

**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

GISELLE DE ANDRADE RAMOS

**SÍNTESE E AVALIAÇÃO DE NOVOS LIGANTES MULTIALVO PLANEJADOS
A PARTIR DO CARDANOL CANDIDATOS AO TRATAMENTO
DA DOENÇA DE ALZHEIMER**

**Brasília
2018**

GISELLE DE ANDRADE RAMOS

**SÍNTESE E AVALIAÇÃO DE NOVOS LIGANTES MULTIALVO PLANEJADOS
A PARTIR DO CARDANOL CANDIDATOS AO TRATAMENTO
DA DOENÇA DE ALZHEIMER**

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade de Brasília, como requisito para à obtenção do título de Doutora em Ciências Farmacêuticas.

Orientador: Prof. Dr. Luiz Antonio Soares Romeiro

**Brasília
2018**

GISELLE DE ANDRADE RAMOS

**SÍNTESE E AVALIAÇÃO DE NOVOS LIGANTES MULTIALVO PLANEJADOS
A PARTIR DO CARDANOL CANDIDATOS AO TRATAMENTO
DA DOENÇA DE ALZHEIMER**

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade de Brasília, como requisito para à obtenção do título de Doutora em Ciências Farmacêuticas.

Aprovado em 28 de Junho de 2018.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Luiz Antonio Soares Romeiro

Faculdade de Ciências da Saúde – UnB

Dr. Cláudio Viegas Junior

Universidade Federal de Alfenas – UNIFAL

Dra. Márcia Renata Mortari

Instituto de Ciências Biológicas – UnB

Dr. Maurício Homem de Melo

Faculdade de Ciências da Saúde – UnB

Dra. Djane Braz Duarte

Faculdade de Ciências da Saúde – UnB

*Dedico aos meus pais, Jovelino e Maria,
Sempre presentes em minha vida, que auxiliaram nas mais importantes decisões.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por ter me abençoado até aqui, sempre me direcionando para o caminho correto.

Agradeço aos meus pais, Jovelino e Maria, por seus conselhos, amor, por me incentivarem a realizar este trabalho, e por estarem presentes em minha vida e me ajudarem a trilhar este caminho.

Ao professor Dr. Luiz Antonio Soares Romeiro pela orientação, discussões teóricas, dedicação e paciência, e assim também por todas as oportunidades a mim oferecidas, presentes desde minha graduação.

À Dra. Manuela Bartolini do Departamento de Farmácia e Biotecnologia da Universidade de Bolonha pela realização dos ensaios farmacológicos de colinesterases.

Ao Dr. Paul Fraser e Ling Wu por me receberem tão cordialmente durante minha temporada no *Tanz Centre for Research in Neurodegenerative Diseases* e também pelas orientações e ensinamentos quanto às novas técnicas por eles me ensinados.

Ao Dr. Ondrej Soukup e Jana Janockova do Centro de Pesquisa Biomédica do Hospital Universitário Hradec Kralove pela realização dos ensaios de permeabilidade.

À Prof. Dra. Silvia Alcanfor e Margareth Amaral dos Santos Marques da Central Analítica da Universidade Católica de Brasília (UCB) pela realização dos espectros no Infravermelho (IV).

Ao Prof. Dr. Edilberto Silveira, Msc. Patrícia Nascimento e Hebert Magalhães do Centro Nordestino de Aplicação e Uso de Ressonância Magnética Nuclear (CENAUREMN) da Universidade Federal do Ceará pela concessão dos espectros de RMN de ^1H e RMN de ^{13}C .

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoas de Nível Superior (Capes) pela concessão de bolsa de estudos.

Ao CNPq (Br, #473389/2009-6 e 490203/2012-4) pelo apoio financeiro.

Aos amigos e companheiros do Laboratório de Desenvolvimento de Estratégias Terapêuticas (LADETER).

À banca examinadora por aceitar o convite, e desde já pelas críticas e contribuições no enriquecimento do trabalho.

“Ao menos que modifiquemos a nossa maneira de pensar, não seremos capazes de resolver os problemas causados pela forma como nos acostumamos a ver o mundo.”

Albert Einstein

RESUMO

RAMOS, Giselle de Andrade. **Síntese e avaliação de novos ligantes multialvo planejados a partir do cardanol candidatos ao tratamento da Doença de Alzheimer**. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) – Faculdade de Ciências da Saúde. Universidade de Brasília, Brasília, 2018.

A Doença de Alzheimer (DA) é uma doença neurodegenerativa progressiva que apresenta a demência como manifestação clínica clássica e sinais como alteração do comportamento e outros. No âmbito de uma linha de pesquisa que visa ao desenvolvimento de novos ligantes dirigidos, descrevemos neste estudo a síntese e a caracterização de intermediários e produtos finais planejados a partir da mistura de cardanois (**1A-C**), bem como a avaliação da atividade inibitória frente às *hAChE/hBuChE*, agregação β A, bem como seus perfis antioxidante e de permeabilidade. Foram sintetizados 2 intermediários-chave, LDT71 (**53**, 60%) e LDT108 (**54**, 64%), e 3 séries totalizando 19 compostos em rendimentos que variaram de 21% a 91%. Os ensaios frente à *hAChE/hBuChE* demonstraram a capacidade dos compostos de inibir as enzimas em percentuais que variaram de 10% a 75% (*hAChE*) e 10% a 80% (*hBuChE*) permitindo a determinação das CI_{50} para os compostos com percentual > 10%. Para os derivados das séries 1 e 2 das *N*-benzilamidas/aminas, incluindo as *orto*-substituídas, destacaram-se os derivados LDT577 (**57**, *AChE* CI_{50} 7,2 μ M; *BuChE* CI_{50} 1,28 μ M) e LDT579 (**60**, *AChE* CI_{50} 6,68 μ M; *BuChE* CI_{50} 0,47 μ M). Para a subsérie das 2-metóxibenzilamidas/aminas, incluindo as *orto*-substituídas, LDT585 (**62**, *BuChE* CI_{50} 2,15 μ M) e LDT587 (**63**, *BuChE* CI_{50} 0,74 μ M) apresentaram os melhores perfis inibitórios. Para a série 3 dos álcoois derivados *orto*-substituídos avaliados, LDT638 (**69**, *AChE* CI_{50} 30,0 μ M; *BuChE* CI_{50} 6,12 μ M) apresentou melhor perfil dual; enquanto que os derivados LDT636 (**68**) e LDT544 (**70**) apresentaram seletividade para *BuChE*. Os ensaios frente à agregação β A para a série 3 demonstraram que compostos com contribuição hidrofóbica permanecem como espiral aleatória, e gerando baixa densidade de agregados, destacando aqui o LDT692 (**76**). O ensaio HORAC revelou LDT640 (**67**, 9,73 EAG) como melhor antioxidante. No ensaio de permeabilidade (PAMPA) todos os derivados, exceto LDT544 (**70**), foram capazes de atravessar a BHE. Tomando como base todas as avaliações, destaca-se o derivado LDT638 (**69**) que apresentou perfil dual em *hAChE/hBuChE*; capacidade de manter o peptídeo como espiral aleatória e com baixa densidade de agregados; perfil antioxidante dentro da faixa dos controles; e permeabilidade à BHE. A avaliação da toxicidade dos agregados gerados na presença dos derivados-alvo é perspectiva deste trabalho.

Palavras-chave: Doença de Alzheimer, *iAChE*, *iBuChE*, agregação β A, LCC, Cardanol.

RAMOS, Giselle de Andrade. **Synthesis and evaluation of new multi-target ligands designed from cardanol as candidates for the treatment of Alzheimer's disease.**

Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) – Faculdade de Ciências da Saúde. Universidade de Brasília, Brasília, 2018.

Alzheimer's disease (AD) is a progressive neurodegenerative disease that presents dementia as a classic clinical manifestation and other symptoms and signals such as behavioral change and others. In the context of a research line aimed to the development of new directed ligands, we describe the synthesis and characterization of intermediates and final products planned from cardanol mixture (**1A-C**), as well the evaluation of their inhibitory profiles against *hAChE/hBuChE*, aggregation $A\beta$ activity, as well their antioxidant and permeability profiles. Thus, we synthesized two key intermediates, LDT71 (**53**, 60%) and LDT108 (**54**, 64%), and also three series totalizing 19 compounds in overall yields ranging from 21% to 91%. The *hAChE/hBuChE* assays showed an ability of the compounds to inhibit the enzyme in percentages ranging from 10% to 75% (*hAChE*) and 10% to 80% (*hBuChE*) allowing the determination of IC_{50} for the compounds percentage > 10%. For Series 1 and 2 of the N-benzylamides/amines derivatives, including ortho-substituted, LDT577 (**57**, *AChE* IC_{50} 7,2 μ M; *BuChE* IC_{50} 1,28 μ M) and LDT579 (**60**, *AChE* IC_{50} 6,68 μ M; *BuChE* IC_{50} 0,47 μ M) showed the best results for these classes. The subset of 2-methoxybenzylamides/amines, including ortho-substituted, LDT585 (**62**, *BuChE* IC_{50} 2,15 μ M) and LDT587 (**63**, *BuChE* IC_{50} 0,74 μ M) showed the best inhibitory profile. For Series 3 of the *ortho*-substituted alcohol derivatives evaluated, LDT638 (**69**, *AChE* IC_{50} 30,0 μ M, *BuChE* IC_{50} 6,12 μ M) showed the best dual profile; meanwhile, LDT636 (**68**) and LDT544 (**70**) showed selectivity for *hBuChE*. Tests against $A\beta$ aggregation activity for Series 3 demonstrated that compounds with hydrophobic contribution remain as random coil and with a low density of aggregates, highlighting here the LDT692 (**76**). The HORAC assay revealed that LDT640 (**67**, 9,73 EAG) was the best antioxidant observed. From the permeability assay (PAMPA) it was observed that all the derivatives, except LDT544 (**70**), can cross the BBB. Based on all evaluations, the derivative LDT638 (**69**) stands out. **69** showed a dual profile in *hAChE/hBuChE*; able to maintain the peptide as a random coil and with a low density of aggregates; antioxidant profile within the control range; and permeability through the BBB. The evaluation of aggregates toxicity generated in the presence of the target derivatives is a perspective of this work.

Keywords: Alzheimer's disease, *AChEi*, *BuChEi*, $A\beta$ aggregation, CNSL, Cardanol.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1:	Representação da acetilcolinesterase.	22
Figura 2:	Representação estrutura de βA_{42}	25
Figura 3:	Inibidores da AChE.	29
Figura 4:	Inibidores duais da AChE.	32
Figura 5:	Novos inibidores duais da AChE.	33
Figura 6:	Agentes que atuam por interação direta com peptídeo βA .	34
Figura 7:	Inibidores da BACE-1.	34
Figura 8:	Inibidores da γ -secretase.	35
Figura 9:	Inibidores da fosforilação da proteína tau.	36
Figura 10:	Agentes quelantes e antioxidantes.	37
Figura 11:	Agentes naturais e planejados a partir de compostos naturais.	39
Figura 12:	Representação do caju/LCC.	40
Figura 13:	Principais componentes do LCC.	40
Figura 14:	Derivados LDT185 (47), LDT161 (48), LDT438 (49) e LDT523 (50).	42
Figura 15:	Cardanol (1C) – possíveis alvos para modificações moleculares.	43
Figura 16:	Planejamento das modificações estruturais no derivado LDT167 (51) e AP2238 (54)	47
Figura 17:	Planejamento das séries de compostos-alvo a partir do LDT71 (53)	48
Figura 18:	Numeração e legendas empregadas no assinalamento de sinais em RMN de 1H e RMN de ^{13}C	53
Figura 19:	Preparação de amostras para realização do ensaio de agregação.	55
Figura 20:	Intermediários e produtos finais sintetizados e caracterizados.	70
Figura 21:	Exemplo de tautomerismo e Zwitterions para derivados amídicos.	81
Figura 22:	Espectros de RMN para LDT578 (64) e LDT586 (65).	82
Figura 23:	Planejamento das séries de compostos-alvos a partir de LDT71 (53).	84
Figura 24:	Derivados da Série 3.	93
Figura 25:	Análise <i>in vitro</i> da atividade anticolinesterásica das amostras em concentração de 20 μM (média \pm EPM de duplicata).	98

Figura 26:	DC – Análise <i>in vitro</i> da atividade antiagregante no tempo inicial (Tempo 0).	107
Figura 27:	MET – Análise <i>in vitro</i> da atividade antiagregante no tempo inicial (Tempo 0).	108
Figura 28:	DC – Análise <i>in vitro</i> da atividade antiagregante no tempo de 24 horas (Tempo 1).	109
Figura 29:	MET – Análise <i>in vitro</i> da atividade antiagregante no tempo 1.	110
Figura 30:	DC – Análise <i>in vitro</i> da atividade antiagregante no tempo de 48 horas (Tempo 2).	111
Figura 31:	MET – Análise <i>in vitro</i> da atividade antiagregante no tempo 2.	112
Figura 32:	DC – Análise <i>in vitro</i> da atividade antiagregante no tempo de 48 horas (Tempo 2).	113
Figura 33:	MET – Análise <i>in vitro</i> da atividade antiagregante no tempo 3.	114
Figura 34:	Atividade antioxidante dos compostos.	119

LISTA DE TABELAS

Tabela 1:	Composição – LCC técnico e LCC natural.	41
Tabela 2:	Principais sinais em RMN para LDT71 (53) e LDT108 (54).	73
Tabela 3:	Características dos derivados LDT576 (55) e LDT592 (56)	74
Tabela 4:	Características dos derivados LDT577 (57) e LDT593 (58).	75
Tabela 5:	Características dos derivados 59 até 63 .	76
Tabela 6:	Dados de deslocamentos químicos de RMN de ^1H e RMN de ^{13}C (δ , ppm) para o núcleo benzílico (anel E e metileno a), <i>N</i> -substituintes para a Série 1 e 2 dos derivados amídicos e amínicos	78
Tabela 7:	Dados de deslocamentos químicos de RMN de ^1H e RMN de ^{13}C (δ , ppm) para o núcleo benzílico (anel D e metileno b), <i>N</i> -substituintes (Série 2)	80
Tabela 8:	Dados de deslocamentos químicos de RMN de ^1H e RMN de ^{13}C (δ , ppm) para o núcleo benzílico (anel F e metileno c), <i>N</i> -substituintes (Série 2)	80
Tabela 9:	Características dos derivados 67 até 76 .	94
Tabela 10:	Dados de deslocamentos químicos de RMN de ^1H e RMN de ^{13}C (δ , ppm) para as aminas heterocíclicas da Série 3	95
Tabela 11:	Percentual de inibição enzimática e os valores de CI_{50} para os derivados alvo a 20 μM .	99
Tabela 12:	Dados gerais da análise de dicroísmo circular.	115
Tabela 13:	Atividade antioxidante por $\text{OH}\cdot$ expressos como EAG.	118
Tabela 14:	Dados da estimação da penetração na BHE obtidos a partir do ensaio de PAMPA para os derivados da Série 3.	122

LISTA DE ESQUEMAS

Esquema 1: Metodologia sintética geral para obtenção dos derivados-alvo.	50
Esquema 2: Condições reacionais e metodologia utilizada na obtenção dos derivados.	76
Esquema 3: Metodologia sintética geral para obtenção dos derivados da série 3.	86

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

%I – Percentual de inibição

β A – Beta amiloide

AG – Ácido gálico

ALH – Aceptor de ligação de hidrogênio

ACh – Acetilcolina

AChE – Acetilcolinesterase

AINEs – Anti-inflamatórios não esteroidais

A β PP/APP – Precursor de proteína beta amiloide

Akt – Proteína quinase B

AMPK – Proteína quinase ativada por AMP

APOE – Gene da apolipoproteína E

ApoE – Apolipoproteína E

β A – β -amiloide

β A₄₀ – β -amiloide de 40 aminoácidos

β A₄₂ – β -amiloide de 42 aminoácidos

BACE-1 – Enzima 1 de clivagem beta amiloide (β -secretase 1)

BHE – Barreira hematoencefálica

Bn – Benzila

BuChE – Butirilcolinesterase

c.c.f – Cromatografia de camada fina

ChE – Colinesterase

d – Duplete

dd – Duplo duplete

DA – Doença de Alzheimer

DEA – dietilamina

DC – Dicroísmo circular

DCM – Diclorometano

DLH – Doador de ligação de hidrogênio

dt – Duplo tripleto

EAG – Equivalentes de ácido gálico

EPM – Erro padrão da média

EtOH – Etanol
GAGs – Glicosaminoglicanas
GSK3 β – Glicogênio sintase-quinase 3 β
hAChE – Acetilcolinesterase humana
hBuChE – Butirilcolinesterase humana
HEA – hidroxilamina
HFIP – 1,1,1,3,3,3-hexanofluoro-2-propanolol
HORAC – Capacidade antioxidante de radicais hidroxila
Hz – Hertz
iAChE – Inibidor da enzima acetilcolinesterase
iBuChE – Inibidor da enzima butirilcolinesterase
IV – Infravermelho
Cl₅₀ – Concentração requerida para adquirir 50% do efeito inibitório máximo
J – Constante de acoplamento
LCC – Líquido da castanha do caju
m – Multiplete
MeCN – Acetonitrila
MeOH – Metanol
MET – Microscopia eletrônica de transmissão
NMDA – *N*-metil-D-aspartato
ORAC – Capacidade da absorvância do radical oxigênio
PAMPA – Ensaio de permeabilidade por meio de membrana artificial paralela
PBL – Lipídio cerebral polar
Pe – Permeabilidade
PFA – Paraformaldeído
PS1 – Presenilina 1
PS2 – Presenilina 2
q – Quarteto
qi – Quinteto
R_f – Fator de retenção
RM – Reconhecimento molecular
RMN – Ressonância magnética nuclear
RMN de ¹H – Ressonância magnética nuclear de hidrogênio
RMN de ¹³C – Ressonância magnética nuclear de carbono 13

s – Simpleto

sl – Sinal Largo

SAC – Sítio aniônico catalítico

SAP – Sítio aniônico periférico

t – Tripleto

TEA – Trietilamina

TFA – Ácido trifluoroacético

TFE - Trifluoroetanol

THF - Tetrahydrofurano

TMS – Tetrametilsilano

UV – Ultravioleta

V_A – Volume na placa aceptora

V_D – Volume na placa doadora

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	19
1.1 DADOS EPIDEMIOLÓGICOS DA DOENÇA DE ALZHEIMER	20
1.2 HIPÓTESES FISIOPATOLÓGICAS DA DOENÇA DE ALZHEIMER	20
1.2.1 Hipótese Colinérgica	21
1.2.2 Hipótese Amiloide	23
1.2.3 Hipótese da Hiperfosforilação de Proteína Tau	26
1.2.4 Outras Hipóteses	27
1.3 TRATAMENTO E ALVOS FARMACOLÓGICOS DA DOENÇA DE ALZHEIMER	29
1.3.1 Inibidores de Colinesterases	29
1.3.2 Ligantes Duais da AChE	30
1.3.3 Agentes Capazes de Atuar na Agregação Amiloide	33
1.3.4 Inibidores Fosforilação da Proteína Tau	35
1.3.5 Agentes Quelantes e Antioxidantes	36
1.4 A BIODIVERSIDADE APLICADA À DOENÇA DE ALZHEIMER	37
1.5 O LÍQUIDO DA CASCA DA CASTANHA DE CAJU (LCC)	39
1.5.1 Aplicação do Cardanol (1) no Desenvolvimento de Agentes Terapêuticos	42
2 OBJETIVOS	45
2.1 OBJETIVO GERAL	45
2.1.1 Objetivos Específicos	45
3 PLANEJAMENTO ESTRUTURAL	47
4 PLANEJAMENTO SINTÉTICO	50
5 PARTE EXPERIMENTAL	52
5.1 GENERALIDADES E MATERIAIS	52
5.2 METODOLOGIA DE AVALIAÇÃO DO PERFIL ANTICOLINESTERÁSICO	54
5.3 METODOLOGIA DE AVALIAÇÃO DO PERFIL ANTIAGREGANTE β A	55
5.4 METODOLOGIA DE AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE	56
5.5 METODOLOGIA DE AVALIAÇÃO DO PERFIL DE PERMEABILIDADE	56
Capítulo I – Desenvolvimento Químico: Resultados e Discussões	58

6 METODOLOGIA SINTÉTICA E CARACTERIZAÇÃO DOS COMPOSTOS	60
6.1 OBTENÇÃO DA MISTURA DE CARDANOIS ACETILADA	60
6.2 OBTENÇÃO DO DERIVADO 8-(3-HIDROXIFENIL)OCTAN-1-OL (LDT71, 53)	60
6.3 OBTENÇÃO DO DERIVADO ÁCIDO 8-(3-HIDROXIFENIL)OCTANOICO (LDT108, 54)	62
6.4 PROCEDIMENTO GERAL PARA OBTENÇÃO DOS INTERMEDIÁRIOS- ALVO AMIDAS	63
6.5 PROCEDIMENTO GERAL PARA OBTENÇÃO DOS INTERMEDIÁRIOS- ALVO AMINAS	65
6.6 PROCEDIMENTO GERAL PARA OBTENÇÃO DOS DERIVADOS- ALVO ORTO-AMINAS	67
7 CARACTERIZAÇÃO ESPECTROSCÓPICA	72
7.1 CARACTERIZAÇÃO DO DERIVADO 8-(3-HIDROXIFENIL)OCTAN-1-OL (LDT71, 53)	72
7.2 CARACTERIZAÇÃO DO DERIVADO ÁCIDO 8-(3-HIDRÓXIFENIL) OCTANOICO (LDT108, 54)	73
7.3 CARACTERIZAÇÃO DOS DERIVADOS-ALVO	74
7.3.1 Derivados Benzilamídicos e Benzilamínicos (Séries 1 e 2)	77
7.3.2 Derivados <i>orto</i>-hidroxiaminometilsubstituídos (Série 2)	79
7.3.3 Derivados Benzilamídicos e Benzilamínicos: Tautomerismo e Zwitteríons	81
8 PLANEJAMENTO ESTRUTURAL – SÉRIE 3	84
9 PLANEJAMENTO SINTÉTICO – SÉRIE 3	86
10 PARTE EXPERIMENTAL – SÉRIE 3	88
10.1 OBTENÇÃO DOS DERIVADOS SÉRIE 3	88
10.1.2 Caracterização dos Derivados <i>orto</i>-hidroxiaminometilsubstituídos (Série 3)	94
 Capítulo II – Avaliação Biológica: Resultados e Discussões	 96
 11 AVALIAÇÃO DO PERFIL COLINESTERÁSICO (<i>in vitro</i>)	 98
11.1 RELAÇÕES ESTRUTURA QUÍMICA-ATIVIDADE ANTICOLINESTERÁSICA	98

11.1.1 Derivados Benzilamídicos e Benzilamínicos (Série 1)	99
11.1.2 Derivados Benzilamínicos (Série 2)	100
11.1.3 Álcoois derivados <i>orto</i>-hidroxiaminometilsubstituídos (Série 3)	102
12 AVALIAÇÃO DO PERFIL ANTIAGREGANTE	106
12.1 RELAÇÕES ESTRUTURA QUÍMICA-ATIVIDADE ANTIAGREGANTE β A	106
12.1.1 Álcoois derivados <i>orto</i>-hidroxiaminometilsubstituídos (Série 3)	106
13 AVALIAÇÃO DO PERFIL ANTIOXIDANTE	118
13.1 ÁLCOOIS DERIVADOS <i>ORTO</i> -HIDROXIAMINOMETILSUBSTITUÍDOS (SÉRIE 3)	119
14 AVALIAÇÃO DO PERFIL DE PERMEABILIDADE	122
14.1 AVALIAÇÃO DO PERFIL DE PERMEABILIDADE (SÉRIE 3)	122
15 CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS	124
16 REFERÊNCIAS	127
ANEXOS	144

Introdução

1 INTRODUÇÃO

Hodiernamente, as doenças neurodegenerativas vêm intensificando o interesse de pesquisadores pelo inevitável aumento do número de casos e estimativa global exponencial de novos casos. Muito deste panorama está associado à precisão nos diagnósticos e à longevidade das populações devido à melhor qualidade de vida. A Doença de Alzheimer (DA) é uma destas desordens, caracterizada por ser progressiva e irreversível, capaz de afetar a memória, o comportamento, a cognição e outras funções importantes (PRICE, 2015; REITZ & MAYEUX, 2014).

Ainda que descrita há mais de 100 anos por seu descobridor – Alois Alzheimer – a DA ainda é um desafio para os pesquisadores na determinação de sua fisiopatologia em virtude de sua natureza multifatorial (LEON, GARCIA & CONTELLES, 2011; SINGH et al, 2013). Sobretudo, acredita-se que esteja relacionada a algumas hipóteses fundamentais: (I) diminuição da concentração de acetilcolina; (II) acúmulo do peptídeo β A insolúvel; (III) excesso de emaranhados neurofibrilares – como consequência da hiperfosforilação de tau –; e (IV) fatores genéticos e ambientais (BRUS et al, 2014; SAWATZKY et al 2016; SINGH et al, 2013). Como resultado destas anormalidades têm-se a atrofia e degeneração dos neurônios colinérgicos subcorticais, principalmente aqueles na parte basal do prosencéfalo (núcleo basal de Meynert) que conferem inervação colinérgica a todo córtex cerebral, apresentando mudanças sinápticas do córtex, formação hipocampal, ou outras áreas cerebrais essenciais para funções cognitivas (BERTRAM et al, 2010; KORABECNY et al, 2010).

No âmbito de uma linha de pesquisa que visa ao desenvolvimento de novos candidatos a ligantes multialvo, o presente estudo descreve a síntese, caracterização de intermediários e produtos finais, e a avaliação *in vitro* de novos derivados planejados racionalmente a partir do cardanol (**1**) frente aos perfis inibitórios de colinesterases e da agregação β A, bem como antioxidante e de permeabilidade visando o estabelecimento de relações estrutura-atividade.

1.1 DADOS EPIDEMIOLÓGICOS DA DOENÇA DE ALZHEIMER

A incidência da doença está intimamente relacionada com a idade do indivíduo. Devido ao aumento na expectativa de vida e também de melhores condições de saúde e controle de outras enfermidades, observa-se o aumento de doenças crônicas, tais como as neurodegenerativas (PRICE, 2015; REITZ & MAYEUX, 2014).

A prevalência de casos da DA é exponencial e o que se tem observado a partir de dados atuais é que estas projeções tendem a duplicar ou quadruplicar até 2050. De acordo com pesquisas, estima-se que existam entre 24 a 35 milhões de indivíduos que apresentam a DA no mundo (BRUS et al, 2014; HUGHES & GUTHRIE, 2014; IMTIAZ et al, 2014; REITZ & MAYEUX, 2014; SAWATZKY et al 2016). O Brasil apresenta cerca de 20,5 milhões de idosos com cerca de 1,5 milhões de pessoas com DA (NGANDU, MANGIALASCHE & KIVIPERTO, 2014; PRICE, 2015). Os gastos mundiais relacionados com a DA foram estimados em 604 bilhões de dólares no ano início desta década (SINDI, MAGIALASCHE & KIVIPERTO, 2015; WIMO et al, 2013).

1.2 HIPÓTESES FISIOPATOLÓGICAS DA DOENÇA DE ALZHEIMER

O entendimento do mecanismo fisiopatológico da DA é importante para o desenvolvimento racional de novos fármacos, entretanto, a doença não possui causa etiológica bem estabelecida (BRUS et al, 2014; LEON, GARCIA & CONTELLES, 2011; IMAHORI, 2010; SAWATZKY et al 2016). Estudos realizados no decorrer das décadas auxiliam na descoberta da etiologia desta patologia com propostas de mecanismos e interconexões de uma ou mais cascatas de eventos que ocasionam os sintomas observados na DA (CHESSER, PRITCHARD & JOHNSON, 2013; IQBAL & GRUNDKE-IQBAL, 2008; LESNE, 2013).

1.2.1 Hipótese Colinérgica

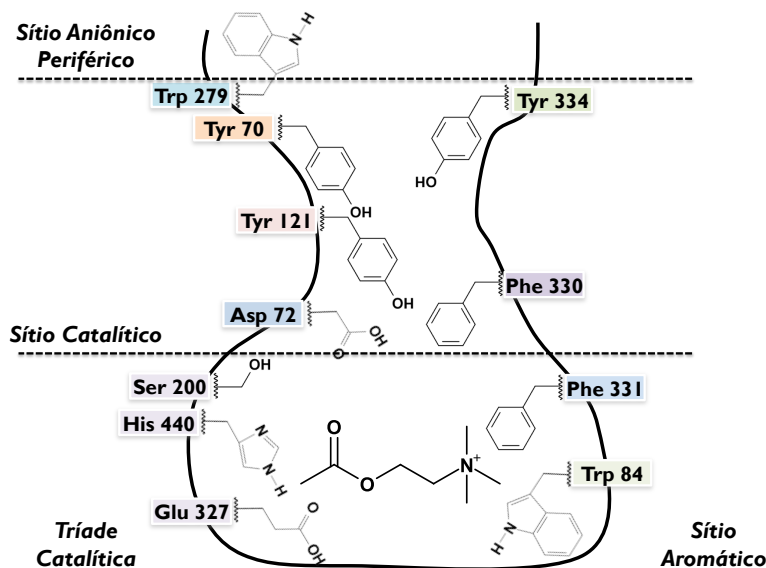
A hipótese colinérgica, a primeira a ser proposta, foi introduzida pelos pesquisadores DAVIES e MALONEY (1976). Os primeiros fármacos desenvolvidos, e que foram introduzidos no mercado, eram baseados na hipofunção colinérgica dos pacientes (CONTESTABILE, 2011; MUFSON, COUNTS & PEREZ, 2010; NORDBERG et al, 2013). Esta hipótese tem como princípio básico a assunção de baixas concentrações do neurotransmissor acetilcolina (ACh) que pode estar associada à sua baixa produção ou alta degradação por sua enzima (Acetilcolinesterase – AChE); ou também pela degeneração e perda de neurônios colinérgicos, considerando ainda baixa sensibilidade dos receptores do sistema colinérgico (BRUS et al, 2014; CRAIG, HONG & MCDONALD, 2011; MAURICE et al, 2016; PÁKÁSKI & KÁLMÁN, 2008; POMARA et al, 1986; VAN BEEK & CLAASSEN, 2011).

O amplo estudo desta hipótese culminou no conhecimento das principais características estruturais das colinesterases. Tanto AChE, quanto butirilcolinesterase (BuChE), possuem a função de hidrolisar a acetilcolina. Vale destacar que a BuChE é uma enzima não-específica predominantemente encontrada no sistema circulatório e, teoricamente, é o primeiro contato enzimático extra-sináptico para hidrólise de ACh (BRUS et al, 2014; DVIR et al, 2010; GIACOBINI, 2001; MAURICE et al, 2016; NORDBERG et al, 2013; SAWATZKY et al, 2016).

Ainda é observado que estas colinesterases compartilham cerca de 65% de homologia de seus aminoácidos com sítios ativos e tríade catalítica semelhantes, exceto o sítio aniônico periférico (SAP) para a enzima BuChE, já que esta enzima apresenta maior volume quando comparada à AChE é dita como não possuir um SAP (BRUS et al, 2014; FANG et al, 2011; KRYGER et al, 2000; NORDBERG et al, 2013; SAWATZKY et al 2016). As enzimas possuem uma ‘garganta’ (*gorge*) hidrofóbica, com 14 aminoácidos em AChE – sendo que destes, 6 aminoácidos são diferentes em BuChE – que se estende e se divide em dois sítios de ligação: o SAP e a tríade catalítica (SAC) (Figura 1). A tríade catalítica está localizada ao fundo da garganta de ambas enzimas sendo composta por três principais aminoácidos (Ser200-His440-Glu327 em AChE; e Ser226-His466-Glu353 em BuChE), responsáveis pelo

catabolismo de ésteres de colina (DIGHE et al, 2016; MASSON & LUSHCHEKINA, 2016; PUNDIR & CHAUHAN, 2012; SINGH et al, 2013).

Figura 1: Representação da acetilcolinesterase.



O sítio catalítico é caracterizado pela presença de subsítio aniônico e subsítio aromático capazes de conferir complementariedade para a interação de ligantes. Adicionalmente, a enzima possui diversos aminoácidos hidrofóbicos ao longo de sua garganta (DVIR et al, 2010; FANG et al, 2011; PUNDIR & CHAUHAN, 2012; SINGH et al, 2013; STODDARD, HAMANN & WADKINS, 2014; TONG et al, 2013).

A região em que ocorre a primeira interação com o ligante é o SAP – que está localizado no início da garganta hidrofóbica. O SAP tem como funções atrair e conduzir o ligante até os outros sítios importantes da enzima (INESTROSA et al, 1996; NORDBERG et al, 2013; PUNDIR & CHAUHAN, 2012; SINGH et al, 2013; STODDARD, HAMANN & WADKINS, 2014; TONG et al, 2013).

Apesar de a BuChE ser considerada como inespecífica, estudos atuais atribuem funções mais específicas que antes não foram postuladas. A maior parte destes estudos relatam a BuChE com o desenvolvimento do sistema nervoso, correguladora da transmissão colinérgica, hidrólise de grelina, e o mais importante: foi observado que a BuChE está aumentada na DA e em outras doenças neurodegenerativas (BRUS et al, 2014; DARVESH, HOPKINS & GEULA, 2003; DARVESH & REID, 2016; FANG et al, 2011; GOK, ZEYBEK & BODUR, 2016;

MASSON & LUSHCHEKINA, 2016; NORDBERG et al, 2013; SCHOPFER, LOCKRIDGE & BRIMIJOIN, 2015).

Na DA, postula-se que a BuChE tenha função compensatória em relação à AChE – que é produzida em neurônios disfuncionais – demonstrando que a inibição da BuChE pode trazer os mesmos efeitos benéficos da inibição de AChE: melhora cognitiva e aquisição da memória (BRUS et al, 2014; SAWATZKY et al 2016). A BuChE no processo patológico é altamente secretada pela neuroglia ao redor de placas amiloides (DARVESH & REID, 2016; GUILLOZET et al, 1997; MAURICE et al, 2016; MESULAM & GEULA, 1994; NORDBERG et al, 2013).

Embora não se saiba o papel principal da BuChE na DA, alguns estudos têm descrito algumas funções tal como o bloqueio da agregação do peptídeo β -amiloide (β A) em placas para fibrilas longas (GUILLOZET et al, 1997; MAURICE et al, 2016; NORDBERG et al, 2013; LUSHCHEKINA et al, 2016). Este processo decorre da interação entre BuChE com o peptídeo β A desacelerando a taxa de formação de fibrilas β A neurotóxicas – *in vitro* (DIAMANT et al, 2006; NORDBERG et al, 2013). Adicionalmente, a BuChE está relacionada com a presença de emaranhados neurofibrilares, cuja associação conduz ao raciocínio de que também seja relevante sua inibição no processo patológico da DA (BRUS et al, 2014; DARVESH, HOPKINS & GEULA, 2003; DARVESH & REID, 2016; MAURICE et al, 2016; NORDBERG et al, 2013).

1.2.2 Hipótese Amiloide

A hipótese amiloide refere-se ao acúmulo do peptídeo β A pelo processo de sua agregação. Este acúmulo ocorre como placas β A no meio extracelular que são formadas por meio de processamento endoproteolítico pós-traducional do precursor de proteína β -amiloide – A β PP ou APP (ARCE et al, 2014; FINDEIS, 2007; LEON, GARCIA & CONTELLES, 2011). Na DA, este processo ocorre irregularmente e/ou com a dificuldade de depuração do peptídeo (HAN, PARK & MOOK-JUNG, 2016).

A obtenção do peptídeo β A ocorre em duas maneiras: *i.* a enzima α -secretase cliva o APP formando o peptídeo β A com 40 aminoácidos (β A₄₀); *ii.* a enzima-1 de

clivagem β -amiloide (BACE-1 – também conhecida como β -secretase) cliva o APP formando peptídeo β A com 42 aminoácidos (β A₄₂), adicionalmente, a ação da enzima γ -secretase cliva os fragmentos restantes. Os peptídeos β A₄₀ e β A₄₂ são conhecidos por sua citotoxicidade, sendo o β A₄₂ de maior toxicidade (CACACE, SLEEGERS & BROECKHOVEN, 2016; COUGHLAN & BREEN, 2000; SORRENTINO et al, 2014; WALSH & TELOW, 2012; WANG, CHEN & CHOU, 2005). Didaticamente estas vias são diferenciadas como não-amiloidogênica e amiloidogênica, respectivamente.

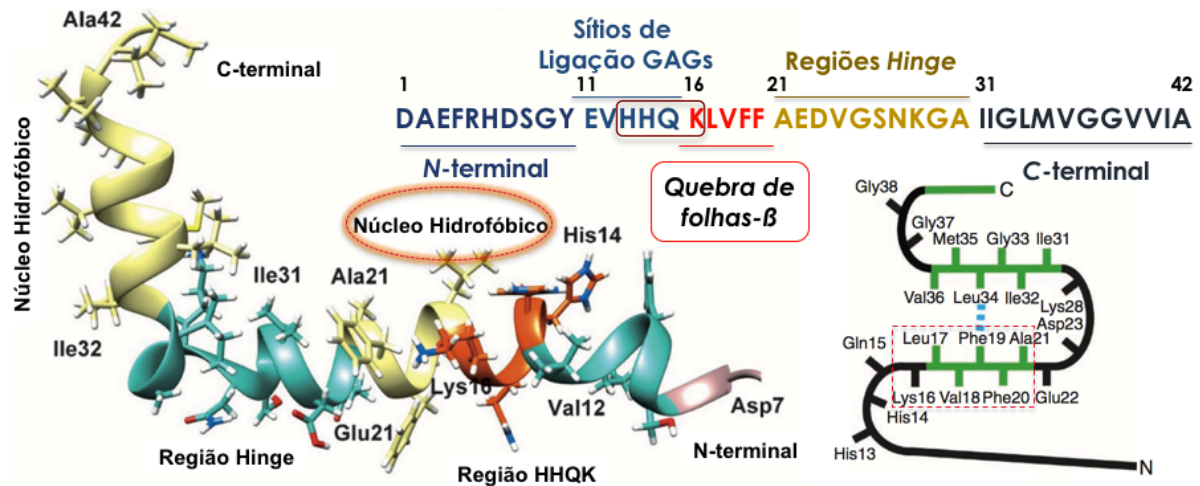
O acúmulo do peptídeo β A tóxico pode alterar a rede neuronal e a função sináptica ocasionando dano cognitivo. Algumas evidências científicas têm demonstrado que a toxicidade pode estar relacionada com a capacidade de o peptídeo interagir com determinados receptores (CLEARY et al, 2004; HAN, PARK & MOOK-JUNG, 2016; MAJI et al, 2009). Esta toxicidade também se relaciona com a formação de estruturas de folhas- β , principalmente para o β A₄₂ como o mais tóxico.

O processo de agregação é o ponto crítico desta via patológica. Estudos indicam que a agregação se inicia pelo processo de nucleação e fibrilogênese tendo como “sementes” as estruturas com maior conteúdo de folhas- β (SOTO et al, 1995; SOTO & CASTAÑO, 1996). Diversos fatores podem induzir o rearranjo da estrutura secundária formando espécies oligoméricas com alto teor de folhas- β , que, por sua vez, são mais resistentes à degradação proteolítica e de difícil depuração (SIMMONS et al, 1994; TOMSKI & MURPHY, 1992; YANG et al, 2010).

Identificar detalhadamente a estrutura deste peptídeo é primordial no desenho e planejamento de estratégias na obtenção de novos potenciais ligantes. Sabe-se que o peptídeo β A apresenta regiões importantes que se associam a diferentes níveis de formação de fibrilas e de agregados, como exemplo, as regiões *N*-terminal e *C*-terminal, o núcleo hidrofóbico e a região de dobradiça ou de “voltas”, como representado na Figura 2 (MISHRA; AYYANNAN & PANDA, 2015).

As regiões de dobradiça de “voltas” são regiões flexíveis entre duas α -hélices que possuem a função de originar as estruturas de folha- β – já que realizam a aproximação de dois segmentos hidrofóbicos. Diversas destas regiões são importantes para a manutenção das folhas- β como: Glu22-Asp23, Val24-Lys28 e a região *C*-terminal. A interferência nestas regiões, conseqüentemente, acarretará na desestabilização das estruturas de folhas- β prejudicando o processo de agregação. (MISHRA, AYYANNAN & PANDA, 2015; MURAKAMI et al, 2005; TYCKO, 2006).

Figura 2: Representação estrutura de βA_{42} .



Fonte: Adaptado de MISHRA, AYYANNAN & PANDA (2015) e AHMED et al (2010).

A região C-terminal – que compreende os resíduos Ile31 até Ala42 – tem sido o alvo de escolha para inibir a formação de folhas- β devido à sua função no processo de oligomerização. Esta região fornece perfil de hidrofobicidade para interação com a bicamada lipídica onde se acumula o peptídeo e se inicia a formação de fibrilas e agregação (MISHRA, AYYANNAN & PANDA, 2015).

O núcleo hidrofóbico vem demonstrando relevância, especialmente na região em que se concentra a sequência KLVFF (aminoácidos Lys16 até Phe20) reconhecida como alvo “ β -sheet breaker” (quebra de folhas- β). Além desta sequência, os aminoácidos Ile32 a Ala42 (IIGLMVGGVVIA) também são considerados como núcleo hidrofóbico importante na direção da formação de fibrilas βA . Entre estas sequências destaca-se a Met35 como o resíduo-chave para desestabilização de oligômeros. Adicionalmente, a ponte salina entre a Lys28 e Glu-22-Asp23 é importante para estabilização da estrutura secundária do peptídeo (BOYD-KIMBALL et al, 2004; MELQUIOND et al, 2008; MISHRA, AYYANNAN & PANDA, 2015; VERDIER & PENKE, 2004; YOSHIKE, AKAGI & TAKASHIMA, 2007).

Ademais, quatro resíduos de aminoácido (His13-His14-Glu15-Lys16 – HHQK) são responsáveis pelo processo de formação dos oligômeros e propagação das fibrilas, também sendo considerados como reforçadores da nucleação βA (MISHRA; AYYANNAN & PANDA, 2015). A agregação do peptídeo βA pode ocorrer em diversas morfologias, as quais induzem diferentes níveis de toxicidade. Os oligômeros, estágio inicial, são mais tóxicos que as fibrilas, consideradas como estágio mais avançado do

processo de agregação (CHIMON et al, 2007; KESHET, GRAY & GOOD, 2010; LEE, FERNANDEZ & GOOD, 2007; MAJI et al, 2009).

A enzima AChE é conhecida também por promover a agregação β A auto-induzida (MASSON & LUSHCHEKINA, 2016), tendo o domínio próximo à região *N*-terminal (aminoácidos Gly7-Ile20) como responsável pela promoção da agregação. Evidências sugerem que a estrutura de “grampo- β ” próxima ao *C*-terminal apresente sequência similar ao β A, podendo também promover a agregação (HOU et al, 2014; MISHRA, AYYANNAN & PANDA, 2015).

1.2.3 Hipótese da Hiperfosforilação de Proteína Tau

A proteína tau está associada à montagem dos microtúbulos que possui como função a estabilização destes pela agregação da tubulina, além disso, esta proteína é abundante tanto no sistema nervoso central como no periférico. Nesta hipótese, ocorre a fosforilação desequilibrada da tau principalmente realizada por quinases (ANNAMALAI et al, 2015; KANDIMALLA et al, 2013; TELL & HILGEROTH, 2013). Quando em estado hiperfosforilado a proteína tau é considerada como forma aberrante, não sendo capaz de exercer sua função, causando a desestabilização de microtúbulos e como resultado seu acúmulo no cérebro com consequente formação dos emaranhados neurofibrilares intracelulares, que também envolve a formação de placas senis extracelulares (DRIVER, ZHOU & LU, 2014; HERNANDEZ et al, 2010; TOLOSA et al, 2014; YE et al, 2013).

Na DA a proteína tau hiperfosforilada promove a dissociação dos microtúbulos e, por conseguinte, a autoagregação provocando lesões morfológicamente diferenciadas (HU et al, 2016). Estas lesões estão associadas com o depósito extracelular de peptídeo β A; porém, também decorrem na sua ausência. Além disso, oligômeros β A podem induzir à fosforilação da proteína tau em culturas de neurônios, aumentando atividade de quinases e sugerindo que β A participa no desenvolvimento desta via (ANNAMALAI et al, 2015; DORARD et al, 2016; TENREIRO, ECKERMANN & OUTEIRO, 2014; TOLNAY & PROBST, 1999).

As quinases são um dos principais fatores relacionados com a fosforilação de tau, que decorrem do aumento de sua atividade e/ou diminuição da atividade de

fosfatases – que ocasionam a desfosforilação da proteína. A glicogênio sintetase quinase 3 β (GSK3 β) é uma das quinases envolvidas na fosforilação de tau. Adicionalmente, a proteína quinase B (Akt) inibe GSK3 β e, conseqüentemente, aumenta a atividade da quinase pela associação com o peptídeo β A. Neste sentido, a inibição da sinalização de GSK3 β pode reduzir a neuropatologia β A e ser considerado como uma das estratégias para tratamento da doença (ANNAMALAI et al, 2015; ENGEL et al, 2006; LLORET et al, 2015; LY et al, 2013; TENREIRO, ECKERMANN & OUTEIRO, 2014; TOWNSEND, MEHTA & SELKOE, 2007).

1.2.4 Outras Hipóteses

Alguns fatores distintos estão relacionados a diversas vias patológicas na DA como os fatores genéticos e ambientais que, atualmente, vêm sendo amplamente estudados. Ressaltando que os fatores genéticos estão intimamente relacionados com o desenvolvimento precoce da doença, cujos genes se apresentam como formas autossômicas dominantes. Neste contexto, quatro mutações genéticas estão entre as mais descritas na literatura: proteína precursora de amiloide (APP), presenilina 1 (PSEN1), presenilina 2 (PSEN2) e o alelo E4 da apolipoproteína E (APOE) (CACACE, SLEEGERS & BROECKHOVEN, 2016; CAUWENBERGHE, BROECKHOVEN & SLEEGERS, 2016)

Um dos genes mais conhecidos é o gene codificador de APP, proteína fundamental na obtenção do peptídeo β A. Sabe-se que este gene possui diversas mutações já caracterizadas que orientam o aumento da produção de β A₄₂ (FINDEIS, 2007; SOLDANO & HASSAN, 2014). Estudos revelam aproximadamente 52 formas patogênicas do gene de APP localizadas próximas ou dentro da sequência de β A, mais especificamente próximo de seu sítio de clivagem (ATES et al, 2016; CACACE, SLEEGERS & BROECKHOVEN, 2016; CAUWENBERGHE, BROECKHOVEN & SLEEGERS, 2016).

O gene da apolipoproteína E (APOE) apresenta a mais conhecida mutação associada na DA. APOE codifica uma glicoproteína polimórfica expressa no fígado, cérebro, macrófagos e monócitos. Sua função se dá no transporte de colesterol bem como na imunoregulação e regeneração neuronal. A apolipoproteína E (ApoE) é

produzida no SNC pelos astrócitos e em menor quantidade pela microglia (BERTRAM & TANZI, 2012; NAJ, CARNEY & HAHN, 2013). Existem três isoformas desta proteína: ApoE2, ApoE3 e ApoE4 – que diferem na sequência de seus aminoácidos – sendo a ApoE4 (alelo Apo ξ 4) relacionada ao aumento do risco do desenvolvimento da DA; apesar disso, isoladamente não é suficiente para causar a doença (ATES et al, 2016; CACACE, SLEEGERS & BROECKHOVEN, 2016; CAWENBERGHE, BROECKHOVEN & SLEEGERS, 2016; VILATELA, LÓPEZ & GÓMEZ, 2012).

PSEN1 e PSEN2 são componentes importantes da γ -secretase. Os genes são altamente homólogos, cujas mutações prejudicam a clivagem mediada por γ -secretase resultando no aumento da proporção de $\beta A_{42}/\beta A_{40}$. As mutações em PSEN1 são geralmente autossômicas dominantes, originando as formas mais severas da doença (CACACE, SLEEGERS & BROECKHOVEN, 2016; CAWENBERGHE, BROECKHOVEN & SLEEGERS, 2016).

Fatores ambientais se correlacionam com a DA destacando o desequilíbrio da homeostase de íons metálicos como alumínio, ferro, zinco e cobre (AYTON, LEI & BUSH, 2013; MANDEL et al, 2007; PITHADIA & LIM, 2012; TIIMAN, PALUMAA & TOUGO, 2013; VILES, 2012; ZATTA et al, 2009). Muitos destes metais têm o potencial de modificar a agregação do peptídeo βA , principalmente na evolução da nucleação (HAN, PARK & JUNG, 2016).

Os íons de cobre (II) e zinco (II) se concentram no ambiente extracelular, particularmente em placas βA , o que, conseqüentemente, induz o aumento de sua produção. Ainda mais, podem interagir com a proteína tau aumentando sua hiperfosforilação. O íon de ferro (II), em contraste aos de cobre e zinco, está localizado no ambiente intracelular e sua principal atividade está associada ao dano oxidativo e à neurodegeneração. Já o íon de alumínio (III) induz a transição conformacional de βA_{40} na estrutura secundária de α -hélice para folha- β (HAN, PARK & JUNG, 2016; MASTERS & SELKOE, 2016).

O estresse oxidativo produzido por alguns destes íons induz ao dano celular. Estudos sugerem que o processo é iniciado pela peroxidação lipídica de sistemas de membrana. A disfunção mitocondrial é um importante – se não o principal – fator envolvido na evolução do estresse oxidativo devido à produção de espécies reativas de oxigênio (BONDA et al, 2010; GREENOUGH, CAMAKARIS & BUSH, 2013;

MOREIRA et al, 2007; QUINTANILLA, ORELLANA & BERNHARDI, 2012; SWOMLEY et al, 2013; TRAMUTOLA et al, 2016; WANG et al, 2013).

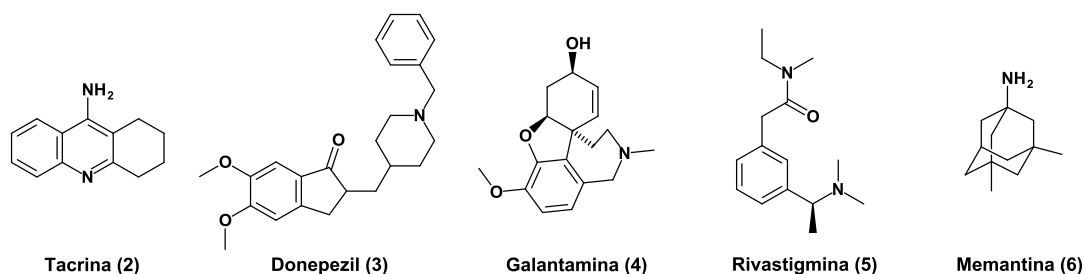
1.3 TRATAMENTO E ALVOS FARMACOLÓGICOS DA DOENÇA DE ALZHEIMER

Os primeiros indícios da gênese da DA foram associados à disfunção colinérgica, o que proporcionou a obtenção de fármacos responsáveis pela restauração dos níveis de acetilcolina pela inibição da AChE. Em virtude disto, desde a última década é possível observar o desenvolvimento de novos compostos dirigidos a diversos alvos terapêuticos já identificados (NYGAARD, 2013). Visto que o paradigma do tratamento voltado a um único alvo terapêutico parece limitado a doenças multifatoriais; decerto por novas descobertas sobre a doença foi reconcebida a estratégia de padrão multidirecionado ou multialvo (ANAND, GILL & MAHDI, 2014).

1.3.1 Inibidores de Colinesterases

Atualmente o tratamento da DA é direcionado à sintomatologia da doença apresentando como alternativas terapêuticas os inibidores de colinesterases, especialmente os inibidores da AChE (iAChE). Estes são capazes de inibir a enzima que degrada ACh e diminuir os sintomas cognitivos presentes na doença. Os primeiros fármacos desenvolvidos a partir desta via foram: tacrina (2), donepezil (3), galantamina (4) e rivastigmina (5), representados na Figura 3 (LEON, GARCIA & CONTELLES, 2011; GROSSBERG, 2003; LOPES, 2011).

Figura 3: Inibidores da AChE.



Em 1993, o primeiro representante destes fármacos a ser comercializado foi a tacrina (**2**, Figura **3**), como inibidor reversível não-competitivo da AChE; conquanto seu uso foi descontinuado nos Estados Unidos, devido à hepatotoxicidade. Posteriormente, no ano de 1996, o inibidor seletivo e reversível – donepezil (**3**) – foi introduzido no mercado. Nos anos seguintes, foi descoberto o único representante derivado de produto natural comercializado: a galantamina (**4**), um alcaloide inibidor competitivo reversível da AChE. O único inibidor pseudoirreversível destes representantes é a rivastigmina (**5**), cuja hidrólise da subunidade carbamato para restauração da enzima é lenta (BOLOGNESI et al, 2008; MEHTA, ADEM & SABBAGH, 2012; SIMÕES et al, 2014; SOUZA, RENNÃ & FIGUEROA-VILLAR, 2016; ROCHA et al, 2011; SCHNEIDER, 2001; SUGIMOTO et al, 2002).

A memantina (**6**, Figura **3**) – última a ser introduzida no mercado – inibe o sistema glutamatérgico via antagonismo de receptores NMDA (*N*-metil-*D*-aspartato), causando uma resposta neuroprotetora frente à citotoxicidade de glutamato. O excesso de glutamato é conhecido por causar grande influxo de cálcio no interior do neurônio conduzindo-o à morte (ROCHA et al, 2011; SIMÕES et al, 2014; SOUZA, RENNÃ & FIGUEROA-VILLAR, 2016).

Atualmente, o tratamento de primeira escolha da DA tem como base o uso memantina (**6**) associado aos inibidores da AChE, como exemplo a associação entre **6** e donepezil (**3**) (BRASIL, 2017). Todos estes fármacos apresentam bons efeitos na melhora da sintomatologia da doença, porém nenhum é capaz de promover sua cura. Com isto, novos estudos e pesquisas no desenvolvimento de ligantes vêm sendo realizados com objetivo de melhorar a qualidade de vida dos pacientes (FANG et al, 2008; SIMÕES et al, 2014).

1.3.2 Ligantes Duais da AChE

O desenvolvimento de ligantes duais relacionados à DA constitui uma nova estratégia. Nesta abordagem, estes ligantes atuam na inibição de AChE e têm sido considerados promissores uma vez que são capazes de inibir simultaneamente os dois sítios da enzima: o sítio aniônico periférico (SAP) e o sítio aniônico catalítico (SAC). Estes derivados duais, potencialmente, podem ser capazes de inibir a

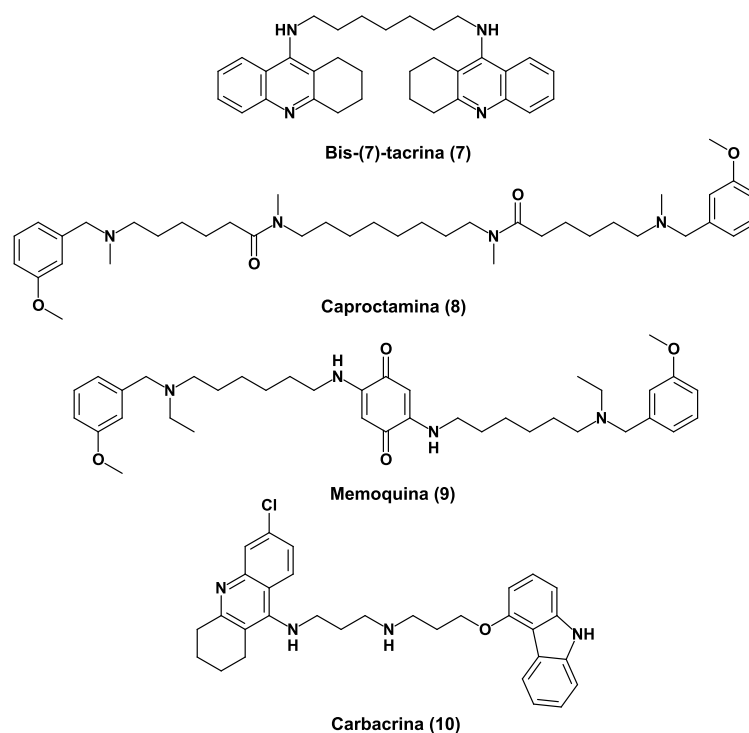
agregação β A induzida pela AChE em face das interações com o SAP. O donepezil (**3**) se mostrou capaz de interagir de maneira dual, apresentando como resposta a diminuição da agregação β A induzida pela AChE em 21%. Desta forma, **3** e outros ligantes disponíveis serviram como modelos para modificações moleculares visando à obtenção de novos ligantes duais (BAJDA et al, 2011; BOLOGNESI et al, 2008; LEON, GARCIA & CONTELLES, 2011; SIMÕES et al, 2014).

Um dos primeiros representantes, o homodímero bis-(7)-tacrina (**7**), foi capaz de inibir ambas colinesterases AChE (CI_{50} 0,40 nM) e BuChE, e diminuir agregação β A induzida por AChE, com adicional perfil antagonista de receptores NMDA. Estes resultados culminaram na geração de outros compostos homodímeros – ligantes com iguais subunidades no arcabouço molecular – e heterodímeros – ligantes com diferentes subunidades no arcabouço molecular – que apresentaram crescente evolução no planejamento de novos inibidores multialvo (DU & CARLIER, 2004; BOLOGNESI et al, 2008; MUNOZ-TORRERO et al, 2006; PANG et al, 1996).

Posteriormente, em 1998, pesquisadores da Universidade de Bologna desenvolveram a caproctamina (**8**), na época considerada como promissor iAChE dual (CI_{50} 0,17 μ M) e modulador do receptor muscarínico M2, colaborando com a liberação de ACh (BOLOGNESI, CAVALLI & MELCHIORRE, 2009). O mesmo grupo, baseado na estrutura de **8**, planejou novos ligantes a partir da substituição do espaçador octametileno – entre as duas funções amidas – e troca dos substituintes das funções aminas gerando a memoquina (**9**) com atividade anticolinesterásica (AChE CI_{50} 1,55 nM; BuChE CI_{50} 144 nM) bem como antiagregante β A (Inibição da agregação induzida por AChE de 87% e auto-induzida de 66%) e de BACE-1 (inibição > 80%), sendo considerado como ligante multialvo (BOLOGNESI et al, 2008; BOLOGNESI et al, 2011; TUMIATTI et al, 2004).

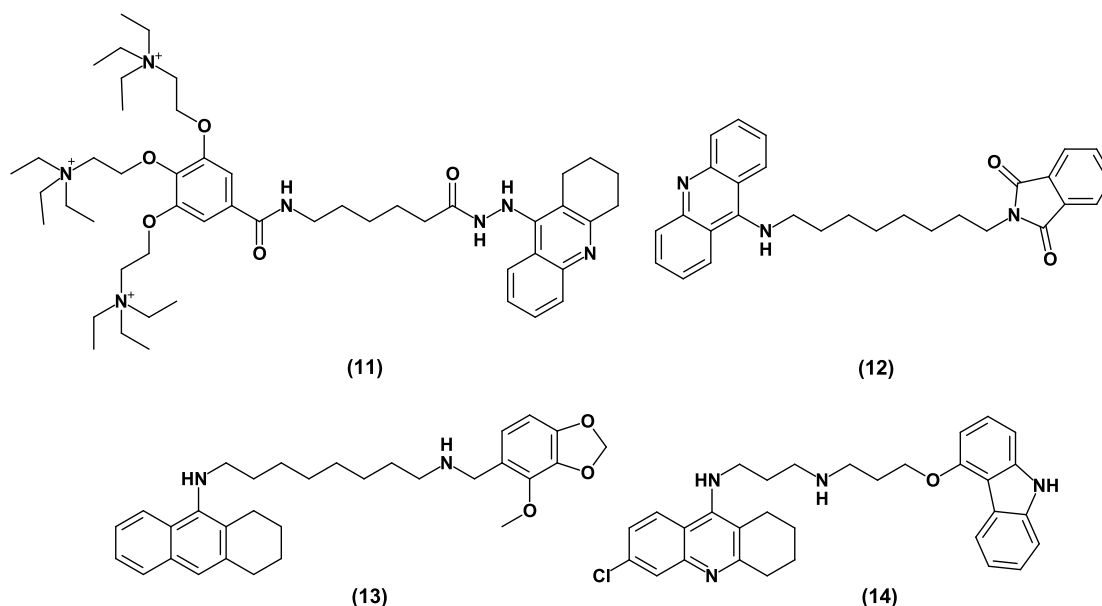
O ligante dual carbacrina (**10**) foi obtido pelo estudo de compostos conectados à subunidade carbazol, presente no fármaco anti-hipertensivo carvedilol, conhecido pelos efeitos antioxidantes e neuroprotetores. Ademais, é capaz de inibir a formação de fibrilas β A. Por isto, **10**, além de interagir com ambos sítio catalítico e SAP, apresentou atividade antiagregante com 57,7% de inibição, antagonismo NMDA (CI_{50} 0,74 μ M), e antioxidante (CI_{50} 23 μ M) (BOLOGNESI et al, 2009; HOWLETT et al, 1999).

Figura 4: Inibidores duais da AChE.



Sob esta perspectiva, novos ligantes duais foram descritos na literatura como o derivado **11** (Figura 5), baseado em ambas as estruturas da tacrina (**2**) e galamina – agente muscarínico alostérico que em altas concentrações inibe colinesterases. O derivado **11** demonstrou atividade iAChE (CI_{50} 23,2 nM) e modulação dos receptores muscarínicos M2 (BOLOGNESI et al, 2008; ELSINGHORST et al, 2007; ELSINGHORST, TANARRO & GÜTSCHOW, 2006). O híbrido entre **2** e donepezil (**3**) deu origem ao derivado **12** que inibe AChE (CI_{50} 2,4 nM) de forma dual com atividade iBuChE (CI_{50} 90 nM) (ALONSO et al, 2005). Outros heterodímeros, baseados entre tacrina (**2**) e separados por cadeia hidrofóbica, foram sintetizados por LUO et al (2011) destacando **13** (AChE CI_{50} 7,98 nM; BuChE CI_{50} 7,94 nM; inibição da agregação β A induzida: 65,1%) e **14** (AChE CI_{50} 22,41 nM; BuChE CI_{50} 2,59 nM).

Figura 5: Novos inibidores duais da AChE.



1.3.3 Agentes Capazes de Atuar na Agregação Amiloide

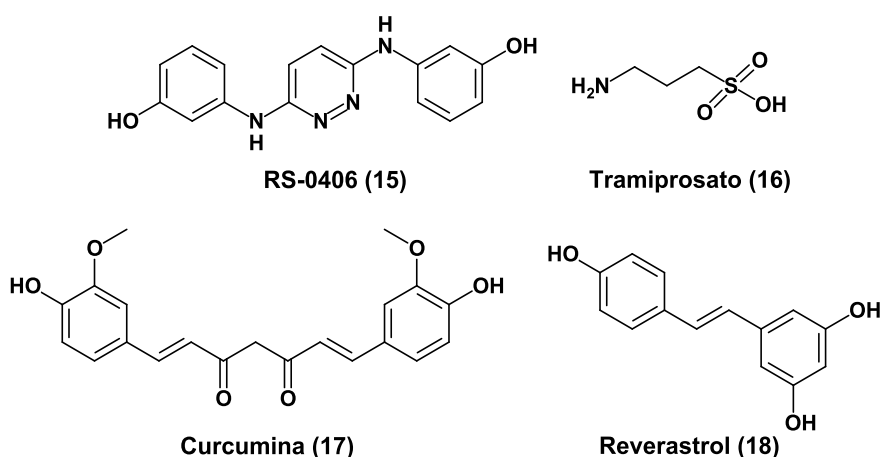
Existem diversos alvos na via de agregação amiloide cuja inibição da formação de agregados tem se demonstrado promissora. Uma das estratégias abordadas compreende a desestabilização das estruturas secundárias e terciárias do peptídeo β A, geralmente feita por agentes peptidomiméticos – que são de mais fácil interação – mas também por pequenas moléculas (MISHRA, AYYANNAN & PANDA 2015).

Para este fim, a estratégia racional visa a ligantes capazes de interagir entre os peptídeos, formando um obstáculo estéreo para o bloqueio da agregação em placas amiloides; ou até mesmo na interferência das estruturas de folhas- β , responsáveis pela toxicidade. Como antecipado, a inibição do SAP da AChE também é capaz de regular a agregação, porém somente nos processos induzidos pela enzima (MISHRA, AYYANNAN & PANDA, 2015).

Componentes peptidomiméticos têm sido descritos na literatura tendo como principal alvo os aminoácidos KLVFF (núcleo hidrofóbico, Figura 2). É importante ressaltar o derivado RS-0406 (15, Figura 6), molécula não-peptídica capaz de inibir a fibrilogênese de β A₄₂, diminuindo a citotoxicidade (MISHRA, AYYANNAN & PANDA, 2015; NAKAGAMI et al, 2002). Já o tramiprosato (16) atua na sequência HHQK

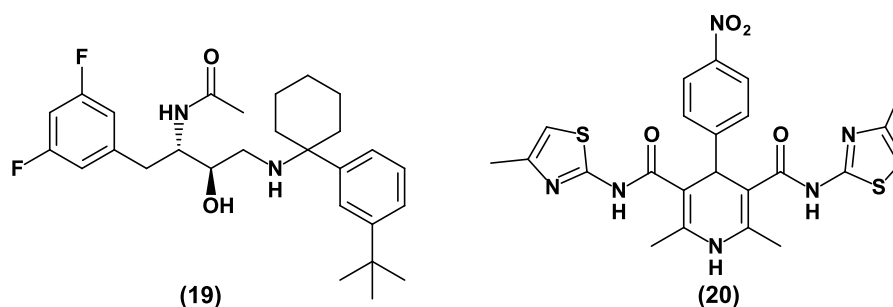
(Figura 2), demonstrando relevante inibição da agregação e da fibrilogênese (GERVAIS et al, 2007; MISHRA; AYYANNAN & PANDA, 2015). Outra pequena molécula capaz de interagir com o peptídeo β A é a curcumina (17), que altera as interações intermoleculares de agregados. Pesquisadores também descreveram o reverastrol (18) atuando de forma similar à 17, e o iAChE galantamina (4) que rompe as interações aromáticas π - π entre a Phe29 e Phe19 (LI et al, 2014; LI, WANG & KONG, 2014; LU et al, 2013; MISHRA, AYYANNAN & PANDA, 2015; MITHU et al, 2014; RAO, MOHAMED & OSMAN, 2013).

Figura 6: Agentes que atuam por interação direta com peptídeo β A.



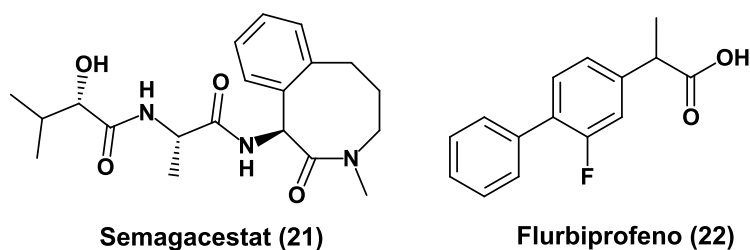
O desenvolvimento de novos compostos direcionados à inibição de secretases como a BACE-1 também é viável. A maioria dos ligantes desta classe utilizam arcabouço molecular contendo a subunidade hidroxietilamina (HEA) tal como 19 (RAYMOND et al, 2013) e derivados ciclo-hexilamínicos como 20 (Figura 7) (RAZZAGHI-ASL et al, 2013), responsáveis pela interação com a secretase (BACK et al, 2008; LIU et al, 2014; TAYEB et al, 2012; TROUNG et al, 2010).

Figura 7: Inibidores da BACE-1.



Outras substâncias como inibidores da enzima γ -secretase também são atrativas devido à diminuição da produção de βA_{42} ; entretanto, estes inibidores podem ocasionar patologias gastrointestinais, assim também como alteração na diferenciação de linfócitos (MISHRA, AYYANNAN & PANDA, 2015; TAYEB et al, 2012). Como exemplo, o protótipo semagacestat (**21**) é um bom inibidor de γ -secretase (Figura 8), porém não prosseguiu além dos ensaios clínicos de fase III (HALL & PATEL, 2012). Alguns anti-inflamatórios não-esteroidais (AINEs) também são capazes de inibir a γ -secretase, como exemplo o flurbiprofeno (**22**, Figura 8) (KUROSUMI et al, 2010).

Figura 8: Inibidores da γ -secretase.



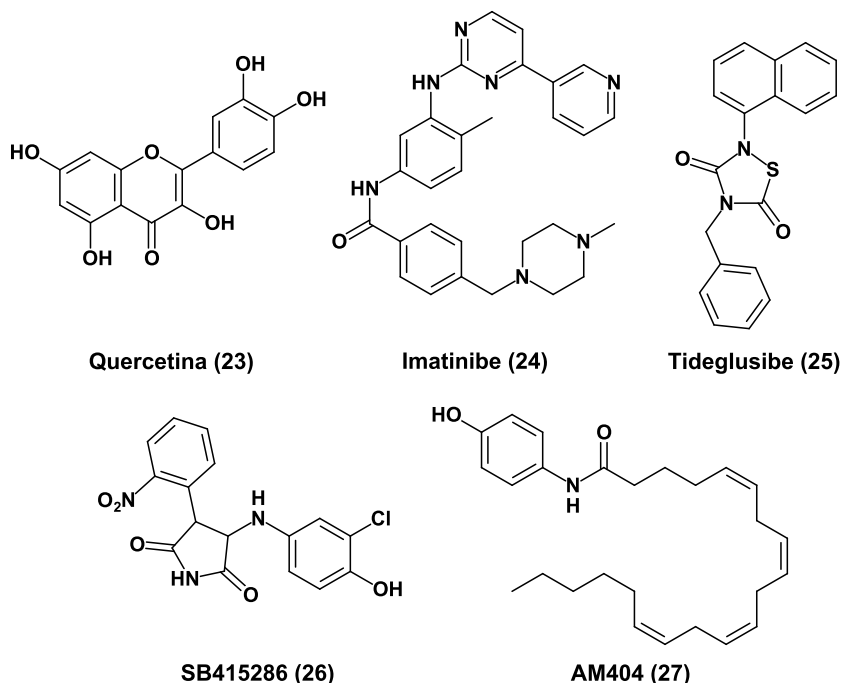
1.3.4 Inibidores da Fosforilação da Proteína Tau

A desregulação nas vias que envolvem a fosforilação da proteína tau pode aumentar de forma descontrolada o processo observado na DA. Logo, novos ligantes foram desenvolvidos na tentativa de regular esta via. O flavonoide quercertina (**23**, Figura 9) é capaz de ativar AMPK (proteína quinase ativada por AMP) bloqueando a fosforilação de tau sob condições de estresse oxidativo (CHEN et al, 2016). Outro exemplo, o imatinibe (**24**) – fármaco antineoplásico – atua interferindo na interação entre γ -secretase e proteína ativadora de γ -secretase diminuindo a formação de βA (GARDNER et al, 2016).

Tideglusibe (**25**), inibidor GSK3 β , foi responsável pela diminuição da quantidade de placas amiloide e do déficit de memória em ensaios pré-clínicos; porém, os ensaios não foram continuados devido à atividade apresentada não ter sido estatisticamente significativa quando comparado os grupo de tratamento e controle

(GODYN et al, 2016). Outros inibidores de GSK3 β : SB415286 (**26**) e AM404 (**27**) reduzem a agregação de proteína tau. Adicionalmente, **27** é capaz de inibir o transporte de anandamida (COGHLAN et al, 2000; ROGOSCH et al, 2012).

Figura 9: Inibidores da fosforilação da proteína tau.



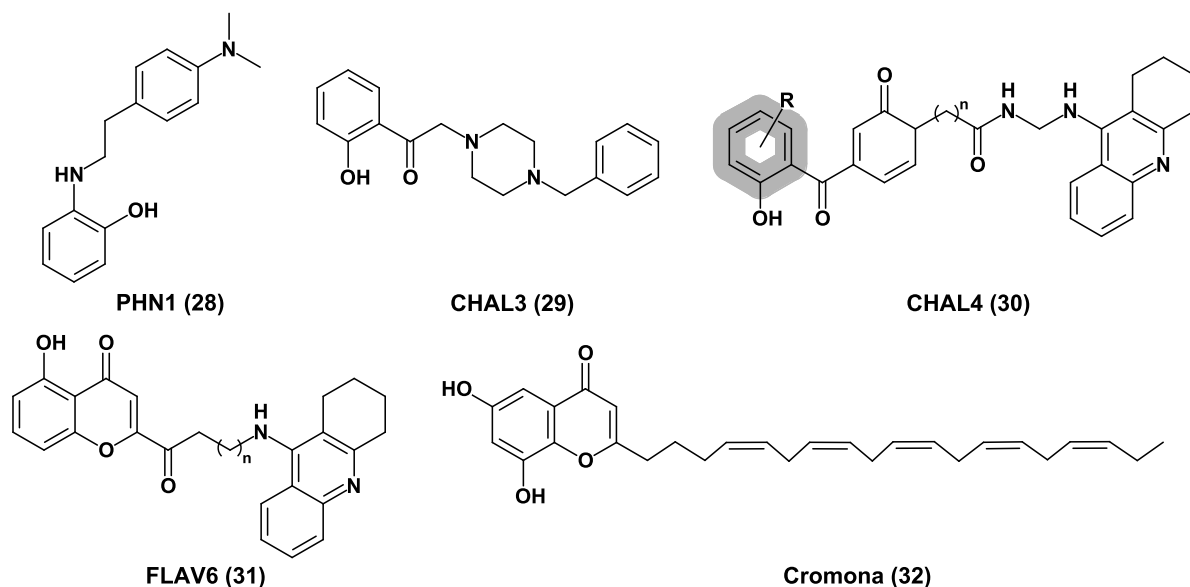
1.3.5 Agentes Quelantes e Antioxidantes

Compostos antioxidantes e quelantes têm sido amplamente desenvolvidos como os sintetizados por MAO e colaboradores (2012) que demonstraram atividade iAChE, antioxidante moderada, inibição da agregação β A e quelante com diversos íons metálicos. Neste contexto, a amina fenólica PHN1 (**28**, Figura 10) apresentou ação quelante preferencialmente com íons cobre podendo também modular a agregação β A induzida por este íon (SAVELIEFF et al, 2014).

Alguns derivados planejados a partir de chalcona, além de atividade iAChE, foram relatados com ação antioxidante e quelante como: CHAL3 (**29**) e CHAL4 (**30**) (SANTOS, CHAND & CHAVES, 2016; ZHOU et al, 2015). Por sua vez, LI e colaboradores (2013) desenvolveram o derivado FLAV6 (**31**), quelante de cobre e ferro, com atividade iAChE de maneira dual, ou seja, interage com ambos os sítios

aniônico periférico e catalítico. Ademais, **31** inibe a agregação β A induzida pela AChE. A cromona (**32**), produto natural de ácido graxo poliinsaturado, demonstrou boa atividade antioxidante (GASPAR et al, 2015).

Figura 10: Agentes quelantes e antioxidantes.



1.4 A BIODIVERSIDADE APLICADA À DOENÇA DE ALZHEIMER

Compostos obtidos da biodiversidade nos oferecem potenciais atividades terapêuticas, algumas delas são relatadas na literatura como sendo capazes de atuar nas vias relacionadas com a DA. Diversos destes produtos naturais são estudados como potenciais “protótipos” para modificações químicas visando à melhora de sua atividade (CAMPOS et al, 2011; ROCHA et al, 2011).

Estudos têm demonstrado que componentes do extrato de *ginseng* são capazes de atenuar a ativação de receptores NMDA, diminuindo os processos neurodegenerativos (KIM et al, 2002; KIM et al, 2004). O *Ginkgo biloba* é utilizado na medicina tradicional Chinesa com relatos de potencial uso na disfunção cognitiva, possuindo ainda propriedades antioxidativas que são consideradas neuroprotetoras (BASTIANETTO et al, 2000; TOPIC et al, 2002).

Na medicina tradicional Indiana, *Celastrus paniculatus* tem sido utilizado para melhora da cognição (KUMAR & GUPTA, 2002; ROCHA et al, 2011). Neste mesmo

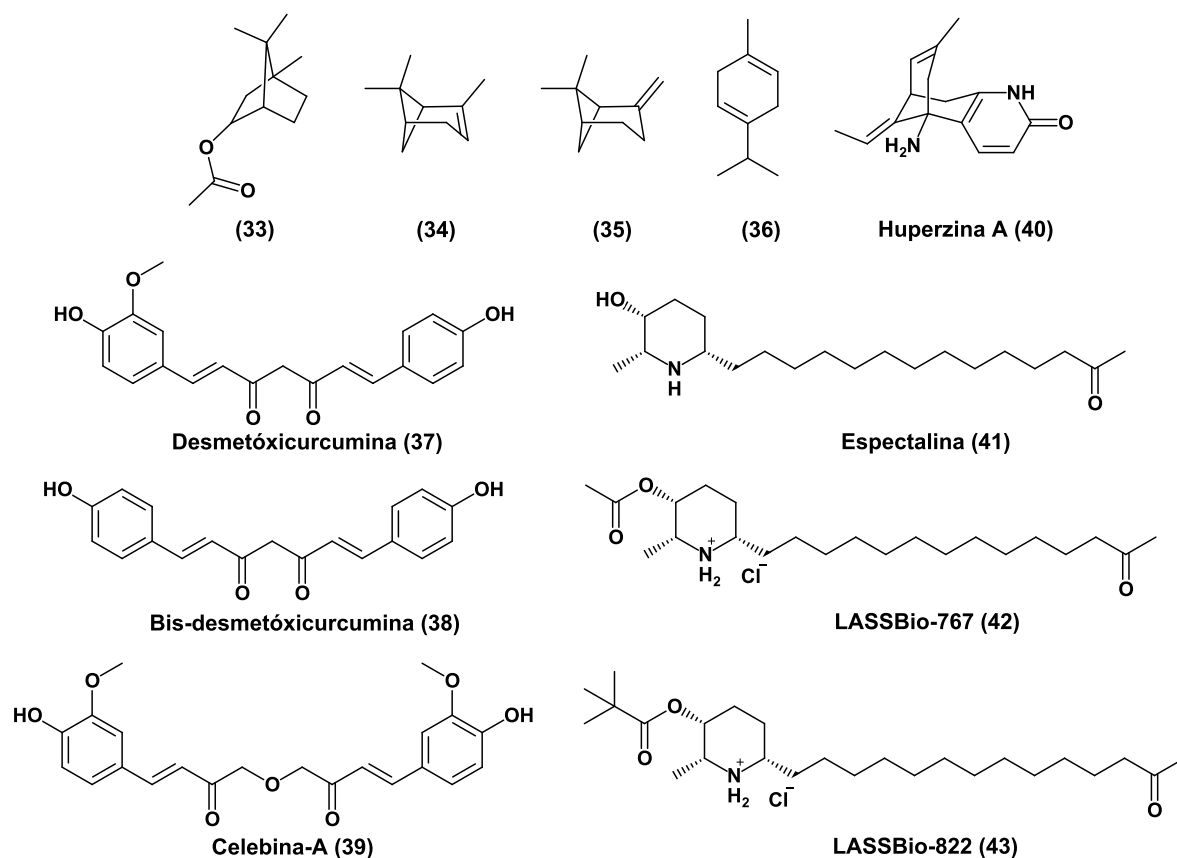
contexto, óleos essenciais de *Centella asiática* constituídos em sua maioria por monoterpenos, como: acetato de bornila (**33**), α -pineno (**34**), β -pineno (**35**) e δ -pineno (**36**), foram identificados como inibidores de AChE demonstrados na Figura 11 (MIYAZAWA, WATANABE & KAMEOKA, 1997; PERRY et al, 2000).

A *Curcuma longa* vem sendo amplamente estudada para o tratamento de doenças neurodegenerativas. Seus rizomas são ricos em curcumina (**17**, Figura 6, pág 33) amplamente utilizada no continente asiático. **17** é conhecida por suas atividades antioxidante, anti-inflamatória e neuroprotetora contra a morte neuronal induzida pelo β A. Alguns outros componentes da *Curcuma longa* tais como desmetóxicurcumina (**37**), bis-desmetóxicurcumina (**38**) e celebina-A (**39**, Figura 11) também são capazes de proteger as células da toxicidade β A (DAS & DAS, 2002; MANCUSO et al, 2012; MIQUEL et al, 2002; KHANNA et al, 2009; KIM & KIM, 2001; PARK & KIM, 2002; SILVA et al, 2014; YAN et al, 2009).

A erva *Huperzia serrata* é largamente empregada na medicina chinesa, tendo como principal componente a huperzina A (**40**), alcaloide inibidor irreversível de AChE com maior biodisponibilidade e potência que a tacrina (**2**) e donepezil (**3**). Além disso, **40** demonstrou atividade antagonista NMDA sendo protetor contra a toxicidade de glutamato (MANCUSO et al, 2012; ROCHA et al, 2011; SILVA et al, 2014; YAN et al, 2009). Galantamina (**4**, Figura 3, pág 29), alcaloide isolado de *Lycoris radiata* e de *Galanthus nivalis*, é um dos fármacos (iAChE) aprovados para o tratamento da DA que apresenta melhora na cognição (WILCOCK, LILIENTFELD & GAENS, 2000; WILKINSON & MURRAY, 2001).

O alcaloide piperidínico espectralina (**41**, Figura 11), extraído das flores de *Senna spectabilis*, possui estrutura química que mimetiza o neurotransmissor acetilcolina com estereoquímica peculiar. Visando esta particularidade, VIEGAS e colaboradores (2005) realizaram modificações moleculares obtendo os ligantes LASSBio-767 (**42**) e LASSBio-822 (**43**, Figura 11) (CASTRO et al, 2008; FANG et al, 2014).

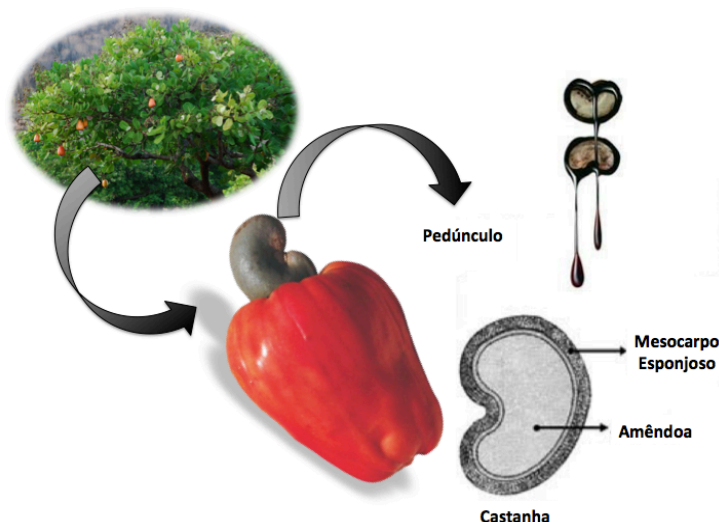
Figura 11: Agentes naturais e planejados a partir de compostos naturais.



1.5 O LÍQUIDO DA CASCA DA CASTANHA DE CAJU (LCC)

O cajueiro (*Anacardium occidentale*), membro da família Anacardiaceae, é originário do Brasil e presente na Ásia e no continente Africano. O cajueiro produz o fruto mais conhecido como castanha de caju, que é protegida por uma casca que contém em seus alvéolos um óleo de coloração quase negra denominado de líquido da casca da castanha de caju (LCC) (MAZZETTO, LOMONACO & MELE, 2009; OLIVEIRA et al, 2011).

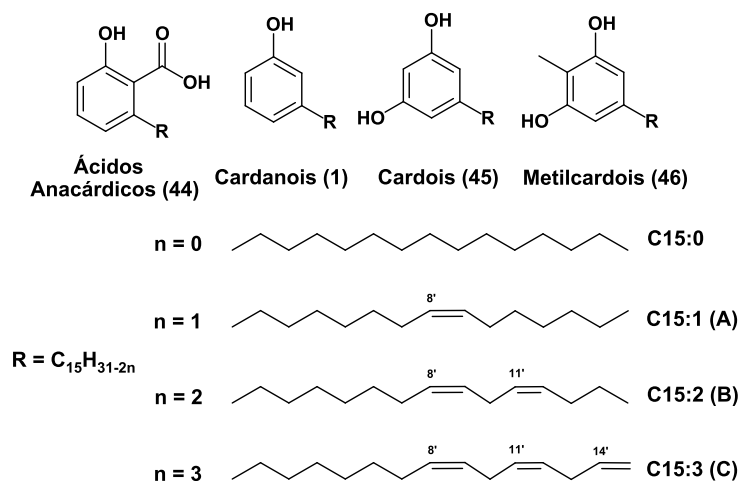
Figura 12: Representação do caju/LCC.



Fonte: Baseado em MAZZETTO, LOMONACO & MELE (2009).

O LCC constitui cerca de 18 a 27% do peso total da castanha sendo considerado como um dos subprodutos do agronegócio do caju; porém tem se tornado de grande interesse em diversas áreas (BALACHANDRAN et al, 2013; GEDAM & SAMPATHKUMARAN, 1986; HARVEY & CAPLAN, 1940; MAZZETTO, LOMONACO & MELE, 2009). O LCC é constituído principalmente de lipídeos fenólicos não-isoprenoides caracterizados por apresentarem um anel aromático com pelo menos um grupo fenólico, e uma cadeia lateral com quinze carbonos, a qual pode ser saturada ou conter no máximo três insaturações (monoeno A C15:1 – C8:C9; dieno B C15:2 – C8:C9, C11:C12; e trieno C C15:3 – C8:C9, C11:C12 e C14:C15) (Figura 13). Os principais derivados fenólicos do LCC apresentam-se como misturas de ácidos anacárdicos (44), cardanois (1), cardois (45) e metilcardois (46) (BALACHANDRAN et al, 2013; PATEL, BANDYOPADHYAY & GANESH, 2006; KUMAR et al, 2002).

Figura 13: Principais componentes do LCC.



A quantidade dos constituintes do LCC é principalmente determinada pelo método de extração que fornece basicamente dois extratos brutos: o LCC natural e o LCC técnico. O LCC natural é obtido por meio de extração à frio, por solvente ou por processo térmico-mecânico. Já o LCC técnico é obtido em altas temperaturas (acima de 200 °C) com a conseqüente descarboxilação da mistura de ácidos anacárdicos (**44**) e conversão em mistura de cardanois (**1**). Por isto as concentrações de **1** são maiores no LCC técnico (BALACHANDRAN et al, 2013; KUMAR et al, 2002; MAZZETTO, LOMONACO & MELE, 2009; YULIANA, TRAN-THI & JU, 2012).

Tabela 1: Composição – LCC técnico e LCC natural.

Componentes Fenólicos	LCC Natural (%)	LCC Técnico (%)
Ácidos Anacárdicos (44)	71,7 – 82,0	1,0 – 1,7
Cardanois (1)	1,6 – 9,2	67,8 – 94,6
Cardois (45)	13,8 – 20,1	3,8 – 18,8
2-Metilcardois (46)	1,6 – 3,9	1,2 – 4,1
Componentes Minoritários	2,2	3,0 – 3,9
Material Polimérico	–	0,3 – 21,6

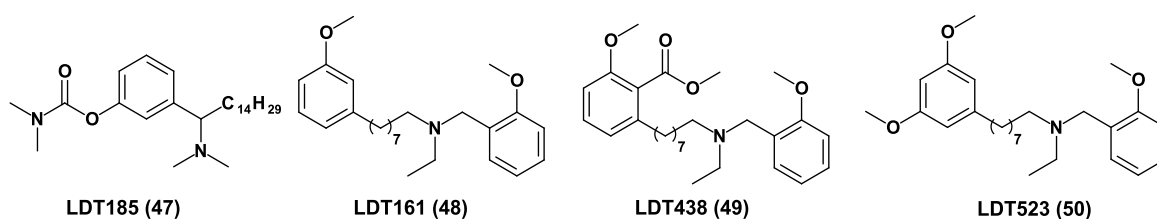
Fonte: MAZZETTO, LOMONACO & MELE (2009)

Os compostos derivados do LCC têm se mostrado promissores no desenvolvimento de produtos industriais e biotecnológicos aplicados à indústria e também à saúde (MAZZETTO, LOMONACO & MELE, 2009; STASIUK, BARTOSIEWICZ & KOZUBEC, 2008). Neste sentido, os compostos fenólicos presentes no líquido da casca da castanha de caju são conhecidos por seus efeitos anticancerígenos, anti-inflamatórios e antioxidantes (KUMAR et al, 2002; MAIA et al 2015; OLIVEIRA et al, 2011). STASIUK, BARTOSIEWICZ & KOZUBEC (2008) avaliaram o perfil anticolinesterásico destes compostos que demonstraram atividade inibitória moderada para cardol (**45**, Cl_{50} 15 μ M) e ácido anacárdico (**44**, Cl_{50} 22 μ M), enquanto que cardanol (**1**) e metilcardol (**46**) não inibiram a AChE. Estudos prévios em nosso laboratório demonstraram que a partir de modificações químicas é possível fazer com que o cardanol (**1**) apresente atividade anticolinesterásica. Com isto, o derivado LDT185 (**47**, Figura **14**) foi obtido como análogo da rivastigmina (**5**) mantendo a cadeia alquílica a fim de mimetizar a cadeia de LASSBio-767 (**42**), apresentando Cl_{50} 50,0 μ M para AChE (PAULA et al, 2007; PAULA et al, 2009).

Novos estudos para síntese de inibidores da AChE – de enguia e humana – e BuChE (equina) utilizando como arca-bouço estrutural cardanol (**1**), ácido anacárdico (**44**) e cardol (**45**) foram realizados com diferentes classes de amins: alquilaminas

(dietilamina); cicloalquilaminas heterocíclicas (piperidina e seus bioisómeros); e alquilarilaminas (benzilaminas) – incluindo a subunidade farmacofórica 2-metóxi-benzilamina presente na memoquina (**9**) nesta última classe. Foram identificados os compostos LDT161 (**48**, *EeAChE* Cl_{50} 6,6 μ M; *hAChE* Cl_{50} 5,6 μ M; *EeBuChE* Cl_{50} 5,6 μ M) (LEMES, 2013; LEMES et al, 2016), LDT438 (**49**, *EeAChE* Cl_{50} 4,4 μ M; *hAChE* Cl_{50} 6,2 μ M) (FERNANDES, 2014) e LDT523 (**50**, *EeAChE* Cl_{50} 3,28 μ M; *hAChE* Cl_{50} 3,3 μ M) (RAMOS, 2014). Os resultados obtidos para os derivados contendo a subunidade benzilamina conduziram à ideia do desenvolvimento de ligantes duais a partir da mistura de cardanois (**1A-C**).

Figura 14: Derivados LDT185 (**47**), LDT161 (**48**), LDT438 (**49**) e LDT523 (**50**).

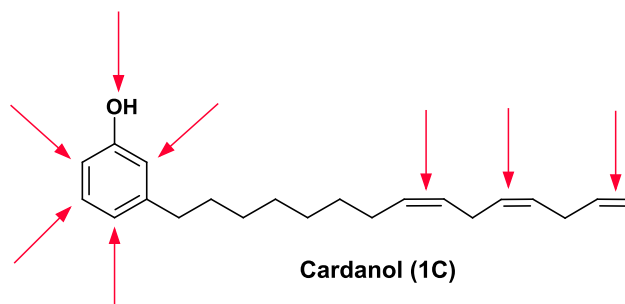


1.5.1 Aplicação do Cardanol (**1**) no Desenvolvimento de Agentes Terapêuticos

O cardanol (**1**) e suas misturas insaturadas (**1A-C**) apresentam diferentes perfis de atividades biológicas como atividade antimicrobiana, antitumoral e antioxidante; porém demonstra alto nível de toxicidade, o que limita sua aplicação sem modificações estruturais que minimizem estes efeitos adversos (MAHATA et al, 2014). Apesar dos derivados saturados e insaturados do cardanol não demonstrarem atividade frente à AChE, PAULA e colaboradores (2009) planejaram e sintetizaram novos compostos análogos da rivastigmina que foram capazes de inibir a enzima em concentração micromolar. Estes novos derivados possuem características eletrônicas, estruturais e hidrofóbicas relevantes para o reconhecimento pela AChE.

Os cardanois (**1A-C**), encontrado como mistura de cardanois em ambos LCC (natural e técnico), possuem três diferentes insaturações em sua cadeia lateral: (I) uma insaturação no carbono 8 (**1A**, C15:0); (II) duas insaturações nos carbonos 8 e 11 (**1B**, C15:2); e (III) três insaturações nos carbonos 8, 11 e 14 (**1C**, C15:3). Ademais, o cardanol (**1**, Figura 15) provê diversas regiões passíveis de modificações químicas.

Figura 15: Cardanol (1) – possíveis alvos para modificações moleculares.



Como exemplos de regiões para modificações químicas se tem: a hidroxila fenólica reativa, a cadeia *meta*-alquílica com diferentes insaturações (contribuindo também com os perfis anfifílico e hidrofóbico), e o anel aromático que permite sua funcionalização. Estes fatores fazem do cardanol saturado (1) e suas misturas (1A-C) bons precursores para modificações químicas visando ao desenvolvimento de novos agentes terapêuticos (BALACHANDRAN et al, 2013) e potenciais ligantes como os derivados LDT185 (47), LDT161 (48), LDT438 (49) e LDT523 (50), citados anteriormente (FERNANDES, 2014; LEMES, 2013; LEMES et al, 2016; PAULA et al, 2007; PAULA et al, 2009; RAMOS, 2014).

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

O presente estudo tem como objetivo o uso da mistura de cardanois (**1A-C**) na obtenção racional de novos ligantes candidatos ao perfil biológico multialvo para o tratamento da doença de Alzheimer.

2.1.1 Objetivos Específicos

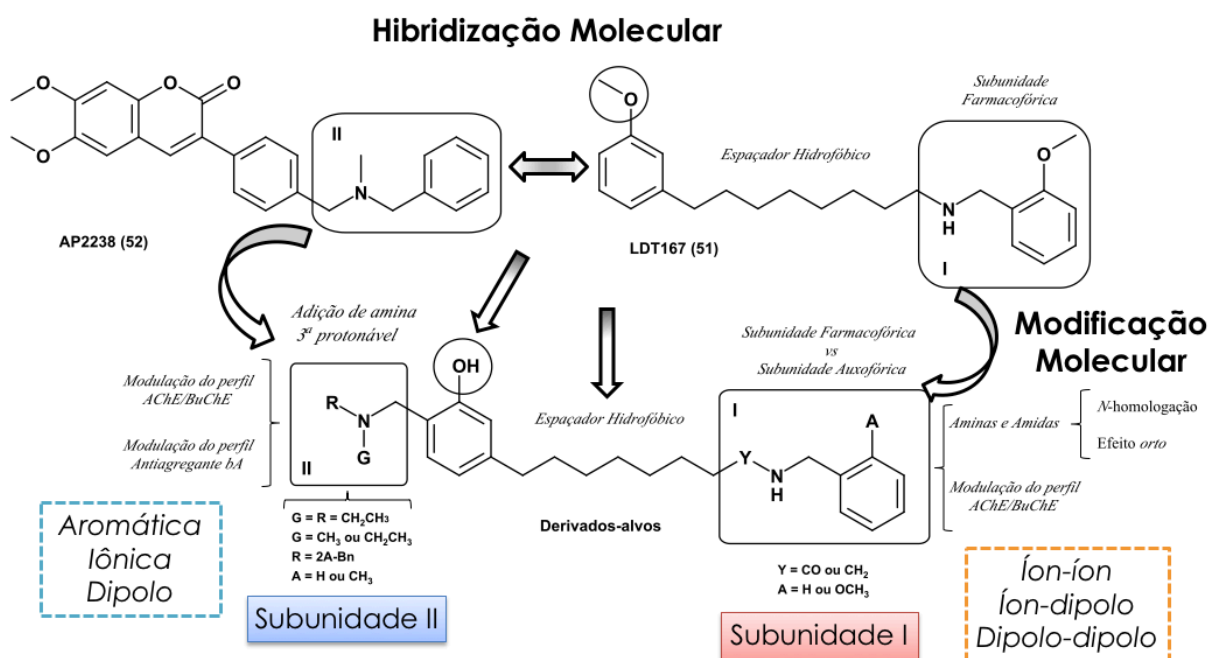
Compreendem os objetivos específicos:

- A síntese e a caracterização dos intermediários e produtos finais;
- A avaliação do perfil biológico *in vitro* dos compostos-alvo quanto às atividades:
 - Anticolinesterásica (AChE/BuChE) em modelos experimentais *in vitro*;
 - Inibição de agregação de peptídeo β -amiloide;
 - Predição da permeabilidade da barreira hematoencefálica; e
 - Inibição de espécies reativas de oxigênio.
- Estabelecimento de relação estrutura química-atividade biológica dos compostos-alvo.

3 PLANEJAMENTO ESTRUTURAL

Os derivados-alvo foram planejados a partir da estratégia de hibridização molecular entre o derivado benzilamínico LDT167 (**51**, *EeAChE* (Cl_{50} 17,2 μ M) e o derivado cumarínico AP2238 (**52**, *hAChE/hBuChE* (Cl_{50} 44,5 nM/ Cl_{50} 48,9 pM) (Figura 16).

Figura 16: Planejamento das modificações estruturais no derivado LDT167 (**53**) e AP2238 (**54**).



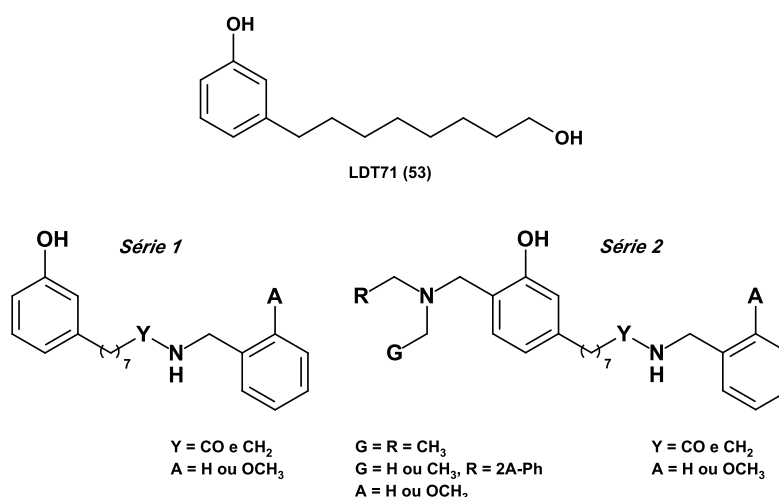
O planejamento dos novos derivados foi idealizado a partir de estratégias de modificação molecular na subunidade farmacofórica de LDT167 (**51**) – grupo 2-metóxi-benzilamina – por meio da obtenção de benzilamidas e benzilaminas secundárias visando identificar a relevância das interações íon-íon, íon-dipolo e dipolo-dipolo na modulação do perfil de atividade (Subunidade I). Adicionalmente, o padrão de substituição no anel aromático em **A** (H ou CH₃O) visa explorar os efeitos eletrônicos e estéreos dos compostos-alvo análogos. O espaçador hidrofóbico, com comprimento de cerca de 7,65 Å, será mantido como em **51**; enquanto o grupo 3-metoxila será modificado para 3-hidroxila visando estudar o perfil antioxidante característico dos fenóis livres.

A Subunidade II consiste em aminas terciárias, como observado na subunidade *N*-benzilamínica de AP2238 (**52**), visando, além das interações com resíduos

aromáticos e polares – iônicos e dipolos – complementares, estudos de seletividade AChE/BChE pelo aumento de volume molecular. Adicionalmente, a presença dos grupos fenol e *orto*-aminometila pode favorecer a quelação de metais divalentes e interferência na agregação de proteínas β A.

Uma vez estabelecidas as principais alterações estruturais para os novos compostos foram planejadas 2 séries (Figura 17): i. Compostos benzilamínicos e benzilamídicos contendo somente o grupo fenol livre (Série 1); e ii. Compostos benzilamínicos e benzilamídicos com a presença da Subunidade II (série 2).

Figura 17: Planejamento das séries de compostos-alvos a partir de LDT71 (53).



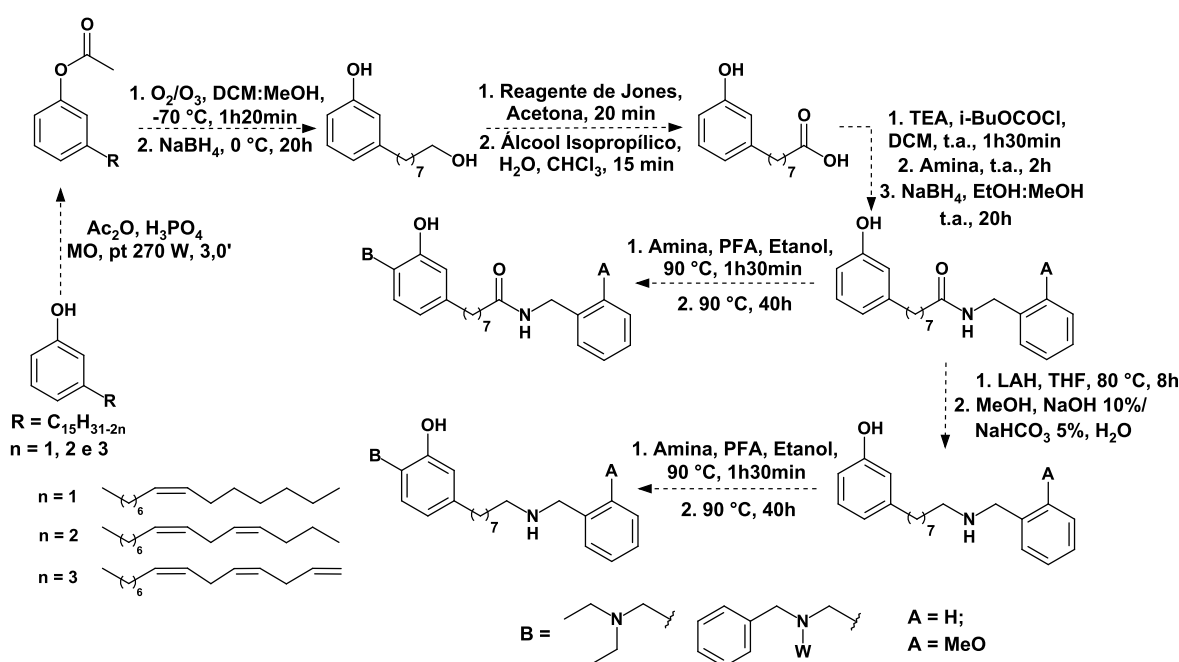
As séries planejadas exploram a presença de substituintes com restrição e liberdade conformacional bem como contribuições hidrofílicas (cátions e dipolos permanentes) e hidrofóbicas (alifáticos e aromáticos), compreendendo novos padrões moleculares com arcabouço estrutural complementar aos resíduos de aminoácidos das enzimas colinesterásicas, do peptídeo β A e com grupo fenol livre capaz de atuar como antioxidante.

4 PLANEJAMENTO SINTÉTICO

O planejamento sintético para a obtenção dos derivados-alvo das séries **1-2** foi concebido a partir da exploração de procedimentos clássicos, tais como proteção de grupos funcionais, ozonólise, redução com hidretos metálicos, interconversão de grupos funcionais e reações de *N*-alquilação (Esquema 1).

Neste sentido, a mistura de cardanois (**1A-C**) foi acetilada por meio de reação com anidrido acético catalisado com ácido fosfórico. Posteriormente a mistura obtida foi submetida à clivagem oxidativa via ozonólise, cujo tratamento do ozonídeo secundário com NaBH₄ visou a obtenção do álcool 8-(3-hidróxifenil)octan-1-ol (LDT71, **51**). **51** foi convertido ao ácido correspondente (LDT108, **52**) por tratamento com reagente de Jones em acetona. O ácido **52** foi convertido nos intermediários amida correspondentes via anidrido misto com clorofornato de isobutila na presença de trietilamina e a amina correspondente. As amidas foram reduzidas aos derivados amínicos por tratamento com hidreto de lítio e alumínio em tetraidrofurano anidro. Por fim, os intermediários amida/amina foram submetidos à reação tipo Mannich na presença da respectiva amina e paraformaldeído em etanol.

Esquema 1: Metodologia sintética geral para obtenção dos derivados-alvo.



5 PARTE EXPERIMENTAL

5.1 GENERALIDADES E MATERIAIS

Os procedimentos experimentais em Síntese Orgânica foram realizados no Laboratório de Desenvolvimento de Estratégias Terapêuticas (LADETER) da Universidade Católica de Brasília (UCB) e no Laboratório de Desenvolvimento de Inovações Terapêuticas (LDT) da Universidade de Brasília (UnB), no período entre agosto de 2014 e maio de 2017.

Os reagentes e solventes químicos utilizados neste trabalho foram adquiridos das indústrias Sigma-Aldrich® (EUA), Tedia® (EUA) e PanReac® (Espanha). Tetraidrofurano (THF), diclorometano (DCM) e trietilamina (TEA) foram previamente tratados com hidreto de cálcio e destilados antes do uso.

As reações foram realizadas sob agitação magnética, à temperatura ambiente ou em aquecimento em banho de óleo. Para as reações realizadas sob radiação microondas, foi utilizado microondas doméstico Brastemp®, modelo BMK38ABHNA JetDeFrost com capacidade de 38 L e potência de 900 W sem agitação magnética. Para as reações sob refluxo com reagentes e solventes com ponto de ebulição menor que a temperatura de aquecimento, foi utilizado sistema de refrigeração dos condensadores a temperaturas que variaram de -8 °C a 10 °C.

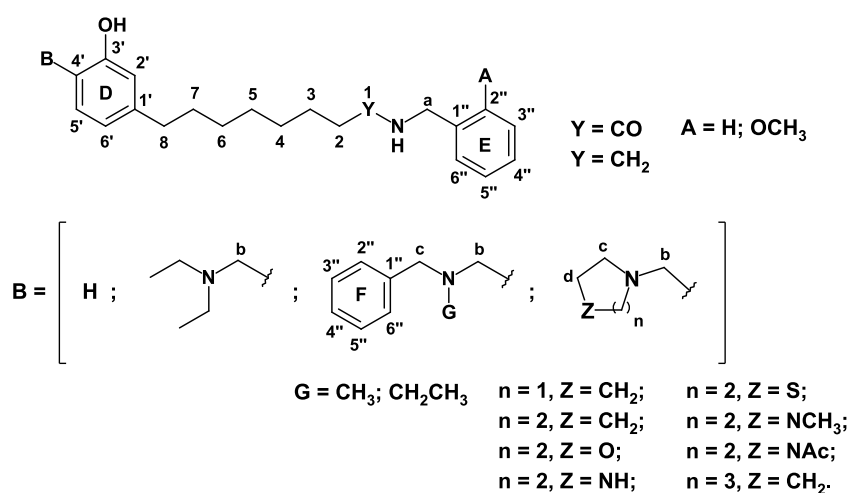
As reações foram monitoradas por cromatografia em camada fina (c.c.f) por meio de cromatofolhas (5,0 x 1,5 cm) de alumínio de Kieselgel 60 F254 com espessura de 0,25 mm (SILICYCLE®) e reveladas em lâmpada UV (254 nm), complexação com iodo, ou por imersão em solução etanólica de FeCl₃ 5% em 0,5 N de HCl (STAHL, 1969), ou em solução butanólica de ninidrina 0,3% em ácido acético glacial (PATTON & CHISM, 1951), que permitiram o cálculo do fator de retenção (Rf). Para a purificação dos compostos, utilizou-se cromatografia em coluna de sílica gel G60 (70-230 mesh) SILICYCLE® e o sistema de cromatografia flash em equipamento *Isolera Spektra Systems with ACI™* (Biotage®) em cartucho de sílica SNAP 10 g. Os pontos de fusão, não corrigidos, foram determinados em aparelho MQAPF-302.

A evaporação dos solventes foi realizada em evaporador rotatório Tecnal® TE-211, à pressão reduzida, variando entre 10 e 0,1 mmHg, e em temperaturas entre 40 e 60 °C.

Os espectros na região do infravermelho (IV) foram obtidos em Espectrofotômetro Perkin Elmer modelo Spectrum BX, utilizando pastilhas de brometo de potássio (KBr) ou na forma de filme líquido em placa de cloreto de sódio (NaCl) da Central Analítica da Universidade Católica de Brasília – UCB. Os valores para as absorções ($\nu_{\text{máx}}$) são referidos em números de ondas, utilizando como unidade o centímetro recíproco (cm^{-1}). O volume das aminas (B) foi calculada pelo programa Spartan Student versão 7.2.6.

Os espectros de ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN de ^1H) e carbono-13 (RMN de ^{13}C) foram realizados no Centro Nordeste de Aplicação e Uso da Ressonância Magnética Nuclear (CENAUREMN) da Universidade Federal do Ceará, e os espectros obtidos a 300 MHz e 75 MHz ou a 500 MHz e 125 MHz respectivamente, verificados em aparelho Bruker Avance DRX300 e DRX500. Para a realização das análises, as amostras foram solubilizadas em CDCl_3 , tendo tetrametilsilano (TMS) como referência interna. Os valores de deslocamento químico (δ) são referidos em parte por milhão (ppm) em relação ao TMS e as constantes de acoplamento (J) em Hertz (Hz). As áreas dos sinais foram obtidas por integração eletrônica e suas multiplicidades descritas como: simpleto (s); duplete (d); duplo-duplete (dd); tripleto (t); duplo-tripleto (dt); quarteto (q); quinteto (qi); multiplete (m); e sinal largo (sl). A numeração e legendas utilizadas nesta seção estão de acordo com a Figura 18.

Figura 18: Numeração e legendas empregadas no assinalamento de RMN de ^1H e de ^{13}C .



Os ensaios de inibição das colinesterases e do perfil antioxidante foram realizados em parceria com a Profa. Manuela Bartolini da Universidade de Bolonha na Itália, utilizando adaptação da metodologia descrita por Ellman e colaboradores (1961). Ensaios de atividade antiagregante foram realizados em parceria com o Prof. Paul Fraser do Laboratório Tanz CRND da Universidade de Toronto, utilizando peptídeo βA_{42} sintético com sua agregação acompanhada por dicroísmo circular (DC) e análise de microscopia eletrônica de transmissão (MET). Ensaio para predição da permeabilidade da barreira hematoencefálica (BHE) foi realizado em parceria com o Prof. Ondrej Soukup do Centro de Pesquisa Biomédica do Hospital Universitário Hradec Kralove na República Checa, utilizado o ensaio modificado de permeabilidade por meio de membrana artificial paralela (PAMPA).

5.2 METODOLOGIA DE AVALIAÇÃO DO PERFIL ANTICOLINESTERÁSICO

Uma vez sintetizados e caracterizados, os derivados-alvo foram transformados em seus cloridratos, por meio da saturação de solução em diclorometano com HCl gasoso, e submetidos ao ensaio *in vitro* para avaliação de seus perfis anticolinesterásicos frente à *hAChE* e *hBuChE*. Os ensaios foram realizados no laboratório de Farmacologia Molecular da Universidade de Bolonha na Itália pela metodologia descrita em Elmman et al (1961).

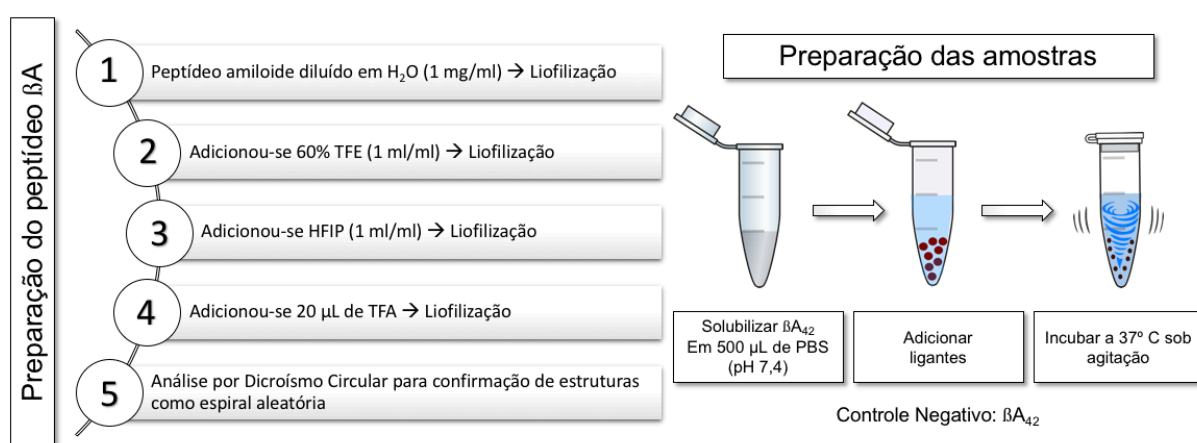
As soluções estoque dos derivados testados (1 mM) foram preparadas e dissolvidas em metanol. A solução do ensaio (1 mL) consistiu de PBS 0,1 M (pH 8,0), 340 μ M de ácido 5,5'-ditiobis(2-nitrobenzóico), 0,02 U/mL de *hAChE/hBuChE* e 550 μ M de substrato (iodeto de acetilticolina/iodeto de butirilticolina). Para os estudos de inibição, 50 μ L da solução estoque foram adicionados. As soluções de ensaio (com ou sem ligante) foram pre-incubadas a 37 °C por 20 minutos seguido da adição do substrato. A solução branco continha todos os componentes, exceto *hAChE/hBuChE*.

Os resultados foram representados como percentual inibitório da inibição em função do log decimal da concentração final do inibidor. A significância do desvio padrão, regressão linear e valores de CI_{50} foram calculados utilizando programa Microcal Origin 3.5 (Microcal Software Inc). Cada ponto foi determinado em triplicata.

5.3 METODOLOGIA DE AVALIAÇÃO DO PERFIL ANTIAGREGANTE β A

Ensaio de atividade antiagregante foram realizados com peptídeo β A₄₂ sintético – sintetizado no laboratório Tanz CRND, Universidade de Toronto. Desta forma, o peptídeo foi induzido a adotar estruturas em ‘*random coil*’ (espiral aleatória) para inicialização dos ensaios, como demonstrado no Figura 19.

Figura 19: Preparação de amostras para realização do ensaio de agregação.



De posse dos peptídeos β A₄₂ como estrutura de espiral aleatória, a estes foram adicionados 500 µL de PBS (tampão fosfato salino) pH 7,4 e homogeneizados. O controle negativo representa apenas a presença do peptídeo (0,0332 µmol) em PBS – sem outro componente. Para os ligantes a serem avaliados foi seguida a proporção de 1:5 (β A₄₂:ligante), desta forma foram adicionados 0,1661 µmol de LDT544 (**70**), LDT636 (**68**), LDT638 (**69**), LDT640 (**67**), LDT637 (**74**), LDT639 (**75**), LDT641 (**72**), LDT642 (**71**), LDT643 (**73**) e LDT692 (**76**). Posteriormente, as amostras foram homogeneizadas e incubadas a 37 °C sob agitação pelo período de 72 h, observados em dicroísmo circular por três tempos: tempo 0 (0 hora), tempo 1 (24 horas), tempo 2 (48 horas) e tempo 3 (72 horas).

Ademais, a análise quantitativa do espectro de dicroísmo circular, que visa a estimação da proporção de estruturas secundárias, foi realizada utilizando algoritmo desenvolvido por MICSONAI e colaboradores (2015) denominado de *β -structure selection* (BeStSel) capaz de realizar a deconvolução dos espectros de proteínas ricas em estruturas- β .

Simultaneamente à avaliação da agregação, foram realizadas análises de microscopia eletrônica de transmissão (MET), onde foram avaliadas as características de densidade dos agregados e formação de fibras. As amostras foram analisadas a partir do tempo 0. Foram coletados 20,0 µL de cada amostra e adicionados à grade de microscopia eletrônica, e adsorvidas por 2 minutos. Posteriormente a este tempo, a grade foi seca com papel de filtro e então adicionado por mais 2 minutos 20,0 µL de solução 1% de acetato de uranila (*negative stain*) e seca de mesma forma, para finalmente serem observadas na MET.

5.4 METODOLOGIA DE AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

A atividade antioxidante relativa aos radicais hidroxila (OH·) foi avaliada em parceria com a Universidade de Bolonha utilizando o conjunto de ensaio da atividade HORAC OxiSelect® (Cell Biolabs Inc.). A solução de estoque de metanol (2-4 mM) de curcumina, ácido ferúlico e os compostos testados foram diluídos a 50 µM com o tampão de ensaio. Seguindo o protocolo do fabricante, o tampão de ensaio foi usado como branco e o ácido gálico (AG) como referência. Segundo instruções, 20 µL da solução do composto e 140 µL da solução de fluoresceína foram adicionados, e misturados cuidadosamente, e as amostras foram imediatamente analisadas em triplicata. A intensidade de fluorescência foi medida na excitação no comprimento de onda de 480 nm e emissão no comprimento de onda de 530 nm utilizando um leitor de fluorescência para placas (Wallac Victor2®, PerkinElmer).

O decaimento da área sob a curva (ASC) está relacionado à capacidade antioxidante dos compostos testados. Resultados são expressos como equivalentes de AG (EAG), calculados como na seguinte fórmula:

$$EAG = \frac{ASC_{Composto} - ASC_{Branco}}{ASC_{AG} - ASC_{Branco}}$$

5.5 METODOLOGIA DE AVALIAÇÃO DO PERFIL DE PERMEABILIDADE

Para predição da permeabilidade dos compostos frente à barreira hematoencefálica (BHE) foi utilizado o ensaio modificado de permeabilidade por meio de membrana artificial paralela (PAMPA) realizado junto ao Centro de Pesquisa Biomédica do Hospital Universitário *Hradec Kralove*, na República Checa. Este ensaio é considerado como uma ferramenta de varredura de alto rendimento aplicada para prever o transporte passivo de ligantes através da BHE (BAUTISTA-AGUILERA et al, 2017; DI et al, 2003).

Assim sendo, para realização do ensaio foram utilizados placas de 96 poços *MultiScreen-IP* da Merck Millipore® (República Checa) com filtros de membrana de porosidade 0,45 µm. O filtro de membrana da placa doadora foi revestido com PBL (Lipídio cerebral polar – *Polar Brain Lipid*) da Avanti® (EUA) em dodecano (4 µL de 20 mg/mL PBL em dodecano). A placa aceptora foi preenchida com 300 µL de PBS (tampão fosfato salino, pH 7,4, V_A).

Os compostos testados foram primeiramente dissolvidos em DMSO e então diluídos em 0,01 M de PBS (pH 7,4) para obter a solução doadora (30 a 50 µM), é ressaltado que a concentração de DMSO não excedeu 0,5% (V/V) na solução doadora. Foram adicionados 300,0 µL da solução doadora (V_D) aos poços doadores, e desta forma a placa doadora foi cuidadosamente colocada na placa aceptora, para que desta forma a membrana revestida ficasse “em toque” com ambas solução doadora e o tampão acceptor. Os compostos testados foram difundidos do poço doador através da membrana revestida de PBL (Área = 0,28 cm²) para o poço acceptor.

A concentração dos compostos testados em ambos os poços doadores e aceptores foi avaliada após 3, 4, 5 e 6 horas de incubação à temperatura ambiente em quadruplicata utilizando leitora de ultravioleta *Synergy HT* da Biotek® (EUA) no comprimento de onda de máxima absorção para cada composto.

Foram também preparadas soluções no equilíbrio teórico de cada composto, isto é, a concentração teórica do compartimento doador e acceptor for simplesmente combinada). Assim sendo, a concentração dos compostos no poço doador e acceptor, bem como o equilíbrio de concentração, foram calculados seguindo a curva padrão e expressos como permeabilidade (Pe) de acordo com a seguinte equação (DI et al, 2003; WOHNSLAND & FALLER, 2001).

$$\log Pe = \log \left\{ C \times - \ln \left(1 - \frac{[\text{ligante}] \text{ acceptor}}{[\text{ligante}] \text{ equilíbrio}} \right) \right\} \quad \text{onde } C = \left(\frac{V_D \times V_A}{(V_D + V_A) \times \text{Área} \times \text{Tempo}} \right)$$

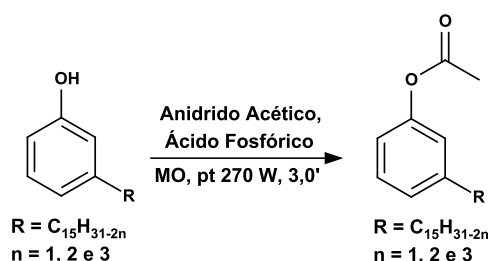
Capítulo I

Desenvolvimento Químico

Resultados e Discussão

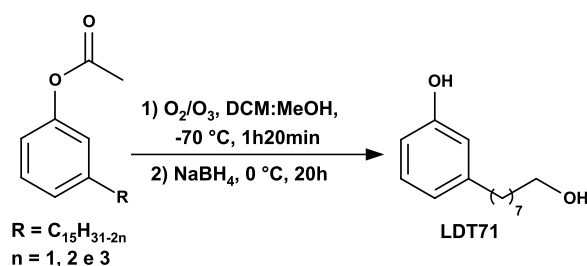
6 METODOLOGIA SINTÉTICA E CARACTERIZAÇÃO DOS COMPOSTOS

6.1 OBTENÇÃO DA MISTURA DE CARDANOIS ACETILADA



Em um erlenmeyer de 125 mL foram adicionados 2,0 g da mistura de cardanois (1A-C) insaturados (6,57 mmol), 1,24 mL de anidrido acético (13,13 mmol) e ácido fosfórico (4 gotas). A mistura foi submetida à radiação em forno de micro-ondas convencional durante 3 minutos (3 x 1'), à potência 30% (270 W). Ao final deste tempo, solução de HCl a 10% (30 mL) foi adicionada à mistura reacional e esta extraída com acetato de etila (2 x 30 mL). As fases orgânicas foram reunidas e lavadas com solução saturada de cloreto de sódio (30 mL) e seca sob sulfato de sódio anidro. A solução foi concentrada à pressão reduzida em evaporador rotatório e o produto bruto purificado em coluna de gel de sílica, eluída com diclorometano, fornecendo 2,1 g de mistura de cardanois acetilados como óleo amarelo, $R_f = 0,75$ (diclorometano), em 92% de rendimento.

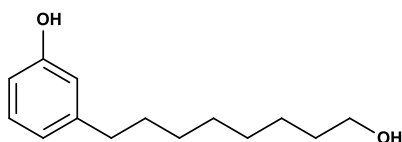
6.2 OBTENÇÃO DO DERIVADO 8-(3-HIDRÓXIFENIL)OCTAN-1-OL (LDT71, 53)



Em um balão de 250 mL do sistema para reação de ozonólise foram adicionados 12,0 g da mistura de cardanois acetilados (34,66 mmol), diclorometano (50 mL) e metanol (50 mL). O sistema reacional foi resfriado em mistura de gelo

seco/acetona à temperatura de aproximadamente $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$, e submetido a fluxo contínuo de ozônio (5 g/mL) em oxigênio por uma hora e vinte minutos (2 x de 40"). Ao final deste tempo, o excesso de ozônio foi purgado com fluxo de nitrogênio e à solução, sob banho de gelo, foram adicionados 2,62 g de boroidreto de sódio (69,25 mmol) e a mistura permaneceu por 20 horas sob agitação magnética com evolução à temperatura ambiente. Em seguida, foi adicionada solução de HCl a 50% (~20 mL) até pH 7. A mistura foi vertida em água e extraída com acetato de etila (3 x 40 mL) e as fases orgânicas reunidas lavadas com solução saturada de cloreto de sódio (50 mL). Após secagem com sulfato de sódio anidro, a solução foi concentrada à pressão reduzida em evaporador rotatório e o produto bruto purificado em coluna de gel de sílica eluída com gradiente de mistura de hexano e acetato de etila (95%:5% a 50%:50%), fornecendo 4,60 g de LDT71 (**53**), como óleo amarelo, em 60% de rendimento.

8-(3-Hidróxifenil)octan-1-ol (LDT71, **53**)



Óleo amarelo

Rendimento (60%)

Rf: 0,35 (CHCl_3 95%:EtOH_{5%})

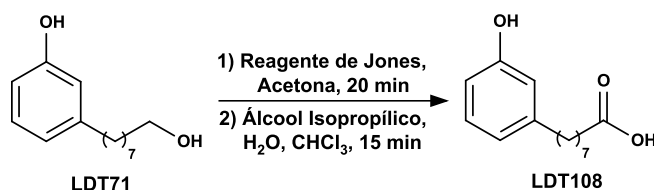
Fórmula Molecular: $\text{C}_{14}\text{H}_{22}\text{O}_2$

IV (KBr) $\nu_{\text{máx}}\text{ cm}^{-1}$: 3351 (ν_{OH}); 2929 (ν_{asCH_2}); 2855 (ν_{sCH_2}); 1589, 1456 ($\nu_{\text{C}=\text{C}}$), 1271 ($\nu_{\text{asAr-O-C}}$); 1156 ($\nu_{\text{asC-O-C}}$); 1051 ($\nu_{\text{sC-O-C}}$).

RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3 ; Anexo 2, pág 146): δ 1,30 (sl, 8H, 3-6); 1,53-1,59 (m, 4H, 2 e 7); 2,54 (t, $J = 7,6\text{ Hz}$, 2H, 8); 3,66 (t, $J = 6,6\text{ Hz}$, 2H, 1); 4,08 (sl, 2H, ArOH e CH_2OH); 6,66 (d, $J = 6,8\text{ Hz}$, 1H, 2' e 4'); 6,72 (d, $J = 7,6\text{ Hz}$, 1H, 6'); 7,12 (dt, $J = 6,8\text{ Hz}$, $J = 1,2\text{ Hz}$, 1H, 5').

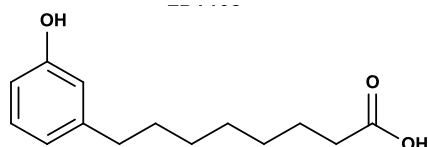
RMN de ^{13}C (75 MHz, CDCl_3 , Anexo 3, pág 147): δ 25,8 ($\underline{\text{C}}\text{H}_2$, 3); 29,2 ($\underline{\text{C}}\text{H}_2$, 5); 29,4 ($\underline{\text{C}}\text{H}_2$, 4); 29,4⁵ ($\underline{\text{C}}\text{H}_2$, 6); 31,3 ($\underline{\text{C}}\text{H}_2$, 2); 32,7 ($\underline{\text{C}}\text{H}_2$, 7); 35,9 ($\underline{\text{C}}\text{H}_2$, 8); 63,2 ($\underline{\text{C}}\text{H}_2$, 1); 112,8 ($\underline{\text{C}}\text{H}$, 4'); 115,6 ($\underline{\text{C}}\text{H}$, 2'); 120,7 ($\underline{\text{C}}\text{H}$, 6'); 129,4 ($\underline{\text{C}}\text{H}$, 5'); 144,8 ($\underline{\text{C}}$, 1'); 156,0 ($\underline{\text{C}}$, 3').

6.3 OBTENÇÃO DO DERIVADO ÁCIDO 8-(3-HIDRÓXIFENIL)OCTANOICO (LDT108, 54)



Em um balão de 100 mL foram adicionados 1,48 g do derivado LDT71 (**53**) (6,68 mmol), acetona (20 mL) e a mistura resfriada em banho de água/gelo. Em seguida, foi adicionado, gota a gota, o reagente de Jones (10 mL) – CrO₃ (5 g) e H₂SO₄ concentrado (5 mL) em água (15 mL) – e a reação mantida sob agitação vigorosa à temperatura ambiente por 20 minutos. A reação foi finalizada pela inativação do oxidante com isopropanol (9 mL) até a coloração final verde-azulada, seguido da adição de clorofórmio (10 mL) e água destilada (10 mL). A mistura foi mantida sob agitação por 15 minutos e, em seguida, extraída com clorofórmio (3 x 10 mL). As fases orgânicas reunidas foram lavadas com solução de HCl a 10% (2 x 10 mL) e finalmente solução saturada de cloreto de sódio (30 mL). Após secagem sobre sulfato de sódio anidro, a solução foi concentrada à pressão reduzida em evaporador rotatório. O produto bruto foi diluído em éter etílico (23 mL) e à solução foi adicionada solução de hidróxido de sódio a 10% (5 mL), permanecendo em agitação magnética à temperatura ambiente por 10 minutos. Em seguida, a mistura foi separada em funil de extração e a fase aquosa acidificada até pH 3, seguida de extração com éter etílico (3 x 10 mL). A fase orgânica reunida foi lavada com solução saturada de cloreto de sódio (30 mL), seca sobre sulfato de sódio anidro e o solvente concentrado à pressão reduzida em evaporador rotatório. O produto bruto foi purificado em coluna de gel de sílica, eluída com gradiente de mistura de hexano e acetato de etila (40%:60% a 30%:70%), fornecendo 1,01 g do derivado LDT108 (**54**) como sólido amarelo escuro, em 64% de rendimento.

Ácido 8-(3-Hidróxifenil)octanoico (LDT108, **54**)



Sólido amarelo escuro

Rendimento (64%)

Ponto de Fusão: 44-46 °C

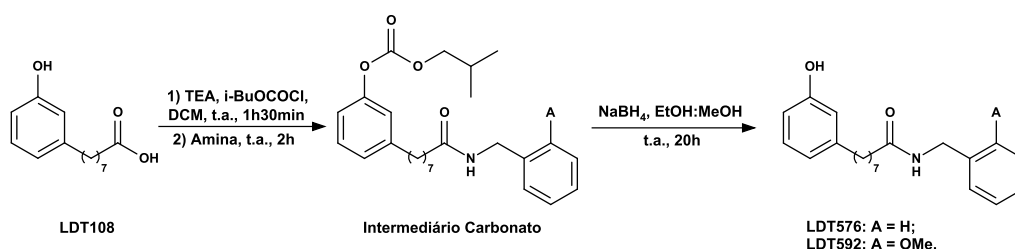
Rf: 0,40 (Hex_{80%}:AcOEt_{20%})

IV (KBr) $\nu_{\text{máx}} \text{ cm}^{-1}$: 2927 (ν_{asCH_2}); 2856 (ν_{sCH_2}); 1696 ($\nu_{\text{C=O}}$); 1459 ($\nu_{\text{C=C}}$); 1267 ($\nu_{\text{asAr-O}}$).

RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3 , Anexo 5, pág 149): δ 1,26-1,33 (m, 6H, 4-6); 1,61 (m, 4H, 3 e 7); 2,36 (t, $J = 7,4 \text{ Hz}$, 2H, 2); 2,54 (t, $J = 7,6 \text{ Hz}$, 2H, 8); 6,67 (d, $J = 6,2 \text{ Hz}$, 2H, 2' e 4'); 6,74 (d, $J = 7,4 \text{ Hz}$, 1H, 6'); 7,13 (t, $J = 8,1 \text{ Hz}$, 1H, 5').

RMN de ^{13}C (125 MHz, CDCl_3 , Anexo 6, pág 150): δ 24,8 ($\underline{\text{C}}\text{H}_2$, 3); 29,1 ($\underline{\text{C}}\text{H}_2$, 5); 29,2 ($\underline{\text{C}}\text{H}_2$, 4); 29,4 (CH_2 , 6); 31,2 ($\underline{\text{C}}\text{H}_2$, 7); 34,2 ($\underline{\text{C}}\text{H}_2$, 2); 35,9 ($\underline{\text{C}}\text{H}_2$, 8); 112,7 ($\underline{\text{C}}\text{H}$, 4'); 115,5 ($\underline{\text{C}}\text{H}$, 2'); 121,0 ($\underline{\text{C}}\text{H}$, 6'); 129,5 ($\underline{\text{C}}\text{H}$, 5'); 144,8 ($\underline{\text{C}}$, 1'); 155,6 ($\underline{\text{C}}$, 3'); 180,3 ($\underline{\text{C}}$, 1).

6.4 PROCEDIMENTO GERAL PARA OBTENÇÃO DOS INTERMEDIÁRIOS-ALVO AMIDAS

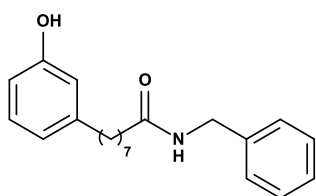


Em um balão de 100 mL foram adicionados 0,8 g de LDT108 (**54**) (3,38 mmol), cloroformato de isobutila (2,5 eq), trietilamina (2,5 eq) e diclorometano anidro (15 mL). A mistura foi deixada sob agitação à temperatura ambiente por 1h30min para completa formação do anidrido misto intermediário. Ao final deste tempo, foi adicionada a respectiva amina (3 eq) e a reação permaneceu sob agitação por 2 horas. Ao término da reação, a solução foi transferida para funil de separação e lavada com HCl a 10% (2 x 10 mL). A fase aquosa foi re-extraída com diclorometano (3 x 10 mL) e as fases orgânicas reunidas lavadas com solução saturada de cloreto de sódio (30 mL). Após secagem sobre sulfato de sódio anidro, a solução foi concentrada em

evaporador rotatório e o produto bruto purificado em coluna de gel de sílica eluída com gradiente de mistura hexano e acetato de etila (20%:80% a 40%:60%).

Posteriormente, os compostos correspondentes foram tratados com solução de boroidreto de sódio (2 eq) em mistura de etanol e metanol 1:1 (20 mL) e a reação permaneceu sob agitação magnética por aproximadamente 20 horas. Em seguida, foi adicionada solução de HCl a 50% até pH 7. A mistura foi vertida em água, extraída com acetato de etila (3 x 10 mL) e a fase orgânica reunida foi lavada com solução saturada de cloreto de sódio (30 mL). Após secagem sobre sulfato de sódio anidro, a solução foi concentrada à pressão reduzida em evaporador rotatório e o produto bruto purificado em coluna de gel de sílica eluída com gradiente de mistura hexano e acetato de etila (20%:80% a 80%:20%), fornecendo os compostos-alvo correspondentes.

N-Benzil-8-(3-hidróxifenil)octanamida (LDT576, **55**)



Óleo amarelo

Rendimento (82%)

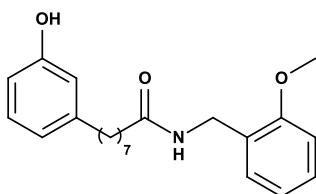
Rf: 0,40 (Hex_{50%}:AcOEt_{50%})

Fórmula Molecular: C₂₁H₂₇NO₂

RMN de ¹H (500 MHz, CDCl₃ Anexo 7, pág 151): δ 1,9 (m, 6H, 4-6); 1,56 (m, 2H, 7); 1,62 (m, 2H, 3); 2,22 (t, *J* = 7,3 Hz, 2H, 2); 2,52 (t, *J* = 7,4 Hz, 2H, 8); 4,42 (d, *J* = 5,3 Hz, 2H, NHCH₂, a); 6,35 (sl, 1H, NH); 6,68-6,72 (m, 3H, 2', 4' e 6'); 7,10 (t, *J* = 7,7 Hz, 1H, 5'); 7,25-7,31 (m, 5H, 2'', 3'', 4'', 5'' e 6'').

RMN de ¹³C (125 MHz, CDCl₃ Anexo 8, pág 152): δ 25,8 (CH₂, 3); 28,8 (CH₂, 4); 29,0 (CH₂, 6); 29,1 (CH₂, 5); 31,0 (CH₂, 7); 35,7 (CH₂, 8); 36,7 (CH₂, 2); 44,0 (NHCH₂, a); 112,9 (CH, 4'); 115,6 (CH, 2'); 120,5 (CH, 6'); 127,8 (CH, 4''); 128,0 (CH, 2'' e 6''); 128,9 (CH, 3'' e 5''); 129,4 (CH, 5'); 138,1 (C, 1''); 144,5 (C, 1'); 156,4 (C, 3'); 174,2 (C, 1).

8-(3-Hidróxifenil)-*N*-[(2-metóxifenil)metil]octanamida (LDT592, **56**)



Óleo amarelo

Rendimento (67%)

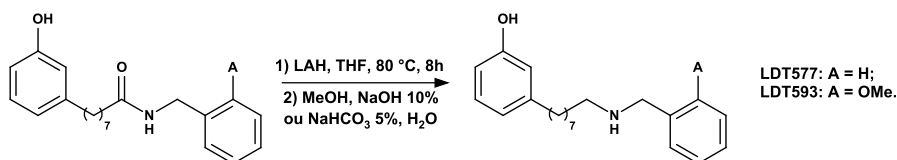
Rf: 0,40 (Hex_{80%}:AcOEt_{20%})

Fórmula Molecular: C₂₂H₂₉NO₃

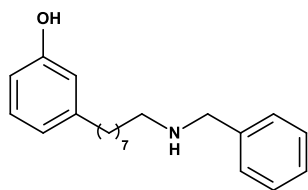
RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3 , Anexo 9, pág 153): δ 1,27 (m, 6H, 4-6); 1,56 (qi, $J = 6,9$ Hz, 2H, 3); 1,60 (qi, $J = 6,3$ Hz, 2H, 7); 2,17 (t, $J = 7,5$ Hz, 2H, 2); 2,51 (t, $J = 7,4$ Hz, 2H, 8); 3,84 (s, 3H, OCH_3); 4,45 (d, $J = 5,7$ Hz, 2H, NHCH_2 , a); 6,10 (sl, 1H, OH); 6,67-6,70 (m, 3H, 2', 4' e 6'); 6,86-6,92 (m, 2H, 3'' e 5''); 7,10 (t, $J = 7,7$ Hz, 2H, 5'); 7,25-7,28 (m, 2H, 4'' e 6'').

RMN de ^{13}C (125 MHz, CDCl_3 , Anexo 10, pág 154): δ 25,7 (CH_2 , 3); 28,8 (CH_2 , 6); 29,0 (CH_2 , 4); 29,2 (CH_2 , 5); 30,9 (CH_2 , 7); 35,7 (CH_2 , 8); 36,9 (CH_2 , 2); 39,7 (NHCH_2 , a); 55,5 (OCH_3); 110,5 (CH , 3''); 112,9 (CH , 4'); 115,6 (CH , 2'); 120,4 (CH , 5''); 120,9 (CH , 6'); 126,2 (C , 1''); 129,1 (CH , 4''); 129,4 (CH , 5'); 130,1 (CH , 6''); 144,5 (C , 1'); 156,5 (CH , 3'); 157,7 (C , 2''); 173,6 (C , 1).

6.5 PROCEDIMENTO GERAL PARA OBTENÇÃO DOS INTERMEDIÁRIOS-ALVO AMINAS



A um balão de 50 mL foram adicionados 2,0 a 2,6 mmol dos derivados amidas correspondentes [LDT576 (**55**) ou LDT592 (**56**)], hidreto de lítio e alumínio (4,0 eq) em tetraidrofurano (20,0 mL). O sistema foi levado a refluxo e permaneceu sob agitação magnética por oito horas. Ao final deste tempo, a mistura foi resfriada a 0 °C e, gota a gota, foi adicionado metanol (3 mL) para inativação do excesso do agente redutor. Em seguida, foram adicionados solução de hidróxido de sódio a 10% (1 a 3 mL) e água destilada (5 mL). A mistura ficou sob agitação magnética por 20 minutos e em seguida foi acidificada a pH 2-3 e extraída com éter etílico (15 mL). A fase aquosa foi basificada a pH 10 e extraída com éter etílico (3 x 10 mL) e a fase orgânica lavada com solução saturada de cloreto de sódio (30 mL). Após secagem sobre sulfato de sódio anidro, a solução foi concentrada à pressão reduzida em evaporador rotatório e o produto bruto purificado em coluna de gel de sílica eluída com gradiente de mistura hexano e acetato de etila (20%:80% a 80%:20%), fornecendo os compostos-alvo correspondentes LDT577 (**57**) e LDT593 (**58**).

3-[8-(Benzilamino)octil]fenol (LDT577, **57**)

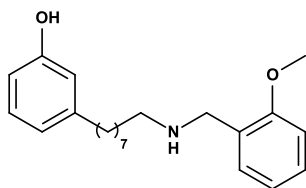
Óleo amarelo

Rendimento (60%)

Rf = 0,33 (Hex_{50%}:AcOEt_{50%})Fórmula Molecular: C₂₁H₂₉NO

RMN de ¹H (300 MHz, CDCl₃ Anexo 11, pág 155): δ 1,26 (m, 8H, 3-6); 1,55 (m, 4H, CH₂, 2 e 7); 2,51 (t, $J = 7,2$ Hz, 2H, 8); 2,66 (t, $J = 7,2$ Hz, 2H, 1); 3,48 (s, 2H, NHCH₂, a); 4,65 (sl, 2H, NH e OH); 6,63 (sl, 2H, 2' e 4'); 6,68 (d, $J = 7,3$ Hz, 1H, 6'); 7,10 (t, $J = 7,2$ Hz, 1H, 5'); 7,26-7,34 (m, 2'', 3'', 4'', 5'' e 6'').

RMN de ¹³C (75 MHz, CDCl₃ Anexo 12, pág 156): δ 27,1 (CH₂, 3); 29,0 (CH₂, 6); 29,1 (CH₂, 4); 29,2 (CH₂, 5); 29,3 (CH₂, 2); 31,2 (CH₂, 7); 35,8 (CH₂, 8); 48,9 (CH₂, 1); 53,5 (NHCH₂, a); 113,1 (CH, 4'); 115,9 (CH, 2'); 120,3 (CH, 6'); 127,7 (CH, 4''); 128,8³ (CH, 2'' e 6''); 128,8⁵ (CH, 3'' e 5''); 129,4 (CH, 5''); 138,2 (C, 1''); 144,6 (C, 1'); 156,4 (CH, 3').

3-[8-(2-Metóxifenil)metilamino)octil]fenol (LDT593, **58**)

Óleo amarelo

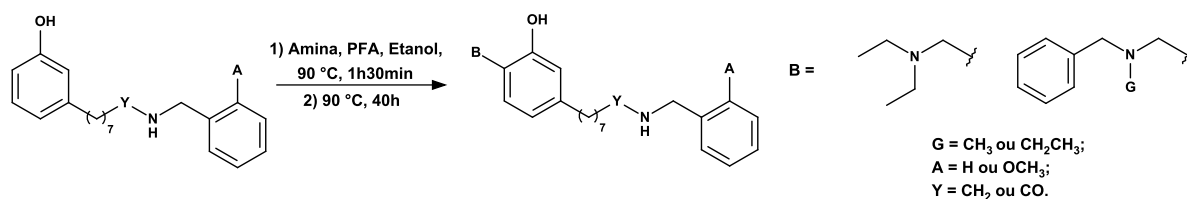
Rendimento (47%)

Rf = 0,26 (Hex_{50%}:AcOEt_{50%})Fórmula Molecular: C₂₂H₃₁NO₂

RMN de ¹H (300 MHz, CDCl₃ Anexo 13, pág 157): δ 1,25 (sl, 8H, 3-6); 1,55 (m, 4H, 2 e 7); 2,50 (t, $J = 7,5$ Hz, 2H, 8); 2,61 (t, $J = 7,4$ Hz, 2H, 1); 3,83 (s, 3H, OCH₃); 3,87 (s, 2H, NHCH₂, a); 5,41 (sl, 2H, OH e NH); 6,61-6,67 (m, 3H, 2', 4' e 3''); 6,88 (t, $J = 7,8$ Hz, 2H, 5''); 6,91 (d, $J = 7,4$ Hz, 2H, 6'); 7,09 (t, $J = 7,6$ Hz, 3H, 5'); 7,23-7,29 (m, 2H, 4'' e 6'').

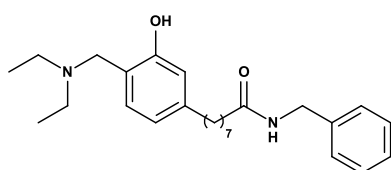
RMN de ¹³C (75 MHz, CDCl₃ Anexo 14, pág 158): δ 27,0 (CH₂, 3); 28,9 (CH₂, 4); 29,1 (CH₂, 6); 29,2 (CH₂, 5); 29,3 (CH₂, 2); 31,1 (CH₂, 7); 35,8 (CH₂, 8); 47,9 (CH₂, 1); 48,3 (NHCH₂, a); 55,5 (OCH₃); 110,6 (CH, 3''); 113,1 (CH, 4'); 115,9 (CH, 2'); 120,0 (CH, 5''); 120,8 (CH, 6'); 124,4 (C, 1''); 129,4 (CH, 4''); 129,6 (CH, 5''); 131,1 (CH, 6''); 144,5 (C, 1'); 156,9 (C, 3'); 158,0 (C, 2'').

6.6 PROCEDIMENTO GERAL PARA OBTENÇÃO DOS DERIVADOS-ALVO ORTO-AMINAS



A um balão de 50 mL foram adicionados a amina correspondente (1 eq), paraformaldeído (1 eq) e etanol (10 mL). A mistura permaneceu em refluxo sob agitação magnética por 1h30min. Ao final deste tempo, foram adicionados 0,2 g do derivado-alvo [LDT71 (**51**), LDT576 (**53**), LDT590 (**54**), LDT592 (**55**), LDT594 (**56**), LDT577 (**57**), LDT591 (**58**), LDT593 (**59**) e LDT595 (**60**)], e o refluxo foi mantido por cerca de 40 h. Ao final deste tempo, a mistura foi concentrada à pressão reduzida em evaporador rotatório e purificada em coluna de gel de sílica, eluída com gradiente hexano e acetato de etila (5%:95% a 90%:10%), fornecendo os compostos-alvo correspondentes LDT582 (**59**), LDT579 (**60**), LDT581 (**61**), LDT585 (**62**) e LDT587 (**63**), respectivamente.

N-Benzil-8-{4-[(dietilamino)metil]-3-hidróxifenil}octanamida (LDT582, **59**)



Óleo amarelo

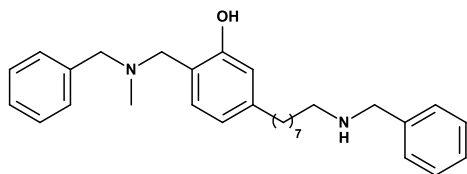
Rendimento (59%)

Rf: 0,60 (CHCl₃ 95%:MeOH5%)

Fórmula Molecular: C₂₆H₃₈N₂O₂

RMN de ¹H (300 MHz, CDCl₃ Anexo 15, pág 159): δ 1,16 (t, $J = 7,1$ Hz, 6H, NCH₂CH₃); 1,31 (sl, 6H, 4-6); 1,57-1,60 (m, 2H, 3 e 7); 2,20 (t, $J = 7,5$ Hz, 2H, 2); 2,51 (t, $J = 7,5$ Hz, 2H, 8); 2,72 (q, $J = 7,1$ Hz, 4H, NCH₂CH₃); 3,82 (s, 2H, NCH₂, **b**); 4,43 (d, $J = 5,8$ Hz, 2H, NHCH₂, **a**); 5,91 (sl, 1H, NH); 6,10 (sl, 1H, OH); 6,60 (d, $J = 7,5$ Hz, 1H, 6'); 6,70 (s, 1H, 2'); 6,94 (d, $J = 7,5$ Hz, 5'); 7,26-7,31 (m, 5H, 2'', 3'', 4'', 5'' e 6'').

RMN de ¹³C (75 MHz, CDCl₃ Anexo 16, pág 160): δ 10,4 (NCH₂CH₃); 25,7 (CH₂, 3); 28,9 (CH₂, 6); 29,0 (CH₂, 6); 29,1 (CH₂, 4); 30,9 (CH₂, 7); 35,5 (CH₂, 8); 36,7 (CH₂, 2); 43,6 (NHCH₂, **a**); 46,2 (NHCH₂CH₃ e NCH₂, **b**); 116,8 (CH, 2'); 119,7 (CH, 6'); 127,5 (CH, 4''); 127,8 (2CH, 2'' e 6''); 128,7 (CH, 3'' e 5''); 129,7 (CH, 5'); 138,5 (C, 1'); 144,8 (C, 1'); 157,5 (C, 3'); 173,2 (C, 1).

2-[[Benzil(metil)amino]metil]-5-[8-(benzilamino)octil]fenol (LDT579, **60**)

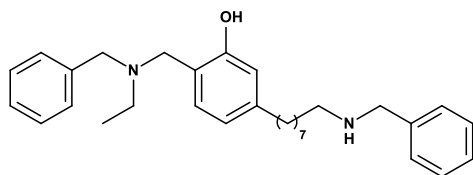
Óleo amarelo

Rendimento (82%)

Rf: 0,72 (CHCl₃ 95%:EtOH₅%)Fórmula Molecular: C₃₁H₄₀N₂O₂

RMN de ¹H (500 MHz, CDCl₃ Anexo 17, pág 161): δ 1,29 (sl, 8H, 3-6); 1,58 (sl, 4H, 2 e 7); 2,24 (s, 3H, NCH₃); 2,53 (t, $J = 7,2$ Hz, 2H, 8); 2,65 (t, $J = 7,2$ Hz, 2H, 1); 3,60 (s, 2H, CH₂N, **c**); 3,72 (s, 2H, NCH₂, **b**); 3,84 (s, 2H, NHCH₂, **a**); 6,64 (d, $J = 7,8$ Hz, 2'); 6,89 (d, $J = 7,4$ Hz, 1H, 5'); 6,96 (s, 6'); 7,27-7,39 (m, 10H, 2'', 3'', 4'', 5'', 6'', 2''', 3''', 4''', 5''' e 6''').

RMN de ¹³C (125 MHz, CDCl₃ Anexo 18, pág 162): δ 27,4 (CH₂, 3); 29,3 (CH₂, 5); 29,4 (CH₂, 4); 29,5 (CH₂, 6); 29,6 (CH₂, 2); 31,4 (CH₂, 7); 35,9 (CH₂, 8); 41,5 (NCH₃); 48,9 (CH₂, 1); 53,4 (NHCH₂, **a**); 60,9 (NCH₂, **b**); 61,6 (CH₂N, **c**); 116,2 (CH, 2'); 119,3 (C, 4'); 119,4 (CH, 6'); 127,7 (CH, 4''); 127,8 (CH, 4'''); 128,7⁶ (CH, 2'', 6'', 3'' e 5''); 128,8⁵ (CH, 2''' e 6'''); 129,8 (CH, 5', 3''' e 5'''); 137,2 (C, 1'' e 1'''); 144,1 (C, 1'); 157,8 (C, 3').

2-[[Benzil(etil)amino]metil]-5-[8-(benzilamino)octil]fenol (LDT581, **61**)

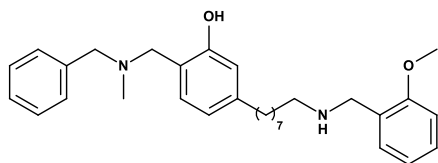
Óleo amarelo

Rendimento (68%)

Rf: 0,72 (CHCl₃ 95%:EtOH₅%)Fórmula Molecular: C₃₁H₄₂N₂O

RMN de ¹H (300 MHz, CDCl₃ Anexo 19, pág 163): δ 1,13 (t, $J = 7,0$ Hz, 3H, NCH₂CH₃); 1,28 (sl, 8H, 3-6); 1,57 (sl, 4H, 2 e 7); 2,52 (t, $J = 7,5$ Hz, 2H, 8); 2,60 (q, $J = 7,7$ Hz, 2H, NCH₂CH₃); 3,61 (s, 2H, CH₂N, **c e b**); 3,82 (s, 2H, NCH₂, **a**); 6,59 (d, $J = 7,1$ Hz, 1H, 6'); 6,67 (s, 1H, 2'); 6,88 (d, $J = 7,5$ Hz, 1H, 5'); 7,26-7,34 (m, 10H, 2'', 3'', 4'', 5'', 6'', 2''', 3''', 4''', 5''', 6''').

RMN de ¹³C (75 MHz, CDCl₃ Anexo 20, pág 164): δ 11,2 (NCH₂CH₃); 29,3 (CH₂, 3); 29,4 (CH₂, 6); 29,5 (CH₂, 6); 29,6 (CH₂, 4); 29,6 (CH₂, 2 e 5); 31,5 (CH₂, 7); 35,8 (CH₂, 8); 46,7 (CH₂, 1); 56,8 (NCH₂, **a**); 57,7 (NCH₂, **b**; CH₂N, **c**); 116,2 (2CH, 2' e 6); 119,4 (C, 4'); 128,4 (CH, 4'''); 128,8-129,8 (CH, 5', 2'', 3'', 4'', 5'', 6'', 5', 2''', 3''', 4''', 5''', 6'''); 137,3 (C, 1'' e 1'''); 143,9 (C, 1'); 157,9 (C, 3').

2-[[Benzil(metil)amino]metil]-5-(8-[[2-metoxifenil]metil]amino)octil)fenol (LDT585, **62**)

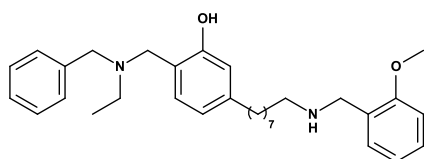
Óleo amarelo

Rendimento (22%)

Rf: 0,63 (Hex_{50%}:AcOEt_{50%})Fórmula Molecular: C₃₁H₄₂N₂O₂

RMN de ¹H (300 MHz, CDCl₃ Anexo 21, pág 165): δ 1,27 (sl, 8H, 3-6); 1,58 (m, 4H, CH₂, 2 e 7); 2,23 (s, 3H, NCH₃); 2,52 (t, $J = 7,7$ Hz, 2H, 8); 2,60-2,67 (m, 2H, 1); 3,59 (s, 2H, CH₂N, **c**); 3,68 (s, 2H, NCH₂, **b**); 3,85 (s, 3H, OCH₃); 3,87 (s, 2H, NHCH₂, **a**); 6,60 (d, $J = 6,1$ Hz, 1H, 6'); 6,68 (s, 1H, 2'); 6,85-6,89 (m, 2H, 3'' e 5''); 6,94 (d, $J = 7,2$ Hz, 1H, 5'); 7,20-7,35 (m, 7H, 4'', 6'', 2''', 3''', 4''', 5''' e 6''').

RMN de ¹³C (75 MHz, CDCl₃ Anexo 22, pág 166): δ 27,3 (CH₂, 3); 29,4 (2CH₂, 4 e 6); 29,6 (2CH₂, 2 e 5); 31,4 (CH₂, 7); 35,9 (CH₂, 8); 41,5 (NCH₃); 48,2 (CH₂, 1); 55,3 (NHCH₂, **a**); 55,5 (OCH₃); 60,9 (NCH₂, **b**); 61,6 (CH₂N, **c**); 110,5 (CH, 3''); 116,2 (CH, 2'); 119,3 (C, 6''); 119,4 (CH, 5'); 120,8 (CH, 5''); 127,8 (CH, 4'''); 128,5 (CH, 4''); 128,8 (CH, 5', 2''' e 6'''); 129,5 (CH, 6'', 3''' e 5'''); 137,2 (C, 1''); 144,1 (C, 3'); 157,8 (C, 3'); 158,0 (C, 2'').

2-[[Benzil(etil)amino]metil]-5-(8-[[2-metoxifenil]metil]amino)octil)fenol (LDT587, **63**)

Óleo amarelo

Rendimento (21%)

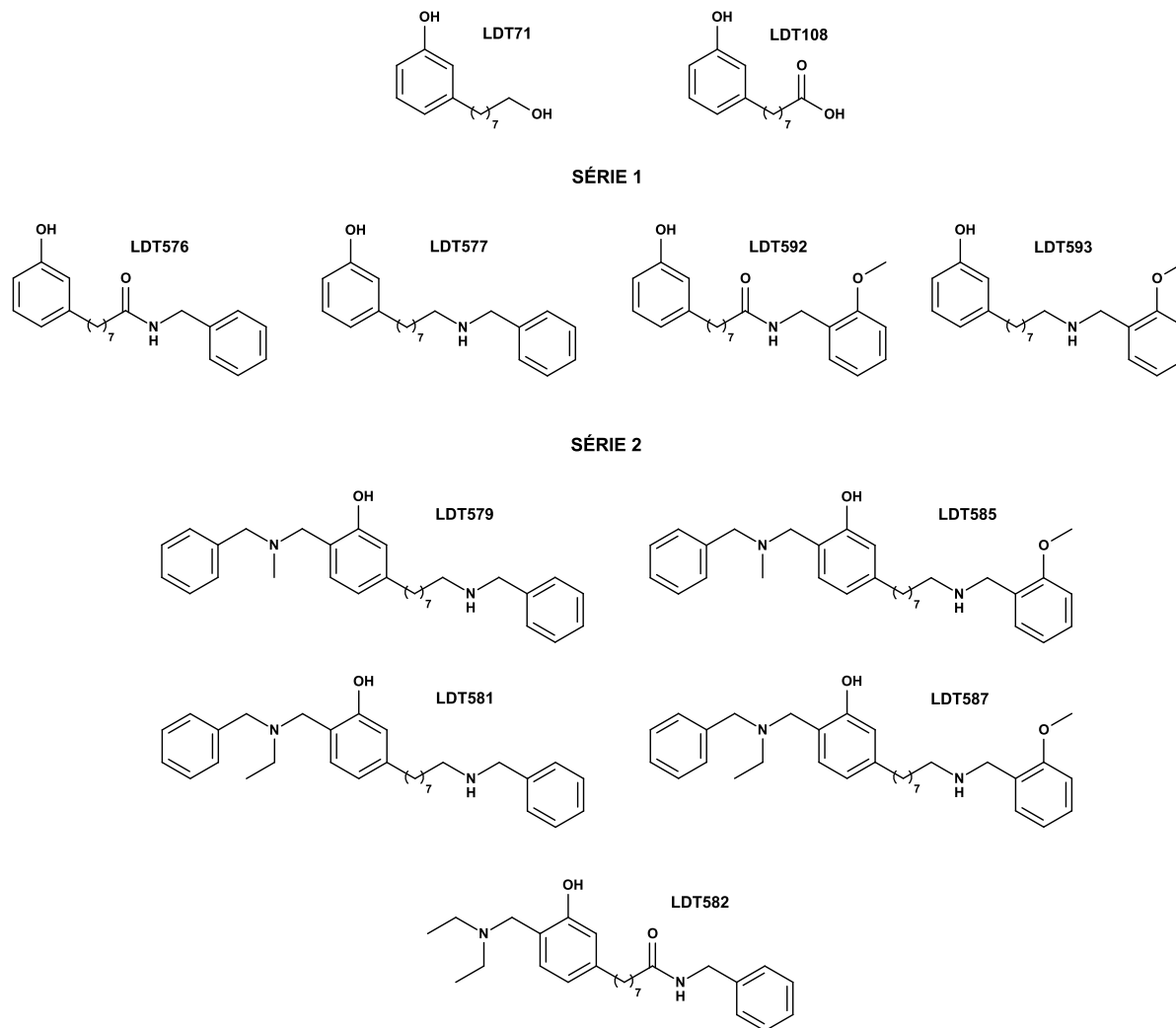
Rf: 0,57 (Hex_{50%}:AcOEt_{50%})Fórmula Molecular: C₃₂H₄₄N₂O₂

RMN de ¹H (300 MHz, CDCl₃ Anexo 23, pág 167): δ 1,13 (t, $J = 7,1$ Hz, 3H, NCH₂CH₃); 1,21-1,39 (m, 8H, 3-6); 1,56 (sl, 4H, 3 e 7); 2,53 (t, $J = 7,7$ Hz, 2H, 8); 2,60 (q, $J = 7,0$ Hz, 2H, 1); 3,62 (s, 2H, CH₂N, **c**); 3,74 (s, 2H, NCH₂, **b**); 3,86 (s, 5H, OCH₃ e NHCH₂, **a**); 6,59 (d, $J = 7,9$ Hz, 1H, 6'); 6,67 (s, 1H, 2'); 6,84-6,93 (m, 1H, 6'); 7,22-7,36 (m, 9H, 3'', 4'', 5'', 6'', 2''', 3''', 4''', 5''' e 6''').

RMN de ¹³C (75 MHz, CDCl₃ Anexo 24, pág 168): δ 11,2 (NCH₂CH₃); 25,9 (CH₂, 3); 29,4 (CH₂, 6); 29,5 (CH₂, 4); 29,6 (CH₂, 2 e 5); 31,4 (CH₂, 7); 35,9 (CH₂, 8); 46,7 (CH₂, 2 e NCH₂CH₃); 53,3 (NCH₂CH₃); 55,4 (OCH₃); 56,8 (NCH₂, **a**); 57,7 (NCH₂, **b**); 63,2 (CH₂N, **c**); 110,8 (CH, 3''); 116,3 (CH, 2'); 119,3 (C, 4'); 119,4 (CH, 6'); 120,6 (CH, 5''); 127,7 (CH, 4'''); 128,6 (CH, 4''); 128,8 (CH, 5', 2''' e 6'''); 129,7 (CH, 6'', 3''' e 5'''); 131,7 (C, 1''); 137,2 (C, 1''); 144,0 (C, 1'); 157,9 (C, 3'); 158,3 (C, 2'').

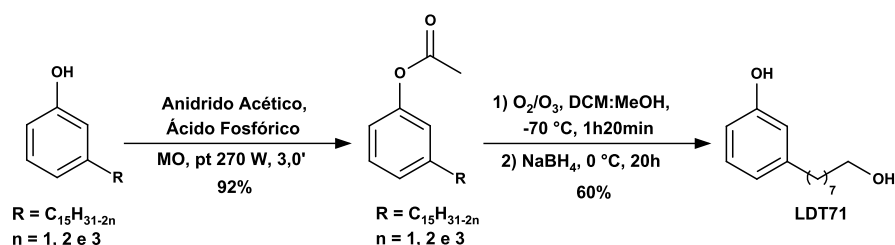
A Figura 20 apresenta as estruturas de dois intermediários-chave e vinte e seis compostos amínicos e amídicos que compreendem os derivados-alvo deste estudo.

Figura 20: Intermediários e produtos finais sintetizados e caracterizados.



7 CARACTERIZAÇÃO ESPECTROSCÓPICA

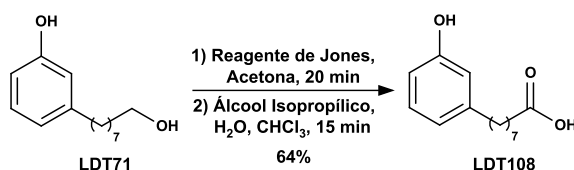
7.1 CARACTERIZAÇÃO DO DERIVADO 8-(3-HIDROXIFENIL)OCTAN-1-OL (LDT71, 53)



A obtenção do derivado LDT71 (**53**) teve início a partir de acetilação da mistura de cardanois com ácido fosfórico em anidrido acético, sob assistência de radiação MO, fornecendo a mistura de cardanois acetilados, Rf 0,75 (DCM), em rendimento de 92%. A mistura, não caracterizada por métodos espectrofotométricos, foi submetida à reação de ozonólise por meio de fluxo contínuo de ozônio (5 g/mL) por dois ciclos de 40 minutos, em mistura de DCM:MeOH (1:1) à aproximadamente - 70 °C, seguida de tratamento redutivo com boroidreto de sódio por 24 horas, fornecendo o derivado dihidroxilado LDT71 (**53**) em rendimento de 60% e Rf 0,35 (CHCl₃). O derivado LDT71 (**53**) apresentou absorção intensa em 3351 cm⁻¹ no infravermelho referente ao estiramento do grupo OH.

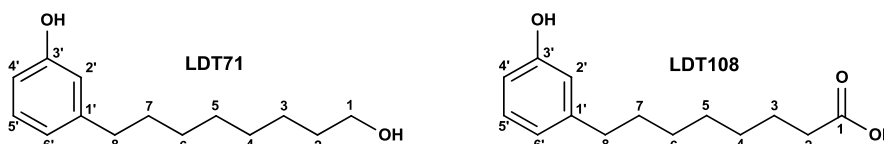
Os dados de RMN confirmaram a clivagem oxidativa pela presença de tripleto em 3,66 ppm em RMN de ¹H corroborados por deslocamento químico em 63,2 ppm no espectro de RMN de ¹³C, relativo à presença dos hidrogênios do grupo metileno ligado à hidroxila (C1). A presença dos hidrogênios do grupo metileno benzílico foi evidenciada pelo tripleto em 2,54 ppm (RMN de ¹H), confirmado por sinal em 35,9 ppm no RMN de ¹³C. Quanto à manutenção do anel aromático, os deslocamentos químicos nas faixas de 6,66 ppm a 7,12 ppm (RMN de ¹H) e de 112,8 ppm a 156,0 ppm (C, 3') confirmaram o padrão de substituição no anel aromático.

7.2 CARACTERIZAÇÃO DO DERIVADO ÁCIDO 8-(3-HIDROXIFENIL)OCTANOICO (LDT108, 54)



Dispondo do LDT71 (**53**), este foi submetido à reação de interconversão do grupo hidroxila ao ácido carboxílico por meio da oxidação com reagente de Jones em acetona. **54** Apresentou R_f 0,40 (Hex_{80%}:AcOEt_{20%}) e teve o grupo carboxila confirmado pelo sinal em 180,2 ppm em RMN de ¹³C. O grupo metileno alfa à carboxila foi evidenciado como tripleto em 2,36 ppm em RMN de ¹H e sinal em 34,2 ppm em RMN de ¹³C. Adicionalmente, a manutenção do fenol foi confirmada pela presença de deslocamento em 155,6 ppm (RMN de ¹³C), referente ao carbono 3' ligado à hidroxila fenólica. Os principais deslocamentos químicos em RMN de ¹H e de ¹³C para os derivados LDT71 (**53**) e LDT108 (**54**) estão resumidos na Tabela 2.

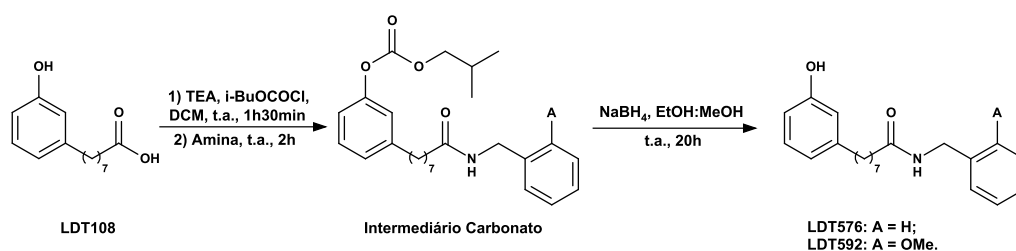
Tabela 2: Principais sinais em RMN para LDT71 (**53**) e LDT108 (**54**).



Composto	RMN de ¹ H (δ, ppm, 300 MHz ^a /500 MHz ^b)			
	RMN de ¹³ C (δ, ppm, 75 MHz ^a /125 MHz ^b), CDCl ₃			
	LDT71 (53) ^b		LDT108 (54) ^a	
	¹ H	¹³ C	¹ H	¹³ C
1'	---	144,8	---	144,8
2'	6,66	112,8	6,67	112,7
6'	6,72	120,7	6,74	121,0
3'	---	156,0	---	155,6
5'	7,12	129,4	7,13	129,5
4'	6,66	115,6	6,67	115,5
1	3,66	63,2	---	180,2

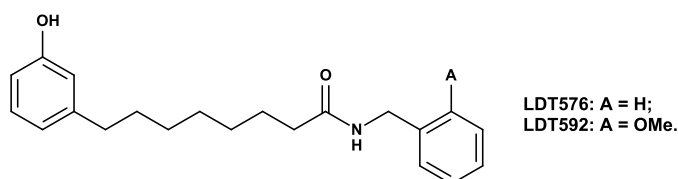
7.3 CARACTERIZAÇÃO DOS DERIVADOS-ALVO

Obtenção dos derivados amídicos



De posse do intermediário LDT108 (**54**), este foi submetido a reações de amidação via anidrido misto com clorofornato de isobutila e aminas na presença de trietilamina, em diclorometano anidro, à temperatura ambiente, fornecendo as amidas intermediárias correspondentes contendo o grupo isobutilcarbonato – sugeridas pela ausência de revelação de fenol em c.c.f. no teste com solução de FeCl_3 a 5%. Neste sentido, os compostos foram reduzidos com NaBH_4 em mistura metanol-etanol, à temperatura ambiente, fornecendo os derivados-alvo LDT576 (**55**) e LDT592 (**56**), em rendimentos de 82 e 67%, respectivamente. Algumas características destes compostos estão descritas na Tabela 3.

Tabela 3: Características dos derivados LDT576 (**55**) e LDT592 (**56**).

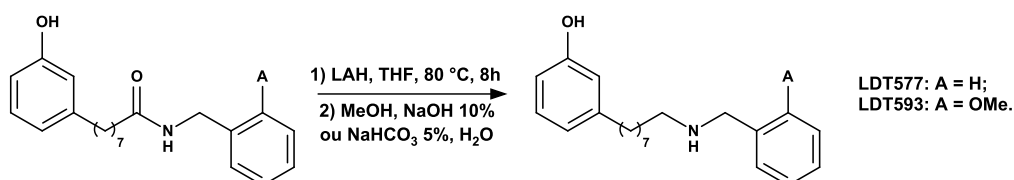


Composto	A	Fórmula Molecular	MM (g mol^{-1})	R (%)	R _f
LDT576 (55)	H	$\text{C}_{21}\text{H}_{27}\text{NO}_2$	325,45	82	0,40 ^b
LDT592 (56)	OMe	$\text{C}_{22}\text{H}_{29}\text{NO}_3$	355,47	67	0,40 ^a

MM: massa molecular; R (%): rendimento em percentagem; R_f: fator de retenção.

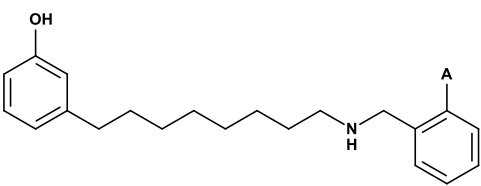
a – Hex_{80%}:AcOEt_{20%}; b – Hex_{50%}:AcOEt_{50%}.

Obtenção dos derivados amínicos



De posse das amidas LDT576 (**55**) e LDT592 (**56**), estas foram reduzidas na presença de hidreto de lítio e alumínio em tetraidrofurano anidro, sob agitação magnética à temperatura de refluxo, fornecendo os amino-derivados LDT577 (**57**), e LDT593 (**58**) em rendimento de 60 e 47%, respectivamente. As características dos derivados supracitados são descritas na Tabela 4.

Tabela 4: Características dos derivados LDT577 (**57**), e LDT593 (**58**).



LDT577: A = H;
LDT593: A = OMe.

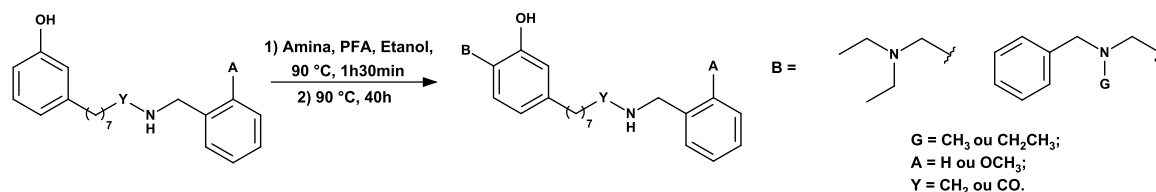
Composto	A	Fórmula Molecular	MM (gmol ⁻¹)	R (%)	R _f
LDT577 (57)	H	C ₂₁ H ₂₉ NO	311,46	60	0,33 ^a
LDT593 (58)	OMe	C ₂₂ H ₃₁ NO ₂	341,49	47	0,26 ^a

MM: massa molecular; R (%): rendimento em percentagem; R_f: fator de retenção.

a – Hex_{50%}:AcOEt_{50%}.

Obtenção dos derivados orto-aminometílicos via reação de Mannich

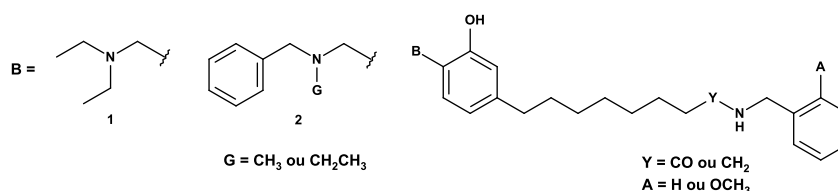
A partir das Amidas e Aminas



Visando a adição de grupos amina protonáveis no arcabouço molecular para interações íon-íon ou íon-dipolo com as ChE, os derivados amidas LDT576 (**55**), e LDT592 (**56**), e aminas LDT577 (**57**) e LDT593 (**58**) foram submetidos à reação de Mannich na presença de paraformaldeído e a respectiva amina em etanol, sob agitação magnética, à temperatura de refluxo por cerca de 40 horas.

A reação teve início com a formação do íon imínio a partir do paraformaldeído e a amina secundária, seguida de ataque regioespecífico no carbono 4' – orientado pela grupo fenol – fornecendo os derivados *orto*-aminometilssubstituídos LDT582 (**59**), LDT579 (**60**), LDT581 (**61**), LDT585 (**62**) e LDT587 (**63**), em rendimentos que variaram de 21-82%. Algumas das características destes compostos estão descritas na Tabela 5.

Tabela 5: Características dos derivados 59 até 63.



Composto	Y	A	B	G	Fórmula Molecular	MM (g·mol ⁻¹)	R (%)	R _f
LDT582 (59)	CO	H	1	-	C ₂₆ H ₃₈ N ₂ O ₂	410,60	59	0,60 ^c
LDT579 (60)	CH ₂	H	2	CH ₃	C ₃₀ H ₄₀ N ₂ O	444,66	82	0,72 ^c
LDT581 (61)	CH ₂	H	2	CH ₂ CH ₃	C ₃₁ H ₄₂ N ₂ O	458,69	68	0,35 ^a
LDT585 (62)	CH ₂	OCH ₃	2	CH ₃	C ₃₁ H ₄₂ N ₂ O ₂	474,68	22	0,63 ^b
LDT587 (63)	CH ₂	OCH ₃	2	CH ₂ CH ₃	C ₃₂ H ₄₄ N ₂ O ₂	488,71	21	0,57 ^b

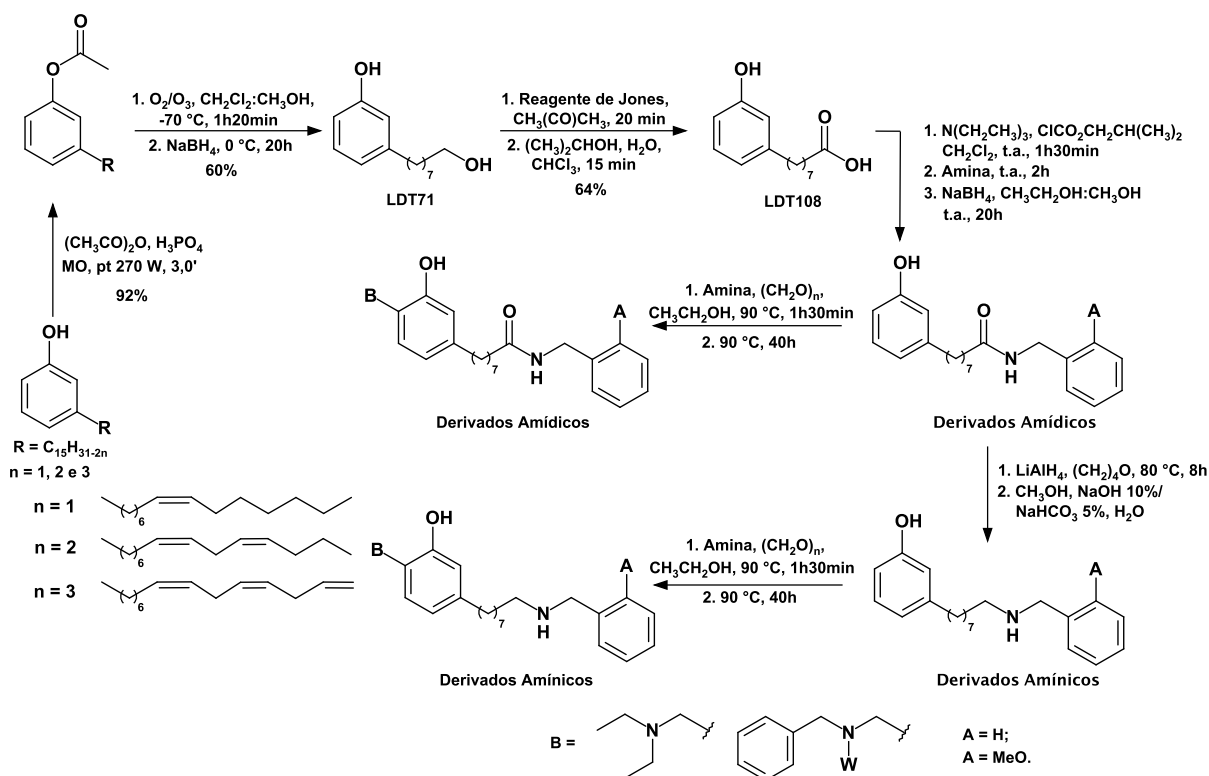
R (%): rendimento em percentagem; R_f: fator de retenção.

a – Hex₈₀%.AcOEt₂₀%; b – Hex₅₀%.AcOEt₅₀%; c – CHCl₃ 95%:MeOH₅%.

A metodologia geral na obtenção destes compostos está ilustrada no Esquema

2.

Esquema 2: Condições reacionais e metodologia utilizada na obtenção dos derivados.



7.3.1 Derivados Benzilamídicos e Benzilamínicos (Séries 1 e 2)

*Núcleo Benzílico (Anel **E** e Metileno **a**)*

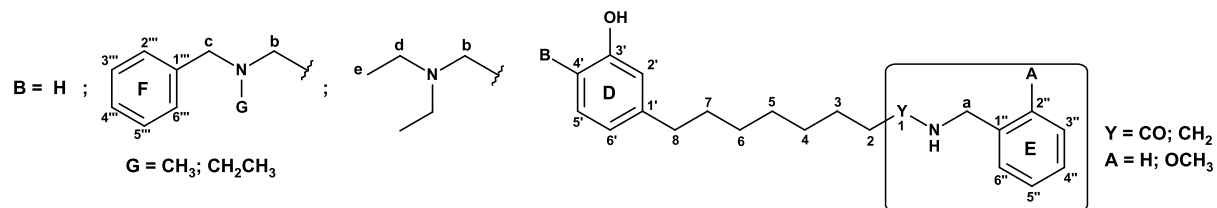
De maneira geral, a análise dos espectros de RMN de hidrogênio e de carbono-13 para os compostos amídicos e amínicos, incluindo os *orto*-hidroxiaminometilssubstituídos confirmou a presença do núcleo aromático **E** pela presença de diferentes multiplicidades na faixa de 7,25 ppm a 7,39 ppm (A = H) e 6,85 ppm a 7,36 ppm (A = OCH₃) em RMN de ¹H, bem como deslocamentos químicos entre 115,1 ppm a 138,5 ppm (A = H) e 110,5 ppm a 158,3 ppm (A = OCH₃) em RMN de ¹³C. Adicionalmente, os simpletos assinalados entre 3,48 ppm e 4,45 ppm em RMN de ¹H evidenciaram a presença do metileno **a**, os quais foram confirmados pelos sinais entre 39,7 ppm e 56,8 ppm em RMN de ¹³C.

Amidas x Aminas (Carbono 1)

A carbonila do grupo amida (carbono 1) foi assinalada pelos deslocamentos químicos na faixa de 173,2 ppm a 174,2 ppm em RMN de carbono-13. A redução do grupo amida foi evidenciada pelo sinal entre 46,7 ppm a 48,9 ppm em RMN de ¹³C bem como pelos assinalamentos como tripleto, multipletto e quarteto entre 2,57 ppm a 2,72 ppm em RMN de ¹H.

Os dados espectroscópicos pertinentes às características supracitadas estão apresentados nas Tabelas **6**.

Tabela 6: Dados de deslocamentos químicos de RMN de ^1H e RMN de ^{13}C (δ , ppm) para o núcleo benzílico (anel **E** e metileno **a**) para a Série 1 e 2 dos derivados amídicos e amínicos.



Derivados Série 1	RMN de ^1H (δ , ppm, 300 MHz ^a /500 MHz ^b) / RMN de ^{13}C (δ , ppm, 75 MHz ^a /125 MHz ^b), CDCl_3						
	Y	A	B	G	E	a	1
LDT576 (55) ^a	CO	H	H	---	7,25-7,31/115,1-138,1	4,42/44,0	--- /174,2
LDT577 (57) ^a	CH_2	H	H	---	7,26-7,34/128,8	3,48/53,5	2,66/48,9
LDT592 (56) ^a	CO	OCH_3	H	---	6,86-7,28/110,5-130,1	4,45/39,7	--- /173,6
LDT593 (58) ^b	CH_2	OCH_3	H	---	6,86-7,29/110,6-158,0	3,87/48,3	2,61/47,9
LDT582 (59) ^a	CO	H	DEA	---	7,26-7,31/127,5-138,5	4,42/43,6	---/173,2
LDT579 (60) ^b	CH_2	H	Bn	CH_3	7,27-7,39/127,7-137,2	3,84/53,4	2,65/48,9
LDT581 (61) ^a	CH_2	H	Bn	CH_2CH_3	7,26-7,34/128,4-137,3	3,82/56,8	2,57-2,72/46,7
LDT585 (62) ^a	CH_2	OCH_3	Bn	CH_3	6,85-7,35/110,5-158,0	3,87/55,3	2,60-2,67/48,2
LDT587 (63) ^a	CH_2	OCH_3	Bn	CH_2CH_3	7,22-7,36/110,8-158,3	3,86/56,8	2,60/46,7

DEA: Dietilamina; Bn: Benzila

7.3.2 Derivados *orto*-hidroxiaminometilsubstituídos (Série 2)

Núcleo Benzílico (Anel D e Metileno b)

Na análise dos espectros de RMN de hidrogênio dos compostos da série 2, os hidrogênios do núcleo aromático **D** foram caracterizados como dupletos ou sinal largo na faixa de 6,59 ppm a 6,96 ppm bem como pelos deslocamentos químicos entre 116,2 ppm a 157,9 ppm nos espectros de RMN de ^{13}C , Tabela 7. Por sua vez, os grupos metilenos **b** foram assinalados como simpletos entre 3,61 ppm e 3,82 ppm em RMN de ^1H , ratificados pelos sinais entre 46,2 ppm e 60,9 ppm em RMN de carbono-13.

Núcleo Benzílico (Anel F e Metileno c)

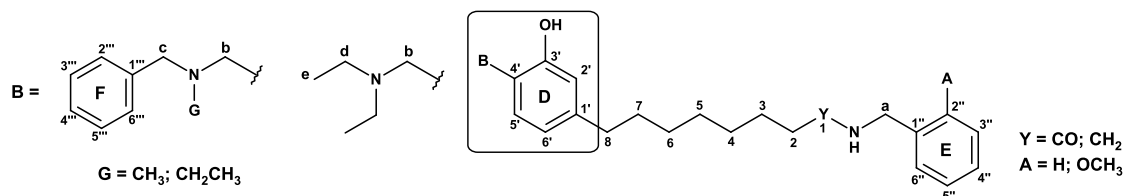
O núcleo aromático **F** das *N*-alquilbenzilaminas foi caracterizado pela presença de sinais em RMN de hidrogênio na região de aromáticos como multipletos na faixa de 7,20 ppm a 7,39 ppm nos espectros de RMN de ^1H , bem como deslocamentos químicos entre 127,7 ppm a 137,2 ppm em RMN de ^{13}C , Tabela 8. Por sua vez, os grupos metilenos **c** foram observados como simpletos na faixa entre 3,59 ppm e 3,62 ppm em RMN de ^1H e ratificados como sinais entre 57,7 ppm a 63,2 ppm em RMN de ^{13}C .

Substituintes N-Alquilbenzilamínicos (G = CH₃ ou CH₂CH₃)

O substituinte *N*-metila (NCH_3) dos compostos da série 2 foi identificado como simpleto na faixa de 2,23 ppm a 2,24 ppm (RMN de ^1H) e deslocamento químico em 41,5 ppm (RMN de ^{13}C).

O padrão de substituição com o grupo *N*-etila (NCH_2CH_3) – exclusivo para a Série 2 – foi observado como quarteto em 2,60 ppm para o grupo metileno; e tripleto em 1,13 ppm em RMN de ^1H para o grupo metila da subunidade etila, respectivamente. O grupo *N*-etil foi ainda identificado em RMN de carbono-13 pelos deslocamentos químicos em 53,3 ppm (NCH_2CH_3) e 11,2 ppm (NCH_2CH_3).

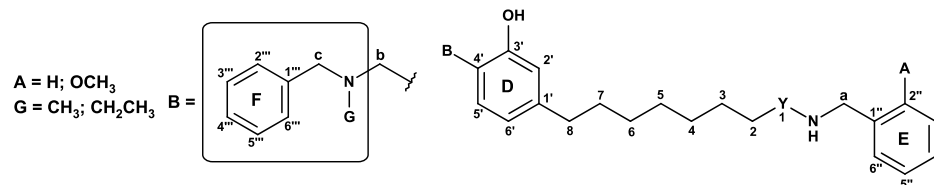
Tabela 7: Dados de deslocamentos químicos de RMN de ^1H e RMN de ^{13}C (δ , ppm) para o núcleo benzílico (anel **D** e metileno **b**), *N*-substituintes (Série 2).



Derivados Série 2	RMN de ^1H (δ , ppm, 300 MHz ^a /500 MHz ^b) / RMN de ^{13}C (δ , ppm, 75 MHz ^a /125 MHz ^b), CDCl_3					
	Y	A	B	G	D	b
LDT582 (59) ^a	CO	H	DEA	---	6,60-6,94/116,8-157,5	3,82/46,2
LDT579 (60) ^b	CH ₂	H	Bn	CH ₃	6,64-6,96/116,2-157,8	3,72/60,9
LDT581 (61) ^a	CH ₂	H	Bn	CH ₂ CH ₃	6,59-6,68/116,2-157,9	3,61/57,7
LDT585 (62) ^a	CH ₂	OCH ₃	Bn	CH ₃	6,60-6,94/116,2-157,8	3,68/60,9
LDT587 (63) ^a	CH ₂	OCH ₃	Bn	CH ₂ CH ₃	6,59-6,93/116,3-157,9	3,74/57,7

DEA: Dietilamina; Bn: Benzila

Tabela 8: Dados de deslocamentos químicos de RMN de ^1H e RMN de ^{13}C (δ , ppm) para o núcleo benzílico (anel **F** e metileno **c**), *N*-substituintes (Série 2).



Derivados Série 2	RMN de ^1H (δ , ppm, 300 MHz ^a /500 MHz ^b) / RMN de ^{13}C (δ , ppm, 75 MHz ^a /125 MHz ^b), CDCl_3									
	Y	A	B	G	F	c	NCH ₃	NCH ₂ CH ₃	NCH ₂ CH ₃	1
LDT579 (60) ^b	CH ₂	H	Bn	CH ₃	7,27-7,39/127,8-137,2	3,60/61,6	2,24/41,5	---	---	2,65/48,9
LDT581 (61) ^a	CH ₂	H	Bn	CH ₂ CH ₃	7,26-7,34/128,4-129,8	3,61/57,7	---	2,60/---	1,13/11,2	2,57-2,72/46,7
LDT585 (62) ^a	CH ₂	OCH ₃	Bn	CH ₃	7,20-7,35-127,8-137,2	3,59/61,6	2,23/41,5	---	---	2,60-2,67/48,2
LDT587 (63) ^a	CH ₂	OCH ₃	Bn	CH ₂ CH ₃	7,22-7,36/127,7-137,2	3,62/63,2	---	---/53,3	1,13/11,2	2,60/33,0

DEA: Dietilamina; Bn: Benzila

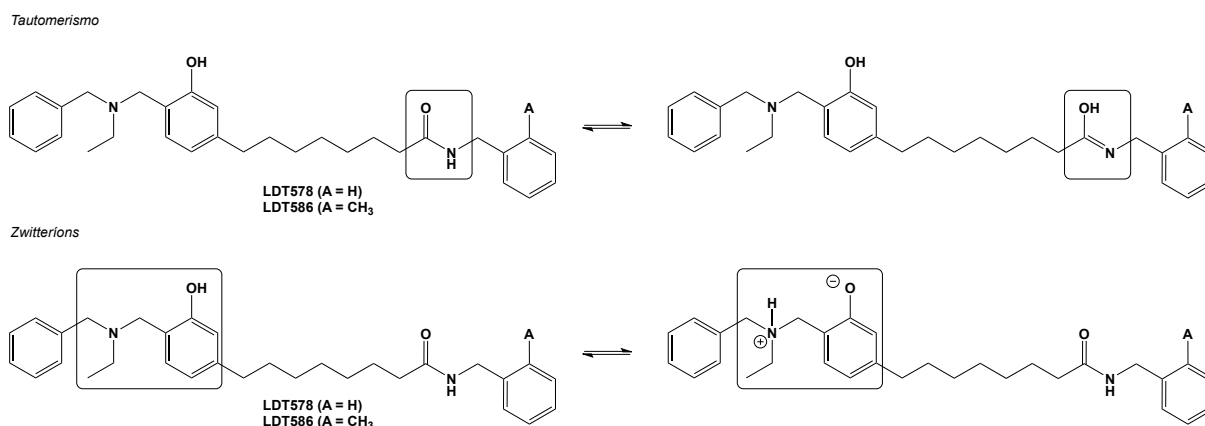
7.3.3 Derivados Benzilamídicos e Benzilamínicos: Tautomerismo e Zwitteríons

Tautomerismo de amidas e Zwitteríons de aminas

A tautomeria é um tipo de isomeria funcional – que ocorre com ésteres, amidas, nitrila entre outros – em que dois isômeros coexistem em equilíbrio dinâmico. Por sua vez, *Zwitterion* – sal interno ou íon dipolar – consiste num composto químico eletricamente neutro, mas que possui cargas opostas que se cancelam. Comum em aminoácidos, esta forma dipolar ocorre pela transferência do átomo de hidrogênio de um sítio ácido para o nitrogênio básico de aminas.

Durante as análises dos espectros de RMN de hidrogênio e carbono 13 de derivados amídicos contendo grupos aminas foram observadas integração dupla para ^1H RMN do derivado LDT578 (**64**) e complexidade do ^{13}C RMN do derivado LDT586 (**65**, Figura 21), que podem estar associadas a estas características isomérica ou ácido-base.

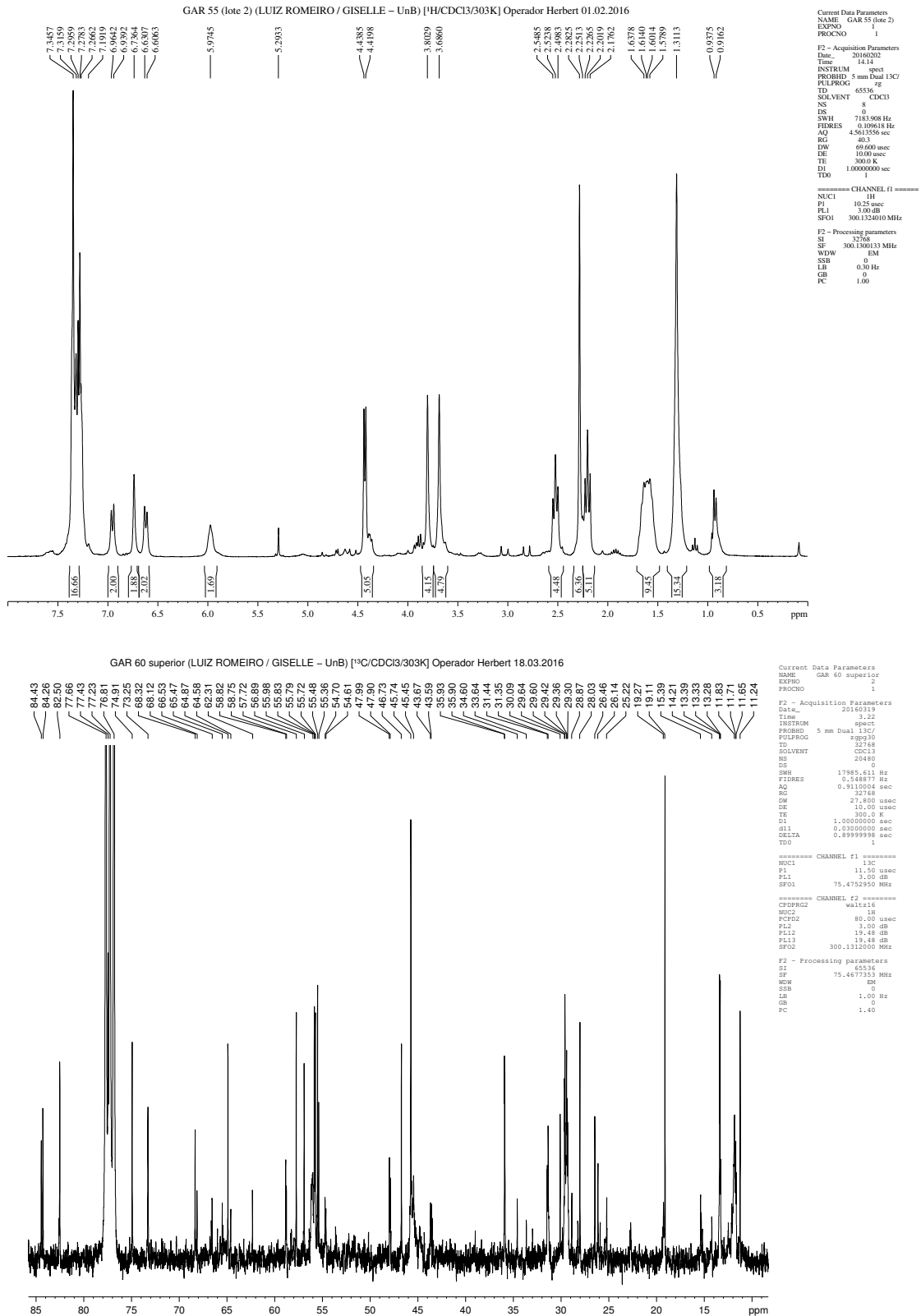
Figura 21: Exemplo de tautomerismo e Zwitterions para derivados amídicos.



A princípio, a complexidade dos espectros (Figura 22) foi relacionada às impurezas das amostras. Neste sentido, todas as reações foram cuidadosamente repetidas e duplamente purificadas em coluna de gel de sílica e pelo sistema de cromatografia flash Biotage; entretanto apresentaram o mesmo resultado. Entendendo que estas características – inerentes a estes compostos – demandam o aprofundamento de estudos de RMN para compreensão do comportamento das moléculas em soluções que mimetizem o pH dos ensaios biológicos estabelecidos neste trabalho, decidimos sobrestar parcialmente o estudo com as séries 1 e 2, e

iniciar um novo planejamento estrutural partindo do mesmo intermediário precursor LDT71 (53).

Figura 22: Espectros de RMN para LDT578 (64) e LDT586 (65).

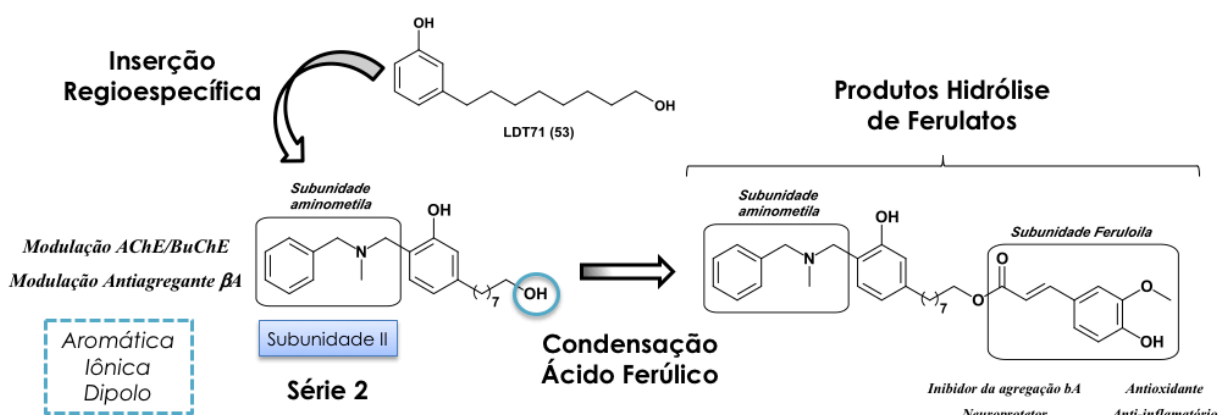


8 PLANEJAMENTO ESTRUTURAL – SÉRIE 3

Os novos derivados *orto*-aminometilfenóis (série 3, Figura 23) foram idealizados a partir do intermediário dihidroxilado LDT71 (53) pela inserção regioespecífica de grupos aminometila na posição 4' (*orto*) ao fenol de 53 – correspondendo à Subunidade II do planejamento inicial da série 2 – com manutenção do álcool primário. Como estabelecido anteriormente, a presença de amins terciárias benzílica, como no derivado AP2238 (52), bem como dietilamina e amins heterocíclicas não aromáticas nos novos derivados visa estudos das interações com resíduos complementares, dos perfis de seletividade (AChE/BuChE), antioxidante e de interferência na agregação de proteínas β A.

A presença do álcool primário, por sua vez, pode ser utilizado para condensação com o ácido ferúlico (66) que é conhecido por seus efeitos farmacológicos como inibidor da agregação β A, neuroprotetor, antioxidante e anti-inflamatório (DIAS et al, 2017; ZHANG et al, 2018). Neste contexto, os novos derivados, como produtos da hidrólise de ferulatos por esterases, seriam investigados quanto aos efeitos sinérgicos àqueles observados pelo ácido ferúlico para a DA.

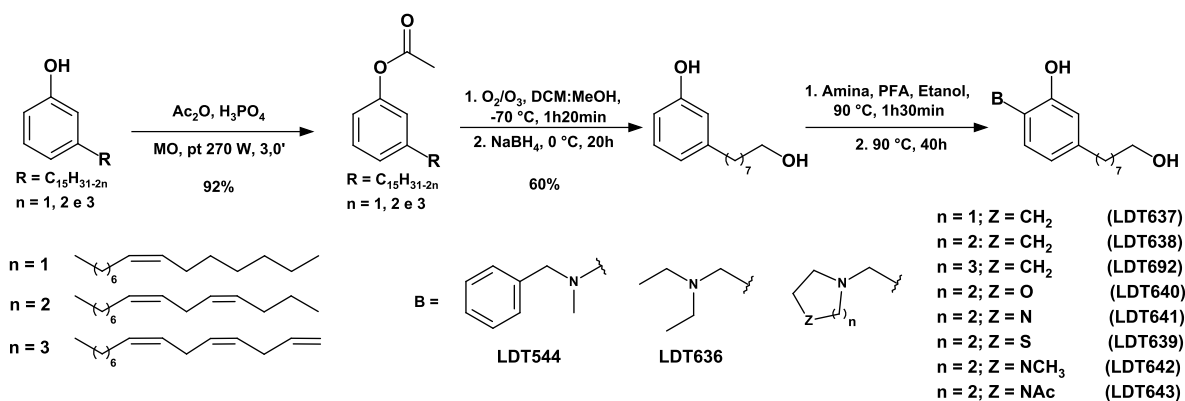
Figura 23: Planejamento das séries de compostos-alvos a partir de LDT71 (53).



9 PLANEJAMENTO SINTÉTICO – SÉRIE 3

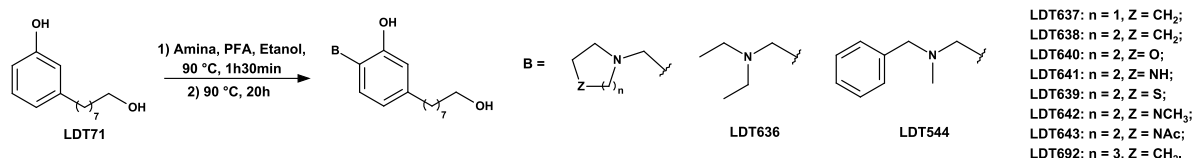
O planejamento sintético para a obtenção dos derivados-alvo da série **3** foi concebido a partir de Reação de Mannich (Esquema **3**) de acordo com as metodologias desenvolvidas para a série 2, descritas na página **50**.

Esquema 3: Metodologia sintética geral para obtenção dos derivados da série 3.



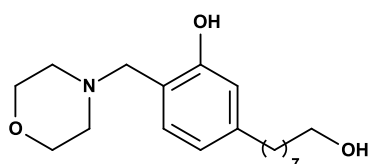
10 PARTE EXPERIMENTAL – SÉRIE 3

10.1 OBTENÇÃO DOS DERIVADOS SÉRIE 3



O procedimento sintético adotado foi o mesmo realizado para a síntese dos derivados-alvo *orto*-aminas, descritos na página 67.

5-(8-Hidróxiocetil)-2-[(morfolin-4-il)metil]fenol (LDT640, 67)



Óleo amarelo

Rendimento (57%)

Rf: 0,47 (CHCl₃ 95%:EtOH5%)

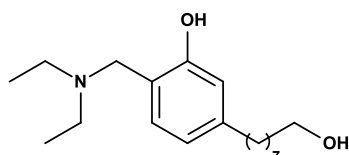
Fórmula Molecular: C₁₉H₃₁NO₃

IV (KBr) $\nu_{\text{máx}}$ cm⁻¹: 3436 (ν_{OH}); 2928 ($\nu_{\text{as CH}_2}$); 2854 ($\nu_{\text{s CH}_2}$); 1581-1455 ($\nu_{\text{C=C}}$); 1274 (ν_{ArOH}); 1119 ($\nu_{\text{C-N}}$); 1071 ($\nu_{\text{C-O}}$); 865 e 755 ($\nu_{\text{Ar-1,3,5-Tri}}$).

RMN de ¹H (300 MHz, CDCl₃ Anexo 26, pág 170): δ 1,31 (sl, 8H, 3-6); 1,53-1,58 (m, 4H, 2 e 7); 2,52 (m, 6H, 8 e OCH₂CH₂N, **c**); 3,61 (t, $J = 6,6$ Hz, 2H, 1); 3,66 (s, 2H, NCH₂, **b**); 3,74 (t, $J = 4,2$ Hz, 4H, OCH₂CH₂N, **d**); 6,60 (dd, $J = 7,5$ Hz, $J = 1,5$ Hz 1H, 6'); 6,65 (sl, 1H, 2'); 6,80 (d, $J = 7,5$ Hz, 1H, 5').

RMN de ¹³C (75 MHz, CDCl₃ Anexo 27, pág 171): δ 25,9 (CH₂, 3); 29,4 (CH₂, 6); 29,5 (CH₂, 5); 29,6 (CH₂, 4); 31,4 (CH₂, 7); 32,9 (CH₂, 2); 35,8 (CH₂, 8); 53,0 (OCH₂CH₂N, **c**); 61,8 (NCH₂, **b**); 63,1 (CH₂, 1); 66,9 (OCH₂CH₂N, **d**); 116,1 (CH, 2'); 118,0 (C, 4'); 119,6 (CH, 6'); 128,7 (CH, 5'); 144,3 (C, 1'); 157,4 (C, 3').

2-[(Dietilamino)metil]-5-(8-hidróxiocetil)fenol (LDT636, 68)



Óleo amarelo

Rendimento (72%)

Rf: 0,42 (CHCl₃ 95%:EtOH5%)

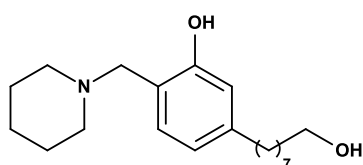
Fórmula Molecular: C₁₉H₃₃NO₂

IV (KBr) $\nu_{\text{máx}} \text{ cm}^{-1}$: 3401 (ν_{OH}); 2928 ($\nu_{\text{as CH}_2}$); 2854 ($\nu_{\text{s CH}_2}$); 1582-1457 ($\nu_{\text{C=C}}$); 1273 (ν_{ArOH}); 1115 ($\nu_{\text{C-N}}$); 756 ($\nu_{\text{Ar-1,3,5-Tri}}$).

RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3 Anexo 29, pág 173): δ 1,11 (t, $J = 7,1$ Hz, 6H, $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{N}$, **d**); 1,27-1,32 (sl, 8H, 3-6); 1,56 (qi, $J = 6,9$ Hz, 4H, 2 e 7); 2,52 (t, $J = 7,7$, 2H, 8); 2,62 (q, $J = 7,1$ Hz, 4H, $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{N}$, **c**); 3,62 (t, $J = 6,6$ Hz, 2H, 1); 3,73 (sl, 2H, NCH_2 , **b**); 6,59 (d, $J = 7,5$ Hz, 1H, 6'); 6,63 (sl, 1H, 2'); 6,80 (d, $J = 7,5$ Hz, 1H, 5').

RMN de ^{13}C (75 MHz, CDCl_3 Anexo 30, pág 174): δ 11,3 ($\text{CH}_3\text{CH}_2\text{N}$, **d**); 25,9 (CH_2 , 3); 29,4 (CH_2 , 6); 29,5 (CH_2 , 5); 29,6 (CH_2 , 4); 31,4 (CH_2 , 7); 32,9 (CH_2 , 2); 35,8 (CH_2 , 8); 46,4 ($\text{CH}_3\text{CH}_2\text{N}$, **c**); 56,8 (NCH_2 , **b**); 63,2 (CH_2 , 1); 116,2 (C , 2'); 119,1 (CH , 6'); 119,4 (CH , 4'); 128,2 (CH , 5'); 143,7 (C , 1'); 158,2 (C , 3').

5-(8-Hidróxiocetil)-2-[(piperidin-1-il)metil]fenol (LDT638, **69**)



Óleo amarelo

Rendimento (81%)

Rf: 0,44 (CHCl_3 95%:EtOH 5%)

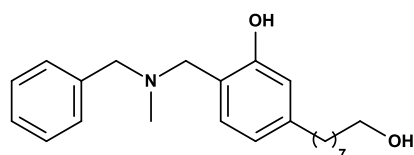
Fórmula Molecular: $\text{C}_{20}\text{H}_{33}\text{NO}_2$

IV (KBr) $\nu_{\text{máx}} \text{ cm}^{-1}$: 3435 (ν_{OH}); 2930 ($\nu_{\text{as CH}_2}$); 2855 ($\nu_{\text{s CH}_2}$); 1582-1455 ($\nu_{\text{C=C}}$); 1279 (ν_{ArOH}); 1154 ($\nu_{\text{C-N}}$); 860 e 756 ($\nu_{\text{Ar-1,3,5-Tri}}$).

RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3 Anexo 32, pág 176): δ 1,32 (sl, 8H, 3-6); 1,52-1,67 (m, 10H, 2, 7 e $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}$, **d e e**); 2,52 (t, $J = 7,7$, 4H, 8); 3,60 (t, $J = 6,0$ Hz, 4H, 1 e $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}$, **c**); 6,58 (dd, $J = 7,5$ Hz, $J = 1,5$ Hz 1H, 6'); 6,65 (sl, 1H, 2'); 6,85 (d, $J = 7,5$ Hz, 1H, 5').

RMN de ^{13}C (75 MHz, CDCl_3 Anexo 337, pág 177): δ 24,2 ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}$, **e**); 25,9 ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}$, **d**); 26,0 (CH_2 , 3); 29,4 (CH_2 , 6); 29,4 (CH_2 , 4); 29,4 (CH_2 , 5); 31,4 (CH_2 , 2); 32,9 (CH_2 , 7); 35,8 (CH_2 , 1); 54,0 ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}$, **c**); 62,0 (NCH_2 , **b**); 63,2 (CH_2 , 8); 116,1 (CH , 2'); 118,9 (C , 4'); 119,2 (CH , 6'); 128,4 (CH , 5'); 143,8 (C , 3'); 158,0 (C , 1').

2-[[Benzil(metil)amino]metil]-5-(8-hidróxiocetil)fenol (LDT544, **70**)



Óleo amarelo

Rendimento (63%)

Rf: 0,48 (CHCl_3 95%:EtOH 5%)

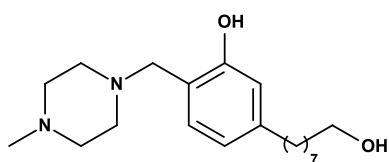
Fórmula Molecular: $\text{C}_{23}\text{H}_{33}\text{NO}_2$

IV (KBr) $\nu_{\text{máx}} \text{ cm}^{-1}$: 3390 (ν_{OH}); 2928 ($\nu_{\text{as CH}_2}$); 2853 ($\nu_{\text{s CH}_2}$); 1581-1453 ($\nu_{\text{C=C}}$); 1274 (ν_{ArOCH_3}); 1119 ($\nu_{\text{C-N}}$); 1071 ($\nu_{\text{C-O}}$); 755 e 699 ($\nu_{\text{Ar-1,3,5-Tri}}$).

RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3 Anexo 35, pág 179): δ 1,32 (sl, 8H, 3-6); 1,56 (m, 4H, 2 e 7); 2,25 (s, 3H, NCH_3); 2,54 (t, $J = 7,7$, 2H, 8); 3,61 (s, 2H, CH_2N , **c**); 3,63 (t, $J = 6,6$ Hz, 2H, 1); 3,73 (sl, 2H, NCH_2 , **b**); 6,62 (dd, $J = 7,6$ Hz, $J = 1,5$ Hz 1H, 6'); 6,70 (sl, 1H, 2'); 6,90 (d, $J = 7,6$ Hz, 1H, 5'); 7,29-7,38 (m, 5H, 1'', 2'', 3'', 4'' e 5'').

RMN de ^{13}C (75 MHz, CDCl_3 Anexo 36, pág 180): δ 25,9 (CH_2 , 6); 29,4 (CH_2 , 6); 29,4 (CH_2 , 4); 29,4 (CH_2 , 5); 31,4 (CH_2 , 2); 33,0 (CH_2 , 7); 35,9 (CH_2 , 1); 41,4 (NCH_3); 60,8 (CH_2N , **c**); 61,5 (NCH_2 , **b**); 63,2 (CH_2 , 1); 116,2 (CH , 2'); 119,2 (C , 4'); 119,5 (CH , 6'); 127,8 (CH , 4''); 128,5 (CH , 5'); 128,8 (CH , 2'' e 6''); 129,5 (CH , 3'' e 5''); 137,0 (C , 1''); 144,2 (C , 3'); 157,8 (C , 1').

5-(8-Hidróxiocetil)-2-[(4-metilpiperazin-1-il)metil]fenol (LDT642, **71**)



Óleo amarelo

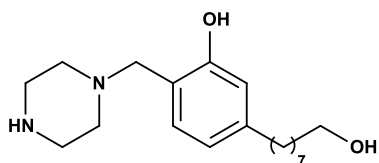
Rendimento (72%)

Rf: 0,51 (CHCl_3 95%:EtOH5%)

Fórmula Molecular: $\text{C}_{20}\text{H}_{34}\text{N}_2\text{O}_2$

RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3 Anexo 37, pág 181): δ 1,30 (sl, 8H, 3-6); 1,52-1,56 (m, 4H, 2 e 7); 2,29 (s, 3H, NCH_3 e $\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{N}$, **d**); 2,51 (t, $J = 7,6$, 3H, 8 e $\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{N}$, **c**); 3,60 (t, $J = 6,6$ Hz, 2H, 1); 3,67 (s, 2H, NCH_2 , **b**); 6,58 (d, $J = 7,1$ Hz, 1H, 6'); 6,64 (s, 1H, 2'); 6,85 (d, $J = 7,5$ Hz, 1H, 5').

RMN de ^{13}C (125 MHz, CDCl_3 Anexo 38, pág 182): δ 25,9 (CH_2 , 3); 29,4 (CH_2 , 6); 29,5 (CH_2 , 4); 29,6 (CH_2 , 5); 31,4 (CH_2 , 7); 32,9 (CH_2 , 2); 35,8 (CH_2 , 8); 45,9 (NCH_3); 52,4 ($\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{N}$, **c**); 55,0 ($\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{N}$, **d**); 61,2 (NCH_2 , **b**); 62,9 (CH_2 , 1); 116,0 (CH , 2'); 118,4 (C , 4'); 119,4 (CH , 6'); 128,6 (CH , 5'); 144,1 (C , 1'); 157,5 (C , 1').

5-(8-Hidróxiocetil)-2-[(piperazin-1-il)metil]fenol (LDT641, **72**)

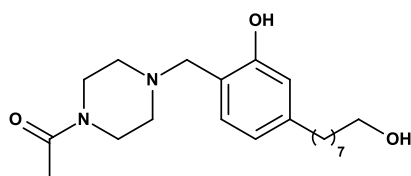
Óleo amarelo

Rendimento (48%)

Rf: 0,51 (CHCl₃ 95%:EtOH₅%)Fórmula Molecular: C₁₉H₃₂N₂O₂

RMN de ¹H (300 MHz, CDCl₃ Anexo 39, pág 183): δ 1,30 (sl, 8H, 3-6); 1,55-1,57 (m, 4H, 2 e 7); 2,52 (t, *J* = 7,5, 2H, 8); 3,62 (t, *J* = 6,5 Hz, 2H, 1); 3,68 (s, 2H, NCH₂, **b**); 4,04 (s, 1H, NH); 6,61 (d, *J* = 7,3 Hz, 1H, 2'); 6,64 (s, 1H, 5'); 6,87 (d, *J* = 7,5 Hz, 1H, 6').

RMN de ¹³C (75 MHz, CDCl₃ Anexo 40, pág 184): δ 25,9 (CH₂, 3); 29,4 (CH₂, 6); 29,5 (CH₂, 4); 29,6 (CH₂, 5); 31,4 (CH₂, 7); 32,9 (CH₂, 2); 35,8 (CH₂, 8); 52,5 (NCH₂CH₂N, **c** e **d**); 61,1 (NCH₂, **b**); 63,2 (CH₂, 1); 116,2 (CH, 2'); 118,2 (C, 4'); 119,6 (CH, 6'); 128,7 (CH, 5'); 144,3 (C, 1'); 157,5 (C, 1').

1-(4-{[2-Hidróxi-4-(8-hidróxiocetil)fenil]metil}piperazin-1-il)etan-1-ona (LDT643, **73**)

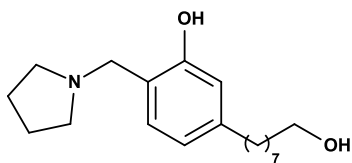
Óleo amarelo

Rendimento (76%)

Rf: 0,51 (CHCl₃ 95%:EtOH₅%)Fórmula Molecular: C₂₁H₃₄N₂O₃

RMN de ¹H (300 MHz, CDCl₃ Anexo 41, pág 185): δ 1,39 (sl, 8H, 3-6); 1,64 (d, *J* = 5,9 Hz, 4H, 2 e 7); 2,17 (s, 3H, NCOCH₃); 2,60 (t, *J* = 7,6, 6H, 8 e NCH₂CH₂N, **d**); 3,60 (sl, 4H, NCH₂CH₂N, **c**); 3,70 (t, *J* = 6,4 Hz, 2H, 1); 3,78 (s, 2H, NCH₂Ar); 6,70 (d, *J* = 7,5 Hz, 1H, 2'); 6,76 (s, 1H, 6'); 6,96 (d, *J* = 7,3 Hz, 1H, 5').

RMN de ¹³C (75 MHz, CDCl₃ Anexo 41, pág 186): δ 21,4 (NCOCH₃); 25,9 (CH₂, 3); 29,4 (CH₂, 6); 29,5 (CH₂, 4); 29,6 (CH₂, 5); 31,4 (CH₂, 7); 32,9 (CH₂, 2); 35,8 (CH₂, 8); 41,3 (NCH₂CH₂N, **c**); 46,1 (NCH₂CH₂N, **c**); 52,4 (NCH₂CH₂N, **d**); 52,6 (NCH₂CH₂N, **d**); 61,1 (NCH₂, **b**); 63,2 (CH₂, 1); 116,4 (CH, 2'); 117,7 (C, 4'); 119,8 (CH, 6'); 129,0 (CH, 5'); 144,7 (C, 1'); 157,3 (C, 1'); 169,2 (NCOCH₃).

5-(8-Hidróxiocetil)-2-[[pirrolidin-1-il]metil]fenol (LDT637, **74**)

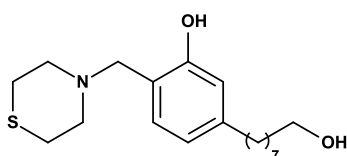
Óleo amarelo

Rendimento (48%)

Rf: 0,55 (CHCl₃ 95%:EtOH₅%)Fórmula Molecular: C₁₉H₃₁NO₂

RMN de ¹H (300 MHz, CDCl₃ Anexo 43, pág 187): δ 1,31 (sl, 8H, 3-6); 1,55 (m, 4H, 2 e 7); 1,83 (s, 4H $\underline{\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}}$, **d**); 2,52 (t, $J = 7,6$, 2H, 8); 2,62 (s, 4H, $\text{CH}_2\underline{\text{CH}_2\text{N}}$, **c**); 3,62 (t, $J = 6,6$ Hz, 2H, 1); 3,78 (s, 2H, NCH_2 , **b**); 6,57 (d, $J = 7,5$ Hz, 1H, 6'); 6,64 (s, 1H, 6'); 6,86 (d, $J = 7,5$ Hz, 1H, 5').

RMN de ¹³C (75 MHz, CDCl₃ Anexo 44, pág 188): δ 23,8 ($\underline{\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}}$ **d**); 25,9 ($\underline{\text{CH}_2}$, 3); 29,4 ($\underline{\text{CH}_2}$, 6); 29,5 ($\underline{\text{CH}_2}$, 4); 29,6 ($\underline{\text{CH}_2}$, 5); 31,4 ($\underline{\text{CH}_2}$, 7); 32,9 ($\underline{\text{CH}_2}$, 2); 35,8 ($\underline{\text{CH}_2}$, 8); 53,6 ($\text{CH}_2\underline{\text{CH}_2\text{N}}$ **c**); 58,7 (NCH_2 , **b**); 63,2 ($\underline{\text{CH}_2}$, 1); 116,0 ($\underline{\text{CH}}$, 2'); 119,1 ($\underline{\text{CH}}$, 6'); 119,8 ($\underline{\text{C}}$, 4'); 127,7 ($\underline{\text{CH}}$, 5'); 143,8 ($\underline{\text{C}}$, 1'); 157,9 ($\underline{\text{C}}$, 1').

5-(8-Hidróxiocetil)-2-[[tiomorfolin-4-il]metil]fenol (LDT639, **75**)

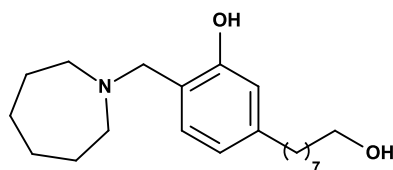
Óleo amarelo

Rendimento (45%)

Rf: 0,62 (CHCl₃ 95%:EtOH₅%)Fórmula Molecular: C₁₉H₃₁NO₂S

RMN de ¹H (300 MHz, CDCl₃ Anexo 45, pág 189): δ 1,32 (sl, 8H, 3-6); 1,56-1,58 (m, 4H, 2 e 7); 2,53 (t, $J = 7,5$, 2H, 8); 2,73 (sl, 4H, $\text{SCH}_2\text{CH}_2\text{N}$, **d**); 2,82 (sl, 4H, $\text{SCH}_2\underline{\text{CH}_2\text{N}}$, **c**); 3,63 (t, $J = 6,5$ Hz, 2H, 1); 3,68 (s, 2H, NCH_2 , **b**); 6,60 (d, $J = 7,4$ Hz, 1H, 6'); 6,65 (s, 1H, 2'); 6,86 (d, $J = 7,5$ Hz, 1H, 5').

RMN de ¹³C (75 MHz, CDCl₃ Anexo 46, pág 190): δ 25,9 ($\underline{\text{CH}_2}$, 3); 28,1 ($\text{SCH}_2\text{CH}_2\text{N}$, **d**); 29,4 ($\underline{\text{CH}_2}$, 6); 29,5 ($\underline{\text{CH}_2}$, 4); 29,6 ($\underline{\text{CH}_2}$, 5); 31,4 ($\underline{\text{CH}_2}$, 7); 33,0 ($\underline{\text{CH}_2}$, 2); 35,8 ($\underline{\text{CH}_2}$, 8); 54,5 ($\text{SCH}_2\underline{\text{CH}_2\text{N}}$, **c**); 62,1 (NCH_2 , **b**); 63,1 ($\underline{\text{CH}_2}$, 1); 116,2 ($\underline{\text{CH}}$, 2'); 118,0 ($\underline{\text{C}}$, 4'); 119,6 ($\underline{\text{CH}}$, 6'); 128,8 ($\underline{\text{CH}}$, 5'); 144,4 ($\underline{\text{C}}$, 1'); 157,6 ($\underline{\text{C}}$, 1').

2-[(azepan-1-il)metil]-5-(8-hidróxiocetil)fenol (LDT692, **76**)

Óleo amarelo

Rendimento (32%)

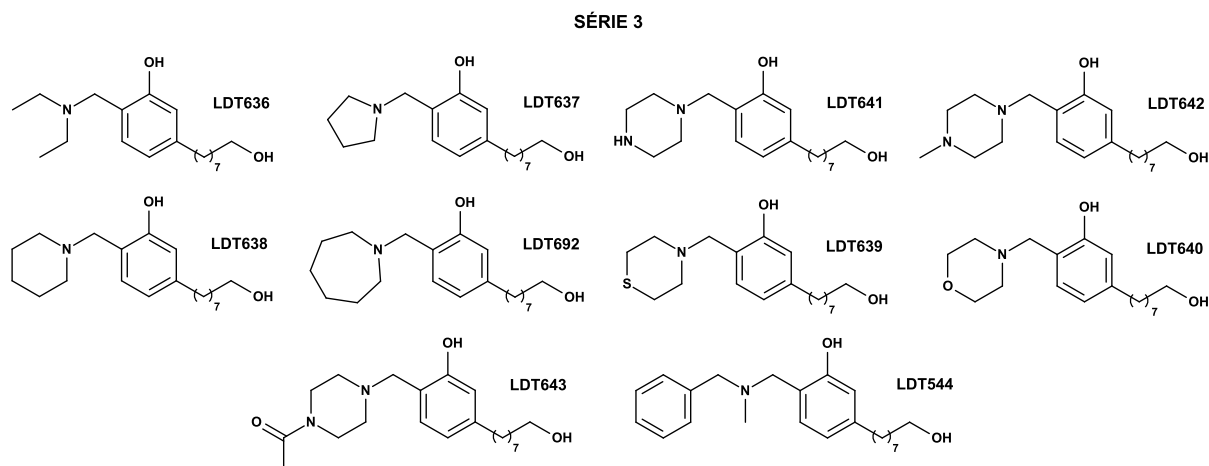
Rf: 0,57 (CHCl₃ 95%:EtOH₅%)Fórmula Molecular: C₂₁H₃₅NO₂

RMN de ¹H (500 MHz, CDCl₃ Anexo 47, pág 191): δ 1,36 (sl, 8H, 3-6); 1,56-1,73 (m, 4H, 2, e 7); 1,67 (sl, 4H, CH₂CH₂CH₂N, e); 1,73 (sl, 4H, CH₂CH₂CH₂N, d); 2,56 (t, *J* = 7,7 Hz, 2H, 8); 2,74 (sl, 4H, CH₂CH₂CH₂N, c); 3,66 (t, *J* = 6,6 Hz, 2H, 1); 3,78 (s, 2H, NCH₂, b); 6,61 (d, *J* = 7,4 Hz, 1H, 6'); 6,68 (s, 1H, 2'); 6,87 (d, *J* = 7,5 Hz, 1H, 5').

RMN de ¹³C (125 MHz, CDCl₃ Anexo 47, pág 192): δ 25,9 (CH₂, 3); 26,8 (CH₂CH₂CH₂N, e); 27,8 (CH₂CH₂CH₂N, d); 29,4 (CH₂, 6); 29,5 (CH₂, 4); 29,6 (CH₂, 5); 31,4 (CH₂, 7); 32,9 (CH₂, 2); 35,8 (CH₂, 8); 55,4 (CH₂CH₂CH₂N, c); 62,0 (NCH₂, b); 63,2 (CH₂, 1); 116,1 (CH, 2'); 119,0 (C, 6'); 119,7 (CH, 4'); 128,2 (CH, 5'); 143,8 (C, 1'); 158,3 (C, 3').

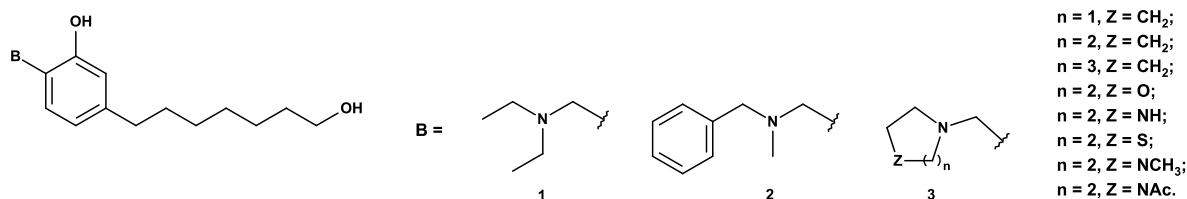
A Figura **24** apresenta as estruturas dos derivados da série 3.

Figura **24**: Derivados da Série 3.



Desta maneira, os álcoois LDT640 (**67**), LDT636 (**68**), LDT638 (**69**), LDT544 (**70**), LDT637 (**74**), LDT639 (**75**), LDT641 (**72**), LDT642 (**71**), LDT643 (**73**) e LDT692 (**76**) foram submetidos à reação de Mannich com dietilamina, *N*-benzil-*N*-metilamina e aminas heterocíclicas, cujos resultados estão descritos na Tabela **9**.

Tabela 9: Características dos derivados 67 até 76.



Composto	B	n	Z	Fórmula Molecular	MM (g·mol ⁻¹)	R (%)	R _f (CHCl ₃ 95%:EtOH5%)
LDT544 (70)	2	-	-	C ₂₃ H ₃₃ NO ₂	355,52	63	0,48
LDT636 (68)	1	-	-	C ₁₉ H ₃₃ NO ₂	307,47	72	0,42
LDT640 (67)	3	2	O	C ₁₉ H ₃₁ NO ₃	321,46	57	0,47
LDT638 (73)	3	2	CH ₂	C ₂₀ H ₃₃ NO ₂	319,48	81	0,44
LDT637 (74)	3	1	CH ₂	C ₂₁ H ₃₄ N ₂ O ₃	362,51	76	0,51
LDT639 (75)	3	2	S	C ₂₀ H ₃₄ N ₂ O ₂	325,44	72	0,51
LDT641 (72)	3	2	NH	C ₁₉ H ₃₂ N ₂ O ₂	320,47	75	0,51
LDT642 (71)	3	2	NCH ₃	C ₁₉ H ₃₁ NO ₂	305,46	48	0,55
LDT643 (73)	3	2	NCOCH ₃	C ₁₉ H ₃₁ NO ₂ S	337,52	45	0,62
LDT692 (76)	3	3	CH ₂	C ₂₁ H ₃₅ NO ₂	333,51	32	0,57

MM: massa molecular; R (%): rendimento em percentagem; R_f: fator de retenção.

10.1.2 Caracterização dos Derivados *orto*-hidróxiaminometilsubstituídos (Série 3)

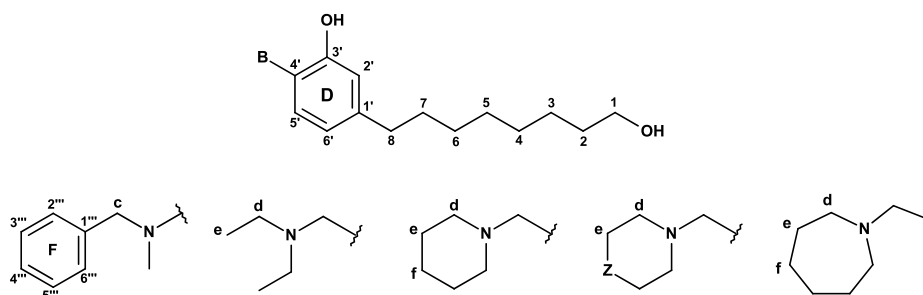
De forma similar ao encontrado para a benzilamina *N*-etilsubstituída, os derivados contendo a subunidade *N,N*-dietilamina – LDT582 (59) e LDT636 (68) – apresentaram deslocamentos químicos semelhantes que foram assinalados como quartetos nas faixas de 2,31 ppm a 3,61 ppm para os grupos metileno [N(CH₂CH₃)₂] e tripletos entre 1,09 ppm e 1,21 ppm para os grupos metila [N(CH₂CH₃)₂] da subunidade *N,N*-dietila, Tabela 10. Os *N,N*-dissubstituintes foram confirmados em RMN de ¹³C pelos deslocamentos químicos entre 39,6 ppm e 47,9 ppm para os grupos metileno e 10,4 ppm e 15,2 ppm para os grupos metila, respectivamente.

A análise dos espectros de RMN de hidrogênio para os derivados heterocíclicos – LDT639 (75), LDT640 (67), LDT641 (72), LDT642 (71) e LDT643 (73) – levou à identificação dos grupos metileno **d** como simpletos largos e tripletos entre 2,57 a 3,74 ppm, enquanto que os grupos metileno em **e** como simpletos largos entre 2,73 ppm a

3,74 ppm, confirmados pelos deslocamentos químicos para **d** e entre 41,4 a 61,7 ppm e 28,0 a 66,9 em RMN de ^{13}C , respectivamente.

Por sua vez, os grupos metileno **e** ($\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$) e **f** ($\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$) dos derivados homólogos – LDT638 (**69**), LDT637 (**74**) e LDT692 (**76**) – foram caracterizados como multipletos e simpletos na faixa de 1,51 ppm a 1,83 ppm; enquanto os metilenos **d** ($\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$) como simpleto largo, simpleto e triplete entre 1,51 a 2,73 ppm em RMN de ^1H . Estes grupos foram ratificados nos espectros de RMN de ^{13}C pelos sinais entre 24,2 a 26,8 ppm ($\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$) para o metileno **f**, 23,8 a 27,8 ppm ($\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$) para o metileno **e**, e 53,6 a 62,0 ppm ($\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$) para o metileno **d**.

Tabela 10: Dados de deslocamentos químicos de RMN de ^1H e RMN de ^{13}C (δ , ppm) para as aminas heterocíclicas da Série 3.



Derivados Série 3	RMN de ^1H (δ , ppm, 300 MHz) / RMN de ^{13}C (δ , ppm, 75 MHz), CDCl_3									
	b		d		e		f		1	
LDT640 (67)	3,66	53,0	3,74	61,7	3,74	66,9	---	---	3,61	63,1
LDT636 (68)	3,73	56,8	2,62	46,4	1,10	11,3	---	---	3,62	63,2
LDT638 (69)	3,60	54,0	1,51- 1,67	62,0	1,51- 1,67	25,9	1,51- 1,67	24,2	3,60	63,2
LDT642 (71)	3,66	61,2	---	52,4	---	55,0	---	---	3,60	62,9
LDT641 (72)	3,68	61,1	---	52,5	---	---	---	---	3,62	63,2
LDT643 (73)	3,74	61,0	2,57	41,4	3,55	52,5	---	---	3,67	63,1
LDT637 (74)	3,78	61,1	2,62	53,6	1,83	23,8	---	---	3,62	63,2
LDT639 (75)	3,68	62,1	2,82	54,5	2,73	28,0	---	---	3,62	63,1
LDT692 (76)	3,78	63,1	2,73	55,3	1,56- 1,73	27,8	1,56- 1,73	26,8	3,66	62,0
	F		c	NCH ₃	NCH ₂ CH ₃	NCH ₂ CH ₃	1			
LDT544 (70) ^a	7,27-7,38/ 127,8-137,3		3,63/63,2	2,25/41,4	---	---	3,63/61,5			

Capítulo II

Avaliação Biológica

Resultados e Discussão

Avaliação do Perfil Colinesterásico

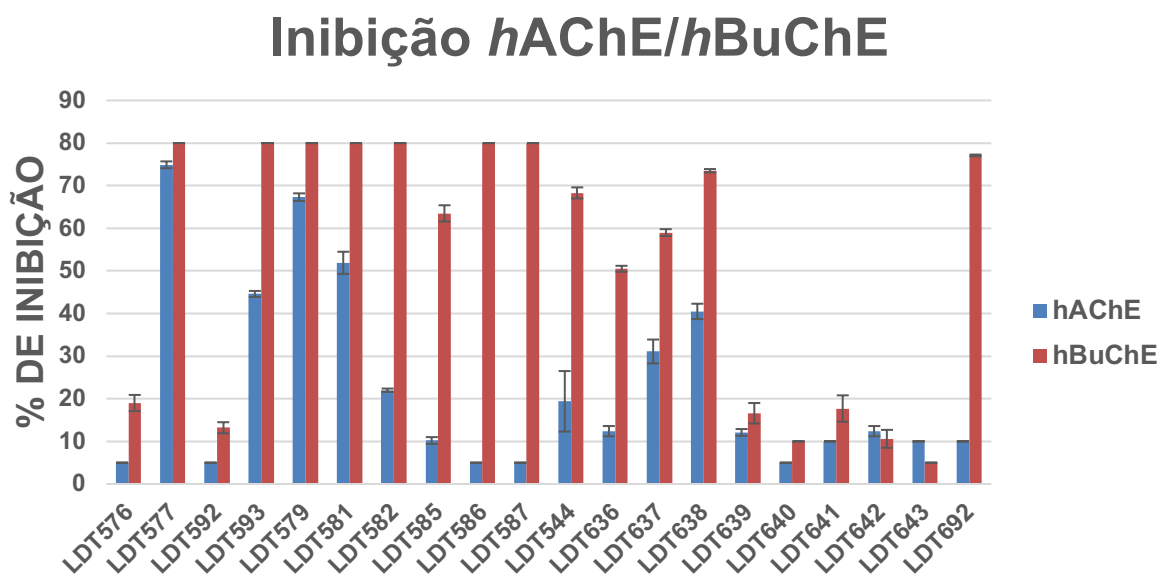
11 AVALIAÇÃO DO PERFIL COLINESTERÁSICO (*in vitro*)

11.1 RELAÇÕES ESTRUTURA QUÍMICA-ATIVIDADE ANTICOLINESTERÁSICA

O padrão molecular descrito no planejamento estrutural (pág 47) – tendo a mistura de cardanois (**1A-C**) como material de partida e LDT167 (**51**) como arcabouço para modificações estruturais das séries propostas – visou identificar a contribuição das subunidades **I e II**, como farmacofórica ou auxofórica, bem como propor as possíveis interações entre os compostos-alvos e as enzimas estudadas.

De acordo com os objetivos iniciais do trabalho, concernente à avaliação do perfil dos compostos-alvo em modelos experimentais *in vitro* utilizando as enzimas acetilcolinesterase (*hAChE*) e butirilcolinesterase (*hBuChE*) humanas, os resultados preliminares quanto ao percentual inibitório estão representados na Figura 25.

Figura 25: Análise *in vitro* da atividade anticolinesterásica das amostras em uma concentração de 20 μ M (média \pm EPM de triplicata).



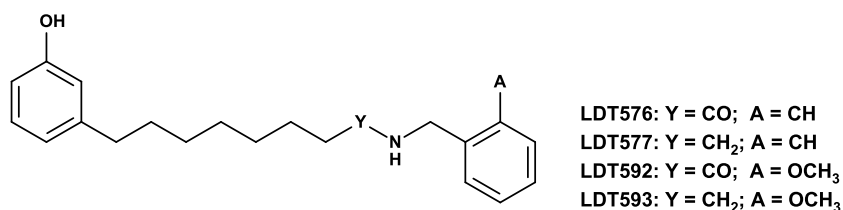
O CI_{50} (Tabela 11) dos derivados foram analisados e agrupados de acordo com as características estruturais dos compostos visando a inferir considerações detalhadas em relação às estrutura-atividades.

Tabela 11: Percentual de inibição enzimática e os valores de Cl_{50} para os derivados-alvo a 20 μ M.

Derivado	% inibição <i>hAChE</i>	Cl_{50} <i>hAChE</i> (μ M) \pm EPM	% inibição <i>hBuChE</i>	Cl_{50} <i>hBuChE</i> (μ M) \pm EPM
Série 1				
LDT576 (55)	<5	-	19,0 \pm 1,9	-
LDT577 (57)	74,9 \pm 0,8	7,20 \pm 0,02	> 80	1,28 \pm 0,02
LDT592 (56)	< 5	-	13,2 \pm 1,3	-
LDT593 (58)	44,5 \pm 0,7	29,3 \pm 0,7	> 80	1,52 \pm 0,11
Série 2				
LDT579 (60)	67,3 \pm 0,9	6,68 \pm 0,25	> 80	0,473 \pm 0,030
LDT581 (61)	51,9 \pm 2,6	19,7 \pm 6,9	> 80	1,65 \pm 0,13
LDT582 (59)	22,0 \pm 0,4	-	63,5 \pm 1,9	8,21 \pm 0,87
LDT585 (62)	10,2 \pm 0,8	-	> 80	2,15 \pm 0,26
LDT587 (63)	< 5	-	> 80	0,745 \pm 0,024
Série 3				
LDT544 (70)	19,4 \pm 7,1	-	68,3 \pm 1,3	6,74 \pm 0,7
LDT636 (68)	12,4 \pm 1,2	-	50,5 \pm 0,7	17,5 \pm 3,5
LDT637 (74)	31,1 \pm 2,8	47,6 \pm 4,1	59,0 \pm 0,8	13,3 \pm 0,5
LDT638 (69)	40,5 \pm 1,8	30,0 \pm 2,6	73,5 \pm 0,4	6,12 \pm 0,8
LDT639 (75)	12,1 \pm 0,8	-	16,6 \pm 2,4	-
LDT640 (67)	< 5	-	< 10	-
LDT641 (72)	< 10	-	17,7 \pm 3,1	-
LDT642 (71)	< 5	-	10,6 \pm 2,1	-
LDT643 (73)	< 10	-	< 5	-
LDT692 (76)	< 10	785 \pm 42	77,1 \pm 0,2	4,62 \pm 0,14

Destacamos que o pH 8,0 utilizado para os experimentos *in vitro* influencia no equilíbrio entre as espécies neutras/catiônicas, onde admitimos que a maioria das moléculas encontram-se protonadas.

11.1.1 Derivados Benzilamídicos e Benzilamínicos (Série 1)

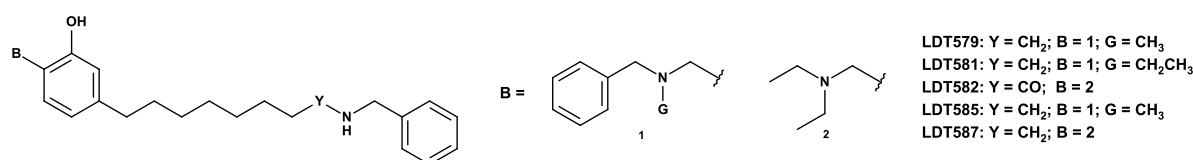


Os resultados iniciais para os derivados da Série 1 revelaram que as amidas LDT576 (55) e LDT592 (56) apresentaram nenhuma ou baixa inibição (< 20%) frente à *hAChE* e *hBuChE*. Os dados sugerem que para esta classe de compostos as interações íon-dipolo, dipolo-dipolo e hidrofóbicas não são suficientes para a inibição das enzimas. Do contrário, as aminas LDT577 (57) e LDT593 (58) – cujos átomos de

nitrogênio podem estar protonados e, desta forma, serem reconhecido pelas enzimas por interação íon-íon, íon-dipolo ou cátion pi – apresentaram percentual de inibição de 74,9% e 44,6% frente à *hAChE* e acima de 80% para a *hBuChE*. **57** – *hAChE* (Cl_{50} 7,20 μ M) e *hBuChE* (Cl_{50} 1,28 μ M) – e **58** – *hAChE* (Cl_{50} 29,3 μ M) e *hBuChE* (Cl_{50} 1,52 μ M) – exibiram perfil anticolinesterásico dual.

Os dados ainda apontam para perfil inibitório quatro vezes menor de **58** frente à *hAChE* quando comparado ao **57**, sugerindo que a presença do grupo 2-metoxila modula negativamente a atividade para esta enzima. Do contrário, o perfil de atividade de ambos derivados, **57** e **58**, foi semelhante para a *hBuChE*, demonstrando que este substituinte é melhor tolerado por esta enzima.

11.1.2 Derivados Benzilamínicos (Série 2)



Iniciando a análise pelo composto aminobenzilamídicos, o derivado *N,N*-dietilamínico LDT582 (**59**) apresentou percentual de inibição de 22% para a *hAChE* e de 63,5% para a *hBuChE* com Cl_{50} 8,21 μ M. Este resultado corrobora a relevância da contribuição da subunidade dietilamínica (DEA) para aumento do percentual de atividade inibitória frente às enzimas *hAChE* (< 5% para 22%) e *hBuChE* (19% para 63,5%), quando comparada a LDT576 (**55**). Entretanto, as possíveis interações originadas pela presença da DEA não foram significativas para inibição da *hAChE*.

Os compostos dibenzilamínicos demonstram perfis de ação dual *hAChE/hBuChE*. Neste contexto, LDT581 (**61**) apresentou atividade para *hAChE* (%I 51,9 % e Cl_{50} 19,7 μ M) e para *hBuChE* (%I > 80 % e Cl_{50} 1,65 μ M). Por sua vez, LDT579 (**60**) apresentou o melhor perfil de inibição dual *hAChE* (%I 67,3 % e Cl_{50} 6,68 μ M) e *hBuChE* (%I >80 % e Cl_{50} 0,47 μ M).

Quando comparados ao derivado LDT577 (**57**) – benzilamina não substituída em **B** – a inserção de substituintes benzilamina em C4 diminuem o percentual de inibição frente à *hAChE* (%I 74,9 %) e diferentemente modulam os valores de e Cl_{50} de acordo com o substituinte em G: metila ou etila. Neste contexto, o derivado LDT579

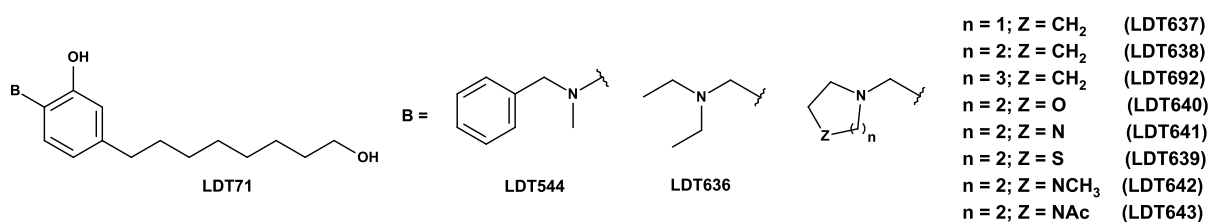
(**60**), G = CH₃, apresenta valor de Cl₅₀ similar ao derivado **57** (7,20 μM) enquanto melhora o Cl₅₀ em 2,7 vezes para a *hBuChE* (Cl₅₀ 1,28 μM x Cl₅₀ 0,47 μM). Por sua vez, o derivado LDT581 (**61**), G = CH₂CH₃, apresenta diminuição do Cl₅₀ em 2,7 vezes para *hAChE* e manutenção do perfil de atividade para *hBuChE* (Cl₅₀ 0,47 μM). A ligeira modulação negativa do perfil de atividade para *hAChE* pode estar relacionada ao aumento do volume do derivado *N*-Benzil-*N*-etilamina.

Para os derivados com o grupo 2-metoxila na subunidade **I**, LDT585 (**62**) – análogo de **60** (%I 67,3 % e Cl₅₀ 6,68 μM) e *hBuChE* (I% >80 % e Cl₅₀ 0,47 μM) – apresentou percentual de inibição da *hAChE* de 10%; entretanto foi capaz de inibir *hBuChE* (%I > 80 % e Cl₅₀ 2,15 μM). Os dados apontam para a modulação negativa da subunidade 2-metóxi-benzilamina que diminuiu o percentual de inibição da *hAChE* em 6,7 vezes bem como o Cl₅₀ para a *hBuChE* em 4,5 vezes. Desta forma, a adição do grupo 2-metóxi alterou o perfil dual *hAChE/hBuChE*, observado para o derivado LDT579 (**60**), para *hBuChE*-seletivo considerando o derivado LDT585 (**62**).

Os resultados para o G-etil-derivado LDT587 (**63**) – análogo de **61** (*hAChE* (%I 51,9 % e Cl₅₀ 19,7 μM) e para *hBuChE* (%I > 80 % e Cl₅₀ 1,65 μM) – reforçam a inibição não significativa da enzima *hAChE* (%I 5 %); conquanto o perfil inibitório para *hBuChE* (I% > 80% e Cl₅₀ 0,74 μM) foi duas vezes melhor quando comparado ao LDT585 (**62**). Vale destacar que os derivados dibenzilamínicos (A = H) desta subsérie apresentaram perfil de inibição dual *hAChE/hBuChE*; enquanto os derivados contendo o grupo 2-metoxila favorecem a inibição seletiva da *hBuChE*.

Além da relevância das contribuições hidrofóbicas, especialmente a aromática, para modulação do perfil de atividade anticolinesterásica, os dados revelam que a presença de grupo benzilamínico no carbono 1 pode ser considerados como ponto de reconhecimento para a *hAChE*, em face do menor volume deste grupo (**D**) em relação aos anéis (**E** + **F**). Adicionalmente, a presença de grupos amínicos em **B** melhoram o perfil de inibição da *hBuChE*, tanto no derivado benzilamídico LDT582 (**59**) quanto nas benzilaminas LDT579 (**60**) e LDT581 (**61**) (A = H) e LDT585 (**62**) e LDT587 (**63**) (A = OCH₃). Nestes casos, a DEA pode no derivado **59** pode ser considerada farmacofórica uma vez que o derivado precursor **55** foi inativo; enquanto as benzilamina atuam como auxóforos modulando o perfil de atividade já identificado no derivado **57**.

11.1.3 Álcoois derivados *orto*-hidroxiaminometilsubstituídos (Série 3)



Inicialmente, destacamos que o derivado LDT71 (**53**) mostrou-se inativo frente às enzimas, caracterizando a ausência de ponto farmacofórico de reconhecimento molecular pelas enzimas.

Na sequência do planejamento estrutural foi obtido o derivado *N*-metil-*N*-benzilaminometílico LDT544 (**70**). **70** apresentou perfil inibitório de 19,4 % para *hAChE* e 68,3 % para *hBuChE* com Cl_{50} 6,74 μ M. Admitindo que os compostos sejam reconhecidos da mesma forma pela enzima, temos que a comparação entre as interações do grupo álcool em **70** com a *N*-benzilamina no derivado **60** (Cl_{50} 0,47 μ M) – capaz de atuar como íon positivo – reforça a relevância de interações íon-íon e íon-dipolo nesta região de reconhecimento molecular pela enzima *hBuChE*.

Visando compreender a importância de interações hidrofóbicas aromáticas, foi planejado o derivado LDT636 (**68**) pela simplificação molecular do núcleo *N*-metil-*N*-benzilaminometílico (volume 154 \AA^3) pelo grupo *N,N*-dimetilaminometila (B1, volume 100 \AA^3). De maneira geral, **68** apresentou menor perfil de inibição tanto para *hAChE* (%I 12,4 %) quanto para *hBuChE* (%I 50,7 % e Cl_{50} 17,5 μ M), em relação a **70**, demonstrando que as contribuições hidrofóbicas aromáticas do anel **F** da *N*-metil-*N*-benzilamina foram mais significativas que as forças de London sigma (FL_{σ}) do grupo *N,N*-dietila.

Na busca de características estruturais relevantes para esta classe de compostos foram planejados compostos com aminas heterocíclicas não aromáticas visando identificar a contribuição da liberdade/restrrição conformacional bem como da natureza hidrofóbica/hidrofílica dos derivados-alvo. Neste contexto, foi avaliado o derivado pirrolidínico LDT637 (**74**) – planejado pela ciclização do grupo *N,N*-dietila (volume 100 \AA^3) – que apresentou efeito inibitório dual para *hAChE* (%I = 31,1, Cl_{50} 47,6 μ M) e *hBuChE* (%I 59 % e Cl_{50} 13,3 μ M), demonstrando que a restrição conformacional permite o reconhecimento molecular por ambas as enzimas, e

sugerindo que o menor volume da pirrolidina (volume 89 Å³) favorece especialmente à *hAChE*.

A homologação do derivado LDT637 (**74**) levou ao derivado piperidínico LDT638 (**69**) que não só manteve como melhorou o perfil de atividade dual *hAChE* (%I = 40,5 e CI_{50} 30,0 µM) e *hBuChE* (%I 73,5 % e CI_{50} 6,12 µM). Este resultado corrobora a existência de região de interação hidrofóbica capaz de reconhecer aminas heterocíclicas com volume da piperidina (volume 105 Å³). Nosso próximo passo foi investigar se esta região abrigaria um derivado de 7-membros (azepano, volume 123 Å³) – homólogo da piperidina **69**. Desta forma, o LDT692 (**76**) foi avaliado e apresentou percentual de inibição menor que 10% para *hAChE* com CI_{50} 785 µM, sendo, portanto, vinte e seis vezes maior que o encontrado para o homólogo inferior **69**. Este resultado indica uma restrição de volume até o valor de 105 Å³ para o reconhecimento de moléculas com este arcabouço molecular pela *hAChE*. Do contrário, **76** foi ainda mais ativo para *hBuChE* (%I 77,1 % e CI_{50} 4,62 µM), ratificando a presença de maior bolso de interação hidrofóbica quando comparado à *AChE*. Assim sendo, **76** apresenta-se como inibidor seletivo da *hBuChE* com índice de seletividade de 170 vezes frente à *hAChE*.

Visando explorar a natureza das interações com as enzimas, novos compostos foram planejados a partir da troca bioisotérica clássica divalente entre o grupo metileno **f** da piperidina de LDT638 (**69**) por oxigênio (derivado morfolínico LDT640 (**67**)); enxofre (derivado tiomorfolínico LDT639 (**75**)); e por nitrogênio (derivado piperazínico LDT641 (**72**)). Os novos derivados apresentaram percentuais de inibição menores que 20% para ambas as enzimas. Estruturalmente, a substituição da contribuição hidrofóbica do grupo metileno no derivado dual LDT638 (**69**) pelo aceptor de ligação de hidrogênio (ALH) no derivado LDT640 (**67**) bem como pelo doador de ligação de hidrogênio (DLH)/ALH no derivado LDT641 (**72**) – considerando que somente o nitrogênio terciário e, portanto, mais básico protona – demonstra a importância de interações hidrofóbicas com resíduos de aminoácidos complementares nos sítios ativos das enzimas. Já o bioisótero LDT639 (**75**), que possui a contribuição hidrofóbica fornecida pelo átomo de enxofre, apresentou o maior percentual de inibição para a *hAChE* (12 %), mas foi inativo para ambas as enzimas. Vale destacar que a tiomorfolina tem volume de 107 Å³, sendo, portanto, maior que o volume da piperidina de 105 Å³, o que sugere que o baixo perfil inibitório para *hAChE* tenha relação com a restrição estérica uma vez que a natureza desta região da

tiomorfolina é hidrofóbica. Estes dados ainda sugerem que a troca do grupo metileno pelo enxofre pode alterar a eletronegatividade por meio da polarizabilidade – ainda que limitada em função da restrição conformacional do ciclo de 6 membros – afetando de maneira negativa o reconhecimento pelas enzimas colinesterásicas.

Mais dois derivados piperazínicos com características estruturais que reforçam a presença e ausência do cátion na posição 4 da piperazina foram planejados. Desta forma, foram avaliados os derivados LDT642 (**71**) – que contem o substituinte *N*-metila (volume 120 Å³), mais básico que o nitrogênio 1 da piperazina – e LDT643 (**73**) – com o grupo *N*-acetila (volume 140 Å³). Ambos os derivados apresentaram inibição menor que 10% não apresentando complementaridade estrutural suficiente para serem reconhecidos por ambas as enzimas. Vale observar que ambos os derivados possuem volumes maiores que o volume percebido como limite de 105 Å³ para esta classe de compostos, e, neste caso, a inatividade pode estar relacionada à restrição estérica.

Os resultados preliminares para a Série 3 revelam que grupos hidrofóbicos com atributos de FL σ , conformacionalmente restritos e com volume até 105 Å³ são melhor tolerados pela *hAChE*; enquanto grupos hidrofóbicos (FL σ) ou aromáticos (FL π), conformacionalmente livres ou restritos contribuem para o reconhecimento molecular pela *hBuChE*. Vale destacar que a presença de grupos hidrofílicos (dipolo negativo, dipolo positivo de hidrogênio, ou cátion) nesta região de interação é deletéria para a atividade anticolinesterásica.

12 AVALIAÇÃO DO PERFIL ANTIAGREGANTE

12.1 RELAÇÕES ESTRUTURA QUÍMICA-ATIVIDADE ANTIAGREGANTE β A

Compreendido entre os objetivos específicos deste trabalho foi realizada a avaliação do perfil biológico dos compostos-alvo quanto à atividade antiagregante em modelos experimentais *in vitro*, utilizando peptídeo sintético β A₄₂, a partir das técnicas de dicroísmo circular (DC) e microscopia eletrônica de transmissão. Os resultados foram agrupados de acordo com as características estruturais dos compostos visando inferir considerações detalhadas em relação à estrutura-atividade.

12.1.1 Álcoois derivados *orto*-hidroxiaminometilsubstituídos (Série 3)

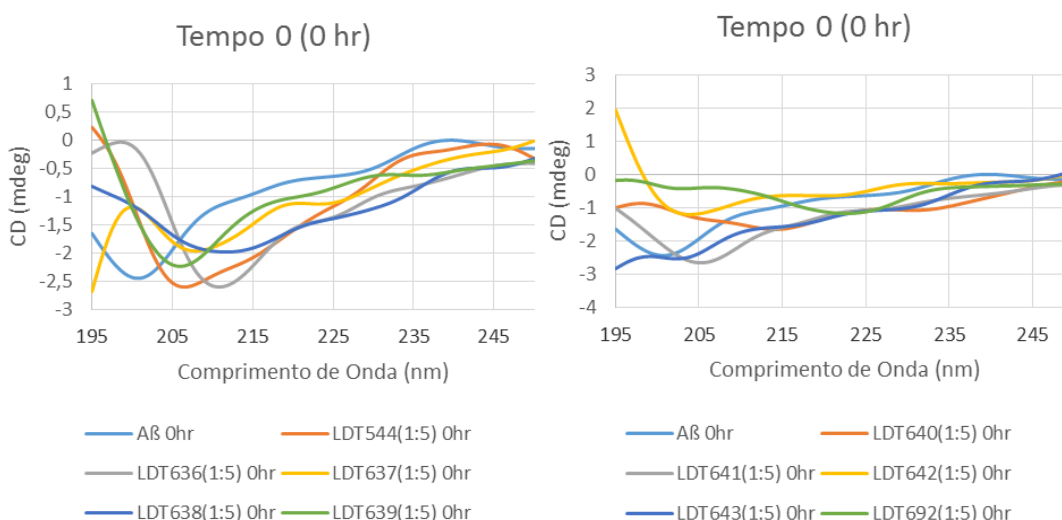
Tempo 0 (0 hora)

As amostras de β A₄₂ (controle negativo), no tempo 0, devem ser utilizadas como espiral aleatória com a finalidade de acompanhar o processo de agregação durante o período do ensaio. Desta forma, o controle negativo (β A₄₂) apresentou forte banda negativa em aproximadamente 200 nm, sendo indicativo da adoção de estruturas em espiral aleatória (POSTUMA et al, 2000; YANG et al, 2000), como observado na Figura 24. De maneira semelhante, os ligantes LDT544 (70), LDT638 (69), LDT639 (75), LDT640 (67), LDT641 (72), LDT642 (71), LDT643 (73) e LDT692 (76) também apresentaram banda negativa por volta de 200 nm. Portanto, os controles e os ligantes citados demonstraram perfil como o esperado para início do ensaio.

Entretanto, os derivados LDT636 (68) e LDT637 (74) apresentaram perfil de folhas- β , que é a estrutura esperada para a forma tóxica do peptídeo β A₄₂ (SOTO et al, 1995; SOTO & CASTAÑO, 1996). Este resultado é representado pela banda positiva por volta de 200 nm e a banda negativa em aproximadamente 210 nm

(BRUGGINK et al 2012; GORMAN et al, 2003) em seu perfil de dicroísmo circular (Figura 26).

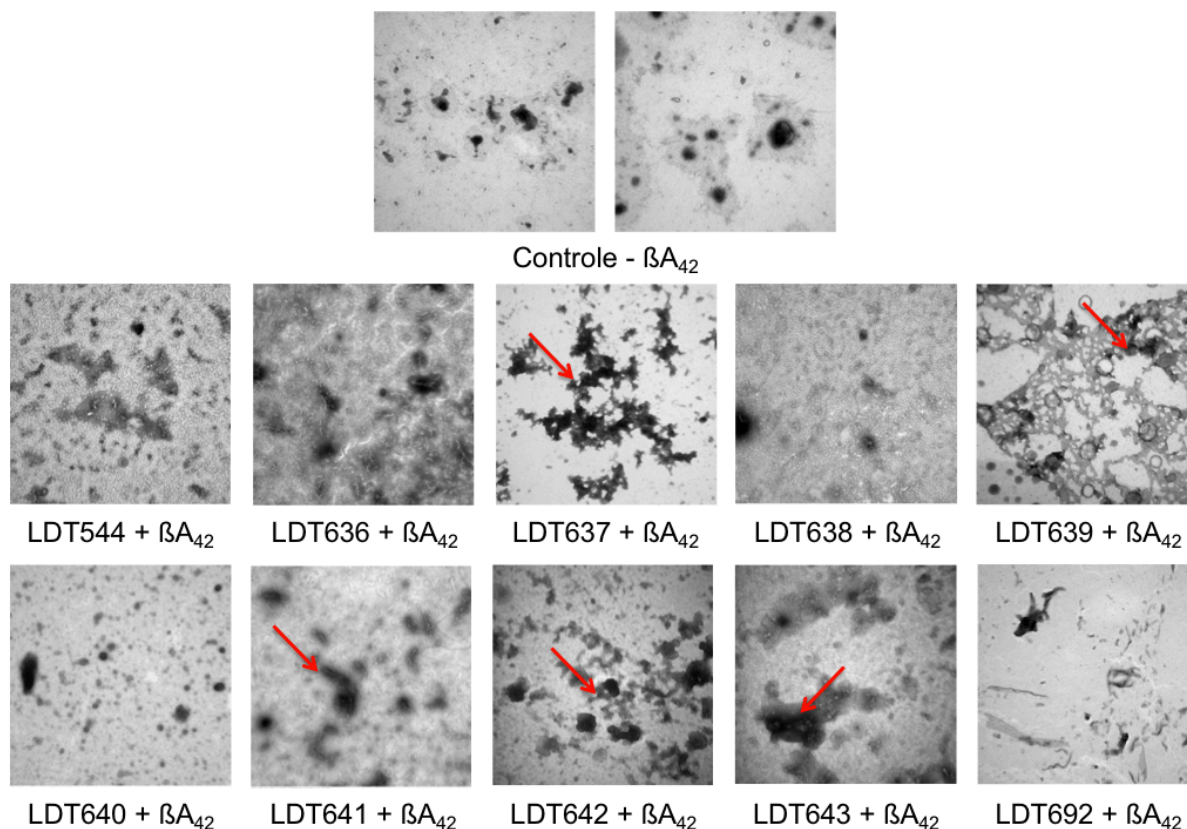
Figura 26: DC – Análise *in vitro* da atividade antiagregante no tempo inicial (Tempo 0).



Dados resultantes da deconvolução para estimação da composição de estruturas secundárias do espectro de **68** e **74** ratificam esse comportamento, uma vez que foi estimado a proporção de 44% e 43% de folhas- β , respectivamente (Anexo **49**). Os resultados sugerem que estes derivados possam induzir a adoção de tais estruturas secundárias no tempo inicial, sendo necessária a averiguação por um tempo mais prolongado do ensaio.

O comportamento do controle negativo (βA_{42}) na microscopia eletrônica de transmissão (MET) demonstrou a presença de poucos agregados amorfos no tempo 0 (Figura **27**). Os derivados LDT544 (**70**), LDT636 (**68**), LDT638 (**69**), LDT640 (**67**), LDT641 (**72**), LDT642 (**71**) e LDT692 (**76**) demonstraram baixa densidade de agregados, enquanto que LDT637 (**74**), LDT639 (**75**) e LDT643 (**73**), assim como o controle, apresentou agregados amorfos como observado na Figura **27**.

Figura 27: MET – Análise *in vitro* da atividade antiagregante no tempo inicial (Tempo 0).



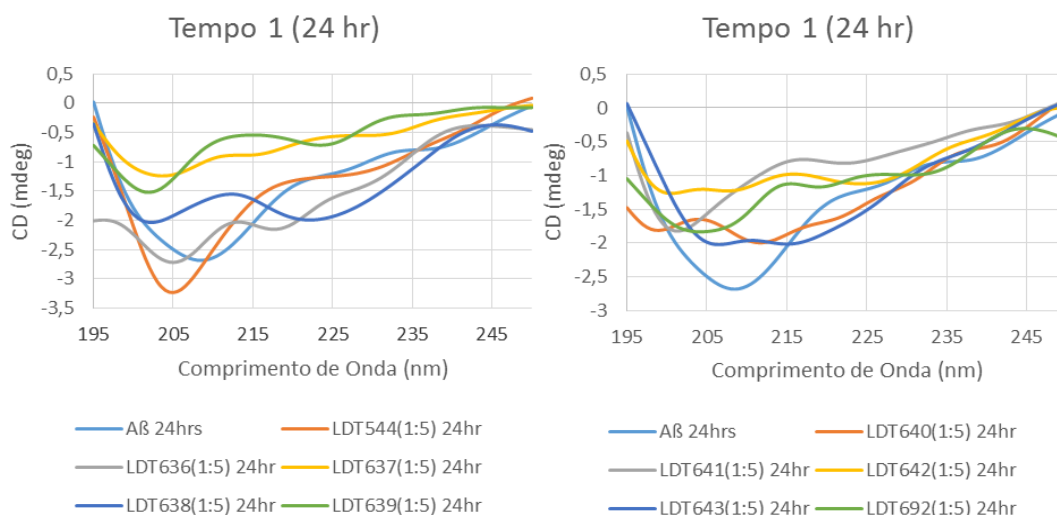
Setas em vermelho destacam a presença de agregados amorfos, enquanto que demais imagens demonstram baixa densidade de agregados.

Tempo 1 (24 horas)

A partir do tempo 1 espera-se que possa ocorrer o início de alguma mudança nas estruturas secundárias do peptídeo. Com efeito, foi observado para o controle negativo (βA_{42}) aumento da intensidade da banda negativa aproximadamente em 205 nm com um ombro próximo a 215 nm (Figura 28), que sugerem ainda a presença de estruturas em espiral aleatória e/ou pouca ou nenhuma presença de estruturas como α -hélice/folhas- β (POSTUMA et al, 2000; YANG et al, 2000).

Os derivados LDT544 (70), LDT638 (69), LDT639 (75), LDT641 (72), LDT642 (71) e LDT692 (76) mantiveram a banda negativa < 205 nm, indicando a manutenção das estruturas em espiral aleatória até o tempo 1 (POSTUMA et al, 2000; YANG et al, 2000), sendo interessante a observação da manutenção deste comportamento no decorrer do ensaio. Adicionalmente, o derivado LDT643 (73) demonstrou presença de α -hélice, como observado pelos sinais típicos da banda negativa de 205 a 215 nm (KOBAYASHI, MURANAKA & MACK, 2012), representado na Figura 28.

Figura 28: DC – Análise *in vitro* da atividade antiagregante no tempo de 24 horas (Tempo 1).



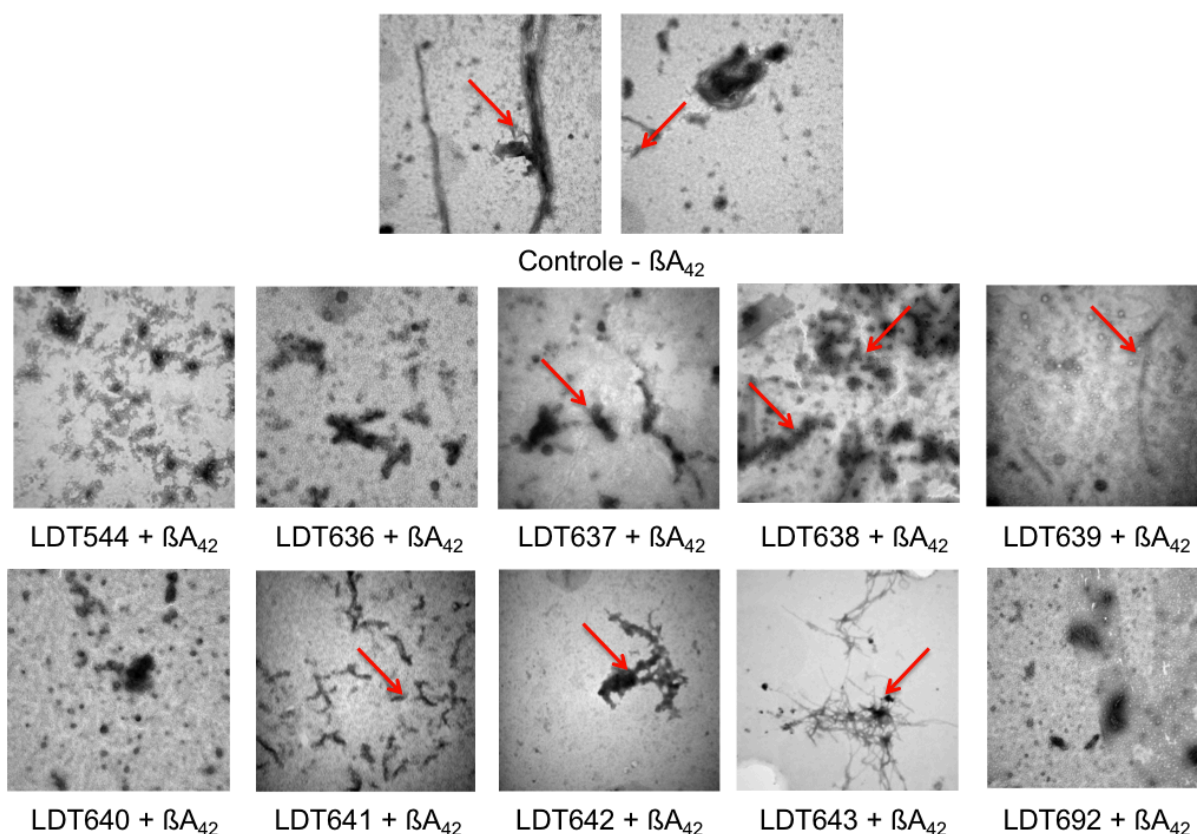
Por sua vez, LDT636 (**68**) manteve o mesmo padrão para o tempo 0 pela presença de banda negativa em aproximadamente 217 nm, que é indicativo da adoção de estruturas em folhas- β (BRUGGINK et al, 2012; FASMAN, 1996; FENG et al, 2009; SCROCCHI et al, 2002). Entretanto, também foi observado o deslocamento da banda negativa para aproximadamente 205 nm, o que é característico de espiral aleatória. O perfil de deconvolução deste espectro demonstrou proporção de 39% de estruturas como folhas- β e 57% para estruturas classificadas como “outras” (Anexo **49**). Neste caso, a observação de ambas as formas de espiral aleatória e folhas- β para **68** implica que pode ocorrer atividade de desestabilização ou de indução da formação de folhas- β , que devem ser melhores investigadas no período de acompanhamento do ensaio.

O derivado LDT637 (**74**) induziu a transição conformacional para estruturas de espiral aleatória (Figura **27**). Os resultados apontam que **74** foi capaz de, possivelmente, interromper a formação de folhas- β resultando em formas de espiral aleatória. Ademais, a deconvolução de **74** (Anexo **49**) apresentou 60% de estruturas classificadas como “outras”. Porém, LDT640 (**67**) induziu a transição conformacional para folhas- β , como observado pela banda negativa em 198 nm e 212 nm e o sinal positivo em 205 nm (BEROVA, NAKANISHI & WOODY, 2000; BRUGGINK et al 2012; GORMAN et al, 2003). Este dado sugere que no Tempo 1 este derivado é capaz de induzir a transição de espiral aleatória para folhas- β . Dados de seu perfil de deconvolução demonstram cerca de 41% de estruturas em folhas- β (Anexo **49**).

Na MET (Figura **29**) o controle negativo (βA_{42}) apresentou poucas fibrilas dispersas, enquanto que a maioria dos derivados – LDT544 (**70**), LDT636 (**68**),

LDT639 (75), LDT640 (67) e LDT692 (76) – ainda mantiveram uma baixa densidade de agregados. Apenas LDT637 (74) e LDT642 (71) demonstraram a presença de agregados amorfos no tempo 1, enquanto que LDT641 (72) apresentou algumas fibrilas dispersas. Adicionalmente, foi observado que LDT638 (69) induziu uma maior densidade de agregados quando comparado ao tempo 0, conquanto LDT643 (73) diminuiu esta densidade.

Figura 29: MET – Análise *in vitro* da atividade antiagregante no tempo 1.



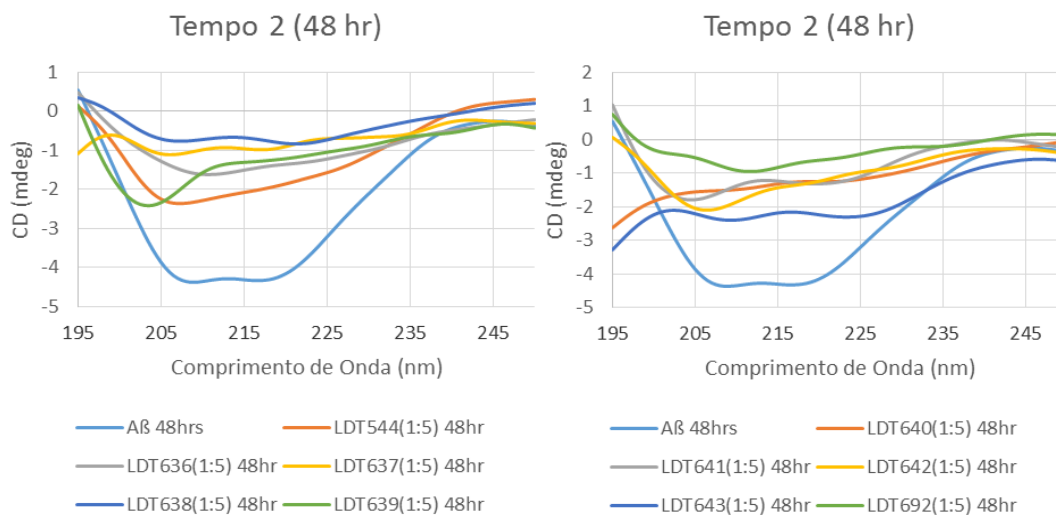
Setas em vermelho destacam a presença de agregados amorfos e fibrilas, enquanto que demais imagens demonstram baixa densidade de agregados.

Tempo 2 (48 horas)

A partir do tempo 2, o controle negativo (βA_{42}) apresentou banda negativa de 205 a 218 nm, o que é típico para a presença de estruturas secundárias como α -hélice (KOBAYASHI, MURAKANA & MACK, 2012). Os derivados LDT637 (74), LDT638 (69), LDT639 (75), LDT641 (72) e LDT642 (71) mantiveram o mesmo padrão observado no tempo 1, ou seja: conservaram o perfil de espiral aleatória. Isto foi observado pela característica típica da curva do gráfico destas estruturas observado na Figura 30. Os

dados indicam que estes derivados têm a capacidade de influenciar nas interações intra/intermoleculares observadas do peptídeo, impedindo a alteração conformacional entre estruturas secundárias.

Figura 30: DC – Análise *in vitro* da atividade antiagregante no tempo de 48 horas (Tempo 2).



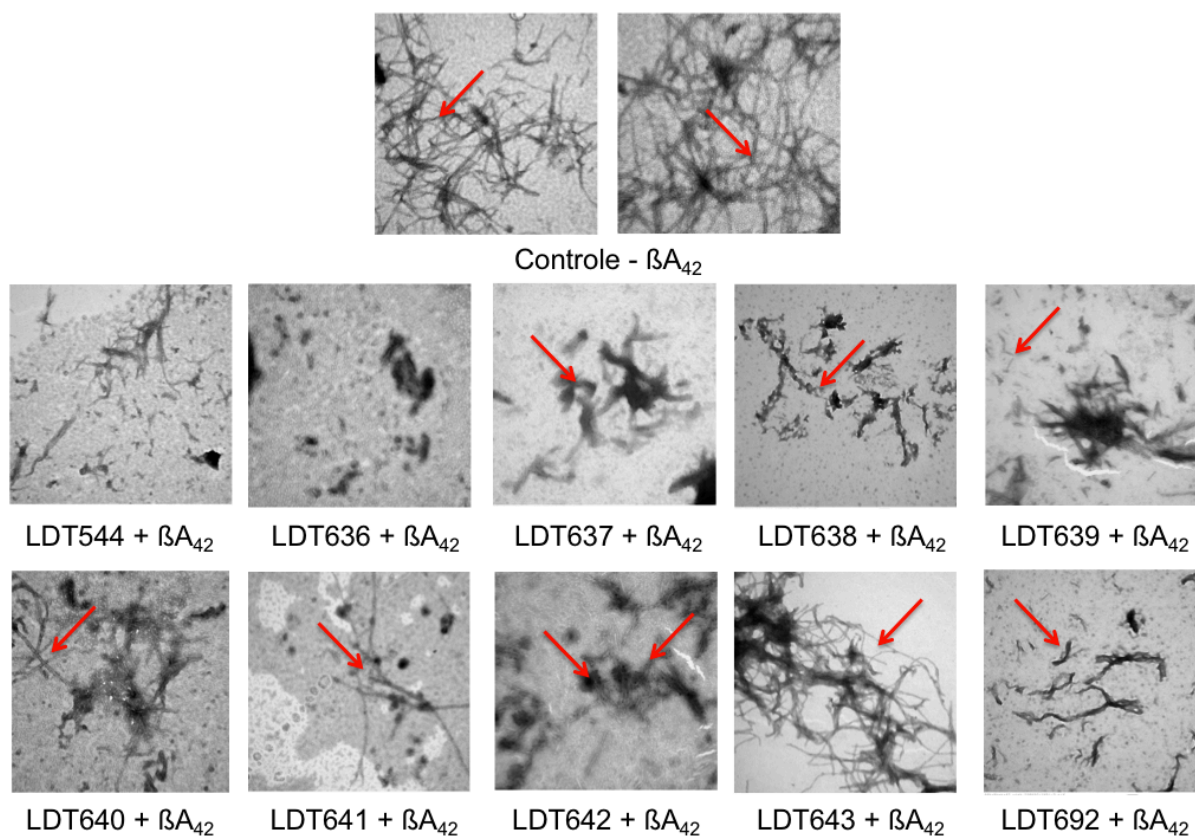
Em relação aos derivados LDT636 (**68**) e LDT544 (**70**), ao contrário do observado para o tempo 1 (folhas- β e espiral aleatória, respectivamente), **68** e **70** demonstraram banda negativa a partir 205 a 222 nm no Tempo 2, sugerindo estruturas como α -hélice (KOBAYASHI, MURAKANA & MACK, 2012). Enquanto que LDT640 (**67**) apresentou características de estruturas como espiral aleatória (Figura 30). Para **67** também foi observada a proporção de 60% de estruturas classificadas como “outras” no seu perfil de deconvolução (Anexo 49). Este dado sugere que em 48 horas **67** foi capaz de induzir a desestabilização das estruturas secundárias.

Foi observado que o derivado LDT643 (**73**) parece induzir a transição de α -hélice para adoção de estruturas em folhas- β , como observado pela banda positiva de 200 a 205 nm (BEROVA, NAKANISHI & WOODY, 2000; FASMAN, 1996; GORMAN et al, 2003). Ademais, seu perfil de deconvolução demonstrou cerca de 43% de estruturas como folhas- β (Anexo 49). Já o LDT692 (**76**) demonstrou ambas estruturas: espiral aleatória e α -hélice, observados na Figura 30.

Na MET referente à análise no tempo 2 o controle negativo (βA_{42}) passa a demonstrar o entrelaçamento entre fibrilas na MET como observado na Figura 31. Apenas LDT544 (**70**) e LDT636 (**68**) ainda apresentam baixa densidade de agregados, sendo que a maioria dos derivados – LDT637 (**74**), LDT639 (**75**), LDT640 (**67**),

LDT641 (72) e LDT692 (76) – apresentaram fibrilas dispersas. O derivado LDT638 (69), em relação ao tempo 1, observa-se a diminuição da densidade de agregados, enquanto que LDT642 (71) demonstra agregados amorfos. De forma semelhante ao controle negativo, LDT643 (73) demonstrou o entrelaçamento entre fibrilas.

Figura 31: MET – Análise *in vitro* da atividade antiagregante no tempo 2.



Setas em vermelho destacam a presença de agregados amorfos e fibrilas, enquanto que demais imagens demonstram baixa densidade de agregados.

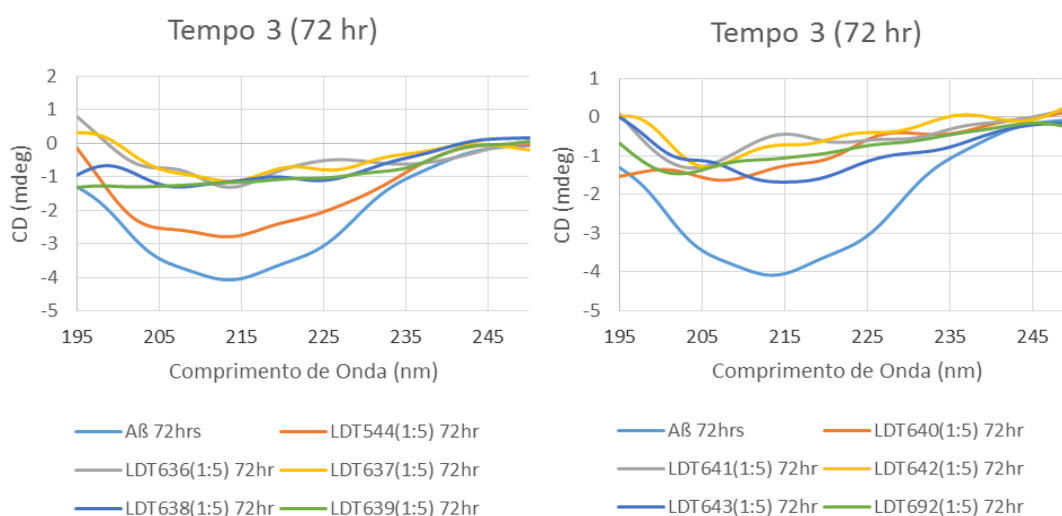
Tempo 3 (72 horas)

A partir do tempo 3 o controle negativo (βA_{42}) demonstrou banda positiva por volta de 198 nm, além da banda negativa de maior proporção em 215 nm. Estes dados em conjunto indicam o desaparecimento de estruturas em α -hélice, com a conversão para as formas tóxicas do peptídeo: folhas- β (BEROVA, NAKANISHI & WOODY, 2000; BRUGGINK et al, 2012; FASMAN, 1996).

No tempo 3 os derivados LDT639 (75), LDT640 (67), LDT641 (72) e LDT642 (71) não demonstraram alteração do perfil quando comparado ao tempo 2. Infere-se que estes derivados foram capazes de impedir qualquer tipo de adoção de estruturas

secundárias, uma vez que foi capaz de manter o peptídeo em espiral aleatória, como observado na Figura 32.

Figura 32: DC – Análise *in vitro* da atividade antiagregante no tempo de 48 horas (Tempo 2).



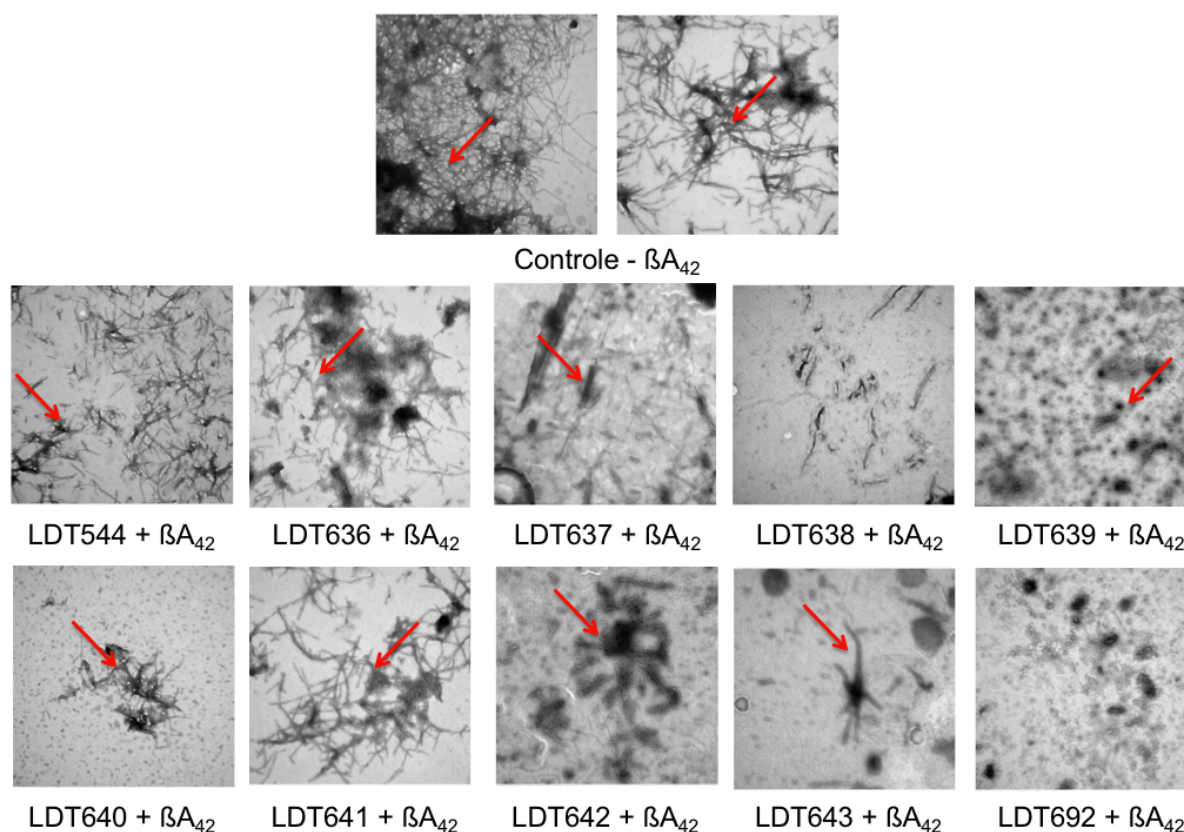
Os derivados LDT637 (**74**) e LDT638 (**69**) apresentaram banda positiva em aproximadamente 197 nm que é indicativo da presença de estruturas como folhas- β (FASMAN, 1996; JUSZCZYK, KOTODZIEJCZYK & GRZONKA, 2005). Ademais, **74** ainda demonstrou a banda negativa em 215 nm, que é mais uma confirmação de sinal típico para as estruturas em folhas- β (BEROVA, NAKANISHI & WOODY, 2000).

O padrão para o composto LDT544 (**70**) observado no Tempo 2 foi mantido no Tempo 3, porém com maior intensidade (Figura 32). O derivado LDT643 (**73**) passou a apresentar banda negativa em 210 a 220 nm, característico de α -hélice (KOBAYASHI, MURAKANA & MACK, 2012; JUSZCZYK, KOTODZIEJCZYK & GRZONKA, 2005). Enquanto que LDT636 (**68**) parece apresentar transição conformacional entre espiral aleatória/folhas- β para estruturas em folhas- β somente, como representado pela banda negativa de 210 a 215 nm (BRUGGINK et al, 2012).

Apesar de LDT692 (**76**) se comportar como estruturas entre espiral aleatória e α -hélice no Tempo 2, parece induzir a transição conformacional para adoção da forma em espiral aleatória no tempo 3, como observada a presença da banda negativa em aproximadamente 200 nm (POSTUMA et al, 2000; YANG et al, 2003). Foi observado proporção de 55% de estruturas classificadas como “outras” no seu perfil de deconvolução (Anexo 49). Os dados revelam que **76** foi capaz de desestabilizar as interações intra/intermoleculares do peptídeo.

A partir do tempo 3, na MET (Figura 33), observa-se o aumento da densidade de fibrilas para o controle negativo (βA_{42}) enquanto que o derivado LDT692 (76) demonstra uma baixa densidade de agregados. Os derivados observados em induzir a presença de agregados amorfos foram LDT639 (75), LDT642 (71) e LDT643 (73). Adicionalmente, LDT544 (70), LDT636 (68), LDT637 (74) e LDT641 (72) demonstraram a presença de fibrilas dispersas que tendem a se entrelaçar ou não. O derivado LDT640 (67) apresentou menor proporção de fibrilas dispersas quando comparado ao tempo 2.

Figura 33: MET – Análise *in vitro* da atividade antiagregante no tempo 3.



Setas em vermelho destacam a presença de agregados amorfos e fibrilas dispersas ou que tendem a se entrelaçar, enquanto que demais imagens demonstram baixa densidade de agregados.

Os dados gerias quanto ao ensaio de dicroísmo circular (DC) estão representados na Tabela 12.

Tabela 12: Dados gerais da análise de dicroísmo circular.

Análise da estrutura secundária - Dicroísmo Circular				
	Tempo 0	Tempo 1	Tempo 2	Tempo 3
βA42	Espiral aleatória	Espiral aleatória*	α-hélice	folha-β
LDT544 (70)	Espiral aleatória	Espiral aleatória	α-hélice	α-hélice
LDT636 (68)	folha-β	Espiral aleatória e folha-β	α-hélice	folha-β
LDT637 (74)	folha-β	Espiral aleatória	Espiral aleatória	folha-β
LDT638 (69)	Espiral aleatória	Espiral aleatória	Espiral aleatória	folha-β
LDT639 (75)	Espiral aleatória	Espiral aleatória	Espiral aleatória	Espiral aleatória
LDT640 (67)	Espiral aleatória	folha-β	Espiral aleatória	Espiral aleatória
LDT641 (72)	Espiral aleatória	Espiral aleatória	Espiral aleatória	Espiral aleatória
LDT642 (71)	Espiral aleatória	Espiral aleatória	Espiral aleatória	Espiral aleatória
LDT643 (73)	Espiral aleatória	α-hélice	folha-β	α-hélice
LDT692 (76)	Espiral aleatória	Espiral aleatória	Espiral aleatória e α-hélice	Espiral aleatória

*Espiral aleatória, c/ pouco ou nenhuma α-hélice e folha-β.

De maneira geral, foi possível observar que os derivados com contribuição hidrofóbica são melhores para a indução de estruturas como espiral aleatória bem como induzir a uma baixa densidade de agregados, como observado na microscopia eletrônica de transmissão (MET). Em especial, foi observado que a homologação dos derivados LDT637 (**74**), LDT638 (**69**) e LDT692 (**76**) favorece a adoção de tais estruturas. Sendo que **76** foi o de melhor perfil, seguido do **69** e **74**.

Para os derivados cíclicos de 6 membros – LDT638 (**69**), LDT639 (**75**), LDT640 (**67**), LDT641 (**72**), LDT642 (**71**) e LDT643 (**73**) – na MET demonstraram, de forma geral, menor densidade de agregados e fibrilas quando comparado ao controle negativo. O melhor perfil é representado por aqueles que demonstram substituintes com contribuição hidrofóbica principalmente, seguido de aceptores de ligação de hidrogênio (ALH) e doadores de ligação de hidrogênio (DLH).

Os resultados ainda revelaram que os derivados **73**, **75** e **71** apresentaram perfis destacados, uma vez que por todo o período do ensaio foram capazes de manter o peptídeo como espiral aleatória; enquanto os derivados **69** e **67** demonstraram adoção de espiral aleatória na maior parte do ensaio e folhas-β no tempo 3 e tempo 1, respectivamente. Por fim, **72** com contribuição hidrofóbica e de

ALH, induziu os peptídeos a adotarem estruturas em α -hélice na maior parte do ensaio, apresentando folhas- β somente no tempo 2.

Também foi observado que a contribuição hidrofóbica do substituinte de cadeia aberta, LDT636 (**68**), favorece a adoção de estruturas como folhas- β na maior parte de realização do ensaio. Enquanto que as contribuições aromática e hidrofóbica observadas no derivado LDT544 (**70**) favorece a adoção de espiral aleatória e α -hélice. Estes derivados também foram observados capazes de induzir menor densidade de agregados e fibrilas na MET.

Analisando em conjunto os dados obtidos nos ensaios de DC e MET foi observado que a contribuição hidrofóbica dos homólogos cíclicos favorece a adoção de estruturas como espiral aleatória com baixa densidade de agregados, apesar da presença de poucas fibrilas curtas. O mesmo comportamento foi observado para os derivados cíclicos de 6 membros. Vale destacar que embora o perfil de DC tenha sido melhor aos que possuem contribuição hidrofóbica, os compostos com contribuição de grupos ALH apresentaram menor densidade. Para o substituinte de cadeia aberta, o favorecimento para adoção de estruturas como folhas- β , com a presença de muitas fibrilas dispersas, foi observado. Já a contribuição concomitante como aromático/hidrofóbico favorece a adoção de espiral aleatória e α -hélice, com baixa densidade de agregados.

13 AVALIAÇÃO DO PERFIL ANTIOXIDANTE

O ensaio da capacidade antioxidante de radicais hidroxila (HORAC) é uma ferramenta clássica para medir a capacidade antioxidante de compostos de uma variedade de amostras. O ensaio da atividade HORAC segue o princípio do ensaio da capacidade de absorvência do radical oxigênio (ORAC) que é baseado na oxidação de uma sonda fluorescente pelo radical peroxila – ROO[·] (CAO et al, 1993; OU, HAMPSCH-WODILL & PRIOR, 2001). Entretanto, no ensaio HORAC a sonda é consumida pelo radical hidroxila (OH[·]) pelo processo de transferência do átomo de hidrogênio.

Os radicais hidroxila são produzidos a partir de uma fonte radicalar e pelo Reagente de Fenton que reduz a sonda fluorescente sobre o tempo. Os antioxidantes presentes no ensaio funcionam como bloqueadores da oxidação do radical hidroxila da sonda fluorescente até que a atividade antioxidante na amostra esteja esgotada. A capacidade antioxidante da amostra, portanto, correlaciona-se com o decaimento da curva de fluorescência, que é usualmente representada como área sob a curva (ASC). A ASC é usada para quantificar o total da atividade antioxidante do radical hidroxila em uma amostra, e é comparado com a curva padrão do antioxidante ácido gálico (AG) denominada como equivalente de ácido gálico (EAG). Os dados obtidos quanto ao perfil antioxidante está representado na Tabela 13.

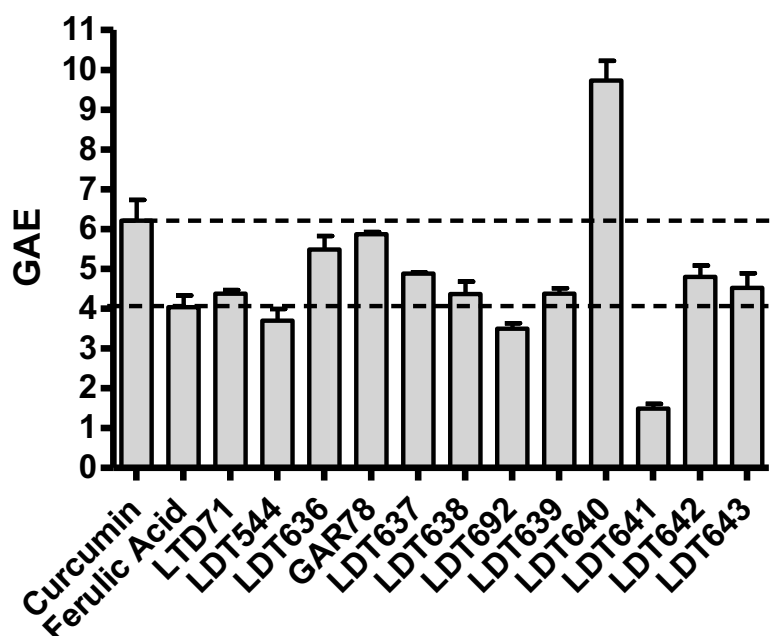
Tabela 13: Atividade antioxidante por OH[·] expressos como EAG.

Derivados	Atividade de retirada de OH [·] como equivalente de ácido gálico (EAG) <i>Valor Médio ± DP</i>
LDT544 (70)	3,70 ± 0,50
LDT636 (68)	5,49 ± 0,09
LDT637 (74)	4,88 ± 0,049
LDT638 (69)	4,37 ± 0,54
LDT639 (75)	4,38 ± 0.23
LDT640 (67)	9,73 ± 0.86
LDT641 (72)	1,49 ± 0.20
LDT642 (71)	4,80 ± 0.49
LDT643 (73)	4,52 ± 0.64
LDT692 (76)	3.50 ± 0.23
Curcumina (17)	6,21 ± 0,91
Ácido ferúlico	4,04 ± 0,51

13.1 ÁLCOOIS DERIVADOS ORTO-HIDROXIAMINOMETILSUBSTITUÍDOS (SÉRIE 3)

O decaimento da área sob a curva (ASC) está relacionado à capacidade antioxidante dos compostos avaliados, e os resultados estão expressos como equivalentes de AG (EAG), representados na Figura 34. Como controles foram utilizados a curcumina (**17**) e o ácido ferúlico, que apresentaram 6,21 e 4,04 EAG, respectivamente. Os valores obtidos a partir da avaliação dos compostos testados variaram de 1,49 a 9,73 EAG.

Figura 34: Atividade antioxidante dos compostos.



GAE: *gallic acid equivalent* (equivalente de ácido gálico – EAG).

Foi observado que o derivado LDT640 (**67**) demonstrou o melhor perfil antioxidante, apresentando atividade maior que os controles. Este derivado é caracterizado por possuir o substituinte morfolina que apresenta contribuições como acceptor de ligação de hidrogênio (ALH) bem como nitrogênio protonados (Pka 7,0) no pH dos ensaios. Acredita-se que a sua atividade antioxidante esteja relacionada pela interação intramolecular entre a hidroxila fenólica com o átomo de oxigênio da

morfolina, o que resultaria em uma conformação que é capaz de “sequestrar” radicais livres, com conseqüente efeito antioxidante.

Ademais o segundo mais potente foi o derivado LDT636 (**68**), que apresentou perfil antioxidante semelhante aos controles utilizados. O derivado **68** é caracterizado por apresentar grupo ALH de cadeia aberta com dois substituintes etila (*N,N*-dietilamina). Seguindo a mesma teoria para a atividade de **67**, o derivado **68** também pode apresentar interação intramolecular. Entretanto, **68** apresentou menor atividade antioxidante, sugerindo que o átomo de oxigênio parece modular positivamente a atividade antioxidante quando comparado ao átomo de nitrogênio.

Os derivados LDT637 (**74**), LDT642 (**71**), LDT643 (**73**), LDT639 (**75**) e LDT638 (**69**) apresentaram perfis antioxidante semelhantes (4,37 a 4,88 EAG) e no mesmo nível dos controles, porém, com atividade menor que observada para **67** e **68**. O derivado **74**, caracterizado pelo substituinte pirrolidina, teve menor atividade que os dois melhores antioxidantes, possivelmente devido à maior proporção de moléculas protonadas que ALH no átomo de nitrogênio livre.

Já os derivados *N*-metilpiperazina (**71**) e *N*-acetilpiperazina (**73**) apresentaram menor atividade antioxidante. Os compostos **71** e **73** exibiram perfis equivalentes, provavelmente relacionados a contribuições semelhantes (Hidrofóbico e ALH); e sugerindo que a conformação fornecida para a interação intramolecular a partir de seu ALH não seja adequada para a atividade antioxidante.

Os compostos LDT544 (**70**) e LDT692 (**76**) apresentaram atividade antioxidante menor que os controles, justamente devido ao grande volume de seus substituintes. O de menor atividade antioxidante, LDT641 (**72**) com o substituinte piperazina, não demonstra grande nível de impedimento estérico. Entretanto este derivado demonstra a presença de dois ALH e um doador de ligação de hidrogênio (DLH). É provável que a presença deste DLH possa interferir de forma negativa para o efeito antioxidante, resultando no composto de menor atividade.

Levando em consideração estas informações, percebe-se que o melhor perfil como antioxidante apresenta contribuição como ALH, sendo o átomo de oxigênio como o de melhor perfil. Já a presença de grupos que forneçam algum impedimento estérico são capazes de diminuir o nível antioxidante, sendo que aqueles com maior grau de impedimento o conseqüente maior decaimento da atividade. Ainda mais, a presença de um DLH decai perceptivelmente no perfil antioxidante.

14 AVALIAÇÃO DO PERFIL DE PERMEABILIDADE

14.1 AVALIAÇÃO DO PERFIL DE PERMEABILIDADE (SÉRIE 3)

A predição da penetração da barreira hematoencefálica (BHE) dos compostos testados pela metodologia PAMPA está resumida na Tabela 14. De acordo com DI et al (2003), foi relatado que compostos com permeabilidade (Pe) menor que $2,0 \times 10^{-6}$ $\text{cm}\cdot\text{s}^{-1}$ são classificados como não permeáveis à BHE (BHE-); enquanto que compostos com Pe maior que $4,0 \times 10^{-6}$ $\text{cm}\cdot\text{s}^{-1}$ são reconhecidos como permeáveis à BHE (BHE+).

Tabela 14: Dados da estimacão da penetração na BHE obtidos a partir do ensaio de PAMPA para os derivados da Série 3.

Derivados	Estimacão da penetração na BHE				
	$Pe \pm \text{EPM}$ ($\times 10^{-6}$ cm s^{-1})	BHE +/-	Controles	$Pe \pm \text{EPM}$ ($\times 10^{-6}$ cm s^{-1})	BHE +/-
LDT544 (70)	N.D.	BHE -	Tacrina (2)	$5,94 \pm 0,67$	BHE +
LDT636 (68)	$7,0 \pm 1,9$	BHE +	Donepezil (3)	$21,93 \pm 2,06$	BHE +
LDT637 (74)	$11,8 \pm 0,8$	BHE +	Rivastigmina (5)	$18,69 \pm 2,03$	BHE +
LDT638 (69)	$12,05 \pm 0,95$	BHE +	Clorotiazida	$0,66 \pm 0,28$	BHE -
LDT639 (75)	$12,15 \pm 0,55$	BHE +	Furosemida	$0,13 \pm 0,05$	BHE -
LDT640 (67)	$13,55 \pm 0,85$	BHE +	Ranitidina	$0,04 \pm 0,02$	BHE -
LDT641 (72)	$6,15 \pm 0,55$	BHE +	Sulfasalazina	$0,09 \pm 0,053$	BHE -
LDT642 (71)	$12,45 \pm 0,45$	BHE +			
LDT643 (73)	$10,85 \pm 1,05$	BHE +			
LDT692 (76)	$8,6 \pm 0,66$	BHE +			

BHE+: permeável à barreira hematoencefálica; BHE-: não permeável à barreira hematoencefálica; Pe : permeabilidade; N.D.: não determinado.

Baseado nos dados obtidos, os compostos avaliados demonstraram alta probabilidade de atravessar a BHE por difusão passiva. Os resultados foram comparados com os fármacos padrões, onde a disponibilidade da BHE é conhecida e também reportadas em ensaios utilizando a metodologia PAMPA (DI et al, 2009; WANG et al, 2005). O derivado LDT544 (70) não foi categorizado devido à sua baixa solubilidade no meio de ensaio.

15 CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

O presente estudo possibilitou a obtenção de novos ligantes multialvo realizados a partir da mistura de cadanois (**1A-C**) para o tratamento da doença de Alzheimer.

Considerando a etapa de síntese orgânica foram sintetizados dois intermediários-chave, LDT71 (**53**, 60%) e LDT108 (**54**, 64%), e dezenove compostos em rendimentos que variaram entre 21% a 91%. A caracterização estrutural dos intermediários e derivados-alvo por meio de métodos espectroscópicos de análise por RMN de ^1H e RMN de ^{13}C permitiram ratificar a obtenção dos compostos planejados neste trabalho.

Quanto à avaliação do perfil biológico dos derivados, os ensaios anticolinesterásicos demonstraram capacidade em inibir as enzimas em percentuais que variaram de 10% a 75% (*hAChE*) e de 10% a 80% (*hBuChE*). Seus respectivos CI_{50} variaram de 6,68 μM a 30,0 μM (*hAChE*) e de 0,47 μM a 17,5 μM (*hBuChE*). Para os derivados álcool *orto*-substituídos destaca-se LDT638 (**73**) como melhor composto (*AChE* CI_{50} 30,0 μM ; *BuChE* CI_{50} 6,12 μM); enquanto que para os derivados da série de benzilamidas/aminas *orto*-substituídos destaca-se LDT577 (**57**, *AChE* CI_{50} 7,2 μM ; *BuChE* CI_{50} 1,28 μM) e LDT579 (**62**, *AChE* CI_{50} 6,68 μM ; *BuChE* CI_{50} 0,47 μM); Por fim, para a série de derivados 2-metóxi-benzilamidas/aminas *orto*-substituídas destaca-se LDT585 (**62**, *BuChE* CI_{50} 2,15 μM) e LDT587 (**63**, *BuChE* CI_{50} 0,74 μM).

Os ensaios frente à agregação βA demonstraram a capacidade dos derivados-alvo interferirem no processo de agregação do peptídeo. Neste sentido foi observado que derivados com contribuição hidrofóbica são melhores para manter um perfil de espiral aleatória por um período de 72 horas demonstrando baixa densidade de agregados. Dentre os derivados homólogos cíclicos destacou-se LDT692 (**76**); e para os derivados cíclicos substituídos LDT639 (**75**), LDT641 (**74**) e LDT642 (**71**). Ademais, o derivado LDT636 (**68**) favoreceu estruturas como folhas- β , apesar de demonstrar baixa densidade de agregados e fibrilas dispersas.

O ensaio da avaliação do perfil antioxidante dos derivados-alvo revelou que o melhor perfil como antioxidante são referentes aos compostos que apresentem contribuição como aceptor de ligação de hidrogênio (ALH). Sobretudo, observou-se

que a presença de grupos que forneçam algum impedimento estérico são capazes de diminuir o nível antioxidante dos derivados, bem como a presença de um doador de ligação de hidrogênio (DLH). O melhor antioxidante foi o derivado LDT640 (**67**, 9,73 EAG), enquanto que a maioria dos derivados mantiveram perfil semelhante aos controles. Apenas 3 dos compostos avaliados demonstraram atividade antioxidante menor que o controle;

Adicionalmente, foi demonstrado que todos os derivados são capazes de atravessar a barreira hematoencefálica, exceto LDT544 (**70**) que não foi categorizado devido ao resultado tendencioso à sua baixa solubilidade no meio de ensaio.

Tomando em consideração todas as análises realizadas, destaca-se o derivado LDT638 (**69**). Em primeiro lugar, **69** apresentou o melhor perfil dual no ensaio de inibição de colinesterases, seguindo por seu comportamento na avaliação antiagregante onde foi capaz, até o tempo 2, manter o peptídeo como espiral aleatória. Além de exibir densidade de agregados menor do que o controle negativo. Ainda mais, demonstrou perfil antioxidante dentro da faixa dos controles utilizados no ensaio, além de demonstrar permeabilidade à BHE. Portanto, devido a estas características, **69** foi considerado o melhor derivado com base nos ensaios realizados até o momento.

A finalização da avaliação farmacológica dos compostos quanto à atividade anticolinesterásica, antiagregante e antioxidante se faz necessária para melhor racionalização dos resultados e estabelecimento de relações estrutura-atividade. Ademais, a avaliação da toxicidade dos agregados gerados na presença dos derivados-alvo também é uma das perspectivas deste trabalho.

Referências

16 REFERÊNCIAS

A PATTON,; CHISM, Patricia. Quantitative Paper Chromatography of Amino Acids. An Evaluation of Techniques. **Analytical Chemistry**, [s.l.], v. 23, n. 11, p.1683-1685, 1 nov. 1951. American Chemical Society (ACS).

ALONSO, D. et al. Donepezil–tacrine hybrid related derivatives as new dual binding site inhibitors of AChE. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, [s.l.], v. 13, n. 24, p.6588-6597, dez. 2005. Elsevier BV

ANNAMALAI, Balasubramaniam et al. Role of S-nitrosoglutathione mediated mechanisms in tau hyper-phosphorylation. **Biochemical And Biophysical Research Communications**, [s.l.], v. 458, n. 1, p.214-219, fev. 2015. Elsevier BV.

ATES, M. Panpalli et al. Analysis of genetics and risk factors of Alzheimer’s Disease. **Neuroscience**, [s.l.], v. 325, p.124-131, jun. 2016. Elsevier BV.

BALACHANDRAN, Vijai Shankar et al. Recent advances in cardanol chemistry in a nutshell: from a nut to nanomaterials. **Chemical Society Reviews**, [s.l.], v. 42, n. 2, p.427-438, 2013. Royal Society of Chemistry (RSC).

BARTOLINI, Manuela et al. Insight Into the Kinetic of Amyloid β (1–42) Peptide Self-Aggregation: Elucidation of Inhibitors’ Mechanism of Action. **Chembiochem**, [s.l.], v. 8, n. 17, p.2152-2161, 23 nov. 2007. Wiley-Blackwell.

BASTIANETTO, Stéphane et al. The ginkgo biloba extract (EGb 761) protects hippocampal neurons against cell death induced by β -amyloid. **European Journal Of Neuroscience**, [s.l.], v. 12, n. 6, p.1882-1890, jun. 2000. Wiley-Blackwell.

BAUTISTA-AGUILERA, Óscar M. et al. Multitarget-Directed Ligands Combining Cholinesterase and Monoamine Oxidase Inhibition with Histamine H3R Antagonism for Neurodegenerative Diseases. **Angewandte Chemie International Edition**, [s.l.], v. 56, n. 41, p.12765-12769, 1 set. 2017. Wiley-Blackwell.

BELLUTI, Federica et al. Benzophenone-based derivatives: A novel series of potent and selective dual inhibitors of acetylcholinesterase and acetylcholinesterase-induced beta-amyloid aggregation. **European Journal Of Medicinal Chemistry**, [s.l.], v. 46, n. 5, p.1682-1693, maio 2011. Elsevier BV.

BELLUTI, Federica et al. Design, synthesis, and evaluation of benzophenone derivatives as novel acetylcholinesterase inhibitors. **European Journal Of Medicinal Chemistry**, [s.l.], v. 44, n. 3, p.1341-1348, mar. 2009. Elsevier BV.

BERTRAM, L., *et al.*, The Genetics of Alzheimer Disease: Back to the Future, *Neuron*, 2010, 270-281

- BEROVA, Nina; NAKANISHI, Koji; WOODY, Robert W.. **Circular Dichroism: Principles and Applications**. 2. ed. Nova Iorque: Wiley-vch, 2000.
- BOLOGNESI, M. et al. MTDL Design Strategy in the Context of Alzheimer's Disease: From Lipocrine to Memoquin and Beyond. **Current Pharmaceutical Design**, [s.l.], v. 15, n. 6, p.601-613, 1 fev. 2009. Bentham Science Publishers Ltd..
- BOLOGNESI, Maria et al. From Dual Binding Site Acetylcholinesterase Inhibitors to Multi-Target-Directed Ligands (MTDLs): A Step Forward in the Treatment of Alzheimer's Disease. **Mini-Reviews in Medicinal Chemistry**, [s.l.], v. 8, n. 10, p.960-967, 1 set. 2008. Bentham Science Publishers Ltd..
- BOYD-KIMBALL, Debra et al. Role of Phenylalanine 20 in Alzheimer's Amyloid β -Peptide (1-42)-Induced Oxidative Stress and Neurotoxicity. **Chemical Research in Toxicology**, [s.l.], v. 17, n. 12, p.1743-1749, dez. 2004. American Chemical Society (ACS).
- BRASIL. Portaria n^o 13, de 28 de novembro de 2017. **Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas da Doença de Alzheimer**. Brasília-DF, 2017.
- BRUGGINK, Kim A., et al. Methods for Analysis of Amyloid- β Aggregates. **Journal Of Alzheimer's Disease**, [s.l.], v. 28, n. 4, p.735-758, 2012. IOS Press.
- BRUS, Boris et al. Discovery, Biological Evaluation, and Crystal Structure of a Novel Nanomolar Selective Butyrylcholinesterase Inhibitor. **Journal of Medicinal Chemistry**, [s.l.], v. 57, n. 19, p.8167-8179, 9 out. 2014. American Chemical Society (ACS).
- BUTTERFIELD, D. Allan; BOYD-KIMBALL, Debra. The critical role of methionine 35 in Alzheimer's amyloid β -peptide (1-42)-induced oxidative stress and neurotoxicity. **Biochimica Et Biophysica Acta (bba) - Proteins And Proteomics**, [s.l.], v. 1703, n. 2, p.149-156, jan. 2005. Elsevier BV.
- CACACE, Rita; SLEEGERS, Kristel; BROECKHOVEN, Christine V. Molecular genetics of early-onset Alzheimer's disease revisited. **Alzheimer's & Dementia**, [s.l.], v. 12, n. 6, p.733-748, jun. 2016. Elsevier BV.
- CAO, Guohua; ALESSIO, Helaine M.; CUTLER, Richard G.. Oxygen-radical absorbance capacity assay for antioxidants. **Free Radical Biology And Medicine**, [s.l.], v. 14, n. 3, p.303-311, mar. 1993. Elsevier BV.
- CAUWENBERGHE, Caroline V.; BROECKHOVEN, Christine V.; SLEEGERS, Kristel. The genetic landscape of Alzheimer disease: clinical implications and perspectives.

Genetics In Medicine, [s.l.], v. 18, n. 5, p.421-430, 27 ago. 2015. Nature Publishing Group.

CHEN, Junjun et al. Quercetin attenuates tau hyperphosphorylation and improves cognitive disorder via suppression of ER stress in a manner dependent on AMPK pathway. **Journal Of Functional Foods**, [s.l.], v. 22, p.463-476, abr. 2016. Elsevier BV.

CHIMON, Sandra et al. Evidence of fibril-like β -sheet structures in a neurotoxic amyloid intermediate of Alzheimer's β -amyloid. **Nature Structural & Molecular Biology**, [s.l.], v. 14, n. 12, p.1157-1164, dez. 2007. Nature Publishing Group.

CLEARY, James P et al. Natural oligomers of the amyloid- β protein specifically disrupt cognitive function. **Nature Neuroscience**, [s.l.], v. 8, n. 1, p.79-84, 19 dez. 2004. Nature Publishing Group.

COGHLAN, Matthew P et al. Selective small molecule inhibitors of glycogen synthase kinase-3 modulate glycogen metabolism and gene transcription. **Chemistry & Biology**, [s.l.], v. 7, n. 10, p.793-803, out. 2000. Elsevier BV.

DARVESH, S.; REID, G.a.. Reduced fibrillar β -amyloid in subcortical structures in a butyrylcholinesterase-knockout Alzheimer disease mouse model. **Chemico-biological Interactions**, [s.l.], p.1-6, abr. 2016. Elsevier BV.

DARVESH, Sultan; HOPKINS, David A.; GEULA, Changiz. Neurobiology of butyrylcholinesterase. **Nature Reviews Neuroscience**, [s.l.], v. 4, n. 2, p.131-138, fev. 2003. Nature Publishing Group.

DAS, Kumuda C; DAS, Chandan K. Curcumin (diferuloylmethane), a singlet oxygen (1O_2) quencher. **Biochemical And Biophysical Research Communications**, [s.l.], v. 295, n. 1, p.62-66, jul. 2002. Elsevier BV.

DAVIES, P.; MALONEY, A. J. F. Selective Loss of Central Cholinergic Neurons in Alzheimer's Disease. **The Lancet**, [s.l.], v. 308, n. 8000, p.1403 μ , dez. 1976. Elsevier BV.

DIAMANT, S. et al. Butyrylcholinesterase attenuates amyloid fibril formation in vitro. **Proceedings Of The National Academy Of Sciences**, [s.l.], v. 103, n. 23, p.8628-8633, 26 maio 2006. Proceedings of the National Academy of Sciences.

DIAS, Kris Simone T. et al. Design, synthesis and evaluation of novel feruloyl-donepezil hybrids as potential multitarget drugs for the treatment of Alzheimer's disease. **European Journal Of Medicinal Chemistry**, [s.l.], v. 130, p.440-457, abr. 2017. Elsevier BV.

DÍAZ, Juan Carlos et al. Histidines 13 and 14 in the A β sequence are targets for inhibition of Alzheimer's disease A β ion channel and cytotoxicity. **Biol. Res.**, [s.l.], v. 39, n. 3, p.447-460, 2006. SciELO Comision Nacional de Investigacion Cientifica Y Tecnologica (CONICYT).

DI, Li et al. High throughput artificial membrane permeability assay for blood–brain barrier. **European Journal Of Medicinal Chemistry**, [s.l.], v. 38, n. 3, p.223-232, mar. 2003. Elsevier BV.

DI, Li et al. Comparison of blood–brain barrier permeability assays: in situ brain perfusion, MDR1-MDCKII and PAMPA-BBB. **Journal Of Pharmaceutical Sciences**, [s.l.], v. 98, n. 6, p.1980-1991, jun. 2009. Elsevier BV.

DIGHE, Satish N. et al. Discovery and Structure–Activity Relationships of a Highly Selective Butyrylcholinesterase Inhibitor by Structure-Based Virtual Screening. **Journal Of Medicinal Chemistry**, [s.l.], v. 59, n. 16, p.7683-7689, 26 jul. 2016. American Chemical Society (ACS).

DORARD, Emilie et al. Increases of SET level and translocation are correlated with tau hyperphosphorylation at ser202/thr205 in CA1 of Ts65Dn mice. **Neurobiology Of Aging**, [s.l.], v. 46, p.43-48, out. 2016. Elsevier BV.

DU, Da-ming; CARLIER, Paul. Development of Bivalent Acetylcholinesterase Inhibitors as Potential Therapeutic Drugs for Alzheimers Disease. **Current Pharmaceutical Design**, [s.l.], v. 10, n. 25, p.3141-3156, 1 out. 2004. Bentham Science Publishers Ltd..

DVIR, Hay et al. Acetylcholinesterase: From 3D structure to function. **Chemico-biological Interactions**, [s.l.], v. 187, n. 1-3, p.10-22, set. 2010. Elsevier BV.

ENGEL, T. et al. Full Reversal of Alzheimer's Disease-Like Phenotype in a Mouse Model with Conditional Overexpression of Glycogen Synthase Kinase-3. **Journal Of Neuroscience**, [s.l.], v. 26, n. 19, p.5083-5090, 10 maio 2006. Society for Neuroscience.

ELLMAN, George L. et al. A New and Rapid Colorimetric Determination of Acetylcholinesterase Activity. **Biochemical Pharmacology**, [s.l.], v. 7, p.88-95, 1961.

ELSINGHORST, Paul W. et al. First Gallamine–Tacrine Hybrid: Design and Characterization at Cholinesterases and the M 2 Muscarinic Receptor. **Journal of Medicinal Chemistry**, [s.l.], v. 50, n. 23, p.5685-5695, nov. 2007. American Chemical Society (ACS).

ELSINGHORST, Paul W.; TANARRO, Camino M. González; GÜTSCHOW, Michael. Novel Heterobivalent Tacrine Derivatives as Cholinesterase Inhibitors with Notable

Selectivity Toward Butyrylcholinesterase. **Journal of Medicinal Chemistry**, [s.l.], v. 49, n. 25, p.7540-7544, dez. 2006. American Chemical Society (ACS).

FANG, Lei et al. Active Site Gating and Substrate Specificity of Butyrylcholinesterase and Acetylcholinesterase: Insights from Molecular Dynamics. **The Journal Of Physical Chemistry B**. [s.l.], p. 8797-8805. 17 jun. 2011.

FANG, Lei et al. Design and synthesis of tacrine–ferulic acid hybrids as multi-potent anti-Alzheimer drug candidates. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, [s.l.], v. 18, n. 9, p.2905-2909, maio 2008. Elsevier BV.

FASMAN, Gerald D. (Ed.). **Circular Dichroism and the Conformational Analysis of Biomolecules**. 2. ed. Nova Iorque: Plenum Press, 1996.

FENG, Ying et al. Resveratrol inhibits beta-amyloid oligomeric cytotoxicity but does not prevent oligomer formation. **Neurotoxicology**, [s.l.], v. 30, n. 6, p.986-995, nov. 2009. Elsevier BV.

FERNANDES, Viviane C. A. **Síntese e avaliação farmacológica de novos inibidores AChE planejados a partir do ácido anacárdico**. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Faculdade de Saúde. Universidade de Brasília, Brasília, 2014.

FRAUTSCHY, S. Phenolic anti-inflammatory antioxidant reversal of A β -induced cognitive deficits and neuropathology. **Neurobiology Of Aging**, [s.l.], v. 22, n. 6, p.993-1005, dez. 2001. Elsevier BV.

GARDNER, L.e. et al. Imatinib methanesulfonate reduces hyperphosphorylation of tau following repeated peripheral exposure to lipopolysaccharide. **Neuroscience**, [s.l.], v. 331, p.72-77, set. 2016. Elsevier BV.

GASPAR, Alexandra et al. Oxidative Stress and Neurodegenerative Diseases: Looking for a Therapeutic Solution Inspired on Benzopyran Chemistry. **Current Topics in Medicinal Chemistry**, [s.l.], v. 15, n. 5, p.432-445, 23 fev. 2015. Bentham Science Publishers Ltd..

GEDAM, P. H.; SAMPATHKUMARAN, P. S.. Cashew Nut Shell Liquid: Extraction, Chemistry and Applications. **Progress In Organic Coatings**, [s.l.], n. 14, p.115-157, 1986.

GERVAIS, Francine et al. Targeting soluble A β peptide with Tramiprosate for the treatment of brain amyloidosis. **Neurobiology Of Aging**, [s.l.], v. 28, n. 4, p.537-547, abr. 2007. Elsevier BV.

GIACOBINI, Ezio. Selective Inhibitors of Butyrylcholinesterase. **Drugs & Aging**, [s.l.], v. 18, n. 12, p.891-898, 2001. Springer Science + Business Media.

GODYN, Justyna et al. Therapeutic strategies for Alzheimer's disease in clinical trials. **Pharmacological Reports**, [s.l.], v. 68, n. 1, p.127-138, fev. 2016. Elsevier BV.

GORMAN, Paul M. et al. Alternate Aggregation Pathways of the Alzheimer β -Amyloid Peptide: A β Association Kinetics at Endosomal pH. **Journal Of Molecular Biology**, [s.l.], v. 325, n. 4, p.743-757, jan. 2003. Elsevier BV.

GOK, Muslum; ZEYBEK, N. Dilara; BODUR, Ebru. Butyrylcholinesterase expression is regulated by fatty acids in HepG2 cells. **Chemico-biological Interactions**, [s.l.], p.1-6, abr. 2016. Elsevier BV.

GUILLOZET, A. L. et al. Butyrylcholinesterase in the life cycle of amyloid plaques. **Annals Of Neurology**, [s.l.], v. 42, n. 6, p.909-918, dez. 1997. Wiley-Blackwell.

HAN, Sun-ho; PARK, Jong-chan; MOOK-JUNG, Inhee. Amyloid β -interacting partners in Alzheimer's disease: From accomplices to possible therapeutic targets. **Progress In Neurobiology**, [s.l.], v. 137, p.17-38, fev. 2016. Elsevier BV.

HARVEY, M. T.; CAPLAN, S.. Cashew Nut Shell Liquid. **Industrial & Engineering Chemistry**, [s.l.], v. 32, n. 10, p.1306-1310, out. 1940. American Chemical Society (ACS).

HAVIV, H. et al. Bivalent Ligands Derived from Huperzine A as Acetylcholinesterase Inhibitors. **Current Topics in Medicinal Chemistry**, [s.l.], v. 7, n. 4, p.375-387, 1 fev. 2007. Bentham Science Publishers Ltd..

HE, Xu-chang et al. Study on dual-site inhibitors of acetylcholinesterase: Highly potent derivatives of bis- and bifunctional huperzine B. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, [s.l.], v. 15, n. 3, p.1394-1408, 1 fev. 2007. Elsevier BV.

HOSHINO, Tyuji et al. Binding and Aggregation Mechanism of Amyloid β -Peptides onto the GM1 Ganglioside-Containing Lipid Membrane. **The Journal Of Physical Chemistry B**, [s.l.], v. 117, n. 27, p.8085-8094, 11 jul. 2013. American Chemical Society (ACS).

HOU, Li-na et al. A New Motif in the N-Terminal of Acetylcholinesterase Triggers Amyloid- β Aggregation and Deposition. **Cns Neuroscience & Therapeutics**, [s.l.], v. 20, n. 1, p.59-66, 24 ago. 2013. Wiley-Blackwell.

HOWLETT, David R. et al. Common structural features determine the effectiveness of carvedilol, daunomycin and rolitetracycline as inhibitors of Alzheimer β -amyloid fibril formation. **Biochemical Journal**, [s.l.], v. 343, n. 2, p.419-423, 15 out. 1999. Portland Press Ltd..

HU, Wen et al. Hyperphosphorylation determines both the spread and the morphology of tau pathology. **Alzheimer's & Dementia**, [s.l.], p.1-12, abr. 2016. Elsevier BV.

INESTROSA, Nibaldo C. et al. Acetylcholinesterase Accelerates Assembly of Amyloid- β -Peptides into Alzheimer's Fibrils: Possible Role of the Peripheral Site of the Enzyme. **Neuron**, [s.l.], v. 16, n. 4, p.881-891, abr. 1996. Elsevier BV.

JUSZCZYK, Paulina; KOŁODZIEJCZYK, Aleksandra S.; GRZONKA, Zbigniew. Circular dichroism and aggregation studies of amyloid β (11–28) fragment and its variants. **Acta Biochimica Polonica**, Polônia, v. 52, n. 2, p.425-431, jun. 2005.

KESHET, Ben; GRAY, Jeffrey J.; GOOD, Theresa A.. Structurally distinct toxicity inhibitors bind at common loci on β -amyloid fibril. **Protein Science**, [s.l.], v. 19, n. 12, p.2291-2304, 18 nov. 2010. Wiley-Blackwell.

KHANNA, Savita et al. Neuroprotective and Antiinflammatory Properties of a Novel Demethylated Curcuminoid. **Antioxidants & Redox Signaling**, [s.l.], v. 11, n. 3, p.449-468, mar. 2009. Mary Ann Liebert Inc.

KIM, Darrick S.h.I; KIM, Jin Yung. Total synthesis of calebin-A, preparation of its analogues, and their neuronal cell protectivity against β -amyloid insult. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, [s.l.], v. 11, n. 18, p.2541-2543, set. 2001. Elsevier BV.

KIM, Sunoh et al. Ginsenoside Rg3 antagonizes NMDA receptors through a glycine modulatory site in rat cultured hippocampal neurons. **Biochemical And Biophysical Research Communications**, [s.l.], v. 323, n. 2, p.416-424, out. 2004. Elsevier BV.

KIM, Sunoh et al. Inhibitory effect of ginsenosides on NMDA receptor-mediated signals in rat hippocampal neurons. **Biochemical And Biophysical Research Communications**, [s.l.], v. 296, n. 2, p.247-254, ago. 2002. Elsevier BV.

KOBAYASHI, Nagao; MURANAKA, Atsuya; MACK, John. **Circular Dichroism and Magnetic Circular Dichroism Spectroscopy for Organic Chemists**. Cambridge: Royal Society Of Chemistry, 2012.

KORABECNY, J., et al., Synthesis and in vitro evaluation of N-alkyl-7-methoxytacrine hydrochlorides as potential cholinesterase inhibitors in Alzheimer disease, **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, 2010, 6093–6095

KRYGER, Gitay et al. Structures of recombinant native and E202Q mutant human acetylcholinesterase complexed with the snake-venom toxin fasciculín-II. **Acta Crystallogr D Biol Cryst**, [s.l.], v. 56, n. 11, p.1385-1394, 1 nov. 2000. International Union of Crystallography (IUCr).

KUMAR, M.h.v.; GUPTA, Y.k.. Antioxidant property of *Celastrus paniculatus* Willd.: a possible mechanism in enhancing cognition. **Phytomedicine**, [s.l.], v. 9, n. 4, p.302-311, jan. 2002. Elsevier BV.

KUMAR, P. Phani et al. Process for Isolation of Cardanol from Technical Cashew (*Anacardium occidentale* L.) Nut Shell Liquid. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, [s.l.], v. 50, n. 16, p.4705-4708, jul. 2002. American Chemical Society (ACS).

LEE, S.; FERNANDEZ, E. J.; GOOD, T. A.. Role of aggregation conditions in structure, stability, and toxicity of intermediates in the Abeta fibril formation pathway. **Protein Science**, [s.l.], v. 16, n. 4, p.723-732, 27 fev. 2007. Wiley-Blackwell.

LEES, J. G. et al. A reference database for circular dichroism spectroscopy covering fold and secondary structure space. **Bioinformatics**, [s.l.], v. 22, n. 16, p.1955-1962, 20 jun. 2006. Oxford University Press (OUP).

LEMES, L. F. N. **Síntese e avaliação farmacológica de novos inibidores da AChE planejados a partir do cardanol candidatos ao tratamento de Alzheimer**. 2013. 225p. Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) – Faculdade de Saúde. Universidade de Brasília, Brasília, 2013.

LEMES, Laís Flávia Nunes et al. Cardanol-derived AChE inhibitors: Towards the development of dual binding derivatives for Alzheimer's disease. **European Journal Of Medicinal Chemistry**, [s.l.], v. 108, p.687-700, jan. 2016. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejmech.2015.12.024>.

LI, Su-yi et al. Multifunctional tacrine–flavonoid hybrids with cholinergic, β -amyloid-reducing, and metal chelating properties for the treatment of Alzheimer's disease. **European Journal Of Medicinal Chemistry**, [s.l.], v. 69, p.632-646, nov. 2013. Elsevier BV.

LI, Su-yi; WANG, Xiao-bing; KONG, Ling-yi. Design, synthesis and biological evaluation of imine resveratrol derivatives as multi-targeted agents against Alzheimer's disease. **European Journal Of Medicinal Chemistry**, [s.l.], v. 71, p.36-45, jan. 2014. Elsevier BV.

LI, Yujie et al. Design, synthesis and evaluation of rivastigmine and curcumin hybrids as site-activated multitarget-directed ligands for Alzheimer's disease therapy. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, [s.l.], v. 22, n. 17, p.4717-4725, set. 2014. Elsevier BV.

LI, Yuxing et al. Pterostilbene-O-acetamidoalkylbenzylamines derivatives as novel dual inhibitors of cholinesterase with anti- β -amyloid aggregation and antioxidant properties for the treatment of Alzheimer's disease. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, [s.l.], v. 26, n. 8, p.2035-2039, abr. 2016. Elsevier BV.

LLORET, A. et al. Molecular mechanisms linking amyloid β toxicity and Tau hyperphosphorylation in Alzheimer's disease. **Free Radical Biology And Medicine**, [s.l.], v. 83, p.186-191, jun. 2015. Elsevier BV.

LU, Chuanjun et al. Design, Synthesis, and Evaluation of Multitarget-Directed Resveratrol Derivatives for the Treatment of Alzheimer's Disease. **Journal of Medicinal Chemistry**, [s.l.], v. 56, n. 14, p.5843-5859, 25 jul. 2013. American Chemical Society (ACS).

LUO, Wen et al. Design, synthesis and evaluation of novel tacrine-multialkoxybenzene hybrids as dual inhibitors for cholinesterases and amyloid beta aggregation. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, [s.l.], v. 19, n. 2, p.763-770, jan. 2011. Elsevier BV.

LUSHCHEKINA, Sofya et al. Understanding the non-catalytic behavior of human butyrylcholinesterase silent variants: Comparison of wild-type enzyme, catalytically active Ala328Cys mutant, and silent Ala328Asp variant. **Chemico-biological Interactions**, [s.l.], p.1-10, abr. 2016. Elsevier BV.

LY, Philip T.T. et al. Inhibition of GSK3 β -mediated BACE1 expression reduces Alzheimer-associated phenotypes. **Journal Of Clinical Investigation**, [s.l.], v. 123, n. 1, p.224-235, 3 dez. 2013. American Society for Clinical Investigation.

MAHATA, Denial et al. Self-assembled cardanol azo derivatives as antifungal agent with chitin-binding ability. **International Journal Of Biological Macromolecules**, [s.l.], v. 69, p.5-11, ago. 2014. Elsevier BV.

MAIA, Francisco Jonas Nogueira et al. Evaluation of antioxidant action by electrochemical and accelerated oxidation experiments of phenolic compounds derived from cashew nut shell liquid. **Industrial Crops And Products**, [s.l.], v. 67, p.281-286, maio 2015. Elsevier BV.

MAJI, S. K. et al. Amino Acid Position-specific Contributions to Amyloid β -Protein Oligomerization. **Journal Of Biological Chemistry**, [s.l.], v. 284, n. 35, p.23580-23591, 30 jun. 2009. American Society for Biochemistry & Molecular Biology (ASBMB).

MAO, Fei et al. O-Hydroxyl- or o-amino benzylamine-tacrine hybrids: Multifunctional biometals chelators, antioxidants, and inhibitors of cholinesterase activity and amyloid- β aggregation. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, [s.l.], v. 20, n. 19, p.5884-5892, out. 2012. Elsevier BV.

MANCUSO, Cesare; et al. Natural substances and Alzheimer's disease: From preclinical studies to evidence based medicine. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA): Molecular Basis of Disease**, Vol. 1822, Issue 5, May 2012, p. 616-624.

MANDEL, Silvia et al. Cell signaling pathways in the neuroprotective actions of the green tea polyphenol (-)-epigallocatechin-3-gallate: implications for neurodegenerative diseases. **Journal Of Neurochemistry**, [s.l.], v. 88, n. 6, p.1555-1569, 2 fev. 2004. Wiley-Blackwell.

MARSHALL, Karen E. et al. Hydrophobic, Aromatic, and Electrostatic Interactions Play a Central Role in Amyloid Fibril Formation and Stability. **Biochemistry**, [s.l.], v. 50, n. 12, p.2061-2071, 29 mar. 2011. American Chemical Society (ACS).

MARTIN PRICE (Reino Unido). Alzheimer's Disease International. **World Alzheimer Report 2015: The Global Impact of Dementia**. An analysis of prevalence, incidence, cost and trends. Londres: Bupa, 2015. 92 p. (1).

MASSON, Patrick; LUSHCHEKINA, Sofya V.. Slow-binding inhibition of cholinesterases, pharmacological and toxicological relevance. **Archives Of Biochemistry And Biophysics**, [s.l.], v. 593, p.60-68, mar. 2016. Elsevier BV.

MAURICE, Tangui et al. Learning performances and vulnerability to amyloid toxicity in the butyrylcholinesterase knockout mouse. **Behavioural Brain Research**, [s.l.], v. 296, p.351-360, jan. 2016. Elsevier BV.

MEEK, Autumn; SIMMS, Gordon; WEAVER, Donald. Searching for an endogenous anti-Alzheimer molecule: identifying small molecules in the brain that slow Alzheimer disease progression by inhibition of β -amyloid aggregation. **Journal Of Psychiatry & Neuroscience**, [s.l.], v. 38, n. 4, p.269-275, 1 jun. 2013. 8872147 Canada, Inc..

MEHTA, Mona; ADEM, Abdu; SABBAGH, Marwan. New Acetylcholinesterase Inhibitors for Alzheimer's Disease. **International Journal Of Alzheimer's Disease**, [s.l.], v. 2012, p.1-8, 2012. Hindawi Publishing Corporation.

MELQUIOND, Adrien et al. Role of the Region 23-28 in A β Fibril Formation: Insights from Simulations of the Monomers and Dimers of Alzheimers Peptides A β 40 and A β 42. **Current Alzheimer Research**, [s.l.], v. 5, n. 3, p.244-250, 1 jun. 2008. Bentham Science Publishers Ltd..

MESULAM, Marsel; GEULA, Changiz. Butyrylcholinesterase reactivity differentiates the amyloid plaques of aging from those of dementia. **Annals Of Neurology**, [s.l.], v. 36, n. 5, p.722-727, nov. 1994. Wiley-Blackwell.

MICSONAI, András et al. Accurate secondary structure prediction and fold recognition for circular dichroism spectroscopy. **Proceedings Of The National Academy Of Sciences**, [s.l.], v. 112, n. 24, p.3095-3103, 2 jun. 2015. Proceedings of the National Academy of Sciences.

MIQUEL, J et al. The curcuma antioxidants: pharmacological effects and prospects for future clinical use. A review. **Archives Of Gerontology And Geriatrics**, [s.l.], v. 34, n. 1, p.37-46, fev. 2002. Elsevier BV.

MISHRA, Pankaj; AYYANNAN, Senthil R.; PANDA, Gautam. Perspectives on Inhibiting β -Amyloid Aggregation through Structure-Based Drug Design. **Chemmedchem**, [s.l.], v. 10, n. 9, p.1467-1474, 24 jul. 2015. Wiley-Blackwell.

MITHU, Venus Singh et al. Curcumin Alters the Salt Bridge-containing Turn Region in Amyloid β (1– 42) Aggregates. **The Journal Of Biological Chemistry**, [s.l.], v. 289, n. 16, p.11122-11131, 5 mar. 2014.

MIYAZAWA, Mitsuo; WATANABE, Hitomi; KAMEOKA, Hiromu. Inhibition of Acetylcholinesterase Activity by Monoterpenoids with a p -Menthane Skeleton. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, [s.l.], v. 45, n. 3, p.677-679, mar. 1997. American Chemical Society (ACS).

MUNOZ-TORRERO, D. et al. Dimeric and Hybrid Anti-Alzheimer Drug Candidates. **Current Medicinal Chemistry**, [s.l.], v. 13, n. 4, p.399-422, 1 fev. 2006. Bentham Science Publishers Ltd..

MURAKAMI, Kazuma et al. Formation and Stabilization Model of the 42-mer $A\beta$ Radical: Implications for the Long-Lasting Oxidative Stress in Alzheimer's Disease. **Journal of the American Chemical Society**, [s.l.], v. 127, n. 43, p.15168-15174, nov. 2005. American Chemical Society (ACS).

NAKAGAMI, Yasuhiro et al. A novel β -sheet breaker, RS-0406, reverses amyloid β -induced cytotoxicity and impairment of long-term potentiation in vitro. **British Journal Of Pharmacology**, [s.l.], v. 137, n. 5, p.676-682, nov. 2002. Wiley-Blackwell.

NGUYEN, Thi Thuy Ha et al. Neuroprotective Effect of Sanguisorbae Radix against Oxidative Stress-Induced Brain Damage: in Vitro and in Vivo. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, [s.l.], v. 31, n. 11, p.2028-2035, 2008. Pharmaceutical Society of Japan.

NIE, Qin; DU, Xiao-guang; GENG, Mei-yu. Small molecule inhibitors of amyloid β peptide aggregation as a potential therapeutic strategy for Alzheimer's disease. **Acta Pharmacologica Sinica**. Vol. 32, 2011, p. 545-551.

NORDBERG, Agneta et al. A Review of Butyrylcholinesterase as a Therapeutic Target in the Treatment of Alzheimer's Disease. **The Primary Care Companion For CNS Disorders** [s.l.], p. 1-11. 7 mar. 2013.

OLIVEIRA, Micheline Soares Costa et al. Antioxidant, larvicidal and antiacetylcholinesterase activities of cashew nut shell liquid constituents. **Acta Tropica**, [s.l.], v. 117, n. 3, p.165-170, mar. 2011. Elsevier BV.

OU, Boxin; HAMPSCH-WOODILL, Maureen; PRIOR, Ronald L.. Development and Validation of an Improved Oxygen Radical Absorbance Capacity Assay Using Fluorescein as the Fluorescent Probe. **Journal Of Agricultural And Food Chemistry**, [s.l.], v. 49, n. 10, p.4619-4626, out. 2001. American Chemical Society (ACS).

PANG, Yuan-ping, et al. Highly Potent, Selective, and Low Cost Bis-tetrahydroaminacrine Inhibitors of Acetylcholinesterase. STEPS TOWARD NOVEL DRUGS FOR TREATING ALZHEIMER'S DISEASE. **Journal Of Biological Chemistry**, [s.l.], v. 271, n. 39, p.23646-23649, 27 set. 1996. American Society for Biochemistry & Molecular Biology (ASBMB).

PARK, So-young; KIM, Darrick S. H. L.. Discovery of Natural Products from Curcuma longa that Protect Cells from Beta-Amyloid Insult: A Drug Discovery Effort against Alzheimer's Disease. **J. Nat. Prod.**, [s.l.], v. 65, n. 9, p.1227-1231, set. 2002. American Chemical Society (ACS).

PAULA, A. A. N.; et al. Eletronic structure calculations toward new potentially AChE inhibitors. **Chemical Physics Letters**, Vol. 446, 200, p. 304-308.

PAULA, A. A. N.; et al. New potential AChE inhibitor candidates. **European Journal of Medicinal Chemistry**, Vol. 44, 2009, p. 3754-3759.

PERRY, Nicolette S. L. et al. In-vitro Inhibition of Human Erythrocyte Acetylcholinesterase by Salvia lavandulaefolia Essential Oil and Constituent Terpenes. **Journal Of Pharmacy And Pharmacology**, [s.l.], v. 52, n. 7, p.895-902, jul. 2000. Wiley-Blackwell.

PIAZZI, Lorna et al. Extensive SAR and Computational Studies of 3-{4-[(Benzylmethylamino)methyl]phenyl}-6,7-dimethoxy-2H-2-chromenone (AP2238) Derivatives. **Journal Of Medicinal Chemistry**, [s.l.], v. 50, n. 17, p.4250-4254, ago. 2007. American Chemical Society (ACS).

POSTUMA, Ronald B. et al. Substrate-Bound β -Amyloid Peptides Inhibit Cell Adhesion and Neurite Outgrowth in Primary Neuronal Cultures. **Journal Of Neurochemistry**, [s.l.], v. 74, n. 3, p.1122-1130, mar. 2000. Wiley-Blackwell.

RAJASEKHAR, K.; et al. Rationally Designed Peptidomimetic Modulators of A β Toxicity in Alzheimer's Disease. **Scientific Reports**. Vol. 5, 2015, p. 1-9.

RAMOS, Giselle A. **Síntese e avaliação farmacológica de novos inibidores da enzima acetilcolinesterase planejados a partir do cardol**. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Faculdade de Saúde. Universidade de Brasília, Brasília, 2014.

RAO, Praveen P.n.; MOHAMED, Tarek; OSMAN, Wesseem. Investigating the binding interactions of galantamine with β -amyloid peptide. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, [s.l.], v. 23, n. 1, p.239-243, jan. 2013. Elsevier BV.

REINKE, Ashley A.; GESTWICKI, Jason A. Structure–activity Relationships of Amyloid Beta-aggregation Inhibitors Based on Curcumin: Influence of Linker Length and Flexibility. **Chemical Biology & Drug Design**. Vol. 70, 2007, p. 206-215.

REZAI-ZADEH, Kavon et al. Flavonoid-mediated presenilin-1 phosphorylation reduces Alzheimer's disease β -amyloid production. **Journal Of Cellular And Molecular Medicine**, [s.l.], v. 13, n. 3, p.574-588, mar. 2009. Wiley-Blackwell.

ROCHA-GONZÁLEZ, Héctor I.; AMBRIZ-TUTUTI, Mónica; GRANADOS-SOTO, Vinicio. Resveratrol: A Natural Compound with Pharmacological Potential in Neurodegenerative Diseases. **Cns Neuroscience & Therapeutics**, [s.l.], v. 14, n. 3, p.234-247, set. 2008. Wiley-Blackwell.

ROCHA, Miguel Divino da et al. The Role of Natural Products in the Discovery of New Drug Candidates for the Treatment of Neurodegenerative Disorders II: Alzheimers Disease. **Cns & Neurological Disorders - Drug Targets**, [s.l.], v. 10, n. 2, p.251-270, 1 mar. 2011. Bentham Science Publishers Ltd..

ROGOSCH, Tobias et al. Novel bioactive metabolites of dipyrone (metamizol). **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, [s.l.], v. 20, n. 1, p.101-107, jan. 2012. Elsevier BV.

SANTOS, M. Amélia; CHAND, Karam; CHAVES, Silvia. Recent progress in multifunctional metal chelators as potential drugs for Alzheimer's disease. **Coordination Chemistry Reviews**, [s.l.], maio 2016. Elsevier BV.

SAVELIEFF, Masha G. et al. A small molecule that displays marked reactivity toward copper– versus zinc–amyloid- β implicated in Alzheimer's disease. **Chemical Communications**, [s.l.], v. 50, n. 40, p.5301-5303, 2014. Royal Society of Chemistry (RSC).

SAWATZKY, Edgar et al. Discovery of Highly Selective and Nanomolar Carbamate-Based Butyrylcholinesterase Inhibitors by Rational Investigation into Their Inhibition Mode. **The Journal Of Medicinal Chemistry**. [s.l.], p. 2067-2082. 17 fev. 2016.

SCHNEIDER, Lon S.. Treatment of alzheimer's disease with cholinesterase inhibitors. **Clinics In Geriatric Medicine**, [s.l.], v. 17, n. 2, p.337-358, maio 2001. Elsevier BV.

SCHOPFER, Lawrence M.; LOCKRIDGE, Oksana; BRIMIJOIN, Stephen. Pure human butyrylcholinesterase hydrolyzes octanoyl ghrelin to desacyl ghrelin. **General And Comparative Endocrinology**, [s.l.], v. 224, p.61-68, dez. 2015. Elsevier BV.

SIMMONS, LK; et al. Secondary structure of amyloid beta peptide correlates with neurotoxic activity in vitro. **Molecular Pharmacology**, 45:373–379, 1994.

SCROCCHI, Louise A. et al. Design of Peptide-based Inhibitors of Human Islet Amyloid Polypeptide Fibrillogenesis. **Journal Of Molecular Biology**, [s.l.], v. 318, n. 3, p.697-706, maio 2002. Elsevier BV.

SHIGETA, Koji et al. Potentiation of Nerve Growth Factor-Induced Neurite Outgrowth in PC12 Cells by a Coptidis Rhizoma Extract and Protoberberine Alkaloids. **Bioscience, Biotechnology, And Biochemistry**, [s.l.], v. 66, n. 11, p.2491-2494, jan. 2002. Informa UK Limited.

SILVA, T., et al., Alzheimer's disease, enzyme targets and drug discovery struggles: From natural products to drug prototypes. **Ageing Research Reviews**, Vol. 15, May 2014, p. 116-145.

SIMOES, Maria Rodrigues et al. Donepezil: An Important Prototype to the Design of New Drug Candidates for Alzheimer's Disease. **Mini-Reviews in Medicinal Chemistry**, [s.l.], v. 14, n. 1, p.2-19, 31 jan. 2014. Bentham Science Publishers Ltd..

SINDI, Shireen; MANGIALASCHE, Francesca; KIVIPELTO, Miia. Advances in the prevention of Alzheimer's Disease. **F1000prime Reports**, [s.l.], v. 7, p.1-12, 12 maio 2015. Faculty of 1000, Ltd..

SINGH, Manjinder et al. Acetylcholinesterase inhibitors as Alzheimer therapy: From nerve toxins to neuroprotection. **European Journal Of Medicinal Chemistry**, [s.l.], v. 70, p.165-188, dez. 2013. Elsevier BV.

SOTO, Claudio; CASTAÑO, Eduardo M.. The conformation of Alzheimer's β peptide determines the rate of amyloid formation and its resistance to proteolysis. **Biochemical Journal**, [s.l.], v. 314, n. 2, p.701-707, 1 mar. 1996. Portland Press Ltd..

SOTO, Claudio et al. Fibrillogenesis of synthetic amyloid-fl peptides is dependent on their initial secondary structure. **Neuroscience Letters**, [s.l.], n. 200, p.105-108, 1995.

SOUZA, Luana G. de; RENNÄ, Magdalena N.; FIGUEROA-VILLAR, Jose D.. Coumarins as cholinesterase inhibitors: A review. **Chemico-biological Interactions**, [s.l.], v. 254, p.11-23, jul. 2016. Elsevier BV.

STODDARD, Shana; HAMANN, Mark; WADKINS, Randy. Insights and Ideas Garnered from Marine Metabolites for Development of Dual-Function Acetylcholinesterase and Amyloid- β Aggregation Inhibitors. **Marine Drugs**, [s.l.], v. 12, n. 4, p.2114-2131, 4 abr. 2014. MDPI AG.

SUGIMOTO, Hachiro et al. Research and Development of Donepezil Hydrochloride, a New Type of Acetylcholinesterase Inhibitor. **The Japanese Journal Of Pharmacology**, [s.l.], v. 89, n. 1, p.7-20, 2002. Japanese Pharmacological Society.

TENREIRO, Sandra; ECKERMANN, Katrin; OUTEIRO, Tiago F.. Protein phosphorylation in neurodegeneration: friend or foe?. **Frontiers in Molecular Neuroscience**, [s.l.], v. 7, p.1-30, 13 maio 2014.

TOLNAY, M.; PROBST, A. REVIEW: tau protein pathology in Alzheimer's disease and related disorders. **Neuropathol Appl Neurobiol**, [s.l.], v. 25, n. 3, p.171-187, jun. 1999. Wiley-Blackwell.

TOMSKI, Sharon J.; MURPHY, Regina M.. Kinetics of aggregation of synthetic β -amyloid peptide. **Archives Of Biochemistry And Biophysics**, [s.l.], v. 294, n. 2, p.630-638, maio 1992. Elsevier BV.

TOPIC, B et al. Enhanced maze performance and reduced oxidative stress by combined extracts of zingiber officinale and ginkgo biloba in the aged rat. **Neurobiology Of Aging**, [s.l.], v. 23, n. 1, p.135-143, jan. 2002. Elsevier BV.

TOWNSEND, M.; MEHTA, T.; SELKOE, D. J.. Soluble A β Inhibits Specific Signal Transduction Cascades Common to the Insulin Receptor Pathway. **Journal Of Biological Chemistry**, [s.l.], v. 282, n. 46, p.33305-33312, 13 set. 2007. American Society for Biochemistry & Molecular Biology (ASBMB).

TRAMUTOLA, A. et al. Oxidative stress, protein modification and Alzheimer disease. **Brain Research Bulletin**, [s.l.], p.1-9, jun. 2016. Elsevier BV.

TUMIATTI, Vincenzo et al. Structure-Activity Relationships of Acetylcholinesterase Noncovalent Inhibitors Based on a Polyamine Backbone. 3. Effect of Replacing the Inner Polymethylene Chain with Cyclic Moieties. **Journal of Medicinal Chemistry**, [s.l.], v. 47, n. 26, p.6490-6498, dez. 2004. American Chemical Society (ACS).

TYCKO, Robert. Molecular structure of amyloid fibrils: insights from solid-state NMR. **Quarterly Reviews Of Biophysics**, [s.l.], v. 39, n. 01, p.1-55, fev. 2006. Cambridge University Press (CUP).

VERDIER, Yann; PENKE, Botond. Binding Sites of Amyloid β -Peptide in Cell Plasma Membrane and Implications for Alzheimers Disease. **Current Protein & Peptide Science**, [s.l.], v. 5, n. 1, p.19-31, 1 fev. 2004. Bentham Science Publishers Ltd..

WANG, Qing et al. Evaluation of the MDR-MDCK cell line as a permeability screen for the blood–brain barrier. **International Journal Of Pharmaceutics**, [s.l.], v. 288, n. 2, p.349-359, jan. 2005. Elsevier BV.

WANG, Steven S.-s.; CHEN, Ya-ting; CHOU, Shang-wei. Inhibition of amyloid fibril formation of β -amyloid peptides via the amphiphilic surfactants. **Biochimica Et Biophysica Acta (bba) - Molecular Basis Of Disease**, [s.l.], v. 1741, n. 3, p.307-313, set. 2005. Elsevier BV.

WEINREB, Orly; AMIT, Tamar; YOUDIM, Moussa B.h.. The application of proteomics for studying the neurorescue activity of the polyphenol (-)-epigallocatechin-3-gallate. **Archives Of Biochemistry And Biophysics**, [s.l.], v. 476, n. 2, p.152-160, ago. 2008. Elsevier BV.

WILCOCK, G. K; LILIENFELD, S.; GAENS, E.. Efficacy and safety of galantamine in patients with mild to moderate Alzheimer's disease: multicentre randomised controlled trial. **BMJ**, [s.l.], v. 321, n. 7274, p.1445-1445, 9 dez. 2000. BMJ.

WILKINSON, D.; MURRAY, J.. Galantamine: a randomized, double-blind, dose comparison in patients with Alzheimer's disease. **International Journal Of Geriatric Psychiatry**, [s.l.], v. 16, n. 9, p.852-857, 2001. Wiley-Blackwell.

WIMO, Anders et al. The worldwide economic impact of dementia 2010. **Alzheimer's & Dementia**, [s.l.], v. 9, n. 1, p.1-11, jan. 2013. Elsevier BV.

WOHNSLAND, Frank; FALLER, Bernard. High-Throughput Permeability pH Profile and High-Throughput Alkane/Water logPwith Artificial Membranes. **Journal Of Medicinal Chemistry**, [s.l.], v. 44, n. 6, p.923-930, mar. 2001. American Chemical Society (ACS).

YAN, J.; et al. Rational design and synthesis of highly potent anti-acetylcholinesterase activity huperzine A derivatives. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, Vol.17, Issue 19, 2009, p. 6937-6941.

YANG, Cao et al. Exploration of the mechanism for LPFFD inhibiting the formation of β -sheet conformation of $A\beta(1-42)$ in water. **Journal Of Molecular Modeling**, [s.l.], v. 16, n. 4, p.813-821, 5 jan. 2010. Springer Science + Business Media.

YANG, Dun-sheng et al. Examining the zinc binding site of the amyloid- β peptide. **European Journal Of Biochemistry**, [s.l.], v. 267, n. 22, p.6692-6698, nov. 2000. Wiley-Blackwell.

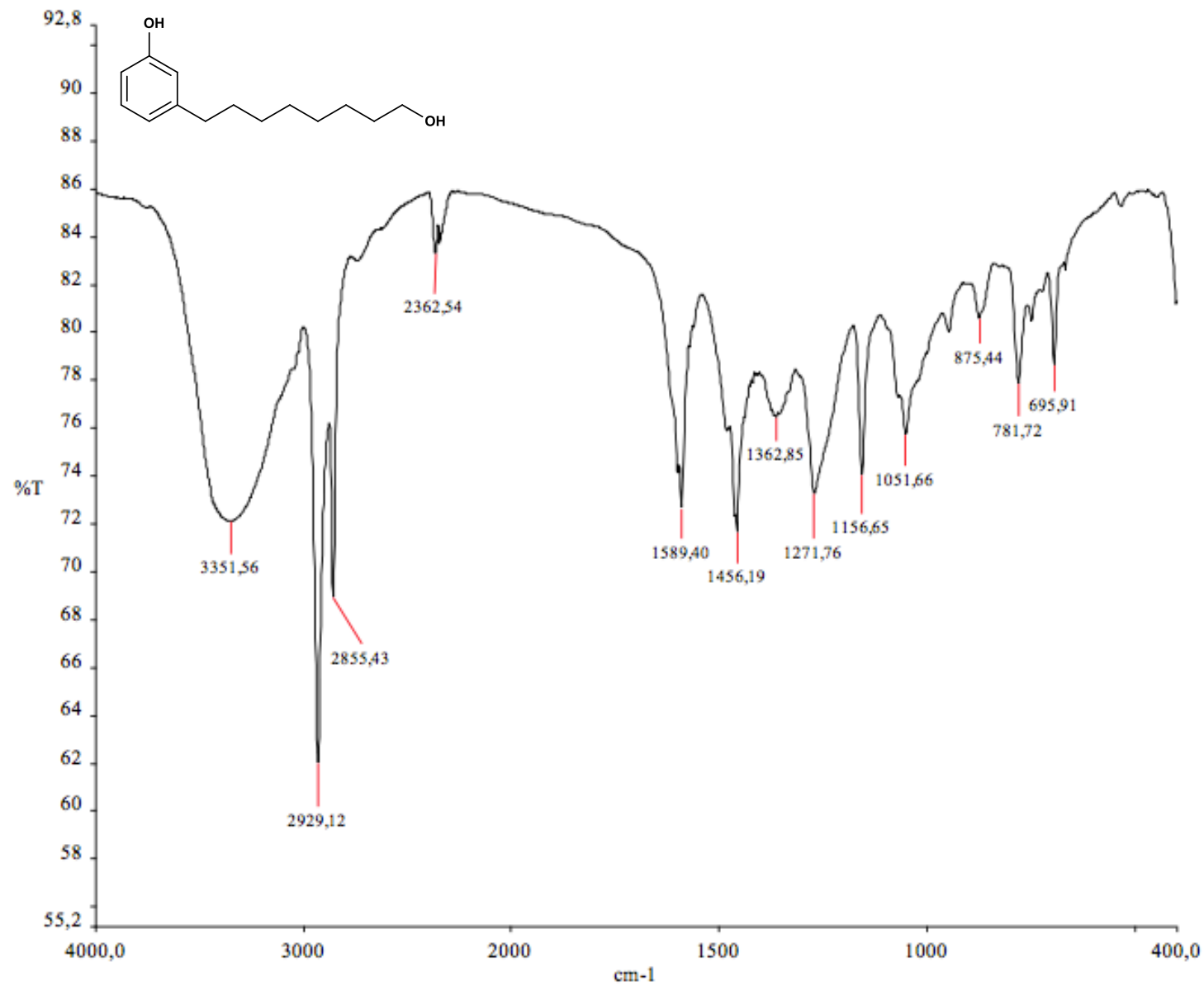
YOSHIIKE, Yuji; AKAGI, Takumi; TAKASHIMA, Akihiko. Surface Structure of Amyloid- β Fibrils Contributes to Cytotoxicity. **Biochemistry**, [s.l.], v. 46, n. 34, p.9805-9812, ago. 2007. American Chemical Society (ACS).

YULIANA, Maria et al. Separation and purification of cardol, cardanol and anacardic acid from cashew (*Anacardium occidentale* L.) nut-shell liquid using a simple two-step column chromatography. **Journal Of The Taiwan Institute Of Chemical Engineers**, [s.l.], v. 45, n. 5, p.2187-2193, set. 2014. Elsevier BV.

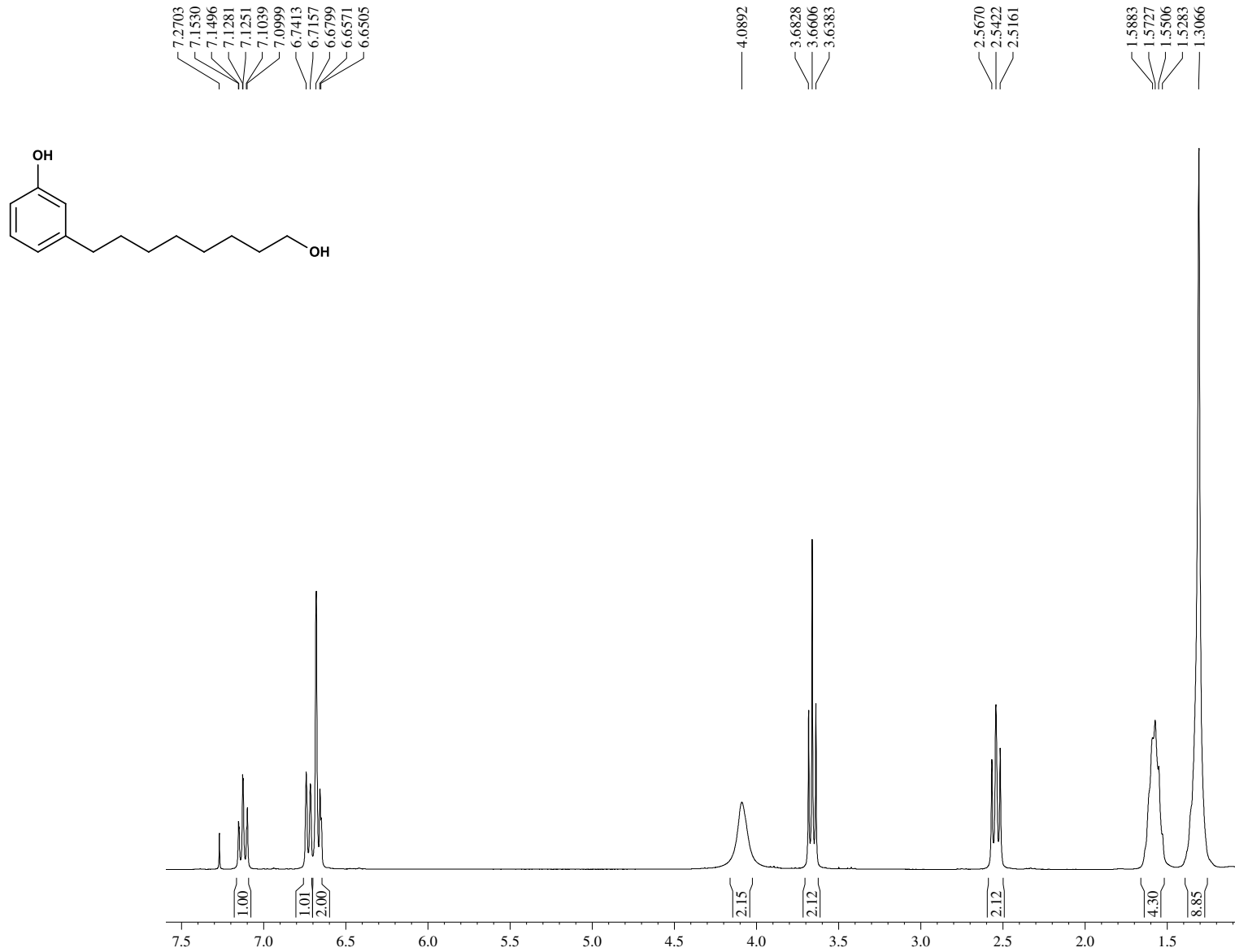
ZHANG, Xiao et al. A review on the hybrids of hydroxycinnamic acid as multi-target-directed ligands against Alzheimer's disease. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, [s.l.], v. 26, n. 3, p.543-550, fev. 2018. Elsevier BV.

ZHOU, An et al. Synthesis and Evaluation of Paeonol Derivatives as Potential Multifunctional Agents for the Treatment of Alzheimer's Disease. **Molecules**, [s.l.], v. 20, n. 1, p.1304-1318, 14 jan. 2015. MDPI AG.

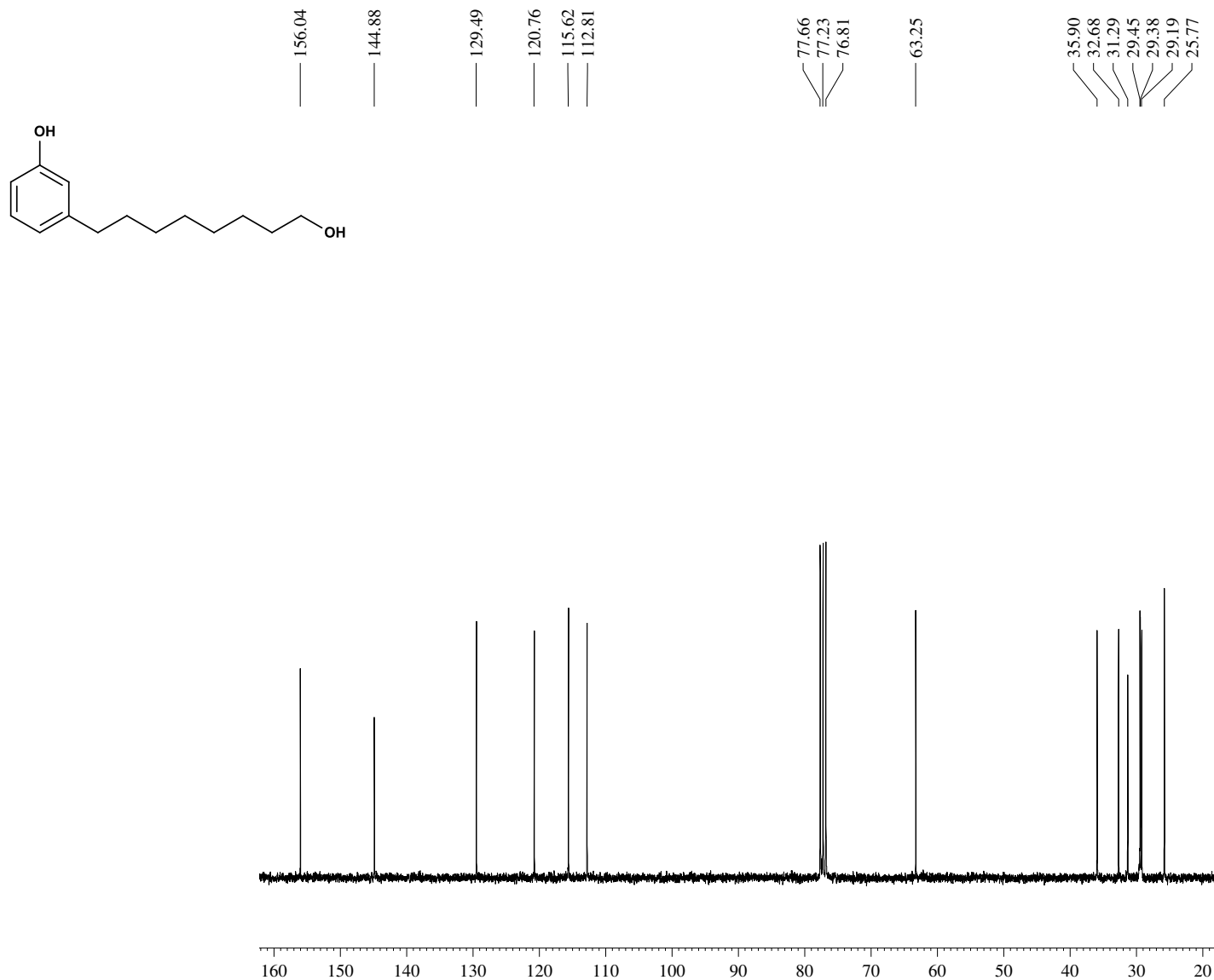
ANEXO 1 – Espectro de Infravermelho (cm⁻¹, KBr): 3-(8-hidroxiocetil)fenol (LDT71)



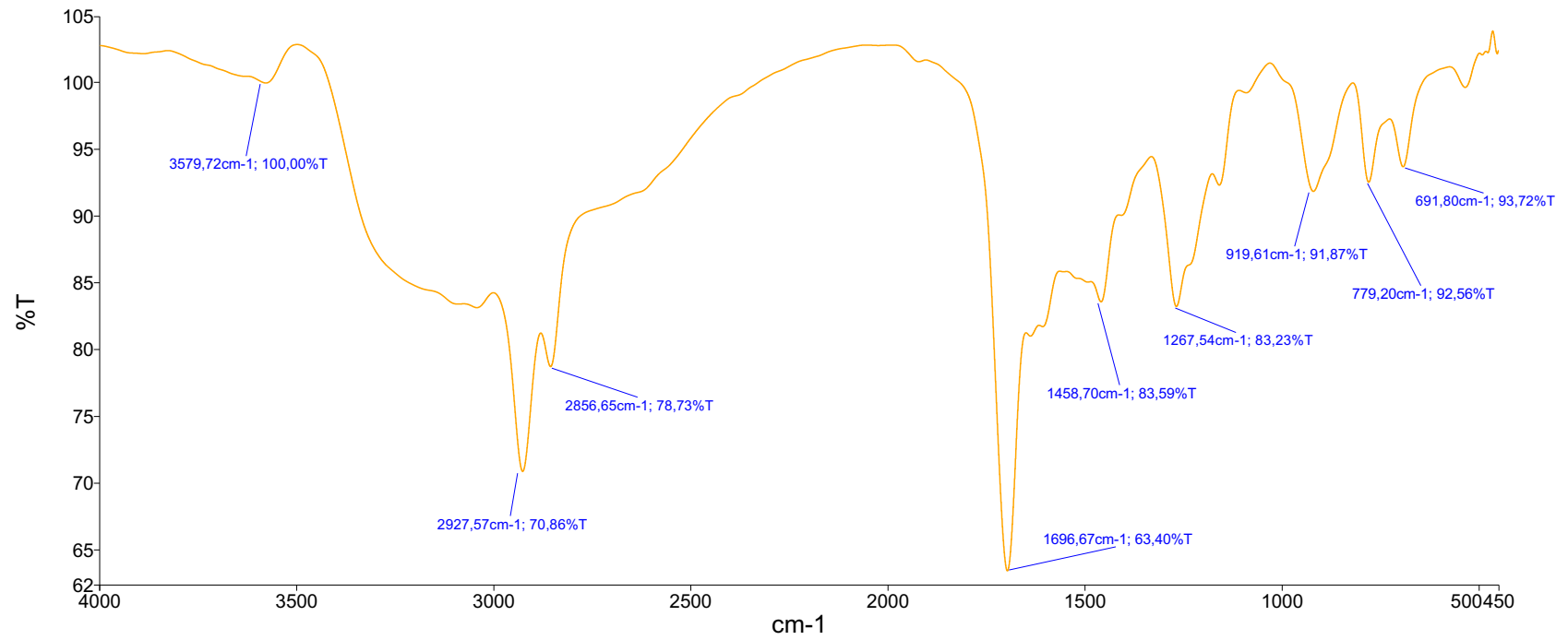
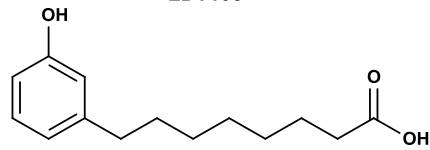
ANEXO 2 – Espectro de RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃): 3-(8-hidroxiocetil)fenol (LDT71)



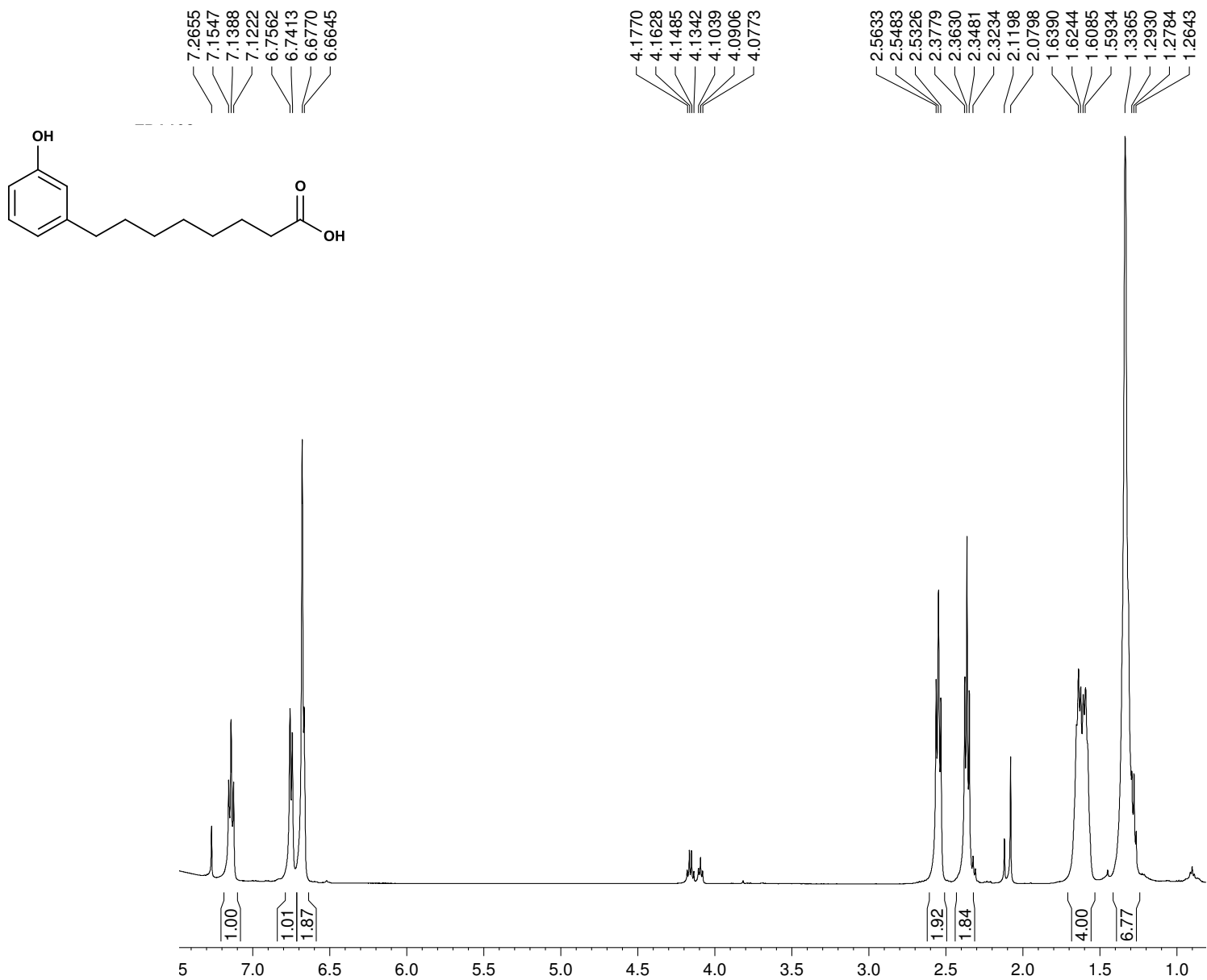
ANEXO 3 – Espectro de RMN ¹³C (75 MHz, CDCl₃): 3-(8-hidroxiocetil)fenol (LDT71)



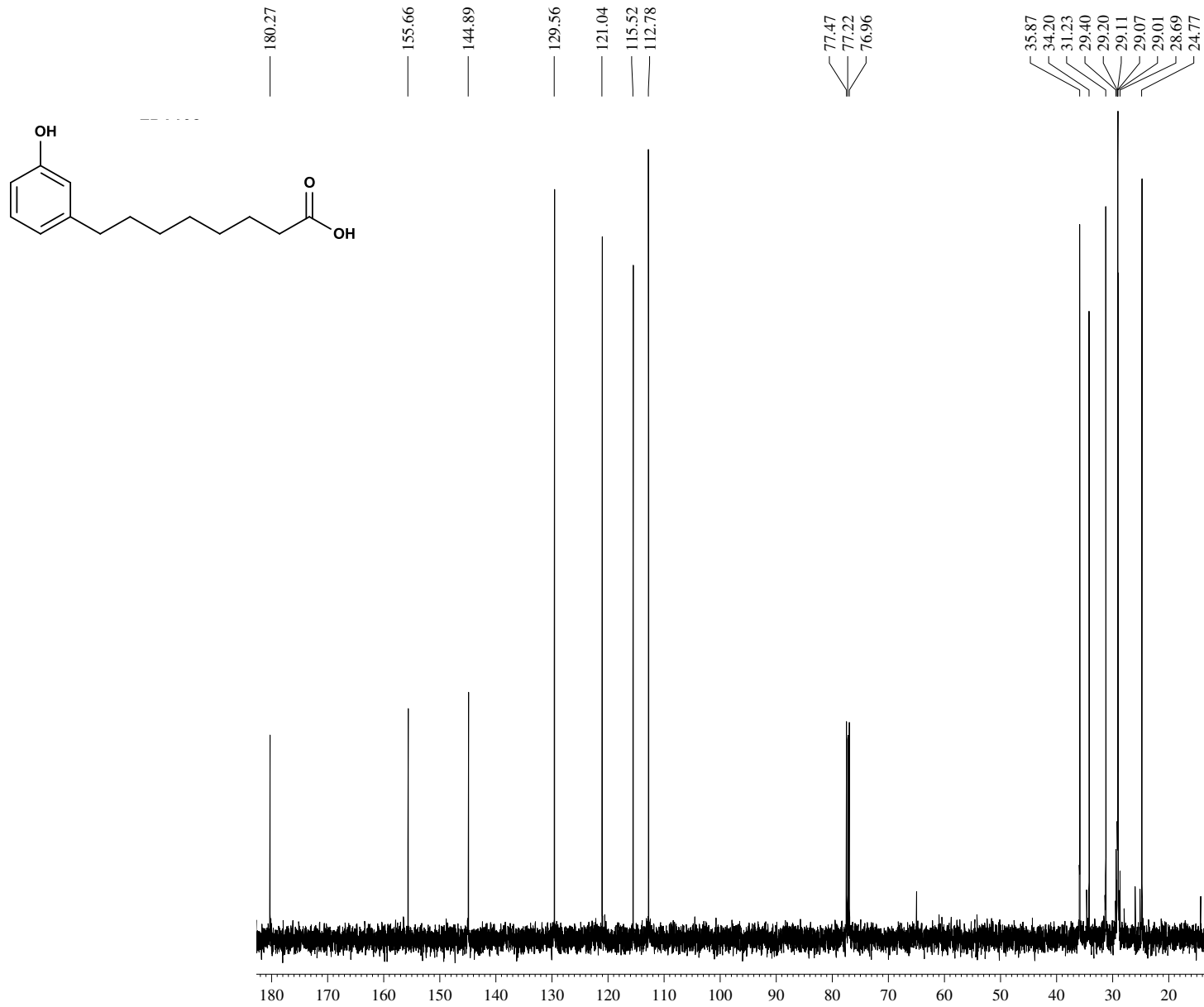
ANEXO 4 – Espectro de Infravermelho (cm⁻¹, KBr): Ácido 8-(3-Hidroxifenil)octanoico (LDT108)



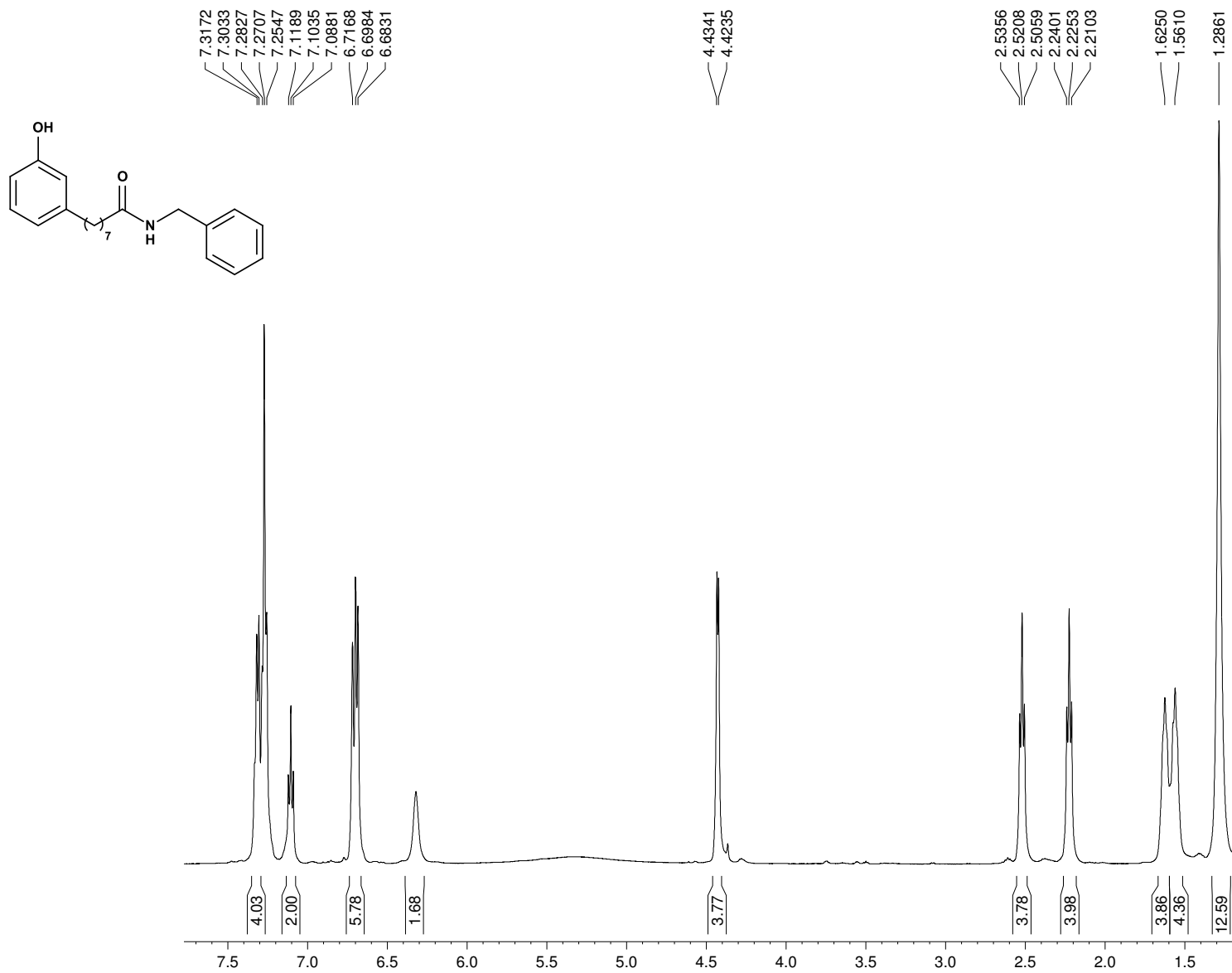
ANEXO 5 – Espectro de RMN ¹H (500 MHz, CDCl₃): Ácido 8-(3-Hidroxifenil)octanoico (LDT108)



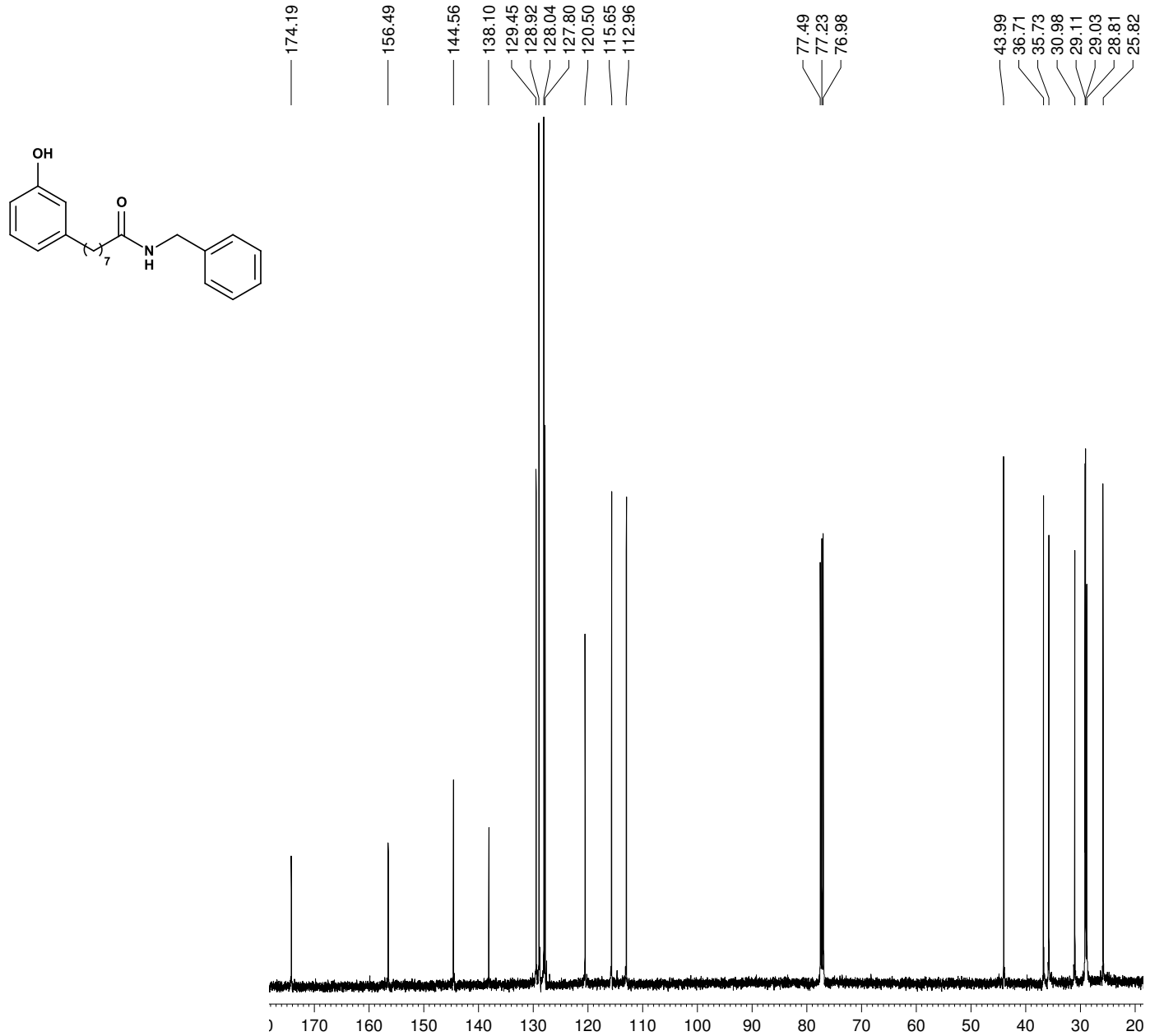
ANEXO 6 – Espectro de RMN ¹³C (125 MHz, CDCl₃): Ácido 8-(3-Hidroxifenil)octanoico (LDT108)



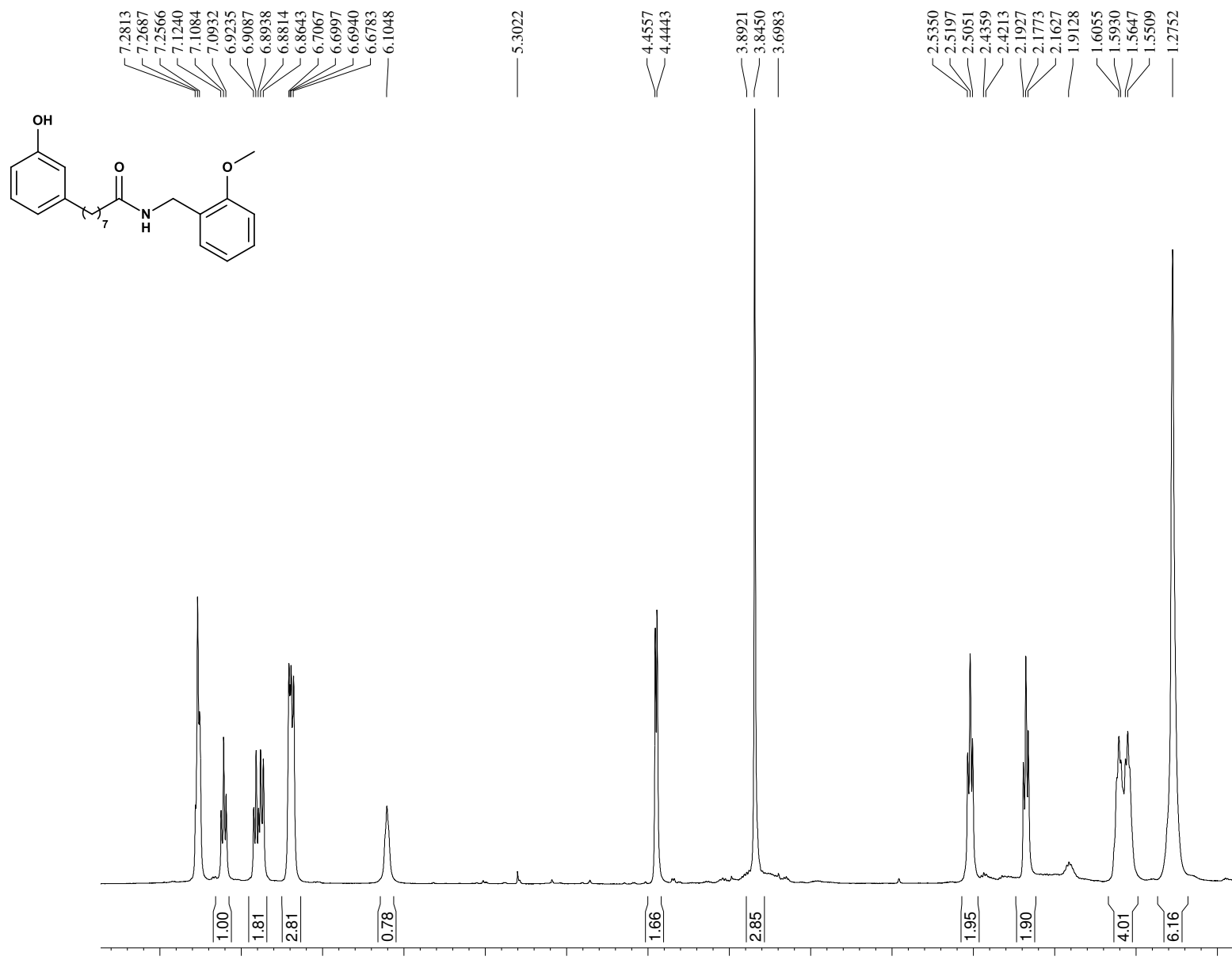
ANEXO 7 – Espectro de RMN ¹H (500 MHz, CDCl₃): N-benzil-8-(3-hidroxifenil)octanamida (LDT576)



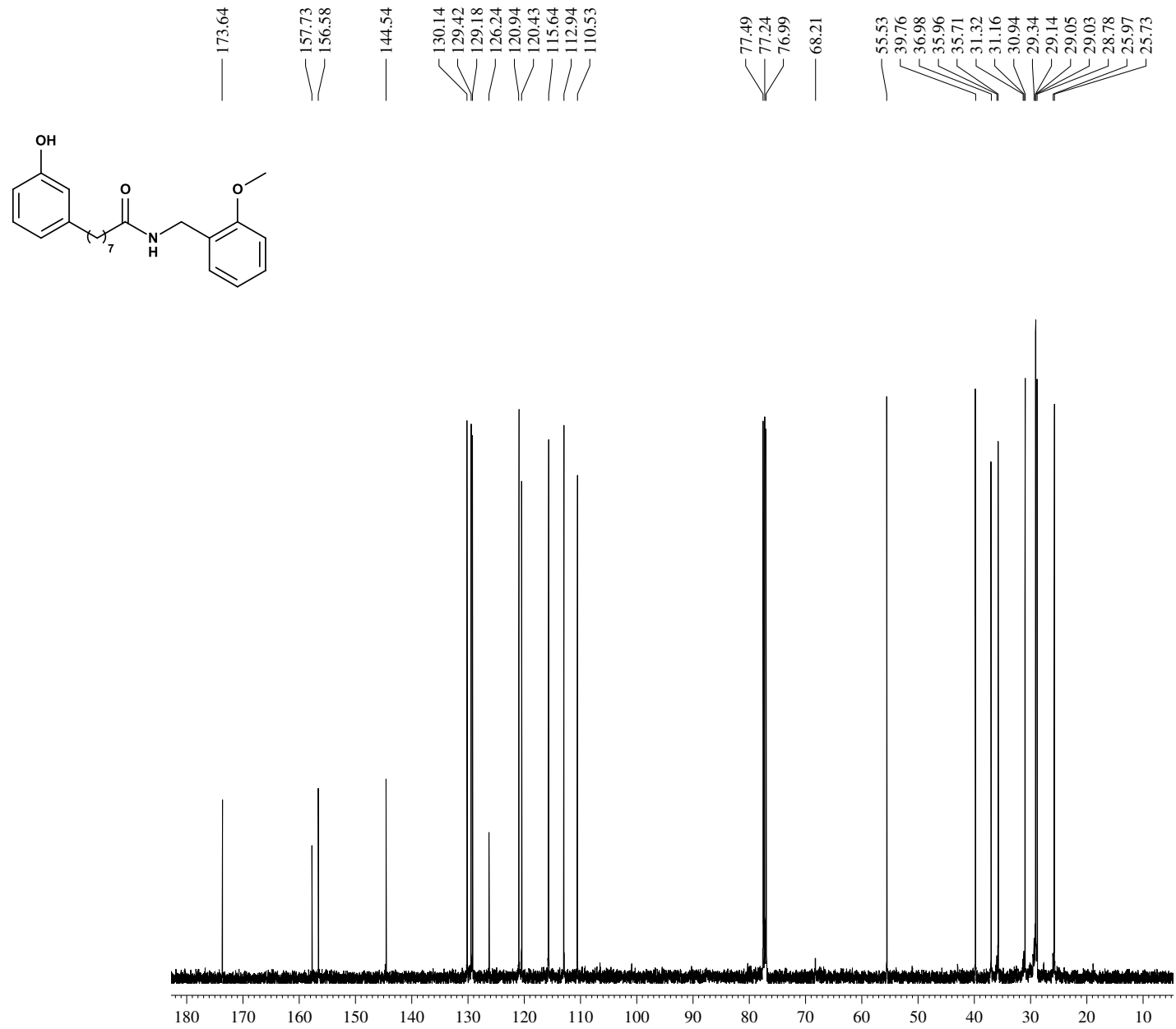
ANEXO 8 – Espectro de RMN ¹³C (125 MHz, CDCl₃): N-benzil-8-(3-hidroxifenil)octanamida (LDT576)



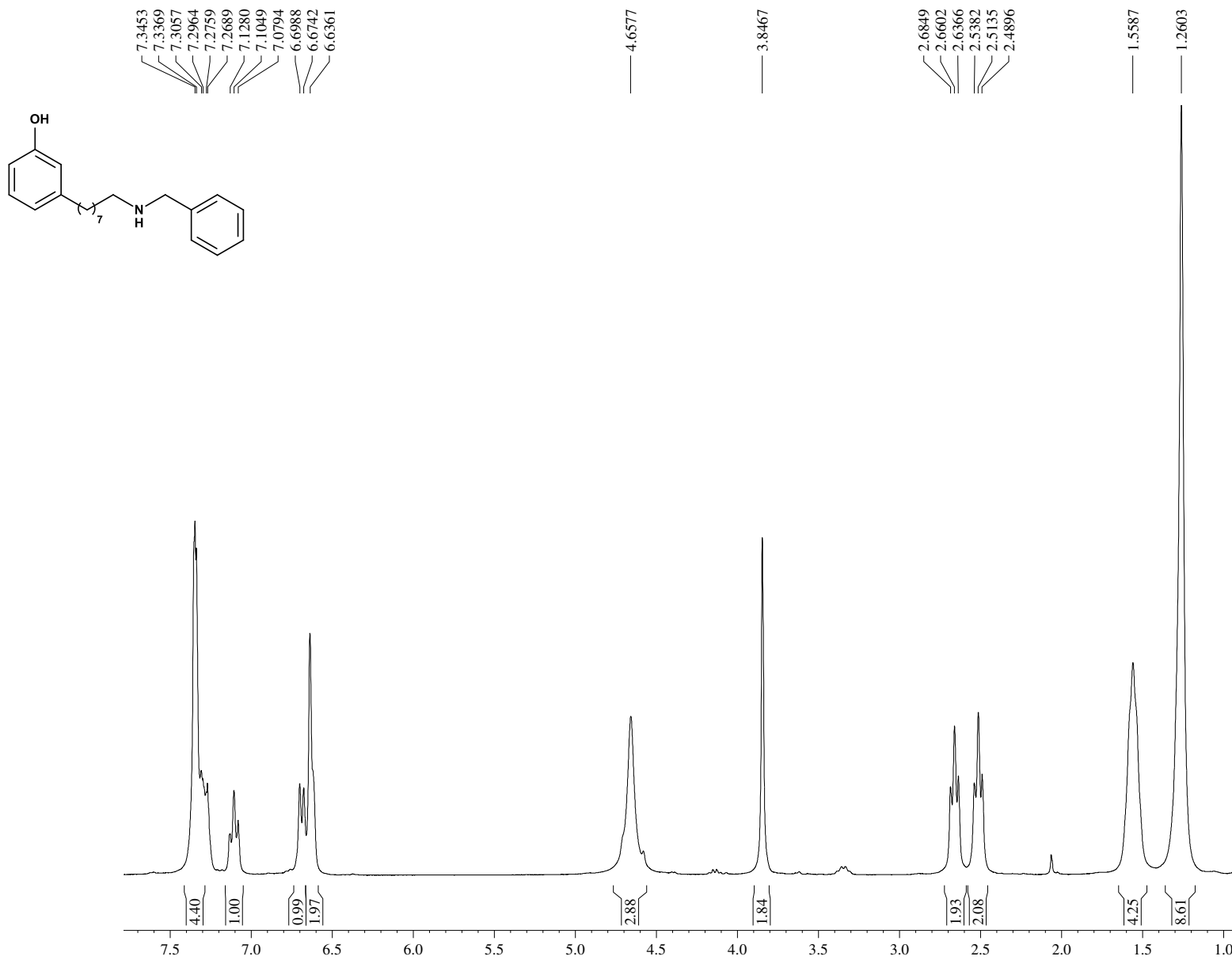
ANEXO 9 – Espectro de RMN ¹H (500 MHz, CDCl₃): 8-(3-hidroxifenil)-N-[(2-metoxifenil)metil]octanamida (LDT592)



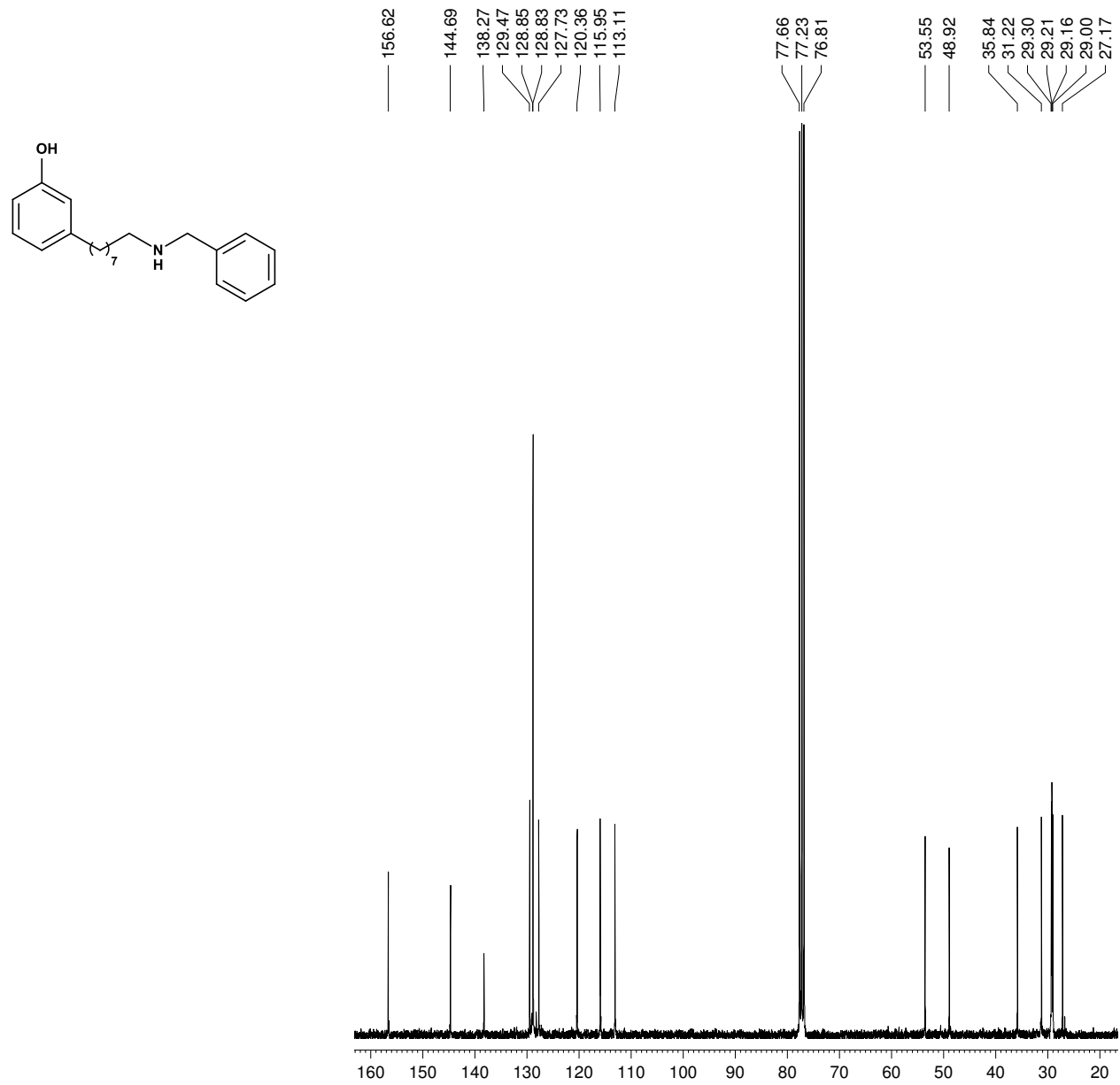
ANEXO 10 – Espectro de RMN ¹³C (125 MHz, CDCl₃): 8-(3-hidroxifenil)-N-[(2-metoxifenil)metil]octanamida (LDT592)



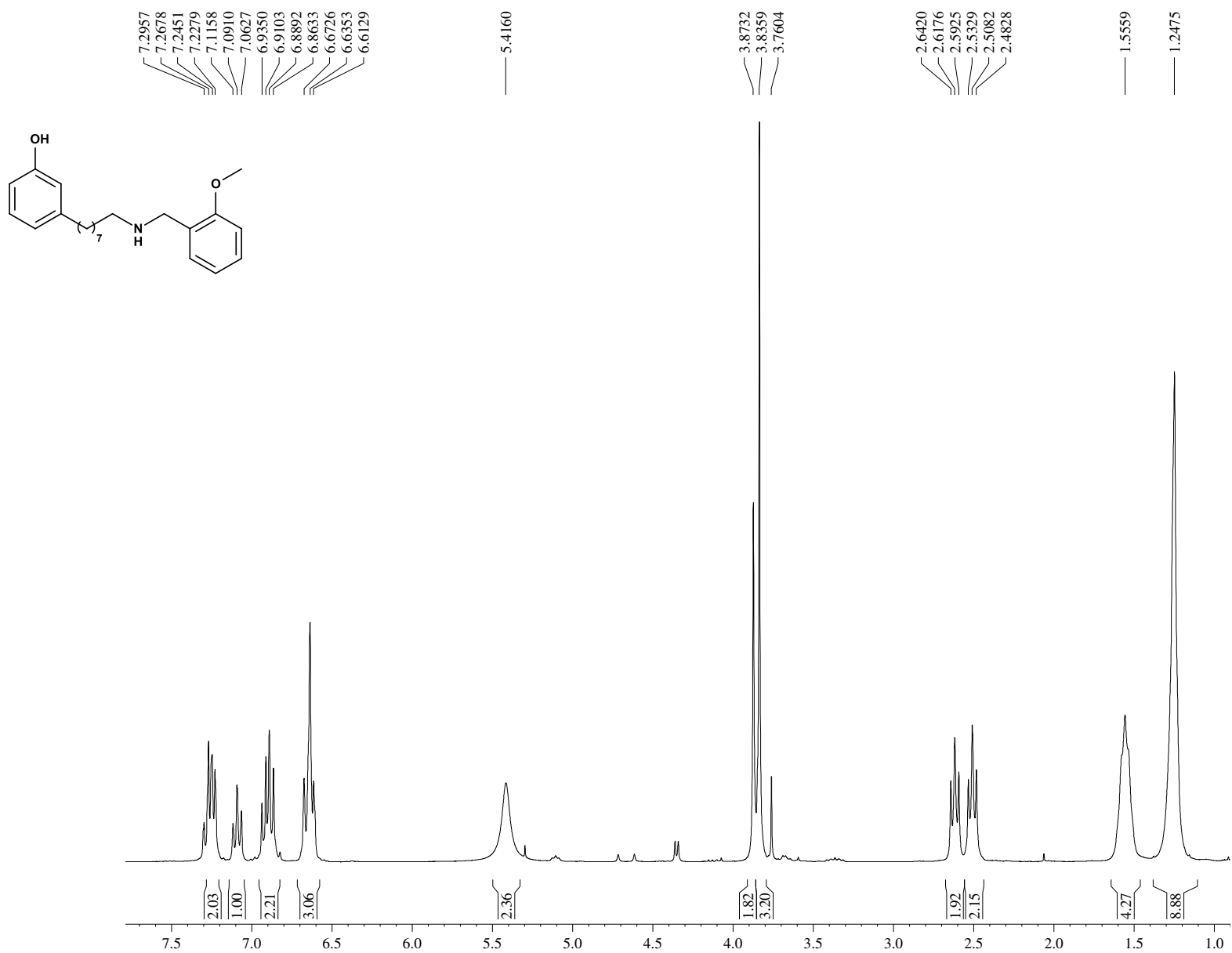
ANEXO 11 – Espectro de RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃): 3-[8-(benzilamino)octil]fenol (LDT577)



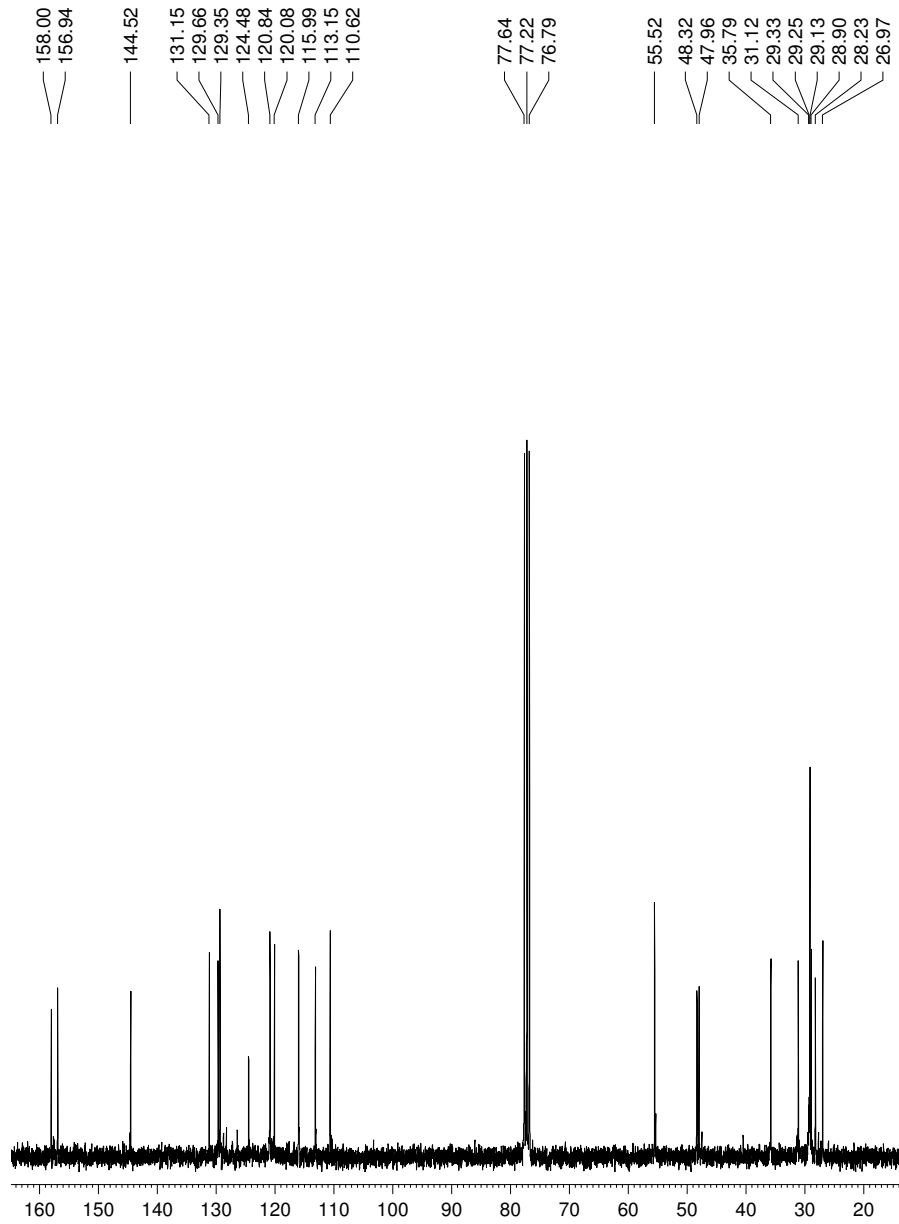
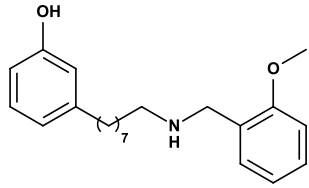
ANEXO 12 – Espectro de RMN ¹³C (75 MHz, CDCl₃): 3-[8-(benzilamino)octil]fenol (LDT577)



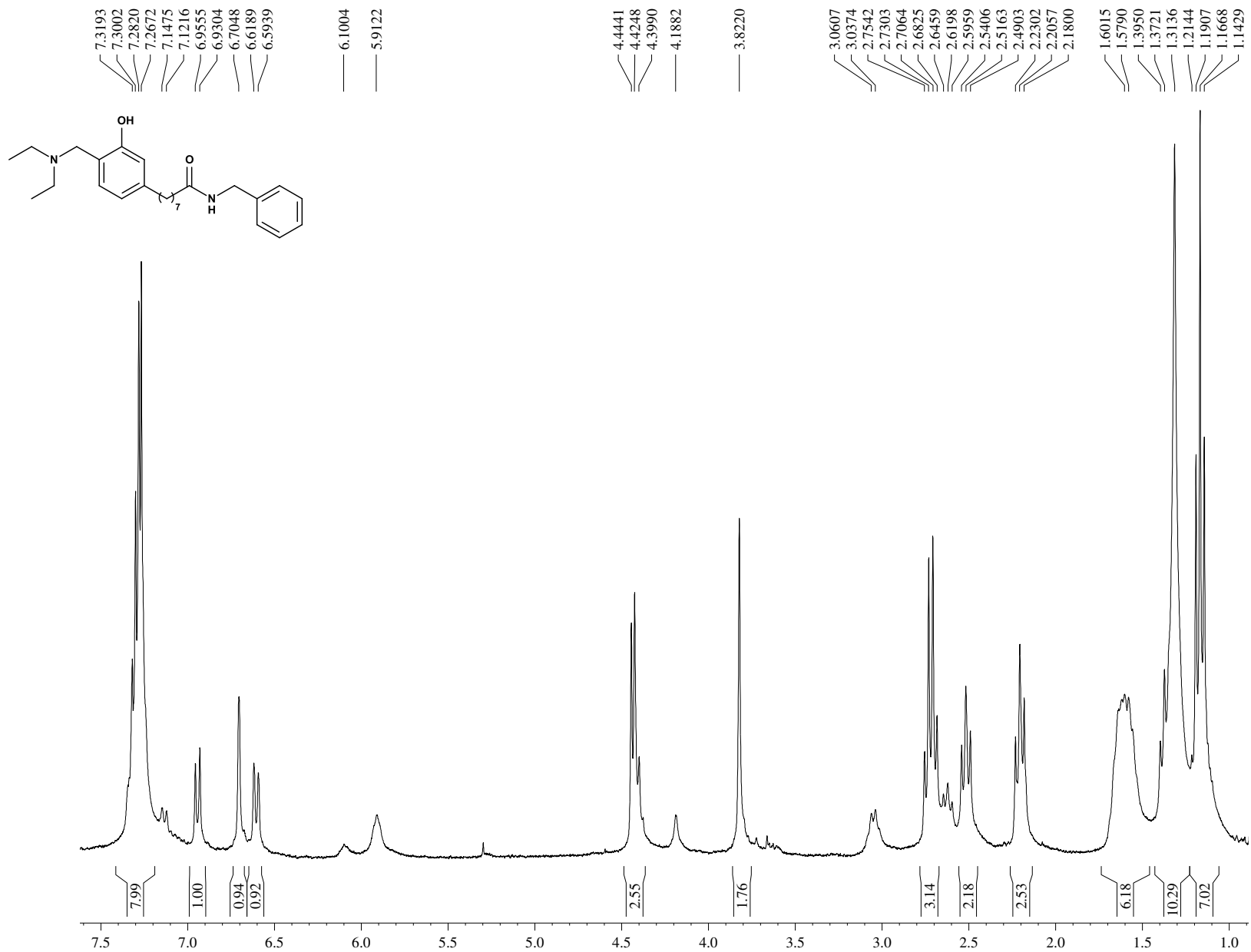
ANEXO 13 – Espectro de RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃): 3-(8-[[2-metoxifenil]metil]amino)octil)fenol (LDT593)



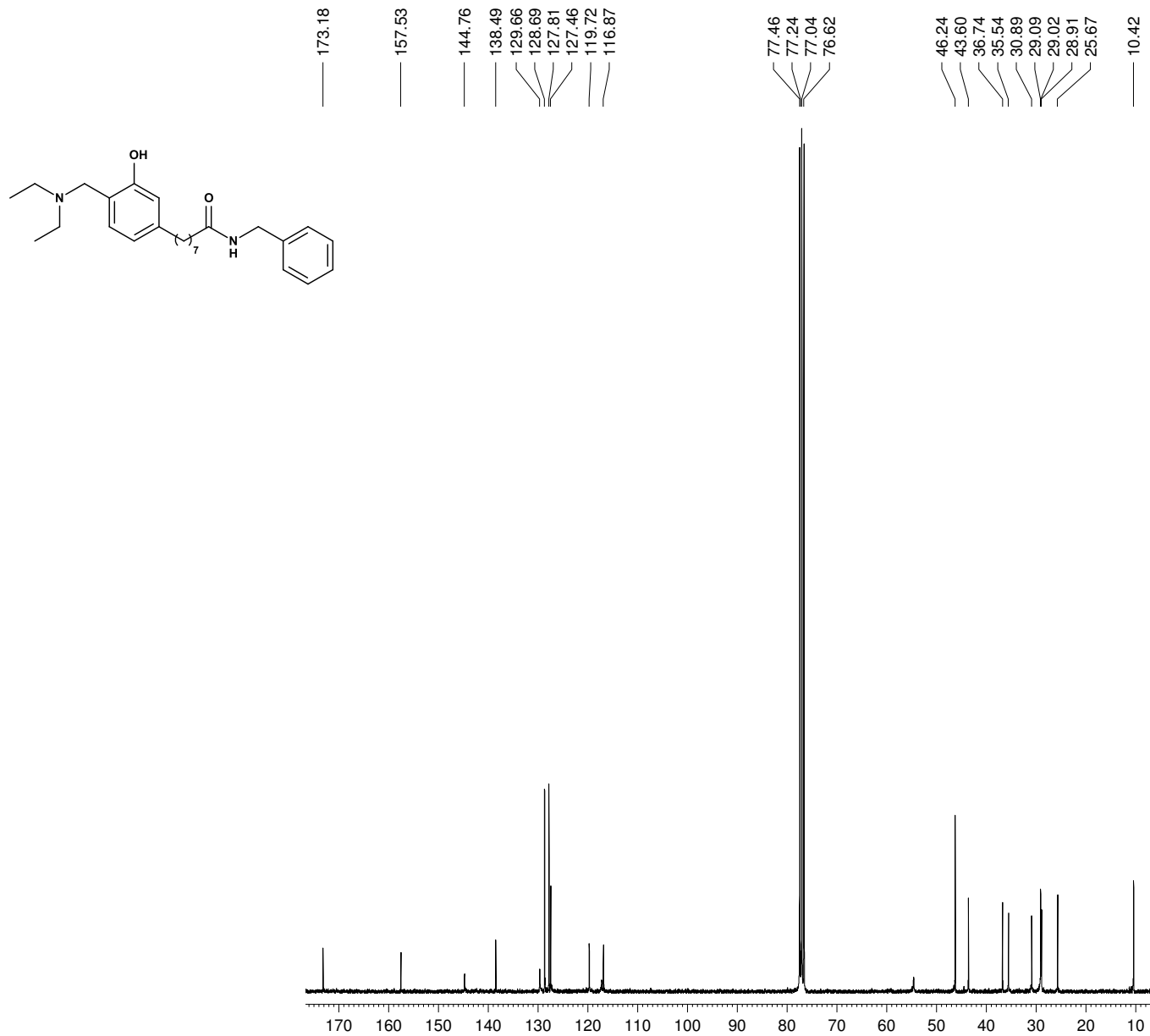
ANEXO 14 – Espectro de RMN ¹³C (75 MHz, CDCl₃): 3-(8-[[2-metoxifenil]metil]amino)octil)fenol (LDT593)



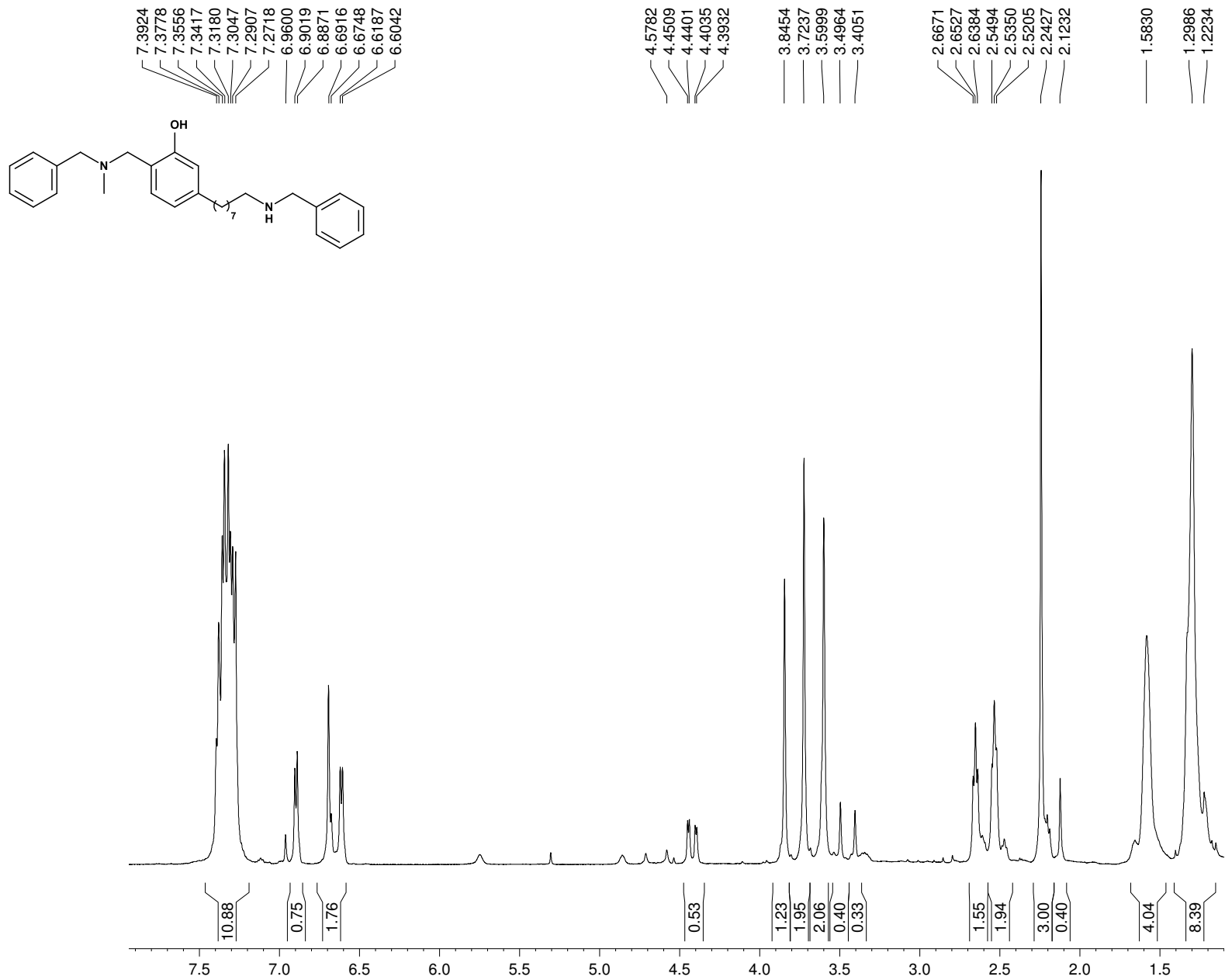
ANEXO 15 – Espectro de RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃): N-benzil-8-{4-[(dietilamino)metil]-3-hidroxifenil}octanamida (LDT582)



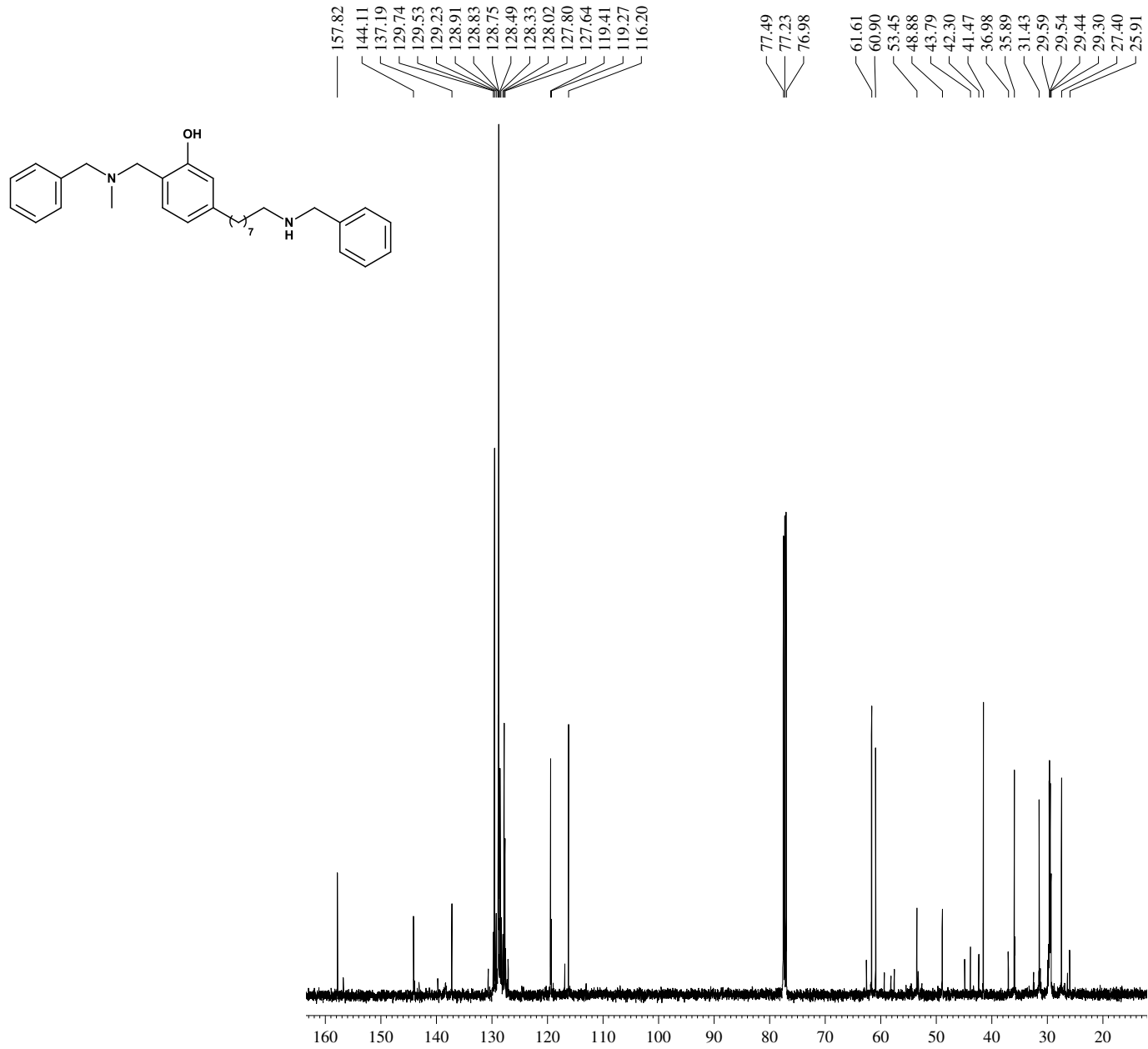
ANEXO 16 – Espectro de RMN ¹³C (75 MHz, CDCl₃): N-benzil-8-{4-[(dietilamino)metil]-3-hidroxifenil}octanamida (LDT582)



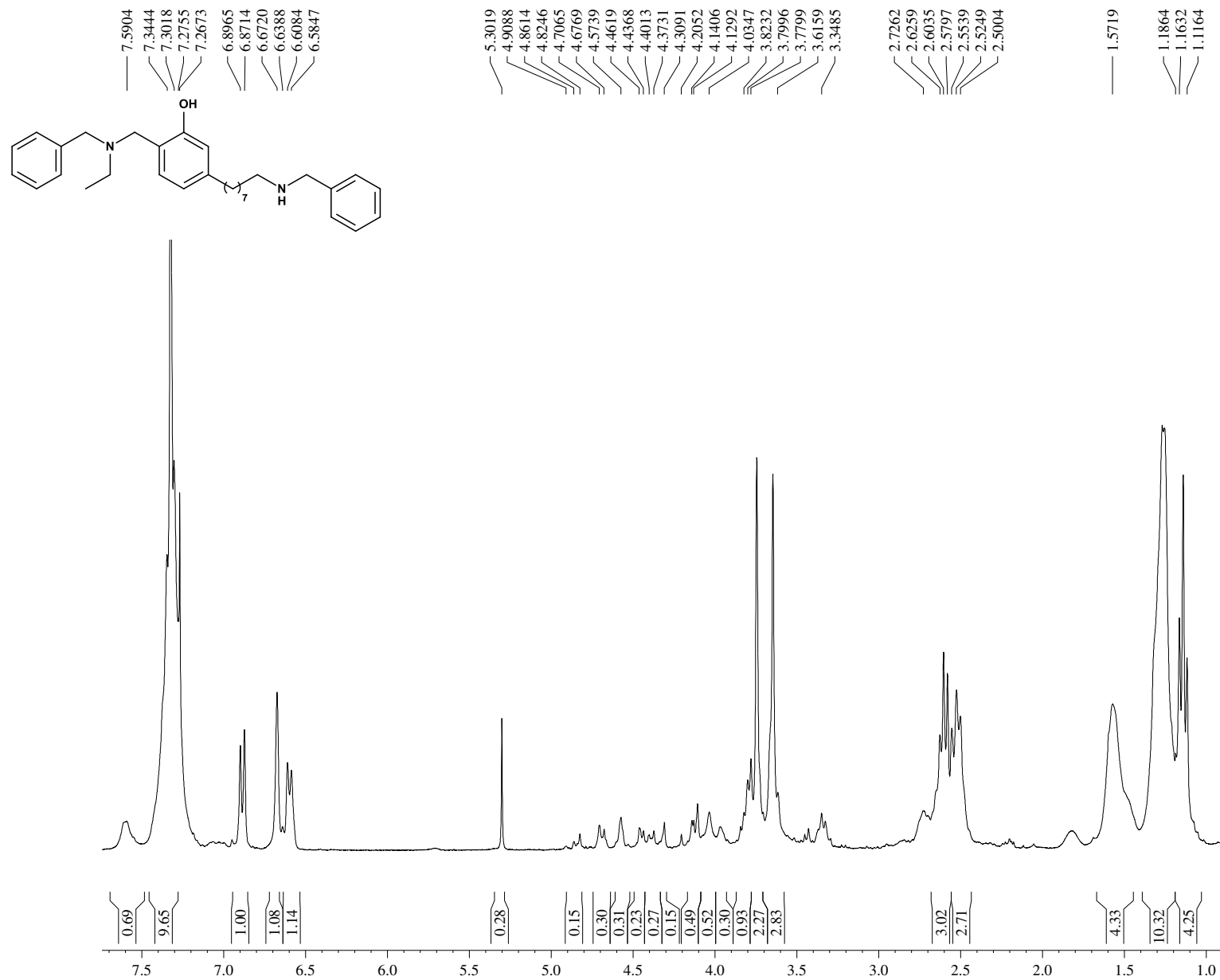
ANEXO 17 – Espectro de RMN ¹H (500 MHz, CDCl₃): 2-[[benzil(metil)amino]metil]-5-[8-(benzilamino)octil]fenol (LDT579)



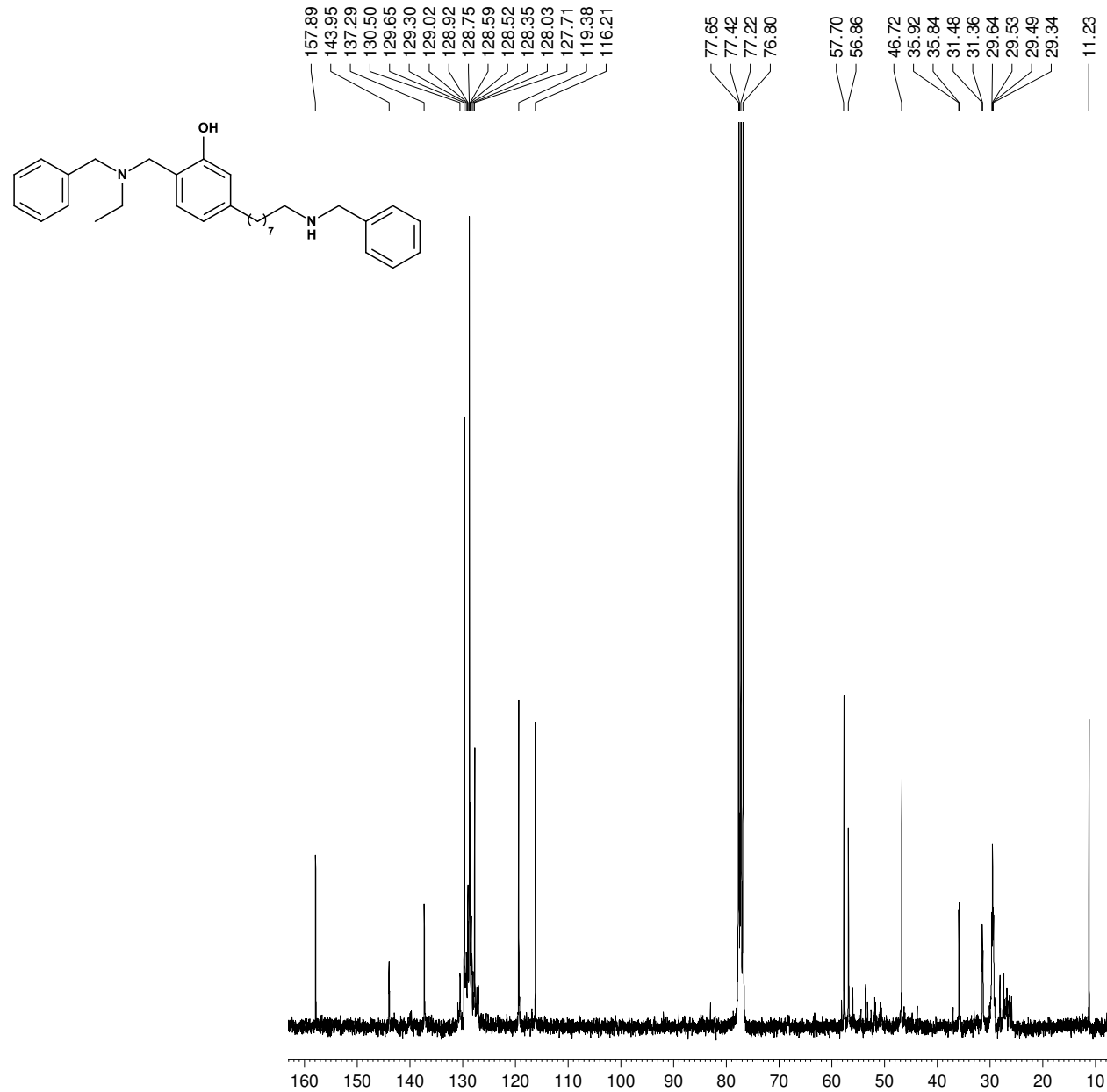
ANEXO 18 – Espectro de RMN ¹³C (125 MHz, CDCl₃): 2-[[benzil(metil)amino]metil]-5-[8-(benzilamino)octil]fenol (LDT579)



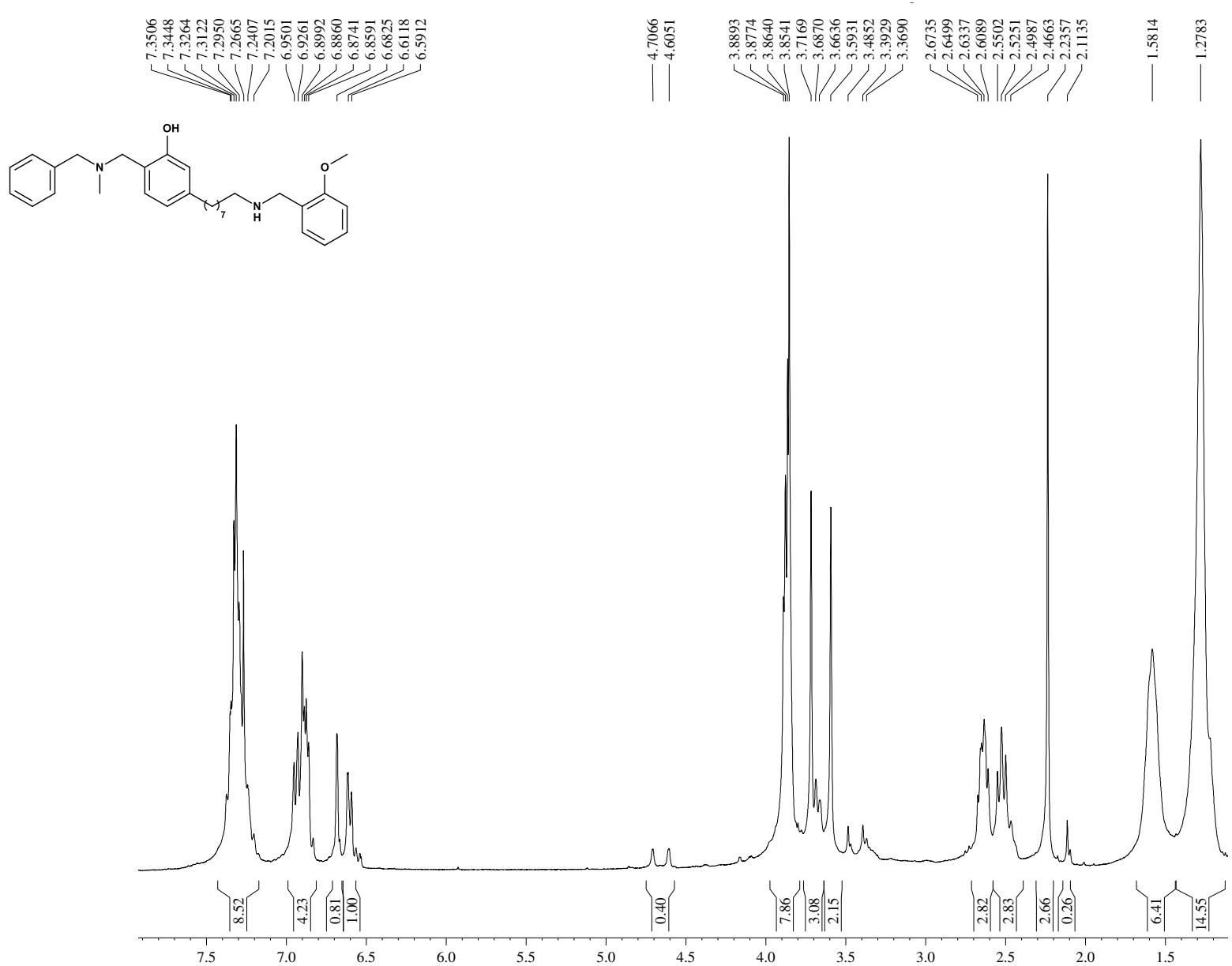
ANEXO 19 – Espectro de RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃): 2-[[benzil(etil)amino]metil]-5-[8-(benzilamino)octil]fenol (LDT581)



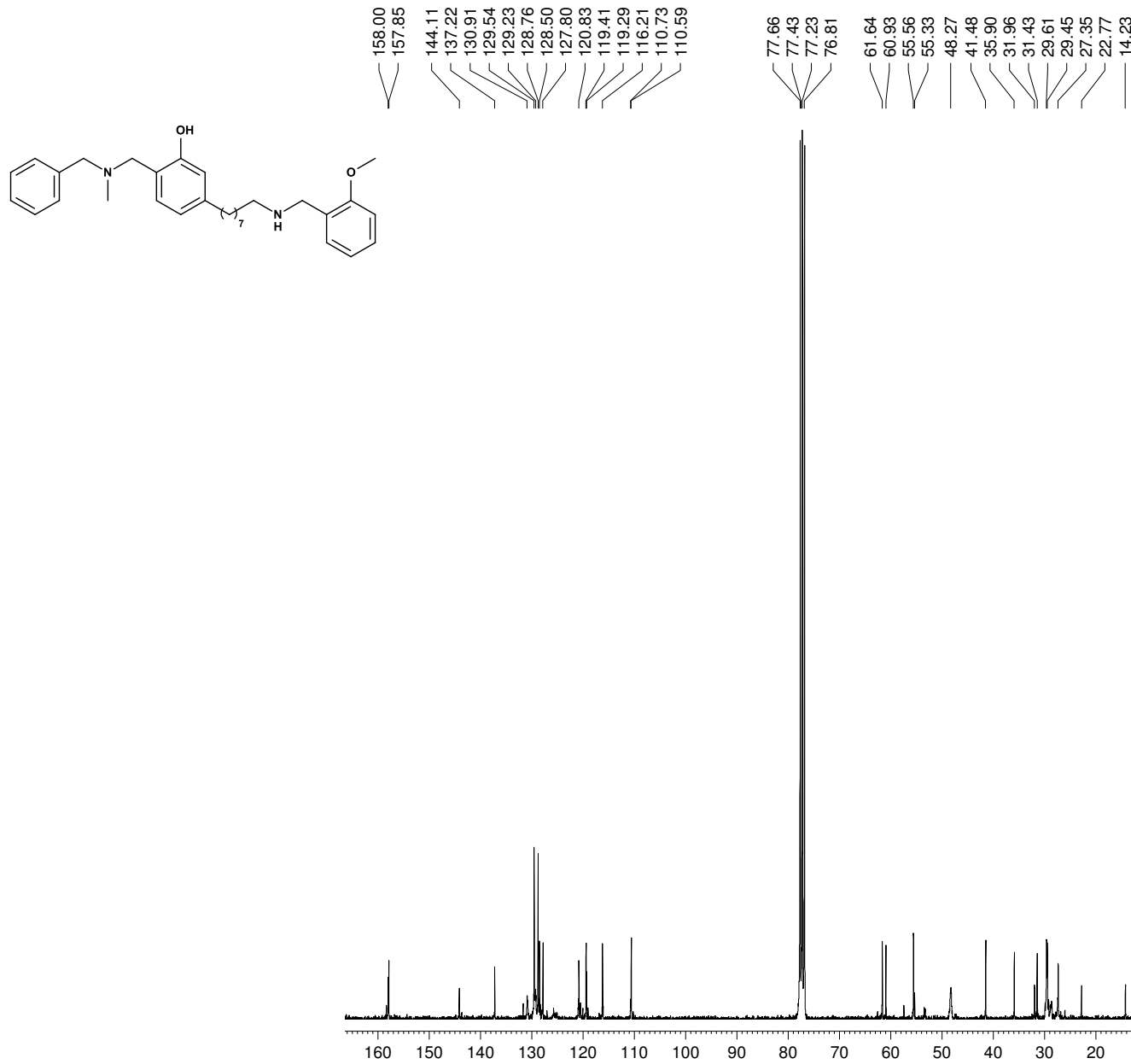
ANEXO 20 – Espectro de RMN ¹³C (75 MHz, CDCl₃): 2-[[benzil(etil)amino]metil]-5-[8-(benzilamino)octil]fenol (LDT581)



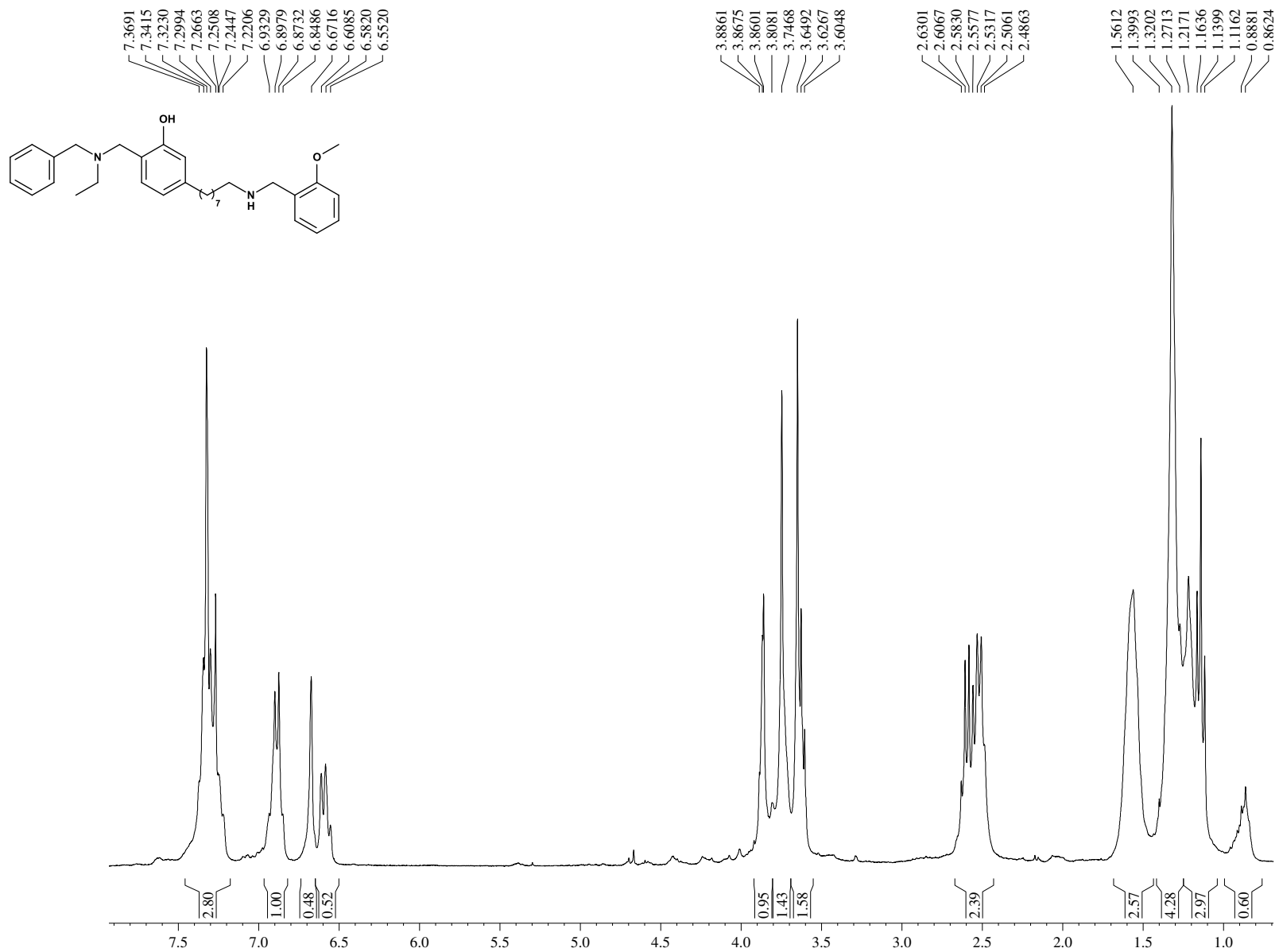
ANEXO 21 – Espectro de RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃2-[[benzil(metil)amino]metil]-5-(8-[[2-metoxifenil]metil]amino)octil)fenol (LDT585)



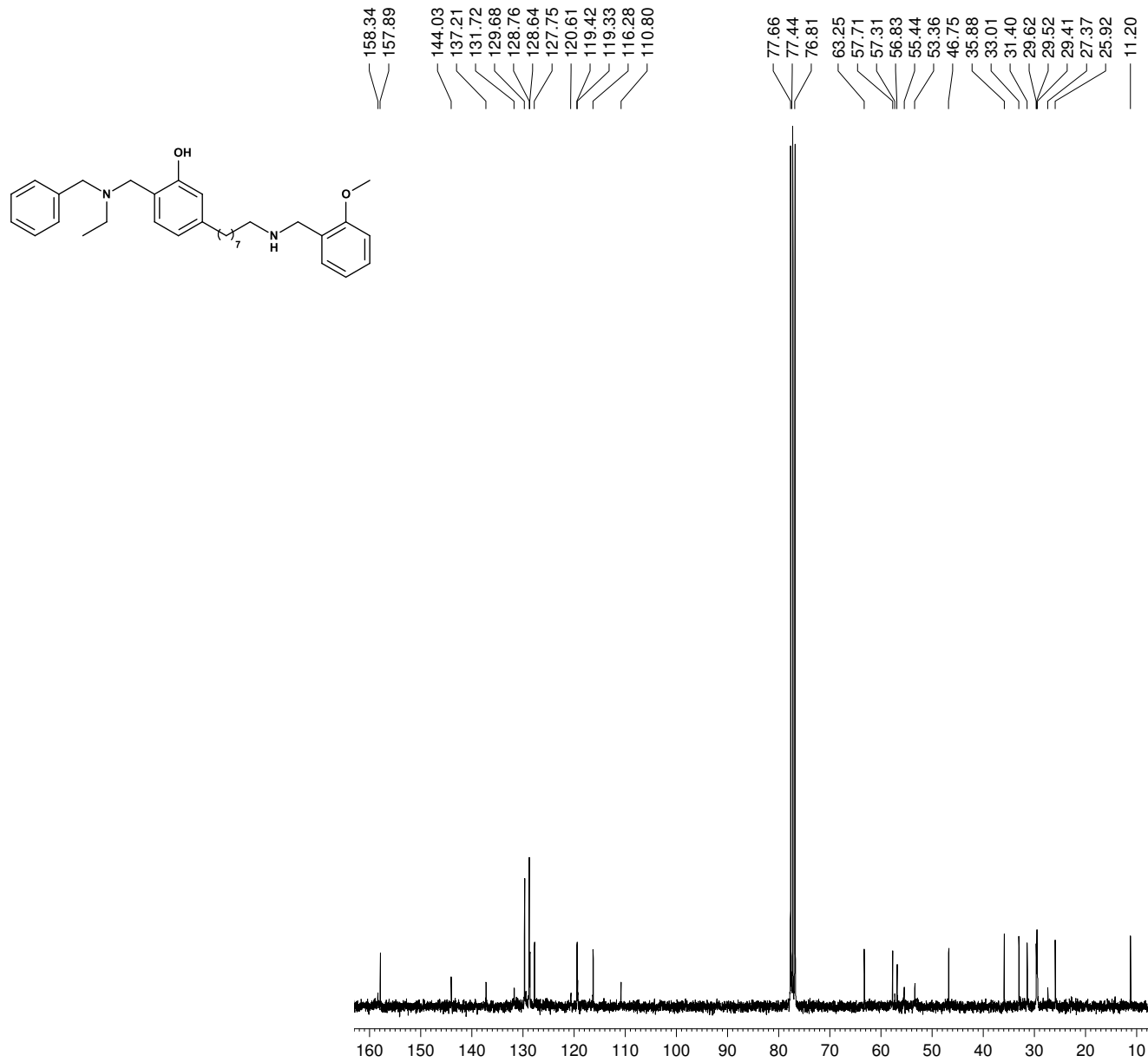
ANEXO 22 – Espectro de RMN ¹³C (75 MHz, CDCl₃): 2-[[benzil(metil)amino]metil]-5-(8-[[[(2-metoxifenil)metil]amino]octil]fenol (LDT585)



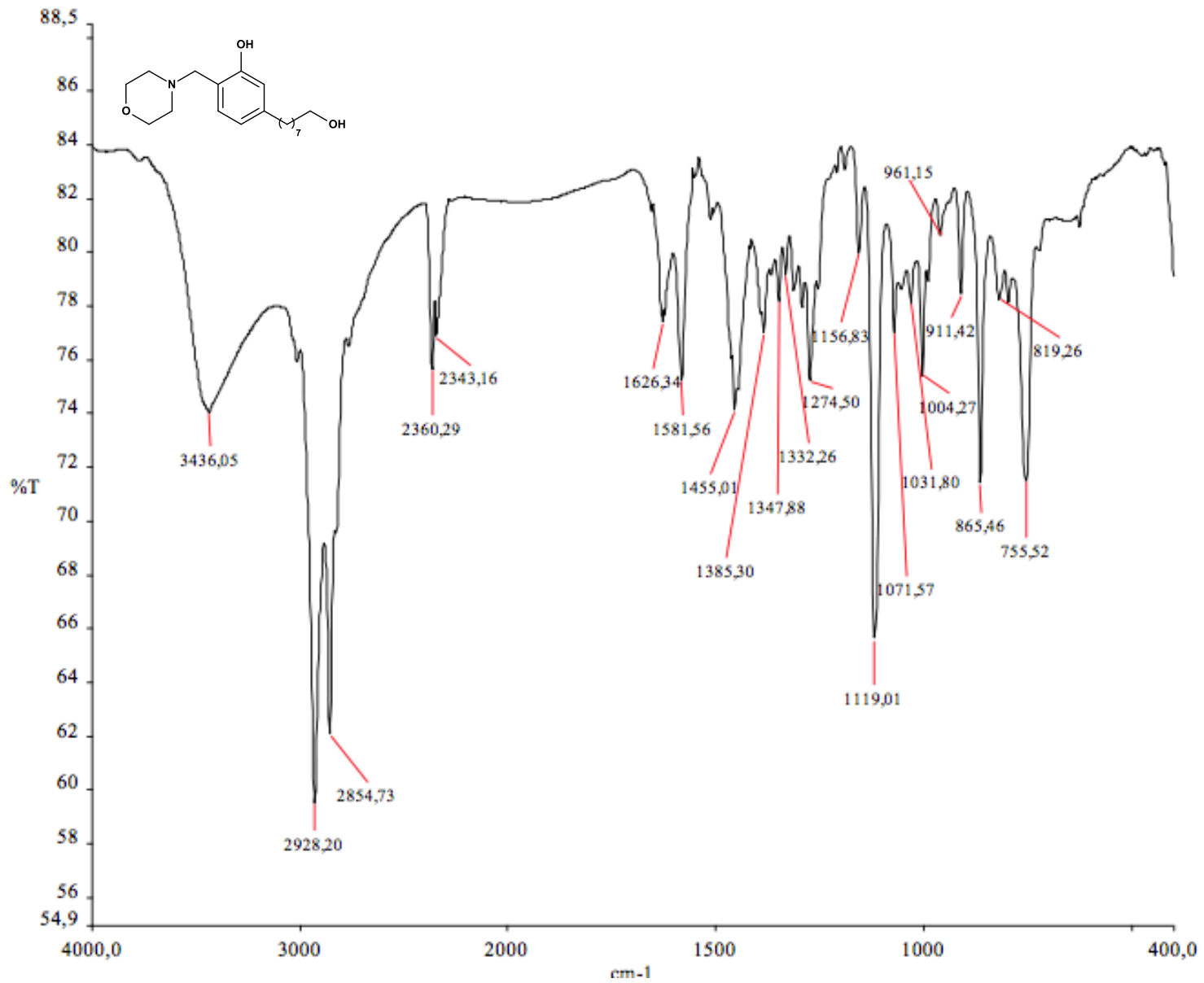
ANEXO 23 – Espectro de RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃): 2-[[benzil(etil)amino]metil]-5-(8-[[2-metoxifenil]metil]amino)octil)fenol (LDT587)



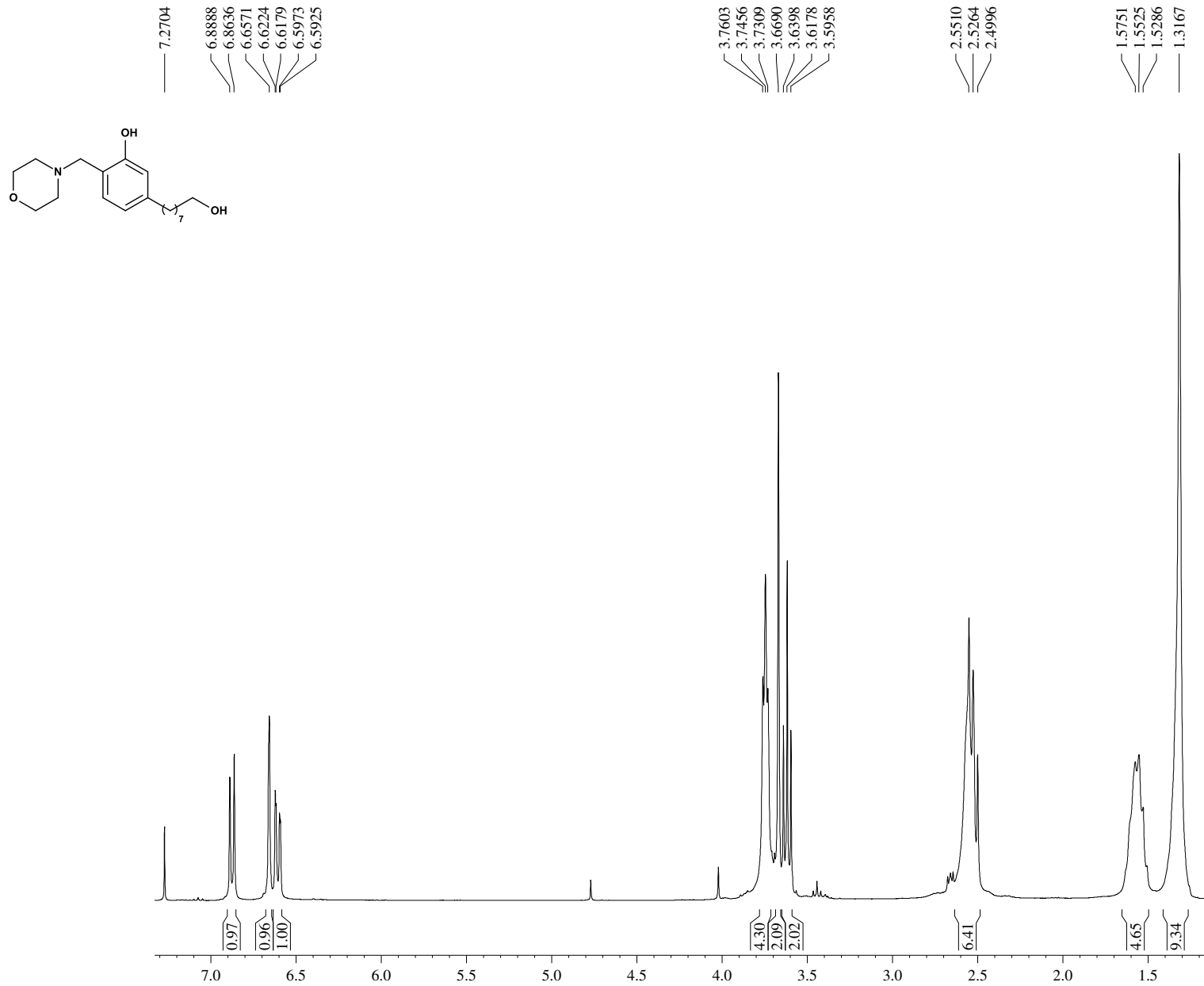
ANEXO 24 – Espectro de RMN ^{13}C (75 MHz, CDCl_3): 2-[[benzil(etil)amino]metil]-5-(8-[[[(2-metoxifenil)metil]amino]octil]fenol (LDT587)



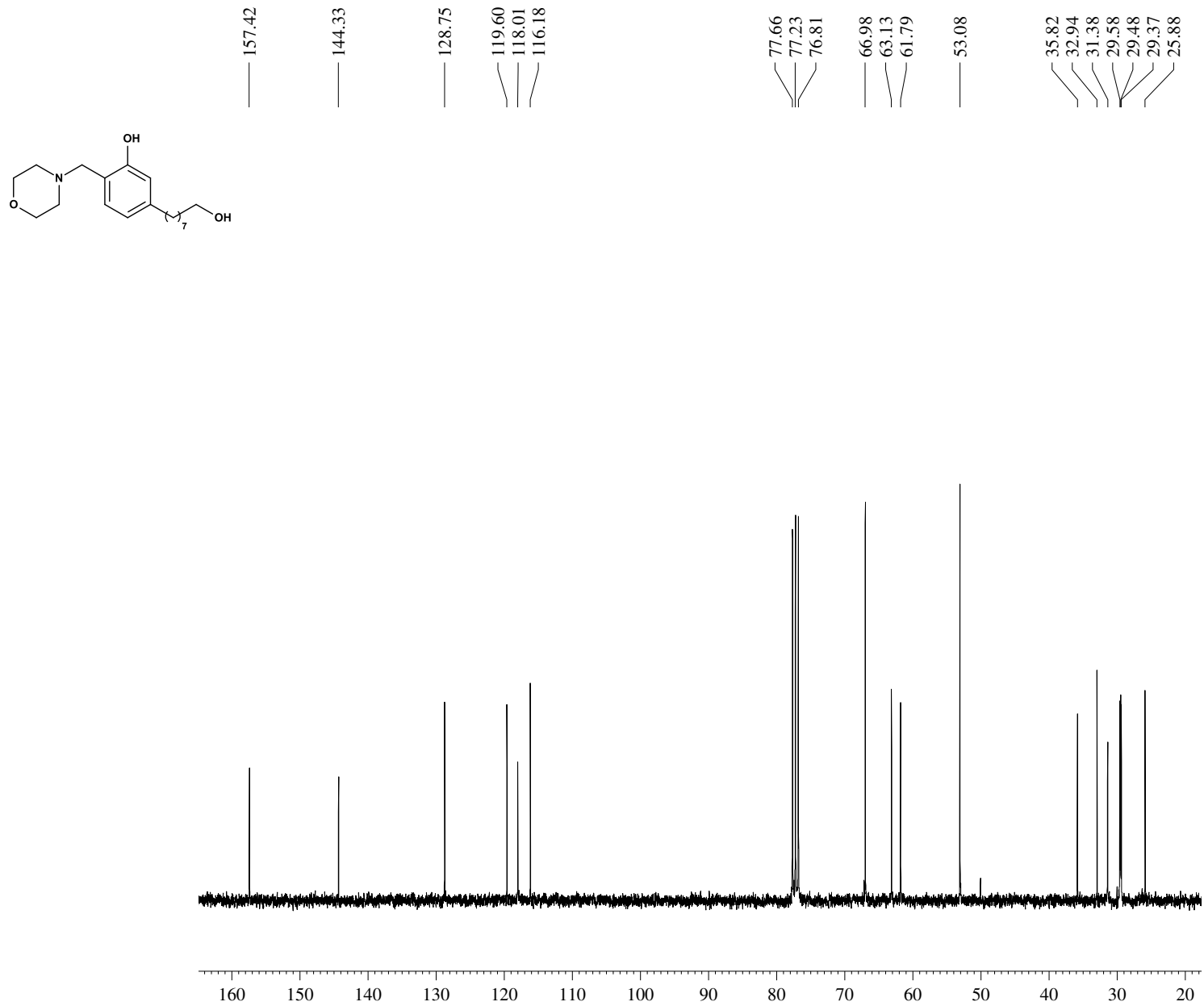
ANEXO 25 – Espectro de Infravermelho (cm⁻¹, KBr): 5-(8-hidroxiocetil)-2-[(morfolin-4-il)metil]fenol (LDT640)



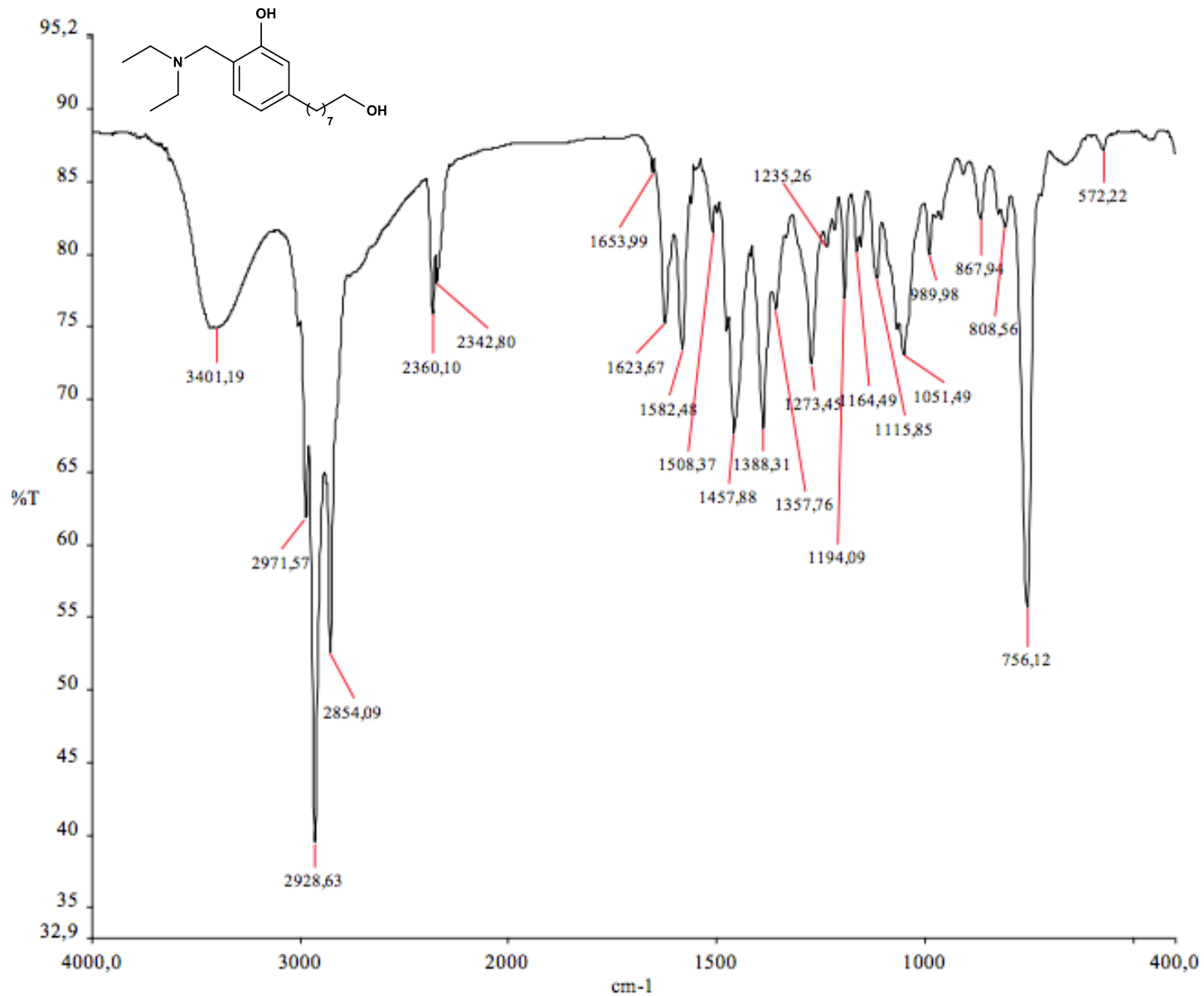
ANEXO 26 – Espectro de RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃): 5-(8-hidroxiocetil)-2-[(morfolin-4-il)metil]fenol (LDT640)



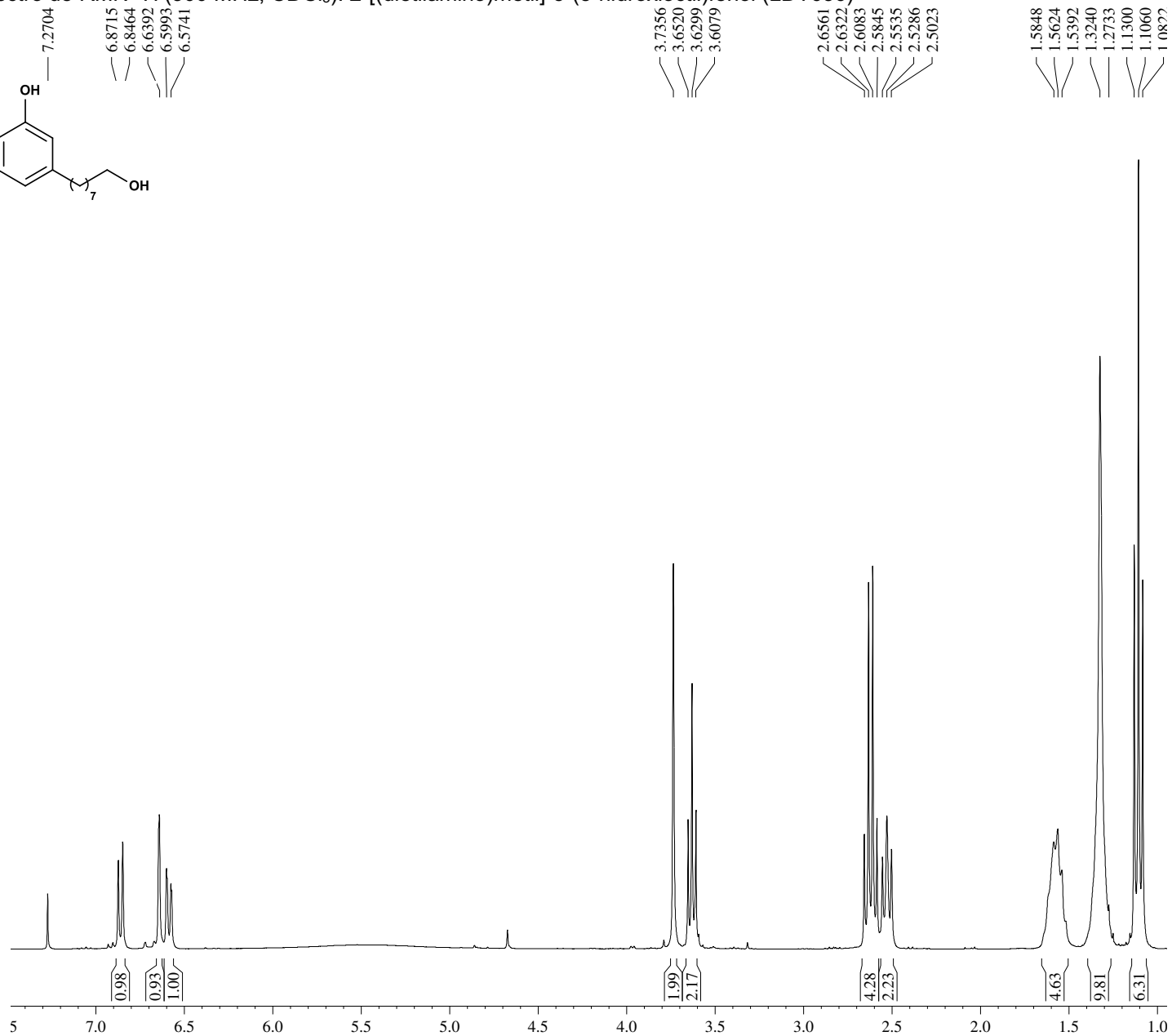
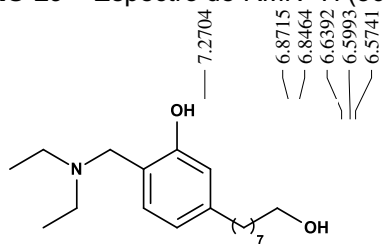
ANEXO 27 – Espectro de RMN ^{13}C (75 MHz, CDCl_3): 5-(8-hidroxiocetil)-2-[(morfolin-4-il)metil]fenol (LDT640)



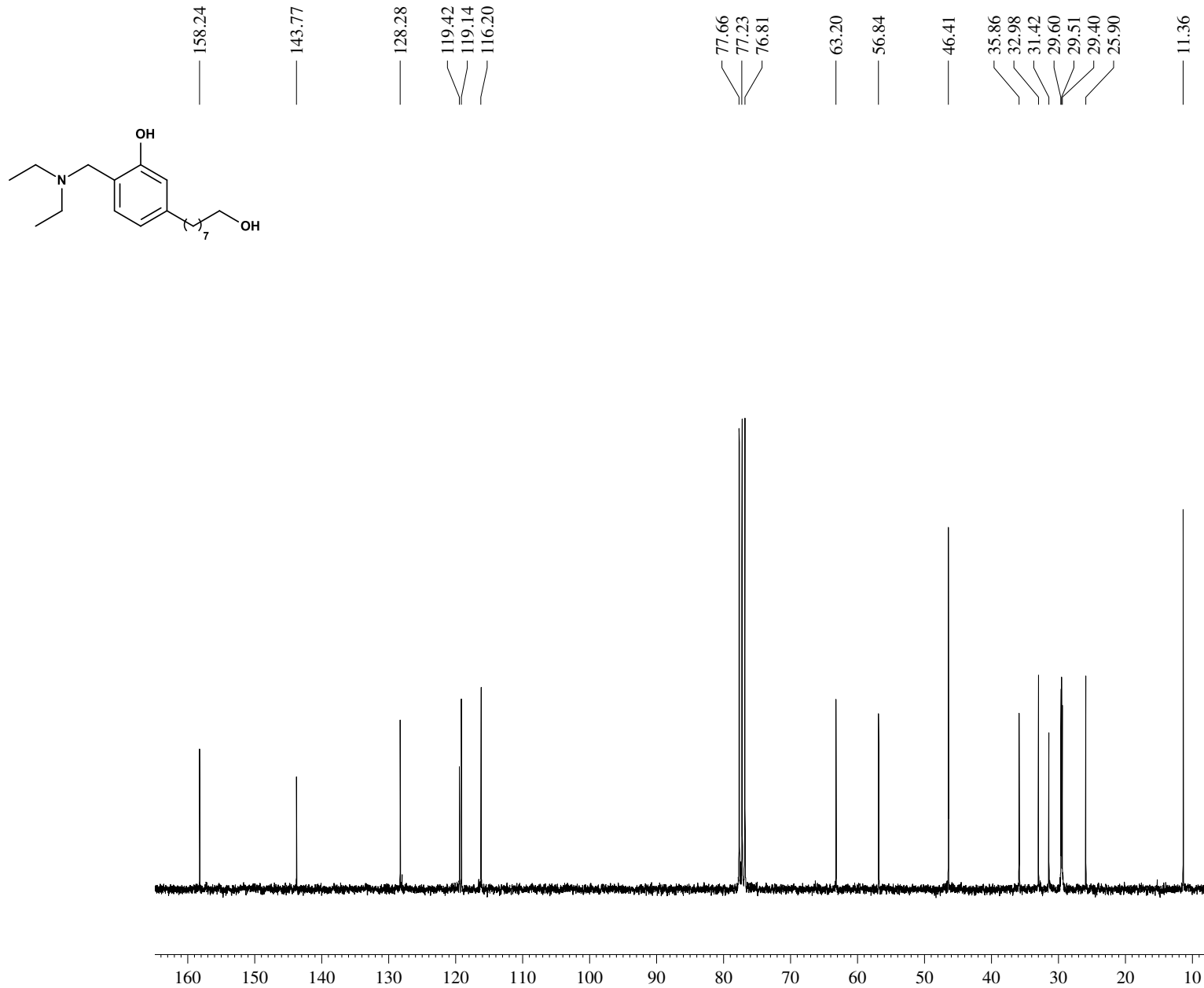
ANEXO 28 – Espectro de Infravermelho (cm⁻¹, KBr): 2-[(dietilamino)metil]-5-(8-hidroxiocetil)fenol (LDT636)



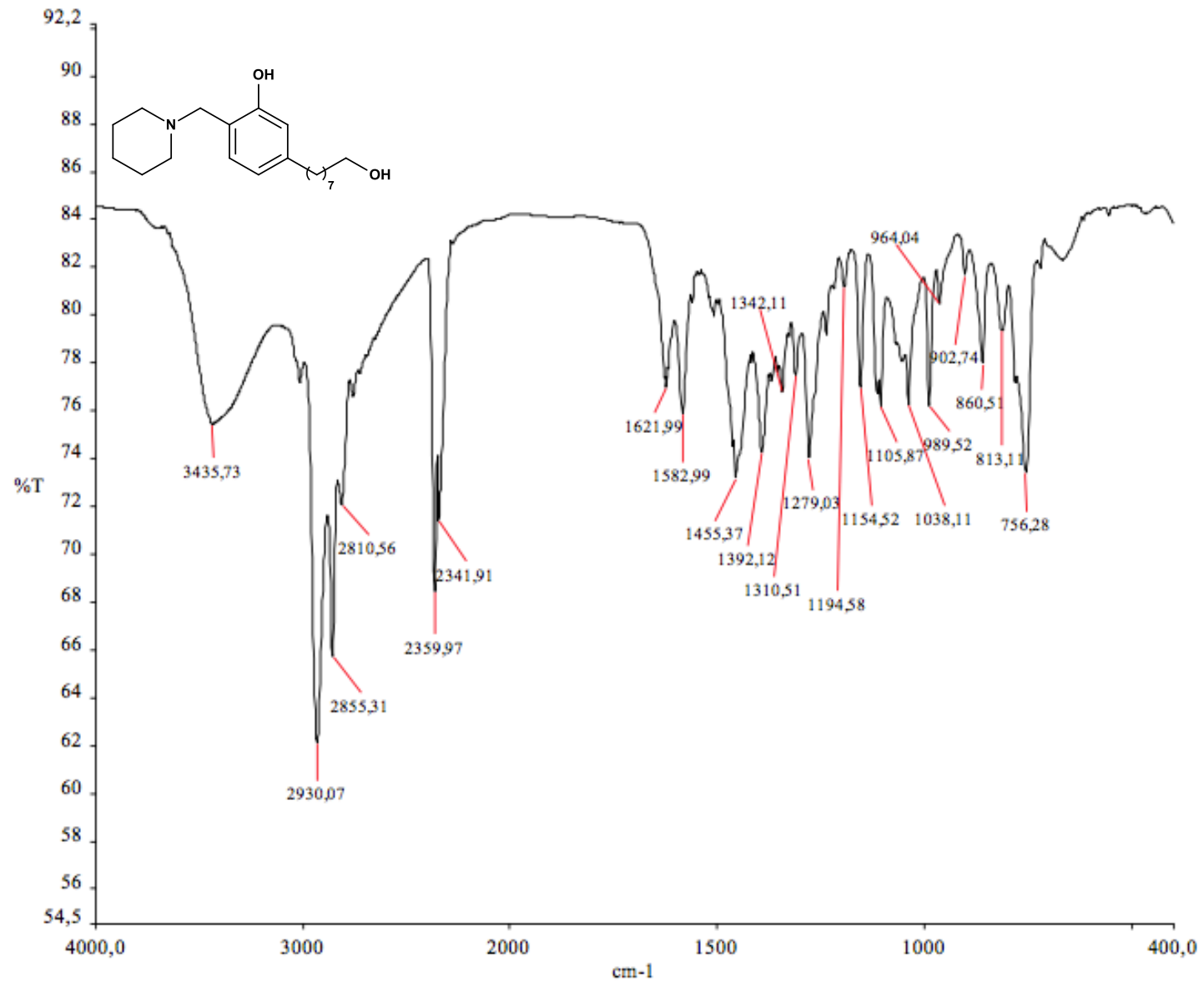
ANEXO 29 – Espectro de RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃): 2-[(dietilamino)metil]-5-(8-hidroxiocetil)fenol (LDT636)



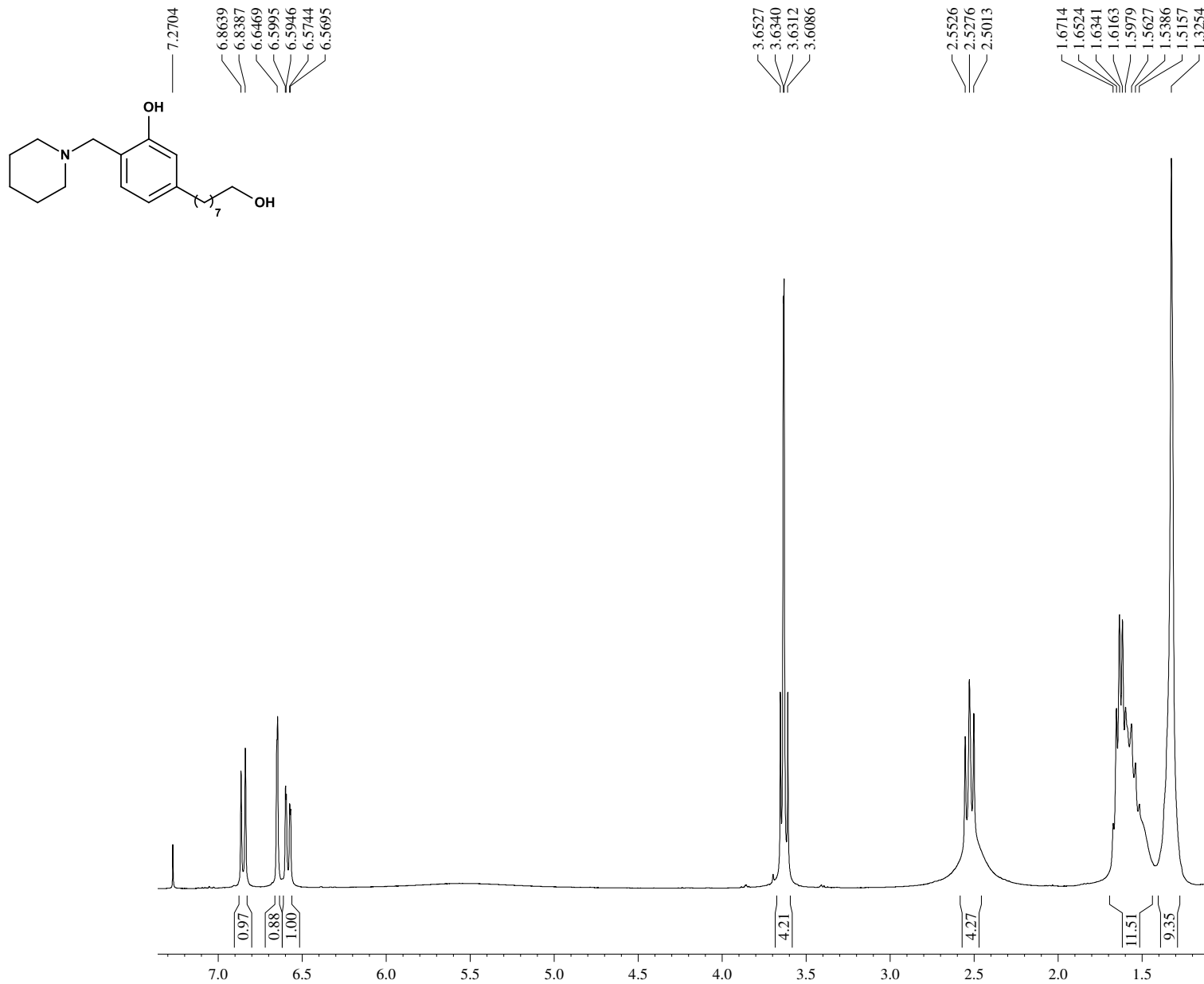
ANEXO 30 – Espectro de RMN ¹³C (75 MHz, CDCl₃): 2-[(dietilamino)metil]-5-(8-hidroxiocetil)fenol (LDT636)



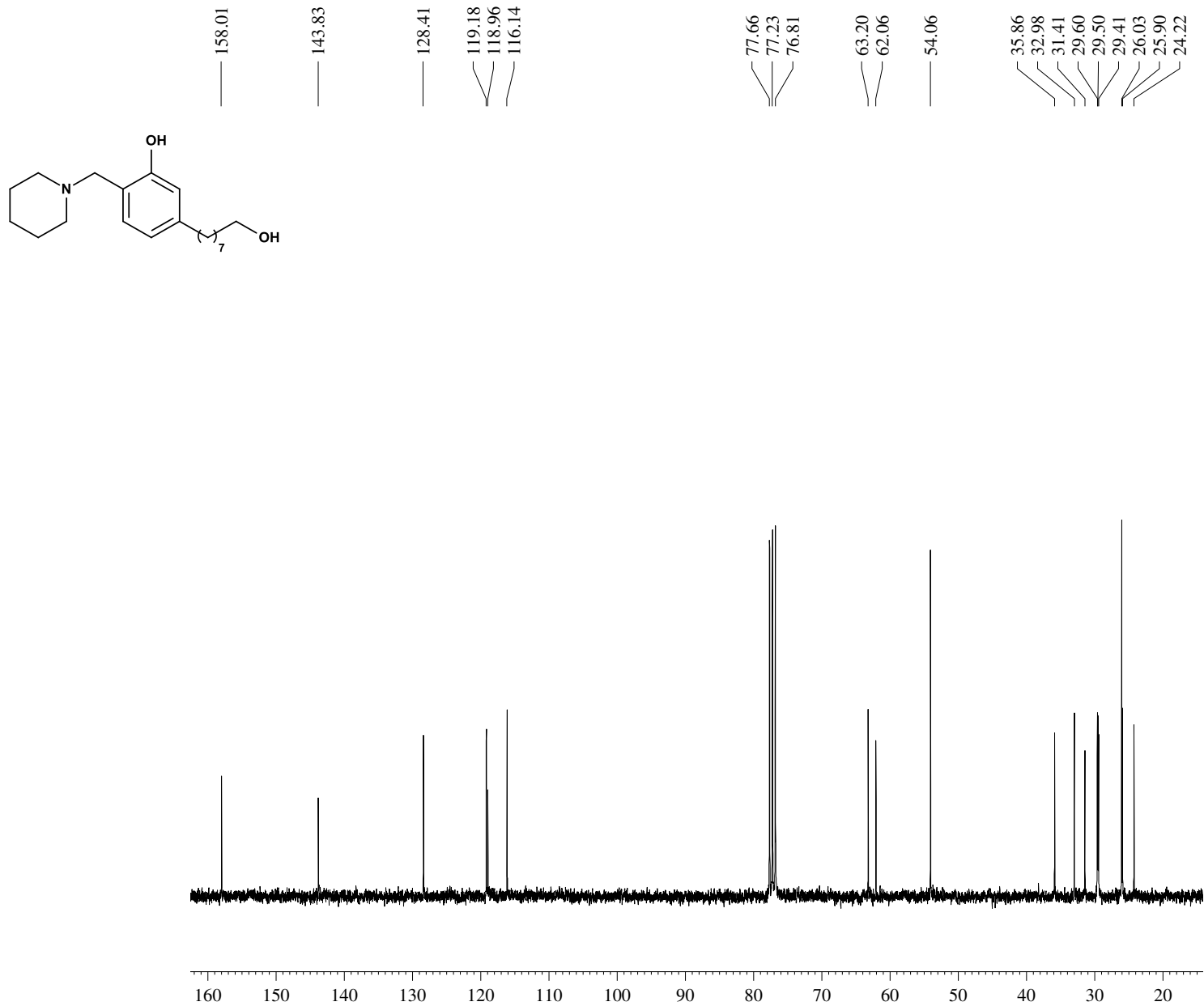
ANEXO 31 – Espectro de Infravermelho (cm^{-1} , KBr): 5-(8-hidroxiocetil)-2-[(piperidin-1-il)metil]fenol (LDT638)



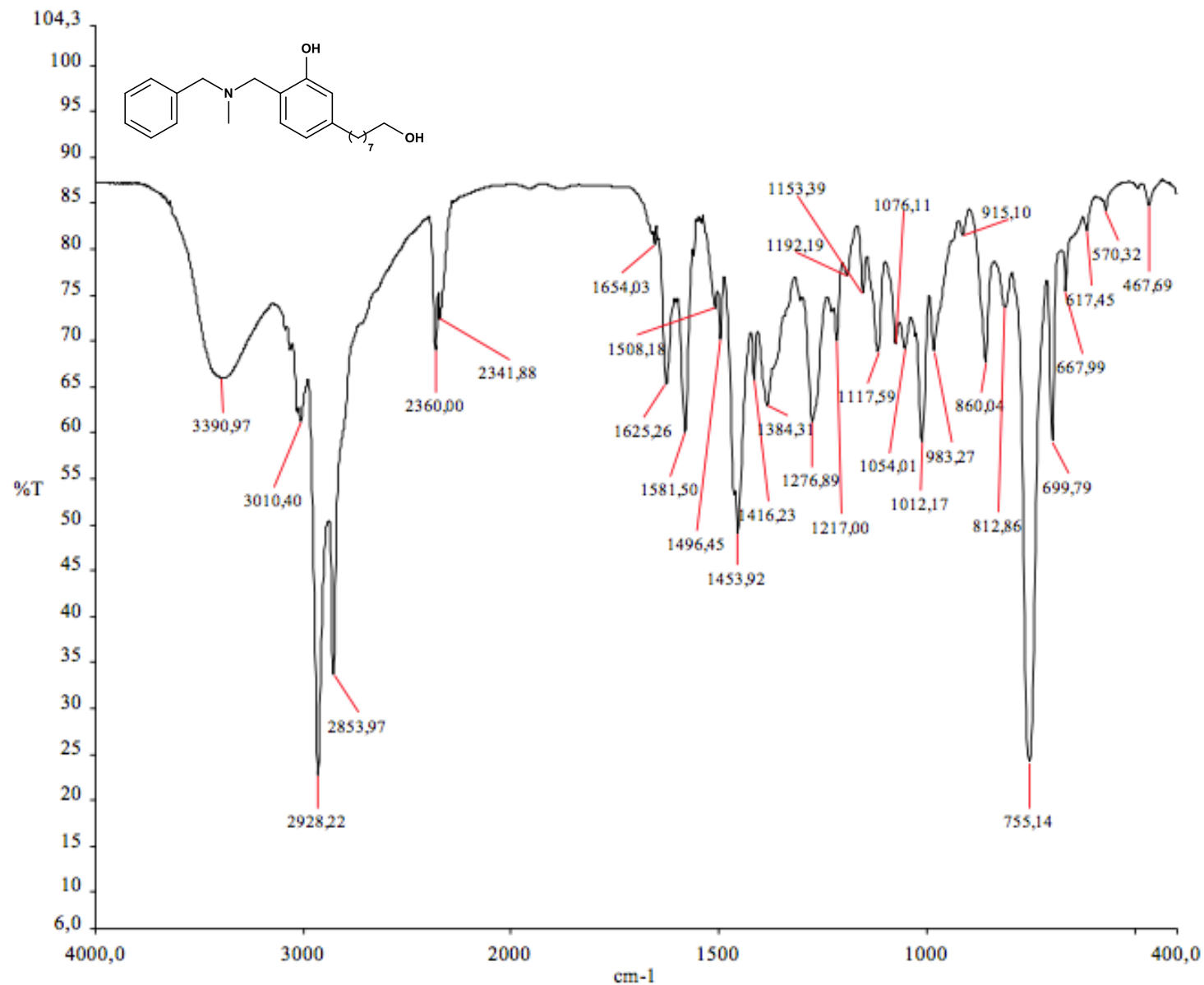
ANEXO 32 – Espectro de RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃): 5-(8-hidroxiocetil)-2-[(piperidin-1-il)metil]fenol (LDT638)



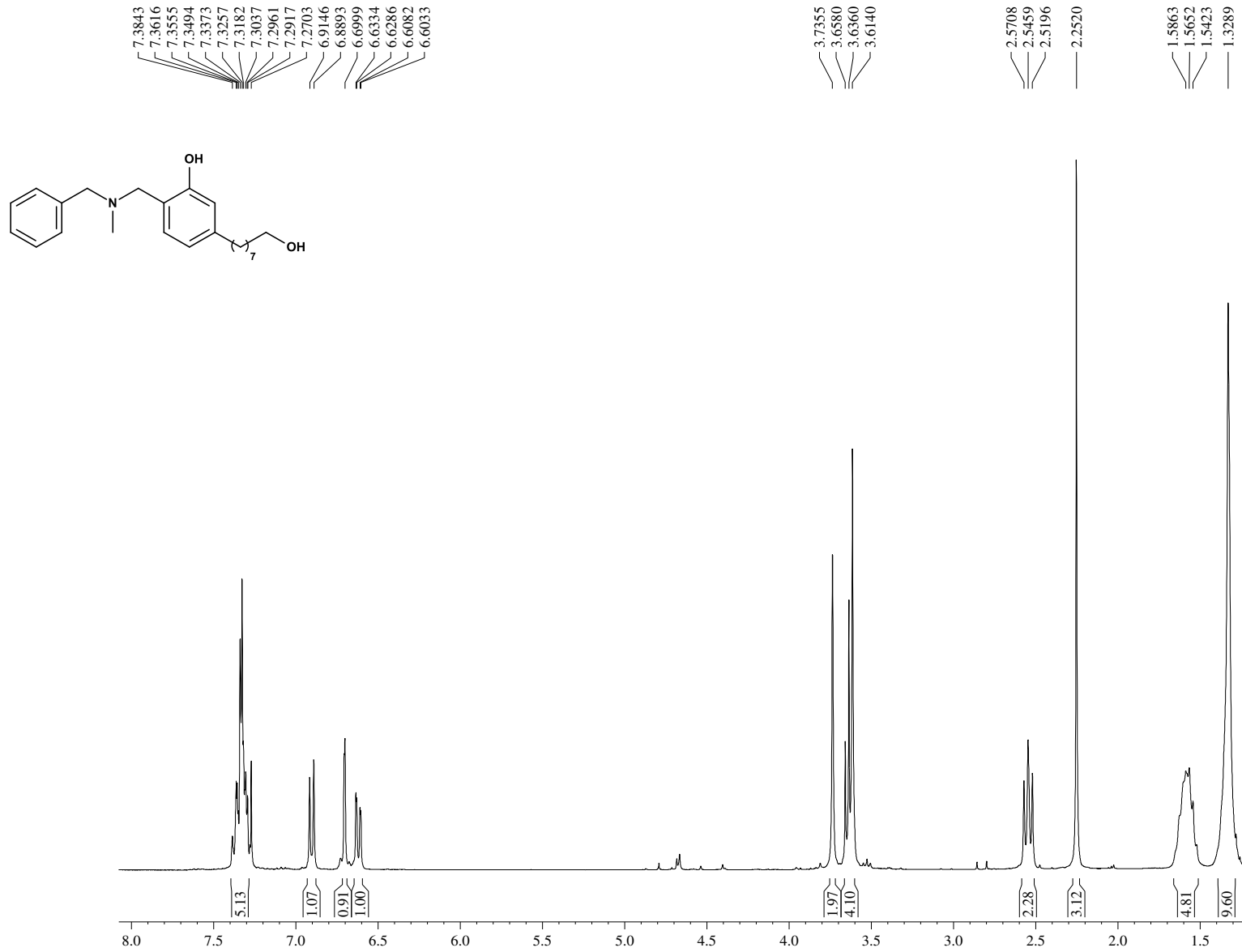
ANEXO 33 – Espectro de RMN ¹³C (75 MHz, CDCl₃): 5-(8-hidroxiocetil)-2-[(piperidin-1-il)metil]fenol (LDT638)



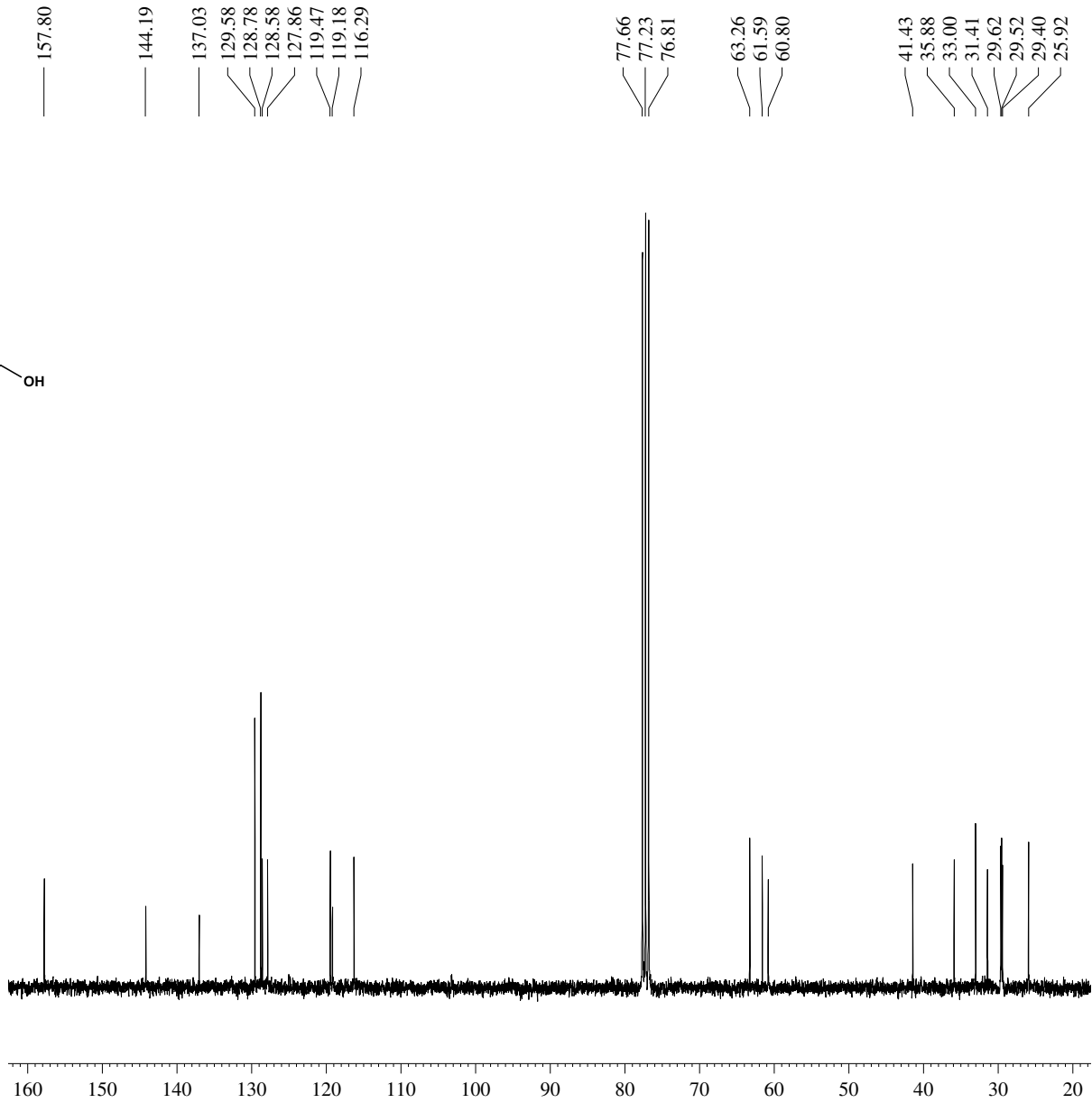
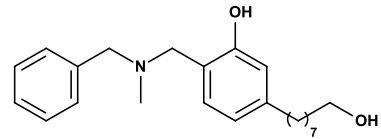
ANEXO 34 – Espectro de Infravermelho (cm⁻¹, KBr): 2-[[benzil(metil)amino]metil]-5-(8-hidroxiocetil)fenol (LDT544)



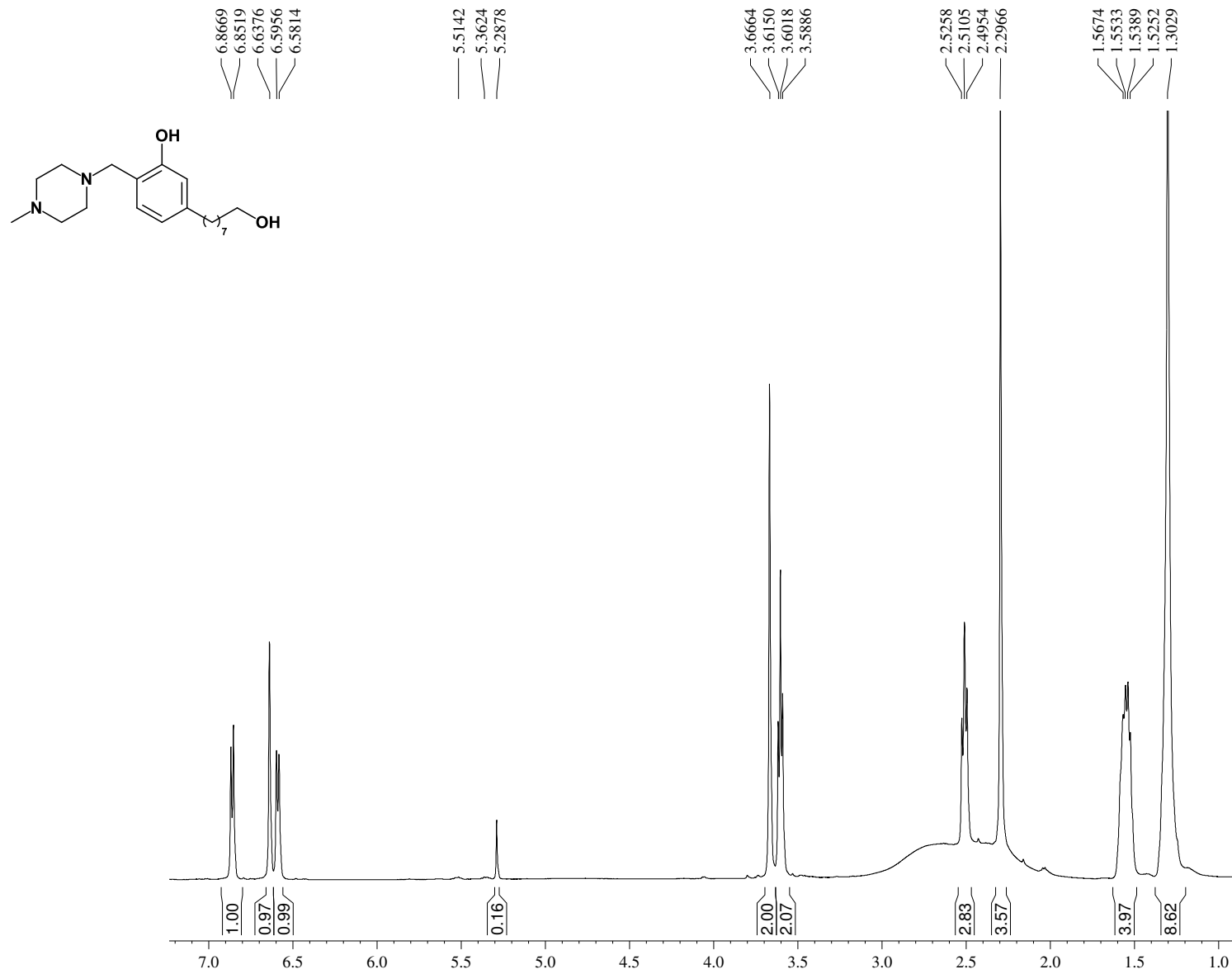
ANEXO 35 – Espectro de RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃): 2-[[benzil(metil)amino]metil]-5-(8-hidroxiocetil)fenol (LDT544)



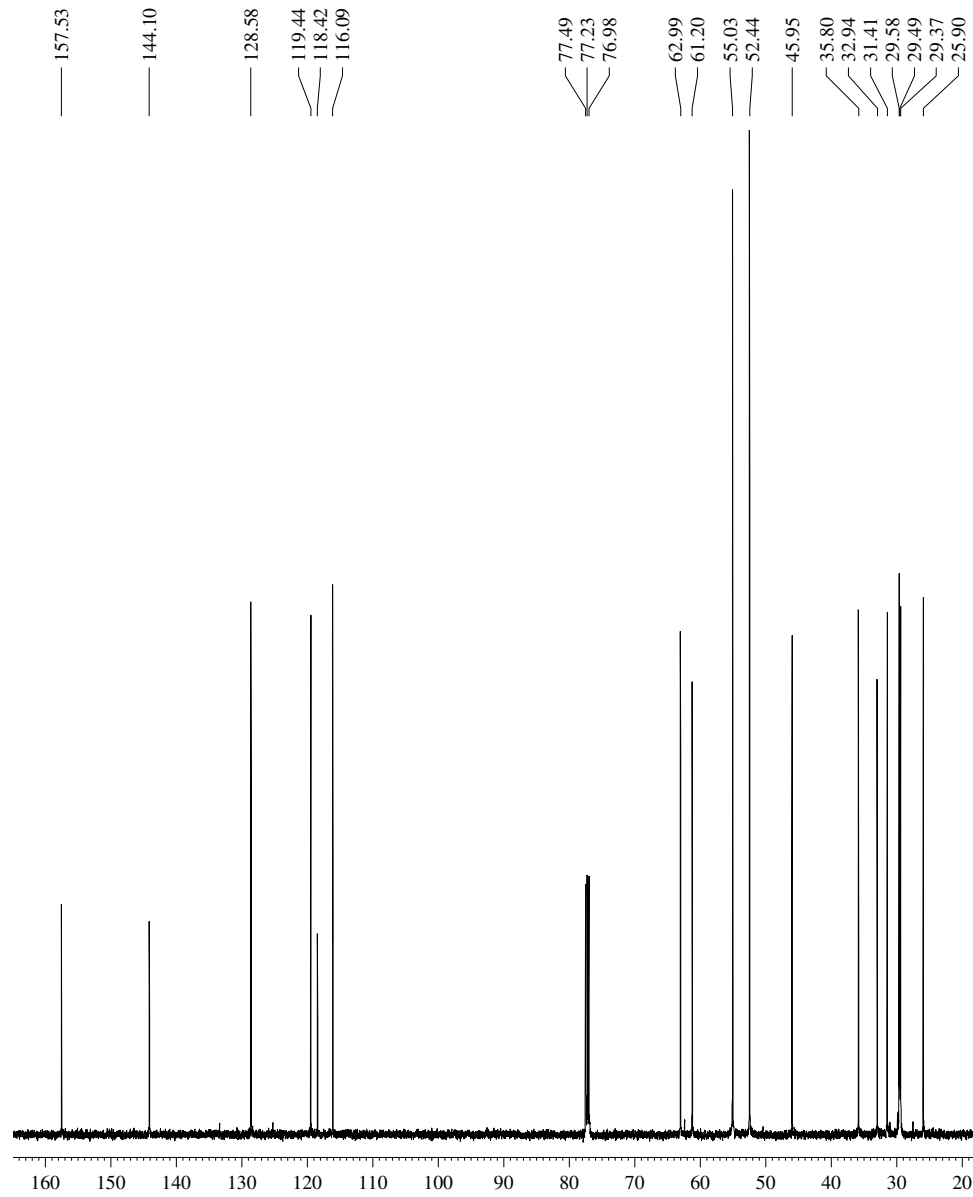
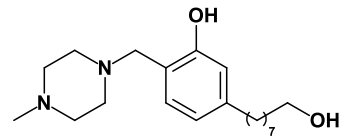
ANEXO 36 – Espectro de RMN ¹³C (75 MHz, CDCl₃): 2-[[benzil(metil)amino]metil]-5-(8-hidroxiocil)fenol (LDT544)



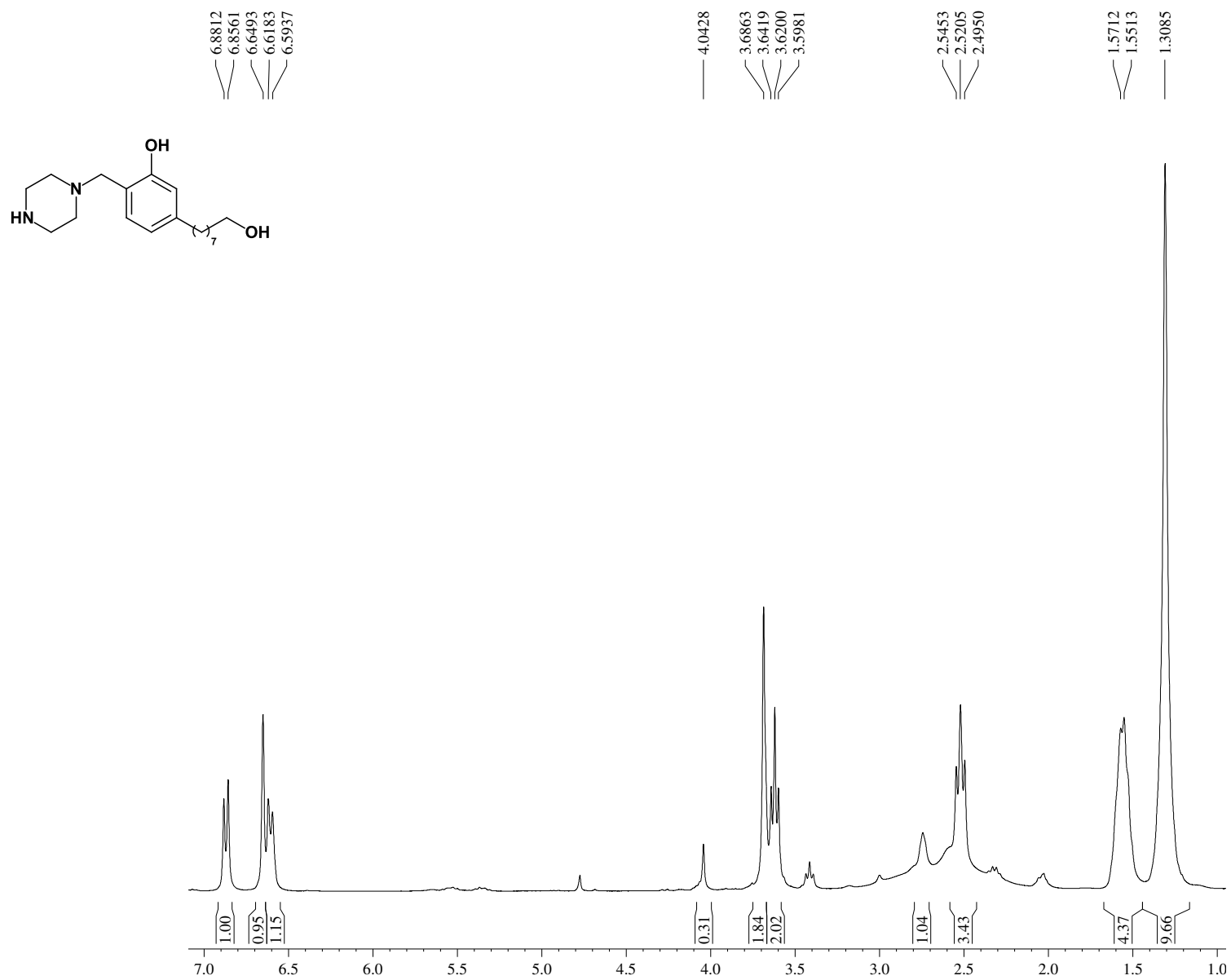
ANEXO 37 – Espectro de RMN ¹H (500 MHz, CDCl₃): 5-(8-Hidroxiocetil)-2-[(4-metilpiperazin-1-il)metil]fenol (LDT642)



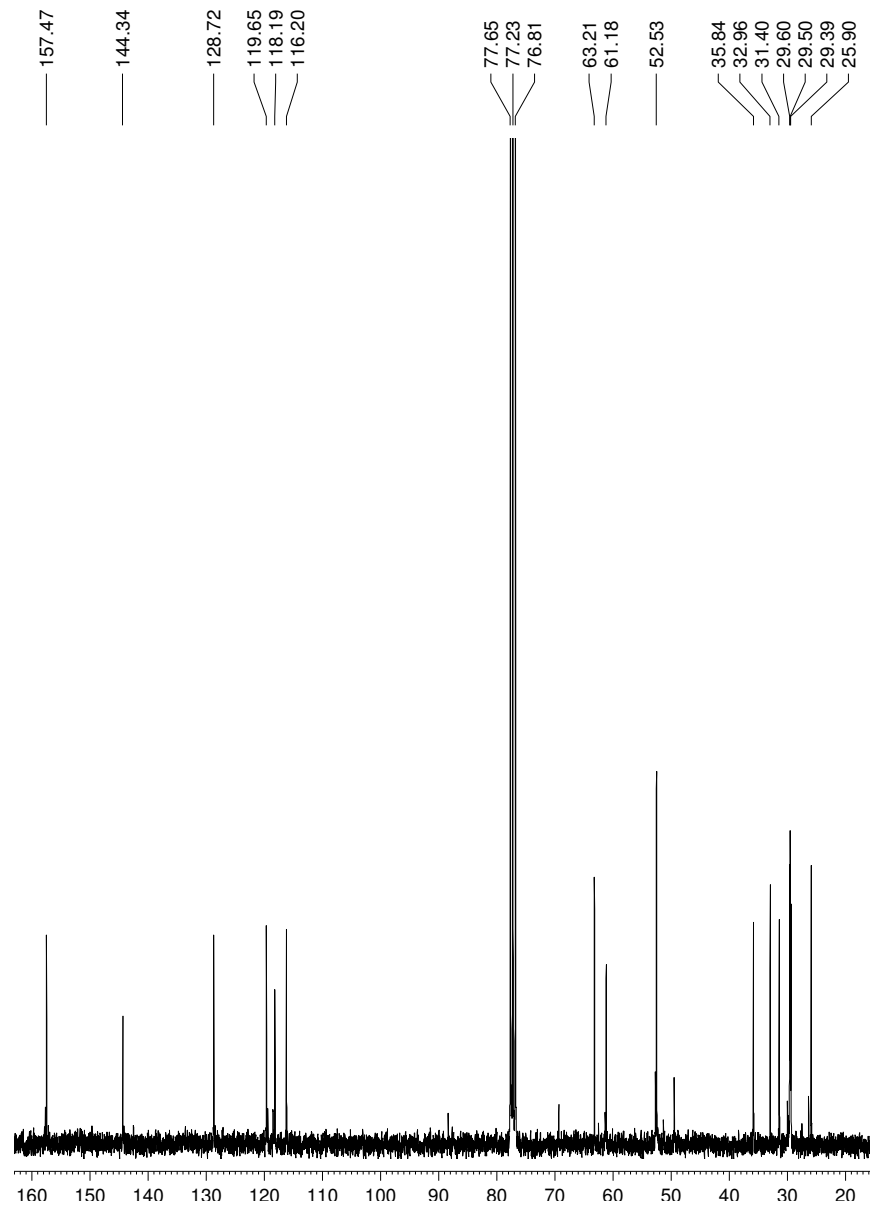
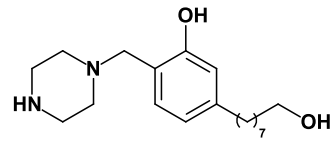
ANEXO 38 – Espectro de RMN ¹³C (125 MHz, CDCl₃): 5-(8-Hidroxiocetil)-2-[(4-metilpiperazin-1-il)metil]fenol (LDT642)



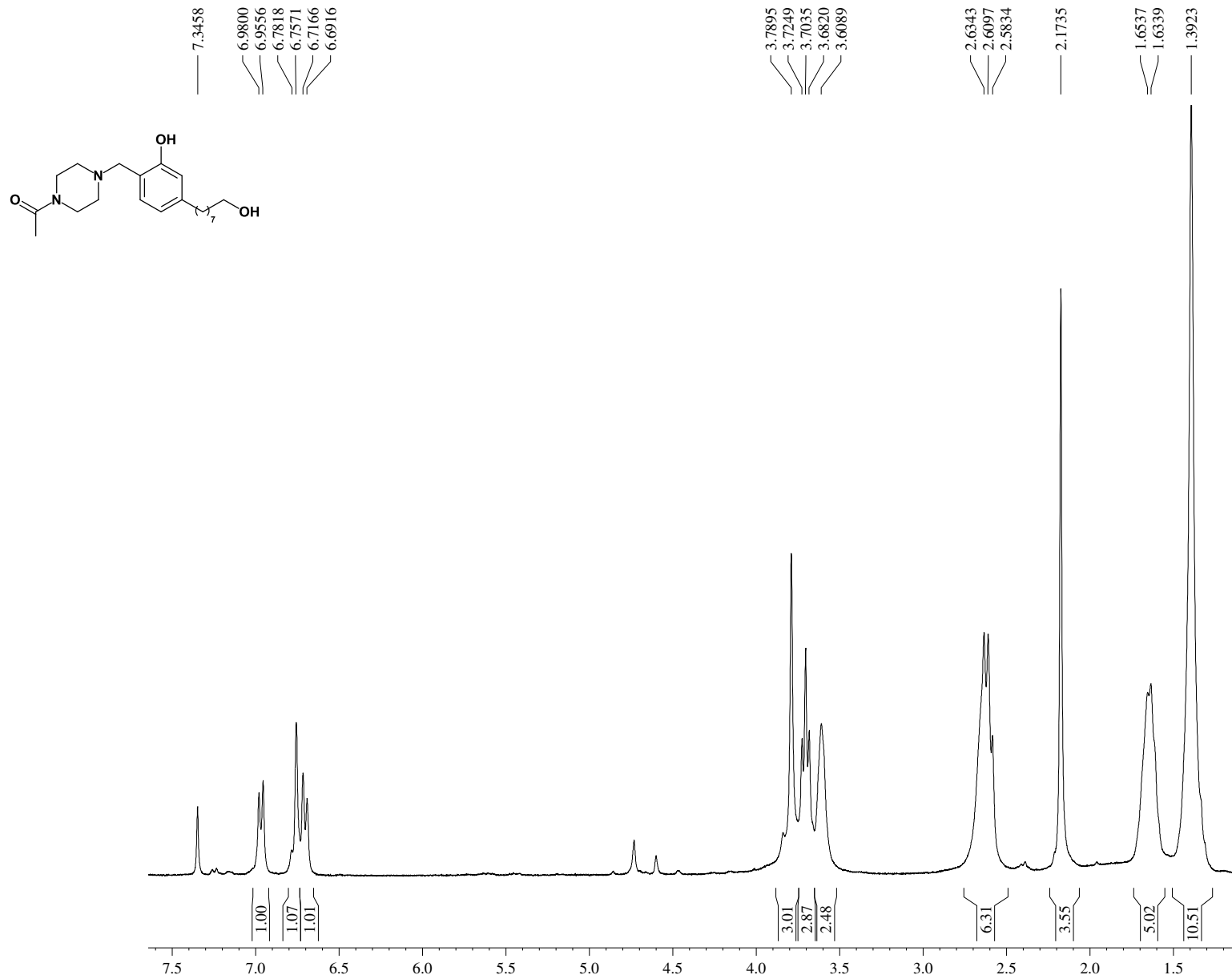
ANEXO 39 – Espectro de RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃): 5-(8-Hidroxiocetil)-2-[(piperazin-1-il)metil]fenol (LDT641)



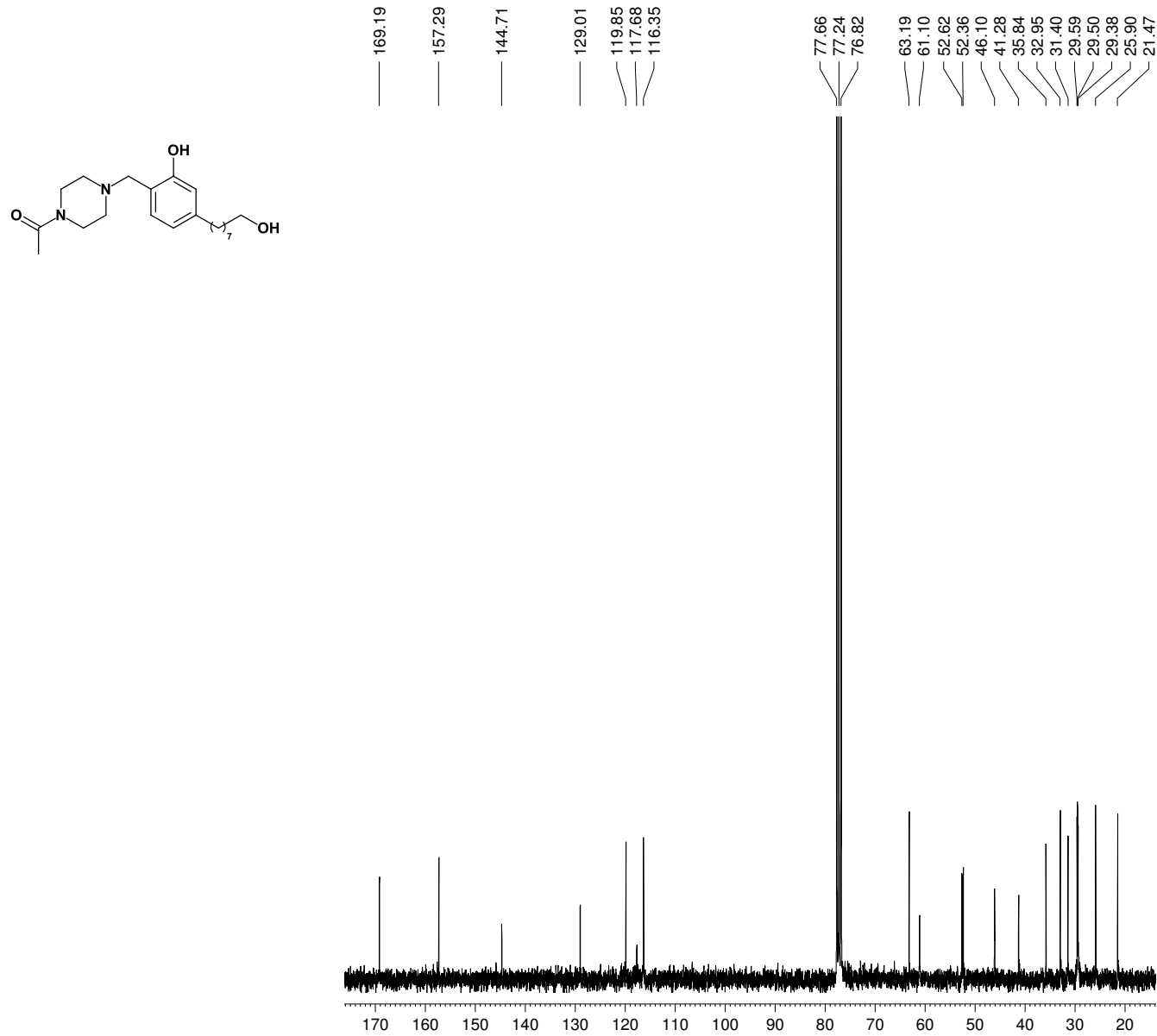
ANEXO 40 – Espectro de RMN ¹³C (75 MHz, CDCl₃): 5-(8-Hidroxiocetil)-2-[(piperazin-1-il)metil]fenol (LDT641)



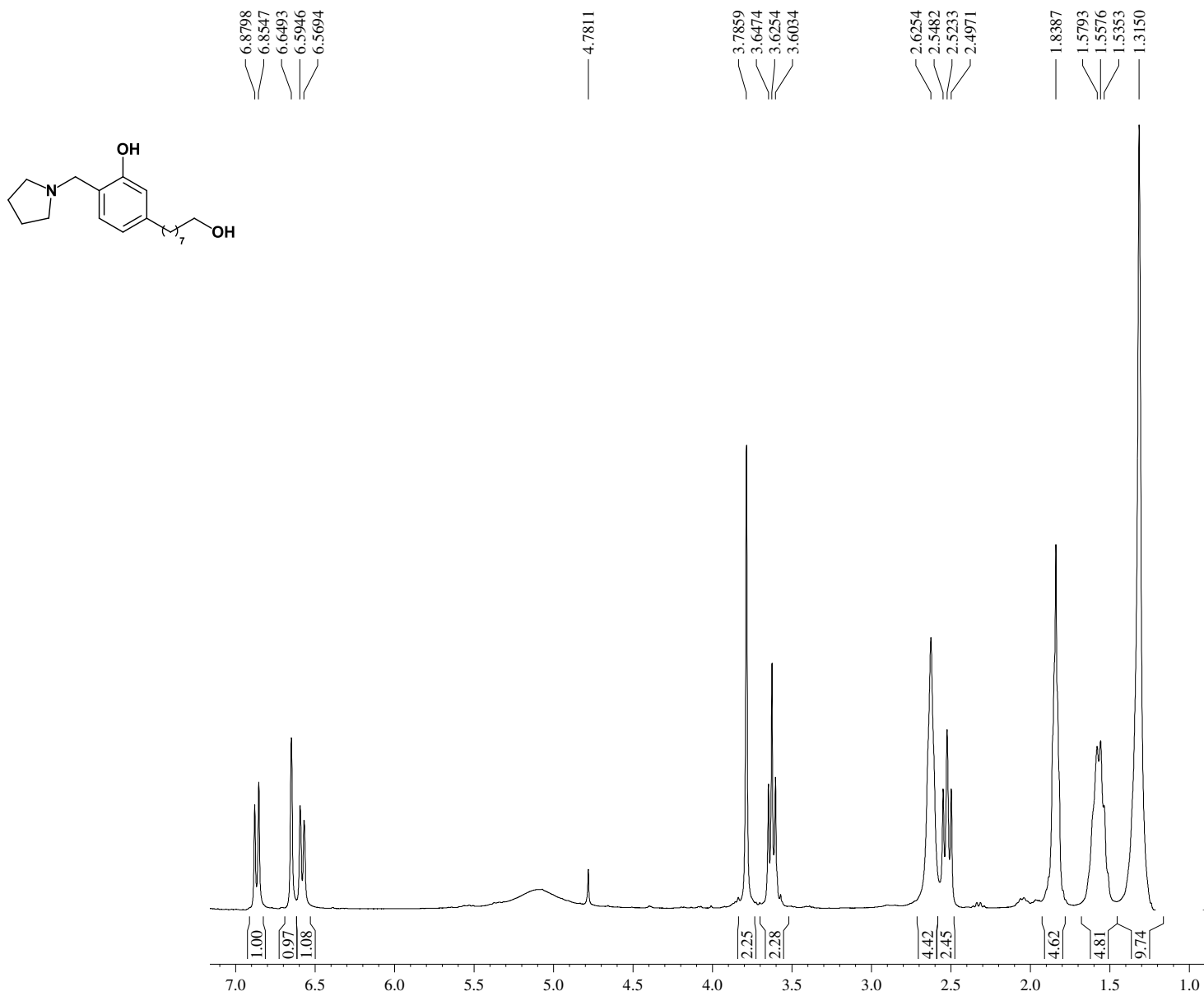
ANEXO 41 – Espectro de RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃): 1-(4-[[2-Hidroxi-4-(8-hidroxiocetil)fenil]metil]piperazin-1-il)etan-1-ona (LDT643)



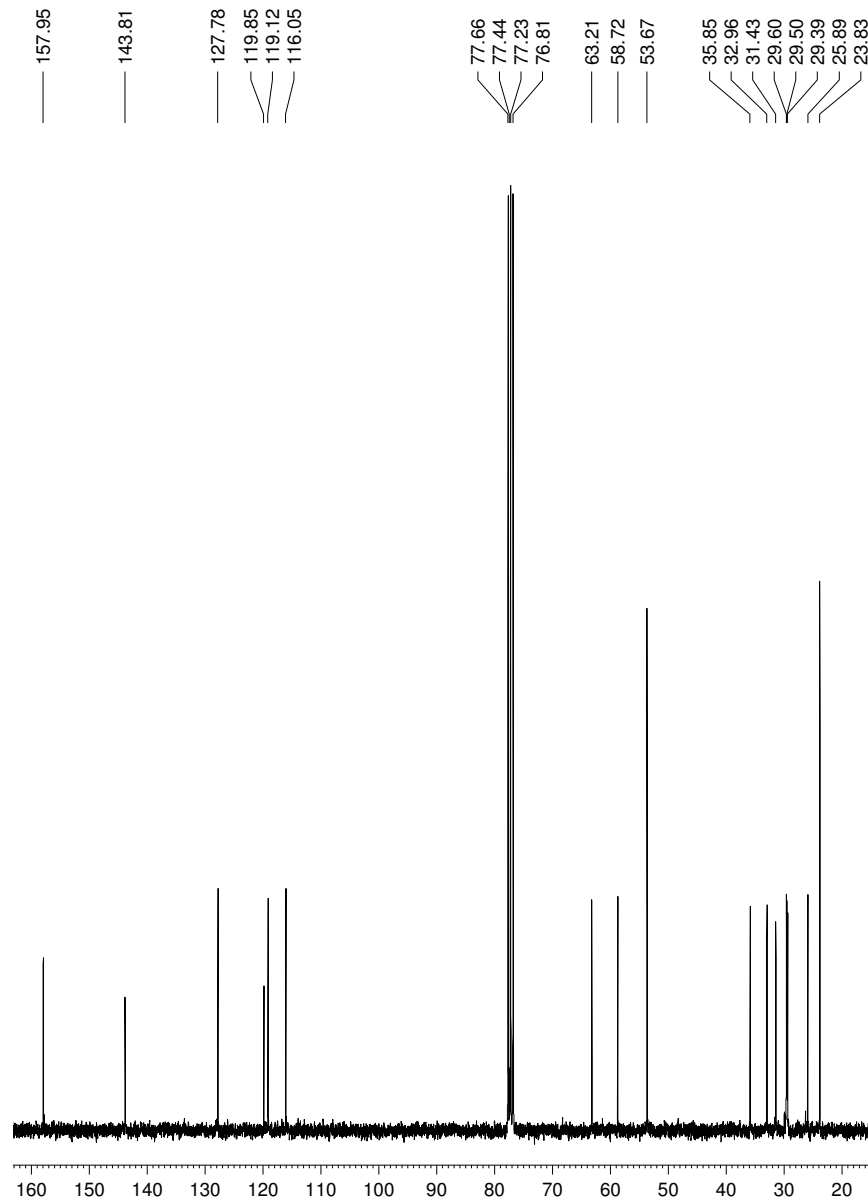
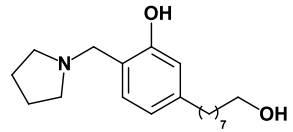
ANEXO 42 – Espectro de RMN ¹³C (75 MHz, CDCl₃): 1-(4-{[2-Hidroxi-4-(8-hidroxiocetil)fenil]metil}piperazin-1-il)etan-1-ona (LDT643)



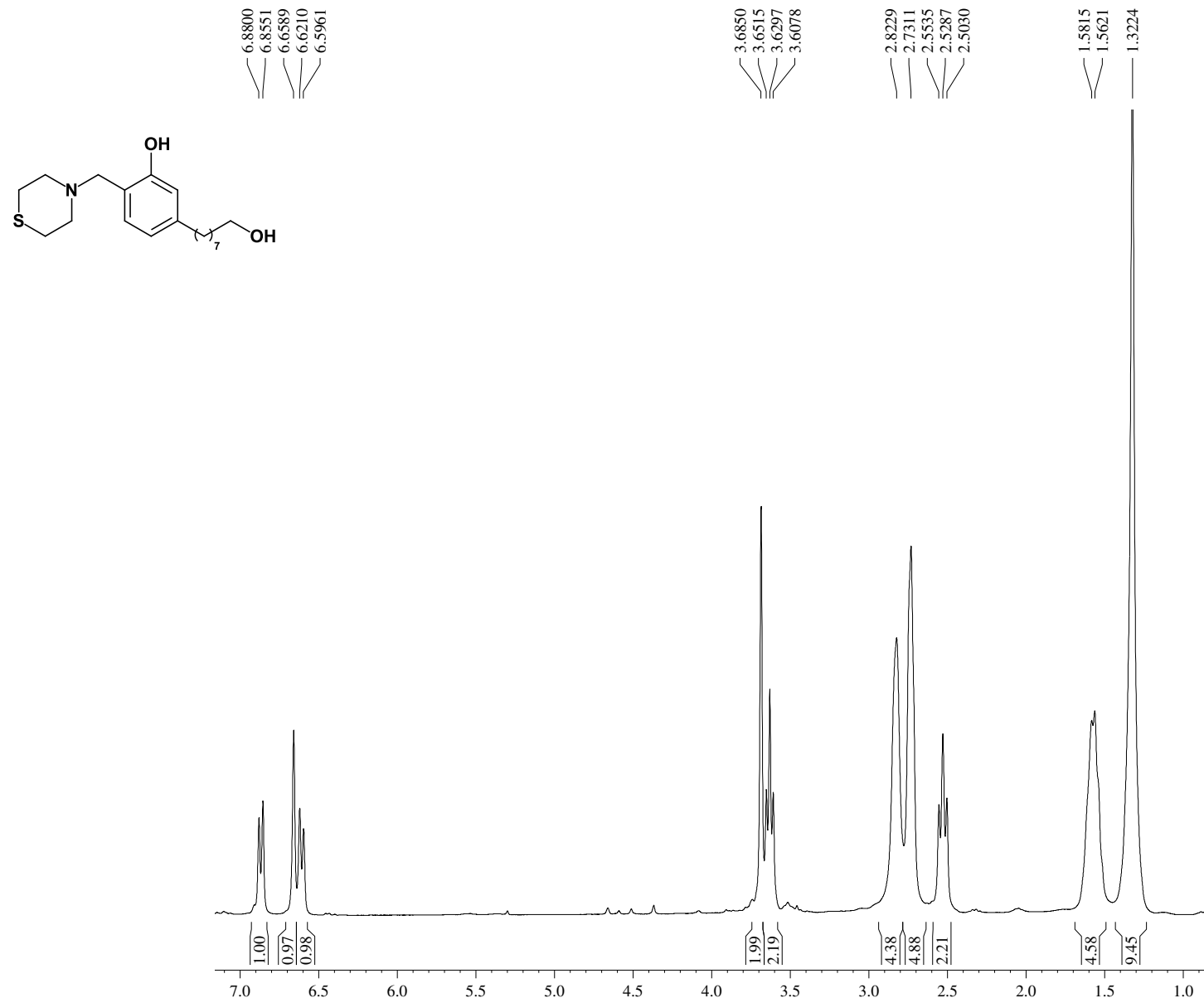
ANEXO 43 – Espectro de RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃): 5-(8-Hidroxiocetil)-2-[(pirrolidin-1-il)metil]fenol (LDT637)



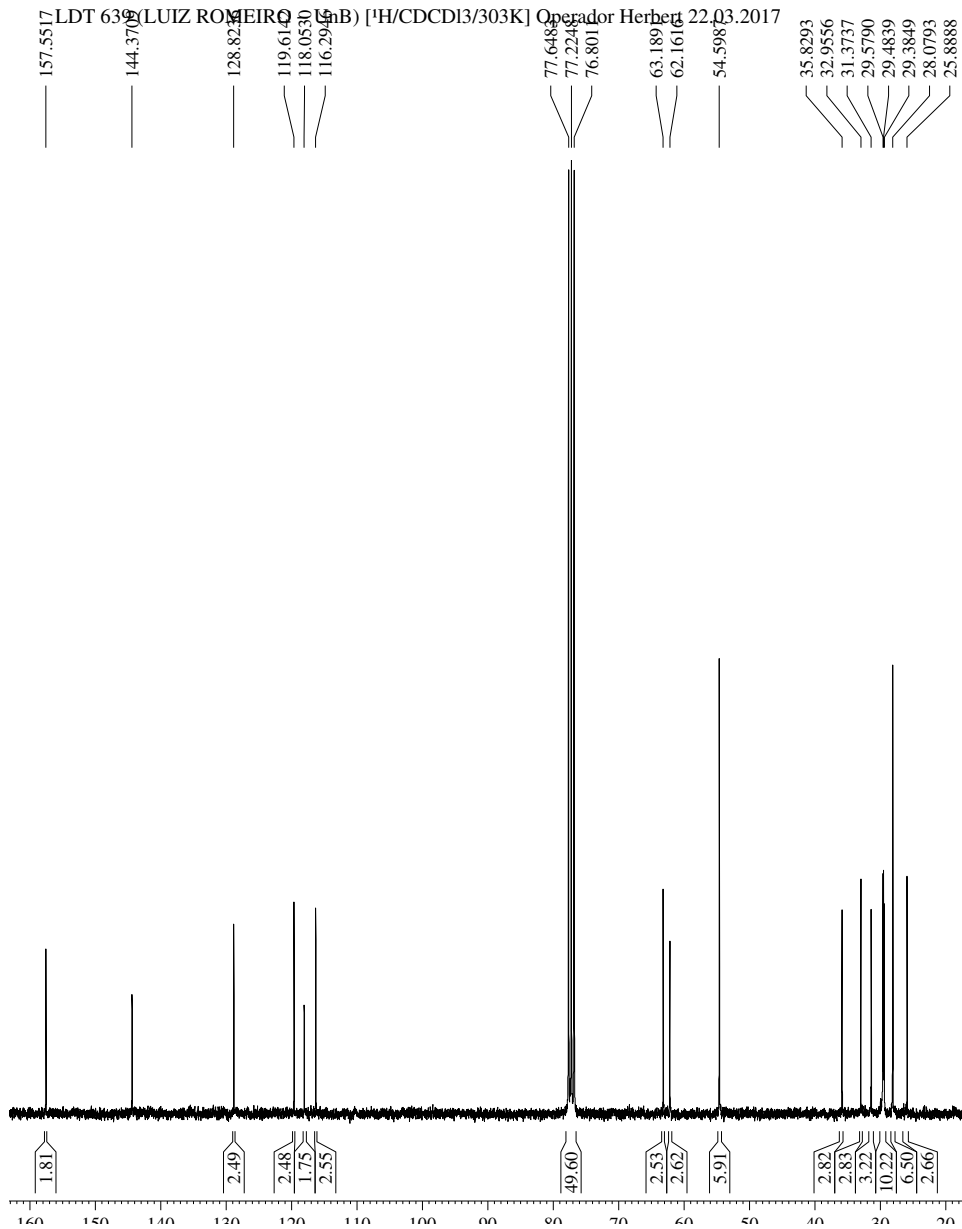
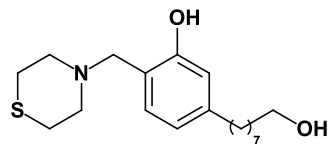
ANEXO 44 – Espectro de RMN ^{13}C (75 MHz, CDCl_3): 5-(8-Hidroxiocetil)-2-[(pirrolidin-1-il)metil]fenol (LDT637)



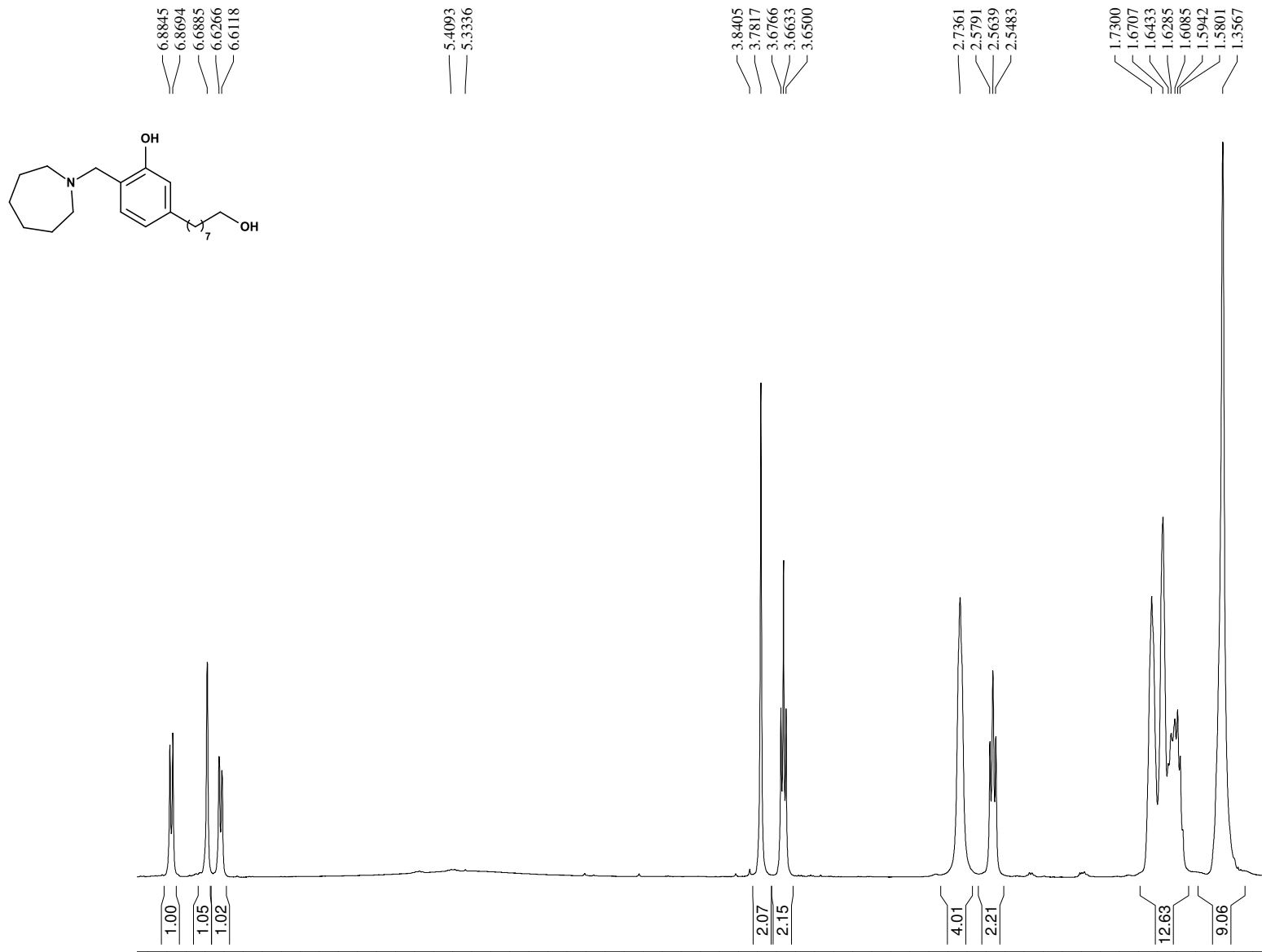
ANEXO 45 – Espectro de RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃): 5-(8-Hidroxiocetil)-2-[(tiomorfolin-4-il)metil]fenol (LDT639)



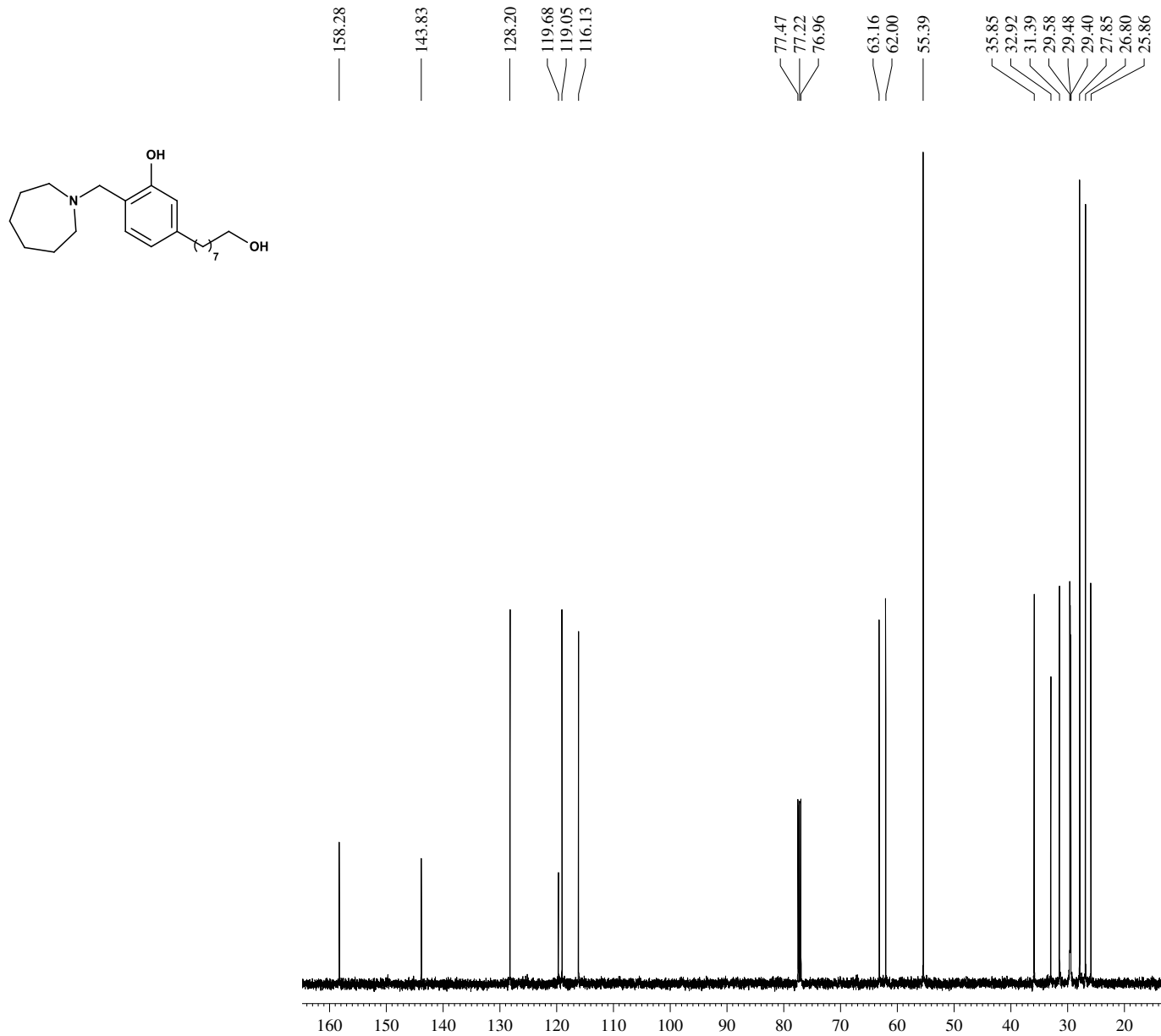
ANEXO 46 – Espectro de RMN ¹³C (75 MHz, CDCl₃): 5-(8-Hidroxiocetil)-2-[(tiomorfolin-4-il)metil]fenol (LDT639)



ANEXO 47 – Espectro de RMN ¹H (500 MHz, CDCl₃): 2-[(azepan-1-il)metil]-5-(8-hidroxiocetil)fenol (LDT692)



ANEXO 48 – Espectro de RMN ¹³C (125 MHz, CDCl₃): 2-[(azepan-1-il)metil]-5-(8-hidroxiocil)fenol (LDT692)



ANEXO 49 – Deconvolução dos espectros de dicroísmo circular

Análise da estrutura secundária para 53 µM βA42 + Compostos - Tempo 0					
	α-hélice	Folha-β	Turn	Folha-β + Turn	Outros
βA42	2,60%	27,30%	15,20%	42,50%	54,90%
LDT637	2,30%	26,20%	17,60%	43,80%	50,90%
LDT639	2,30%	26,50%	15,50%	42,00%	55,70%
LDT641	2,40%	27,10%	15,20%	42,30%	55,30%
LDT642	2,50%	26,70%	15,20%	41,90%	55,40%
LDT643	5,50%	19,80%	14,40%	34,20%	60,30%

Análise da estrutura secundária para 53 µM βA42 + Compostos - Tempo 1					
	α-hélice	Folha-β	Turn	Folha-β + Turn	Outros
βA42	12,60%	16,70%	19,80%	36,50%	50,80%
LDT637	4,00%	21,20%	14,80%	36,00%	60,00%
LDT639	2,20%	29,10%	17,20%	46,30%	51,50%
LDT641	2,80%	16,40%	18,90%	35,30%	61,80%
LDT642	10,00%	20,30%	16,80%	37,10%	52,90%
LDT643	4,40%	20,90%	14,80%	35,70%	59,90%

Análise da estrutura secundária para 66 µM βA42 + Compostos - Tempo 0					
	α-hélice	Folha-β	Turn	Folha-β + Turn	Outros
βA42	12,40%	21,10%	16,10%	37,20%	50,40%
LDT544	6,50%	30,60%	13,70%	44,30%	49,20%
LDT636	4,20%	30,80%	13,80%	44,60%	51,10%
LDT638	3,40%	29,90%	14,60%	44,50%	52,10%
LDT640	2,80%	27,30%	14,40%	41,70%	55,40%
LDT692	1,80%	33,70%	15,60%	49,30%	48,90%

Análise da estrutura secundária para 66 µM βA42 + Compostos - Tempo 1					
	α-hélice	Folha-β	Turn	Folha-β + Turn	Outros
βA42	2,90%	28,10%	14,90%	43,00%	54,00%
LDT544	7,00%	19,70%	17,40%	37,10%	56,00%
LDT636	2,80%	22,80%	16,60%	39,40%	57,80%
LDT638	3,10%	16,50%	19,00%	35,50%	61,40%
LDT640	4,30%	26,50%	14,60%	41,10%	54,50%
LDT692	2,60%	20,70%	16,70%	37,40%	60,00%

Análise da estrutura secundária para 53 µM βA42 + Compostos - Tempo 2					
	α-hélice	Folha-β	Turn	Folha-β + Turn	Outros
βA42	3,50%	29,20%	12,80%	42,00%	54,50%
LDT637	3,10%	27,30%	15,00%	42,30%	54,60%
LDT639	2,20%	24,90%	16,10%	41,00%	56,80%
LDT641	4,00%	32,40%	15,90%	48,30%	47,70%
LDT642	3,90%	31,30%	14,50%	45,80%	50,30%
LDT643	3,90%	20,50%	17,70%	38,20%	58,00%

Análise da estrutura secundária para 53 µM βA42 + Compostos - Tempo 3					
	α-hélice	Folha-β	Turn	Folha-β + Turn	Outros
βA42	9,00%	28,20%	12,00%	40,20%	50,80%
LDT637	7,60%	29,50%	17,10%	46,60%	45,90%
LDT639	6,10%	15,20%	18,10%	33,30%	60,70%
LDT641	4,50%	18,80%	21,50%	40,30%	55,20%
LDT642	5,50%	26,80%	16,80%	43,60%	51,00%
LDT643	3,30%	26,30%	12,60%	38,90%	57,80%

Análise da estrutura secundária para 66 µM βA42 + Compostos - Tempo 2					
	α-hélice	Folha-β	Turn	Folha-β + Turn	Outros
βA42	14,30%	27,40%	11,50%	38,90%	46,90%
LDT544	12,30%	16,80%	19,30%	36,10%	51,60%
LDT636	3,40%	31,00%	14,40%	45,40%	51,10%
LDT638	7,40%	20,90%	20,70%	41,60%	50,90%
LDT640	4,80%	17,60%	17,40%	35,00%	60,20%
LDT692	8,10%	24,10%	18,80%	42,90%	49,00%

Análise da estrutura secundária para 66 µM βA42 + Compostos - Tempo 3					
	α-hélice	Folha-β	Turn	Folha-β + Turn	Outros
βA42	8,80%	31,50%	11,40%	42,90%	48,20%
LDT544	13,10%	27,20%	12,50%	39,70%	47,10%
LDT636	3,00%	25,70%	12,90%	38,60%	58,40%
LDT638	12,00%	19,50%	21,40%	40,90%	47,10%
LDT640	6,00%	24,90%	14,70%	39,60%	54,40%
LDT692	3,10%	26,70%	15,00%	41,70%	55,20%