

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE GOIÁS
UNIDADE UNIVERSITÁRIA DE CIÊNCIAS EXATAS
E TECNOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO *STRICTO SENSU*
EM CIÊNCIAS MOLECULARES

**SÍNTESE DE AZINAS ASSISTIDA POR
MICRO-ONDAS E AVALIAÇÃO DA
ATIVIDADE ANTICOLINESTERÁSICA.**

MIRIA MOREIRA COSTA

ANÁPOLIS- GO

2015

MIRIA MOREIRA COSTA

**SÍNTESE DE AZINAS ASSISTIDA POR
MICRO-ONDAS E AVALIAÇÃO DA
ATIVIDADE ANTICOLINESTERÁSICA.**

Dissertação de Mestrado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação *Stricto sensu*
em Ciências Moleculares da Universidade
Estadual de Goiás como parte dos
requisitos para obtenção do título de
Mestre em Ciências Moleculares
Área de concentração: Química Orgânica
Orientador: Gilberto Lúcio Benedito de
Aquino

ANÁPOLIS- GO

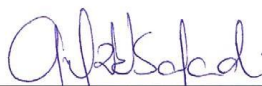
2015

SÍNTESE DE AZINAS ASSISTIDA POR MICRO-ONDAS E AVALIAÇÃO DA
ATIVIDADE ANTICOLINESTERÁSICA

MIRIÃ MOREIRA COSTA

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Ciências Moleculares da Unidade Universitária de Ciências Exatas e Tecnológicas, da Universidade Estadual de Goiás, apresentada como parte dos requisitos necessários para obtenção do título de Mestra em Ciências Moleculares.

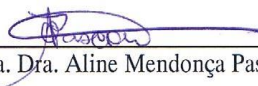
Aprovada em 29/04/2015 por:



Prof. Dra. Giuliana Muniz Vila Verde Safadi (UEG)



Prof. Dr. William Pires de Macedo (UEG)



Prof. Dra. Aline Mendonça Pascoal (IFG)

ANÁPOLIS – GO
ABRIL 2015

Dedico este trabalho a minha mãe Sra. Alcione da Silva Moreira e à minha tia Sra. Ivanilde Alves Costa, pois sem elas certamente não estaria aqui hoje. São exemplos de perseverança e grandes incentivadoras da minha caminhada em todas as áreas. Que Deus as abençoe sempre!

AGRADECIMENTOS

Sobre todas as coisas agradeço a Deus que me concedeu a oportunidade de ingressar neste programa de mestrado, bem como chegar até aqui.

A Capes pela bolsa concedida, pois sem ela seria difícil concluir este estudo, e a Universidade Estadual de Goiás pelo amparo a pesquisa com sua estrutura laboratorial e excelente quadro de docentes.

Ao laboratório de Ressonância Magnética do Instituto de Química da Universidade Federal de Goiás e ao Técnico Eudécio por realizar as análises de RMN.

À Universidade de São Paulo (USP) – Ribeirão Preto nas pessoas de Profa. Dra. Carmen Lúcia Cardoso, Ms. Adriana Ferreira Lopes Vilela e Dra. Cláudia Seidl, pelos testes de atividade anticolinesterárica.

De forma especial ao meu orientador prof. Dr. Gilberto Lucio Benedito de Aquino, pela paciência, contribuições ao meu trabalho e por acreditar em mim.

Assim, também agradeço à contribuição de todos os professores do programa de Ciências Moleculares (PMCM) e sua secretária executiva Ediléia.

Aos colegas de laboratório Cindy, Diogo, Eduardo, Jamerson, Thiago, Regina e Wanderson.

À Andreza S. Figueiredo e Késia da Paixão, por me ajudarem fornecendo dados de suas pesquisas e explicações quando necessário.

Aos técnicos da Universidade Estadual de Goiás (UEG): Isabela pelas análises realizadas, Sr Fernando, Vanessa e Adrielly pelo companheirismo e paciência no desempenho de seu trabalho.

A todos aos que contribuíram direta ou indiretamente, mas não foram citados muito obrigada!

...Mas, como está escrito: As coisas que o olho não viu, e o ouvido não ouviu, e não subiram ao coração do homem, são as que Deus preparou para os que o amam... (I Aos Coríntios 2:9)

RESUMO

As Azinas que são compostos formados a partir de hidrazonas e apresentam diversas atividades biológicas, dentre elas a atividade anticolinesterásica, usada no tratamento da doença de Alzheimer. Na doença de Alzheimer (DA), uma doença complexa neurodegenerativa e multifatorial, atingindo primordialmente a população idosa com mais de 65 anos de idade são observados déficits cognitivos e funcionais. Evidências demonstram que esses déficits relacionam-se com a degeneração do sistema colinérgico, devido principalmente a diminuição dos níveis plasmáticos de acetilcolina. Pacientes com DA apresentam melhora dos sintomas cognitivos, comportamentais e funcionais relacionados às demências hipocolinérgicas, quando tratados com inibidores de acetilcolinesterase (AChE). Esses inibidores aumentam os níveis de acetilcolina presentes nas sinapses entre neurônios colinérgicos. A principal classe de medicamentos inibidores da (AChE) são a tacrina, donepezil, galantamina e rivastigmina, justificando a busca por inibidores da AChE mais potentes e com menor toxicidade. Estudos sugerem semelhanças estruturais entre o donepezila e algumas azinas. Sendo assim o objetivo desse trabalho foi sintetizar com o uso de irradiação por micro-ondas, identificar a estrutura dos compostos sintetizados e realizar testes anticolinesterásicos de uma série de azinas, semelhantes ao donepezila. Essas azinas foram sintetizadas e testadas, verificando-se que das azinas sintetizadas **20 e 29**, utilizando o teste de modificado de Ellman em placas cromatográficas inibiram a acetilcolinesterase, mas ao confirmar o teste fazendo o teste de falso positivo, não confirmou-se a inibição da acetilcolinesterase por esses compostos, nos compostos **16, 17, 18, 22, 23,25, 26, 27 e 30** não houve inibição enzimática e sim reação química entre os compostos e a tiocolina, e os compostos **19, 21, 24, 28 e 31** não apresentaram atividade e nem reagiram com a tiocolina. Concluindo-se que a técnica de Irradiação por Micro-ondas é bastante eficaz em síntese orgânica, reduziu o tempo, o custo das reações e quantidade de solvente liberado no meio ambiente. Pelo fato das azinas apresentarem atividades biológicas descritas na literatura, como antitumoral, anti-coagulante, plaquetária entre outras sugere-se que se façam outros testes com as azinas sintetizadas para avaliar se apresentam outras atividades biológicas.

Palavras-chave: Síntese, Micro-ondas, Atividade Anticolinesterásica, Hidrazona, Azina.

ABSTRACT

The azines that are compounds formed from hydrazones and exhibit several biological activities, among them anticholinesterase activity, used in the treatment of Alzheimer's disease. In Alzheimer's disease (AD), a neurodegenerative multifactorial and complex disease primarily affecting the elderly population over 65 years old are observed cognitive and functional deficits. Evidence has shown that these deficits relate to the degeneration of the cholinergic system, mainly due to the reduction of plasma levels of acetylcholine. AD patients show improvement of cognitive, behavioral and functional symptoms related to hypocholinergic dementias, when treated with acetylcholinesterase (AChE) inhibitors. These inhibitors increase levels of acetylcholine present in the synapses between cholinergic neurons. The main class of inhibitor medicines (AChE) are tacrine, donepezil, galantamine and rivastigmine, justifying the search for more potent and with less toxicity AChE inhibitors. Studies suggest structural similarities between the donepezil and some azines. Thus the aim of this study was to synthesize using microwave irradiation, identify the structure of the synthesized compounds and perform anticholinesterase test a number of azines, similar to donepezil. These azines were synthesized and tested, verifying that the azines **20** and **29** synthesized using a modified Ellman's test for chromatographic plates inhibited acetylcholinesterase, but confirm the test making false positive test that has not confirmed the inhibition acetylcholinesterase by these compounds, the compounds **16, 17, 18, 22, 23,25, 26, 27** and **30** no enzyme inhibition but chemical reaction between the thiocholine and compounds, and compounds **19, 21, 24, 28** and **31** showed no activity nor reacted with thiocholine. Concluding that the irradiation Microwave technique is quite effective in organic synthesis, reduced the time, the cost of the reaction and the amount of solvent released into the environment. Because of azines present biological activities described in the literature, such as antitumor, anti-coagulant, among other platelet is suggested to make other tests with azines synthesized to evaluate if present other biological activities.

Keywords: Synthesis, Microwave, acetylcholinesterase activity, Hydrazone, Azine.

LISTA DE FIGURAS

Figura 01: Estrutura da piridoxalisonicotinoil hidrazona (PIH) 4; Estrutura da salicilaldeído isonicotinoil hidrazona (SIH) 5; Estrutura da 2-hidroxi-1-naftaldeído isonicotinoil hidrazona 6	27
Figura 02: Estrutura da benzo[d]isotiazol hidrazonas; 6-mercaptopurina	28
Figura 03: Representação para azinas simétricas e assimétricas	29
Figura 04: Localização da região de micro-ondas no espectro eletromagnético	30
Figura 05: Moléculas de água com e sem influência do campo magnético	31
Figura 06: Representação das formas de aquecimento: Convencional e por Irradiação de Micro-Ondas	32
Figura 07: Formação das placas amilóide	37
Figura 08: Cascata de Amilóide	38
Figura 09: Estrutura molecular dos fármacos mais usados para o tratamento da doença de Alzheimer.	40
Figura 10: Placa cromatográfica do Ensaio Ellman realizado com AChE ee	59
Figura 11: Placa cromatográfica do Ensaio falso-positivo de Ellman	60
Figura 12: Placa cromatográfica do Ensaio Marston	61
Figura 13: Espectro na região do IV do composto 16 (4000 - 500 cm^{-1}).	73
Figura 14: Espectro de massas do composto 16	74
Figura 15: Espectro de RMN ^1H composto 17 (CDCl_3 , 500 MHz)	76
Figura 16: Espectro de RMN ^{13}C composto 17 (2D - HSQC).	77

Figura 17: Espectro na região do IV do composto 11 (4000 - 500 cm ⁻¹).	78
Figura 18: Espectro de massas do composto 17	79
Figura 19: Espectro de RMN ¹ H composto 18 (CDCl ₃ , 500 MHz)	81
Figura 20: Espectro de RMN ¹³ C composto 18 (2D - HMBC)	82
Figura 21: Espectro na região do IV do composto 18 (4000 - 500 cm ⁻¹).	83
Figura 22: Espectro de massas do composto 18	84
Figura 23: Espectro de RMN ¹ H composto 19 (CDCl ₃ , 500 MHz)	86
Figura 24: Espectro de RMN ¹³ C composto 19 (2D - HMBC)	87
Figura 25: Espectro na região do IV do composto 19 (4000 - 500 cm ⁻¹).	88
Figura 26: Espectro de massas do composto 19	89
Figura 27: Espectro de RMN ¹ H composto 20 (CDCl ₃ , 500 MHz).	91
Figura 28: Espectro de RMN ¹³ C composto 20 (2D - HMBC)	92
Figura 29: Espectro na região do IV do composto 20 (4000 - 500 cm ⁻¹).	93
Figura 30: Espectro de massas do composto 20.	94
Figura 31: Espectro de RMN ¹ H composto 21 (CDCl ₃ , 500 MHz).	96
Figura 32: Espectro de RMN ¹³ C composto 21 (2D - HMBC).	97
Figura 33: Espectro na região do IV do composto 21 (4000 - 500 cm ⁻¹).	98
Figura 34: Espectro de massas do composto 21.	99
Figura 35: Espectro de RMN ¹ H composto 22 (CDCl ₃ , 500 MHz).	101

Figura 36: Espectro de RMN ^{13}C composto 22 (2D - HMBC)	102
Figura 37: Espectro na região do IV do composto 22 (4000 - 500 cm^{-1}).	103
Figura 38: Espectro de massas do composto 22.	104
Figura 39: Espectro de RMN ^1H composto 23 (CDCl_3 , 500 MHz).	106
Figura 40: Espectro de RMN ^{13}C composto 23 (2D - HMBC).	107
Figura 41: Espectro na região do IV do composto 23 (4000 - 500 cm^{-1}).	108
Figura 42: Espectro de massas do composto 23.	109
Figura 43: Espectro de RMN ^1H composto 24 (CDCl_3 , 500 MHz).	111
Figura 44: Espectro de RMN ^{13}C composto 24 (2D - HMBC).	112
Figura 45: Espectro na região do IV do composto 24 (4000 - 500 cm^{-1}).	113
Figura 46: Espectro de massas do composto 24.	114
Figura 47: Espectro de RMN ^1H composto 25 (CDCl_3 , 500 MHz)	116
Figura 48: Espectro de RMN ^{13}C composto 25 (HMBC).	117
Figura 49: Espectro na região do IV do composto 25 (4000 - 500 cm^{-1}).	118
Figura 50: Espectro de RMN ^1H composto 26 (CDCl_3 , 500 MHz).	120
Figura 51: Espectro de RMN ^{13}C composto 26 (HMBC).	121
Figura 52: Espectro na região do IV do composto 26 (4000 - 500 cm^{-1}).	122
Figura 53: Espectro de massas do composto 26.	123
Figura 54: Espectro de RMN ^1H composto 27 (CDCl_3 , 500 MHz).	125

Figura 55: Espectro de RMN ^{13}C composto 27 (HMBC).	126
Figura 56: Espectro na região do IV do composto 27 (4000 - 500 cm^{-1}).	127
Figura 57: Espectro de massas do composto 27.	128
Figura 58: Espectro de RMN ^1H composto 28 (CDCl_3 , 500 MHz).	130
Figura 59: Espectro de RMN ^1H composto 29 (CDCl_3 , 500 MHz).	132
Figura 60: Espectro de RMN ^{13}C composto 29 (HMBC).	133
Figura 61: Espectro de RMN ^1H composto 30 (CDCl_3 , 500 MHz).	135
Figura 62: Espectro de RMN ^{13}C composto 30 (HMBC)	136
Figura 63: Espectro na região do IV do composto 30 (4000 - 500 cm^{-1}).	137
Figura 64: Espectro de massas do composto 30.	138
Figura 65: Espectro de RMN ^1H composto 31 (CDCl_3 , 500 MHz).	140
Figura 66: Espectro de RMN ^{13}C composto 31 (HMBC).	141
Figura 67: Espectro na região do IV do composto 31 (4000 - 500 cm^{-1}).	142
Figura 68: Espectro de massas do composto 31.	143

LISTA DE ESQUEMAS

Esquema 01: Representação da estrutura de uma hidrazona.	23
Esquema 02: Mecanismo de formação de hidrazonas via catálise ácida.	24
Esquema 03: Isomerismo E/Z	25
Esquema 04: Formação de bis-hidrazonas ou azinas simétricas (dímero).	28
Esquema 05: Planejamento de Azinas por simplificação de N-acilidrazonas. Estrutura do Donepezil.	41
Esquema 06: Síntese da (E) -1 – (4-Nitrobenzilideno) – hidrazina: (Hidrazona 16).	44
Esquema 07: Síntese da série de Azinas.	45
Esquema 08: Catálise da acetiltiocolina e reação de Ellman.	58
Esquema 09: Catálise da acetilcolinesterase com acetato de nafitil e subsequente formação do corante púrpura observado.	60

LISTA DE TABELAS

Tabela 01 Taxa de conversão do 4-nitrobenzaldeído e hidrazina na hidrazona 16 , com variação da temperatura em 3 ciclos.	50
Tabela 02 Azinas sintetizadas a partir da (E) – 1 – (4-Nitrobenzilideno) hidrazina.	53
Tabela 03 Taxa de conversão da hidrazona 16 em azinas.	54
Tabela 04 Resultados dos ensaios de inibição realizados em CCD.	56

LISTA DE ABREVIATURAS

A β (β - amilóide)

ACh acetilcolina

AChE Acetilcolinesterase

ACTI Iodeto de acetiltiocolina

APP Proteína Precursora do Amilóide

CCD Cromatografia em Camada Delgada

CIM Concentração Inibitória mínima

CGMS Cromatografia gasosa acoplada a Espectroscopia de Massas

D Duplete

DA Doença de Alzheimer

dd duplo duplete

ddd duplo duplo duplete

DTNB 5,5 '-ditio-bis (2-nitrobenzóico)

EM Espectrometria de massas

FDA *Food and Drug Administration*

IMO Irradiação de Micro-ondas

IV Infravermelho

m multiplete

NCE – do inglês *New chemical Entities* – Novas Entidades Químicas.

PIH Piridoxatisonicotinoil hidrazona

REA – Relações entre Estrutura Química e Atividade Biológica.

RMN ¹H/¹³C Ressonância Magnética Nuclear de hidrogênio e carbono 13

RMN Ressonância Magnética Nuclear

s simpleto

Ser Serina

SIH Salicilaldeído isonicotinoil hidrazona

t tripleto

tau Taurina

TMS Tetrametilsilano

Trp Triptofano

Tyr Tirosina

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	19
2 REVISÃO DA LITERATURA	21
2.1 PLANEJAMENTO DE FÁRMACOS.	21
2.1.2 Processo de Modificação Molecular em Fármacos.	22
2.2 HIDRAZONAS.	23
2.3 AZINAS.	28
2.4 SÍNTESE ORGÂNICA POR IRRADIAÇÃO DE MICRO – ONDAS.	29
2.5 POPULAÇÃO IDOSA E A DOENÇA DE ALZHEIMER.	33
2.5.1 Doença de Alzheimer (DA).	34
2.5.2 Alterações comuns no cérebro acometido pelo Alzheimer	35
2.5.2.1 Placas amilóide	36
2.5.2.2 Emaranhados neurofibrilares	38
2.5.2.3 Perda das conexões celulares e morte cerebral	39
2.5.2.4 Inibidores da Acetilcolinesterase	39
3 OBJETIVOS	42
3.1 Objetivo Geral	42
3.2 Objetivos específicos	42
4 MATERIAIS E MÉTODOS	43
4.1 MATERIAIS	43
4.1.1 Reagentes, Equipamentos e Laboratórios	43
4.2 METODOLOGIA	43
4.2.1 Síntese da Hidrazona 16 , assistida por micro-ondas	43
4.2.2 Síntese de Azinas assistida por micro-ondas	44

4.2.3 Identificação Estrutural	46
4.2.4 Análise da atividade anticolinesterásica	46
4.2.4.1 Ensaio em Cromatografia de Camada Delgada (CCD)	46
4.2.4.2 Tampões	47
4.2.4.3 Preparo da Enzima	47
4.2.4.4 Preparo do substrato	48
4.2.4.5 Preparo dos Reagentes Colorimétricos	48
5. RESULTADOS E DISCUSSÕES	50
5.1 SÍNTESE DA HIDRAZONA (E) -1- (4-NITROBENZILIDENO) HIDRAZINA ASSISTIDA POR MICRO-ONDAS	50
5.2 SÍNTESE DAS AZINAS ASSISTIDA POR MICRO-ONDAS	52
5.3 ATIVIDADE ANTICOLINESTERÁSICA	55
5.3.1 Solubilidade	55
5.3.2 Ensaio Modificado de Ellman	58
5.3.3 Ensaio falso-positivo de Ellman	60
5.3.4 Ensaio de Marston	60
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS	63
REFERÊNCIAS	65
ANEXOS	72

1 INTRODUÇÃO

A Química Medicinal em suas inúmeras atribuições engloba o planejamento racional de novas substâncias bioativas, envolvendo a síntese ou a modificação molecular de substâncias; o isolamento de princípios ativos naturais (plantas, animais, minerais); a identificação ou elucidação da estrutura; a descrição das moléculas desde a sua constituição atômica (passando por relações entre a estrutura e propriedades) até suas características estruturais quando da(s) interações com os diferentes sistemas biológicos; a compreensão em nível molecular de processos farmacodinâmicos, farmacocinéticos e toxicológicos; finalmente, a proposição e validação de modelos matemáticos através dos estudos de relações entre a estrutura química e a atividade farmacológica e/ou toxicológica, permitindo então a proposição de novas entidades de interesse (AMARAL e MONTANARI, 2002).

Sendo assim, o cumprimento desta difícil e complexa missão exige uma equipe interdisciplinar e fundamenta-se, simplificadamente, na tríade: Química Orgânica - Farmacologia - Química Computacional (Barreiro, 2002). A partir do avanço da Biologia Molecular, inúmeros processos biológicos foram identificados, fornecendo diversos novos alvos farmacológicos para o planejamento e desenvolvimento de novos fármacos (CERA e PANCOTE, 2009).

Para a química o surgimento de reatores de micro-ondas foi um grande desenvolvimento que potencializou as reações orgânicas e ocorreu como consequência direta do estudo das reações em forno doméstico, que demonstrou o grande potencial desta técnica. Estes aparelhos, segundo alguns autores, teriam vantagens marcantes sobre o forno doméstico de micro-ondas, tais como: possibilidade de realização de refluxo e controle

de temperatura e pressão (que não é possível no forno doméstico) (LOUPY *et al.*, 2002). A segurança operacional também seria muito maior, já que o forno de micro-ondas doméstico não foi fabricado para o uso em Química. Outro fator importante, é que esses reatores operam de forma diferente que um forno doméstico, onde a distribuição de micro-ondas no interior do forno não é homogênea (forno multimodo) (SANSEVERINO, 2002).

Assim, os reatores de micro-ondas são mais eficientes do ponto de vista energético, reduzindo o tempo das reações e garantiriam uma maior reprodutibilidade de experimentos. Outro fato apontado é a possibilidade de trabalhar com potências menores nestes reatores (15-300 W), que evita decomposição térmica em certas reações conduzidas no forno doméstico (BARBOZA *et al.*, 2001).

As hidrazonas que são compostos que podem ser obtidas pela reação entre aldeídos ou cetonas com hidrazina e as azinas sintetizadas à partir das hidrazonas são substâncias químicas com diversas e pronunciadas atividades biológicas, relacionando às atividades antimicrobiana, antiparasitária, analgésica, anti-inflamatória, anticonvulsivante, anti-agregante, plaquetária, além de atividades antituberculose, antitumoral, anticolinesterásica entre outras (LIMA, 2000; ROLLAS, 2007).

Perante o exposto, unindo a técnica de síntese por irradiação de micro-ondas e a possibilidade de sintetizar compostos com atividades biológicas, o objetivo deste trabalho será realizar a síntese com o uso de reator de micro-ondas e resolver o problema de formação de subprodutos da hidrazona (E) - 1 - (4- Nitrobenzilideno) hidrazina e de uma série de azinas, fazer a identificação estrutural, para que posteriormente sejam realizados o teste biológico (Anticolinesterásico) .

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 PLANEJAMENTO DE FÁRMACOS

O Planejamento e Desenvolvimento de Novos Fármacos é uma área da Química Farmacêutica Medicinal, ciência que engloba inovação, descoberta, síntese ou modificação molecular, extração, isolamento, identificação de substâncias bioativas, bem como suas respectivas relações entre estrutura química e atividade biológica (REA) (CERA e PANCOTE, 2009). O processo de descoberta e desenvolvimento de fármacos é complexo, longo e de alto custo, onde os avanços expressivos da Química e Biologia e a melhor compreensão de vias bioquímicas, alvos moleculares e de mecanismos que levam ao aparecimento e desenvolvimento de doenças são muito importantes para se criar um novo fármaco (GUIDO *et al.*, 2008).

A quantidade de medicamentos de origem natural vem diminuindo, e aqueles de origem sintética aumentam constantemente, em detrimento da síntese química que está contribuindo cada vez mais com novos fármacos e esta, por sua vez, exige conhecimento dos mecanismos que regem as reações químicas, a interação com catalisadores e métodos especializados de purificação e identificação dos fármacos (FERREIRA, 2003).

O processo de descoberta e desenvolvimento de fármacos, é dividido em duas grandes fases: (i) descoberta (também conhecida como pré-clínica ou pesquisa básica) e (ii) desenvolvimento (ou clínica). Nos estágios iniciais da fase de descoberta, as pesquisas se concentram geralmente na identificação e otimização de moléculas pequenas capazes de representar novas entidades químicas (NCE, do inglês *New Chemical Entities*) com potencial de desenvolvimento clínico. A validação do alvo

molecular selecionado é fundamental por uma série de razões que envolvem desde o estabelecimento de sua relevância no processo fisiopatológico em estudo até a caracterização do impacto de sua modulação seletiva no tratamento ou na cura de doenças ou disfunções em humanos (LOMBARDINO e LOWE, 2004).

2.1.2 Processo de Modificação Molecular em Fármacos

Diversas estratégias de planejamento molecular de fármacos são disponíveis, sendo a principal aquela baseada no mecanismo de ação farmacológica pretendido, também denominada de abordagem fisiológica (GANELLIN,2000; BARREIRO, 2002).

Uma vez comprovada a atividade farmacológica desejada por meio de protocolos farmacológicos *in vivo*, tem-se um novo composto protótipo, candidato a novo fármaco. Introduziu-se o termo “hit” para designar ligante ou análogo-ativo de baixa afinidade ou eficácia, respectivamente, representando uma etapa anterior à identificação do composto protótipo (BARREIRO, 2002).

O novo composto protótipo pode ter sua eficácia otimizada por modificações estruturais subsequentes, planejadas de forma a preservar as propriedades farmacocinéticas detectadas nos bioensaios *in vivo*. De forma bem breve, podemos dizer que essas modificações podem consistir de aproximação intuitiva, tais como a síntese de análogos, isômeros e isósteros, simplificação molecular, latenciação, modificação de sistemas anelares, entre outros (KOROLKOVAS, 1988; WERMUTH, 2003).Uma vez otimizado o composto protótipo identificado na série congênere bioativa e com comprovada ausência de toxicidade, tem-se uma nova entidade química (“NCE”) (Ong, Allen, 1988), estruturalmente original,

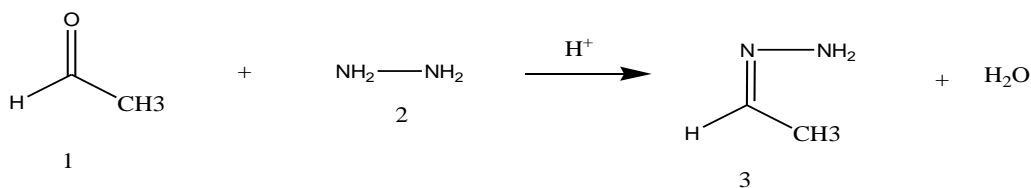
que pode ser submetida às fases de ensaios pré-clínicos e clínicos, resultando, finalmente, num novo fármaco.

2.2 HIDRAZONAS

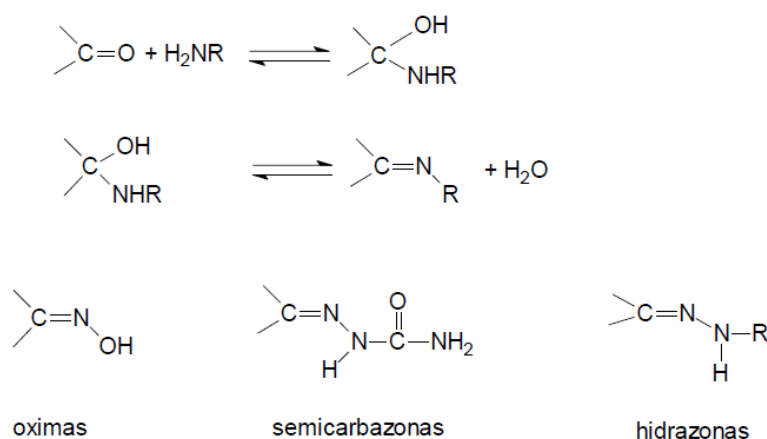
Na literatura química, as hidrazonas não são usualmente reconhecidas como formadoras de uma classe diferenciada de compostos orgânicos, sendo frequentemente consideradas como substâncias derivadas de compostos carbonílicos. São consideradas hidrazonas, todos os compostos cujas moléculas possuem em sua estrutura uma porção triatômica, ($R_2C=N-NR_2$) considerando que esta não pertença a um heterociclo (KITAEV e BUZYKIN, 1972; JIN, 2007).

A reação de uma cetona ou de um aldeído **1** com uma amina primária **2** origina derivados do tipo imina (oximas, hidrazonas **3**, semicarbazonas e enaminas) (esquema 01), também designados por base de Schiff. É uma reação de equilíbrio conforme pode ser visto no esquema 02 (MARCH, 1992).

Esquema 01: Representação da estrutura de uma hidrazona



Esquema 02: Formação de iminas.

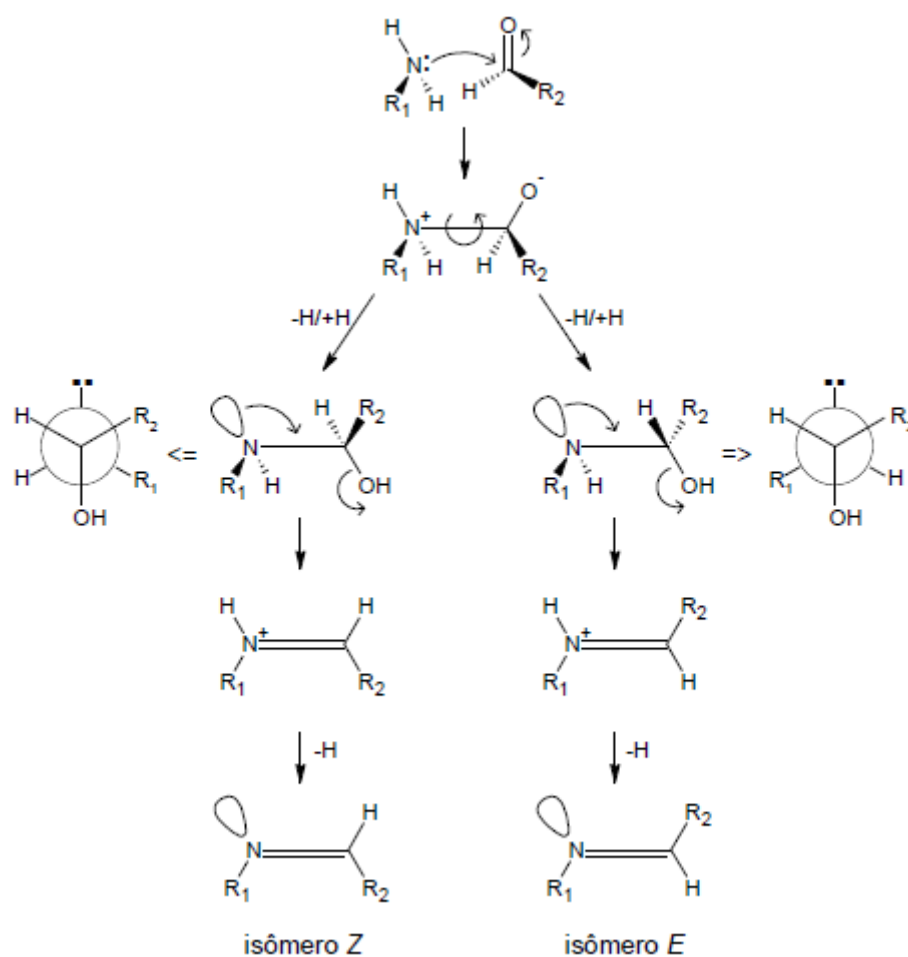


A hidrazona é comumente sintetizada por catálise ácida, podendo ser também por catálise básica. No caso da catálise ácida, dependendo do solvente, não é necessária a adição de ácido, uma vez que quantidades traço do íon hidrônio já são suficientes. A primeira etapa é concertada entre as três espécies reagentes, com transferência de próton e adição nucleofílica simultaneamente. A seguir, o próton ligado ao nitrogênio é removido pela base recém-formada enquanto o oxigênio é protonado outra vez. Em seguida, uma molécula de água é eliminada com formação do correspondente íon imínium. A última etapa consiste na remoção do outro hidrogênio ácido ligado ao nitrogênio e formação da hidrazona (CAREY, 2007).

O par de elétrons não-ligante do nitrogênio do tipo amino é conjugado à ligação dupla em C-N, deixando esse carbono com caráter menos positivo e, conseqüentemente, menos suscetível a ataques nucleofílicos em comparação com as iminas, conferindo maior estabilidade que estas, portanto. Ambos os nitrogênios podem reagir com eletrófilos, assim como o próprio carbono (BELSKAYA, DEHAEN, BAKULEV; 2010).

Hidrazonas são passíveis de possuir isomerismo *E/Z*, conforme pode ser visto no esquema 03, devido a deslocalização de elétrons π pela presença do outro nitrogênio, a isomerização é facilitada. Esse efeito é causado tanto termicamente, quanto fotoquimicamente, e é promovido por solventes polares, por catálise ácida/básica ou por substituintes doadores de elétrons. Há, ainda, a possibilidade de um tautomerismo azo-hidrazona (CARREY, 2007).

Esquema 03: Isomerismo *E/Z*.



Solventes polares capazes de interagir por ligação de hidrogênio, promovem essa isomerização, devido o solvente formar ligação de hidrogênio intermolecular e anular a interação intramolecular previamente

existente, o que não é possível em solventes pouco polares e apolares (PALLA, PREDIERI, DOMIANO, VIGNALI, TURNER; 1986).

A funcionalidade hidrazona consiste no grupo farmacofórico de algumas substâncias, induzindo às atividades antimicrobiana, antiparasitária, analgésica, anti-inflamatória, anticonvulsivante anti-agregante, plaquetária, além de atividades antituberculose, antitumoral e outras (LIMA, 2000; ROLLAS, 2007).

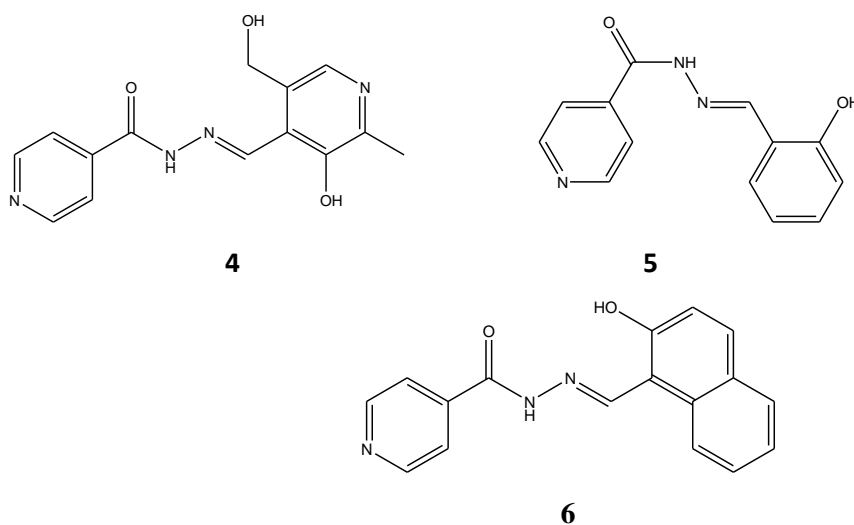
Devido ao comportamento quelante dessas moléculas, as hidrazonas são usadas como reagentes analíticos para determinar quantidades traço de íons metálicos. Além disso, esses compostos são usados no controle de pragas agrícolas, enquanto hidrazonas aromáticas são utilizadas em fotorreceptores eletrofotográficos de impressoras a *laser* (GETAUTIS *et al*, 2008).

Rollas e colaboradores (2007) estudaram o potencial antimicrobiano de uma série de hidrazonas provenientes de ácido 4-fluorbenzóico hidrazida, que foram testadas frente a colônias de bactérias *S. aureus*, *E. coli*, *P. aeruginosa* e de fungos *C. albicans*. Os resultados mostraram que as hidrazonas inibem o crescimento das bactérias *S. aureus*, apresentando valores de Concentração Inibitória Mínima (CIM) na mesma faixa observada para o agente antibacteriano ceftriaxona. Por outro lado, as hidrazonas estudadas não apresentaram atividade satisfatória contra os demais micro-organismos.

Em (2004), Walcourt e colaboradores investigaram a atividade antimalárica de piridoxalisonicotinoil hidrazona (PIH) **4**, salicilaldeído isonicotinoil hidrazona (SIH) **5** e 2-hidroxi-1-naftaldeído isonicotinoil hidrazona **6**, figura 01, frente a parasitas sensíveis e resistentes à cloroquina. A determinação de IC₅₀ destes compostos revelou que a hidrazona **6** possui maior atividade que o agente antimalárico desferroxamina, o qual apresenta atividade em humanos; O Mesilato de

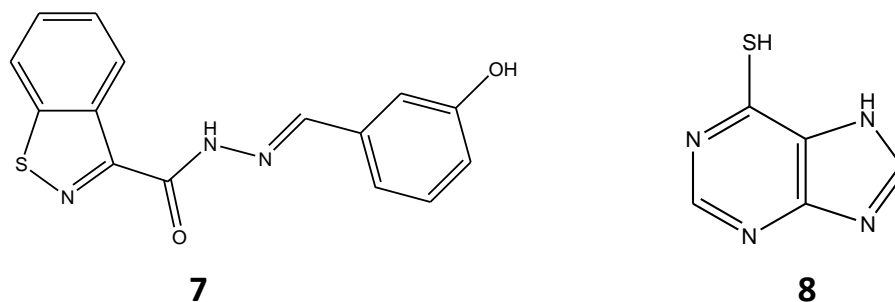
desferroxamina (Desferal[®] Novartis) é um quelante utilizado para retirar o excesso de ferro e o excesso ou intoxicação por alumínio em pacientes com doença renal crônica.

Figura 01: Estrutura da piridoxalisonicotinoil hidrazona (PIH) **4**; Estrutura da salicilaldeído isonicotinoil hidrazona (SIH) **5**; Estrutura da 2-hidroxi-1-naftaldeído isonicotinoil hidrazona **6**.



Vicini e colaboradores (2006) testaram uma série de benzo[*d*]isotiazol hidrazonas **7**, figura 02, contra diversas linhagens de células humanas de tumores sólidos e hematológicos. Os resultados mostraram que alguns compostos testados apresentaram atividade citotóxica similar à do antineoplásico, antimetabólito 6-mercaptopurina **8**, que inibem a biossíntese dos componentes essenciais para o DNA e RNA impedindo sua multiplicação e usado contra os tumores hematológicos testados, como as leucemias e linfomas.

Figura 02: Estrutura da benzo[*d*]isotiazol hidrazonas **7**; 6-mercaptopurina **8**



2.3 AZINAS

Uma forma de se obter uma azina é adicionando-se um aldeído à uma hidrazona, ou quando uma hidrazona continua reagindo (formando dímeros) como pode ser observado no esquema 04, devido a sua alta reatividade, as hidrazonas podem reagir entre si formando dímeros e liberando hidrazina no meio reacional (FIGUEREDO, 2013).

De acordo com a natureza dos substituintes R, as azinas podem ser classificadas em simétricas ($R_2=R_3$) ou assimétricas ($R_2\neq R_3$) conforme a figura 03. O esquema clássico para sua síntese baseia-se na reação entre aldeídos / cetonas com hidrazina, de forma simples e eficiente (DAYAGI e DEGANI, 1970).

Esquema 04: Formação de bis-hidrazonas ou azinas simétricas (dímero)

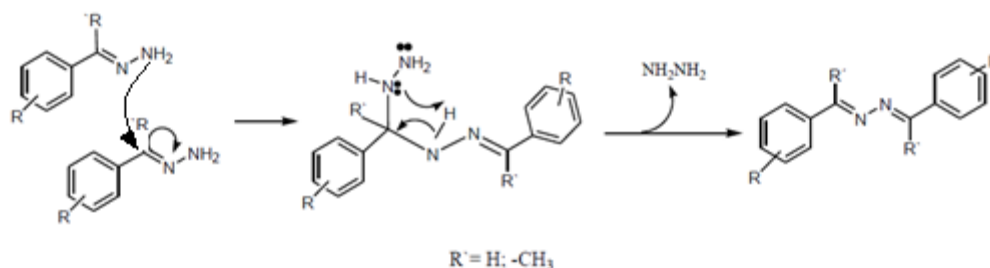
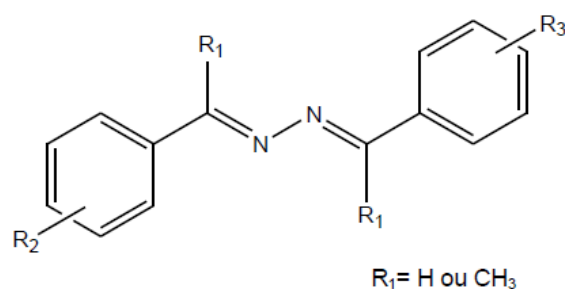


Figura 03: Representação para azinas simétricas e assimétricas



Azinas apresentam propriedades químicas e espectroscópicas incomuns que conduziram ao interesse em ambas as suas características estereoquímicas em solução e da fase gás, bem como em estado sólido. Azinas assimétricas são particularmente interessantes por causa da capacidade dessa funcionalidade em ligar dois grupos diferentes (POMAR, SODERQUIST, 2000).

2.4 SÍNTESE ORGÂNICA POR IRRADIAÇÃO DE MICRO-ONDAS

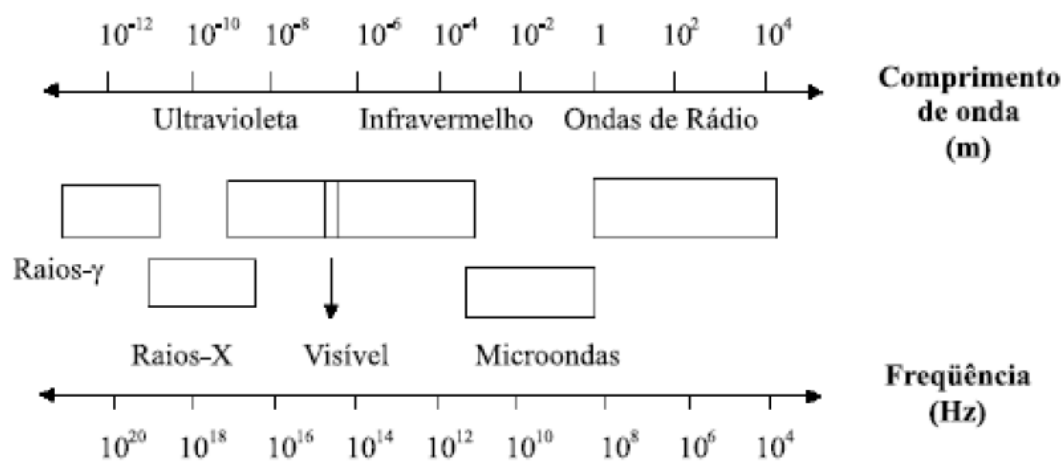
A tecnologia de irradiação de micro-ondas começou a ser desenvolvida na década de 40, possuindo um campo de aplicação bastante restrito, sendo utilizada principalmente na indústria de alimentos e polímeros. A sua utilização como ferramenta pelos químicos orgânicos só aconteceu em meados da década de 80, tendo como ponto de partida os trabalhos de Gedye e Guiguere. Nesses artigos, os autores descrevem os resultados obtidos através da utilização de aparelhos de micro-ondas domésticos em reações de esterificação e ciclo-adição, respectivamente (SOUZA, 2011)

Processos químicos já conhecidos foram estudados e melhorados com o advento desta técnica. Reações heterocíclicas, reações catalisadas

por metais como a química do Paládio, reduções de vários grupos funcionais, sínteses utilizando suportes sólidos como reagentes são alguns exemplos da vasta lista de relatos envolvendo a emissão de micro-ondas como principal atributo dessas melhorias (TIERNEY e LIDSTRÖM, 2005; LOUPY, 2002).

As micro-ondas são radiação eletromagnética não ionizante, que possuem uma frequência que vai de 300 a 300.000 MHz, conforme figura 04 e que corresponde a comprimentos de onda de 1 mm a 1 m. Estas ondas são da mesma natureza das ondas de rádio, ou da luz, diferindo apenas na frequência. Atividades de radar e telecomunicações também operam nesta região, desta forma a maioria dos instrumentos de micro-ondas comercial operam em 2450 MHz para evitar interferências (CADDICK, 1995; PECORARO *et al.*, 1997; SANSEVERINO, 2002).

Figura 04: Localização da região de micro-ondas no espectro eletromagnético



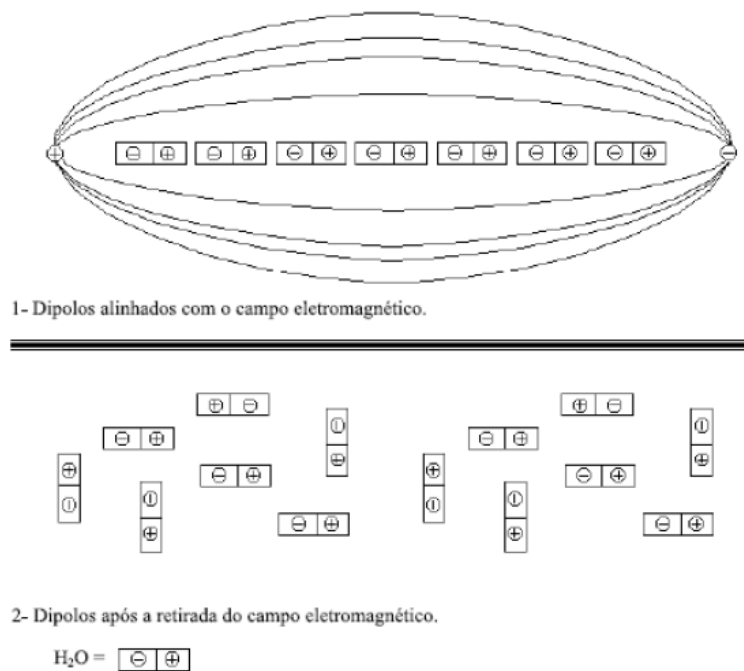
Fonte: SANSEVERINO, 2002.

Na irradiação de micro-ondas (IMO), diferentemente do aquecimento convencional onde a transferência de calor se dá por mecanismos de condução e convecção, a transferência é de forma direta e

ocorre através de dois mecanismos principais: a rotação de dipolos e a condução iônica (SANSEVERINO, 2002).

A rotação de dipolo relaciona-se com o alinhamento das moléculas (que tem dipolos permanentes ou induzidos) com o campo elétrico aplicado. Quando o campo é removido, as moléculas voltam a um estado desordenado, e a energia que foi absorvida para esta orientação nestes dipolos é dissipada na forma de calor. Como o campo elétrico na frequência de 2,45 GHz oscila (muda de sinal) $4,9 \times 10^9$ vezes por segundo, ocorre um pronto aquecimento destas moléculas. A habilidade das moléculas em um líquido para alinhar a um campo elétrico aplicado varia com diferentes frequências, com a viscosidade do líquido (LIDSTROM *et al.*, 2001) e com o tamanho da molécula (BARBOZA *et al.*, 2001). Uma representação esquemática é mostrada na Figura 5, onde usou-se a água como exemplo.

Figura 05: Moléculas de água com e sem influência do campo magnético



Fonte: (SANSEVERINO, 2002)

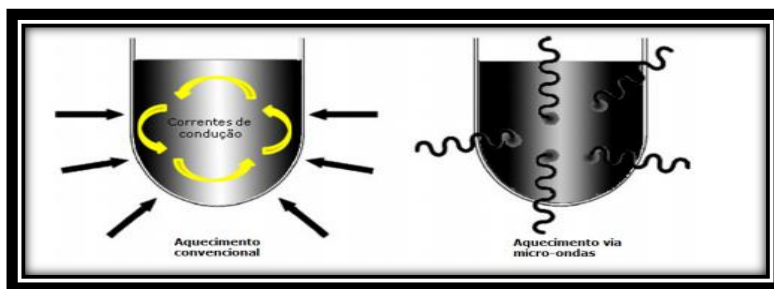
Por outro lado, sob a influência de alta frequência do campo elétrico, os dipolos não têm tempo suficiente para responder a esta oscilação do campo e não ocorre rotação. Uma vez que nenhum movimento é induzido nas moléculas, não há transferência de energia e não ocorre aquecimento. Se o campo aplicado está na região da radiação de micro-ondas, o fenômeno ocorre entre esses dois extremos, promovendo o aquecimento (LIDSTROM *et al.*, 2001).

O mecanismo de condução iônica ocorre em amostras que contenham íons livres ou moléculas carregadas que, neste caso, sob a aplicação do campo elétrico migram através da amostra. Este fenômeno de migração, e conseguinte fricção entre as moléculas presente na amostra, promove a geração de calor de maneira uniforme (SANSEVERINO, 2002).

Algumas vantagens atribuídas à emissão de micro-ondas em reações químicas tais como o aumento da velocidade e a seletividade de possíveis produtos competitivos tanto na presença como na ausência de solventes já é um fato conhecido e aceito no meio acadêmico (TIERNEY e LIDSTRÖM, 2005; LOUPY, 2002).

Inicialmente tais vantagens encontradas nas reações mediadas por micro-ondas podem ser atribuídas à forma de aquecimento, conforme podemos observar na figura 06.

Figura 06: Representação das formas de aquecimento: Convencional e por Irradiação de Micro ondas



Fonte: (KAPPE, 2009)

Tradicionalmente as reações que ocorrem sob aquecimento externo, ou seja, transferência de energia de uma fonte externa para dentro da amostra por condução é considerada lenta e ineficiente quando comparada com o aquecimento sob irradiação, pois pode gerar diferentes gradientes de temperatura e superaquecimentos localizados levando a decomposição de produtos, reagente e substratos. Por outro lado, a irradiação de micro-ondas proporciona um aquecimento interno uniforme pela interação direta entre a energia e as moléculas de reagentes, catalisadores e solventes (aquecimento dielétrico).

Entretanto, os princípios físicos e os fatores que determinam a aplicação bem sucedida de micro-ondas em vários ramos da química bem como na síntese orgânica não são amplamente familiares entre os químicos. Portanto, tal conhecimento é essencial para o entendimento das interações micro-ondas - matéria e da natureza dos efeitos desta irradiação (KAPPE, 2009).

2.5 POPULAÇÃO IDOSA E A DOENÇA DE ALZHEIMER

Além das modificações populacionais, o Brasil tem experimentado uma transição epidemiológica, com alterações relevantes no quadro de morbi-mortalidade. As doenças infectocontagiosas, que representavam 40% das mortes registradas no país em 1950, hoje são responsáveis por menos de 10%. O oposto ocorreu em relação às doenças cardiovasculares, em 1950, eram causa de 12% das mortes e, representam mais de 40%. Em menos de 40 anos, o Brasil passou de um perfil de mortalidade típico de uma população jovem para um desenho caracterizado por enfermidades complexas e mais onerosas, próprias das faixas etárias mais avançadas (GORDILHO *et al*, 2000).

Uma doença também influenciada pelo fator idade é a doença de Alzheimer (DA) que é a principal causa de declínio cognitivo em adultos, sobretudo idosos, representando mais da metade dos casos de demência. Sendo então a idade um fator de risco, sua prevalência passa de 0,7% aos 60 a 64 anos de idade para cerca de 40% nos grupos etários de 90 a 95 anos. Isso revela a magnitude do problema no Brasil, onde já vivem cerca de 15 milhões de indivíduos com mais de 60 anos (FORLENZA, 2005).

Sendo assim, espera-se um aumento ainda maior do número de pacientes com a doença com a melhoria da expectativa de vida e consequente aumento do número da população idosa. Segundo a Organização Mundial de Saúde, estima-se que 34 milhões irão apresentar algum sintoma da doença de Alzheimer em 2025 o que a torna um dos problemas de saúde pública mais alarmante nesse século, o que demonstra a necessidade de estudo para cura ou amenização dos sintomas da doença (REICHMAN, 2003; VIEGAS *et al.*, 2005).

2.5.1 Doença de Alzheimer (DA)

Foi descrita pela primeira vez pelo médico Alois Alzheimer, em 1907, ao descrever o caso de uma paciente que morreu após breve doença caracterizada por demência, afasia e psicose, tendo a mesma apresentado na autópsia placas e alterações neurofibrilares no córtex cerebral (BONDAREFF *et al.*, 1994).

Dentre as chamadas síndromes demenciais, a doença de Alzheimer, conhecida como demência senil do tipo Alzheimer é também chamada popularmente “esclerose” ou “caduquice”. Este tipo de demência apresenta uma complexa etiologia, onde fatores genéticos e ambientais influenciam na patogênese. A idade, o sexo, a poliproteína E4, a avançada idade paterna, a doença cerebrovascular, o trauma craniano, o infarto do

miocárdio e os defeitos imunológicos também são citados na literatura como sendo fatores de risco para a Doença de Alzheimer. Outros como defeitos cromossômicos, fatores ambientais, agentes infecciosos, toxinas, grau de escolaridade, e ocupação também são relacionados como as possíveis vertentes desencadeadoras para a doença (REIMAN e CASELLI, 1999).

Em geral, o primeiro aspecto clínico é a deficiência da memória recente, enquanto as lembranças remotas são preservadas até um certo estágio da doença. Além das dificuldades de atenção e fluência verbal, outras funções cognitivas deterioram à medida que a patologia evolui, entre elas a capacidade de fazer cálculos, as habilidades visuo-espaciais e a capacidade de usar objetos comuns e ferramentas. O grau de vigília e a lucidez do paciente não são afetados até a doença estar muito avançada. A fraqueza motora também não é observada, embora as contraturas musculares sejam uma característica quase universal nos estágios avançados da patologia (LINDEBOOM, 2004).

2.5.2 Alterações comuns no cérebro acometido pelo Alzheimer

A doença de Alzheimer caracteriza-se, histopatologicamente, pela maciça perda sináptica e pela morte neuronal observada nas regiões cerebrais responsáveis pelas funções cognitivas, incluindo o córtex cerebral, o hipocampo, o córtex entorrinal e o estriado ventral (SELKOE, 2001).

A DA é caracterizada por dois tipos de agregados protéicos: depósitos extracelulares esféricos, compactos (placas amilóides), compostos por uma pequena proteína designada péptido β -amilóide ($A\beta$) e por depósitos intracelulares (novelos neurofibrilares) constituídos,

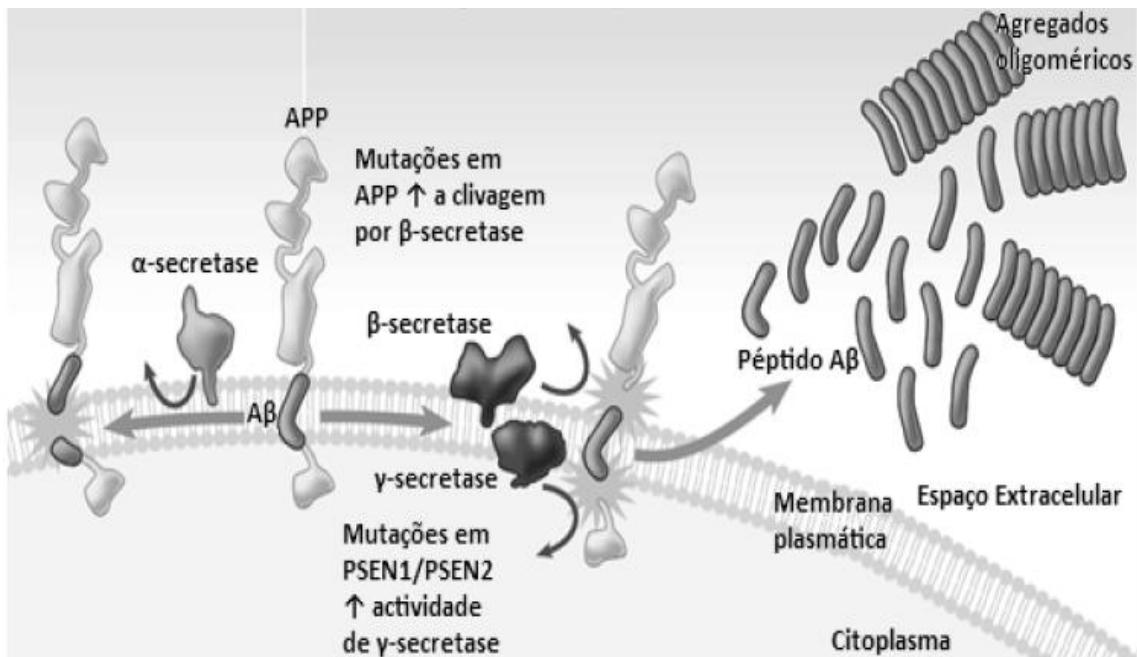
principalmente, pela proteína *tau* associada a microtúbulos (LA FERLA e ODDO, 2005).

2.5.2.1 Placas amilóide

Descobriu-se que o péptido (β - amilóide) $A\beta$ é produzido constitutivamente durante o metabolismo normal das células, no entanto, em condições normais, o péptido $A\beta$ é degradado por algumas enzimas. A hipótese central para a causa da doença de Alzheimer é a hipótese da cascata amilóide, que afirma que um desequilíbrio entre a produção e a eliminação do peptídeo $A\beta$ no cérebro é o evento de iniciação, levando a degeneração neuronal e demência (BLENNOW *et al*, 2006).

A figura 07 ilustra o mecanismo de formação dessas placas amilóides, onde APP (proteína precursora amilóide) que é uma proteína transmembranar tipo I, pode ser processada por duas vias principais. Na via α -secretase (também designada via não-amiloidogênica), α -secretase cliva APP no domínio $A\beta$, prevenindo desse modo a formação de $A\beta$, resultando na liberação de uma porção extracelular grande e solúvel de APP (α -sAPP) e um fragmento C-terminal constituído de 83 resíduos (C83). C83, por sua vez, pode sofrer uma transformação posterior de γ -secretase com liberação do peptídeo p3, que é considerado não amiloidogênico, embora se deposite nas placas difusas. Na via β -secretase cliva APP imediatamente antes do domínio $A\beta$, liberando um fragmento solúvel de APP (β -sAPP) e um fragmento C-terminal amiloidogênico (C99). C99 por sua vez, pode sofrer uma transformação posterior por γ -secretase com liberação do peptídeo $A\beta$, que vão se aglomerando em forma de placas (LA FERLA e ODDO, 2005).

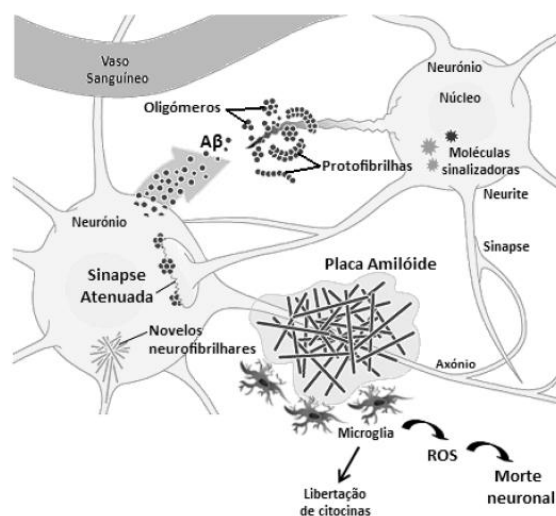
FIGURA 07: Formação das placas amilóide.



Fonte: Patterson *et al.*, 2008

Hipótese da cascata amilóide. A cascata é iniciada através da geração de péptidos A β . Oligómeros podem agredir diretamente as sinapses e neurites dos neurónios do cérebro, além de ativarem microglia e astrócitos, conduzindo à morte neuronal. O péptido A β desencadeia ainda a hiperfosforilação da tau, originando novos neurofibrilares, o que contribui substancialmente para a doença (SANTOS, 2009).

FIGURA 08: Cascata de Amilóide



Fonte: (SANTOS, 2009)

2.5.2.2 Emaranhados neurofibrilares

Os eventos descritos acima conduzem não só a disfunção neuronal como também provocam alterações na atividade quinase/fosfatase. Estas alterações são relevantes uma vez que leva ao aparecimento de novos neurofibrilares que são constituídos por proteína *tau* hiperfosforilada. Num estado normal, *tau* é uma proteína solúvel que promove a junção e estabilização de microtúbulos. A proteína *tau* patológica, pelo contrário, exhibe propriedades de solubilidade alteradas, estrutura com forma filamentosa e está anormalmente fosforilada em certos resíduos (LaFerla e Oddo, 2005). A hiperfosforilação da *tau* na DA começa intracelularmente, levando à captação da *tau* normal e outras proteínas associadas a microtúbulos, o que promove a desconexão dos microtúbulos axonais e assim prejudica o transporte axonal, comprometendo a função neuronal e sináptica (IQBAL, 2005).

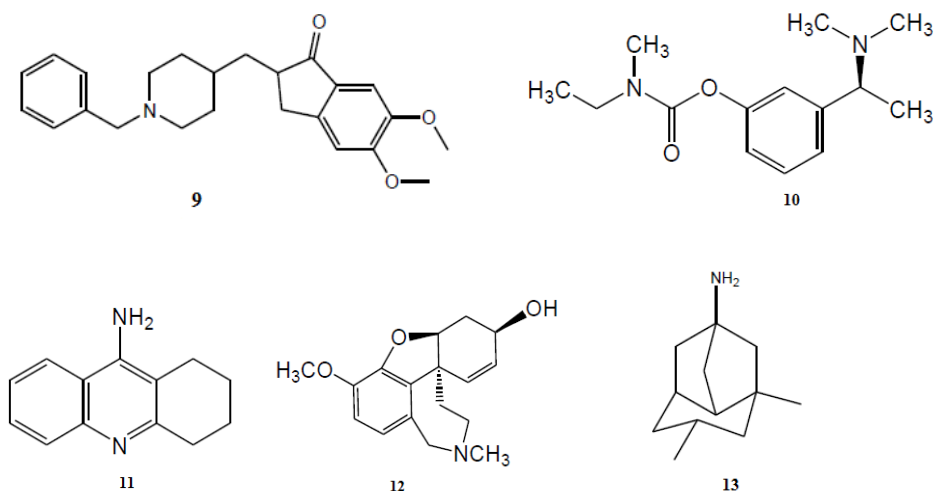
2.5.2.3 Perda das conexões celulares e morte cerebral

Os cientistas propuseram inúmeras teorias explicando o mecanismo de desenvolvimento da DA. Algumas delas são: diminuição da função colinérgica (conhecida como hipótese colinérgica), cascata amiloide (hipótese amiloide), stress oxidativo, diminuição da concentração de hormônios esteroides e processo inflamatório. A hipótese colinérgica tem sido amplamente estudada e confirmada, ela afirma que a incapacidade de transmitir impulsos neurológicos entre as sinapses cerebrais é a razão para as disfunções cognitivas e comportamentais (ANAND et al, 2012; SEIDL, 2010; SZYMANSKI et al, 2011).

2.5.2.4 Inibidores da Acetilcolinesterase (AChE)

As drogas atuais para o tratamento da DA são limitadas a inibidores da acetilcolinesterase (AChE), a enzima responsável pela hidrólise da Ach na fenda sináptica. Os principais representantes dos inibidores da AChE são o donepezila **9**(Aricept[®]), rivastigmina **10** (Exelon[®]), galantamina **11** (Reminyl[®]), tacrina **12** (Cognex[®]) e memantina **13** (Antagonista do receptor de glutamato N- Methyl – D aspartato) (Ebix[®]), Figura 09. Esses medicamentos são capazes de aumentar a neurotransmissão colinérgica, através do aumento da disponibilidade da Ach na fenda sináptica. Além disso, os inibidores da AChE desempenham um importante papel na deposição de placas β -amiloides: além da sua função catalítica, a AChE também atua como um promotor da formação de fibrilas β -amiloides (PIAZZI et al, 2008; XIE et al, 2013).

Figura 09: Estrutura molecular dos fármacos mais usados para o tratamento da doença de Alzheimer



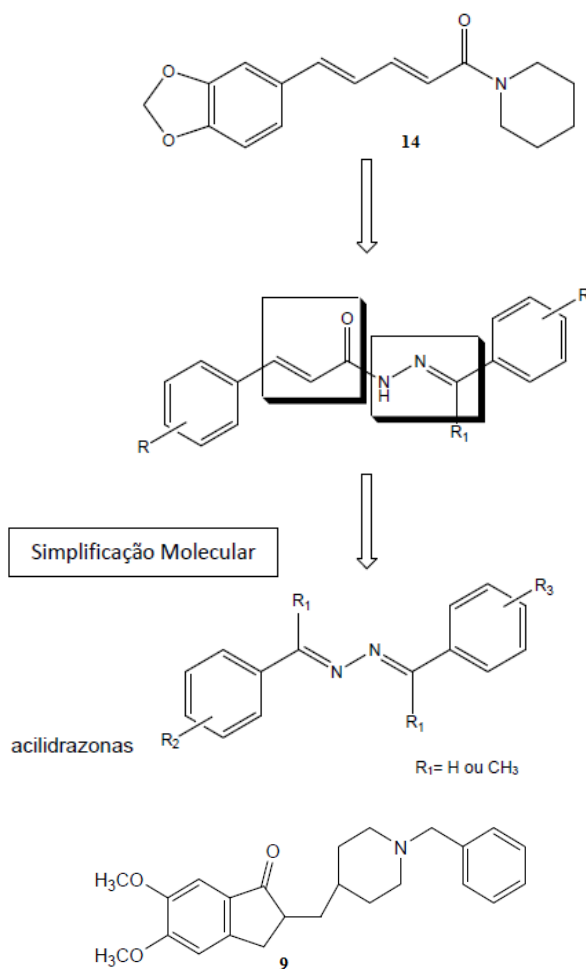
Os fármacos aprovados, entretanto, apresentam baixa eficácia em estágios avançados da doença de Alzheimer, além de altos custos e efeitos adversos severos que dificultam a adesão ao tratamento (TERRY e BUCCAFUSCO, 2003).

Na busca por novos inibidores, vários produtos naturais têm sido estudados. Um estudo recente demonstrou que a piperina **14**, alcalóide natural presente em frutos de pimenta preta, apresenta melhora significativa sobre o comprometimento da memória e neurodegeneração associada à DA, sendo a inibição da acetilcolinesterase o mecanismo mais provável (CHONPATHOMPIKUNLERT *et al*, 2010).

Figueredo, 2013 propôs a síntese de uma série de análogos da piperina **14**, conforme o esquema 05, utilizando a estratégia de simplificação molecular. A piperina **14** é estruturalmente semelhante ao donepezil **9**, um dos fármacos usado no tratamento da doença de Alzheimer. Entretanto os rendimentos obtidos, variavam de 44 a 70% dependendo da azina formada, rendimento esse que poderia ser maior, o

que foi limitado pela tendência da hidrazona (E)- 1- (4- Nitrobenzilideno) Hidrazina, em formar dímeros.

Esquema 05: Planejamento de Azinas por simplificação de N-acilidrazonas.
Estrutura do Donepezil.



Estruturalmente mais simples, as azinas propostas por Figueredo, (2013) apresentam diminuição do número de grupos CH, além de substituição bioisostérica da carbonila por uma ligação C=N. Esses compostos também tem um amplo espectro de atividade descrito, que inclui, entre outras, atividade antitumoral, antibacteriana, anticonvulsivante e antioxidante (KURTEVA et al, 2011).

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

- Sintetizar e identificar estruturalmente uma série de Azinas formadas a partir da hidrazona: (*E*) -1 - (4-nitrobenzilideno)-hidrazina e testar a atividade anticolinesterásica dos compostos sintetizados.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar condições ideais no reator de micro-ondas (temperatura, pressão e potência) para síntese da hidrazona (*E*) -1 - (4-nitrobenzilideno)-hidrazina;
- Determinar condições ideais no reator de micro-ondas (temperatura, pressão e potência) para síntese das azinas;
- Identificar estruturalmente os compostos sintetizados com uso de métodos espectrométricos de Infravermelho (IV), Massas (EM) e Ressonância Magnética Nuclear (RMN);
- Avaliar a atividade anticolinesterásica *in vitro*.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 MATERIAIS

4.1.1 Reagentes, Equipamentos e Laboratórios

Os reagentes orgânicos foram adquiridos das empresas Aldrich[®], Merck[®] ou Acros Organics[®] e foram usados sem purificações extras.

As reações foram realizadas em reator de micro-ondas monomodo da marca Discover modelo Explorer SP operando a 2450 MHz.

Os espectros de infravermelho (IV) foram obtidos a partir de um equipamento FT-IR PERKINELMER modelo Spectrum frontier.

As reações de irradiação de micro-ondas, os espectros IV e os espectros de massas foram obtidos no laboratório de análise instrumental da Universidade Estadual de Goiás (UEG).

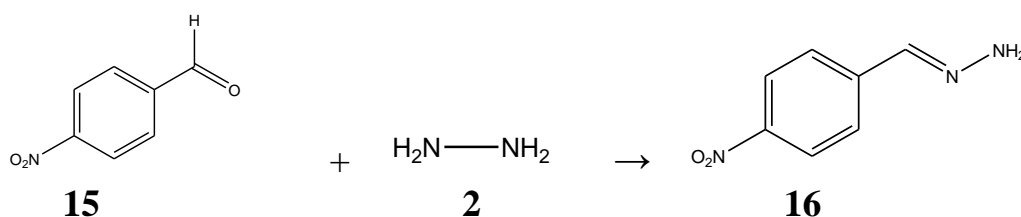
As análises de RMN foram realizadas no laboratório de Ressonância Magnética do Instituto de Química da Universidade Federal de Goiás em colaboração com o Prof. Dr. Luciano Morais Lião.

4.2. METODOLOGIA

4.2.1 Síntese da hidrazona 16 assistida por micro-ondas

Pesou-se 1mmol de 4- nitrobenzaldeído (0,1540mg) em balança analítica direto no tubo do reator de micro-ondas, adicionou-se ao tubo 1mmol de hidrazina 80% (49 μ L), colocou-se uma barra magnética no tubo tampou-o e colocou-o no reator de micro-ondas à 120⁰ C, por dois ciclos de 90s, com pressão de 300 psi e potência de 200 W.

Esquema 06: Síntese da (E) -1 - (4-Nitrobenzilideno) - hidrazina: (Hidrazona **16**).



4.2.2 Síntese de Azinas assistida por micro-ondas.

Após verificar a formação do composto anterior (hidrazona **16**) em CG-MS (165mg – 1mmol), adicionou-se no mesmo tubo com a hidrazona **16**, 1mmol de aldeído (cada reação com um aldeído diferente), realizou-se 15 reações. A hidrazona **16** foi sintetizada todas as vezes que se desejou sintetizar uma azina, ele era a primeira a etapa de formação das azinas, adicionou-se como solvente 1mL de etanol anidro e 1gota de ácido acético glacial como catalisador, tampou-se o tubo e colocou-se no reator para reagir à 100⁰C, em dois ciclos de 90s, com pressão de 300psi e potência de 200W.

Em seguida filtrou-se à vácuo, lavando-se com etanol 96% a azina de cada reação separadamente e colocou-se para secar em placas de Petri tampadas com vidros-relógios. Após secar verificou-se no CG-MS a pureza de cada composto.

Aldeídos usados (usou-se apenas um aldeído em cada reação, como pode ser visto no esquema 07):

2 – Nitrobenzaldeído (165 mg);

2 – Piridina Carboxaldeído (107 μL);

3,4,5 trimetoxibenzaldeído (196 mg)

4 – Dimetilamina benzaldeído (149mg);

4 – Etóxi benzaldeído (138 mg);

4 – Nitrobenzaldeído (151mg);

4 – Piridina – Carboxibenzaldeído (104 μ L);

4- Etilbenzaldeído (136,8 μ L);

4- hidroxibenzaldeído (122mg);

4- Isopropilbenzaldeído (151 μ L);

4- Metilbenzaldeído (118mg);

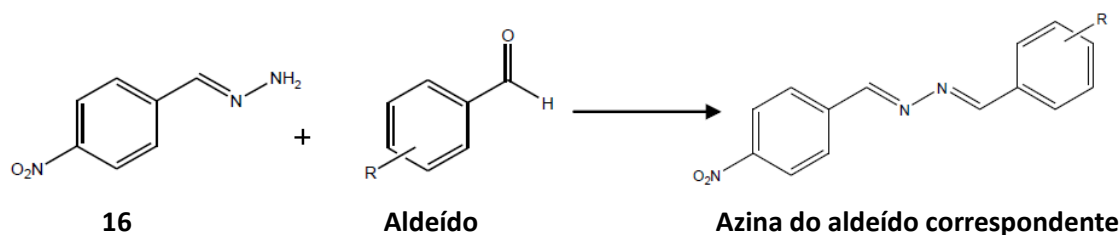
4- Metoxibenzaldeído (122 μ L);

Benzaldeído (112 μ L);

Seringaldeído (182mg);

Vanilina (152mg).

Esquema 07: Síntese da série de Azinas.



R:

H: Azina **17**, pág.73

4-OCH₃: Azina **26** pág. 117

4-N(CH₃)₂: Azina **31** pág. 137

4-CH₃: Azina **18** pág.78

4-OCH₂CH₃: Azina **28** pág.127

2-NO₂: Azina **29** pág.129

4-NO₂ : Azina **30** pág.132

4-CH₂CH₃: Azina **19** pág. 83

Fonte: Própria autora

3,5-OCH₃ , 4-OH: Azina **25** pág.113

2-piridina: Azina **21** pág.93

4-CH(CH₃)₂: Azina **20** pág. 88

3,4,5-OCH₃: Azina **27** pág. 122

4-piridina **22**: Azina - pág.98

4-OH: Azina **23** pág. 103

3-OCH₃, 4-OH : Azina **24** pág. 108

4.2.3 Identificação Estrutural

Para confirmar a estrutura dos compostos foram utilizadas técnicas espectroscópicas de Ressonância Magnética Nuclear, espectrometria de massas e Infravermelho (IV).

Os espectros de massa foram obtidos através de um aparelho CGMS QP 210 Ultra Shimadzu. O progresso da reação foi analisado por cromatografia em camada delgada (CCD) utilizando gel de sílica Merck (60 F254) sobre chapas de alumínio, a menos que indicado de outra forma. A visualização foi realizada com luz UV a 254 nm e / ou 366 nm, a coloração de vapor de iodo. As amostras foram solubilizadas em diclorometano.

Os espectros de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) foram obtidos em espectrômetro Bruker Avance 500 operando a 500 MHz, com clorofórmio deuterado como solvente. Os deslocamentos químicos foram expressos em valores adimensionais (ppm) em relação a um padrão interno de tetrametilsilano (TMS). A visualização dos espectros foi realizada por meio do programa ACD LABS 12.0.

Os espectros de infravermelho (IV) foram obtidos a partir de pastilhas de KBr em equipamento FT-IR PERKINELMER modelo Spectrum frontier. Os dados foram transportados em formato ASCII pelo programa Origin™ versão 8.6.

4.2.4 Análise da atividade anticolinesterásica.

4.2.4.1 Ensaio em Cromatografia de Camada Delgada (CCD)

As placas de alumínio para cromatografia de sílica Gel 60 F254, 0,2 mm de espessura foram adquiridas da Merck (Darmstadt, Alemanha).

Realizou-se três ensaios com metodologias diferentes onde, foi necessário o preparo de três placas cromatográficas iguais, uma para cada ensaio. Uma para o ensaio com o reagente de Ellman (Rhee et al. 2001), outra para o ensaio falso-positivo com o reagente de Ellman (Rhee et al., 2003b) e outra com o reagente de Marston (Marston et al., 2002). Diluiu-se 1 mmol de cada amostra em 100% de Diclorometano separadamente e aplicou-se volumes de 2,5 μ L de cada uma nas placas. Tacrina (T) foi aplicada como o inibidor controle em cada placa.

4.2.4.2 Tampões

Os seguintes tampões foram utilizados: Tampão A: Tris 50 mM, pH 8,0; tampão B: Tris 50 mM, pH 8,0 contendo 0,1 % de soro albumina bovia (BSA); tampão C: Tris 50 mM, pH 8, contendo 0,1 M NaCl e 0,02 M de $MgCl_2 \cdot 6H_2O$; tampão D: 50 mM NaH_2PO_4 , pH 7,6; tampão E: 0,05 M KH_2PO_4 e 1,25 M $(NH_4)_2SO_4$, pH 5,8; tampão F: Tris 0,05 M, pH 7,8 contendo 150mg de BSA.

4.2.4.3 Preparo da Enzima

Acetilcolinesterase de peixe elétrico (Tipo VI-S, pó liofilizado, 292 U/mg sólido, 394 U/mg proteína, Sigma, lote: 046K7675) foi utilizada em todos os ensaios em CCD e utilizando o reagente colorimétrico de Ellman. A enzima liofilizada foi dissolvida em tampão A para preparar uma solução estoque 1000 U/ml e, posteriormente diluída em tampão B para obter uma solução de enzima 0,226 U/ml utilizada no ensaio em microplaca ou em tampão A para obter uma solução de enzima 3 U/ml para ser utilizada no ensaio em CCD.

Acetilcolinesterase de peixe elétrico (Tipo V-S, pó liofilizado, 658 U/mg sólido, 1.210 U/mg de proteína, Sigma, lote: 025K7671) foi

utilizada no ensaio em CCD utilizando o método colorimétrico de Marston. A enzima liofilizada foi dissolvida em tampão F para obter uma solução 6,6 U/ml (ELLMAN et al, 1961; RHEE et al, 2001 SEIDL, 2010).

4.2.4.4 Preparo do Substrato

Ensaio positivo e falso positivo de Ellman

Iodeto de acetiltiocolina (ACTI) (Sigma-Aldrich®) foi o substrato utilizado nos ensaios em CCD com o reagente colorimétrico de Ellman nas concentração 1 mM em tampão A.

Ensaio de Marston

Acetato de alfa-naftila (Sigma-Aldrich®) foi o substrato utilizado no ensaio em CCD para o método colorimétrico de Marston em solução 2,5% em etanol (ELLMAN et al, 1961; RHEE et al, 2001 SEIDL, 2010).

4.2.4.5 Preparo dos reagentes colorimétricos

Teste Positivo

O ensaio foi realizado conforme Rhee e colaboradores (2001). Resumidamente, as amostras foram aplicadas em placas de CCD e após o desenvolvimento com o solvente adequado, as placas foram completamente secas. Uma mistura de solução de substrato e do reagente de Ellman foi borrifada sobre a placa. Após completa secagem da placa uma solução de enzima AChE foi borrifada e alguns minutos se passaram até o desenvolvimento ou não de manchas brancas sob um fundo amarelo, onde as manchas brancas indicam a presença de compostos inibidores da enzima acetilcolinesterase, a ausência dessas manchas brancas mostra que não houve inibição da enzima (Rhee et al., 2001).

Teste falso positivo

Resultados falsos positivos foram eliminados pelo método descrito por Rhee e colaboradores (2003). As mesmas amostras foram aplicadas em placas de CCD e desenvolvidas com o mesmo sistema de solvente para o teste positivo (preferencialmente na mesma cuba cromatográfica). Após secagem, a placa foi borrifada com uma sequência diferente dos mesmos reagentes do teste positivo. Primeiro foi borrifado a solução de reagente de Ellman e, após secagem, uma solução de substrato (ACTI) e da enzima AChE a 37°C (Rhee et al., 2003).

Sal fast blue – Ensaio de Marston

O ensaio foi realizado conforme descrito por Marston e colaboradores (2002). Resumidamente, as amostras foram aplicadas em placas de cromatografia de camada delgada (CCD), eluídas em solvente adequado e secas a temperatura ambiente. Cada placa foi borrifada com a solução estoque da enzima e novamente secas. Para incubação da enzima, a placa foi colocada sob um suporte no interior de um recipiente plástico contendo 5 ml de água (a água não entra em contato com a placa, somente mantém úmido o interior do recipiente), fechado e mantido a 37°C por 20 min. Para detecção da enzima, após esse período, 10 ml de uma solução do substrato e 40 ml da solução do reagente colorimétrico sal Fast Blue B foram misturadas momentos antes do uso e borrifadas sobre a placa. Após alguns minutos o desenvolvimento de manchas brancas sob o fundo roxo indicou a presença de compostos inibidores da enzima acetilcolinesterase (MARSTON *et al.*, 2002).

5 RESULTADOS E DISCUSSÕES.

5.1 SÍNTESE DA (E) -1- (4- Nitrobenzilideno) – Hidrazina ASSISTIDA POR MICRO-ONDAS.

Para encontrar as condições ideais no reator para a formação da hidrazona **16**, obtendo-se o produto com alto rendimento, algumas variações nas condições foram feitas e estão na tabela 01, mantendo a potência constante (200W), pressão (300 psi) e variando a temperatura, utilizando: 80°, 100°, 110° e 120° graus Celsius, foram realizados 3 ciclos de 90 segundos para cada temperatura.

Tabela 01: Taxa de conversão do 4-nitrobenzaldeído e hidrazina na hidrazona **16**, com variação da temperatura em 3 ciclos.

Temperatura (°C)	Ciclos (90 s)	Taxa de conversão (%)
80	1	P (60,19)
		D (39,81)
	2	P (67,57)
		D (32,43)
	3	P (78,80)
		D (21,20)
100	1	P (82,57)
		D (17,43)
	2	P (82,61)
		D (17,39)
	3	P (83,66)
		D (16,27)
110	1	P (83,73)
		D (16,27)
	2	P (83,43)

		D (16,57)
	3	P (80,48)
		D (19,52)
120	1	P (79,43)
		D (20, 57)
	2	P (100)
		D (0)
	3	P (86,00)
		D (14,00)

P – produto; D – Dímero (o produto reagiu com ele mesmo) não é o desejado. (Porcentagem obtidas através da taxa de conversão, obtida pelo CG-MS).

Observa-se que à 80° a formação do produto foi inferior a sua formação em temperaturas maiores, e o mesmo também diminui com temperaturas acima de 120°. Em 120° ao fim do segundo ciclo a hidrazona **16**, se forma completamente sem formar subproduto ou se dimerizar. As temperaturas inferiores à 80°C, não aparecem na tabela 01, não foram colocadas pois a reação ainda não finaliza restando ainda reagentes de partida. Sobretudo o que se tem com o uso da irradiação por micro-ondas é que o tempo reacional para formação da hidrazona **16** foi reduzido e houve a conversão total dos reagentes no produto esperado, e sem necessidade do uso de solventes.

Ao final da reação obteve-se como produto um sólido amarelo escuro, cujos dados espectroscópicos encontram-se em anexo.

A hidrazona **16** quando sintetizada pelo método convencional, através da agitação do 4-nitrobenzaldeído e uma solução de hidrazina em etanol por 10 min leva a formação de subproduto, devido a alta reatividade do composto que continua reagindo e se dimeriza, diminuindo assim o rendimentos da próxima etapa de reação que é a adição de um segundo aldeído para se formar uma azina (FIGUEREDO, 2013).

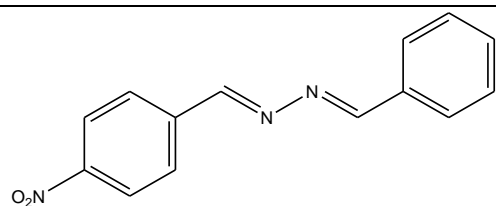
Ao realizar a síntese com irradiação por micro-ondas o problema da formação de subprodutos foi resolvido, pois a utilização da irradiação de micro-ondas em lugar do aquecimento convencional nas reações orgânicas leva, na maioria dos casos, a uma diminuição dos tempos de reação e redução de produtos indesejáveis (SOUZA e MIRANDA, 2011).

Segundo Hayes, (2002), a energia associada à irradiação de micro-ondas que é usualmente empregada em reações químicas é da ordem de $0,037 \text{ Kcal. mol}^{-1}$ sendo, portanto, muito baixa para ocasionar a clivagem de ligações químicas das moléculas - a energia necessária para clivar ligações químicas de compostos orgânicos, em geral, são maiores que $42,9 \text{ Kcal.mol}^{-1}$ (Smith e March, 2007). Esta energia permite, portanto, apenas a modificação do perfil cinético destas reações, que era o esperado para essas reações.

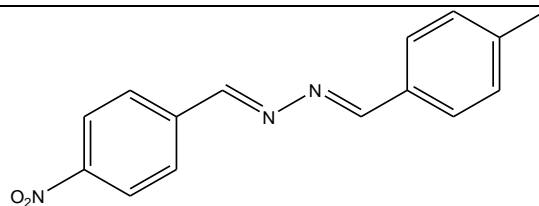
5.2 SÍNTESE DAS AZINAS ASSISTIDA POR MICRO-ONDAS.

Após otimizar a reação anterior, evitando a dimerização da hidrazona **16**, reagiu-se a 4- (nitrobenzilideno)- hidrazina , (hidrazona **16**) com uma série de aldeídos para obter as azinas dos respectivos aldeídos, conforme pode ser encontrado na tabela 02. Procurou-se padronizar a reação de síntese das azinas com temperatura de (100° C), potência (200 W) e pressão (300 psi) cujos percentuais de conversão dos reagentes nas respectivas azinas, obtidos por CG-MS estão apresentados na tabela 03:

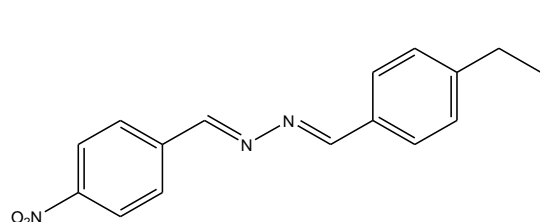
Tabela 02: Azinas sintetizadas a partir da (E) – 1 – (4- Nitrobenzilideno) hidrazina.



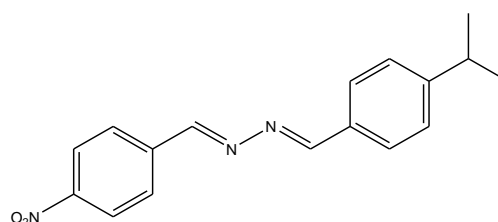
17



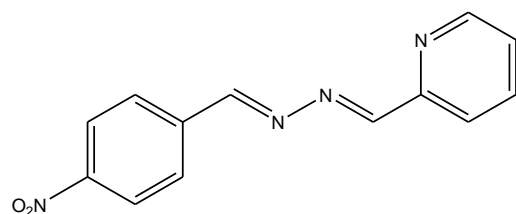
18



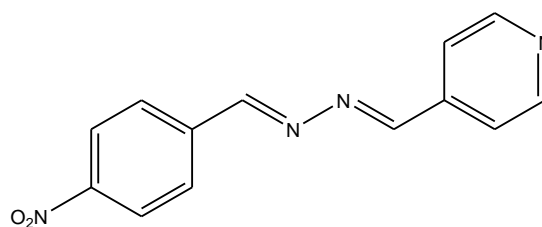
19



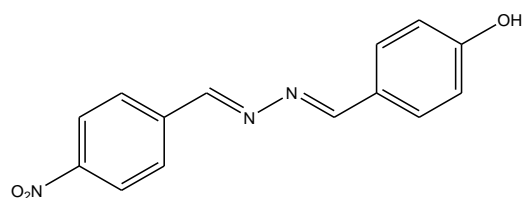
20



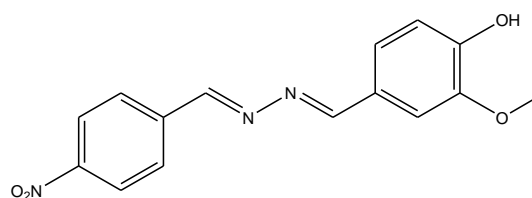
21



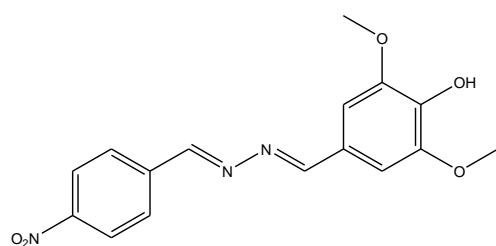
22



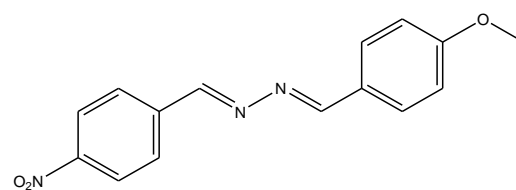
23



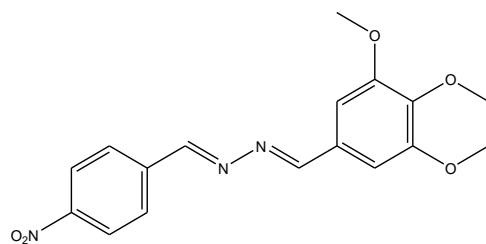
24



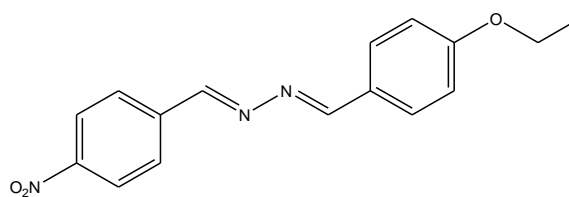
25



26



27



28

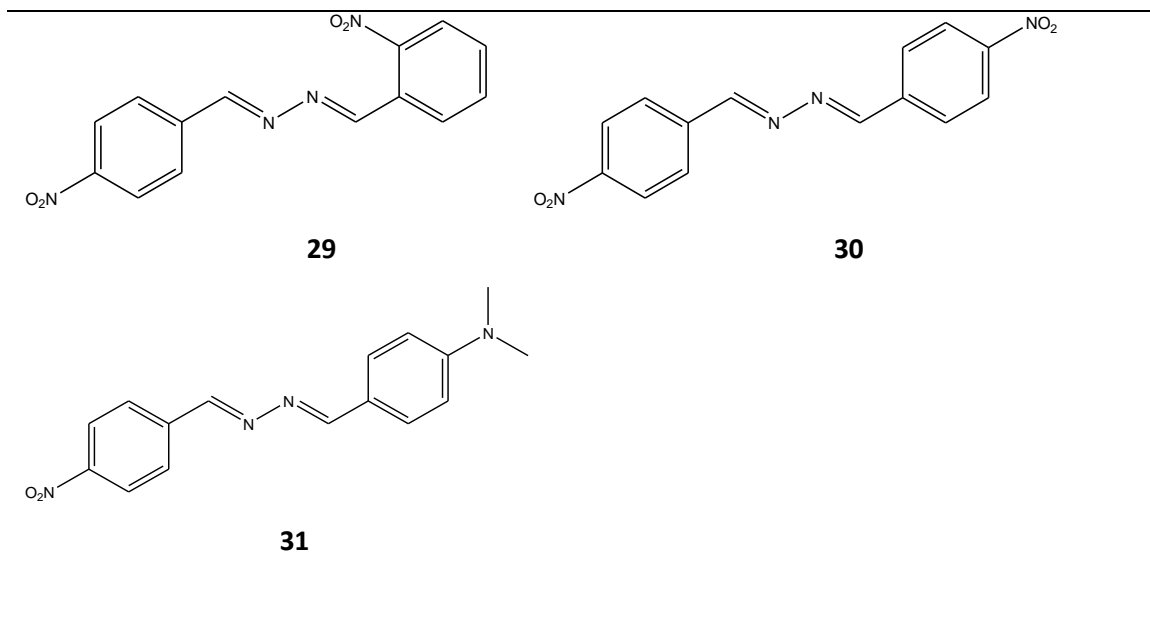


Tabela 03: Taxa de conversão da hidrazona **16** em azinas.

Azinas	Taxa de conversão CG-MS (%)
17	96
18	91
19	100
20	95
21	100
22	100
23	64
24	100
25	-
26	92
27	65
28	-
29	-

30	100
31	90

¹ taxa de conversão dos reagentes no produto, obtida pelo CG-MS.

As variações de grupamentos no segundo anel das azinas produzidas foram para avaliar a influência dessa variação na atividade anticolinesterásica. Verificar se a presença de radicais alquila no segundo anel exercem influência sobre a atividade anticolinesterásica, quais diferenças seriam provocadas pela substituição bioisotérica (CH→N) na posição 2 e na posição 4 e a influência de radicais oxigenados (–OH, –OCH₃ e –OCH₂CH₃).

As características das Azinas sintetizadas, com os respectivos Espectros de Massas, Infravermelho e RMN estão em anexo.

5.3 ATIVIDADE ANTICOLINESTERÁSICA

5.3.1 Solubilidade

Ellman e colaboradores, (1961) descreveram um método fotométrico para a determinação da atividade anticolinesterásica, tal método necessita de uma elevada solubilidade em água de todos os reagentes e principalmente das amostras já que os tampões e soluções são aquosos. Na ênfase de resolver o problema de solubilidade de diversos compostos, Rhee e colaboradores (Rhee et al., 2001) desenvolveram um sistema rápido e eficaz para a detecção de substâncias inibidoras, o sistema em CCD que também utiliza o reagente de Ellman e como solvente água, metanol, diclorometano ou uma mistura de alguns desses solventes. Neste ensaio os inibidores da enzima acetilcolinesterase são detectados pelo aparecimento de manchas brancas de inibição sobre o fundo amarelo da placa cromatográfica

A hidrazona **16** e a azinas sintetizadas neste trabalho não são compostos solúveis em água, o que tornou inviável o uso do método de Ellman, mas foram solubilizados em 100% de diclorometano, o que sugere o uso da técnica proposto por Rhee, que é o também chamado de teste modificado de Ellman.

As amostras foram submetidas a ensaios para determinação de atividade inibitória para a enzima acetilcolinesterase de peixe elétrico (AChE ee) (*Electrophorus electricus*): ensaio de Ellman, Falso-positivo Ellman e ensaio Marston todos em CCD.

Os resultados obtidos dos ensaios anticolinesterásicos deste estudo estão na tabela 4:

Tabela 4. Resultados dos ensaios de inibição realizados em CCD.

Ensaio em Cromatografia de Camada Delgada					
Código	Composto	Método modificado de <i>Ellman</i> * (DTNB) ^a	Ensaio Falso Positivo* (DTNB) ^b	Ensaio <i>Marston</i> ^{c*}	Observações
A 1	29	+	+	-	Inibidor falso-positivo
A 2	22	-	+	-	Inibi a reação química e não inibi a atividade enzimática.
A 3	27	-	+	-	Inibi a reação química e não inibi a atividade enzimática.

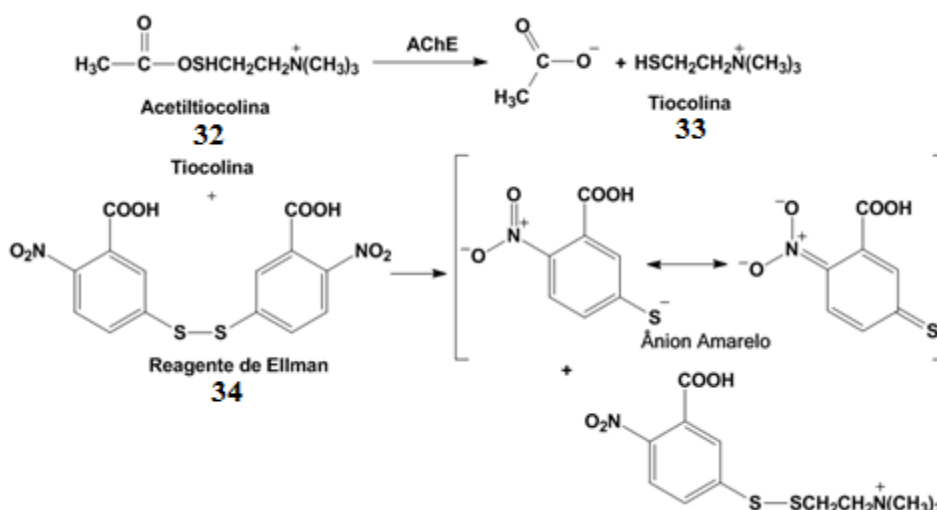
A 4	31	-	-	-	
A 5	23	-	+	-	Inibi a reação química e não inibi a atividade enzimática.
A 6	30	-	+	-	Inibi a reação química e não inibi a atividade enzimática.
A 7	21	-	-	-	
A 8	19	-	-	-	
A 9	28	-	-	-	
A 10	20	+	+	-	Falso positivo
A 11	26	-	+	-	Inibi a reação química e não inibi a atividade enzimática.
A 12	17	-	+	-	Inibi a reação química e não inibi a atividade enzimática.
A 13	16	-	+	-	Inibi a reação química e não inibi a atividade enzimática.
A 14	18	-	+	-	Inibi a reação química e não inibi a atividade enzimática.
A 15	25	-	+	-	Inibi a reação química e não inibi a atividade enzimática.
A 16	24	-	-	-	

^{a e c} (+) inibição, (-) não inibição; ^b (+) falso inibidor, (-) inibidor; *Padrão tacrina.

5.3.2 Ensaio Modificado de Ellman

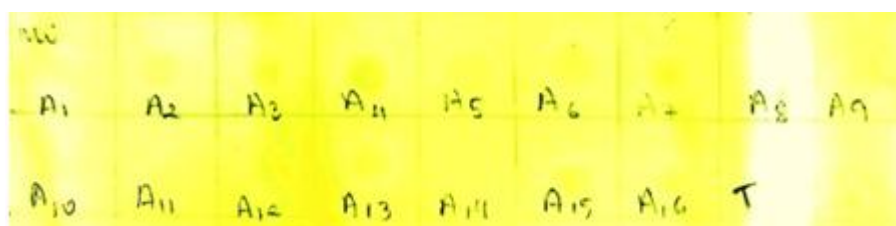
Os ensaios de atividade foram feitos de acordo com o método modificado de Ellman. Tal método baseia-se na medida da velocidade de produção da tiocolina **33** formada através da hidrólise do análogo do substrato da AChE, a acetiltiocolina **32**. A tiocolina formada reage com o chamado Reagente de Ellman **34** (ácido 5,5-ditiobis[2-nitrobenzóico]) formando uma mistura de dissulfetos e um ânion amarelo com intensa absorção em 405nm ou 412 nm, esquema 8 (ELLMAN, 1961).

Esquema 08: Catálise da acetiltiocolina e reação de Ellman.



Na figura 10 estão os resultados encontrados para o ensaio de Ellman, cada divisão na placa corresponde a um composto testado, e no final da placa tem-se o padrão para comparação – Tacrina (T). A inibição da enzima AChE ee nos ensaios de Ellman é observada pelo aparecimento de halos brancos na placa de sílica .

Figura 10: Placa cromatográfica do Ensaio Ellman realizado com AChE ee.



Fonte: Própria autora

Ao observar a placa cromatográfica nota-se que as azinas 29 e 20 (ver estruturas nas páginas 53 e 54), que correspondem aos códigos A1 e A2 da placa, desenvolveram manchas brancas. Somente com este teste poderia dizer que esses dois compostos inibiram a acetilcolinesterase.

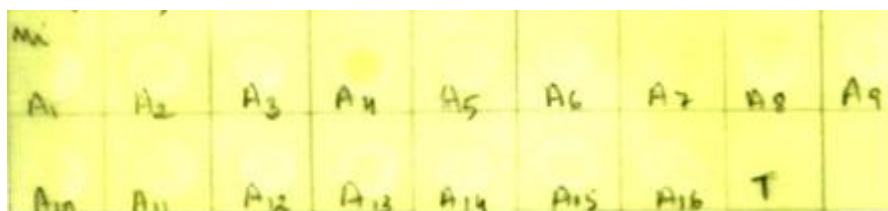
Relatos na literatura indicam que compostos como aldeídos e aminas podem provocar resultados falso-positivo no ensaio de Ellman. Estes compostos impedem a reação entre a tiocolina (produto da reação enzimática) e o reagente de Ellman, o que impediria a formação do ânion amarelo e resultaria na formação do halo branco. No entanto, neste caso, não há inibição da atividade enzimática e sim reação química entre os compostos e a tiocolina (RHEE, 2003).

Assim, a fim de distinguir entre os compostos que atuam realmente na inibição da atividade enzimática e aqueles que atuam na reação química entre a tiocolina e o reagente de Ellman, as amostras foram submetidas ao teste de falso positivo.

5.3.3 Ensaio falso positivo de Ellman

Placa cromatográfica do Ensaio falso-positivo de Ellman a formação do halo branco indica que a amostra não inibe a enzima.

Figura 11: Placa cromatográfica do Ensaio falso-positivo de Ellman .



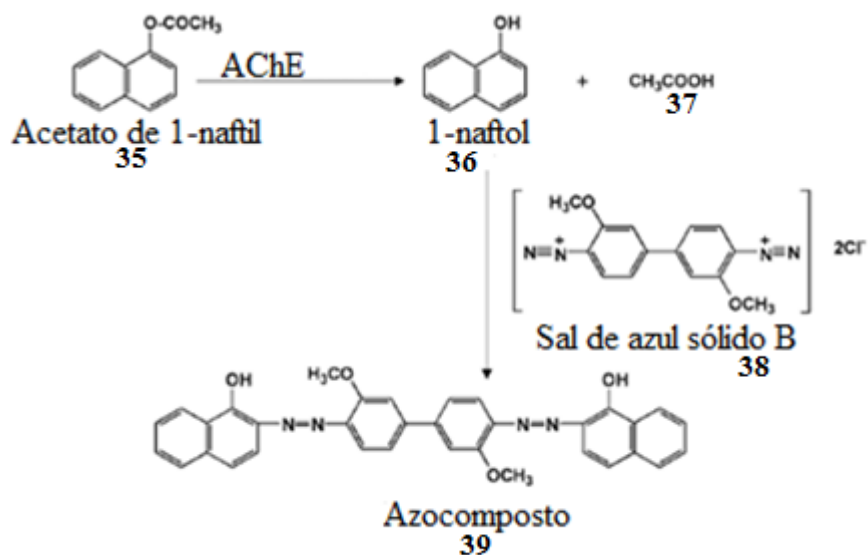
Fonte: Própria autora

Portanto como pode ser visto na figura 11 os compostos de códigos A1, A2, A3, A5, A6, A10, A11, A12, A12, A13, A14, A15 que correspondem respectivamente aos compostos 29, 22, 27, 23, 30, 20, 26, 17, 16, 18 e 25, (ver estruturas nas páginas 53 e 54) foram considerados falsos positivos, pois formaram halos brancos. O que significa que estes inibem a reação química, mas não a atividade enzimática.

5.3.4 Ensaio de Marston

A atividade enzimática é detectada pela conversão do acetato de α -naphthyl **35** a α -naftol **36** que reage com o sal de Fast Blue B **38** formando um corante diazo **39** de cor púrpura, conforme esquema 09. Resultado positivo neste ensaio significa que o composto presente na amostra inibiu a enzima não ocorrendo, portanto, a formação do α -naftol e a consequente formação do corante (MARSTON, 2002).

Esquema 9: Catálise da acetilcolinesterase com acetato de naftil e subsequente formação do corante púrpura observado.



A figura 12 representa o ensaio de Marston, a placa cromatográfica ilustra o resultado obtido para o ensaio onde mostra que **19**, **21,24**, **28** e **31** (ver estruturas nas páginas 53 e 54), não inibiram a acetilcolinesterase e nem reagiu com o substrato.

Figura 12: Placa cromatográfica do Ensaio Marston.



Fonte: Própria autora

A atividade enzimática é detectada pelo corante diazo de cor púrpura. A inibição é observada pelo aparecimento de halos brancos na placa de sílica, o que não ocorreu para nenhum composto.

Observou-se nessas três análises de forma geral, que das azinas sintetizadas as **20** e **29** revelaram ser falsos positivos, as **16, 17, 18, 22, 23, 25, 26, 27** e **30** inibiram a reação de formação para formação do ânion amarelo, mas não inibiram a enzima acetilcolinesterase e os compostos **19, 21, 24, 28** e **31** não inibiram a reação e nem a enzima. Avaliando a inibição da atividade enzimática de forma geral, não observou-se a capacidade de inibir a acetilcolinesterase *in vitro*. Com relação a estrutura-atividade, observa-se que a mudança de grupos no segundo anel praticamente não exerceu influência sobre a atividade anticolinesterásica e que estes compostos inibem em sua maioria a reação química para a formação do ânion amarelo. Somente as azinas do 4- isopropil - benzaldeído **20** e do 2-nitro benzaldeído **29** revelaram ser falsos positivos, o que pode sugerir um novo teste, em concentração superior ao que foi realizado para esses dois compostos, para saber se estas duas azinas inibiriam a enzima em concentração maior.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O objetivo de se otimizar os rendimentos na síntese da hidrazona **16** e das azinas foram alcançados com emprego da técnica de irradiação de micro-ondas.

Esta técnica empregada também em síntese orgânica, revelou-se muito eficaz na conversão dos reagentes no produto esperado devido a baixa energia associada à irradiação de micro-ondas o que evita clivagens modificando-se apenas o perfil cinético das reações.

Além de otimizar as reações, as técnicas de IMO reduziu o tempo da reação, permitiu realizá-la com pouquíssimo material de partida (mmol) e permitiu-se também reduzir o uso de solventes, visto que o descarte de solventes orgânicos tem sido um inconveniente para o meio ambiente.

As azinas apresentam duas funções químicas associadas a compostos com diferentes perfis farmacológicos; um grupo NO_2 ligado a um grupamento aromático e o grupo azometino ($\text{NHN}=\text{CH}$), também ligado a um anel aromático conferindo diversas propriedades.

No teste da atividade anticolinesterásica a falta de solubilidade dos compostos em água foi um fator limitante, mas não impediu que os testes fossem realizados, no entanto foi empregada a técnica com o uso de CCD. Com isso propõe-se modificar a solubilidade destes compostos, por meio de modificações estruturais que possibilitem a formação de compostos mais hidrossolúveis, contudo mantendo a atividade biológica.

Das azinas sintetizadas **20 e 29** revelaram-se falsos positivos, e como a concentração usada no teste foi muito baixa seria interessante refazer os testes em uma concentração maior. Entretanto nos compostos **16, 17, 18, 22, 23, 25, 26, 27 e 30** não houve inibição enzimática e sim reação

química entre os compostos e a tiocolina. Os compostos **19, 21, 24, 28 e 31** não inibiram a enzima e nem reagiram com a tiocolina.

Visto que as azinas apresentam atividades biológicas, antiparasitária, antitumoral, antichagásica, anticolinesterásica, entre outras, sugere-se que se façam outros testes biológicos, onde estas azinas possam ser mais eficazes e capazes de apresentar maior aplicabilidade terapêutica.

REFERÊNCIAS

AMARAL, A. T., MONTANARI, C. A. **Química Medicinal: 25 anos de planejamento racional de fármacos.** Química Nova, v. 25, suppl. 1, p.39-44, 2002.

ANAND, P. *et al.* **A review on coumarins as acetylcholinesterase inhibitors for Alzheimer's disease.** Bioorganic & Medicinal Chemistry. n. 20, p.1175–1180, 2012.

ANDRICCOPULO, Adriano D., GUIDO, Rafael V.C., OLIVA, Glaucius. **Planejamento de Fármacos, biotecnologia e Química Medicinal: Aplicação em doenças infecciosas.** Estudos Avançados 24 (70), p 81- 98, 2010.

BARBOZA, A.C.R.N.; CRUZ, C.V.M.S. et al.. **Aquecimento em forno de microondas / desenvolvimento de alguns conceitos fundamentais.** Química Nova, v. 24, p.901-904, 2001.

BARREIRO, Eliezer J. **Estratégia de Simplificação no Planejamento de Fármacos: A Descoberta de Novo Agente Cardioativo.** Química Nova, v. 25, No. 6B, 1172-1180, p.1172- 1180, 2002.

BELSKAYA, Nataliya P.; DEHAEN, Wim; BAKULEV, Vasiliy A. **Synthesis and properties of hydrazones bearing amide, thioamide and amidine functions.** Arkivoc, p. 275-332, 2010.

BLENNOW K; Leon M; Zetterberg H. **Alzheimer's Disease.** Lancet 368: 2006. p. 387-403.

BONDAREFF, W.; HARRINGTON C. R.; McDANIEL S. W.; WISCHIK, C. M.; ROTH, M. **Presence of axonal paired helical filament-tau in Alzheimer's disease: submicroscopic localization.** J Neurosci Res, New York, v. 38, n. 6, p. 664-669, Aug. 1994

CADDICK, S. **Microwave assisted organic reactions.** Tetrahedron, v.51, n.38, p. 10403-10432,1995.

CAREY, Francis A; SUNDBERG, Richard J. **Advanced Organic Chemistry Part A: Structure and Mechanisms.** Norwell: Springer Science Business Media, LLC, 2007

CARVALHO, S. A; FEITOSA, L. O; SOARES, M; COSTA, T. E. E. M; HENRIQUES, M. G; SALOMÃO, K; CASTRO, S. L; KAISER, M; BRUN, R; WARDELL, J. L; WARDELL, S. M. S. V; TROSSINI, G. H. G; ANDRICOPULO, A. D; SILVA, E. F; FRAGA, C. A. M. **Design and synthesis of new (E)-cinnamic N-acylhydrazones as potente antitrypanosomal agents.** European Journal of Medicinal Chemistry v.54 p.512-521, 2012.

CERA, Tatiane Peixoto; PANCOTE Camila Garcel. **Planejamento de Fármacos**, Revista Científica Unilago p 137 à 148, 2009.

CHONPATHOMPIKUNLERT, P.; WATTANATHORN, J.; MUCHIMAPURA, S. **Piperine, the main alkaloid of Thai black pepper, protects against neurodegeneration and cognitive impairment in animal model of cognitive deficit like condition of Alzheimer's disease.** Food and Chemical Toxicology v.48, p.798–802, 2010.

DAYAGI, S.; DEGANI, Y. **Formation of the Carbon-Nitrogen Double Bond.** 1º edição. Saul Patai, p. 61-147, 1970.

EASTWOOD, R.; REISBERG, B. **Mood and behaviour.** In: Gauthier S, editor. Clinical diagnosis and management of Alzheimer's disease. London: Martin Dunitz; 1996. p. 175-90.

ELIEZER, J. **Synthesis and analgesic activity of novel N-acylarylhydrazones and isosters, derived from natural safrole.** European Journal of Medicinal Chemistry, v. 35, p. 187-203. 2000.

ELLMAN, G. L.; COURTNEY, D.; ANDRES V.; FEATHERSTONE, R. M. **“A new rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity”.** Biochemical Pharmacology. 7: 88, 1961.

FERREIRA, D. T. **Sínteses e semi-sínteses de fármacos.** In: ANDREI, C. C., FERREIRA, D. T., FACCIONE, M., FARIA, T. J. Da química medicinal à química combinatória e modelagem molecular. 1 ed. São Paulo: Manole, 2003. Cap. 3, p.49-63.

FIGUEREDO, A. S. **Planejamento, síntese e avaliação da atividade anticolinesterásica de análogos de piperina.** 169 p. Dissertação

(Mestrado) - Programa de Pós-Graduação Stricto Sensu em Ciências Moleculares, Universidade Estadual de Goiás, 2013.

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

FRANK e Gupta S. **A Review of Antioxidants and Alzheimer's Disease**. Ann Clin Psychiatry 17: 2005. p. 269-286.

GANELLIN, C. R. E. **Medicinal Chemistry Principles and Practice**; King, F. D., ed.; RSC: London, 1994, p. 189; Gibbs, J.B.; Science 2000.

GETAUTIS, V.; DASKEVICIENE, M.; MALINAUSKAS, T.; JANKAUSKAS, V.; SIDARAVICIUS, J. **Thin Solid Films** 516, 2008.

GORDILHO, Adriano. *et al.* **Desafios a serem enfrentados no terceiro milênio pelo setor saúde na atenção ao idoso**. Rio de Janeiro: UnATI, 92p, 2000

GUIDO, R. V. C. et al. **Virtual screening and its integration with modern drug design technologies**. Curr. Med. Chem., v.15, n.1, p.37-46, 2008.

GULLBERG, M.; ORRLING, K.; NILSSON, P.; LARHED, M.; *Chem. Commun.* 2004, 790

HAYES, B. L. **Microwave synthesis**. Chemistry at the speed of light. USA, CEM Publishing, 2002.

HERRERO, M. A.; KREMSNER, J. M.; KAPPE, C. O.; *J. Org. Chem.* 2008, 73, 36.

IBGE, **Diretoria de Pesquisas, coordenação de População e Indicadores Sociais, projeção da População do Brasil por sexo e idade para o período de 1980-2050 – Revisão 2008**.

IQBAL K; Alonso A; Chen S; Chohan M; El-Akkad E; Gong C; Khatoon S; Li B; Liu F; Rahman A; Tanimukai H; Grundke-Iqbal I. **Tau pathology in Alzheimer disease and other tauopathies**. *Biochim Biophys Acta* 1739:198-210, 2005.

JIN, Z-Y, Zhang, J, Zhang, L, Jiang, A. **Crystal structure of N,N_-bis (4-methoxy benzylidene) hydrazine C₁₆ H₁₆ N₂ O₂ . Z. Kristallogr. NCS 222, 2007.**

KAPPE, C. O.; DALLINGER, D.; MURPHREE, S. S., **Practical Microwave Synthesis for Organic Chemists: Strategies, Instruments, and Protocols Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2009**

KITAEV, Yu.P.; BUZYKIN, B.I. **The Reactions of Hydrazones. Russian Chemical Reviews.** v. 41, n. 6, p. 495-515, 1972.

KOROLKOVAS, A. **Essentials of Medicinal Chemistry.** 2ed. New York: Wiley, 1988.

KURTEVA, V. B.; SIMEONOV, S.P.; DISHEVA, M. S. **Symmetrical Acyclic Aryl Aldazines with Antibacterial and Antifungal Activity.** Pharmacology & Pharmacy v.2, p.1-9, 2011.

LA FERLA, F.; ODDO, S. **Alzheimer's disease: A β , tau and synaptic dysfunction.** Trends Mol Med 11: 2005. p. 170- 176.

LINDEBOOM, J.; WEINSTEIN, H. **Neuropsychology of cognitive ageing, minimal cognitive impairment, Alzheimer's disease, and vascular cognitive impairment.** Eur J Pharmacol. 490(1-3):83-6. 2004

LIDSTROM, P.; TIERNEY, J.et al. **Microwave assisted organic synthesis - a review.** Tetrahedron, v.57, n. 45, p. 9225-9283, 2001.

LIMA, Patricia C.; LIMA, Lidia M.; SILVA, Kelli Cristine M. da; LEDA, Paulo Henrique O.; MIRANDA, Ana Luisa P. de; FRAGA, Carlos A. M.; BARREIRO, Eliezer J. **Synthesis and analgesic activity of novel N-acylarylhydrazones and isosters, derived from natural safrole.** European Journal of Medicinal Chemistry, v. 35, p. 187-203. 2000.

LOUPY, A.; PETIT, A.; HAMELIN, J.; TEXIER-BOULLET, F.; JACQUAULT, P.; MATH, D. **Synthesis** 1998, Tetrahedron 2002.

LOMBARDINO, J. G.; LOWE, J. A. 3rd. **The role of the medicinal chemist in drug discovery – then and now.** Nat. Rev. Drug Discov., v.3, n.10, p.853-62, 2004.

MARCH, Jerry. **Advanced organic chemistry: reactions, mechanisms and structure.** 4. ed. New York: John Wiley & Sons, 1992

MARSTON, A.; KISSLING, J. ; HOSTETTMANN, K.; **A Rapid TLC Bioautographic Method for the Detection of Acetylcholinesterase and Butyrylcholinesterase Inhibitors in Plants**, *Phytochem. Anal.* 13, 51–54, 2002.

ONG, H. H.; ALLEN, R. C.; **Annu. Rep. Med. Chem.** 1988, 24, 295.

PALLAS M, Camins A. **Molecular and biochemical features in Alzheimer's disease**. *Curr Pharm Design* 12: 2006. 4389-4408.

PALLA, Gerardo; PREDIERI, Giovanni; DOMIANO, Paolo; VIGNALI, Carlo; TURNER, Walter. **Conformational behavior and E/Z isomerization of N-acyl- and N-aroylhydrazones**. *Tetrahedron*, v. 42, p. 3649-3654. 1986.

PECORARO, E.; DAVALOS, M. R.; JAFELICCI Jr., M.; *Quim. Nova*, 20, p 89,1997.

PIAZZI, L. et al. **Multi-target-directed coumarin derivatives: hAChE and BACE1 inhibitors as potential anti-Alzheimer compounds**. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, n. 18, p. 423–426, 2008.

POMAR, Jorge C.Justo de; SODERQUIST, John A. **Unsymmetrical azines via triisopropylsilylhydrazine**. *Tetrahedron Letters* 41, 3285-3289, 2000.

RASKIND, M. A. **Alzheimer's disease: treatment of noncognitive behavioural abnormalities**. In: Bloom FE, Kupper DJ. *Psychopharmacology: the fourth generation of progress*. New York: Raven Press; 1995. p. 1427-35.

RHEE, I. K.; VAN de MEENT M., INGKANINAN, K.; VERPOORTE, R. **“Screening for acetylcholinesterase inhibitors from Amaryllidaceae using silica gel thin-layer chromatography in combination with bioactivity staining”**. *J. Chromatography A*. 915: 217-223. 2001.

RHEE, I. K.; VAN RIJN, R, M.; VERPOORTE, R. **Qualitative Determination of False-positive Effects in the Acetylcholinesterase Assay using Thin Layer Chromatography**. *Phytochem. Anal.* 14, 127–131, 2003.

REICHMAN, W.E. **Current pharmacologic options for patients with Alzheimer's disease.** *Ann Gen Hospital Psychiatry* 2: 2003. p. 1-14.

REIMAN, E. M.; CASELLI, R. J. **Alzheimer's disease.** *Maturitas*, Amsterdam, v. 31, n. 3, p. 185-200, Mar. 1999

ROLLAS, Sevim; KUCUKGUZEL, S. Guniz. **Biological activities of hydrazone derivatives.** *Molecules*, v. 12, p. 1910-1939. 2007.

SANSEVERINO, A. M. **Microondas em síntese orgânica,** *Quim. Nova*, 25, 660-667, 2002.

SANTOS, Susana Isabel Pólvora. **Estudos de Actividade Inibidora de Acetilcolinesterase e Actividade Antioxidante por Derivados de Colina de Ácidos Cafeico, Cinâmico e Rosmarínico.** 79p. Dissertação (Mestrado) – Universidade de Lisboa, Faculdade de Ciências, Departamento de Bioquímica, 2009.

SEIDL, C. **Pesquisa de substâncias naturais inibidoras da acetilcolinesterase.** 86 p. Dissertação (Mestrado) - Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná, 2010.

SELKOE, D. **Alzheimer's disease: genes, proteins, and therapy.** *Physiol Rev.* 2001;81(2):741- 66.

SMITH, M. B.; MARCH, J. **March's advanced organic chemistry,** John Wiley & Sons, Inc., 2007.

SOUZA, Rodrigo Octavio M. A. de; MIRANDA, Leandro Soter de M. e. **Irradiação de micro-ondas aplicada à síntese orgânica: Uma história de sucesso no Brasil.** *Quim. Nova*, vol. 34, nº 3, p 497-506, 2011.

SZYMANSKI, P. et al, **Synthesis and biological activity of derivatives of tetrahydroacridine as acetylcholinesterase inhibitors.** *Bioorganic Chemistry*, n. 39, p. 138–142, 2011.

TERRY JR., A. V. & BUCCAFUSCO, J. J. **The Cholinergic Hypothesis of Age and Alzheimer's Disease-Related Cognitive Deficits: Recent Challenges and Their Implications for Novel Drug Development.** *The Journal of Pharmacology and experimental Therapeutics*, v. 306, n. 3, p. 821-827, 2003.

TIERNEY, J. P.; LIDSTRÖM, P. **Microwave Assisted Organic Synthesis** Blackwell Publishing Ltda, CRC Press, 2005.

VICINI, P.; INCERTI, M.; DOYTCHINOVA, I.A.; LA COLLA, P.; BUSONERA, B.; LODDO, R. **Eur. J. Med. Chem.** 41, p 624, 2006.

VIEGAS C, Bolzani VD, Barreiro EJ, Fraga CAM. **New anti-Alzheimer drugs from biodiversity: The role of the natural acetylcholinesterase inhibitors.** *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry* 5: 2005. p.915-926.

WALCOURT, A.; LOYEVSKY, M.; LOVEJOY, D.B.; GORDEUK, V.R.; RICHARDSON, D.R. **Int. J. Biochem. Cell B** 36 p 401, 2004.

.

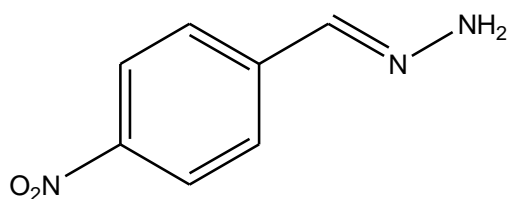
WERMUTH, C. G. **The practice of medicinal chemistry.** 2 ed. San Diego: Academic Press. P. 69-89, 2003.

WRAGG R.E.; JESTE D.V. **Overview of depression and psychosis in Alzheimer's disease.** *Am J Psychiatry.* 1989.

XIE, S. S. et al. **Design, synthesis and evaluation of novel tacrineecoumarin hybrids as multifunctional cholinesterase inhibitors against Alzheimer's disease.** *European Journal of Medicinal Chemistry*, n. 64, p. 540-553, 2013.

ANEXOS - ESPECTROS

(E) -1- (4 nitrobenzilideno) hidrazina



Fórmula molecular: $C_{14}H_7N_3O_2$

Coloração: amarelo escuro

Pureza (CG-MS): 100%

Dados espectroscópicos:

IV (4000 – 500 cm^{-1}): (NO_2) $1520cm^{-1}$ e $1340cm^{-1}$; ($C=N$) $1600cm^{-1}$; (mono-substituído) $750cm^{-1}$ e $690cm^{-1}$.

EM (m/z): $[M^+]$ - 165 Pico base: 165

Figura 13: Espectro na região do IV do composto 16 ($4000 - 500 \text{ cm}^{-1}$).

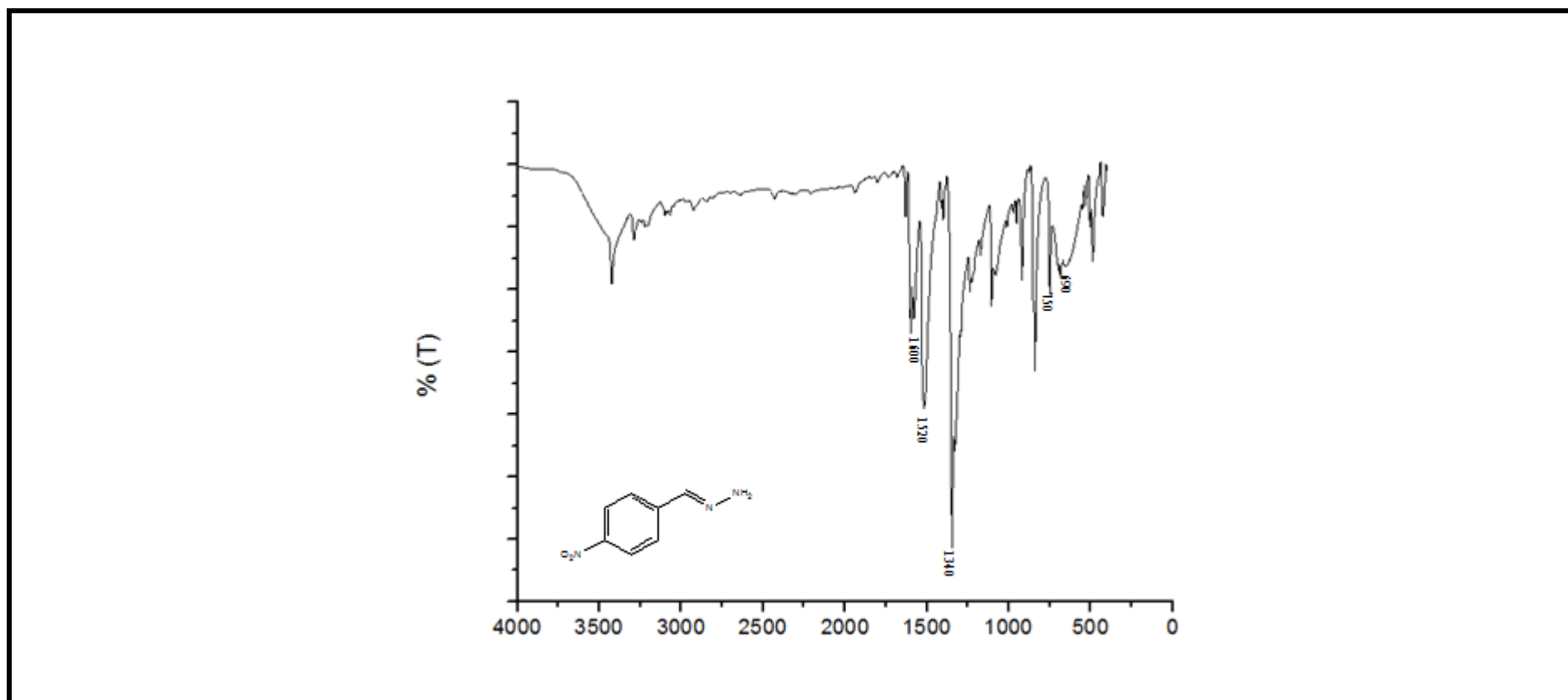
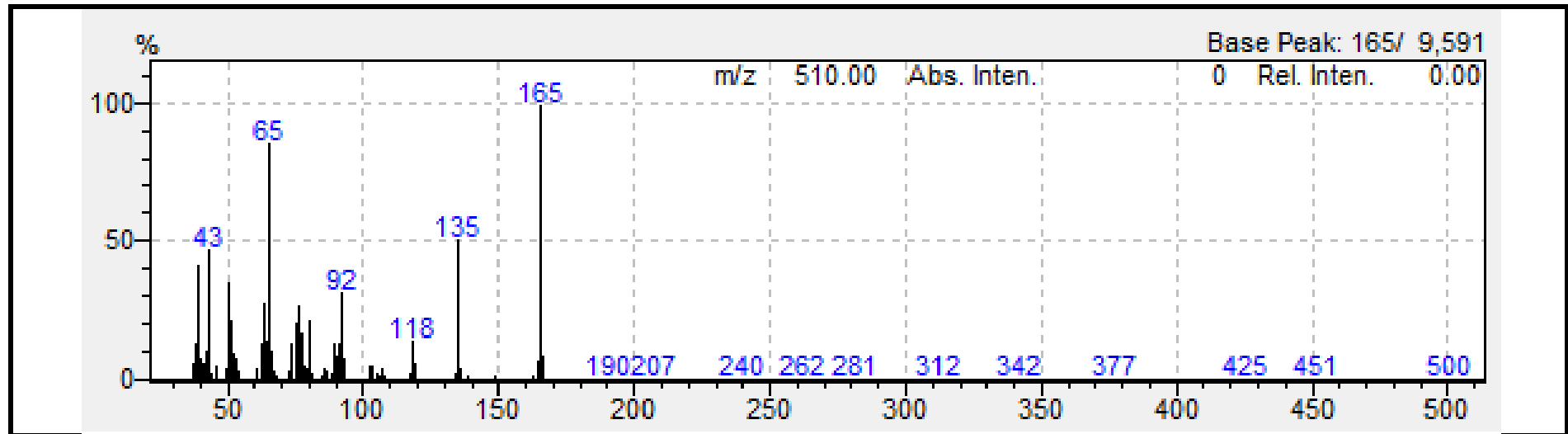
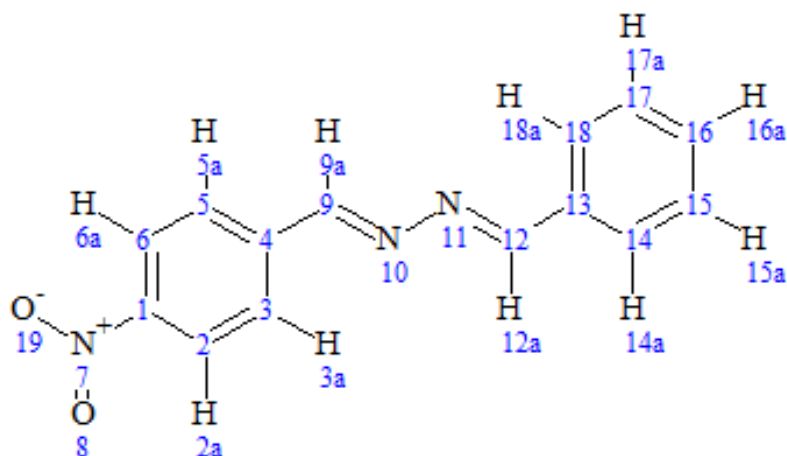


Figura 14: Espectro de massas do composto 16



(7E,8E) -1- (4 nitrobenzilideno) – 2 – hidrazina benzilideno



Fórmula molecular: C₁₄H₁₁N₃O₂

Coloração: amarelo claro

Pureza (CG-MS): 96,09%

Dados espectroscópicos:

RMN de ¹H: (500MHz, CDCl₃): δ 7,56 (m, 3H – 15, 16, 17); δ 8,13 (d, 2H – 14 e 18); δ 8,34 (d, 2H – 3 e 5); δ 8,78 (d, 2H – 11 e 13); δ 9,30 (s, 1H - 12); δ 9,33 (s, 1H- 8).

RMN de ¹³C: (CDCl₃): δ 124,03 (C- 2 e 6); δ 129,29 (C- 3 e 5); δ129,31 (C- 15 e 17); δ 131,92 (C- 14 e 18); δ 133,60 (C - 13); δ140,06 (C - 4); δ 149,40 (C - 16); δ159,45 (C – 9 e 12); δ 163,76 (C - 1)

IV (4000 – 500 cm⁻¹): (NO₂) 1520cm⁻¹ e 1340cm⁻¹; (C=N) 1600cm⁻¹; (mono-substituído) 750cm⁻¹ e 690cm⁻¹.

EM (m/z): [M⁺] - 253 Pico base: 225

Figura 15: Espectro de RMN ^1H composto 17 (CDCl_3 , 500 MHz)

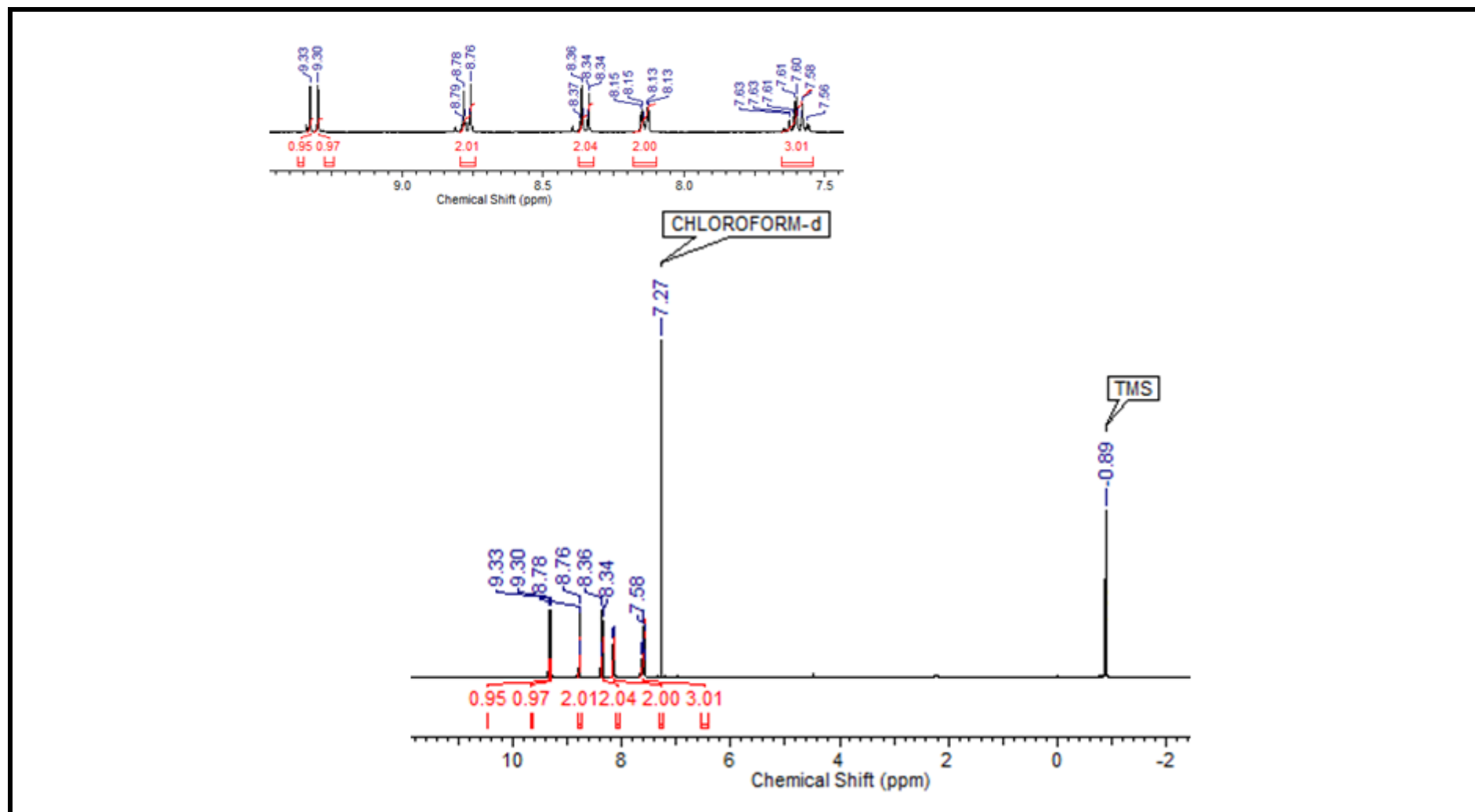


Figura 16: Espectro de RMN ^{13}C composto 17 (2D - HSQC).

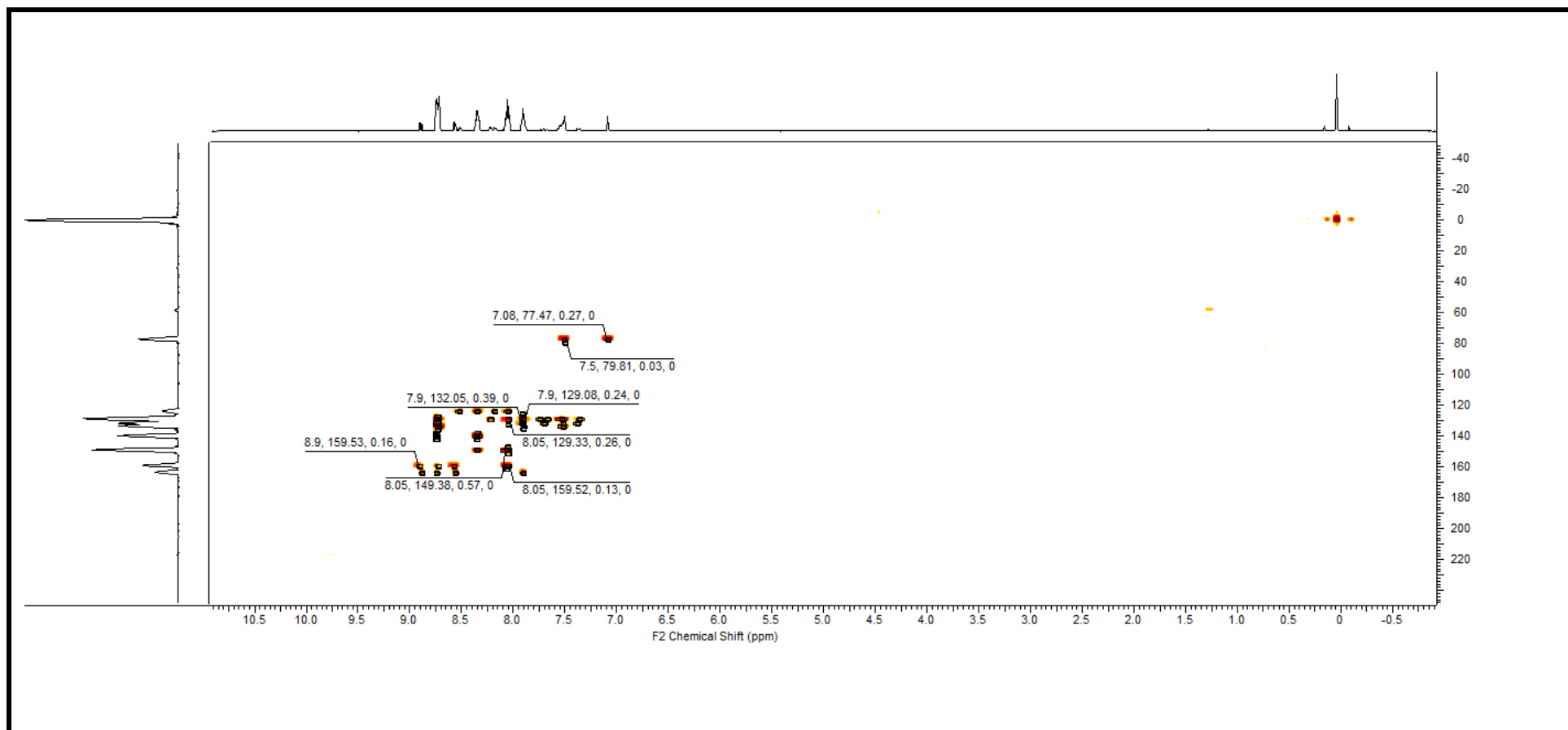


Figura 17: Espectro na região do IV do composto 17 (4000 - 500 cm^{-1}).

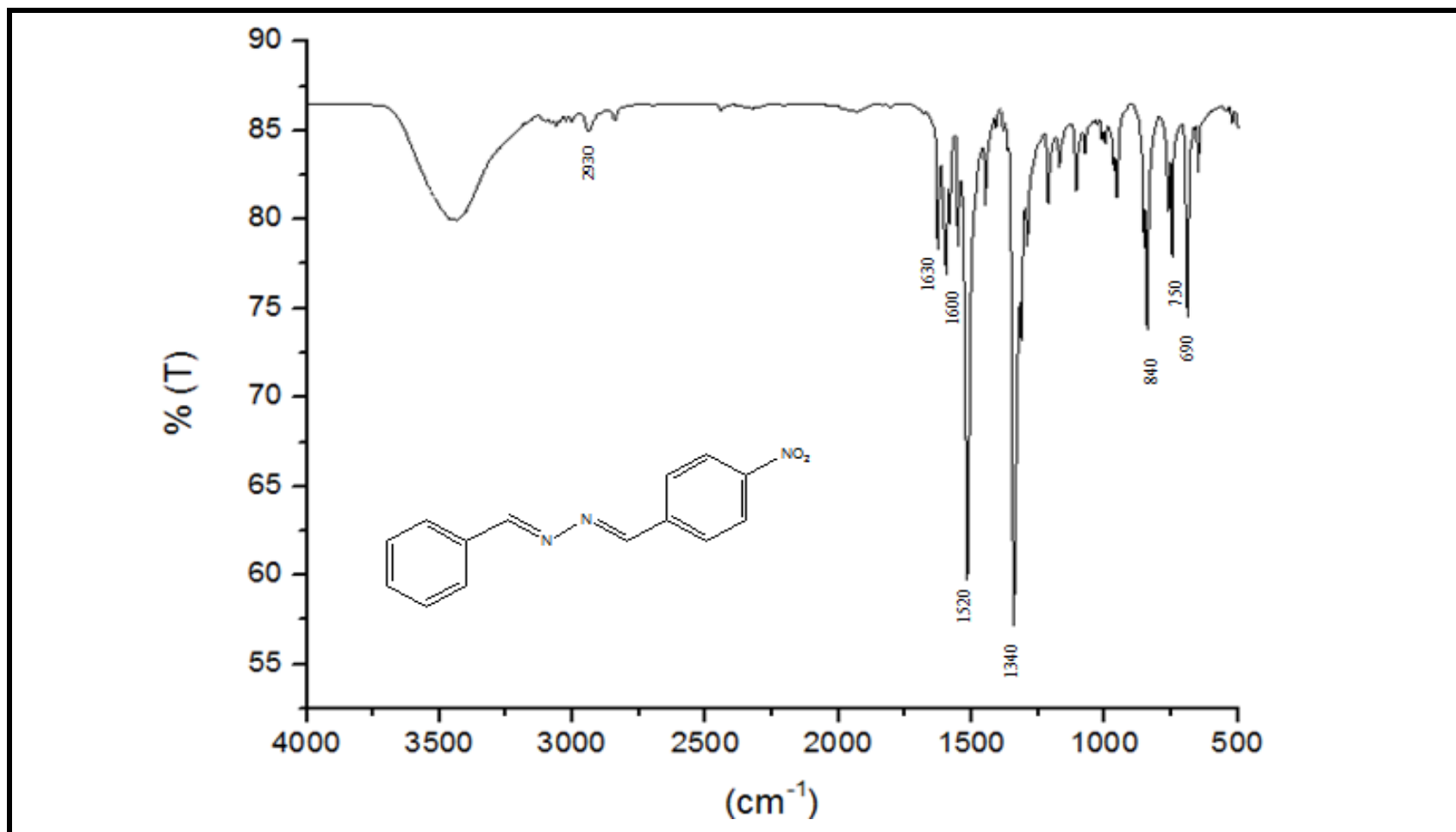
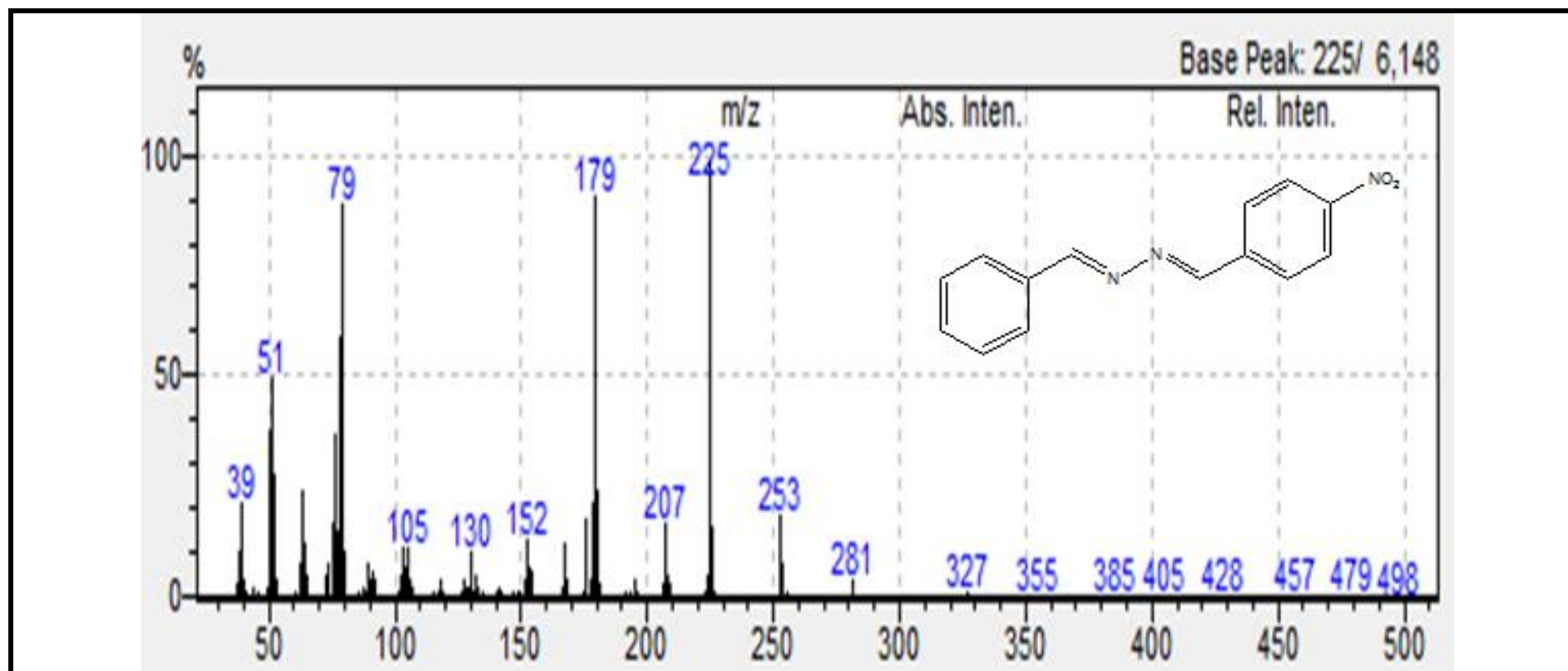
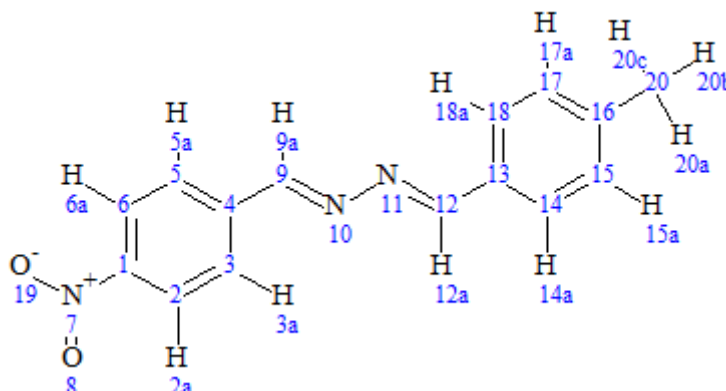


Figura 18: Espectro de massas do composto 17



(7E,8E) -2- (4-metilbenzilideno) -1- (4-nitrobenzilideno) - hidrazina



Fórmula molecular: C₁₅H₁₃N₃O₂

Coloração: amarelo claro com brilho

Pureza (CG-MS): 91,96%

Dados espectroscópicos:

RMN de ¹H: (500 MHz, CDCl₃): δ 2,41(s, 3H - 20); δ 7,29 (d, 2H - 6 e 2); δ 7,77 (d, 2H- 5 e 3); δ 8,01 (d, 2H - 18 e 14); δ 8,31 (d, 2H - 15 e 17); δ 8,66 (s, 1H - 9) δ 8,71 (s, 1H - 12).

RMN de ¹³C: (CDCl₃): δ 21,49 (C-20); δ128,91 (C - 2, C- 3, C - 5, C-5, C-14 e C- 18); δ 123,18 (C- 15 e C - 17); δ 162,57 (C - 9); δ 158,27 (C -12).

IV (4000 – 500 cm⁻¹): (NO₂) 1520 e 1340cm⁻¹; (C = N) 1600cm⁻¹; (- CH₃) 2840 cm⁻¹.

EM (m/z): [M⁺] = 267 Pico base = 145

Figura 19: Espectro de RMN ^1H composto 18 (CDCl_3 , 500 MHz)

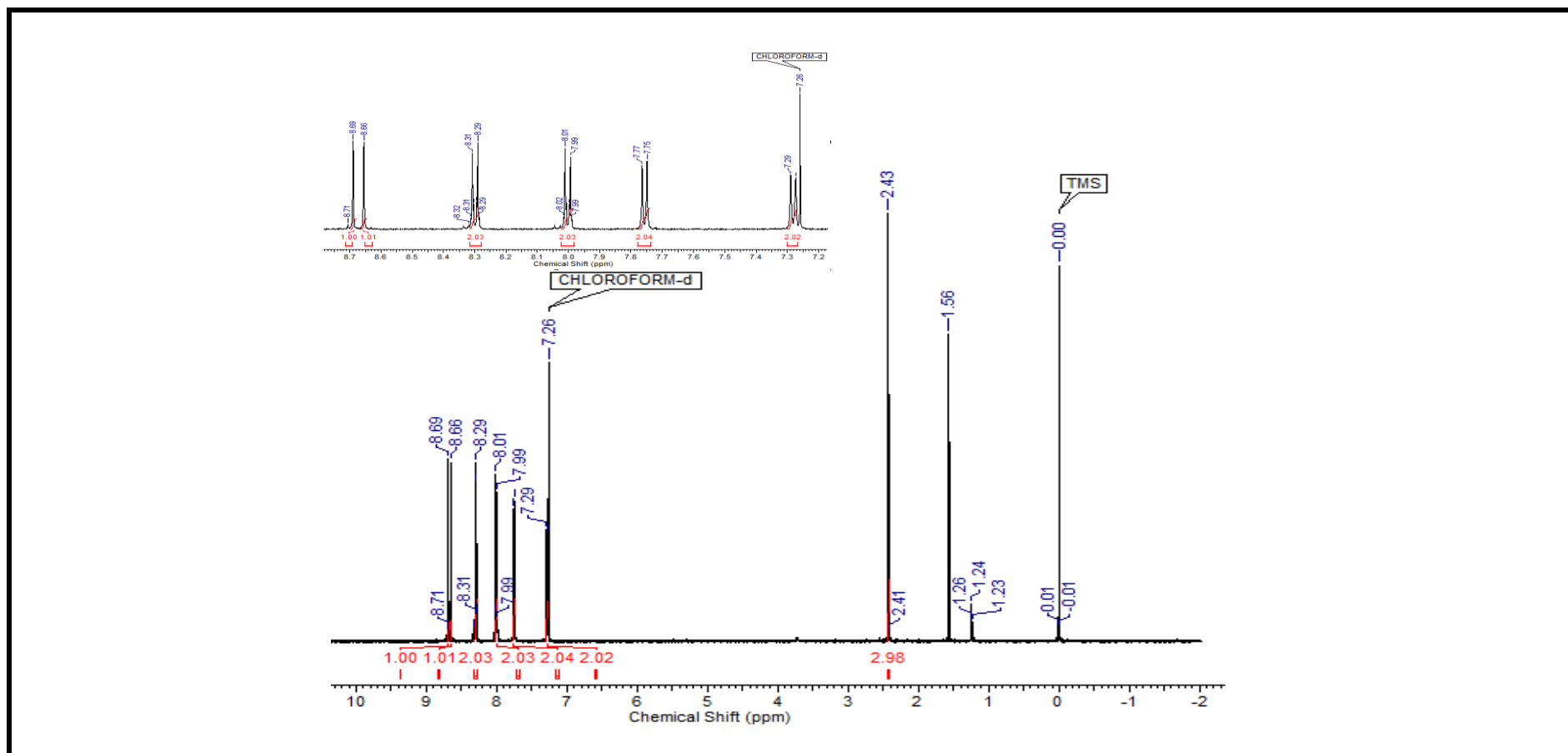


Figura 20: Espectro de RMN ^{13}C composto 18 (2D - HMBC)

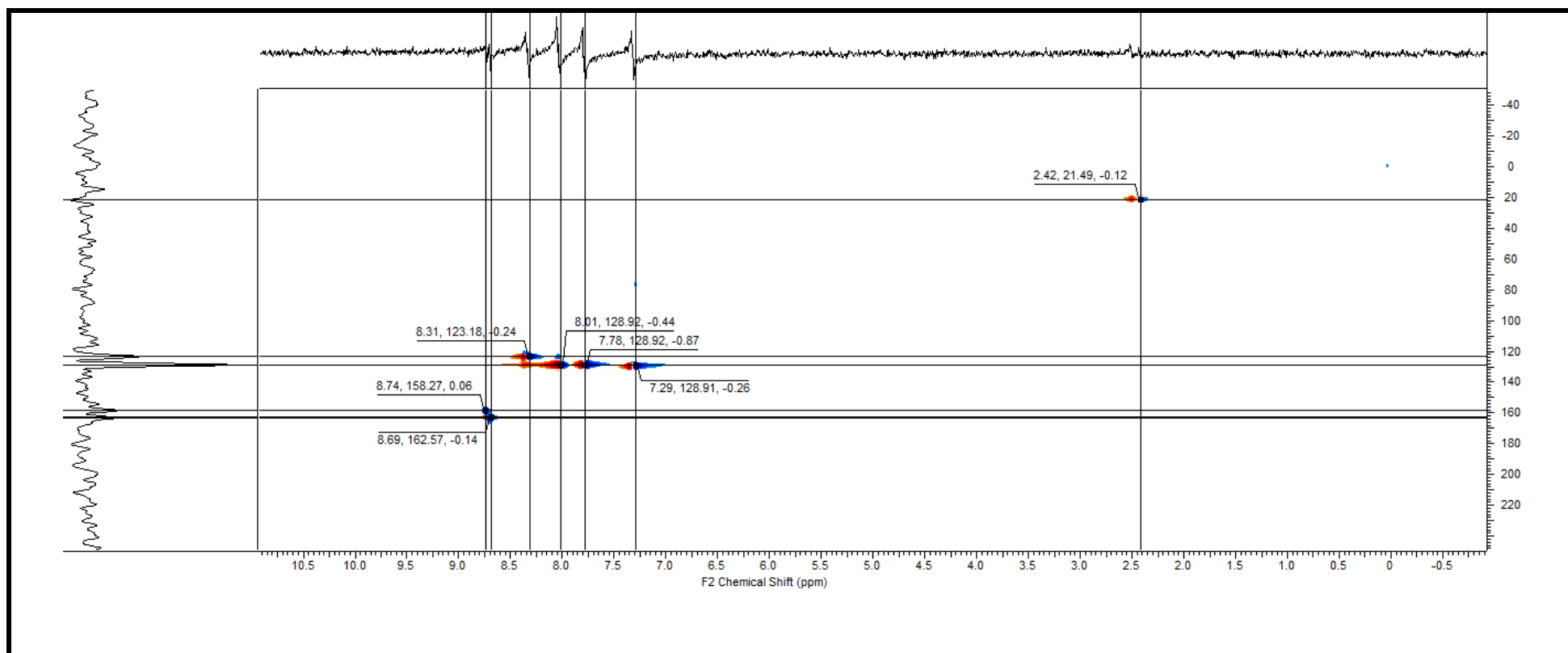


Figura 21: Espectro na região do IV do composto 18 ($4000 - 500 \text{ cm}^{-1}$).

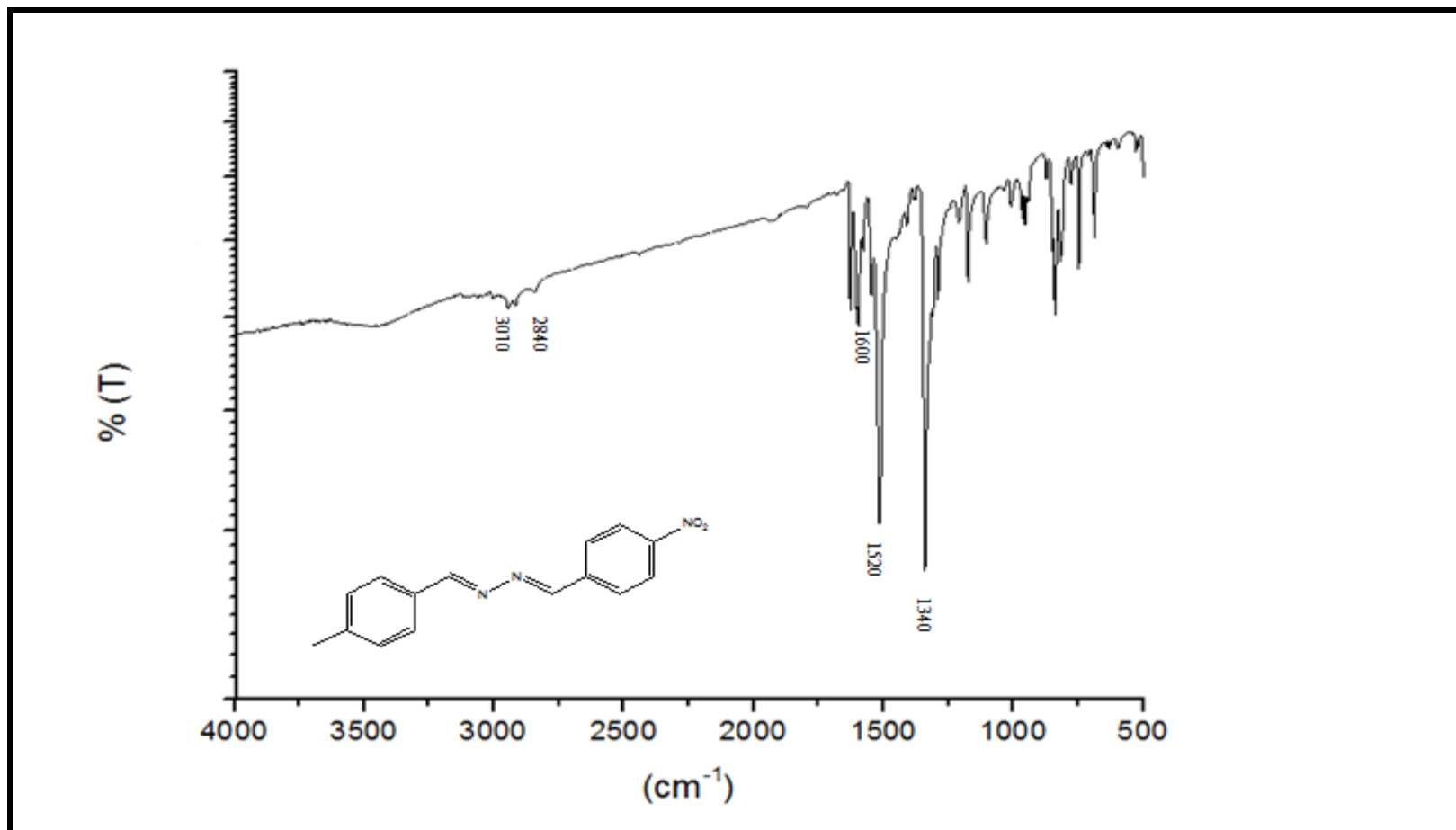
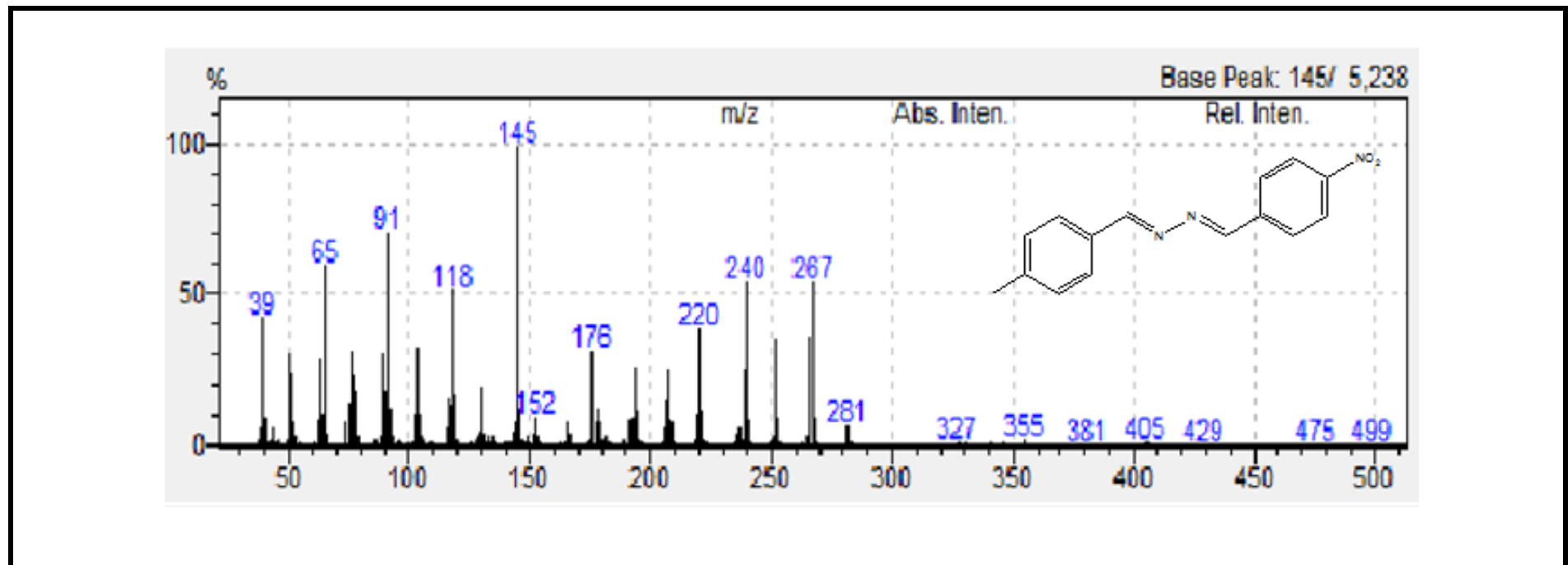
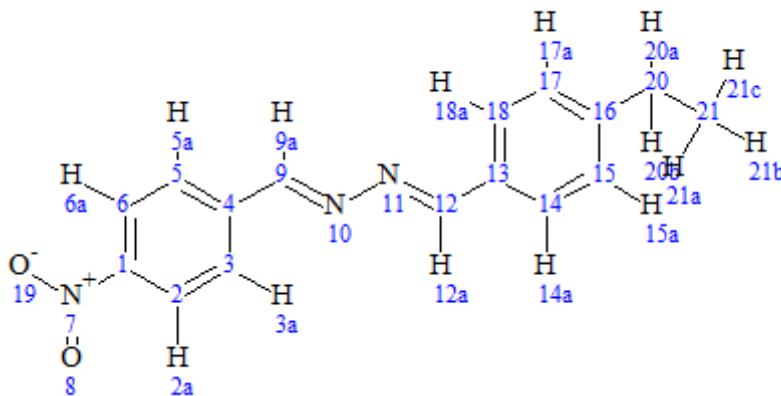


Figura 22: Espectro de massas do composto 18



(7E, 8E) – 1- (4- etilbenzilideno) – 2- (4-nitrobenzilideno) hidrazina.



Fórmula molecular: C₁₆H₁₅N₃O₂

Coloração: Amarelo claro

Pureza (CG-MS): 100%

Dados espectroscópicos:

RMN de ¹H: (500 MHz, CDCl₃): δ 1,51 (t, 3H - 21); δ 3,23 (q, 2H - 20); δ 8,67 (d, 2H - 15 e 17); δ 9,23 (d, 2H - 14 e 18); δ 9,5 (d, 2H - 5 e 3); δ 9,85 (d, 2H - 6 e 2); δ 10,27 (s, 1H - 12); δ 10,30 (s, 1H - 9).

RMN de ¹³C: (CDCl₃): δ 15,05 (C - 20); δ 29,37 (C - 21); δ 128,91 (C - 15 e 17); δ 128,91 (C- 14 e 18); δ 123,18 (C- 5 e 3); δ 159,70 (C - 6 e 2); δ 163,28 (C - 12); δ 159,69 (C - 9).

IV (4000 – 500 cm⁻¹): (NO₂) 1506 e 1340; (C =N) 1600; (-CH₂CH₃) 2920 e 2985.

EM (m/z): [M⁺] 281 Pico base = 159

Figura 23: Espectro de RMN ^1H composto 19 (CDCl_3 , 500 MHz)

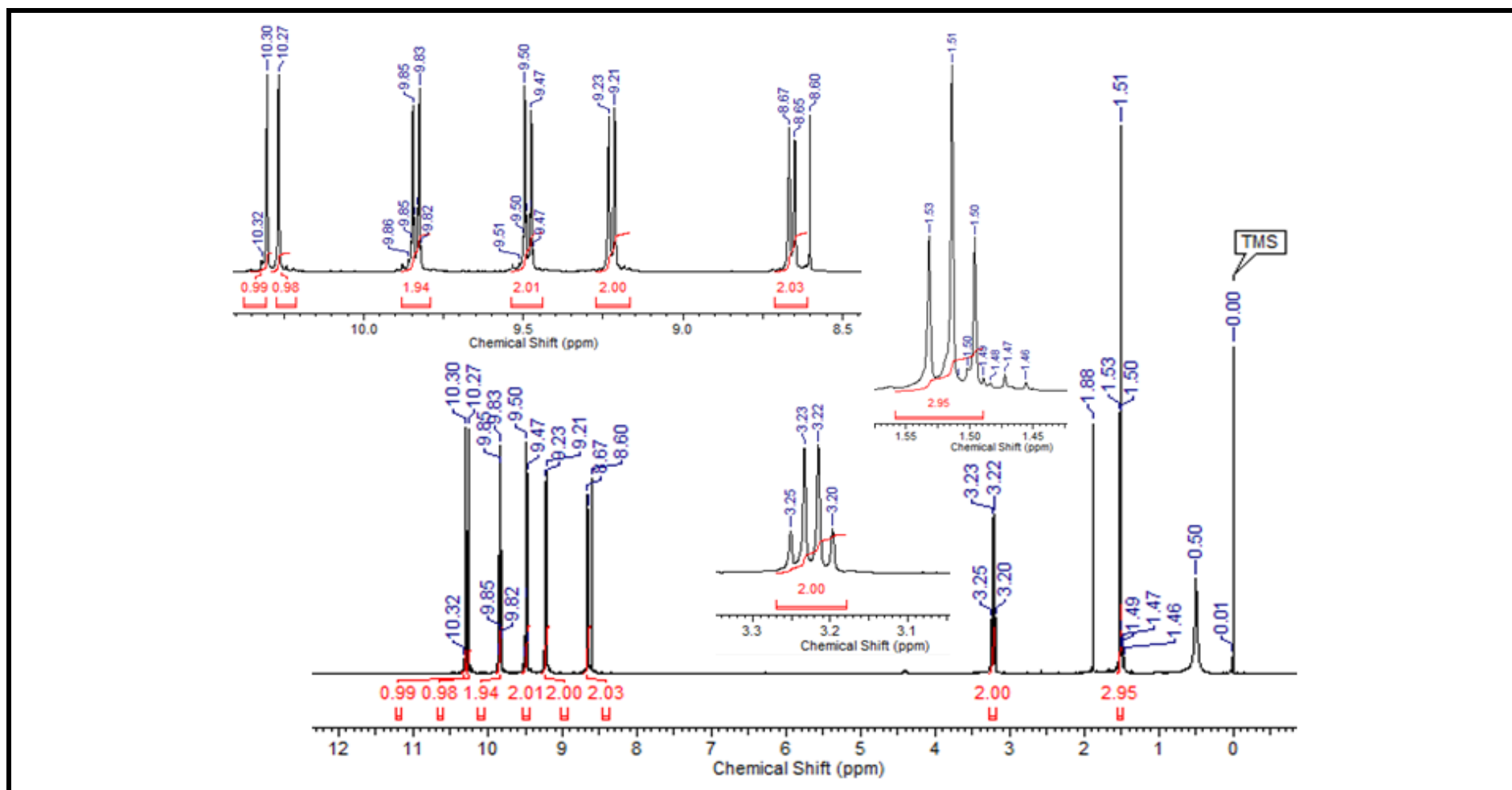


Figura 24: Espectro de RMN ^{13}C composto 19 (2D - HMBC)

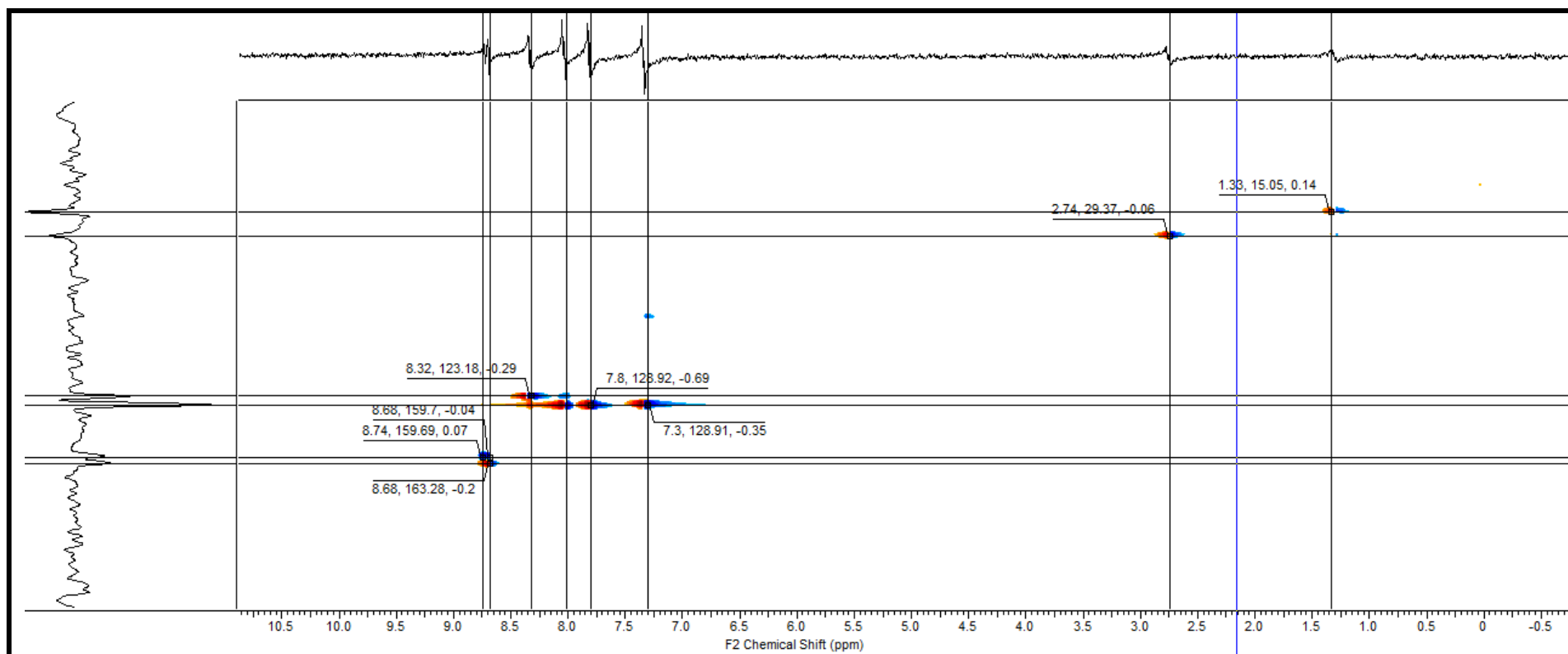


Figura 25: Espectro na região do IV do composto 19 ($4000 - 500 \text{ cm}^{-1}$).

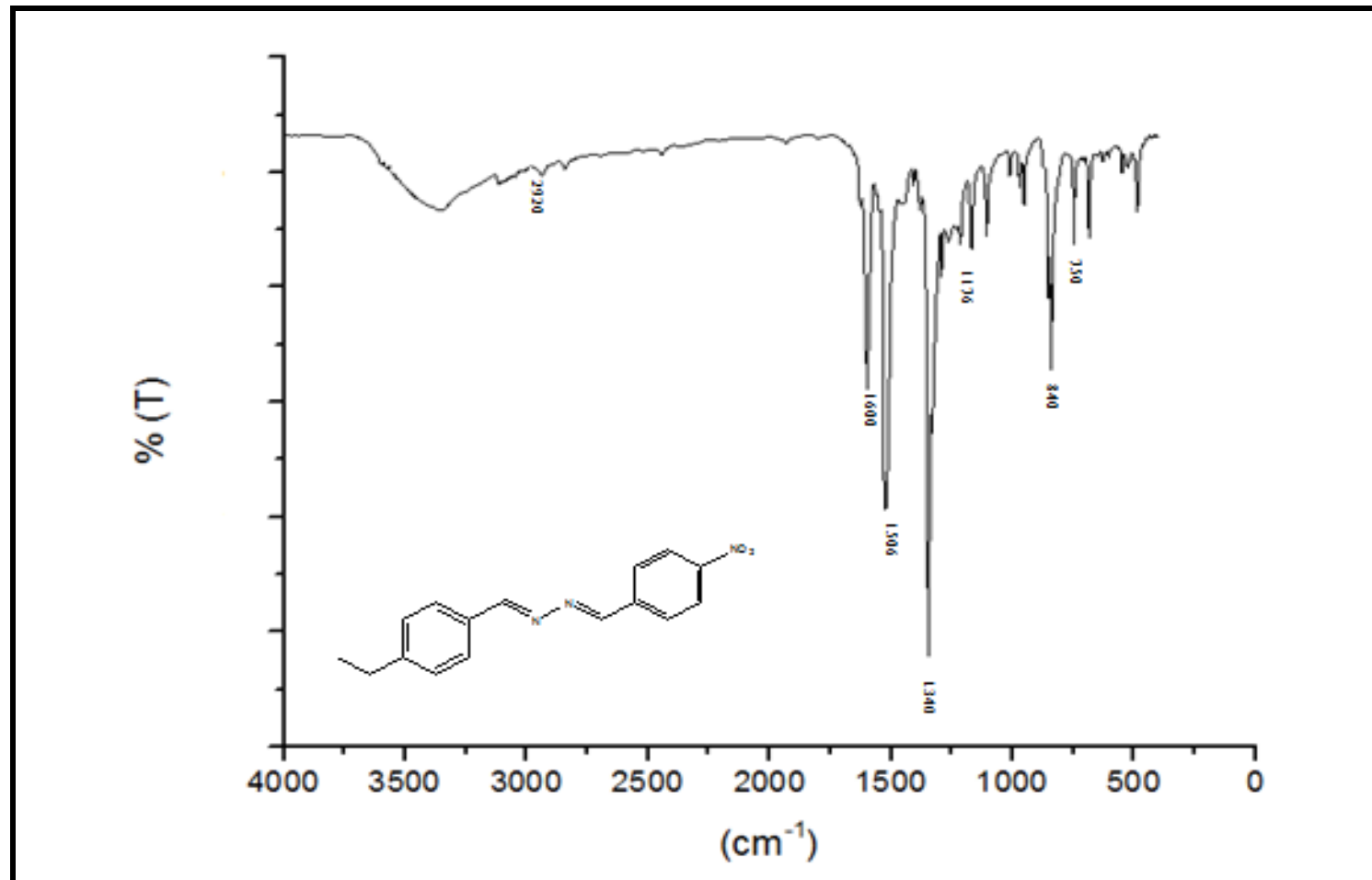
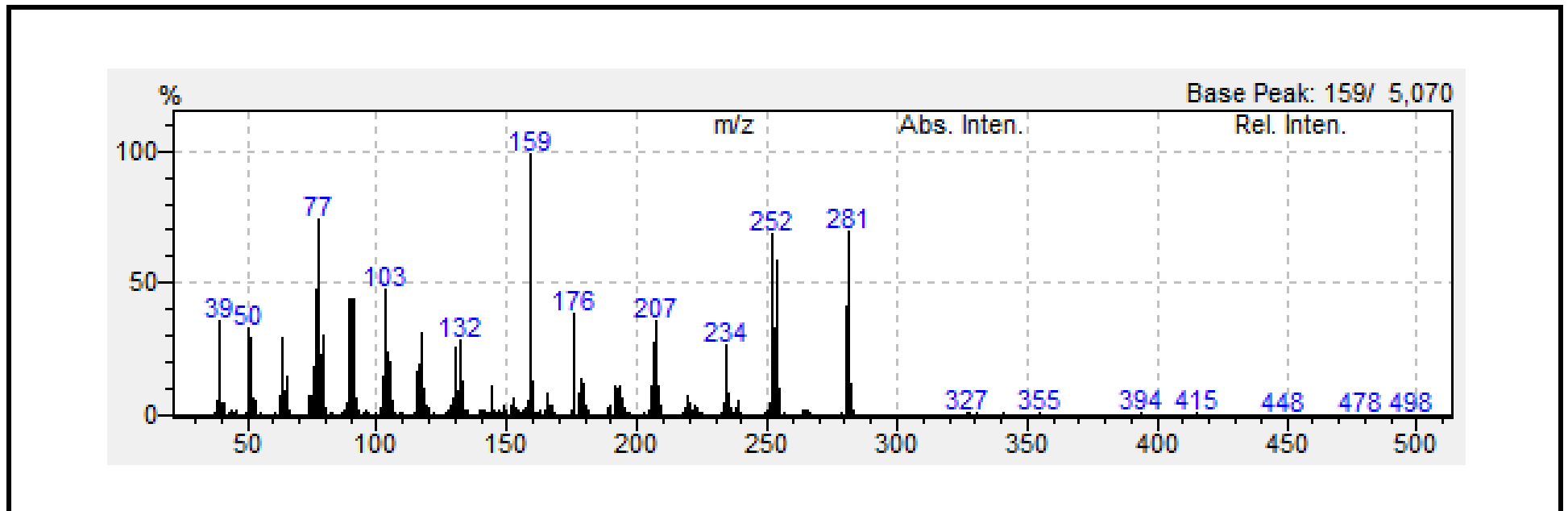
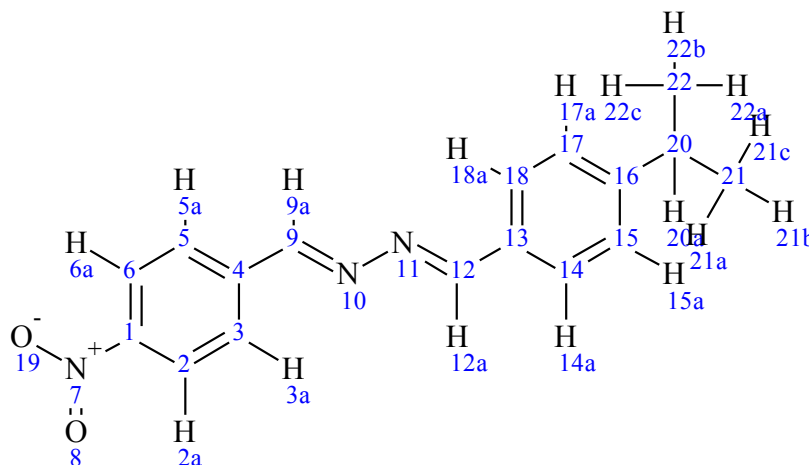


Figura 26: Espectro de massas do composto 19



(7E, 8E) -2- (4-isopropil - benzilideno) – 1- (4- nitrobenzilideno) hidrazina



Fórmula molecular: $C_{17}H_{17}N_3O_2$

Coloração: amarelo claro

Pureza (CG-MS): 95%

Dados espectroscópicos:

RMN de 1H : (500MHz, $CDCl_3$): δ 1,28 (d, 6H – 21 e 22); δ 2,97 (m, 1H - 20), δ 7,33 (d, 2H, 15 e 17); δ 7,78 (d, 2H – 14 E 18); δ 7,99 (d, 2H – 5 e 3); δ 8,29 (d, 2H – 6 e 2); δ 8,66 (s, 1H - 12); δ 8,69 (s, 1H - 9)

RMN de ^{13}C : ($CDCl_3$): δ 22,12 (C – 21 e 22); δ 33,58 (C- 20); δ 128,10 (C - 15 e 17); δ 128.10 (C 14 e 18); δ 128.10 (C – 5 e 3); δ 123,09 (6 e 2); δ 158,90 (C - 12); δ 137,41 (C - 9).

IV (4000 – 500 cm^{-1}): (NO_2): 1520 e 1340; (C=N): 1600; (-CH (CH $_3$) $_2$): 2950 e 1375

EM (m/z): $[M^+] = 295$ Pico base = 252

Figura 27: Espectro de RMN ^1H composto 20 (CDCl_3 , 500 MHz)

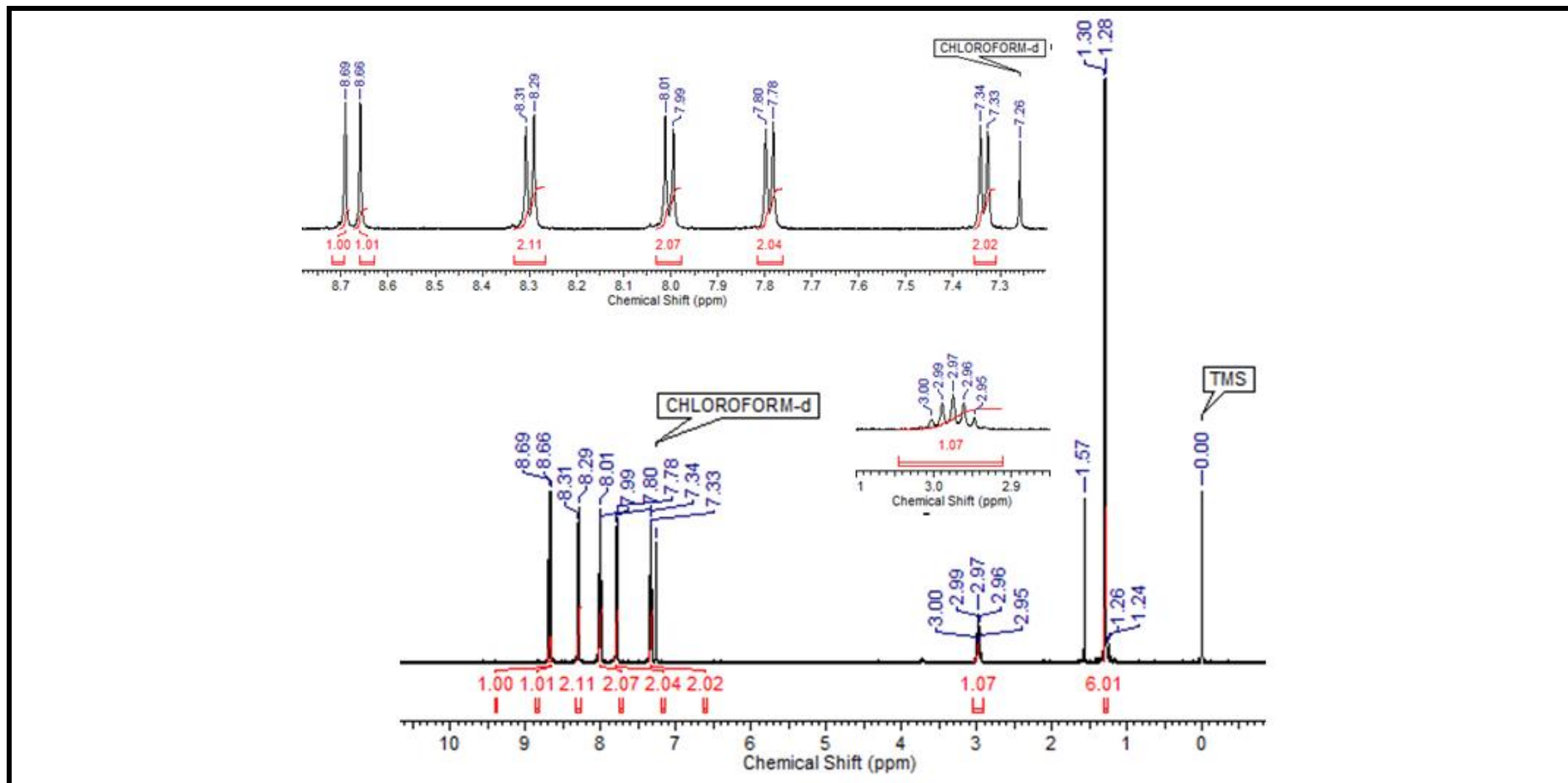


Figura 28: Espectro de RMN ^{13}C composto 20 (2D - HMBC)

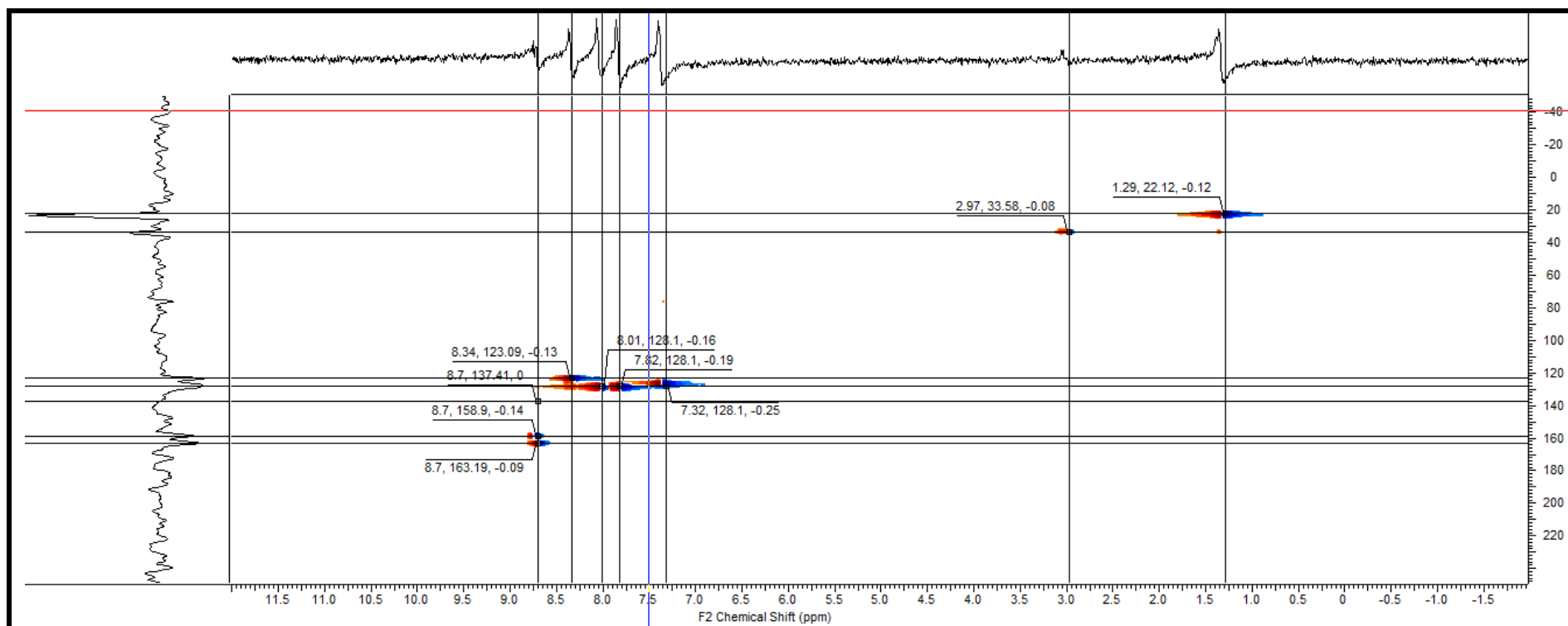


Figura 29: Espectro na região do IV do composto 20 ($4000 - 500 \text{ cm}^{-1}$).

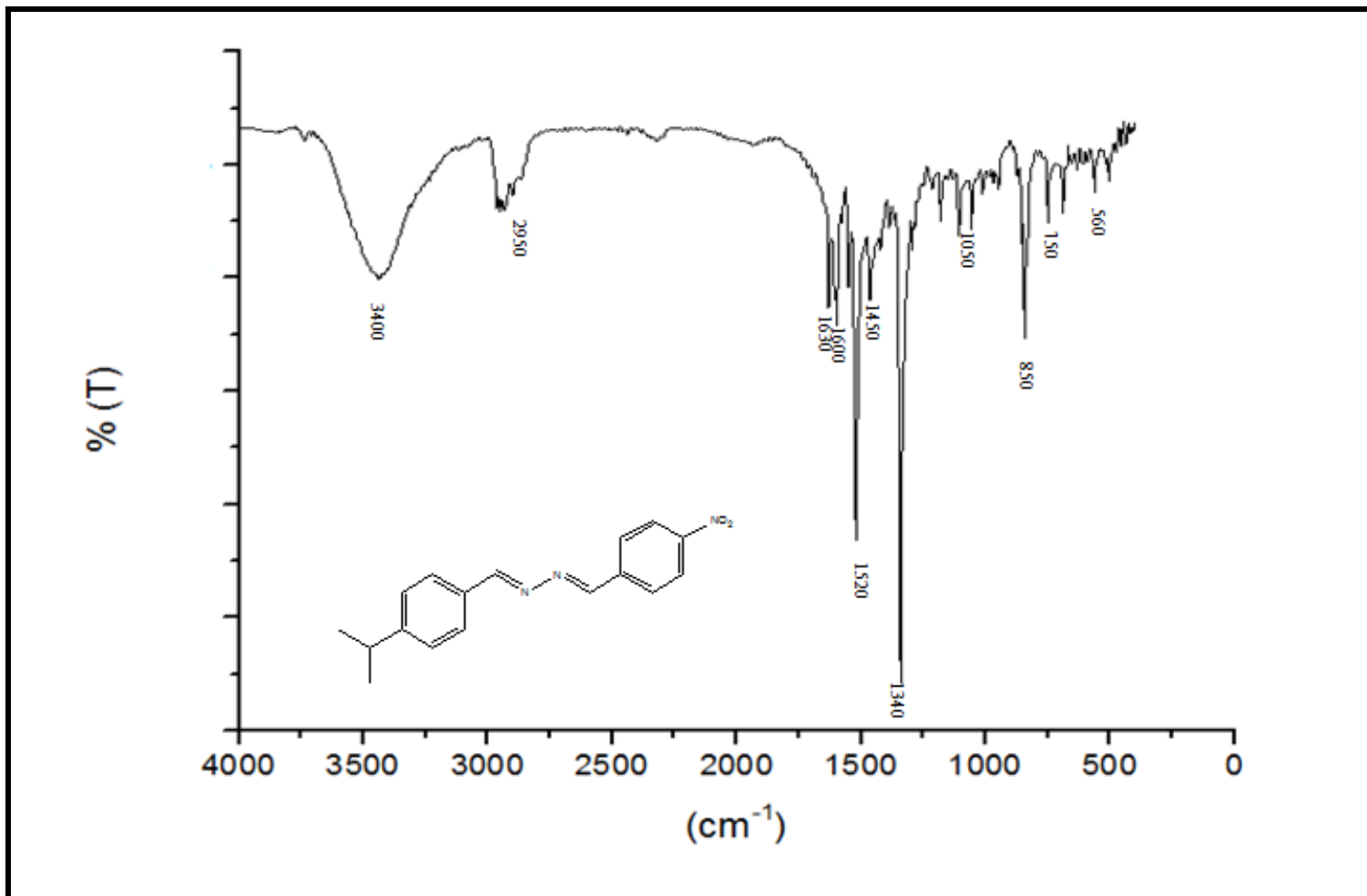
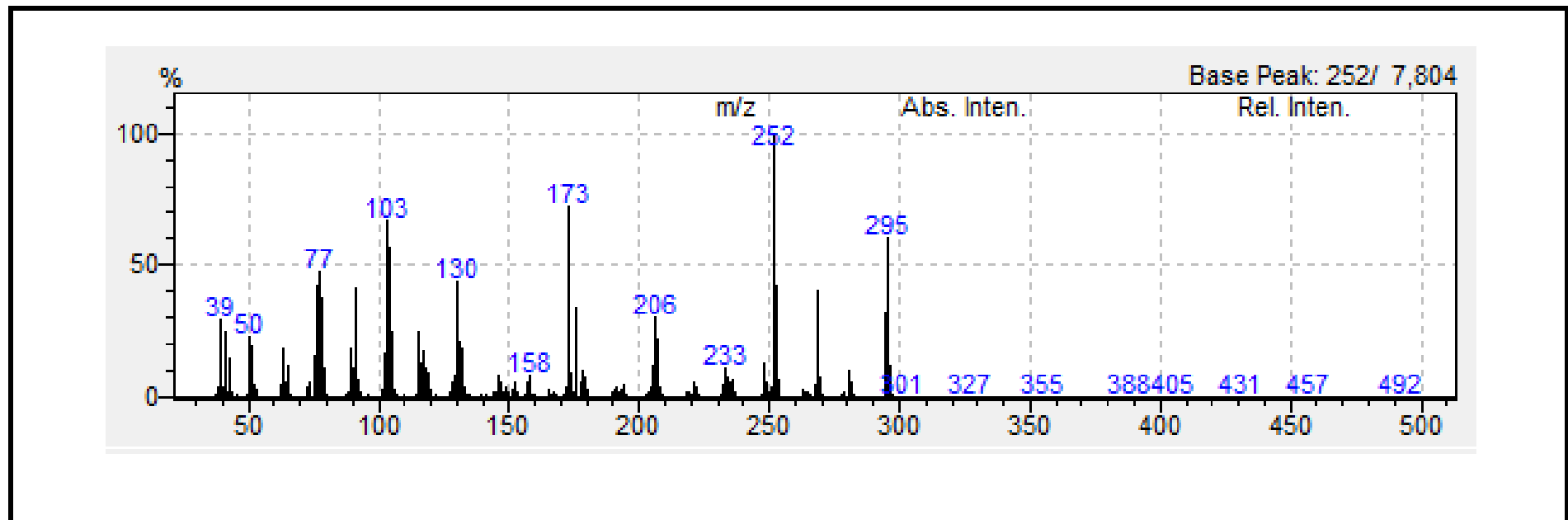
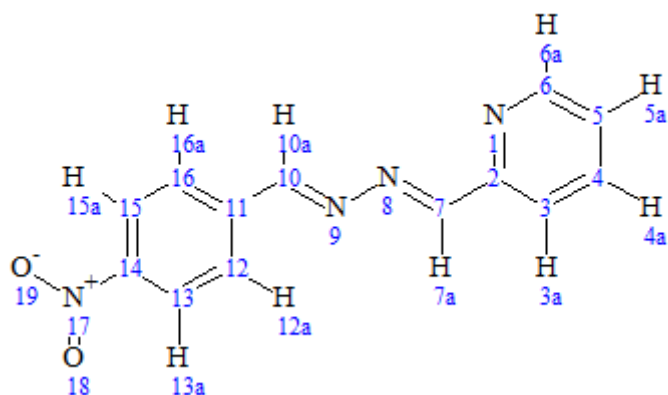


Figura 30: Espectro de massas do composto 20



(7E, 8E) -2- (4-nitrobenzilideno)- 1 – ((piridin -2- il) – metileno) – hidrazina.



Fórmula molecular: $C_{13}H_{10}N_4O_2$

Coloração: amarelo claro

Pureza (CG-MS): 100%

Dados espectroscópicos:

RMN de 1H : (500 MHz, $CDCl_3$): δ 7,39 (m, 1H – 4); δ 7,82 (q, 1H - 3), δ 8,05 (d, 2H, 12 e 16); δ 8,33 (d, 2H – 13 e 15); δ 8,70 (s, 1H – 7); δ 8,70 (s, 1H – 10); δ 8,75 (d, 1H - 5)

RMN de ^{13}C : ($CDCl_3$): δ 124,62 (C – 4); δ 136,08 (C- 3); δ 129,64 (C - 12 e 16); δ 129,63 (C - 2); δ 124,61 (C – 13 e 15); δ 161,15 (C-7); δ 161,15 (C - 10); δ 158,99 (C - 5).

IV (4000 – 500 cm^{-1}): (NO_2) 510 e 1345; (Py) 1460 e 750; (C = N) 1600; (=CH-CH₃) 2840 e 1430

EM (m/z): $[M^+] = 253$ Pico base = 225

Figura 31: Espectro de RMN ^1H composto 21 (CDCl_3 , 500 MHz)

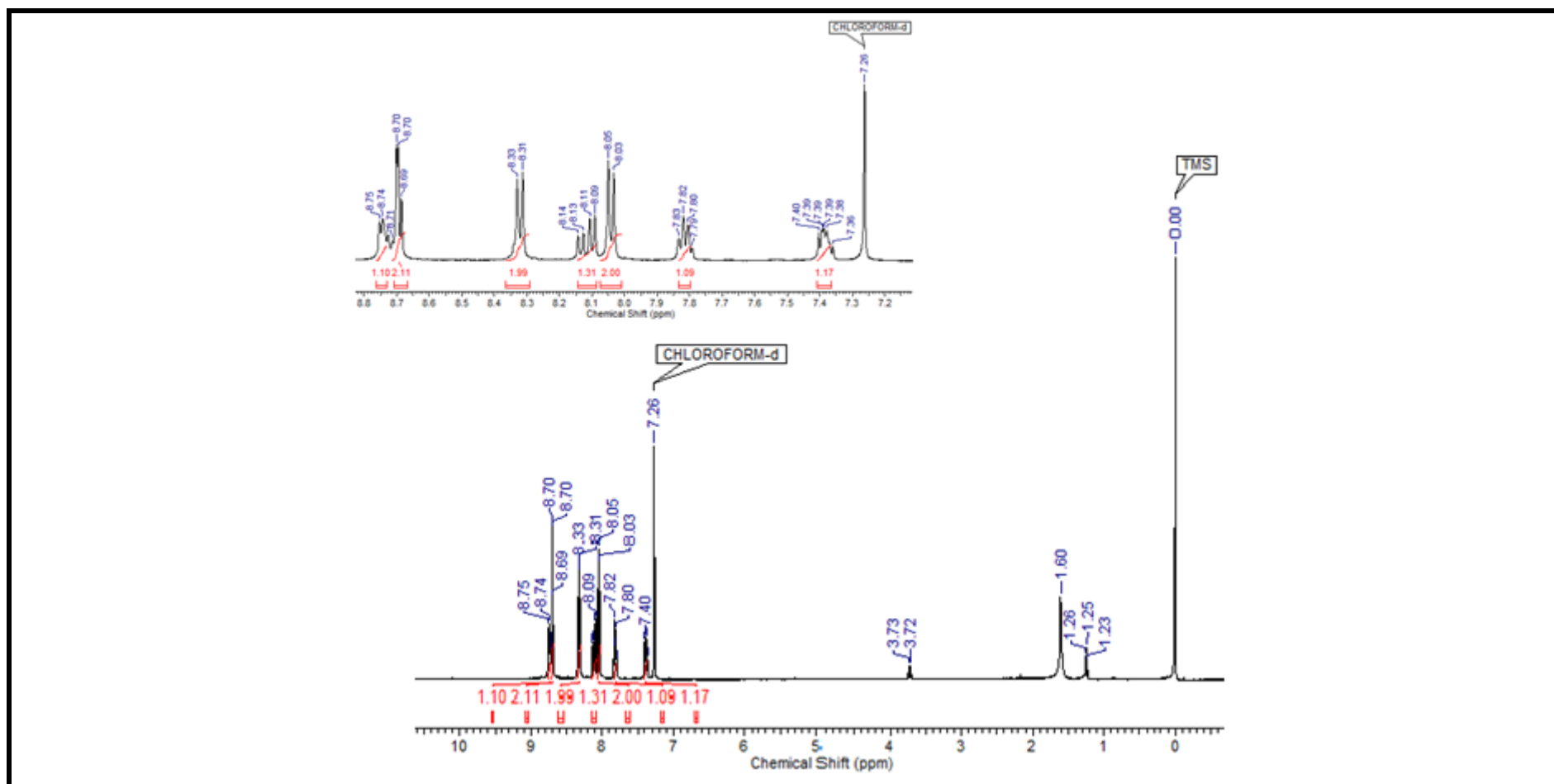


Figura 32: Espectro de RMN ^{13}C composto 21 (2D - HMBC)

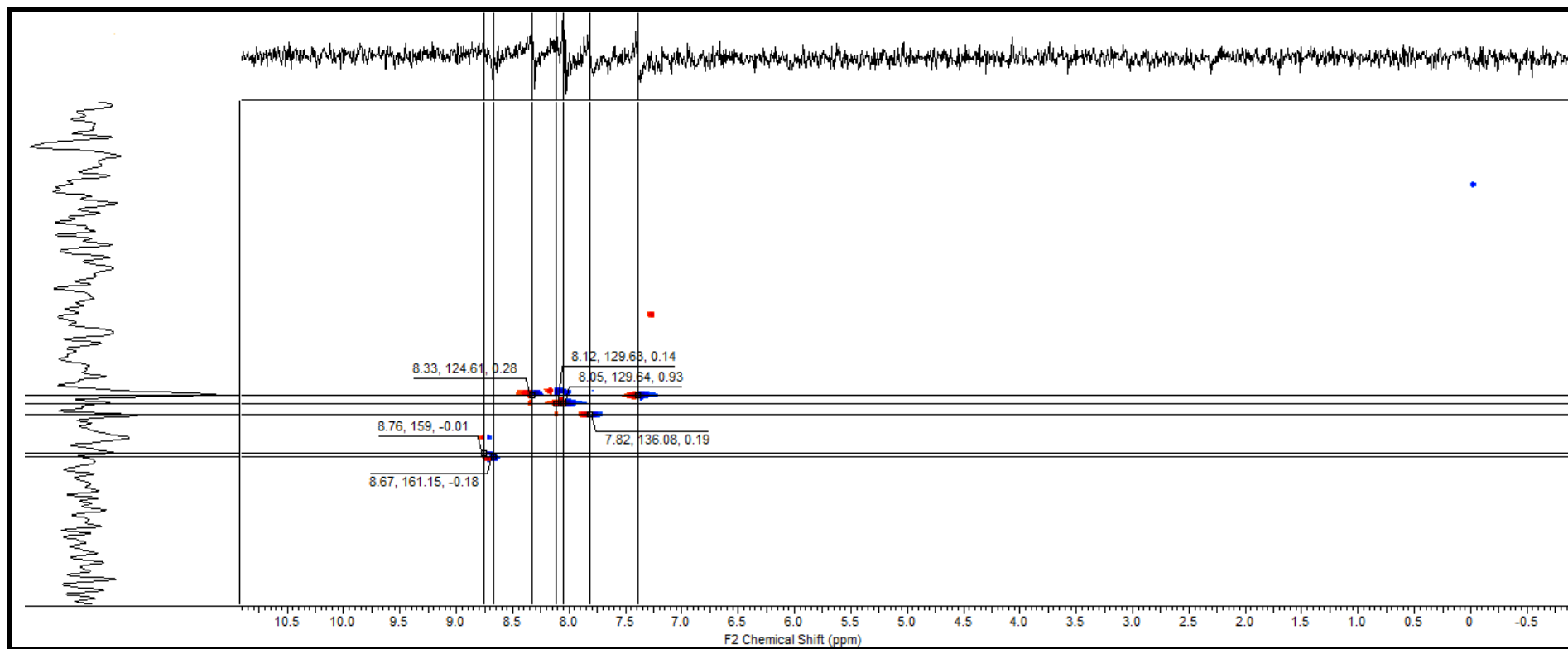


Figura 33: Espectro na região do IV do composto 21 ($4000 - 500 \text{ cm}^{-1}$).

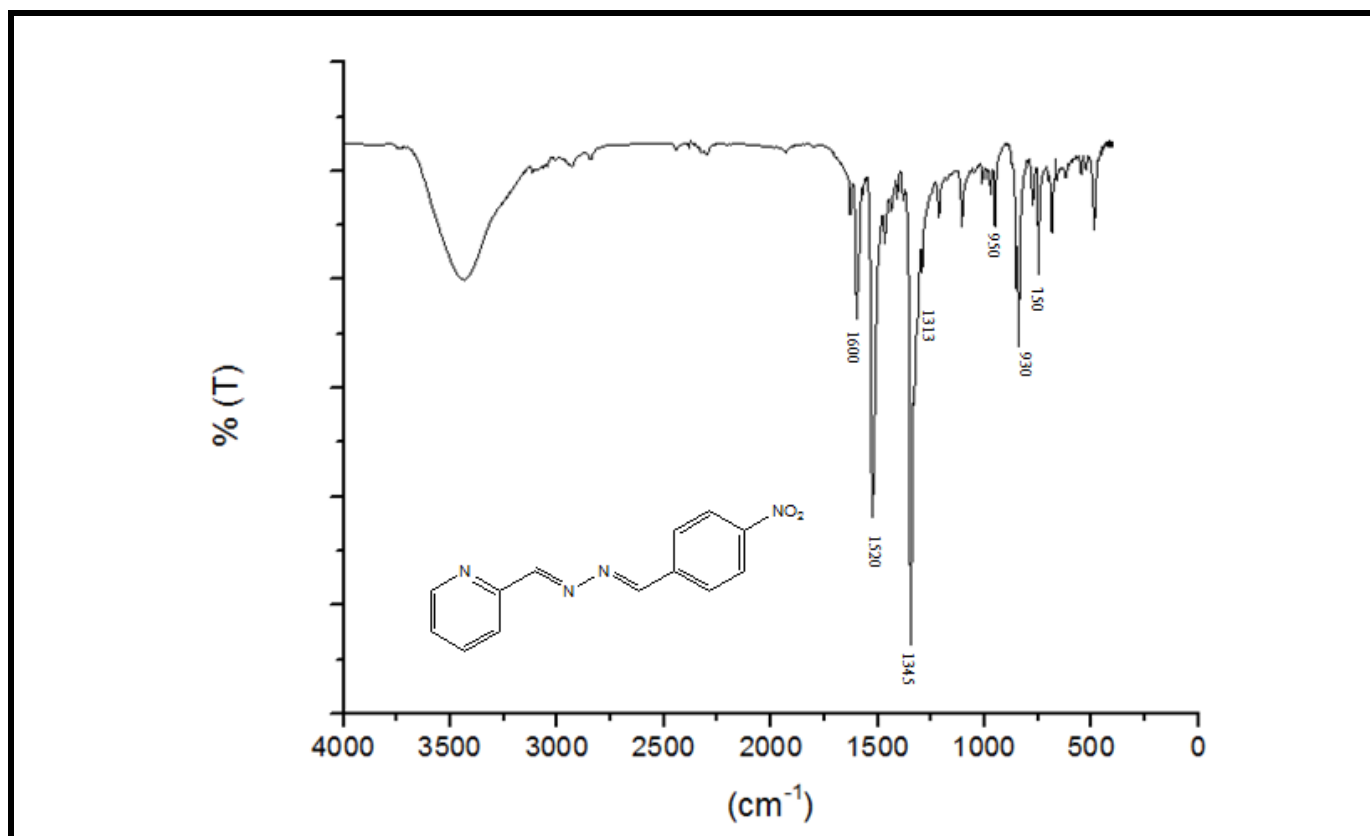
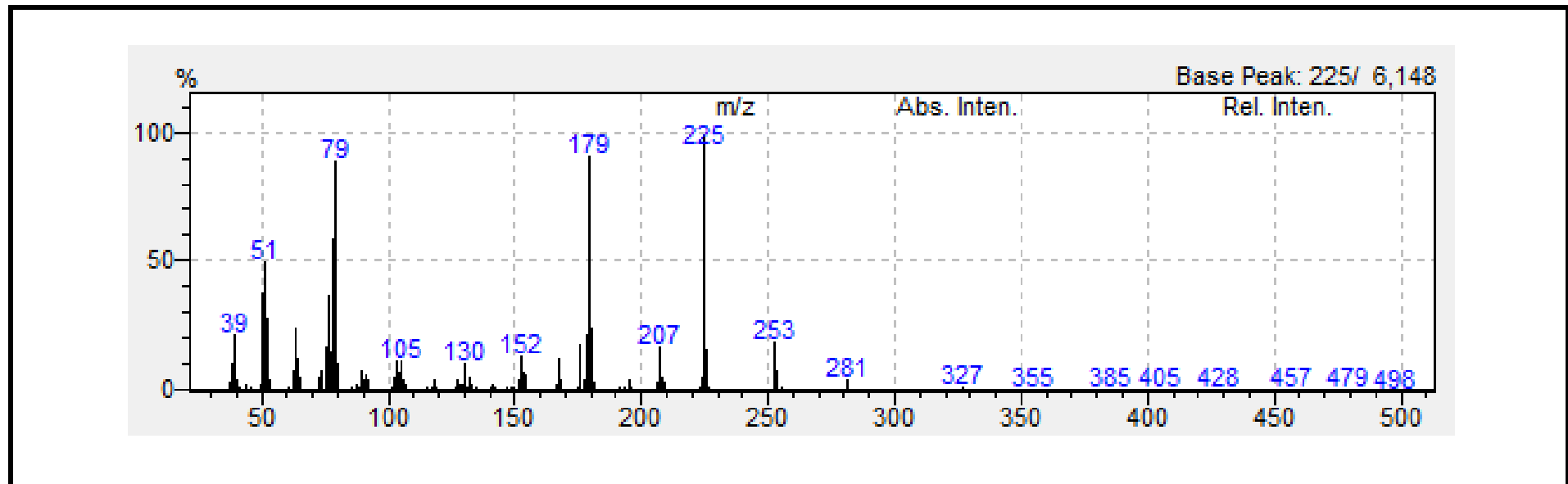
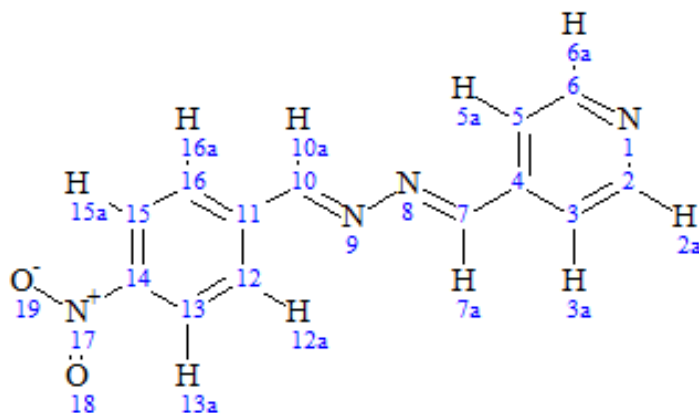


Figura 34: Espectro de massas do composto 21



(7E, 8E) -1 - (4-nitrobenzilideno) -2 - ((piridin-4-il)-metileno)-hidrazina



Fórmula molecular: C₁₃H₁₀N₄O₂

Coloração: amarelo

Pureza (CG-MS): 100%

Dados espectroscópicos:

RMN de ¹H: (500 MHz, CDCl₃): δ 7,71 (d, 2H – 3 e 5); δ 8,04 (d, 2H – 12 e 16), δ 8,33 (d, 2H, 13 e 15); δ 8,60 (s, 1H – 8); δ 8,69 (s, 1H – 10); δ 8,77 (d, 2H – 2 e 6).

RMN de ¹³C: (CDCl₃): δ 123,29 (C – 3 e 5); δ 129,02 (C- 12 e 16); δ 123,28 (C – 13 e 15); δ 161.24 (C - 8);δ 158.38 (C – 10); δ 150,5 (C -2 e 6).

IV (4000 – 500 cm⁻¹): (NO₂) 510 e 1345; (Py) 1460 e 750; (C = N) 1600.

EM (m/z): [M⁺] = 254 Pico base = 132

Figura 35: Espectro de RMN ^1H composto 22 (CDCl_3 , 500 MHz)

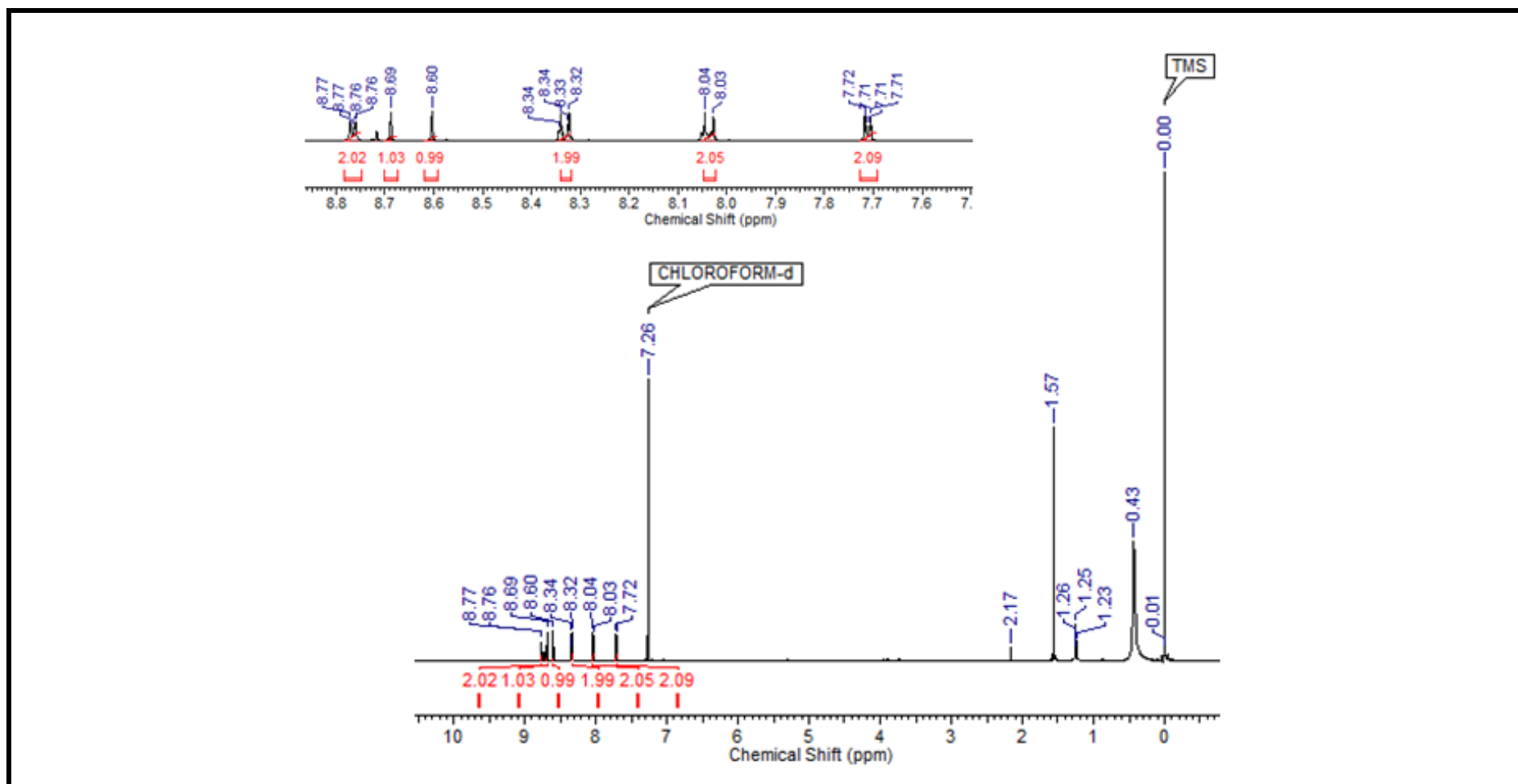


Figura 36: Espectro de RMN ^{13}C composto 22 (2D - HMBC)

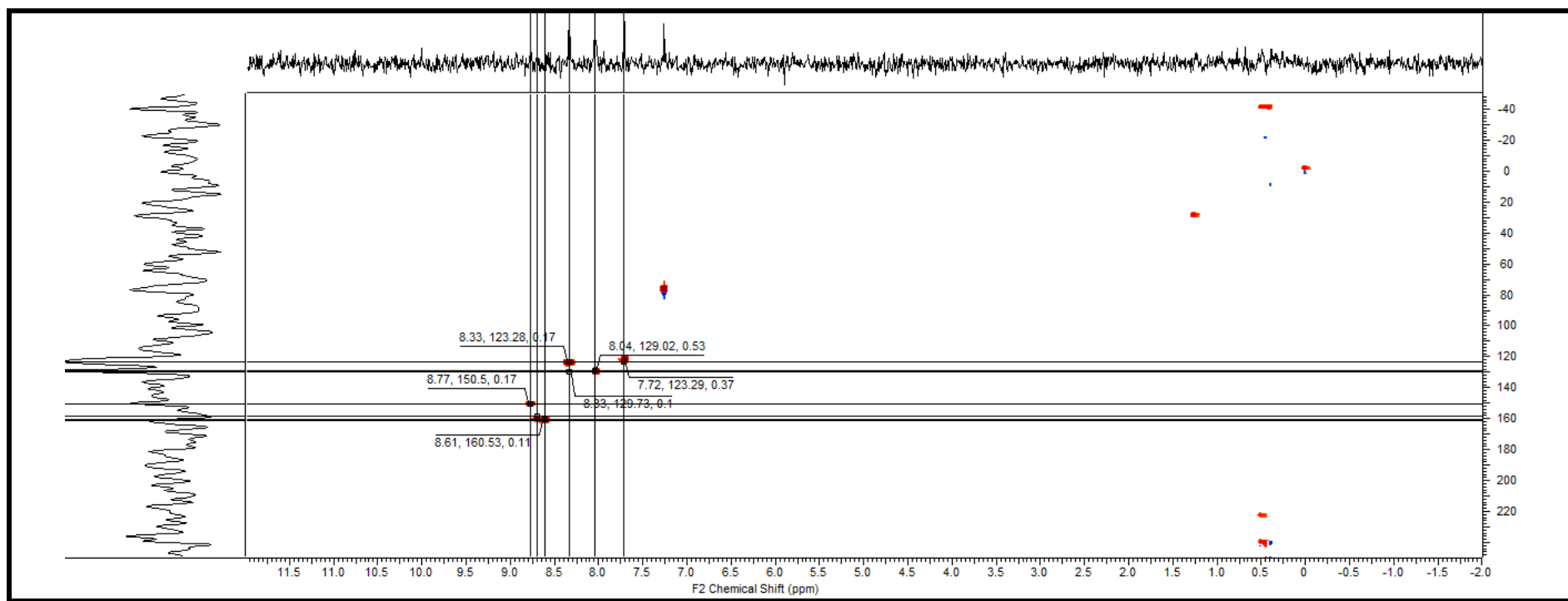


Figura 37: Espectro na região do IV do composto 22 (4000 - 500 cm^{-1}).

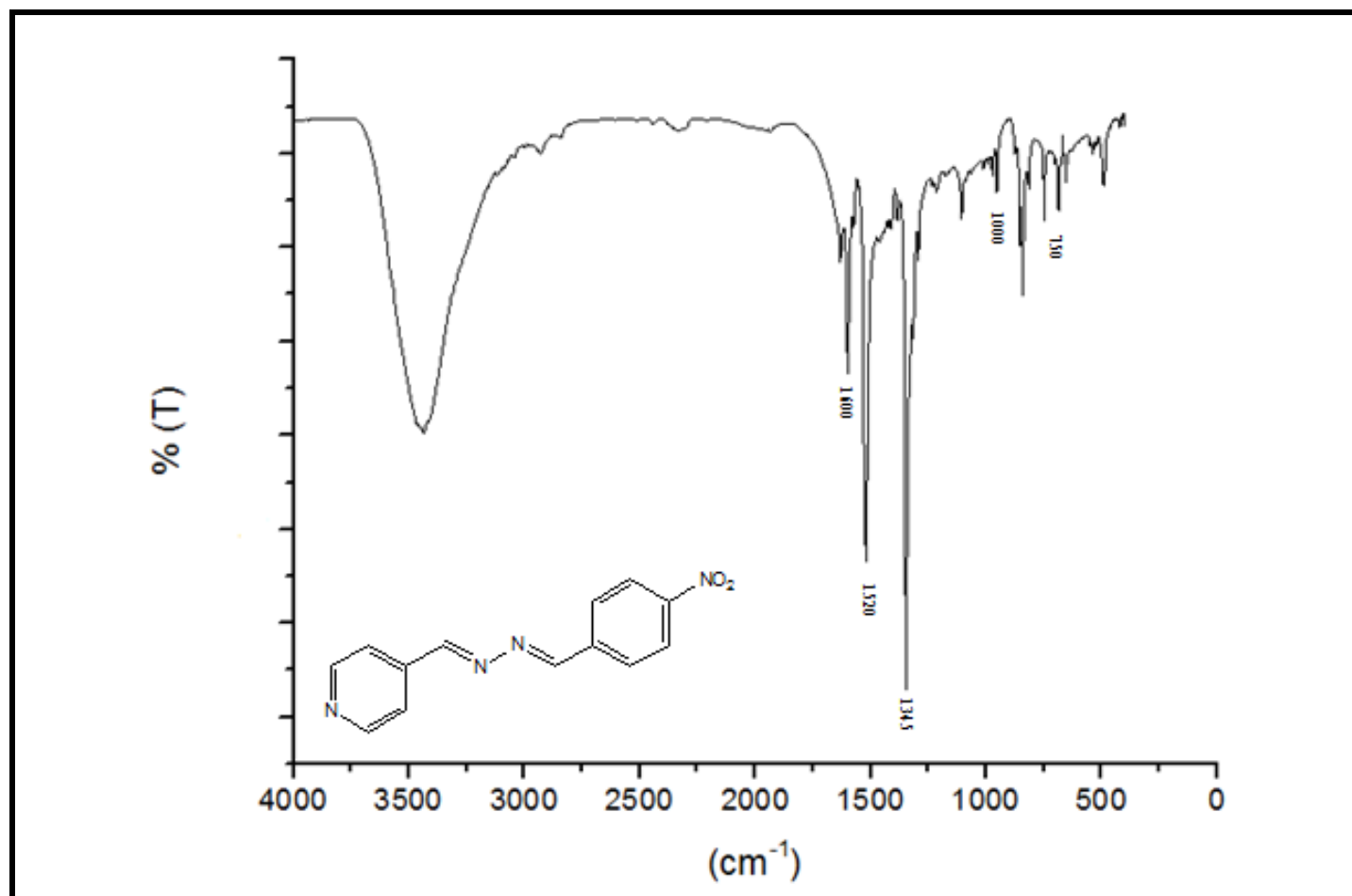
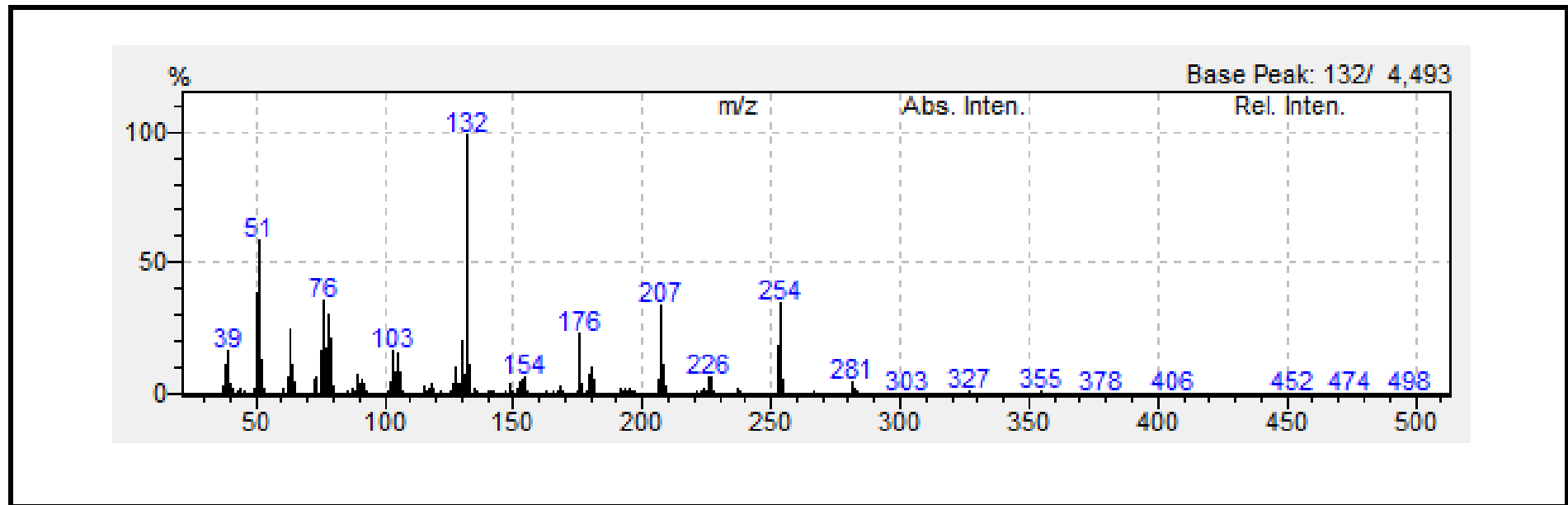
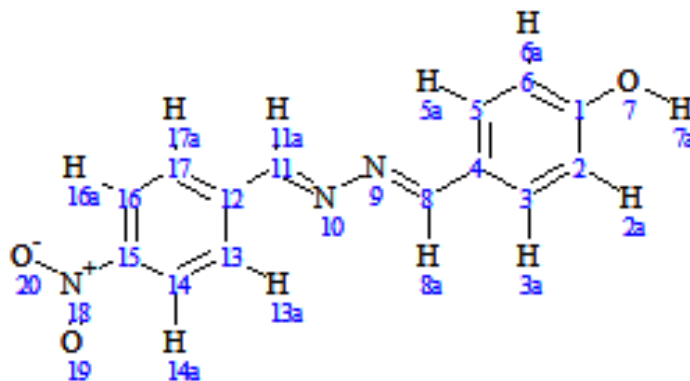


Figura 38: Espectro de massas do composto 22



(7E, 8E) - 2 - (4- hidroxibenzilideno) - 1 - (4-nitrofenil metileno) - hidrazina.



Fórmula molecular: C₁₄H₁₁N₃O₃

Coloração: amarelo claro

Pureza (CG-MS): 64,86 %

Dados espectroscópicos:

RMN de ¹H: (500 MHz, CDCl₃): δ 5,87 (s, 1H - 7); δ 6,93 (d, 1H - 13), δ 7,69 (d, 1H - 17); δ 7,74 (s, 1H - 3); δ 7,79 (d, 1H - 5); δ 8,01 (d, 1H - 2); δ 8,05 (d, 1H - 6); δ 8,20 (s, 1H - 16); δ 8,29 (d, 1H - 14); δ 8,33 (d, 1H - 11); δ 8,69 (d, 1H - 8).

RMN de ¹³C: (CDCl₃): δ 115,91 (C - 13); δ 126,31 (C - 17); δ 139,11 (C - 3); δ 130,79 (C - 5); δ 128,83 (C - 2); δ 129,68 (C - 6); δ 123,97 (C - 16); δ 123,84 (C - 14); δ 163,35 (C - 11); δ 158,54 (C - 8).

IV (4000 - 500 cm⁻¹): (NO₂) 1510 e 1345; (OH) 3500; (C = N) 1600.

EM (m/z): [M⁺] = 269 Pico base = 147

Figura 39: Espectro de RMN ^1H composto 23 (CDCl_3 , 500 MHz)

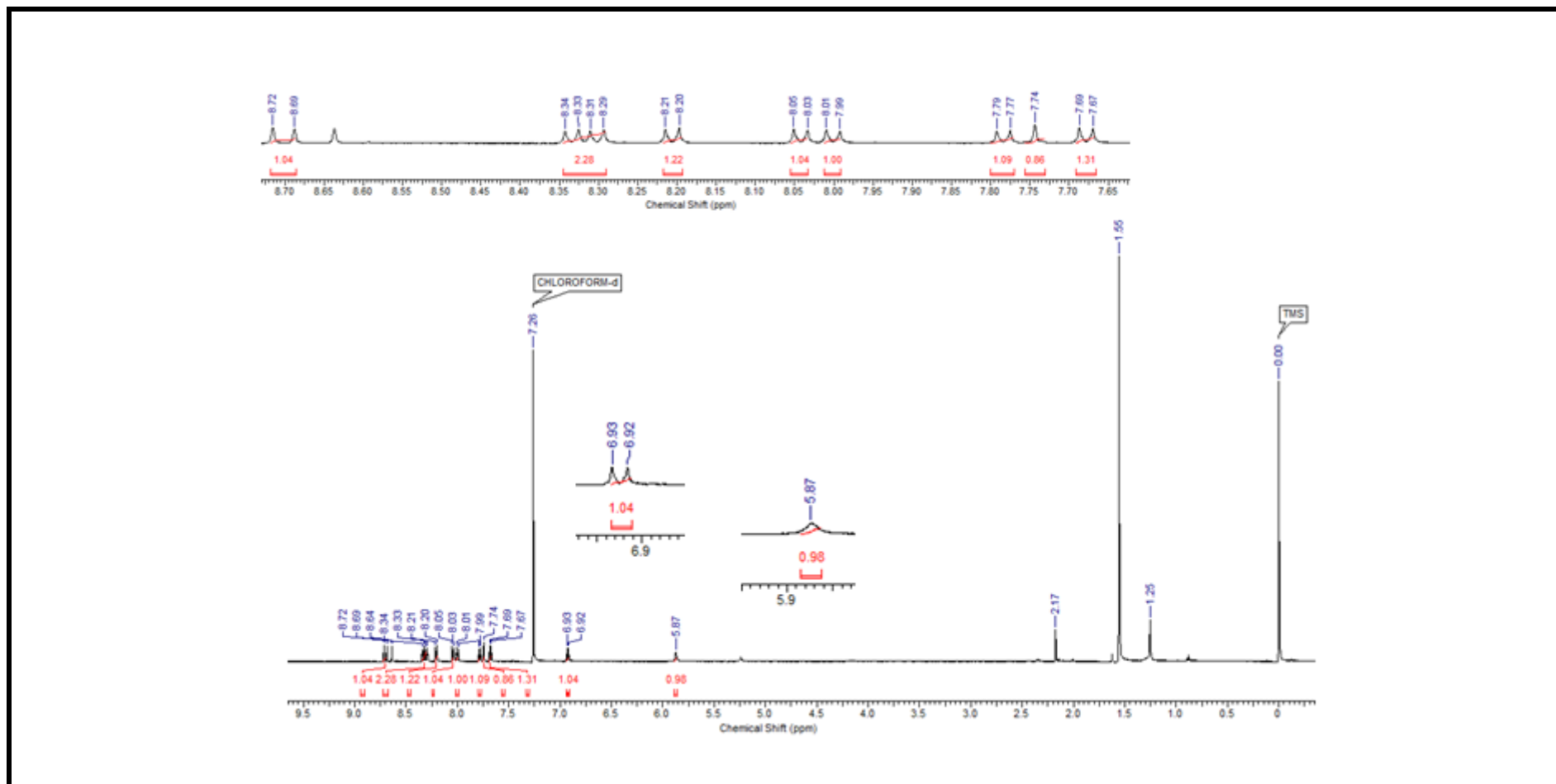


Figura 40: Espectro de RMN ^{13}C composto 23 (2D - HMBC)

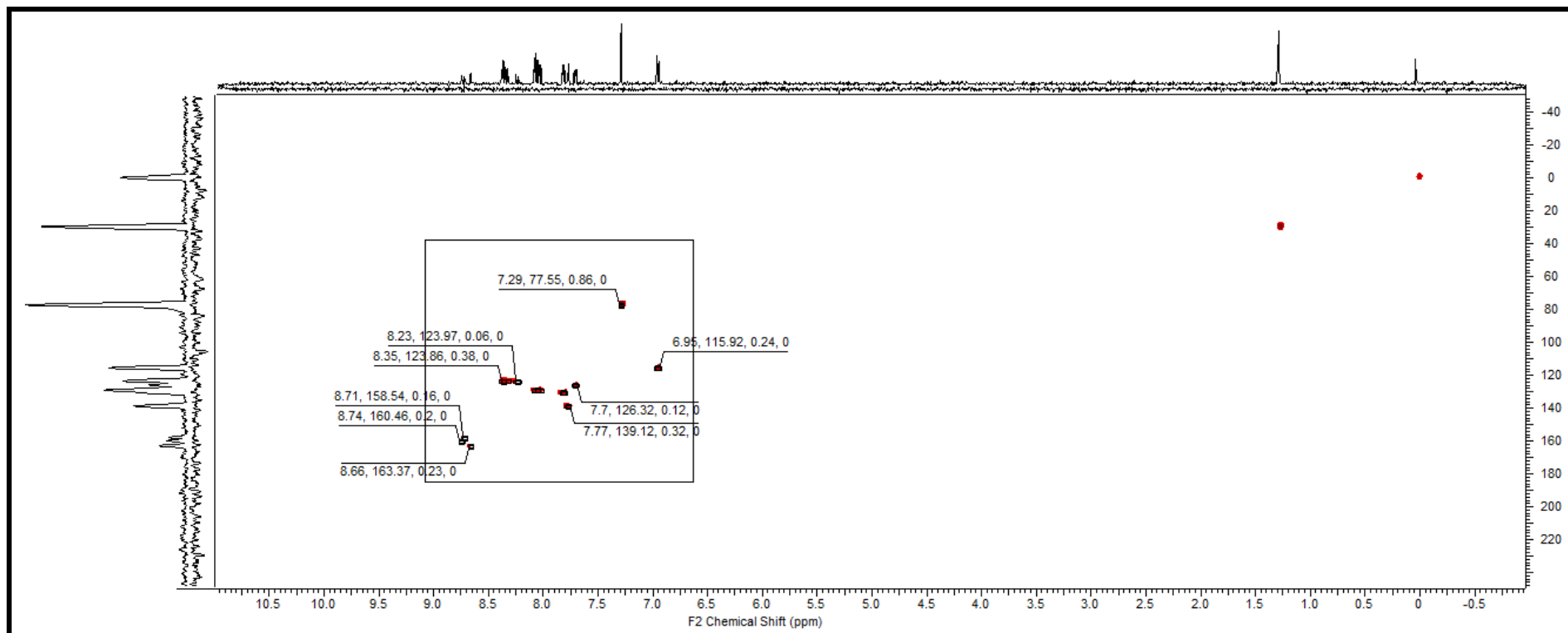


Figura 41: Espectro na região do IV do composto 23 (4000 - 500 cm^{-1}).

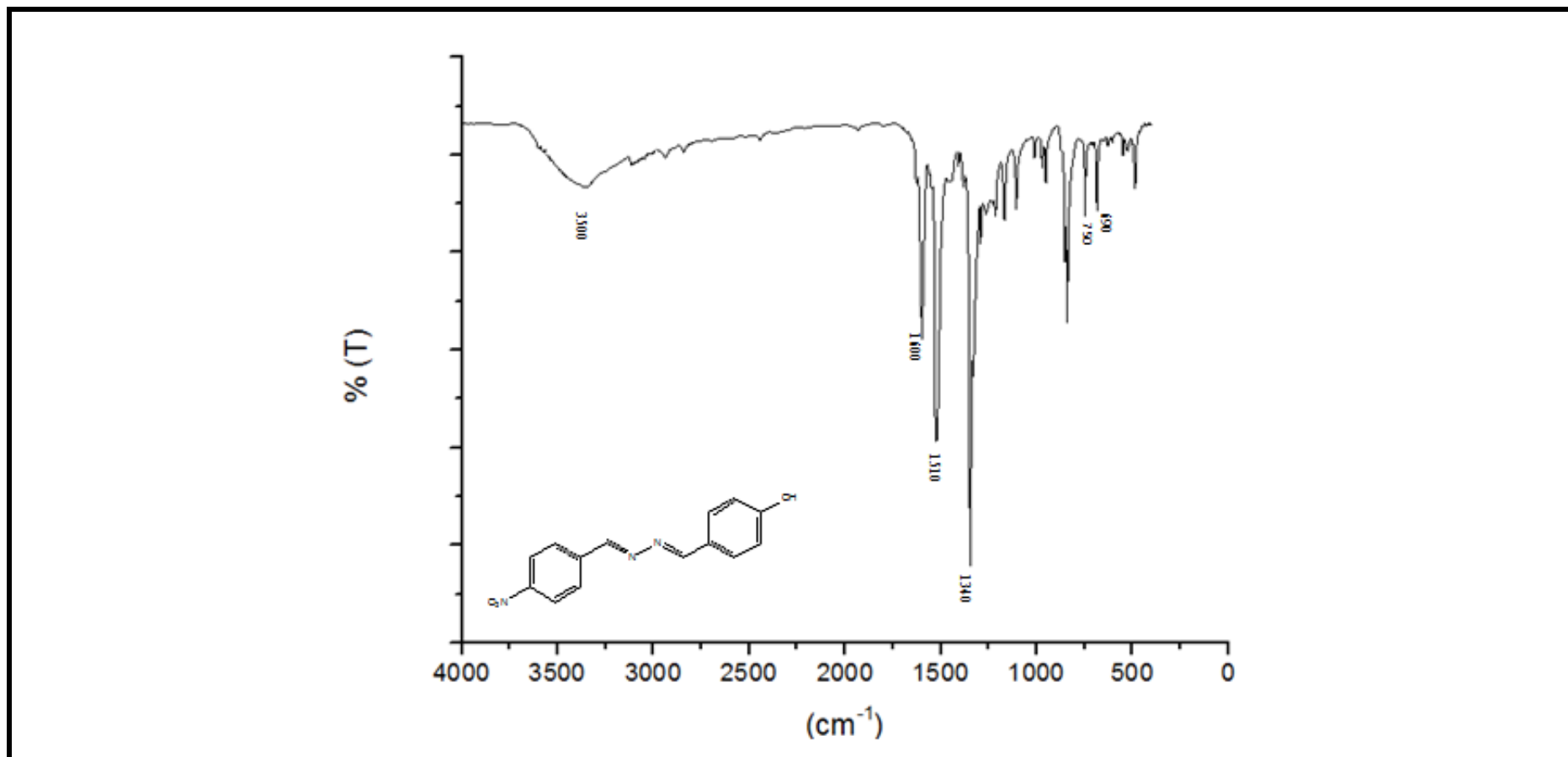
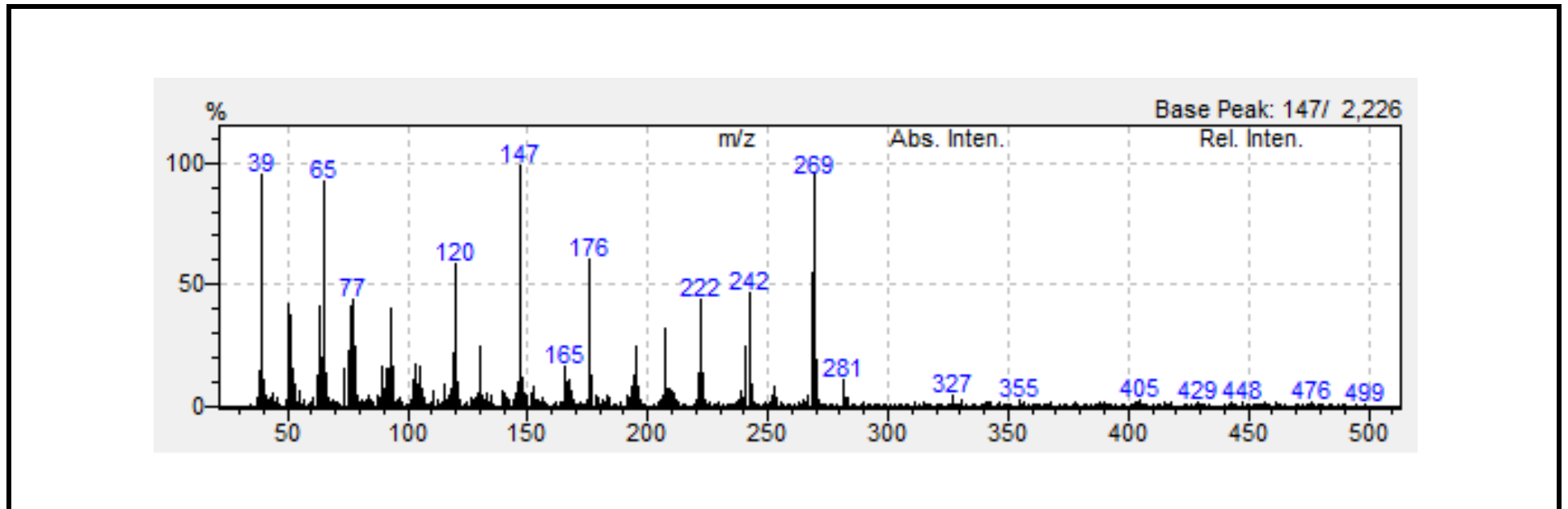
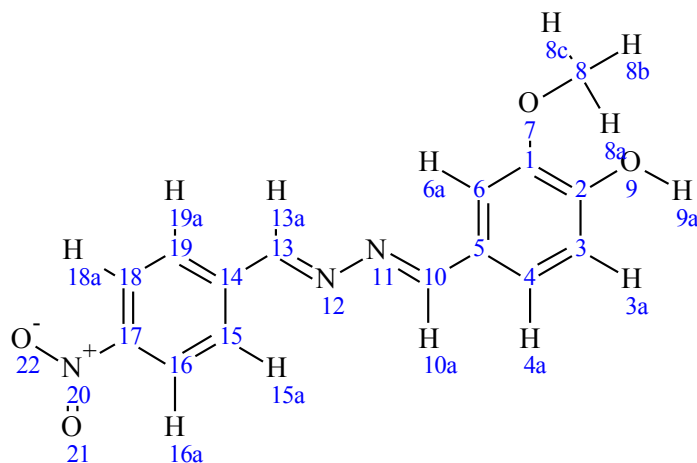


Figura 42: Espectro de massas do composto 23



**(7E, 8E) -2- (3-metoxi-4-hidroxi-benzilideno) -1- (4-nitro benzilideno)-
hidrazina**



Fórmula molecular: C₁₅H₁₃N₃O₄

Coloração: amarelo claro

Pureza (CG-MS): 100 %

Dados espectroscópicos:

RMN de ¹H: (500 MHz, CDCl₃): δ 3,98 (s, 3H – 8); δ 6,09 (s, 1H - 9), δ 7,00 (d, 1H - 6); δ 7,27 (d, 1H – 4); δ 7,54 (d, 1H – 3); δ 8,00 (d, 2H – 15 e 19); δ 8,30 (d, 2H – 16 e 18); δ 8,60 (s, 1H - 13); δ 8,68 (s, 1H - 10)

RMN de ¹³C: (CDCl₃): δ 56,58 (C – 8); δ 115,30 (C- 6); δ 123,90 (C - 4); δ 108,86 (C - 3); δ 128,91 (C – 15 e 19); δ 123,90 (C -16 e 18); δ 163,90 (C – 13); δ 158,27 (C -10).

IV (4000 – 500 cm⁻¹): (NO₂) 510 e 1345; (Py) 1460 e 750; (C = N) 1600.

EM (m/z): [M⁺] = 299 Pico base = 299

Figura 43: Espectro de RMN ^1H composto 24 (CDCl_3 , 500 MHz)

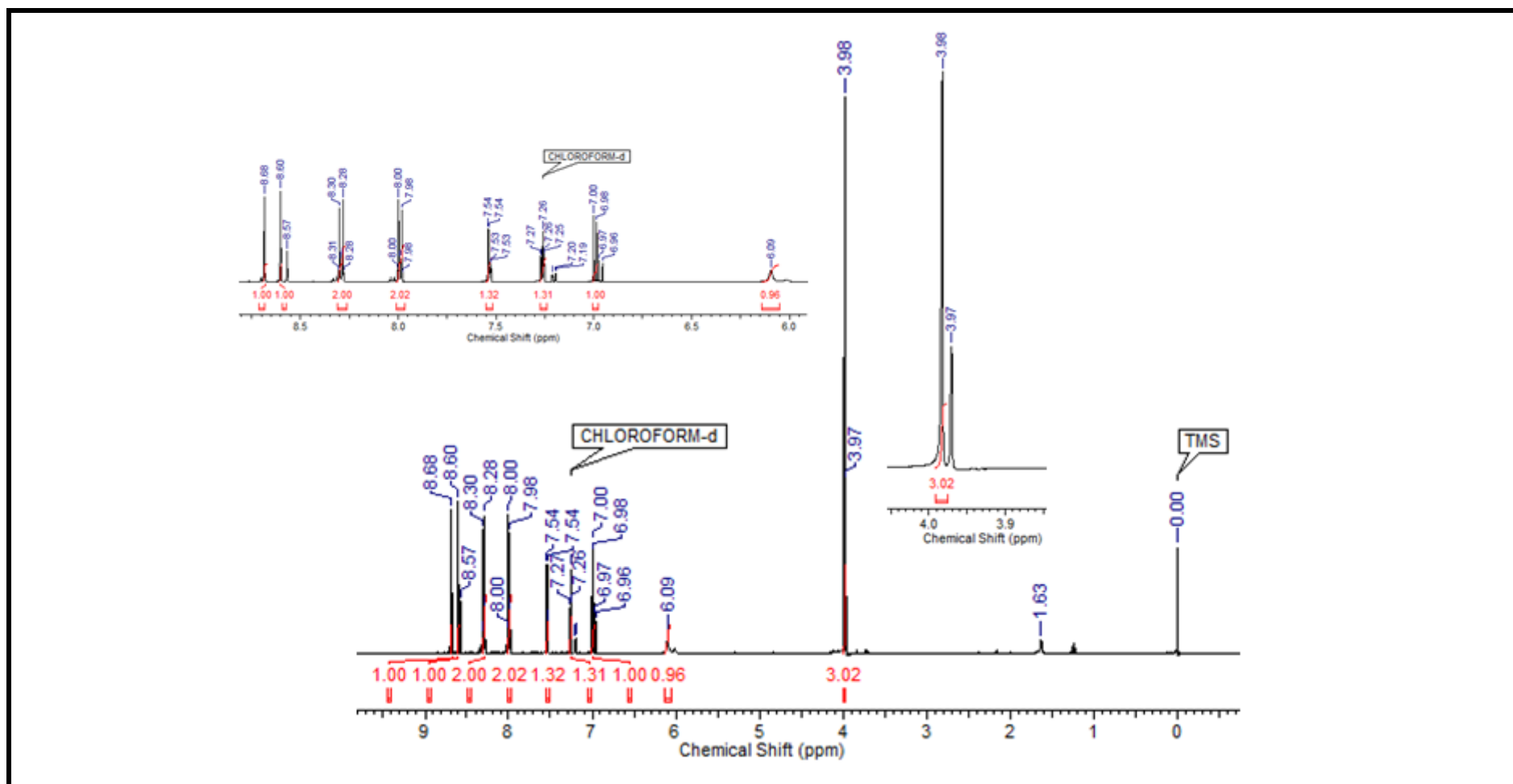


Figura 44: Espectro de RMN ^{13}C composto 24 (2D - HMBC)

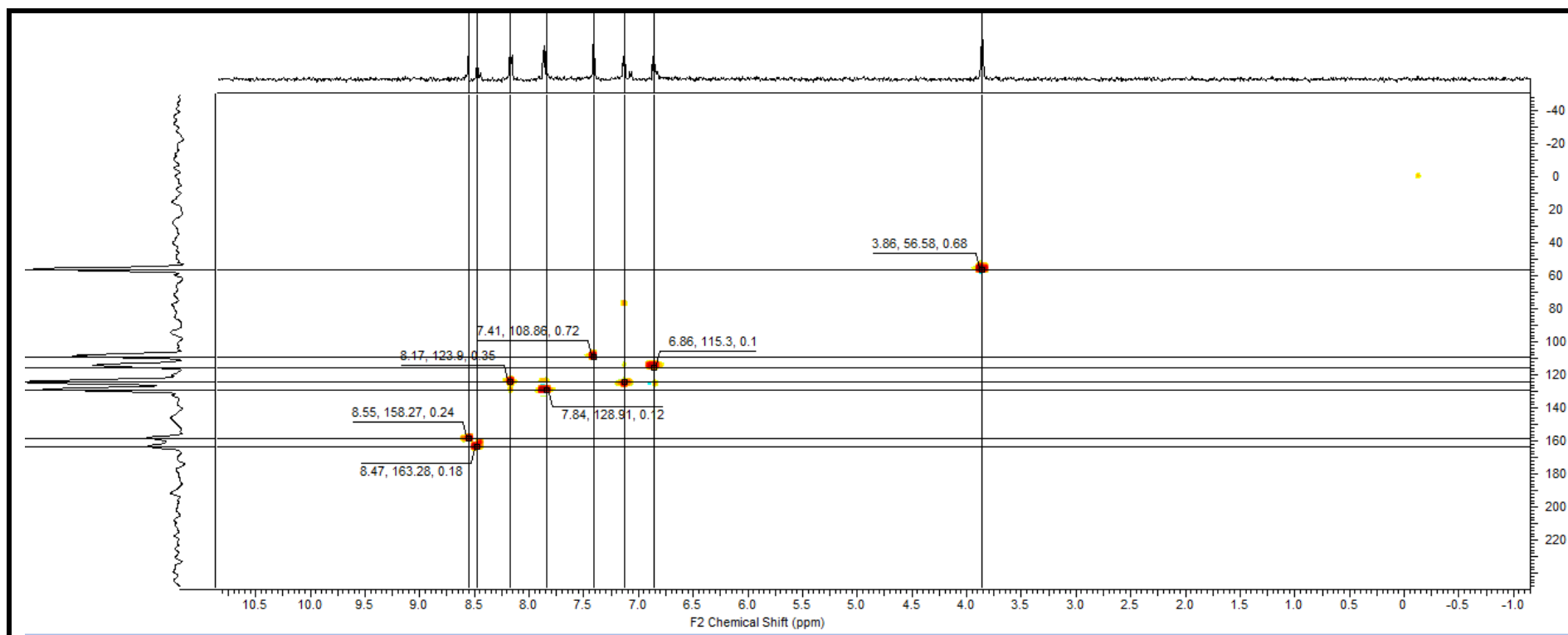


Figura 45: Espectro na região do IV do composto 24 (4000 - 500 cm^{-1}).

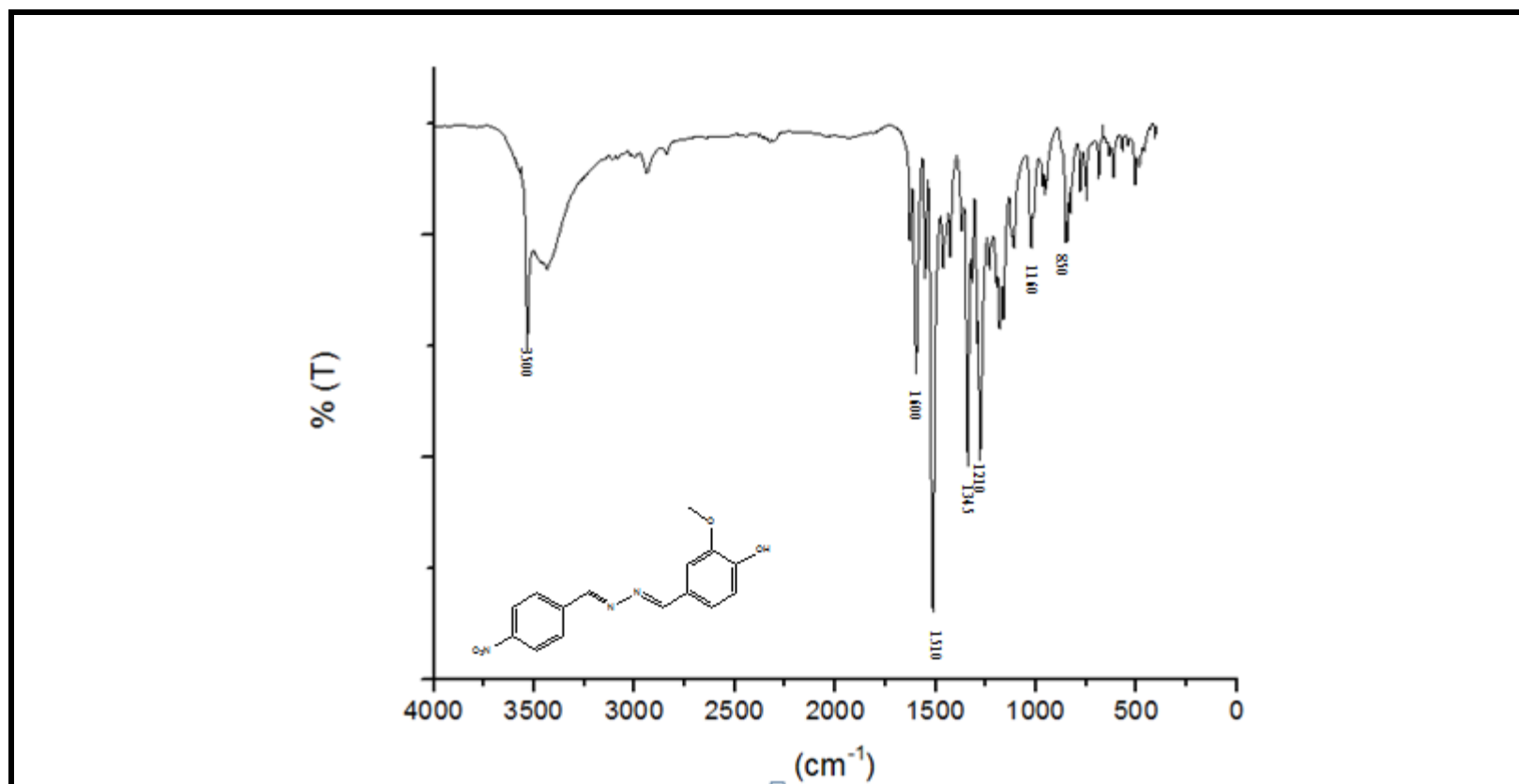
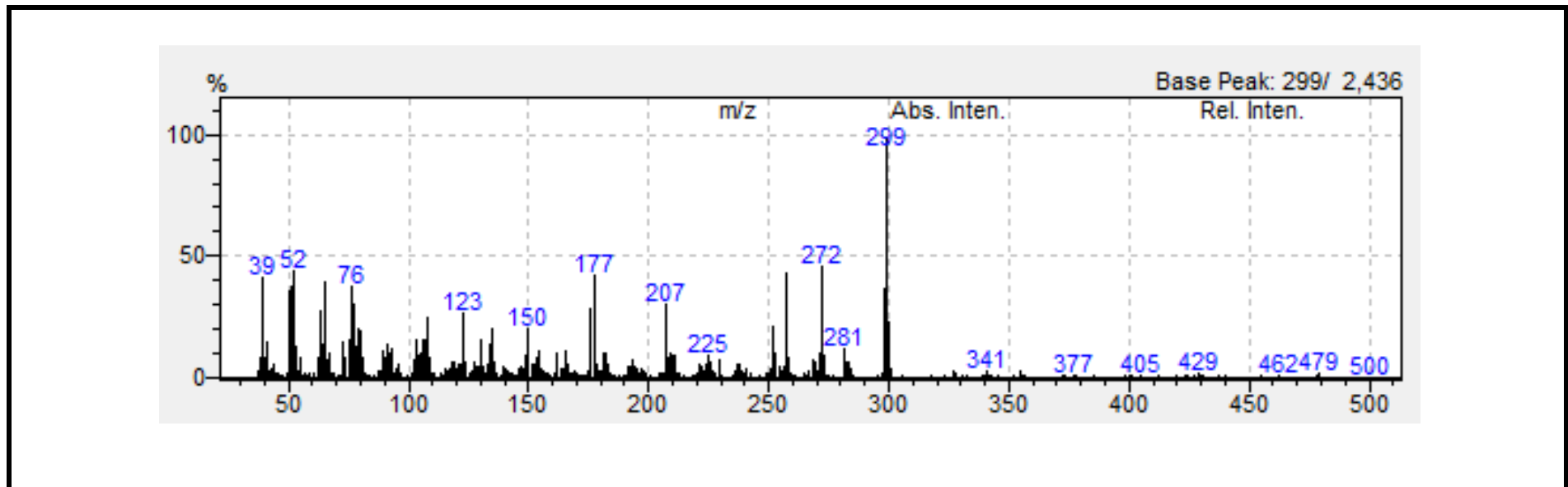
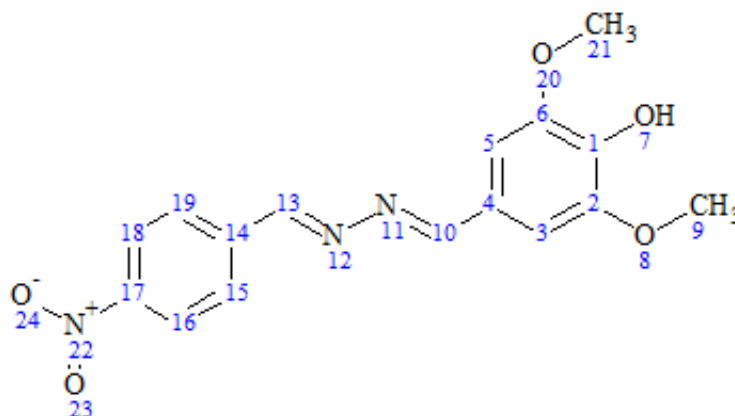


Figura 46: Espectro de massas do composto 24



(7E,8E) – 2- (3,5 dimetóxi benzilideno) – 1 – (4- nitrobenzilideno) hidrazina



Fórmula molecular: C₁₆H₁₅N₃O₄

Coloração: amarelo escuro

Dados espectroscópicos:

RMN de ¹H: (500 MHz, CDCl₃): δ 3,98 (s, 6H – 9 e 21); δ 5,98 (s, 1H - 7), δ 7,10 (d, 2H – 15 e 19); δ 8,01 (d, 2H – 16 e 18); δ 8,31 (d, 2H – 3 e 5); δ 8,56 (d, 1H – 10); δ 8,59 (d, 1H – 13).

RMN de ¹³C: (CDCl₃): δ 71,46 (C – 21); δ 56,55 (C- 9); δ 105,34 (C – 15 e 19); δ 128,94 (C -16 e 18); δ 124,15 (C – 3 e 5); δ 161,38 (C - 10); δ 8,62 (C - 13).

IV (4000 – 500 cm⁻¹): (NO₂) 1520 e 1340; (C - O) 1210 e 1260; (C = N) 1600; (OH) 3500

Figura 47: Espectro de RMN ^1H composto 25 (CDCl_3 , 500 MHz)

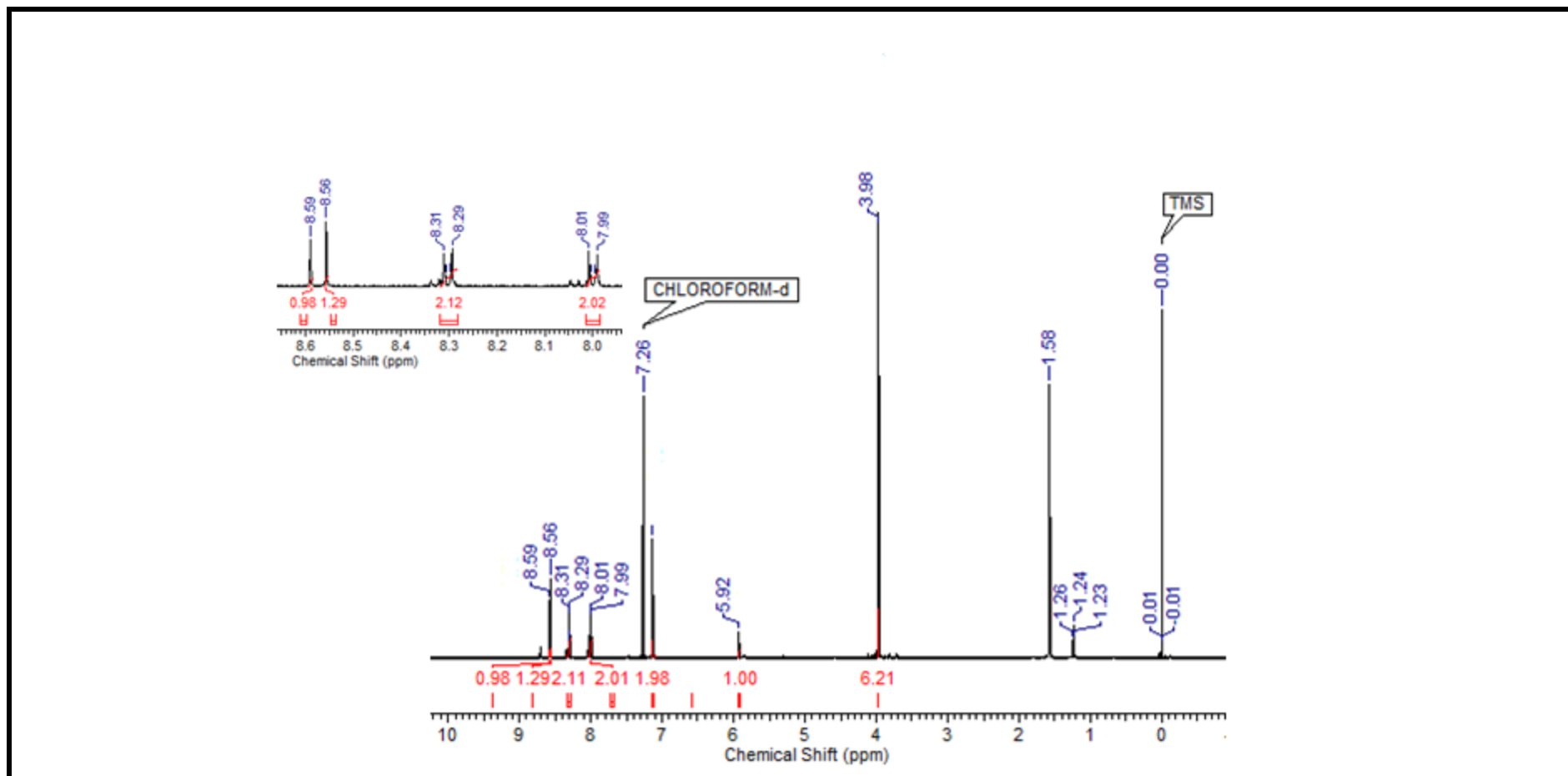


Figura 48: Espectro de RMN ^{13}C composto 25 (HMBC)

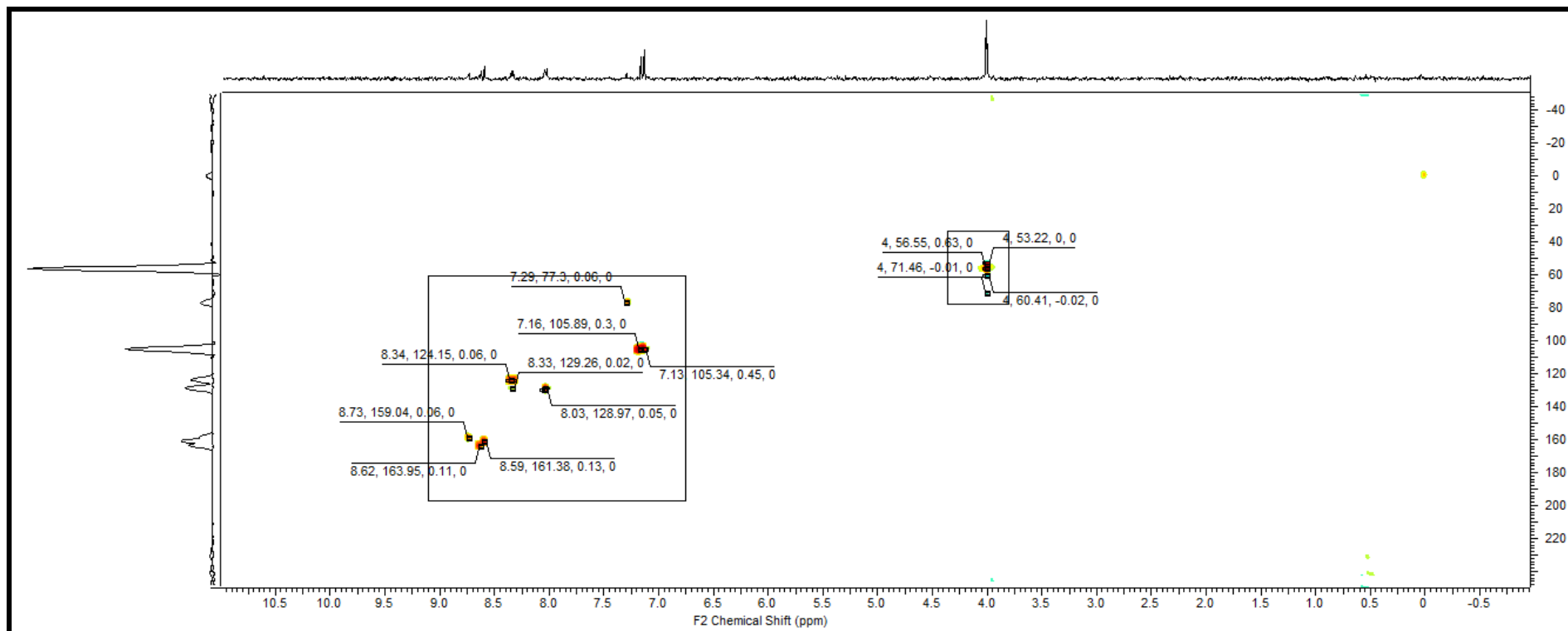


Figura 49: Espectro na região do IV do composto 25 ($4000 - 500 \text{ cm}^{-1}$).

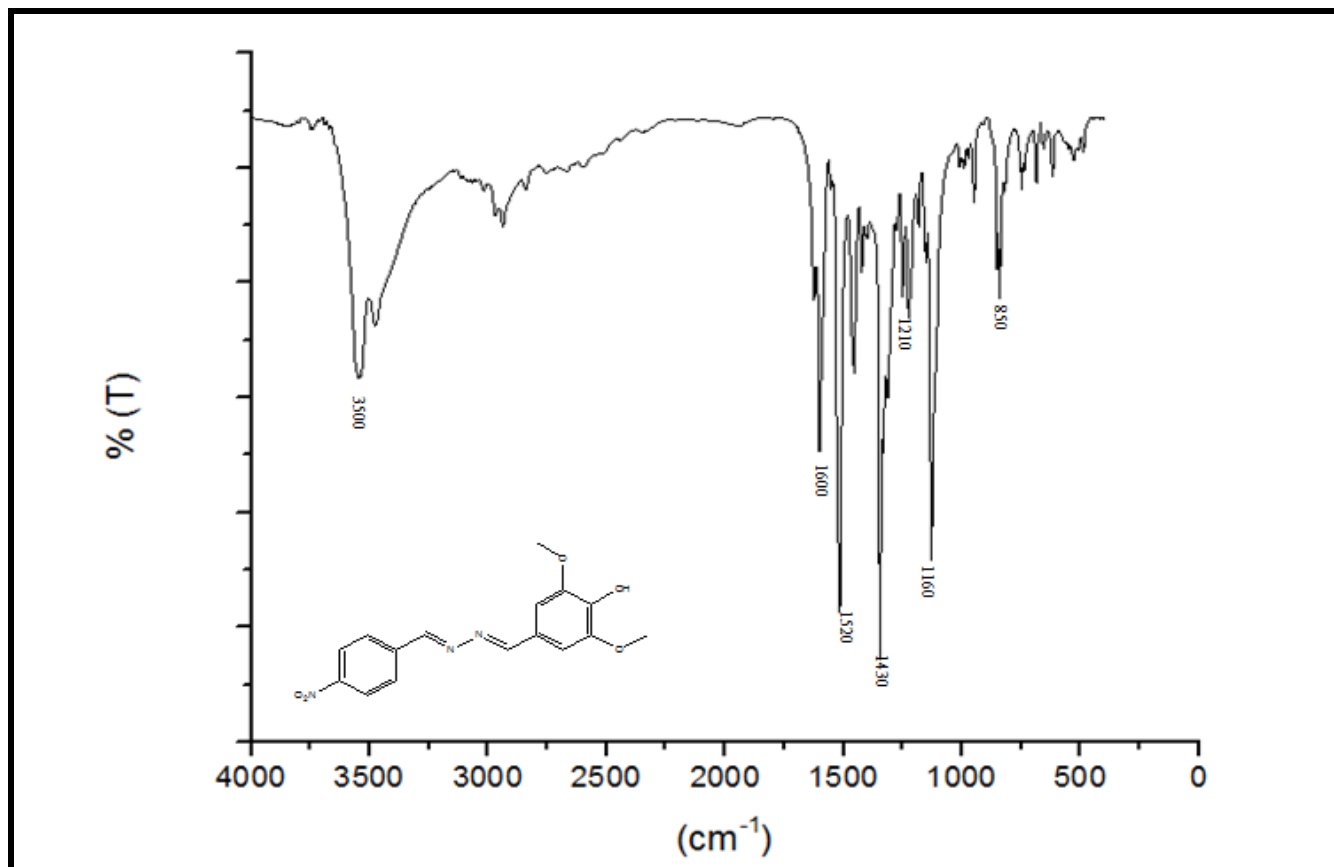


Figura 50: Espectro de RMN ^1H composto 26 (CDCl_3 , 500 MHz)

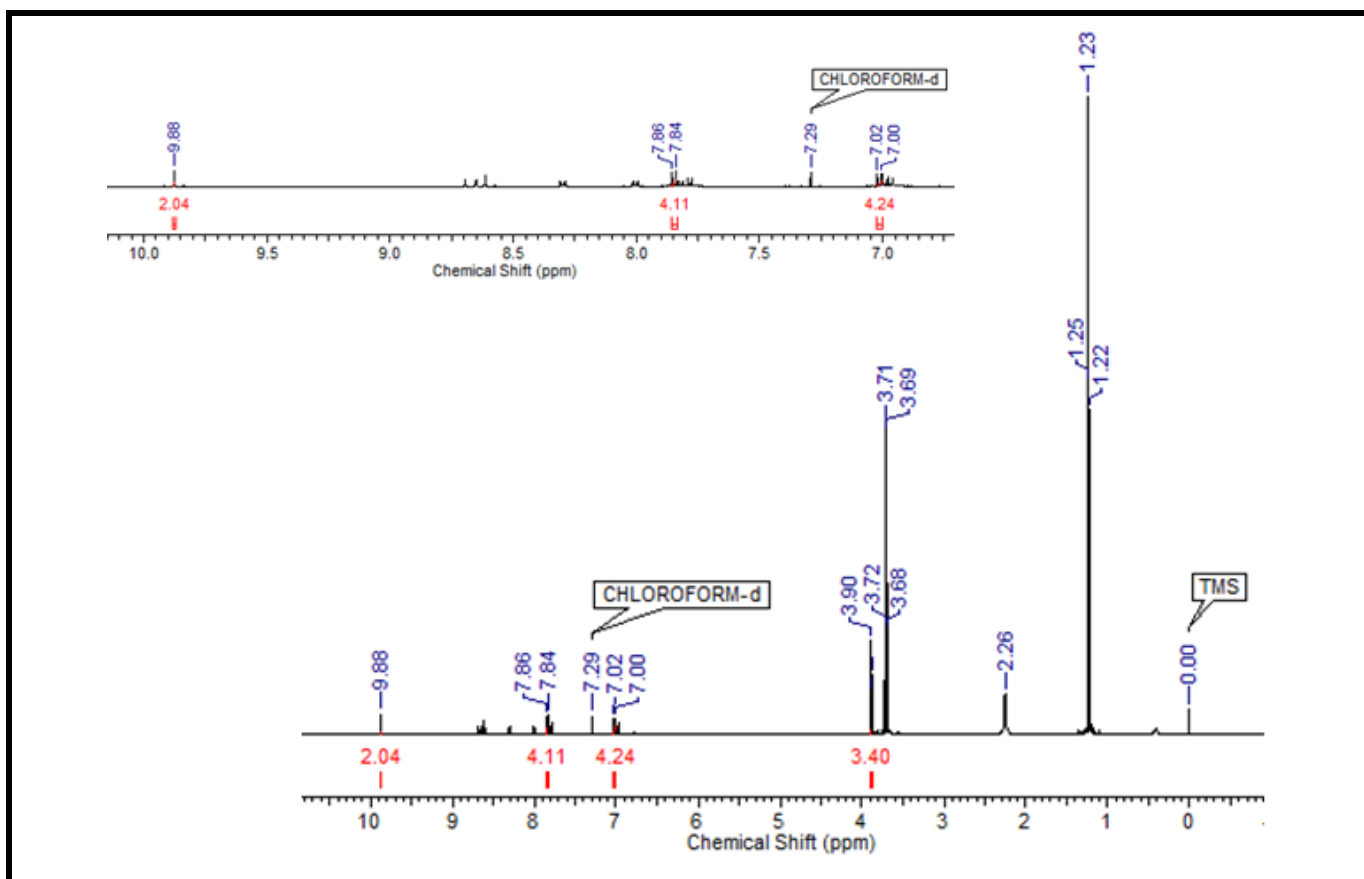


Figura 51: Espectro de RMN ^{13}C composto 26 (HMBC)

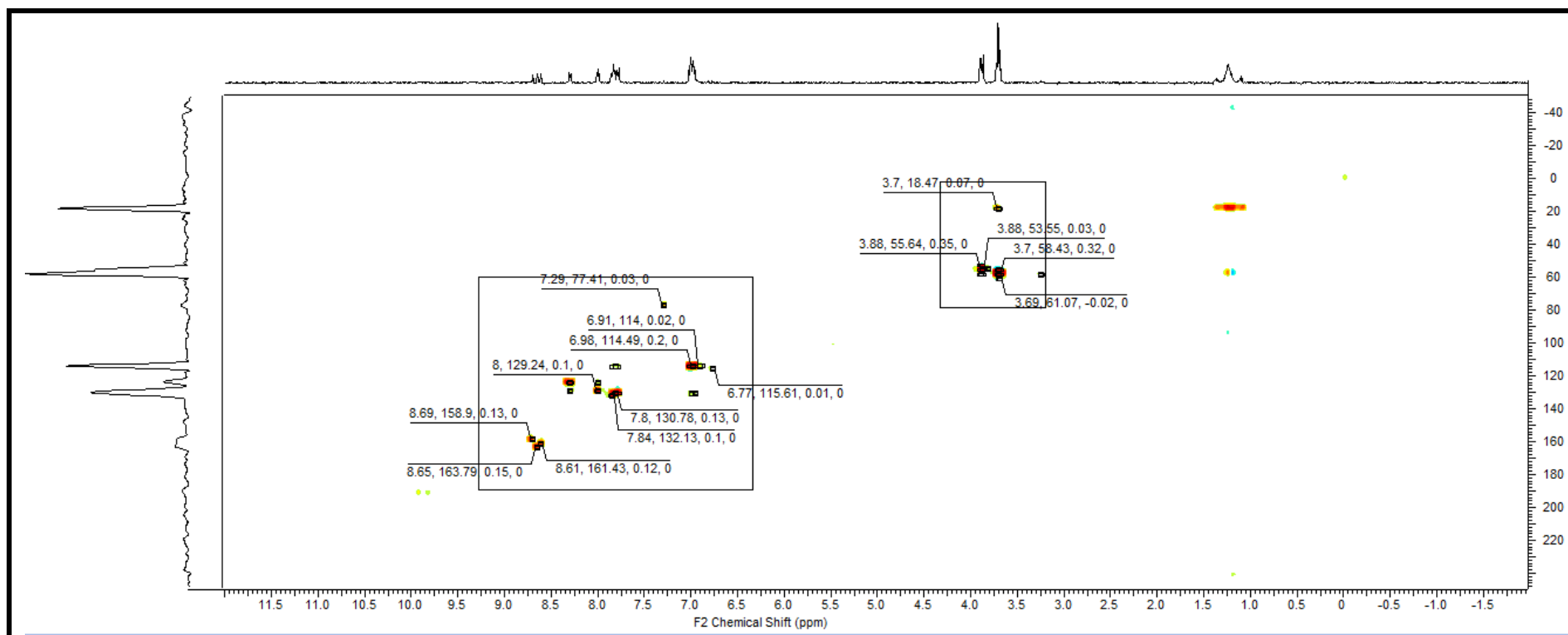


Figura 52: Espectro na região do IV do composto 26 ($4000 - 500 \text{ cm}^{-1}$).

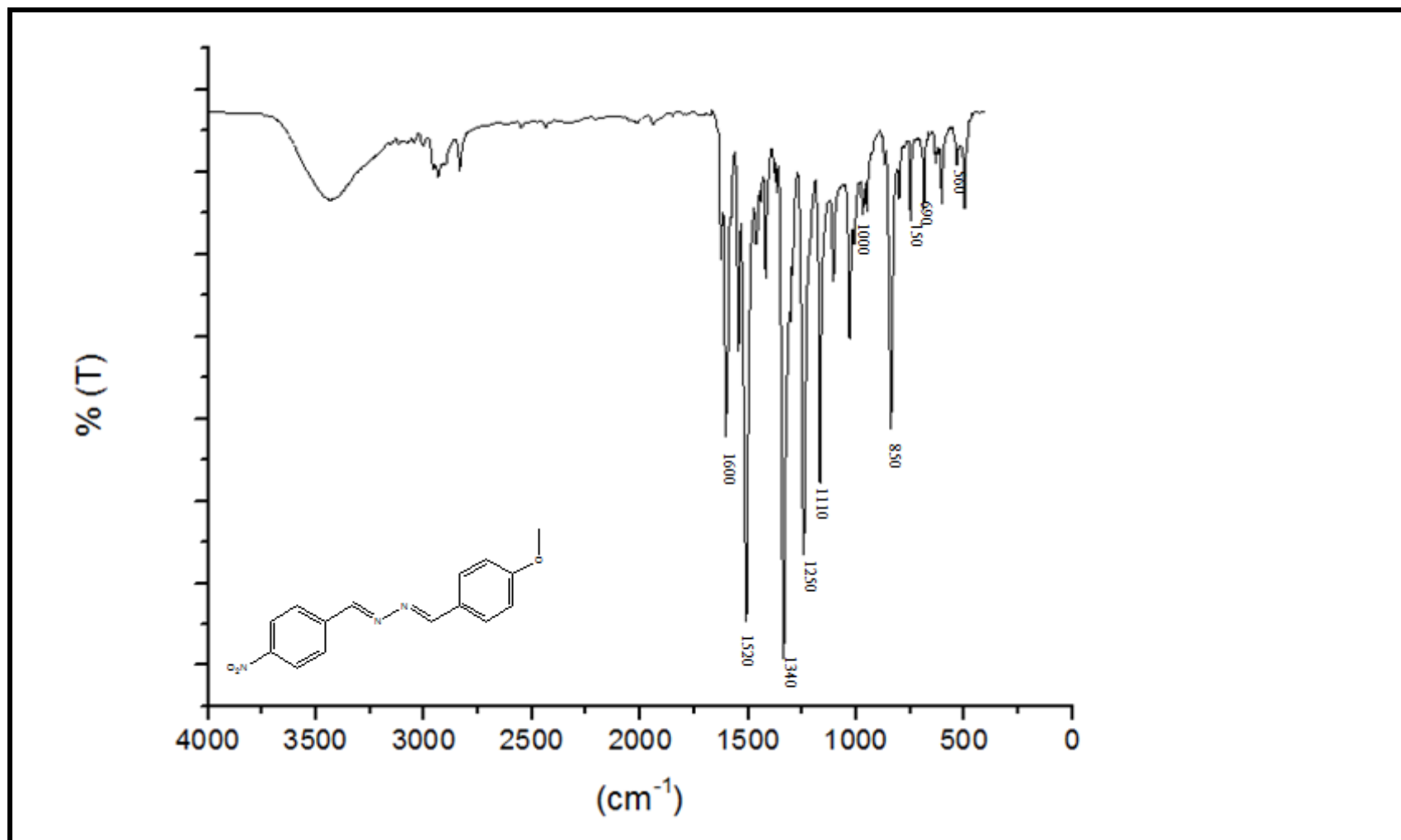
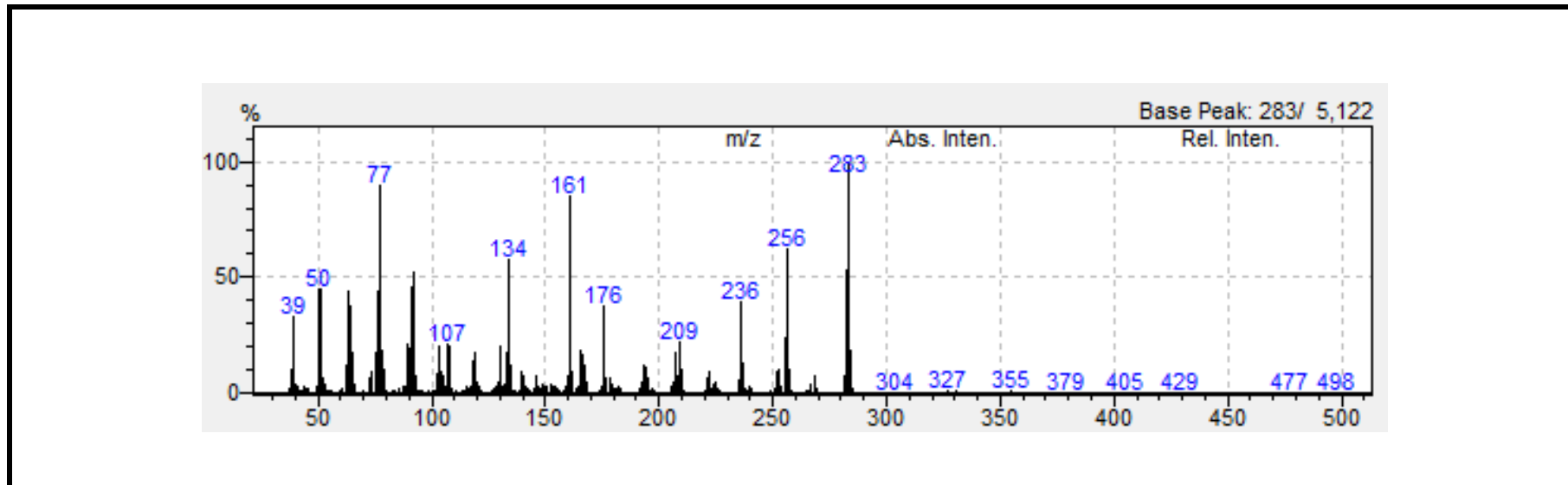
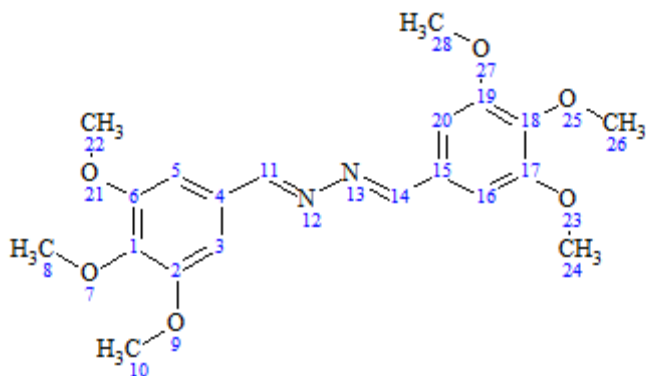


Figura 53: Espectro de massas do composto 26

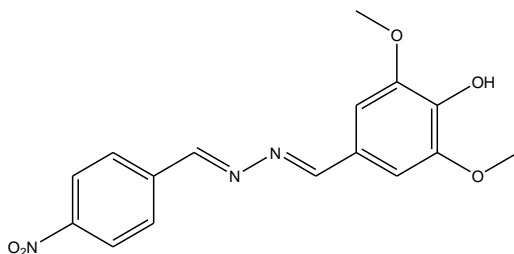


1,2 – Bis (3,4,5 trimetóxi benzilideno) hidrazina

Obtido:



Esperado:



Fórmula molecular esperada: $C_{15}H_{13}N_3O_4$

Coloração: amarelo claro

Pureza (CG-MS): 65,46 %

Dados espectroscópicos:

RMN de 1H : (500 MHz, $CDCl_3$): δ 3,92 (s, 6H – 8 e 26); δ 3,94 (s, 12H – 12, 22, 24 e 28), δ 7,09 (s, 4H – 3, 5, 16 e 20); δ 8,57 (s, 2H – 11 e 14)

RMN de ^{13}C : ($CDCl_3$): δ 60,99 (C – 8); δ 64,83 (C- 26); δ 59,88 (C - 24); δ 53,12 (C - 22); δ 56,27 (C – 28); δ 39,10 (C - 12); δ 105,62 (C- 3 e 5); δ 129,76 (C – 16 e 20); δ 161,64 (C – 11 e 14).

IV (4000 – 500 cm^{-1}): (NO_2) 1520 e 1340; (O – C) 1250 e 1100; (C = N) 1600.

EM (m/z): $[M^+] = 343$ Pico base = 343

Figura 54: Espectro de RMN ^1H composto 27 (CDCl_3 , 500 MHz)

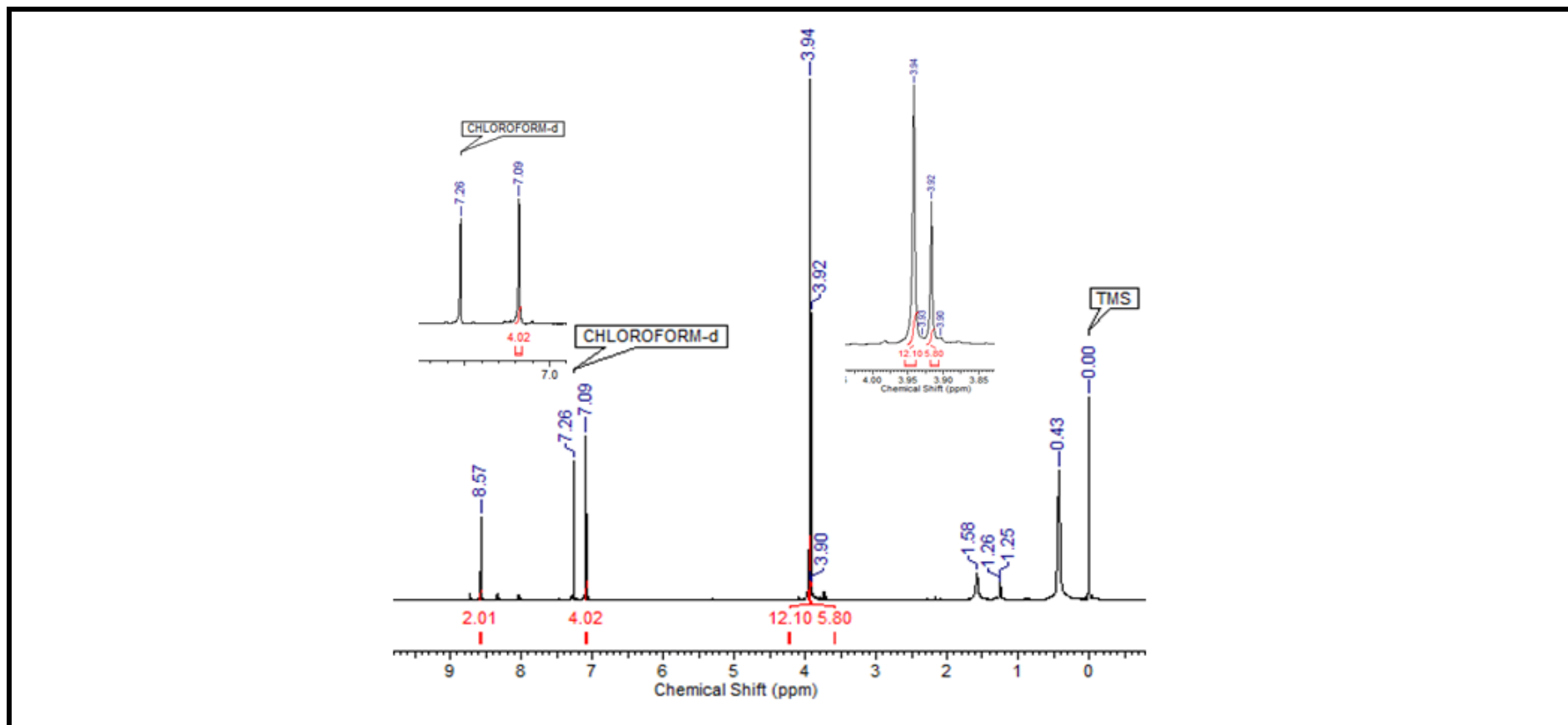


Figura 55: Espectro de RMN ^{13}C composto 27 (HMBC)

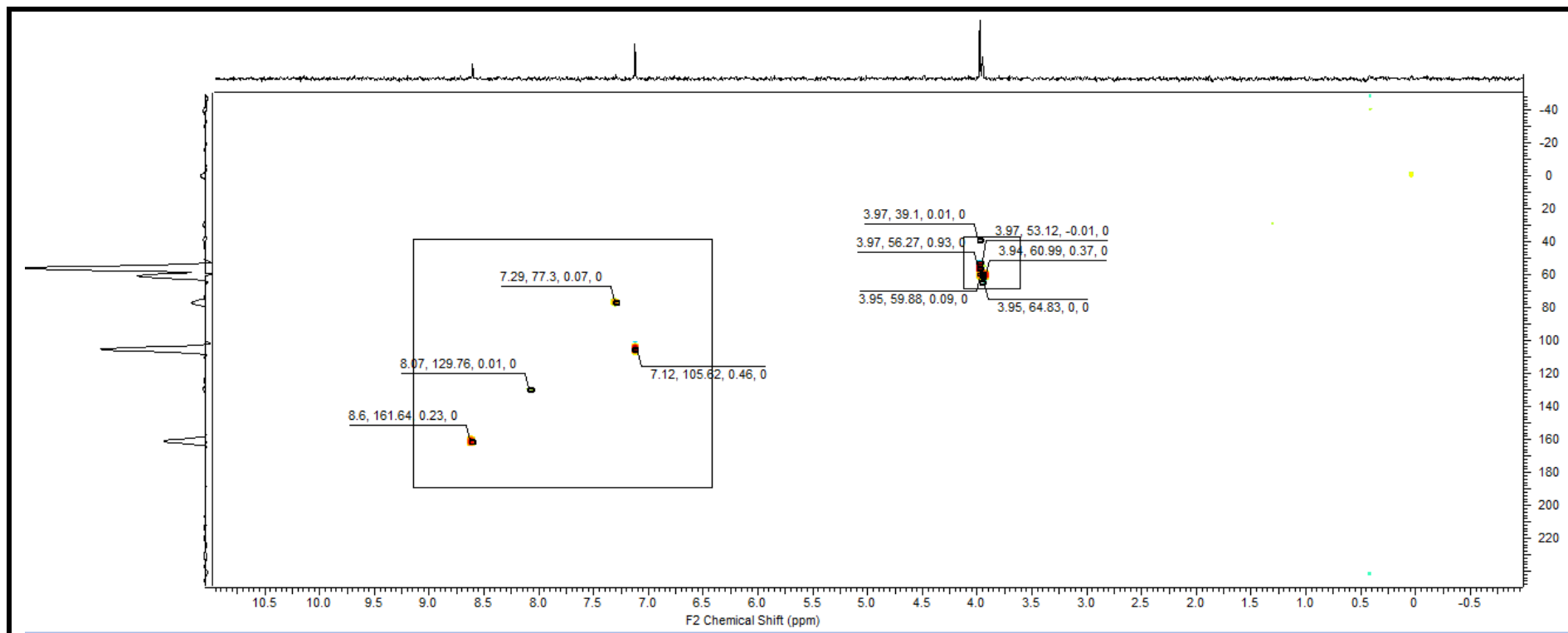


Figura 56: Espectro na região do IV do composto 27 ($4000 - 500 \text{ cm}^{-1}$).

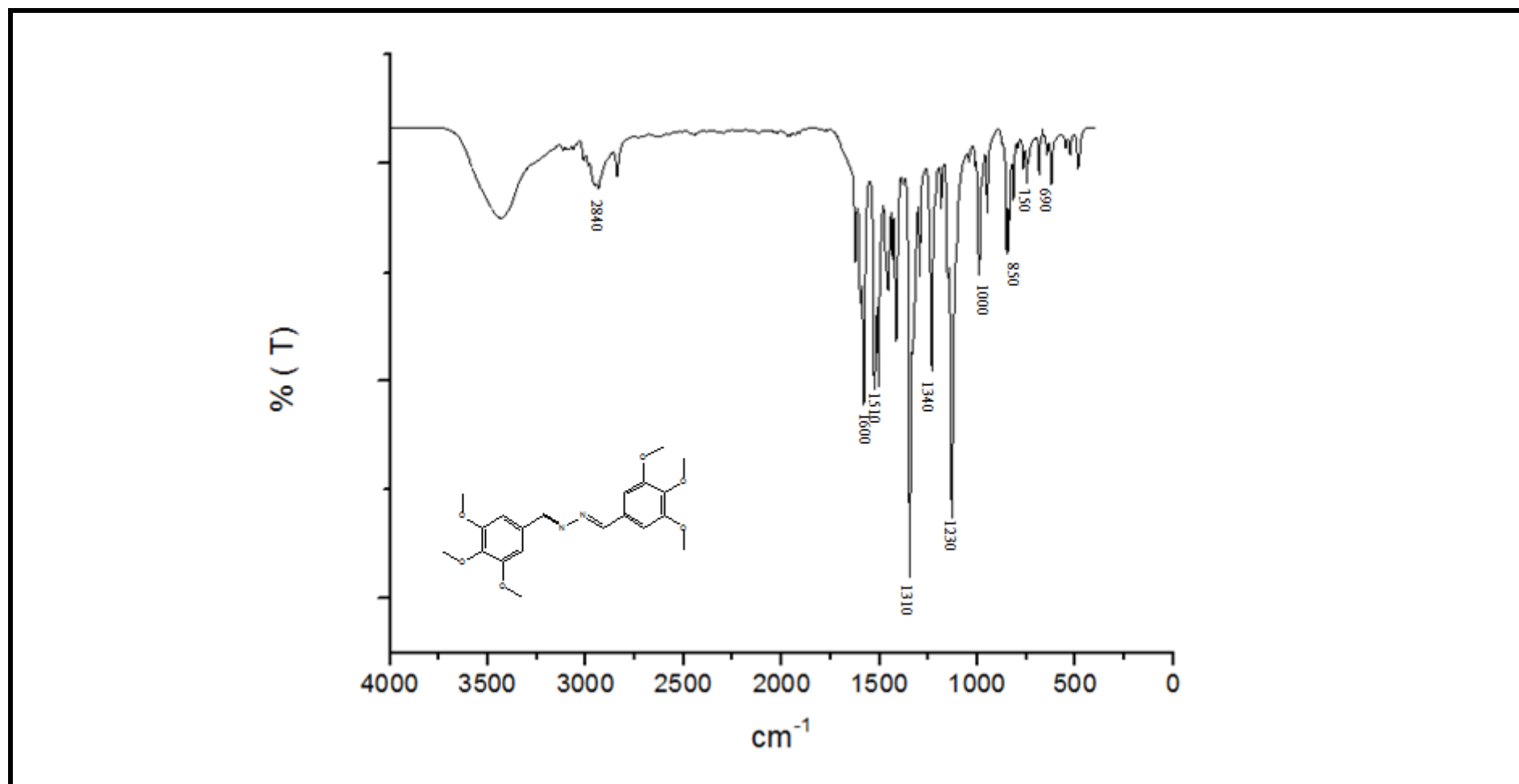
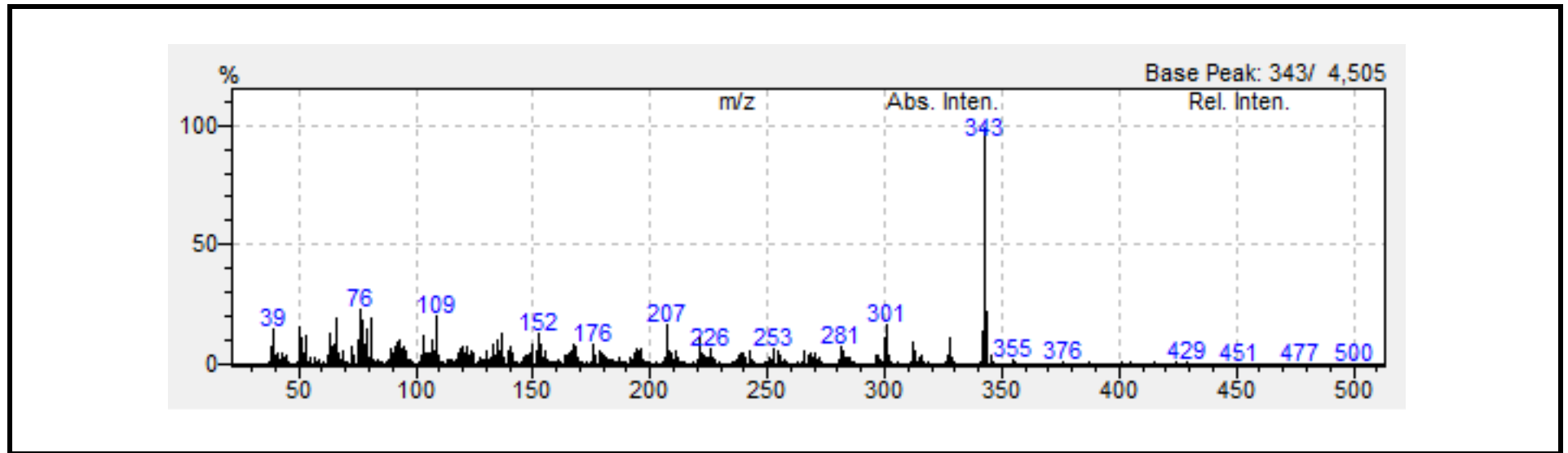
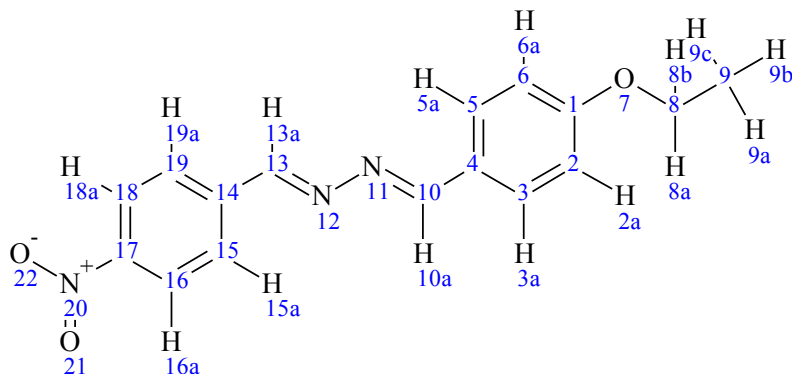


Figura 57: Espectro de massas do composto 27



(7E,8E) – 2 – (4 – etóxi benzilideno) – 1 – (4- nitrobenzilideno) hidrazina



Fórmula molecular: $C_{16}H_{15}N_3O_3$

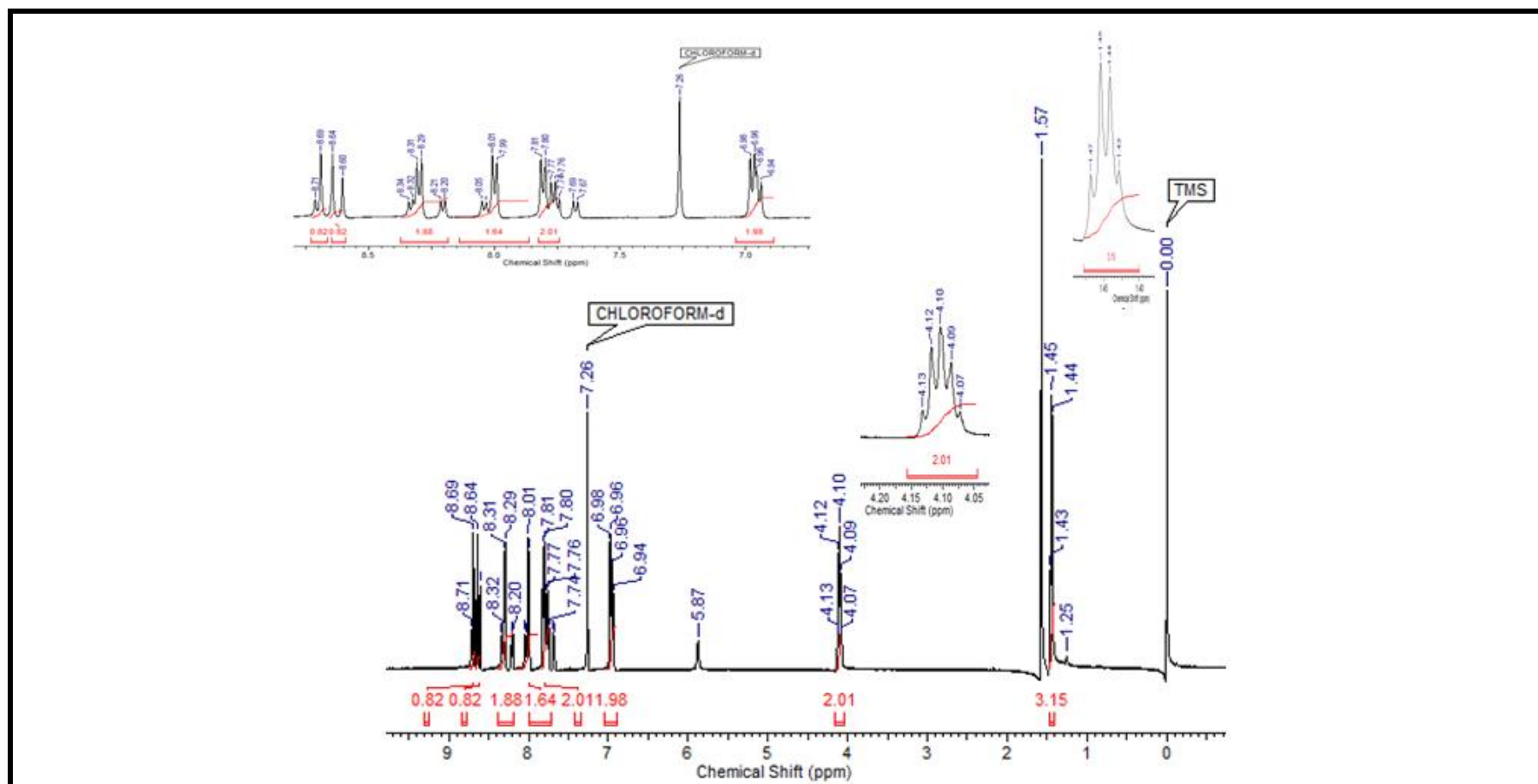
Coloração: amarelo claro

Dados espectroscópicos:

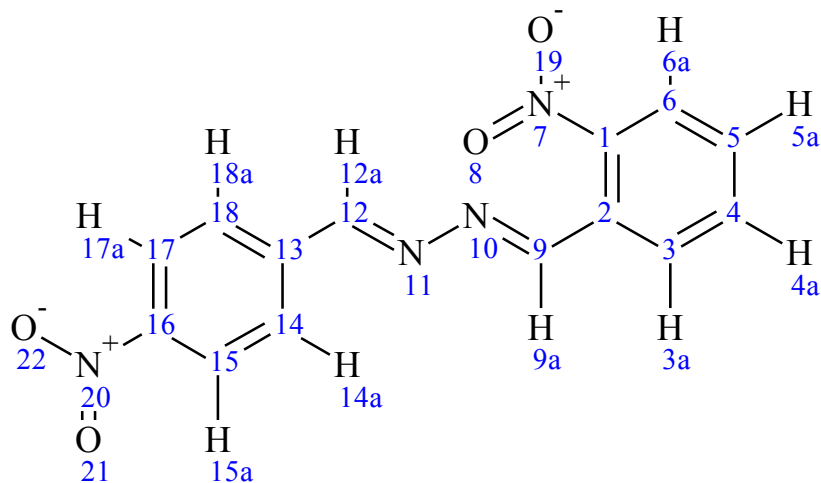
RMN de 1H : (500 MHz, $CDCl_3$): δ 1,45 (t, 3H – 9); δ 6,98 (q, 2H – 8), δ 6,98 (d, 2H – 2 e 6); δ 7,80 (d, 2H – 3 e 5); δ 8,01 (d, 2H – 15 e 19), δ 8,29 (d, 2H – 18 e 16); δ 8,60 (s, 1H – 10); δ 8,69 (s, 1H - 13).

IV (4000 – 500 cm^{-1}): (NO_2) 1520 e 1340 cm^{-1} ; (C = N) 1600 cm^{-1} , (O - C) 1250 cm^{-1} e 1100 cm^{-1}

Figura 58: Espectro de RMN ^1H composto 28 (CDCl_3 , 500 MHz)



**(7E,8E) – 2 – (2 – Nitrobenzilideno) – 1 – (4- nitrobenzilideno)
hidrazina**



Fórmula molecular: $C_{14}H_{10}N_4O_2$

Coloração: amarelo claro

Dados espectroscópicos:

RMN de 1H : (500 MHz, $CDCl_3$): δ 7,67 (d, 1H – 4); δ 7,74 (t, 1H – 5), δ 8,05 (d, 2H – 18 e 14); δ 8,11 (d, 1H – 3); δ 8,34 (d, 2H – 17 e 15), δ 8,67 (s, 1H - 12); δ 9,11 (s, 1H – 9).

RMN de ^{13}C : ($CDCl_3$): δ 131,54 (C – 4); δ 133,21 (C- 5); δ 129,55 (C – 14 e 18); δ 124,96 (C – 3); δ 129,59 (C – 6), δ 124,12 (C – 15 e 17); 159,45 (C – 9 e 12).

IV (4000 – 500 cm^{-1}): (NO_2) 1520 e 1340 cm^{-1} ; (C = N) 1600 cm^{-1} .

Figura 59: Espectro de RMN ^1H composto 29 (CDCl_3 , 500 MHz)

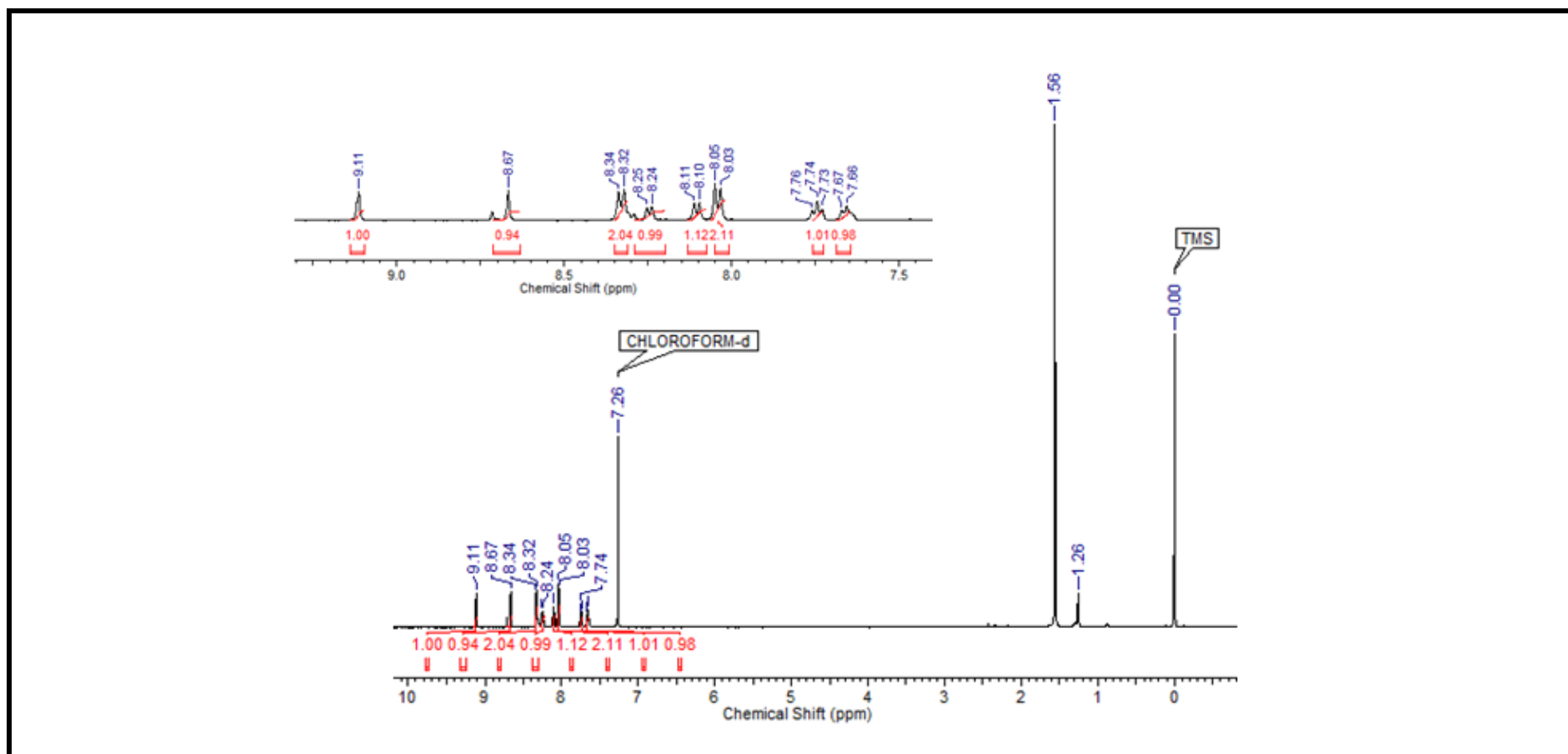
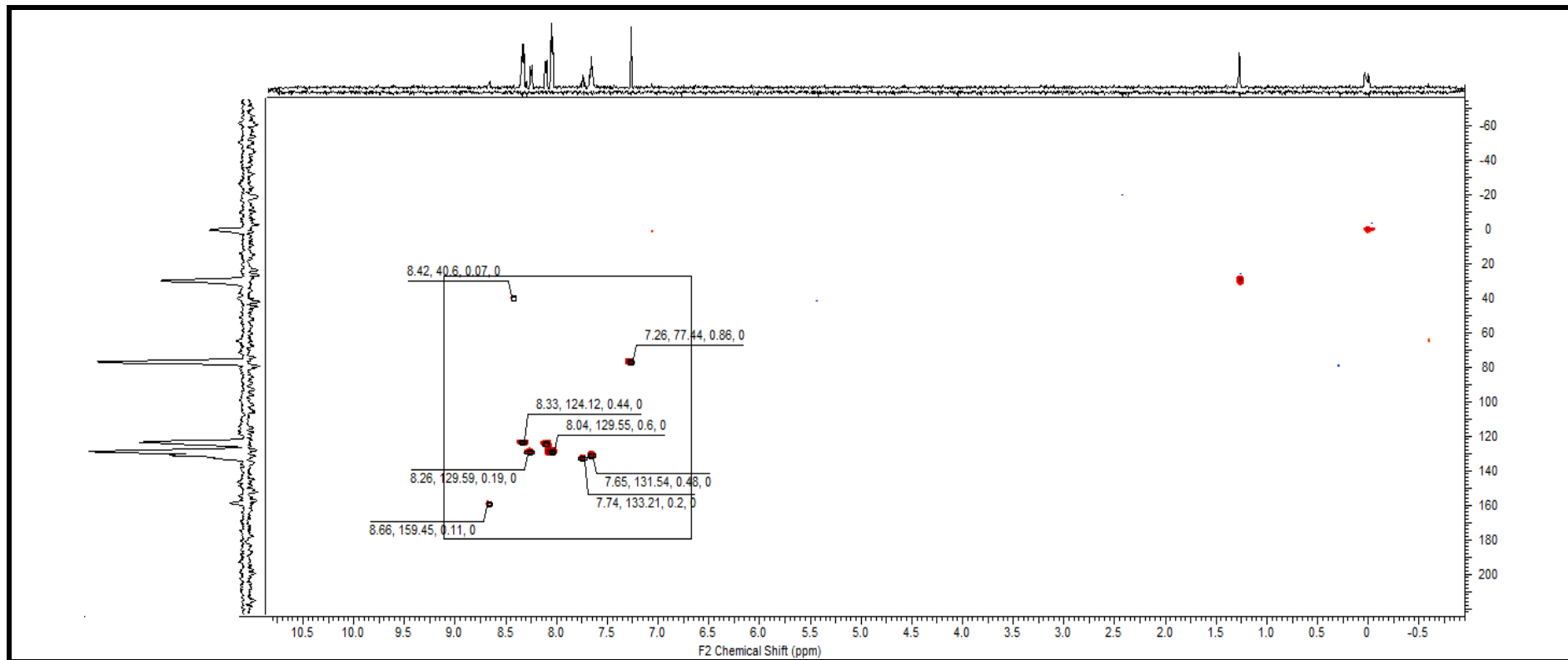
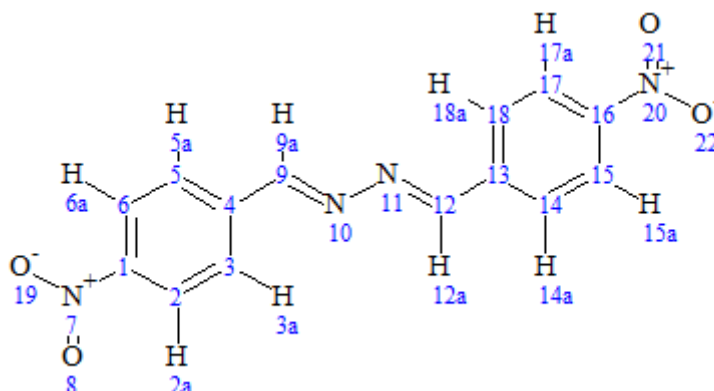


Figura 60: Espectro de RMN ^{13}C composto 29 (HMBC)



1,2 - bis (4 nitrobenzilideno) hidrazina



Fórmula molecular: $C_{14}H_{10}N_4O_2$

Coloração: amarelo claro com brilho

Pureza (CG-MS): 100%

Dados espectroscópicos:

RMN de 1H : (500 MHz, $CDCl_3$): δ 8,05 (d, 4H – 3, 5, 14 e 18); δ 8,34 (d, 4H – 2, 6, 15 e 17), δ 8,71 (s, 2H – 9 e 12)

RMN de ^{13}C : ($CDCl_3$): δ 89,16 (C – 3, 5, 14 e 18); δ 124,38 (C- 2, 6, 15 e 17); δ 129,67 (C – 9 e 12).

IV (4000 – 500 cm^{-1}): (NO_2) 1520 e 1340 cm^{-1} ; (C = N) 1600 cm^{-1} .

EM (m/z): $[M^+] = 298$ Pico base = 176

Figura 61: Espectro de RMN ^1H composto 30 (CDCl_3 , 500 MHz)

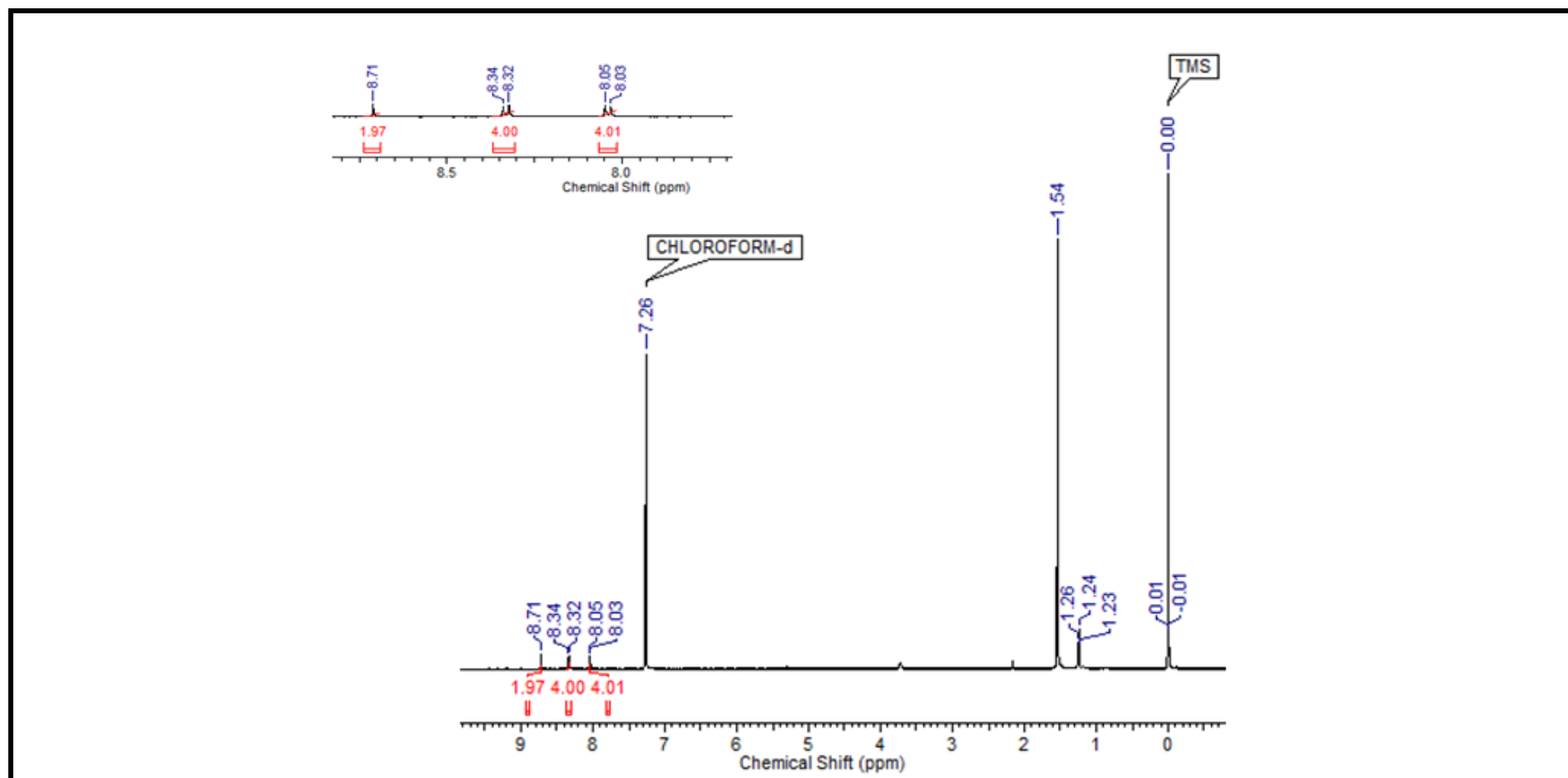


Figura 62: Espectro de RMN ^{13}C composto 30 (HMBC)

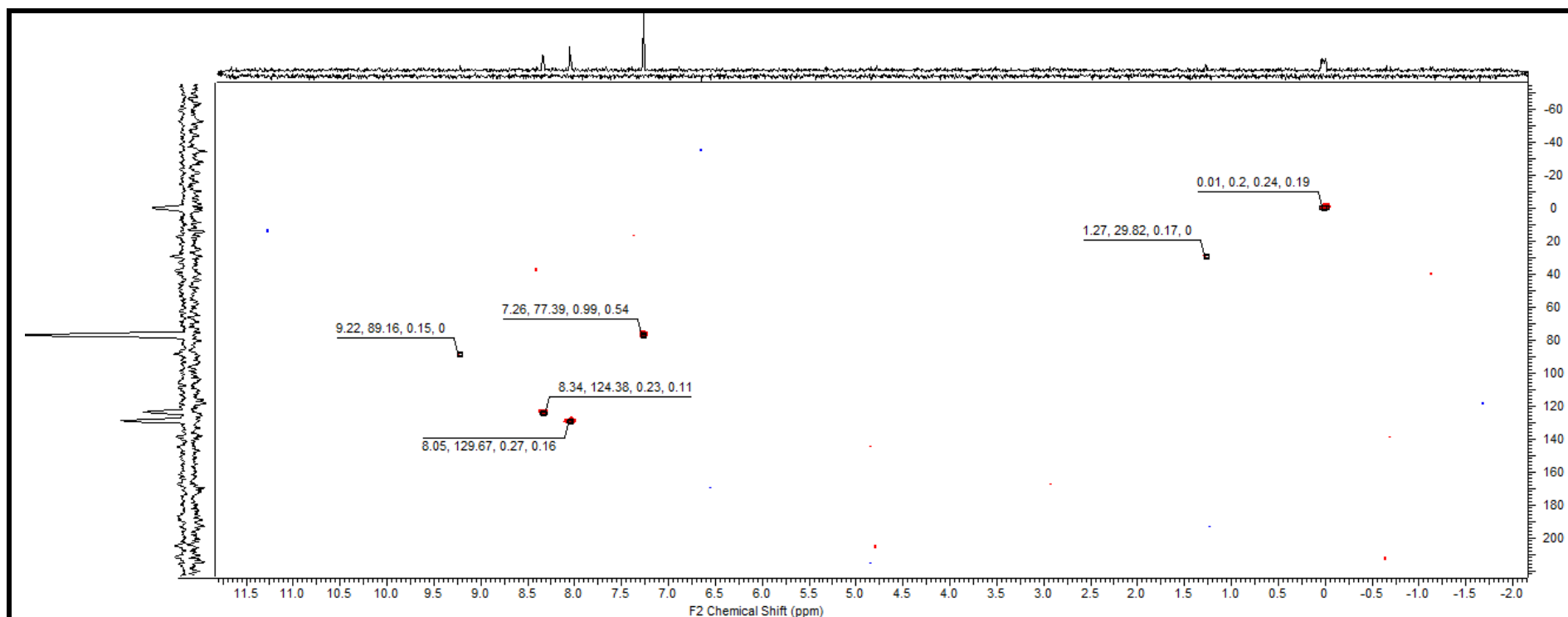


Figura 63: Espectro na região do IV do composto 30 ($4000 - 500 \text{ cm}^{-1}$).

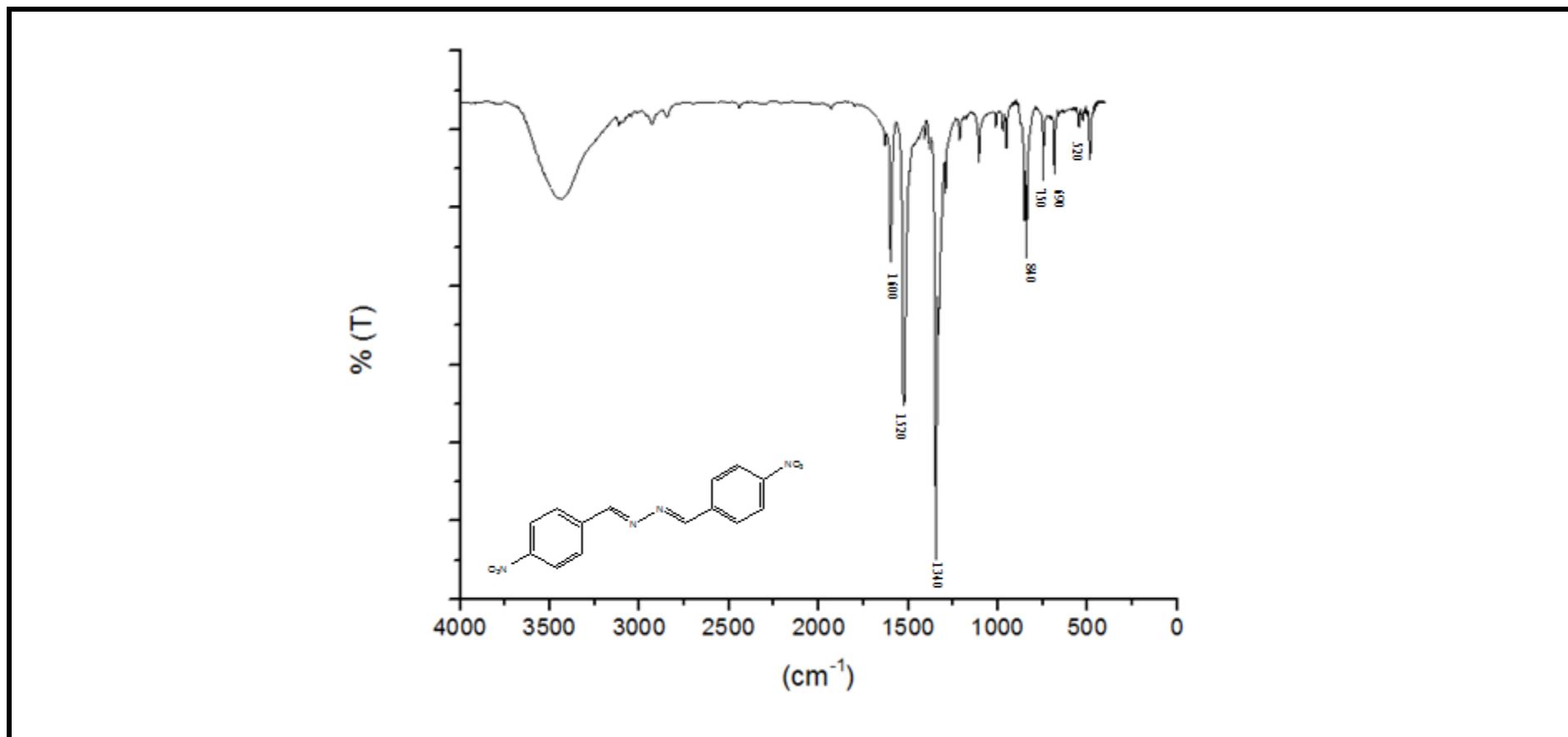
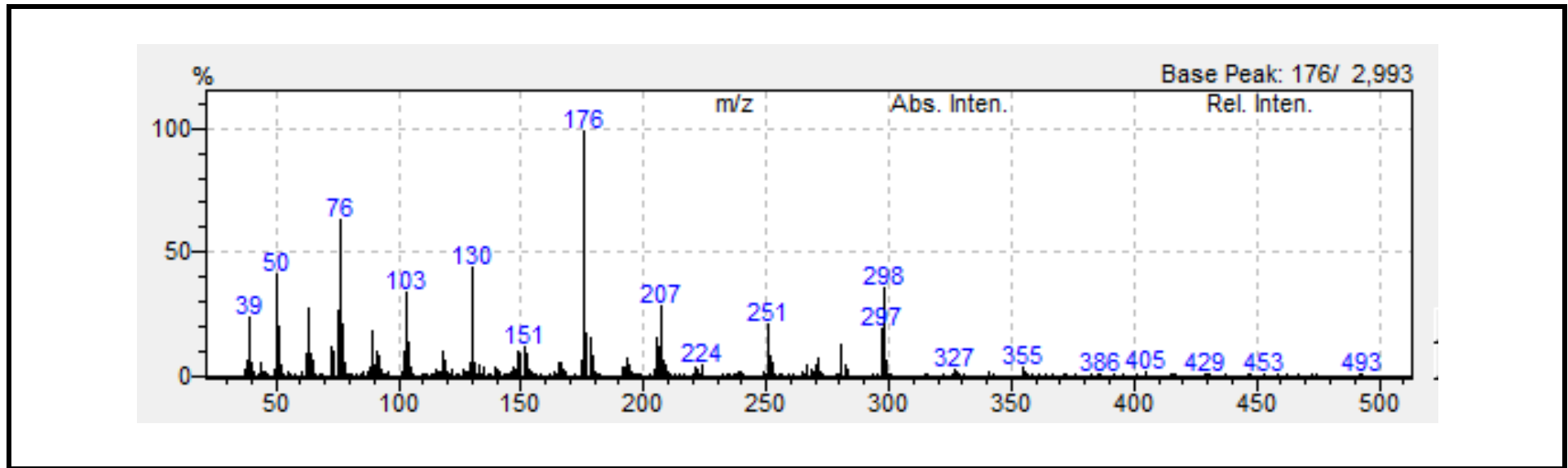
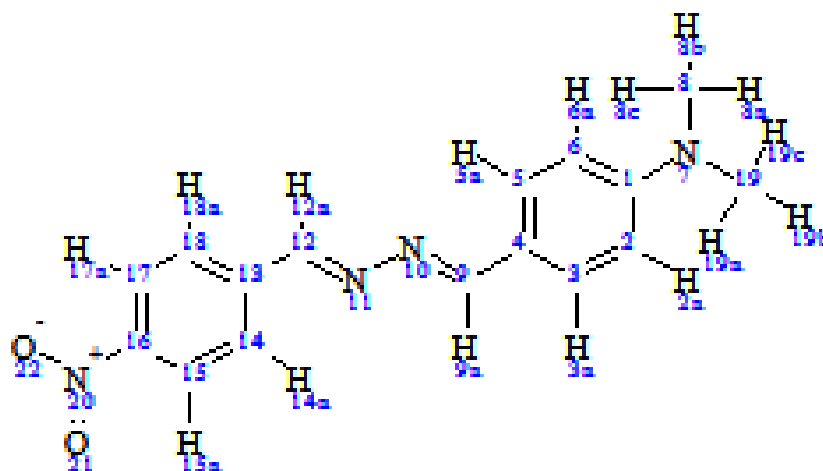


Figura 64: Espectro de massas do composto 30



**(7E, 8E) -1 - (4-nitrobenzilideno) -2 - (4- dimetilamino benzilideno)-
hidrazina**



Fórmula molecular: C₁₆H₁₆N₄O₂

Coloração: marrom

Pureza (CG-MS): 90,47%

Dados espectroscópicos:

RMN de ¹H: (500 MHz, CDCl₃): δ 3,07 (s, 6H – 8 e 19); δ 6,74 (d, 2H – 1 e 3), δ 6,75 (d, 2H – 4 e 6); δ 7,98 (d, 2H – 14 e 18); δ 8,29 (d, 2H – 15 e 17); δ 8,62 (s, 1H – 9); δ 8,68 (s, 1H - 12).

RMN de ¹³C: (CDCl₃): δ 40,22 (C – 8 e 19); δ 111,77 (C- 4 e 6); δ 123,70 (C – 14 e 18); δ 124,00 (C - 15); δ 129,21 (C – 17); δ 129,96 (C - 4); δ 130,89 (C - 6); δ 161,07 (C - 9); δ 164,84 (C- 12).

IV (4000 – 500 cm⁻¹): (NO₂) 1520 e 1340 cm⁻¹; - N (CH₃)₂ 1505 cm⁻¹; (C = N) 1600 cm⁻¹.

EM (m/z): [M⁺] = 296 Pico base = 296

Figura 65: Espectro de RMN ^1H composto 31 (CDCl_3 , 500 MHz)

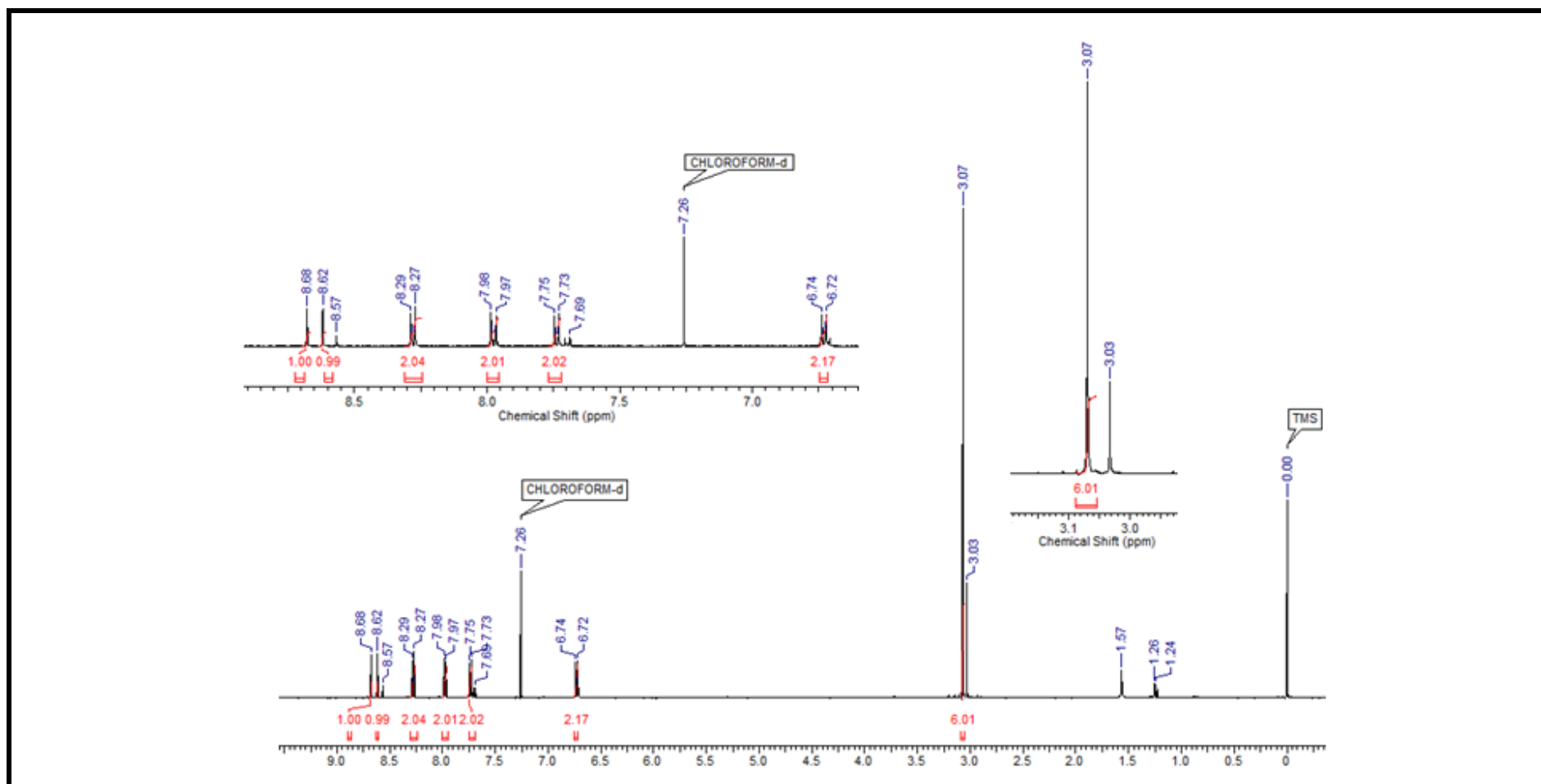


Figura 66: Espectro de RMN ^1H composto 31 (HMBC).

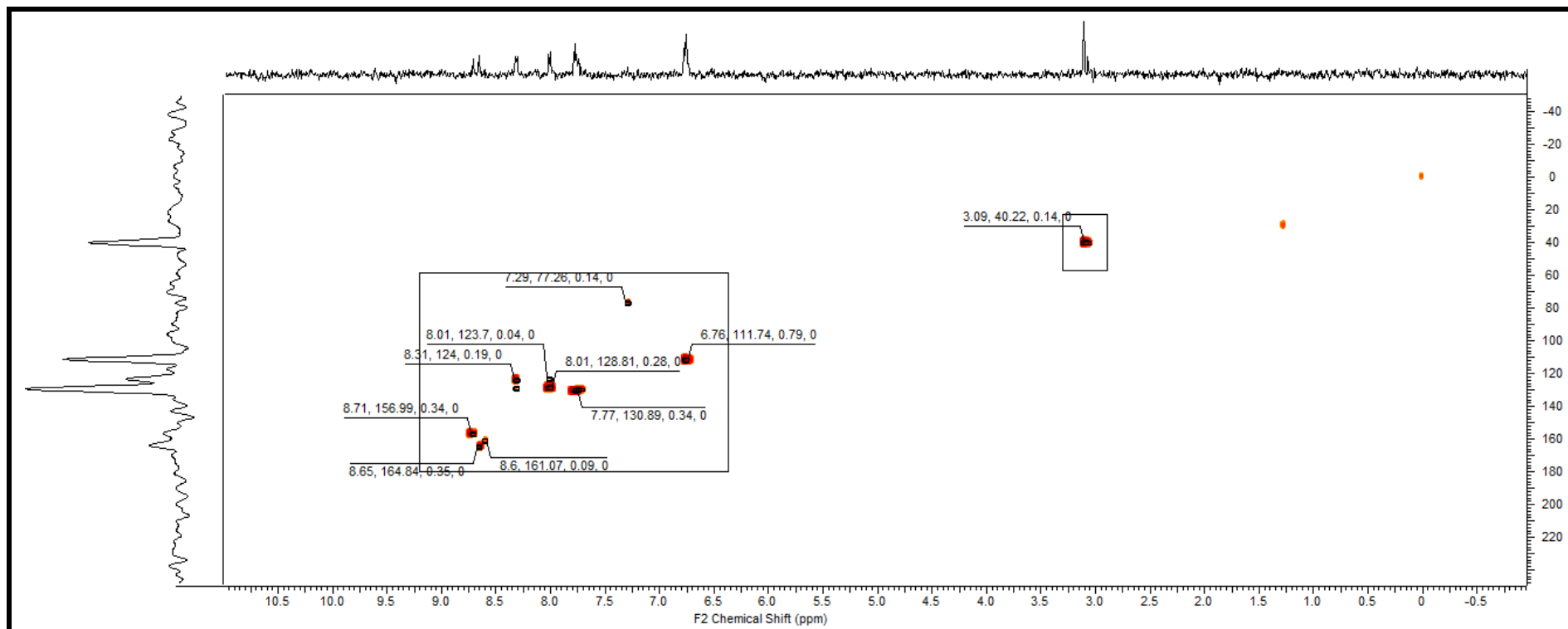


Figura 67: Espectro na região do IV do composto 31 ($4000 - 500 \text{ cm}^{-1}$).

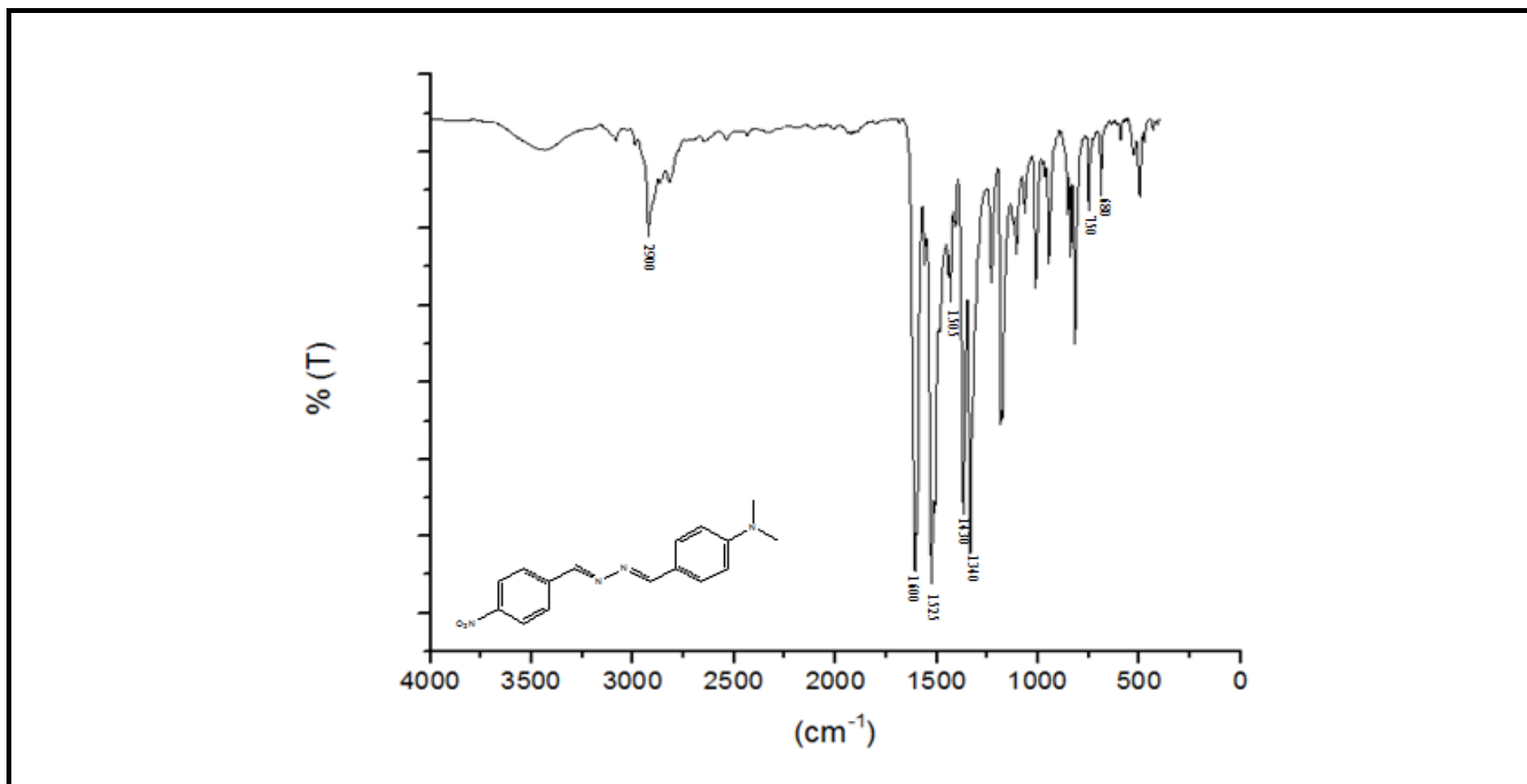


Figura 68: Espectro de massas do composto 31

