

**MINISTÉRIO DA DEFESA
EXÉRCITO BRASILEIRO
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA
INSTITUTO MILITAR DE ENGENHARIA
CURSO DE MESTRADO EM QUÍMICA**

JULIANA DE OLIVEIRA CARNEIRO BRUM

**SÍNTESE E AVALIAÇÃO DE POTENCIAIS FÁRMACOS PARA A
DOENÇA DE ALZHEIMER**

Rio de Janeiro

2016

INSTITUTO MILITAR DE ENGENHARIA

JULIANA DE OLIVEIRA CARNEIRO BRUM

**SÍNTESE E AVALIAÇÃO DE POTENCIAIS FÁRMACOS PARA A
DOENÇA DE ALZHEIMER**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Curso de Mestrado em Química do Instituto Militar de Engenharia, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Ciências em Química.

Orientador: Prof: José Daniel Figueroa Villar- Ph.D.

Rio de Janeiro
2016

c2016

INSTITUTO MILITAR DE ENGENHARIA

Praça General Tibúrcio, 80 – Praia Vermelha

Rio de Janeiro – RJ CEP: 22290-270

Este exemplar é de propriedade do Instituto Militar de Engenharia, que poderá incluí-lo em base de dados, armazenar em computador, microfilmар ou adotar qualquer forma de arquivamento.

É permitida a menção, reprodução parcial ou integral e a transmissão entre bibliotecas deste trabalho, sem modificação de seu texto, em qualquer meio que esteja ou venha a ser fixado, para pesquisa acadêmica, comentários e citações, desde que sem finalidade comercial e que seja feita a referência bibliográfica completa.

Os conceitos expressos neste trabalho são de responsabilidade do(s) autor(es) e do(s) orientador(es).

660.2	Brum, Juliana de Oliveira Carneiro
B893s	Síntese e avaliação de potenciais fármacos para a doença de Alzheimer / Juliana de Oliveira Carneiro Brum; orientada por José Daniel Figueroa Villar – Rio de Janeiro: Instituto Militar de Engenharia, 2016.
	186p.: il.
	Dissertação (Mestrado) – Instituto Militar de Engenharia, Rio de Janeiro, 2016.
	1. Curso de Química – teses e dissertações. 2. Quinolinas. 3. Hidrazonas. 4. Enzima acetilcolinesterase. 5. Doença de Alzheimer. I. Villar, José Daniel Figueroa. II. Título. III. Instituto Militar de Engenharia.

INSTITUTO MILITAR DE ENGENHARIA

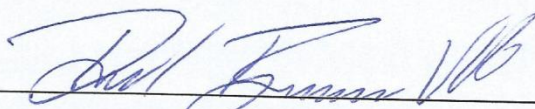
JULIANA DE OLIVEIRA CARNEIRO BRUM

**SÍNTESE E AVALIAÇÃO DE POTENCIAIS FÁRMACOS
PARA A DOENÇA DE ALZHEIMER**

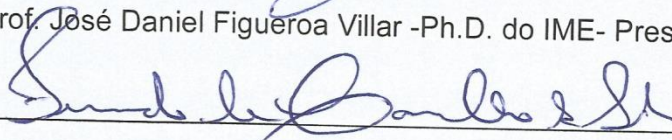
Dissertação de Mestrado apresentada ao curso de Mestrado em Química do Instituto Militar de Engenharia, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Ciências em Química.

Orientador: Prof. José Daniel Figueroa Villar – Ph. D.

Aprovada em 18 de fevereiro de 2016 pela seguinte Banca Examinadora:



Prof. José Daniel Figueroa Villar -Ph.D. do IME- Presidente



Prof. Fernando de Carvalho da Silva – D.Sc. da UFF



Prof. Luiz Eduardo Pizarro Borges – D.Sc. do IME

Rio de Janeiro - RJ

2016

Dedico este trabalho aos meus pais, ao meu irmão, à minha tia Higinia e à minha avó Amelia por sempre me apoiarem nos momentos difíceis e incentivarem a alcançar meus objetivos.

AGRADECIMENTOS

Inicialmente, agradeço a Deus por ter me abençoado em todos os momentos difíceis e permitir que este trabalho fosse realizado.

Agradeço aos meus pais, Ana Maria (*in memoriam*) e Ernani, ao meu irmão Rodrigo, à minha avó Amelia e aos meus tios José e Lúcia pelo apoio e carinho, e especialmente à minha tia Higina que sempre esteve presente em todos os momentos, aconselhando, ouvindo e me dando força para superar cada obstáculo.

Agradeço ao Instituto Militar de Engenharia (IME), principalmente à Seção de Engenharia Química, pela oportunidade de desenvolver esta dissertação.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de estudos.

Agradeço ao meu orientador, professor Figueroa, pela paciência, dedicação e incentivo. Reconhecido no meio científico por ser um excelente profissional, também é uma pessoa admirável, já que apesar de ser muito requisitado em diversas atividades acadêmicas e trabalhar à exaustão, está sempre disponível para ajudar e aconselhar a todos do nosso grupo de pesquisa.

Agradeço ao meu grupo de pesquisa - Denise, Edijane, Elaine, Jacqueline, Luana, Mariana, Paulo, Priscila, Sirlene e Ten. Garcia – pela amizade, pelo apoio, companheirismo, momentos de descontração e pelo conhecimento compartilhado ao longo destes dois anos. Agradeço especialmente à Edijane e Mariana por estarem ao meu lado em todos os momentos, e Denise pela realização dos testes de inibição enzimática.

Aos amigos de outros grupos – Cap. Bonfim, Chiraz, Eduardo, Ingrid, Rafaela, Raiane e Sasaqui – muito obrigada por todo apoio e momentos muito especiais.

À Sgt. Barnabel e à Sgt. Grazielle pelas demonstrações de amizade e carinho, e especialmente à Sgt. Grazielle pela colaboração na obtenção dos espectros de infravermelho.

À professora Kátia Regina de Souza pela oportunidade de estágio e pelos preciosos conselhos.

A todos os professores que de alguma forma colaboraram para meu crescimento pessoal e acadêmico, muito obrigada.

Por fim, agradeço a todos que não foram citados – alunos ou técnicos administrativos – mas que contribuíram para meu aprendizado e para a execução deste trabalho.

Muito obrigada!

SUMÁRIO

LISTA DE ILUSTRAÇÕES	10	
LISTA DE TABELAS	13	
LISTA DE ABREVIATURAS	15	
1	INTRODUÇÃO	18
1.1	Doença de Alzheimer	18
1.1.1	Apresentação Clínica	18
1.1.2	Patogênese	18
1.1.3	Tratamento Sintomático	26
1.2	Quinolinas e Guanil-hidrazonas com Aplicação na Inibição das Enzimas Colinesterases.....	34
1.2.1	Quinolinas	34
1.2.2	Hidrazonas	38
1.3	Testes de Inibição das Enzimas Colinesterases	40
1.3.1	Teste de Ellman.....	40
1.3.2	Teste pelo Método de Ressonância Magnética Nuclear (SOARES <i>et al.</i> , 2013)	42
2	OBJETIVOS.....	44
2.1	Objetivo Geral.....	44
2.2	Objetivos Específicos	44
3	MATERIAIS E MÉTODOS	45
3.1	Planejamento.....	45
3.2	Materiais Utilizados nas Sínteses.....	48
3.3	Métodos Cromatográficos	50
3.4	Métodos de Caracterização e Análise	50
3.5	Parte Experimental.....	51
3.5.1	Síntese do 6-nitro-1,3-benzodioxole-5-carboxaldeído: 6-nitropiperonal (1) (EKELEY & KLEMM, 1928; BOGERT & ELDER, 1929).....	51

3.5.2	Síntese do 6-amino-1,3-benzodioxole-5-carboxaldeído: 6-aminopiperonal (2) (JACOBS & HEIDELBERGER, 1917; CAMPBELL <i>et al.</i> , 1951)	52
3.5.3	Síntese dos Derivados Quinolínicos	53
3.5.4	Síntese das Guanil-hidrazonas (BORGES <i>et al.</i> , 2004)	58
3.6	Teste de Inibição Enzimática	60
4	RESULTADOS E DISCUSSÕES	62
4.1	Síntese do 6-nitro-1,3-benzodioxole-5-carboxaldeído (1) (EKELEY & KLEMM, 1928; BOGERT & ELDER, 1929)	62
4.2	Síntese do 6-amino-1,3-benzodioxole-5-carboxaldeído (2) (JACOBS & HEIDELBERGER, 1917; CAMPBELL <i>et al.</i> , 1951).....	65
4.3	Síntese dos Derivados Quinolínicos	68
4.3.1	Sínteses Utilizando Catálise Ácida (CONTELLES <i>et al.</i> , 2009).....	69
4.3.2	Sínteses Utilização Catálise Básica	83
4.4	Síntese das Guanil-hidrazonas (BORGES <i>et al.</i> , 2004)	102
4.4.1	Síntese da Guanil-hidrazona de 6-nitro-1,3-benzodioxole-5-carboxaldeído (10)	102
4.4.2	Síntese da Guanil-hidrazona de 6-amino-1,3-benzodioxole-5-carboxaldeído (11)	105
4.4.3	Síntese da Guanil-hidrazona de 7,7-dimetil-7,8-diidro-[1,3]dioxolo[4,5-b]acridin-9(6h)-ona (12)	108
4.5	Avaliação da Capacidade de Inibição Enzimática dos Compostos pelo Método de RMN	115
5	CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS	118
5.1	Conclusões.....	118
5.2	Perspectivas	119
6	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	121
7	APÊNDICES.....	129
7.1	Apêndice 1 – Espectros de RMN de ¹ H.....	130
7.2	Apêndice 2 – Espectros de RMN de ¹³ C	143

7.3	Apêndice 3 – Espectros de gHMBC	156
7.4	Apêndice 4 – Espectros de gHSQC	168
7.5	Apêndice 5 – Espectros de IV	178

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIG. 1.1	Placas senis e emaranhados neurofibrilares em um cérebro com a doença de Alzheimer (adaptado de BLENNOW <i>et al.</i> , 2006).....	19
FIG. 1.2	Visualização microscópica das placas senis (A) e dos emaranhados neurofibrilares (B) em cérebros de pacientes com a doença de Alzheimer (Adaptado de CUMMINGS & COLE, 2002)	19
FIG. 1.3	Síntese da Acetilcolina (Adaptado de CALASANS-MAIA, 2002).....	20
FIG. 1.4	Esquema de transmissão e controle nervoso das sinapses (PETRONILHO <i>et al.</i> , 2011).....	21
FIG. 1.5	Hidrólise da Acetilcolina.....	21
FIG. 1.6	Interação entre a ACh e a AChE (adaptado de CALASANS-MAIA, 2002).....	22
FIG. 1.7	Interações no sítio ativo da AChE (adaptado de PATRICK, 1995).....	22
FIG. 1.8	Estrutura geral das acridinas	27
FIG. 1.9	Tacrina.....	27
FIG. 1.10	Estrutura do Donepezil	28
FIG. 1.11	Estrutura da Rivastigmina.....	29
FIG. 1.12	Estrutura da Galantamina.....	30
FIG. 1.13	Estrutura da Memantina	31
FIG. 1.14	Estrutura de fármaco inibidor da enzima β -secretase (YONEZAWA <i>et al.</i> , 2013)	31
FIG. 1.15	Estrutura do Flurizan, fármaco inibidor da enzima γ -secretase (FISCHER <i>et al.</i> , 2011).....	32
FIG. 1.16	Vitamina C (ácido ascórbico).....	32
FIG. 1.17	Vitamina E (α -tocoferol)	33
FIG. 1.18	8-hidroxiquinolina.....	33
FIG. 1.19	Estrutura da quinolina.....	34
FIG. 1.20	Síntese de quinolinas a partir da reação de Friedländer (adaptado de PROLA, 2011)	34
FIG. 1.21	Mecanismo proposto para a formação das quinolinas.....	35
FIG. 1.22	Estrutura geral dos inibidores de AChE (adaptado de BONACORSO <i>et al.</i> , 2015)	36

FIG. 1.23 Estruturas dos alcalóides harmana, harmina e harmalina (adaptado de ZHAO <i>et al.</i> , 2013).....	36
FIG. 1.24 Estrutura da skimianina (adaptado de YANG <i>et al.</i> , 2012)	37
FIG. 1.25 Estruturas dos derivados quinolínicos (adaptado de CAMPS <i>et al.</i> , 2010).....	37
FIG. 1.26 Mecanismo proposto para a formação das hidrazonas	38
FIG. 1.27 Estrutura geral de uma guanil-hidrazona.....	39
FIG. 1.28 Estruturas da hidrazonas com maior capacidade inibitória da AChE (adaptado de PETRONILHO <i>et al.</i> , 2015)	40
FIG. 1.29 Reações químicas ocorridas no método de Ellman (adaptado de ELLMAN <i>et al.</i> , 1961).....	41
FIG. 1.30 Exemplo da variação dos sinais do grupo metila da acetilcolina e do acetato na pela ação da AChE em condições inibitórias (adaptado de SOARES <i>et al.</i> , 2013).....	43
FIG. 1.31 Inibição da AChE utilizando o composto de interesse em comparação com um composto de referência em função do tempo (adaptado de PETRONILHO <i>et al.</i> , 2015)	43
FIG. 3.1 Anéis responsáveis pela interação da tacrina com o sítio ativo da AChE	45
FIG. 3.2 Tautômero da tacrina contendo átomo de nitrogênio protonado capaz de realizar interações de hidrogênio com o aminoácido His440 da tríade catalítica do sítio ativo da AChE	45
FIG. 3.3 Região positiva das guanil-hidrazonas com possibilidade de interação com o sítio aniônico da AChE	46
FIG. 3.4 Esquema geral das sínteses propostas.....	47
FIG. 3.5 Hidrólise da acetilcolina	60
FIG. 4.1 Rota sintética para obtenção do composto 1	62
FIG. 4.2 Rota sintética para obtenção do composto 2	65
FIG. 4.3 Mecanismo de formação do composto 2	65
FIG. 4.4 Mecanismo geral da reação de Friedländer para a formação de quinolinas	69
FIG. 4.5 Rota de síntese do composto 3	70
FIG. 4.6 Semelhança estrutural entre o composto 3 e a tacrina.....	73
FIG. 4.7 Rota de síntese do composto 4	74
FIG. 4.8 Mecanismo proposto para a formação do composto 4	75

FIG. 4.9 Semelhança estrutural entre o composto 4 e o tautômero protonado da tacrina.....	78
FIG. 4.10 Rota de síntese do composto 5	79
FIG. 4.11 Semelhança estrutural relativa entre o composto 5 e a tacrina.....	83
FIG. 4.12 Rota de síntese dos compostos 6 e 7	83
FIG. 4.13 Rota de síntese do composto 7	90
FIG. 4.14 Semelhança estrutural entre o composto 7 e o tautômero da tacrina	92
FIG. 4.15 Rota de síntese do composto 8	93
FIG. 4.16 Semelhança estrutural entre o composto 8 e o tautômero da tacrina	95
FIG. 4.17 Rota de síntese do composto 9	96
FIG. 4.18 Transesterificação para a síntese do composto 9 a partir de um provável composto intermediário	96
FIG. 4.19 Espectro de RMN de ^1H do composto 9	97
FIG. 4.20 Espectro de RMN de ^{13}C do composto 9	99
FIG. 4.21 Semelhança estrutural entre o composto 9 e a tacrina	101
FIG. 4.22 Mecanismo geral de formação das guanil-hidrazonas.....	102
FIG. 4.23 Rota de síntese do composto 10	102
FIG. 4.24 Rota de síntese do composto 11	105
FIG. 4.25 Rota de síntese do composto 12	108
FIG. 4.26 Espectro de RMN de ^1H do composto 12	109
FIG. 4.27 Espectro de ^{13}C do composto 12	111
FIG. 4.28 Regiões do composto 12 onde pode haver interação com a AChE	114
FIG. 4.29 Semelhança estrutural entre os compostos 3 e 12 - em azul, destaca-se a presença do grupamento guanil-hidrazona no composto 12	117

LISTA DE TABELAS

TAB. 3.1	Relação de equipamentos utilizados nas sínteses	48
TAB. 3.2	Relação de reagentes e solventes utilizados nas sínteses.....	49
TAB. 4.1	Assinalamento do espectro de RMN de ^1H do composto 1	63
TAB. 4.2	Assinalamento do espectro de RMN de ^{13}C do composto 1	63
TAB. 4.3	Principais absorções de IV do composto 1	64
TAB. 4.4	Assinalamento do espectro de RMN de ^1H do composto 2	66
TAB. 4.5	Assinalamento do espectro de RMN de ^{13}C do composto 2	67
TAB. 4.6	Principais absorções de IV do composto 2	67
TAB. 4.7	Assinalamento do espectro de RMN de ^1H do composto 3	71
TAB. 4.8	Assinalamento do espectro de RMN de ^{13}C do composto 3	72
TAB. 4.9	Principais absorções de IV do composto 3	73
TAB. 4.10	Assinalamento do espectro de RMN de ^1H do composto 4	76
TAB. 4.11	Assinalamento do espectro de RMN de ^{13}C do composto 4	77
TAB. 4.12	Principais absorções de IV do composto 4	77
TAB. 4.13	Assinalamento do espectro de RMN de ^1H do composto 5	80
TAB. 4.14	Assinalamento do espectro de RMN de ^{13}C do composto 5	81
TAB. 4.15	Principais absorções de IV do composto 5	82
TAB. 4.16	Assinalamento do espectro de RMN de ^1H do composto 6	85
TAB. 4.17	Assinalamento do espectro de RMN de ^{13}C do composto 6	86
TAB. 4.18	Assinalamento do espectro de RMN de ^1H do composto 7	88
TAB. 4.19	Assinalamento do espectro de RMN de ^{13}C do composto 7	89
TAB. 4.20	Assinalamento do espectro de RMN de ^1H do composto 7	91
TAB. 4.21	Assinalamento do espectro de RMN de ^{13}C do composto 7	92
TAB. 4.22	Assinalamento do espectro de RMN de ^1H do composto 8	94
TAB. 4.23	Assinalamento do espectro de RMN de ^{13}C do composto 8	95
TAB. 4.24	Assinalamento do espectro de RMN de ^1H do composto 9	98
TAB. 4.25	Assinalamento do espectro de RMN de ^{13}C do composto 9	100
TAB. 4.26	Assinalamento do espectro de RMN de ^1H do composto 10	103
TAB. 4.27	Assinalamento do espectro de RMN ^{13}C do composto 10	104
TAB. 4.28	Principais absorções de IV do composto 10	104

TAB. 4.29	Assinalamento do espectro de RMN de ^1H do composto 11	106
TAB. 4.30	Assinalamento do espectro de RMN de ^{13}C do composto 11	107
TAB. 4.31	Principais absorções de IV do composto 11	107
TAB. 4.32	Assinalamento do espectro de RMN de ^1H do composto 12	110
TAB. 4.33	Assinalamento do espectro de RMN de ^{13}C do composto 12	112
TAB. 4.34	Principais absorções de IV do composto 12	113
TAB. 4.35	Capacidade inibitória dos compostos testados.....	115

LISTA DE ABREVIATURAS

ACh	–	Acetilcolina
AChE	–	Acetilcolinesterase
APP	–	Proteína precursora de amiloide
APT	–	Attached proton test
BuChE	–	Butirilcolinesterase
CAT	–	Colina acetiltransferase
CCD	–	Cromatografia de camada delgada
Ch	–	Colina
D ₂ O	–	Água deuterada
<i>EeAChE</i>	–	Acetilcolinesterase do peixe da espécie <i>Electrophorus</i>
<i>Electricus</i>		
Glu	–	Ácido glutâmico
gHMBC	–	Heteronuclear multiple bond coherence (field gradient)
gHSQC	–	Heteronuclear single quantum coherence (field gradient)
His	–	Histidina
I-Ch	–	Inibidores de colinesterase
IME	–	Instituto Militar de Engenharia
IV	–	Espectroscopia de Infravermelho
MPACs	–	Compostos de atenuação da associação metal-proteínas
NMDA	–	Receptores N-metil-D-aspartato
RMN	–	Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear
RMN de ¹ H	–	Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio
RMN de ¹³ C	–	Ressonância Magnética Nuclear de Carbono
Ser	–	Serina
Tpr	–	Triptofano
Tyr	–	Tirosina
UV	–	Ultravioleta

RESUMO

O presente trabalho teve como objetivo sintetizar uma série de compostos visando à obtenção de potenciais fármacos para o tratamento sintomático da doença de Alzheimer.

Para isso, a tacrina foi utilizada como protótipo para a síntese de quinolinas estruturalmente similares a este fármaco, já que este é reconhecido como o melhor inibidor da enzima acetilcolinesterase sintetizado até o momento.

Adicionalmente, foram sintetizadas guanil-hidrazonas para avaliação de sua capacidade de inibir a acetilcolinesterase. Esta classe de moléculas apresenta uma ampla aplicação na Química Medicinal, entretanto estudos relacionando guanil-hidrazonas ao tratamento da doença de Alzheimer ainda são raros, sendo nosso grupo de pesquisa pioneiro nesta área de pesquisa.

No desenvolvimento deste trabalho, foram sintetizadas seis quinolinas e três guanil-hidrazonas. Entre os compostos sintetizados, dois são inéditos na literatura: os compostos **9** e **12**, uma quinolina e uma guanil-hidrazona, respectivamente.

A avaliação da capacidade de inibir a enzima acetilcolinesterase foi testada através do método de Ressonância Magnética Nuclear inicialmente em cinco dos compostos sintetizados, incluindo os inéditos.

A maioria dos resultados obtidos através dos testes de cinética enzimática indicou que os compostos sintetizados são inibidores muito eficientes da enzima acetilcolinesterase. Estes resultados promissores indicam que estes compostos podem ser potenciais fármacos para o tratamento de sintomas característicos da doença de Alzheimer.

A análise de alguns resultados permitiu observar que a presença de diferentes substituintes em estruturas moleculares idênticas pode levar a alterações significativas na capacidade inibitória. Esta observação indica que estudos relativos a este trabalho devem ser aprofundados a fim de proporcionar um planejamento mais eficiente de potenciais fármacos.

ABSTRACT

The objective of this work was to synthesize a series of compounds to obtain potential drugs for the symptomatic treatment of Alzheimer's disease.

For this, the tacrina was used as a prototype for the synthesis of quinolines structurally similar to this drug, since this is recognized as the best inhibitor of acetylcholinesterase enzyme synthesized until the moment.

Additionally, were synthesized guanylhydrazones for evaluation of their capacity to inhibit the acetylcholinesterase.

This class of molecules presents a wide application in medicinal chemistry, however studies correlating guanylhydrazones to treatment of Alzheimer's disease are still rare, being our research group pioneer in this area of research. In the development of this work, were synthesized six quinolinas and three guanylhydrazones. Among the compounds synthesized, two are novel in the literature: the compounds **9** and **12**, a quinoline and a guanylhydrazone, respectively.

Evaluation of the capacity of inhibiting the acetylcholinesterase enzyme was tested by the method of Nuclear Magnetic Resonance initially in five of the synthesized compounds, including the unpublished. Most of the results obtained through the tests of enzymatic kinetics indicated that the synthesized compounds are very efficient inhibitors of acetylcholinesterase enzyme.

These promising results indicate that these compounds may be potential drugs for the treatment of characteristic symptoms of Alzheimer's disease. The analysis of some results allowed us to observe that the presence of different substituent on molecular structures identical can lead to significant changes in inhibitory capacity. This note indicates that studies concerning this work should be developed further in order to provide a more efficient planning of potential drugs.

1 INTRODUÇÃO

1.1 DOENÇA DE ALZHEIMER

1.1.1 APRESENTAÇÃO CLÍNICA

A doença de Alzheimer é uma doença degenerativa progressiva do cérebro e é a causa mais comum de demência (BURNS *et al.*, 2002).

No Brasil, mais de 1 milhão de pessoas vivem com alguma forma de demência. Em todo o mundo, ao menos 44 milhões de pessoas vivem com demência causada pela doença de Alzheimer, tornando a doença uma crise global de saúde que deve ser resolvida (ALZHEIMER'S ASSOCIATION, 2015).

Inicialmente, a doença leva a déficits da função cognitiva que causam perda de memória (amnésia), comprometimento da linguagem (afasia), incapacidade de realizar tarefas motoras (apraxia) e incapacidade de reconhecer (agnosia). Com o tempo, vários sintomas psiquiátricos e distúrbios de comportamento tornam-se aparentes, como a depressão, mudança de personalidade, delírios, alucinações e erros de identificação. Também surgem dificuldades com as atividades da vida diária, tais como dificuldades de vestir-se e alimentar-se (BURNS *et al.*, 2002).

Estima-se que a neurodegeneração na doença de Alzheimer seja iniciada cerca de 20-30 anos antes de sua manifestação clínica (BLENNOW *et al.*, 2006).

1.1.2 PATOGÊNESE

Patologicamente, a doença de Alzheimer é caracterizada pela perda sináptica e neuronal e por deposição anormal de duas proteínas, a proteína β - amiloide e a proteína tau associada a microtúbulos (WOLFE, 2012).

No nível microscópico, as lesões características na doença de Alzheimer são placas senis e emaranhados neurofibrilares nas estruturas do lobo temporal medial e

áreas corticais do cérebro, juntamente com uma degeneração dos neurônios e sinapses (BLENNOW *et al.*, 2006) (FIG. 1.1 e FIG. 1.2).

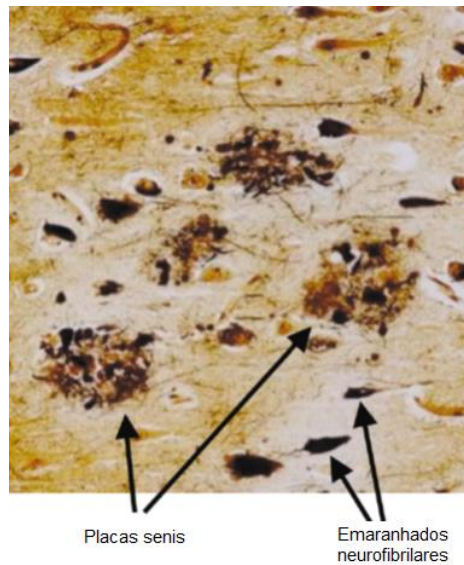


FIG. 1.1 Placas senis e emaranhados neurofibrilares em um cérebro com a doença de Alzheimer (adaptado de BLENNOW *et al.*, 2006)

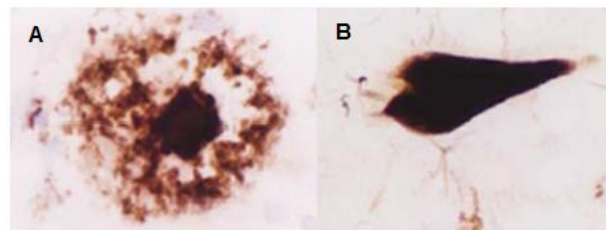


FIG. 1.2 Visualização microscópica das placas senis (A) e dos emaranhados neurofibrilares (B) em cérebros de pacientes com a doença de Alzheimer (adaptado de CUMMINGS & COLE, 2002)

Existem várias hipóteses para o surgimento destas lesões e também dos sintomas associados à doença de Alzheimer. Entre elas, destacam-se:

1.1.2.1 HIPÓTESE COLINÉRGICA

A acetilcolina (ACh), que foi identificada por Henry Hallet Dale em 1914 é um reconhecido neurotransmissor que é armazenado em vesículas sinápticas até que um potencial de ação leve a uma despolarização da membrana plasmática das células pré-sinápticas (ANDRADE DOS SANTOS, 2009).

A enzima colina acetiltransferase (CAT) é produzida no *nucleus basalis de Meynert*. Essa enzima é transportada para estruturas-alvo no sistema nervoso central: formação hipocampal, córtex cerebral e amígdala, dentre outros. Nessas regiões, ela catalisa a reação de síntese da ACh a partir da colina (Ch) e da acetilcoenzima A (MINETT & BERTOLUCCI, 2000) (FIG. 1.3).

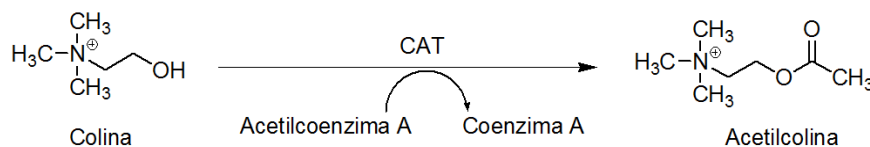


FIG. 1.3 Síntese da Acetilcolina (adaptado de CALASANS-MAIA, 2002)

Depois de formada, a ACh é liberada na fenda sináptica, onde poderá ser acoplada a dois tipos de receptores – muscarínico e nicotínico. A ACh restante é degradada pela enzima acetilcolinesterase (AChE) (MINETT & BERTOLUCCI, 2000), sendo este processo muito importante, já que evita problemas colinérgico que podem levar a graves alterações na saúde.

O processo da transmissão colinérgica se processa da seguinte forma: a despolarização da membrana plasmática das células pré-sinápticas resulta na entrada de cálcio, seguida pela fusão de vesículas sinápticas com a membrana plasmática. Quando a ACh é liberada na fenda sináptica e se difunde até o receptor, a célula pós-sináptica, que pode atuar como um canal catiônico. O receptor sofre uma mudança conformacional logo após se ligar à ACh. Esta mudança na estrutura tridimensional resulta em uma entrada de sódio, que despolariza a membrana plasmática na célula pós-sináptica e é iniciado um potencial de ação. Para que a sinapse seja capaz de responder a outro sinal, é necessário que a ACh seja removida da fenda sináptica antes deste novo sinal. Isto requer a ação da AChE (ANDRADE DOS SANTOS, 2009) (FIG. 1.4).

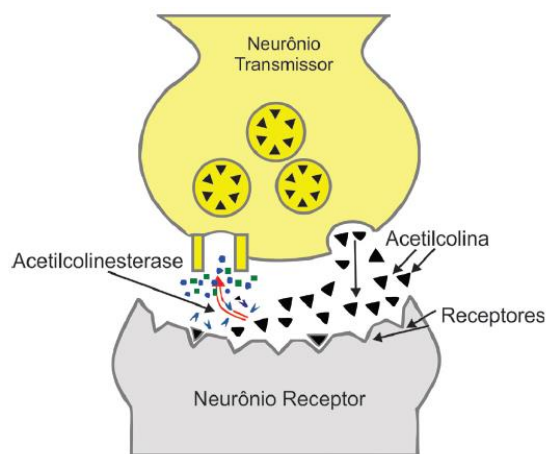


FIG. 1.4 Esquema de transmissão e controle nervoso das sinapses (PETRONILHO *et al.*, 2011)

A acetilcolinesterase (AChE) é uma serina hidrolase que tem papel essencial no mecanismo colinérgico, catalisando a hidrólise natural do substrato ACh em colina (Ch) e ácido acético (QUINN *et al.*, 1987) (FIG. 1.5).

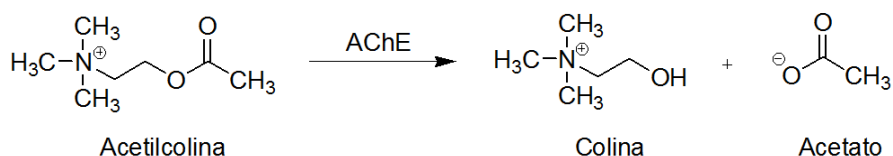


FIG. 1.5 Hidrólise da Acetilcolina

A AChE apresenta dois locais de ação em sua molécula: um é chamado de sítio aniônico, de carga negativa, que é composto pelos resíduos Trp84, Phe330 e Glu199 e se liga à parte positiva da ACh. Essa é a ligação que orienta a hidrólise de forma apropriada, sendo responsável pela inibição por substratos. O outro local é chamado de sítio esterásico, o qual contém a tríade catalítica (resíduos dos aminoácidos Ser200, His440 e Glu327 que se apresentam separados por distâncias características de ligação hidrogênio) que é responsável pela quebra da ACh (FIG.1.6 e FIG.1.7) (CALASANS-MAIA, 2002; PATRICK,1995; SILVA, 2009).

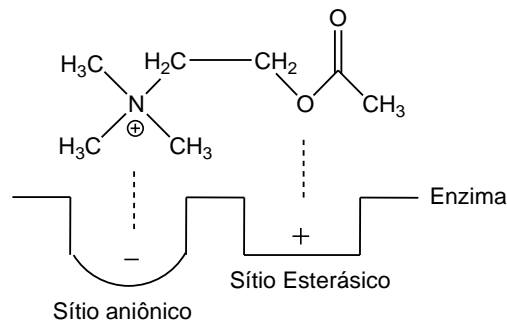


FIG. 1.6 Interação entre a ACh e a AChE (adaptado de CALASANS-MAIA, 2002)

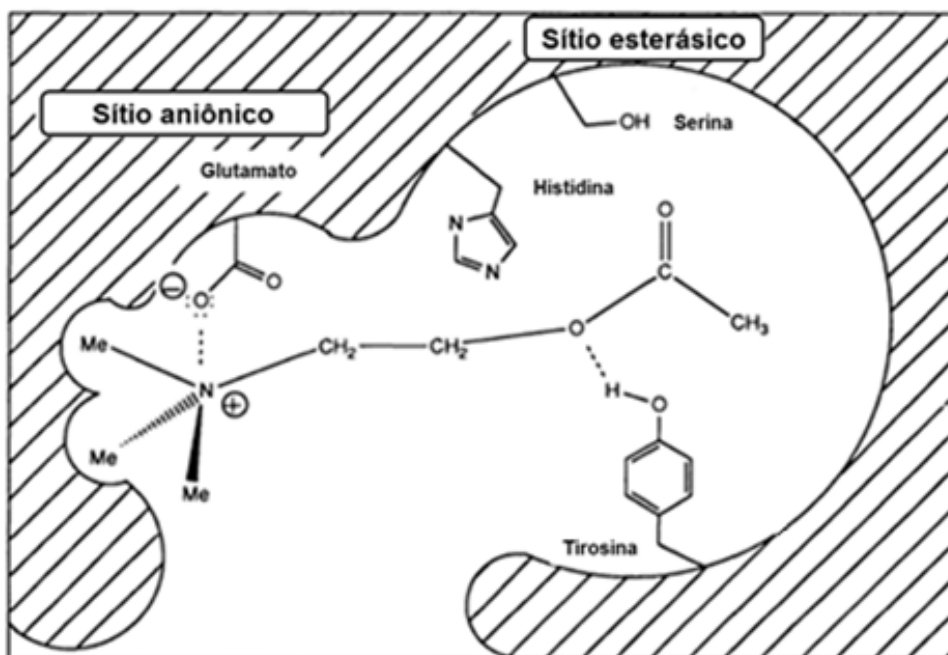


FIG. 1.7 Interações no sítio ativo da AChE (adaptado de PATRICK, 1995)

A partir da FIG.1.7, pode-se observar que a acetilcolina se liga à enzima colinesterase por ligação iônica a um resíduo de glutamato e por uma ligação de hidrogênio com o resíduo de tirosina.

A histidina e a serina estão fortemente envolvidas no mecanismo de hidrólise da acetilcolina, já que o resíduo de histidina atua como um catalisador ácido/base em todo o mecanismo, enquanto serina desempenha o papel de nucleófilo.

Há vários estágios para o mecanismo de hidrólise:

- A acetilcolina liga-se à enzima acetilcolinesterase. A histidina atua como uma base e remove um próton do grupo hidroxila da serina, tornando-a um nucleófilo forte que ataca o grupo carbonila da função éster da ACh;
- Após o ataque nucleofílico, a porção álcool do éster (ou seja, de colina) é liberada. Este processo é auxiliado pela histidina, que agora atua com um ácido doando um próton para subunidade O-R tornando-a um melhor grupo abandonador, um álcool de partida.
- A porção acila da acetilcolina liga-se de forma covalente ao sítio receptor e a colina deixa o sítio ativo, sendo substituída por água. A água é normalmente um nucleófilo fraco, mas como a histidina novamente age como um catalisador básico, há adição nucleofílica e ocorre mais uma vez a abertura do grupo carbonila.
- O grupo carbonila é restabelecido e o resíduo de serina é liberado quando o par de elétrons sobre o oxigênio forma novamente a ligação dupla (PATRICK, 1995).

Na doença de Alzheimer, existe uma atrofia no *nucleus basalis* de Meynert, resultando na diminuição da síntese da CAT e, conseqüentemente, na diminuição dos níveis de ACh (MINETT & BERTOLUCCI, 2000). A região cerebral do *nucleus basalis* de Meynert subserve à memória e, além da queda nos níveis de ACh, o número de seus neurônios também diminui no decorrer da doença de Alzheimer, levando a sintomas de perturbações cognitivas (RUBEY, 2003).

1.1.2.2 HIPÓTESE DA CASCATA AMILÓIDE

Os peptídeos β -amiloides são produtos naturais do metabolismo, sendo compostos por 36 a 43 aminoácidos. Eles são originários da proteólise da proteína precursora de amilóide por ações das enzimas α -, β - e γ -secretase (QUERFURTH & LAFERLA, 2010).

No que diz respeito à organização estrutural ou comprimento assumido pelo β -amilóide, este pode existir em diferentes formas: monômero, dímero, trímero, oligômero, fibrilas e agregados de fibrilas (HAMPEL *et al.*, 2010).

Os β -amilóides produzidos podem ter dois destinos: permanecer na forma solúvel no meio extracelular ou agregar-se, tornando-se insolúvel e depositando-se

na forma de placas senis. Por muito tempo a forma agregada foi considerada a única forma patogênica deste peptídeo, entretanto estudos recentes indicam que formas oligoméricas do β -amiloide, as quais corresponderiam a formas solúveis do mesmo, poderiam apresentar grande potencial neurotóxicos e afetar de forma significativa diferentes vias de sinalização celular. Estes arranjos distintos do peptídeo podem representar formas intermediárias do processo de fibrilação ou corresponder a uma via distinta de processamento e polimerização do peptídeo β -amiloide (KREUTZ, 2010).

Diversos estudos indicam que os oligômeros solúveis e os amilóides intermediários são as formas mais neurotóxicas do β -amiloide, sendo os dímeros e os trímeros tóxicos para sinapses. A gravidade da deficiência cognitiva na doença de Alzheimer correlaciona-se com os níveis de oligômeros no cérebro, não com quantidade total de β -amiloide (QUERFURTH & LAFERLA, 2010).

1.1.2.3 HIPÓTESE DA DEGENERAÇÃO DO CITOESQUELETO NEURONAL

Os axônios são constituídos em grande parte pela proteína tau e por microtúbulos de baixo peso molecular. A proteína tau tem grande importância na estabilização dos microtúbulos e na própria indução de sua formação (MACCIONI *et al.*, 2010). Ela atua ligando-se às unidades de tubulina, possibilitando a organização em hélice das mesmas e o crescimento dos microtúbulos. Sua atividade é regulada por mecanismos de fosforilação e desfosforilação. Sob a ação de enzimas, a proteína tau pode ser hiperfosforilada, comprometendo a ligação desta proteína à tubulina que, conseqüentemente, leva a uma desestabilização e desestruturação dos microtúbulos bem como à fibrilação e deposição intracelular da proteína tau na forma de emaranhados neurofibrilares (KREUTZ, 2010).

Emaranhados neurofibrilares ocorrem na doença de Alzheimer e em outras doenças neurodegenerativas denominadas tauopatias. O número de emaranhados neurofibrilares consiste em um marcador patológico da gravidade da doença de Alzheimer.

Como oligômeros de β -amilóides, agregados intermediários de moléculas tau anormais são citotóxicos e prejudiciais à cognição e evidências experimentais

indicam que a acumulação de β -amilóides precede e dirige a agregação de tau (QUERFURTH & LAFERLA, 2010). Estas formas oligoméricas e os filamentos tau são libertados para o meio extracelular como resultado da morte neuronal (SANTOS, 2011).

1.1.2.4 HIPÓTESE DO ÍON METÁLICO

O equilíbrio de metais é fundamental para funções fisiológicas, em particular no sistema nervoso central, onde os metais são essenciais para as atividades enzimáticas, para o bom funcionamento mitocondrial, na neurotransmissão, na memória e na aprendizagem (SANTOS, 2011).

Por meio de uma complexa rede de interações moleculares, a homeostase metálica age para equilibrar a absorção intracelular de metal, o tráfego, o armazenamento, a especiação e a sinalização. As células precisam, portanto, manter os íons metálicos dentro de uma estreita gama de concentrações a fim de evitar uma alteração prejudicial da homeostase (MOUNICOU, 2009) e um mecanismo altamente orquestrado é necessário para garantir a homeostase metálica (MILARDI & RIZZARELLI, 2011).

Quando os reguladores de homeostase metálica corrigem parcialmente as concentrações de íons metálicos, pode ocorrer o desenvolvimento de uma grande variedade de doenças, principalmente aquelas ligadas ao envelhecimento (ZATTA et al., 2009). No processo de envelhecimento normal, e particularmente quando há doenças neurodegenerativas, observa-se que há uma alteração homeostática, embora ainda não se saiba por que isto ocorre (BONDA *et al.*, 2011).

A hipótese do íon metálico na doença de Alzheimer surgiu da observação de que os íons metálicos são particularmente abundantes nas placas senis. A ligação de zinco (II) e de cobre (II) em β -amilóides pode induzir alterações em sua estrutura secundária, que, por sua vez, podem favorecer a agregação do peptídeo amiloidogênico *in vitro*, com consequências patológicas, tais como o stress oxidativo em cérebros com a doença de Alzheimer (TRAVAGLIA *et al.*, 2012).

1.1.3 TRATAMENTO SINTOMÁTICO

Devido à complexidade da doença de Alzheimer, existem várias pesquisas em busca de fármacos capazes de tratá-la ou de pelo menos amenizar seus sintomas. Apesar dos esforços, no momento apenas duas classes de medicamentos para o tratamento dos sintomas foram aprovadas: inibidores de colinesterase e antagonistas de glutamato (DALVI, 2012).

Seguem abaixo algumas classes de medicamentos pesquisadas atualmente.

1.1.3.1 FÁRMACOS APROVADOS E TACRINA

I. INIBIDORES DE COLINESTERASE

Os inibidores da acetilcolinesterase são agentes de primeira linha para o tratamento da doença de Alzheimer leve ou moderada (WINSLOW *et al.*, 2011).

Uma abordagem terapêutica para aumentar a neurotransmissão colinérgica é aumentar a disponibilidade de acetilcolina, inibindo a acetilcolinesterase e a butirilcolinesterase (BuChE), enzimas que degradam a acetilcolina na fenda sináptica (BLENNOW *et al.*, 2006).

Os inibidores de colinesterase (I-Ch) têm efeito sintomático discreto sobre a cognição, algumas vezes beneficiando também certas alterações não-cognitivas da demência. Os I-Ch donepezil, rivastigmina e galantamina são aprovados para uso clínico da doença de Alzheimer. Donepezil e galantamina são inibidores seletivos da acetilcolinesterase, enquanto a risvastigmina inibe a acetilcolinesterase e a butirilcolinesterase (FORLENZA, 2005).

Apesar de pequenas variações nos mecanismos de ação, esses agentes podem provocar efeitos adversos, sendo os mais comuns: náuseas, vômitos e diarreia; efeitos cardiovasculares e neurológicos também podem ocorrer (WINSLOW *et al.*, 2011).

a. TACRINA

As acridinas, compostos tricíclicos nucleares, são uma importante classe de derivados quinolínicos, cuja estrutura corresponde à fusão de um núcleo quinolínico com um anel benzênico (COSTA, 2010) (FIG. 1.8).

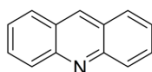


FIG. 1.8 Estrutura geral das acridinas

A tacrina (9-amino-1,2,3,4-tetraidroacridina), é uma acridina que atua como inibidor não competitivo de acetilcolinesterase e de butirilcolinesterase (HAMULAKOVA *et al.*, 2014) (FIG. 1.9).

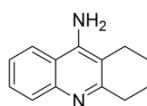


FIG. 1.9 Tacrina

A tacrina é utilizada no tratamento da doença de Alzheimer, evitando a degradação excessiva da acetilcolina, aumentando a neurotransmissão colinérgica, visando, assim, compensar uma das principais características da doença, a perda de neurônios colinérgicos (CHEFFER & ULRICH, 2011).

Estes fármacos estabelecem fortes interações com o sítio de ligação de colina da AChE, porém não estabelece interações com o sítio periférico. Existe uma interação do tipo empilhamento- π entre o anel quinolínico da tacrina e o anel indólico do aminoácido Trp84. Já o átomo de nitrogênio protonado do anel quinolínico do tautômero da tacrina estabelece ligação de hidrogênio diretamente com a carbonila da cadeia principal do aminoácido His440, componente da tríade catalítica, e ainda, o anel quinolínico dispõe-se paralelamente e em contato com o grupo fenil do aminoácido Phe330, capaz também de estabelecer forte interação π - π com o anel quinolínico (ALMEIDA, 2011).

Apesar de sua eficiência como fármaco, a tacrina exibe considerável hepatotoxicidade via elevação dos níveis séricos de alanina aminotransferase,

tornando sua aplicação clínica limitada, levando à sua retirada do mercado farmacêutico logo após a sua aprovação.

Em estudos mais recentes, a tacrina tem sido utilizada para a síntese de compostos híbridos ou multi-alvo que combinem sua potente inibição das colinesterases com outras propriedades farmacológicas. Essas sínteses podem ser realizadas através de ligação covalente entre a tacrina e outros compostos farmacologicamente ativos (ROMERO *et al.*, 2013).

b. DONEPEZIL

O donepezil (FIG. 1.10) é um derivado de piperidina, que atua como inibidor misto de AChE competitivo e não-competitivo e mostra uma seletividade relativa para a AChE em comparação com a BuChE.

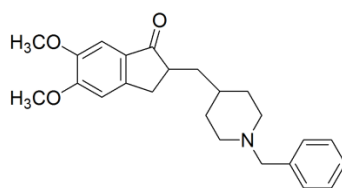


FIG. 1.10 Estrutura do Donepezil

Este fármaco é o inibidor de AChE mais comumente utilizado para o tratamento da doença de Alzheimer. Por isso, ele representa uma referência de eficácia de tratamento na avaliação de novas terapias para a doença leve a moderada (TSUNO, 2009).

Vários estudos indicam que após 6 meses de administração de donepezil, constatou-se uma diminuição significativa dos níveis solúveis e insolúveis dos peptídeos β -amilóides no cérebro, prevenindo a perda sináptica. A degeneração neuronal não foi continuada, indicando que o fármaco é capaz de regular ou interferir no metabolismo amilóide. Observou-se também que o donepezil foi capaz de melhorar o nível cognitivo dos pacientes e ser bem tolerado, sem hepatotoxicidade. O donepezil, portanto, mostrou-se capaz de impedir a agregação dos peptídeos β -amilóides promovidos pela AChE. Os enfermos que apresentam menor déficit

cognitivo apresentaram melhor resposta ao tratamento com o donepezil (SANTOS, 2011).

c. RIVASTIGMINA

Os carbamatos (ésteres do ácido carbâmico) são reconhecidos por inibir a AChE. O mecanismo de inibição da acetilcolinesterase por carbamatos ocorre por meio da formação de um complexo enzima-inibidor e posterior carbamilação (GUILOSKI *et al.*, 2010). Entre os carbamatos, como fármaco, destaca-se a rivastigmina (FIG. 1.11).

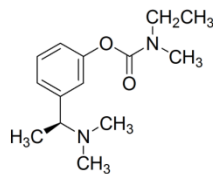


FIG. 1.11 Estrutura da Rivastigmina

A rivastigmina é um inibidor enzimático pseudo-irreversível responsável pela hidrólise de ACh na fenda sináptica. A inibição é classificada como pseudo-irreversível, porque ocorre dissociação temporal entre seus parâmetros farmacocinéticos e farmacodinâmicos: a interação da enzima com a rivastigmina, na fenda sináptica, leva à formação de um produto de clivagem fenólico com atividade farmacológica mínima e rápida excreção, e de um complexo carbamilado com a enzima, que impede a hidrólise da acetilcolina, por inibição competitiva e duradoura, porém reversível. Com isso, os efeitos inibidores perduram após a eliminação da droga-mãe e seus metabólitos, reduzindo assim os riscos de interações medicamentosas (TREBBASTONI *et al.*, 2012).

A rivastigmina é aconselhada para casos de doença de Alzheimer com desequilíbrio cognitivo moderado a grave (FERRI *et al.*, 2005).

d. GALANTAMINA

A galantamina (FIG. 1.12), um alcalóide terciário fenantrênico isolado de *Galanthus nivalis* (*Amaryllidaceae*), que inibe a AChE de forma seletiva, reversível, competitiva e modula de forma alostérica os receptores nicotínicos da ACh (MAIER, 2010).

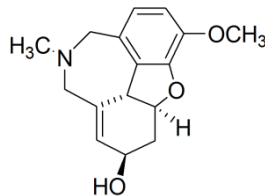


FIG. 1.12 Estrutura da Galantamina

A vantagem da utilização deste medicamento sobre outros anticolinesterásicos no tratamento da doença de Alzheimer, é que a galantamina é um inibidor reversível e de longa duração da AChE, enquanto a rivastigmina e outros inibem irreversivelmente a enzima, fator determinante para a potencialização dos efeitos colaterais indesejáveis (DOS SANTOS, 2013).

Um estudo controlado com galantamina em idosos portadores da doença de Alzheimer grave mostrou benefícios na avaliação cognitiva, mas não em atividades da vida diária (MOREIRA & STEFANI, 2012).

II. ANTAGONISTAS DE GLUTAMATO

O glutamato é o principal neurotransmissor excitatório cerebral, particularmente em regiões associadas às funções cognitivas e à memória, tais como o córtex temporal e o hipocampo. O glutamato também age como uma excitotoxina, causando a morte neuronal quando níveis elevados desse neurotransmissor são liberados por períodos prolongados (FORLENZA, 2005).

A memantina, um antagonista de receptores N-metil-D-aspartato (NMDA), pode reduzir o dano celular induzido por excitotoxicidade do glutamato e melhorar a função dos neurônios sobreviventes do hipocampo (FIG. 1.13). A memantina, utilizada isoladamente ou em combinação com um inibidor da colinesterase

retardam a progressão da doença de Alzheimer de moderada a grave. A eficácia modesta desses agentes deve ser equilibrada com o custo benefício e a utilização destes medicamentos deve ser interrompida nos estágios avançados da doença de Alzheimer, já que nestes casos eles não são eficazes. Entretanto, paradas bruscas devem ser evitadas.

Os efeitos colaterais dessas drogas incluem sintomas gastrointestinais, sonhos vívidos, confusão e bradicardia (DALVI, 2012).

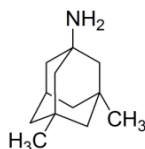


FIG. 1.13 Estrutura da Memantina

1.1.3.2 OUTRAS ABORDAGENS TERAPÊUTICAS

I. INIBIDORES DE β - e γ -SECRETASE

As enzimas β - e γ -secretase são responsáveis pelo processamento sequencial da proteína precursora de amiloide (APP) (HUANG *et al.*, 2006).

Com o bloqueio de produção de β -amiloide com inibidores da β - e γ -secretase espera-se retardar ou impedir a progressão da doença de Alzheimer e, por isso, tem sido feito um grande esforço para o desenvolvimento destes medicamentos na última década (LEE *et al.*, 2011).

Inibidores da β -secretase demonstraram conseguir inibir eficazmente *in vitro* e *in vivo* (FIG. 1.14). Entretanto, ainda existe o problema de que a APP não é o único substrato envolvido.

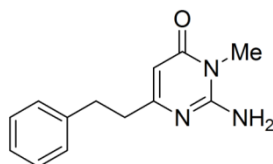


FIG. 1.14 Estrutura de fármaco inibidor da enzima β -secretase (YONEZAWA *et al.*, 2013)

Em relação ao tratamento com os inibidores de γ -secretase, verificou-se que podem eventualmente provocar toxicidade gastrointestinal grave e também podem interferir na maturação dos linfócitos T e B (SANTOS, 2011) (FIG. 1.15).

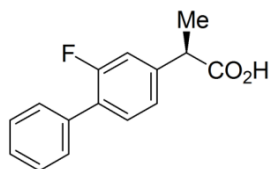


FIG. 1.15 Estrutura do Flurizan, fármaco inibidor da enzima γ -secretase (FISCHER et al., 2011)

II. ANTIOXIDANTES

Danos oxidativos em componentes celulares resultam em modificações nas propriedades da membrana plasmática. Em excesso, estes danos podem ter como consequência a morte celular. No cérebro de um paciente com a doença de Alzheimer, além das placas senis e dos emaranhados fibrilares, ocorre uma alteração nas reações de oxi-redução, levando ao aumento de danos oxidativos em muitas células (CHAUHAN, 2006).

Acredita-se que o uso de antioxidantes pode diminuir o declínio cognitivo na doença de Alzheimer. Estudos indicam que a ingestão de vitamina E, em combinação com a vitamina C, está associada a uma diminuição da incidência e prevalência da doença de Alzheimer (CASTELLANI *et al.*, 2010) (FIG. 1.16 e FIG. 1.17).

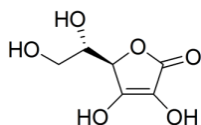


FIG. 1.16 Vitamina C (ácido ascórbico)

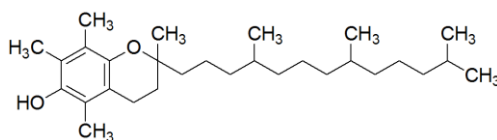


FIG. 1.17 Vitamina E (α -tocoferol)

III. QUELANTES DE METAIS

Compostos quelantes de são aqueles que apresentam capacidade de se ligarem a íons metálicos e, dessa forma, proporcionam a depleção de metais do organismo. Os agentes utilizados no tratamento da doença de Alzheimer atuam quelando os metais, levando à dissolução dos β -amilóides, e também ativam os percursos de sinalização de neuroprotetores celulares (DUCE & BUSH, 2010).

Dados recentes obtidos indicam que além das estratégias quelantes, a investigação também deve ser focada em moléculas chamadas por alguns autores de compostos de atenuação da associação metal-proteínas (MPACs) que são capazes de seqüestrar Cu^{2+} e Zn^{2+} das placas amilóides e das fendas sinápticas (ZATTA *et al.*, 2009).

O uso de um ligante de metal como um agente terapêutico é afetado por muitas propriedades, tais como tamanho, carga, hidrofobicidade e densidade. O desenvolvimento de ligantes terapêuticos também depende da localização e do alvo metálico (isto é, se o metal é intracelular ou extracelular, facilmente biodisponível ou ligado firmemente). Exemplos destes quelantes são as 8-hidroxiquinolinas que através dos grupos nitrogênio e oxigênio tendem a ter melhores propriedades de penetração da membrana através da formação de complexos neutros (BARNHAM, 2006) (Figura 1.18).

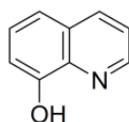


FIG. 1.18 8-hidroxiquinolina

1.2 QUINOLINAS E GUANIL-HIDRAZONAS COM APLICAÇÃO NA INIBIÇÃO DAS ENZIMAS COLINESTERASES

1.2.1 QUINOLINAS

A quinolina é um sistema heterocíclico presente em diversos produtos de origem natural e sintética, que apresenta atividade farmacológica variada, como antiasmática, antibacteriana, anti-inflamatória e anti-hipertensiva. A estrutura geral de uma quinolina pode ser vista na FIG. 1.19 (COSTA, 2010).

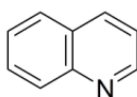


FIG. 1.19 Estrutura da quinolina

A reação de Friedländer constitui a principal estratégia para a construção de compostos quinolínicos e seus derivados. A condensação de Friedländer consiste na reação entre um *o*-aminoaldeído ou *o*-aminoacetona aromática com aldeídos ou cetonas que tenham um grupo metileno ativo em posição α -carbonila (FIG. 1.20) (PISONI, 2010).

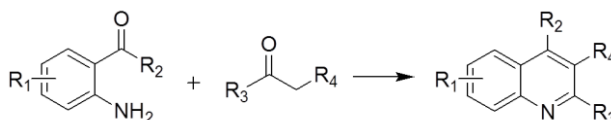


FIG. 1.20 Síntese de quinolinas a partir da reação de Friedländer (adaptado de PROLA, 2011)

Este tipo de condensação pode ser realizada via catálise ácida ou básica, ou até mesmo na ausência de catalisador, sendo exigidas altas temperaturas neste último caso (PISONI, 2010). O mecanismo de formação de quinolinas a partir da reação de Friedländer encontra-se na FIG. 1.21.

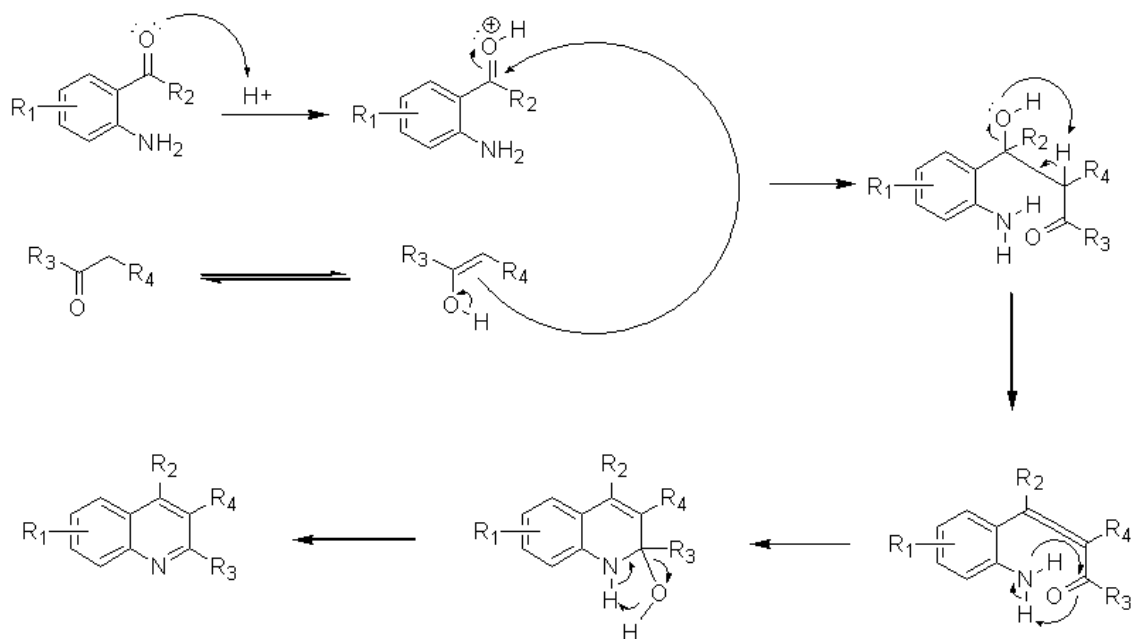
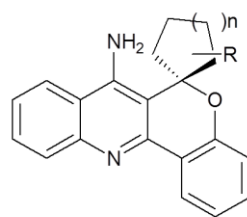


FIG. 1.21 Mecanismo proposto para a formação das quinolinas

As quinolinas têm sido estudadas quanto sua capacidade de inibir as enzimas colinesterases. Publicações recentes mostram que muitos derivados quinolínicos podem inibir significativamente tanto a AChE quanto a BuChE.

BONACORSO *et al.* sintetizaram compostos similares estruturalmente à tacrina e estes demonstraram capacidade de inibir a enzima AChE. O composto 3a mostrou o maior potencial de inibição em comparação com os demais análogos da tacrina e, além disso, apresentou um valor IC₅₀ muito semelhante à galantamina, que também é um inibidor reversível da AChE utilizado no tratamento da doença de Alzheimer. Estudos de docking molecular mostraram que o composto 3a interage com a AChE nas mesmas regiões onde a tacrina atua. Os compostos 3a-g não exibiram citotoxicidade em leucócitos humanos nas concentrações testadas. A estrutura geral dos compostos 3a-g pode ser observada na FIG. 1.22 (BONACORSO *et al.*, 2015).



2,3	a	b	c	d	e	f	g
R	H	H	H	2'-Me	3'-Me	4'-Me	4'-t-Bu
n	1	2	3	2	2	2	2

FIG. 1.22 Estrutura geral dos inibidores de AChE (adaptado de BONACORSO *et al.*, 2015)

ZHAO *et al.* avaliaram a atividade inibitória de alcalóides derivados de β -carbolina e quinolina de plantas do gênero *Peganum* relação às enzimas colinesterases. Todos os compostos testados apresentaram algum grau de atividade tanto na AChE quanto na BuChE. A estrutura dos compostos com maior capacidade inibitória encontra-se na FIG. 1.23 (ZHAO *et al.*, 2013).

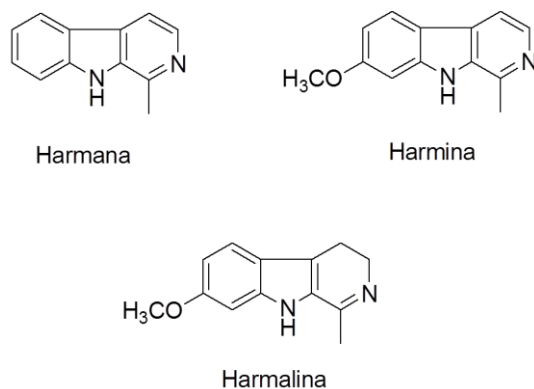


FIG. 1.23 Estruturas dos alcalóides harmana, harmina e harmalina (adaptado de ZHAO *et al.*, 2013)

Em 2012, YANG *et al.* avaliaram através do Teste de Ellman a capacidade inibitória de alguns alcalóides furoquinolínicos da planta *Zanthoxylum nitidum*. Entre os compostos testados, a skimianina mostrou-se um forte inibidor da AChE. A estrutura da skimianina pode ser observada na FIG. 1.24 (YANG *et al.*, 2012).

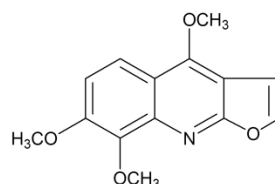


FIG. 1.24 Estrutura da skimianina (adaptado de YANG *et al.*, 2012)

CAMPS *et al.* sintetizaram uma série de compostos contendo um seguimento molecular da molécula de tacrina modificada que demonstraram ser excelentes inibidores da AChE. A FIG. 1.25 mostra uma representação geral das moléculas sintetizadas. Estes compostos interagiram com o sítio ativo da AChE da seguinte forma: a unidade tacrina posicionou-se de forma paralela ao anel aromático dos aminoácidos Trp86 e Tyr337, o átomo de nitrogênio protonado da piridina realizou ligação de hidrogênio com o aminoácido His447 e o átomo de cloro ligou-se à região hidrofóbica formada pelos aminoácidos Trp439, Met443, e Pro446 (CAMPS *et al.*, 2010).

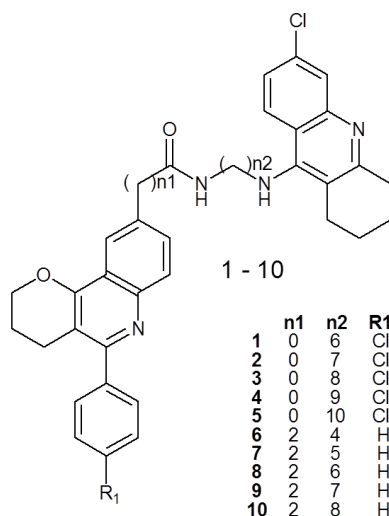


FIG. 1.25 Estruturas dos derivados quinolínicos (adaptado de CAMPS *et al.*, 2010)

1.2.2 HIDRAZONAS

As hidrazonas são bases de Schiff pertencentes a uma classe de compostos caracterizados por conter o esqueleto $R_1R_2C=N-NR_3R_4$ e que apresentam uma variedade de aplicações químicas e farmacológicas. A obtenção destes compostos geralmente ocorre pela condensação de hidrazinas com cetonas ou aldeídos, sendo comumente necessária a utilização de catálise ácida (PARRILHA, 2012). Um possível mecanismo de formação das hidrazonas pode ser visto na FIG. 1.26.

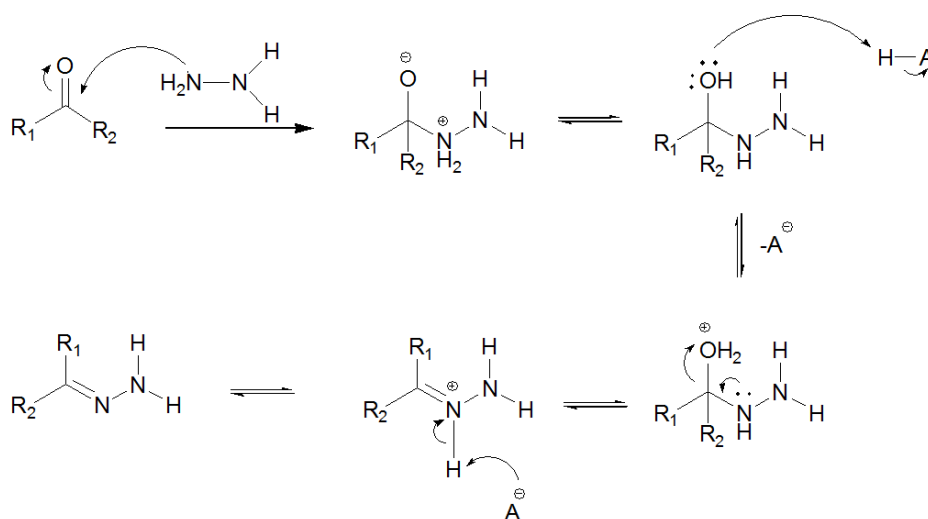


FIG. 1.26 Mecanismo proposto para a formação das hidrazonas

Assim como outros compostos ambifílicos, as hidrazonas são precursores importantes em síntese orgânica. Suas aplicações vão desde a identificação de carbonilas, passando pela deoxigenação de compostos carbonílicos através da redução de Wolff-Kishner, pela formação de ânions vinílicos através da reação de Shapiro, pela formação de diazo-compostos, entre outros. Além disso, a presença de grupos azo (diazenos) em compostos orgânicos está relacionada a uma gama variada de aplicações tecnológicas e medicinais (AMARAL, 2009).

Iminas em que o átomo de nitrogênio carrega um grupo eletronegativo (oximas, hidrazonas e semicarbazonas) são geralmente estáveis, porque o substituinte eletronegativo pode participar da deslocalização da ligação dupla C=N. A deslocalização diminui a densidade de carga no átomo de carbono da ligação dupla

da imina (C=N) e eleva a energia do LUMO, tornando-o menos susceptível a ataque nucleofílico (CLAYDEN *et al.*, 2000).

Dentro das hidrazonas encontra-se um grupo de compostos muito importante para a química medicinal, as guanil-hidrazonas. As guanil-hidrazonas compreendem diferentes classes químicas, contendo grupos amidina (guanil) ligados ao grupo hidrazona. Guanil-hidrazonas são moléculas amplamente estudadas, biológica e quimicamente. A estrutura geral de uma guanil-hidrazona pode ser vista na FIG. 1.27.

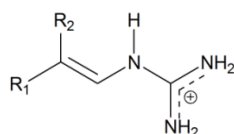


FIG. 1.27 Estrutura geral de uma guanil-hidrazona

Na química, são utilizados como intermediários na construção de compostos heterocíclicos polifuncionais contendo átomos de nitrogênio. Entre o potencial biológico destas moléculas, destacam-se as ações: depressora do sistema nervoso central, anti-hipertensiva, inibição da agregação plaquetária, antitumoral, antileucêmica, antiviral, antibacteriana, antimalarial, tripanocida, entre outras (PINHATTI, 2009).

As hidrazonas ainda são muito pouco estudadas como compostos inibidores das enzimas colinesterases e publicações destes trabalhos são raras.

Nosso grupo é pioneiro nesta linha de pesquisa e tem obtido resultados muito promissores. Em publicação recente, foram apresentadas sínteses e avaliação de hidrazonas e guanil-hidrazonas como potenciais inibidores das enzimas colinesterases (FIG. 1.28). Estes compostos foram investigados através do Teste de Ellman e pelo método de RMN utilizando tacrina como padrão de referência. Ambas as análises indicaram que todos os compostos apresentam atividade inibitória da *EeAChE*, enzima acetilcolinesterase do peixe elétrico *Electrophorus electricus*, confirmando que guanil-hidrazonas e hidrazonas são compostos potencialmente inibidores de AChE. Esta ação se deve principalmente à presença de grupos catiônicos que são capazes de interagir com o sítio ativo da enzima presente (PETRONILHO *et al.*, 2015).

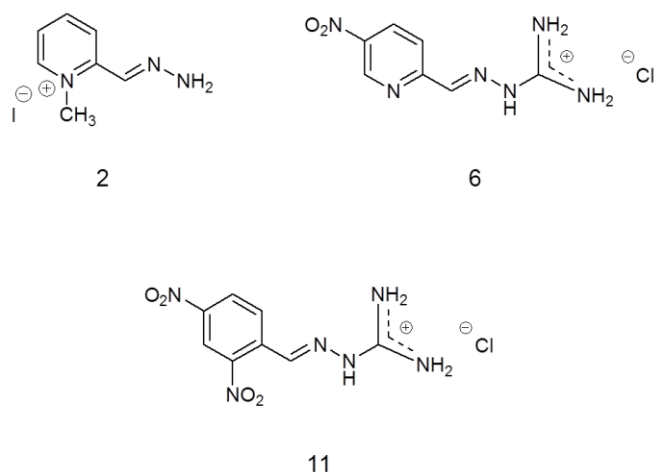


FIG. 1.28 Estruturas da hidrazonas com maior capacidade inibitória da AChE (adaptado de PETRONILHO *et al.*, 2015)

1.3 TESTES DE INIBIÇÃO DAS ENZIMAS COLINESTERASES

A ação inibitória de um determinado composto em relação às enzimas colinesterases pode ser investigada através da realização de testes *in vitro*.

O Teste de Ellman é reconhecido no meio acadêmico por sua eficiência na identificação de potenciais inibidores das enzimas AChE e BuChE e tem sido amplamente empregado nestes estudos.

Já o teste através do método de Ressonância Magnética Nuclear, recentemente desenvolvido e publicado pelo nosso grupo de pesquisa, tem se mostrado uma excelente metodologia para a avaliação da capacidade inibitória de compostos orgânicos.

1.3.1 TESTE DE ELLMAN

O método fotométrico de Ellman descrito em 1961 é muito divulgado e utilizado em diversas análises atualmente.

Este método determina a atividade anticolinesterásica através da determinação taxa de produção de tiocolina à medida que a acetiltiocolina é hidrolisada pela acetilcolinesterase.

A hidrólise da acetiltiocolina pela AChE produz tiocolina e o ânion acetato. A tiocolina reage com o reagente de Ellman, ácido 5,5 – ditiobis-2-nitrobenzóico (DTNB), formando o composto TNB de coloração amarela, que pode ser detectado espectrometricamente. Quando um composto capaz de inibir a AChE está presente no meio reacional é observada variação da coloração amarela, devido a não formação ou diminuição da formação de TNB. A taxa da produção do composto colorido é realizada em espectrofotômetro UV/VIS em 412 ou 405nm. Este método é bastante sensível e pode ser aplicado a pequenas quantidades de tecido e em baixas concentrações da enzima. As reações químicas que ocorrem no teste de Ellman podem ser observadas na FIG. 1. 29 (ELLMAN, 1961).

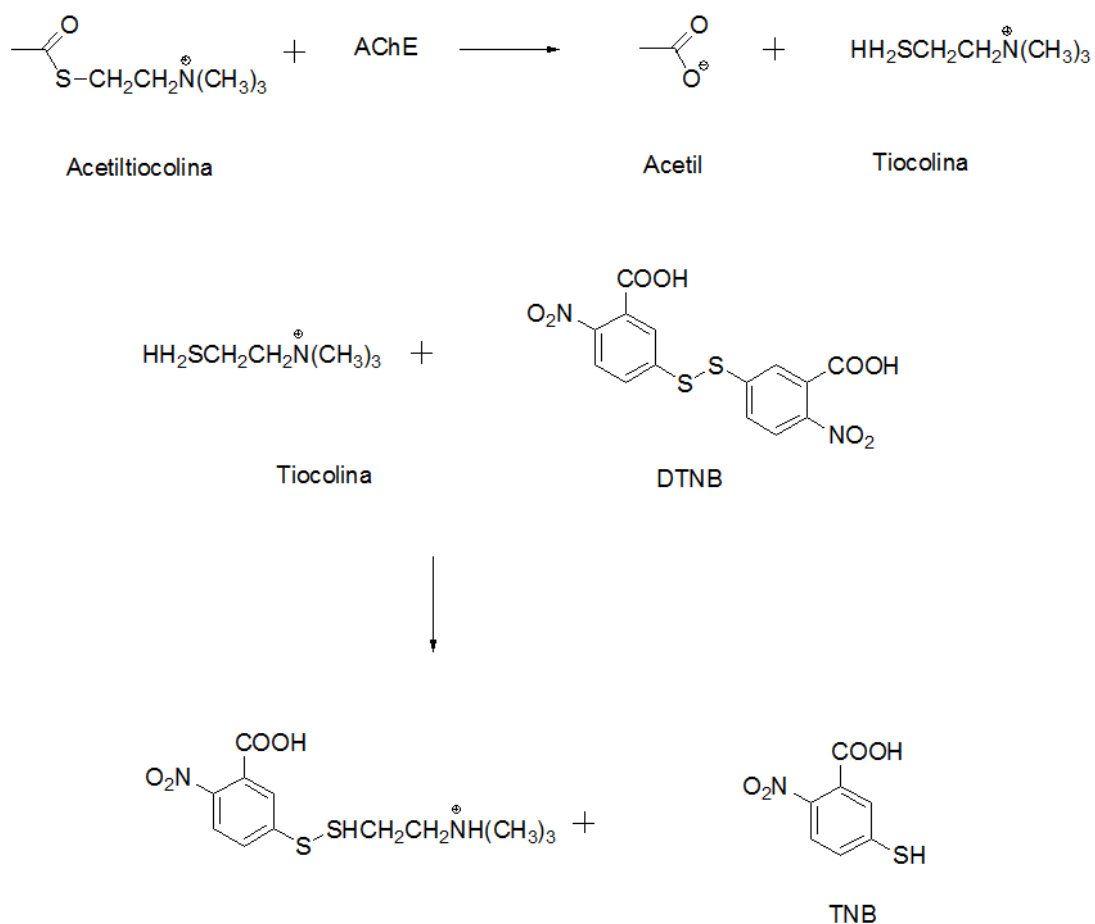


FIG. 1.29 Reações químicas ocorridas no método de Ellman (adaptado de ELLMAN *et al.*, 1961)

1.3.2 TESTE PELO MÉTODO DE RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR (SOARES *et al.*, 2013)

Estudos de inibição enzimática normalmente são conduzidos utilizando métodos de espectroscopia de UV-visível, mas alguns destes métodos requerem a utilização de substratos diferentes para testar a enzima. Por exemplo, o teste de Ellman utiliza a acetiltiocolina em vez de acetilcolina (ACh) como substrato para a acetilcolinesterase (AChE). Apesar da acetiltiocolina também ser um substrato da AChE, sua utilização em testes de inibição enzimática que visam a avaliação da capacidade da AChE processar a ACh em presença do composto de interesse pode levar a variações consideráveis nos resultados destes testes.

Uma boa alternativa aos métodos de UV-visível é a utilização de Ressonância Magnética Nuclear. A espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) é uma das técnicas mais poderosas para estudos de interação ligante-proteína, sendo um método eficiente para determinar e quantificar interações intermoleculares, tornando-se assim um método muito seguro para os estudos de cinética de inibição enzimática.

A principal vantagem do método de RMN é sua precisão, em especial na detecção e diferenciação do substrato da enzima, produtos e potenciais inibidores. A desvantagem da utilização de RMN em comparação com métodos de UV-visível é o fato de que o primeiro é um método menos sensível, requerendo concentrações relativamente mais elevadas e tempos mais longos de teste.

No método por RMN desenvolvido por nosso grupo de pesquisa, a espectroscopia de RMN de ^1H é utilizada para acompanhar a inibição da AChE, já que esta técnica torna o método simples e eficaz, podendo ser aplicado em estudos para o desenvolvimento de potenciais fármacos para o tratamento da doença de Alzheimer.

Este método acompanha a hidrólise da acetilcolina pela AChE que conduz inicialmente à formação de colina (Ch) e acetato. Este processo é monitorado pela integração dos sinais dos grupos metila da ACh em 2,24 ppm, que diminuem com o tempo, e de acetato em 2,16 ppm, que aumentam com o tempo (FIG. 1.30).

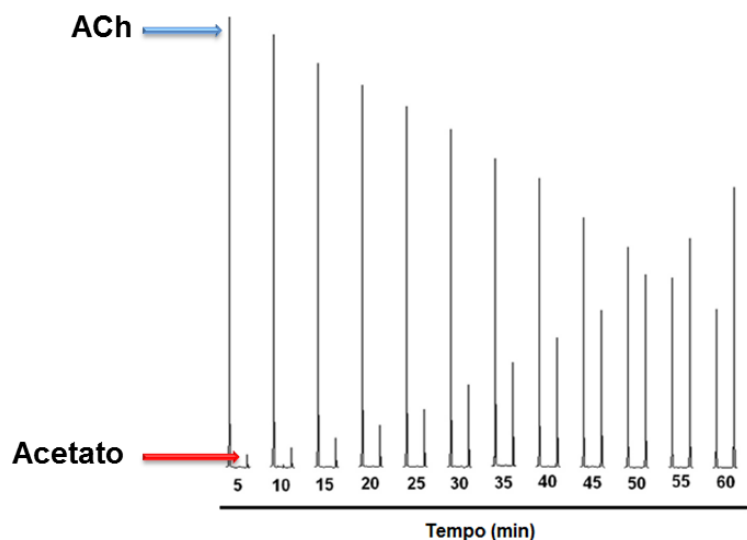


FIG. 1.30 Exemplo da variação dos sinais do grupo metila da acetilcolina e do acetato na pela ação da AChE em condições inibitórias (adaptado de SOARES *et al.*, 2013)

Após a integração dos sinais dos espectros de RMN ^1H e o devido tratamento dos dados obtidos, é possível estimar as concentrações finais de ACh e seu percentual de inibição pela AChE na presença do composto de interesse em função do tempo (FIG. 1.31).

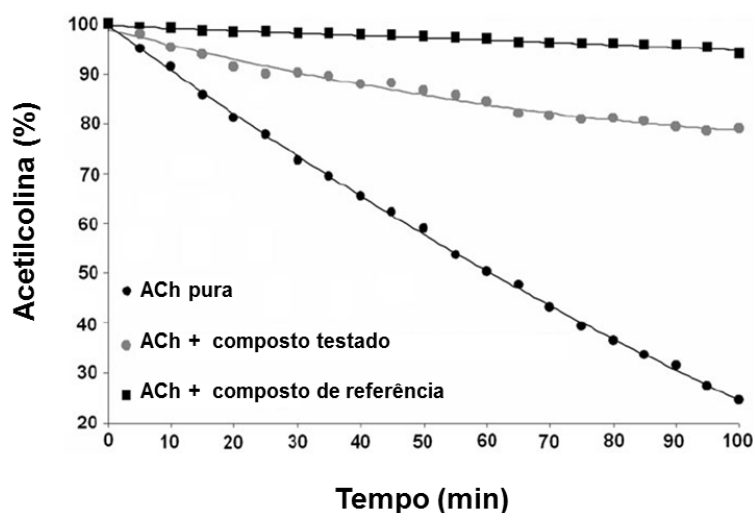


FIG. 1.31 Inibição da AChE utilizando o composto de interesse em comparação com um composto de referência em função do tempo (adaptado de PETRONILHO *et al.*, 2015)

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Este trabalho tem como objetivo sintetizar quinolinas e guanil-hidrazonas derivadas do 1,3-benzodioxole-5-carboxaldeído e a avaliação destes compostos como potenciais inibidores da acetilcolinesterase.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Sintetizar quinolinas que apresentem similaridade estrutural com a tacrina, além de algumas guanil-hidrazonas, que possam apresentar ação farmacológica semelhante ao fármaco de referência;
- Verificar se os compostos são capazes de inibir enzimas colinesterases através de estudos de cinética enzimática utilizando Ressonância Magnética Nuclear.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 PLANEJAMENTO

As sínteses deste trabalho foram planejadas utilizando a tacrina como protótipo. Para a obtenção de quinolinas similares estruturalmente à tacrina, as sínteses destas moléculas devem ser conduzidas de modo que permitam a formação dos anéis aromáticos presentes na tacrina (FIG. 3.1). A obtenção destes anéis é fundamental para que ocorra interações entre o fármaco e o sítio ativo da AChE.

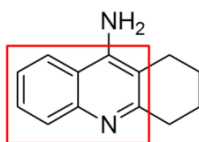


FIG. 3.1 Anéis responsáveis pela interação da tacrina com o sítio ativo da AChE

Outra hipótese para compostos análogos à tacrina consiste na síntese de moléculas semelhantes ao tautômero protonado deste fármaco (FIG. 3.2). Além da interação permitida pelo anel aromático, neste caso, a presença do nitrogênio protonado também permite a interação dos compostos de interesse através da formação de ligações de hidrogênio.

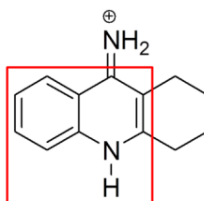


FIG. 3.2 Tautômero da tacrina contendo átomo de nitrogênio protonado capaz de realizar interações de hidrogênio com o aminoácido His440 da tríade catalítica do sítio ativo da AChE

Adicionalmente, planejou-se a síntese de algumas guanil-hidrazonas para que fossem testadas quanto à sua capacidade de interagir com a AChE inibindo-a. Como as guanil-hidrazonas possuem um grupo catiônico, o grupo guanidina (FIG. 3.3), acredita-se que estas moléculas sejam capazes desenvolver interações eficientes com o sítio aniônico da AChE.

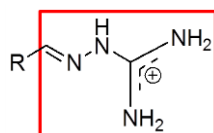


FIG. 3.3 Região positiva das guanil-hidrazonas com possibilidade de interação com o sítio aniônico da AChE

Um esquema geral das sínteses realizadas neste trabalho pode ser observado na FIG. 3.4.

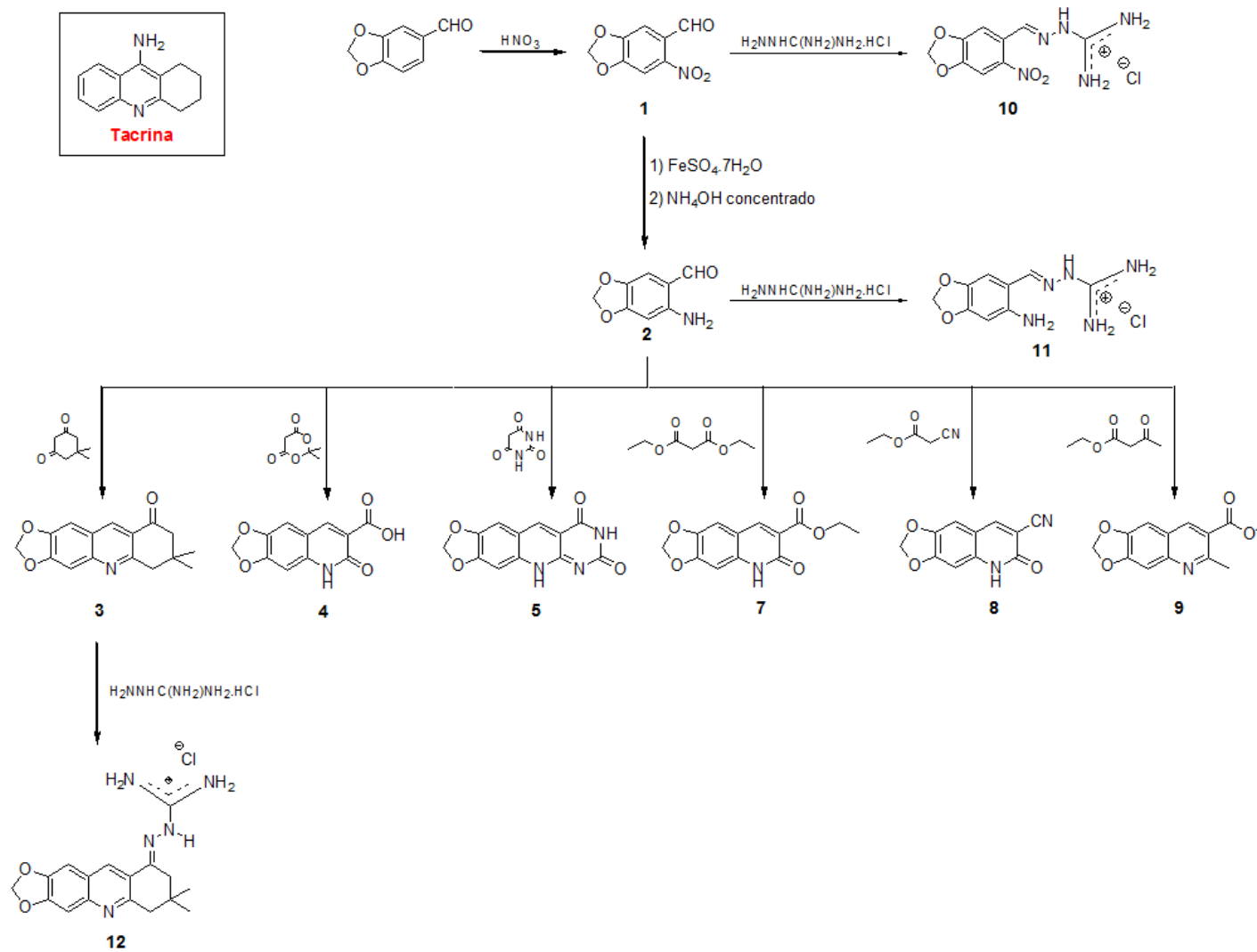


FIG. 3.4 Esquema geral das sínteses propostas

3.2 MATERIAIS UTILIZADOS NAS SÍNTESES

Os equipamentos utilizados nas sínteses dos compostos encontram-se na TAB. 3.1.

TAB. 3.1 Relação de equipamentos utilizados nas sínteses

Equipamento	Marca	Modelo
Aparelho de ponto de fusão	Fisatom	430
Balança Analítica	Marte	AS 5500
Bomba de Vácuo	Fisatom	830
Espectrômetro de Infravermelho	Shimadzu	Prestige 21
Espectrômetro de Ressonância Magnética Nuclear	Varian 600 MHz	Premium Compact
Evaporador Rotatório	IKA	RV10
Placa de aquecimento e agitação magnética	IKA	C-MAG

Os solventes foram utilizados como foram adquiridos, não sendo necessário nenhum tratamento prévio.

Tanto os solventes quanto os reagentes utilizados para as sínteses dos compostos tiveram seu grau de pureza determinados pelos fabricantes (TAB. 3.2).

TAB. 3.2 Relação de reagentes e solventes utilizados nas sínteses

Reagentes/Solventes	Fabricante	Grau de pureza
Acetato de etila	Vetec	PA
Acetoacetato de etila	Merck	98%
Acetona	Vetec	PA
Ácido barbitúrico	AcrósOrganics	99%
Ácido clorídrico	Vetec	PA
Ácido de Meldrum	Aldrich	98%
Água destilada	-	-
Benzeno	Vetec	99,5%
Butanol	Vetec	PA
Cianoacetato de etila	Merck	98%
Cicloexano	Vetec	PA
Cloridrato de aminoguanidina	AcrósOrganics	98%
Clorofórmio	Vetec	PA
Dimedona	Aldrich	95%
Dimetilsulfóxido- d_6	Cambridge Isotope	99,9%
Dioxano	Vetec	PA
Etanol	Vetec	95%
Hexano	Vetec	PA
Hidróxido de amônio	Vetec	24-26% PA
Malonato de dietila	Aldrich	99%
Metanol	Vetec	PA
Piperonal	-	-
Sílica gel 230-400 mesh	Vetec	100%
Sílica gel PF 2554 c/13% de gesso	Vetec	100%
Sulfato ferroso heptaidratado	Controltec	PA
Trietilamina	Vetec	OS

3.3 MÉTODOS CROMATOGRÁFICOS

Todas as etapas de síntese foram acompanhadas através de cromatografia de camada delgada (CCD). A CCD foi realizada utilizando cromatofolhas de sílica gel 60 F₂₅₄ com espessura de 0,2 mm de camada em alumínio da marca Merck. Para a revelação das placas cromatográficas, foi utilizada uma câmara para revelação de CCD equipada com lâmpadas de UV com comprimentos de onda de 254 e 365 nm.

Também foi utilizada cromatografia em coluna na tentativa de separação dos compostos. A coluna foi preparada utilizando sílica gel de 40-63 µm (230-400 mesh) da marca Vetec como fase estacionária e uma mistura de hexano e acetato de etila (7:3) ou ciclohexano e acetato de etila (4:1) como fase móvel.

3.4 MÉTODOS DE CARACTERIZAÇÃO E ANÁLISE

Todos os compostos sintetizados foram caracterizados por ponto de fusão e Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio e Carbono (RMN de ¹H e ¹³C), APT, gHSQC e gHMBC.

A maior parte dos compostos foi caracterizada por Espectroscopia de Infravermelho (IV). Não foi possível realizar esta análise em todos os produtos devido à danificação do espectrômetro durante o último semestre, não sendo possível que os reparos fossem realizados em tempo hábil.

Todas as análises espectroscópicas foram realizadas no Instituto Militar de Engenharia (IME).

Os pontos de fusão foram determinados utilizando um equipamento da Fisatom 430.

Os espectros de infravermelho foram obtidos em um espectrômetro Prestige 21, marca Shimadzu utilizando pastilhas de KBr anidro. Os valores para as absorções estão expressos em número de onda, utilizando como unidade o centímetro inverso (cm⁻¹).

Os espectros de RMN de ¹H (600 MHz), ¹³C (125 MHz), APT, gHSQC e gHMBC foram obtidos em um espectrômetro Varian 600/54 MHz, modelo Premium Compact, utilizando tubos de 5 mm e dimetilsulfóxido deuterado (DMSO-*d*₆) como solvente. Os

valores de deslocamento químico (δ) estão expressos em partes por milhão (ppm) e as constantes de acoplamento (J) em Hertz (Hz).

3.5 PARTE EXPERIMENTAL

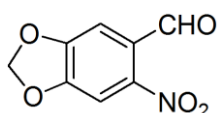
3.5.1 SÍNTESE DO 6-NITRO-1,3-BENZODIOXOLE-5-CARBOXALDEÍDO: 6-NITROPIPERONAL (**1**) (EKELEY & KLEMM, 1928; BOGERT & ELDER, 1929)

A síntese foi processada de acordo com o indicado pela literatura, mas foram necessárias algumas adaptações para que fosse obtido um melhor rendimento.

O 1,3-benzodioxole-5-carboxaldeído, também denominado piperonal, foi triturado até que fosse obtido um pó fino marrom escuro. Adicionou-se a este pó HNO_3 a 65% P.A. (20,0 g de piperonal, 100 mL de HNO_3), sob agitação constante e banho de gelo. Observou-se a formação de um composto amarelo claro.

Após cerca de 3 h, o precipitado foi filtrado e lavado com água gelada em abundância até que todo o resíduo de HNO_3 fosse retirado.

Foi realizada uma cromatografia de camada delgada, que indicou a formação de somente um produto.



Aspecto físico: sólido amarelo claro; **Ponto de fusão:** 87-89°C;
Rendimento: 91%;

RMN¹H (DMSO-*d*₆, 600 MHz): δ /ppm 10,08 (1H,s); 7,74 (1H,s); 7,32 (1H,s); 6,33(2H,s).

RMN ¹³C (DMSO-*d*₆, 125 MHz): δ /ppm 188,18; 151,89; 151,31; 145,67; 127,47; 107,04; 104,99; 104,40.

IV (KBr, cm⁻¹): 3449; 3109; 2924; 2855; 1682; 1597; 1520;1420; 1335; 1273; 1119; 1026; 879.

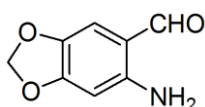
3.5.2 SÍNTESE DO 6-AMINO-1,3-BENZODIOXOLE-5-CARBOXALDEÍDO: 6-AMINOPIPERONAL (**2**) (JACOBS & HEIDELBERGER, 1917; CAMPBELL *et al.*, 1951)

Da mesma forma como ocorreu com a síntese do 6-nitropiperonal, a síntese do 6-aminopiperonal (composto **2**) foi processada de acordo com o indicado pela literatura, mas também foram necessárias algumas adaptações para que fosse obtido um melhor rendimento.

Solubilizou-se 1,00 g do composto **1** em 50,0 mL de etanol 50% em ebulição. Adicionou-se a esta solução, 10 g de sulfato ferroso heptaidratado solubilizado em 50,0 mL de água destilada em ebulição e deixou-se com aquecimento durante um minuto. Após este tempo, foram adicionadas alíquotas de 1,00 mL de NH₄OH concentrado, respeitando-se um intervalo de cerca de 30 s entre uma alíquota e outra, até o total de 13,0 mL, e após a adição completa, deixou-se a aproximadamente 100 °C durante 10 min.

A solução amarela obtida após filtragem foi arrefecida em banho de gelo durante algumas horas e houve a precipitação de um composto amarelo escuro. O produto foi recristalizado em água destilada, obtendo-se finas agulhas amarelo escuro.

Para que fosse obtido um rendimento satisfatório da reação, foi necessário manter todas as vidrarias e papéis de filtro envolvidos na síntese e nas filtrações à alta temperatura. Caso contrário, o composto preto endurecia-se e prendia entre suas camadas o produto de interesse, sendo impossível sua posterior retirada.



Aspecto físico: sólido amarelo escuro; **Ponto de fusão:** 108-110°C; **Rendimento:** 77%;

RMN¹H (DMSO-*d*₆, 600 MHz): δ/ppm 9,54 (1H,s); 7,24 (2H,bs); 6,98 (1H,s); 6,31 (1H,s); 5,96 (2H,s).

RMN¹³C (DMSO-*d*₆, 125 MHz): δ/ppm 190,49; 153,55; 150,12; 138,10; 110,95; 110,66; 101,26; 95,18.

IV (KBr, cm⁻¹): 3418; 3318; 2909; 2855; 1651; 1574; 1481;1420; 1265; 1227; 1088; 1034; 933; 856.

3.5.3 SÍNTESE DOS DERIVADOS QUINOLÍNICOS

3.5.3.1 SÍNTESES UTILIZANDO CATÁLISE ÁCIDA (CONTELLES *et al.*, 2009)

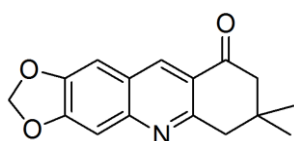
3.5.3.1.1 SÍNTESE DO 7,8-DIIDRO-7,7-DIMETIL-1,3-DIOXOLO[4,5-B]ACRIDIN-9(6H)-ONA (**3**)

Solubilizou-se 1 mmol de dimedona (0,140 g) em 20,0 mL de dioxano em um balão tritubulado e adicionou-se a esta solução 1 mmol de 6-aminopiperonal (composto **2**) (0,165 g) solubilizado em 20,0 mL de dioxano e deixou-se em refluxo durante 72 h.

Realizou-se uma CCD e observou-se a presença dos reagentes e a formação de um produto.

Deixou-se a solução sob refluxo durante outras 72 h e, através de CCD, verificou-se que os reagentes ainda estavam presentes em solução.

Foi necessário separar o produto dos reagentes através de uma coluna e este apresentou-se na forma de um sólido marrom escuro.



Aspecto físico: sólido marrom; **Ponto de fusão:** 176-178°C;
Rendimento: 68%;

RMN¹H (DMSO-*d*₆, 600 MHz): δ /ppm 8,56 (1H,s); 7,44 (1H,s); 7,25 (1H,s); 6,17 (2H,s); 2,99 (2H,s); 2,50 (2H,s); 0,96 (6H,s).

RMN ¹³C (DMSO-*d*₆, 125 MHz): δ /ppm 197,84; 159,23; 153,27; 148,91; 148,01; 134,32; 123,70; 104,76; 104,47; 102,86; 52,04; 46,21; 32,89; 28,26.

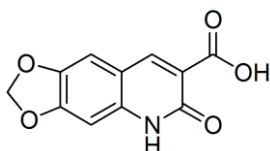
IV (KBr, cm⁻¹): 3449; 3032; 2924; 1682; 1589; 1497;1458; 1242;1219; 1042;957.

3.5.3.1.2 SÍNTESE DO ÁCIDO 5,6-DIIDRO-6-OXO-1,3-DIOXOLO[4,6g]QUINOLINA-7-CARBOXÍLICO (4)

Foi adicionado a um balão tritubulado 1 mmol do composto **2** (0,165 g), que foi solubilizado e aquecido em 20,0 mL de dioxano. Adicionou-se a esta solução 1 mmol de ácido de Meldrum (0,144 g) solubilizado em 20,0 mL de dioxano e manteve-se a solução sob refluxo.

Após alguns dias, observou-se através de CCD a formação mínima de produto e a presença dos reagentes em solução. Por isso, cogitou-se a possibilidade da necessidade de uma catálise ácida.

Adicionou-se à solução 16 gotas de HCl 6 M e manteve-se sob refluxo e a temperatura anterior. Após 16 h, observou-se que foi formado um único produto acinzentado.



Aspecto físico: sólido marrom; **Ponto de fusão:** >300°C;

Rendimento: 56%;

RMN¹H (DMSO-*d*₆, 600 MHz): δ /ppm 14,85 (1H,s); 13,14 (1H,bs); 8,81 (1H,s); 7,51 (1H,s); 6,98 (1H,s); 6,21 (2H,s).

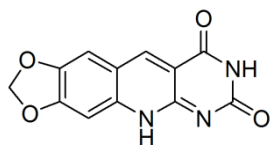
RMN ¹³C (DMSO-*d*₆, 125 MHz): δ /ppm 164,99; 163,73; 153,60; 145,37; 145,10; 138,01; 114,44; 113,94; 106,23; 102,84; 95,41.

IV (KBr, cm⁻¹): 3441; 2924; 1705; 1628;1458; 1381; 1250; 1157; 1034; 926.

3.5.3.1.3 SÍNTESE DO 1,3-DIOXOLO[4,5-G]PIRIMIDO[4,5-B]QUINOLINA-7,9(6H, 8H)-DIONA (5)

Adicionou-se a um balão tritubulado, contendo 20,0 mL de butanol, 1 mmol do composto **2** (0,165 g) e, em seguida, verteu-se sobre esta solução uma solução contendo 1 mmol de ácido barbitúrico (0,128 g) em 20 mL de butanol. Acrescentou-

se 15 gotas de HCl 6 M e manteve-se sob refluxo por 4 h. Observou-se a formação de um precipitado rosado.



Aspecto físico: sólido rosa; **Ponto de fusão:** >300°C;
Rendimento: 62%;

RMN¹H (DMSO-*d*₆, 600 MHz): δ /ppm 11,55 (1H,bs); 11,39 (1H,s); 8,74 (1H,s); 7,50 (1H,s); 7,19 (1H,s); 6,24 (2H,s).

RMN ¹³C (DMSO-*d*₆, 125 MHz): δ /ppm 162,25; 153,53; 150,49; 148,94; 148,57; 146,62; 136,61; 121,18; 108,28; 103,88; 103,04; 102,42.

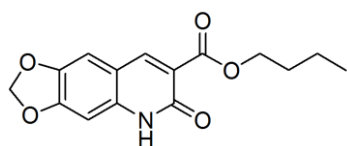
IV (KBr, cm⁻¹): 3441; 3048; 2847; 1728; 1674; 1612; 1474;1389; 1281; 1242; 1034; 934; 841.

3.5.3.2 SÍNTESES UTILIZANDO CATÁLISE BÁSICA

3.5.3.2.1 SÍNTESE DO BUTIL 6-OXO-5,6-DIIDRO-[1,3]DIOXOLO[4,5-G]QUINOLINA-7-CARBOXILATO (**6**) E DO ETIL 6-OXO-5,6-DIIDRO-[1,3]DIOXOLO[4,5-G]QUINOLINA-7-CARBOXILATO (**7**) (CORMA & MARTIN-ARANDA, 1991)

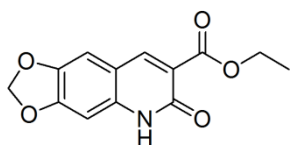
Adicionou-se 1 mmol do composto **2** (0,165 g) solubilizado em 10,0 mL de butanol a um balão tritubulado e, em seguida, uma solução contendo 1 mmol de malonato de dietila em 10,0 mL de butanol.

Após refluxo de 72 h, verificou-se a formação de um precipitado verde claro, que foi filtrado, lavado e seco.



RMN¹H (DMSO-*d*₆, 600 MHz): δ /ppm 11,91 (1H,s); 8,37 (1H,s); 7,32 (1H,s); 6,80 (1H,s); 6,17(2H,s); 4,19 (2H,t,7,0 Hz); 1,69 (2H,qui,7,0 Hz) ; 1,41 (3H,sex,7.0 Hz); 0,92(3H,t,7,0 Hz).

RMN ¹³C (DMSO-*d*₆, 125 MHz): δ/ppm 164,56; 158,36; 152,32; 143,79; 143,69; 138,41; 119,14; 112,04; 106,03; 102,22; 94,57; 64,05; 30,30; 18,67; 13,63.

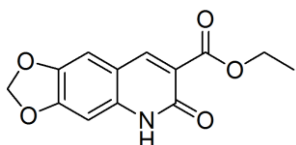


RMN¹H (DMSO-*d*₆, 600 MHz): δ/ppm 11,91 (1H,s); 8,39(1H,s); 7,31(1H,s); 6,80 (1H,s); 6,17(2H,s); 4,24(2H,qua,7,0 Hz); 1,28(3H,t,7,0 Hz).

RMN ¹³C (DMSO-*d*₆, 125 MHz): δ/ppm 164,47; 158,38; 152,34; 143,88; 143,68; 138,41; 119,08; 112,04; 106,01; 102,22; 94,57; 60,35; 14,21.

3.5.3.2.2 SÍNTESE DO ETIL 5,6-DIIDRO-6-OXO-[1,3]DIOXOLANO[4,5-G]QUINOLINA-7-CARBOXILATO (**7**) (CORMA & MARTIN-ARANDA, 1991)

Solubilizou-se 1 mmol de malonato de dietila em 10,0 mL de dioxano em um balão tritubulado e adicionou-se a esta solução 1 mmol do composto **2** (0,165 g) solubilizado em 10,0 mL de dioxano e deixou-se em refluxo durante 72 h. Observou-se a formação de um precipitado verde claro, que foi filtrado, lavado e seco.



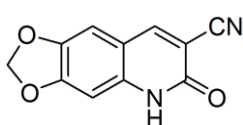
Aspecto físico: sólido verde claro; **Ponto de fusão:** 241-243°C; **Rendimento:** 71%;

RMN¹H (DMSO-*d*₆, 600 MHz): δ/ppm 11,92 (1H,s); 8,39 (1H,s); 7,31 (1H,s); 6,80 (1H,s); 6,13 (2H,s); 4,24 (2H,q, 7.0Hz); 1,28 (3H,t, 7.0Hz).

RMN ¹³C (DMSO-*d*₆, 125 MHz): δ/ppm 164,45; 158,34; 152,30; 143,82; 143,61; 138,38; 119,09; 112,02; 105,98; 102,19; 94,55; 60,32;14,18.

3.5.3.2.3 SÍNTESE DO 5,6-DIIDRO-6-OXO-[1,3]DIOXOLO[4,5-G]QUINOLINA-7-CARBONITRILA (**8**) (SIDHU & RAI, 2008)

Em um balão tritubulado, solubilizou-se 1 mmol do composto **2** (0,165 g) em 10,0 mL de benzeno e, em seguida, adicionou-se 1 mmol de cianoacetato de etila e uma quantidade catalítica de trietilamina. A solução foi mantida em agitação e refluxo por 24 h, obtendo-se um precipitado amarelo, que foi filtrado, lavado e seco.



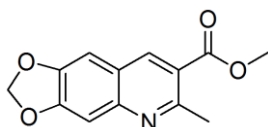
Aspecto físico: sólido amarelo claro; **Ponto de fusão:** >300°C;
Rendimento: 78%;

RMN¹H (DMSO-*d*₆, 600 MHz): δ /ppm 12,37 (1H,s); 8,51 (1H,s); 7,20 (1H,s); 6,82 (1H,s); 6,17 (2H,s).

RMN ¹³C (DMSO-*d*₆, 125 MHz): δ /ppm 158,81; 153,28; 148,23; 144,25; 138,67; 116,37; 112,38; 105,46; 102,66; 101,90; 95,18.

3.5.3.2.4 SÍNTESE DO METIL 6-METIL-[1,3]DIOXOLO[4,5-G]QUINONA-7-CARBOXILATO (**9**) (MISHRA et al., 2015)

Solubilizou-se 1 mmol do composto **2** (0,165 g) em 10,0 mL de metanol e adicionou-se a esta solução 1 mmol de acetoacetato de etila e uma quantidade catalítica de trietilamina. A solução foi mantida sob agitação e refluxo por 120 h. Obteve-se um precipitado branco que foi filtrado, lavado e seco.



Aspecto físico: sólido branco; **Ponto de fusão:** 207-209°C;
Rendimento: 53%;

RMN¹H (DMSO-*d*₆, 600 MHz): δ /ppm 8,65 (1H,s); 7,45 (1H,s); 7,30 (1H,s); 6,23 (2H,s); 3,88 (3H,s); 2,78 (3H,s).

RMN ¹³C (DMSO-*d*₆, 125 MHz): δ/ppm 166,49; 155,40; 152,53; 147,63; 146,93; 138,06; 122,25; 121,04; 104,30; 103,33; 102,37; 52,18; 24,79.

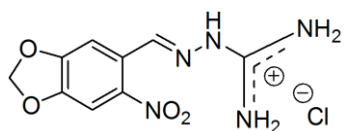
3.5.4 SÍNTESE DAS GUANIL-HIDRAZONAS (BORGES *et al*, 2004)

3.5.4.1 SÍNTESE GUANIL-HIDRAZONA DE 6-NITRO-1,3-BENZODIOXOLE-5-CARBOXALDEÍDO (**10**)

Adicionou-se 1 mmol de cloridrato de aminoguanidina (0,111 g) a um balão tritubulado e acrescentou-se 5,00 mL de etanol e 8 gotas de HCl 6 M. Deixou-se sob agitação e refluxo durante 10 min.

A esta solução, foi adicionado 1 mmol de 6-nitropiperonal (composto **1**) solubilizado em 10,0 mL de etanol e manteve-se a solução sob refluxo durante 72 h.

Observou-se a formação de um produto amarelo claro, que foi filtrado, lavado e seco.



Aspecto físico: sólido amarelo claro; **Ponto de fusão:** 294-296°C; **Rendimento:** 88%;

RMN¹H (DMSO-*d*₆, 600 MHz): δ/ppm 11,87 (1H,s); 8,14 (1H,s); 8,00 (2H,bs); 7,51 (2H,bs); 7,31 (1H,s); 6,90 (1H,s); 6,06 (2H,s).

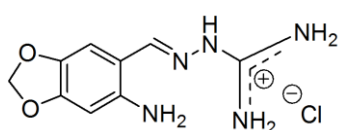
RMN ¹³C (DMSO-*d*₆, 125 MHz): δ/ppm 155,00; 149,64; 146,25; 143,49; 133,43; 114,84; 108,82; 101,97; 101,30.

IV (KBr, cm⁻¹): 3402; 2924; 1682; 1635; 1520; 1335; 1273; 1119; 1026.

3.5.4.2 SÍNTESE GUANIL-HIDRAZONA DE 6-AMINO-1,3-BENZODIOXOLE-5-CARBOXALDEÍDO (11)

Adicionou-se 1 mmol de cloridrato de aminoguanidina (0,111 g) a um balão tritubulado e acrescentou-se 5,00 mL de etanol e 8 gotas de HCl 6 M. Deixou-se sob agitação e refluxo durante 10 min.

A esta solução, foi adicionado 1 mmol de 6-aminopiperonal (composto **2**) (0,165 g) solubilizado em 10,0 mL de etanol e manteve-se a solução sob refluxo durante 72 h, obtendo-se um precipitado rosado, que foi filtrado, lavado e seco.



Aspecto físico: sólido rosado; **Ponto de fusão:** 245-247°C; **Rendimento:** 79%;

RMN¹H (DMSO-*d*₆, 600 MHz): δ /ppm 11,75 (1H,s); 8,84 (1H,s); 8,11 (2H,s); 7,19 (2H,s); 7,09 (1H,s); 6,69 (1H,s); 5,98 (2H,s).

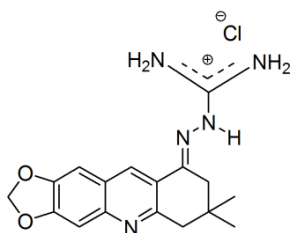
RMN ¹³C (DMSO-*d*₆, 125 MHz): δ /ppm 159,14; 154,84; 149,84; 147,85; 141,18; 111,02; 109,06; 101,44; 99,18.

IV (KBr, cm⁻¹): 3372; 3202; 2785; 1636; 1497;1412; 1273; 1227; 1034; 926.

3.5.4.3 SÍNTESE DA GUANIL-HIDRAZONA DE 7,7-DIMETIL-7,8-DIIDRO-[1,3]DIOXOLO[4,5-B]ACRIDIN-9(6H)-ONA (12)

Em um balão tritubulado solubilizou-se 1 mmol de cloridrato de aminoguanidina (0,111 g) em 10,0 mL de etanol e adicionou-se 10 gotas de HCl 6 M, mantendo-se em refluxo por 10 min.

Adicionou-se uma solução contendo 1 mmol do composto **3** (0,269 g) e 10,0 mL de etanol e manteve-se sob refluxo por 72 h. Obteve-se um precipitado amarelo escuro, que foi filtrado, lavado e seco.



Aspecto físico: sólido amarelo escuro; **Ponto de fusão:** 269-271°C; **Rendimento:** 51%;

RMN¹H (DMSO-*d*₆, 500 MHz): δ/ppm 11,63 (1H,s); 9,74 (1H,s); 8,03 (4H,bs); 7,68 (1H,s); 7,45 (1H,s); 6,39 (2H,s); 3,18 (2H,s); 2,73 (2H,s); 1,06 (6H,s).

RMN ¹³C (DMSO-*d*₆, 125 MHz): δ/ppm 156,08; 154,42; 152,58; 149,27; 146,85; 139,51; 137,40; 124,92; 123,84; 103,82; 103,39; 98,28; 56,02; 38,50; 30,49; 27,87.

IV (KBr, cm⁻¹): 3318; 2963; 2700; 1682; 1597; 1466; 1366; 1265; 1142; 1034; 933.

3.6 TESTE DE INIBIÇÃO ENZIMÁTICA

Os compostos sintetizados foram testados quanto sua capacidade de inibição enzimática da acetilcolinesterase com a intenção de verificar sua possível aplicação como protótipos para o tratamento sintomático da doença de Alzheimer.

A reação de hidrólise da acetilcolina pode ser acompanhada através de testes de inibição via RMN. A metodologia para este teste foi desenvolvida por nosso grupo de pesquisa e tem se mostrado bastante eficaz na avaliação cinética da enzima acetilcolinesterase (AChE) (SOARES *et al.*, 2011).

Esta metodologia consiste em determinar a capacidade da enzima de processar seu substrato natural, a acetilcolina (ACh), quando exposta a condições inibitórias que, neste caso, corresponde à interação com os compostos sintetizados, que poderão impedir o acesso ao seu sítio ativo. A avaliação cinética por RMN monitora os grupos metila da acetilcolina e do acetato (FIG. 3.5) (SOARES *et al.*, 2011).

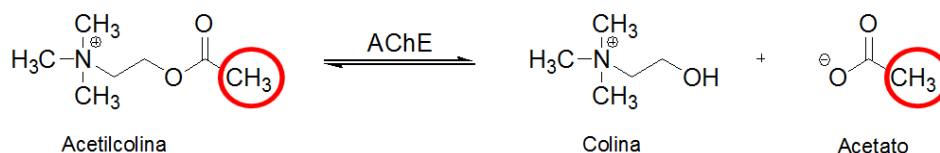


FIG. 3.5 Hidrólise da acetilcolina

Esta escolha é feita porque os grupos metila aparecem em regiões limpas e distintas, porém próximas, e na forma de simpletos no espectro de RMN ^1H . Devido à relação estequiométrica, para cada mol de acetilcolina que desaparece do meio reacional, é gerado um mol de acetato, fazendo com que a integração dos sinais das duas espécies seja direta. Outros grupos poderiam ser monitorados, mas estes grupos, além de não se apresentarem em formas de simpletos, estão em regiões menos limpas do espectro, dificultando a integração de seus sinais (SOARES *et al.*, 2011).

Os espectros utilizados como referência são aqueles da reação entre a AChE (que neste caso é utilizada a do peixe elétrico *Electrophorus electricus*, EeAChE, da Sigma Aldrich) e seu substrato natural, a ACh, na ausência dos compostos sintetizados. A partir da comparação com os espectros de referência, pode-se constatar as diferenças nas velocidades de reação quando os experimentos forem conduzidos na presença dos compostos sintetizados (PETRONILHO, 2011).

Após o preparo da amostra, esta deve ser inserida imediatamente no espectrômetro de RMN e, logo depois de feito o shimming, são adquiridos vários espectros de RMN de ^1H , com intervalos de 5 em 5 minutos entre cada aquisição, até o tempo total de 1 h 20 min. No final do experimento, pode-se estimar a concentração de produto formado em relação à diminuição da concentração do reagente em função do tempo. Através da observação da sequência de espectros e da integração dos sinais do reagente e do produto em um determinado tempo, é possível constatar que a reação foi processada (PETRONILHO, 2011).

4 RESULTADOS E DISCUSSÕES

4.1 SÍNTESE DO 6-NITRO-1,3-BENZODIOXOLE-5-CARBOXALDEÍDO (1) (EKELEY & KLEMM, 1928; BOGERT & ELDER, 1929)

O composto **1** foi obtido através da rota sintética apresentada na FIG. 4.1.

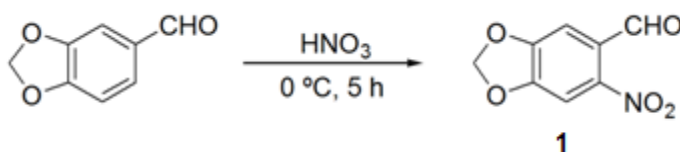


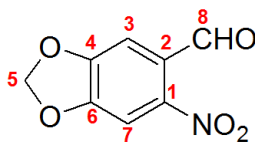
FIG. 4.1 Rota sintética para obtenção do composto 1

Esta síntese consiste na nitração do reagente de partida, o 1,3-benzodioxol-5-carbaldeído (piperonal), de acordo com a metodologia descrita pela literatura, através de uma substituição eletrofílica aromática, levando à obtenção de um sólido amarelo claro com faixa de ponto de fusão entre 87-89°C e rendimento de 91%.

A reação entre o piperonal e o HNO₃ deve ser mantida em temperatura próxima a 0 °C, já que em maiores temperaturas observa-se a formação de um segundo produto, o ácido piperonílico, gerando uma mistura de produtos e diminuindo o rendimento do produto de interesse.

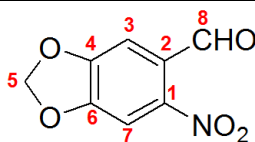
O composto **1** foi caracterizado por Espectroscopia de Infravermelho e Ressonância Magnética Nuclear através de RMN de ¹H, RMN de ¹³C, gHMBC, gHSQC e APT.

Na caracterização por ¹H observou-se quatro simpletos, um em 10,1 ppm referente ao grupo carbonila do aldeído, dois referentes a prótons de anel aromático, um mais desblindado em 7,74 ppm referente ao grupo CH mais próximo ao grupo NO₂ e o outro em 7,32 ppm referente ao grupo CH mais próximo ao grupo aldeído, e o último simpleto em 6,33 ppm referente ao CH₂ do anel 1,3-dioxole. Os assinalamentos de todos os hidrogênios encontram-se na TAB. 4.1.

TAB. 4.1 Assinalamento do espectro de RMN de ¹H do composto 1

H	δ_H	gHSQC	gHMBC
H-3	7,32 (1H,s)	107,04	188,19; 151,89; 151,31; 145,67; 104,40
H-5	6,33 (2H,s)	104,40	151,89; 151,31
H-7	7,74 (1H,s)	104,99	188,19; 151,89; 145,67; 127,47
H-8	10,08 (1H,s)	188,18	151,31; 127,47; 107,04

No espectro de RMN ¹³C observa-se um sinal mais desblindado em 188,2 ppm referente a C-8 que está presente na carbonila do grupo aldeído. Em seguida, pode-se verificar a presença dos outros três sinais consideravelmente desblindados devido à grande proximidade entre átomos de carbono e átomos de oxigênio em 151,9, 151,3 e 145,7 ppm, referentes aos carbonos C-6, C-4 e C-1, respectivamente. Os assinalamentos de todos os carbonos encontram-se na TAB. 4.2.

TAB. 4.2 Assinalamento do espectro de RMN de ¹³C do composto 1

C	δ_C	APT
C-1	145,67 (-)	C
C-2	127,47	C
C-3	107,04 (+)	CH
C-4	151,31 (-)	C
C-5	104,40	CH ₂
C-6	151,89	C
C-7	104,99(+)	CH
C-8	188,18 (+)	CH

Os deslocamentos químicos de todos os carbonos foram confirmados a partir de experimentos de gHMBC e gHSQC. Nas tabelas apresentadas ao longo deste trabalho, os sinais mostrados no gHMBC em negrito são os de maior interação e os azuis são os menos eficientes. Normalmente, os sinais mais fortes no gHMBC são a três ligações e os mais baixos são a 4 ligações, sendo que a duas ligações normalmente o sinal é intermediário ou baixo.

As principais absorções observadas nos espectro de IV encontram-se na TAB. 4.3.

TAB. 4.3 Principais absorções de IV do composto 1

Absorção (cm⁻¹)	Características
3449	v O-H
3109, 2924 e 2855	v C-H de C sp ²
1682	v C=O de aldeído
1597 e 1420	v C=C de C aromático
1520	v NO ₂
1335	v NO ₂
1273 e 1026	v C-O de éter
879	δ C-H fora do plano

A absorção encontrada em 1682 cm⁻¹ refere-se ao estiramento C=O da carbonila do grupo aldeído em conjugação com uma ligação C=C do anel aromático. Foram observadas duas absorções referentes a estiramento das ligações do grupo -NO₂, em 1520 e 1335 cm⁻¹. As absorções em 1273 e 1026 cm⁻¹ referem-se ao estiramento das ligações C-O do éter do anel 1,3-dioxole. Já as absorções em 3109, 2924 e 2855 cm⁻¹ referem-se ao estiramento das ligações de carbonos sp² de anel aromático e a absorção em 879 cm⁻¹ refere-se ao dobramento fora do plano da ligação C-H do anel aromático. A absorção presente em 3449 cm⁻¹ refere-se ao estiramento da ligação O-H, indicando que o produto encontra-se hidratado (PAVIA *et al.*, 2013).

4.2 SÍNTESE DO 6-AMINO-1,3-BENZODIOXOLE-5-CARBOXALDEÍDO (2) (JACOBS & HEIDELBERGER, 1917; CAMPBELL *et al.*, 1951)

A rota sintética indicada pela literatura para a obtenção do produto 6-amino-1,3-benzodioxole-5-carboxaldeído (composto 2) pode ser observada na FIG. 4.2.

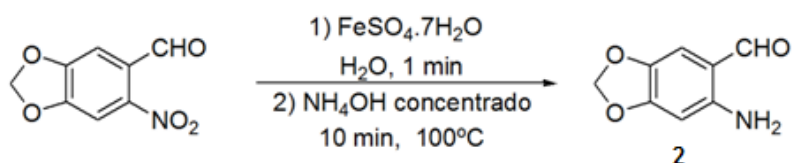


FIG. 4.2 Rota sintética para obtenção do composto 2

O composto 2 foi obtido como um sólido amarelo escuro com faixa de ponto de fusão entre $108\text{-}110^\circ\text{C}$ e com rendimento de 77%.

Nesta reação ocorre a redução do grupo nitro levando à formação do grupo amino. A redução ocorre através da transferência de elétrons entre o grupo nitro e o Fe^{2+} . O mecanismo proposto para a redução encontra-se na FIG. 4.3.

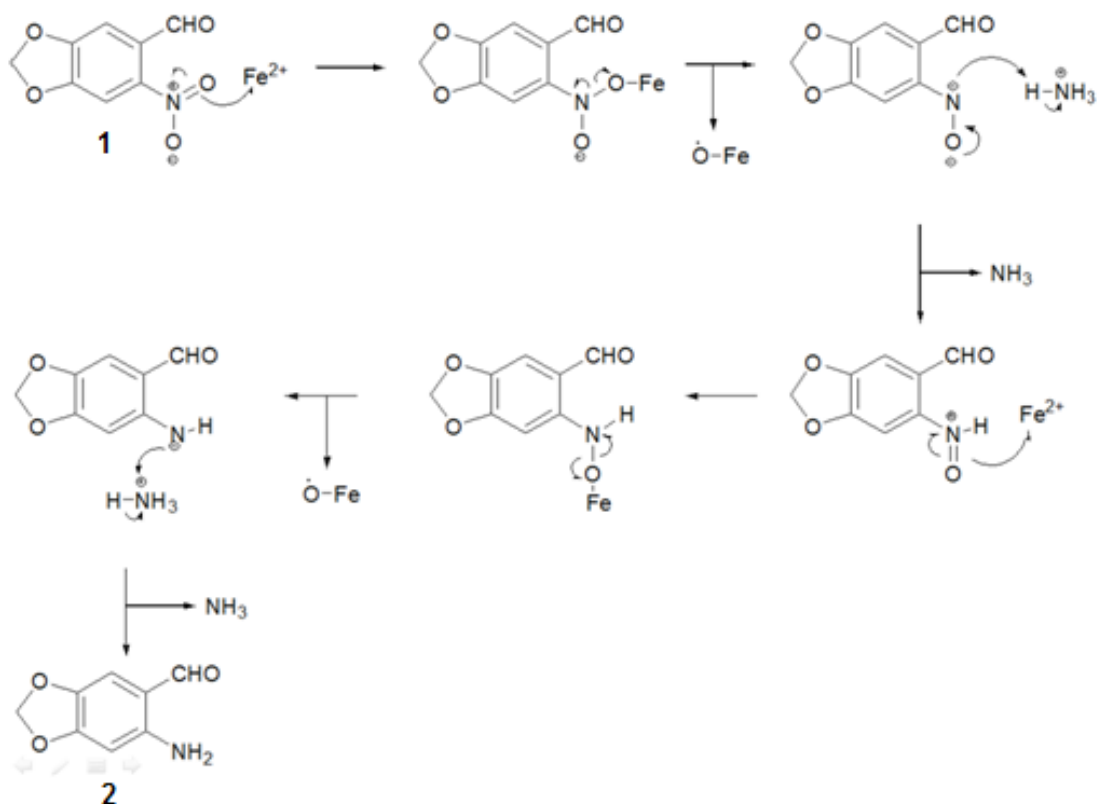
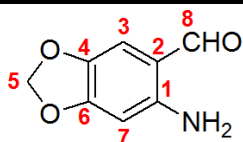


FIG. 4.3 Mecanismo de formação do composto 2

O composto **2** também foi caracterizado por IV, RMN de ^1H , RMN de ^{13}C , gHMBC, gHSQC e APT.

A análise do espectro de ^1H permitiu observar cinco simpletos. Os simpletos mais desblindados em 7,28 e 9,54 ppm relacionam-se aos prótons dos grupo NH_2 e aldeído, respectivamente; dois simpletos referentes a prótons de anel aromático, um em 6,31 ppm referente ao grupo CH mais próximo ao grupo NH_2 e o outro em 6,98 ppm referente ao grupo CH mais próximo ao grupo aldeído; por último, observa-se um simpleto referente ao grupo CH_2 do anel 1,3-dioxole. Os assinalamentos de todos os hidrogênios encontram-se na TAB. 4.4.

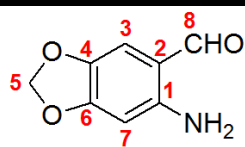
TAB. 4.4 Assinalamento do espectro de RMN de ^1H do composto 2



H	δ_{H}	gHSQC	Ghmbc
H-3	6,98 (1H,s)	110,95	190,49; 153,55; 150,12 (+); 138,10
H-5	5,96 (2H,s)	101,26	153,55 (+); 138,10
H-7	6,31 (1H,s)	95,18	153,55 (-); 138,10; 110,95
H-8	9,54 (1H,s)	190,49	150,12; 110,95
H-NH ₂	7,28 (2H,bs)	-	-

Na caracterização por ^{13}C , foi possível observar um sinal em 190,5 ppm referente a C-8 do grupo aldeído, um sinal em 101,3 ppm referente a C-5 do grupo CH_2 , além de sinais em 110,7, 110,9, 138,1, 153,5, 95,2 e 150,1 ppm referentes a C-2, C-3, C-4, C-6, C-7 e C-1 do anel aromático. Os assinalamentos de todos os carbonos encontram-se na TAB. 4.5.

TAB. 4.5 Assinalamento do espectro de RMN de ^{13}C do composto 2



C	δ_{C}	APT
C-1	150,12	C
C-2	110,66	C
C-3	110,95	CH
C-4	138,10	C
C-5	101,26	CH ₂
C-6	153,55	C
C-7	95,18	CH
C-8	190,49	CH

As principais absorções observadas nos espectro de IV encontram-se na TAB. 4.6.

TAB. 4.6 Principais absorções de IV do composto 2

Absorção (cm^{-1})	Características
3418 e 3318	ν N-H
2978, 2909 e 2885	ν C-H de C sp^2
1651	ν C=O de aldeído
1574, 1481	ν C=C de C aromático
1265 e 1034	ν C-O de éter
1227	ν C-N
933	δ C-H fora do plano
856	δ N-H fora do plano

As absorções observadas em 3418 e 3318 cm^{-1} referem-se ao estiramento da ligação N-H de amina primária, indicando a presença do grupo – NH₂. A absorção

encontrada em 1651 cm^{-1} refere-se ao estiramento C=O da carbonila do grupo aldeído em conjugação com uma ligação C=C do anel aromático. As absorções em 1265 e 1034 cm^{-1} referem-se ao estiramento das ligações C-O do éter do anel 1,3-dioxole. Já as absorções em 2978 , 2909 e 2885 cm^{-1} referem-se ao estiramento das ligações de carbonos sp^2 de anel aromático e a absorção em 933 cm^{-1} refere-se ao dobramento fora do plano da ligação C-H do anel aromático. A absorção em 856 cm^{-1} refere-se ao dobramento fora do plano da ligação N-H de uma amina (PAVIA *et al.*, 2013).

4.3 SÍNTESE DOS DERIVADOS QUINOLÍNICOS

Os derivados quinolínicos foram sintetizados a partir de condensações via reação de Friedländer entre o 6-aminopiperonal (composto **2**) e o composto carbonílico adequado.

Uma das propostas encontradas na literatura para o mecanismo de formação de quinolinas pode ser observada na FIG. 4.4 e indica que ocorre uma condensação aldólica intramolecular que leva à formação de uma hidroxímina, que ao sofrer desidratação, proporciona a obtenção do composto alvo.

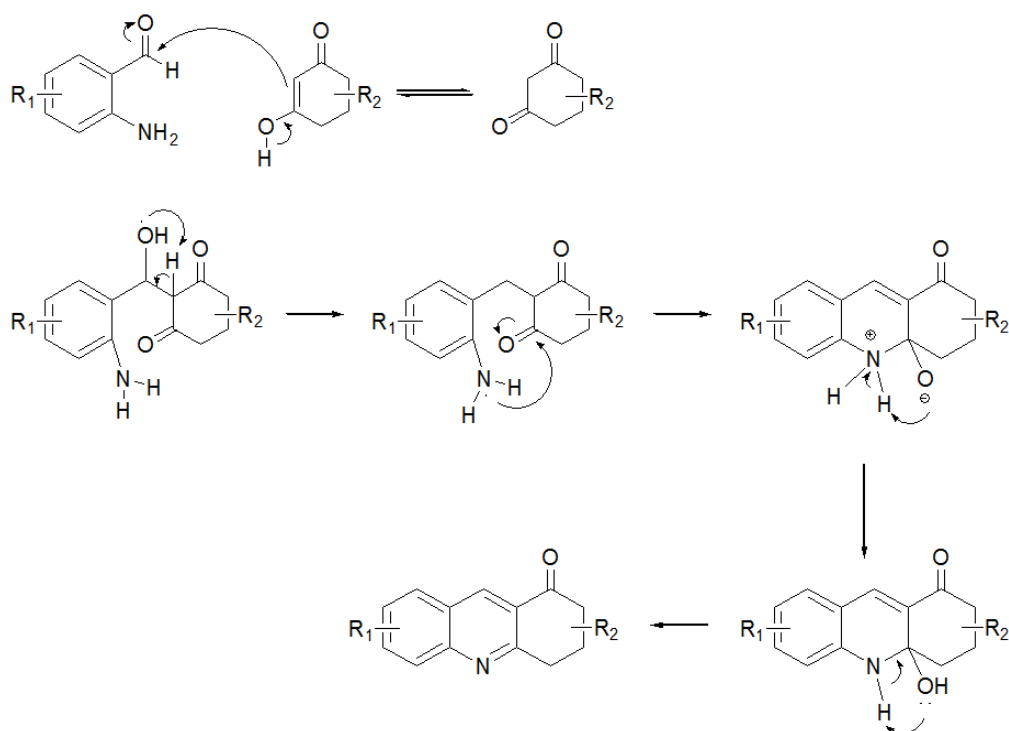


FIG. 4.4 Mecanismo geral da reação de Friedländer para a formação de quinolinas

Acredita-se que a condensação aldólica preceda à formação da hidroxímina devido à carga parcialmente positiva presente no carbono da carbonila. Desta forma, o ataque nucleofílico ocorre preferencialmente nesta região da molécula.

4.3.1 SÍNTESES UTILIZANDO CATÁLISE ÁCIDA (CONTELLES *et al.*, 2009)

Devido a características dos compostos dicarbônicos utilizados, as reações nas quais estes encontram-se envolvidos foram conduzidas em meio ácido.

A catálise ácida leva à protonação de uma das carbonilas do composto dicarbônico, permitindo, assim, a formação de uma dupla ligação dentro do anel, tornando o ataque nucleofílico à carbonila do composto **2** mais favorável. Desta forma, inicialmente forma-se a ligação aldólica e, posteriormente ocorre a formação da imina, conforme demonstrado na FIG. 4.4 (pág. 66).

4.3.1.1 SÍNTESE DO 7,8-DIIDRO-7,7-DIMETIL-1,3-DIOXOLO[4,5-B]ACRIDIN-9(6H)-ONA (**3**)

O composto **3** foi obtido como um sólido marrom com faixa de ponto de fusão entre 176-178 °C e com rendimento de 68%. Sua síntese foi processada de acordo com a rota sintética apresentada na FIG. 4.5.

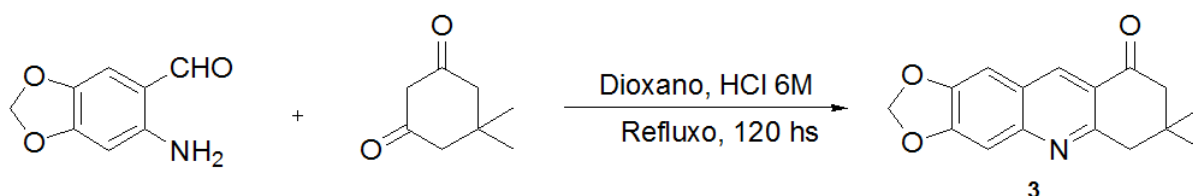
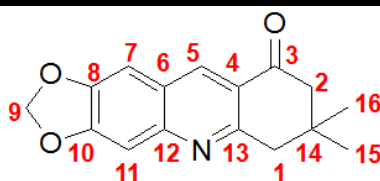


FIG. 4.5 Rota de síntese do composto 3

O composto **3** teve sua estrutura elucidada a partir das análises de IV, RMN de ^1H , ^{13}C , gHMBC, gHSQC e APT.

A caracterização por RMN de ^1H permitiu observar sete simpletos. O simpleto em 0,96 ppm corresponde aos prótons H-15 e H-16 das metilas; os sinais em 2,50, 2,99 e 6,17 ppm são referentes aos prótons H-1, H-2 e H-9, respectivamente, dos grupos CH_2 ; e os simpletos em 8,56, 7,44 e 7,25 ppm referem-se aos prótons dos anéis aromáticos. Os assinalamentos de todos os hidrogênios encontram-se na TAB. 4.7.

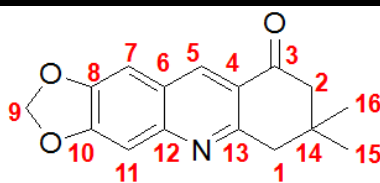
TAB. 4.7 Assinalamento do espectro de RMN de ¹H do composto 3



H	δ_H	gHSQC	gHMBC
H-1	2,50 (2H,s)	52,04	197,84; 123,70; 46,21; 32,89; 28,26
H-2	2,99 (2H,s)	46,21	197,84; 159,23; 123,70; 52,04; 32,89; 28,26
H-5	8,56 (1H,s)	134,32	197,84; 159,23; 148,91; 104,47
H-7	7,44 (1H,s)	104,47	153,27; 148,91; 148,01; 134,32
H-9	6,17 (2H,s)	102,86	153,27; 148,91
H-11	7,25 (1H,s)	104,76	153,27; 148,01; 123,70
H-15 e H-16	0,96 (6H,s)	28,26	52,04; 46,21; 32,89

Na caracterização por RMN de ¹³C, observa-se um sinal em 197,8 ppm referente ao carbono C-3 do grupo carbonila do grupo cetona; sinais em 102,9, 52,0 e 46,2 ppm referentes aos carbonos C-9, C-1 e C-2 de grupos CH₂; sinais em 123,7, 134,3, 104,5, 148,0, 153,3, 104,8, 148,9 e em 159,2 ppm referentes aos carbonos C-4 e C-6, C-5, C-7, C-8, C-10, C-11, C-12 e C-13 dos anéis aromáticos; e um sinal em 28,3 referente aos carbonos C-15 e C-16 dos grupos metila. Os assinalamentos de todos os carbonos encontram-se na TAB. 4.8.

TAB. 4.8 Assinalamento do espectro de RMN de ^{13}C do composto 3



C	δ_c	APT
C-1	52,04	CH ₂
C-2	46,21	CH ₂
C-3	197,84	C
C-4 e C-6	123,70	C
C-5	134,32	CH
C-7	104,47	CH
C-8	148,91	C
C-9	102,86	CH ₂
C-10	153,27	C
C-11	104,76	CH
C-12	148,01	C
C-13	159,23	C
C-14	32,89	C
C-15 e C-16	28,26	CH ₃

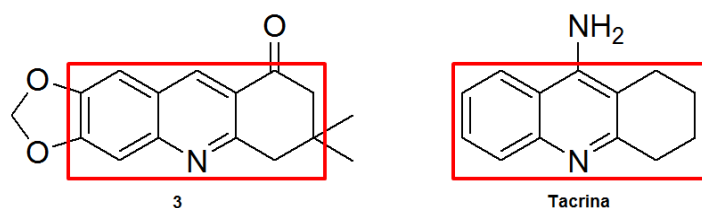
As principais absorções observadas para o composto **3** no IV encontram-se na TAB. 4.9.

TAB. 4.9 Principais absorções de IV do composto 3

Absorção (cm ⁻¹)	Características
3449	v O-H
3032	v C-H de C sp ³
2924	v C-H de C sp ²
1682	v C=O de cetona
1589, 1497 e 1458	v C=C de C aromático
1242 e 1042	v C-O de éter
957	δ C-H fora do plano

A absorção encontrada em 1682 cm⁻¹ refere-se ao estiramento C=O da carbonila do grupo cetona em conjugação com uma ligação C=C do anel aromático. As absorções em 1242 e 1042 referem-se ao estiramento das ligações C-O do éter do anel 1,3-dioxole. As absorções em 3032 e 2924 referem-se ao estiramento das ligações C-H de carbonos sp³ e sp², respectivamente, de anel aromático e a absorção em 957 refere-se ao dobramento fora do plano da ligação C-H do anel aromático. A absorção presente em 3449 cm⁻¹ refere-se ao estiramento da ligação O-H, indicando que o produto encontra-se hidratado (PAVIA *et al.*, 2013). Este fato já era esperado já que, neste caso, a secagem do produto é complexa, pois ao ser exposto a altas temperaturas este é degradado.

Após a caracterização do composto **3**, foi possível observar que este apresenta a semelhança estrutural planejada em relação à tacrina, já que contém a estrutura básica deste fármaco, incluindo os dois anéis aromáticos que são responsáveis por importantes interações com o sítio ativo da AChE (FIG. 4.6). Por isso, acredita-se que o composto **3** seja capaz de interagir com a AChE de modo semelhante ao realizado pela tacrina.

**FIG. 4.6 Semelhança estrutural entre o composto 3 e a tacrina**

4.3.1.2 SÍNTESE DO ÁCIDO 5,6-DI-IDRO-6-OXO-1,3-DIOXOLO[4,6G]QUINOLINA-7-CARBOXÍLICO (**4**)

O composto **4** foi obtido como um sólido marrom com ponto de fusão maior que 300 °C e rendimento de 56%. A rota sintética seguida para a obtenção do composto **4** encontra-se na FIG. 4.7.

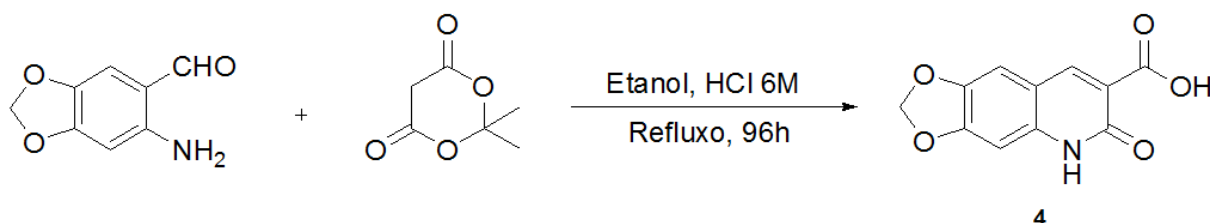


FIG. 4.7 Rota de síntese do composto **4**

Inicialmente, esta síntese foi processada utilizando como dioxano como solvente. Como o rendimento obtido foi muito baixo, optou-se pela síntese utilizando etanol como solvente, o que permitiu um melhor rendimento.

Para a formação do composto **4**, após a condensação aldólica e a formação da hidroxi-imina, é necessário que ocorra a hidrólise do anel oriundo do ácido de Meldrum, levando à eliminação de uma molécula de cetona. O mecanismo de formação do composto **4** pode ser observado na FIG. 4.8.

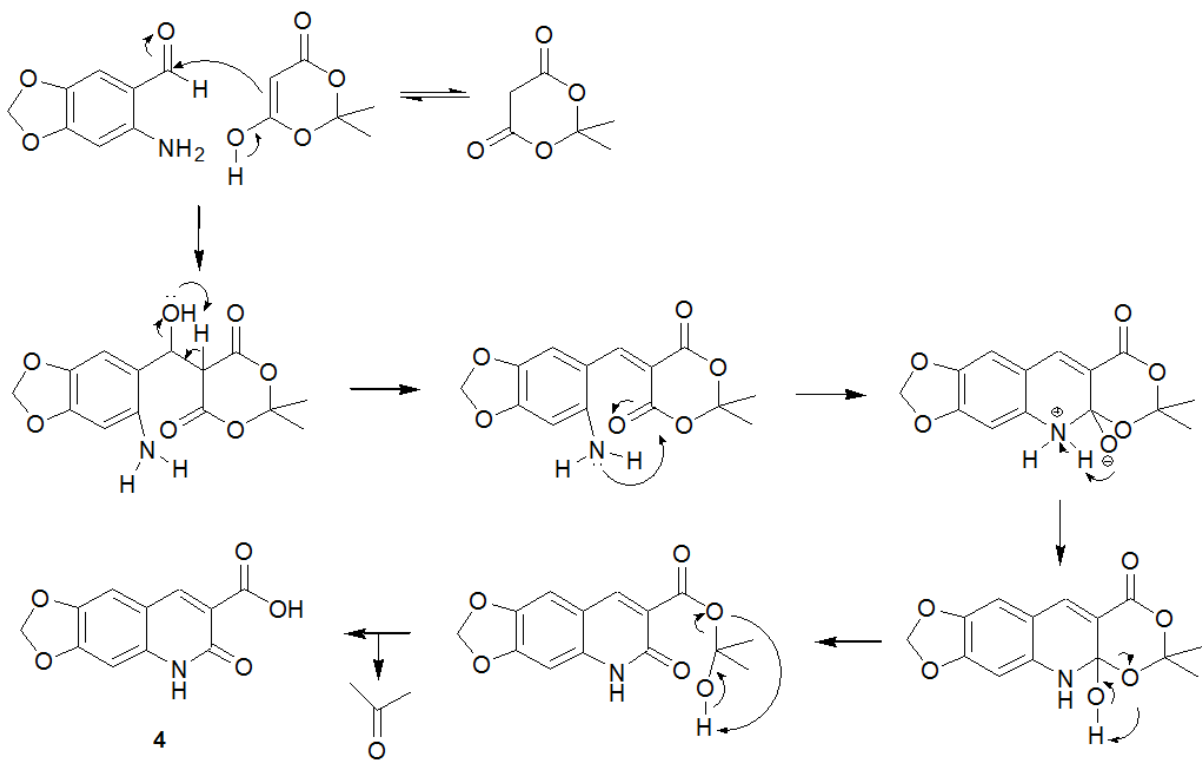
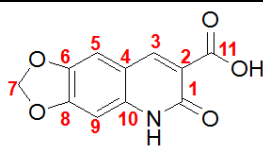


FIG. 4.8 Mecanismo proposto para a formação do composto 4

O composto **4** teve sua estrutura elucidada a partir das análises de IV, RMN de ^1H , ^{13}C , gHMBC, gHSQC e APT.

Analisando o espectro de ^1H , é possível observar seis simpletos. Os simpletos mais desblindados em 14,9 e 13,1 ppm relacionam-se aos prótons dos grupo NH e da hidroxila do grupo ácido carboxílico, respectivamente; os simpletos referentes a prótons de anel aromático são vistos em 8,81, 7,51 e 6,98 ppm e são referentes ao H-3 H-5 e H-9, respectivamente; por último, observa-se um simpleto referente ao grupo CH_2 do anel 1,3-dioxole em 6,21 ppm. Os assinalamentos de todos os hidrogênios encontram-se na TAB. 4.10.

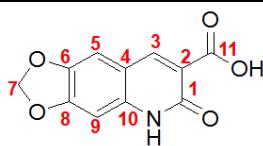
TAB. 4.10 Assinalamento do espectro de RMN de ^1H do composto 4



H	δ_{H}	gHSQC	gHMBC
H-3	8,81 (s,1H)	145,37	164,99; 163,73; 138,01; 113,94; 106,23
H-5	7,51 (s,1H)	106,23	153,60; 145,37; 145,10; 138,01
H-7	6,21 (s,2H)	102,85	153,60; 145,10
H-9	6,98 (s,1H)	95,41	153,60; 145,10; 138,01; 114,44
H-NH	14,85 (s,1H)	-	-
H-OH	13,14 (bs,1H)	-	-

Na caracterização por ^{13}C , observa-se um sinal em 165,0 ppm referente a C-11 do grupo ácido carboxílico, um sinal em 163,7 ppm referente a C-1 do grupo aldeído, além de sinais em 113,9, 145,4, 114,4, 106,2, 145,1, 153,6, 95,4 e 138,0 ppm referentes a C-2, C-3, C-4, C-5, C-6, C-8, C-9 e C-10 do anel aromático, e o sinal referente ao grupo CH_2 do anel 1,3-dioxole pode ser observado em 102,4 ppm. Os assinalamentos de todos os carbonos encontram-se na TAB. 4.11.

TAB. 4.11 Assinalamento do espectro de RMN de ^{13}C do composto 4



C	δ_{C}	APT
C-1	163,73	C
C-2	113,94	C
C-3	145,37	CH
C-4	114,44	C
C-5	106,23	CH
C-6	145,10	C
C-7	102,84	CH ₂
C-8	153,60	C
C-9	95,41	CH
C-10	138,01	C
C-11	164,99	C

As principais absorções observadas no IV para o composto 4 encontram-se na TAB. 4.12.

TAB. 4.12 Principais absorções de IV do composto 4

Absorção (cm ⁻¹)	Características
3441	ν O-H
2924	ν C-H de carbono sp ²
1705	ν C=O ác. carboxílico
1628	ν C=O amida
1458	ν C-N
1250 e 1034	ν C-O de éter
926	δ C-H fora do plano

A confirmação da presença de um grupo ácido carboxílico na molécula se dá ao observar duas absorções específicas: uma larga em 3441 cm^{-1} referente ao estiramento da ligação O-H e outra em 1705 cm^{-1} referente ao estiramento da ligação C=O de uma carbonila, ambas em regiões características de um ácido carboxílico. A absorção em 1628 cm^{-1} refere-se ao estiramento C=O da carbonila de uma amida. As absorções em 1250 e 1034 referem-se ao estiramento das ligações C-O do éter do anel 1,3-dioxole. A absorção em 2924 cm^{-1} refere-se ao estiramento das ligações C-H de carbonos sp^2 de anel aromático e a absorção em 926 cm^{-1} refere-se ao dobramento fora do plano da ligação C-H do anel aromático (PAVIA *et al.*, 2013).

A estrutura esperada para o composto **4** foi confirmada pelas análises realizadas. Pode-se observar que este composto possui relativa similaridade estrutural ao tautômero protonado da tacrina (FIG. 4.9).

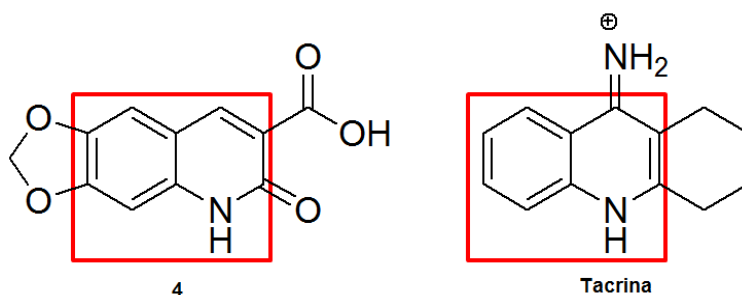


FIG. 4.9 Semelhança estrutural entre o composto 4 e o tautômero protonado da tacrina

Desta forma, acredita-se que este composto deve comportar-se em relação à AChE de forma semelhante ao tautômero, isto é, possivelmente interage de modo semelhantemente à tacrina, mas, adicionalmente, poderia ser capaz de realizar ligação de hidrogênio com o aminoácido His440.

4.3.1.3 SÍNTESE DO 1,3-DIOXOLO[4,5-G]PIRIMIDO[4,5-B]QUINOLINA-7,9(6H,8H)-DIONA (**5**)

A obtenção do composto **5** foi possível através da rota sintética apresentada na FIG. 4.10.

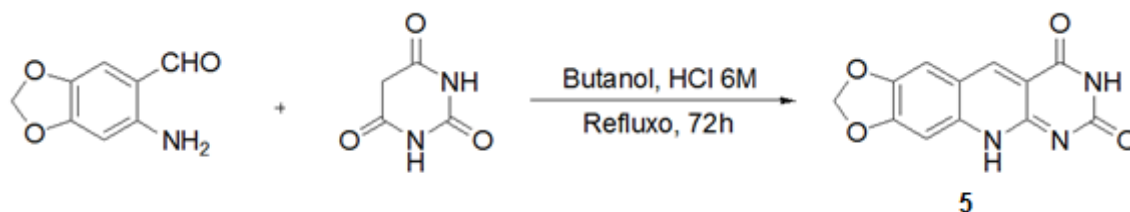


FIG. 4.10 Rota de síntese do composto **5**

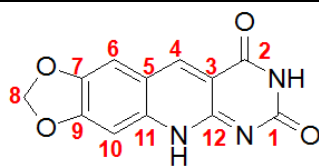
Esta rota permitiu a obtenção do composto **5** como um sólido rosado com ponto de fusão acima de 300 °C e rendimento de 62%.

Foram realizadas tentativas de síntese utilizando dioxano ou etanol como solvente. Ambos os casos conduziram a rendimentos ruins, então optou-se por utilizar um solvente com ponto de ebulição maior, sendo escolhido o butanol. A utilização deste solvente permitiu melhor rendimento da reação.

O composto **5** teve sua estrutura elucidada a partir das análises de IV, RMN de ^1H , ^{13}C , gHMBC, gHSQC e APT.

A caracterização por RMN de ^1H permitiu observar seis simpletos. O simpleto mais desblindado em 11,6 ppm corresponde ao próton do grupo NH ligado às carbonilas do anel quinolínico; o simpleto em 11,4 ppm refere-se ao próton do NH do anel barbiturato; os sinais em 8,74, 7,50 e 7,19 ppm são referentes aos prótons H-4, H-6 e H-10, respectivamente, dos anéis aromáticos; e o simpleto em 6,24 ppm refere-se ao próton do grupo CH_2 do anel 1,3-dioxole. Os assinalamentos de todos os hidrogênios encontram-se na TAB. 4.13.

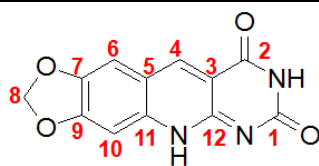
TAB. 4.13 Assinalamento do espectro de RMN de ^1H do composto 5



H	δ_{H}	gHSQC	gHMBC
H-4	8,74 (1H,s)	136,63	162,25; 148,94; 121,19; 103,90
H-6	7,50 (1H,s)	103,90	153,53; 148,58; 146,64; 136,63; 103,06
H-8	6,24 (2H,s)	102,43	153,53; 146,64
H-10	7,19 (1H,s)	103,06	153,53; 148,58; 146,64; 121,19; 103,90
H-NHq	11,55 (1H,bs)	-	-
H-NH-CO	11,39 (1H,s)	-	162,25; 136,63; 108,29; 121,19

Na caracterização por RMN de ^{13}C , observa-se um sinal em 150,5 ppm referente ao carbono C-1 do grupo carbonila entre o átomo de nitrogênio e o grupo NH do anel barbiturato; um sinal em 162,2 ppm referente ao C-2 da outra carbonila do anel barbiturato; sinais em 108,3, 136,6, 121,2, 103,9, 146,6, 153,5, 103,1, 148,6 e 148,9 ppm referentes aos carbonos C-3, C-4, C-5, C-6, C-7, C-9, C-10, C-11 e C-12 dos anéis aromáticos; e um sinal em 102,4 referente ao carbonos C-8 do grupo CH_2 do anel 1,3-dioxole. Os assinalamentos de todos os carbonos encontram-se na TAB. 4.14.

TAB. 4.14 Assinalamento do espectro de RMN de ^{13}C do composto **5**



C	δ_{C}	APT
C-1	150,49	C
C-2	162,25	C
C-3	108,29	C
C-4	136,63	CH
C-5	121,19	C
C-6	103,90	CH
C-7	146,64	C
C-8	102,43	CH ₂
C-9	153,53	C
C-10	103,06	CH
C-11	148,58	C
C-12	148,94	C

As principais absorções observadas no IV para do composto **5** encontram-se na TAB. 4.15.

TAB. 4.15 Principais absorções de IV do composto 5

Absorção (cm ⁻¹)	Características
3441	ν N-H
3048 e 2847	ν C-H de carbono sp ²
1728	ν C=O de amida
1674	ν C=O de amida
1612	δ N-H de amida
1474	δ N-H de amina
1389	ν C-N de amina
1242 e 1026	ν C-O éter
934	δ C-H fora do plano
841	δ N-H fora do plano

A absorção larga em 3441 cm⁻¹ pode ser referente tanto ao estiramento da ligação N-H da amida quanto da amina do anel quinolínico. As absorções fortes em 1728 e 1674 cm⁻¹ referem-se ao estiramento das ligações C=O das carbonilas da amida. Estas absorções encontram-se deslocadas para frequências maiores devido à grande possibilidade de ressonância e conjugação. As absorções em 1612 e 1474 cm⁻¹ referem-se a dobramentos fora do plano de ligações N-H de amida e amina, respectivamente. A absorção observada em 1389 cm⁻¹ refere-se ao estiramento da ligação C-N da amina. As absorções em 1242 e 1026 cm⁻¹ referem-se ao estiramento das ligações C-O do éter do anel 1,3-dioxole. As absorções em 3048 e 2847 cm⁻¹ referem-se ao estiramento das ligações C-H de carbonos sp² de anel aromático e a absorção em 934 cm⁻¹ refere-se ao dobramento fora do plano da ligação C-H do anel aromático. A absorção em 841 cm⁻¹ refere-se ao dobramento fora do plano da ligação N-H de uma amina (PAVIA *et al.*, 2013).

As caracterizações por RMN e IV permitiram confirmar a estrutura do composto **5** como também sendo relativamente semelhante ao tautômero da tacrina, logo espera-se que este composto possa interagir de maneira semelhante ao tautômero com a AChE (FIG. 4.11).

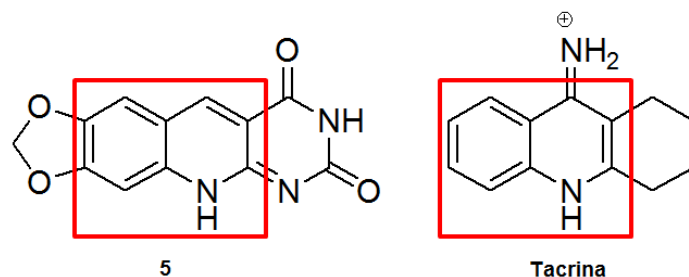


FIG. 4.11 Semelhança estrutural relativa entre o composto 5 e a tacrina

4.3.2 SÍNTESES UTILIZAÇÃO CATÁLISE BÁSICA

As reações a seguir foram conduzidas em meio básico.

A catálise básica permite a formação de um nucleófilo eficiente a partir do composto carbonílico. Desta forma, o ataque nucleofílico à carbonila do composto **2** torna-se mais favorável.

4.3.2.1 SÍNTESE DO BUTIL 6-OXO-5,6-DIIDRO-[1,3]DIOXOLO[4,5-G]QUINOLINA-7-CARBOXILATO (**6**) E DO ETIL 6-OXO-5,6-DIIDRO-[1,3]DIOXOLO[4,5-G]QUINOLINA-7-CARBOXILATO (**7**) (CORMA & MARTIN-ARANDA, 1991)

Os compostos **6** e **7** foram sintetizados de acordo com a rota apresentada na FIG. 4.12.

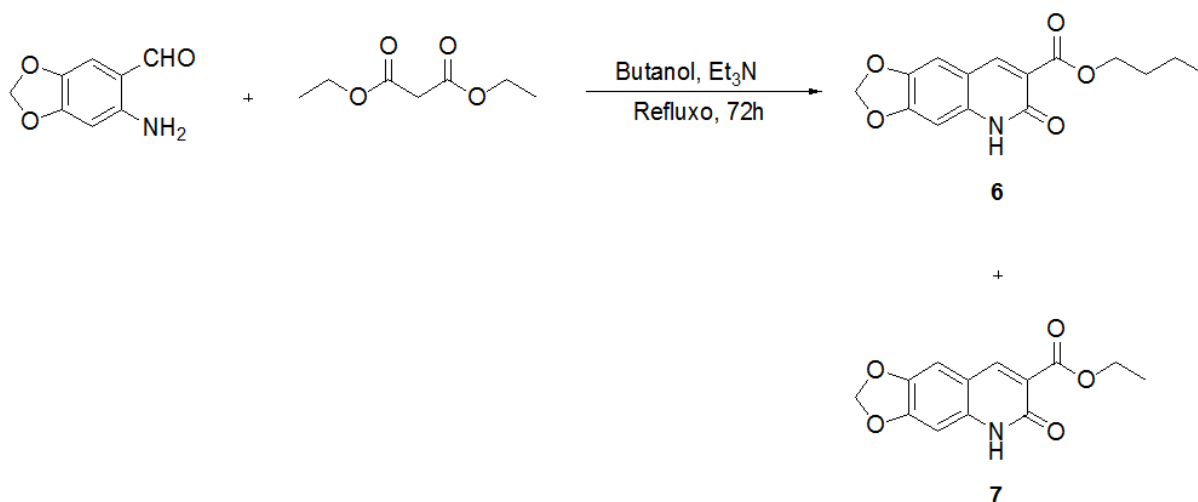


FIG. 4.12 Rota de síntese dos compostos 6 e 7

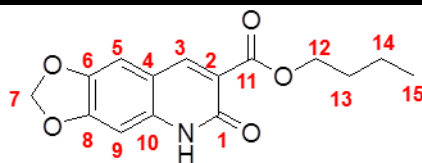
Após tentativas de recristalização e purificação através de cromatografia em coluna, não foi possível separar os produtos. Por isso, decidiu-se tentar sintetizar somente composto **7** a partir de ajustes na metodologia.

A obtenção de dois produtos nesta síntese ocorreu devido a uma transesterificação. Como a trietilamina é uma base forte, ela atuou retirando o próton da molécula de butanol, levando à produção de um alcóxido ($\text{CH}_3\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-O}^-$), que é um nucleófilo forte. Por isso, apesar da formação do composto **7, este sofreu uma substituição nucleofílica em sua porção éster, levando à síntese do composto **6**.**

As estruturas de ambas quinolinas foram elucidadas a partir das análises de RMN de ^1H , ^{13}C , gHMBC, gHSQC e APT. Como não foi possível a separação destas moléculas, encontra-se a seguir uma ampla descrição dos resultados de gHMBC e gHSQC que comprovam a presença destes dois compostos.

A análise do espectro de ^1H do composto **6** permitiu observar cinco simpletos, dois tripletos, um quinteto e um sexteto. O simpleto mais desblindado encontra-se em 11,9 ppm e refere-se ao próton dos grupo NH do anel quinolínico; três simpletos referentes a prótons de anel aromático em 8,37, 7,32 e 6,80 ppm referentes a H-3, H-5 e H-9, respectivamente; e um simpleto em 6,17 ppm referente aos prótons do grupo CH_2 do anel 1,3-dioxole. Os dois tripletos situam-se em 4,19 e 0,92 ppm são referentes aos prótons H-12 e H-15, respectivamente; o quinteto em 1,69 ppm refere-se ao próton H-13 e o sexteto em 1,41 ppm refere-se ao próton H-14. Como pode ser observado, estes multipletos são sinais referentes à cadeia alifática lateral na estrutura da do composto **6**. Os assinalamentos de todos os hidrogênios encontram-se na TAB. 4.16.

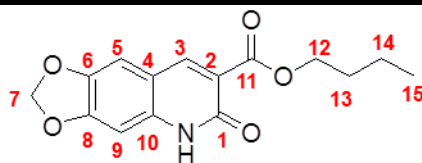
TAB. 4.16 Assinalamento do espectro de RMN de ^1H do composto 6



H	δ_{H}	gHSQC	gHMBC
H-3	8,37 (1H,s)	143,79	164,56; 158,36; 138,41; 119,19; 106,03
H-5	7,32 (1H,s)	106,03	152,32; 143,79; 138,41; 94,56
H-7	6,17 (2H,s)	102,22	152,32; 143,79
H-9	6,80 (1H,s)	94,57	152,32; 143,69; 138,41; 112,04;106,03
H-12	4,19 (2H,t, 7,0 Hz)	64,05	164,56; 30,30; 18,67
H-13	1,69 (2H,qui, 7,0 Hz)	30,30	64,05; 18,67; 13,63
H-14	1,41(3H,sex, 7.0 Hz)	18,67	64,05; 30,30; 13,63
H-15	0,92 (3H,t, 7,0 Hz)	13,63	30,30; 18,67
H-NHq	11,91(1H,s)	-	112,04

Na caracterização do composto **6** por ^{13}C , foi possível observar um sinal em 164,6 ppm referente a C-11 do grupo éster, um sinal em 158,4 ppm referente a C-1 da carbonila da amida, além de sinais em 119,1, 143,8, 112,0, 106,0, 143,7, 152,3, 94,6 e 138,4 ppm referentes a C-2, C-3, C-4, C-6, C-8, C-9 e C-10 do anel aromático. O espectro também apresenta um sinal em 102,2 ppm referente a C-7 do anel 1,3-dioxole. Os assinalamentos de todos os carbonos encontram-se na TAB. 4.17.

TAB. 4.17 Assinalamento do espectro de RMN de ^{13}C do composto 6



C	δ_{C}	APT
C-1	158,36	C
C-2	119,14	C
C-3	143,79	CH
C-4	112,04	C
C-5	106,03	CH
C-6	143,69	C
C-7	102,22	CH ₂
C-8	152,32	C
C-9	94,57	CH
C-10	138,41	C
C-11	164,56	C
C-12	64,05	CH ₂
C-13	30,30	CH ₂
C-14	18,67	CH ₂
C-15	13,63	CH ₃

Os deslocamentos químicos de todos os carbonos do composto **6** foram confirmados a partir de experimentos de gHMBC e gHSQC. Os dados obtidos pelas análises de gHSQC e gHMBC podem ser visualizados na TAB. 4.16 (pág. 81).

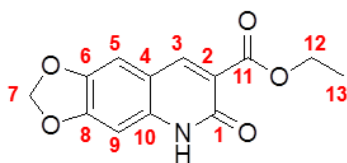
A análise do espectro de gHSQC, permitiu determinar a correlação entre os carbonos C-3, C-5, C-7, C-9, C-12, C-13, C-14 e C-15 (143,8; 106,0; 102,2; 94,6; 64,0; 30,3; 18,7 e 13,6 ppm) e os hidrogênios H-3, H-5, H-7, H-9, H-12, H-13, H-14 e H-15 (8,37; 7,32; 6,17; 6,80; 4,19; 1,69; 1,41 e 0,92 ppm), respectivamente.

Já na análise por gHMBC, foram verificadas as seguintes interações:

- H-3 correlaciona-se com os carbonos C-1, C-5, C-10 e C-11 fortemente, e moderadamente com C-2;
- H-5 demonstra interação forte com C-3, C-8 e C-10 e fraca com C-9;
- H-7 interage fortemente com C-6 e C-8;
- H-9 possui forte correlação com C-4 e C-6, moderada com C-8 e C-10 e interage mais fracamente com C-5;
- H-12 correlaciona-se fortemente com C-11 e C-14 e menos efetivamente com C-13;
- H-13 possui um forte interação com C-15 e interações moderadas com C-12 e C-14 ;
- H-14 demonstra forte correlação com C-12 e moderadas com C-13 e C-15;
- H-15 interage fortemente com C-13 e com menor intensidade com C-14;
- H-NHq correlaciona-se fortemente com C-4.

A análise do espectro de ^1H do composto **7** permitiu observar cinco simpletos, um tripleto e um quarteto. O simpleto mais desblindado encontra-se em 11,9 ppm e refere-se ao próton dos grupo NH do anel quinolínic; três simpletos referentes a prótons de anel aromático em 8,39, 7,31 e 6,80 ppm referentes a H-3, H-5 e H-9, respectivamente; e um simpleto em 6,17 ppm referente aos prótons do grupo CH_2 do anel 1,3-dioxole. O tripleto situa-se em 1,28 ppm é referente ao próton H-13 e o quarteto em 4,24 ppm refere-se ao próton H-12. Os assinalamentos de todos os hidrogênios encontram-se na TAB. 4.18.

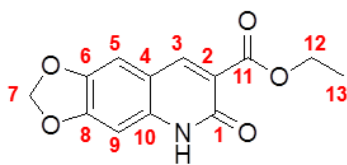
TAB. 4.18 Assinalamento do espectro de RMN de ^1H do composto 7



H	δ_{H}	gHSQC	gHMBC
H-3	8,39 (1H,s)	143,69	164,47; 158,34; 138,41; 119,08; 106,01
H-5	7,31 (1H,s)	106,01	152,34; 143,88; 143,69; 138,41; 94,57
H-7	6,17 (2H,s)	102,22	152,34; 143,69
H-9	6,80 (1H,s)	94,57	152,34; 143,69; 138,41; 112,04
H-12	4,24 (2H,qua,7,0 Hz)	60,35	164,47; 14,21
H-13	1,28 (3H,t,7,0 Hz)	14,21	60,35
H-NH	11,91 (1H,s)	-	112,04

Na caracterização do composto **7** por ^{13}C , foi possível observar um sinal em 164,5 ppm referente a C-11 do grupo éster, um sinal em 158,3 ppm referente a C-1 da carbonila da amida, além de sinais em 119,1, 143,9, 112,0, 106,0, 143,7, 152,3, 94,6 e 138,4, ppm referentes a C-2, C-3, C-4, C-6, C-8, C-9 e C-10 do anel aromático. O sinal em 102,2 ppm refere-se a C-7 do anel 1,3-dioxole. Os assinalamentos de todos os carbonos encontram-se na TAB. 4.19.

TAB. 4.19 Assinalamento do espectro de RMN de ^{13}C do composto 7



C	δ_c	APT
C-1	158,34	C
C-2	119,08	C
C-3	143,88	CH
C-4	112,04	C
C-5	106,01	CH
C-6	143,69	C
C-7	102,22	CH ₂
C-8	152,34	C
C-9	94,57	CH
C-10	138,41	C
C-11	164,47	C
C-12	60,35	CH ₂
C-13	14,21	CH ₃

Os deslocamentos químicos dos carbonos do composto **7** também foram confirmados por gHMBC e gHSQC. Os dados obtidos pelas análises de gHSQC e gHMBC podem ser visualizados na TAB. 4.18 (pág. 84).

A análise do espectro de gHSQC, permitiu determinar a correlação entre os carbonos C-3, C-5, C-7, C-9, C-12 e C-13 (143,9; 106,0; 102,2; 94,6; 60,4 e 14,2 ppm) e os hidrogênios H-3, H-5, H-7, H-9, H-12 e H-13 (8,39; 7,31; 6,17; 6,80; 4,24 e 1,28 ppm), respectivamente.

A análise por gHMBC, permitiu verificar as seguintes interações:

- H-3 correlaciona-se com os carbonos C-1, C-5, C-10 e C-11 fortemente, e fracamente com C-2;

- H-5 demonstra interação forte com C-3, C-8 e C-10, moderada com C-6 e fraca com C-9;
- H-7 interage fortemente com C-6 e C-8;
- H-9 possui forte correlação com C-4 e C-6 e moderada com C-8 e C-10;
- H-12 correlaciona-se fortemente com C-11 e moderadamente com C-13;
- H-13 interage moderadamente com C-12;
- H-NHq correlaciona-se fortemente com C-4.

4.3.2.2 SÍNTESE DO ETIL ÉSTER 5,6-DIIDRO-6-OXO-1,3-DIOXOLO[4,5-G]QUINOLINA-7-ÁCIDO CARBOXÍLICO (**7**) (CORMA & MARTIN-ARANDA, 1991)

A rota sintética apresentada na FIG. 4.13 mostra a síntese do composto **7**. A substituição do butanol por dioxano como solvente permitiu a obtenção do composto **7** como único produto verde claro, com faixa de ponto de fusão entre 241-243 °C e rendimento de 71%. Como o dioxano é considerado um solvente inerte, sua utilização evitou a formação de produtos secundários oriundos de uma transesterificação.

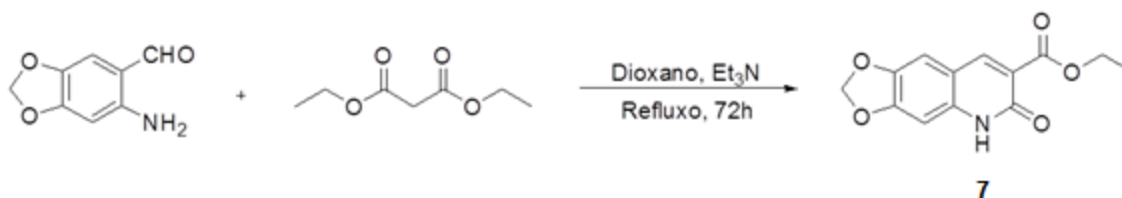


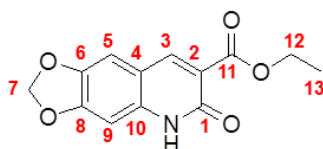
FIG. 4.13 Rota de síntese do composto 7

O composto **7** foi caracterizado por Ressonância Magnética Nuclear através de RMN de ¹H, RMN de ¹³C, gHMBC, gHSQC e APT.

Na caracterização por ¹H, observa-se um simpleto mais desblindado em 11,9 ppm e refere-se ao próton dos grupo NH do anel quinolínico; três simpletos referentes a prótons de anel aromático em 8,39, 7,31 e 6,80 ppm referentes a H-3, H-5 e H-9, respectivamente; e um simpleto em 6,13 ppm referente aos prótons do

grupo CH₂ do anel 1,3-dioxole. Há um tripleto em 1,28 ppm é referente ao próton H-13 e um quarteto em 4,24 ppm que refere-se ao próton H-12. Os assinalamentos de todos os hidrogênios encontram-se na TAB. 4.20.

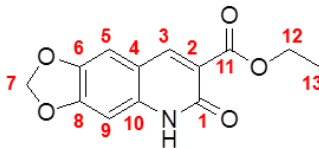
TAB. 4.20 Assinalamento do espectro de RMN de ¹H do composto 7



H	δ_H	gHSQC	gHMBC
H-3	8,39 (1H,s)	143,82	164,45; 158,34; 138,38; 119,09; 105,98
H-5	7,31 (1H,s)	105,98	152,30; 143,82; 143,61; 138,38; 94,44
H-7	6,13 (2H,s)	102,19	152,30; 143,61
H-9	6,80 (1H,s)	94,55	152,30; 143,61; 138,38; 112,02
H-12	4,24 (2H,q, 7,0 Hz)	60,32	164,45; 14,18
H-13	1,28 (3H,t,7,0 Hz)	14,18	60,32
H-NH	11,92 (1H,s)	-	112,02

No espectro de RMN ¹³C observa-se dois sinais mais desblindados, um em 164,5 ppm referente a C-11 do grupo éster, e o outro em 158,3 ppm referente ao C-1 da carbonila da amida. Pode-se observar sinais em 119,1, 143,8, 112,0, 106,0, 143,6, 152,3, 94,5 e 138,4 ppm referentes a C-2, C-3, C-4, C-6, C-8, C-9 e C-10 do anel aromático. O sinal em 102,2 ppm refere-se a C-7 do anel 1,3-dioxole. Já os sinais em 60,3 e 14,2 referem-se a C-12 e C-13 da cadeia alifática lateral. Os assinalamentos de todos os carbonos encontram-se na TAB. 4.21.

TAB. 4.21 Assinalamento do espectro de RMN de ^{13}C do composto 7



C	δ_c	APT
C-1	158,34	C
C-2	119,09	C
C-3	143,82	CH
C-4	112,02	C
C-5	105,98	CH
C-6	143,61	C
C-7	102,19	CH ₂
C-8	152,30	C
C-9	94,55	CH
C-10	138,38	C
C-11	164,45	C
C-12	60,32	CH ₂
C-13	14,18	CH ₃

Assim como nos casos dos compostos 4 e 5, comprovou-se a estrutura do composto 7 através de caracterização por RMN e observou-se que sua molécula também exibe relativa semelhança com o tautômero da tacrina (FIG. 4.13).

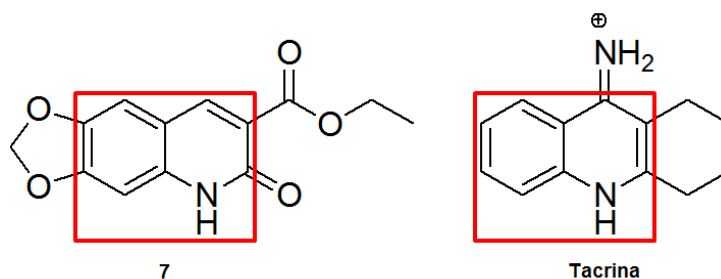


FIG. 4.14 Semelhança estrutural entre o composto 7 e o tautômero da tacrina

Devido a esta semelhança, acredita-se que o composto **7** seja capaz de realizar interações significativas com a AChE.

4.3.2.3 SÍNTESE DO 5,6-DI-IDRO-6-OXO-[1,3]DIOXOLO[4,5-G]QUINOLINA-7-CARBONITRILA (**8**) (SIDHU & RAI, 2008)

O composto **8** foi sintetizado se acordo com rota apresentada na FIG. 4.15 e foi obtido como um sólido amarelo claro, com ponto de fusão acima de 300°C e rendimento de 78%.

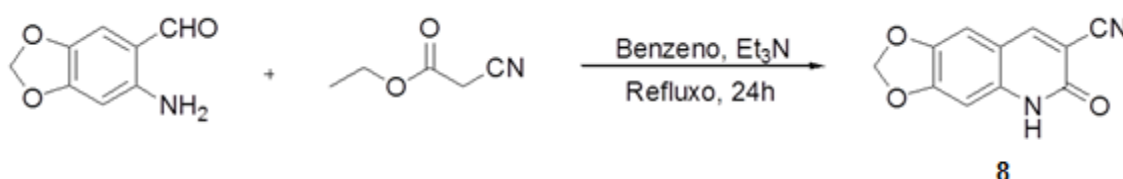
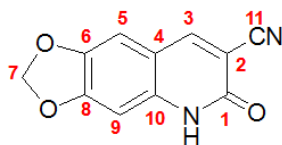


FIG. 4.15 Rota de síntese do composto 8

O composto sintetizado teve sua estrutura elucidada a partir das análises de RMN de ¹H, ¹³C, gHMBC, gHSQC e APT.

Analisando o espectro de ¹H, é possível observar cinco simpletos. O simpleto mais desblindado em 12,4 ppm relaciona-se ao próton dos grupo NH do anel quinolínico; os simpletos referentes a prótons de anel aromático são vistos em 8,51, 7,20 e 6,82 ppm e são referentes ao H-3 H-5 e H-9, respectivamente; por último, observa-se um simpleto referente ao grupo CH₂do anel 1,3-dioxole em 6,17 ppm. Os assinalamentos de todos os hidrogênios encontram-se na TAB. 4.22.

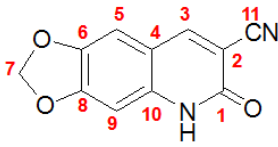
TAB. 4.22 Assinalamento do espectro de RMN de ^1H do composto 8



H	δ_{H}	gHSQC	gHMBC
H-3	8,51 (1H,s)	148,23	158,81; 138,67; 116,37; 105,46
H-5	7,20 (1H,s)	105,46	153,28; 148,23; 144,25; 138,67
H-7	6,17 (2H,s)	102,66	153,28; 144,25
H-9	6,82 (1H,s)	95,18	153,28; 144,25; 138,67; 112,38
H-NH	12,37 (1H,s)	-	-

Na caracterização por RMN de ^{13}C , observa-se um sinal em 116,4 ppm referente ao carbono C-11 do grupo nitrila e outro em 158,8 ppm referente ao carbono C-1 da carbonila; sinais em 112,4, 148,2, 101,9, 105,5, 144,2, 153,3, 95,2 e 138,7 ppm referentes aos carbonos C-2, C-3, C-4, C-5, C-6, C-8, C-9, C-10 dos anéis aromáticos; e um sinal em 102,7 ppm referente aos carbonos C-7 do grupo CH_2 do anel 1,3-dioxole. Os assinalamentos de todos os carbonos encontram-se na TAB. 4.23.

TAB. 4.23 Assinalamento do espectro de RMN de ^{13}C do composto 8



C	δ_c	APT
C-1	158,81	C
C-2	112,38	C
C-3	148,23	CH
C-4	101,90	C
C-5	105,46	CH
C-6	144,25	C
C-7	102,66	CH ₂
C-8	153,28	C
C-9	95,18	CH
C-10	138,67	C
C-11	116,37	C

A estrutura do composto 8 corresponde a um derivado quinolínico estruturalmente semelhante ao tautômero protonado da tacrina (FIG. 4.16).

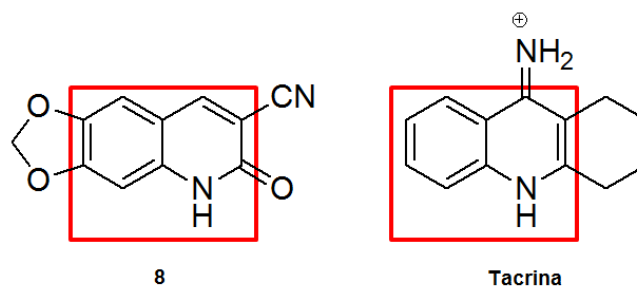


FIG. 4.16 Semelhança estrutural entre o composto 8 e o tautômero da tacrina

Por isso, acredita-se que além das interações permitidas por seus anéis, também seja capaz de interagir com a AChE através da formação de ligação de hidrogênio com o aminoácido His440 da tríade catalítica.

4.3.2.4 SÍNTESE DO METIL 6-METIL-[1,3]DIOXOLO[4,5-G]QUINONA-7-CARBOXILATO (**9**) (MISHRA *et al.*, 2015)

A rota sintética apresentada na FIG. 4.17 permitiu a obtenção do composto **9** como um sólido branco, com faixa de ponto de fusão entre 207-209 °C e rendimento de 53%, sendo este composto inédito na literatura.

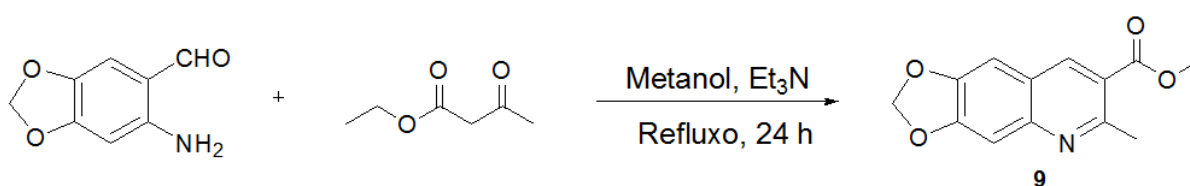


FIG. 4.17 Rota de síntese do composto **9**

A obtenção deste composto também se deve a uma transesterificação. A base forte presente no meio reacional gerou um alcóxido forte, o $\text{CH}_3\text{-O}^-$, que realizou uma substituição nucleofílica na porção éster de um possível produto intermediário (FIG. 4.18).

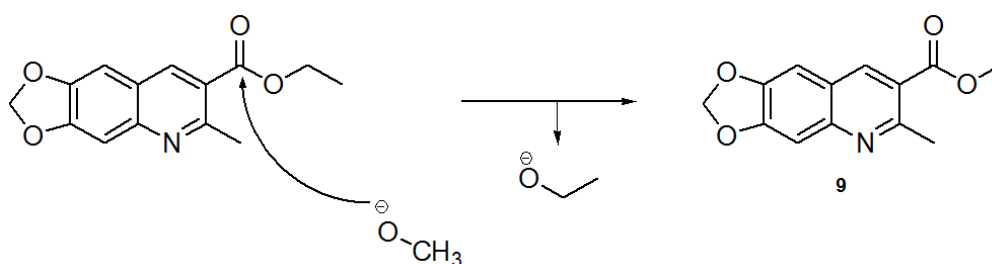


FIG. 4.18 Transesterificação para a síntese do composto **9** a partir de um provável composto intermediário

Assim como os demais produtos sintetizados, o composto **9** foi caracterizado por Ressonância Magnética Nuclear através de RMN de ^1H , RMN de ^{13}C , gHMBC, gHSQC e APT. Como esta molécula é inédita na literatura, segue uma detalhada caracterização por todos os métodos de análise utilizados.

Pode-se observar no espectro de RMN de ^1H (FIG. 4.19) a presença de seis simples: dois relacionados a grupos metila, um em 2,78 ppm referente ao próton H-11 da metila ligada ao anel aromático, e outro em 3,88 ppm referente ao próton H-13 da metila do grupamento éster; três referentes aos prótons de anel aromático, um mais desblindado em 8,65 ppm devido à proximidade do grupo éster, outro em 7,45 ppm e o último em 7,30 ppm; e um simpleto em 6,23 ppm referente ao próton H-7 do grupo CH_2 do anel 1,3-dioxole.

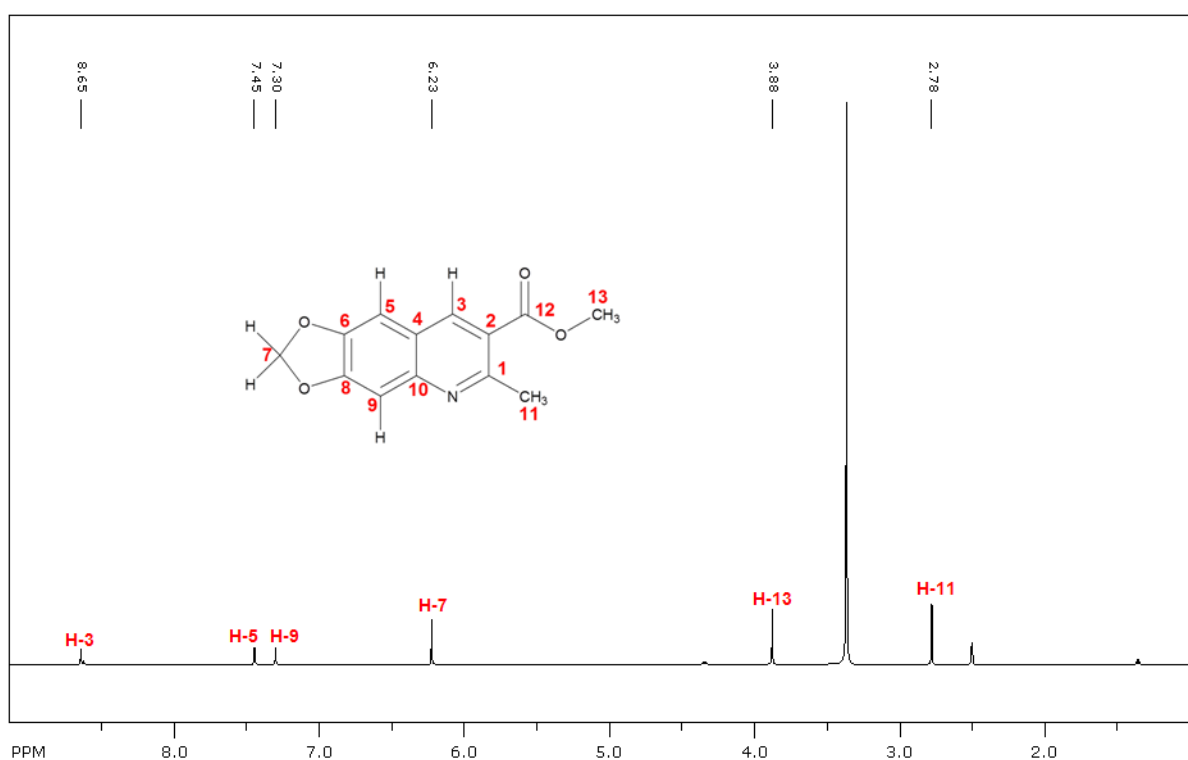
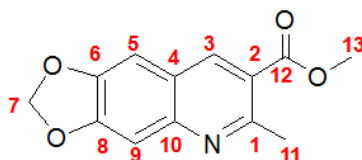


FIG. 4.19 Espectro de RMN de ^1H do composto 9

Os assinalamentos de todos os hidrogênios encontram-se na TAB. 4.24.

TAB. 4.24 Assinalamento do espectro de RMN de ^1H do composto 9



H	δ_{H}	gHSQC	gHMBC
H-3	8,65 (1H, s)	138,06	166,49; 155,40; 146,93; 103,33
H-5	7,45 (1H, s)	103,33	152,53; 146,93; 138,06; 104,30
H-7	6,23 (2H, s)	102,37	152,53; 147,63
H-9	7,30 (1H, s)	104,30	152,53; 147,63; 122,25
H-11	2,78 (3H, s)	24,29	155,40; 121,04
H-13	3,88 (3H, s)	58,18	166,49

No espectro de RMN ^{13}C (FIG. 4.20), observa-se dois sinais relacionados ao grupo éster, um mais desblindado em 166,5 ppm referente ao C-12 da carbonila e outro em 52,2 ppm, referente ao C-13 da metila. Em seguida, pode-se verificar a presença de outros dois sinais consideravelmente desblindados, ambos relacionados a carbonos de anel quinolínico e próximos ao átomo de nitrogênio, um em 155,4 ppm referente ao C-1 e outro em 146,9 ppm referente ao C-10. Além destes sinais, os sinais referentes ao C-6 e C-8 também são encontrados com deslocamentos químicos elevados, devido à proximidade destes aos átomos de oxigênio, em 147,6 e 152,5 ppm, respectivamente. Os sinais em 121,0, 138,1, 122,2, 103,3 e 104,3 ppm são referentes aos carbonos C-2, C-3, C-4, C-5, C-9 dos anéis aromáticos. O sinais em 102,4 e 24,8 ppm referem-se, respectivamente aos carbonos C-7 do anel 1,3-dioxole e C-11 do grupo metila ligado ao anel quinolínico.

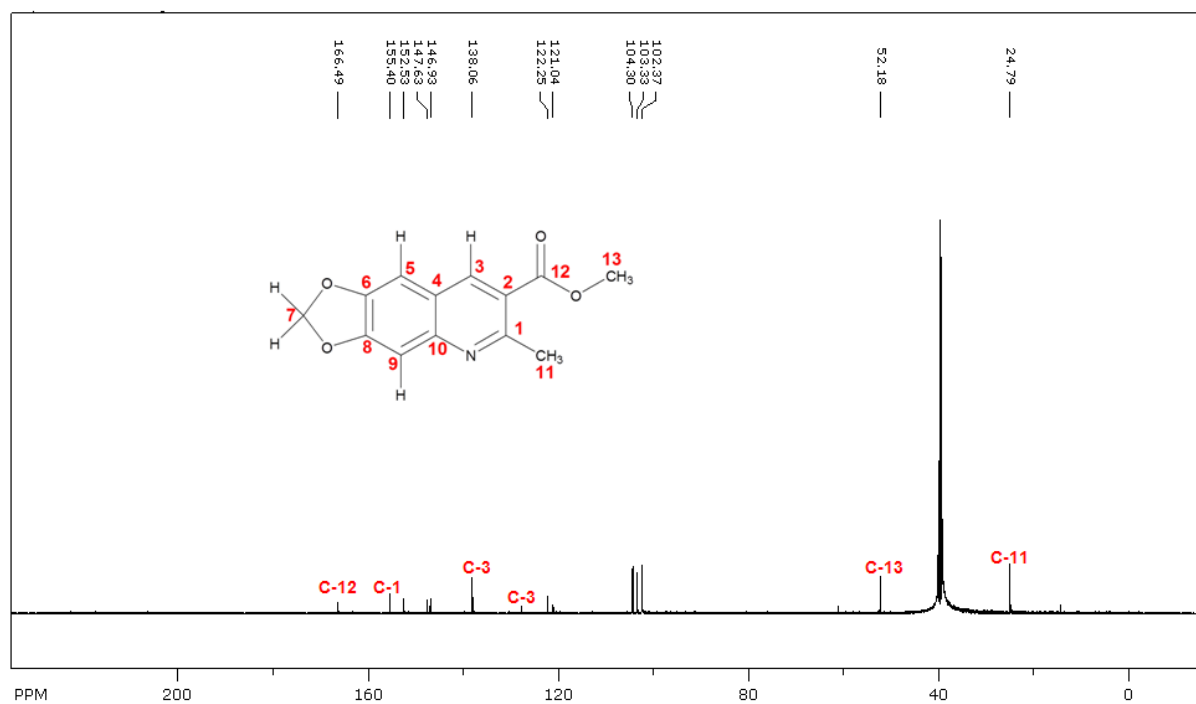
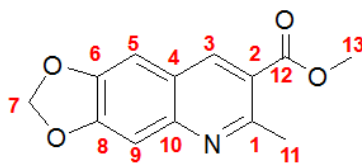


FIG. 4.20 Espectro de RMN de ^{13}C do composto 9

Os assinalamentos de todos os carbonos encontram-se na TAB. 4.25.

TAB. 4.25 Assinalamento do espectro de RMN de ^{13}C do composto 9



C	δ_{C}	APT
C-1	155,40	C
C-2	121,04	C
C-3	138,06	CH
C-4	122,25	C
C-5	103,33	CH
C-6	147,63	C
C-7	102,37	CH ₂
C-8	152,53	C
C-9	104,29	CH
C-10	146,93	C
C-11	24,79	CH ₃
C-12	166,49	C
C-13	52,18	CH ₃

Os deslocamentos químicos de todos os carbonos do composto **9** foram confirmados a partir de experimentos de gHMBC e gHSQC. Os dados obtidos pelas análises de gHSQC e gHMBC podem ser visualizados na TAB. 4.24 (pág. 94). Como este composto é inédito na literatura, torna-se necessária uma descrição detalhada das interações observadas entre seus átomos através da caracterização por técnicas de RMN em 2D.

A análise do espectro de gHSQC, permitiu determinar a correlação entre os carbonos C-3, C-5, C-7, C-9, C-11 e C-13 (138,0; 103,3; 102,4; 104,3; 24,3 e 58,2 ppm) e os hidrogênios H-3, H-5, H-7, H-9, H-11 e H-13 (8,65; 7,45; 6,23; 7,30; 2,78 e 3,88 ppm), respectivamente.

A análise por gHMBC permitiu observar as correlações entre carbonos e hidrogênios a longa distância, sendo verificadas as seguintes interações:

- H-3 correlaciona-se com os carbonos C-1, C-5, C-10 e C-12 fortemente;
- H-5 demonstra interação forte com C-3, C-8 e C-10, e interação fraca com C-9;
- H-7 interage fortemente com C-6 e C-8;
- H-9 possui forte correlação com C-4 e C-6, e interage mais fracamente com C-8;
- H-11 correlaciona-se fortemente com C-1 e C-2;
- H-13 interage fortemente com C-12.

A análise detalhada da estrutura do composto **9** permitiu observar que este é estruturalmente semelhante à molécula da tacrina. Desta forma, acredita-se que interaja com o sítio ativo da AChE de modo semelhante à tacrina (FIG. 4.21).

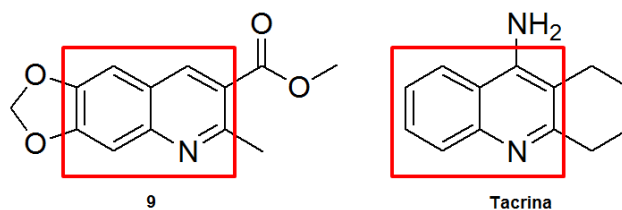


FIG. 4.21 Semelhança estrutural entre o composto 9 e a tacrina

4.3.3 SÍNTESE DAS GUANIL-HIDRAZONAS (BORGES *et al*, 2004)

O mecanismo geral para a síntese das guanil-hidrazonas pode ser observado na FIG. 4.22.

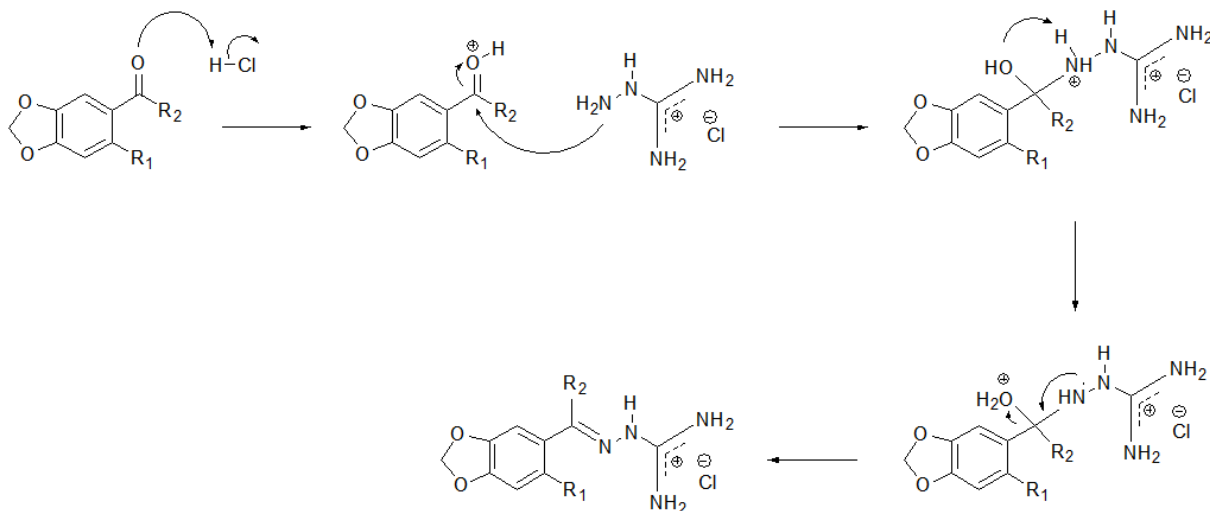


FIG. 4.22 Mecanismo geral de formação das guanil-hidrazonas

As sínteses das guanil-hidrazonas foram processadas em meio ácido.

A protonação do oxigênio do composto carbonílico torna mais eficiente a substituição nucleofílica, permitindo a formação da respectiva guanil-hidrazona.

4.3.4 SÍNTESE DA GUANIL-HIDRAZONA DE 6-NITRO-1,3-BENZODIOXOLE-5-CARBOXALDEÍDO (**10**)

A partir da síntese ilustrada na FIG. 4.23, foi possível obter o composto **10** como um sólido amarelo claro, com faixa de ponto de fusão entre 294-296°C e rendimento de 88%.

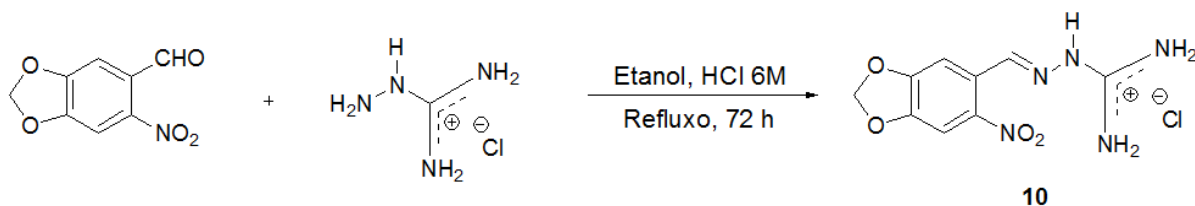
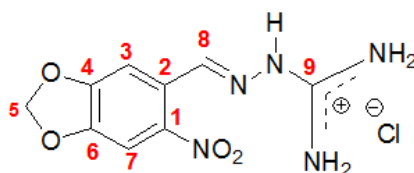


FIG. 4.23 Rota de síntese do composto 10

O composto **10** foi caracterizado por Ressonância Magnética Nuclear através de IV, RMN de ^1H , RMN de ^{13}C , gHMBC, gHSQC e APT.

A análise do espectro de ^1H permitiu observar sete simpletos. Os simpletos mais desblindados em 11,9, 8,14, 8,00 e 7,51 ppm referem-se aos prótons dos grupos H-NH, H-8, H-NH $_2^+$ e H-NH $_2^+$, respectivamente, do grupamento guanil-hidrazona; dois simpletos referentes aos prótons H-3 e H-7 do anel aromático, em 7,31 e 6,90 ppm; e um simpleto em 6,06 ppm referente ao próton H-5 do anel 1,3-dioxole. Os assinalamentos de todos os hidrogênios encontram-se na TAB. 4.26.

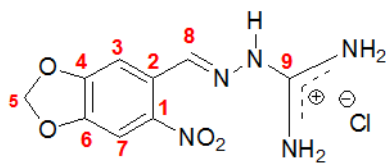
TAB. 4.26 Assinalamento do espectro de RMN de ^1H do composto 10



H	δ_{H}	gHSQC	gHMBC
H-3	7,31 (1H,s)	108,82	149,64; 146,25; 143,49
H-5	6,06 (2H,s)	101,97	149,64; 143,49
H-7	6,90 (1H,s)	101,30	149,64; 143,49; 114,84
H-8	8,14 (1H,s)	146,25	133,43; 114,84; 108,82
H-NH	11,87 (1H,s)	-	155,00; 146,25
H-NH $_2^+$	8,00 (2H,bs)	-	-
H-NH $_2^+$	7,51 (2H,bs)	-	-

Na caracterização por ^{13}C , foi possível observar sinais em 155,0 e 146,2 ppm referentes a C-9 e C-8 do grupamento guanil-hidrazona; sinais em 133,4, 114,8, 108,8, 143,5, 149,6 e 101,3 ppm referentes a C-1, C-2, C-3, C-4, C-6, C-7 do anel aromático; e um sinal em 102,0 ppm referente a C-e do anel 1,3-dioxole. Os assinalamentos de todos os carbonos encontram-se na TAB. 4.27.

TAB. 4.27 Assinalamento do espectro de RMN ^{13}C do composto 10



C	δ_{C}	APT
C-1	133,43	C
C-2	114,84	C
C-3	108,82	CH
C-4	143,49	C
C-5	101,97	CH ₂
C-6	149,64	C
C-7	101,30	CH
C-8	146,25	CH
C-9	155,00	C

As principais absorções observadas nos espectro de IV encontram-se na TAB. 4.28.

TAB. 4.28 Principais absorções de IV do composto 10

Absorção (cm ⁻¹)	Características
3402	ν N-H
2924	ν C-H de carbono sp ²
1682 e 1635	ν C=N
1520 e 1335	ν NO ₂
1273 e 1026	ν C-O de éter
1126	ν C-N
671	δ C-H fora do plano

A absorção em 3402 cm^{-1} refere-se ao estiramento da ligação N-H. As absorções encontradas em 1682 e 1635 cm^{-1} referem-se ao estiramento da ligação C=N do grupo guanil-hidrazona. Foram observadas duas absorções referentes a estiramento das ligações do grupo $-\text{NO}_2$, em 1520 e 1335 cm^{-1} . As absorções em 1273 e 1026 cm^{-1} referem-se ao estiramento das ligações C-O do éter do anel 1,3-dioxole. Já a absorção em 2924 cm^{-1} refere-se ao estiramento das ligações C-H de carbonos sp^2 de anel aromático e a absorção em 671 cm^{-1} refere-se ao dobramento fora do plano da ligação C-H. A absorção em 1126 cm^{-1} refere-se ao estiramento da ligação C-N, também indicando a presença do grupo guanil-hidrazona. (PAVIA *et al.*, 2013; SILVERSTEIN *et al.*, 2000).

4.3.5 SÍNTESE DA GUANIL-HIDRAZONA DE 6-AMINO-1,3-BENZODIOXOLE-5-CARBOXALDEÍDO (11)

A rota sintética apresentada na FIG. 4.24 permitiu a obtenção do composto **11** como um sólido rosado com faixa de ponto de fusão entre $245\text{-}247\text{ }^\circ\text{C}$ e rendimento de 79%.

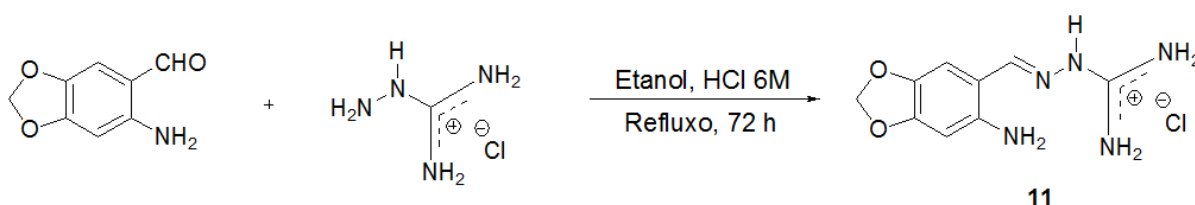


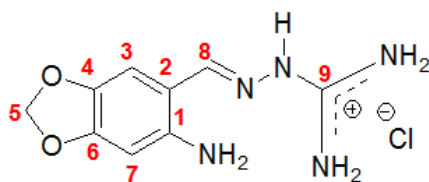
FIG. 4.24 Rota de síntese do composto 11

O composto **11** teve sua estrutura elucidada a partir das análises de IV, RMN de ^1H , ^{13}C , gHMBC, gHSQC e APT.

A caracterização por RMN de ^1H permitiu observar sete simpletos. Os simpletos em 11,8, 8,11 e 7,19 ppm correspondem aos prótons H-NH, H-8 e H-NH $_2^+$, respectivamente, do grupamento guanil-hidrazona; o sinal em 8,84 é referente ao próton H-NH $_2$ do grupo NH $_2$ ligado ao anel aromático; os sinais em 7,09 e 6,69 ppm são referentes aos prótons H-3 e H-7 do anel aromático; e o sinal em 5,98 ppm

refere-se ao próton H-5 do anel 1,3-dioxole. Os assinalamentos de todos os hidrogênios encontram-se na TAB. 4.29.

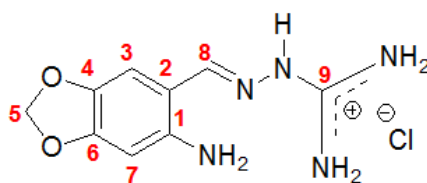
TAB. 4.29 Assinalamento do espectro de RMN de ^1H do composto 11



H	δ_{H}	gHSQC	gHMBC
H-3	7,09 (1H,s)	109,06	149,84; 147,85; 141,18
H-5	5,98 (2H,s)	101,44	149,84; 141,18
H-7	6,69 (1H,s)	99,18	149,84; 141,09; 111,02
H-8	8,11 (1H,s)	147,85	111,02; 109,06
H-NH	11,75 (1H,s)	-	154,84; 147,85
H-NH ₂	8,84 (2H,bs)	-	-
H-NH ₂ ⁺	7,19 (4H,bs)	-	-

Na caracterização por RMN de ^{13}C , observa-se sinais em 147,9 e 159,1 ppm referentes aos carbonos C-8 e C-9 do grupamento guanil-hidrazona; sinais em 154,8, 111,0, 109,1, 141,2, 149,84 e 99,2 ppm referentes aos carbonos C-1, C-2, C-3, C-4, C-6 e C-7 do anel aromático; e um sinal em 101,5 referente ao carbono C-5 do anel 1,3-dioxole. Os assinalamentos de todos os carbonos encontram-se na TAB. 4.30.

TAB. 4.30 Assinalamento do espectro de RMN de ^{13}C do composto 11



C	δ_c	APT
C-1	154,84	C
C-2	111,02	C
C-3	109,06	CH
C-4	141,18	C
C-5	101,44	CH
C-6	149,84	C
C-7	99,18	CH ₂
C-8	147,18	CH
C-9	159,14	C

As principais absorções observadas no espectro de IV encontram-se na TAB. 4.31.

TAB. 4.31 Principais absorções de IV do composto 11

Absorção (cm ⁻¹)	Características
3372 e 3202	ν N-H
2785	ν C-H de carbono sp ²
1636	ν C=N
1497 e 1412	ν C=C de C aromático
1273	ν C-N
1227 e 1034	ν C-O de éter
926	δ C-H fora do plano

As absorções observadas em 3372 e 3202 cm^{-1} referem-se ao estiramento da ligação N-H de amina primária, indicando a presença do grupo $-\text{NH}_2$. A absorção encontrada em 1636 cm^{-1} refere-se ao estiramento da ligação C=N do grupo guanil-hidrazona. As absorções em 1227 e 1034 referem-se ao estiramento das ligações C-O do éter do anel 1,3-dioxole. As absorções em 1497 e 1412 cm^{-1} referem-se ao estiramento de ligações C=C de carbonos de anel aromático. Já a absorção em 2785 cm^{-1} refere-se ao estiramento das ligações C-H de carbonos sp^2 de anel aromático e a absorção em 926 cm^{-1} refere-se ao dobramento fora do plano da ligação C-H. A absorção em 1273 refere-se ao estiramento da ligação C-N, também indicando a presença do grupo guanil-hidrazona. (PAVIA *et al.*, 2013; SILVERSTEIN *et al.*, 2000).

4.3.6 SÍNTESE DA GUANIL-HIDRAZONA DE 7,7-DIMETHIL-7,8-DIIDRO-[1,3]DIOXOLO[4,5-B]ACRIDIN-9(6H)-ONA (**12**)

A síntese apresentada na FIG. 4.25 permitiu a obtenção do composto **12** como um sólido amarelo escuro com ponto de fusão entre 269-271 $^{\circ}\text{C}$ e rendimento de 51%, sendo este produto inédito na literatura.

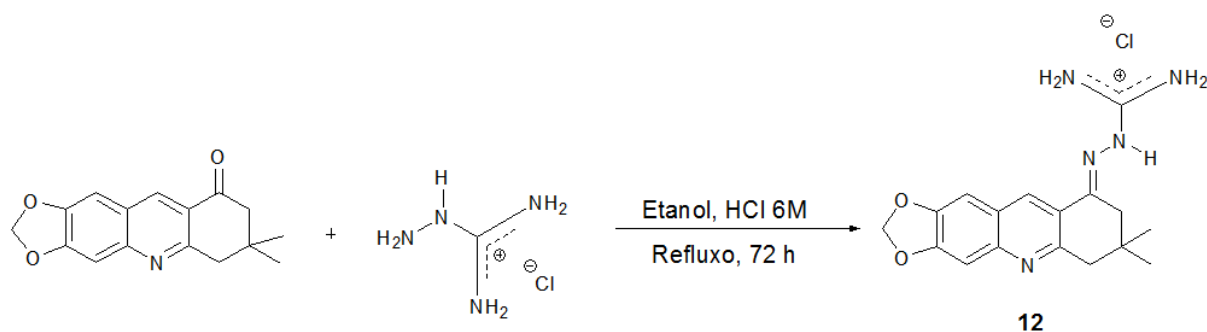


FIG. 4.25 Rota de síntese do composto 12

O composto **12** teve sua estrutura elucidada a partir das análises de IV, RMN de ^1H , ^{13}C , gHMBC, gHSQC e APT.

Analisando o espectro de ^1H (FIG. 4.26), é possível observar nove simpletos. Os simpletos em 11,6 e 8,03 ppm relacionam-se aos prótons dos grupos NH e NH_2^+ ,

respectivamente, do grupamento guanil-hidrazona; os simpletos referentes a prótons de anel aromático são vistos em 9,74, 7,45 e 7,68 ppm e são referentes ao H-5, H-7 e H-11, respectivamente; observa-se também três simpletos relativos a grupos CH₂ em 3,18, 2,73 e 6,39 ppm referentes aos prótons H-1, H-2 e H-9 do anel 1,3-dioxole; e o simpleto em 1,06 ppm é referente aos grupos metila.

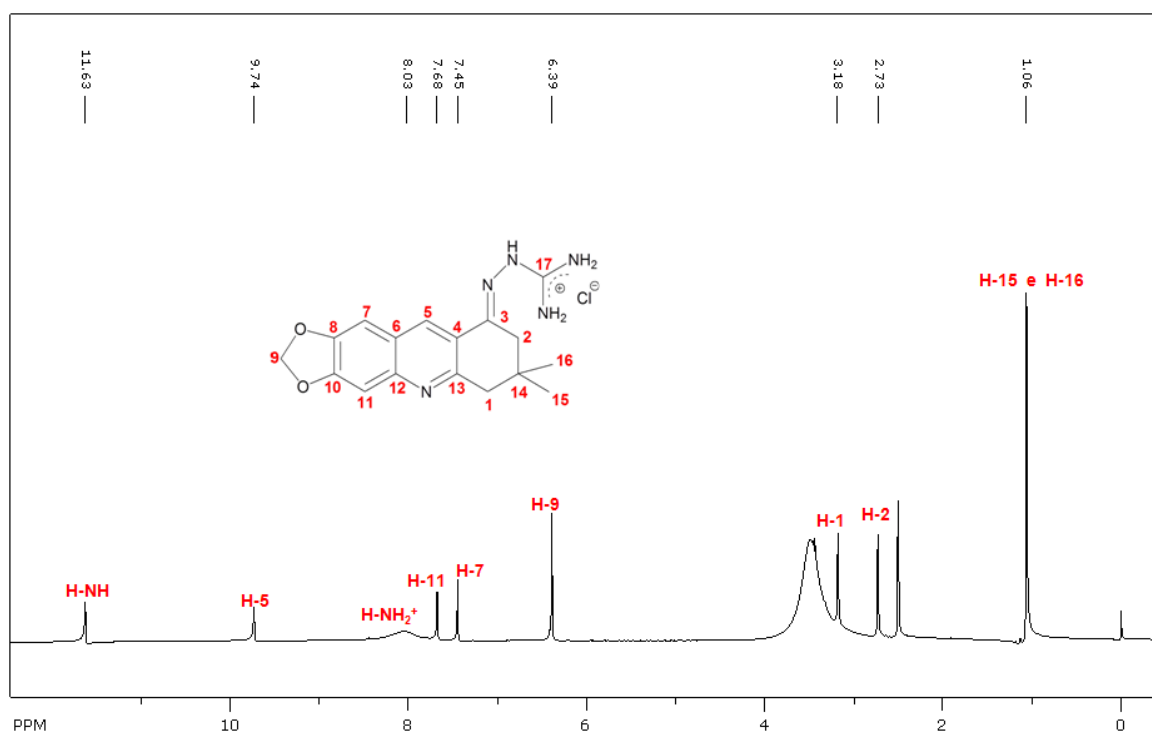
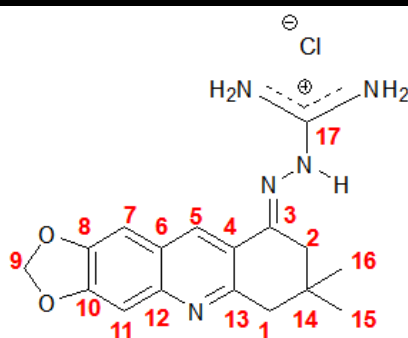


FIG. 4.26 Espectro de RMN de ¹H do composto 12

Os assinalamentos de todos os hidrogênios encontram-se na TAB. 4.32.

TAB. 4.32 Assinalamento do espectro de RMN de ^1H do composto 12



H	δ_{H}	gHSQC	gHMBC
H-1	3,18 (2H,s)	56,02	152,48; 123,84; 38,50; 30,50; 27,87
H-2	2,73 (2H,s)	38,50	146,85; 123,84; 56,02; 30,50; 27,87
H-5	9,74 (1H,s)	137,40	152,58; 146,85; 139,51; 103,39
H-7	7,45 (1H,s)	103,39	154,42; 149,27; 139,51; 137,49
H-9	6,39 (2H,s)	103,82	154,42; 149,27
H-11	7,68 (1H,s)	98,28	154,42; 149,27; 139,51; 124,92
H-15 e H-16	1,06 (6H,s)	27,87	56,02; 38,50; 30,50; 27,87
H-NH	11,63 (1H,s)	-	156,07; 146,85
H-NH ₂ ⁺	8,03 (4H,bs)	-	-

Na caracterização por ^{13}C (FIG. 4.27), observa-se um sinal em 156,1 ppm referente a C-17 do grupamento guanil-hidrazona; um sinal em 146,9 ppm referente a C-3, carbono de ligação entre o grupamento guanil-hidrazona e o restante da molécula; sinais em 123,8, 137,4, 124,9, 103,4, 149,3, 154,4, 98,3, 139,5 e 152,6 ppm referentes a C-4, C-4, C-5, C-6, C-7, C-8, C-10, C-11, C-12 e C-13 dos anéis aromáticos; sinais referente aos grupos CH₂ em 41,0, 38,5 e 103,8 ppm referentes aos carbonos C-1, C-2 e C-9 do anel 1,3-dioxole; e um sinal em 30,5 ppm referente ao carbono C-14.

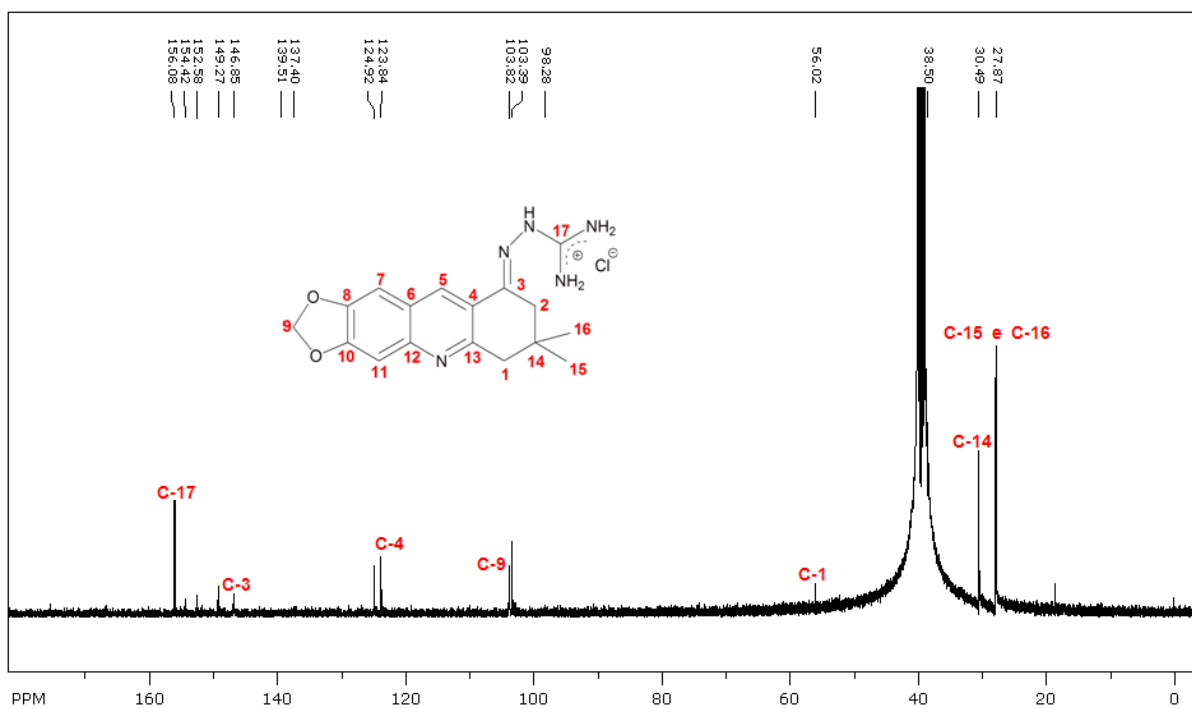
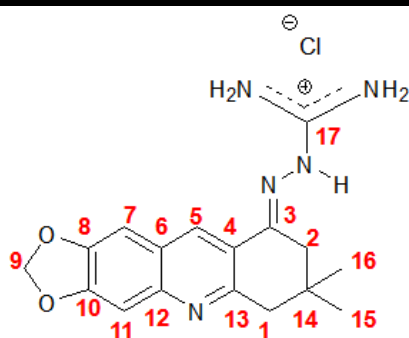


FIG. 4.27 Espectro de ^{13}C do composto 12

Os assinalamentos de todos os carbonos encontram-se na TAB. 4.33.

TAB. 4.33 Assinalamento do espectro de RMN de ^{13}C do composto 12



C	δ_{C}	APT
C-1	56,02	CH ₂
C-2	38,50	CH ₂
C-3	146,85	C
C-4	123,84	C
C-5	137,40	CH
C-6	124,92	C
C-7	103,39	CH
C-8	149,27	C
C-9	103,82	CH ₂
C-10	154,42	C
C-11	98,28	CH
C-12	139,51	C
C-13	152,58	C
C-14	30,49	C
C-15 e C-16	27,87	CH ₃
C-17	156,08	C

Como o composto **12** é inédito na literatura, deve-se confirmar os deslocamentos químicos de todos os carbonos a partir de experimentos de gHMBC e gHSQC. Os dados obtidos pelas análises de gHSQC e gHMBC podem ser visualizados na TAB. 4.32 (pág. 106).

A análise do espectro de gHSQC, permitiu determinar a correlação entre os carbonos C-1, C-2, C-5, C-7, C-9, C-11 e C-15/16 (56,0; 38,5; 137,4; 103,4; 103,8;

98,3 e 27,9 ppm) e os hidrogênios H-1, H-2, H-5, H-7, H-9, H-11 e H-15/16 (3,18; 2,73; 9,74; 7,45; 6,39; 7,68 e 1,06 ppm), respectivamente.

Já na análise por gHMBC, foi possível observar as correlações entre carbonos e hidrogênios a longa distância, sendo verificadas as seguintes interações:

- H-1 correlaciona-se fortemente com os carbonos C-2, C-4, C-13, C-14 e C-15/16;
- H-2 demonstra interação forte com C-1, C-3, C-4, C-14 e C-15/16;
- H-5 interage fortemente com C-3 e C-13 e menos efetivamente com C-7 e C-12;
- H-7 possui forte correlação com C-8, C-10 e C-12, e interage mais fracamente com C-5;
- H-9 interage fortemente com C-8 e C-10;
- H-11 demonstra forte correlação com C-6, C-8 e C-10, e fraca com C-12;
- H-15/16 correlaciona-se fortemente com C-1, C-2, C-14 e C-15/16;
- H-NH possui interação muito forte com C-17 e menos forte com C-3.

As principais absorções observadas nos espectro de IV encontram-se na TAB. 4.34.

TAB. 4.34 Principais absorções de IV do composto 12

Absorção (cm ⁻¹)	Características
3318	v N-H
2963 e 2700	v C-H de carbono sp ²
1682	v C=N
1466	v C=C
1366 e 1142	v C-N
1265 e 1034	v C-O
933	δ C-H fora do plano

A absorção observada em 3318 cm⁻¹ refere-se ao estiramento da ligação N-H. A absorção encontrada em 1682 cm⁻¹ refere-se ao estiramento da ligação C=N do

grupo guanil-hidrazona. As absorções em 1265 e 1034 referem-se ao estiramento das ligações C-O do éter do anel 1,3-dioxole. A absorção em 1466 cm^{-1} refere-se ao estiramento de ligações C=C de carbonos de anel aromático. Já as absorções em 2963 e 2700 cm^{-1} referem-se ao estiramento das ligações C-H de carbonos sp^2 de anel aromático e a absorção em 933 cm^{-1} refere-se ao dobramento fora do plano da ligação C-H. As absorções em 1366 e 1142 cm^{-1} referem-se ao estiramento da ligação C-N, também indicando a presença do grupo guanil-hidrazona. (PAVIA *et al.*, 2013; SILVERSTEIN *et al.*, 2000).

A estrutura do composto **12** representa a junção das duas classes químicas tidas como objetivo neste trabalho, isto é, em sua molécula há tanto o grupo quinolina quanto o grupamento guanil-hidrazona. Por isso, espera-se que esta molécula interaja com a AChE através de duas regiões: os anéis aromáticos também presentes na estrutura base da tacrina podem interagir com o sítio ativo da enzima de forma semelhante à interação realizada pelo fármaco; e o grupo guanidina do grupamento guanil-hidrazona, por ser uma região positiva, pode ser capaz de interagir com a parte aniônica do sítio ativo da AChE (FIG. 4.28).

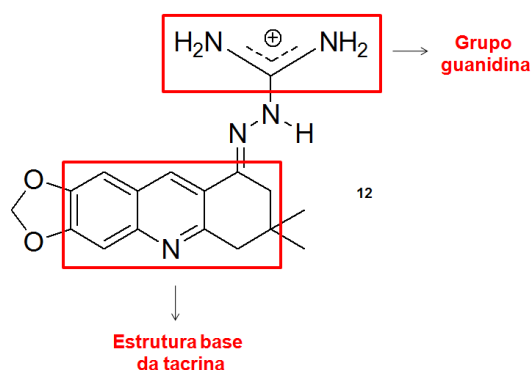


FIG. 4.28 Regiões do composto **12** onde pode haver interação com a AChE

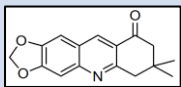
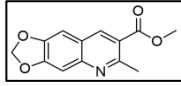
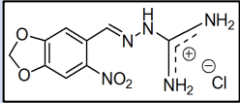
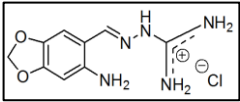
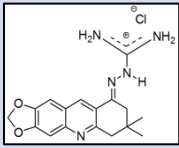
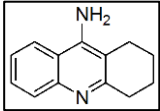
4.4 AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE DE INIBIÇÃO ENZIMÁTICA DOS COMPOSTOS PELO MÉTODO DE RMN

Foram realizados testes de inibição da enzima AChE para cinco dos compostos sintetizados neste trabalho: compostos **3**, **9**, **10**, **11** e **12**, onde priorizou-se aos dois compostos inéditos, **9** e **12**, que correspondem a uma quinolina e uma quinolina contendo o grupamento guanil-hidrazona, respectivamente.

Como se trata de testes iniciais, estes foram realizados em duplicata, para garantir a confiabilidade dos resultados, sendo a tacrina utilizada como composto referência, já que esta é conhecida como o inibidor mais eficiente de AChE.

Os resultados obtidos encontram-se na TAB. 4.35.

TAB. 4.35 Capacidade inibitória dos compostos testados

Classe molecular	Composto	Inibição da AChE (%)
Quinolina	3 	(73,91 ± 6,26)
Quinolina	9 	(66,8 ± 11,34)
Guanil-hidrazona	10 	(81,76 ± 1,07)
Guanil-hidrazona	11 	(38,81 ± 3,73)
Quinolina e guanil-hidrazona	12 	(80,87 ± 5,97)
Quinolina	Tacrin a 	(93,50 ± 5,42)

A partir dos dados apresentados na tabela, podemos observar que foram obtidos resultados promissores para a maioria dos compostos analisados e também podemos notar que todos demonstraram a capacidade de inibir a ação da enzima AChE.

Os compostos **3** e **9** mostraram boa capacidade inibitória e, por serem quinolinas com estruturas similares à da tacrina, acredita-se que estas interajam com a AChE de modo parecido com o da tacrina. As estruturas das quinolinas sintetizadas permitem que ocorra interações do tipo empilhamento- π entre o anel quinolínico e o anel indólico do aminoácido Trp84. Além disso, caso o anel quinolínico disponha-se paralelamente ao grupo fenil do aminoácido Phe330, também é possível que se estabeleça uma forte interação π - π entre estes anéis.

Já os compostos **10** e **12**, mostraram-se excelentes inibidores da enzima AChE, com capacidade de inibição maior que 80%. Como estas moléculas são guanil-hidrazonas, possuem o grupo guanidina, que é um grupo catiônico. A inibição da ação da AChE, neste caso, pode ser realizada através da interação entre o grupo catiônico da guanil-hidrazona com o subsítio aniônico da AChE.

Pode-se observar, ao comparar os resultados obtidos para os compostos **3** e **12**, que, apesar de apresentarem estruturas base semelhantes (FIG. 4.29), a presença do grupamento guanil-hidrazona no composto **12** colaborou para que sua capacidade de inibir a enzima acetilcolinesterase fosse superior à do composto **3**. Esta observação é um indicio de que a capacidade adicional de inibição pode ser oriunda das interações deste composto em duas regiões da AChE simultaneamente: a molécula seria capaz de interagir com a enzima tanto por interações π - π características dos anéis aromáticos da porção quinolina, quanto por interações entre o grupo guanidina e o subsítio aniônico da enzima. Esta constatação é muito importante, já que indica uma promissora aplicação de guanil-hidrazonas como inibidores de AChE para auxiliarem no tratamento sintomático da doença de Alzheimer.

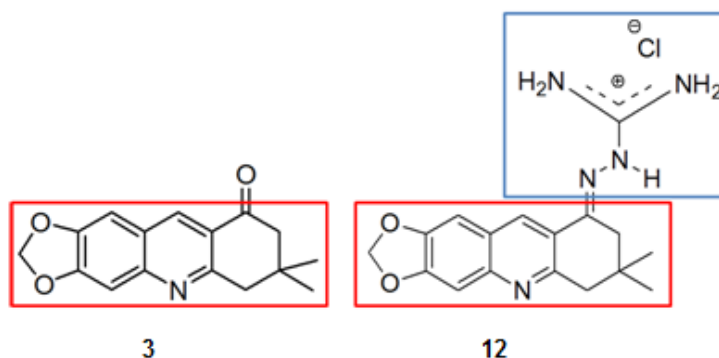


FIG. 4.29 Semelhança estrutural entre os compostos 3 e 12- em azul, destaca-se a presença do grupamento guanil-hidrazona no composto 12

O composto **11**, apesar de apresentar capacidade inibitória, demonstrou ser um inibidor relativamente ruim. Como este composto é estruturalmente similar ao composto **10**, que entre os compostos avaliados mostrou ser um excelente inibidor, acredita-se que a presença de diferentes substituintes levou a estes resultados significativamente distintos.

Como a polarização de guanil-hidrazonas aumenta na presença de substituintes eletronegativos (como o grupo nitro do composto **10**), os resultados obtidos pelos testes sugerem que este tipo de substituinte pode favorecer o processo de inibição por meio do deslocamento da nuvem eletrônica. Esta suposição indica que guanil-hidrazonas altamente polarizadas podem interagir melhor com o centro ativo da AChE.

Para que seja possível uma melhor compreensão dos resultados obtidos nos testes de inibição da enzima AChE pelos compostos sintetizados neste trabalho, pretende-se estudar, através de testes mais aprofundados e por modelagem molecular, como estes substituintes podem mudar o ambiente eletrônico da molécula a tal ponto de influenciar a capacidade inibitória das moléculas.

5 CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

5.1 CONCLUSÕES

A doença de Alzheimer é a principal causa de demência atualmente e, apesar de diversos estudos, ainda não foi possível desenvolver tratamentos que levassem à cura desta enfermidade. Entretanto, pode-se realizar o tratamento sintomático a fim de retardar a progressão do quadro da doença e, assim, permitir uma melhor qualidade de vida para o enfermo. Desta forma, muitos esforços são direcionados à obtenção de fármacos com aplicação nas diferentes hipóteses sugeridas para o surgimento dos sintomas característicos, tais como afasia, amnésia, entre outros.

Nosso grupo de pesquisa tem como foco a Hipótese Colinérgica e busca a síntese de compostos que possam ser inibidores das enzimas colinesterases. Para isso, utiliza-se como protótipo a tacrina, composto reconhecido por sua excelente capacidade de inibir a enzima acetilcolinesterase.

Este trabalho teve como objetivo a síntese de quinolinas estruturalmente semelhantes à tacrina e guanil-hidrazonas, ambas derivadas do composto 1,3-benzodioxole-5-carboxaldeído. Inicialmente, este composto sofreu uma nitração e o produto obtido teve seu grupo nitro reduzido a amino, de modo a permitir a síntese do composto **2**, sendo este composto essencial para a formação do anel quinolínico presente na tacrina.

As reações entre o composto **2** e os compostos carbonílicos mostraram-se muito eficientes na síntese de quinolinas similares à tacrina. A síntese das guanil-hidrazonas através da reação entre as respectivas quinolinas com o cloridrato de aminoguanidina também foram conduzidas de forma satisfatória.

Tanto as sínteses das quinolinas quanto as das guanil-hidrazonas apresentaram bons rendimentos, encontrando-se todos acima de 50%.

Entre os compostos derivados do 1,3-benzodioxole-5-carboxaldeído sintetizados, cinco foram testados e quatro destes foram avaliados como inibidores muito bons da enzima acetilcolinesterase. Estes resultados eram esperados, já que tanto quinolinas quanto guanil-hidrazonas são moléculas com ampla aplicação em

Química Medicinal e possuem características estruturais essenciais para a interação com o sítio ativo da enzima.

Os resultados indicam que a presença dos anéis aromáticos da estrutura base da tacrina nas quinolinas sintetizadas permite que estes compostos interajam adequadamente com o sítio ativo da AChE através de interações do tipo π - π com anéis aromáticos de aminoácidos presentes no sítio ativo. Já as guanil-hidrazonas, por possuírem o grupo catiônico guanidina, podem interagir com o sítio aniônico da AChE.

Entre os compostos avaliados, encontram-se os compostos **9** e **12**, inéditos na literatura, e ambos apresentaram resultados muito promissores quanto a potenciais inibidores da enzima AChE, sendo o composto **12** avaliado neste trabalho como um excelente inibidor.

A comparação entre as estruturas base dos compostos **3** e **12** permitiu observar que a presença de um grupamento guanil-hidrazona pode colaborar para o aumento da capacidade inibitória de um determinado composto.

Ao observar as estruturas dos compostos **10** e **11**, foi possível verificar que diferentes substituintes presentes na molécula podem influenciar significativamente na capacidade inibitória desta. A presença de grupos eletronegativos na molécula permite uma maior polarização através do deslocamento da nuvem eletrônica, favorecendo a interação mais eficiente com o sítio ativo da enzima acetilcolinesterase.

Os efeitos destes substituintes na molécula devem ser investigados através de testes mais aprofundados e também por Modelagem Molecular, para que, assim, seja possível o planejamento adequado de potenciais fármacos para o tratamento sintomático da doença de Alzheimer.

5.2 PERSPECTIVAS

Pretende-se realizar testes de inibição enzimática utilizando o RMN para os compostos sintetizados e ainda não avaliados, além de realizar outros testes, tais como o conhecido teste de Ellman, para todas as quinolinas e guanil-hidrazonas sintetizados neste trabalho.

Como a maior parte das moléculas sintetizadas apresentou boa capacidade inibitória da enzima acetilcolinesterase, pode-se tentar a síntese de outras quinolinas e guanil-hidrazonas derivadas do 1,3-benzodioxole-5-carboxaldeído.

A observação de que o substituinte presente na molécula pode causar efeitos significativos na capacidade de inibir indica que devem ser realizados outros estudos, para que, assim, seja possível identificar quais substituintes proporcionariam a obtenção de melhores protótipos a fármacos. Seria muito importante a realização de estudos através de modelagem molecular, por exemplo.

Adicionalmente, pretende-se realizar testes biológicos para a verificação da ação sobre micro-organismos.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALMEIDA, J. R. **Estudos de modelagem molecular e relação estrutura-atividade da acetilcolinesterase e inibidores em Mal de Alzheimer.** Dissertação de Mestrado, Universidade de São Paulo, 2011.
- ALZHEIMER'S ASSOCIATION. **Alzheimer's and Dementia in Brazil.** Disponível em: <http://www.alz.org/br/dementia-alzheimers-en.asp>.
- AMARAL, S. S. **Heterociclização entre 4-alcóxi-1,1,1-trifluór-3-alquen-2-onas e hidrazonas: metodologias seletivas para a obtenção de heterociclos trifluormetilados.** Tese de Doutorado, Universidade Federal de Santa Maria, 2009.
- ANDRADE DOS SANTOS, G. A. **Avaliação dos efeitos do tartarato de rivastigmina nas formas oral e transdérmica em pacientes com demência do tipo doença de Alzheimer.** Dissertação de Mestrado, Universidade Bandeirante de São Paulo, 2009.
- BARNHAM, K. J.; MASTERS, C. L.; CAPPAL, R.; VILLEMAGNE, V. L. J. **Molecular mechanisms for Alzheimer's disease: implications for neuroimaging and therapeutics.** *Neurochemistry*, v. 97, p. 1700–1725, 2006.
- BLENNOW, K.; DE LEON, M. J.; ZETTERBERG, H. **Alzheimer's disease.** *The Lancet*, v. 368, p. 387- 403, 2006.
- BOGERT, M. T.; ELDER, F. R. **The synthesis of 6-hydroxypiperonylic acid and incidental compounds.** *Journal of American Chemistry Society*, v. 51, p. 532-539, 1929.
- BONACORSO, H. G.; SILVA, L. B.; ROCHA, J. B. T.; NOGARA, P. A.; WACZUK, E. P.; SILVA, F. D' A.; BUENO, D. C.; KADER, Y. N. A. M.; MARTINS, M. A. P.; ZANATTA, N. **Synthesis, biological evaluation and molecular docking study of 7-amine-spiro[chromeno[4,3-b]quinoline-6,10-cycloalkanes] as new tacrine hybrids.** *Tetrahedron Letters*, v. 56, p. 7024–7027, 2015.
- BONDA, D. J.; LEE, H. G.; BLAIR, J. A.; ZHU, X.; PERRY, G.; SMITH, M. A. **Role of metal dyshomeostasis in Alzheimer's disease.** *Metallomics*, v. 3, p. 367–370, 2011.

- BORGES, M. N.; MESSEDER, J. C.; FIGUEROA-VILLAR, J. D. **Synthesis, anti-*Trypanosoma cruzi* activity and micelle interaction studies of bisguanylhydrazones analogous to pentamidin.** European Journal of Medicinal Chemistry, v. 39, p. 925-929, 2004.
- BURNS, A.; BYRNE, E. J.; MAURER, K. **Alzheimer's disease.** The Lancet, v. 360, p. 163-165, 2002.
- CALASANS-MAIA, J. A. **Bloqueadores neuromusculares - bases científicas e uso clínico em Anestesiologia: Capítulo 3.** SAERJ, 2002.
- CAMPBELL, K. N.; HOPPER, P. F.; CAMPBELL, B. K. **The preparation of methylenedioxy - methoxybenzaldehydes.** The Journal of Organic Chemistry, v. 16, p. 1736-41, 1951.
- CAMPS, P.; FORMOSA, X.; GALDEANO, C.; GÓMEZ, T.; DIEGO MUÑOZ-TORRERO, D.; RAMÍREZ, L.; VIAYNA, E.; GÓMEZ, E.; ISAMBERT, N.; LAVILLA, R.; BADIA, A.; CLOS, M. V.; BARTOLINI, M.; MANCINI, F.; ANDRISANO, V.; BIDON-CHANAL, A.; HUERTAS, Ó.; DAFNI, T.; LUQUE, F. J. **Tacrine-based dual binding site acetylcholinesterase inhibitors as potential disease-modifying anti-Alzheimer drug candidates.** Chemo-Biological Interactions, v. 187, p. 411-415, 2010.
- CASTELLANI, R. J.; ROLSTON, R. K.; SMITH, M. A. **Alzheimer disease.** Dis Mon, v. 56, p. 484-546, 2010.
- CHAUHAN, V.; CHAUHAN, A. **Oxidative stress in Alzheimer's disease.** Pathophysiology, v. 13, p. 195-208, 2006.
- CHEFFER, A.; ULRICH, H. **Inhibition mechanism of rat $\alpha 3\beta 4$ nicotinic acetylcholine receptor by the Alzheimer therapeutic tacrine.** Biochemistry, v. 50, p. 1763-1770, 2011.
- CLAYDEN, J.; GREEVES, N.; WARREN, S.; WOTHERS, P. **Organic Chemistry, 1^a ed.** Oxford University Press, p.349-351, 2000.
- CONTELLES, J. M.; MAYORAL, E. P.; SAMADI, A.; CARREIRAS, M. C.; SORIANO, E. **Recent advances in the Friedländer reaction.** Chemical Reviews, v. 109, p. 2652 -2671, 2009.

CORMA, A., MARTIN-ARANDA, R. M. **Alkaline-substituted sepiolites as a new type of strong base catalyst.** Journal of Catalysis, v. 130, p. 130-137, 1991.

COSTA, J. S. **Aplicação de haletos metálicos como novos catalisadores na síntese da tacrina e análogos.** Dissertação de Mestrado - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2010.

CUMMINGS, J. L.; COLE, G. **Alzheimer disease.** Journal of American Medical Association, v. 287, p. 2335-2338, 2002.

DALVI, A. **Alzheimer's disease.** Dis Mon, v. 58, p. 666-677, 2012.

DUCE, J. A.; BUSH, A. I. **Biological metals and Alzheimer's disease: Implications for therapeutics and diagnostics.** Progress in Neurobiology, v. 92, p. 1-18, 2010.

EKELEY, J. B.; KLEMM, M. S. **The nitration of piperonal.** Journal of American Chemistry Society, v. 50, p. 2711-15, 1928.

ELLMAN, G.L.; COURTNEY, K. D.; ANDRES, J. R. V.; FEATHERSTONE, R. M. **A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity.** Biochemical Pharmacology, v. 7, p. 88-90, 1961.

FERRI, C. P.; PRINCE, M., BRAYNE, C., BRODATY, H; FRATIGLIONI, L.; GANGULI, M.; HALL, K.; HASEGAWA, K.; HENDRIE, H.; HUANG, Y.; JORM, A.; MATHERS, C.; MENEZES, P. R.; RIMMER, E.; SCAZUFCA, M. **Global prevalence of dementia: a Delphi consensus study.** The Lancet, v. 366, p. 2112-17, 2005.

FISCHER, C.; SHAH, S.; HUGHES, B. L.; NIKOV, G. N.; CRISPINO, J. L.; MIDDLETON, R. E.; SZEWCZAK, A. A.; MUNOZ, B.; SHEARMAN, M. S. **Quinazolinones as γ -secretase modulators.** Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters, v. 21, p. 773-776, 2011.

FORLENZA, O.V. **Tratamento farmacológico da doença de Alzheimer,** Revista de Psiquiatria Clínica, v. 32, p. 137-148, 2005.

FREITAS, L. V.; SILVA, C. C. P.; ELLENA, J.; COSTA, L. A. S.; REY, N. A. **Structural and vibrational study of 8-hydroxyquinoline-2-carboxaldehydeisonicotinoylhydrazone – a potential metal protein**

- attenuating compound (MPAC) for the treatment of Alzheimer's disease.** Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy 116, 41–48, 2013.
- GUILOSKI, I. C.; DA SILVA, E. G.; NISHIKAWA, C. M.; DE ASSIS, H. C. S. **Atividade da colinesterase em cérebro e músculo de *Corydoras paleatus* (Pisces, Teleostei) expostos ao carbaril.** Revista Acadêmica de Ciências Agrárias e Ambientais, v. 8, p. 461-468, 2010.
- HAMPEL, H.; SHEN, Y.; WALSH, D. M.; AISEN, P.; SHAW, L. M.; ZETTERBERG, H.; TROJANOWSKI, J. Q.; BLENNOW, K. **Biological markers of amyloid β -related mechanisms in Alzheimer's disease.** Experimental Neurology, v. 223, p. 334–346, 2010.
- HAMULAKOVA, S.; JANOVEC, L.; HRABINOVA, M.; SPILOVSKA, K.; KORABECNY, J.; KRISTIAN, P.; KUCA, K.; IMRICH, J. **Synthesis and biological evaluation of novel tacrine derivatives and tacrine-coumarin hybrids as cholinesterase inhibitors.** Journal of Medicinal Chemistry, v. 57, p. 7073 -7084, 2014.
- HUANG, D.; LUTHI, U., KOLB, P.; CECCHINI, M.; BARBERIS, A.; CAFLISCH, A. **In silico discovery of β -secretase inhibitors.** Journal of American Chemistry Society, v. 128, p. 5436-5443, 2006.
- JACOBS, W. A.; HEIDELBERGER, M. **The ferrous sulfate and ammonia method for the reduction of nitro to amino compounds.** Journal of American Chemistry Society, v. 39, p. 1435-1439, 1917.
- KREUTZ, F. **Efeito do peptídeo β -amilóide sobre a biossíntese de gangliosídeos e avaliação da atividade neuroprotetora do GM1.** Dissertação de Mestrado, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2010.
- LEE, J.; SONG, L.; TERRACINA, G.; BARA, T.; JOSIEN, H.; ASBEROM, T.; SASIKUMAR, T. K.; BURNETT, D. A.; CLADER, J.; PARKER, E. M.; ZHANG, L. **Identification of presenilin 1-selective γ -secretase inhibitors with reconstituted γ -secretase complexes.** Biochemistry, v. 50, p. 4973-4980, 2011.
- MISHRA, G., SACHAN, N., CHAWLA, P. **Synthesis and evaluation of thiazolidinedione-coumarin adducts as antidiabetic, anti-inflammatory and antioxidant agents.** Letters in Organic Chemistry, v. 12, p. 429-445, 2015.

- MACCIONI, R., B.; FARÍAS, G.; MORALES, I.; NAVARRETE, L. **The revitalized tau hypothesis on Alzheimer's disease.** *Arquives of Medical Research*, v. 41, p. 226-231, 2010.
- MAIER, J. A. **Efeitos do extrato etanólico e frações purificadas de *Esenbeckialeiocarpa* Engl. (*Rutaceae*) na atividade anticolinesterásica e no comportamento de animais.** Dissertação de Mestrado, Instituto de Botânica da Secretaria de Estado do Meio Ambiente, São Paulo, 2010.
- MILARDI, D.; RIZZARELLI, E. **Neurodegeneration, metallostasis and proteostasis**, Eds. RSC, Cambridge, 2011.
- MINETT, T. S. C.; BERTOLUCCI, P. H. F. **Terapia colinérgica na doença de Alzheimer.** *Revista de Neurociências*, v. 8, p. 11-14, 2000.
- MOREIRA, P. A.; STEFANI, F. Y. **Tratamento farmacológico da doença de Alzheimer.** *Revista Acadêmica Oswaldo Cruz – Graduação e Pós-Graduação*, Ano 1, n.2, Janeiro-Março, 2012.
- MOUNICOU, S.; SZPUNAR, J.; LOBINSKI, R. **Metallomics: the concept and methodology.** *Chemical Society Reviews*, v. 38, p. 1119–1138, 2009.
- PARRILHA, G. L. **Complexos metálicos de hidrazonas, tiossemicarbazonas e lapachol: atividade farmacológica e avaliação de relações estrutura-atividade.** Tese de Doutorado, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2012.
- PATRICK, G. L. **An introduction to Medicinal Chemistry.** 1ª edição, Ed. Oxford University Press, Nova Iorque, 1995.
- PAVIA, D. L.; LAMPMAN, G. M.; KRIZ, G. S.; VYVYAN, J. R. **Introdução à espectroscopia.** 4ª edição, Ed. Cengage Learning, São Paulo, 2013.
- PETRONILHO, E. C. **Síntese e avaliação de hidrazonas como inibidoras e reativadoras da acetilcolinesterase.** Dissertação de Mestrado, Instituto Militar de Engenharia, 2011.

- PETRONILHO, E. C.; PINTO, A. C.; FIGUEROA-VILLAR, J. D. **Acetilcolinesterase: Alzheimer e guerra química.** Revista Militar de Ciência e Tecnologia, 3º trimestre, p. 3-14, 2011.
- PETRONILHO, E. C.; RENNÓ, M. N.; CASTRO, N. G.; SILVA, F. M. R.; PINTO, A. C.; FIGUEROA-VILLAR, J. D. **Design, synthesis, and evaluation of guanylhydrazones as potential inhibitors or reactivators of acetylcholinesterase.** Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry, v. 11, p. 1-10, 2015.
- PINHATTI, V. R. **Avaliação das atividades biológicas e genotóxicas em dois derivados de guanil-hidrazonas.** Dissertação de Mestrado, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2009.
- PISONI, D. S. **Síntese e avaliação biológica de novas tetraidroacridinas quirais obtidas a partir de cetonas terpênicas.** Tese de Doutorado, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2010.
- PROLA, L. D. **Síntese de 3-haloacetil-4-metilquinonas utilizando liquid iônico sob irradiação de micro-ondas.** Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de Santa Maria, 2011.
- QUERFURTH, H.; LAFERLA, F. M. **Alzheimer's disease.** The New England Journal of Medicine, v. 362, p. 329-344, 2010.
- QUINN, D. M. **Acetylcholinesterase: enzyme structure, reaction dynamics and virtual transition states.** Chemical Reviews, v. 87, p. 955-979, 1987.
- ROMERO, A.; CACABELOS, R.; OSET-GASQUE, M. J.; SAMADI, A.; MARCO-CONTELLES, J. **Novel tacrine-related drugs as potential candidates for the treatment of Alzheimer's disease.** Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters, v. 23, p. 1916–1922, 2013.
- RUBEY, R. **The cholinesterase inhibitors.** Journal of Psychiatric Practice, v. 9, p. 422 -430, 2003.
- SANTOS, F. M. C. S. **A doença de Alzheimer – importância dos metais na neuropatologia da doença.** Dissertação de Mestrado, Universidade Fernando Pessoa, 2011.

- SIDHU, A., RAI, M. **Reaction of ethyl cyanoacetate with benzal-4-acetylanilines: an unexpected result.** Indian Journal of Chemistry, v. 47B, p. 778-780, 2008.
- SILVA, S. V. **Estudo semi-empírico da inibição da enzima AChE por policetídeos extraídos da esponja marinha *Plakortis angulospiculatus*.** Dissertação de Mestrado, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, 2009.
- SILVERSTEIN, R. M.; WEBSTER, F. X.; KIEMLE, D. J. **Identificação Espectrométrica de Compostos Orgânicos.** 6ª edição, Ed. LTC, Rio de Janeiro, 2000.
- SOARES, S. F. C. X. **Estudos por Ressonância Magnética Nuclear e Modelagem Molecular do efeito de oximas na inibição e reativação da acetilcolinesterase inibida por Paraoxon.** Dissertação de Mestrado, Instituto Militar de Engenharia, 2011.
- SOARES, S. F. C. X.; VIEIRA, A. A.; DELFINO, R. T.; FIGUEROA-VILLAR, J. D. **NMR determination of Electrophorus electricus acetylcholinesterase inhibition and reactivation by neutral oximes.** Bioorganic Medicinal Chemistry, v. 21, p. 5923-30, 2013.
- TRAVAGLIA, A.; PIETROPAOLO, A.; LA MENDOLA, D.; NICOLETTI, V. G.; RIZZARELLI, E. **The inorganic perspectives of neurotrophins and Alzheimer's disease.** The Journal of Inorganic Biochemistry, v. 111, p. 130 - 137, 2012.
- TREBBASTONI, A.; GILIO, F.; D'ANTONIO, F.; CAMBIERI, C.; CECCANTI, M.; DE LENA, C.; INGHILLERI, M. **Chronic treatment with rivastigmine in patients with Alzheimer's disease: A study on primary motor cortex excitability tested by 5 Hz-repetitive transcranial magnetic stimulation.** Clinical Neurophysiology, v. 123, p. 902–909, 2012.
- TSUNO N. **Donepezil in the treatment of patients with Alzheimer's disease.** Expert Review of Neurotherapeutics, v. 9, p. 591–598, 2009.
- WINSLOW, B. T.; ONYSKO, M. K.; STOB, C. M.; HAZLEWOOD, K. A. **Treatment of Alzheimer disease.** American Family Physician, v. 83, p. 1403 -1412, 2011.
- WOLFE, M. S. **Introduction to special issue on Alzheimer's disease.** Journal of Medicinal Chemistry, v. 55, p. 8977–8978, 2012.

YANG, Z., ZHANG, D., REN, J., YANG, M. **Skimmianine, a furoquinoline alkaloid from *Zanthoxylum nitidum* as a potential acetylcholinesterase inhibitor.** Medicinal Chemistry Research, v. 21, p. 722–725, 2012.

YONEZAWA, S.; FUJIWARA, K.; YAMAMOTO, T.; HATTORI, K.; YAMAKAWA, H.; MUTO, C.; HOSONO, M.; TANAKA, Y.; NAKANO, T.; TAKEMOTO, H.; ARISAWA, M.; SHUTO, S. **Conformational restriction approach to b-secretase (BACE1) inhibitors III: Effective investigation of the binding mode by combinational use of X-ray analysis, isothermal titration calorimetry and theoretical calculations.** Bioorganic & Medicinal Chemistry, v. 21, p. 6506–6522, 2013.

ZATTA, P.; DRAGO, D.; BOLOGNIN, S.; SENSI, S. L. **Alzheimer's disease, metal ions and metal homeostatic therapy.** Trends in Pharmacological Sciences, v. 30, p. 346-355, 2009.

ZHAO, T.; DING, K., ZHANG, L., CHENG, X., WANG, C., WANG, Z. **Acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase inhibitory activities of β -carboline and quinoline alkaloids derivatives from the plants of genus *Peganum*.** Journal of Chemistry, v. 2013, 2013.

7 APÊNDICES

7.1 APÊNDICE 1 – ESPECTROS DE RMN DE ^1H

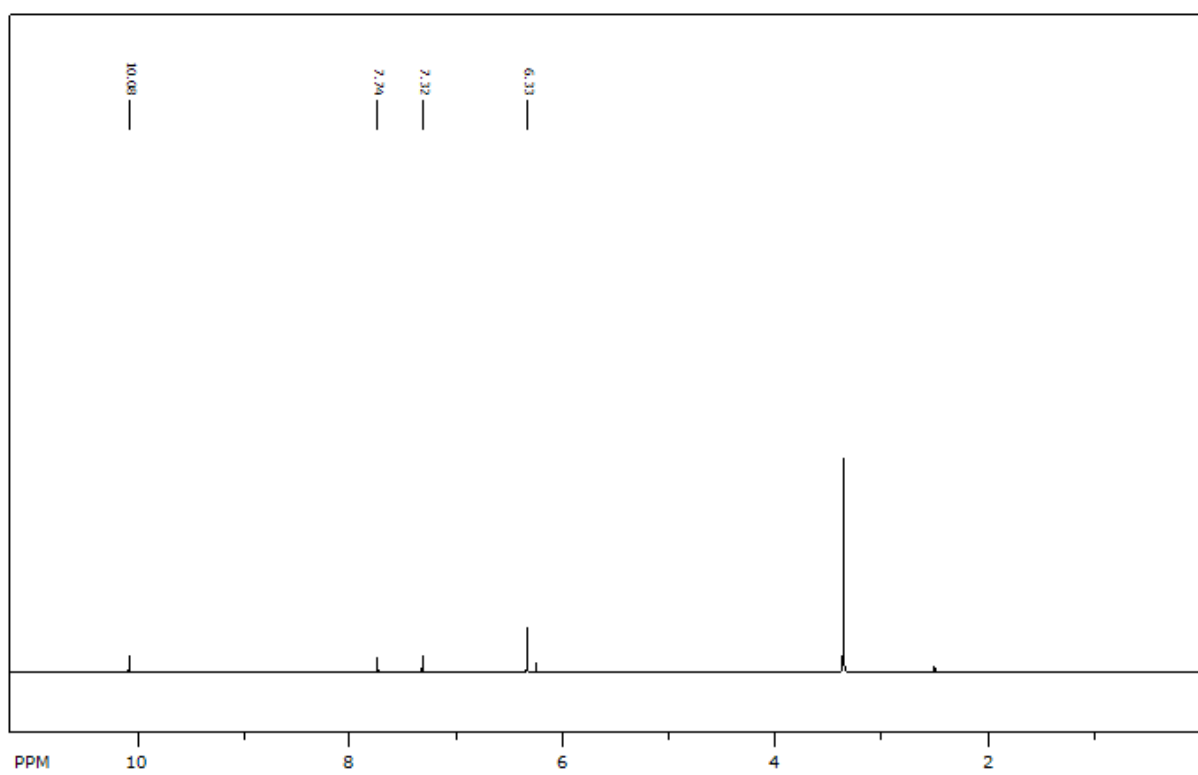
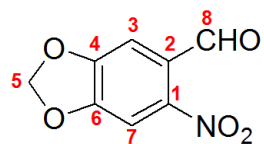


FIG. 7.1 Espectro de RMN de ¹H do composto 1

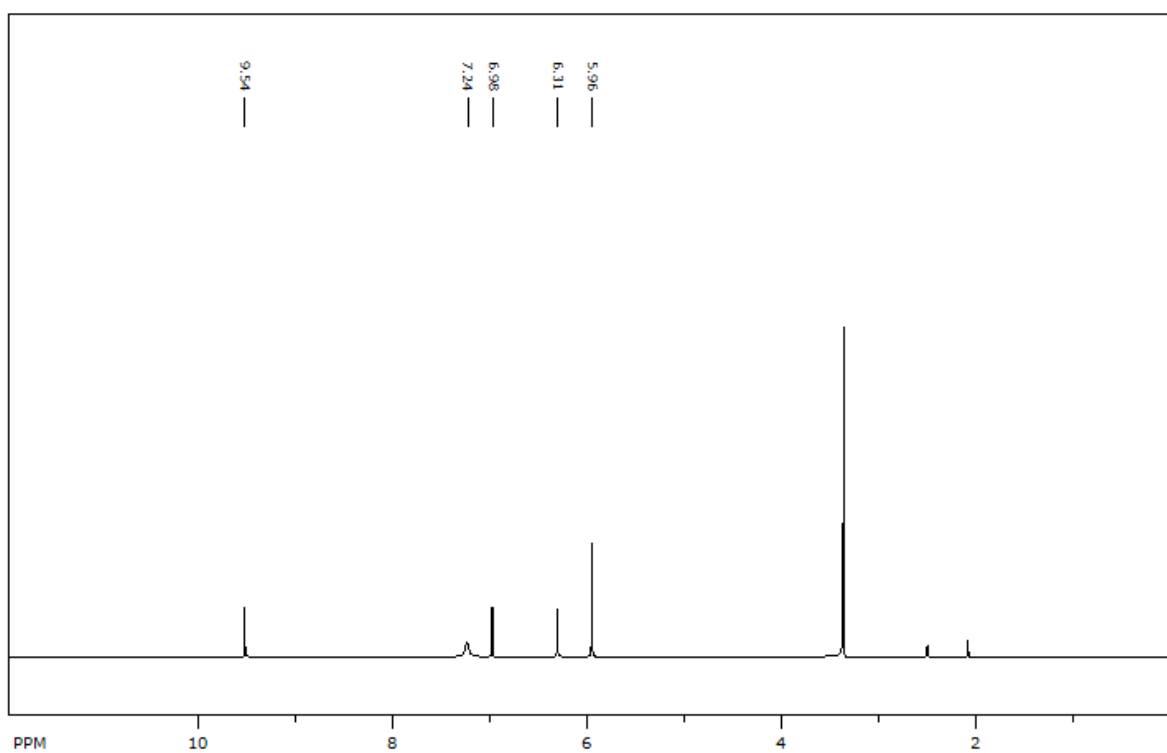
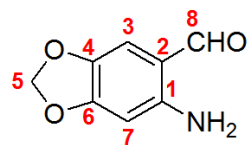


FIG. 7.2 Espectro de RMN de ¹H do composto 2

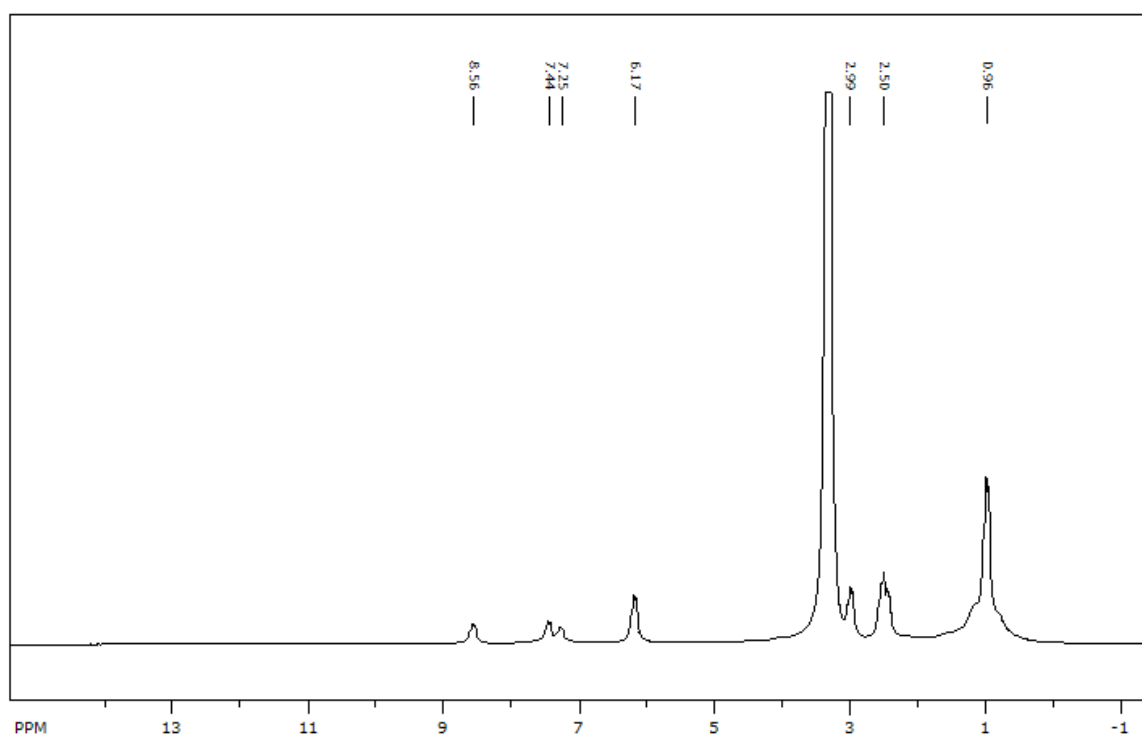
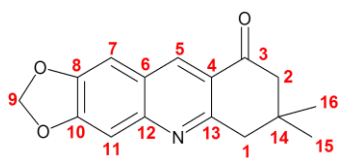


FIG. 7.3 Espectro de RMN de ¹H do composto 3

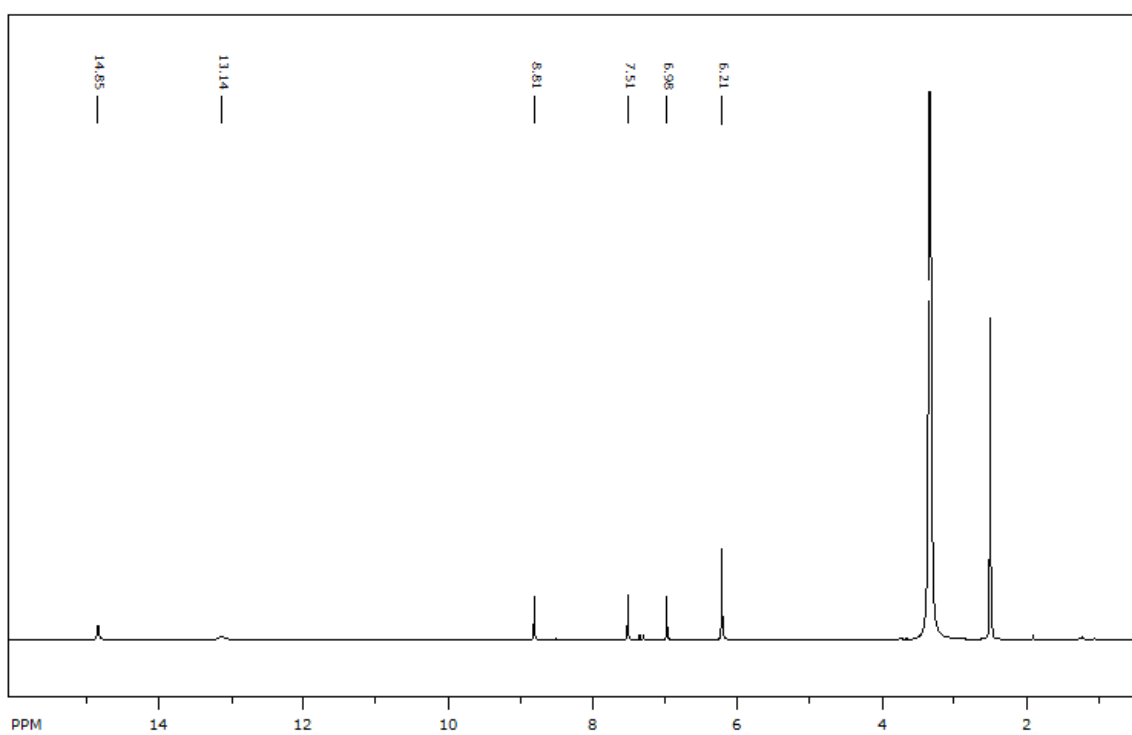
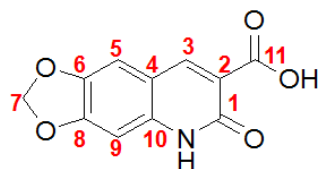


FIG. 7.4 Espectro de RMN de ¹H do composto 4

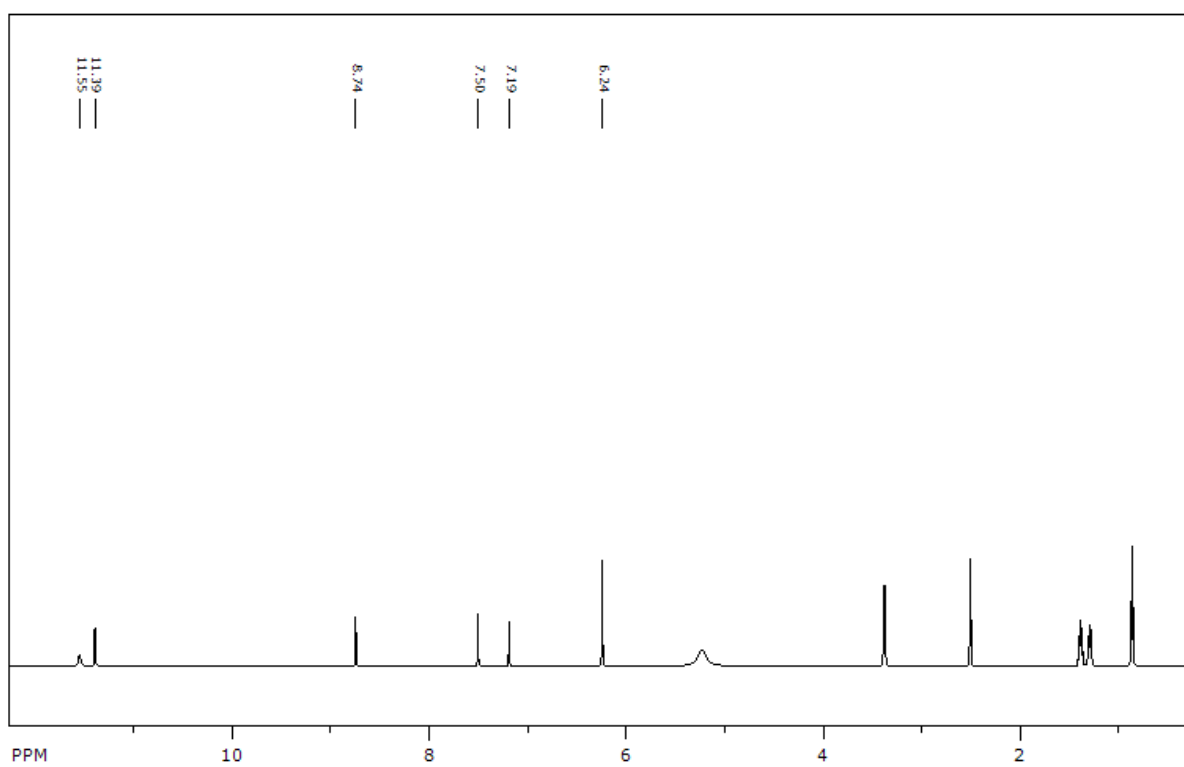
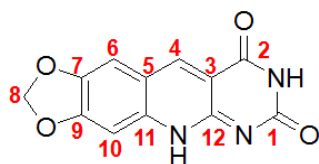


FIG. 7.5 Espectro de RMN de ¹H do composto 5

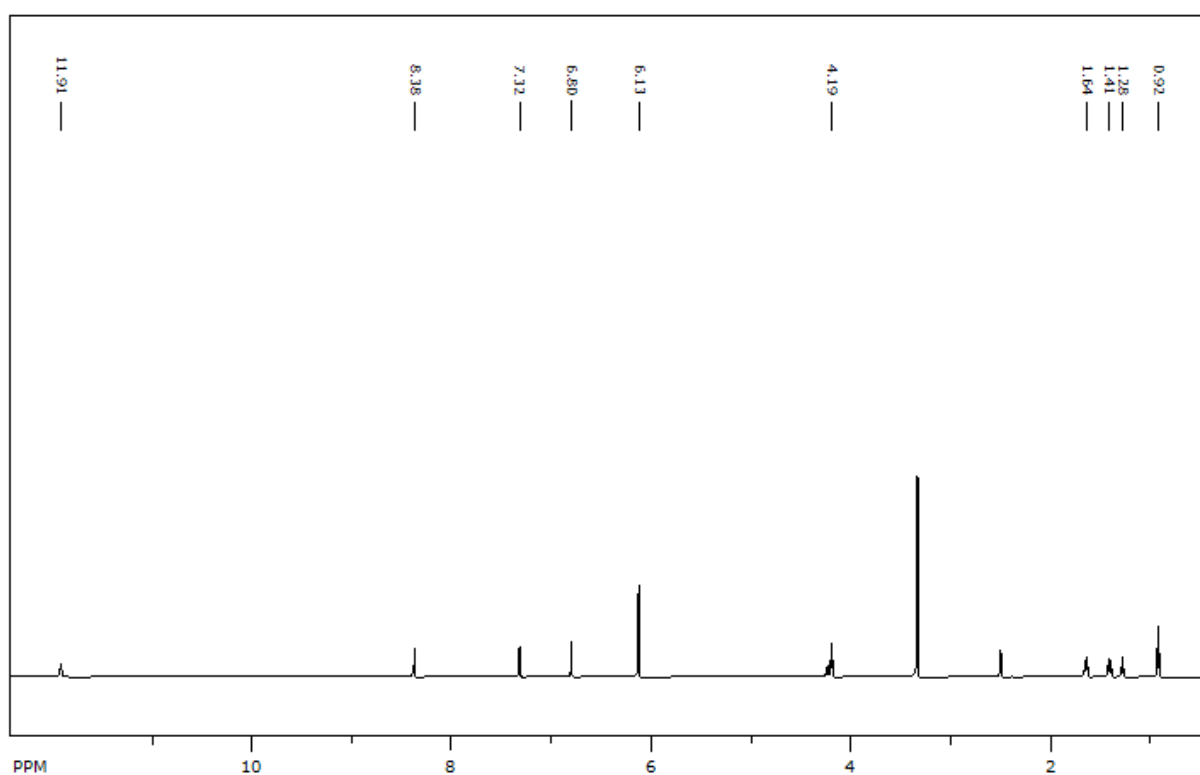
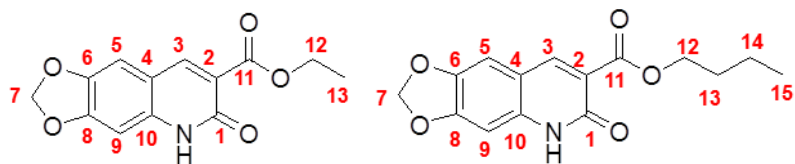


FIG. 7.6 Espectro de RMN de ^1H dos compostos 6 e 7

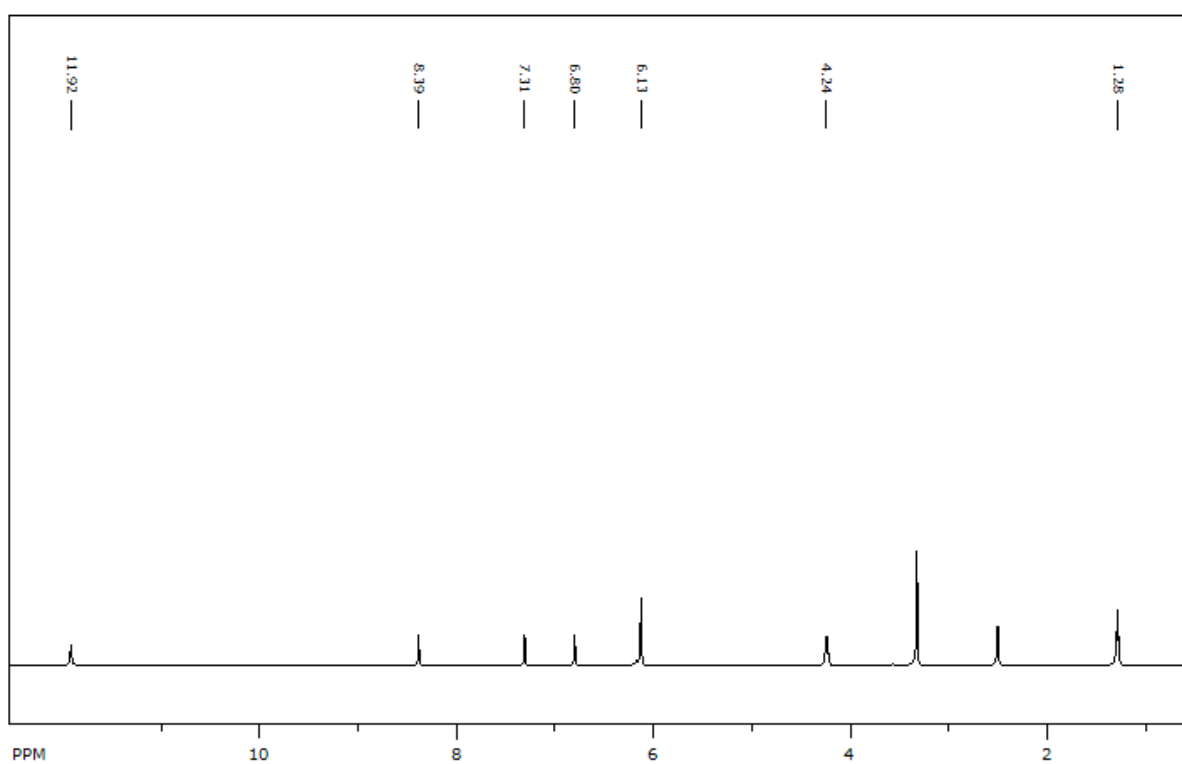
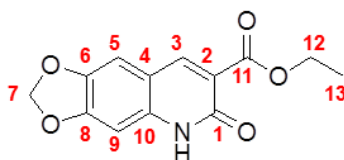


FIG. 7.7 Espectro de RMN de ¹H do composto 7

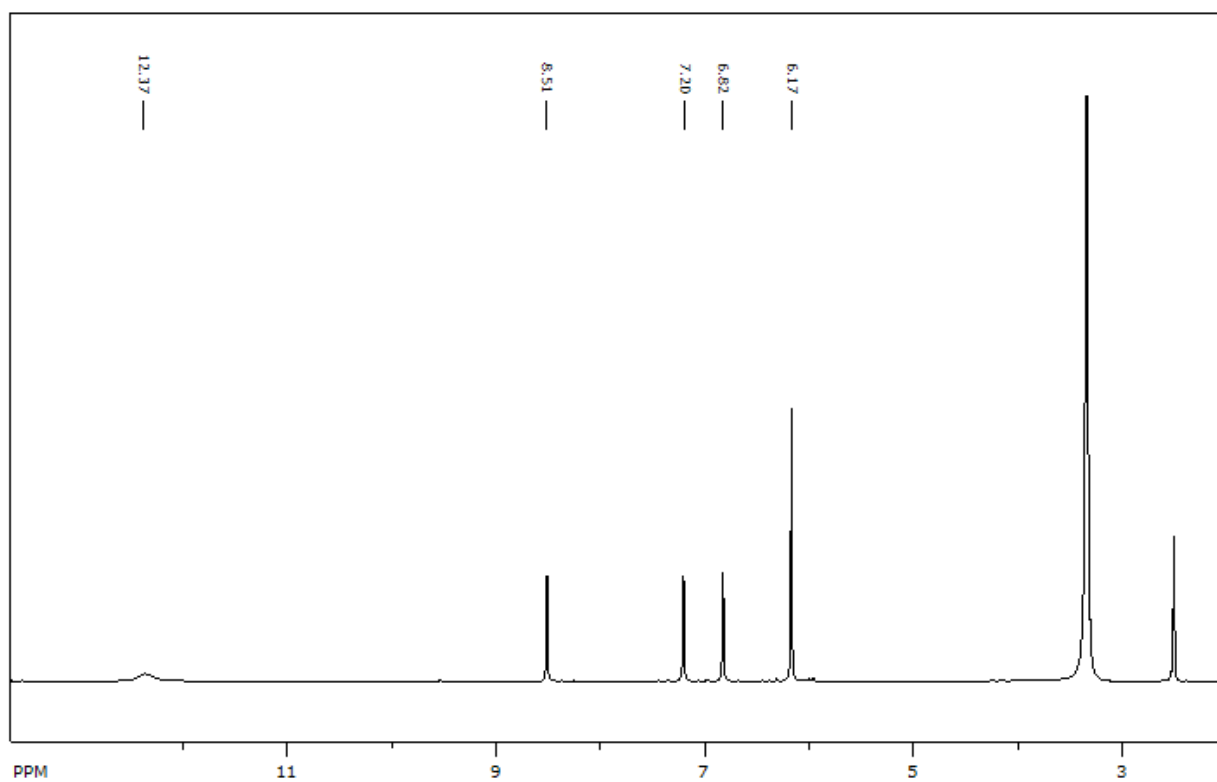
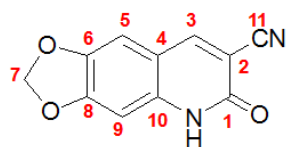


FIG. 7.8 Espectro de RMN de ¹H do composto 8

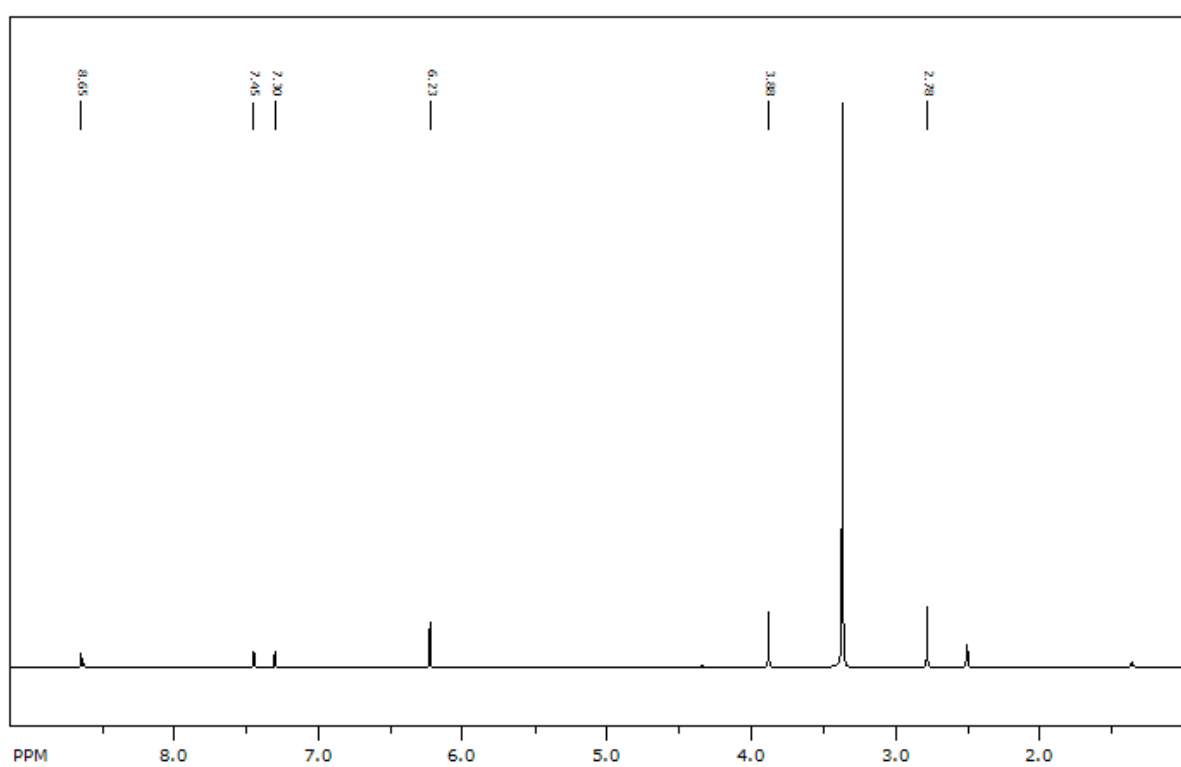
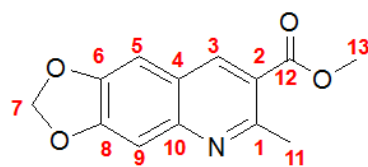


FIG. 7.9 Espectro de RMN de ^1H do composto 9

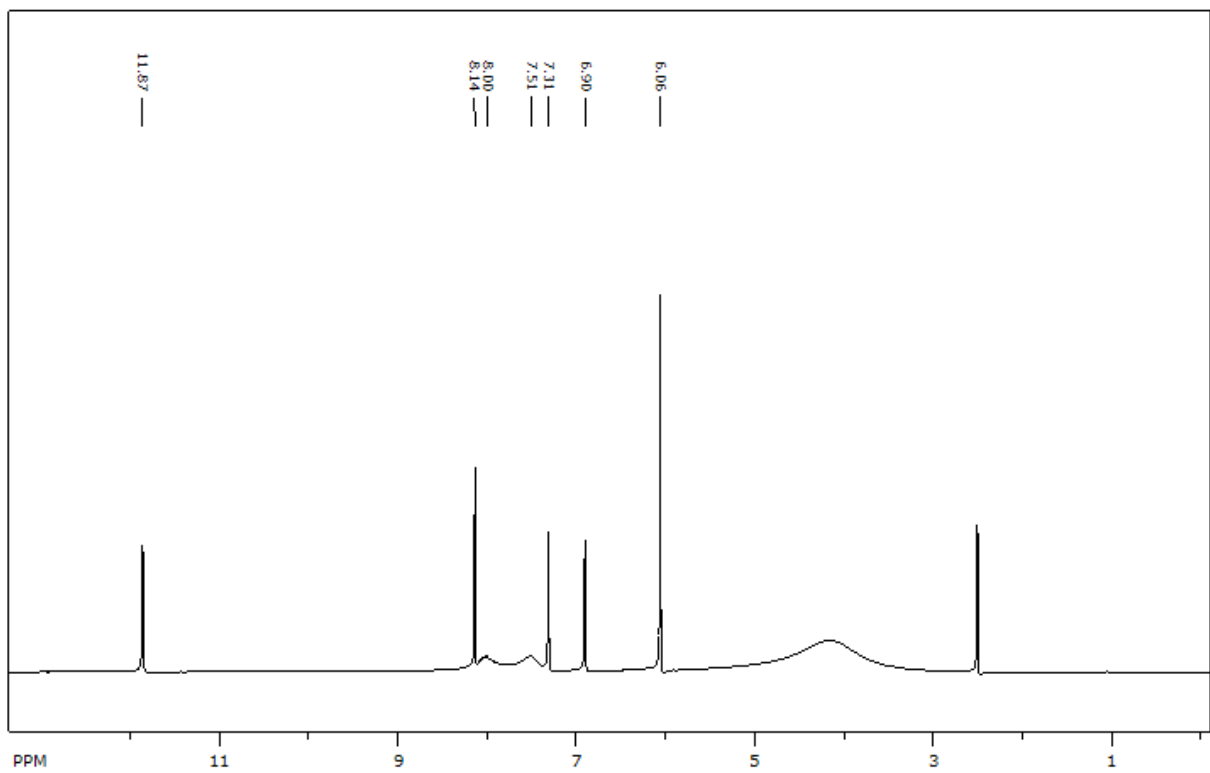
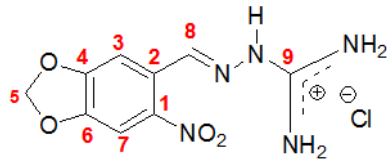


FIG. 7.10 Espectro de RMN de ¹H do composto 10

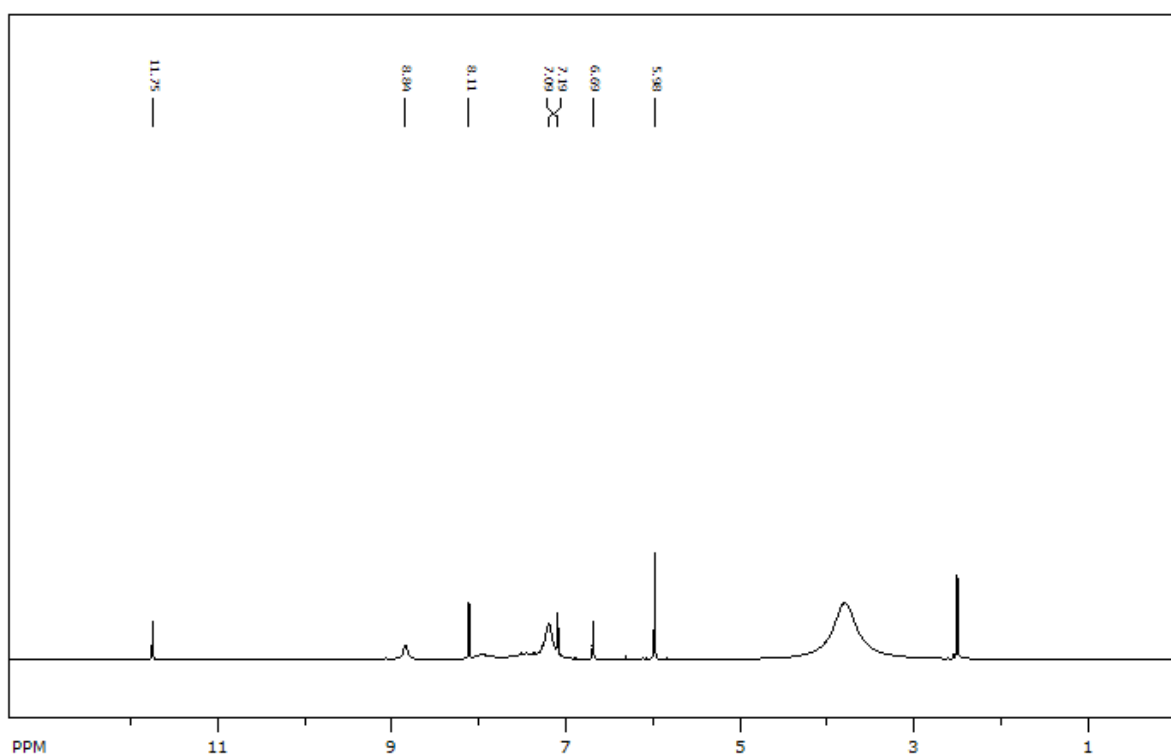
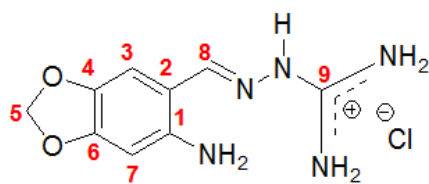


FIG. 7.11 Espectro de RMN de ^1H do composto 11

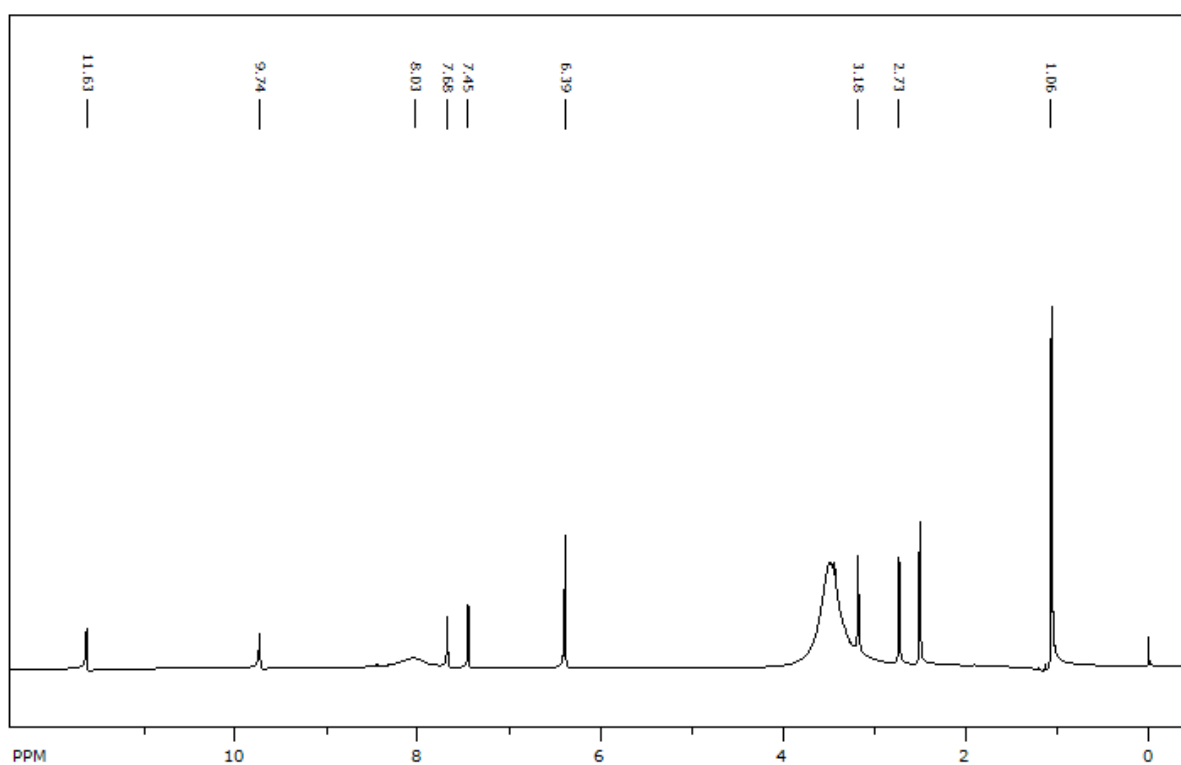
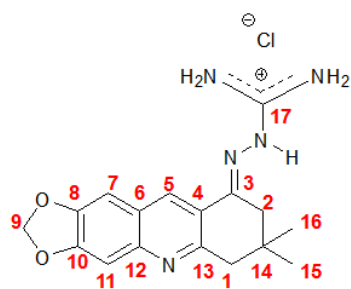


FIG. 7.12 Espectro de RMN de ^1H do composto 12

7.2 APÊNDICE 2 – ESPECTROS DE RMN DE ^{13}C

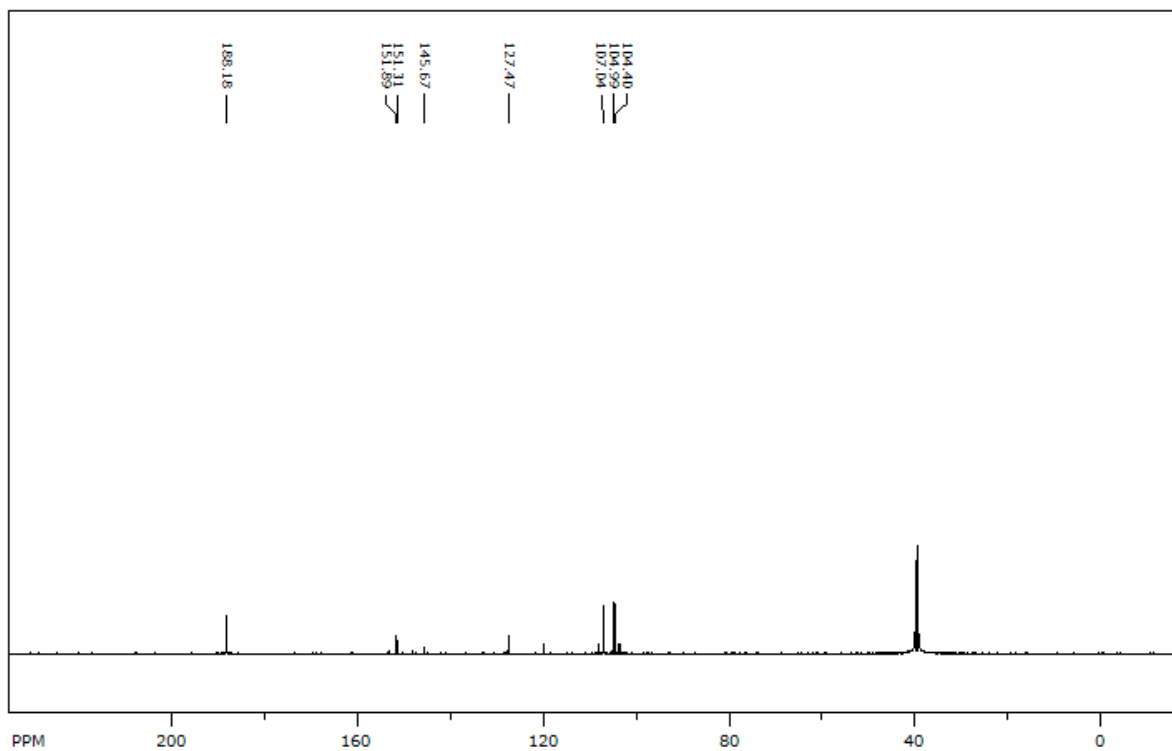
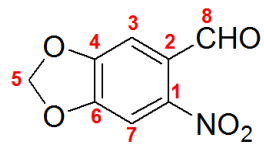


FIG. 7.13 Espectro de RMN de ^{13}C do composto 1

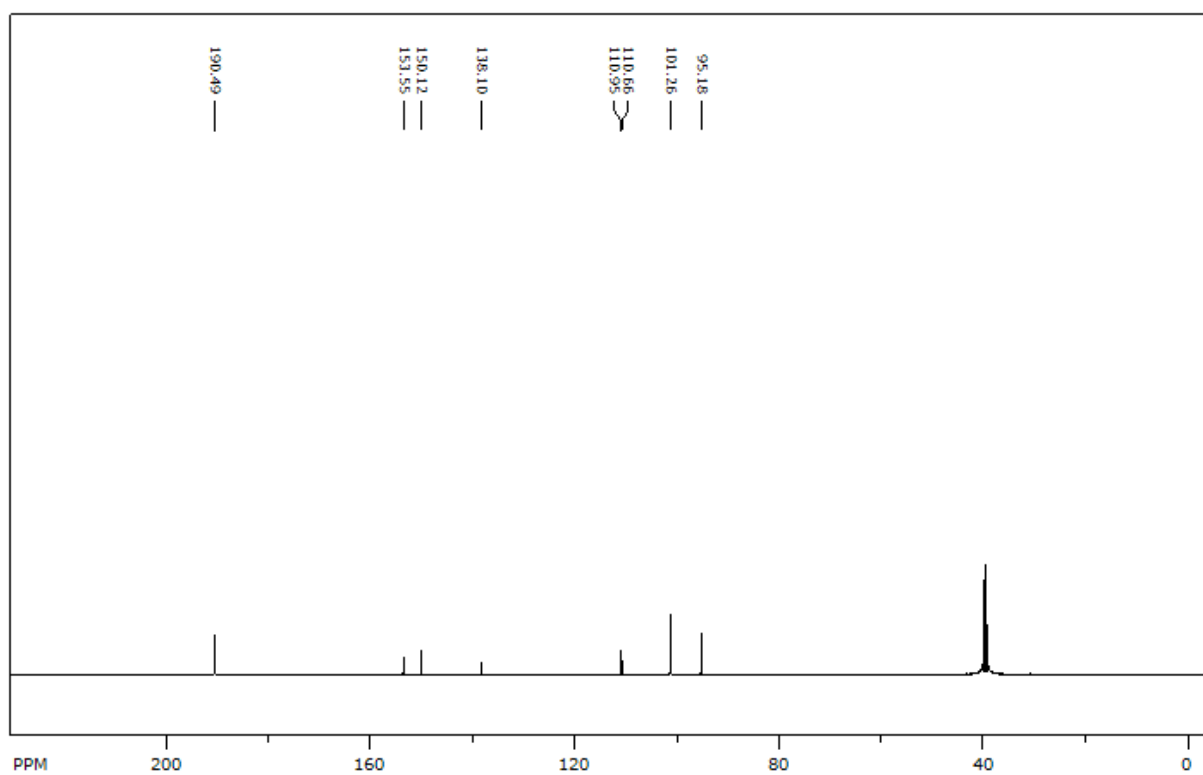
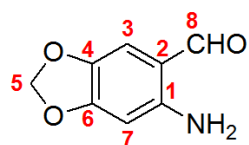


FIG. 7.14 Espectro de RMN de ^{13}C do composto 2

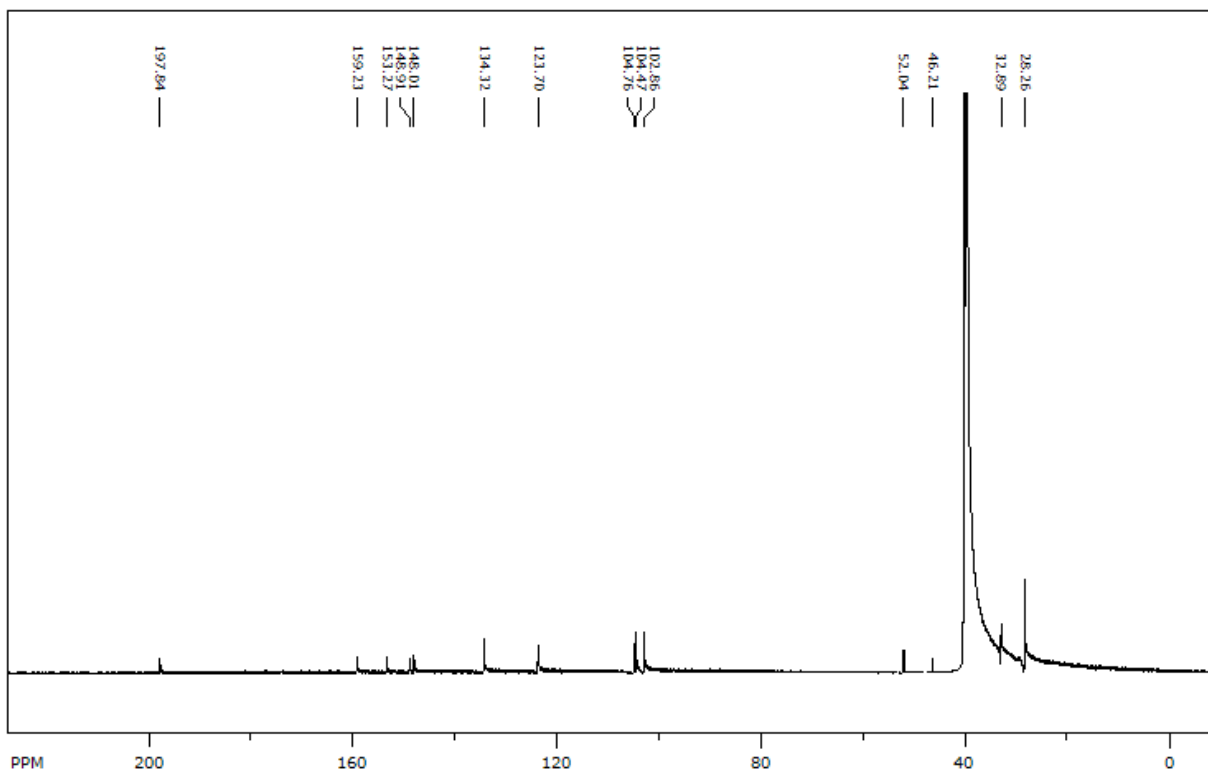
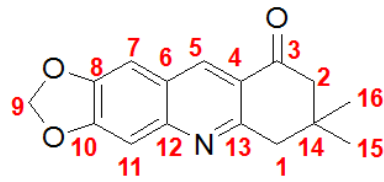


FIG. 7.15 Espectro de RMN de ^{13}C do composto 3

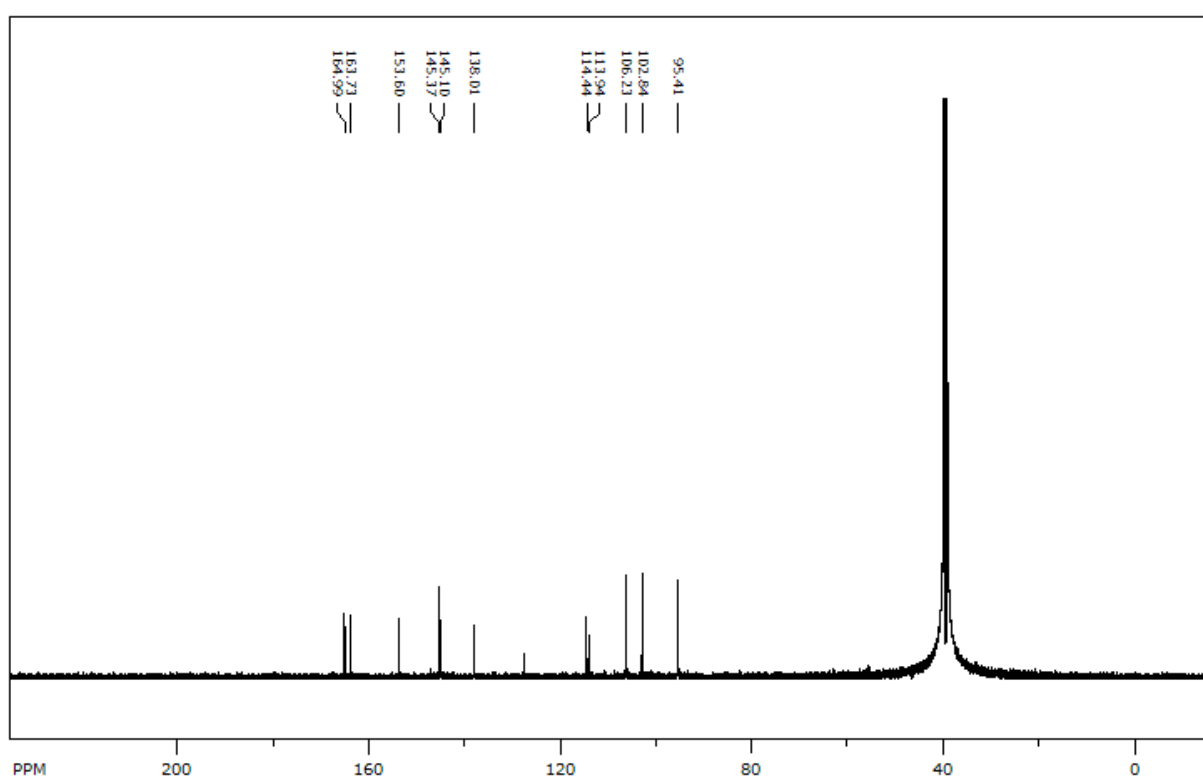
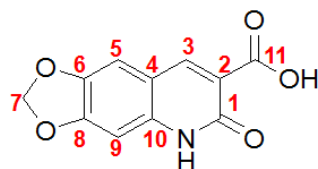


FIG. 7.16 Espectro de RMN de ^{13}C do composto 4

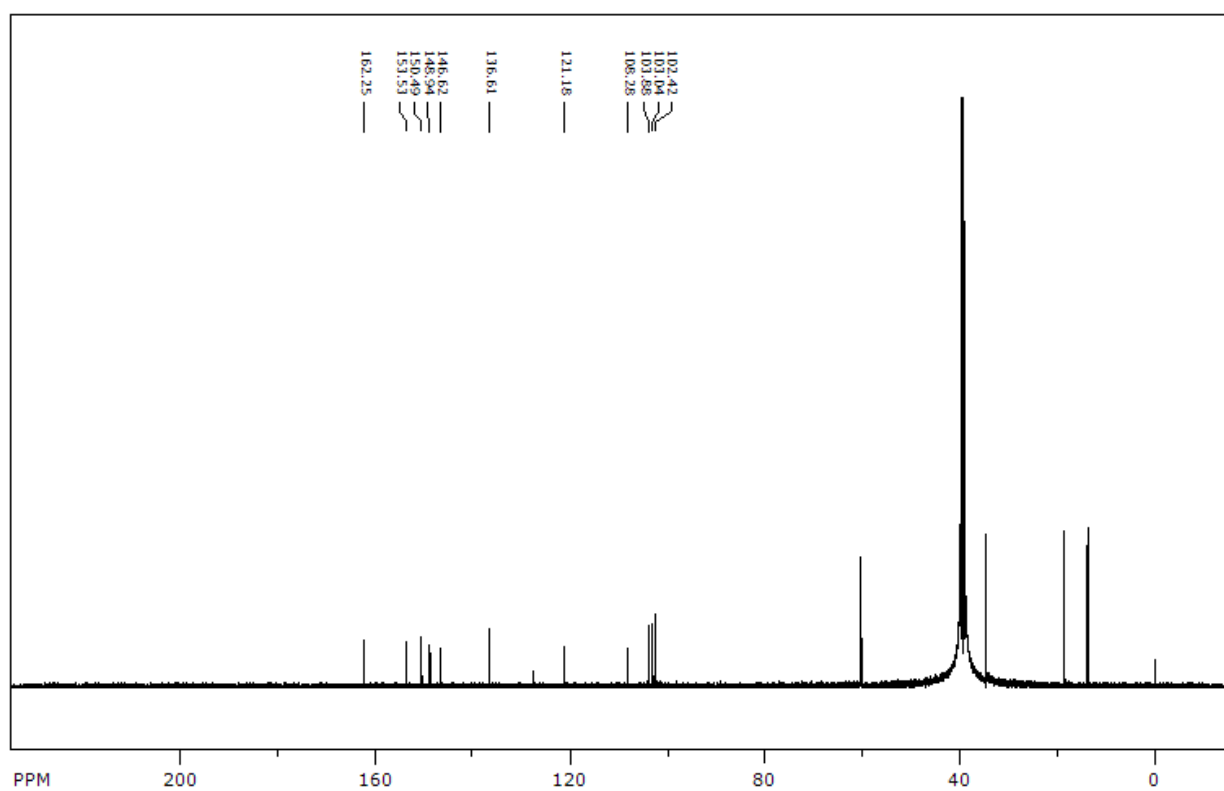
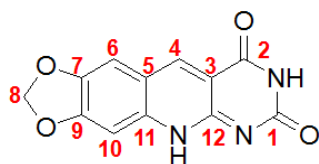


FIG. 7.17 Espectro de RMN de ^{13}C do composto 5

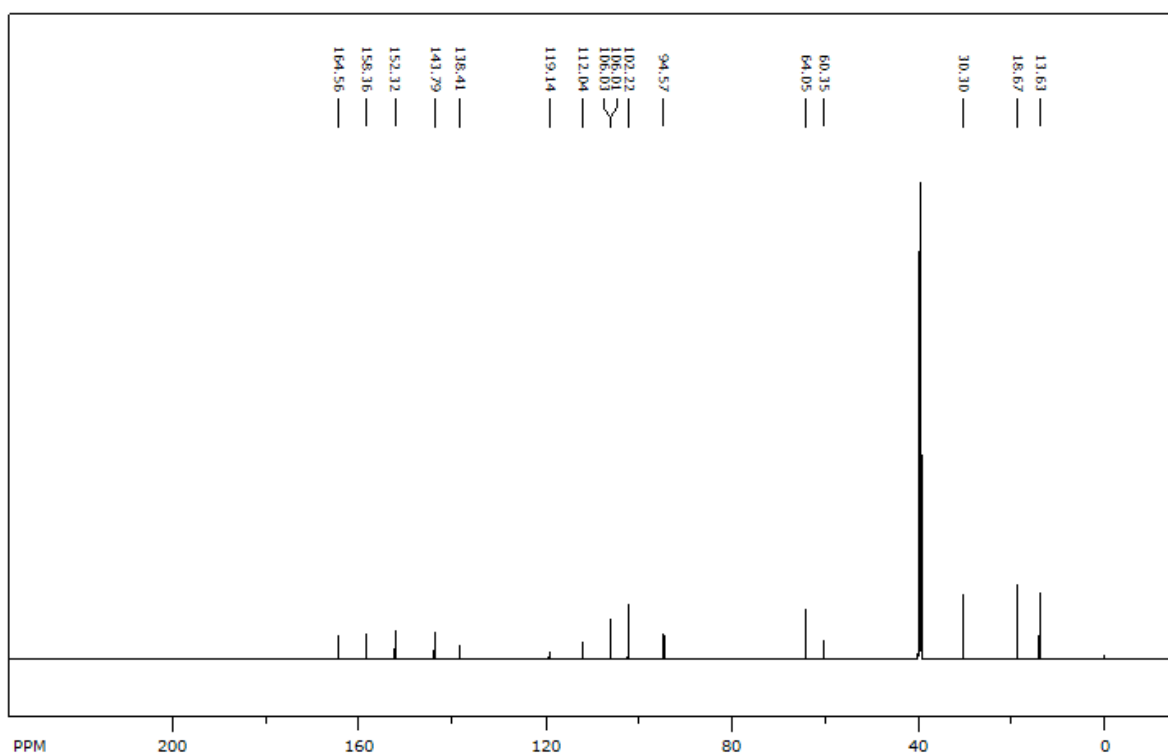
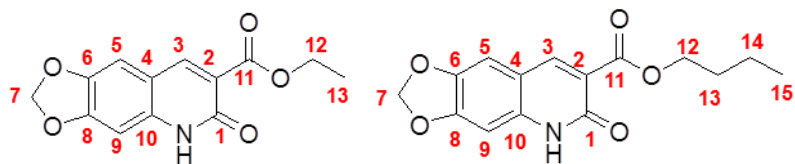


FIG. 7.18 Espectro de RMN de ^{13}C dos compostos 6 e 7

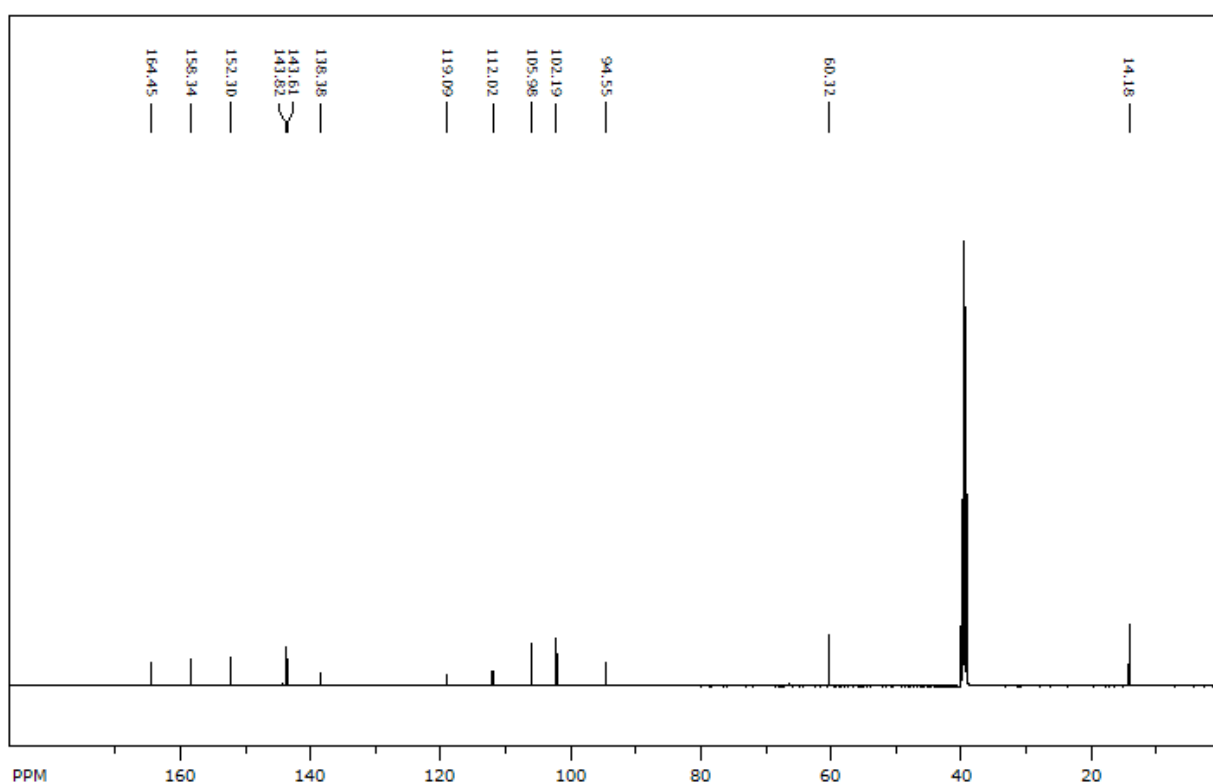
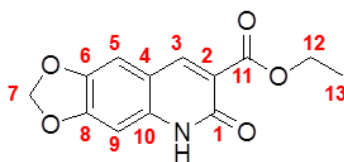


FIG. 7.19 Espectro de RMN de ^{13}C do composto 7

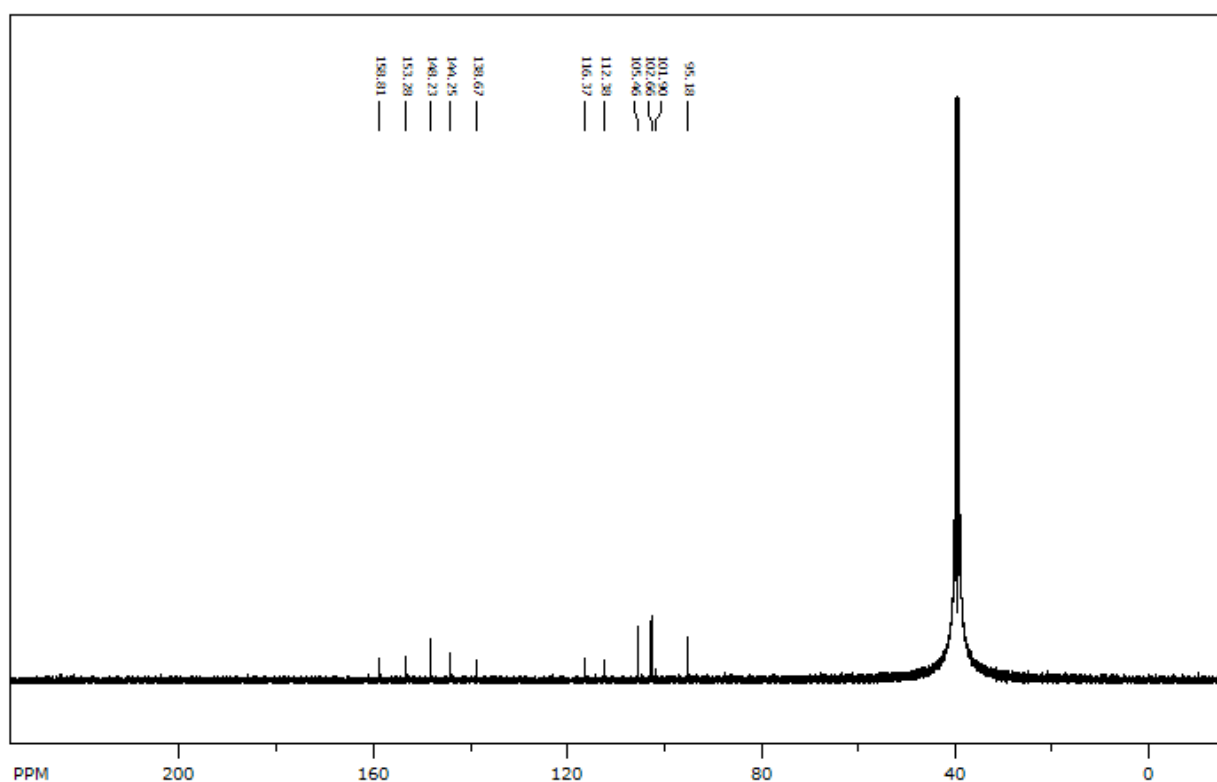
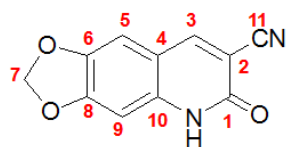


FIG. 7.20 Espectro de RMN de ^{13}C do composto 8

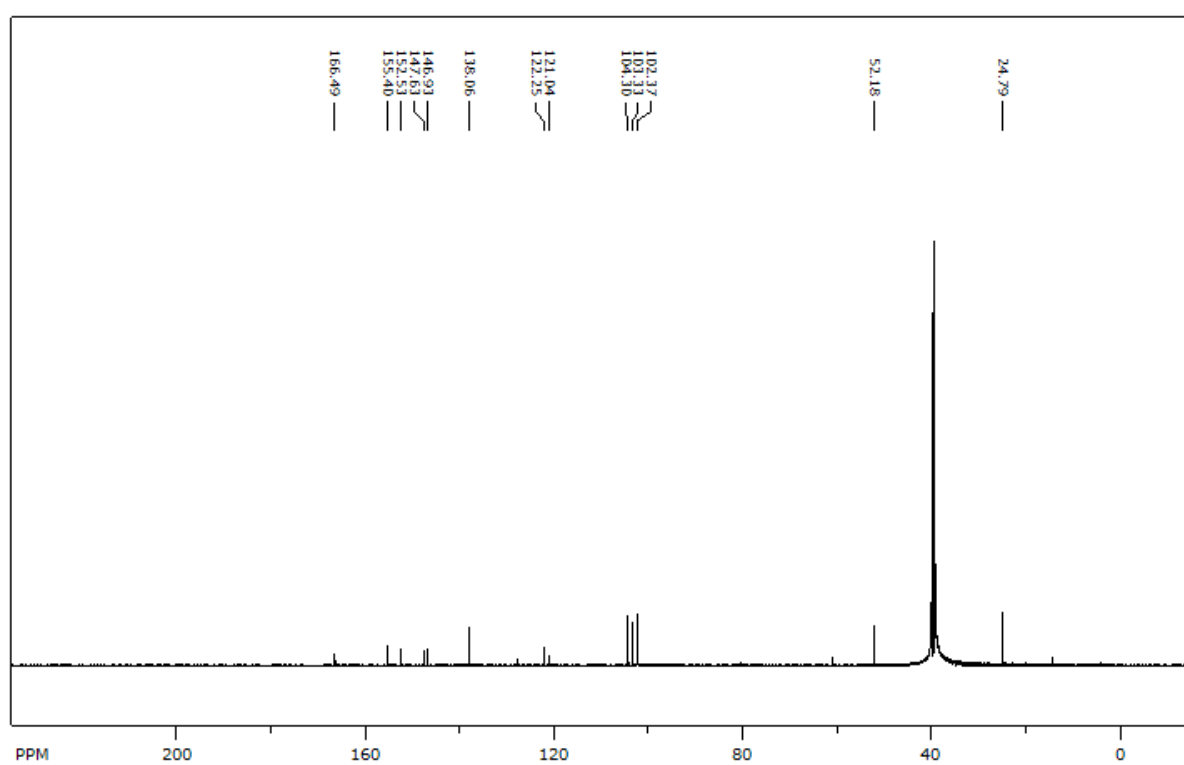
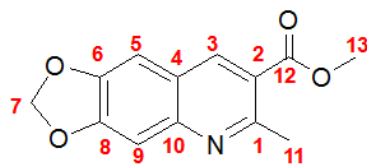


FIG. 7.21 Espectro de RMN de ^{13}C do composto 9

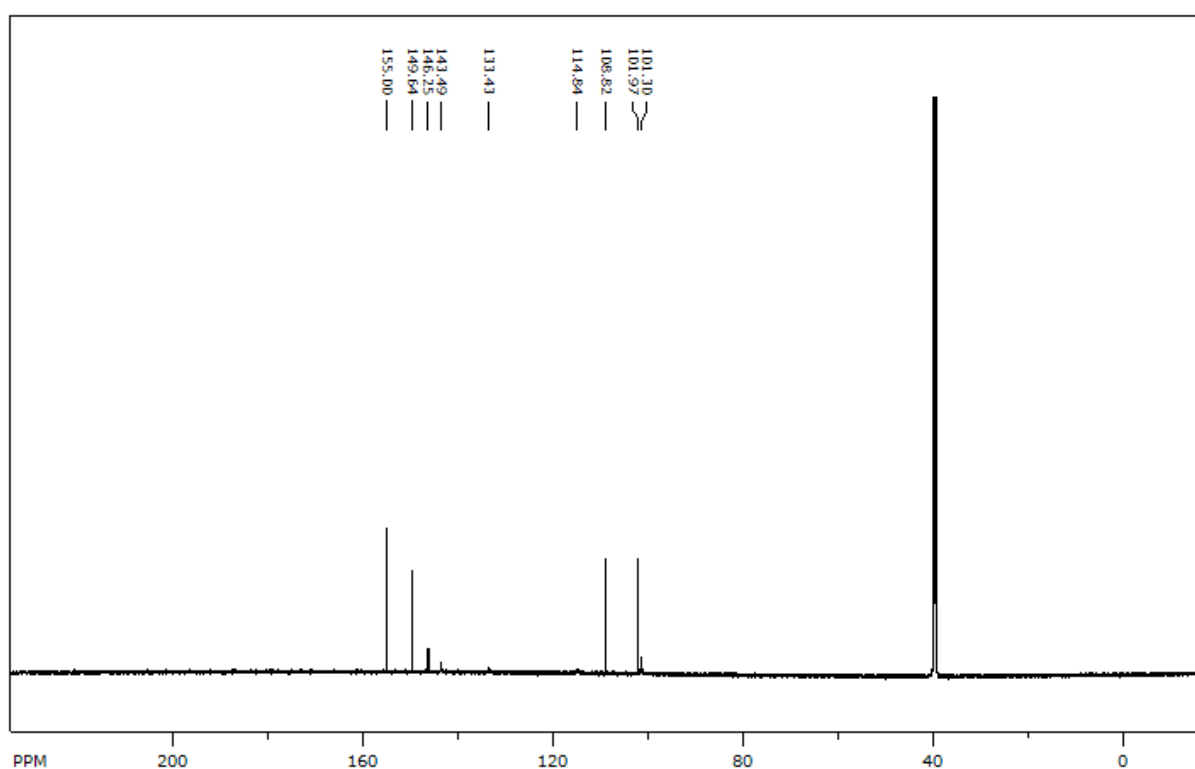
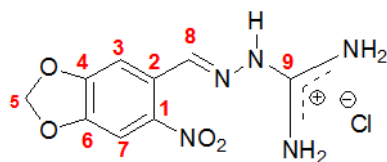


FIG. 7.22 Espectro de RMN de ^{13}C do composto 10

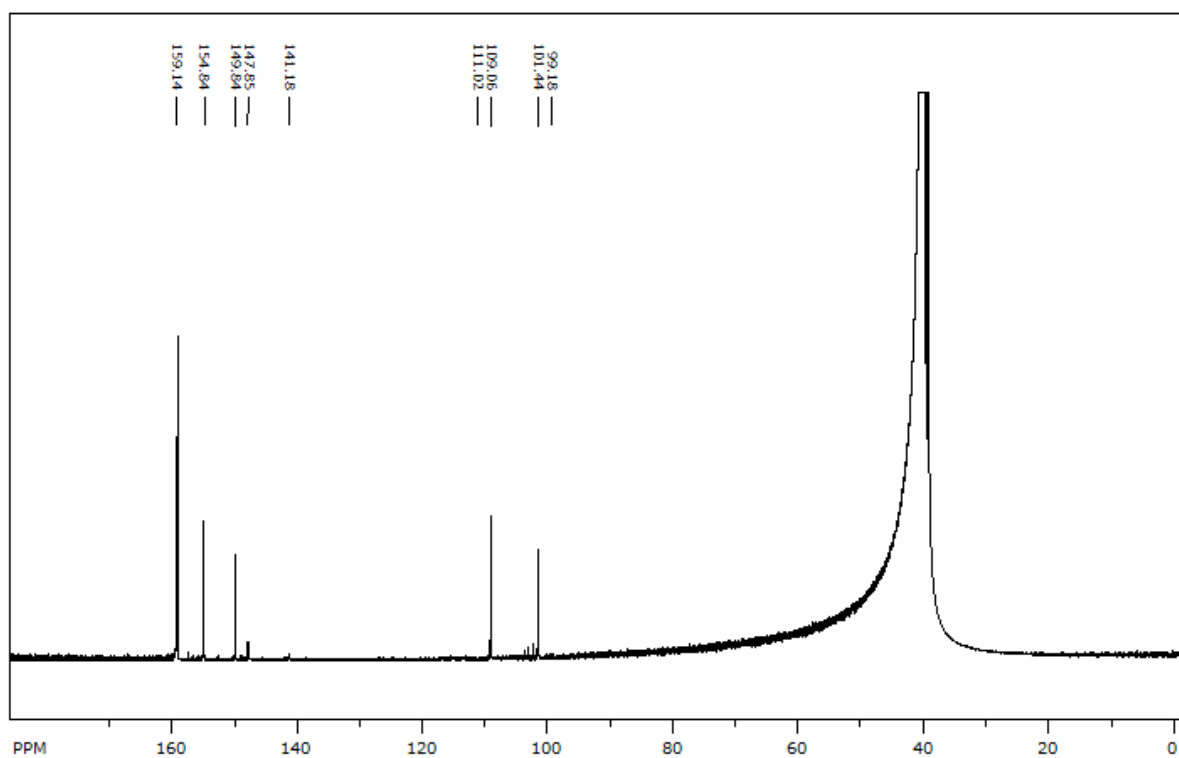
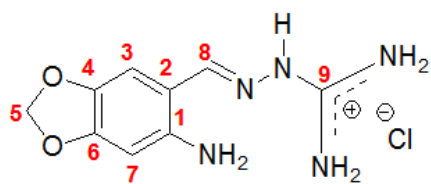


FIG. 7.23 Espectro de RMN de ^{13}C do composto 11

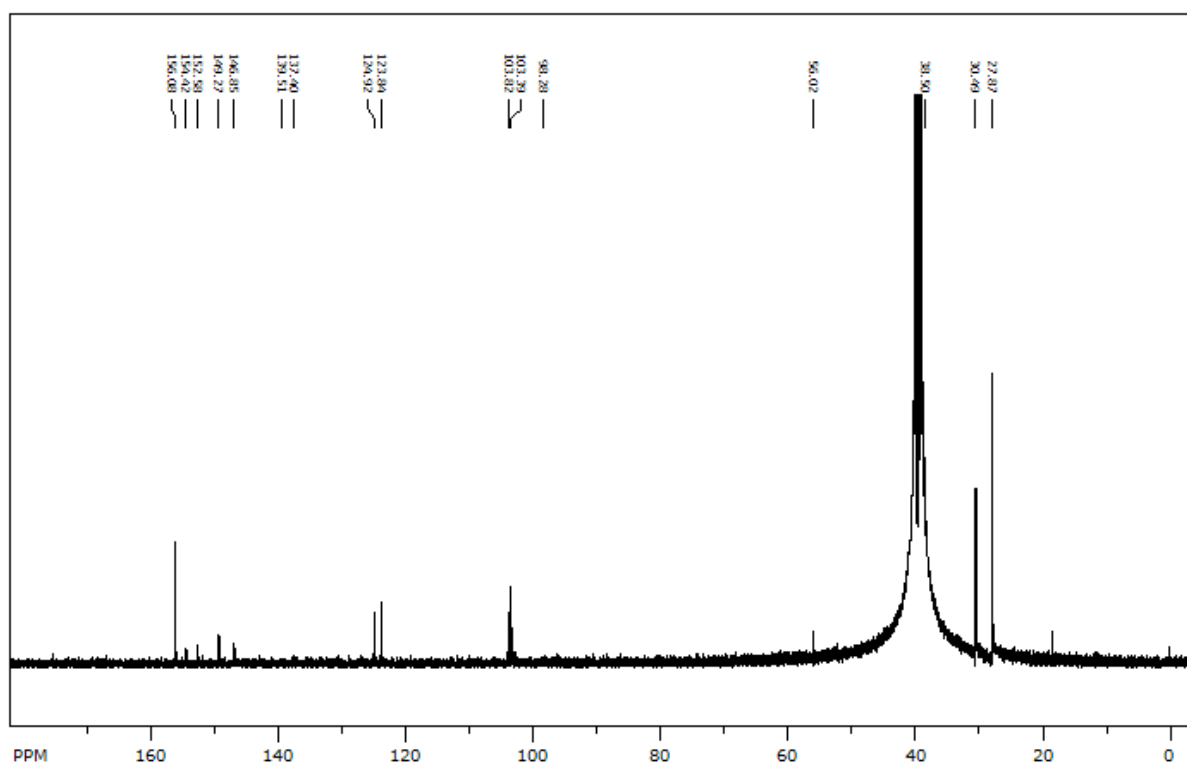
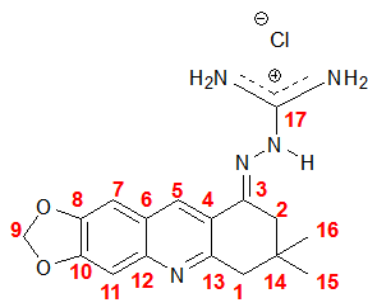


FIG. 7.24 Espectro de RMN de ¹³C do composto 12

7.3 APÊNDICE 3 – ESPECTROS DE gHMBC

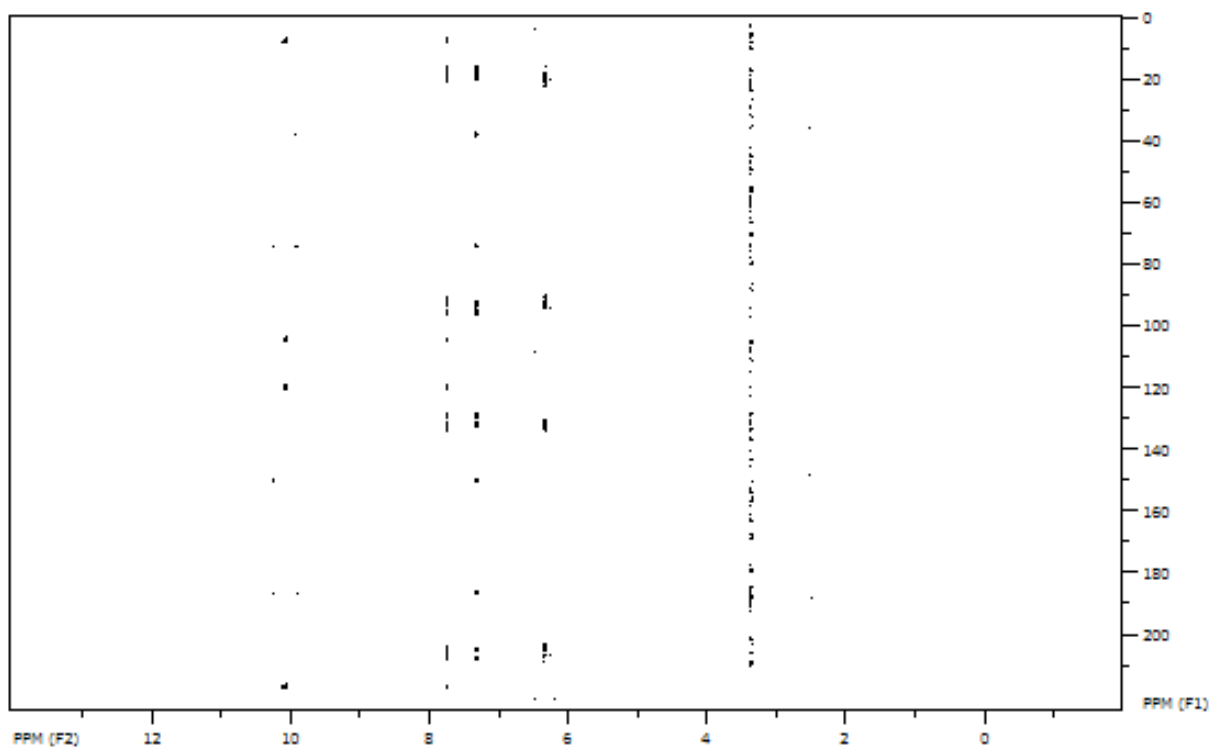
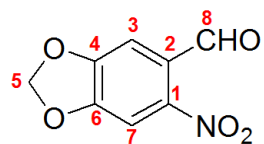


FIG. 7.25 Espectro de gHMBC do composto 1

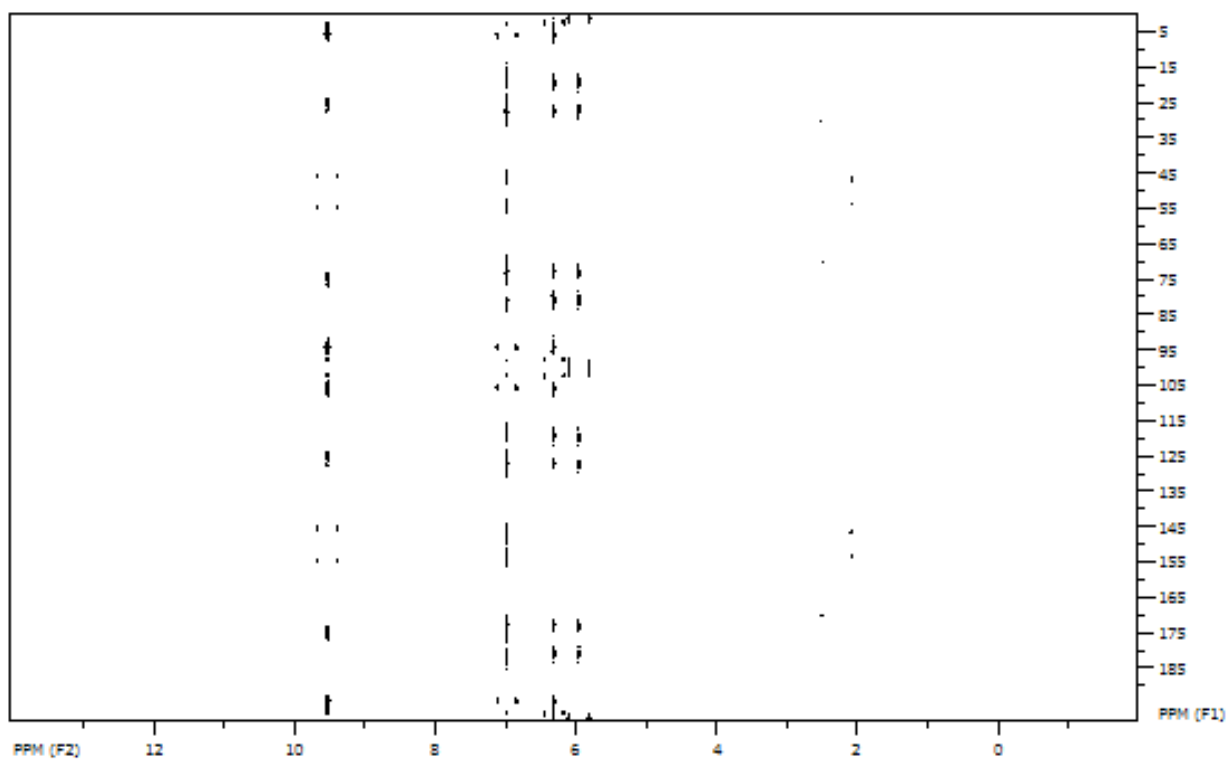
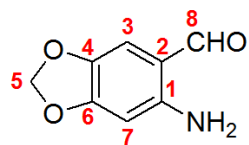


FIG. 7.26 Espectro de gHMBC do composto 2

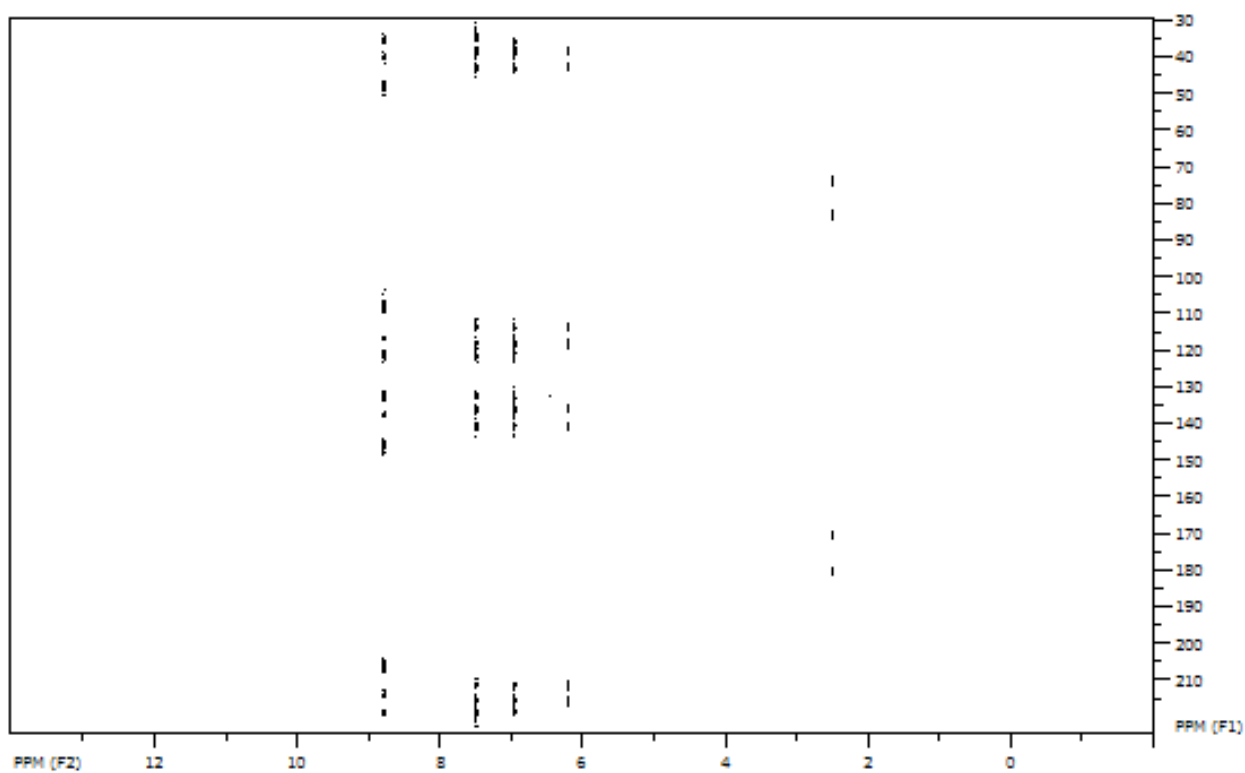
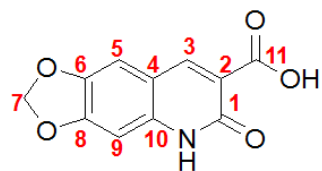


FIG. 7.27 Espectro de gHMBC do composto 4

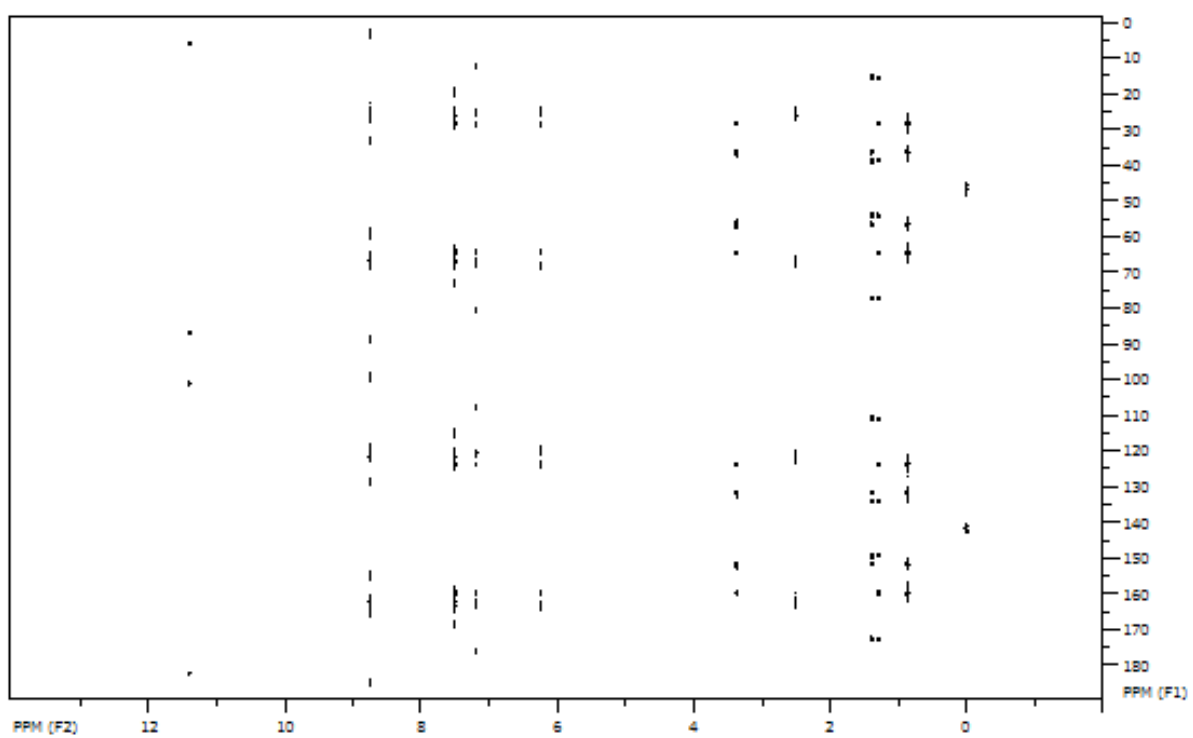
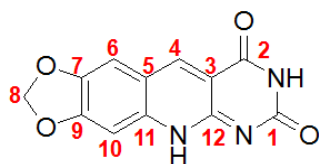


FIG. 7.28 Espectro de gHMBC do composto **5**

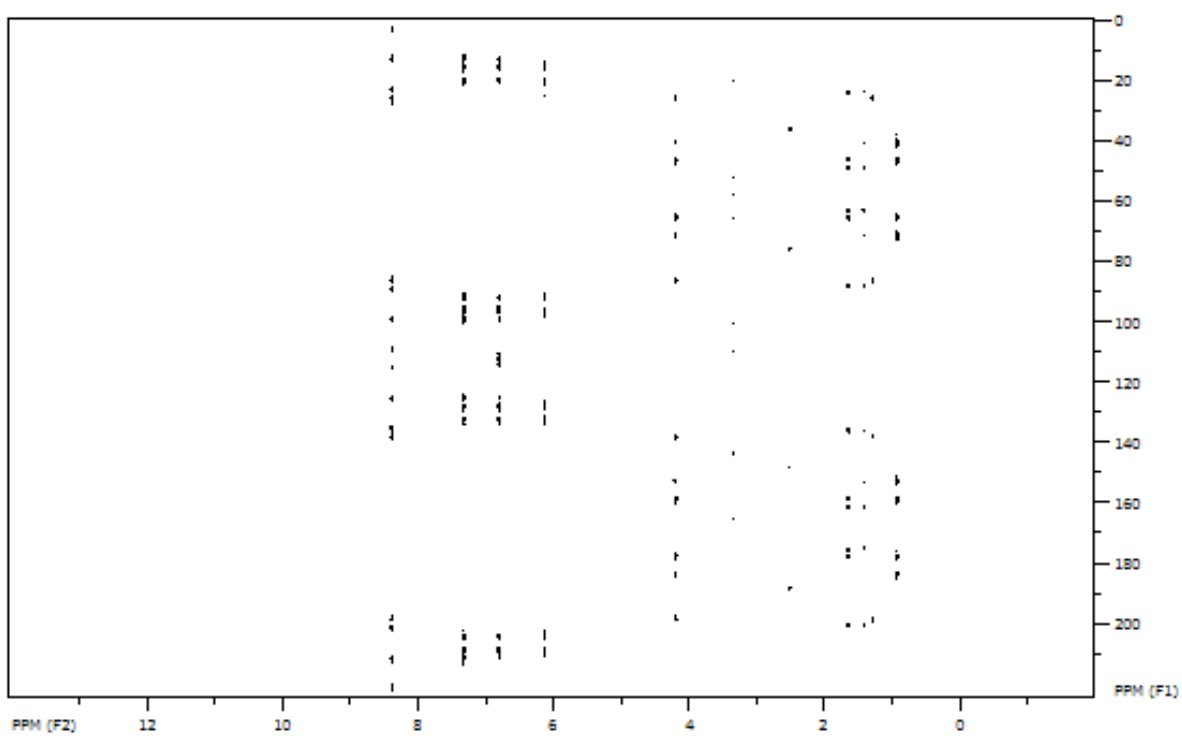
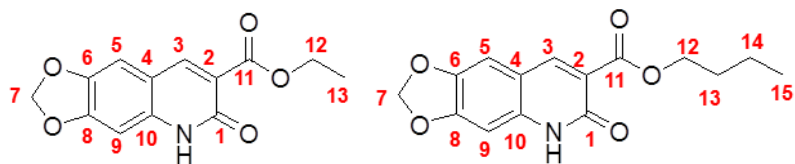


FIG. 7.29 Espectro de gHMBC dos compostos 6 e 7

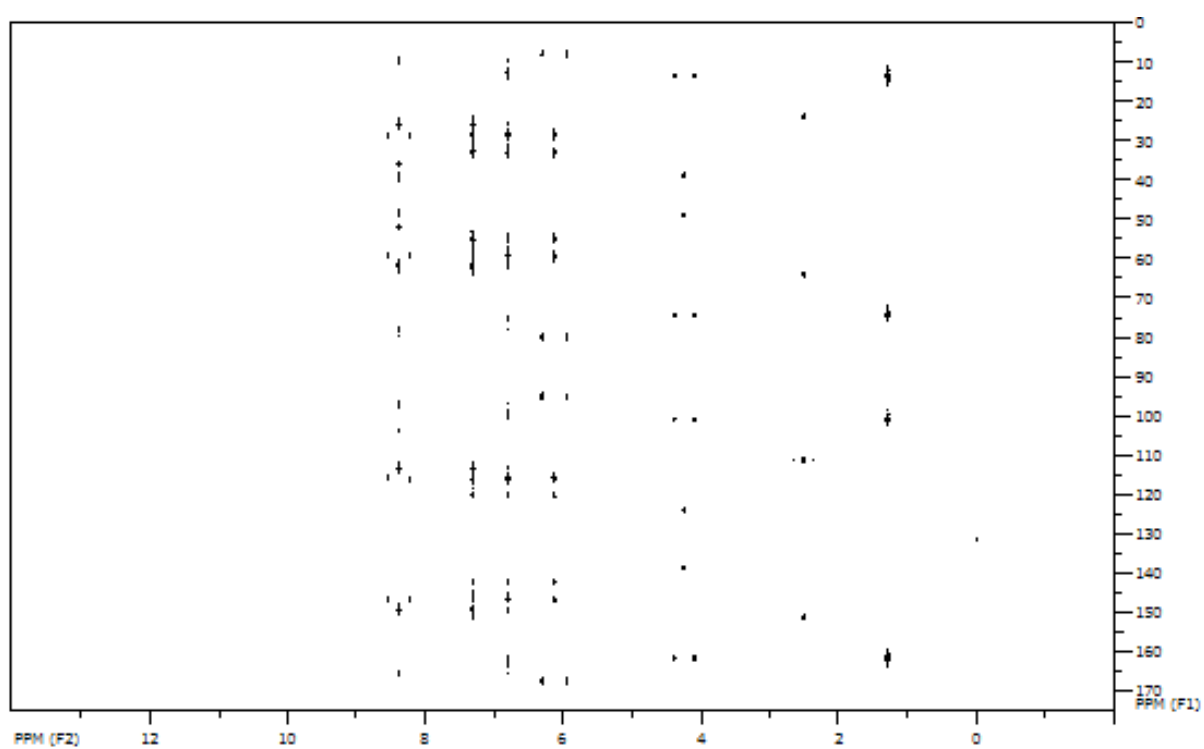
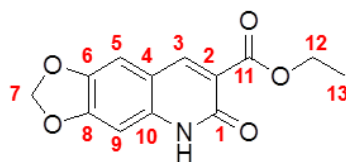


FIG. 7.30 Espectro de gHMBC do composto 7

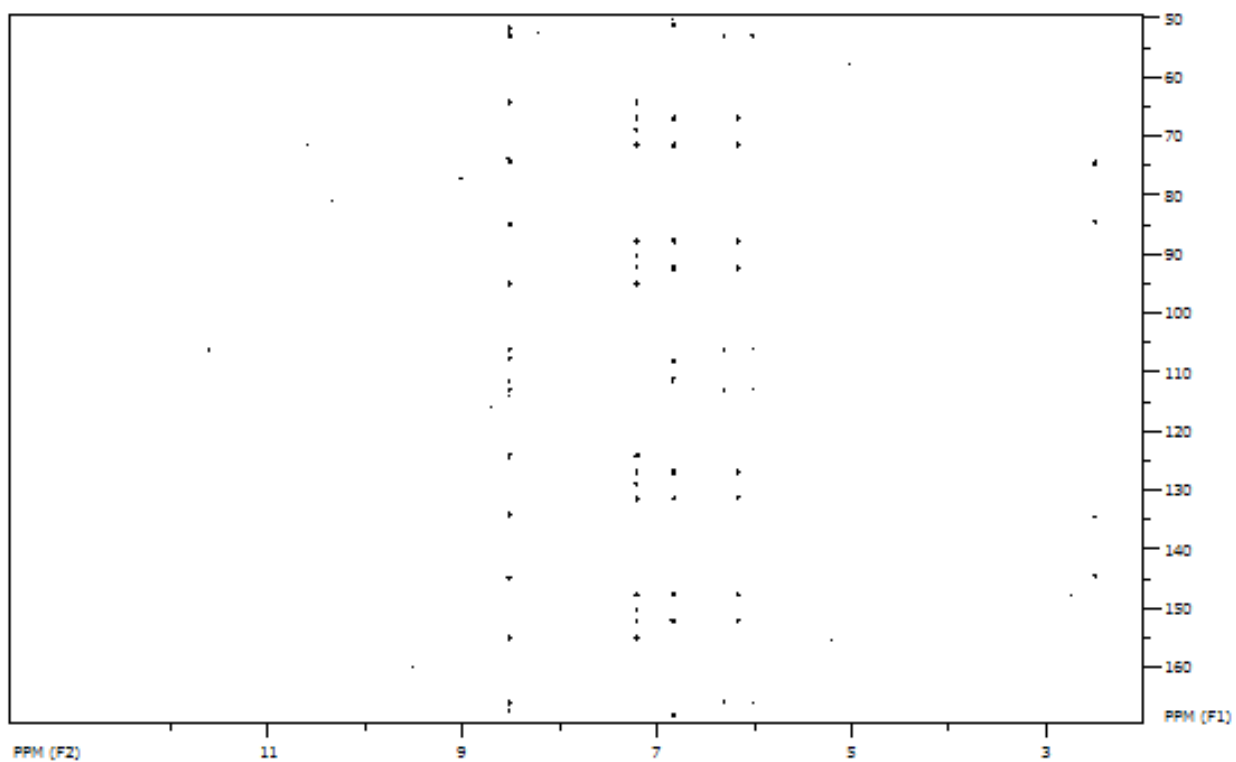
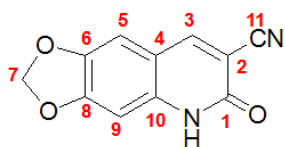


FIG. 7.31 Espectro de gHMBC do composto 8

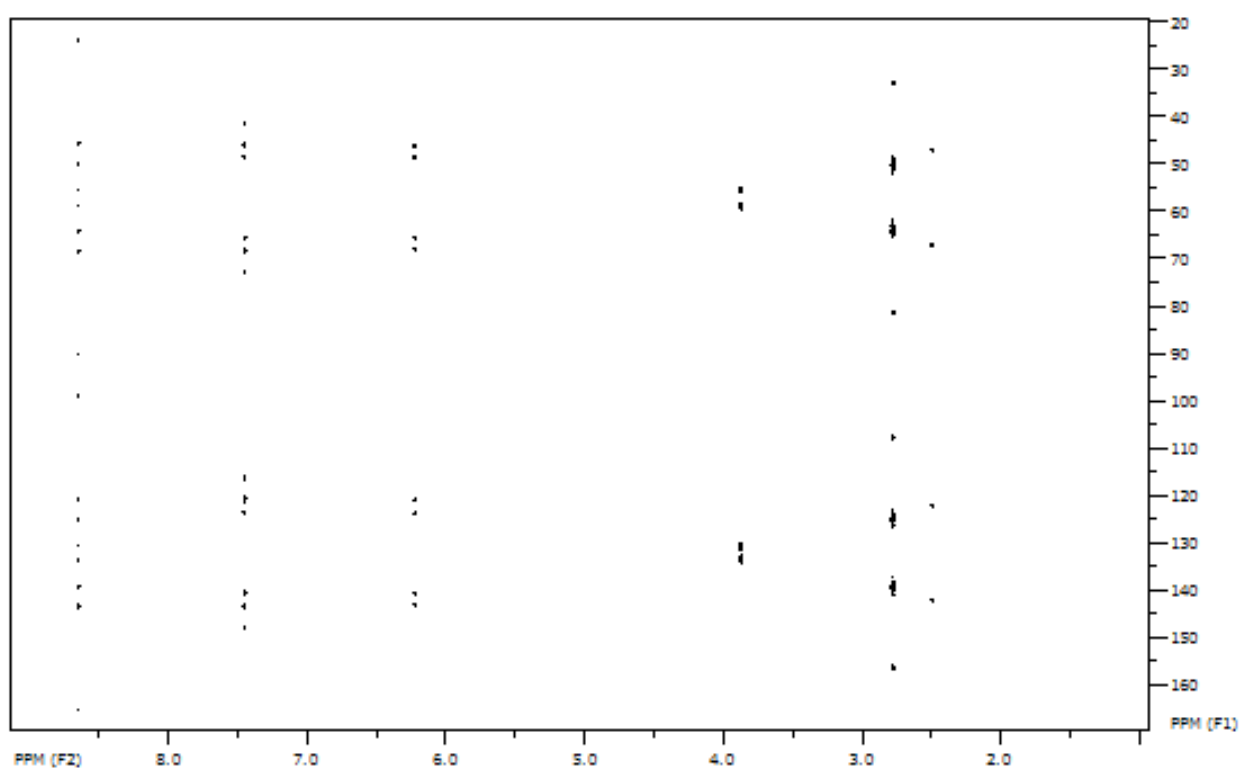
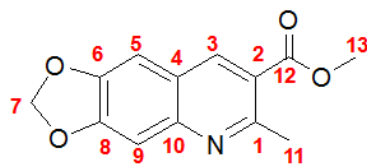


FIG. 7.32 Espectro de gHMBC do composto 9

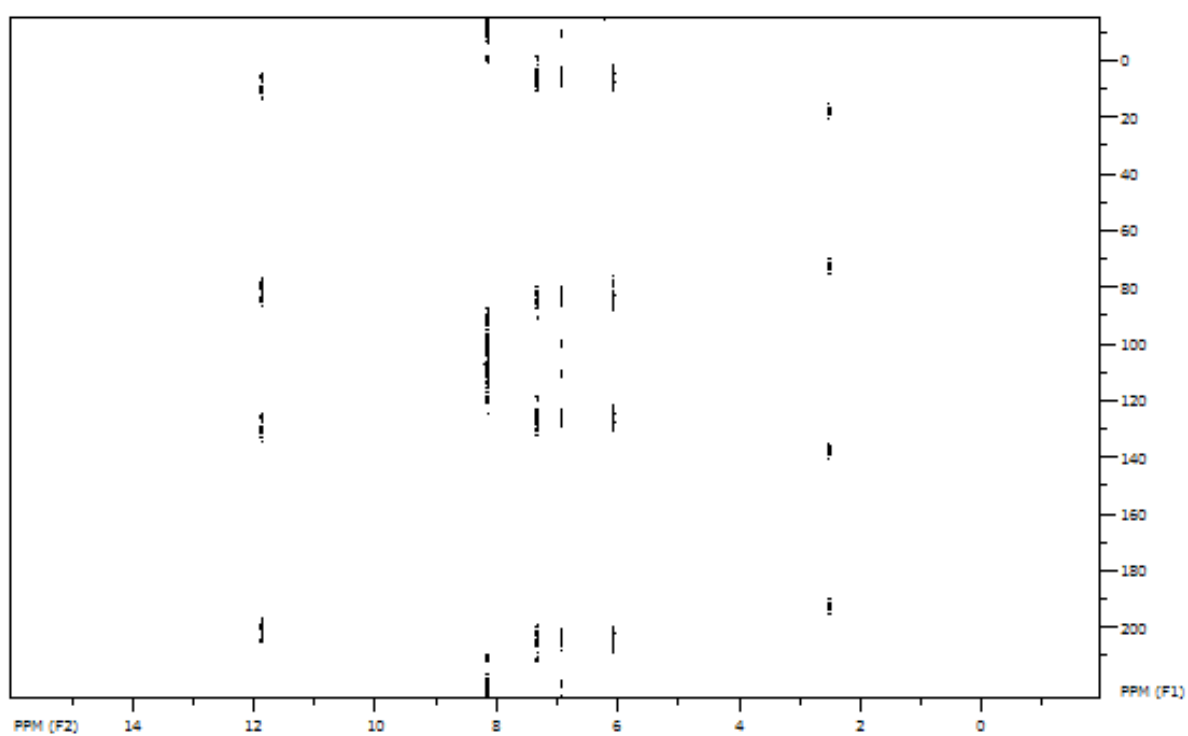
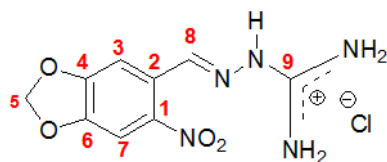


FIG. 7.33 Espectro de gHMBC do composto 10

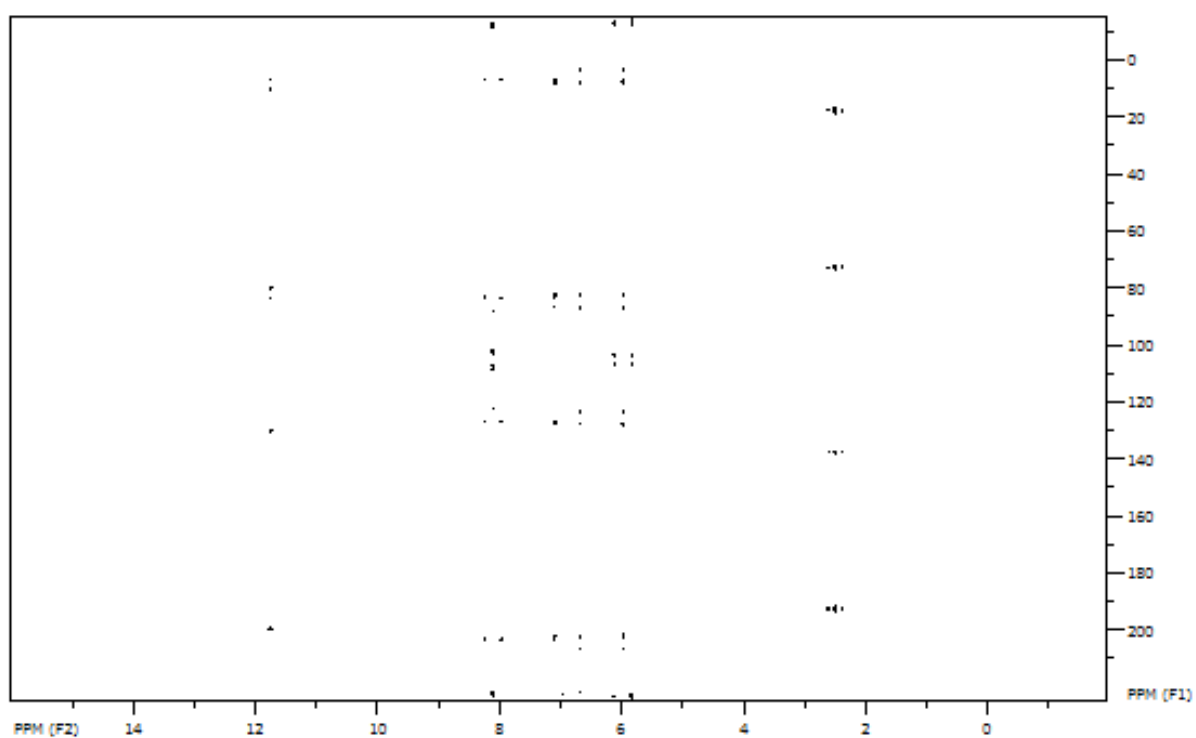
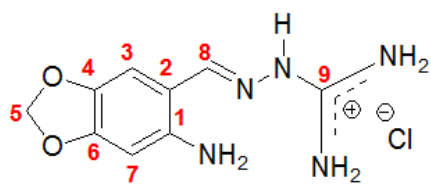


FIG. 7.34 Espectro de gHMBC do composto 11

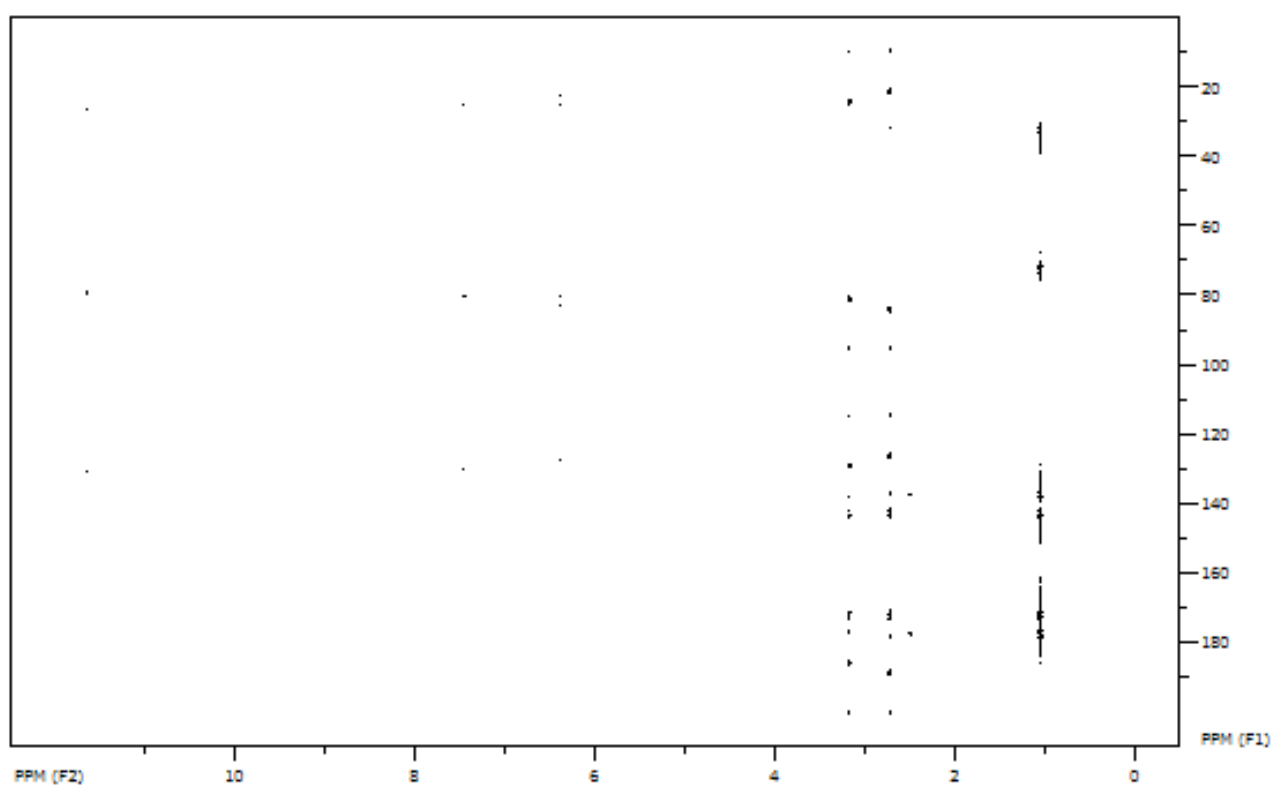
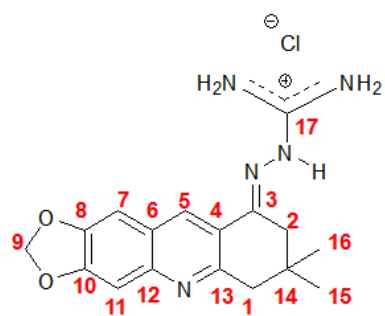


FIG. 7.35 Espectro de gHMBC do composto 12

7.4 APÊNDICE 4 – ESPECTROS DE gHSQC

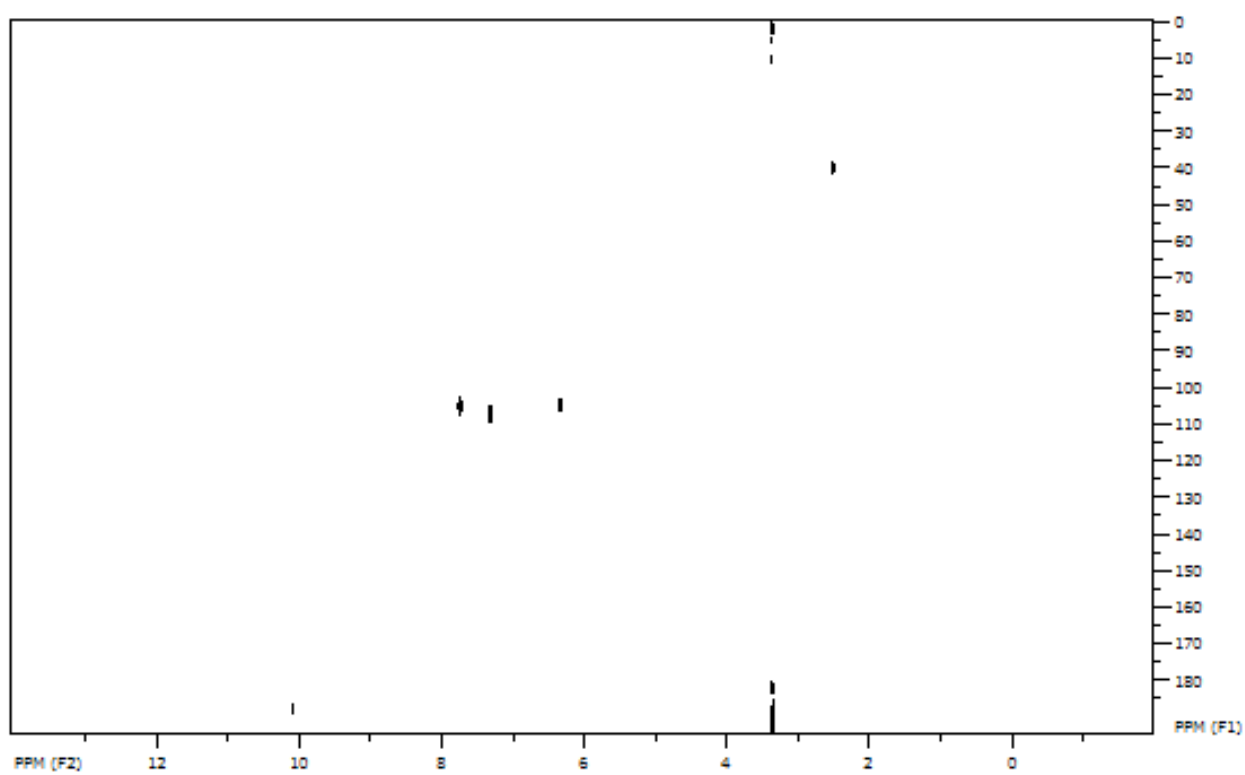
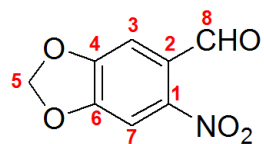


FIG. 7.36 Espectro de gHSQC do composto 1

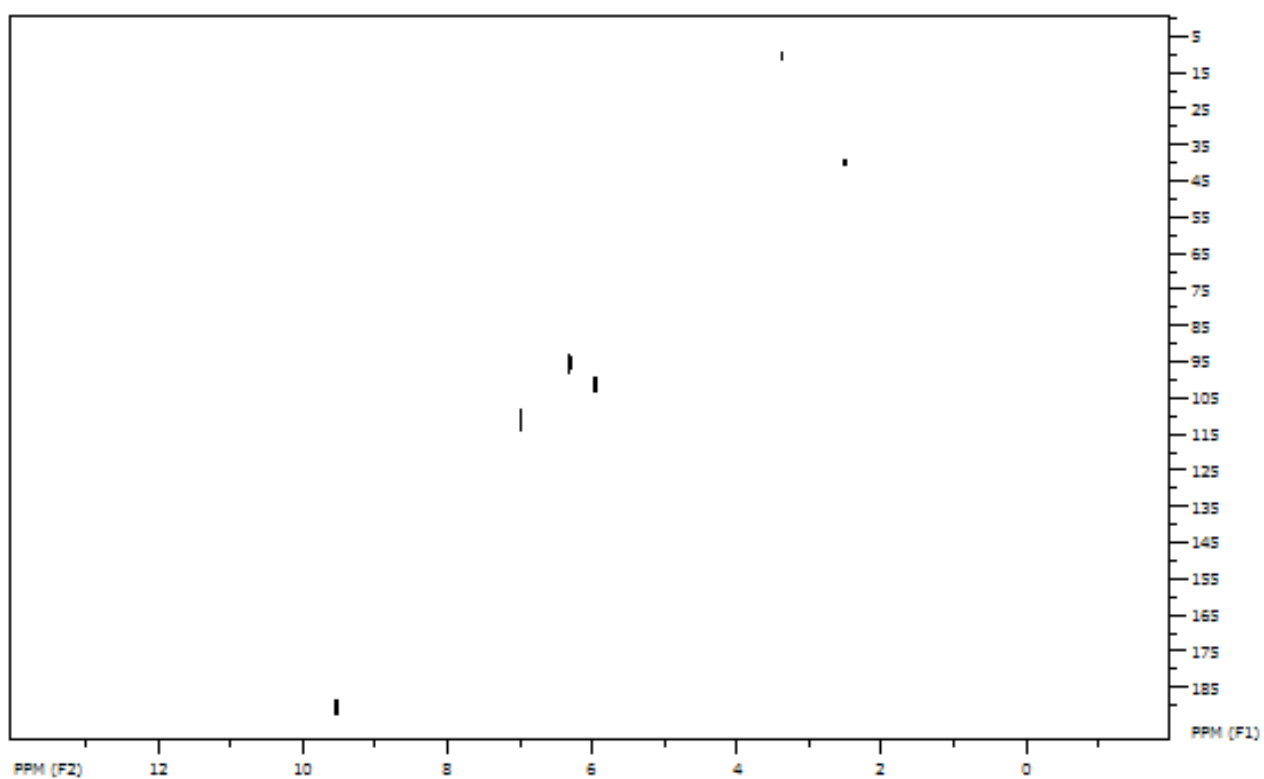
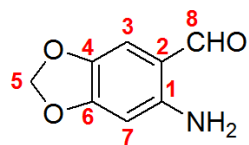


FIG. 7.37 Espectro de gHSQC do composto 2

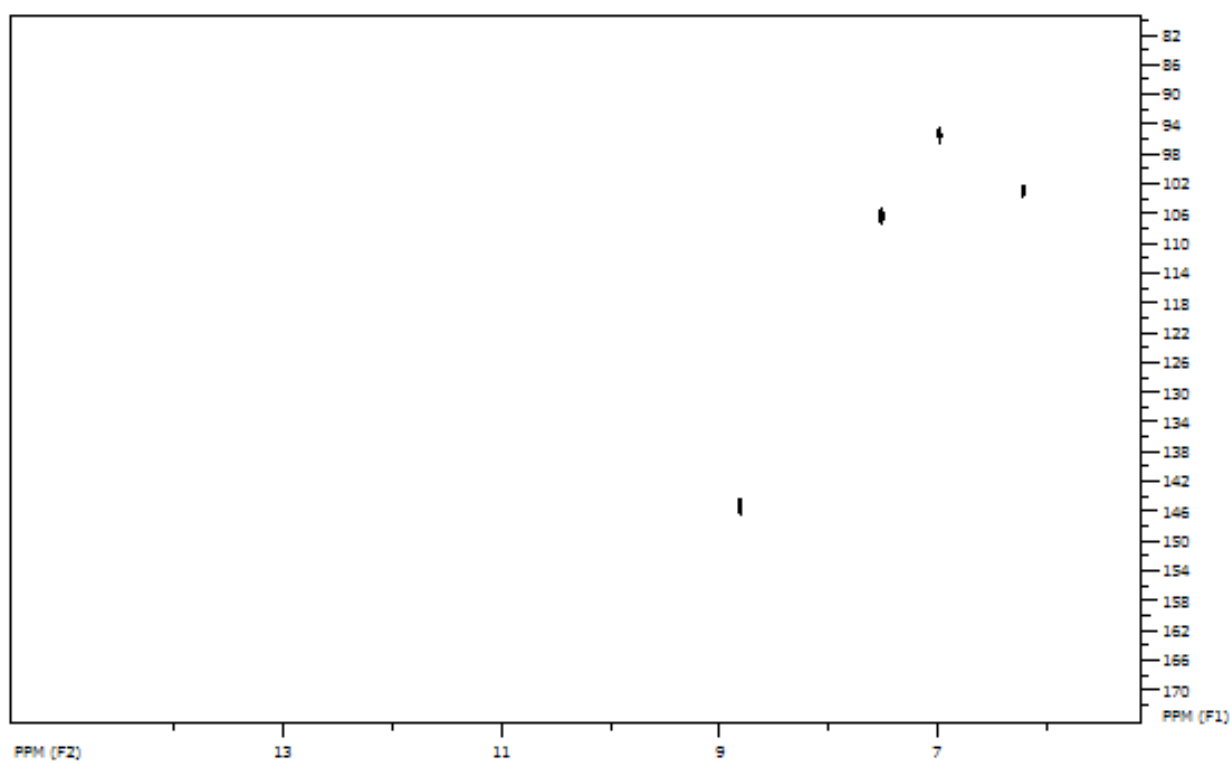
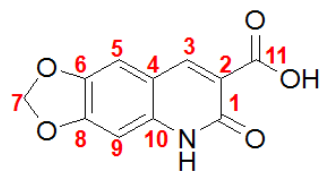


FIG. 7.38 Espectro de gHSQC do composto 4

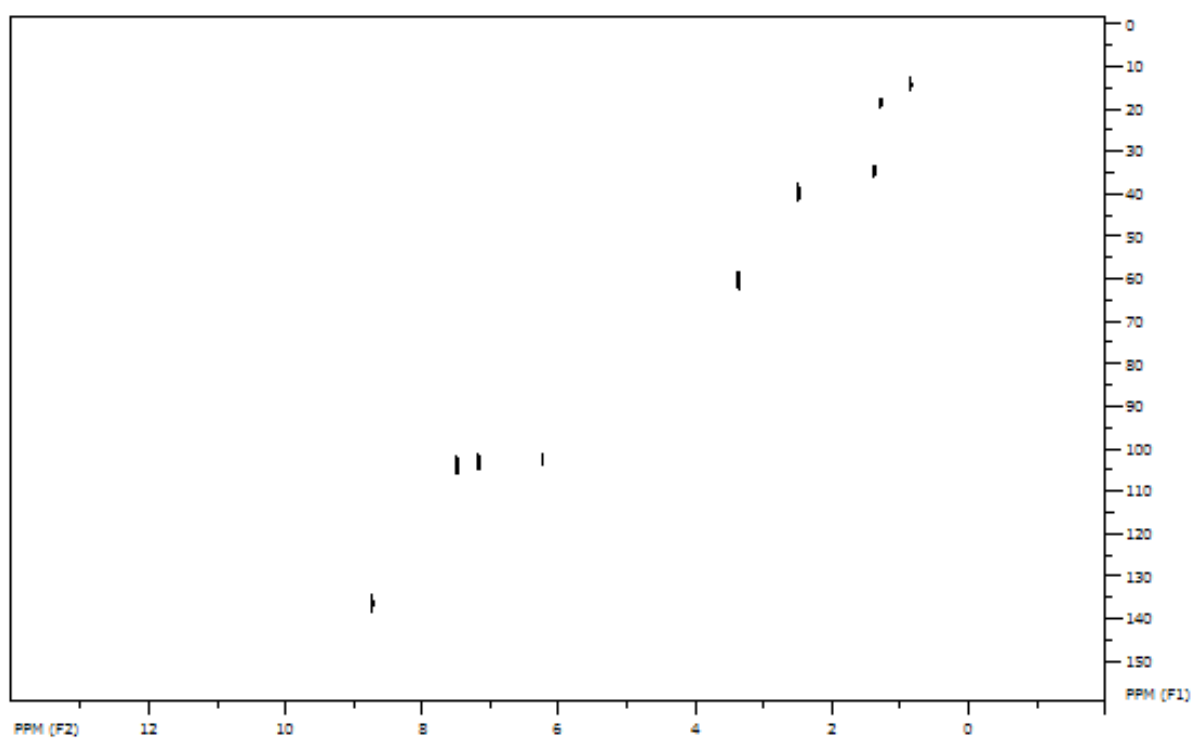
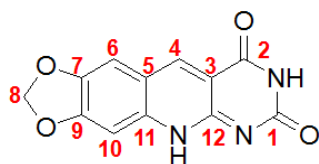


FIG. 7.39 Espectro de gHSQC do composto 5

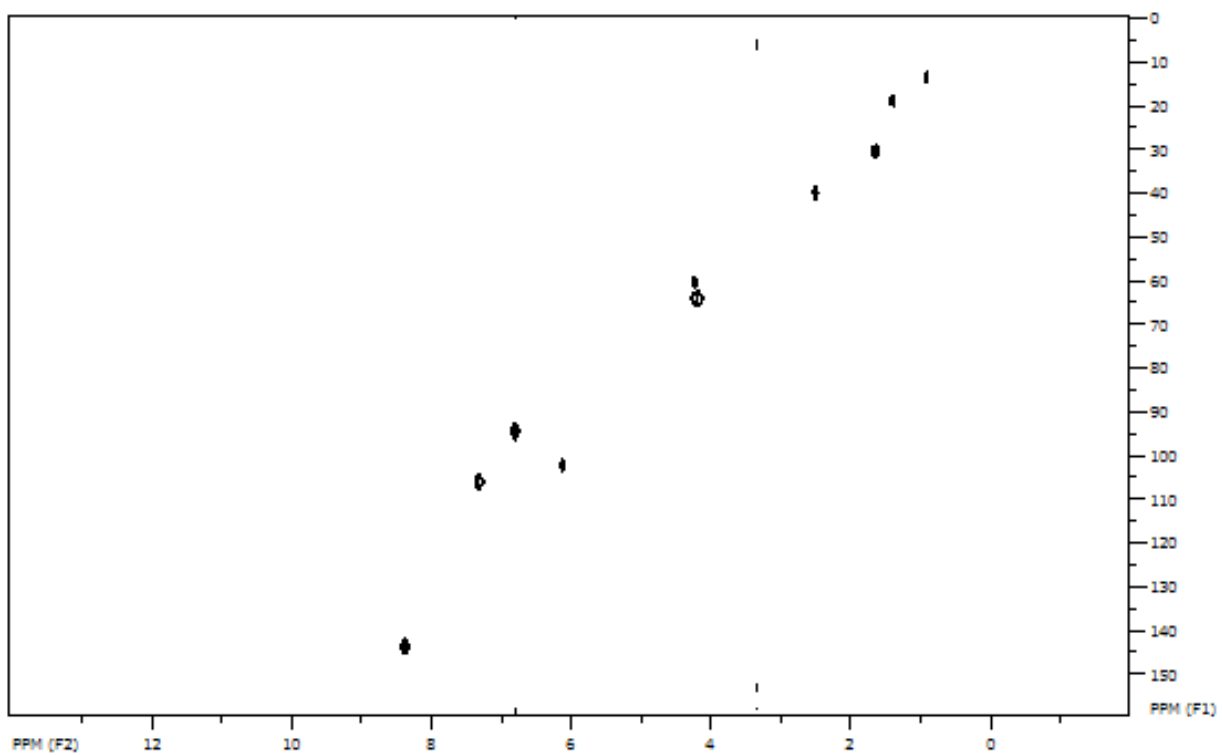
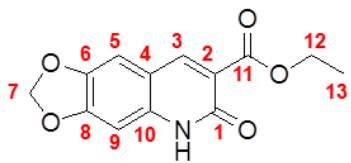


FIG. 7.40 Espectro de gHSQC dos compostos 6 e 7

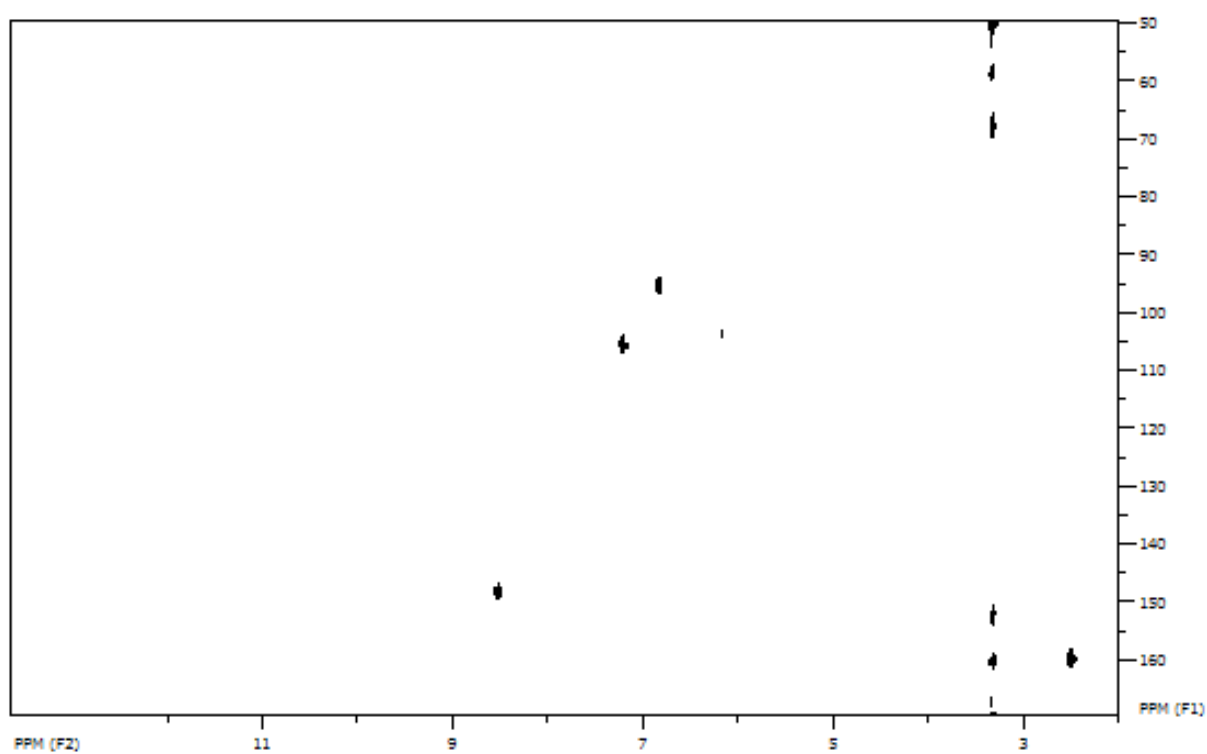
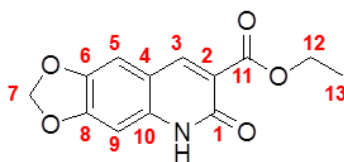


FIG. 7.41 Espectro de gHSQC do composto 8

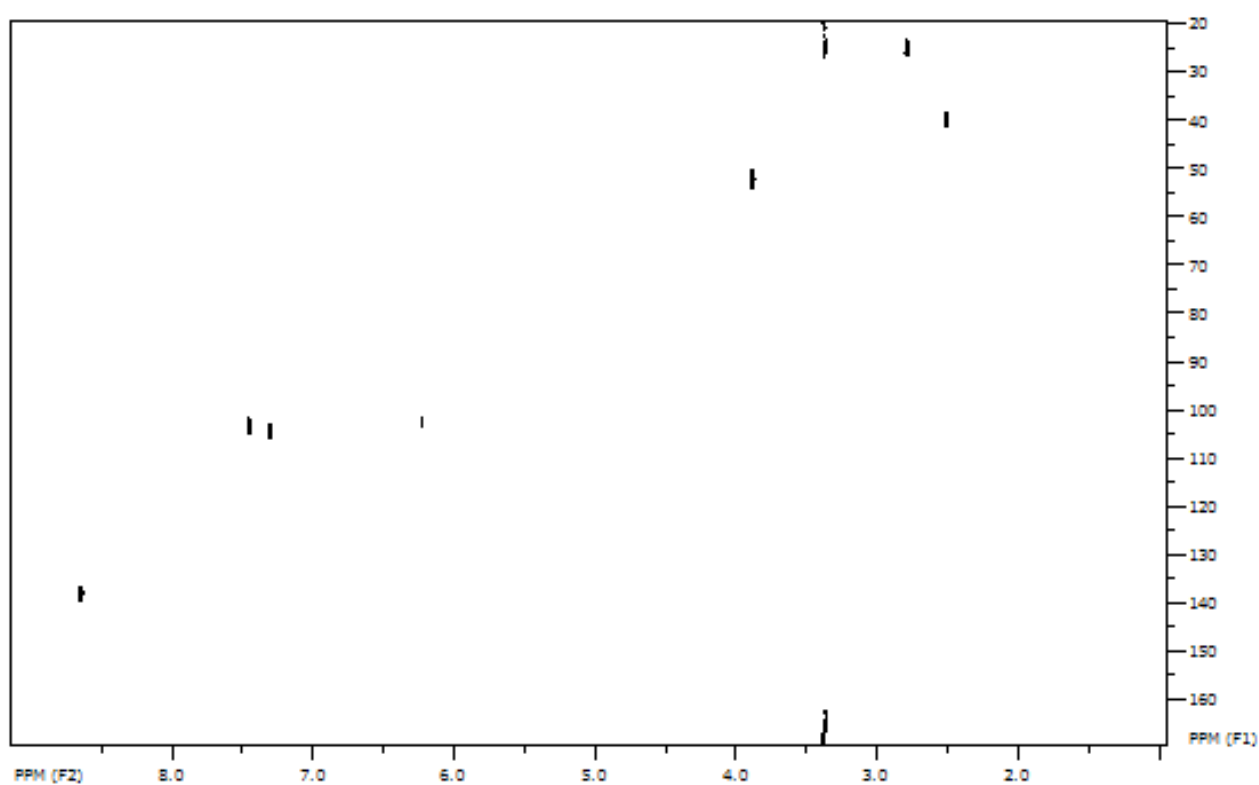
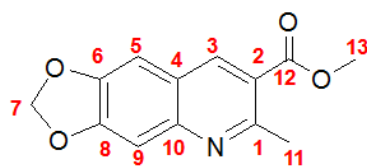


FIG. 7.42 Espectro de gHSQC do composto 9

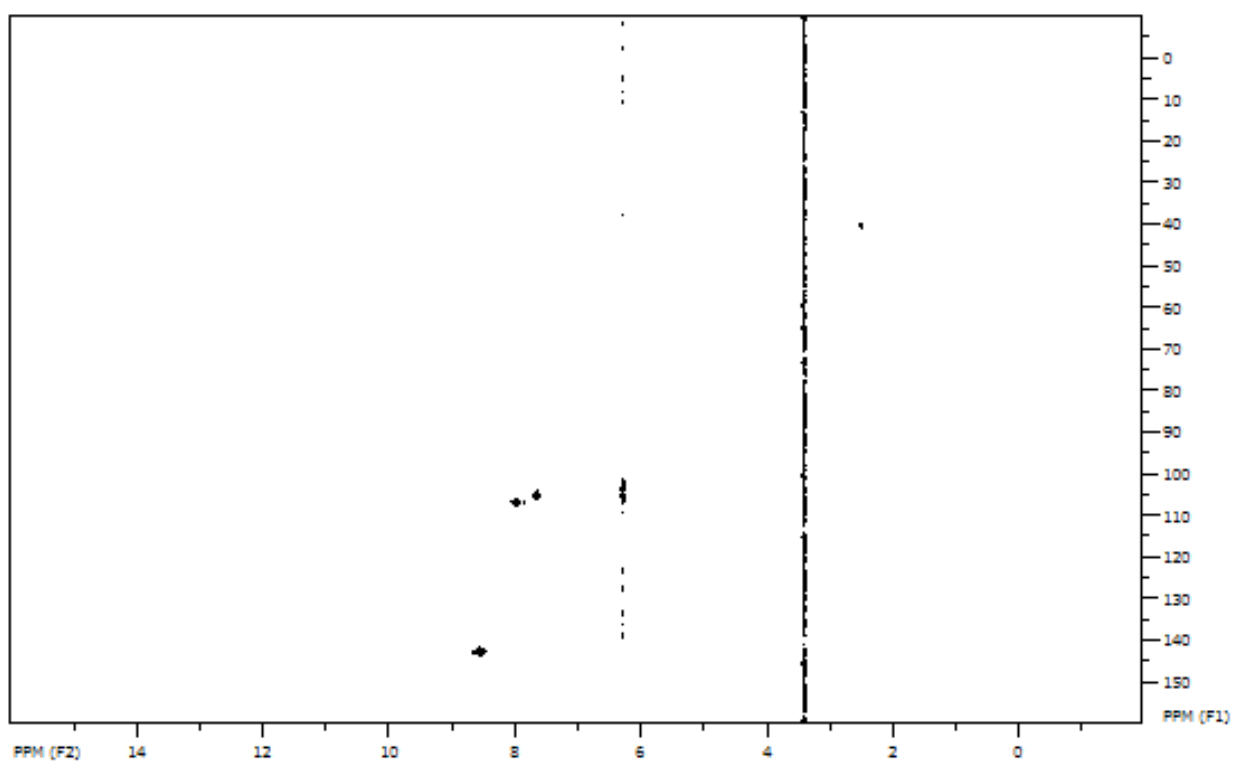
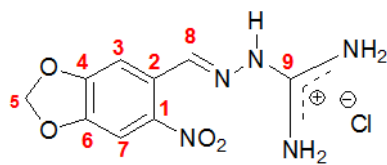


FIG. 7.43 Espectro de gHSQC do composto 10

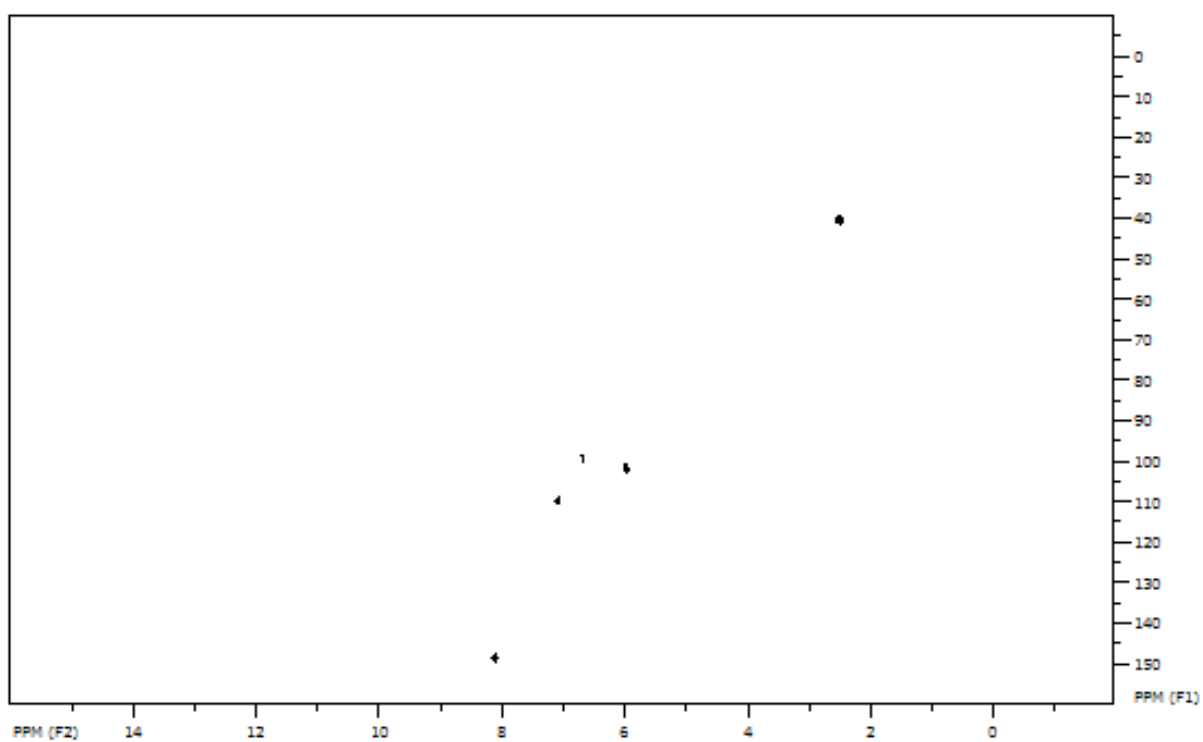
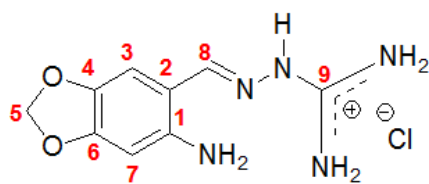


FIG. 7.44 Espectro de gHSQC do composto 11

7.5 APÊNDICE 5 – ESPECTROS DE IV

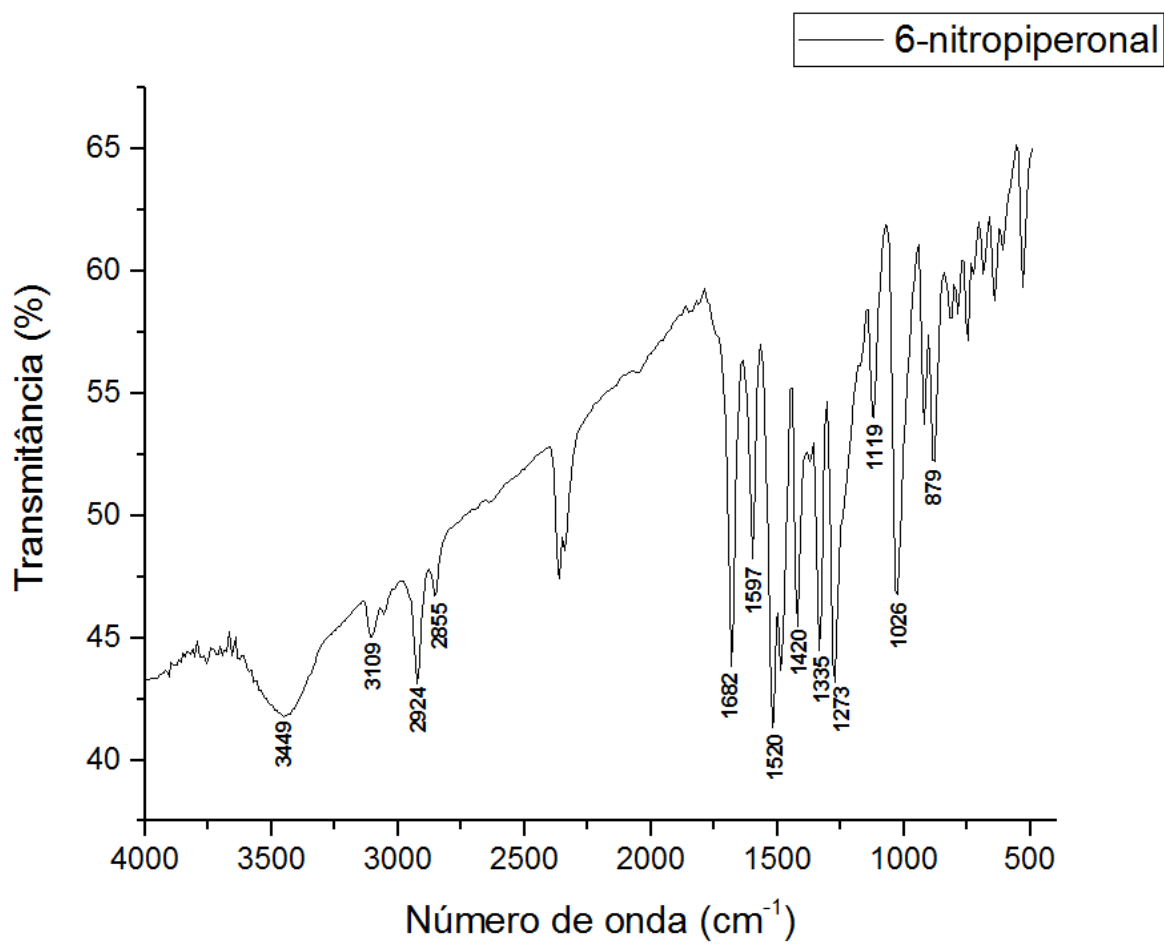
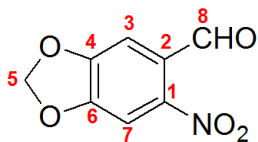


FIG. 7.45 Espectro de IV do composto 1

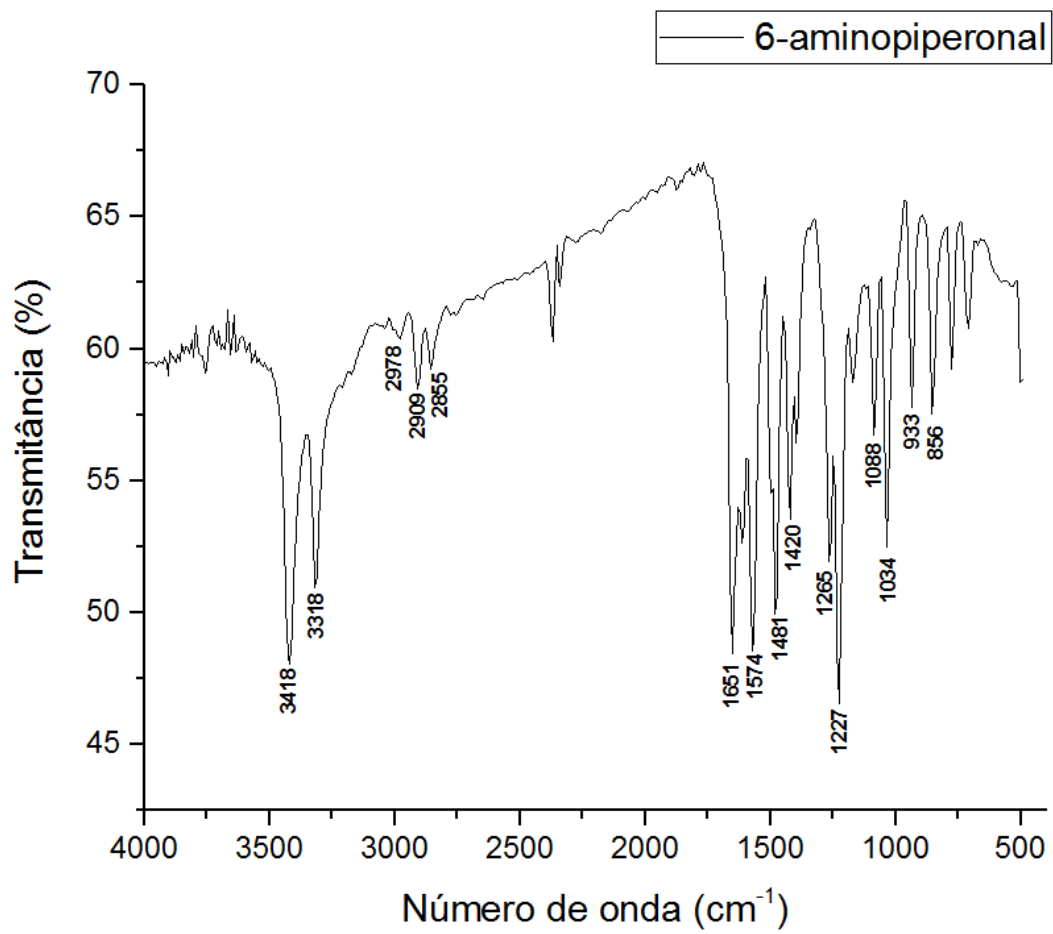
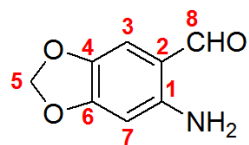


FIG. 7.46 Espectro de IV do composto 2

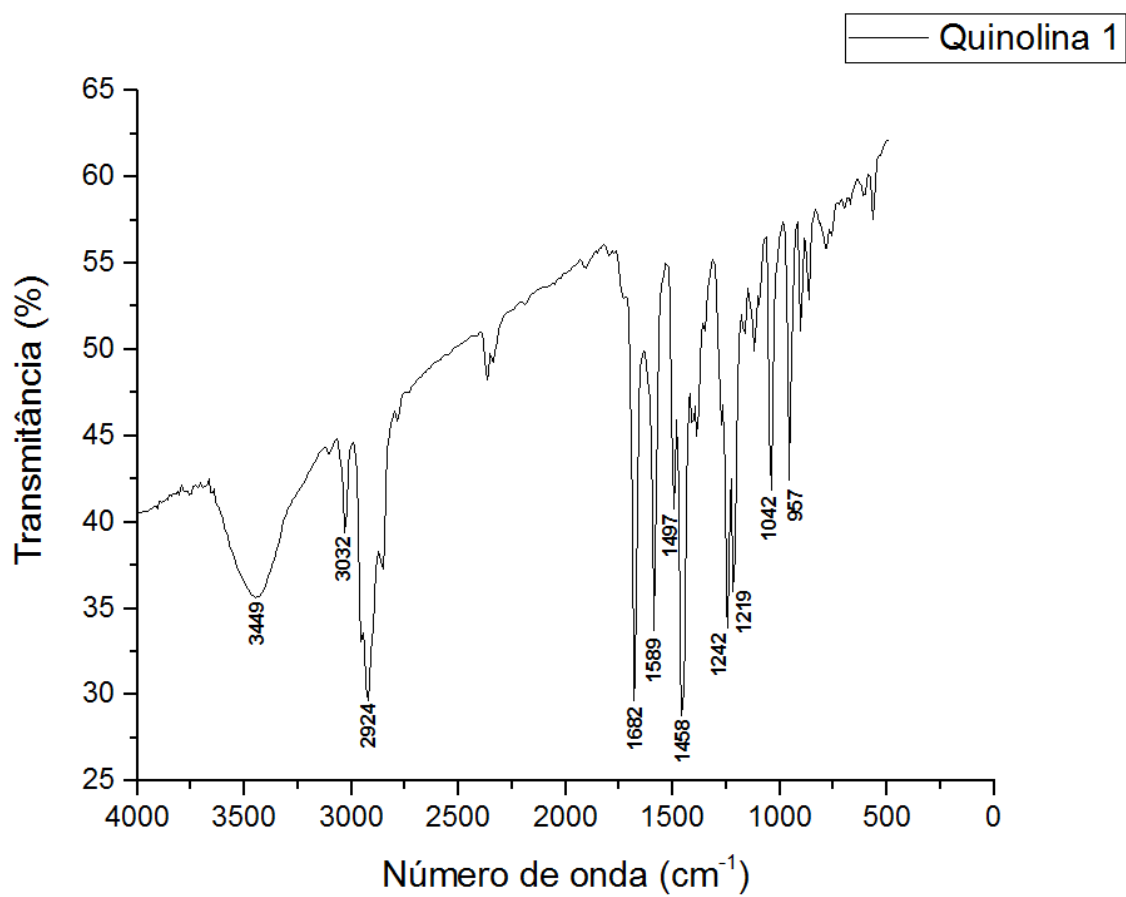
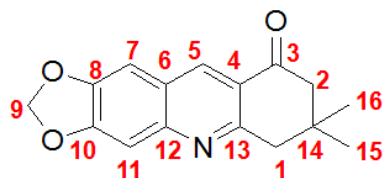


FIG. 7.47 Espectro de IV do composto 3

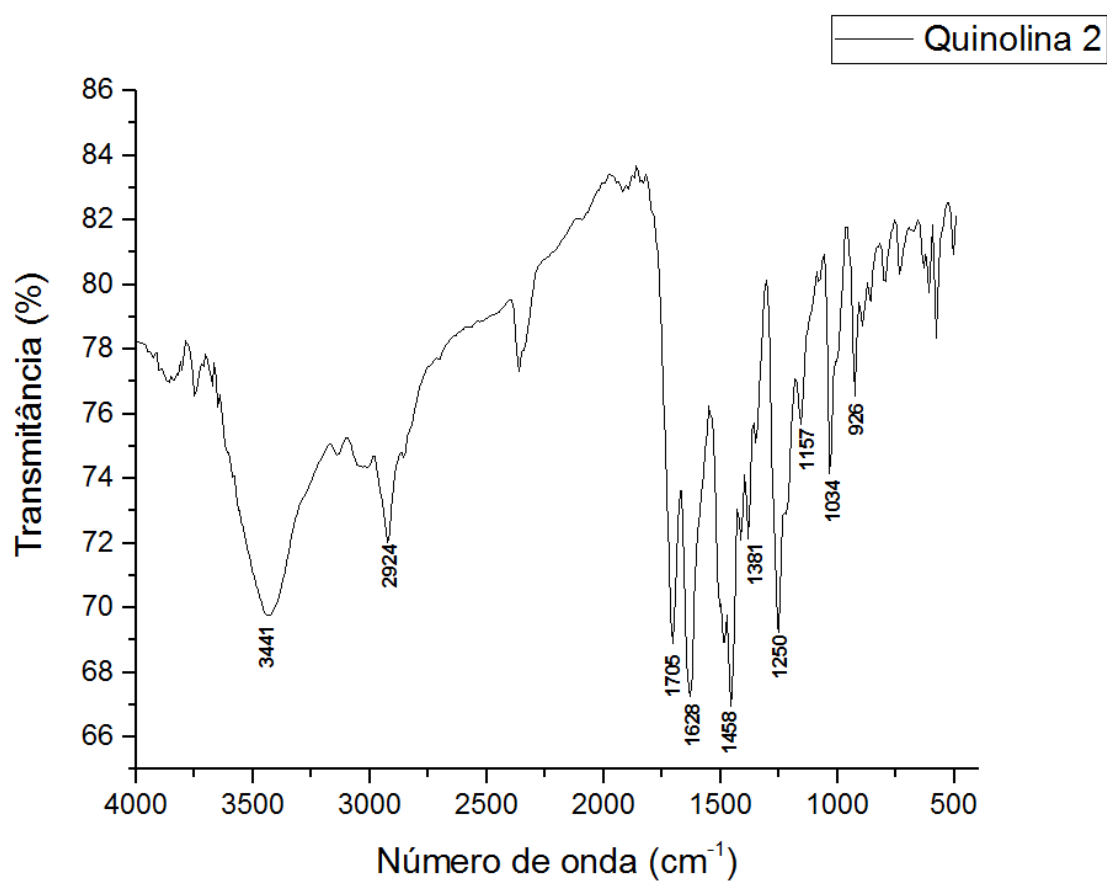
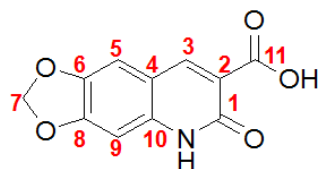


FIG. 7.48 Espectro de IV do composto 4

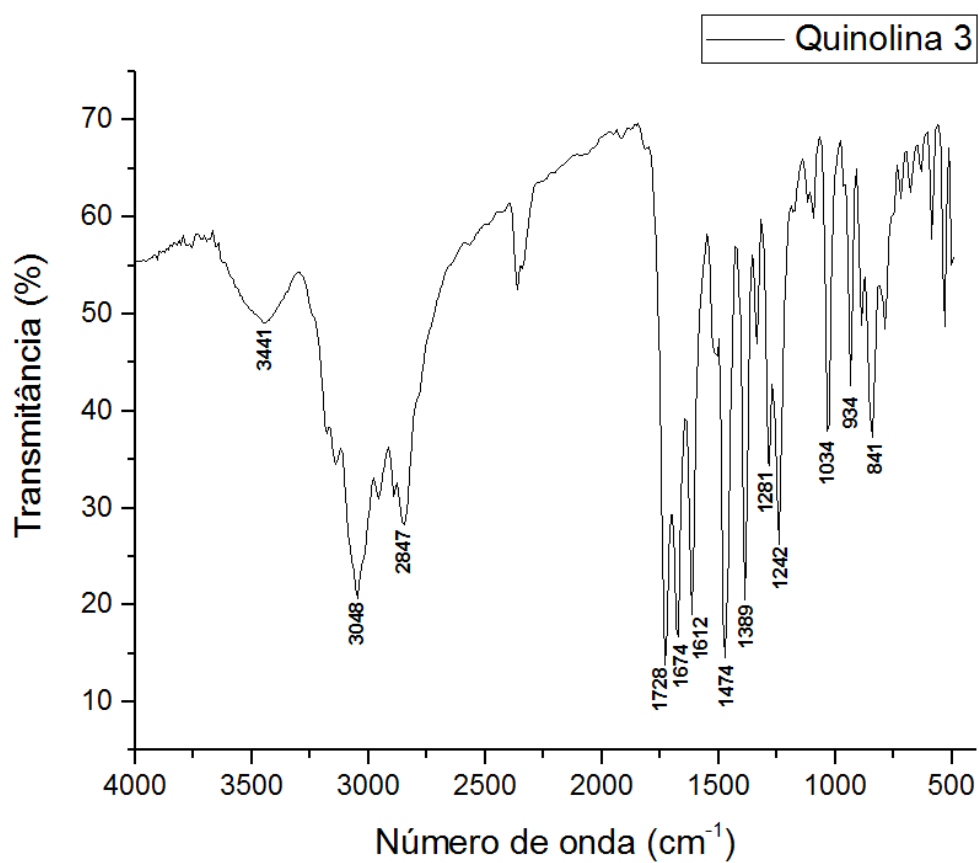
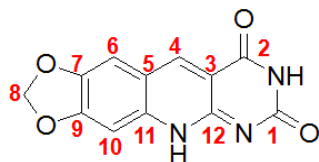


FIG. 7.49 Espectro de IV do composto 5

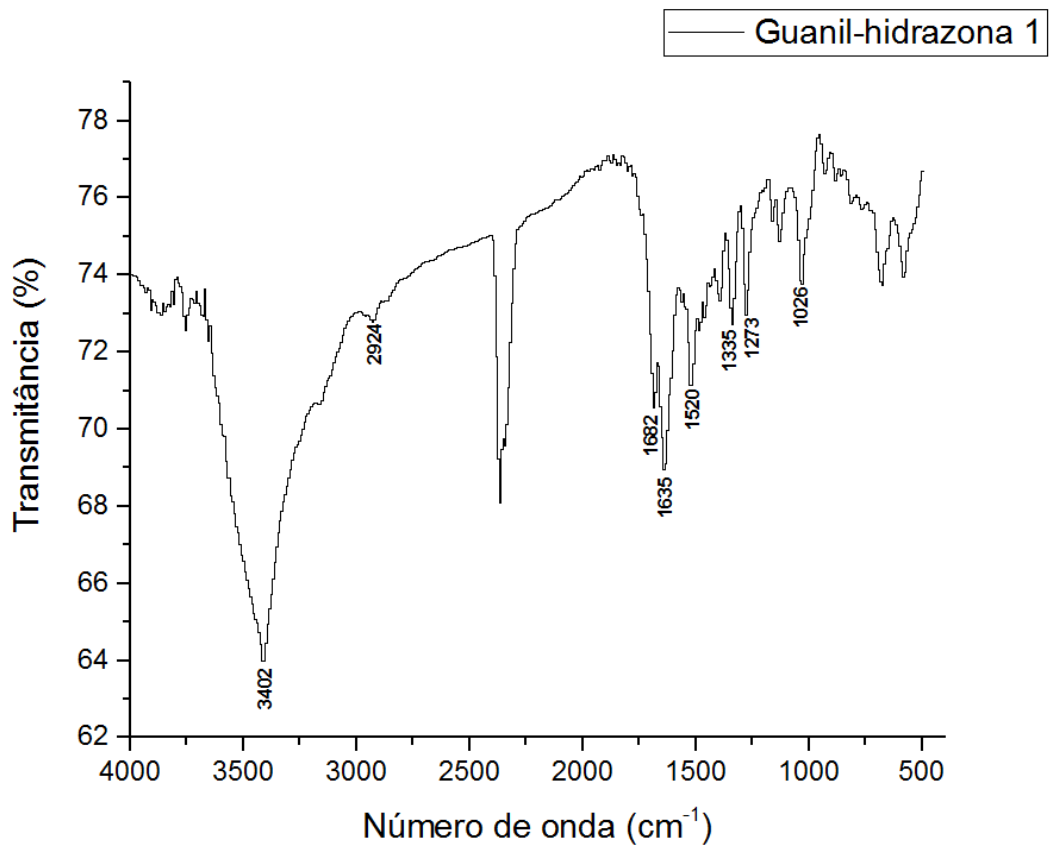
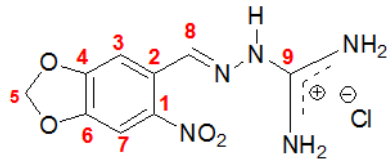


FIG. 7.50 Espectro de IV do composto 10

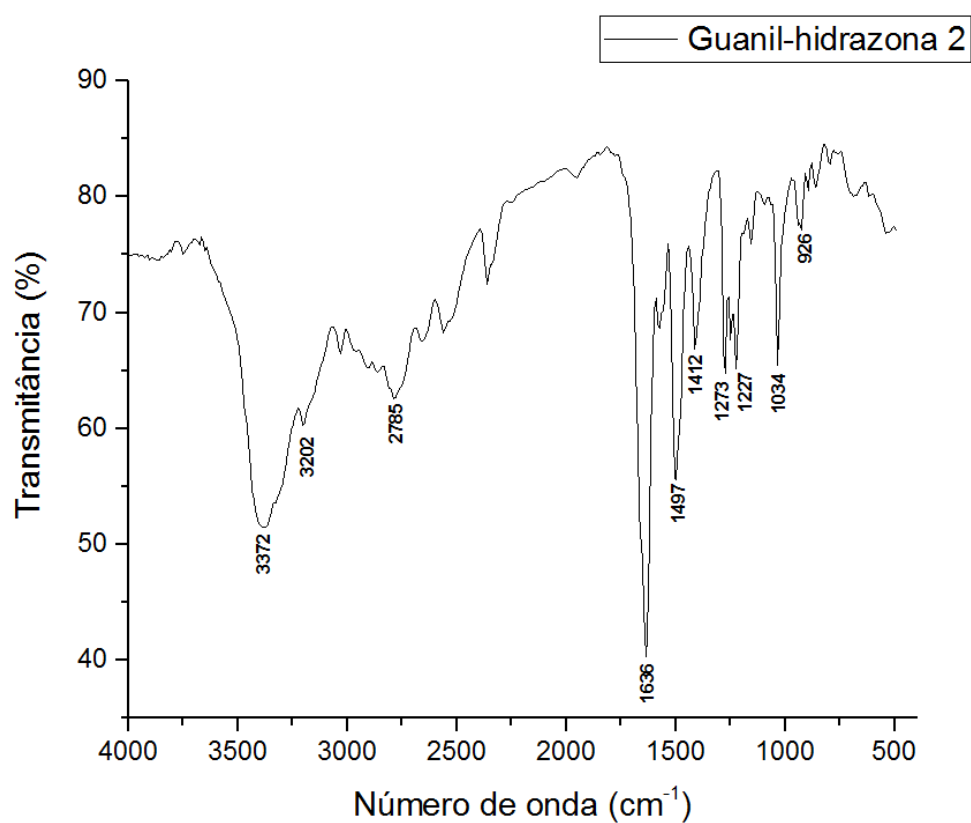
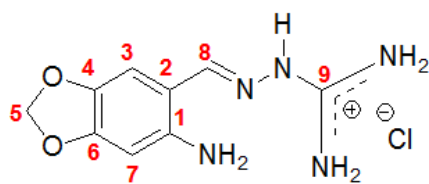


FIG. 7.51 Espectro de IV do composto 11

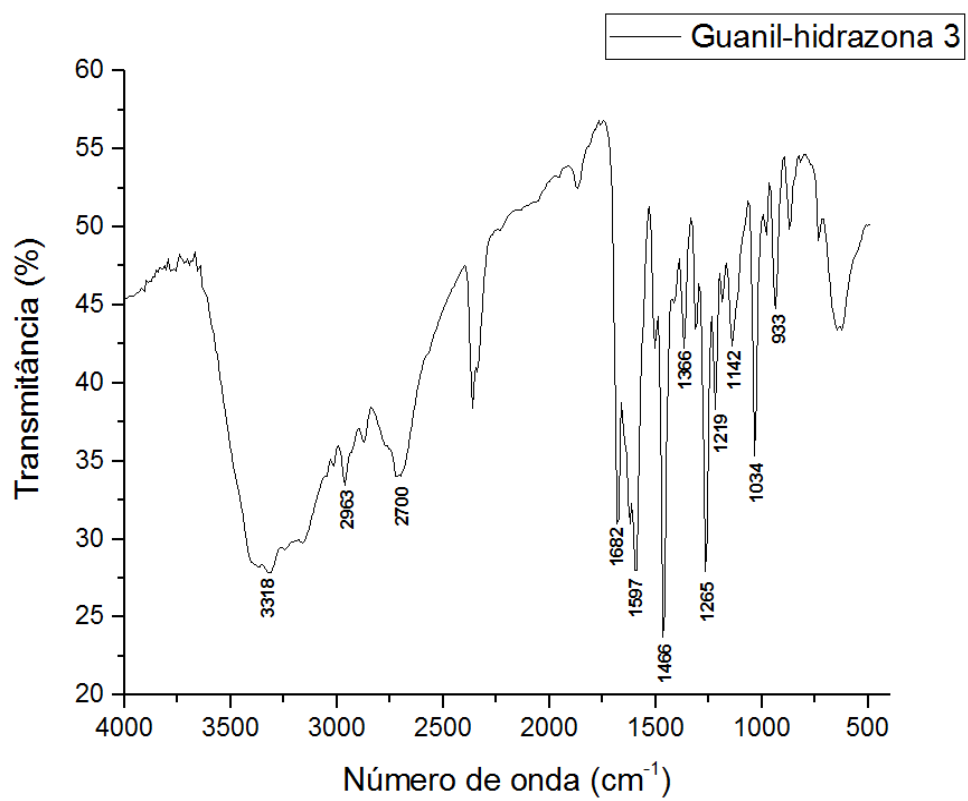
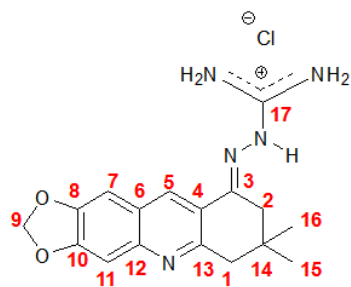


FIG. 7.52 Espectro de IV do composto **12**