UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
INSTITUTO DE QUÍMICA

GISELE SILVESTRE DA SILVA

DESENVOLVIMENTO DE ACIL-HIDRAZONAS DERIVADAS DA 4-OXO-1,4-DIIDROQUINOLONA COMO POTENCIAIS INIBIDORES DA ACETILCOLINESTERASE E PEPTÍDEO *β*-AMILÓIDE

CAMPINAS
2017

GISELE SILVESTRE DA SILVA

DESENVOLVIMENTO DE ACIL-HIDRAZONAS DERIVADAS DA 4-OXO-1,4-DIIDROQUINOLONA COMO POTENCIAIS INIBIDORES DA ACETILCOLINESTERASE E PEPTÍDEO *β*-AMILÓIDE

Tese de Doutorado apresentada ao Instituto de Química da Universidade Estadual de Campinas como parte dos requisitos exigidos para a obtenção do título de Doutora em Ciências

Orientadora: Profa. Dra. Wanda Pereira Almeida

ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO FINAL DA TESE DEFENDIDA PELA GISELE SILVESTRE DA SILVA, E ORIENTADA PELA PROFA. DRA. WANDA PEREIRA ALMEIDA

CAMPINAS
2017

Agência(s) de fomento e nº(s) de processo(s): CNPq, 147111/2013-7

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca do Instituto de Química
Camila Barleta Fullin - CRB 8462

Si38d

Silva, Gisele Silvestre da, 1981-
Desenvolvimento de acil-hidrazonas derivadas da 4-oxo-1,4-diidroquinolona como potenciais inibidores da acetilcolinesterase e peptídeo beta-amilóide. / Gisele Silvestre da Silva. – Campinas, SP : [s.n.], 2017.

Orientador: Wanda Pereira Almeida.
Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Química.

1. Alzheimer, Doença de. 2. N-acil hidrazonas. 3. Quinolonas. 4. Acetilcolinesterase. 5. Peptídeos. 6. Beta-amiloide. I. Almeida, Wanda Pereira,1959-. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Química. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Development of acyl hydrazones derived from 4-oxo-1,4-dihydroquinolone as potential inhibitors of acetyllcholinesterase and beta-amyloid peptide
Palavras-chave em inglês:
Alzheimer Disease
N-acyl hydrazones
Quinolones
Acetylcholinesterase
Peptides
Amyloide beta
Área de concentração: Química Orgânica
Titulação: Doutora em Ciências
Banca examinadora:
Wanda Pereira Almeida [Orientador]
Daniel Fabio Kawano
Rodrigo Antonio Cormanich
Paulo Marcos Donate
Roberto Parise Filho
Data de defesa: 24-07-2017
Programa de Pós-Graduação: Química

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Wanda Pereira Almeida (Orientadora)

Prof. Dr. Paulo Marcos Donate (FFCLRP-USP)

Prof. Dr. Roberto Parise Filho (FCF-USP)

Prof. Dr. Daniel Fabio Kawano (FCF-UNICAMP)

Prof. Dr. Rodrigo Antonio Cormanich (IQ-UNICAMP)

A Ata da defesa com as respectivas assinaturas dos membros encontra-se no processo de vida acadêmica do(a) aluno(a).

Este exemplar corresponde à redação final da Tese de Doutorado defendida pela aluna **GISELE SILVESTRE DA SILVA,** aprovada pela Comissão Julgadora em 24 de julho de 2017.

Meus sinceros agradecimentos aos professores.
Grandes incentivadores e influenciadores para toda a vida.

Meu agradecimento especial para as professoras
Júlia Gusmão do liceu do Ceará e a Artemisa do colégio UV-4.
Plantaram sonhos e esperança em meus miolos. Muito obrigada!

“Um professor afeta a eternidade; é impossível dizer até onde vai sua influência. ”
Henry Brooks Adams

“In nature nothing is created, nothing is lost, everything changes.”

— *Antoine Lavoisier, Traité élémentaire de chimie*

"I am a collection of water, calcium and organic molecules called Carl Sagan. You are a collection of almost identical molecules with a different collective label. But is that all? Is there nothing in here but molecules?"

Carl Sagan

Agradecimentos

A Deus, em quem deposito minha fé cega e amolada. Aquele que me faz forte em meio a fraqueza.

A Wanda Pereira Almeida, pela oportunidade de fazer parte do grupo Laboratório de Fármacos e Medicamentos. Planejamento, Síntese e Avaliação - LAFAME. Agradeço pela orientação, amizade e todo o processo de crescimento pessoal e profissional que tive no decorrer desses anos.

A minha família (Ádima, Fabim, Gezinha, Sr.Antônio, Leo, Bel) por fazerem parte na minha jornada de transformação e aprendizado nessa vida.

Aos que passaram pelas repúblicas e agregados - "*Baixa da égua*" e "*Morango do Nordeste"* (Ridley, Rômulo, Pedro, Lili, Isa, Dani, Claudio, Sol, Marcos Junior, Júlio, Rodrigo, Lívia, Lair, Iolana, Pedro, Mayara, Rafael, Sol, Marcos, Claudio, Rick, Marcela Albino, Marcos Bezerra, Alejandro, Sergio Kopp, Daniel Sebastian, Kateryn, Laura Mayorga, Cristina Prado, Vivi, Takuma, Kazuhiro e Yusuki). Obrigada a todos por todo o aprendizado que essa convivência multi-cultural me trouxe.

Ao Lab D245, espaço físico que me acolheu durante todos esses anos de mestrado e doutorado. Agradeço pelo convívio de tantas pessoas maravilhosas (Renata Parruca, Daniela Gouveia, Ana Maria, Paula Huber, Caio Barros, Renan Ferreira, Renata Sigrist, Gabriela Torment, Ana Beatriz, Bruno Saccheto, Daniel Schuch, Gustavo Duarte, Pedro H. Vendramini, Letícia Nishimura, Lucas Colombo, Larissa Varella, Luciana Gonzaga, Micheli, Pedro Cruz, Raphael Campos, Suelen Gomes, Suéllen Silva, Raquel, Diogo Martinez, Erica C. Fernandes, Gabriella Reis, Vanessa Mucédola, Lissa). Obrigada pelas colaborações, conselhos e troca de conhecimento. Nossa amizade fez o dia-a-dia nesse espaço de trabalho ainda mais prazeroso. I Love D245!

A Associação dos Pós-graduandos da Química - APGQ, onde tive o prazer de trabalhar com um grupo sensacional (Eric F. Simão, Guilherme Borgui, Marina da Géa, Leticia Paifer, Lanousse, Fábio Santos, Bruno).

Aos últimos remanescentes da “Nordestinaiada” em Campinas (Lair, Michel, Tiago Baiano, Romin, Thiaguin, Ramon, Luelc, Mandinha, Ricardo). Vamos até o fim!

A todos os professores que contribuíram direta e indiretamente na minha formação. Especialmente, Julia Gusmão (Liceu do Ceará) que me inspirou a ser química. Artemísa (UV-4) que sempre me incentivou ao progresso contínuo. Mesmo depois de perder o contato com estas professoras suas vozes ainda ecoam nos meus ouvidos. Imensamente grata!

As funcionárias da CPG (Bel, Janaina, Gabriela e Isabela) pelos inúmeros auxílios e esclarecimentos da burocracia do dia-a-dia no IQ.

Aos técnicos de RMN e IV (Paula, Anderson, Sônia, Gustavo e Marcia) pelo treinamento, boas conversas e colaborações diárias.

Aos funcionários do Instituto de Química (Marcio, Moacir, Nestor, Cristiano, Rafael) sempre muito solícitos;

A todos os funcionários da BIQ, especialmente a Carmila Barleta.

Faepex pelo auxílio para apresentação do nosso trabalho no XXIV EFMC International Symposium on Medicinal Chemistry em Manchester – UK.

Ao CNPQ pela minha bolsa e auxílio financeiro (147111/2013-7).

À FAPESP pelo financiamento do projeto (2013/18203-5).

Resumo

O projeto consistiu no estudo de uma série de compostos acil-hidrazônicos como protótipos multialvos para a doença de Alzheimer (DA). Os alvos moleculares escolhidos foram o peptídeo β-amilóide (Aβ) e a enzima acetilcolinesterase (AChE). O primeiro alvo molecular foi escolhido dado à relevância da hipótese amilóide que considera que o processo de produção, agregação e deposição do peptídeo Aβ é o iniciador que leva a progressão da DA. O segundo alvo foi a AChE, responsável pela hidrólise da acetilcolina. Nesta enzima destacam-se dois principais sítios de interação ligante-receptor - o sítio catalítico e o sítio periférico. O sítio catalítico age como catalisador da hidrólise, enquanto o sítio periférico auxilia no processo de fibrilização do peptídeo Aβ. Doze acil-hidrazonas foram sintetizadas e caracterizadas por IV, RMN e EM. O composto-chave para a síntese das acil-hidrazonas é a 3-carboetoxi-4-oxo-1*H*-quinolina (**1**), que foi obtida por dois métodos diferentes: um, via reação de Morita-Baylis-Hillman, e o outro, via condensação da anilina com dietiletoximetilenomalonato. A reação da quinolona obtida com hidrazina monoidratada levou à correspondente hidrazida em 82 % de rendimento. A condensação dessa hidrazida com aldeídos aromáticos substituídos permitiu a preparação das acil-hidrazonas, alvo desse estudo em rendimentos de 63 a 90 %. Os espectros de RMN de ^{1}H apresentaram sinais duplicados referentes aos rotâmeros da função amida, que coalesceram a 120 ºC. Todas as acil-hidrazonas tiveram efeito inibitório sobre a AChE, avaliado pelo método colorimétrico de Ellman, com valores de IC_{50} de 0,0058 a 17 μM. O estudo cinético mostrou que as acil-hidrazonas **11**, **14** e **20** são inibidores competitivos, enquanto a acil-hidrazona **19** é um inibidor misto. Estudos de *docking* molecular realizado no *AutoDocking Vina* corroboram esses modos de inibição. No estudo de inibição da agregação do peptídeo β-amilóide, pelo ensaio de emissão de fluorescência da tioflavina-T, mostrou que as acil-hidrazonas inibem essa agregação de 49 % (acil-hidrazona **11**) a 67 % (acil-hidrazona **14)**. Assim, os compostos sintetizados se destacam como agentes capazes de interferir em dois processos relacionados ao desenvolvimento e progressão da DA, o que os coloca como potenciais candidatos a fármacos.

Abstract

The project consisted in the study of a series of acyl-hydrazones compounds as multi-target prototypes for Alzheimer's disease (AD). The molecular targets chosen were the *β*-amyloid peptide (A*β*) and the enzyme acetylcholinesterase (AChE). The first molecular target was chosen given the relevance of the amyloid hypothesis, which considers that the production process, aggregation and deposition of the A*β* peptide is initiator and leads to the progression of AD. The second target was AChE, responsible for the hydrolysis of acetylcholine. In this enzyme, there is two main binding catalytic and the peripheral site. The catalytic site acts as a catalyst for the hydrolysis and the peripheral site assists in the process of fibrilization of the A*β* peptide. Twelve acyl hydrazones were synthesized and characterized by IR, NMR and MS. The key compound for the synthesis of acyl-hydrazones is 3-carboethoxy-4-oxo-1*H*-quinolone (**1**), which was obtained by two different methods: first, via a Morita-Baylis-Hillman reaction, and the other via condensation of the aniline with diethylethoxymalonate. Reaction of the quinoline **1** obtained with hydrazine monohydrate led to the corresponding hydrazide in 82 % yield. The condensation of this hydrazide with substituted aromatic aldehydes allowed the preparation of the target acyl-hydrazones of this study in yields of 63 to 90 %. ^{1}H NMR spectra showed duplicate signals for the amide function rotamers, which coalesced at 120 °C when the analysis was performed at higher temperatures. All acyl-hydrazones had an inhibitory effect on AChE, evaluated by the Ellman colorimetric method, with IC_{50} values of 0.0058 to 17 μM. The kinetic study showed that the acyl-hydrazones **11**, **14** and **20** are competitive inhibitors, while the acyl-hydrazone **19** is a mixed inhibitor. Molecular docking studies conducted in AutoDocking Vina corroborate these modes of inhibition. In the study of inhibition of *β*-amyloid peptide aggregation by the fluorescence emission assay of thioflavin-T, it was shown that acyl-hydrazones inhibit this aggregation in 49 % (acyl-hydrazone **11**) 67 % (acyl-hydrazone **14**). Thus, the synthesized compounds stand out as agents capable of interfering in two processes related to the development and progression of AD, which places them as potential drug candidates.

Lista de ilustrações

Figura 1. Principais divisões do cérebro. Em destaque, o hipocampo localizado no lobo temporal. 26

Figura 2. Biomarcadores histológicos: placas neuríticas extracelulares e emaranhados neurofibrilares intracelular. 29

Figura 3. Representação esquemática da APP e as α, β e γ- secretases em uma membrana celular neuronal. 31

Figura 4. Produção do monômero Aβ via clivagem da APP pela ação das enzimas BACE e γ-secretases. (APP: proteína precursora do amilóide; C99; fragmento carboxiterminal 99; AICD: proteína do domínio APP-intracelular). 32

Figura 5. Estruturas amilóides, a formação de fibrilas do peptídeo Aβ e alguns efeitos e interações do Aβ. 33

Figura 6. Coordenação de cobre e zinco com o peptídeo amilóide com os resíduos de histidina (His13 e His14). 37

Figura 7. A) Ciclo da acetilcolina no sistema colinérgico; B) Ativação dos receptores colinérgicos pela acetilcolina na região de sinapse. (ChAT: colina acetil transferase; ACh: acetilcolina; Direção do sinal sinapse = ↷; AChE: acetilcolinesterase). 42

Figura 8. Visão tridimensional da região do sítio ativo da enzima 1EVE. 45

Figura 9. Fármacos aprovados pelo FDA para o tratamento de DA. 48

Figura 10. Estrutura das *N*-acil-hidrazonas. 50

Figura 11. Variações da estrutura da *N*-acil-hidrazona: A) conformações da amida *anti* e *sin*; B) configurações *E* e *Z* da imina (C=N). 51

Figura 12. Compostos bioativos contendo a função *N*-acil-hidrazona com diferentes perfis farmacológicos. 52

Figura 13. A - Visão frontal da interação da quinolona com o sítio Trp84 da AChE 1E66; B - Visão perpendicular da Interação da quinolona com o sítio Trp86 da AChE humana 1B41. 60

Figura 14. A - Vista frontal da estrutura da tacrina minimizada; B - Interação π-stacking da THA com Trp86 da AChE humana 1B41. 61

Figura 15. Estrutura geral proposta para os compostos-alvo desse estudo, indicando a função de cada uma de suas subunidades. 62

Figura 16. Variação da estrutura dos ligantes considerando os dois seguintes pontos: A) conformações da amida anti e sin; B) configurações *E* e *Z* da imina (C=N); C) tautômeros imina-enamina. _____ 74
Figura 17. Expansão dos espectros de RMN ^{1}H da acil-hidrazona 13 em DMSO-d_6 nas seguintes temperaturas a) 25 °C b) 80 °C e c) 120 °C. _____ 75
Figura 18. Expansão do NOESY da acil-hidrazona 14._____ 76
Figura 19. Possibilidades de acoplamento entre os prótons da função acil-hidrazona nas estruturas conformacionais da acil-hidrazonas: *anti-Z*, *anti-E*, *sin-E* e *sin-Z*. _____ 77
Figura 20. Expansão do espectro 2D HMBC de ^{15}N das acil-hidrazonas 13 e 14 na região de 7,0 – 9,5 ppm._____ 78
Figura 21. Espectros de IV da acil-hidrazona 13 (linha preta) e dos complexos metálico de cobre (linha vermelha) e zinco (linha azul)._____ 80
Figura 22. Expansão dos espectros de RMN de ^{1}H do ligante 13 e do complexo de Zn (II) na região de 7,0 a 15 ppm._____ 82
Figura 23. Espectro de massas do complexo de zinco com a acil-hidrazona 13. _____ 83
Figura 24. Proposta de estruturas para os picos (M+1) de íons encontrados no espectro de análise alta resolução utilizando ESI em modo positivo do complexo de zinco._____ 84
Figura 25. Curva termogravimétrica do complexo da acil-hidrazona 13 com o cobre._____ 85
Figura 26. Propostas para as estuturas dos complexos entre a acil-hidrazona 13 com o zinco (13-Zn) e com o cobre (13-Cu). _____ 85
Figura 27. Reações envolvidas na detecção da hidrólise da ATC no Método de Ellman. __ 86
Figura 28. Gráfico de Lineweaver-Burk para inibição da AChE pelas acil-hidrazonas 19 e 20. _____ 92
Figura 29. Esquema do mecanismo de interação entre o inibidor (19 e 20) com a enzima AChE; A) Inibição competitiva e B) Inibição não-competitiva ou mista. _____ 93
Figura 30. Esquema do procedimento do estudo e validação do *docking* molecular. _____ 95
Figura 31. Estruturas acil-hidrazonas Anti-*E*, Anti-*Z* e Sin-*E,* Sin-*Z.* _____ 96
Figura 32. Visão tridimensional da estrutura E2020 no sítio ativo da 1EVE._____ 99
Figura 33. Redocking do ligante DON da estrutura cristalográfica 1E66. _____ 103
Figura 34. Representação tridimensional da acil-hidrazona 19-Anti *E* no sitio ativo da AChE 1EVE. _____ 103
Figura 35. Representação tridimensional da acil-hidrazona 19-Sin *E* no sítio ativo da AChE 1EVE. _____ 104

Figura 36. Efeito das acil-hidrazonas (9-14) e (16-20) sobre a emissão de fluorescência (450 nm) no tempo inicial do experimento (t_0) e após 24 h de incubação (t_{24}). _____ 107
Figura 37. Espectro de IV (filme, ν_{max}) do aduto de MBH 4. _____ 143
Figura 38. Espectro de RMN ^{1}H ($CDCl_3$, 600 MHz) do aduto de MBH 4._____ 144
Figura 39. Espectro de RMN ^{13}C ($CDCl_3$, 150 MHz) do aduto de MBH 4. _____ 145
Figura 40. Espectro de RMN ^{13}C DEPT-135 ($CDCl_3$, 150 MHz) do aduto de MBH 4. ___ 146
Figura 41. Espectro de IV (KBr, ν_{max}) do *N*-óxido 5. _____ 147
Figura 42. Espectro de RMN ^{1}H ($CDCl_3$, 500 MHz) do *N*-óxido 5._____ 148
Figura 43. Espectro de RMN ^{13}C ($CDCl_3$, 125 MHz) do *N*-óxido 5. _____ 149
Figura 44. Espectro de HSQC ^{13}C-^{1}H ($CDCl_3$, 500/125 MHz) do *N*-Óxido. _____ 150
Figura 45. Expansão do espectro de HSQC ^{13}C-^{1}H ($CDCl_3$, 500/125 MHz) do *N*-Óxido 5. 151
Figura 46. Espectro de IV (KBr, ν_{max}) da quinolona 1._____ 152
Figura 47. Espectro de RMN ^{1}H (600 MHz, CF_3COOD) da quinolona 1. _____ 153
Figura 48. Espectro de RMN ^{13}C (125 MHz, CF_3COOD) da quinolona 1._____ 154
Figura 49. Espectro de RMN ^{13}C DEPT-135 (125 MHz, CF_3COOD) da quinolona 1. ___ 155
Figura 50. Expansão do espectro de HSQC ^{13}C-^{1}H (CF_3COOD, 600/150 MHz) da quinolona 1._____ 156
Figura 51. Expansão do espectro de HSQC ^{13}C-^{1}H (CF_3COOD, 600/150 MHz) da quinolona 1._____ 157
Figura 52. Espectro de HMBC ^{13}C-^{1}H (CF_3COOD, 600/150 MHz) da quinolona 1._____ 158
Figura 53. Expansão do espectro de HMBC ^{13}C-^{1}H (CF_3COOD, 600/150 MHz) da quinolona 1._____ 159
Figura 54.Espectro no Infravermelho (KBr, ν_{max}) da hidrazida 2. _____ 160
Figura 55. Espectro de RMN ^{1}H (DMSO-d_6, 500 MHz) da hidrazida 2. _____ 161
Figura 56. Espectro de RMN ^{13}C (DMSO-d_6, 125 MHz) da hidrazida 2._____ 162
Figura 57. Espectro de RMN ^{13}C DEPT-135 (DMSO-d_6, 125 MHz) da hidrazida 2._____ 163
Figura 58. Espectro de HMBC ^{13}C-^{1}H (DMSO-d_6, 400/100 MHz) da hidrazida 2. _____ 164
Figura 59. Expansão do espectro de HSQC ^{13}C-^{1}H (DMSO-d_6, 400/100 MHz) da hidrazida 2. _____ 165
Figura 60. Espectro de HMBC ^{13}C-^{1}H (DMSO-d_6, 400/100 MHz) da hidrazida 2. _____ 166
Figura 61. Expansão do espectro de HMBC ^{13}C-^{1}H (400/100 MHz, DMSO-d_6) da hidrazida 2._____ 167
Figura 62. Espectro de IV da acil-hidrazona 9. _____ 168

Figura 63. Espectro de RMN ^{1}H (600 MHz, DMSO-d_6) da acil-hidrazona 9. _____ 169
Figura 64. Espectro de RMN ^{13}C (150 MHz, DMSO-d_6) da acil-hidrazona 9._____ 170
Figura 65. Espectro de RMN ^{13}C DEPT-135 (150 MHz, DMSO-d_6) da acil-hidrazona 9._ 171
Figura 66. Expansão do espectro de HSQC ^{13}C-^{1}H (DMSO-d_6, 600/150 MHz) da acil-hidrazona 9. _____ 172
Figura 67. Expansão do espectro de HSQC ^{13}C-^{1}H (DMSO-d_6, 600/150 MHz) da acil-hidrazona 9. _____ 173
Figura 68. Expansão do espectro de HMBC ^{13}C-^{1}H (DMSO-d_6, 600/150 MHz) da acil-hidrazona 9. _____ 174
Figura 69. Expansão do espectro de HSQC ^{13}C-^{1}H (DMSO-d_6, 600/150 MHz) da acil-hidrazona 9. _____ 175
Figura 70. Espectro de massas de alta resolução (TOF-MS-ES+) da acil-hidrazona 9. ___ 176
Figura 71. Espectro de IV da acil-hidrazona 10. _____ 177
Figura 72. Espectro de RMN ^{1}H (500 MHz, DMSO-d_6) da acil-hidrazona 10. _____ 178
Figura 73. Espectro de RMN ^{13}C (500 MHz, DMSO-d_6) da acil-hidrazona 10._____ 179
Figura 74. Espectro de RMN ^{13}C DEPT-135 (500 MHz, DMSO-d_6) da acil-hidrazona 10. 180
Figura 75. Espectro de HSQC ^{13}C-^{1}H (500/125 MHz, DMSO-d_6) da acil-hidrazona 10.__ 181
Figura 76. Expansão do espectro de HSQC ^{13}C-^{1}H (500/125 MHz, DMSO-d_6) da acil-hidrazona 10. _____ 182
Figura 77. Espectro de HMBC ^{13}C-^{1}H (500/125 MHz, DMSO-d_6) da acil-hidrazona 10. _ 183
Figura 78. Expansão do espectro de HMBC ^{13}C-^{1}H (500/125 MHz, DMSO-d_6) da acil-hidrazona 10. _____ 184
Figura 79. Espectro de massas de alta resolução (TOF-MS-ES+) da acil-hidrazona 10. __ 185
Figura 80. Espectro de IV da acil-hidrazona 11. _____ 186
Figura 81. Espectro de RMN ^{1}H (400 MHz, DMSO-d_6) da acil-hidrazona 11. _____ 187
Figura 82. Espectro de RMN ^{13}C (100 MHz, DMSO-d_6) da acil-hidrazona 11._____ 188
Figura 83. Espectro de RMN ^{13}C DEPT-135 (100 MHz, DMSO-d_6) da acil-hidrazona 11. 189
Figura 84. Espectro de RMN ^{13}C DEPT-90 (100 MHz, DMSO-d_6) da acil-hidrazona 11._ 190
Figura 85. Espectro de HSQC ^{13}C-^{1}H (400/100 MHz, DMSO-d_6) da acil-hidrazona 11.__ 191
Figura 86. Expansão do espectro de HSQC ^{13}C-^{1}H (400/100 MHz, DMSO-d_6) da acil-hidrazona 11. _____ 192
Figura 87. Espectro de HMBC ^{13}C-^{1}H (400/100 MHz, DMSO-d_6) da acil-hidrazona 11. _ 193
Figura 88. Expansão do espectro de HMBC ^{13}C-^{1}H (500/125 MHz, DMSO-d_6) da acil-hidrazona 11. _____ 194

Figura 89. Espectro de massas de alta resolução (TOF-MS-ES+) da acil-hidrazona 11. __ 195
Figura 90. Espectro de IV da acil-hidrazona 12. _____ 196
Figura 91. Espectro de RMN ^{1}H (500 MHz, DMSO-d_6) da acil-hidrazona 12. _____ 197
Figura 92. Espectro de RMN ^{13}C (100 MHz, DMSO-d_6) da acil-hidrazona 12._____ 198
Figura 93. Espectro de RMN ^{13}C DEPT-135 (100 MHz, DMSO-d_6) da acil-hidrazona 12. 199
Figura 94. Espectro de RMN ^{13}C DEPT-90 (100 MHz, DMSO-d_6) da acil-hidrazona 12._ 200
Figura 95. Espectro de HSQC ^{13}C-^{1}H (400/100 MHz, DMSO-d_6) da acil-hidrazona 12.__ 201
Figura 96. Expansão do espectro de HSQC ^{13}C-^{1}H (400/100 MHz, DMSO-d_6) da acil-hidrazona 12. _____ 202
Figura 97. Espectro de HMBC ^{13}C-^{1}H (400/100 MHz, DMSO-d_6) da acil-hidrazona 12. _ 203
Figura 98. Expansão do espectro de HMBC ^{13}C-^{1}H (400/100 MHz, DMSO-d_6) da acil-hidrazona 12. _____ 204
Figura 99. Espectro de massas de alta resolução (TOF-MS-ES+) da acil-hidrazona 12. __ 205
Figura 100. Espectro de IV da acil-hidrazona 13. _____ 206
Figura 101. Espectro de RMN ^{1}H (500 MHz, DMSO-d_6) da acil-hidrazona 13. _____ 207
Figura 102. Espectro de RMN ^{13}C (125 MHz, DMSO-d_6) da acil-hidrazona 13._____ 208
Figura 103. Espectro de RMN ^{13}C DEPT-135 (125 MHz, DMSO-d_6) da acil-hidrazona 13. _____ 209
Figura 104. Espectro de RMN ^{13}C DEPT-90 (125 MHz, DMSO-d_6) da acil-hidrazona 13. 210
Figura 105. Espectro de HSQC ^{13}C-^{1}H (500/125 MHz, DMSO-d_6) da acil-hidrazona 13._ 211
Figura 106. Expansão do espectro de HSQC ^{13}C-^{1}H (500/125 MHz, DMSO-d_6) da acil-hidrazona 13. _____ 212
Figura 107. Espectro de HMBC ^{13}C-^{1}H (500/125 MHz, DMSO-d_6) da acil-hidrazona 13. 213
Figura 108. Expansão do espectro de HMBC ^{13}C-^{1}H (500/125 MHz, DMSO-d_6) da acil-hidrazona 13. _____ 214
Figura 109. Espectro de HMBC ^{15}N-^{1}H (500/125 MHz, DMSO-d_6) da acil-hidrazona 13. 215
Figura 110. Espectro de NOESY (400 MHz, DMSO-d_6) da acil-hidrazona 14._____ 216
Figura 111. Expansão do espectro de NOESY (400 MHz, DMSO-d_6) da acil-hidrazona 14. _____ 217
Figura 112. Expansão do espectro de NOESY (400 MHz, DMSO-d_6) da acil-hidrazona 14. _____ 218
Figura 113. Espectro de massas de alta resolução (TOF-MS-ES+) da acil-hidrazona 13. _ 219
Figura 114. Espectro de IV da acil-hidrazona 14. _____ 220
Figura 115. Espectro de RMN ^{1}H (500 MHz, DMSO-d_6) da acil-hidrazona 14. _____ 221

Figura 116. Espectro de RMN ^{13}C (125 MHz, DMSO-d_6) da acil-hidrazona 14. _____ 222
Figura 117. Espectro de RMN ^{13}C DEPT-135 (125 MHz, DMSO-d_6) da acil-hidrazona 14. _____ 223
Figura 118. Espectro de RMN ^{13}C DEPT-90 (100 MHz, DMSO-d_6) da acil-hidrazona 14. 224
Figura 119. Espectro de HSQC ^{13}C-^{1}H (400/100 MHz, DMSO-d_6) da acil-hidrazona 14._ 225
Figura 120. Expansão do espectro de HSQC ^{13}C-^{1}H (400/100 MHz, DMSO-d_6) da acil-hidrazona 14. _____ 226
Figura 121. Espectro de HMBC ^{13}C-^{1}H (500/125 MHz, DMSO-d_6) da acil-hidrazona 14. 227
Figura 122. Expansão do espectro de HMBC ^{13}C-^{1}H (500/125 MHz, DMSO-d_6) da acil-hidrazona 14. _____ 228
Figura 123. Espectro de HMBC ^{15}N-^{1}H (500/125 MHz, DMSO-d_6) da acil-hidrazona 14. 229
Figura 124. Espectro de NOESY (400 MHz, DMSO-d_6) da acil-hidrazona 14. _____ 230
Figura 125. Expansão do espectro de NOESY (400 MHz, DMSO-d_6) da acil-hidrazona 14. _____ 231
Figura 126. Expansão do espectro de NOESY (400 MHz, DMSO-d_6) da acil-hidrazona 14. _____ 232
Figura 127. Espectro de massas de alta resolução (TOF-MS-ES+) da acil-hidrazona 14. _ 233
Figura 128. Espectro de IV da acil-hidrazona 15. _____ 234
Figura 129. Espectro de RMN ^{1}H (500 MHz, DMSO-d_6) da acil-hidrazona 15. _____ 235
Figura 130. Espectro de RMN ^{13}C (500 MHz, DMSO-d_6) da acil-hidrazona 15._____ 236
Figura 131. Espectro de RMN ^{13}C DEPT-135 (500 MHz, DMSO-d_6) da acil-hidrazona 15. _____ 237
Figura 132. Espectro de RMN ^{13}C DEPT-90 (100 MHz, DMSO-d_6) da acil-hidrazona 15. 238
Figura 133. Espectro de HSQC ^{13}C-^{1}H (500/125 MHz, DMSO-d_6) da acil-hidrazona 15._ 239
Figura 134. Espectro de HMBC ^{13}C-^{1}H (500/125 MHz, DMSO-d_6) da acil-hidrazona 15. 240
Figura 135. Expansão do espectro de HMBC ^{13}C-^{1}H (500/125 MHz, DMSO-d_6) da acil-hidrazona 15. _____ 241
Figura 136. Espectro de massas de alta resolução (TOF-MS-ES+) da acil-hidrazona 15. _ 242
Figura 137. Espectro de IV da acil-hidrazona 16. _____ 243
Figura 138. Espectro de RMN ^{1}H (500 MHz, DMSO-d_6) da acil-hidrazona 16. _____ 244
Figura 139. Espectro de RMN ^{13}C (125 MHz, DMSO-d_6) da acil-hidrazona 16._____ 245
Figura 140. Espectro de RMN ^{13}C DEPT-135 (125 MHz, DMSO-d_6) da acil-hidrazona 16. _____ 246
Figura 141. Espectro de RMN ^{13}C DEPT-90 (125 MHz, DMSO-d_6) da acil-hidrazona 16. 247

Figura 142. Espectro de HSQC ^{13}C-^{1}H (500/125 MHz, DMSO-d_6) da acil-hidrazona 16. _ 248
Figura 143. Espectro de HMBC ^{13}C-^{1}H (500/125 MHz, DMSO-d_6) da acil-hidrazona 16. 249
Figura 144. Espectro de massas de alta resolução (TOF-MS-ES+) da acil-hidrazona 16. _ 250
Figura 145. Espectro de IV da acil-hidrazona 17. _____ 251
Figura 146. Espectro de RMN ^{1}H (400 MHz, DMSO-d_6) da acil-hidrazona 17. _____ 252
Figura 147. Espectro de RMN ^{13}C (100 MHz, DMSO-d_6) da acil-hidrazona 17._____ 253
Figura 148. Espectro de RMN ^{13}C DEPT-135 (100 MHz, DMSO-d_6) da acil-hidrazona 17. _____ 254
Figura 149. Espectro de RMN ^{13}C DEPT-90 (100 MHz, DMSO-d_6) da acil-hidrazona 17. 255
Figura 150. Espectro de HSQC ^{13}C-^{1}H (400/100 MHz, DMSO-d_6) da acil-hidrazona 17._ 256
Figura 151. Espectro de HMB.C ^{13}C-^{1}H (400/100 MHz, DMSO-d_6) da acil-hidrazona 17. 257
Figura 152. Expansão do espectro de HMBC ^{13}C-^{1}H (400/100 MHz, DMSO-d_6) da acil-hidrazona 17. _____ 258
Figura 153. Espectro de massas de alta resolução (TOF-MS-ES+) da acil-hidrazona 17. _ 259
Figura 154. Espectro de IV da acil-hidrazona 18. _____ 260
Figura 155. Espectro de RMN ^{1}H (500 MHz, DMSO-d_6) da acil-hidrazona 18. _____ 261
Figura 156. Espectro de RMN ^{13}C (125 MHz, DMSO-d_6) da acil-hidrazona 18._____ 262
Figura 157. Espectro de RMN ^{13}C DEPT-135 (125 MHz, DMSO-d_6) da acil-hidrazona 18. _____ 263
Figura 158. Espectro de RMN ^{13}C DEPT-90 (125 MHz, DMSO-d_6) da acil-hidrazona 18. 264
Figura 159. Espectro de HSQC ^{13}C-^{1}H (500/125 MHz, DMSO-d_6) da acil-hidrazona 18._ 265
Figura 160. Expansão do espectro de HSQC ^{13}C-^{1}H (500/125 MHz, DMSO-d_6) da acil-hidrazona 18. _____ 266
Figura 161. Espectro de HMBC ^{13}C-^{1}H (500/125 MHz, DMSO-d_6) da acil-hidrazona 18. 267
Figura 162. Expansão do espectro de HMBC ^{13}C-^{1}H (500/125 MHz, DMSO-d_6) da acil-hidrazona 18. _____ 268
Figura 163. Espectro de massas de alta resolução (TOF-MS-ES+) da acil-hidrazona 18. _ 269
Figura 164. Espectro de IV da acil-hidrazona 19. _____ 270
Figura 165. Espectro de RMN ^{1}H (500 MHz, DMSO-d_6) da acil-hidrazona 19. _____ 271
Figura 166. Espectro de RMN ^{13}C (500 MHz, DMSO-d_6) da acil-hidrazona 19._____ 272
Figura 167. Espectro de RMN ^{13}C DEPT-90 (125 MHz, DMSO-d_6) da acil-hidrazona 19. 273
Figura 168. Espectro de HSQC ^{13}C-^{1}H (500/125 MHz, DMSO-d_6) da acil-hidrazona 19._ 274
Figura 169. Expansão do espectro de HSQC ^{13}C-^{1}H (600/125 MHz, DMSO-d_6) da acil-hidrazona 19. _____ 275

Figura 170. Espectro de HMBC ^{13}C-^{1}H (500/125 MHz, DMSO-d_6) da acil-hidrazona 19. 276
Figura 171. Expansão do espectro de HMBC ^{13}C-^{1}H (500/125 MHz, DMSO-d_6) da acil-hidrazona 19. 277
Figura 172. Espectro de massas de alta resolução (TOF-MS-ES+) da acil-hidrazona 19. 278
Figura 173. Espectro de IV da acil-hidrazona 20. 279
Figura 174. Espectro de RMN ^{1}H (500 MHz, DMSO-d_6) da acil-hidrazona 20. 280
Figura 175. Espectro de RMN ^{13}C (125 MHz, DMSO-d_6) da acil-hidrazona 20. 281
Figura 176. Espectro de RMN ^{13}C DEPT-135 (125 MHz, DMSO-d_6) da acil-hidrazona 20. 282
Figura 177. Espectro de RMN ^{13}C DEPT-90 (125 MHz, DMSO-d_6) da acil-hidrazona 20. 283
Figura 178. Espectro de massas de alta resolução (TOF-MS-ES+) da acil-hidrazona 20. 284

Lista de tabelas

Tabela 1. Metais e seus respectivos sítios de coordenação no peptídeo β-amilóide. _____ 36

Tabela 2. Principais locais de interação do sítio ativo da AChE e suas respectivas funções. 47

Tabela 3. Candidatos a fármacos no desenvolvimento de fármaco para a DA. _____ 49

Tabela 4. Estrutura das acil-hidrazonas preparadas e seus respectivos rendimentos. _____ 72

Tabela 5. Bandas características de IV (cm^{-1}) da acil-hidrazona (13) e dos correspondentes complexos de Cu (13-Cu) e Zn (13-Zn). _____ 81

Tabela 6. Valores de IC_{50} obtidos no ensaio de inibição in vitro da AChE. _____ 87

Tabela 7. V_{max} e K_m obtidos da equação de Lineweaver-Burk. _____ 90

Tabela 8. Tipos de inibição baseado na alteração dos valores de K_m e V_{max} para as acil-hidrazonas 11, 14, 19 e 20 e os modos de inibição. _____ 91

Tabela 9. Valores de energia da interação receptor-ligante obtida no programa *Docking Vina* para as acil-hidrazonas com diferentes geometrias (NH-amida - *sin* ou *anti*) e estereoquímica (imina sp^2 C=N -*E* ou *Z*). _____ 101

Tabela 10. Interações químicas no complexo ligante-proteina das acil-hidrazonas 19-Anti E e 19-Sin E no sítio ativo da AChE: tipo de interação, grupos que participam da interação receptor-ligante e suas respectivas distâncias. _____ 105

Lista de esquemas

Esquema 1. Planejamento da 3-carboetoxi-4-quinolona, tendo a tacrina (THA) como protótipo. _____ 58

Esquema 2. Preparo da 4-oxo-1H-quinolina 1 via aduto MBH _____ 63

Esquema 3. Propostas mecanísticas de McQuade,[131] Aggarwal,[132] e Singleton[133] para a formação do aduto de MBH. _____ 65

Esquema 4. Mecanismo proposto por Kim e colaboradores[135] para ciclização do aduto de MBH levando ao N-óxido 5. _____ 67

Esquema 5. Etapas envolvidas na formação da 4-oxo-1,4-diidroquinolina-3-carboxilato de etila 1, na presença de hexacarbonilmolibdênio. _____ 68

Esquema 6. Reação para obtenção da quinolona 1 via DEEMM _____ 69

Esquema 7. Mecanismo da reação em DEEMM para obtenção da quinolona 1 via intermediário 7. _____ 70

Esquema 8. Obtenção da hidrazida 2 a partir da quinolona 1. _____ 70

Lista de abreviaturas e convenções

)))	Reação com sonicação em banho de ultrassom de 81 W e 40 Hz
Aβ:	Peptídeo β-amiloide
Aβ_{42}:	Peptídeo β-amiloide contendo 42 resíduos aminoácidos
Acetil-CoA:	Acetil coenzima-A
ACh:	Acetilcolina
AChE:	Acetilcolinesterase
ADT:	*AutoDockTools*
AICD:	Proteína do domínio APP-intracelular
APP:	Proteína precursora do amiloide
ATC:	Iodeto de acetiltiocolina
COSY:	*Homonuclear correlation spectroscopy*
ChAT:	Colina acetiltransferase
CCD:	Cromatografia em camada delgada
δ:	Deslocamento químico
DA:	Doença de Alzheimer
DABCO:	1,4-diazabiciclo-[2.2.2]-octano
DEPT:	*Distortionless enhancement by polarization transfer*
DEEMM:	Dietil(etoximetileno)malonato
DMAP:	4-Dimetilaminopiridina
DMSO:	Dimetilsulfóxido
DNTB:	Ácido 5,5-ditiobis (2-nitrobenzóico)
DON:	Donepezila
E2020:	Ligante donepezila da enzima de código 1EVE.pdb
EM:	Espectrometria de massa
ESI-MS:	Espectrometria de massas por electronspray
HFIP:	1,1,1,3,3,3-hexafluor-2-propanol
HMBC:	*Heteronuclear Multiple Bond Correlation*
HSQC:	*Heteronuclear Single Quantum Coherence*
IC_{50}:	Concentração do inibidor que diminui a atividade enzimática em 50%.
IAChE:	Inibidores da acetilcolinesterase
IV:	Infravermelho

Sumário

1. Introdução ____ *25*

1.1 Doença de Alzheimer (DA) ____ **25**

1.2 Genética e Doença de Alzheimer ____ **27**

1.3 Características histológicas da DA ____ **29**

1.4 Hipótese amilóide ____ **30**

1.4.1 Proteólise da APP via secretases ____ 30

1.4.2 Doença de Alzheimer e alterações na homeostase de íons metálicos ____ 34

1.4.3 Peptídeo β-amilóide e sítios de coordenação com metais ____ 35

1.4.4 Hipótese amilóide e alvos moleculares para a DA ____ 37

1.5 Hipótese tau ____ **38**

1.6 Hipótese colinérgica ____ **40**

1.6.1 Neurotransmissão colinérgica ____ 40

1.6.2 Acetilcolinesterase ____ 44

1.7 Fármacos aprovados para o tratamento da DA e perspectivas de tratamento ____

1.8 *N*-Acil-hidrazonas ____ **50**

2 Objetivos ____ *53*

2.1 Gerais ____ **53**

2.2 Específicos ____ **53**

3 Metodologias ____ *54*

3.1 Química ____ **54**

3.2 Avaliação biológica das acil-hidrazonas ____ **55**

3.2.1 Medida da atividade da AChE in vitro (Método de Ellman) ____ 55

3.2.2 Determinação do tipo de inibição sobre a AChE (cinética enzimática) ____ 56

3.2.3 *Docking* molecular ____ 56

3.2.4 Efeito das acil-hidrazonas sobre a formação de fibrilas do peptídeo β-amilóide. ____ 56

4 Resultados e Discussão ____ *58*

4.1 Desenvolvimento de acil-hidrazonas como inibidor multi-alvo da DA _____ 58

4.2 Química _____ 63

4.2.1 Obtenção da 4-oxo-1,4-diidroquinolina-3-carboxilato de etila (1) _____ 63

4.2.2 Obtenção da 1,4-diidroquinolona-3-carboidrazida (2) _____ 70

4.2.3 Obtenção das acil-hidrazonas _____ 72

4.2.4 Análise estrutural das acil-hidrazonas por RMN 1D e 2D _____ 73

4.2.5 Complexos de acil-hidrazonas _____ 79

4.2.6 Preparo de complexos de cobre e zinco _____ 79

4.3 Efeito das acil-hidrazonas sobre a AChE _____ 86

4.3.1 Medida da atividade anticolinesterásica _____ 86

4.3.2 Cinética enzimática _____ 88

4.4 Estudos de ancoramento (docking) molecular _____ 94

4.4.1 Minimização da estrutura dos ligantes acil hidrazônicos _____ 95

4.4.2 Docking molecular _____ 96

4.5 Estudo do efeito das acil-hidrazona sobre a fibrilização do peptídeo *β*-amilóide _____ 106

5 Conclusões _____ 108

6 Referências Bibliográficas _____ 110

7 Apêndice: Parte experimental _____ 126

7.1 Geral _____ 127

7.2 Química _____ 128

7.2.1 Preparação do acrilato de metil-2-[(2-nitrofenil)(hidroxi)metila] (4) _____ 128

7.2.2 Preparação do óxido de 4-hidroxiquinolina-3-carboxilato de metila (5) _____ 129

7.2.3 4-Oxo-1,4-diidroquinolina-3-carboxilato de etila (1) - Método A _____ 129

7.2.4 4-Oxo-1,4-diidroquinolina-3-carboxilato de etila (1) - Método B _____ 130

7.2.5 Preparo da 4-Oxo-1,4- diidroquinolona-3-carbohidrazida (2): _____ 130

7.2.6 Procedimento geral para o preparo das acil-hidrazonas (9-20) _____ 131

7.2.7 Preparação dos complexos de zinco e cobre com a acil-hidrazona (13-Zn e 13-Cu) _____ 139

7.3 Biologia _____ 139

7.3.1 Ensaio de inibição da acetilcolinesterase _____ 139

7.3.2 Ensaio do estudo de fibrilização do peptídeo β-amilóide 140

8 Anexo 142

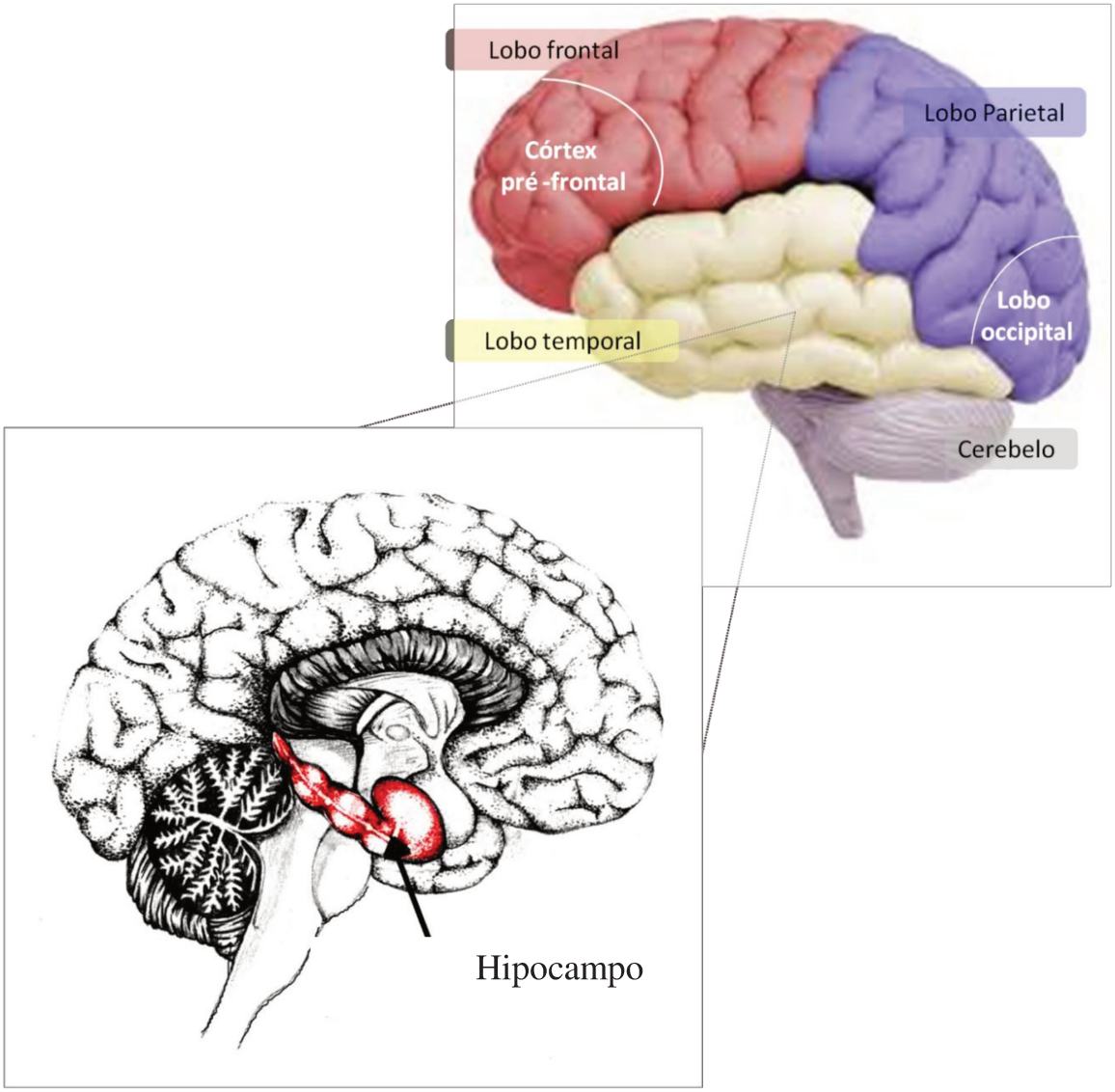
1. Introdução

1.1 *Doença de Alzheimer (DA)*

A demência é uma condição debilitante frequentemente associada ao envelhecimento. Dentre os vários tipos deste quadro clínico se destaca a doença de Alzheimer (DA) por representar 70% de todos os casos de demência.[1] Clinicamente, a DA é detectada por deficiência na memória recente, seguida por outras disfunções relacionadas aos processos de linguagem, aprendizado e concentração. Embora a perda de memória recente seja um dos primeiros sintomas detectados, estudos mostram que o processo fisiopatológico se inicia antes de surgirem os primeiros sintomas clínicos.[2]

A DA é um distúrbio multifatorial, no qual há alterações de proteínas, estresse oxidativo, neuroinflamação, desregulação imune, comprometimento da comunicação neuro-glial e agentes neurotóxicos, que são apontados como fatores que desencadeiam a degeneração neuronal, sendo que cada um desses pode variar de paciente para paciente.[3] Com a progressão da doença de Alzheimer, diversos outros sintomas relacionados à perda de atividade neuronal ocorrem até que a doença atinja um ponto máximo de inatividade do cérebro.

Sabe-se que o hipocampo, região localizada no lobo temporal (Figura 1), é a estrutura cerebral inicialmente afetada pela perda de atividade neuronal. O hipocampo é responsável por várias funções cerebrais,[4] como aprendizagem, consolidação da memória, regulação do sono, batimento cardíaco,[5] regulação do humor[6] bem como um importante processo de produção de neurônios na fase adulta conhecida como neurogenêse.



Catherine E. Myers. Copyright © 2006 *Memory Loss and the Brain* Artwork copyright © 2000 Ann L

Figura 1. Principais divisões do cérebro. Em destaque, o hipocampo localizado no lobo temporal.

Na neurogênese, isto é, no processo geração de novos neurônios na fase adulta estima-se que 700 neurônios são gerados no hipocampo por dia.[7] O cérebro adulto de humanos e outros mamíferos geram continuamente novos neurônios ao longo da vida.[8]

Evidências emergentes indicam que a neurogênese alterada no hipocampo adulto representa um evento crítico precoce da DA.[9,10] Anomalias na neurogênese do hipocampo estão diretamente associadas a problemas de aprendizagem e memória, plasticidade sináptica, neurodegeneração na DA,[11] distúrbios no sono e até alteração do batimento cardíaco.[12]

Além do hipocampo, outras áreas no cérebro são responsáveis pelos processos cognitivos, incluindo o córtex frontal e os lobos occipitais (*Figura 1*).[13] Todas as habilidades cognitivas requerem comunicação e transferência de informações de todas essas regiões do cérebro. Sintomas posteriores que incluem prejuízo na comunicação, desorientação, confusão, dificuldade para fazer julgamentos e tomada de decisão, mudanças de comportamento e, em última instância, dificuldade em falar, engolir e andar. Progressiva e irreversivelmente, todas as capacidades do paciente serão afetadas levando o indivíduo à morte.

O maior fator de risco da DA é o avanço da idade, seguido de histórico familiar. Outros fatores de risco são traumatismo craniano, gênero, depressão, diabetes mellitus, hiperlipidemia e fatores vasculares.[14]

Atualmente, o diagnóstico da DA incorpora o diagnóstico clínico e alguns testes de biomarcadores para a DA. São realizadas análises por imagem do peptídeo β-amilóide e, além disso, monitoramento do peptídeo Aβ e proteína *tau* no líquido cefalorraquidiano,[15,16] que é um fluído corpóreo encontrado em regiões especificas no cérebro e medula espinhal. Embora se observe um enorme avanço nesses testes usando biomarcadores da fisiopatologia da DA,[17,18] somente evidências histopatológicas obtidas por biópsia ou necropsia confirmam o diagnóstico.

1.2 *Genética e Doença de Alzheimer*

A herança genética da DA pode expressar-se em portadores Alzheimer de início precoce ou tardio. Simplificadamente, existem algumas mutações raras na proteína precursora do amilóide (APP), e duas isoformas de presenilinas (PSEN1 e PSEN2),[19] que causam a DA de início precoce (< 65 anos).[20,21]

Originalmente, PSEN1 e PSEN2 codificam as presenilinas, que constituem a subunidade catalítica da γ-secretase,[21] um importante complexo que está envolvido diretamente no metabolismo da proteína precursora do amilóide (APP) e formação do peptídeo β-amilóide, que será descrito no item 1.4. Estudos também sugerem que mutações genéticas na PSEN1 alteram a neurogênese do hipocampo e a função de memória em modelos de ratos.[22]

As mutações nos genes dessas três proteínas levam ao declínio cognitivo na terceira ou quarta década de vida, enquanto que, polimorfismos genéticos comuns, tais como as variantes dos alelos *epsilon* 4 (ε4), 2 (ε2) e no gene APOE estão associados ao aparecimento de DA após os 65 anos.[23]

PSEN1 é o gene mais comumente envolvido, com 241 mutações relatadas como patogênicas no banco de dados *Alzforum*.[24] O segundo gene mais comum envolvido é APP, com 52 mutações patogênicas descritas, enquanto 45 diferentes mutações patogênicas têm sido relatadas para PSEN2.

O gene APOE, por usa vez, codifica a proteína apolipoproteína E. Existem três isoformas da APOE alélicas: ε3, ε4 e ε2, em ordem decrescente de prevalência populacional. Especificamente, os portadores do alelo ε4 apresentam um risco maior de desenvolvimento de DA, de tal forma que os heterozigóticos e os homozigóticos têm um risco de vida de 2-3 vezes e 12 vezes maior, respectivamente.[25]

Essa variação ε4 comum no *locus* APOE é o fator de risco genético mais forte para a DA.[23] A identificação da variante ε4 do gene APOE, como o fator genético de risco mais comum para a DA de início tardio, sugere que o colesterol pode ter um papel direto na patogênese da doença. Apesar desta forte responsabilidade genética, alguns portadores de APOE-ε4 nunca desenvolvem DA sintomática ou têm uma idade de início muito tardia, sugerindo que esses indivíduos podem também apresentar alelos protetores. O gênero também pode influenciar – mulheres que apresentam APOE ε4 apresentam maior chance de desenvolver DA do que homens.[26]

Muitos outros *loci* de DNA foram identificados a partir de estudos genômicos de associações que possivelmente conferem algum risco de DA. Alguns notáveis são BIN1, GAB2, GALP, ABCA7, TNK1, TREM2, PICALM, eCLU.[27] Muitos destes estão envolvidos no transporte de membrana, endocitose, sistema imunológico e/ ou metabolismo lipídico. Embora se encontre relação entre a genética dos pacientes e a patogênese da DA, esta relação ainda não está totalmente clara. O conhecimento da conectividade entre o mecanismo patogênico da DA e esses genes é fundamental para o desenvolvimento de novas abordagens terapêuticas.

1.3 *Características histológicas da DA*

Desde a descoberta da DA por Alois Alzheimer, os neuropatologistas tem identificado placas senis e emaranhados neurofibrilares intracelulares em cérebros *post mortem* de portadores da DA,[28] sugerindo que estas estruturas poderiam estar conectadas com a gênese da doença.

O peptídeo *β*-amilóide é o principal componente proteíco das placas senis cerebrais extracelulares, enquanto que as formas filamentosas de proteína *tau* intraneuronal são os principais componentes dos emaranhados neurofibrilares tal como mostra a *Figura 2*. Tanto as placas amilóides quanto os emaranhados neurofibrilares coexistem na doença de Alzheimer, mas com diferentes padrões topológicos e temporais. Se essas duas lesões são independentes ou biologicamente relacionadas ainda é incerto.[29,30]

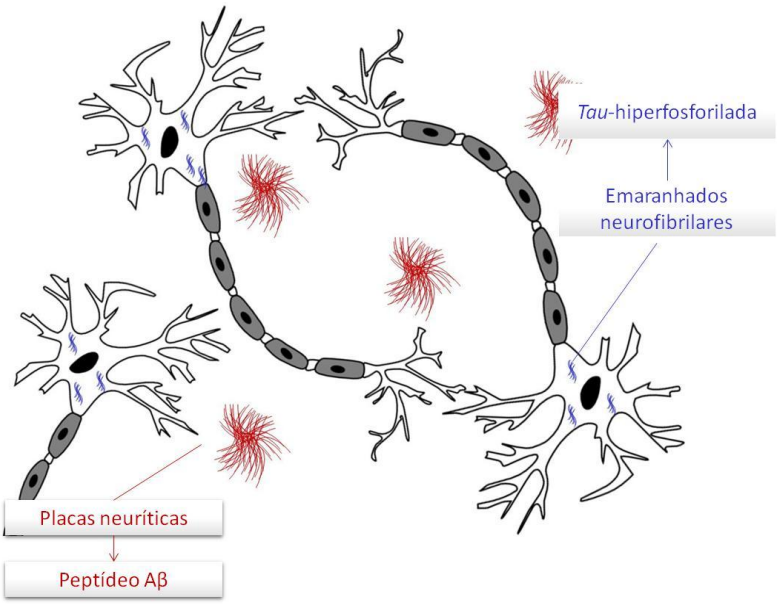


Figura 2. Biomarcadores histológicos: placas neuríticas extracelulares e emaranhados neurofibrilares intracelular.

Curiosamente, observou-se que os emaranhados neurofibrilares raramente ocorrem no córtex cerebral a menos que as placas amilóides também estejam presentes. Isto levou à ideia de que placas amilóides de alguma forma desencadeam a propagação de emaranhados.[29] No entanto, o aparecimento do déficit cognitivo detectados na fase clínica,

por sua vez, é mais fortemente ligado à presença de emaranhados neurofibrilares no córtex cerebral.[31,32]

Além destas evidências histológicas, múltiplas alterações celulares são identificadas na patogênese da doença de Alzheimer, incluindo danos mitocondriais, perda sináptica, respostas inflamatórias,[33] desequilíbrio metálico[34] e influxo de cálcio,[35] dentre outros. Outra característica da DA é o estresse oxidativo, definido como um desequilíbrio entre a produção de espécies reativas de oxigênio / nitrogênio (ROS / RNS).[36] Baseados nas principais características histológicas, genética e os sintomas cognitivos observados em paciente com a Doença de Alzheimer foram desenvolvidas várias hipóteses na tentativa de explicar a gênese da doença. Na sequência, as hipóteses mais relevantes e que se relacionam ao desenvolvimento desse trabalho serão discutidas.

1.4 *Hipótese amilóide*

A hipótese amilóide é baseada em características histológicas e genéticas encontradas em pacientes portadores da DA.[37] A análise *post-mortem* de cérebro destes pacientes revela a presença de placas senis extracelulares compostas por agregados insolúveis de peptídeo β-amilóide.

Na hipótese amilóide, a presença do peptídeo β-amilóide é interpretada como um efeito de mutações genéticas, que subsequentemente conduzem à morte celular neural progressiva e leva à demência. A mutação anormal no gene da APP, que codifica a proteína precursora β-amilóide,[38,39] e/ou das prenisilinas do complexo γ-secretase,[40] leva ao processamento dessa proteína conduzindo à produção do peptídeo β-amilóide (Aβ).

Desse modo, conjectura-se que o peptídeo β-amilóide é a proteína-chave que leva à disfunção sináptica progressiva, degeneração dos neurônios e morte neuronal na DA.[41,42] Para que se compreenda melhor a hipótese amilóide, é necessário apresentar brevemente o processamento proteolítico da APP.

1.4.1 Proteólise da APP via secretases

A APP é uma glicoproteína transmembrana contendo 695-770 resíduos de aminoácidos, que pode sofrer processamento proteolítico por enzimas denominadas

secretases, e que está presente na superfície celular dos neurônios e células da glia.[43] A APP tem uma grande região *N*-terminal extracelular, um domínio transmembranar e uma pequena cauda *C*-terminal citoplasmático (*Figura 3*).

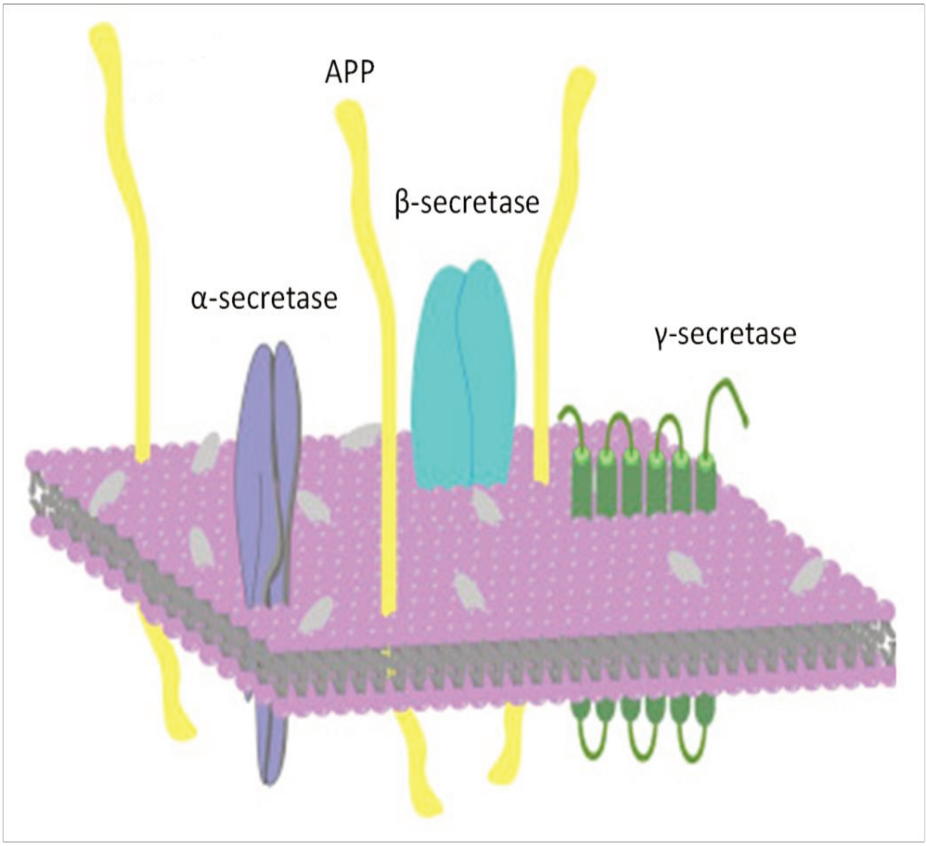


Figura 3. Representação esquemática da APP e as *α*, *β* e *γ*- secretases em uma membrana celular neuronal. (Reproduced from Praveen P.N. Rao *et al*. Amyloid cascade in Alzheimer's disease: Recent advances in medicinal chemistry. *Eur J Med Chem*. 2016;113:258-272. Copyright©2016. Elsevier Masson SAS. All rights reserved.)

Três enzimas secretases estão envolvidas na clivagem dessa proteína - as enzimas proteolíticas *α*, *β* e *γ*-secretase.[44] A clivagem proteolítica da APP, representada na *Figura 4*, resulta na geração de peptídeos de vários tamanhos conhecidos por suas funções de neuroproteção, reparação da membrana sináptica,[45] crescimento celular, formação de sinapses, crescimento de neurites,[46] sinalização celular,[47] dentre outras.

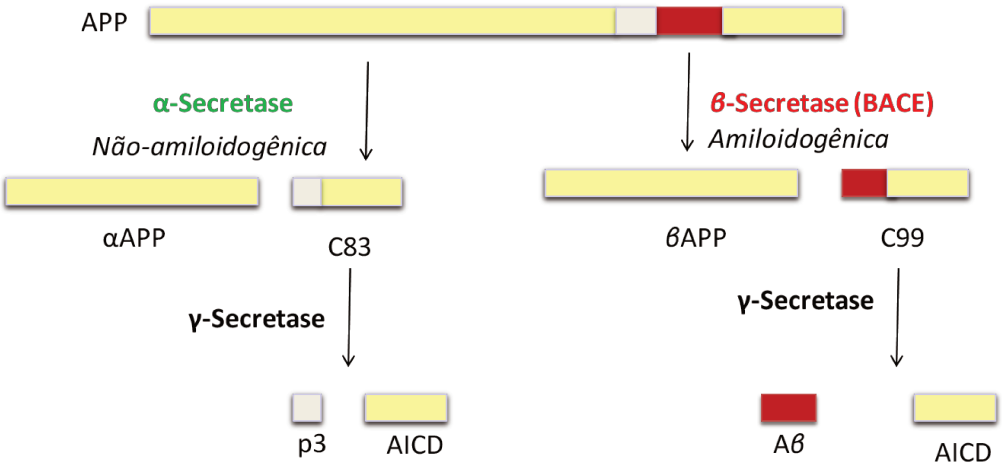


Figura 4. Produção do monômero Aβ via clivagem da APP pela ação das enzimas BACE e γ-secretases. (*APP*: proteína precursora do amilóide; *C99*; fragmento carboxiterminal 99; *AICD*: proteína do domínio APP-intracelular).

Na clivagem normal, conhecida como via não amiloidogênica, a APP é clivada pela ação da enzima α-secretase, liberando no meio extracelular o fragmento peptídico C-terminal (C83) e um fragmento solúvel denominado APP-α (sAPPα). Esse fragmento tem várias funções fisiológicas, como por exemplo, a neurotrófica, neuroprotetora, neurogênica, estimuladora da síntese proteíca e da expressão gênica, além de potencializar a memória.[46] Em um segundo momento, o fragmento C83 é processado pela γ-secretase, produzindo o peptídeo P3 e outro fragmento derivado do domínio intracelular da proteína precursora amilóide (AICD), que também possuem funções sinalizadoras e neuroproteroras.

O peptídeo β-amilóide (Aβ), por sua vez, é produzido na rota amiloidogênica a partir da clivagem anormal da APP que é encontrada nas membranas de células e organelas.[48] A clivagem do APP pela enzima BACE-1, anteriormente denominada de β-secretase (*Figura 4*), produz uma espécie sAPPβ e um fragmento contendo noventa e nove aminoácidos (C99). C99, que por sua vez, é clivado pela γ-secretase. É importante mencionar que a clivagem pela γ-secretase é imprecisa e resulta na produção de peptídeos que variam de 37 a 43 aminoácidos.[49]

O peptídeo Aβ pode ser encontrado na forma de monômeros e em estruturas compostas por dímeros, trímeros,[50] e formando estruturas oligoméricas, enquanto que as protofibrilas são as estruturas intermediárias entre estes agregados e as fibrilas amilóides. As

estruturas oligoméricas são altamente complexas, pois caracterizam um amplo grupo de agregados não fibrilares.

Estes agregados amilóides são de natureza solúvel, sendo consideravelmente mais tóxicos de todas as formas agregadas. Além disso, é bem estabelecido que oligômeros do Aβ_{42} são mais tóxicos que protofibrilas e fibrilas.[51] Os peptídeos Aβ também podem se auto-modelar em uma variedade de oligômeros solúveis de baixo peso molecular bem como agregados de alto peso molecular, [52] tais como protofibrilas anulares como mostra a *Figura 5.*

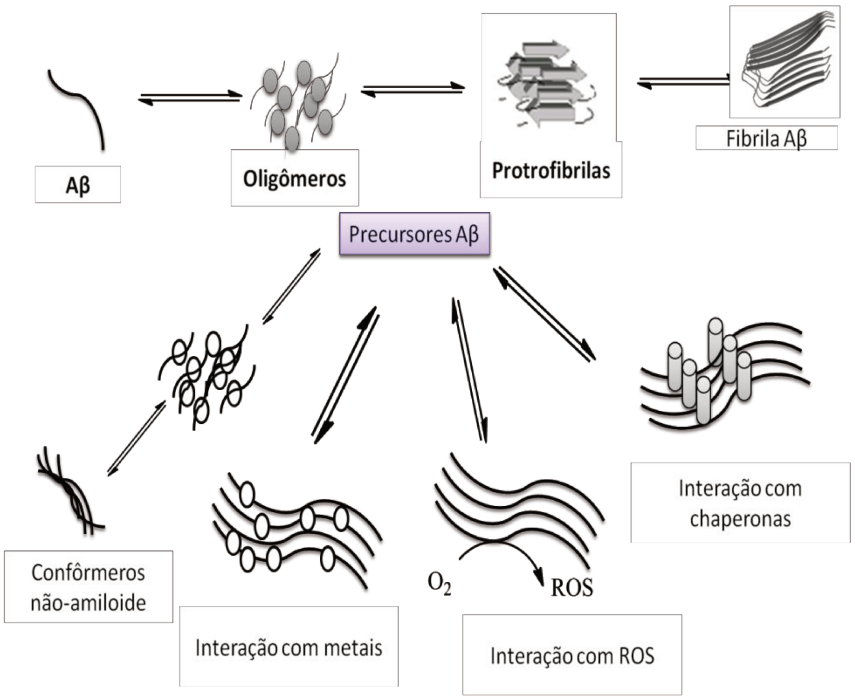


Figura 5. Estruturas amilóides, a formação de fibrilas do peptídeo Aβ e alguns efeitos e interações do Aβ.

Em contraste com as fibrilas inertes, os oligômeros são altamente heterogêneos e estruturalmente desorganizados, permitindo a exposição das sequências da cadeia lateral do aminoácido para participar de interações com outros componentes celulares.[53] Espécies de diferentes metais, chaperonas, espécies oxidativas tem a capacidade de interagir com as fibrilas do peptídeo amilóide e, desse modo podem participar na formação e estabilização desses agregados.

1.4.2 Doença de Alzheimer e alterações na homeostase de íons metálicos

Há vários processos anormais documentados em estudos da DA correlacionados com o peptídeo amilóide. Esses processos incluem a disfunção mitocondrial, o desequilíbrio da homeostase de cálcio,[54] e de diversos metais[55] tais como cobre, zinco, ferro e alumínio, além do estresse oxidativo.[56,57]

A análise morfométrica revela que a quantidade de mitocôndrias diminui na doença de Alzheimer.[58] Isto implica em mudanças no metabolismo energético celular, particularmente relacionado a baixos níveis de glicose. As mitocôndrias são organelas altamente metabólicas que combinam trajetórias de sinalização de nutrientes e de sinalização de crescimento para regular o período de saúde e a longevidade, mantendo a produção de energia e homeostase Ca^{2+} e reduzindo a apoptose celular. A alteração mitocondrial, por sua vez, também pode implicar em desequilíbrio dos níveis de cálcio.

A sinalização intracelular de Ca^{2+} é fundamental para a fisiologia e viabilidade neuronal. Notavelmente, existem interações recíprocas entre caminhos que envolvem o cátion Ca^{2+} e a patologia amilóide. A alteração da sinalização de Ca^{2+} acelera a formação do peptídeo Aβ, enquanto que outras estruturas do peptideo de Aβ, como as formas oligoméricas solúveis, induzem a desequilibrio de Ca^{2+} intra e extracelular.[59] Dentro desse contexto, há evidência de que particularmente o peptídeo Aβ pode promover sobrecarga celular de cálcio.

Um estudo realizado em cérebros de ratosmostrou que os agregados amilóides são capazes de induzir a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS), a atividade da acetilcolinesterase, níveis de nitrito, peroxidação lipídica e inibição da atividade enzimática antioxidante nas regiões hipocampo e córtex cerebral. [57]

Íons cálcio, zinco, ferro e cobre têm papel fundamental na sinalização de neurônios, apoptose, inflamação, controle do estresse oxidativo e proliferação celular.[60] Alterações na sua homeostase provocam um aumento de espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio,[61] é uma das características da Doença de Alzheimer.

Para dar uma idéia sobre a participação dos metais e sua relação com o estresse oxidativo, íons metálicos de cobre e ferro, por exemplo, podem sofrer reações do tipo redox produzindo ROS na presença de oxigênio (O_2) e um agente redutor.

No caso do ferro, é relatado que a expressão excessiva da enzima hemeoxigenase cortical no hipocampo promove a conversão do hemo para Fe^{2+} induzindo a insuficiência mitocondrial, aumentando a atividade da citocromo C oxidase e a geração de H_2O_2.[62] Além disso, o envolvimento de ferro e cobre na reação de Fenton (*Esquema 1*) gera radicais livres que podem se associar a diferentes estruturas amilóides.

(i) $Fe^{2+} + H_2O_2 \rightarrow Fe^{3+} + OH^- + \bullet OH$

(ii) $Cu^{+} + H_2O_2 \rightarrow Cu^{2+} + OH^- + \bullet OH$

Esquema 1. Reação de Fenton: oxidação de íons metálicos e geração de ROS.

Os metais cobre, zinco e ferro são naturalmente abundantes no cérebro, no entanto, no cérebro de pacientes com a doença de Alzheimer contém elevadas concentrações desses metais em áreas correlacionadas com as placas amilóides.[63]

O desequilíbrio metálico, especialmente no caso de Cu^{2+} e Zn^{2+}, tem atraído o interesse na investigação da etiologia de uma variedade de condições neurodegenerativas e, em particular, a patogênese da DA.[64]

1.4.3 Peptídeo *β*-amilóide e sítios de coordenação com metais

Particulamente, o peptídeo Aβ_{42} é o mais potente catalisador para gerar espécies reativas, podendo dar início a essa reação, antes mesmo de oligomerizar. Por causa disso, o Aβ_{42} também desempenha um papel significativo na perda da homeostase oxidativa.[65]

As espécies metálicas de zinco, cobre, cálcio, ferro e alumínio complexam com resíduos específicos do peptídeo Aβ, que age então como quelante metálico. De forma resumida, os principais resíduos de interação com cobre, zinco, ferro e cálcio relatados na literatura[66] encontram-se na *Tabela 1*.

Tabela 1. Metais e seus respectivos sítios de coordenação no peptídeo *β*-amilóide.

Íon metálico	Estabilidade da ligação	Número de coordenação	Resíduo de aminoácido
Zn^{2+}	Alta	3	His, Cys, Glu
Cu^{+}	Alta	3,4	His, Cys, Met
Cu^{2+}	Alta	3,4	His, Cys
Ca^{2+}	Intermediária	7 (8)	Glu, Asp
Fe^{2+}	Baixa	4–6	His, Glu, Asp Cys
Fe^{3+}	Alta	4–6	Glu, Asp, Tyr Cys

A ligação de íons metálicos ao peptídeo A*β* invariavelmente resulta em agregação, que pode ser de tipo amorfo ou amilóide, dependendo do íon metálico e da estequiometria.[65] As altas concentrações de Zn^{2+} e Cu^{2+} são responsáveis pela formação de agregados A*β* amorfos.

Por outro lado, concentrações equimolares de Cu^{2+} e Zn^{2+} conduzem à fibrilação A*β*. Zn^{2+} liga-se a A*β* estequiometricamente (1:1) com um amplo intervalo de afinidade de 1 a 300 μM. Na presença de Cu^{2+}, o peptídeo $A\beta_{42}$ se organiza em fibrilas amilóides com estequiometrias mais elevadas, $A\beta_{40}$ e $A\beta_{42}$ formam oligômeros esféricos de 10 a 20 nm de largura e grandes agregados amorfos citotóxicos insolúveis.

Dentre os resíduos apresentados na *Tabela 1*, os que mais se destacam são os de histidina (His13 e His14) localizados na parte N-terminal do peptídeo $A\beta_{42}$. Uma representação da interação do complexo formado entre cobre ou zinco com esses resíduos de histidina se encontra na *Figura 6*. Além da histidina, os íons metálicos se ligam também aos resíduos de aspartato e tirosina do peptídeo A*β*.[62]

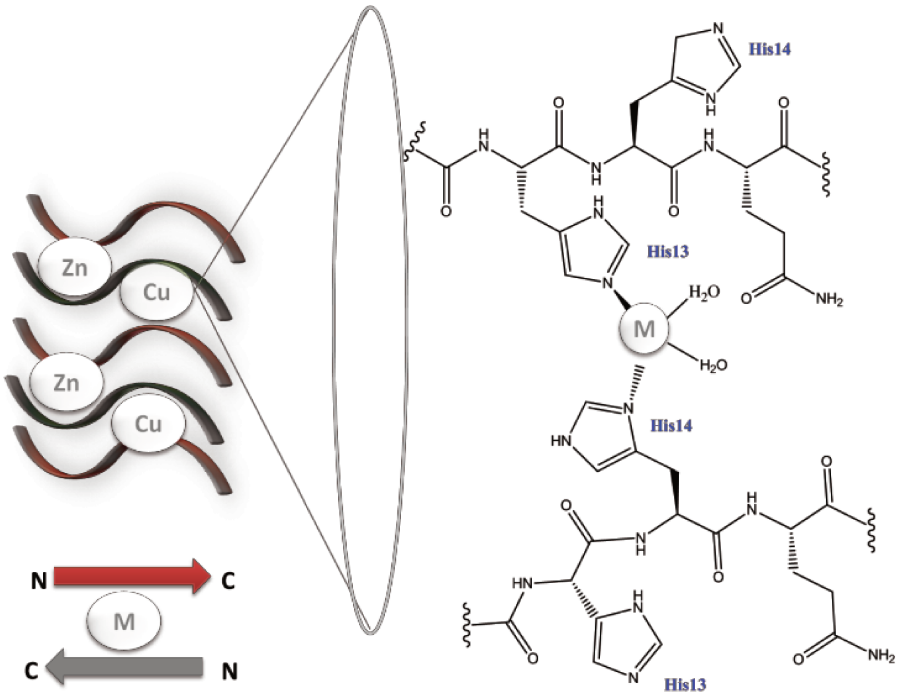


Figura 6. Coordenação de cobre e zinco com o peptídeo amilóide com os resíduos de histidina (His13 e His14).

Um resíduo de metionina (Met35) na região C-terminal, tem sido apontado como uma das regiões fundamentais para ligação com o íon metálico. Estudos sobre a formação de ROS em linhagens celulares mostraram que um resíduo de metionina (Met 35) presente na estrutura do peptídeo Aβ_{42} é um resíduo considerado essencial em reações redox.[67] A metionina parece estar envolvida com a redução do cobre e geração de peróxido de hidrogênio, por exemplo.

1.4.4 Hipótese amilóide e alvos moleculares para a DA

A hipótese amilóide tem impulsionado a investigação em busca de tratamento da doença de Alzheimer nos últimos 25 anos.[42] O desenvolvimento de medicamentos concentra-se em alvos farmacológicos que incluem enzimas, receptores e suas diferentes vias de sinalização.

As principais propostas de novos fármacos baseados da hipótese amilóide icluem (a) moléculas moduladores do processamento de precursor de proteína β-amilóide (APP), por exemplo, através de modulação das secretases α, β e γ; (b) pequenas moléculas que podem

inibir os processos de agregação de estruturas amilóides; ou ainda (c) compostos que promovem a remoção de estruturas amilóide. Adicionalmente, do ponto de vista genético, os três genes de início precoce, ou seja, a APP e as duas presenilinas, e o gene de apolipoproteína E de inicio tardio (ApoE) tambem são alvos potenciais para o tratamento da DA. Dentro desse contexto, as duas principais abordagens usadas para prevenir o acúmulo de peptídeo β-amilóide são (i) desenvolvimento de inibidores da β-secretase (BACE) e (ii) inibidores diretos do processo de agregação β-amilóide.

Embora não haja dúvida alguma quanto ao fato de que a desregulação da biossíntese e interações da APP alteram o equilíbrio em seu processamento proteolítico, desde o processamento não amiloidogênico até o amiloidogênico, contribuindo assim para um aumento da carga amilóide,[68] ainda há várias vias relacionadas ao APP que ainda não são bem entendidas. Isso ocorre devido aos seus múltiplos locais de clivagem e à produção de vários metabólitos que podem ou não ser benéficos ao indivíduo. Para modular a produção do APP com eficácia há a necessidade urgente de entender todos esses processos e suas interações.

1.5 *Hipótese tau*

Tau é uma proteína citoplasmática com função estrutural que se localiza predominantemente para axônios neuronais, onde modula a estabilidade e a montagem de microtúbulos.[69] Estes, por sua vez, são construídos a partir de heterodímeros de tubulina que se polimerizam em protofilamentos e se associam lateralmente a microtúbulos. Ao fazê-lo, *tau* gera um estado parcialmente estável, mas ainda dinâmico, em microtúbulos importantes para o crescimento axonal e o transporte axonal efetivo.

No entanto, em cérebros de paciente Alzheimer, a proteína *tau* é desagregada dos microtúbulos e depositada no citosol devido a uma hiperfosforilação anormal que afeta o complexo da *tau* com os microtúbulos. Isto leva ao desprendimento da proteína *tau* e, desse modo provoca instabilidade e desagregação dos microtúbulos.[28]

A agregação da proteína *tau* não é um processo tardio e se inicia a partir dos 40 ou 50 anos de idade. Esse dado clínico inicial chamou a atenção dos pesquisadores que passaram a estudar mais cuidadosamente os mecanismos de hiperfosforilação da proteína *tau* e,

posteriormente, levaram a formular a hipótese de que a proteína *tau* poderia ser o iniciador da DA.

Nesta teoria, uma sinalização anômala ainda não bem esclarecida leva à hiperfosforilação da proteína *tau* através, por exemplo, da via fyn kinase.[70] As modificações da proteína *tau* levam à sua oligomerização e ao desenvolvimento dos emaranhados neurofibrilares, o que resulta em tráfico intracelular anormal, colapso do citoesqueleto e subsequente morte neuronal.

Como resultado da morte neuronal, as formas oligoméricas e os filamentos de *tau* são liberados para o ambiente extracelular, contribuindo para a ativação de células microgliais e estimulando o ciclo deletério levando à disseminação progressiva da degeneração neuronal.[69] Ou seja, os agregados patológicos de *tau* induzem a ativação microglial conduzindo a eventos subsequentes da cascata neuroinflamatória.[71] Por uma via oposta, muitas evidências sugerem que mudanças estruturais que ocorrem em ambiente de metabolismo energético alterado e estresse oxidativo precedem a agregação da proteína *tau*.[58]

Os emaranhados são compostos de proteína *tau* e o seu núcleo é composto de uma parte do filamento proveniente de um domínio da *tau*. Esta porção da *tau* pode catalisar e propagar a conversão de *tau* solúvel normal em *tau* oligomérico e agregado fibrilar que, por sua vez, pode se espalhar para neurônios vizinhos.[72]

Estudos recentes demonstraram que o grau de comprometimento cognitivo ou disfunção neural está mais correlacionado com a extensão da patologia *tau* do que à distribuição da deposição de placa Aβ.

Algumas evidências clínicas indicam que a proteína *tau* tem uma relação mais próxima com os estágios de demência dos pacientes com DA como, por exemplo:

(i) A gravidade da demência correlaciona-se com o aumento do acúmulo de emaranhados neurofibrilares no cérebro;

(ii) A alta correlação entre as espécies de *tau* hiperfosforiladas no líquido cefalorraquidiano de pacientes com DA e a extensão da gravidade do comprometimento cognitivo;

(iii) As diminuições nos filamentos de *tau* por fármacos dirigidos a este alvo molecular são capazes de diminuir o comprometimento cognitivo.

A favor da hipótese amilóide, há ainda indícios de que a presença do peptídeo Aβ nduz a formação e deposição de espécies bioativas de proteína *tau*.[29]

Nos últimos anos, a investigação de possíveis terapias abordando a hipótese *tau* vem se desenvolvendo, e inclui imunoterapêuticos ativo e passivo, agentes estabilizadores de microtúbulos, inibidores de proteína quinase e, por último, inibidor direto da agregação *tau*.

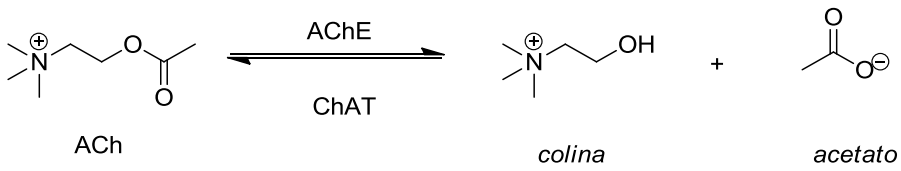
1.6 *Hipótese colinérgica*

A hipótese colinérgica foi a primeira teoria proposta na tentativa de explicar a doença de Alzheimer. Foi proposta há mais de 30 anos como um processo degenerativo primário capaz de prejudicar seletivamente grupos de neurônios colinérgicos no hipocampo, córtex frontal, amígdala, núcleo basal e septo medial, e outras regiões e estruturas que têm funções importantes em processos de concentração, aprendizagem, memória e outros processos mnemônicos.[73] Achados clínicos revelam atrofia cortical e hipocampal significativa associada à modulação colinérgica.[62]

O sistema colinérgico é constituído principalmente por duas enzimas, a colinesterase e a colina acetiltransferase (ChAT) responsáveis pela hidrólise e pela biossíntese da acetilcolina (ACh), respectivamente e, pelos receptores colinérgicos chamados de muscarínicos e nicotínicos. A ativação nos receptores muscarínicos e nicotínicos pela ação do neurotransmissor colinérgico ACh são essenciais para as mais variadas funções no sistema nervoso central e periférico.

1.6.1 Neurotransmissão colinérgica

O sistema neurotransmissor colinérgico é responsável pela biossíntese e degradação da ACh pela ação das enzimas colina acetil-transferase (ChAT) e acetilcolinesterase (AChE), respectivamente, como mostrado no *Esquema 2*.



Esquema 2. Reações de biossíntese e degradação da acetilcolina, pela ação das enzimas AChE e ChAT, respectivamente.

Na *Figura 7*-A, temos um esquema de comunicação entre dois neurônios, demonstrando a produção e degradação da acetilcolina nos neurônios denominados pré e pós-sinapticos. No neurônio pré-sináptico, ocorre a biossíntese da ACh pela ação da enzima colina acetiltransferase (ChAT), a partir de colina e o cofator acetil-CoA.

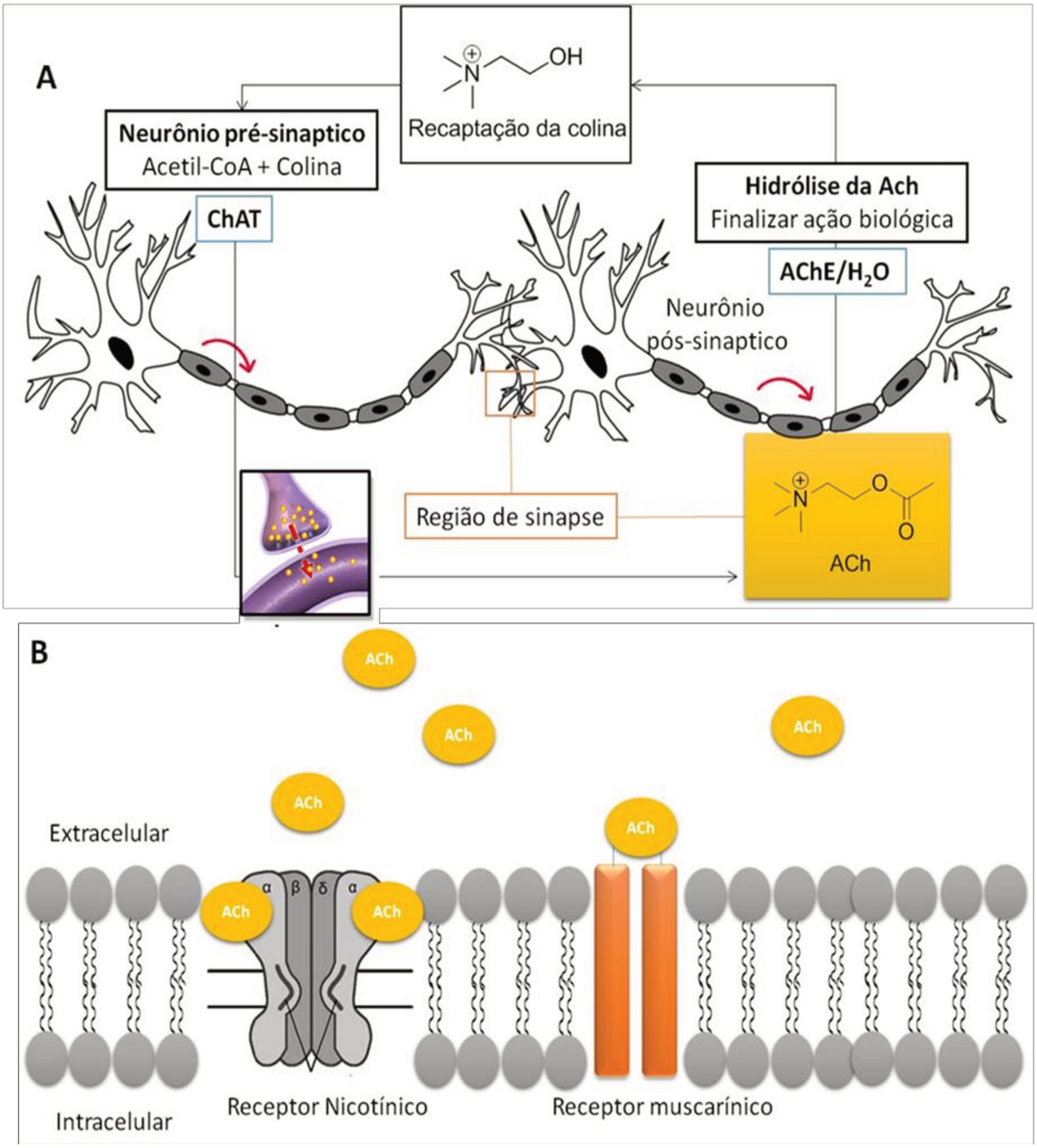


Figura 7. A) Ciclo da acetilcolina no sistema colinérgico; B) Ativação dos receptores colinérgicos pela acetilcolina na região de sinapse. (ChAT: colina acetil transferase; ACh: acetilcolina; Direção do sinal sinapse = ↷; AChE: acetilcolinesterase).

Uma vez produzida, ACh é transportada em vesículas pelo axônio através de estímulo elétrico. Esse impulso terá que atingir as extremidades do axônio da célula pré-sináptica, para então ocorrer à liberação de substâncias químicas, no caso ACh, nos espaços sinápticos.[74] Nesse ponto, o neurotransmissor pode ligar-se reversivelmente aos receptores colinérgicos, muscarínicos e nicotínicos, produzindo outro estímulo elétrico no orgão efetor

(nervo, músculo ou glândula) e, assim dá inicio as mais variadas ações biológicas no sistema nervoso central e periférico (*Figura 7*-B).

Os receptores muscarínicos são encontrados em gânglios do sistema nervoso periférico e nos órgãos efetores autonômicos, como coração, músculos lisos, cérebro e glândulas exócrinas.[75] Por exemplo, quando a ACh ativa os receptores muscarínicos no sistema nervoso periférico tem ações que incluem a regulação da frequência cardíaca, o relaxamento de vasos sanguíneos periféricos e a constrição das vias respiratórias. No sistema nervoso central, ela é responsável por funções cognitivas como aprendizado, concentração, e participa de processos relacionados à qualidade do sono, modulação do estresse, dentre outros.

A ativação dos receptores nicotínicos, por sua vez, é mais abundante em determinadas regiões cerebrais, como a amídala, hipocampo, estriato, cerebelo e o córtex pré-frontal.[74] Estes são amplamente expressos no sistema nervoso, onde participam da transmissão colinérgica. No sistema nervoso central, a inervação colinérgica que atua através de NAChRs (receptores nicotínicos da acetilcolina) regula processos como a liberação do transmissor, excitabilidade celular e integração neuronal, que são cruciais para as operações de rede e influenciam funções fisiológicas, tais como excitação, sono, fadiga, ansiedade, processamento de dor, ingestão de alimentos e uma série de funções cognitivas.

Para finalizar o estímulo no receptor colinérgico, a ACh sofre uma reação de hidrólise, catalisada pela enzima acetilcolinesterase (AChE) formando acetato e colina. Esta última pode ser recapturada e reutilizada para biossíntese de ACh no neurônio pré-sináptico, e assim reinicia-se o ciclo biossintético da acetilcolina.

Todo o processo que envolve transporte do precursor biosintético colina para dentro do neurônio, biossíntese da ACh pela ação da enzima colina acetil-transferase (ChAT), transporte e liberação de ACh na fenda sináptica, ativação dos receptores colinérgicos e degradação da ACh pela acetilcolinesterase são essenciais para a ação biológica do neurotransmissor colinérgico, acetilcolina, que constitui a base da hipótese colinérgica. Falhas em qualquer dessas etapas interfere na ação biológica proporcionada pela ativação dos receptores colinérgicos.

Alterações neuropatológicas observadas em paciente Alzheimer incluem perda neuronal, problemas na liberação de acetilcolina na região de sinapse, decréscimo da densidade de receptores muscarínicos,[76] déficits na expressão de receptores nicotínicos e muscarínicos,[77] deficiênicas no transporte axonal e problemas de recaptação da colina para o neurônio pré-sinaptico.

A disfunção colinérgica é uma das principais alterações patológicas na DA, embora o déficit de neurônios colinérgicos seja causado pela toxicidade das placas β-amilóides e emaranhados neurofibrilares.[78] Atualmente, há um consenso de que a relação observada entre comprometimento cognitivo e a diminuição da transmissão colinérgica no cérebro desempenha um papel importante na DA, mas por si só não estabelece causalidade definitiva da doença de Alzheimer.

A hipótese colinérgica tem servido de base para a maioria das estratégias de tratamento e abordagens de desenvolvimento de fármacos para a DA, como os inibidores de acetilcolinesterase, precursores colinérgicos, agonistas de receptores colinérgicos, bloqueadores dos receptores NMDA. Recentemente, verificou-se que a AChE tem também uma função não colinérgica nas fases iniciais de DA. A ligação da AChE ao peptídeo Aβ, acelera a polimerização do peptídeo em oligômeros e fibrilas.[79]

1.6.2 Acetilcolinesterase

AChE é uma glicoproteína, classificada como serina hidrolase, que é encontrada predominantemente no SNC, mas também na superfície de eritrócitos e tecido muscular. Embora possa ser encontrada como monômero, é mais comum na forma de dímero ou tetrâmero.[80]

O principal papel biológico da acetilcolinesterase é o término da transmissão colinérgica por hidrólise rápida do neurotransmissor, acetilcolina. A sua inibição é uma das estratégias mais bem-sucedidas no reforço da transmissão colinérgica. Além disso, a AChE realiza diversas funções catalíticas e não catalíticas, abrangendo desde a adesão celular da neuritogênese, sinaptogênese, hematopoiese e da trombopoiese até a promoção da fibrilação β-amilóide.[81]

O sítio ativo da AChE (*Figura 8*) é localizado no fundo de um vale com 20 Å de profundidade caracterizado pela presença de alguns aminoácidos estratégicos com funções bem definidas. Dentre estes se destacam os triptofanos na catálise enzimática por sua ligação do tipo cátion-π tendo uma função de cunho conformacional essencial para a hidrólise da ACh.[81]

Estudos cinéticos indicaram que o sítio ativo de AChE contém dois sítios principais, os chamados de "esterásicos" e "aniônicos".[82] O primeiro é o sítio catalítico e o segundo é conhecido como sítio periférico aniônico (PAS), correspondendo, respectivamente, à maquinaria da reação catalítica da hidrólise da ACh e ao local de ligação da colina.[80]

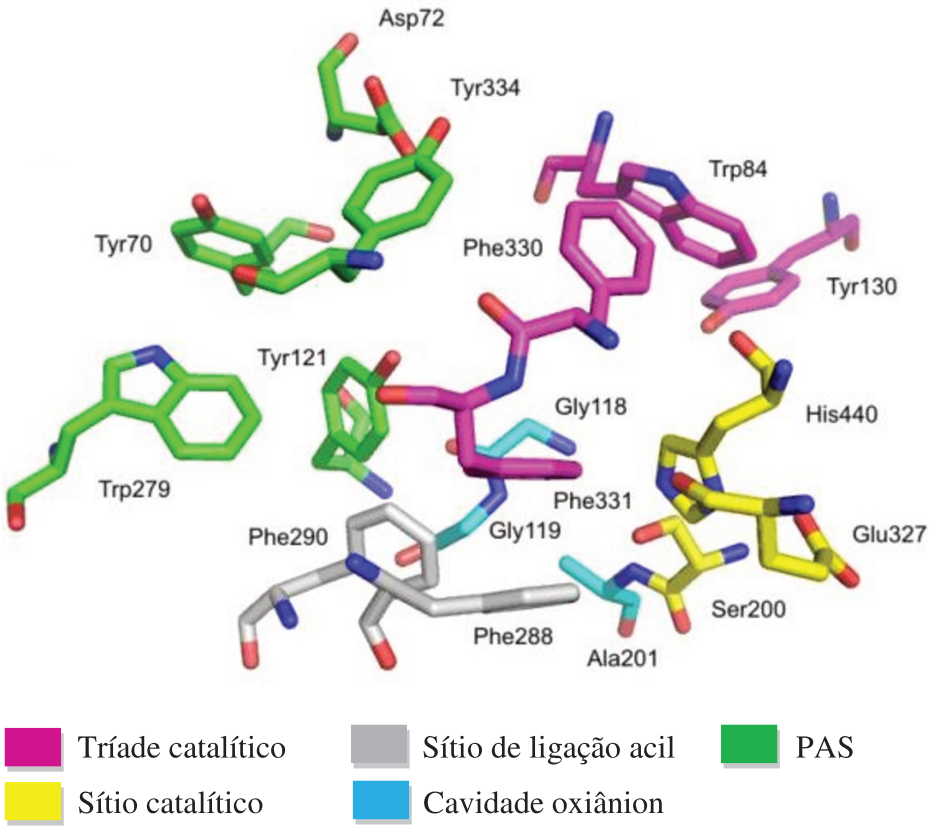


Figura 8. Visão tridimensional da região do sítio ativo da enzima 1EVE.[83]

O papel do sítio periférico aniônico é a formação de interações cátion-π na entrada do sítio ativo com o ligante. Uma vez que o ligante esteja devidamente orientado, a formação de interações catiônicas será específica e sincronizada.[80] Além do PAS estar envolvido na modulação alostérica na catálise no sítio ativo, ele também está associado a um número de funções não clássicas, em particular, à adesão de células e à deposição de amilóide.[84,85]

O segundo subsítio tem um papel conformacional, no qual o Trp84 mais precisamente é o local de ligação ao grupo quaternário amônio da acetilcolina. Os outros dois subsítios da AChE estão localizados mais profundamente na cavidade: o subsítio aniônico (canal de oxigênio) formado por Gly119, Ala201 e Gly118 e o subsítio catalítico também conhecido como esterásico, que é composto pela tríade Ser200-Glu327-His440[86] (destacados em amarelo na *Figura 8*), onde ocorre a hidrólise de ACh.

Estes dois subsítios são conhecidos como o sítio de acilação catalítica (CAS). O resíduo ácido glutâmico da tríade catalítica é essencial para estabilizar o estado de transição através de interações eletrostáticas. O orifício de oxiânion, também é considerado um papel importante na catálise.

De acordo com estudos realizados por Zhang *et al*.[87] são formados duas ligações de hidrogênio entre o oxigênio carbonilíco da ACh e os grupos peptídicos NH de Gly121 (Gly118) e Gly122 (Glu119). À medida que a reação prossegue, a distância entre o oxigênio carbonilíco do grupo ACh e NH de Ala204 (Ala201) torna-se menor e uma terceira ligação de hidrogênio é formada tanto no estado de transição como no intermediário tetraédrico.

A estratégia de planejamento de protótipos para a DA, usando a enzima AChE, consiste em inibir os sítios catalítico e periférico, envolvidos com a hidrólise da AChE e com o processo de formação de fibrilas do peptídeo β-amilóide, respectivamente. Inibir o sítio catalítico pode ajudar na melhoria de cognição dos pacientes com Alzheimer, enquanto que interagir com o sítio periférico, que atua como uma chaperona,[88] pode impedir ou retardar a formação das fibrilas do peptídeo β-amilóide (Aβ).[89,90] Na *Tabela 2* está apresentada a composição e função dos sítios da AChE.

Tabela 2. Principais locais de interação do sítio ativo da AChE e suas respectivas funções.

Íon metálico	Estabilidade da ligação	Número de coordenação	Resíduo de aminoácido
Zn^{2+}	Alta	3	His, Cys, Glu
Cu^{+}	Alta	3,4	His, Cys, Met
Cu^{2+}	Alta	3,4	His, Cys
Ca^{2+}	Intermediária	7 (8)	Glu, Asp
Fe^{2+}	Baixa	4–6	His, Glu, Asp Cys
Fe^{3+}	Alta	4–6	Glu, Asp, Tyr Cys

* Os números dos resíduos de aminoácido podem variar em função da espécie de origem da enzima. A numeração aqui apresentada é da enzima 1EVE, que foi utilizada nos ensaios desse projeto.

1.7 *Fármacos aprovados para o tratamento da DA e perspectivas de tratamento*

Até os dias atuais, os fármacos utilizados para tratar a DA têm um valor terapêutico limitado. Não há tratamento disponível que possa reverter à patologia da doença de Alzheimer já estabelecida. As principais classes de fármacos recomendados para o tratamento da DA pelo U.S. Food and Drug Administration (FDA)[91] incluem inibidores de acetilcolinesterase (AChEI), antagonistas do receptor N-metil-D-aspartato (NMDA), anti-oxidantes, inibidores da enzima monoamino oxidase (MAOI) e agentes anti-inflamatórios. AChEI são os medicamentos de primeira linha no tratamento da DA leve a moderada.

Há cinco medicamentos que foram aprovados pelo FDA para controlar os sintomas da DA: donepezila, galantamina, rivastigmina e tacrina, que são inibidores da AChE, e a memantina, um antagonista do receptor NMDA. As estruturas estão representadas na *Figura 9.*

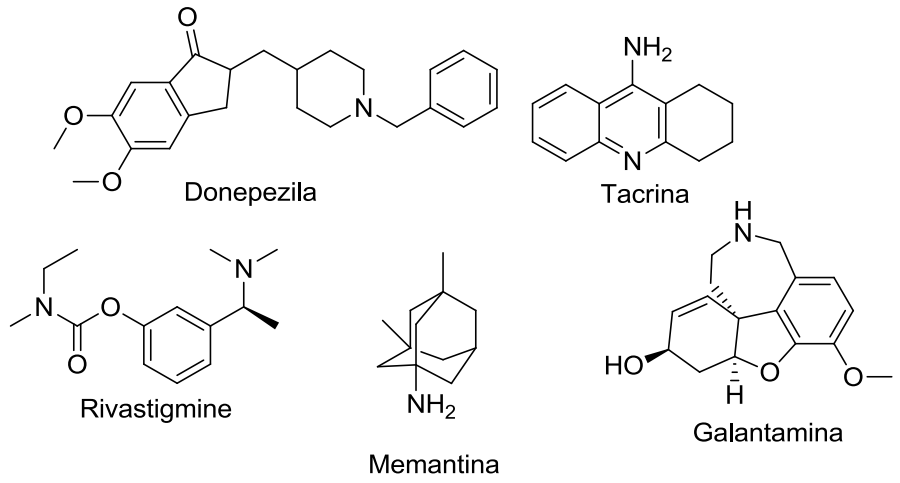


Figura 9. Fármacos aprovados pelo FDA para o tratamento de DA.

Dentre estes, a tacrina teve que ser retirada devido à hepatotoxicidade grave[92] e nenhum dos medicamentos disponíveis está livre de efeitos colaterais, principalmente de distúrbios gastrointestinais, náuseas, vômitos e dor de cefaleia.

O DON é um inibidor da colinesterase reversível e não competitivo da acetilcolinesterase,[93] que aumenta a função cognitiva de pacientes com DA do tipo leve a moderada e tem uma boa tolerabilidade, sem causar hepatoxicidade. Devido às suas características de maior ação seletiva, boa tolerabilidade e facilidade de administração, além da eficácia terapêutica, o donepezila é considerado um tratamento de primeira linha para a doença de Alzheimer.

Foi constatado que, em portadores da Doença de Alzheimer, a quantidade de glutamato está presente em níveis elevados.[94] O glutamato é responsável por regular a quantidade de íons cálcio que entram na célula neuronal.[92] Como consequência do excesso de glutamato, há um aumento na quantidade de íons cálcio intracelular. Isto, por sua vez, leva a geração de espécies reativas de oxigênio que aumentam a toxicidade e podem levar à morte celular. A excitotoxicidade refere-se a um processo de alterações patológicas que levam a lesão na celula neuronal e, desse modo são capazes de mediar à morte de neurônios.[95]

A memantina compete com o glutamato pelo mesmo receptor. Este fármaco age como uma antagonista não competitiva do NMDA,[91] por meio de um bloqueio de

receptores do glutamato. A memantina consegue reduzir a excitotoxicidade do glutamato, promovendo a proteção para os neurônios.[96]

Existem outras abordagens terapêuticas utilizadas no tratamento da DA[97] com o uso de anti-inflamatórios, estrógenos e os antioxidantes, por exemplo. Outros medicamentos, como a fisostigmina,[98] clioquinol, bapineuzumabe, semagacestate[99] foram clinicamente estudados e testados e chegaram a fases avançadas no desenvolvimento de fármacos para o tratamento da DA.

Alguns exemplos de candidatos a fármaco para a DA que atingiram as fases II e III na etapa de desenvolvimento de fármaco, e seus respectivos alvos moleculares encontram-se na *Tabela 3*.

Tabela 3. Candidatos a fármacos no desenvolvimento de fármaco para a DA.

Local da AChE	**Aminoácido**	**Principal função**
PAS	Trp279, Tyr70, Tyr121, Tyr334, Asp72	Conformação - Ligação cátion-π
Sitio catalítico	Trp84, Phe330	Conformação - Ligação cátion-π
Sitio esterásico	Ser200, Glu327 e His440	Reações de hidrólise

1.8 *N-Acil-hidrazonas*

A função *N*-acil-hidrazona foi caracterizada como uma estrutura privilegiada, que por definição é aquela subunidade que é capaz de fornecer pontos de ligação para vários tipos distintos de biorreceptores.

As modificações das subunidades ligadas às suas funções acila e imina resultam em vários derivados, que tem a habilidade de modular uma vasta diversidade de alvos moleculares. Essa função corresponde à fusão entre subunidades de amida e imina (*Figura 10*), que são grupos passíveis de interações com receptores, que compreendem tanto receptor como de doadores de ligação de hidrogênio.

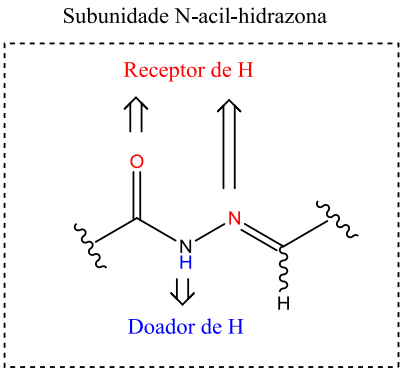


Figura 10. Estrutura das *N*-acil-hidrazonas.

No último século, apenas seis patentes divulgando derivados *N*-acil-hidrazônica para fins terapêuticos foram publicadas, e somente em 2010, essa subunidade começou a receber alguma atenção real em relação ao seu potencial terapêutico.[103]

As universidades brasileiras e chinesas foram identificadas como os principais candidatos a patenteadores, especialmente para candidatos a fármacos para tratamento de dor crônica, distúrbios inflamatórios e câncer.[103] Apesar da sua escassez entre fármacos aprovados, a subunidade estrutural acil hidrazônica está presente na estrutura do dantroleno (ver *Figura 12*),[104] fármaco utilizado para tratamento de hipertermia maligna.

No entanto, muitos grupos de pesquisa têm investigado compostos baseados na função *N*-acil hidrazona, devido à facilidade de se preparar série de derivados com grande

variedade estrutural, explorando a fácil condensação de hidrazidas e aldeídos ou cetonas via catálise ácida ou básica, ou ainda, irradiação por microondas.

Apesar da sua natureza mimética peptídica, a estabilidade química da função *N*-acil-hidrazona frente à hidrólise, é superior quando comparada à amida ou imina. Outra característica deste grupo é que as mudanças conformacionais em derivados *N*-acil-hidrazônicos podem ter perfil bioativo diferente. A ligação amida pode ter as conformações sinperiplanar (*sin*) ou antiperiplanar (*anti*),[105] em relação à orientação da carbonila e nitrogênio da "amida" (*Figura 11*). Ainda, a ligação imina apresenta isomeria *E/Z*.[106]

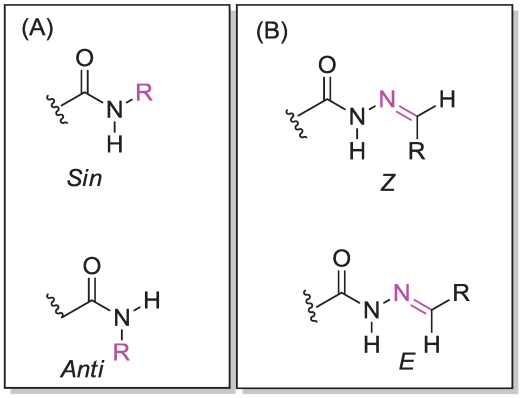


Figura 11. Variações da estrutura da *N*-acil-hidrazona: A) conformações da amida *anti* e *sin*; B) configurações *E* e *Z* da imina (C=N).

As modificações das subunidades ligadas a ambas as funções acil e imina realizadas nos últimos anos tem resultado em vários derivados de hidrazônicos que são capazes de modular diferentes alvos moleculares, proporcionando uma variedade surpreendentemente ampla de propriedades terapêuticas como antibacteriana,107 anti-inflamatória,[108] anticâncer,[109] antiviral,[110] antimicrobiana,[111] entre outras. Alguns exemplos estão apresentados na *Figura 12*.

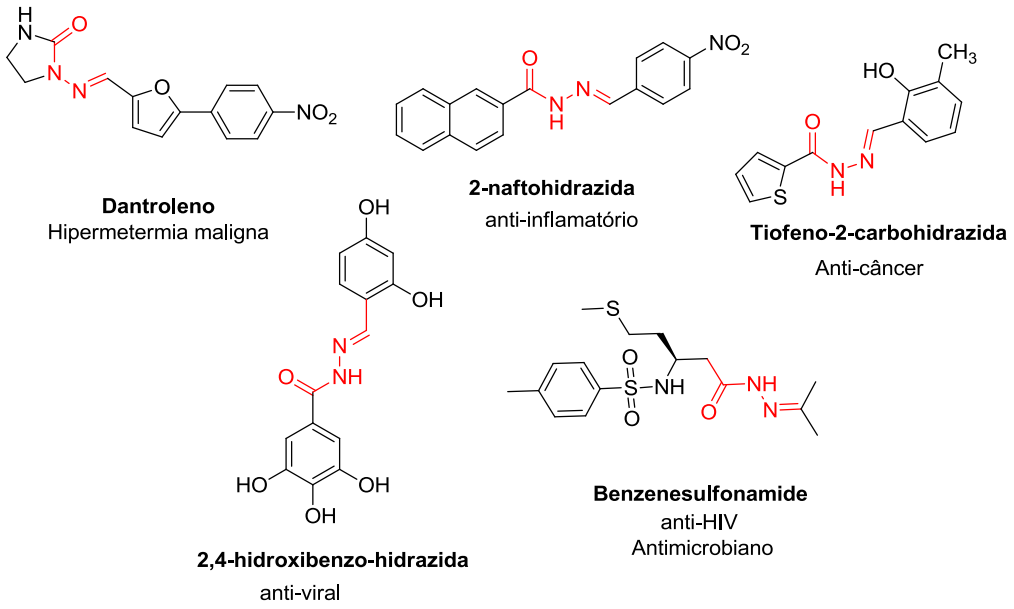


Figura 12. Compostos bioativos contendo a função *N*-acil-hidrazona com diferentes perfis farmacológicos.

2 Objetivos

2.1 *Gerais*

O nosso laboratório vem trabalhando em estratégias para o desenvolvimento de candidatos a fármacos para o tratamento da DA.[112] O presente projeto tem por objetivo realizar a síntese e a caracterização de uma série de acil-hidrazonas derivadas da 4-quinolona, assim como a avaliação de seu efeito sobre a atividade da acetilcolinesterase e modulação do processo de fibrilação do peptídeo β-amilóide. Além disso, tendo como alvo o peptídeo β-amilóide, propomos o preparo e caracterização dos complexos formados entre a acil-hidrazona com os íons metálicos de Cu (II) e Zn (II) com o fim de avaliar a capacidade quelante das acil-hidrazonas.

2.2 *Específicos*

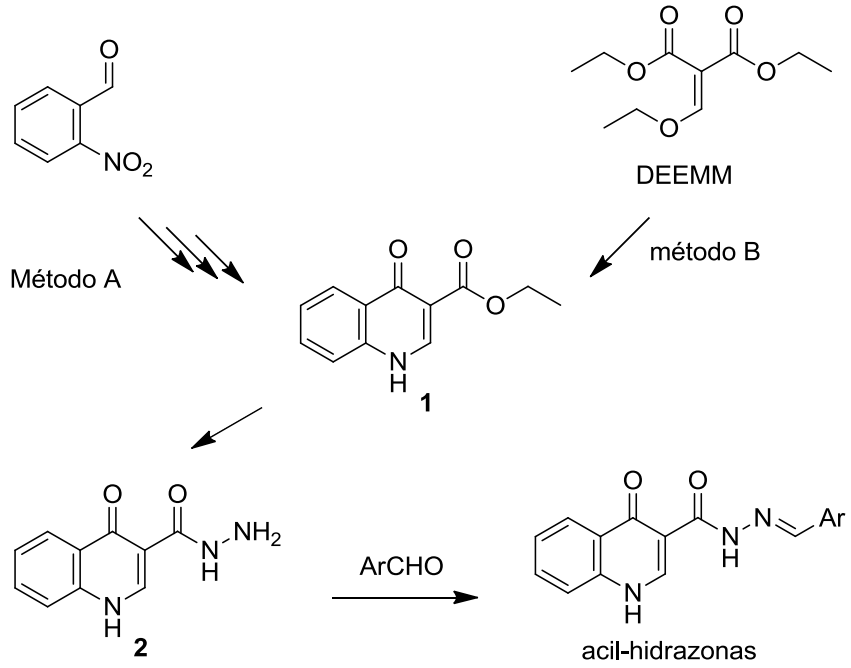
De forma sintetizada, os objetivos dessa tese são:

1. Preparo e caracterização de acil-hidrazonas derivadas da 3-carboxi-4-quinolona.
2. Análise estrutural e conformacional das acil-hidrazonas utilizando experimentos de RMN ^{1}D e ^{2}D (homonuclear e heteronuclear).
3. Avaliação biológica dos compostos sintetizados utilizando dois alvos moleculares relacionadas à DA: AChE e peptídeo β-amilóide.
4. Identificar o tipo de inibição induzida pelas acil-hidrazonas sobre a atividade da acetilcolinesterase, através de estudos de cinética enzimática.
5. Avaliar os resultados de inibição biológica da AChE por *docking* molecular.
6. Síntese e caracterização dos complexos de cobre e zinco das acil-hidrazonas derivadas da 3-carboxi-4-quinolona.

3 Metodologias

3.1 *Química*

A rota sintética usada para a obtenção dos compostos está esquematizada no *Esquema 3*. A 3-carboetoxi-4-quinolona (**1**) é o intermediário chave para obtenção das acil-hidrazonas.



Esquema 3. Estratégia para a obtenção das acil-hidrazonas alvo desse estudo.

A quinolona **1** foi preparada por dois métodos distintos. O primeiro deles (*Método A*), consistiu em uma sequência de três etapas, a partir do aduto de Morita-Baylis-Hillman derivado do 2-nitro-benzaldeído, por uma metodologia desenvolvida por Coelho e colaboradores,[113] e o segundo (*Método B*), através de uma condensação entre anilina e dietil(etoximetileno)malonato (DEEMM). [114]

A hidrazida **2** foi preparada por método relatado na literatura,[115] a partir da 3-carboxi-4-quinolona em etanol, na presença de hidrazina monohidratada (50 %). A hidrazida **2** é convertida à acil-hidrazona pretendida, por uma reação de condensação com o correspondente aldeído aromático, utilizando método previamente relatado na literatura com modificações.[116] Os detalhes dos procedimentos e discussão dessas metodologias, se

encontram na parte experimental e discussão dos resultados, respectivamente. Os complexos acil-hidrazônicos foram preparados pela adição de sais de cobre ou zinco a uma solução do ligante (acil-hidrazonas), conforme procedimento geral descrito na literatura.[117]

Na tentativa de realizar a caracterização e determinação dos modos de ligação aos sítios de coordenação da acil-hidrazona com o íon metálico Cu (II) e Zn (II) foram utilizados os seguintes métodos: IV, RMN, espectrometria de massas, termogravimetria e análise elementar.

Todos os compostos preparados neste trabalho foram analisados utilizando os seguintes métodos espectroscópicos: IV, RMN 1D e 2D dos núcleos de ^{1}H e ^{13}C. Para a acil-hidrazona derivada do 4-nitrobenzaldeído foram conduzidos experimentos de RMN ^{1}H a alta temperatura para verificar a presença de rotâmeros e, por conseguinte, a determinação da temperatura de coalescência. Além disso, realizou-se experimentos de HMBC ^{1}H-^{15}N para duas acil-hidrazonas isoméricas derivadas do nitro benzaldeído (2 e 4-nitro benzaldeído) e NOESY para determinação da estereoquímica.

3.2 *Avaliação biológica das acil-hidrazonas*

3.2.1 Medida da atividade da AChE in vitro (Método de Ellman)

Os ensaios para avaliação da atividade anticolinesterásica foram realizados através do método colorimétrico descrito por Ellman *et al.*,[118] utilizando AChE de *Electrophorus electricus* (electric eel) - Type VI-S (Sigma-Aldrich).

Para o acompanhamento da taxa de hidrólise, a enzima foi ressuspensa em tampão Tris/HCl, 50 mM, pH 8 e diluída até uma concentração final de 1 U/mL. O reagente de Ellman foi preparado diluindo-se DTNB em tampão Tris/HCl (1 mM). O substrato iodeto de acetiltiocolina foi utilizado em uma concentração de 0,8 mM (substrato iodeto de acetiltiocolina - ATC; Aldrich Chem. Co.). Resumidamente, 125 µL de DTNB 10 mM, 50 µl de H_2O Milli-Q, 25 µl de AChE 1 U/mL e 30 µL de tacrina 2,5 µM foram adicionados em uma microplaca de 96 poços. Após 15 minutos de incubação a 25 °C, 30 µL de substrato (ATC 0,8 mM) foram adicionados. A leitura foi realizada a 415 nm a cada 30 s por 5 min em um leitor de placa (MicroplateReader Model 680, Bio-Rad Laboratories, UK).

Todos os experimentos foram feitos em triplicata. O padrão para inibição da acetilcolinesterase no teste de Ellman foi a tacrina, um conhecido inibidor de acetilcolinesterase.

Para determinação da percentagem de inibição, medidas de absorção foram tomadas, utilizando um gradiente de concentração. A concentração inibitória mínima para reduzir a atividade enzimática em 50% (IC_{50}) foi calculada usando-se o programa Graph Pad Prism 6.0e/ou Origin 8.[119]

3.2.2 Determinação do tipo de inibição sobre a AChE (cinética enzimática)

O estudo foi realizado medindo-se a atividade enzimática sobre o substrato acetiltiocolina (ATC) em quatro concentrações diferentes (0,1, 0,25, 0,5, 0,75 mM), na ausência e na presença das acil-hidrazonas inibidoras (200, 100, 50, 25 e 12,5 μM). A partir disso, os gráficos duplo-recíproco de Lineweaver-Burk (1/V versus 1/[S]) foram construídos utilizando o programa Microsoft Excel®, a fim de estimar K_m e $V_{máx}$ e determinar assim, o tipo de inibição de cada composto-teste (acil-hidrazona). As reações foram realizadas em duplicata.

3.2.3 *Docking* molecular

A minimização de energia dos ligantes propostos neste trabalho foi realizada com o pacote do programa Gaussian 09,[120] empregando o método semi-empírico Austin Model (AM1).[121] O docking molecular foi realizado no programa Autodock Vina[122] e, por último, a validação da ancoragem foi feita com o ligante E2020 (donepezila, DON) ancorado na enzima 1EVE.pdb pelo método de *redocking*.

3.2.4 Efeito das acil-hidrazonas sobre a formação de fibrilas do peptídeo β-amilóide.

A avaliação do efeito das acil-hidrazonas sobre a formação de fibrilas *β*-amilóide foi feita pelo teste de emissão de fluorescência da tioflavina-T (ThT), com excitação a 450 nm e emissão a 485 nm.[123,124]

Uma solução de cada acil-hidrazona em DMSO (0,2 mM) foi adicionada ao filme peptídico (6 mM)' e a solução resultante, sonicada por 10 min. Após este período, adicionou-se 29 μL de HCl 10 mM ao meio (Composto-teste + Aβ_{42} + DMSO + HCl). O peptídeo Aβ_{42}

na presença de HCl é utilizado como controle (Aβ_{42} + DMSO + HCl) de formação de fibrilas e o peptídeo Aβ em DMSO é usado como branco (Aβ_{42} + DMSO). Após a primeira leitura (t_0), a placa é incubada por 24 h à 37 °C e, em seguida uma nova leitura é realizada após 24 h (t_{24}).

Com a formação das fibrilas em meio ácido, a fluorescência deverá aumentar após 24 h. Na presença de um inibidor, por sua vez, espera-se que a formação de fibrilas do peptídeo βA diminua. Isso é verificado pela diminuição da emissão de fluorescência da tioflavina T. O percentual de inibição (*% I*) é calculado pela fórmula abaixo, onde, t_{24} é a emissão após 24 h e t_0 a emissão inicial, conforme fórmula seguinte.

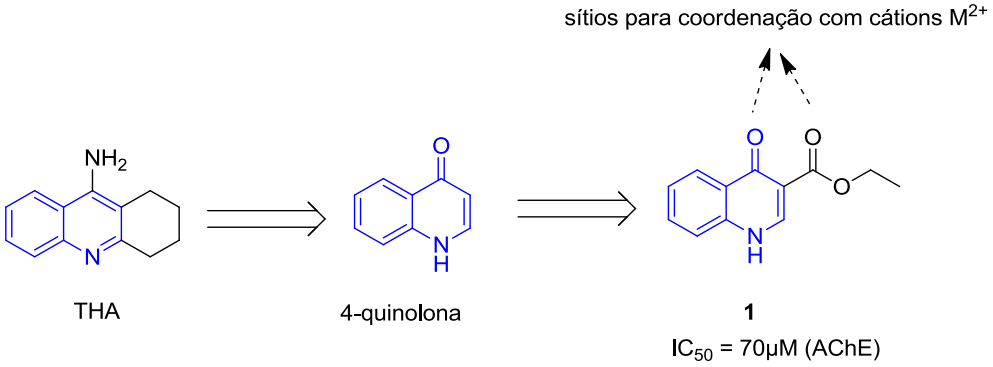
$$I\% = \frac{\left(t_{24} - t_0\right)}{t_{24}} x100$$

4 Resultados e Discussão

4.1 *Desenvolvimento de acil-hidrazonas como inibidor multi-alvo da DA*

Estudos preliminares com diversas estruturas contendo a subunidade 3-carboetoxi-4-quinolona nos incentivaram a explorar o potencial dessas quinolonas como agentes que pudessem interagir com alvos para o desenvolvimento de fármacos para a doença de Alzheimer, no caso, acetilcolinesterase e peptídeo *β*-amilóide.

A 3-carboetoxi-4-quinolona (**1**, *Esquema 1*) inicialmente foi planejada com base na estrutura da tacrina (THA), potente inibidor da AChE, que, embora tenha sido utilizada como fármaco anti-DA, foi retirada do mercado devido à sua elevada hepatotoxicidade.[125]



Esquema 1. Planejamento da 3-carboetoxi-4-quinolona, tendo a tacrina (THA) como protótipo.

A ideia consistiu em simplificar a estrutura da tacrina, removendo a porção cicloexânica do núcleo tetraidroacridínico. Considerando que na DA, há um aumento da concentração de íons metálicos Zn^{2+} e Cu^{2+} no SNC, foi introduzido um grupo carboxila/carboetoxi, visando explorar a capacidade quelante das duas carbonilas, aumentando a potencialidade do composto **1**, um protótipo para o desenvolvimento de fármacos para a DA.

Em 2013, da Silva[112a] sintetizou e avaliou a quinolona **1** quanto ao efeito inibitório sobre a AChE, obtendo um IC_{50} de 70 μM. Estudos de ancoramento molecular (*docking*) realizado no programa *Molegro Virtual Docking* mostraram que as quinolonas interagiam com o sítio catalítico da AChE de maneira semelhante à tacrina (Trp84 ou Trp86).

Na *Figura 13* observa-se as poses de interação da 4-oxo-1,4-diidroquinolina-3-ácido carboxílico com o sítio ativo da AChE (1E66.pdb e 1B41.pdb).

A observação mais importante desses estudos de ancoragem molecular é que o ligante quinolona interage com dois resíduos do sítio esterásico, Trp84 (Trp86) e Trp334 (Trp337), através de uma interação do tipo π- stacking com o primeiro resíduo, semelhante ao feito pela THA (*Figura 14*), e uma segunda interação com o Trp334 (Trp337), através de uma ligação de hidrogênio. Adicionalmente, há outra ligação de H com His440 que compõe a tríade catalítica.[126]

Anteriormente, também em nosso laboratório, Huber e colaboradores[110b] estudaram o efeito de 4-quinolonas sobre a fibrilização do peptídeo Aβ, monitorando a formação das fibrilas do peptídeo β-amilóide por microscopia de força atômica (MFA), emissão de fluorescência da tioflavina-T e eletroforese.

Nesse estudo, verificou-se que a quinolona **1** é capaz de reduzir a formação de fibrilas em cerca de 50%. Com o estímulo desses resultados e pelo fato de que o grupo quinolônico tem pouca citação na literatura,[127] decidimos explorá-la como protótipo para o desenvolvimento de inibidores mais potentes.

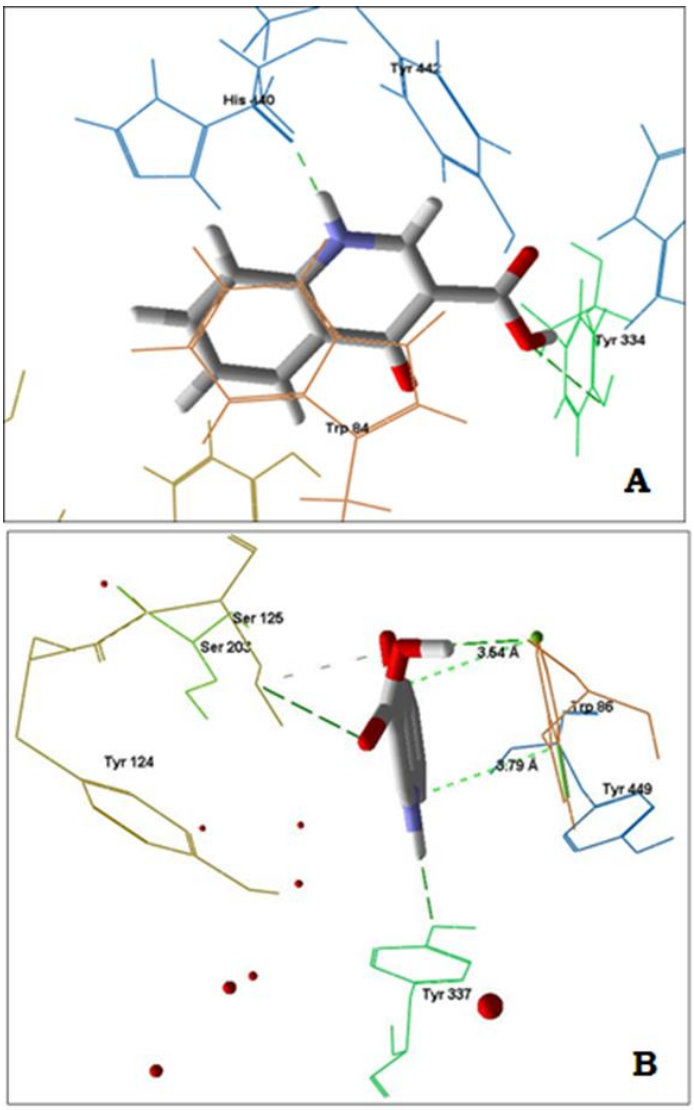


Figura 13. **A -** Visão frontal da interação da quinolona com o sítio Trp84 da AChE 1E66; **B -** Visão perpendicular da Interação da quinolona com o sítio Trp86 da AChE humana 1B41.

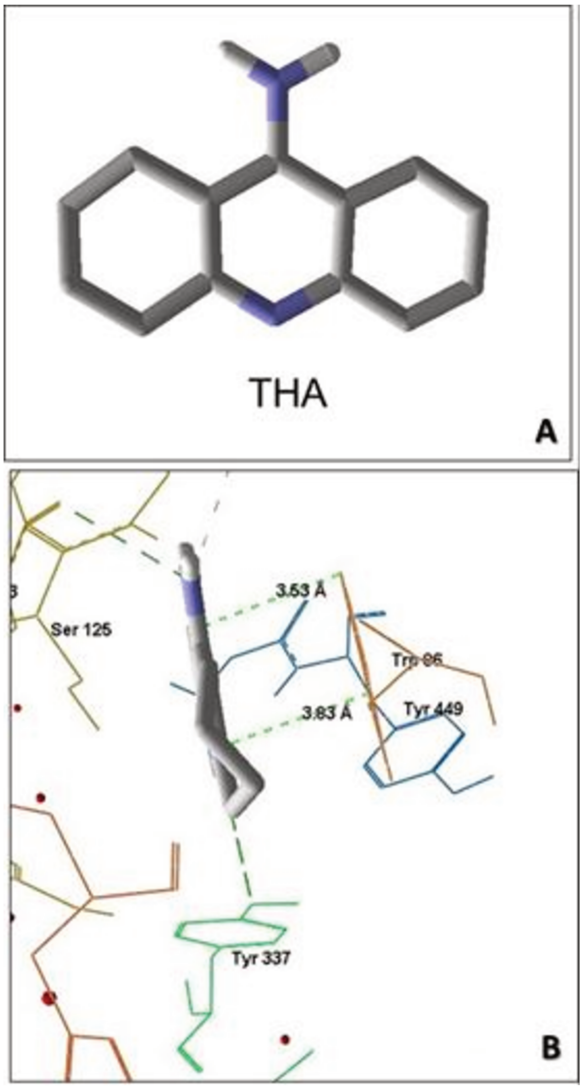


Figura 14. A - Vista frontal da estrutura da tacrina minimizada; B - Interação π-stacking da THA com Trp86 da AChE humana 1B41.

A proposta para esses novos análogos consistiu em desenvolver outras quinolonas que pudessem atuar como duplo-ligantes para a enzima AChE, considerando a importância de seus dois sítios ligantes: o catalítico e o periférico, inserindo na estrutura dos compostos a serem estudados, grupos funcionais que pudessem se complementar aos principais resíduos de triptofano presentes nesses dois sítios enzimáticos.

Para tal fim seria necessário uma estrutura contendo um espaçador, que permitisse o posicionamento adequado da porção quinolônica e uma porção hidrofóbica “terminal”, para interagir com o sítio periférico.

Dentre as diferentes possibilidades de espaçadores, a função acil-hidrazona, já comentada, foi selecionada para desempenhar esse papel (*Figura 15*). Além da função de espaçador, considerou-se também, a possibilidade de haver interações adicionais com outros resíduos de aminoácidos posicionadas entre os sítios ligantes da enzima.

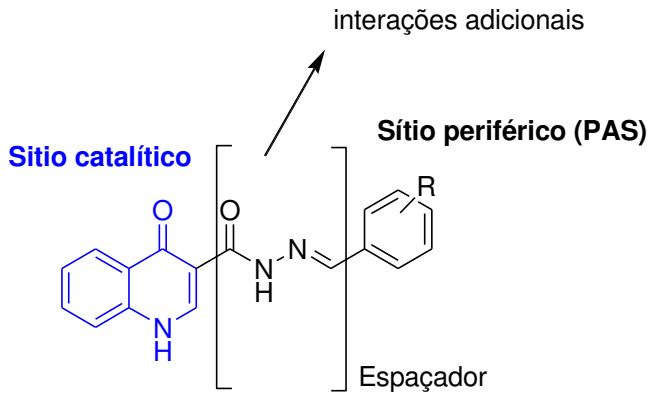


Figura 15. Estrutura geral proposta para os compostos-alvo desse estudo, indicando a função de cada uma de suas subunidades. (R = grupos doadores e receptores de eletrons).

A estrutura proposta criou também a expectativa de ação sobre outros alvos importantes na Doença de Alzheimer. Em relação à interação com o peptídeo Aβ, já havia sido descrito o papel do núcleo quinolônico na inibição da formação de fibrilas desse peptídeo.[112b]

Assim, a manutenção dessa subunidade estrutural pode permitir a manutenção da atividade inibitória da formação de fibrilas. Outro aspecto importante é o papel das duas carbonilas do núcleo quinolônico como grupos capazes de coordenar íons metálicos.[128]

Dada à simplicidade de síntese de acil-hidrazonas e a possibilide de interferir no processo de dois alvos moleculares, inibição da AChE e no processo de fibrilização do peptídeo β-amilóide, seria possível preparar uma série de derivados acil-hidrazônicos com potencial a candidatos multi-alvo para o desenvolvimento de fármacos para a DA. Possivelmente, esta série acil-hidrazônica terá potencial inibitório ainda melhor que as observadas nesse estudo prévio com as quinolonas.

4.2 *Química*

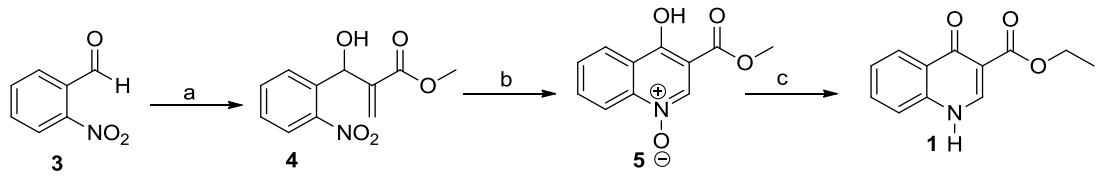
4.2.1 Obtenção da 4-oxo-1,4-diidroquinolina-3-carboxilato de etila (1)

A 4-oxo-l*H*-quinolina (**1**) é um intermediário sintético fundamental para a obtenção das acil-hidrazonas. Nesse projeto, a quinolona foi obtida por dois métodos distintos. O primeiro método utilizado foi via reações consecutivas de ciclização de um aduto de Baylis-Hillman e posterior redução do *N*-óxido.

Com o objetivo de otimizar tempo e custo optamos pela tentativa de uma segunda metodologia para a obtenção da quinolona. Com esse fim, então escolhemos uma nova metodologia baseada na literatura, no qual a 4-oxo-1,4-diidroquinolina-3-carboxilato de etila **1** é preparada em uma única etapa com a anilina reagindo com dietil(etoximetileno)malonato (Método B). Mais detalhes sobre os aparatos sintéticos, descrição expectroscópica e mecanismo reacional serão descritos nos tópicos a seguir.

4.2.1.1 Método A: obtenção da 4-oxo-1*H*-quinolina via MBH

O primeiro método (Método A) foi feito em três etapas utilizando a reação de Morita-Baylis-Hillman (MBH) tal como mostra o *Esquema 2*.[129]



Reagentes e condições. [a] acrilato de metila, DABCO,))) , 8h, t.a., 80 %.; [b] ácido trifluoroacético, 20 h, 70–75 °C, 80-90 %; [c] $Mo(CO)_6$, EtOH, 43 min, 25 °C, 65 %.

Esquema 2. Preparo da 4-oxo-*1H*-quinolina **1** via aduto MBH

Na primeira etapa, o 2-nitro-benzaldeído **3** foi convertido ao correspondente aduto de MBH **4** em 80% de rendimento, pelo tratamento com excesso de acrilato de metila, na presença do catalisador 1,4-diazabiciclo[2.2.2]octano (DABCO) em irradiação de ultrassom.

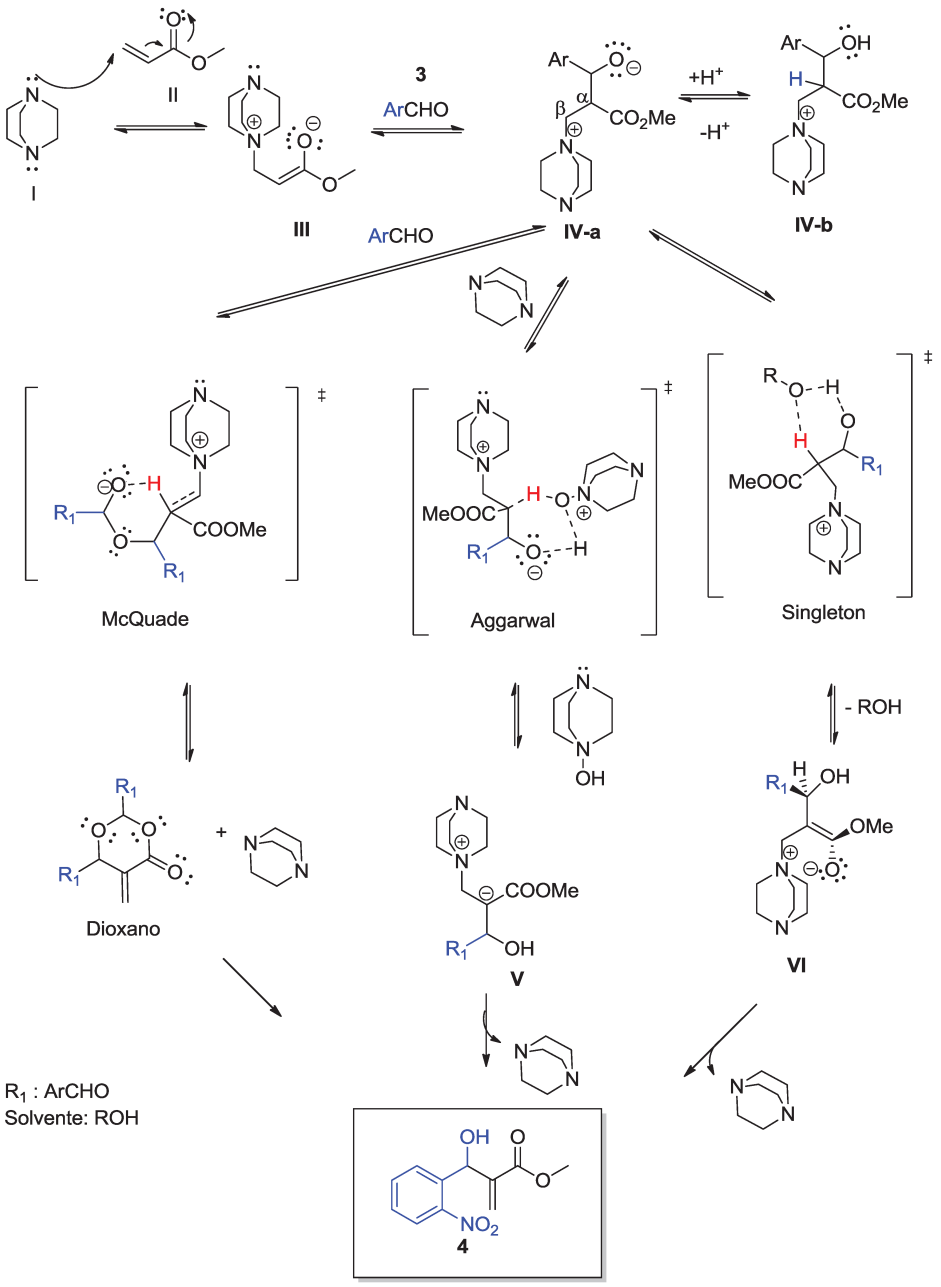
O mecanismo proposto da reação de MBH (*Esquema 3*), especificamente para o 2-nitrobenzaldeído, considera que em uma primeira etapa ocorre uma adição de aza-Michael reversível do catalisador DABCO (**I**) ao sistema olefínico α,β-insaturado do acrilato de metila

(**II**) levando a formação do enolato **III**. Este, por sua vez, sofre uma reação aldólica com nitrobenzaldeído **3** levando as estruturas **IV-a**. A partir dessa etapa de formação do produto aldol (**IV-a**), há algumas interessantes discussões quanto ao mecanismo da reação que leva a formação do aduto de MBH **4**.[130]

Duas propostas mecanísticas mais aceita foram estudadas por McQuade[131] e Aggarwal[132] (*Esquema 3*). De acordo com McQuade, uma segunda molécula de aldeído é adicionada ao produto de aldol, de modo a formar o intermediário hemiacetal. A transferência de prótons envolve um estado de transição cíclica de seis membros e, na sequência, o catalisador e um subproduto dioxanona são eliminados para formar o aduto de MBH **4**.

Estudo cinético e teórico de Aggarwal,[130] por sua vez, considera que ocorre a autocatálise na etapa de transferência de prótons. Desse ponto, espécies próticas (aduto ou solventes) auxiliadas por uma ligação de hidrogênio pode levar ao intermediário cíclico. Nesse ponto da reação considera-se que há uma etapa de prototropia que leva a uma interação com outra molécula de DABCO. O intermediário se degrada levando a formação de um novo zwiterion (**V**). Este, por sua vez, se degrada levando a regeneração do catalisador e assim conduz a formação do β-hidroxi-α-metileno carbonilado **4** desejado. Em ambos os casos, o intermediário hemiacetal cíclico formado parece ter um papel importante na etapa de transferência de prótons.

Mais recentemente Plata e Singleton[33] propuseram um mecanismo de MBH diferente, no qual a via de transporte de protóns é refutada. Ao invés disso, um mecanismo de equilíbrio ácido-base é proposto tendo como base estudos de RMN e cálculos teóricos.



Esquema 3. Propostas mecanísticas de McQuade,[131] Aggarwal,[132] e Singleton[133] para a formação do aduto de MBH.

Como a conversão não catalisada de **III** a **VI-b** não é sustentável devido à conhecida lentidão de transferência direta de próton 1,3-intramolecular.[134] Logo, seria mais provável que **VI-a,** pode reagir em uma reação ácido-base formando **IV-b**.

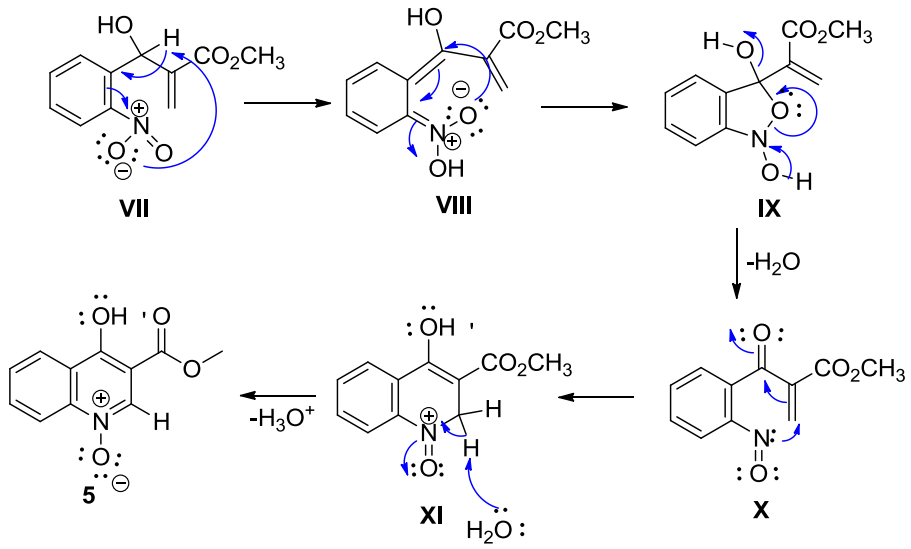
Nessa proposta de Singleton considera-se que **IV-a** ou **IV-b,** conduzem a estrutura de transição (**VI**).[131] Para a formação da proposta desse intermediário **VI**, considera-

se que o íon metóxido pode realizar a desprotonação α C-H, ou ainda, pode realizar uma interação intramolecular com a hidroxila. Em ambos os casos, o solvente metanol acelera a reação mediando à reação ácido-base. Todas as estruturas de transição obtidas nesse estudo conduzem ao intermediário zwitterion **VI**. Este, por sua vez, rearranja-se eletrônicamente liberando DABCO e conduzindo ao aduto de MBH (**4**) desejado (*Esquema 3*).

Feitas as considerações sobre o mecanismo da reação de MBH, passamos a análise estrutural. Tendo o produto desejado em mãos (**4**), este foi caracterizado por métodos espectroscópicos. Destacando-se, no espectro de infravermelho, as absorções da C=O e C=C conjugadas, em 1722 cm^{-1} e 1633 $cm^{-1,}$ respectivamente, além da absorção em atribuída à ligação O-H em 3394 cm^{-1} .

No espectro de RMN de ^{1}H, foram observados dois singletos em δ 6,20 e 6,37 ppm, integrando para 1H cada um, correspondentes aos hidrogênios vinílicos. Adicionalmente, observa-se dois singletos, um pequeno e largo correspondente ao hidrogênio carbinólico em δ 3,42 ppm, e outro longo em δ 3,73 ppm, integrando para 3H, correspondente ao grupo metila do éster, além dos sinais dos hidrogênios aromáticos como esperado. Como esperado, o espectro de RMN de ^{13}C mostrou sinais característicos do aduto de MBH **4** formado. Destacando-se dentre estas, as absorções em δ 67,8 (*CH*-OH), 126,5 (CH_2=C) e 166,4 (C=O). Todos os dados espectroscópicos são compatíveis com os descritos na literatura.[134]

Dando sequência à síntese da quinolona, o aduto de MBH **4** foi convertido ao *N*-óxido **5** na presença de ácido trifluoroacético (TFA) em 90 % de rendimento. De acordo com o mecanismo proposto por Kim e colaboradores,[135] essa reação de ciclização envolve a protonação do oxigênio do grupo nitro (**VII**), levando ao intermediário **VIII**, que cicliza para formar o *N*,*O*-acetal cíclico I**X**. A abertura do anel de cinco membros resulta no *β*-oxoacrilato **X**, que novamente cicliza gerando o precursor **XI**, que aromatiza formando o *N*-óxido **5** (*Esquema 4*).



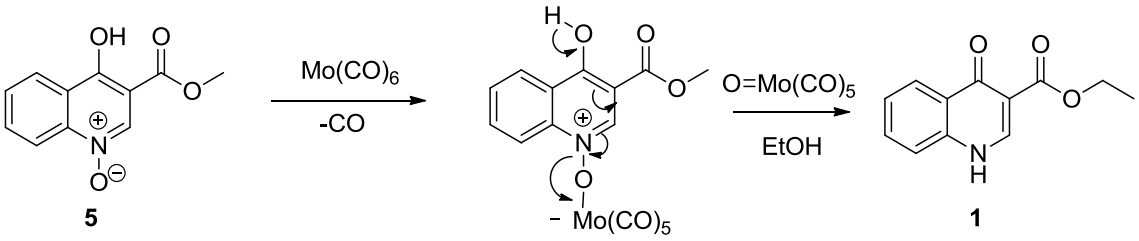
Esquema 4. Mecanismo proposto por Kim e colaboradores[135] para ciclização do aduto de MBH levando ao N-óxido **5**.

O espectro de infravermelho apresentou como principais absorções as bandas em 3448 e 1707 cm^{-1}, atribuídas ao estiramento da ligação hidroxila e à carbonila de éster, respectivamente. No espectro de RMN de ^{1}H do *N*-óxido observa-se o desaparecimento da absorção dos prótons vinílicos, e o aparecimento do singleto em δ 12,75 ppm atribuído ao próton da hidroxila ligada ao anel quinolina. Observa-se tambem um sinal em δ 8,73 quinolínico em posição alfa ao grupo *N*-óxido. No espectro de RMN de ^{13}C, por sua vez, não foi detectado o sinal do carbono carbinólico em 67,8 ppm, do material de partida. Foram detectados um CH em δ 145,5 ppm correspondente ao carbono em posição *α* ao grupo nitro da quinolona, bem como absorção de carbonos das carbonilas do éster e da quinolona em δ 165,0 ppm e δ 172,3 ppm , respectivamente.

Tendo em mãos o *N*-óxido **5**, foi possível dar seguimento ao protocolo de síntese da quinolona. Nesta etapa, **5** foi submetido a uma redução utilizando quantidades estequiométricas de hexacarbonilmolibdato em etanol, sob refluxo.

Um mecanismo plausível para a formação da quinolona **1** é proposto por Yoo e colaboradores[137] para a redução da ligação N-O do grupo *N*-óxido de **5**. O oxigênio da função *N*-óxido de **5** faz um ataque ao molibdênio, deslocando um ligante CO. O intermediário formado decompõe para gerar a 4-oxo-1,4-diidroquinolina-3-carboxilato de etila **1**, em 65% de rendimento. A função éster sofreu uma reação de transesterificação com o solvente etanol,

de modo que não foi observada a formação da correspondente 4-oxo-1,4-diidroquinolina-3-carboxilato de metila.



Esquema 5. Etapas envolvidas na formação da 4-oxo-1,4-diidroquinolina-3-carboxilato de etila **1**, na presença de hexacarbonilmolibdênio.

Tendo o *N*-óxido **5** em mãos, partimos para a síntese da 4-oxo-1,4-diidroquinolina-3-carboxilato de etila (**1**) desejada. Pela análise do espectro no IV do produto de reação, verificou-se o aparecimento da absorção em 1682 cm^{-1} característica de C=O da 4-oxo-1,4-diidroquinolina e a absorção em 1705 cm^{-1} atribuída à C=O do grupo éster.

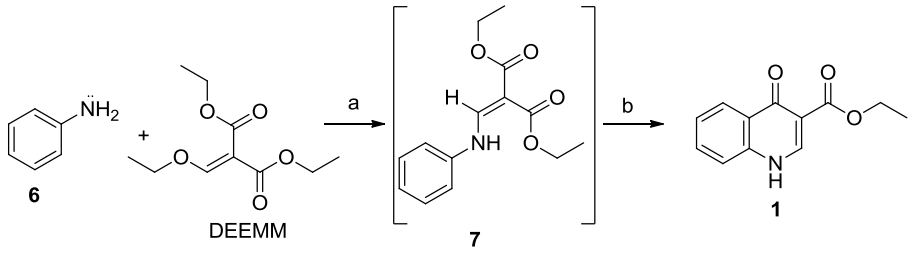
No espectro de RMN de ^{1}H do produto de reação observamos um singleto em δ 9,38 ppm atribuído ao hidrogênio em posição alfa ao grupo nitrogênio quinolínico. Além dos sinais típicos de hidrogênios aromáticos, observa-se também o aparecimento de um quarteto em δ 5,34 ppm, integrando para 2H, e um tripleto em δ 2,20 ppm, integrando para 3H. Estes sinais são correspondentes aos hidrogênios do grupo etila.

O espectro de RMN de ^{13}C apresenta como sinais mais característicos da formação do produto, dois carbonos quaternários em δ_C = 171,7 e δ = 167,5 ppm, atribuídos respectivamente às carbonilas da cetona e do éster, respectivamente. Também visualizamos os sinais correspondentes aos grupos metileno (CH_2) e metila (CH_3) da porção etila em δ 64,81 e δ 12,23, respectivamente.

No início do trabalho, toda a 4-oxo-1*H*-quinolina **1** utilizada na obtenção das acil-hidrazonas foi preparada por essa sequênica de etapas.

4.2.1.2 Método B: obtenção do núcleo 3-carboetoxi-4-quinolona via condensação com DEEMM.

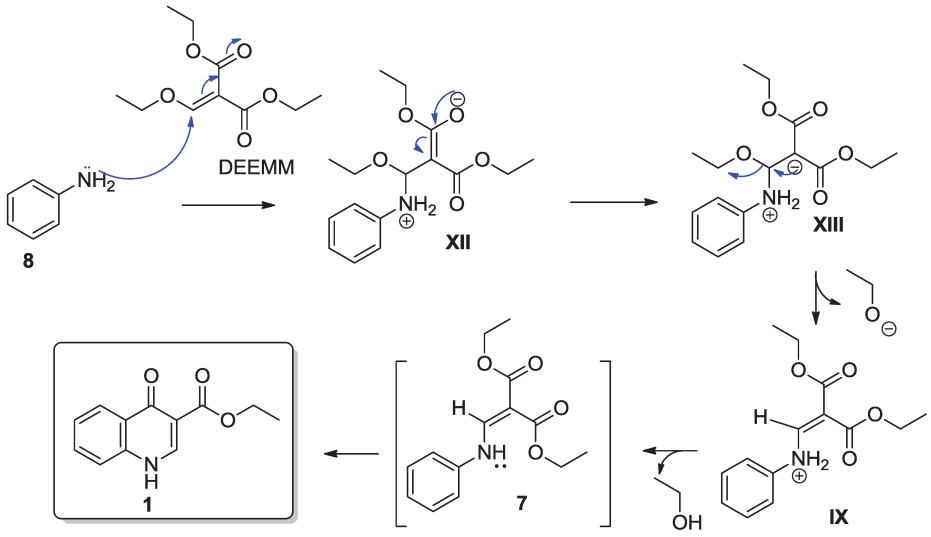
Com o objetivo de otimizar tempo, custo e rendimento reacional, foi utilizada uma segunda metodologia. Nessa, a 3-carboetoxi-4-quinolona **1** foi preparada em uma única etapa, pela ciclização do intermediário **7** (*Esquema 6*), formado pelo ataque nucleofílico da amina da anilina **6** ao carbono mais eletrofílico do dietiletoximalonato (DEEMM).[137] Embora a caracterização do intermediário **7,** tenha sido dificultada devido sua rápida decomposição, foi possível separá-lo por cromatografia de coluna em silica gel e identificá-lo por ressonacia magnética nuclear do próton. O dados obtidos do espectro de RMN ^{1}H do intermediário **7** está de acordo com dados relatados por Banerji *et al*.[138]



Reagentes e condições. [a] DEEMM, Δ, 1h; [b] difenil eter, 120 °C, 24 h

Esquema 6. Reação para obtenção da quinolona **1** via DEEMM

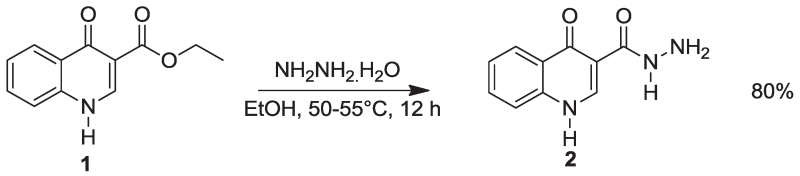
Considerando o mecanismo dessa reação, apresentado no *Esquema 7*, a amina aromática **6** age como nucléofilo atacando o carbono *β*-insaturado do DEEMM que é altamente eletrofílico formando o zwiterion **XII**. Este sofre rearranjo formando o intermediário **XIII** que possui uma carga entre duas carbonilas. Isto dar a possibilidade de ressonância eletrônica, o que dar a este intermediário certa estabilidade. Este intermediário **XIII**, por sua vez, tem a capacidade de restabelecer a ligação dupla, liberando um etóxido levando a formação do intermediário **IX**. Reação ácido-base com etoxi forma o intermediário **7** que pode pode ciclizar-se formando a quinolona **1**.



Esquema 7. Mecanismo da reação em DEEMM para obtenção da quinolona **1** via intermediário **7**. [139]

4.2.2 Obtenção da 1,4-diidroquinolona-3-carboidrazida (2)

Tendo em mãos a quinolona **1** chave para o preparo das acil-hidrazonas desejadas, deu-se prosseguimento à síntese das acil-hidrazonas, preparando a hidrazida **2** (*Esquema 8*). Esse composto foi obtido por uma reação de adição nucleofílica e eliminação em carbono sp^2 da quinolona **1** com excesso de hidrazina monohidratada (50 %). A hidrazida **2** foi obtida como um sólido amarelo não cristalino em 80 % de rendimento.



Esquema 8. Obtenção da hidrazida **2** a partir da quinolona **1**.

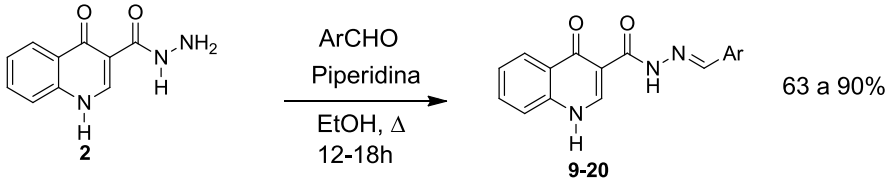
Na análise do espectro de IV observa-se o desaparecimento da absorção em 1705 cm^{-1} característica de C=O de ésteres α,β-insaturados. Em contrapartida observa-se um sinal em 1676 cm^{-1} característico de uma absorção de C=O de amida. No espectro de RMN ^1H em DMSO-d_6 confirmou-se a estrutura da hidrazida pela presença de sinal de próton característico em 10,74 ppm atribuído ao H da amida formada, embora não tenha sido detectada absorção correspondente aos prótons do grupo NH_2.

O espectro de RMN de ^{13}C também mostrou sinal característico da carbonila da hidrazida formada. Visualiza-se a absorção da carbonila amídica em δ 164,6 (C=O). Adicionalmente, o espectro de HMBC de **2** confirma a formação da ligação amida pela correlação encontrada do próton da amida (H_{12}) com a carbonila da amida (Ver anexo - *Figura 61. Expansão do espectro de HMBC $^{13C\text{-}1H}$ (400/100 MHz, DMSO-d6) da hidrazida* ***2.***) Os demais sinais observados no espectro são equivalentes ao núcleo quinolônico e estão de acordo com a literatura.[140]

4.2.3 Obtenção das acil-hidrazonas

A reação da hidrazida **2** com aldeídos aromáticos com diferentes padrões de substituição permitiu a preparação da série de derivados acil hidrazônicos **9-20**. A reação ocorreu em refluxo de etanol, com tempo reacional variando de 12 a 18 h. Os rendimentos químicos se encontram na *Tabela 4*.

Tabela 4. Estrutura das acil-hidrazonas preparadas e seus respectivos rendimentos.



2 **9-20**

Acil-hidrazona	Cadeia lateral (Ar)	Rendimento (%)
9	Fenila	68
10	4-clorofenila	72
11	3-clorofenila	63
12	2,3-diclorofenila	65
13	4-nitrofenila	90
14	2-nitrofenila	84
15	4-metilsulfonilfenila	63
16	4-metiltiofenila	85
17	4-(2-tiofenila)	79
18	4-metoxifenila	84
19	4-trifluorofenila	90
20	3,4-(dimetilenodioxi)	85

Pela análise por espectrometria de massas, o percentual de erro de massa ficou entre 0,002 e 0,009 %. Como não obtivemos monocristais dos compostos sintetizados não foi possível realizar análise por Difração de Raios-X.

A caracterização estrutural foi feita por análises espectroscópicas de IV, RMN 1D e 2D de ^{1}H e ^{13}C. De um modo geral, as estruturas das acil hidrazonas foram identificadas devido ao aparecimento de sinais característicos. Principalmente, devido a presença do sinal do próton da ligação imina (N=CH), na região em torno de δ 8,50 ppm. Além disso, observaram-se sinais do grupo arila substituído. Nas acil-hidrazonas, o sinal do próton do núcleo quinolônico proveniente da hidrazida **2** é modificado pelo ambiente químico tornando-se mais desblindado. Desse modo, espera-se que esse sinal apareça em valores de δ ainda mais altos. Como previsto, esse sinal aparece em torno de δ = 13,5 ppm, enquanto que na hidrazida esse sinal era em 10,74 ppm, como já dito anteriormente.

Com o objetivo de estudar detalhes estruturais relevantes como estereoquímica e conformação, experimentos de RMN 1D e 2D (Homonuclear e heteronuclear) foram realizados. A formação de possíveis isômeros conformacionais poderia ser estudada por análise espectral de RMN de ^{1}H em DMSO-d_6 em diferentes temperaturas e para análise tridimensional experimentos de NOESY. Outra possibilidade estrutural interessante que deveria ser considerada era a obtenção de compostos tautoméricos devido à possível interconversão imina-enamina. Os dados obtidos deste estudo encontram-se discutidos nos tópicos a seguir.

4.2.4 Análise estrutural das acil-hidrazonas por RMN 1D e 2D

No estudo realizado com as acil-hidrazonas sintetizadas foram considerados três aspectos relevantes: o primeiro, foi a detecção nos espectros de RMN de ^{1}H de todas as acil-hidrazonas sintetizadas, de dois singletes entre 13,30 e 14,28 ppm, referentes ao próton da amida (*Figura 16*). A duplicação do singleto pode estar relacionada à presença de rotâmeros do grupo amida. Segundo, a possível presença de isômeros *E* ou *Z* em relação à configuração da ligação C=N (B) e, por último, a presença ou não de tautômeros do tipo imina-enamina (C).

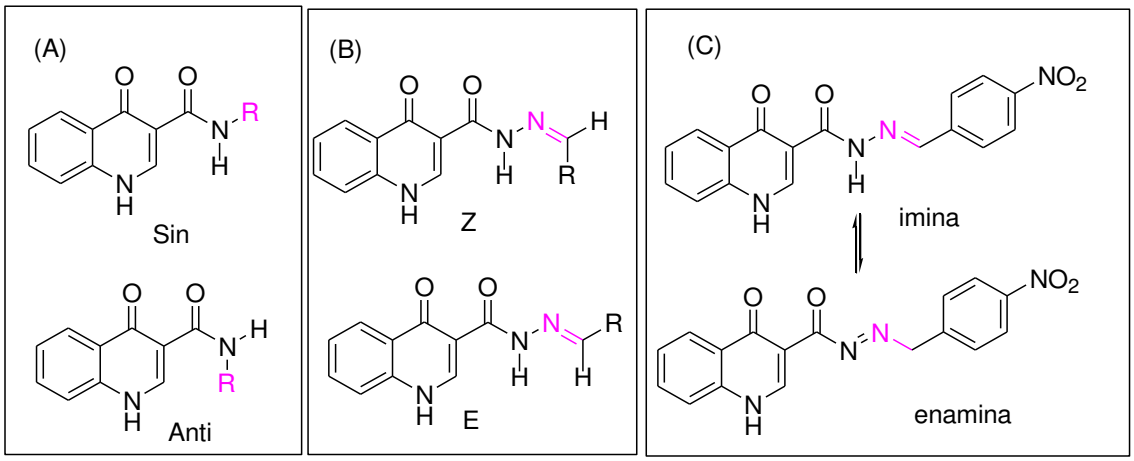


Figura 16. Variação da estrutura dos ligantes considerando os dois seguintes pontos: A) conformações da amida anti e sin; B) configurações *E* e *Z* da imina (C=N); C) tautômeros imina-enamina.

A estratégia utilizada para relacionar as absorções dos sinais duplicados em torno de 13,50 ppm foi a realização de experimentos de RMN utilizando o método de coalescência dependente do aumento da temperatura.[141] Com o aumento de temperatura há um aumento da liberdade rotacional da ligação N–C(O) e assim, os confôrmeros rotacionais se interconvertem cada vez mais rápido. A velocidade de interconversão entre estes confôrmeros passa a ser tão rápida que o duplo sinal pode tornar-se apenas um único sinal no espectro de RMN.

Assim, poderemos encontrar a temperatura de coalescência que é exatamente a temperatura, na qual há a fusão dos dois picos encontrados em torno de 13,50 ppm do espectro de RMN e, com essa evidência confirmamos a presença de rotâmeros conformacionais das acil-hidrazonas. Com tal fim, usando essa estratégia dependente de temperatura, foram realizados experimentos de RMN ^{1}H do composto N-4-(nitrofenil)metilideno]-4-oxo-1,4-diidroquinolina-3-carboidrazida **13** a 25, 80 e 120 °C. O resultado dos espectros obtidos encontra-se na *Figura 17*.

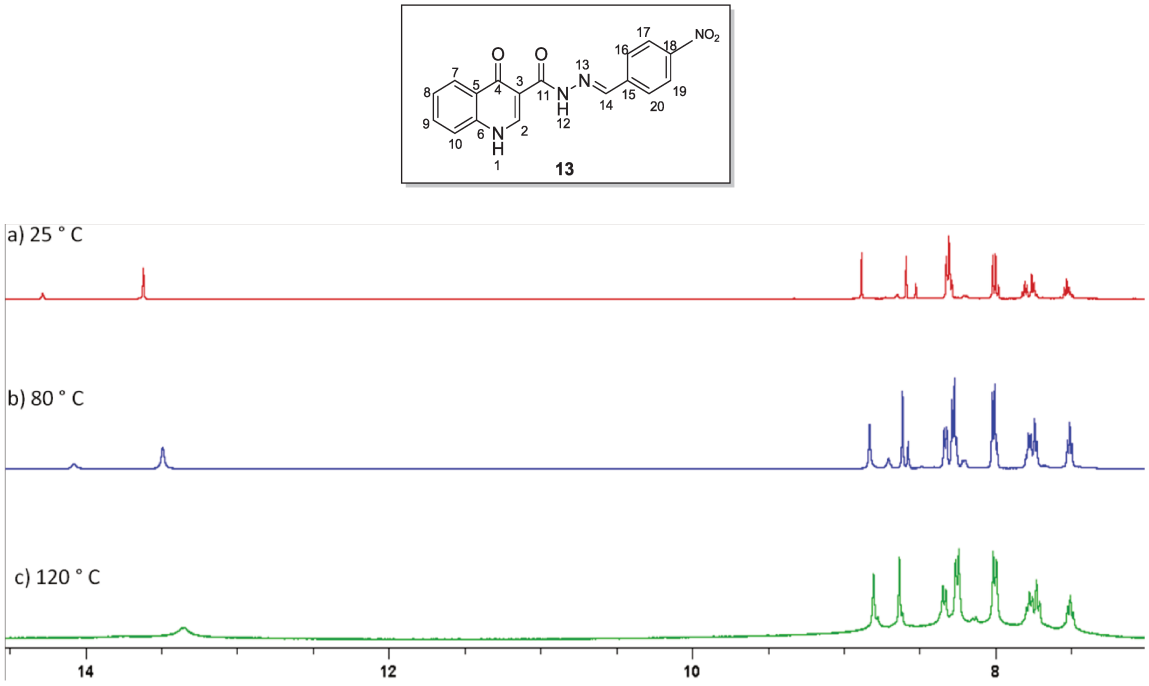


Figura 17. Expansão dos espectros de RMN ^{1}H da acil-hidrazona **13** em DMSO-d_6 nas seguintes temperaturas a) 25 °C b) 80 °C e c) 120 °C.

Observou-se que a 25 °C (a) há dois singletos correspondentes ao hidrogênio H-12 em 13,20-13,75 ppm. Essa mesma característica foi observada para os sinais dos prótons de H-2 e H-14 em 8,30-8,88 ppm.

À medida que a temperatura aumenta, observou-se a coalescência gradativa destes sinais de 80 °C (b) a 120 °C (c). A completa coalescência, com o aparecimento de apenas um pico aconteceu a 120 °C. O aumento da temperatura permite que a energia necessária para vencer a barreira rotacional seja alcançada rapidamente, conduzindo a uma rápida interconversão entre os confôrmeros.[142] Como todas as acil-hidrazonas apresentam uma duplicação do singleto na região da amida, por inferência acreditou-se que os compostos hidrazônicos sintetizados se apresentam como rotâmeros em DMSO-d_6, à temperatura ambiente.

A respeito da ligação C=N da função imina, duas configurações *E* e *Z* são possíveis, mas para esta série acil-hidrazônica, não se detectou mistura desses isômeros configuracionais, pois não há duplicação de sinais nos espectros de RMN. Portanto, apenas um dos isômeros foi obtido. Tendo como meta definir a estereoquímica relativa da acil-

hidrazona, foi realizado o experimento de NOE (*Nuclear Overhauser Effect*), no qual é possível observar as relações espaciais da molécula.

No espectro de NOESY para a acil-hidrazona **14**, observamos correlação espacial semelhante (*Figura 18*). Esse espectro do composto **14** foi selecionado para apresentação devido a uma menor quantidade de sinal de ruído comparado ao isômero **13**. Dentre as a transferência de magnetização no espectro de NOESY observadas, destacamos as correlações do hidrogênio da amina (H-12) e o próton de um dos tautômeros ligado à imina (H-14) destacado em azul. A princípio, existem duas possibilidades estruturais para esse acoplamento variando a conformação e configuração conforme apresentadas na *Figura 19*.

No entanto, para que essa correlação ocorra é ainda mais provável que os prótons devem estar do mesmo lado por serem espacialmente mais próximos. Essa informação é compatível com a configuração *E* da ligação C=N da imina.

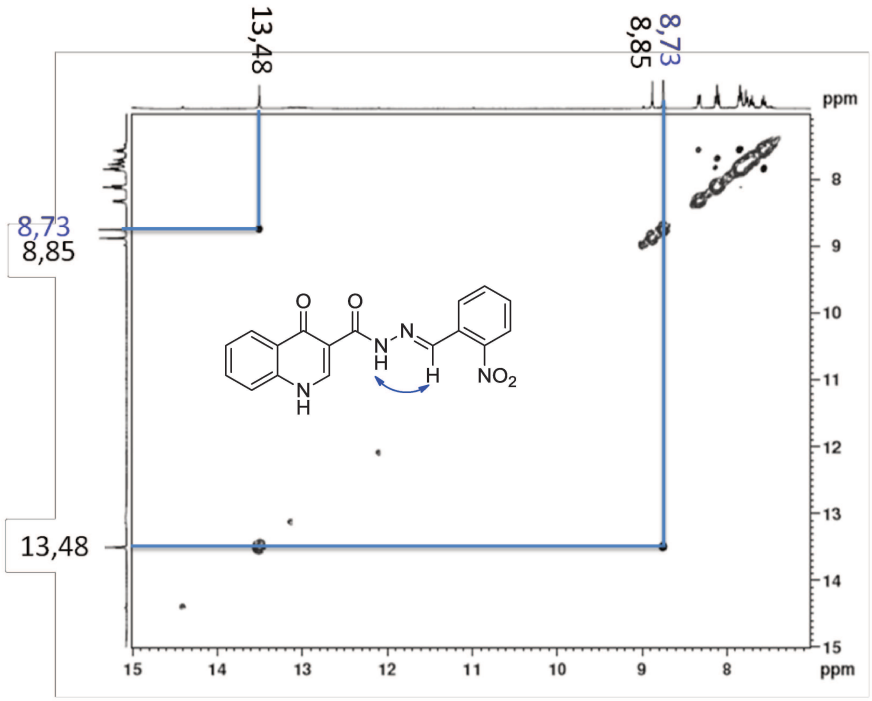


Figura 18. Expansão do NOESY da acil-hidrazona **14**.

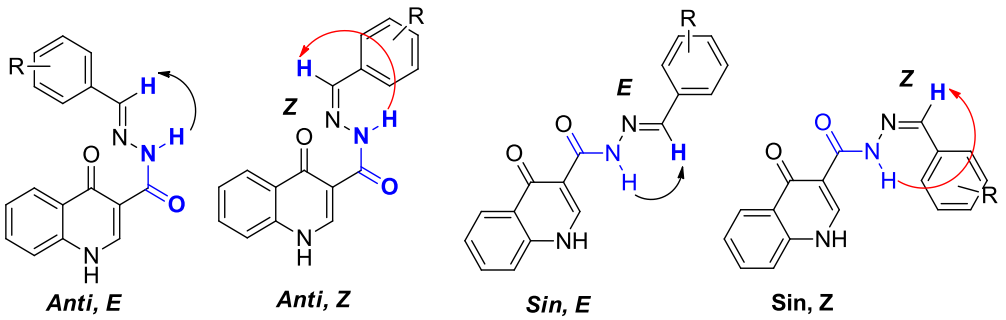


Figura 19. Possibilidades de acoplamento entre os prótons da função acil-hidrazona nas estruturas conformacionais da acil-hidrazonas: *anti-Z*, *anti-E*, *sin-E* e *sin-Z*.

Desse modo, a partir do experimento de NOESY realizado com os isômeros **13** e **14** da acil-hidrazona foi possível definir a estereoquímica da configuração *E* da ligação C=N da imina. Assim, sugere-se por inferência que as acil-hidrazonas preparadas devem ter configuração *E* para a ligação imina. Para a total caracterização das acil-hidrazonas, os espectros ^{1}H-^{15}N HMBC dos isômeros nitro-aromáticos **13** e **14** foram adquiridos (*Figura 20*).

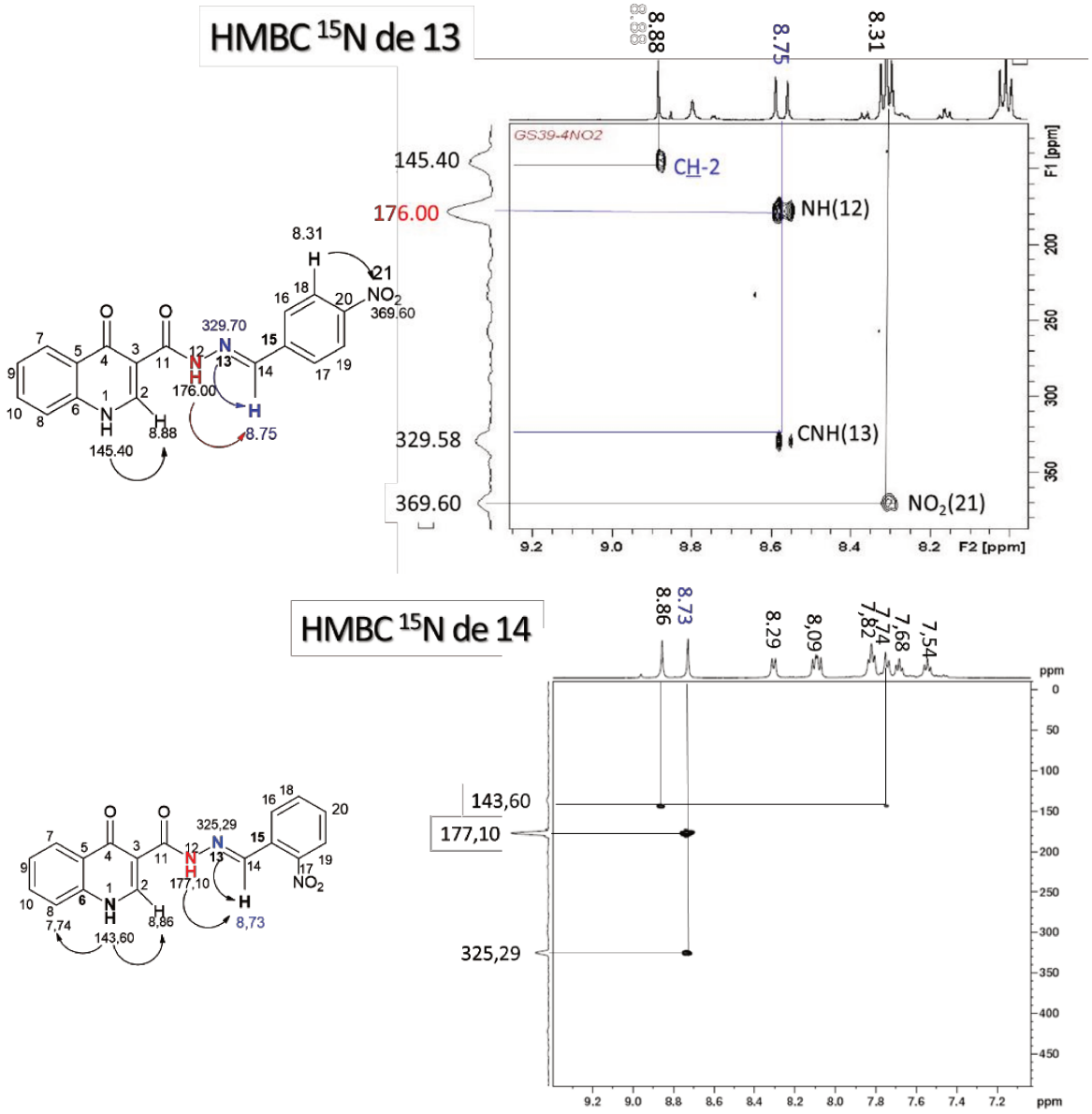


Figura 20. Expansão do espectro 2D HMBC de ^{15}N das acil-hidrazonas **13** e **14** na região de 7,0 – 9,5 ppm.

A análise revelou espectros semelhantes, exceto pelo fato de que para o composto acil-hidrazona com o grupo nitro na posição 4 do anel aromático (**13**) foi possível visualizar todos os nitrogênios presentes. Ao passo que, no espectro da acil- hidrazona **14** não observamos o nitrogênio da função nitro. O estudo de RMN usando o efeito NOE permitiu constatar que o hidrogênio ligado à função imina deve estar do mesmo lado que o grupo 2-nitro aromático, o que é compatível para a configuração *E*.

Tendo em mãos todas estas evidências espectroscópicas, concluímos que conseguimos sintetizar as acil-hidrazonas com a configuração *E*.

4.2.5 Complexos de acil-hidrazonas

4.2.5.1 Estudo da capacidade quelante dos compostos acil-hidrazonas

Outra abordagem terapêutica bastante explorada no contexto amiloidogênico é baseada na capacidade quelante dos compostos com os íons metálicos de cobre e zinco chamados de agentes de atenuação de interação metal-proteína (*metal–protein attenuating compounds*), conforme apresentado na introdução desse trabalho.[143]

Nesse contexto, merece destaque o composto clioquinol, um composto que contém o esqueleto 8-hidroxiquinolina que alcançou a fase 2.[144] e tem sido um protótipo bastante explorado na busca de novos fármacos contra a doença de Alzheimer na última década.[145] Esse conhecido quelante de estrutura 8-hidroxiquinolina foi previamente relatado por reduzir a formação de Aβ e restaurar a homeostase de íons metálicos, além de melhorar a cognição em modelos de DA de camundongo.[146]

O esqueleto hidrazônico[147] e quinolônico[148] têm sido explorados dentro desse contexto. Acreditamos que este estudo poderia ajudar a entender como potencializar a interação do ligante com o peptídeo amilóide. Dada as justificativas, propomos o estudo e avaliação das acil-hidrazonas quanto a inibição da AChE e possível modulação metálica para inibição da fibrilização do peptídeo Aβ-amilóide.

4.2.6 Preparo de complexos de cobre e zinco

Iniciou-se a preparação dos complexos metálicos com a acil-hidrazona **13**, adicionando acetato de Zn^{2+} ou Cu^{2+} a uma solução etanólica do ligante (acil-hidrazonas **13**). Foi necessário aquecer, em função da baixa solubilidade da acil-hidrazona.[115] Na tentativa de realizar a caracterização e determinação dos modos de ligação da acil-hidrazona foram utilizados os seguintes métodos: IV, RMN, espectrometria de massas, termogravimetria e análise elementar.

4.2.6.1 Espectro no Infravermelho dos complexos de cobre e zinco e do ligante

Na *Figura 21*, estão apresentados os espectros no IV da acil-hidrazona **13** comparado aos dos complexos metálicos de Zn e Cu formados denominados com as siglas **13-Cu** e **13-Zn**, respectivamente.

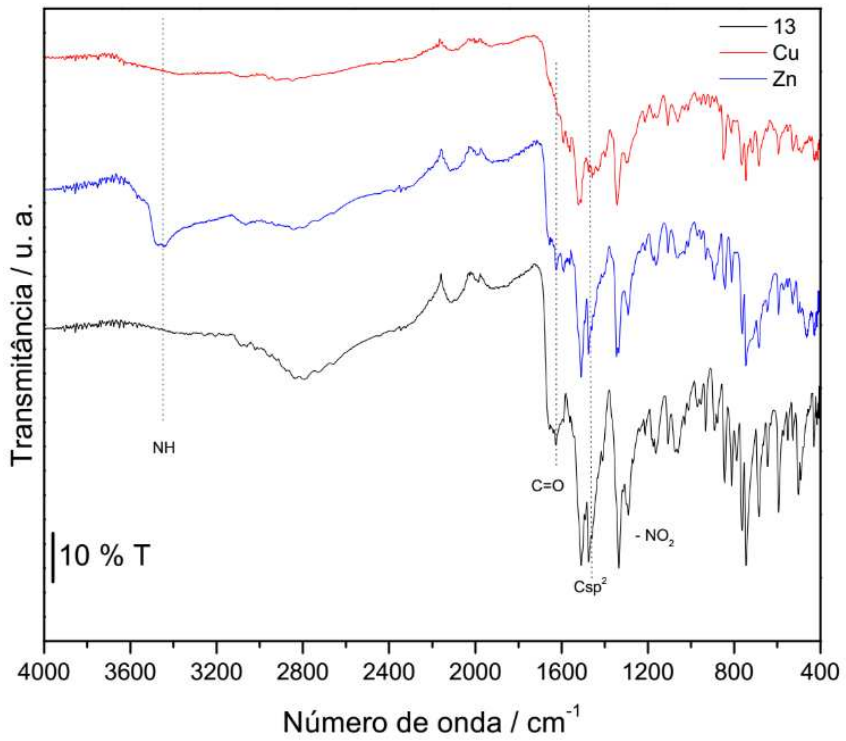


Figura 21. Espectros de IV da acil-hidrazona **13** (linha preta) e dos complexos metálico de cobre (linha vermelha) e zinco (linha azul).

Comparando o espectro de IV do material de partida **13** com os espectros dos complexos de zinco e cobre obtidos, observa-se uma nítida mudança. Observou-se que os comprimentos de onda das absorções característica da função carbonila das acil-hidrazona e quinolona nos complexos de zinco e cobre (**13-Zn** e **13-Cu**) são menores que no material de partida (**13**). Ou seja, a absorção característica da C=O do anel quinolônico apresenta-se deslocada para região de menor energia nos espectros dos complexos.

Na *Tabela 5*, observa-se que a absorção das carbonilas da hidrazida e quinolona no material de partida **13** foi de 1646 e 1626 cm^{-1}, respectivamente, enquanto que as mesmas bandas de absorção no complexo de zinco (**13-Zn**) foram de 1622 e 1592 cm^{-1} e no complexo de cobre (**13-Cu**), 1590 e 1561 cm^{-1}, respectivamente. Estas mudanças podem ser uma

evidência de coordenação da mesma com o metal. Observa-se também, que outras absorções no IV foram pouco alteradas.

Tabela 5. Bandas características de IV (cm^{-1}) da acil-hidrazona (**13**) e dos correspondentes complexos de Cu (**13-Cu**) e Zn (**13-Zn**).

ν (cm^{-1})	**13**	***13-Zn***	***13-Cu***
C=O-HN-N=	-	3470-3448	-
C=O-NH	1646	1622	1590
C=O (quinolona)	1626	1592	1561
C=N	1508	1506	1522
C=C	1475	1476	1458
NO_2	1336	1335	1343
N-N	1298	1292	1300

4.2.6.2 Caracterização por RMN do complexo de Zinco

Dando continuidade à caracterização do complexo de zinco, um estudo por RMN foi realizado. Na *Figura 22*, temos a expansão da região do espectro de RMN ^1H em DMSO-d_6 do complexo de zinco e do ligante **13** entre 7,0 e 15,0 ppm. A comparação entre os espectros de RMN da acil-hidrazona **13** e do complexo de Zn (II) obtido mostra que sem dúvida houve mudança de ambiente químico. As principais diferenças são o aparecimento de um sinal de hidrogênio adicional, alargado e curto em δ 8,99 ppm (s,1H) que deve ser proveniente da hidroxila formada a partir da tautomerização da carbonila da quinolona (C-4).

E, ainda a diminuição do sinal duplicado da amida (NH-12) em 13, 62 ppm. Sugere-se que ocorre reorganização do átomo de hidrogênio e um par de elétrons por tautomerização, restaurando-se a aromaticidade do núcleo quinolônico e formando-se à estrutura **13-OH**. A tautomerização quinolona-hidroquinolina já foi relatada na literatura.[149]

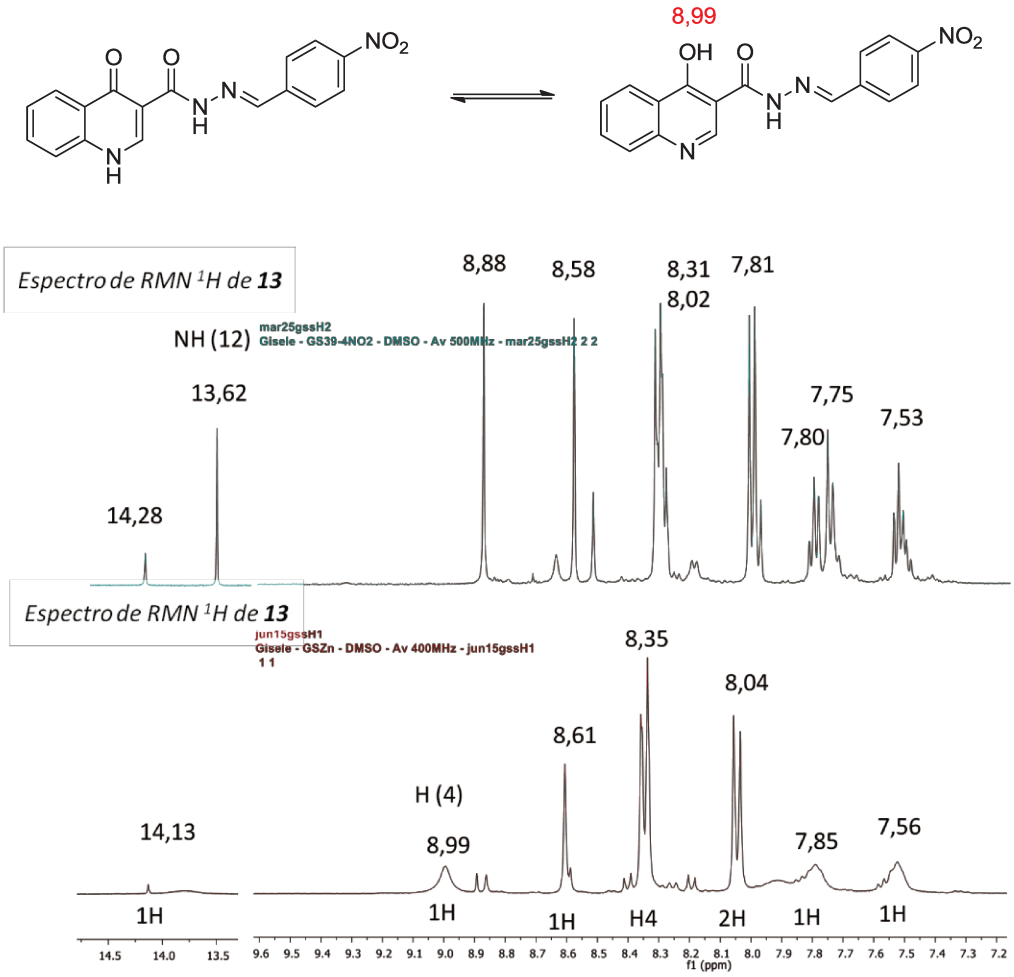


Figura 22. Expansão dos espectros de RMN de ^{1}H do ligante **13** e do complexo de Zn (II) na região de 7,0 a 15 ppm.

No RMN do complexo de zinco (**13-OH**) na *Figura 22*, observou-se que os prótons ligados ao anel aromático da quinolona e da porção 4-nitro-fenila são praticamente conservados, exceto pelo desaparecimento do sinal intenso do próton H-2 em δ 8,88 ppm do ligante **13** e o concomitante aparecimento de um sinal de próton bem curto e alargado em δ 8,99 ppm que foi atribuído ao H-4. O próton H-2, por sua vez, aparece junto com os prótons aromáticos (H-18,19) em δ 8,36 ppm (m,3H).

Como estratégia para esclarecimento dessa hipótese, o espectro de RMN de ^{13}C foi adquirido, no entanto não apresentou resolução mínima para estabelecer alguma conclusão devido ao não aparecimento de todos os carbonos esperados. Provavelmente devido pouco tempo de aquisição no experimento de RMN junto a um problema de baixa solubilidade das acil-hidrazonas e precipitação do material no tubo de RMN. Este foi um problema que tivemos em todo o desenvolvimento desse trabalho. Como informação adicional, o RMN do complexo de cobre não foi realizado dado à propriedade paramagnética desse metal.

4.2.6.3 Espectro de massas de alta resolução dos complexos de zinco e cobre

No estudo de espectrometria de massas, foram detectadas espécies relativas ao ion molecular para ambos os complexos de zinco e cobre, considerando a acil-hidrazona **13-Zn** como um ligante bidentado, em função das observações no IV. As espécies com relação massa/carga (*m/z*) = 398,9558 e 400,0165 para os complexos de cobre e zinco, respectivamente, foram detectadas, além de outras espécies carregadas.

No espectro de massas do complexo de zinco (*Figura 23*) observou-se vários íons moleculares monocarregados ($M^+ + 1$), destacando-se dentre estes os complexos de razão m/z = 400,9725 e 434,9367. A presença do pico m/z 735,0925, sugere que o zinco está ligado a duas moléculas da acil-hidrazona.

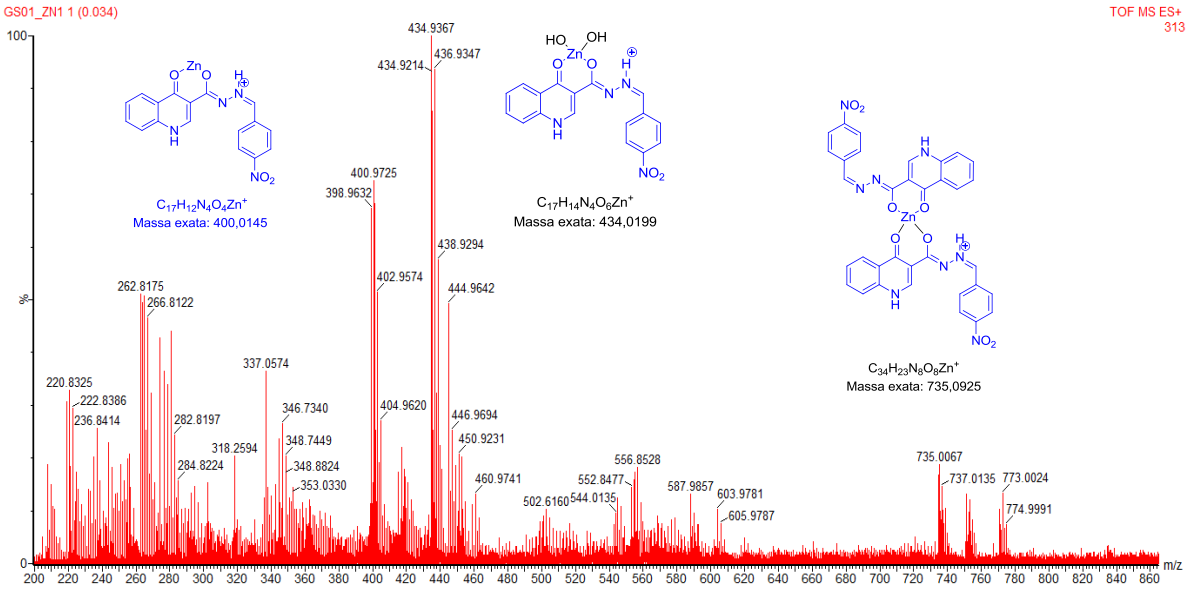


Figura 23. Espectro de massas do complexo de zinco com a acil-hidrazona **13**.

Os espectros de massas por ESI no modo positivo dos complexos de zinco e cobre são semelhantes e revelam a presença de íons bidentados, preferencialmente, e outros picos de massas resultado da dissociação do mesmo. Na *Figura 24*, encontram-se propostas de estruturas para os picos de razão *m/z* encontrados no espectro de ESI-MS em modo positivo para o complexo de zinco. Espécies similares foram encontradas no espectro de cobre.

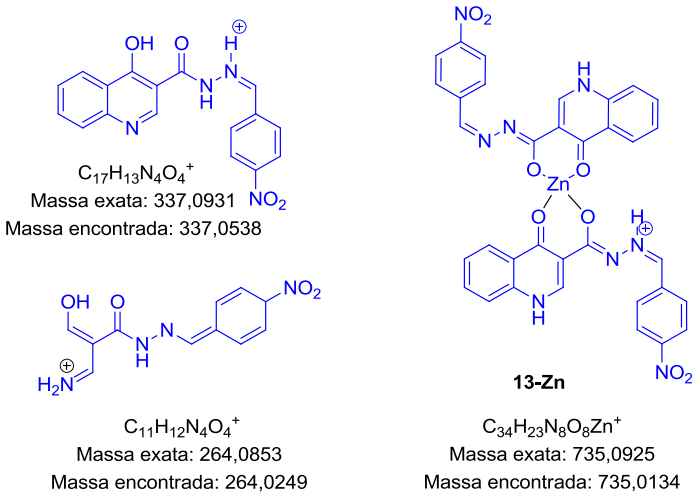


Figura 24. Proposta de estruturas para os picos (M+1) de íons encontrados no espectro de análise alta resolução utilizando ESI em modo positivo do complexo de zinco.

4.2.6.4 Análise termogravimétrica

A análise termogravimétrica (TGA) com o complexo de cobre (**13-Cu**) foi realizada em atmosfera oxidante com taxa de aquecimento de 10 °C min^{-1}.

De acordo com as curvas TGA (*Figura 25*), há uma perda de 6,15% da massa até 99 °C, que pode ser atribuída à eliminação de água adsorvida no complexo. A partir de 220 °C até aproximadamente 366 °C, há uma perda de massa que totaliza aproximadamente 76 %, correspondente à decomposição do ligante que ocorreu em duas etapas (220 – 310 °C e 310 – 366 °C). A massa residual que não foi completamente degradada (18 %), pode ser atribuída à formação de óxido de cobre (CuO), uma vez que a medida foi feita sob atmosfera oxidante.

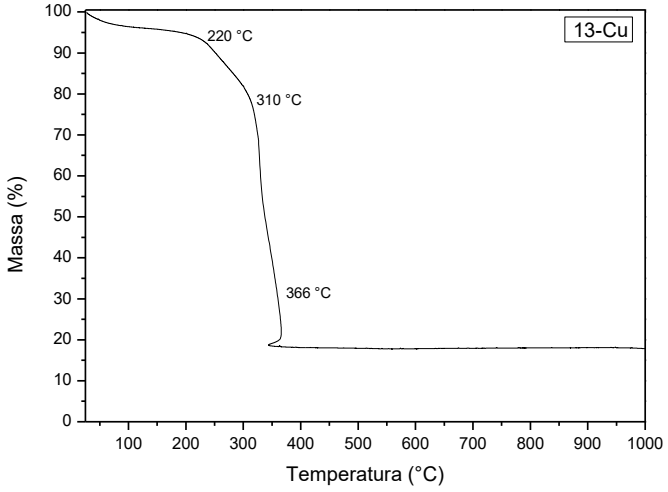


Figura 25. Curva termogravimétrica do complexo da acil-hidrazona **13** com o cobre.

Tendo em vista esses dados, a primeira proposta é que o ligante acil-hidrazona se ligue ao metal diretamente através das duas carbonilas tal como mostra a *Figura 25*(**13-Zn**). Essa proposta corrobora com dados da literatura obtidos anteriormente em nosso grupo de pesquisa por Huber *et al*.[150]

Os complexos metálicos de zinco e cobre contendo o núcleo quinolona conectado covalentemente ao centro metálico foram obtidos com proposta de estrutura similar. No entanto, considerando a alteração na absorção da C=N no infravermelho para o complexo de cobre, esse complexo recebe uma proposta diferente da do zinco. As propostas das estruturas dos complexos **13**-M (M = Cu ou Zn) encontram se na *c*

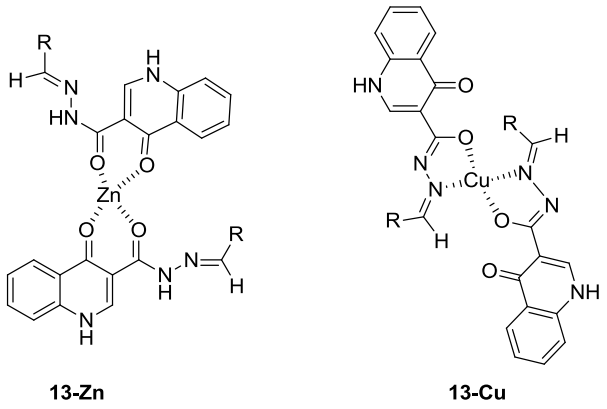


Figura 26. Propostas para as estuturas dos complexos entre a acil-hidrazona **13** com o zinco (**13**-**Zn**) e com o cobre (**13**-**Cu**).

Apesar de várias tentativas de recristalização para ambos os complexos sintetizados, não foi possível a obtenção dos cristais simples (monocristais) para um futuro estudo de Cristalografia de Raios-X, assim como realizar a análise elementar, que não foi conclusiva. As análises no infravermelho, espectrometria de massas, RMN de próton e carbono e dados termogravimetricos não permitiu a completa caracterização dos complexos de cobre e zinco tendo como ligante a acil-hidrazona **13**. No entanto, nos permite propor que a estrutura do ligante deve ser do tipo bidentada, e que o metal se liga a duas moléculas de acil-hidrazona.

4.3 *Efeito das acil-hidrazonas sobre a AChE*

4.3.1 Medida da atividade anticolinesterásica

Os ensaios para avaliação da atividade anticolinesterásica foram realizados através do método colorimétrico descrito por Ellman *et al.*,[151,152] utilizando tacrina como controle positivo. O princípio do teste envolve a medida da taxa de reação de hidrólise da acetiltiocolina (ATC) que é acompanhada pela continua reação entre tiocolina e ácido 5,5´-ditiobis-2-nitrobenzóico (DTNB) que produz um 5-tio-dinitrobenzoato, de coloração amarela (*Figura 27*). A taxa de produção do ânion é medida pelo método espectrofotométrico a 415 nm.

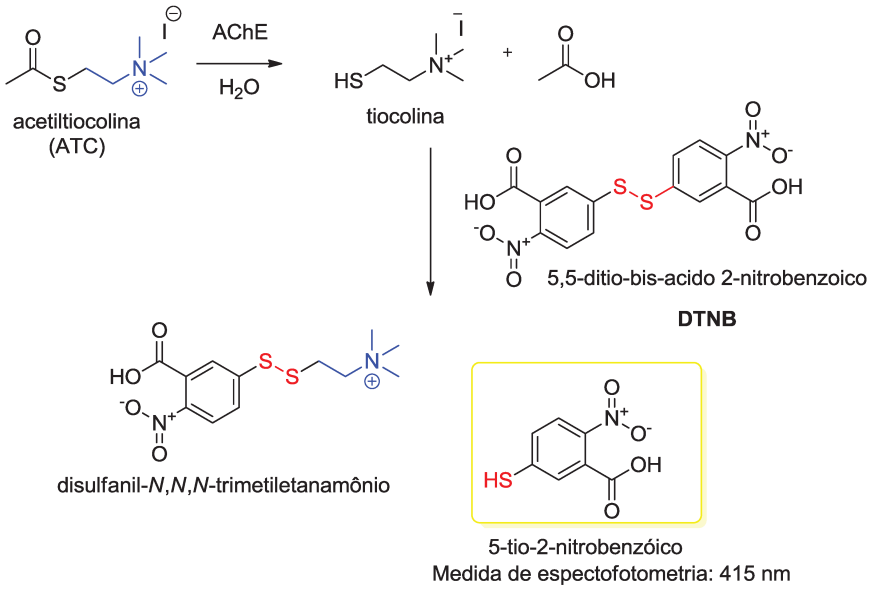


Figura 27. Reações envolvidas na detecção da hidrólise da ATC no Método de Ellman.

Dos resultados obtidos, os percentuais de inibição enzimática dos compostos acil hidrazônicos testados na menor concentração estudada (12,5 μM) e os cálculos de IC_{50} calculados pelo programa *GraphPad Prisma* estão apresentados na *Tabela 6*.

Tabela 6. Valores de IC_{50} obtidos no ensaio de inibição in vitro da AChE.

Acil-hidrazona	**Cadeia lateral (R)**	**IC_{50} (μM±SD)**
9	Fenila	4,1±0,1
10	4-clorofenila	13,6**±0,2**
11	3-clorofenila	1,3*
12	2,3-diclorofenila	17,4**±0,3**
13	4-nitrofenila	10,2**±0,2**
14	2-nitrofenila	1,2*
15	4- metilsulfonilfenila	-
16	4-metiltiofenila	8,5±0,1
17	4-(2-tiofenila)	3.5*
18	4-metoxifenila	6,1±0,1
19	4-trifluorofenila	0,0072**
20	3,4-(metilenodioxi)	0,0058**
1	-	70
Tacrina	-	0,04*[1]

Desvio padrão: *SD <0,02; ** SD<0,001; *[1] Controle

Todas as acil-hidrazonas sintetizadas são mais potentes que a 3-carboetoxi-4-quinolona **1** (IC_{50} = 70 μM), que foi o protótipo no planejamento destas acil-hidrazonas que tem em sua estrutura o núcleo quinolônico. Em síntese, todas as acil-hidrazonas foram capazes de inibir a AChE com IC_{50} de 0,0058 a 17 mM, destacando-se as acil-hidrazonas **19** e **20**. A natureza eletrônica do substituinte do anel aromático não parece influenciar de modo

significativo o efeito da acil-hidrazona sobre a atividade da acetilcolinesterase. Observa-se, por exemplo, que a presença de um grupo retirador de elétrons, como o grupo nitro, não é determinante para a atividade, uma vez que a acil-hidrazona **13** (Ar = 4-nitrofenila) é quase 10 vezes menos potente que a acil-hidrazona **14** (Ar = 2-nitrofenila). Além disso, a acil-hidrazona **15**, contendo o grupo (4-metilsulfonil)-fenila nem mesmo teve o seu IC_{50} determinado devido à inibição pouco significativa sobre a enzima na concentração mais baixa estudada.

As acil-hidrazonas **16** e **18**, cujos substituintes no anel aromático da porção imina são doadores de elétrons, 4-metoxi e 4-metiltio, respectivamente, são as menos potentes. Entretanto, a diferença entre a potência, expressa pelo IC_{50} não é muito grande. Assim, nada foi possível afirmar sobre a relação estrutura-atividade. Um estudo com um maior número de estruturas de acil-hidrazonas com ligantes doadores e receptores de elétrons nas posições *orto*, *meta* e *para* nos permitiria uma melhor exploração dessa temática.

Considerando os resultados promissores de inibição da AChE obtidos com as acil-hidrazonas seria interessante verificar o mecanismo de ação pelo qual ocorre a inibição da AChE. Com este fim, foi feito um estudo cinético da ação das acil-hidrazona sobre a inibição da AChE.

4.3.2 Cinética enzimática

O estudo cinético foi conduzido a partir de dados da hidrólise do substrato actiltiocolina (ATC). Esse estudo foi realizado com as acil-hidrazonas **11**, **14**, **19** e **20** por apresentar os melhores resultados de IC_{50}. O efeito da concentração do substrato sobre a velocidade da enzima na presença de diferentes concentrações de inibidores foi avaliado pela equação Michaelis-Mentem.

Utilizaram-se cinco diferentes concentrações do substrato ATC (10 a 75 μM) contra diferentes concentrações dos compostos acil-hidrazonas (0,2, 0,1, 0,05, 0,025 e 0,0125 mM). À medida que a concentração do substrato aumenta, a enzima satura-se e a velocidade da reação atinge o seu valor máximo. Embora em baixas concentrações de substrato o comportamento da equação se mantenha linear, curva-se à medida que aumenta a concentração de substrato tornando-se uma hipérbole.

Por essa razão, utiliza-se o método de linearização da equação de Michaelis-Menten, dando como resultado o gráfico de Lineweaver-Burk. O gráfico de Lineweaver-Burk ou representação de duplo recíproco é a forma mais comum de demonstrar os dados da cinética enzimática.[153]

O estudo realizado permitiu estimar os valores da constante de Michaelis-Mentem (K_m) e da velocidade máxima (V_{max}) através da equação da reta de Lineweaver-Burk, abaixo representada. Estes parâmetros cinéticos dão informações sobre o modo de inibição da atividade enzimática pela acil-hidrazona. K_m é a concentração de substrato necessária para que a velocidade de reação alcance a metade da velocidade máxima (V_{max}) e V_{max}, por sua vez, é a máxima velocidade atingida durante a reação.

$$\frac{1}{V\max} = \left(\frac{Km}{V\max}\right)\frac{1}{[S]}x\frac{1}{V\max}$$

Equação 1. Equação de Lineweaver-Burk

Organizando os dados obtidos desse estudo de inibição enzimática da AChE pela acil-hidrazona **11** na *Tabela 7*, as equações da reta obtida para cada concentração (0,0125 - 0,2 mM), assim também como os respectivos valores de V_{max} e K_m. O coeficiente de correlação (R^2) de todas as equações da reta foram próximo da unidade, o que indica que este estudo apresenta boa correlação entre 1/[S] e $1/V_0$.

Analisando os parâmetros cinéticos V_{max} e K_m na *Tabela 7*, podemos afirmar que a maioria das acil-hidrazonas apresenta o mesmo tipo de mecanismo de ação, isto é, as acil-hidrazonas **11**, **14** e **20** se ligam, preferencialmente no mesmo local do substrato natural, acetilcolina e, portanto, apresentam mecanismo de ação do tipo competitivo, tendo em vista que K_m aumenta com a concentração e V_{max} se mantém inalterada.

Tabela 7. V_{max} e K_m obtidos da equação de Lineweaver-Burk.

Concentração (mM)	**Equação da reta**	**V_{max}**	**K_m**	**R^2**
Substrato	y = 0,1298x + 8,9164	0,1122	0,015	0,9951
0,0125	y = 0,3108x + 8,8856	0,1125	0,035	0,9895
0,025	y = 0,3464x + 8,8795	0,1126	0,039	0,9895
0,05	y = 0,3776x + 8,8786	0,1126	0,043	0,9924
0,1	y = 0,4609x + 8,9367	0,1119	0,052	0,9976
0,2	y = 0,6203x + 8,9277	0,1120	0,069	0,9932

No entanto, para a acil-hidrazona **19** observamos um comportamento diferente dos parâmetros cinéticos, no qual os valores de K_m e V_{max} diminuem. Desses parâmetros, concluímos que este inibidor apresenta modo de inibição conhecido como misto ou não competitivo.

Inclusive, o nome "inibição mista" se origina dessa mistura de comportamento dos mecanismos competitivo e não competitivo. Esse modo de ligação com a enzima tanto altera a atividade catalítica como a ligação do substrato com a enzima, de modo que V_{max} diminui e K_m pode aumentar ou diminuir.[154]

Na *Tabela 8*, encontra-se os tipos de inibição encontrados nesse estudo baseado na alteração dos valores de K_m e V_{max} para as acil-hidrazonas **11**, **14**, **19** e **20**.

Tabela 8. Tipos de inibição baseado na alteração dos valores de K_m e V_{max} para as acil-hidrazonas **11**, **14**, **19** e **20** e os modos de inibição.

Acil-hidrazona	Tipo de inibição
11	Competitiva (K_m ↑ e $V_{máx}$ não altera)
14	Competitiva (K_m ↑ e $V_{máx}$ não altera)
19	Inibidor misto (K_m ↑ e $V_{máx}$ diminui)
20	Competitiva (K_m ↑ e $V_{máx}$ não altera)

Na *Figura 28,* temos a representação do duplo recíproco resultado do teste de inibição da AChE com as acil-hidrazonas **19** e **20**. Para cada concentração do substrato temos uma representação em linha reta cujo cálculo é baseado na equação de Lineweaver-Burk, em ambos os casos. Observam-se facilmente as diferenças entre os mecanismos de inibição competitivos e não competitivo (ou mista), respectivamente.

As diferenças entre os gráficos de Lineweaver-Burk dos compostos **19** e **20** são evidentes. Observa-se que para a acil-hidrazona de mecanismo misto **19** todas as retas cruzam-se a esquerda do eixo $1/V_0$, enquanto que para a acil-hidrazona de mecanismo competitivo **20** esse encontro das retas ocorre exatamente sob o eixo $1/V_0$. Assim, a partir dessas observações fica evidente que estas possuem tipo de inibição diferenciada.

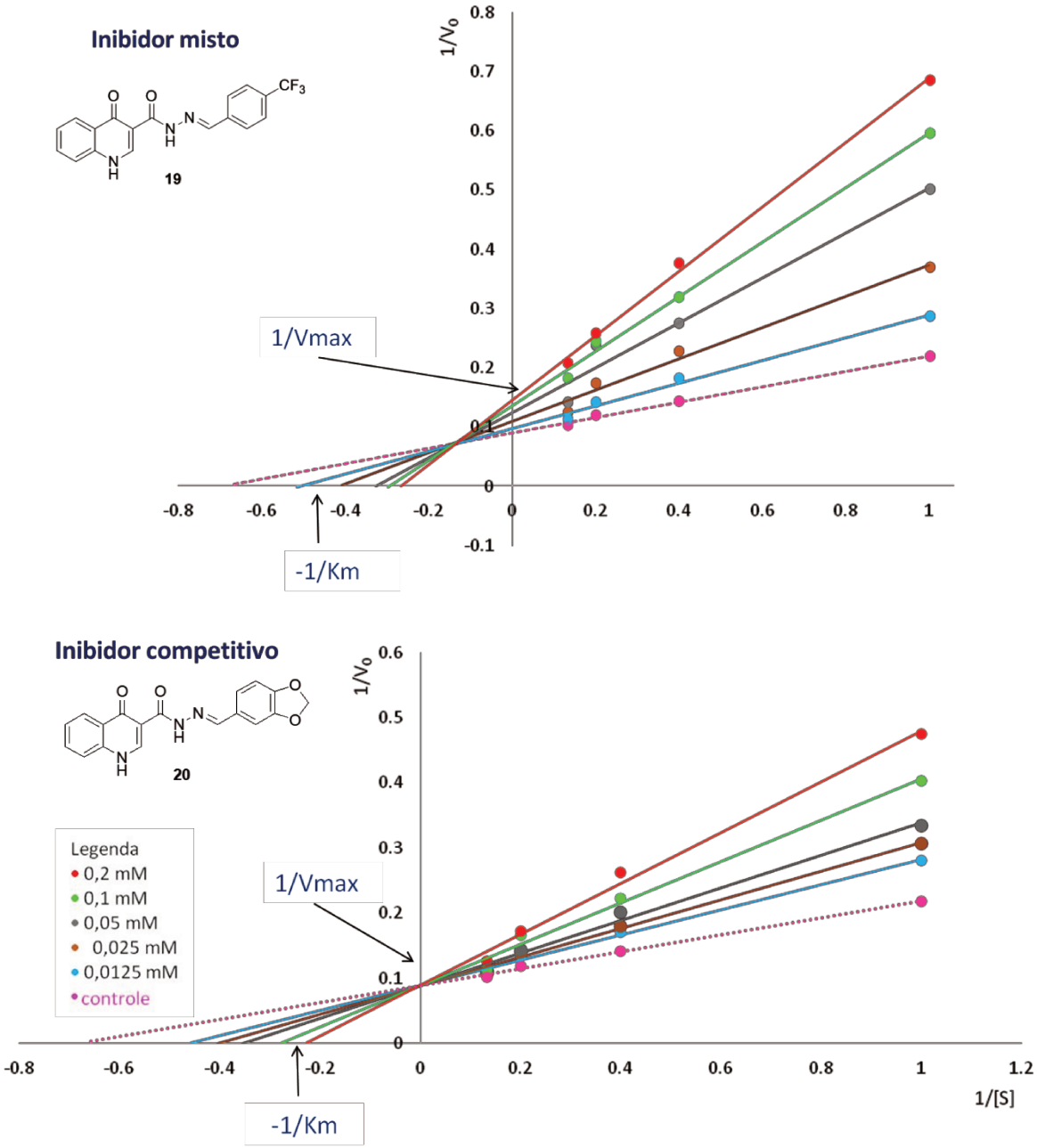
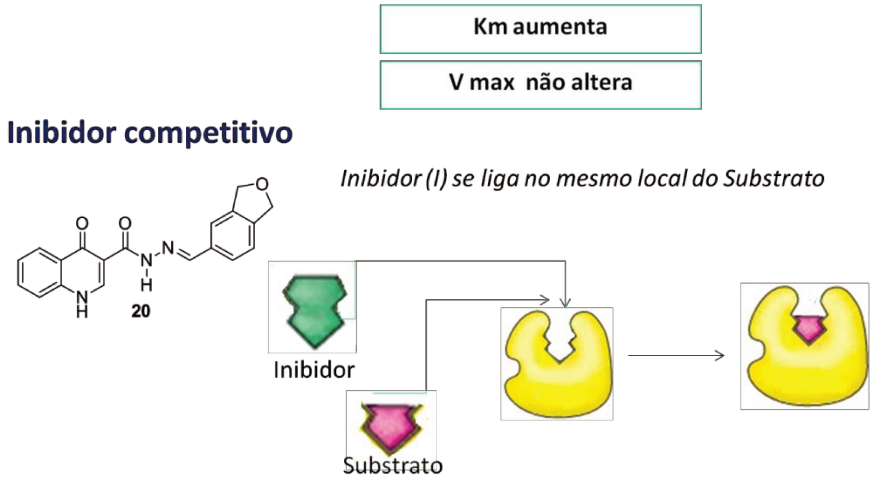


Figura 28. Gráfico de Lineweaver-Burk para inibição da AChE pelas acil-hidrazonas **19** e **20**.

Desse estudo concluiu-se que a maioria das acil-hidrazonas atua com mecanismo do tipo competitivo, exceto a acil-hidrazona **19** que atua com mecanismo misto ou não competitivo.



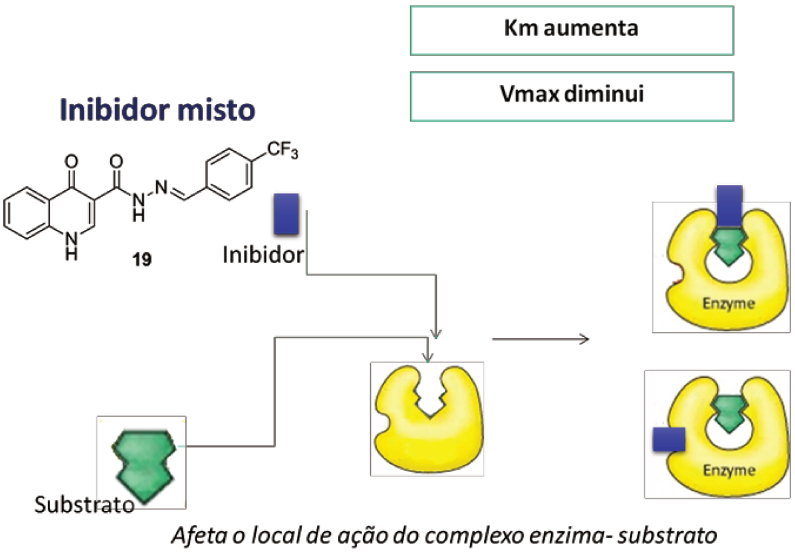


Figura 29. Esquema do mecanismo de interação entre o inibidor (**19** e **20**) com a enzima AChE; A) Inibição competitiva e B) Inibição não-competitiva ou mista.

No mecanismo de inibição competitiva, o inibidor age no mesmo sítio do substrato natural (sítio catalítico). Neste caso, há uma competição entre o substrato natural e o inibidor, afetando a formação do complexo [ES] como mostrado na *Figura 29*. Como K_m é um parâmetro característico da interação enzima e substrato,[155] este é aumentado porque a afinidade do inibidor com a enzima é elevada, requerendo uma maior concentração de substrato para atingir a metade da velocidade máxima.

No modo não competitivo, por sua vez, o inibidor não atua diretamente no sítio catalítico. Ele pode ligar-se a outro sítio da enzima modificando a sua conformação e impedindo a catálise enzimática de forma indireta. O inibidor misto, por sua vez, pode alterar a formação do produto tanto pela ligação direta no sítio catalítico, quanto por uma interação em outro sítio.

No estudo realizado nesse projeto, não foram identificados inibidores do tipo incompetitivos, ou seja, um tipo inibição na qual a ligação do inibidor ocorre no complexo enzima-substrato [ES], e não tem afinidade pela enzima livre. O complexo formado (ESI) é cataliticamente inativo. Isso se reflete em alterações dos valores de K_m e V_{max}.

Desse modo, este estudo de cinética das acil-hidrazonas sob a inibição da AChE mostrou que maioria das acil-hidrazonas agem de forma competitiva quanto ao sitio de ação da enzima AChE. Dentre estes somente a acil-hidrazona **19** comportou-se com inibição mista.

4.4 *Estudos de ancoramento (docking) molecular*

Docking molecular é uma técnica de química computacional amplamente utilizada no processo de design de fármacos baseado em estrutura. Nesse contexto, o *Structure-Based Drug Design* (SBDD) é uma parte essencial da química medicinal moderna que tem sido usada tanto na academia quanto na indústria farmacêutica.

O acoplamento molecular ligante-receptor é realizado com o intuito de prever e classificar a estrutura do complexo intramolecular. Nesse estudo é possível visualizar interações químicas, assim como também obter suas afinidades de ligação.

As afinidades de ligação (ΔG) são calculadas teoricamente usando a função de pontuação predefinida dos programas com base nas interações dadas associadas a cada conformação. As funções de pontuação na maioria dos programas são usadas para avaliar os contatos entre átomos de proteína e ligante para cada pose de ligação e classificá-los com base em suas interações não covalentes, como ligações de hidrogênio, contatos não-polares (*Van der Waals*), forças de repulsão e parâmetros de solvatação.

Para o estudo de *docking* molecular, nós seguimos a seguinte sequência de passos. Primeiramente, realizamos o preparo dos ligantes acil-hidrazônico para o ensaio *in silico.*

Depois disso, executamos de fato ao *docking* molecular e para a validação dos parâmetros utilizados pelo método de *redocking* como mostra o esquema na *Figura 30*.

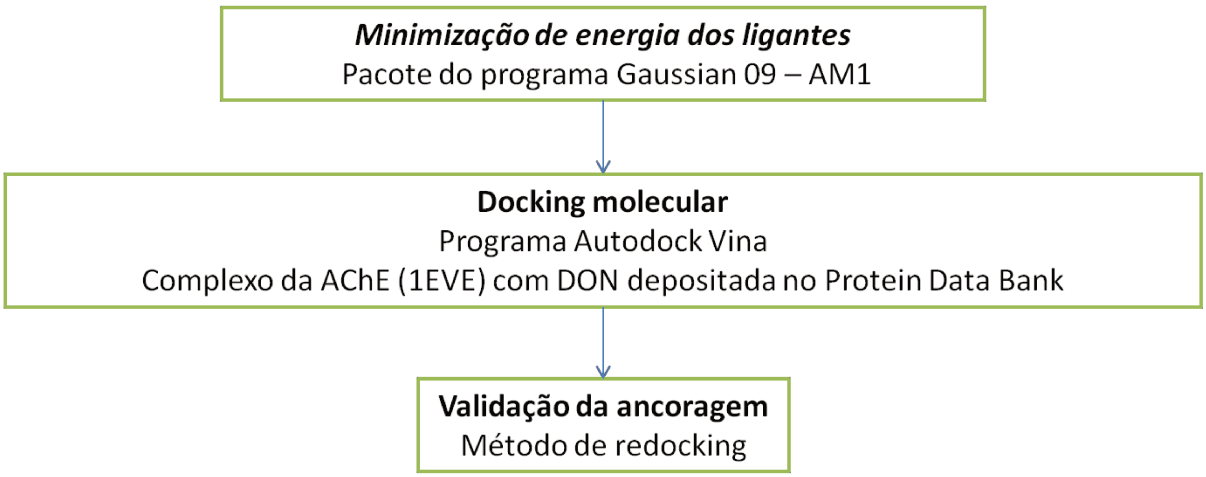


Figura 30. Esquema do procedimento do estudo e validação do *docking* molecular.

4.4.1 Minimização da estrutura dos ligantes acil hidrazônicos

As estruturas dos ligantes acil-hidrazônicos propostos foram desenhadas e suas respectivas energias minimizadas utilizando o pacote do programa Gaussian 09. Optou-se por realizar a otimização das estruturas dos modelos virtuais baseadas em mecânica quântica (AM1), além de utilizar aproximações empíricas com a finalidade de melhorar o desempenho do cálculo teórico.

Para cada acil-hidrazona escolhida, fizemos duas considerações relativas às possíveis conformações e configurações da acil-hidrazona. A primeira quanto à conformação anti ou sin da amida e a segunda quanto à configuração geométrica *E* ou *Z* relativa à ligação imina (C=N), tal como mostra a *Figura 31*.

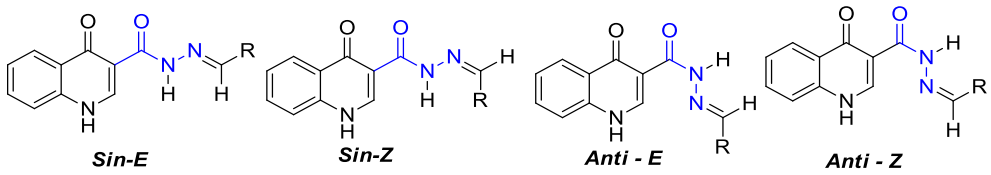


Figura 31. Estruturas acil-hidrazonas Anti-*E*, Anti-*Z* e Sin-*E,* Sin-*Z.*

Desse modo, para cada ligante foram feitos quatro diferentes grupos estruturais (Anti-*E*, Anti-*Z* e Sin-*E,* Sin-*Z*). Todas as acil hidrazonas (**9** - **20**) sintetizadas foram desenhadas e minimizadas no programa Gaussian utilizando o método de mecânica quântica - AM1. Depois de obtidas todas as estruturas na sua conformação mais estável foi possível dar início ao estudo de *docking* molecular.

4.4.2 Docking molecular

AutoDock Vina[156] é um software adequado e tido como confiável e disponível sem custo para descoberta de novos fármacos, que permite o acoplamento molecular e o rastreio virtual que foi projetado e implementado pelo Dr. Oleg Trott. O programa tem sido bem aceito na academia e sempre são incorporadas inovações que facilitam a acesssibilidade do programa e explicam sua alta taxa de aceitação.

O *docking* molecular foi realizado no programa *Autodock Vina* que opera empregando algoritimo genético com um único ligante diretamente do sítio ativo da enzima, que proporciona flexibilidade rotacional para receptores de hidrogênio, flexibilidade total do ligante, além de proporcionar alguma flexibilidade para a proteína.

Os algoritmos genéticos aplicam idéias derivadas da genética e a teoria da evolução biológica ao encaixe. Os algoritmos começam a partir de uma população inicial de diferentes conformações do ligante em relação à proteína. Cada conformação é definida por um conjunto de variáveis de estado (definidas como genes) que descrevem aspectos como a tradução, a orientação e a conformação do ligante em relação ao receptor da proteína.

O conjunto completo das variáveis de estado dos ligantes é definido como o genótipo, enquanto as coordenadas atômicas referem-se ao fenótipo. Os operadores genéticos

(mutações, crossovers e migrações) são aplicados à população para sondar o espaço conformacional, até que uma população final seja atingida com função otimizada.[157]

A função de pontuação no AutoDock é baseada na versão *United Atom* do campo de força chamado de AMBER,[158] neste os átomos de hidrogênio não-polares são removidos para reduzir o número de átomos a serem simulados e o raio de Van der Waals do átomo pesado ao qual estão conectados é aumentado em conformidade, juntamente com a modificação apropriada de sua carga parcial para preservar a carga total original. Isto significa que tanto o ligante como a macromolécula, devem ser modelados com átomos de hidrogênio polares.

O Autodocking Vina pode ser operado com a ajuda de *A*utoDockTools (ADT) ou usando linha de comando.[159] O ADT é o modo mais acessível, este faz parte do MGLTools, do Laboratório de Gráficos Moleculares do Instituto de Pesquisas Scripps, desenvolvido no Python Molecule Viewer.

Assim, o software ADT foi a interface utilizada para preparar os arquivos de entrada. O ADT utiliza o método de cálculo de carga parcial Gasteiger para cálculo de carga de proteína e do ligante. De forma geral, ADT permite a adição ou remoção de hidrogênios, o reparo de cadeias laterais de resíduos incompletas, adicionando átomos ausentes, modificação da protonação de histidina, entre muitas outras ferramentas úteis.

O protocolo de *docking* molecular foi bem descrito por Morris *et al*.[156] Três etapas principais estão envolvidas nas simulações de ancoragem:

1) Escolha e preparação da proteína;

2) Preparação e adição do ligante à proteína;

3) Definição do local ativo (Gride).

A estrutura tridimensional da AChE de código 1EVE da especie *Torpedo californica* (Resolução: 2,5 Å) de uma arraia foi escolhida por que acoplada a sua estrutura tridimensional encontra-se a estrutura do ligante donepezila (E2020), fármaco anticolinesterásico conhecido como Aricept®, que é indicado para DA leve a moderada. Assim, a conformação encontrada desse ligante E2020 complexado com a enzima 1EVE, as

interações observadas com os resíduos do sítio de ação e as distâncias nas interações, por exemplo, poderiam ser utilizadas como padrão de comparação com os ligantes acil-hidrazônicos propostos neste estudo de docagem molecular.

O preparo da proteína, por sua vez, envolve a separação dos ligantes internos da enzima. Isto é, retiram-se todos os ligantes orgânicos, cofatores e água que estiverem presentes na macromolécula. Assim, os ligantes foram removidos das estruturas do arquivo 1EVE.PDB[160] utilizando-se o programa Notepad^{++}. Problemas potenciais na estrutura da enzima que incluem, por exemplo, átomos de cadeia lateral ausentes, água adicionada, mais de uma molécula, polaridade, átomos desordenados com locais alternativos podem ser arrumados no ADT.[156] No entanto, a estrutura tridimensional 1EVE foi mantida rígida e sem modificações estruturais.

Os ligantes acil hidrazônicos em sua conformação mais estável foram, então preparados usando a ferramenta MGLTools.[161] O *AutoDock Vina* exige que o arquivo do ligante seja escrito no formato PDBQT. Essa etapa de preparo do ligante nesse formato envolve garantir que seus átomos sejam atribuídos aos tipos de átomos corretos, adicionando taxas de carga de Gasteiger, se necessário, mesclando os hidrogênios não-polares, detectando carbono aromático, se houver, e configurando a rotação de ligações no comando "Torsion count".

No caso desse estudo, optou-se por manter os hidrogênios polares e a acil-hidrazona rígida, isto é, todas as ligações sem livre rotação. A combinação entre configuração e conformação é de extrema importância para as interações biológicas. As possibilidades e variabilidade de posição e geometria podem alterar a capacidade da molécula interagir com o sítio ativo e, em decorrência disso, pode até apresentar atividade biológica completamente oposta.

Por último, definiu-se a região onde o *docking* iria acontecer. É uma espécie de mapas pré-calculados, dispostos em uma caixa composta por uma grade tridimensional de pontos (*grid maps*). A caixa foi posicionada na região catalítica da enzima acetilcolinesterase na região próxima ao sítio catalítico e periférico da AChE. As dimensões da Grid Box no eixo X-, Y- e Z- foram, respectivamente, 4,36 Å, 72,80 Å e 65,23 Å. Essa coordenada foi

escolhida tendo como base um átomo de nitrogênio do sítio catalítico (N, Trp84 – 1EVE.PDB).

4.4.2.1 Análise do *docking* das acil-hidrazonas com a AChE

Para a avaliação do *docking* molecular das acil-hidrazonas considerou-se os valores de energia obtidos pelo método de docagem. Este valor de energia de *docking* obtido em Kcal/mol representa o grau de afinidade de ligação entre o receptor e o ligante. Além disso, considerou-se a possível interação do ligante acil-hidrazônico com os principais sítios catalíticos (Trp84) e periféricos (Trp286).

Adicionalmente, levamos em conta todas as interações observadas na região do sitio ativo (*Figura 32*). Os dados de interações observadas no ligante donepezila (E2020) complexado com a enzima e suas respectivas distâncias foram utilizados como padrão de comparação com a docagem feita com os ligantes acil hidrazônicos. As principais interações entre ligante e receptor (E2020-1EVE) observadas no sítio ativo da acetilcolinesterase estão descritas na sequência.

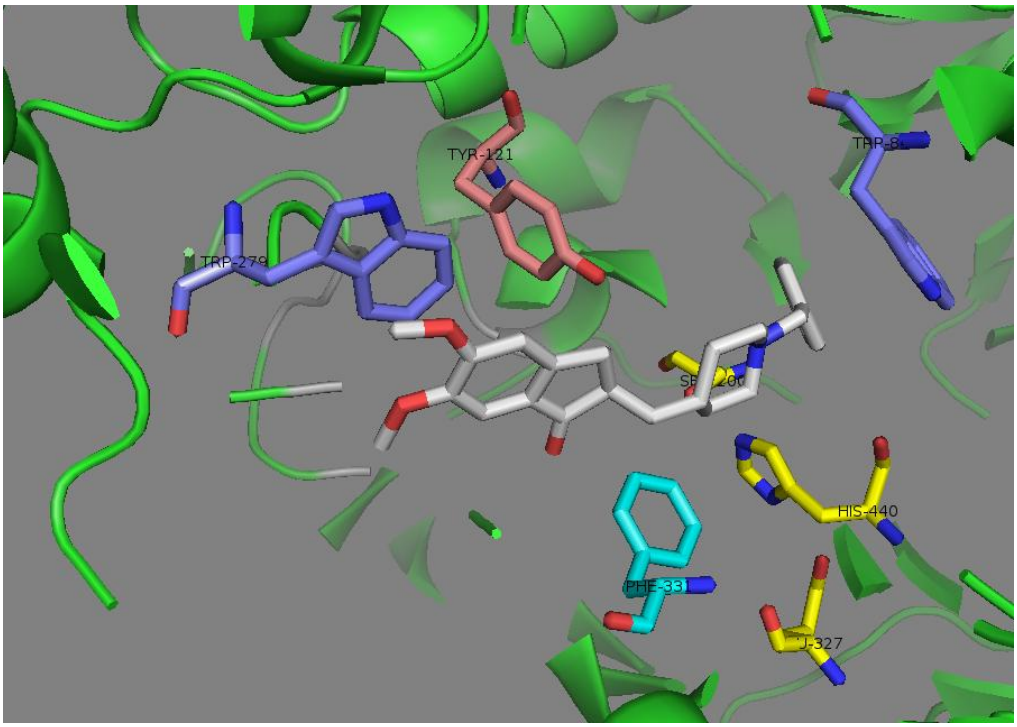


Figura 32. Visão tridimensional da estrutura E2020 no sítio ativo da 1EVE.

Uma face do anel aromático do ligante donepezila E2020 exibe empilhamento do tipo π-π paralelo clássico com o anel de seis membros do indol do Trp84, semelhante à interação com a THA,[162] através de uma interação do tipo π-*stacking*,[163] bloqueando desta forma, a ligação cátion-π da acetilcolina e, consequentemente retardando a sua hidrólise.

O nitrogênio carregado do anel piperidínico faz uma interação cátion-π[164] com o anel fenila da Phe330, com distâncias médias de 3,9 a 4,5 Å entre o nitrogênio e os carbonos do anel.[161] Estes dados sugerem que Phe330 pode servir como um local de ligação quaternário adicional, no meio do canal, entre o local periférico e o subsítio aniônico do sítio ativo.

No topo do desfiladeiro, o anel da indanona empilha-se com o anel indólico do Trp279 no PAS, por uma interação π-clássica com distâncias entre 3,7 Å - 4,2 Å. A carbonila do anel de cinco membros da indanona, por sua vez, interage com AChE através de ligação de *Van der Waals* com os anéis aromáticos de Phe331 e Phe290.[161]

A ligação de *Van der Waals* feita pela função carbonila ajuda a orientar a fração indanona para que seja possível uma interação com o anel indol do Trp279. Não se observou interação da E2020 com a tríade catalítica.

Os valores de energia gerados da interação entre enzima e os ligantes acil-hidrazonas obtidos nesse ensaio de ancoragem virtual, realizado no programa *Autodock Vina*, encontram-se na *Tabela 9*.

Tabela 9. Valores de energia da interação receptor-ligante obtida no programa *Docking Vina* para as acil-hidrazonas com diferentes geometrias (NH-amida - *sin* ou *anti*) e estereoquímica (imina sp^2 C=N -*E* ou *Z*).

Compostos*	**Cadeia lateral (Ar)**	**Energia em Kcal/mol**				
		Anti E	***Anti Z***	***Sin E***	***Sin Z***	∑
9	Fenila	-10,5	-11,9	-10,4	-10,8	-10,7
10	4-clorofenila	-10,7	-11,3	-10,8	-10,9	-10,9
11	3-clorofenila	-10,8	-11,4	-10,9	-11,0	-10,9
12	2,3-clorofenila	-10,7	-10,9	-10,6	-11,5	-10,9
13	4-nitrofenila	-12,2	-11,5	-10,6	-11,6	-11,4
14	2-nitrofenila	-11,0	-10,5	-11,7	-11,7	-11,2
15	4-metilsulfonilfenila	-11,5	-11,1	-11,1	-9,9	-10,9
16	4-metiotiofenila	-11,0	-10,9	-10,3	-10,9	-10,7
17	4-(2-tiofenila)	-10,3	-9,8	-9,9	-9,7	-9,9
18	4-metoxifenila	-10,9	-10,7	-10,4	-11,1	-10,7
19	4-trifluorofenila	**-12,0**	-11,1	-10,5	-11,9	-11,4
20	3,4-(metilenodioxi)fenila	-11,3	-11,7	-11,6	-11,9	-11,6

*ligante E2020 (DON) ancorado na enzima 1EVE.pdb utilizada no redocking; ∑ = média aritmética dos valores de energia. (Energia em Kcal/mol: -8,6, -10,8, -10,7 para THA, E2020 e DON, respectivamente).

Para avaliar o comportamento global das estruturas é calculada a Raiz do Desvio Medio Quadratico (*Root mean square desviation*, RMSD) para os sistemas, tomando como referência a estrutura após as minimizações. O cálculo do RMSD de uma nova conformação em relação a todas as conformações previamente registradas do ligante determina se a nova conformação é aceita.

No *Autodock Vina*, os valores de RMSD são devidamente calculados e registrados no arquivo de saída padrão gerados no final da docagem. A qualidade do ajuste foi avaliada com base nos valores de RMSD do ligante com os seguintes intervalos:

- RMSD ≤ 1,0 Å, boa;
- 1Å < RMSD ≤ 2,0 Å pose razoável;
- 2Å < RMSD ≤ 3.,0 Å, pose com erros;

Ao fim do estudo de docking, 120 diferentes poses foram geradas (cada ligante hidrazônico gerou 10 poses). As poses que mostraram valores de RMSD até uma pontuação acima de 2,0 foram descartadas.

4.4.2.2 Validação do método de docagem molecular por *redocking*

Por último, a validação da ancoragem foi feita com o ligante E2020 (donepezila, DON) ancorado na enzima 1EVE.pdb pelo método de *redocking*.

Redocking é o processo pelo qual o ligante é extraído do cristal proteico e, em seguida, é realizado o *docking* com esse ligante com o mesmo receptor.[165] Isso é realizado para verificar se os parâmetros de *docking* utilizado para o método de ancoragem são razoáveis e confiáveis (*Figura 33*).

Realizou-se o *docking* da estrutura da donepezila (DON) desenhando-o no programa *Gaussian View* e minimizando sua estrutura no programa *Gaussian 09* utilizando o método AM1, tal qual realizamos para todos os ligantes acil-hidrazonas (DON). O resultado para este ligante apresentou resultado similar ao redocking. Para a análise do resultado do docking realizado serão consideradas as distâncias de interação que encontramos para o ligante donepezila complexado no cristal com a sigla E2020.

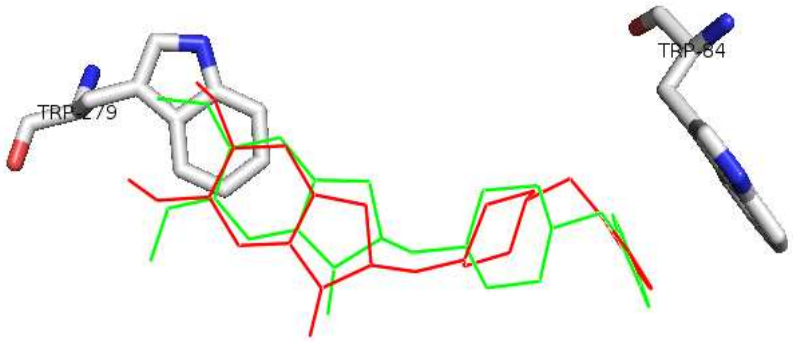


Figura 33. Redocking do ligante DON da estrutura cristalográfica 1E66 (*E2020*: verde; DON *redocking*: vermelho, -10,7 Kcal/mol e RMSD: 0,00).

De acordo com os valores de energia encontrados na docagem, as melhores poses considerando energia de cada conformação e configuração foram as das acil-hidrazonas **19**-*Anti E*, **19**-*Sin Z* e **20**-*Sin Z*, com 12,0, 11,9 e 11,9 Kcal/mol, respectivamente. Haja vista que as acil-hidrazonas sintetizadas têm configuração *E*, para esse estudo final do ensaio virtual não serão demonstradas as acil-hidrazonas de configuração *Z*. Embora, algumas interações são encontradas para todas as outras configurações/conformações.

Para demostrar os resultados obtidos foram desenhados no programa *Pymol* duas poses da acil-hidrazona **19** (**19**-*Anti E e* **19-**Sin *E* - *Figuras 34* e *35*, respectivamente). Dentre as interações observadas em todas as acil-hidrazonas, observam-se as ligações de hidrogênio entre a quinolona (NH) e nitrogênio indol do Trp84 e mais duas interações de hidrogênio da hidroxila da Tyr121.

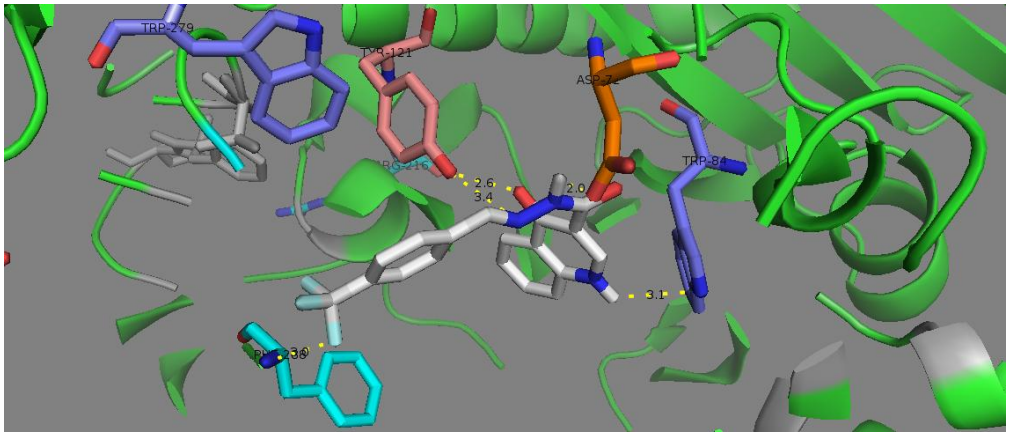


Figura 34. Representação tridimensional da acil-hidrazona **19**-*Anti E* no sitio ativo da AChE 1EVE.

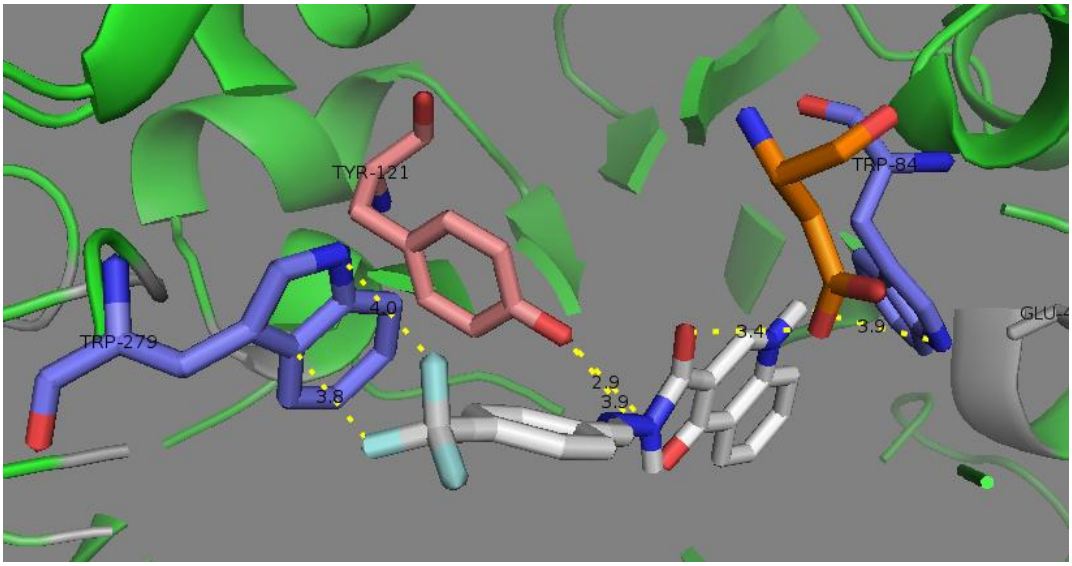


Figura 35. Representação tridimensional da acil-hidrazona **19**-*Sin E* no sítio ativo da AChE 1EVE.

Dentre todas as interações observadas, se destaca na *Figura 35* uma possível ligação de flúor não-covalente entre um flúor do grupo trifluoro da acil-hidrazona ***19***-*Sin E* com o sistema π do Trp279 (PAS) que explica perfeitamente o estudo cinético experimental da acil-hidrazona **19**.

Vimos anteriormente no estudo do mecanismo de ação das acil-hidrazonas que apenas a acil-hidrazona **19** demostrou o tipo de inibição mista. Isto significa que, embora esse composto tenha a habilidade de se ligar no sítio catalítico, adicionalmente é possível que sua interação com o sítio periférico seja determinate para o tipo de comportamento "misto" apresentado neste estudo cinético.

Vale a pena destacar também que interações de ligações de halogênio apresenta extrema relevância em sistemas biológicos.[166,167] A observação de que o ligante acil-hidrazona **19-***Sin E* interage com os sítios catalítico e periférico, simultâneamente, poderia melhor explicar o seu mecanismo de inibição mista. Apenas a configuração rotacional da amida *Sin* apresentou essa ligação de flúor. Todas as interações observadas e suas respectivas distâncias encontram-se dispostas na *Tabela 10.*

Tabela 10. Interações químicas no complexo ligante-proteina das acil-hidrazonas **19**-Anti E e **19**-Sin E no sítio ativo da AChE: tipo de interação, grupos que participam da interação receptor-ligante e suas respectivas distâncias.

Ligante	**Interação**	**Resíduo do aminoácido-ligante**	**Distância (Å)**
	Ligação de H	Trp84 (NH-Indol) ⋯ (NH)-Piridin4-ona	3,9
	Ligação de H	Tyr121 (OH) ⋯ (C=O)-Piridin-4-ona	3,9
19-*Sin E*	Ligação de H	Tyr121 (OH) ⋯ (N=C)-Imina	3,9
	Ligação de H	Phe288 (NH) ⋯ (F-C)-4-Trifluorometil	4,0
	Ponte de sal	Asp72 (COOH) ⋯ (N=N-Imina)	3,4
	Ligação de H	Trp84 (NH-Indol ⋯ (NH)-Piridin-4-ona	3,1
9-*Anti E*	Ligação de H	Tyr121 (OH) ⋯ (C=O)-Piridin-4-ona	4,0
	Ligação de H	Tyr121 (OH) ⋯ (N=C)-Imina	2,9

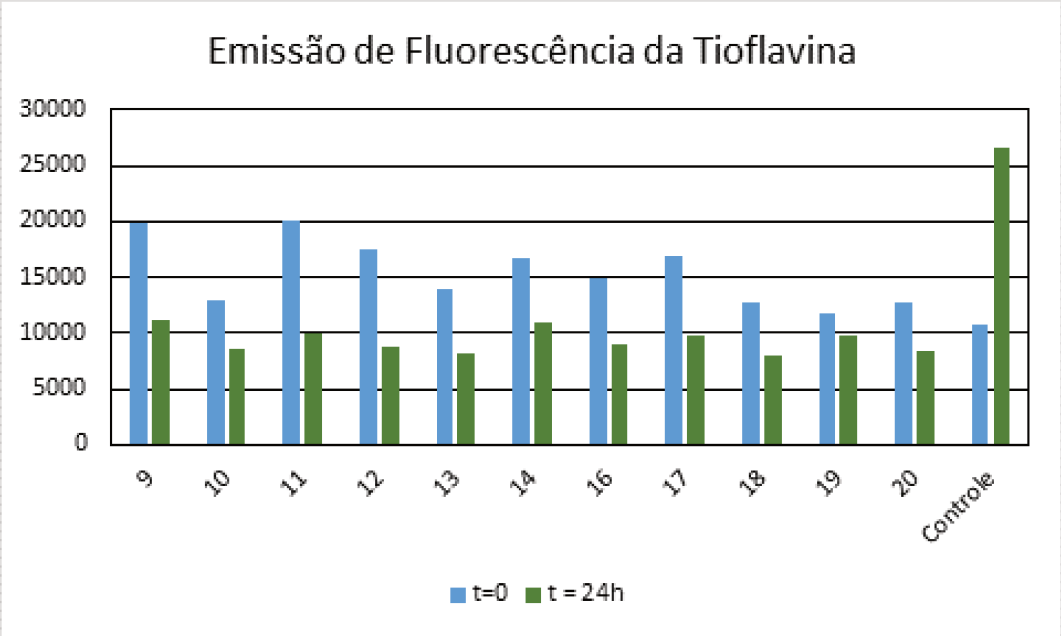
4.5 *Estudo do efeito das acil-hidrazona sobre a fibrilização do peptídeo β-amilóide*

O monitoramento da capacidade das acil-hidrazonas de interferir no processo de formação de fibrilas do peptídeo βA foi realizado por medida da intensidade de fluorescência em tioflavina-T (ThT).[168,169] Simplificadamente, nesse método a tioflavina-T liga-se as fibrilas do peptídeo β-amilóide. Estas ligações ThT com as fibrilas, por sua vez, levam ao aumento da emissão de fluorescência.

Desse modo, com o objetivo de avaliar a habilidade das acil-hidrazonas de inibir o processo de fibrilização do peptídeo β-amilóide foram realizadas duas medidas neste experimento: uma primeira medida no início do experimento, imediatamente após a mistura do peptídeo amilóide na presença do composto-teste (Filme Aβ_{42} + DMSO + HCl + Acil-hidrazona na concentração de 0,2 mM), e uma segunda medida de fluorescência, após 24 h de incubação a 37 °C. O mesmo procedimento foi feito com o controle positivo (filme Aβ_{42} + DMSO + HCl). O filme do peptídeo β-amilóide utilizado nesse ensaio foi preparado por método já realizado em nosso laboratório por Nilsson *et al*.[121]

Na *Figura 36*, observa-se um gráfico em barras contendo as respectivas medições de fluorescência no tempo inicial de medida (t_0 = barra azul) e após 24 h de incubação (t_{24} = barra verde) das amostras controle e das acil-hidrazonas (**9-14**) e (**16-20**). Inicialmente, comparando as barras t_0 e t_{24} da amostra controle observa-se que há um aumento da emissão de fluorescência após 24 h de incubação a 37 °C. O aumento da intensidade de emissão de fluorescência da ThT pode ser interpretado como consequência de que mais fibrilas foram se formando com o tempo de incubação.[170] Daí, vemos que quanto mais fibrilas são formadas maior é a medida da intensidade da fluorescência em ThT. Por outro lado, para todas as acil-hidrazonas observa-se o oposto, após 24 h de incubação houve uma diminuição da emissão de fluorescência.

A diminuição de emissão de fluorescência na presença das acil hidrazinas ocorreu com o mínimo de 49% da acil-hidrazona **11,** e o máximo de inibição da acil-hidrazona **14** com 67%, acil-hidrazonas derivadas da 3-cloro e 2-nitro-benzaldeído, respectivamente. Este resultado mostra que as acil-hidrazonas são capazes de interferir no processo de formação de fibrilas do peptídeo Aβ_{42}.



Controle: Aβ_{42} + DMSO + HCl;
Amostra: Aβ_{42} + DMSO + HCl+ acil-hidrazona (0,2mM)

Figura 36. Efeito das acil-hidrazonas (**9**-**14**) e (**16**-**20**) sobre a emissão de fluorescência (450 nm) no tempo inicial do experimento (t_0) e após 24 h de incubação (t_{24}).

5 Conclusões

Neste trabalho foi planejada a síntese de uma série de acil hidrazonas baseadas na estrutura da 4-oxo-1,4-diidroquinolina-3-carboxilato de etila, que em estudos prévios havia sido identificada como inibidor da AChE (IC_{50} = 70 μM). Essa 4-oxo-1*H*-quinolina também apresentou efeito inibitório da fibrilização do peptídeo A*β*. Neste contexto, buscou-se nesse projeto manter o núcleo quinolônico, porém introduzindo outro grupo capaz de interagir com o sítio periférico da AChE. Selecionou-se a função acil-hidrazona que poderia funcionar como um espaçador entre o núcleo quinolônico e um grupo aromático que poderia ser complementar ao sítio periférico da enzima, constituindo-se o que é conhecido como duplo ligante. Assim, foram sintetizadas doze acil-hidrazonas a partir da quinolina, sendo que dez delas são inéditas. Os compostos foram caracterizados por Infravermelho e Ressonânica Magnética Nuclear de ^{1}H, ^{13}C e ^{15}N, com experimentos a alta temperatura e técnicas bidimensionais. A análise dos espectros indicou a presença de isômeros rotacionais relativos à ligação amídica e permitiu a determinação da configuração *E* da ligação imínica por estudos de RMN bidimensionais.

As doze acil-hidrazonas sintetizadas foram avaliadas frente a dois importantes alvos para desenvolvimento de fármacos para tratar a DA: a enzima AChE e o peptídeo A*β*. Com respeito à AChE, todas as acil-hidrazonas foram capazes de inibí-la com uma variação de IC_{50} de 0,0058 a 17 mM. Destacam-se entre os inibidores as acil-hidrazonas **19** e **20**, com valores de IC_{50} na faixa nanomolar.

Com o objetivo de entender o mecanismo da inibição, foram realizados estudos cinéticos com as acil-hidrazonas **11**, **14**, **19** e **20** que apresentaram melhores resultados para a inibição enzimática. As acil-hidrazonas **11**, **14** e **20** são inibidores competitivos, enquanto a acil-hidrazona **19** apresenta tipo de inibição mista. Essas conclusões foram tiradas a partir do cálculo de K_m e V_{max}.

Os estudos de *docking* molecular foram realizados no programa *Auto Docking Vina*, e os resultados foram compatíveis com o resultado experimental. Os compostos mais ativos têm uma boa energia de interação com a enzima. As acil-hidrazonas **19** e **20** interagem com ambos os sítios da enzima, embora com energias diferentes.

Com respeito à inibição da agregação do peptídeo *β*-amilóide, foi observada a diminuição de emissão de fluorescência da tioflavina, na presença das acil-hidrazonas, indicando a baixa concentração de fibrilas amilóides. Os percentuais de inibição variaram entre 49 % (acil-hidrazona **11**) e 67 % (acil-hidrazona **14)**.

Foram sintetizados dois complexos de cobre e zinco tendo como ligante a acil-hidrazona **13**. Para caracterização, fez-se a comparação entre os espectros do ligante precursor (**13**) com os espectros dos complexos (**13-Zn** e **13-Cu**).

Os espectros no infravermelho dos complexos revelaram um deslocamento na banda de carbonila para menores valores de comprimento de onda. Esta evidência nos remete à possibilidade de interação dessas carbonilas com o metal. A comparação dos espectros de próton da acil-hidrazona **13** e do complexo de zinco corroborou com a premissa de que há uma mudança de ambiente químico sugerindo a formação do complexo de zinco. Para o complexo de cobre (**13-Cu**), a análise de TG/DTA indica duas perdas de massa, sendo relacionadas à decomposição do ligante.

As análises dos espectros de massas por ESI no modo positivo de ambos os complexos metálicos de zinco e cobre são semelhantes e revelam a presença de complexos bidentados, preferencialmente, e outros picos de massas resultantes da dissociação do mesmo. As evidências apontam que o ligante deve se ligar de forma bidentada com o metal, sendo que este se liga a duas moléculas do ligante. Não foi possível realizar análise por difração de Raios-X, pois os complexos se apresentaram como sólidos não cristalinos. Desse modo, concluímos que há a formação do complexo metálico, no entanto, a total caracterização do complexo não foi satisfatória.

Os objetivos alcançados com sucesso resultaram na publicação do artigo da doutoranda na revista *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry,*[171] um periódico especializado com índice de impacto 4.293. O trabalho também foi apresentado oralmente no XXIV International Symposium on Medicinal Chemistry (EFMC-ISMC 2016) em Manchester – UK. Finalmente, desse trabalho concluímos que as acil-hidrazonas sintetizadas são protótipos mulit-alvo para a DA. Sua capacidade de interferir na atividade enzimática, pela ligação no sítio catalítico e no processo de fibrilização do peptídeo *β*-amilóide torna esses compostos promissores como modelos para futuros fármacos.

6 Referências Bibliográficas

1. Córdova-Palomera A, Kaufmann T, Persson K, *et al.* Disrupted global metastability and static and dynamic brain connectivity across individuals in the Alzheimer's disease continuum. *Sci Rep*. 2017;7:40268, 1-14.
2. Alzheimer's disease facts and figures. *Alzheimer's Dement*. 2017;13(4):325-373.
3. Maccioni RB, Farías G, Morales I, *et al.* The revitalized tau hypothesis on Alzheimer's disease. *Arch Med Res*. 2010;41(3):226-231.
4. Yamada J, Hatabe J, Tankyo K, *et al.* Cell type and region-specific enhancement of adult hippocampal neurogenesis by daidzein in middle-aged female mice. *Neuropharmacology*. 2016;111:92-106.
5. Kent BA, Mistlberger RE. Sleep and hippocampal neurogenesis: Implications for Alzheimer's disease. *Front Neuroendocrinol*. 2017;45:35-52.
6. Lazarov O, Hollands C. Hippocampal neurogenesis: Learning to remember. *Prog Neurobiol*. 2016;138:1-18.
7. Bonds JA, Kuttner-Hirshler Y, Bartolotti N, *et al.* Presenilin-1 dependent neurogenesis regulates hippocampal learning and memory. *PLoS One*. 2015;10(6), 1-22.
8. Richetin K, Moulis M, Millet A, *et al*. Amplifying mitochondrial function rescues adult neurogenesis in a mouse model of Alzheimer's disease. *Neurobiol Dis*. 2017;102:113-124.
9. i) Sreenivasmurthy S, Liu J-Y, Song J-X, *et al*. Neurogenic Traditional chinese medicine as a promising strategy for the treatment of Alzheimer's disease. *Int J Mol Sci*. 2017;18(2), 1-17; ii) Vivar C. Adult hippocampal neurogenesis, aging and neurodegenerative diseases: possible strategies to prevent cognitive impairment. *Curr Top Med Chem*. 2015;15(21):2175-2192; iii) Christian KM, Song H, Ming G. functions and dysfunctions of adult hippocampal neurogenesis. *Annu Rev Neurosci*. 2014;37(1):243-262.
10. Winner B, Winkler J. Adult neurogenesis in neurodegenerative diseases. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2015;7(4), 1-15.
11. Kiyota T, Morrison CM, Tu G, *et al*. Presenilin-1 familial Alzheimer's disease mutation alters hippocampal neurogenesis and memory function in CCL2 null mice. *Brain Behav Immun*. 2015;49:311-321.

12. Kent BA, Mistlberger RE. Sleep and hippocampal neurogenesis: Implications for Alzheimer's disease. *Front Neuroendocrinol*. 2017;45:35-52.
13. Dailey C. The impact of Alzheimer' s disease - the silent killer. *JCCC Honor J*. 2016;7(2):1-16.
14. Anand R, Gill KD, Mahdi AA. Therapeutics of Alzheimer's disease: past, present and future. *Neuropharmacology*. 2014;76:27-50.
15. Sharma N. Exploring biomarkers for Alzheime's disease. *J Clin Diagnostic Res*. 2016;10(7):KE01-KE06.
16. Efthymiou AG, Goate AM. Late onset Alzheimer's disease genetics implicates microglial pathways in disease risk. *Mol Neurodegener*. 2017;12(1):12-43.
17. Dubois B, Feldman HH, Jacova C, *et al.* Advancing research diagnostic criteria for Alzheimer's disease: the IWG-2 criteria. *Lancet Neurol*. 2014;13(6):614-629.
18. Sorbi S, Hort J, Erkinjuntti T, *et al*. EFNS-ENS Guidelines on the diagnosis and management of disorders associated with dementia. *Eur. J. Neurol.* 2012;19:1159-1179.
19. Rosenberg RN, Lambracht-Washington D, Yu G, Xia W. Genomics of Alzheimer disease. *JAMA Neurol*. 2016;73(7):867-874.
20. Kerchner GA, Wyss-Coray T. The role of aging in Alzheimer's disease. In: *Advances in Geroscience*. Cham: Springer International Publishing; 2016:197-227.
21. Lanoiselée H-M, Nicolas G, Wallon D, *et al.* APP, PSEN1, and PSEN2 mutations in early-onset Alzheimer disease: a genetic screening study of familial and sporadic cases. *PLOS Med*. 2017;14(3), 1-16.
22. Zeng Q, Zheng M, Zhang T, *et al*. Hippocampal neurogenesis in the APP/PS1/nestin-GFP triple transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *Neuroscience*. 2016;314:64-74.
23. Tanzi RE. The genetics of Alzheimer disease. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2012;2(10), 1-11.
24. http://www.alzforum.org/mutations; Acessado em 14/09/2017.
25. Michaelson DM. APOE ε4: The most prevalent yet understudied risk factor for Alzheimer's disease. *Alzheimer's Dement*. 2014;10(6):861-868.

26. Altmann A, Tian L, Henderson VW, *et al*. Sex modifies the *APOE*-related risk of developing Alzheimer disease. *Ann Neurol*. 2014;75(4):563-573.
27. Kepp KP. Ten challenges of the amyloid hypothesis of Alzheimer's disease. *J Alzheimer's Dis*. 2016;55(2):447-457.
28. Kumar A, Singh A, Ekavali. A review on Alzheimer's disease pathophysiology and its management: an update. Pharmacol Rep. 2015;67(2):195-203.
29. Kadavath H, Hofele RV., Biernat J, *et al.* Tau stabilizes microtubules by binding at the interface between tubulin heterodimers. *Proc Natl Acad Sci*. 2015;112(24):7501-7506.
30. Bennett RE, DeVos SL, Dujardin S, *et al.* Enhanced *tau* aggregation in the presence of amyloid *β*. *Am J Pathol*. 2017, 187(7):1601-1612.
31. Bierer LM, Hof PR, Purohit DP, *et al.* Neocortical Neurofibrillary Tangles Correlate with Dementia Severity in Alzheimer's Disease. *Arch Neurol*. 1995;52(1):81-88.
32. Arriagada PV, Growdon JH, Hedley-Whyte ET, Hyman BT. Neurofibrillary tangles but not senile plaques parallel duration and severity of Alzheimer's disease. *Neurology*. 1992;42(3):631-639.
33. Kuruva CS, Reddy PH. Amyloid beta modulators and neuroprotection in Alzheimer's disease: a critical appraisal. *Drug Discov Today*. 2017;22(2):223-233.
34. Sastre M, Ritchie CW, Hajji N. Metal Ions in Alzheimer's Disease Brain. *JSM Alzheimer's Dis Relat Dement*. 2015;2(1):1-6.
35. Magi S, Castaldo P, Macrí ML, *et al.* Intracellular Calcium Dysregulation: Implications for Alzheimer's Disease. *Biomed Res Int*. 2016;2016:1-14.
36. Akkaya Ç, Yavuzer SS, Yavuzer H, *et al*. DNA damage, DNA susceptibility to oxidation and glutathione redox status in patients with Alzheimer's disease treated with and without memantine. *J Neurol Sci*. 2017; 378:158-162.
37. Reitz C. Alzheimer's Disease and the amyloid cascade hypothesis: a critical review. *Int J Alzheimers Dis*. 2012:1-11.
38. Kuruva CS, Reddy PH. Amyloid beta modulators and neuroprotection in Alzheimer's disease: a critical appraisal. *Drug Discov Today*. 2017;22(2):223-233.

39. Netzer WJ, Bettayeb K, Sinha SC, *et al*. Gleevec shifts APP processing from a *β*-cleavage to a nonamyloidogenic cleavage. *Proc Natl Acad Sci*. 2017;114(6):1389-1394.
40. Cacquevel M, Ne Aeschbach L, Houacine J, *et al.* Alzheimer's disease-linked mutations in presenilin-1 result in a drastic loss of activity in purified γ-secretase complexes. *PLoS One*. 2012;7(4), 1-13.
41. Nigam SM, Xu S, Kritikou JS, *et al.* Exercise and BDNF reduce Aβ production by enhancing α-secretase processing of APP. *J Neurochem*. 2017;142(2):286-296.
42. Selkoe DJ, Hardy J, Andersen O, *et al.* The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease at 25 years. *EMBO Mol Med*. 2016;8(6):595-608.
43. Mohamed A, Chaves E. A*β* internalization by neurons and glia. *Int J Alzheimers Dis*. 2011;2011:1-17.
44. Mohamed T, Shakeri A, Rao PPN. Amyloid cascade in Alzheimer's disease: Recent advances in medicinal chemistry. *Eur J Med Chem*. 2016;113:258-272.
45. Andreeva TV, Lukiw WJ, Rogaev EI. Biological basis for amyloidogenesis in Alzheimer's disease. *Biochem*. 2017;82(2):122-139.
46. Mockett BG, Richter M, Abraham WC, *et al*. Therapeutic potential of secreted amyloid precursor protein APPsα. *Front Mol Neurosci*. 2017;10(30):1-14.
47. Van Der Kant R, Goldstein LSB. Cellular functions of the amyloid precursor protein from development to dementia. *Dev Cell*. 2015;32:502-515.
48. Wolfe MS. Processive proteolysis by γ-secretase and the mechanism of Alzheimer's disease. *Biol Chem*. 2012;393(9):899-905.
49. Barykin EP, Mitkevich VA, Kozin SA, *et al*. Amyloid *β* modification: a key to the sporadic Alzheimer's disease? *Front Genet*. 2017;8:1-5.
50. Ross CA, Poirier MA. Protein aggregation and neurodegenerative disease. *Nat Med*. 2004;10(7):S10-S17.
51. Ahmed M, Davis J, Aucoin D, *et al.* Structural conversion of neurotoxic amyloid-*β*(1–42) oligomers to fibrils. *Nat Struct Mol Biol*. 2010;17(5):561-567.
52. Potapov A, Yau W-M, Ghirlando R, *et al*. Successive stages of amyloid-*β* self-assembly characterized by solid-state nuclear magnetic resonance with dynamic nuclear polarization. *J Am Chem Soc*. 2015;137(25):8294-8307.

53. Cristóvão JS, Santos R, Gomes CM. Metals and neuronal metal binding proteins implicated in Alzheimer's disease. *Oxid Med Cell Longev*. 2016;2016:1-13.
54. Sanabria-Castro A, Alvarado-Echeverría I, Monge-Bonilla C. molecular pathogenesis of Alzheimer's disease: an update. *Ann Neurosci*. 2017;24(1):46-54.
55. Kepp KP. Bioinorganic chemistry of Alzheimer's disease. *Chem Rev*. 2012;112(10):5193-5239.
56. Roberts HL, Schneider BL, Brown DR. α-Synuclein increases *β*-amyloid secretion by promoting β-/γ-secretase processing of APP. *PLoS One*. 2017;12(2):e0171925, 1-22.
57. França MB, Lima KC, Eleutherio ECA. oxidative stress and amyloid toxicity: insights from yeast. *J Cell Biochem*. 2017;118(6):1442-1452.
58. Mamelak M. Energy and the Alzheimer brain. *Neurosci Biobehav Rev*. 2017;75:297-313.
59. Demuro A, Parker I, Stutzmann GE. Calcium signaling and amyloid toxicity in Alzheimer disease. *J Biol Chem*. 2010;285(17):12463-12468.
60. Kepp KP. Alzheimer's disease: How metal ions define *β*-amyloid function. *Coord Chem Rev*. 2017; 1-33.
61. Cheng X, Zhang L, Lian Y-J. Molecular targets in Alzheimer's disease: from pathogenesis to therapeutics. *Biomed Res Int*. 2015; 2015:1-6.
62. Zhou X, Li Y, Shi X, *et al.* An overview on therapeutics attenuating amyloid *β* level in Alzheimer's disease: targeting neurotransmission, inflammation, oxidative stress and enhanced cholesterol levels. *Am J Transl Res*. 2016; 8(2):246-269.
63. Greenough MA, Camakaris J, Bush AI. Metal dyshomeostasis and oxidative stress in Alzheimer's disease. *Neurochem Int*. 2013;62(5):540-555.
64. Istrate AN, Kozin SA, Zhokhov SS, *et al.* Interplay of histidine residues of the Alzheimer's disease Aβ peptide governs its Zn-induced oligomerization. *Sci Rep*. 2016;6:1-14.
65. Cristóvão JS, Santos R, Gomes CM. Metals and Neuronal Metal Binding Proteins Implicated in Alzheimer's Disease. *Oxid Med Cell Longev*. 2016;2016:1-14.

66. Leal SS, Botelho HM, Gomes CM. Metal ions as modulators of protein conformation and misfolding in neurodegeneration. *Coord Chem Rev*. 2012;256:2253-2270.
67. Butterfield DA, Sultana R. Methionine-35 of A*β*(1–42): Importance for oxidative stress in Alzheimer disease. *J Amino Acids*. 2011;2011:1-10.
68. Deyts C, Thinakaran G, Parent AT. APP Receptor? To Be or Not To Be. *Trends Pharmacol Sci*. 2016;37(5):390-411.
69. Mandelkow E-M, Mandelkow E. Biochemistry and cell biology of tau protein in neurofibrillary degeneration. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2012;2(7):1-25.
70. Rafii MS, Aisen PS. Advances in Alzheimer's disease drug development. *BMC Med*. 2015;13(1):62. 1-7.
71. Morales I, Jiménez JM, Mancilla M, *et al*. Tau oligomers and fibrils induce activation of microglial *J Alzheimer's Dis*. 2013;37(4):849-856.
72. Wischik CM, Harrington CR, *et al*. *Tau*-aggregation inhibitor therapy for Alzheimer's disease. *Biochem Pharmacol*. 2014;88(4):529-539.
73. Sanabria-Castro A, Alvarado-Echeverría I, Monge-Bonilla C. Molecular Pathogenesis of Alzheimer's Disease: An Update. *Ann Neurosci*. 2017;24(1):46-54.
74. Pereda AE. Electrical synapses and their functional interactions with chemical synapses. *Nat Rev Neurosci*. 2014;15(4):250-263.
75. Gotti C, Clementi F. Neuronal nicotinic receptors: from structure to pathology. *Prog Neurobiol*. 2004;74(6):363-396.
76. Manuel I, Lombardero L, LaFerla FM, *et al.* Activity of muscarinic, galanin and cannabinoid receptors in the prodromal and advanced stages in the triple transgenic mice model of Alzheimer's disease. *Neuroscience*. 2016;329:284-293.
77. Nakaizumi K, Terada T, Yoshikawa E, *et al*. Implication of altered α7 nicotinic receptors and amyloid deposition in the Alzheimer's brain *Eur Psychiatry*. 2016;33:s235-s237.
78. Confaloni A, Tosto G, Maria Tata A. Promising therapies for Alzheimer's disease. *Curr Pharm Des*. 2016;22(14):2050-2056.
79. Shaik JB, Palaka BK, Penumala M, *et al.* Synthesis, pharmacological assessment, molecular modeling and in silico studies of fused tricyclic coumarin derivatives

as a new family of multifunctional anti-Alzheimer agents. *Eur J Med Chem*. 2016;107:219-232.

80. Belluti F, Rampa A, Piazzi L, *et al*. Cholinesterase inhibitors: xanthostigmine derivatives blocking the acetylcholinesterase-induced *β*-amyloid aggregation. *J Med Chem*. 2005;48(13):4444-4456.
81. Branduardi D, Gervasio FL, Cavalli A, *et al*. The role of the peripheral anionic site and cation−π interactions in the ligand penetration of the human AChE gorge. *J Am Chem Soc*. 2005;127(25):9147-9155.
82. Dvir H, Silman I, Harel M, *et al*. Acetylcholinesterase: from 3D structure to function. *Chem Biol Interact*. 2010;187(1):10-22.
83. http://www.rcsb.org/pdb/explore.do?structureId=1eve; Acessado em 14/09/2017.
84. Johnson G, Moore SW. The peripheral anionic site of acetylcholinesterase: structure, functions and potential role in rational drug design. *Curr Pharm Des*. 2006;12(2):217-225.
85. Inestrosa NC, Dinamarca MC, Alvarez A. Amyloid-cholinesterase interactions. Implications for Alzheimer's disease. *FEBS J*. 2008;275(4):625-632.
86. Nascimento ÉCM, Oliva M, Swiderek K, *et al*. Binding analysis of some classical acetylcholinesterase inhibitors: insights for a rational design using free energy perturbation method calculations with QM/MM MD simulations. *J Chem Inf Model*. 2017;57(4):958-976.
87. Zhang Y, Kua J, McCammon JA. Role of the catalytic triad and oxyanion hole in acetylcholinesterase catalysis: an ab initio QM/MM study. *J Am Chem Soc*. 2002;124(35):10572-10577.
88. Dickerson TJ, Beuscher AE, Rogers CJ, *et al*. Discovery of acetylcholinesterase peripheral anionic site ligands through computational refinement of a directed library. *Biochemistry*. 2005;44(45):14845-14853.
89. Hou L-N, Xu J-R, Zhao Q-N, *et al.* A New Motif in the *N*-terminal of acetylcholinesterase triggers amyloid-*β* aggregation and deposition. *CNS Neurosci Ther*. 2014;20(1):59-66.
90. Pisani L, Catto M, De Palma A, *et al.* Discovery of potent dual binding site acetylcholinesterase inhibitors via homo- and heterodimerization of coumarin-based moieties. *ChemMedChem*. 2017:1-11.

91. https://www.fda.gov/; Acessado em 14/09/2017.
92. Blackard WG, Sood GK, Crowe DR, Fallon MB. Tacrine. A cause of fatal hepatotoxicity? *J Clin Gastroenterol*. 1998;26(1):57-59.
93. Zemek F, Drtinova L, Nepovimova E, *et al*. Outcomes of Alzheimer's disease therapy with acetylcholinesterase inhibitors and memantine. *Expert Opin Drug Saf*. 2014;13(6):759-774.
94. Maragos WF, Greenamyre JT, *et al*. Glutamate dysfunction in Alzheimer's disease: an hypothesis. *Trends Neurosci*. 1987;10(2):65-68.
95. Choi DW. Excitotoxic cell death. *J Neurobiol*. 1992;23(9):1261-1276.
96. Limapichat W, Yu WY, Branigan E, *et al*. Key binding interactions for memantine in the NMDA Receptor. *ACS Chem Neurosci*. 2013;4(2):255-260.
97. Kawas CH. Medications and diet protective factors for AD? *Alzheimer Dis Assoc Disord*. 2006;20:S89–S96.
98. Ul-Haq Z, Khan W, Kalsoom S, *et al*. In silico modeling of the specific inhibitory potential of thiophene-2,3-dihydro-1,5-benzothiazepine against BChE in the formation of β-amyloid plaques associated with Alzheimer's disease. *Theor Biol Med Model*. 2010;7(1):1-26.
99. Doody RS, Gavrilova SI, Sano M, *et al*. Effect of dimebon on cognition, activities of daily living, behaviour, and global function in patients with mild-to-moderate Alzheimer's disease: a randomised, double-blind, placebo-controlled study. *Lancet*. 2008;372:207-215.
100. Doody RS, Raman R, Farlow M, *et al*. A Phase 3 trial of semagacestat for treatment of Alzheimer's disease. *N Engl J Med*. 2013;369(4):341-350.
101. i) Imbimbo BP. Why Did Tarenflurbil Fail in Alzheimer's Disease? *J Alzheimer's Dis*. 2009;17(4):757-760; ii) Weggen S, Eriksen JL, Sagi SA, *et al*. Evidence that nonsteroidal anti-inflammatory drugs decrease amyloid *β*42 production by direct modulation of γ-Secretase Activity. *J Biol Chem*. 2003;278(34):31831-31837.
102. Ritchie CW, Bush AI, Mackinnon A, *et al.* Metal-Protein attenuation with iodochlorhydroxyquin (clioquinol) targeting Aβ amyloid deposition and toxicity in Alzheimer disease. *Arch Neurol*. 2003;60(12):1685.

103. Maia R do C, Tesch R, Fraga CAM. Acylhydrazone derivatives: a patent review. *Expert Opin Ther Pat*. 2014;24(11):1161-1170.

104. Krause T, Gerbershagen MU, Fiege M, *et al*. Dantrolene - A review of its pharmacology, therapeutic use and new developments. *Anaesthesia*. 2004;59(4):364-373.

105. Su X, Aprahamian I. Supramolecular and dynamic covalent reactivity hydrazone-based switches, metallo-assemblies and sensors. *Chem Soc Rev*. 2014;43(43):1963-1981.

106. Van Dijken DJ, Kovaříček P, Ihrig SP, *et al* Acylhydrazones as widely tunable photoswitches. *J Am Chem Soc*. 2015;137(47):14982-14991.

107. Wei Z-Y, Chi K-Q, Yu Z-K, *et al.* Synthesis and biological evaluation of chalcone derivatives containing aminoguanidine or acylhydrazone moieties. *Bioorg med chem lett*. 2016;26(24):5920-5925.

108. Cordeiro NM, Freitas RHCN, Fraga CAM, *et al*. discovery of novel orally active tetrahydro- naphthyl-*N*-acylhydrazones with in vivo anti-TNF-α effect and remarkable anti- inflammatory properties. *PLoS One*. 2014;473106, 1-17.

109. Cardoso LNF, Nogueira CM, *et al*. N-acylhydrazones containing thiophene nucleus: a new anticancer class. *Med Chem Res*. 2017;26:1605-1608.

110. Carcelli M, Rogolino D, Gatti A, *et al*. Chelation motifs affecting metal-dependent viral enzymes: N-acylhydrazone ligands as dual target inhibitors of HIV-1 integrase and reverse transcriptase ribonuclease h domain. *Front Microbiol*. 2017;8:440, 1-10.

111. Tatar E, Şenkardeş S, Sellitepe HE, *et al*. Synthesis, and prediction of molecular properties and antimicrobial activity of some acylhydrazones derived from *N*-(arylsulfonyl)methionine. *Turkish J Chem*. 2016;40:510-534.

112. (a) da Silva GS. Desenvolvimento de um híbrido molecular com base na estrutura da tacrina candidato a inibidor de acetilcolinesterase. 2013. 213 f. Dissertação (Mestrado em química) – Instituto de Química, Universidade estadual de Campinas. Campinas, São Paulo. 2013; (b) Huber PC. Avaliação do efeito de agentes antimicrobianos na inibição da agregação do peptídeo *β*-amilóide. 2012. 113 f. Dissertação (Mestrado em química) – Instituto de Química, Universidade estadual de Campinas. Campinas, São Paulo. 2012.

113. Coelho F, Almeida WP, Veronese D, *et al.* Ultrasound in Baylis–Hillman reactions with aliphatic and aromatic aldehydes: scope and limitations. *Tetrahedron*. 2002;58(37):7437-7447.

114. Moerdyk JP, Speelman AL, Kuper KE, *et al*. Synthesis and photochemistry of two quinoline analogs of the perimidinespirohexadienone family of photochromes. *J Photochem Photobiol A Chem*. 2009;205(2-3):84-92.

115. Cachiba TH, Demartini B, Diogo CE, *et al.* Síntese e avaliação preliminar da atividade antibacteriana e antifúngica de derivados n-acilidrazônicos. *Quim Nov*. 2012;35(8):1566-1569.

116. Lopes AB, Miguez E, Kümmerle AE, *et al*. Characterization of amide bond conformers for a novel heterocyclic template of N-acylhydrazone derivatives. *Molecules*. 2013;18(10):11683-11704.

117. Gökçe C, Gup R. Copper (II) complexes of acylhydrazones: synthesis, characterization and DNA interaction. *Appl Organomet Chem*. 2013;27(5):263-268.

118. Ellman GL, Courtney KD, Andres V, *et al.* A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem Pharmacol*. 1961;7(2):88-95.

119. One-way ANOVA followed by Dunnett's multiple comparisons test was performed using GraphPad Prism version 7.00 for Windows, GraphPad Software, La Jolla California USA.

120. Gaussian 09, Revision D.01, M. J. Frisch, G. W. Trucks, H. B. Schlegel *et al*. Gaussian, Inc., Wallingford CT, 2013.

121. Dewar MJS, Zoebisch EG, Healy EF, *et al.* Development and use of quantum mechanical molecular models. 76. AM1: a new general purpose quantum mechanical molecular model. *J Am Chem Soc*. 1985;107(13):3902-3909.

122. Trott O, Olson AJ., AutoDock Vina: improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization and multithreading, *J. Comput. Chem.*, 2010, 31, 455-461.

123. Nilsson MR. Techniques to study amyloid fibril formation in vitro. *Methods*. 2004;34(1):151-160.

124. Huber PC, Reis GP, Benevento CE, *et al*. Effect of levofloxacin and 3-carboethoxy-4-quinolone on the *β*-amyloid fibrils formation. *J Chem Pharm Res*. 2015;7(8):993-1000.

125. i) Je abek J, Uliassi E, Guidotti L, *et al*. Tacrine-resveratrol fused hybrids as multi-target-directed ligands against Alzheimer's disease. *Eur J Med Chem*. 2017;127:250-262. ii) Hamulakova S, Poprac P, Jomova K, *et al.* Targeting copper (II)-induced oxidative stress and the acetylcholinesterase system in Alzheimer's disease using multifunctional tacrine-coumarin hybrid molecules. *J Inorg Biochem*. 2016;161:52-62; iii) Minarini A, Milelli A, Simoni E, *et al*. Multifunctional tacrine derivatives in Alzheimer's disease. *Curr Top Med Chem*. 2013;13(15):1771-1786.

126. Wu W-Y, Dai Y-C, Li N-G, *et al*. Novel multitarget-directed tacrine derivatives as potential candidates for the treatment of Alzheimer`s disease. *J Enzyme Inhib Med Chem*. 2017;32(1):572-587.

127. Pudlo M, Luzet V, Ismaïli L, *et al*. Quinolone-benzylpiperidine derivatives as novel acetylcholinesterase inhibitor and antioxidant hybrids for Alzheimer disease. *Bioorg Med Chem*. 2014;22:2496-2507.

128. Huber PC, Reis GP, Amstalden MCKK, *et al.* Synthesis, spectroscopic characterizations and antimicrobial activity of copper and zinc complexes of levofloxacin, ciprofloxacin and 3-carboxy-4-quinolone. *Polyhedron*. 2013;57:14-19.

129. Coelho F, Almeida WP, Veronese D, *et al.* Ultrasound in Baylis–Hillman reactions with aliphatic and aromatic aldehydes: scope and limitations. *Tetrahedron*. 2002;58(37):7437-7447.

130. Galaverna R, Camilo NS, Godoi MN, Coelho F, Eberlin MN. Charge Tags for Most Comprehensive ESI-MS Monitoring of Morita-Baylis-Hillman (MBH)/ aza-MBH Reactions: Solid Mechanistic View and the Dualistic Role of the Charge Tagged Acrylate. *J Org Chem*. 2016;81(3):1089-1098.

131. Price KE, Broadwater SJ, Walker BJ, McQuade DT. A new interpretation of the Baylis-Hillman mechanism. *J Org Chem*. 2005;70(10):3980-3987.

132. Robiette R, Aggarwal VK, Harvey JN. Mechanism of the Morita-Baylis-Hillman reaction: a computational investigation. *J Am Chem Soc*. 2007;129(50):15513-15525.

133. Plata RE, Singleton DA. A case study of the mechanism of alcohol-mediated Morita Baylis–Hillman reactions. the importance of experimental observations. *J Am Chem Soc*. 2015;137(11):3811-3826.

134. Amarante, GW, Coelho F, *et al*. An approach for the enantioselective synthesis of biologically active furanones from a Morita-Baylis-Hillman adduct, *Tetrahedron,* 2010, *66*, 4370- 4376.

135. Kim JN, Lee KY, Kim HS, *et al.* Synthesis of 3-ethoxycarbonyl-4-hydroxyquinoline N-oxides from the baylis-hillman adducts of o -nitrobenzaldehydes. *Org Lett*. 2000;2(3):343-345.

136. Yoo BW, Choi JW, Yoon CM. A facile and efficient deoxygenation of amine-*N*-oxides with $Mo(CO)_6$. *Tetrahedron Lett*. 2006;47(1):125-126.

137. Moerdyk, JP, Speelman, AL, Kuper KE, *et al.* Synthesis and photochemistry of two quinoline analogs of the perimidinespirohexadienone family of photochromes. *J Photochem Photobiol A Chem*. 2009;205(2-3):84-92.

138. Banerji B, Conejo-Garcia A, McNeill LA, *et al*. The inhibition of factor inhibiting hypoxia-inducible factor (FIH) by *β*-oxocarboxylic acids. *Chem Commun*. 2005;(43):5438.

139. Malvacio I, Vera D, Moyano E. Microwave assisted synthesis of ethyl-quinolon-4-one-3-carboxylates and hydrolysis to quinolon-4-one-3-carboxylic acids. *Curr Microw Chem*. 2014;1(1):52-58.

140. (a) Farag AE, Wael AE. Synthesis of new 1,3,4-oxadiazol, thiadiazole, 1,2,4-triazole, and arylidenehydrazide derivatives of 4-oxo-1,4-dihydroquinoline with antimicrobial evaluation, *J. Heterocyclic Chem*., 2013, 50(S1), E1–E8; (b) Amarante, GW, Benassi, M, Pascoal, RN *et al.* Mechanism and synthesis of pharmacologically active quinolones from Morita–Baylis–Hillman adducts. *Tetrahedron*, 2010, *66*, 4370–4376.

141. Hamzi I, Barhoumi-Slimi TM, Abidi R. Synthesis, characterization, and conformational study of acylhydrazones of α,*β*-unsaturated aldehydes. *Heteroat Chem*. 2016;27(3):139-148.

142. Lopes AB, Miguez E, Kümmerle AE, *et al.* Characterization of amide bond conformers for a novel heterocyclic template of N-acylhydrazone derivatives. *Molecules*. 2013;18(10):11683-11704.

143. Sampson EL, Jenagaratnam L, McShane R. Metal protein attenuating compounds for the treatment of Alzheimer's dementia. In: Sampson EL, ed. *Cochrane Database of Systematic Reviews*. Chichester, UK: John Wiley & Sons, Ltd; 2012:CD005380.

144. Ritchie CW, Bush AI, Mackinnon A, *et al.* Metal-Protein attenuation with iodochlorhydroxyquin (clioquinol) targeting aβ amyloid deposition and toxicity in Alzheimer disease- a pilot phase 2 clinical trial. *Arch Neurol*. 2003;60(12):1685.

145. i) Wang Z, Wang Y, Li W, *et al.* Design, synthesis, and evaluation of multitarget-directed selenium-containing clioquinol derivatives for the treatment of Alzheimer's disease. *ACS Chem Neurosci*. 2014;5(10):952-962; ii) Liang SH, Southon AG, Fraser BH. Novel fluorinated 8-hydroxyquinoline based metal ionophores for exploring the metal hypothesis of Alzheimer's disease. *ACS Med Chem Lett*. 2015;6(9):1025-1029; iii) Adlard PA, Cherny RA, Finkelstein DI, *et al.* Rapid restoration of cognition in Alzheimer's transgenic mice with 8-hydroxy quinoline analogs is associated with decreased interstitial A*β*. *Neuron*. 2008;59(1):43-55; iv) Prachayasittikul V, Prachayasittikul S, Ruchirawat S, *et al.* 8-Hydroxyquinolines: a review of their metal chelating properties and medicinal applications. *Drug Des Devel Ther*. 2013;7:1157; v) Dgachi Y, Sokolov O, Luzet V, *et al.* Tetrahydropyranodiquinolin-8-amines as new, non hepatotoxic, antioxidant, and acetylcholinesterase inhibitors for Alzheimer's disease therapy. *Eur J Med Chem*. 2017;126:576-589.

146. Oliveri V, Vecchio G. 8-Hydroxyquinolines in medicinal chemistry: a structural perspective. *Eur J Med Chem*. 2016;120:252-274.

147. Cukierman DS, Pinheiro AB, Castiñeiras-Filho SLP, *et al*. A moderate metal-binding hydrazone meets the criteria for a bioinorganic approach towards Parkinson's disease: therapeutic potential, blood-brain barrier crossing evaluation and preliminary toxicological studies. *J Inorg Biochem*. 2017;170:160-168.

148. Singh R, Debnath A, Masram DT, *et al*., Synthesis and biological activities of selected quinolone-metal complexes, 2013, 3(6), 83-94.

149. Horta P, Kuş N, Henriques MSC, *et al*. Quinolone–hydroxyquinoline tautomerism in quinolone 3-esters. preserving the 4-oxoquinoline structure to retain antimalarial activity. *J Org Chem*. 2015; 80 (24):12244-12257.

150. Huber PC, Reis GP, Amstalden MCKK, *et al.* Synthesis, spectroscopic characterizations and antimicrobial activity of copper and zinc complexes of levofloxacin, ciprofloxacin and 3-carboxy-4-quinolone. *Polyhedron*. 2013;57:14-19.

151. Ellman GL, Courtney KD, Andres V, *et al.* New and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem Pharmacol*. 1961;7(2):88-95.

152. Worek F, Eyer P, Thiermann H. Determination of acetylcholinesterase activity by the Ellman assay: a versatile tool for in vitro research on medical countermeasures against organophosphate poisoning. *Drug Test Anal*. 2012;4 (3-4):282-291.

153. Chen Y, Bian Y, Sun Y, *et al*. Identification of 4-aminoquinoline core for the design of new cholinesterase inhibitors. *PeerJ*. 2016;4:1-15.

154. Voet D, Voet JG, Pratt CW, Fundamentals of biochemistry: life at the molecular level, 2nd ed., John Wiley & Sons, USA, 2008. Hoboken, NJ: Wiley, chapter 12, 363-404.

155. Berg JM, Tymoczko JL, Stryer L. Biochemistry. 5th edition. New York: W H Freeman; 2002. Section 8.4, The Michaelis-Menten Model Accounts for the Kinetic Properties of Many Enzymes. Available from: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK22430/ acessado em 14/09/2017.

156. Trott O, Olson AJ. *AutoDock Vina*: improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading. *J Comput Chem*. 2009;31(2): 455–461.

157. Sousa SF, Fernandes PA, Ramos MJ. Protein-ligand docking: current status and future challenges. *Proteins Struct Funct Bioinforma*. 2006;65(1):15-26.

158. Morris GM, Huey R, Olson AJ, Morris GM, Huey R, Olson AJ. Using AutoDock for ligand-receptor docking. In: *Current Protocols in Bioinformatics*. Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc.; 2008:8.14.1-8.14.40.

159. AutoDockTools, the free GUI for AutoDock. http://autodock.scripps.edu/resources/adt; Acessado em 14/09/2017.
160. http://www.rcsb.org/pdb/explore.do?structureId=1eve; Acessado em 14/09/2017.
161. http://autodock.scripps.edu/faqs-help/how-to/how-to-prepare-a-ligand-file-for-autodock4; Acessado em 14/09/2017.
162. Harel M, Schalkt I, Ehret-Sabatiert L, et al. Quaternary ligand binding to aromatic residues in the active-site gorge of acetylcholinesterase. *Biochemistry*. 1993;90:9031-9035.
163. Kryger G, Silman I, Sussman JL. Structure of acetylcholinesterase complexed with E2020 (Aricept®): implications for the design of new anti-Alzheimer drugs. *Structure*. 1999;7(3):297-307.
164. Verdonk ML, Boks GJ, Kooijman H, Kanters JA, Kroon J. Stereochemistry of charged nitrogen-aromatic interactions and its involvement in ligand-receptor binding. *J Comput Aided Mol Des*. 1993;7:173-182.
165. Definição de *redocking* no site The Scripps Research Institute - http://autodock.scripps.edu/faqs-help/glossary/redocking, acessado em 14/09/2017.
166. Rowe RK, Ho PS, J. Z, et al. Relationships between hydrogen bonds and halogen bonds in biological systems. *Acta Crystallogr Sect B Struct Sci Cryst Eng Mater*. 2017;73(2):255-264.
167. Cavallo G, Metrangolo P, Milani R, et al. The Halogen Bond. *Chem Rev*. 2016;116(4):2478-2601.
168. Naiki H, Higuchi K, Hosokawa M, *et al*. Fluorometric determination of amyloid fibrils *in vitro* using the fluorescent dye, thioflavine T. *Anal Biochem*. 1989;177(2):244-249.
169. Levine, H. Thioflavine-T interaction with amyloid β-sheet structures. *Amyloid*, 1995, 2,1−6.
170. Khurana R, Coleman C, Ionescu-Zanetti C, *et al*. Mechanism of thioflavin-t binding to amyloid fibrils. *J Struct Biol*. 2005;151(3):229-238.
171. da Silva GS, Figueiró M, Tormena CF, Coelho F, Almeida WP. Effects of novel acylhydrazones derived from 4-quinolone on the acetylcholinesterase activity and

A β 42 peptide fibrils formation. *J Enzyme Inhib Med Chem*. 2016;31(6):1464-1470.

172. https://chemicalize.com; acessado em 20/05/2017.

173. Srivatava N, Kumar A. Synthesis of substituted-4-oxo-1, 4-dihydro-3-[1-oxo-2-hydrazino-3-{ptoluenesulfon}] quinoline derivatives and their biological activity against bacterial infections. *Orient J Chem*. 2013;29(2):507-511.

7 Apêndice: *Parte experimental*

7.1 *Geral*

Os solventes comerciais utilizados foram previamente tratados e destilados. O tetraidrofurano foi pré-seco com hidreto de cálcio e destilado. Posteriormente, foi refluxado a partir de Na/benzofenona. Etanol e metanol foram secos com Mg/I_2 e, destilados a partir dos correspondentes alcóxidos de magnésio. Os demais solventes e reagentes foram obtidos da Sigma/Aldrich e não tiveram purificação prévia.

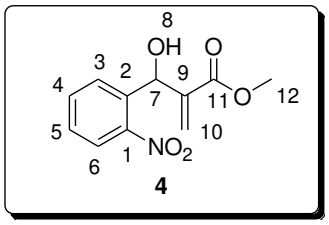
O monitoramento do progresso das reações foi feito por cromatografia em camada delgada (CCD) e empregou-se UV-VIS como revelador. As purificações e separações cromatográficas dos produtos obtidos foram efetuadas com sílica flash (230-400 mesh). A sonicação foi realizada em ultrassom de 81 W e 40 KHz.

Os espectros no infravermelho (IV) foram registrados em equipamento BOMEN modelo MBSERIES e as amostras preparadas em pastilha de KBr seco ou em filme, ou ainda, os dados de absorção foram diretamente coletados da amostra sólida no espectrofotômetro de Absorção IV (Agilent, modelo CARY 630 FTIV). Os espectros de RMN de ^{1}H e de RMN de ^{13}C foram adquiridos nos equipamentos da Inova 500 operando a 500 MHz para ^{1}H e 125 MHz para ^{13}C; BRUKER 250 operando a 250 MHz para ^{1}H e 62,5 MHz para ^{13}C. Os deslocamentos químicos são dados em ppm, e a multiplicidade dos carbonos determinada por DEPT 90 e 135. Os deslocamentos químicos (δ) foram expressos em ppm, tendo como padrão interno tetrametilsilano. Os espectros de massas de alta resolução foram obtidos em um espectrômetro Quadrupolo Híbridos Time-of-Flight (Q-TOF, Micromass) com fonte Electrospray (ESI) da Waters, modelo Xevo QTof MS e as análises termogravimétricas foram conduzidas no equipamento Seiko, modelo TG/DTA 6200, com atmosfera oxidante (25 - 1000 °C, Taxa de aquecimento: 10 °C/min).

A nomenclatura dos compostos corresponde à nomenclatura oficial da IUPAC fornecida pelo programa Chemicalize.[172] A seguir, detalhados somente os procedimentos experimentais que efetivamente conduziram a intermediários e os produtos desejados.

7.2 *Química*

7.2.1 Preparação do acrilato de metil-2-[(2-nitrofenil)(hidroxi)metila] (4)

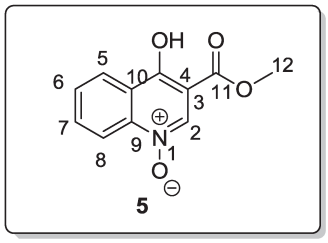


4

Em um balão de 50 mL, misturou-se o 2-nitrobenzaldeído (508 mg, 3,32 mmol), dissolvido em 5 mL de acrilato de metila (em excesso – 5,0 mmol) e o catalisador DABCO (0,65 mmol). A mistura foi submetida à sonicação em um banho de ultrassom. Depois de evidenciado o término da reação por CCD, o excesso de acrilato de metila foi evaporado sob pressão reduzida e o resíduo bruto foi redissolvido em acetato de etila. A fase orgânica foi lavada com solução saturada de NaCl, seca com Na_2SO_4. Após a filtração, o solvente foi evaporado sob pressão reduzida e o bruto submetido à purificação por coluna cromatográfica, utilizando-se um gradiente de eluição hexano: acetato de etila até 50%. O aduto de MBH foi obtido em 80 % de rendimento, como um óleo amarelo.

IV (KBr, cm^{-1}): ν 3394 (OH, NH_2), 1722 (C=O), 1633 (Csp^2).**RMN ^{1}H** (600 MHz, $CDCl_3$): δ 7,95 (dd, *J* = 1,25 e 8,0 Hz, H-4), 7,76 (dd, *J* = 1,5 e 7,75 Hz, H-7), 7,64 (td, *J* = 1,2 e 7,5 Hz, H-5), 7,44 (td, *J* = 1,45 e 7,75 Hz, H-6), 6,37 (s, H-10), 6,20 (s, H-10), 5,73 (s, 1H-8), 3,73 (s, OCH_3), 3,08 (s, OH); **RMN ^{13}C** (150 MHz, $CDCl_3$): δ 166,4 (C=O), 148,4 (C-2), 140,7 (C-3), 136,0 (CH2=C-9), 133,4 (CH2=C-10), 128,8 (CH-7), 128,70 (CH-5), 126,4 (CH-6), 67,8 (CH-OH-8), 52,2 (CH_3).

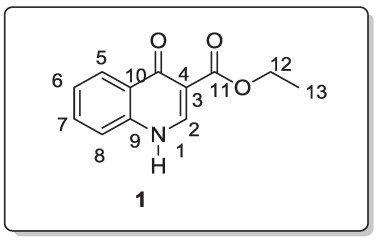
7.2.2 Preparação do óxido de 4-hidroxiquinolina-3-carboxilato de metila (5)



Em um balão de 50 mL, uma mistura do aduto de MBH **4** (498,1mg, 2,10 mmol) e 3 mL de ácido trifluoroacético (TFA), sob agitação magnética, foi aquecida a 70 – 75 °C. A reação foi monitorada por CCD e após 24 h foi evidenciado o término da reação. A solução foi colocada em água gelada e a mistura reacional foi extraída com acetato de etila fornecendo 395,2 mg de um sólido bege após purificação por coluna cromatográfica. Utilizou-se como gradiente diclorometano: metanol até 90:10. O rendimento da reação foi de 90 %.

IV (KBr, cm^{-1}): ν 3438 (OH), 1707 (C=O carbometoxi), 1614 - 1438 (Csp^2); **RMN ^{1}H** (500 MHz, $CDCl_3$): δ 8,73 (s, H-2) , δ 8,22 (d, *J* = 8,0 Hz, H-6), 7,86 (d, *J* = 1,2 Hz, H-8), 7,84 (d, *J* = 3,0 Hz, H-7), 7,52 (ddd, *J* = 1,2, 3,0 e 8,0 Hz, H-5); **RMN ^{13}C** (125 MHz, $CDCl_3$): δ 172,3 (C=O), 165,0 (C0-C9), 145,4 (C-2), 139,46 (C0-9), 133,5 (C-7), 127,8 (C0-10), 125,9 (CH-6), 125,6 (CH-5), 115,7 (CH-8), 107,8 (C0-10), 51,81 (CH_3).

7.2.3 4-Oxo-1,4-diidroquinolina-3-carboxilato de etila (1) - Método A



Em um balão de 25 mL contendo 194,9 mg (0,89 mol, mmol) do *N*-óxido **5** e sob atmosfera de nitrogênio foram adicionados 5 mL de etanol anidro e 242 mg de hexacarbonilmolibdato (VI). Esta mistura foi mantida em agitação e refluxo por 43 minutos, quando então foi evidenciado o término da reação por CCD. A mistura foi resfriada até a temperatura ambiente, filtrada e evaporada, fornecendo o composto reduzido **1** (287 mg) como um sólido branco, em 65 % de rendimento.

PF. 284-287 °C.

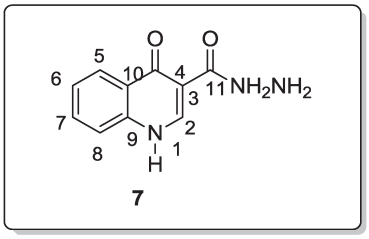
IV (KBr, cm^{-1}): ν 3101-3169 (-NH), 1705 (C=O, 4-oxo-quinolina), 1682 (C=O, carboetoxi), 1614 – 1475 (Csp^2); **RMN ^{1}H** (DMSO- d_6, 500 MHz): δ10,10 (s, 1H, H-2), 9,38 (dd, *J* = 8,7 Hz e 0,6 Hz, 1H, H-5), 9,15 (t, *J* = 8,7 Hz, 1H, H-8), 8,95 (td, *J*= 7,8 Hz e 0,6, 1H, H-7), 8,70 (d, *J* = 7,8 Hz, 1H, H-6), 5,34 (q, *J* = 7,2 Hz, 2H), 2,20 (t, *J* = 7,2 Hz, 3H); **RMN ^{13}C** (DMSO-d_6, 125 MHz) δ 171,7 (C=O), 167,50 (C=O), 144,2 (CH-2), 140,1 (C0-9), 138,8 (CH-7), 131,1 (CH-6), 121,6 (C0-10), 117,2 (CH-8), 104,4 (C0-3), 65,3 (CH_2), 12,7 (CH_3).

7.2.4 4-Oxo-1,4-diidroquinolina-3-carboxilato de etila (1) - Método B

Uma mistura de anilina (13,2 mmol, 1,2293 g) e dietil(etoximetileno)malonato (DEEMM) (14,5 mmol, 3,1353 g) foi refluxada até que a solução se torne levemente amarelada. Em seguida, foram adicionados 25 mL de difenil éter, e a solução foi mantida em refluxo a 120 °C por 24 horas. Depois de evidenciado o término da reação por CCD, o difenil éter foi destilado utilizando um sistema *Kugelrohr,* até que a solução final ficasse concentrada em aproximadamente metade do volume, formando-se um precipitado. Após secagem do sólido obtido por filtração a vácuo e sucessivas lavagens com éter dietílico, obteve-se a quinolona **1** como um sólido bege com rendimento de 80% (11,6 mmol).

Os dados espectroscópicos foram idênticos aos do produto obtido pelo método A.

7.2.5 Preparo da 4-Oxo-1,4- diidroquinolona-3-carbohidrazida (2):



7

Uma mistura equimolar da 3-carboetoxi-4-quinolona **1** (0,55 mmol) e hidrazina monoidratada (50%, 10,28 mmol) em etanol (5 mL) foi aquecida por 12 horas. Depois desse período, o solvente foi removido sob pressão reduzida, e o bruto reacional foi recristalizado em etanol, fornecendo a hidrazida **7**, como um sólido amarelo, em 80 % de rendimento.

PF. 280-283 °C (decomposição); **IV** (KBr, cm^{-1}): ν 3448-3265 (*H*N-C=O e H_2N-N), 1676 (C=O, hidrazida), 1631 (C=O, 4-carboxi); **RMN ^{1}H** (DMSO-d_6, 500 MHz): δ 10.72 (s, 1H, -CONH), 8,74 (s, 1H, H-2), 8,27 (dd, *J* = 8.4 e 1.2 Hz, 1H, H-5), 7,78 (td, *J* = 7,5 e 1,2 Hz, 1H, H-6), 7,47 (td, *J* = 7,5 e 1,2 Hz, 1H, H-7), 7,68 (dd, *J* = 7,5 Hz, 1H, H-8); **RMN ^{13}C** (DMSO-d_6, 125 MHz): δ 176,16 (C=O), 164,64 (C=ONHNH2), 143,56 (CH-2), 139,46 (C0-9), 133,22 (CH-6), 126,41 (C0-10), 125,91 (CH-5), 125,44 (CH-7), 119,44 (CH-8), 110,80 (C0-3).

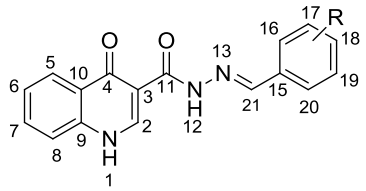
Esses dados estão de acordo com dados relatados por Srivatava N. *et al.*[173]

7.2.6 Procedimento geral para o preparo das acil-hidrazonas (9-20)

O preparo das acil-hidrazonas seguiu o método previamente relatado na literatura, [1] com algumas modificações, conforme descrito a seguir.

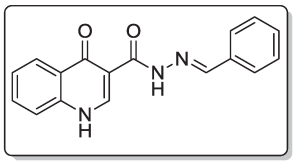
Uma mistura equimolar do aldeído aromático (4,3 mmol) e da quinolona hidrazida **5** (4,3 mmol) foi refluxada em etanol (3 mL), sob agitação magnética, na presença de 20 gotas de piperazina por 12 h – 18 h. Após evidenciado o término da reação por CCD, o excesso de solvente foi removido sob pressão reduzida e, em seguida, o material resultante foi filtrado a vácuo. O sólido coletado foi lavado com uma quantidade mínima de etanol e seco à temperatura ambiente.

Esqueleto acil-hidrazônico



[1] Todos os pontos de fusão das acil-hidrazonas foram maiores que 300 ° C.

7.2.6.1 4-Oxo-N'-[(1E)-fenilmetilideno]-1,4-diidroquinolina-3-carbohidrazida (9)

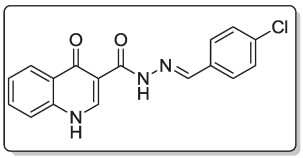


Sólido bege, Rendimento: 68 %.

IV (KBr, cm^{-1}): ν 3267-3057 (*H*N-C=O e H_2N-N), 1680 (C=O hidrazida), 1617 (C=O, quinolona); **RMN ^{1}H** (DMSO- d_6, 500 MHz) δ (ppm): 13,58 (s, 1H, -CONH), 8,42 (s, 1H, H-2), 8,43 (s, 1H, -N=CH-14), 8,31 (dd, *J* = 8.1 e 1.0 Hz, 1H, H-5), 7,81 (td, *J* = 8,1 e 1.0 Hz, 1H, H-6), 7,53 (td, *J* = 7,8 Hz e 1,0 Hz, 1H, H-7), 7,75 (d, *J* = 7,8 Hz, 1H, H-8), 7,45 (m, 3H, H-8, H-17 e H-19), 7,77 (dd, *J* = 7,4 e 1,4 Hz, 2H, H-16 e H-20);

RMN ^{13}C (DMSO-d_6, 150 MHz): δ 176,0 (C=O), 161,5 (C=ONH), 147,8 (CH-14), 144,4 (CH-2), 139,2 (C0-9), 134,5 (C0-15), 133,2 (CH-7), 130,1 (CH-18), 128,8 (CH-17 e H-19), 127,2 (CH-16 e CH-20), 125,9 (C0-10), 119,7 (CH-8), 109,6 (C0-3); **EM** (ESI+) Calculado para $C_{17}H_{14}N_3O_2$ (M + H^+): 292.1086. Encontrado: 292.1086.

7.2.6.2 4-Oxo-N'-[(1*E*)-(4-clorofenil)metilideno]-1,4-diidroquinolina-3-carbohidrazida (10)

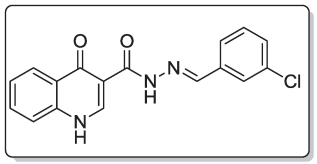


Sólido bege, Rendimento: 72 %.

IV (KBr, cm^{-1}): ν 3273-3026 (*H*N-C=O e H_2N-N), 1645 (C=O hidrazida), 1618 (C=O, quinolona); **RMN ^{1}H** (DMSO- d_6, 500 MHz) δ (ppm): 13,40 (s, 1H, -CONH), 8,9 (s, 1H, H-2), 8,47 (s, 1H, -N=CH-14), 8,34 (dd, *J* = 8,0 e 1,0 Hz, 1H, H-5), 7,57 (td, *J* = 8,0 e 1,0 Hz, 1H, H-17 e H-19), 7,85 (td, *J* = 8,2 e 1,0 Hz, 1H, H-7), 7,78 (d, *J* = 8,2 Hz, 1H, H-8), 7,82 (d, *J* = 8,6 Hz, 2H, H-16 e H-20), 7,57 (d, *J* = 8,6 Hz, 1H, H-6); **RMN ^{13}C** (DMSO-d_6, 125 MHz): δ 176,5 (C=O), 162,0 (C=ONH), 146,9 (CH-14), 144,9 (CH-2), 139,6 (C0-9), 133,8 (C0-15), 133,5 (CH-7), 129,4 (CH-17 e C-19), 129,3 (CH-16 e CH-20), 126,3 (C0-10), 125,9

(CH-7), 119,8 (CH-8), 110,34 (C0-3); **EM** (ESI+) Calculado para $C_{17}H_{12}ClN_3O_2$ (M + H^+): 326.0696. Encontrado: 326.0716.

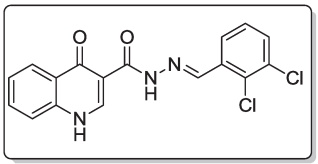
7.2.6.3 4-Oxo-N'-[(1*E*)-(3-clorofenil)metilideno]-1,4-diidroquinolina-3-carbohidrazida (11)



Sólido amarelo, Rendimento: 63 %.

IV (KBr, cm^{-1}): ν 3265-3062 (*H*N-C=O e H_2N-N), 1646 (C=O hidrazida), 1620 (C=O, quinolona); **RMN ^{1}H** (DMSO- d_6, 400 MHz): δ 13,38 (s, 1H, -CONH), 8,86 (s, 1H, -N=CH-14), 8,43 (s, 1H, H-2), 8,30 (dd, *J* = 8,2 e 1,2 Hz, 1H, H-5), 7,82 (td, *J* = 7,0 e 1,2 Hz, 1H, H-7), 7,74 (d, *J* = 7,0, 1H, H-8), 7,72 (ddd, *J* = 5,5, 3,3 e 1,2 Hz, 1H, H-16 e H-20), 7,54 (d, 8,2 , 1H, H-6), 7,50 (dd, *J* = 1,2 e 3,3 Hz, 2H, H-17 e H-18); **RMN ^{13}C** (DMSO-d_6, 100 MHz): δ 176,5 (C=O), 162,0 (C=ONH), 146,6 (CH-14), 144,9 (CH-2) , 139,5 (C0-9), 137,1 (C0-15), 134,0 (C0-19), 133,6 (CH-7), 131,2 (CH-18), 130,2 (CH-17), 130,1 (CH-6), 126,9 (CH-20), 126,3 (CH-16), 125,9 (CH-7), 119,6 (CH-8), 110,3 (C0-3). **EM** (ESI+) Calculado para $C_{17}H_{13}ClN_3O_2$ (M + H^+): 326.0696. Encontrado: 326.0716.

7.2.6.4 4-Oxo-N'-[(1*E*)-(2,3-diclorofenil)metilideno]-1,4-diidroquinolina-3-carbohidrazida (12)

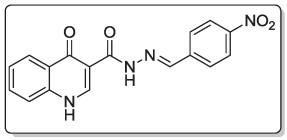


Sólido amarelo, Rendimento: 65%.

IV (KBr, cm^{-1}): ν 3265-3067 (*H*N-C=O e H_2N-N), 1662 (C=O hidrazida), 1621 (C=O, quinolona); **RMN ^{1}H** (DMSO- d_6, 500 MHz): δ 13,52 (s, 1H, -CONH), 8,89 (s, 1H, H-2), 8,76 (s, 1H, -N=CH-14), 8,32 (d, *J* = 7,8 Hz, 1H, H-5), 8,01 (d, *J* = 7,0 Hz, 1H, H-8), 7,83 (t, *J* = 7,0 Hz, 1H, H-16), 7,76 (m, 2H, H-17 e H-18), 7,55 (t, *J* = 7,8 Hz, 1H, H-7); 7,50 (t, *J* = 7,8 Hz, 1H, H-6); **RMN ^{13}C** (DMSO-d_6, 125 MHz): δ 173,5 (C=O), 161,9 (C=ONH),

148,2 (C0-20), 145,5 (CH-2) , 143,2 (C0-19), 142,8 (CH-14), 141,4 (C0-15), 139,8 (C0-9), 133,4 (CH-16), 128,9 (CH-17), 128,4 (CH-18), 128,80 (CH-6), 127,1 (C0-10), 126,2 (CH-7), 126,3 (CH-17), 124,5 (CH-5), 116,8 (CH-8), 107,9 (C0-3); EM (ESI+) Calculado para $C_{17}H_{11}Cl_2N_3O2$ (M + H^+): 360,0607. Encontrado: 361,1557.

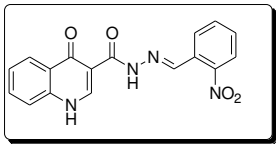
7.2.6.5 4-Oxo-N'-[(1*E*)-(4-nitrofenil)metilideno]-1,4-diidroquinolina-3-carbohidrazida (13):



Sólido amarelo, Rendimento: 90%.

IV (KBr, cm^{-1}): ν 3267-3067 (HN-C=O e H_2N-N), 1670 (C=O hidrazida), 1630 (C=O, quinolona); **RMN ^{1}H** (DMSO-d_6, 500 MHz): δ 13,62 (s, 1H, -CONH-12), 8,84 (s, 1H, H-2), 8,72 (s, 1H, -N=CH-14), 8,34 (dd, *J* = 8,0 e 1,0 Hz, 1H, H-5), 7,99 (d, *J* = 8,5 Hz, 2H, H-16 e H-20), 8,31 (d, *J* = 8,5 Hz, 2H, H-17 e H-19), 7,81 (td, *J* = 8,0 e 1,0 Hz, 1H, H-7), 7,76 (d, *J* = 8,0 Hz, 1H, H-8) 7,52 (td, *J* = 8,0 e 1,0 Hz, 1H, H-6); RMN ^{13}C (DMSO-d_6, 125 MHz): δ 175,9 (C=O), 161,9 (C=ONH), 147,7 (CH-14), 147,7 (C0-20), 145,2 (CH-2), 140,9 (C0-15), 139,7 (C0-9), 132,9 (CH-7), 127,7 (CH-16 e CH-17), 125,9 (C0-10), 125,3 (CH-18 e CH-19), 125,4 (CH-6), 124,0 (CH-5), 109,6 (C0-3), 119,7 (CH-8); **RMN ^{15}N** (DMSO- d_6, 60 MHz) δ (ppm) 145,4 (s, 1N, NH-1), 176,0 (s, 1H, -CONH-12), 329,6 (s, 1N, -N=C-13), 369,6 (s, 1N, NO_2-21); EM (ESI+) Calculado para $C_{17}H_{12}N_4O_4$ (M + H^+): 337,0937. Encontrado: 337,0963.

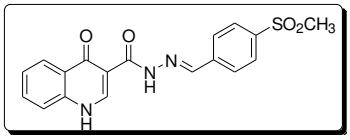
7.2.6.6 4-Oxo-N'-[(1E)-(2-nitrofenil)metilideno]-1,4-diidroquinolina-3-carbohidrazida (14):



Sólido amarelo, Rendimento: 84 %.

IV (KBr, cm^{-1}): ν 3099-3029 (*H*N-C=O e H_2N-N), 1672 (C=O hidrazida), 1608 (C=O, quinolona); **RMN ^{1}H** (DMSO- d_6, 500 MHz) δ (ppm): 13,48 (s, 1H, -CONH), 8,86 (s, 1H, H-2), 8,73 (s, 1H, -N=CH-14), 8,29 (d, *J* = 7,5 Hz, 1H, H-5), 8,09 (d, *J* = 8,0 Hz, 1H, H-19) 8,07 (d, *J* = 8,0 Hz, 1H, H-16), 7,82 (t, *J* = 7,5 Hz, 2H, H-7 e H-17), 7,74 (t, *J* = 7,5 Hz, 1H, H-8), 7,68 (t, *J* = 7,5 Hz, 1H, H-18), 7,54 (t, 7,5 Hz, 1H, H-6); **RMN ^{13}C** (DMSO-d_6, 125 MHz) δ (ppm): 176,5 (C=O), 162,3 (C=ONH), 148,7 (C0-20), 145,0 (CH-14), 143,8 (CH-2) 139,5 (C0-9), 134,2 (CH-17), 133,7 (CH-7), 131,1 (CH-18), 129,2 (C0-15), 128,8 (CH-16), 126,3 (C0-10), 126,0 (CH-5), 125,9 (CH-6), 125,1 (CH-19), 110,2 (C0-3), 119,6 (CH-8); **RMN ^{15}N** (DMSO- d_6, 60 MHz): δ 143,60 (s, 1N, NH-1), 177,10 (s, 1H, -CONH-12), 325,29 (s, 1N, -N=C-13); EM (ESI+) Calculado para $C_{17}H_{13}N_4O_4$ ($M + H^+$): 337,0937. Encontrado: 337,0965.

7.2.6.7 4-Oxo-N'-[(1*E*)-(4-metanosulfonilfenil)metilideno]-1,4-diidroquinolina-3-carbohidrazida (15):

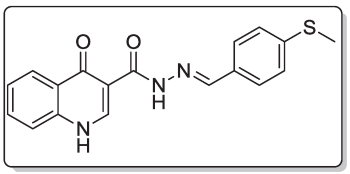


Sólido amarelo, Rendimento: 63%.

IV (KBr, cm^{-1}): ν 3261-3064 (HN-C=O e H_2N-N), 1654 (C=O hidrazida), 1637 (C=O, quinolona); **RMN ^{1}H** (DMSO-d_6, 500 MHz): δ 13,51 (s, 1H, -CONH-12), 8,89 (s, 1H, H-2), 8,56 (s, 1H, -N=CH-14), 8,34 (d, J = 8,1 Hz, 1H, H-7), 8,01 (s, 4H, H-16-20), 7,81 (td, J = 8,1 Hz, 1,0 Hz, 1H, H-7), 7,76 (d, J = 8,1 Hz, 1H, H-8), 7,54 (td, J = 8,1 e 1,0 Hz, 1H, H-6), 2,23 (s, 3H, H-21); **RMN ^{13}C** (DMSO-d_6, 125 MHz): δ 176,5 (C=O), 162,1 (C=ONH), 146,3 (CH-14), 145,0 (CH-2), 141,8 (C0-20), 139,8 (C0-15), 139,6 (C0-9), 128,2 (CH-16 e 17),

127,9 (CH-18 e 19), 126,3 (C0-10), 125,9 (CH-7), 125,9 (CH-6), 133,6 (CH-7), 110,3 (C0-3), 119,7 (CH-8), 43,95 (CH-21); EM (ESI+) Calculado para $C_{18}H_{15}N_3O_4S$ (M + H^+): 370,0862. Encontrado: 370,0889.

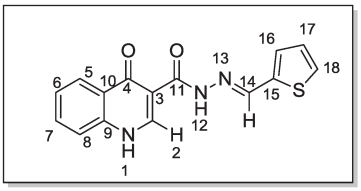
7.2.6.8 4-Oxo-N'-[(1E)-[4-(metilsulfanil)fenil]metilideno]-1,4-diidroquinolina-3-carbohidrazida (16):



Sólido branco, Rendimento: 85%.

IV (KBr, cm^{-1}): ν 3265-2920 (HN-C=O e H_2N-N), 1670 (C=O hidrazida), 1630 (C=O, quinolona); **RMN ^{1}H** (DMSO- d_6, 500 MHz) δ 13,33 (s, 1H, -CONH-12), 8,86 (s, 1H, H-2), 8,38 (s, 1H, -N=CH-14), 8,30 (dd, *J* = 8,1 e 0,9 Hz, 1H, H-5), 7,80 (td, *J* = 8,2 Hz e 0,9 Hz, 1H, H-7), 7,75 (d, *J* = 8,1 Hz, 1H, H-6), 7,69 (d, *J* = 8,5 Hz, 2H, H-16 e H-20), 7,52 (td, *J* = 8,2 e 0,9 Hz, 1H, H-8), 7,33 (d, *J* = 8,5 Hz, 2H, H-17 e H-19), 2,52 (s, 3H, H-21). **RMN ^{13}C** (DMSO-d_6, 125 MHz): δ 176,4 (C=O), 161,9 (C=ONH), 147,6 (CH-14), 144,9 (CH-2), 141,3 (C0-20), 139,9 (C0-9), 133,3 (CH-7), 131,3 (C0-15), 128,0 (CH-16 e 17), 126,4 (C0-10), 125,9 (CH-18 e 19), 125,7 (CH-5), 125,6 (CH-6), 119,9 (CH-8), 110,5 (C0-3), 44,3 (SCH_3) **EM** (ESI+) Calculado para $C_{18}H_{16}N_3O_2S$ (M + H^+): +): 338.0963. Encontrado: 338,0988.

7.2.6.9 4-Oxo-N'-[(1E)-tiofeno-2-metilideno]-1,4-diidroquinolina-3-carbohidrazida (17)

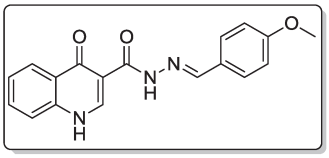


Sólido branco, Rendimento: 79 %.

IV (KBr, cm^{-1}): ν 3264-3058 (HN-C=O e H_2N-N), 1645 (C=O hidrazida), 1620 (C=O, quinolona). **RMN ^{1}H** (DMSO-d_6, 500 MHz) δ 13,38 (s, 1H, -CONH-12), 8,84 (s, 1H, H-2), 8,66 (s, 1H, -N=CH-14), 8,31 (d, *J* = 7,9 Hz, 1H, H-5), 7,80 (t, *J* = 8,0 Hz, 1H, H-7), 7,74 (d, *J* = 8,0 Hz, 1H, H-8), 7,68 (d, *J* = 4,0 Hz, 1H, H-18), 7,53 (t, *J* = 7,9 Hz, 1H, H-6),

7,68 (d, *J* = 4,0 Hz, 1H, H-18), 7,47 (d, *J* = 3,0 Hz, 1H, H-16), 7,16 (dd, *J* = 4,0 e 3,0 Hz 1H, H-17). **RMN ^{13}C** (DMSO-d_6, 125 MHz) δ (ppm): 176,2 (C=O), 162,1 (C=ONH), 145,4 (CH-14), 143,1 (CH-2), 140,5 (C0-15), 139,5 (C0-9), 133,3 (CH-7), 131,5 (CH-18), 129,3 (CH-16), 128,4 (CH-17), 126,4 (C0-10), 125,9 (CH-5), 125,6 (CH-6), 120,4 (CH-8), 110,2 (C0-3). **EM** (ESI+) Calculado para $C_{15}H_{12}N_3O_2S$ ($M + H^+$): 298,0650. Encontrado: 298,0672.

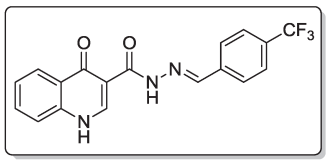
7.2.6.10 4-Oxo-N'-[(1E)-(4-metoxifenil)metilideno]-1,4-diidroquinolina-3-carbohidrazida (18)



Sólido branco, Rendimento: 85%.

IV (KBr, cm^{-1}): ν 3267-2894 (HN-C=O e H_2N-N), 1647 (C=O hidrazida), 1604 (C=O, quinolona). **RMN ^{1}H** (DMSO- d_6, 500 MHz): δ 13,20 (s, 1H, -CONH-12), 12,97 (d, *J* = 6,1 Hz, 1H, -NH-1), 8,82 (d, *J* = 6,1 Hz, 1H, H-2), 8,34 (s, J = 1H, -N=CH-14), 8,30 (d, *J* = 7,7 Hz, 1H, H-7), 7,81 (d, *J* = 8,3 Hz, 1H, H-7), 7,73 (d, *J* = 8,3 Hz, 3H, H-8, H-16 e H-20), 7,53 (t, *J* = 7,7 Hz, 1H, H-6), 7,02 (d, *J* = 8,3 Hz, 2H, H-17 e H-19), 3,80 (s, 3H, H-21). **RMN ^{13}C** (DMSO-d_6, 125 MHz): δ 176,7 (C=O), 161,7 (C=ONH), 161,3 (C0-20), 148,1 (CH-2), 144,6 (CH-14), 139,4 (C0-9), 133,5 (CH-7), 129,3 (CH-16 e 20), 127,3 (C0-15), 126,3 (C0-5), 125,9 (CH-7), 125,7 (CH-6), 119,6 (CH-8), 110,5 (C0-3), 114,7 (CH-18 e 19), 55,8 (OCH_3). **EM** (ESI+) Calculado para $C_{18}H_{16}N_3O_3$ ($M + H^+$): 322,1192. Encontrado: 322,1215.

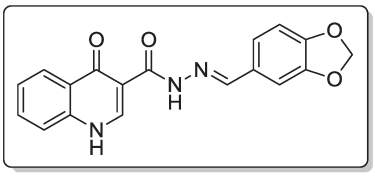
7.2.6.11 4-Oxo-N'-[(1E)-[4-(trifluorometil)fenil]metilideno]-1,4-diidroquinolina-3-carbohidrazida (19)



Sólido branco, Rendimento: 85%.

IV (KBr, cm^{-1}): ν 3103-2928 (*H*N-C=O e H_2N-N), 1639 (C=O hidrazida), 1614 (C=O, quinolona). **RMN ^{1}H** (DMSO- d_6, 500 MHz): δ 13,75 (s, 1H, -CONH-12), 8,72 (s, 1H, H-2), 8,49 (s, 1H, -N=CH-14), 8,26 (d, J = 8.0, 1H, H-5), 7,92 (d, *J* = 8,0 Hz, 1H, H-8), 7,80 (d, *J* = 8,0 Hz, 2H, H-17 e H-19), 7,71 (t, *J* = 8,0 Hz, 1H, H-7). 7,49 (t, *J* = 8,0 Hz, 3H, H-6, H-16 e H-20), **RMN ^{13}C** (DMSO-d_6, 125 MHz): δ 172,4 (C=O), 161,7 (C=ONH), 145,5 (CH-14), 141,6 (CH-2), 139,8 (C0-9), 132,1 (CH-7), 129,7 (C0-18), 127,5 (CF_3-21), 126,7 (CH-6), 125,7 (CH-5), 125,32 (C0-10), 125,6 (CH-16 e 20), 125,1 (CH-17 e 19), 124,74 (C0-15), 116,4 (CH-8), 107,10 (C0-3). **EM** (ESI+) Calculado para $C_{18}H_{13}F_3N_3O_2$ (M + H^+): 360,0954. Encontrado 360,0987.

7.2.6.12 4-Oxo-N'-[(1E)-1-(2H-1,3-benzodioxol-5-il)metilideno]-1,4-diidroquinolina-3-carbohidrazida (20)



Sólido branco, Rendimento: 85%.

IV (KBr, cm^{-1}): ν 3101-2987 (HN-C=O e H_2N-N), 1686 (C=O hidrazida), 1616 (C=O, quinolona). **RMN ^{1}H** (DMSO- d_6, 500 MHz): δ 13,82 (s, 1H, -CONH-12), 8,68 (s, 1H, H-2), 8,31 (s, 1H, -N=CH-14), 8,29 (dd, *J* = 8,0 e 1,0 Hz, 1H, H-5), 8,11 (d, *J* = 8,4, 1H, H-8), 7,74 (td, *J* = 8,4 e 1,0 Hz, 1H, H-7), 7,50 (td, *J* = 8,0 e 1,0 Hz, 1H, H-6), 7,34 (d, *J* = 1,4 Hz , 1H, H-20), 7,23 (dd, *J* = 8,1 e 1,4 Hz, 1H, H-16), 7,00 (d, *J* = 8.1 Hz , 1H, H-17), 6,11 (s , 2H, H-21). **RMN ^{13}C** (DMSO-d_6, 125 MHz): δ 171,5 (C=O), 162,2 (C=ONH), 149,3 (C0-18), 148,3 (C0-19), 147,9 (CH-14), 146,9 (CH-2), 140,8 (C0-15), 133,4 (CH-7), 129,6 (C0-9), 126,4 (C0-10), 125,9 (CH-5), 123,9 (CH-6), 123,6 (CH-16), 119,8 (CH-8), 110,5 (C0-3),

108,9 (CH-17), 105,7 (CH-20), 101,93 (CH_2-21); **EM** (ESI+) Calculado para $C_{18}H_{14}N_3O_4$ (M + H^+): 336,0979. Encontrado: 336,1008.

7.2.7 Preparação dos complexos de zinco e cobre com a acil-hidrazona (13-Zn e 13-Cu)

Em um balão volumétrico de 50 mL, uma solução de 1 mmol de acetato do respectivo metal em EtOH (10 ml) foi adicionada a uma solução da acil-hidrazona **13** (2 mmol, 0,202 g). Essa mistura foi refluxada *overnight* e o resíduo bruto obtido foi filtrado a vácuo e lavado extensivamente com etanol. O sólido foi seco a temperatura ambiente.

7.2.7.1 Complexo de zinco (13-Zn)

Sólido amarelo, Rendimento: 68 %.

IV (KBr, cm^{-1}): ν 3470-3448 (-C=O-HN-N=), 1622 (C=O hidrazida), 1592 (C=O, quinolona),1506 (C=N), 1476 (C=C), 1336 (NO_2), 1292 (N-N). **RMN ^{1}H** (DMSO- d_6, 500 MHz) δ 14,13 (s, 1H, -CONH), 8,99 (s, 1H, OH-4), 8,61 (s, 1H, H-2), 8,35 (d, *J* = 8,0 Hz , 4H, -N=CH-14,H-5, H-17,19), 8,04 (d, *J* = 8,0 Hz , 2H, H-16,20), 7,80 (d, *J* = 8,0 Hz, 1H, H-8), 7,56 (d, *J* = 8,0 Hz, 1H, H-6).

7.3 *Biologia*

7.3.1 Ensaio de inibição da acetilcolinesterase

A enzima utilizada para o ensaio de inibição da AChE foi da espécie *Electrophorus electricus* (electric eel) - Type VI-S (Sigma-Aldrich). O substrato ATC, DNTP, 1,1,1,3,3,3-Hexafluoro-2-propanol (HFIP), DMSO estéril e a tacrina foram adquiridos da Sigma-Aldrich.

7.3.1.1 Preparo do reagente de Elmman

O reagente de Ellman foi preparado diluindo-se 5,5'-ditiobis- (2-nitrobenzóico (DTNB) em tampão Tris/HCl (1 mM). O substrato iodeto de acetiltiocolina (ATC) 0,8 mM foi preparado a partir de diluição do ATC comercial (Aldrich Chem. Co). A solução tampão Tris/HCl (50 mM, pH 8) foi preparada a partir da base da marca Fluka Analytical (Trisma®) com monitoramento de pH com pHmetro modelo pH300M da marca Analyser.

7.3.2 Ensaio do estudo de fibrilização do peptídeo β-amilóide

7.3.2.1 Materiais e preparo da solução de tioflavina (ThT)

O peptídeo Aβ_{42} foi adquirido da American Peptide Co, e mais recentemente da BACHEN. A Tioflavina T foi adquirido da Sigma-Aldrich.

7.3.2.2 Preparação da solução de tioflavina-T

A solução estoque de ThT foi preparada dissolvendo-se cerca de 8 mg (0,02 mmol) da ThT para 10 mL de tampão fosfato (pH 7.4). O conteúdo foi filtrado através de filtro Millipore 0,2 μm e o filtrado (solução estoque), mantido a temperatura ambiente e ao abrigo da luz. Esta solução é estável por uma semana nestas condições. No dia da análise, a solução estoque foi diluída em tampão fosfato (1:50 v/v), com a concentração final de 0,05 mM.

7.3.2.3 Preparação do filme peptídico

Inicialmente, 1 mg (0,2 mmol) do peptídeo foi dissolvido em 1 mL de 1,1,1,3,3,3-Hexafluoro-2-propanol (HFIP). O frasco contendo o peptídeo foi lavado minuciosamente e, em seguida, mantido fechado à temperatura ambiente por 60 minutos. Em seguida, o frasco foi colocado no gelo por 5-10 minutos e a solução foi dividida igualmente em seis frascos. Os frascos foram mantidos abertos na capela até evaporação do HFIP e, em seguida, o material foi centrifugado à vácuo por 10 min. Os filmes foram armazenados em freezer a -80°C até o momento de uso.

7.3.2.4 Ensaio fibrilogênico na presença e ausência das acil-hidrazonas

Nos ensaios de inibição, o filme peptídico (Aβ_{42}) é ressuspenso em 6 μL de uma solução 0,2 mmol.L^{-1} do composto teste (**9** - **20**) em DMSO estéril. A solução devidamente homogeneizada com uma pipeta e posteriormente sonicada por 10 minutos. Depois desse periodo, adicionou-se 29 μL de solução 10 mM de HCl. Esta solução foi homogeneizada em vórtex por 30 segundos e incubada a 37 °C.

As amostras controle (Aβ_{42} + DMSO + HCl) e o branco (Aβ_{42} + DMSO) são preparadas da mesma forma, porém ambos sem a presença do composto-teste. As medidas de

fluorescência foram realizadas em dois momentos; inicialmente, no momento da mistura do composto teste (t_0) e após 24 horas (t_{24}) de incubação a 37 °C. Os espectros de fluorescência foram obtidos a 25 °C, na velocidade de 1 $nm.s^{-1}$ com aberturas de janelas para excitação e emissão de 10 mm e 10 mm, sendo os resultados de cada ponto do espectro a média de 10 leituras. Após agitação da solução por 1 minuto, a ligação de ThT foi então monitorada for fluorescência com excitação em 450 nm e espectro de emissão a 485 nm.

8 Anexo

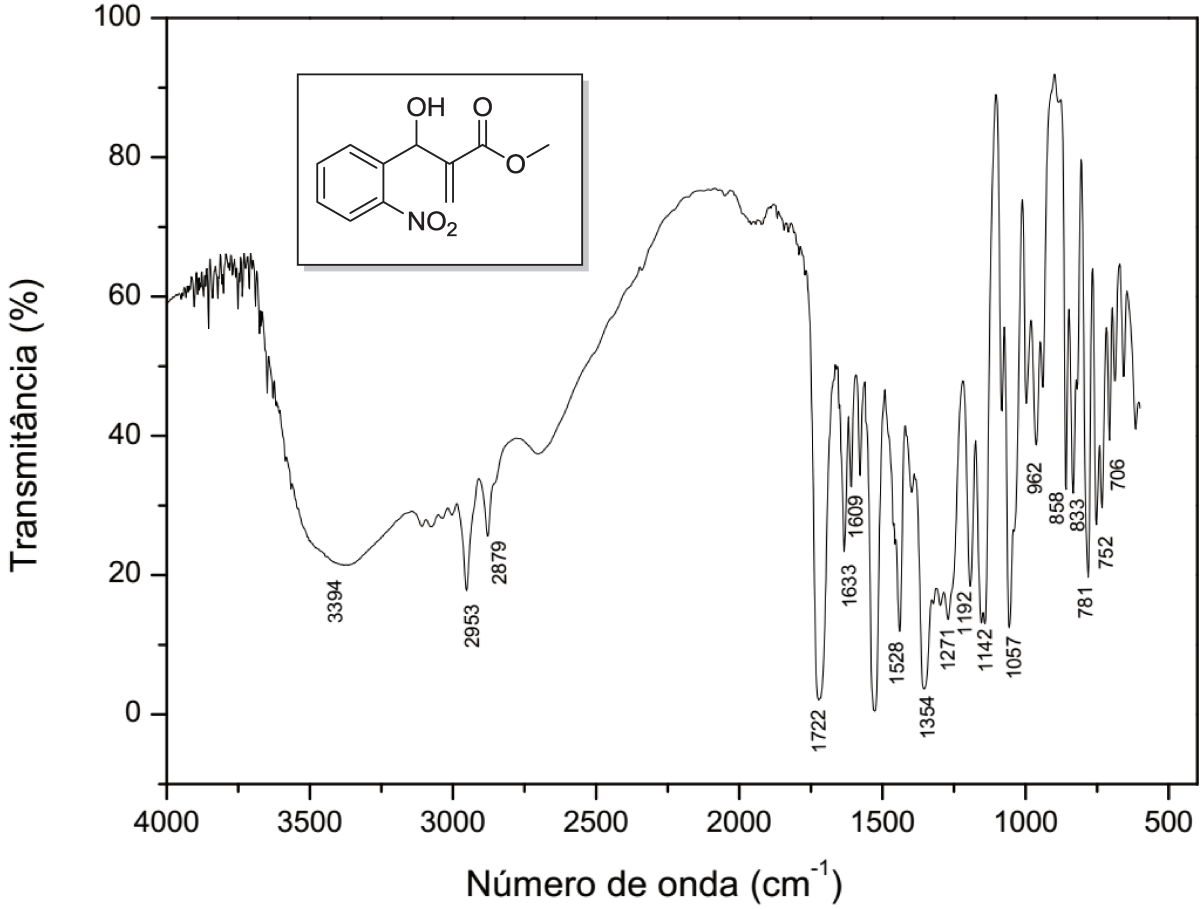


Figura 37. Espectro de IV (filme, ν_{max}) do aduto de MBH **4**.

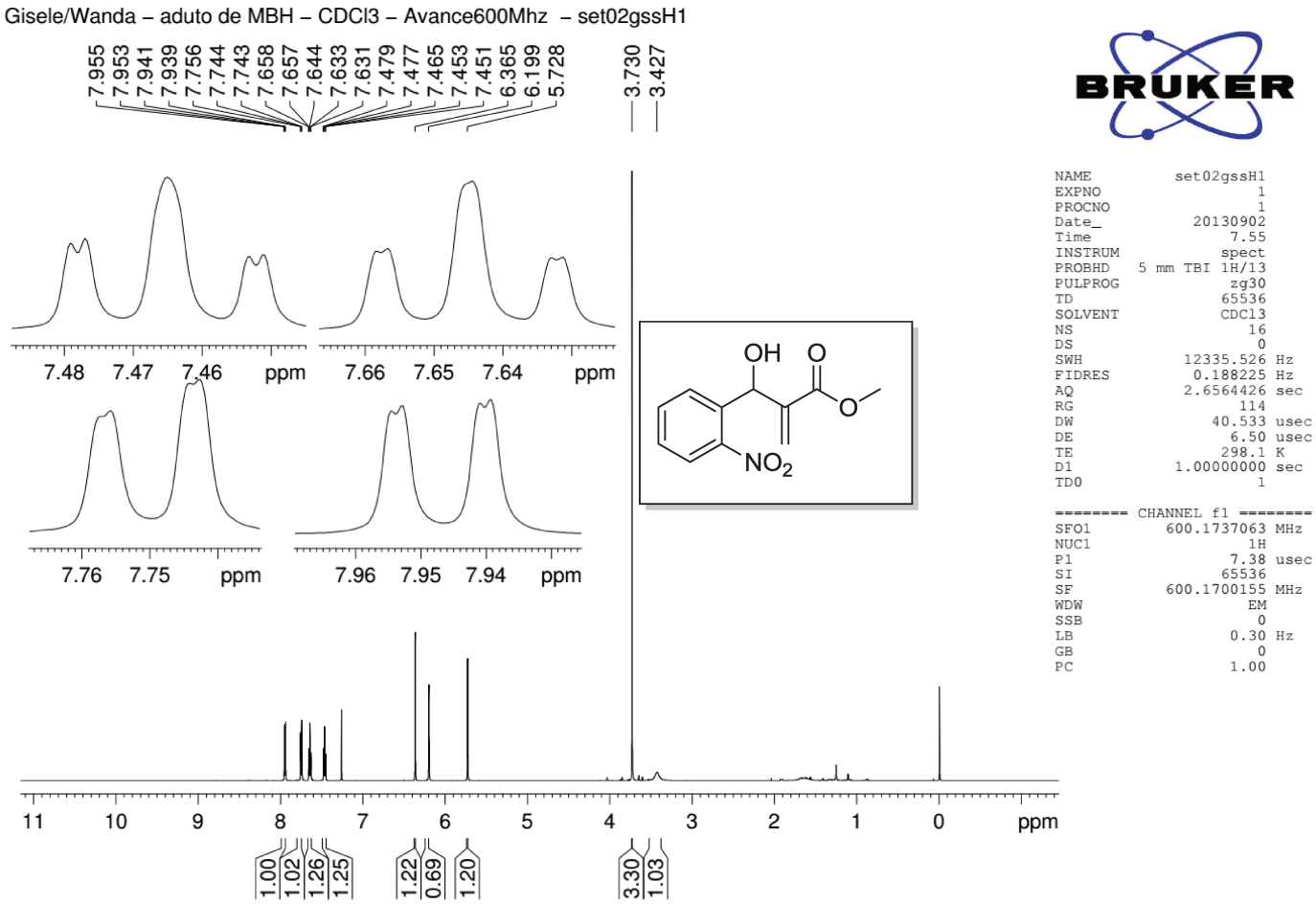


Figura 38. Espectro de RMN ^{1}H ($CDCl_3$, 600 MHz) do aduto de MBH **4**.

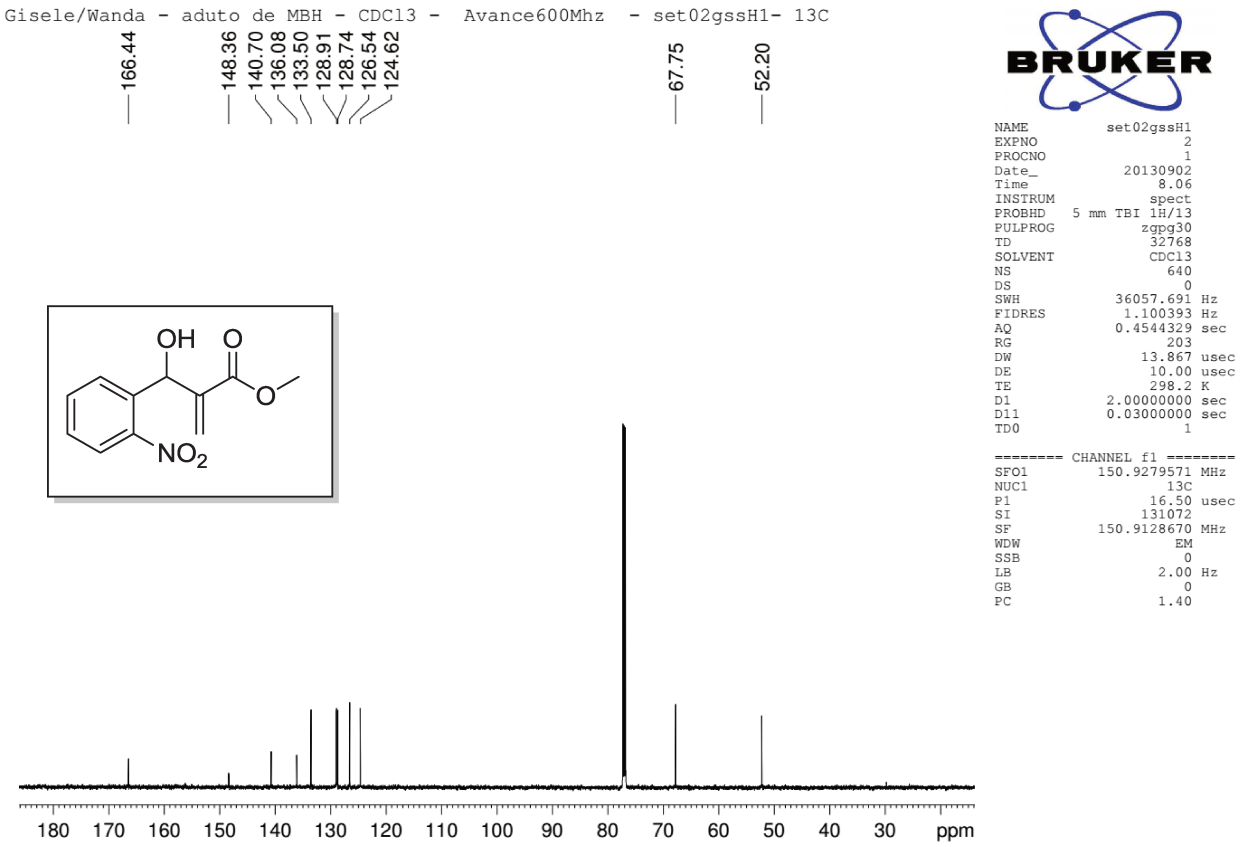


Figura 39. Espectro de RMN ^{13}C ($CDCl_3$, 150 MHz) do aduto de MBH **4**.

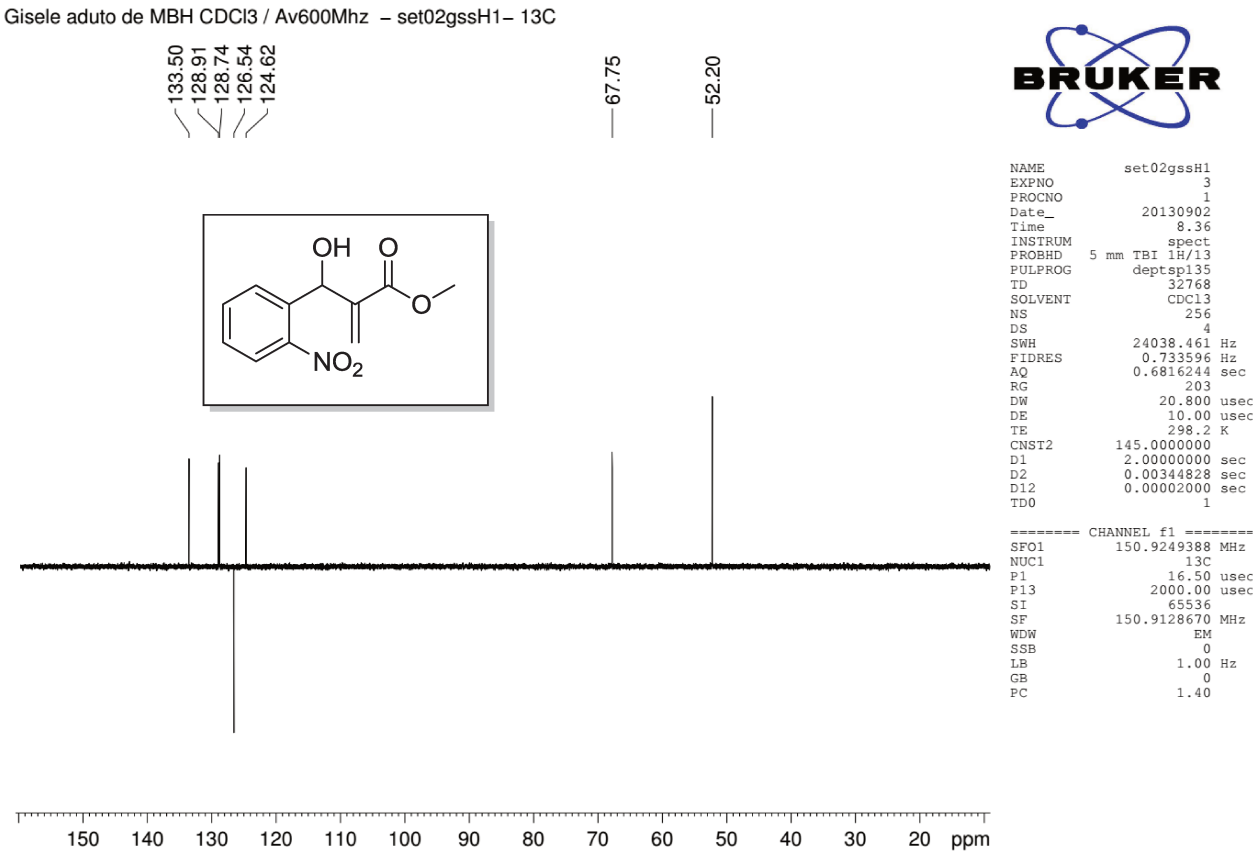


Figura 40. Espectro de RMN ^{13}C DEPT-135 ($CDCl_3$, 150 MHz) do aduto de MBH **4**.

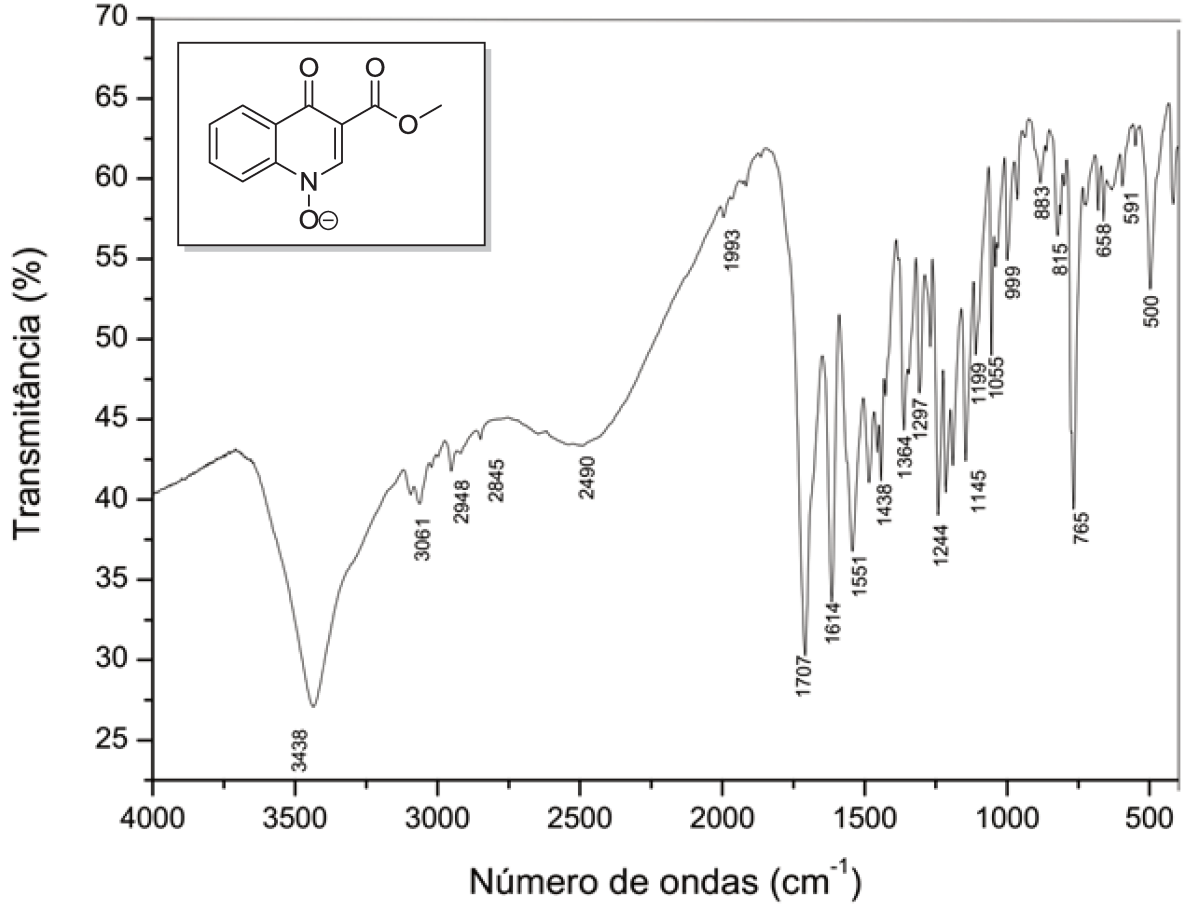


Figura 41. Espectro de IV (KBr, ν_{max}) do *N*-óxido **5**.

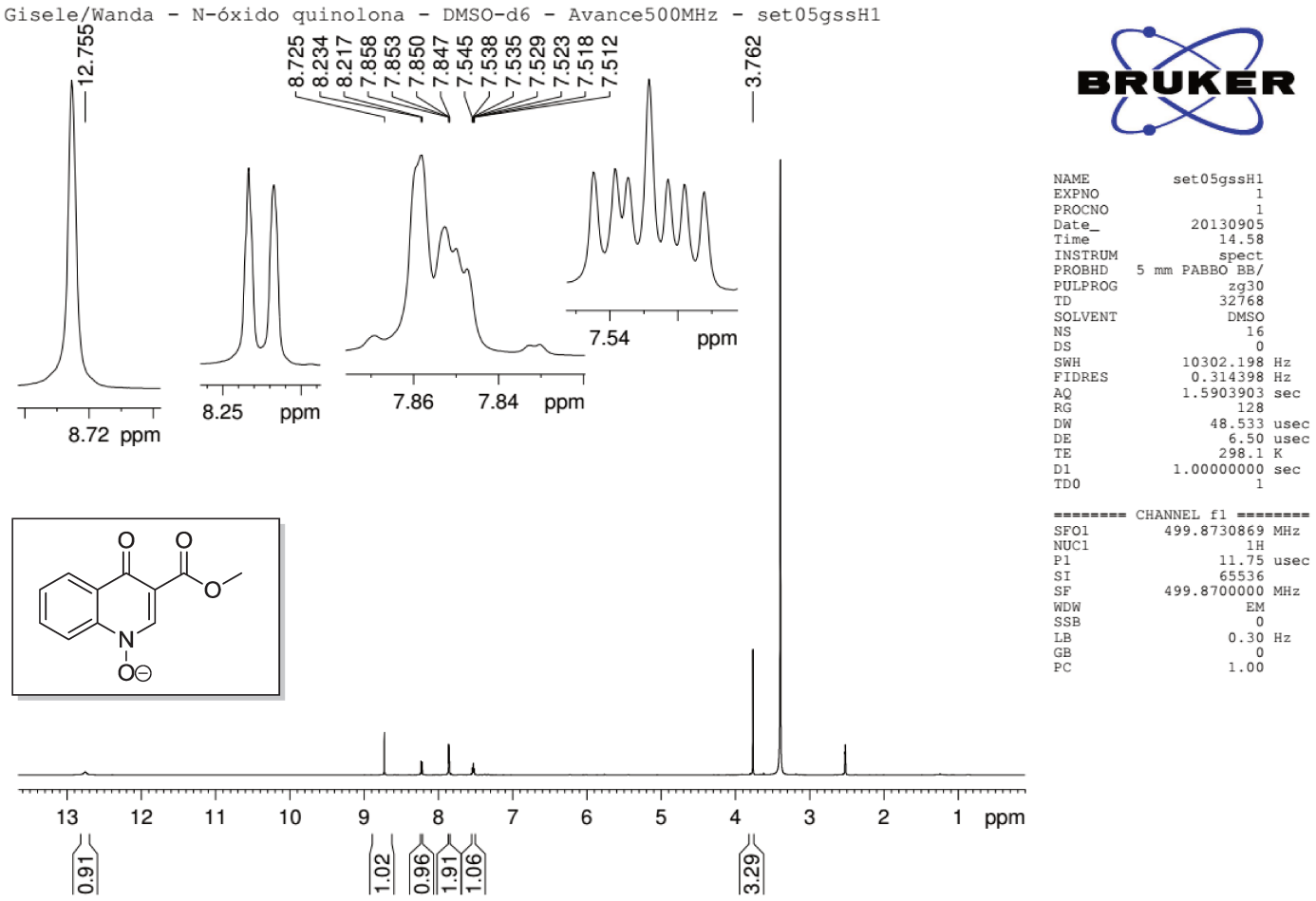


Figura 42. Espectro de RMN ^{1}H ($CDCl_3$, 500 MHz) do *N*-óxido **5**.

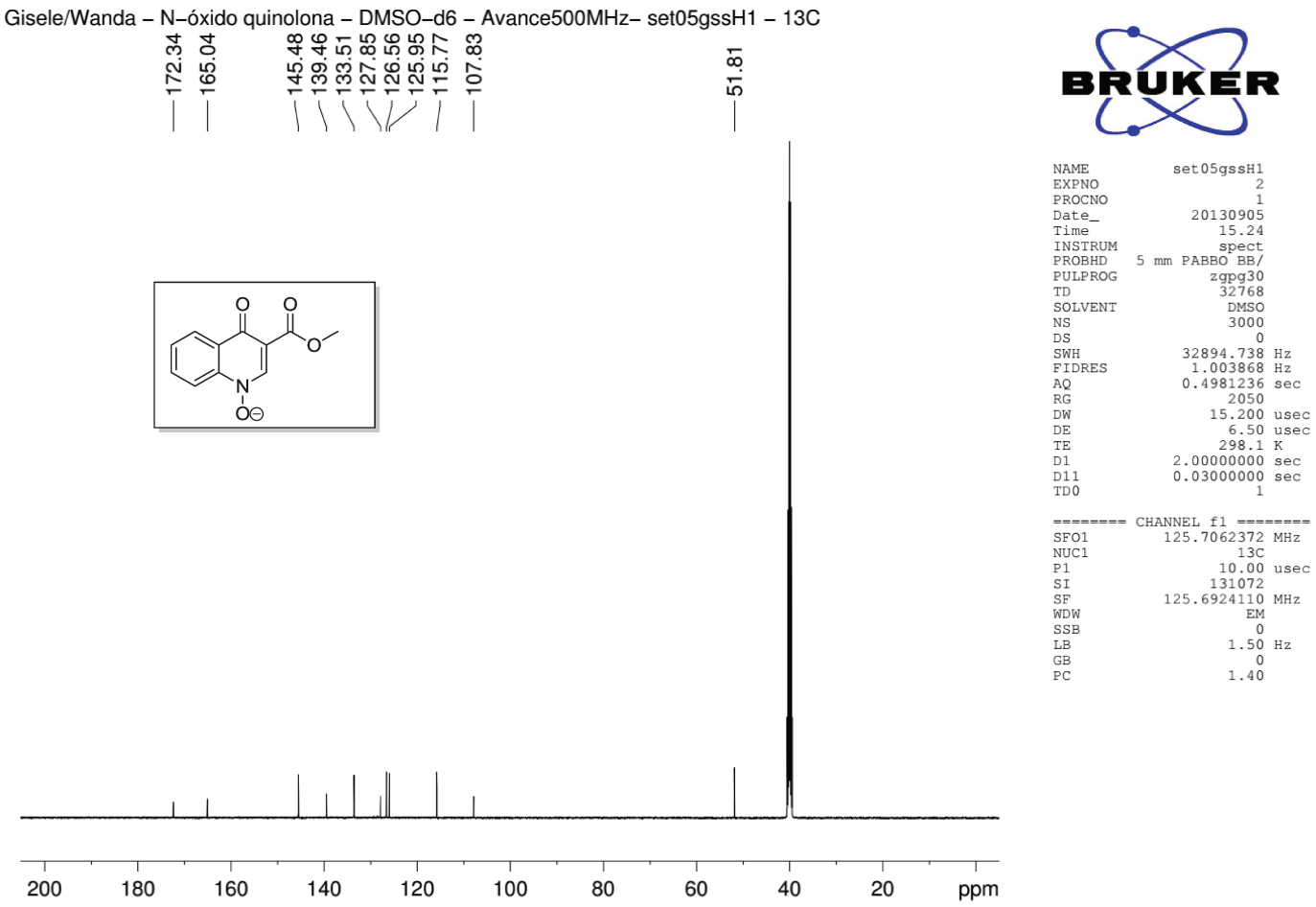


Figura 43. Espectro de RMN ^{13}C ($CDCl_3$, 125 MHz) do *N*-óxido **5**.

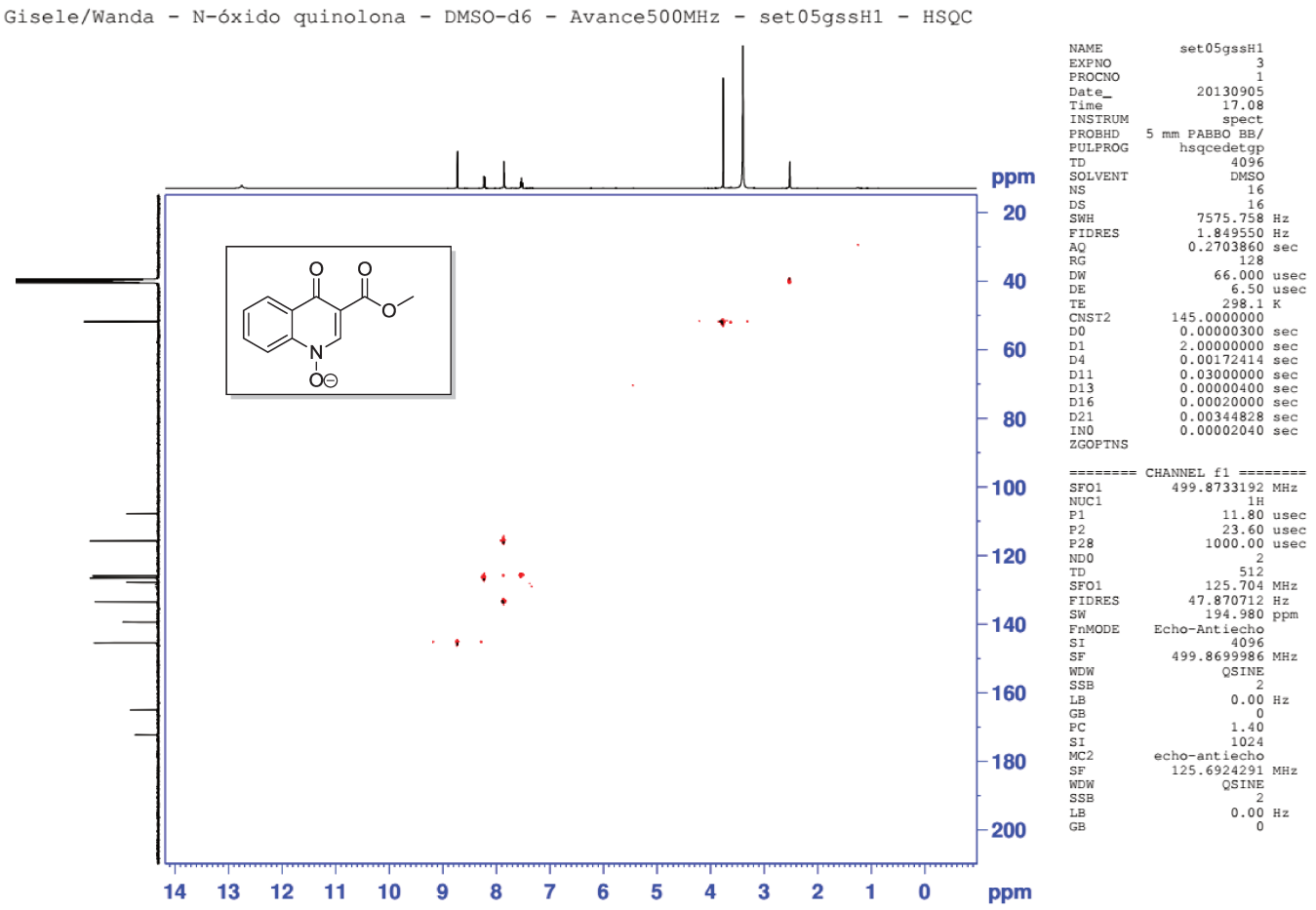


Figura 44. Espectro de HSQC ^{13}C-^{1}H ($CDCl_3$, 500/125 MHz) do *N*-Óxido.

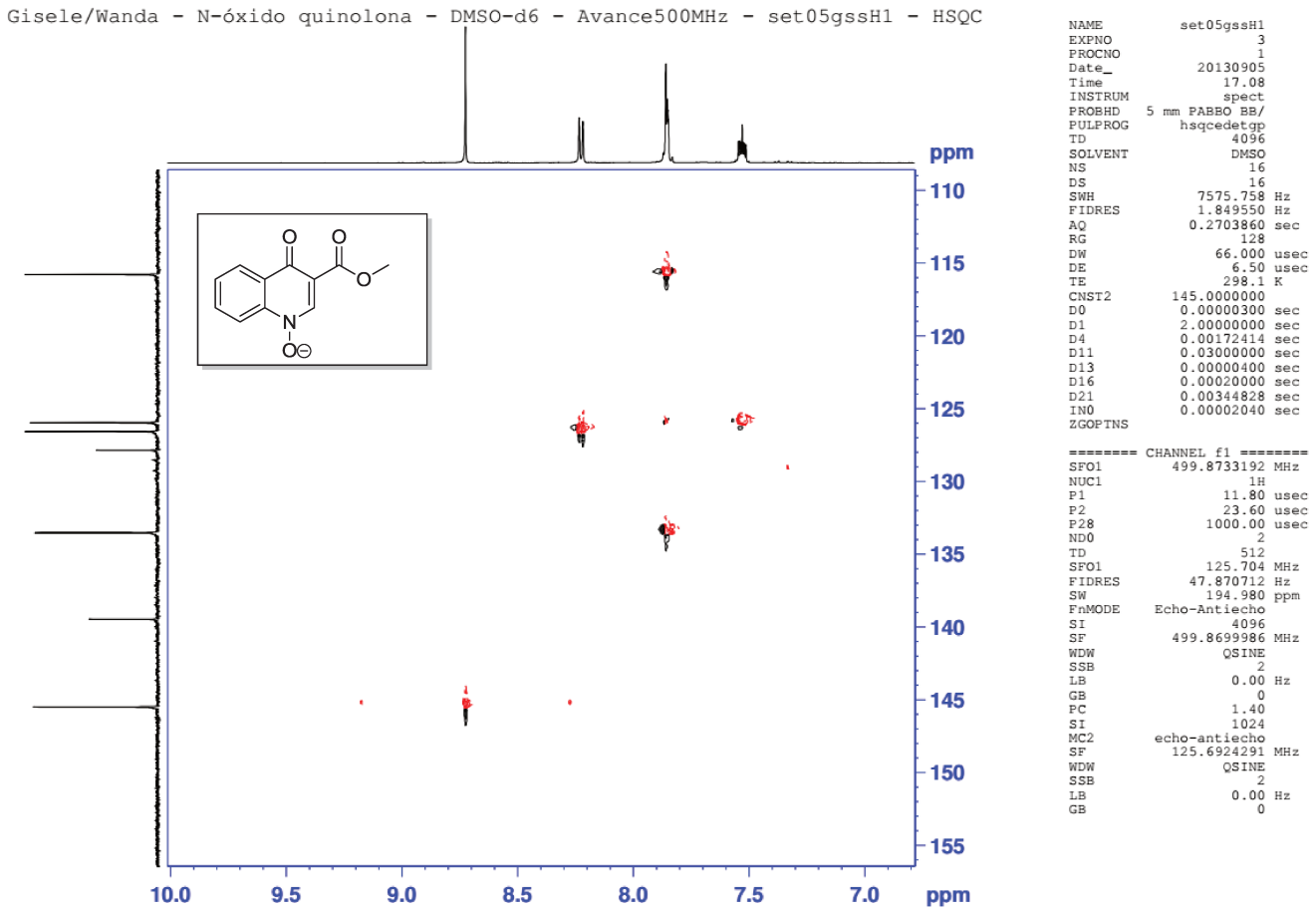


Figura 45. Expansão do espectro de HSQC ^{13}C-^{1}H ($CDCl_3$, 500/125 MHz) do *N*-Óxido **5**.

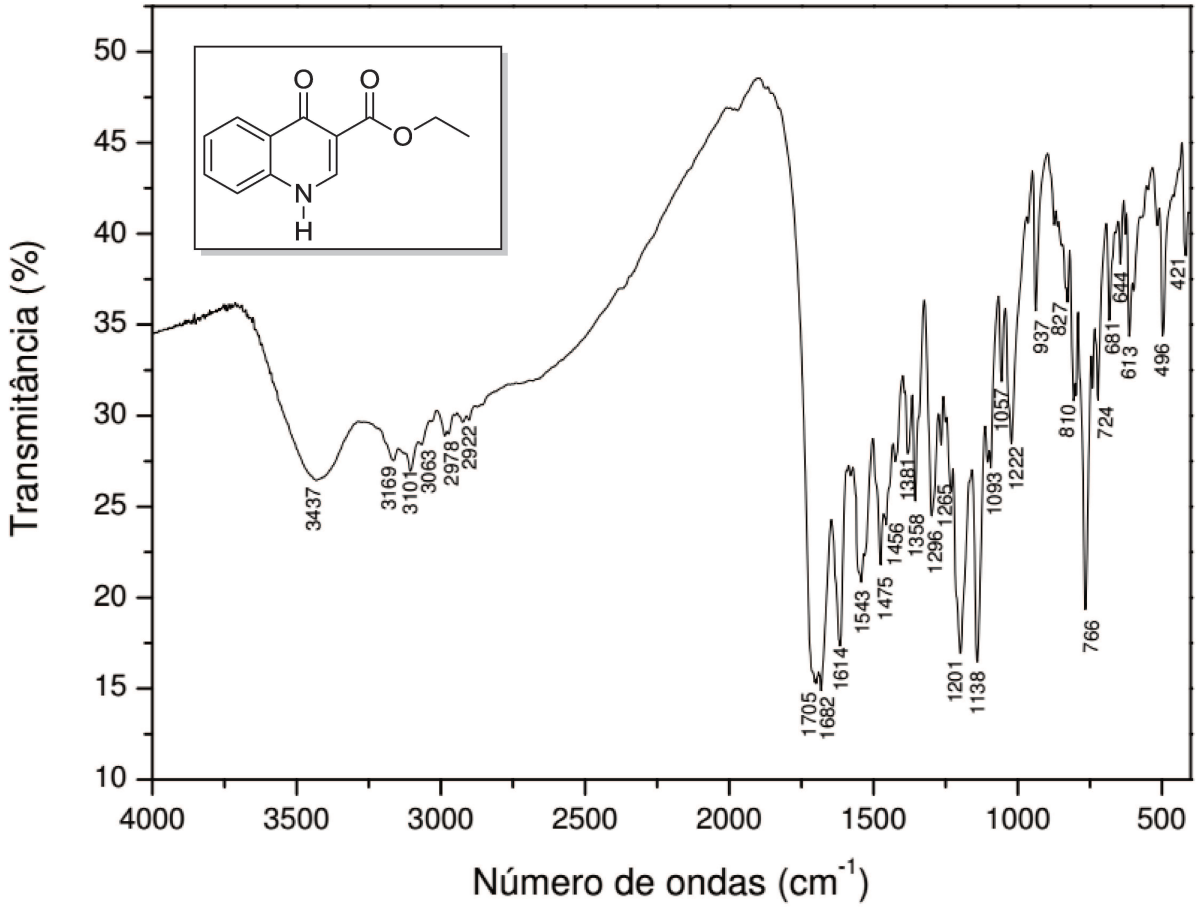


Figura 46. Espectro de IV (KBr, ν_{max}) da quinolona **1**.

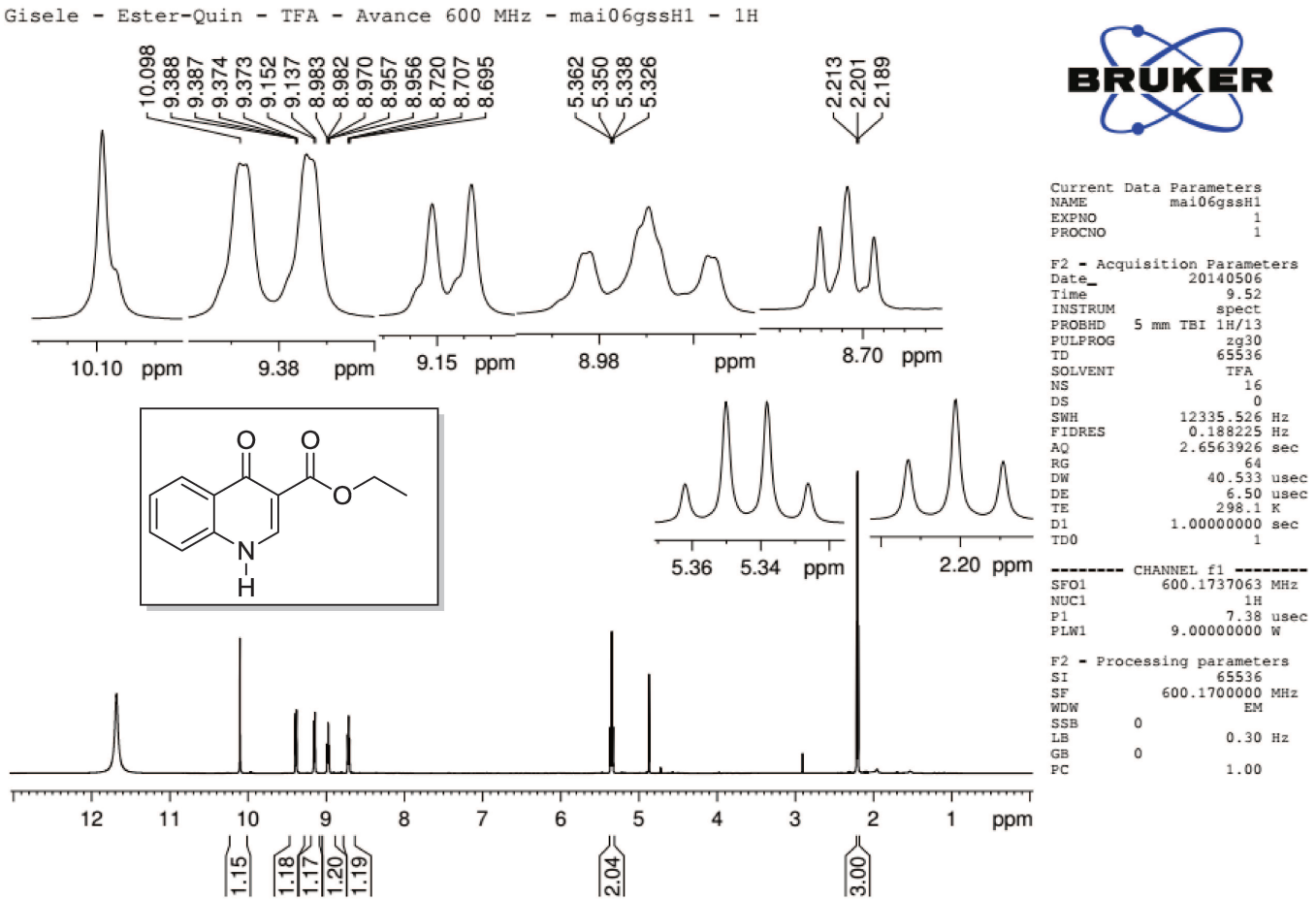


Figura 47. Espectro de RMN ^{1}H (600 MHz, CF_3COOD) da quinolona **1**.

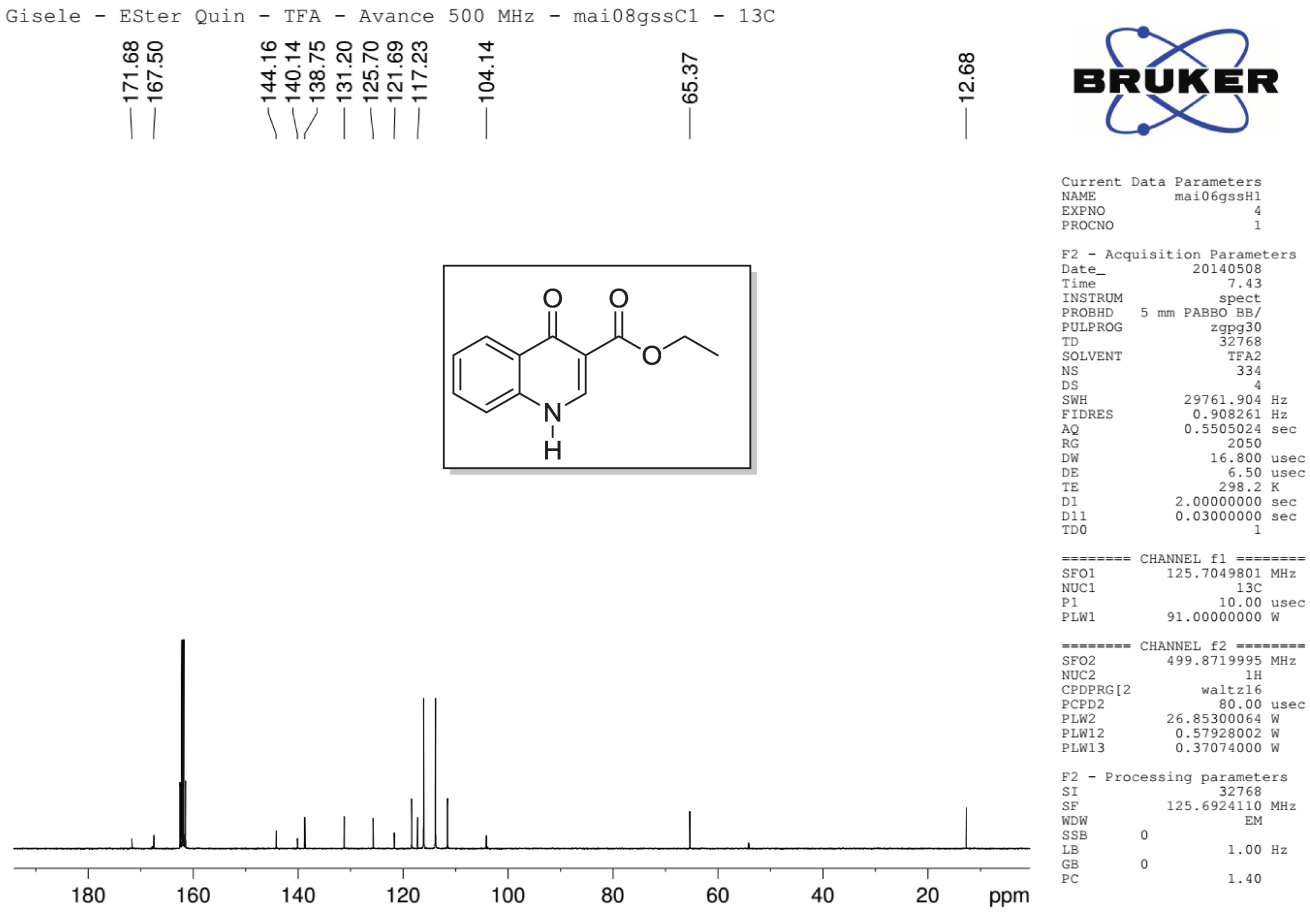


Figura 48. Espectro de RMN ^{13}C (125 MHz, CF_3COOD) da quinolona **1**.

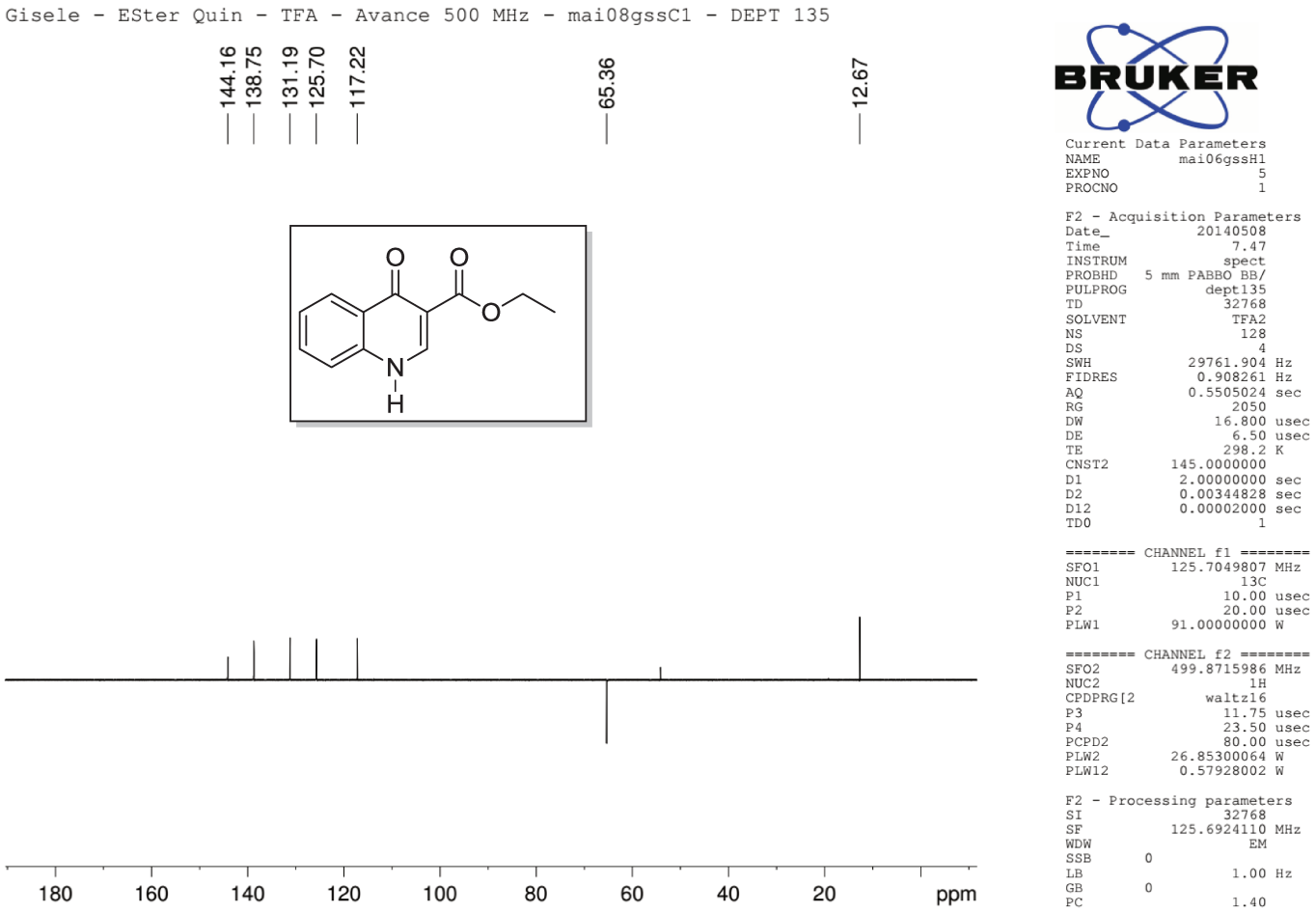


Figura 49. Espectro de RMN ^{13}C DEPT-135 (125 MHz, CF_3COOD) da quinolona **1**.

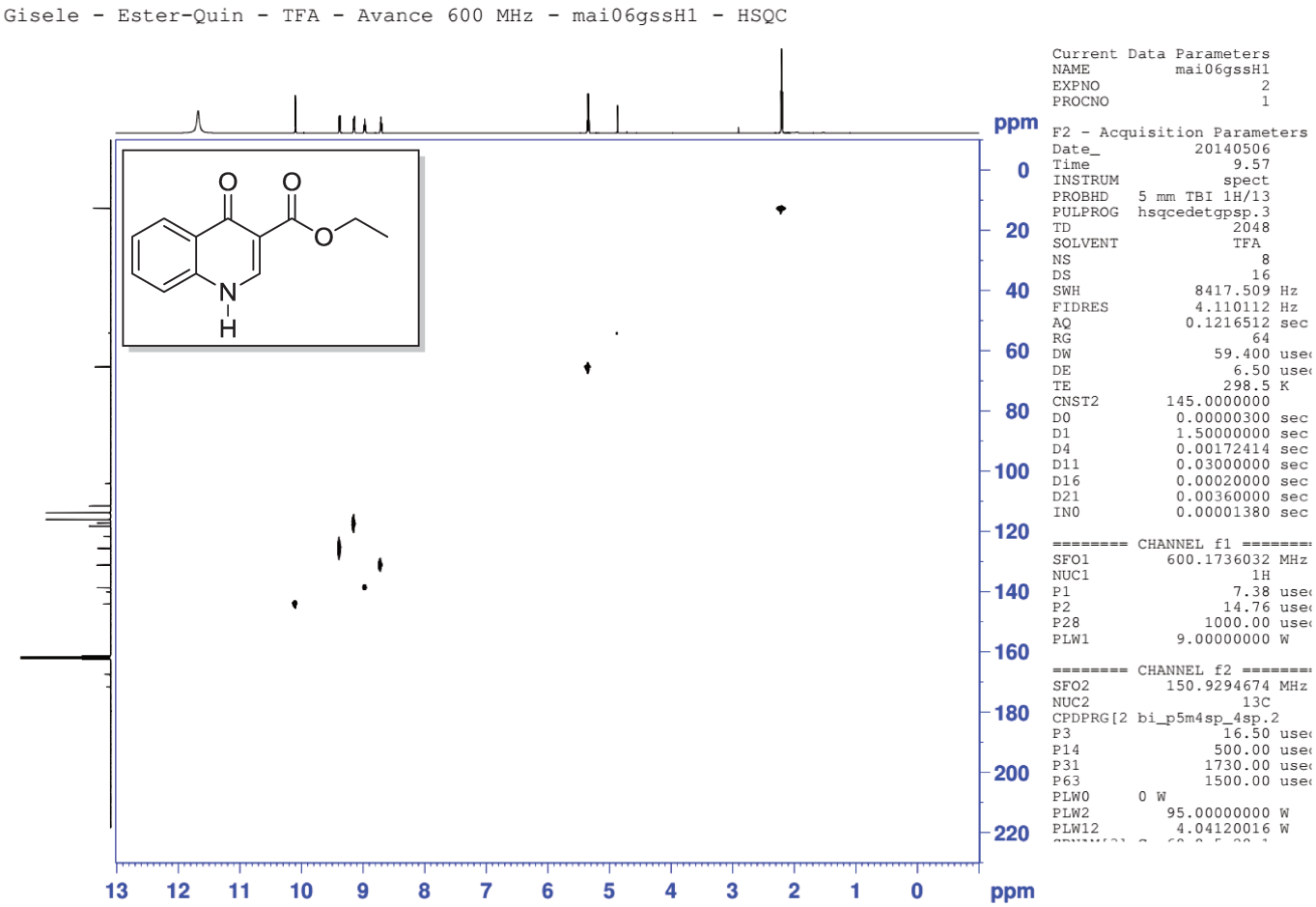


Figura 50. Expansão do espectro de HSQC ^{13}C-^{1}H (CF_3COOD, 600/150 MHz) da quinolona **1**.

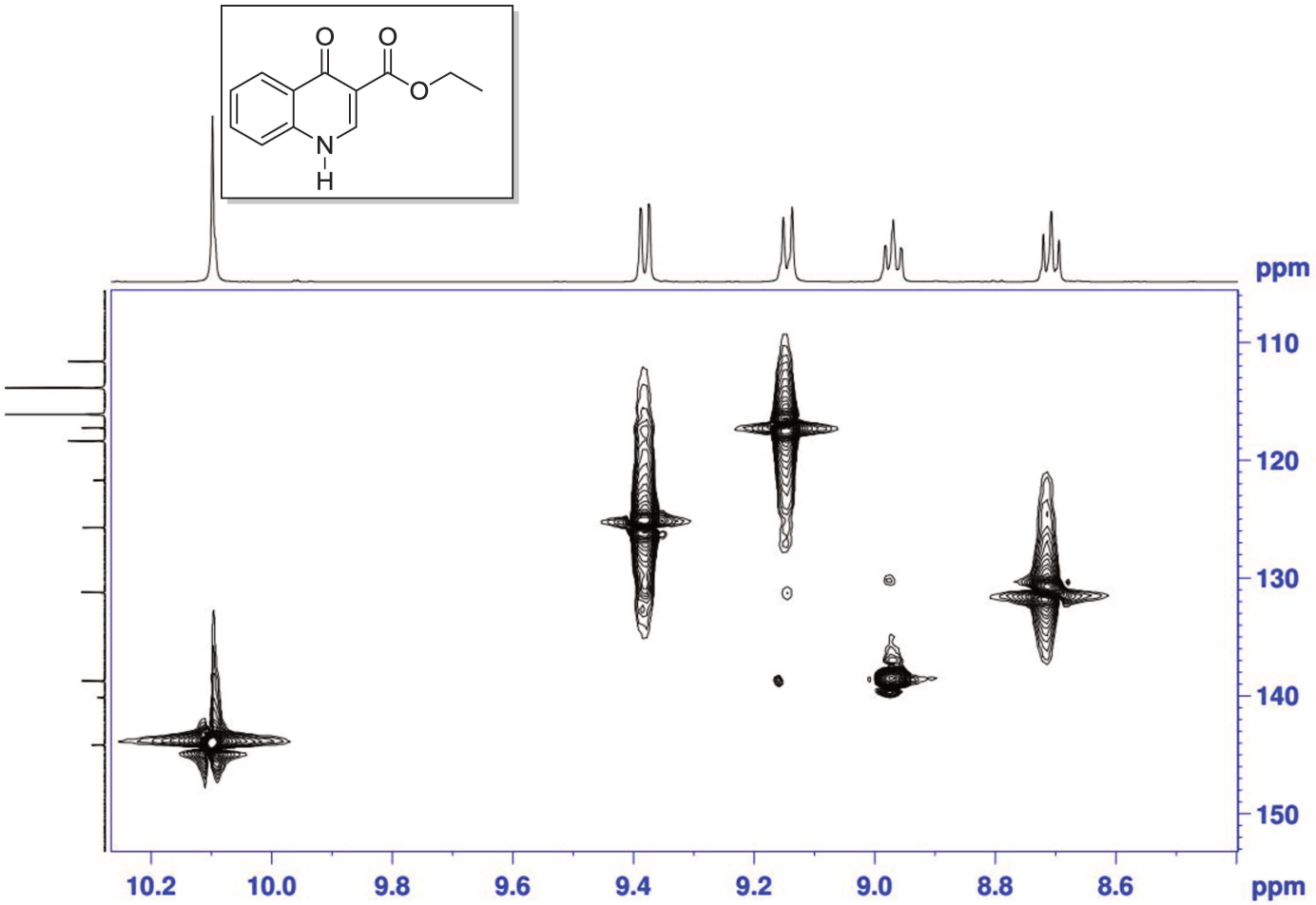


Figura 51. Expansão do espectro de HSQC ^{13}C-^{1}H (CF_3COOD, 600/150 MHz) da quinolona **1**.

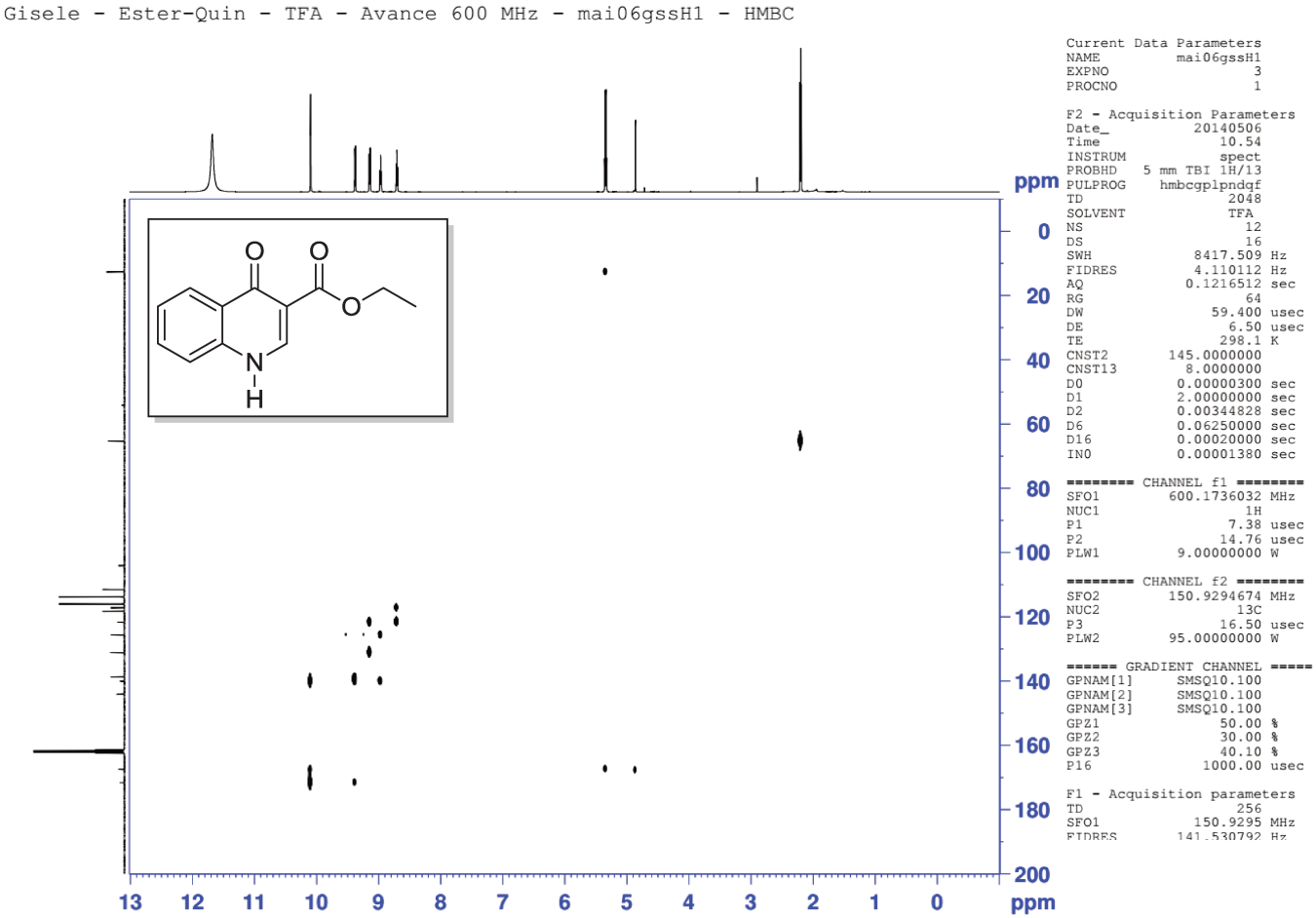


Figura 52. Espectro de HMBC ^{13}C-^{1}H (CF_3COOD, 600/150 MHz) da quinolona **1**.

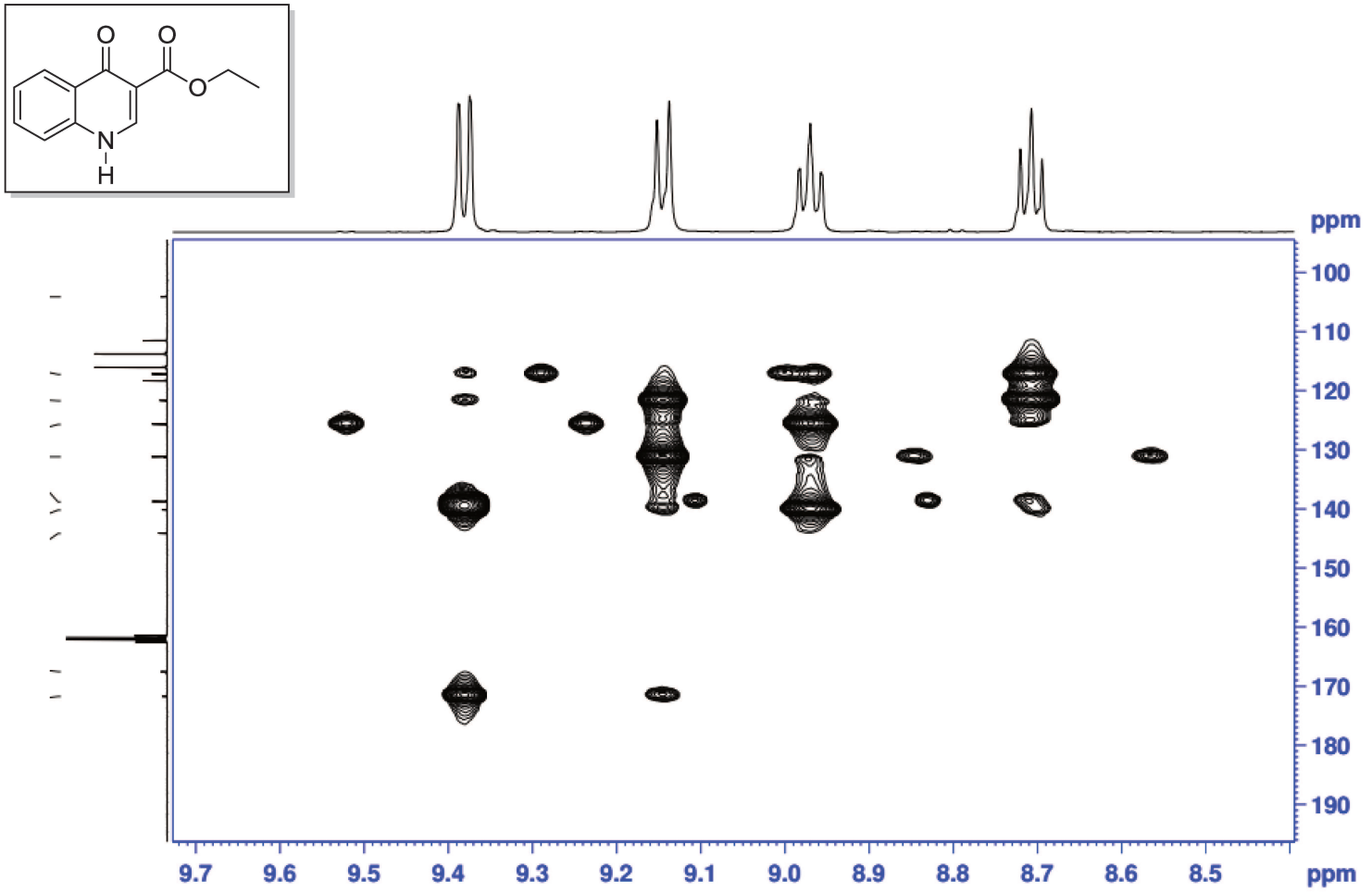


Figura 53. Expansão do espectro de HMBC ^{13}C-^{1}H (CF_3COOD, 600/150 MHz) da quinolona **1**.

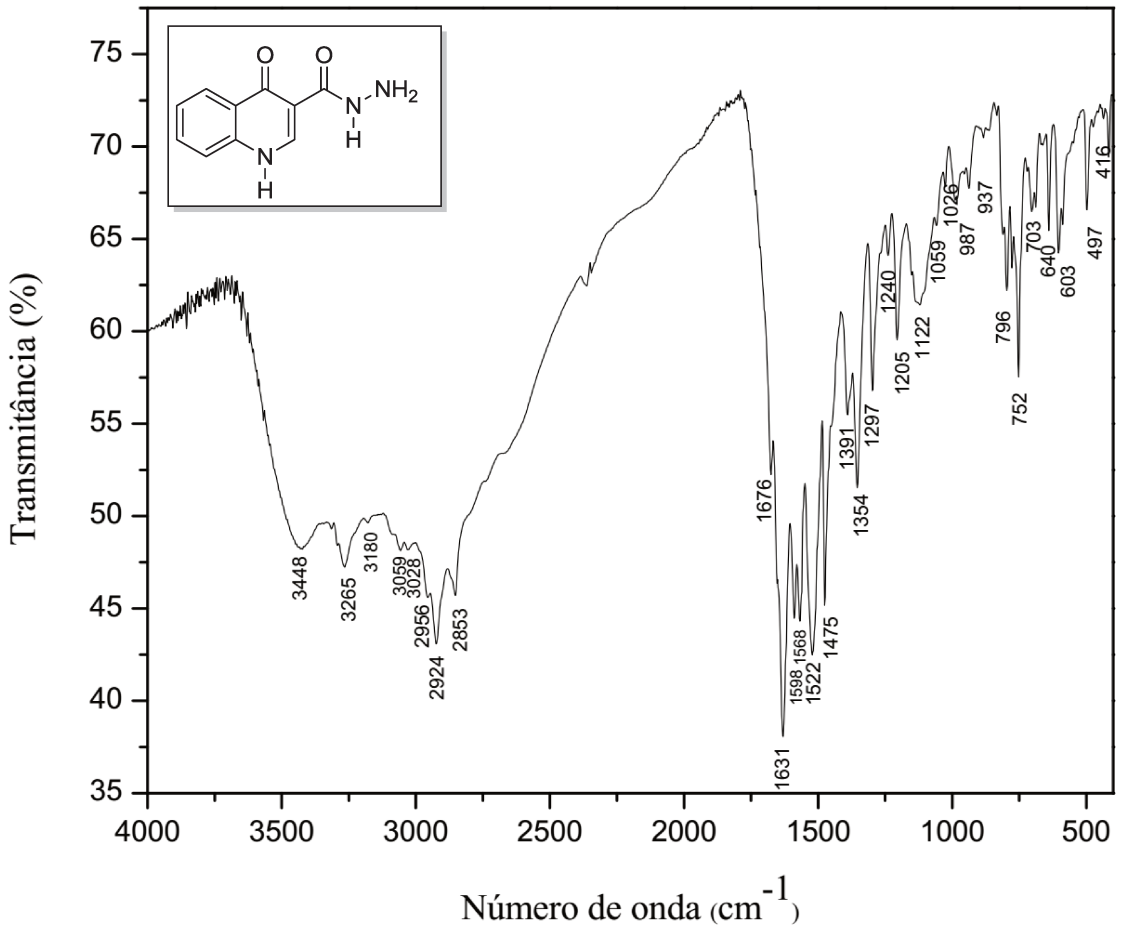


Figura 54.Espectro no Infravermelho (KBr, ν_{max}) da hidrazida **2**.

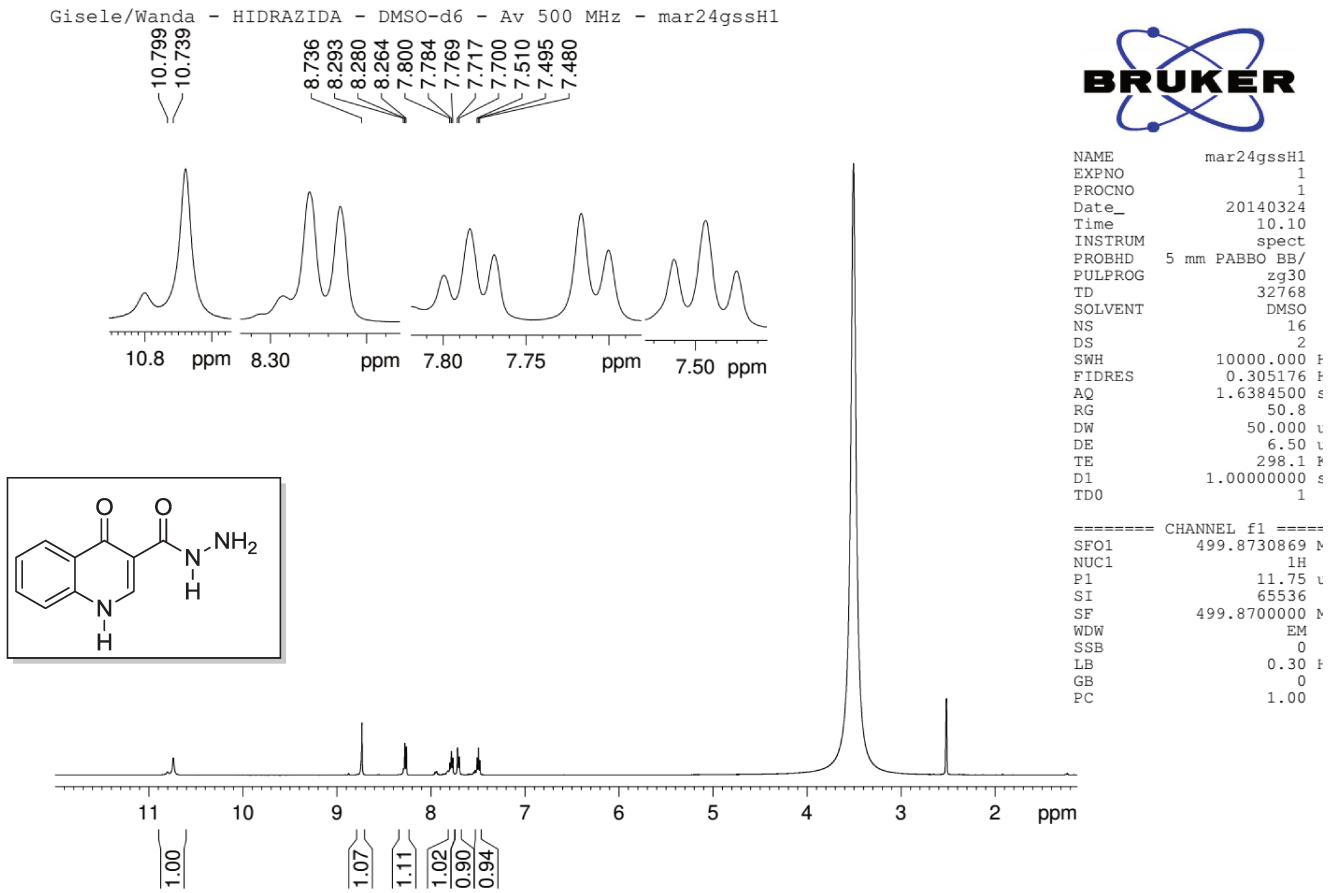


Figura 55. Espectro de RMN ^{1}H (DMSO-d_6, 500 MHz) da hidrazida **2**.

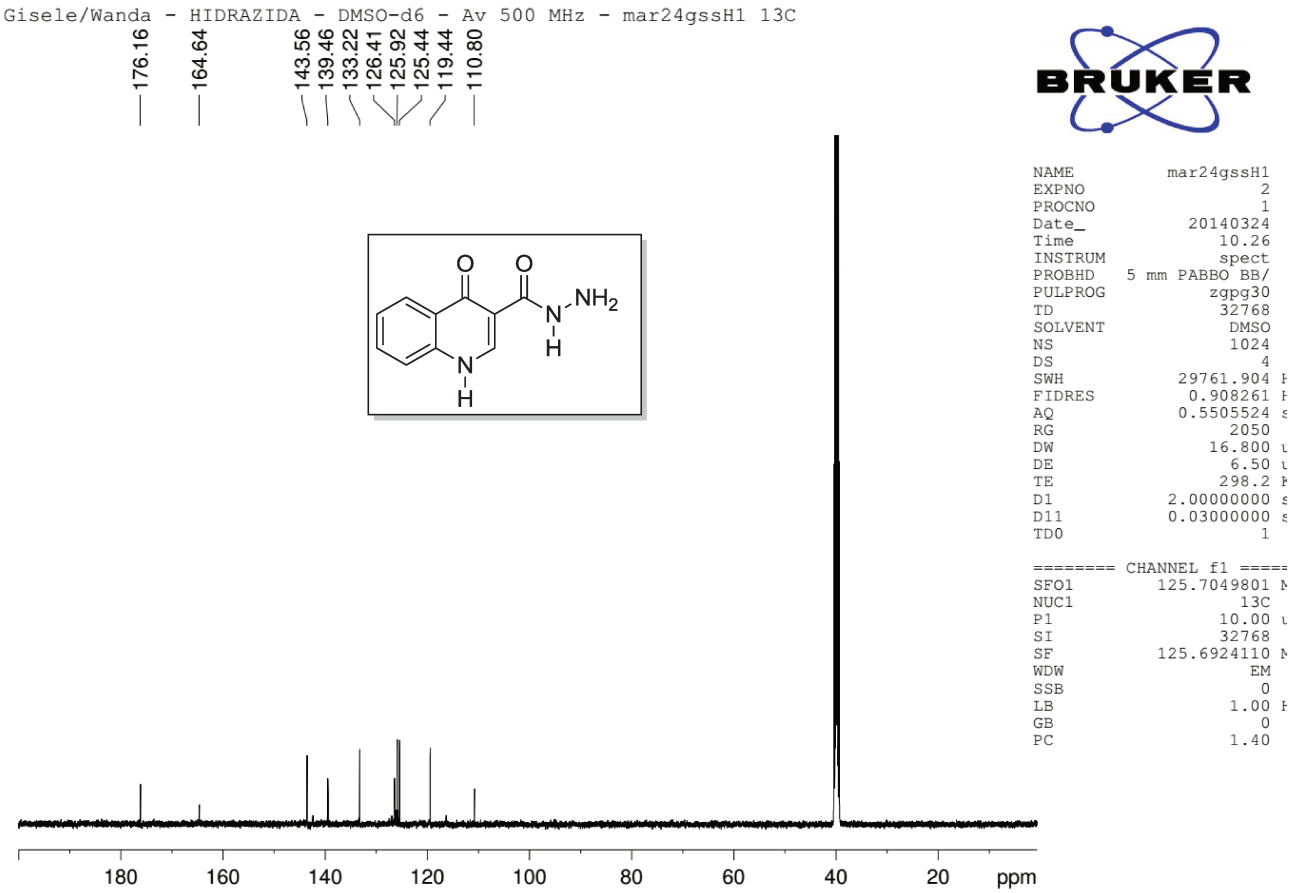


Figura 56. Espectro de RMN ^{13}C (DMSO-d_6, 125 MHz) da hidrazida **2**.

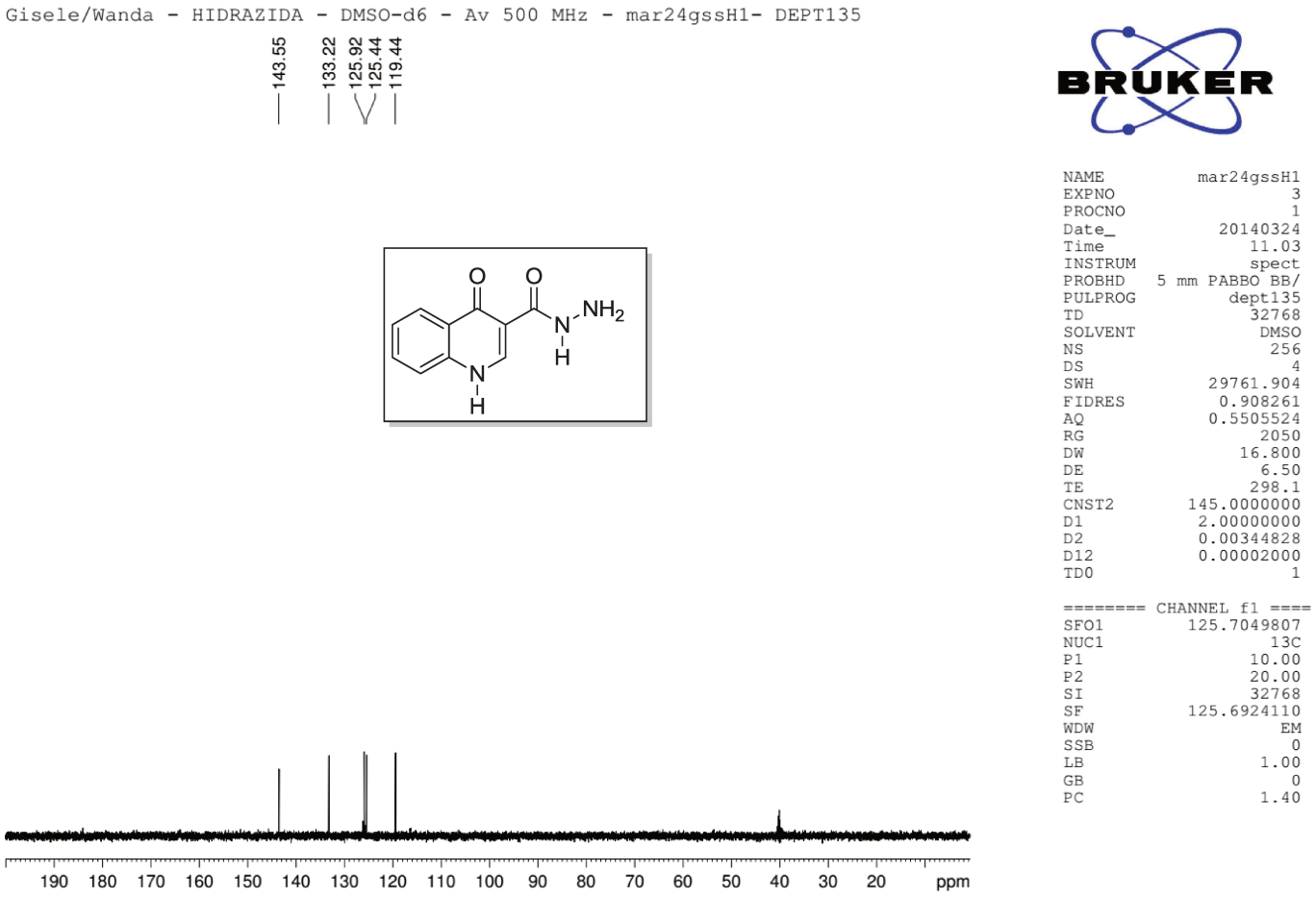


Figura 57. Espectro de RMN ^{13}C DEPT-135 (DMSO-d_6, 125 MHz) da hidrazida **2**.

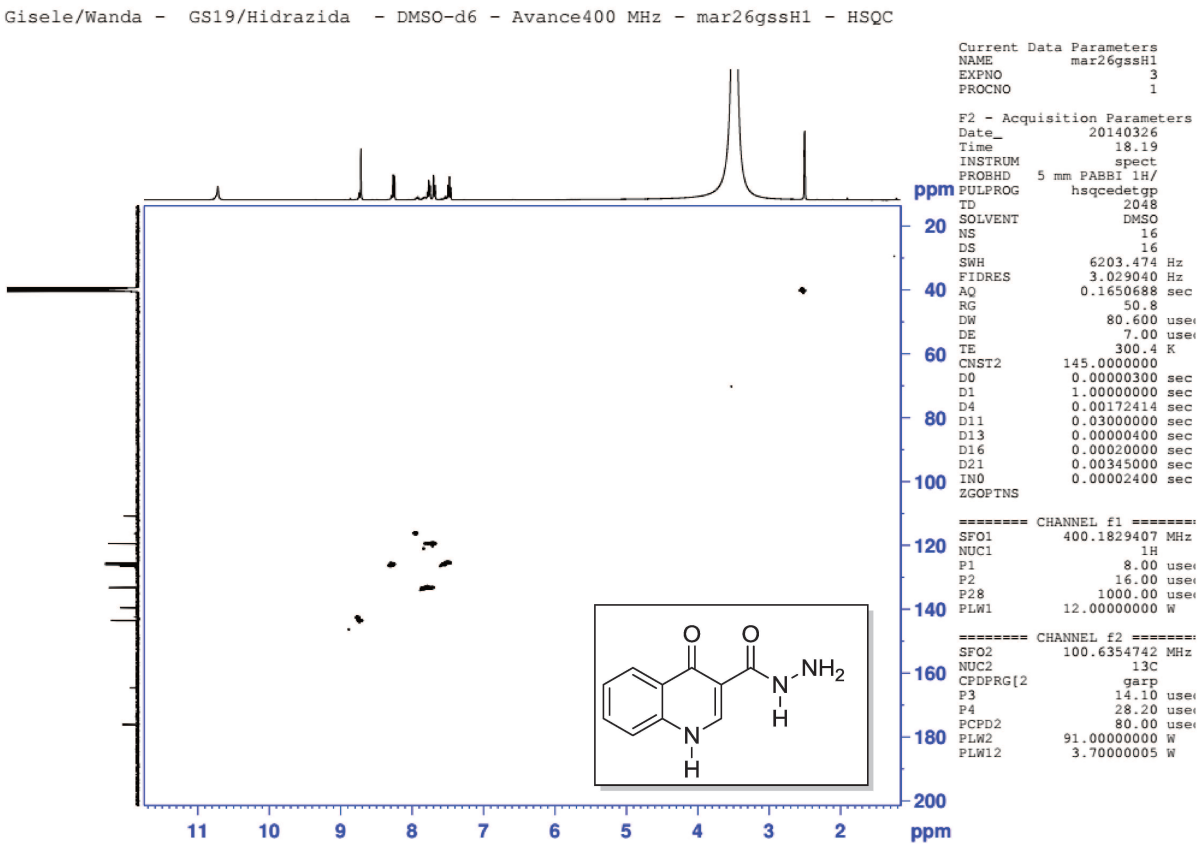


Figura 58. Espectro de HMBC ^{13}C-^{1}H (DMSO-d_6, 400/100 MHz) da hidrazida **2**.

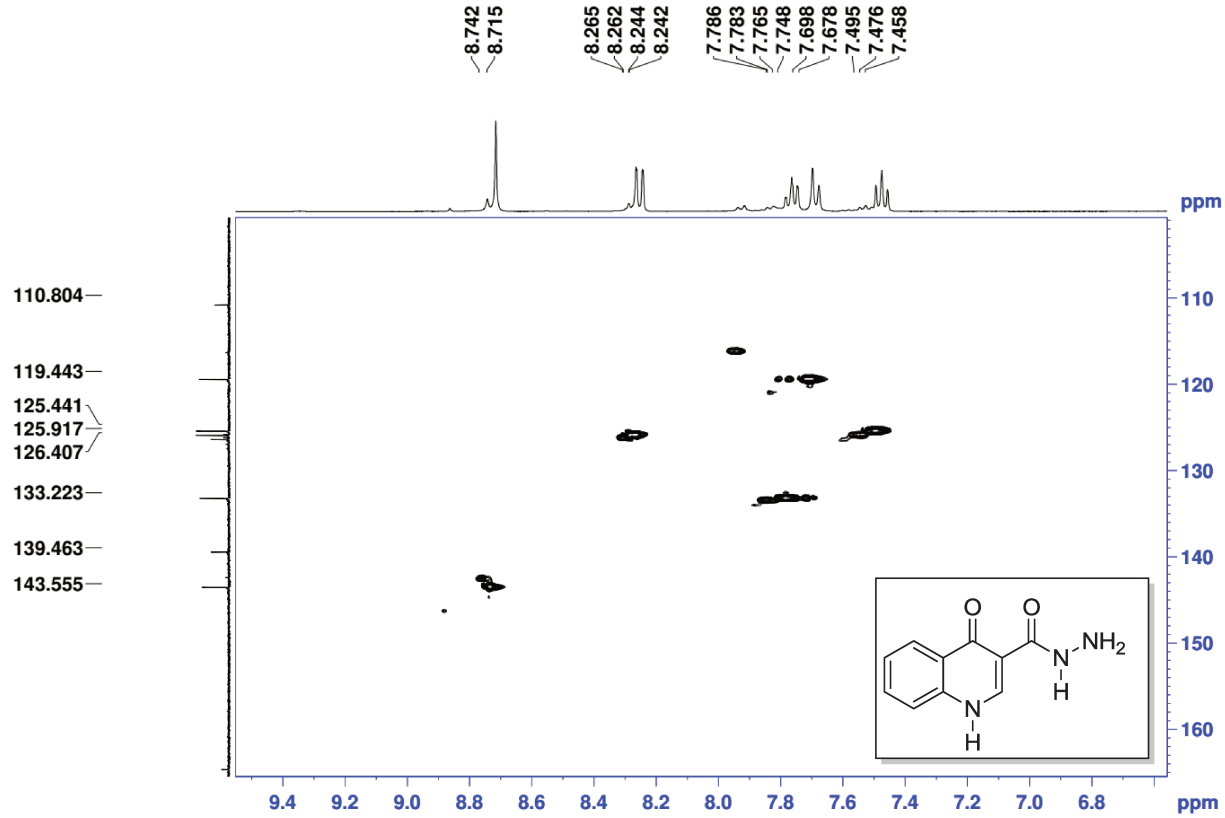


Figura 59. Expansão do espectro de HSQC ^{13}C-^{1}H (DMSO-d_6, 400/100 MHz) da hidrazida **2**.

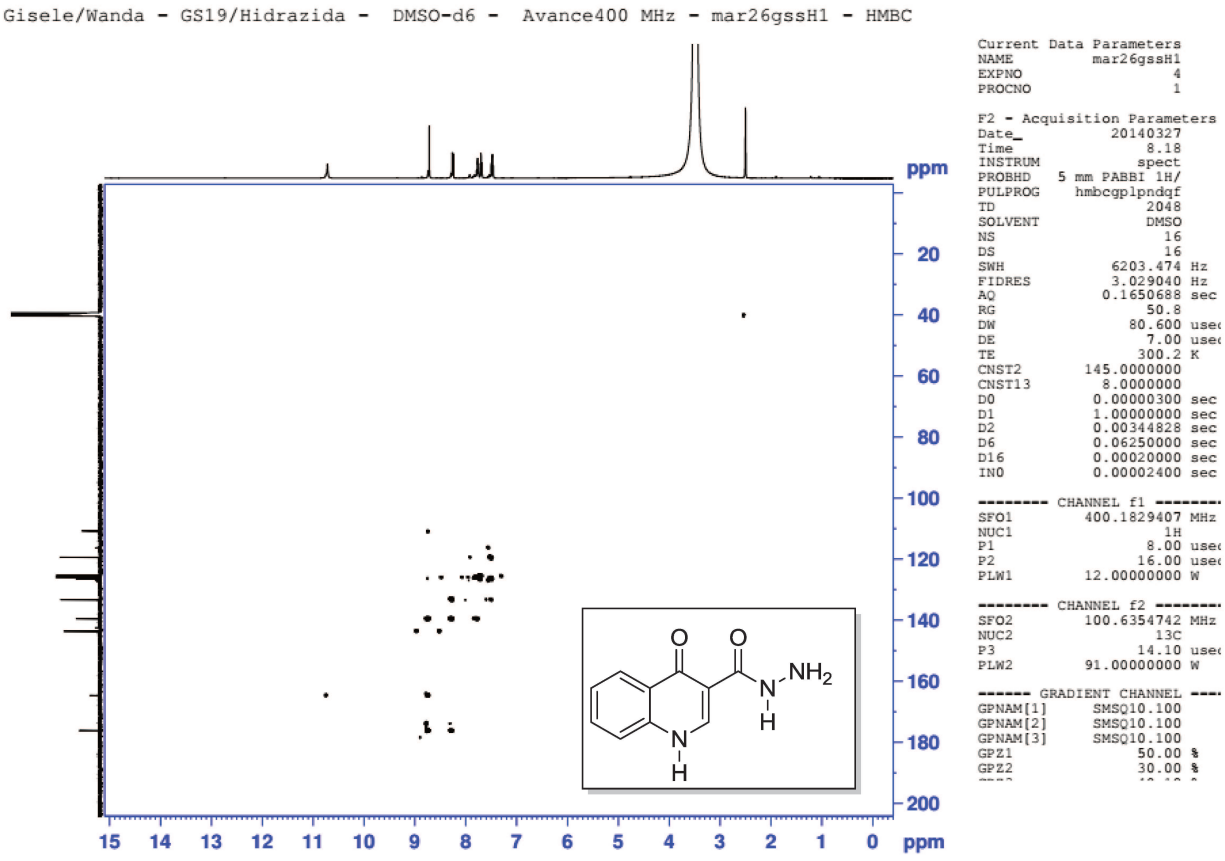


Figura 60. Espectro de HMBC ^{13}C-^{1}H (DMSO-d_6, 400/100 MHz) da hidrazida **2**.

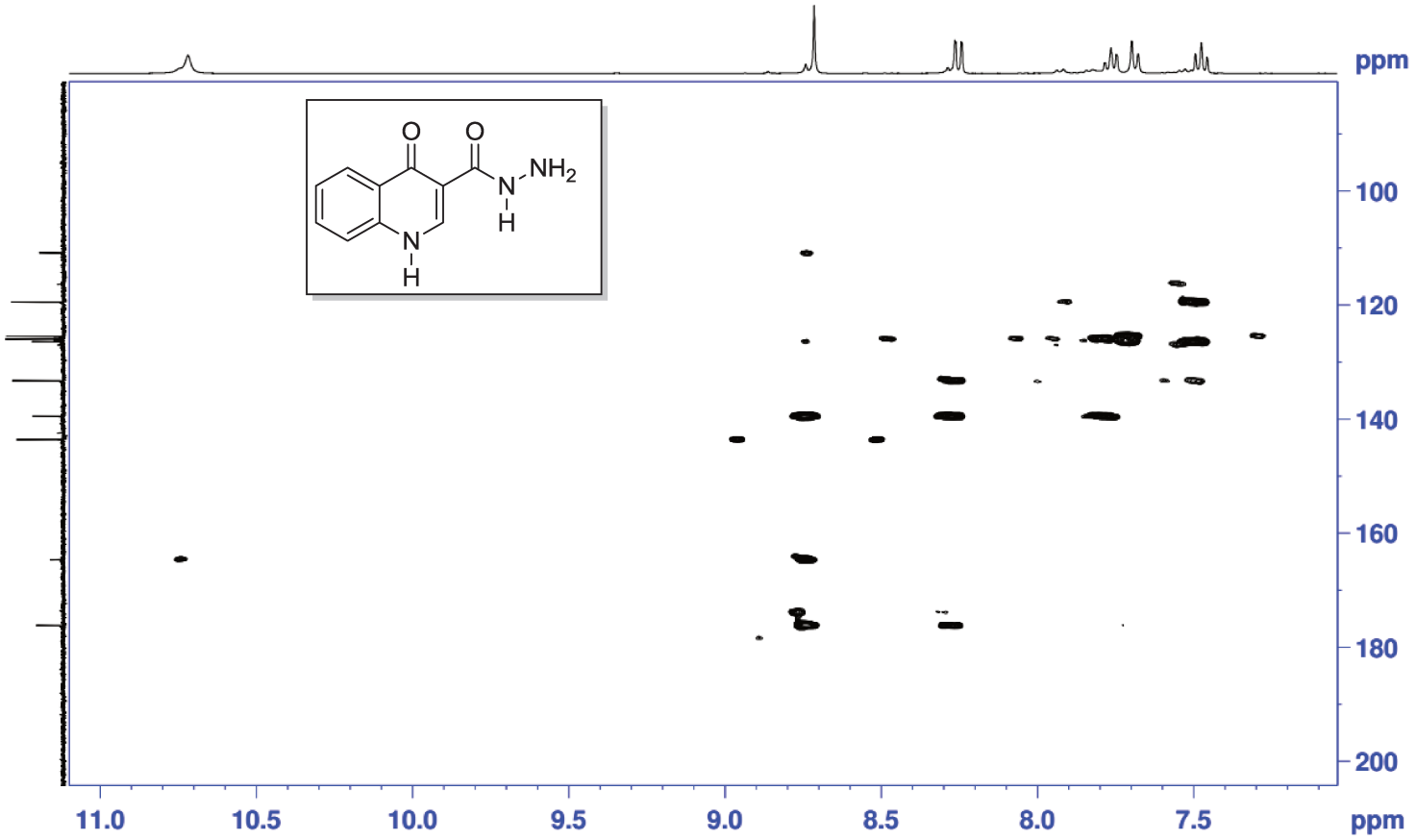


Figura 61. Expansão do espectro de HMBC ^{13}C-^{1}H (400/100 MHz, DMSO-d_6) da hidrazida **2**.

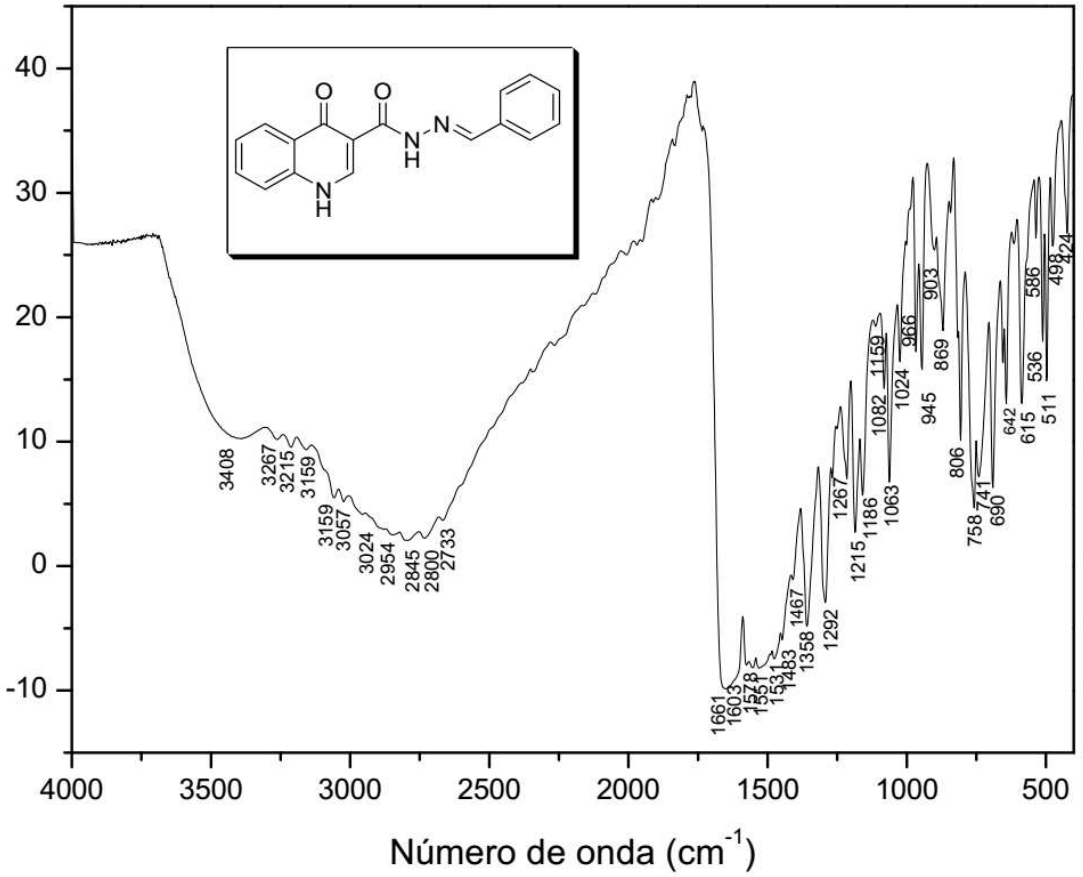


Figura 62. Espectro de IV da acil-hidrazona **9**.

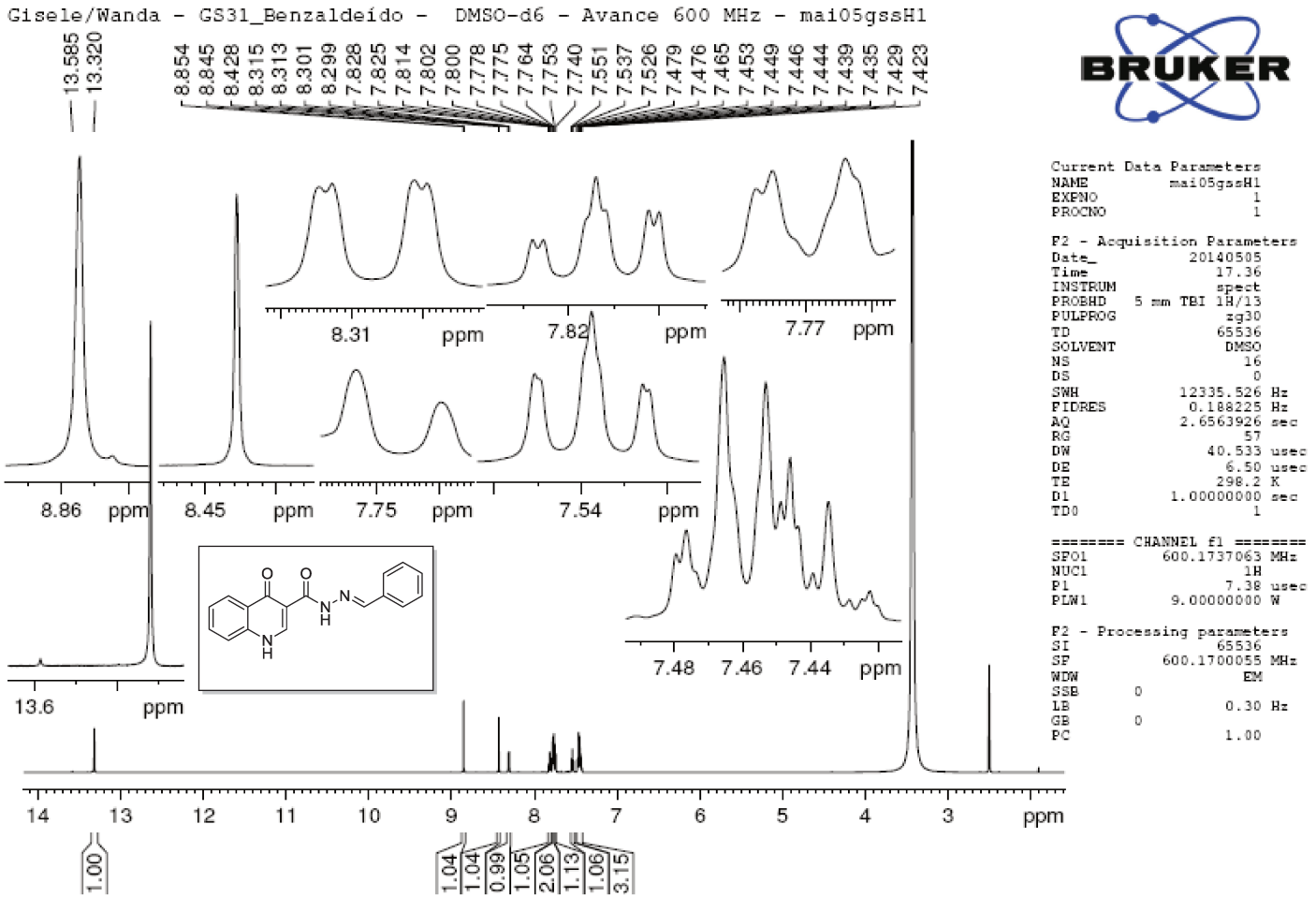


Figura 63. Espectro de RMN ^{1}H (600 MHz, DMSO-d_6) da acil-hidrazona **9**.

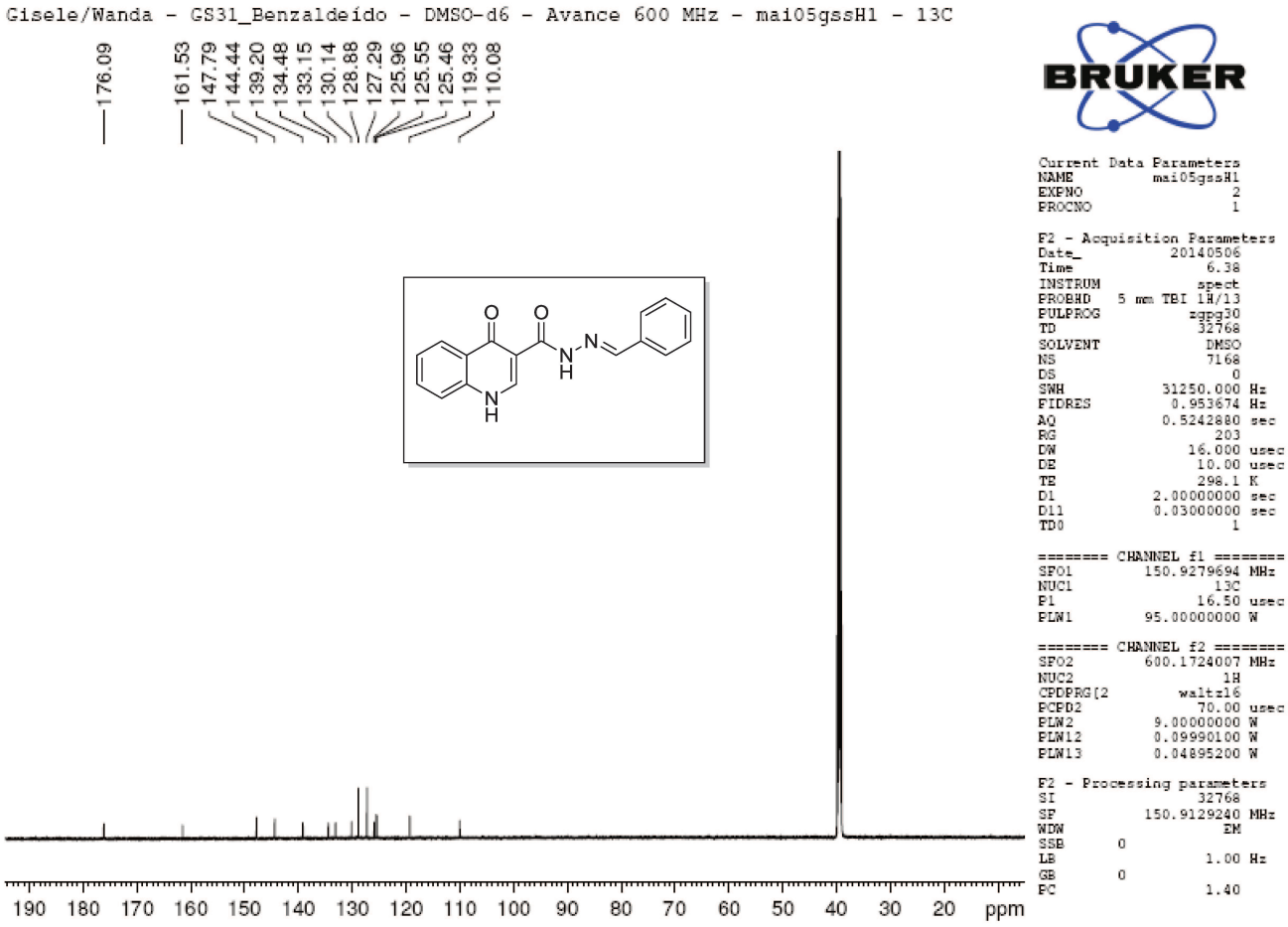


Figura 64. Espectro de RMN ^{13}C (150 MHz, DMSO-d_6) da acil-hidrazona **9**.

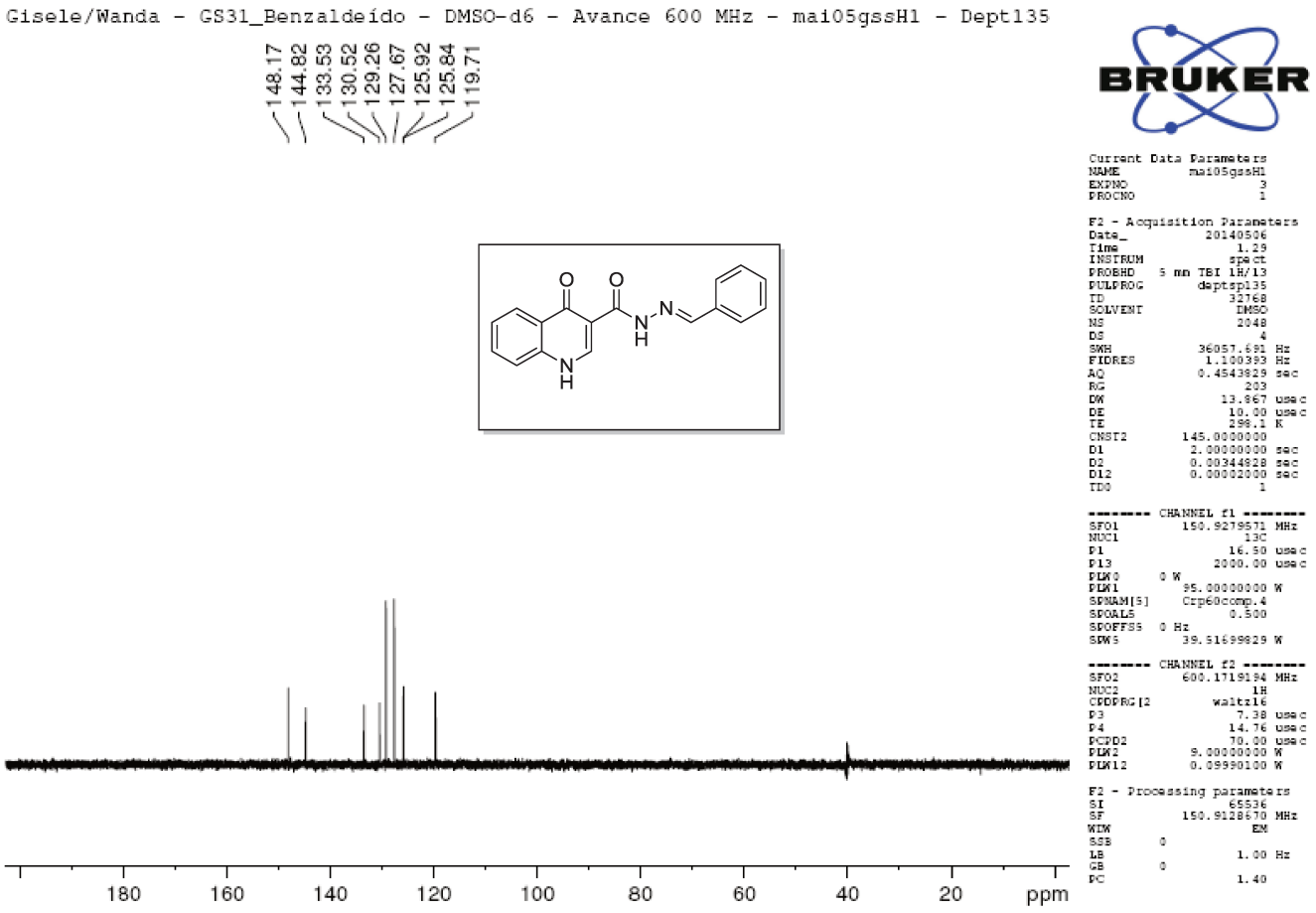


Figura 65. Espectro de RMN ^{13}C DEPT-135 (150 MHz, DMSO-d_6) da acil-hidrazona **9**.

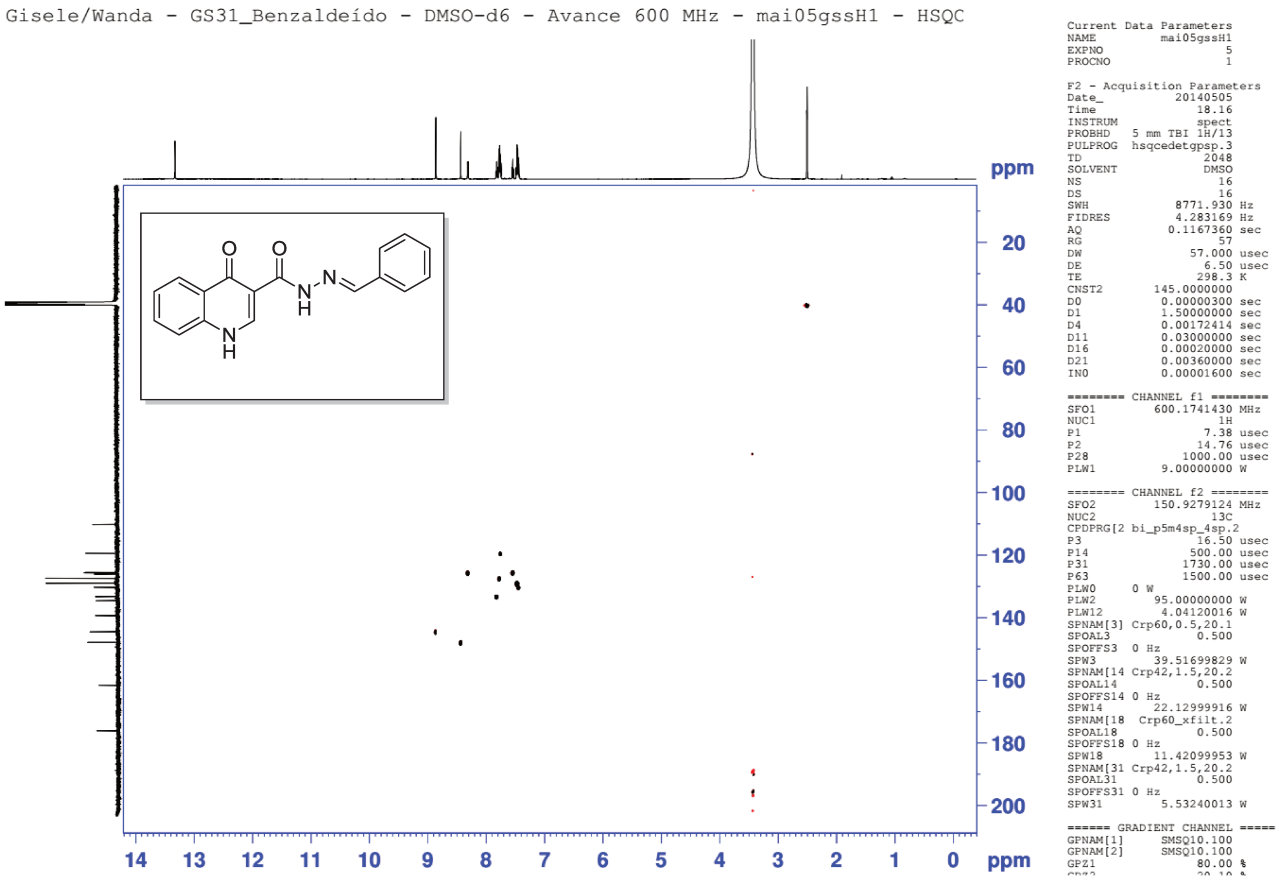


Figura 66. Expansão do espectro de HSQC ^{13}C-^{1}H (DMSO-d_6, 600/150 MHz) da acil-hidrazona **9**.

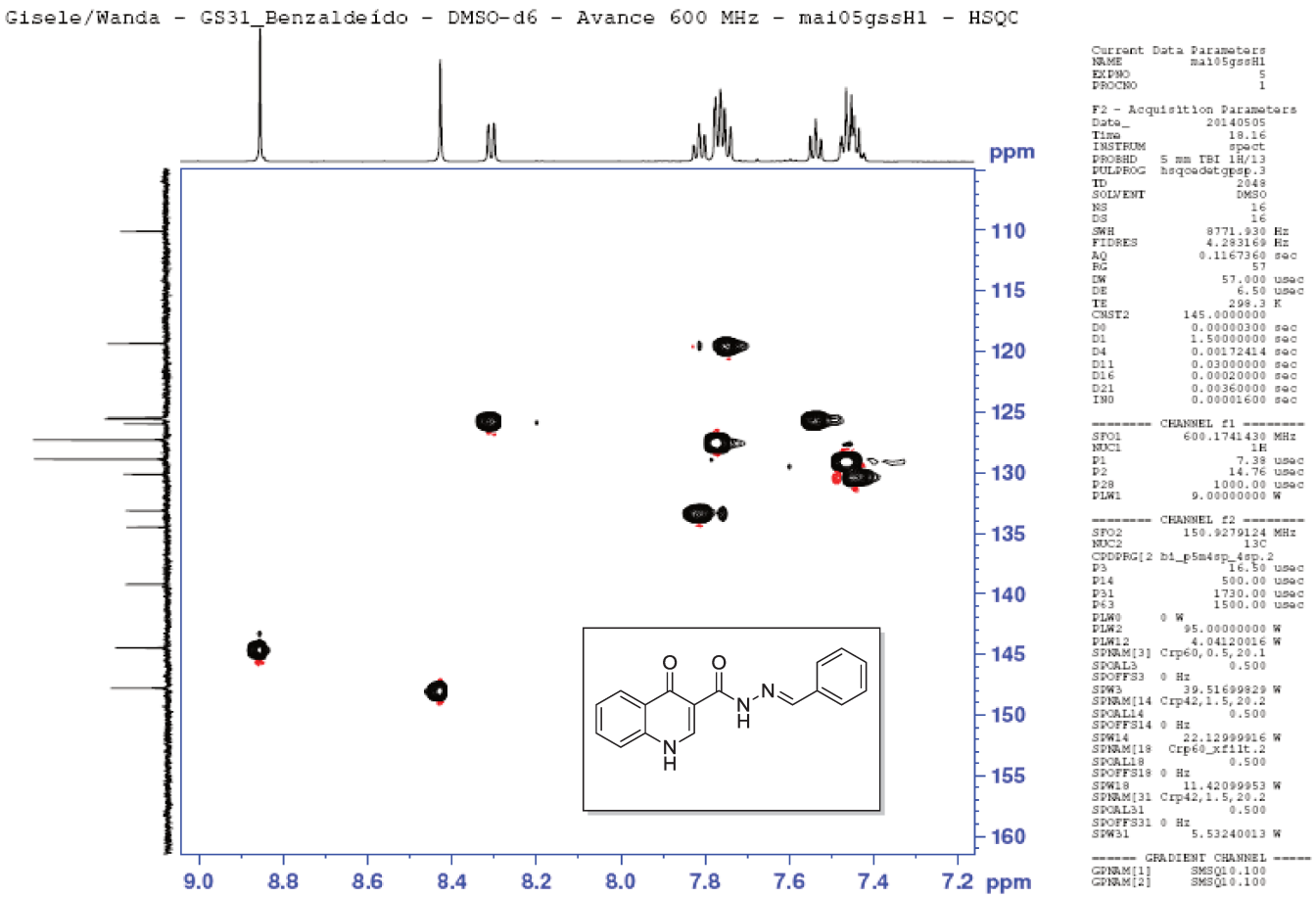


Figura 67. Expansão do espectro de HSQC ^{13}C-^{1}H (DMSO-d_6, 600/150 MHz) da acil-hidrazona **9**.

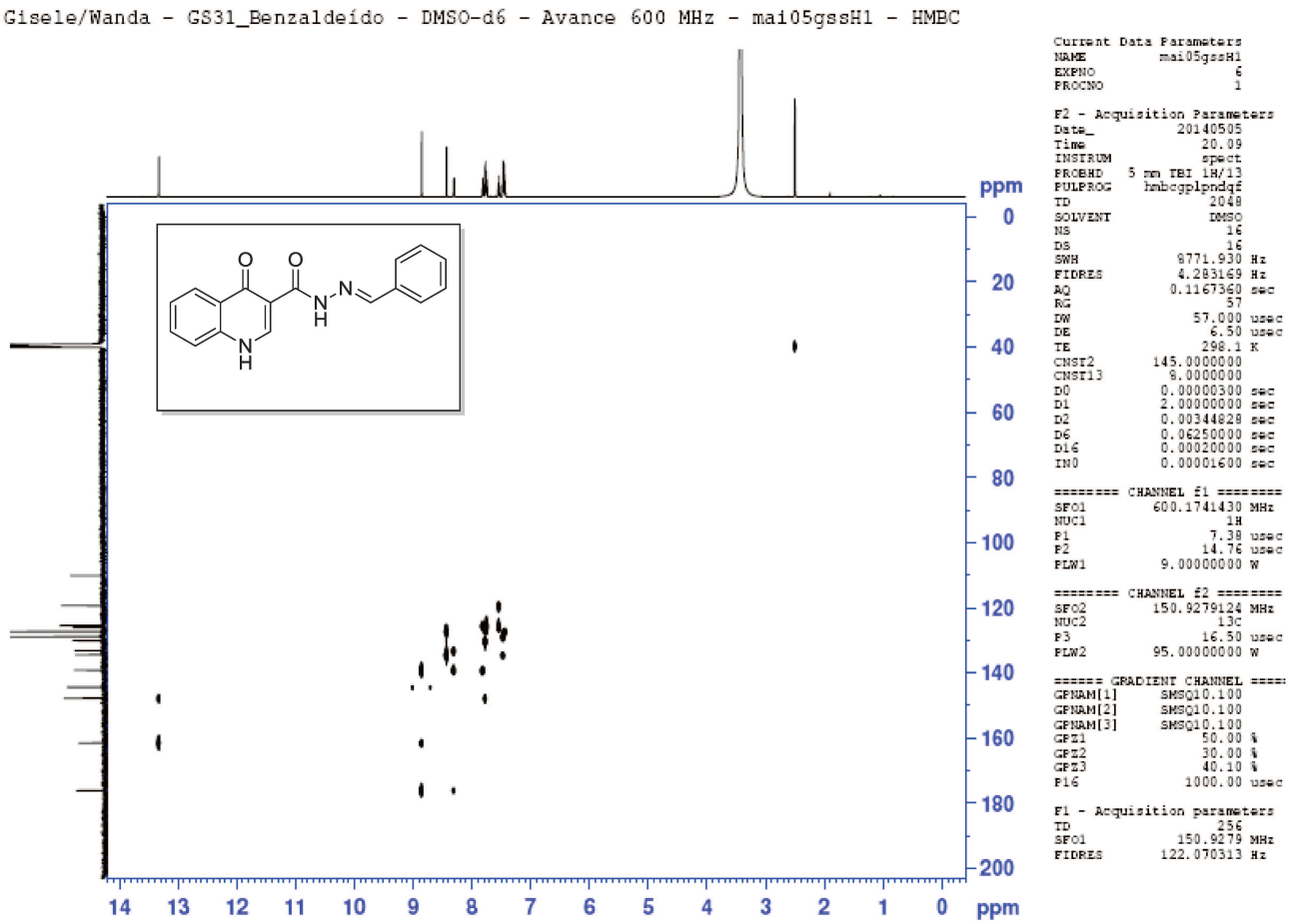


Figura 68. Expansão do espectro de HMBC ^{13}C-^{1}H (DMSO-d_6, 600/150 MHz) da acil-hidrazona **9**.

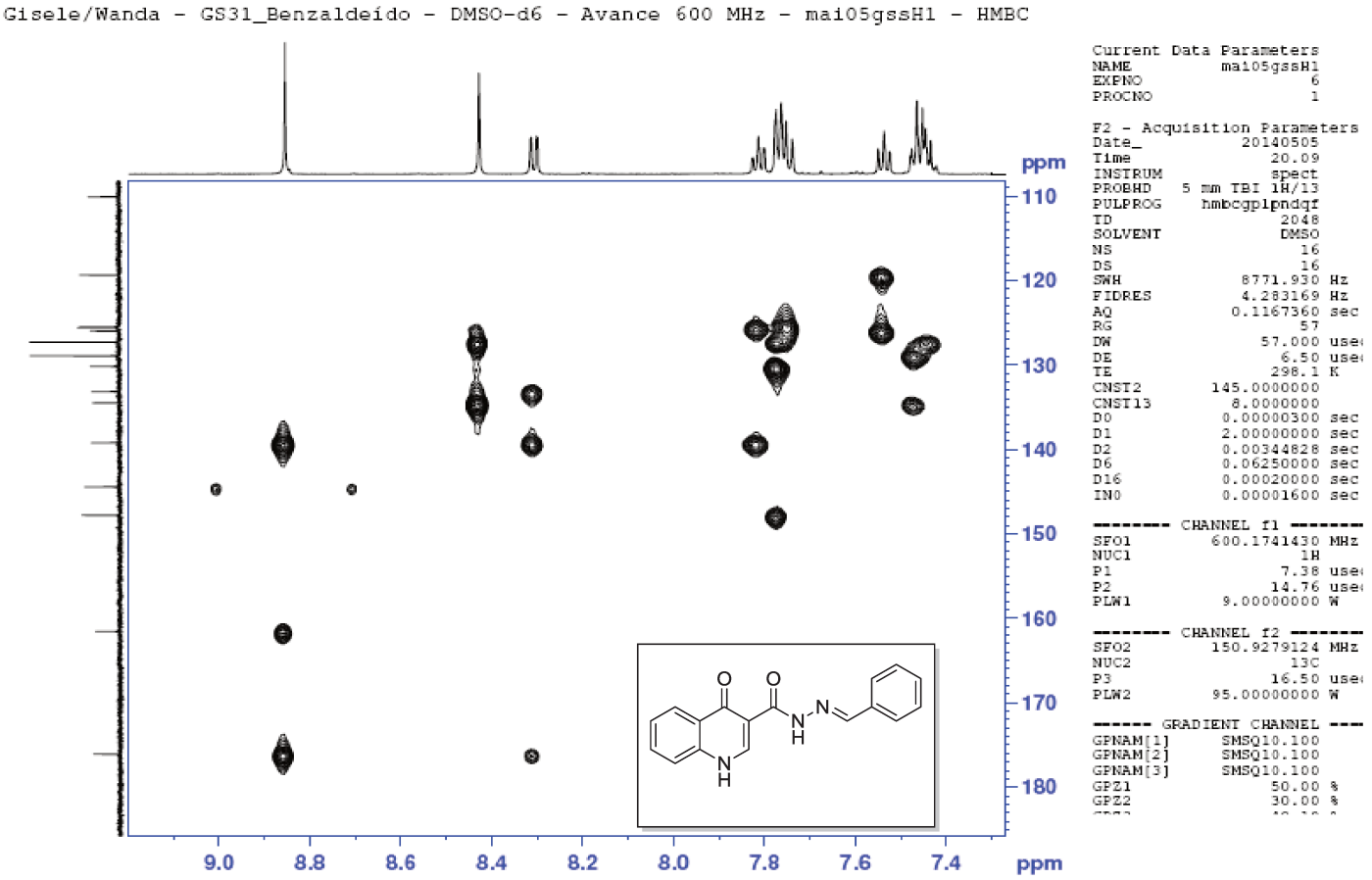


Figura 69. Expansão do espectro de HSQC ^{13}C-^{1}H (DMSO-d_6, 600/150 MHz) da acil-hidrazona **9**.

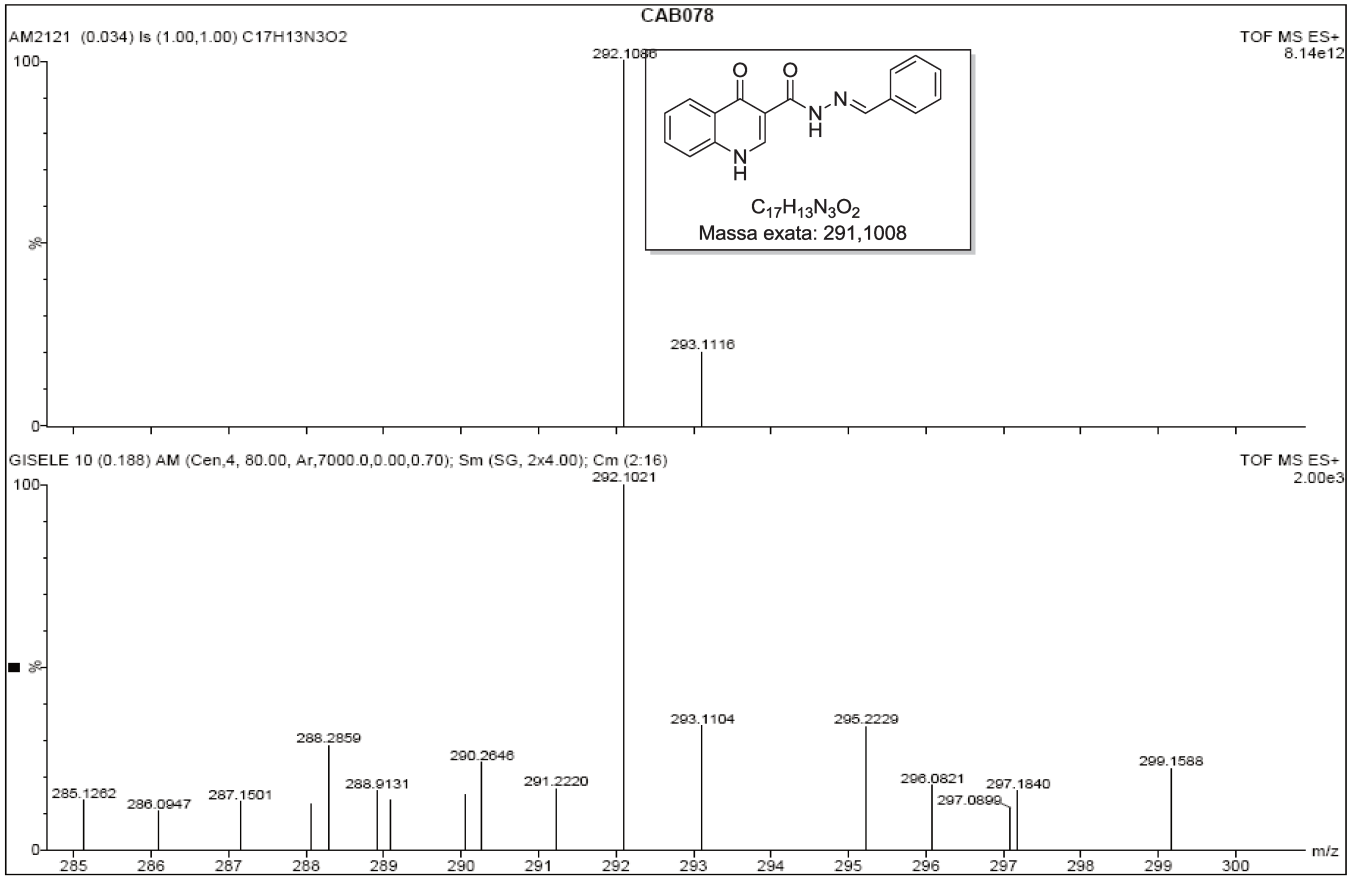


Figura 70. Espectro de massas de alta resolução (TOF-MS-ES+) da acil-hidrazona **9**.

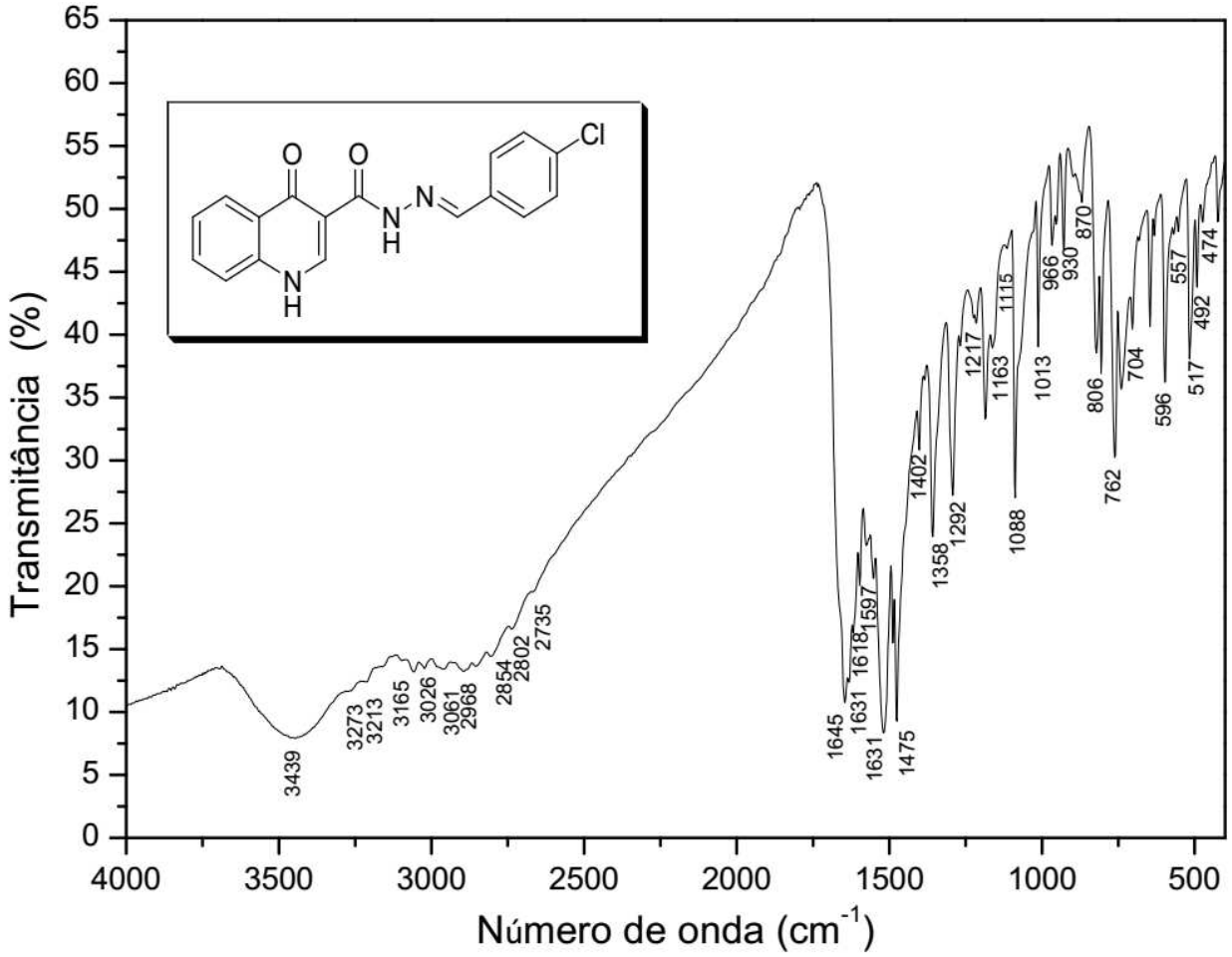


Figura 71. Espectro de IV da acil-hidrazona **10**.

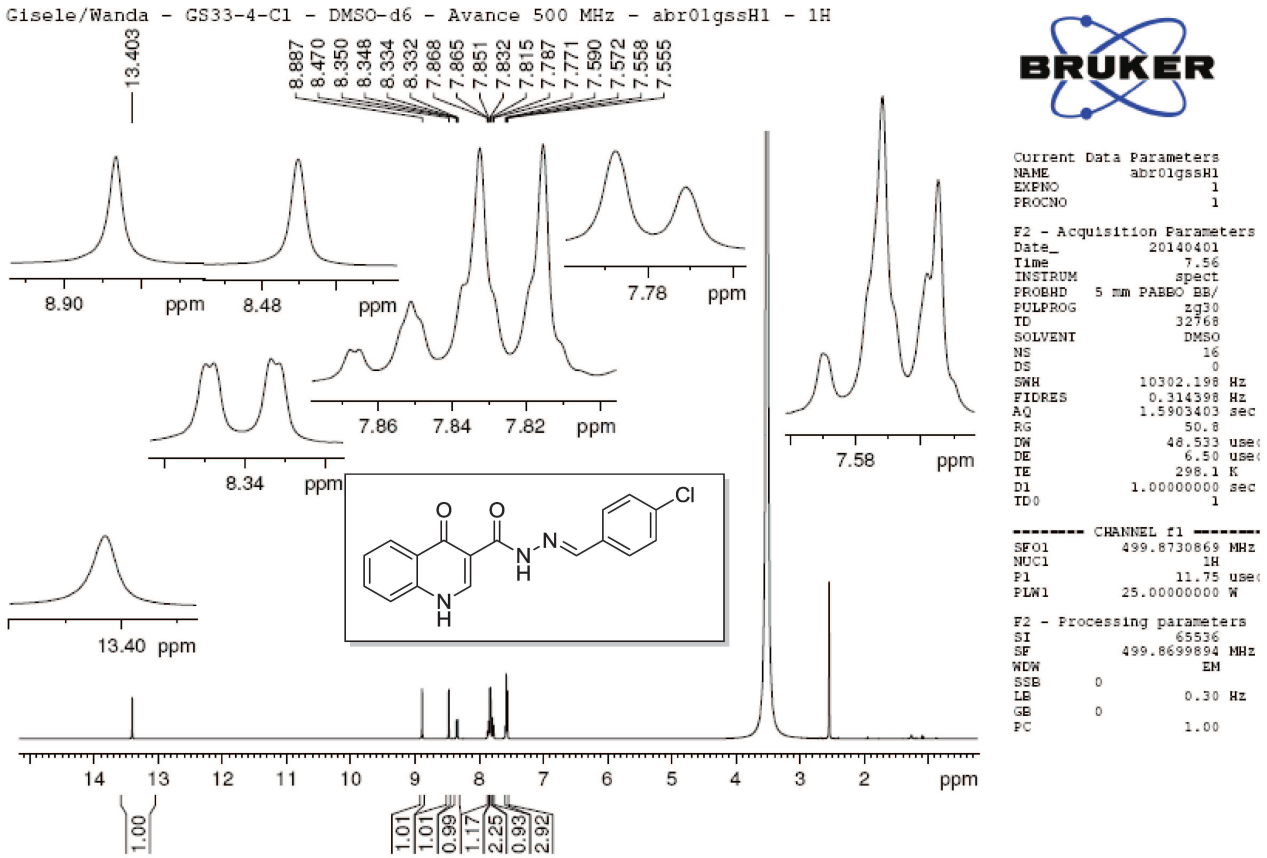


Figura 72. Espectro de RMN ^{1}H (500 MHz, DMSO-d_6) da acil-hidrazona **10**.

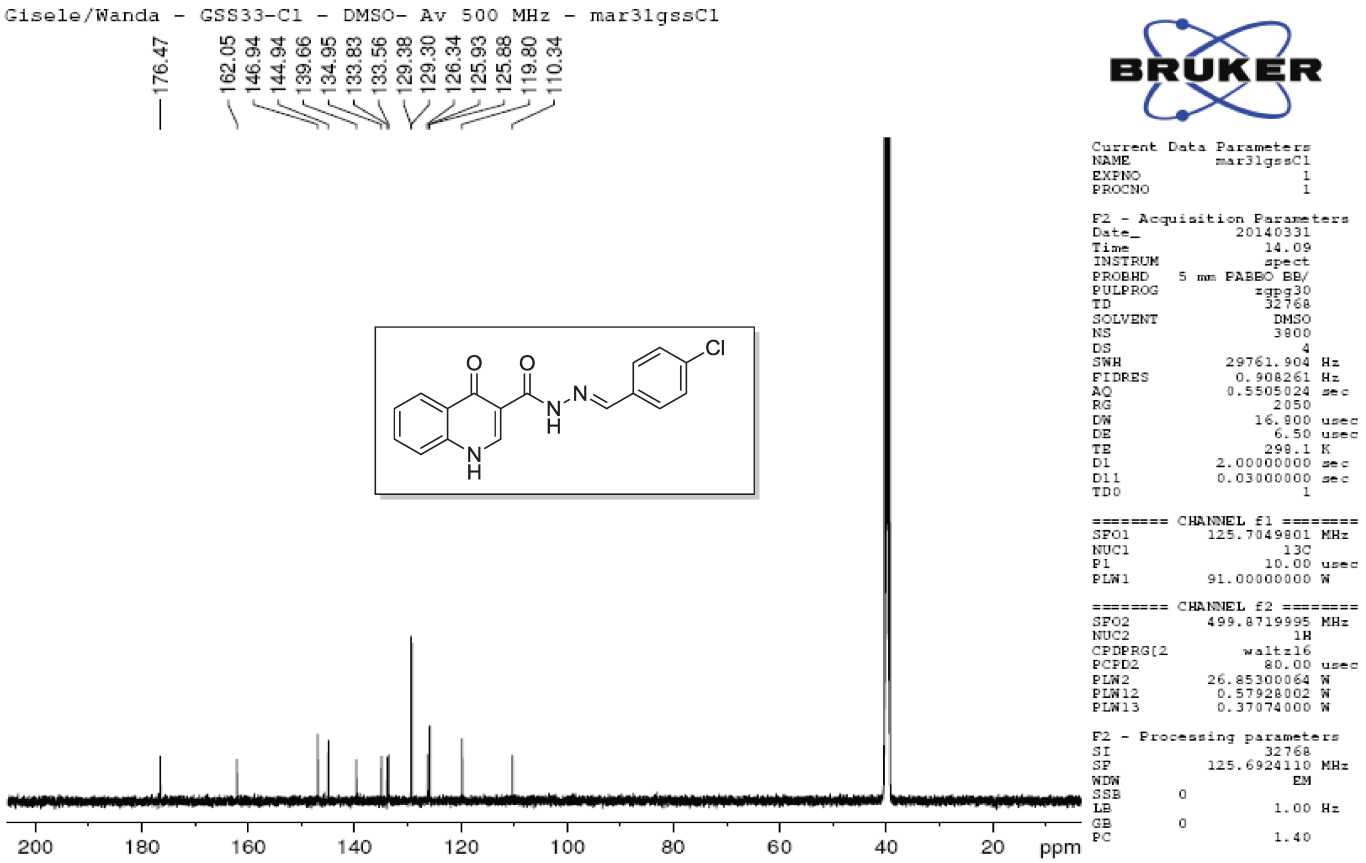


Figura 73. Espectro de RMN ^{13}C (500 MHz, DMSO-d_6) da acil-hidrazona **10**.

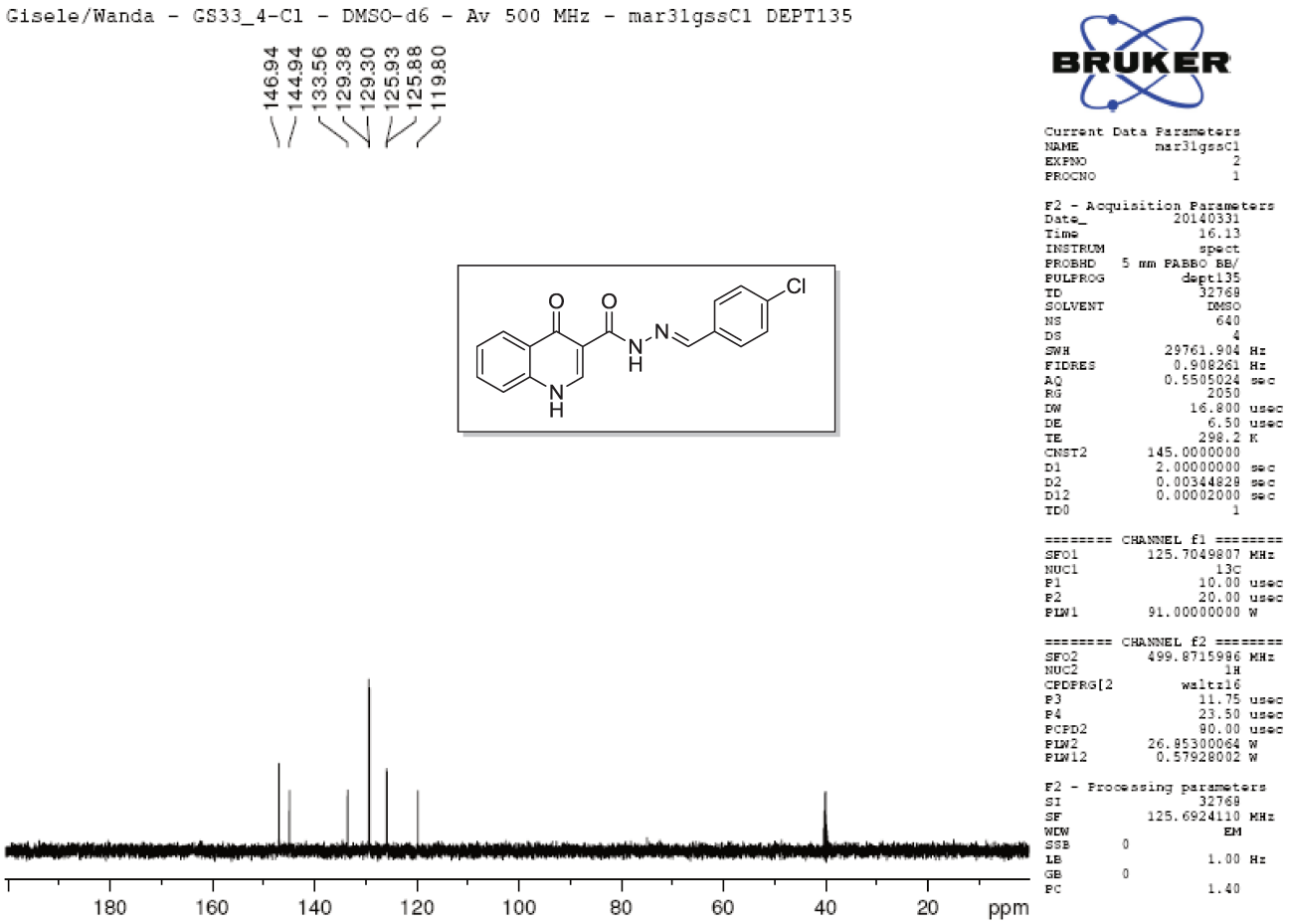


Figura 74. Espectro de RMN ^{13}C DEPT-135 (500 MHz, DMSO-d_6) da acil-hidrazona **10**.

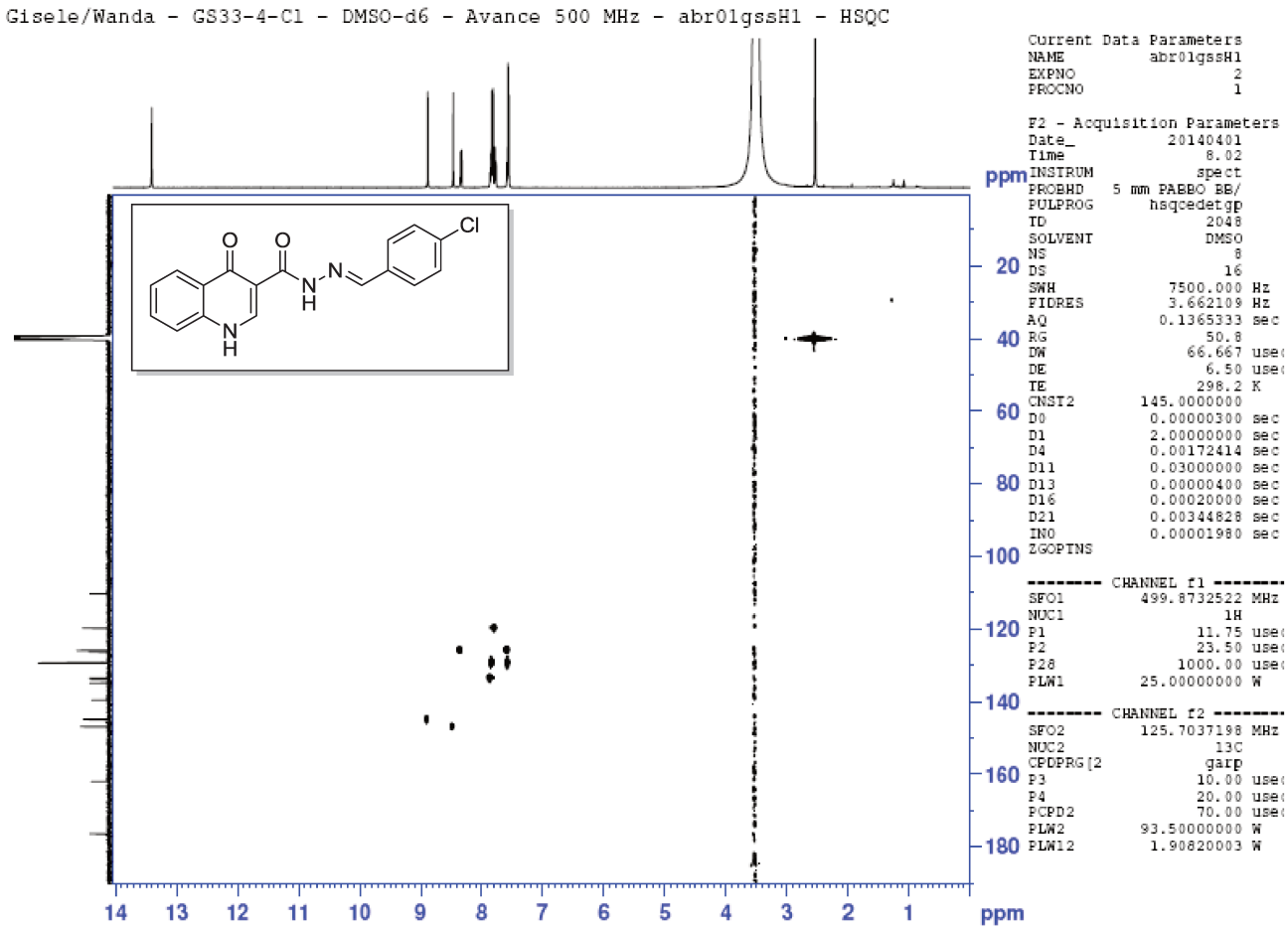


Figura 75. Espectro de HSQC ^{13}C-^{1}H (500/125 MHz, DMSO-d_6) da acil-hidrazona **10**.

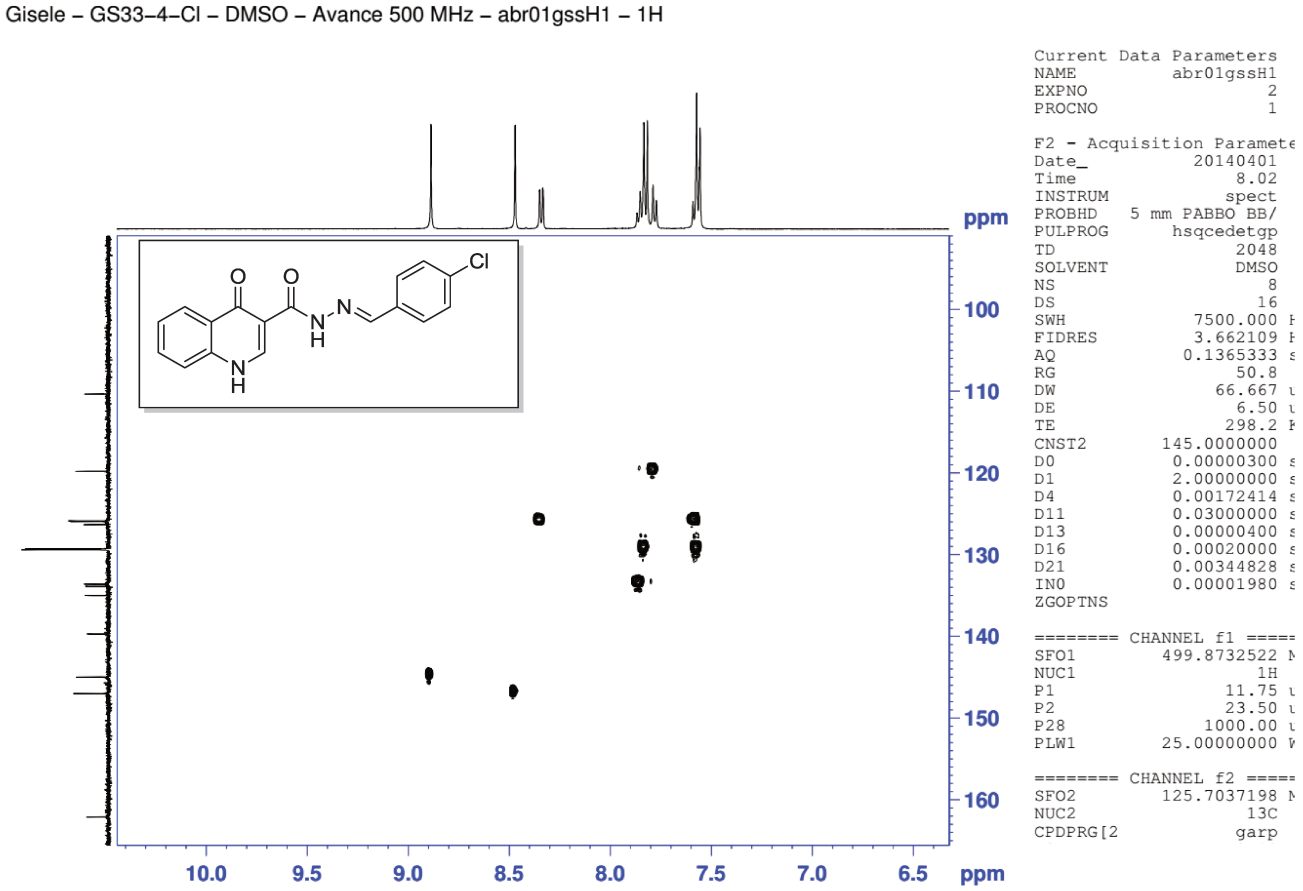


Figura 76. Expansão do espectro de HSQC ^{13}C-^{1}H (500/125 MHz, DMSO-d_6) da acil-hidrazona **10**.

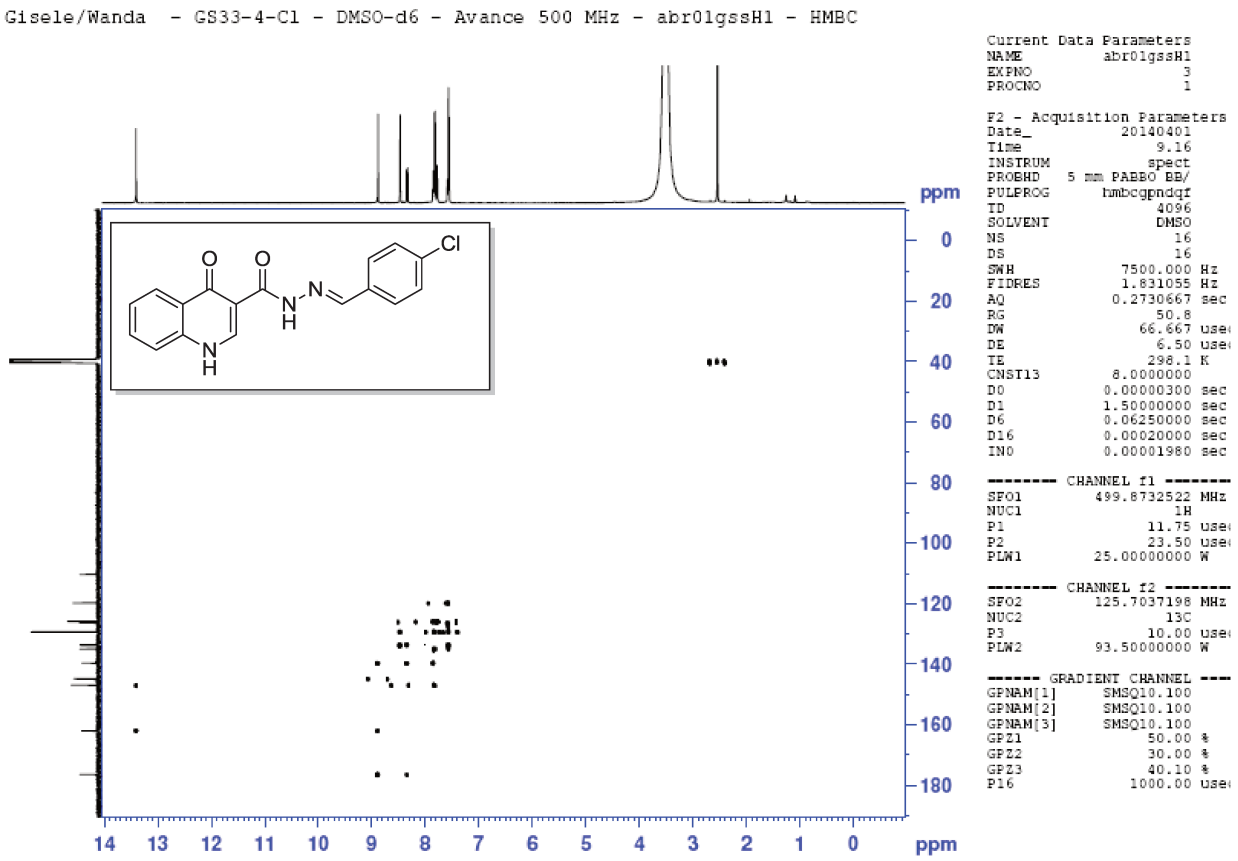


Figura 77. Espectro de HMBC ^{13}C-^{1}H (500/125 MHz, DMSO-d_6) da acil-hidrazona **10**.

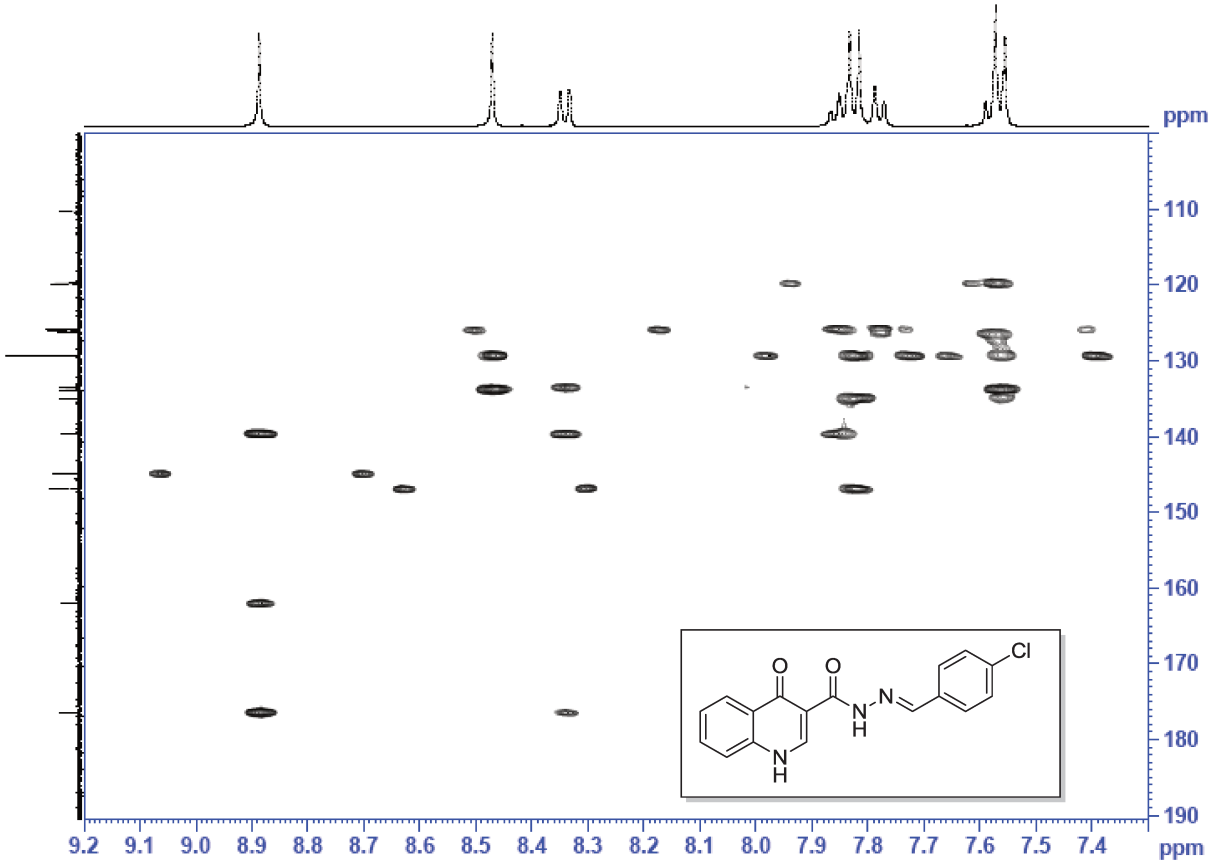


Figura 78. Expansão do espectro de HMBC ^{13}C-^{1}H (500/125 MHz, DMSO-d_6) da acil-hidrazona **10**.

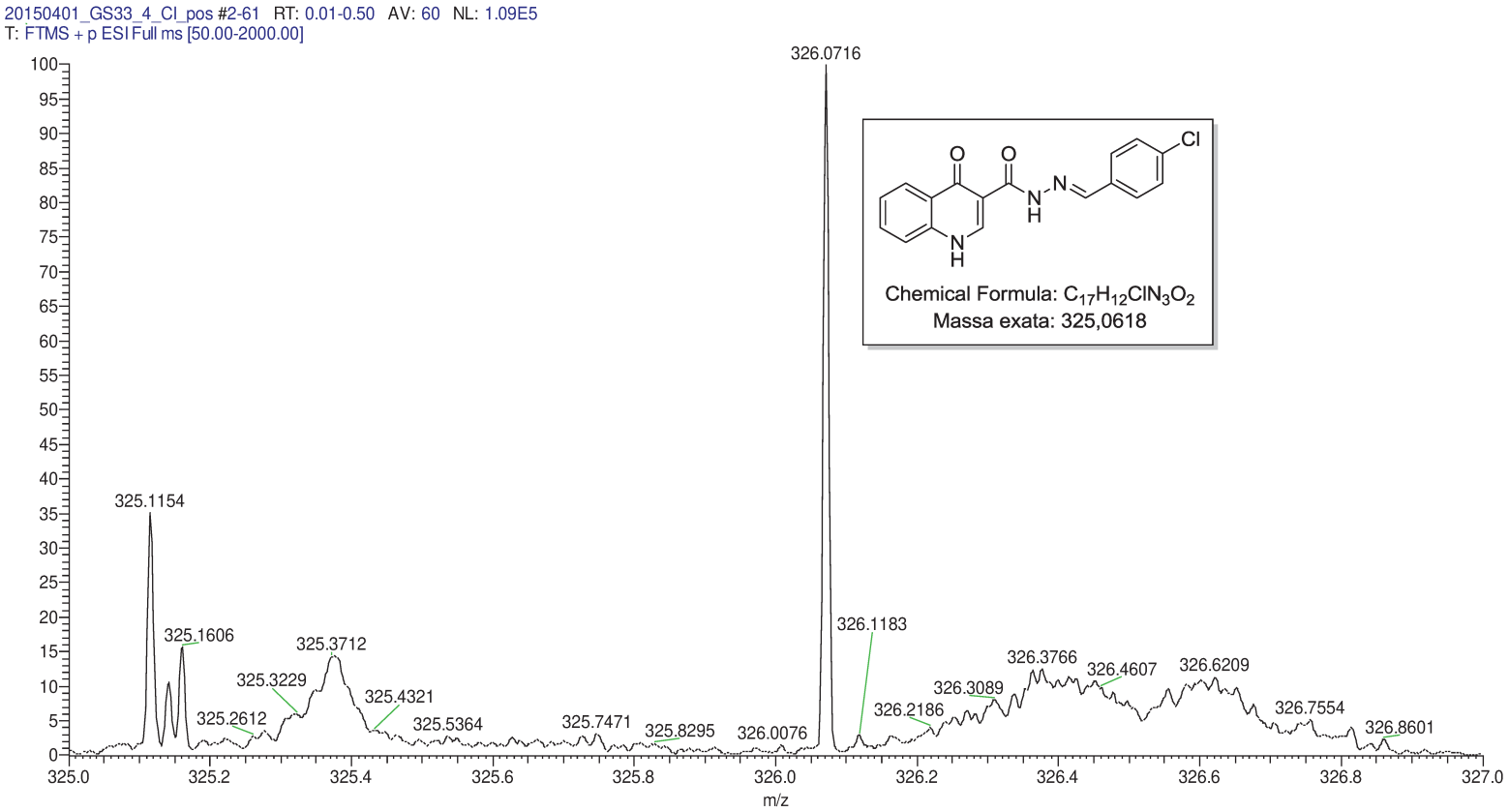


Figura 79. Espectro de massas de alta resolução (TOF-MS-ES+) da acil-hidrazona **10**.

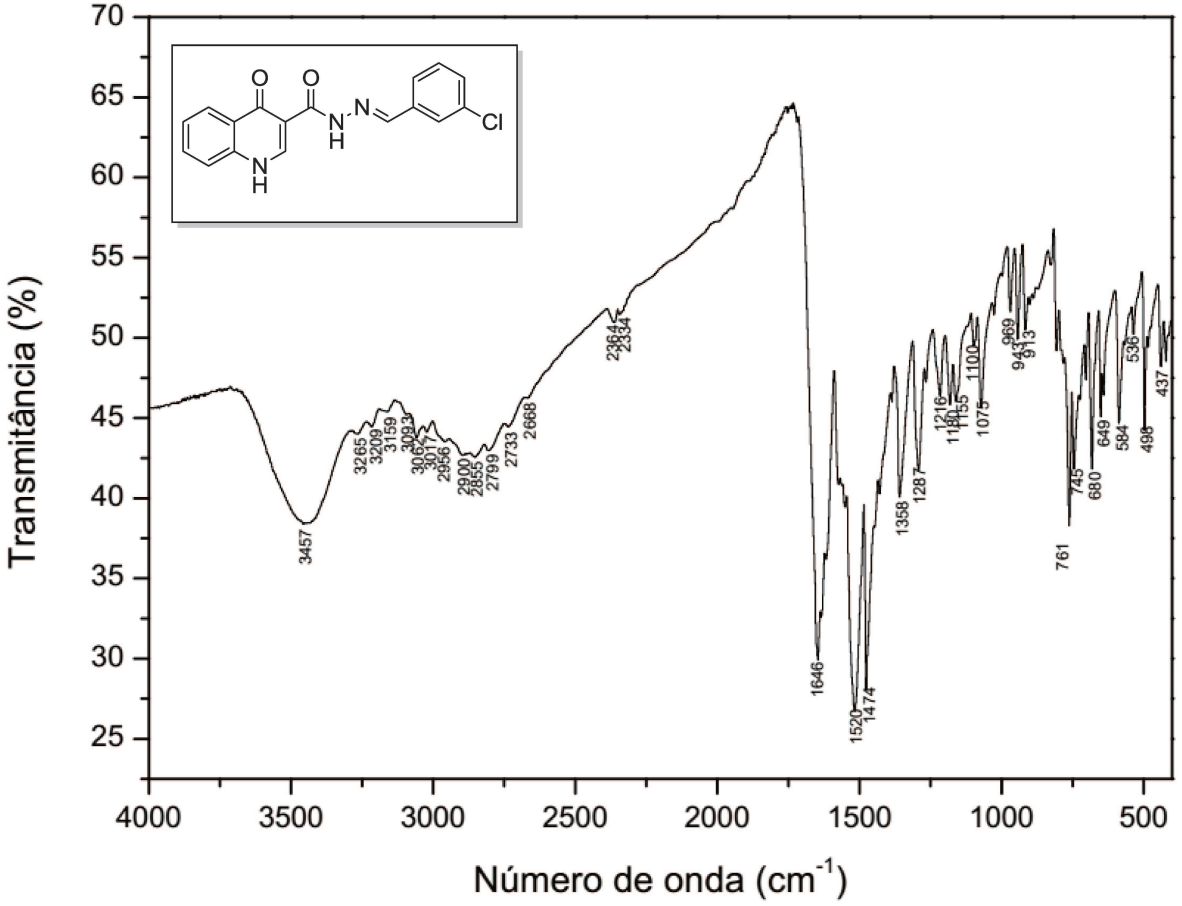


Figura 80. Espectro de IV da acil-hidrazona **11**.

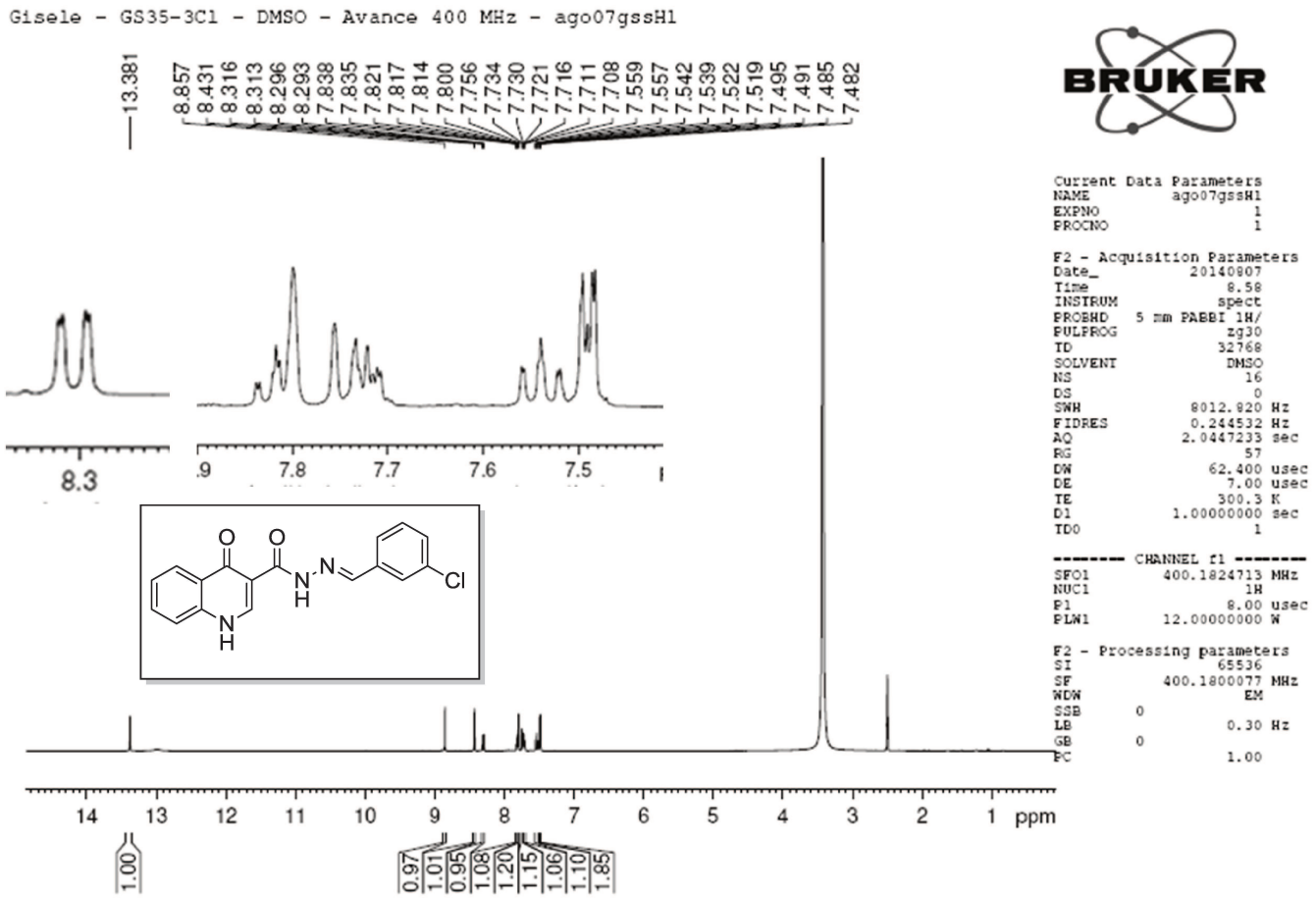


Figura 81. Espectro de RMN ^{1}H (400 MHz, DMSO-d_6) da acil-hidrazona **11**.

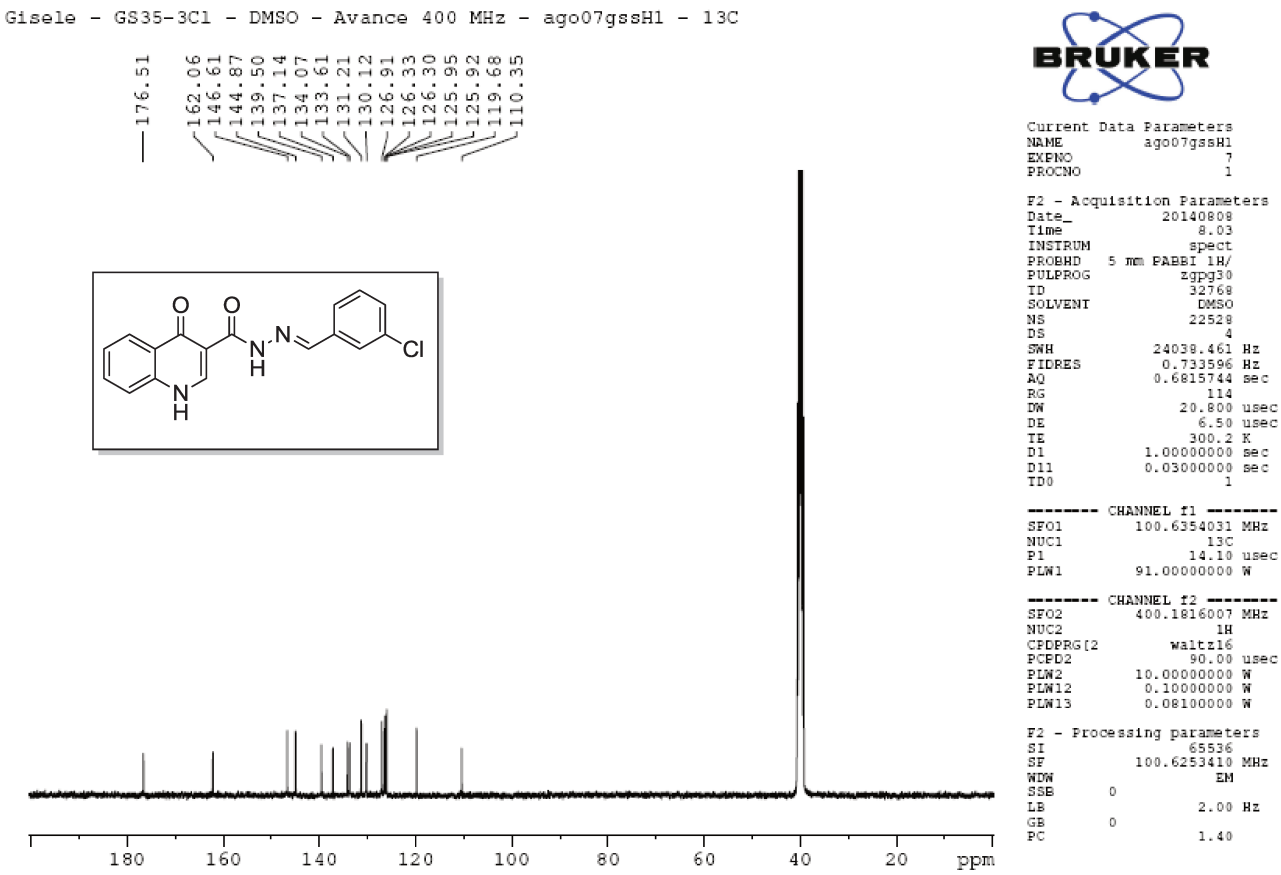


Figura 82. Espectro de RMN ^{13}C (100 MHz, DMSO-d_6) da acil-hidrazona **11**.

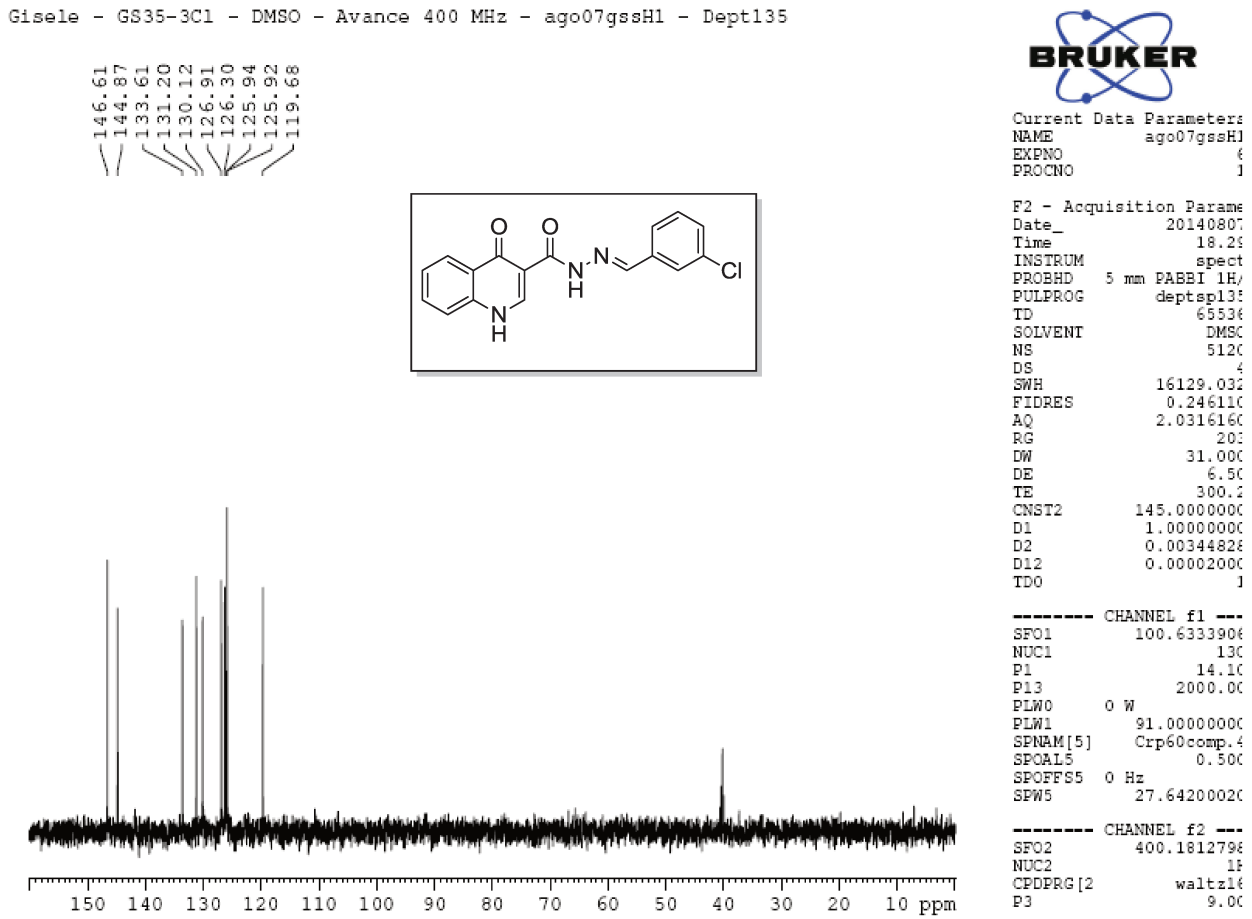


Figura 83. Espectro de RMN ^{13}C DEPT-135 (100 MHz, DMSO-d_6) da acil-hidrazona **11**.

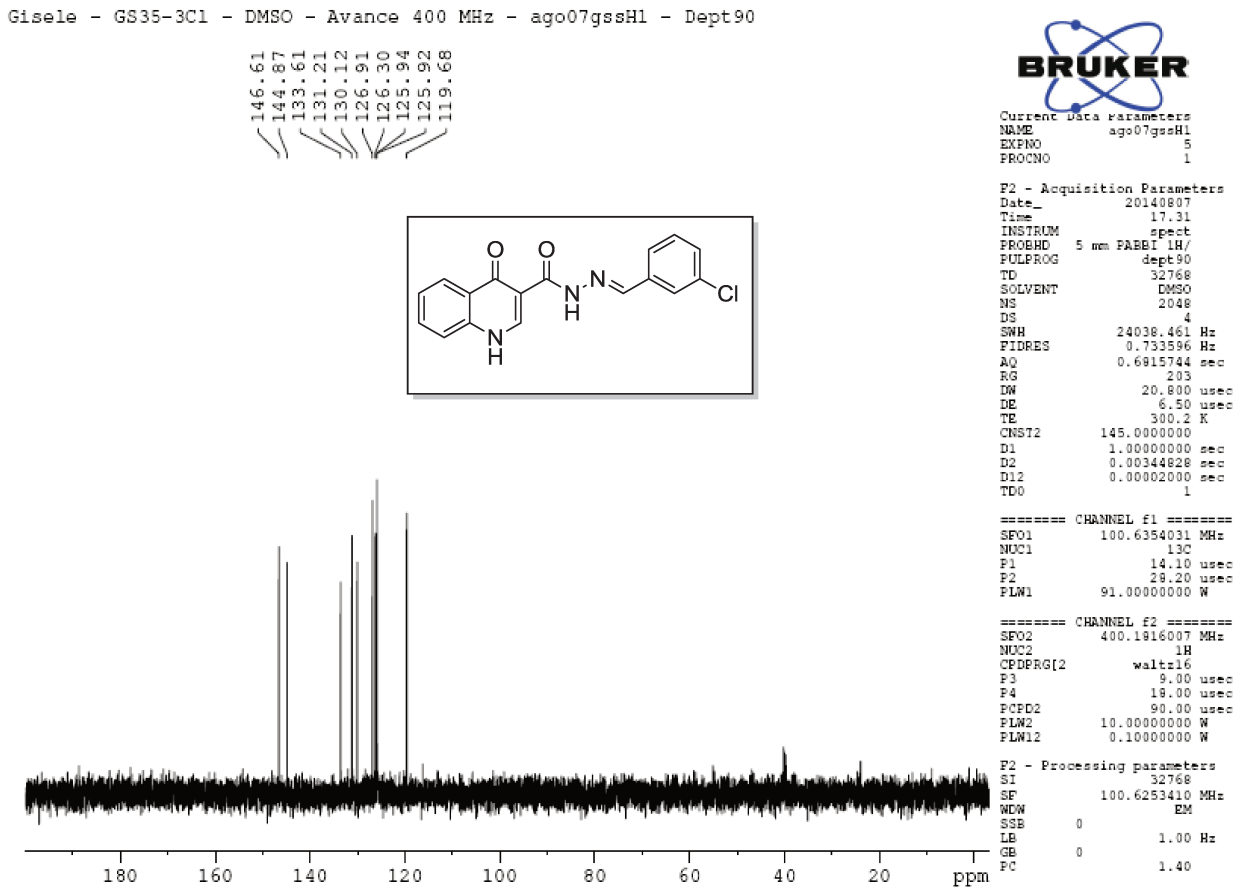


Figura 84. Espectro de RMN ^{13}C DEPT-90 (100 MHz, DMSO-d_6) da acil-hidrazona **11**.

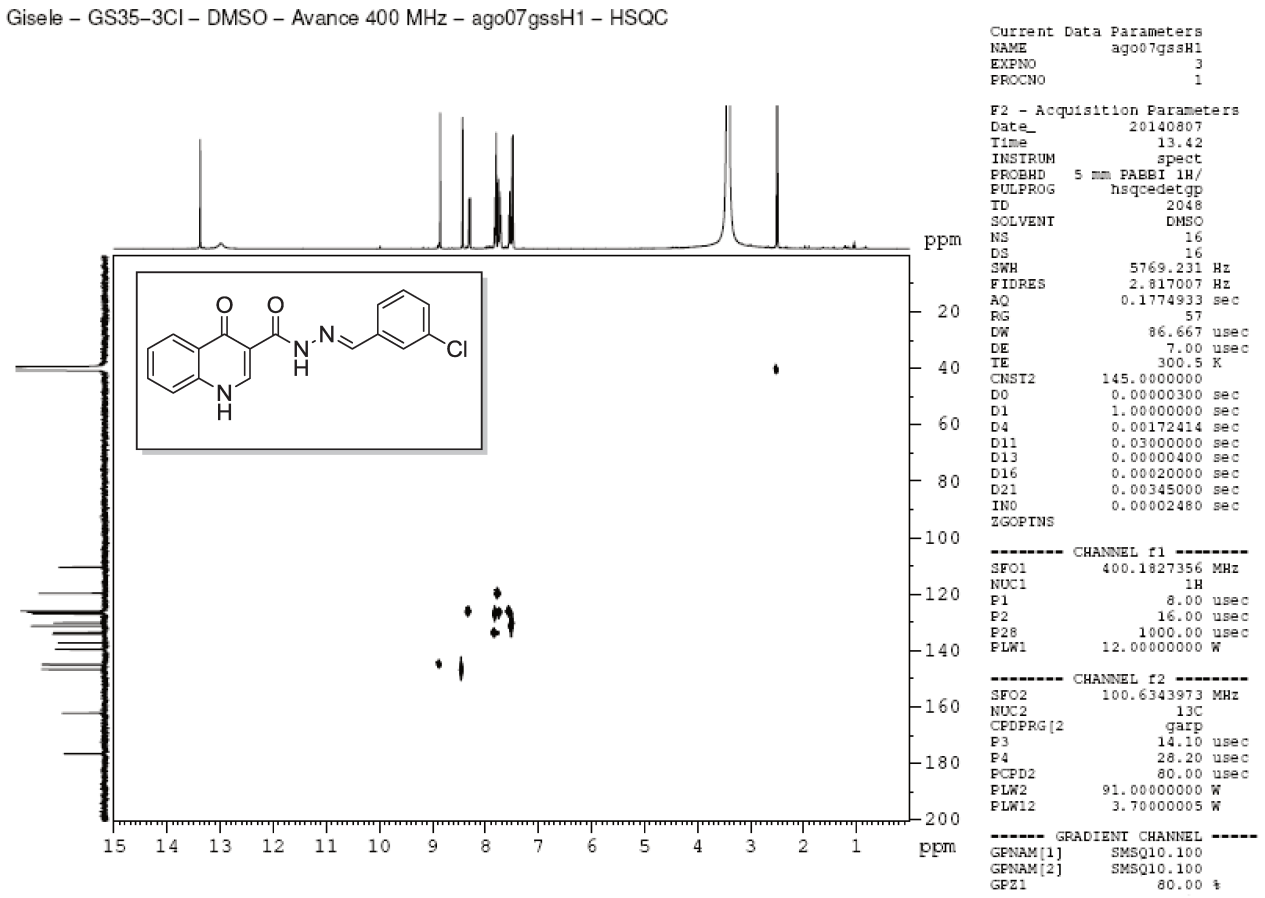


Figura 85. Espectro de HSQC ^{13}C-^{1}H (400/100 MHz, DMSO-d_6) da acil-hidrazona **11**.

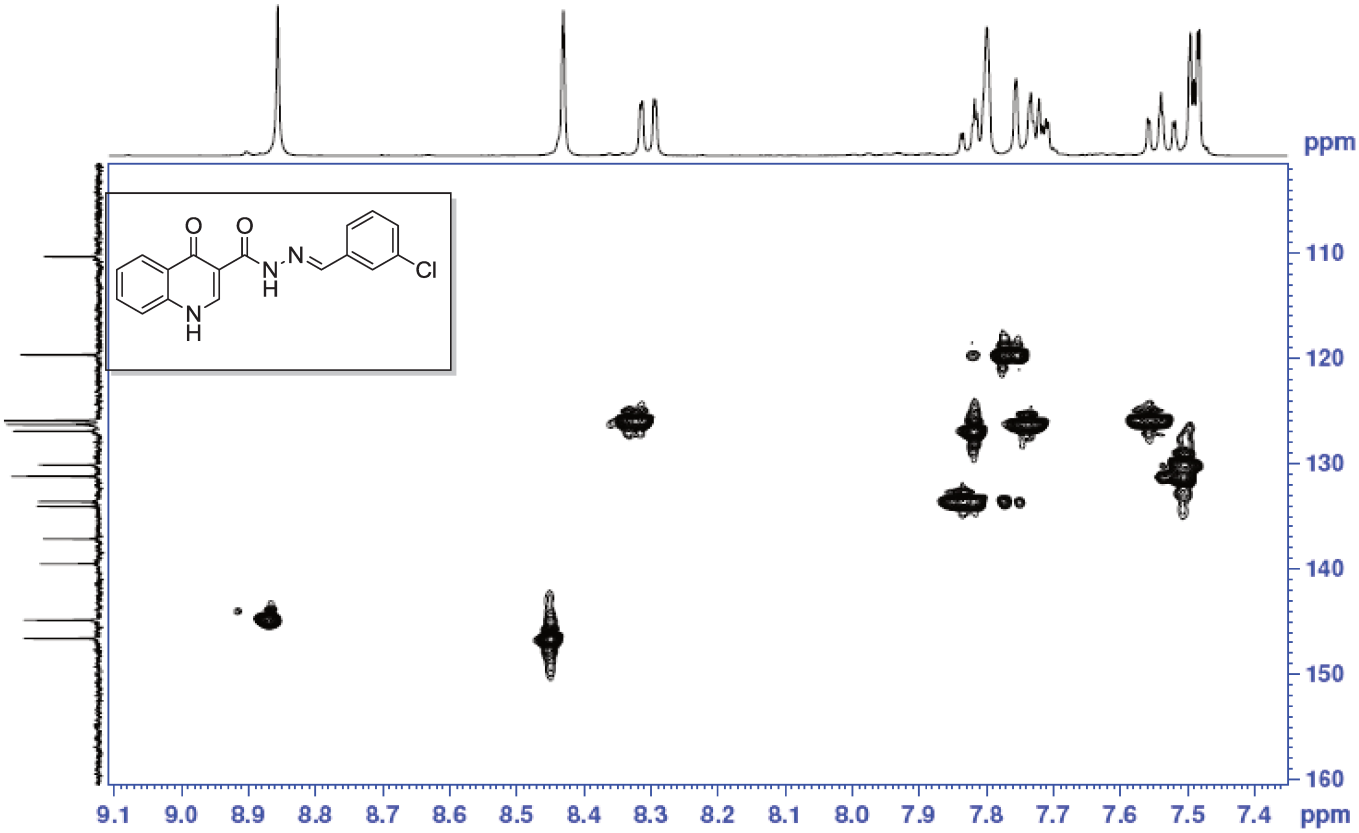


Figura 86. Expansão do espectro de HSQC ^{13}C-^{1}H (400/100 MHz, DMSO-d_6) da acil-hidrazona **11**.

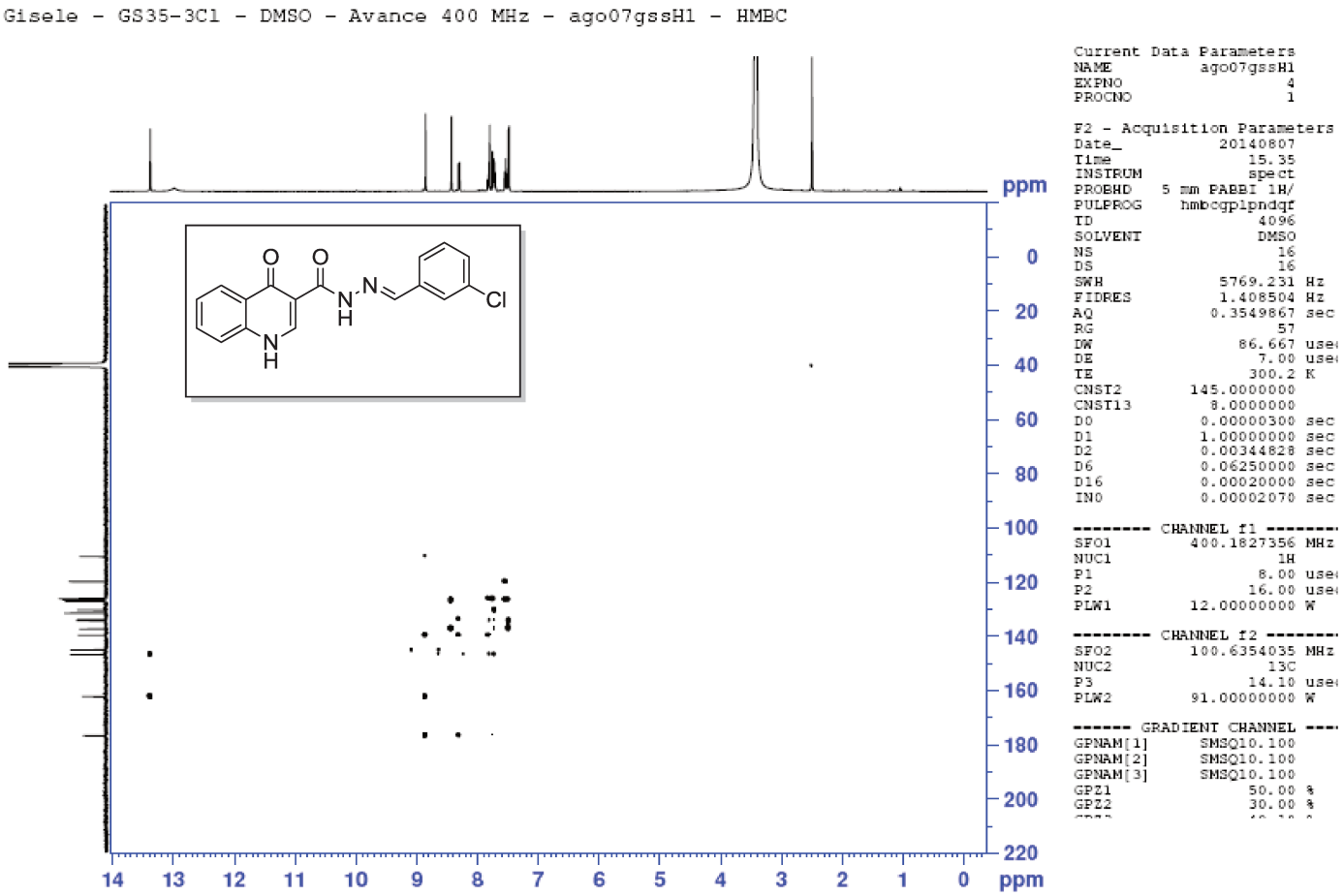


Figura 87. Espectro de HMBC ^{13}C-^{1}H (400/100 MHz, DMSO-d_6) da acil-hidrazona **11**.

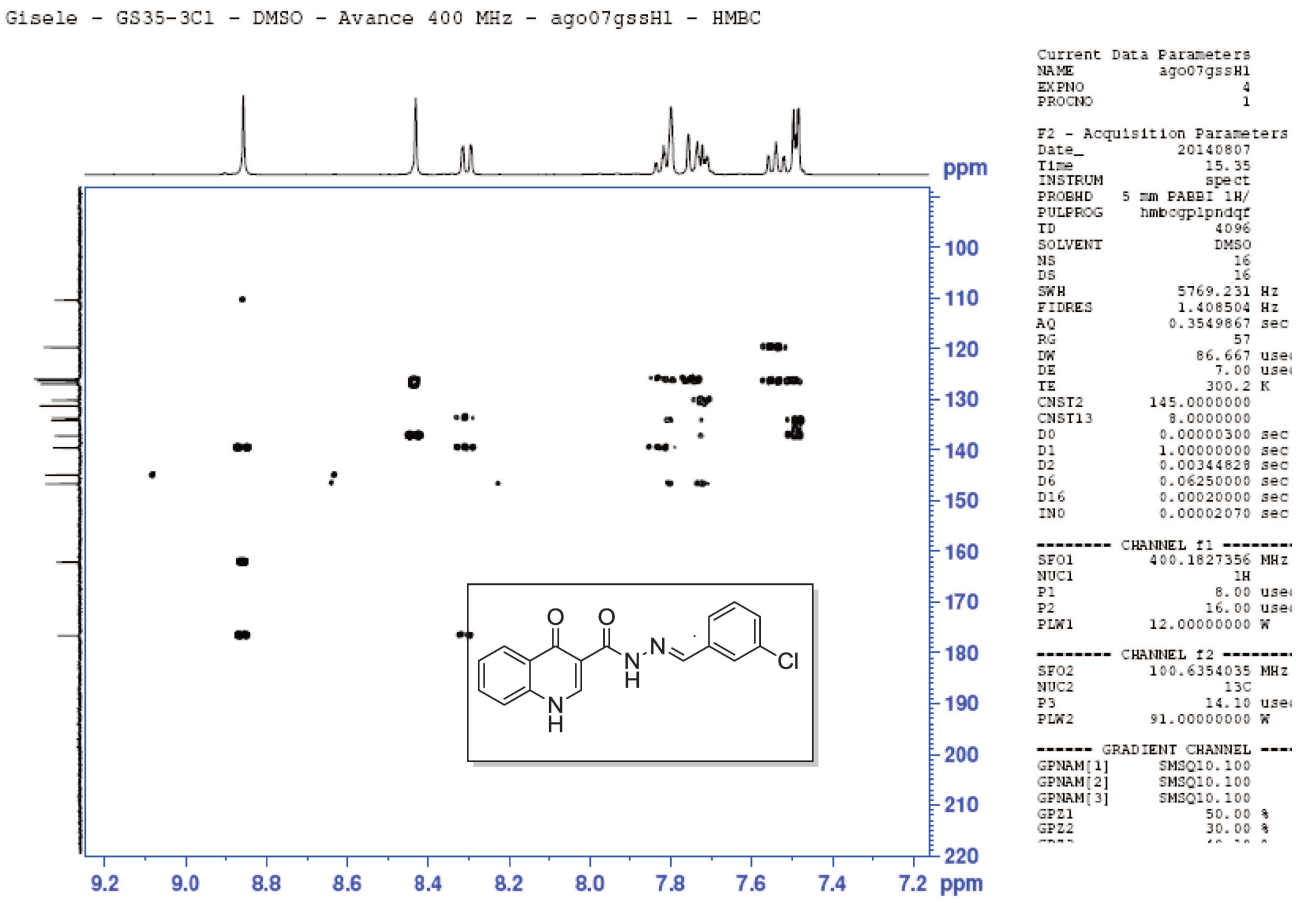


Figura 88. Expansão do espectro de HMBC ^{13}C-^{1}H (500/125 MHz, DMSO-d_6) da acil-hidrazona **11**.

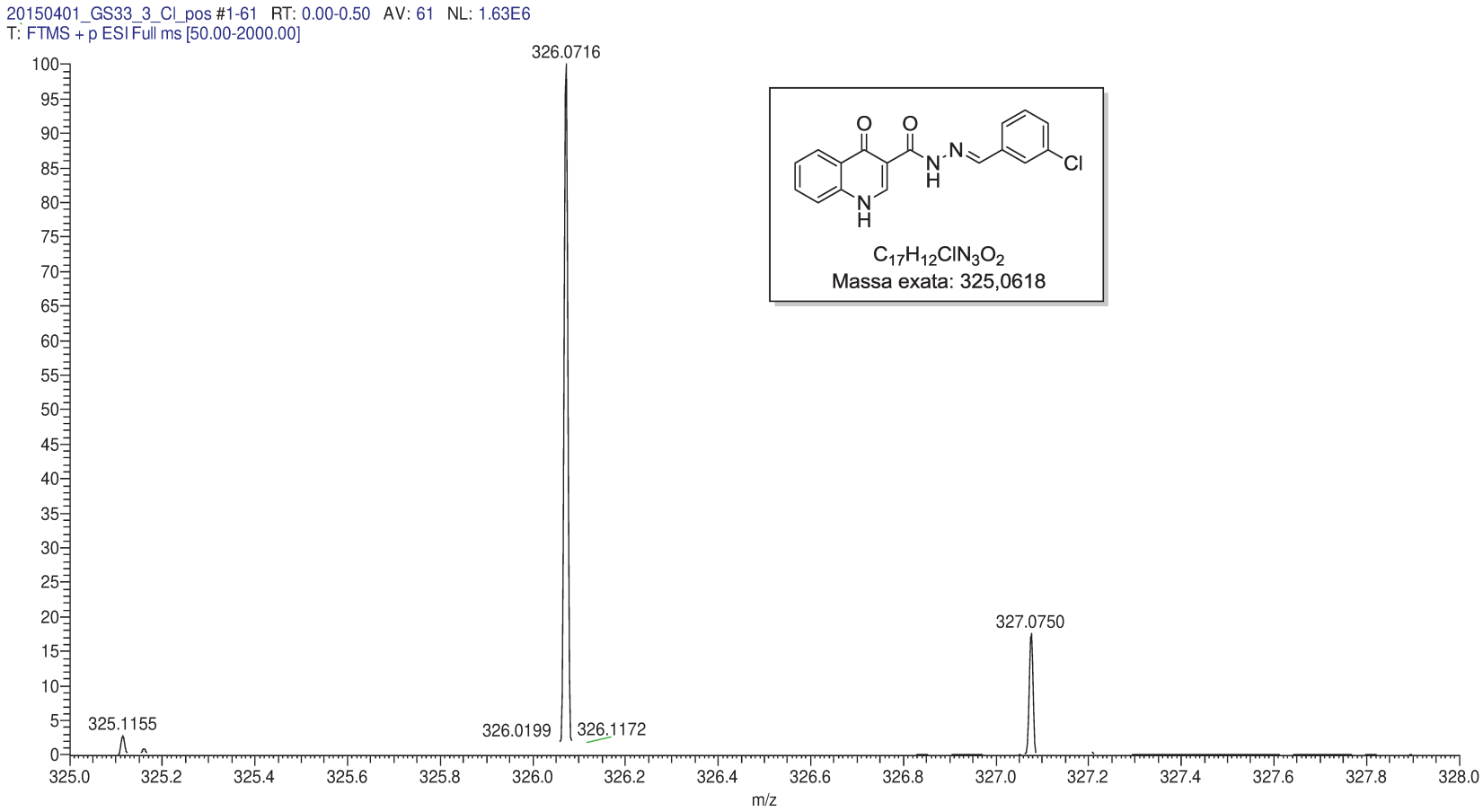


Figura 89. Espectro de massas de alta resolução (TOF-MS-ES+) da acil-hidrazona **11**.

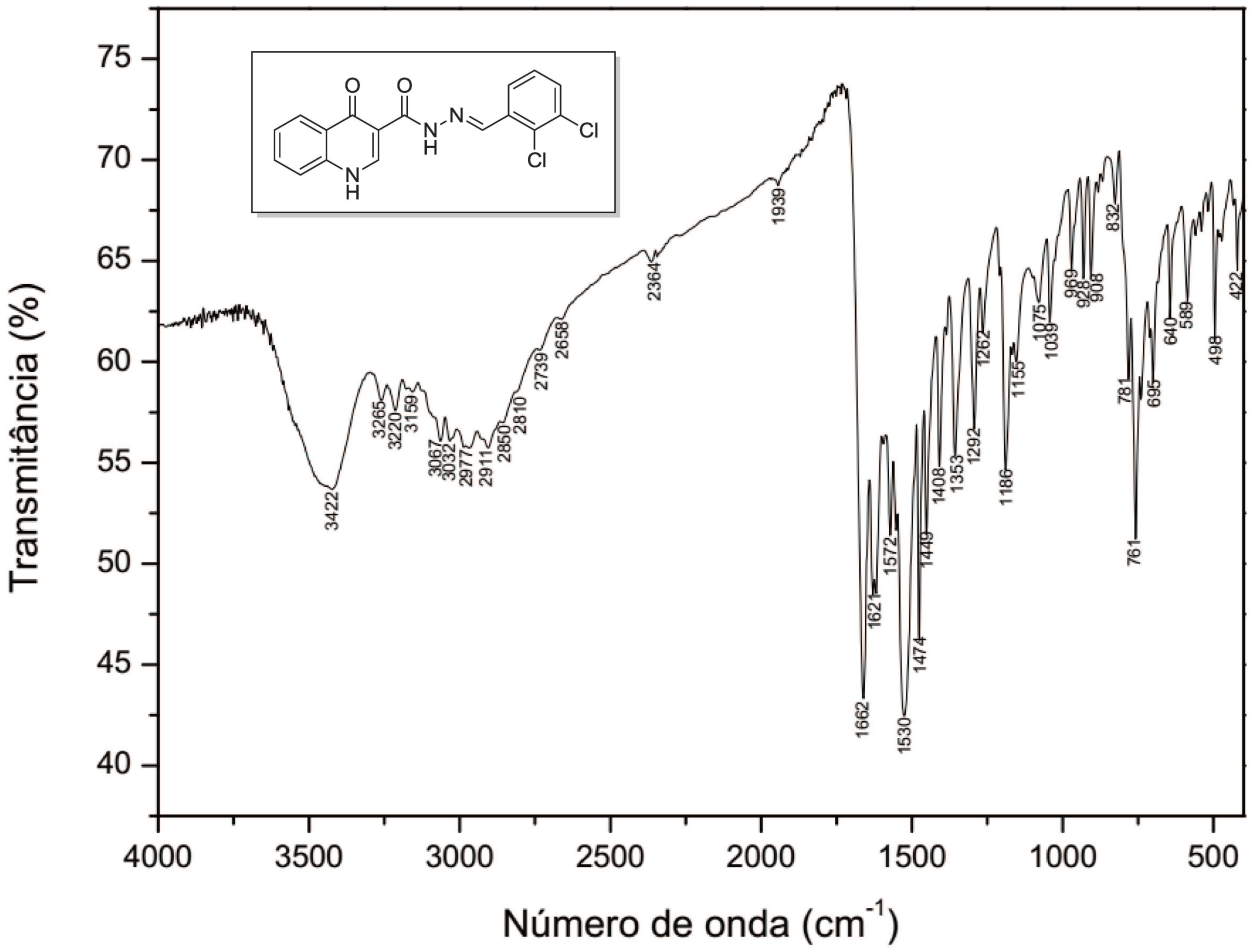


Figura 90. Espectro de IV da acil-hidrazona **12**.

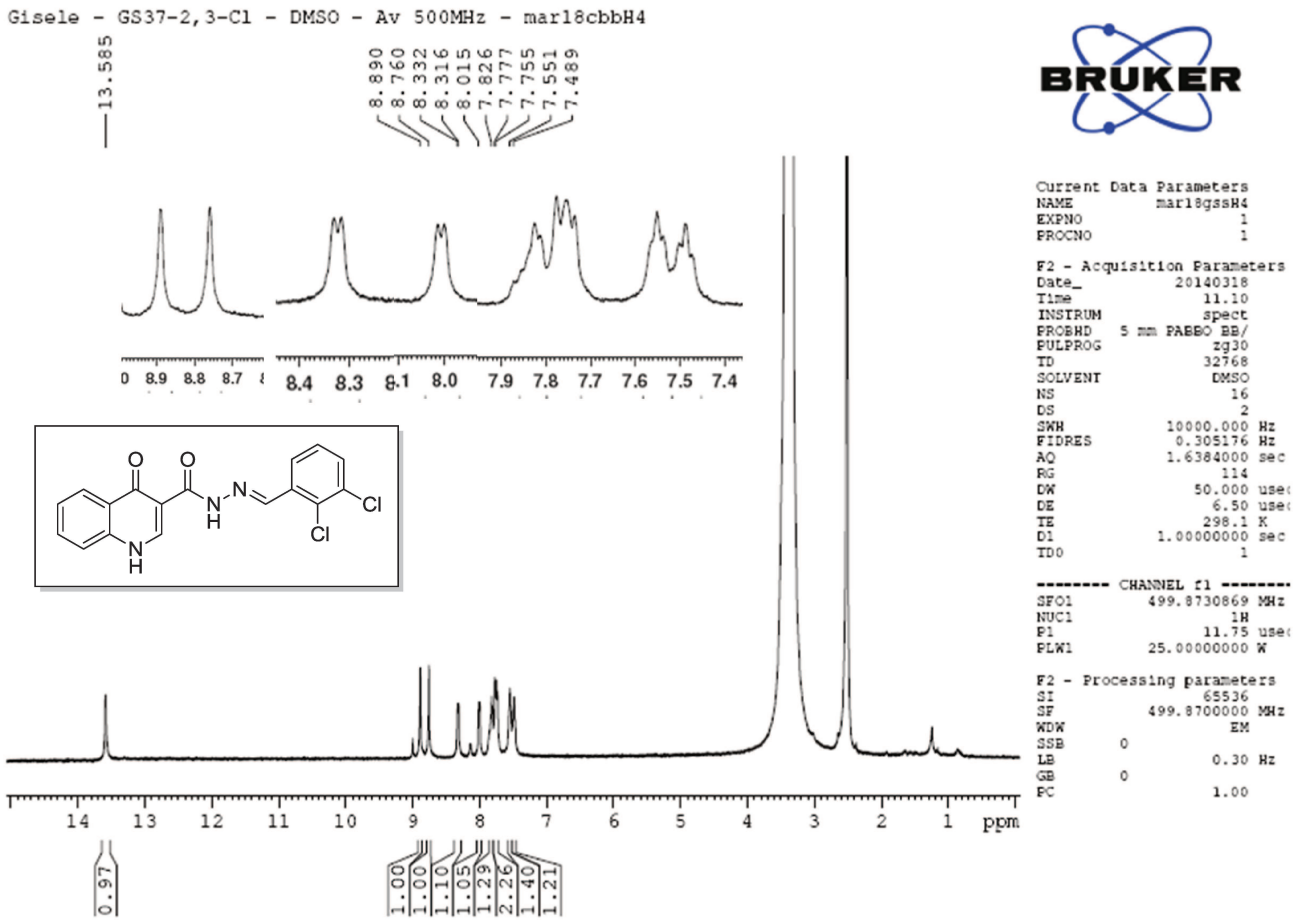


Figura 91. Espectro de RMN ^{1}H (500 MHz, DMSO-d_6) da acil-hidrazona **12**.

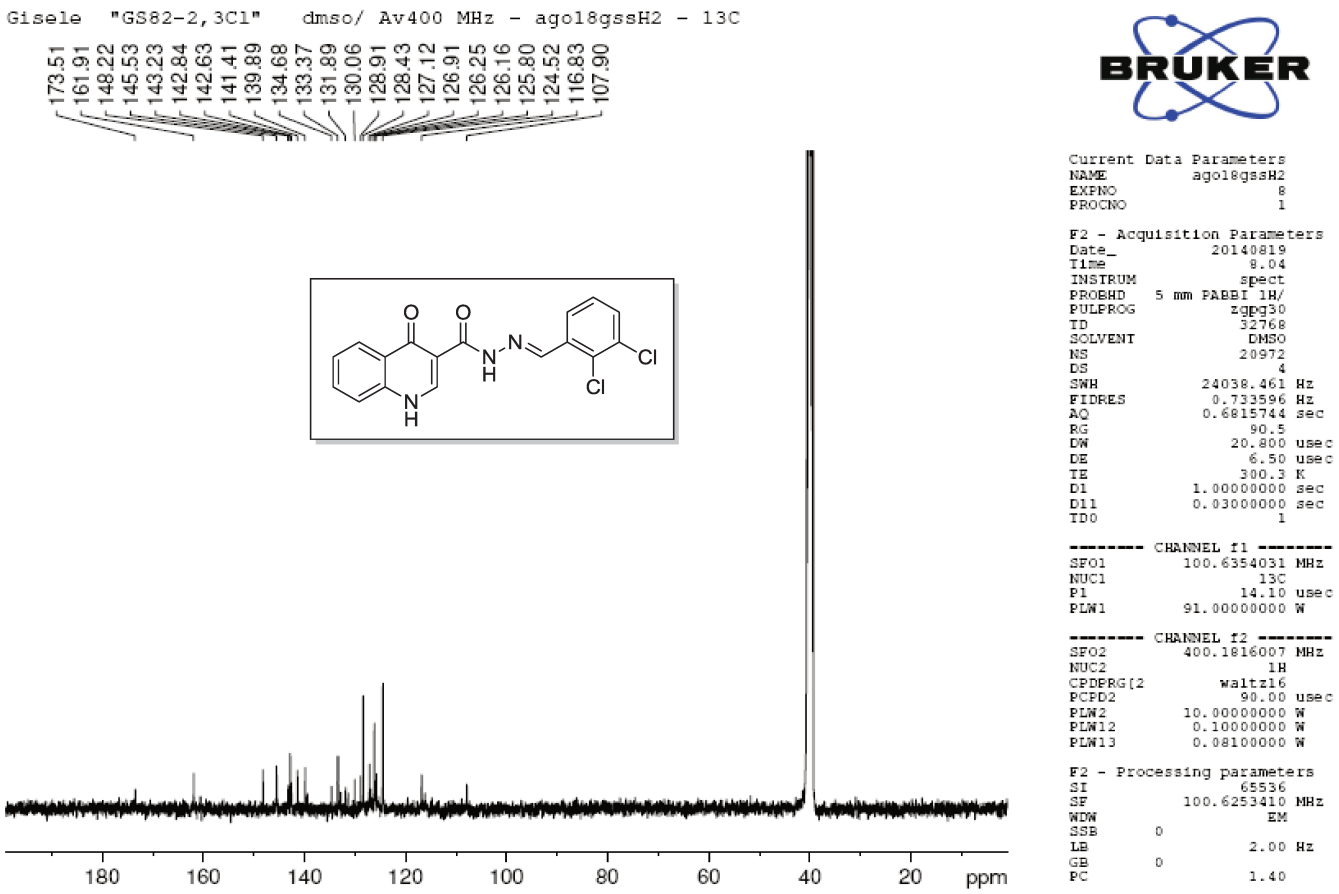


Figura 92. Espectro de RMN ^{13}C (100 MHz, DMSO-d_6) da acil-hidrazona **12**.

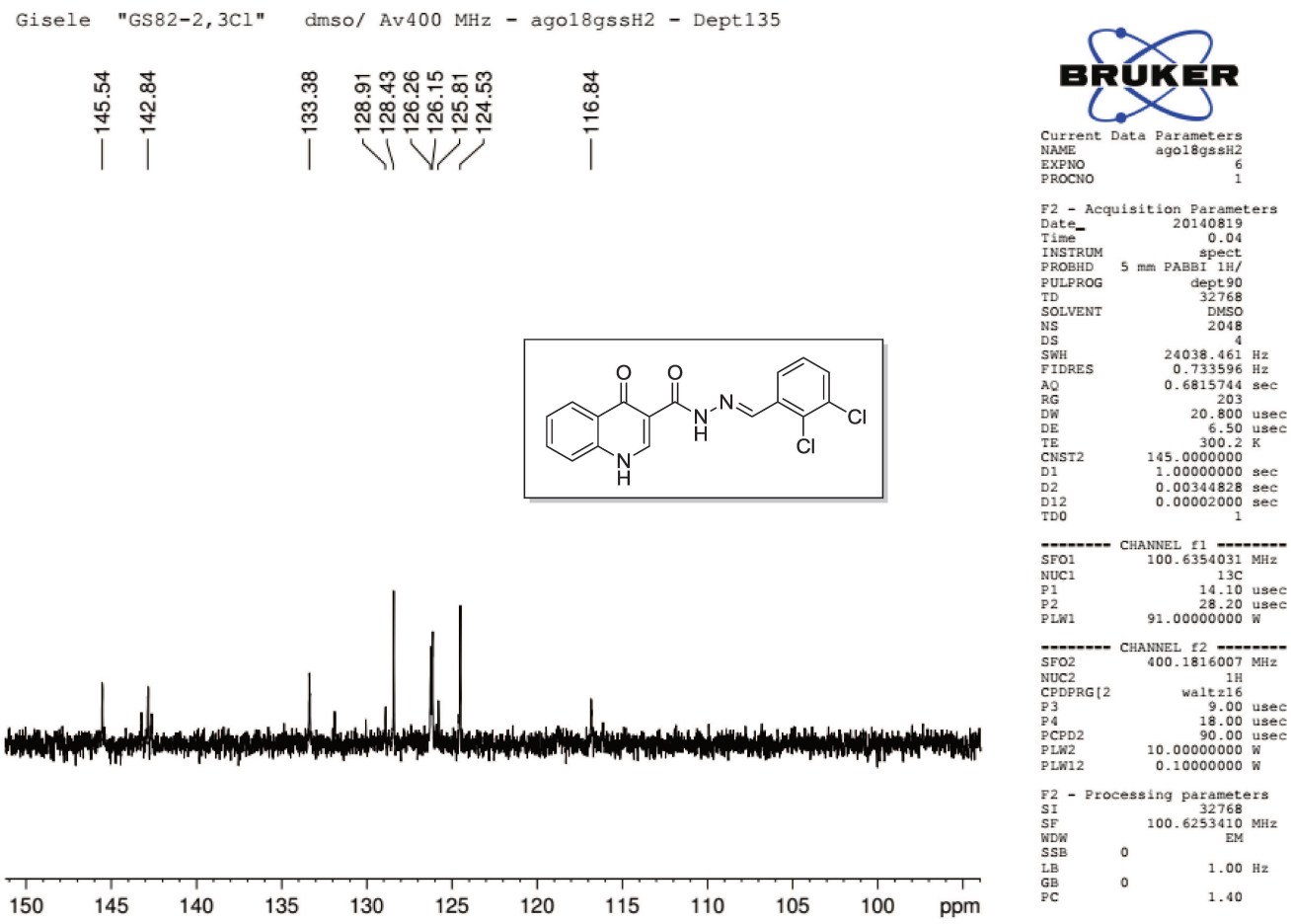


Figura 93. Espectro de RMN ^{13}C DEPT-135 (100 MHz, DMSO-d_6) da acil-hidrazona **12**.

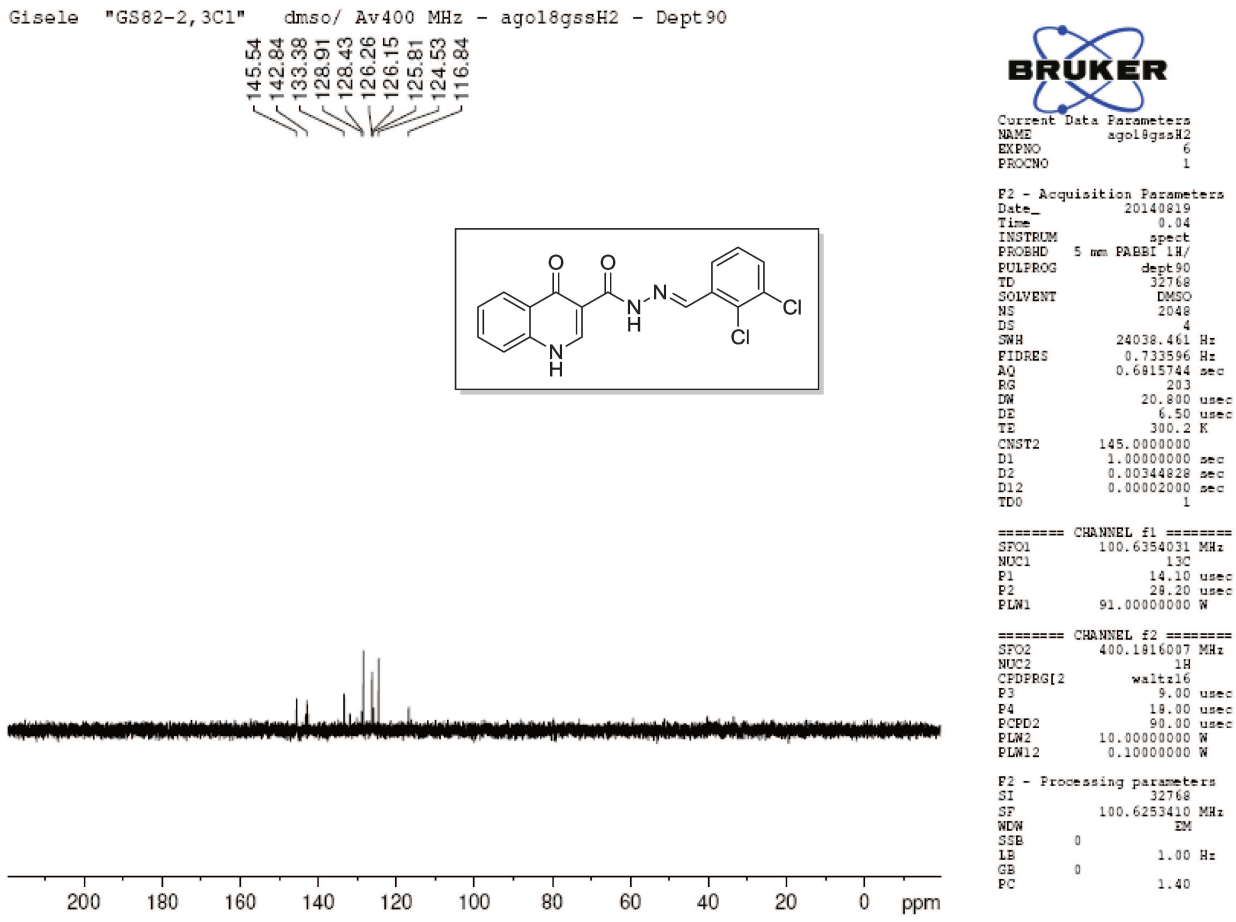


Figura 94. Espectro de RMN ^{13}C DEPT-90 (100 MHz, DMSO-d_6) da acil-hidrazona **12**.

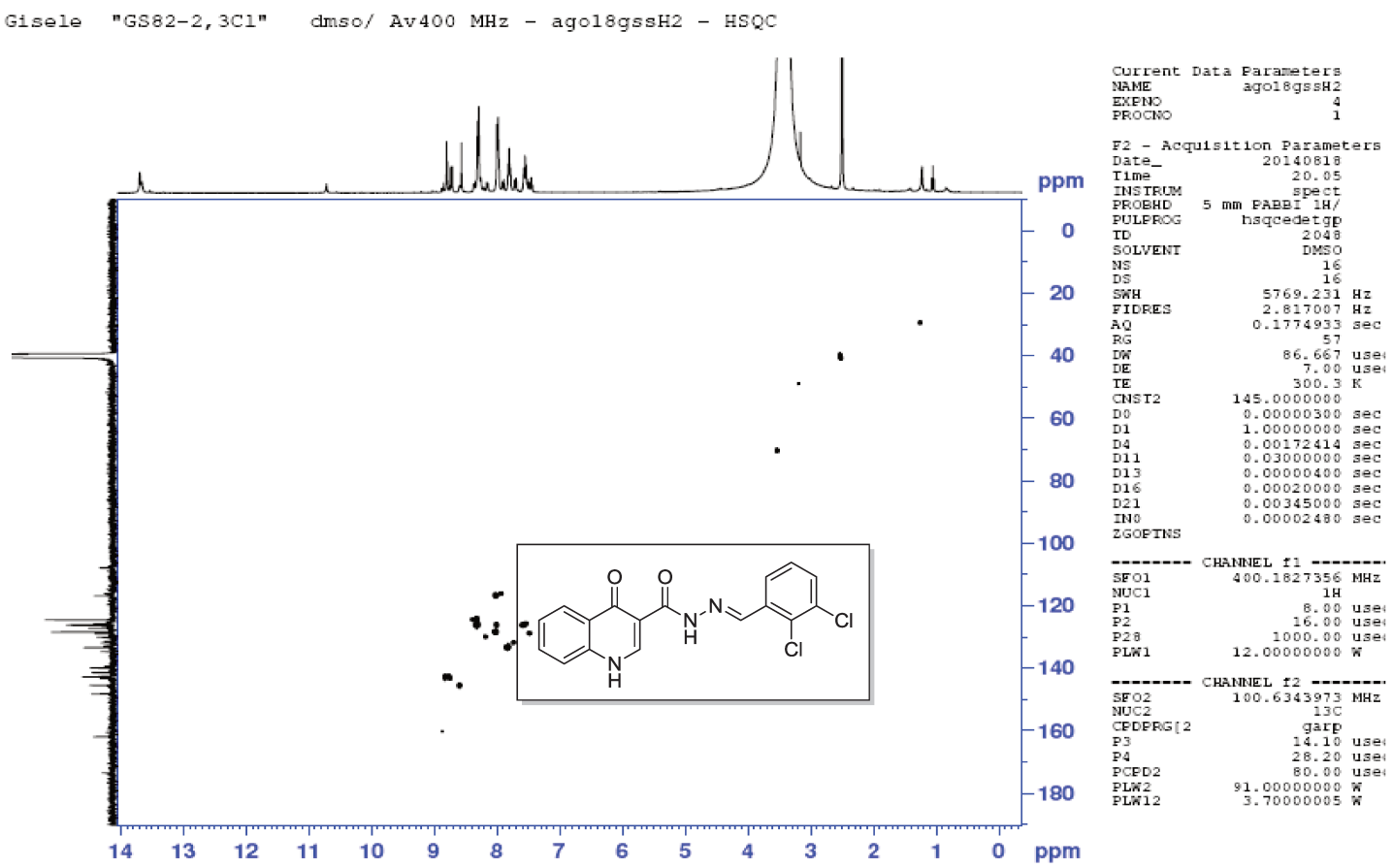


Figura 95. Espectro de HSQC ^{13}C-^{1}H (400/100 MHz, DMSO-d_6) da acil-hidrazona **12**.

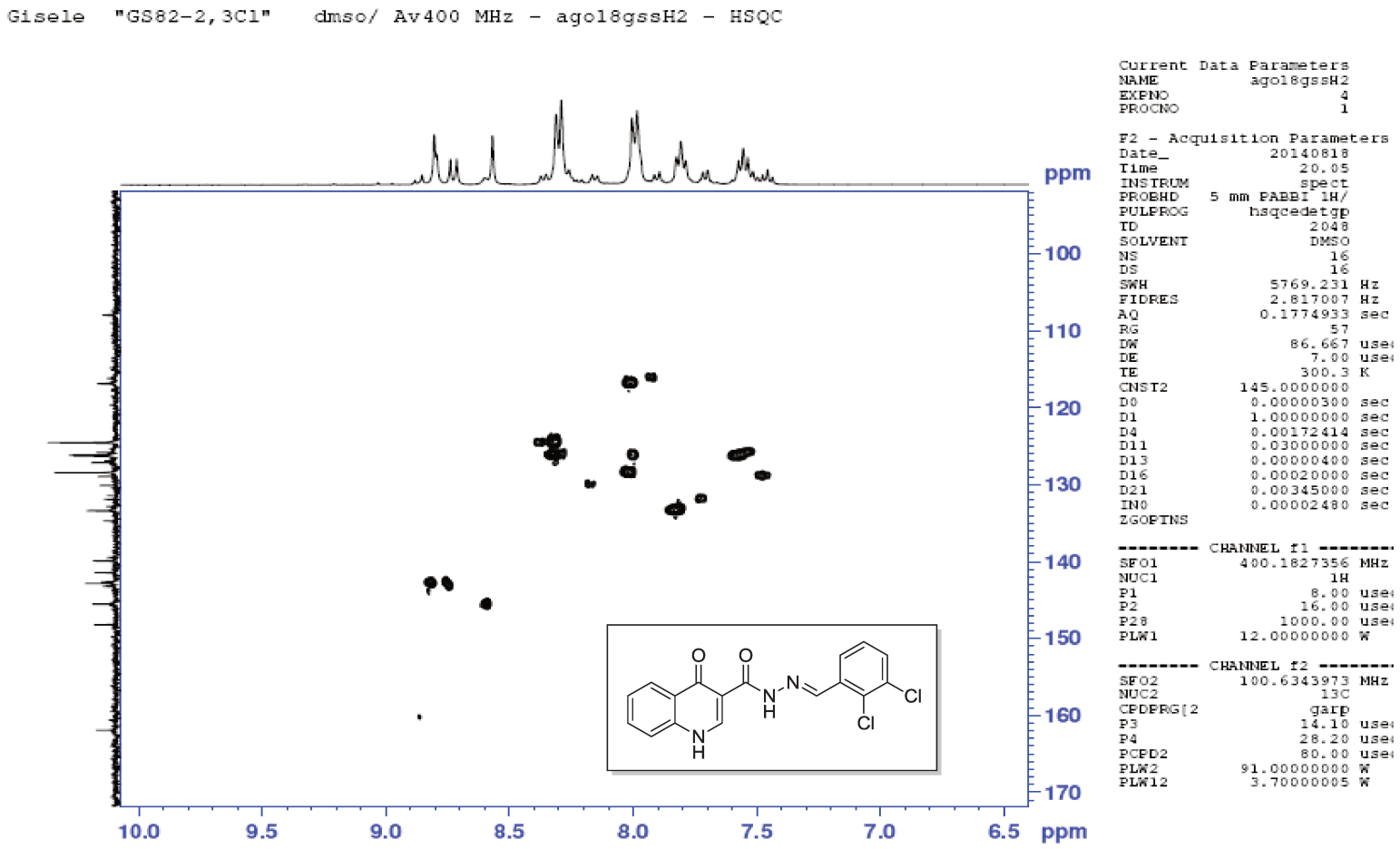


Figura 96. Expansão do espectro de HSQC ^{13}C-^{1}H (400/100 MHz, DMSO-d_6) da acil-hidrazona **12**.

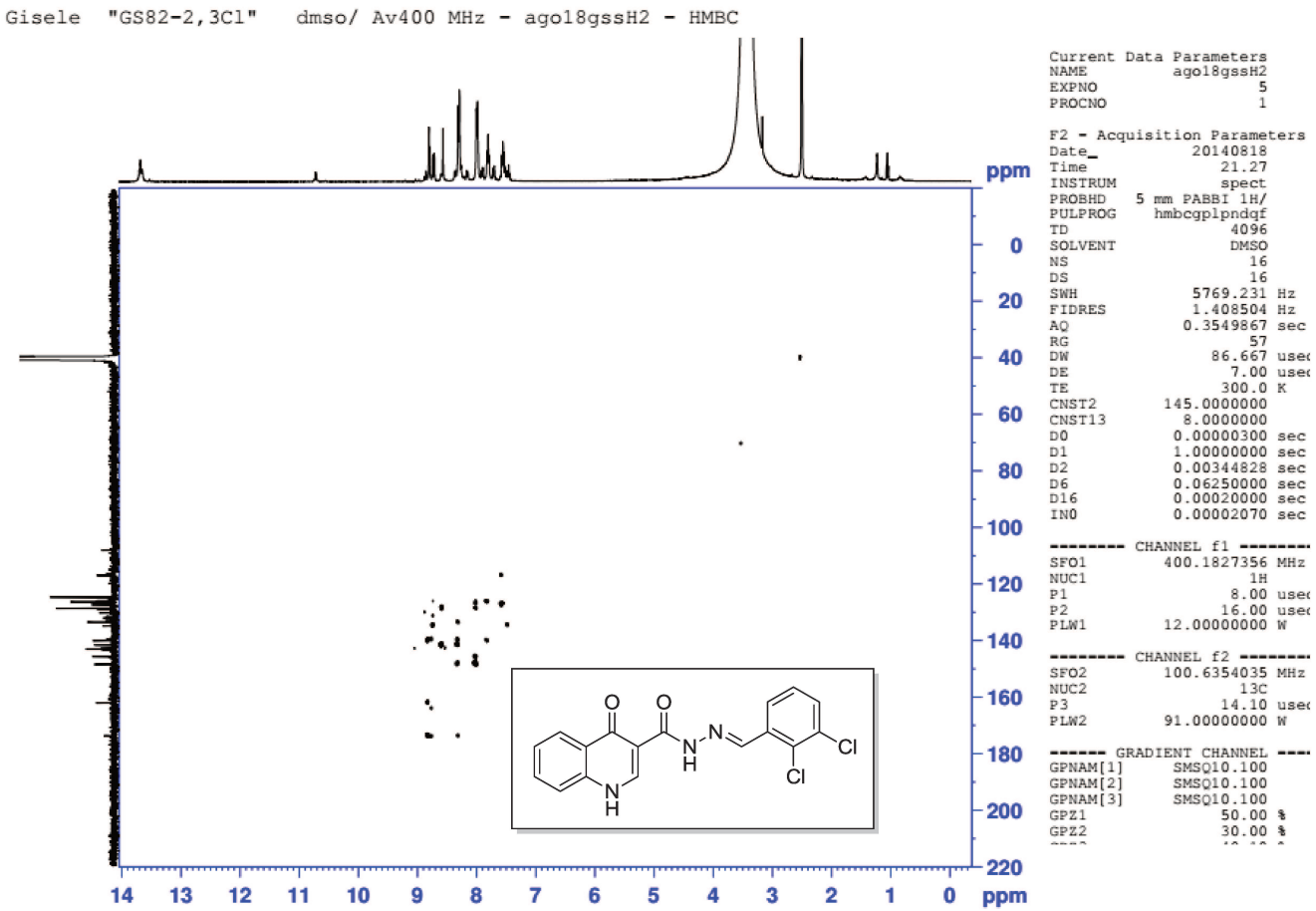


Figura 97. Espectro de HMBC ^{13}C-^{1}H (400/100 MHz, DMSO-d_6) da acil-hidrazona **12**.

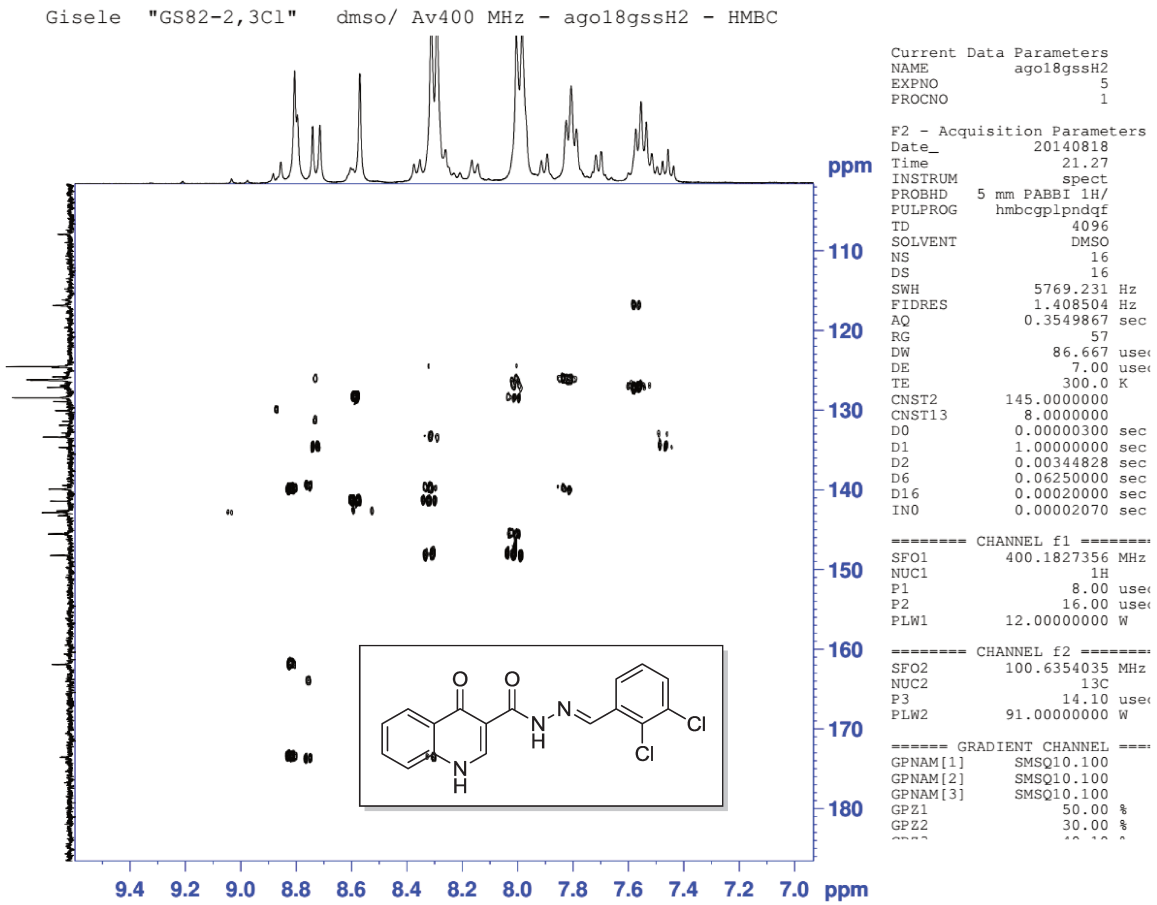


Figura 98. Expansão do espectro de HMBC ^{13}C-^{1}H (400/100 MHz, DMSO-d_6) da acil-hidrazona **12**.

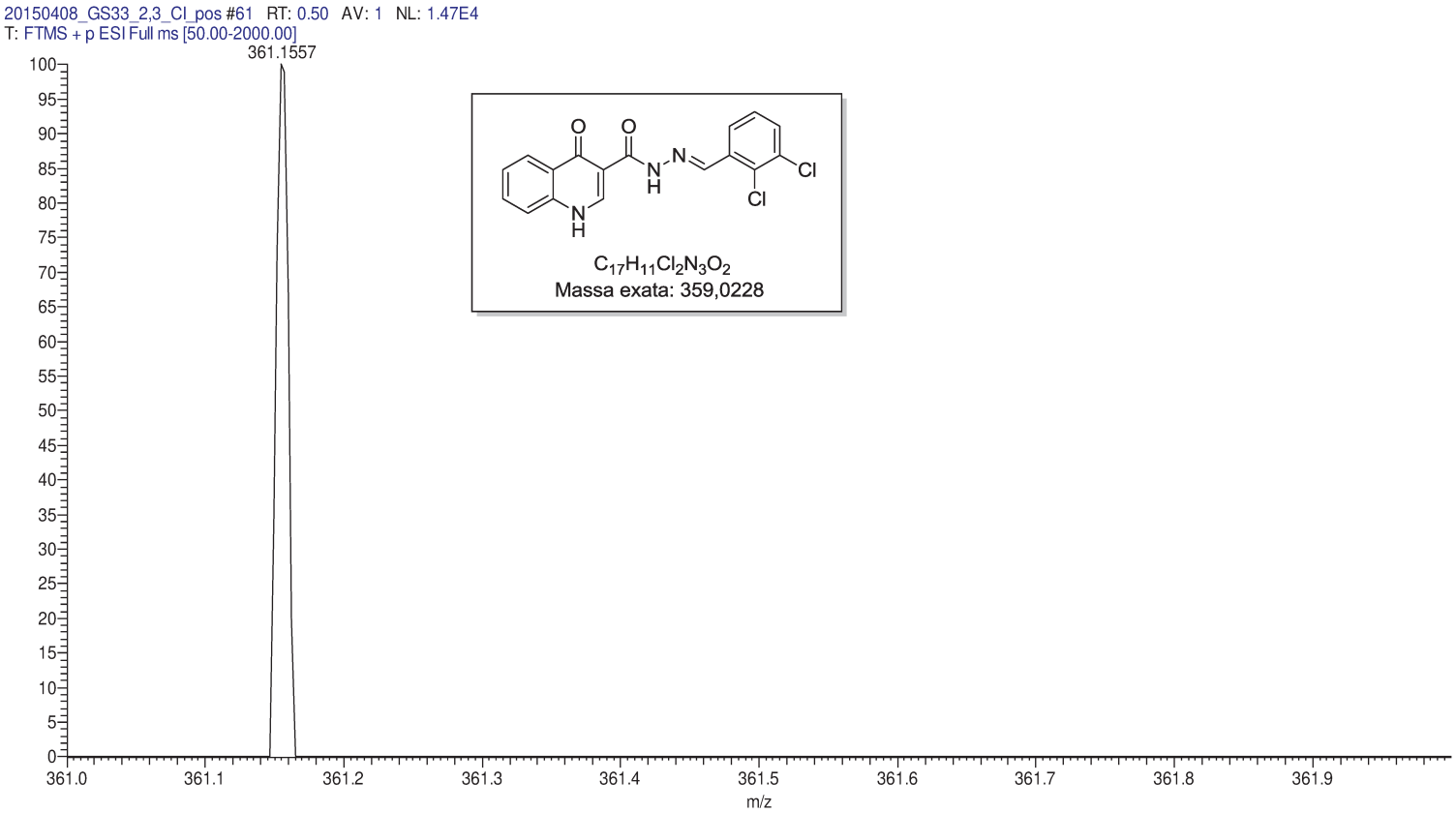


Figura 99. Espectro de massas de alta resolução (TOF-MS-ES+) da acil-hidrazona **12**.

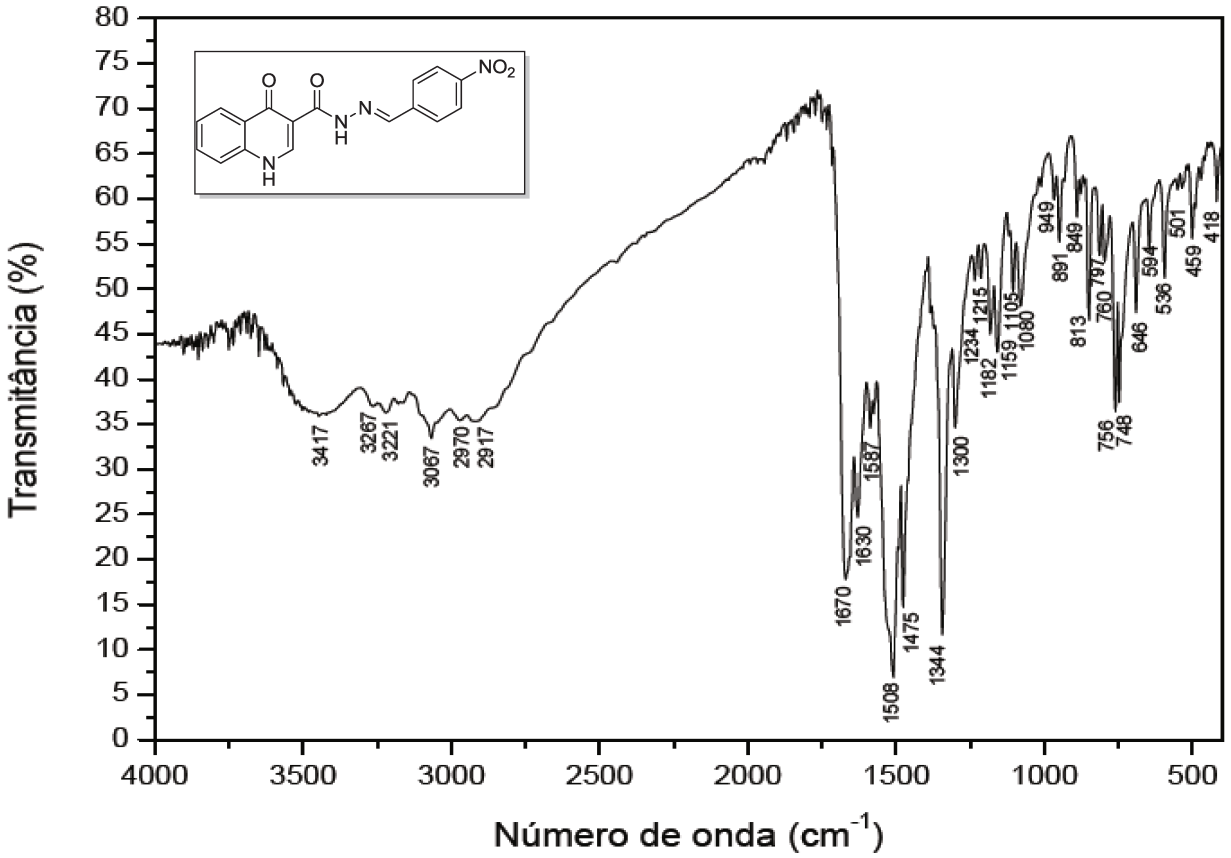


Figura 100. Espectro de IV da acil-hidrazona **13**.

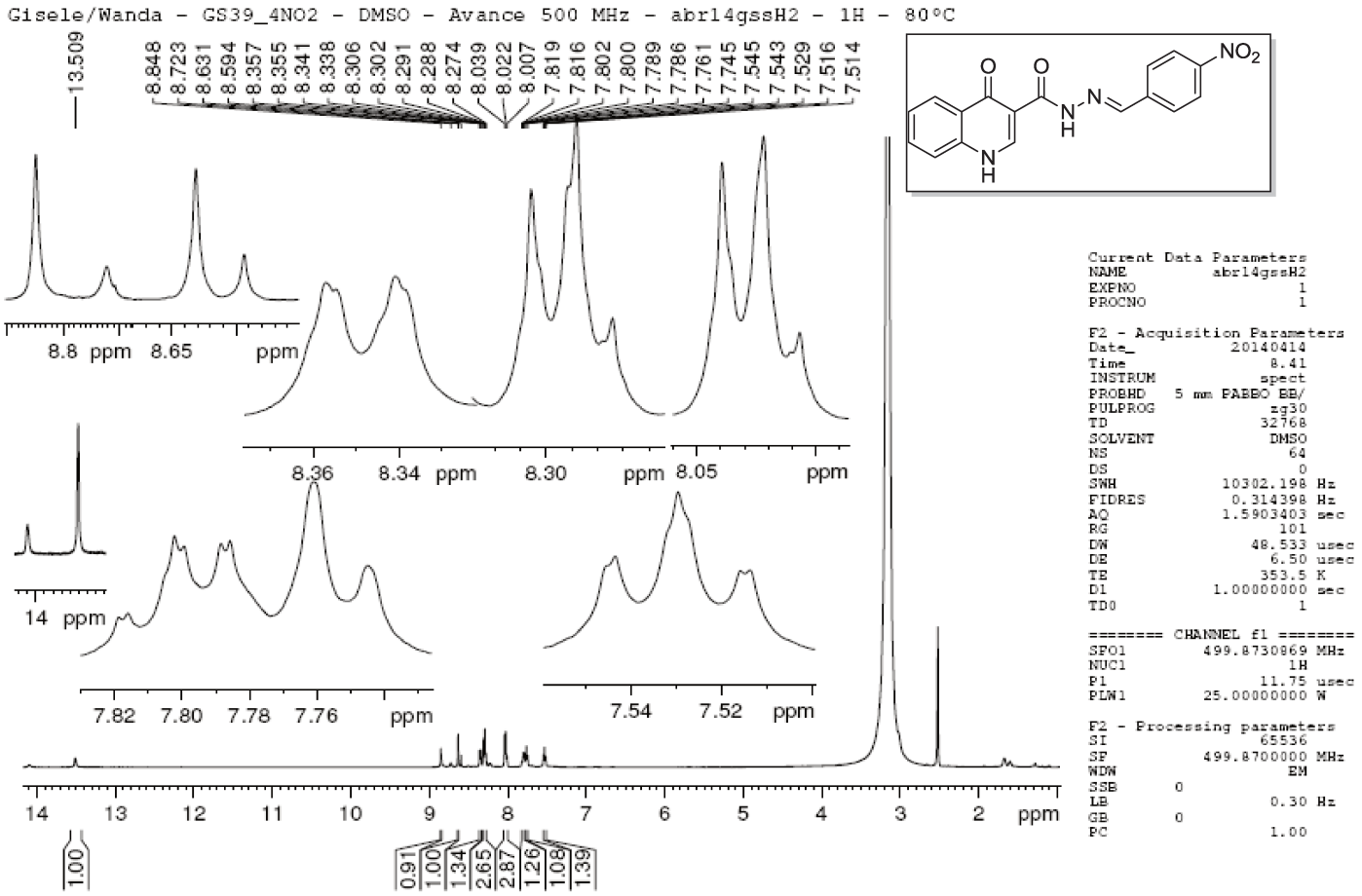


Figura 101. Espectro de RMN ^{1}H (500 MHz, DMSO-d_6) da acil-hidrazona **13**.

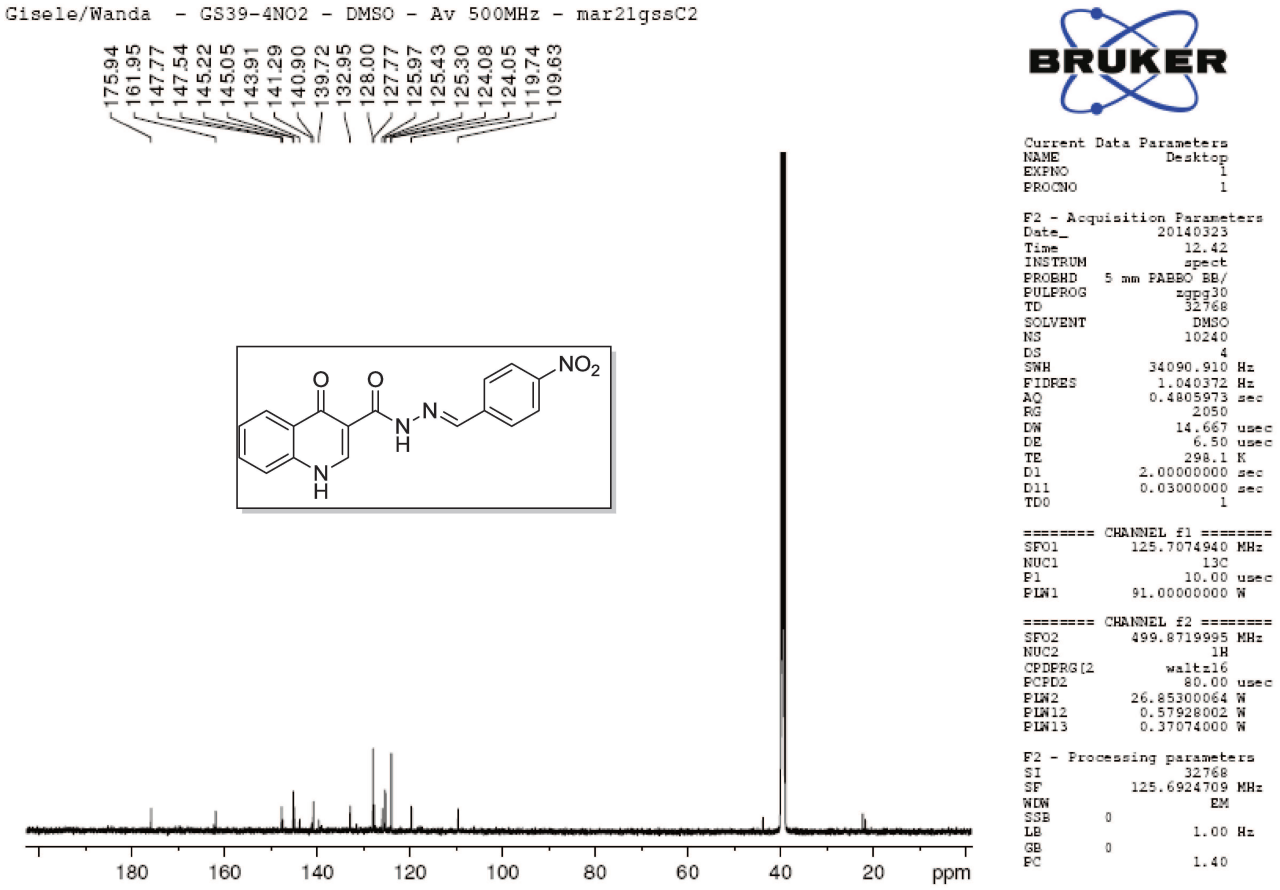


Figura 102. Espectro de RMN ^{13}C (125 MHz, DMSO-d_6) da acil-hidrazona **13**.

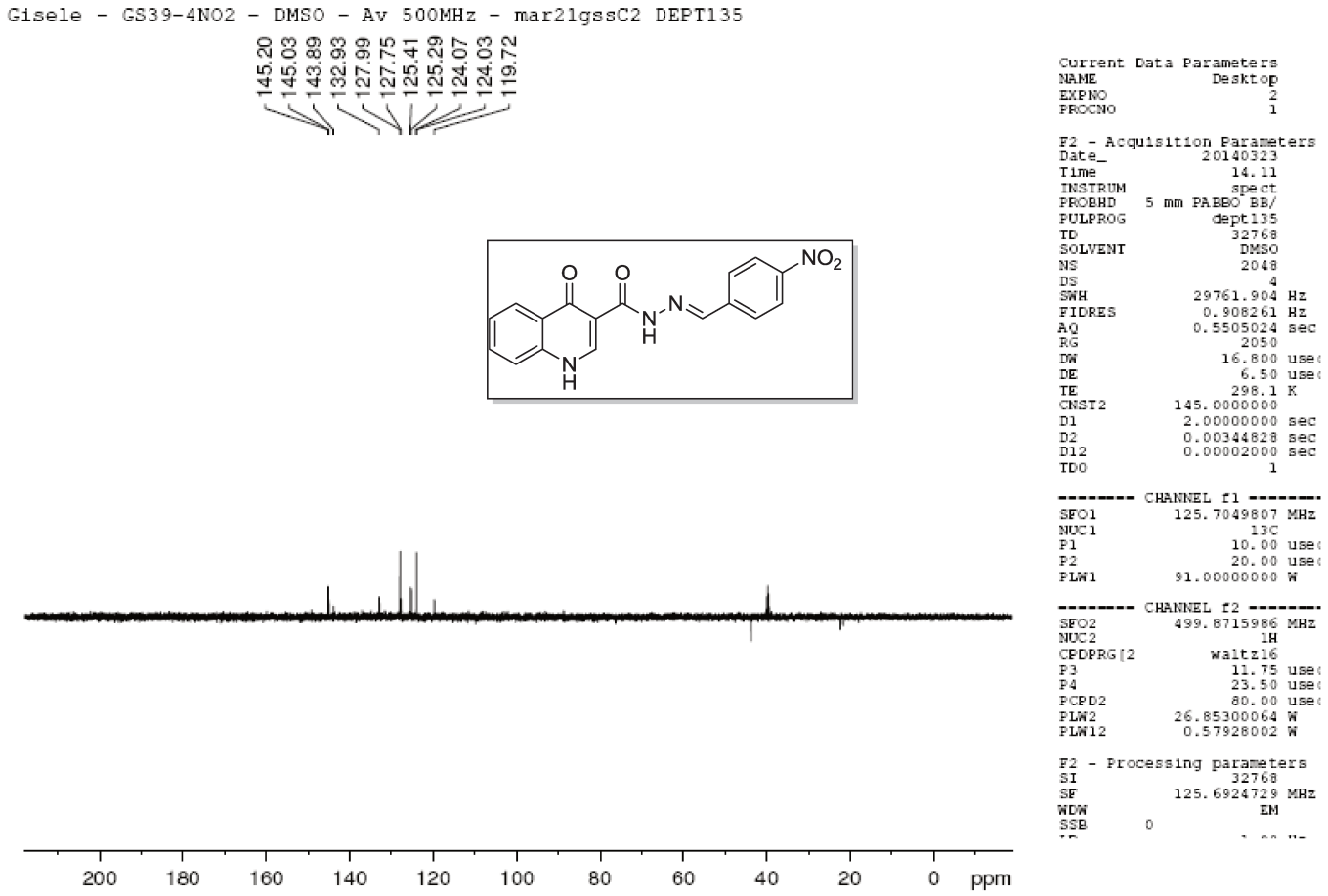


Figura 103. Espectro de RMN ^{13}C DEPT-135 (125 MHz, DMSO-d_6) da acil-hidrazona **13**.

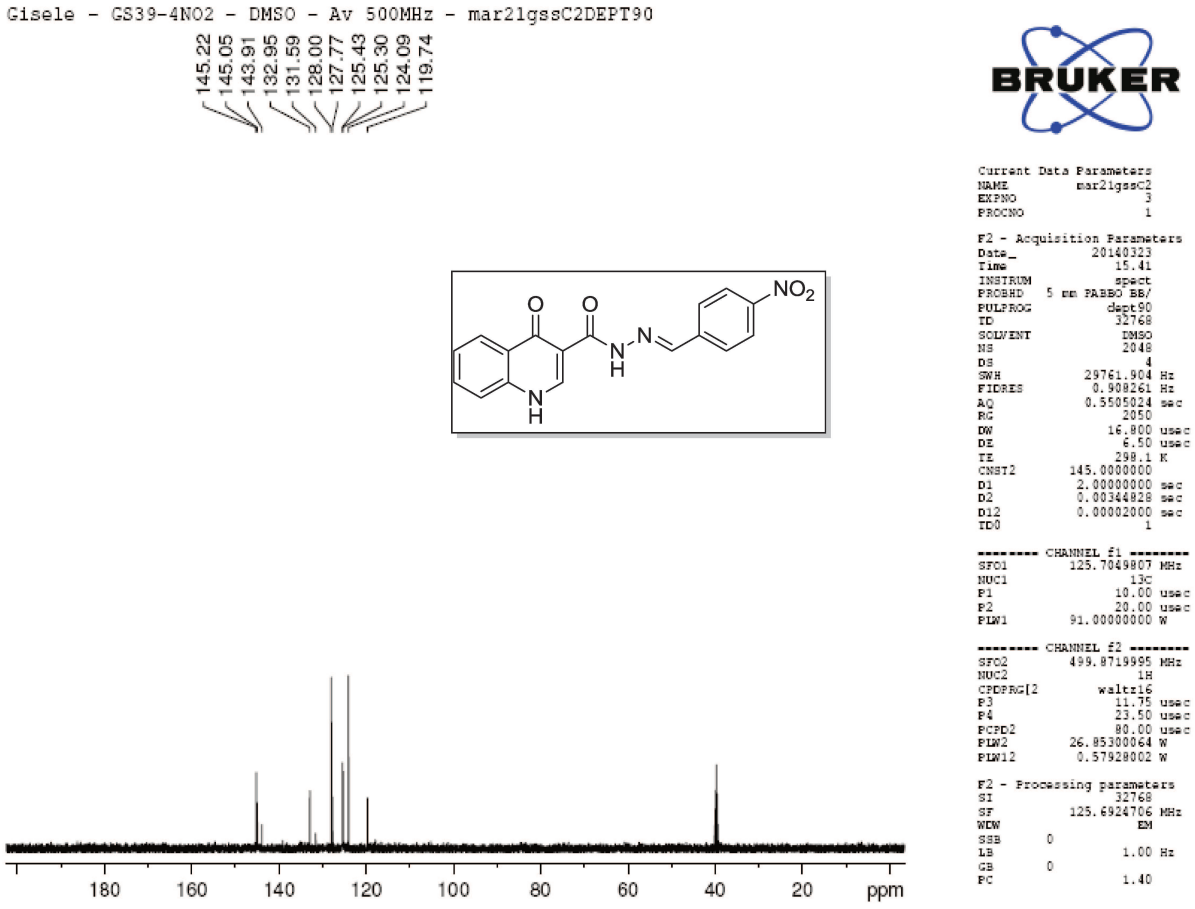


Figura 104. Espectro de RMN ^{13}C DEPT-90 (125 MHz, DMSO-d_6) da acil-hidrazona **13**.

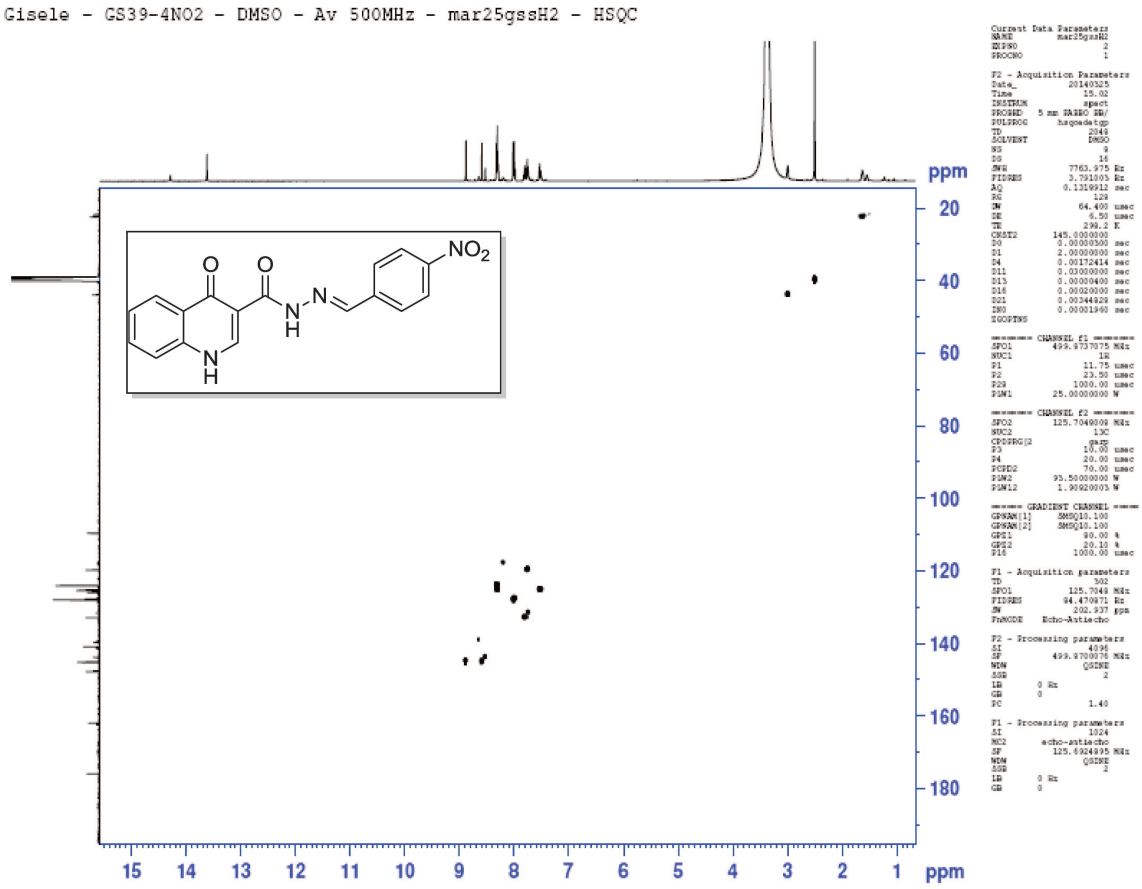


Figura 105. Espectro de HSQC ^{13}C-^{1}H (500/125 MHz, DMSO-d_6) da acil-hidrazona **13**.

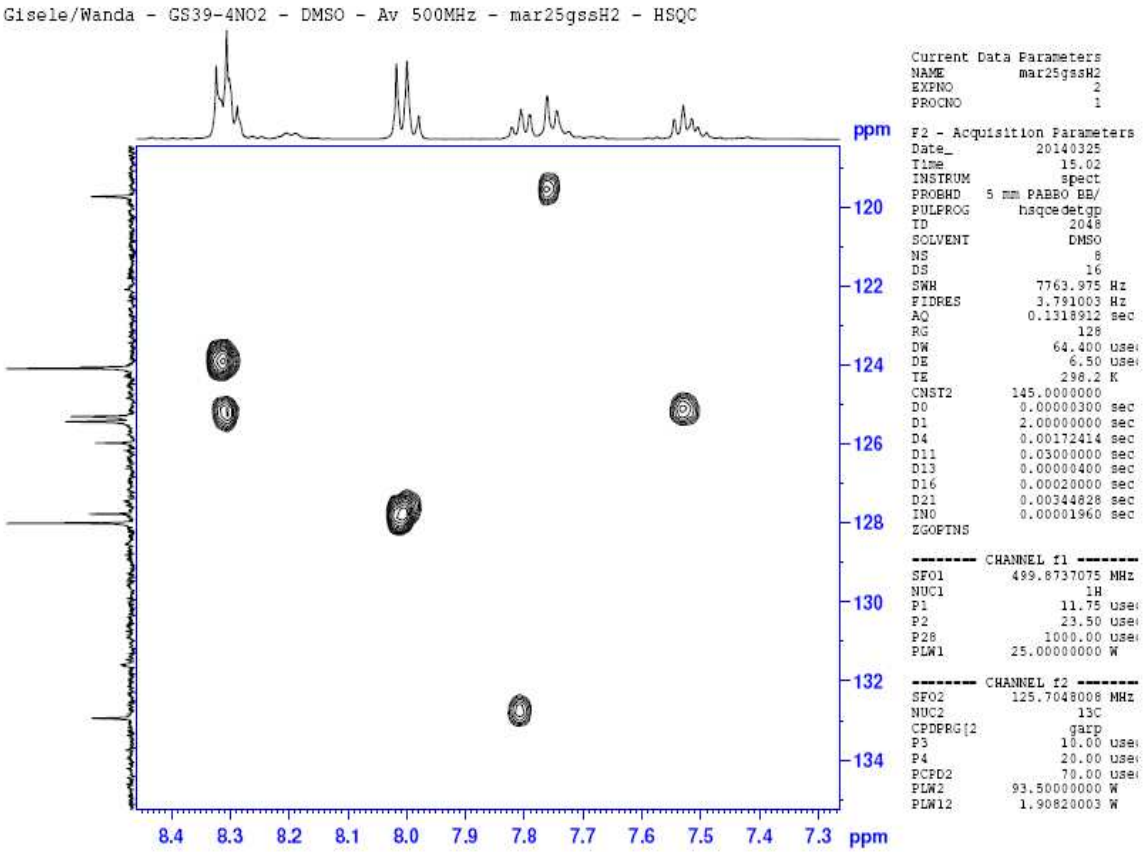


Figura 106. Expansão do espectro de HSQC ^{13}C-^{1}H (500/125 MHz, DMSO-d_6) da acil-hidrazona **13**.

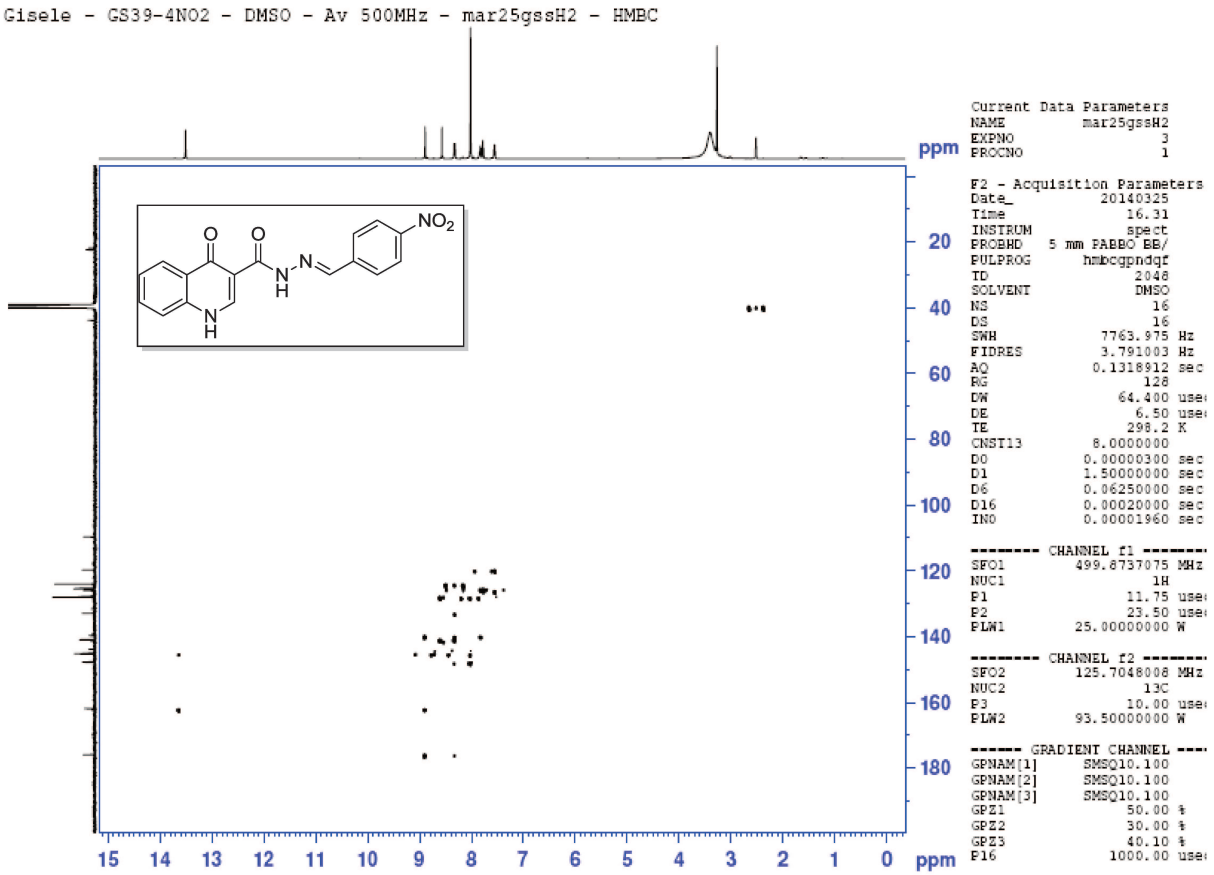


Figura 107. Espectro de HMBC ^{13}C-^{1}H (500/125 MHz, DMSO-d_6) da acil-hidrazona **13**.

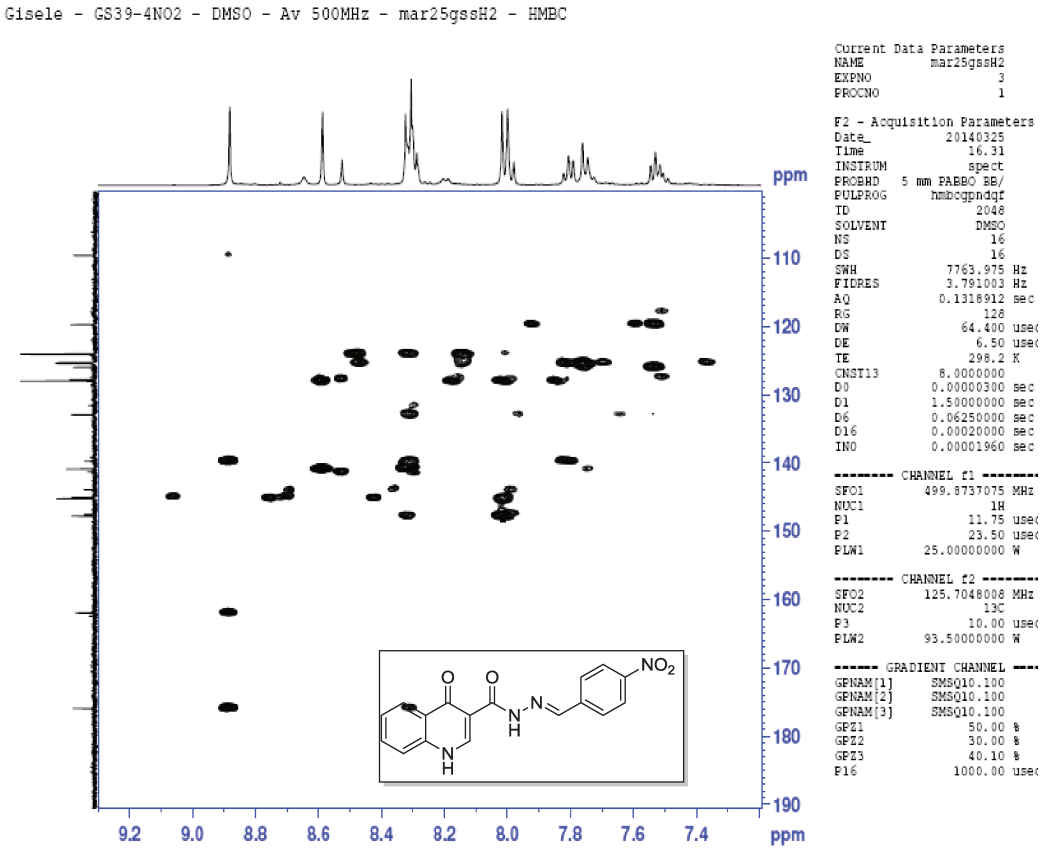


Figura 108. Expansão do espectro de HMBC ^{13}C-^{1}H (500/125 MHz, DMSO-d_6) da acil-hidrazona **13**.

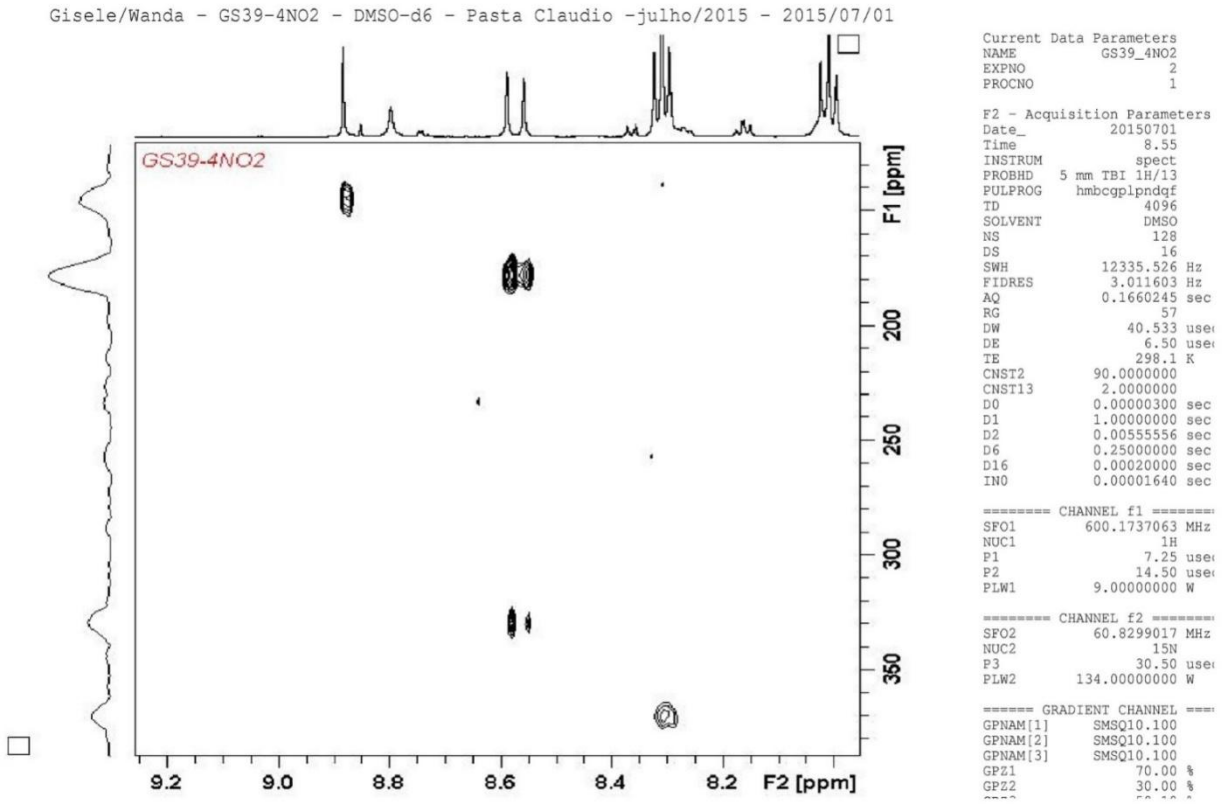


Figura 109. Espectro de HMBC ^{15}N-^{1}H (500/125 MHz, DMSO-d_6) da acil-hidrazona **13**.

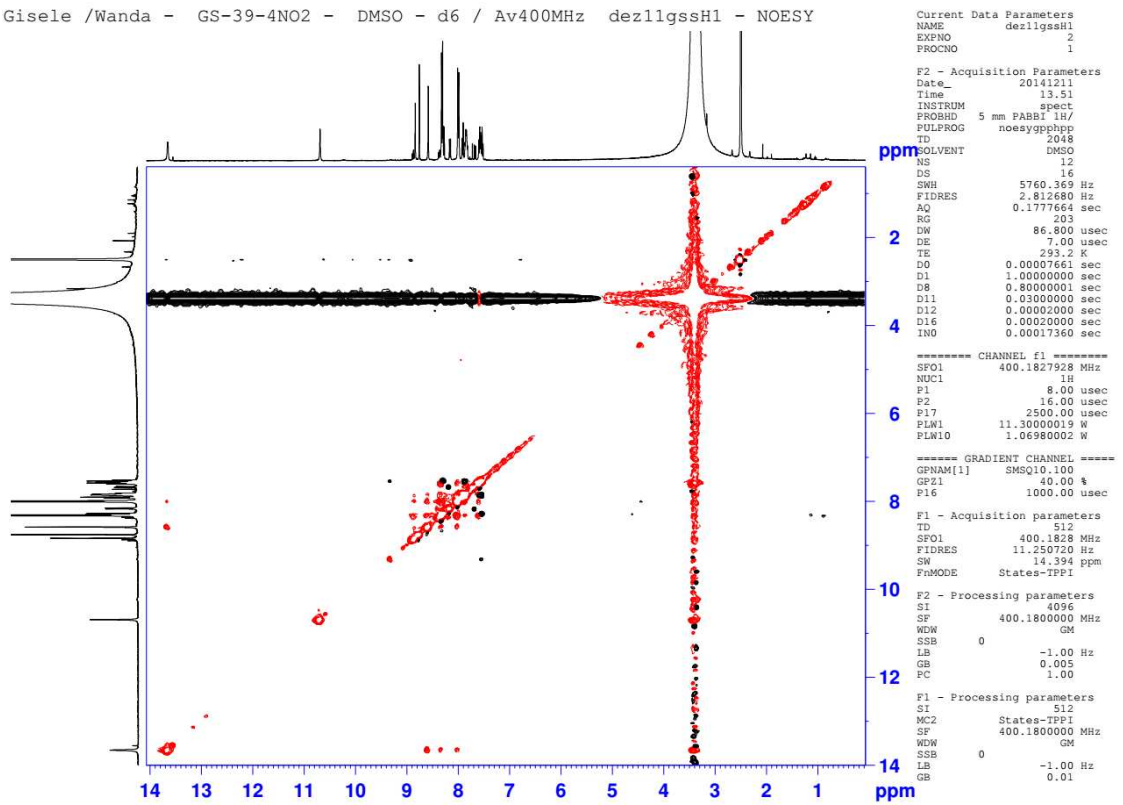


Figura 110. Espectro de NOESY (400 MHz, DMSO-d_6) da acil-hidrazona **14**.

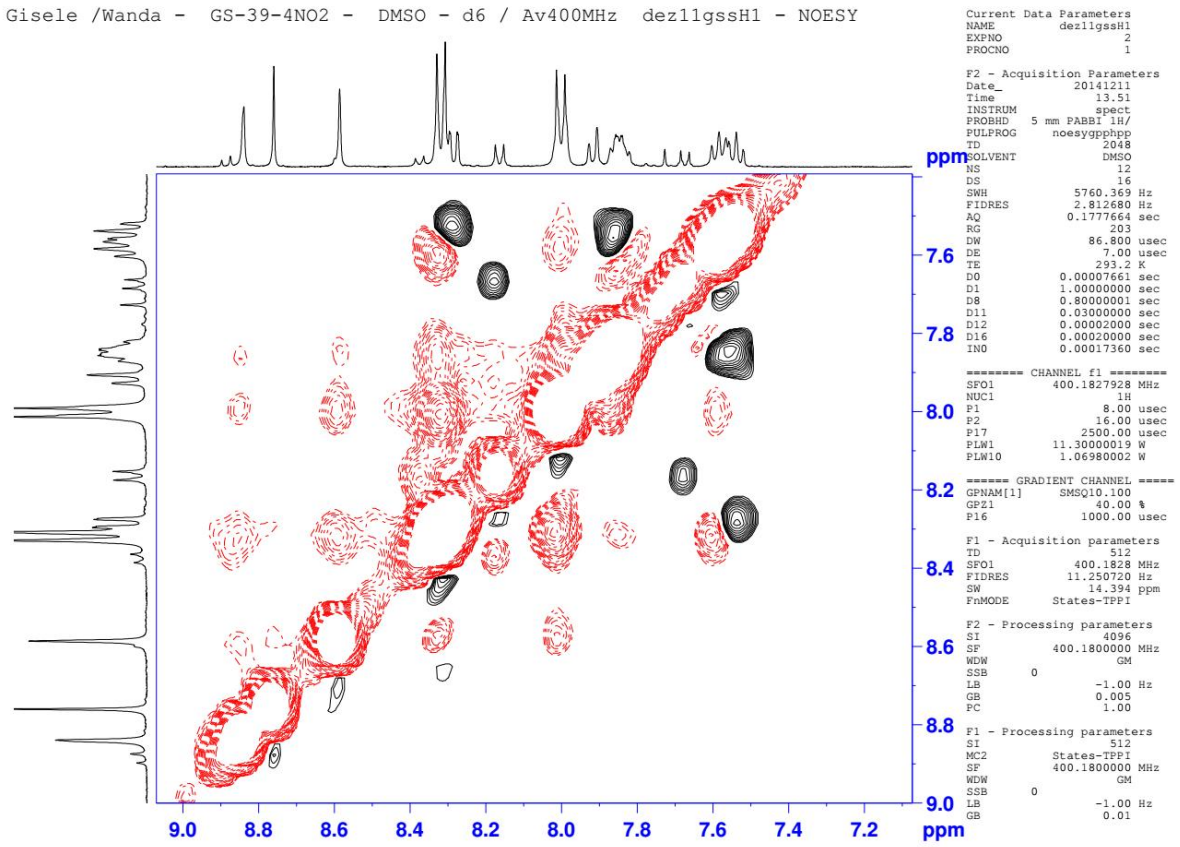


Figura 111. Expansão do espectro de NOESY (400 MHz, DMSO-d_6) da acil-hidrazona **14**.

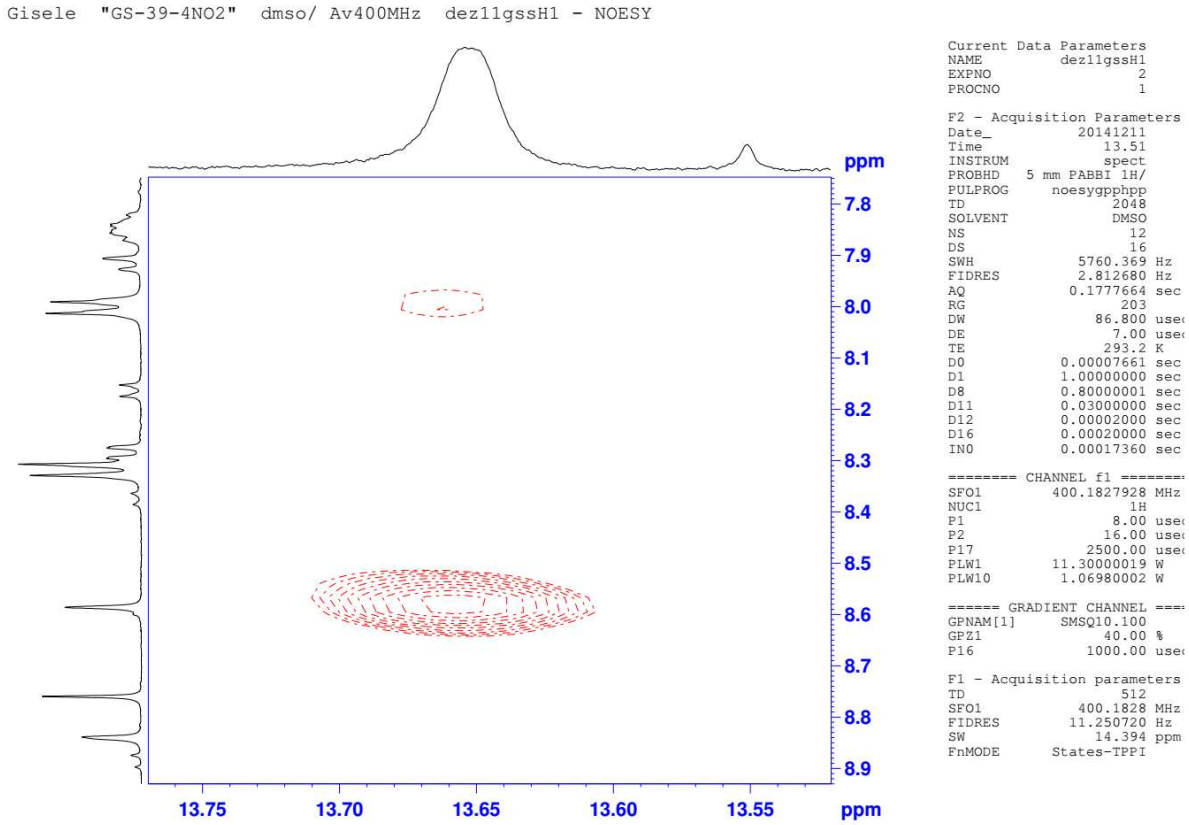


Figura 112. Expansão do espectro de NOESY (400 MHz, DMSO-d_6) da acil-hidrazona 14.

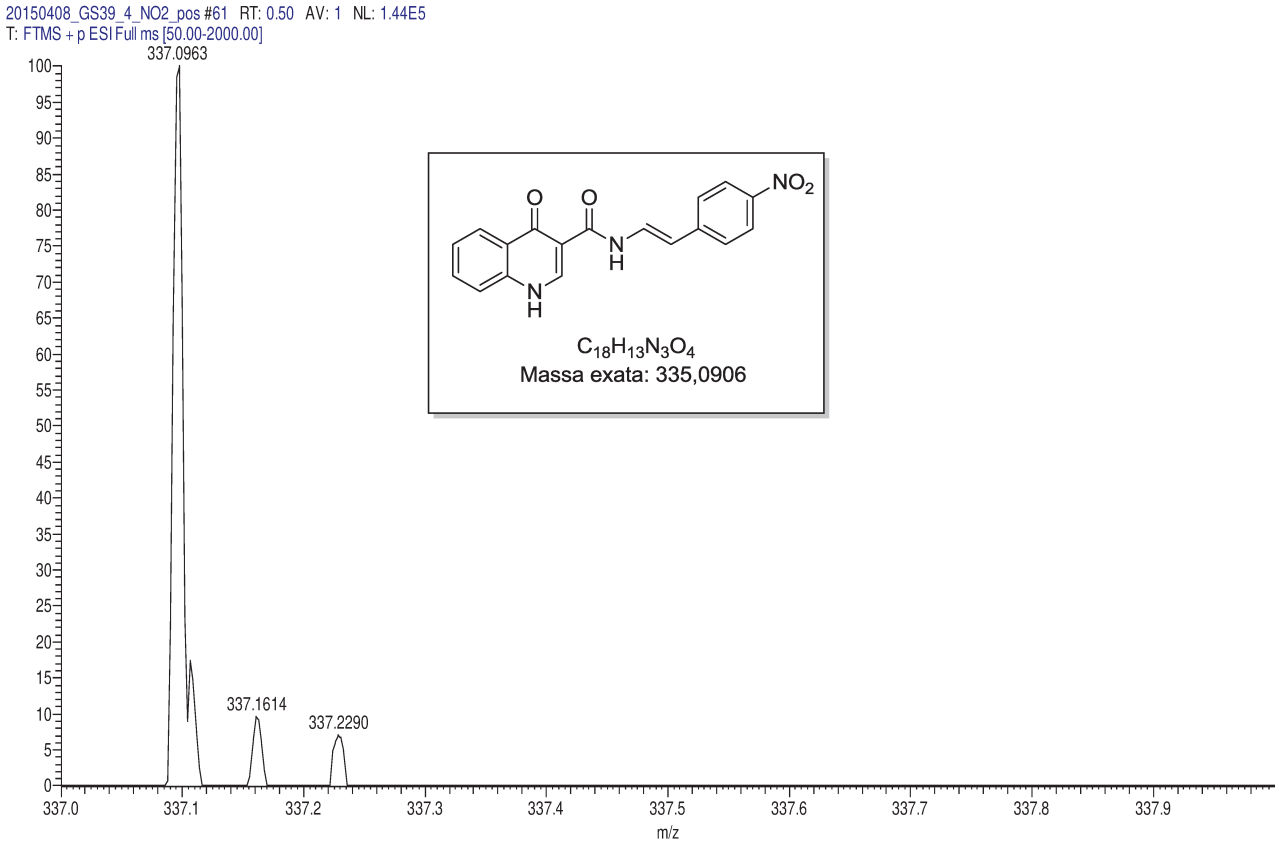


Figura 113. Espectro de massas de alta resolução (TOF-MS-ES+) da acil-hidrazona **13**.

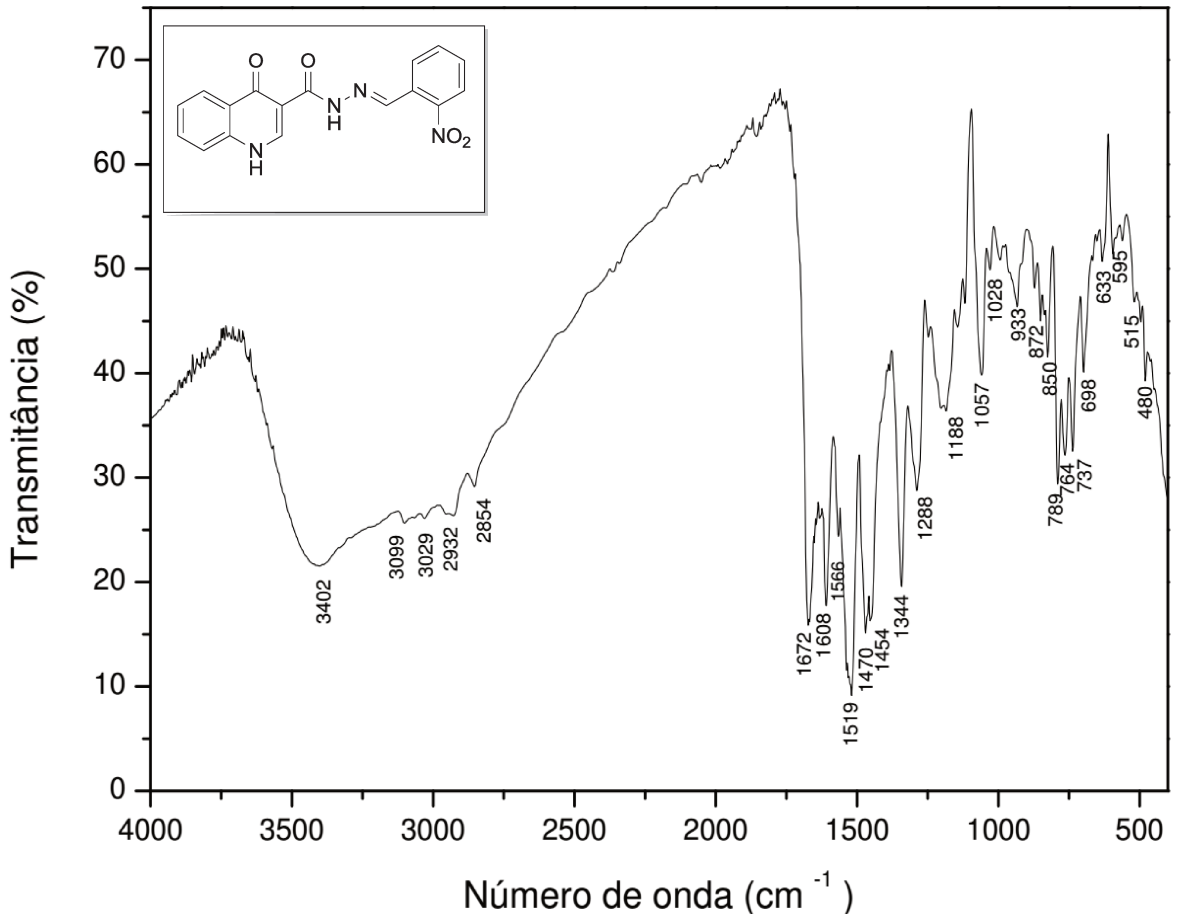


Figura 114. Espectro de IV da acil-hidrazona **14**.

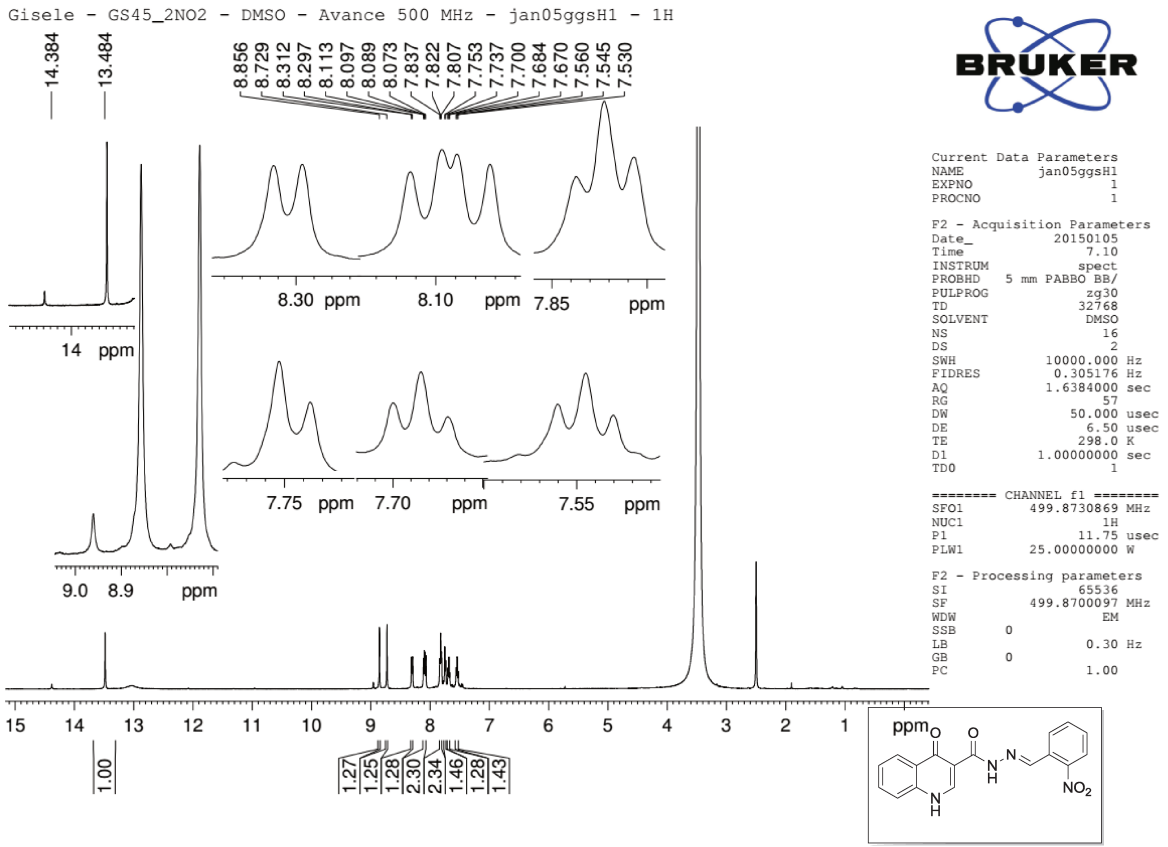


Figura 115. Espectro de RMN ^{1}H (500 MHz, DMSO-d_6) da acil-hidrazona **14**.

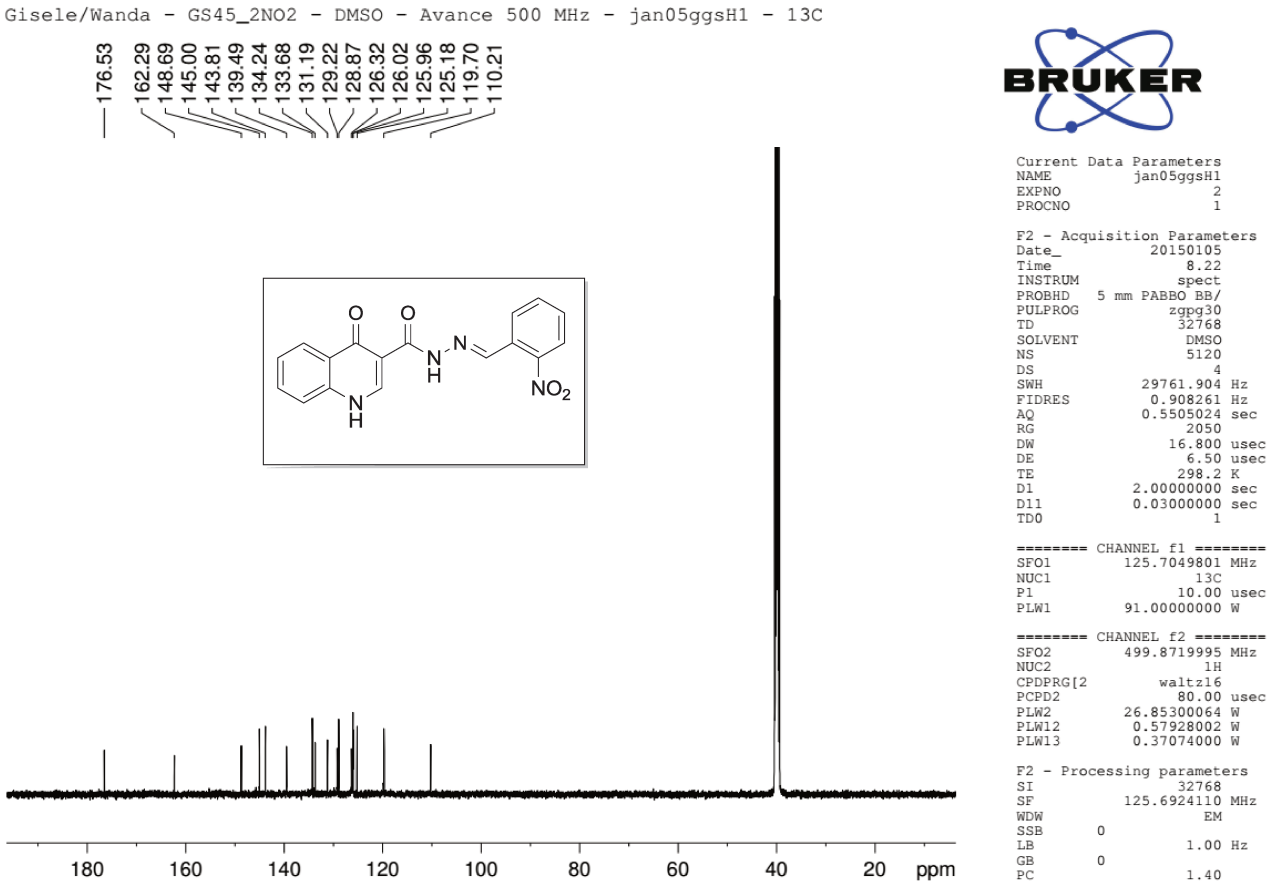


Figura 116. Espectro de RMN ^{13}C (125 MHz, DMSO-d_6) da acil-hidrazona **14**.

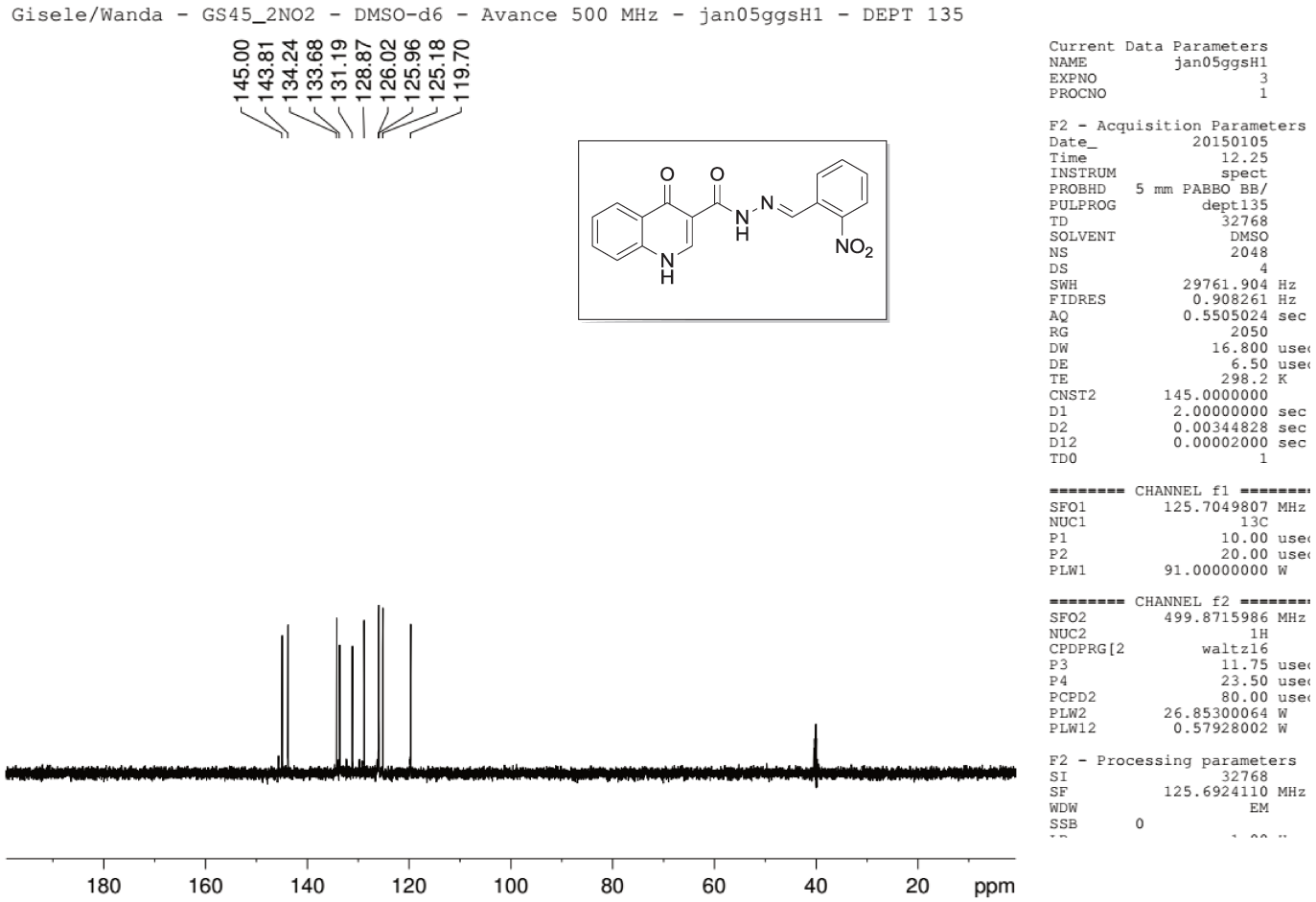


Figura 117. Espectro de RMN ^{13}C DEPT-135 (125 MHz, DMSO-d_6) da acil-hidrazona **14**.

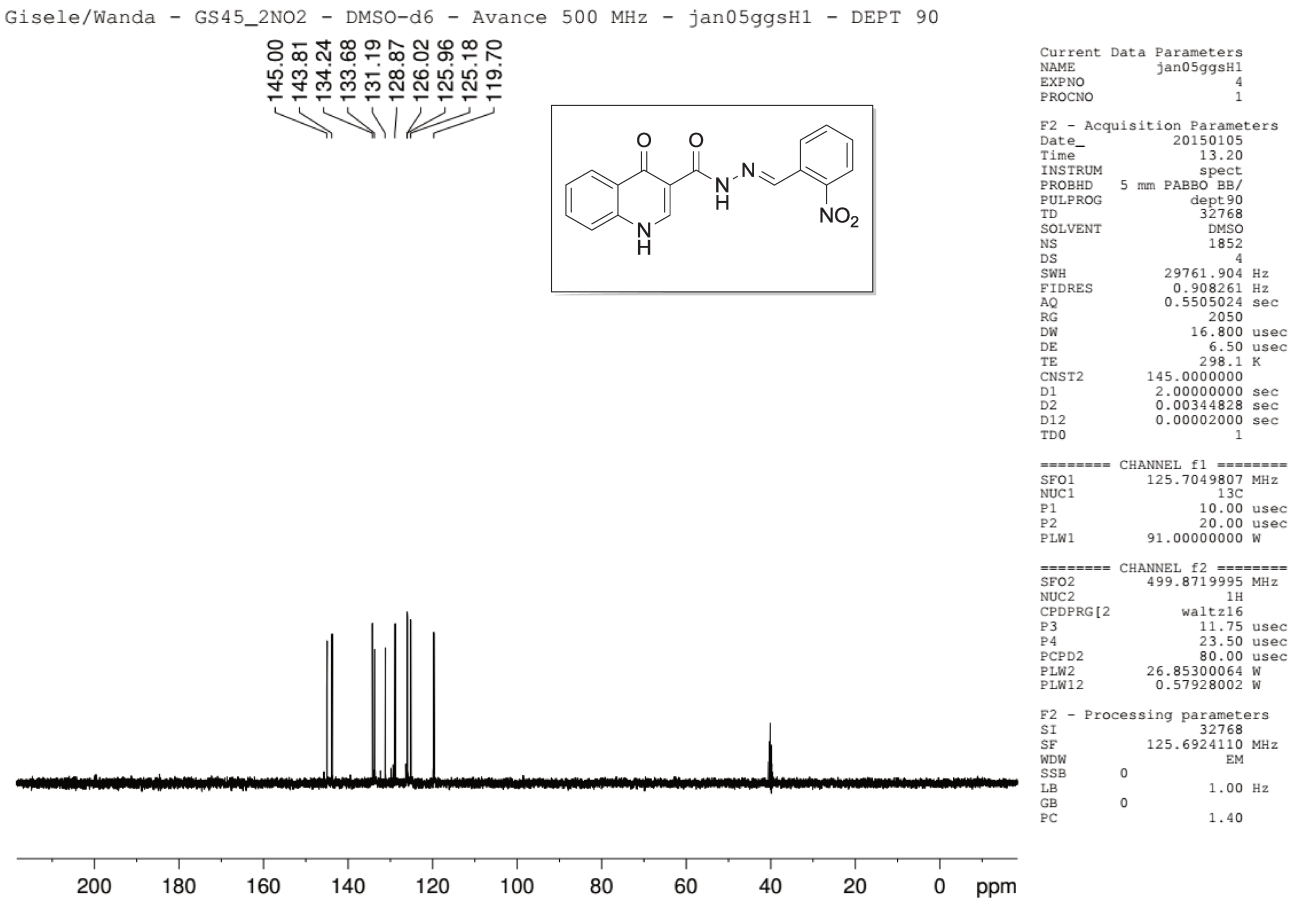


Figura 118. Espectro de RMN ^{13}C DEPT-90 (100 MHz, DMSO-d_6) da acil-hidrazona **14**.

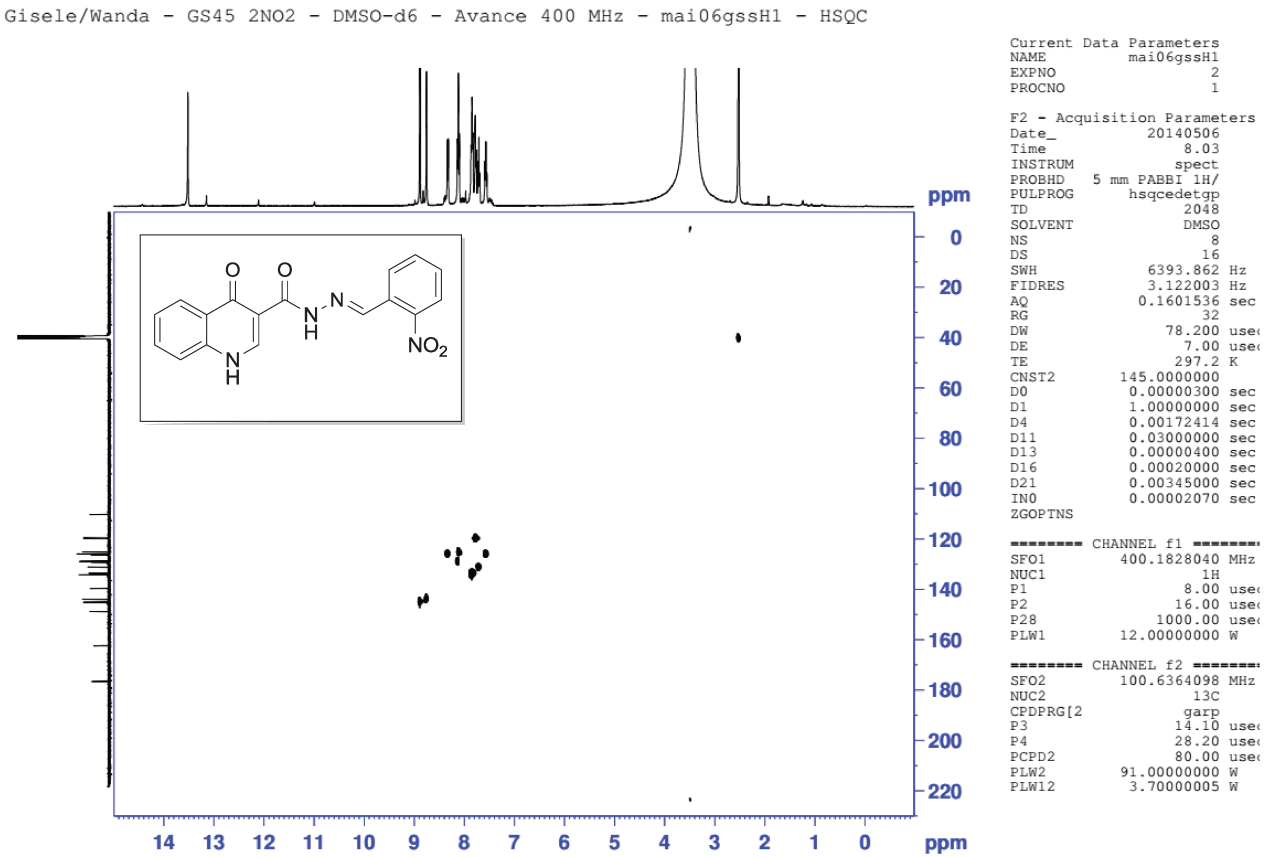


Figura 119. Espectro de HSQC ^{13}C-^{1}H (400/100 MHz, DMSO-d_6) da acil-hidrazona **14**.

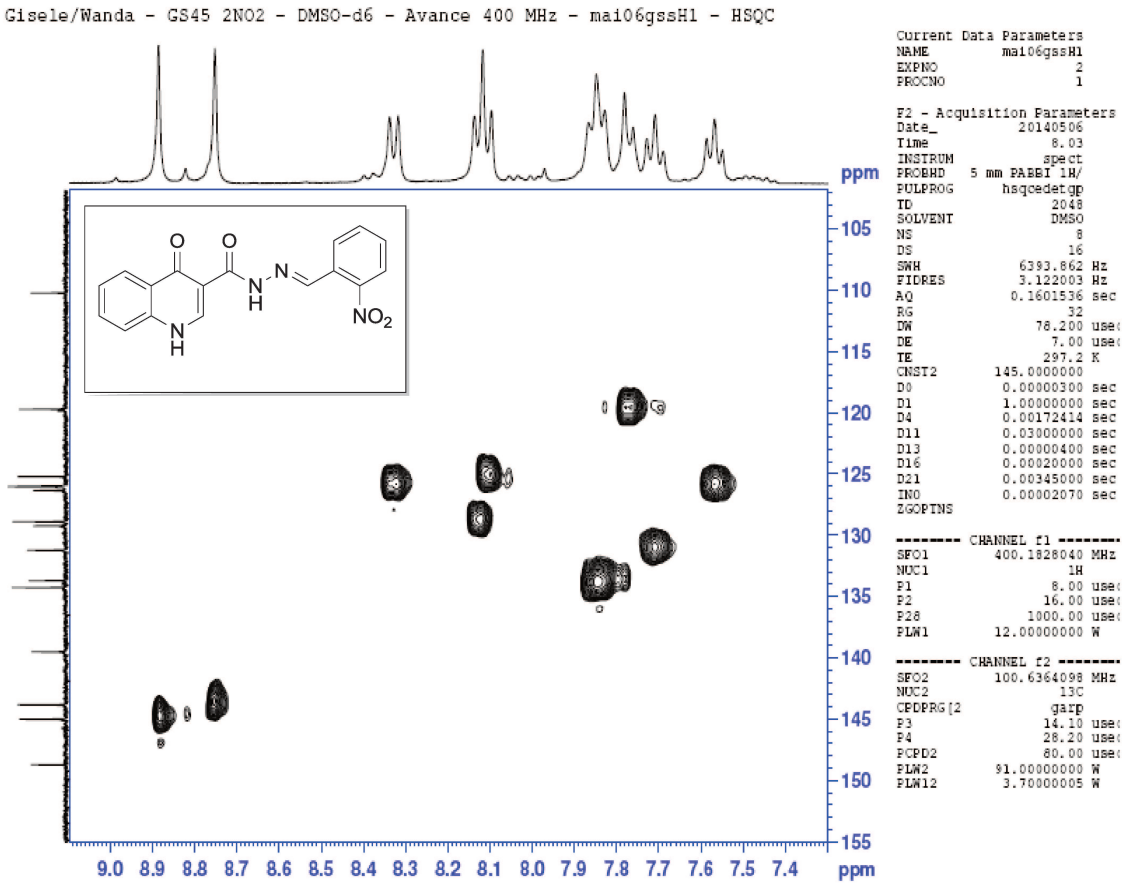


Figura 120. Expansão do espectro de HSQC ^{13}C-^{1}H (400/100 MHz, DMSO-d_6) da acil-hidrazona **14**.

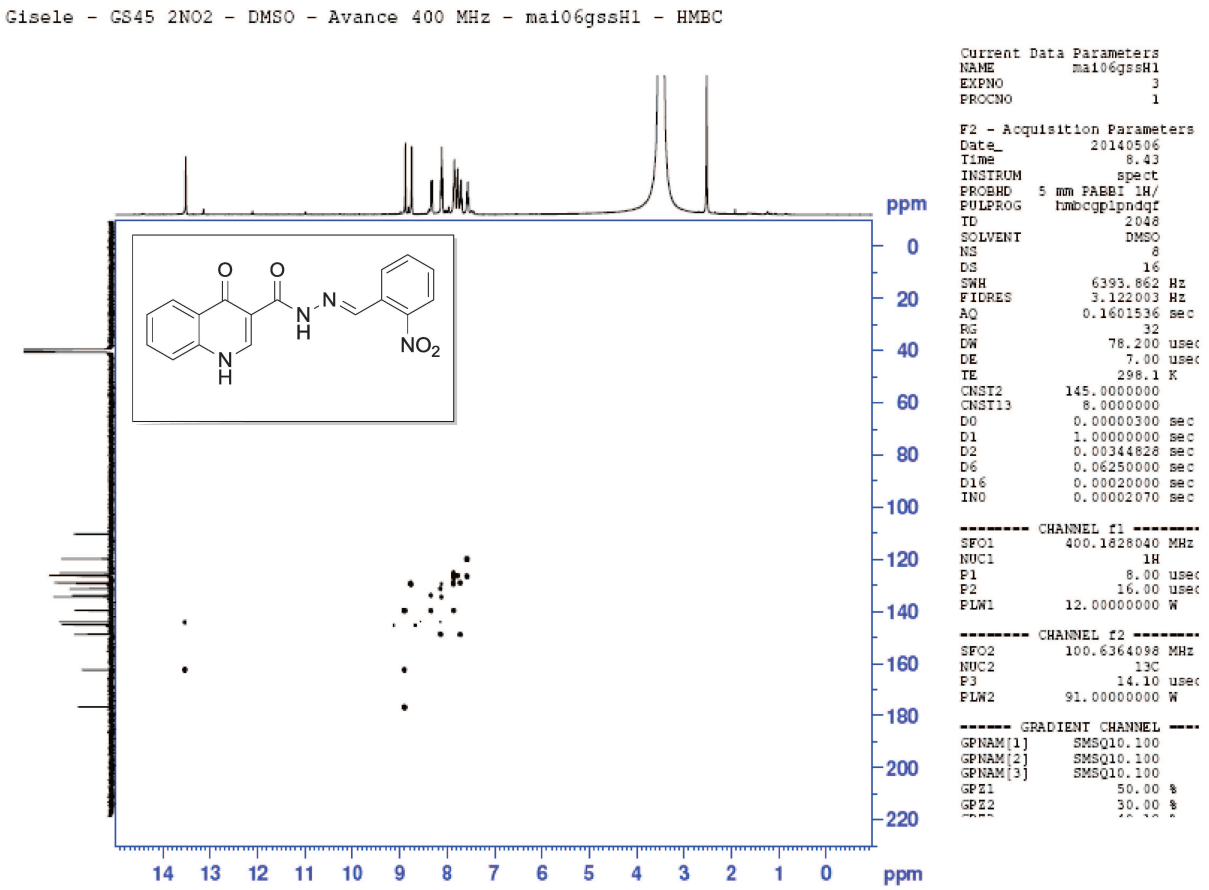


Figura 121. Espectro de HMBC ^{13}C-^{1}H (500/125 MHz, DMSO-d_6) da acil-hidrazona **14**.

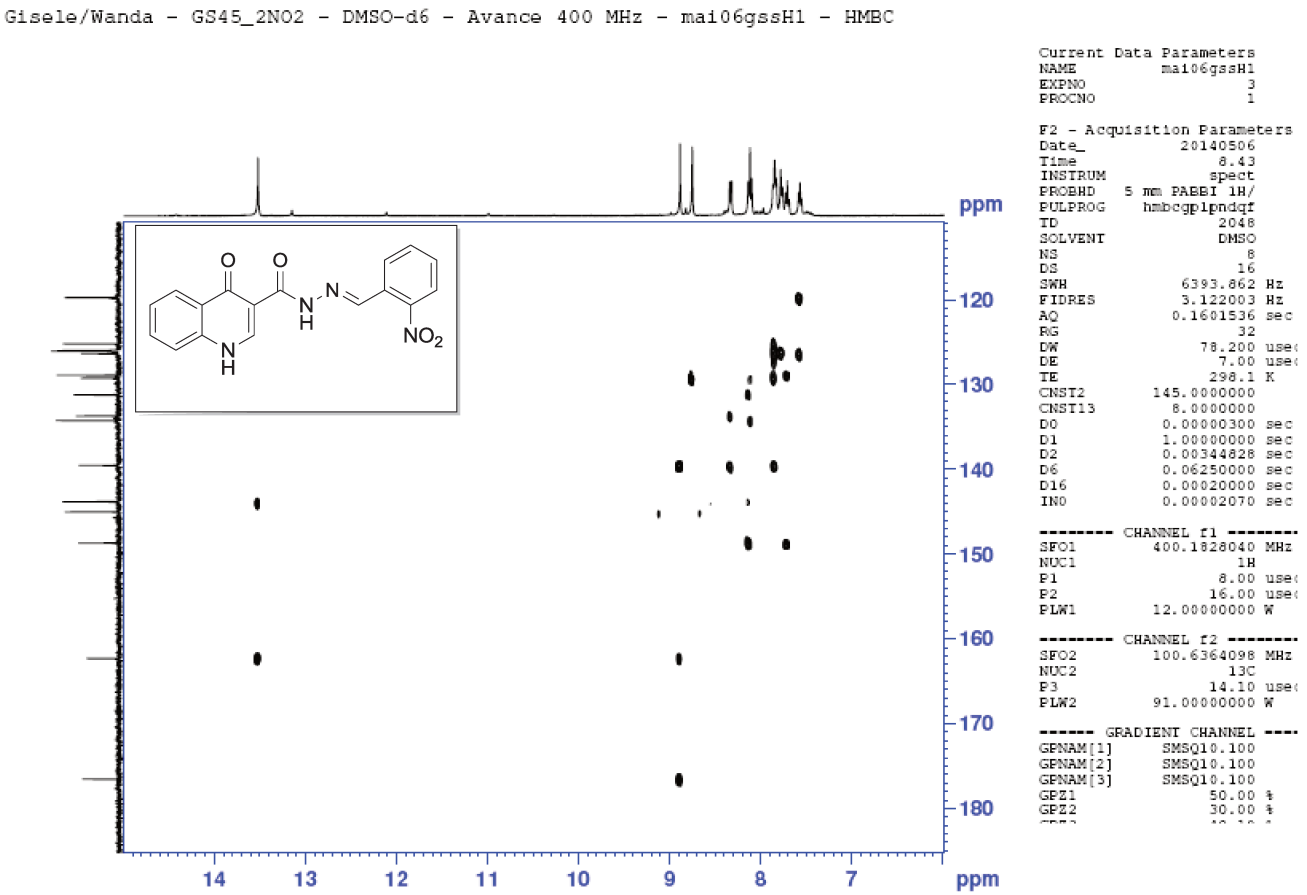


Figura 122. Expansão do espectro de HMBC ^{13}C-^{1}H (500/125 MHz, DMSO-d_6) da acil-hidrazona **14**.

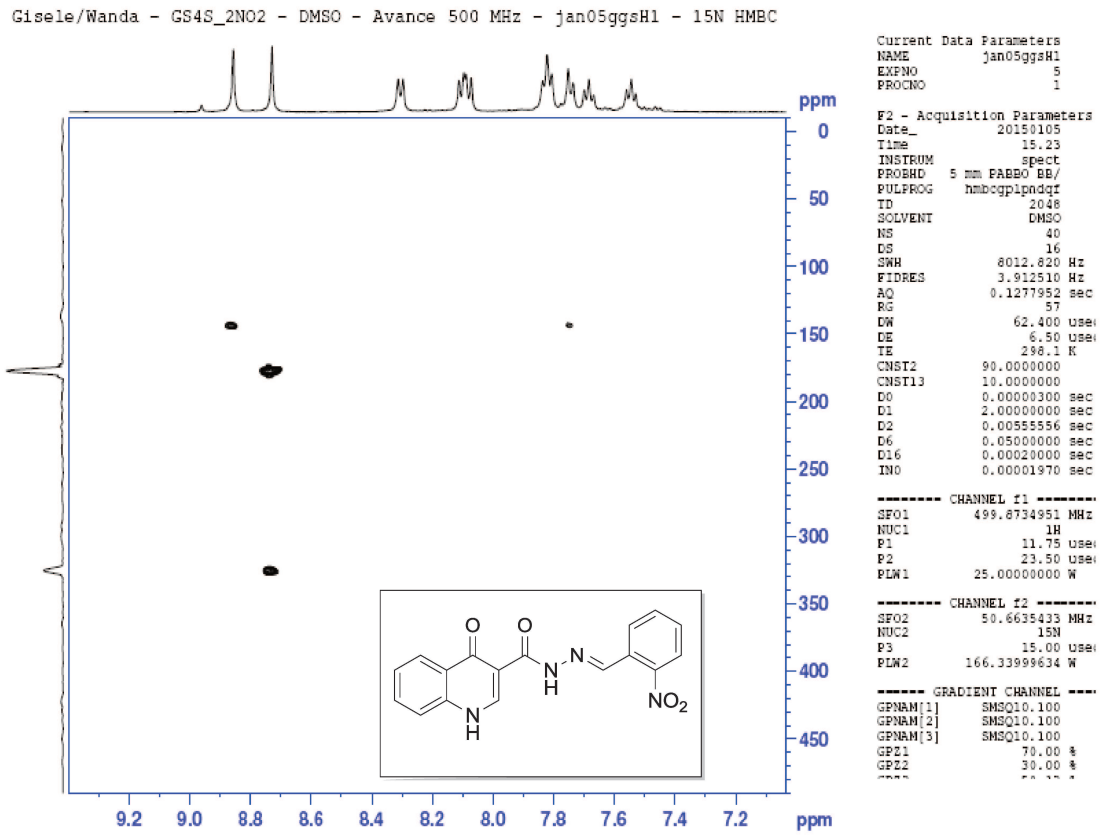


Figura 123. Espectro de HMBC ^{15}N-^{1}H (500/125 MHz, DMSO-d_6) da acil-hidrazona **14**.

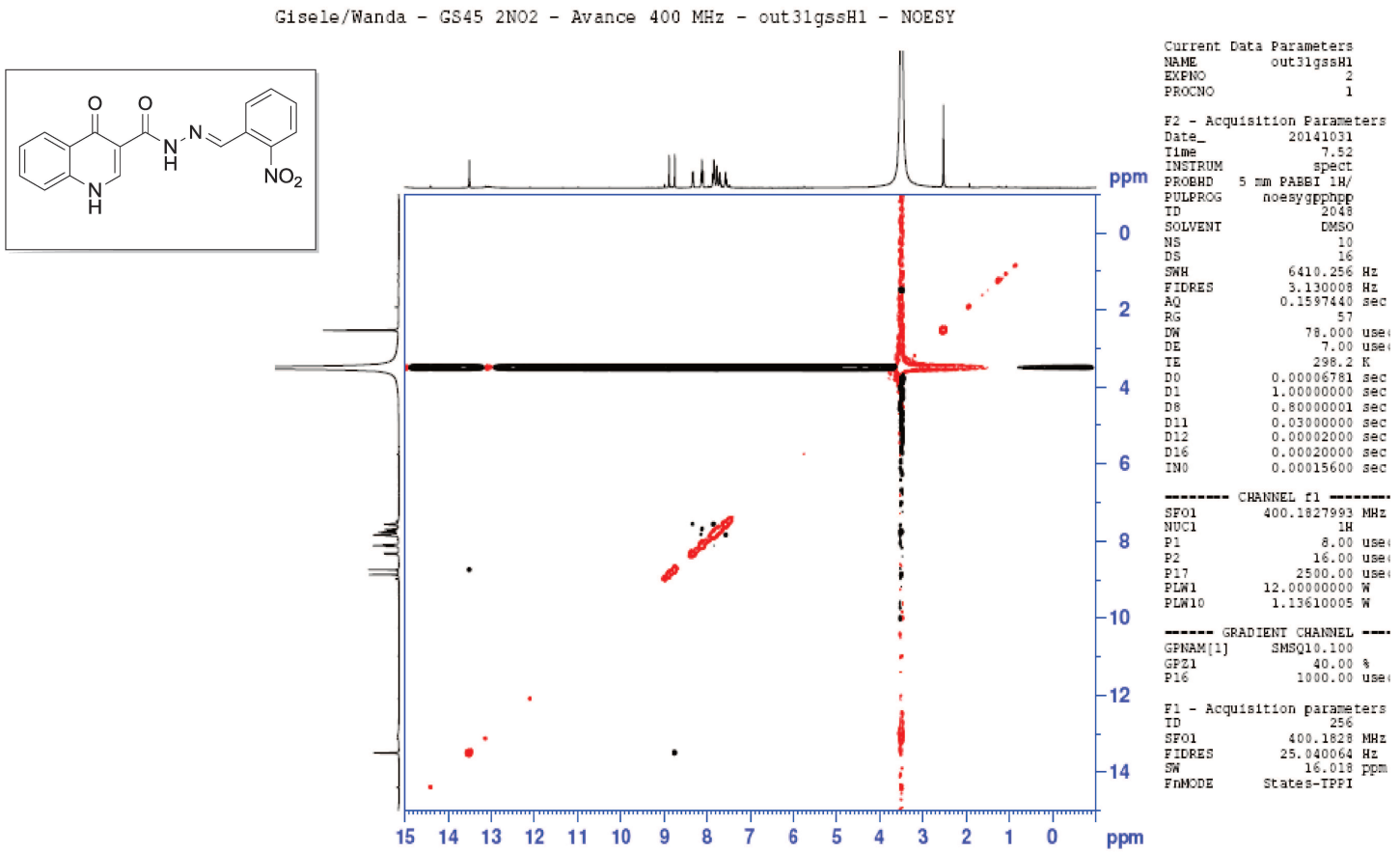


Figura 124. Espectro de NOESY (400 MHz, DMSO-d_6) da acil-hidrazona **14**.

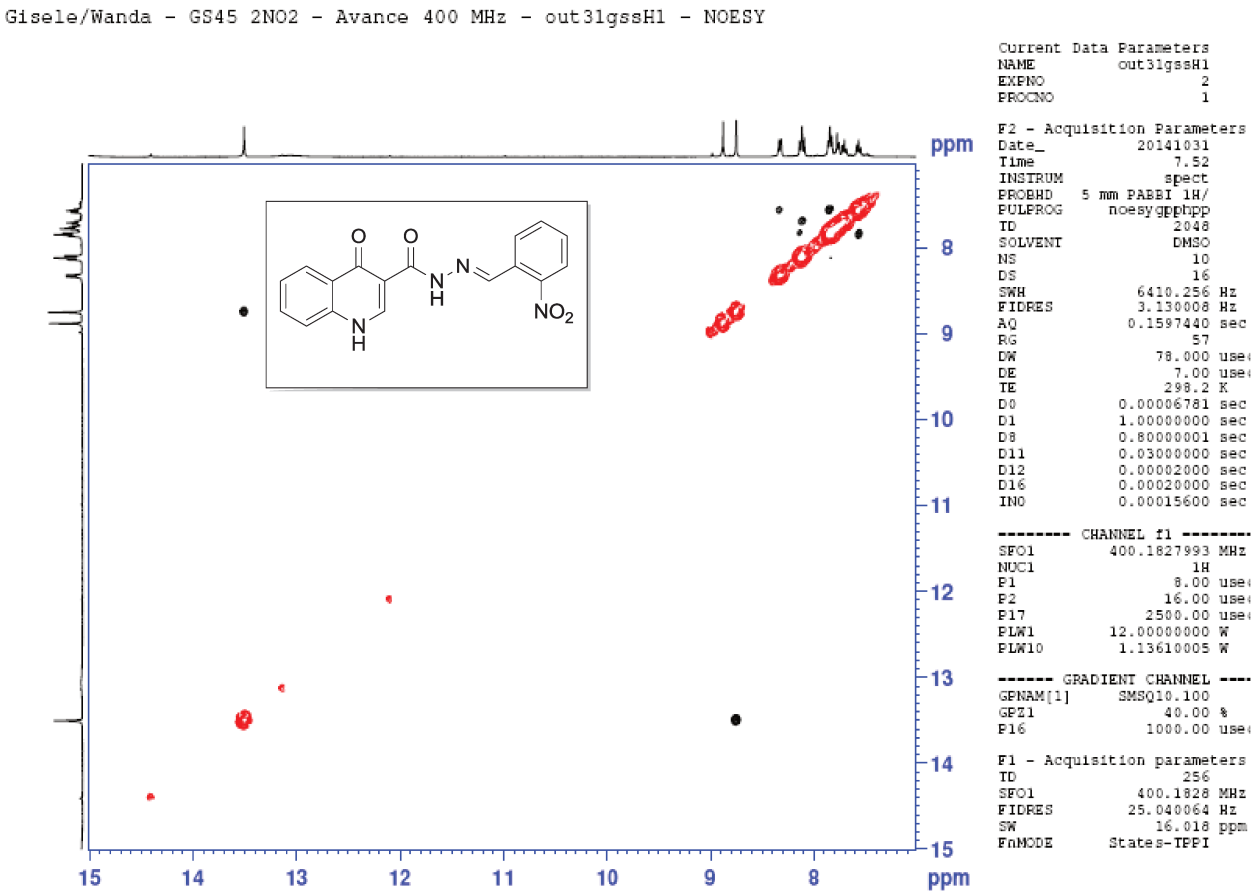


Figura 125. Expansão do espectro de NOESY (400 MHz, DMSO-d_6) da acil-hidrazona **14**.

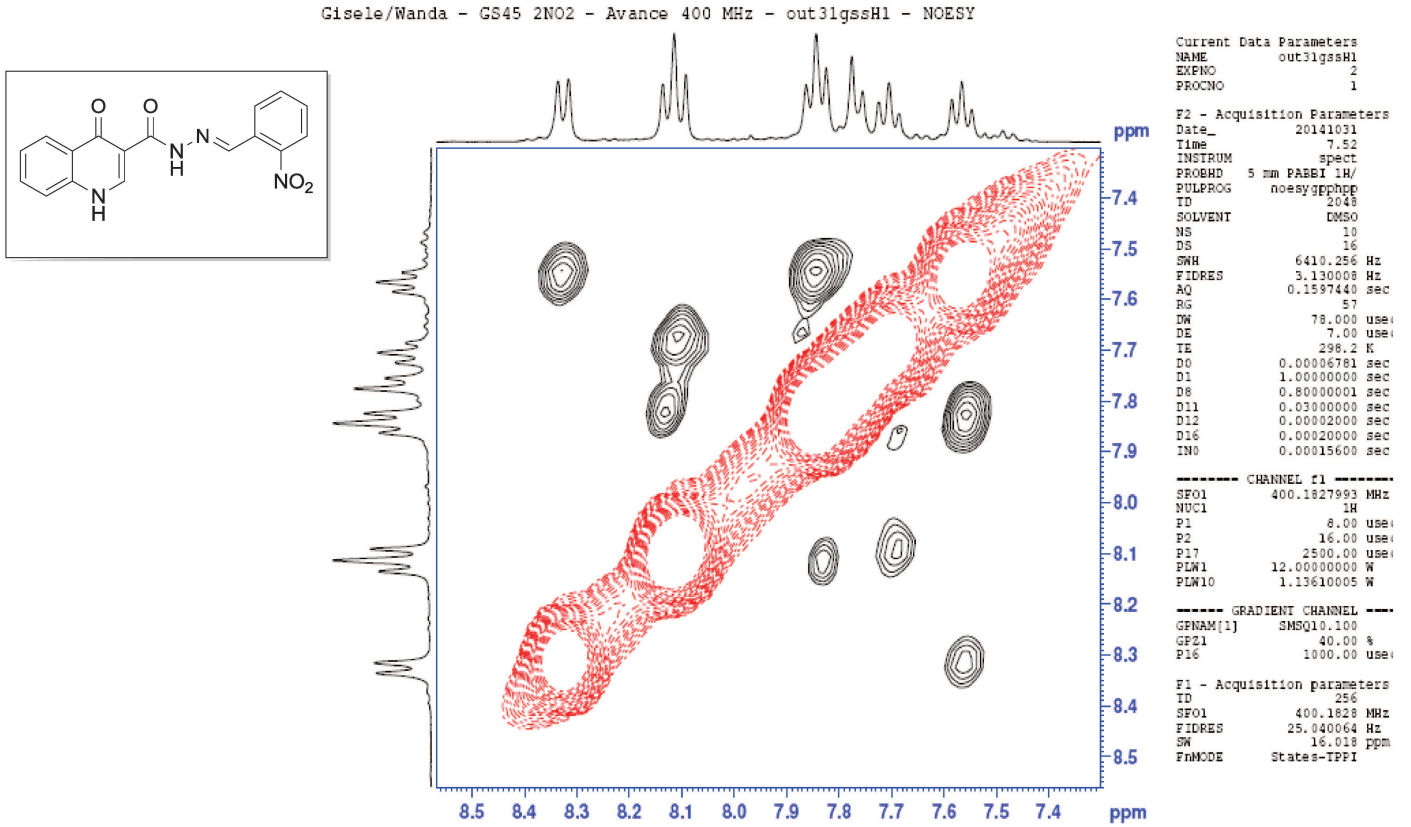


Figura 126. Expansão do espectro de NOESY (400 MHz, DMSO-d_6) da acil-hidrazona **14**.

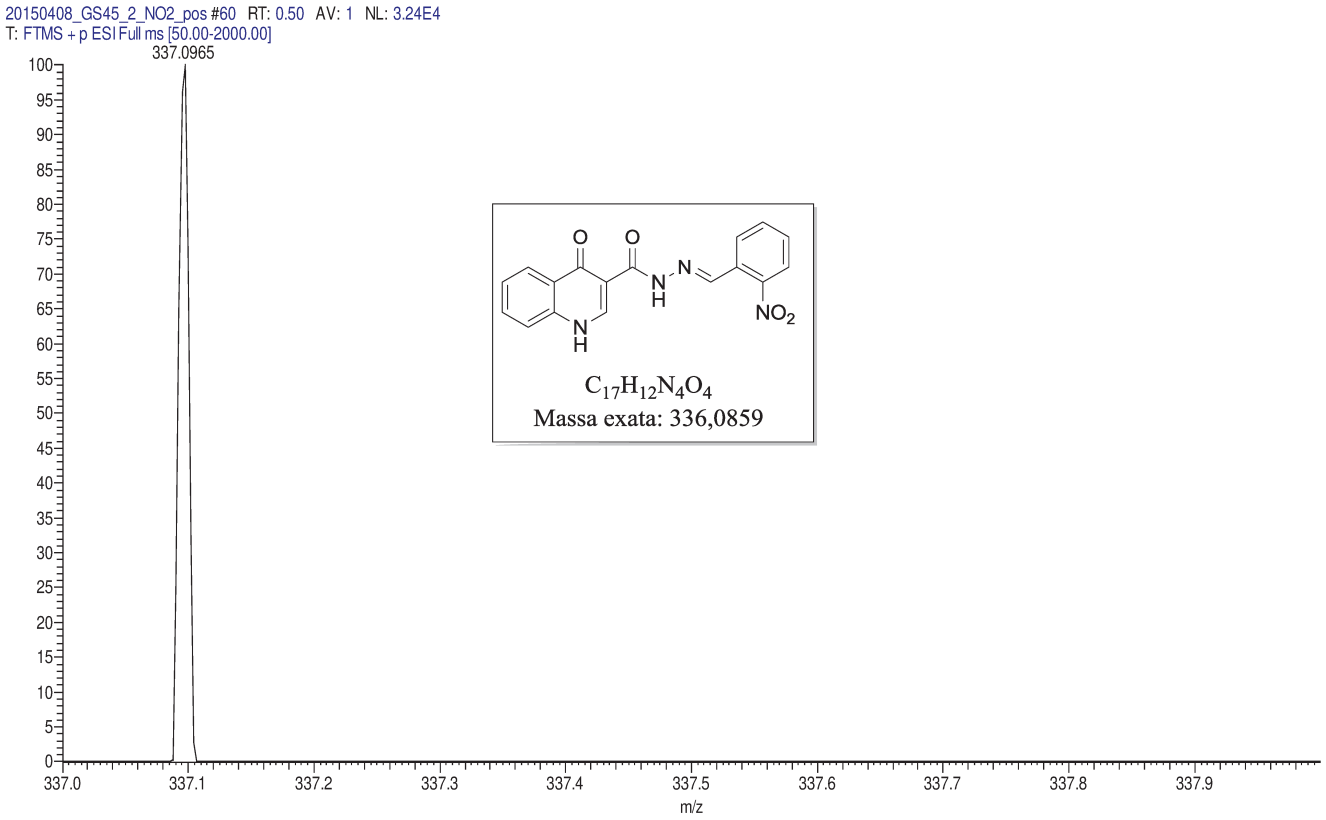


Figura 127. Espectro de massas de alta resolução (TOF-MS-ES+) da acil-hidrazona **14**.

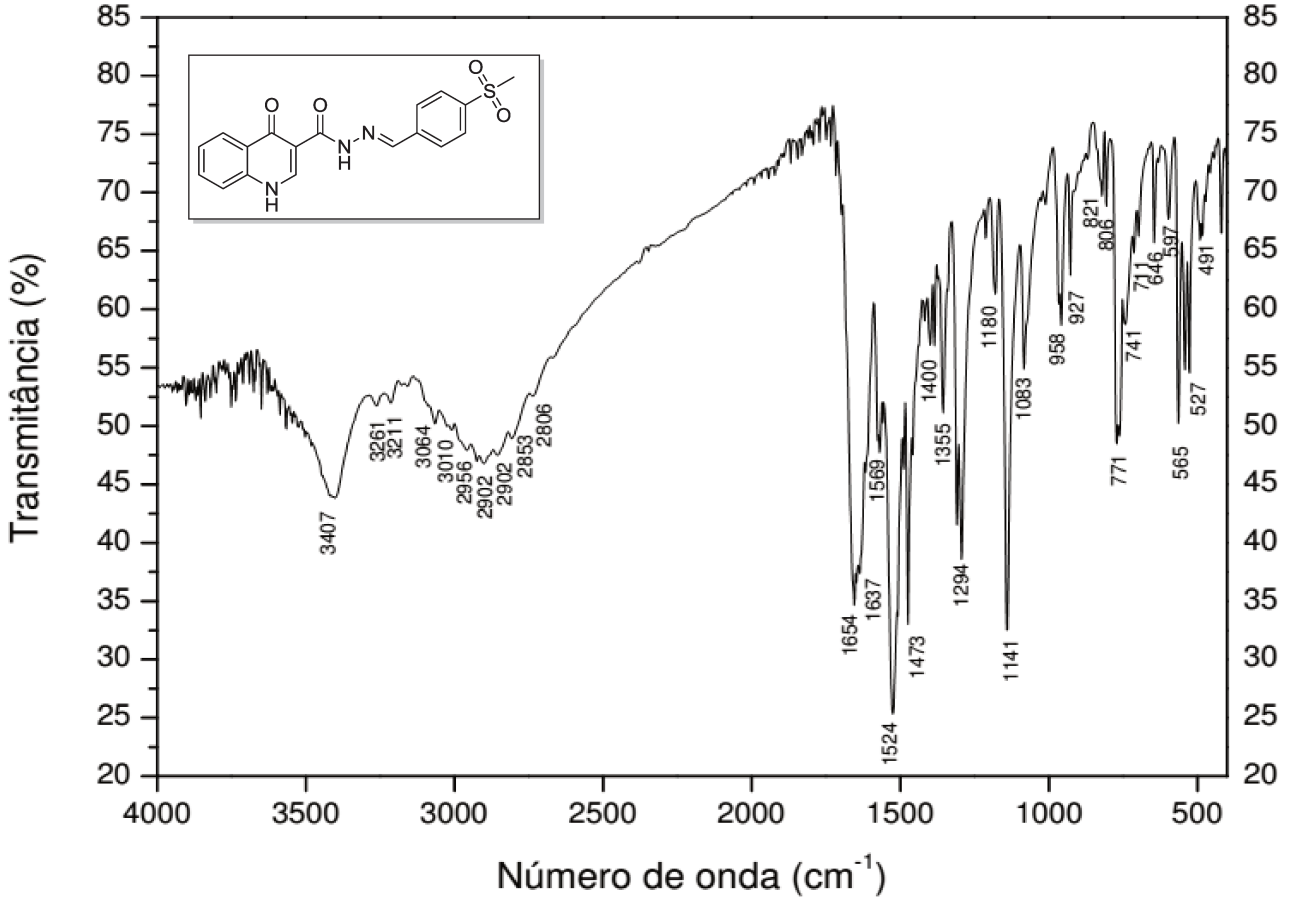


Figura 128. Espectro de IV da acil-hidrazona **15**.

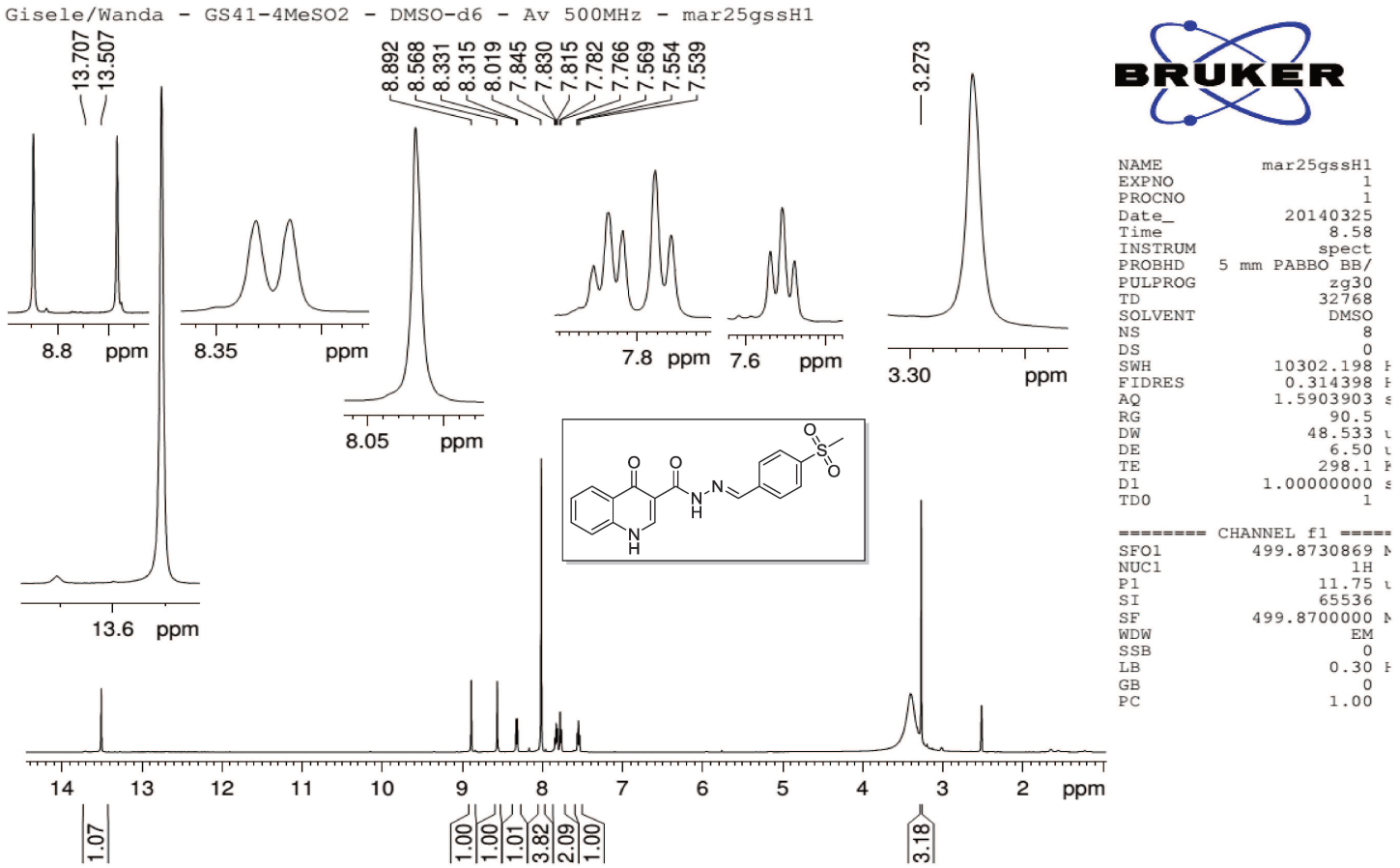


Figura 129. Espectro de RMN ^{1}H (500 MHz, DMSO-d_6) da acil-hidrazona **15**.

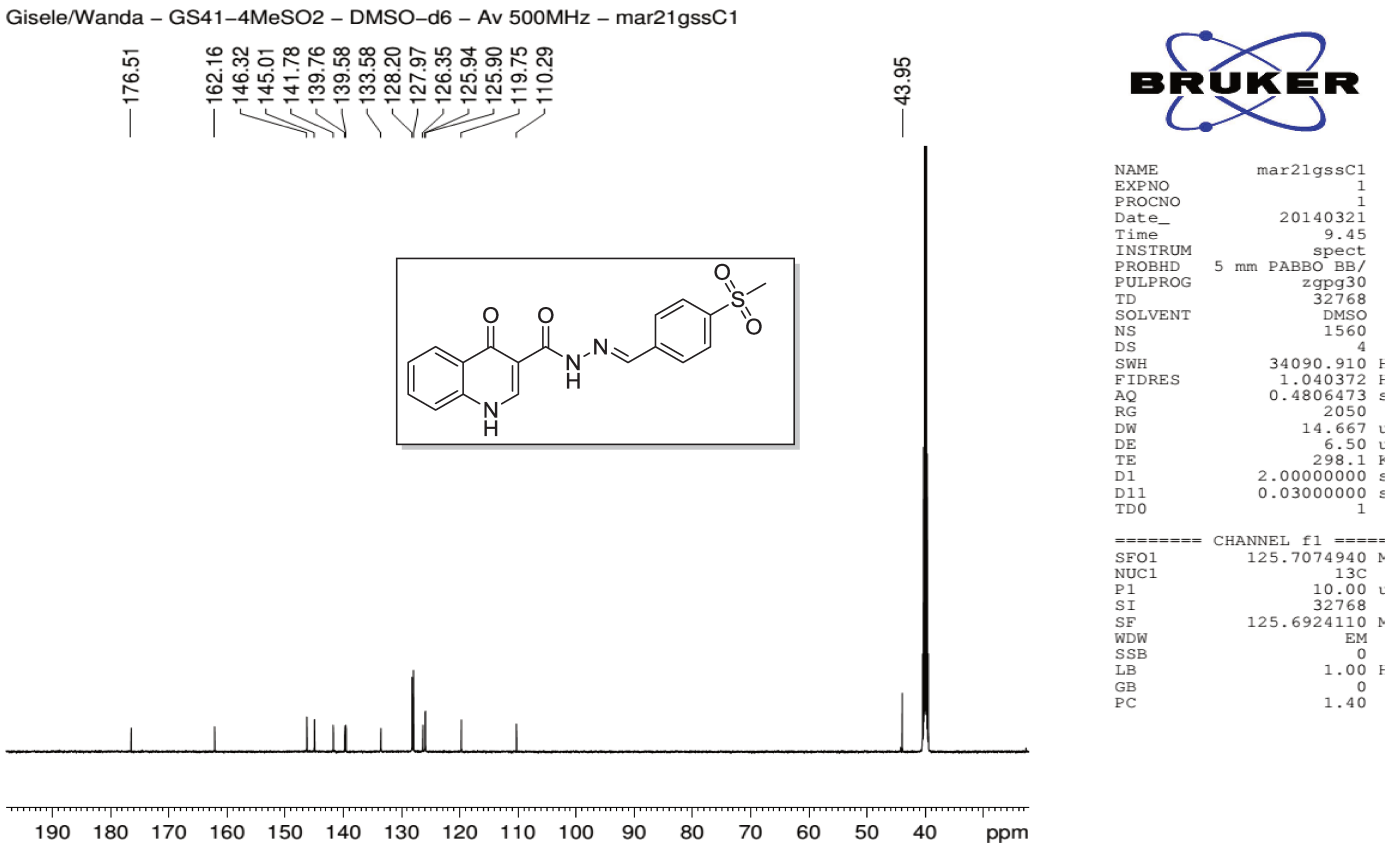


Figura 130. Espectro de RMN ^{13}C (500 MHz, DMSO-d_6) da acil-hidrazona **15**.

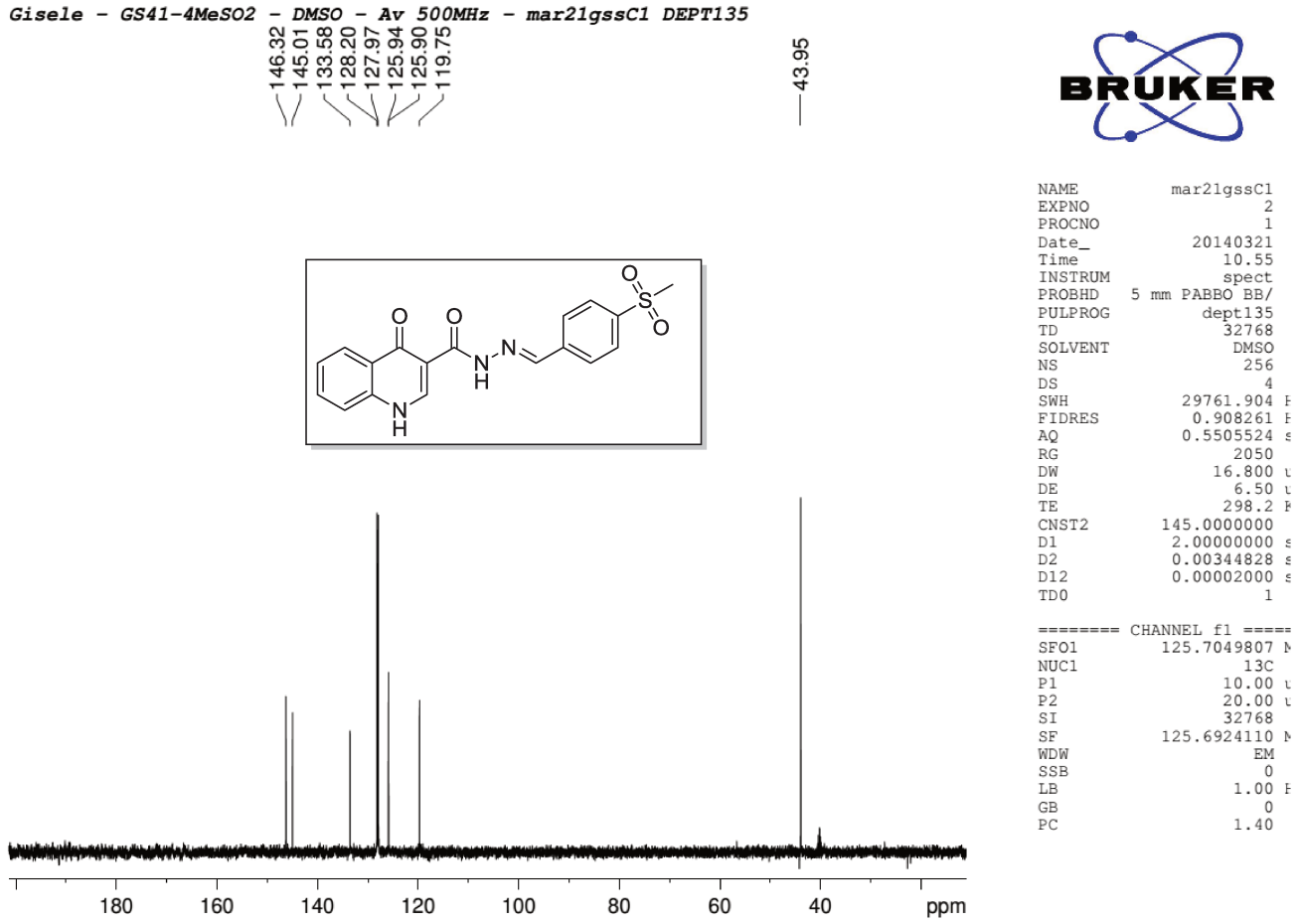


Figura 131. Espectro de RMN ^{13}C DEPT-135 (500 MHz, DMSO-d_6) da acil-hidrazona **15**.

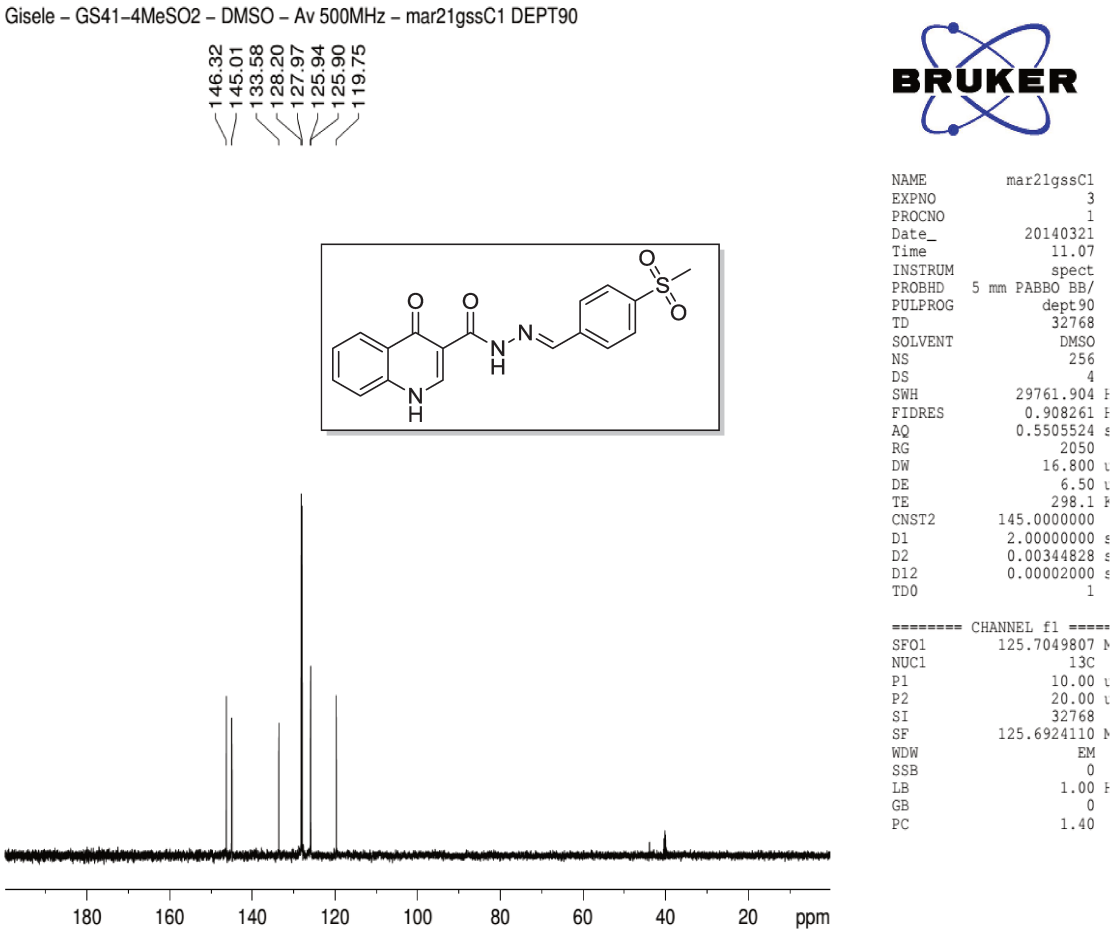


Figura 132. Espectro de RMN ^{13}C DEPT-90 (100 MHz, DMSO-d_6) da acil-hidrazona **15**.

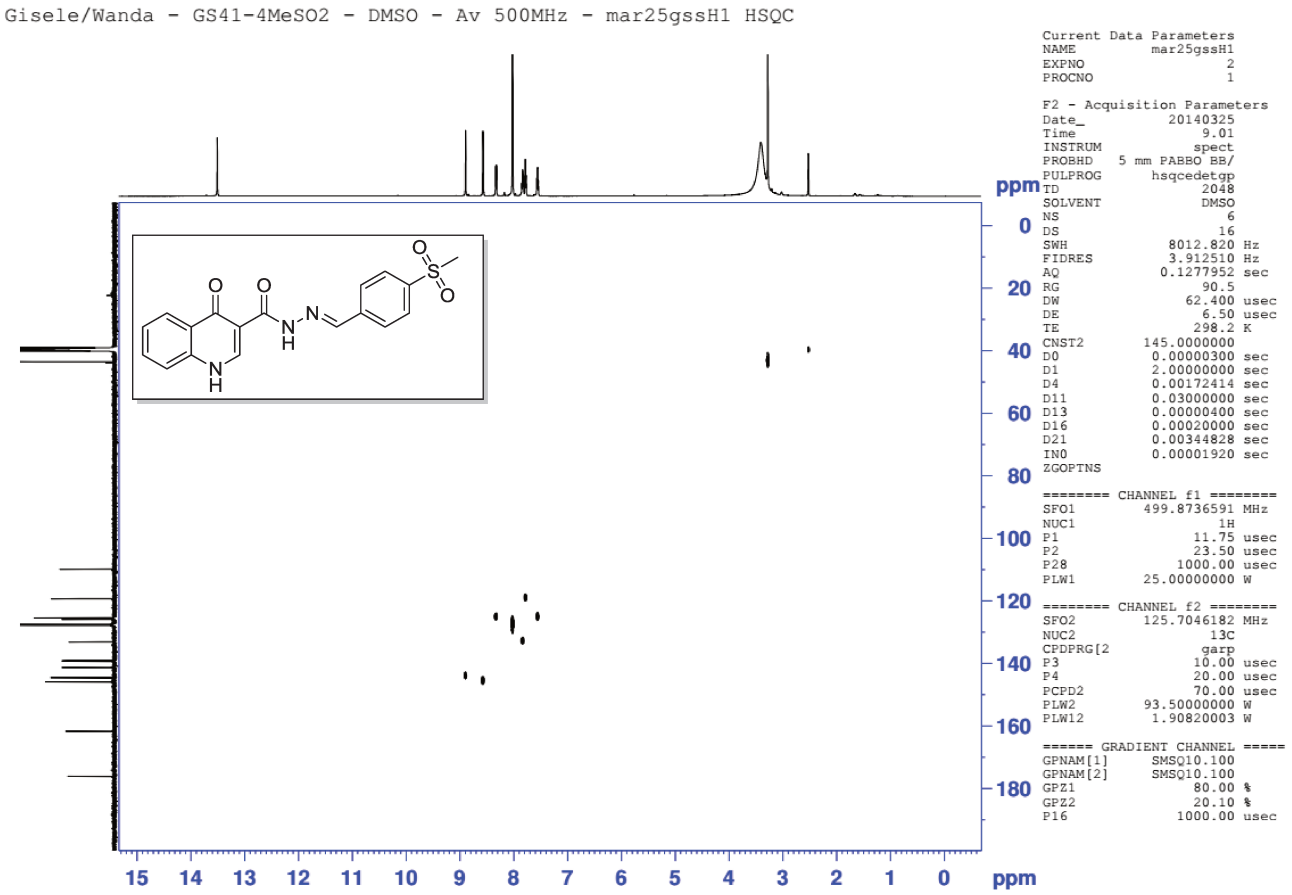


Figura 133. Espectro de HSQC ^{13}C-^{1}H (500/125 MHz, DMSO-d_6) da acil-hidrazona **15**.

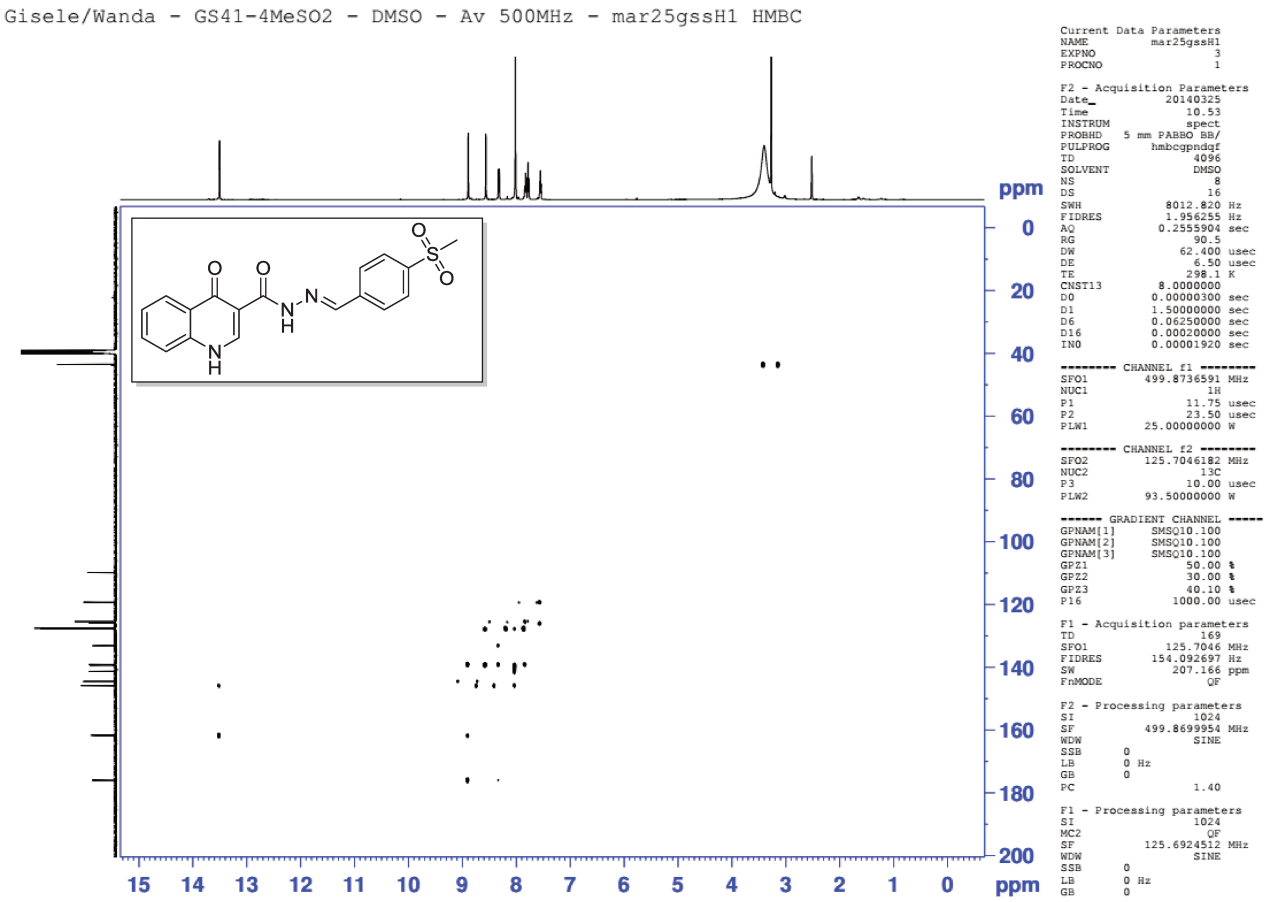


Figura 134. Espectro de HMBC ^{13}C-^{1}H (500/125 MHz, DMSO-d_6) da acil-hidrazona **15**.

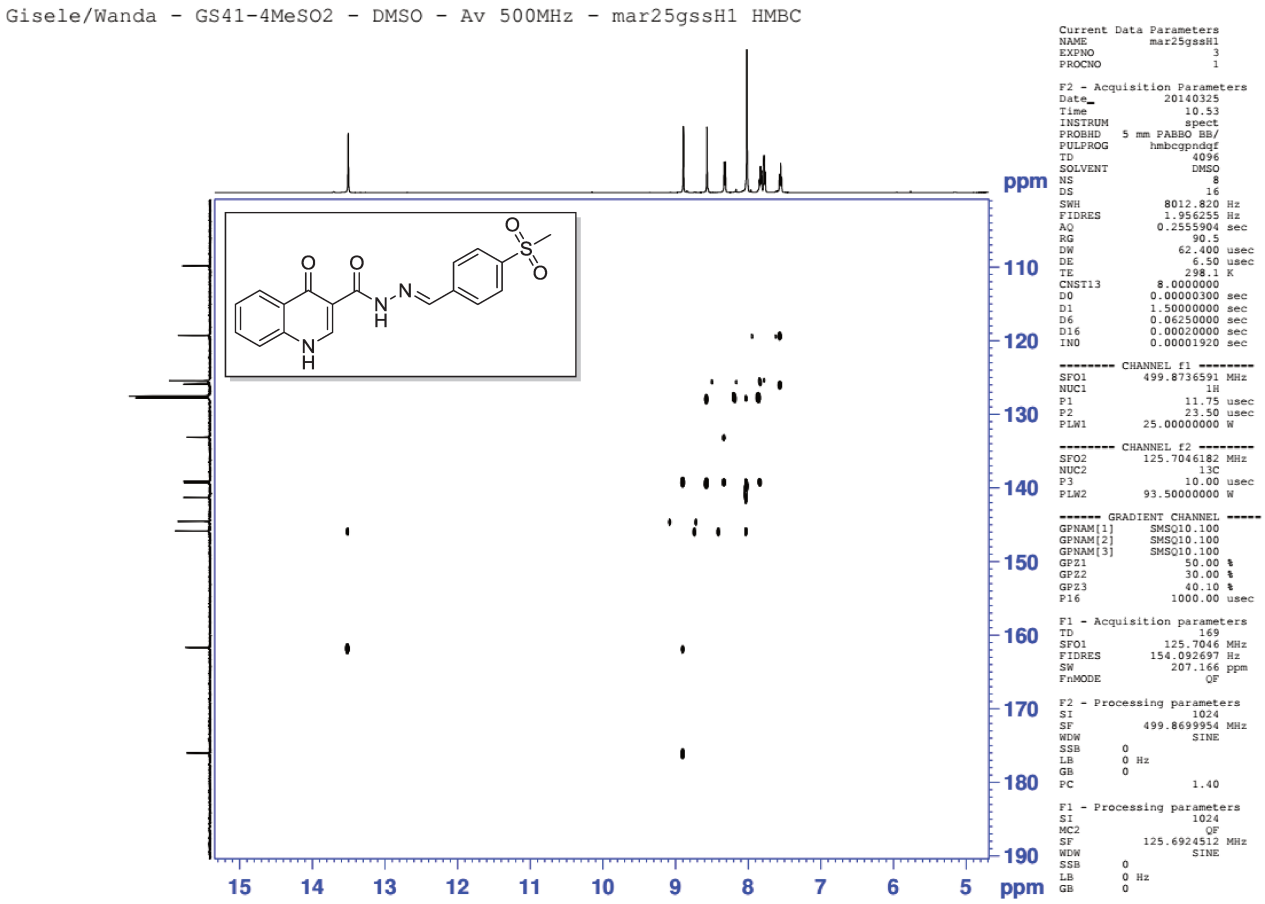


Figura 135. Expansão do espectro de HMBC ^{13}C-^{1}H (500/125 MHz, DMSO-d_6) da acil-hidrazona **15**.

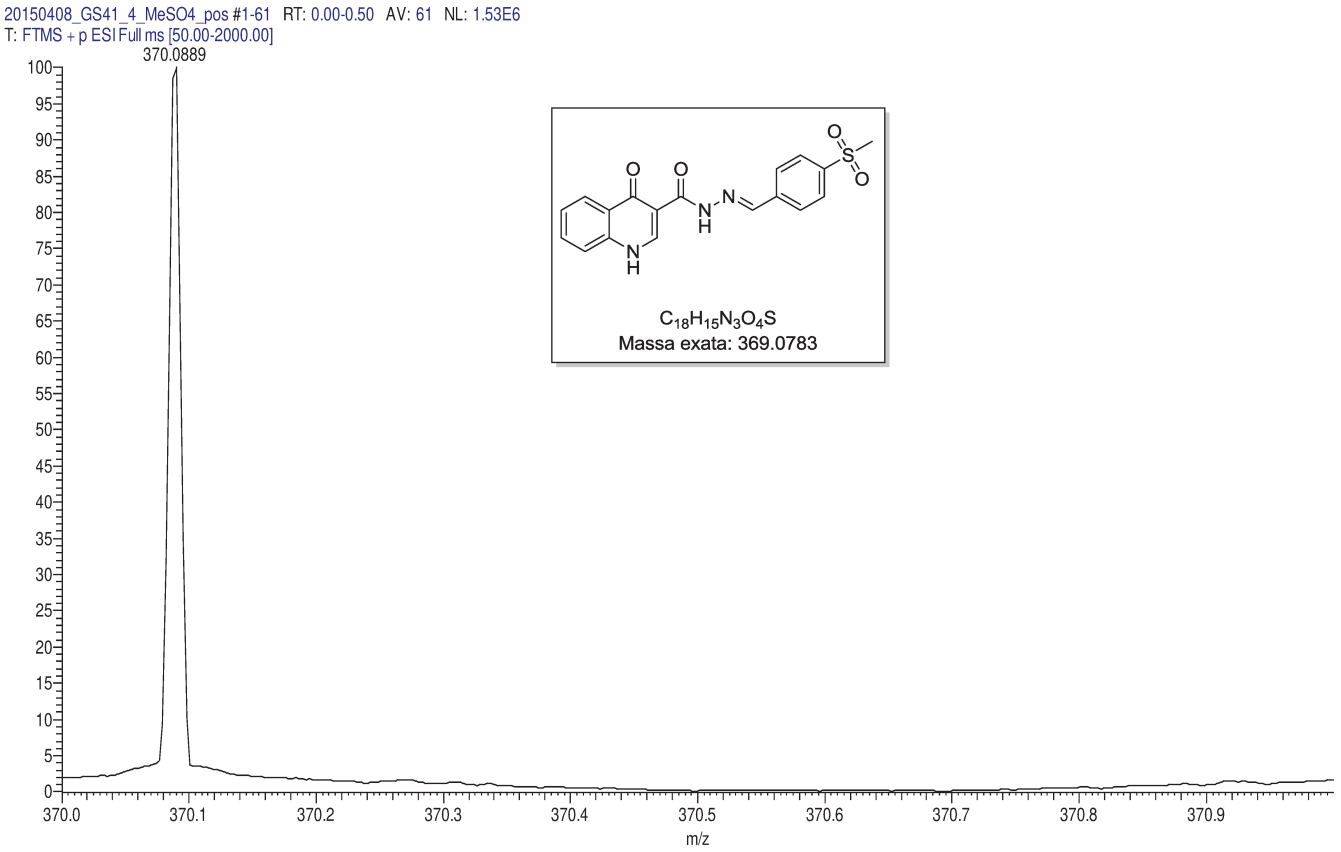


Figura 136. Espectro de massas de alta resolução (TOF-MS-ES+) da acil-hidrazona **15**.

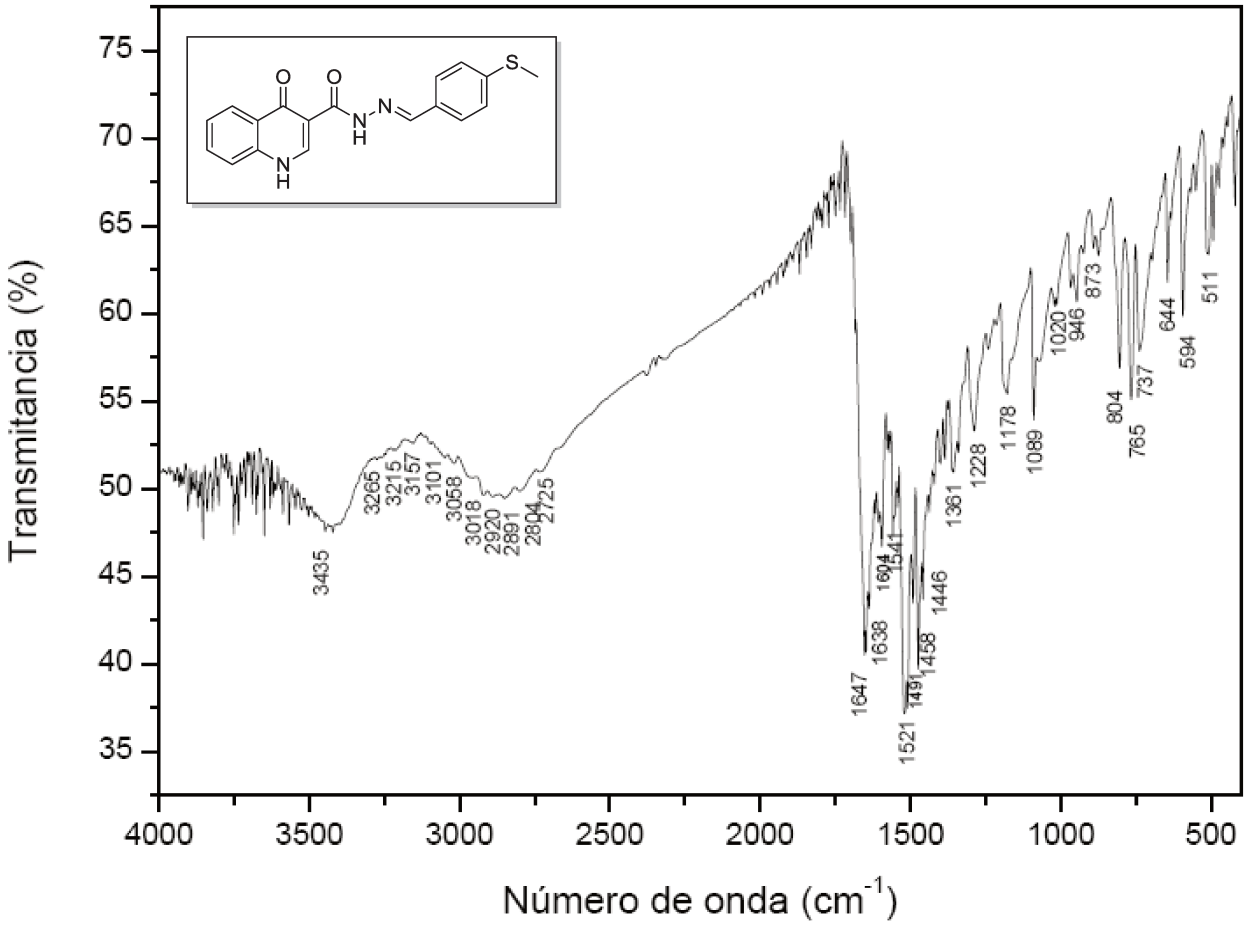


Figura 137. Espectro de IV da acil-hidrazona **16**.

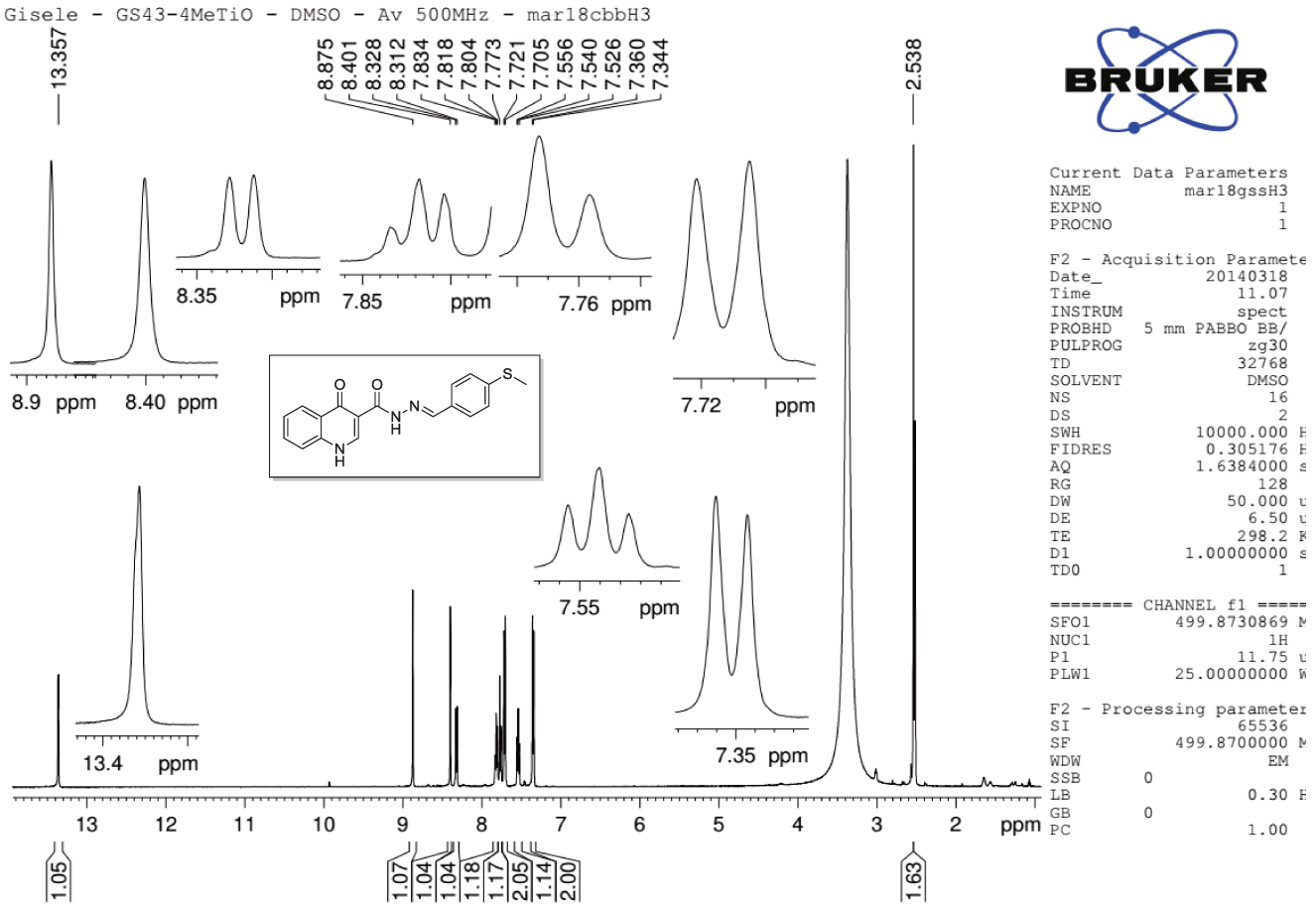


Figura 138. Espectro de RMN ^{1}H (500 MHz, DMSO-d_6) da acil-hidrazona **16**.

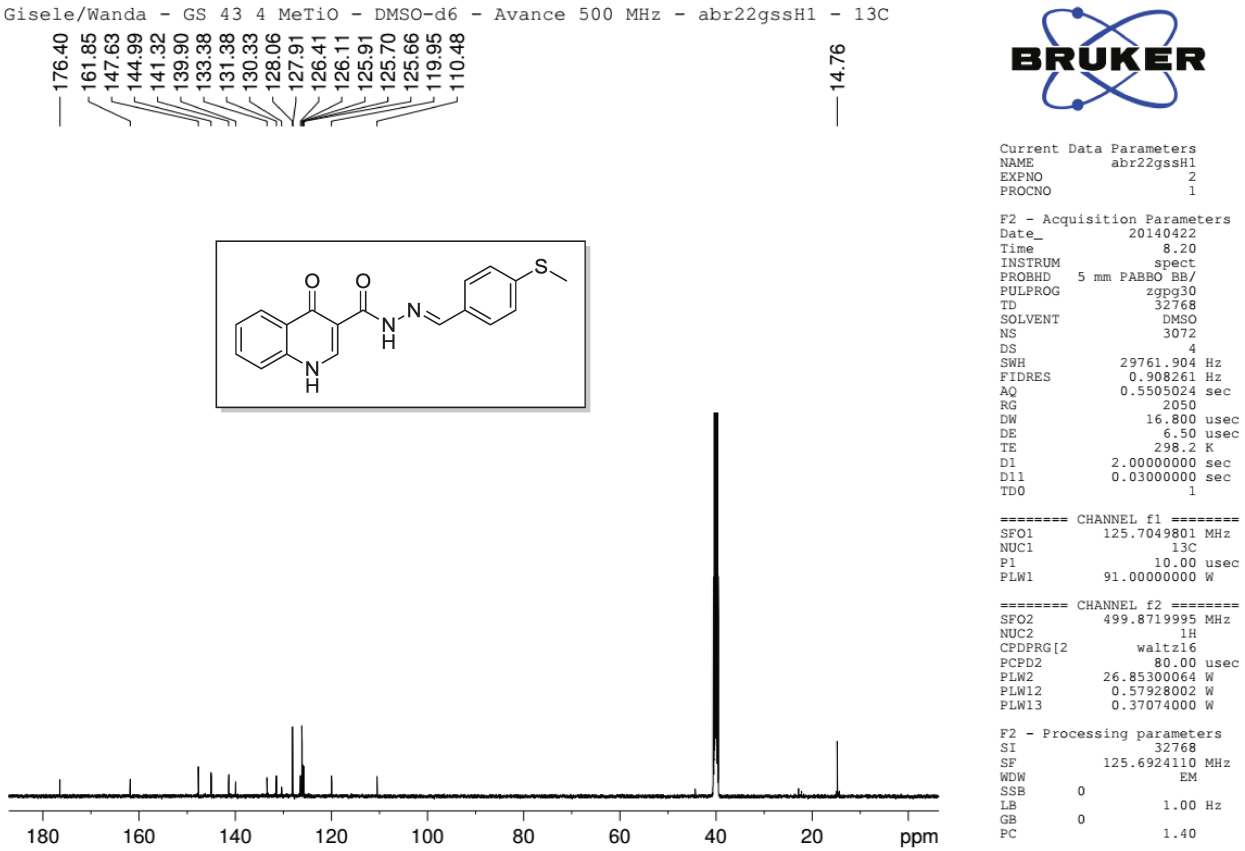


Figura 139. Espectro de RMN ^{13}C (125 MHz, DMSO-d_6) da acil-hidrazona **16**.

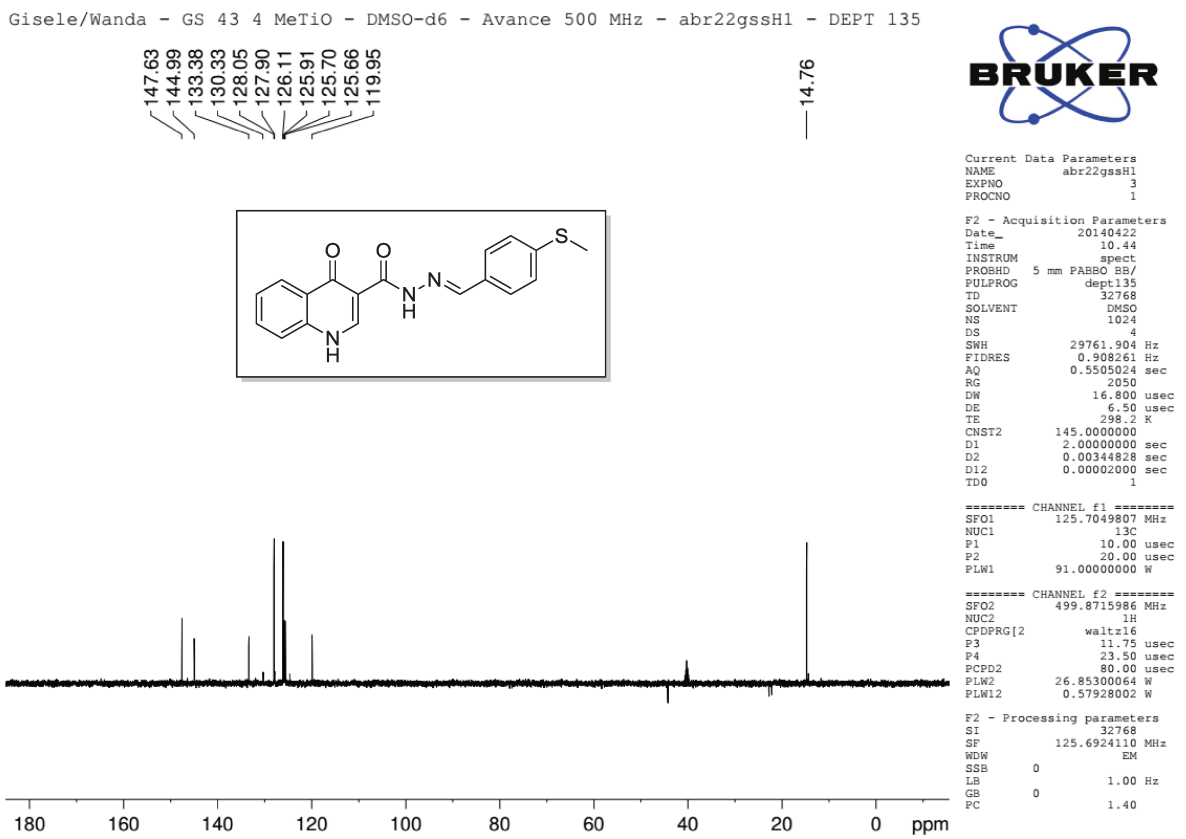


Figura 140. Espectro de RMN ^{13}C DEPT-135 (125 MHz, DMSO-d_6) da acil-hidrazona **16**.

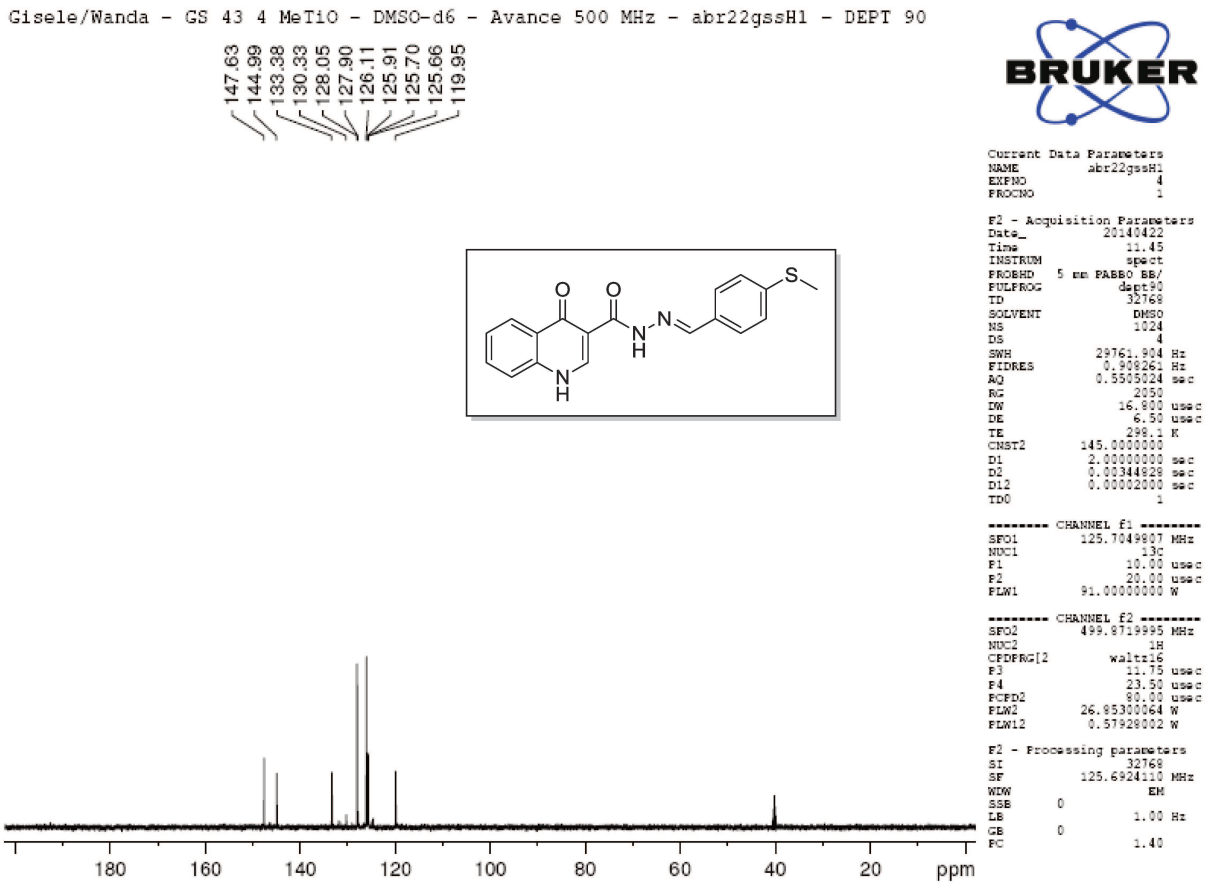


Figura 141. Espectro de RMN ^{13}C DEPT-90 (125 MHz, DMSO-d_6) da acil-hidrazona **16**.

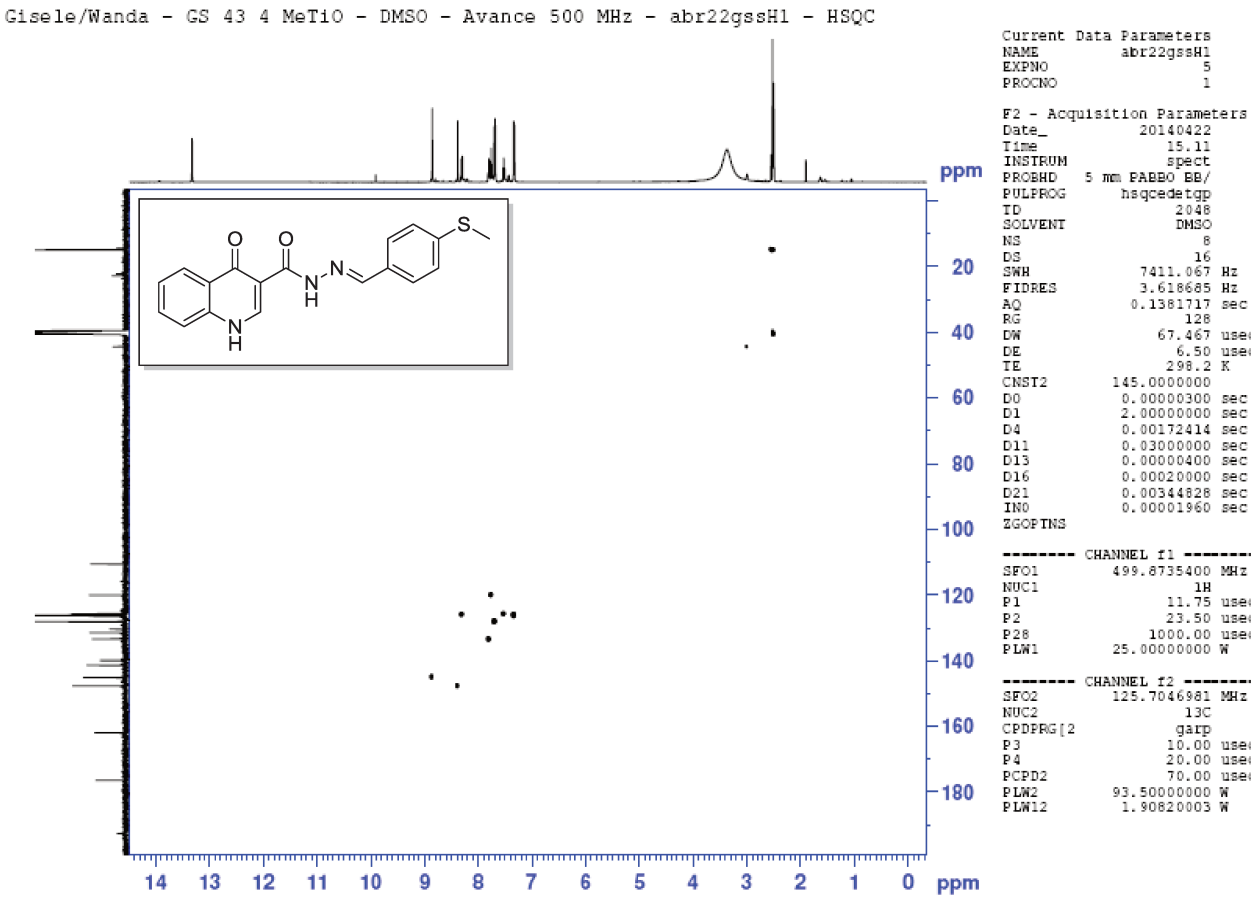


Figura 142. Espectro de HSQC ^{13}C-^{1}H (500/125 MHz, DMSO-d_6) da acil-hidrazona **16**.

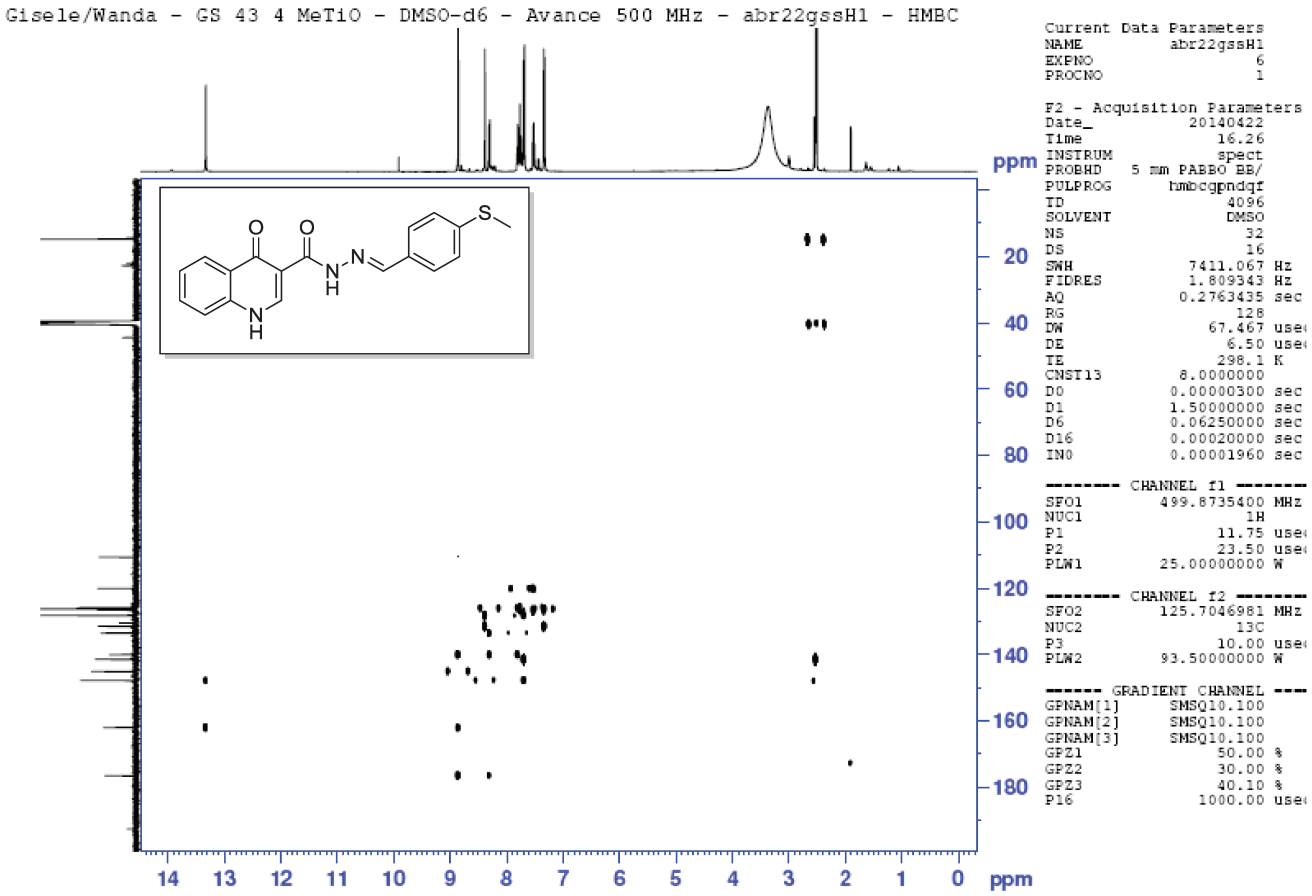


Figura 143. Espectro de HMBC ^{13}C-^{1}H (500/125 MHz, DMSO-d_6) da acil-hidrazona **16**.

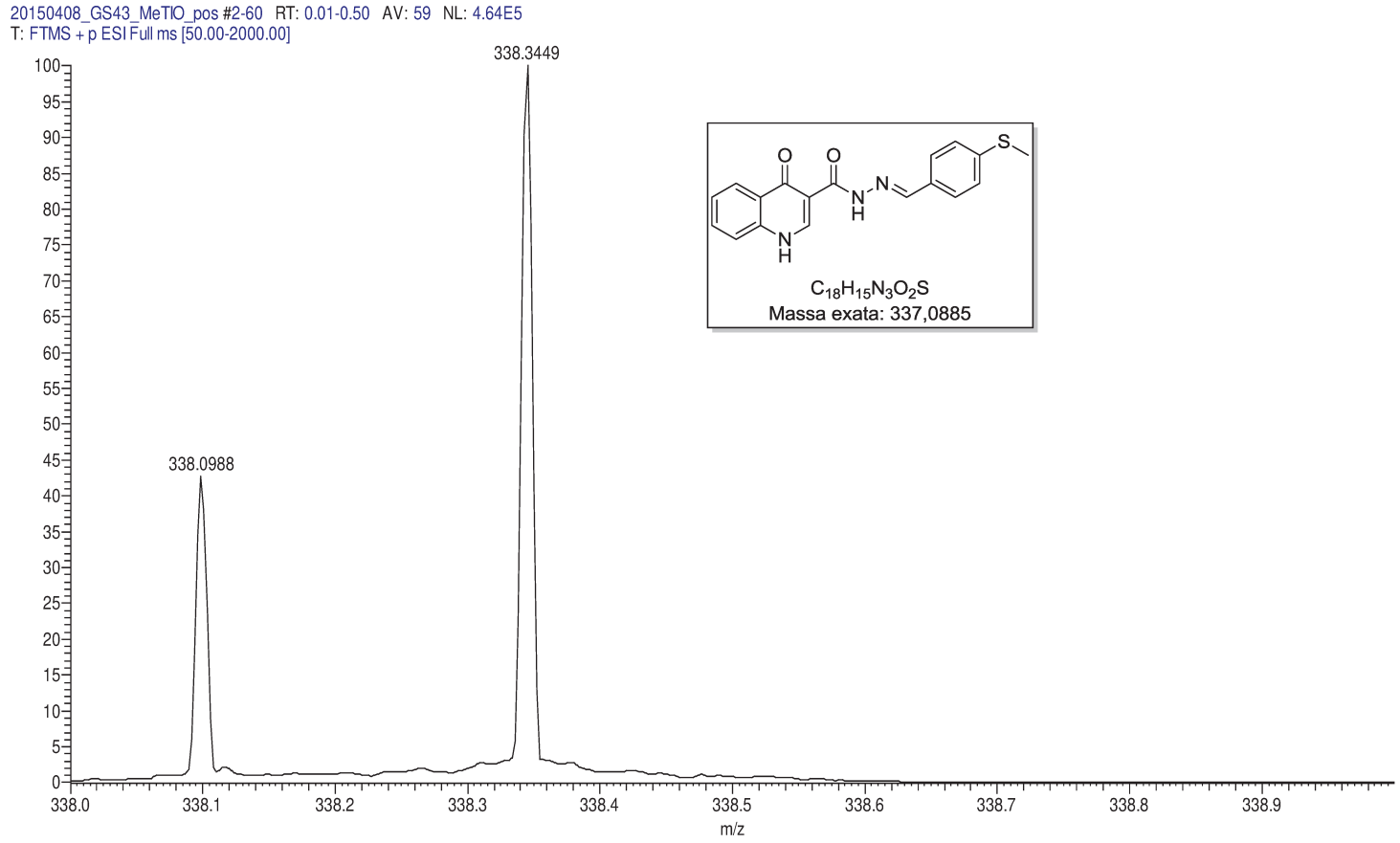


Figura 144. Espectro de massas de alta resolução (TOF-MS-ES+) da acil-hidrazona **16**.

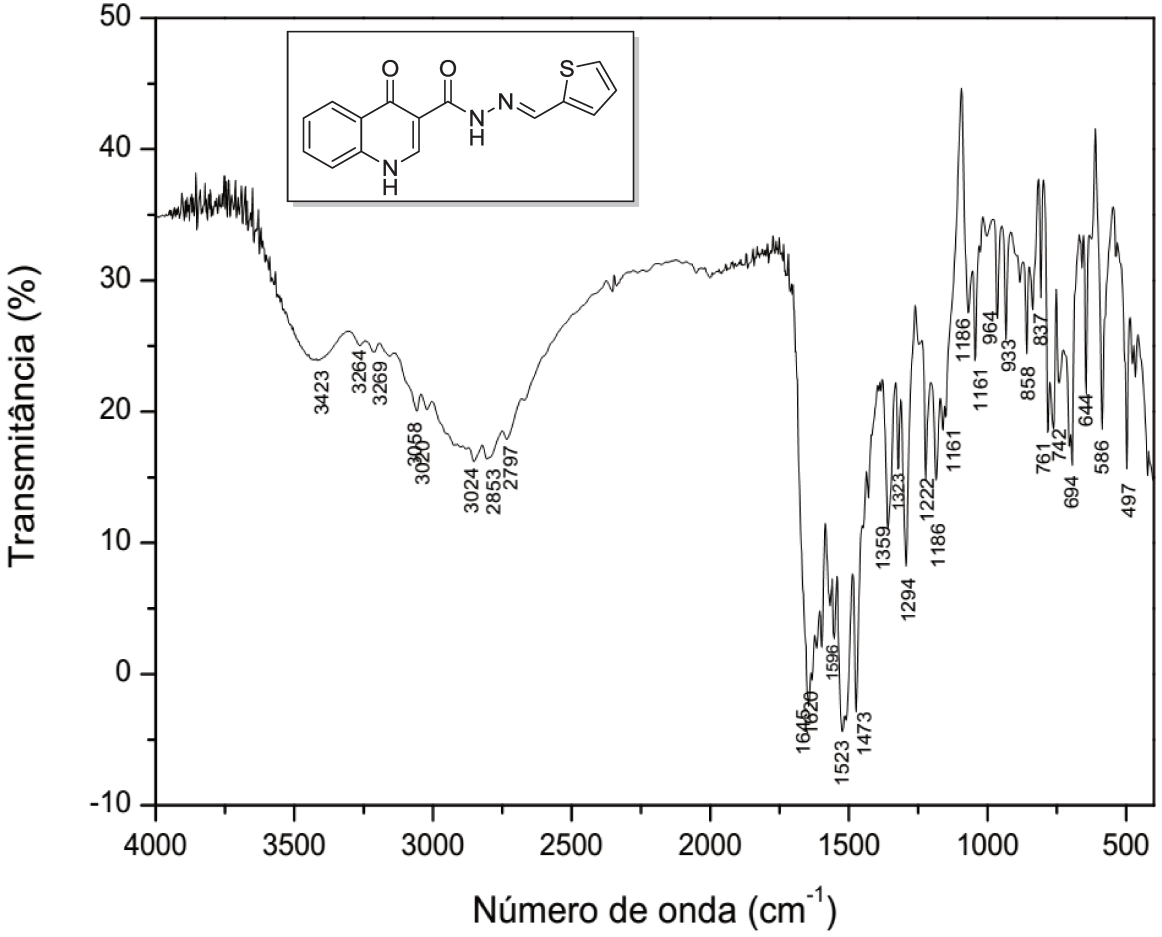


Figura 145. Espectro de IV da acil-hidrazona **17**.

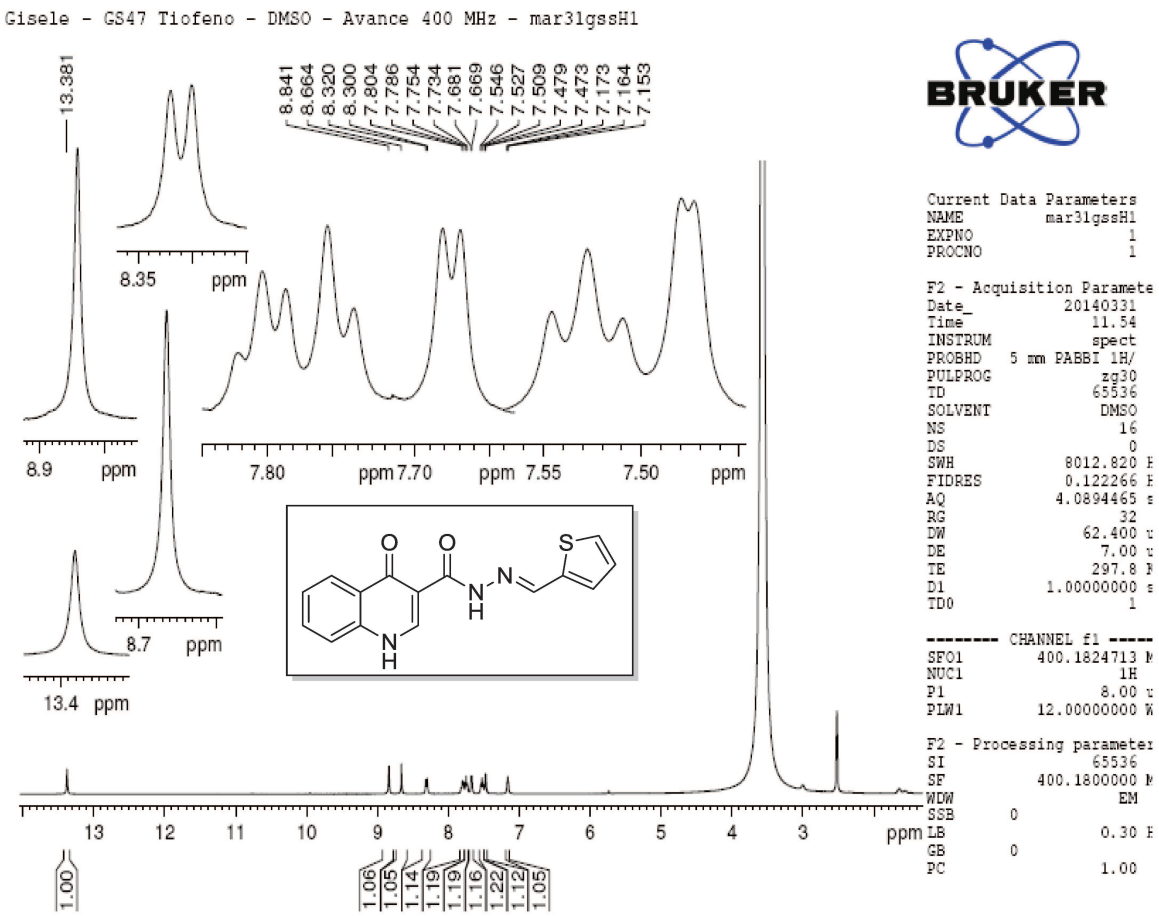


Figura 146. Espectro de RMN ^{1}H (400 MHz, DMSO-d_6) da acil-hidrazona **17**.

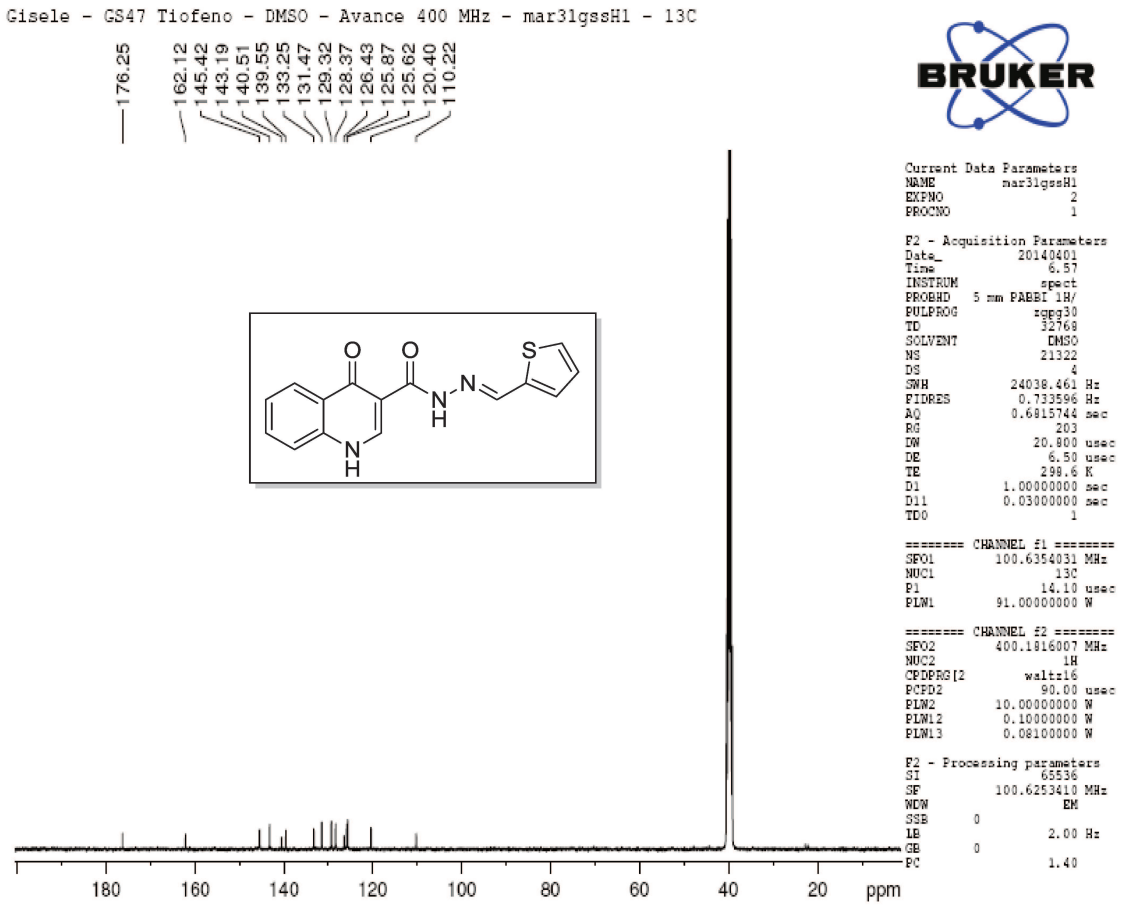


Figura 147. Espectro de RMN ^{13}C (100 MHz, DMSO-d_6) da acil-hidrazona **17**.

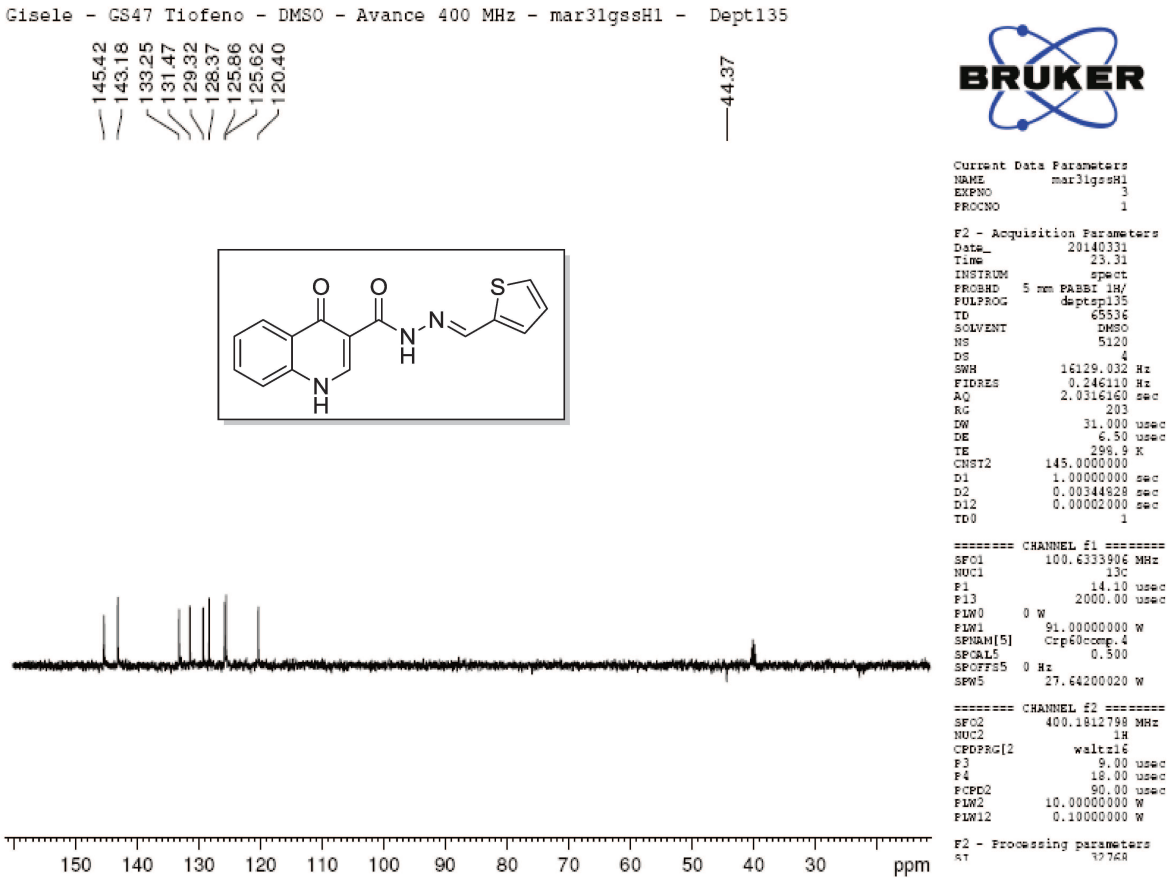


Figura 148. Espectro de RMN ^{13}C DEPT-135 (100 MHz, DMSO-d_6) da acil-hidrazona **17**.

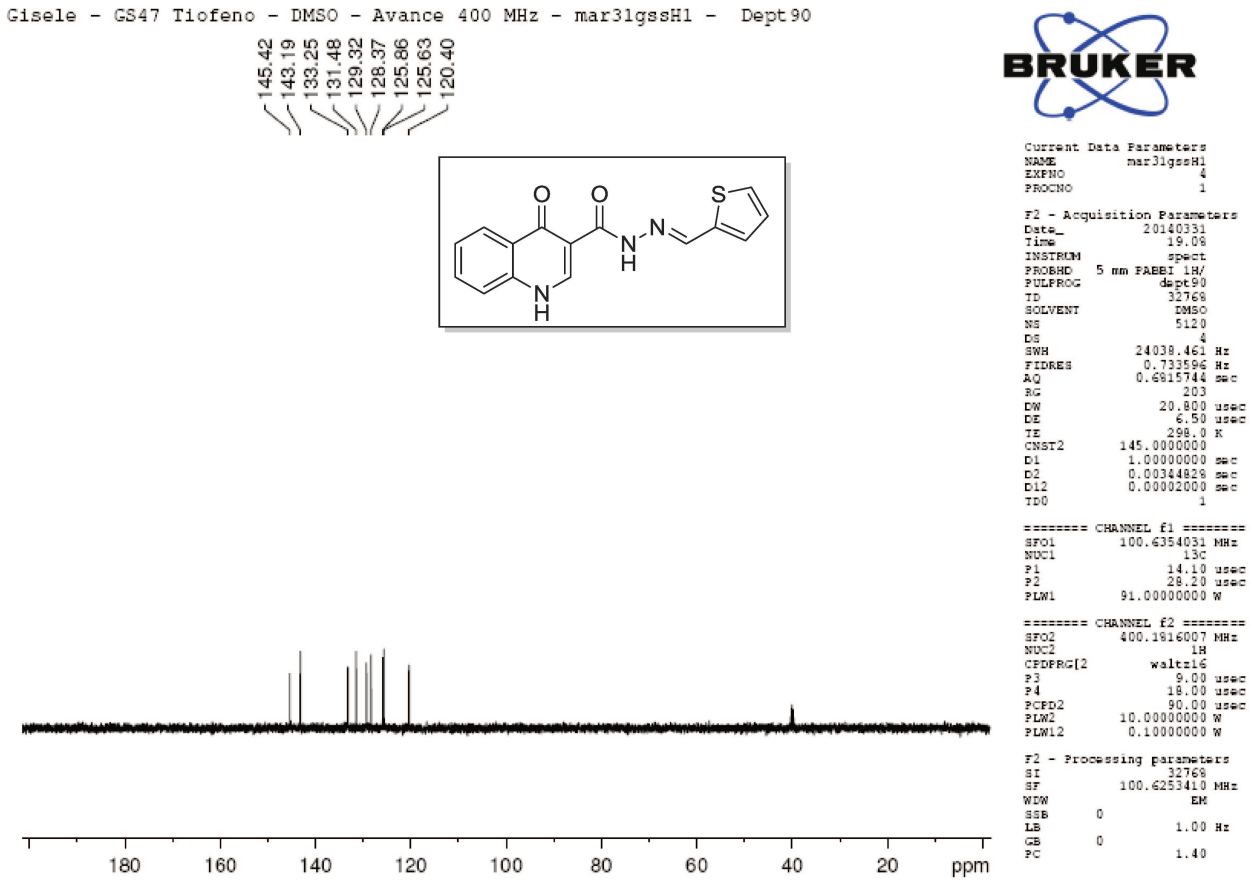


Figura 149. Espectro de RMN ^{13}C DEPT-90 (100 MHz, DMSO-d_6) da acil-hidrazona **17**.

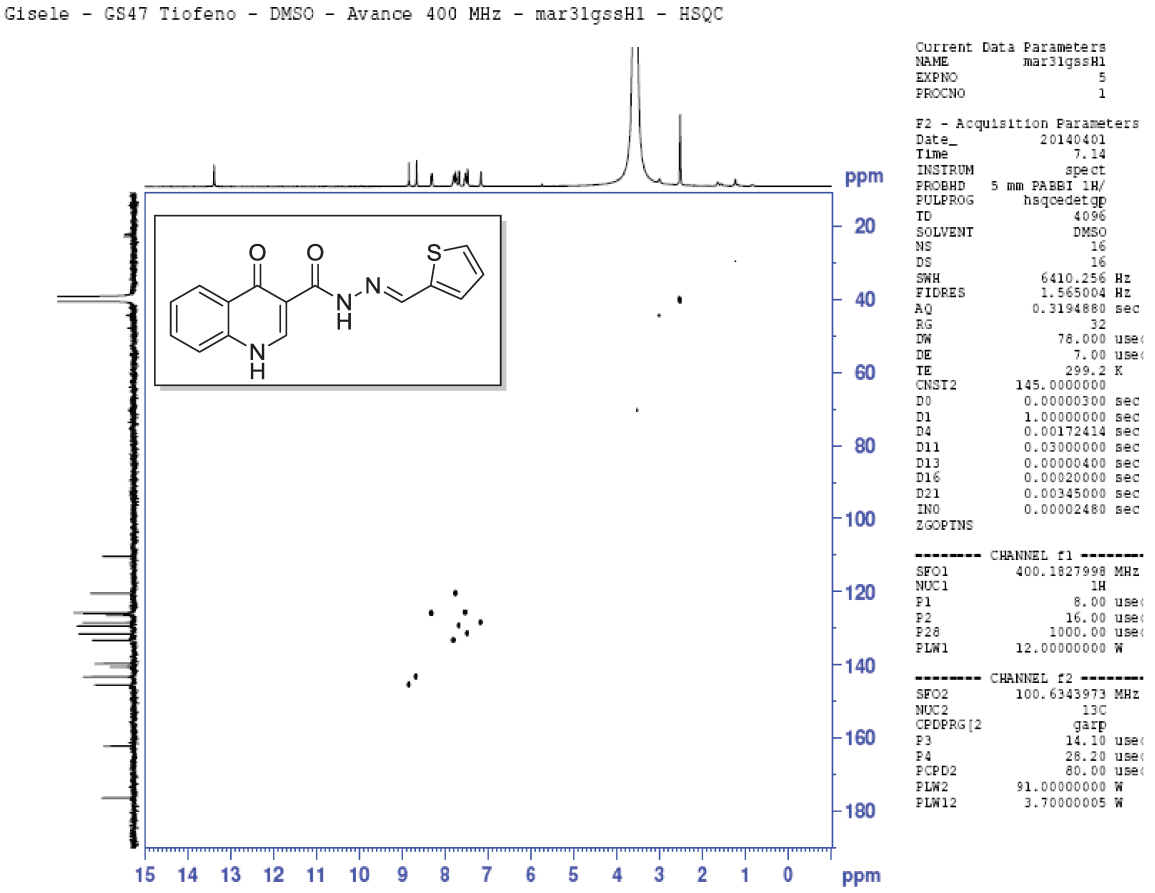


Figura 150. Espectro de HSQC ^{13}C-^{1}H (400/100 MHz, DMSO-d_6) da acil-hidrazona **17**.

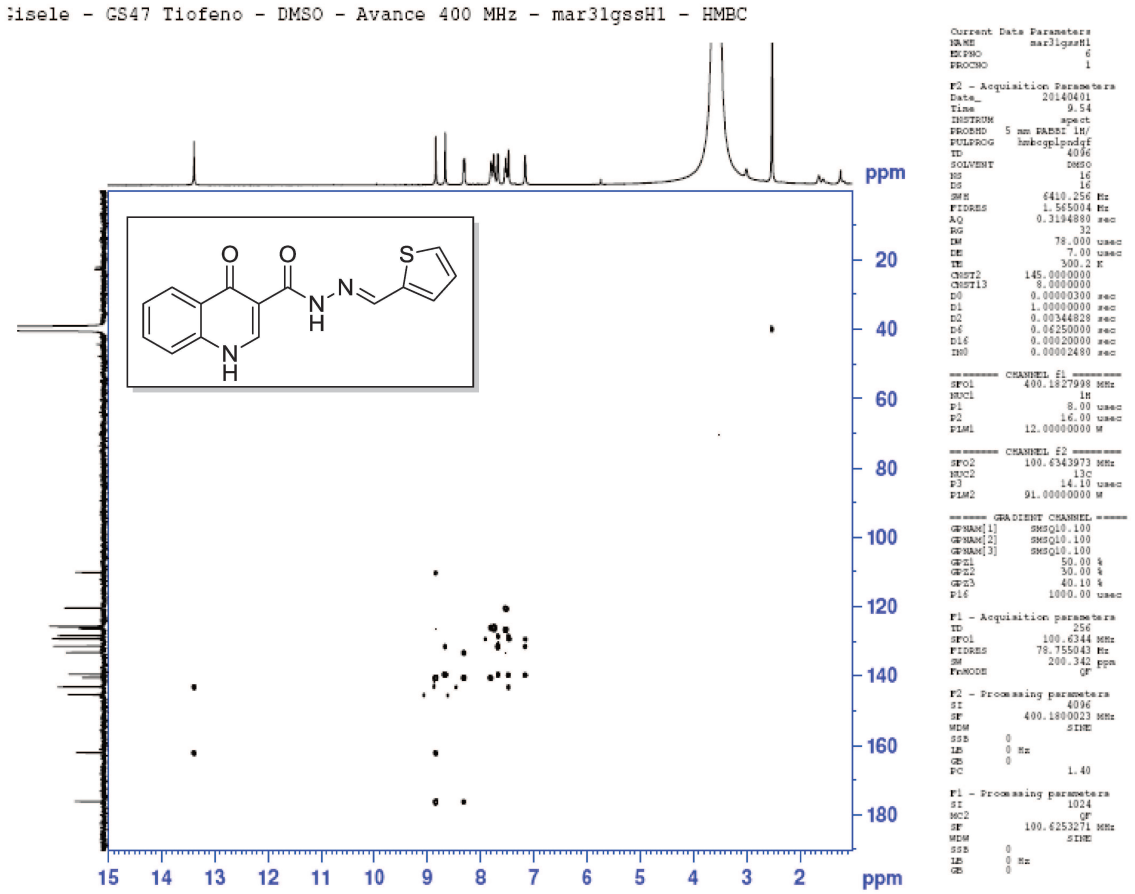


Figura 151. Espectro de HMB.C ^{13}C-^{1}H (400/100 MHz, DMSO-d_6) da acil-hidrazona **17**.

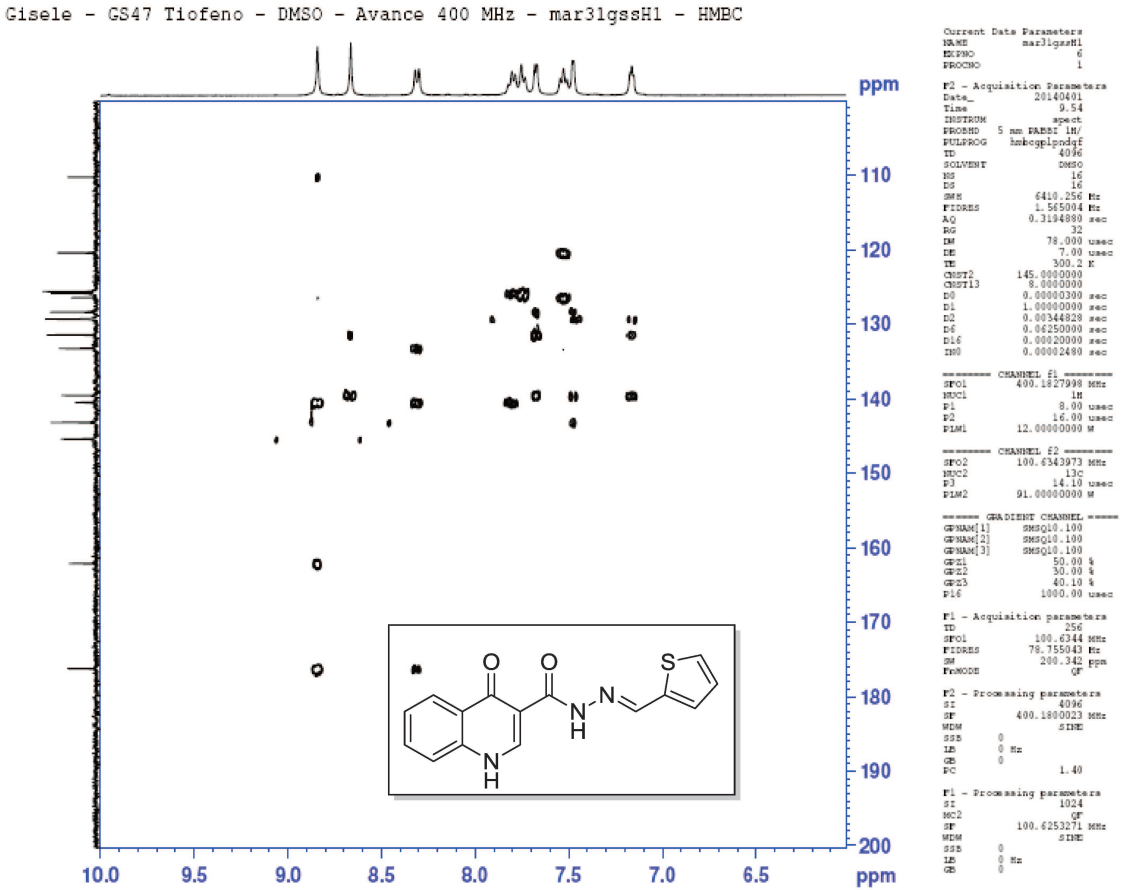


Figura 152. Expansão do espectro de HMBC ^{13}C-^{1}H (400/100 MHz, DMSO-d_6) da acil-hidrazona **17**.

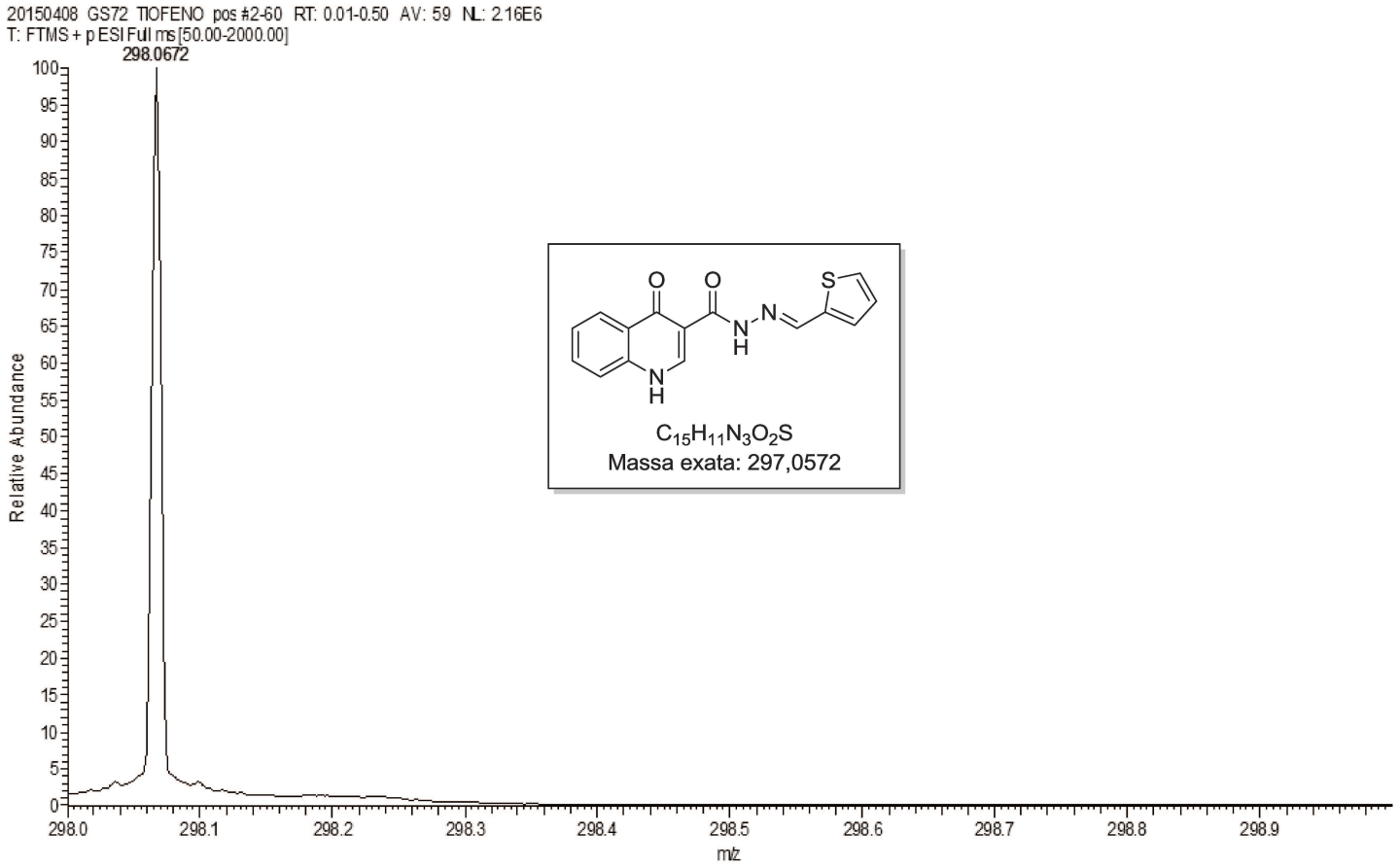


Figura 153. Espectro de massas de alta resolução (TOF-MS-ES+) da acil-hidrazona **17**.

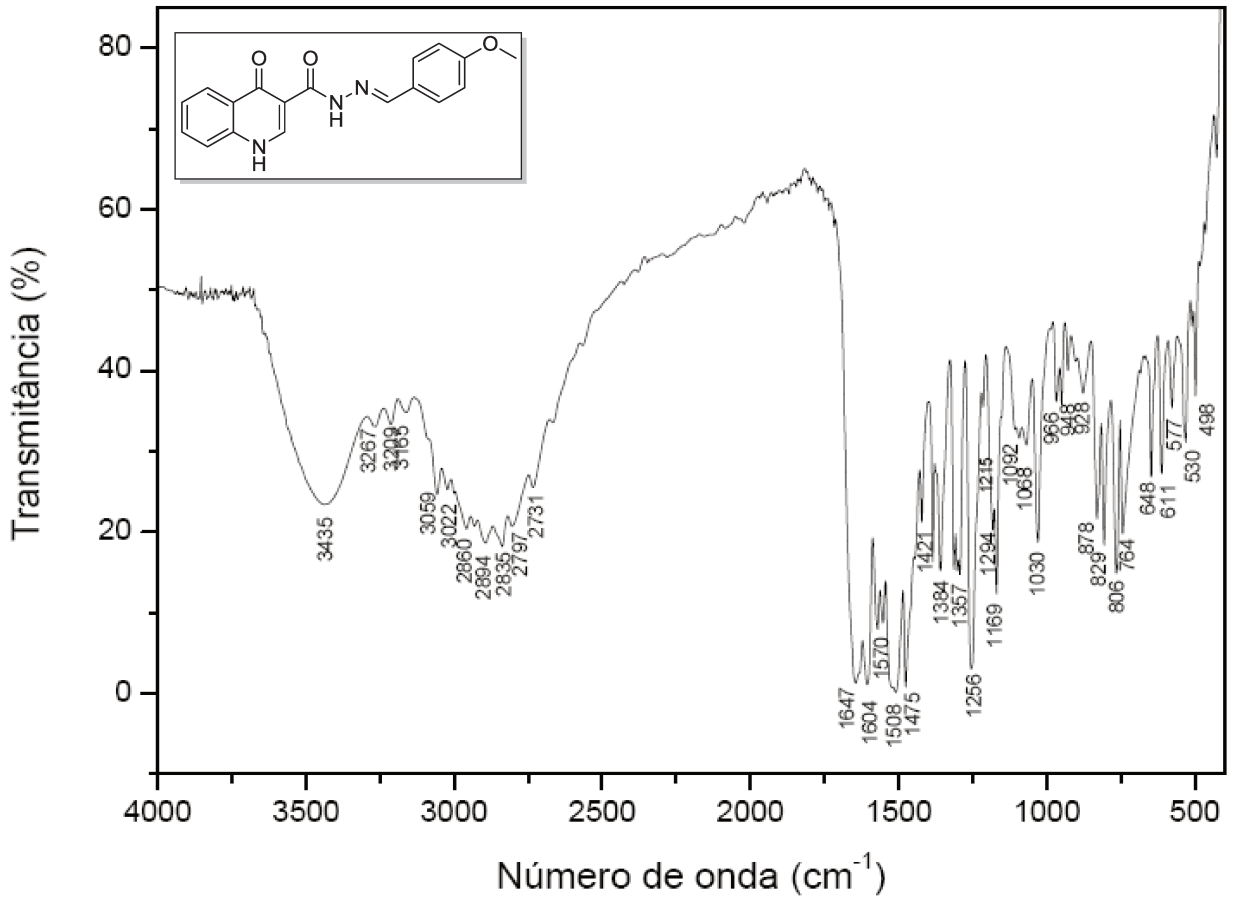


Figura 154. Espectro de IV da acil-hidrazona **18**.

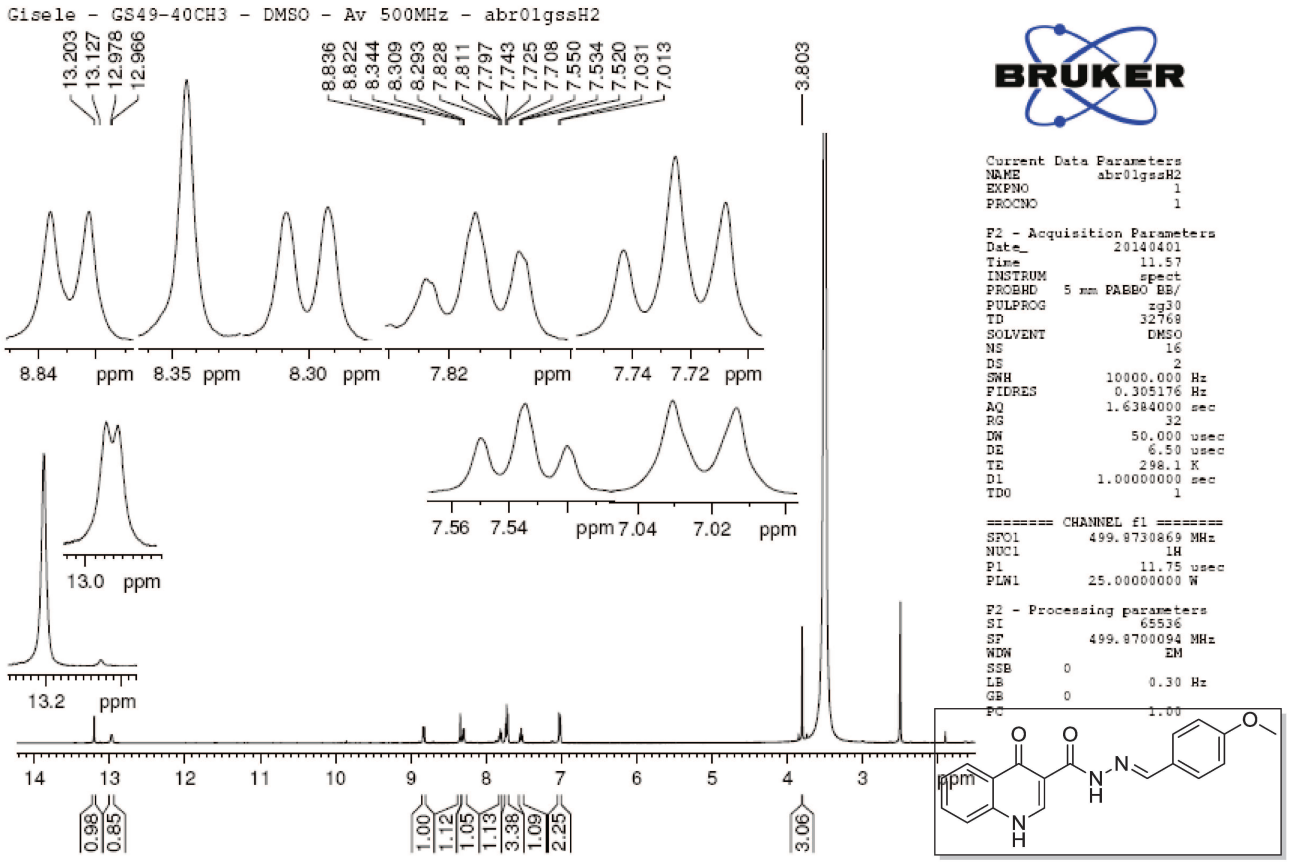


Figura 155. Espectro de RMN ^{1}H (500 MHz, DMSO-d_6) da acil-hidrazona **18**.

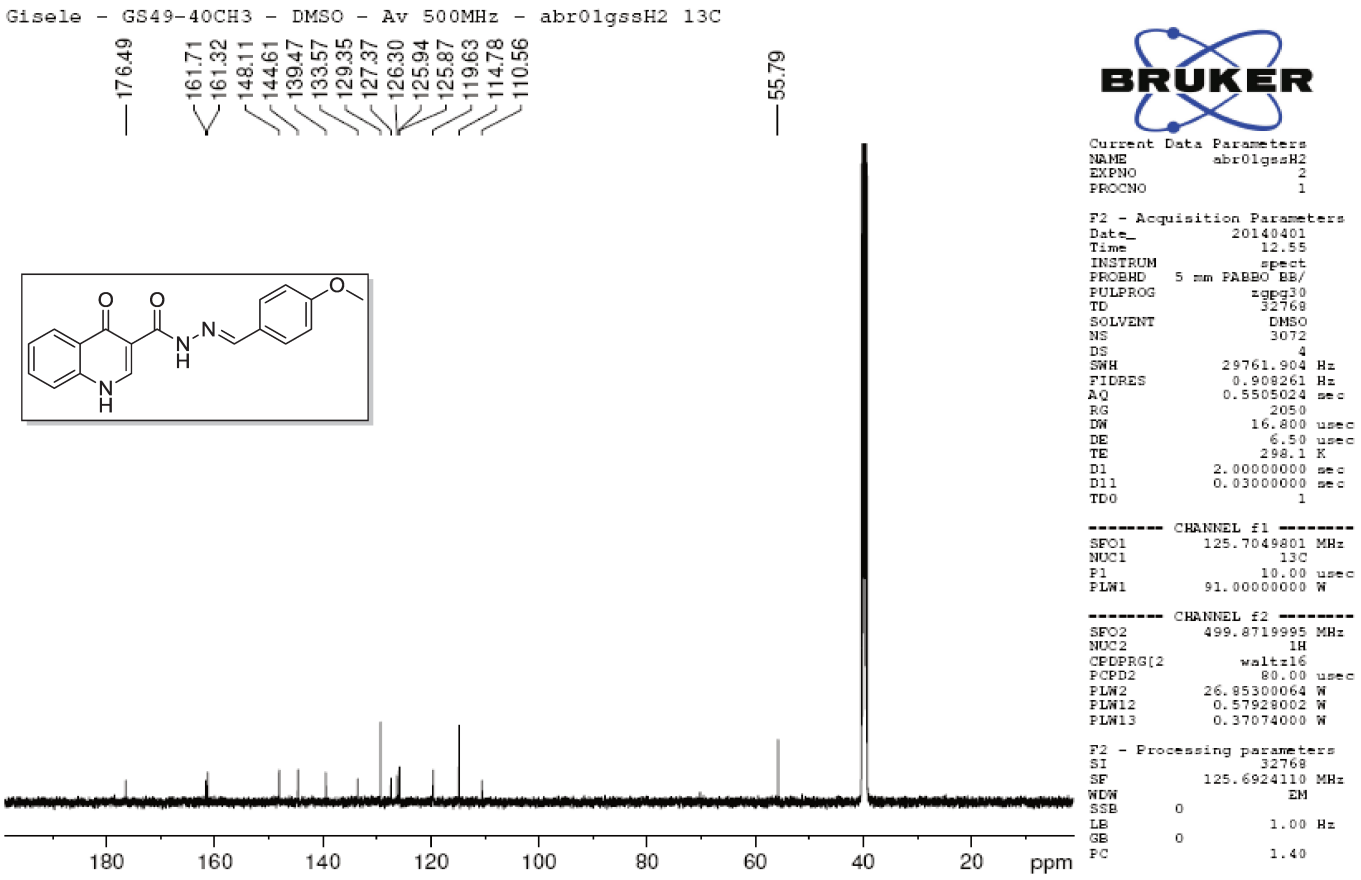


Figura 156. Espectro de RMN ^{13}C (125 MHz, DMSO-d_6) da acil-hidrazona **18**.

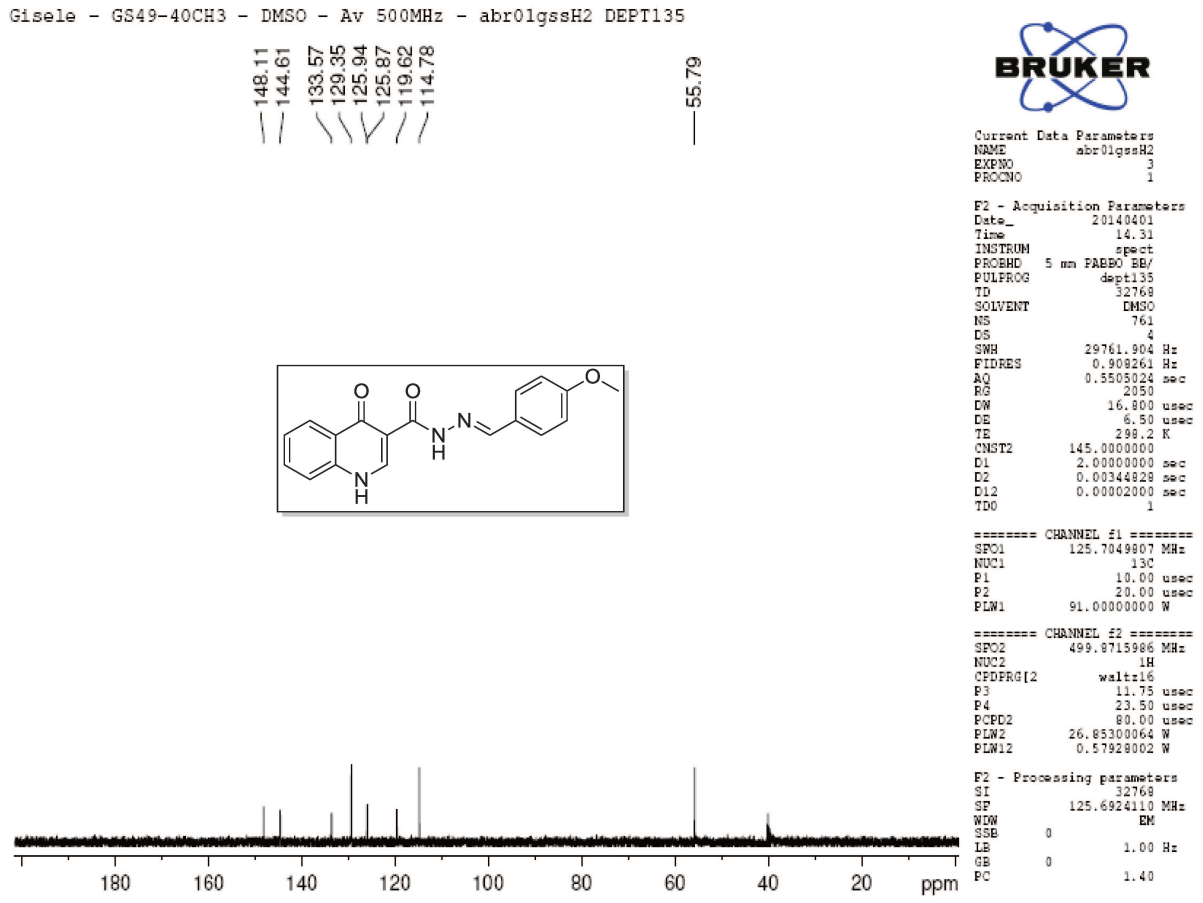


Figura 157. Espectro de RMN ^{13}C DEPT-135 (125 MHz, DMSO-d_6) da acil-hidrazona **18**.

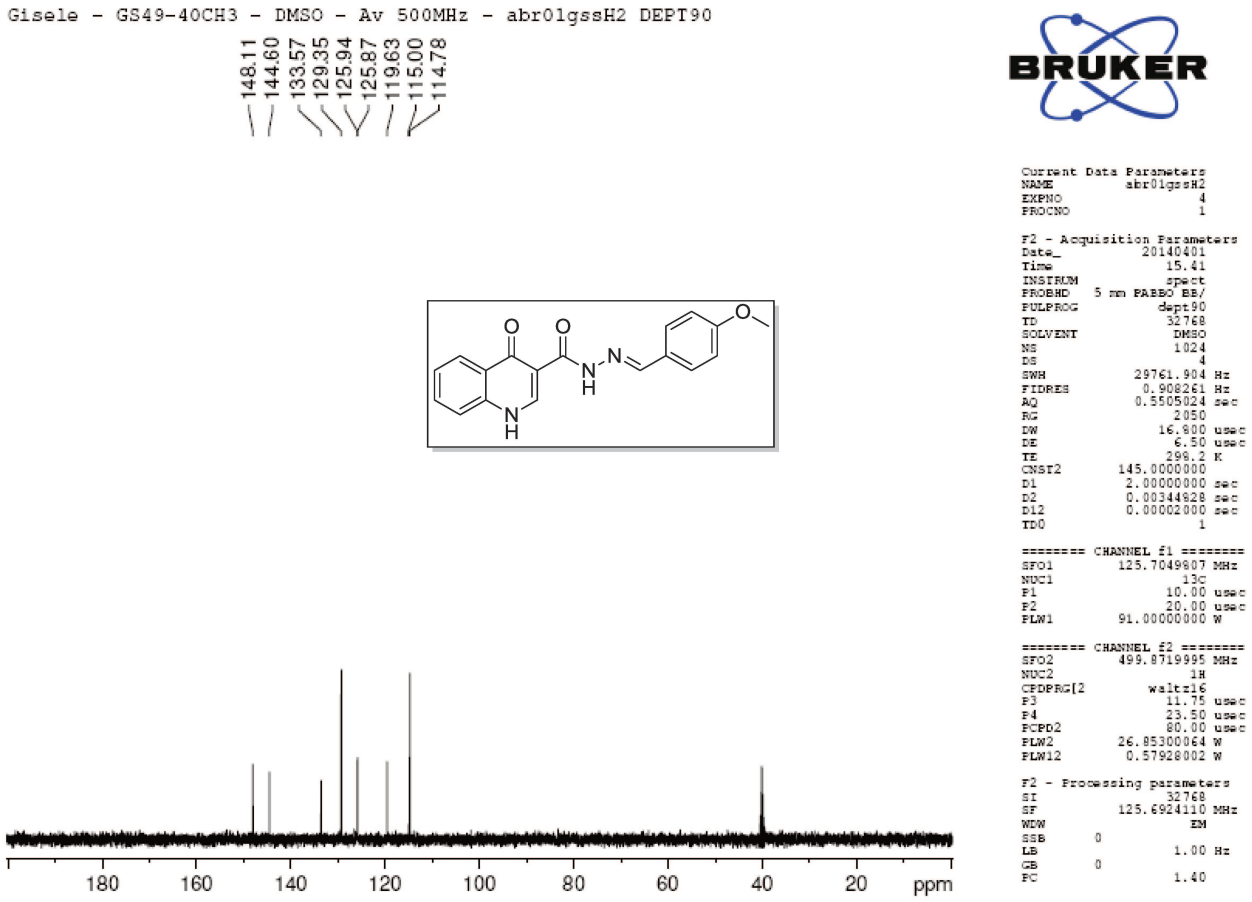


Figura 158. Espectro de RMN ^{13}C DEPT-90 (125 MHz, DMSO-d_6) da acil-hidrazona **18**.

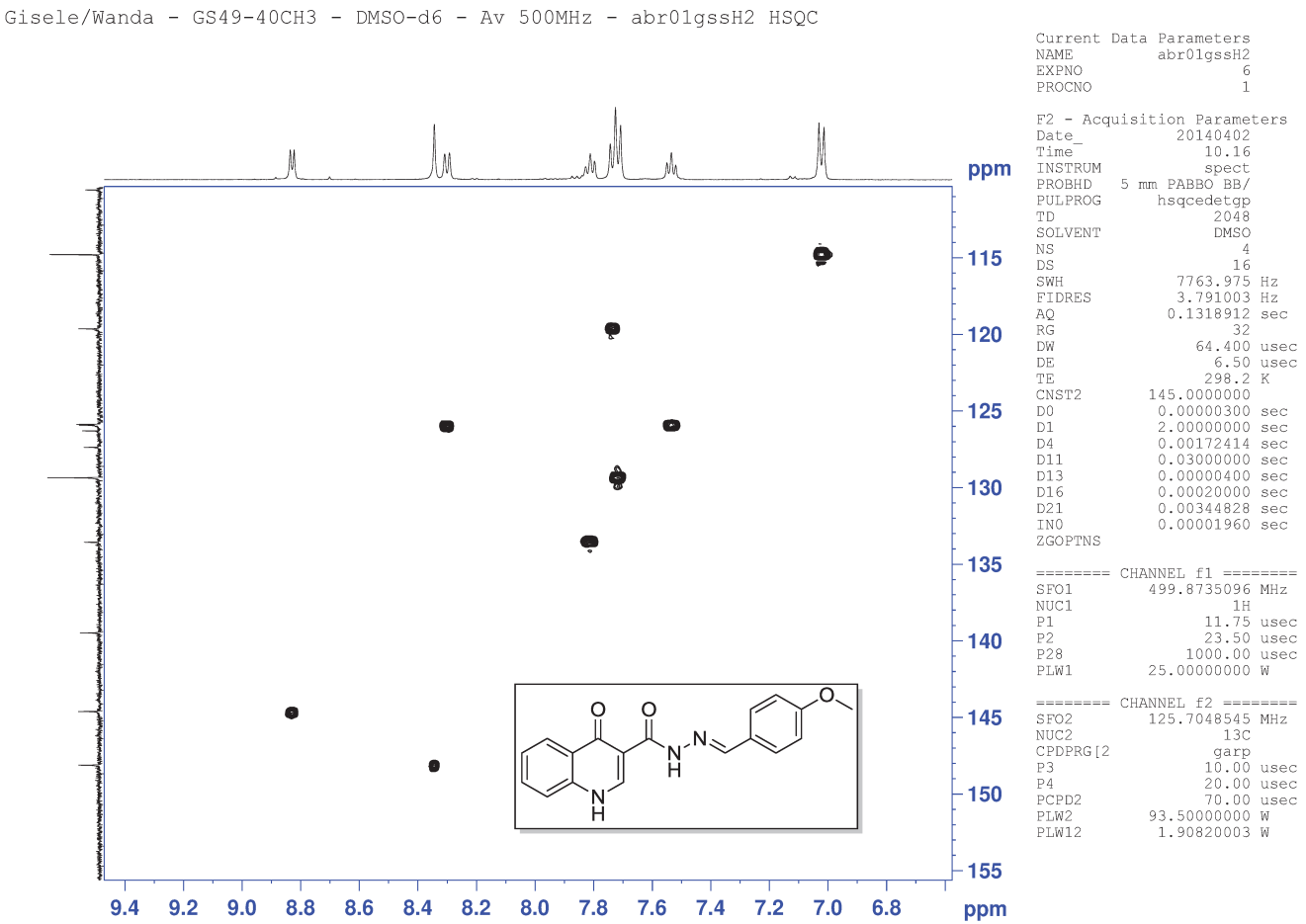


Figura 159. Espectro de HSQC ^{13}C-^{1}H (500/125 MHz, DMSO-d_6) da acil-hidrazona **18**.

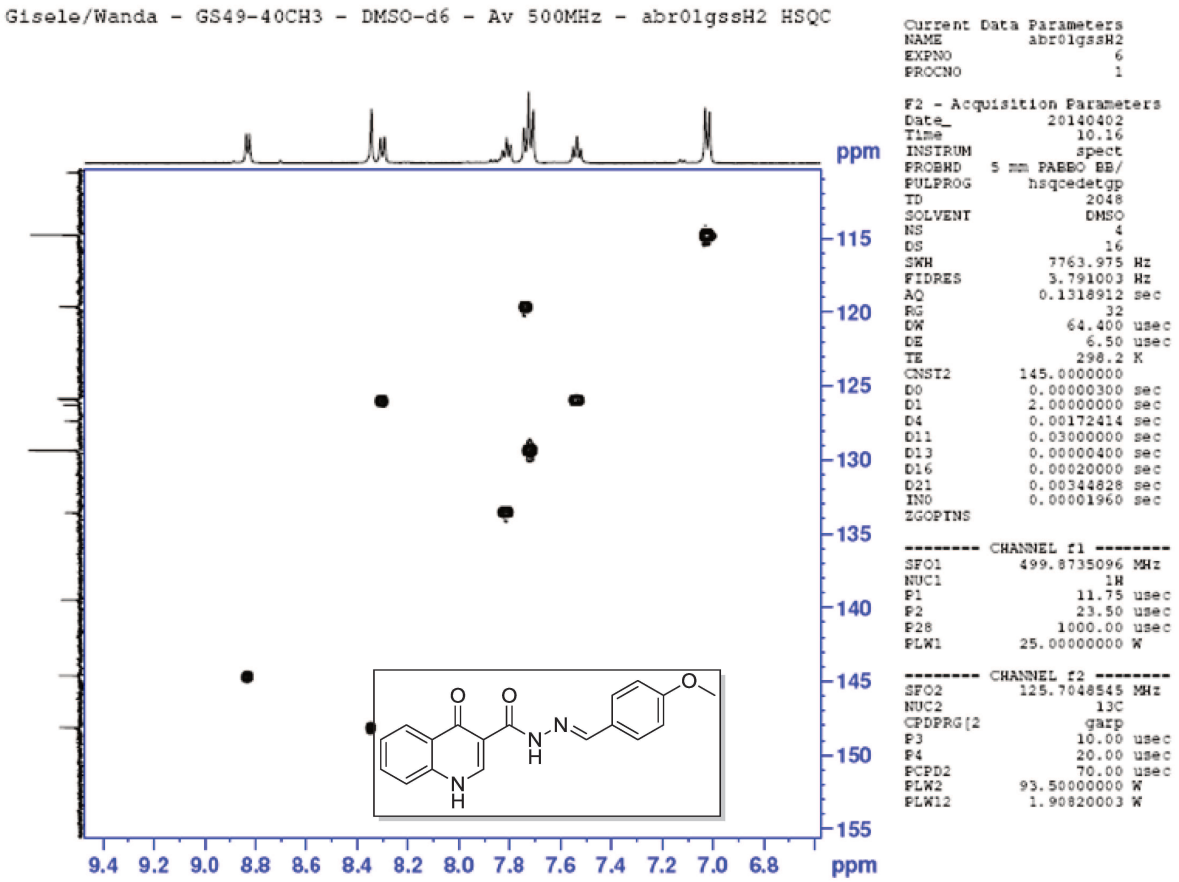


Figura 160. Expansão do espectro de HSQC ^{13}C-^{1}H (500/125 MHz, DMSO-d_6) da acil-hidrazona **18**.

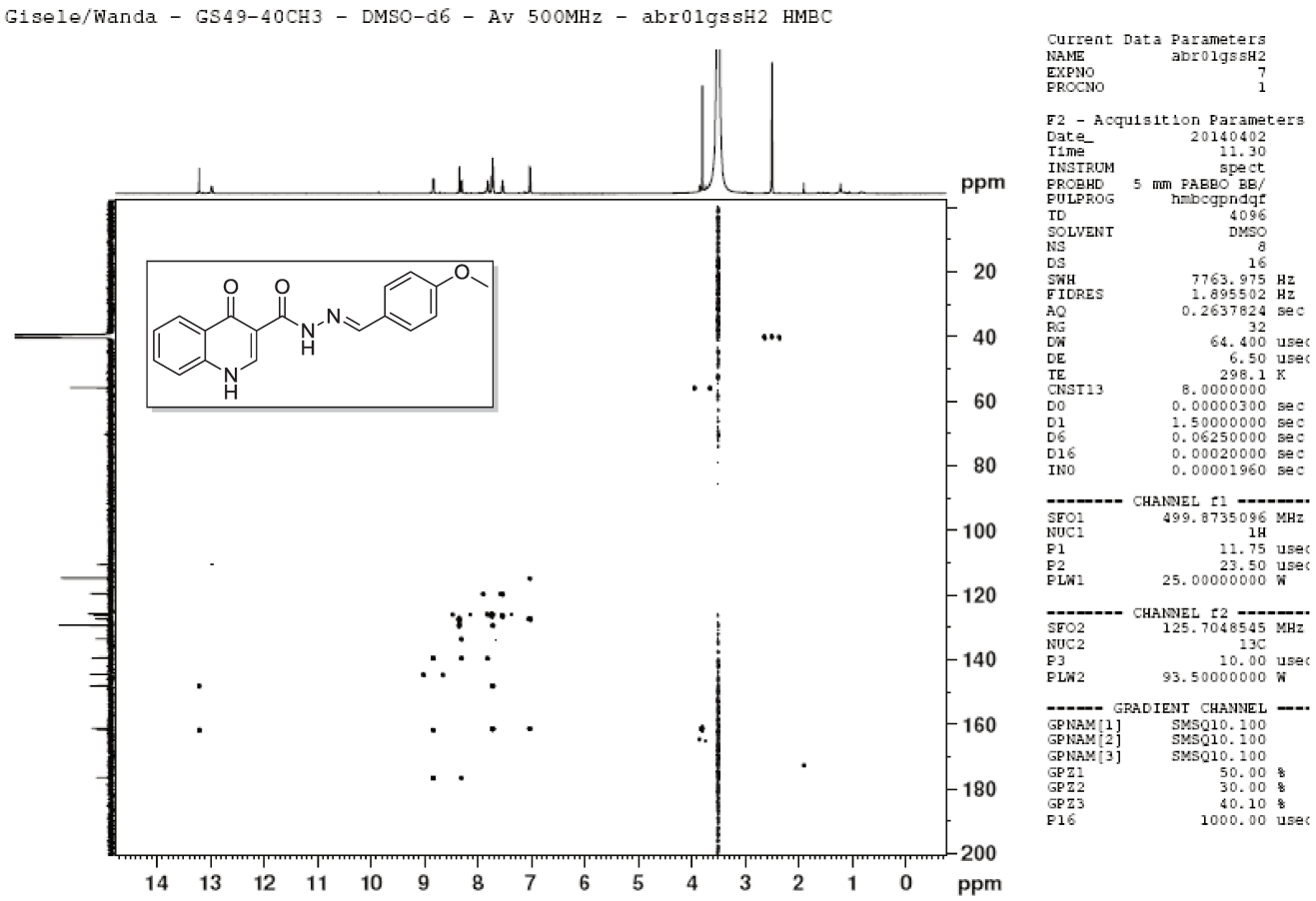


Figura 161. Espectro de HMBC ^{13}C-^{1}H (500/125 MHz, DMSO-d_6) da acil-hidrazona **18**.

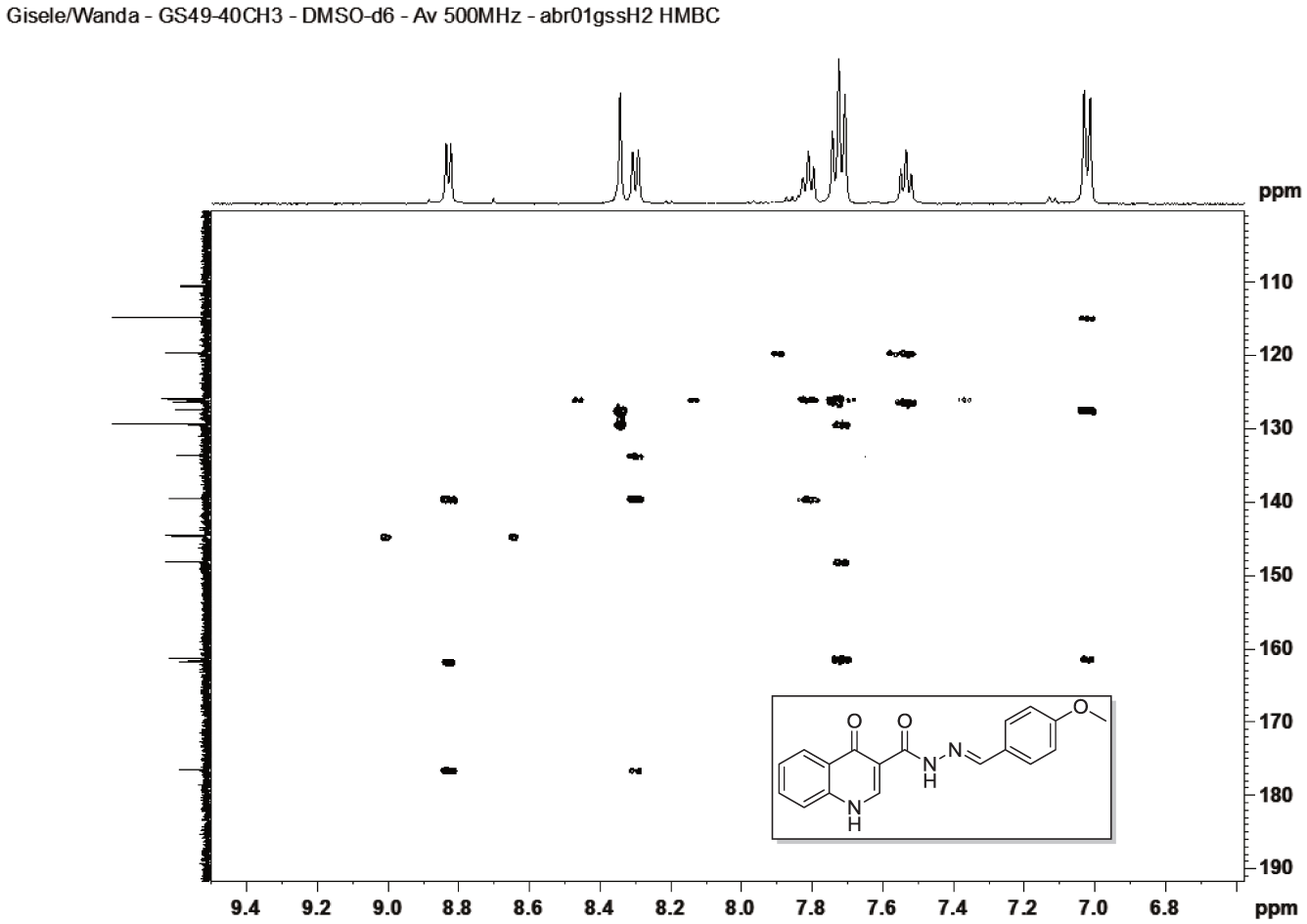


Figura 162. Expansão do espectro de HMBC ^{13}C-^{1}H (500/125 MHz, DMSO-d_6) da acil-hidrazona **18**.

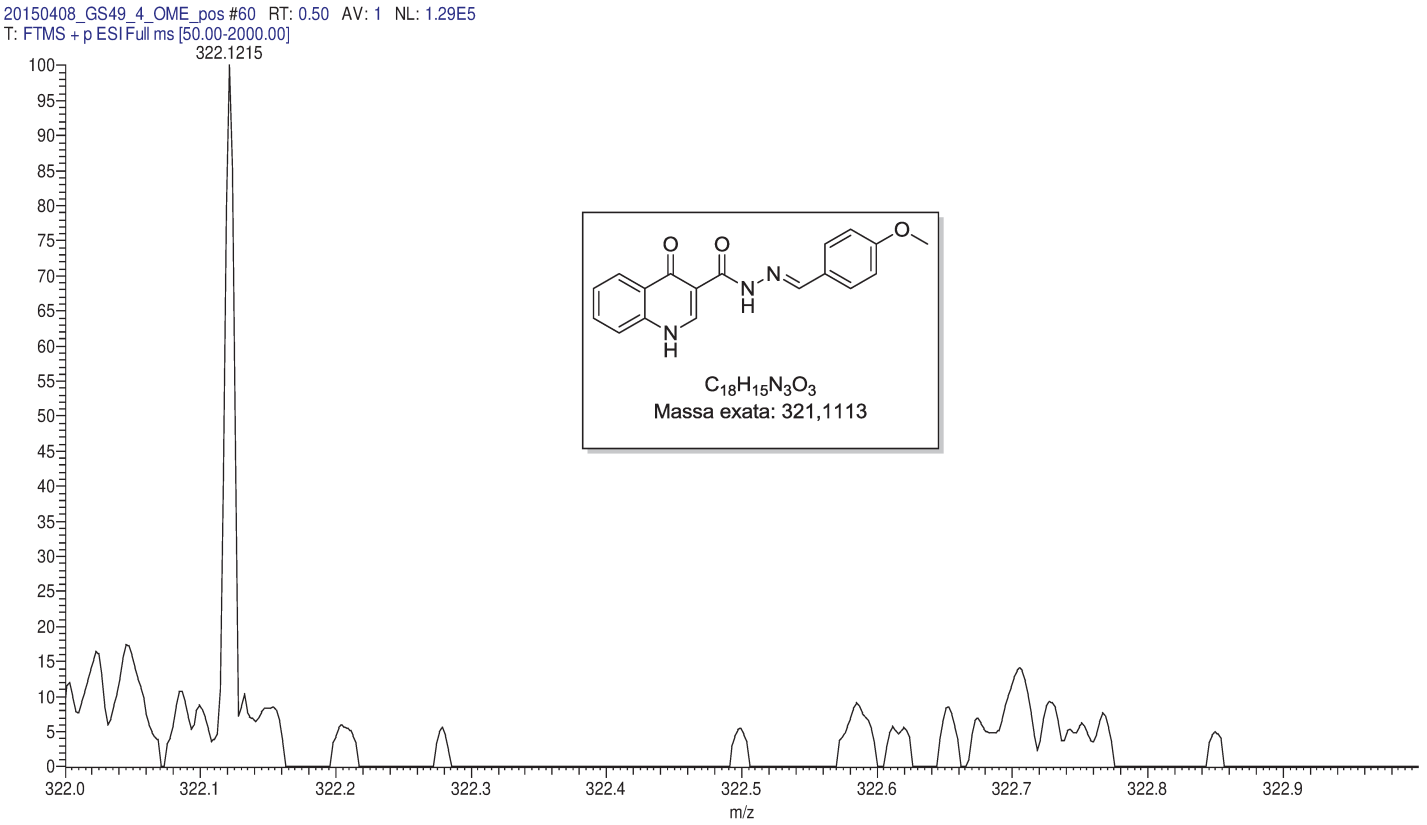


Figura 163. Espectro de massas de alta resolução (TOF-MS-ES+) da acil-hidrazona **18**.

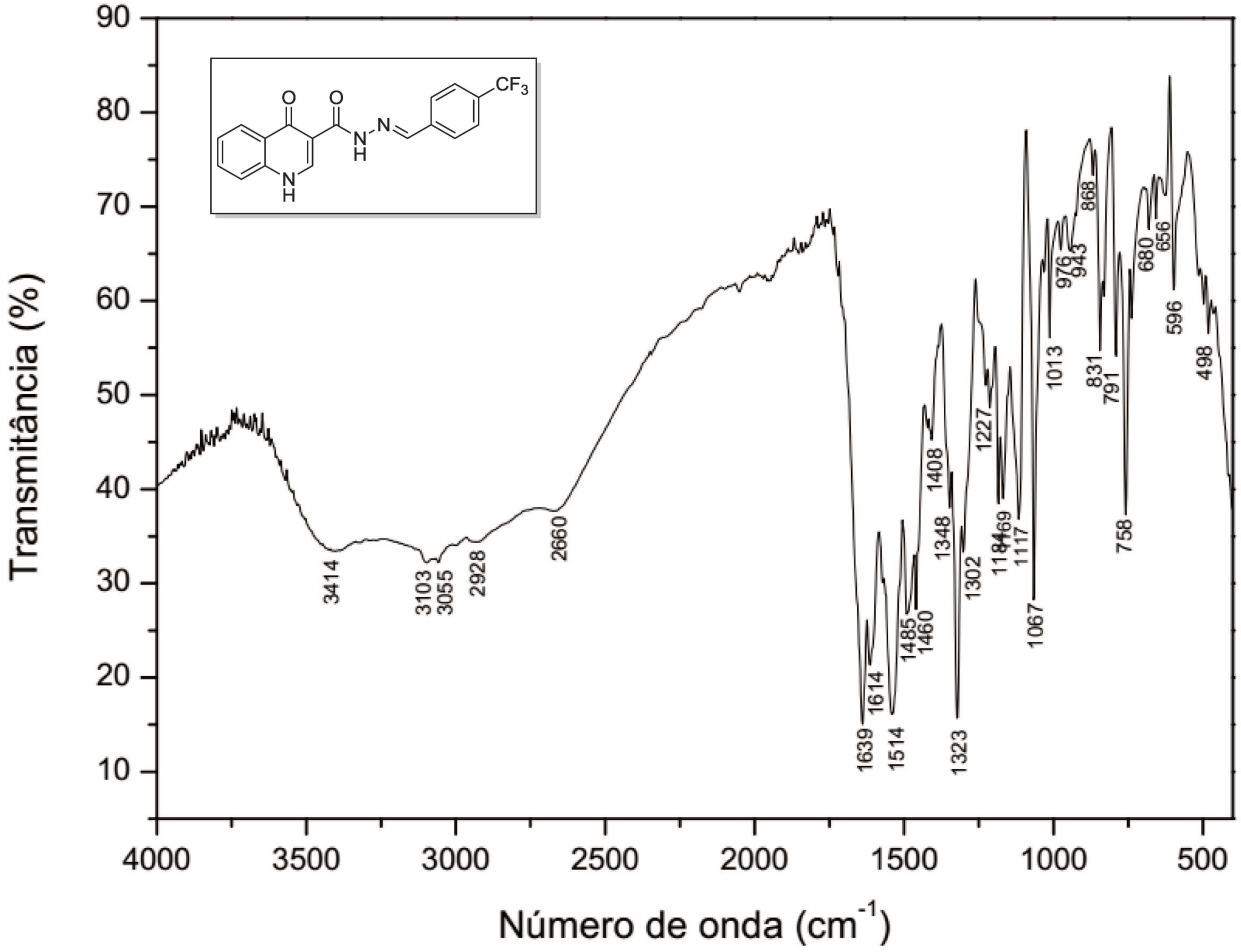


Figura 164. Espectro de IV da acil-hidrazona **19**.

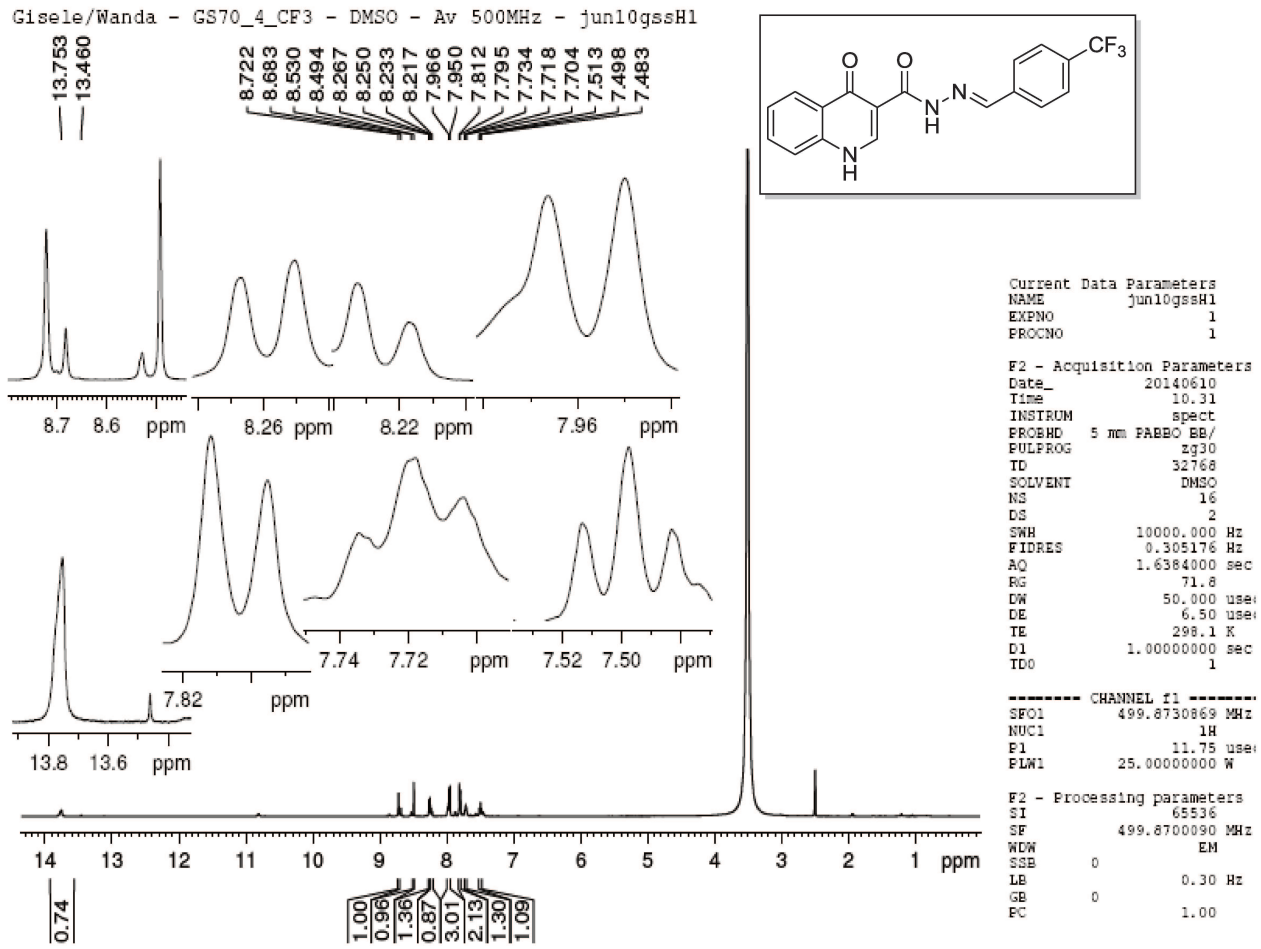


Figura 165. Espectro de RMN ^{1}H (500 MHz, DMSO-d_6) da acil-hidrazona **19**.

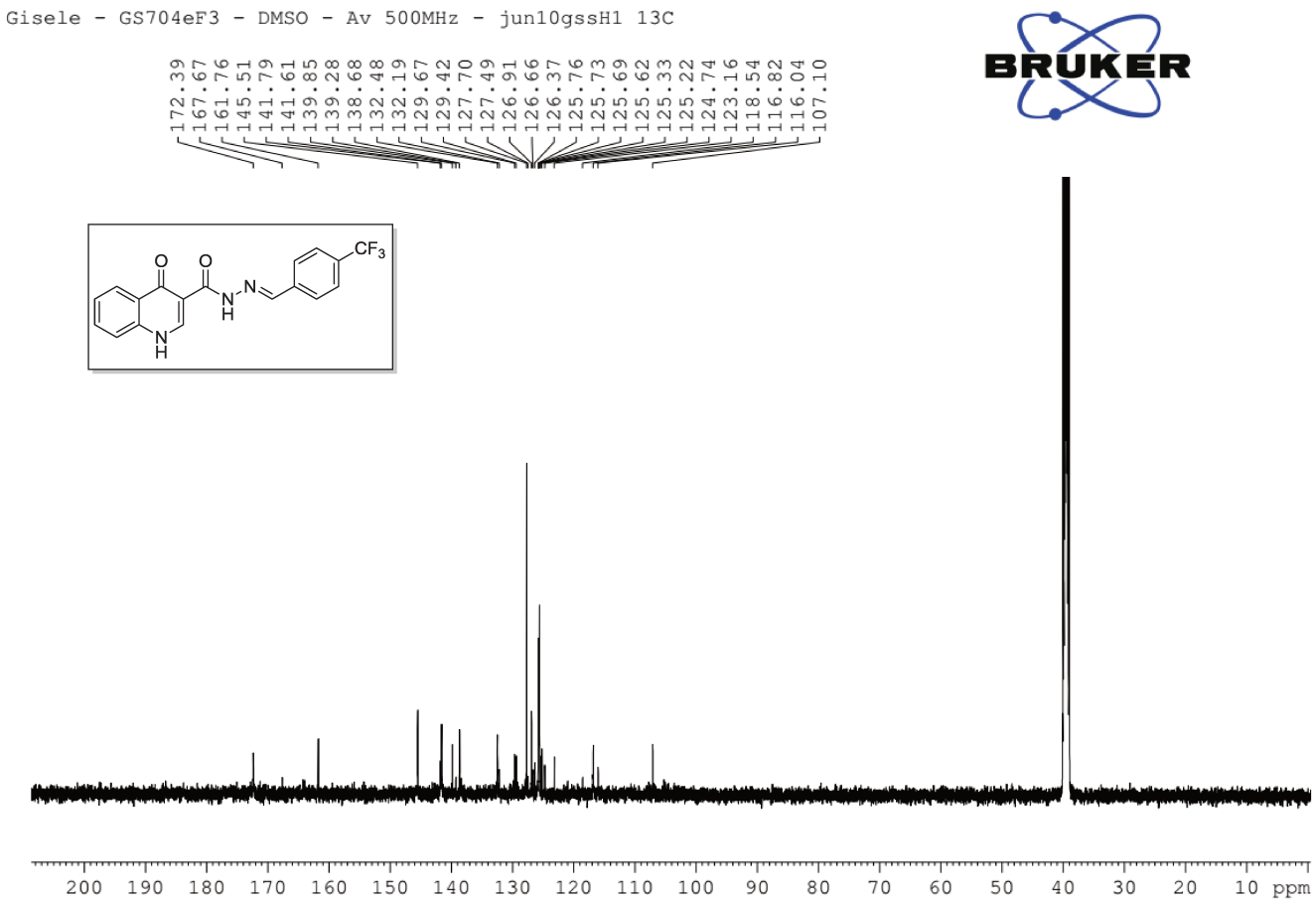


Figura 166. Espectro de RMN ^{13}C (500 MHz, DMSO-d_6) da acil-hidrazona **19**.

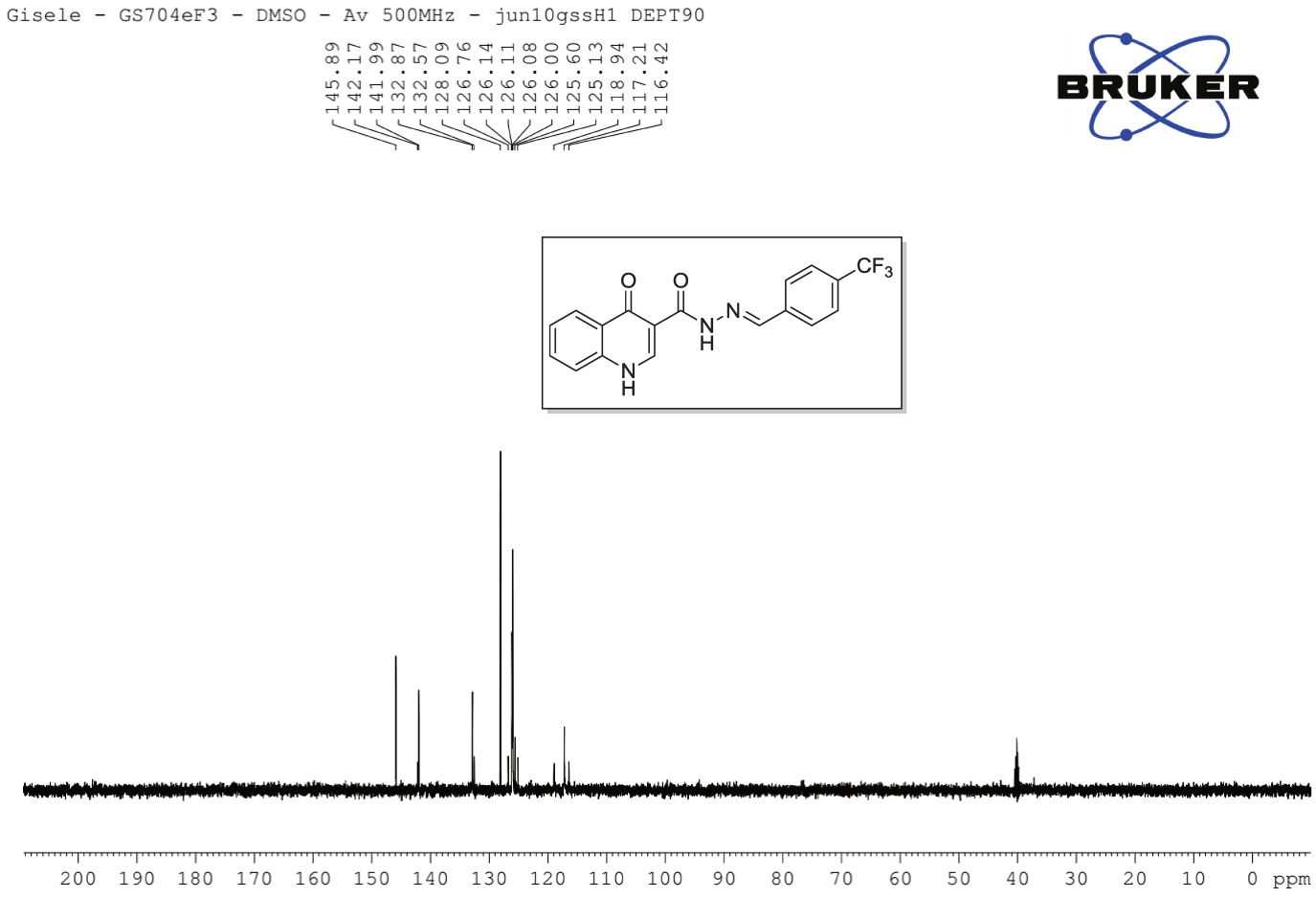


Figura 167. Espectro de RMN ^{13}C DEPT-90 (125 MHz, DMSO-d_6) da acil-hidrazona **19**.

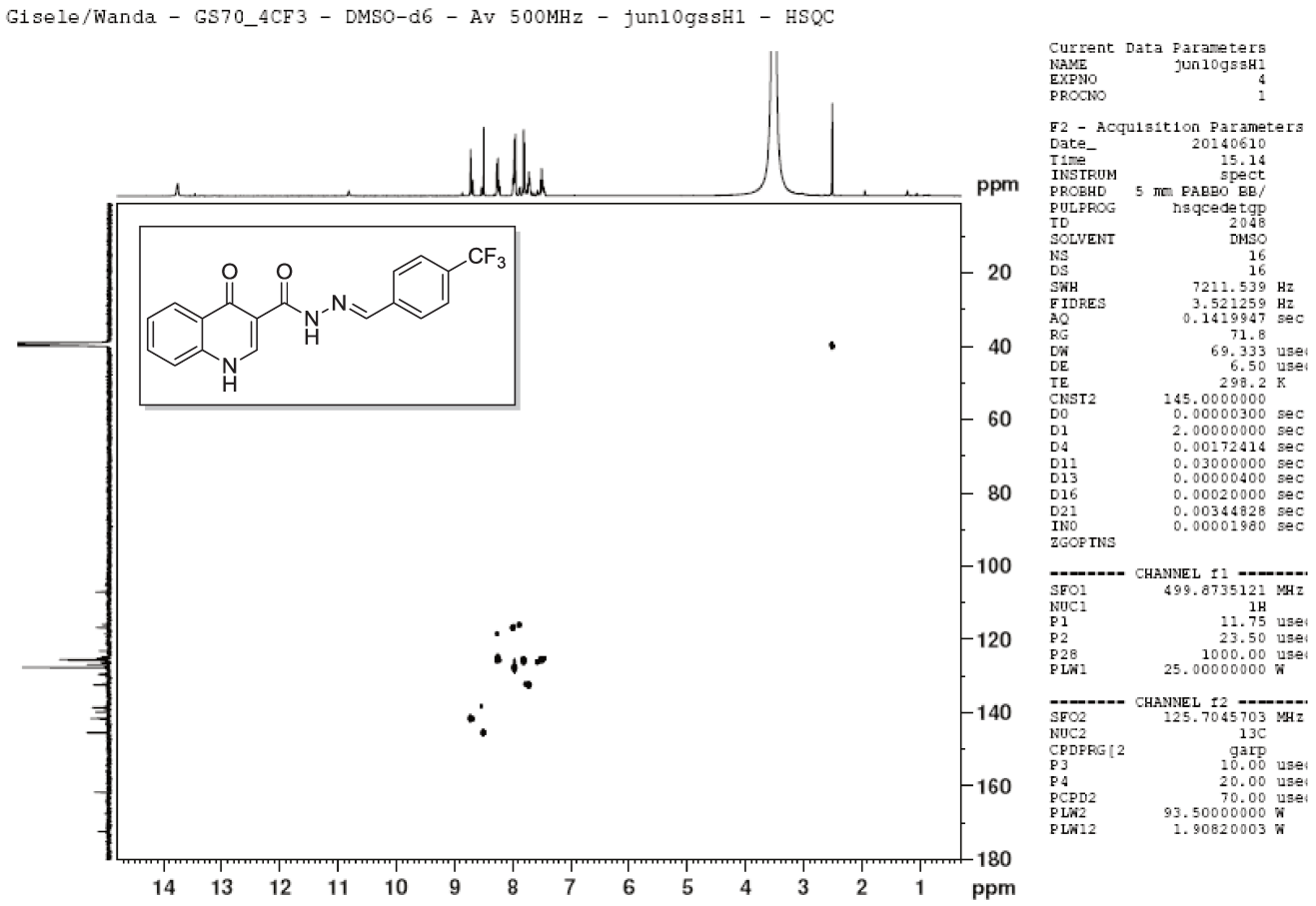


Figura 168. Espectro de HSQC ^{13}C-^{1}H (500/125 MHz, DMSO-d_6) da acil-hidrazona **19**.

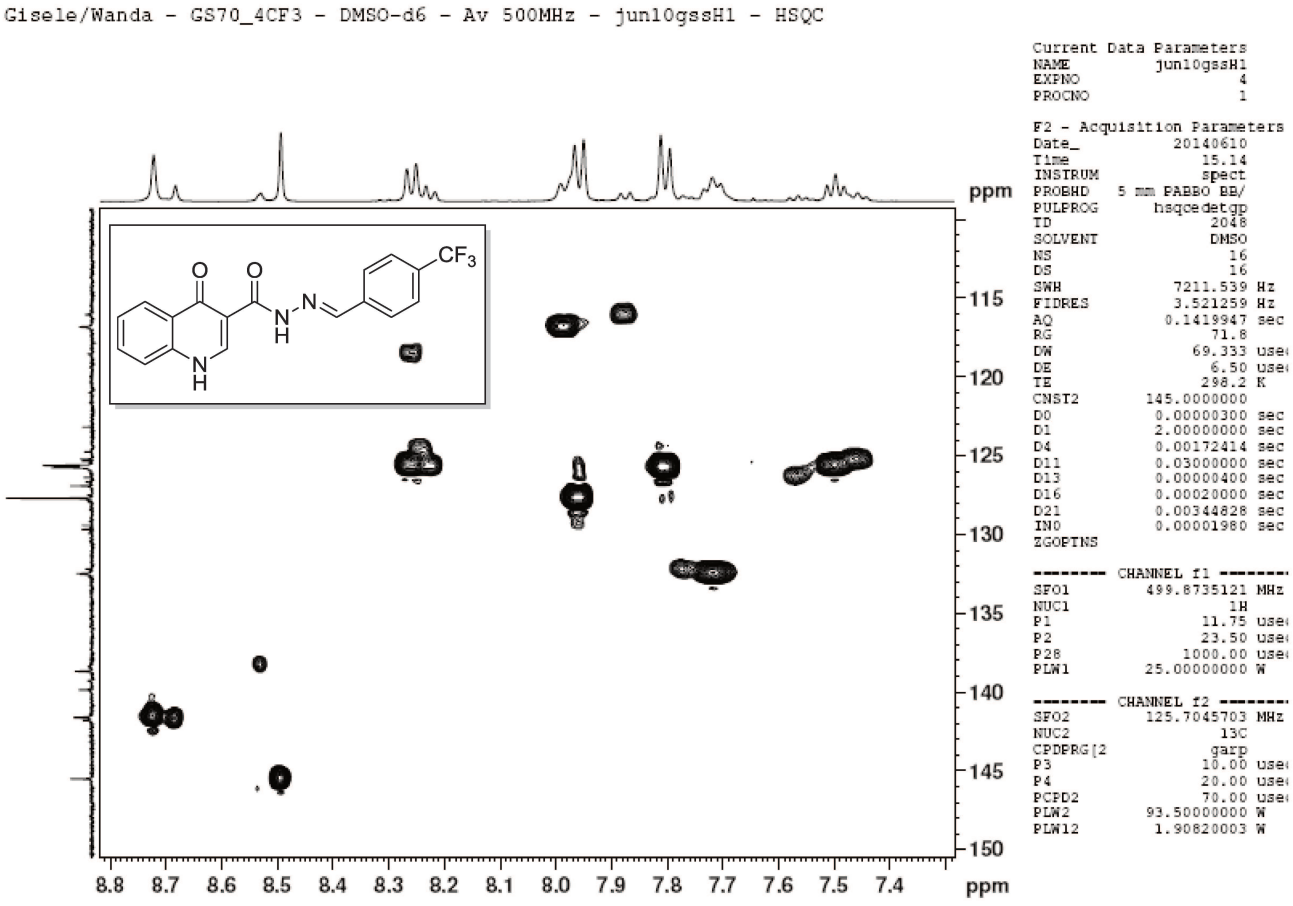


Figura 169. Expansão do espectro de HSQC ^{13}C-^{1}H (600/125 MHz, DMSO-d_6) da acil-hidrazona ***19***.

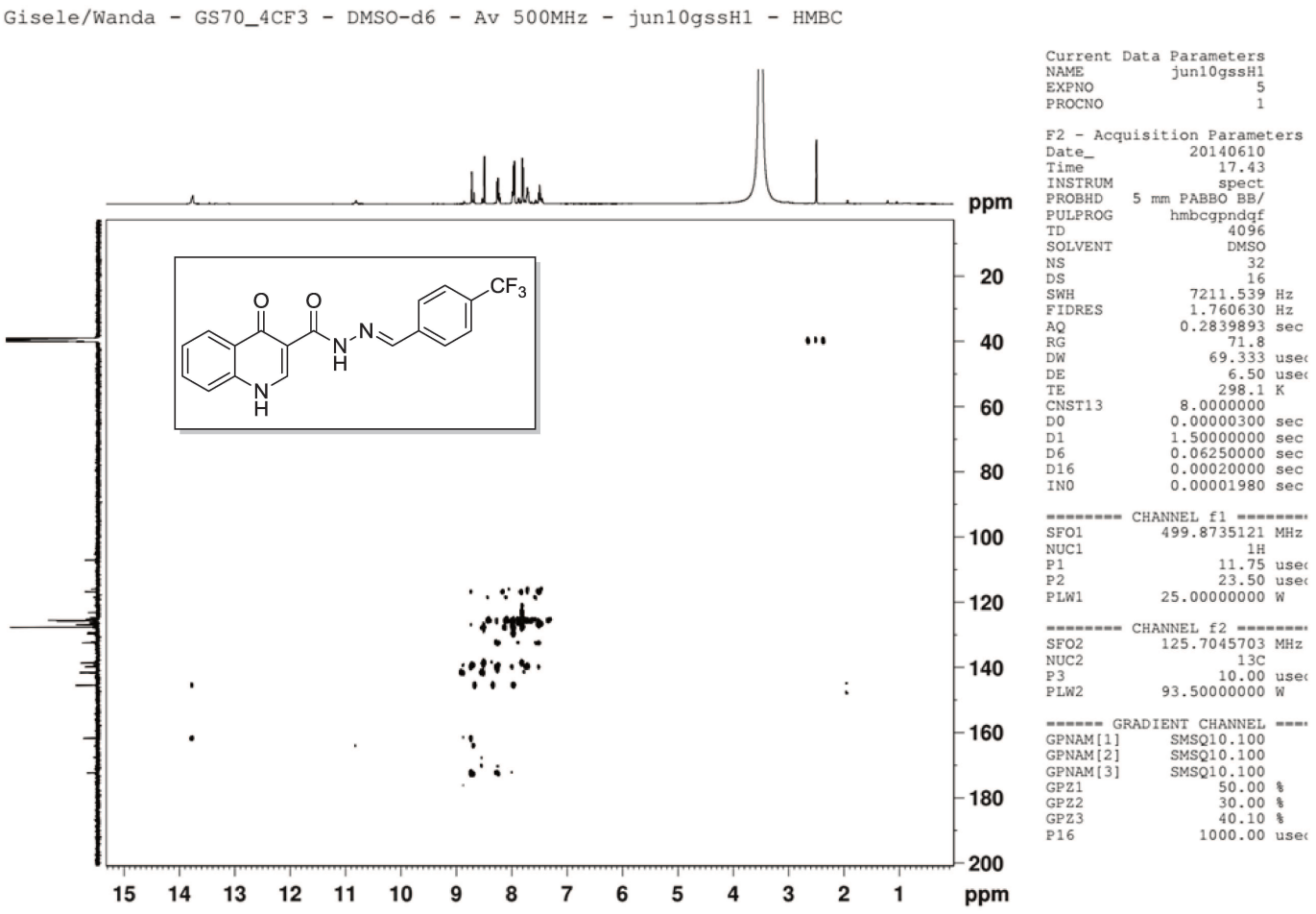


Figura 170. Espectro de HMBC ^{13}C-^{1}H (500/125 MHz, DMSO-d_6) da acil-hidrazona **19**.

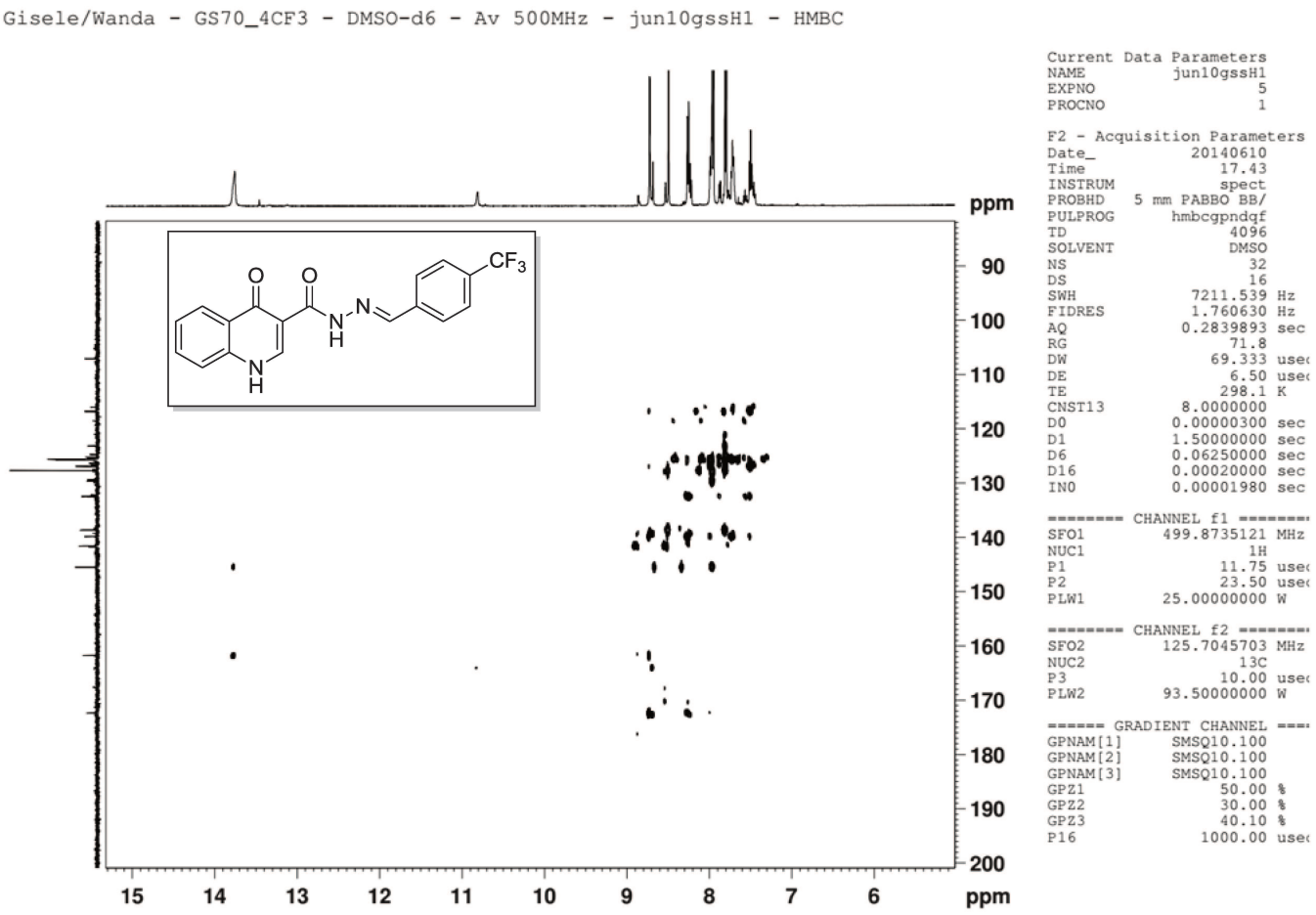


Figura 171. Expansão do espectro de HMBC ^{13}C-^{1}H (500/125 MHz, DMSO-d_6) da acil-hidrazona **19**.

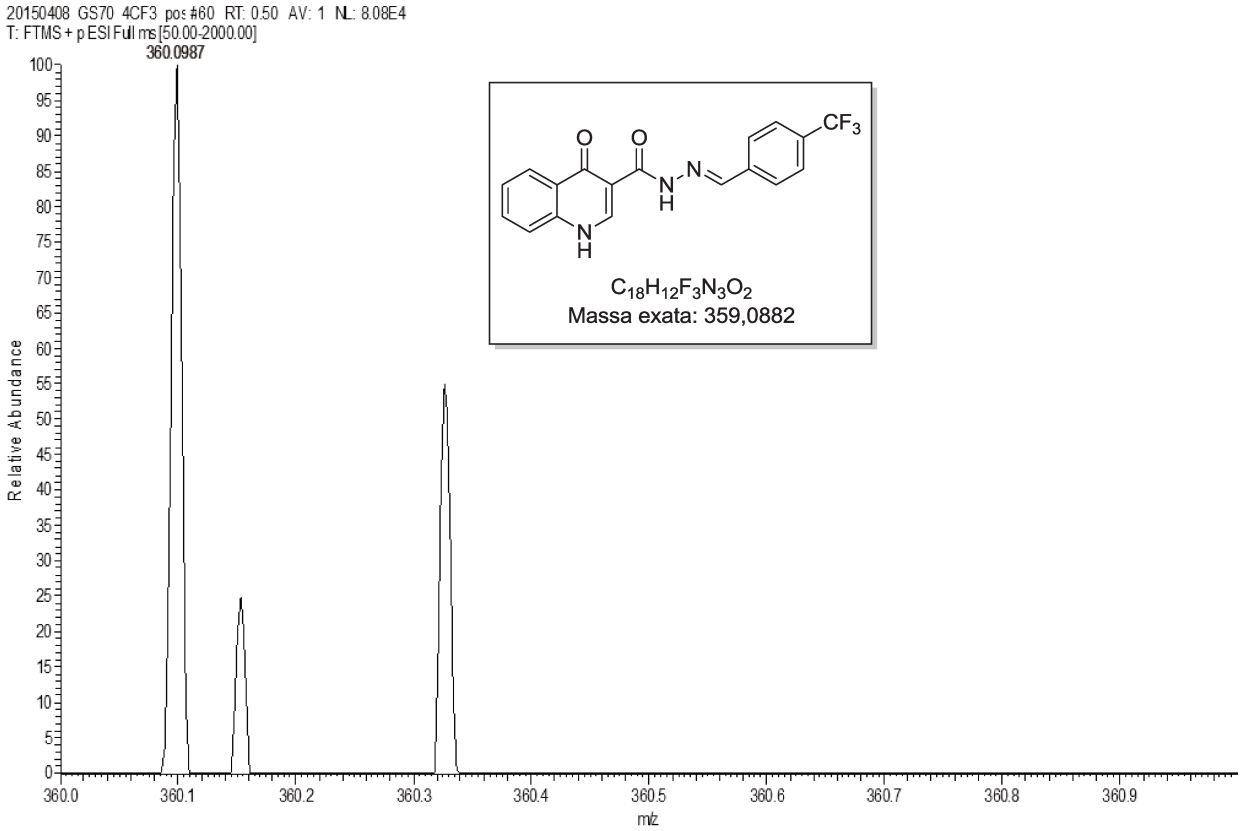


Figura 172. Espectro de massas de alta resolução (TOF-MS-ES+) da acil-hidrazona **19**.

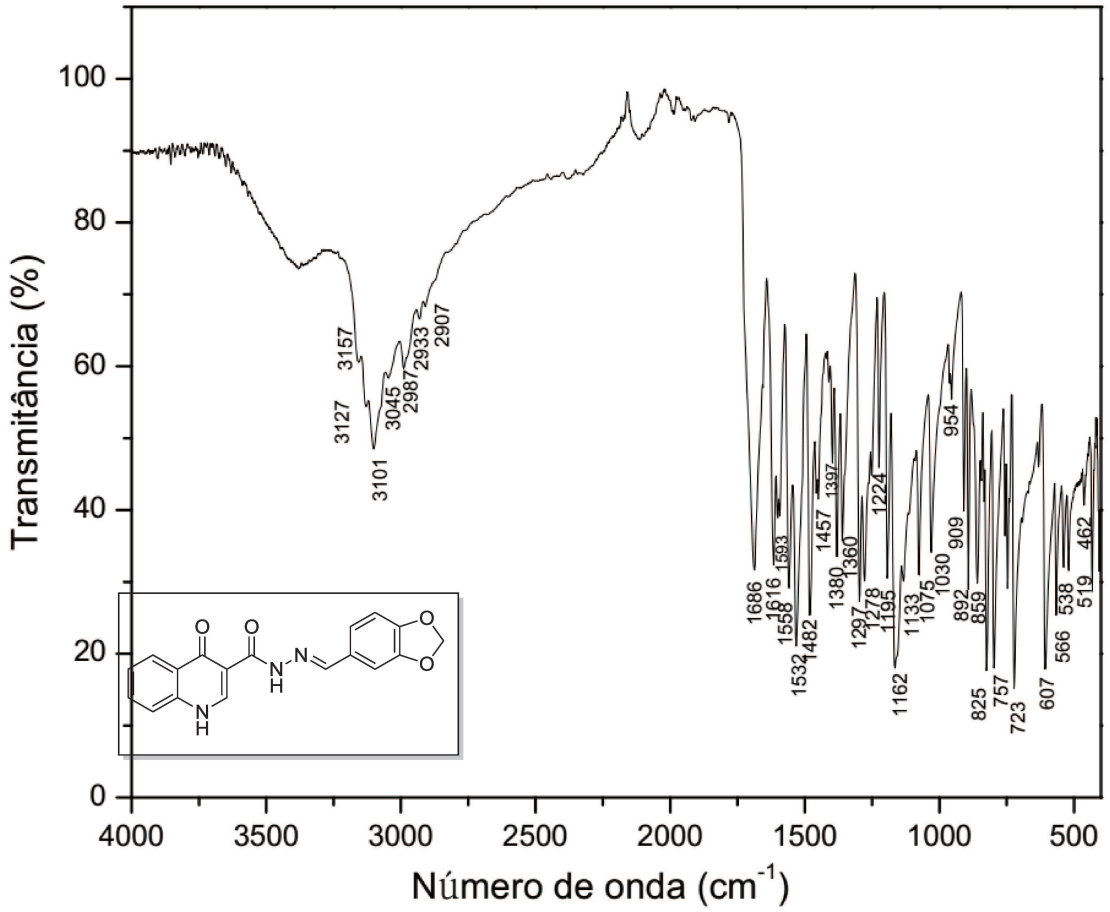


Figura 173. Espectro de IV da acil-hidrazona **20**.

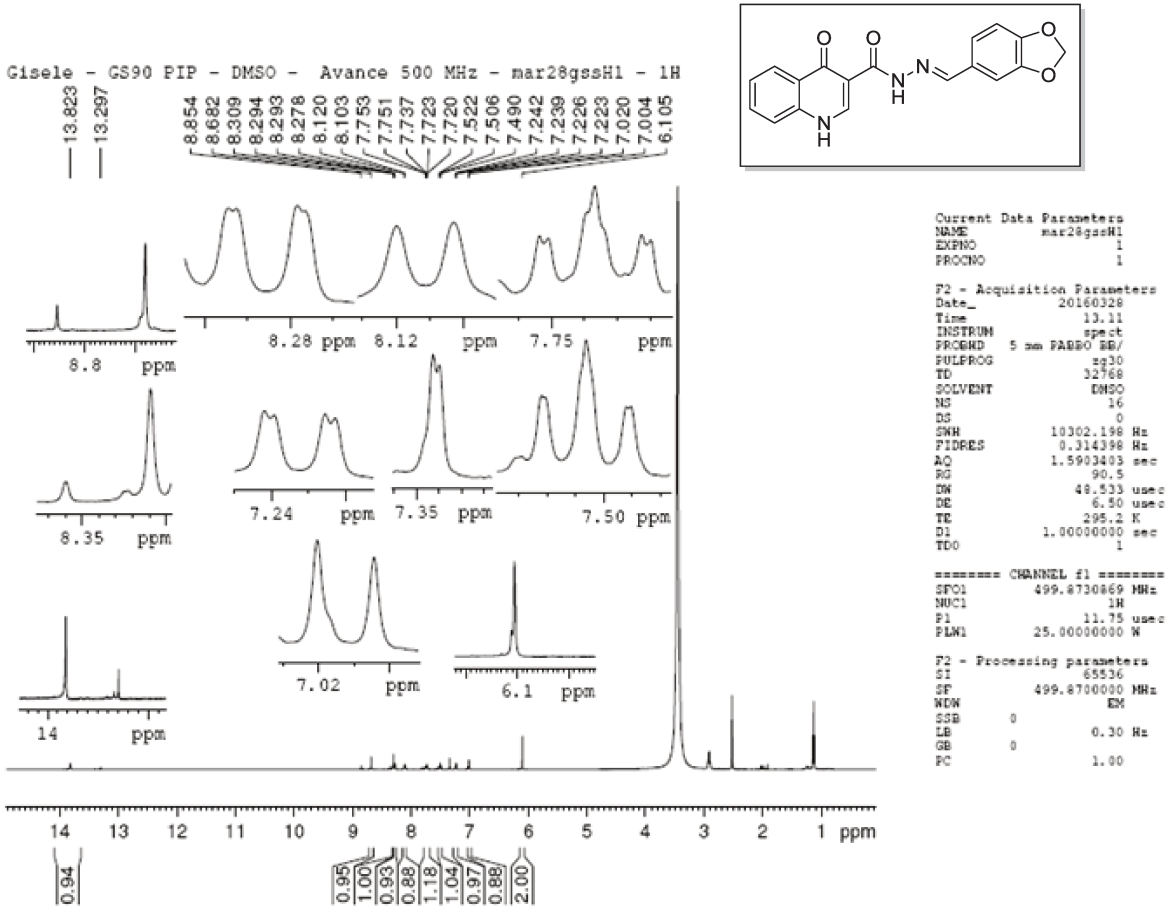


Figura 174. Espectro de RMN ^{1}H (500 MHz, DMSO-d_6) da acil-hidrazona **20**.

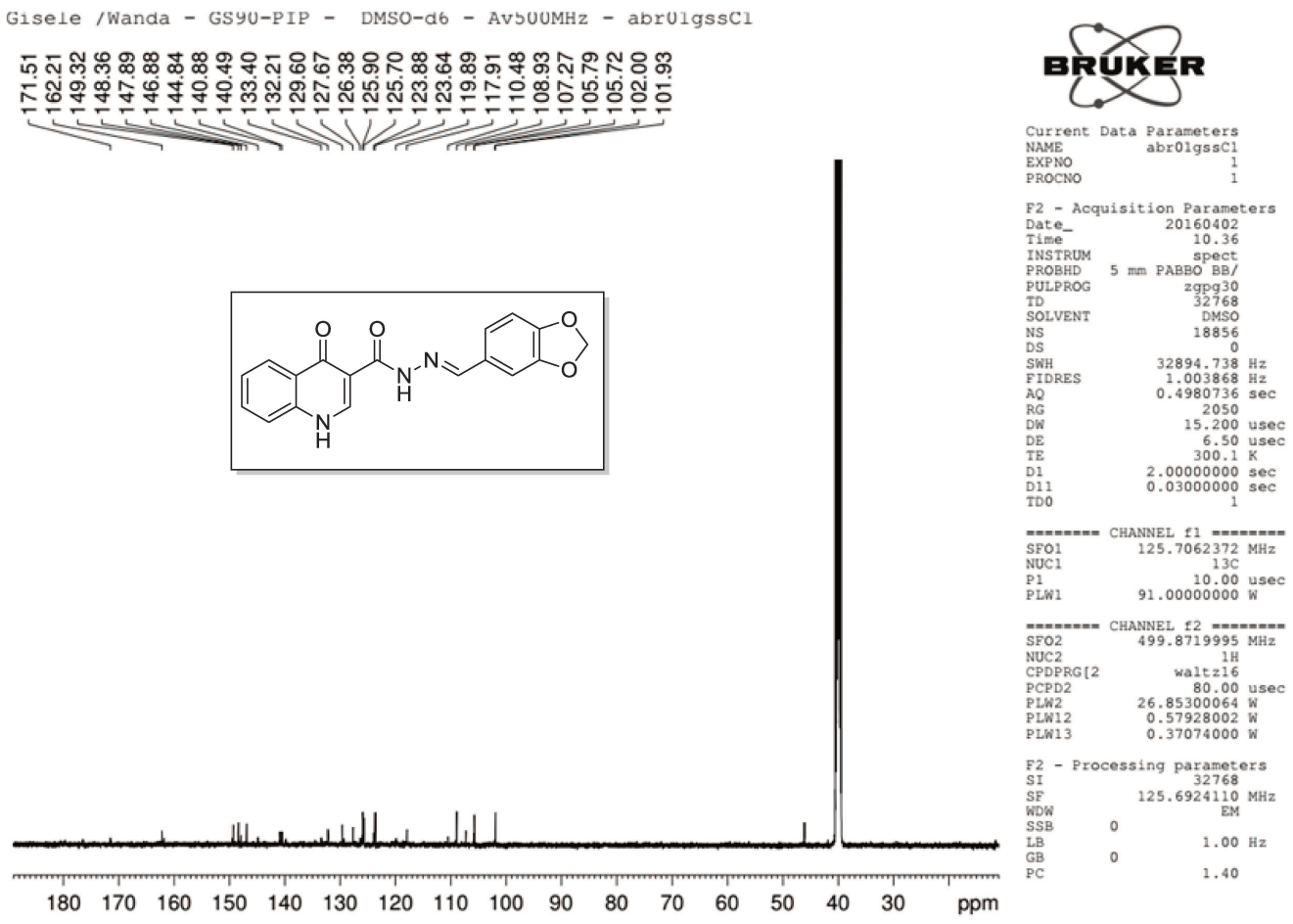


Figura 175. Espectro de RMN ^{13}C (125 MHz, DMSO-d_6) da acil-hidrazona **20**.

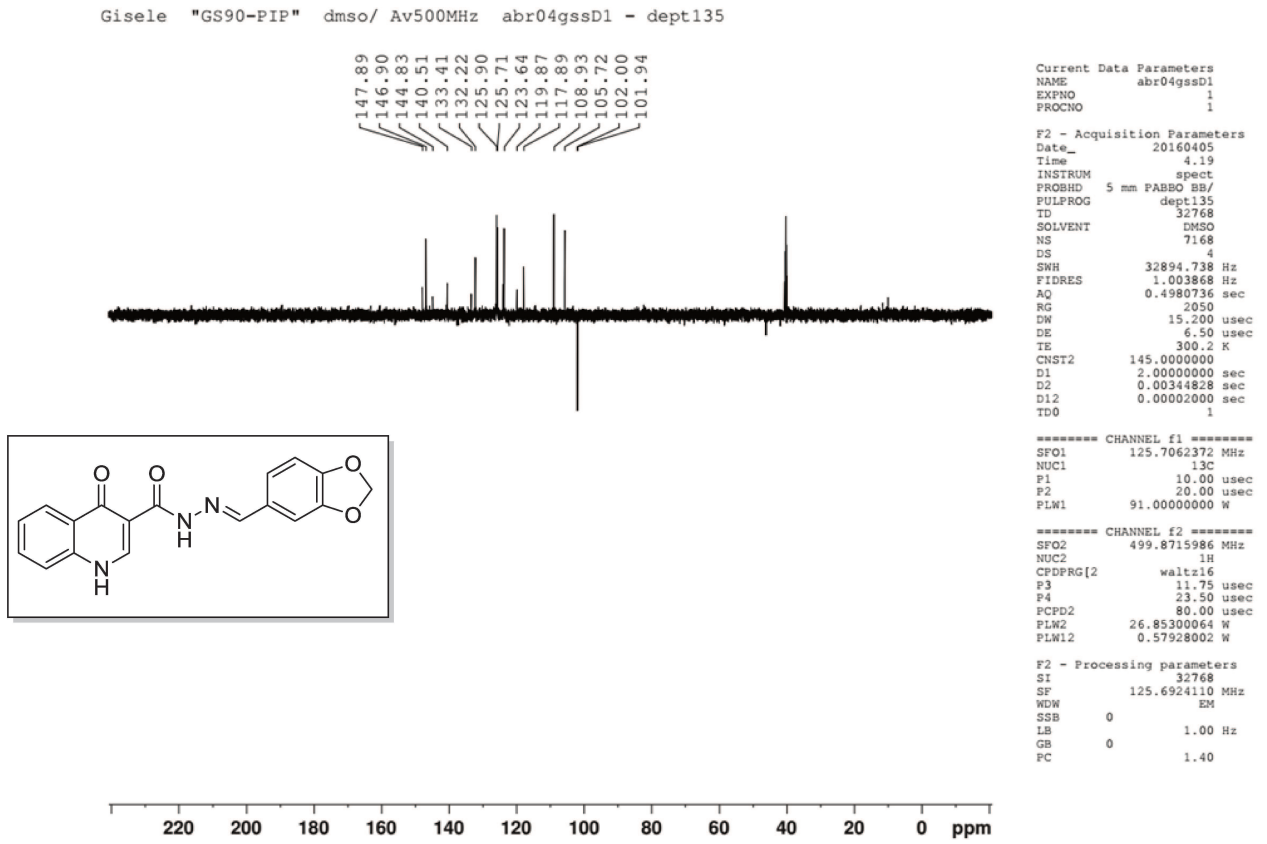


Figura 176. Espectro de RMN ^{13}C DEPT-135 (125 MHz, DMSO-d_6) da acil-hidrazona **20**.

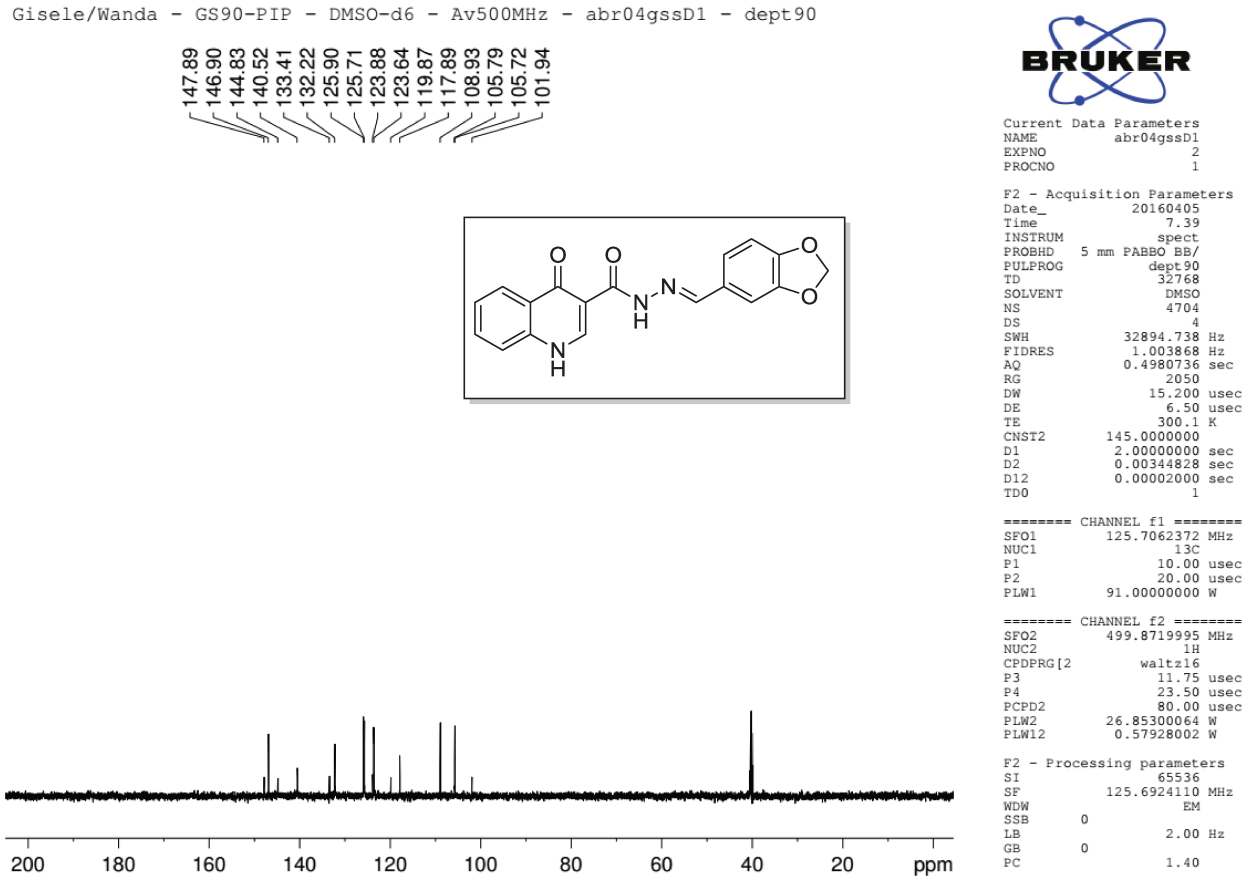


Figura 177. Espectro de RMN ^{13}C DEPT-90 (125 MHz, DMSO-d_6) da acil-hidrazona **20**.

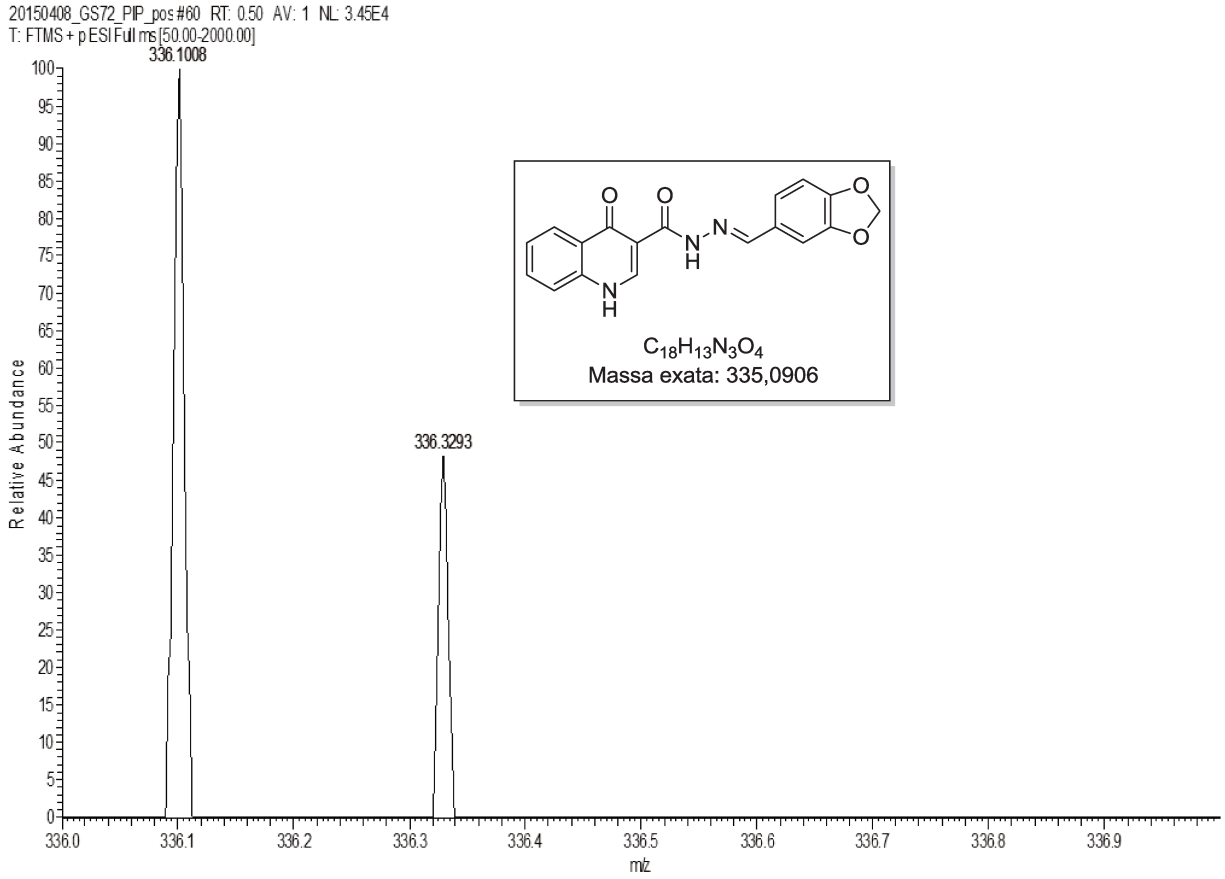


Figura 178. Espectro de massas de alta resolução (TOF-MS-ES+) da acil-hidrazona **20**.