



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

ANDREZA SILVA FIGUEREDO

**PLANEJAMENTO, SÍNTESE E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE
ANTICOLINESTERÁSICA DE ANÁLOGOS DE PIPERINA**

Anápolis – GO

2013

ANDREZA SILVA FIGUEREDO

**PLANEJAMENTO, SÍNTESE E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE
ANTICOLINESTERÁSICA DE ANÁLOGOS DE PIPERINA**

Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Ciências Moleculares (nível mestrado) da Universidade Estadual de Goiás como parte dos requisitos para obtenção do título de mestre.

Orientador: Prof. Dr. Gilberto Lúcio Benedito de Aquino

Co-orientador: Prof. Dr. Vinicius Barreto da Silva

Anápolis – GO

2013

PLANEJAMENTO, SÍNTESE E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE
ANTICOLINESTERÁSICA DE ANÁLOGOS DE PIPERINA

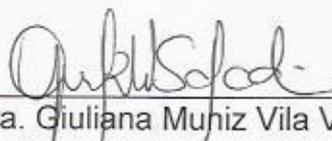
ANDREZA SILVA FIGUEREDO

Dissertação apresentada ao corpo docente do 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 Mestre em Ciências Moleculares.

Aprovada por:



Prof. Dr. Gilberto Lúcio Benedito de Aquino (UEG)



Profa. Dra. Giuliana Muhiz Vila Verde (UEG)



Prof. Dr. Ricardo Menegatti (UFG)

AGRADECIMENTOS

Essa deveria ser a parte mais fácil de todo o trabalho, mas não é. A grande dúvida em um agradecimento seletivo nunca é decidir quem incluir, mas quem não mencionar. Então, a meus amigos que, de uma forma ou de outra, contribuíram com sua amizade e sugestões efetivas, minha gratidão.

Ao professor Dr. Gilberto Aquino, orientador dessa dissertação, por quem tenho profunda admiração, pelos ensinamentos, paciência, incentivo, exemplo e amizade. Disse que estaria sempre ao meu lado, e esteve!

Ao professor Dr. Vinícius Barreto, meu co-orientador, pela valiosa ajuda, atenção, amizade e ensinamentos.

À professora Dr.^a Giuliana Vila Verde e ao professor Msc. Jivago Jaime pelo incentivo e carinho. Muito bom contar com a confiança de pessoas como vocês!

Ao Caio, parceiro nesse trabalho, por toda ajuda, disposição e paciência. Foi bom trabalhar com você. Te desejo muito sucesso!

Aos companheiros do grupo de pesquisa: Thiago Freitas, Wanderson, Lucas, Gabriella, Wellington, Miriã, Diogo e Késia pelas contribuições, bons momentos e amizade.

Aos amigos que fiz na UEG nesses dois anos: Jeane, José Elias (Zelão), Weslany, Suzane, Andrea, Danilo, Charles e, em especial, ao Francisco Neto (Chico) e Marcos pela receptividade e forma carinhosa com que me trataram desde o início.

As minhas amigas Ludmylla e Cássia, que sempre torceram por mim.

Aos técnicos dos laboratórios de química, em especial, Paula, Dayane, Vanessa, Guilherme e Adryelle, pela gentileza e ajuda nas análises.

Ao professor Dr. Luciano Morais Lião (UFG) pelas análises de RMN e aos professores: Dr. Cid Aimbiré de M. Santos (UFPR) e Dr. Eric de Souza Gil (UFG) pelas análises de atividade biológica.

A CAPES pelo apoio financeiro e bolsa concedida.

Agradecer é a arte de atrair coisas boas!

CURRICULUM VITAE

FORMAÇÃO ACADÊMICA

- **2011 - 2013:** Mestrado em Ciências Moleculares – Universidade Estadual de Goiás - UEG (em andamento).
- **2007 – 2010:** Bacharelado em Farmácia – UniEVANGÉLICA.

ATUAÇÃO EM PESQUISA

- **2010 – 2011: Iniciação científica** - Aluna voluntária - FUNADESP

Título: Estudo comparativo entre sexagem fetal e ultrassonografia na identificação genética do sexo de recém-nascidos.

Orientador: Prof.º Msc. Jivago Carneiro Jaime.

- **2011 – 2013: Mestrado em Ciências Moleculares – Bolsista CAPES.**

Título: Triagem virtual de análogos da piperina com potencial atividade inibitória sobre a enzima acetilcolinesterase.

Orientador: Prof.º Dr. Gilberto Lúcio Benedito de Aquino.

TRABALHOS CIENTIFICOS

- **2010: TCC – Trabalho de conclusão de curso.**

Título: Avaliação do perfil lipídico e prevalência de dislipidemias em indivíduos do município de Anápolis- GO.

Orientador: Prof.º Msc. Jivago Carneiro Jaime.

PARTICIPAÇÃO EM EVENTOS

- **2013:** XII Encontro Nacional de Professores de Química Farmacêutica (Goiânia).
- **2012:** 52º Congresso Brasileiro de Química (Recife).
- **2012:** VII Jornada de Pesquisa e Pós Graduação da UEG.
- **2012:** I Workshop em Ciências Moleculares (UEG).
- **2011:** VI Jornada de Pesquisa e Pós Graduação da UEG (Anápolis).
- **2009:** IV- Simpósio em estudos farmacêuticos: Avanços na profissão farmacêutica (Anápolis).

ATUAÇÃO PROFISSIONAL

- **2007 – 2008:** Monitoria das disciplinas de Anatomia humana e Fisiologia.
- **2011:** Responsável técnica na Drogeria + Econômica.
- **2012:** Estágio supervisionado na disciplina de Síntese de fármacos (UEG).

PRODUÇÃO BIBLIOGRÁFICA

- PEIXOTO, J.C.; SAFADI, G.M.V.; FIGUEREDO, A.S.; BARROS, D.A.; AQUINO, G.L.B. Método de extração de óleos essenciais por irradiação de micro-ondas: uma perspectiva de estudo para plantas do Cerrado. In: Solemar Oliveira. (Org.) Ciências Moleculares. 1ªed. Anápolis: Pró-Reitoria de Pesquisa, **2013**, v. 2, p. 50 - 100.
- FIGUEREDO, A. S.; ANDRADE, C.C.; SILVA, D. R.; AQUINO, G. L. B. Síntese de azinas assimétricas derivadas de aril-aldeídos e aril-cetonas. In: 36ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química. Águas de Lindóia, 2013.
- FIGUEREDO, A.S.; COSTA, L.M.; AQUINO, G.L.B.; NAPOLITANO, H.B. Determinação por difração de Raios X da estrutura molecular de uma chalcona metilada. In: 52º Congresso Brasileiro de Química, **2012**, Recife - PE.
- RIBEIRO, T.F.; SOUZA, W.C.; FIGUEREDO, A.S.; AQUINO, G.L.B. Síntese de compostos pirazolidínicos e avaliação da atividade antibacteriana. In: 52º Congresso Brasileiro de Química, **2012**, Recife - PE.

RESUMO

A doença de Alzheimer (DA) é uma desordem neurodegenerativa caracterizada por perda irreversível e progressiva da memória e das funções cognitivas. Constitui a forma mais comum de demência em idosos, podendo representar até 80% dos casos. Os tratamentos existentes são apenas sintomáticos e os medicamentos mais modernos atuam elevando os níveis de acetilcolina pela inibição da enzima acetilcolinesterase (AChE). Contudo, sua ação nem sempre é bem sucedida, especialmente em estágios avançados da doença, o que justifica a busca por novos inibidores, mais potentes e com efeitos adversos menos severos. Para tanto, o uso de técnicas de modelagem molecular como estratégia de planejamento racional de fármacos é uma boa aposta e diversas substâncias de origem natural têm sido utilizadas como protótipo. O objetivo desse estudo foi planejar, sintetizar e avaliar compostos com atividade anticolinesterásica promissora a partir da molécula de piperina após simulações de *docking* molecular. Para tanto, os ensaios virtuais foram realizados utilizando o programa GOLD 4.1, tomando como base o modo de interação entre a AChE e o donepezila, devido a similaridade estrutural entre esse fármaco e a piperina. A partir dos resultados preliminares desses ensaios foi proposta a síntese de uma série de azinas assimétricas, estruturalmente relacionadas ao protótipo. Foram sintetizados 40 compostos, com diferentes padrões de substituição. A atividade anticolinesterásica foi avaliada *in vitro* por ensaio em microplaca com o reagente de Ellman (Método modificado por Rhee). Dentre os compostos sintetizados, 5 apresentaram capacidade de inibir a AChE, embora com percentuais menores de inibição do que os obtidos para a piperina **12**, ácido **13** e éster piperínico **14** que foram de: 46,5, 50,6 e 63,6%, respectivamente. Complementarmente, o potencial antioxidante das substâncias submetidas ao teste de atividade anticolinesterásica foi avaliado por voltametria. Desses, os compostos **12**, **13**, **14**, **46** e **47** apresentaram eletroatividade.

Palavras chave: Doença De Alzheimer, Acetilcolinesterase, Piperina, Docking, Azinas.

ABSTRACT

Alzheimer's disease (AD) is a chronic neurodegenerative disorder characterized by progressive and irreversible loss of memory and cognitive functions. Is the most common cause of dementia in elderly people, accounting for about 80% of cases. Existing treatments are only symptomatic. The more modern drugs act by increasing acetylcholine levels by inhibiting the enzyme acetylcholinesterase (AChE). However, their action is not always successful, especially in advanced stages of the disease, which justifies the search for new inhibitors that are more potent and less severe adverse effects. For this, the use of molecular modeling techniques as a strategy for rational drug design is a good bet and various substances of natural origin have been used as a prototype. The objective of this study was to design and synthesize compounds with promising acetylcholinesterase from the piperine molecule after molecular docking simulations. For this, the virtual assays were performed using the program GOLD 4.1, based on the mode of interaction between donepezil and AChE due to structural similarity between this drug and piperine. Based on the results of these preliminary assays it was proposed the synthesis of a series of asymmetric azines structurally related to the prototype. Forty compounds with different substitution patterns were synthesized. The anticholinesterase activity of the substances was evaluated by in vitro microplate assay with Ellman's reagent (Method modified by Rhee). Among these compounds, 5 showed the ability to inhibit AChE, albeit with lower percentages of inhibition obtained for the piperine **12**, acid **13** and piperic ester **14** which were: 46.5, 50.6 and 63.6%, respectively. In addition the antioxidant potential of the substances tested with anticholinesterase activity was evaluated by voltammetry. Of these, compounds **12**, **13**, **14**, **46** and **47** showed electroactivity.

Keywords: Alzheimer's Disease, Acetylcholinesterase, Piperine, Docking, Azines.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Acetilcolina.....	21
Figura 2: Os quatro inibidores da acetilcolinesterase atualmente aprovados pelo FDA para tratamento da doença de Alzheimer.....	23
Figura 3: Pimenta do reino.....	28
Figura 4: Piperina.....	28
Figura 5: Sobreposição das conformações da acetilcolinesterase em complexo com o donepezila (átomos de carbono em amarelo) e com a tacrina (átomos de carbono em verde).....	41
Figura 6: Complexo com a tacrina (átomos de carbono em verde) (A); Complexo com o donepezil (átomos de carbono em amarelo) (B).....	42
Figura 7: Sobreposição das estruturas do donepezila (átomos de carbono em ciano) e piperina (átomos de carbono em amarelo).....	43
Figura 8: Conformação da estrutura cristalográfica do donepezila (ciano) e as dez orientações calculadas.....	44
Figura 9: Representação 3D do modo de interação entre a piperina (átomos de carbono em amarelo) e a acetilcolinesterase (A); Representação 2D da piperina e interações no sítio ativo (B).....	45
Figura 10: Representação 3D dos modos de interação entre o ácido piperínico (átomos de carbono em laranja) e a acetilcolinesterase obtidos por docking.....	46
Figura 11: Ácido piperínico (modo de interação A) e aminoácidos do sítio ativo (A); Representação 2D do ácido piperínico (modo de interação A) e interações no sítio ativo (B).....	47
Figura 12: Ácido piperínico (modo de interação B) e aminoácidos do sítio ativo (A); Representação 2D do ácido piperínico (modo de interação B) e interações no sítio ativo (B).....	48
Figura 13: Representação 3D dos modos de interação entre o éster piperínico (átomos de carbono em azul) e a acetilcolinesterase obtidas por docking.....	50
Figura 14: Éster piperínico (modo de interação A) e aminoácidos do sítio ativo (A); Representação 2D do éster piperínico (modo de interação A) e interações no sítio ativo (B).....	51

Figura 15: Éster piperínico (modo de interação B) e aminoácidos do sítio ativo (A); Representação 2D do éster piperínico (modo de interação B) e interações no sítio ativo (B).....	53
Figura 16: Planejamento de azinas por simplificação molecular de N-acilidrazonas.....	54
Figura 17: Compostos selecionados para os testes biológicos.....	61
Figura 18: Voltamograma cíclico (A); Voltamograma de pulso diferencial (B), Voltamograma de onda quadrada (C), obtidos para a piperina 12.....	66
Figura 19: Voltamograma cíclico (A); Voltamograma de pulso diferencial (B), Voltamograma de onda quadrada (C), obtidos para o ácido piperínico 13.....	67
Figura 20: Voltamograma cíclico (A); Voltamograma de pulso diferencial (B), Voltamograma de onda quadrada (C), obtidos para o éster piperínico 14.....	68
Figura 21: Voltamograma cíclico (A); Voltamograma de pulso diferencial (B), Voltamograma de onda quadrada (C), obtidos para o composto 46.....	69
Figura 22: Espectro de RMN ¹ H da piperina 12 (CDCl ₃ , 500 MHz).....	80
Figura 23: Espectro de RMN ¹³ C da piperina 12 (CDCl ₃ , 125 MHz).....	81
Figura 24: Espectro na região do IV da piperina 12 (4000 – 500 cm ⁻¹).....	82
Figura 25: Espectro de massas da piperina 12.....	83
Figura 26: Espectro de RMN ¹ H do ácido piperínico 13 (CDCl ₃ , 500 MHz).....	85
Figura 27: Espectro de RMN ¹³ C do ácido piperínico 13 (CDCl ₃ , 125 MHz).....	86
Figura 28: Espectro na região do IV do ácido piperínico 13 (4000 – 500 cm ⁻¹)....	87
Figura 29: Espectro de RMN ¹ H do éster piperínico 14 (CDCl ₃ , 500 MHz).....	89
Figura 30: Espectro de RMN ¹³ C do éster piperínico 14 (CDCl ₃ , 125 MHz).....	90
Figura 31: Espectro na região do IV do éster piperínico 14 (4000 – 500 cm ⁻¹).....	91
Figura 32: Espectro de massas do éster piperínico 14.....	92
Figura 33: Espectro de massas da hidrazona 15.....	93
Figura 34: Espectro de massas da hidrazona 16.....	94
Figura 35: Espectro de RMN ¹ H do composto 17 (CDCl ₃ , 500 MHz).....	96
Figura 36: Espectro de RMN ¹³ C do composto 17 (CDCl ₃ , 125 MHz).....	97
Figura 37: Espectro na região do IV do composto 17 (4000 – 500 cm ⁻¹).....	98
Figura 38: Espectro de massas do composto 17.....	99
Figura 39: Espectro de RMN ¹ H do composto 18 (CDCl ₃ , 500 MHz).....	101
Figura 40: Espectro de RMN ¹³ C do composto 18 (CDCl ₃ , 125 MHz).....	102

Figura 41: Espectro na região do IV do composto 18 (4000 – 500 cm ⁻¹).....	103
Figura 42: Espectro de massas do composto 18.....	104
Figura 43: Espectro de RMN ¹ H do composto 19 (CDCl ₃ , 500 MHz).....	106
Figura 44: Espectro de RMN ¹³ C do composto 19 (CDCl ₃ , 125 MHz).....	107
Figura 45: Espectro na região do IV do composto 19 (4000 – 500 cm ⁻¹).....	108
Figura 46: Espectro de massas do composto 19.....	109
Figura 47: Espectro de RMN ¹ H do composto 20 (CDCl ₃ , 500 MHz).....	111
Figura 48: Espectro de RMN ¹³ C do composto 20 (CDCl ₃ , 125 MHz).....	112
Figura 49: Espectro na região do IV do composto 20 (4000 – 500 cm ⁻¹).....	113
Figura 50: Espectro de massas do composto 20.....	114
Figura 51: Espectro de RMN ¹ H do composto 29 (CDCl ₃ , 500 MHz).....	116
Figura 52: Espectro de RMN ¹³ C do composto 29 (CDCl ₃ , 125 MHz).....	117
Figura 53: Espectro na região do IV do composto 29 (4000 – 500 cm ⁻¹).....	118
Figura 54: Espectro de massas do composto 29.....	119
Figura 55: Espectro de RMN ¹ H do composto 37 (CDCl ₃ , 500 MHz).....	121
Figura 56: Espectro de RMN ¹³ C do composto 37 (CDCl ₃ , 125 MHz).....	122
Figura 57: Espectro na região do IV do composto 37 (4000 – 500 cm ⁻¹).....	123
Figura 58: Espectro de massas do composto 37.....	124
Figura 59: Espectro de RMN ¹ H do composto 38 (CDCl ₃ , 500 MHz).....	126
Figura 60: Espectro de RMN ¹³ C do composto 38 (CDCl ₃ , 125 MHz).....	127
Figura 61: Espectro na região do IV do composto 38 (4000 – 500 cm ⁻¹).....	128
Figura 62: Espectro de massas do composto 38.....	129
Figura 63: Espectro de RMN ¹ H do composto 39 (CDCl ₃ , 500 MHz).....	131
Figura 64: Espectro de RMN ¹³ C do composto 39 (CDCl ₃ , 125 MHz).....	132
Figura 65: Espectro na região do IV do composto 39 (4000 – 500 cm ⁻¹).....	133
Figura 66: Espectro de massas do composto 39.....	134
Figura 67: Espectro de RMN ¹ H do composto 40 (CDCl ₃ , 500 MHz).....	136
Figura 68: Espectro de RMN ¹³ C do composto 40 (CDCl ₃ , 125 MHz).....	137
Figura 69: Espectro na região do IV do composto 40 (4000 – 500 cm ⁻¹).....	138
Figura 70: Espectro de massas do composto 40.....	139
Figura 71: Espectro de RMN ¹ H do composto 42 (CDCl ₃ , 500 MHz).....	141
Figura 72: Espectro de RMN ¹³ C do composto 42 (CDCl ₃ , 125 MHz).....	142
Figura 73: Espectro na região do IV do composto 42 (4000 – 500 cm ⁻¹).....	143

Figura 74: Espectro de massas do composto 42.....	144
Figura 75: Espectro de RMN ¹ H do composto 43 (CDCl ₃ , 500 MHz).....	146
Figura 76: Espectro de RMN ¹³ C do composto 43 (CDCl ₃ , 125 MHz).....	147
Figura 77: Espectro na região do IV do composto 43 (4000 – 500 cm ⁻¹).....	148
Figura 78: Espectro de massas do composto 43.....	149
Figura 79: Espectro de RMN ¹ H do composto 45 (CDCl ₃ , 500 MHz).....	151
Figura 80: Espectro de RMN ¹³ C do composto 45 (CDCl ₃ , 125 MHz).....	152
Figura 81: Espectro na região do IV do composto 45 (4000 – 500 cm ⁻¹).....	153
Figura 82: Espectro de massas do composto 45.....	154
Figura 83: Espectro de RMN ¹ H do composto 46 (CDCl ₃ , 500 MHz).....	156
Figura 84: Espectro de RMN ¹³ C do composto 46 (CDCl ₃ , 125 MHz).....	157
Figura 85: Espectro na região do IV do composto 46 (4000 – 500 cm ⁻¹).....	158
Figura 86: Espectro de massas do composto 46.....	159
Figura 87: Espectro de RMN ¹ H do composto 47 (CDCl ₃ , 500 MHz).....	161
Figura 88: Espectro de RMN ¹³ C do composto 47 (CDCl ₃ , 125 MHz).....	162
Figura 89: Espectro na região do IV do composto 47 (4000 – 500 cm ⁻¹).....	163
Figura 90: Espectro de massas do composto 47.....	164
Figura 91: Espectro de RMN ¹ H do composto 49 (CDCl ₃ , 500 MHz).....	166
Figura 92: Espectro de RMN ¹³ C do composto 49 (CDCl ₃ , 125 MHz).....	167
Figura 93: Espectro na região do IV do composto 49 (4000 – 500 cm ⁻¹).....	168
Figura 94: Espectro de massas do composto 49.....	169

LISTA DE ESQUEMAS

Esquema 1: Hidrólise da acetilcolina.....	21
Esquema 2: Acetilação do ácido salicílico 8 para obtenção do ácido acetil salicílico 9.....	24
Esquema 3: Estruturas da morfina 10 e petidina 11.....	25
Esquema 4: Síntese do ácido piperínico 13.....	32
Esquema 5: Síntese do éster piperínico 14.....	32
Esquema 6: Síntese da hidrazona 15.....	33
Esquema 7: Síntese da hidrazona 16.....	34
Esquema 8: Síntese da séries de azinas 1 (17-30).....	34
Esquema 9: Síntese da série de azinas 2 (31-36).....	35
Esquema 10: Síntese da série de azinas 3 (37-50).....	36
Esquema 11: Síntese da série de azinas 4 (51-56).....	36
Esquema 12: Mecanismo de formação de bis hidrazonas ou azinas simétricas (dímeros).....	59
Esquema 13: Sequência de reações para detecção de atividade anticolinesterásica pelo método de Ellman.....	62

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Percentuais de formação dos compostos da série 1.....	56
Tabela 2: Percentuais de formação dos compostos da série 2.....	57
Tabela 3: Percentuais de formação dos compostos da série 3.....	58
Tabela 4: Percentuais de formação dos compostos da série 4.....	59
Tabela 5: Percentual de inibição da piperina e derivados sobre a AChE.....	63
Tabela 6: Percentual de inibição das azinas 17, 18, 19, 20, 29, 37, 38, 39, 40, 42, 43, 45, 46, 47 e 49 sobre a AChE	64

LISTA DE ABREVIATURAS

DA	Doença de Alzheimer
AChE	Acetilcolinesterase
APP	Proteína Precursora do Amilóide
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
ACh	acetilcolina
Ser	Serina
His	Histidina
Glu	Glutamato
Trp	Triptofano
Phe	Fenilalanina
Asp	Aspargina
Tyr	Tirosina
ERO	Espécies Reativas de Oxigênio
AAS	Ácido Acetil Salicílico
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
GOLD	<i>Genetic Optimization for ligand Docking</i>
MVD	<i>Molegro Virtual Docker</i>
PDB	<i>Protein Data Bank</i>
Gly	Glicina

CGMS	Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de Massas
CCD	Cromatografia em Camada Delgada
RMN ¹H/¹³C	Ressonância Magnética Nuclear de hidrogênio e carbono 13
EM	Espectrometria de massas
IV	Infravermelho
TMS	Tetrametilsilano
ACTI	Iodeto de acetilcolina
DTNB	5,5 '-ditio-bis (2-nitrobenzóico)
VC	Voltametria Cíclica
VPD	Voltametria de Pulso Diferencial
VOQ	Voltametria de onda quadrada
Arg	Arginina
BChE	Butirilcolinesterase
DPPH	2,2-difenil-1-picrilhidrazila
m	multiplete
d	duplete
s	simpleto
dd	duplo duplete
ddd	duplo duplo duplete
t	tripleto

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	18
2. REVISÃO DA LITERATURA	19
2.1 Doença de Alzheimer	19
2.1.1 Tratamento farmacológico da doença de Alzheimer	22
2.2 Planejamento racional de fármacos	23
2.2.1 <i>Docking</i>	25
2.3 Piperina	27
3. OBJETIVOS	30
3.1 Objetivo Geral	30
3.2 Objetivos específicos	30
4. METODOLOGIA.....	31
4.1 <i>Docking</i>	31
4.2 Extração da piperina	31
4.3 Síntese de derivados da piperina	32
4.3.1 Síntese do ácido piperínico	32
4.3.2 Síntese do éster piperínico.....	32
4.4 Síntese de análogos.....	33
4.4.1 Síntese de hidrazonas.....	33
4.4.1.1 Síntese da (E) -1 - (4-nitrobenzilideno)-hidrazina (hidrazona 15).....	33
4.4.1.2 Síntese da (E) -1 - (4 - (nitrofenil)-etilideno)-hidrazina (hidrazona 16)	33
4.4.2 Síntese de azinas assimétricas	34
4.5 Métodos analíticos	37
4.6 Avaliação da atividade anticolinesterásica in vitro.....	37
4.7 Ensaio para determinação de atividade antioxidante	39
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	41
5.1 Simulações de docking.....	41
5.1.1 Seleção da estrutura da proteína	41
5.1.2 Validação.....	43
5.1.3 Simulação com a piperina	44
5.1.4 Simulação com o ácido piperínico	46
5.1.5 Simulação com o éster piperínico	49

5.2 Planejamento de novos compostos.....	54
5.3 Síntese das azinas assimétricas	55
5.3.1 Síntese da série 1 (17-30)	55
5.3.2 Síntese da série 2 (31-36)	56
5.3.3 Síntese da série 3 (37-50)	57
5.3.4 Síntese da série 4 (51-56)	58
5.4 Seleção de compostos para avaliação de atividade biológica.....	60
5.5 Avaliação da atividade anticolinesterásica in vitro.....	62
5.5.1 Ensaio em microplaca pelo Método de Ellman modificado	63
5.6 Avaliação da atividade antioxidante por voltametria.....	65
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS... ..	70
REFERÊNCIAS.....	71
ANEXOS	

1. INTRODUÇÃO

A doença de Alzheimer (DA) é a forma de demência mais comum em idosos no mundo. Caracteriza-se clinicamente por perda progressiva e irreversível da memória e declínio das funções cognitivas (ALZHEIMER'S ASSOCIATION, 2010).

Sua incidência está diretamente ligada ao avanço da idade e o tratamento dos idosos afetados representa altos custos para o sistema de saúde, especialmente em países que vem experimentando o envelhecimento de sua população (MEBANE-SIMS e ALZHEIMER'S, 2009).

O aumento da expectativa de vida nesses países corrobora para as projeções de crescimento do número de casos da doença nas próximas décadas e para a importância de compreender seus aspectos mecânicos e desenvolver diagnósticos e tratamentos mais eficientes.

Atualmente o tratamento farmacológico é feito basicamente com inibidores da enzima acetilcolinesterase. 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, 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).

O objetivo inicial desse estudo foi determinar o modo como a piperina interage com a acetilcolinesterase, através de simulações de docking molecular, e a partir dos resultados, planejar, sintetizar e avaliar a atividade anticolinesterásica dos análogos obtidos.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Doença de Alzheimer

A doença de Alzheimer foi relatada pela primeira vez em 1906, em um congresso na Alemanha, pelo médico alemão Alois Alzheimer. Na ocasião, o pesquisador descreveu características neuropatológicas, de uma paciente de 55 anos de idade com histórico de 4 anos de demência progressiva, que ainda hoje refletem as principais características da doença (BLENNOW et al, 2006).

O Mal de Alzheimer, como também é conhecida essa desordem, é uma doença neurodegenerativa que constitui a forma mais prevalente de demência sem razão precedente, representando de 60 a 80% do total de casos (ALZHEIMER'S ASSOCIATION, 2010).

Essa prevalência aumenta significativamente com o avanço da idade e dobra a cada cinco anos após os sessenta e cinco anos (MEBANE-SIMS e ALZHEIMER'S, 2009). A doença afeta um número maior de mulheres do que de homens, provavelmente porque a expectativa de vida é maior entre elas (SCHIMIDT et al, 2008).

Clinicamente, a DA é caracterizada por déficits de memória e um declínio progressivo da função cognitiva podendo levar a um estado incapacitante antes da morte. Embora haja certa preservação da memória remota em estágios iniciais, a perda de memória é global na evolução da Doença de Alzheimer. O indivíduo torna-se progressivamente incapaz de desempenhar atividades da vida diária e de cuidar de si mesmo (GINSBERG et al, 2006).

No estágio avançado da doença observa-se a perda significativa da linguagem, da capacidade de desempenhar tarefas e de nomear pessoas e objetos. Alterações psíquicas e comportamentais estão presentes em até 75% dos casos. A morte ocorre devido a complicações associadas à imobilidade, como a pneumonia ou a embolia pulmonar (FORLENZA, 2005; ALZHEIMER'S ASSOCIATION, 2010).

As causas da DA ainda não são conhecidas. Embora especialistas acreditem que o fator preponderante no desenvolvimento da doença seja a idade avançada, fatores de risco como diabetes, hipertensão, níveis elevados de colesterol e tabagismo são associados ao processo patológico (MARTINS et al, 2006; KIVIPELTO, 2006; ANSTEY et al, 2007).

Macroscopicamente a atrofia cortical é a característica marcante na doença de Alzheimer (RYAN, 2005). As principais alterações cerebrais são placas senis ou neuríticas e os emaranhados neurofibrilares. As placas senis resultam do metabolismo anormal da proteína precursora do amilóide (APP), conduzindo à formação de agregados do peptídeo β -amilóide; os emaranhados neurofibrilares formam-se a partir do colapso do citoesqueleto neuronal, decorrente da hiperfosforilação da proteína tau (FORLENZA, 2005).

Acredita-se que a presença destes neurotóxicos esteja associada à degeneração das vias colinérgicas no sistema nervoso central e conseqüentemente a danos da neurotransmissão colinérgica, apontada como causa principal dos sintomas da doença.

O diagnóstico baseia-se na avaliação clínica e em testes laboratoriais, almejando excluir quaisquer outras causas possíveis de demência. Entretanto, o diagnóstico concreto exige a análise do cérebro pós-morte, verificando a presença de sinais característicos da doença, como as placas amilóides (FINDEIS, 2007; GOODMAN et al, 2006).

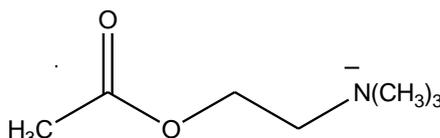
Envolvidos na patogenia da DA, os radicais livres, como são conhecidas as espécies reativas de oxigênio (ERO) e nitrogênio, são produzidos como resultado de diversas reações bioquímicas e são considerados a principal causa de dano oxidativo, que inclui desnaturação de proteínas, mutagênese e peroxidação lipídica, em células aeróbicas (STADLER, 2002).

No que concerne aos aspectos mecanísticos da evolução da doença, acredita-se que os agregados da proteína β -amilóide levam à fragmentação peptídica e geração de radicais livres. Além disso, o acúmulo de ferro, característico na doença de Alzheimer, é apontado como uma condição sinérgica para a formação desses radicais (SMITH et al, 1997).

As evidências recentes de que o stress oxidativo participa da patogenia da doença tem justificado o emprego de diversas substâncias antioxidantes no tratamento do mal de Alzheimer (HOUGHTON et al, 2007). Compostos como a vitamina E (α -tocoferol) e a selegilina têm sido empregados como adjuvantes. Embora não proporcionem melhora objetiva da cognição, podem retardar a evolução natural da doença, exercendo um suposto efeito neuroprotetor (FORLENZA, 2005).

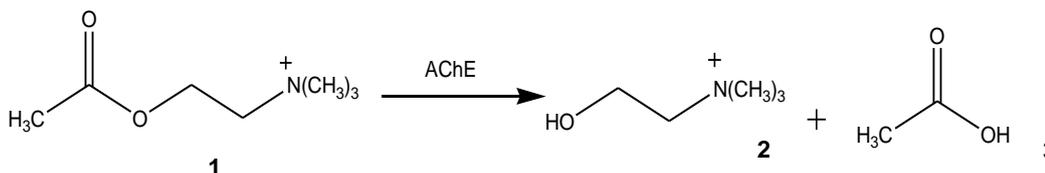
Principal neurotransmissor associado ao processo patogênico, a acetilcolina **1** (ACh) (**Figura 1**) é encontrada no sistema nervoso central e periférico, compondo parte do sistema nervoso parassimpático. Quimicamente é um éster de colina e ácido acético biossintetizado a partir da acetil-coenzima A e colina em reação catalisada pela enzima colina-acetiltransferase (VIEGAS JUNIOR et al, 2004).

Figura 1: Acetilcolina **1**



Depois de formada, a ACh é liberada na fenda sináptica, onde pode se ligar a dois tipos de receptores: muscarínico e nicotínico. Sua ação é interrompida através da sua hidrólise (**Esquema 1**), a qual é catalisada rápida e eficientemente pela acetilcolinesterase, resultando na formação de colina **2** e ácido acético **3**.

Esquema 1: Hidrólise da acetilcolina



A acetilcolinesterase é uma enzima constituída por um tetrâmero com peso molecular de 320.000 Da, que contém 537 aminoácidos e consiste em dois tipos de cadeias polipeptídicas $\alpha 2\beta 2$ que se repetem (SILVA et al, 2006).

As estruturas tridimensionais disponíveis revelam que seu sítio ativo é localizado na base de uma profunda e estreita cavidade com cerca de 20 Å, onde predominam resíduos aromáticos (XU et al, 2008). Encontram-se aí os aminoácidos conhecidos como tríade catalítica da acetilcolinesterase: serina (Ser) 200, histidina (His) 440 e glutamato (Glu) 327, considerados essenciais para a atividade catalítica da enzima.

Além disso, existem ainda um sítio aniônico catalítico - *catalytic anionic site* - (CAS) composto por resíduos de triptofano (Trp) 84, Glu199 e fenilalanina (Phe) 330 e um sítio aniônico periférico - *peripheral anionic site* - (PAS) localizado na entrada

da cavidade e composto por resíduos de aspargina (Asp) 72, tirosina (Tyr) 70 e (Tyr) 121, Trp 279, e Phe 290 (UL-HAQ et al, 2009).

Existem atualmente 97 estruturas cristalográficas da acetilcolinesterase. Além da AChE humana, elas são derivadas de outras 4 espécies: *Drosophila melanogaster*, *Electrophorus electricus*, *Torpedo californica* e *Rattus rattus*. Dessas, 55 estruturas são originárias da AChE de *Torpedo californica*, muito semelhante à humana e utilizada na maioria dos testes *in silico* com fármacos hoje aprovados para o tratamento da DA (KAMAU e MUSTATA, 2007).

A resolução da estrutura tridimensional da acetilcolinesterase de *Torpedo californica* foi realizada por Sussan e colaboradores (1991).

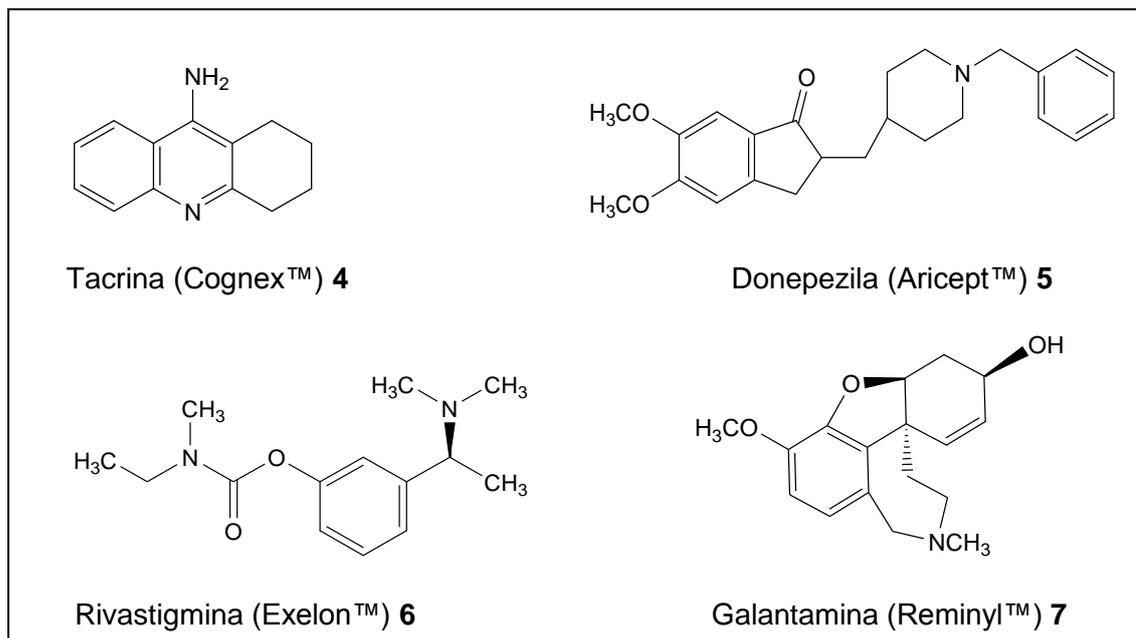
2.1.1 Tratamento farmacológico da doença de Alzheimer

A hipótese do déficit de acetilcolina como causa ou origem da doença de Alzheimer levou à busca de fármacos com a propriedade de aumentar a capacidade de neurotransmissão colinérgica.

Algumas estratégias inicialmente empregadas envolveram a utilização de precursores da acetilcolina, agonistas de receptores muscarínicos M₁, nicotínicos e antagonistas muscarínicos M₂. Essas estratégias, entretanto, não se mostraram eficazes no aumento da atividade colinérgica central (FRANCIS et al, 1999).

Os mais modernos medicamentos utilizados para tratar os sintomas da DA elevam os níveis de acetilcolina pela inibição da enzima acetilcolinesterase. (GIORDANI, 2008). Existem atualmente quatro inibidores (**4**, **5**, **6** e **7**) aprovados pelo *Food and Drug Administration* (FDA) (**Figura 2**), órgão responsável pela liberação da venda de medicamentos nos Estados Unidos (GOEDERT e SPILLANTINI, 2006).

Figura 2: Os quatro inibidores da acetilcolinesterase atualmente aprovados pelo FDA para tratamento da doença de Alzheimer



Todavia o sucesso do tratamento utilizando tais fármacos é limitado, pois eles só melhoram a memória de pacientes com demência leve, mas não param o processo de neurodegeneração e praticamente são ineficientes em estágios avançados da doença de Alzheimer. Além disso, efeitos colaterais como vômitos, náuseas, diarreia, insônia e hepatotoxicidade, no caso da tacrina, estão associados a esses fármacos dificultando a adesão ao tratamento (CHONPATHOMPIKUNLERT et al, 2010; CRAIG e STITZEL, 2005; GOODMAN et al, 2006).

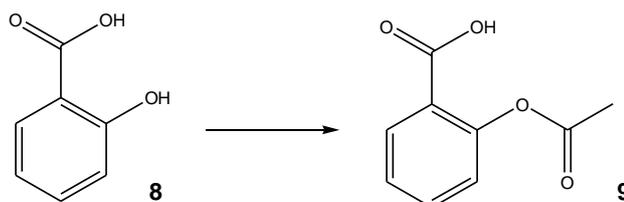
Esse contexto tem estimulado o desenvolvimento de novos inibidores da AChE. Na busca por fármacos mais potentes e com efeitos adversos menos severos, modernas técnicas de modelagem molecular tem sido utilizadas como estratégia de planejamento racional de fármacos.

2.2 Planejamento racional de fármacos

A descoberta do ácido acetil salicílico (AAS) no final do século XIX marcou a história da química farmacêutica. Antes sintetizado pela Bayer e comercializado sob o nome de Aspirina®, o AAS foi o primeiro fármaco produzido comercialmente (BARREIRO e FRAGA, 2008).

Desde então, o ácido acetil salicílico é um exemplo clássico de fármaco sintético cuja descoberta está ligada a moléculas de origem natural. Sinteticamente pode ser obtido por uma modificação estrutural simples, a partir da acetilação do ácido salicílico, derivado da salicilina obtida do extrato natural de *Salix alba* (**Esquema 2**) (HOSTETTMANN et al, 2003).

Esquema 2: Acetilação do ácido salicílico **8** para obtenção do ácido acetil salicílico **9**.



Vários avanços científicos foram realizados desde essa época, e atualmente o processo de desenvolvimento de um novo fármaco é um desafio caro, demorado e que requer a consideração de aspectos multidisciplinares.

Embora a natureza de tentativa e erro continue presente, concepções racionais e modernos métodos de química computacional são, hoje, amplamente utilizados na seleção de compostos protótipos, naturais ou não, e planejamento de modificações estruturais a fim de obter substâncias com potencial bioatividade. O objetivo primário dessas modificações é alcançar alta seletividade de ligação sem perder atividade farmacológica (ANDRICOPULO, 2009).

O desenho de pequenas moléculas com propriedades definidas para interação com um alvo conhecido, que pode ser uma proteína, é uma das abordagens mais promissoras na química medicinal moderna (MANDAL, 2009).

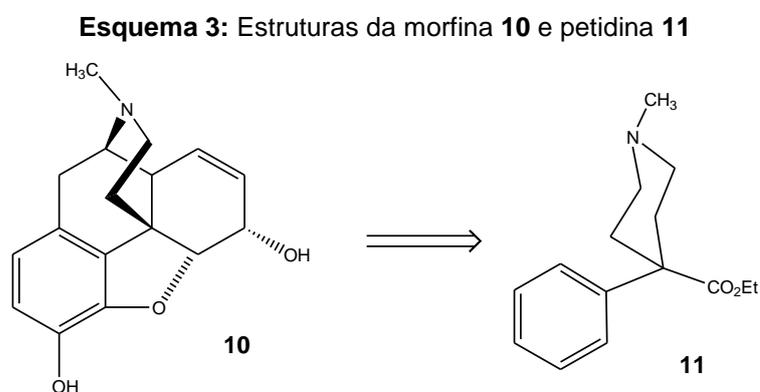
Os avanços nas técnicas de isolamento, purificação e determinação da estrutura tridimensional de macromoléculas, por difração de raios-X e Ressonância magnética nuclear (RMN), permitem compreender melhor quais características são importantes para a atividade dos fármacos e tem impulsionado pesquisas nessa área (MÜLLER, 2009).

Entre as principais estratégias de planejamento de novas moléculas estão o bioisosterismo, a simplificação molecular, a latenciação de fármacos e a hibridação molecular (BARREIRO e FRAGA, 2008).

A simplificação molecular é uma importante estratégia de planejamento de novos fármacos. Foi inicialmente empregada na obtenção de compostos

estruturalmente mais simples, a partir de protótipos naturais ativos estruturalmente complexos.

Essas modificações eram propostas empiricamente, sem conhecimento prévio das unidades farmacofóricas. Um exemplo clássico é a morfina **10**, alcalóide natural isolado de *Papaver somniferum* L. em 1803. Este fármaco foi o precursor de analgésicos da classe das 4-fenilpiperidinas, representados pela petidina **11** (**Esquema 3**), que ilustra o sucesso da estratégia de simplificação molecular de protótipos naturais (BARREIRO, 2002).



Sabe-se hoje que o sistema piperidínico da petidina, similar àquele contido na morfina, em que o carbono C-4 encontra-se ligado ao anel benzênico, correspondia ao grupo farmacofórico clássico dos analgésicos opiáceos (BARREIRO, 2002).

A estratégia de simplificação molecular consiste na realização de mudanças estruturais planejadas, capazes de resultar em uma molécula estruturalmente simples, com redução do peso molecular, do número de grupos funcionais e de centros estereogênicos, preservando as unidades farmacofóricas (BARREIRO e FRAGA, 2008).

A possibilidade de encurtar rotas sintéticas caras e que envolvem um número grande de etapas, mantendo ou melhorando a atividade biológica de protótipos é a principal vantagem da simplificação molecular.

2.2.1 Docking

Docking ou docagem molecular é o termo usado para estratégia de desenvolvimento de fármacos que utiliza programas computacionais que buscam encontrar o melhor encaixe entre duas moléculas, investigando as possíveis orientações que estas possam assumir para formar um complexo estável (MIZUTANI e ITAI, 2004).

Se as moléculas em questão forem uma enzima/receptor e um substrato/ligante, o *docking* receptor-ligante consiste na identificação do modo de ligação do substrato no sítio ativo da proteína e na determinação de quão forte são essas ligações. Essas informações permitem determinar o mecanismo pelo qual o receptor pode ser inibido ou ativado.

Nos ensaios virtuais, as características estruturais e físico-químicas das moléculas interagentes estão diretamente relacionadas ao processo de reconhecimento molecular receptor-ligante. Através da complementaridade destas características busca-se a identificação do arranjo conformacional preferencial e a melhor energia livre de interação correspondente (CAVASOTTO e ORRY, 2007).

As características estruturais, tais como orientação, posição espacial e rotações de ligações covalentes, definem os arranjos espaciais moleculares. As características físico-químicas, tais como forças eletrostáticas, interações hidrofóbicas, interações de Van der Waals, ligações de hidrogênio e ligações covalentes, definem o grau de afinidade e especificidade entre o ligante e receptor (MORGON e COUTINHO, 2007).

Uma das características mais valiosas dos métodos de *docking* é sua capacidade de reproduzir modos de ligação observados experimentalmente, podendo ser utilizado como uma forma de validação dos mesmos.

Devido à complexidade das interações envolvidas no processo de reconhecimento molecular, os programas de *docking* podem ser descritos como a combinação de duas componentes: um algoritmo de busca e uma função escore (ZOETE et al, 2009)

O primeiro deve avaliar de maneira eficaz os possíveis modos de ligação, incluindo o previsto experimentalmente, e prever a melhor conformação e orientação da molécula ligante relativa ao sítio ativo do receptor, explorando os

graus de liberdade de acordo com a flexibilidade considerada (CAVASOTTO e ORRY, 2007).

A função escore possibilita distinguir os diferentes modos de ligação do mesmo ligante e avaliar entre ligantes distintos, o que possui maior afinidade de ligação para um mesmo receptor (HUANG et al, 2010).

De modo geral os métodos computacionais de *docking* devem ser eficientes na determinação do modo de ligação mais favorável, possuir funções de escore suficientemente sensíveis para discriminar entre os modos de interação alternativos e o modo de interação correto e ser robusto o bastante para permitir que vários sistemas receptor-ligante sejam investigados (ABRAHAM, 2003).

Existem hoje mais de 30 diferentes “softwares” de *docking*. Entre os mais amplamente utilizados estão: DOCK; FlexX/FlexE; AutoDock; GOLD (*Genetic Optimization for ligand Docking*); Glide e MVD (Molegro Virtual Docker). Eles se distinguem basicamente na maneira de lidar com a flexibilidade da proteína e do ligante, algoritmo de amostragem e função de escore (ZOETE et al, 2009).

2.3 Piperina

A piperina é um alcalóide presente nos frutos de pimenta das espécies *Piper nigrum* L., conhecida popularmente como pimenta do reino, *Piper longum* L. e em outras espécies da família Piperaceae, sendo responsável pela ardência e aroma dos frutos (ESSA et al, 2012).

A pimenta do reino tem sido utilizada, há milênios, como especiaria doméstica e em vários sistemas tradicionais de medicina na Ásia (**Figura 3**). Embora considerada uma planta exótica no Brasil, o país é um dos principais produtores mundiais, com destaque para os estados do Pará e Espírito Santo (CHONPATHOMPIKUNLERT et al, 2010).

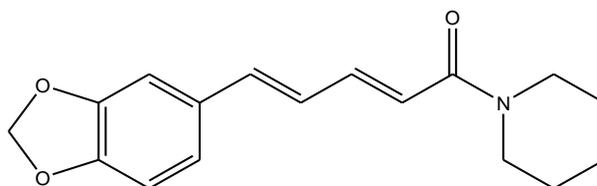
Figura 3: Ramo com infrutescência: Pimenta do reino (*Piper nigrum* L.)



Fonte: <http://www.ceplac.gov.br/radar/pimentadoreino.htm>

A estrutura molecular da piperina **12** (**Figura 4**) é dividida em três componentes: um anel fenilmetilenodioxola, uma cadeia lateral com duplas ligações conjugadas e um anel piperidina ligado à cadeia lateral através de um grupo carbonila.

Figura 4: piperina **12**



Estudos recentes demonstram que a piperina **12** possui um conjunto diversificado de atividades farmacológicas, incluindo efeito antidepressivo, antimicrobiano, imunomoduladora, antitumoral, anti-inflamatório e antiobesidade (LEE et al, 2005; JIN et al, 2011; SUNILA e KUTTAN, 2004; KIM et al, 2011).

Esse alcalóide apresenta ainda capacidade de atuar sobre enzimas do Citocromo P450 interferindo no metabolismo de elementos e substâncias como Selênio, vitamina B, β -caroteno e curcumina. Essa característica, em especial, demonstra seu potencial para ser utilizado como adjuvante no tratamento de diferentes doenças crônicas (SHOBA et al, 1998).

Recentemente, um estudo realizado por Chonpathompikunlert e colaboradores (2010) demonstrou que a piperina apresenta melhora significativa sobre o comprometimento da memória e neurodegeneração associada à doença de Alzheimer, sendo uns dos prováveis mecanismos a inibição da enzima acetilcolinesterase.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

- Planejar, sintetizar e avaliar a atividade anticolinesterásica de análogos de piperina.

3.2 Objetivos específicos

- ✓ Realizar ensaios de *docking* com a piperina **12** e derivados para determinar o modo de interação com a acetilcolinesterase;
- ✓ Planejar a série de compostos a ser sintetizada baseando em métodos racionais de desenvolvimento de fármacos;
- ✓ Sintetizar os compostos planejados;
- ✓ Avaliar as atividades anticolinesterásica e antioxidante dos compostos obtidos;

4. METODOLOGIA

4.1 Docking

Inicialmente as estruturas da piperina e derivados ácido e éster foram modeladas no programa *ChemDraw* Ultra 8.0. As estruturas 3D e as cargas foram geradas com o programa *DS Visualizer* e salvas em formato SYBYL mol2.

As estruturas da acetilcolinesterase foram selecionadas no *Protein Data Bank* (PDB), com os códigos 1EVE e 1ACJ.

Para validação dos parâmetros que foram utilizados nas simulações com a piperina e derivados foi utilizado o complexo acetilcolinesterase/donepezil. Os valores de RMSD menores que 1,5 foram considerados satisfatórios.

As simulações de *docking* foram realizadas com o programa GOLD 4.1 (VERDONK et al, 2003) que utiliza um algoritmo genético. Entre os parâmetros disponíveis no *software*, os seguintes foram selecionados: População equivalente a 100 confôrmeros; 100.000 operações; 95 mutações; 95 “*crossovers*”.

Os cálculos foram realizados dentro de uma esfera de 15 Å, centrada no átomo de carbono do resíduo de glicina (Gly) 118. A função matemática *ChemScore* foi utilizada para selecionar as 10 conformações mais bem pontuadas. As estruturas dos complexos foram visualizadas e analisadas usando o *software PyMOL* v0.99.

4.2 Extração da piperina

A piperina **12** foi extraída de frutos maduros de pimenta do reino, obtidos comercialmente, conforme metodologia descrita por Ikan (1991), com modificações.

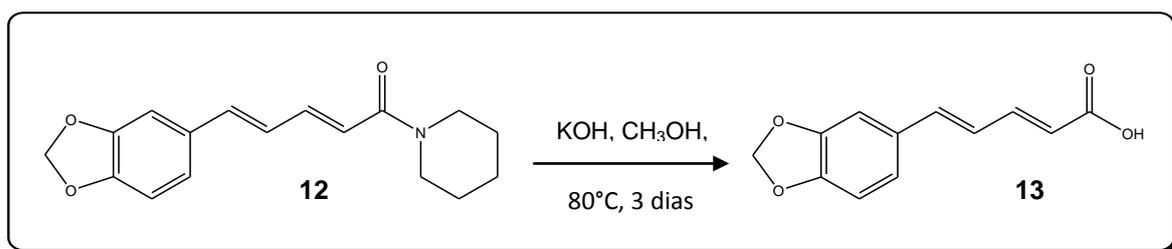
A extração foi realizada a partir de 60 gramas de pimenta do reino moída e 900 mL de etanol 95% em aparelho de Soxhlet por 3 horas. A solução obtida foi filtrada e concentrada em evaporador rotativo sob pressão reduzida a 50° C. A seguir foram adicionados 10 mL de solução etanólica de KOH 10% e 50 mL de água destilada. A mistura foi mantida em repouso por 12 horas. O precipitado amarelo obtido foi filtrado, lavado com água e seco a temperatura ambiente (2,6 g). Rendimento: 4,35%. Os dados espectroscópicos do composto estão no anexo.

4.3 Síntese de derivados da piperina

4.3.1 Síntese do ácido piperínico

O ácido piperínico **13** foi obtido através da hidrólise da piperina **12**, conforme procedimento descrito por Venkatswamy e colaboradores (2004): 11,4 g de piperina e 500 mL de solução metanólica de KOH 20% foram mantidos em refluxo a 80°C por 3 dias (**Esquema 4**). Após a conclusão da hidrólise, o metanol foi destilado sob pressão reduzida. A mistura resultante foi suspensa em água quente e acidificada com HCl para pH < 1. O precipitado foi filtrado, lavado com água fria e recristalizado em metanol para produzir cristais de ácido piperínico (6,5 g). Rendimento: 57%.

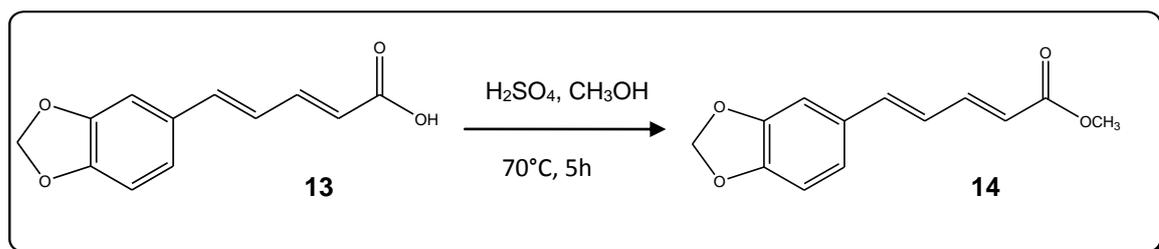
Esquema 4: Síntese do ácido piperínico **13**



4.3.2 Síntese do éster piperínico

Em um balão de fundo redondo, foram adicionados 5 gramas de ácido piperínico **13**, 500 mL de metanol e 5 mL de ácido sulfúrico P.A (**Esquema 5**). A mistura foi mantida sob refluxo por 5 h e então resfriada. O precipitado foi filtrado e seco a temperatura ambiente (3,25 g). Rendimento: 65%.

Esquema 5: Síntese do éster piperínico **14**



4.4 Síntese de análogos

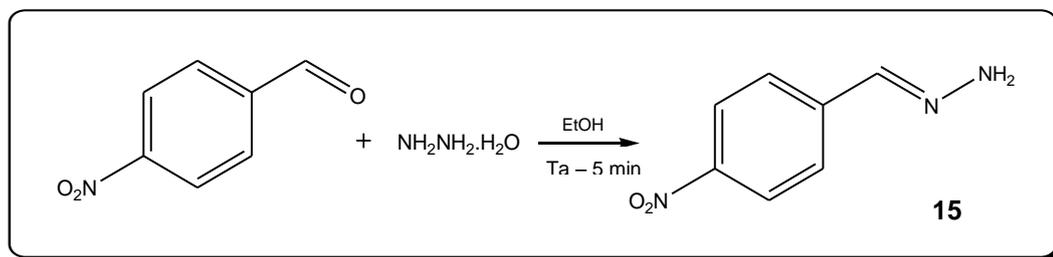
Foram sintetizadas quatro séries de azinas assimétricas análogas à piperina **12**. A síntese desses compostos passa pela formação inicial de hidrazonas, que podem ser obtidas pela reação de aldeídos/cetonas com hidrazina.

4.4.1 Síntese de hidrazonas

4.4.1.1 Síntese da (*E*)-1 - (4-nitrobenzilideno)-hidrazina (hidrazona **15**)

Para obtenção da hidrazona **15**, um mmol de hidrato de hidrazina (solução 70%) foi adicionado em 5 mL de etanol anidro, seguido pela adição de 1 mmol de 4-nitrobenzaldeído. A mistura foi agitada a temperatura ambiente por 10 minutos (**Esquema 6**).

Esquema 6: Síntese da hidrazona **15**

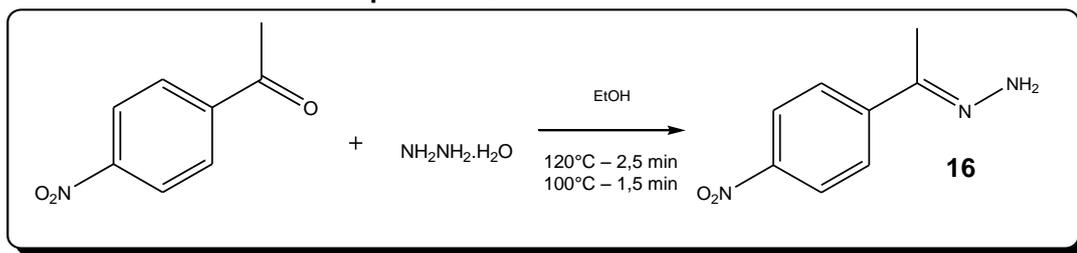


Fórmula molecular: $\text{C}_7\text{H}_7\text{N}_3\text{O}_2$ (165,05 g/mol)

4.4.1.2 Síntese da (*E*)-1 - (4 - (nitrofenil)-etilideno)-hidrazina (hidrazona **16**)

Para a síntese da hidrazona **16** um mmol de hidrato de hidrazina (solução 70%) foi adicionado em 5 mL de etanol anidro. A seguir, um mmol da 4-nitroacetofenona (165 mg) foi adicionado a essa solução. A mistura foi aquecida em reator de microondas Discover DC-7196, marca CEM Corporation em dois ciclos: 2,5 minutos a 120°C e 1,5 minutos a 100°C (**Esquema 7**). A reação foi resfriada e o precipitado filtrado e lavado com etanol gelado. Rendimento: 70%.

Esquema 7: Síntese da hidrazona 16



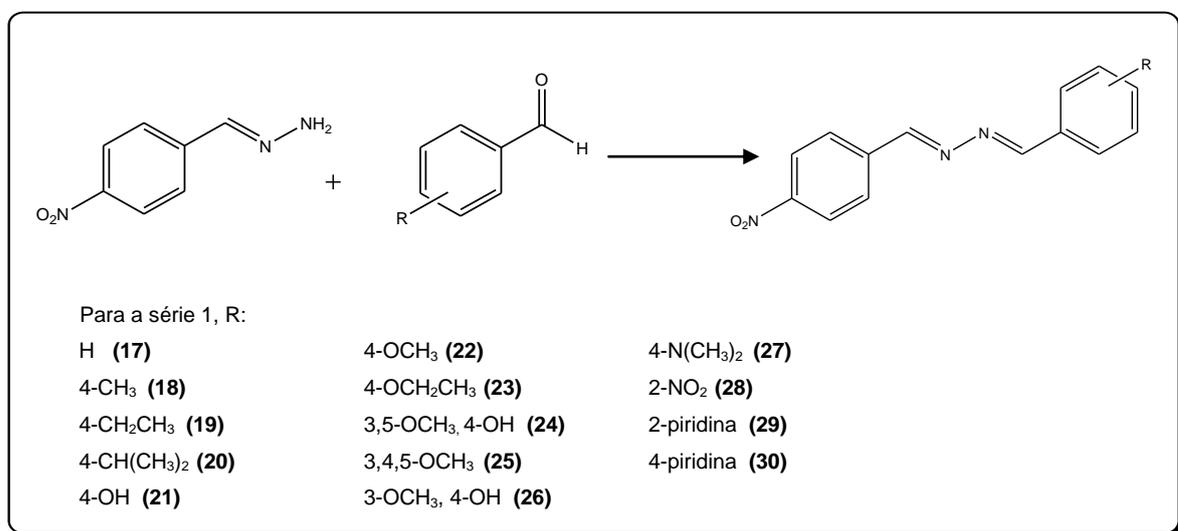
Fórmula molecular: $C_8H_9N_3O_2$ (179,07 g/mol)

4.4.2 Síntese de azinas assimétricas

Síntese da série 1 (17-30) - Procedimento A

Após confirmar a conversão total do 4-nitrobenzaldeído na hidrazona **15** um segundo benzaldeído substituído foi adicionado (1 mmol) e a mistura mantida sob agitação constante por 2 horas, à temperatura ambiente (**Esquema 8**). O precipitado foi filtrado e lavado com etanol gelado.

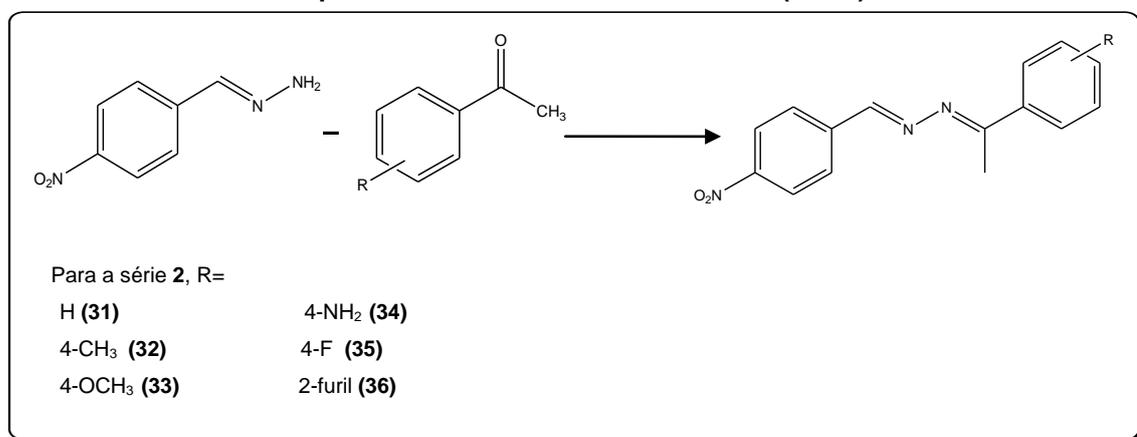
Esquema 8: Síntese da série de azinas 1 (17-30)



Síntese da série 2 (31-36) - Procedimento B

Os compostos da série 2 foram preparados pela reação entre a hidrazona **15** e diferentes acetofenonas. Quantidades equivalentes das substâncias (1 mmol) foram adicionados em tubo de reação, com 2 mL de etanol, e aquecidos em reator de microondas em 3 ciclos de 1,5 minutos a 100° C. No terceiro ciclo foi adicionada 1 gota ácido acético glacial, como catalisador (**Esquema 9**). O precipitado foi filtrado e lavado com etanol gelado.

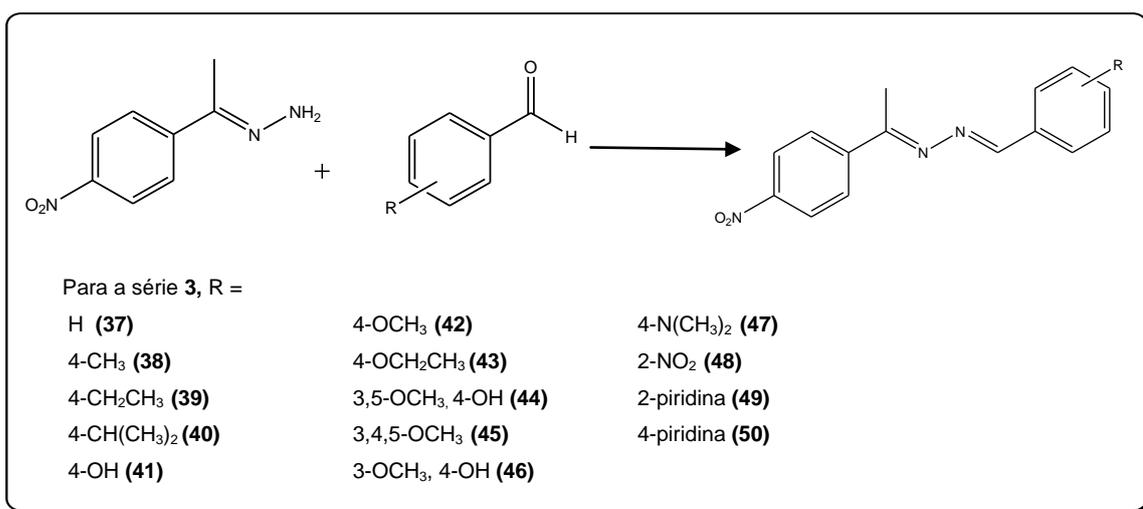
Esquema 9: Síntese da série de azinas **2** (31-36)



Síntese da série 3 (37-50) - Procedimento C

Para a síntese da série 3, 1 mmol da hidrazona **16** e 1 mmol de um benzaldeído substituído foram adicionados em um tubo de reação, com 2 mL de etanol e aquecidos em reator de microondas em 3 ciclos: 1,5 minutos a 80° C e 2,5 minutos a 100° C por 2 vezes (**Esquema 10**). O precipitado foi filtrado e lavado com etanol gelado.

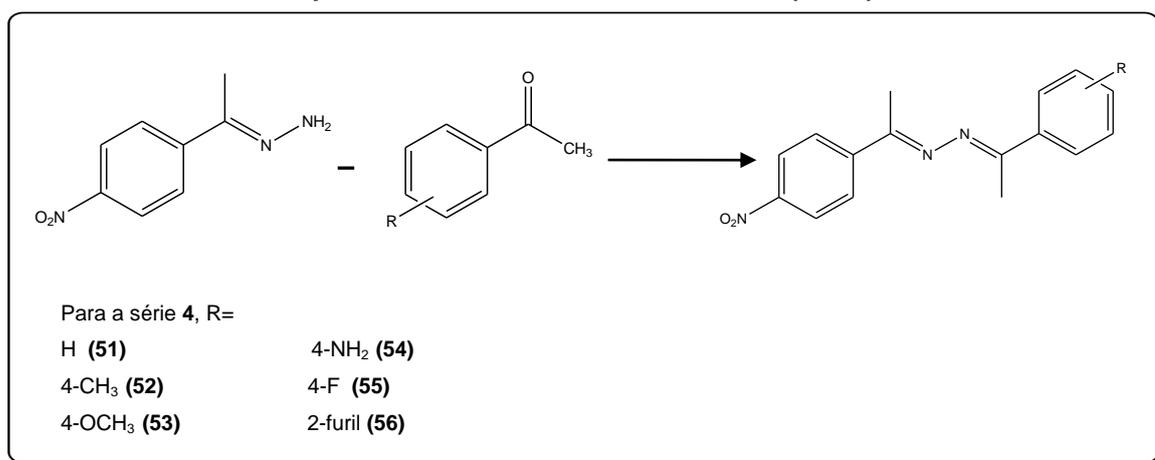
Esquema 10: Síntese da série de azinas 3 (37-50)



Síntese da série 4 (51-56) - Procedimento D

A série 4 foi sintetizada pela reação entre 1 mmol da hidrazona **16** e 1 mmol de diferentes acetofenonas. A mistura foi adicionada em um tubo de reação, com 2 mL de etanol, e aquecida em Reator de Microondas em 3 ciclos: 1,5 minutos a 80° C e 2,5 minutos a 100° C por 2 vezes (**Esquema 11**). No terceiro ciclo foi adicionada 1 gota ácido acético glacial, como catalisador. O precipitado foi filtrado e lavado com etanol gelado.

Esquema 11: Síntese da série de azinas 4 (51-56)



4.5 Métodos analíticos

As reações foram acompanhadas por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (CGMS) em equipamento QP-2010 Ultra da SHIMADZU. A pureza dos compostos sintetizados foi verificada também por cromatografia em camada delgada (CCD) e determinação da faixa de fusão.

Nas cromatoplasas foram utilizados sistema de solventes hexano/acetato de etila (9:1, 8:2 e 7:3). As faixas de fusão dos compostos foram determinadas em aparelho Microquímica MQAPF-301.

Identificação estrutural

Para confirmar a estrutura dos compostos foram utilizadas técnicas espectroscópicas de Ressonância Magnética Nuclear de hidrogênio e carbono 13 (RMN $^1\text{H}/^{13}\text{C}$), espectrometria de massas (EM) e Infravermelho (IV).

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.

Os espectros foram obtidos em espectrômetro Bruker Avance 500 operando a 500 MHz (^1H) e 125 MHz (^{13}C), com clorofórmio ou DMSO 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 massas foram obtidos no laboratório de análise instrumental da Universidade Estadual de Goiás em CG-MS. As amostras foram solubilizadas em diclorometano ou metanol.

Os espectros no infravermelho 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 OriginTM versão 8.6.

4.6 Avaliação da atividade anticolinesterásica *in vitro*

As análises foram realizadas na Universidade Federal do Paraná (UFPR) sob orientação do Prof. Dr. Cid Aimbiré de M. Santos.

A capacidade de inibição dos compostos sobre a acetilcolinesterase foi testada com base no método de Ellman (ELLMAN et al, 1961) modificado por Rhee (RHEE et al, 2001).

Os testes foram realizados em microplacas de poliestireno com 96 poços (300 μL /TPP®). Para medida da absorbância foi utilizado leitor de microplacas Tecan modelo Sunrise.

Reagentes

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 bovina;

Enzima

Acetilcolinesterase de enguia elétrica – *Electrophorus electricus* - (Tipo VI-S, pó liofilizado, 292 U/mg sólido, 394 U/mg proteína, Sigma). A AChE foi dissolvida em tampão A para preparar uma solução 1000 U/ml e, a seguir, diluída em tampão B para obter solução 0,226 U/mL.

Substrato

Iodeto de acetiltiocolina (ACTI) (Sigma-Aldrich®).

Reagente colorimétrico

Ácido 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzóico (DTNB) (Sigma-Aldrich®)

Procedimento

Nas microplacas foram adicionados 25 μL de iodeto de acetiltiocolina 15 mMol em água, 125 μL de DTNB 3 mMol em tampão Tris A pH 8, 50 μL de tampão B pH 8 e 25 μL da solução de amostra, em diferentes concentrações, diluídas em metanol ou Metanol/Clorofórmio. A absorbância foi monitorada a cada 10 s durante 230s em 412 nm. Após esse período 25 μL de uma solução aquosa de enzima AChE 0,226 U/ml foram adicionados e a absorvância novamente monitorada a cada 10 s durante

230 s em 412 nm. Como controle positivo foi utilizado um inibidor reversível da acetilcolinesterase (fisostigmina - eserine).

A atividade enzimática foi calculada, em porcentagem, pela comparação entre as velocidades das reações nos poços com amostras e a velocidade do ensaio usando tampão sem qualquer inibidor. O cálculo foi feito conforme expressão a seguir:

$$I\% = \frac{V(\text{enzima s/ amostras}) - V(\text{enzima c/ amostras})}{V(\text{enzima sem amostras})}$$

Qualquer aumento da absorbância antes da adição da enzima devido à hidrólise espontânea do substrato foi corretamente corrigido subtraindo-se a taxa da reação antes da adição da enzima da taxa obtida após a adição da enzima.

Cada concentração de cada amostra foi analisada em triplicata e os resultados obtidos através de média.

4.7 Ensaio para determinação de atividade antioxidante

A avaliação da atividade antioxidante da piperina e derivados, assim como dos análogos sintetizados, foi realizada no laboratório de farmácia da Universidade Federal de Goiás, em colaboração com o Prof. Drº Eric de Souza Gil.

As análises foram realizadas através de voltametria, pela combinação de três técnicas eletroquímicas: Voltametria cíclica (VC), Voltametria de Pulso Diferencial (VPD) e Voltametria de Onda Quadrada (VOQ).

Amostras

Foram utilizados 250 µL de solução 1 mMol das amostras em DMSO.

Equipamentos

Todas as medidas eletroquímicas foram realizadas em Potenciostato/Galvanostato µAUTOLAB III ® da Eco Chemie acoplado a uma cela eletroquímica em sistema de 3 eletrodos (trabalho, referência e auxiliar).

- ✓ Eletrodo de trabalho: Carbono Vítreo (ECV, $\varnothing = 2$ mm)
- ✓ Eletrodo de referencia: Ag/AgCl (3 molL^{-1} KCl)
- ✓ Eletrodo auxiliar: Espiral de platina

O Eletrodo de trabalho foi polido em suspensão de sílica de granulometria 3 mm antes de cada experimento eletroquímico, o que garante reprodutibilidade dos resultados. O potenciostato é conectado ao *software* GPES 4.9 ® para a aquisição dos dados.

Medidas eletroquímicas

As análises foram realizadas em 5 mililitros de solução eletrolítica tampão fosfato 0.1 M, pH 6.0, injetando 250 μL das amostras.

Os parâmetros experimentais para a Voltametria Cíclica (VC) foram: Start potential: -0,25V; First vertex potential: 1,25V; Final potential: -0,25V; Step potential: 0.02441V, em velocidades de varredura de 100, 300, 500 e 700 mVs⁻¹.

Na Voltametria de Pulso Diferencial (VPD) os parâmetros utilizados foram: Modulation time: 0,05s; Interval time: 0,5 s; Initial potential: -0,25V; Final potential: 1,25V; Step potential: 0.0051V; Modulation amplitude: 0.02502V e Scan rate: 0.0102V

Na técnica de Voltametria de Onda Quadrada (VOQ) os parâmetros empregados foram: Frequency: 20 Hz; Initial potential: -0,25V; Final potential: 1,25V Step potential: 0,0045V e Amplitude: 0.045V.

Todas as experiências foram realizadas à temperatura ambiente.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

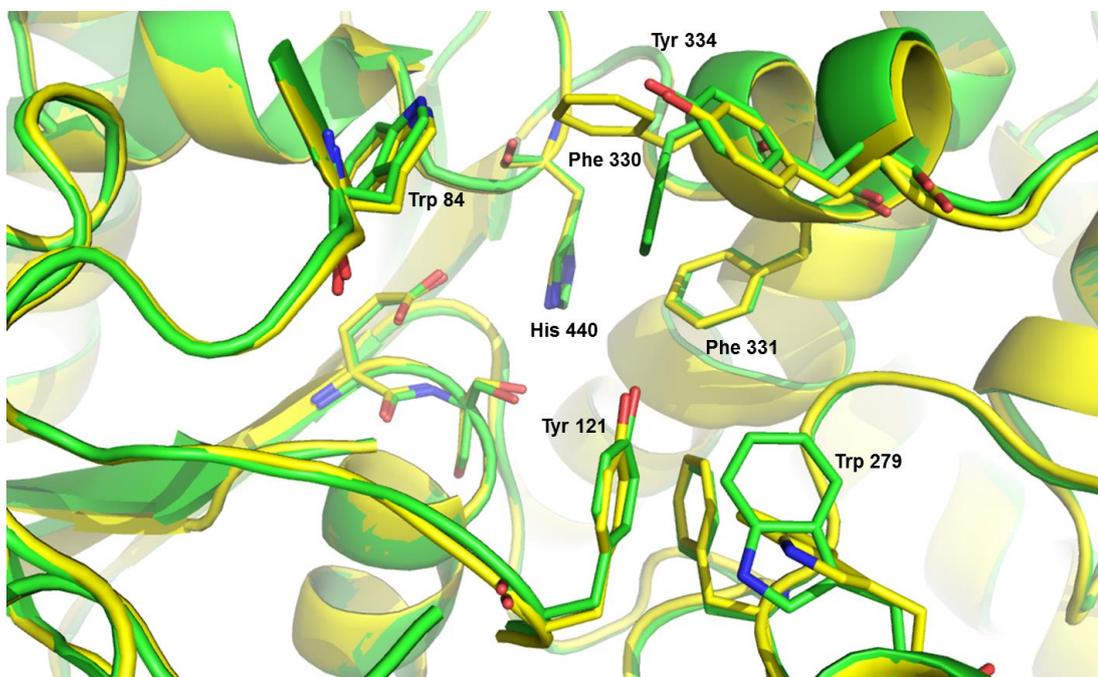
5.1 Simulações de *docking*

As simulações de *docking* foram realizadas utilizando o programa GOLD 4.1 para gerar as 10 orientações de maior escore para cada composto no sítio ativo da enzima acetilcolinesterase.

5.1.1 Seleção da estrutura da proteína

A fim de selecionar a estrutura da acetilcolinesterase a ser utilizada nas simulações de *docking*, as estruturas dos complexos cristalográficos entre a acetilcolinesterase/donepezila e acetilcolinesterase/tacrina foram comparadas. Os dados dos complexos foram recuperados do banco de dados *Protein Data Bank* com código 1EVE e 1ACJ, respectivamente (**Figura 5**).

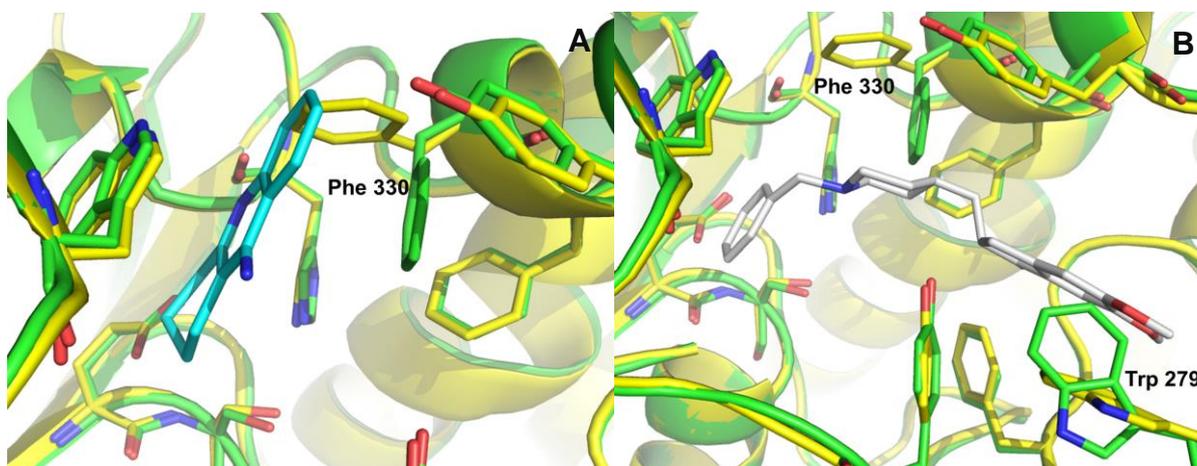
Figura 5: Sobreposição das conformações da acetilcolinesterase em complexo com o donepezila (átomos de carbono em amarelo) e com a tacrina (átomos de carbono em verde)



A sobreposição das estruturas demonstrou que a principal diferença na conformação da enzima nos dois casos está na posição do anel aromático do resíduo de aminoácido fenilalanina 330.

Segundo Harel et al (1993), essa mudança na conformação, no complexo tacrina/acetilcolinesterase evita um impedimento estérico entre a cadeia lateral da Phe 330 e a tacrina e simultaneamente, favorece uma interação do tipo π -stacking entre seu anel aromático e o grupo fenil do sistema quinolínico da tacrina. Nessa posição a tacrina **4** também é capaz de estabelecer forte ligação com o triptofano 84 (Figura 6).

Figura 6: Complexo com a tacrina (átomos de carbono em verde) (A); Complexo com o donepezila (átomos de carbono em amarelo) (B).



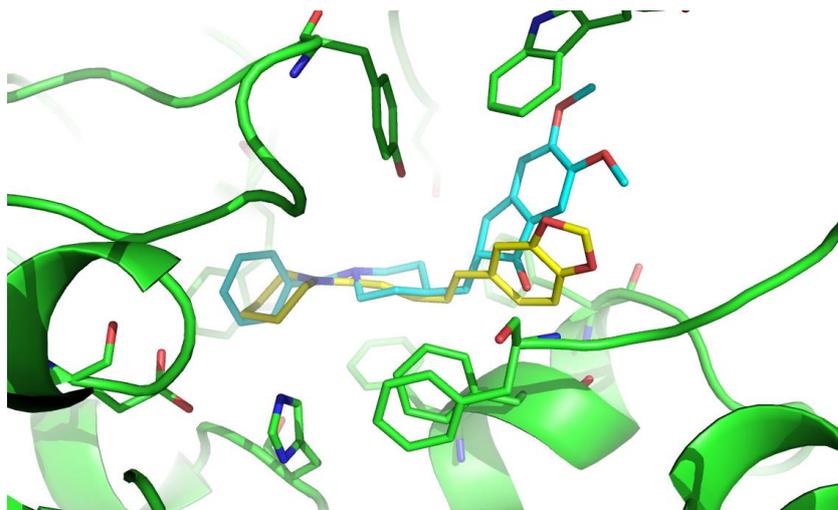
Já o donepezila **5**, interage com a enzima ao longo de toda a extensão do sítio ativo (Figura 6), estabelecendo interações específicas com a acetilcolinesterase, sendo algumas, intermediadas por moléculas de água.

Essas interações ocorrem principalmente por π -stacking com resíduos aromáticos presentes no sítio ativo, além de interações hidrofóbicas.

Em um dos pontos, o grupo benzílico do donepezila interage com o anel indólico do aminoácido Trp 84. Na região mediana da cavidade, o átomo de nitrogênio do anel piperidínico interage com o grupo fenila da Phe 330. Uma terceira interação ocorre entre o anel de indanona e o grupo indólico do Trp 279 através de uma clássica interação π - π paralela.

Nesse estudo, as simulações de *docking* para a piperina **12** e derivados foram realizadas tomando como base o modo de interação entre o donepezila e acetilcolinesterase devido a similaridade estrutural (volume, funções químicas) entre esse fármaco e a piperina (**Figura 7**).

Figura 7: Sobreposição das estruturas do donepezila (átomos de carbono em ciano) e piperina (átomos de carbono em amarelo).



5.1.2 Validação

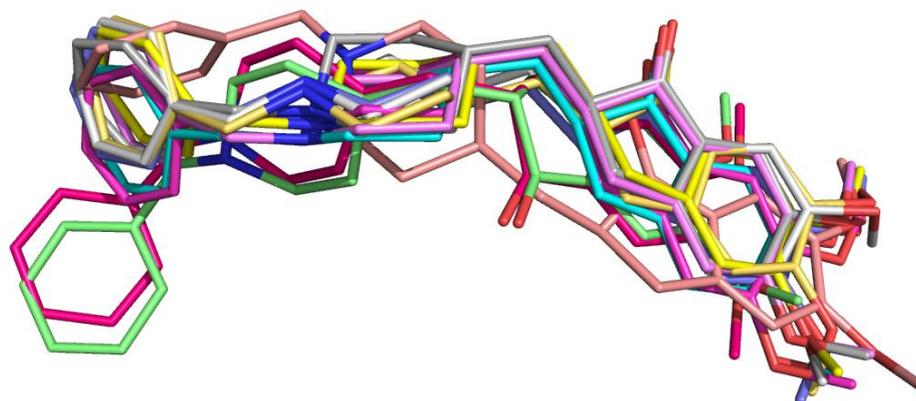
Antes de realizar os ensaios com a piperina e derivados, simulações de *docking* foram realizadas com o donepezila **5** para validar o modo de ligação deste no sitio ativo da acetilcolinesterase. O objetivo principal foi avaliar a precisão de encaixe e a capacidade do programa de prever afinidades de ligação.

Para isso, utilizou-se a estrutura do complexo donepezila/AChE depositada no PDB com código 1EVE. A estrutura da acetilcolinesterase, nesse complexo, é de *Torpedo californica*.

Inicialmente o donepezila foi extraído do complexo, e após adição de hidrogênios à estrutura da enzima, foi feita a simulação. Obtidos os resultados, foi possível observar que as dez orientações de melhor escore calculadas pelo programa foram muito similares à orientação cristalográfica. Dessas, sete apresentaram valores de RMDS < 1.

Mesmo as três orientações que apresentaram os maiores valores de RMSD (rosa escuro, rosa claro e verde água) não apresentaram grande discrepância em relação à conformação original (cristalográfica) (**Figura 8**).

Figura 8: Conformação da estrutura cristalográfica do donepezila (ciano) e as dez orientações calculadas

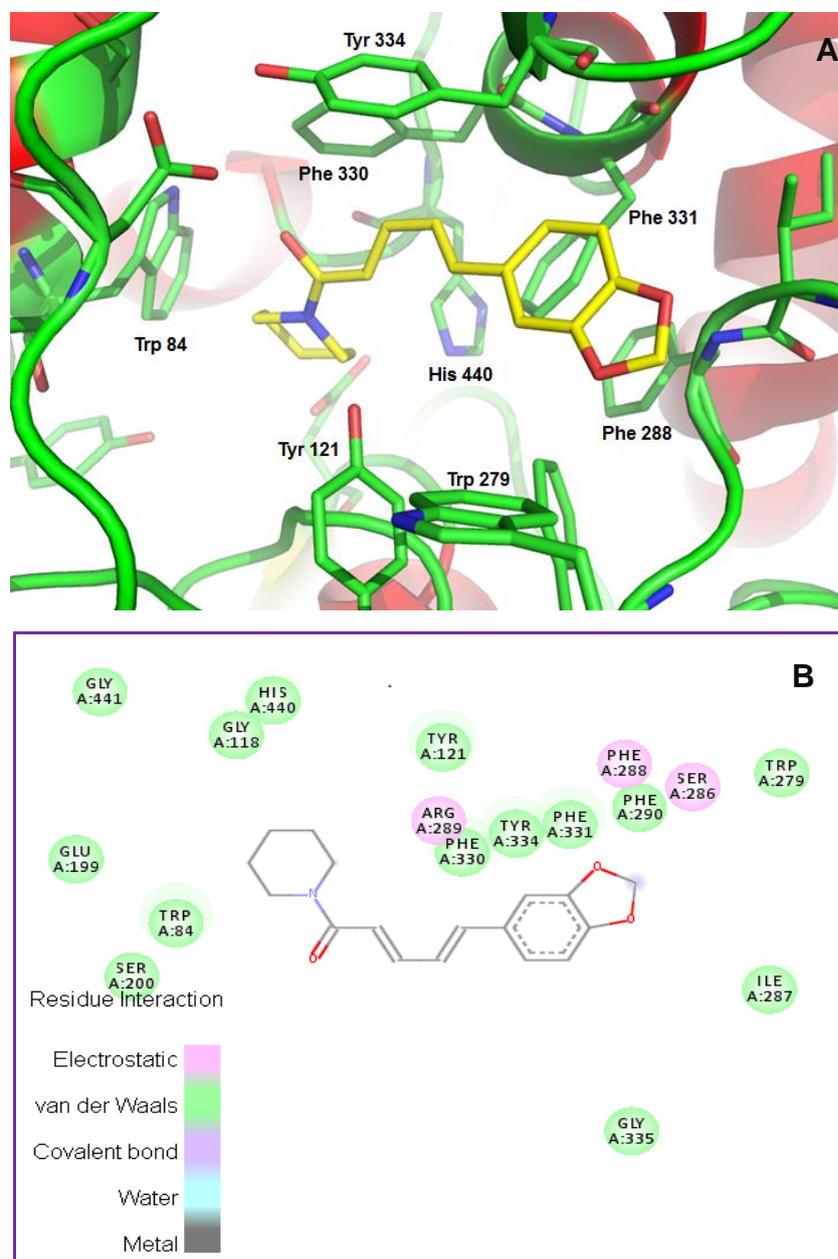


O protocolo de docking foi assim capaz de reproduzir a conformação e o modo de ligação do donepezila **5** no complexo 1 EVE, tendo sido validado para os experimentos com a piperina **12** e derivados.

5.1.3 Simulação com a piperina **12**

Nos cálculos com a piperina **12**, as dez orientações obtidas por *docking* foram muito semelhantes sendo consideradas equivalentes entre si. Dessa forma a orientação apresentada foi a que obteve maior valor de escore (33,06) durante as simulações (**Figura 9**).

Figura 9: Representação 3D do modo de interação entre a piperina **12** (átomos de carbono em amarelo) e a acetilcolinesterase (A); Representação 2D da piperina **12** e interações no sítio ativo (B)



Assim como o donepezila **5**, a piperina **12** não interage fortemente com os aminoácidos da tríade catalítica (serina 200, histidina 440 e glutamato 327). Entretanto, várias interações podem ser notadas, incluindo interações específicas com seu anel metilenodioxi, além de interações de van der Waals. Entre as primeiras, três interações eletrostáticas: i- Com o grupo NH_2 do resíduo de Phe 288; ii- Com OH do resíduo de Ser 286 (Interações com átomos do anel metilenodioxi da piperina) e iii- Com o resíduo de arginina (Arg) 289.

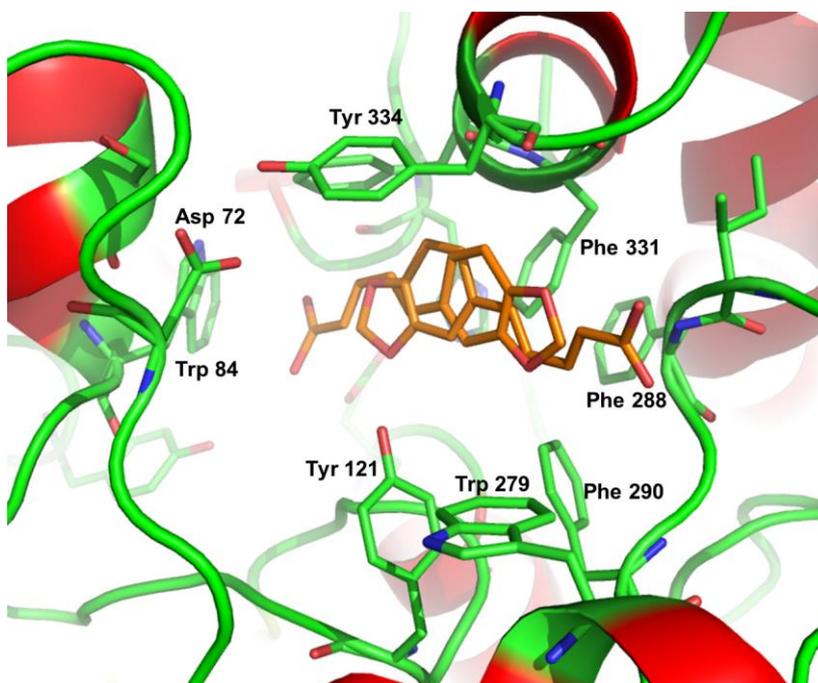
Além disso, interações de van der Waals com resíduos importantes como Ser 200, His 440 (dois aminoácidos da tríade catalítica), Trp 84, Phe 330, Phe 331 e Trp 279, entre outros, também foram encontradas. No donepezil **5**, as interações com os resíduos de Trp 279 e Phe 330 tem forte ligação com sua seletividade para a AChE, já que esses resíduos não estão presentes na butirilcolinesterase (BChE).

Dessa forma, é possível sugerir que embora não se ligue diretamente à tríade catalítica, a piperina **12** é capaz de estabelecer interações com outros resíduos e se manter ligada ao sítio ativo, impedindo a ligação da ACh e exercendo ação anticolinesterásica.

5.1.4 Simulação com o ácido piperínico **13**

Nos ensaios de *docking* com o ácido **13**, entre as dez orientações preferenciais, dois modos de interação foram observados, com cinco representantes cada, cuja diferença está na inversão do carboxilato. Na figura a seguir estão representadas as orientações de maior escore de cada um dos grupos.

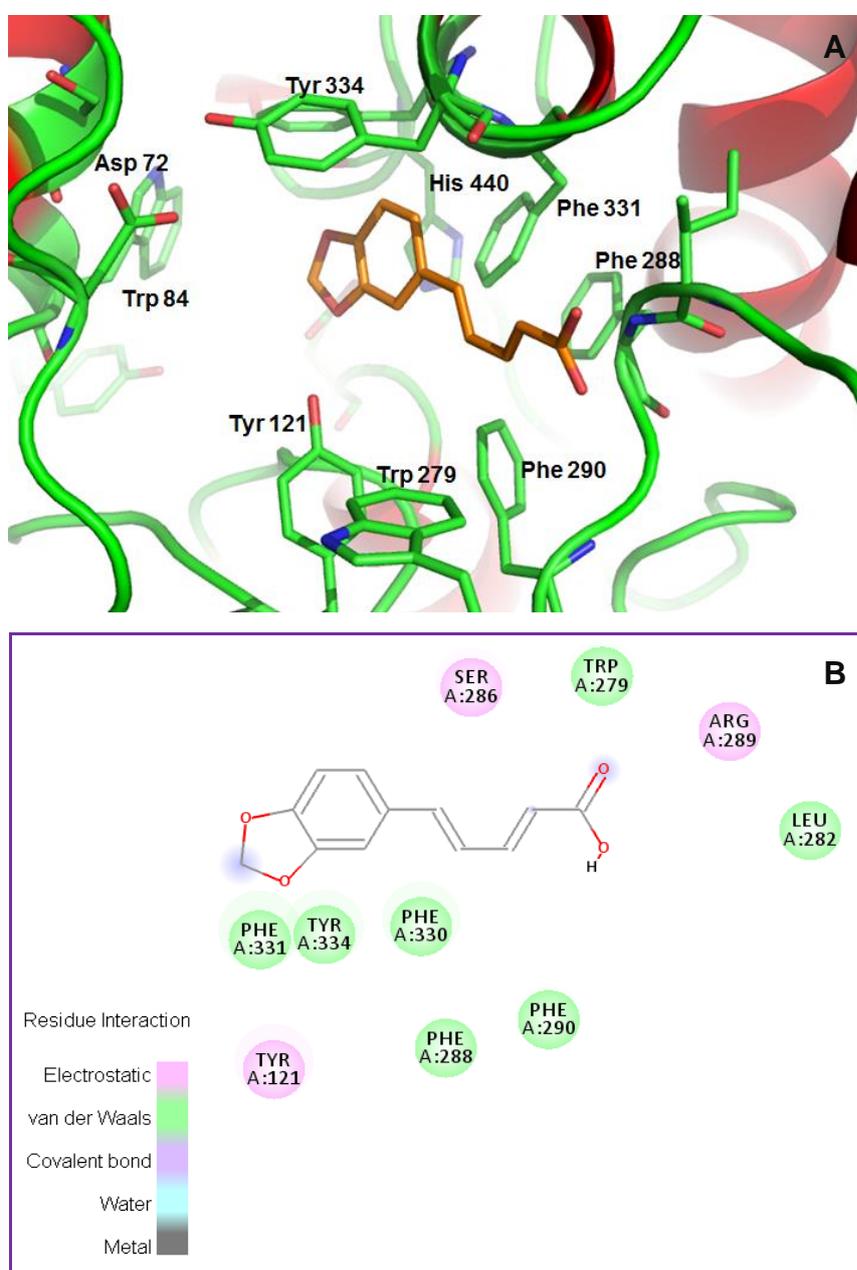
Figura 10: Representação 3D dos modos de interação entre o ácido piperínico **13** (átomos de carbono em laranja) e a acetilcolinesterase obtidos por *docking*.



Modo de interação A

Não houve diferença significativa nos valores de escore das dez orientações calculadas. No primeiro grupo, as cinco orientações obtidas apresentaram uma inversão de posição dos anéis metilenodioxi e benzênico em relação à piperina **12**. Na **figura 11** está representada a orientação de maior escore (25,74).

Figura 11: Ácido piperínico **13** (modo de interação A) e aminoácidos do sítio ativo (A);
Representação 2D do ácido piperínico **13** (modo de interação A) e
interações no sítio ativo (B)



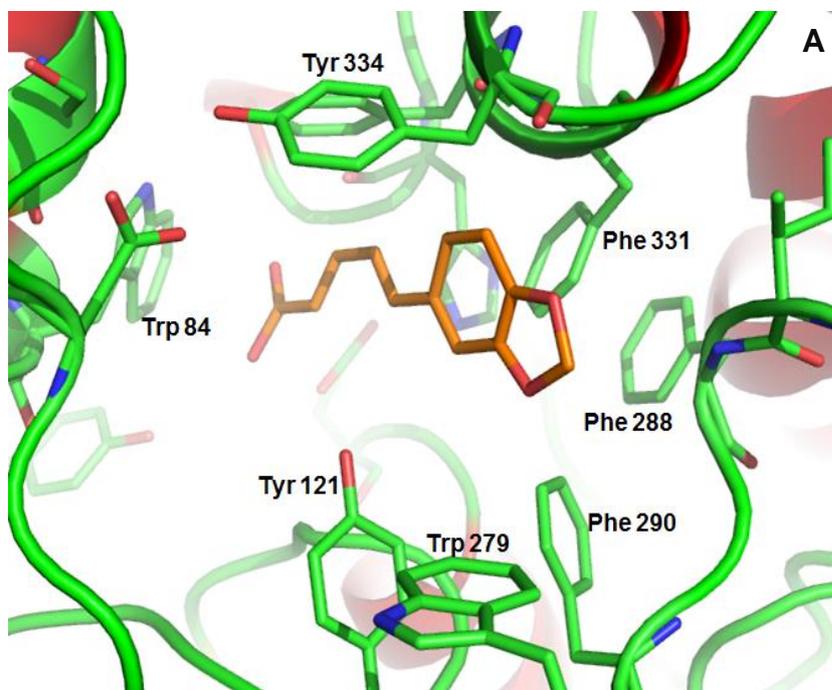
Nesse caso, o ácido piperínico **13** apresenta interações eletrostáticas entre seu grupo carboxilato e os aminoácidos Ser 286 e Arg 289, além de uma interação entre os átomos de oxigênio do anel metilenodioxi e a hidroxila ligada ao anel fenila do resíduo de Tyr 121.

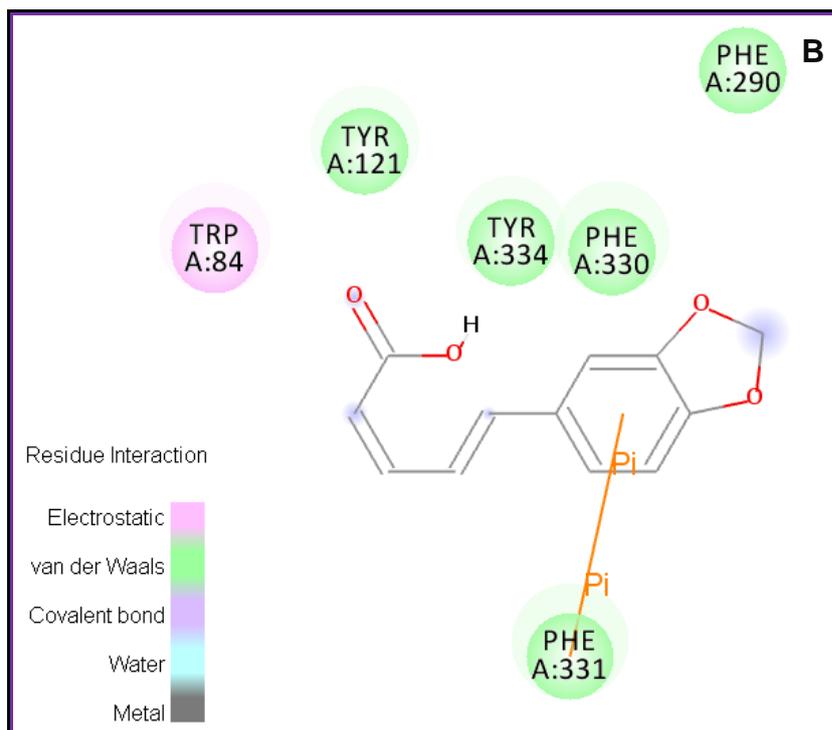
Algumas interações hidrofóbicas, com outros resíduos de aminoácidos, também ocorrem ao longo da cadeia. Interações desse tipo também foram encontradas com a piperina **12**.

Modo de interação B

No segundo grupo (modo de interação B), a posição dos anéis é semelhante à aquela apresentada pela piperina **12**. A orientação de maior escore (25,64) desse grupo está representada na **figura 12**.

Figura 12: Ácido piperínico **13** (modo de interação B) e aminoácidos do sítio ativo (A); Representação 2D do ácido piperínico **13** (modo de interação B) e interações no sítio ativo (B)





Nesse modo, ocorre interação eletrostática entre o grupamento carboxilato do ácido piperínico e o resíduo de Trp 84 (pertencente ao CAS).

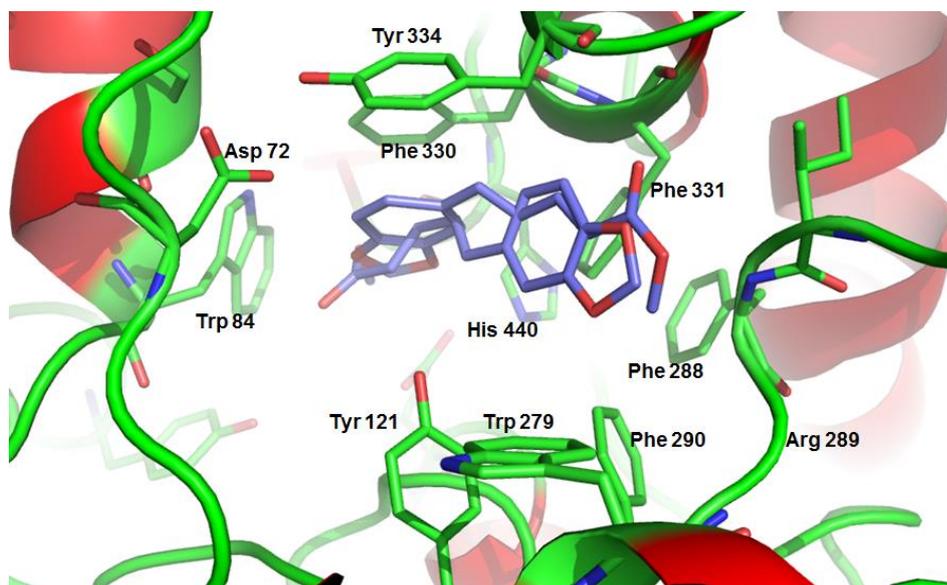
Uma interação do tipo empilhamento π - π entre o anel benzênico do ácido piperínico e o anel fenila da cadeia lateral do resíduo de Phe 331 também pode ser observada.

Além disso, interações de van der Waals com os aminoácidos Tyr 121, Tyr 334, Phe 330 e Phe 290 ocorrem em outros pontos da estrutura.

5.1.5 Simulação com o éster piperínico 14

Nos ensaios com o éster piperínico **14**, também foram observados dois modos de interação com a enzima, com 3 e 7 representantes respectivamente. A diferença entre os grupos está na inversão do posicionamento do grupo éster (**Figura 13**).

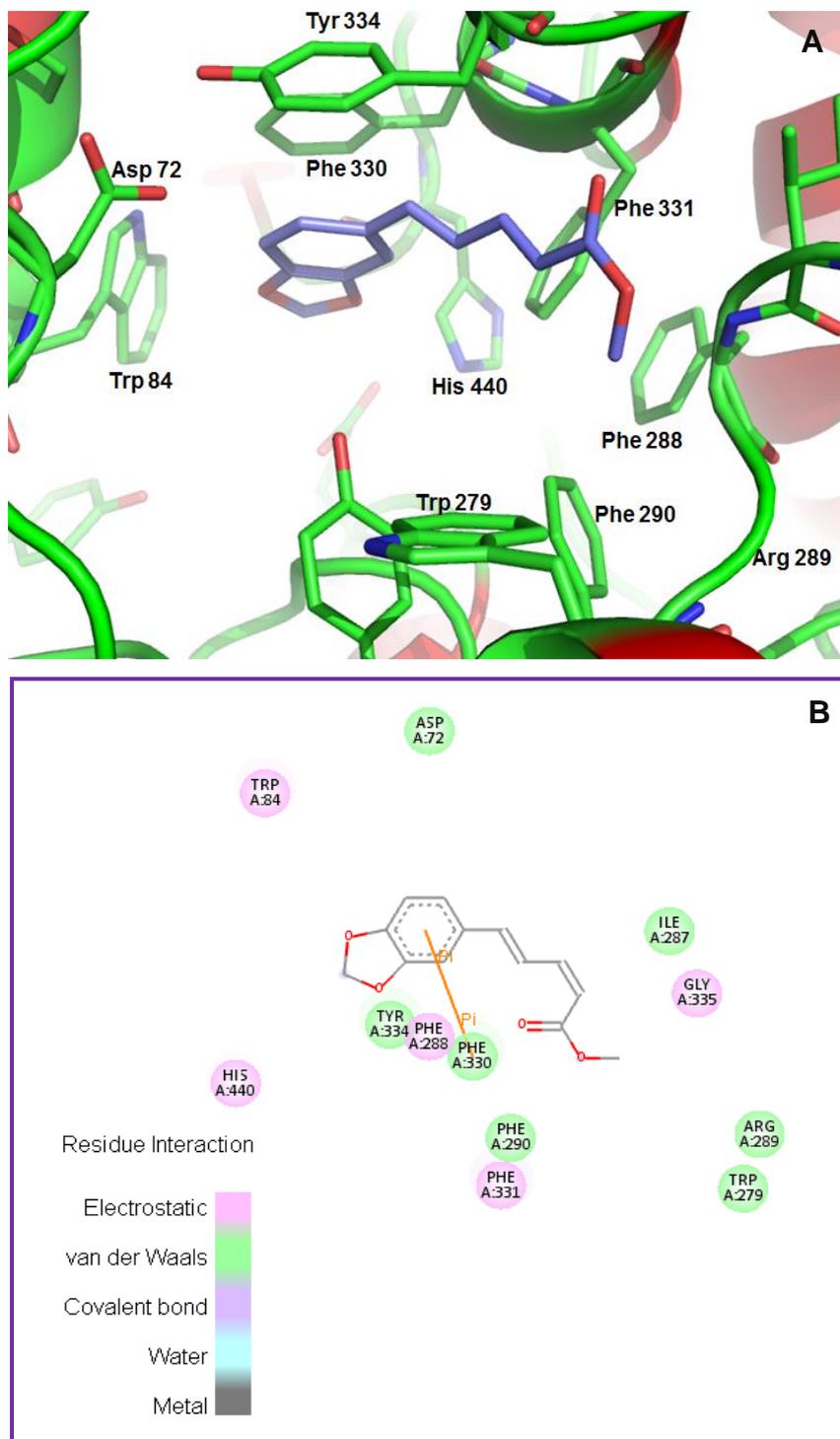
Figura 13: Representação 3D dos modos de interação entre o éster piperínico **14** (átomos de carbono em azul) e a acetilcolinesterase obtidas por *docking*.



Modo de interação A

No primeiro grupo, as três orientações apresentam inversão da posição dos anéis metilenodioxí e benzênico quando comparados à posição desses anéis na piperina. A orientação de maior escore (24,91) está representada na **figura 14**.

Figura 14: Éster piperínico **14** (modo de interação A) e aminoácidos do sítio ativo (A);
 Representação 2D do éster piperínico (modo de interação A) e interações no sítio ativo (B)



Nesse caso, o éster piperínico interage com a acetilcolinesterase ao longo de toda cadeia. Podem ser observadas interações eletrostáticas entre o anel metilenodioxí e resíduos de Trp 84 e His 440 (pertence à tríade catalítica da AChE).

Esse tipo de interação também ocorre em outras partes da estrutura com resíduos de Phe 288, Phe 331 e Gly 335.

É possível observar ainda uma interação do tipo empilhamento $\pi-\pi$ (hidrofóbica) entre o anel benzênico do éster piperínico **14** e o anel fenila da cadeia lateral do resíduo de Phe 330. Este resíduo pertence ao CAS e é um dos dois resíduos aromáticos que pertencem ao gargalo da garganta do sítio de ligação da AChE. Xu e colaboradores (2008) sugeriram que a orientação dos anéis desses dois aminoácidos controla a abertura/fechamento do gargalo.

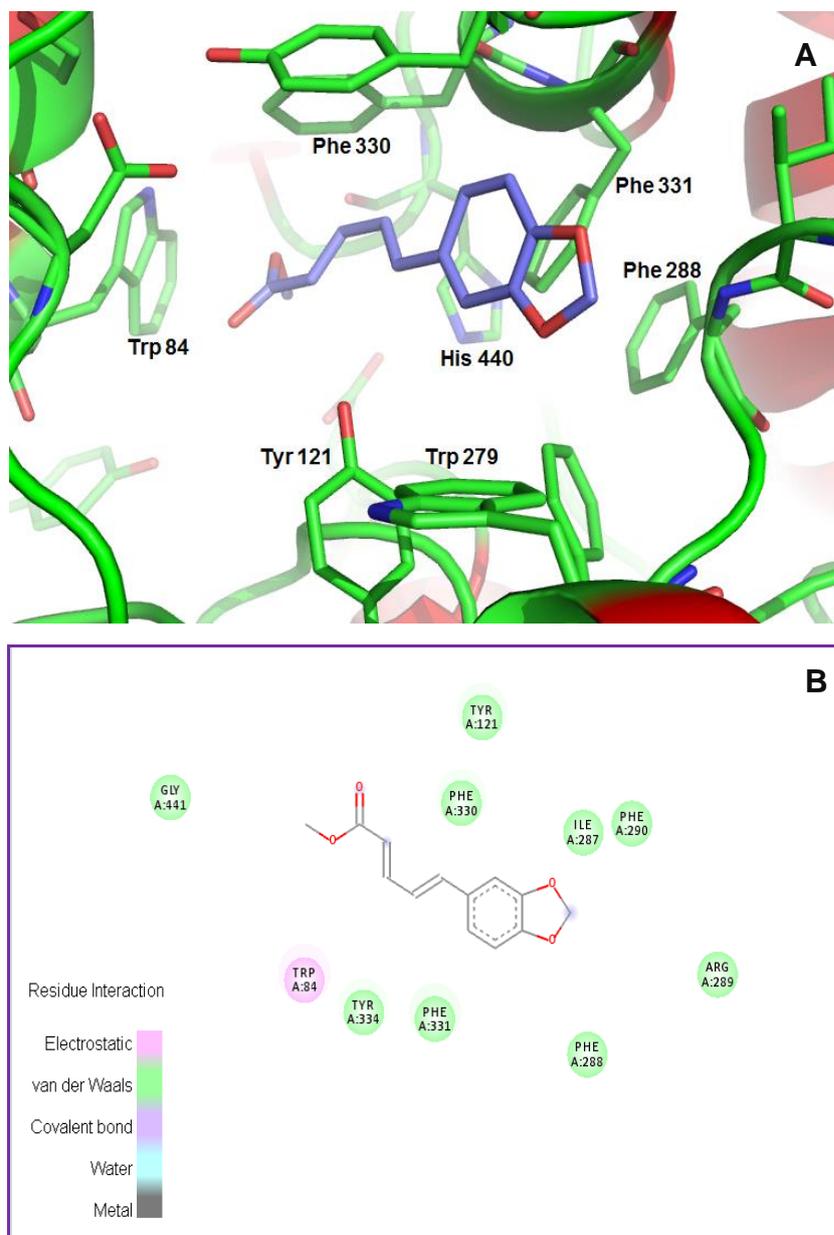
Dessa forma, é possível sugerir que em alguns casos, interações com esses resíduos contribuem com atividade anticolinesterásica por prejudicar efetivamente a entrada de ACh no sítio ativo.

Interações de van der Waals com resíduos de Tyr 334, Phe 290, Trp 279 entre outros, também ocorrem ao longo da cadeia do éster.

Modo de interação B

Um segundo modo de interação (b) foi observado entre o éster piperínico **14** e a acetilcolinesterase. Sete, das dez orientações calculadas, interagem com a enzima dessa maneira. A orientação de maior escore (24,97) está representada na figura a seguir.

Figura 15: Éster piperínico **14** (modo de interação B) e aminoácidos do sítio ativo (A);
 Representação 2D do éster piperínico (modo de interação B) e interações no sítio ativo (B)



Essa orientação do éster piperínico **14** apresenta uma interação dipolo entre a carbonila do grupo éster e o anel indol do Trp 84 (aminoácido que pertence ao CAS).

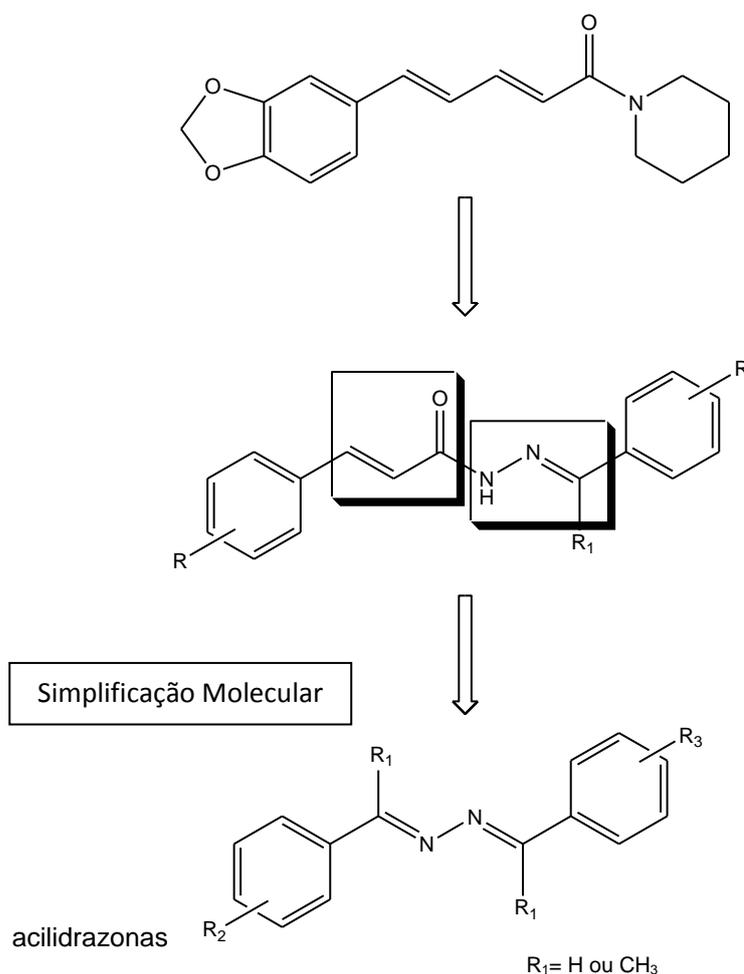
Além disso, existem diversas interações hidrofóbicas ao longo de toda a cadeia com resíduos de Gly 441, Phe 330, Phe 331, Tyr 334, Phe 288, isoleucina (Ile) 287, Phe 290 e Arg 289. A maioria desses aminoácidos interage também com a piperina **12**.

5.2 Planejamento de novos compostos

A necessidade de avaliar novos compostos para compreender melhor o modo de interação entre a piperina **12** e derivados e a acetilcolinesterase, apontada pelas simulações de *docking*, levaram ao planejamento, síntese e avaliação da atividade anticolinesterásica de uma série de azinas assimétricas.

Esses compostos foram planejados, com base na estratégia de simplificação molecular, a partir da estrutura das N-acilidrazonas, compostos que guardam semelhança estrutural com a piperina (**Figura 16**).

Figura 16: Planejamento de azinas por simplificação molecular de N-



Analisando a estrutura das N-acilidrazonas é possível notar a presença de duas funções químicas interessantes e frequentemente associadas a compostos com diferentes perfis farmacológicos: a carbonila $\alpha\beta$ insaturada ligada a um

grupamento aromático e o grupo azometino (-NHN=CH-), também ligado a anel aromático.

A presença dessas funções tem tornado compostos com essa estrutura, alvos para avaliação de diferentes atividades farmacológicas, que incluem atividade analgésica, anti-inflamatória, antitrombótica e tripanocida (FRAGA e BARREIRO, 2006; CARVALHO et al, 2012).

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

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

5.3 Síntese das azinas assimétricas

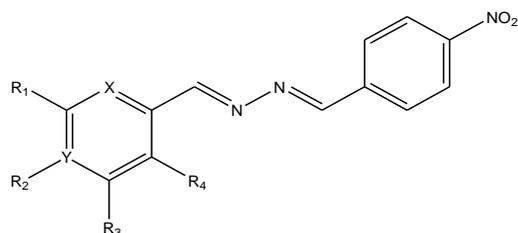
Foram sintetizadas 40 azinas assimétricas, divididas em quatro séries. O grupamento nitro na posição 4 foi fixado em um dos anéis e variou-se os substituintes do segundo anel.

A obtenção desses compostos passa pela síntese inicial de hidrazonas. Essas foram obtidas pelas reações entre o 4-nitrobenzaldeído e 4-nitroacetofenona com hidrato de hidrazina. A formação das hidrazonas foi confirmada por CGMS.

Os espectros de massas das hidrazonas **15** e **16** estão apresentados em anexo.

5.3.1 Síntese da série 1 (17-30)

Para a síntese da série 1, foram utilizadas quantidades equimolares da hidrazona **15** e benzaldeídos substituídos conforme procedimento A. Os percentuais de conversão, obtidos por CGMS, estão apresentados na **tabela 1**.

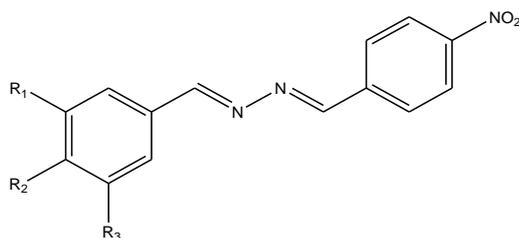
Tabela 1: Percentuais de formação dos compostos da série 1

Composto	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	X	Y	% Conversão
17	H	H	H	H	CH	C	62,8
18	H	CH ₃	H	H	CH	C	70,3
19	H	CH ₂ CH ₃	H	H	CH	C	55
20	H	CH(CH ₃) ₂	H	H	CH	C	69,6
21	H	OH	H	H	CH	C	52,7
22	H	OCH ₃	H	H	CH	C	45
23	H	OCH ₂ CH ₃	H	H	CH	C	39,5
24	OCH ₃	OH	OCH ₃	H	CH	C	46
25	OCH ₃	OCH ₃	OCH ₃	H	CH	C	44,5
26	OCH ₃	OH	H	H	CH	C	57,5
27	H	N(CH ₃) ₂	H	H	CH	C	53,3
28	H	H	H	NO ₂	CH	C	59,25
29	H	H	H	H	N	C	67,2
30	H	H	H	H	CH	N	48,1

5.3.2 Síntese da série 2 (31-36)

Para a síntese da série 2, foram utilizadas quantidades equimolares da hidrazona **15** e acetofenonas substituídas conforme procedimento B. Os percentuais de conversão, obtidos por CGMS, estão apresentados na **tabela 2**.

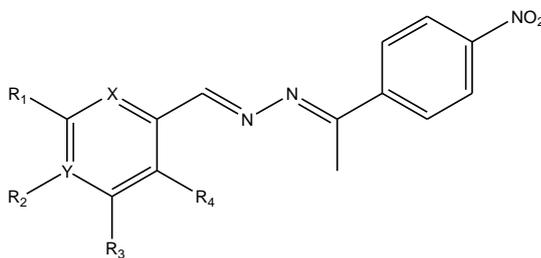
Tabela 2: Percentuais de formação dos compostos da série 2



Compostos	R ₁	R ₂	R ₃	% de Conversão
31	H	H	H	54,2
32	H	CH ₃	H	55,1
33	H	OCH ₃	H	54,5
34	H	NH ₂	H	34
35	H	F	H	37,2
36		Furil		57,4

5.3.3 Síntese da série 3 (37-50)

Para a síntese da série 3, foram utilizadas quantidades equimolares da hidrazona **16** e benzaldeídos substituídos conforme procedimento C. Os percentuais de conversão, obtidos por CGMS, estão apresentados na **tabela 3**.

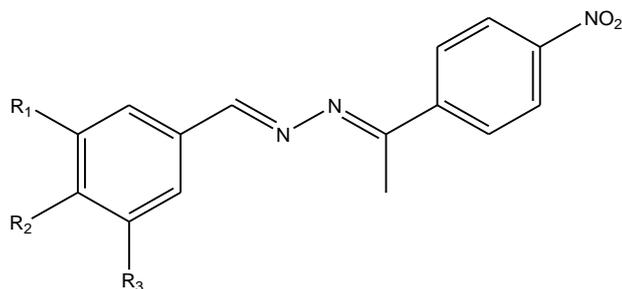
Tabela 3: Percentuais de formação dos compostos da série 3

Composto	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	X	Y	% de Conversão
37	H	H	H	H	CH	C	98
38	H	CH ₃	H	H	CH	C	94
39	H	CH ₂ CH ₃	H	H	CH	C	95
40	H	CH(CH ₃) ₂	H	H	CH	C	97
41	H	OH	H	H	CH	C	83,6
42	H	OCH ₃	H	H	CH	C	88,7
43	H	OCH ₂ CH ₃	H	H	CH	C	90,2
44	OCH ₃	OH	OCH ₃	H	CH	C	80,8
45	OCH ₃	OCH ₃	OCH ₃	H	CH	C	79
46	OCH ₃	OH	H	H	CH	C	90,3
47	H	N(CH ₃) ₂	H	H	CH	C	97,7
48	H	H	H	NO ₂	CH	C	88
49	H	H	H	H	N	C	93,1
50	H	H	H	H	CH	N	91,2

5.3.4 Síntese da série 4 (51-56)

Para a síntese da série 4, foram utilizadas quantidades equimolares da hidrazona **16** e acetofenonas substituídas conforme procedimento D. Os percentuais de conversão, obtidos por CGMS, estão apresentados na **tabela 4**.

Tabela 4: Percentuais de formação dos compostos da série 4

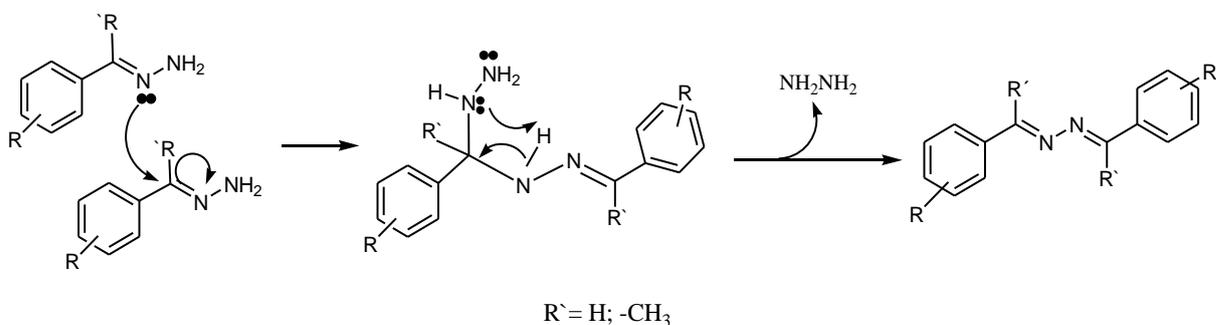


Composto	R ₁	R ₂	R ₃	% de conversão
51	H	H	H	90
52	H	CH ₃	H	76,6
53	H	OCH ₃	H	56,7
54	H	NH ₂	H	54,7
55	H	F	H	59,1
56		Furil		86,38

De forma geral, as séries 3 e 4 apresentaram percentuais maiores de conversão dos reagentes de partida em produto, quando comparadas as séries 1 e 2, respectivamente. Esse fato pode ser explicado pela maior tendência da hidrazona **15**, comparada a hidrazona **16**, de formar dímeros.

Conforme demonstrado no **esquema 12**, devido a sua alta reatividade, as hidrazonas podem reagir entre si formando dímeros e liberando hidrazina no meio reacional.

Esquema 12: Mecanismo de formação de *bis* hidrazonas ou azinas simétricas (dímeros).



A hidrazina liberada pode então reagir com o segundo aldeído e formar uma nova hidrazona e conseqüentemente um novo dímero. Essas reações simultâneas diminuem o percentual de formação do produto esperado.

Esse fato explica os menores percentuais de formação de produto nas reações das séries 1 e 2. Nessas, além do produto esperado, houve formação dos dois dímeros.

5.4 Seleção de compostos para avaliação de atividade biológica

Tanto a piperina **12** e derivados ácido **13** e éster **14** quanto alguns dos compostos sintetizados foram selecionados para a avaliação de sua atividade anticolinesterásica e antioxidante.

As estruturas escolhidas estão ilustradas na **figura 17**. Os dados analíticos e espectroscópicos desses compostos estão em anexo.

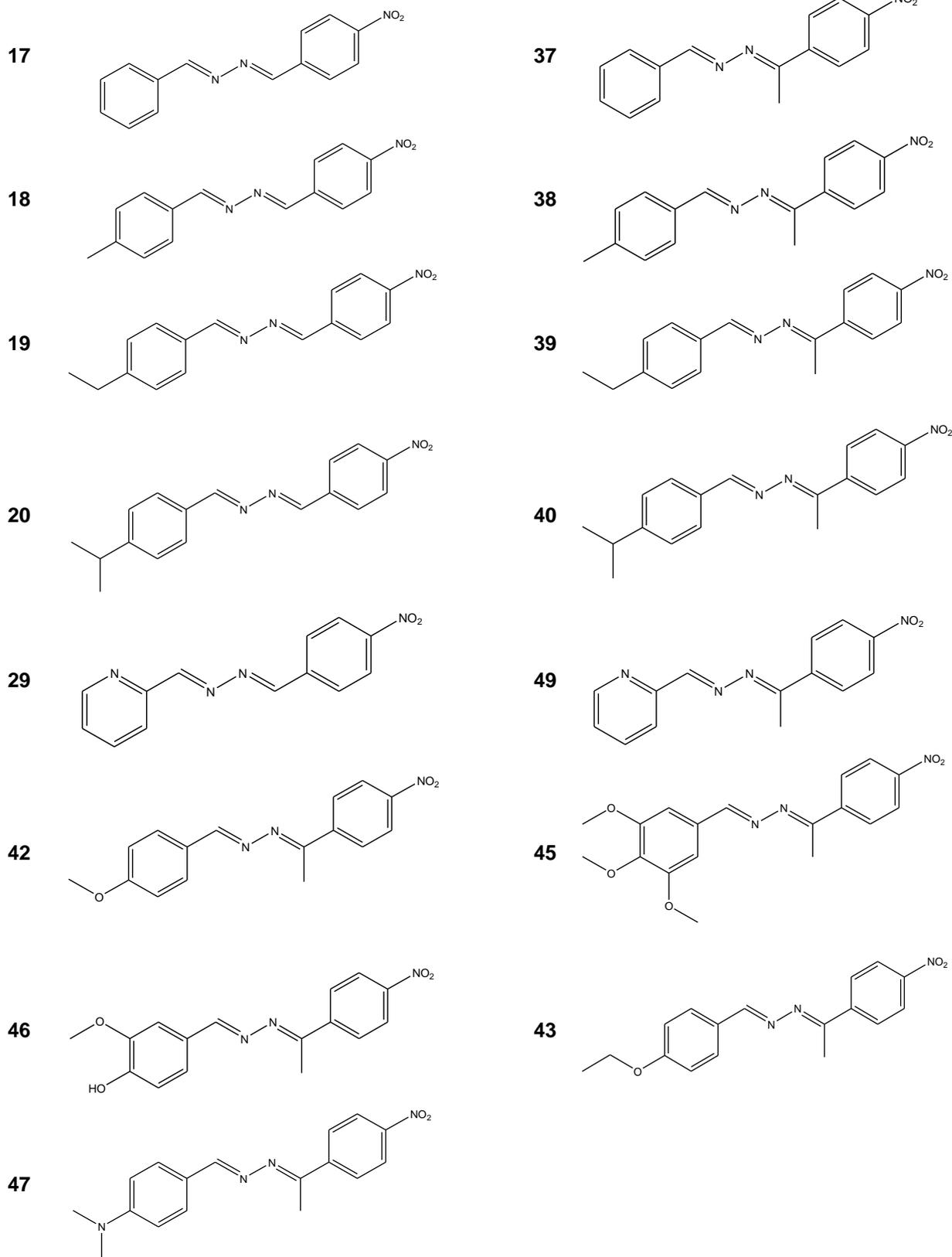
Inicialmente, a seleção das azinas teve como objetivo verificar se a presença de radicais alquila no primeiro anel exercem influência sobre a atividade anticolinesterásica (**17, 18, 19 e 20**) e quais diferenças seriam provocadas pela inserção de um grupamento metila no carbono adjacente ao segundo anel aromático (**37, 38, 39 e 40**).

Os compostos **29 e 49** foram selecionados por apresentar uma substituição bioisostérica (CH→N) na posição 2 do primeiro anel.

A análise da influência de radicais oxigenados (-OH, -OCH₃ e -OCH₂CH₃) determinou a escolha dos compostos **42, 43, 45 e 46**.

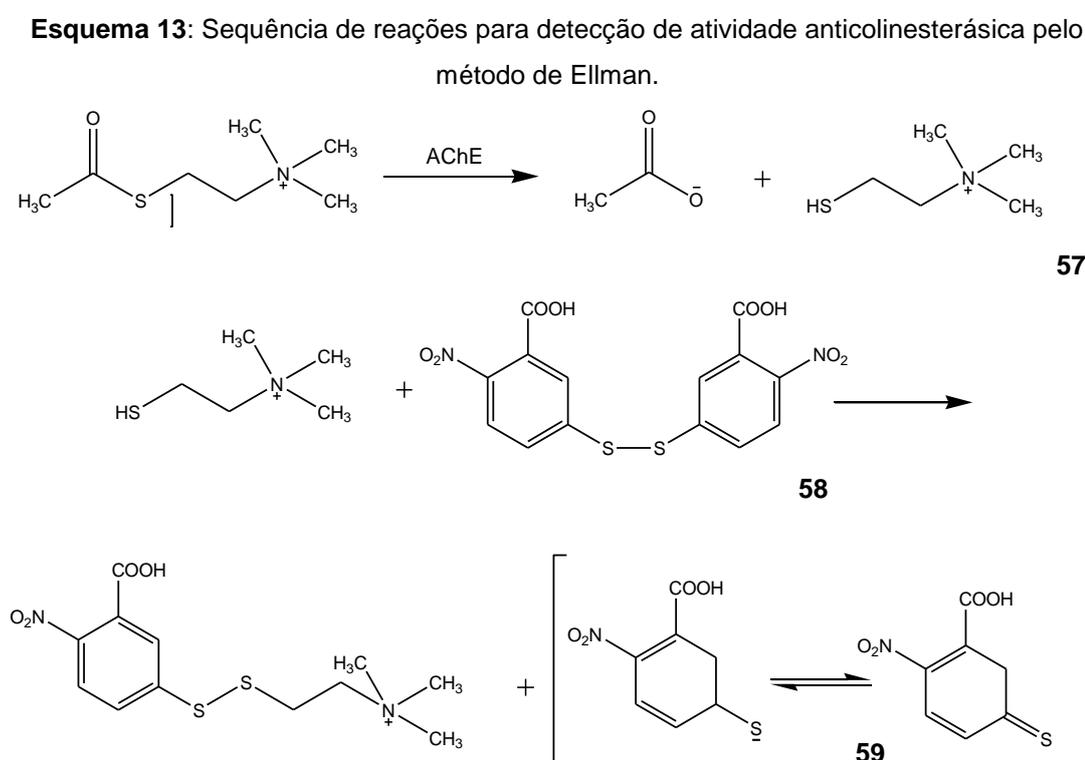
Por fim, o composto **47** apresenta uma substituição bioisostérica (CH→N), no radical da posição 4, quando comparado aos compostos **20 e 40**.

Figura 17: Compostos selecionados para os testes biológicos



5.5 Avaliação da atividade anticolinesterásica *in vitro*

Os testes para determinação da atividade anticolinesterásica foram realizadas com base no método de Ellman. Nesse método, a enzima hidrolisa o substrato acetiltiocolina resultando na produção de Tiocolina **57** que reage com 5,5'-ditio-bis(2-nitrobenzóico) **58**, conhecido como reagente de Ellman, para produzir 2-nitrobenzoato-5-mercaptotiocholine/5-tio-2-nitrobenzoato **59** que pode ser detectado a 412 nm (**esquema 13**).



Quando substâncias capazes de inibir a acetilcolinesterase são adicionadas, a absorbância diminui, indicando a inibição da enzima.

Este método fotométrico exige uma elevada solubilidade em água de todos os reagentes e principalmente das amostras, uma vez que as soluções e tampões são preparados em meio aquoso (ELLMAN et al, 1961).

Esse problema foi parcialmente superado por Rhee e colaboradores (2001) que adaptaram a metodologia permitindo o uso de soluções não aquosas e monitoramento da produção do composto colorido em placas de 96 poços utilizando um leitor de microplaca.

Essa adaptação tornou o método bastante eficiente e sensível, pois permite a análise de um grande número de substâncias em pouco tempo e em concentrações muito menores, tornando-o o mais utilizado para avaliação de compostos naturais e sintéticos (DI GIOVANNI et al, 2008).

5.5.1 Ensaio em microplaca pelo Método de Ellman modificado

Piperina e derivados

Os percentuais de inibição apresentados pela piperina e derivados, assim como a concentração máxima em que foram testados, estão descritos na **tabela 5**.

Tabela 5: Porcentagem de inibição da piperina e derivados sobre a AChE.

Composto	% Inibição*	Concentração	Solvente
Piperina 12	<u>46,5</u>	1 mMol	MeOH
Ácido piperínico 13	<u>50,6</u>	1 mMol	MeOH
Ester piperínico 14	<u>63,6</u>	1 mMol	MeOH
Fisostigmina	<u>93,8</u>	1mMol	MeOH

Resultados são a média (%) (n=3);

Confirmando que existe interação entre a piperina e derivados ácido e éster e a acetilcolinesterase, fato apontado pelos ensaios de *docking*, os compostos demonstraram capacidade de inibir a enzima *in vitro*, com percentuais de 46,5, 50,6 e 63,6% respectivamente, quando comparados ao controle positivo (fisostigmina).

A atividade dos compostos parece estar relacionada às diferenças estruturais entre eles. Inicialmente, a retirada do anel piperidínico gera aumento da atividade no ácido. Já a esterificação parece exercer influência ainda maior, provavelmente devido ao aumento da lipofilicidade do composto.

Análogos sintetizados

Os percentuais de inibição da acetilcolinesterase apresentados pelas azinas selecionadas (**figura 17**), assim como a concentração máxima em que foram testados, estão descritos na **tabela 6**.

Tabela 6: Percentuais de inibição das azinas **17, 18, 19, 20, 29, 37, 38, 39, 40, 42, 43, 45, 46, 47 e 49** sobre a AChE.

Composto	% Inibição*	Concentração	Solvente
17	<u>0,5</u>	100 µMol	MeOH/CHCl ₃ 95/5
18	NI**	10 µMol	MeOH/CHCl ₃ 50/50
19	NI	10 µMol	MeOH/CHCl ₃ 50/50
20	NS***	10 µMol	MeOH/CHCl ₃ 95/5
29	NI	10 µMol	MeOH/CHCl ₃ 50/50
37	<u>18,34</u>	22,46 µMol	MeOH/CHCl ₃ 95/5
38	NI	100 µMol	MeOH/CHCl ₃ 95/5
39	NS	100 µMol	MeOH/CHCl ₃ 95/5
40	NI	10 µMol	MeOH
42	NI	100 µMol	MeOH/CHCl ₃ 95/5
43	NS	100 µMol	MeOH/CHCl ₃ 95/5
45	NI	100 µMol	MeOH/CHCl ₃ 95/5
46	<u>2,99</u>	100 µMol	MeOH/CHCl ₃ 95/5
47	<u>15,56 %</u>	100 µMol	MeOH/CHCl ₃ 95/5
49	<u>17,43</u>	10 µMol	MeOH

*Resultados são a média (%) (n=3); **Não inibiu; *** Não solubilizou.

A avaliação do percentual de inibição da atividade enzimática pelo método de Ellman revelou ausência de atividade ou baixos valores em geral. Somente os compostos **17, 37, 46, 47 e 49** apresentaram capacidade de inibir a acetilcolinesterase *in vitro*.

Entre estes, os maiores percentuais de inibição foram apresentados pelos compostos **37** (18, 24%) e **49** (17,53%), que não têm substituintes no primeiro anel.

O composto **47**, com radical dimetilamino na posição 4, apresentou percentual de inibição de 15, 56%.

Já os compostos **17** e **46** apresentaram percentuais de 0,5 e 2,99% o que os classifica como possíveis falsos positivos (KHALID et al., 2004; ORHAN et al., 2007).

É preciso considerar, entretanto, que os testes foram limitados pela baixa solubilidade dos compostos em água, o que não permitiu que as análises fossem realizadas em concentrações maiores.

5.6 Avaliação da atividade antioxidante por voltametria

O potencial antioxidante de compostos naturais e sintéticos pode ser avaliado por diversos métodos, envolvendo desde ensaios bioquímicos simples, como os que utilizam β -caroteno ou o radical livre estável 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH), a ensaios mais complexos baseados em técnicas eletroquímicas.

As técnicas voltamétricas podem correlacionar parâmetros eletroquímicos, como potenciais de oxidação e intensidade de corrente com a capacidade antioxidante. Entre as técnicas mais difundidas destacam-se a voltametria cíclica e a voltametria de pulso diferencial (ALVES et al, 2010).

Nessas técnicas, de forma geral, valores baixos de potencial anódico associados a valores altos de intensidade de corrente predizem um alto poder antioxidante.

Piperina e derivados

A piperina **12**, o ácido piperínico **13** e o éster piperínico **14** tiveram seu potencial antioxidante avaliado pela combinação de três técnicas eletroquímicas: voltametria cíclica, voltametria de pulso diferencial e voltametria de onda quadrada.

Os três compostos apresentaram eletroatividade. O maior potencial antioxidante foi apresentado pelo composto **13**, com picos em 0,26 e 1,07 V. Os resultados experimentais são apresentados nas figuras a seguir.

Figura 18: Voltamograma cíclico (A); Voltamograma de pulso diferencial (B), Voltamograma de onda quadrada (C), obtidos para a piperina **12**;

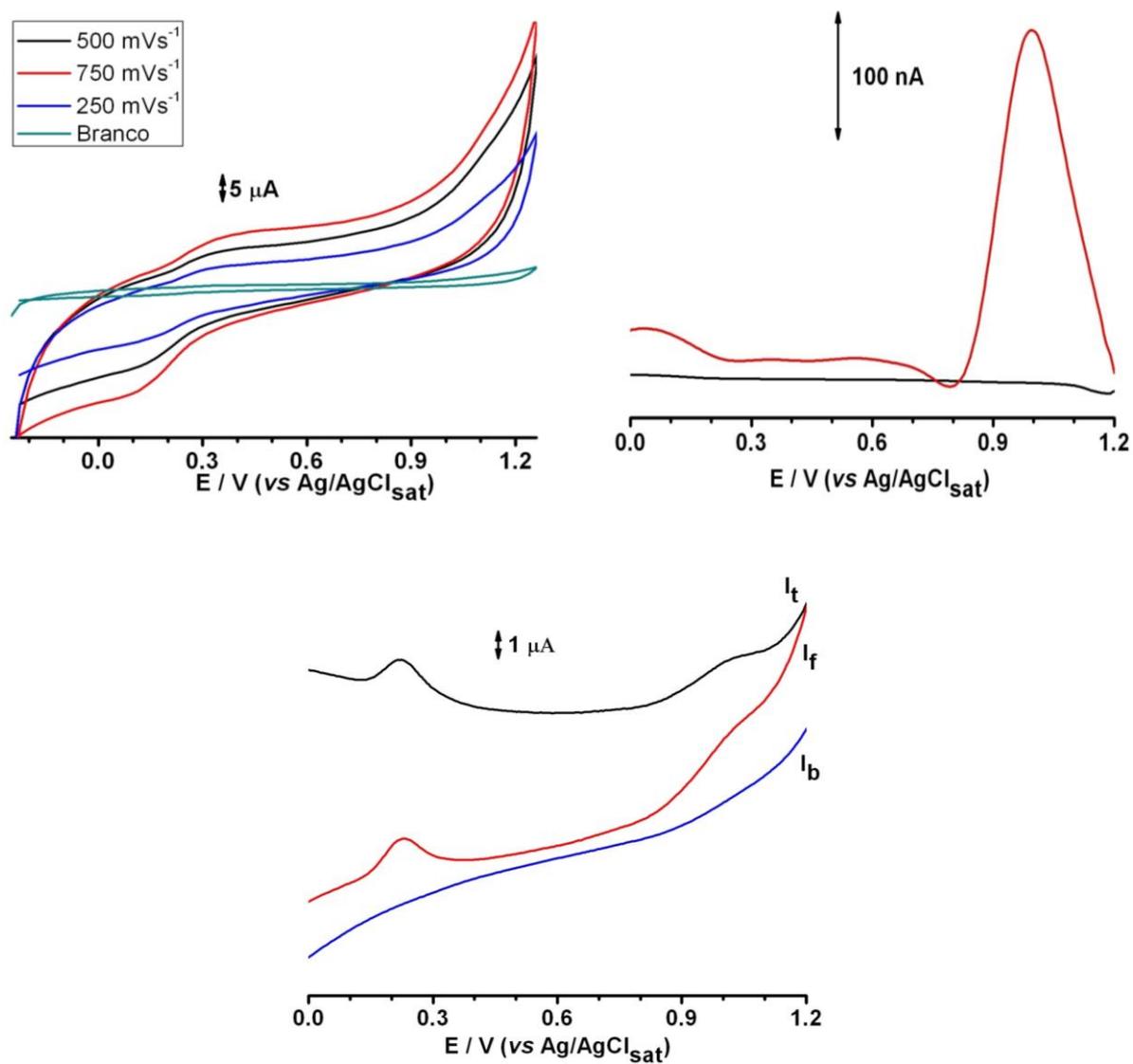


Figura 19: Voltamograma cíclico (A); Voltamograma de pulso diferencial (B), Voltamograma de onda quadrada (C), obtidos para o ácido piperínico **13**;

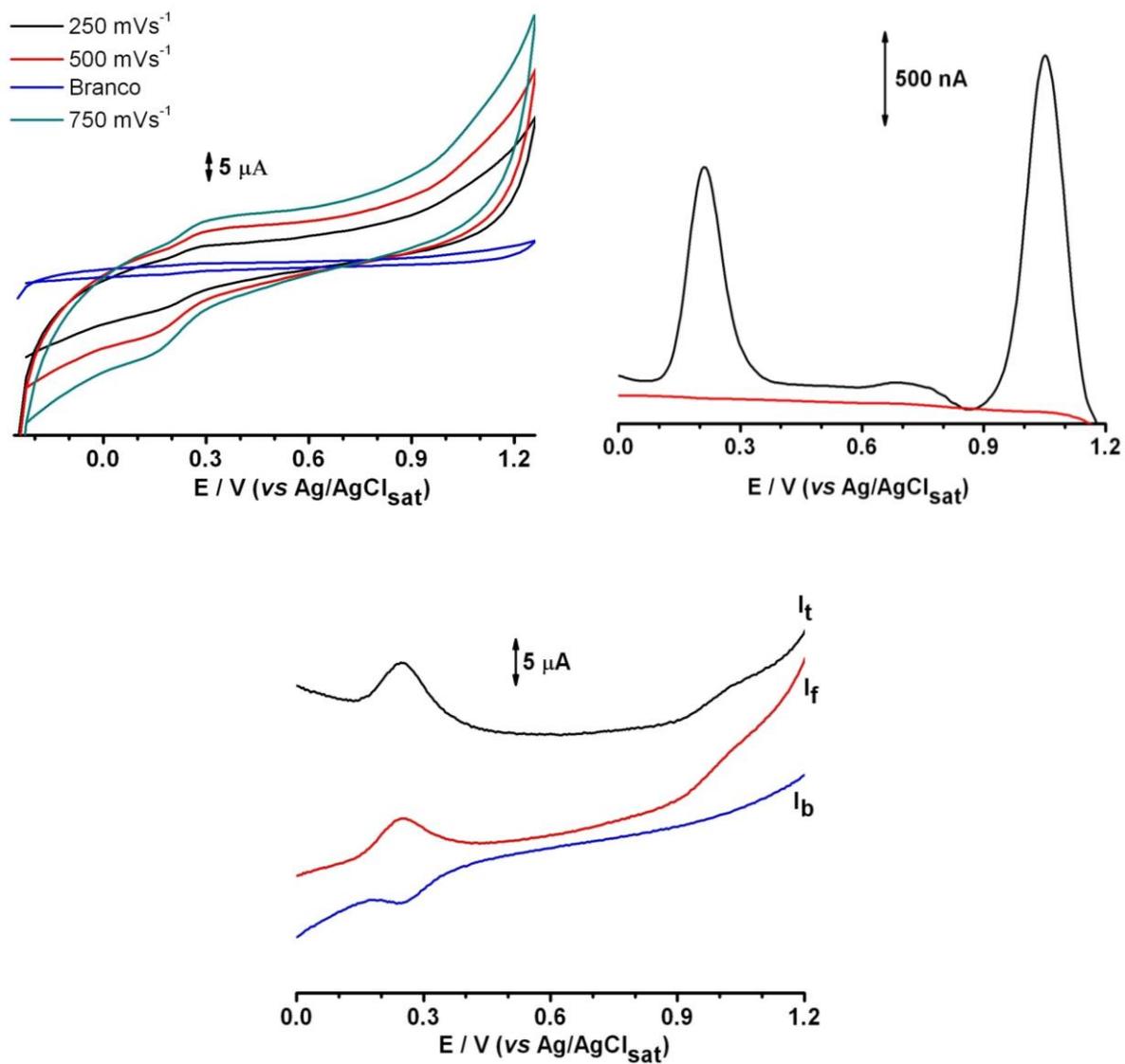
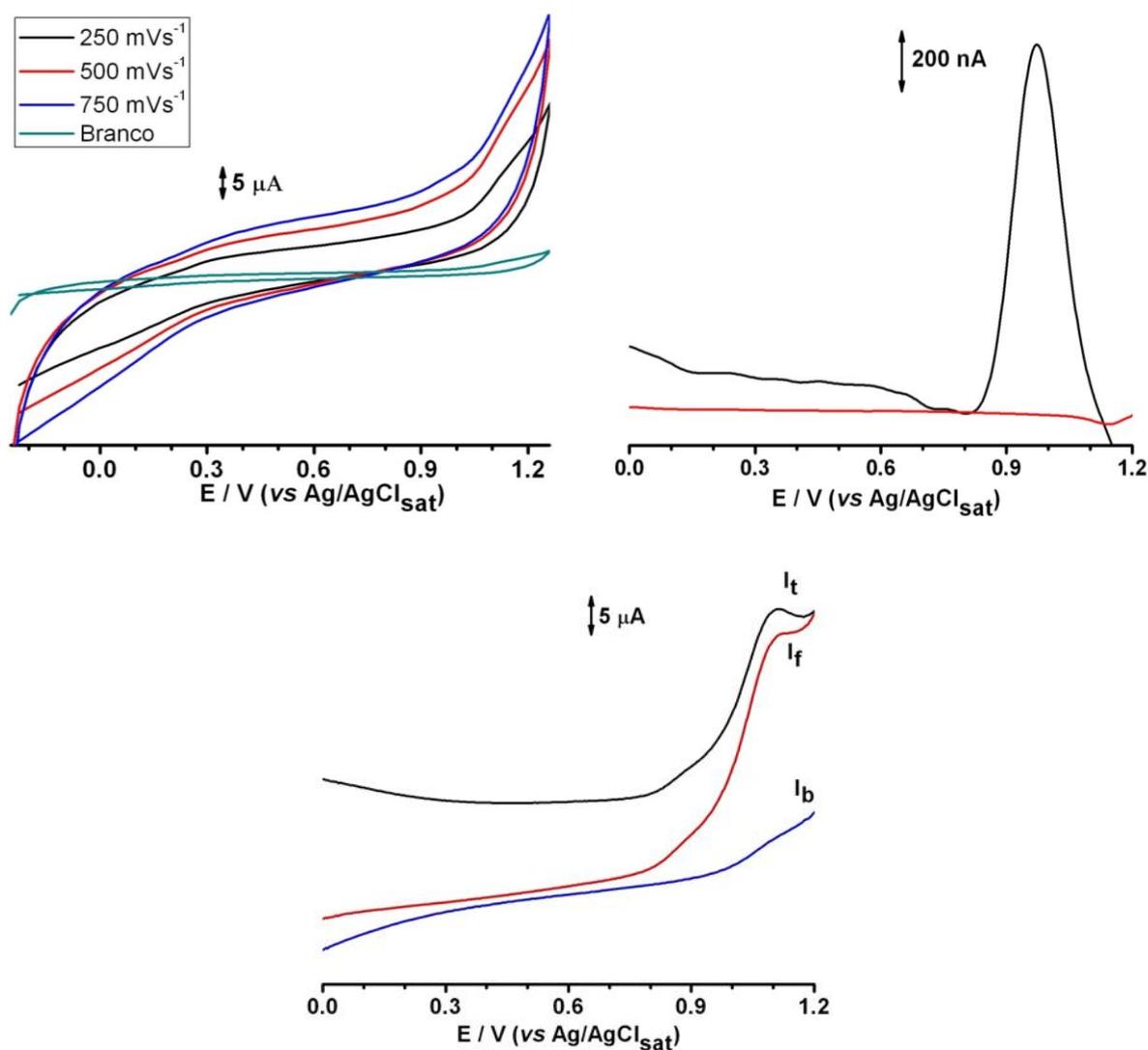


Figura 20: Voltamograma cíclico (A); Voltamograma de pulso diferencial (B), Voltamograma de onda quadrada (C), obtidos para o éster piperínico **14**;



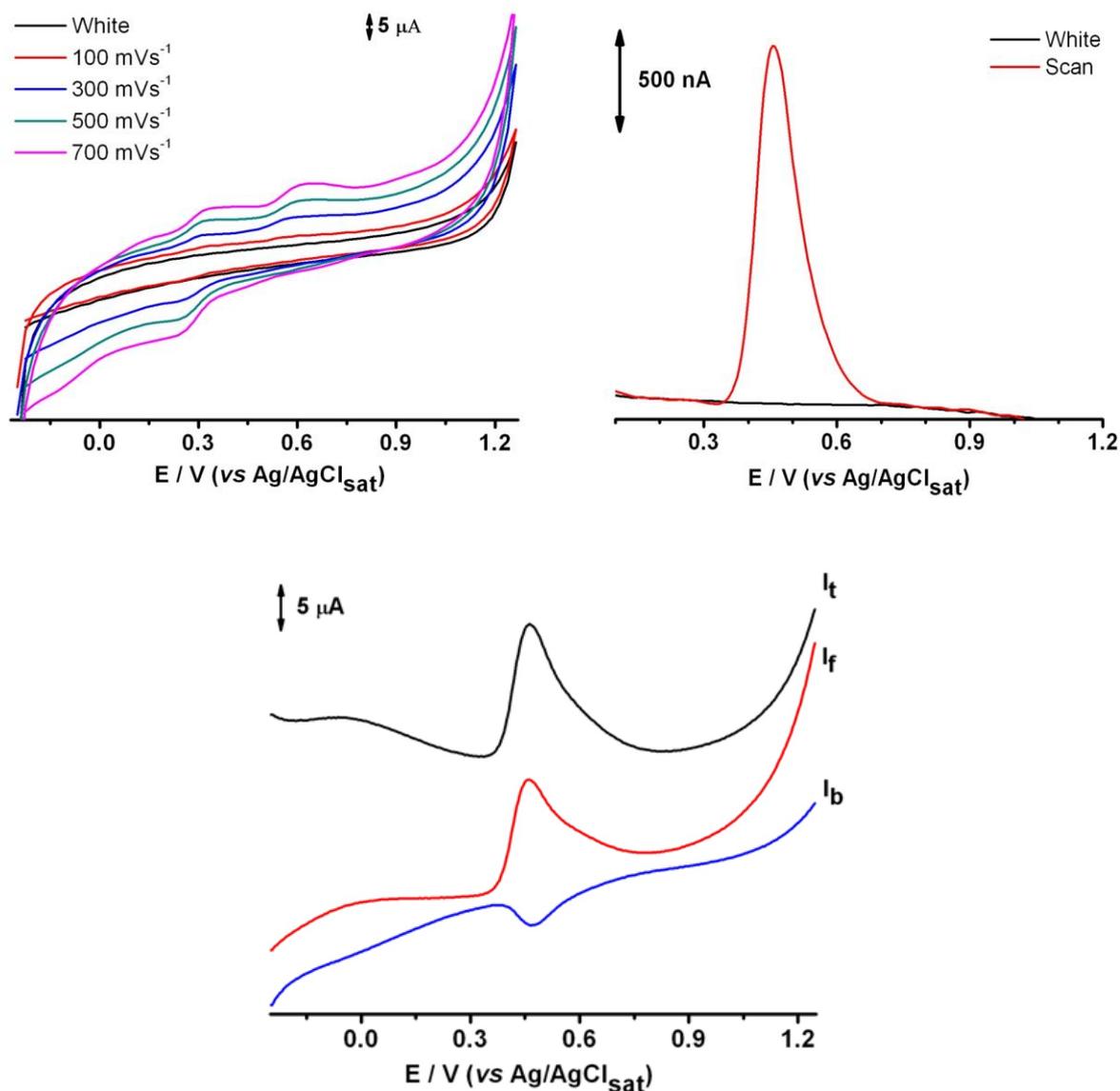
Todos os voltamogramas apresentados tiveram a linha de base subtraída e corrigida. Este tratamento matemático não introduz qualquer artefato, no entanto, a intensidade de pico é, em alguns casos, reduzida (<10%) em relação à curva tratada. Este procedimento torna melhor e mais clara a identificação dos picos.

Análogos sintetizados

As azinas submetidas ao teste de atividade anticolinesterásica também tiveram seu potencial antioxidante avaliado por voltametria (VC, VPD e VOQ). Destes, somente os compostos **45** e **46** apresentaram eletroatividade.

O composto **46** apresentou pico bem definido em 0.46 V, característico de substâncias fitoantioxidantes. Os voltamogramas são apresentados na **figura 21**.

Figura 21: Voltamograma cíclico (A); Voltamograma de pulso diferencial (B), Voltamograma de onda quadrada (C), obtidos para o composto **46**;



Já o composto **45** apresentou um pico pouco intenso em 1.13 V o que significa que a substância pode apresentar perfil antioxidante fraco ou pró-oxidante. Os demais compostos não apresentaram eletroatividade.

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

As simulações de docking entre a piperina **12** e derivados ácido **13** e éster **14** e a acetilcolinesterase confirmaram a existência de interação entre esses compostos e diversos resíduos de aminoácidos que compõe o sitio ativo da enzima.

Todavia, não foi possível definir um modo de interação único entre o ácido e éster piperínico e a AChE, já que dois modos de interação possíveis foram apontados pelo programa.

Com o intuito de compreender quais características estruturais são determinantes para a interação e assim facilitar a opção por um dos modos foi sintetizada uma série de azinas assimétricas análogas à piperina **12**. A formação dos compostos foi confirmada por RMN, EM e IV.

A atividade anticolinesterásica dos compostos foi satisfatoriamente avaliada *in vitro* através de ensaio em microplaca pelo método de Ellman.

Tanto a piperina **12** quanto os derivados ácido **13** e éster **14** apresentaram atividade anticolinesterásica, o que permite sugerir que a inibição da enzima é um dos mecanismos pelo qual a piperina **12** minimiza o comprometimento da memória e da função cognitiva, característicos na doença de Alzheimer.

Entretanto, para que se conclua sobre seu potencial terapêutico são necessárias outras análises, como a determinação dos valores de IC50 e biodisponibilidade.

Entre os compostos sintetizados que foram testados, cinco apresentaram capacidade de inibir a acetilcolinesterase. A baixa solubilidade desses compostos em água limitou a realização do teste, já que as análises só puderam ser realizadas com baixas concentrações.

O potencial antioxidante dos compostos foi avaliado por voltametria, devido a recente utilização de compostos antioxidantes no tratamento complementar da DA. Entre os compostos que apresentaram eletroatividade, o composto **46** ((7*E*, 8*E*) -1-(3-metoxi-4-hidroxi-benzilideno) -2-(1 - (4-nitrofenil)-etilideno)-hidrazina) se mostrou o mais promissor.

REFERÊNCIAS

ABRAHAM, Donald J. **Burger's Medicinal Chemistry and Drug Discovery**. 6. ed.. Wiley-Interscience v. 1, p. 113-119, 2003.

ALVES, C. Q.; DAVID, J. M.; DAVID, J. P.; BAHIA, M. V.; AGUIAR, R. M. Métodos para determinação de atividade antioxidante *in vitro* em substratos orgânicos. **Química Nova** v.33, p.2202-2210, 2010.

ALZHEIMER'S ASSOCIATION. Alzheimer's Disease Facts and Figures. **Alzheimer's & Dementia** v.6, p.158-194, 2010.

ANDRICOPULO, A. D.; SALUM, L. B.; ABRAHAM, D. J. Structure-Based Drug Design Strategies in Medicinal Chemistry. **Current Topics in Medicinal Chemistry** v.9, p771-790, 2009.

ANSTEY, K.; VON SANDEN, C.; SALIM, A.; KEARNEY, R. Smoking as a risk factor for dementia and cognitive decline: a meta-analysis of prospective studies. **American Journal of Epidemiology** v.166, p.367–378, 2007.

BARREIRO, E. J.; Estratégia de simplificação molecular no planejamento racional de fármacos: a descoberta de novo agente cardioativo. **Química Nova** v.25, p.1172-1180, 2002.

BARREIRO, E. J.; FRAGA, C. A. M.; **Química medicinal: As bases moleculares das ações dos fármacos**. 2º edição. ARTMED, 2008.

BLENNOW, K.; de LEON, M. J.; ZETTERBERG, H. Alzheimer's disease. **The Lancet** v.368, p. 387–403, 2006.

CAVASOTTO, C.; N, ORRY. Ligand Docking and Structure-based Virtual Screening in Drug Discovery. **Current Topics in Medicinal Chemistry** v.7, p.1006-1014, 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.

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.

CRAIG, R.; STITZEL, R. E. **Farmacologia Moderna: com Aplicações Clínicas**. 6ª edição. Guanabara Koogan, p. 347-348, 113-114, 2005.

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

DI GIOVANNI, S.; BORLOZ, A.; URBAIN, A.; MARSTON, A.; HOSTETTMANN, K.; CARRUPT, P. A.; REIST, M. In vitro screening assays to identify natural or synthetic acetylcholinesterase inhibitors: thin layer chromatography versus microplate methods. **European Journal of Pharmaceutical Sciences** v.33, p.109-119, 2008.

ELLMAN, G. L.; COURTNEY, K. D.; ANDRES, V.; FEATHERSTONE, R. M. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. **Biochemical Pharmacology** v.7, p.88-95, 1961.

ESSA, M. M.; VIJAYAN, R. K.; CASTELLANO-GONZALEZ, G.; MEMOM, M. A.; BRAIDY, N.; GIULLEMIN, G. J. Neuroprotective Effect of Natural Products Against Alzheimer's Disease. **Neurochemical Research** v.37, p.1829–1842, 2012.

FINDEIS, M. A. The role of amyloid β peptide 42 in Alzheimer's disease. **Pharmacology & Therapeutics** v.116, p.266–286, 2007.

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

FRAGA, C. A. M.; BARREIRO, E. J. Medicinal Chemistry of N-Acylhydrazones: New Lead-Compounds of Analgesic, Anti-inflammatory and Antithrombotic Drugs. **Current Medicinal Chemistry** v.13, p.167-198, 2006.

FRANCIS, P. T.; PALMER, A. M.; SNAPE, M.; WILCOCK, G. K. J. **Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry** v.66 p.137, 1999.

GINSBERG, S. D.; CHE, S.; COUNTS, S. E.; MUFSON, E. J. Single cell gene expression profiling in Alzheimer's disease. **NeuroRx** v.3, p.302–318, 2006.

GIORDANI, R. B.; PAGLIOSA, L. B.; HENRIQUES, A. T.; ZUANAZZI, J. A. Investigaç o do potencial antioxidante e anticolinester sico de *Hippeastrum* (Amaryllidaceae). **Qu mica Nova** v.31, p.2042-2046, 2008.

GOEDERT, M., SPILLANTINI, M. G. A century of Alzheimer's disease. **Science** v.314, p.777–78, 2006.

GOODMAN, L. S. *et al.* **Goodman & Gilman's: the pharmacological basis of therapeutics**. 11.ed. New York: McGraw-Hill, p. 538-540, 2006.

HAREL, M.; SCHALK, I.; EHRET-SABATIER, L.; BOUET, L.; GOELDNER, M.; HIRTH, C.; AXELSEN, P. H.; SILMAN, I.; SUSSMAN, J. L. Quaternary ligand binding to aromatic residues in the active-site gorge of acetylcholinesterase. **Biochemistry** v.90, p. 9031-9035, 1993.

HOSTETTMANN, K.; QUEIROZ, E.F.; VIEIRA, P.C. "Princ pios Ativos de Plantas Superiores". **EdUFSCar** 1  ed, p.9-36, 2003.

HOUGHTON, P. J.; HOWES, M. J.; LEE, C. C.; STEVENTON, G. Uses and abuses of in vitro tests in ethnopharmacology: Visualizing an elephant. **Journal of Ethnopharmacology** v.110, p. 391-400, 2007.

HUANG, S., GRINTER, S. Z., ZOU, X. Scoring functions and their evaluation methods for protein–ligand docking: recent advances and future directions. **Physical Chemistry Chemical Physics** v.12, p.12899–12908, 2010

IKAN, R. **Natural Products, a Laboratory Guide**, 2° edição. Academic Press: New York, 1991.

JIN, J.; ZHANG, J.; GUO, N.; FENG, H.; LI, H.; LIANG, C.; SUN, K; WU, X.; WANG, X.; LIU, M.; DENG, X.; YU, L. The plant alkaloid piperine as a potential inhibitor of ethidium bromide efflux in *Mycobacterium smegmatis*. **Journal of Medical Microbiology**. v.60, p.223–229, 2011.

KAMAU, E.; MUSTATA, G. Pharmacophore model development for the identification of novel Acetylcholinesterase inhibitors. ccbd.pitt.edu (2007).

KHALID, A.; UL-HAQ, Z.; GHAYUR, M. N.; FERROZ, F.; RAHMAN, A.; GILANI, A. H.; CHOUDHARY, M. I. Cholinesterase inhibitory and spasmolytic potential of steroidal alkaloids. **Journal of Steroid Biochemistry** v.92, p.477–484, 2004.

KIM, K. J; LEE, M. S; JO, K; HWANG, J. K. Piperidine Alkaloids from Piper Retrofractum Vahl.Protect Against High-Fat Diet-Induced Obesity by Regulating Lipid Metabolism and Activating AMP-Activated Protein Kinase. **Biochemical and Biophysical Research Communications** v.411, p.219–225, 2011.

KIVIPELTO, M. S. A. Cholesterol as a risk factor for Alzheimer's disease epidemiological evidence. **Acta Neurologica Scandinavica** v.114, p.50–57, 2006.

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.

LEE, S. A.; HONG, S. S.; HAN, X. H. Piperine from the fruits of *Piper longum* with inhibitory effect on monoamine oxidase and antidepressant like activity. **Chemical & Pharmaceutical Bulletin** v.53, p.832–835, 2005.

MANDAL, S., MOUDGIL, M., MANDAL, S. K. Rational drug design. **European Journal of Pharmacology**. v.625, p.90–100, 2009.

MARTINS, I. J.; HONE, E.; FOSTER, J. K.; SUNRAM-LEA, S. I.; GNJEC, A.; FULLER, S. J.; NOLAN, D.; GANDY, S. E.; MARTINS, R. N. Apolipoprotein E, cholesterol metabolism, diabetes, and the convergence of risk factors for Alzheimer's disease and cardiovascular disease. **Molecular Psychiatry** v.11, p.721–736, 2006.

MEBANE-SIMS, I. & ALZHEIMER'S, A. Alzheimer's disease facts and figures. **Alzheimers & Dementia**, v. 5, p. 234-270, 2009.

MIZUTANI, M. Y.; ITAI, I. Efficient Method for High-Throughput Virtual Screening Based on Flexible Docking: Discovery of Novel Acetylcholinesterase Inhibitors. **Journal of Medicinal Chemistry** v.47, p.4818-4828, 2004.

MORGON, N. H.; COUTINHO, K. **Métodos de Química Teórica e Modelagem Molecular**. São Paulo: Livraria da Física, p. 489-527, 2007.

MÜLLER, B. A. Imatinib and its successors how modern chemistry has changed drug Development. **Current Pharmaceutical Design** v.15, p.120–133, 2009.

ORHAN, I.; NAZ, Q.; KARTAL, M.; TOSUN, F.; SENER, B.; CHOUDHARY M. I. In vitro anticholinesterase activity of various alkaloids. **Zeitschrift für Naturforschung** v.62, p.684-688, 2007.

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. **Journal of Chromatography A** v.915, p.217-223, 2001.

RYAN, T. M.; MD, C. D.; HULETTE, M. D. Neuropathology of Alzheimer's disease. **Neuroimaging Clinics of North America** v.15 p.755–765, 2005.

SCHMIDT, R.; KIENBACHER, E.; BENKE, T.; DAL-BIANCO, P.; DELAZER, M.; LADURNER, G.; JELLINGER, K.; MARKSTEINER, J.; RANSMAYR, G.; SCHMIDT, H.; STÖGMANN, E.; FRIEDRICH, J.; WEHRINGER, C. Sex differences in Alzheimer's disease. **Neuropsychiatrie** v.22, p.1-15, 2008.

SHOBA, G.; JOY, D.; JOSEPH, T.; MAJEED, M.; RAJENDRAN, R.; SRINIVAS, P. S. R. Influence of piperine on the pharmacokinetics of curcumin in animals and human volunteers. **Planta Médica** v.64, p.353-356, 1998.

SILVA, C. H. T. P.; CAMPO, V. L.; CARVALHO, I.; TAFT, C. Molecular modeling, docking and ADMET studies applied to the design of a novel hybrid for treatment to Alzheimer's disease. **Journal of Molecular Graphics and Modelling**, v 25, p.169-175, 2006.

SMITH, M. A.; HARRIS, P. L.; SAYRE, L. M. PERRY, G. Iron accumulation in Alzheimer disease is a source of redox-generated free radicals. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America** v.94, p.9866-9868, 1997.

STADLER, I. Oxygen consumption methods: xanthine oxidase and lipoxygenase. **Humana Press** v. 108, p.3-14, 2002.

SUNILA, E. S.; KUTTAN, G. Immunomodulatory and antitumor activity of *Piper longum* L. and piperine. **Journal of Ethnopharmacology** v.90, p.339-346, 2004.

SUSSMAN, J. L.; HAREL, M.; FROLOW, F.; OEFNER, C.; GOLDMAN, A.; TOKER, L.; SILMAN, I. Atomic structure of acetylcholinesterase from *Torpedo californica*: a prototypic acetylcholine-binding protein. **Science**. v.253, p.872-879, 1991.

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, 2003.

UL-HAQ, Z.; MAHMOOD, U.; JEANGIR, U. Ligand-based 3D-QSAR Studies of Physostigmine Analogues as Acetylcholinesterase Inhibitors. **Chemical Biology & Drug Design** v.74, p.571–581, 2009.

VENKATSWAMY, R.; FAAS, L.; YOUNG, A. R.; RAMAN, A.; HIDER, R. C. Effect of piperine analogues on stimulation of melanocyte proliferation and melanocyte differentiation. **Bioorganic & Medicinal Chemistry** v.12, p.1905-1920, 2004.

VERDONK, M. L.; COLE, J. C.; HARTSHORN, M. J.; MURRAY, C. W.; TAYLOR, R. D. Improved protein–ligand docking using GOLD. **Proteins** v.52, p.609–623, 2003.

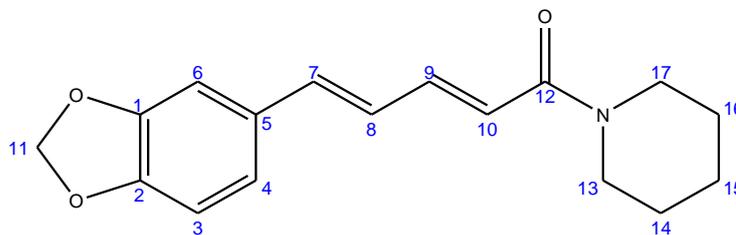
XU, Y. C.; COLLETIER, J. P.; WEIK, M.; JIANG, H. L.; MOULT, J.; SILMAN, I.; SUSSMAN, J. L. Flexibility of aromatic residues in the active site gorge of acetylcholinesterase: X-ray versus molecular dynamics. **Biophysical Journal** v.95 p.2500–2511, 2008.

WERMUTH, G. C. **The practice of medicine chemistry**. 3^o edição. Edit. Elsevier Science, 2008.

ZOETE, V.; GROSDIDIER, A.; MICHIELIN, O. Docking, virtual high throughput screening and in silico fragment-based drug design. **Journal of Cellular and Molecular Medicine** v.13, p.238-248, 2009.

ANEXOS – ESPECTROS

PIPERINA (12)



Nome: (2*E*, 4*E*) - 5 - (1,3-benzodioxol-5-il) -1 - (piperidina) -penta-2,4-dieno-1-ona

Formula molecular: C₁₇H₁₉NO₃ (285,14 g/mol)

Coloração: amarelo

Faixa de fusão: 127,1 – 128,4

Rendimento: 4,35%

Pureza (CG-MS): 96,8%

Dados espectroscópicos

RMN de ¹H (500 MHz, CDCl₃): δ 1,58 (m, 4 H – 14 e 16) 1,66 (m, 2H – 15) δ 3,6 (d, 4H – 13 e 17) δ 5,96 (s, 2H – 11) δ 6,44 (d, 1H - 10) δ 6,73 (m, 1H - 8) δ 6,74 (m, 1H – 7) δ 6,77 (d, 1H – 3) δ 6,88 (dd, 1H – 4) δ 6,97 (d, 1H -6) δ 7,4 (ddd, 1H -9).

RMN de ¹³C (125 MHz, CDCl₃): δ 24,51 (C-15) 25,42 (C-14 e 16) 43,12 (C-13 e 17) 46,67 (C-13 e 17) 101,49 (C-11) 105,81 (C-6) 108,62 (C-3) 119,57 (C-10) 122,48 (C-4) 125,22 (C-7) 130,96 (C-5) 138,22 (C-8) 142,40 (C-9) 148,23 (C-1) 148,35 (C-2) 165,62 (C-12).

IV (4000 – 500 cm⁻¹): (C–O) 1030 cm⁻¹; (C–N) 1250; (C=C) 1580 e 1490 cm⁻¹; (C=O αβ insaturada) 1635 cm⁻¹; (C–H, alcano) 2850 e 2930 cm⁻¹; 3010 cm⁻¹.

EM (m/z): [M⁺] 285; Fragmentos: 201, 173, 84.

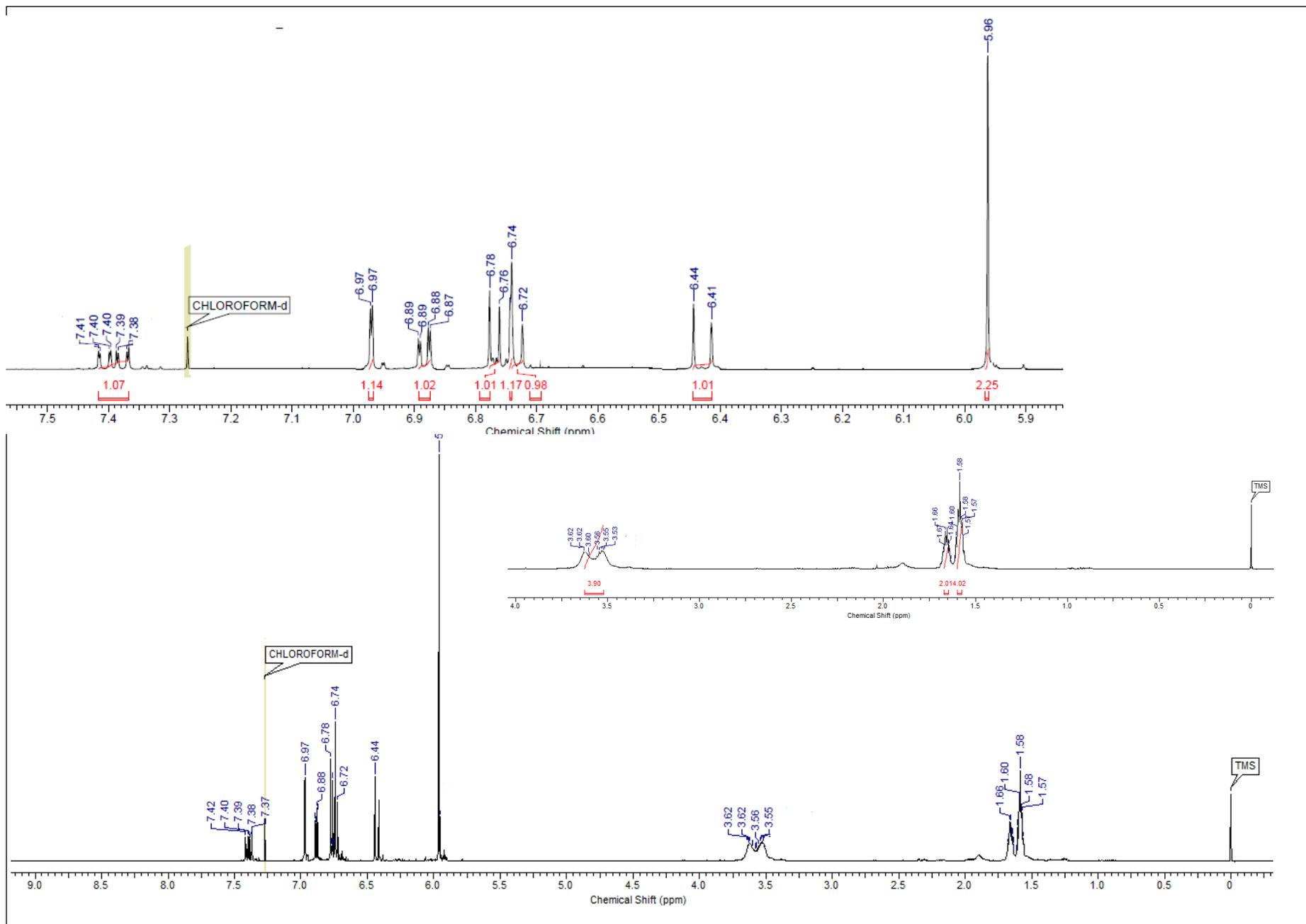


Figura 22: Espectro de RMN ^1H da piperina 12 (CDCl_3 , 500 MHz).

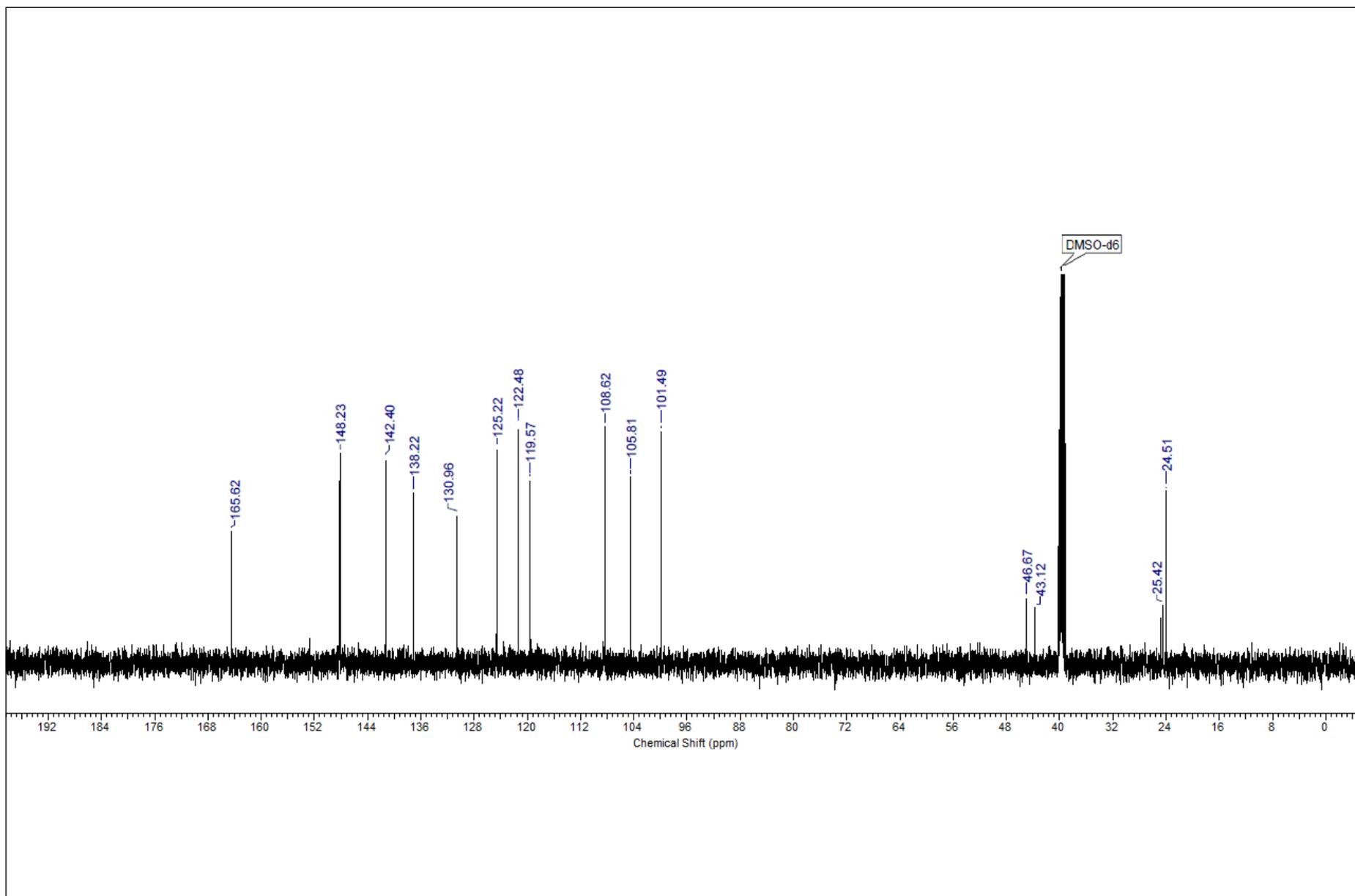


Figura 23: Espectro de RMN ^{13}C da piperina **12** (CDCl_3 , 125 MHz).

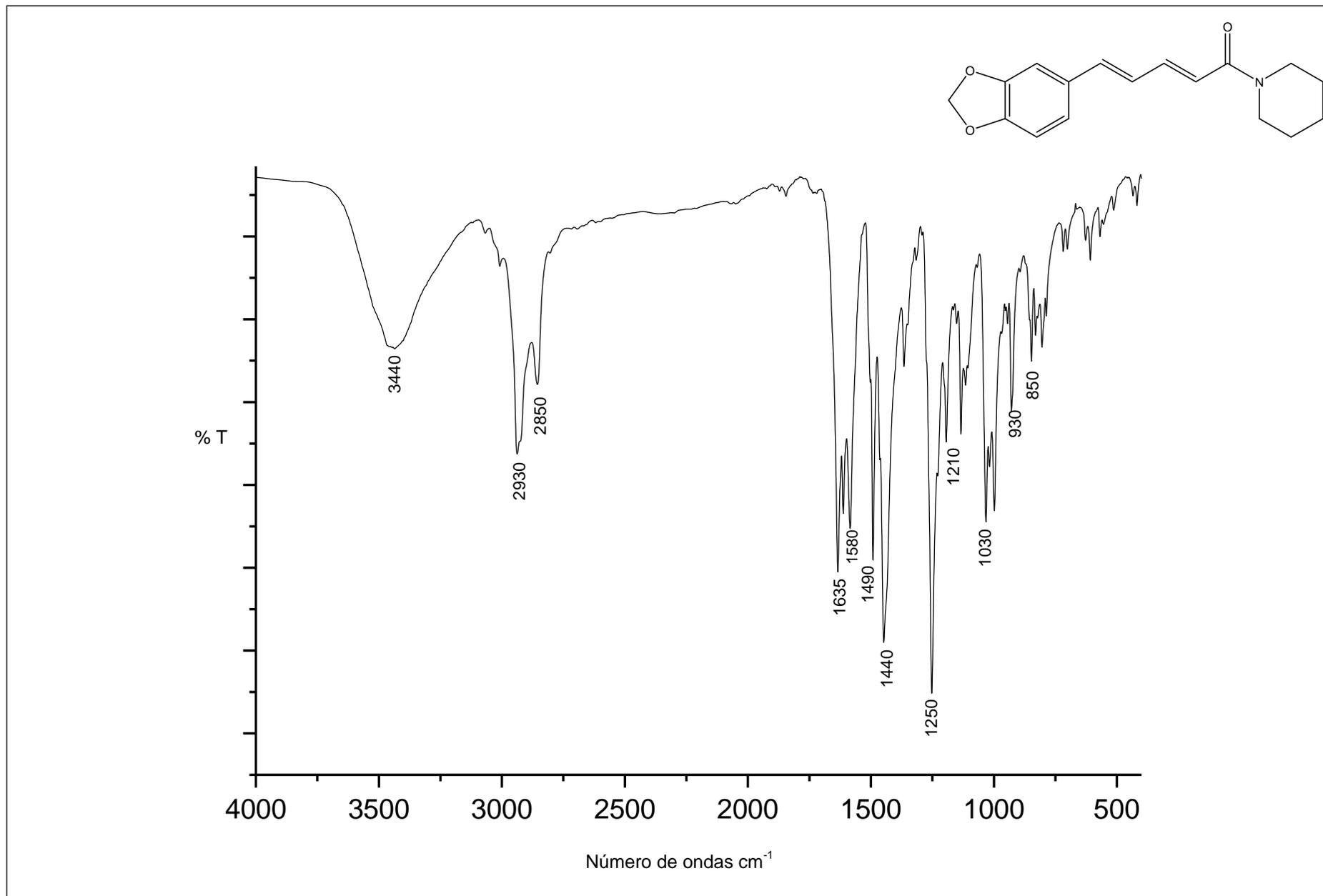


Figura 24: Espectro na região do IV da piperina (12).

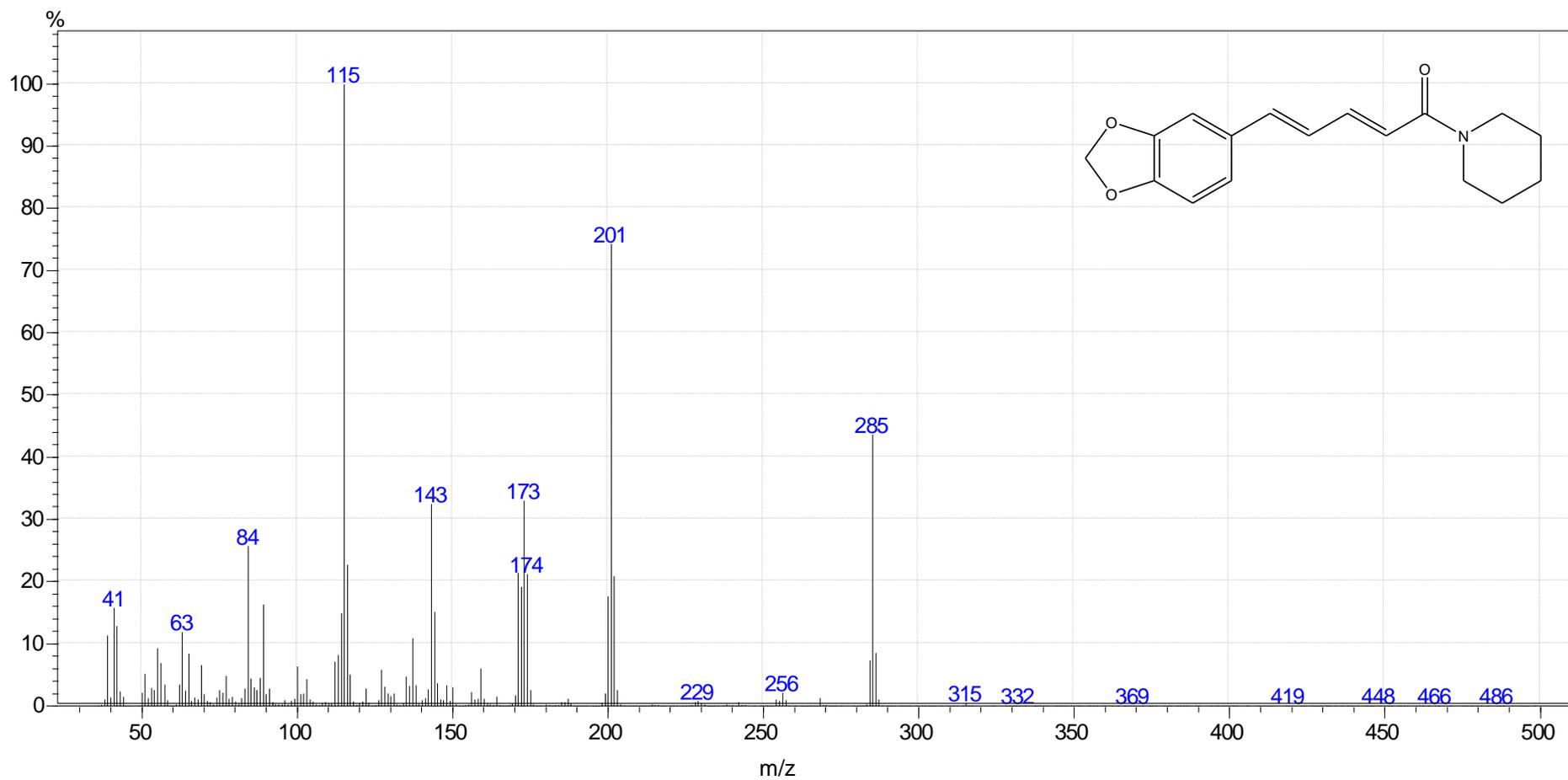
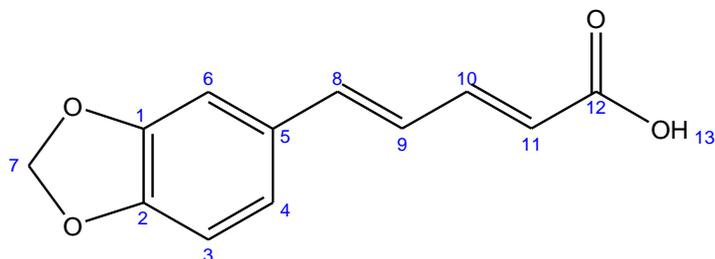


Figura 25: Espectro de massas da piperina (12).

ÁCIDO PIPERÍNICO (13)



Nome: Ácido 5-(3,4-metilenodioxifenil)-2(*E*)-4(*E*)-pentadienóico

Formula molecular: C₁₂H₁₀O₄ (218,21 g/mol)

Coloração: amarelo

Faixa de fusão: 216,4 – 217,9°C

Rendimento: 57 %

Pureza (CG-MS): Não determinada

Dados espectroscópicos

RMN de ¹H (500 MHz, CDCl₃): δ 5,93 (d, 1 H - 11) δ 6,05 (s, 2H - 7) δ 6,44 (d, 1H - 10) δ 6,92 (d, 1H - 8) δ 6,96 (s, 1H - 6) δ 6,97 (d, 1H - 4) δ 7,01 (dd, 1H - 9) δ 7,23 (d, 1H - 3) δ 7,32 (m, 1H - 10).

RMN de ¹³C (125 MHz, CDCl₃): δ 102,93 (C-7) 107,19 (C-3) 109,92 (C-6) 122,61 (C-4) 124,61 (C-11) 126,35 (C-9) 131,89 (C-5) 141,27 (C-8) 145,99 (C-10); 149,37 (C-2) 149,55 (C-1) 169,26 (C-12).

IV (4000 – 500 cm⁻¹): (C–O) 1030 e 1250; (C=C, anel) 1500 e 1600 cm⁻¹; (C=O) 1690 cm⁻¹; (C–H, alcano) 2850 e 2930 cm⁻¹; (OH) 2400 - 3300 cm⁻¹.

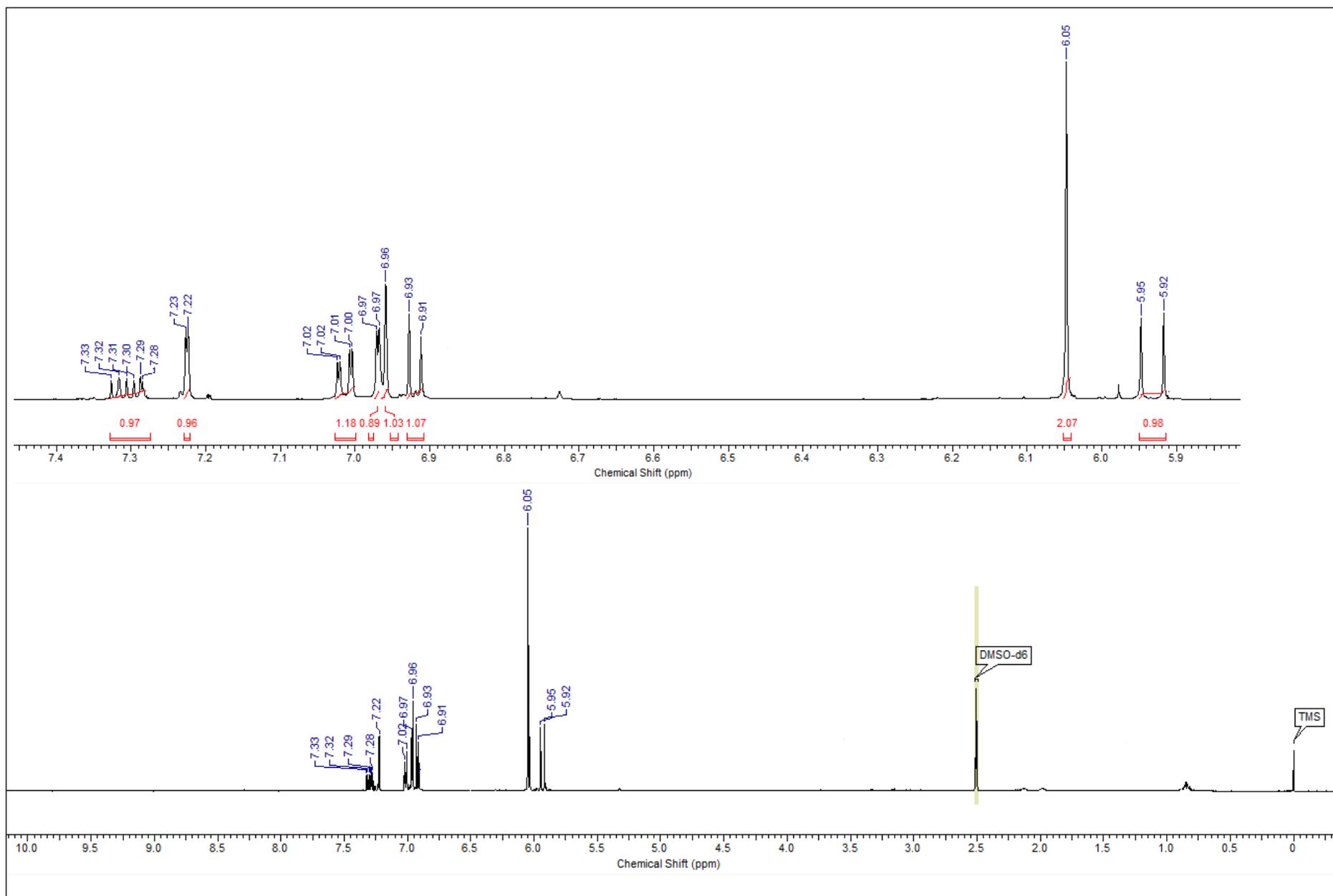


Figura 26: Espectro de RMN ^1H do ácido piperínico **13** (CDCl_3 , 500 MHz)

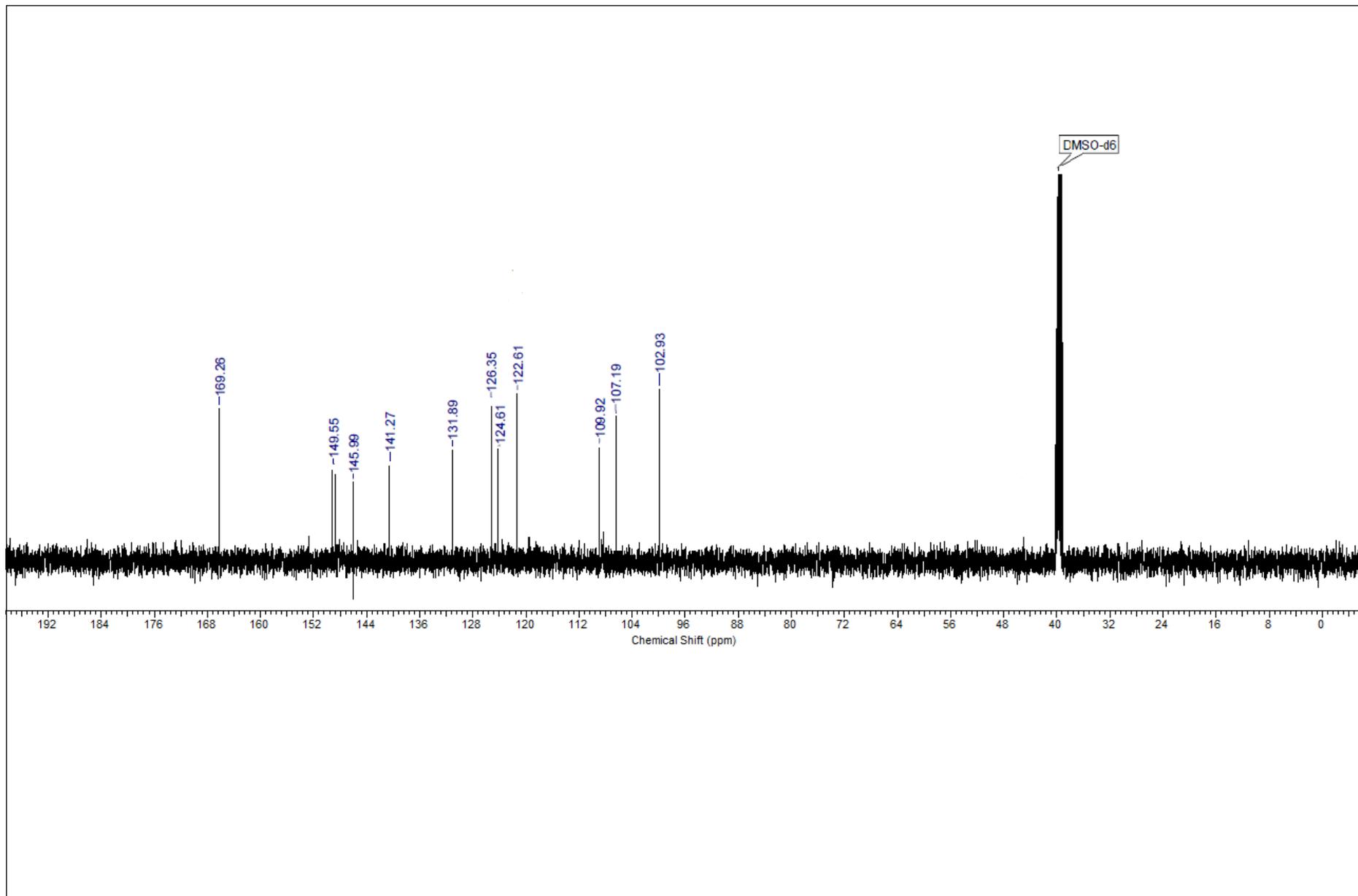


Figura 27: Espectro de RMN ^{13}C do ácido piperínico 13 (CDCl_3 , 125 MHz)

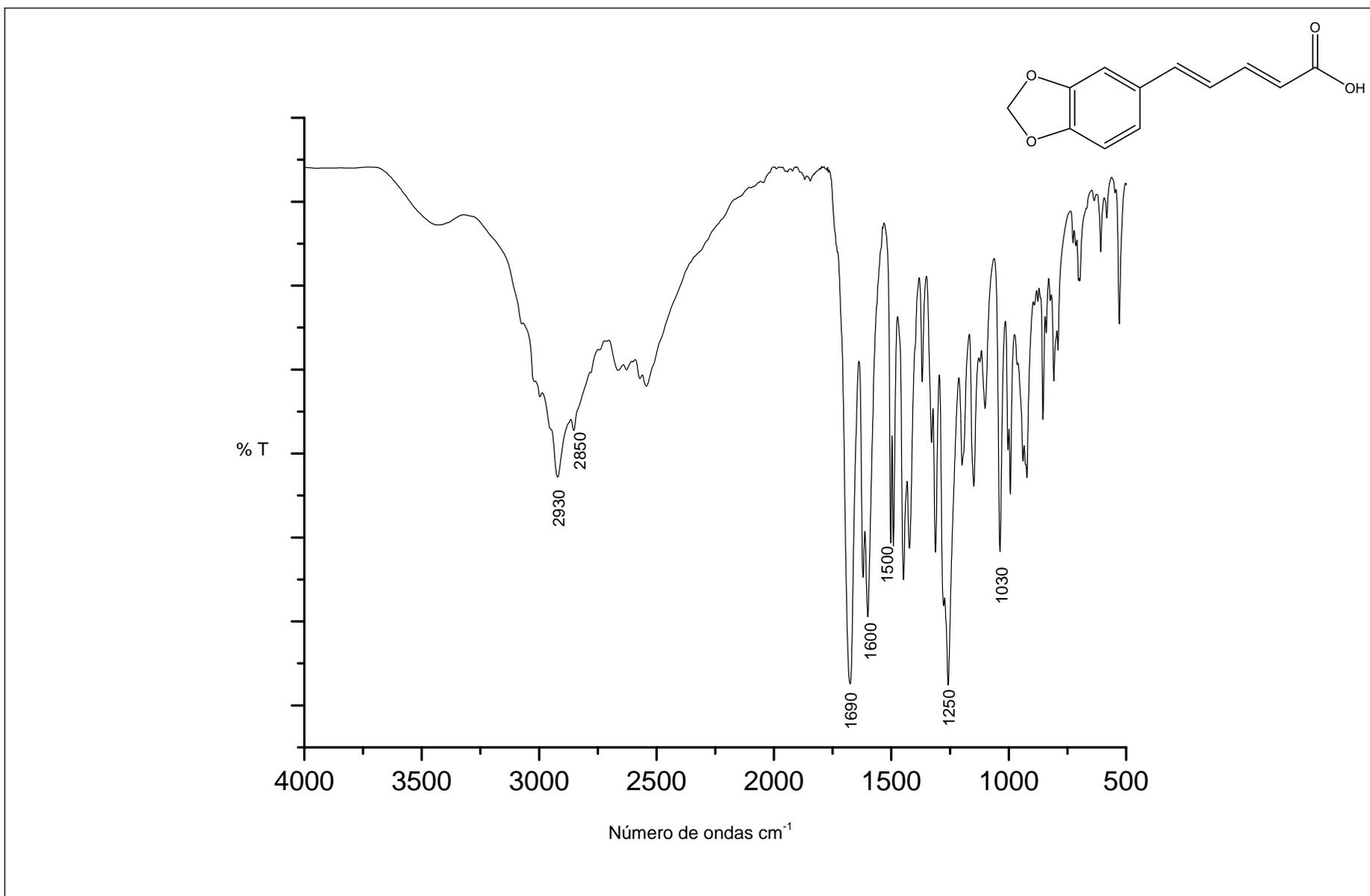
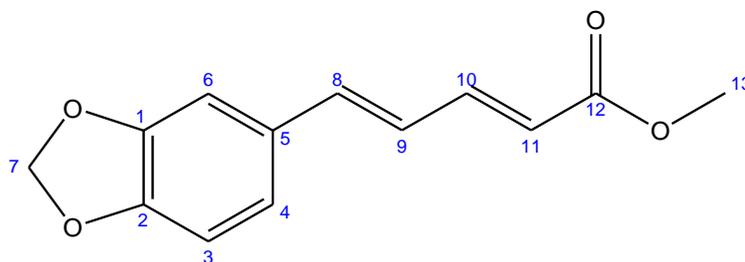


Figura 28: Espectro de IV do ácido piperínico **13** (4000 – 500 cm⁻¹)

ÉSTER PIPERÍNICO 14



Nome: (2*E*, 4*E*)-metil 5 - (benzo [d] [1,3] dioxol-6-il)-penta-2,4-dienoato

Formula molecular: C₁₃H₁₂O₄ (232,23 g/mol)

Coloração: amarelo

Faixa de fusão: 157 – 157,7 °C

Rendimento: 65%

Pureza (CG-MS): 97 %

Dados espectroscópicos

RMN de ¹H (500 MHz, CDCl₃): δ 3,76 (s, 3H – 13) δ 5,94 (d, 1H – 11) δ 5,98 (s, 2H – 7) δ 6,715 (d, 1H -8) δ 6,78 (s, 1H -6) δ 6,79 (m, 1H - 4) δ 6,91 (dd, 1H - 9) δ 6,99 (d, 1H -3) δ 7,4 (m, 1H – 10).

RMN de ¹³C (125 MHz, CDCl₃): δ 51,34 (C-13) 101,49 (C-7) 105,81 (C-3) 108,62 (C-6) 118,17 (C-4) 119,57 (C-11) 124,76 (C-9) 128,89 (C-5) 130,55 (C-8); 145,31 (C-10) 152,74 (C-1 e 2) 166,76 (C-12).

IV (4000 – 500 cm⁻¹): (C=O, αβ insaturada) 1710; (O–CH₃) 1140 e 1240; (C=C, anel aromático) 1490; (C–H, CH₂) 2940; (C=C conjugadas) 1600;

EM (m/z): [M⁺] 232; Fragmentos: 201; 173.

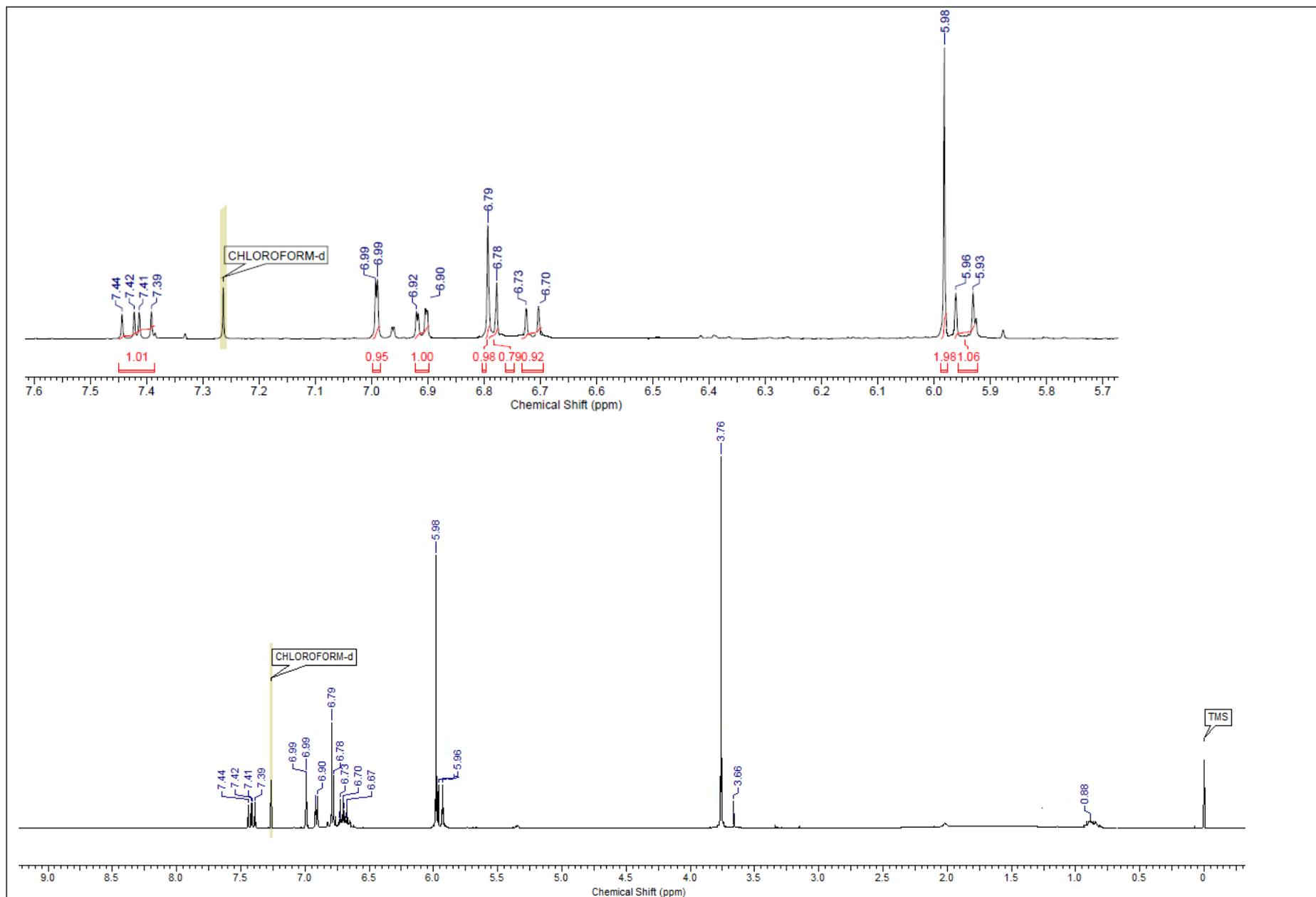


Figura 29: Espectro de RMN ^1H do éster piperínico **14** (CDCl_3 , 500 MHz).

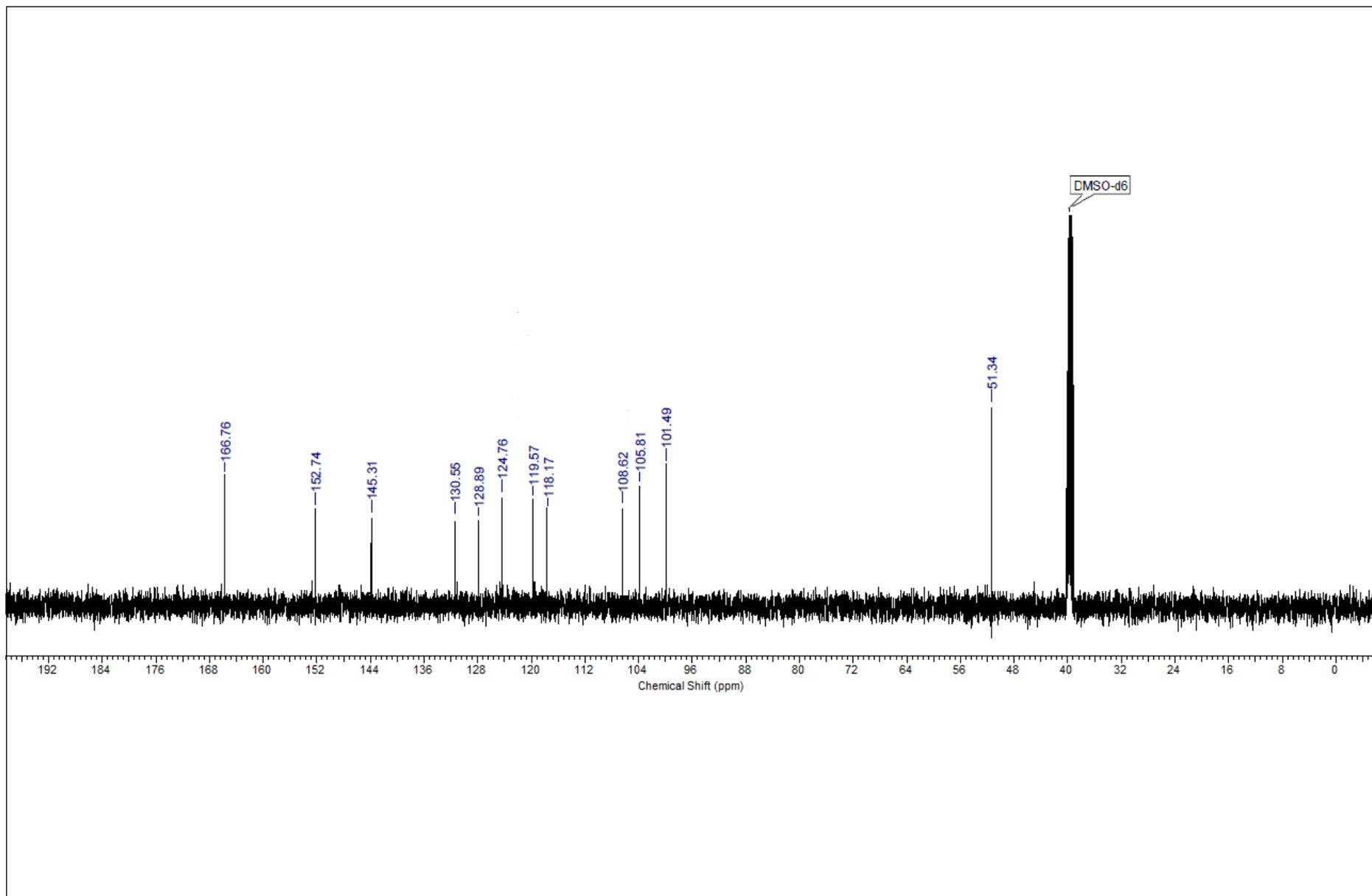


Figura 30: Espectro de RMN ^{13}C do éster piperínico **14** (CDCl_3 , 125 MHz).

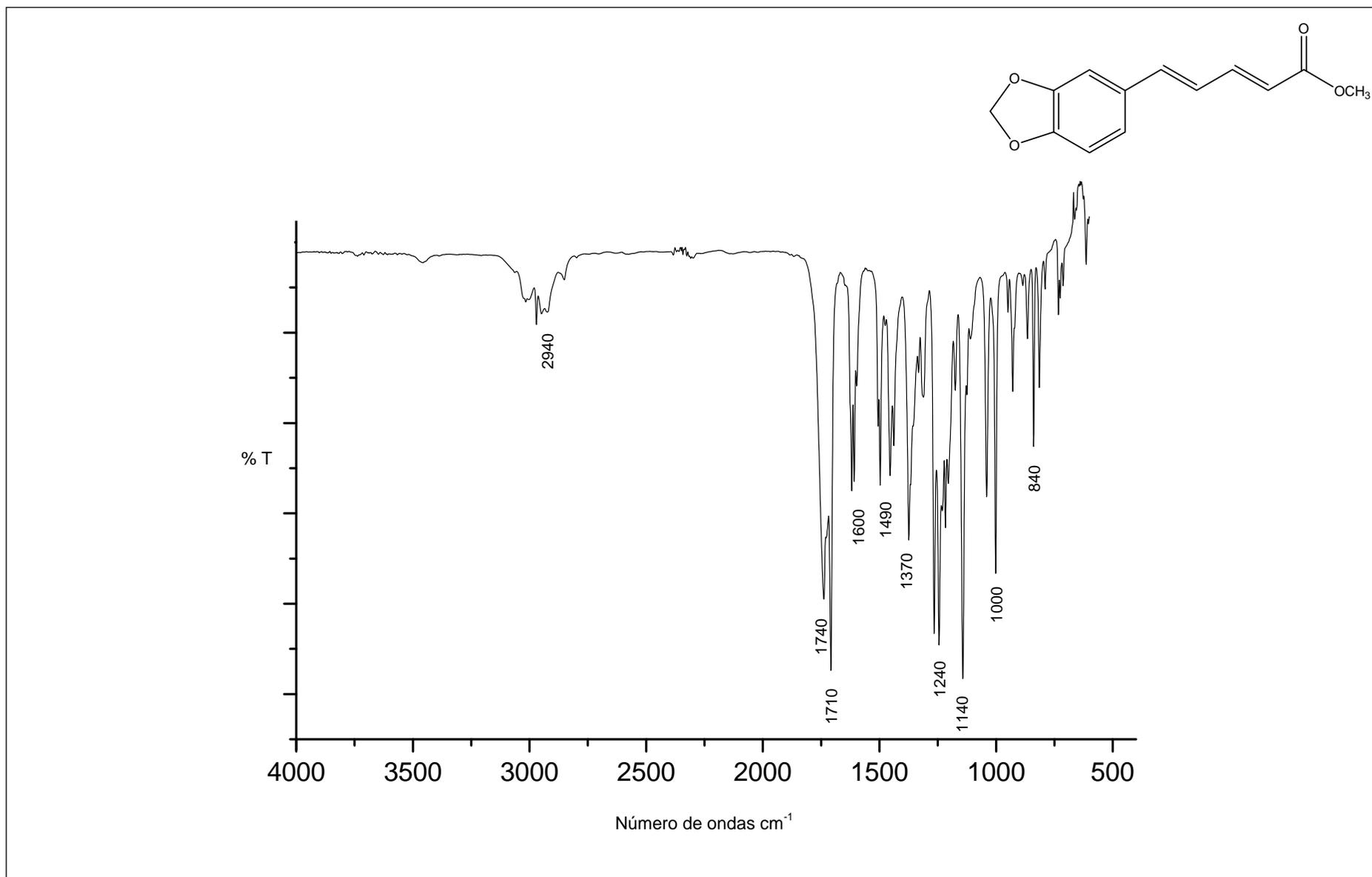


Figura 31: Espectro na região do IV do éster piperínico **13**.

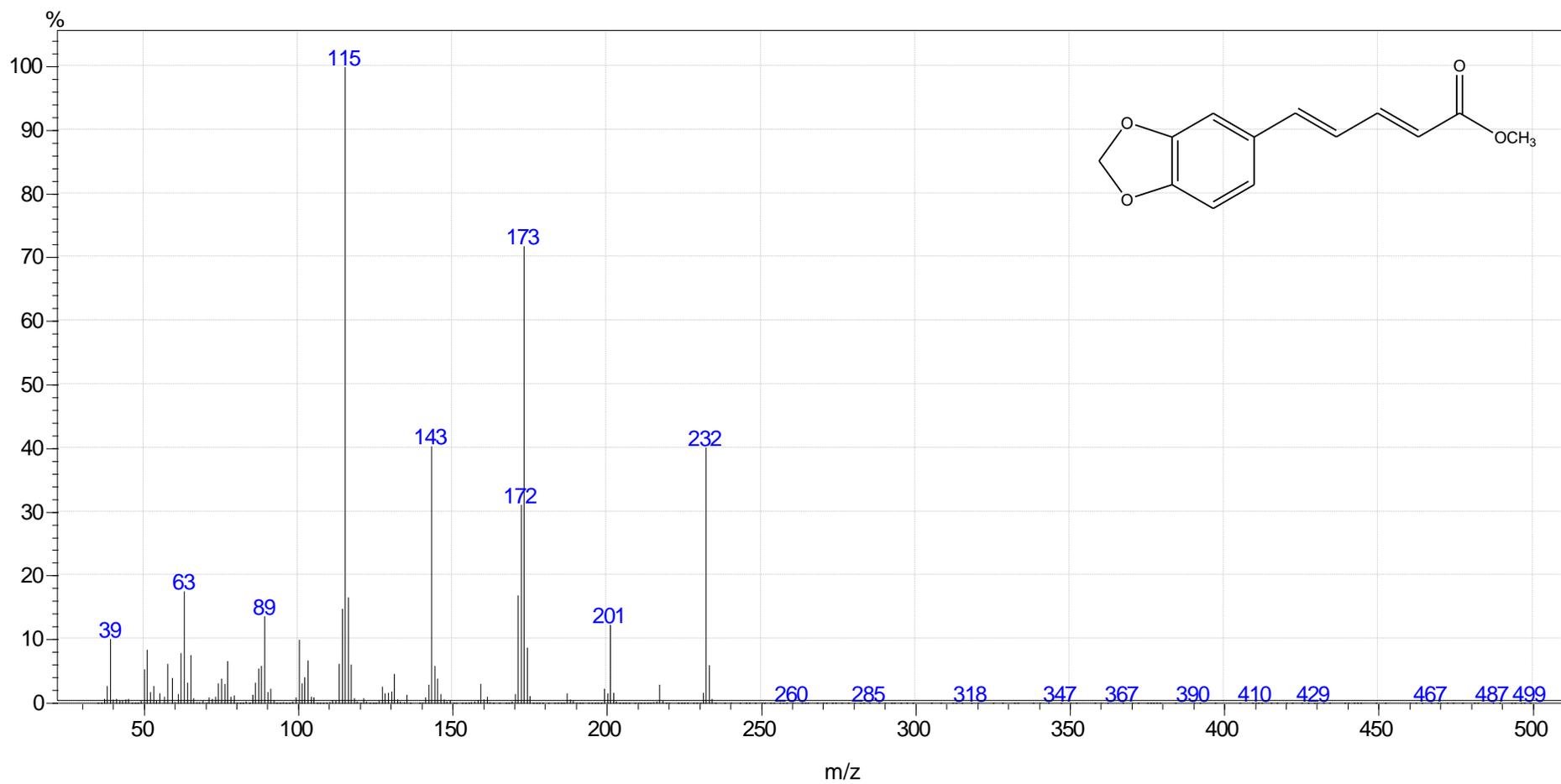


Figura 32: Espectro de massas do éster piperínico **13**.

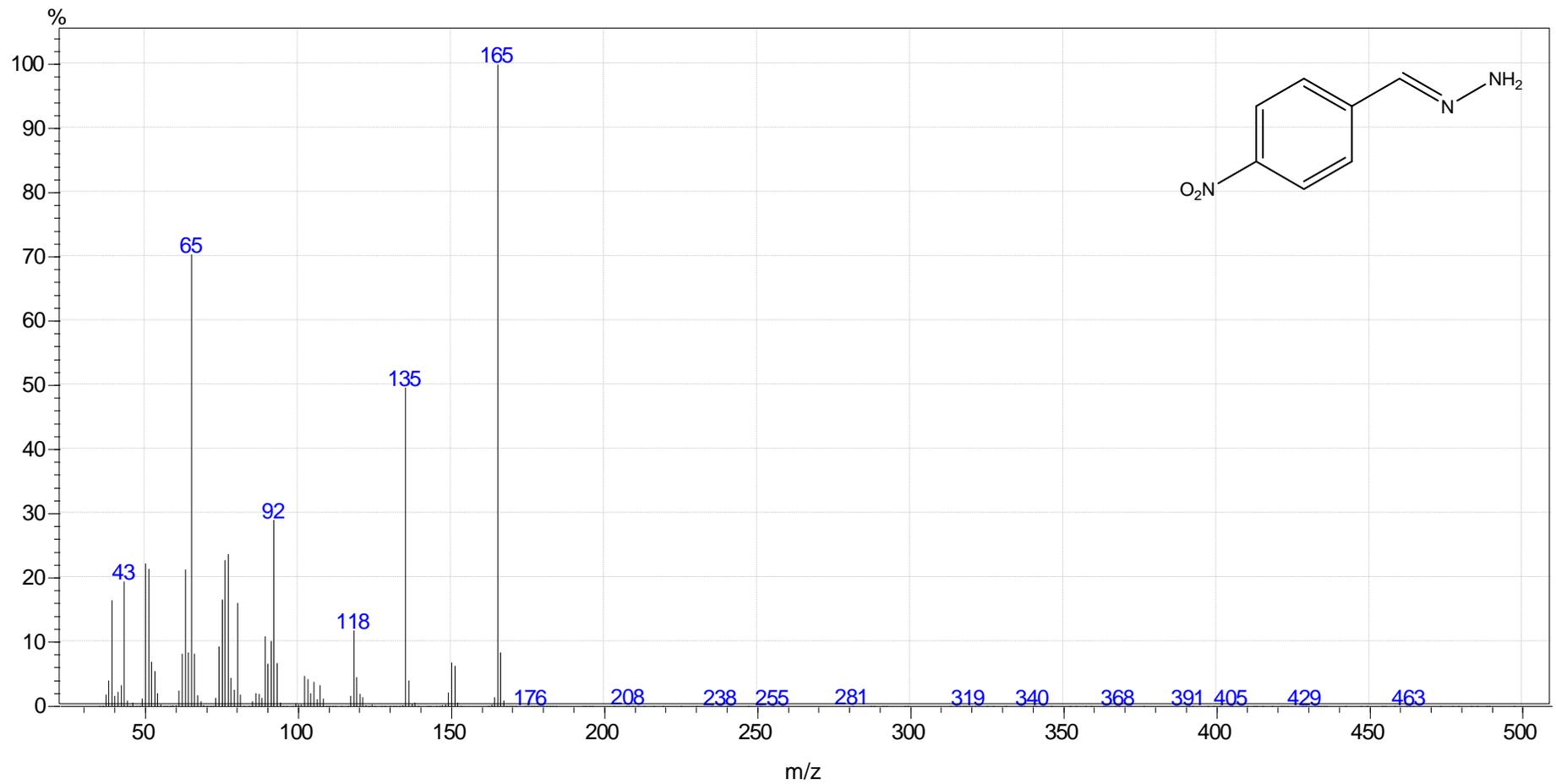


Figura 33: Espectro de massas da hidrazona 15

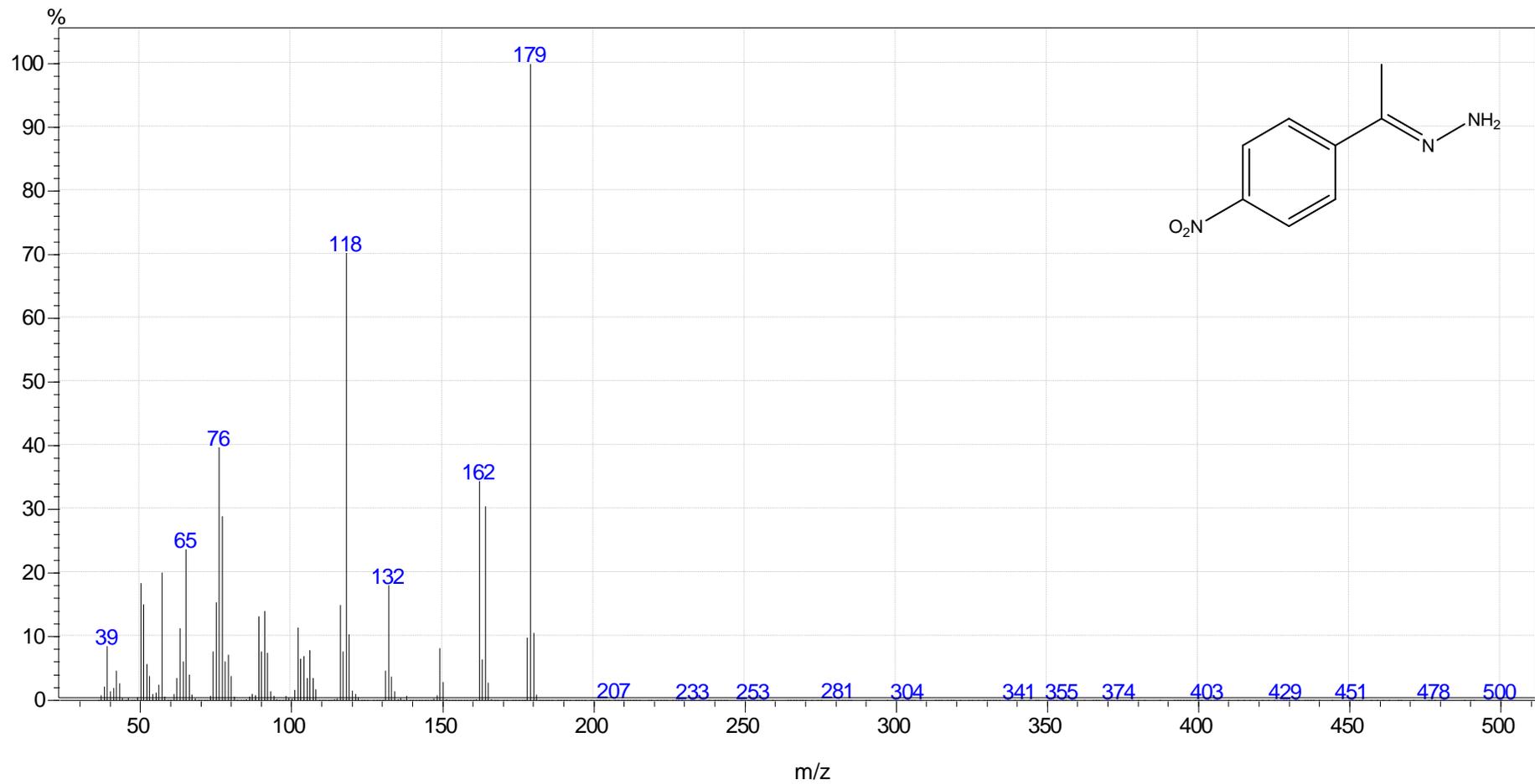
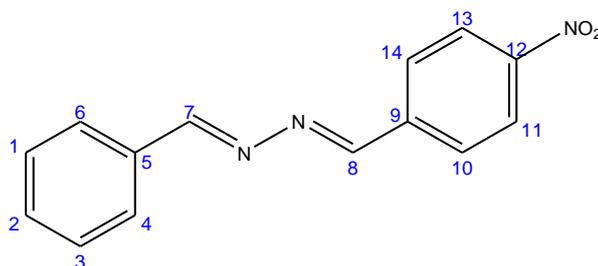


Figura 34: Espectro de massas da hidrazona 16

Síntese da (7E, 8E) -2 - (4-nitrobenzilideno) -1 - hidrazina benzilideno (17)



No meio reacional, contendo 165 mg (1 mmol) da hidrazona **15**, foi adicionado 106 mg (1 mmol) de benzaldeído, conforme procedimento A. Características do sólido obtido:

Fórmula molecular: C₁₄H₁₁N₃O₂ (253,09 g/mol)

Coloração: amarelo claro

Faixa de fusão: 157,2 – 158,6 °C

Rendimento: 58,8 %

Pureza (CG-MS): 97,7%

Dados espectroscópicos

RMN de ¹H (500 MHz, CDCl₃): δ 7,47 (m, 3H - 1, 2 e 3) δ 7,87 (d, 2H - 4 e 6) δ 8,02 (d, 2H - 10 e 14) δ 8,31 (d, 2H - 11 e 13) δ 8,68 (s, 1H - 7) 8,7 δ (s, 1H - 8).

RMN de ¹³C (125 MHz, CDCl₃): δ 124,04 (C-11 e 13) 128,87 (C-10 e 14) 129,13 (C-1 e 3) 131,79 (C-4 e 6) 133,59 (C-5) 136,59 (C-2) 140,03 (C-9) 159,21 (C-7 e 8) 163,57 (C-12).

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

EM (m/z): [M⁺] 253; Fragmentos: 176; 131; 104; 77.

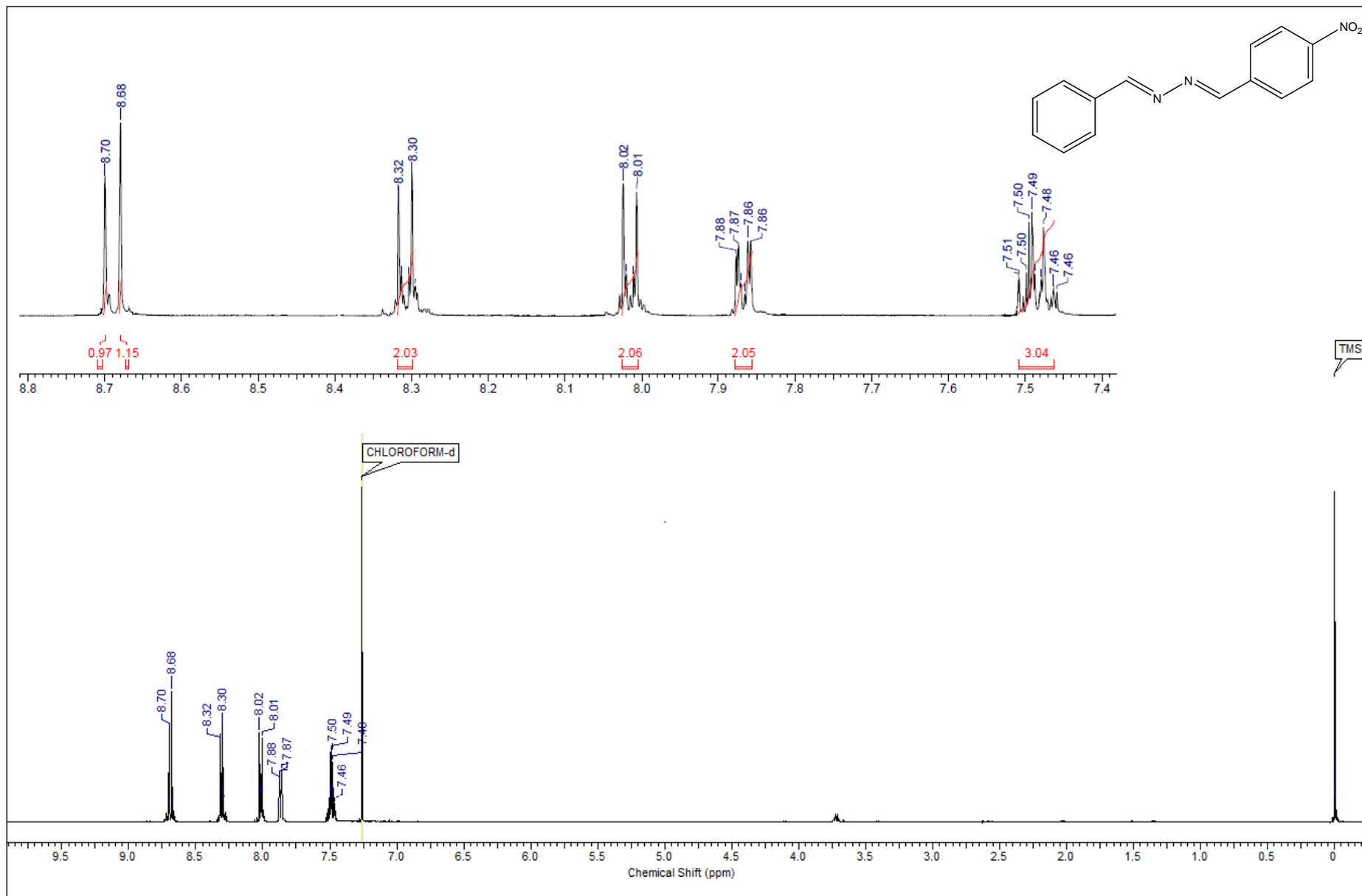


Figura 35: Espectro de RMN ^1H do composto 17 (CDCl_3 , 500 MHz).

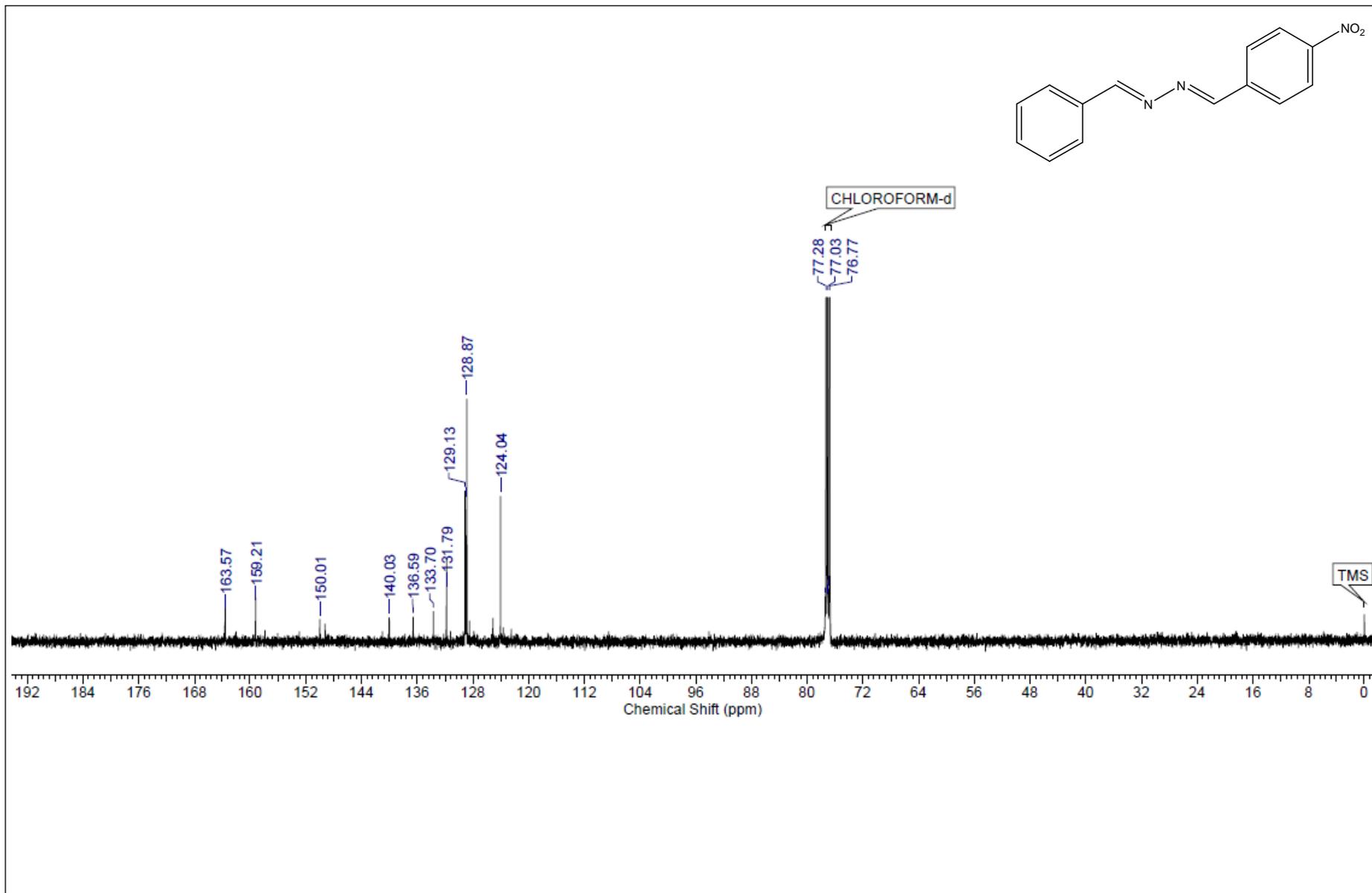


Figura 36: Espectro de RMN ^{13}C do composto 17 (CDCl_3 , 125 MHz).

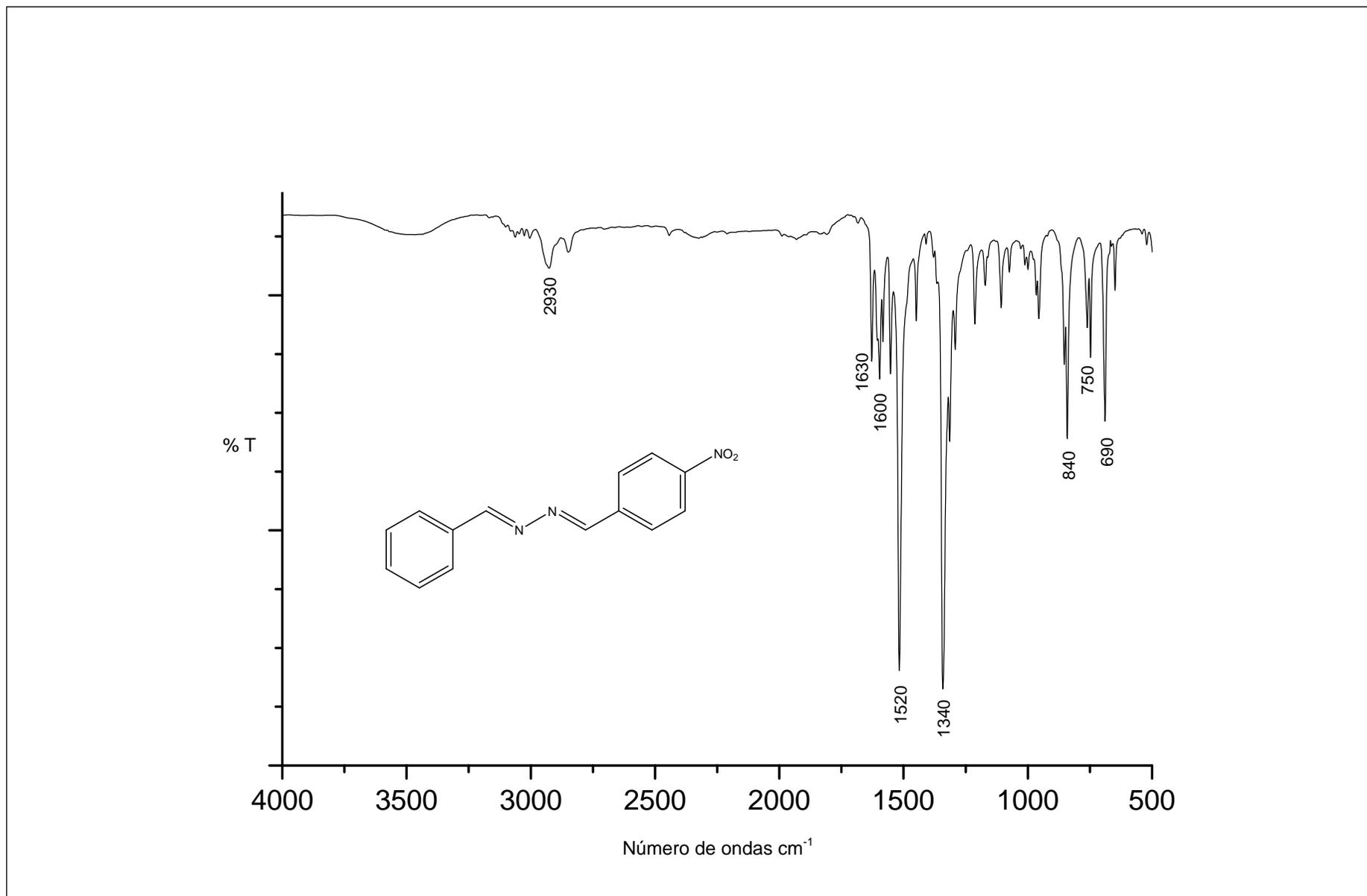


Figura 37 - Espectro na região do IV do composto **17** (4000-500 cm⁻¹).

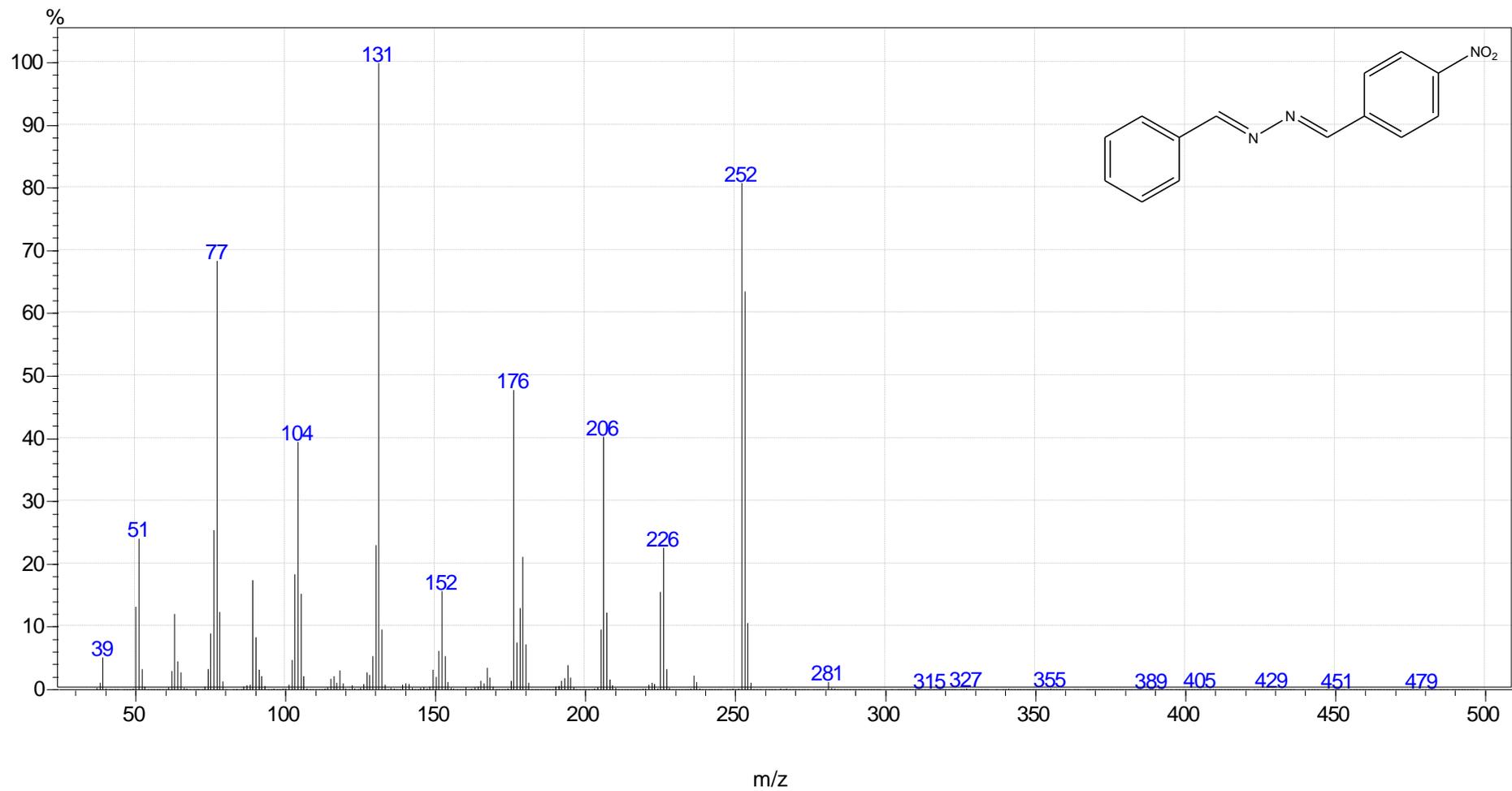
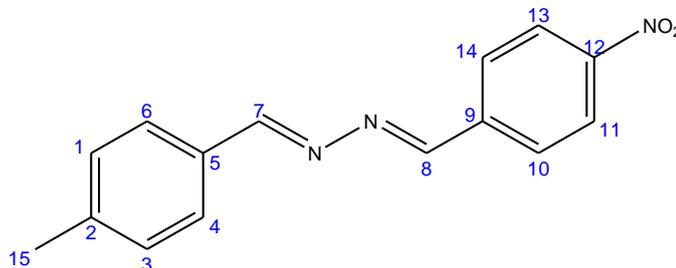


Figura 38 - Espectro de massas do composto 17

**Síntese da (7E, 8E) - 1 - (4-metilbenzilideno) - 2 - (4-nitrobenzilideno)-hidrazina
(18)**



No meio reacional, contendo 165 mg (1 mmol) da hidrazona **15**, foi adicionado 120 mg (1 mmol) de 4-metilbenzaldeído, conforme procedimento A. Características do sólido obtido:

Formula molecular: C₁₅H₁₃N₃O₂ (267,1 g/mol)

Coloração: amarelo claro

Faixa de fusão: 162,1 -163,8°C

Rendimento: 60,37 %

Pureza (CG-MS): 95,7 %

Dados espectroscópicos

RMN de ¹H (500 MHz, CDCl₃): δ 2,43 (s, 3H - 15) δ 7,28 (d, 2H - 1 e 3) δ 7,76 (d, 2H - 4 e 6) δ 8,0 (d, 2H -10 e 14) δ 8,31 (d, 1H - 11 e 13) δ 8,66 (s, 1H - 7) δ 8,69 (s, 1H - 8).

RMN de ¹³C (125 MHz, CDCl₃): δ 21,9 (C-15) 124,21 (C-11 e 13) 128,79 (C-10 e 14) 129,1 (C-4 e 6) 129,7 (C-1 e 3) 129,89 (C-5) 140,33 (C-9) 142,67 (C-2); 159,21 (C-7 e 8) 164,01 (C-12).

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

EM (m/z): [M⁺] 267; Fragmentos: 176; 145; 118; 91.

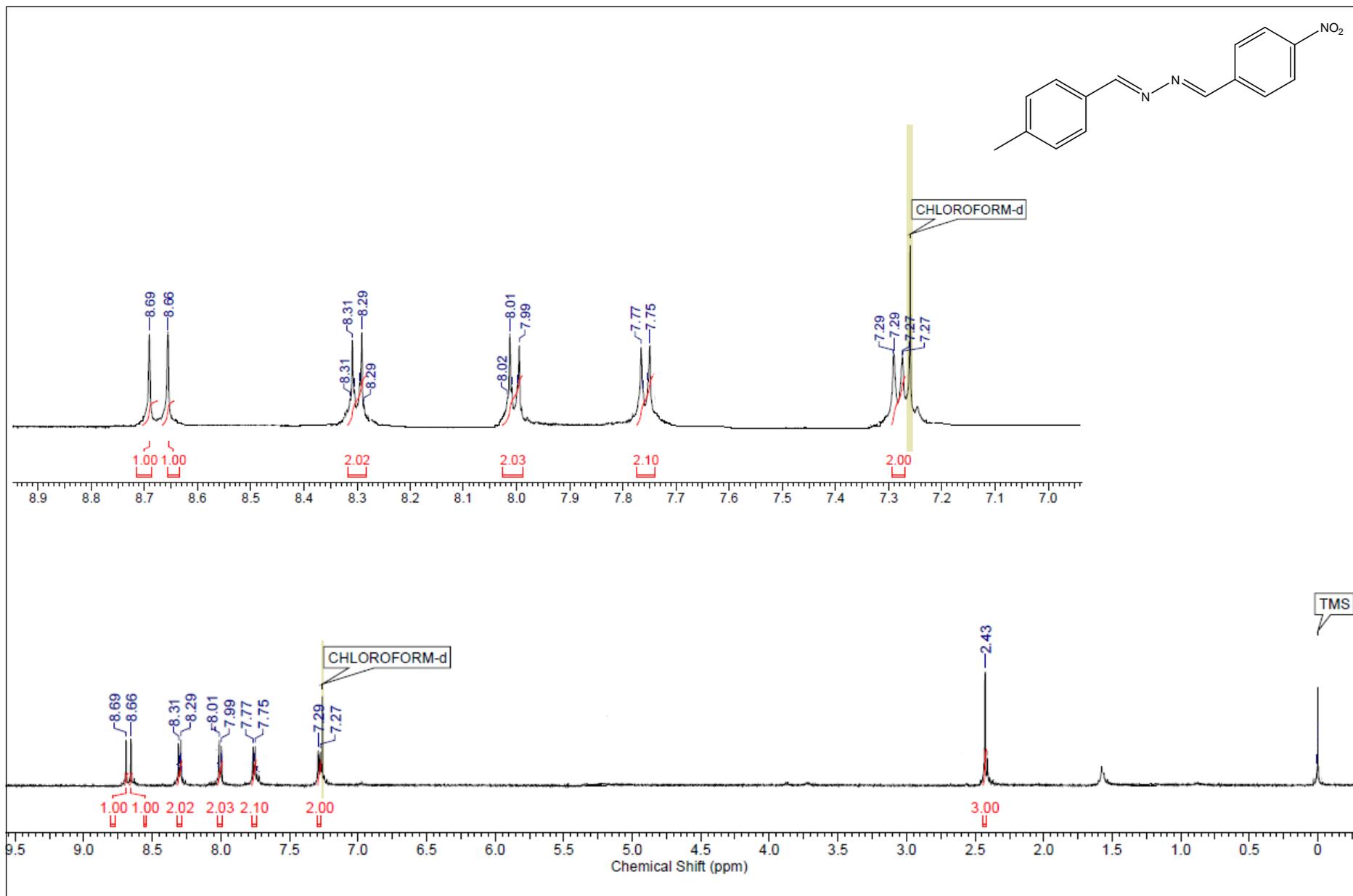


Figura 39: Espectro de RMN ¹H do composto **18** (CDCl₃, 500 MHz)

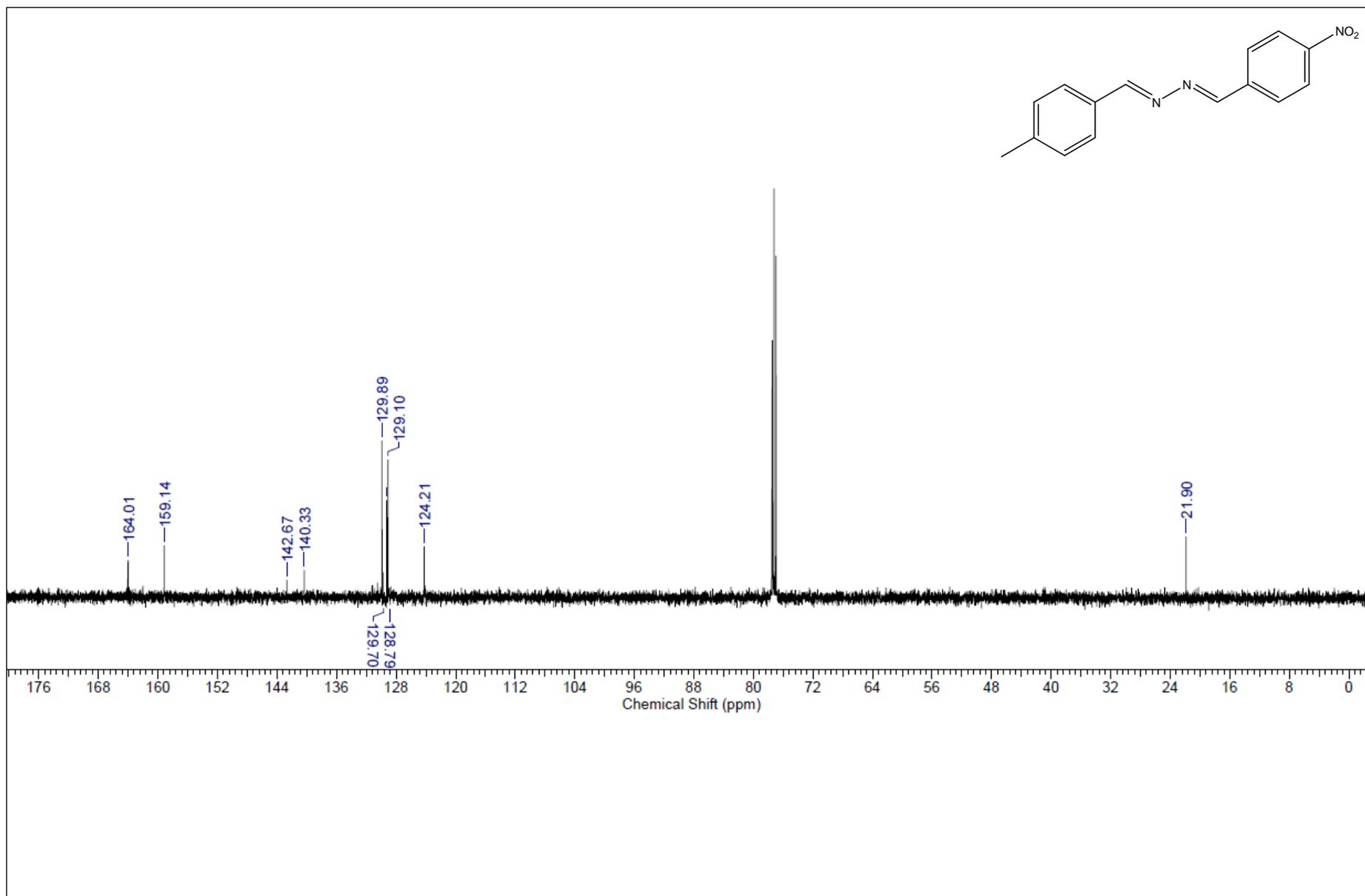


Figura 40: Espectro de RMN ^{13}C do composto **18** (CDCl_3 , 125 MHz)

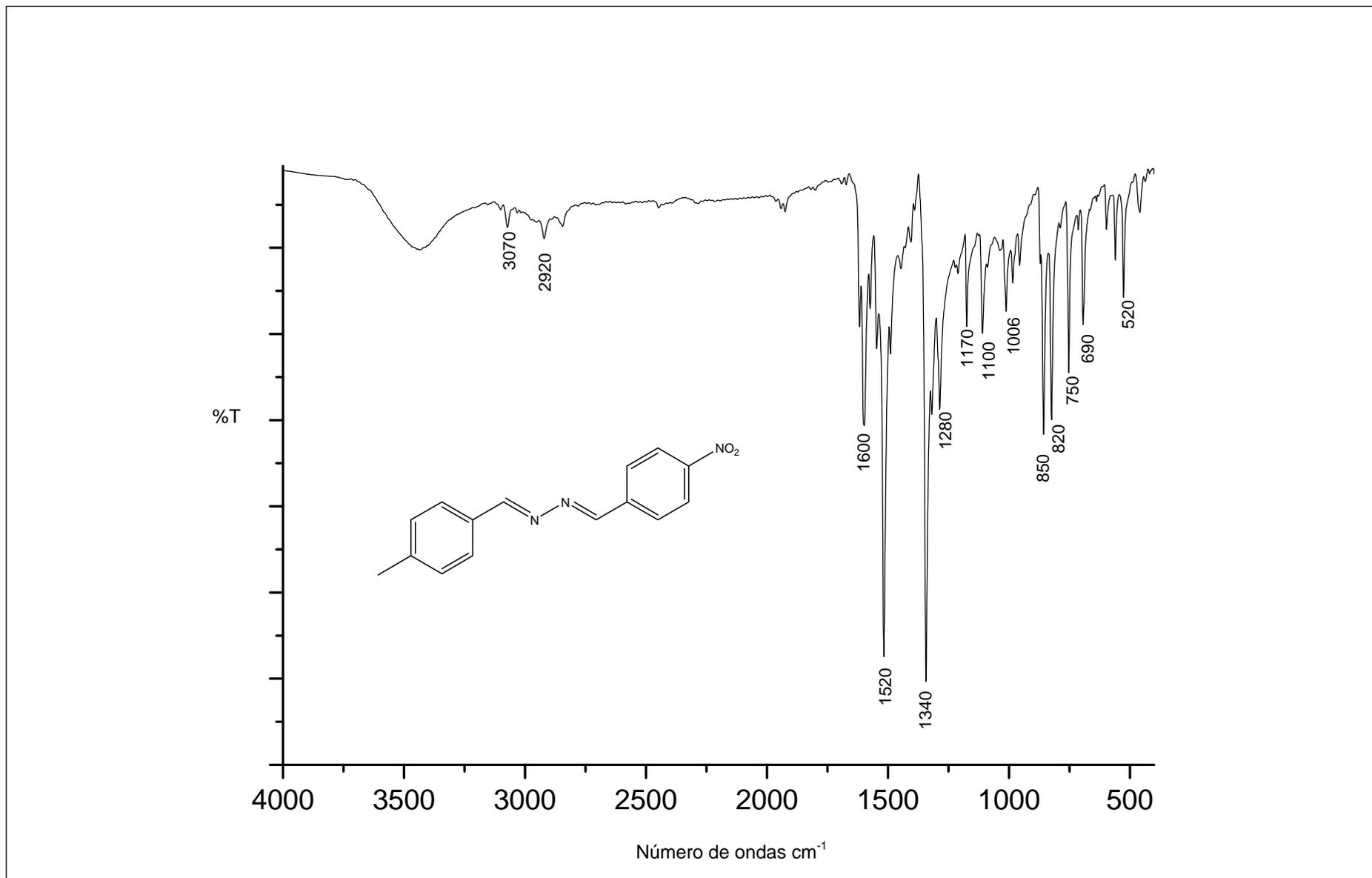


Figura 41: Espectro na região do IV do composto **18** (4000-500 cm^{-1}).

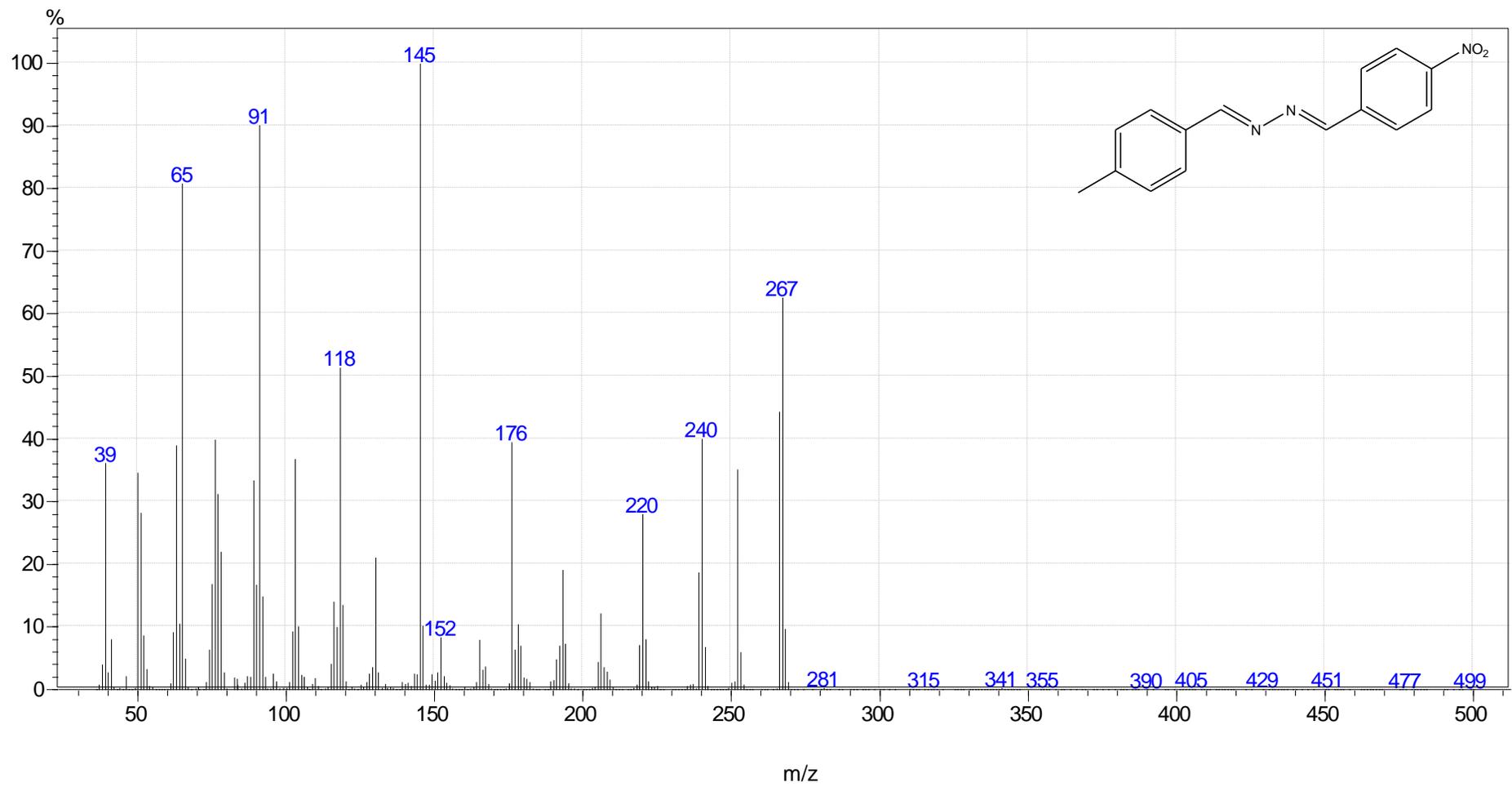
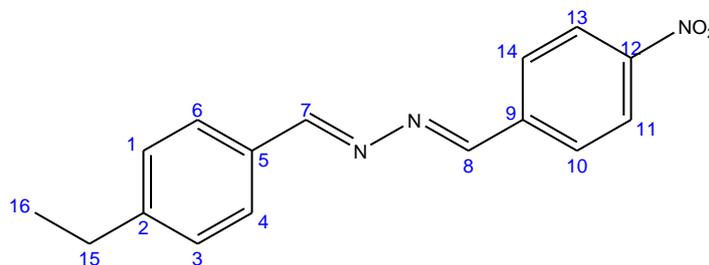


Figura 42: Espectro de massas do composto **18**

**Síntese da (7E, 8E) - 1 - (4-etil-benzilideno) - 2 - (4-nitrobenzilideno)-hidrazina
(19)**



No meio reacional, contendo teoricamente 165 mg (1 mmol) da hidrazona **15**, foi adicionado 134 mg (1 mmol) de 4-etilbenzaldeído, conforme procedimento A. Características do sólido obtido:

Formula molecular: C₁₆H₁₅N₃O₂ (281,31 g/mol)

Coloração: amarelo claro

Faixa de fusão: 161,1 – 162,5°C

Rendimento: 53,78%

Pureza (CG-MS): 96%

Dados espectroscópicos

RMN de ¹H (500 MHz, CDCl₃): δ 1,28 (t, 3H - 16) δ 2,73 (q, 2H - 15) δ 7,3 (d, 2H - 1 e 3) δ 7,79 (d, 2H - 4 e 6) δ 8,0 (d, 2H - 10 e 14) δ 8,31 (d, 2H - 11 e 13) δ 8,66 (s, 1H - 7) δ 8,69 (s, 1H - 8).

RMN de ¹³C (125 MHz, CDCl₃): δ 15,25 (C -16) 29 (C -15) 123,99 (C-11 e 13) 128,48 (C-1 e 3) 128,78 (C-10 e 14) 129,03 (C-4 e 6) 131,18 (C-5) 140,11 (C-9) 148,72 (C - 2) 158,29 (C - 7 e 8) δ 163,7 (C - 12).

IV (4000 – 500 cm⁻¹): (NO₂) 1506 e 1340 cm⁻¹; (C=N) 1600 cm⁻¹; (-CH₂-CH₃) 2920 e 2985 cm⁻¹;

EM (m/z): [M⁺] 281; Fragmentos: 252; 176; 159; 132.

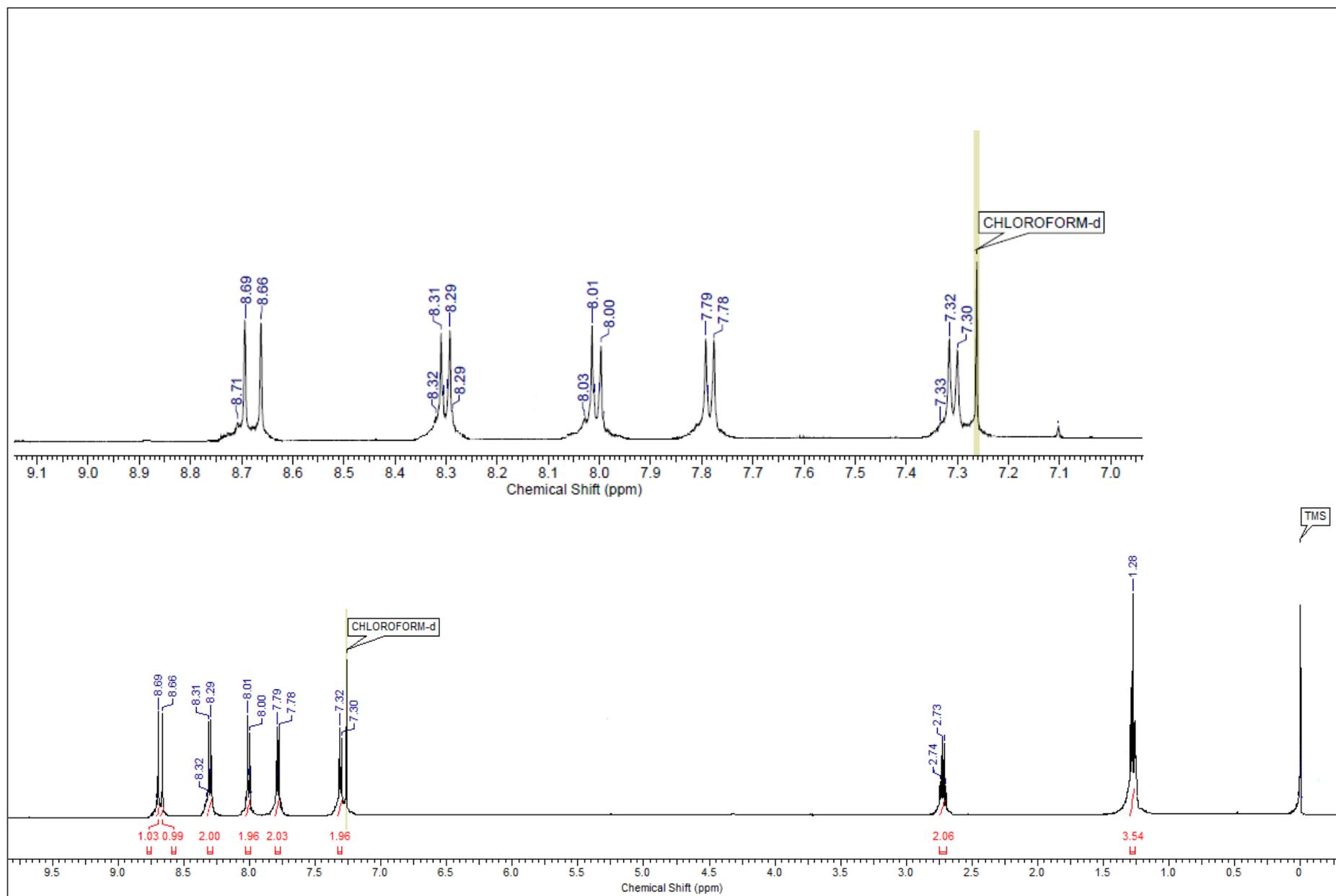


Figura 43: Espectro de RMN ^1H do composto **19** (CDCl_3 , 500 MHz)

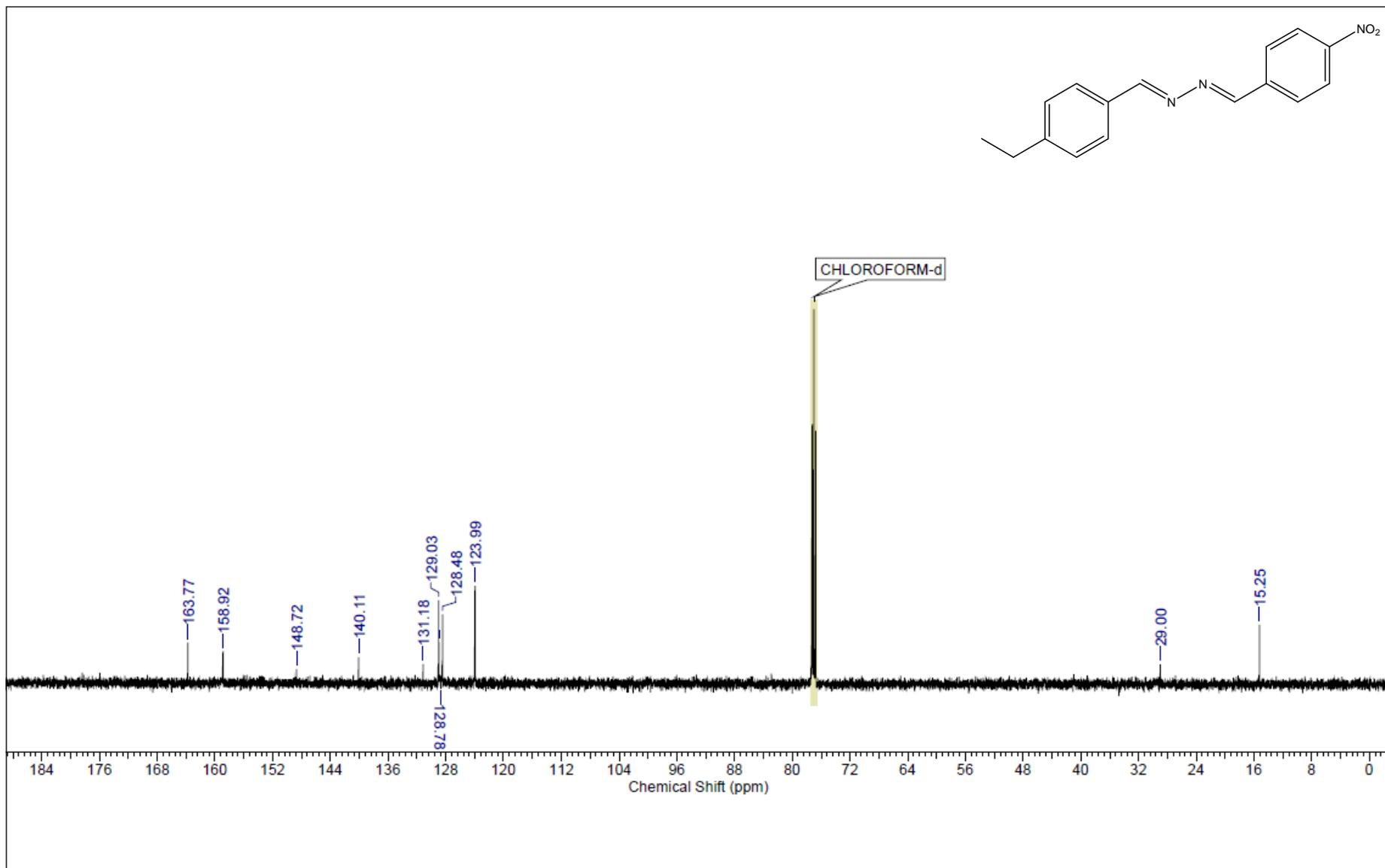


Figura 44: Espectro de RMN ^{13}C do composto 19 (CDCl_3 , 125 MHz)

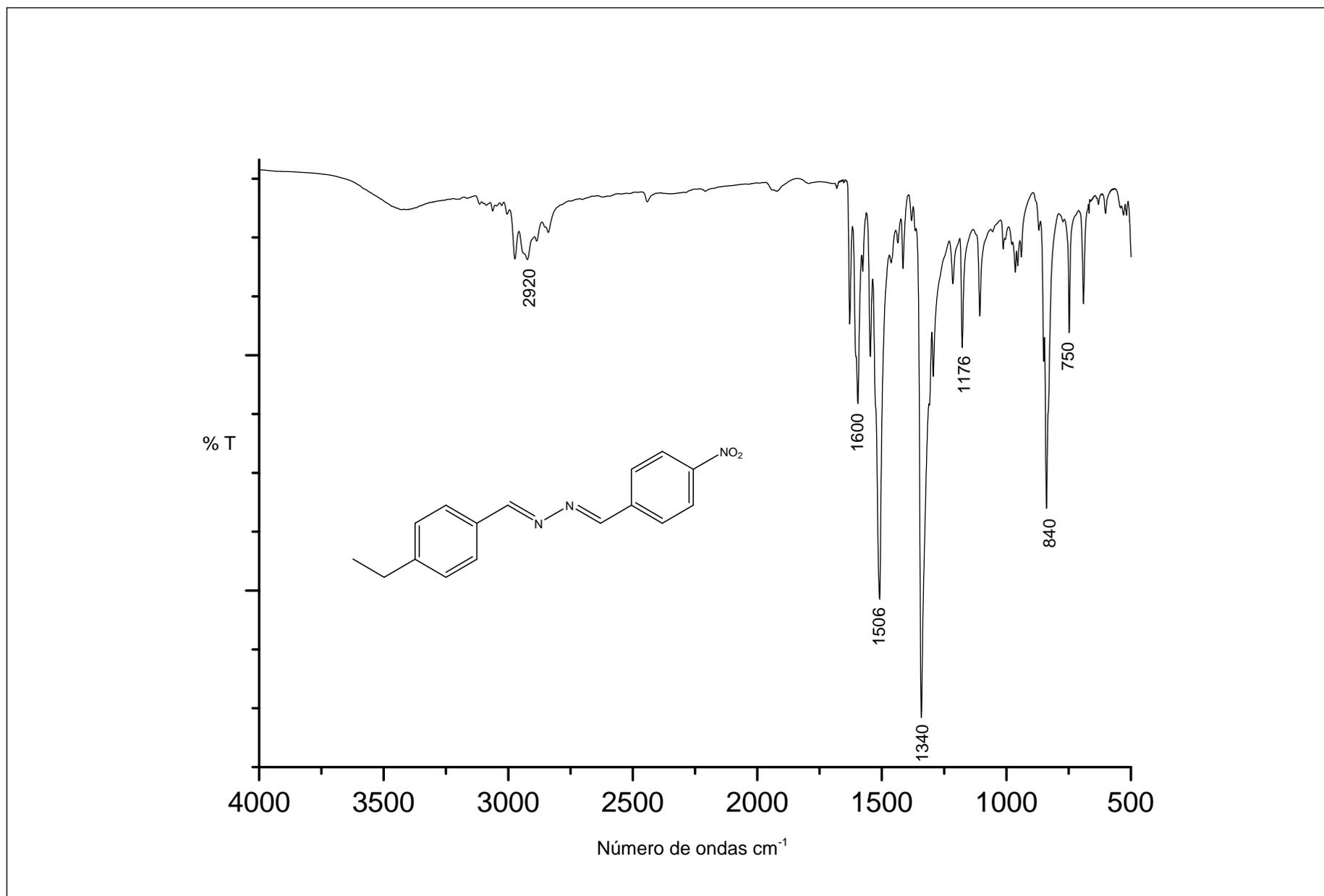


Figura 45 - Espectro na região do IV do composto **19** ($4000\text{-}500\text{ cm}^{-1}$).

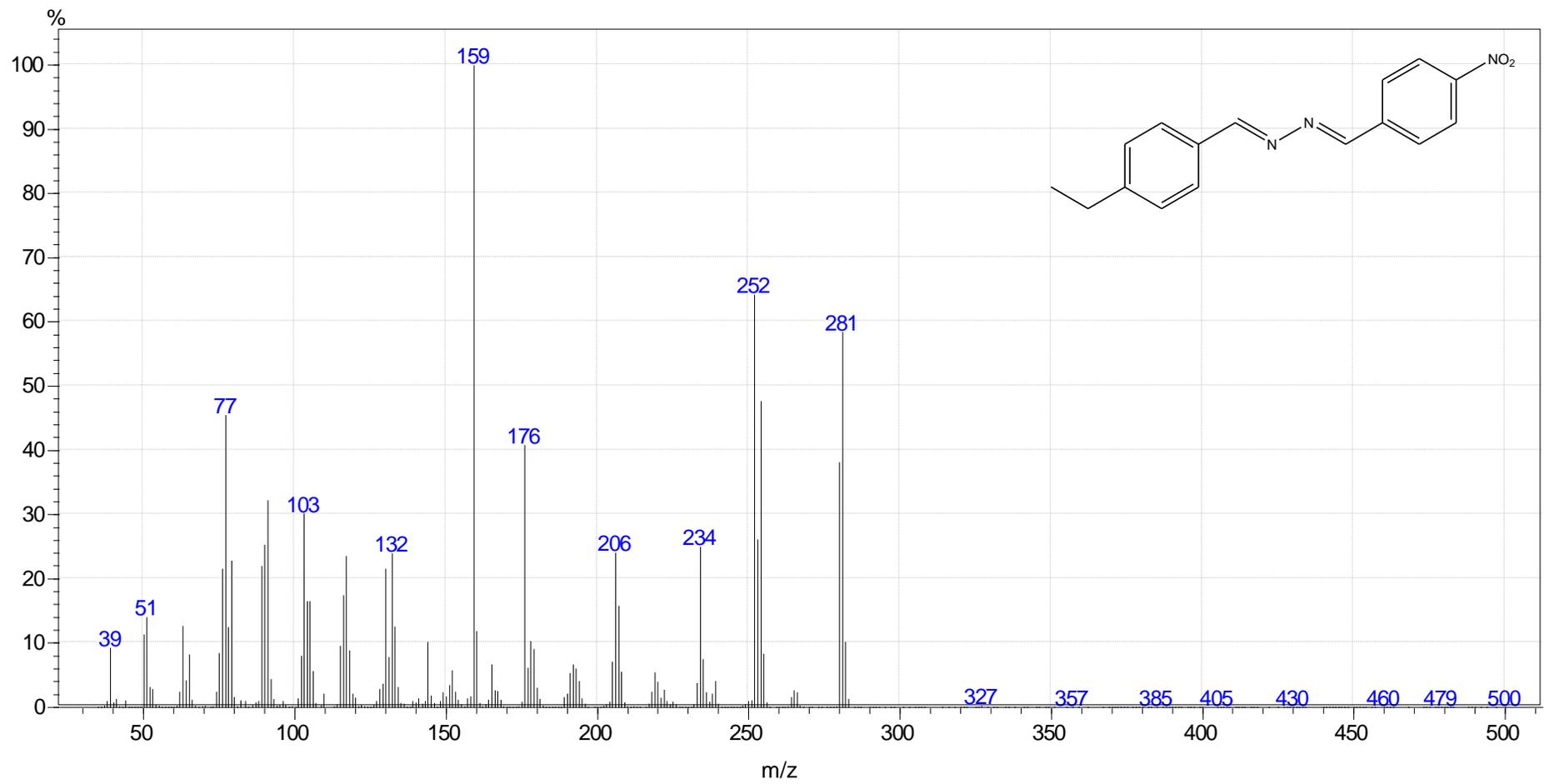
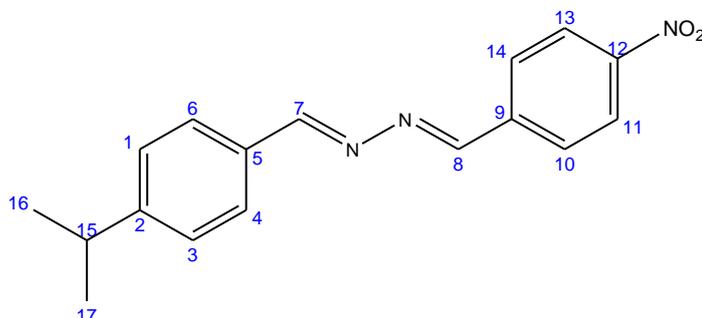


Figura 46: Espetro de massas do composto 19

Síntese da (7E, 8E) - 1 - (4-isopropil-benzilideno) - 2 - (4-nitrobenzilideno) hidrazina (20)



No meio reacional, contendo teoricamente 165 mg (1 mmol) da hidrazona **15**, foi adicionado 149 mg (1 mmol) de 4-isopropilbenzaldeído, conforme procedimento A.

Características do sólido obtido:

Formula molecular: C₁₇H₁₇N₃O₂ (295,13 g/mol)

Coloração: amarelo claro

Faixa de fusão: 137,4 – 139°C

Rendimento: 55,14 %

Pureza (CG-MS): 99%

Dados espectroscópicos

RMN de ¹H (500 MHz, CDCl₃): δ 1,28 (d, 2H – 16 e 17) δ 2,97 (m, 1H – 15) δ 7,32 (d, 2H - 1 e 3) δ 7,8 (d, 2H -2 e 6) δ 7,99 (d, 2H – 10 e 14) 8,3 δ (d, 2H – 11 e 13) δ 8,66 (s, 1H – 7) δ 8,69 (s, 1H - 8).

RMN de ¹³C (125 MHz, CDCl₃): δ 23,79 (C – 16 e 17) 34,26 (C - 15) 123,59 (C-11 e 13) 126,96 (C-1 e 3) 128,69 (C-10 e 14) 132,01 (C-5) 144,24 (C-9) 152,71 (C-2); 159 (C – 7 e 8) 162,14 (C - 12).

IV (4000 – 500 cm⁻¹): (NO₂) 1520 e 1340 cm⁻¹; (C=N) 1600 cm⁻¹; (-CH (CH₃)₂) 2950 e 1375 cm⁻¹;

EM (m/z): [M⁺] 295; Fragmentos: 252; 176; 173; 91.

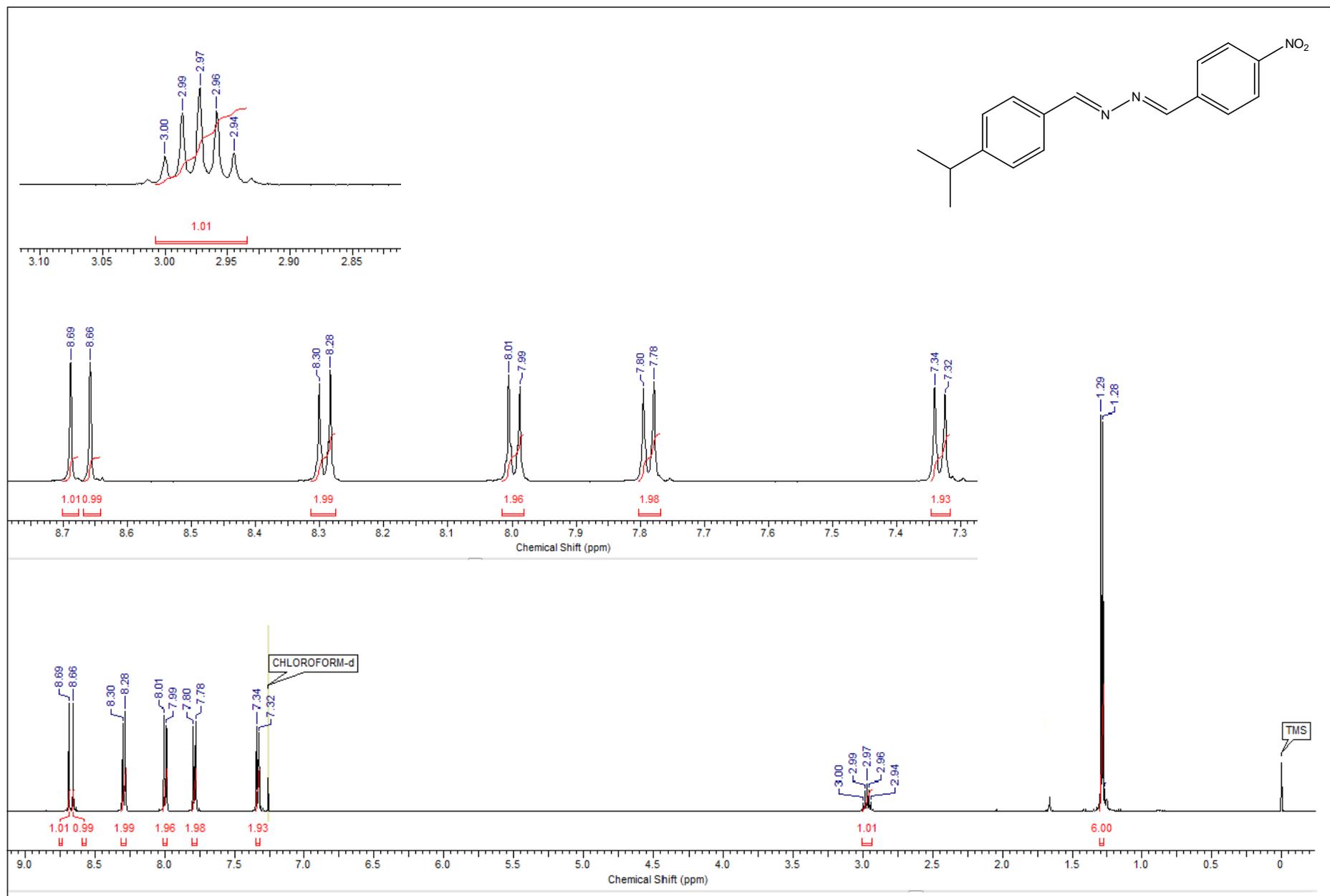


Figura 47: Espectro de RMN ¹H do composto 20 (CDCl₃, 500 MHz).

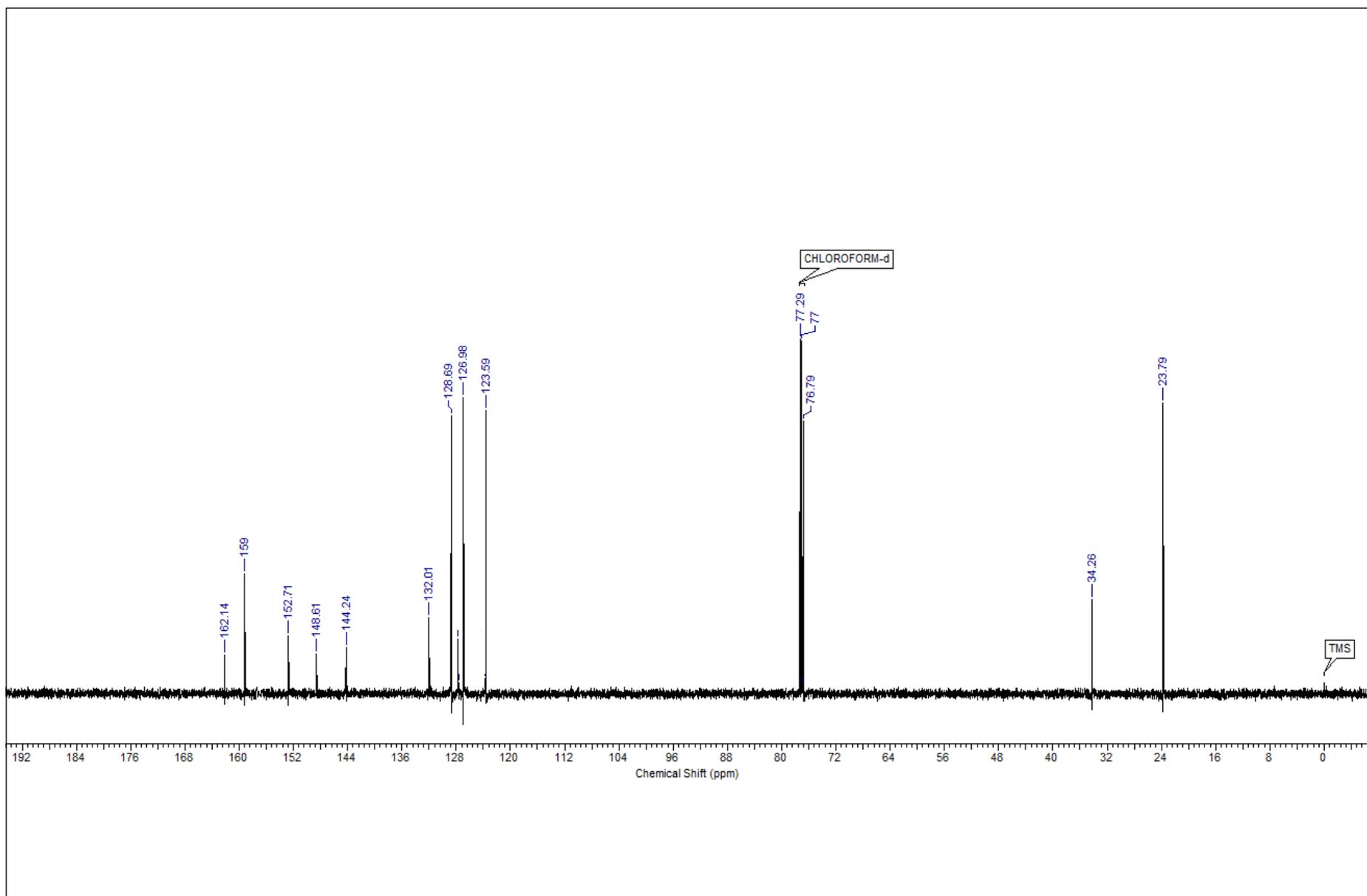


Figura 48: Espectro de RMN ^{13}C do composto **20** (CDCl_3 , 125 MHz)

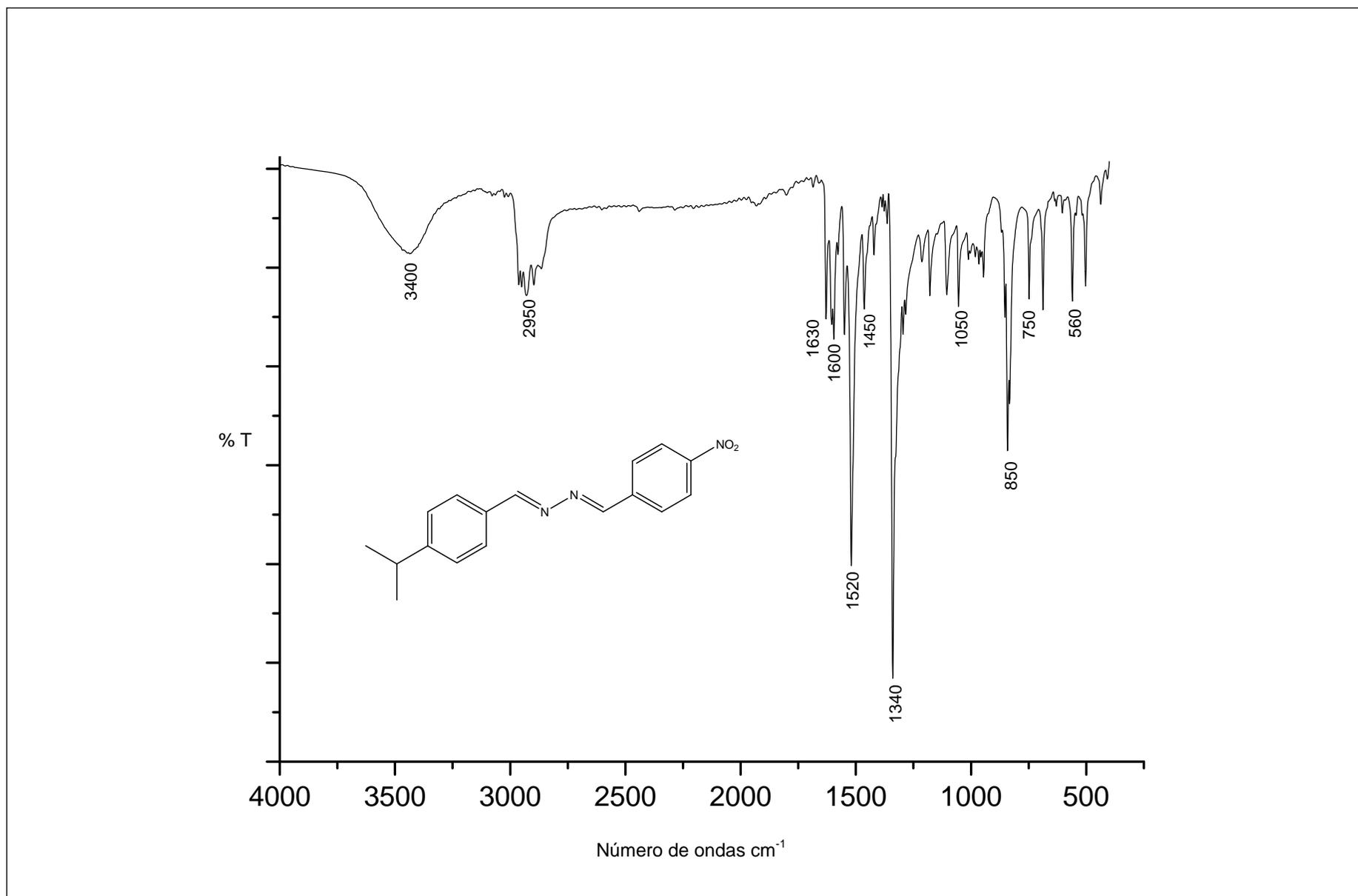


Figura 49: Espectro na região do IV do composto **20** (4000-500 cm^{-1}).

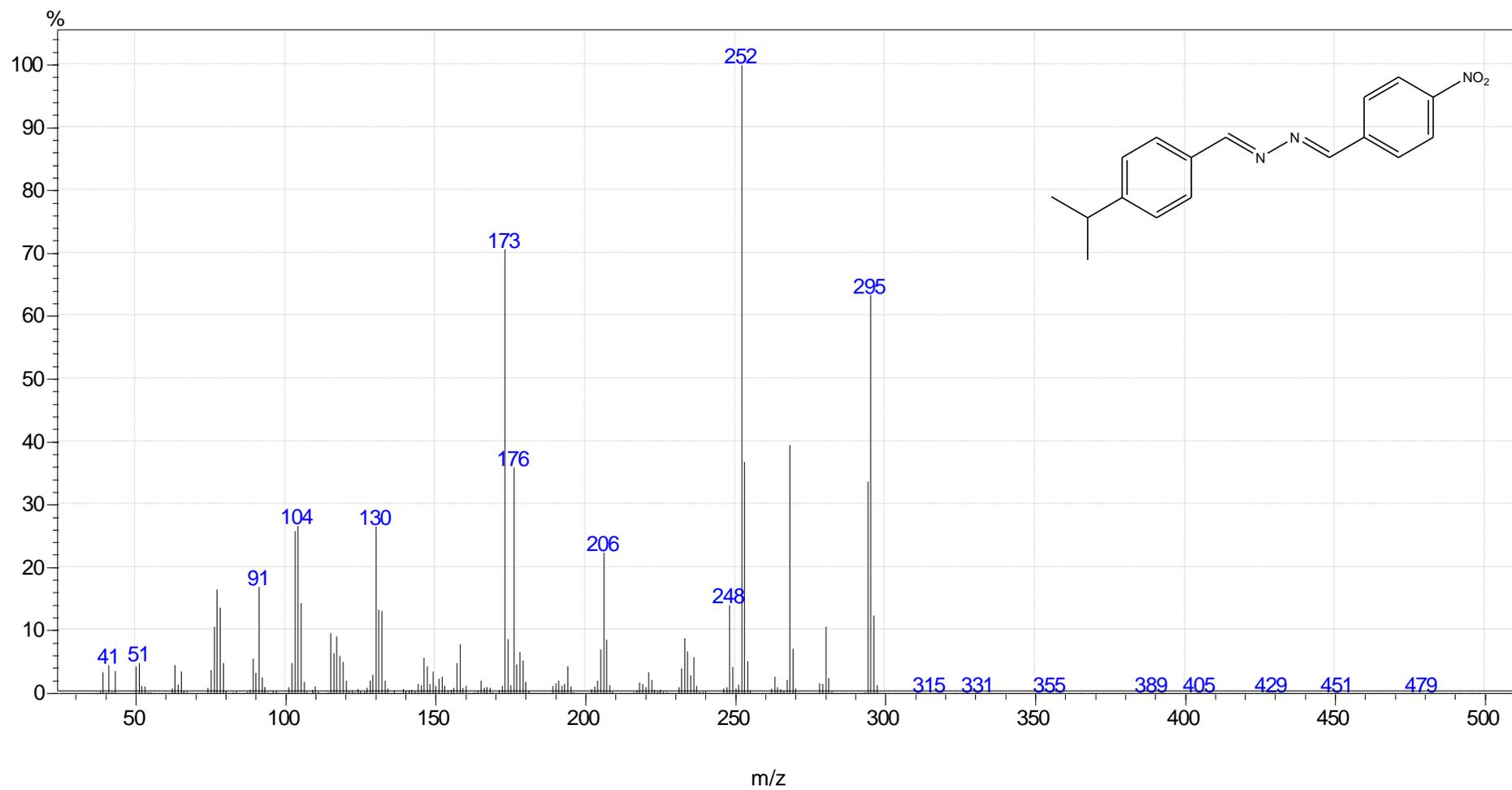
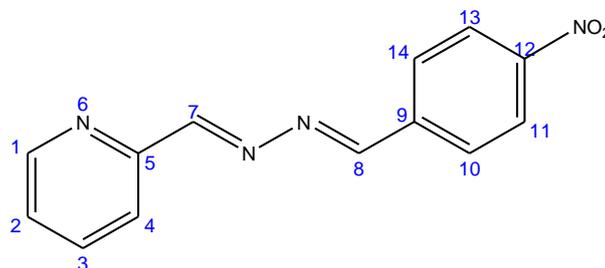


Figura 50: Espectro de massas do composto **20**.

Síntese da (7E, 8E) -2 - (4-nitrobenzilideno) -1 - ((piridin-2-il)-metileno)-hidrazina (29)



No meio reacional, contendo teoricamente 165 mg (1 mmol) da hidrazona **15**, foi adicionado 107 mg (1 mmol) de 2-piridina-carboxialdeído, conforme procedimento A.

Características do sólido obtido:

Formula molecular: C₁₃H₁₀N₄O₂ (254,24 g/mol)

Coloração: amarelo

Faixa de fusão: 158,6 – 159°C

Rendimento: 34%

Pureza (CG-MS): 98,8%

Dados espectroscópicos

RMN de ¹H (500 MHz, CDCl₃): δ 7,38 (m, 1H - 2) δ 7,81 (m, 1H - 3) δ 8,04 (d, 2H - 10 e 14) δ 8,1 (d, 1H - 4) δ 8,32 (d, 2H - 11 e 13) δ 8,69 (s, 1H - 7) δ 8,69 (s, 1H - 8) δ 8,75 (d, 1H - 1).

RMN de ¹³C (125 MHz, CDCl₃): δ 122, 66 (C-4) 124,05 (C-11 e 13) 125, 35 (C-2) 129,38 (C-10 e 14) 136,67 (C-3) 149,39 (C-9) 150,01 (C-1) 150,17 (C-5) 159,8 (C-7 e 8) 162,85 (C-12).

IV (4000 – 500 cm⁻¹): 510 e 1345 cm⁻¹; (Py) 1460 e 750 cm⁻¹; (C=N) 1600 cm⁻¹; (=C-CH₃) 2840 e 1430 cm⁻¹.

EM (m/z): [M⁺] 254; Fragmentos: 176; 105; 79.

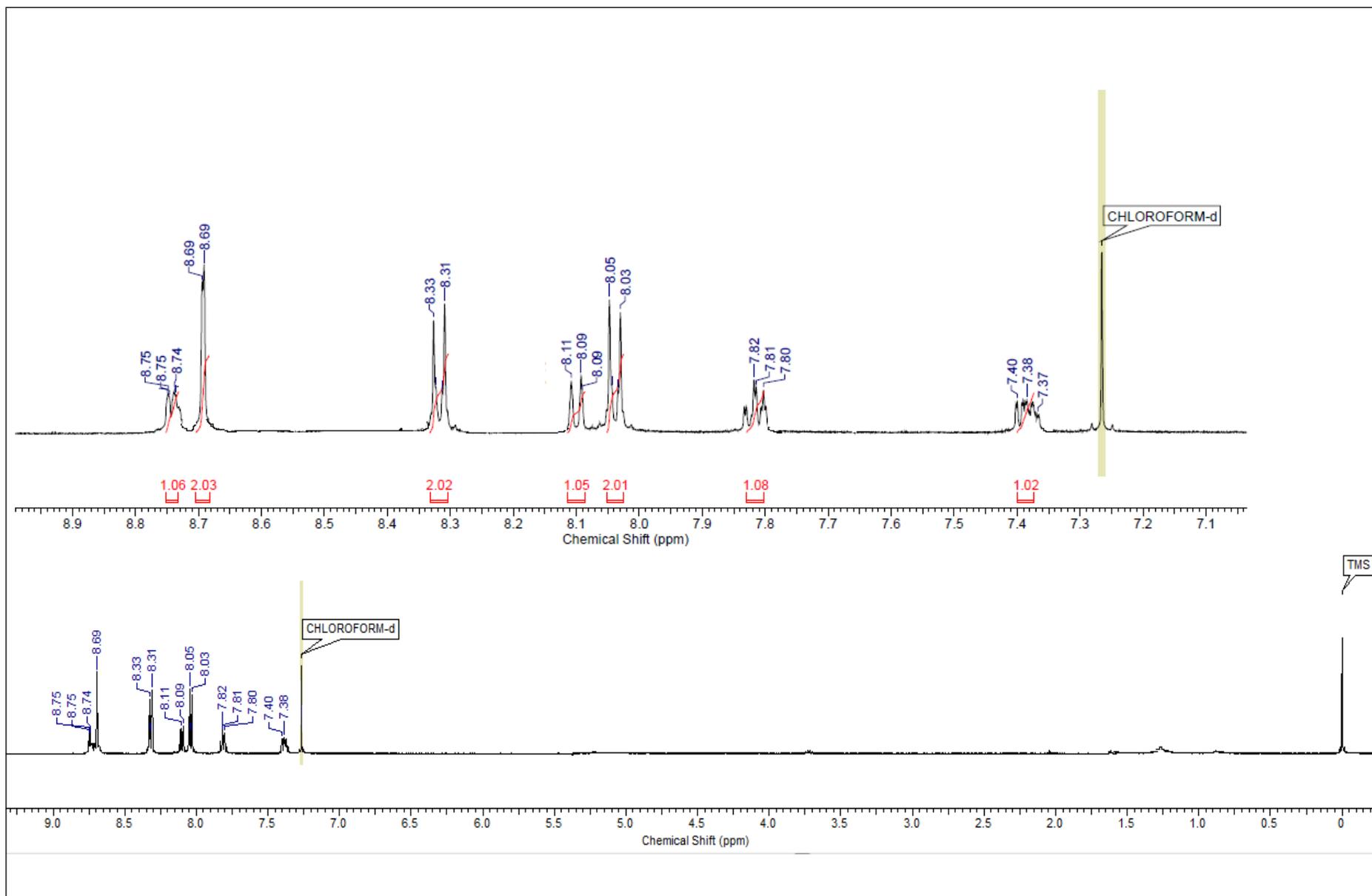


Figura 51: Espectro de RMN ^1H do composto **29** (CDCl_3 , 500 MHz).

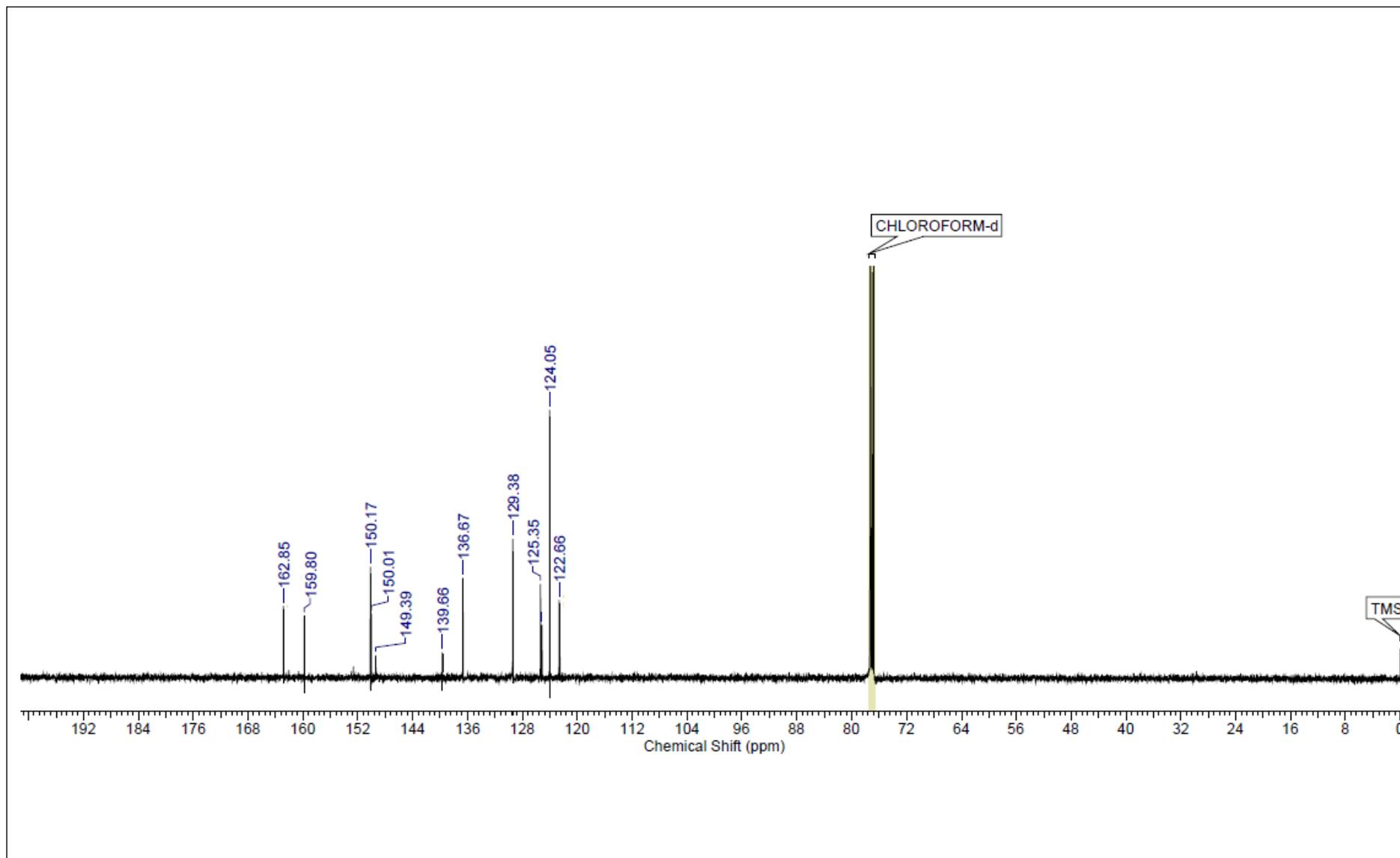


Figura 52: Espectro de RMN ^{13}C do composto **29** (CDCl_3 , 125 MHz).

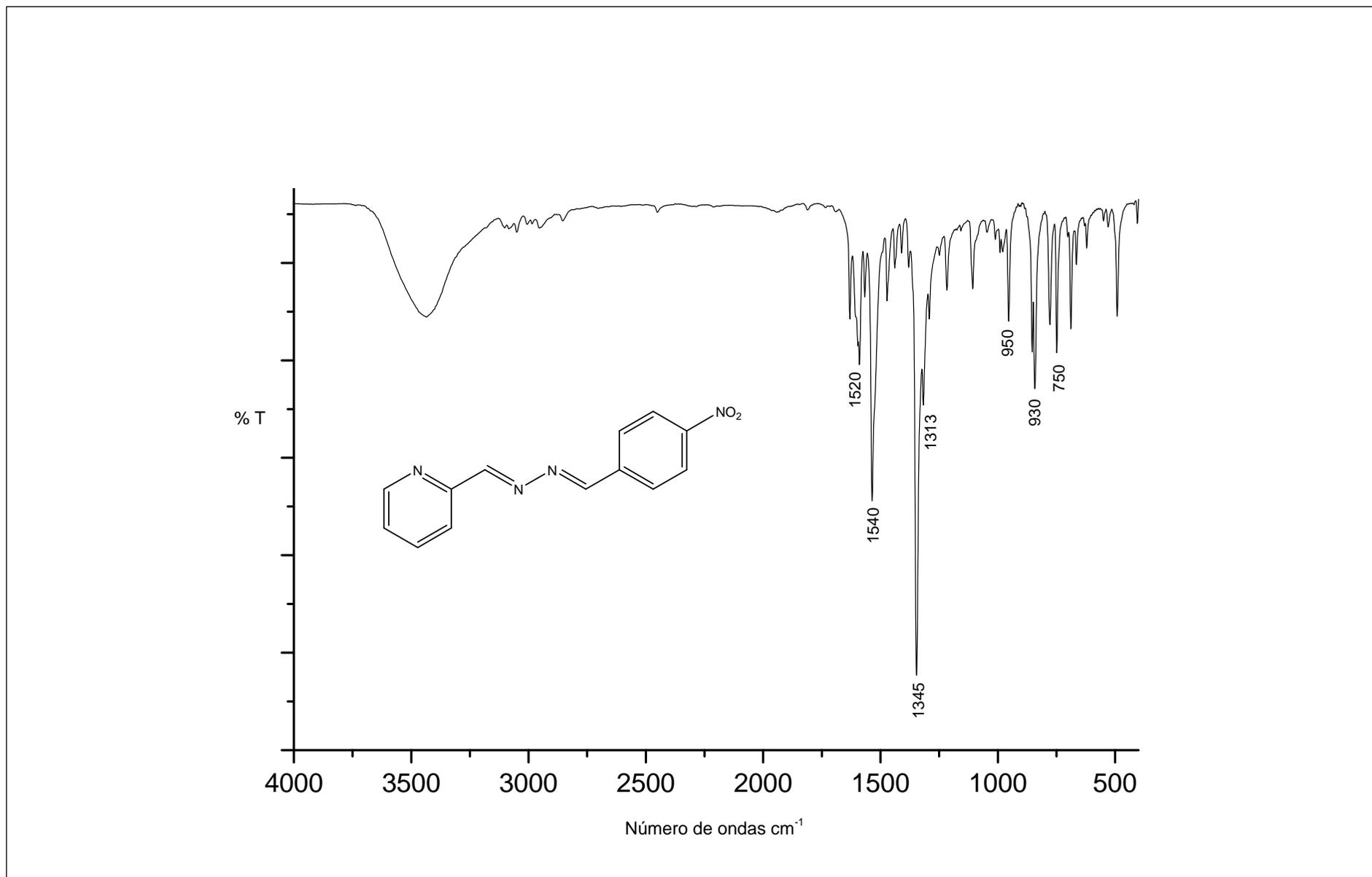


Figura 53 - Espectro na região do IV do composto **29** (4000-500 cm⁻¹).

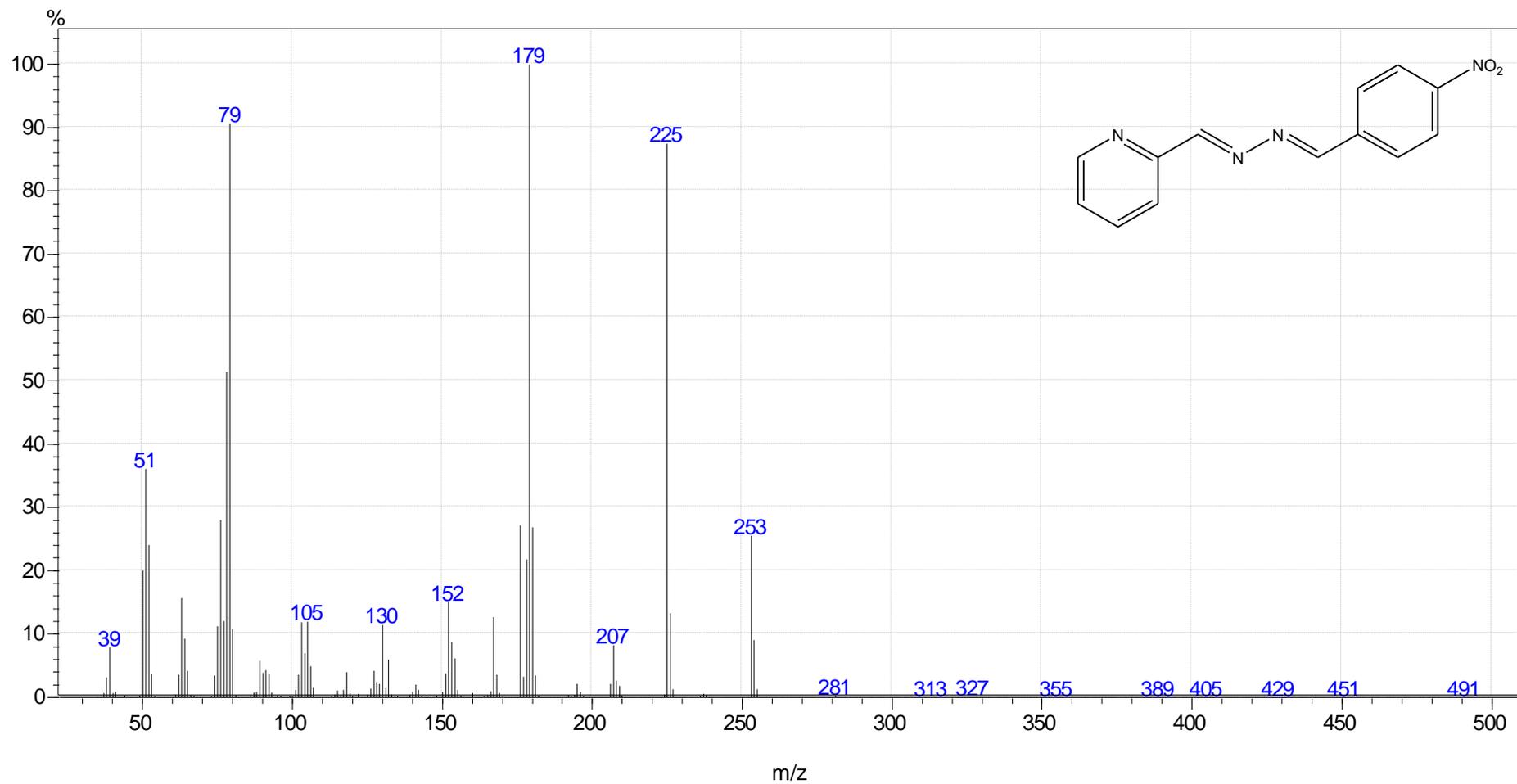
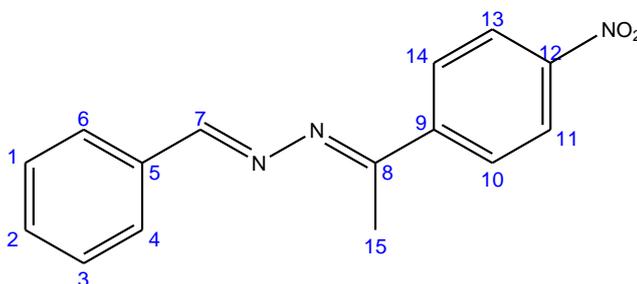


Figura 54 - Espectro de massas do composto **29**.

Síntese da Benzilideno-2-(1-(4-nitrofenil)-etilideno)-hidrazina (37)



Foram utilizados 106 mg (1 mmol) de benzaldeído e 179 mg (1 mmol) da hidrazona **16**, conforme procedimento C. Características do sólido obtido:

Formula molecular: C₁₅H₁₃N₃O₂ (267,28 g/mol)

Coloração: amarelo claro

Faixa de fusão: 146,9 – 147°C

Rendimento: 68%

Pureza (CG-MS): 98%

Dados espectroscópicos

RMN de ¹H (500 MHz, CDCl₃): δ 2,55 (s, 3H - 15) δ 7,47 (m, 3H - 1, 2 e 3) δ 7,86 (d, 2H - 4 e 6) δ 8,08 (d, 2H - 10 e 14) δ 8,28 (d, 2H - 11 e 13) δ 8,43 (s, 1H - 7).

RMN de ¹³C (125 MHz, CDCl₃): δ 15,26 (C-15) 123,57 (C-11 e 13) 127,7 (C-1 e 3) 128,5 (C-4 e 6) 128,81 (C-2) 131,25 (C-10 e 14) 134,3 (C-5) 144,11 (C-9) 148,66 (C-7) 159,02 (C-8) 162,3 (C-12).

IV (4000 – 500 cm⁻¹): (NO₂) 1520 e 1340 cm⁻¹; (Mono-Substituído) 750 e 690 e 3070 cm⁻¹; (C=N) 1590 cm⁻¹; (=C-CH₃) 1450 e 2840 cm⁻¹.

EM (m/z): [M⁺] 267; Fragmentos: 190; 104; 77.

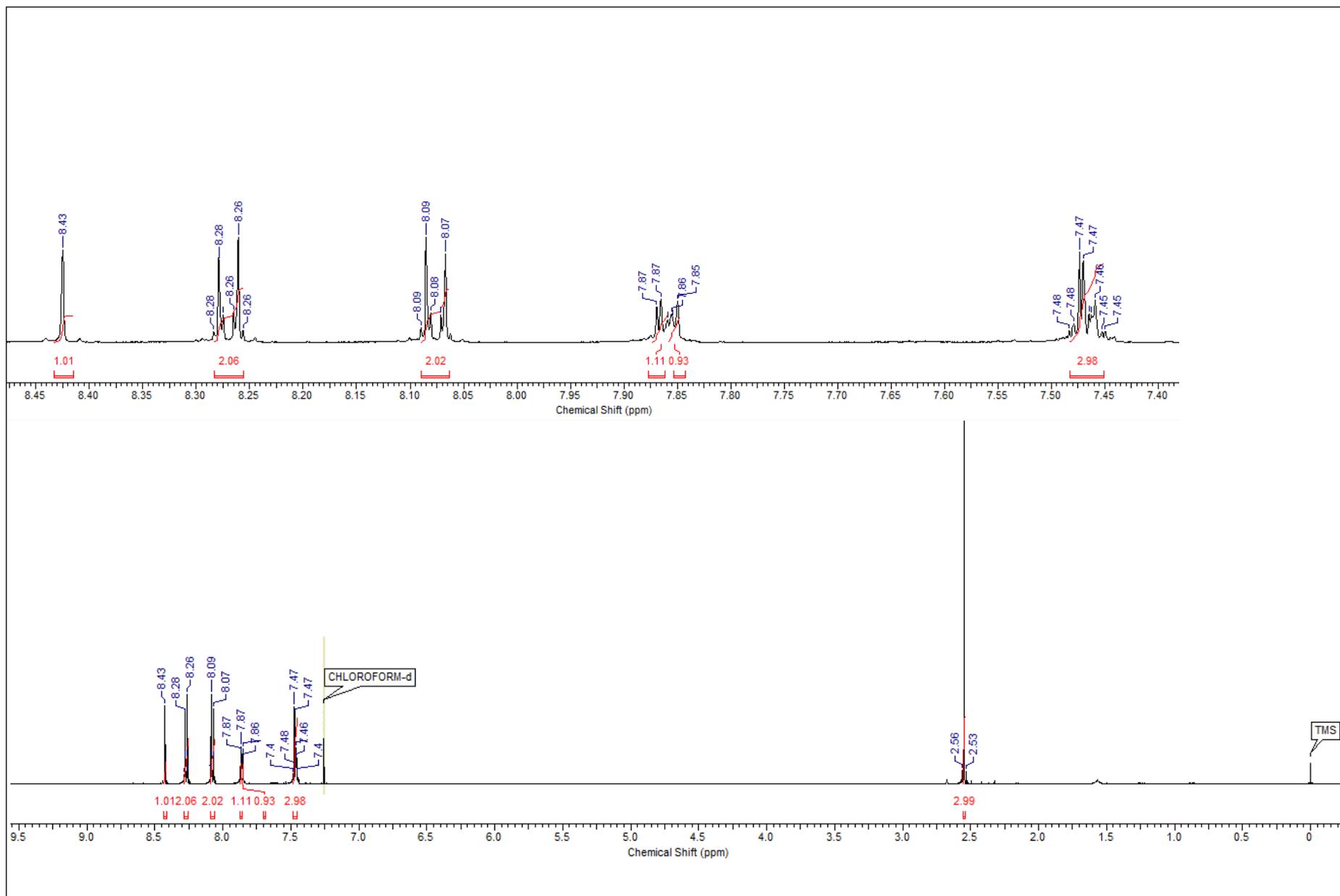


Figura 55: Espectro de RMN ¹H do composto 37 (CDCl₃, 500 MHz).

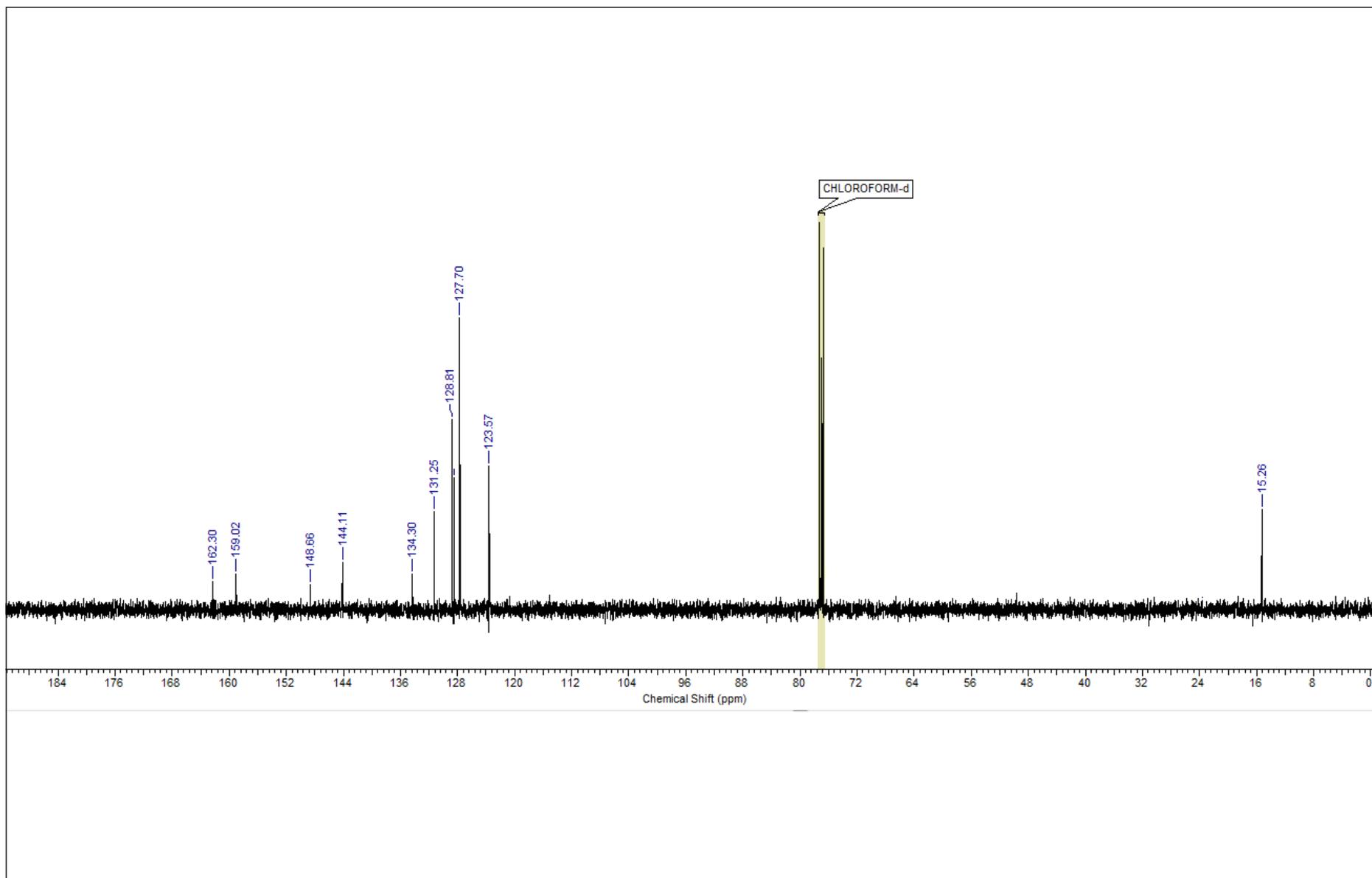


Figura 56: Espectro de RMN ¹³C do composto 37 (CDCl₃, 125 MHz)

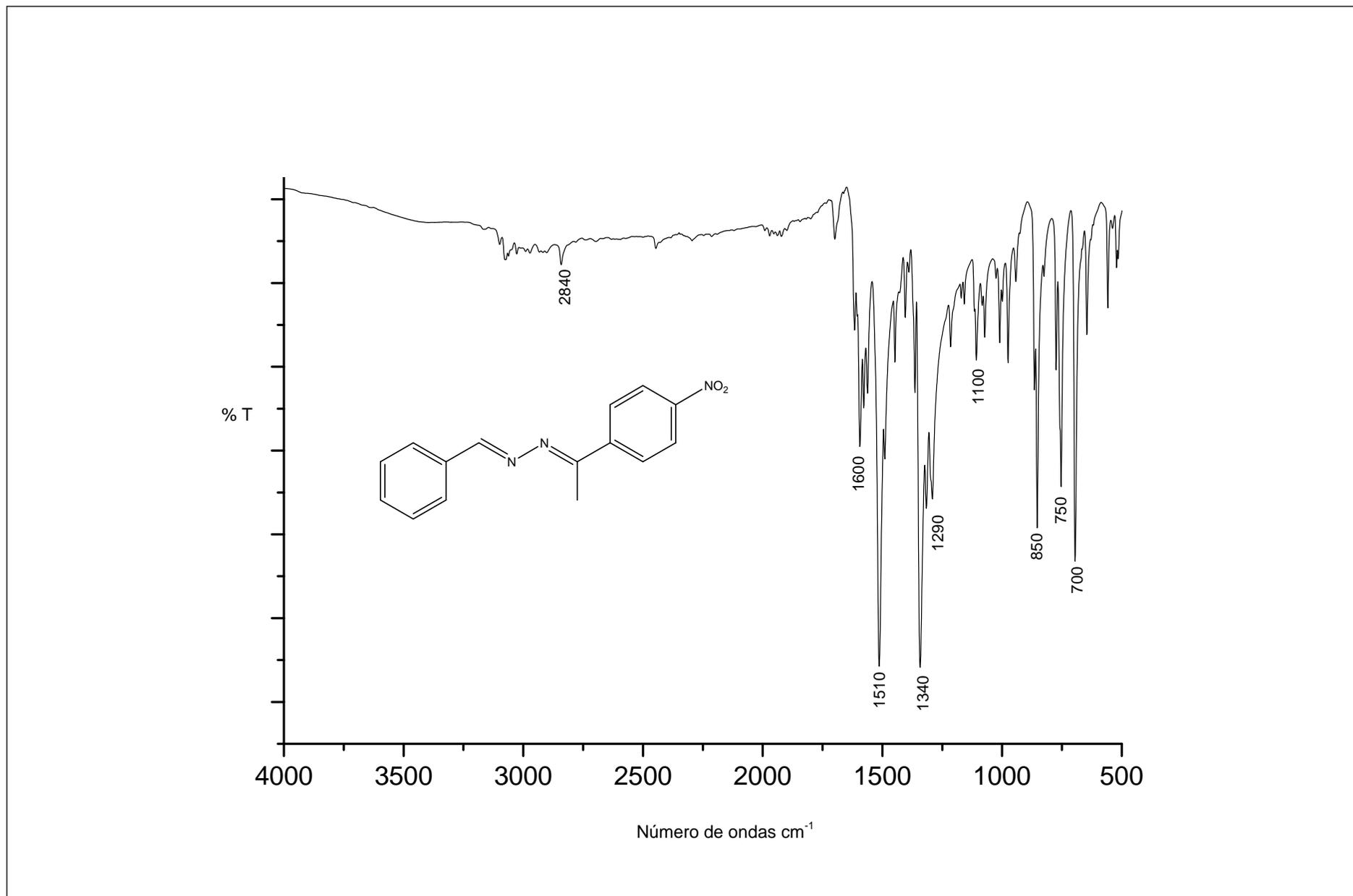


Figura 57: Espectro na região do IV do composto 37 (4000-500 cm^{-1}).

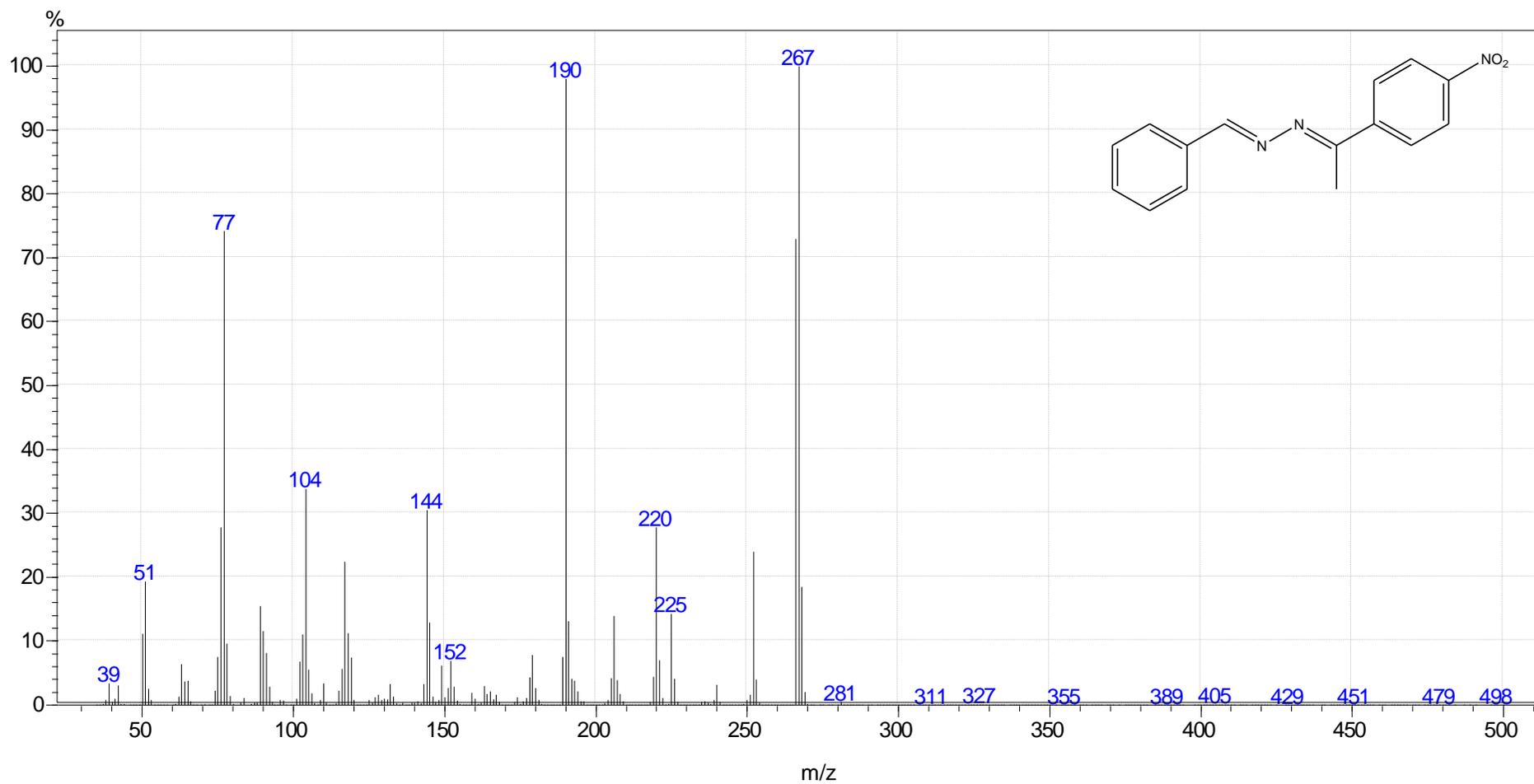
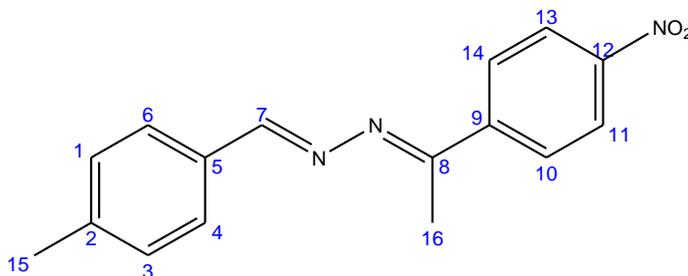


Figura 58: Espectro de massas do composto 37

Síntese da (7E, 8E) - 1 - (4-metilbenzilideno) - 2 - (1 - (4-nitrofenil)-etilideno)-hidrazina (38).



Foram utilizados 120 mg (1 mmol) de 4-metilbenzaldeído e 179 mg (1 mmol) da hidrazona **16**, conforme procedimento C. Características do sólido obtido:

Formula molecular: C₁₆H₁₅N₃O₂ (281,12 g/mol)

Coloração: amarelo claro

Faixa de fusão: 121,7 – 122,9°C

Rendimento: 74%

Pureza (CG-MS): 98%

Dados espectroscópicos

RMN de ¹H (500 MHz, CDCl₃): δ 2,42 (s, 3H - 15) δ 2,55 (s, 3H - 16) δ 7,27 (d, 2H - 1 e 3) δ 7,77 (d, 2H - 4 e 6) δ 8,08 (d, 2H - 10 e 14) δ 8,27 (d, 2H - 11 e 13) δ 8,42 (s, 1H - 7).

RMN de ¹³C (125 MHz, CDCl₃): δ 15,22 (C-16) 21,62 (C-15) 123,57 (C-11 e 13) 127,66 (C-1 e 3) 128,55 (C-4 e 6) 129,56 (C-5) 131,64 (C-10 e 14) 141,83 (C-2) 144,24 (C-9) 148,62 (C-7) 159,29 (C-8) 162,18 (C-12).

IV (4000 – 500 cm⁻¹): (NO₂) 1520 e 1340 cm⁻¹; (-CH₃) 2840 cm⁻¹; (C=N) 1600 cm⁻¹; (=C-CH₃) 2920 e 1450 cm⁻¹.

EM (m/z): [M⁺] 281; Fragmentos: 266; 190; 159; 118.

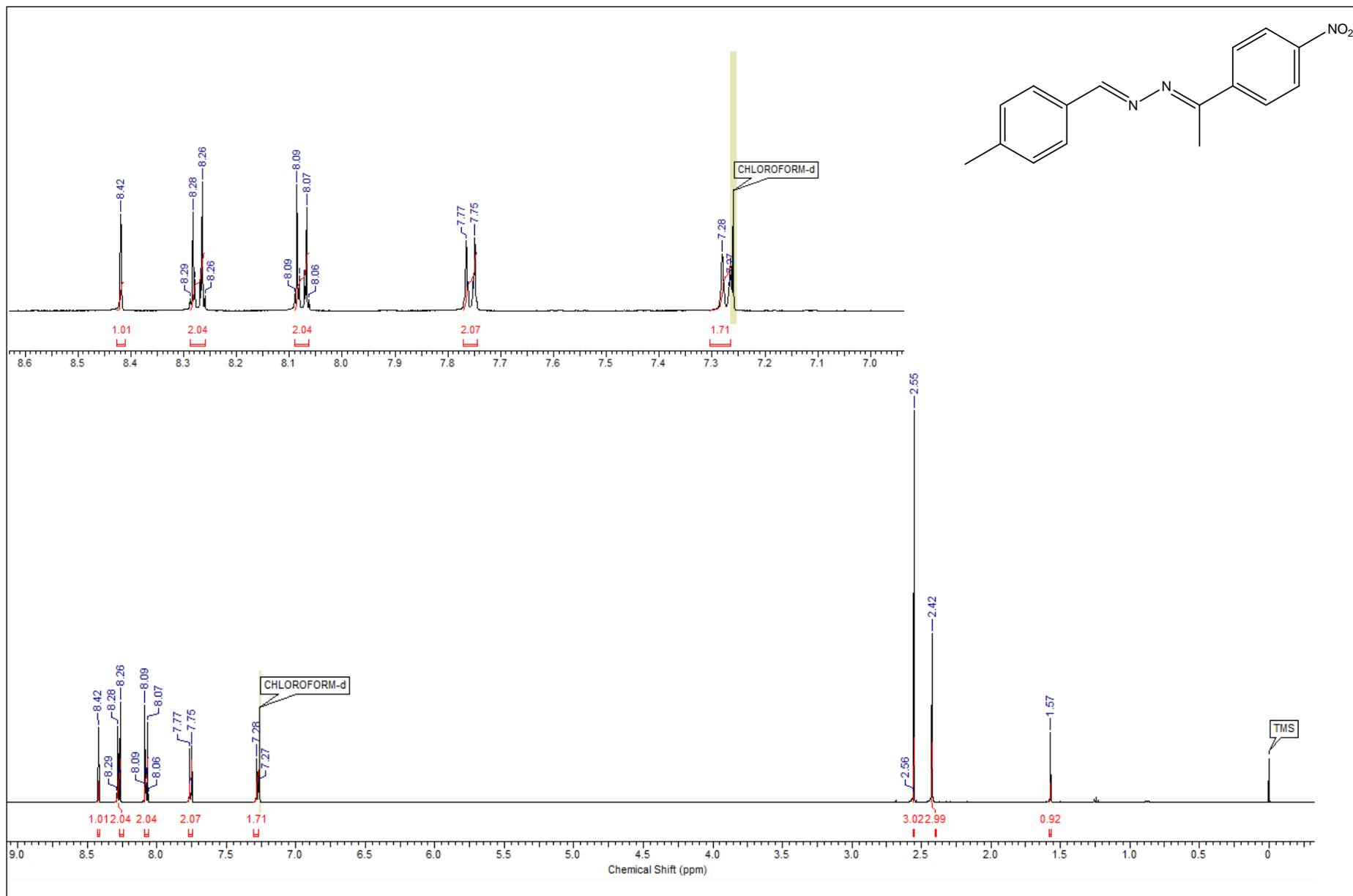


Figura 59: Espectro de RMN ^1H do composto **38** (CDCl_3 , 500 MHz).

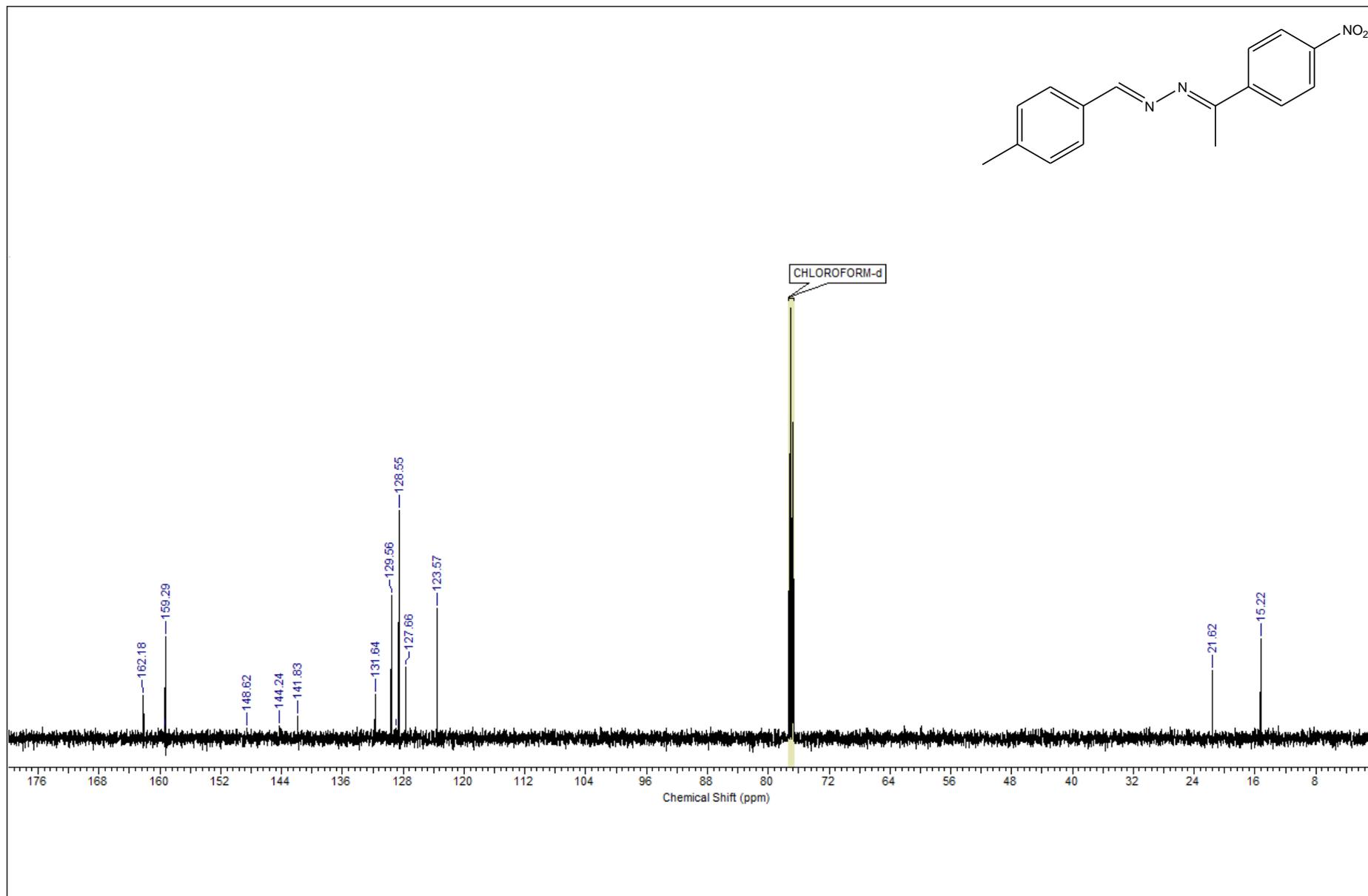


Figura 60: Espectro de RMN ^{13}C do composto 38 (CDCl_3 , 125 MHz).

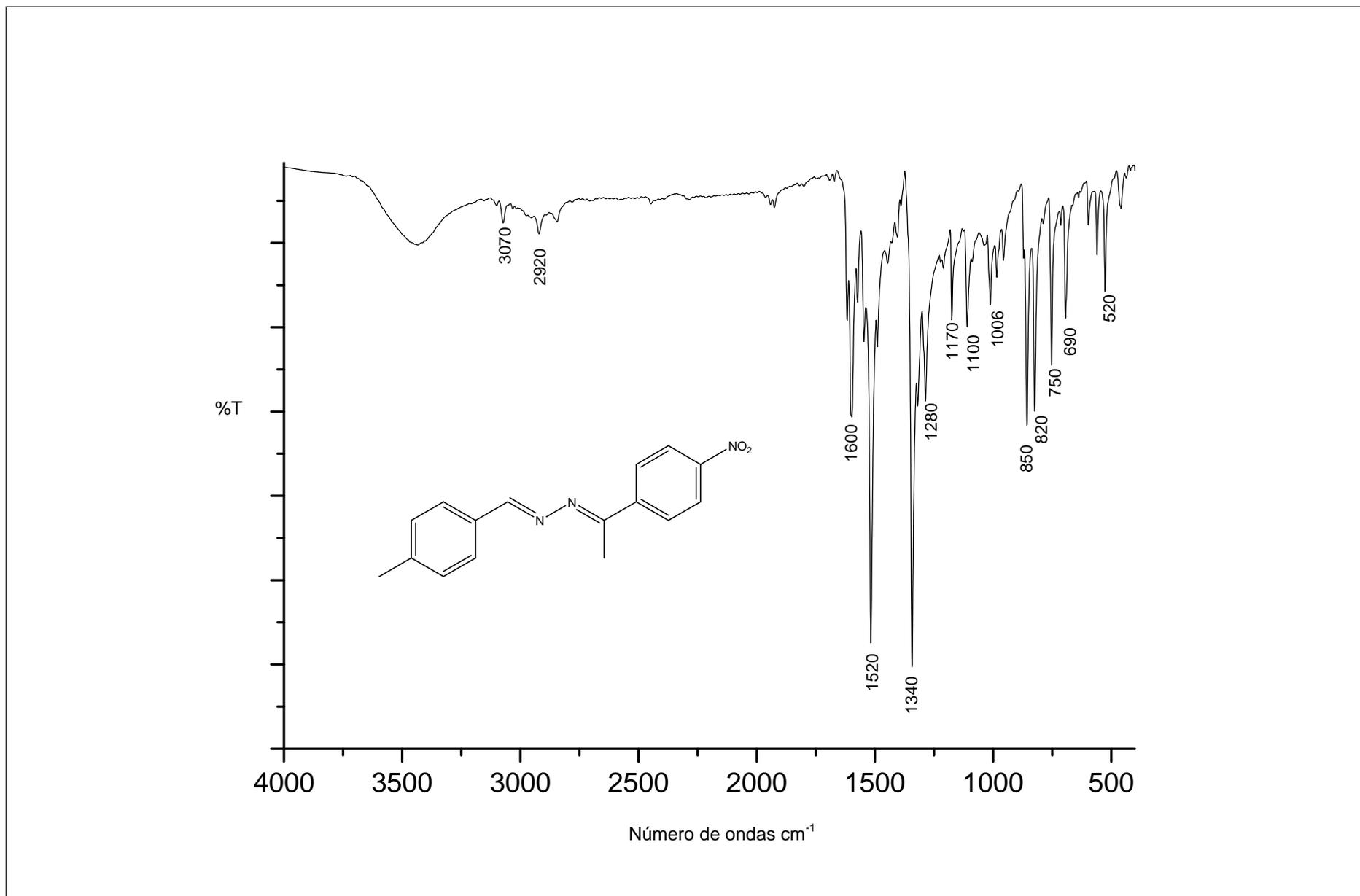


Figura 61: Espectro na região do IV do composto **38** (4000-500 cm^{-1}).

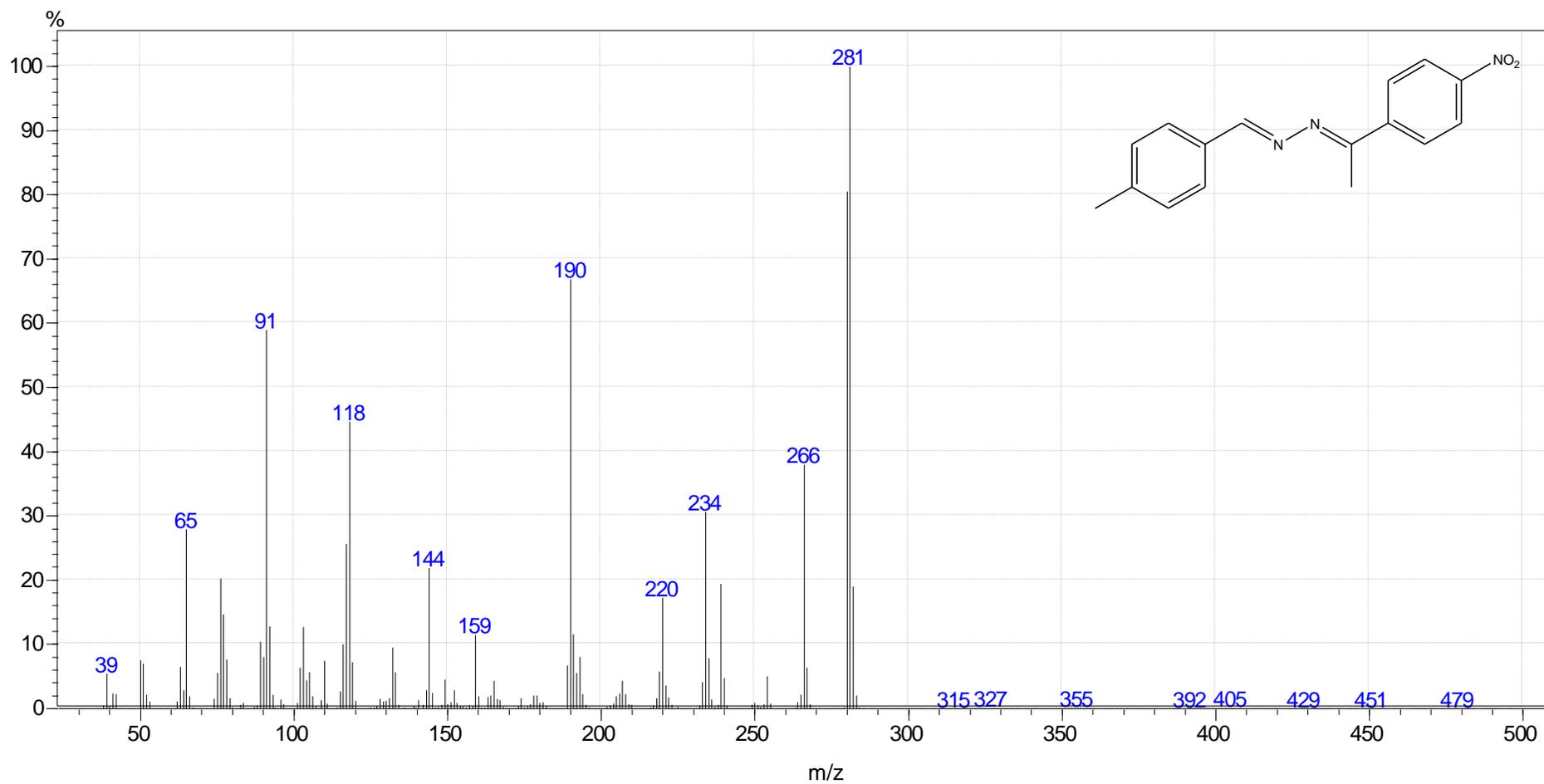
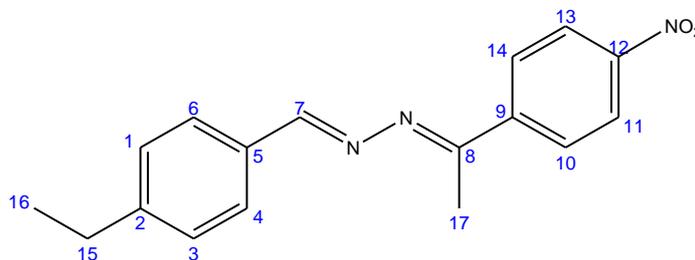


Figura 62: Espectro de massas do composto **38**.

Síntese da (7E, 8E) - 1 - (4-etil-benzilideno) - 2 - (1 - (4-nitrofenil)-etilideno)-hidrazina (39)



Foram utilizados 134 mg (1 mmol) de 4-etilbenzaldeído e 179 mg (1 mmol) da hidrazona **16**, conforme procedimento C. Características do sólido obtido:

Formula molecular: C₁₇H₁₇N₃O₂ (295,34 g/mol)

Coloração: amarelo claro

Faixa de fusão: 100,8 – 102,4°C

Rendimento: 71, 38%

Pureza (CGMS): 95%

Dados espectroscópicos

RMN de ¹H (500 MHz, CDCl₃): δ 1,28 (t, 3H - 15) δ 2,55 (s, 3H - 17) δ 2,72 (q, 2H - 15) δ 7,3 (d, 2H - 1 e 3) δ 7,79 (d, 2H - 4 e 6) δ 8,08 (d, 2H - 10 e 14) δ 8,27 (d, 2H - 11 e 13) δ 8,41 (s, 1H - 7).

RMN de ¹³C (125 MHz, CDCl₃): δ 15,21 (C-17) 15,31 (C-16) 28,96 (C-15) 123,55 (C-11 e 13) 127,66 (C-1 e 3) 128,5 (C-4 e 6) 128,64 (C-5) 131,83 (C-10 e 14) 144,21 (C-9) 148,1 (C-2) 148,57 (C-7) 159,22 (C-8) 162,15 (C-12).

IV (4000 – 500 cm⁻¹): (NO₂) 1520 e 1340 cm⁻¹; (-CH₂-CH₃) 2960 e 2920 cm⁻¹; (C=N) 1600 cm⁻¹; (=C-CH₃) 2900 e 1450 cm⁻¹.

EM (m/z): [M⁺] 295; Fragmentos: 266; 190; 173; 77.

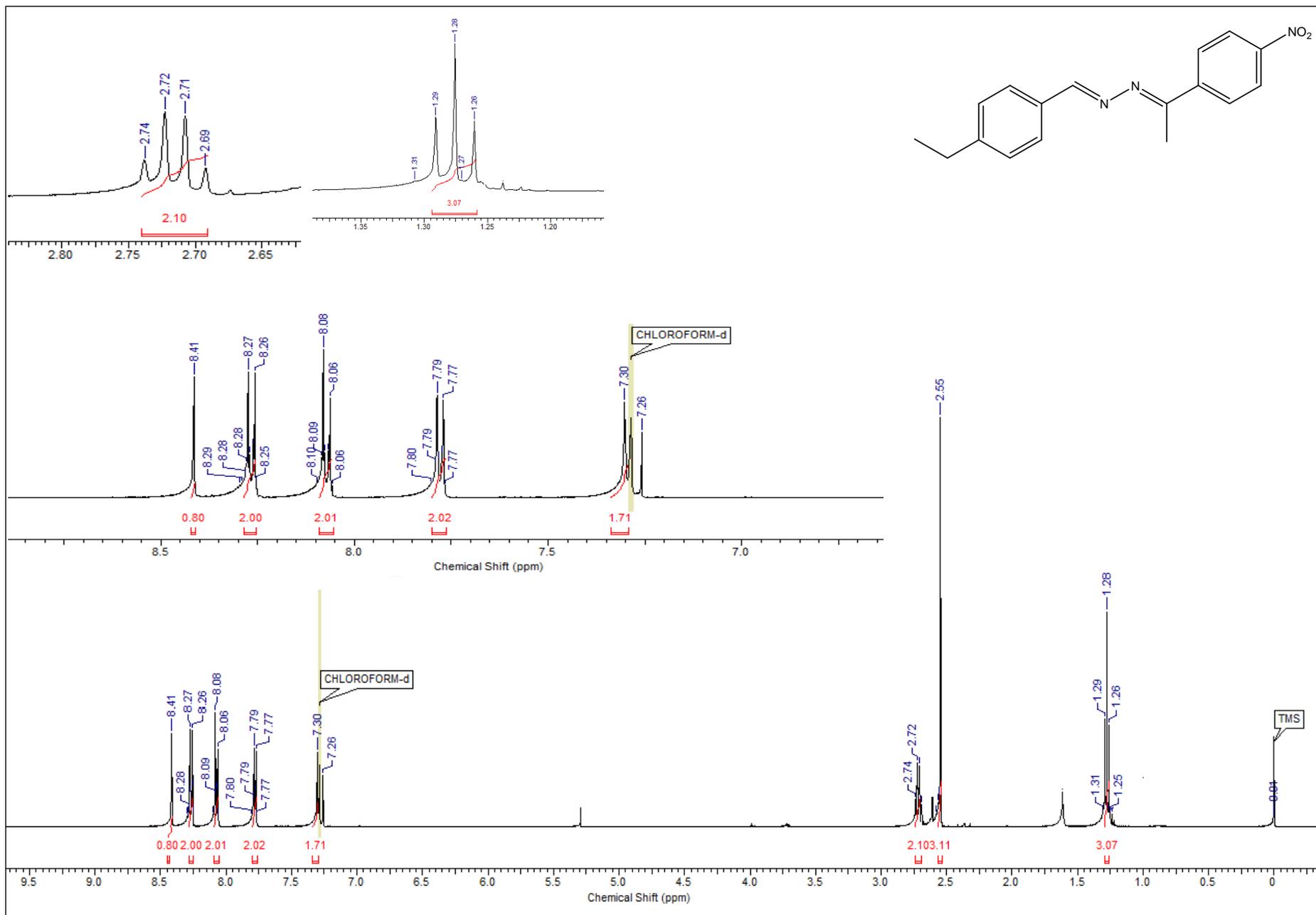


Figura 63: Espectro de RMN ¹H do composto **39** (CDCl₃, 500 MHz)

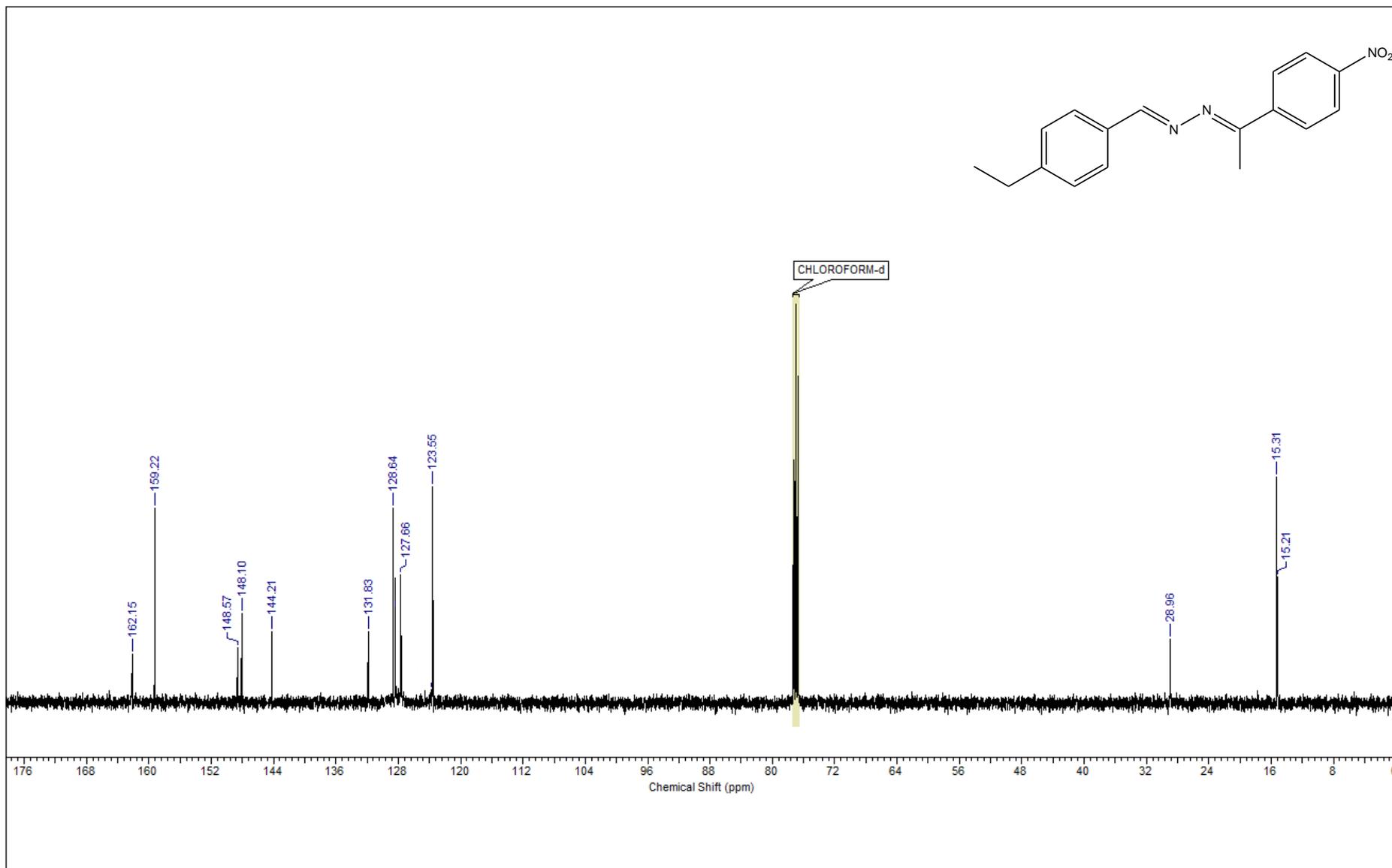


Figura 64: Espectro de RMN ^{13}C do composto **39** (CDCl_3 , 125 MHz)

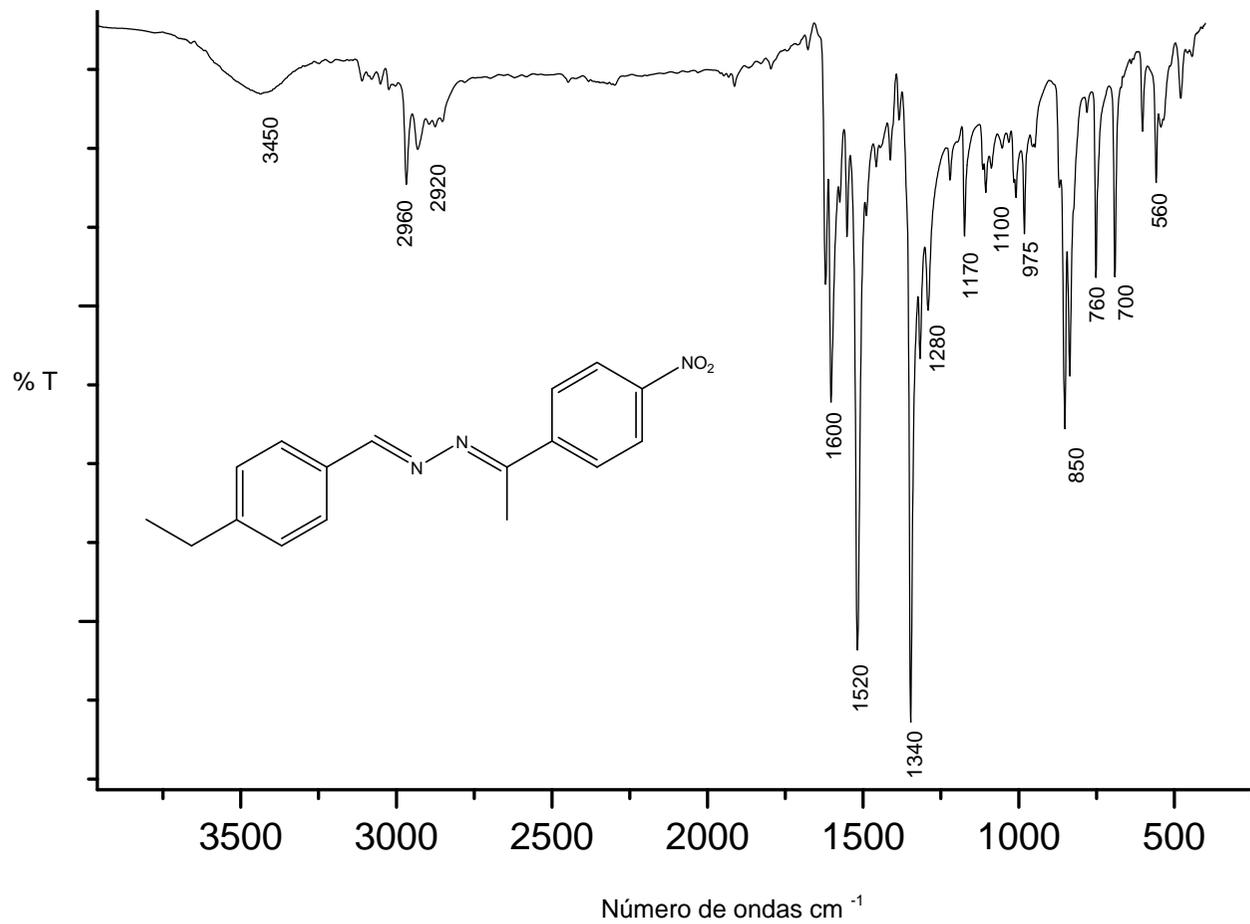


Figura 65 - Espectro na região do IV do composto 39 ($4000\text{-}500\text{ cm}^{-1}$).

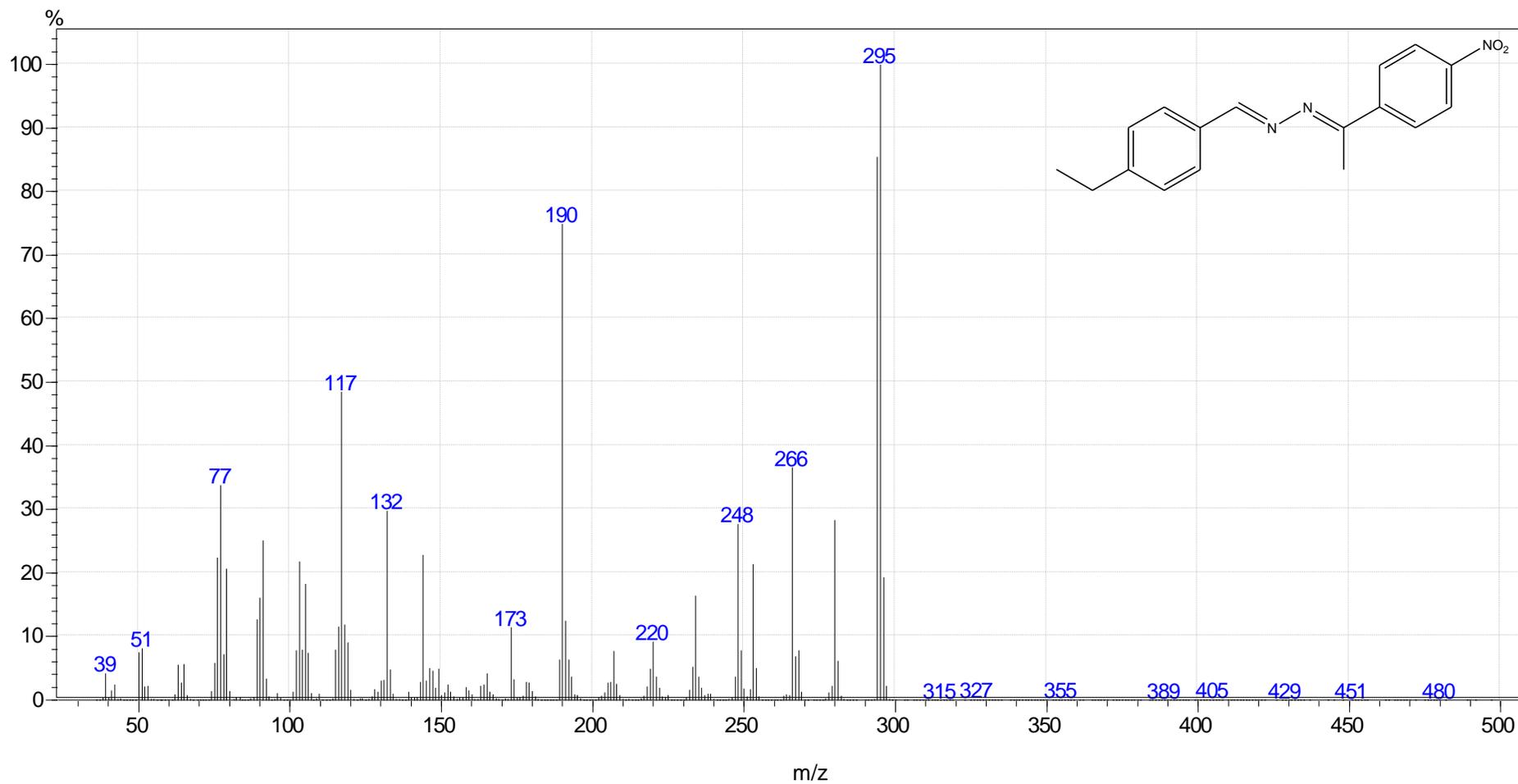
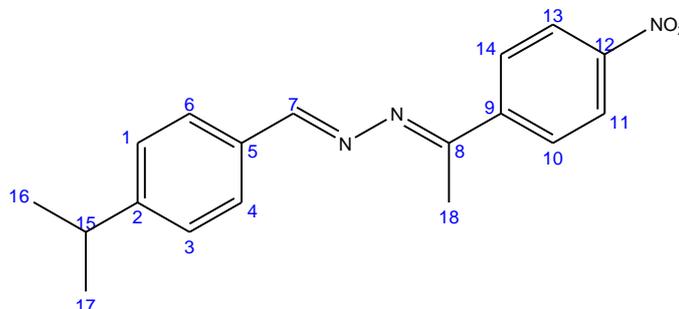


Figura 66: Espectro de massas do composto 39

Síntese da (8E, 9E) -1 - (4-isopropil-benzilideno) -2 - (1 - (4-nitrofenil)-etilideno)-hidrazina (40)



Foram utilizados 148 mg (1 mmol) de 4-isopropilbenzaldeído e 179 mg (1 mmol) da hidrazona **16**, conforme procedimento C. Características do sólido obtido:

Formula molecular: C₁₈H₁₉N₃O₂ (309,15 g/mol)

Coloração: amarelo

Faixa de fusão: 96 – 96,9°C

Rendimento: 65,5 %

Pureza (CG-MS): 97%

Dados espectroscópicos

RMN de ¹H (500 MHz, CDCl₃): δ 1,3 (d, 6H – 16 e 17) δ 2,56 (s, 3H – 18) δ 2,99 (m, 1H – 15) δ 7,99 (d, 2H – 1 e 3) δ 8,07 (d, 2H – 10 e 14) δ 8,28 (d, 2H - 11 e 13) δ 8,30 (d, 2H – 4 e 6) δ 8,43 (s, 1H – 7).

RMN de ¹³C (125 MHz, CDCl₃): δ 15,24 (C-18) 23,79 (C-16 e 17) 34,26 (C- 15) 123,59 (C-11 e 13) 126,98 (C-4 e 6) 127,5 (C-1 e 3) 128,69 (C-3) 132,01 (C-10 e 14) 144,24 (C-9) 148,61 (C-7); 152,7 (C-2) 159,15 (C-8) 162,14 (C-12).

IV (4000 – 500 cm⁻¹): (NO₂) 1510 e 1340 cm⁻¹; (-CH (CH₃)₂) 2920 e 1410 cm⁻¹; (C=N) 1600 cm⁻¹; (=C-CH₃) 2960 e 1460 cm⁻¹.

EM (m/z): [M⁺] 309; Fragmentos: 294; 190; 91.

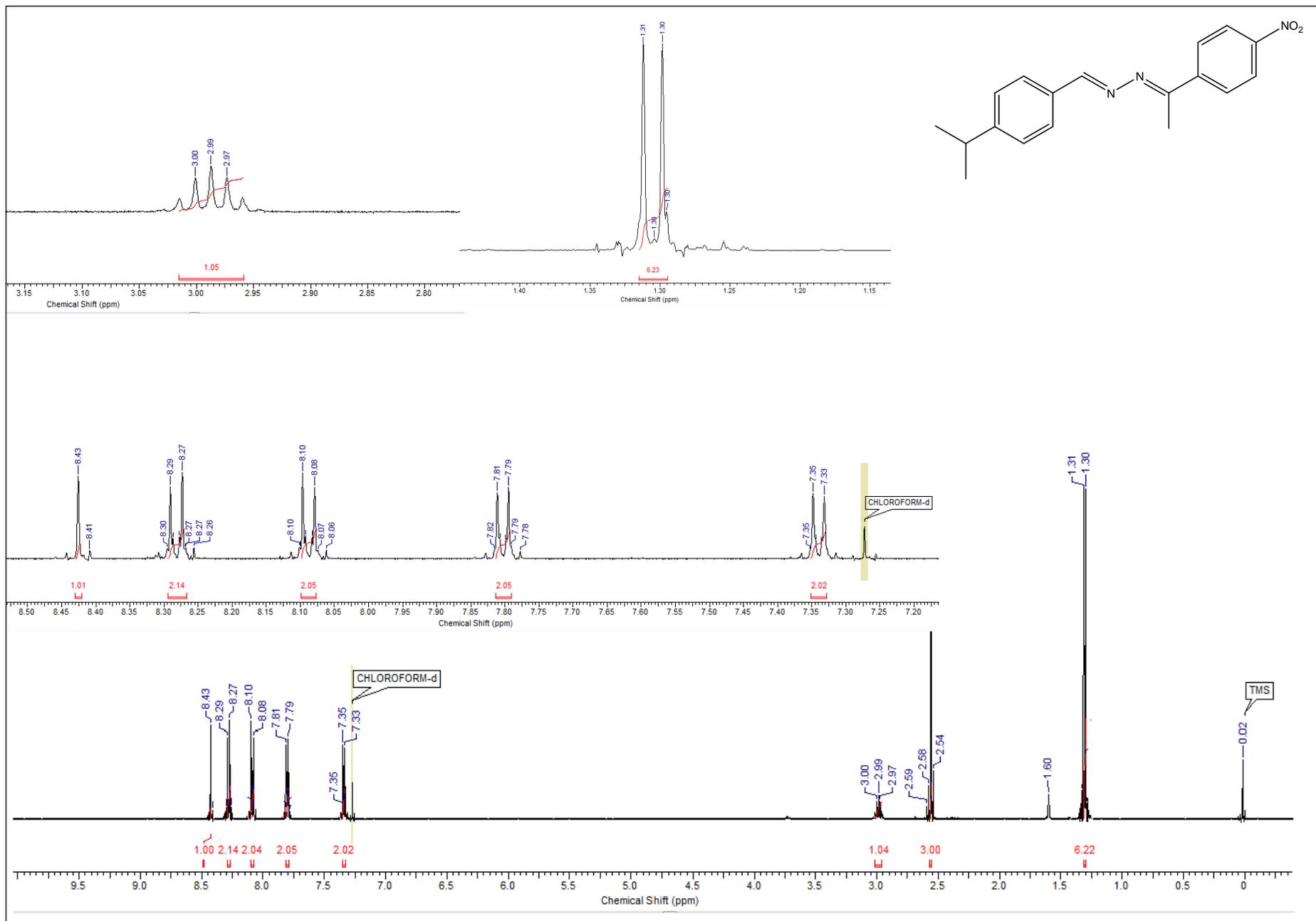


Figura 67: Espectro de RMN ^1H do composto 40 (CDCl_3 , 500 MHz)

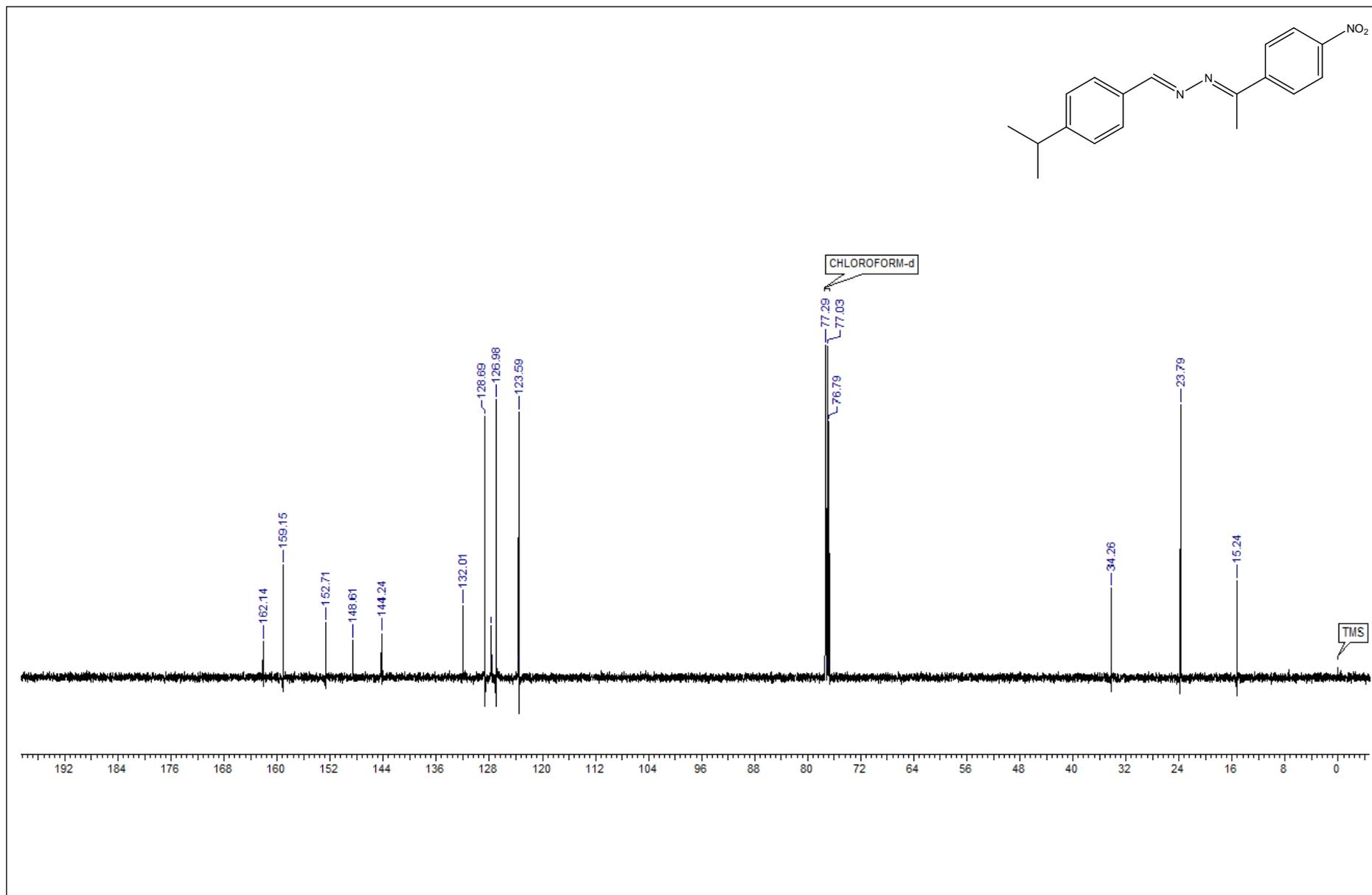


Figura 68: Espectro de RMN ^{13}C do composto **40** (CDCl_3 , 125 MHz).

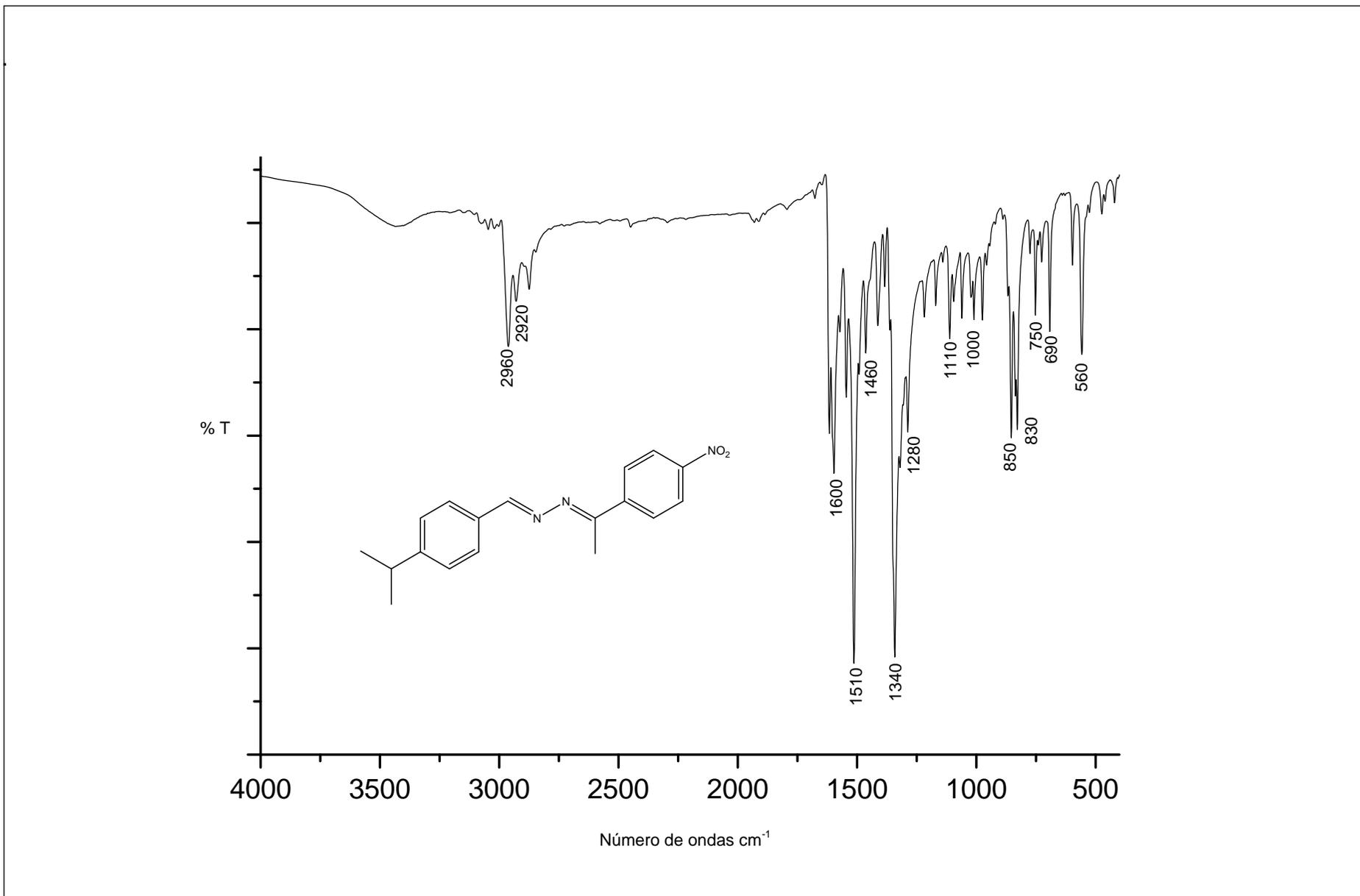


Figura 69 - Espectro na região do IV do composto **40** (4000-500 cm⁻¹).

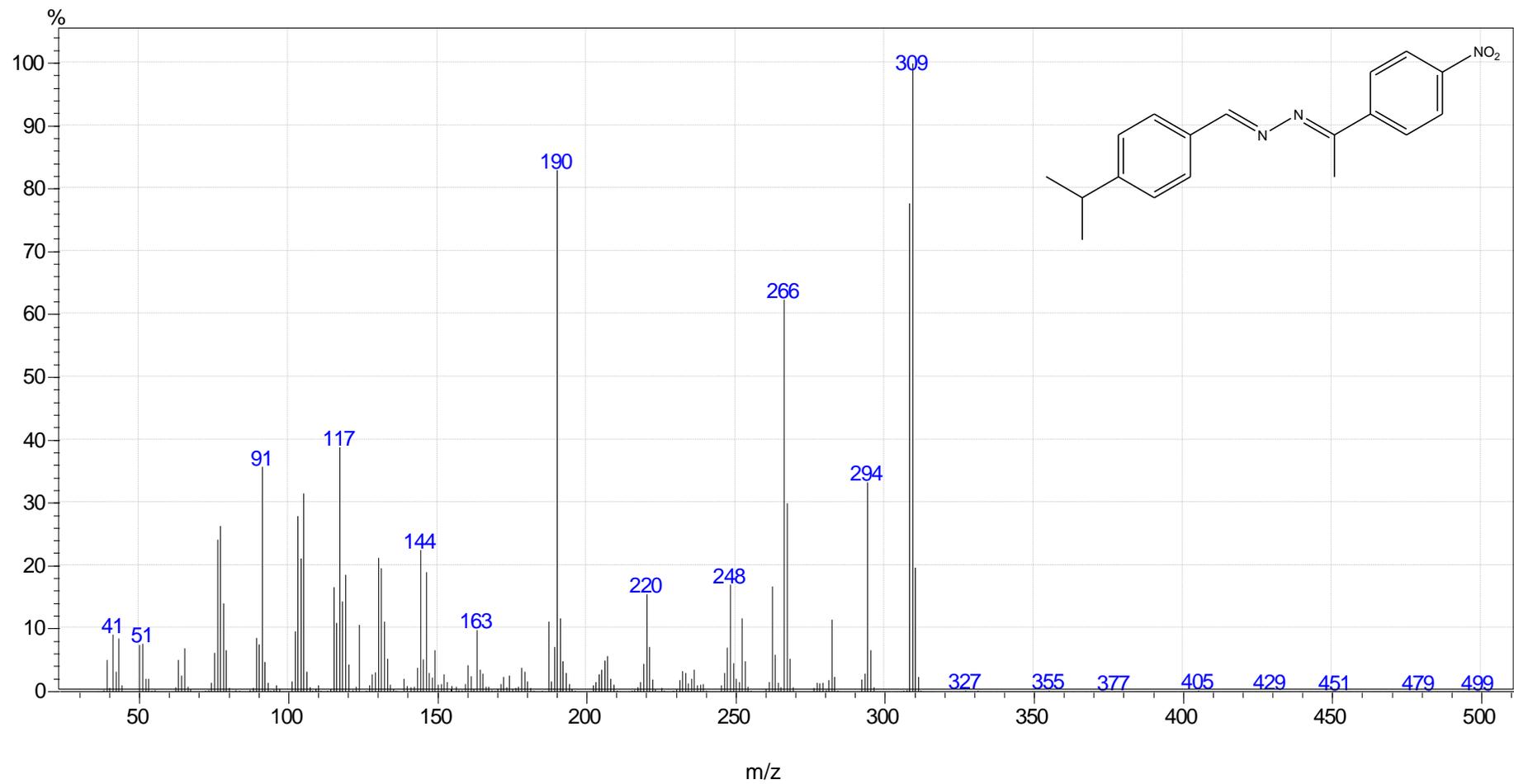
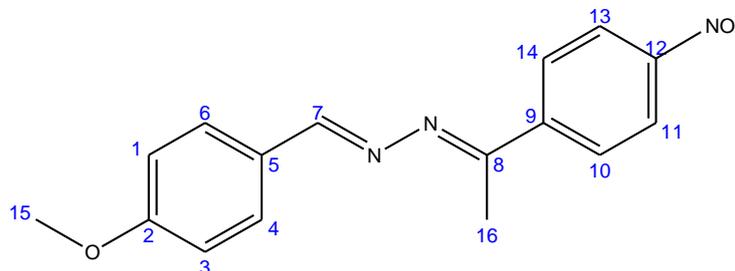


Figura 70: Espectro de massas do composto 40

Síntese da (8E, 9E) -1 - (4-metoxibenzilideno) -2 - (1 - (4-nitrofenil)-etilideno)-hidrazina (42).



Foram utilizados 136 mg (1 mmol) de 4-metoxibenzaldeído e 179 mg (1 mmol) da hidrazona **16**, conforme procedimento C. Características do sólido obtido:

Formula molecular: C₁₆H₁₅N₃O₃ (297,31 g/mol)

Coloração: amarelo

Faixa de fusão: 133,9 – 134,3°C

Rendimento: 44,3

Pureza (CG-MS): 98,7%

Dados espectroscópicos

RMN de ¹H (500 MHz, CDCl₃): δ 2,56 (s, 3H – 16) δ 3,88 (s, 3H – 15) δ 6,98 (d, 2H – 1 e 3) δ 7,82 (d, 2H – 4 e 6) δ 8,08 (d, 2H – 10 e 14) δ 8,28 (d, 2H - 11 e 13) δ 8,42 (s, 1H – 7).

RMN de ¹³C (125 MHz, CDCl₃): δ 15,21 (C- 16) 58, 44 (C- 15) 114,34 (C- 1 e 3) 123,59 (C- 11 e 13) 127,11 (C-5) 127,66 (C-4 e 6) 130,33 (C-10 e 4) 144,36 (C-9) 148,56 (C-7) 159,21 (C-8) 160,65 (C- 2)162,24 (C-12).

IV (4000 – 500 cm⁻¹): (NO₂) 1510 e 1340 cm⁻¹; (O–C) 1250 e 1160 cm⁻¹; (C=N) 1600 cm⁻¹; (=C-CH₃) 2920 e 1420 cm⁻¹.

EM (m/z): [M⁺] 297; Fragmentos: 208; 190; 134; 104; 77.

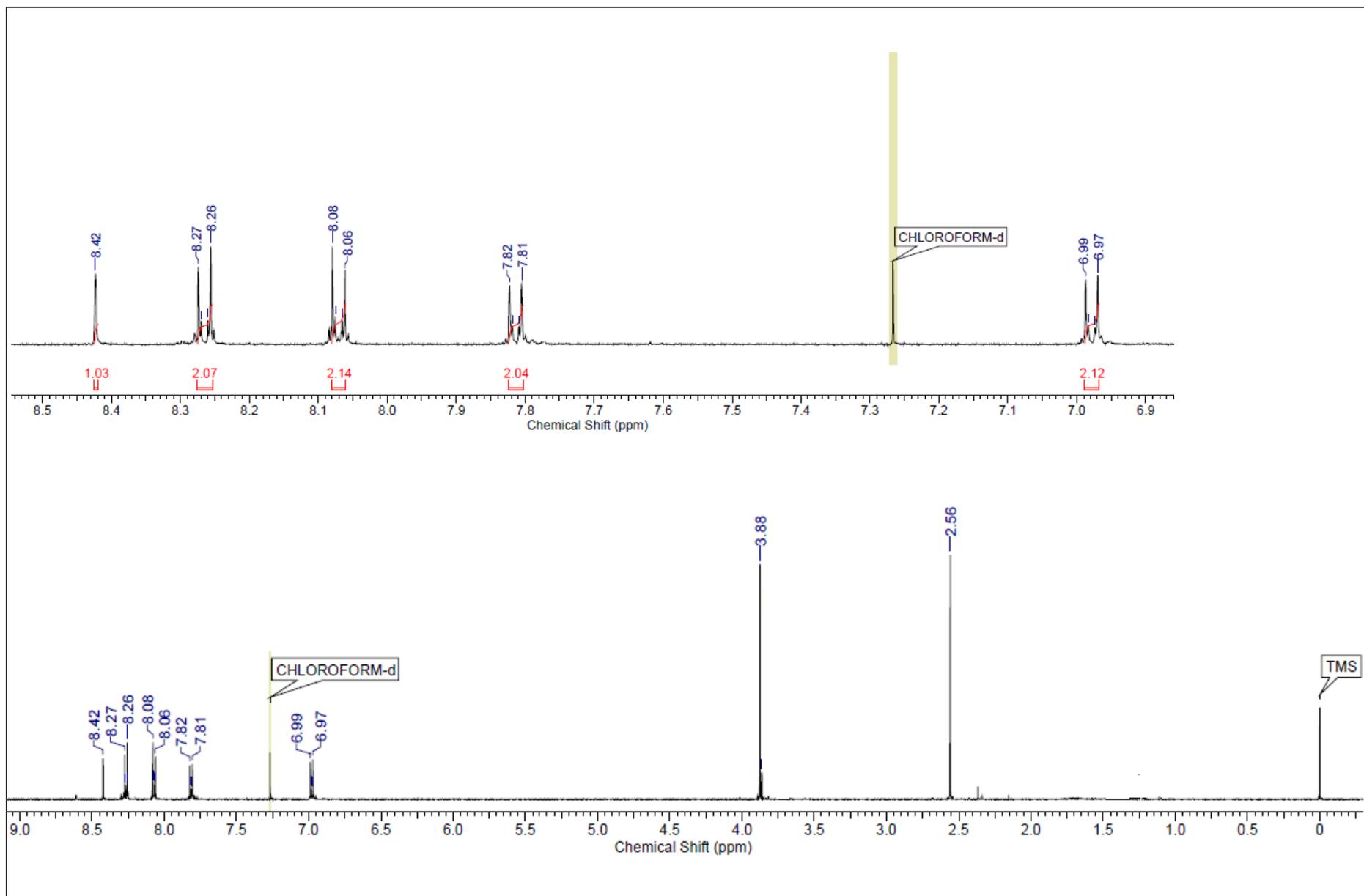


Figura 71: Espectro de RMN^1H do composto **42** (CDCl_3 , 500 MHz).

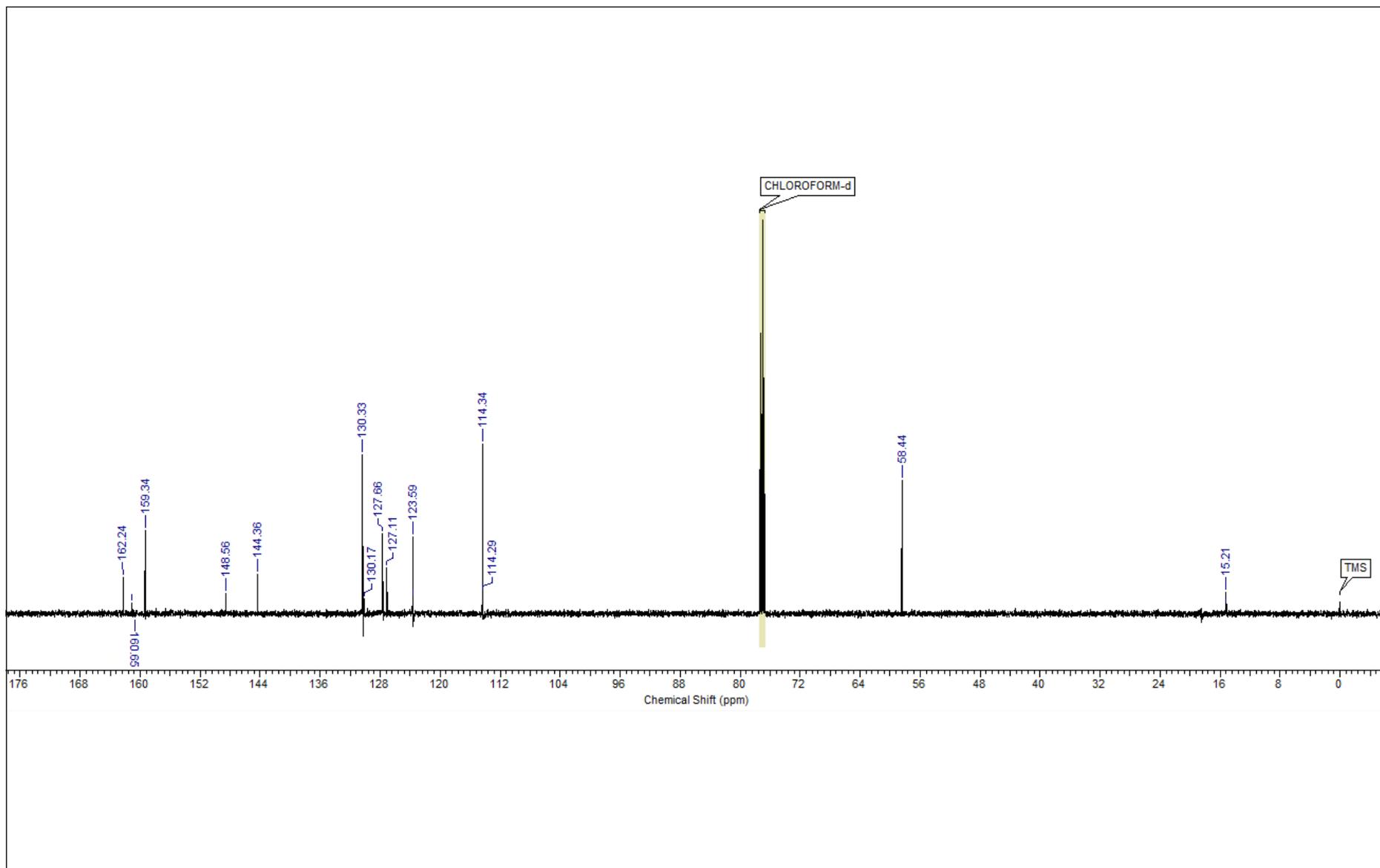


Figura 72: Espectro de RMN ^{13}C do composto **42** (CDCl₃, 500 MHz).

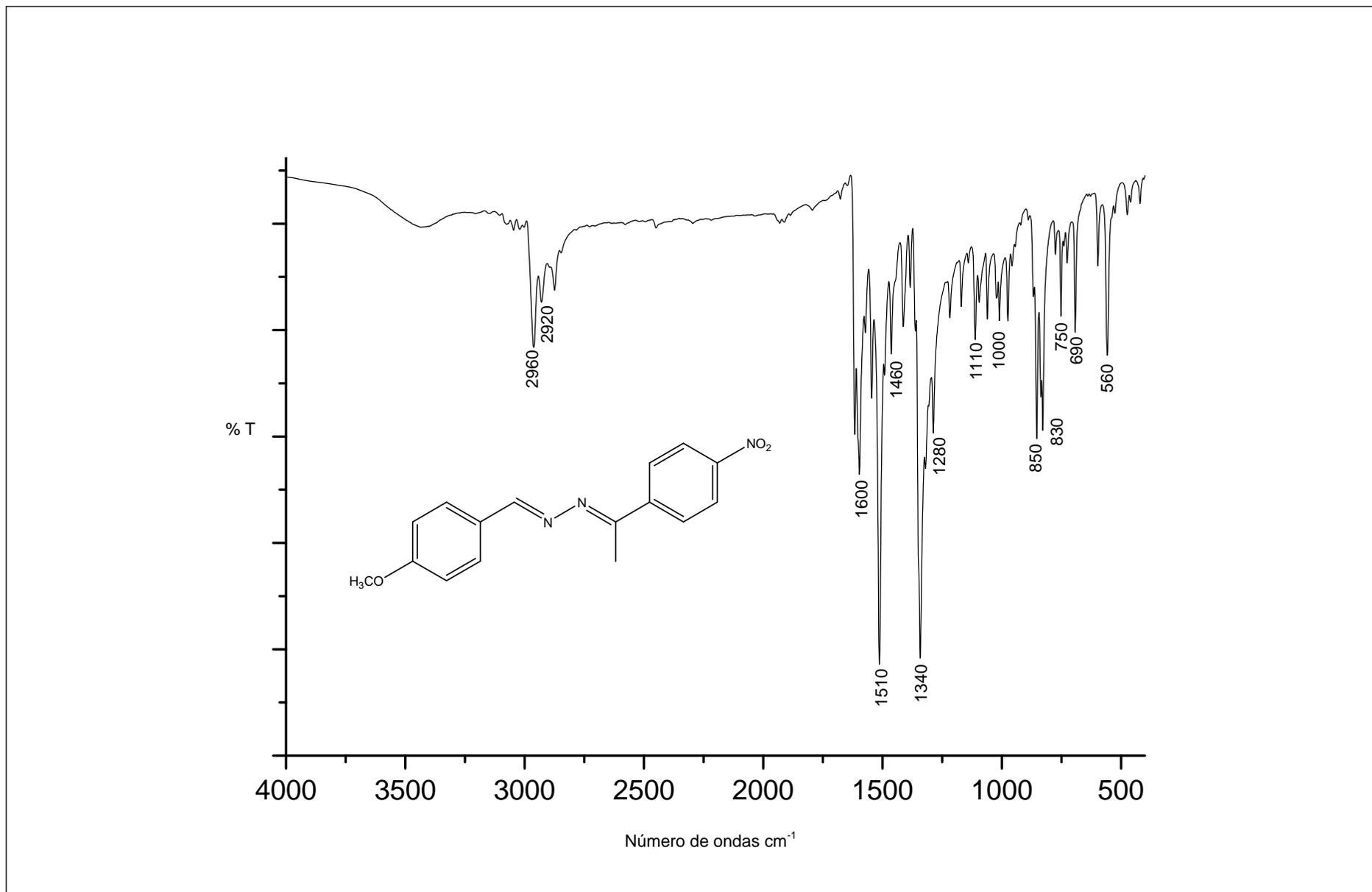


Figura 73: Espectro na região do IV do composto **42** (4000-500 cm⁻¹).

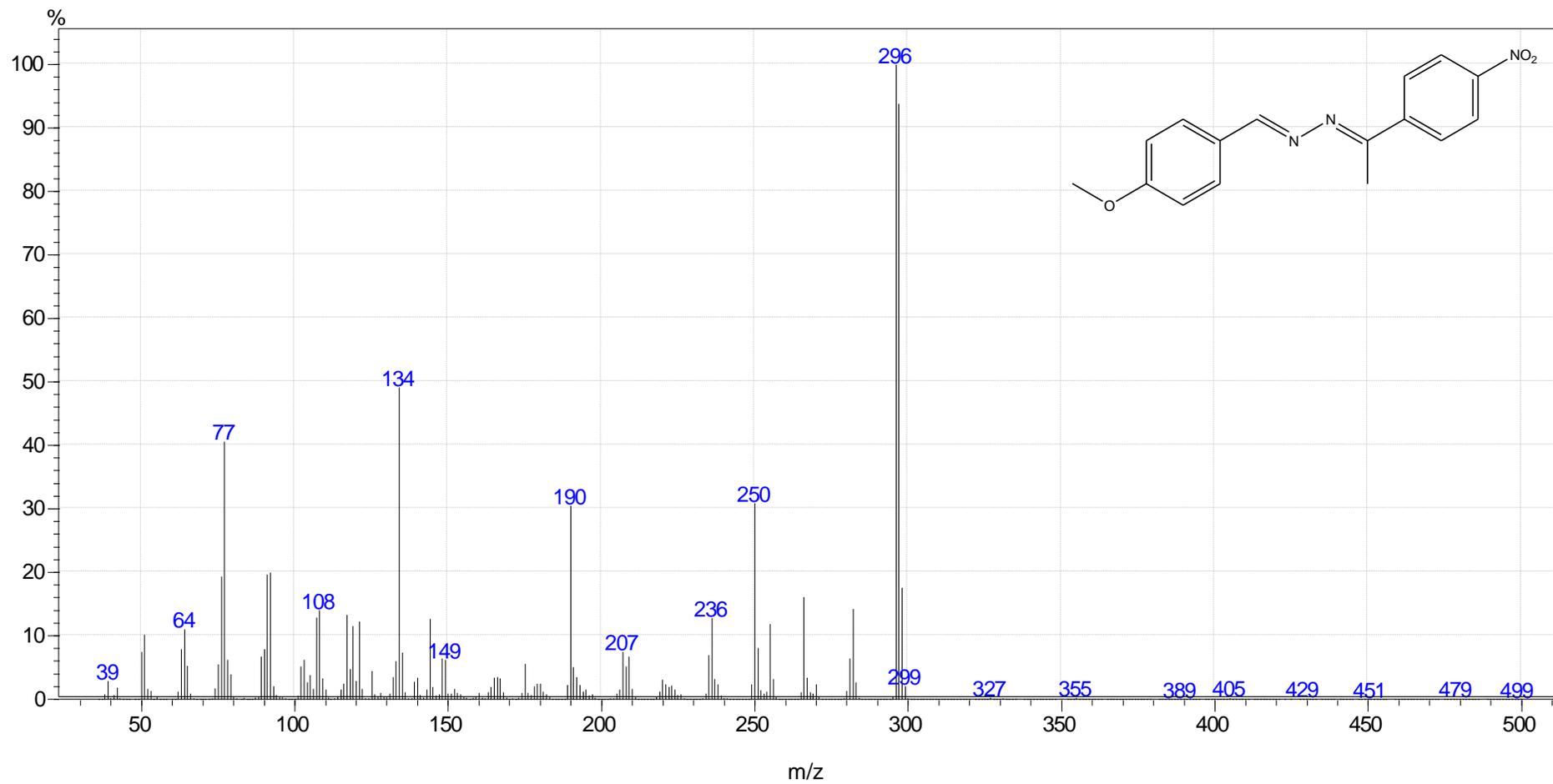
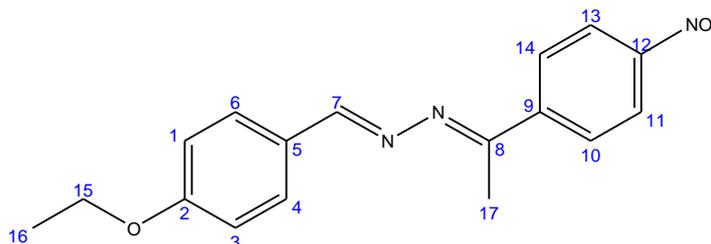


Figura 74: Espectro de massas do composto 42

Síntese da (8E, 9E) - 1 - (4-etoxi-benzilideno) - 2 - (1 - (4-nitrofenil)-etilideno)-hidrazina (43).



Foram utilizados 150 mg (1 mmol) de 4-etoxibenzaldeído e 179 mg (1 mmol) da hidrazona **16**, conforme procedimento C. Características do sólido obtido:

Formula molecular: C₁₇H₁₇N₃O₃ (311,34 g/mol)

Coloração: amarelo

Faixa de fusão: 112 – 112,6°C

Rendimento: 69,7%

Pureza (CG-MS): 99,8 %

Dados espectroscópicos

RMN de ¹H (500 MHz, CDCl₃): δ 1,45 (t, 3H – 16) δ 2,56 (s, 3H – 17) δ 4,1 (q, 2H – 15) δ 6,95 (d, 2H – 1 e 3) δ 7,8 (d, 2H – 4 e 6) δ 8,07 (d, 2H - 10 e 14) δ 8,26 (d, 2H – 11 e 13) δ 8,42 (s, 1H – 7).

RMN de ¹³C (125 MHz, CDCl₃): δ 14,73 (C-16) 15,18 (C-17) 63,7 (C-15) 114,8 (C- 1 e 3) 123,57 (C-11 e 13) 127,5 (C-5) 127,63 (C-4 e 6) 130,33 (C-10 e 14) 144,1 (C-9) 148,55 (C-7) 159, 44 (C-8); 161,69 (C-2) 162,18 (C-12).

IV (4000 – 500 cm⁻¹): (NO₂) 1510 e 1340 cm⁻¹; (O-C) 1250 e 1100 cm⁻¹; (C=N) 1600 cm⁻¹; (=C-CH₃) 2980 e 1450 cm⁻¹.

EM (m/z): [M⁺] 311; Fragmentos: 266; 190; 148.

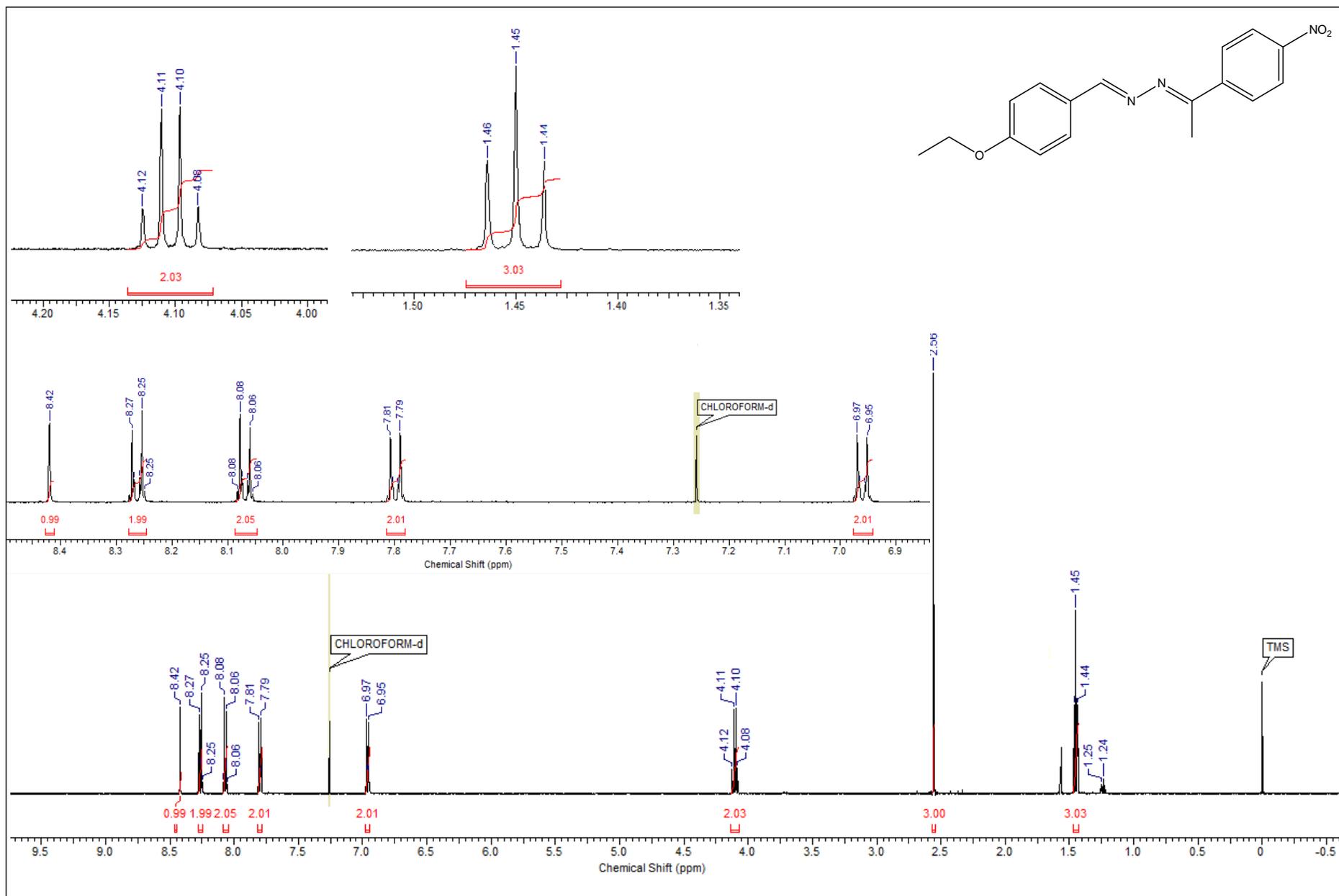


Figura 75: Espectro de RMN ¹H do composto 43 (CDCl₃, 500 MHz).

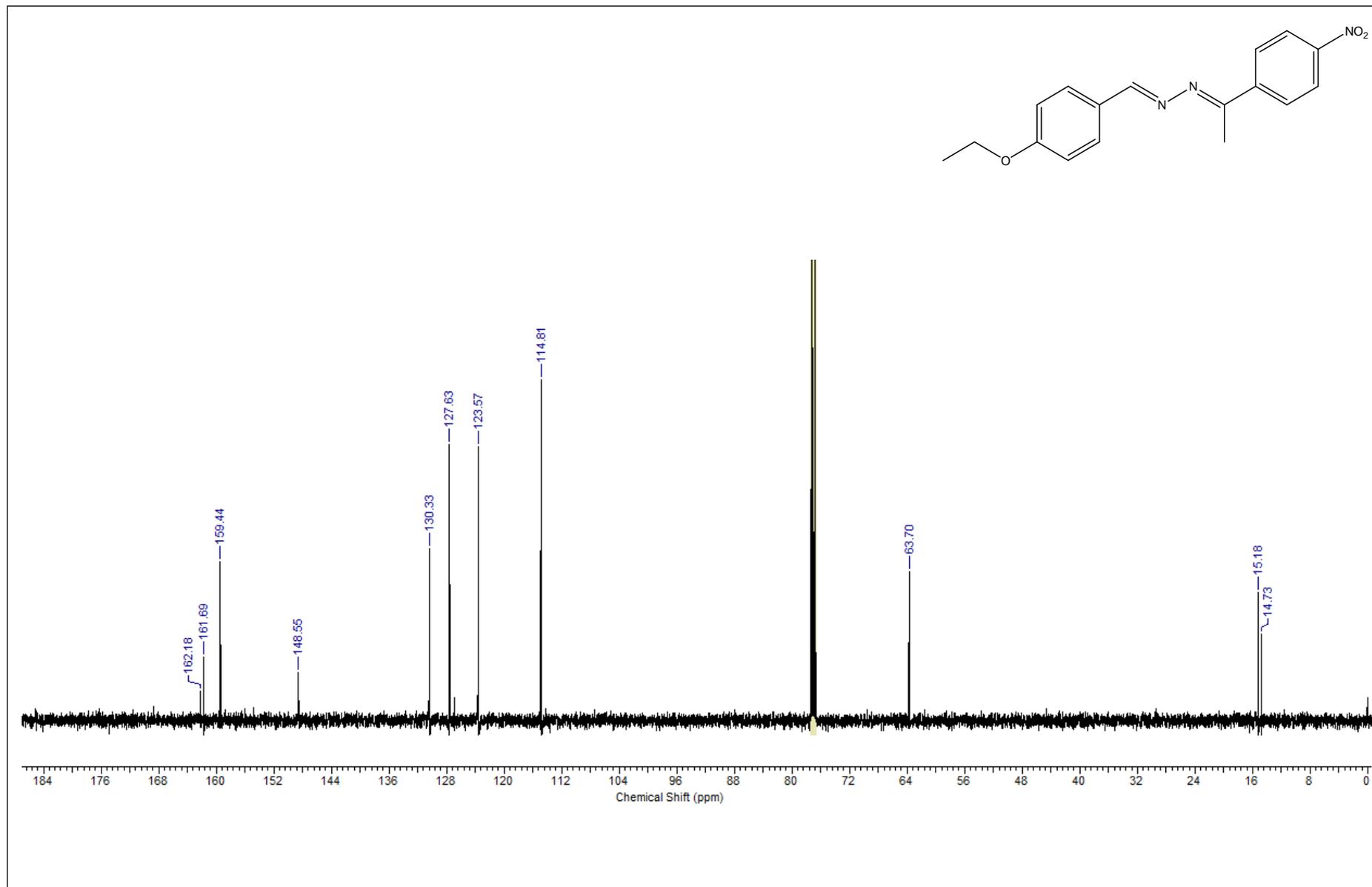


Figura 76: Espectro de RMN ^{13}C do composto 43 (CDCl_3 , 125 MHz).

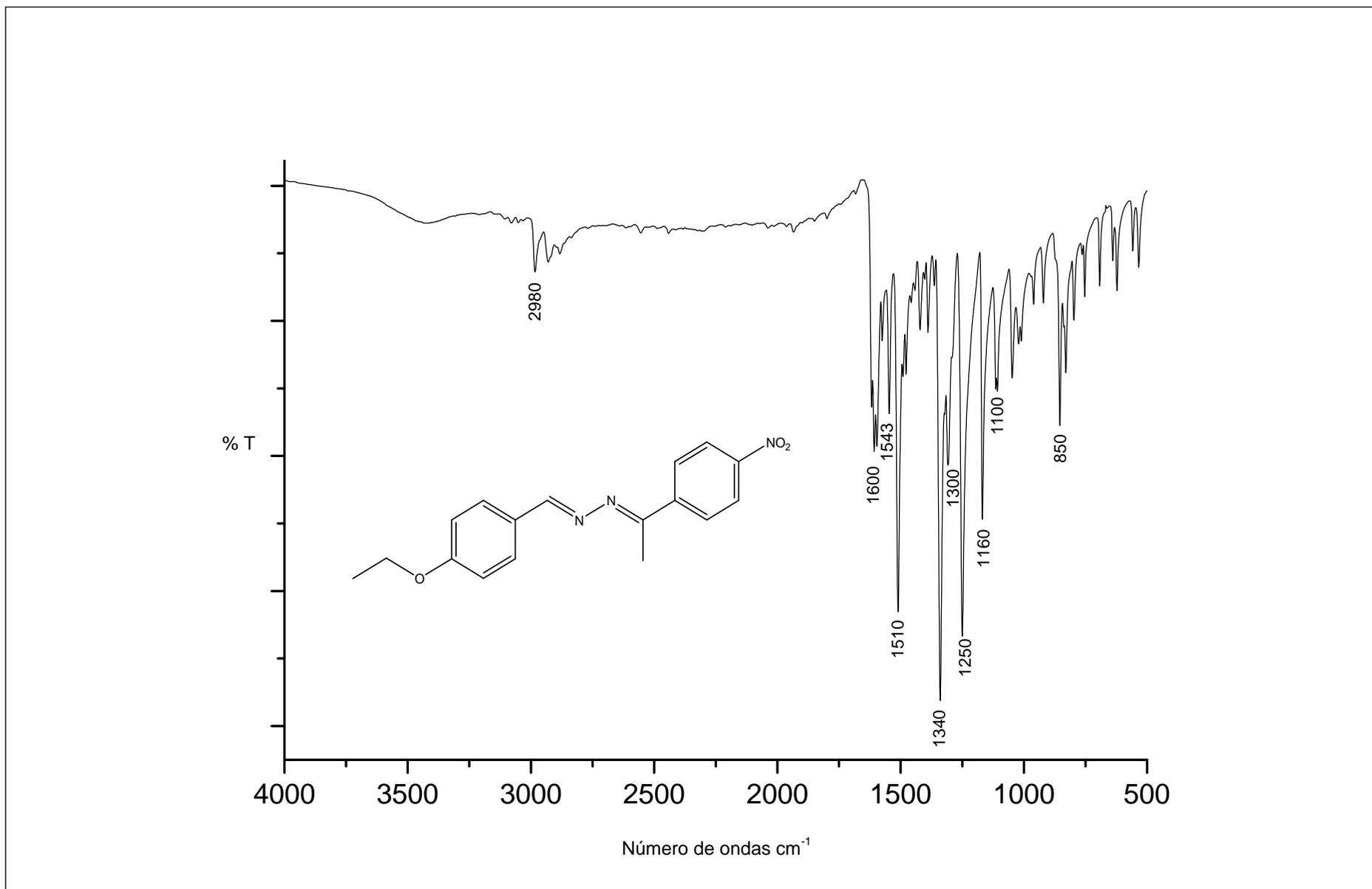


Figura 77: Espectro na região do IV do composto **43** ($4000\text{-}500\text{ cm}^{-1}$).

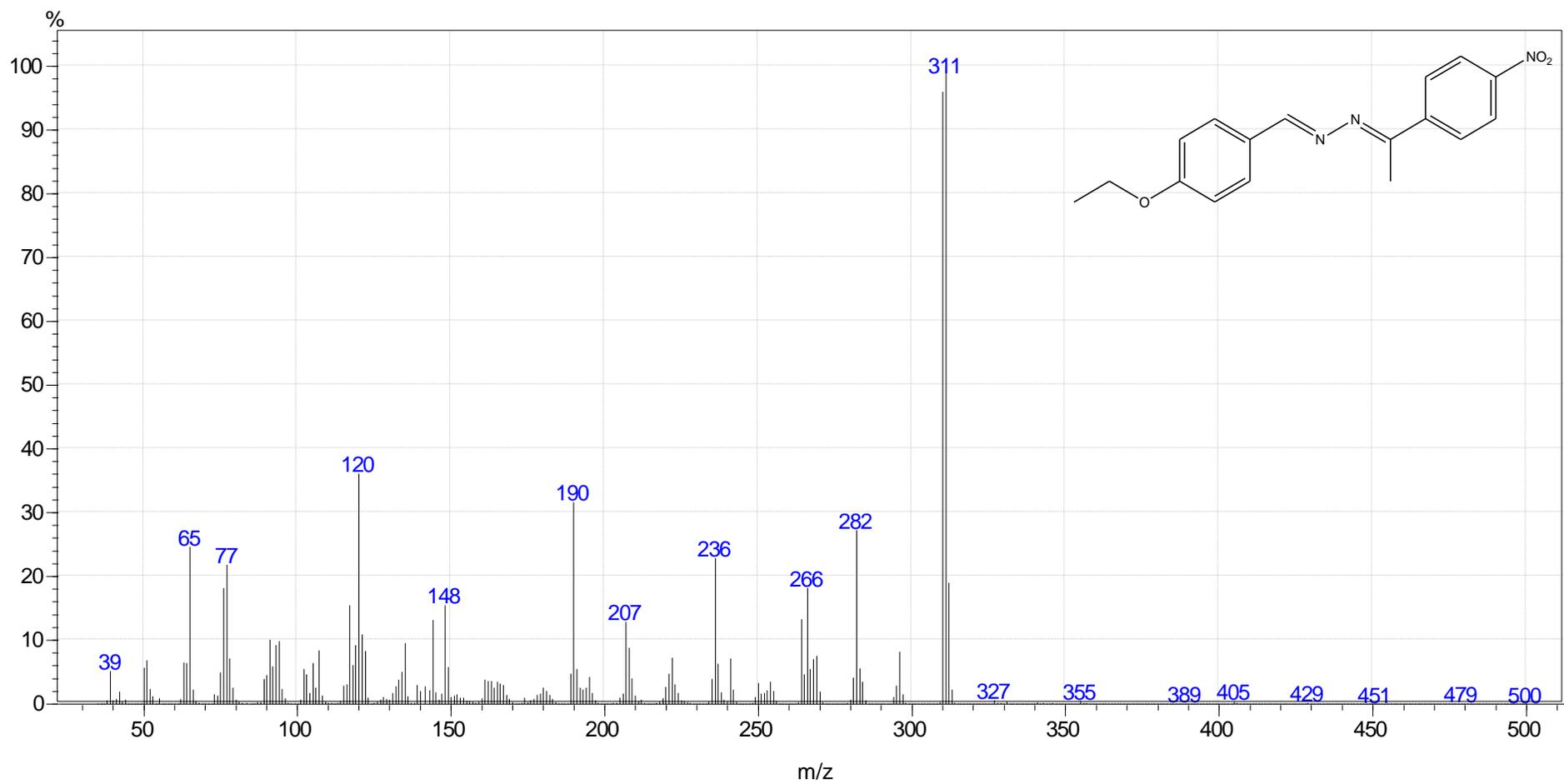
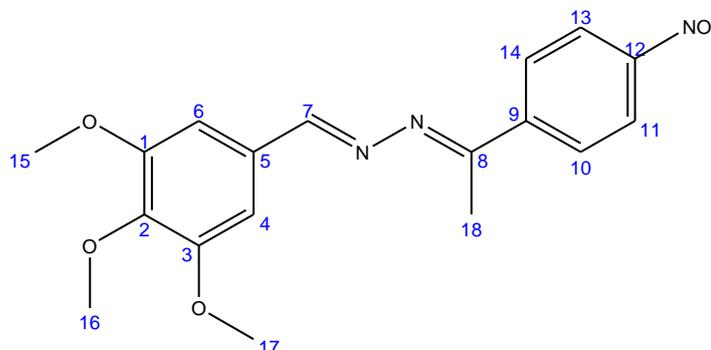


Figura 78: Espectro de massas do composto 43.

Síntese da (8E, 9E) - 1 - (3,4,5-trimetoxi-benzilideno) - 2 - (1 - (4-nitrofenil) metilideno)-hidrazina (45)



Foram utilizados 196 mg (1 mmol) de 3,4,5- trimetoxibenzaldeído e 179 mg (1 mmol) da hidrazona **16**, conforme procedimento C. Características do sólido obtido:

Formula molecular: C₁₈H₁₉N₃O₅ (357,36 g/mol)

Coloração: amarelo escuro

Faixa de fusão: 140,7 -142,5°C

Rendimento: 67,4 %

Pureza (CG-MS): 97,8%

Dados espectroscópicos

RMN de ¹H (500 MHz, CDCl₃): δ 2,56 (s, 3H – 18) δ 3,92 (s, 3H – 16) δ 3,95 (s, 6H – 15 e 17) δ 7,1 (s, 2H – 4 e 6) δ 8,07 (d, 2H - 10 e 14) δ 8,29 (d, 2H – 11 e 13) δ 8,33 (s, 1H – 7).

RMN de ¹³C (125 MHz, CDCl₃): δ 15,28 (C-18) 56,26 (C-15 e 17) 60,98 (C-16) 105,66 (C-4 e 6) 123,57 (C- 11 e 13) 127,66 (C-5) 129,64 (C-10 e 14) 141,08 (C-2) 144,08 (C-9) 148,6 (C-7) 153,57 (C-1 e 3) 158,87 (C-8) 158,95 (C-12).

IV (4000 – 500 cm⁻¹): (NO₂) 1510 e 1335 cm⁻¹; (O–C) 1230 e 1130 cm⁻¹; (C=N) 1580 cm⁻¹; (=C-CH₃) 2940 e 1415 cm⁻¹.

EM (m/z): [M⁺] 357; Fragmentos: 326; 208; 190; 131.

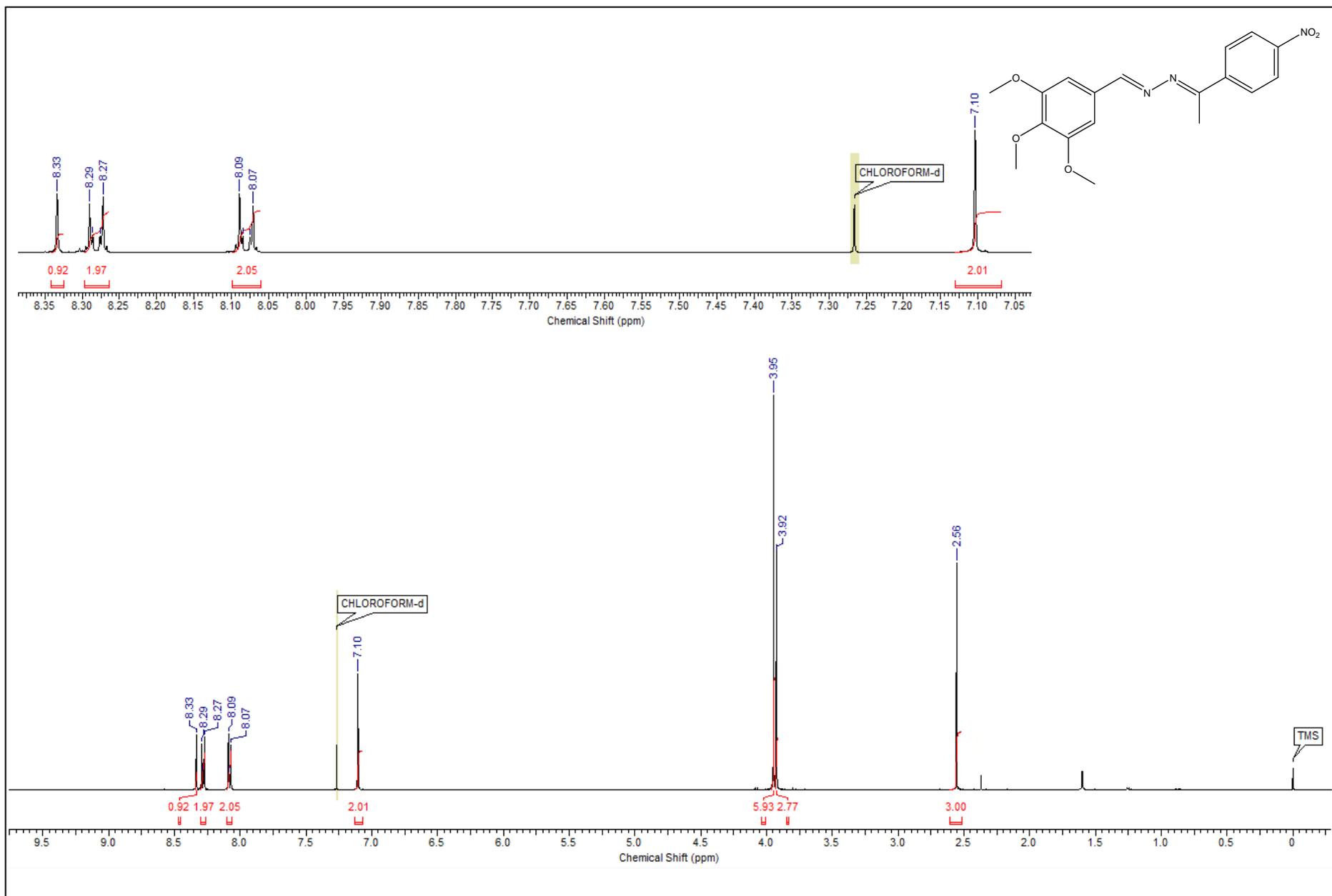


Figura 79: Espectro de RMN ^1H do composto 45 (CDCl_3 , 500 MHz).

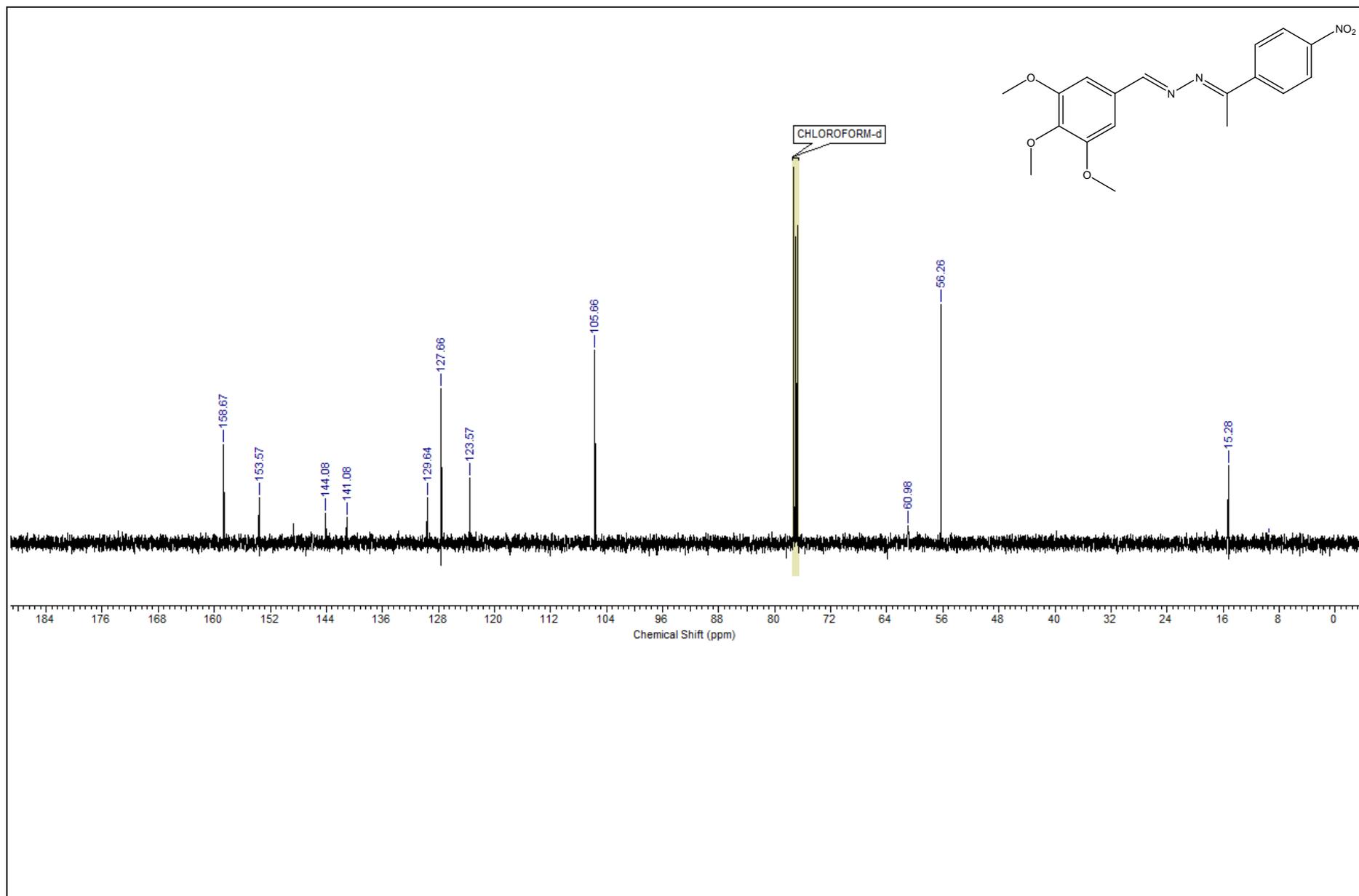


Figura 80: Espectro de RMN ^{13}C do composto 45 (CDCl_3 , 125 MHz).

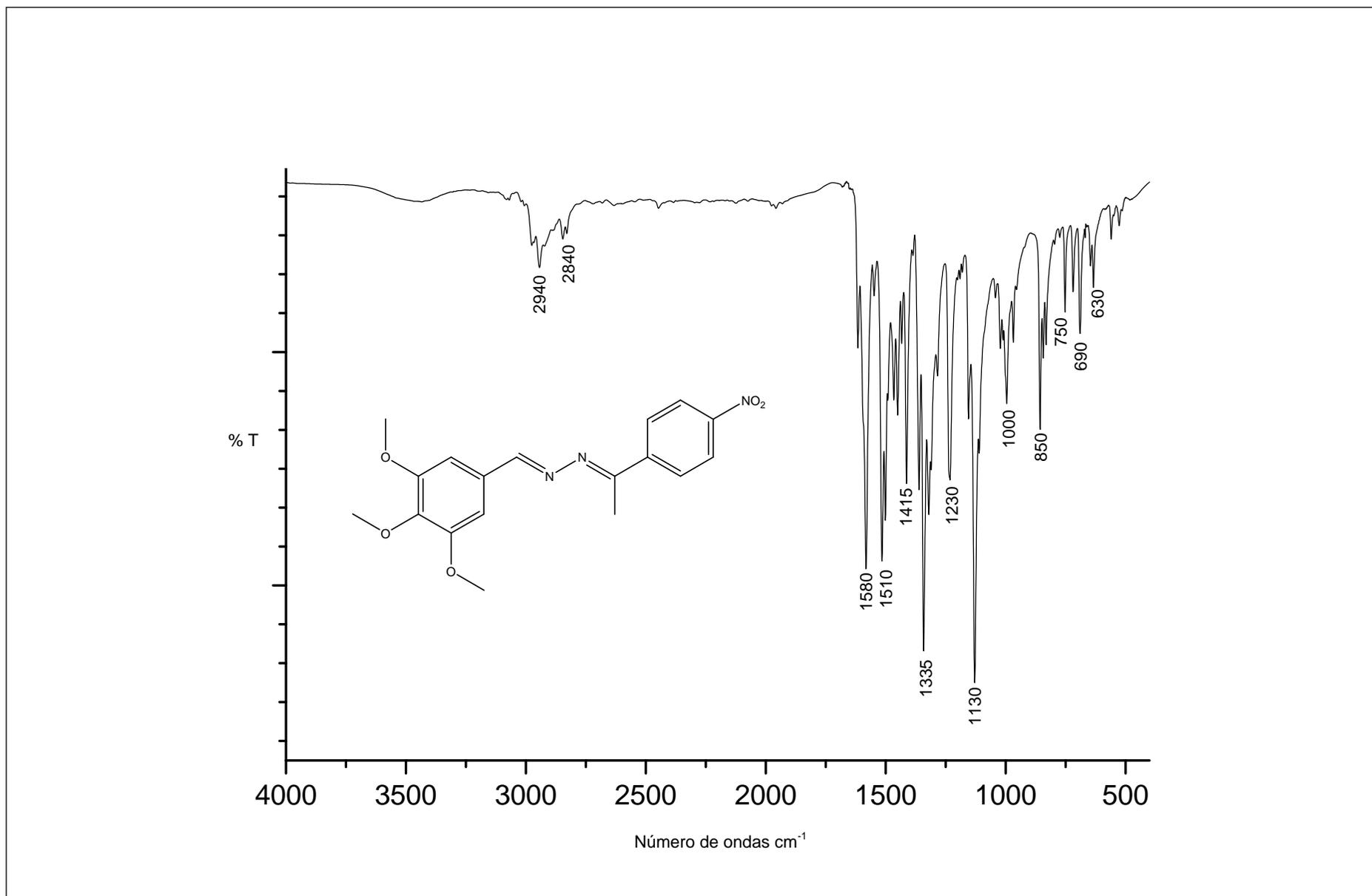


Figura 81 - Espectro na região do IV do composto **45** ($4000\text{-}500\text{ cm}^{-1}$).

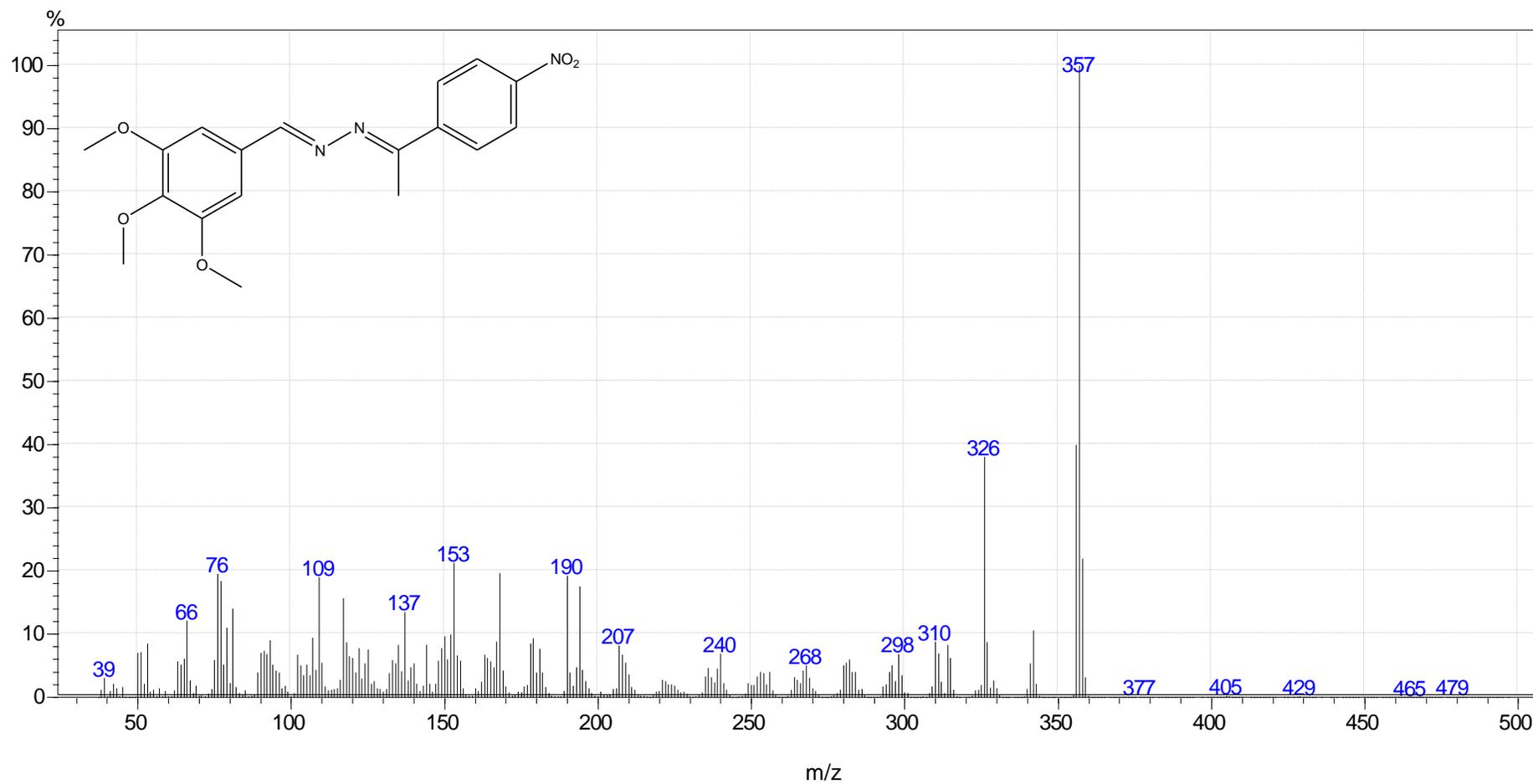
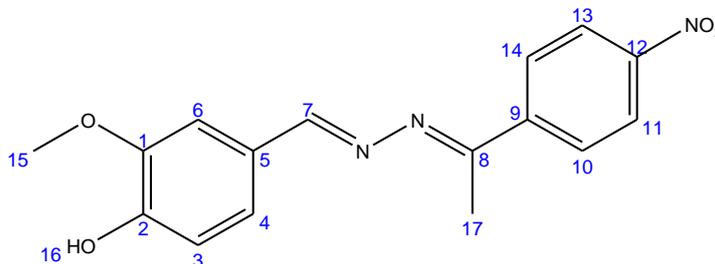


Figura 82: Espectro de massas do composto 45.

Síntese da (7E, 8E) -1- (3-metoxi-4-hidroxi-benzilideno) -2- (1 - (4-nitrofenil)-etilideno)-hidrazina (46).



Foram utilizados 152 mg (1 mmol) de vanilina e 179 mg (1 mmol) da hidrazona **16**, conforme procedimento C. Características do sólido obtido:

Formula molecular: C₁₆H₁₅N₃O₄ (313,31 g/mol)

Coloração: amarelo escuro

Faixa de fusão: 144,1 -144,9°C

Rendimento: 67 %

Pureza (CG-MS): 96,3%

Dados espectroscópicos

RMN de ¹H (500 MHz, CDCl₃): δ 1,58 (s, 1H – 16) δ 2,56 (s, 3H – 17) δ 3,99 (s, 3H – 15) δ 5,98 (s, 1H 6) δ 6,98 (d, 1H – 4) δ 7,52 (d, 1H -3) δ 8,06 (d, 2H - 10 e 14) δ 8,26 (d, 2H – 11 e 13) δ 8,37 (s, 1H – 7).

RMN de ¹³C (125 MHz, CDCl₃): δ 15,22 (C-17) 56,06 (C-15) 108,74 (C-6) 114,49 (C-3) 123,59 (C-11 e 13) 124,55 (C-4) 127,63 (C-10 e 14) 144,29 (C-9) 147 (C-2) 147,7 (C-1) 148,97 (C-7); 159,41 (C-8) 161,95 (C-12).

IV (4000 – 500 cm⁻¹): (NO₂) 1520 e 1345 cm⁻¹; (OH) 3500 cm⁻¹; (O–C) 1210 e 1160 cm⁻¹; (C=N) 1590 cm⁻¹.

EM (m/z): [M⁺] 313; Fragmentos: 296; 190; 150.

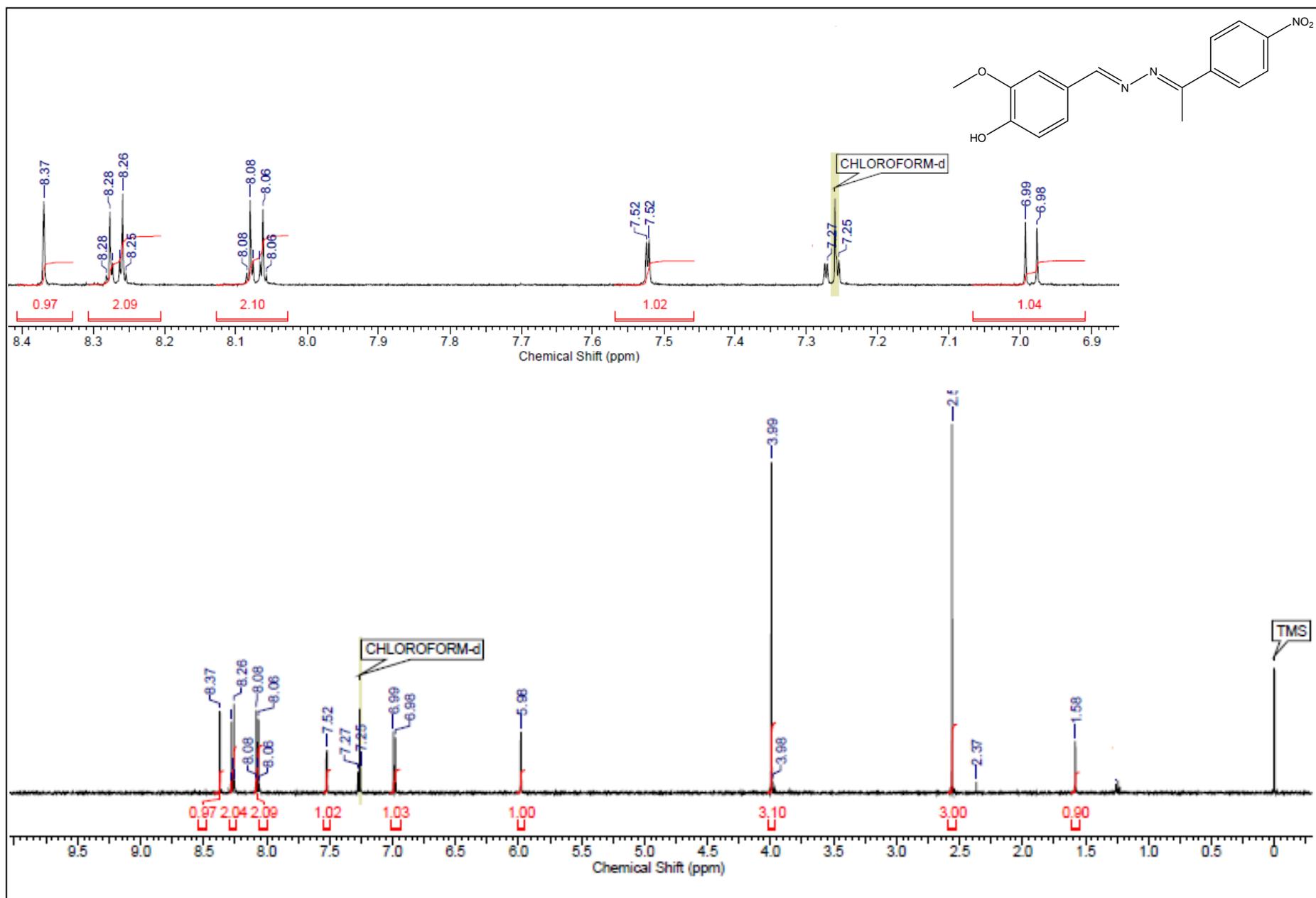


Figura 83: Espectro de RMN ¹H do composto 46 (CDCl₃, 500 MHz).

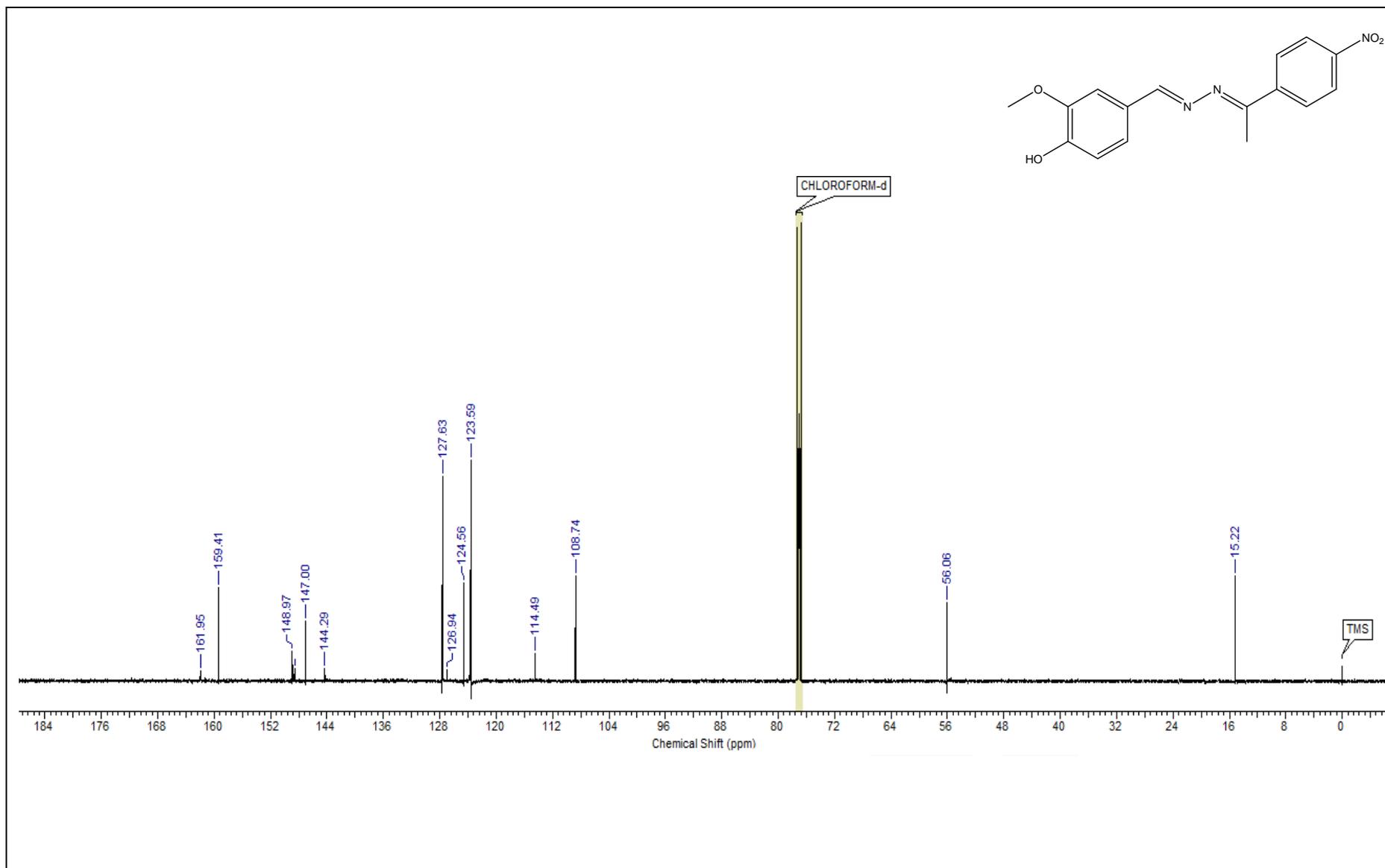


Figura 84: Espectro de RMN ^{13}C do composto 46 (CDCl_3 , 125 MHz).

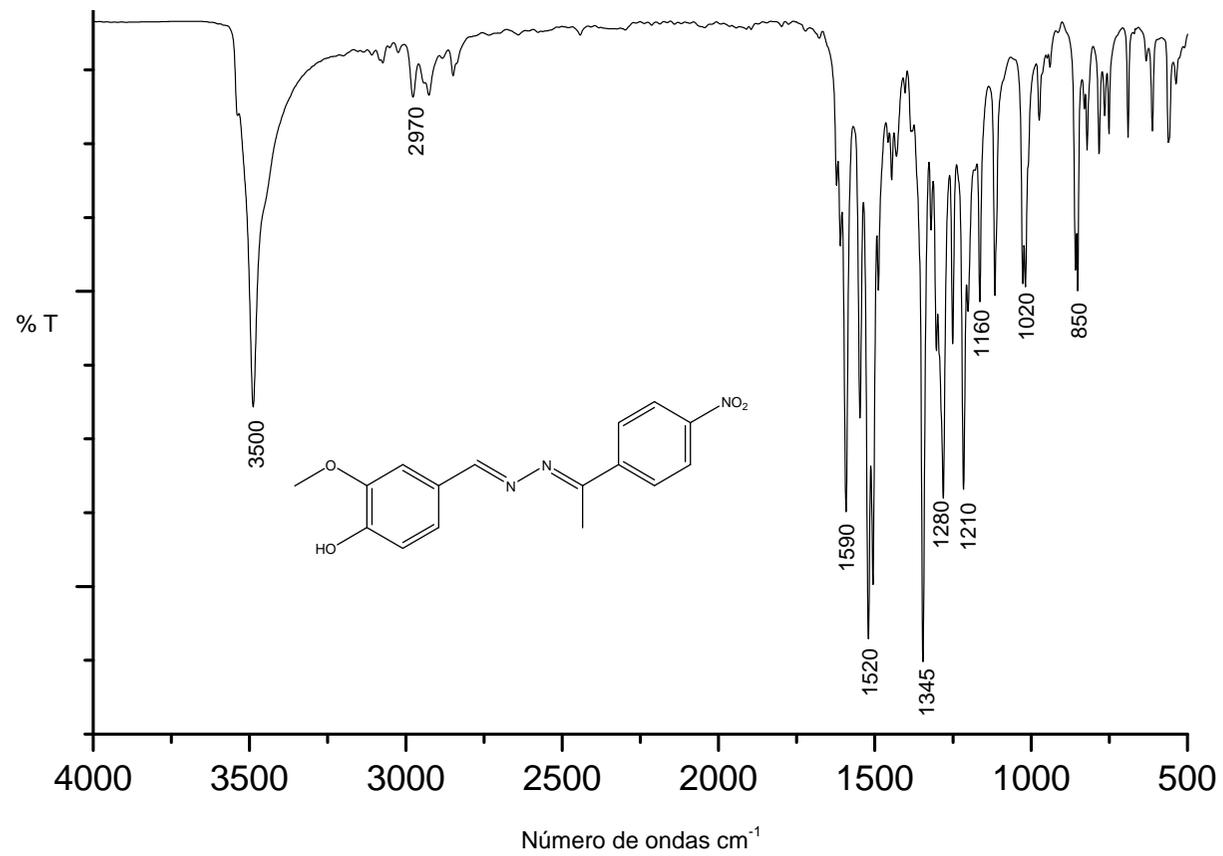


Figura 85: Espectro na região do IV do composto 46.

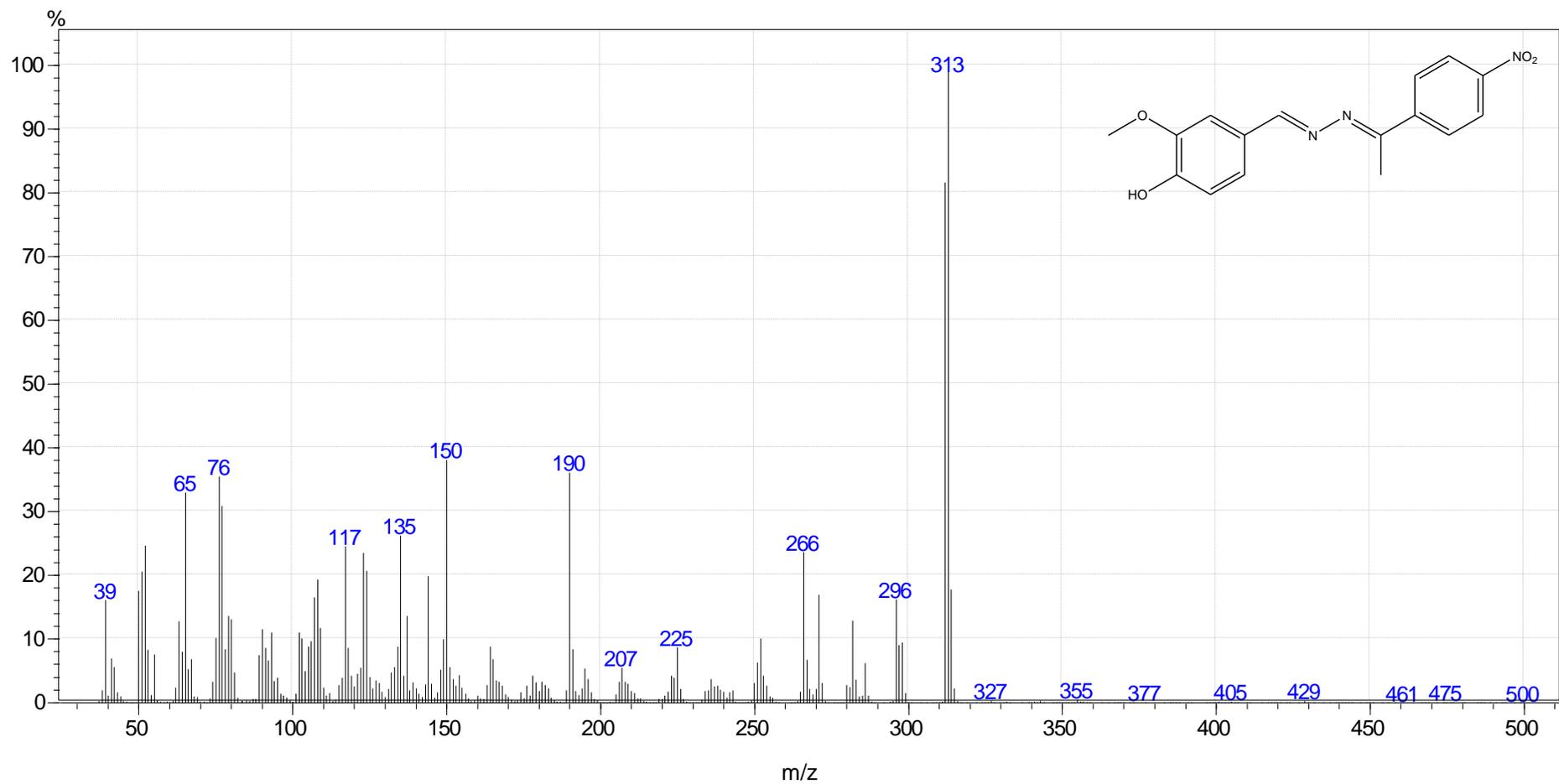
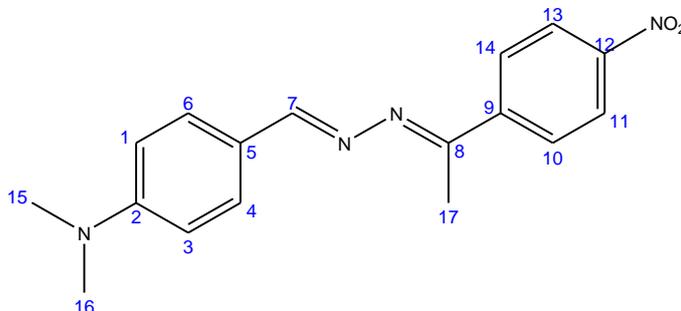


Figura 86: espectro de massas do composto 46

Síntese da (7E, 8E) - 1 - (4-dimetilamino - benzilideno) - 2 - (1 - (4-nitrofenil) - etilideno) hidrazina (47).



Foram utilizados 149 mg (1 mmol) de 4-dimetilamino-benzaldeído e 179 mg (1 mmol) da hidrazona **16**, conforme procedimento C. Características do sólido obtido:

Formula molecular: C₁₇H₁₈N₄O₂ (310,35 g/mol)

Coloração: vermelho

Faixa de fusão: 194 -194,9°C

Rendimento: 68,4 %

Pureza (CG-MS): 97,7%

Dados espectroscópicos

RMN de ¹H (500 MHz, CDCl₃): δ 2,58 (s, 3H – 17) δ 3,06 (s, 6H – 15 e 16) δ 6,72 (d, 2H – 1 e 3) δ 7,76 (d, 2H - 4 e 6) δ 8,06 (d, 2H - 10 e 14) δ 8,27 (d, 2H – 11 e 13) δ 8,43 (s, 1H – 7).

RMN de ¹³C (125 MHz, CDCl₃): δ 15 (C-17) 40,12 (C-15 e 16) 111,68 (C-1 e 3) 122,05 (C-5) 123,51 (C-11 e 13) 127,48 (C-4 e 6) 130,32 (C-10 e 14) 144,73 (C-9) 152,53 (C-7); 160 (C-2) 160,68 (C-8) 161,33 (C-12).

IV (4000 – 500 cm⁻¹): (NO₂) 1525 e 1340 cm⁻¹; (-N(CH₃)₂) 1505 cm⁻¹; (C=N) 1608 cm⁻¹; (=C-CH₃) 2900 e 1430 cm⁻¹.

EM (m/z): [M⁺] 310; Fragmentos: 190; 147; 77.

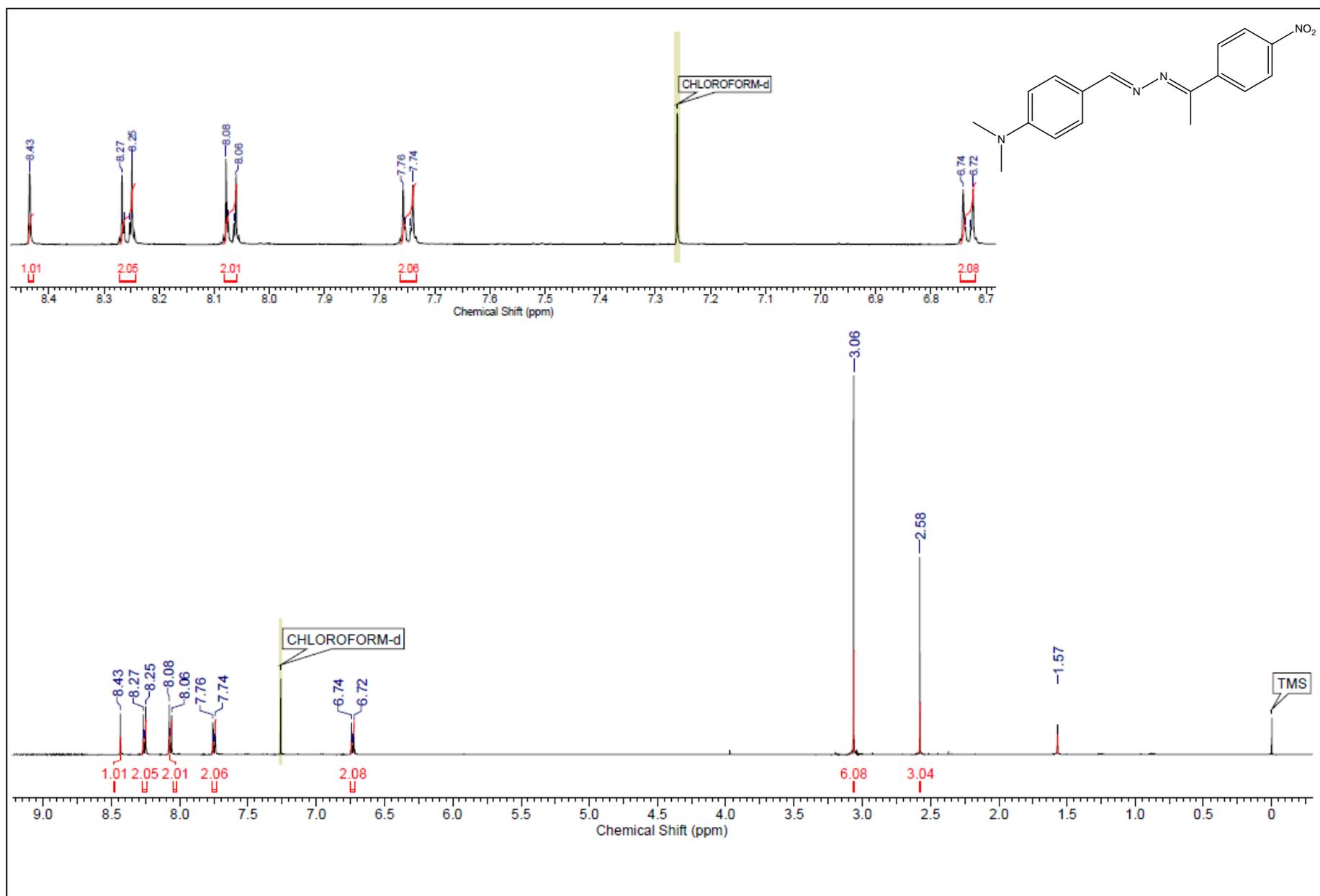


Figura 87: Espectro de RMN ^1H do composto 47 (CDCl_3 , 500 MHz).

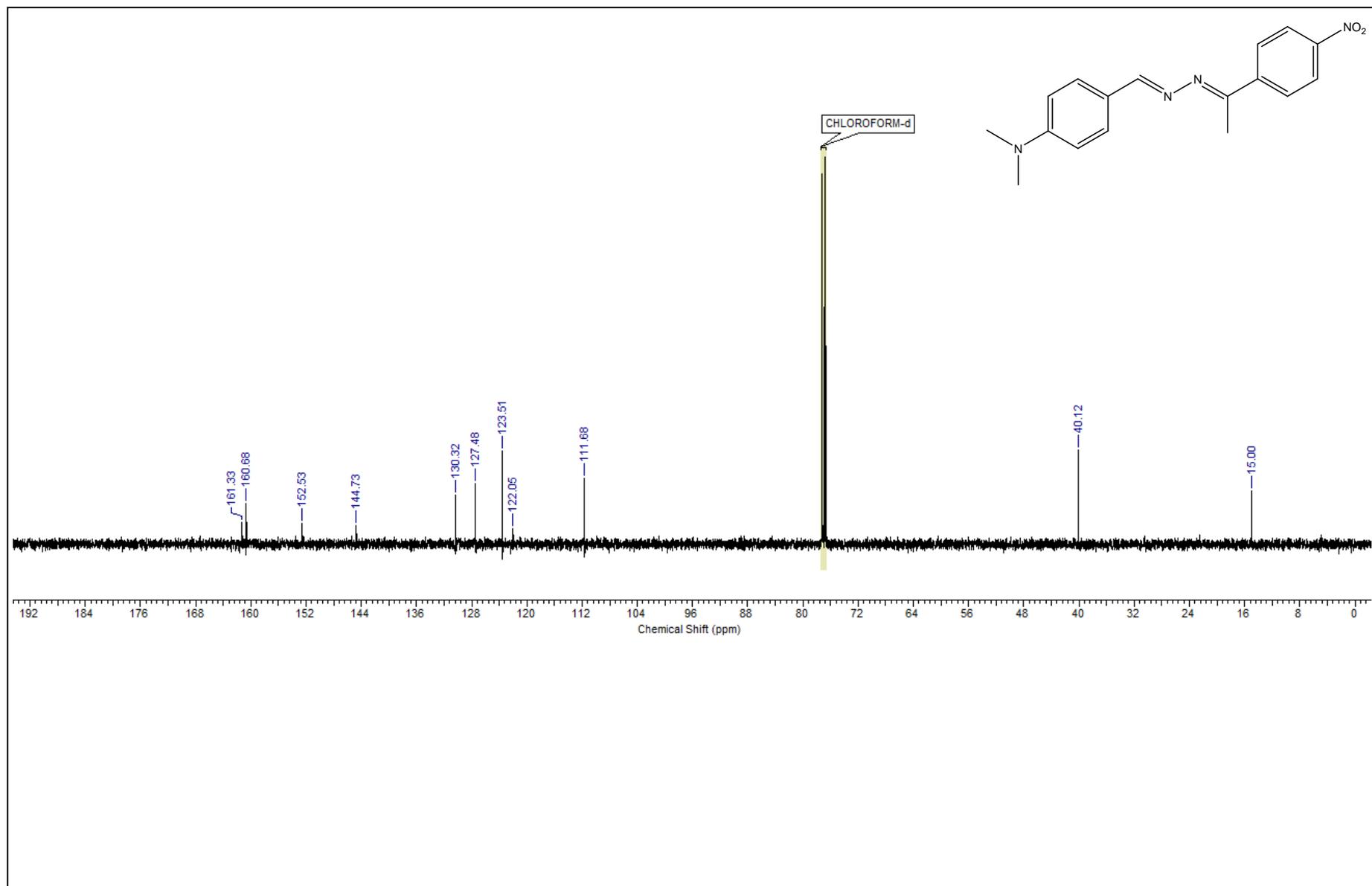


Figura 88: Espectro de RMN ^{13}C do composto 47 (CDCl_3 , 125 MHz).

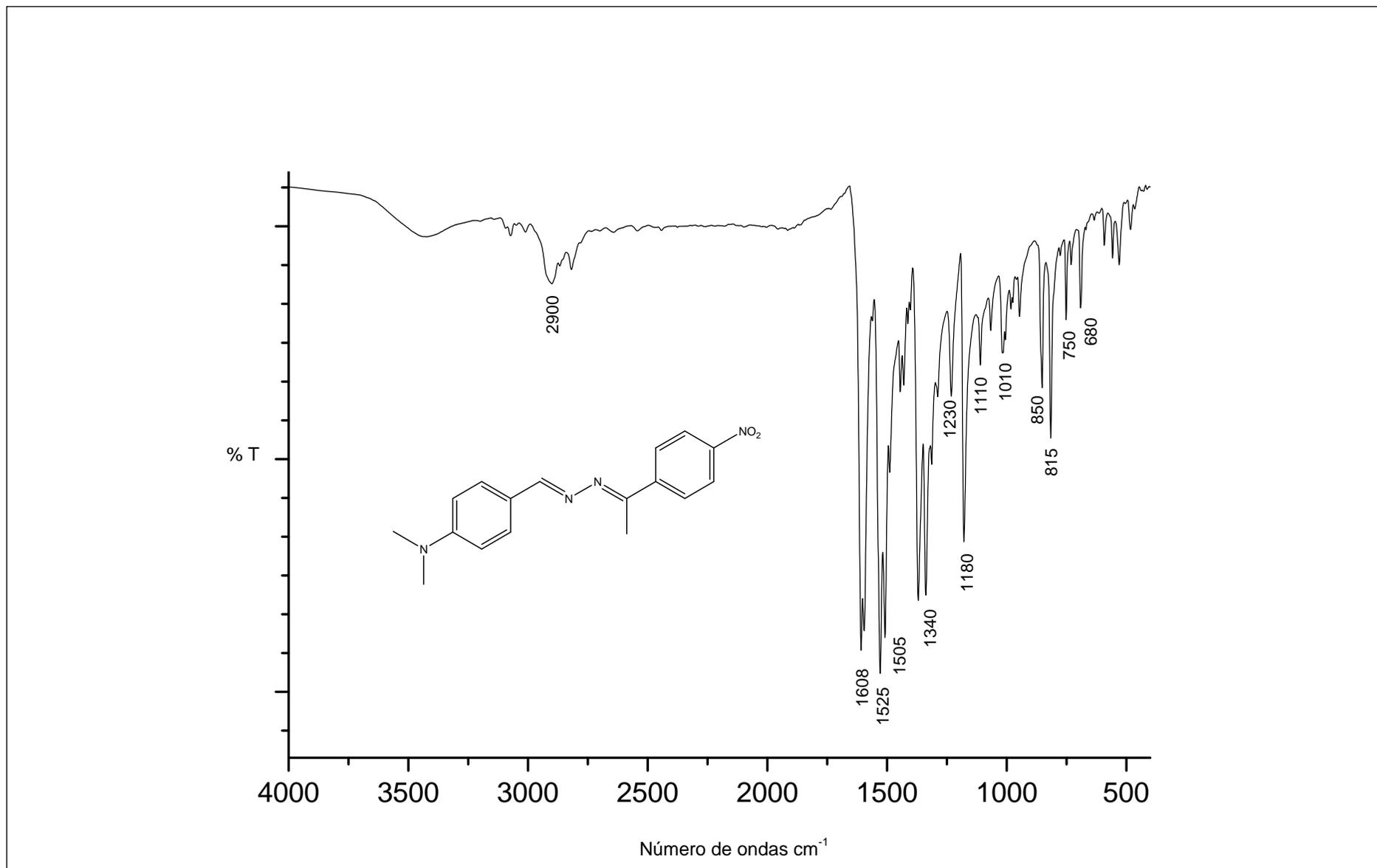


Figura 89: Espectro na região do IV do composto 47 (4000-500 cm⁻¹).

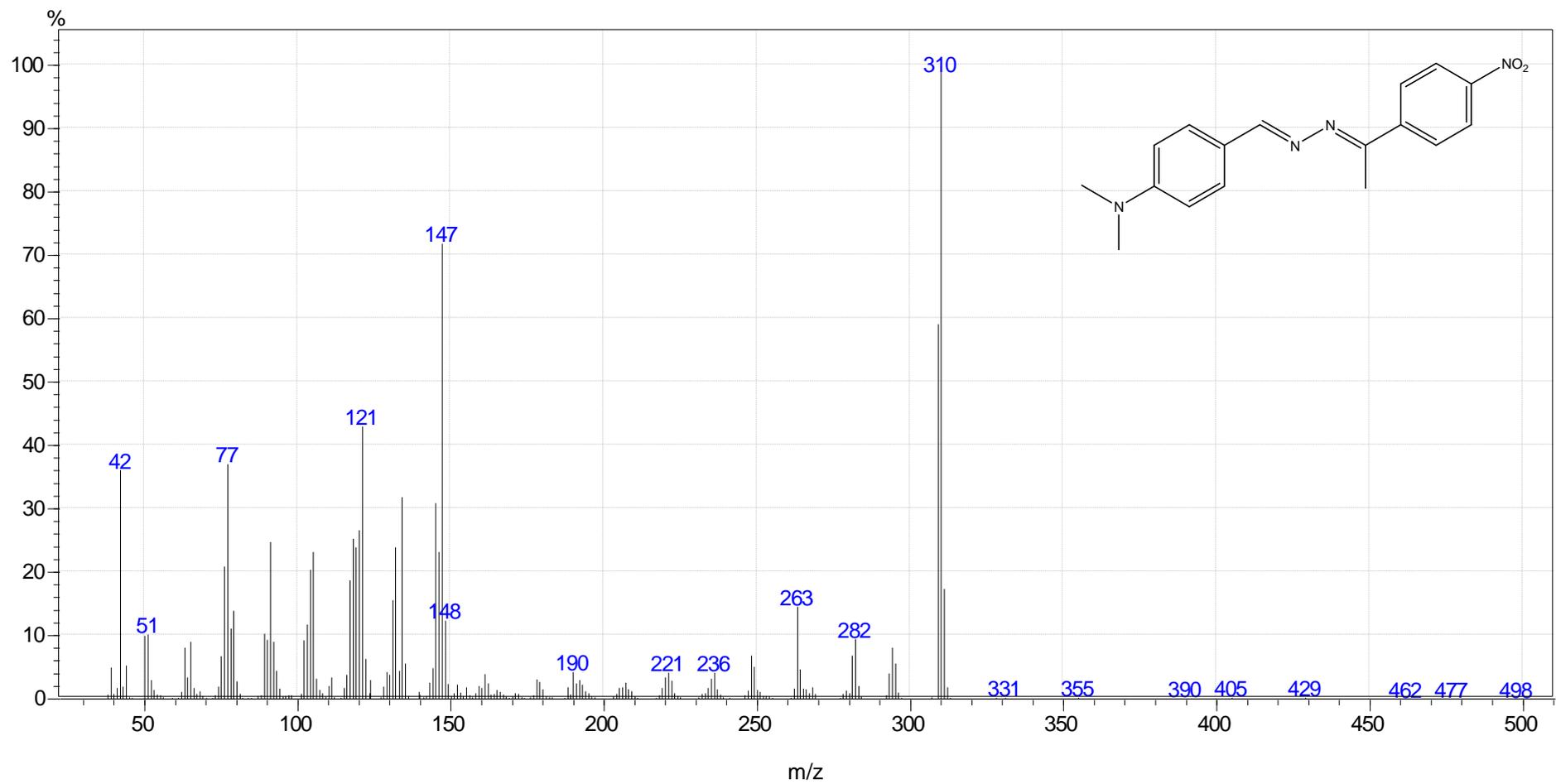
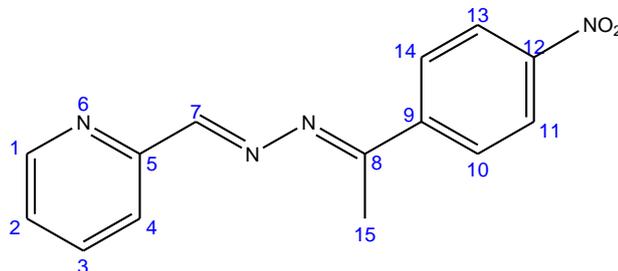


Figura 90: Espectro de massas do composto 47

Síntese da (7E, 8E) -2 - (1 - (4-nitrofenil)-etilideno) -1 - ((piridin-2-il)-metileno)-hidrazina (49).



Foram utilizados 107 mg (1 mmol) de 2-piridina-carboxialdeído e 179 mg (1 mmol) da hidrazona **16**, conforme procedimento C. Características do sólido obtido:

Formula molecular: C₁₄H₁₁N₄O₂ (268,1 g/mol)

Coloração: amarelo claro

Faixa de fusão: 157 – 158°C

Rendimento: 77,9%

Pureza (CG-MS): 100%

Dados espectroscópicos

RMN de ¹H (500 MHz, CDCl₃): δ 2,5 (s, 3H - 15) δ 7,37 (m, 1H - 2) δ 7,8 (m, 1H - 3) δ 8,09 (d, 2H – 10 e 14) δ 8,15 (d, 1H - 4) δ 8,28 (d, 2H – 11 e 13) δ 8,38 (s, 1H - 7) δ 8,7 (s, 1H - 1).

RMN de ¹³C (125 MHz, CDCl₃): δ 15,43 (C-15) 121,87 (C-) 123,63 (C-11 e 13) 124,97 (C-2) 127,86 (C-10 e 14) 136,63 (C-3) 143,71 (C-9) 148,77 (C-7) 153,23 (C-5) 157,79 (C-8) 161,64 (C-12).

IV (4000 – 500 cm⁻¹): (NO₂) 1340 e 1510 cm⁻¹; (C=N) 1600 cm⁻¹; (=C-CH₃) 1100 e 2840 cm⁻¹.

EM (m/z): [M⁺] 267; Fragmentos: 190; 78.

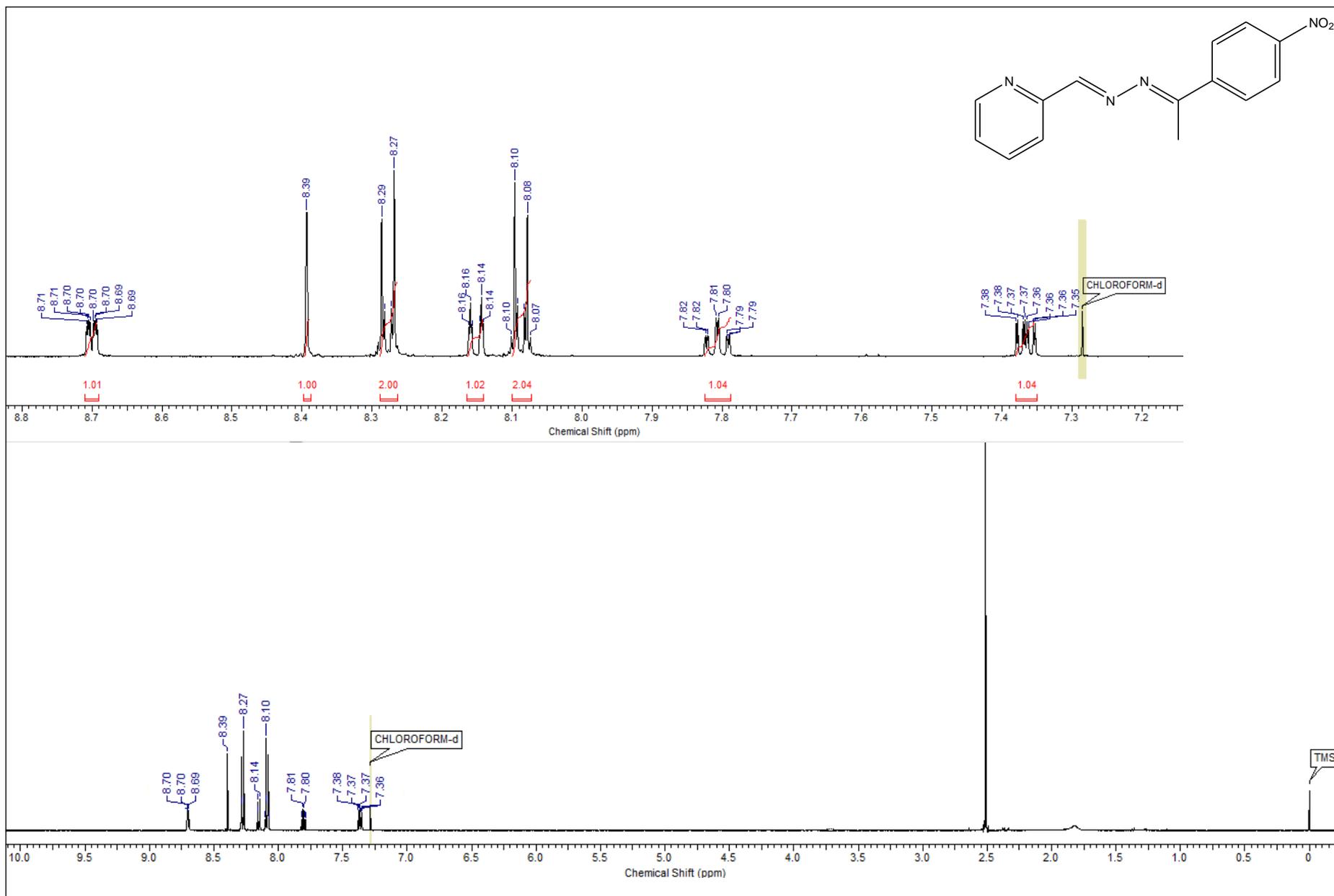


Figura 91: Espectro de RMN ¹H do composto 49 (CDCl₃, 500 MHz)

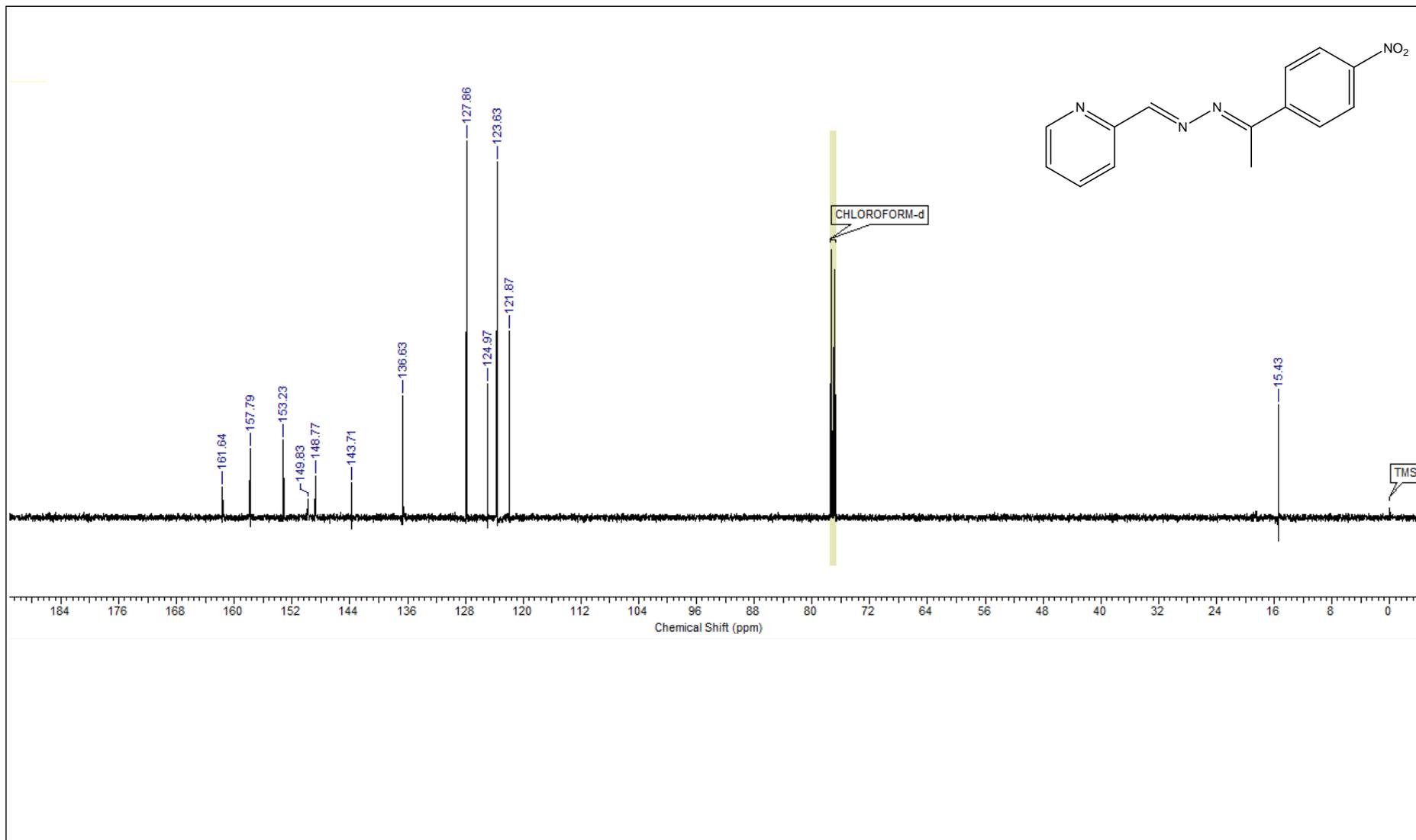


Figura 92: Espectro de RMN ^{13}C do composto 49 (CDCl_3 , 125 MHz)

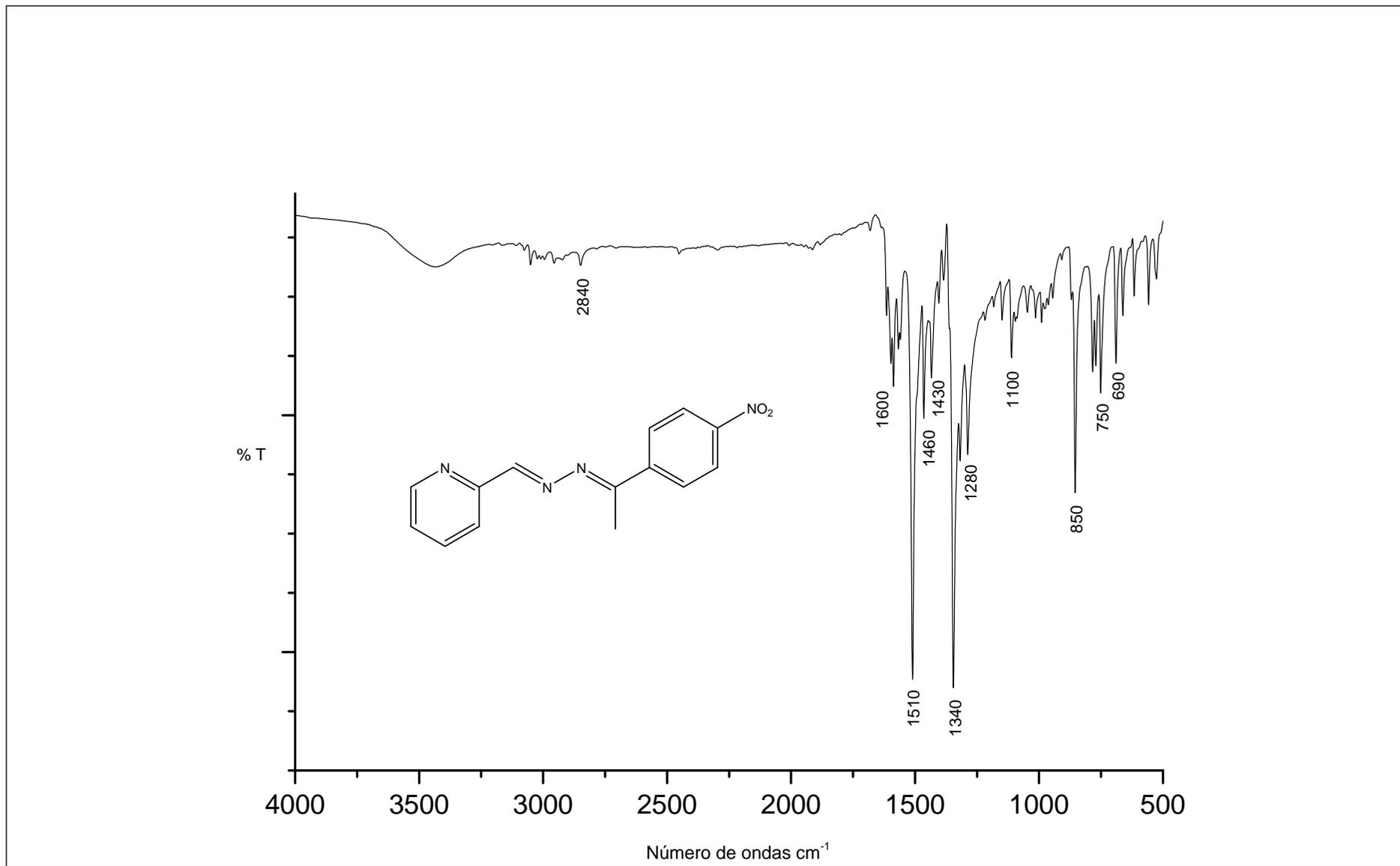


Figura 93: Espectro na região do IV do composto **49** ($4000\text{-}500\text{ cm}^{-1}$).

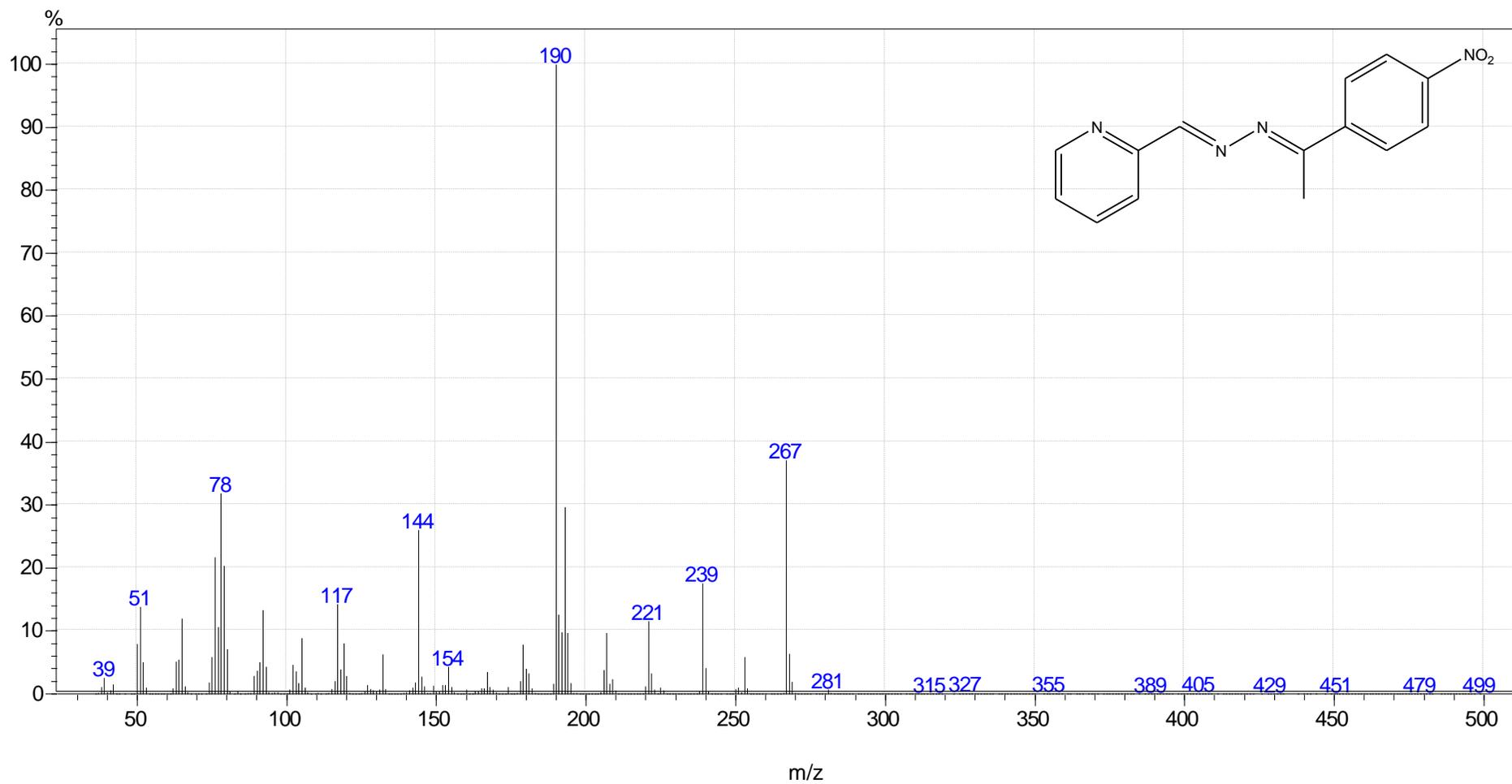


Figura 94: Espectro de massas do composto 49