



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
INSTITUTO DE QUÍMICA

MATHEUS ZIVIANI PAGNAN

**SÍNTESE E AVALIAÇÃO DE ACIL-HIDRAZONAS E CHALCONAS CONTENDO A
SUBUNIDADE BENZODIOXOLA PARA ATUAR SOBRE MARCADORES DA
DOENÇA DE ALZHEIMER**

CAMPINAS
2023

MATHEUS ZIVIANI PAGNAN

**SÍNTESE E AVALIAÇÃO DE ACIL-HIDRAZONAS E CHALCONAS
CONTENDO A SUBUNIDADE BENZODIOXOLA PARA ATUAR SOBRE
MARCADORES DA DOENÇA DE ALZHEIMER**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Instituto de Química da Universidade Estadual de Campinas como parte dos requisitos exigidos para a obtenção do título de Mestre em Química na área de Química Orgânica.

Orientadora: Profa. Dra. Wanda Pereira Almeida

O arquivo digital corresponde à versão final da Dissertação defendida pelo aluno Matheus Ziviani Pagnan e orientada pela Profa. Dra. Wanda Pereira Almeida.

**CAMPINAS
2023**

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca do Instituto de Química
Simone Luiz Alves - CRB 8/9094

P148s Pagnan, Matheus Ziviani, 1988-
Síntese e avaliação de acil-hidrazonas e chalconas contendo a subunidade benzodioxola para atuar sobre marcadores da doença de Alzheimer / Matheus Ziviani Pagnan. – Campinas, SP : [s.n.], 2023.

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

1. Doença de Alzheimer. 2. N-acil hidrazonas. 3. Chalconas. I. Almeida, Wanda Pereira, 1959-. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Química. III. Título.

Informações Complementares

Título em outro idioma: Synthesis and evaluation of Acyl-hydrazones and chalcones containing the benzodioxole subunit for acting on biomarkers of Alzheimer's disease

Palavras-chave em inglês:

Alzheimer's disease

N-acyl hydrazones

Chalcones

Área de concentração: Química Orgânica

Titulação: Mestre em Química na área de Química Orgânica

Banca examinadora:

Wanda Pereira Almeida [Orientador]

Maria Teresa Salles Trevisan

Daniel Fabio Kawano

Data de defesa: 30-01-2023

Programa de Pós-Graduação: Química

Identificação e informações acadêmicas do(a) aluno(a)

- ORCID do autor: <https://orcid.org/0000-0002-7907-0794>

- Currículo Lattes do autor: <http://lattes.cnpq.br/7858651039572143>

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Wanda Pereira Almeida (Orientadora)

Profa. Dra. Maria Teresa Salles Tevisan - DQOI – Universidade Federal do Ceará

Prof. Dr. Daniel Fabio Kawano – FCF – Universidade Estadual de Campinas

A Ata da defesa assinada pelos membros da Comissão Examinadora, consta no SIGA/Sistema de Fluxo de Dissertação/Tese e na Secretaria do Programa da Unidade.

Este exemplar corresponde à redação final da
Dissertação de Mestrado defendida pelo aluno
MATHEUS ZIVIANI PAGNAN, aprovada pela
Comissão julgadora em 30 de janeiro de 2023.

“As flores nascem e depois murcham... as estrelas brilham, mas algum dia se extinguem.... comparado com isso, a vida do homem não é nada mais do que um simples piscar de olhos, um breve momento. Nesse pouco tempo, as pessoas nascem, riem, choram, lutam, são feridas, sentem alegria, tristeza, odeiam alguém, amam alguém e morrem. A morte não é o fim de tudo, a morte é o passo que leva à vida seguinte. A morte não é algo definitivo. No passado todos aqueles que nasceram neste mundo, mas foram chamados de santos, todos puderam superar a morte, se entender isso se tornará o homem mais perto de Deus.”
Provérbio budista

Agradecimentos

Agradeço a Deus pela oportunidade de evoluir e aprender sempre. Ao meu pai Jadir e minha irmã Aline por sempre me apoiarem em conquistar meus sonhos. À minha finada mãe Maria Rosa por sempre ter me mostrado que a educação é o melhor caminho. À minha esposa e companheira Paula pela paciência nos momentos difíceis, e por estar sempre ao meu lado. Aos meus filhos Enzo e Ísis por me motivar a sempre dar o meu melhor e tentar construir um futuro próspero. A minha família por me apoiar sempre: Aos meus avós Olyntho e Maria, por me mostrar o valor da família e do trabalho duro, aos meus inúmeros tio e tias, primos e primas, por sempre acreditarem em mim. Aos meus amigos, do grupo do modern da Shinu Made, pelos momentos de descontração, ao meu irmão Felipe por me apoiar em toda caminhada, à minha irmã Carla por ser meu porto seguro. Aos meus alunos, por mostrar a cada dia que eu escolhi o caminho certo.

A Professora Wanda Pereira Almeida, pela oportunidade de fazer parte do grupo Laboratório de Fármacos e Medicamentos (LAFAME). Agradeço infinitamente pela orientação não só referente ao presente trabalho, mas de conhecimentos que levarei para toda a vida, eu jamais vou conseguir expressar em palavras o quanto sou grato. Agradeço aos colegas do Laboratório pela descontração e ajuda em todos os momentos: Gisele Silvestre, Renata Sigrist, Ana Beatriz, Bruno Saccheto, Giorgio Antonioli, Renata Parruka, e Camila Frias . Agradeço a todos os professores e pesquisadores do Instituto de Química e da Faculdade de Ciências Farmacêuticas que me auxiliaram com ensinamentos: Professor Daniel Kawano, Professor Marcelo Lancellotti, Professor Júlio Pastre, Professor Fernando Coelho. Aos funcionários da CPG (Bel, Janaina e Isabela) pelos auxílios e esclarecimentos. Aos técnicos de RMN e IV (Paula, Anderson, Sônia, Marcia e Cláudia) pelos auxílios durante o trajeto. Aos funcionários do Instituto de Química (Márcio, Moacir, Nestor, Cristiano, Rafael) sempre muito solícitos.

Agradeço também à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001, pela concessão da bolsa.

Resumo

A expectativa de vida vem aumentando consideravelmente ao longo dos anos, e estudos voltados para o tratamento de doenças associadas ao envelhecimento vem crescendo vem crescendo, principalmente no que se refere à busca de fármacos para o tratamento de doenças neurodegenerativas que afetam a população idosa. A doença de Alzheimer (DA) é o principal tipo de demência senil, caracterizada por comprometimento cognitivo, associado a um déficit colinérgico, e em fases intermediárias e avançadas, também apresenta comprometimento motor progressivo e acaba levando o paciente ao óbito. Apesar da gravidade da doença, o arsenal terapêutico é muito limitado, e os marcadores histológicos e bioquímicos são alvos para o desenvolvimento de candidatos a fármacos. Este trabalho teve como objetivo sintetizar compostos acil-hidrazônicos e chalconas contendo em sua estrutura o grupo 1,3-benzodioxola e avaliar o seu efeito inibitório sobre as enzimas acetilcolinesterase (AChE) e beta-secretase (BACE-1), e também frente à agregação do peptídeo beta-amiloide. A primeira enzima hidrolisa a acetilcolina, principal neurotransmissor associado à memória e cognição, e a segunda, atua no processamento anormal da proteína precursora do amiloide, resultando em fragmento peptídico com propriedades auto-agregantes ($A\beta_{42}$). Os oligômeros têm elevada neurotoxicidade, e substâncias capazes de bloquear ou diminuir esse processo de oligomerização e formação de fibrilas são de interesse como potenciais candidatos a fármacos. Foram obtidos 14 compostos e alguns apresentaram efeito inibitório significativo. A sua potência foi comparada a de análogos estruturais que não possuem o grupo benzodioxola. A grande maioria é menos potente que este último. Estudos de docking molecular revelaram a importância do grupo para interação com resíduos-chave no sítio ativo das enzimas. Dentre os compostos sintetizados, a acil-hidrazona derivada da condensação entre a hidrazida do ácido 3-carboxi-4-quinolona e do piperonal, que foi ativa frente aos três alvos testados, sendo mais ativa frente à AChE com valor de IC_{50} na faixa nanomolar.

Palavras-chave: Doença de Alzheimer, N-acilhidrazonas, chalconas

Abstract

Life expectancy has increased considerably over the years, and studies aimed at the treatment of diseases associated with aging have been growing, especially with regard to the search for drugs for the treatment of neurodegenerative diseases that affect the elderly population. Alzheimer's disease (AD) is the main type of senile dementia, characterized by cognitive impairment, associated with a cholinergic deficit, and in intermediate and advanced stages, it also presents progressive motor impairment and ends up leading the patient to death. Despite the severity of the disease, the therapeutic arsenal is very limited, and histological and biochemical markers are targets for the development of drug candidates. This work aimed to synthesize acyl-hydrazonic compounds and chalcones containing the 1,3-benzodioxole group in their structure and to evaluate their inhibitory effect on acetylcholinesterase (AChE) and beta-secretase (BACE-1) enzymes, as well as against aggregation of beta-amyloid peptide. The first enzyme hydrolyzes acetylcholine, the main neurotransmitter associated with memory and cognition, and the second acts on the abnormal processing of the amyloid precursor protein, resulting in a peptide fragment with self-aggregating properties (A β 42). Oligomers have high neurotoxicity, and substances capable of blocking or decreasing this oligomerization process and fibril formation are of interest as potential drug candidates. Fourteen compounds were obtained and some of them showed a significant inhibitory effect. Its potency was compared to structural analogues lacking the benzodioxol group. The vast majority are less potent than the latter. Molecular docking studies revealed the importance of the group for interaction with key residues in the active site of enzymes. Among the compounds synthesized, the acyl-hydrazone derived from the condensation between the hydrazide of 3-carboxy-4-quinolone acid and piperonal, which was active against the three targets tested, being more active against AChE with IC₅₀ value in the nanomolar range.

Keywords: Alzheimer's disease, N-acylhydrazones, chalcones

Lista de Figuras

Figura 1. Gráfico da projeção para o envelhecimento populacional no Brasil. Construído a partir de dados disponíveis em: http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/tabcgi.exe?ibge/cnv/projpopbr.def . Acesso em 09/09/2019	22
Figura 2. Fases da doença de Alzheimer e sintomas associados a cada uma delas.	23
Figura 3. Mini-Exame do Estado Mental, de acordo com Folstein.....	25
Figura 4. Biossíntese e degradação da acetilcolina	26
Figura 5. Processamento da proteína precursora do amiloide (APP): vias não amiloidogênica e amiloidogênica. A figura não é escalonada	28
Figura 6. Representação do processo de hiperfosforilação da proteína tau e consequente desintegração dos microtúbulos e depósito de fragmentos tau formando emaranhados. Autoria própria utilizando o Mind the Graph® e Power Point.	29
Figura 7. Células que compõem SNC (figura elaborada pelo autor utilizando o Mind the Graph®).	30
Figura 8. Interação de folhas- β do peptídeo amiloide com metais.	31
Figura 9. Geração de ROS (em vermelho): a partir da mitocôndria (esquerda), ativação da micróglia (direita), e participação da Met35 da cadeia peptídica A β (centro da figura). Na parte inferior, está exemplificada a reação de Fenton para o Cu ²⁺	32
Figura 10. Estruturas dos fármacos autorizados pelo FDA para o tratamentos dos sintomas cognitivos da doença de Alzheimer.....	33
Figura 11. Classificação dos agentes em Fase III. Gráfico adaptado da ref. 64.....	35
Figura 12. Exemplos de compostos bioativos e fármacos contendo o grupo benzo[1,3]dioxola	36
Figura 13. Comparação entre um sistema catecólico e um grupo 1,3-benzodioxola.	37
Figura 14. Exemplo de acil-hidrazona e (esquerda) e chalcona (direita), ambas contendo o grupo 1,3-benzodioxola, apresentando efeito inibitório potente sobre a	

AChE.....	38
Figura 15. Séries de compostos a serem sintetizados e avaliados neste estudo.....	40
Figura 16. Estruturas dos compostos 1-13 , estudados nesse projeto.	44
Figura 17. Espectro de RMN- ¹ H (500 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆) da acil-hidrazona 1 . Os sinais são bem pequenos em função da quantidade de água presente no DMSO. Os sinais estão destacados nas regiões ampliadas.	53
Figura 18. Expansão de região do espectro de RMN (experimento NOESY) da acil-hidrazona, na região de 15 a 7 ppm, em DMSO- <i>d</i> ₆ , mostrando a interação espacial entre os hidrogênios do grupo N-H e C-H, que confirma a configuração <i>E</i>	55
Figura 19. Expansão de região dos espectros de RMN- ¹ H em diferentes temperaturas. A: 25°, B: 80°, C:130° em DMSO- <i>d</i> ₆	56
Figura 20. Cromatograma do bruto da reação de formação da hidrazona do aldeído 25	58
Figura 21. Representação de microplaca de 96 poços utilizada em ensaio de inibição de AChE, pelo método colorimétrico de Ellman. À esquerda, o início do experimento, exemplificado para uma única amostra-teste, indicando a composição de cada um dos poços; no meio: a microplaca após incubação, adição do substrato (ATC) e leitura no tempo zero; à direita, após 5 min de incubação: poço 3, contendo o inibidor tacrina e poço 4, a substância teste, com clareamento da coloração	63
Figura 22. Estrutura do saquinavir indicando a interação do grupo carbonila com os dois resíduos de aspártico e com destaque para o grupo hidroxietilenoamino, bioisóstero não clássico do grupo amida	68
Figura 23. Chalconas testadas frente à BACE-1: R ₁ = H, sem atividade; R ₂ = NH ₂ : IC ₅₀ 2,71 µM.	68
Figura 24. 2'-Aminochalcona e as interações via ligação de hidrogênio (em verde), com os aminoácidos da díade catalítica Asp228 e Asp32, com os grupos amino e carbonila, respectivamente.....	69
Figura 25. Função acil-hidrazona e potenciais interações com resíduos de aspártico do sítio catalítico da BACE-1.....	70
Figura 26. Esquema da transferência de energia de ressonância por fluorescência	

quando um substrato peptídico é clivado pela BACE-1.	70
Figura 27. Acil-hidrazonas que inibiram a atividade da BACE-1	71
Figura 28. Processo de agregação do peptídeo A β	71
Figura 29. Ilustração sobre os tipos de amostras preparadas para o ensaio de agregação.	72
Figura 30. Comparação entre as estruturas das acil-hidrazonas mais potentes contra a agregação do peptídeo A β e a curcumina. Destaque as regiões semelhantes e os aceptores de hidrogênio para formar ligação de hidrogênio	74
Figura 31. Pose mostrando o posicionamento da acil-hidrazona 7 no sítio ativo da acetilcolinesterase (código PDB: 1EVE). Figura cedida por Pedro Fracaro (FCF-Unicamp).	77
Figura 32. Diagrama Boiled-egg para o conjunto de acil-hidrazonas estudadas, evidenciando as acil-hidrazonas fora da região central (“gema”).....	83
Figura 33. Diagrama Boiled-egg para o conjunto de chalconas estudadas, evidenciando as acil-hidrazonas fora da região central (“gema”).....	84
Figura 34. Hidrazidas que não foram sintetizadas neste trabalho	93

Lista de Esquemas

Esquema 1. Rota para a obtenção das acil-hidrazonas	41
Esquema 2. Condensação de Claisen-Schmidt, proposta para a obtenção de chalconas	41
Esquema 3. Obtenção do éster (3,4-metiledioxi)cinamato de etila 22	45
Esquema 4. Preparação das hidrazidas a partir de ésteres. Mecanismo de reação.	46
Esquema 5. Tentativas de obtenção da hidrazida 19 . (a) a partir do ácido 20 , utilizando reagentes de acoplamento; (b) diretamente a partir do cloreto de ácido 21	48
Esquema 6. Tentativa de preparação da hidrazida 19 , utilizando DCC como reagente de acoplamento.....	49
Esquema 7. Etapas envolvidas no mecanismo de formação de hidrazidas utilizando dietilcarbodiimida e hidroxibenzotriazol.....	50
Esquema 8. Mecanismo geral para a formação de <i>N</i> -acil-hidrazonas	51
Esquema 9. Superior: rotâmeros A e B; meio: estruturas de ressonância da porção <i>N</i> -acila; inferior: isômeros geométricos da função imina.....	54
Esquema 10. Análise retrossintética das acil-hidrazonas 6 e 7 , evidenciando duas possíveis rotas sintéticas. Via B: nova rota a ser investigada	57
Esquema 11. Produtos da reação de clorobenzaldeídos com hidrazina.	58
Esquema 12. Reação de formação da acil-hidrazona 6 , a partir da hidrazona 23 e do cloreto de ácido 21	59
Esquema 13. Etapas envolvidas na formação de chalconas pelo método de Claisen-Schmidt	60
Esquema 14. Hidrólise da acetilcolina (ATC) mediada pela actilcolinesterase, levando à formação de tiocolina, que reage com o DTNB (reagente de Ellman), originando o ácido 5-tio-2 nitrobenzóico, detectado em 415 nm.....	62

Esquema 15. Mecanismo da hidrólise da proteína precursora do amiloide (PPA), mediada pela BACE-1.....	67
---	----

Lista de Tabelas

Tabela 1. Hipóteses e marcadores da Doença de Alzheimer e potenciais candidatos a fármacos relacionados	34
Tabela 2. Obtenção de hidrazidas: condições e rendimentos	47
Tabela 3. Resultado das reações de obtenção das acil-hidrazonas	52
Tabela 4. Resultado da condensação de Claisen-Schmidt para obter as chalconas	61
Tabela 5. Avaliação do efeito inibitório dos compostos estudados sobre a atividade da AChE.	64
Tabela 6. Comparativo entre valores de IC ₅₀ para inibição da AChE dos compostos contendo o grupo benzodioxola e análogos estruturais que não apresentam esse grupo.	66
Tabela 7. Resultado da avaliação dos compostos sintetizados frente à agregação do peptídeo A β	73
Tabela 8. Efeito dos compostos sintetizados sobre a enzima AChE, BACE-1 e sobre a agregação do peptídeo β -amiloide.	75
Tabela 9. Composição dos sítios catalítico e periférico da AChE ¹	77
Tabela 10. Interações da acil-hidrazona 7 com a AChE	78
Tabela 11. Propriedades moleculares e físico-químicas calculadas pelo Programa SwissADME.....	81
Tabela 12. Predição de Propriedades Farmacocinéticas para as acil-hidrazonas (ACH)	82
Tabela 13. Propriedades farmacocinéticas preditas para as chalconas utilizando o Programa Swiss	84

Lista de Anexos

Anexo 1. Espectros dos compostos sintetizados	115
Figura S1. Espectro no IV da acil-hidrazona 1 (ATR, cm^{-1}).....	116
Figura S2. Espectro de RMN- ^1H da acil-hidrazona 1 (500 MHz, $\text{CF}_3\text{CO}_2\text{D}$)	117
Figura S3. Espectro de RMN- ^1H da acil-hidrazona 2 (500 MHz, $\text{DMSO}-d_6$)	118
Figura S4. Espectro no IV da acil-hidrazona 4 (ATR, cm^{-1}).....	119
Figura S5. Espectro de RMN- ^1H da acil-hidrazona 4 (500MHz, $\text{DMSO}-d_6$)	120
Figura S6. Espectro de RMN- ^{13}C da acil-hidrazona 4 (100MHz, $\text{DMSO}-d_6$)	121
Figura S7. Espectro de RMN- ^1H da acil-hidrazona 5 (500MHz, $\text{DMSO}-d_6$)	122
Figura S8. Espectro de RMN- ^{13}C da acil-hidrazona 5 (125MHz, $\text{DMSO}-d_6$)	123
Figura S9. Espectro de RMN- ^1H da acil-hidrazona 6 (500MHz, CDCl_3)	124
Figura S10. Espectro de RMN- ^{13}C da acil-hidrazona 6 (125MHz, $\text{DMSO}-d_6$) ..	125
Figura S11. Espectro no IV da acil-hidrazona 7 (ATR, cm^{-1}).....	126
Figura S12. Espectro de RMN- ^1H da acil-hidrazona 7 (500MHz, CDCl_3).....	127
Figura S13. Espectro de RMN- ^1H da acil-hidrazona 8 (500MHz, $\text{DMSO}-d_6$) ...	128
Figura S14. Espectro de RMN- ^{13}C da acil-hidrazona 8 (125MHz, $\text{DMSO}-d_6$) ..	129
Figura S15. Espectro de RMN- ^1H da chalcona 9 (250MHz, CDCl_3).....	130
Figura S16. Espectro de RMN- ^{13}C da chalcona 9 (62,5MHz, CDCl_3)	131
Figura S17. Espectro no IV da chalcona 10 (ATR, cm^{-1}).....	132
Figura S18. Espectro de RMN- ^1H da chalcona 10 (500MHz, CDCl_3).....	133
Figura S19. Espectro de RMN- ^{13}C da chalcona 10 (125MHz, CDCl_3)	134
Figura S20. Espectro de RMN- ^1H da chalcona 11 (500MHz, CDCl_3).....	135
Figura S21. Espectro de RMN- ^1H da chalcona 12 (250MHz, CDCl_3).....	136
Figura S22. Espectro de RMN- ^{13}C da chalcona 12 (125 MHz, CDCl_3)	137
Figura S23. Espectro de RMN- ^1H da chalcona 13 (250MHz, CDCl_3).....	138
Figura S24. Espectro de RMN- ^{13}C da chalcona 13 (125MHz, CDCl_3)	139

Figura S25. Espectro de RMN- ¹ H da hidrazida 15 (600MHz, CDCl ₃)	140
Figura S26. Espectro de RMN- ¹³ C da hidrazida 15 (125MHz, CDCl ₃)	141
Figura S27. Espectro de RMN- ¹ H da hidrazida 17 (400MHz, DMSO- <i>d</i> ₆)	142
Figura S28. Espectro de RMN- ¹ H da hidrazida 18 (500MHz, DMSO- <i>d</i> ₆)	143
Figura S29. Espectro de RMN- ¹³ C da hidrazida 18 (125MHz, DMSO- <i>d</i> ₆).....	144
Figura S30. Espectro no IV da hidrazida 19 (ATR, cm ⁻¹)	145
Figura S31. Espectro de RMN- ¹ H da hidrazida 19 (500MHz, CF ₃ CO ₂ D).....	146
Figura S32. Espectro no IV do ácido 20 (ATR, cm ⁻¹)	147
Figura S33. Espectro de RMN- ¹ H do ácido 20 (600MHz, DMSO- <i>d</i> ₆)	148
Figura S34. Espectro de RMN- ¹³ C do ácido 20 (150MHz, DMSO- <i>d</i> ₆).....	149
Figura S35. Espectro de RMN- ¹ H do cloreto de ácido 21 (400MHz, CDCl ₃)....	150
Figura S36. Espectro de RMN- ¹ H do éster 22 (250MHz, CDCl ₃).....	151
Figura S37. Espectro de RMN- ¹³ C do éster 22 (62,5MHz, CDCl ₃).....	152
 Anexo 2: Estruturas dos compostos citados neste trabalho	153
 Compostos 1 a 8A	154
 Compostos 8B a 12A	155
 Compostos 13 a 26	156

Lista de Siglas, Símbolos e Abreviações

ACh: acetilcolina

AChE: acetilcolinesterase

AICD: domínio intracelular do APP

APP: amyloid protein precursor. Em português: PPA

ATP: adenosina trifosfato

A β : peptídeo β -amiloide

A β ₄₂: peptídeo β -amiloide com 42 resíduos de amino ácidos

BHE: barreira hemato-encefálica

CAS: sítio aniônico catalítico

CCD: cromatografia em camada delgada

ChaT: colina acetil-transferase

CoA: coenzima-A

d: dubleto

DA: doença de Alzheimer

DCC: dicloexilcarbodiimida

dd: duplo dubleto

DIC: diisopropilcarbodiimida

DMAP: *N,N*-dimetilaminopiridina

DPOC: doença pulmonar obstrutiva crônica

DTNB: ácido 5,5-ditio-bis(2-nitrobenzoico) = reagente de Ellman

EDC: dietilcarbodiimida

FDA: Food and Drug Administration

FRET: fluorescence resonance energy transfer (transferência de energia de ressonância por fluorescência)

HBA:ceptor de hidrogênio em ligação de hidrogênio

HBD: doador de hidrogênio em ligação de hidrogênio

hept: hepteto

HOBt: hidroxibenzotriazol

J: constante de acoplamento em hertz (Hz)

LR: ligações rotacionáveis

m: multiplete

mAChR: Receptor muscarínico da acetilcolina

MAO: monoamino oxidase

MC: melhora cognitiva

MDMA: 3,4-metilenodioximetanfetamina (Ecstasy)

MEEM: miniexame do estado mental

nAChR: eceptor nicotínico da acetilcolina

NAD: nicotinamida adenina dinucleotídeo

NMDA: N-Metil-D-Aspartato

NOS: espécies reativas de nitrogênio

NTA: número total de átomos

PAS: sítio aniônico periférico

PDB: Protein Data Bank

PET: tomografia de emissão de pósitron

PPA: proteína precursora do amiloide

q: quarteto

RM: refratividade molar

RMN: ressonância magnética nuclear

ROS: espécies reativas de oxigênio

s: simpleto

sAPP α : ectodomínio α clivado solúvel

sAPP β : ectodomínio β clivado solúvel

SNC: sistema nervoso central

SOD: superóxido dismutase

t: tripleto

ThT: tioflavina-T

TMD: terapias modificadoras da doença

TNF- α : fator de necrose tumoral α

TPSA: superfície polar topográfica

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	22
1.1 DOENÇA DE ALZHEIMER (DA): CONTEXTUALIZAÇÃO	22
1.2 FASES DA DOENÇA DE ALZHEIMER E SINTOMATOLOGIA	23
1.3 DIAGNÓSTICO	24
1.4 HIPÓTESES FISIOPATOLÓGICAS	25
1.4.1 Hipótese colinérgica	26
1.4.2 Hipótese amiloide	27
1.4.3 Receptor NMDA e excitotoxicidade	28
1.4.4 Hipótese da proteína Tau	28
1.4.5 Neuroinflamação	29
1.4.6 Alterações na homeostase de íons metálicos	30
1.4.7 Estresse oxidativo	31
1.5 TRATAMENTO E PERSPECTIVAS NO DESENVOLVIMENTO DE FÁRMACOS	33
1.6 O GRUPO BENZO[1,3] DIOXOLA	35
1.7 PRECEDENTES DO LABORATÓRIO	37
2 OBJETIVOS	39
2.1 GERAL	39
2.2 ESPECÍFICOS	39
3 METODOLOGIA	41
3.1 SÍNTESE	41
3.1.1 Obtenção das acil-hidrazonas	41
3.1.2 Obtenção de chalconas	41
3.2 AVALIAÇÃO BIOLÓGICA	42
3.2.1 Efeito dos compostos sobre a atividade da AChE	42

3.2.2 Efeito dos compostos sobre a agregação do peptídeo A β	42
3.2.3 Inibição da enzima β -secretase (BACE-1)	42
3.3 ANCORAMENTO MOLECULAR (DOCKING)	43
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	44
4.1 OBTENÇÃO DE ACIL-HIDRAZONAS	44
4.1.1 Obtenção das hidrazidas 15 a 19 (Estratégia A)	45
4.1.2 Reações de obtenção de acil-hidrazonas	50
4.1.3 Rota alternativa à reação de transmidação para obter as acil-hidrazonas 6 e 7	56
4.2 OBTENÇÃO DE CHALCONAS	59
4.3 AVALIAÇÃO BIOLÓGICA	62
4.3.1 Efeito dos compostos sobre a atividade da enzima acetilcolinesterase (AChE)	62
4.3.2 Avaliação dos compostos frente à enzima β -secretase (BACE-1)	66
4.3.3 Avaliação dos compostos frente à agregação do peptídeo A β	71
4.3.4 Avaliação geral dos resultados biológicos	74
4.4 ESTUDOS DE MODELAGEM MOLECULAR COM A AChE	76
4.5 PREDIÇÃO DAS PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS e FARMACOCINÉTICAS	78
4.5.1 Propriedades moleculares e parâmetros físico-químicos	75
4.5.2 Propriedades farmacocinéticas	81
5 CONCLUSÕES	85
6 PARTE EXPERIMENTAL	87
6.1 GERAL	87
6.2 SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DOS COMPOSTOS DERIVADOS DO ÁCIDO (E)-3,4-METILENODIOXICINÂMICO	88
6.2.1 Preparação do ácido (E)-3,4-metilenodioxicinâmico (20)	88

6.2.2	Preparação do cloreto do ácido (<i>E</i>)-3,4-metilenodioxicinâmico (21)	88
6.2.3	Preparação do éster etílico do ácido (<i>E</i>)-3,4- metilenodioxicinâmico (22)	89
6.2.4	Preparação da hidrazida do ácido (<i>E</i>)-3,4- metilenodioxicinâmico (19)	89
6.2.5	Síntese das hidrazonas derivadas do clorobenzaldeído (23,24)	90
6.2.6	Obtenção das acil-hidrazonas 6 e 7	91
6.3	OBTENÇÃO DA ACIL-HIDRAZONA 1	92
6.4	SÍNTESE DAS DEMAIS HIDRAZIDAS PRECURSORAS UTILIZADAS NESTE TRABALHO	93
6.4.1	Síntese das hidrazidas precursoras 15 - 17	93
6.4.2	Obtenção da hidrazida 18	94
6.5	OBTENÇÃO DA ACIL-HIDRAZONA 2	95
6.6	OBTENÇÃO DAS ACIL-HIDRAZONAS 4 e 5	96
6.6.1	Acil-hidrazona 4	96
6.6.2	Acil-hidrazona 5	97
6.7	OBTENÇÃO DA ACIL-HIDRAZONA 8	97
6.8	PROCEDIMENTO GERAL PARA A OBTENÇÃO DE CHALCONAS	98
6.8.1	Obtenção da chalcona 9	99
6.8.2	Obtenção da chalcona 10	99
6.8.3	Obtenção da chalcona 11	100
6.8.4	Obtenção da chalcona 12	100
6.8.5	Obtenção da chalcona 13	101
	REFERÊNCIAS	102
	ANEXOS	115
	Anexo 1. Espectros dos compostos sintetizados	115
	Anexo 2. Estruturas dos compostos citados neste trabalho	153

1 INTRODUÇÃO

1.1 DOENÇA DE ALZHEIMER (DA): CONTEXTUALIZAÇÃO

Doenças neurodegenerativas são um problema enigmático e intratável em biomedicina. A doença de Alzheimer (DA) é o exemplo mais comum de doença neurodegenerativa, afetando cerca de 10% dos indivíduos com idade acima dos 65 anos e cerca de 40% dos indivíduos acima de 80 anos [1].

No Brasil, a população na faixa etária de risco para a doença de Alzheimer (de 65 a mais de 90 anos) da população vem aumentando, assim como no mundo todo. O gráfico representado na **Figura 1**, mostra esse crescimento com previsão até 2040 [2].

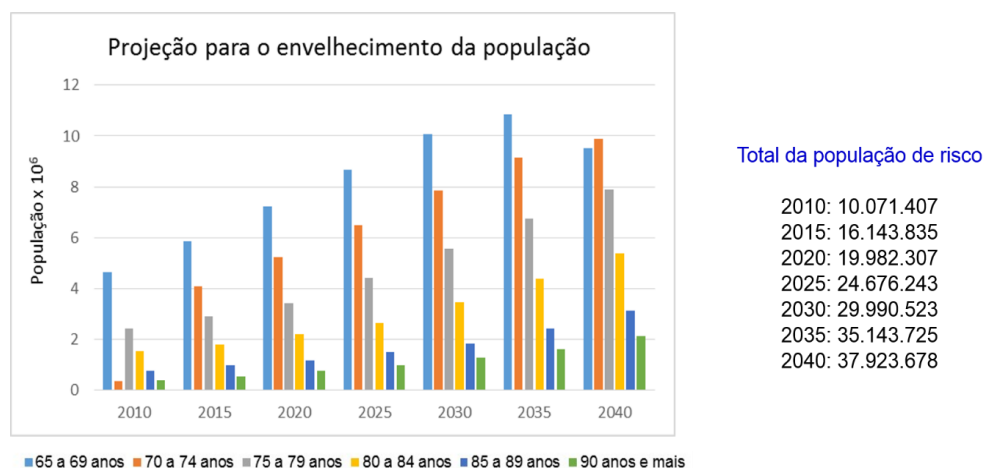


Figura 1. Gráfico da projeção para o envelhecimento populacional no Brasil. Construído a partir de dados disponíveis em: <http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/tabcgi.exe?ibge/cnv/projpopbr.def> . Acesso em 09/09/2019.

O número de pessoas no Brasil que vivem com algum tipo de demência é cerca de 1,2 milhão e cerca de 100 mil novos casos por ano. Entretanto é importante observar que existe a possibilidade do número ser bem maior, pois muitos casos não devidamente diagnosticados, principalmente na população de baixa renda [3].

Este crescimento não é acompanhado por um desenvolvimento e ampliação do arsenal terapêutico, que é muito limitado e não se aplica a todas as fases da doença.

1.2 FASES DA DOENÇA DE ALZHEIMER E SINTOMATOLOGIA

A Doença de Alzheimer é reconhecida por três diferentes fases: a fase pré-clínica assintomática; a fase pré-clínica sintomática e a fase de demência (**Figura 2**).

Cada uma dessas fases é caracterizada por alterações cognitivas e comportamentais [4]. A fase conhecida como *pré-clínica assintomática*, embora receba este nome, já é caracterizada por falhas na memória recente, ainda que ocasionais, mas que se intensificam conforme a doença progride. Além disso, o indivíduo tende a se negar a realizar tarefas que exigem concentração, abandonando inclusive, passatempos. Na fase conhecida como *pré-clínica sintomática*, os sintomas não deixam mais dúvidas sobre a natureza da demência senil: o indivíduo apresenta falha grave na memória recente e, em alguns casos, ocorre também o esquecimento de fatos do passado. Ele não tem orientação sobre o tempo, sendo incapaz de se lembrar do dia e do ano presente, e necessita de auxílio para realizar algumas atividades rotineiras. Já nessa fase, o portador da doença de Alzheimer já apresenta sintomas comportamentais, tais como agitação, paranóia, delírios e desconfiança. Estados depressivos, com choro, também são comuns. A *fase de demência* propriamente dita, é caracterizada pela incapacidade de locomoção, muita dificuldade com a fala, e para se alimentar. Além disso, apresenta incontinência urinária e fecal, necessitando de cuidados 24h por dia. Nesta fase, o paciente já tem comprometimento de várias funções fisiológicas vitais, como cardiorespiratória e renal. Por fim, a falência de órgãos leva ao óbito.

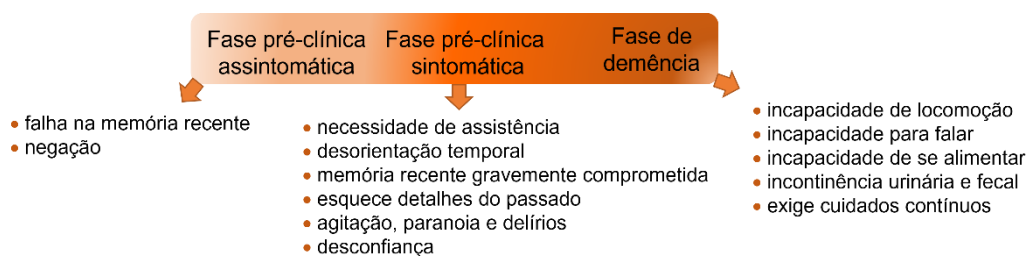


Figura 2. Fases da doença de Alzheimer e sintomas associados a cada uma delas.

Em 2022, as despesas com cuidadores e serviços hospitalares com pacientes portadores de demência como mais de 65 anos, chegaram a 321 bilhões de dólares nos Estados Unidos [5]. Ainda de acordo com a Alzheimer's Association, as internações hospitalares são recorrentes em diversas fases, sendo que a Doença

Pulmonar Obstrutiva Crônica (DPOC), falência cardíaca, infarto, doença renal crônica e doença arterial coronariana são as principais causas nos Estados Unidos, em idosos com mais de 65 anos, portadores de demência e Alzheimer. Além das patologias citadas, diabetes e câncer também surgem nas estatísticas. Os números são consideravelmente superiores a pacientes não -Alzheimer.

O ônus financeiro para a família é bastante significativo, tanto onerando significativamente a família, que também necessita de apoio e orientação psicológica.

Uma outra abordagem mais geral sobre a divisão das fases da Doença de Alzheimer está baseada na interferência da doença no exercício de atividades rotineiras, é apresentada pela Alzheimer's Disease Association [5]. Nesta, considera-se a *fase pré-clínica* como aquela na qual supõe-se haver alterações cerebrais, porém ainda imperceptíveis. A fase de *Declínio cognitivo devido à Doença de Alzheimer branda* é caracterizada pela existência de sintomas discretos, porém não chegam a impedir que o indivíduo exerça suas atividades. Quando a demência é considerada branda, porém há alguma interferência no desempenho de atividades, esse processo é denominado *Demência devida à Alzheimer branda*. Com o progresso da doença, duas outras fases são reconhecidas: Demência devida à Alzheimer moderada e Demência devida à Alzheimer severa. Na primeira, os sintomas interferem significativamente no desempenho de atividades rotineiras, e, na última, é praticamente impossível exercer essas atividades.

1.3 DIAGNÓSTICO

O diagnóstico da Doença de Alzheimer é basicamente clínico, com base nos sintomas e dificuldades para realizar tarefas rotineiras. Vários testes de cognição são realizados, sendo o mais conhecido o Mini-Exame do Estado Mental – MEEM [6]. Neste, é atribuída uma pontuação para cada atividade proposta. Um esquema do teste básico, criado em 1975 está apresentado na **Figura 3**. Com o tempo, verificou-se que os resultados podem ser afetados por vários fatores, por exemplo, nível de instrução, levando à adaptações da proposta original [7,8].

Escala de Folstein		
Atividade	Pontuação	
Orientação temporal	5	→ Dia da semana, dia do mês, mês, ano, hora (1 pt cada)
Orientação espacial	5	→ Local específico, rua, bairro, cidade, estado (1 pt cada)
Memória imediata	3	→ Falar 3 palavras, aguardar 5 minutos, mandar repetir (1 pt cada)
Atenção e cálculo	5	→ De 100 a 65, falar números com diferença de 7 (1 pt cada)
Evocação	3	→ Mandar repetir as palavras do item 3 (1 pt cada)
Linguagem 1 (nomear objetos)	2	→ Apontar dois objetos e perguntar o que é (1 pt cada)
Linguagem 2 (repetição de frase)	1	→ Falar uma frase e pedir para repetir (1 pt cada)
Linguagem 3 (obedecer uma ordem)	3	→ Pegar um papel com a mão direita, dobrar, colocar no chão (1 pt cada)
Linguagem 4 (ler e obedecer)	1	→ Papel escrito com um comando: ler e obedecer (1 pt cada)
Escrita (uma frase)	1	→ Escrever 1 frase com sentido: sujeito e predicado (1 pt cada)
Desenho (cópia)	1	→ Copiar 1 desenho (1 pt cada)
Pontuação máxima	30	
Deficiência cognitiva	< 24	

MEEM
Leve: 26-18
Moderada: 17-10
Grave: 9-0

Figura 3. Mini-Exame do Estado Mental, de acordo com Folstein [6].

Exames laboratoriais e tomografias podem auxiliar o diagnóstico. Em relação aos biomarcadores, estes incluem níveis anormais do peptídeo amiloide, e diminuição do metabolismo da glicose, através de escaneamento por tomografia de emissão de pósitron - PET [9, 10], análise do fluido cérebro espinhal e alterações da proteína tau no plasma [11].

1.4 HIPÓTESES FISIOPATOLÓGICAS

A principal característica da DA é o declínio da capacidade cognitiva, incluindo o aprendizado, memória e capacidade de resolução de problemas. Com o avanço da doença, delírios, depressão, agitação e também agressividade podem ocorrer [5]. Embora a etiologia da DA não seja clara, vários fatores tem sido associados a esta patologia, tais como: a deposição extracelular de oligômeros e fibrilas do peptídeo β -amiloide ($A\beta$) [12-14]; a hiperfosforilação da proteína tau [15], seguida de fragmentação e formação de emaranhados neurofibrilares intracelulares; falha na homeostase de metais, principalmente cobre e zinco, levando ao acúmulo dos mesmos no sistema nervoso central [16, 17], estresse oxidativo [17,18] e ainda um importante déficit colinérgico [19]. Neuroinflamação [20] e excitotoxicidade via receptor glutamatérgico N-Metil-D-Aspartato [21], também são processos importantes.

Esta característica multifatorial da doença de Alzheimer resulta na existência de vários alvos para a avaliação de compostos bioativos. No contexto deste trabalho, destacamos as hipóteses colinérgica e amiloide e faremos um breve comentário sobre as demais.

1.4.1 Hipótese colinérgica

A biossíntese de acetilcolina (ACh) se dá através da colina e da acetil-CoA dentro dos neurônios colinérgicos pré-sinápticos, pela ação da enzima colina acetiltransferase (ChAT) e armazenda em vesículas. Mediante um estímulo, a vesícula funde com a membrana do neurônio pré-sináptico, liberando a ACh na fenda. Esse neurotransmissor se liga a receptores nicotínicos (nAChR) ou muscarínicos (mAChR), desencadeando o seu efeito, através da neurotransmissão colinérgica. A sua terminação é encerrada através de uma reação de hidrólise, mediada pela enzima acetilcolinesterase (AChE), resultando em acetil-CoA e colina, que é, na verdade o precursor da ACh (**Figura 4**). A colina liberada é transportada de volta ao neurônio pré-sináptico, via transportador, e o ciclo de síntese recomeça.

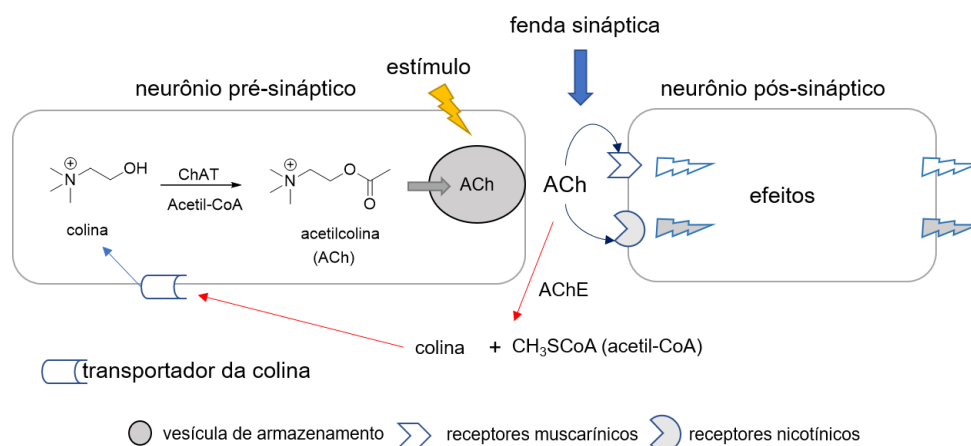


Figura 4. Biossíntese e degradação da acetilcolina

A diminuição da transmissão colinérgica, mediada pela ACh tem grande impacto nas funções cognitivas como a memória e aprendizado [19], como observado para pacientes com Alzheimer. Uma vez que a enzima AChE diminui a concentração de ACh na fenda, esta enzima foi o primeiro alvo para o desenvolvimento de fármacos [22,23].

Um outro marcador importante relacionado à hipótese colinérgica são os receptores nicotínicos e muscarínicos, subtipo M2 [24], presentes em regiões relacionadas ao aprendizado e memória, e o receptor nicotínico central do subtipo $\alpha 7$, com destaque para este último. O receptor nicotínico $\alpha 7$ nAChR participa de funções cognitivas essenciais, assim como memória, pensamento, compreensão e

capacidade de aprender calcular e de orientação [25]. Estes receptores estão amplamente distribuídos no córtex e hipocampo, porém o seu decréscimo [26], paralelo à perda neuronal [27], leva ao comprometimento da função cognitiva, tornando-se portanto um alvo para o desenvolvimento de agonistas com potencial efeito [28].

Alterações na expressão do transportador da colina para o neurônio pré-sináptico também são apontadas como fonte da diminuição da transmissão colinérgica [29,30].

1.4.2 Hipótese amiloide

A progressão da DA vem sendo relacionada com a deposição extracelular de agregados de peptídeos amiloides ($A\beta$) formando-se oligômeros e placas, tornaram esse peptídeo um marcador da DA, tendo papel central na disfunção sináptica progressiva, na neurodegeneração e na morte neuronal [31].

O peptídeo $A\beta$ é resultante do processamento da proteína precursora do amiloide (APP), que é uma glicoproteína transmembrana presente nos neurônios. Ela possui uma grande região *N*-terminal extracelular, e uma porção *C*-terminal citoplasmática (**Figura 5**). Em seu processamento não amiloidogênio ("normal"), a clivagem inicial pela enzima α -secretase, forma-se os fragmentos $sAPP\alpha$ e C83, sendo que este último, sofre a ação da γ -secretase sendo transformado em AICD (domínio intracelular do APP) e P3 [32]. Porém, quando o APP sofre a ação da β -secretase, conhecida também por BACE-1, formam-se o $sAPP\beta$ e C99, este último também sofre a ação da γ -secretase formando AICD e $A\beta$ [33]. Esse resíduo $A\beta$ pode conter de 39 a 43 aminoácidos [34]. Esses conglomerados $A\beta$ por sua vez se agregam formando oligômero, e dos possíveis resíduos o $A\beta_{42}$ é o que apresenta maior toxicidade pois possui a maior propriedade de oligomerização [35, 36]. Este processo é induzido pelo PAS da AChE sendo um ótimo local para o acoplamento desses oligômeros, uma vez que estes apresentam baixo peso molecular [37]. Este complexo formado por AChE e $A\beta$ é ainda mais tóxico, estando intimamente ligado a neuroinflamação, hiperfosforilação da proteína Tau, o estresse oxidativo e o comprometimento da atividade colinérgica, todos esses processos estão relacionados com a progressão dos sintomas dos pacientes com DA.

O peptídeo A β será abordado em maior detalhe no item 1.5.

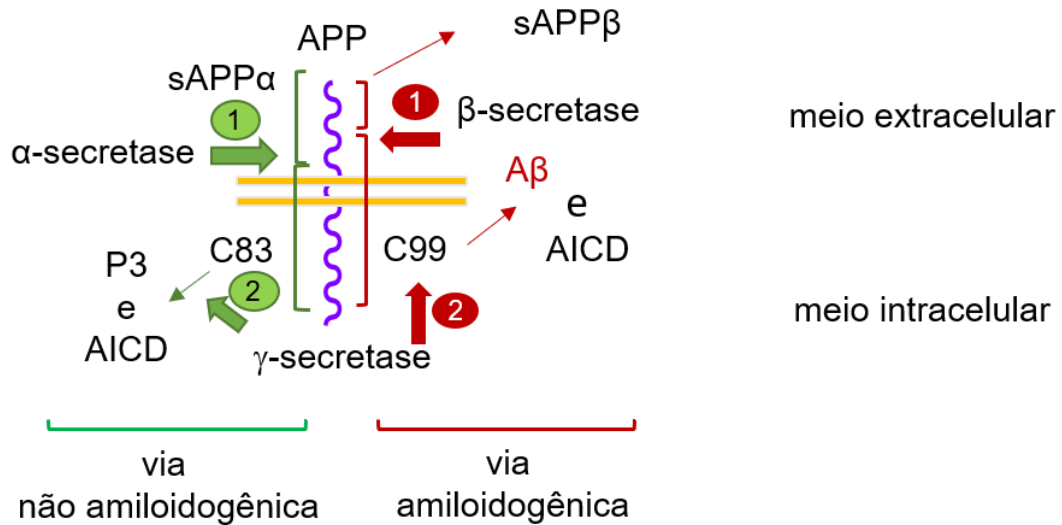


Figura 5. Processamento da proteína precursora do amiloide (APP): vias não amiloidogênica e amiloidogênica. A figura não é escalonada.

1.4.3 Receptores NMDA e excitotoxicidade

Glutamato é um dos neurotransmissores excitatórios que se liga a receptores glutamatérgicos, dentre eles, no contexto deste trabalho, está o receptor **N-Metil-D-Aspartato (NMDA)**. A ligação entre este receptor e a Doença de Alzheimer foi postulada quando pacientes em uso de memantina, um conhecido antagonista do NMDA, apresentaram um retardo no progresso da doença [38]. O bloqueio desse receptor diminui o influxo de cálcio, minimizando o dano neuronal [39].

Pesquisadores sugerem que estes receptores têm participação no processo de plasticidade neural e memória [40]. O fenômeno da excitotoxicidade decorre da estimulação contínua moderada ou excessiva deste receptor, levando ao influxo de cálcio que acaba modificando a função mitocondrial. Alterações na membrana dessa organela provoca a depleção de ATP e formação de espécies reativas de oxigênio (ROS) e neurodegeneração [41,42]. Entretanto a ligação entre excitotoxicidade e a Doença de Alzheimer apresenta várias lacunas, e permanece em discussão [43,44].

1.4.4 Hipótese da proteína Tau

A proteína tau (τ) participa de processos biológicos fundamentais, como a formação de microtúbulos e manutenção da estrutura do neurônio [45]. Dentre os 352-

441 resíduos de amino ácidos que a constituem, 79 são passíveis de fosforilação, catalisa pela enzima tau cinase [46]. Em condições não patológicas existe um equilíbrio entre esta enzima e uma fosfatase que catalisa a reação inversa, ou sej, hidrolisa os ésteres de fosfato formados pela primeira.

Quando ocorre um desequilíbrio entre as atividades dessas enzimas, a proteína pode se tornar hiperfosforilada, o que leva à formação de fragmentos que podem agregar. A proteína tau tem 6 isoformas conhecidas, sendo que duas delas parecem estar relacionadas com a doença de Alzheimer [46], gerando estruturas intracelulares denominadas emaranhados neurofibrilares. Estes, juntamente com os depósitos amiloidogênicos (oligômeros e fibrilas A β) e a perda neuronal são os principais achados histológicos da doença de Alzheimer. Na Figura 6, observa-se ampliada, do lado esquerdo, os microtúbulos sendo estabilizados pela proteína tau (roxo). Do lado direito da figura, o processo de hiperfosforilação é representado mostrando a desestabilização do microtúbulo, com desintegração e a liberação de fragmentos que vão se emaranhar e depositar.

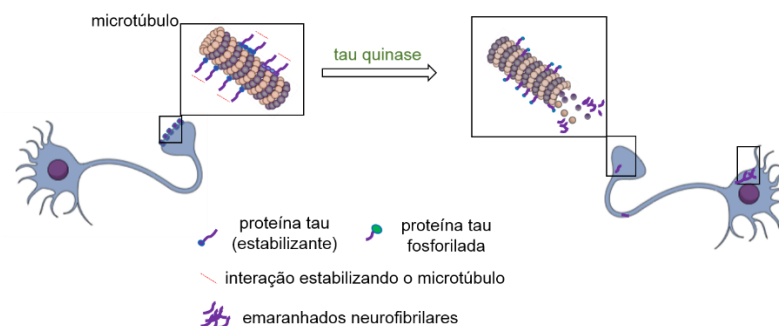


Figura 6. Representação do processo de hiperfosforilação da proteína tau e consequente desintegração dos microtúbulos e depósito de fragmentos tau formando emaranhados. Autoria própria utilizando o Mind the Graph® e Power Point.

1.4.5 Neuroinflamação

As células que compõem o Sistema Nervoso Central (SNC) são os neurônios e um conjunto de células denominadas células da glia, que, por sua vez é constituída por astrócitos, oligodendrócitos e micróglia.

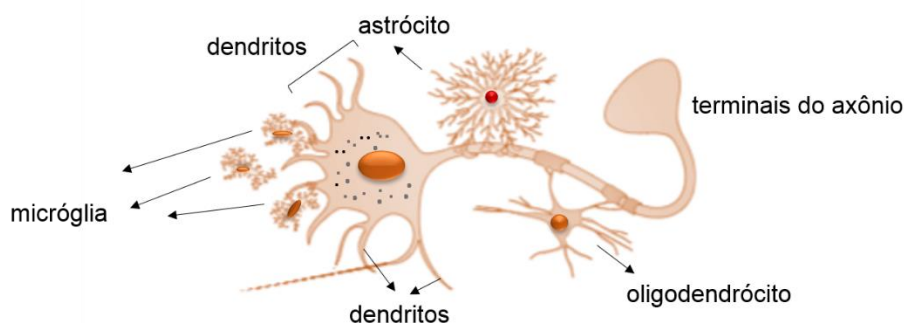


Figura 7. Células que compõem SNC (figura elaborada pelo autor utilizando o Mind the Graph®).

Dentre estas células, a micróglia, células conhecidas também por macrófagos residentes do SNC, tem um papel essencial na homeostase, mantendo sinapses e funcionamento neural. A micróglia sintetiza e libera diversas citocinas, tais como, interleucina-1 α (IL-1 α), interleucina-1 β (IL-1 β), fator de necrose tumoral (TNF- α) e quimiocinas durante processo inflamatório [47]. A micróglia é, em outras palavras um sistema capaz de dar respostas neuroinflamatórias. Quando a micróglia possui ativação crônica, há o acúmulo desses fatores, resultando em danos teciduais e neuronais. Na doença de Alzheimer, ocorre essa ativação crônica, devido à deposição de oligômeros do peptídeo A β [48]. Além, devido à alta quantidade de peptídeo, as células da glia não conseguem realizar a fagocitose apropriadamente, levando a um *clearance* reduzido desses oligômeros, e consequentemente, depósito aumentado [49].

1.4.6 Alterações na homeostase de íons metálicos

O desequilíbrio da homeostase de diversos íons metálicos tais como cobre, zinco, ferro e alumínio, além do estresse oxidativo, que será comentado na sequência, e o link com a doença de Alzheimer, é fundamento na análise post mortem de cérebros, nos quais se observou a presença de placas amiloides e um acúmulo excessivo de cobre, zinco e ferro. A concentração destes era significativamente superior à encontrada em cérebros de indivíduos que não portavam a doença de Alzheimer, sendo que o cobre predominava [50].

Os metais zinco e cobre, principalmente, podem induzir a agregação do peptídeo A β , mas o tipo de agregado depende da concentração. Em condições estequiométricas, zinco e cobre formam agregados amorfo e em altas

concentrações, podem induzir a formação de fibrilas com tamanhos característicos [51,52].

A afinidade de íons metálicos pelo peptídeo A β é devida à presença de alguns resíduos de aminoácidos na estrutura desse peptídeo, que seriam responsáveis pela formação de complexos estáveis entre o íon e o peptídeo. A Figura 8 é uma representação desta interação. Os principais resíduos de aminoácidos que se ligam ao metal são a His13 e His14. O peptídeo se agrega através de folhas- β , com orientação antiparalela. Assim, o metal é complexado pelo nitrogênio imidazólico da His13 de uma de cadeia e His14 da outra [53]. Além desses resíduos, destaca-se também a Metionina (Met35) que é apontada como um centro de redução de metais, gerando espécies reativas de oxigênio [54].

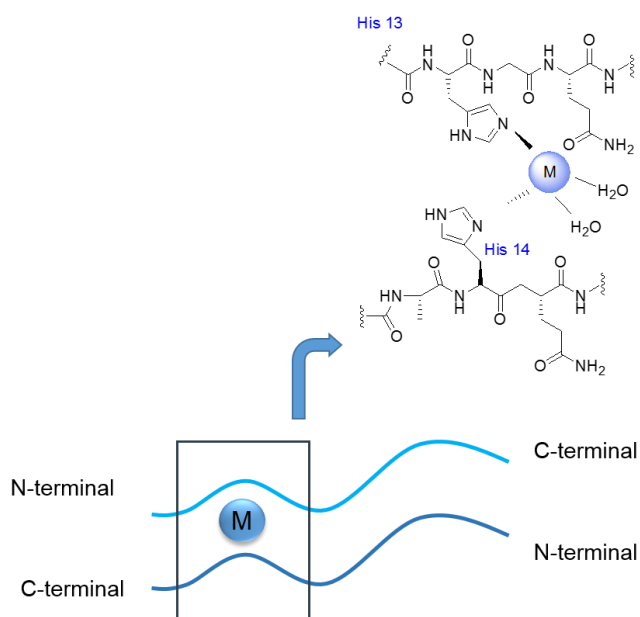


Figura 8. Interação de folhas- β do peptídeo amiloide com metais.

1.4.7 Estresse oxidativo

Vários fenômenos biológicos resultam na formação de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio (ROS e NOS). O organismo tem vários processos enzimáticos e não-enzimáticos responsáveis pela eliminação destas espécies que podem levar à morte celular. Quando acontece um desequilíbrio (“ímbalance”) entre a geração de ROS e NOS pode levar a danos oxidativos a lipídios, proteínas e ácidos nucleicos. Para a doença de Alzheimer, a formação dessas espécies, principalmente as oxigenadas está relacionada à progressão e aumento dos sintomas [55]. A oxidação

exacerbada de lipídeos, ácidos nucleicos e proteínas foi observada na DA, e, para alguns pesquisadores é um evento inicial da patogênese [56].

Os principais eventos bioquímicos de geração de ROS estão apresentados na **Figura 9**. Na mitocôndria, durante as reações redox, com transferência de elétron para o oxigênio (O_2), ocorre a formação de ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$), que é transformado em peróxido de hidrogênio (H_2O_2) através da superóxido dismutase (SOD), e na sequência, catalases e glutathiona peroxidase eliminam o peróxido. Outro evento importante é a ativação da micróglia, como resposta inflamatória ao peptídeo $A\beta$ e seus agregados [57]. Na micróglia a NADPH oxidase catalisa a formação de superóxido [58]. Outro evento importante também é deslançado pelo peptídeo $A\beta$, em função dos já mencionados sítios de complexação de metais e região de oxirredução, através da Met35 [59]. No processo envolvendo a participação de metais, a espécie oxidativa formada é radicais hidroxila $\cdot OH$ que são altamente reativos [60]. O ânion superóxido formado pelas diferentes vias comentadas, pode também reagir com um íon metálico, geralmente ferro ou cobre (reação de Fenton), provocando a sua redução e, gerando radicais hidroxila [59].

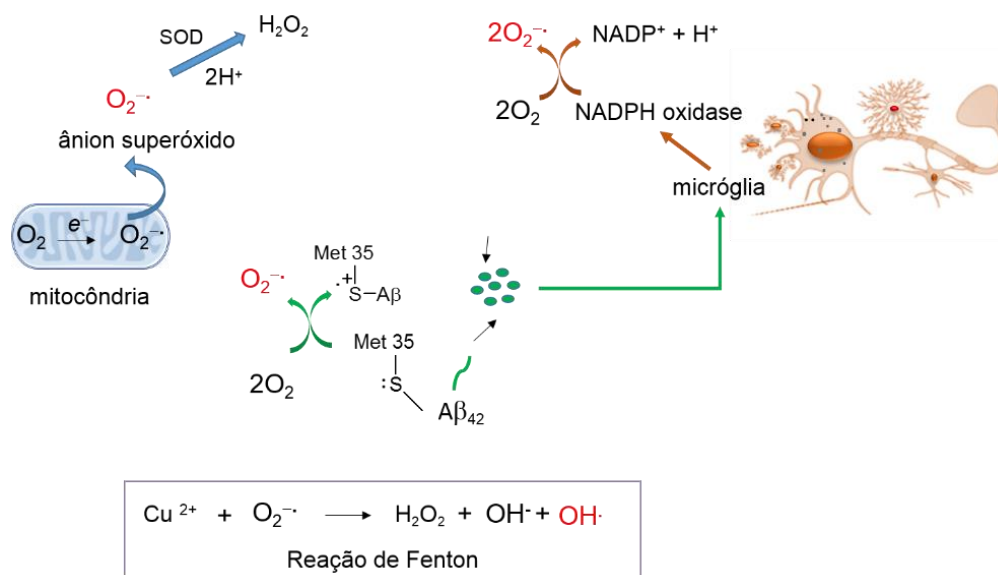


Figura 9. Geração de ROS (em vermelho): a partir da mitocôndria (esquerda), ativação da micróglia (direita), e participação da Met35 da cadeia peptídica $A\beta$ (centro da figura). Na parte inferior, está exemplificada a reação de Fenton para o Cu^{2+} .

1.5 TRATAMENTO E PERSPECTIVAS NO DESENVOLVIMENTO DE FÁRMACOS

O tratamento aborda a sintomatologia cognitiva e também a comportamental. Esta última recebe a contribuição de fármacos bem estudados que já estão no mercado, destacando-se os antipsicóticos quetiapina e risperidona, e antidepressivos, principalmente citalopram, escitalopram e sertralina [61]. Os fármacos existentes para o tratamento dos sintomas cognitivos, pertencem à classe dos inibidores de acetilcolinesterase e a memantina, um antagonista do glutamato no receptor NMDA. Os fármacos aprovados pelo FDA são: galantamina, donepezila e rivastigmina. Suas estruturas se encontram na **Figura 10**. Estes fármacos melhoram discretamente os sintomas cognitivos, porém a resposta do paciente é variável, e também depende do estágio que a doença em que se encontra. Dentre os inibidores da AChE, apenas a donepezila tem dado resultados muito modestos no estado grave doença, e a maioria é mais indicada para os estágios leves e moderados. Atualmente, estes inibidores estão sendo utilizados em clínica, em monoterapia ou em associação com a memantina.

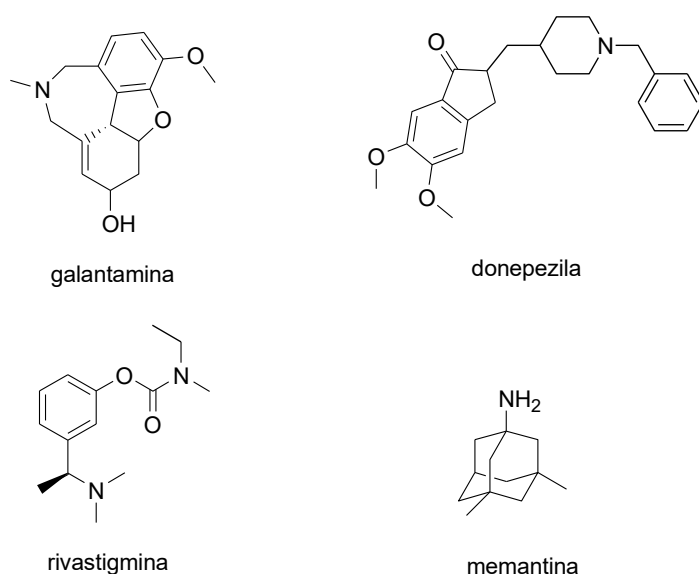


Figura 10. Estruturas dos fármacos autorizados pelo FDA para o tratamentos dos sintomas cognitivos da doença de Alzheimer.

Assim, o arsenal terapêutico para o tratamento da Doença de Alzheimer é muito limitado e ainda tem-se como complicador a dificuldade do diagnóstico precoce. Face ao exposto, o interesse no desenvolvimento de fármacos é crescente. As estratégias envolvem as duas hipóteses melhor estudadas, que são a colinérgica e a amiloide,

além de alguns testes voltados para a proteína tau.

O caráter multifatorial da doença de Alzheimer, se por um lado abre uma grande leque de perspectivas para pesquisa de candidatos a fármacos, por outro, dificulta a seleção de protótipos atuando em um único alvo. O controle de marcadores de uma hipótese não é suficiente para controlar a doença como um todo, uma vez que existem marcadores reconhecidos nas diferentes hipóteses. Esse fato aumenta o interesse no que se chama de fármacos multialvo [62], pois atuam sobre alvos relacionados às diferentes hipóteses. Uma grande dificuldade em fase pré-clínica, é o grande número de alvos para serem avaliados nos ensaios.

A **Tabela 1** relaciona as diferentes hipóteses a potenciais candidatos a fármacos mais discutidos na literatura [63].

Tabela 1. Hipóteses e marcadores da Doença de Alzheimer e potenciais candidatos a fármacos relacionados

Hipótese	Candidato
Colinérgica	• inibidores de AChE
	• agonistas do receptor nicotínico (α_7)
Amiloide	• inibidores de β -secretase
	• inibidores de γ -secretase
	• depuradores de formas insolúveis
Proteína tau	• inibidores da fosforilação
	• estabilizadores da proteína tau
	• depuradores
Neuroinflamação	• anti-inflamatórios
Desequilíbrio na homeostase de metais	• quelantes de metais
Excitotoxicidade	• antagonistas do glutamato
Estresse oxidativo	• anti-oxidantes

Atualmente, existem 143 candidatos em fase clínica [64], sendo que

predominam substâncias relacionadas à hipótese amiloide, particularmente anticorpos monoclonais, cujo alvo é o peptídeo A β . Além destes, agentes que atuam sobre receptores de neurotransmissores também têm uma contribuição importante. Dos 143 agentes, 31 estão fase III (**Figura 11**). Em relação ao efeito desses agentes, a maioria (68%) é formada por aqueles que modificam a doença, destacando-se os agentes relacionados à hipótese amiloide, seguida de substâncias neuroprotetoras, as que diminuem o estresse oxidativo e que afetam o metabolismo.

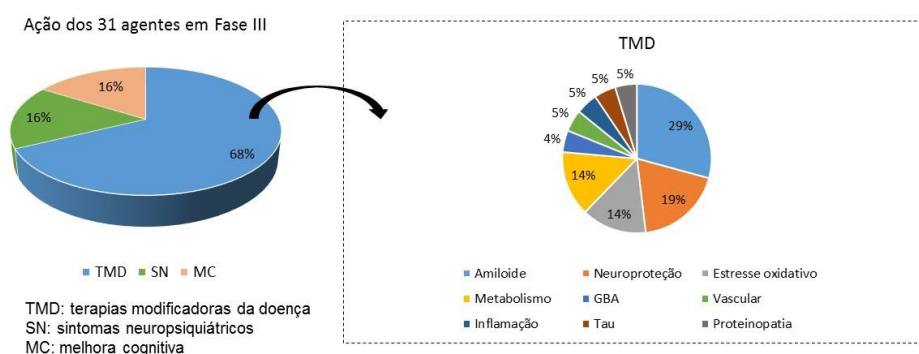


Figura 11. Classificação dos agentes em Fase III. Gráfico adaptado da ref. 64.

Frente ao limitado arsenal, a busca por agentes que possam atuar na melhora dos sintomas, sejam eles cognitivos ou comportamentais.

1.6 O GRUPO BENZO[1,3] DIOXOLA

Também conhecido como 1,3-benzodioxola ou 3,4-metilenodioxifenila, este grupo está presente em vários produtos naturais e sintéticos com atividade biológica e em alguns fármacos (**Figura 12**).

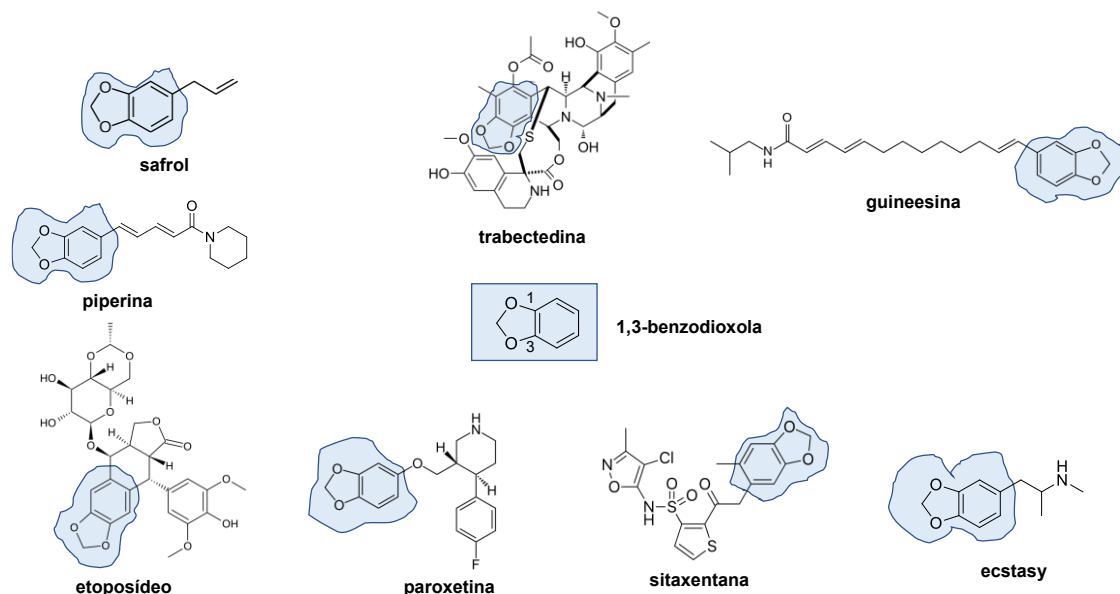


Figura 12. Exemplos de compostos bioativos e fármacos contendo o grupo benzo[1,3]dioxola

O safrol, também representado na Figura 12, é o principal componente do óleo de sassafrás. Embora não haja propriedades farmacológicas diretamente relacionadas a ele, tem sido bastante utilizado em química orgânica como precursor para a síntese de diversos compostos contendo o grupo benzo[1,3]dioxola [65]. Plantas do gênero *Piper* apresentam vários componentes bioativos que contêm em sua estrutura o grupo benzo [1,3]dioxola, destacando-se a piperina [66]. Guineesina é derivada de *Piper nigrum*, ou pimenta preta, é um inibidor na faixa nanomolar da captação celular da endocanabinoide anandamida [67]. Trabectedina, embora seja um alcaloide sintético, foi originalmente isolado da espécie marinha *Ecteinascidia turbinata*, apresenta atividade antitumoral para o tratamento de câncer de ovário e sarcoma [68] e foi aprovado na Europa em 2007. Outros produtos naturais também entraram no mercado farmacêutico, como a neolignana denominada Etoposídeo, um fármaco antineoplásico; a Paroxetina, que é um antidepressivo comercializado desde 1993, é um inibidor seletivo da recaptação da serotonina [69]. Sitaxentana, foi aprovado para o tratamento de hipertensão arterial pulmonar e para insuficiência cardíaca diastólica, porém devido à alta hepatotoxicidade, foi retirado do mercado em muitos países [70]. Já um conjunto de drogas ilícitas e lícitas também contém esse grupo funcional, como por exemplo o ecstasy, conhecido como MDMA.

A possibilidade de ligação de hidrogênio intramolecular torna o sistema

catecólico um pseudociclo (**Figura 13**). As hidroxilas livres pode atuar como aceptores e doadores de hidrogênio para a realização de ligação de hidrogênio em sítios ligantes/ativos de bio-receptores, porém a estabilidade metabólica é mais baixa do que a do grupo benzodioxola, uma vez que pode sofrer reações de conjugação (glicuronidação/sulfatação) ou ainda, dependendo da estrutura do composto, O-metilação. Assim, o grupo benzodioxola, pode atuar como acceptor de hidrogênio, com a vantagem de ser mais estável metabolicamente.

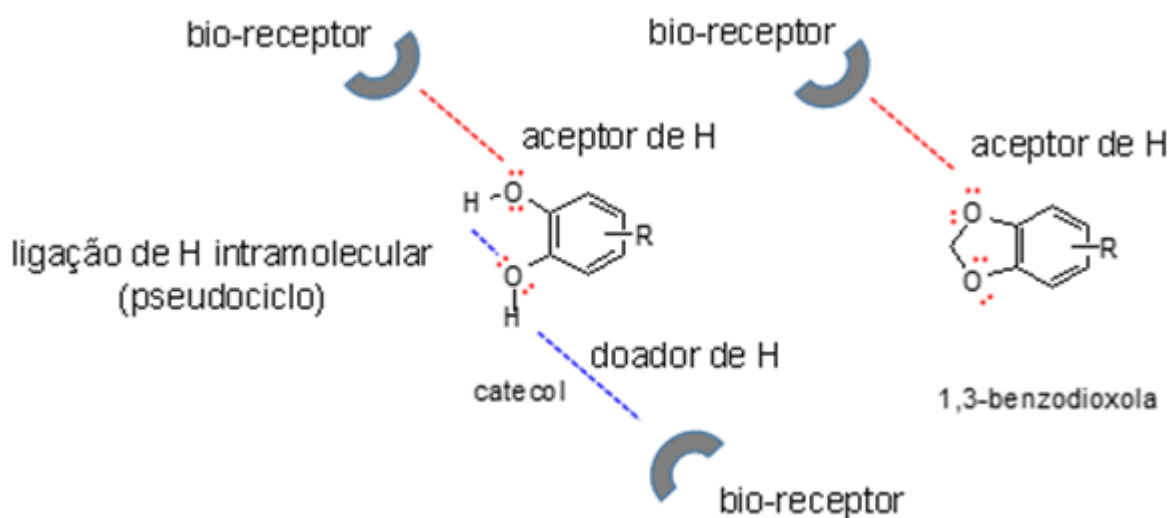


Figura 13. Comparação entre um sistema catecólico e um grupo 1,3-benzodioxola.

A restrição conformacional, maior estabilidade metabólica, e a presença de grupos aceptores de hidrogênio, estimularam a inclusão deste grupo funcional neste estudo.

1.7 PRECEDENTES DO LABORATÓRIO

O Laboratório de Pesquisa em Fármacos e Medicamentos está envolvido na busca de novos compostos de origem natural e sintética, que possam interagir com marcadores bioquímicos da doença de Alzheimer. Neste grupo, estão os inibidores da acetilcolinesterase (AChE), inibidores da formação de fibrilas do peptídeo β -amiloide, inibidores da β -secretase, inibidores da monoaminoxidase (MAO) e anti-oxidantes [71].

Dentre os compostos avaliados, destacam-se as acil-hidrazonas derivadas de 4-quinolonas, que apresentaram não só efeito inibitório sobre a AChE, como também

sobre a formação de fibrilas do peptídeo β -amiloide. Os valores de IC_{50} para a inibição da AChE ficaram em torno de 1 μ M, para a maioria dos compostos sintetizados [71c]. Duas delas, apresentaram valores na escala nanomolar, com destaque para a acil-hidrazona derivada do piperonal (**Figura 14**). Outra classe de compostos que vem sendo estudada neste laboratório é a das chalconas e derivados. Tanto as chalconas naturais, quanto os seus análogos sintéticos apresentam algum tipo de atividade biológica, havendo relatos de atividade anticâncer, anti-inflamatória, antioxidante, dentre outras [72]. Entretanto, poucos estudos foram realizados sobre o seu efeito sobre a AChE e outros marcadores da doença de Alzheimer. Neste grupo de pesquisa, foi sintetizada uma série de chalconas que apresentaram efeito inibitório sobre a AChE e outros marcadores. A chalcona representada na Figura 14 é um exemplo.

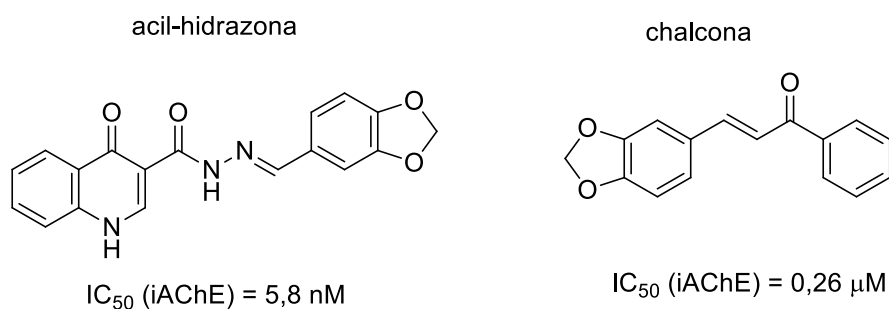


Figura 14. Exemplo de acil-hidrazona e (esquerda) e chalcona (direita), ambas contendo o grupo 1,3-benzodioxola, apresentando efeito inibitório potente sobre a AChE.

Assim, o Laboratório se propôs a continuar investigando compostos dessas classes.

2 OBJETIVOS

2.1 GERAL

Considerando os resultados tanto de inibição da AChE quanto os de formação de fibrilas A β , selecionou-se para este projeto, uma série de compostos contendo o grupo benzodioxola (**Figura 15**) para verificar o impacto deste grupo sobre a atividade biológica.

2.2. ESPECÍFICOS

- ✓ Sintetizar acil-hidrazonas derivadas do ácido 3-carboxi-4-quinolona
- ✓ Sintetizar acil-hidrazonas contendo heterociclo (isoniazida e quinolina)
- ✓ Sintetizar acil-hidrazonas derivadas da hidrazida do ácido benzóico
- ✓ Sintetizar acil-hidrazonas derivadas do ácido (3,4-metilenodioxi)cinâmico
- ✓ Sintetizar chalconas contendo a subunidade benzodioxola
- ✓ Avaliar os compostos com o grupo benzodioxola quanto à atividade anticolinesterásica e o efeito sobre a formação de fibrilas β -amiloide (A β_{42})
- ✓ Comparar o efeito observado com o de análogos estruturais sem o grupo benzodioxola
- ✓ Analisar modos possíveis de interação dos compostos ativos com o sítio ativo da AChE, por ancoramento molecular (*docking*)

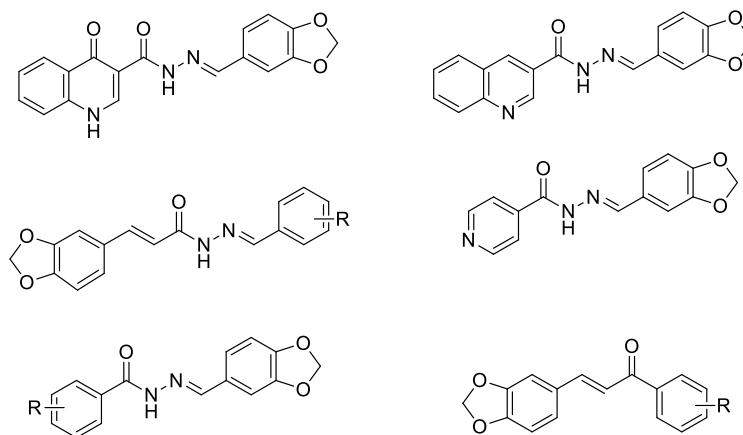


Figura 15. Séries de compostos a serem sintetizados e avaliados neste estudo

Outras acil-hidrazonas e chalconas, que não contêm o grupo benzodioxola, deverão ser estudadas para fins de comparação da atividade com as que apresentam a subunidade benzodioxola.

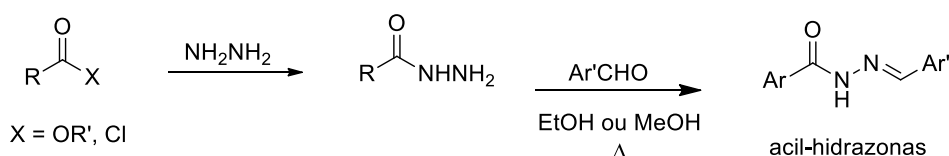
3 METODOLOGIA

3.1 SÍNTESE

O procedimento sintético envolverá interconversões de grupos funcionais bem conhecidas na literatura e também estabelecidas no grupo de pesquisas.

3.1.1 Obtenção das acil-hidrazonas

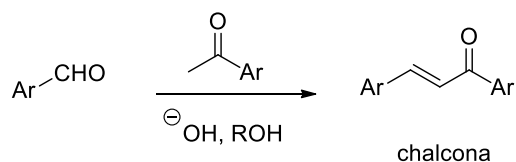
A proposta consiste na preparação das hidrazidas, pela reação do ácido carboxílico ou derivado de ácido e hidrazina, conforme **Esquema 1**. A hidrazida obtida será submetida a uma reação de condensação com o aldeído adequadamente substituído. No caso das acil-hidrazonas da série B, não será necessário preparar a hidrazida precursora, uma vez que é comercial e já foi adquirida pelo laboratório. As condições de reação estão pré-estabelecidas no grupo, necessitando eventualmente de alguma modificação [73].



Esquema 1. Rota para a obtenção das acil-hidrazonas

3.1.2 Obtenção de chalconas

As chalconas serão obtidas através da condensação de Claisen-Schmidt [74], entre um aldeído aromático e uma acetofenona, substituída ou não. A condensação vem sendo realizada em nosso laboratório, em condições básicas (KOH ou NaOH) em solvente polar prótico (MeOH ou EtOH), conforme **Esquema 2**.



Esquema 2. Condensação de Claisen-Schmidt, proposta para a obtenção de chalconas

3.2 AVALIAÇÃO BIOLÓGICA

3.2.1 Efeito dos compostos sobre a atividade da AChE

Os ensaios para avaliação da atividade inibidora dos compostos frente à enzima AChE, adquirida da Sigma, cuja origem é do organismo peixe elétrico (*electric eel*) foram realizados através do método colorimétrico descrito por Ellman e colaboradores [75]. O ensaio é realizado em uma placa de 96 poços onde em cada poço são adicionados o reagente de Ellman (ácido 5,5'-ditiobis(2-nitrobenzoico), água Milli-Q, a enzima, o composto teste (100 µM) e o substrato iodeto de acetiltiocolina (ATC). Tacrina, que é um inibidor conhecido da AChE, foi utilizada como controle positivo de inibição. Em um outro poço determinado como controle negativo, adiciona-se todos os reagentes menos o composto teste ou a Tacrina. Então é realizada leitura da placa em um espectrofotômetro UV/Vis a 415 nm em 0 (absorbância inicial, A_i) e 5 minutos (absorbância final, A_f). A diferença entre a absorbância final e a inicial é dividida por 5 e o valor obtido (Δ/min), ver fórmula seguinte, é utilizado para calcular o percentual de inibição. Esse protocolo foi seguido para as amostras (Ca), o controle negativo (Cn) e controle positivo (tacrina). Os compostos com atividade superior a 70%, foram reavaliadas em concentrações diferentes.

$$\% \text{ inibição} = 100 \times [\Delta/\text{min} (Cn) - \Delta/\text{min} (Ca)] / \Delta/\text{min} (Cn)$$

3.2.2 Efeito dos compostos sobre a agregação do peptídeo A β

A agregação do peptídeo amiloide foi medida através da emissão de fluorescência da tioflavina-T (ThT). Na presença de formas pré-fibrilares e fibrilares, ocorre um aumento na emissão de fluorescência [76, 77]. O procedimento foi realizado de acordo com o previamente reportado no laboratório [78]. Esse experimento foi supervisionado pela Dra. Renata Parruca Sakata.

O percentual de inibição foi calculado subtraindo-se de 100, o valor da diferença entre a emissão de fluorescência no tempo 0 e após 24 h (excitação em 450 nm e emissão a 485 nm).

3.2.3 Inibição da enzima β -secretase (BACE-1)

O método utilizado foi o método FRET (transferência de energia de ressonância por fluorescência). O protocolo seguido foi o do fabricante do kit (Thermo Fisher

Scientific, P2985). O ensaio é realizado em uma placa de 96 poços escura onde em cada poço são adicionados o tampão (acetato de sódio 50mM, pH 4,5), substrato (0,75 µM em tampão), enzima (1U/mL em tampão) e o composto teste (50µM em DMSO). Após 60 minutos de incubação foi feita a leitura em fluorímetro com leitor de placas, nos comprimentos de onda 545 nm e 585 nm, para excitação e emissão, respectivamente. O controle positivo de inibição foi a quercetina (IC_{50} = 5,6 µM) [79].

A diferença entre a fluorescência emitida pelo controle negativo (hidrólise do substrato pela BACE-1) e a fluorescência emitida pelos compostos testes é utilizada para o cálculo do percentual de inibição. Na fórmula seguinte, Cn é a fluorescência do controle (solução-tampão, substrato e enzima), e Ct, do composto-teste.

$$\% \text{Inibição} = [(Cn - Ct)/Cn] \times 100$$

3.3 ANCORAMENTO MOLECULAR (DOCKING)

Os estudos de *docking* molecular dos compostos foram realizados no programa AutoDockVina [80]. O composto foi desenhado no programa GaussView 5.0.8 e em seguida, as conformações ideais foram calculadas pelo método semi-empírico PM6 no Gaussian 09. As estruturas obtidas foram utilizadas para realizar o *docking*. Todos os estudos de *docking* desta pesquisa foram realizados com ligantes flexíveis, ou seja, suas ligações são rotacionáveis. A estrutura cristalográfica da enzima acetilcolinesterase e foi obtida no PDB (*Protein Data Bank*), com o código 1EVE com resolução de 2,5 Å, proveniente do organismo *Tetronarcecalifornica* e está complexada com Donepezila, um conhecido inibidor da acetilcolinesterase e que é utilizado em clínica. O procedimento para as acil-hidrazonas da *série C* foi realizado pelo aluno Pedro Henrique Gibim Fracaro (FCF/Unicamp).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Nesse projeto, planejou-se a síntese dos compostos com as estruturas representadas na **Figura 16**.

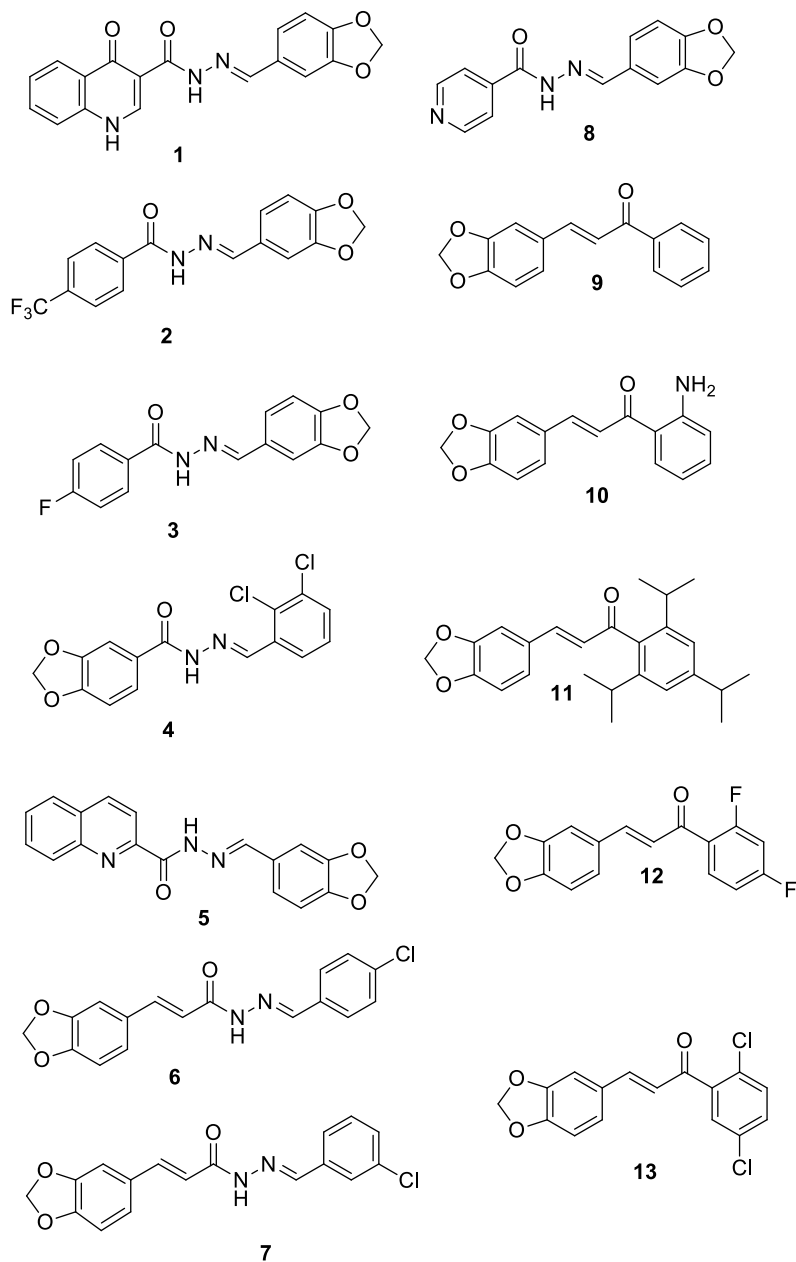


Figura 16. Estruturas dos compostos 1-13, estudados nesse projeto.

4.1 SÍNTESE DE ACIL-HIDRAZONAS

Acil-hidrazonas são bastante conhecidas na literatura, pelo fato deste grupo funcional ter características de doador e aceitor de ligação de hidrogênio, que pode ser complementar a amino ácidos de proteínas-alvo. Elas vêm sendo bastante

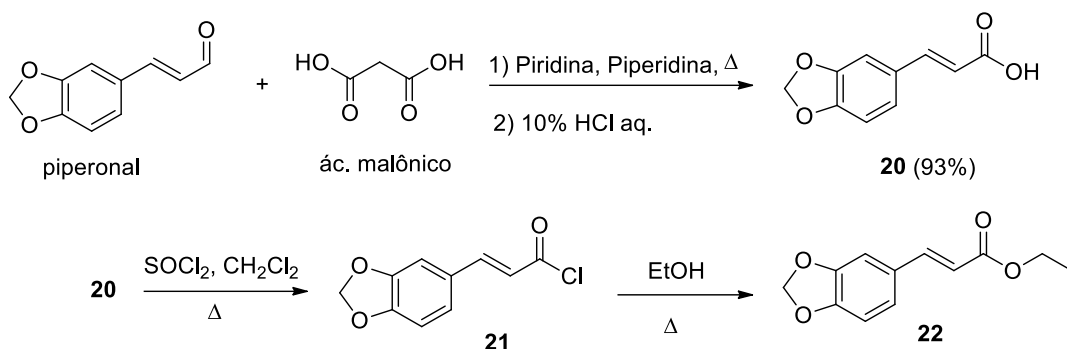
estudadas como compostos bioativos [81]. Para a síntese dessas moléculas, foi necessária a obtenção das hidrazidas precursoras, excetuando-se a hidrazida derivada do ácido isonicotínico (isoniazida), que é comercial, e foi utilizada para obter **8**. A acil-hidrazona **1**, embora estivesse disponível no laboratório, a quantidade era pequena e utilizou-se a hidrazida **14** disponível para obter a acil-hidrazona.

Assim, foram preparadas as hidrazidas **15** a **19**.

4.1.1 Obtenção de hidrazidas **15** a **19** (estratégia A)

Conforme citado na metodologia de síntese, as hidrazidas são obtidas a partir de ésteres ou cloretos de ácido. Os ésteres de partida foram adquiridos diretamente do comércio (Sigma), com exceção daquele contendo o grupo cinamoila, necessário à preparação da hidrazida **19**.

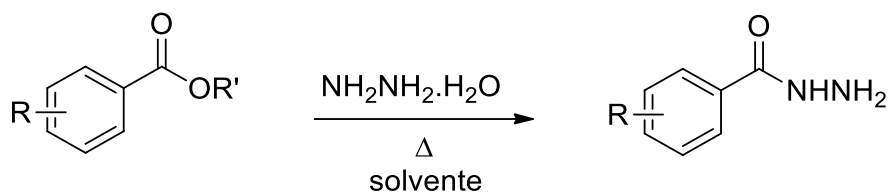
Neste caso, uma reação de condensação de ácido malônico com o piperonal, utilizando piperidina como base e piridina como solvente, forneceu o ácido **20** em 93% de rendimento (**Esquema 3**). Tendo o ácido em mãos, preparou-se o correspondente cloreto de ácido **21**, que posteriormente reagiu com etanol anidro para obtenção do éster etílico **22**.



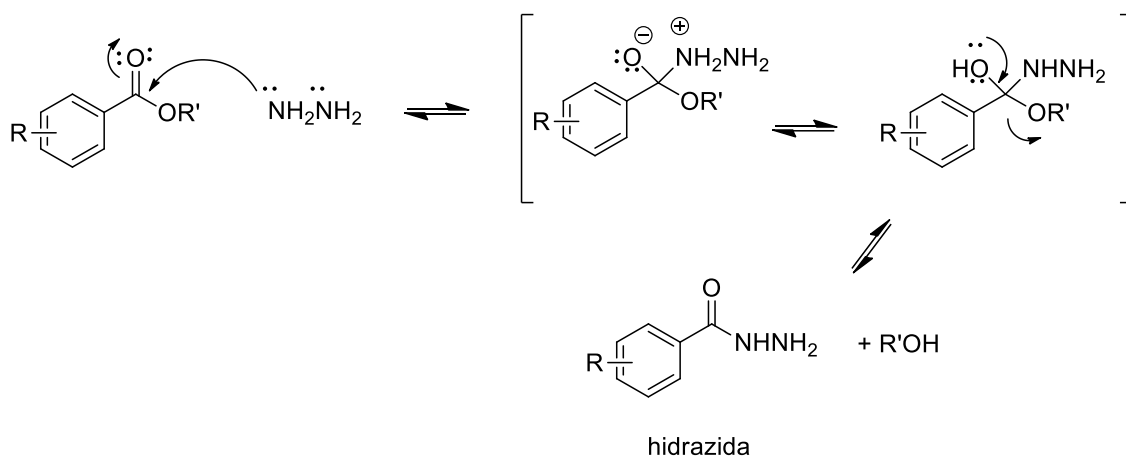
Esquema 3. Obtenção do éster (3,4-metiledioxi)cinamato de etila **22**

Os ésteres correspondentes às hidrazidas **15**, **17-19** (**Esquema 4**) foram submetidos à reação de transamidação com hidrato de hidrazina por transamidação dos ésteres correspondentes, em refluxo, utilizando-se etanol ou metanol como solvente, dependendo se o éster era etílico ou metílico, respectivamente. O ataque nucleofílico da hidrazina sobre o carbono carbonílico leva à formação de uma espécie tetraédrica, que reibridiza com a eliminação do álcool. Os resultados se

encontram na **Tabela 2**.



Mecanismo



Esquema 4. Preparação das hidrazidas a partir de ésteres. Mecanismo de reação.

As hidrazidas **16** e a isoniazida não foram sintetizadas neste trabalho, mas obtidas diretamente do comércio. A 3-carboidrazida-4-quinolona foi gentilmente cedida pela Dra. Gisele Silvestre, que desenvolveu seu Doutorado em nosso grupo de pesquisa.

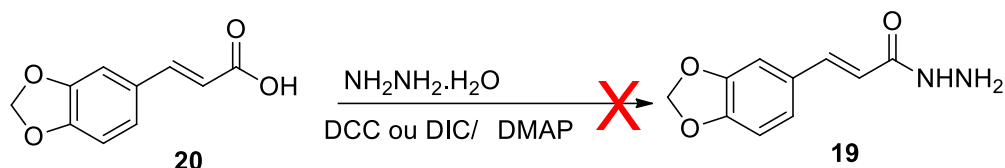
Tabela 2. Obtenção de hidrazidas: condições e rendimentos

Hidrazida	Ar	R'	Tempo (h), solvente	Rendimento %
15	4-CF ₃ Ph	etila	8, EtOH	82
17	3,4-(OCH ₂ O)Ph	etila	12, EtOH	90
18		metila	10, MeOH	60
19		metila	36, MeOH	18

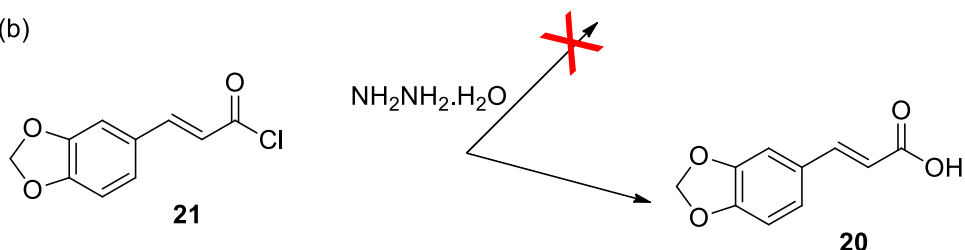
Como pode ser observado na Tabela 2, os rendimentos químicos foram de moderados a bons, excetuando-se a hidrazida **19**, que foi obtida em apenas 18%. Os produtos foram caracterizados por RMN, e os espectros não apresentaram sinais correspondentes aos H dos grupos etila/metila do éster de partida, e, por outro lado apareceram sinais alargados com deslocamentos químicos e integração compatíveis com os H ligados aos nitrogênios do grupo hidrazida.

O baixo rendimento para a obtenção da hidrazida **19**, estimulou a busca por outras tentativas de preparação de hidrazidas (**Esquema 5**).

(a)

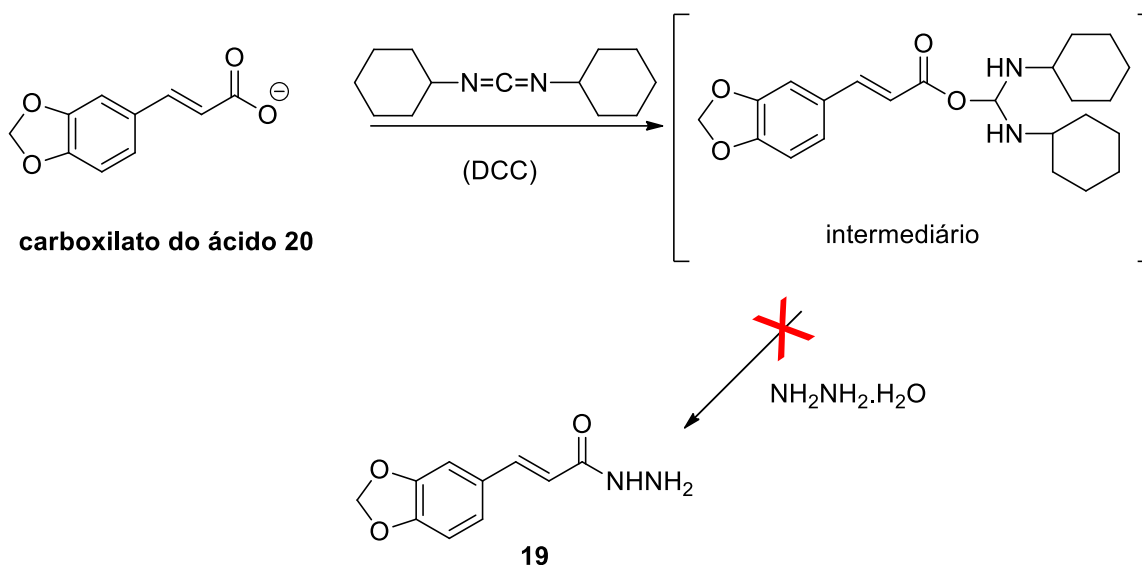


(b)



Esquema 5. Tentativas de obtenção da hidrazida **19**. (a) a partir do ácido **20**, utilizando reagentes de acoplamento; (b) diretamente a partir do cloreto de ácido **21**.

Tentou-se o acoplamento direto do ácido **20** com a hidrazina, na presença de dicitloexilcarbodiimida (DCC), e também com diisopropilcarbodiimida (DIC). *N,N*-dimetilaminopiridina (DMAP) foi utilizada para desprotonar o ácido carboxílico, gerando o carboxilato que é mais nucleofílico frente à função carbodiimida. A reação a partir do cloreto de ácido **21**, diretamente com hidrazina, também foi avaliada. Neste último caso, houve a recuperação do ácido de partida, pelo fato da hidrazina ser disponibilizada na forma de hidrato, promovendo a hidrólise do cloreto de ácido **21**. Na reação com DCC, o que se obteve foi uma mistura de produtos que não foi possível purificar para caracterizações detalhadas. A análise do espectro bruto de RMN de ^1H indicou a presença de picos compatíveis com o intermediário da reação, sugerindo que, embora seja uma molécula pequena, a substituição nucleofílica pela hidrazina no intermediário (**Esquema 6**), não era completa. Por outro lado, alguns sinais eram característicos da dicitloexilureia, subproduto da reação.

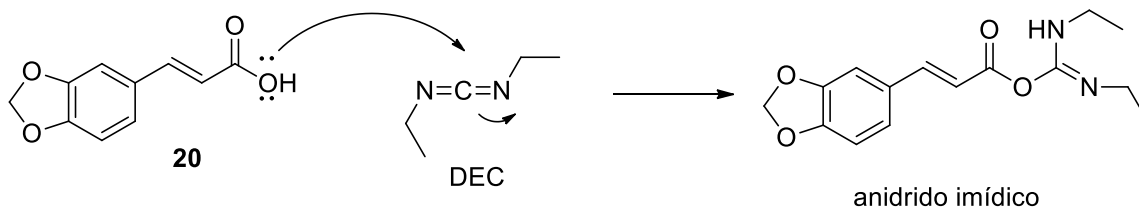


Esquema 6. Tentativa de preparação da hidrazida **19**, utilizando DCC como reagente de acoplamento

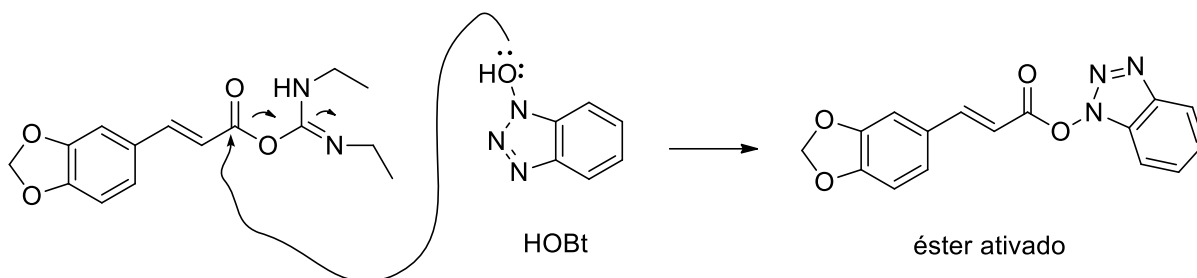
Uma alternativa seria a troca da carbodiimida, por uma solúvel em água, e portanto removida no workup, a análise do espectro bruto, seria mais simples do que quando contaminado com a dicicloexilureia, resultante da reação com DCC. Então, este reagente foi substituído por EDC (dietilcarbodiimida), na presença de HOBt (hidrozibenzotriazol). As etapas deste mecanismo estão representadas no **Esquema 7**. Na primeira etapa, a hidroxila do ácido faz um ataque nucleofílico à carbodiimida, gerando um anidrido, que é reativo frente ao HOBt. A substituição gera um éster ativado, suscetível à reação com a hidrazina.

Apesar do produto ter sido obtido, o rendimento ficou em torno de 35%, recuperando-se uma grande parte do ácido de partida.

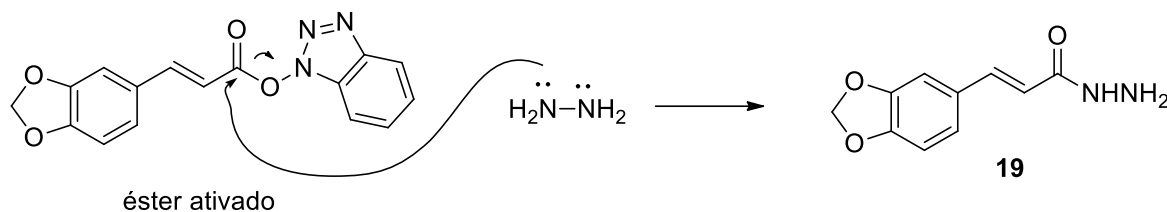
Primeira etapa: ativação da carbonila do ácido



Segunda etapa: formação de um éster ativado



Terceira etapa: formação da hidrazida

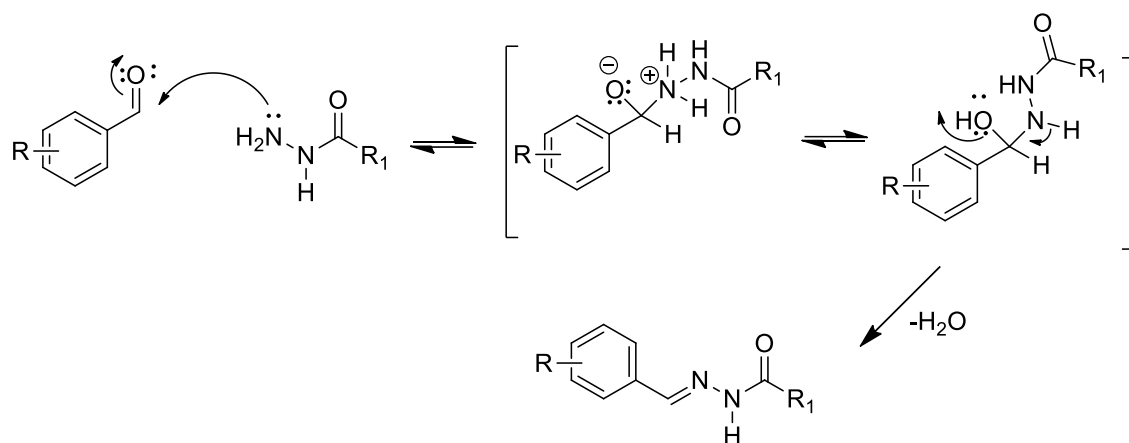


Esquema 7. Etapas envolvidas no mecanismo de formação de hidrazidas utilizando dietilcarbodiimida e hidroxibenzotriazol.

Tendo as hidrazidas necessárias em mãos, iniciou-se a preparação das correspondentes acil-hidrazonas.

4.1.2 Reação de obtenção de acil-hidrazonas

Tendo em mãos as hidrazidas necessárias, foi iniciada a preparação das acil-hidrazonas. Nesta reação, ocorre um ataque nucleofílico da amina (grupo NH₂) sobre a carbonila do aldeído, gerando um intermediário tetraédrico (**Esquema 8**), que, na sequência sofre uma reação de desidratação levando à formação da ligação C=N, resultando na função acil-hidrazona. As condições reacionais foram as mesmas para quase todas as hidrazidas.



Esquema 8. Mecanismo geral para a formação de *N*-acil-hidrazonas

A **Tabela 3** apresenta os resultados das reações para obter **1-8**.

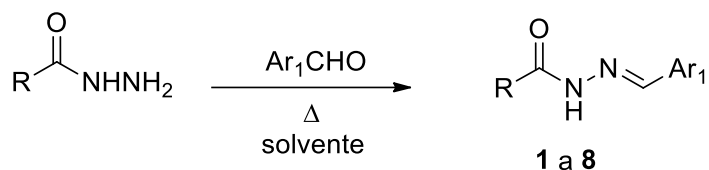
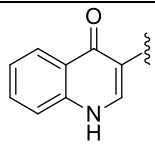
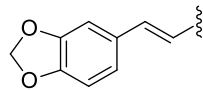
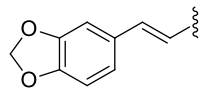


Tabela 3. Resultado das reações de obtenção das acil-hidrazonas

Acil-hidrazona	R	Ar ₁	Condições	Rend.%
1		3,4-metiledioxifenila	EtOH, piperazina	85
2	4-trifluormetilfenila	3,4-metiledioxifenila	EtOH	76
3	4-fluorfenila	3,4-metiledioxifenila	EtOH	< 20% (*)
4	3,4-(metilenodioxi)fenila	2,3-diclorofenila	EtOH	93
5	2-quinolinina	3,4-metiledioxifenila	EtOH, HCl	68
6		4-clorofenila	EtOH	55
7		3-clorofenila	EtOH	71
8	4-piridila	3,4-metiledioxifenila	MeOH, DMF	76

(*) não foi obtida em bom grau de pureza. Descartada para os ensaios biológicos

Os resultados obtidos foram de moderado a bons, com exceção da acil-hidrazona **3**. Apesar das várias tentativas, não só da reação propriamente dita, mas também de purificações, não se obteve sucesso.

Para as reações bem sucedidas, o espectro de RMN de ¹H tem, conforme exemplificado para a acil-hidrazona **1** (**Figura 17**), sinais característicos do hidrogênio imínico (N=C-H, H₁₄); hidrogênios característicos do aldeído de partida (H₂₁), sinal do hidrogênio vinílico do anel quinolônico (H₂), e sinal do hidrogênio da função amida (H₁₂).

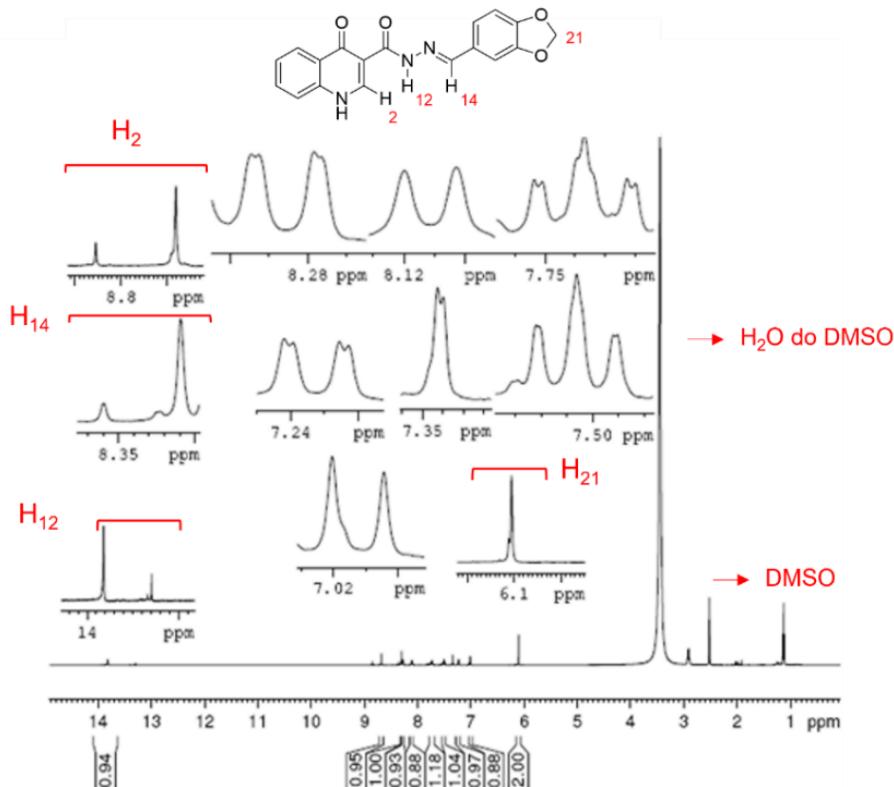
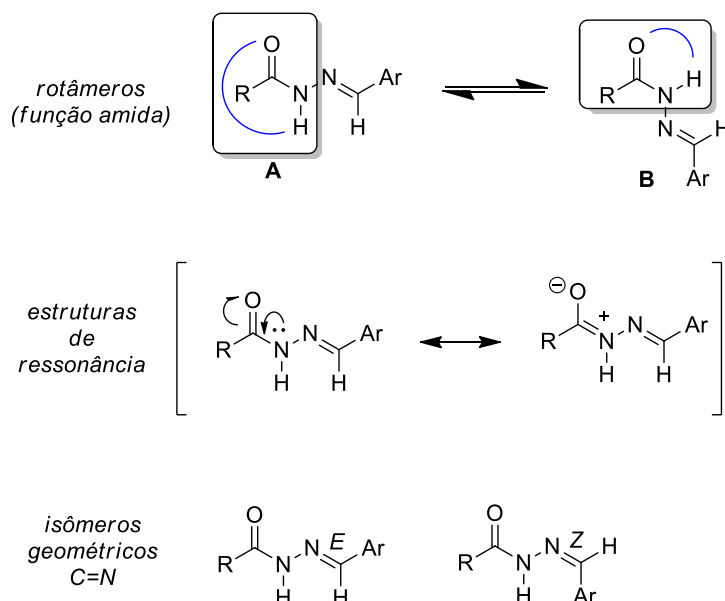


Figura 17. Espectro de RMN- ^1H (500 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) da acil-hidrazona **1**. Os sinais são bem pequenos em função da quantidade de água presente no DMSO. Os sinais estão destacados nas regiões ampliadas.

Alguns picos eram alargados ou duplicados com integrações diferentes. Esse comportamento levou à proposição de a) presença de rotâmeros decorrentes da função amida; b) isômeros geométricos da ligação $\text{C}=\text{N}$ formada. Essas possibilidades estão representadas no **Esquema 9**. A possibilidade de impureza foi descartada devido ao padrão dos sinais. Uma outra hipótese levantada foi a ocorrência de tautômeros imina-enamina, porém não se sustenta devido à ausência de hidrogênio no carbono adjacente à dupla.



Esquema 9. Superior: rotâmeros A e B; meio: estruturas de ressonância da porção *N*-acila; inferior: isômeros geométricos da função imina.

A presença de rotâmeros A e B (**Esquema 9**, superior) é devida à alta barreira rotacional de amidas, em decorrência da contribuição importante da estrutura de ressonância (**Esquema 9**, meio), que confere caráter sp^2 , à ligação $(\text{C}=\text{O})-\text{NH}$. A determinação da configuração da ligação dupla $\text{C}=\text{N}$, foi determinada pelo experimento de NOESY, que permitiu verificar a realção espacial entre os hidrogênios ligados ao N ($\text{N}-\text{H}$) e ao C-vinílico ($\text{N}=\text{C}-\text{H}$), **Figura 18**. Assim, a configuração é *E* (representação no **Esquema 9**, parte inferior).

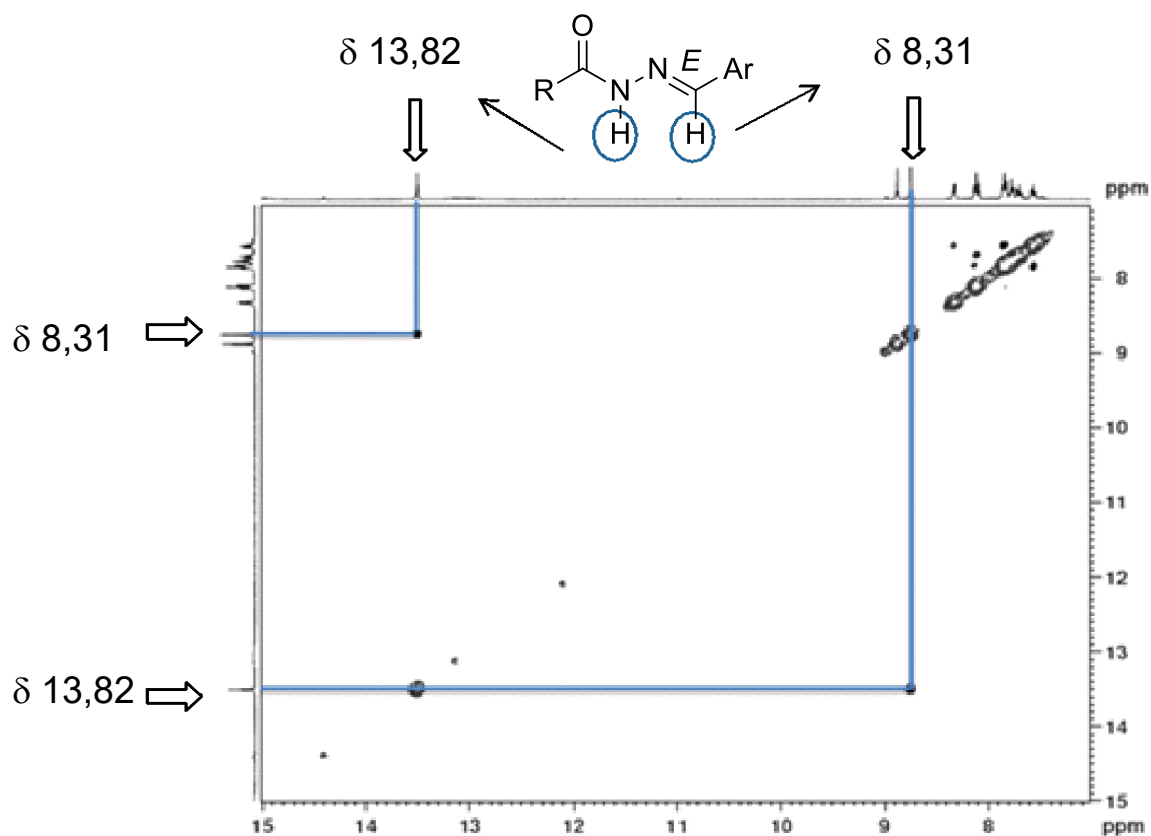


Figura 18. Expansão de região do espectro de RMN (experimento NOESY) da acil-hidrazona, na região de 15 a 7 ppm, em $DMSO-d_6$, mostrando a interação espacial entre os hidrogênios do grupo N-H e C-H, que confirma a configuração *E*.

A confirmação de que os sinais duplicados pertenciam a rotâmeros foi feita pela realização do espectro em alta temperatura. Observou-se que, à medida que esta aumentava os sinais coalesciam (**Figura 19**).

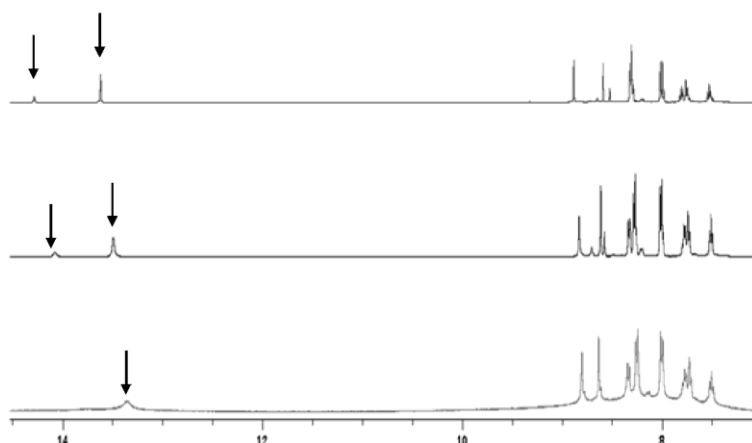
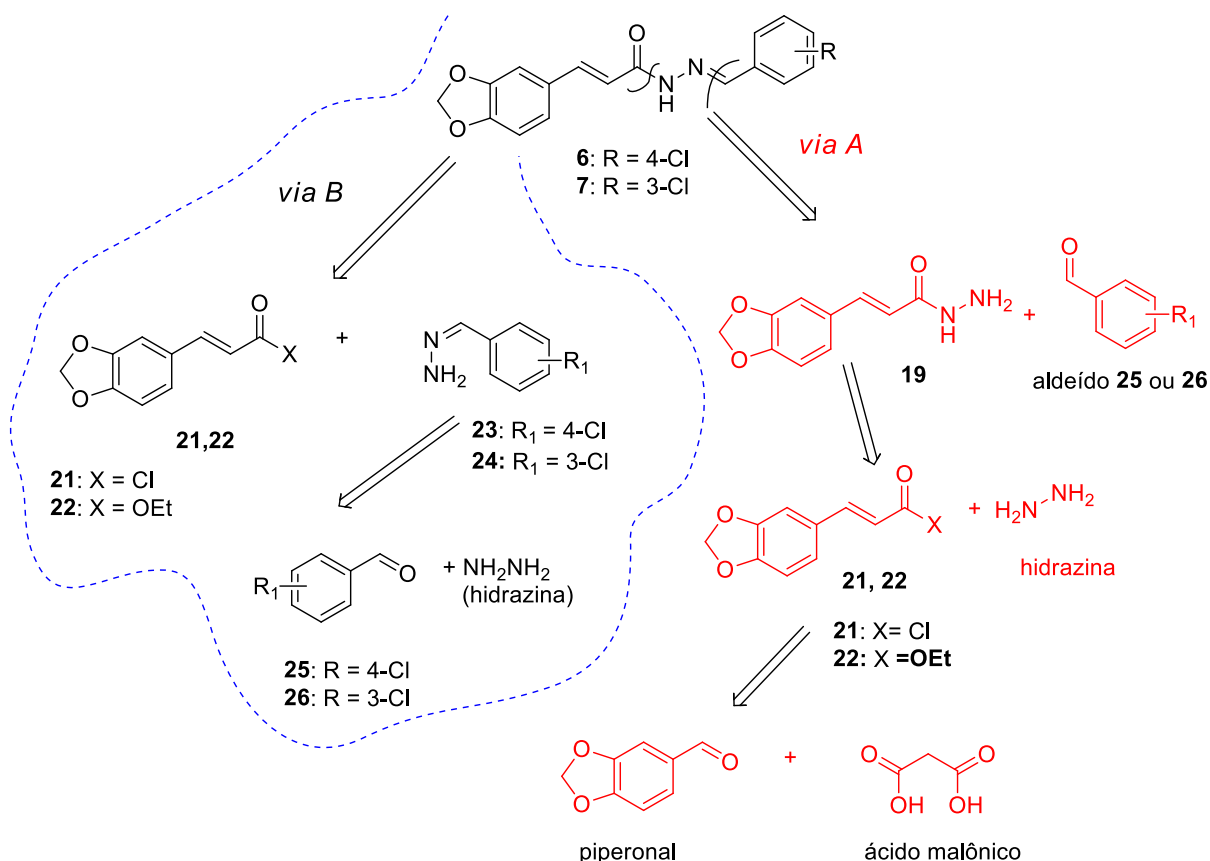


Figura 19. Expansão de região dos espectros de RMN- ^1H em diferentes temperaturas. A: 25°, B: 80°, C: 130° em $\text{DMSO}-d_6$.

4.1.3 Rota alternativa à reação de transmidação para obter as acil-hidrazonas 6 e 7

Essa sucessão de rendimentos baixos e produtos impuros na obtenção da hidrazida **19**, levou a uma reflexão sobre outra estratégia para se obter as acil-hidrazonas derivadas do ácido cinâmico.

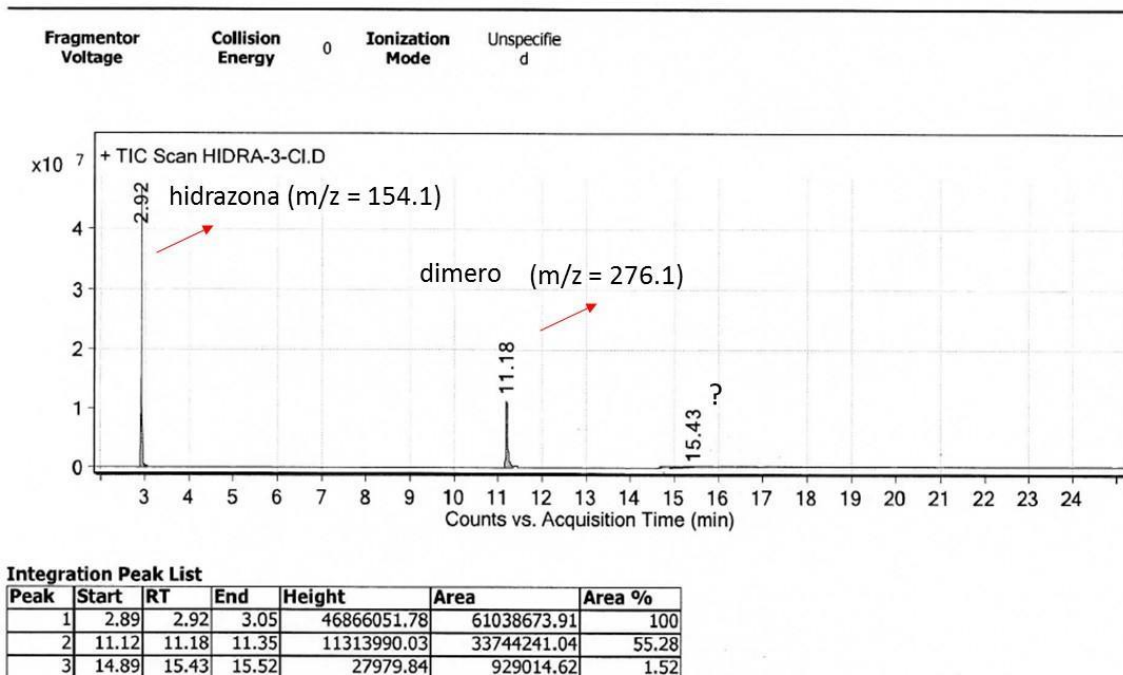
Quando se faz uma análise retro sintética de uma acil-hidrazona, é possível vislumbrar um outro ponto de desconexão e, portanto, uma outra estratégia sintética. O **Esquema 10** apresenta duas conexões possíveis para a obtenção desses compostos: a via A, que foi a empregada para a obtenção das acil-hidrazonas descritas no item anterior, e a via B, objeto desta discussão. A **via A** (destacada em vermelho no esquema) foi iniciada com a preparação do ácido (*E*)-3,4-metilenodioxicinâmico **20** ($\text{X} = \text{OH}$) por uma reação de Knoevenagel do piperonal com ácido malônico. Em seguida, o ácido seria convertido ao cloreto de ácido **21** ($\text{X} = \text{Cl}$) ou no éster **22** ($\text{R} = \text{OEt}$) para a preparação da hidrazida **19**. Entretanto, essa etapa deu um rendimento muito baixo e a **via B**, na qual foi feita a desconexão entre o grupo carbonila e o nitrogênio “amídico”, foi explorada. Essa desconexão evidencia os derivados de ácido **21** e as hidrazonas **23-24**, que, por sua vez, viriam da reação dos correspondentes aldeídos (**25** ou **26**) com a hidrazina.



Esquema 10. Análise retrosintética das acil-hidrazonas **6** e **7**, evidenciando duas possíveis rotas sintéticas. Via B: nova rota a ser investigada.

Assim, os aldeídos comerciais 4-clorobenzaldeído (**25**) e 3-clorobenzaldeído (**26**), foram submetidos à reação com a hidrazina. Para fins de discussão, o foco será dado à reação do aldeído **25**, sendo que o resultado foi semelhante ao do aldeído **26**. A reação foi iniciada pela preparação de uma mistura equimolar do aldeído e da hidrazina em etanol, com algumas gotas de ácido acético. A reação foi monitorada por cromatografia em fase gasosa, acoplada à espectrometria de massas (CG-MS) e observou-se a formação de dois produtos, com tempo de retenção de 2,92 min e 11,18 min, sendo o primeiro majoritário, com relação massa/carga de 154,1 e de 276,1, respectivamente (**Figura 20**). Essas espécies correspondem aos íons moleculares da hidrazona do clorobenzaldeído e ao dímero.

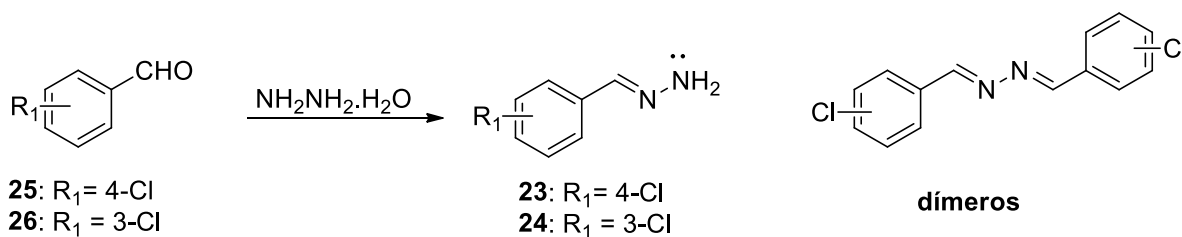
User Chromatograms



--- End Of Report ---

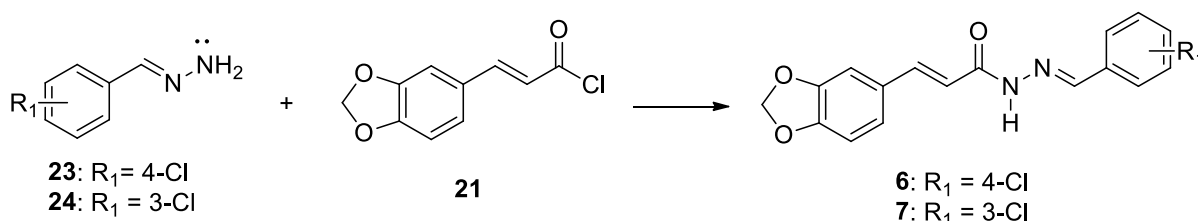
Figura 20. Cromatograma do bruto da reação de formação da hidrazona do aldeído **25**.

Atribuiu-se a formação do dímero ao ataque nucleofílico do grupo amino da hidrazona a uma outra molécula de aldeído (**Esquema 11**).

**Esquema 11.** Produtos da reação de clorobenzaldeídos com hidrazina.

Para tentar resolver esse problema, inverteu-se a ordem de adição dos reagentes, gotejando-se uma solução do aldeído sobre a hidrazina, mas ainda assim foi observada a formação do dímero, porém em menor proporção. Procedeu-se a uma cromatografia em coluna, utilizando com hexano como eluente para tentar separar o dímero, mas a hidrazona não foi obtida pura. Assim, a mistura enriquecida na hidrazona (**23** ou **24**) foi submetida à reação seguinte de formação das acil-hidrazonas, tendo como materiais de o cloreto de ácido **21** e a hidrazona (**Esquema**

12) levando à formação das acil-hidrazonas **6** e **7**, em rendimento de aproximadamente 43%.



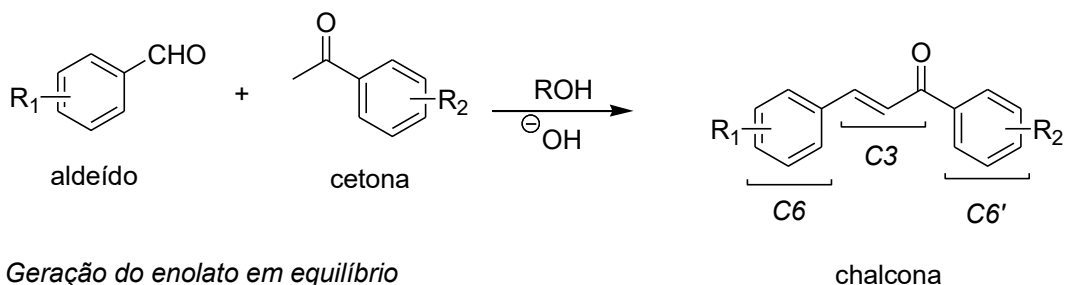
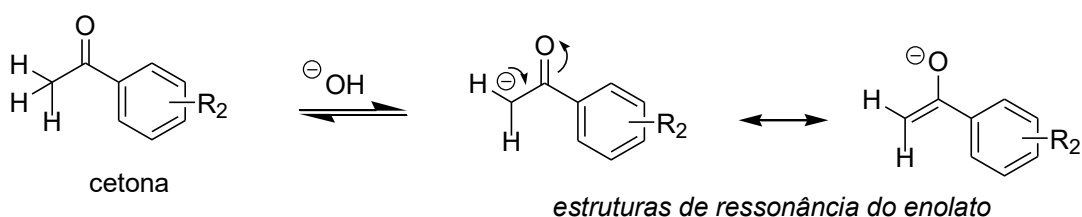
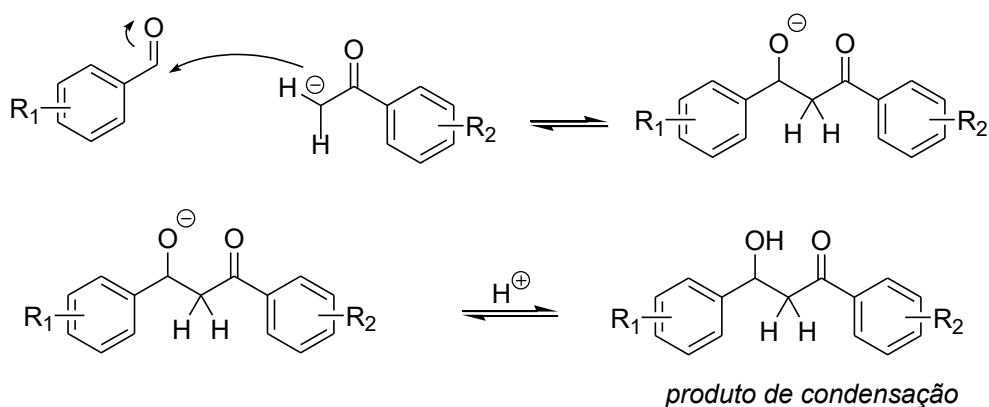
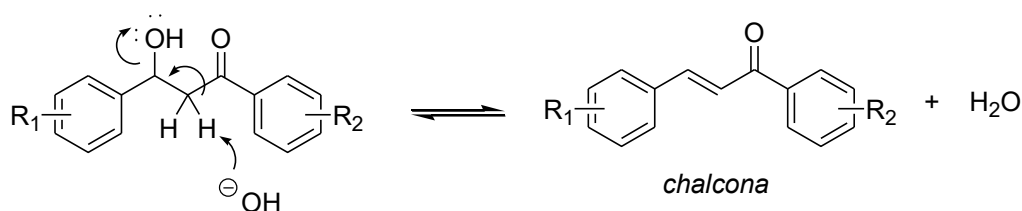
Esquema 12. Reação de formação da acil-hidrazona **6**, a partir da hidrazona **23** e do cloreto de ácido **21**.

As acil-hidrazonas foram facilmente identificadas por RMN. No espectro de ¹H Ao final de todas estas tentativas, conclui-se que as acil-hidrazonas **6** e **7** podem ser obtidas por diferentes rotas. Não é possível determinar qual é a melhor rota, uma vez que o material de partida na verdade é uma mistura de produtos. Os rendimentos apontados para a obtenção destes compostos foram calculados considerando a massa da mistura inicial, descontando-se a massa que foi obtida de dímero, após purificação por coluna cromatográfica. Essa impureza foi removida, mas por outro lado, foi muito difícil eluir completamente a acil-hidrazona, o que sem dúvida deve ter prejudicado o rendimento final.

4.2 OBTENÇÃO DE CHALCONAS

Chalconas são compostos contendo dois anéis aromáticos ligados através de um sistema carbonílico conjugado (sistema C6-C3-C6'). Estes compostos são bastante estudados e apresentam muitas propriedades biológicas descritas [82, 83], inclusive atividade relatada sobre marcadores da Doença de Alzheimer [84]. As chalconas foram obtidas através de uma reação de Claisen-Schmidt, entre um aldeído aromático e uma acetofenona, contendo os substituintes apropriados. A reação ocorre em meio básico e o solvente utilizado é etanol ou metanol, dependendo da solubilidade dos reagentes.

As etapas mecanísticas propostas para essa reação estão representadas no **Esquema 13**. Inicialmente, ocorre a desprotonação da cetona em equilíbrio em função da base ser fraca. Na sequência ocorre o ataque nucleofílico do enolato sobre o aldeído. O alcóxido formado é protonado gerando uma β-hidroxicetona. A eliminação de água, é possibilitada pela desprotonação do carbono α-carbonila pelo meio básico.

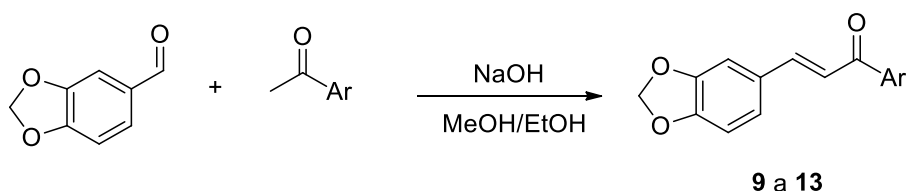
Esquema geral*Geração do enolato em equilíbrio**Adição do enolato ao aldeído e protonação**Desidratação***Esquema 13.** Etapas envolvidas na formação de chalconas pelo método de Claisen-Schmidt.

Essas reações foram acompanhadas por CCD, e, quando terminadas, o sólido foi coletado por filtração a vácuo e lavado com o metanol ou etanol gelado para remover os reagentes que não tenham sido convertidos em chalcona (esta não dissolve nestes solventes), e, na sequência com água gelado para remover o excesso do solvente alcóolico. Após secagem, quando necessário o sólido foi recristalizado em solvente específico de cada caso, ou purificado por cromatografia em coluna. Na

maioria dos casos, a purificação não foi necessária.

Os resultados se encontram na **Tabela 4**. Para as chalconas deste trabalho, o tempo médio de reação foi de 6 horas.

Tabela 4. Resultado da condensação de Claisen-Schmidt para obter as chalconas



Chalconas	Ar	Rend (%)
9	fenila	92
10	2-aminofenila	82
11	2,4,6-triisopropilfenila	73
12	2,4-difluorofenila	95
13	2,5-diclorofenila	84

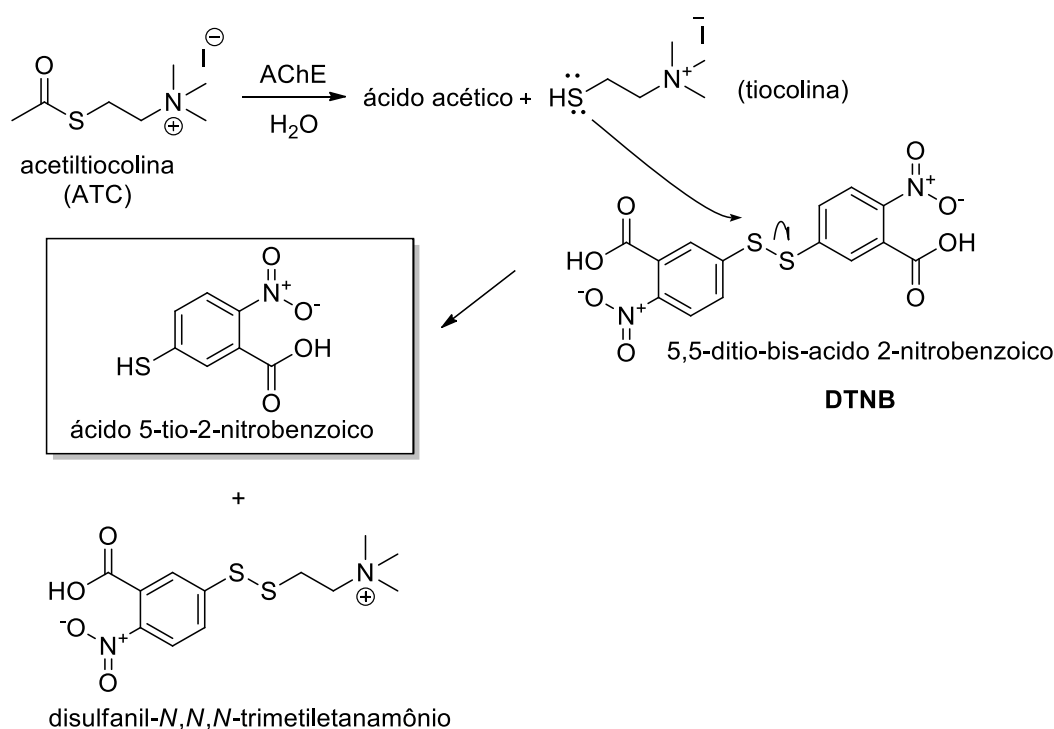
As chalconas são facilmente caracterizados por IV e RMN. Uma das principais características no espectro de RMN de ^1H é a presença de hidrogênios vinílicos ($\text{HC}=\text{CH}-\text{C}=\text{OAr}$) que acoplam com um alto valor de J ($\sim 16\text{Hz}$), sendo típico da configuração *E*. Também não são observados sinais dos materiais de partida, tais como o H ($\text{H}-\text{C}=\text{O}$) do aldeído e nem da metila ($\text{CH}_3-\text{C}=\text{O}$) da acetofenona. No espectro no IV, a carbonila da chalcona absorve em frequência menor do que as carbonilas dos reagentes, devido à conjugação da dupla.

Tendo os compostos em mãos, iniciou-se a etapa de avaliação biológica.

4.3 AVALIAÇÃO BIOLÓGICA

4.3.1 Efeito dos compostos sobre a enzima acetilcolinesterase (AChE)

A enzima acetilcolinesterase (AChE) de peixe elétrico foi adquirida de fonte comercial e o efeito dos compostos sintetizados sobre a sua atividade foi avaliado pelo método colorimétrico de Ellman. Este método se baseia na detecção de em 415 nm, um produto amarelo, gerado pela reação entre o reagente DTNB e tiocolina. Essa tiocolina é gerada pela hidrólise enzimática do substrato acetiltiocolina, mediada pela AChE. Assim, na presença de um inibidor, há menos produto formado ou nenhum, em caso de inibição total. O **Esquema 14** apresenta essas reações.



Esquema 14. Hidrólise da acetilcolina (ATC) mediada pela acetilcolinesterase, levando à formação de tiocolina, que reage com o DTNB (reagente de Ellman), originando o ácido 5-tio-2 nitrobenzóico, detectado em 415 nm.

O método colorimétrico detecta o ácido 5-tio-2-nitrobenzóico, de coloração amarela. Na microplaca é possível visualizar que, quando maior a atividade enzimática, mais amarelo fica o meio, sendo o contrário para a menor atividade enzimática. No caso das chalconas, que são em geral, bastante coloridas, foi feito um estudo prévio em nosso laboratório para ver como se comportavam em 415 nm, para

avaliar uma possível interferência no ensaio. Preparou-se uma solução 100 μM do composto-teste, e a partir daí, se descontava a eventual absorção do mesmo. No caso dessas chalconas não houve interferência. Tacrina e/ou donepezila foram utilizados como controles de inibição, por serem inibidores conhecidos e já comercializados. Todos os resultados foram realizados em triplicata. A **Figura 21**, representa uma microplaca com a organização do experimento.

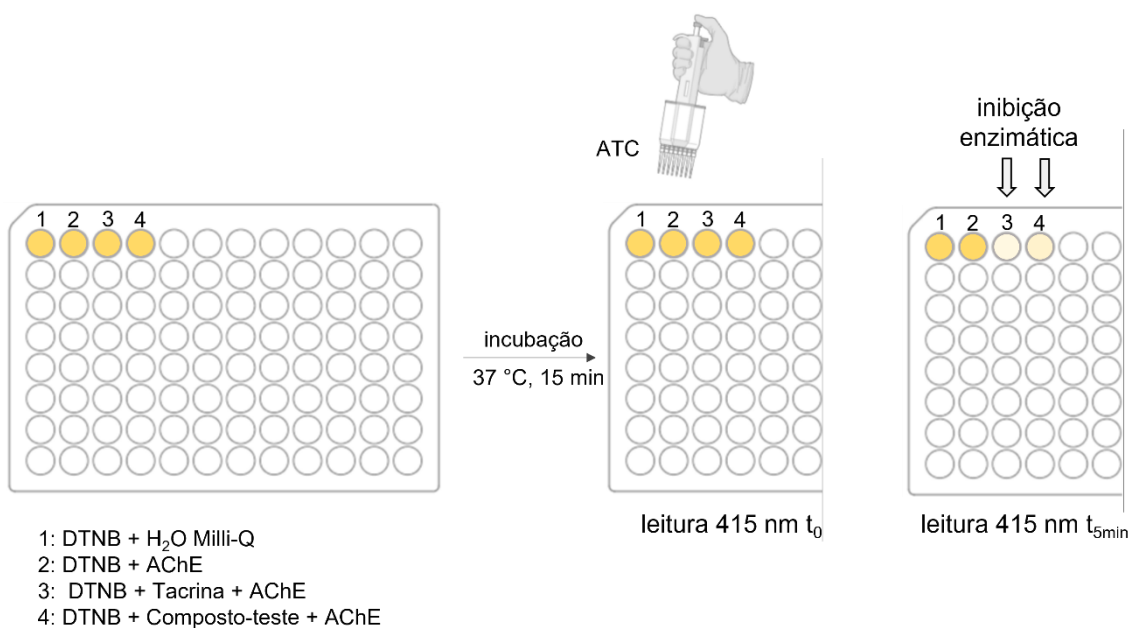


Figura 21. Representação de microplaca de 96 poços utilizada em ensaio de inibição de AChE, pelo método colorimétrico de Ellman. À esquerda, o início do experimento, exemplificado para uma única amostra-teste, indicando a composição de cada um dos poços; no meio: a microplaca após incubação, adição do substrato (ATC) e leitura no tempo zero; à direita, após 5 min de incubação: poço 3, contendo o inibidor tacrina e poço 4, a substância teste, com clareamento da coloração.

A partir do experimento inicial, o ensaio foi repetido em diferentes concentrações para fins de determinação da concentração mínima para inibir a atividade enzimática em 50%. Os resultados se encontram na **Tabela 5**.

Tabela 5. Avaliação do efeito inibitório dos compostos estudados sobre a atividade da AChE.

Compostos	IC ₅₀ (μM)
Acil-hidrazona 1*	0,0058
Acil-hidrazona 2	6,75
Acil-hidrazona 4	1,86
Acil-hidrazona 5	17,2
Acil-hidrazona 6	2,87
Acil-hidrazona 7	2,04
Acil-hidrazona 8	3,21
Chalcona 9	0,26
Chalcona 10	4,16
Chalcona 11	0,74
Chalcona 12	0,26
Chalcona 13	2,53

* Composto obtido e avaliado por da Silva, em seu doutoramento no grupo de pesquisa deste projeto [Ref. 71c]

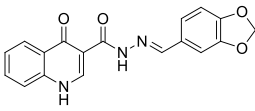
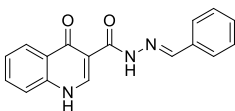
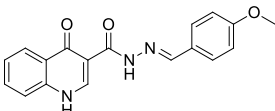
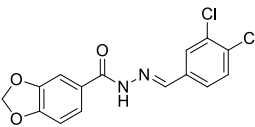
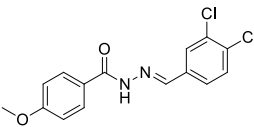
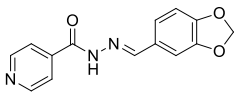
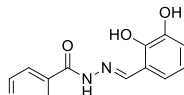
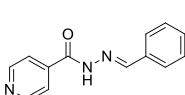
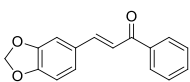
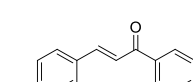
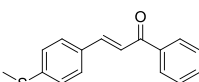
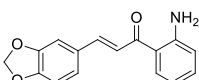
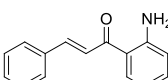
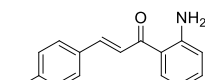
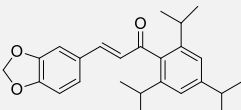
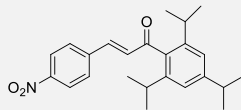
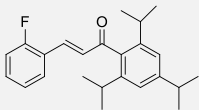
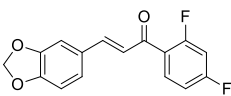
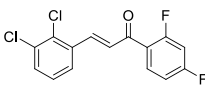
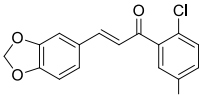
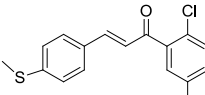
Neste grupo de compostos avaliados, que apresentam o grupo [1,3] benzodioxola, todos tiveram efeito inibitório sobre a AChE. Neste mesmo estudo, incluiu-se outras chalconas e acil-hidrazonas estruturalmente relacionados, mas que não apresentam em sua estrutura este grupamento. Alguns deles não tiveram efeito sobre a atividade enzimática ou foram significativamente menos potentes frente à AChE. Esta comparação está mostrada na **Tabela 6**. Para as acil-hidrazonas **6** e **7**, não se obteve os análogos. As demais acil-hidrazonas e chalconas análogas estavam disponíveis no laboratório, tendo sido sintetizadas durante os projetos de Doutorado, Iniciação ou Trabalhos de Conclusão de Curso orientados pela Dra. Wanda, conforme a fonte citada. Destaca-se que em alguns casos, não foi possível ter um análogo estrutural muito próximo, e, nestes casos, foi incluído análogo com substituição total do grupo [1,3]-benzodioxola.

Observa-se que na grande maioria dos casos, a presença do grupo [1,3]-benzodioxola contribui para a atividade, com exceção do grupo formado por **11**, **11A**

e **11B**, porque os dois análogos sem o grupo benzodioxola (**11A** e **11B**) são mais potentes que **11**. Este é um resultado difícil de discutir, uma vez que o grupo nitro, presente em **11A**, tem um caráter retirador de elétrons do anel, tanto por indução quanto por ressonância, que não é o mesmo do metilenodioxi e nem do flúor, ambos retiradores por indução e doadores por ressonância. É possível que o posicionamento da molécula no sítio ativo da enzima seja modificado pelos grupos tri-isopropila, que são volumosos e de alguma forma podem tornar mais difíceis as interações com o metilenodioxi do anel A da chalcona.

O grupo metilenodioxi apresenta dois aceptores de hidrogênio para ligação de hidrogênio. Assim, esta potência maior para esse tipo de análogo pode estar relacionada a este fato. No caso das acil-hidrazonas **6** e **7**, isto foi suportado por docking molecular com a AChE, que mostrou interações deste grupo com resíduos de aminoácidos do sítio ativo da AChE. Este estudo será apresentado mais adiante.

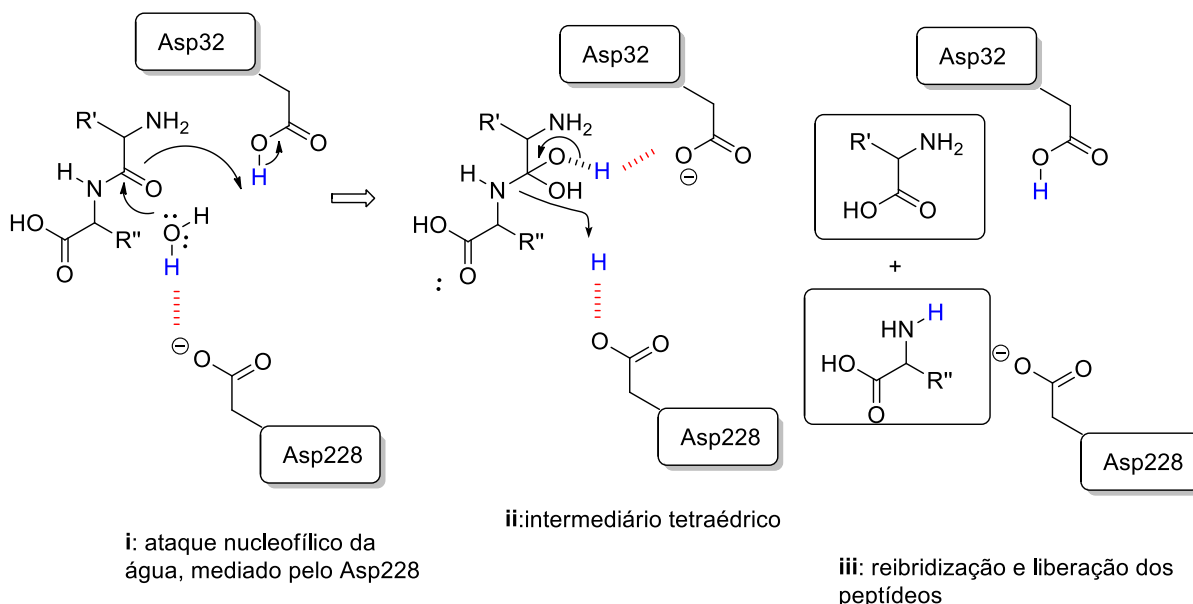
Tabela 6. Comparativo entre valores de IC₅₀ para inibição da AChE dos compostos contendo o grupo benzodioxola e análogos estruturais que não apresentam esse grupo.

Compostos	Análogo(s)	Fonte	
 1: 0,0058 μM	 1A: 4,19 μM	 1B: 5,9 μM	71c
 4: 1,86 μM	 4A: 3,97 μM		71g
 8: 3,21 μM	 8A: (-)	 8B: (-)	71g, h
 9: 0,26 μM	 9A: 1,47 μM	 9B: 4,81 μM	71d
 10: 4,16 μM	 10A: 83 μM	 10B: 19 μM	71d
 11: 0,74 μM	 11A: 0,52 μM	 11B: 0,03 μM	71d,f
 12: 0,26 μM	 12A: 1,81 μM		71f
 13: 2,53 μM	 13A: 11,9 μM		71f

4.3.2 Avaliação dos compostos frente à enzima β -secretase (BACE-1)

A enzima β -secretase, também conhecida como BACE-1, pertence à classe das aspartil protease [85], uma enzima que conta com a participação de resíduos de

aminoácido aspartato no seu mecanismo de hidrólise. A sequência destes aminoácidos, depende da protease: enquanto a protease do vírus HIV utiliza os resíduos Asp25 e Asp25', a BACE utiliza os resíduos Asp32 e 228 [86]. O **Esquema 15**, é uma representação da hidrólise da proteína, mediada pela BACE-1.



Esquema 15. Mecanismo da hidrólise da proteína precursora do amiloide (PPA), mediada pela BACE-1.

A polaridade dos resíduos de aspártico, tanto na sua forma ionizada, quanto na não-ionizada, permitem a coordenação com moléculas de água. A participação coordenada dos resíduos Asp228 e Asp32, favorecem a reação de hidrólise do substrato proteico, no caso, a proteína precursora do amiloide (PPA). Por um lado, a coordenação de um hidrogênio da água com Asp228, favorece a transferência do grupo O-H da água para o substrato proteico, via adição nucleofílica, e do outro, a ativação da carbonila pelo H do Asp32, levando à formação do intermediário tetraédrico (**etapa i**). O intermediário tetraédrico formado reibridiza concomitantemente à transferência de próton do Asp228 para o nitrogênio, transformando em um bom grupo de saída (**etapa ii**). Assim, os peptídeos são liberados (**etapa iii**) e os resíduos de Asp retornam à configuração inicial (Asp228 ionizado e Asp32, protonado), permitindo a conservação do sítio catalítico.

Este mecanismo detém uma similaridade com a hidrólise de proteases virais, gerando proteínas funcionais para o vírus HIV. O conhecimento deste mecanismo permitiu o desenvolvimento de inibidores de proteases virais, como por exemplo, o saquinavir. O desenvolvimento deste fármaco se baseou no modelo do estado de

transição da hidrólise, possibilitado pelo grupo hidroxietilenoamino. Embora diferentes regiões da molécula façam interações importantes com o sítio ativo da BACE-1, os resíduos de Asp25 e Asp25', pertencentes à díade catalítica, complexam com o oxigênio carbonílico da ligação peptídica a ser clivada [87]. A mimetização do estado de transição tetraédrico é feita pelo grupo hidroxietileno (**Figura 22**).

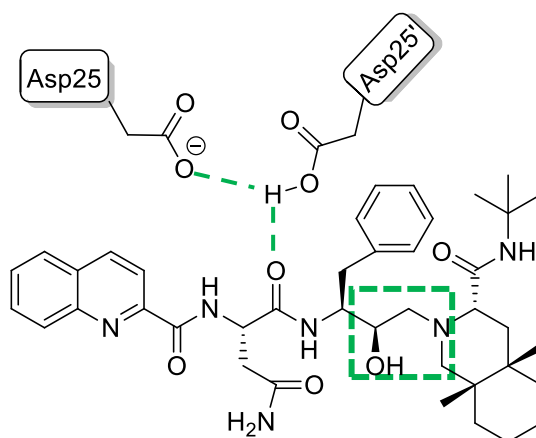
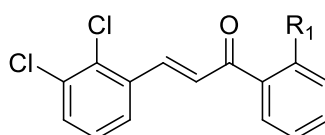


Figura 22. Estrutura do saquinavir indicando a interação do grupo carbonila com os dois resíduos de aspártico e com destaque para o grupo hidroxietilenoamino, bioisóstero não clássico do grupo amida.

O sucesso do desenvolvimento de inibidores de HIV protease incentivou o desenvolvimento de inibidores da BACE-1, utilizando a mesma estratégia de mimetização do estado de transição. Entretanto, os resultados não foram promissores [88].

No grupo de pesquisa onde esse projeto foi desenvolvido, Sakata e colaboradores [78], sintetizaram e avaliaram uma série de chalconas quanto ao seu efeito sobre a BACE-1, sendo que algumas 2'-aminochalconas tiveram resultados promissores. Quando os resultados foram comparados com análogos que não têm o grupo amino na posição 2' observou-se que o efeito inibitório era perdido (**Figura 23**).



$R_1 = \text{H}$: sem efeito inibitório sobre a BACE-1
 $R_1 = \text{NH}_2$: IC_{50} (BACE-1) 2,71 μM

Figura 23. Chalconas testadas frente à BACE-1: $R_1 = \text{H}$, sem atividade; $R_2 = \text{NH}_2$: IC_{50} 2,71 μM .

No mesmo estudo do grupo, foi realizada uma análise por docking molecular da 2'-aminochalcona e a estrutura cristalográfica da BACE-1 depositada no Protein Data Bank com o código 4ZPF. A **Figura 24** é uma representação esquemática das interações da 2'-aminochalcona com o sítio ativo da BACE-1. É possível observar interações importantes do grupo amino e a carbonila com os aminoácidos da díade catalítica. O grupo amino da 2'-aminochalcona atua como doador de hidrogênio, estabelecendo uma ligação de hidrogênio com o Asp228, com a distância de 2,5 Å. O oxigênio do grupo carbonila da chalcona atua como acceptor, formando uma ligação de hidrogênio com o grupo hidroxila do Asp32 (distância de 3,4 Å). Outras interações também foram observadas: do grupo amino com Gly34 (ligação de hidrogênio, 2,7 Å); do cloro da posição 3 com a Lys107 (ligação de halogênio, 3,3 Å), enquanto o átomo de cloro da posição 2 faz uma interação pi-alquila com a Tyr71.

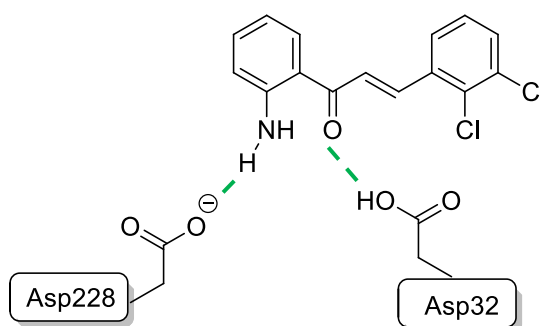


Figura 24. 2'-Aminochalcona e as interações via ligação de hidrogênio (em verde), com os aminoácidos da díade catalítica Asp228 e Asp32, com os grupos amino e carbonila, respectivamente.

A função acil-hidrazona possui grupos funcionais que hipoteticamente poderiam estabelecer ligações de hidrogênio com os resíduos da díade catalítica (**Figura 25**), além da possibilidade de interações com outros resíduos do sítio, através dos substituintes aromáticos. Assim, incluiu-se neste trabalho algumas acil-hidrazonas para serem avaliadas frente à BACE-1.

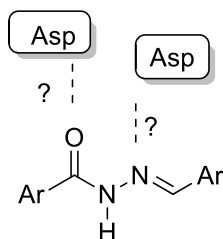


Figura 25. Função acil-hidrazona e potenciais interações com resíduos de aspártico do sítio catalítico da BACE-1.

O método que vem sendo empregado para a avaliação da atividade inibitória de compostos sobre a BACE-1 é a transferência de energia de ressonância por fluorescência (FRET), utilizando um protocolo que é o recomendado pelos fabricantes.

A **Figura 26** mostra esquematicamente o processo de detecção de um substrato hidrolisado pela ação da BACE-1 (enzima β -secretase). O efeito inibitório é observado quando não há emissão correspondente ao substrato hidrolisado em 585 nm (octapeptídeo).

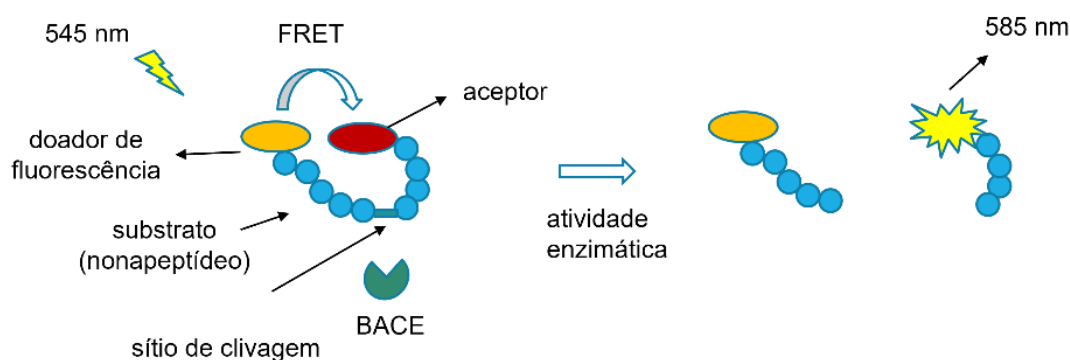


Figura 26. Esquema da transferência de energia de ressonância por fluorescência quando um substrato peptídico é clivado pela BACE-1.

Os ensaios foram realizados em duplicata e em microplaca escura de 96 poços. O resultado foi decepcionante, porque apenas os compostos **1** e **8** inibiram a BACE-1, e os seus valores de IC_{50} foram calculados (**Figura 27**).

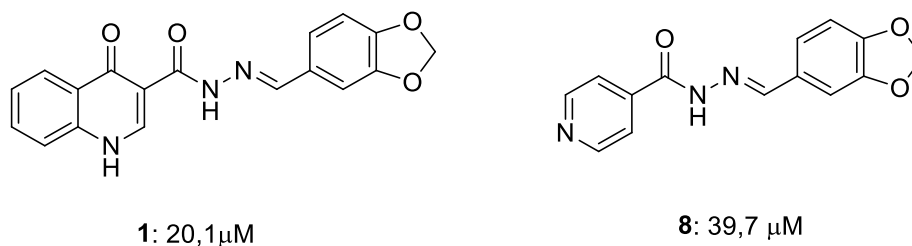


Figura 27: Acil-hidrazonas que inibiram a atividade da BACE-1

4.3.3 Avaliação dos compostos frente à agregação do peptídeo A β

O bloqueio do processo de formação de agregados do peptídeo é uma das abordagens no desenvolvimento de candidatos a fármacos para o tratamento da Doença de Alzheimer [89] (**Figura 28**). O planejamento destes inibidores de agregação não é uma tarefa simples, sob o ponto de vista da modelagem molecular, em função da elevada flexibilidade do peptídeo e, poucos registros são encontrados na literatura, utilizando apenas uma sequência do peptídeo [90]. Assim, considerando a característica multifatorial da Doenças de Alzheimer, a grande maioria das pesquisas investiga a capacidade de compostos inibirem a agregação do peptídeo A β em complementação à inibição de outros marcadores.

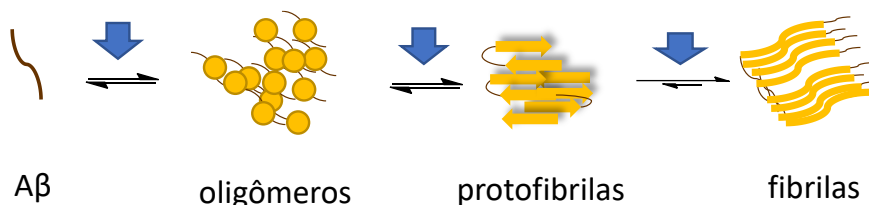


Figura 28. Processo de agregação do peptídeo A β

Neste trabalho, investigou-se a habilidade das chalconas e acil-hidrazonas sintetizadas inibirem a agregação do A β . Os experimentos foram realizados pela Dr. Renata Parruca, Micheli Figueiró e, para algumas amostras, reproduzidos pela aluna de IC Camila Frias. Resumidamente, uma amostra de filme peptídico ressuspenso em HCl foi utilizada como controle positivo de agregação. Embora existam outros métodos para induzir a agregação, uma solução de HCl 10N é o mais rápido, de acordo com Dahlgren e colaboradores [91]. O processo de formação de fibrilas foi monitorado pelo método de emissão de fluorescência da tioflavina T. Quando há formação de protofibrilas e fibrilas, a tioflavina se liga a essas estruturas ocorrendo um aumento na

sua emissão de fluorescência. Para a realização do experimento, as amostras foram inicialmente avaliadas para verificar se emitiam fluorescência e constatou-se que não. Para os ensaios, as amostras em concentração de 200 μM foram adicionadas ao filme peptídico ressuspenso em uma solução de HCl para induzir a agregação. Os tipos de amostras preparadas estão ilustradas na **Figura 29**. O ensaio foi feito em microplacas, com medidas temporais (imediatamente e após 24h de incubação), de fluorescência, após adição de ThT (450 e 485 nm, para excitação e emissão, respectivamente). Uma das amostras corresponde ao controle negativo de agregação (A), que é o filme peptídico ressuspenso em DMSO. O controle positivo de agregação consistiu em uma solução do filme peptídico em condições de agregação, no caso, na presença e HCl 10N (B). Uma solução da amostra em DMSO também foi incubada, para avaliar o espectro fluorimétrico das substâncias a serem testadas, ou seja, para descartar qualquer tipo de interferência no resultado (C). Já as soluções (D) e (E) correspondem à análise do efeito da substância-teste sobre a agregação e do controle positivo de inibição, respectivamente. O inibidor selecionado foi a curcumina [92].

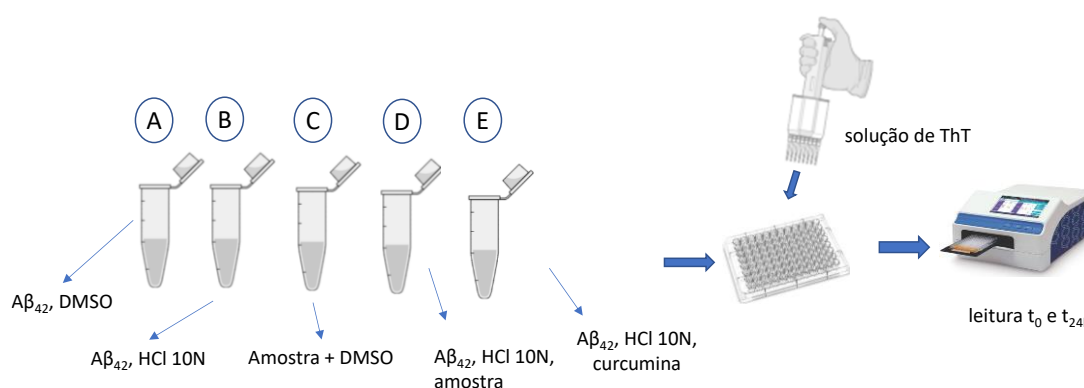


Figura 29. Ilustração sobre os tipos de amostras preparadas para o ensaio de agregação.

Conforme apresentado na metodologia, a tioflavina, ao se ligar à formas fibrilares do peptídeo Aβ, tem a emissão de fluorescência aumentada, proporcional à concentração de formas fibrilares. Assim, na presença de um inibidor da agregação, espera-se uma diminuição na emissão de fluorescência da tioflavina. Os resultados obtidos para os compostos-teste estão disponibilizados na **Tabela 7**. Dentre os compostos avaliados, 6 deles apresentaram efeito inibitório sobre a agregação do peptídeo Aβ, sendo que o controle positivo de inibição (curcumina), e as acil-hidrazonas **6** e **7** tiveram valores

de IC₅₀ de 6,9, 7,1 e 8,7 μ M, respectivamente.

Tabela 7. Resultado da avaliação dos compostos sintetizados frente à agregação do peptídeo A β .

Compostos	A β (μ M)
4	10,3
6	7,1
7	8,7
10	21,7
13	74,3
Curcumina	6,9

As chalconas **10** e **13** foram os inibidores menos potentes da agregação do peptídeo amiloide. Observa-se que as acil-hidrazonas derivadas da ácido (3,4-metilenodioxi)cinâmico (**6** e **7**) têm suas potências semelhantes, sendo que a acil-hidrazona **6** é equiparável à curcumina. Todas as moléculas ativas, com exceção da aminochalcona **10** e da curcumina, claro, apresentam átomos de cloro em sua estrutura. A presença desse átomo é importante para conferir lipossolubidade aos compostos. Considerando que as interações entre as folhas β são primordialmente hidrofóbicas, a natureza apolar dessas moléculas de permitir a sua interseção nestas folhas. Na **Figura 30** é feita uma representação, destacando a semelhança estrutural entre **6**, **7** e a curcumina. Os substituintes oxigenados na curcumina (hidroxila e metoxila) configuram uma analogia com o grupo metilenodioxido das acil-hidrazonas **6** e **7**, o que corresponderia à sua forma cíclica. O grupo metilenodioxido, hidroxila e metoxila podem participar de interações como aceptores para formação de ligação de hidrogênio.

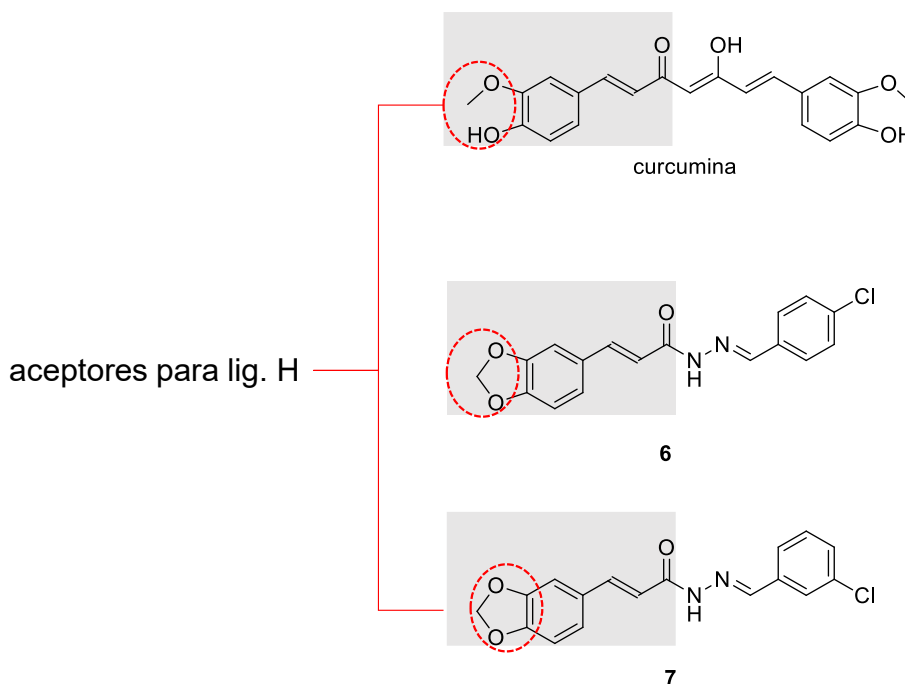


Figura 30. Comparação entre as estruturas das acil-hidrazonas mais potentes contra a agregação do peptídeo A β e a curcumina. Destaque as regiões semelhantes e os aceptores de hidrogênio para formar ligação de hidrogênio.

Os compostos que não contêm o substituinte metilenodioxí não inibiram a agregação A β , porém, nem todos que o contêm tem atividade. Esses resultados são inconclusivos em relação à importância do grupo metilenodioxí para efeito inibitório sobre o processo de agregação. Não foi feito o estudo comparativo para os análogos às acil-hidrazonas **6** e **7**, derivadas do ácido *E*-(3,4-metilenodioxí)cinâmico, pois em função da pandemia não houve retorno ao laboratório para a síntese de análogos que não têm o grupo benzodioxola em sua estrutura.

4.3.4 Análise geral dos resultados biológicos

A natureza multifatorial da doença de Alzheimer aponta mais de um alvo para o planejamento de compostos que possam de alguma forma bloquear o seu avanço, através da interferência sobre a atividade de enzimas como a AChE e BACE-1, além do processo de agregação do peptídeo A β . Assim, com base em precedentes de literatura e resultados deste grupo de pesquisa, os compostos indicados foram selecionados para testes sobre esses alvos, com a expectativa de que atuassem como agentes multialvos. Os resultados desapontadores para a avaliação frente à BACE-1 já levaram a exclusão de vários compostos da classificação multialvo.

A Tabela 8 compila o resultado dos três ensaios, para fins de comparação.

Nenhum dos compostos atuou sobre os três alvos avaliados. As acil-hidrazonas **2** e **5**, e as chalconas **9**, **11** e **12** atuaram apenas sobre a AChE. Embora não haja uma definição acertiva sobre o termo multialvo, seria possível considerar os compostos que atuam sobre dois alvos. Assim, seriam destacadas principalmente as acil-hidrazonas **1**, **4**, **6** e **7**. A acil-hidrazona **8** e as chalconas **10** e **13**, embora tenham um significativo efeito inibitório sobre a AChE, são menos potentes frente aos seus segundos alvos: BACE-1 para **8** e A β para **10** e **13**.

Tabela 8. Efeito dos compostos sintetizados sobre a enzima AChE, BACE-1 e sobre a agregação do peptídeo β -amiloide.

Compostos	AChE (IC ₅₀ μ M)	BACE-1 (IC ₅₀ μ M)	Agregação A β (IC ₅₀ μ M)	Número de alvos
1	0,0058	20,1	nd	2
2	6,75	nd	nd	1
4	1,86	nd	10,3	2
5	17,7	nd	nd	1
6	2,87	nd	7,1	2
7	2,04	nd	8,7	2
8	3,21	39,7	nd	2
9	0,26	nd	nd	1
10	4,16	nd	21,7	2
11	0,74	nd	nd	1
12	0,26	nd	nd	1
13	2,53	nd	74,3	2

(nd): não determinado. Embora concentração-teste de rotina para os compostos seja 50 μ M, os testes foram realizados também em 200 μ M. Ainda assim, os compostos assinalados com nd, não exibiram efeito.

Assim, indica-se como substâncias mais promissoras como protótipos, as acil-hidrazonas **1**, **4**, **6** e **7**.

4.4 ESTUDOS DE MODELAGEM MOLECULAR COM A AChE

O que é possível concluir sobre este estudo com acil-hidrazonas e chalconas, frente à AChE, é que a maioria contendo o grupo benzodioxola é mais potente, mas não é um pré-requisito para que a substância tenha atividade.

O grupo benzodioxola é um excelente acceptor de hidrogênio para formação de ligação de hidrogênio. Em alguns estudos de ancoramento molecular (docking) realizado neste grupo de pesquisas, foi verificado que os oxigênios deste grupo fazem interações do tipo ligação de H [71c-e]. Utilizou-se como alvo para o estudo de modelagem, a enzima acetilcolinesterase.

Acetilcolinesterase é uma serino-hidrolase, que tem seu sítio ativo localizado na parte inferior de um vale, onde se encontram vários resíduos de amino ácidos, que têm função específica no ancoramento e hidrólise do substrato acetilcolina [93]. Estudos de cinética revelaram que existem duas regiões denominadas sítio aniônico catalítico (CAS) e sítio aniônico periférico (PAS). No CAS se encontra a tríade catalítica, ou seja, os três amino ácidos que participam diretamente da hidrólise do substrato: His440, Glu327 e Ser200. O PAS tem um importante papel no auxílio do posicionamento do substrato no sítio ativo [94], principalmente através de interações cátion- π , envolvendo resíduos de triptofano e o nitrogênio quaternário presente na estrutura da acetilcolina. Além disso, está associado ao processo de fibrilização do peptídeo A β . A **Tabela 9** apresenta os diferentes aminoácidos que do sítio ativo e suas respectivas funções.

Tabela 9. Composição dos sítios catalítico e periférico da AChE¹

Sítio ou Função	Resíduos componentes
Tríade	Ser200, Glu327, His440
CAS	Trp84, Tyr130, Phe330
PAS	Tyr70, Tyr121, Trp279, Tyr334
Cavidade oxianion ²	Gly117, Gly118
Sítio de ancoramento de acila ³	Phe288

¹considerando a estrutura cristalina depositada no PDB com o código 1EVE; ²também conhecido como sítio de oxigênio, também relacionado à ligação da porção acetato; ³onde se liga a carbonila.

No projeto dessa Dissertação de Mestrado, o estudo de ancoramento para a acil-hidrazona **7** no sítio ativo da AChE (código PDB 1EVE), foi realizado e a melhor pose se encontra na **Figura 31**. É possível visualizar a interação de hidrogênio entre os oxigênios do grupo benzodioxola e a tirosina 130 (Tyr130), resíduo que faz parte do sítio catalítico. Outras interações também são importantes, conforme **Tabela 10**, anexa à figura.

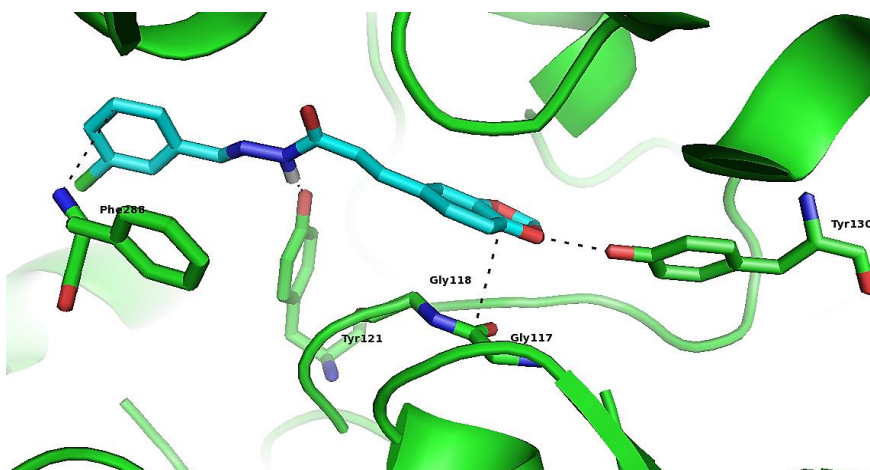


Figura 31. Pose mostrando o posicionamento da acil-hidrazona **7** no sítio ativo da acetilcolinesterase (código PDB: 1EVE). Figura cedida por Pedro Fracaro (FCF-Unicamp).

Tabela 10. Interações da acil-hidrazona **7** com a AChE

Tipo	Distâncias (Å)	Grupos envolvidos
Ligação de H	2,7	Tyr130 (OH) ...O (CH ₂) -O
π -Stacking	3,72	Gly117, Gly118 (C=ONH) ...Ar OCH ₂ O
Ligação de H*	3,95	Phe288 (NH) ... Ar-Cl
Ligação de H	2,04	Tyr121 (OH) ... (HNC=O)

(*) denominada ligação de hidrogênio não convencional: C-H e X-C, onde X = heteroátomos. As cores destacadas referem-se ao tipo de sítio ao qual pertence o resíduo de amino ácido: **rosa**, sítio catalítico; **verde**, sítio periférico; **azul**: cavidade oxiânion; **cinza**, sítio de ancoramento de acila.

4.5 PREDIÇÃO DAS PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS E FARMACOCINÉTICAS

4.5.1 Propriedades moleculares e parâmetros físico-químicos

Em um primeiro momento, analisou-se as propriedades moleculares que foram: o peso molecular, número de ligações rotacionáveis (LR), número de aceptores e doadores de ligações de hidrogênio, refratividade molar e a área de superfície polar (TPSA).

Uma ligação rotacional é definida como uma ligação simples de fragmento acíclico, ligado a um átomo diferente de hidrogênio. Ligações amida C-N não são contadas por causa da barreira rotacional. A quantidade dessas ligações é importante para a Biodisponibilidade. Quanto maior o número de ligações rotacionáveis, maior a dificuldade do fármaco de atravessar a membrana biológica, diminuindo significativamente a entropia [95].

Também foram analisados os números de grupos aceptores e doadores de ligações de hidrogênio, logo porque muitas ligações de hidrogênio farão com que o fármaco não seja absorvido do intestino para o sangue. Uma exceção a esta regra são os açúcares e moléculas polares que atravessam membranas com o auxílio de transportadores.

A refratividade molar (RM) é uma propriedade ligada à polarizabilidade e estrutura tridimensional da molécula e seu encaixe no receptor [96].

Área de superfície polar (PSA) ou área de superfície polar topológica (TPSA) de uma molécula é a soma da superfície de todos os átomos ou moléculas polares, principalmente oxigênio e nitrogênio, incluindo também os átomos de hidrogênio ligados a eles. Esse parâmetro é importante na química medicinal pois é utilizado para a otimização da capacidade de um fármaco de permear células. Moléculas com uma área superior a $140 \text{ \AA}^2$ tendem a não serem bons candidatos.

O Log P e a solubilidade, que são parâmetros físico-químicos, também foram analisados. O Log P é uma medida da lipofilicidade da substância, é definido como a razão da concentração do mesmo, no equilíbrio, após dissolução em um sistema de duas fases, formadas por dois solventes imiscíveis, exemplo: água e octanol [97].

Como condição para se ter uma boa absorção é necessário que a substância seja dissolvida no trato gastrointestinal para que seja absorvida pela membrana intestinal. Assim, características como as explicadas acima, como solubilidade e lipofilicidade, são extremamente importantes, assim como, ligação a proteínas e distribuição em diferentes tecidos [98]. O aumento do Log P é diretamente proporcional a uma maior interação da enzima com seu receptor, maior afinidade com enzimas metabólicas, melhor absorção por membranas e ligação às proteínas plasmáticas [99].

Em 1997, Lipinski e colaboradores desenvolveram a regra dos Cinco (Rule of Five), que ficou conhecida por fazer uma abordagem teórica dos parâmetros farmacocinéticos. Essa regra identifica parâmetros, que os compostos possuem, que levam a problemas de absorção e permeabilidade e tem por finalidade prever a biodisponibilidade oral [100] e com isso analisa se a substância será um potencial fármaco ou não. As características são: PM (é necessário que seja menor que $< 500 \text{ g/mol}$), Log P (< 5), a quantidade de doadores de H em interações de hidrogênio (IH) (< 5), a quantidade de aceptores de H em IH (< 10).

Posteriormente, Ghose e colaboradores [101] analisaram sete subconjuntos diferentes de várias classes de moléculas com atividade biológica comprovada para as mais diversas atividades: ativos do sistema nervoso central e doenças cardiovasculares, anticancerígenos, anti-inflamatórios. O pesquisador considerou os valores de log P, refratividade molar (RM), peso molecular (PM) e o número total de átomos (NTA). Ele observou que mais de 80% dos compostos apresentaram: $-0,4 \leq \log P \leq 5,6$, com um valor médio de 2,52; $160 \leq \text{PM} \leq 480$, com um valor médio de

357; $40 \leq RM \leq 130$, com um valor médio de 97; $20 \leq NTA \leq 70$, com um valor médio de 48.

Veber e colaboradores também contribuíram com os avanços nos estudos *in silico*, quando anunciaram a importância na observação de novos parâmetros: o número de ligações rotacionáveis (≤ 10) e a área de superfície polar ($\leq 140 \text{ \AA}^2$) [95].

Outros pesquisadores também deram sua parcela de contribuição no estudo de propriedades de fármacos para planejar compostos com maior biodisponibilidade por via oral. Um deles, foi Egan e colaboradores [102], que considerou a importância do Log P ($\leq 5,88$) e da área de superfície polar ($\leq 131,6$). Muegge e colaboradores [103], incluíram novos descritores, como o número mínimo de átomos de carbono, número de heteroátomos e o número de anéis. Os descritores totais neste trabalho foram: peso molecular ($200 \leq PM \leq 600$); Log P ($-2 \leq \text{Log P} \leq 5$); Área de superfície polar ($PSA \leq 150$); número de anéis (≤ 7); número de átomos de carbono (> 4); número de átomos de heteroátomos (> 1); número de ligações rotacionáveis ($LR \leq 15$); número de aceptores de ligação de hidrogênio ($HBA \leq 10$); número de doadores de ligação de hidrogênio ($HBD \leq 5$). Em resumo, esses parâmetros surgiram objetivando uma procura mais rápida e prática de possíveis fármacos com uma maior biodisponibilidade oral [104].

Na plataforma Swiss ADME, o Log P é calculado por algoritmos diferentes, e optou-se por utilizar o Log P consenso, que corresponde à média dos valores calculados por esses algoritmos.

O parâmetro seguinte analisado foi a solubilidade. Assim como o Log P, a solubilidade é calculada por mais de um método e optou-se por expressar apenas a classificação: solúvel (S), moderadamente solúvel (MS) e pouco solúvel (PS). Quando houve discordância nos resultados, indicou-se as duas situações, com a citação do algoritmo.

Os resultados se encontram na **Tabela 11**.

Tabela 11. Propriedades moleculares e físico-químicas calculadas pelo Programa SwissADME

Compostos	PM (g/mol)	LR.	HBA	HBD	RM	PSA (Å ²)	Log P (Consenso)	Sol.H ₂ O
1	335,31	4	5	2	96,80	92,78	2,42	MS
2	336,27	5	7	1	78,68	59,92	3,47	MS
3	286,26	4	5	1	73,63	59,92	2,62	S ^a , MS ^b
4	337,16	4	5	1	83,69	59,92	3,48	MS
5	319,31	4	5	1	88,97	72,81	2,76	MS ^c , OS ^d
6	328,75	5	4	1	88,39	59,92	3,51	MS
7	328,75	5	4	1	88,39	59,92	3,57	MS
8	269,26	4	5	1	71,47	72,81	1,67	S ^e , MS ^f
9	252,26	3	3	0	72,71	35,53	3,34	MS
10	267,28	3	3	1	76,72	61,55	2,72	S ^g , MS ^h
11	378,50	6	3	0	116,05	35,53	6,11	PS
12	288,25	3	5	0	72,23	35,53	3,73	MS
13	321,15	3	3	0	82,33	35,53	4,19	MS

Legenda: PM: peso molecular; LR: ligações rotacionáveis; HBA: aceptor de H; HBD: doador de H; RM: refratividade molar; PSA: área de superfície polar; Log P: logaritmo do coeficiente de partição. MS = moderadamente solúvel; S: solúvel; PS: pouco solúvel. ^a modelos de predição: ESOL e Ali; ^b modelo de predição: SILICOS IT; ^c ESOL e Ali; ^d SILICOS IT; ^e ESOL e Ali; ^f SILICOS IT; ^g ESOL e Ali; ^h SILICOS IT.

Analisando os resultados da Tabela 11, observa-se que a chalcona **11**, que possui três grupos isopropila ligados ao anel B, viola os parâmetros referentes ao Log P, de Lipinski e Muegge (Log < 5), Ghose (Log P < 5,6) e Egan (Log P < 5,88). A chalcona **11** tem um Log P consenso de 6,16.

A propriedade predita mais crítica para uma boa biodisponibilidade é a hidrossolubilidade, pois todos eles foram preditos como pouco solúveis ou moderadamente solúveis. A baixa solubilidade de moléculas planares é atribuída ao empacotamento de cristais, que impacta não só na solubilidade, mas também no ponto de fusão [105], o que poderia explicar a baixa solubilidade das chalconas.

4.5.2 Propriedades farmacocinéticas

O SwissADME calcula descritores moleculares baseados nos campos de interação molecular GRID tridimensional e foi utilizado com sucesso para prever as propriedades de ADMET. Nesse estudo, a permeabilidade pela barreira hematoencefálica (BHE) também foi incluído, visto que os alvos moleculares para os compostos sintetizados neste trabalho estão situados no SNC, e é fundamental que se tenha algum conhecimento ou previsão de como se comportarão diante dessa barreira, de caráter tão seletivo. Uma outra propriedade farmacocinética analisada foi a absorção gastrointestinal (GI). Um dos locais mais importantes na absorção dos fármacos é o intestino, visto que tem a maior superfície de absorção [106].

Os resultados obtidos para os compostos sintetizados se encontram na **Tabela 12**. Todas as acil-hidrazonas são preditas como tendo boa absorção gastrointestinal. Os dados indicam que apenas as acil-hidrazonas **1** e **8** não permeiam a BHE e nenhuma é substrato para a glicoproteína-P (P-gp).

Em relação à inibição de isoformas do CYP, todas são apontadas como inibidoras da CYP1A2. Entende-se que o processo de inibição é na maioria das vezes por competição, o que leva a uma pressuposição de que deva haver uma semelhança estrutural do inibidor com o substrato, para fins de reconhecimento pela enzima. Em geral, aminas e amidas planares, como por exemplo a amina planar cafeína, apresentando um $\text{Log } P \geq 0,08$ e $\leq 3,61$ [107]. Já a acil-hidrazona **5**, é a única inibidora da CYP2D6. Provavelmente o reconhecimento é devido à basicidade do anel quinolínico. Curiosamente, a maior parte das acil-hidrazonas não é predita como inibidor da CYP 3A4 a principal isoenzima que biotransforma fármacos, o que é um aspecto positivo no que se refere a interações medicamentosas.

Tabela 12. Predição de Propriedades Farmacocinéticas para as acil-hidrazonas (ACH)

ACH	Abs GI	BHE	P-gp	CYP1A2	CYP2C19	CYP2C9	CYP2D6	CYP3A4
1	Alta	Não	Não	Sim	Não	Sim	Não	Sim
2	Alta	Sim	Não	Sim	Sim	Sim	Não	Não
3	Alta	Sim	Não	Sim	Não	Não	Não	Não
4	Alta	Sim	Não	Sim	Sim	Sim	Não	Não
5	Alta	Sim	Não	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim
6	Alta	Sim	Não	Sim	Sim	Sim	Não	Não
7	Alta	Sim	Não	Sim	Sim	Sim	Não	Não
8	Alta	Não	Não	Sim	Não	Não	Não	Não

Analisando o conjunto, as acil-hidrazonas **4** e **5** seriam provavelmente excluídas, uma vez que são inibidoras da maioria das isoformas do CYP. Além dessa, as acil-hidrazonas **1** e **8**, porque não atravessam a BHE, sendo que os alvos estão localizados no SNC.

O software Swiss ADME também fornece um gráfico denominado boiled-egg, posicionado o conjunto de moléculas em relação à permeabilidade da BHE e glicoproteína-P. Ele é construído em função do coeficiente de partição e da área

topológica polar. O resultado das acil-hidrazonas está disponibilizado na **Figura 32**. O diagrama indica que as acil-hidrazonas **1** e **8** não permeariam a barreira hemato-encefálica, em função de terem os menores valores de Log P (coordenada Y, no gráfico) e os maiores valores de TPSA (coordenada X).

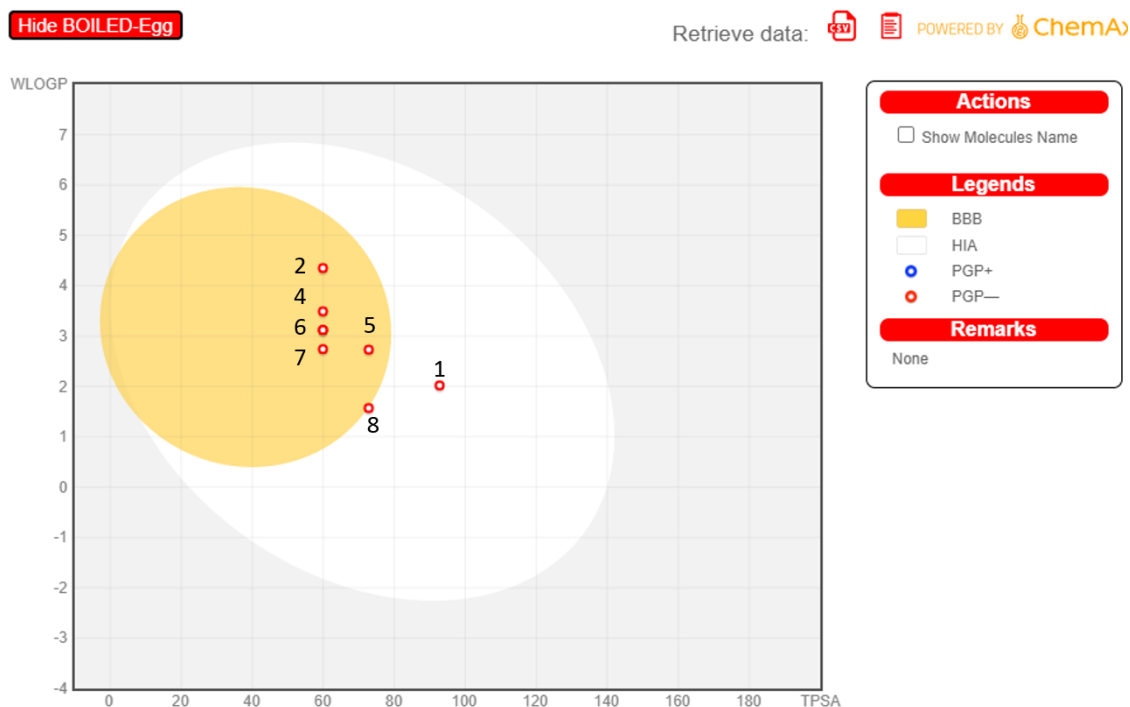


Figura 32. Diagrama Boiled-egg para o conjunto de acil-hidrazonas estudadas, evidenciando as acil-hidrazonas fora da região central (“gema”).

O mesmo estudo de predição de propriedades farmacocinéticas foi realizado para as chalconas. Os resultados se encontram na **Tabela 13**. As chalconas foram preditas como substância com alta absorção gastrointestinal, assim como as acil-hidrazonas estudadas. A chalcona **11** é um possível inibidor para a CYP2D6, ao contrário das demais chalconas, que não inibiriam essa isoforma, mas apresentaram um suposto caráter inibitório sobre pelo menos duas isoformas.

Nenhuma das substâncias foram preditas como inibidores da CYP3A4.

Tabela 13. Propriedades farmacocinéticas previstas para as chalconas utilizando o Programa Swiss ADME

Chalcona	Abs GI	BHE	P-gp	CYP1A2	CYP2C19	CYP2C9	CYP2D6	CYP3A4
9	Alta	Sim	Não	Sim	Não	Sim	Não	Não
10	Alta	Sim	Não	Sim	Sim	Sim	Não	Não
11	Alta	Não	Sim	Não	Não	Não	Sim	Não
12	Alta	Sim	Não	Sim	Sim	Sim	Não	Não
13	Alta	Sim	Não	Sim	Sim	Sim	Não	Não

Em relação à permeação à barreira hematoencefálica, a chalcona **11** é a única que não é prevista permear a barreira. Apesar da elevada lipofilicidade expressa pelo Log P, é uma molécula grande, o que pode estar interferindo nessa permeabilidade. Uma outra hipótese é que ela foi prevista ser substrato da P-gp, o que implicaria na diminuição da concentração intra-barreira desta substância. O diagrama boiled –egg está representado na **Figura 33**.

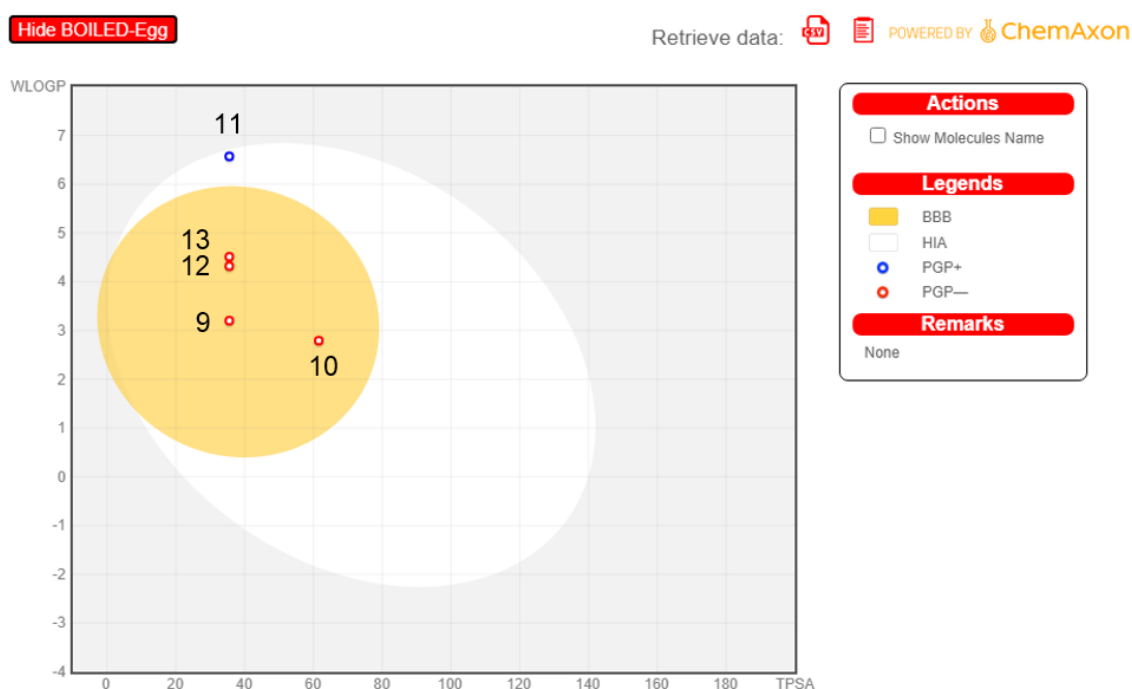


Figura 33. Diagrama Boiled-egg para o conjunto de chalconas estudadas, evidenciando as acil-hidrazonas fora da região central (“gema”).

5 CONCLUSÕES

Neste projeto, propôs-se a síntese de acil-hidrazonas e chalconas contendo o grupo 1,3-benzodioxola, para fins de avaliação frente a alguns alvos moleculares relacionados a marcadores da doença de Alzheimer. Assim, na hipótese do déficit colinérgico, o alvo escolhido foi a acetilcolinesterase (AChE) e, na hipótese amiloide, a enzima β -secretase e o peptídeo A β .

A escolha de acil-hidrazonas e chalconas contendo o grupo 1,3-benzodioxola, se baseou em um precedente do laboratório, que identificou uma acil-hidrazona derivada da carboidrazida do ácido 3-carboxi-4-quinolônico e do 1,3-benzodioxola carboxialdeído (piperonal) com potência inibitória frente à AChE, na faixa nanomolar. De fato, ao comparar essas substâncias com análogos estruturalmente relacionados, porém sem o grupo benzodioxola, verificou-se que, na maioria dos casos, as acil-hidrazonas e chalconas contendo o referido grupo são mais potentes do que esses análogos.

É importante destacar que a acil-hidrazona **1** foi a que apresentou os melhores resultados frente à AChE. Em relação à inibição da agregação do peptídeo A β , as acil-hidrazonas **6** e **7**, derivadas do ácido *E*-(3,4-metilenodioxo)cinâmico, foram as mais potentes, apresentando valores de inibição inferiores a 10 μ M.

Frente à β -secretase, a maioria dos compostos estudados não apresentou efeito. Destacam-se apenas as acil-hidrazonas **1** e **8**, com valores de IC₅₀ de 20,1 e 37,1 μ M, respectivamente.

Estudos de docking molecular revelaram que o grupo 1,3-benzodioxola atua como um importante grupo complementar, por se tratar de um bom aceptor de H para formação de ligações de H.

Propriedades moleculares, físico-químicas e farmacocinéticas foram preditas utilizando o software Swiss ADME. Com exceção da chalcona **11**, tendo em sua estrutura três grupos isopropila, apresenta Log P calculado de 6,16, todos os compostos apresentam compatibilidade os quesitos druglikeness, com base nos filtros de Lipinski, Ghose, Egan e Muegge.

A maioria dos compostos não é substrato para a glicoproteína-P (P-gp) e atravessam a BHE. Em relação à inibição de isoformas do CYP450, o comportamento

predito dos compostos é bastante variável, mas é possível identificar alguns deles, que possuem atividade e que exigiriam apenas um cuidado no momento de co-administração com substratos destas isoformas.

Embora este trabalho pudesse ser expandido, as dificuldades de acesso tanto ao laboratório de síntese, quanto o de ensaio durante a pandemia, acredita-se que tenha aberto possibilidades de estudo mais aprofundado.

Face ao exposto, considera-se que os objetivos do trabalho foram atingidos.

6 PARTE EXPERIMENTAL

6.1 GERAL

Os solventes e reagentes comerciais utilizados foram obtidos da Sigma-Aldrich e não tiveram purificação prévia, exceto a anilina e a feniletilamina que foram destiladas antes do uso.

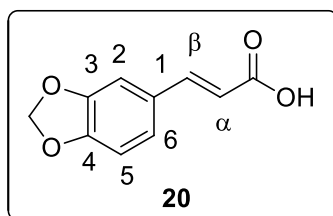
O monitoramento do progresso das reações foi feito por cromatografia em camada delgada (CCD) e empregou-se luz UV como revelador. As purificações e separações foram realizadas por colunas cromatográficas empacotadas com sílica flash (230-400 mesh) ou através do equipamento Isolera™.

Os espectros de RMN de ^1H e ^{13}C foram registados nos equipamentos Bruker 250, Avance 400, 500 e 600, operando a 250, 400, 500, 600 e 62,5, 100, 125, 150 MHz, respectivamente. Os deslocamentos químicos (δ) foram expressos em ppm, tendo como padrão interno tetrametilsilano (TMS). Os pontos de fusão foram medidos em tubos capilares abertos utilizando o equipamento Fisatom® modelo 431D e não foram corrigidos. As análises elementares e a HRMS foram realizadas no analisador elementar PerkinElmer® 2400 Series II CHNS / O e no Micromass Quattro micro API (ESI, detector HPLC e analisador de massa triplo-quadrupolar), respectivamente. Os espectros IV foram realizados no espectrofotômetro BOMEN modelo MB Series com amostras preparadas em pastilha de KBr seco ou em filme ou no espectrofotômetro de absorção IV Agilent®, modelo CARY 630 FTIR utilizando o acessório ATR. Cromatografia líquida de alta eficiência foi realizada em um equipamento com coluna de Sílica - 150 mm x 4.60 mm x 10 μm , sendo as condições de corrida 50:50 hexano: isopropanol, fluxo de 0,5 mL/min, 0,5 mL de injeção. Concentração da amostra: 1 mg/mL e leitura a 214/230 nm a 25°C.

A nomenclatura dos compostos foi fornecida pelo programa ChemDraw Ultra 12.0.

6.2 SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DOS COMPOSTOS DERIVADOS DO ÁCIDO (*E*)-3,4-METILENODIOXICINÂMICO

6.2.1 Preparação do ácido (*E*)-3,4-metilenodioxicinâmico (20)



ácido (*E*)-3-(benzo[*d*][1,3]dioxol-5-il)acrílico

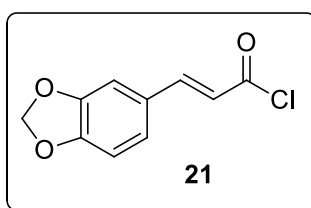
Uma mistura contendo 40 mmol (6g) do 3,4-metilenodioxibenzaldeído (piperonal) e 100 mmol de ácido malônico (10,4 g) foi dissolvida em 18 mL de piridina e 0,30 mL de piperidina e refluxada, sob agitação magnética. A reação foi monitorada por CCD e após 4h de reação, a mistura foi vertida em gelo e acidificada com HCl 10%. O precipitado branco formado foi recolhido através de filtração à vácuo em funil de Büchner. O precipitado foi lavado sucessivamente com água gelada até pH 6. O ácido foi obtido em 93% de rendimento.

IV (ATR, $\nu_{\text{máx}}$, cm^{-1}): 2922 a 2509 (OH); 1690 (C=O); 1601 (C=C); 1243 e 1213 (C-O).

RMN de ^1H (600 MHz, DMSO- d_6): δ 7,48 (d, $J = 16,2$ Hz, 1H, H β), 7,33 (s, 1H, H2), 7,13 (d, $J = 7,8$ Hz, 1H, H6), 6,92 (d, $J = 7,8$ Hz, 1H, H5), 6,36 (d, $J = 16,2$ Hz, 1H, H α), 6,05 (s, 2H, OCH $_2$ O).

RMN- ^{13}C (DMSO- d_6 , 150 MHz): δ 168,2 (C=O); 149,5 ($\underline{\text{C}}$, C3); 148,5 ($\underline{\text{C}}$, C4); 144,3 ($\underline{\text{CH}}$, H β); 129,0 ($\underline{\text{C}}$, C1); 125,0 ($\underline{\text{CH}}$, C6); 117,5 ($\underline{\text{CH}}$, C α); 108,9 ($\underline{\text{CH}}$, C5); 107,0 ($\underline{\text{CH}}$, C2); 101,9 (OCH $_2$ O).

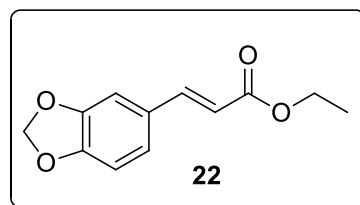
6.2.2 Preparação do cloreto do ácido (*E*)-3,4-metilenodioxicinâmico (21)



cloreto de (*E*)-3-(benzo[*d*][1,3]dioxol-5-il)acrilóila

RMN de ^1H (CDCl_3 , 400 MHz): δ 7,74 (d, J = 15,6 Hz, 1H, H_β), 7,25 (s, 1H, H_2), 7,10-7,01 (m, 1H, H_6), 6,86 (d, J = 8 Hz, 1H, H_5), 6,66 (d, J = 15,2 Hz, 1H, H_α), 6,05 (s, 2H, OCH_2O).

6.2.3 Preparação do éster etílico do ácido (*E*)-3,4- metilenodioxicinâmico (22)

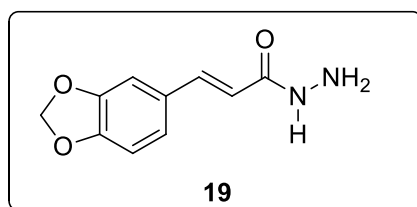


(*E*)-3-(benzo[*d*][1,3]dioxol-5-il)acrilato de etila

RMN de ^1H (CDCl_3 , 250 MHz): δ 7,58 (d, J = 15,8 Hz, 1H, H_β), 7,02 – 6,97 (m, 2H, H_2 e H_6), 6,79 (d, J = 8 Hz, 1H, H_5), 6,25 (d, J = 15,8 Hz, 1H, H_α), 5,99 (s, 2H, OCH_2O), 4,24 (q, J = 7,3 Hz, 2H, $\text{CH}_2\text{-CH}_3$), 1,32 (t, J = 7,3 Hz, 3H, $\text{CH}_2\text{-CH}_3$).

RMN- ^{13}C (CDCl_3 , 63 MHz) δ 167,3 (C=O); 149,7 (C, C3); 148,4 (C, C4); 144,4 (CH, C β); 129,0 (C, C1); 124,5 (CH, C6); 116,3 (CH, C α); 108,6 (CH, C5); 106,6 (CH, C2); 101,6 (OCH_2O), 60,5 (CH_2CH_3), 14,4 (CH_2CH_3).

6.2.4 Preparação da hidrazida do ácido (*E*)-3,4- metilenodioxicinâmico (19)



(*E*)-3-(benzo[*d*][1,3]dioxol-5-il)acrilohidrazida

Método A: a partir do correspondente éster etílico

Uma mistura contendo 4,3667 mmol (0,961g) do (*E*)-3,4-metilenodioxicinamato de etila e 64,424 mmol (2mL) de hidrazina mono hidratada 24% em 15 mL de etanol refluxada (80°C), sob agitação magnética, a reação foi monitorada através de CCD e após 72 horas foi verificado a finalização da reação, foi rota evaporado o etanol adicionado 30mL de acetato de etila e transferido para funil de separação, lavando duas vezes com 100 mL de cloreto de sódio saturado, depois sendo lavado três vezes com água destilada, filtrado o restando com algodão secando o acetato por rota evaporação originando 82,2mg do composto com um rendimento de 18%.

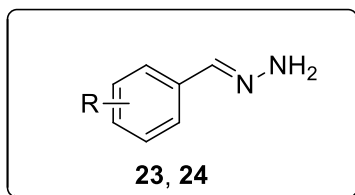
Método B: a partir do ácido (*E*)-3,4-metilenodioxicinâmico utilizando reagente de acoplamento

A uma solução do ácido **20** (3,4-metilenodioxi)-cinâmico (1,29 g, 1,29 mmol) em 15 mL de acetonitrila, à temperatura ambiente e sob agitação magnética, adicionou-se 2,0 equivalentes de hidroxibenzotriazol (HOBt), e, em seguida, 2,0 equivalentes de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida (EDC). Após 2h de reação, verificou-se por CCD que todo o ácido havia sido consumido. A temperatura da solução foi mantida entre 0 e 10 °C usando um banho de gelo, e então adicionou-se, gota a gota, 2 equivalentes de Hidrato de Hidrazina usando uma seringa. A reação foi extraída usando água, acetato de etila e solução bicarbonato de sódio saturada. A fase orgânica foi extraída e o solvente evaporado sob pressão reduzida.

IV (ATR, $\nu_{\text{máx}}$, cm^{-1}): 3172 (NH); 1640 (C=O); 1579 (C=C).

RMN de ^1H ($\text{CF}_3\text{CO}_2\text{D}$, 400 MHz): δ 11,63 (s, 1H, N-H), 7,91 (d, J = 15,6 Hz, 1H, H β), 7,23-7,21 (m, 2H, H2 e H6), 6,96 (d, J = 8,4Hz, 1H, H5), 6,67 (d, J = 15,6 Hz, 1H, H α), 6,09 (s, 2H, OCH $_2$ O).

6.2.5 Preparação das hidrazonas derivadas do clorobenzaldeído (23,24)

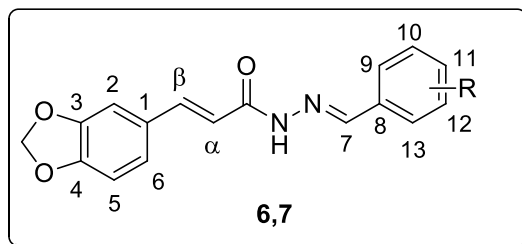


23: R = 3-Cl; (*E*)-(3-clorobenzilideno)hidrazina

24: R = 4-Cl; (*E*)-(4-clorobenzilideno)hidrazina

Uma mistura contendo 7,143 mmol (0,81 mL) de 3-clorobenzaldeído e 7,179mmol (0,98 mL) de hidrazina mono hidratada (24%) em 20mL de etanol e 10 gotas de ácido acético, sob agitação magnética e refluxo (50°C), a reação foi monitorada a cada 15 minutos através de CCD e após 4 horas a reação havia se completado, a reação foi vertida sob gelo forçando a precipitação de um sólido amarelado, que foi filtrado e lavado com água gelada. Observou-se a formação do composto bem como a formação do dímero, com rendimento de 92% (contendo os 2 compostos).

6.2.6 Obtenção das acil-hidrazonas 6 e 7



6: R = 4-Cl; (2*E*,*N'**E*)-3-(benzo[*d*][1,3]dioxol-5-il)-*N'*-(4-clorobenzilideno)acrilohidrazida

7: R = 3-Cl; (2*E*,*N'**E*)-3-(benzo[*d*][1,3]dioxol-5-il)-*N'*-(3-clorobenzilideno)acrilohidrazida

Método A: a partir da hidrazidas dos cloro-benzaldeídos

Uma solução contendo 1 eq da hidrazida do 3-clorobenzaldeído ou 4-clorobenzaldeído (bruto), 2,2 eq. de trietilamina em 6 mL de CH₂Cl₂ foi resfriada a 5°C e em seguida, foram adicionados 1,1 eq de cloreto do ácido (E)-3,4-metilenodioxicinâmico. Ao final da adição, permitiu-se que a mistura retornasse à temperatura ambiente e permanecesse sob agitação. O progresso da reação foi acompanhado por CCD (1 h de reação) e, após remoção do solvente, a mistura foi purificada após lavagem com hexano para remoção de possíveis dímeros da 3 ou 4-clorobenzalhidrazona.

Método B: a partir da hidrazida **19** do ácido 3,4-metilenodioxicinâmico

A uma solução etanólica (10mL) da hidrazida **19** (100 mg, 484,97 µM), adicionou-se, 1,2 equivalentes (581,96 µM) de 3-cloro-benzaldeído ou 4-clorobenzaldeído, e 0,1 equivalente (48,50 µM) de ácido clorídrico 6M. A solução foi mantida sob refluxo com agitação, durante 12 h. Após este período, o solvente foi evaporado e o resíduo foi ressuspenso em acetato de etila, e então lavado com água. A fase orgânica foi seca sobre sulfato de sódio anidro e filtrada. A remoção do solvente levou à respectiva acil-hidrazona. Purificação por coluna cromatográfica (AcOEt-Hex, gradiente de eluição: 15 a 40%)

Acil-hidrazona 6: óleo levemente amarelado; 55% de rendimento (Método B)

RMN de ¹H (CDCl₃, 500 MHz): δ 8,59 (s, 1H, N-H), 7,87 (s, 1H, CH=N), 7,74 (d, *J* = 16 Hz, 1H, H_β), 7,68 (d, *J* = 7,5 Hz, 2H, H-9 e H-13), 7,44 (d, *J* = 8 Hz, 2H, H-10 e H-12), 7,38 (d, *J* = 8Hz, 1H, H-6), 7,06 (d, *J* = 7,0 Hz, 1H, H-2), 6,84 (d, *J* = 8,5 Hz, 1H, H-5), 6,33 (d, *J* = 16Hz, 1H, H_α), 6,03 (s, 2H, OCH₂O).

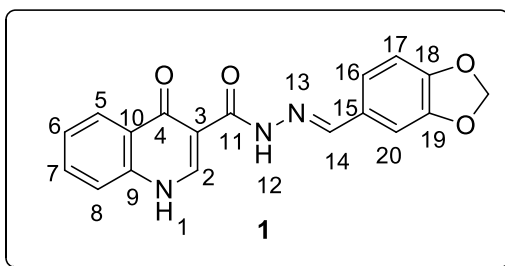
RMN de ^{13}C (125 MHz, CDCl_3): δ 160,7 (C=O), 149,4 ($\underline{\text{C}}$, C3), 148,7 ($\underline{\text{C}}$, C4), 141,6 ($\underline{\text{CH}}=\text{N}$), 134,9 ($\underline{\text{CH}}$, C β), 134,1 ($\underline{\text{C}}$, C11), 130,1 ($\underline{\text{CH}}$, C6), 129,3 ($\underline{\text{CH}}_2$, C9 e C13), 128,9 ($\underline{\text{CH}}_2$, C10 e C12), 123,9 ($\underline{\text{CH}}$, C α), 108,9 ($\underline{\text{CH}}$, C5), 107,2 ($\underline{\text{CH}}$, C2), 101,9 ($\underline{\text{OCH}}_2\text{O}$).

Acil-hidrazona 7: óleo levemente amarelado; 71% de rendimento (Método B)

IV (ATR, $\nu_{\text{máx}}$, cm^{-1}): 3354 (N-H), 1629 (C=O), 1562 (C=N).

RMN de ^1H (500 MHz, $\text{DMSO}-d_6$, ppm): δ 11,04 (s, 1H, N-H), 8,24 (s, 1H, $\underline{\text{CH}}=\text{N}$), 7,75-7,73 (m, 2H, H-13 e H-11), 7,58 (d, $J = 15,8$ Hz, 1H, H β), 7,49 – 7,47 (m, 2H, H-9 e H-10), 7,22 (s, 1H, H-2); 7,17 – 7,15 (m, 2H, H-5 e H6), 6,94 (d, $J=15,8$ Hz; 1H, H α), 6,06 (s, 2H, O- $\underline{\text{CH}}_2\text{O}$).

6.3 OBTENÇÃO DA ACIL-HIDRAZONA 1



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

A uma mistura equimolar de piperonal (2 mmol) e da hidrazida do ácido 3-carboxi-4-quinolona* (2 mmol) contendo 15 gotas de piperazina, foi refluxada em etanol (4 mL), sob agitação magnética, 16 h. A reação foi monitorada por CCD, e, constatado o consumo do piperonal, removeu-se o excesso de solvente 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. A acil-hidrazona foi obtida como um sólido levemente amarelado, em 85 % de rendimento.

* gentilmente cedida pela Dra. G. S da Silva

Ponto de fusão: 283 °C com decomposição.

IV (KBr, cm^{-1}): ν 3101-2987 (HN-C=O e H $_2$ N-N), 1686 (C=O hidrazida), 1616 (C=O, quinolona).

RMN ^1H (500 MHz, $\text{DMSO}-d_6$, ppm): δ 13,82 (s, 1H, -CONH-12), 8,68 (s, 1H, H-2), 8,31 (s, 1H, -N= $\underline{\text{CH}}$ -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 (125 MHz, DMSO- d_6 , ppm): 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 (CH2-21);

EM (ESI+) Calculado para $\text{C}_{18}\text{H}_{14}\text{N}_3\text{O}_4$ ($\text{M} + \text{H}^+$): 336,0979. Encontrado: 336,1008.

6.4 SÍNTESE DAS DEMAIS HIDRAZIDAS PRECURSORAS UTILIZADAS NESTE TRABALHO

Importante destacar que a hidrazida **16**, isoniazida e a 4-quinolona-3-carboidrazida (Figura seguinte), não foram sintetizadas neste trabalho. A primeira e a segunda forma obtidas de fnte comercial em alto grau de pureza, enquanto a última foi cedida pela Dra. Gisele Silvestre da Silva.

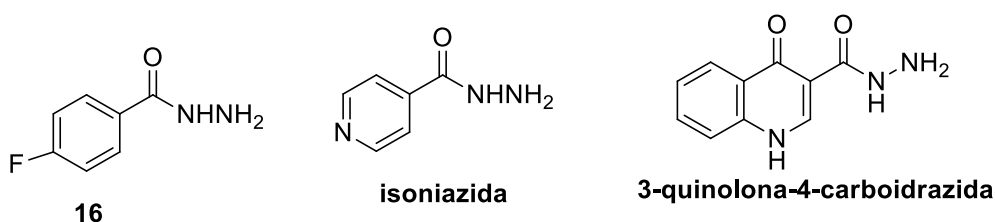
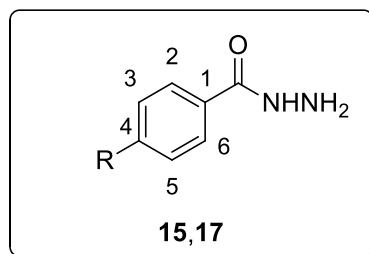


Figura 34. Hidrazidas que não foram sintetizadas neste trabalho

6.4.1 Síntese das hidrazidas precursoras 15 - 17



15: R = 4- CF_3 ; 4-(trifluormetil)benzoidrazida

17: R = 3,4-metilenodioxi; benzo[d][1,3]dioxola-5-carboidrazida

Uma mistura do benzoato de etila substituído (0,55 mmol) e hidrazina monoidratada (50%, 10,28 mmol) em etanol (5 mL) foi aquecida por 8 - 12 horas. Depois desse

período, o solvente foi removido sob pressão reduzida, e o bruto reacional foi recristalizado em etanol, fornecendo a correspondente hidrazida.

Hidrazida 15

Ponto de fusão: 62-64 °C. Sólido levemente amarelado, 82%

RMN de ^1H (500 MHz, DMSO- d_6 , ppm): δ 10,02 (s, 1H, C=O-N-H), 8,02 (d, J = 5Hz, 2H, H2 e H6), 7,84 (d, J = 5Hz, 2H, H3 e H5), 4,59 (s, 2H, NH $_2$).

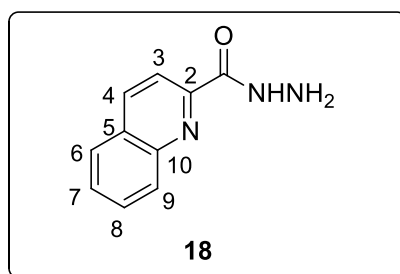
RMN- ^{13}C (125 MHz, DMSO- d_6 , ppm): δ 164,9 (C=O), 137,6 (C1), 131,6 (d, $J_{\text{C-F}}$ = 37,5 Hz, C4), 128,3 (2 x CH, C2 e C6), 125,8 (2 x CH-C-CF $_3$, C3 e C5), 123,3 (CF $_3$).

Hidrazida 17

Ponto de fusão 163-166 °C. Sólido branco; 77 % de rendimento.

RMN de ^1H (500 MHz, DMSO- d_6 , ppm): δ 9,60 (s, HNC=O), 7,43 (d, J = 1,6Hz, 1H, H2), 7,42 (dd, J = 1,6 e 8Hz, 1H, 62), 7,41 (d, J = 1,6 Hz, 1H, H), 6,97 (d, J = 8 Hz, 1H, H5), 6,08 (s, 2H, OCH $_2$ O), 4,42 (s, 2H, NH $_2$)

6.4.2 Obtenção da hidrazida 18



quinolina-2-carbohidrazida

A reação foi conduzida em balão de fundo redondo (de 50 ou 100 mL, dependendo da quantidade de reagentes). Reagiu-se o éster precursor (disponível no comércio) com o hidrato de hidrazina em proporção molar de 1:20, sob agitação e refluxo em etanol a 65 °C. A reação foi acompanhada utilizando-se cromatografia em camada delgada. Procurou-se dissolver o éster na própria hidrazina, e somente depois o solvente foi adicionado, pois utilizando este procedimento o rendimento obtido ao final da reação foi maior. Terminada a reação, o solvente foi removido em evaporador rotatório, e o produto purificado através de lavagem com éter etílico, para remoção do excesso de hidrazina e do éster. Após isso, o material foi inicialmente à temperatura e à pressão ambientes e, posteriormente, a vácuo.

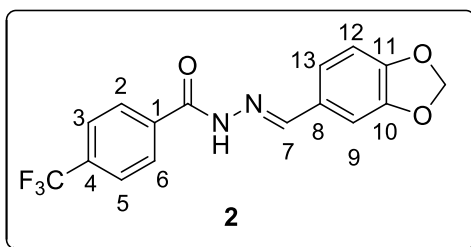
Hidrazida 18: sólido branco em 60% de rendimento.

IV (ATR, $\nu_{\text{máx}}$, cm^{-1}): 3292 e 3199 (NH e NH_2), 1659 ($\text{C}=\text{O}$).

RMN - ^1H (500 MHz, $\text{DMSO}-d_6$, ppm): δ 10,01 (s, 1H, NH), 8,54 (d, $J = 8,5\text{Hz}$, 1H, H3), 8,09 (d, $J = 8,5\text{Hz}$, 2H, H7 e H8), 8,06 (d, $J = 8,0\text{ Hz}$, 1H, H4), 7,85 (dt, $J_1 = 1,5\text{Hz}$ e $J_2 = 7\text{ Hz}$, 1H, H9), 7,70 (dt, $J_1 = 1,5\text{ Hz}$ e $J_2 = 7\text{ Hz}$, 1H, H6), 4,64 (s, 2H, NH_2).

RMN - ^{13}C (125 MHz, $\text{DMSO}-d_6$, ppm): δ 162,9 ($\text{C}=\text{O}$), 150,1 (C2), 146,6 (C10), 137,7 (C4), 130,4 (C8), 129,2 (C9), 128,7 (C7), 128,1 (C6), 127,9 (C5), 118,6 (C3).

6.5 OBTENÇÃO DA ACIL-HIDRAZONA 2



(*E*)-*N'*-(benzo[d][1,3]dioxol-5-il-metileno)-4-(trifluorometil)benzohidrazida

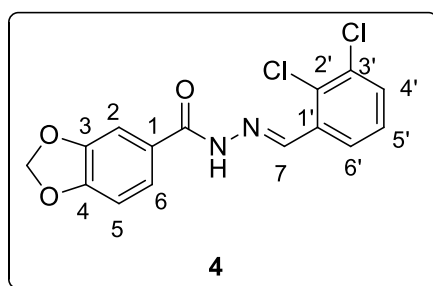
Uma mistura contendo, 1,603mmol de piperonal (240,4 mg) e 0,992mmol da 4-trifluor-benzilidrazida (em 25mL de etanol anidro sob agitação magnética e aquecimento e refluxo (60°C), a reação foi monitorada de hora em hora por CDD, e após 8 horas não mais se observou o reagente. O solvente foi removido sob pressão reduzida, o excesso de piperonal foi extraído por coluna obtendo-se um óleo.

RMN- ^1H (500 MHz, $\text{DMSO}-d_6$, ppm): δ 12,00 (s, 1H, $\text{NH}-\text{C}=\text{O}$), 8,79 (s, 1H, H7), 8,78 (dd, $J = 6,5$ e $1,5\text{Hz}$, 2H, H2 e H6), 7,71 (dd, $J = 8$ e 1 Hz , 1H, H13), 7,56 (d, $J = 8\text{ Hz}$, 2H, H3 e H5), 7,47 (d, $J = 3\text{ Hz}$, 1H, H9), 7,07 (d, $J = 8\text{ Hz}$, 1H, H12), 6,11 (s, 2H, $\text{O}-\text{CH}_2-\text{O}$).

6.6 ACIL-HIDRAZONAS 4 e 5

Uma mistura da hidrazida precursora e o aldeído, na proporção molar de 1:1 foi mantida sob agitação e refluxo em etanol à 65 °C de 8 a 20 horas. Nos casos onde o aldeído não era completamente solúvel em metanol/etanol, adicionou-se algumas gotas de DMF ao meio para solubilizá-lo. Ao fim da reação, a mistura foi filtrada em funil de Büchner e lavada com etanol gelado, e o sólido obtido foi levado ao vácuo para secagem. Em ambos os casos, não foi necessária purificação adicional.

6.6.1 Acil-hidrazona 4



(E)-N'-(2,3-diclorobenzilideno)benzo[d][1,3]dioxol-5-carboidrazida

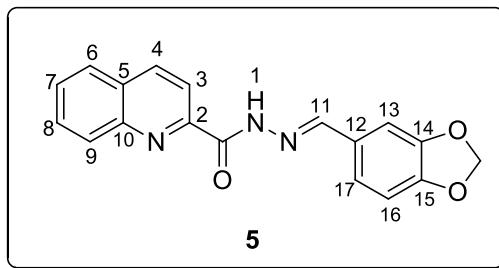
Obtida como um sólido branco. Rendimento: 93%

IV (ATR, $\nu_{\text{máx}}$, cm^{-1}): 3222 (N-H), 1648 (C=O), 1542 (C=N)

RMN- ^1H (500 MHz, DMSO- d_6 , ppm): δ 12,00 (s, 1H, NH-C=O), 8,86 (s, 1H, H7), 7,98 (d, J = 8 Hz, 1H, H6'), 7,71 (dd, J = 8 Hz e 1 Hz, 1H, H4'), 7,56 (d, J = 8 Hz, 1H, H5'), 7,47 (d, J = 3 Hz, 1H, H2), 7,46 (t, J = 8 Hz, 1H, H6), 7,07 (d, 1H, J = 8 Hz, H5), 6,14 (s, 2H, OCH $_2$ O).

RMN- ^{13}C (125 MHz, DMSO- d_6 , ppm): δ 162,8 (C=O), 150,9 (CH, C7), 147,9 (C3), 143,5 (C4), 134,6 (C2'), 132,8 (C3'), 131,9 (CH-C6'), 131,4 (CH-C4'), 128,9 (CH-C5'), 127,22 (C1), 125,9 (CH, C2), 123,5 (C1'), 108,6 (CH-C6), 108,1 (CH-C5), 102,4 (OCH $_2$ O).

6.6.2 Acil-hidrazona 5



(E)-N'-(benzo[d][1,3]dioxol-5-il-metileno)quinolina-2-carboidrazida

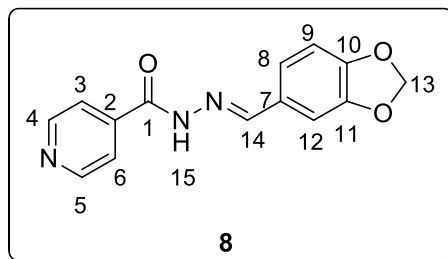
Obtida como um sólido amarelo claro, sem purificação adicional. 80% de rendimento

RMN - ^1H (400 MHz, DMSO- d_6 , ppm): δ 12,11 (s, 1H, NH), 8,64 (s, 1H, H11), 8,62 (d, $J = 4$ Hz, 1H, H3), 8,21 (d, $J = 8,0$ Hz, 2H, H7 e H8), 8,12 (d, $J = 4,0$ Hz, 1H, H4), 7,83 (dd, $J_1 = 4,0$ Hz, $J_2 = 8,0$ Hz, 1H, H9), 7,74 (dd, $J_1 = 4,0$ Hz, $J_2 = 8,0$ Hz, 1H, H6), 7,35 (s, 1H, H13), 7,21 (d, $J = 8$ Hz, 1H, H17), 7,03 (d, $J = 4$ Hz, 1H, H16), 6,12 (s, 2H, OCH $_2$ O).

RMN - ^{13}C (125 MHz, DMSO- d_6 , ppm): δ 160,9 (C=O), 150,4 (C-C2), 149,7 (C-C15), 149,6 (C, C10), 148,5 (C, C14), 146,5 (CH, C11), 138,5 (CH, C4), 131,2 (CH, C8), 129,7 (C, C12), 129,4 (CH, C9), 129,2 (CH, C7), 128,8 (CH, C6), 128,7 (C, C5), 124,1 (CH, C17), 119,6 (CH, C3), 109,0 (CH, C16), 105,6 (CH, C13), 102,1 (CH $_2$ O).

6.7 OBTENÇÃO DA ACIL-HIDRAZONA 8

Em um balão de fundo redondo adicionou-se 2 mmol de isoniazida e o aldeído aromático, em proporção equimolar. Em seguida, acrescentou-se 6 mL de metanol ou etanol e 0,6 mL de dimetilformamida e 1 mL de ácido acético. A mistura resultante foi mantida sob agitação magnética e refluxo, em torno de 65°C. A reação foi monitorada por cromatografia em camada delgada (CCD). Ao fim da reação, a mistura reacional foi filtrada em funil de Büchner e o sólido lavado com metanol. Após ter sido coletado, o material foi seco inicialmente à temperatura e à pressão ambientes e, posteriormente, a vácuo.



(*E*)-*N'*-(benzo[*d*][1,3]dioxol-5-il-metileno)isonicotinohidrazida

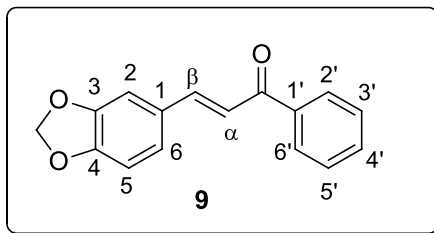
RMN de ^1H (500 MHz, $\text{DMSO-}d_6$): δ 11,96 (s, 1H, H₁₅), 8,78 (dd, J = 1,5 Hz e 4Hz, 2H, H₄ e H₅), 8,38 (s, 1H, H₁₄), 7,82 (dd, J = 1,6 Hz, e 4,5 Hz, 2H, H₃ e H₆), 7,33 (d, J = 1,5 Hz, 1H, H₁₂), 7,22 (dd, J = 1,8 e 8 Hz, 1H, H₈), 7,01 (d, J = 8 Hz, 1H, H₁₀), 6,11 (s, 2H, H₁₃).

RMN- ^{13}C (125 MHz, $\text{DMSO-}d_6$, ppm): δ 161,9 (C=O), 150,9 (CH x 2, C₄, C₅), 149,9 (C, C₁₀), 149,3 (CH , C₁₄), 148,5 (CH , C₁₁), 141,9 (C, C₂), 128,9 (C, C₇), 124,2 (CH, C₈), 121,9 (CH x 2, C₃, C₆), 109,7 (CH , C₉), 105,7 (CH , C₁₂), 102,1 (CH_2 , C₁₃).

6.8 PROCEDIMENTO GERAL PARA OBTENÇÃO DE CHALCONAS

Em um balão de 25 mL adicionou-se 3 mmol do aldeído, 3 mmol da cetona e em seguida, 10 mL de metanol. À solução resultante, adicionou-se lentamente 12 mmol de NaOH. A mistura resultante permaneceu sob agitação magnética e à temperatura ambiente, e a reação foi monitorada por CCD. Ao final da reação, a mistura reacional foi filtrada a vácuo em funil de Büchner, e o sólido, lavado com uma quantidade mínima de água destilada e metanol gelados. Após ter sido coletado, o material foi seco inicialmente à temperatura e pressão ambientes e, posteriormente a vácuo. Quando necessário, as chalconas foram purificadas por cromatografia em coluna com sílica flash (230-400 mesh) utilizando como mistura eluente acetato de etila-hexano (10 a 20%) ou recristalizadas, conforme especificação individual.

6.8.1 Obtenção da chalcona 9



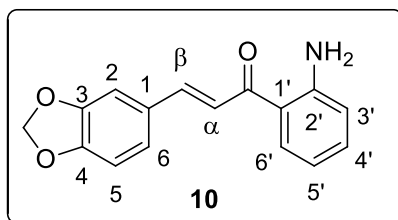
(*E*)-3-(benzo[d][1,3]dioxol-5-yl)-1-phenylprop-2-en-1-ona

Obtido como um sólido branco ligeiramente amarelado; 92% de rendimento.

RMN- ^1H (500 MHz, CDCl_3 , ppm): δ 8,02 – 7,99 (m, 2H, H2', H6'), 7,74 (d, J = 15,5 Hz, 1H, H β), 7,58 – 7,46 (m, 3H, H3', H4', H5'), 7,37 (d, J = 15,5 Hz, 1H, H α), 6,85 (m, 1H, H5), 7,17-7,11 (m, 2H, H3 e H4), 6,03 (s, 2H, OCH_2O).

RMN ^{13}C (125 MHz, CDCl_3 , ppm) δ 190,5 (C=O), 150,0 (C4), 149,5 (C3), 144,7 (CH C β), 138,4 (C1'), 129,4 (CH, C4'), 128,6 (C1), 128,4 (CH x 4, C2', C6', C3', C5'), 125,3 (CH, C α), 120,2 (CH, C6), 108,7 (CH, C5), 106,7 (CH, C2), 101,7 (OCH_2O).

6.8.2 Obtenção da chalcona 10



(*E*)-1-(2-aminofenil)-3-(benzo[d][1,3]dioxol-5-yl)prop-2-en-1-ona

Obtida como um sólido amarelo. O produto foi purificado por recristalização em etanol.

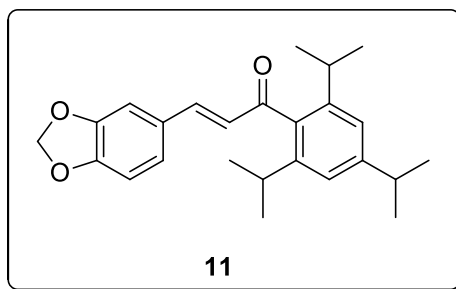
Rendimento: 60%.

IV (ATR, $\nu_{\text{máx}}$, cm^{-1}): 3419 e 3304 (H–N–H), 1613 (C=O), 1564 (C=C).

RMN- ^1H (600 MHz, $\text{DMSO}-d_6$, ppm): δ 8,08 (dd, J = 1,2 e 8,4 Hz, 1H, H3'), 7,81 (d, J = 15,6 Hz, 1H, H β), 7,62 (d, J = 1,8 Hz, 1H, H2), 7,56 (d, J = 15,6 Hz, 1H, H α), 7,35 (s, 2H, NH_2), 7,27 (m, J_1 = 1,8 Hz, J_2 = 8,4 Hz, 2H, H4' e H5'), 6,97 (d, J = 7,8 Hz, 1H, H6'), 6,78 (dd, J_1 = 1,2 e J_2 = 8,4 Hz, 1H, H6), 6,58 (m, 1H, H5), 6,09 (s, 2H, OCH_2O).

RMN- ^{13}C (125 MHz, DMSO- d_6 , ppm): δ 191,0 (C=O), 152,4 (C, C2'), 149,6 (C, C3), 148,5 (C, C4), 142,5 ($\underline{\text{CH}}$, C β), 134,6 ($\underline{\text{CH}}$, C4'), 131,8 (C, C1'), 130,0 (C, C1), 125,8 ($\underline{\text{CH}}$, C6'), 121,8 ($\underline{\text{CH}}$, C5'), 118,1 ($\underline{\text{CH}}$, C6), 117,3 (CH, C α '), 114,9 (CH, C3'), 108,9 ($\underline{\text{CH}}$, C5), 107,3 ($\underline{\text{CH}}$, C2), 102,0 ($\underline{\text{CH}_2}$ -dioxi).

6.8.3 Obtenção da chalcona 11

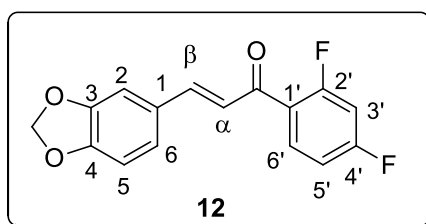


(E)-3-(benzo[d][1,3]dioxol-5-il)-1-(2,4,6-triisopropilfenil)prop-2-en-1-ona

Obtido como um sólido branco ligeiramente amarelado sem purificação adicional; 73% de rendimento.

RMN de ^1H (500 MHz, DMSO- d_6): δ 7,13 (d, J = 15,8 Hz, 1H, H β), 7,04-6,94 (m, 4H, aromático), 6,98 (dd, J = 1,6 Hz, J = 8 Hz, 1H, H ϵ), 6,82 (d, J = 16,3 Hz, 1H, H α), 6,79 (d, J = 8,0 Hz, 1H, aromático), 6,0 (s, 2H, $\underline{\text{CH}_2}\text{O}$), 2,98-2,70 (m, 3H, 3 x CH-isopropil), 1,29 (d, J = 6,8 Hz, 12H, 4 x CH $_3$ -isopropil), 1,18 (d, J = 6,5 Hz, 6H, 2 x CH $_3$ -isopropil).

6.8.4 Obtenção da chalcona 12



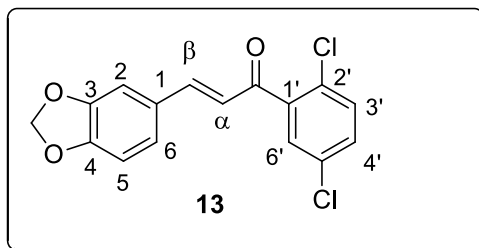
(E)-3-(benzo[d][1,3]dioxol-5-il)-1-(2,4-difluorfenil)prop-2-en-1-ona

Obtido como um sólido amarelo sem purificação adicional; 95% de rendimento.

RMN de ^1H (250 MHz, CDCl_3 , ppm): δ 7,43 (d, J = 1,2 Hz, 1H, H2); 7,41-7,35 (m, 3H, H3', H5' e H6'), 7,38 (d, J = 16 Hz, 1H, H β), 7,09 – 7,03 (m, 1H, H6), 6,92 (d, J = 16 Hz, 1H, H α), 6,03 (d, J = 7,8 Hz, 1H, H5), 6,03 (s, 2H, OCH_2O)

RMN de ^{13}C (125 MHz, CDCl_3): δ 187,2 (C=O), 166,4 (C4', d, $J_{\text{C-F}} = 12,5$ Hz), 164,3 (C2', d, $J_{\text{C-F}} = 12,5$ Hz), 150,2 (C3), 148,5 (C4), 144,9 (CH, C $_{\beta}$), 133,0 (CH, C6'), 132,9 (C1), 132,8 (CH, C2), 132,7 (CH, C $_{\alpha}$), 129,1 (C1'), 125,6 (CH x 2, C3' e C5'), 123,3 (CH, C6), 123,2 (CH, C5), 101,8 (CH₂, dioxi).

6.8.5. Obtenção da chalcona 13



(E)-3-(benzo[d][1,3]dioxol-5-il)-1-(3,5-diclorofenil)prop-2-en-1-ona

Obtido como um sólido amarelo sem purificação adicional; 84% de rendimento.

Ponto de fusão: 112 – 114°C

RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3): δ 7,45 (t, $J = 1,5$ Hz, 1H, H6') 7,43 (d, $J = 15,5$ Hz, 1H, H $_{\beta}$), 7,39 (m, 2H, H3' e H4'), 7,11 (d, $J = 1,5$ Hz, 1H, H2), 7,06 (dd, $J = 1,5$, e 8 Hz, 1H, H6), 6,93 (d, $J = 15,5$ Hz, 1H, H $_{\alpha}$), 6,85 (d, $J = 8$ Hz, 1H, H5), 6,05 (s, 2H, OCH₂O)

RMN de ^{13}C (125 MHz, CDCl_3): δ 192,3 (C=O), 150,7 (C3), 148,8 (C4), 147,1 (C1'), 140,8 (CH, H $_{\beta}$), 133,3 (C5), 131,7 (CH, C3'), 131,4 (CH, C4'), 129,8 (CH, C6'), 129,4 (C2'), 128,9 (CH, H $_{\alpha}$), 126,0 (C5'), 124,0 (CH, H $_{\alpha}$), 108,9 (CH, C6), 107,0 (CH, C2), 102,0 (OCH₂O).

REFERÊNCIAS

- [1] Abbott, A. Dementia: a problem of our age. *Nature* **2011**, 475, S2-S4.
<https://doi.org/10.1038/475S2a>
- [2] Data SUS. <http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/tabcgi.exe?ibge/cnv/projpopbr.def>.
Acesso em 09 de setembro de 2019.
- [3] Biblioteca Virtual do Ministério da Saúde. <https://bvsmis.saude.gov.br/conhecer-a-demencia-conhecer-o-alzheimer-o-poder-do-conhecimento-setembro-mes-mundial-do-alzheimer/#:~:text=2021%20marca%20o%2010%C2%BA%20ano,que%20ainda%20envolvem%20a%20dem%C3%Aancia>. Acesso em 23 de março de 2022.
- [4] National Institute of Health. <https://www.nia.nih.gov/health/what-are-signs-alzheimers-disease>. Acesso em 20 de março de 2022.
- [5] Alzheimer's Association. Alzheimer's disease facts and figures, Alzheimer's Dement., **2022**, 18, 700-789. <http://www.10.1002/alz.12638>
- [6] Folstein, M. F.; Folstein, S. E.; McHugh, P. R. "Mini-mental state". A practical method for grading the cognitive state of patients for the clinician. *J. Psychiatr. Res.*, **1975**, 12, 189-198. [http://www.10.1016/0022-3956\(75\)90026-6](http://www.10.1016/0022-3956(75)90026-6)
- [7] Brucki, S. M. D.; Nitrini, R.; Caramelli, P.; Bertolucci, P. H. F.; Okamoto, I. H. Sugestões para o uso do Mini-Exame do Estado Mental no Brasil. *Arq. Neuropsiquiatr*, **2003**, 61, 777-781. <https://doi.org/10.1590/S0004-282X2003000500014>
- [8] Dutra de Mello, B. L.; Haddad, M. C. G.; Dellaroza, M. S. G. Avaliação cognitiva de idosos institucionalizados. *Acta Scientiarum. Health Sci.*, **2012**, 34, 95-102. <http://www.10.4025/actascihealthsci.v34i1.7974>
- [9] Sperling R.A.; Donohue MC, Raman R, Sun C-K, Yaari R, Holdridge K, et al. Association of factors with elevated amyloid burden in clinically normal older individuals. *JAMA Neurol.*, **2020**, 77, 735-745. <http://www.10.1001/jamaneurol.2020.0387>
- [10] Hunt A, Schonknecht P, Henze M, Seidl U, Haberkorn U, Schroder J. Reduced cerebral glucose metabolism in patients at risk for Alzheimer's disease.

Psych Res: Neuroimaging **2007**, 155, 147-54.

<https://doi.org/10.1016/j.psychresns.2006.12.003>

[11] Olsson, B.; Lautner, R.; Andreasson, U.; Ohrfelt, A.; Portelius, E.; Bjerke, M.; Hölttä, M.; Rosén, C.; Olsson, C.; Strobel, G.; Wu, E.; Dakin, K.; Petzold, M.; Blennow, K.; Zetterberg, H. CSF and blood biomarkers for the diagnosis of Alzheimer's disease: A systematic review and meta-analysis. *Lancet Neurol.*, **2016**, 15, 673-84. [http://www.10.1016/S1474-4422\(16\)00070-3](http://www.10.1016/S1474-4422(16)00070-3)

[12] Kung H.F. The β -amyloid hypothesis in Alzheimer's disease: seeing is believing. *ACS Med. Chem.Lett.*, **2012**, 3, 265-267. <https://doi.org/10.1021/ml300058m>

[13] Zhang, H.; Ma, Q.; Zhang, Y.W.; Xu, H. Proteolytic processing of Alzheimer's β -amyloid precursor protein. *J. Neurochem.* **2012**, 120, 9-21. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2011.07519.x>.

[14] Sekoe, D.J.; Hardy, J. The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease at 25 years, *EMBO Mol. Med.* **2016**, 8, 595–608, <https://doi.org/10.15252/emmm.201606210>.

[15] Basurto-Islas, G.; Luna-Muñoz, J.; Guillozet-Bongaarts, A.L.; Binder, L.I.; Mena, R.; García-Sierra, F. Accumulation of aspartic acid421- and glutamic acid391-cleaved tau in neurofibrillary tangles correlates with progression in Alzheimer disease. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.*, **2008**, 67, 470-483. <https://doi.org/10.1097/nen.0b013e31817275c7>.

[16] Tamano, H.; Takeda, A. Is interaction of amyloid β -peptides with metals involved in cognitive activity? *Metallomics* **2015**, 7, 1205-1212. <https://doi.org/10.1039/c5mt00076a>.

[17] Greenough, M.A.; Camakaris, J.; Bush, A.I. Metal dyshomeostasis and oxidative stress in Alzheimer's disease. *Neurochem. Int.*, **2013**, 62, 540-555. <http://dx.doi.org/10.1016/j.neuint.2012.08.014>.

[18] Cassidy, L.; Fernandez, F.; Johnson, J. B.; Mani, N.; Owoola, A. G.; Broszczak, D. A. Oxidative stress in Alzheimer's disease: A review on emergent natural polyphenolic therapeutics. *Complementary Med Ther.*, **2020**, 49, 102294. <https://doi.org/10.1016/j.ctim.2019.102294>

- [19] Klinkenberg, I.; Sambeth, A.; Blokland, A. Acetylcholine and attention. *Behav. Brain Res.*, **2011**, *221*, 430-442. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbr.2010.11.033>.
- [20] Heneka, M. T.; Carson, M. J.; El Khoury, J.; Landreth, G. E.; Brosseon, F.; Feinstein, D. L.; Jacobs, A. H.; Wyss-Coray, T.; Vitorica, J.; Ransohoff, R. M.; Herrup, K.; Frautschy, S. A.; Finsen, B.; Brown, B.; Brown, G. C.; Verkhratsky, A.; Yamanaka, K.; Koistinaho, J.; Latz, E.; Halle, A.; Petzhold, G. C.; Town, T.; Morgan, D.; Shinohara, M. L.; Perry, V. H.; Holmes, C.; Bazan, N. G.; Brooks, D.; Hunot, S.; Joseph, B.; Deigendesch, N.; Garaschuk, O.; Boddeke, L.; Dinarello, C. A.; Breitner, J. C.; Cole, G. M.; Golenbock, D. T.; Kummer, M. P. Neuroinflammation in Alzheimer's disease. *Lancet Neurol.*, **2015**, *14*, 388-405. [http://www.10.1016/S1474-4422\(15\)70016-5](http://www.10.1016/S1474-4422(15)70016-5)
- [21] Jinping, L.; Chang, L.; Song, Y.; Li, H.; Wu, Y. The role of NMDA receptors in Alzheimer's disease. *Front. Neurosci.*, **2019**, *13*, Article 43. <https://doi.org/10.3389/fnins.2019.00043>
- [22] McGleenon, B.M.; Dynan, K.B.; Passmore, A.P. Acetylcholinesterase inhibitors in Alzheimer's disease. *Br. J. Clin. Pharmacol.*, **1999**, *48*, 471-480. <http://dx.doi.org/10.1046/j.1365-2125.1999.00026.x>.
- [23] Grossberg, G.T. Cholinesterase inhibitors for the treatment of Alzheimer's disease: getting on and staying on. *Curr. Ther. Res. Clin. Exp.*, **2003**, *64*, 216-235. [http://dx.doi.org/10.1016/S0011-393X\(03\)00059-6](http://dx.doi.org/10.1016/S0011-393X(03)00059-6).
- [24] Manuel, I.; Lombardero, L.; LaFerla, F. M.; Giménez-Llort, L.; Rodríguez-Puertas, R. 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. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2016.05.012>
- [25] Picciotto, M. R., Higley, M. J. & Mineur, Y. S. Acetylcholine as a Neuromodulator: Cholinergic Signaling Shapes Nervous System Function and Behavior. *Neuron* 2012, *76*, 116–129. <http://www.10.1016/j.neuron.2012.08.036>
- [26] Nakaizumi, K.; Tereda, T.; Yoshikawa, E.; Kakimoto, A.; Takashi, I.; Suzuki, I.; Tomoyasu, B.; Suzuki, K.; Magata, Y.; Mori, N.; Ouchi, Y. Implication of altered $\alpha 7$

nicotinic receptors and amyloid deposition in the Alzheimer's brain. *European Psy.*, **2016**, 33, S199. <https://doi.org/10.1016/j.eurpsy.2016.01.468>

[27] Whitehouse, P. Price, D. L.; Struble, R. G.; Clark, A. W.; Coyle, J. T.; Delon, M. R. Alzheimer's disease and senile dementia: loss of neurons in the basal forebrain. *Science* **1982**, 215, 1237–1239. <http://www.10.1126/science.7058341>

[28] Russo, P.; Del Bufalo, A.; Frustaci, A.; Fini, M.; Cesario, A. Beyond acetylcholinesterase inhibitors for treating Alzheimer's disease: alpha7-nAChR agonists in human clinical trials. *Curr. Pharm. Des.* **2014**, 20, 6014–6021. <http://www.10.2174/1381612820666140316130720>

[29] Apelt, J., Kumar, A. & Schliebs, R. Impairment of cholinergic neurotransmission in adult and aged transgenic Tg2576 mouse brain expressing the Swedish mutation of human β -amyloid precursor protein. *Brain Res.*, **2002**, 953, 17–30. [https://doi.org/10.1016/S0006-8993\(02\)03262-6](https://doi.org/10.1016/S0006-8993(02)03262-6)

[30] Slotkin, T. A.; Seidler, F. J.; Crain, B. J.; Bell, J. M.; Bissette, G.; Nemeroff, C. B. Regulatory changes in presynaptic cholinergic function assessed in rapid autopsy material from patients with Alzheimer disease: implications for etiology and therapy. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **1990**, 87, 2452–2455. <https://www.jstor.org/stable/2354240>

[31] Mohamed, T.; Shakeri, A.; Rao, P. Amyloid cascade in Alzheimer's disease: Recent advances in medicinal chemistry. *Eur. J. Med. Chem.*, **2016**, 113, 258-272. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejmech.2016.02.049>.

[32] Vassar, R.; Bennett, B.D.; Babu-Khan, S.; Kahn, S.; Mendiaz, E.A.; Denis, P.; Teplow, D.B.; Ross, S.; Amarante, P.; Loeloff, R.; Luo, Y.; Fisher, S.; Fuller, J.; Edenson, S.; Lile, J.; Jarosinski, M.A.; Biere, A.L.; Curran, E.; Burgess, T.; Louis, J.C.; Collins, F.; Treanor, J.; Rogers, G.; Citron, M. β -secretase cleavage of Alzheimer's amyloid precursor protein by the transmembrane aspartic protease BACE. *Science* **1999**, 286, 735-741. <http://dx.doi.org/10.1126/science.286.5440.735>.

[33] Zhang, X.; Li, Y.; Xu, H.; Zhang, Y.-W. The γ -secretase complex: from structure to function *Front. Cell. Neurosci.*, **2014**, 8, Article 427. <http://dx.doi.org/10.3389/fncel.2014.00427>.

- [34] Nhan, H. S.; Chiang, K.; Koo, E. H. The multifaceted nature of amyloid precursor protein and its proteolytic fragments: friends and foes. *Acta Neuropathol.* **2015**, *129*, 1–19. <http://dx.doi.org/10.1007/s00401-014-1347-2>.
- [35] Lambert, M.P.; Barlow, A.K.; Chromy, B.A.; Edwards, C.; Freed, R.; Liosatos, M.; Morgan, T.E.; Rozovsky, I.; Trommer, B.; Viola, K.L.; Wals, P.; Zhang, C.; Finch, C.E.; Krafft, G.A.; Klein, W.L. Diffusible, nonfibrillar ligands derived from A β 1–42 are potent central nervous system neurotoxins. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **1998**, *95*, 6448–6453. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.95.11.6448>.
- [36] Ahmed, M.; Davis, J.; Aucoin, D.; Sato, T.; Ahuja, S.; Aimoto, S.; Elliott, J. I.; Van Nostrand, W.E.; Smith, S.O. Structural conversion of neurotoxic amyloid- β (1–42) oligomers to fibrils. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **2010**, *17*, 561–567. <http://dx.doi.org/10.1038/nsmb.1799>.
- [37] Inestrosa, N. C.; Dinamarca, M. C.; Alvarez, A. Amyloid-cholinesterase interactions. *FEBS J.*, **2008**, *275*, 625–632. <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2007.06238.x>
- [38] Parsons, C. G.; Danysz, W.; Quack, G. Glutamate in CNS disorders as a target for drug development: an update. *Drug News Perspect.* **1998**, *11*, 523–569. <http://www.doi:10.1358/dnp.1998.11.9.863689>.
- [39] Limapichat, W.; Yu, W.Y.; Branigan, E.; Lester, H. A.; Dougherty, D. A. Key binding interactions for memantine in the NMDA Receptor. *ACS Chem Neurosci.*, **2013**, *4*, 255–260. <http://doi.org.10.1021/cn300180a>
- [40] Advokat, C.; Pellegrin, A. I. Excitatory amino acids and memory: evidence from research on Alzheimer's disease and behavioral pharmacology. *Neurosci. Biobehav. Rev.*, **1992**, *16*, 13–24. [http://www.10.1016/s0149-7634\(05\)80046-6](http://www.10.1016/s0149-7634(05)80046-6).
- [41] Zhang, Y.; Li, P.; Feng, J.; Wu, M. Dysfunction of NMDA receptors in Alzheimer's disease. *Neurol. Sci.*, **2016**, *37*, 1039–1047. <http://www.10.1007/s10072-016-2546-5>
- [42] Dodd, P. R.; Scott, H. L.; Westphalen, R. I. Excitotoxic mechanisms in the pathogenesis of dementia. *Neurochem. Int.*, **1994**, *25*, 203–219. [http://www.10.1016/0197-0186\(94\)90064-7](http://www.10.1016/0197-0186(94)90064-7)

- [43] Kocahan, S.; Doğan, Z. Mechanisms of Alzheimer's Disease Pathogenesis and Prevention: The Brain, Neural Pathology, N-methyl-D-aspartate Receptors, Tau Protein and Other Risk Factors. *Clin. Psychopharmacol. Neurosci.* **2017**, *15*, 1–8. <http://www.10.9758/cpn.2017.15.1.1>
- [44] Kelly, B. L.; Ferreira, A. β -amyloid-induced dynamin 1 degradation is mediated by N-methyl-D-aspartate receptors in hippocampal neurons. *J. Biol. Chem.* **2006**, *281*, 28079–28089. <http://www.10.1074/jbc.M605081200>
- [45] Buée, L.; Bussi re, T.; Bu e-Scherrer, V.; Delacourte, A.; Hof, P. R. Tau protein isoforms, phosphorylation, and role in neurodegenerative disorders. *Brain Res. Rev.*, **2000**, *33*, 95–130. [http://www.10.1016/s0165-0173\(00\)00019-9](http://www.10.1016/s0165-0173(00)00019-9)
- [46] Martin, L.; Latypova, X.; Wilson, C. M.; Magnaudeix, A.; Perrin, M.-L.; Yardin, C.; Terro, F. Tau protein kinases: involvement in Alzheimer's disease. *Ageing Res. Rev.*, **2013**, *12*, 289-309. <http://www.10.1016/j.arr.2012.06.003>
- [47] Ozben, T.; Ozben, S. Neuro-inflammation and anti-inflammatory treatment options for Alzheimer's disease. *Clinical Biochem.*, **2019**, *72*, 87-89. <http://www.10.1016/j.clinbiochem.2019.04.001>
- [48] Subhramanyam C.S., Wang C., Hu Q., Dheen S.T. Microglia-mediated neuroinflammation in neurodegenerative diseases. *Seminars in Cell and developmental biology*, **2019**, *94*, 112-120. <http://www.10.1016/j.semcdb.2019.05.004>
- [49] Heneka, M. T.; Carson, M. J.; El Khoury, J.; Landreth, G. E.; Brosseron, F.; Feinstein, D. L.; Jacobs, A.H.; Wyss-Coray, T.; Vitorica, J.; Ransohoff, R. M.; Herrup, K.; Frautschy, S. A.; Finsen, B.; Brown, G. C.; Verkhratsky, A.; Yamanaka, K.; Koistinaho, J.; Latz, E.; Halle, A.; Petzold, G. C.; Town, T.; Morgan, D.; Shinohara, M. L.; Perry, V. H.; Holmes, C.; Bazan, N. G.; Brooks, D. J.; Hunot, S.; Bertrand, J.; Deigendesch, N.; Garaschuk, O.; Boddeke, E.; Dinarello, C.A.; Breitner, J. C.; Cole, G. M.; Golenbock, D. T.; Kummer, M. P. Neuroinflammation in Alzheimer's disease. *Lancet Neurol.*, **2015**, *14*: 388–405. [http://www.10.1016/S1474-4422\(15\)70016-5](http://www.10.1016/S1474-4422(15)70016-5)
- [50] Liu, Y.; Nguyen, M.; Robert, A.; Meunier, B. Metal Ions in Alzheimer's Disease: A Key Role or Not? *Acc. Chem. Res.*, **2019**, *52*, 2026-2035. <http://www.10.1021/acs.accounts.9b00248>

- [51] Leal, S. S.; Botelho, H. M.; Gomes, C. M. Metal ions as modulators of protein conformation and misfolding in neurodegeneration. *Coord. Chem. Rev.* **2012**, *256*, 2253-2270. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2012.04.004>
- [52] Cristóvão, J. S.; Santos, R.; Gomes, C. M. Metals and Neuronal Metal Binding Proteins Implicated in Alzheimer's Disease. *Oxid. Med. Cell. Longev.* **2016**, *2016*, 1-14. <http://www.10.1155/2016/9812178>
- [53] Zhou, X.; Li, X.; Shi, X.; Ma, C. 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*, 246-269. Doi: não localizado.
- [54] Gaeta, A.; Hider, R. C. The crucial role of metal ions in neurodegeneration: the basis for a promising therapeutic strategy. *Br. J. Pharmacol.*, **2005**, 1041-1059. <http://www.10.1038/sj.bjp.0706416>
- [55] Dumont, M.; Beal, M. F. Neuroprotective strategies involving ROS in Alzheimer disease. *Free Radic. Biol. Med.* **2011**, *51*, 1014–1026. <http://www.10.1016/j.freeradbiomed.2010.11.026>
- [56] Bonda, D. J.; Wang, X.; Perry, J.; Nunomura, A.; Tabatan, M.; Zhu, X.; Smith, M. A. Oxidative stress in Alzheimer disease: A possibility for prevention. *Neuropharmacology* **2010**, *59*, 290–294. <http://www.10.1016/j.neuropharm.2010.04.005>
- [57] Lull, M. E.; Block, M. L. Microglial Activation and Chronic Neurodegeneration. *Neurotherapeutics*, 2010, *7*, 354–365. <http://www.10.1016/j.nurt.2010.05.014>
- [58] Block, M. L. NADPH oxidase as a therapeutic target in Alzheimer's disease. *BMC Neurosci.* 2008, *9*, 1–8. <https://doi.org/10.1186/1471-2202-9-S2-S8>
- [59] Huang, X.; Atwood, C. S.; Hartshorn, M. A.; Multhaup, G.; Goldstein, L. E.; Scarpa, R. C.; Cuajungco, M. P.; Gray, D. N.; Lim, J.; Moir, R. D.; Tanzi, R. E.; Bush, I. The A β peptide of Alzheimer's disease directly produces hydrogen peroxide through metal ion reduction. *Biochemistry*, **1999**, *38*, 7609–7616. <http://www.10.1021/bi990438f>

- [60] Butterfield, D. A.; Sultana, R. Methionine-35 of A β (1–42): Importance for Oxidative Stress in Alzheimer Disease. *J. Amino Acids* **2011**, 2011, 1–10. <http://www.10.4061/2011/198430>
- [61] Wells, B. G.; Dipiro, C. V.; Dipiro, J. T.; Schwinghammer, T. L. **Manual de Farmacoterapia**. 9^a ed. Porto Alegre: AMGH Editora, **2016**. 964 p.
- [62] Gonzalez, J. F.; Alcantara, A. R.; Droadrio, A. L.; Sanchez-Montero, J. M. Developments with multi-target drugs for Alzheimer's disease: an overview of the current discovery approach. *Exp. Opin. Drug Discover.* **2019**, 14, 879-891. <https://doi.org/10.1007/s12035-020-02116-9>.
- [63] Bachurin, S. O.; Bovina, E. V.; Ustyugov, A. A. Drugs in Clinical Trials for Alzheimer's Disease: The Major Trends. *Med. Res. Rev.*, **2017**, 37, 1186-1225. <http://doi.org/10.1002/med.21434>.
- [64] Cummings, J.; Lee, G.; Nahed, P.; Kambar, M. E. Z. N.; Zhong, K.; Fonseca, J.; Taghva, K. Alzheimer's disease drug development pipeline: 2022. *Alzheimer Dement.*, **2022**, 8: e12295. <https://doi.org/10.1002/trc2.12295>
- [65] Costa, P. R. R. Safrol e eugenol: estudo da reatividade química e uso em síntese de produtos naturais biologicamente ativos e seus derivados. *Quim Nova*, **2000**, 23, 357-369. <https://doi.org/10.1590/S0100-40422000000300013>
- [66] Quijia, C. R.; Chorilli, M. Characteristics, Biological Properties and Analytical Methods of Piperine: a review. *Critical Rev. Anal. Chem.*, **2020**, 50, 62-77. <http://doi.org/10.1080/10408347.2019.1573656>
- [67] Nicolussi, S.; Viveros-Parede, J. M.; Gachet, M. S.; Rau, M.; Flores-Soto, M. E.; Blunder, M.; Gerstsch, J. Guineensine is a novel inhibitor of endocannabinoid uptake showing cannabimimetic behavioral effects in BALB/c mice. *Pharmacol. Res.*, 2014, 80, 52-65. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2013.12.010>
- [68] D'Incalci, M.; Galmarini, C. M. A Review of Trabectedin (ET-743): A Unique Mechanism of Action. *Am. Assoc. Cancer Res.*, **2010**, 9, 2157-2163. <http://doi.org/10.1158/1535-7163>.
- [69] Lemke, T. L.; Williams, D. A.; Roche, V. F.; Zito, S. W. Foye's Principles of Medicinal Chemistry, 17^a.ed., Filadelfia, Lippincott Wilks & Williams, **2012**.

[70] Rang, H. P.; Ritter, J. M.; Flower, R. J.; Henderson, G. Rang & Dale Farmacologia, 8^a. ed., Rio de Janeiro, Elsevier, **2016**.

[71](a) Paula Cristina Huber, Avaliação do efeito de Agentes antimicrobianos na inibição da agregação do peptídeo β -amiloide. Dissertação de Mestrado, IQ-UNICAMP, **2012**; (b) Gisele Silvestre da Silva, Desenvolvimento de um híbrido molecular com base na estrutura da tacrina candidato a inibidor de acetilcolinesterase. Dissertação de Mestrado, IQ/UNICAMP, **2013**; (c) Gisele Silvestre da Silva, Desenvolvimento de acil-hidrazonas derivadas da 4-oxo-1,4-diidroquinolina como potenciais inibidores da acetilcolinesterase, Tese de Doutorado, IQ-UNICAMP, **2017**; (d) Renata Parruca Sakata, Modelagem, Síntese e estudo biológico de um potencial inibidor de β -secretase (BACE-1), Tese de Doutorado, IQ-UNICAMP, **2018**; (e) Giorgio Antonioli, Síntese e Avaliação da Citotoxicidade de Chalconas e Derivados com Efeito Inibitório sobre a Acetilcolinesterase e β -secretase (BACE-1), Dissertação de Mestrado, IQ-UNICAMP, **2018**; (f) Planejamento Racional no Desenvolvimento de novos derivados de chalcona como agentes anti-Candida albicans. Luiz Frederico Motta, Tese de Doutorado, IQ-UNICAMP, **2012**; (g) Síntese de novas acil-hidrazonas como potenciais ligantes duplos da AChE. Avaliação do efeito biológico e estudo *in silico* de propriedades farmacocinéticas, Camila Cavalleiro Frias, Iniciação Científica -IQ-UNICAMP, **2019**; (h) Síntese de Híbridos Moleculares Derivados da Isoniazida Candidatos a Fármacos para Doença de Alzheimer. Isabela Paes Koury, Trabalho de Conclusão de Curso, FCF-UNICAMP, **2016**.

[72] Tiwari, A.; Bendi, A.; Bhathival, A. S. An overview on synthesis and biological activity of chalcone derive pyrazolines. ChemSelect, **2021**, 6, 12757 – 12795. <https://doi.org/10.1002/slct.202103779>

[73] Da Silva, G.S.; Figueiró, M.; Tormena, C. F.; Coelho, F.; Almeida, W.P. Effects of novel acylhydrazones derived from 4-quinolone on the acetylcholinesterase activity and A β 42 peptide fibrils formation. J. Enz. Inhib. Med. Chem., **2016**, 31, 1464-1470. <https://doi.org/10.3109/14756366.2016.1144597>

[74] Claisen, L.; Claparède, A. Condensationen von Ketonen mit Aldehyden, Berichte der Dtsch. Chem. Gesellschaft, **1881**, 14, 2460–2468. <https://doi.org/10.1002/cber.188101402192>.

- [75] Ellman, G.L.; Courtney, K.D.; Andre Jr., V.; Featherstone, R.M. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity, *Biochem. Pharmacol.*, **1961**, 7, 88–95. [https://doi.org/10.1016/0006-2952\(61\)90145-9](https://doi.org/10.1016/0006-2952(61)90145-9).
- [76] Naiki, H.; Higuchi, K.; Hosokawa, M.; Takeda, T. Fluorometric determination of amyloid fibrils in vitro using the fluorescent dye, thioflavine T, *Anal. Biochem.*, **1989**, 177, 244–249. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(89\)90046-8](https://doi.org/10.1016/0003-2697(89)90046-8).
- [77] Levine 3rd., H. Thioflavine-T interaction with amyloid β -sheet structures. *Amyloid* **1995**, 2, 1–6. <https://doi.org/10.1002/pro.5560020312>.
- [78] Sakata, R. P.; Antonioli, G.; Lancellotti, M.; Kawano, D. F.; Barbosa, E. B.; Almeida, W. P. Synthesis, and biological evaluation of 2'-Aminochalcone: A multi-target approach to find drug candidates to treat Alzheimer's disease. *Bioorg. Chem.*, **2020**, 103, 104201. <https://doi.org/10.1016/j.bioorg.2020.104201>.
- [79] Seong, S. H.; Ali, M. Y.; Kim, H. R.; Jung, H. A.; Choi, J. S. BACE1 inhibitory activity and molecular docking analysis of meroterpenoids from *Sargassum serratifolium*. *Bioorg. Med. Chem.*, **2017**, 25, 3964–3970. <http://doi.org/10.1016/j.bmc.2017.05.033>
- [80] Trott, O.; Olson, A. 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. <http://doi.org/10.1002/jcc.21334>
- [81] Maia, R. do C.; Tesch, R.; Fraga, C.A.; Acylhydrazone derivatives: a patent review. *Expert Opin. Ther. Pat.*, **2014**, 11, 1161-1170. <http://doi.org/10.1517/13543776.2014.959491>
- [82] Ni, L.; Meng, C.Q.; Sikorski, J.A. Recent advances in therapeutic chalcones. *Expert. Opin. Ther. Pat.*, **2004**, 14, 1669-1691. <https://doi.org/10.1517/13543776.14.12.1669>
- [83] Bukhari, S.N.; Jasamai, M.; Jantan, I. Synthesis, and biological evaluation of chalcone derivatives (mini review). *Mini Rev. Med. Chem.*, **2012**, 12, 1394-1403. <http://doi.org/10.2174/13895575112091394>
- [84] Antonioli, G.; Almeida, W. P.; Frias, C. C.; de Oliveira, T. B. Chalcones Acting as Inhibitors of Cholinesterases, β -Secretase and β -Amyloid Aggregation and

other Targets for Alzheimer's Disease: A Critical Review. *Curr. Med. Chem.*, **2021**, 28, 1-24. <http://doi.org/10.2174/0929867327666201020151804>

[85] Vassar, R.; Bennett, B.D.; Babu-Khan, S.; Mendiaz, E.A.; Denis, P.; D.B. Teplow, D.B.; Ross, S.; Amarante, P.; Loeloff, R.; Luo, Y.; Fisher, S.; Fuller, J.; Edenson, S.; Lile, J.; Jarosinski, M.A.; Biere, A.L.; Curran, E.; Burgesss, T.; Louis, J.C.; Collins, F.; Treanor, J.; Rogers, G.; Citron, M. β -Secretase cleavage of Alzheimer's amyloid precursor protein by the transmembrane aspartic protease BACE, *Science* **1999**, 286, 735–741. <https://doi.org/10.1126/science.286.5440.735>.

[86] Barman, A.; Prabhakar, R. Elucidating the catalytic mechanism of β -secretase (BACE1): A quantum mechanics/molecular mechanics (QM/MM) approach, *J. Mol. Graph. Model.*, 2013 40, 1–9. <https://doi.org/10.1016/j.jmgm.2012.12.013>.

[87] Wlodawer, A.; Vondrasek, J. Inhibitors for HIV-1 protease, a major success of structure-assisted drug design. *Annual Rev. Biophys. Biomol. Struct.*, **1998**, 27, 249-284. <https://doi.org/10.1146/annurev.biophys.27.1.249>

[88] Lan, X.; Kiyota, T.; Hanamsagar, R.; Huang, Y.; Andrews, S.; Peng, H.; Zheng, J. C.; Swindells, S.; Carlson, G. A.; Ikezu, T. The effect of HIV-protease inhibitors on Amyloid β -peptide degradation and synthesis in human cells and Alzheimer's disease animal model. *J. Neuroimmune Pharmacol.*, **2012**, 7, 412-423. <http://www.10.1007/s11481-011-9304-5>

[89] Muñoz-Torrero, D.; Galdeano, C.; Arce, E. M.; Martínez, P.; Pérez-Areales, F. J.; Sampietro, A. Unveiling the Multitarget Anti-Alzheimer Drug Discovery Landscape: A Bibliometric Analysis. *Pharmaceuticals*, **2022**, 15, 545. <https://doi.org/10.3390/ph15050545>

[90] Lemkul, J. A.; Bevan, D. R. The role of molecular simulations in the development of inhibitors of amyloid β -peptide aggregation for the treatment of Alzheimer's disease. *ACS Chem. Neurosci.*, **2012**, 3, 845-856. <http://dx.doi.org/10.1021/cn300091a>

[91] Dahlgren K.K; Manelli A.M.; Stine Jr W.B.; Baker L.K.; Krafft G.A.; LaDu M.J. Oligomeric and fibrillar species of amyloid- β peptides differentially affect neuronal viability. *J. Biol. Chem.*, **2002**, 277, 32046-32053. <http://doi.org/10.1074/jbc.M201750200>

- [92] Yang, F.; Lim, G. P.; Begum, A. N.; Ubeda, O. J.; Simmons, M. R.; Ambegaokar, S. S.; Chen, P. P.; Kaye, R.; Glabe, C. G.; Frautschy, S. A.; Cole, G. M. Curcumin inhibits formation of amyloid beta oligomers and fibrils, binds plaques, and reduces amyloid in vivo. *J. Biol. Chem.*, **2005**, *280*, 5892-5901. <http://www.10.1074/jbc.M404751200>
- [93] Dvir, H.; Silman, I.; Harel, M.; Rosenberry, T.L.; Sussman, J.L. Acetylcholinesterase: from 3D structure to function. *Chem. Biol. Interact.*, **2010**, *187*, 10-22. <http://doi.org/10.1016/j.cbi.2010.01.042>
- [94] Branduardi, D.; Gervasio, F.L.; Cavalli, A.; Recanatini, M.; Parrinello, M. 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*, 9147-9155. <http://doi.org/10.1021/ja0512780>.
- [95] Veber, D.F.; Johnson, R.S.; Cheng, H-Y; Smith, B.R.; Ward, K.W.; Kopple, K.D. - Molecular Properties That Influence the Oral Bioavailability of Drug Candidates. *J. Med. Chem.*, **2002**, *45*, 2615-2623. <http://www.10.1021/jm020017n>
- [96] Tavares, L.C. QSAR: A Abordagem de Hansch. *Química Nova* **2004**, *27*, 631-639. <https://doi.org/10.1590/S0100-40422004000400018>
- [97] Bannan, C.C.; Calabró, G.; Kyu, D.Y., Mobley, D.L. Calculating partition coefficients of small molecules in octanol/water and cyclohexane/water. *J. Chem. Theor. Comput.*, **2018**, *12*, 4015–4024. <http://www.10.1021/acs.jctc.6b00449>
- [98] Passamani, F. Dissertação de Mestrado, **2009**, FCF-UFRJ.
- [99] Hou, T.; Wang, J.; Zhang, W.; Xu, X. ADME Evaluation in Drug Discovery. 7. Prediction of Oral Absorption by Correlation and Classification. *J. Chem. Inf. Model.* **2007**, *47*, 208-218. <http://www.10.1021/ci600343x>
- [100] Lipinski, C. A. Lead and drug-like compounds: the rule-of-five revolution. *Drug Discov. Today: Technol.*, **2004**, *1*, 337-341. <http://www.10.1016/j.ddtec.2004.11.007>
- [101] Ghose, A. K.; Viswanadhan, V. N.; Wendoloski, J. J. A Knowledge-Based Approach in Designing Combinatorial or Medicinal Chemistry Libraries for Drug Discovery. 1. A Qualitative and Quantitative Characterization of Known Drug

Databases. J. Comb. Chem., **1999**, *1*, 55-68.
<http://www.doi.org/10.1021/cc9800071>

[102] Egan, W. J.; Merz, Jr., K. M.; Baldwin, J. J. Prediction of Drug Absorption Using Multivariate Statistics. J. Med. Chem., **2000**, *43*, 3867-3877.
<http://www.10.1021/jm000292e>

[103] Muegge, I.; Heald, S. L.; Brittelli, D. Simple Selection Criteria for Drug-like Chemical Matter. J. Med. Chem., **2001**, *44*, 1841-1846. <http://www.10.1021/jm015507e>

[104] Clark D. E., Pickett S. P. Computational methods for the prediction of drug-likeness DDT. Drug Discovery Today, **2000**, *5*, 49-58. [http://www.10.1016/s1359-6446\(99\)01451-8](http://www.10.1016/s1359-6446(99)01451-8)

[105] Ishikawa, M.; Hashimoto, Y. Improvement in aqueous solubility in small molecule drug discovery programs by disruption of molecular planarity and symmetry. J. Med. Chem. **2011**, *54*, 1539–1554. <http://www.10.1021/jm101356p>

[106] Freire, A. C., Podczek, F., Sousa, J., Veiga, F. Liberação específica de fármacos para administração no cólon por via oral. I - O cólon como local de liberação de fármacos. Rev. Bras. Ciên. Farm., **2006**, *42*, 337-355.

[107] Kernes, E. H.; Di, L. Drug-like Properties: concepts, structure design and methods: from ADME to toxicity optimization, 1st. Ed., Amsterdam, Elsevier, **2008**

ANEXOS

Anexo 1. ESPECTROS DAS SUBSTÂNCIAS SINTETIZADAS

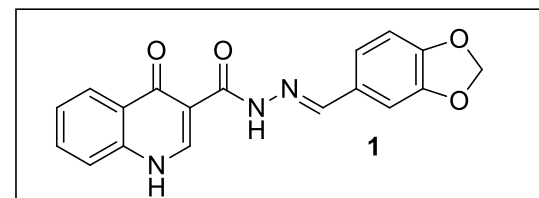
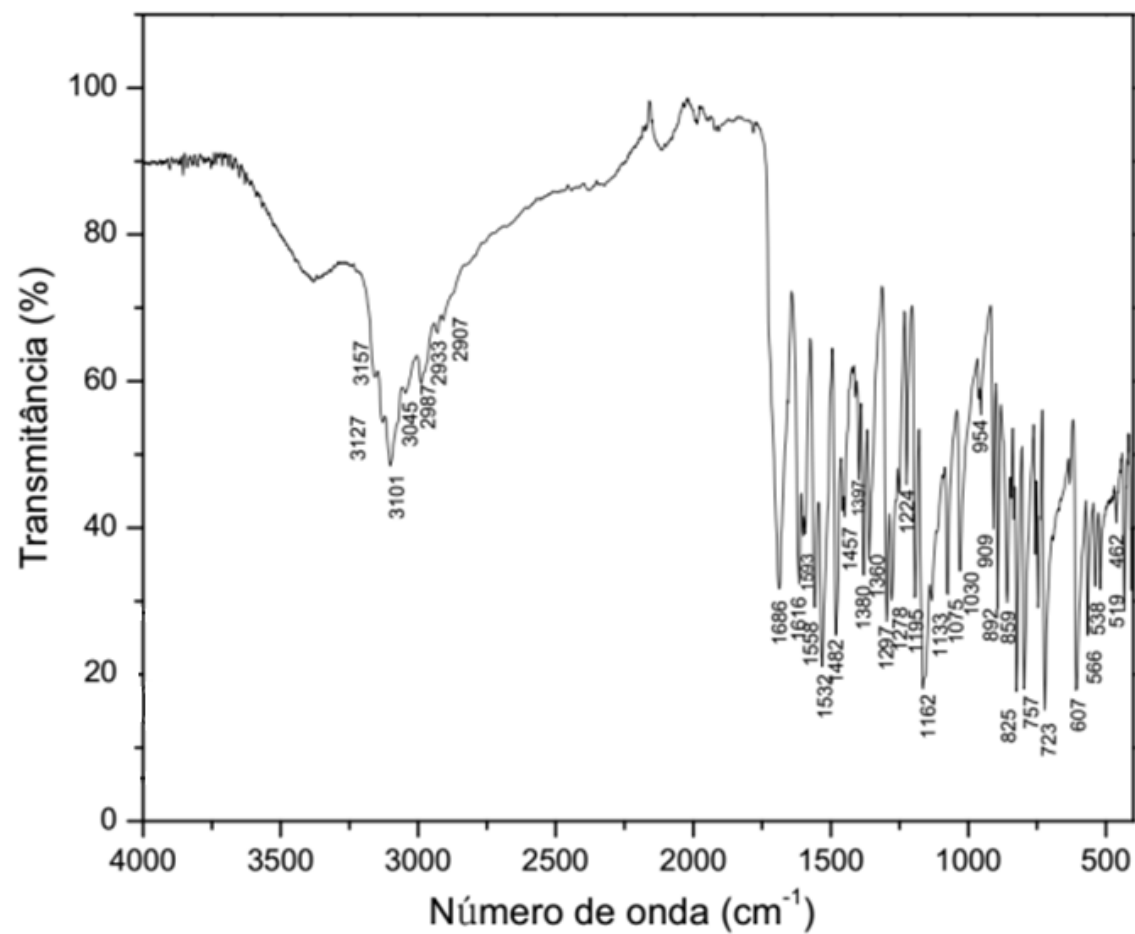


Figura S1. Espectro no IV da acil-hidrazona 1 (ATR, cm⁻¹)

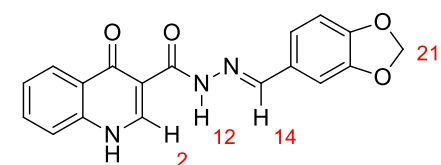
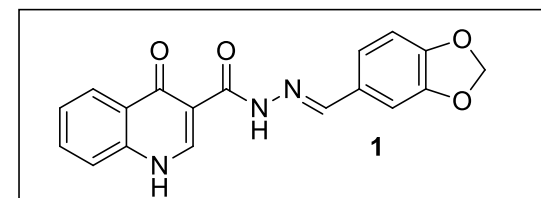
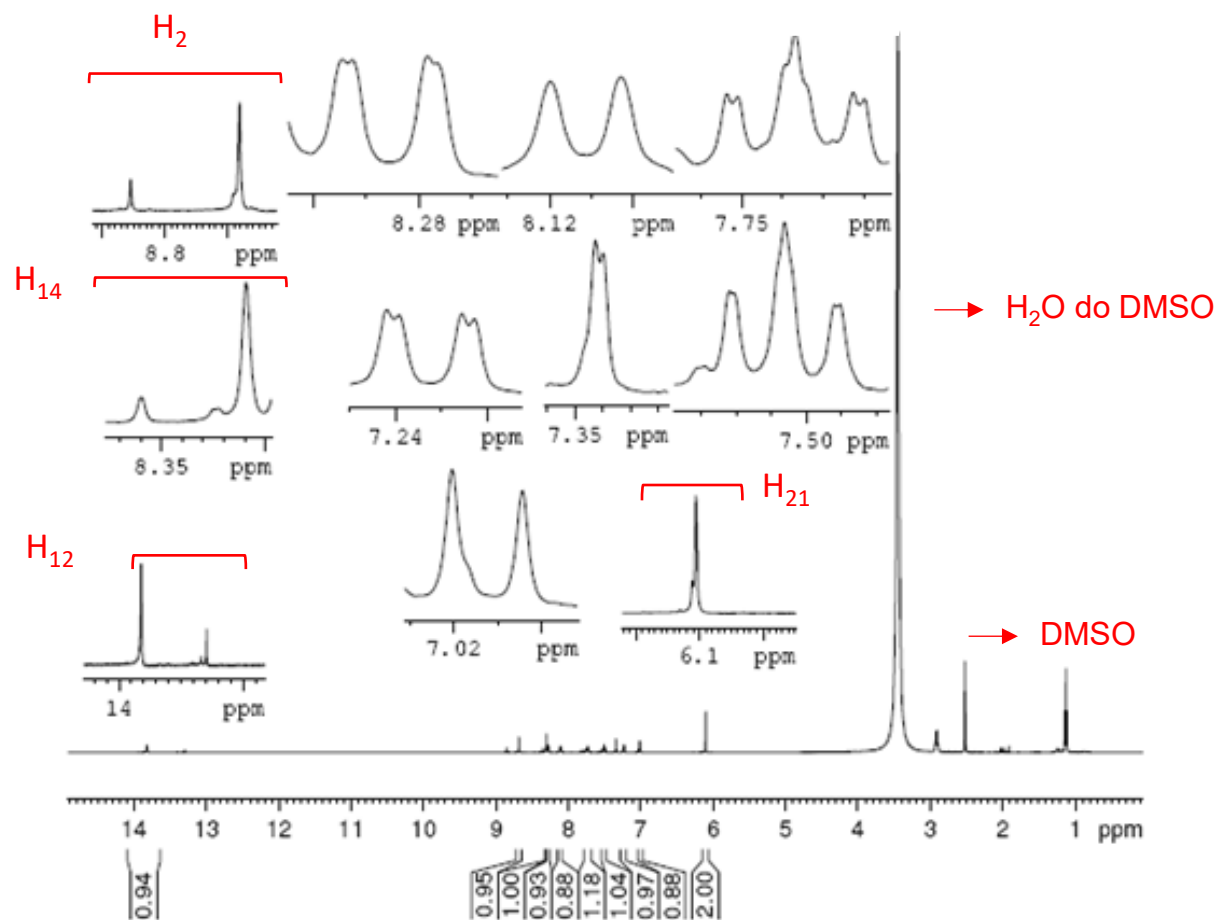
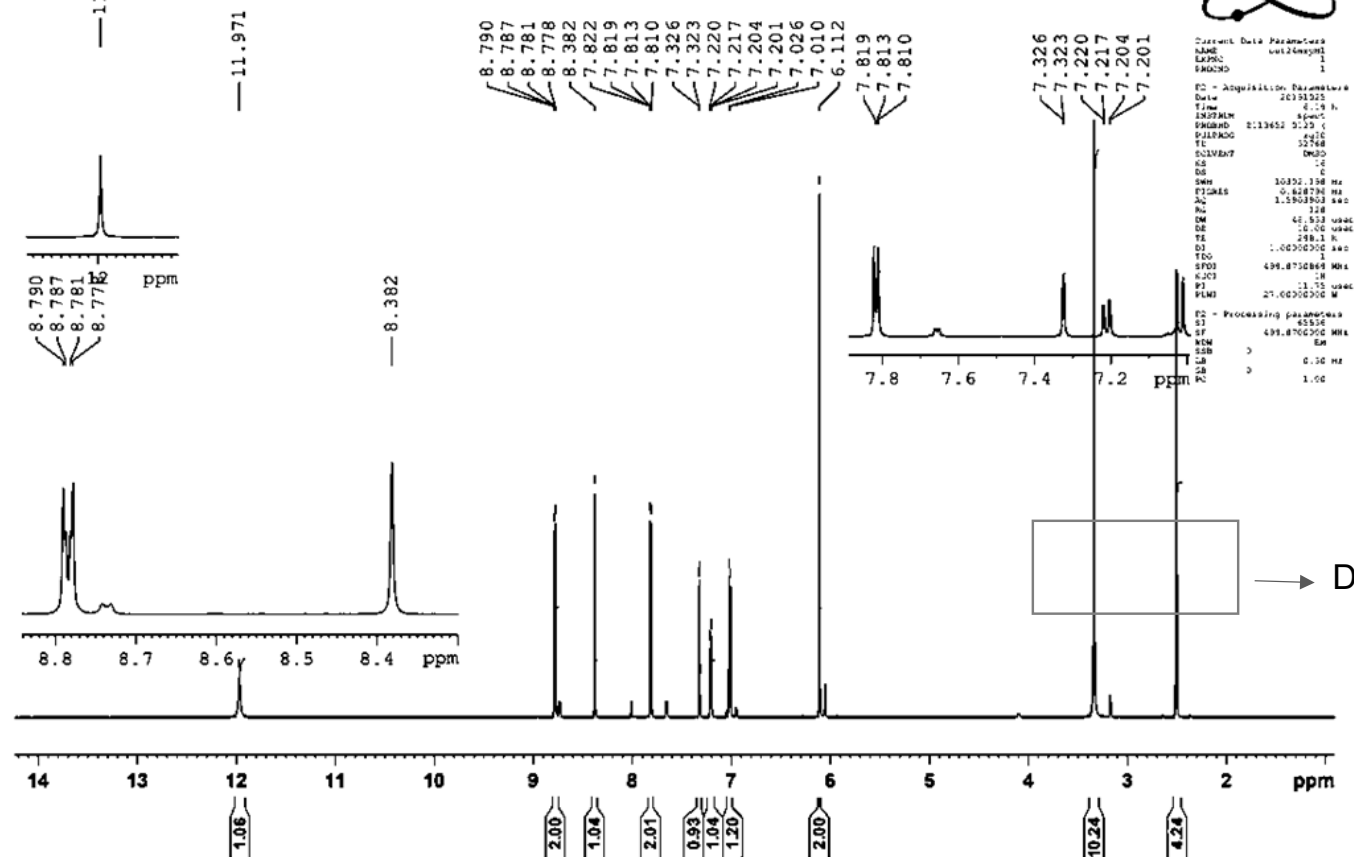


Figura S2. Espectro de RMN-¹H da acil-hidrazona **1** (500 MHz, CF₃CO₂D)

Matheus M2P 20 - DMSO - Av 500 MHz - out24mzpH1 - 1H



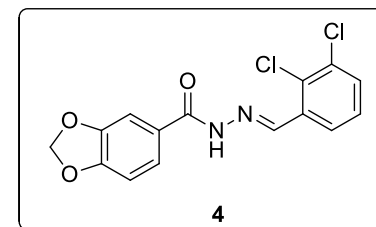
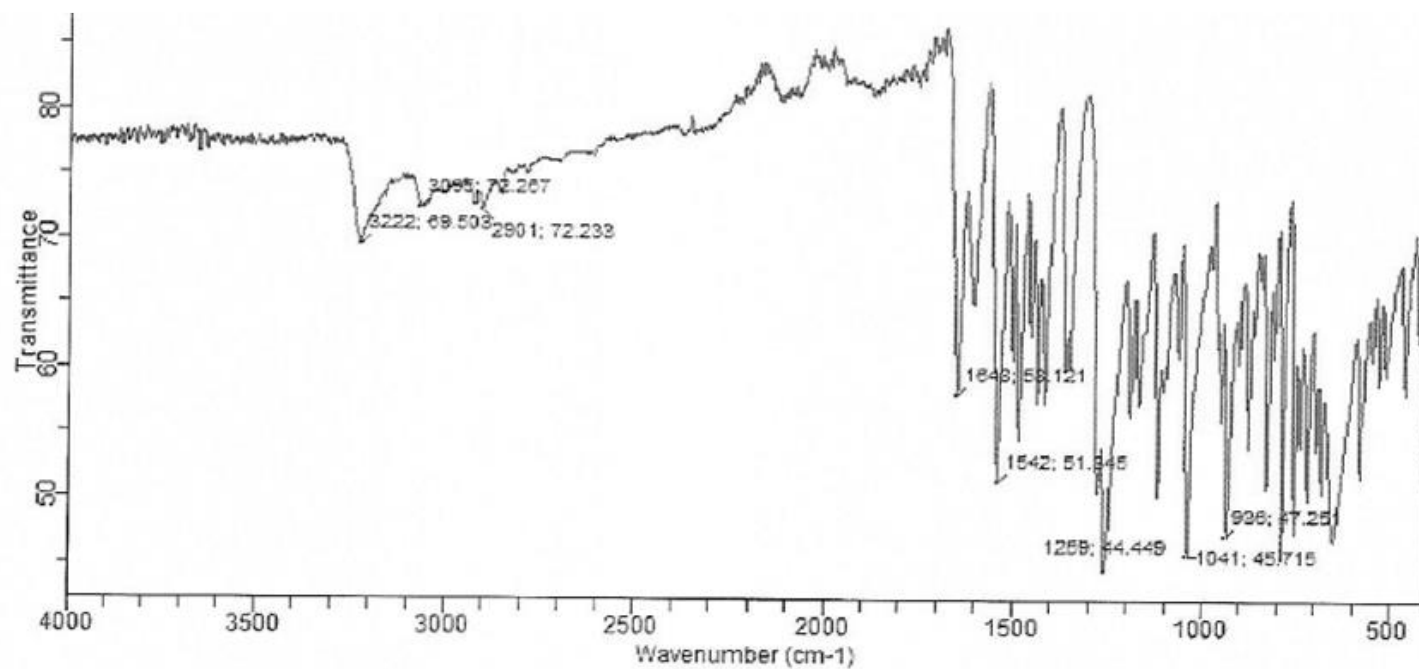


Figura S4. Espectro no IV da acil-hidrazona 4 (ATR, cm⁻¹)

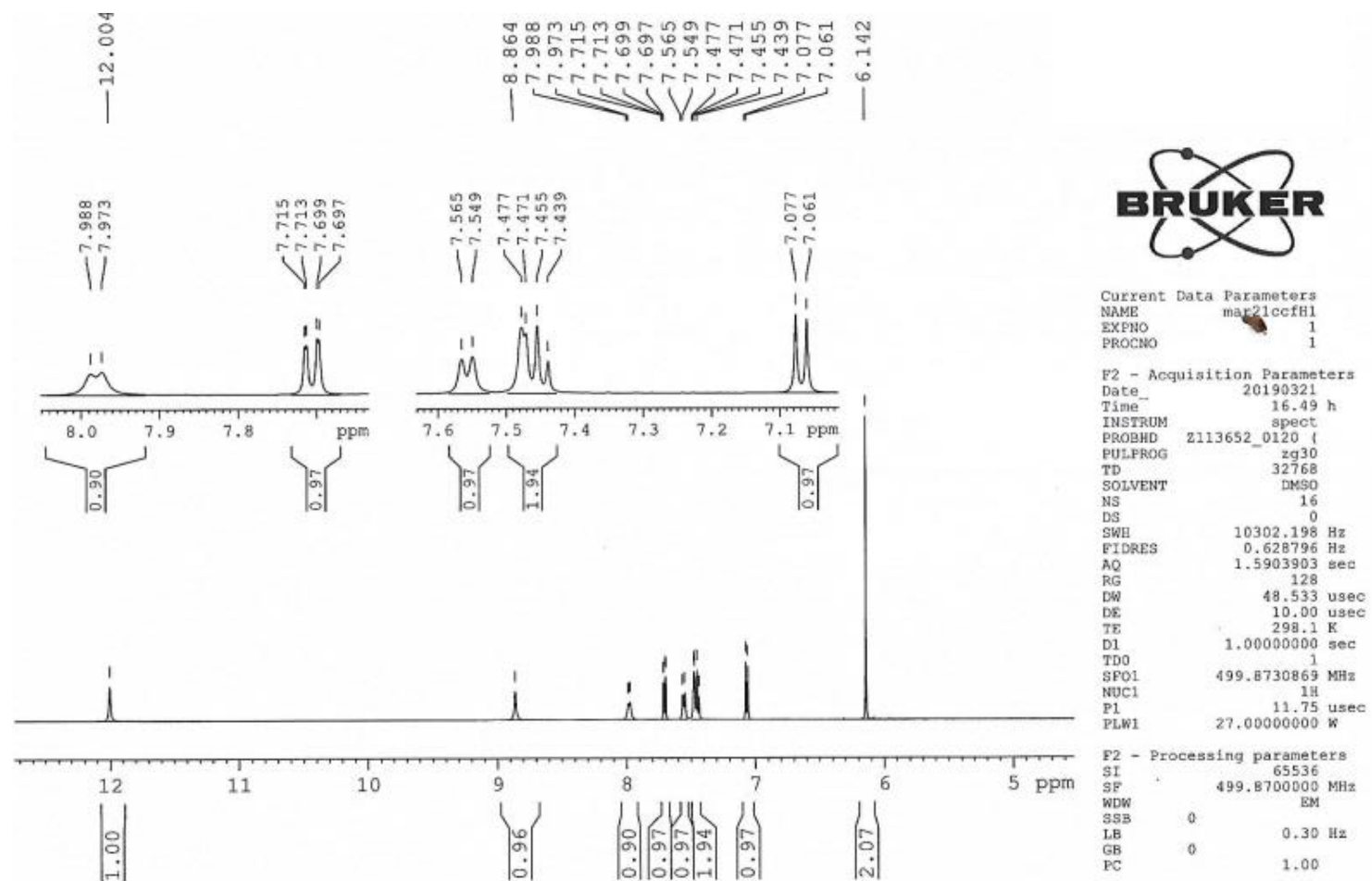


Figura S5. Espectro de RMN-¹H da acil-hidrazona 4 (500MHz, DMSO-*d*₆)

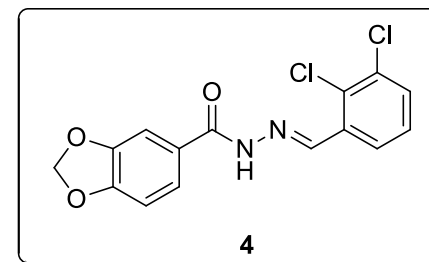
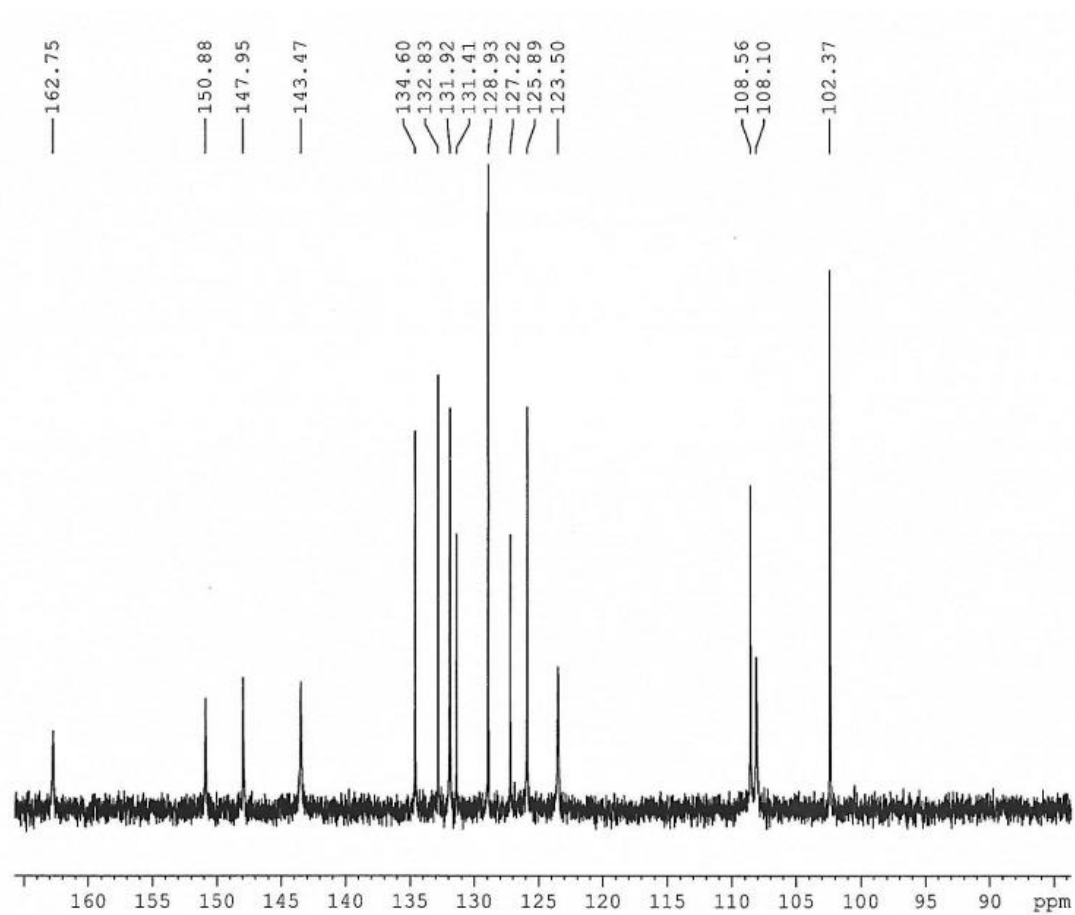


Figura S6. Espectro de RMN- ^{13}C da acil-hidrazona 4 (100MHz, DMSO- d_6)

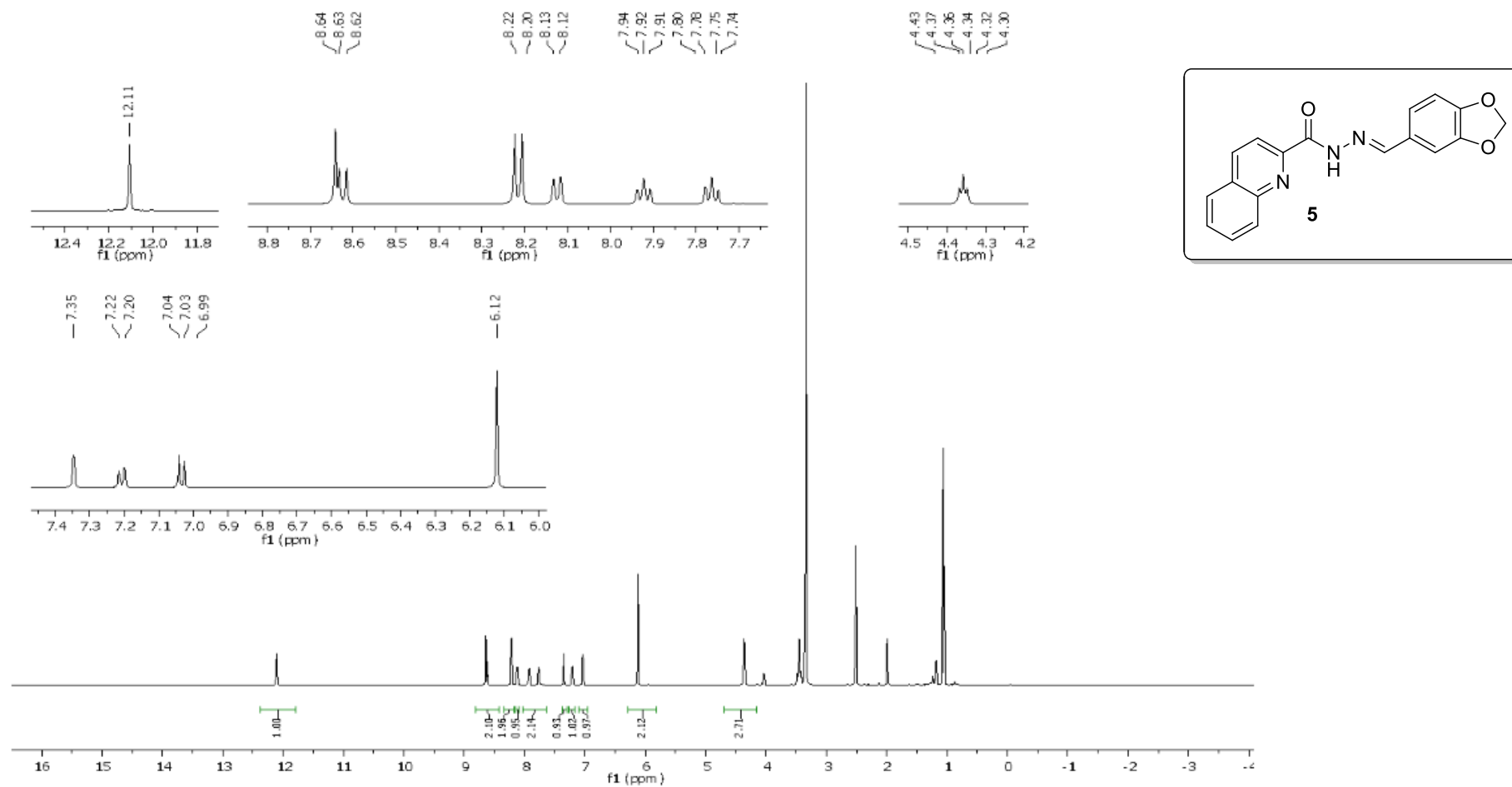


Figura S7. Espectro de RMN-¹H da acil-hidrazona **5** (500MHz, DMSO-*d*₆)

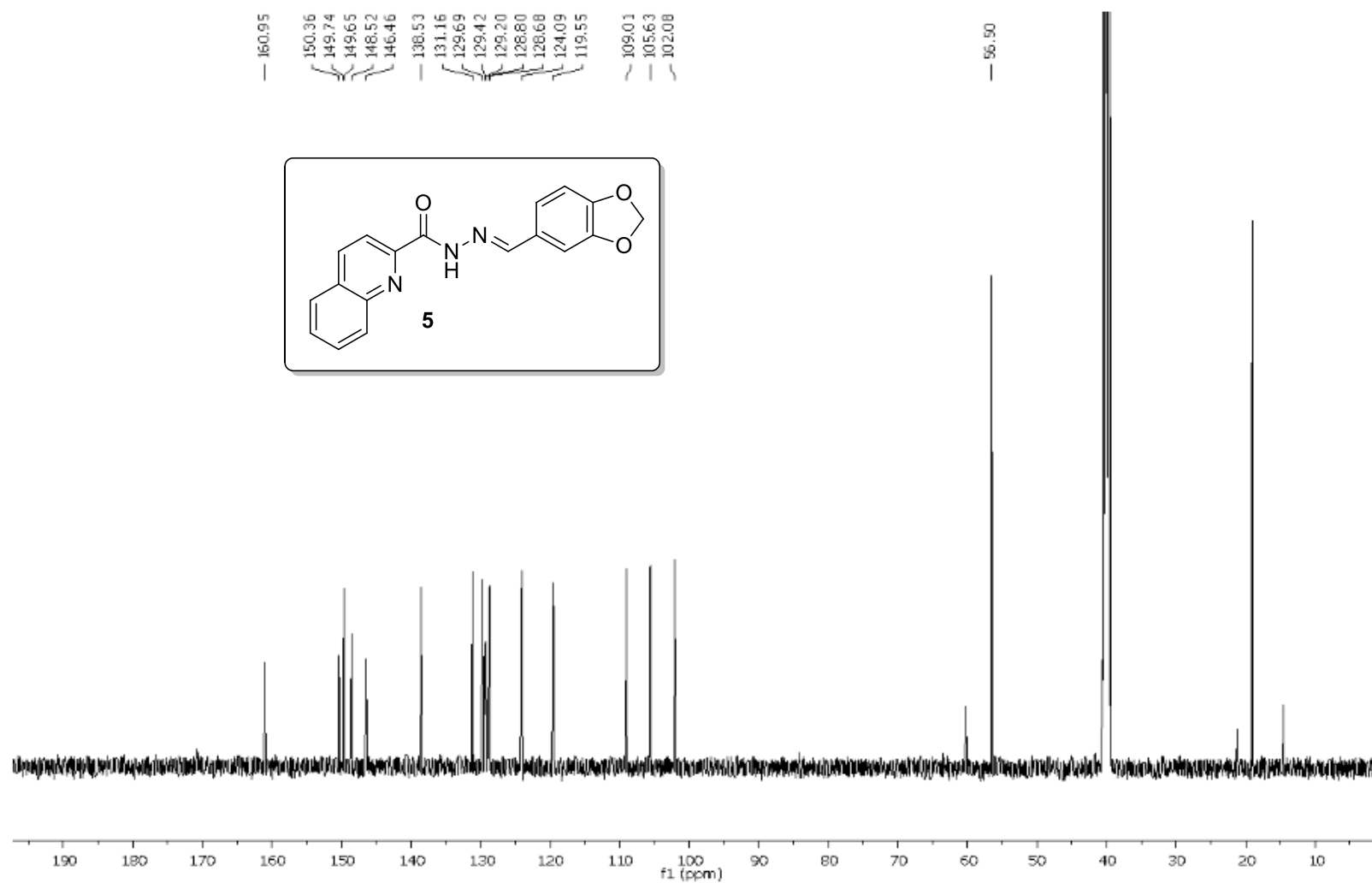


Figura S8. Espectro de RMN- ^{13}C da acil-hidrazona 5 (125MHz, $\text{DMSO}-d_6$)

Matheus - WAM005 - CDC13 - Av 500MHz - jul18wanH2

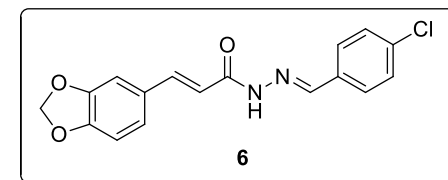
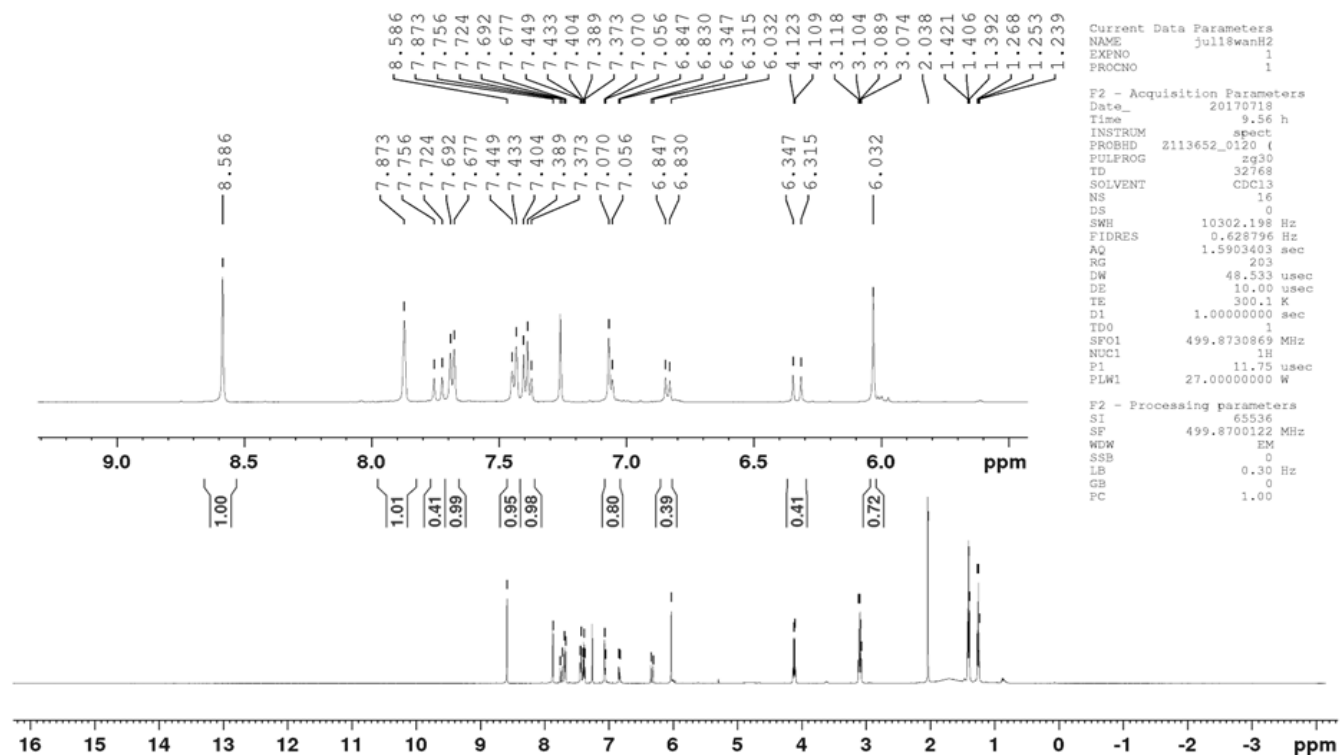


Figura S9. Espectro de RMN-¹H da acil-hidrazona 6 (500MHz, CDCl₃)

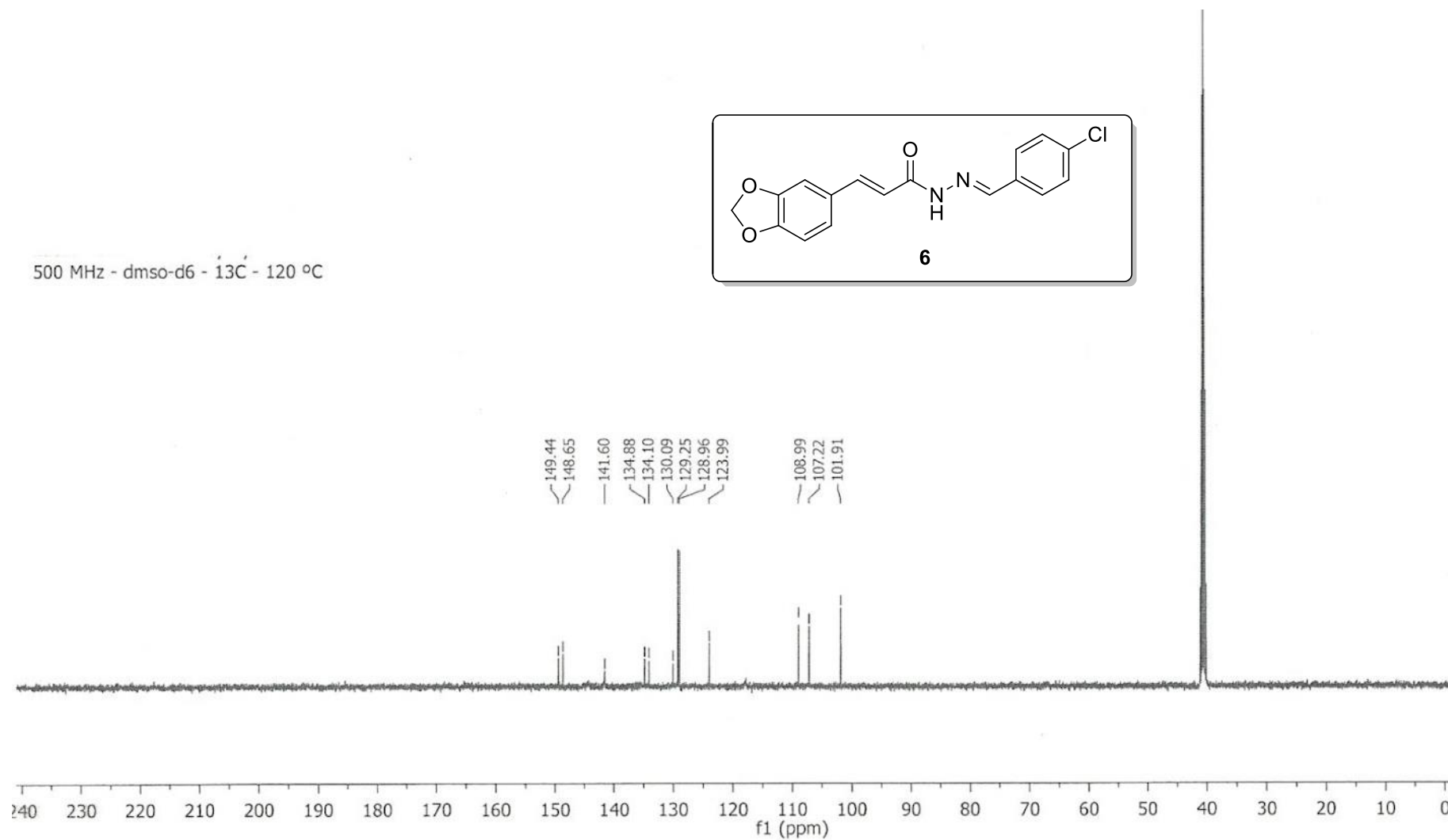


Figura S10. Espectro de RMN-¹³C da acil-hidrazona **6** (125MHz, DMSO-*d*₆)

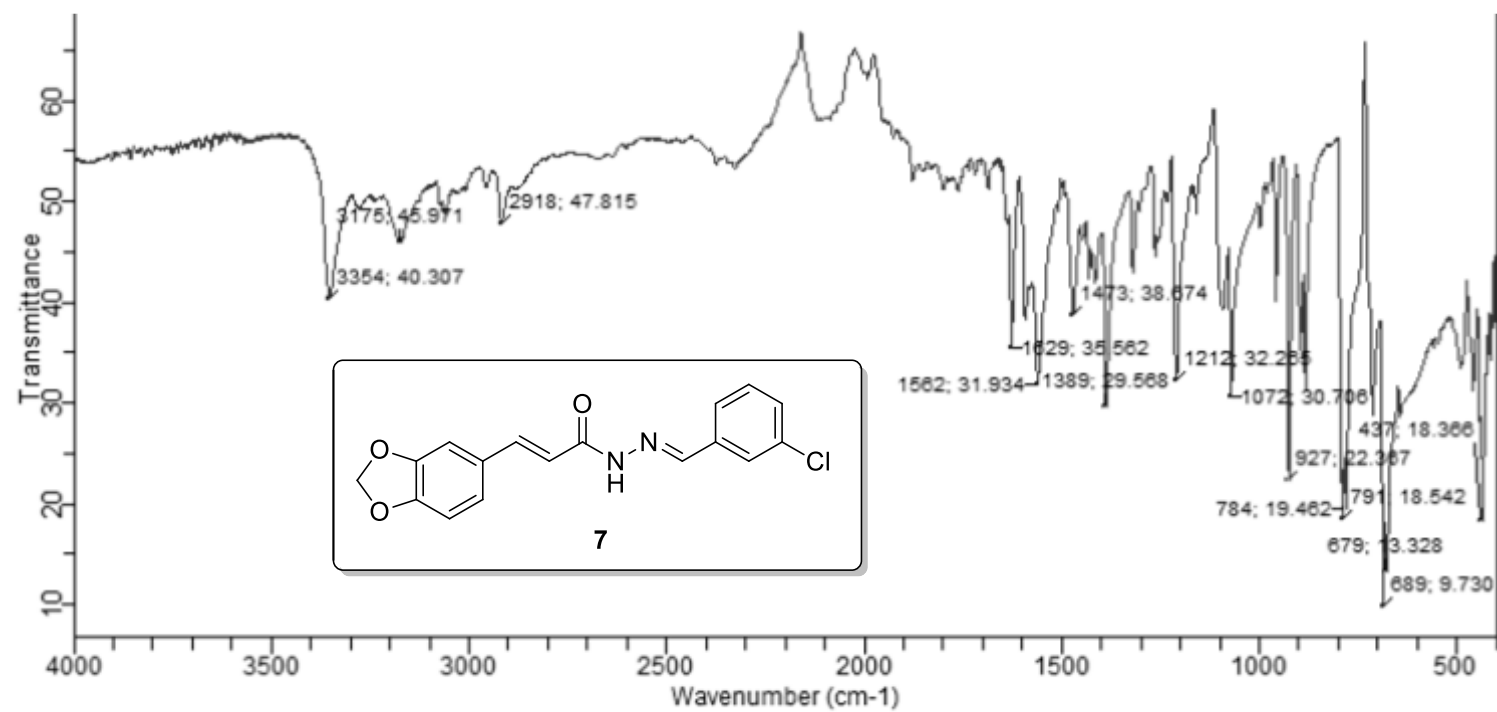


Figura S11. Espectro no IV da acil-hidrazona 7 (ATR, cm⁻¹)

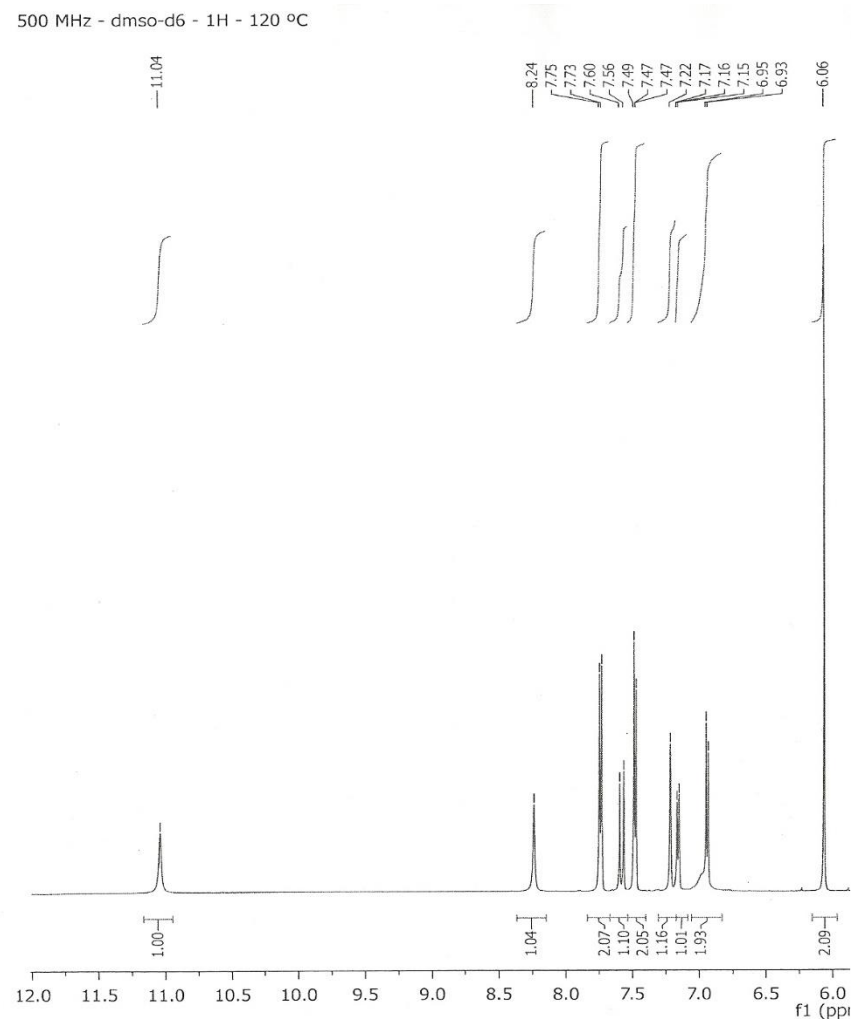


Figura S12. Espectro de RMN-¹H da acil-hidrazona 7 (500MHz, CDCl₃)

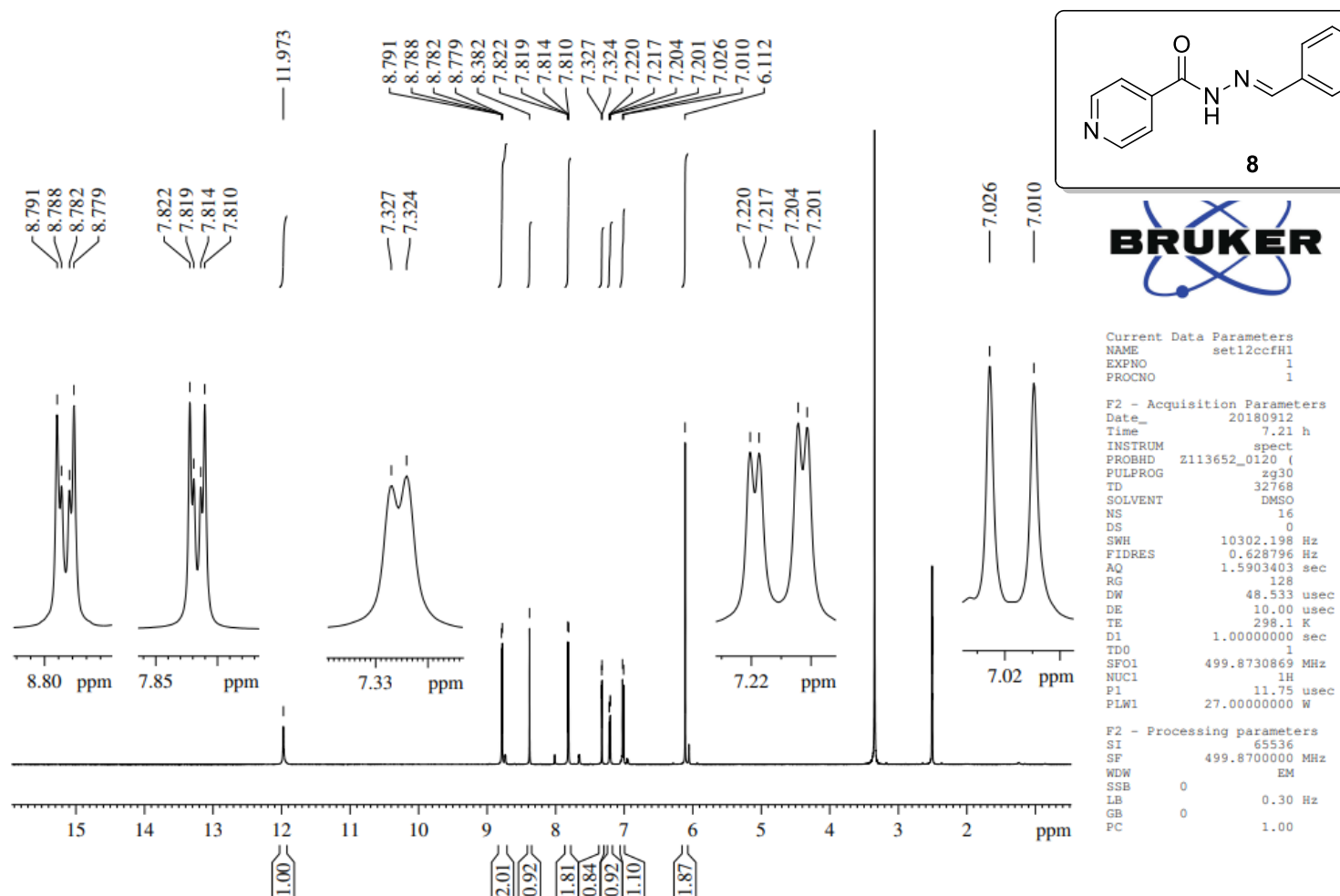


Figura S13. Espectro de RMN-¹H da acil-hidrazona 8 (500MHz, DMSO-*d*₆)

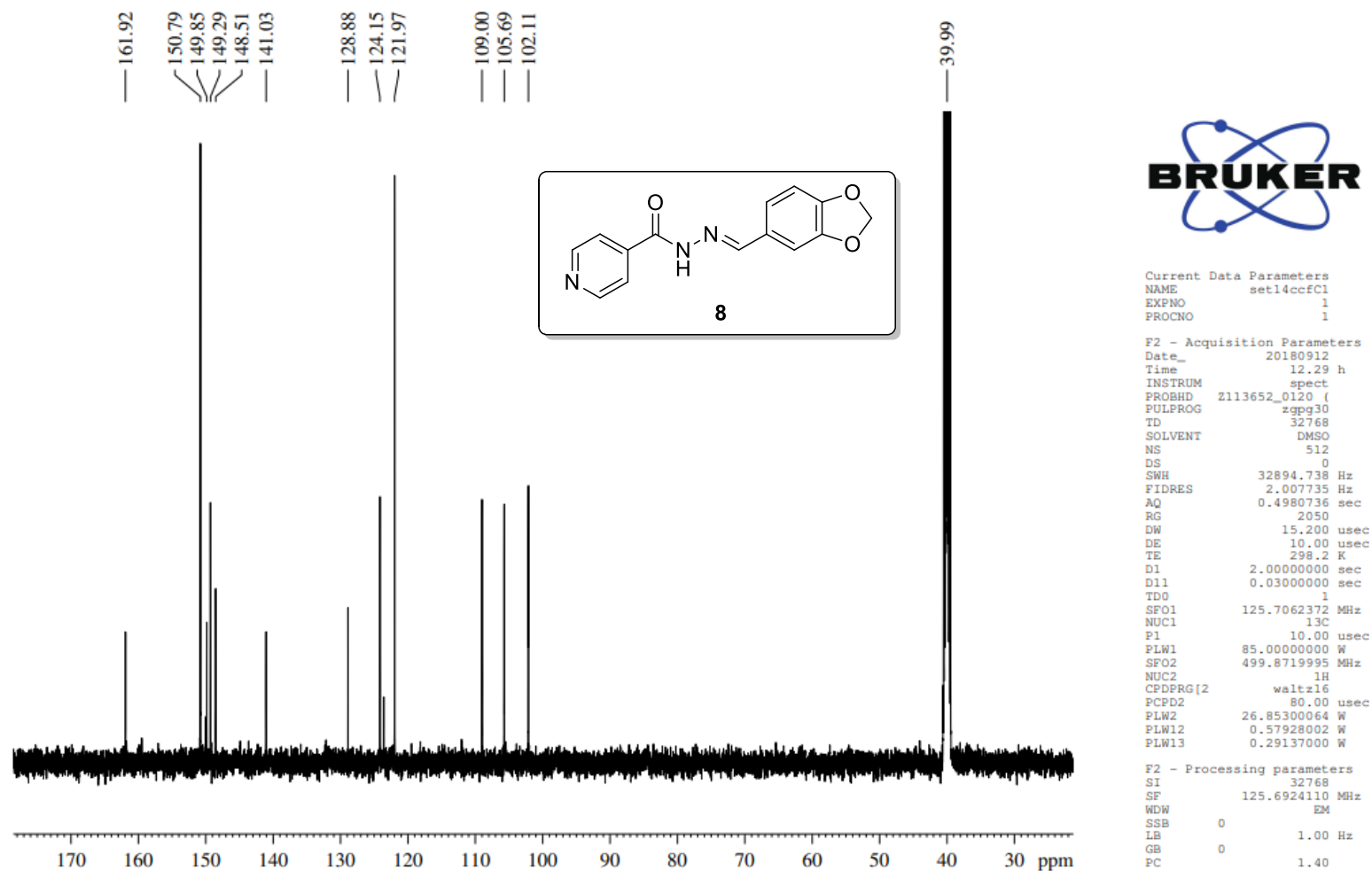


Figura S14. Espectro de RMN-¹³C da acil-hidrazona 8 (125MHz, DMSO-*d*₆)

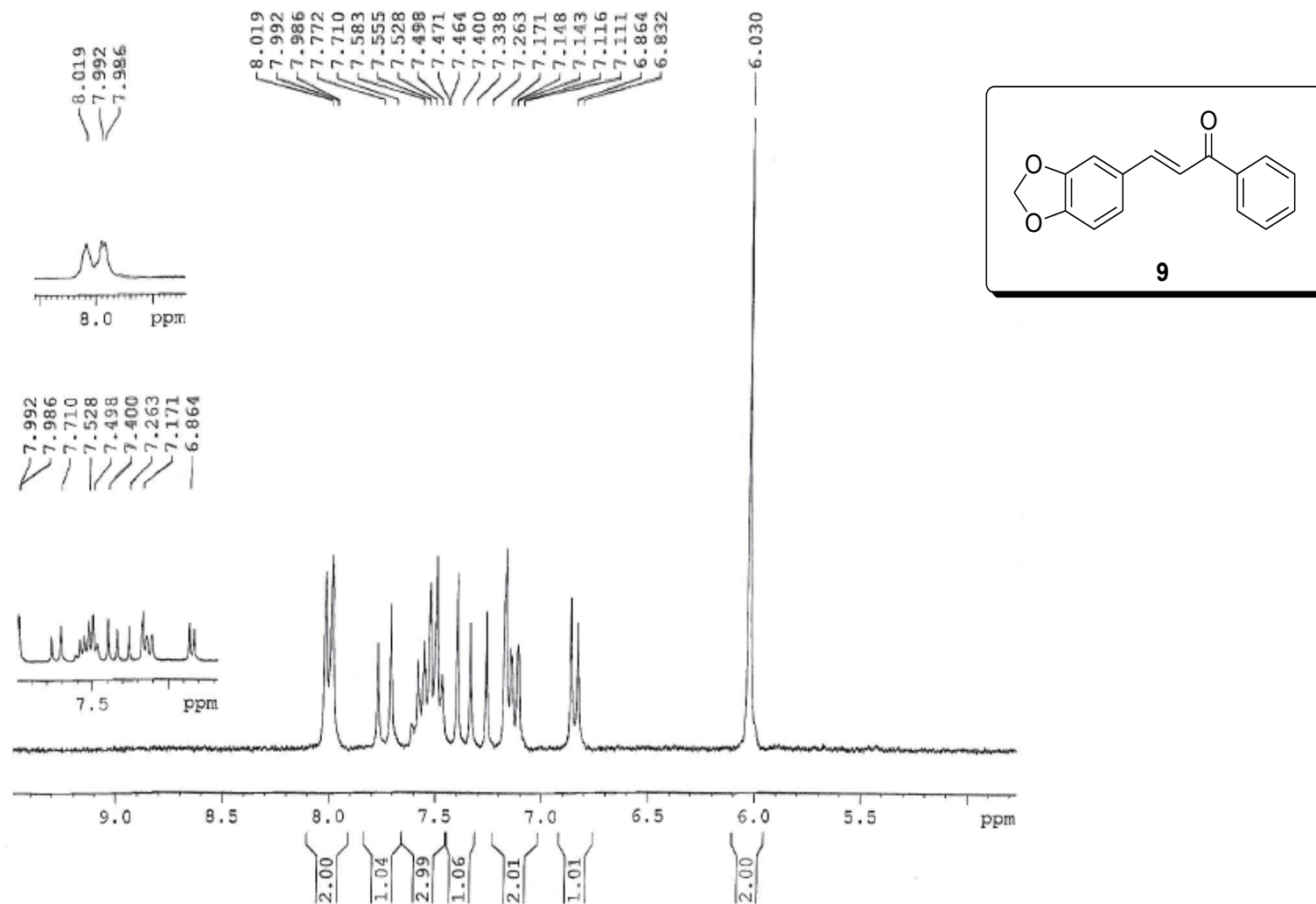


Figura S15. Espectro de RMN-¹H da chalcona 9 (250MHz, CDCl₃)

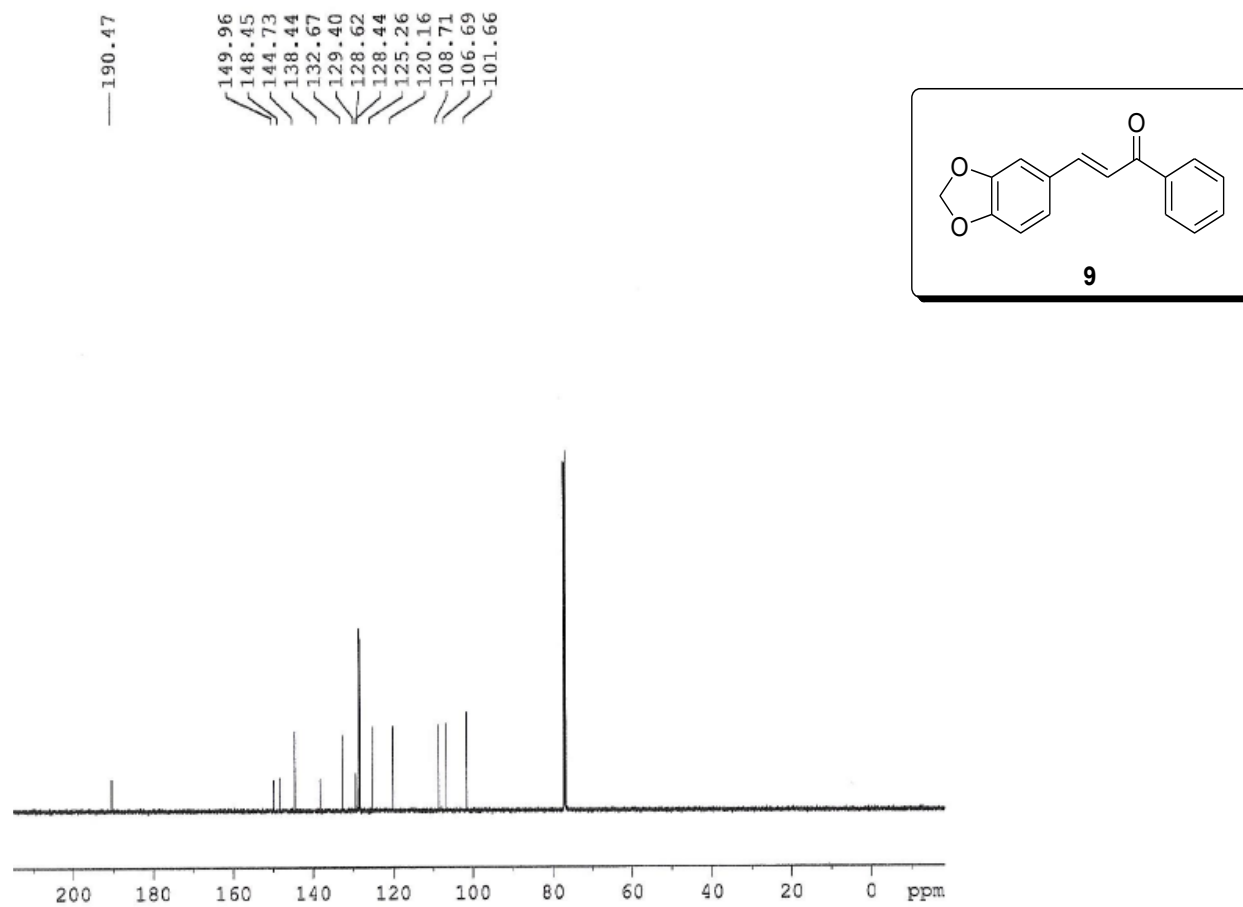


Figura S16. Espectro de RMN- ^{13}C da chalcona 9 (62,5MHz, CDCl_3)

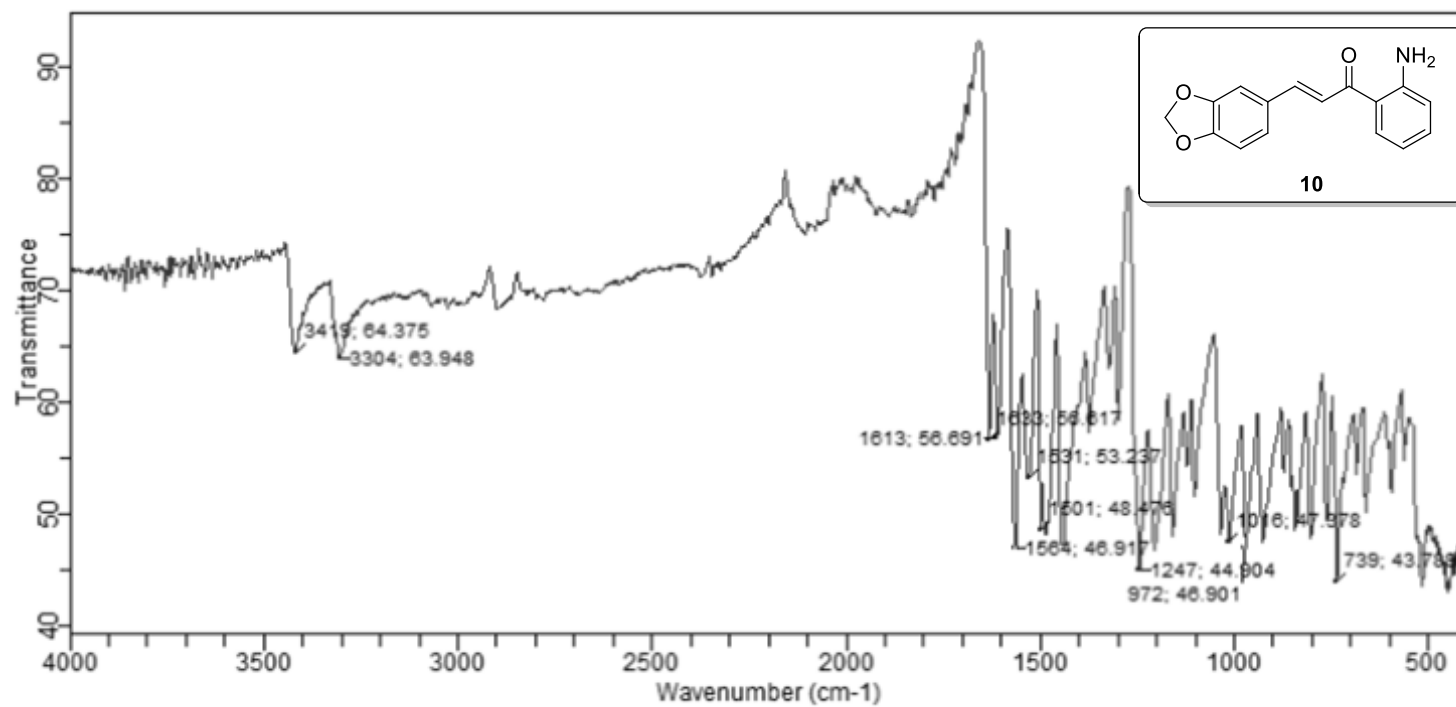


Figura S17. Espectro no IV da chalcona 10 (ATR, cm⁻¹)

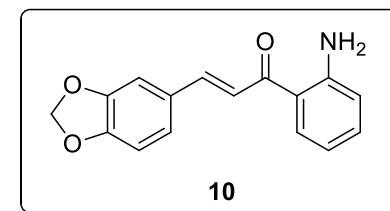
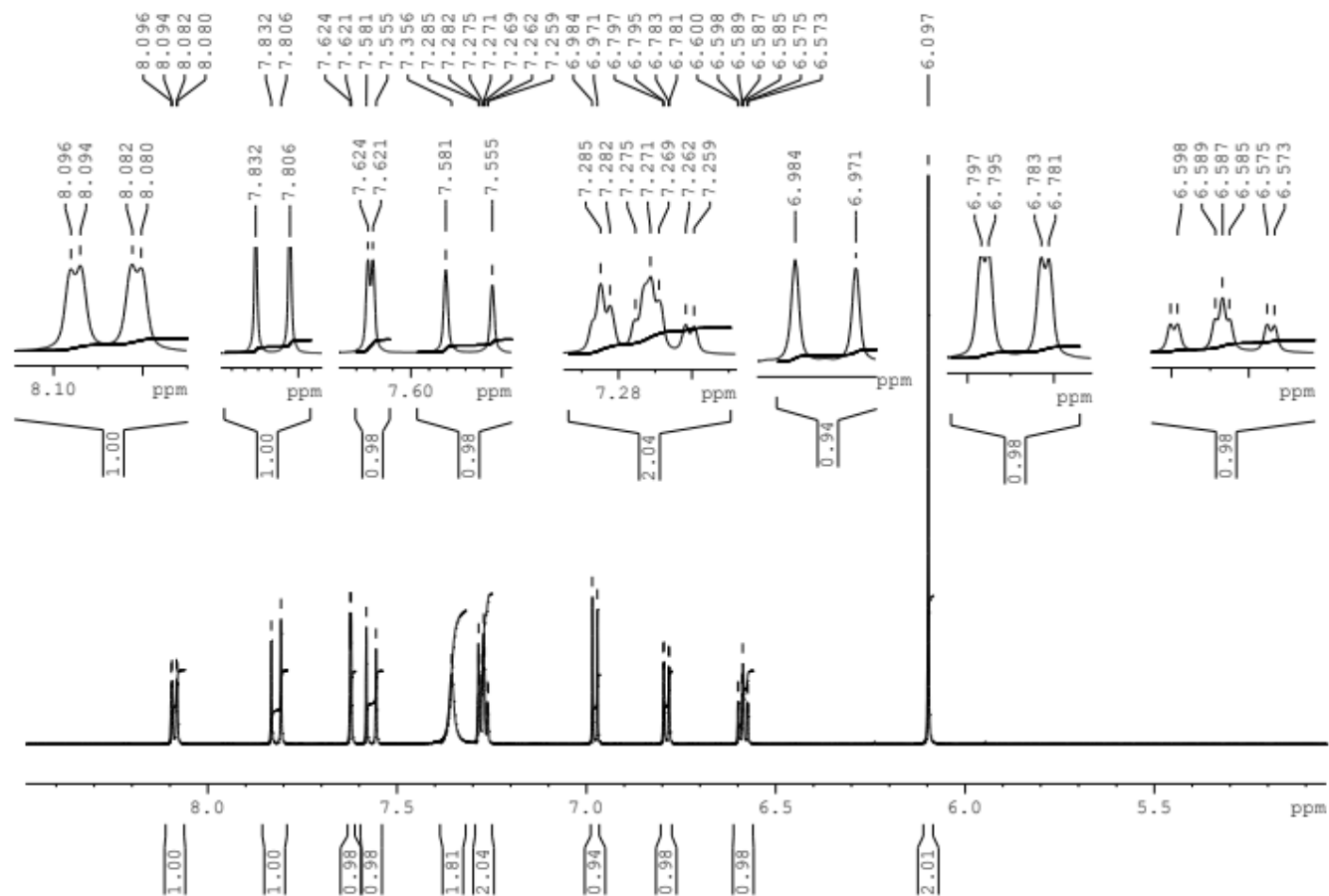
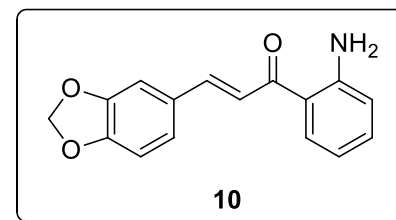
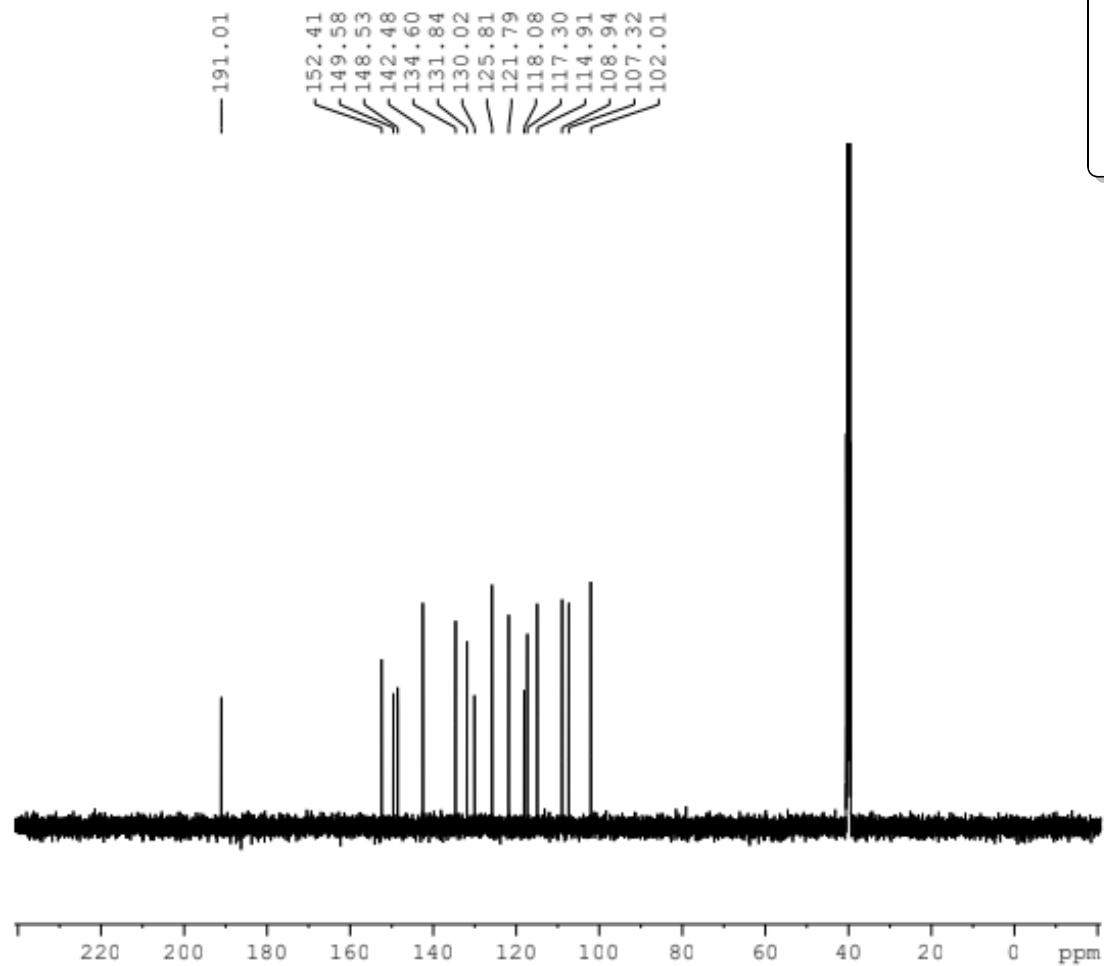


Figura S18. Espectro de RMN-¹H da chalcona 10 (500MHz, CDCl₃)

Tiago - TBO 1 - DMSO - Avance 500 MHz - mai30tboC1 - 13C - 11min



No parameters

Figura S19. Espectro de RMN- ^{13}C da chalcona 10 (125MHz, CDCl_3)

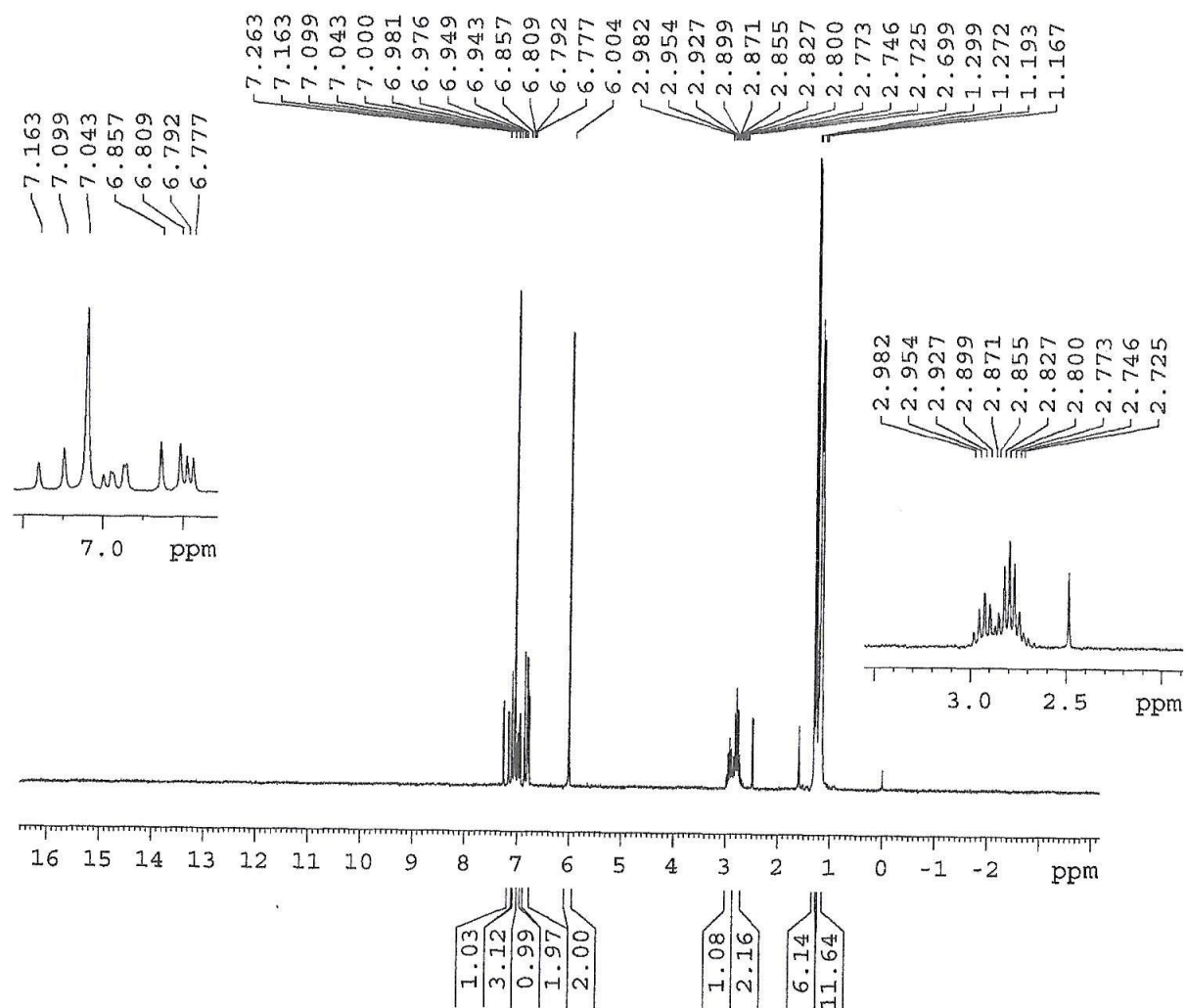


Figura S20. Espectro de RMN-¹H da chalcona 11 (500MHz, CDCl₃)

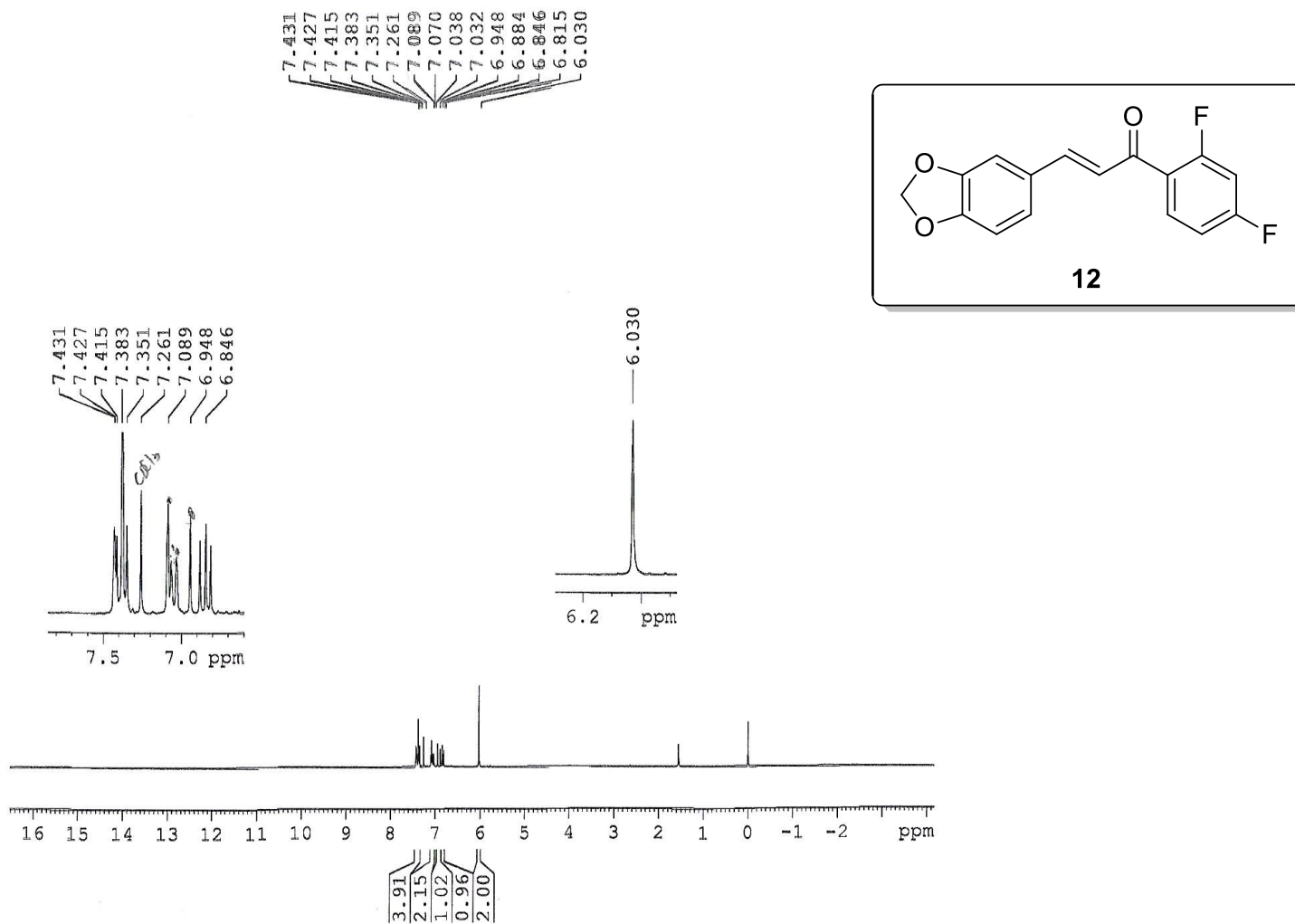


Figura S21. Espectro de RMN- ^1H da chalcona 12 (250MHz, CDCl_3)

Gisele - CHALC 11 - CDCl₃ - Avance 500 MHz - dez09wanC2 - 13C

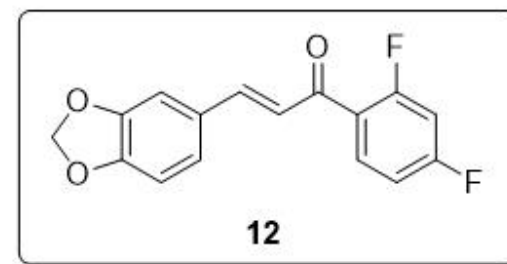
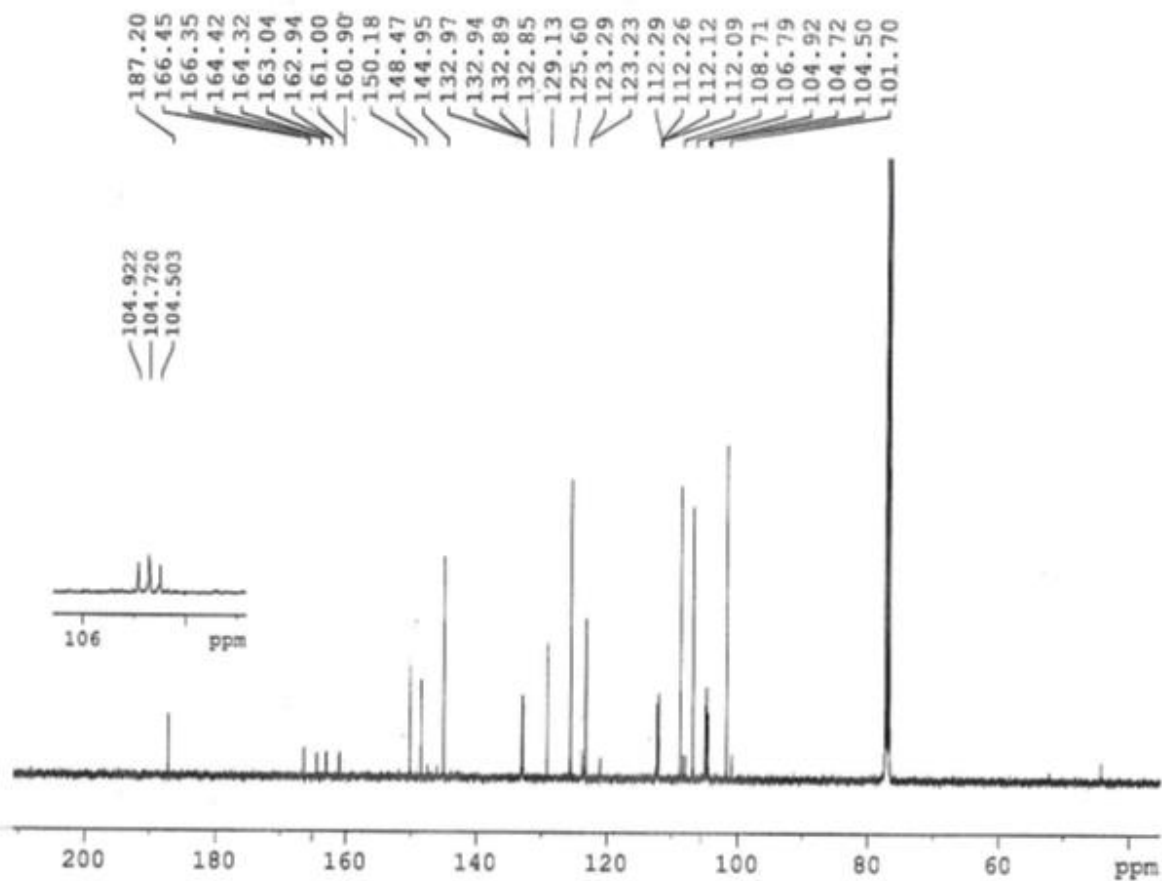


Figura S22. Espectro de RMN-¹³C da chalcona 12 (125 MHz, CDCl₃)

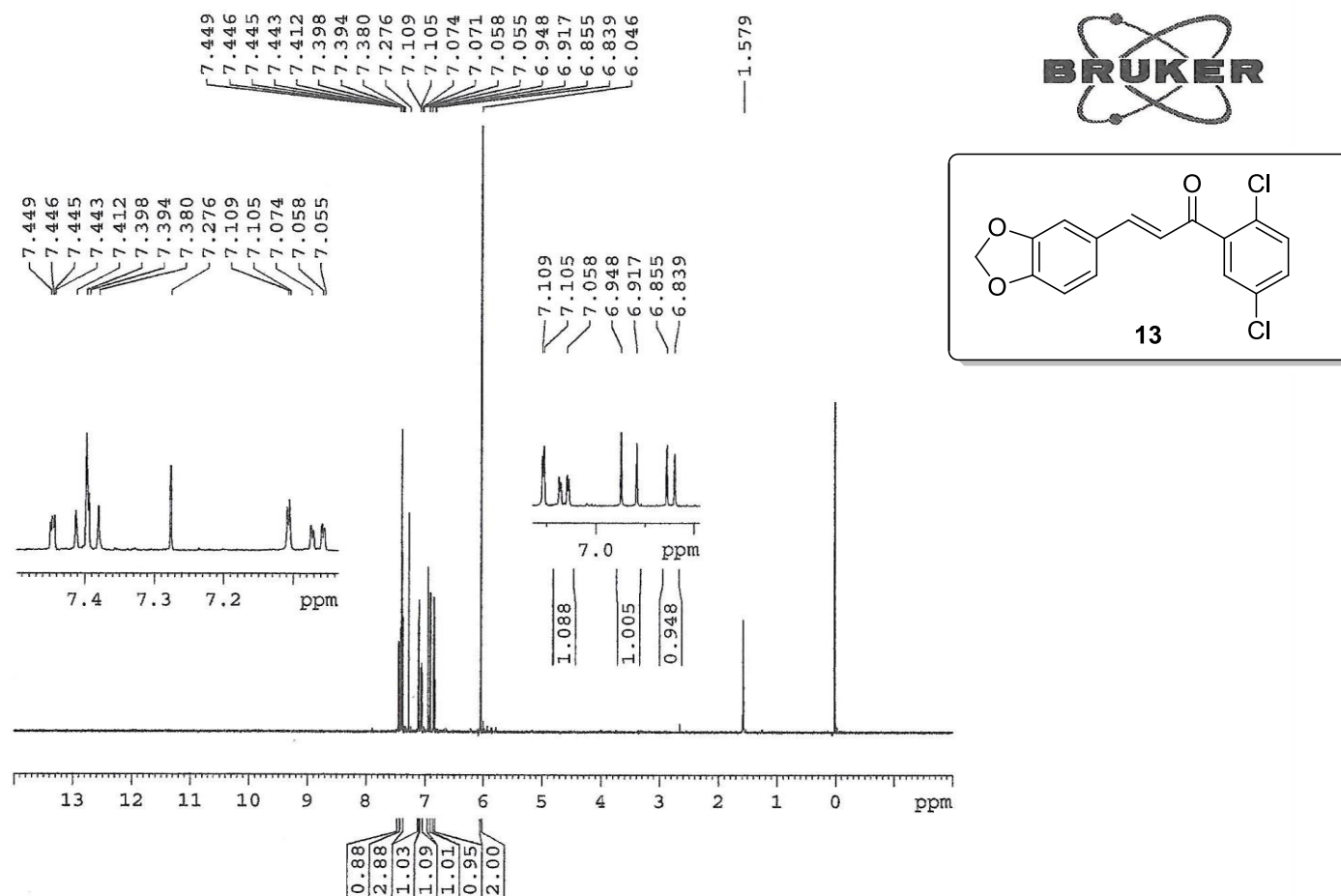


Figura S23. Espectro de RMN-¹H da chalcona 13 (250MHz, CDCl₃)

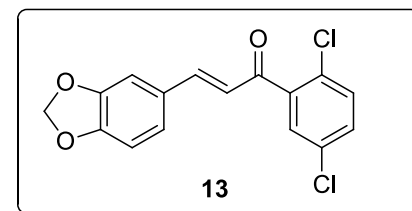
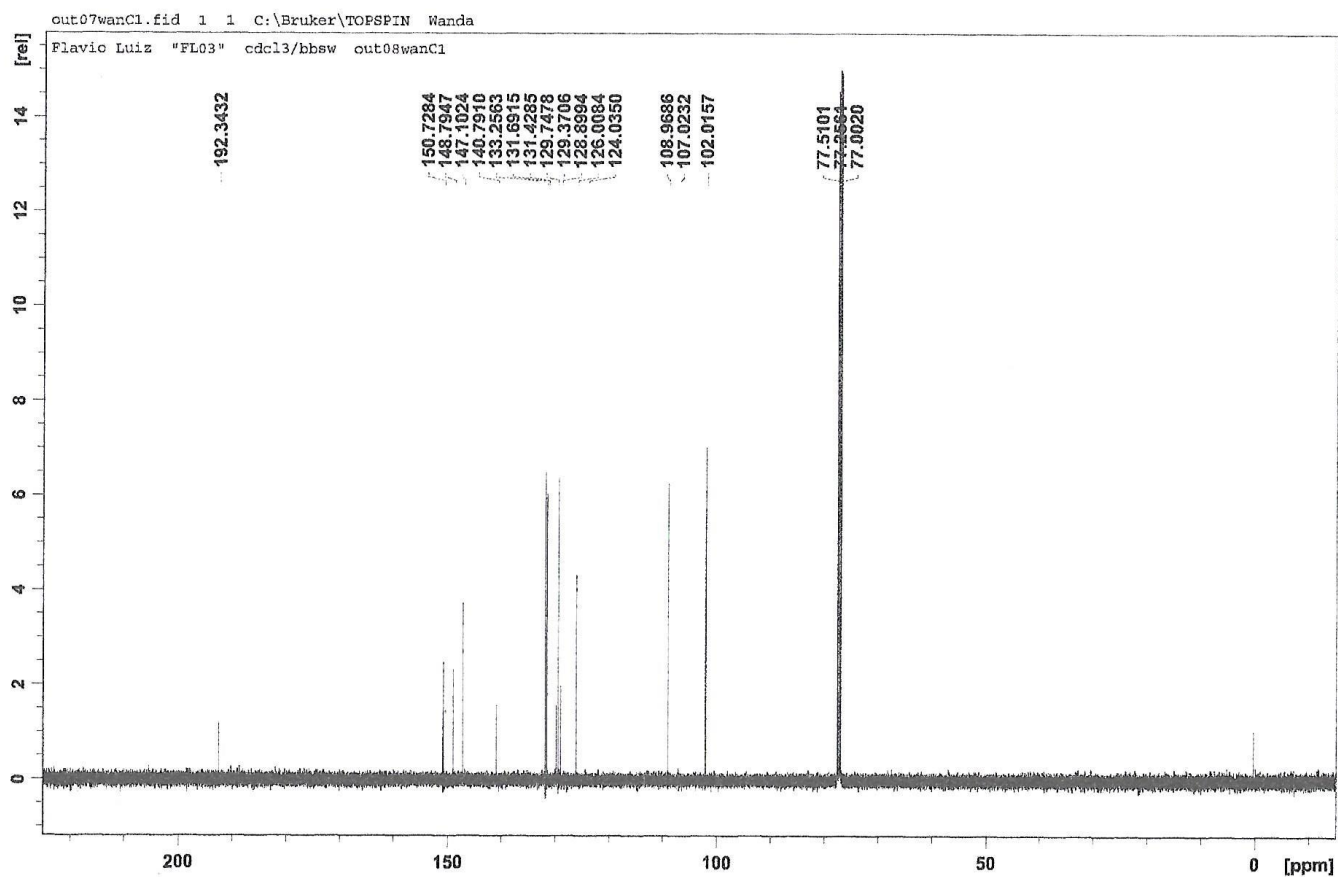


Figura S24. Espectro de RMN- ^{13}C da chalcona 13 (125MHz, CDCl_3)

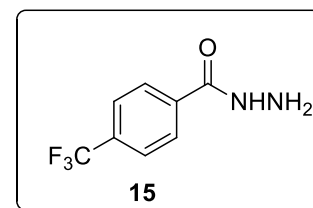
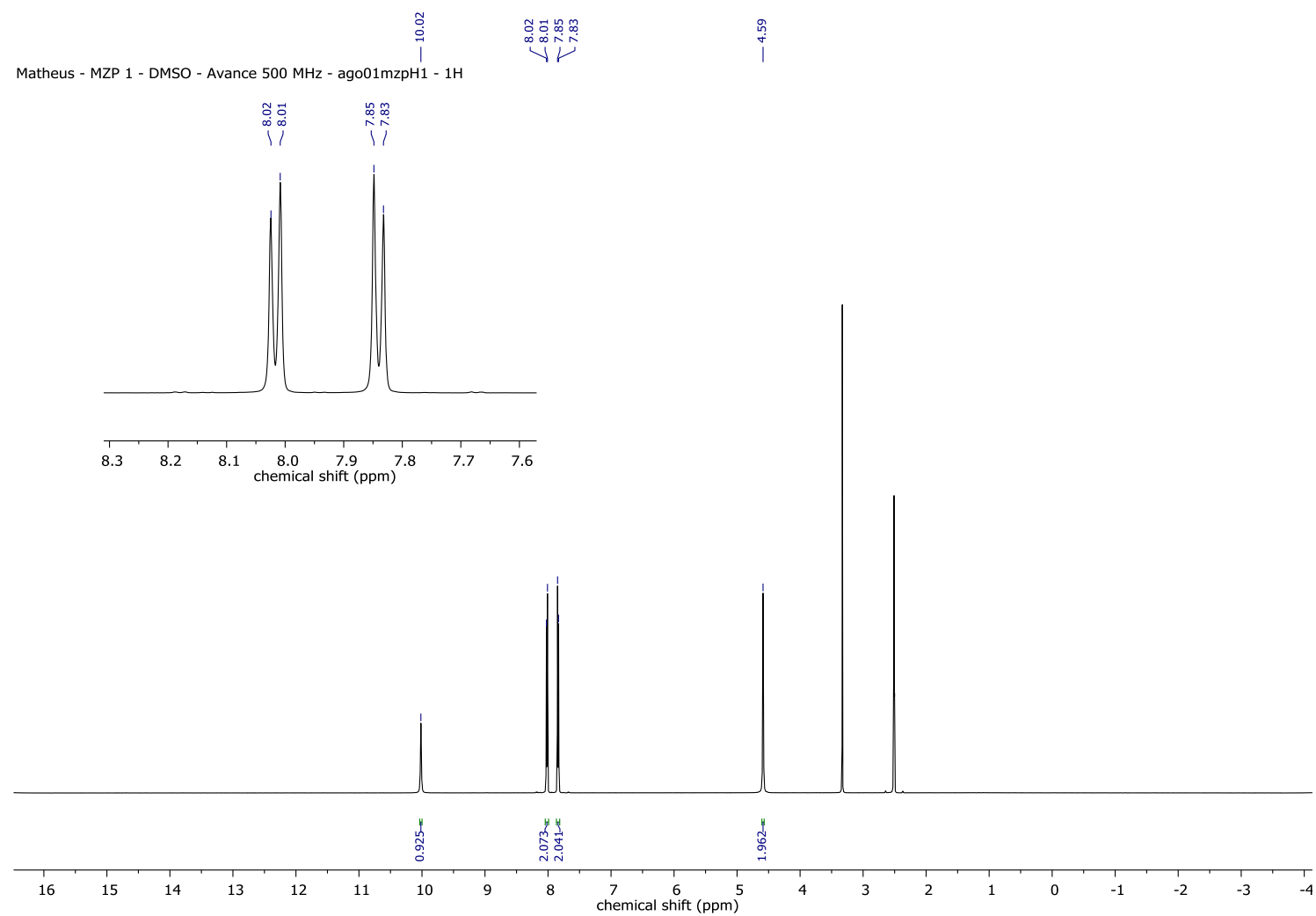


Figura S25. Espectro de RMN-¹H da chalcona 15 (600MHz, CDCl₃)

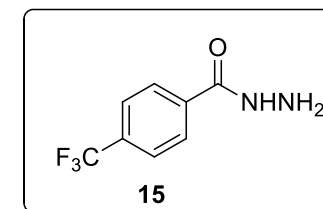
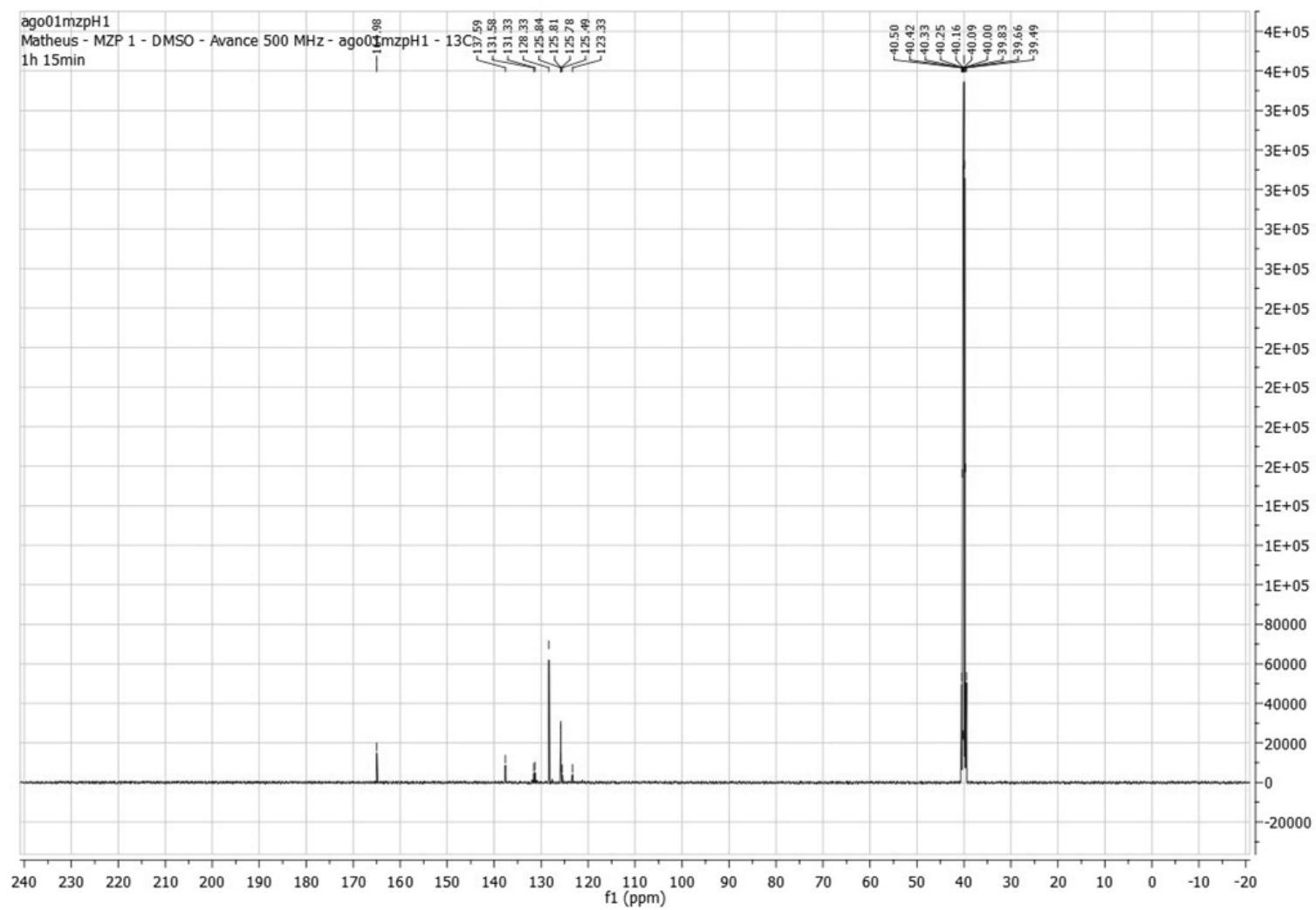


Figura S26. Espectro de RMN- ^{13}C da hidrazida 15 (125MHz, DMSO- d_6)

Camila - Hidra 01 - DMSO - Avance 400 MHz - mar13ccfH1 - 1H

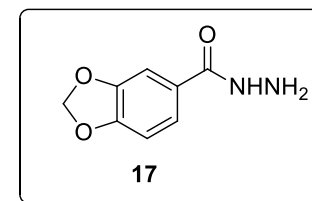
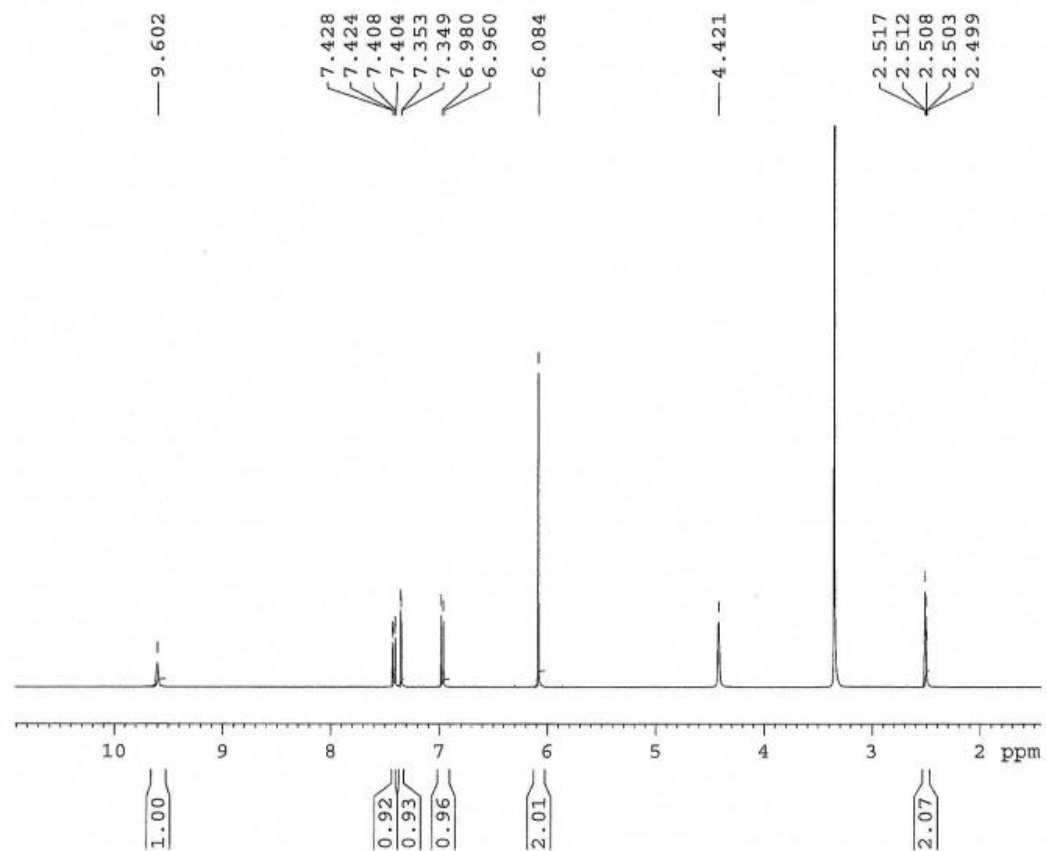


Figura S27. Espectro de RMN-¹H da hidrazida 17 (400MHz, DMSO-*d*₆)

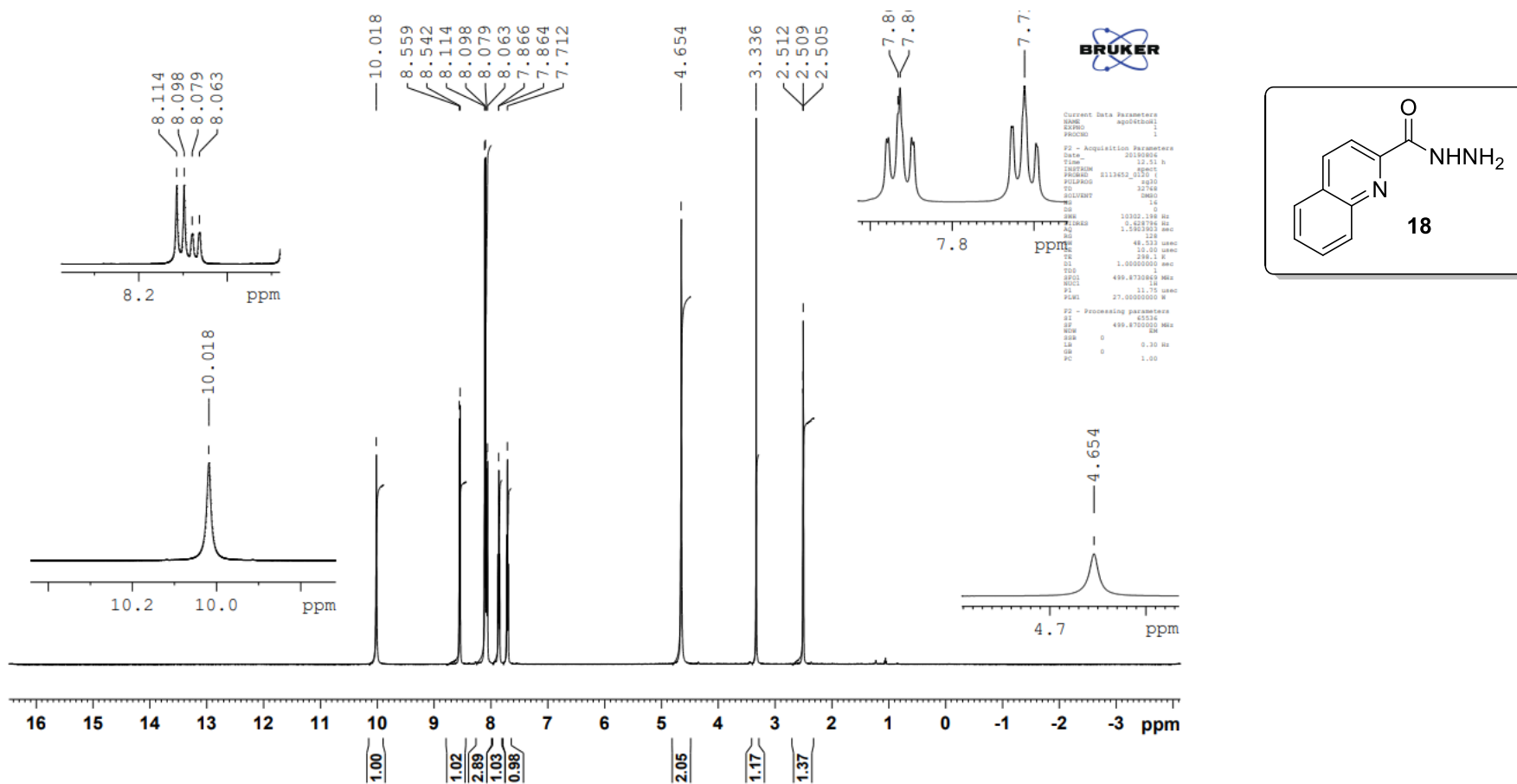


Figura S28. Espectro de RMN-¹H da hidrazida 18 (500MHz, DMSO-*d*₆)

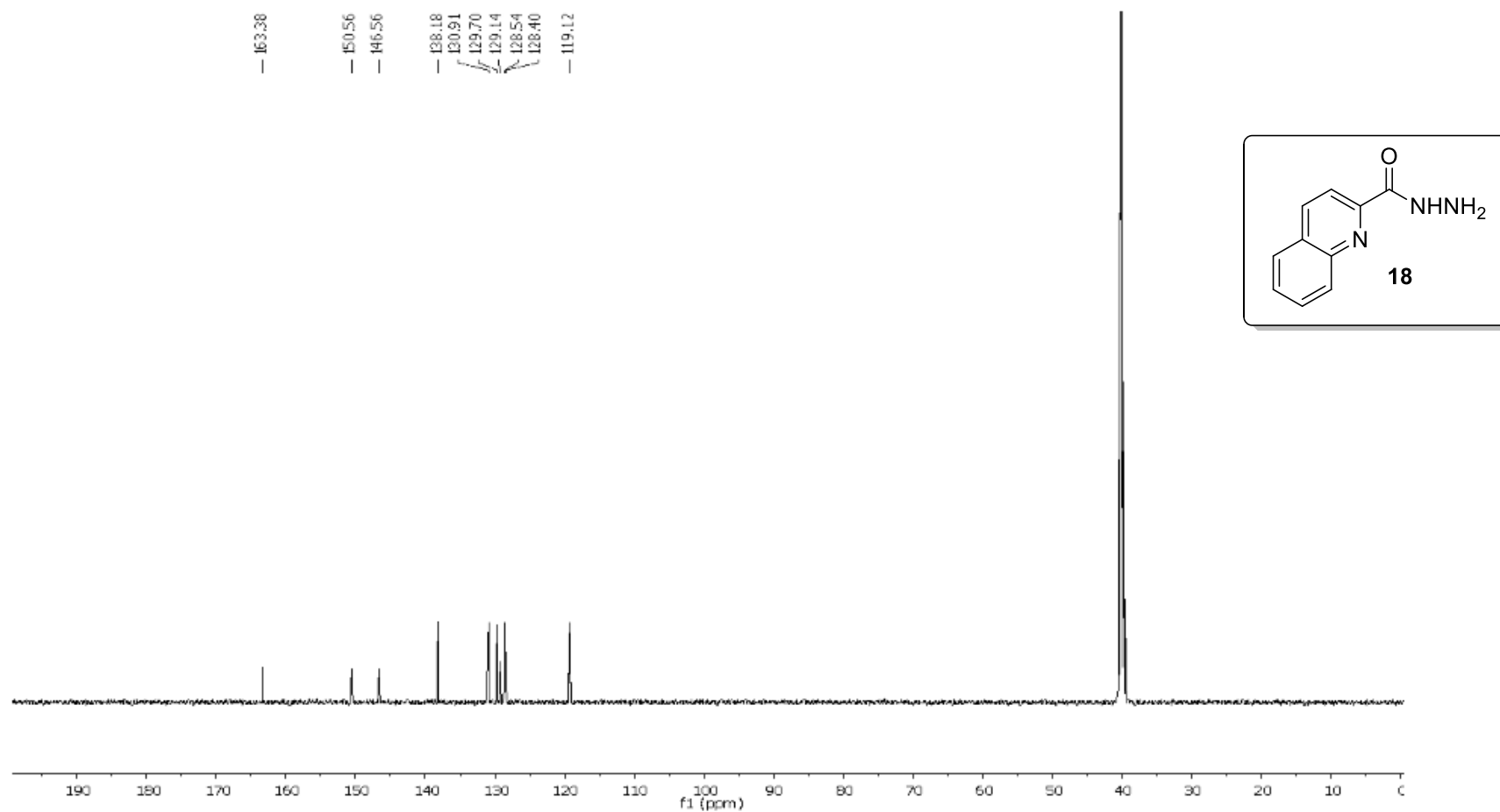


Figura S29. Espectro de RMN- ^{13}C da hidrazida 18 (125MHz, $\text{DMSO-}d_6$)

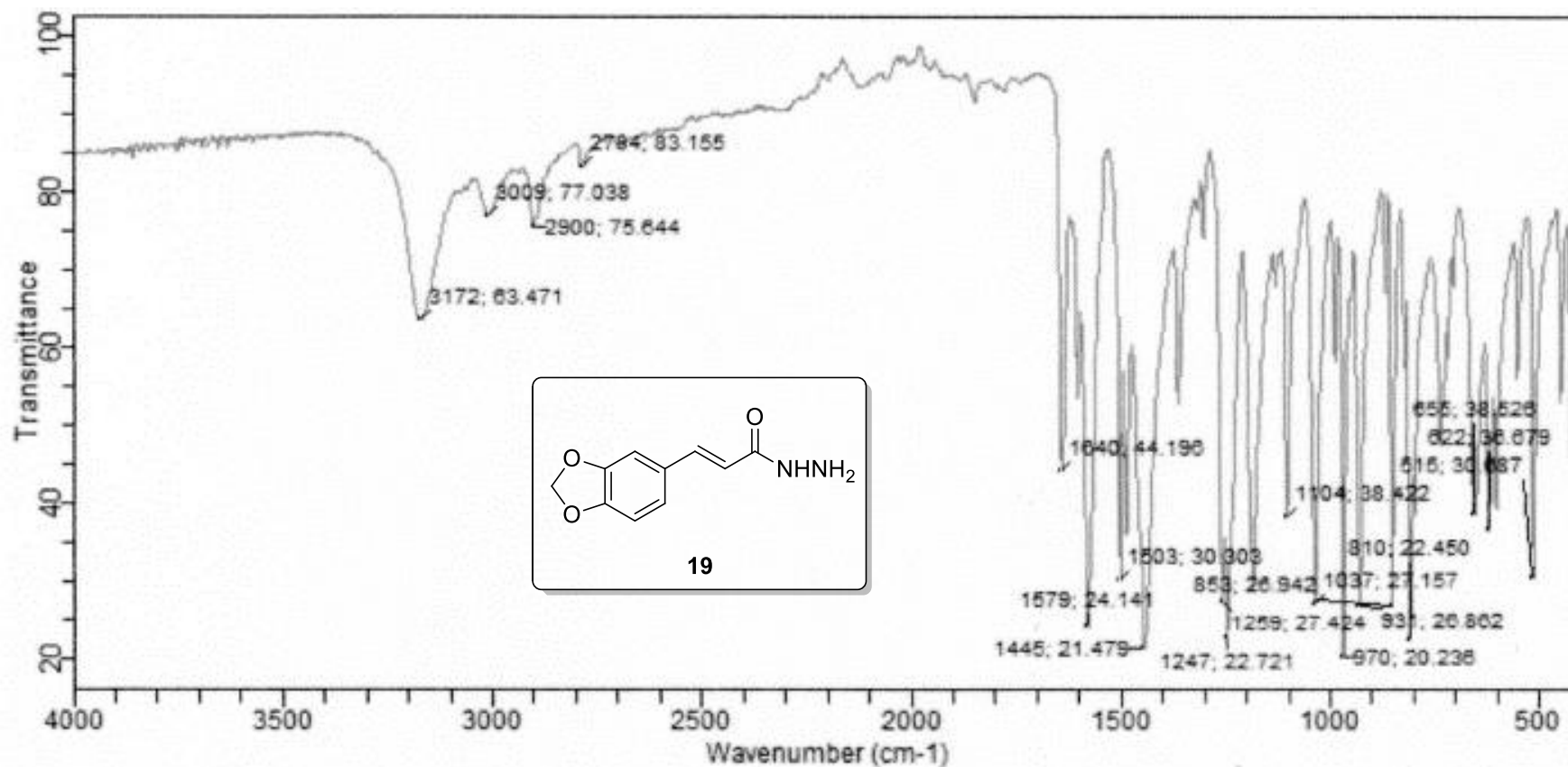


Figura S30. Espectro no IV da hidrazida 19 (ATR, cm⁻¹)

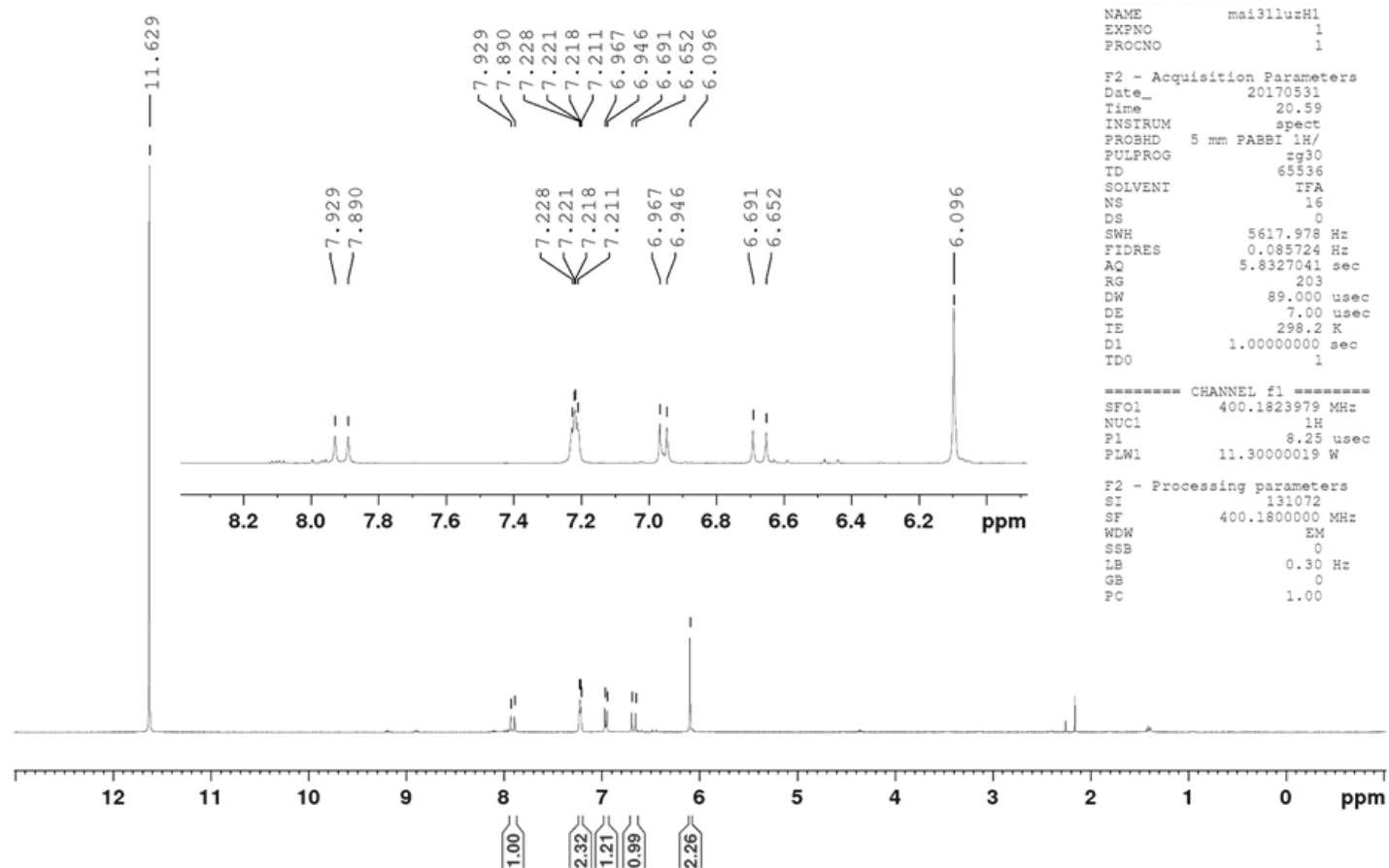


Figura S31. Espectro de RMN-¹H da hidrazida 19 (500MHz, CF₃CO₂D)

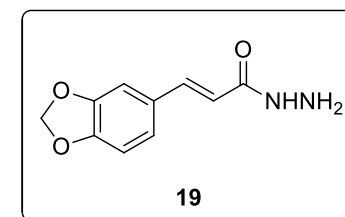
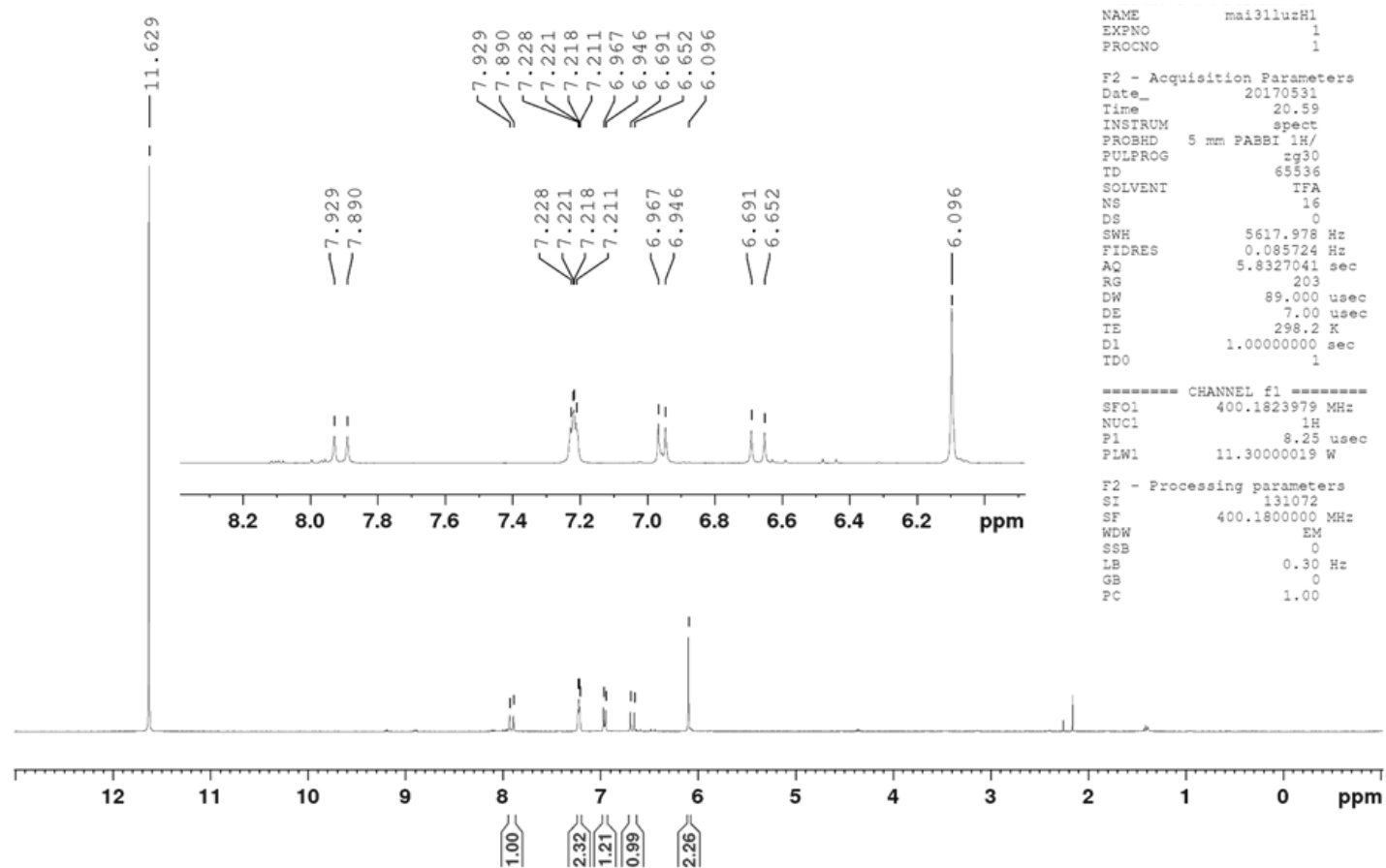


Figura S32. Espectro no IV do ácido 20 (ATR, cm⁻¹)

Matheus - WAM 001 - DMSO - Avance 600 MHz - nov16wanH1 - 1H

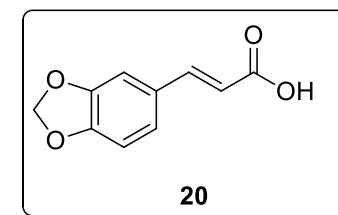
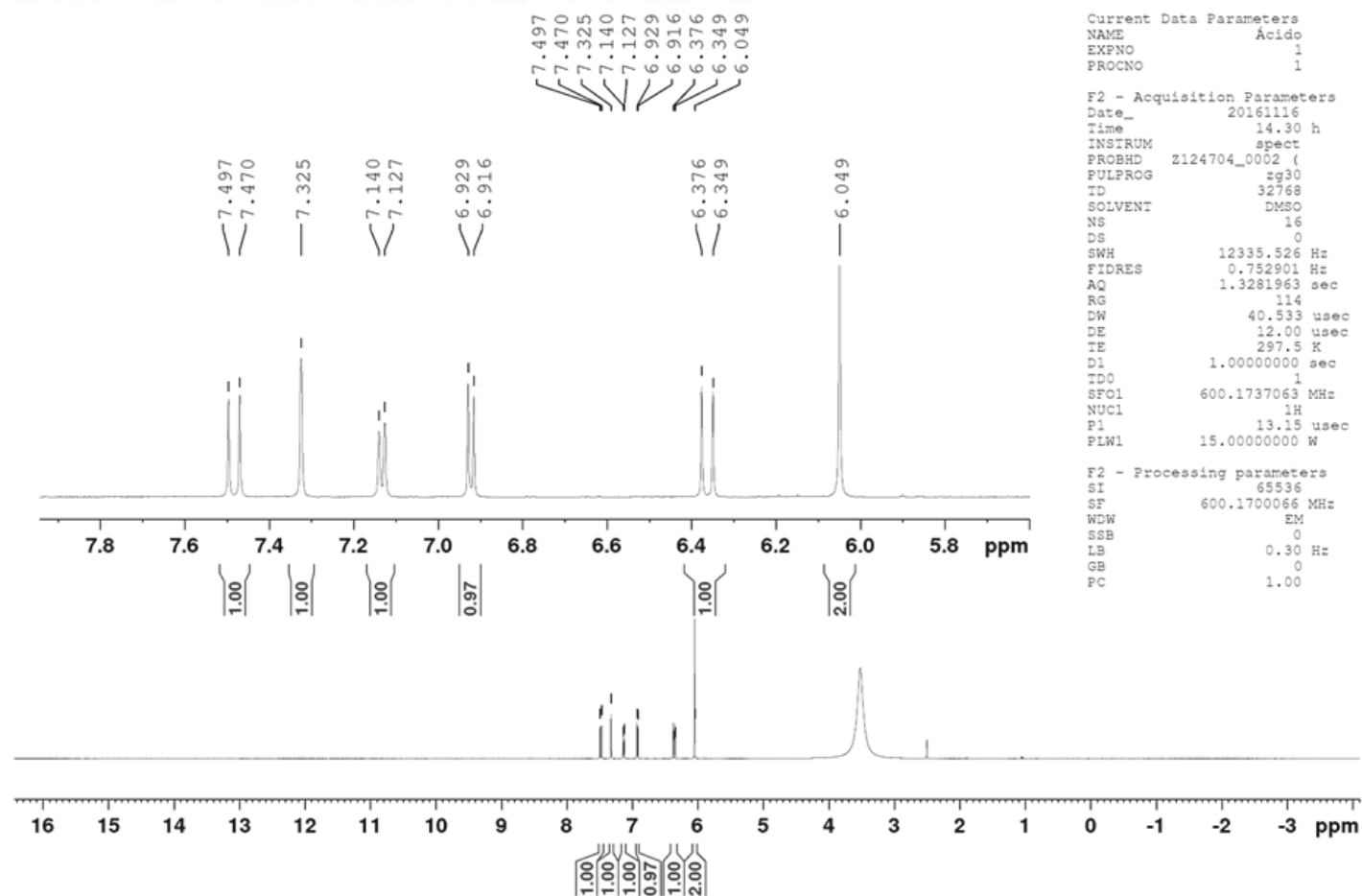
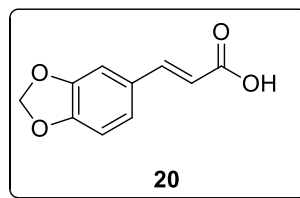


Figura S33. Espectro de RMN-¹H do ácido 20 (600MHz, DMSO-*d*₆)

Matheus - WAM 001 - DMSO - Avance 600 MHz - nov16wanH1 - ^{13}C
30 min

167.99
149.28
148.17
144.02
128.77
124.75
117.17
108.63
106.77
101.68



Current Data Parameters
NAME Ácido
EXPNO 2
PROCNO 1

F2 - Acquisition Parameters
Date_ 20161116
Time 15.02 h
INSTRUM spect
PROBHD Z124704_0002 (
PULPROG zgpg30
TD 32768
SOLVENT DMSO
NS 735
DS 0
SWH 40760.871 Hz
FIDRES 2.487846 Hz
AQ 0.4019541 sec
RG 203
DW 12.267 usec
DE 10.00 usec
TE 299.0 K
D1 2.00000000 sec
D11 0.03000000 sec
TD0 1
SFO1 150.9309761 MHz
NUC1 ^{13}C
P1 9.10 usec
PLW1 89.90000153 W
SFO2 600.1724007 MHz
NUC2 ^1H
CPDPRG2 waltz16
PCPD2 70.00 usec
PLW2 15.00000000 W
PLW12 1.54970002 W
PLW13 0.77951002 W

F2 - Processing parameters
SI 32768
SF 150.9129121 MHz
WDW EM
SSB 0
LB 1.00 Hz
GB 0
PC 1.40

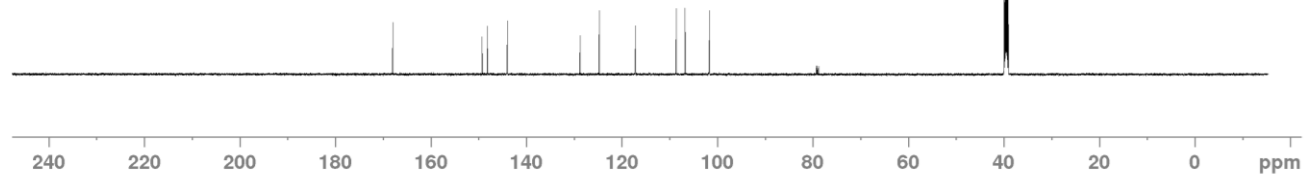


Figura S34. Espectro de RMN- ^{13}C do ácido 20 (150MHz, DMSO- d_6)

Lucas - methylenodioxycinnamoyl chloride
jun27luzH2 - 400 MHz - CDCl₃ - 1H

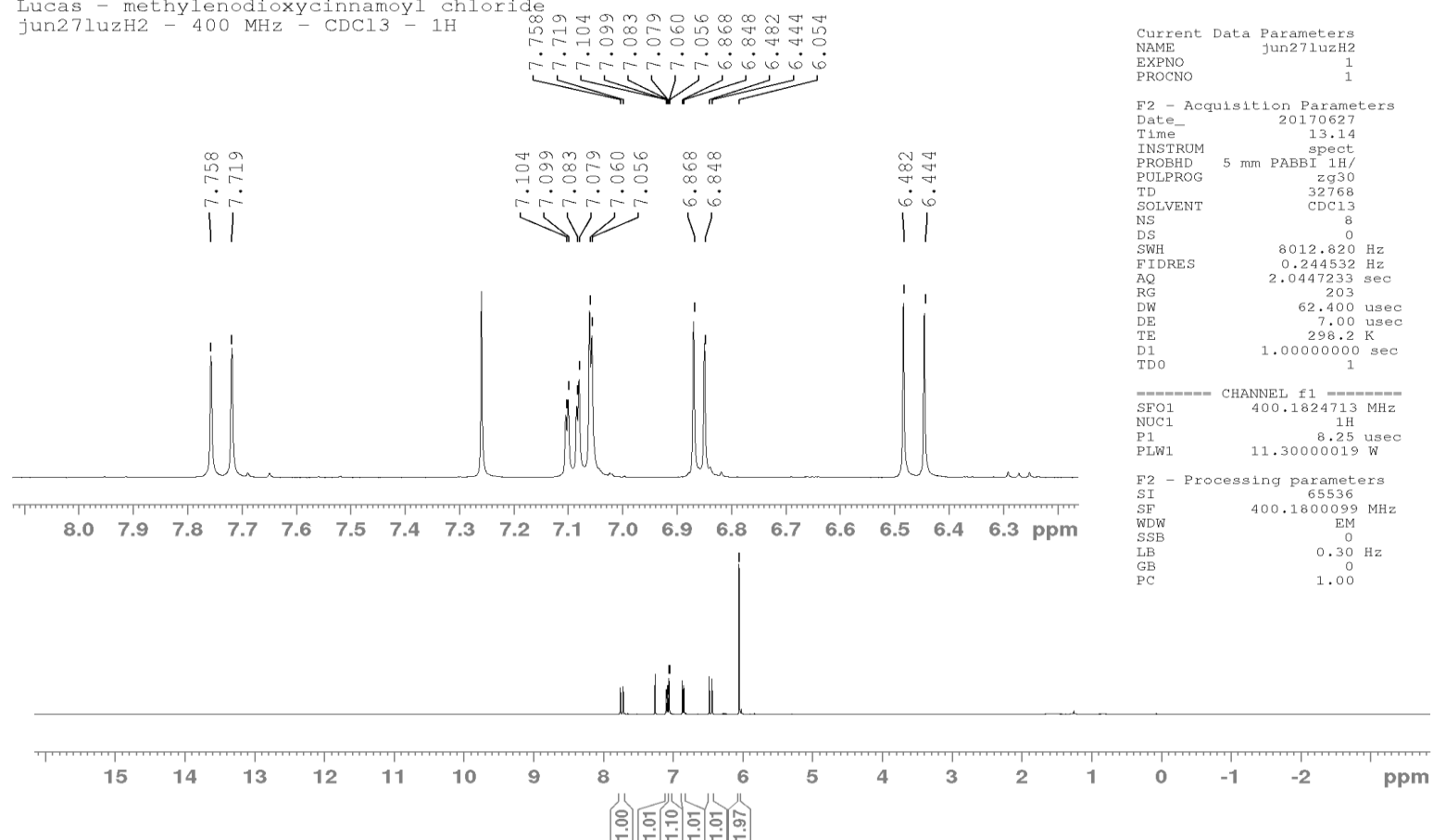
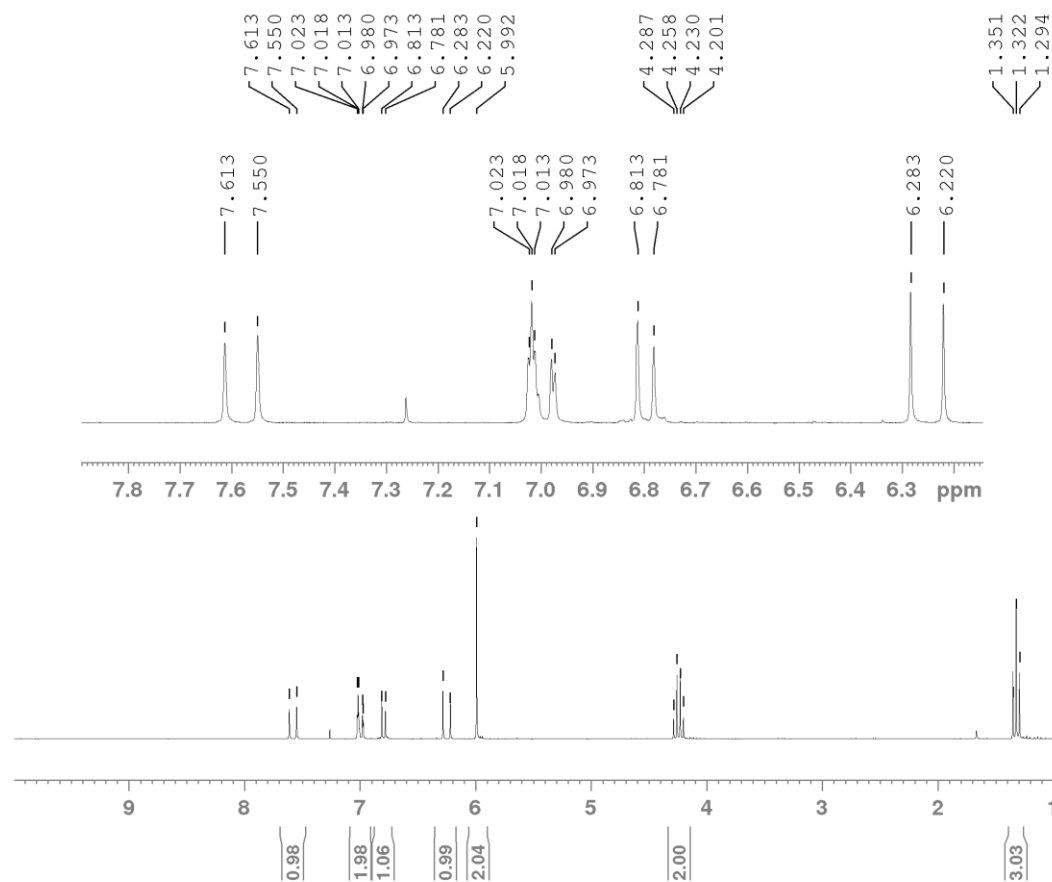


Figura S35. Espectro de RMN-¹H do cloreto de ácido 21 (400MHz, CDCl₃)

Lucas - WAM002
 LUZnov23H2 - 250 MHz - CDCl₃ - 1H



Current Data Parameters
 NAME Ester
 EXPNO 1
 PROCNO 1

F2 - Acquisition Parameters
 Date_ 20161123
 Time 17.22
 INSTRUM spect
 PROBHD 5 mm QNP 1H/13
 PULPROG zg30
 TD 32768
 SOLVENT CDCl₃
 NS 13
 DS 0
 SWH 5175.983 Hz
 FIDRES 0.157958 Hz
 AQ 3.1653888 sec
 RG 574.7
 DW 96.600 usec
 DE 6.00 usec
 TE 298.2 K
 D1 6.00000000 sec
 TD0 1

===== CHANNEL f1 =====
 NUC1 1H
 P1 14.20 usec
 PL1 -6.00 dB
 SFO1 250.1315447 MHz

F2 - Processing parameters
 SI 65536
 SF 250.1300000 MHz
 WDW EM
 SSB 0
 LB 0 Hz
 GB 0
 PC 1.00

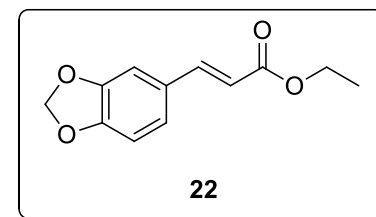


Figura S36. Espectro de RMN-¹H do éster 22 (250MHz, CDCl₃)

Lucas - WAM002
 LUZnov23H2 - 250 MHz - CDCl₃ - ¹³C

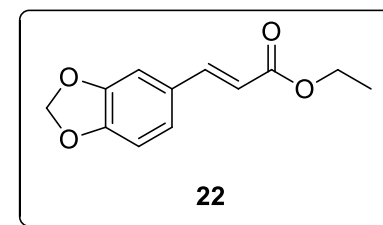
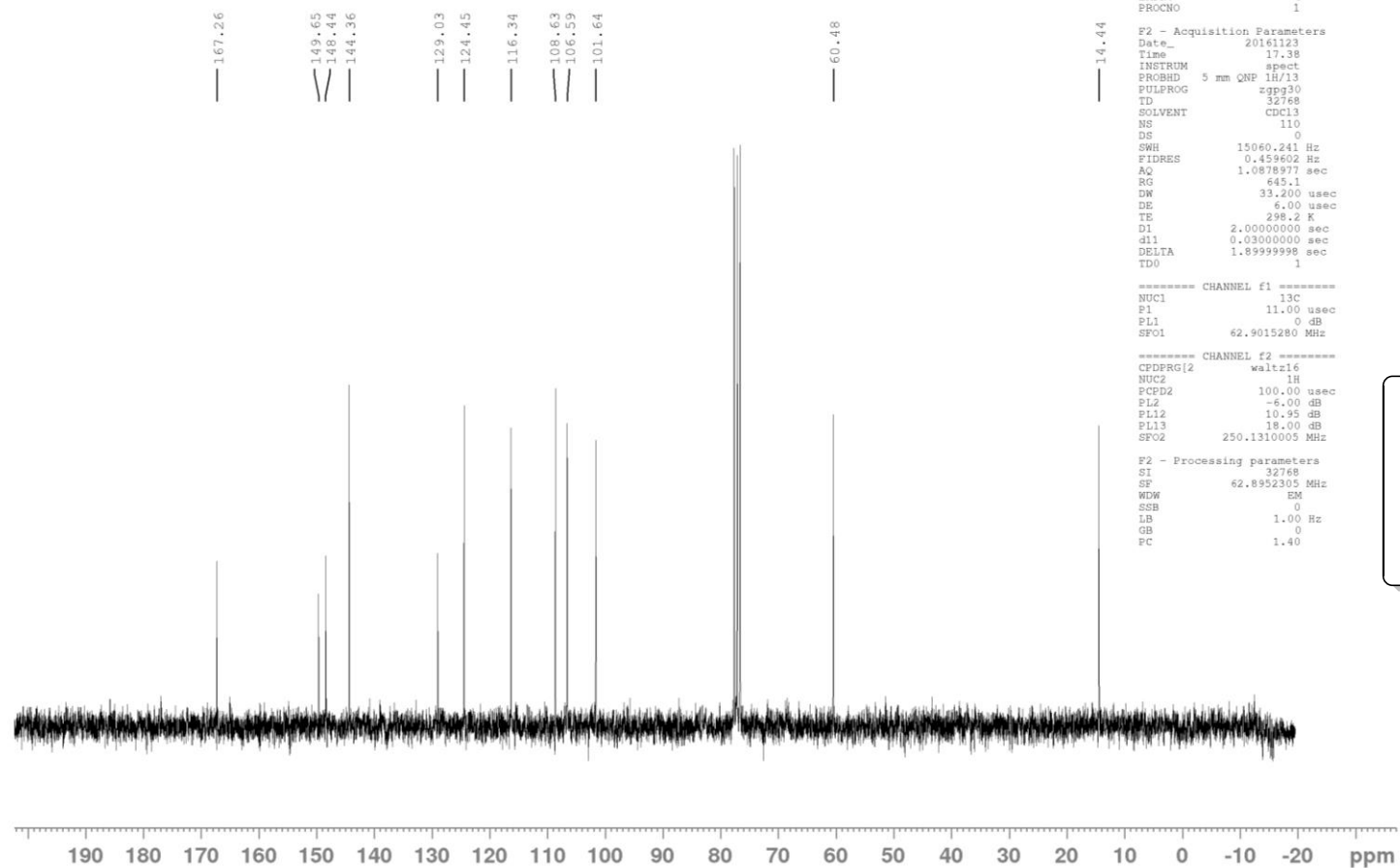
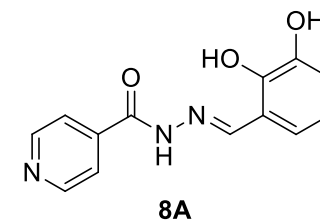
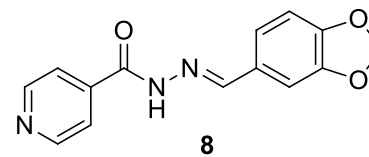
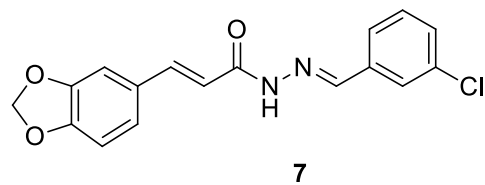
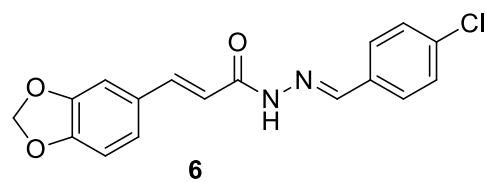
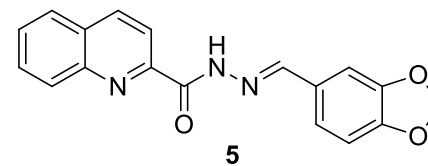
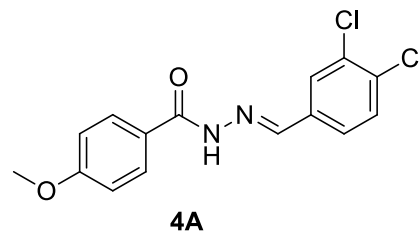
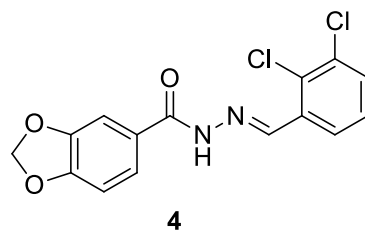
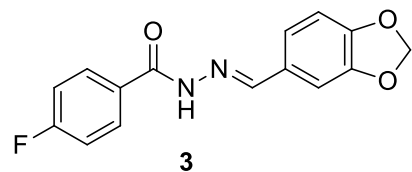
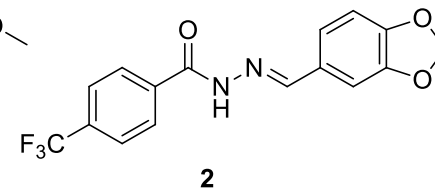
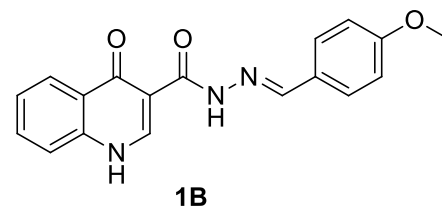
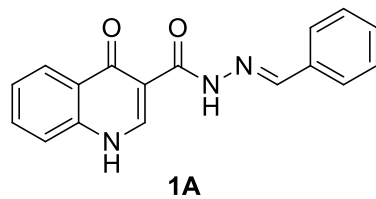
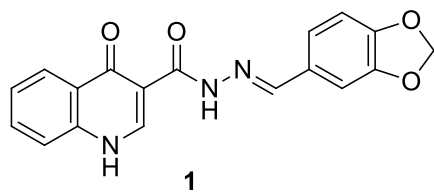


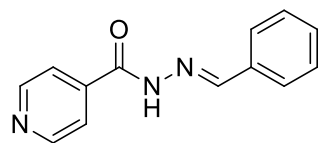
Figura S37. Espectro de RMN-¹³C do éster 22 (62,5MHz, CDCl₃)

Anexo 2. ESTRUTURA DOS COMPOSTOS CITADOS NESTE TRABALHO

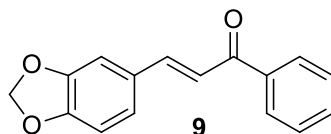
Compostos 1 a 8A



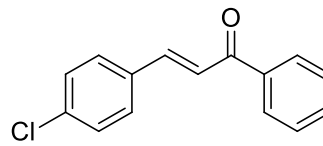
Compostos 8B a 12A



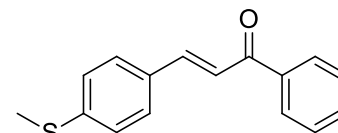
8B



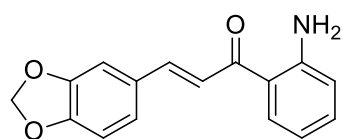
9



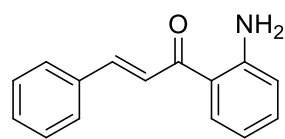
9A



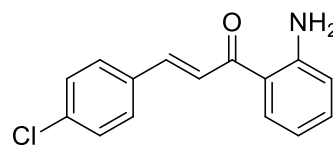
9B



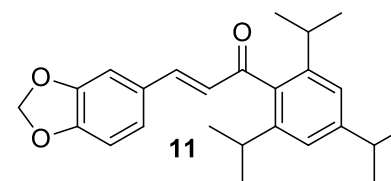
10



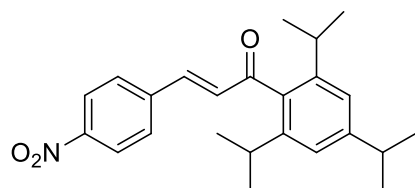
10A



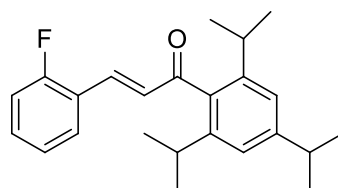
10B



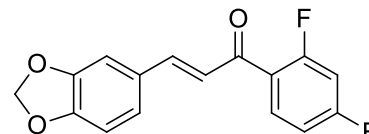
11



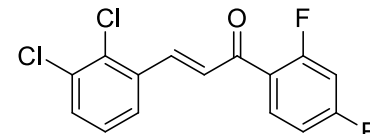
11A



11B



12



12A

Compostos 13 a 26

