



Universidade Federal de Alfenas – UNIFAL-MG  
Laboratório de Fitoquímica e Química Medicinal - LFQM



Miguel Divino da Rocha

**SÍNTESE E AVALIAÇÃO FARMACOLÓGICA DE NOVOS HÍBRIDOS  
MOLECULARES 3-O-PIPERIDINIL-N-BENZIL-ACILIDRAZÔNICOS,  
PLANEJADOS COMO CANDIDATOS A FÁRMACOS SIMBIÓTICOS:  
ANTICOLINESTERÁSICOS E ANTI-INFLAMATORIOS.**

*Alfenas, Agosto*

*2010.*

Universidade Federal de Alfenas – UNIFAL-MG  
Laboratório de Fitoquímica e Química Medicinal - LFQM

Miguel Divino da Rocha

***Síntese e avaliação farmacológica de novos híbridos moleculares  
3-O-piperidinil-N-benzil-acilidrazônicos, planejados como  
candidatos a fármacos simbióticos: anticolinesterásicos e anti-  
inflamatórios.***

Dissertação apresentada como parte dos  
requisitos para a obtenção do título de Mestre  
em Química pela Universidade Federal de Alfenas.  
Área de concentração: Química Orgânica.

Orientador: Prof. Dr. Cláudio Viegas Jr.

*Alfenas, Agosto  
2010*

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)  
Biblioteca Central da Universidade Federal de Alfenas

Rocha, Miguel Divino da.

Síntese e avaliação farmacológica de novos híbridos moleculares  
3-O-peperidinil-N-benzil-acilidrazônicos, planejados como candidatos a  
fármacos simbióticos: antiocolinesterásicos e anti-inflamatórios / Miguel  
Divino da Rocha. -- Alfenas/MG, 2010.  
117 f.

Orientador: Cláudio Viegas Jr.  
Dissertação (Mestrado em Química) - Universidade Federal de Alfenas,  
Alfenas, MG, 2010.  
Bibliografia.

1. Química Farmacêutica. 2. Fármacos. 3. Doença de Alzheimer .  
4. Anti-Inflamatórios. 5. Inibidores da Colinesterase. I. Viegas Jr., Cláudio .  
II. Título.

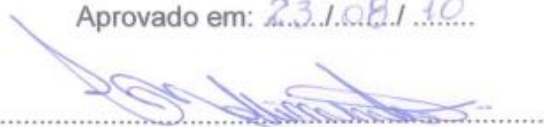
CDD-547

Miguel Divino da Rocha

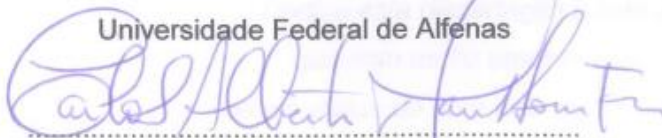
***Síntese e avaliação farmacológica de novos híbridos moleculares  
3-O-piperidinil-N-benzil-acilidrazônicos, planejados como  
candidatos a fármacos simbióticos: anticolinesterásicos e anti-  
inflamatórios.***

A banca examinadora abaixo assinada  
aprova o manuscrito apresentado como parte  
dos requisitos para a obtenção do título de Mestre  
em Química pela Universidade Federal de Alfenas.  
Área de concentração: Química Orgânica.

Aprovado em: 23.1.08.1.10.



Prof. Dr. Carlos Giovani de Oliveira Nascimento (Titular)  
Universidade Federal de Alfenas



Prof. Dr. Carlos Alberto Mansour Fraga (Titular)  
Universidade Federal do Rio de Janeiro

*Dedico esta dissertação à minha querida Mãe,  
que com muito amor me criou e me ensinou  
os princípios de uma vida digna, incentivando-me  
a sempre correr atrás daquilo que desejei.  
Se não fosse ela, eu não estaria aqui.  
Mãe, Obrigado pela força e compreensão.*

## AGRADECIMENTOS

- 1. A Deus por não deixar que nada me falte, por me conduzir por lugares tranquilos, por restaurar minhas forças e por me abençoar com o dom da inteligência.*
- 2. Em especial ao meu Orientador, Professor Dr. Cláudio Viegas Jr., pelo apoio e compreensão nos momentos difíceis. Sua confiança e orientação me fizeram crescer tanto pessoalmente como profissionalmente e muito Obrigado pela paciência.*
- 3. Aos professores do Curso de Pós Graduação em química, pelo conhecimento adquirido, dedicação e exemplo a serem seguidos, e em especial aos professores do LFQM pela acolhida, confiança e amizade.*
- 4. A aluna de Iniciação Científica: Maísa Rosa Castelli, pelo apoio durante os trabalhos laboratoriais.*
- 5. A todos os companheiros de trabalho do LFQM, obrigado pela troca de experiência, pela amizade, pela cooperação e pelo ambiente tranquilo de trabalho.*
- 6. Ao curso de Pós Graduação em Química da Unifal por permitir o desenvolvimento deste trabalho. A CAPES pela concessão da Bolsa de Mestrado e as Instituições colaboradoras.*
- 7. Enfim agradeço a todos que colaboraram para a concretização deste trabalho.*

*Uns são Professores,  
Alguns são Mestres,  
Outros são Doutores,  
Poucos são amigos.  
Aos primeiros escuta-se,  
Aos últimos admira-se.*

## RESUMO

O aumento da qualidade e da expectativa média de vida observados nas últimas décadas vem tornando doenças associadas à longevidade como a Doença de Alzheimer (DA) um grande desafio científico e de saúde pública. No Brasil, estima-se que 1,2 milhões de pessoas sejam portadoras de DA, uma patologia crônica, progressiva, e sem cura até o momento. Esta doença é caracterizada por diminuição progressiva da memória e da capacidade cognitiva, da degradação de neurônios colinérgicos em muitas áreas do SNC, com dramática redução de neurotransmissores, entre os quais a acetilcolina é o mais importante. Além disso, inúmeros estudos apontam para uma importante contribuição do processo neuro-inflamatório no avanço da neurodegeneração. A busca por novas entidades químicas capazes de interferir no avanço da DA, inibindo a atividade da enzima AChE, podendo ainda atuar em outras vias terapêuticas, levou ao planejamento de uma nova série de híbridos moleculares simbióticos: anticolinesterásicos e anti-inflamatórios, desenhados por hibridização molecular entre as estruturas da rivastigmina, do donepezil e acilidrazonas anti-inflamatórias. A síntese de uma nova série de compostos híbridos (**29**) foi realizada a partir do 4-carbóxi-benzaldeído (**30**), que resultou em 21 novas moléculas que se diferenciam na substituição do grupo -OH na posição 3 do núcleo piperidínico e na subunidade benzílica terminal ligada ao espaçador acilidrazônico do esqueleto básico de **29**. A avaliação farmacológica desta série revelou importantes propriedades anti-inflamatorias das substâncias **LFQM-54 (36b)**, **LFQM-55 (36a)**, **LFQM-65 (36e)**, **LFQM-67 (36l)** e **LFQM-69 (29a)**, dentre as quais **LFQM-67**, **LFQM-69** e **LFQM-65**, foram as mais ativas. A avaliação da atividade inibitória de acetilcolinesterase foi indicativo que os derivados acilidrazônicos hidroxilados na subunidade piperidínica apresentaram maior atividade inibitória da enzima, variando de 65 a 91%, com  $IC_{50}$  entre 3,02 e 30,54  $\mu$ M. Destes, **LFQM-57** foi a mais potente da série, sendo que **LFQM-67** foi uma das substâncias com maior potência anti-inflamatoria e a segunda mais potente na inibição da AChE, seguido de **LFQM-55**. Por outro lado, **LFQM-69**, que teve a posição 3-piperidínica carbamoilada, foi extremamente potente no modelo inflamatório, mas sem atividade anticolinesterásica relevante. Estes resultados sugerem que a subunidade piperidínica com um grupamento hidroxila livre na posição C-3 é fundamental farmacoforicamente para a atividade dupla anti-inflamatória e anticolinesterásica. Além disso, os derivados **LFQM-74**, **LFQM-75** e **LFQM-88**, que se mostraram potentes inibidores de AChE, ainda não foram avaliados em modelos de inflamação, podendo contribuir para a identificação de outros candidatos com perfil duplo inovadores.



## ABSTRACT

The increasing in life quality expectancy observed in recent decades, has focused great attention over diseases associated with longevity, like Alzheimer's disease (AD) that represent great scientific challenges to science and public health programs. In Brazil, it is estimated that 1.2 million people are suffering from AD, a chronic, progressive, and incurable disease until now. This pathology is characterized by progressive loss in memory and cognitive abilities, with death of cholinergic neurons in many areas of the CNS, accompanying by a dramatic reduction in release of neurotransmitters, particularly acetylcholine, the most important of them associated to AD's physiopathology. In addition, numerous studies have pointed an important contribution of neuro-inflammatory process in the advance of neurodegeneration and neuronal loss. Nowadays there are only four drugs commercially available for AD treatment and the search for new chemical entities capable to diminish or blockade the progress of AD is still a great challenge to medicinal chemists. As a part of an ongoing research program, we decide to investigate the design of a new series of acetylcholinesterase (AChE) inhibitors that could also exert anti-inflammatory properties, by an innovative dual or symbiotic pharmacological profile. So, a novel structural pattern was drawn by molecular hybridization of two commercial acetyl cholinesterase inhibitors, rivastigmine and donepezil, including an acylhydrazone subunit, that was expected to introduce anti-inflammatory properties. The synthetic route of the new series of hybrid compounds (**29**) was planned from 4-carboxy-benzaldehyde (**30**), as a starting material, which resulted in 21 new molecules, differing in the substituent at C-3 position of the piperidine ring and at the benzylic subunit connected to the acylhydrazone spacer of the basic skeleton **29**. Pharmacological evaluation of these series showed significant anti-inflammatory properties of compounds **LFQM-54**, **LFQM-55**, **LFQM-65**, **LFQM-67** and **LFQM-69**, among which **LFQM-67**, **LFQM-69** and **LFQM-65** were the most active. The *in vitro* evaluation of inhibitory activity of acetylcholinesterase disclosed that acylhydrazones derivatives with a hydroxyl group in the piperidine subunit showed the higher inhibitory activity AChE, ranging 65-91%, with IC<sub>50</sub> ranging from 3.02 to 30.54 μM. Among these, **LFQM-57** was the most potent, and **LFQM-67** was also one of the compounds with higher anti-inflammatory potency and the second most potent in AChE inhibition, followed by **LFQM-55**. Moreover, **LFQM-69**, with an ethylcarbamoyl substituent at the piperidine moiety, was extremely powerful in the inflammatory model, without significant anti-cholinesterase activity. These findings suggest that the piperidine subunit with a free hydroxyl group at position C-3 is an essential pharmacophoric group for dual anti-inflammatory and acetylcholinesterase inhibitory profile. Moreover, compounds **LFQM-74**, **LFQM-75** and **LFQM--88**, which showed potent inhibitors of AChE, were not still evaluated in inflammatory models and may additional contribute to the identification of other innovative drug prototype candidates.

## SUMÁRIO

1. Introdução .....	1
1.1. Inibidores de AChE e a importância dos carbamatos no planejamento de novos anticolinesterásicos .....	7
1.2. Processo inflamatório na DA .....	13
1.3. Tratamento com fármacos antiinflamatórios .....	13
2. Justificativa .....	16
3. Objetivos .....	17
4. Análise retrossintética e planejamento sintético .....	19
5. Resultados e Discussão .....	21
6. Avaliação farmacológica .....	86
6.1. Ensaio de atividade de acetilcolinesterase .....	86
6.2. Avaliação da atividade anti-inflamatória .....	88
6.2..1. Ensaio de hiperalgesia induzida por formalina .....	88
6.2..2. Ensaio de peritonite induzida por LPS .....	89
6.2..3. Ensaio de edema em pata de camundongo induzido por carragenina.....	90
7. Parte experimental .....	94
7.1. Química .....	94
7.1..1. Generalidades .....	94
7.1..2. Aminoação redutiva entre o 4-carboxibenzaldeído ( <b>30</b> ) e a 3-hidroxipiperidina ( <b>31</b> ) .....	95
7.1..3. Esterificação do 4-carboxibenzaldeído ( <b>30</b> ) .....	95
7.1..4. Aminoação redutiva entre o 4-formilbenzoato de metila ( <b>38</b> ) e 3-hidroxipiperidina ( <b>31</b> ) .....	97
7.1..5. Preparação da hidrazida <b>34</b> .....	97
7.1..6. Procedimento geral para obtenção das acilidrazonas <b>36a-n</b> .....	98
7.1..7. . Procedimento para obtenção da acilidrazona <b>36h</b> .....	101
7.1..8. Procedimento para obtenção das acilidrazonas acetiladas <b>29a-j</b> .....	102
7.1..9. Procedimento para obtenção das acilidrazonas acetilada <b>29h</b> .....	104
7.1..10. Procedimento para obtenção das acilidrazonas carbamoiladas <b>39a e c</b> .....	105

7.2. Avaliação farmacológica .....	106
7.2..1. Avaliação da atividade acetilcolinesterásica .....	106
7.2..2. Avaliação da atividade anti-inflamatória .....	107
7.2..2.1. Animais .....	107
7.2..2.2. Ensaio de hiperalgesia induzida por formalina .....	107
7.2..2.3. Ensaio de peritonite induzida por LPS .....	108
7.2..2.4. Ensaio de edema em pata de camundongo induzido por carragenina.....	108
7.2..2.5. Análise estatística .....	108
8. Conclusões .....	109
9. Referências .....	111

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Visão geral da AChE, seus sítios aniônico, periférico e dos resíduos de aminoácidos que constituem a tríade catalítica, .....	4
<b>Figura 2.</b> Fármacos comerciais para tratamento da DA e fisostigmina ( <b>6</b> ) .....	4
<b>Figura 3.</b> Neurônios pré- e pós-sinápticos, onde ocorrem os receptores nicotínicos e muscarínicos de ACh, biossíntese de ACh, fenda sináptica e sítios de intervenção por inibidores de AChE .....	5
<b>Figura 4.</b> Estrutura 3D da AChE, analisada por difração de raios-X, enfatizando a tríade catalítica em vermelho, Trp84 no sítio ativo, Trp279 no sítio periférico anionico e Phe330 no gargalo de acesso em azul (código de acesso pdb 1EA5) .....	7
<b>Figura 5.</b> Mecanismo de ação da rivastigmina e sobre AChE .....	8
<b>Figura 6.</b> Estrutura da rivastigmina e dos compostos sintetizados .....	9
<b>Figura 7.</b> Carbamatos derivados de 4-aminopiridina como potenciais IACHEs e IBuChEs .....	10
<b>Figura 8.</b> Carbamatos derivados da fenotiazina como potenciais IACHEs e IBuChEs.....	11
<b>Figura 9.</b> Compostos obtidos por hibridização molecular como potenciais IACHEs e IBuChEs .....	12
<b>Figura 10.</b> Planejamento de uma nova série de híbridos moleculares simbióticos, anticolinesterásicos e antiinflamatórios .....	18
<b>Figura 11.</b> Análise retrossintética dos compostos-alvo <b>29</b> .....	19
<b>Figura 12.</b> Rota sintética proposta para os compostos-alvo 29a-29d .....	20
<b>Figura 13:</b> Interações conformacionais e estabilidade relativa em sistemas piperidínicos e o exemplo do intermediário <b>33</b> .....	31
<b>Figura 14:</b> Efeito das acilidrazonas (100µmol/Kg) no ensaio de inibição da AChE.....	86
<b>Figura 15:</b> Concentração dos compostos necessaria para reduzir a atividade da AChE em 50% (IC50) .....	88

**Figura 16:** Efeito das substancias-teste **LFQM-54, LFQM-55, LFQM-65, LFQM-67 e LFQM-69** (100 µmol/kg), indometacina (100 µmol/kg) e morfina (39 µmol/kg) sobre as fases neurogênica e inflamatória do teste de formalina ..... 89

**Figura 17:** Efeito das acilidrazonas **LFQM-54, LFQM-55, LFQM-65, LFQM-67 e LFQM-69** (100 µmol/kg, via i.p.), no ensaio de peritonite induzida por LPS em camundongos. Teste de ANOVA, seguido pós-teste de Newman-Kells (\*\*p<0,05)..... 90

**Figura 18:** Efeito das acilidrazonas **LFQM-54, LFQM-55, LFQM-65, LFQM-67 e LFQM-69** (100 µmol/kg, via i.p.), no ensaio de edema de pata de camundongo induzido por carragenina. Teste de ANOVA, seguido pós-teste de Newman-Kells (\*\*p<0,05) ..... 91

## LISTA DE ESPECTROS

<b>Espectro 1.</b> Espectro no IV (KBr) do produto de acilação do 4-carboxibenzaldeído (30) com SOCl <sub>2</sub> , seguida de metanólise .....	22
<b>Espectro 2.</b> Espectro no IV (KBr) do 4-formilbenzoato de metila (38), produto de esterificação com K <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> e iodometano .....	24
<b>Espectro 3.</b> Espectro de RMN de <sup>1</sup> H (200 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) do 4-formilbenzoato de metila 38 .....	25
<b>Espectro 4.</b> Espectro de RMN de <sup>13</sup> C (50 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) do 4-formilbenzoato de metila 38 .....	26
<b>Espectro 5.</b> Espectro no IV (KBr) do 4[(3-hidroxipiperididin-1-il)metil]benzoato de metila (33) .....	28
<b>Espectro 6.</b> Espectro de RMN de <sup>1</sup> H (200 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) do 4[(3-hidroxipiperididin-1-il)metil]benzoato de metila (33) .....	29
<b>Espectro 7.</b> Espectro de RMN de <sup>13</sup> C (50 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) do 4[(3-hidroxipiperididin-1-il)metil]benzoato de metila (33) .....	30
<b>Espectro 8.</b> Espectro no IV (KBr) da 4-[(3-hidroxipiperididin-1-il)metil]benzoidrazina (34) .....	32
<b>Espectro 9:</b> Espectro de RMN de <sup>1</sup> H (400 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) da 4-[(3-hidroxipiperididin-1-il)metil]benzoidrazina (34) .....	33
<b>Espectro 10:</b> Espectro de RMN de <sup>13</sup> C (50 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) da 4-[(3-hidroxipiperididin-1-il)metil]benzoidrazina (34) .....	34
<b>Espectro 11.</b> Espectro no IV (KBr) do produto <i>N'</i> -(4-bromobenzilideno)-4-[(3-hidroxipiperididin-1-il)metil]benzoidrazina (36a) .....	36
<b>Espectro 12:</b> Espectro de RMN de <sup>1</sup> H (400 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) do produto <i>N'</i> -(4-bromobenzilideno)-4-[(3-hidroxipiperididin-1-il)metil]benzoidrazina (36a) .....	37
<b>Espectro 13:</b> Espectro de RMN de <sup>13</sup> C (100 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) do produto <i>N'</i> -(4-bromobenzilideno)-4-[(3-hidroxipiperididin-1-il)metil]benzoidrazina (36a) .....	38
<b>Espectro 14.</b> Espectro no IV (KBr) do produto <i>N'</i> -benzilideno-4-((3-hidroxipiperididin-1-il)metil)benzoidrazina (36b) .....	41
<b>Espectro 15:</b> Espectro de RMN de <sup>1</sup> H (CD <sub>3</sub> OD, 400 MHz) do produto <i>N'</i> -benzilideno-4-((3-hidroxipiperididin-1-il)metil)benzoidrazina (36b) .....	42

<b>Espectro 16.</b> Espectro no IV (KBr) do produto <i>N'</i> -(4-clorobenzilideno)-4-((3-hidroxipiperidin-1-il)metil)benzoilidrazina ( <b>36c</b> ) .....	43
<b>Espectro 17:</b> Espectro de RMN de <sup>1</sup> H (400 MHz, MeOH) do produto <i>N'</i> -(4-clorobenzilideno)-4-((3-hidroxipiperidin-1-il)metil)benzoilidrazina ( <b>36c</b> ) .....	44
<b>Espectro 18:</b> Espectro no IV (KBr) do produto <i>N'</i> -(4-fluorobenzilideno)-4-((3-hidroxipiperidin-1-i)metil)benzoilidrazina ( <b>36d</b> ) .....	45
<b>Espectro 19:</b> Espectro de RMN de <sup>1</sup> H (400 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) do produto <i>N'</i> -(4-fluorobenzilideno)-4-((3-hidroxipiperidin-1-i)metil)benzoilidrazina ( <b>36d</b> ) .....	46
<b>Espectro 20:</b> Espectro de RMN de <sup>13</sup> C (100 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) do produto <i>N'</i> -(4-fluorobenzilideno)-4-((3-hidroxipiperidin-1-i)metil)benzoilidrazina ( <b>36d</b> ) .....	47
<b>Espectro 21:</b> Espectro no IV (KBr) do produto <i>N'</i> -(4-metoxibenzilideno)-4-((3-hidroxipiperidin-1-il)metil)benzoilidrazina ( <b>36e</b> ) .....	48
<b>Espectro 22:</b> Espectro de RMN (400MHz, CD <sub>3</sub> OD) do produto <i>N'</i> -(4-metoxibenzilideno)-4-((3-hidroxipiperidin-1-il)metil)benzoilidrazina ( <b>36e</b> ) .....	49
<b>Espectro 23:</b> Espectro no IV (KBr) do <i>N'</i> -(4-hidroxibenzilideno)-4-((3-hidroxipiperidin-1-il)metil)benzoilidrazina ( <b>36f</b> ) .....	50
<b>Espectro 24:</b> Espectro no IV (KBr) do produto <i>N'</i> -(4-nitrobenzilideno)-4-((3-hidroxipiperidin-1-il)metil)benzoilidrazina ( <b>36g</b> ) .....	51
<b>Espectro 25:</b> Espectro de RMN de <sup>1</sup> H (400 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) do produto <i>N'</i> -(4-nitrobenzilideno)-4-((3-hidroxipiperidin-1-il)metil)benzoilidrazina ( <b>36g</b> ) .....	52
<b>Espectro 26:</b> Espectro de RMN de <sup>13</sup> C (100 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) do produto <i>N'</i> -(4-nitrobenzilideno)-4-((3-hidroxipiperidin-1-il)metil)benzoilidrazina ( <b>36g</b> ) .....	53
<b>Espectro 27:</b> Espectro no IV (KBr) do produto <i>N'</i> -(4-(metiltio)benzilideno)-4-((3-hidroxipiperidin-1-il)metil)benzoilidrazina ( <b>36h</b> ) .....	54
<b>Espectro 28:</b> Espectro de RMN <sup>1</sup> H (400MHz, CD <sub>3</sub> OD) do <i>N'</i> -(4-(metiltio)benzilideno)-4-((3-hidroxipiperidin-1-il)metil)benzoilidrazina ( <b>36h</b> ) .....	55
<b>Espectro 29.</b> Espectro no IV (KBr) do produto <i>N'</i> -(3-metoxibenzilideno)-4-((3-hidroxipiperidin-1-il)metil)benzoilidrazina ( <b>36i</b> ) .....	56
<b>Espectro 30:</b> Espectro no IV(KBr) do produto <i>N'</i> -(4-(pirrolidin-1-il)benzilidene)-4-((3-hidroxipiperidin-1-il)metil)benzoilidrazina ( <b>36j</b> ) .....	57
<b>Espectro 31:</b> Espectro no IV(KBr) do produto <i>N'</i> -(4-(piperidin-1-il)benzilidene)-4-((3-hidroxipiperidin-1-il)metil)benzoilidrazina ( <b>36l</b> ) .....	58

<b>Espectro 32:</b> Espectro de RMN de $^1\text{H}$ (400MHz, $\text{CDCl}_3$ ) do produto <i>N'</i> -(4-(piperidin-1-il)benzilideno)-4-((3-hidroxipiperidin-1-il)metil)benzoilidrazina ( <b>36l</b> ) .....	59
<b>Espectro 33:</b> Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ (100 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) de <i>N'</i> -(4-(piperidin-1-il)benzilideno)-4-((3-hidroxipiperidin-1-il)metil)benzoilidrazina ( <b>36l</b> ) .....	60
<b>Espectro 34:</b> Espectro no IV(KBr) do produto <i>N'</i> -(4-morfolinobenzilidene)-4-((3-hidroxipiperidin-1-il)metil)benzoilidrazina ( <b>36m</b> ) .....	61
<b>Espectro 35:</b> Espectro no IV (KBr) do produto <i>N'</i> -(4-amino-benzilideno)-4-((3-hidroxipiperidin-1-il)metil)benzoilidrazina ( <b>36n</b> ) .....	62
<b>Espectro 36:</b> Espectro de RMN de $^1\text{H}$ (400 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) do produto <i>N'</i> -(4-aminobenzilideno)-4-((3-hidroxipiperidin-1-il)metil)benzoilidrazina ( <b>36n</b> ) .....	63
<b>Espectro 37:</b> Espectro no IV (KBr) do produto acetato de 1-(4-(4-bromobenzilidenoaminocarbamoil)benzil)piperidin-3-ila ( <b>29a</b> ) .....	64
<b>Espectro 38:</b> Espectro de RMN de $^1\text{H}$ (200 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) do produto acetato de 1-(4-(4-bromobenzilidenoaminocarbamoil)benzil)piperidin-3-ila ( <b>29a</b> ) .....	65
<b>Espectro 39:</b> Espectro no IV (KBr) do produto acetato de 1-(4-(benzilidenoaminocarbamoil)benzil)piperidin-3-ila ( <b>29b</b> ) .....	68
<b>Espectro 40:</b> Espectro de RMN de $^1\text{H}$ (400MHz, $\text{CDCl}_3$ ) do produto acetato de 1-(4-(benzilidenoami-nocarbamoil)benzil)piperidin-3-ila ( <b>29b</b> ) .....	69
<b>Espectro 41:</b> Espectro no IV (KBr) do produto acetato de 1-(4-(4-clorobenzilidenoaminocarbamoil)benzil)piperidin-3-ila ( <b>29c</b> ) .....	70
<b>Espectro 42:</b> Espectro de RMN de $^1\text{H}$ (400 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) do produto acetato de 1-(4-(4-clorobenzil-idenoaminocarbamoil)benzil)piperidin-3-ila ( <b>29c</b> ) .....	71
<b>Espectro 43:</b> Espectro no IV (KBr) do produto acetato de 1-(4-(4-fluorobenzilidenoaminocarbamoil)benzil)piperidin-3-ila ( <b>29d</b> ) .....	72
<b>Espectro 44:</b> Espectro de RMN de $^1\text{H}$ (400MHz, $\text{CDCl}_3$ ) do produto acetato de 1-(4-(4-fluorobenzi-lidenoaminocarbamoil)benzil)piperidin-3-ila ( <b>29d</b> ) .....	73
<b>Espectro 45:</b> Espectro no IV (KBr) do produto acetato de 1-(4-(4-metoxibenzilidenoaminocarbamoil)benzil)piperidin-3-ila ( <b>29e</b> ) .....	74



<b>Espectro 46:</b> Espectro de RMN de $^1\text{H}$ (400MHz, $\text{CDCl}_3$ ) do produto acetato de 1-(4-(4-metoxibenzil-idenoaminocarbamoil)benzil)piperidin-3-ila ( <b>29e</b> ) .....	75
<b>Espectro 47:</b> Espectro no IV (KBr) do produto acetato de 1-(4-(4-acetobenzilidenoaminocarbamoil)benzil)piperidin-3-ila ( <b>29f</b> ) .....	76
<b>Espectro 48:</b> Espectro de RMN de $^1\text{H}$ (400MHz, $\text{CDCl}_3$ ) do acetato de 1-(4-(4-acetobenzil-idenoaminocarbamoil)benzil)piperidin-3-ila ( <b>29f</b> ) .....	77
<b>Espectro 49:</b> Espectro no IV (KBr) do produto acetato de 1-(4-(4-nitrobenzilidenoaminocarbamoil)benzil)piperidin-3-ila ( <b>29g</b> ) .....	78
<b>Espectro 50:</b> Espectro de RMN de $^1\text{H}$ (400 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) do produto acetato de 1-(4-(4-nitrobenzil-idenoaminocarbamoil)benzil)piperidin-3-ila ( <b>29g</b> ) .....	79
<b>Espectro 51:</b> Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ (100 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) do produto acetato de 1-(4-(4-nitrobenzil-idenoaminocarbamoil)benzil)piperidin-3-ila ( <b>29g</b> ) .....	80
<b>Espectro 52:</b> Espectro no IV (KBr) do produto acetato de 1-(4-(3-metoxibenzilidenoaminocarbamoil)benzil)piperidin-3-ila ( <b>29i</b> ) .....	81
<b>Espectro 53:</b> Espectro no IV (KBr) do produto: acetato de 1-(4-(4-aminobenzilidenoaminocarbamoil)benzil)piperidin-3-ila ( <b>29n</b> ) .....	82
<b>Espectro 54:</b> Espectro de RMN de $^1\text{H}$ (400 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) do produto acetato de 1-(4-(4-aminobenzilidenoaminocarbamoil)benzil)piperidin-3-ila ( <b>29n</b> ) .....	83
<b>Espectro 55:</b> Espectro no IV (KBr) do produto 1-(4-(4-bromobenzilidenoaminocarbamoil)benzil)piperidin-3-il carbamato de etila .....	84
<b>Espectro 56:</b> Espectro no IV (KBr) do produto 1-(4-(4-clorobenzilidenoaminocarbamoil)benzil)piperidin-3-il carbamato de etila ( <b>39c</b> ) .....	85

## Esquemas

<b>Esquema 1:</b> Reação de aminação redutiva entre o 4-carboxibenzaldeído ( <b>30</b> ) e a 3-hidroxipiperidina ( <b>31</b> ) .....	21
<b>Esquema 2:</b> Reação de conversão 4-carboxibenzaldeído ( <b>30</b> ) em cloreto de acila, seguida de metanólise .....	21
<b>Esquema 3:</b> Reação de esterificação do 4-carboxibenzaldeído ( <b>30</b> ) com iodometano.....	23
<b>Esquema 4:</b> Reação de aminação redutiva entre o aldeído ( <b>38</b> ) e a 3-hidroxipiperidina ( <b>31</b> ) .....	26
<b>Esquema 5:</b> Reação do éster <b>33</b> com monohidrato de hidrazina .....	31
<b>Esquema 6:</b> Reação de acoplamento entre a hidrazida <b>34</b> e 4-bromobenzaldeído ( <b>35a</b> ) .....	35
<b>Esquema 7:</b> Reação de acoplamento entre a hidrazida <b>34</b> e aldeídos funcionalizados <b>35b – j</b> .....	39
<b>Esquema 8:</b> Reação de redução da acilidrazona <b>36g</b> .....	62
<b>Esquema ..9:</b> Reação de acetilação das acilidrazonas <b>36a-j</b> .....	63
<b>Esquema 10:</b> Reação de carbamoilação das acilidrazonas <b>36a e c</b> .....	84

## Tabelas

<b>Tabela 1:</b> dados de RMN de $^1\text{H}$ (200 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) e $^{13}\text{C}$ (50 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) do intermediário <b>38</b> .....	25
<b>Tabela 2:</b> dados de RMN de $^1\text{H}$ (200 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) e $^{13}\text{C}$ (50 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) do 4[(3-hidroxipiperidin-1-il)metil]benzoato de metila <b>33</b> .....	29
<b>Tabela 3:</b> dados de RMN de $^1\text{H}$ (400 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) e $^{13}\text{C}$ (100 MHz, $\text{CDCl}_3$ )da 4-[(3-hidroxipiperidin-1-il)metil]benzohidrazida <b>34</b> .....	35
<b>Tabela 4:</b> dados de RMN de $^1\text{H}$ (400 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) e $^{13}\text{C}$ (400 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) da acilidrazona <b>36a</b> .....	38
<b>Tabela 5:</b> Acilidrazonas <b>36b-n</b> , seus respectivos rendimentos e ponto de fusão ....	39
<b>Tabela 6:</b> dados de RMN de $^1\text{H}$ [ $\delta$ , m, j(Hz)] (400MHz,) das acilidrazonas <b>36b-n</b> .....	40
<b>Tabela 7:</b> Acilidrazonas <b>29a-g, 29i e 29n</b> , seus respectivos rendimentos e ponto de fusão .....	66
<b>Tabela 8:</b> dados de RMN de $^1\text{H}$ [ $\delta$ , m, j(Hz)] (400MHz, $\text{CDCl}_3$ ou $\text{CD}_3\text{OD}$ ) das acilidrazonas acetiladas sintetizadas <b>29a-g, 29i e 29n</b> .....	67
<b>Tabela 9:</b> Efeito das acilidrazonas (100 $\mu\text{mol/Kg}$ ) no ensaio de inibição da AChE e Concentração necessária para reduzir a atividade da AChE em 50% (IC50) .....	87
<b>Tabela 10:</b> Concentração necessária para reduzir a atividade inflamatória em 50% (IC50) .....	92

## Abreviaturas

ACh	.....	acetilcolina
AChE	.....	acetilcolinesterase
AINEs	.....	anti-inflamatorios não esteroidais
APOE	.....	Apolipoproteína E
APP	.....	proteína precursora amilóide
BuChE	.....	butirilcolinesterase
COX	.....	ciclooxigenase
DA	.....	doença de Alzheimer
FDA	.....	Food and drug administration
IACHÉ	.....	inibidores de acetilcolinesterase
IV	.....	Infravermelho
NEQs	.....	novas entidades químicas
NMDA	.....	<i>N</i> -metil- <i>D</i> -aspartato
PPARs	.....	<i>Peroxisome Proliferator-Activated Receptors</i>
RMN	.....	Ressonancia Magnética Nuclear
SNC	.....	Sistema Nervoso Central
TNF- $\alpha$	.....	fator de necrose tumoral alfa
$\beta$ -A	.....	$\beta$ -amilóide
QSAR	.....	<i>Quantitative Structure Activity Relationship</i>

## 1. Introdução

A doença de Alzheimer (DA) foi descrita pela primeira vez por Alois Alzheimer em 1907, numa época em que as pessoas acima de 60 anos representavam apenas 3% da população americana.<sup>1,2</sup> A DA é caracterizada por diminuição progressiva de memória e declínio severo de cognição, associados com degradação de neurônios colinérgicos em muitas áreas do sistema nervoso central (SNC) e com dramática redução de neurotransmissores, entre os quais a acetilcolina é o mais importante<sup>3</sup> e leva à alterações comportamentais, normalmente evoluindo para demência.<sup>4</sup>

A DA manifesta-se de duas formas: uma precoce e uma tardia. A DA precoce ocorre antes dos 60 anos e evolui rapidamente. Está relacionada com alterações genéticas que podem se refletir em gerações sucessivas, por mutações autossômicas dominantes associadas a três genes alocados no cromossomo 21: presilinas 1 e 2 e apolipoproteína E (APOE  $\epsilon_4$ ).<sup>1,5,6</sup>

A incidência da DA tardia tem sido a causa de demência mais comum em pacientes após os 65 anos. Nestes casos, ocorre um aumento da predisposição para a formação de placas neuríticas e emaranhados neurofibrilares no tecido cerebral com perdas de neurônios colinérgicos, dentre outras alterações do SNC. A gênese da doença ainda não está completamente esclarecida, entretanto, sugere-se que fatores ambientais e fenômenos epigenéticos possam contribuir para a manifestação tardia. Por outro lado, também pode ocorrer relação com defeitos genéticos múltiplos, causados por mutações ou susceptibilidade do genoma humano.<sup>7</sup>

A evolução da doença passa por três fases sintomatológicas distintas. Inicialmente ocorrem lapsos esporádicos de memória, esquecimento e confusão de rotinas e nomes de familiares, perda de interesse por atividades antes prazerosas e dificuldade de organizar pensamentos e compreender novas informações e rotinas. Numa segunda fase, o paciente passa a demonstrar esquecimento de detalhes de eventos diários e de sua vida passada, perdendo consciência de seu estado, apresentando dificuldades para vestir-se, podendo ter alucinações, depressão, agitação e comportamento violento. Finalmente, depende de cuidados permanentes,

não consegue se comunicar, não reconhece os familiares e torna-se incapaz de realizar atividades básicas como alimentar-se e com sua higiene pessoal.<sup>5</sup>

Estima-se que no Brasil cerca de 1,2 milhões de pessoas são portadoras da doença de Alzheimer; nos Estados Unidos são cerca de 4,5 milhões e no mundo são cerca de 18 milhões. Com o aumento da expectativa de vida mundial estes números poderão atingir 34 milhões de pessoas, sendo 2/3 em países em desenvolvimento. Estima-se que 10 a 15% das pessoas a partir dos 65 anos e, praticamente, a metade das pessoas a partir dos 85 anos apresentarão a doença, nos próximos 20 anos.<sup>8</sup>

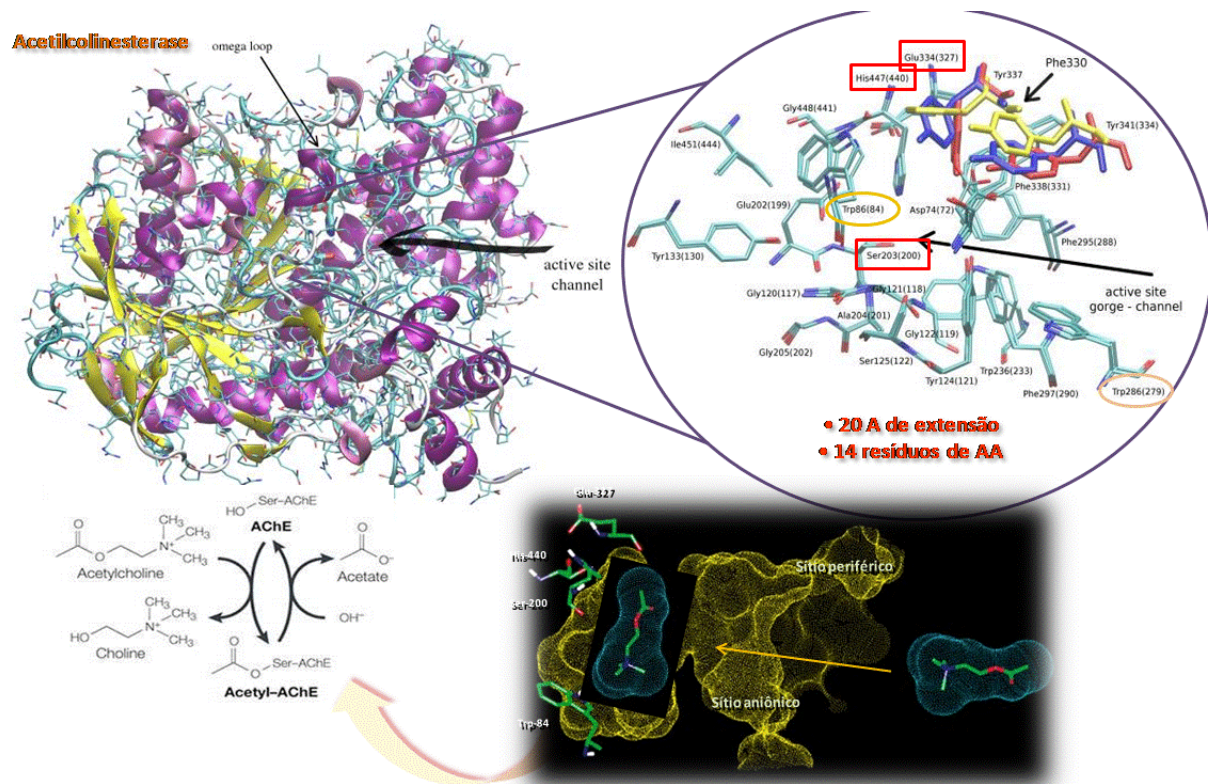
A DA está relacionada com o envelhecimento cerebral e perda localizada de neurônios, principalmente do hipocampo e do proencéfalo basal.<sup>9</sup> Histopatologicamente, é caracterizada pela presença de numerosas placas neuríticas e emaranhados neurofibrilares no cérebro, que acarretam em perda massiva de neurônios.<sup>10</sup> As placas neuríticas são constituídas principalmente pelo depósito de peptídeo  $\beta$ -amiloide ( $\beta$ A),<sup>11,12</sup> que são produzidos pela ação de endoproteases (secretases) da membrana glicoprotéica, a partir da proteína precursora amiloide (APP), codificada por um gene localizado no cromossomo 21.<sup>13,14,15</sup> Fragmentos deste peptídeo formam agregados fibrilares não covalentes característicos tanto *in vivo* quanto *in vitro*, que se depositam no tecido neuronal e estão relacionados à neurotoxicidade da DA.<sup>16,17,18</sup>

As secretases são divididas em  $\alpha$ ,  $\beta$  e  $\gamma$ -secretases e são responsáveis pelo processo proteolítico da APP, levando à formação de diferentes peptídeos  $\beta$ A. As  $\alpha$ -secretases clivam APP em domínio  $\beta$ A (entre os resíduos 16 e 17 da seqüência  $\beta$ A), gerando fragmentos extracelulares solúveis conhecidos como sAPP $\alpha$  e constitui a maior rota fisiológica de quebra da APP. Desta forma, a quebra de APP por  $\alpha$ -secretases inibe a formação de peptídeo  $\beta$ A insolúvel. Estudos em culturas de neurônios têm demonstrado que sAPP $\alpha$  promovem a inibição de inflamação de neurônios, adesão célula-substrato e é neuroprotetor contra uma variedade de danos.<sup>19,20</sup> Estudos *in vitro* também indicaram que inibidores da fosfatase, ativadores da proteína quinase C e inibidores da acetilcolinesterase aumentam a clivagem de APP pela  $\alpha$ -secretase, levando a uma menor concentração de substrato disponível para a clivagem nociva pelas  $\beta$  e  $\gamma$  secretases e, conseqüentemente, diminuído a deposição de fragmentos  $\beta$ A.<sup>21,22,23</sup> Os fragmentos  $\beta$ A são liberados logo após a

quebra de APP entre os resíduos de aminoácidos 596/597 e 637-639 pelas  $\beta$  e  $\gamma$ -secretases, respectivamente.<sup>20,24</sup> As  $\gamma$ -secretases podem quebrar APP em quatro posições diferentes, originando peptídeos  $\beta$ A que variam de 39 a 43 resíduos de aminoácidos, sendo o resíduo  $\beta$ A<sub>1-40</sub> em maior quantidade. Resíduos  $\beta$ A<sub>1-42</sub> e  $\beta$ A<sub>1-43</sub> são produzidos em menor quantidade, porém são as espécies mais encontradas em placas cerebrais<sup>25</sup> e estão fortemente relacionados com o desenvolvimento da DA.<sup>24, 26, 27, 28</sup>

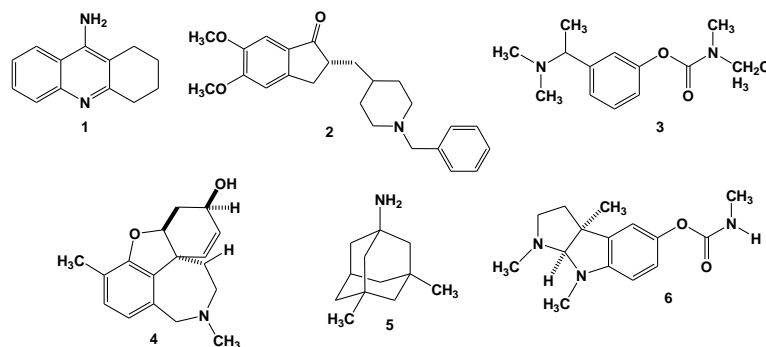
Os emaranhados neurofibrilares são formados principalmente pelo acúmulo da proteína Tau, cuja função é estabilizar os microtúbulos dos axônios, estruturas responsáveis pela formação e manutenção dos contatos interneuronais. Essas funções são alteradas quando a proteína Tau é modificada pela adição anormal de fosfato no processo de fosforilação.<sup>29</sup>

Estudos têm demonstrado que a DA está relacionada com redução nas taxas de acetilcolina (ACh) e outros neurotransmissores como noradrenalina, dopamina, serotonina, glutamato e substância P. Análises de tecidos cerebrais e ensaios farmacológicos evidenciaram uma redução no número de receptores nicotínicos e muscarínicos ( $M_2$ ) da ACh, muitos destes localizados nas terminações colinérgicas pré-sinápticas, preservando os receptores muscarínicos ( $M_1$  e  $M_2$ ) pós-sinápticos.<sup>30</sup> O sítio ativo (Fig.1) da AChE é constituído por uma tríade catalítica (Ser 200, His 440, Glu 327), além de outros resíduos de aminoácidos auxiliares, como o Trp 84, que interage com um grupo quaternário da ACh e o Trp 279, localizado na abertura do gargalo, que dá acesso ao sítio catalítico, os quais estão sendo considerados como sítios de interação adicional no planejamento de novos inibidores de AChE. A inibição direta do sítio ativo impede a ligação da molécula substrato, ou sua hidrólise por ocupação do sítio com uma afinidade alta (a exemplo da tacrina) ou por uma reação irreversível com a serina catalítica (organofosforados e carbamatos).<sup>31</sup>



**Figura 1.** Visão geral da AChE, seus sítios aniônico, periférico e dos resíduos de aminoácidos que constituem a tríade catalítica, adaptado por Claudio Viegas Jr das referências 32 e 33.

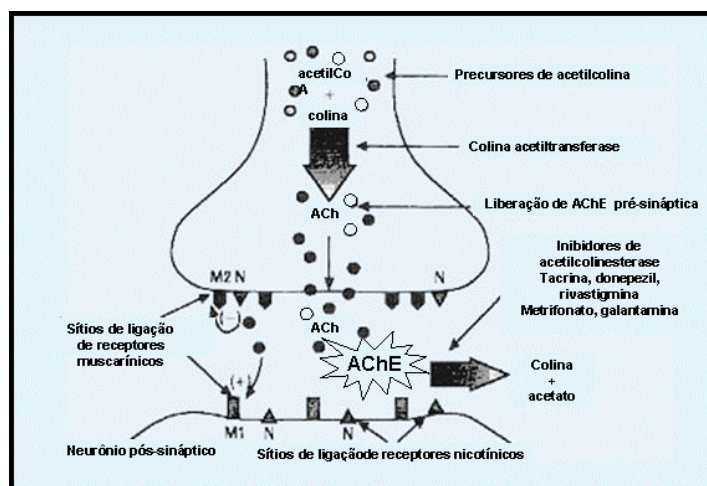
A terapêutica atual baseia-se em três pilares: melhorar a cognição, retardar a evolução e tratar os sintomas e alterações comportamentais. Até o momento, o tratamento da DA tem sido restrito à utilização de fármacos que restabeleçam a função colinérgica, exceto a memantina, atuando, portanto, no alívio dos sintomas da doença e não sobre sua cura efetiva.<sup>2 e 9</sup> Atualmente existem somente cinco fármacos aprovados e disponíveis comercialmente para o tratamento da DA tacrina (Cognex<sup>®</sup>, **1**), donepezil (Aricept<sup>®</sup>, **2**), rivastigmina (Exelon<sup>®</sup>, **3**), galantamina (Reminyl<sup>®</sup>, **4**) e memantina (Namenda<sup>®</sup>, **5**) (**Fig. 2**). Entretanto a tacrina está sendo utilizada com restrições devido a sua toxicidade gástrica e hepática.



**Figura 2.** Fármacos comerciais para tratamento da DA e fisostigmina (6).



Os inibidores de acetilcolinesterase (IACHe) com finalidades terapêuticas são classificados, de acordo com a estrutura e com o mecanismo de ação em: *i*) pseudo-irreversíveis, como a rivastigmina (3), cuja função carbamato esta envolvida na formação de um complexo carbamoilante com resíduo de serina na tríade catalítica da AChE e possuem como protótipo a fisostigmina (6); *ii*) os IACHe reversíveis, caracterizados por ligantes que interagem reversivelmente com a enzima próximo ao sítio catalítico, como é o caso das aminoacridinas (p.e. 1), *n*-benzilpiperidinas (p.e. 2) e alguns alcalóides (p.e. 4).<sup>34</sup> A tacrina (1) e o donepezil (2), bastante hidrofóbicos, atravessam facilmente a barreira hematoencefálica, inibindo a AChE no SNC. A alta afinidade pela AChE e o caráter mais lipofílico são atributos adicionais que garantem uma ação mais prolongada.<sup>35</sup>



**Figura 3.** Neurônios pré- e pós-sinápticos, onde ocorrem os receptores nicotínicos e muscarínicos de ACh, biossíntese de ACh, fenda sináptica e sítios de intervenção por inibidores de AChE. Adaptado da Ref. 36.

A tacrina (1) é um inibidor central da AChE, efetivo em pacientes com DA de intensidade leve a moderada. Apesar de ter sido o primeiro fármaco a ser utilizado, seu uso foi restrito devido aos sérios efeitos hepatotóxicos observados, limitando-se a pacientes que não respondem à nova geração de anticolinesterásicos. A galantamina (4), um produto natural, é um inibidor da AChE capaz de atuar sobre os receptores nicotínicos e tem sido bastante estudada como protótipo para o desenvolvimento de novos candidatos a anticolinesterásicos.<sup>37</sup> Ela possui um mecanismo de ação duplo: inibindo a acetilcolinesterase e modulando o receptor

nicotínico pré-sináptico, promovendo assim uma maior liberação do neurotransmissor e maior permanência deste na fenda sináptica.<sup>38</sup>

Exceto a memantina (5), os fármacos aprovados para uso na DA são indicados para pacientes nas fases iniciais da doença, quando algum grau de cognição e/ou de independência funcional ainda estão preservados, daí a importância do diagnóstico precoce. A memantina é um antagonista do receptor de glutamato (*N*-metil-D-aspartato), evitando um influxo excessivo de cálcio que levaria à morte neuronal<sup>37</sup> e é indicada nas enfermidades de evolução moderada a severa.<sup>38</sup>

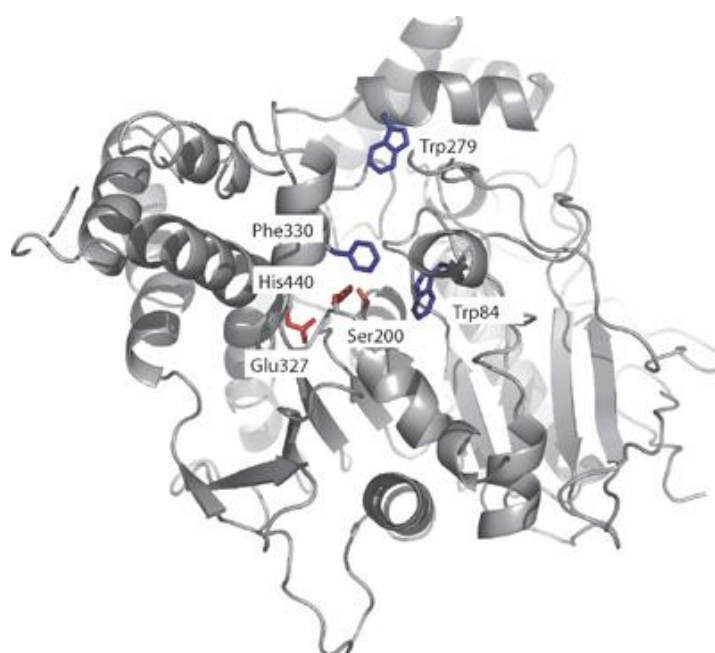
Em um estudo controlado duplo-cego com mais de 1000 pacientes, o uso de donepezil (2) resultou em significativa melhora na memória, concentração, linguagem e raciocínio e sem sinais de hepatotoxicidade.<sup>36</sup> Por sua metabolização hepática, através do citocromo P450, devem-se considerar as possíveis interações medicamentosas e também se recomenda cautela para uso em paciente com insuficiência renal e hepática.<sup>38</sup>

A busca por novas entidades químicas (NEQs) capazes de interferir no avanço da DA tem encontrado na química de produtos naturais uma importante contribuição, tanto de moléculas ativas, como de novos esqueletos que têm servido de modelos para o planejamento sintético de novas entidades químicas (NEQs) ativas.<sup>30, 40</sup> A maioria destas NEQs atua inibindo a atividade da enzima AChE, responsável pela hidrólise de acetilcolina (ACh) em colina e acetato.<sup>30, 41</sup>

O estudo de novas abordagens de intervenção quimioterápica vem apontando para métodos de controle da DA baseados na ação de fármacos capazes de inibir proteases como  $\beta$ - e  $\gamma$ -secretase, que promovem a clivagem da APP e o conseqüente depósito de  $\beta$ -amilóide insolúvel. Outras pesquisas já apresentam resultados promissores a partir da inibição da atividade das quinases relacionadas com a fosforilação anormal da proteína Tau.<sup>38</sup>

## 1.1. Inibidores de AChE e a importância dos carbamatos no planejamento de novos anticolinesterásicos

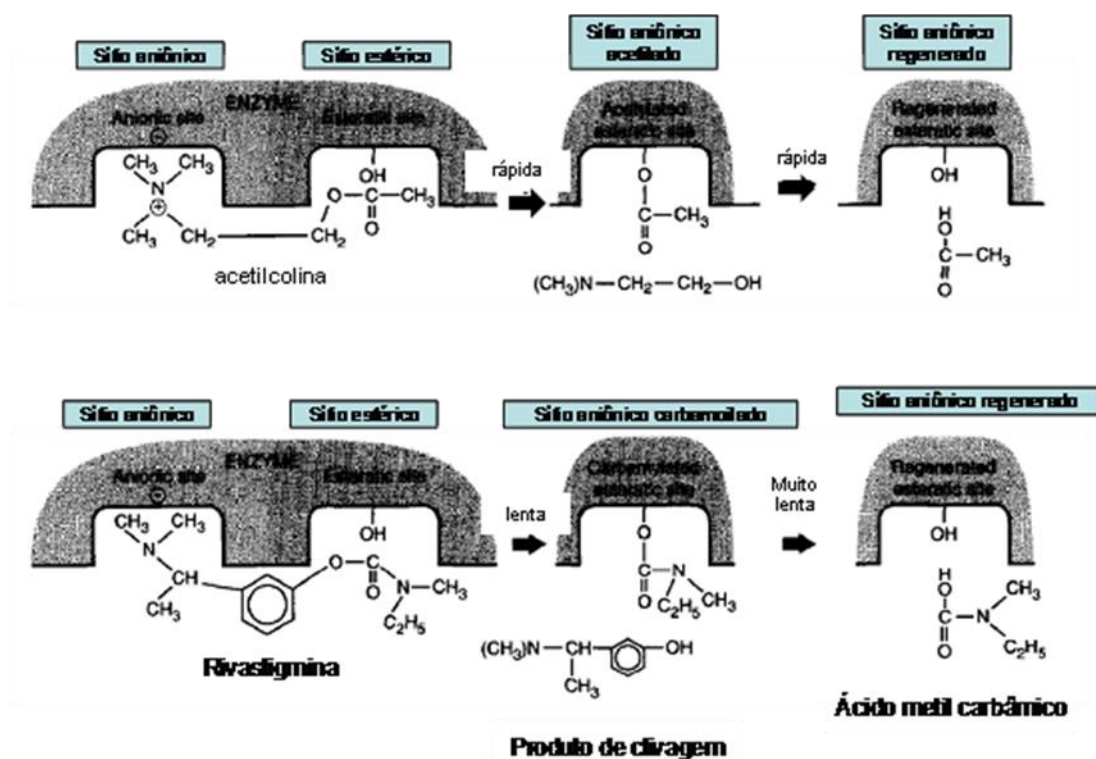
A eficiência catalítica da AChE e sua alta reatividade frente a inúmeros inibidores covalentes e não-covalentes parece originar-se da arquitetura singular do sítio ativo, constituído por uma tríade de aminoácidos, Ser-200, His-440 e Glu-327.<sup>30,42</sup> Estruturas de AChE analisadas por raios-X revelaram a existência dois gargalos de profundidades distintas, que se estendem por meio caminho da enzima e contêm o sítio catalítico a 4 Å de sua base (Fig. 4).



**Figura 4.** Estrutura 3D da AChE, analisada por difração de raios-X, enfatizando a tríade catalítica em vermelho, Trp84 no sítio ativo, Trp279 no sítio periférico aniônico e Phe330 no gargalo de acesso em azul (código de acesso pdb 1EA5).<sup>43</sup>

Além da tríade catalítica, vários sub-sítios funcionais periféricos foram identificados, como sítio aniônico contendo os resíduos Phe-288 e Phe-290, além de um subsítio hidrofóbico.<sup>42</sup> Este último inclui resíduos de Trp-84, Tyr-130, Tyr-330 e Phe-331, operando por interações *stacking* e/ou apolares, sendo responsável pela acomodação da subunidade alcoólica de um intermediário tetraédrico formado antes da liberação de colina no processo de hidrólise da acetilcolina. A estabilização de subunidades carregadas dos substratos ou outros ligantes do sítio ativo da enzima é mediado por interações do tipo cátion- $\pi$ <sup>44</sup>(Fig. 4).

Ao final do processo de hidrólise da acetilcolina, ocorre acetilação do grupo OH da Ser-200, que sofre posterior hidrólise por H<sub>2</sub>O, recompondo a estrutura enzimática original. No caso de carbamatos, ocorre carbamoilação desta unidade de serina, e este complexo carbamoil-serina é reversível e cerca de 10<sup>7</sup> vezes mais resistente à hidrólise pela H<sub>2</sub>O do que seu análogo acetilado, inativando a AChE por maior tempo<sup>30</sup> (Fig. 5).



**Figura 6.** Mecanismo de ação da rivastigmina e sobre AChE, adaptado da referencia<sup>46</sup>.

Por este motivo, a função carbamato, presente na estrutura da fisostigmina (6) (e da rivastigmina (3) (Fig. 2), aliado ao emprego de diversas técnicas de planejamento racional de fármacos, como bioisosterismo, hibridação molecular, estudos de QSAR e *docking*, vem inspirando o desenho molecular de novos carbamatos inibidores de acetilcolinesterase (IACHEs).

A fisostigmina (6) (Fig. 2), também denominada eserina, é um alcalóide obtido da fava-de-calabar ou fava-de-ordálio, isolado em 1864 por Jobst and Hesse das sementes maduras do *Physostigma venenosum*. A primeira aplicação terapêutica do fármaco foi em 1877, por Laqueris, para tratamento do glaucoma.<sup>47</sup>

Foi o primeiro inibidor reversível de AChE (IC<sub>50</sub> = 61 nM) descrito. Por apresentar uma ligação carbamoil-éster é hidrolisada pela AChE muito mais lentamente

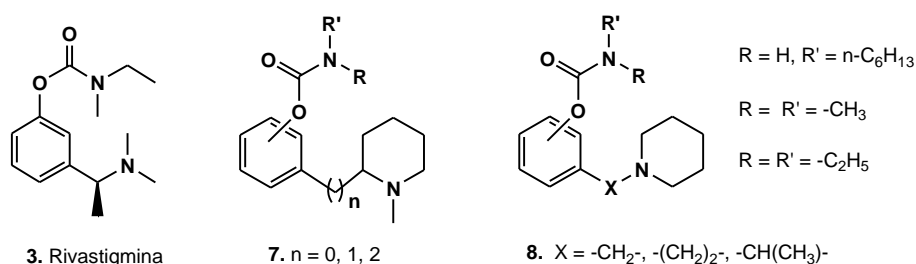
que ACh. Porém inconvenientes como tempo de meia vida curto (2 à 4hs), baixa biodisponibilidade oral e baixa penetração central limitaram seu uso, além de baixa seletividade AChE x BuChE ( $IC_{50} = 61 \text{ nM}$  x  $IC_{50} = 14 \text{ nM}$ ).<sup>48,49</sup>

Tentando melhorar os efeitos farmacocinéticos e farmacodinâmicos da fisostigmina, vários carbamatos planejados a partir de seu esqueleto foram sintetizados, até que se obteve a rivastigmina (**3**) (Fig. 2), que se mostrou mais seletiva em regiões do córtex e hipocampo, que são mais afetadas pela degeneração cerebral, devido sua ação inibitória sobre AChE ( $IC_{50} = 1535 \text{ nM}$ ) e BChE ( $IC_{50} = 301 \text{ nM}$ ).<sup>50</sup>

A rivastigmina representa uma nova geração de IChE, aprovado pelo FDA em 2000, apresentando um grupamento carbamato na sua estrutura o que a faz um substrato capaz de reagir covalente e lentamente com o sítio ativo da enzima.<sup>51</sup> Pelo alto custo e seu tempo de meia vida curto, o uso da rivastigmina torna-se bastante limitado. Visando melhorar este perfil farmacológico, Mustazza e colaboradores estudaram alguns carbamatos, relacionados à rivastigmina e suas atividades biológicas foram testadas.<sup>50</sup> Para seleção dos substituintes carbâmicos, eles observaram os seguintes itens descritos na literatura:

- Dimetilcarbamatos com estruturas relacionadas à miotina são atualmente utilizados como IChE e apresentam alta atividade *in vitro*.
- Dietilcarbamatos, análogos à rivastigmina possuem atividade terapêutica e baixa toxicidade.
- Derivados n-hexila foram preparados, uma vez que a introdução de uma cadeia lipofílica longa esta relacionada à melhora das propriedades farmacológicas.

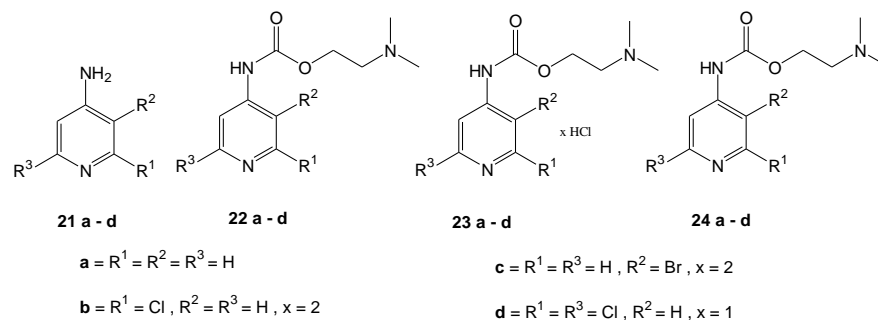
Seguindo estes passos, eles propuseram a síntese e avaliação farmacológica de alguns dimetil, dietil e n-hexilcarbamatos baseados na rivastigmina (Fig. 6).



**Figura 6.** Estrutura da rivastigmina e dos análogos sintetizados.

Dos compostos sintetizados o 1-[1-(3-dimetilcarbamoiloxifenil)etil]piperidina] apresentou alta afinidade para AChE, baixa toxicidade,  $IC_{50} = 7$  nM além de ser bem absorvido por administração oral, porém mostrou-se pouco seletivo com relação a AChE e BuChE.

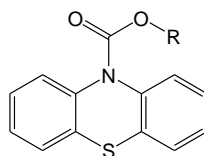
Trabalhos recentes ilustram o uso da subunidade carbamoila, aliado a outras ferramentas de planejamento de fármacos. Em 2008, Scipione e colaboradores<sup>52</sup> sintetizaram e testaram vários carbamatos derivados de 4-aminopiridina (Fig. 7.).



**Figura 7.** Carbamatos derivados de 4-aminopiridina como potenciais IACHEs e IBuChEs.

Todos os compostos sintetizados mostraram inibição não-competitiva entre a AChE e BuChE, o que sugere uma possível interação destes compostos com o sítio aniônico periférico da enzima, que, além de regular a atividade esterásica da enzima, é considerado o responsável pela agregação  $\beta$ -A e representa um novo alvo para fármacos inovadores. Estas novas moléculas mostraram-se capazes de reduzir a atividade hidrolítica da AChE e diminuir a deposição  $\beta$ -A. O derivado **24d** mostrou o maior efeito inibitório não-competitivo, capaz de reverter efeitos amnésicos causados por escopolamina em testes com ratos.

Em outro trabalho, Darvesh e colaboradores<sup>45</sup> sintetizaram e avaliaram as propriedades inibitórias de derivados de carbamatos fenotiazínicos (R = alquil ou alquilamino ou aril) (Fig. 8), partindo de estudo de relações estrutura-atividade para a inibição de colinesterases.



**Carbamatos Fenotiazínicos de Alquila (25)**

- a. R = CH<sub>3</sub>
- b. R = CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>
- c. R = CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>
- d. R = CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>
- e. R = CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>
- f. R = C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>
- g. R = C<sub>5</sub>H<sub>9</sub>

**Carbamatos Fenotiazínicos de Aminoalquila (26)**

- a. R = CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>
- b. R = CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N(CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>
- c. R = CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N(CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>
- d. R = CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NC<sub>4</sub>H<sub>8</sub>
- e. R = CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NC<sub>5</sub>H<sub>10</sub>
- f. R = CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N(C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>)<sub>2</sub>O

**Carbamatos Fenotiazínicos de Arila (27)**

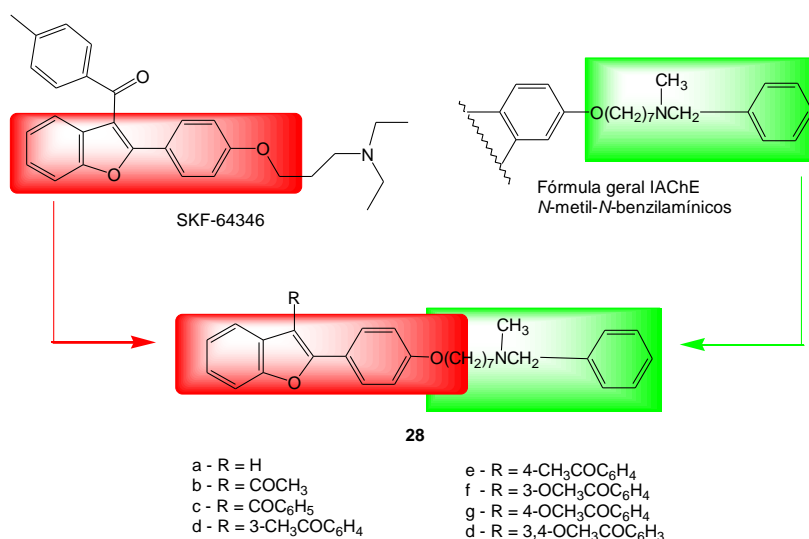
- a. R = C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>
- b. R = 2-CH<sub>3</sub>C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>
- c. R = 3-CH<sub>3</sub>C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>
- d. R = 4-CH<sub>3</sub>C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>
- e. R = 2-CH<sub>3</sub>OC<sub>6</sub>H<sub>4</sub>
- f. R = 3-CH<sub>3</sub>OC<sub>6</sub>H<sub>4</sub>
- g. R = 4-CH<sub>3</sub>OC<sub>6</sub>H<sub>4</sub>
- h. R = 2-ClC<sub>6</sub>H<sub>4</sub>
- i. R = 3-ClC<sub>6</sub>H<sub>4</sub>
- j. R = 4-ClC<sub>6</sub>H<sub>4</sub>
- l. R = 3-N(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>
- m. R = 2-C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>
- n. R = 4-C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>
- o. R = 4-C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>
- p. R = 1-C<sub>10</sub>H<sub>7</sub>
- q. R = 2-C<sub>10</sub>H<sub>7</sub>

**Figura 8.** Carbamatos derivados da fenotiazina como potenciais IACHes e IBuChEs

A maioria dos carbamatos fenotiazínicos de alquila (**25a-g**) sintetizados mostraram baixa inibição da AChE, comparada a rivastigmina, com exceção de **25d** ( $k_a = 1,8 \cdot 10^3 \text{M}^{-1} \text{min}^{-1}$ , rivastigmina  $k_a = 1,13 \cdot 10^3 \text{M}^{-1} \text{min}^{-1}$ , onde  $k_a$  é o valor da constante de afinidade). Assim como os carbamatos fenotiazínicos de alquila, os carbamatos fenotiazínicos de aminoalquila (**26a-f**) foram inibidores fracos de AChE, com exceção de **26d** ( $k_a = 46 \cdot 10^3 \text{M}^{-1} \text{min}^{-1}$ ) e de **26e** ( $k_a = 3 \cdot 10^3 \text{M}^{-1} \text{min}^{-1}$ ) que, comparada a rivastigmina, foram, respectivamente, 40 vezes e três vezes mais ativos. A maioria dos aril-derivados (**27a-q**) inativaram significativamente melhor a AChE comparados a rivastigmina e, dentre os aril-derivados sintetizados, o que mostrou melhor inibição foi o **27l** ( $k_a = 1,92 \cdot 10^7 \text{M}^{-1} \text{min}^{-1}$ ).

Devido à complexidade da DA e ao envolvimento de diferentes enzimas em sua progressão, a modulação de uma única proteína pode não ser suficiente para produzir a eficiência desejada. Assim sendo, abordagens recentes têm explorado estruturas que sejam capazes de interagir com diferentes alvos simultaneamente. Com este novo conceito, através de hibridização molecular, dois compostos com alta seletividade por seus alvos são utilizados como ponto de partida e seus elementos estruturais são combinados para incorporar atividade em ambos os alvos com uma única molécula. Rizzo e colaboradores<sup>53</sup> planejaram um novo esqueleto híbrido *N*-metil-*N*-benzilamina ligada a um esqueleto heptiloxiarila (**28**), baseado na

hibridização entre inibidores de AChE *N*-metil-*N*-benzilamínicos e o inibidor de deposição  $\beta$ -A, SKF-64346, levando a uma nova série (**28 a – h**, Fig. 9).



**Figura 9.** Compostos obtidos por hibridização molecular como potenciais IACHes e IBuChEs

A atividade anticolinesterásica observada foi similar a da rivastigmina ( $IC_{50} = 3,03 \mu M$ ), mostrando melhor inibição em BuChE que AChE. Os compostos **28b** e **28e** foram os que mostraram melhor inibição da AChE, com  $IC_{50} = 17,4 \mu M$  e  $IC_{50} = 10,5 \mu M$ , respectivamente.

É intrigante que IBuChE específicos não somente aumentam a cognição, pelo aumento da concentração de acetilcolina, mas também reduzem a concentração de APP que é a fonte de  $\beta$ -A. O efeito destes compostos sobre a APP parece ser independente de suas habilidades em inibir a BuChE e sugere-se que envolvem interações com interleucina-1, uma molécula pro - inflamatória que implica na patogênese da DA.

Considerando a inibição de  $\beta$ -A, **28a** mostrou alta potência comparada ao padrão curcumina (composto com propriedades antiamiloidogênicas) ( $IC_{50} = 7 \mu M$  e  $IC_{50} = 10 \mu M$ , respectivamente) e foi o melhor composto da série. A acetilação de **28a** com cloreto de acetila levou a **28b** que mostrou atividade pró-agregação  $\beta$ -A, enquanto o derivado benzilado (**28c**) conservou a atividade antiamiloidogênica ( $IC_{50} = 12,5 \mu M$ ).



## **1.2. Processo inflamatório na DA**

A inflamação é uma resposta do organismo responsável por eliminar causas de lesões celulares, bem como células e tecidos necróticos resultantes destas lesões. Se o tecido saudável não é restaurado, a inflamação torna-se crônica, causando danos laterais que acumulam vagarosamente, algumas vezes sem sintomas por anos, podendo levar à deterioração severa do tecido.<sup>54</sup>

A inflamação cerebral é uma característica da DA, em nível crônico, visto que as características inflamatórias agudas, tais como rubor, inchaço, calor e dor não estão presentes e estruturas como microglia, astrócitos e neurônios são os responsáveis pela reação inflamatória. As células ativadas pela lesão tecidual produzem mediadores inflamatórios como citocinas, interleucina-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), IL-6 e TNF- $\alpha$  (fator de necrose tumoral), bem como prostaglandinas, leucotrienos, tromboxanos, fatores de coagulação, espécies reativas de oxigênio e outros radicais como óxido nítrico, fatores complementares, proteases, inibidores de protease e pentraxinas. Uma vez que  $\beta$ -A representa estímulo crônico, o sistema imunológico é ativado no sentido de limpar estes produtos potencialmente tóxicos. A hipótese é que a natureza intratável das placas e emaranhados estimula uma reação inflamatória crônica.<sup>54</sup>

As células da glia ativadas cronicamente podem levar à morte de neurônios adjacentes pela liberação de produtos altamente tóxicos, tais como intermediários reativos de oxigênio, óxido nítrico, enzimas proteolíticas e fatores complementares.<sup>54</sup>

## **1.3. Tratamento com fármacos anti-inflamatorios**

Os anti-inflamatorios não-esteroidais (AINEs) inibidores da ciclooxigenase (COX) são os mais documentados e têm sido usados como agentes terapêuticos desde 1899. Fármacos desta classe são amplamente utilizados no tratamento de uma variedade de condições inflamatórias, particularmente na artrite. São inibidores da COX e geralmente agem via inibição competitiva, com exceção do ácido acetilsalicílico que é capaz de acetilar irreversivelmente o sítio ativo da COX-1 e os inibidores tempo-dependente, como a indometacina, flurbiprofeno e diclofenaco.<sup>55</sup>

Pela inibição da atividade das enzimas COX, os AINEs podem diminuir significativamente a síntese de prostaglandinas, levando à diminuição da inflamação. Porém, o uso prolongado destes fármacos tradicionais, pode levar a distúrbios gastrin-

testinais (úlceras e sangramento). Com a descoberta da COX-2, uma isoforma homóloga à COX-1, e sua relação com a inflamação, foram desenvolvidos inibidores seletivos da COX-2 (celecoxibe e rofecoxibe) sem toxicidade gastrointestinal. Apostando numa possível importância da COX-2 na DA, o celecoxibe e o rofecoxibe foram avaliados como possíveis alternativas terapêuticas. Entretanto, os resultados não evidenciaram benefícios significativos. Contudo, alguns AINEs, como indometacina, flurbiprofeno e sulfeto de sulindaco, demonstraram eficiência no tratamento de pacientes com DA. Estes estudos sugerem que a ação das enzimas COX pode não ser tão pronunciada como suposto e que a neuroproteção observada em alguns casos, pode ser resultado de outros mecanismos.<sup>55</sup>

Alguns autores defendem que os AINEs possam atuar como agonistas de receptores de PPARs (*Peroxisome Proliferator-Activated Receptors*), membros de uma superfamília de receptores nucleares que atuam como fatores de transcrição e que são sobre regulados na DA. Uma vez ativados, os PPARs  $\alpha$  e  $\gamma$  agem via repressão de transcrição de genes pró-inflamatórios, incluindo Stat1, AP1 e NF- $\kappa$ B. A inibição de NF- $\kappa$ B causa baixa regulação de vários sinais pró-inflamatórios, demonstrados pela diminuição na secreção de citocinas TNF, IL-1 $\beta$  e IL-6 pelos monócitos isolados em resposta ao ligante natural PPAR prostaglandina J2, coincidentemente, as mesmas citocinas que são produzidas pela ativação da microglia.<sup>55</sup>

Dados recentes revelaram uma grande diferença entre AINEs tradicionais e inibidores seletivos da COX-2, uma vez que secreção de  $\beta$ A<sub>1-42</sub> é aumentada em células expostas a AINEs seletivos da COX-2, enquanto os inibidores não-seletivos diminuem a secreção de  $\beta$ A<sub>1-40</sub> e  $\beta$ A<sub>1-42</sub> de modo dose-dependente.<sup>55</sup>

Devido ao aspecto multi-fatorial associado ao desencadeamento, evolução e sintomatologia da DA, uma tendência recente tem sido o planejamento de fármacos duplos, que atuam simultaneamente em dois alvos terapêuticos distintos, como é o caso do donepezil que, além de IChE, é um agonista de receptores nicotínicos. Numa variação desta abordagem, os fármacos simbióticos seriam micromoléculas de ação dupla, mas agindo em janelas bioquímicas distintas, como por exemplo, atuando como anti-inflamatórios e inibidores de AChE. Atualmente não há relatos de candidatos a fármacos com este perfil de atividade, o que nos motivou a planejar uma nova série de compostos híbridos, contemplando a subunidade N-benzilpiperidínica do donepezil (**2**) e a subunidade carbamato da rivastigmina (**3**), além de

uma função *N*-acilidrazônica intermediária. Grupamentos *N*-acilidrazônicos tem sido descritos como importantes bioforos anti-inflamatórios, juntamente com arilidrazonas recentemente preparadas em nosso grupo. Desta forma, a série **29** (Fig. 10), constituirá um novo padrão molecular de candidatos a protótipos de fármacos simbióticos, atuando na inibição da enzima acetilcolinesterase e como anti-inflamatorios do SNC, podendo representar uma importante inovação na terapêutica da DA.

## 2. Justificativa

Atualmente no Brasil, muitos tratamentos de doenças crônicas são mantidos por recursos do SUS e outros mecanismos dos Governos Estaduais e Federais: como as farmácias de medicamentos de alto custo, medicamentos excepcionais e farmácias populares, o que demandam grande volume de recursos devido ao alto custo de aquisição/importação de insumos e medicamentos e às poucas alternativas disponíveis para o tratamento adequado de doenças neurodegenerativas. Além disso, a dor e a inflamação são duas condições patológicas que acompanham o quadro sintomático de grande parte das enfermidades.

Neste contexto, projetos que visem à descoberta e o desenvolvimento de novos fármacos em Instituições Nacionais de pesquisa deverão conduzir a uma importante contribuição ao setor farmacêutico local, além da geração de conhecimento e de formação de recursos humanos. Outra estratégia de acesso a novos agentes terapêuticamente úteis seria a busca por produtos naturais abundantes e que apresentem requisitos estruturais necessários às propriedades-alvo pretendidas, como anticolinesterásica, e que possam ser também explorados como agentes anti-inflamatórios, podendo caracterizar agentes de ação dupla anticolinérgica e anti-inflamatória.

A abordagem descrita nesta dissertação visa atender à necessidade de estudos de novas alternativas terapêuticas, à descoberta de novos candidatos a fármacos e o possível desenvolvimento de novos medicamentos úteis no tratamento de doenças inflamatórias do SNC e neurodegenerativas, como a doença de Alzheimer. Aliado a novos agentes anti-inflamatórios, representando inovação tecnológica no setor Farmacêutico Nacional e uma maior facilidade de acesso a medicamentos mais seguros e de menor custo.

Para tanto, foram utilizadas técnicas de Química Medicinal como a hibridação molecular, modificação e simplificação molecular, e bioisosterismo para o planejamento de uma nova série de candidatos a protótipos de fármacos anticolinesterásicos baseados na estrutura da rivastigmina (**3**) e do donepezil (**2**), utilizados no tratamento da DA, e de novos derivados arilidrazônicos com propriedade anti-inflamatórias, que estão em estudo em nosso laboratório.

### 3. Objetivos

#### 3.1. Objetivos gerais:

Obtenção de uma nova série de compostos híbridos (série **29**, Fig. 10) contemplando a subunidade *N*-benzil-piperidínica do donepezil (**2**) e a subunidade carbamato da rivastigmina (**3**), relacionadas à ação anticolinesterásica, além da função *N*-acilidrazona intermediária de compostos anti-inflamatórios, descrita como um importante bióforo anti-inflamatório, candidatos a fármacos simbióticos, capazes de atuar como inibidores de acetilcolinesterase e anti-inflamatórios na Doença de Alzheimer.

#### 3.2. Objetivos específicos:

**3.2.1.** Síntese de uma nova serie de compostos com arquitetura molecular inovadora.

**3.2.2.** Estudo da relação estrutura-atividade oriunda de grupos substituintes com diferentes propriedades eletrônicas, estéricas e hidrofóbicas na posição aromática terminal da subunidade acilidrazona de **29**.

**3.2.3.** Avaliação da contribuição farmacofórica de diferentes grupos carbamoíla e acetila, na posição 3-*O*-piperidínica em relação ao perfil de atividade anticolinesterásico;

**3.2.4.** Avaliação *in vitro* do perfil de atividade inibitória de acetilcolinesterase, determinação de IC<sub>50</sub> e *in vivo* para avaliação das propriedades anti-inflamatórias.

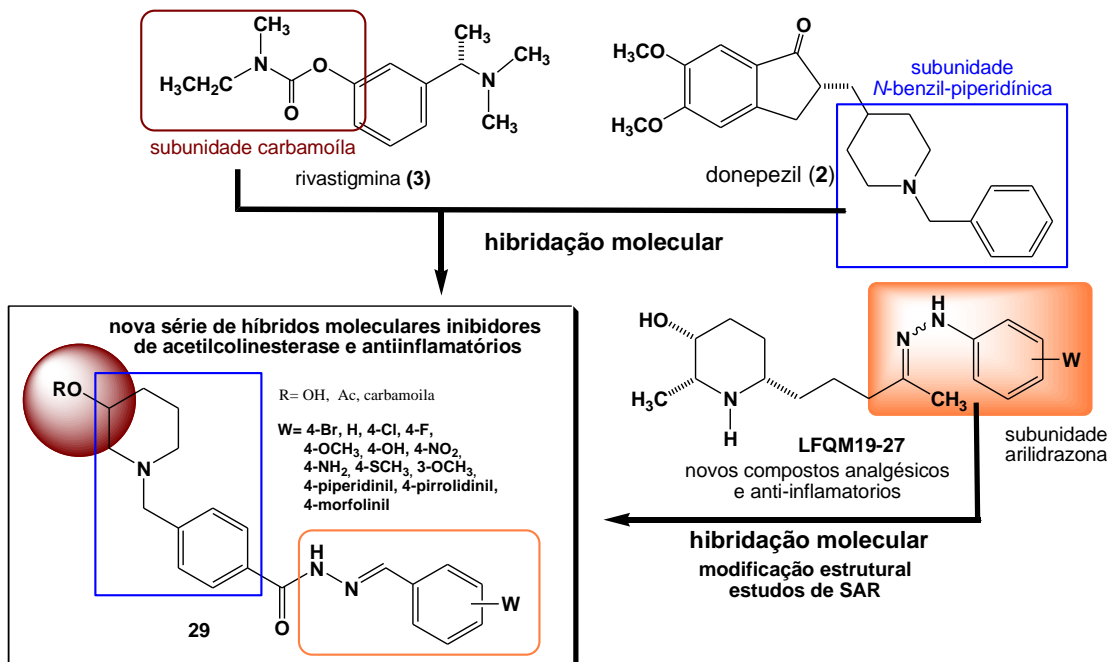


Figura 10. Planejamento de uma nova série de híbridos moleculares simbióticos, anticolinérgicos e anti-inflamatórios

#### 4. Análise retrossintética e planejamento sintético

A análise retrossintética apresentada na Fig. 11 indica que os compostos-alvo **29** poderiam ser obtidos a partir da acilidrazona **36** por interconversão de grupos funcionais (IGF), envolvendo a hidroxila na posição 3 do núcleo piperidínico e anidrido acético ou isocianatos adequadamente escolhidos para gerar os respectivos acetatos ou carbamatos. Os derivados acilidrazônicos **36** poderiam ser obtidos por reação de adição ácido-catalizada entre uma série de benzaldeídos funcionalizados (**35**) e a hidrazida **34**, que por sua vez poderia ser preparada por hidrazinação do éster metílico **33**, derivado direto da esterificação do ácido **32** com metanol em meio ácido. O ácido benzil-piperidínico **32** poderia ser obtido a partir da reação de aminação redutiva entre a 3-hidroxipiperidina (**31**) e o 4-carboxibenzaldeído (**30**), eleitos como materiais de partida.

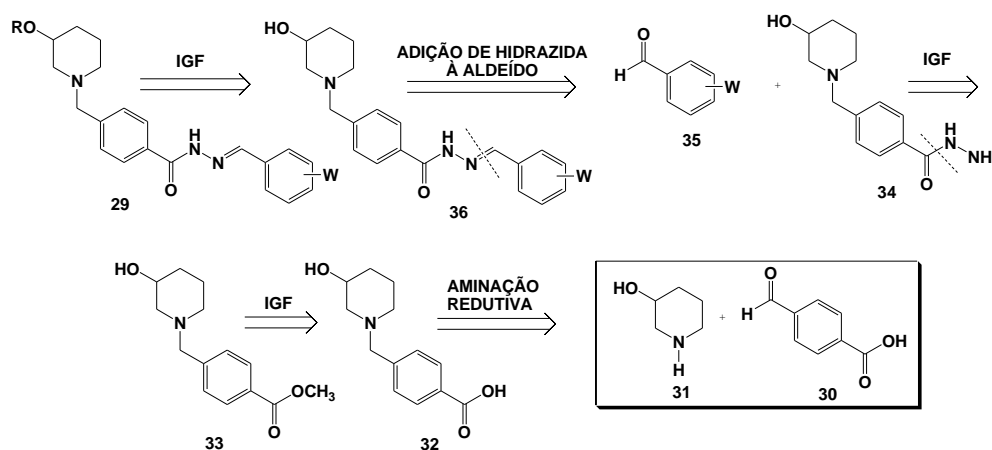


Figura 11. Análise retrossintética dos compostos-alvo **29**

A partir da análise retrossintética anterior, foi planejada uma rota sintética linear para os compostos-alvo **29**, partindo do ácido 4-formil-benzóico (ou 4-carboxibenzaldeído, **30**) e da 3-hidroxi-piperidina (**31**) comerciais. Numa etapa inicial, uma reação de aminação redutiva entre **30** e **31**, na presença de  $\text{NaBH}_3\text{CN}/\text{MeOH}$  seco e pH 6, deverá fornecer o ácido *N*-benzil-piperidínico **32**, que poderá ser convertido no derivado éster metílico **33** por reação com  $\text{MeOH}/\text{H}_2\text{SO}_4$ , sob refluxo. O éster **33** será submetido à reação com monidrato de hidrazina para fornecer a hidrazida **34**, intermediário-chave na rota sintética proposta. A hidrazida **34** deverá, então, reagir com uma série de benzaldeídos substituídos para gerar uma série de intermediários *N*-acilidrazônicos (**36**), com diferentes substituintes no

anel aromático da subunidade *N*-acilidrazonil-benzílico. A série-alvo **29** poderá ser finalmente obtida por reação das acilidrazonas **36** com anidrido acético/4-DMAP para gerar os derivados 3-*O*-acetil-piperidínicos (**29a**) ou com isocianato de etila e metila para fornecer os respectivos carbamatos metílicos e etílicos (**29b**, **29c**). Com o objetivo de avaliar-se a contribuição farmacofórica da função *N,N*-metil-etil-carbamoíla, padrão estrutural presente na rivastigmina (**3**, Figura 2), alguns derivados *N*-etil-carbamoílicos **29** poderão ser adicionalmente submetidos à reação de *N*-alquilação por CH<sub>3</sub>I na presença de base, levando aos derivados **29d** (Fig. 12).

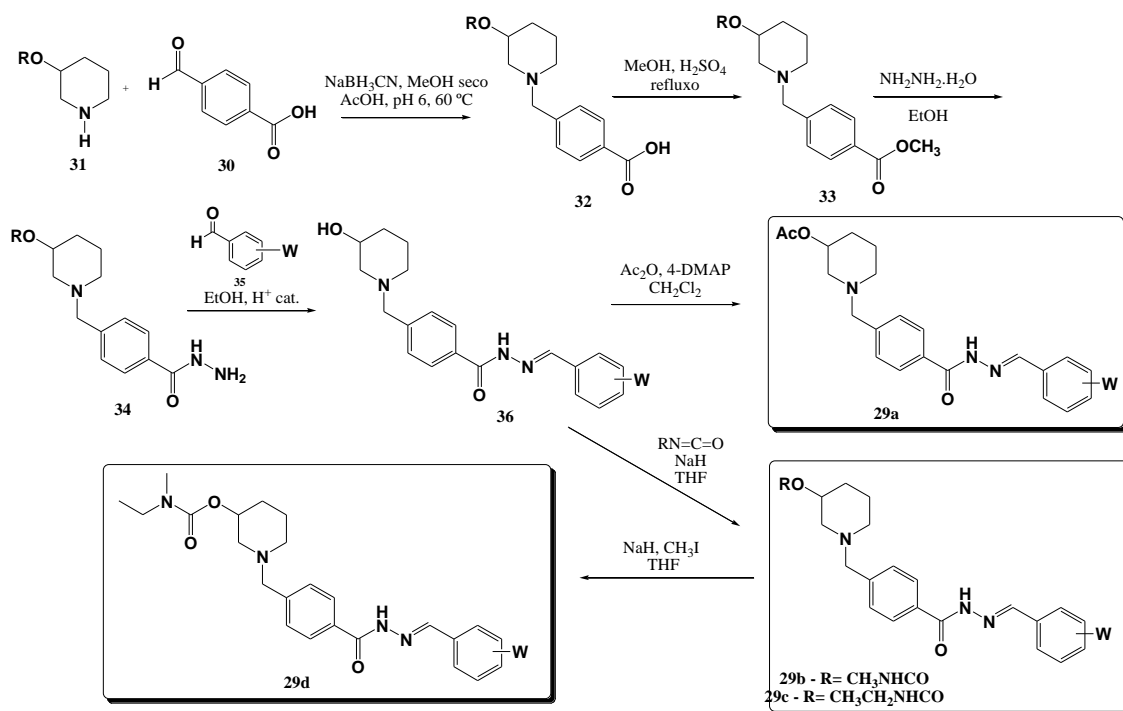


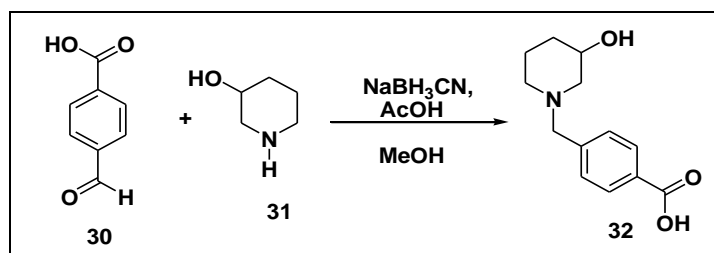
Figura 12. Rota sintética proposta para os compostos-alvo **29a** a **29d**



## 5. Resultados e discussão:

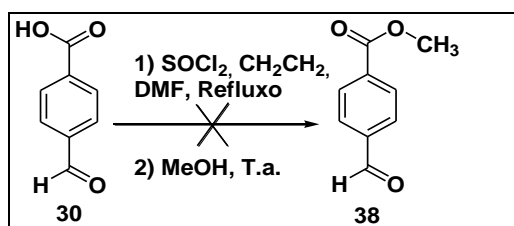
Baseado na análise retrossintética (Fig. 13), o 4-carboxibenzaldeído (**30**) e a 3-hidroxipiperidina (**31**), eleitos como materiais de partida para a síntese das moléculas-alvo, foram submetidos, numa primeira etapa, à reação de aminação redutiva com  $\text{NaBH}_3\text{CN}/\text{MeOH}/\text{AcOH}$  para preparação do ácido *N*-benzil-(3-hidroxi)-piperidínico (**32**) (Esquema 1). A reação foi conduzida conforme descrito na literatura<sup>56,57</sup> mas, ao final da reação, a análise por CCD revelou praticamente todo produto reacional na fase aquosa de extração. Entretanto, apesar de várias tentativas para retirada do produto da fase aquosa, alterando pH e utilizando solventes como diclorometano, acetato de etila e clorofórmio, não se conseguiu isolá-lo.

Em fase aquosa, por se tratar de um aminoácido, em pH ácido o nitrogênio da amina está protonado e em pH alcalino o grupo carboxílico está desprotonado, sendo assim de difícil extração do meio aquoso.



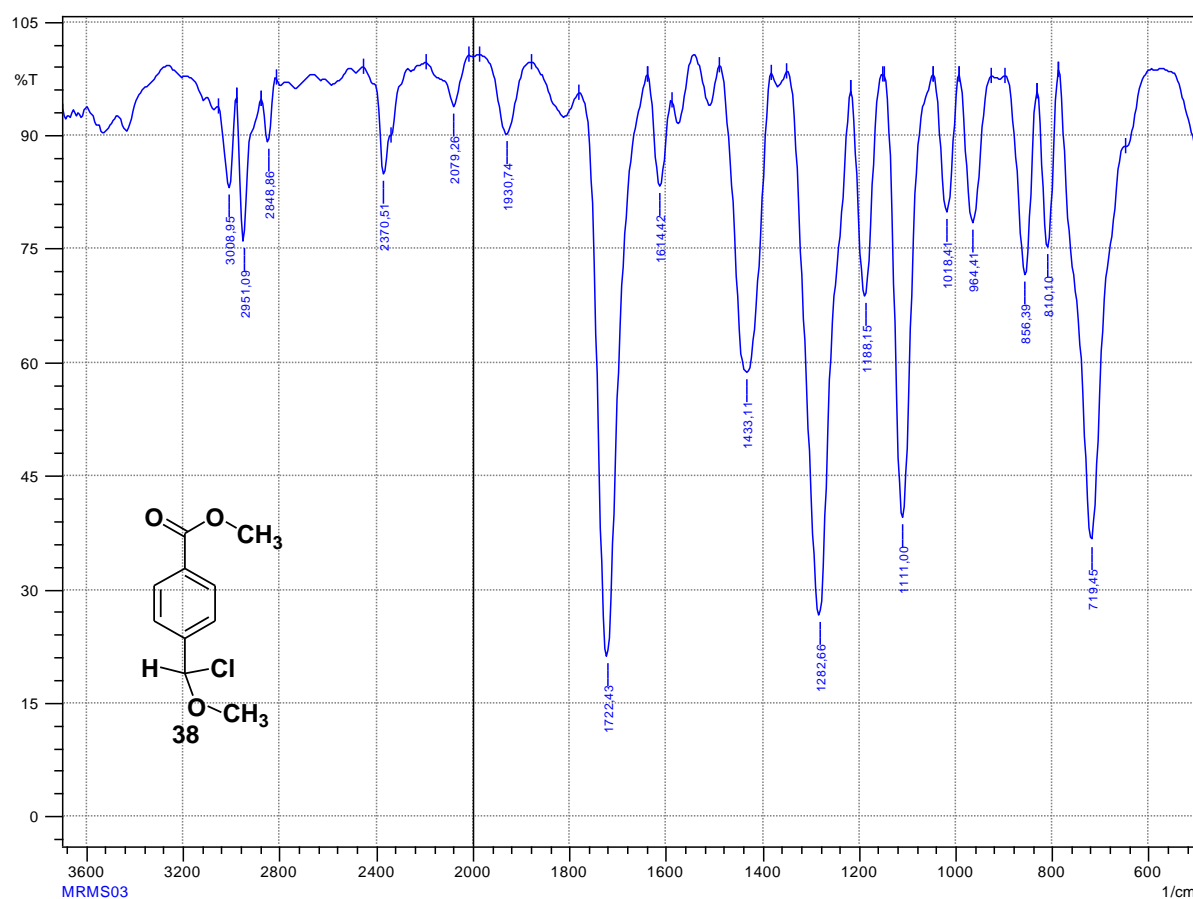
**Esquema 1:** Reação de aminação redutiva entre o 4-carboxibenzaldeído (**30**) e a 3-hidroxipiperidina (**31**).

Diante deste resultado, propusemos a conversão do 4-carboxibenzaldeído (**30**) em cloreto de acila, com cloreto de tionila, catalisada por DMF, seguida por uma metanólise<sup>58</sup> antes da etapa de aminação redutiva.



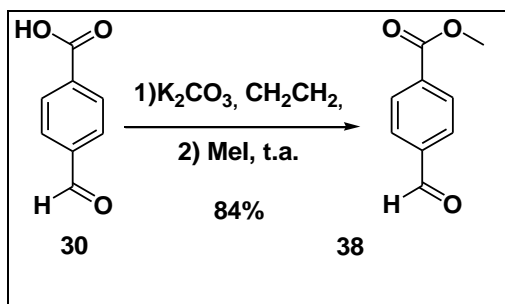
**Esquema 2:** Reação de conversão 4-carboxibenzaldeído (**30**) em cloreto de acila, seguida de metanólise.

A esterificação do 4-carboxibenaldeído (**30**) com  $\text{SOCl}_2/\text{DMF}/\text{MeOH}$ , conforme descrito na literatura<sup>58</sup>, forneceu um sólido branco que foi analisado por espectrometria no infravermelho (Espectro 1). Analisando o espectro no IV e comparando-o ao espectro do 4-carboxibenaldeído, não foi observada a banda de  $\nu_{\text{s}}\text{OH}$  e das bandas características de  $\nu_{\text{s}}$  de C–H de aldeídos, entre 3300 e 2500  $\text{cm}^{-1}$ , presentes no espectro do 4-carboxibenaldeído. Observou-se bandas de  $\nu_{\text{s}}$  de C–H de metila próximo a 3000  $\text{cm}^{-1}$ , uma banda de  $\nu_{\text{s}}$  de C=O em 1722  $\text{cm}^{-1}$  e duas bandas, uma em 1282 e outra 1111  $\text{cm}^{-1}$ , referentes à  $\delta_{\text{s}}$  de C–O característica de ésteres. Estes dados sugeriram uma halogenação não quimiosseletiva.



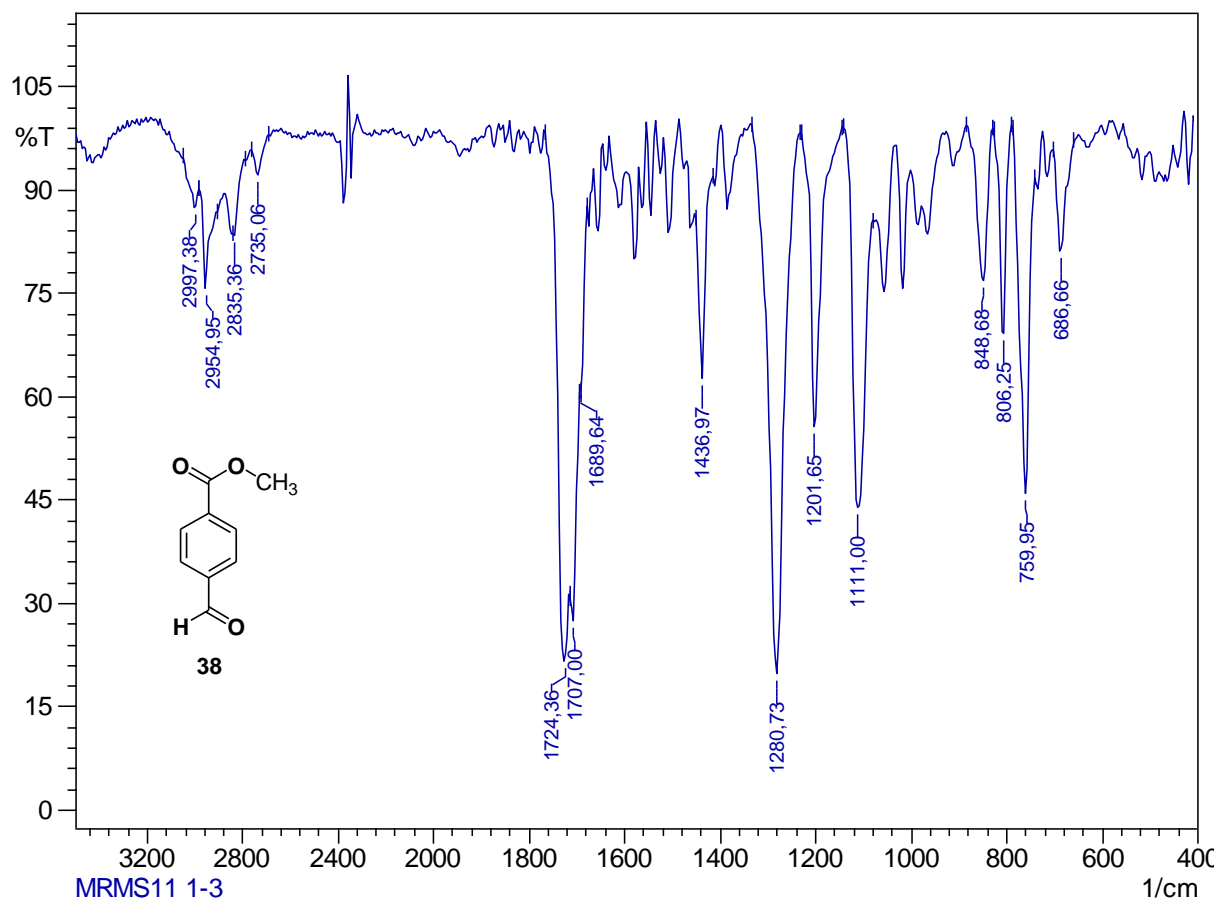
**Espectro 1.** Espectro no IV (KBr) do produto de acilação do 4-carboxibenaldeído (**30**) com  $\text{SOCl}_2$ , seguida de metanólise.

Para contornar este resultado, partiu-se para a esterificação do 4-carboxibenzaldeído (**30**) com carbonato de potássio e iodometano.<sup>59</sup> ao final da reação, obteve-se um produto cristalino (**38**), de maior R<sub>f</sub> que o material de partida e diferente do acetal descrito anteriormente.



**Esquema 3:** Reação de esterificação do 4-carboxibenzaldeído (**30**) com iodometano.

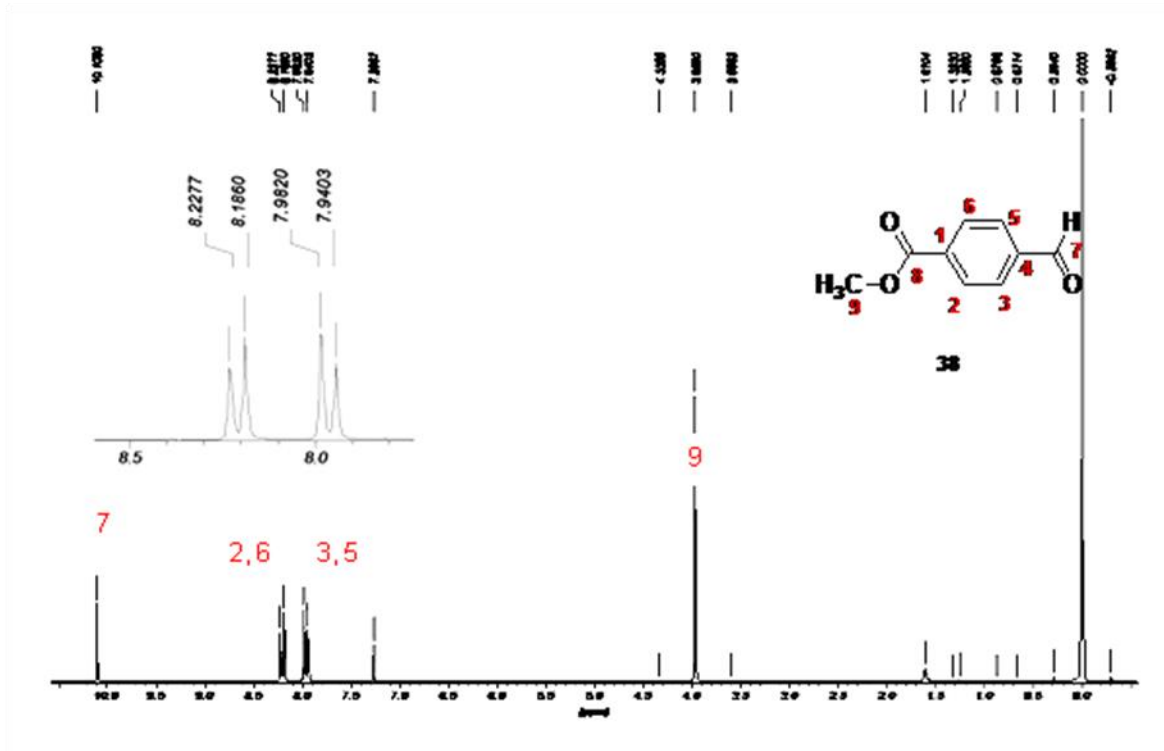
Na análise do espectro obtido no IV do produto **38** (Espectro 2), comparado ao espectro do 4-carboxibenzaldeído, não foi observada a banda de  $\nu_s$ OH, entre 3300 e 2500 cm<sup>-1</sup>, característica do 4-carboxibenzaldeído. Foram observadas duas bandas características de  $\nu_s$  de C-H de aldeídos em 2835 e em 2735 cm<sup>-1</sup>, além de bandas de  $\nu_s$  de C-H de metila em 2997 e 2954 cm<sup>-1</sup>, duas bandas sobrepostas de  $\nu_s$  de C=O em 1724 e 1707 cm<sup>-1</sup> referentes à carbonila do éster e do aldeído respectivamente, além de duas bandas em 1280 e 1111 cm<sup>-1</sup>, referentes à  $\delta_s$  de C-O, característica de ésteres. Estes dados sugeriram que houve sucesso na esterificação. Entretanto quando foi repetida em maior quantidade, não se obteve reprodutibilidade, levando-nos à re-investigação desta etapa sintética, refazendo-a com SOCl<sub>2</sub> e utilizando CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> como solvente. Por esta nova condição experimental, obteve-se um bom resultado de 94% e reprodutibilidade em maior escala.



**Espectro 2.** Espectro no IV (KBr) do 4-formilbenzoato de metila (**38**), produto de esterificação com  $K_2CO_3$  e iodometano.

Na análise do espectro no IV do produto obtido, observou-se as mesmas bandas do produto de esterificação com  $K_2CO_3$  e MeI.

Para confirmação estrutural foi feita análise por RMN de  $^1H$  e  $^{13}C$  (Espectro 3 e 4) No espectro de RMN de  $^1H$  (Espectro 3), observou-se um singlete em  $\delta$  3,96 referente a 3 hidrogênios metílicos, dois dupletos correspondentes aos hidrogênios aromáticos, com padrão de substituição 1,4, em  $\delta$  7,94 e  $\delta$  8,19, além de um singlete em  $\delta$  10,11 correspondente ao hidrogênio de aldeído.

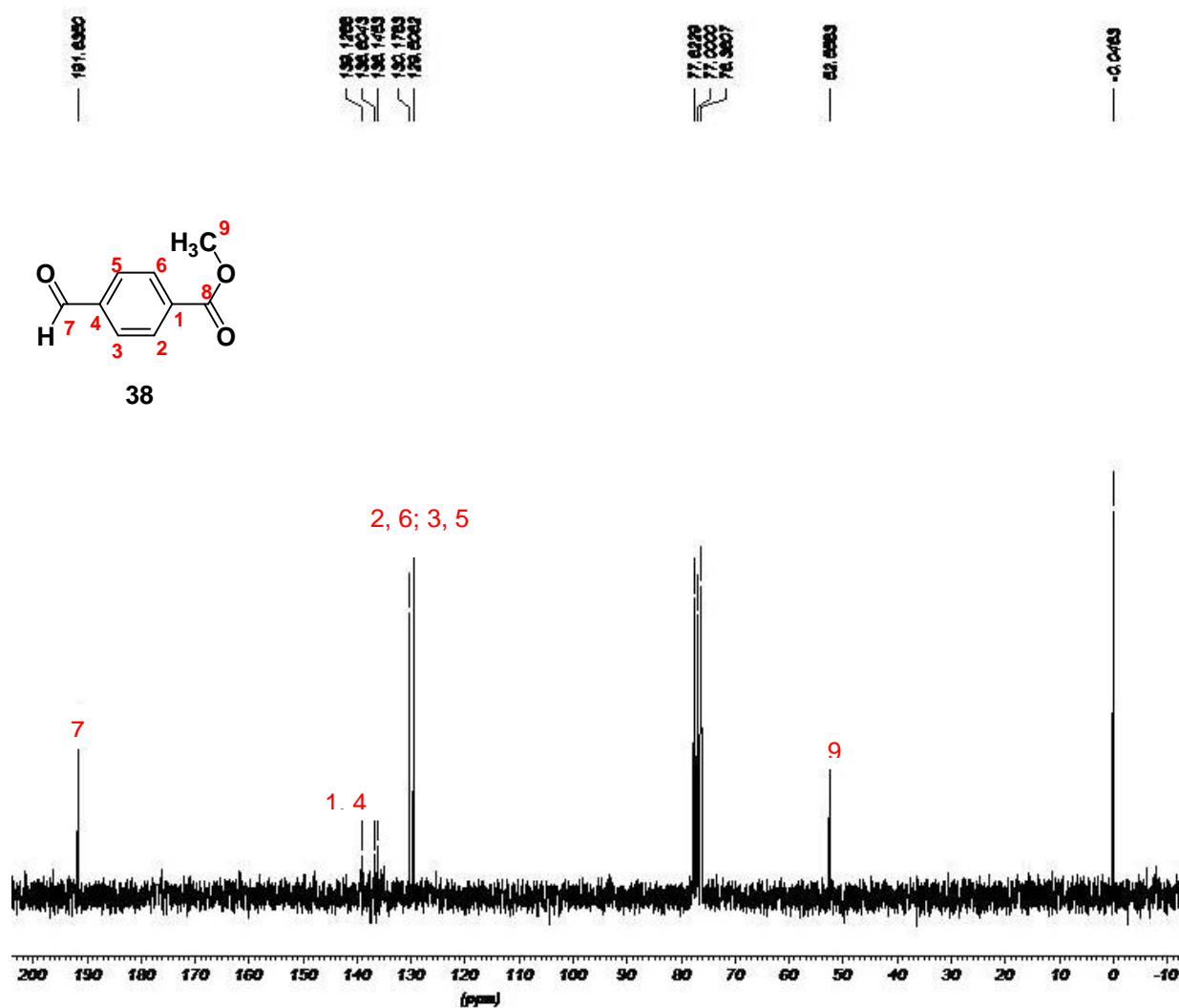


**Espectro 3.** Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (200 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) do 4-formilbenzoato de metila **38**.

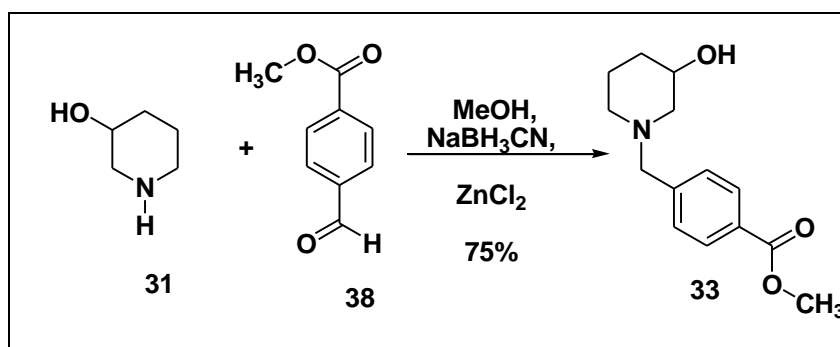
**Tabela 1:** dados de RMN de  $^1\text{H}$  (200 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) e  $^{13}\text{C}$  (50 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) do intermediário **38**.

Posição	$\delta$ $^1\text{H}$ (ppm)	m	$J$	$\delta$ $^{13}\text{C}$ (ppm)
9	3,97	s	-	52,5
3,5	7,96	d	8,3	129,5
2,6	8,21	d	7,9	130,2
7	10,11	s	-	191,6

No espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (Espectro 4), observou-se um sinal em  $\delta$  191,6 relativo ao C carbonílico (C=O) do grupamento aldeídico e um sinal em  $\delta$  52,5 referente ao C metílico da metoxila, além de sinais de carbonos aromáticos, confirmando a conversão do ácido **30** no éster **38**. O sinal do C da carbonila do grupo éster, normalmente observada em  $\delta$  160-170, não foi observado, possivelmente pelo alto tempo de relaxação de *spin* que acarreta um sinal de baixa intensidade.

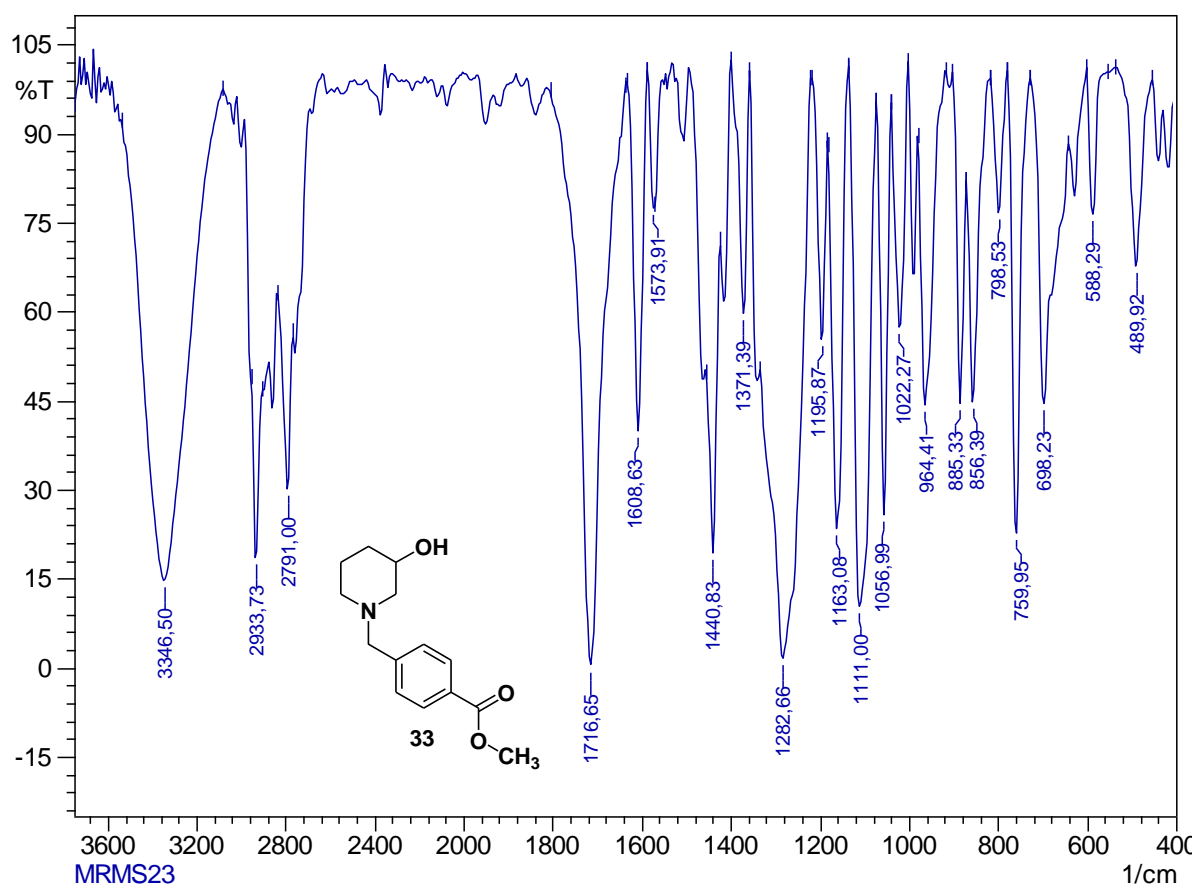


Uma vez otimizada a etapa de obtenção do éster intermediário **38**, partiu-se para a síntese do 4-[(3-hidroxipiperidin-1-il)metil]benzoato de metila (**33**) através da reação de aminação redutiva entre **38** e 3-hidroxipiperidina (**31**).<sup>60</sup>



Esquema 4: Reação de aminação redutiva entre o aldeído (**38**) e a 3-hidroxipiperidina (**31**).

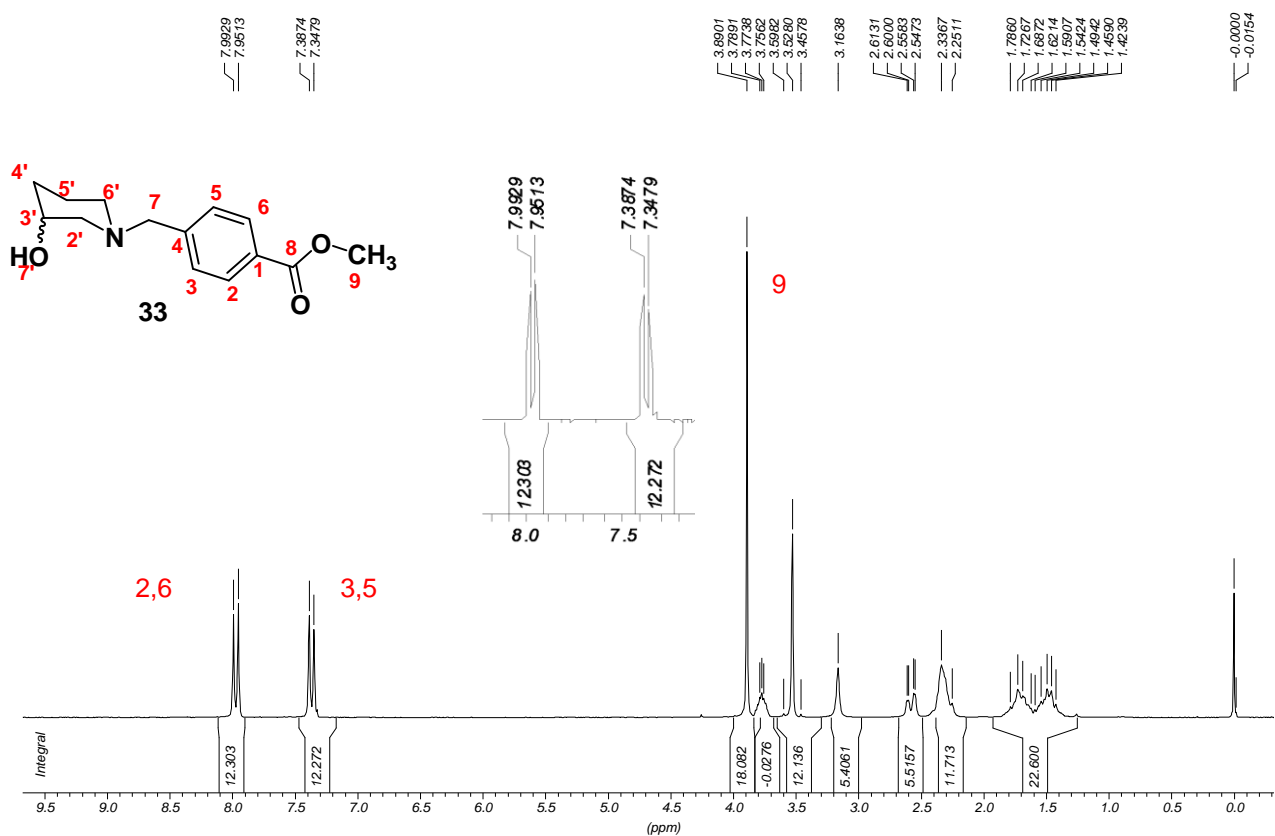
A técnica de aminação redutiva utilizada consistiu na preparação de uma solução de um equiv. do aldeído **38** e dois equiv. da amina **31**. Em outro balão, dissolveu-se dois equiv. de  $\text{NaBH}_3\text{CN}$  e um equiv. de  $\text{ZnCl}_2$  em metanol seco, sob atmosfera de  $\text{N}_2$ . Após uma hora as duas soluções foram misturadas. Acredita-se que o agente redutor seria uma mistura de sais de complexos de zinco tais como:  $\text{Na}[\text{ZnCl}(\text{BH}_3\text{CN})_2]$ ,  $\text{Na}_2[\text{ZnCl}_2-(\text{BH}_3\text{CN})_2]$ ,  $\text{Na}[\text{Zn}(\text{BH}_3\text{CN})_3]$ , e  $\text{Zn}(\text{BH}_3\text{CN})_2$ , onde o zinco atuaria com ácido de Lewis, complexando-se ao oxigênio da carbonila, aumentando a reatividade desta e facilitando a transferência de hidreto<sup>60</sup>. Na análise do espectro no IV do produto obtido (Espectro 5), comparada à análise do éster de partida **38**, observou-se o aparecimento de uma banda de  $\nu_{\text{s}}\text{O-H}$  em  $3346\text{ cm}^{-1}$ . Foram observadas as bandas características de  $\nu_{\text{s}}\text{C-H}$  de metila e metileno em  $2933$  e  $2791\text{ cm}^{-1}$  e não foi observada a banda de  $\nu_{\text{s}}\text{C-H}$  de aldeído em  $2735\text{ cm}^{-1}$ . Foram também observadas uma banda de  $\nu_{\text{s}}\text{C=O}$  em  $1716\text{ cm}^{-1}$  e duas bandas de  $\delta_{\text{s}}\text{C-O}$ , uma larga em  $1282$  e outra  $1111\text{ cm}^{-1}$ , característica de ésteres. O alargamento da banda  $1282\text{ cm}^{-1}$  ocorreu, provavelmente, devido à sobreposição das bandas de  $\delta_{\text{s}}\text{C-O}$  e  $\delta_{\text{s}}\text{C-N}$ . Estes resultados apontaram para o sucesso na preparação do éster *N*-benzílico **33**, que foi adicionalmente caracterizado por RMN de  $^1\text{H}$  e de  $^{13}\text{C}$ .



**Espectro 5.** Espectro no IV (KBr) do 4[(3-hidroxipiperididin-1-il)metil]benzoato de metila (**33**).

Analisando o espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (Espectro 6), foi observado um singlete em  $\delta$  3,89 atribuído aos 3 hidrogênios metílicos, dois dupletos correspondentes aos hidrogênios aromáticos, com padrão de substituição 1,4, um em  $\delta$  7,34 e outro em  $\delta$  7,95 e 6 multipletos mais blindados, correspondente aos hidrogênios do anel piperidínico e metilênicos do grupo benzila. Não foi observado o sinal referente ao hidrogênio de aldeído em  $\delta$  próximo a 10.



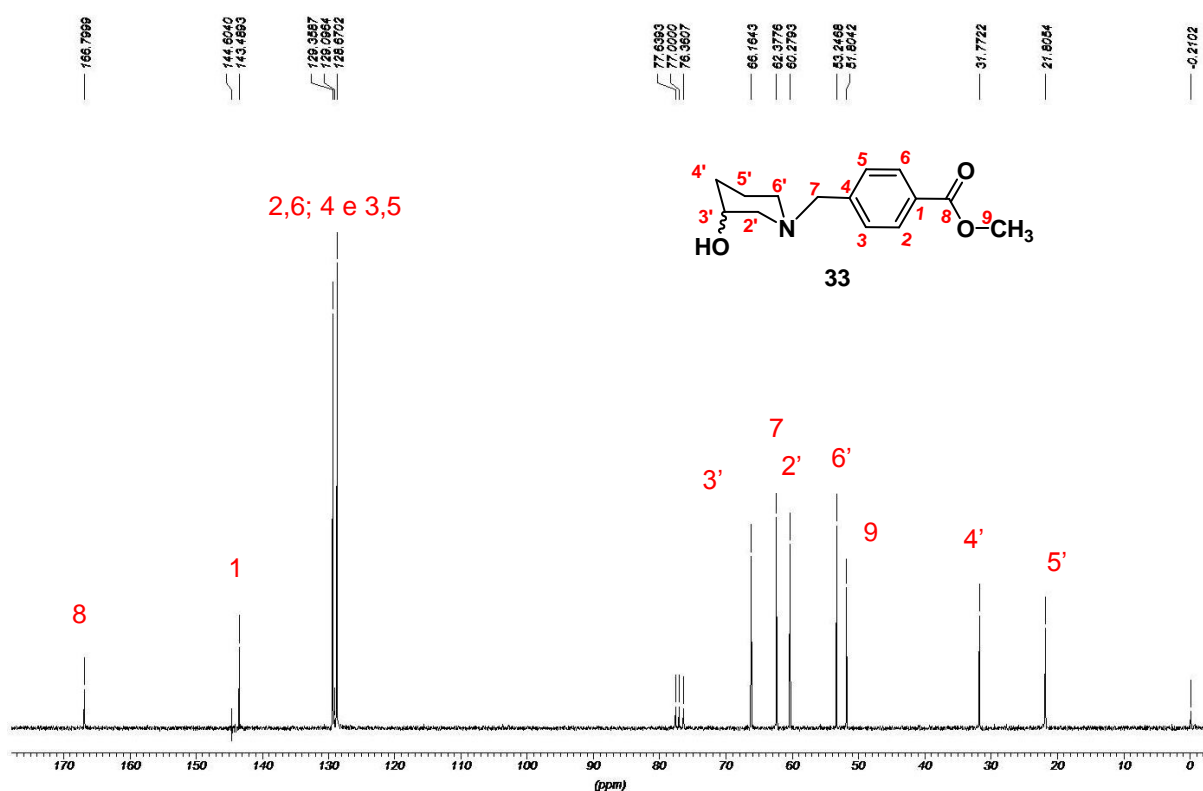


**Espectro 6.** Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (200 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) do 4-[(3-hidroxipiperididin-1-il)metil]benzoato de metila (**33**).

**Tabela 2:** dados de RMN de  $^1\text{H}$  (200 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) e  $^{13}\text{C}$  (50 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) do 4-[(3-hidroxipiperididin-1-il)metil]benzoato de metila **33**.

Posição	$\delta$ $^1\text{H}$ (ppm)	m	J (Hz)	$\delta$ $^{13}\text{C}$ (ppm)
9	3,89	s	-	51,8
8	-	-	-	166,8
1	-	-	-	143,5
2,6	7,97	d	8,0	129,3
3,5	7,37	d	8,0	128,7
4	-	-	-	129,1
7	3,53	s	-	62,4
2'	2,55 - 2,61	m	-	60,3
3'	3,76 - 3,79	m	-	66,2
4'	1,59 - 1,79	m	-	31,8
5'	1,42 - 1,54	m	-	21,8
6'	2,25 - 2,34	m	-	53,2
7'	3,16	$s_L$	-	-

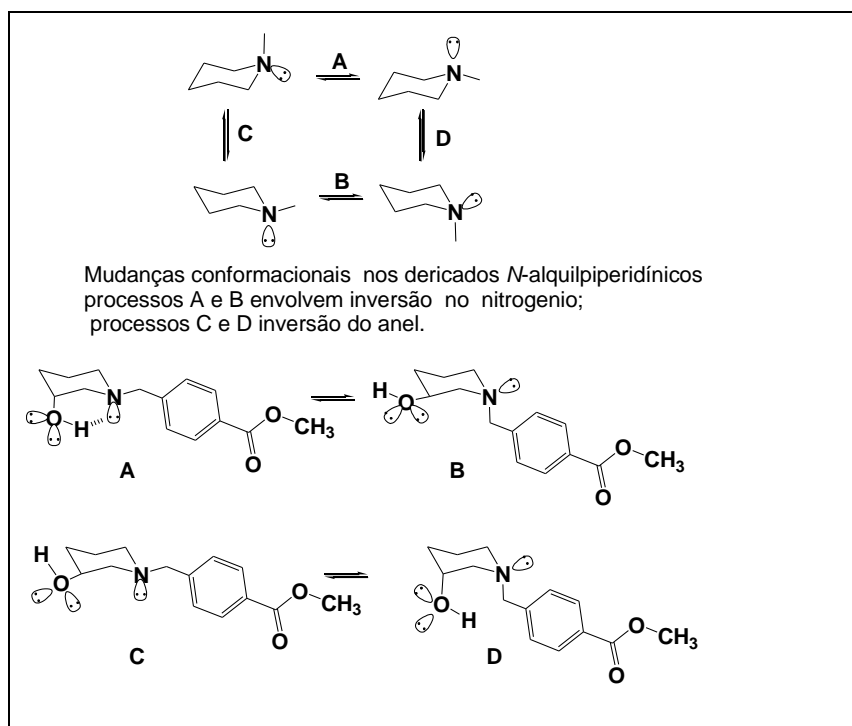
O espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  (Espectro 7) corroborou a caracterização do intermediário **33**. Não foi observado o sinal do carbono carbonílico de aldeído, porém foi observada a presença do sinal de carbono carbonílico do éster em  $\delta$  166,7, além dos sinais de carbonos aromáticos mais desblindados e do anel piperidínico, metilênico e metílico, mais blindados.



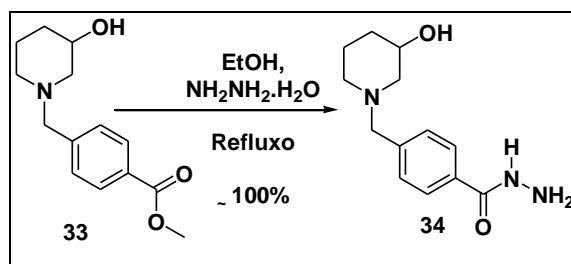
**Espectro 7.** Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (50 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) do 4[(3-hidroxipiperididin-1-il)metil]benzoato de metila (**33**).

Quanto à conformação do anel piperidínico, heterociclos contendo 1 ou até 2 átomos de N apresentam um conjunto de confôrmeros mais complexos, comparado-se ao cicloexano. Isto se deve a dois diferentes tipos de mudanças conformacionais que podem ocorrer: a inversão tetraédrica dos substituintes do átomo de nitrogênio e inversão conformacional do sistema cíclico alifático. A Inversão tetraédrica do N é um processo de menor energia e o confôrmero no qual o átomo de H ligado ao N ocupa a posição equatorial é mais estável. Isto se repete com grupos alquila ligados ao nitrogênio, também ocupam preferencialmente a posição equatorial, minimizando as interações 1-3 diaxiais desestabilizantes e que aumentam a tensão torcional do sistema. Em sistemas cíclicos, Interações entre substituintes normalmente são de repulsão, contudo em alguns anéis heterociclos podem ocorrer interações atrativas

peculiares, as quais influenciam em mudanças conformacionais e na reatividade. Um exemplo destes casos pode ser visto na Figura 14, onde a formação de ligação de hidrogênio intramolecular entre o substituinte e o heteroátomo, como pode ser observado em derivados 3-hidroxi-piperidínicos.<sup>61,62</sup> No intermediário *N*-benzilpiperidínico **33**, a existência de uma ligação de hidrogênio intramolecular envolvendo a hidroxila e o nitrogênio, no isômero *R*, estaria contribuindo para maior estabilidade do confôrmero A que mantém a hidroxila na posição axial. Nesta situação, este confôrmero seria o mais estável, apesar das interações repulsivas 1, 3 diaxiais. Já no isômero *S*, esta ligação de hidrogênio não é possível e o confôrmero C, onde a hidroxila ocupa a posição equatorial, seria o mais estável (Fig. 13).

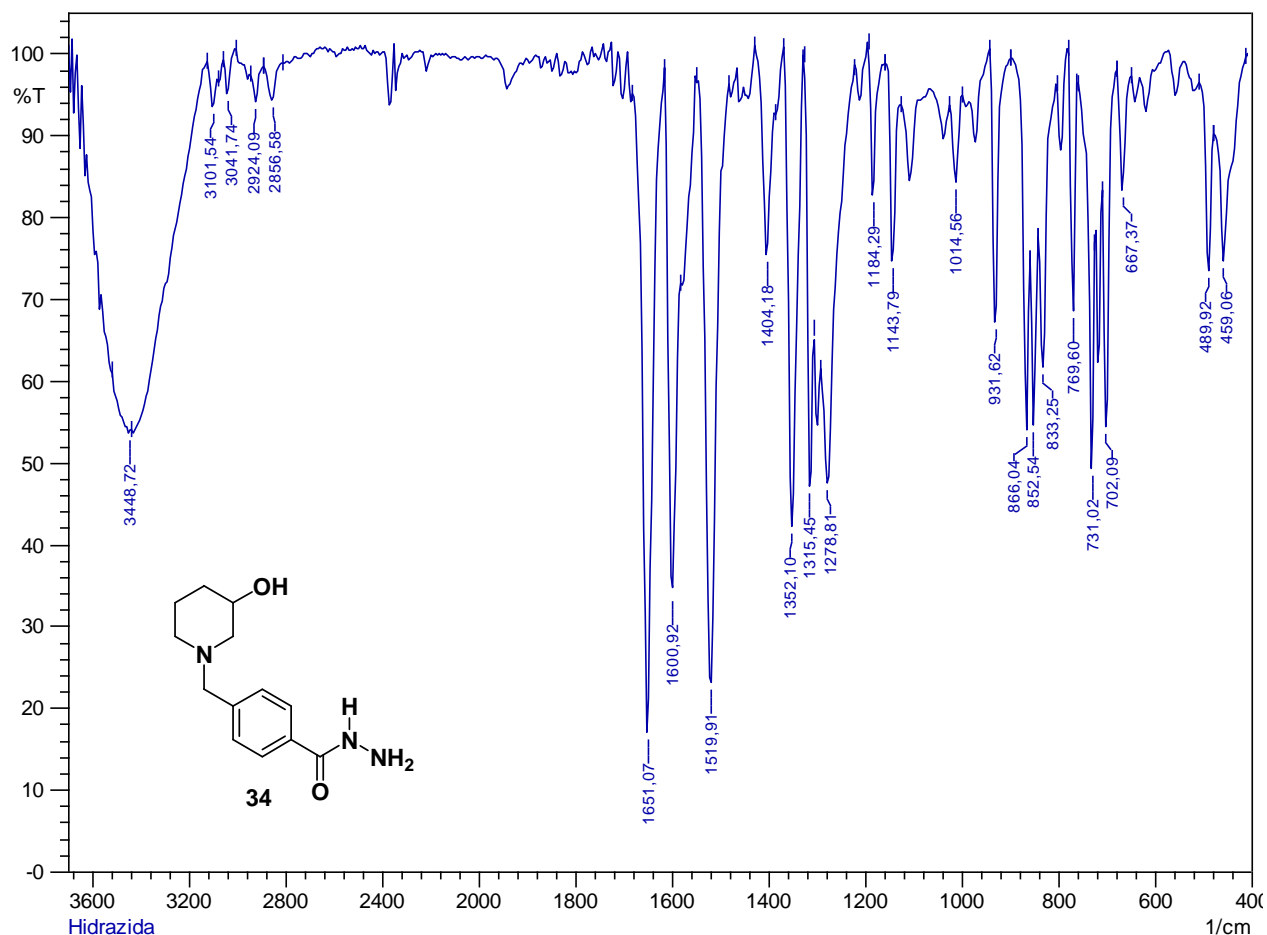


**Figura 13:** Interações conformacionais e estabilidade relativa em sistemas piperidínicos e o exemplo do intermediário **33**.



**Esquema 5:** Reação do éster **33** com monohidrato de hidrazina.

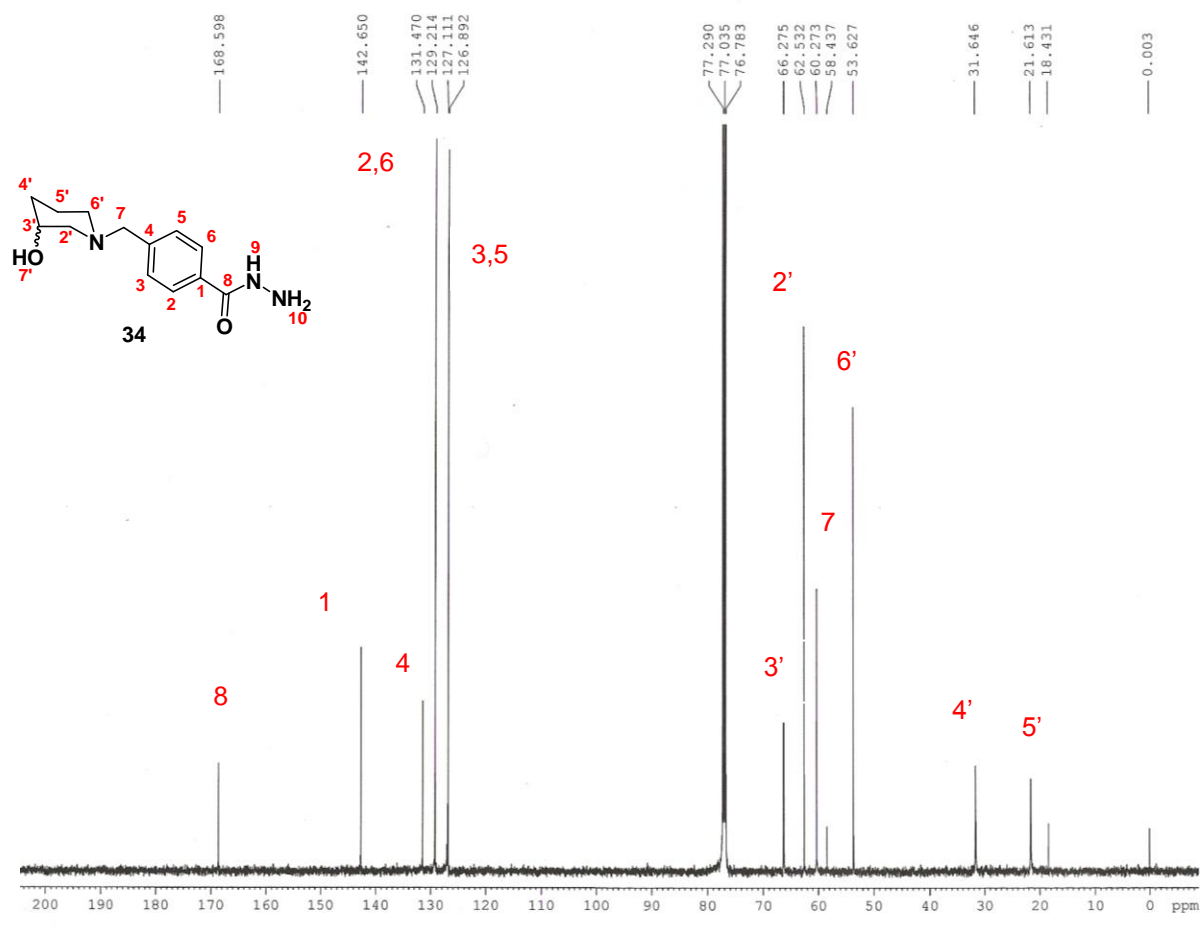
O éster **33** foi convertido na hidrazida **34** por reação com  $\text{NH}_2\text{NH}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}^{63}$ , cujo produto reacional foi analisado por IV (Espectro 8). Comparando-se à análise do éster de partida, foi observado o deslocamento da banda  $\nu_{\text{s}}\text{C}=\text{O}$  de 1716 para 1651  $\text{cm}^{-1}$  e não foi observada a banda intensa em 1111  $\text{cm}^{-1}$ , referente à  $\delta_{\text{s}}\text{C}-\text{O}$ , característica de ésteres, além do aparecimento de uma banda  $\delta$  fora do plano de NH em 1600  $\text{cm}^{-1}$ , o que confirmou a conversão de **33** na hidrazida **34**.



**Espectro 8.** Espectro no IV (KBr) da 4-[(3-hidroxipiperidin-1-il)metil]benzoilidrazina (**34**).

O espectro de RMN de  $^1\text{H}$  de **34** (Espectro 9) confirmou a conversão de **33** na hidrazida **34** pelo desaparecimento do singlete em  $\delta$  3,89 referentes aos 3 hidrogênios metílicos. Observou-se dois dupletos correspondentes aos 4 hidrogênios aromáticos, com padrão de substituição 1,4, em  $\delta$  7,70 e  $\delta$  7,38 e 6 multipletos mais blindados, correspondentes aos hidrogênios do anel piperidínico e aos hidrogênios metilênicos.



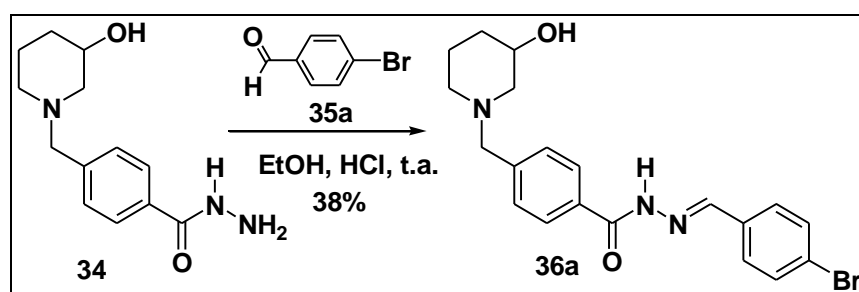


**Espectro 10:** Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) da 4-[(3-hidroxiopiperidin-1-il)metil]-benzoilidrazina (34).

**Tabela 3:** dados de RMN de  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) e  $^{13}\text{C}$  (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) da 4-[(3-hidroxipiperidin-1-il)metil]benzoilidrazina **34**.

Posição	$\delta$ $^1\text{H}$ (ppm)	m	J(Hz)	$\delta$ $^{13}\text{C}$ (ppm)
10	7,27	s	-	-
9	7,57	s	-	-
8	-	-	-	168,6
1	-	-	-	142,6
2,6	7,70	d	4,0	129,2
3,5	7,38	d	8,0	127,1
4	-	-	-	131,5
7	3,54	s	-	60,3
2'	2,47	$s_L$	-	62,5
3'	3,81	$s_L$	-	66,3
4'	1,75 - 1,80	m	-	31,6
5'	1,50 - 1,56	m	-	21,6
6'	2,28	$s_L$	-	53,6
7'	4,74	s	-	-

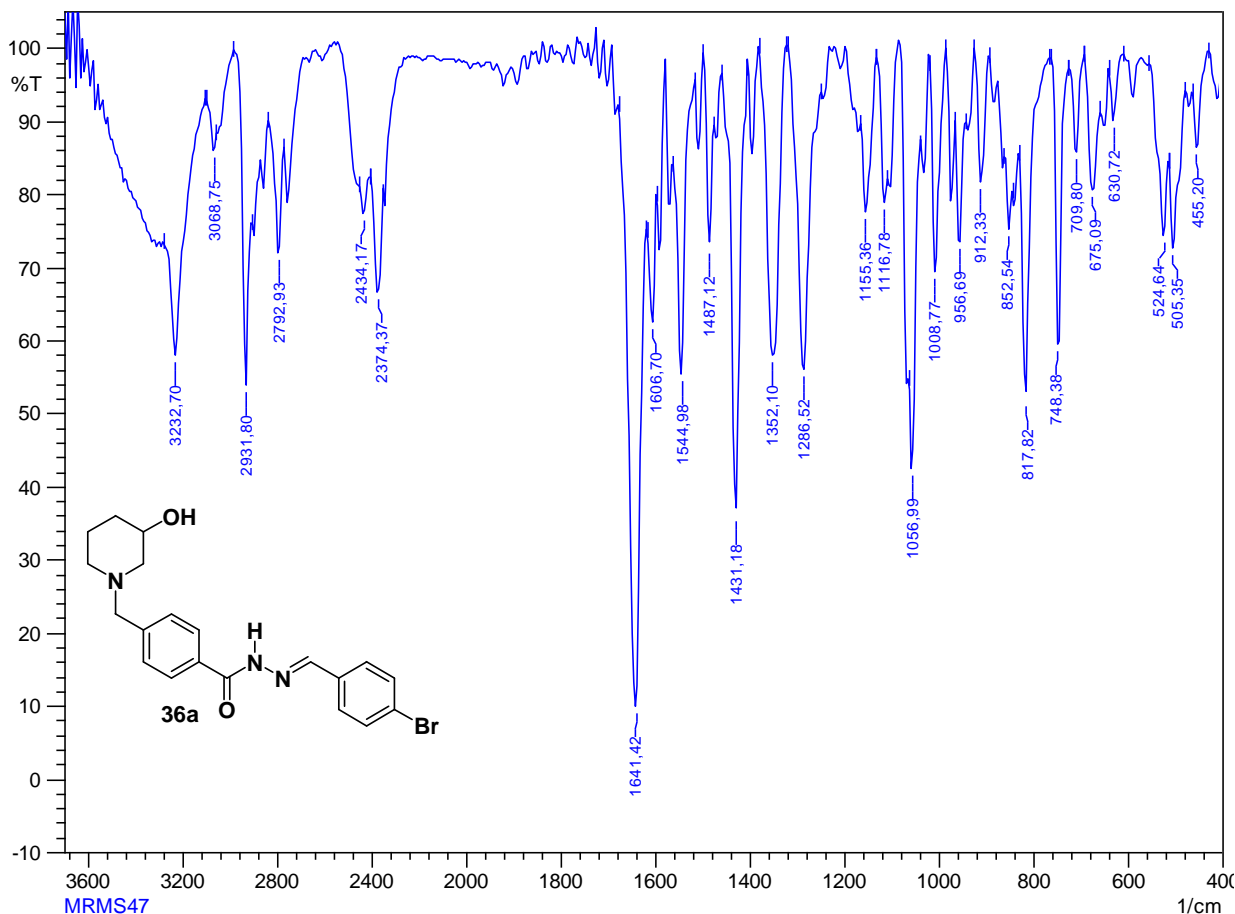
Dando continuidade à rota de obtenção dos compostos-alvo **29**, a hidrazida **34** foi submetida a acoplamentos com uma serie de benzaldeídos funcionalizados **35** (Esquemas 4 e 5). Numa primeira etapa de avaliação das condições reacionais, foi realizada a reação entre **34** e 4-bromobenzaldeído **35a**, acompanhando a evolução da reação por CCD<sup>64</sup>.



**Esquema 6:** Reação de acoplamento entre a hidrazida **34** e 4-bromobenzaldeído (**35a**).

Após elaboração da reação, precipitação por adição de água, nova análise por CCD revelou que o precipitado correspondia ao aldeído de partida e o produto, provavelmente, a acilidrazona desejada **36a**, permaneceu na fase aquosa. A concentração da água e secagem do produto forneceu um sólido branco com 38% de rendimento, que foi analisado por espectrometria no IV (Espectro 11).

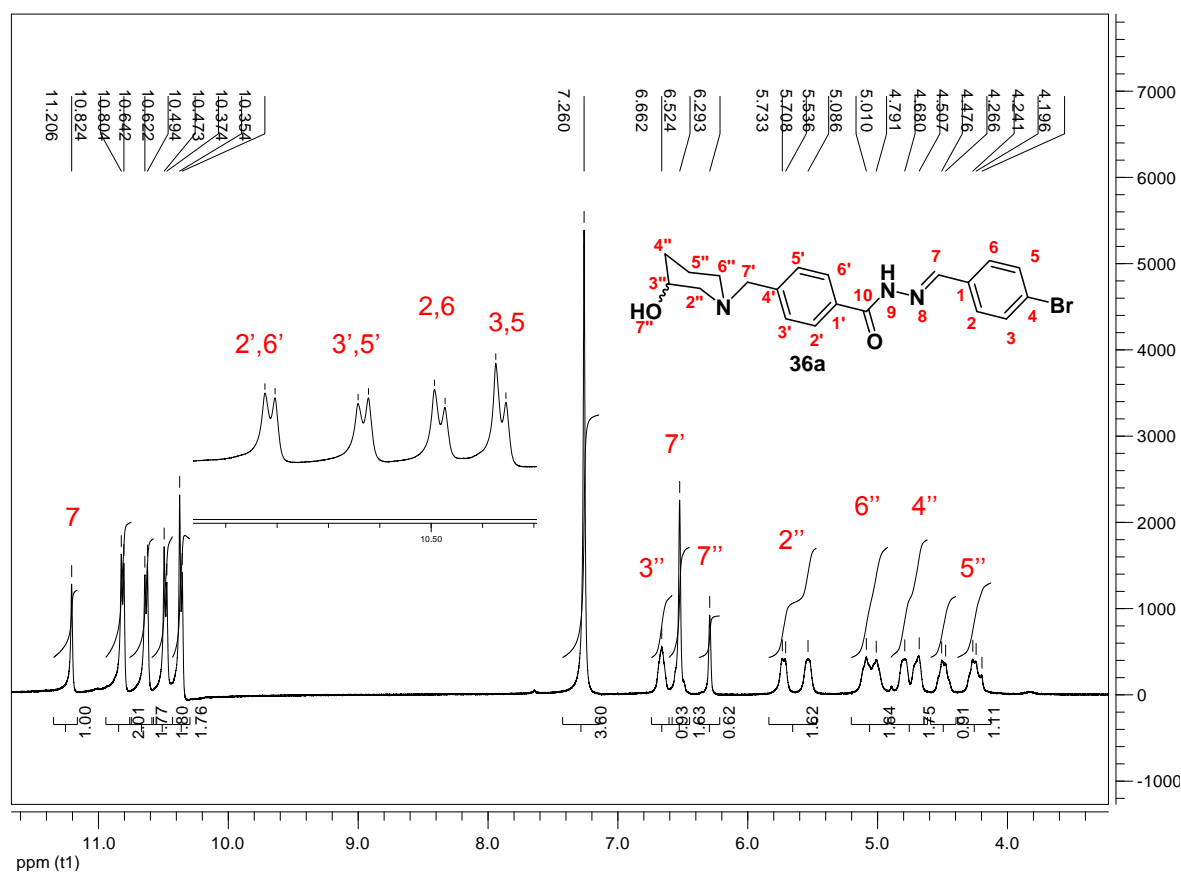
Comparada à análise da hidrazida **34**, observou-se o aparecimento de uma banda em  $3232\text{ cm}^{-1}$  referente ao  $\nu_{\text{s}}\text{N-H}$  e o deslocamento da banda de  $\nu_{\text{s}}\text{C=O}$  de  $1651$  para  $1641\text{ cm}^{-1}$ , que pode ser atribuído ao acoplamento da hidrazida com o aldeído, sugerindo o sucesso na obtenção de **36a**.



**Espectro 11.** Espectro no IV (KBr) do produto *N'*-(4-bromobenzilideno)-4-[(3-hidroxipiperidin-1-il)metil]benzoilidrazina (**36a**).

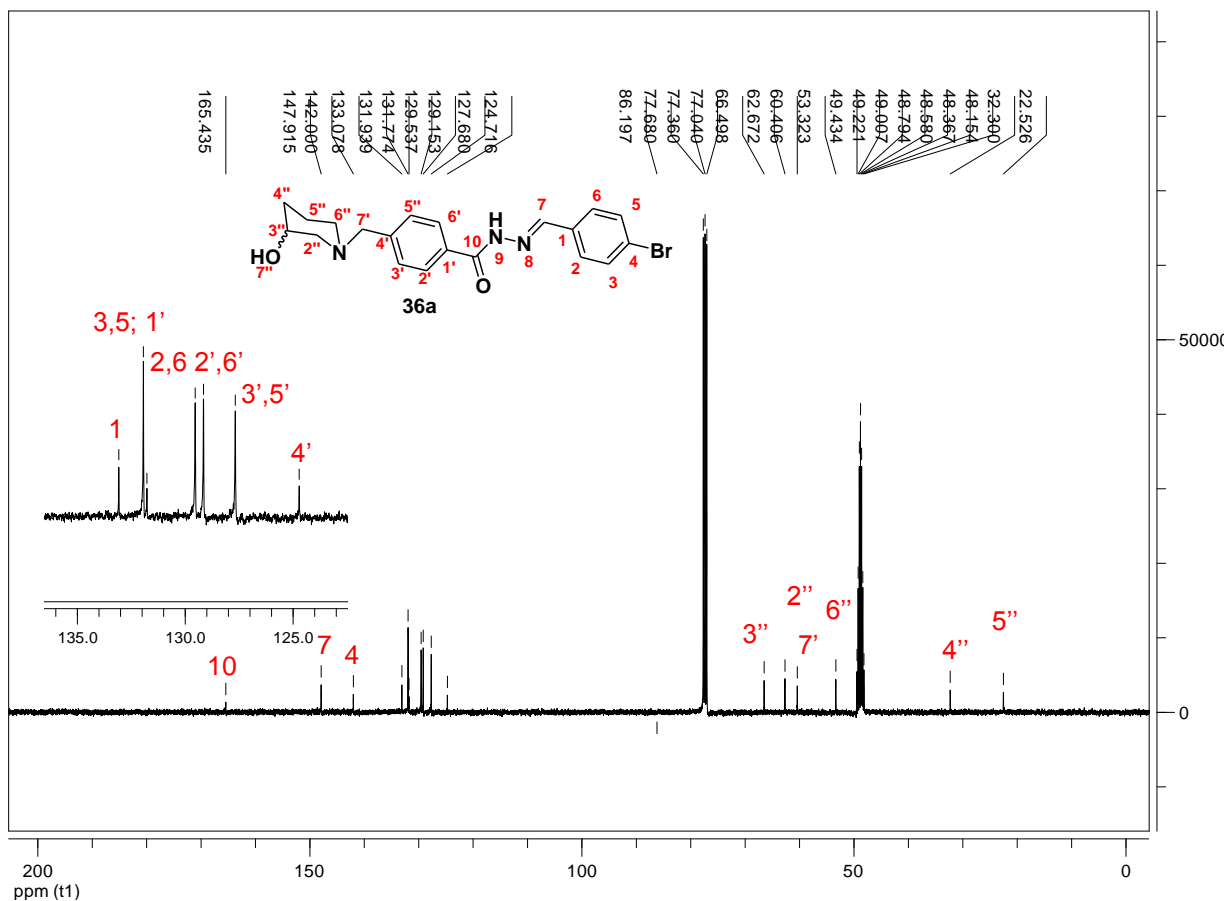
No espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (Espectro 12), foi observado um singlete em  $\delta$  11,21 correspondente ao N-H do grupamento acilidrazona, quatro dupletos correspondentes aos hidrogênios aromáticos, com padrão de substituição 1,4 em  $\delta$  10,82; 10,64; 10,49 e 10,37 além de sinais mais blindados, correspondente aos hidrogênios do anel piperidínico e aos hidrogênios metilênicos.





**Espectro 12:** Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) do produto *N'*-(4-bromobenzilideno)-4-[(3-hidroxipiperidin-1-il)metil]benzoilidrazina (**36a**).

O espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  (Espectro 13) corroborou a caracterização da acilidrazona **36a** pela presença do sinal de carbono carbonílico em  $\delta$  165,4, quatro sinais de carbono quaternário aromático em  $\delta$  147,9, 142,0, 133,1 e 124,7, quatro sinais de carbono terciário aromático em  $\delta$  131,9, 129,5, 129,1 e 127,7, além de sinais dos carbonos do anel piperidínico e do grupo metilênico.

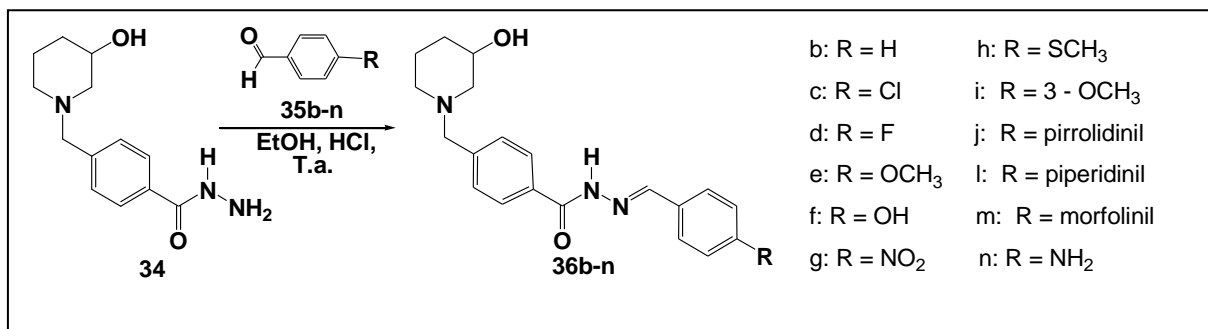


**Espectro 13:** Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) do produto *N'*-(4-bromobenzilideno)-4-[(3-hidroxipiperidin-1-il)metil]benzoilidrazina (**36a**).

**Tabela 4:** dados de RMN de  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) e  $^{13}\text{C}$  (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) da acilidrazona **36a**.

Posição	$\delta^1\text{H}$ (ppm)	m	J(Hz)	$\delta^{13}\text{C}$ (ppm)
4	-	-	-	142,0
2,6	10,48	<i>d</i>	8,0	129,5
3,5	10,36	<i>d</i>	8,0	131,9
1	-	-	-	133,1
7	11,21	<i>s</i>	-	147,9
10	-	-	-	165,4
1'	-	-	-	131,8
2',6'	10,81	<i>d</i>	8,0	129,2
3',5'	10,63	<i>d</i>	8,0	127,7
4'	-	-	-	124,7
7'	6,52	<i>s<sub>L</sub></i>	-	60,4
2''	5,54 - 5,73	<i>m</i>	-	62,7
3''	6,66	<i>s<sub>L</sub></i>	-	66,5
4''	4,68 - 4,69	<i>m</i>	-	32,3
5''	4,20 - 4,51	<i>m</i>	-	22,5
6''	5,01 - 5,09	<i>m</i>	-	53,3
7''	6,29	<i>s</i>	-	-

Subsequentemente, a hidrazida **34** foi submetida ao acoplamento com os aldeídos **35b-n** para gerar as respectivas acilidrazonas **36b-n**, seguindo as condições descritas na parte experimental para o procedimento geral de obtenção das acilidrazonas **36**,<sup>60</sup> otimizado a partir do procedimento anterior, sendo o work-up a evaporação do solvente sob pressão reduzida seguido de purificação em coluna o que proporcionou um melhor rendimento (Esquema 07, Tab. 05).



**Esquema 7:** Reação de acoplamento entre a hidrazida **34** e aldeídos funcionalizados **35b – n**.

**Tabela 5:** Acilidrazonas **36b – n**, seus respectivos rendimentos e ponto de fusão.

Substancia	R	Rendimento (%)	Ponto de fusão (°C)
<b>36a</b>	Br	91	198-203
<b>36b</b>	H	90	194-200
<b>36c</b>	Cl	96	210-215
<b>36d</b>	F	86	225-232
<b>36e</b>	OCH <sub>3</sub>	88	193-195
<b>36f</b>	OH	86	158-163
<b>36g</b>	NO <sub>2</sub>	91	210-214
<b>36h</b>	SCH <sub>3</sub>	65	195-205
<b>36i</b>	3-OCH <sub>3</sub>	78	189-195
<b>36j</b>	pirrolidinil	54	172-180
<b>36l</b>	piperidinil	59	178- 186
<b>36m</b>	morfolinil	67	186-195

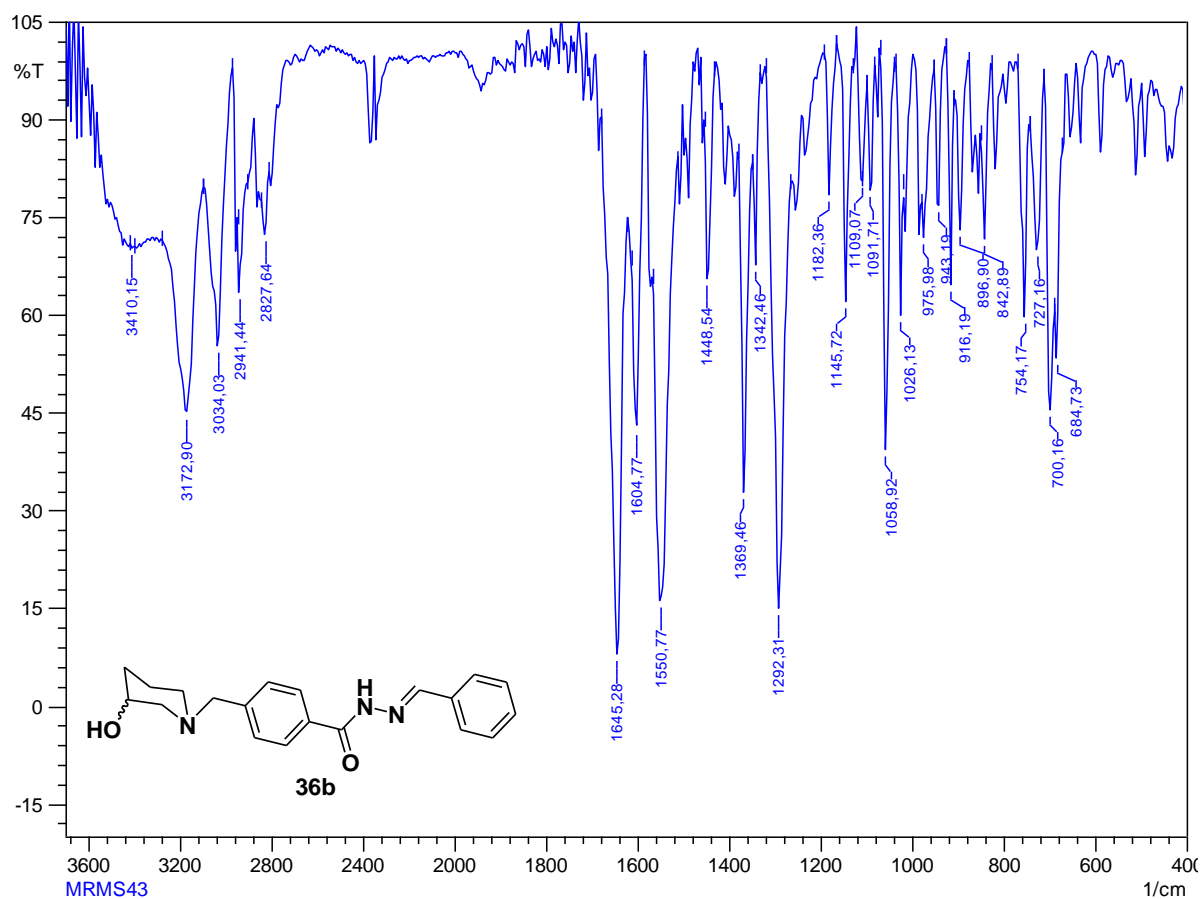
Uma vez que nem todos os dados de RMN  $^{13}\text{C}$  e bidimensionais HMQC e HMBC das acilidrazonas-alvo **36b-n** não estavam disponíveis sua caracterização estrutural preliminar foi realizada pela análise conjunta de seus espectros no IV e dos espectros de RMN de  $^1\text{H}$ , comparando com dados já disponíveis para outras arilidrazonas desta série, com padrão estrutural homólogo. Na análise no IV dos produtos obtidos **36b-n**, observam-se bandas de  $\nu_{\text{s}}$  OH, NH e CH na região de 3000  $\text{cm}^{-1}$ , além da banda de  $\nu_{\text{s}}$  C=O em torno de 1640 a 1660  $\text{cm}^{-1}$ , sugerindo o sucesso na reação. Os dados de RMN  $^1\text{H}$  dos compostos **36b-e**, **36g-h**, **36j** e **36n** estão descritos na Tabela 06.

Respeitando um padrão estrutural comum, em todos os espectros de RMN  $^1\text{H}$  observam-se 4 sinais diferentes de hidrogênios aromáticos na região de 7-10 ppm, com multiplicidades e constantes de acoplamento condizentes com a regioquímica dos substituintes das subunidades aromáticas, além dos sinais de H alifáticos do anel piperidínico na região de 1,0-6,0 ppm.

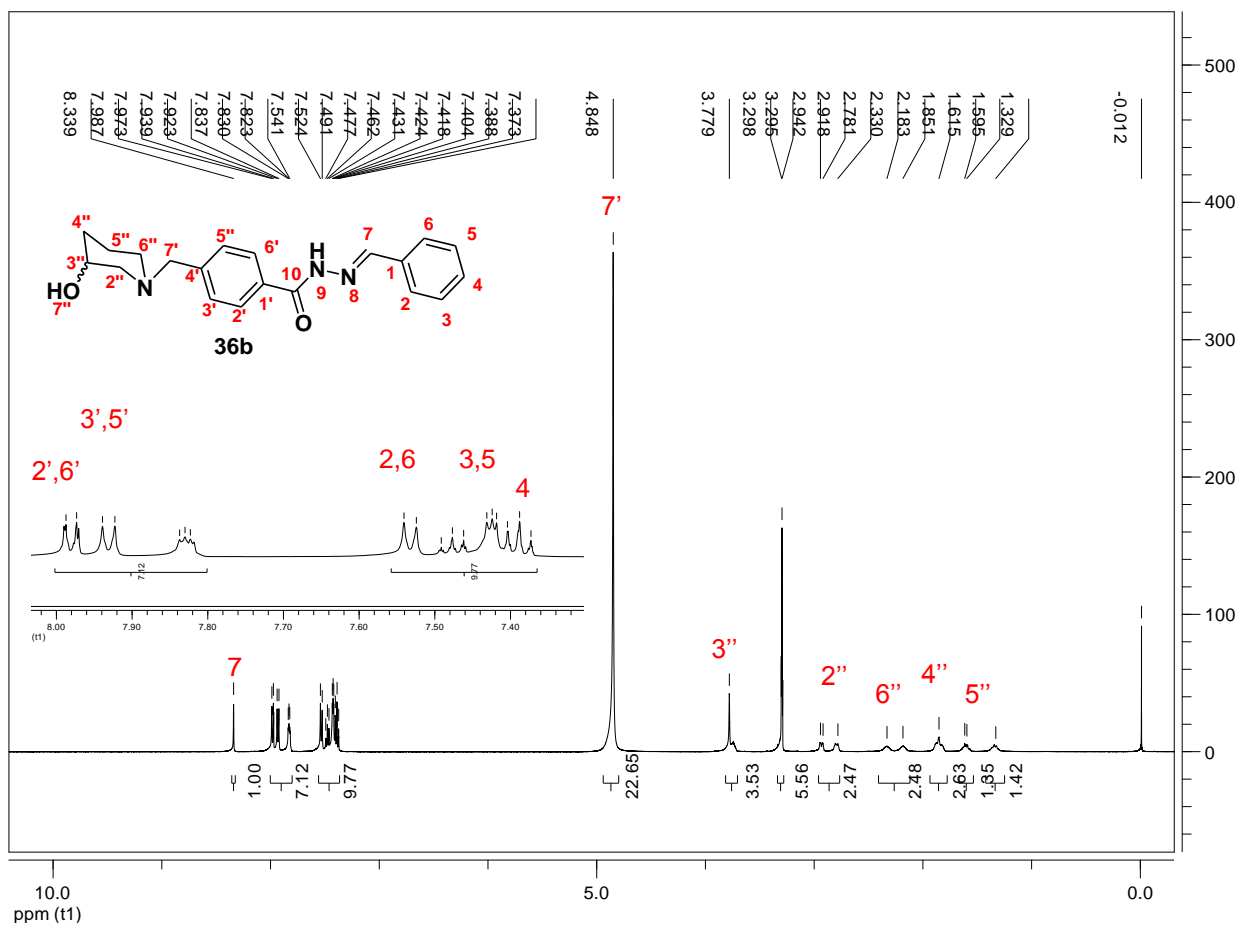
Quanto a estereoquímica da dupla ligação da subunidade acilidrazona os espectros de RMN de  $^1\text{H}$  sugerem configuração *E*, entretantão foram feitos experimentos adicionais para confirmar estes dados de forma inequívoca.

**Tabela 6:** Dados de RMN de  $^1\text{H}$  [ $\delta$ , *m*, J (Hz)] (400 MHz) das acilidrazonas **36b-e**, **36g-h**, **36l** e **36n**.

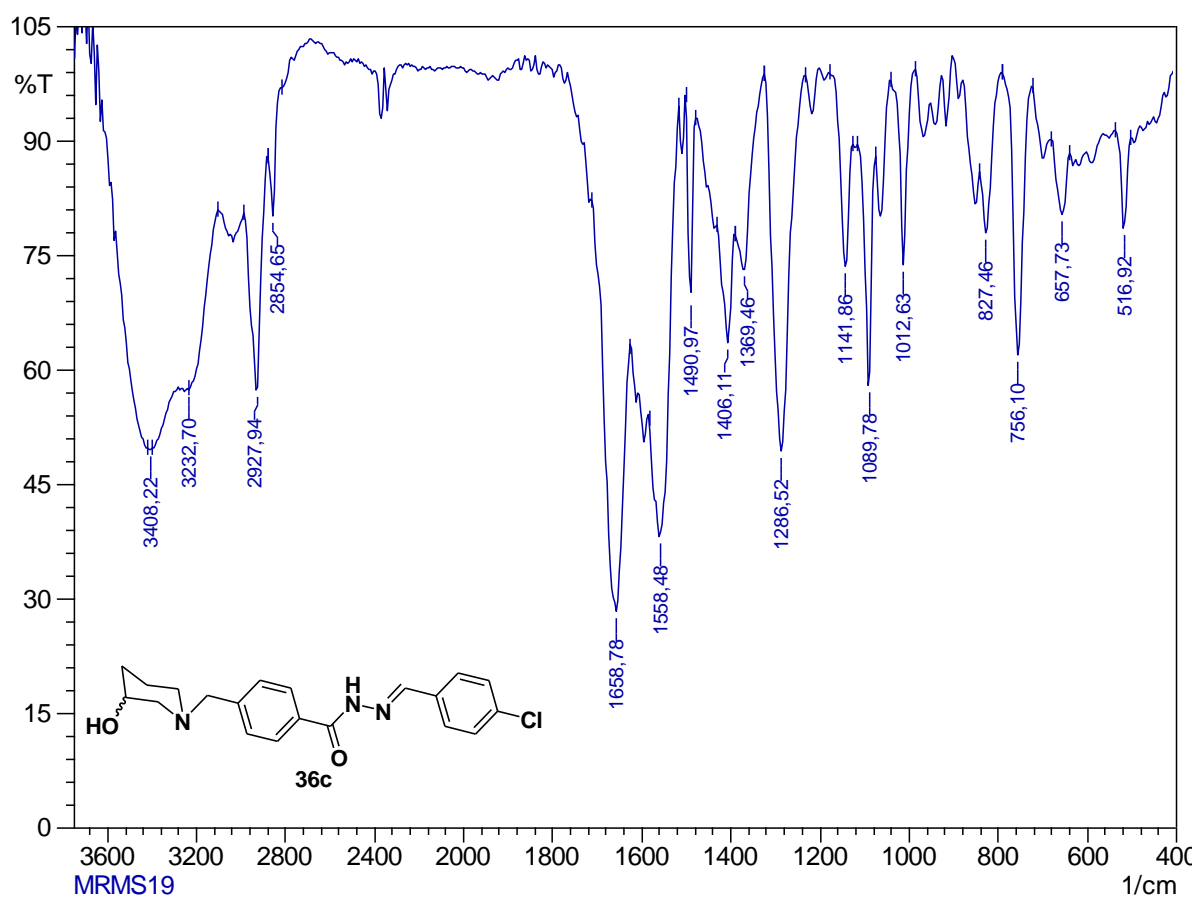
H	<b>36b</b> (CD <sub>3</sub> OD)	<b>36c</b> (CD <sub>3</sub> OD)	<b>36d</b> (CDCl <sub>3</sub> )	<b>36e</b> (CD <sub>3</sub> OD)	<b>36g</b> (CDCl <sub>3</sub> )	<b>36h</b> (CD <sub>3</sub> OD)	<b>36l</b> (CDCl <sub>3</sub> )	<b>36n</b> (CDCl <sub>3</sub> )
4	7,38, <i>t</i> , 8	-	-	-	-	-	-	-
2,6	7,53, <i>d</i> , 8	7,51, <i>d</i> , 8	10,56, <i>t</i> , 16	6,99, <i>d</i> , 8	10,80, <i>d</i> , 8	7,30, <i>d</i> , 8	6,89, <i>d</i> , 8	8,04, <i>d</i> , 8
3,5	7,47, <i>t</i> , 8	7,44, <i>d</i> , 8	10,54, <i>t</i> , 8	7,78, <i>d</i> , 8	11,05, <i>d</i> , 8	7,68, <i>d</i> , 8	7,39, <i>d</i> , 8	8,33, <i>d</i> , 8
7	8,34, <i>s</i>	8,32, <i>s</i>	11,02, <i>s</i>	8,28, <i>s</i>	11,18, <i>s</i>	8,35, <i>s</i>	8,14, <i>s</i>	8,72, <i>s</i>
2',6'	7,96, <i>d</i> , 8	7,91, <i>d</i> , 8	10,60, <i>d</i> , 8	7,89, <i>d</i> , 8	10,68, <i>d</i> , 8	8,03, <i>d</i> , 8	7,78, <i>d</i> , 8	8,27, <i>d</i> , 8
3',5'	7,93, <i>d</i> , 8	7,83, <i>d</i> , 8	10,15, <i>d</i> , 8	7,49, <i>d</i> , 8	10,23, <i>d</i> , 8	7,75, <i>d</i> , 8	7,65, <i>d</i> , 8	7,44, <i>d</i> , 8
7'	4,85, <i>s</i>	4,83, <i>s</i>	6,32, <i>s</i>	4,84, <i>s</i>	6,39, <i>s</i>	4,84, <i>s</i>	3,55, <i>s</i>	
2''	2,94 e 2,78, <i>m</i>	2,70 e 2,89, <i>m</i>	5,34 - 5,56, <i>m</i>	2,86 e 2,68, <i>m</i>	5,41 e 5,60, <i>m</i>	3,14 e 2,83, <i>m</i>	2,47, <i>m</i>	
3''	3,78, <i>m</i>	3,65, <i>m</i>	6,43, <i>m</i>	3,65, <i>m</i>	6,50, <i>m</i>	4,34, <i>m</i>	3,82, <i>m</i>	
4''	1,85, <i>m</i>	1,58 e 1,74, <i>m</i>	4,46 - 4,60, <i>m</i>	1,73 e 1,56, <i>m</i>	4,53 e 4,66, <i>m</i>	1,78, <i>m</i>	1,55, <i>m</i>	
5''	1,33 e 1,61, <i>m</i>	0,90, 1,29, <i>m</i>	3,97 - 4,29, <i>m</i>	1,25, <i>m</i>	4,05 e 4,35, <i>m</i>	1,66, <i>m</i>	0,89, <i>m</i>	
6''	2,33 e 2,18, <i>m</i>	1,91 e 2,10, <i>m</i>	4,76- 4,85, <i>m</i>	2,06 e 1,90, <i>m</i>	4,83 e 4,91, <i>m</i>	2,12, <i>m</i>	1,80, <i>m</i>	
7''	-	4,55, <i>s<sub>L</sub></i>	6,06, <i>s<sub>L</sub></i>	-	6,13, <i>s<sub>L</sub></i>	4,00, <i>s<sub>L</sub></i>		



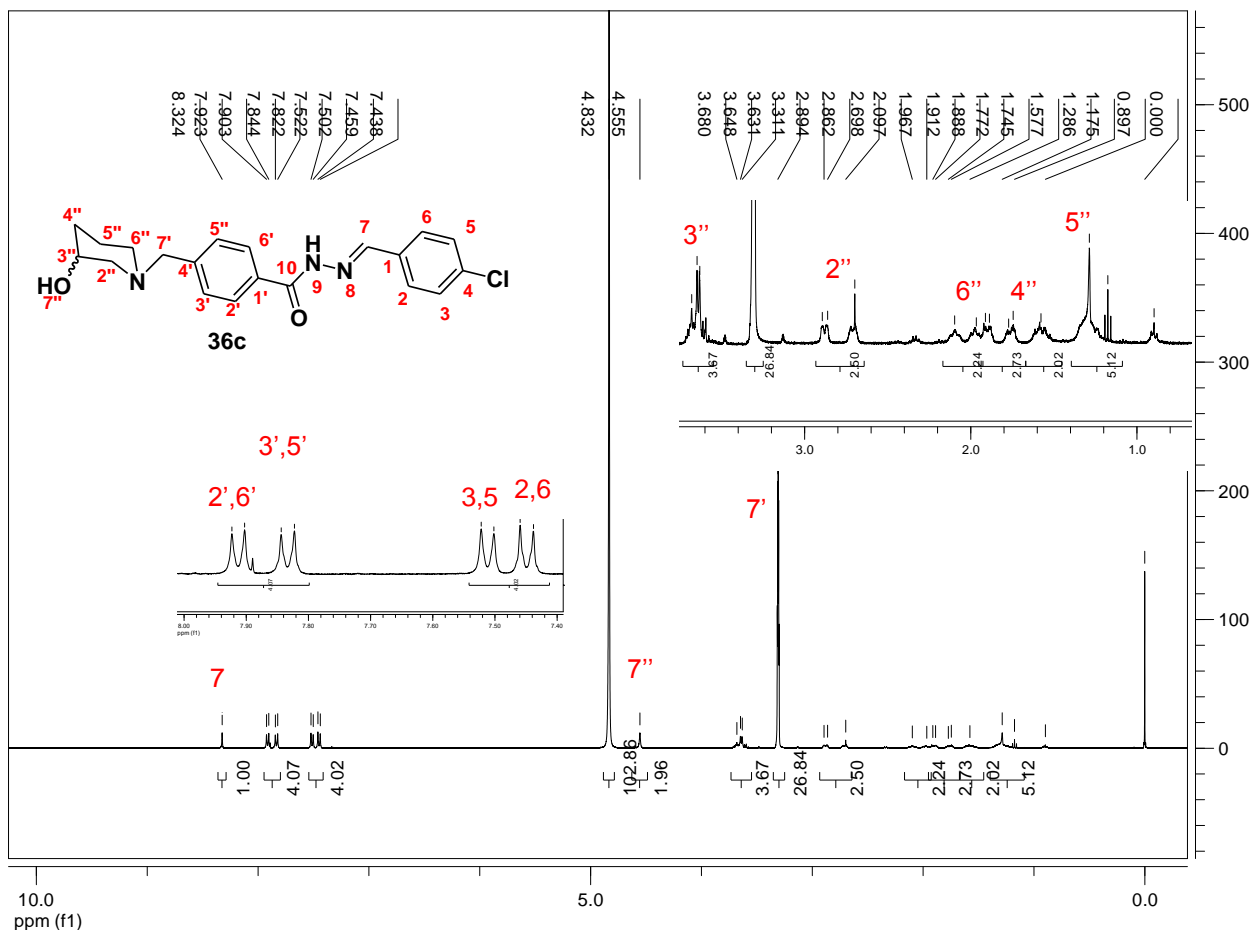
**Espectro 14.** Espectro no IV (KBr) do produto *N*-benzilideno-4-((3-hidroxi-piperidin-1-il)metil)benzoilidrazina (**36b**).



**Espectro 15:** Espectro de RMN de <sup>1</sup>H (CD<sub>3</sub>OD, 400 MHz) do produto *N*-benzilideno-4-((3-hidroxipiperidin-1-il)metil)benzoilidrazina (**36b**).

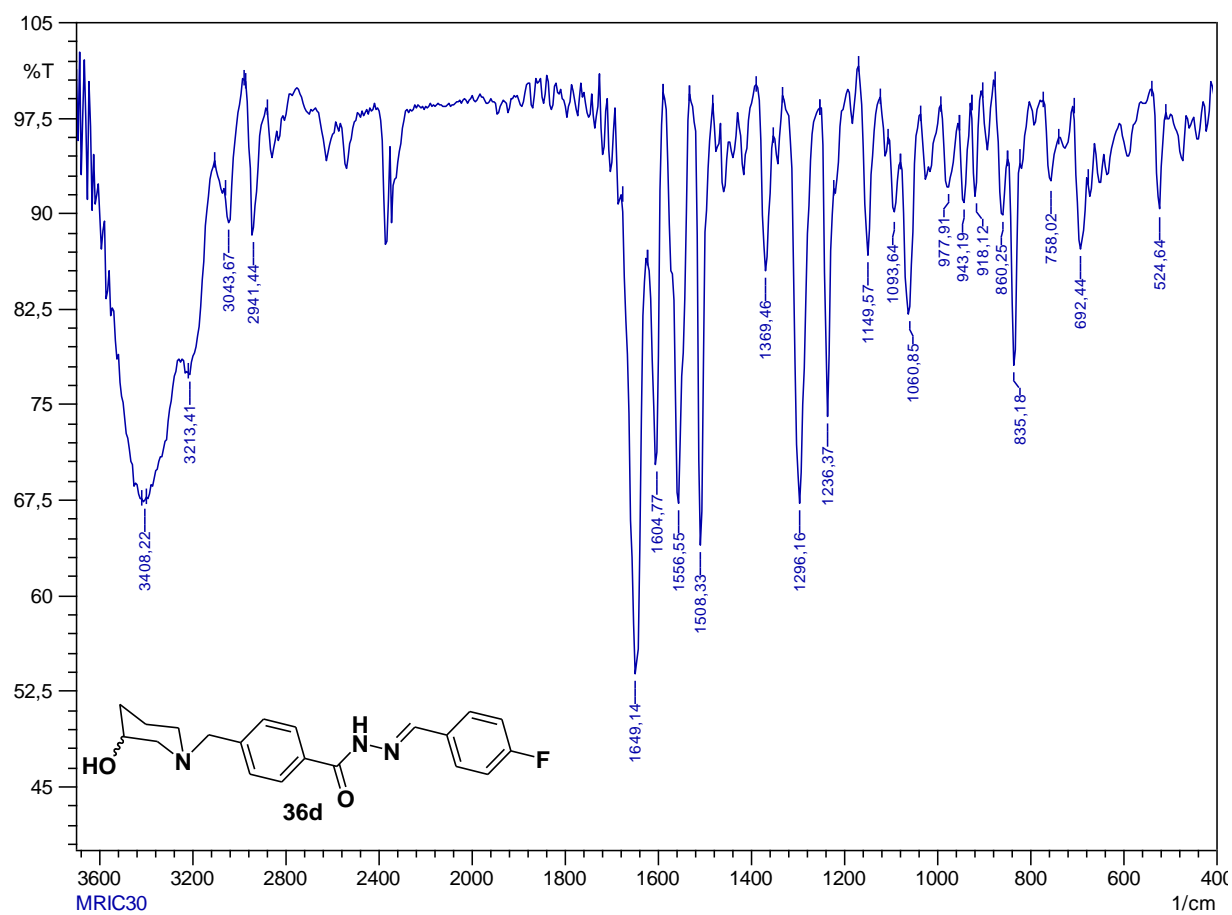


**Espectro 16.** Espectro no IV (KBr) do produto *N*-(4-clorobenzilideno)-4-((3-hidroxipiperidin-1-il)metil)benzoilidrazina (**36c**).

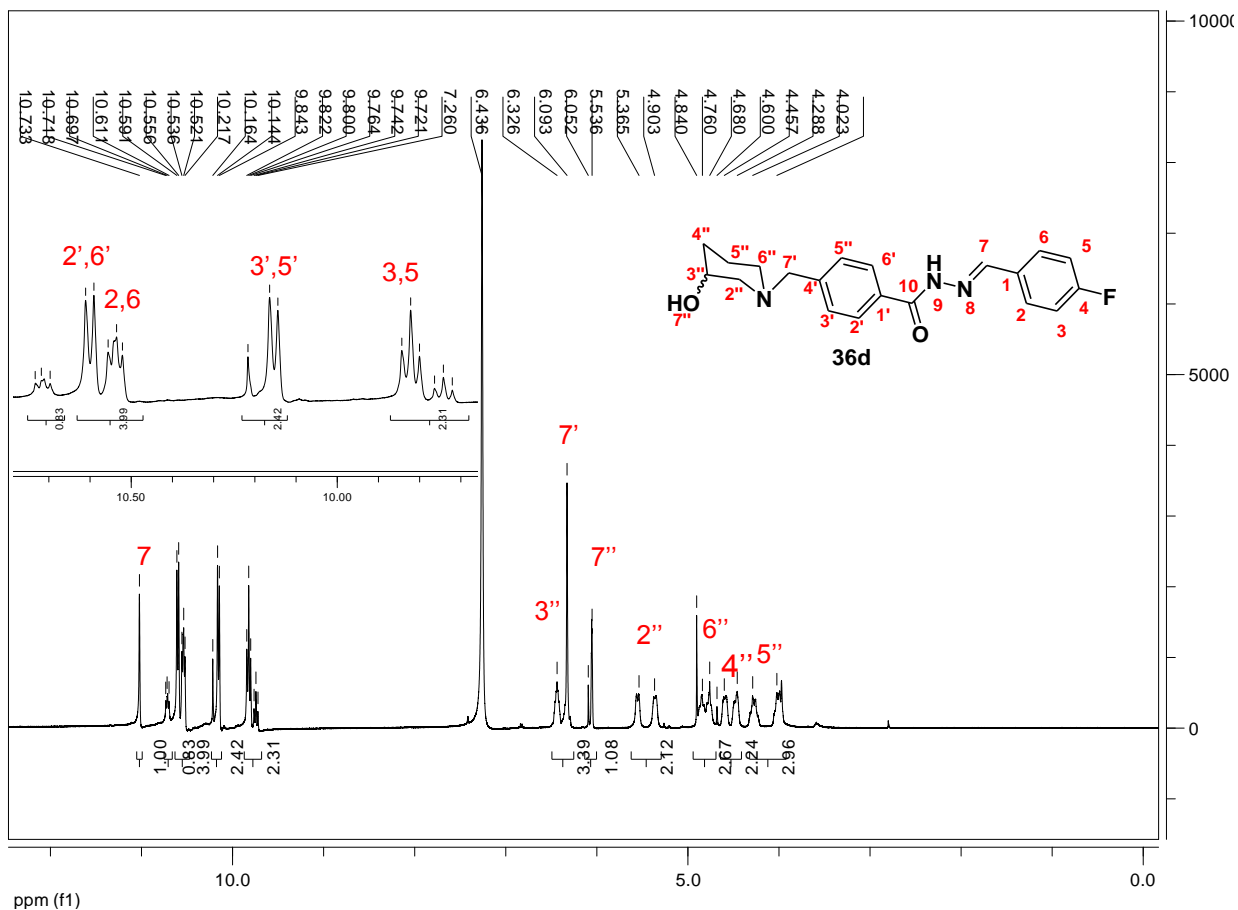


**Espectro 17:** Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ) do produto *N'*-(4-clorobenzilideno)-4-((3-hidroxipiperidin-1-il)metil)benzoilidrazina (**36c**).

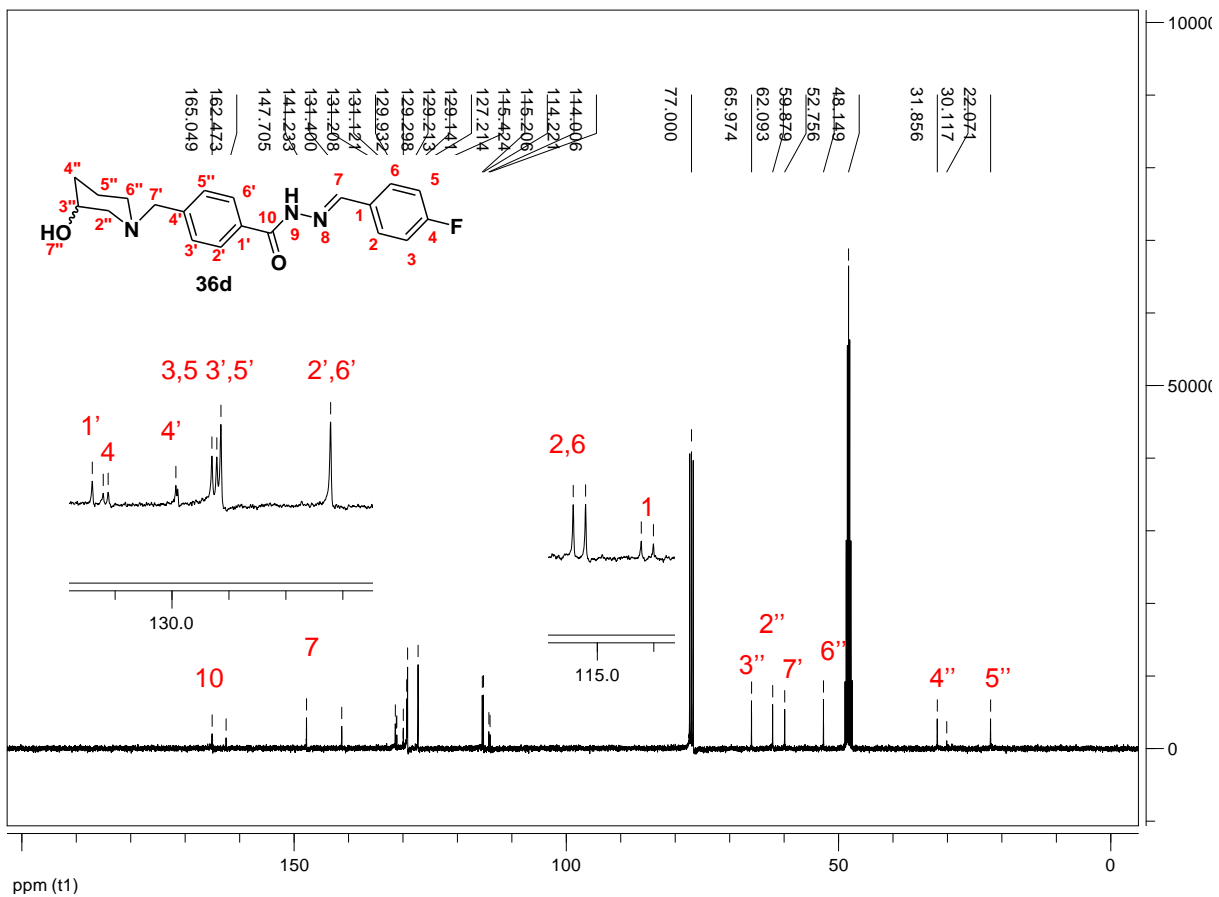




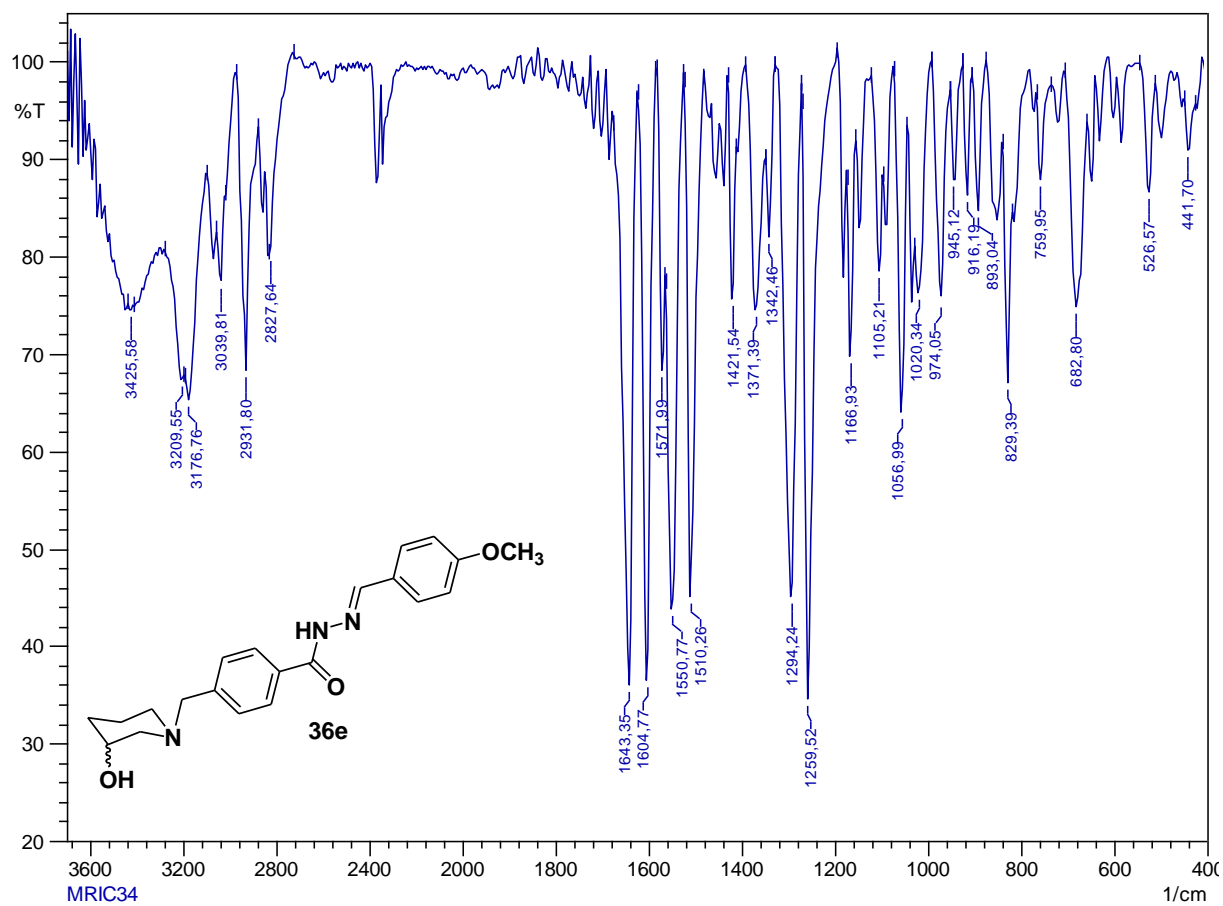
**Espectro 16:** Espectro no IV (KBr) do produto *N'*-(4-fluorobenzilideno)-4-((3-hidroxi-piperidin-1-yl)metil)benzoidrazina (**36d**).



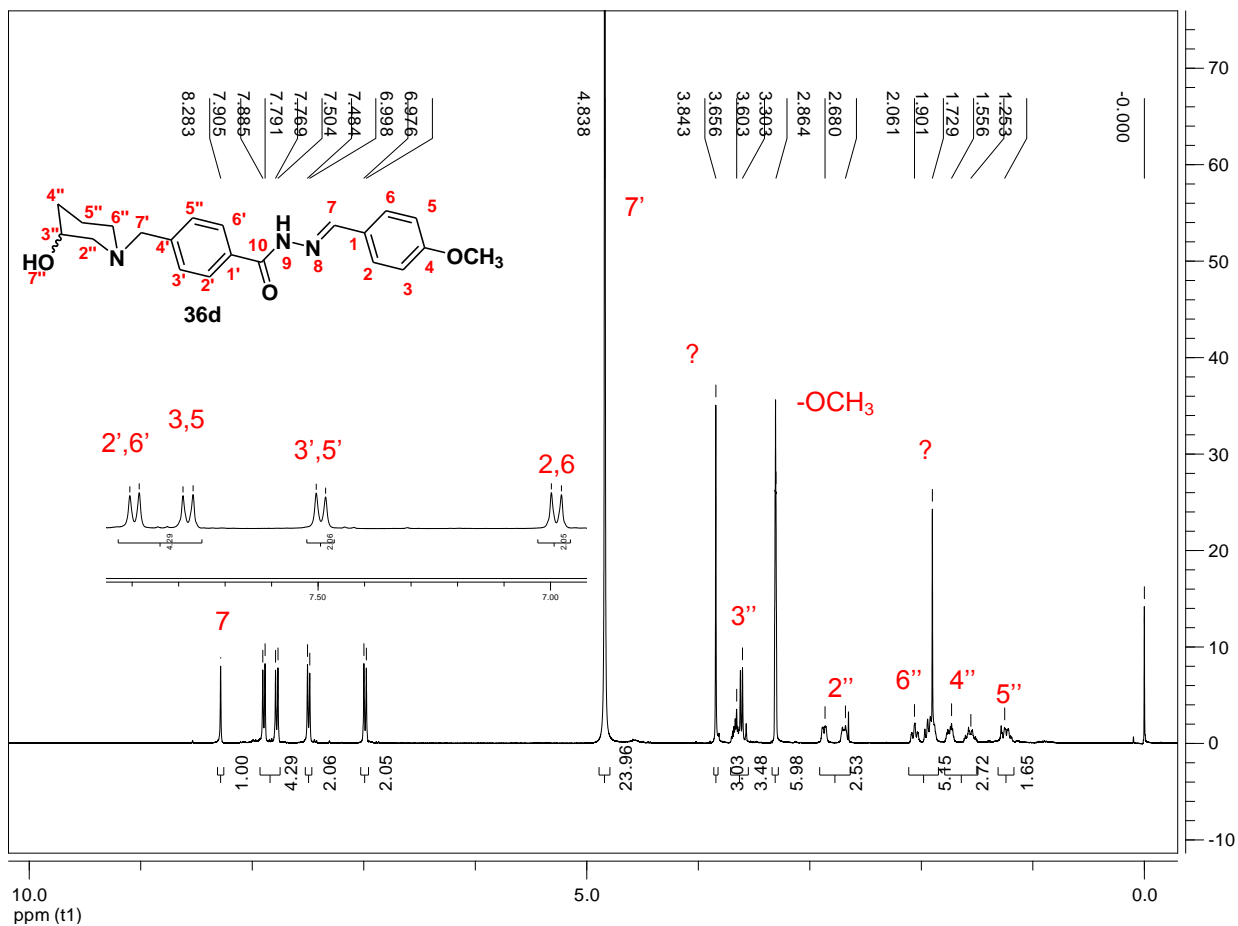
**Espectro 19:** Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) do produto *N*'-(4-fluorobenzilideno)-4-((3-hidroxipiperidin-1-*i*)metil)benzohidrazina (**36d**).



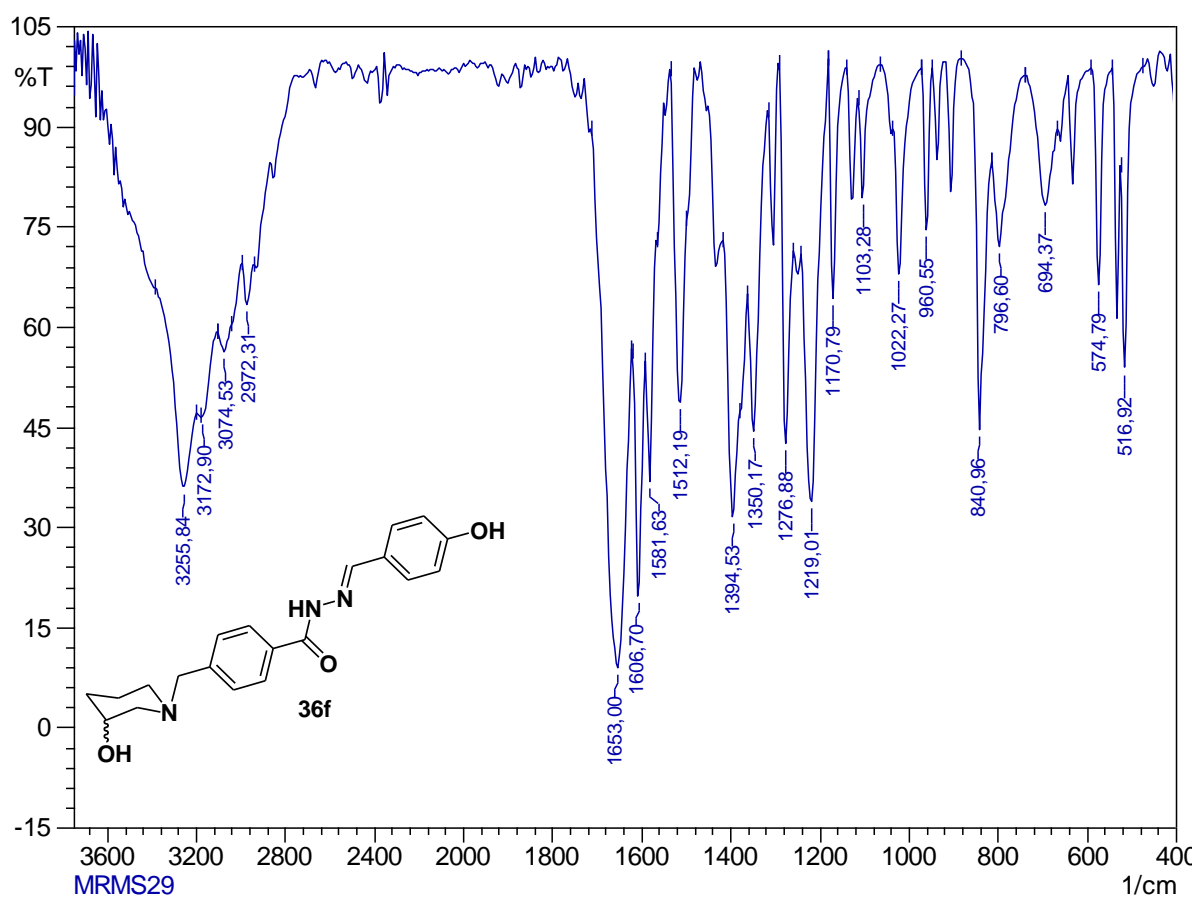
**Espectro 20:** Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) do produto *N'*-(4-fluorobenzilideno)-4-((3-hidroxipiperidin-1-*i*)metil)benzoilidrazina (**36d**).



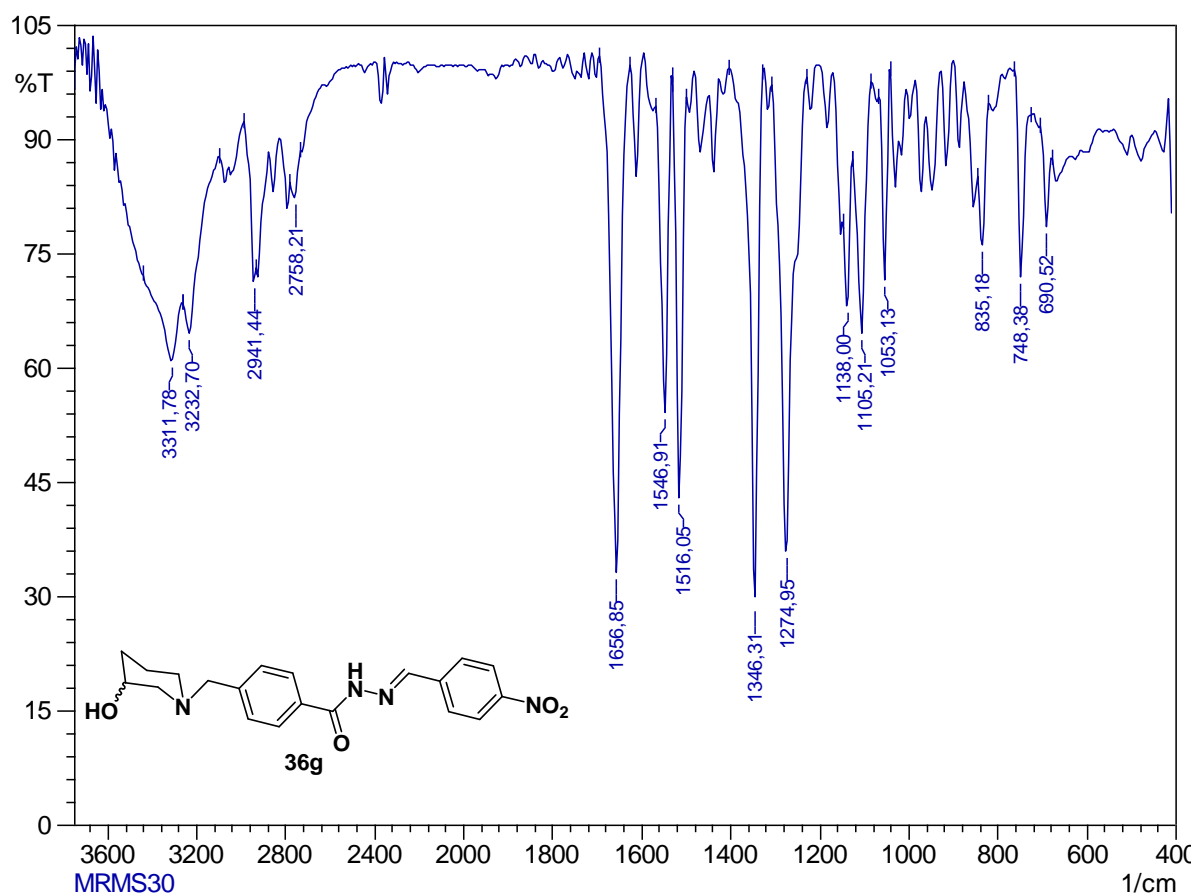
**Espectro 21:** Espectro no IV (KBr) do produto *N'*-(4-metoxibenzilideno)-4-((3-hidroxi-piperidin-1-il)metil)benzoilidrazina (**36e**).



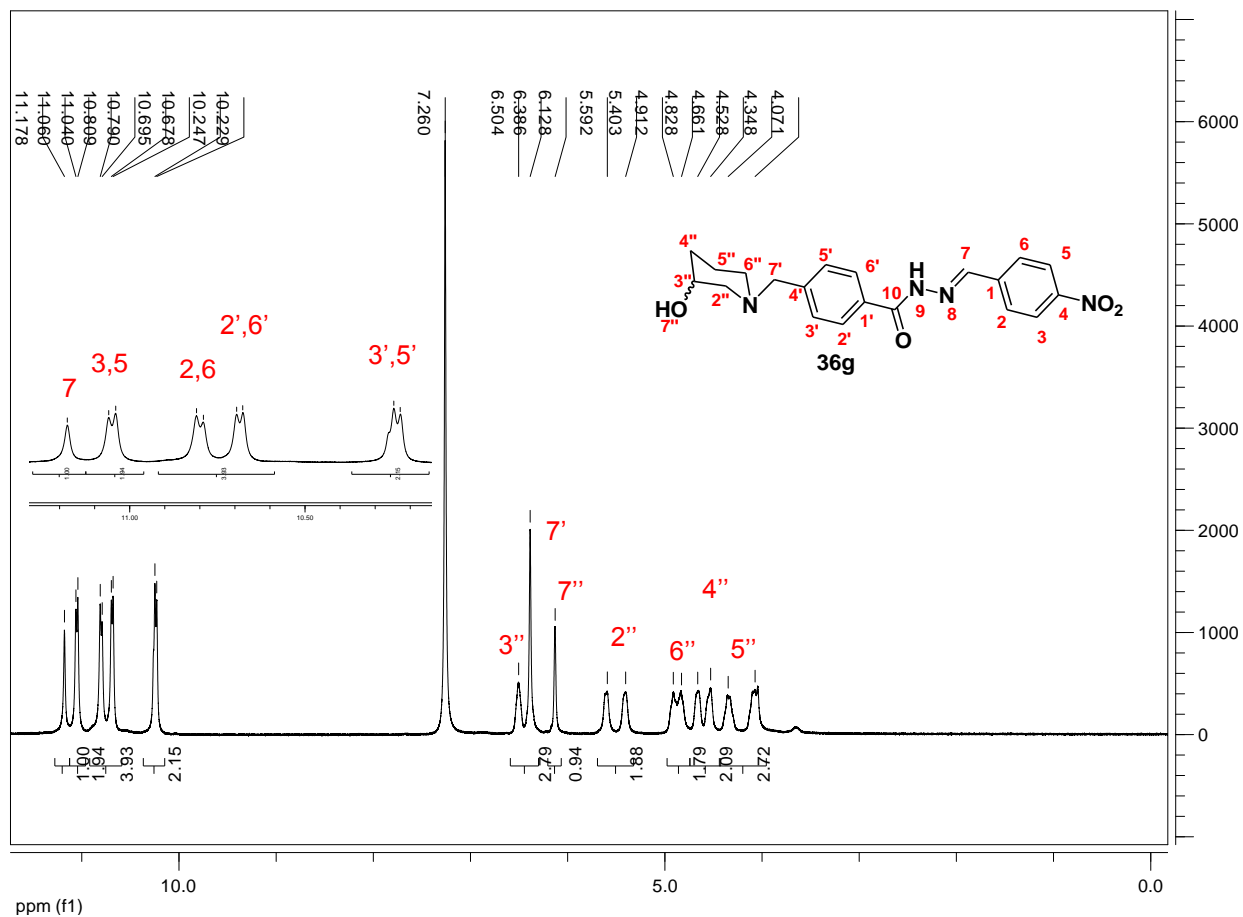
**Espectro 22:** Espectro de RMN (400MHz, CD<sub>3</sub>OD) do produto *N'*-(4-metoxibenzilideno)-4-((3-hidroxi-piperidin-1-il)metil)benzoilidrazina (**36e**).



**Espectro 23:** Espectro no IV (KBr) do produto *N'*-(4-hidroxi benzilideno)-4-((3-hidroxi piperidin-1-il)metil)benzoilidrazina (**36f**).

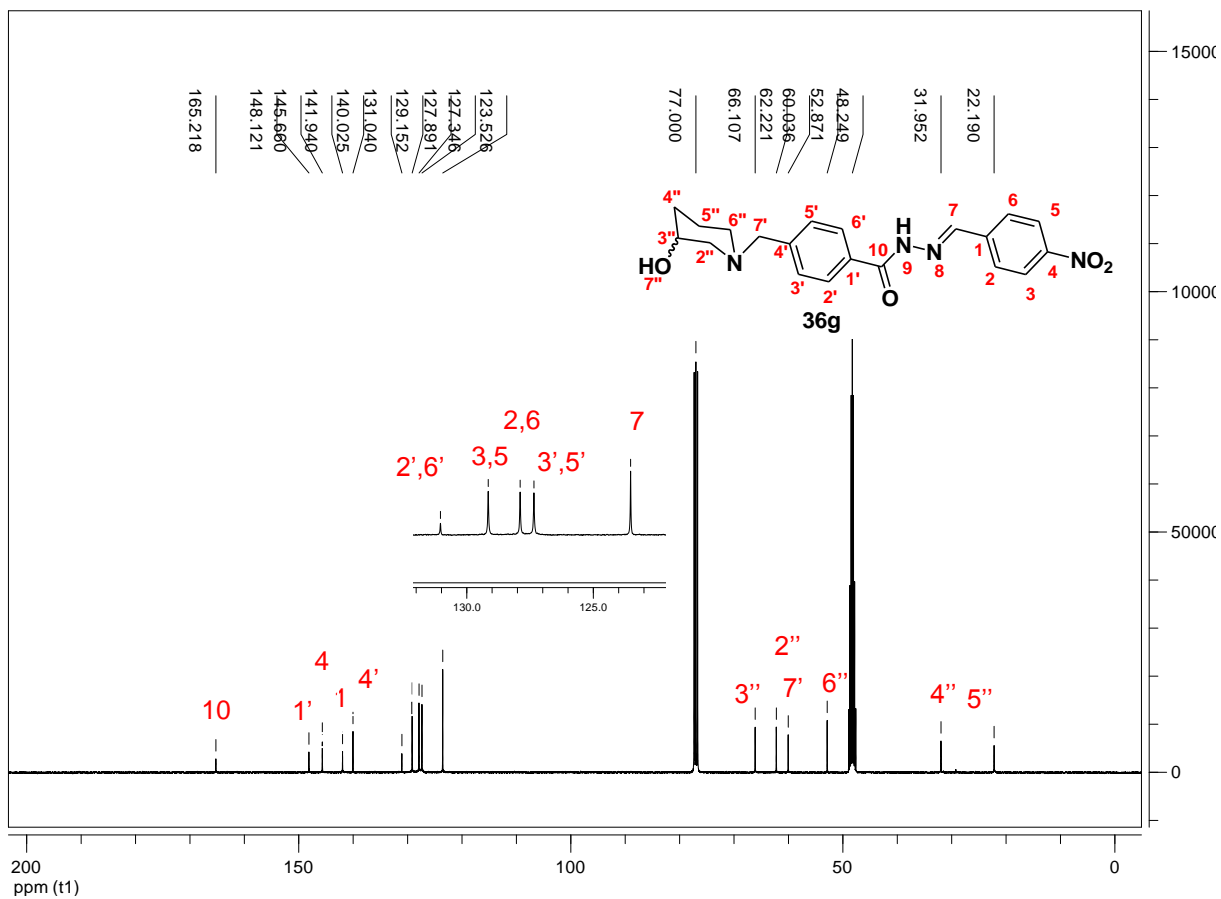


**Espectro 24:** Espectro no IV (KBr) do produto *N'*-(4-nitrobenzilidene)-4-((3-hidroxipiperidin-1-il)metil)benzoilidrazina (**36g**).

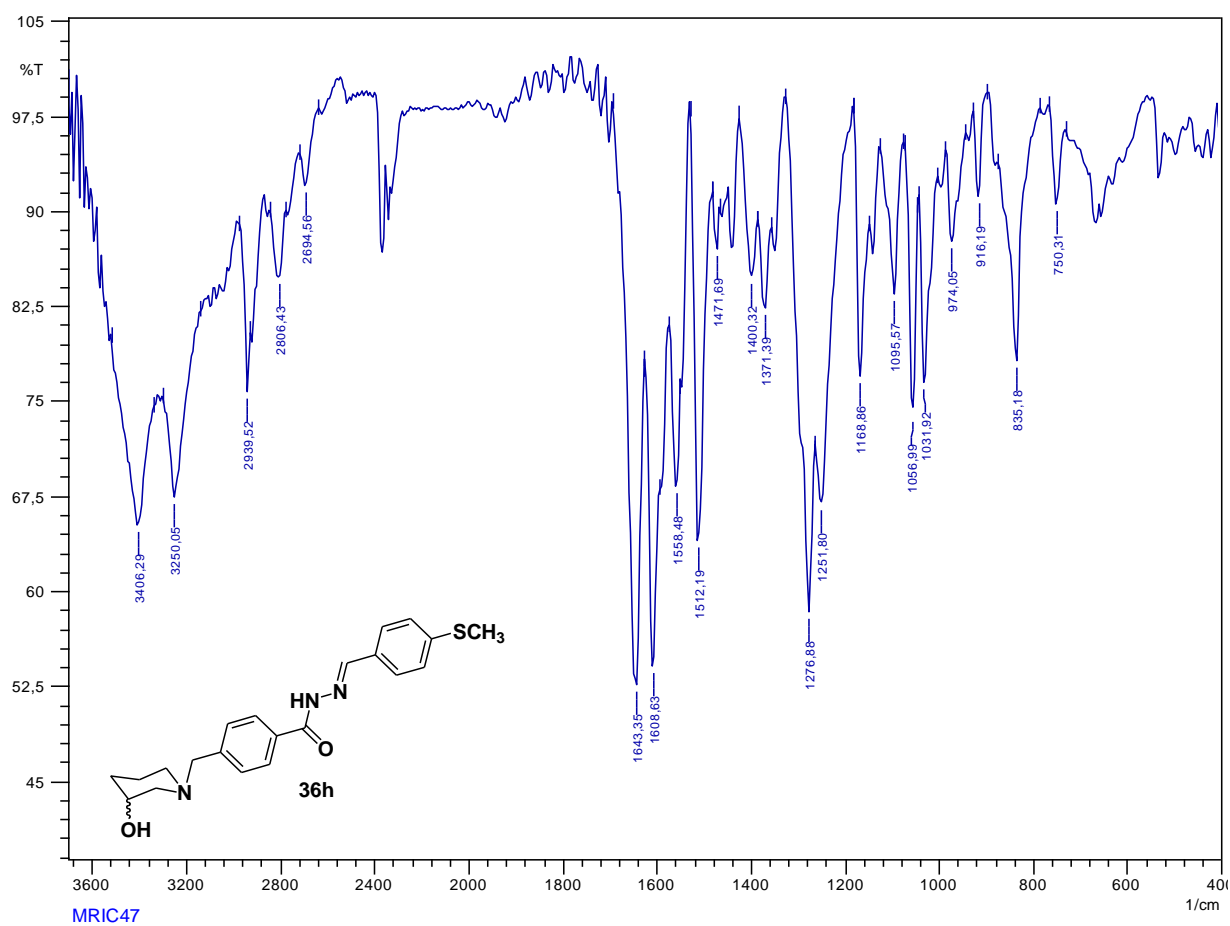


**Espectro 25:** Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) do produto *N*'-(4-nitrobenzilideno)-4-((3-hidroxipiperidin-1-il)metil)benzoilidrazina (**36g**).

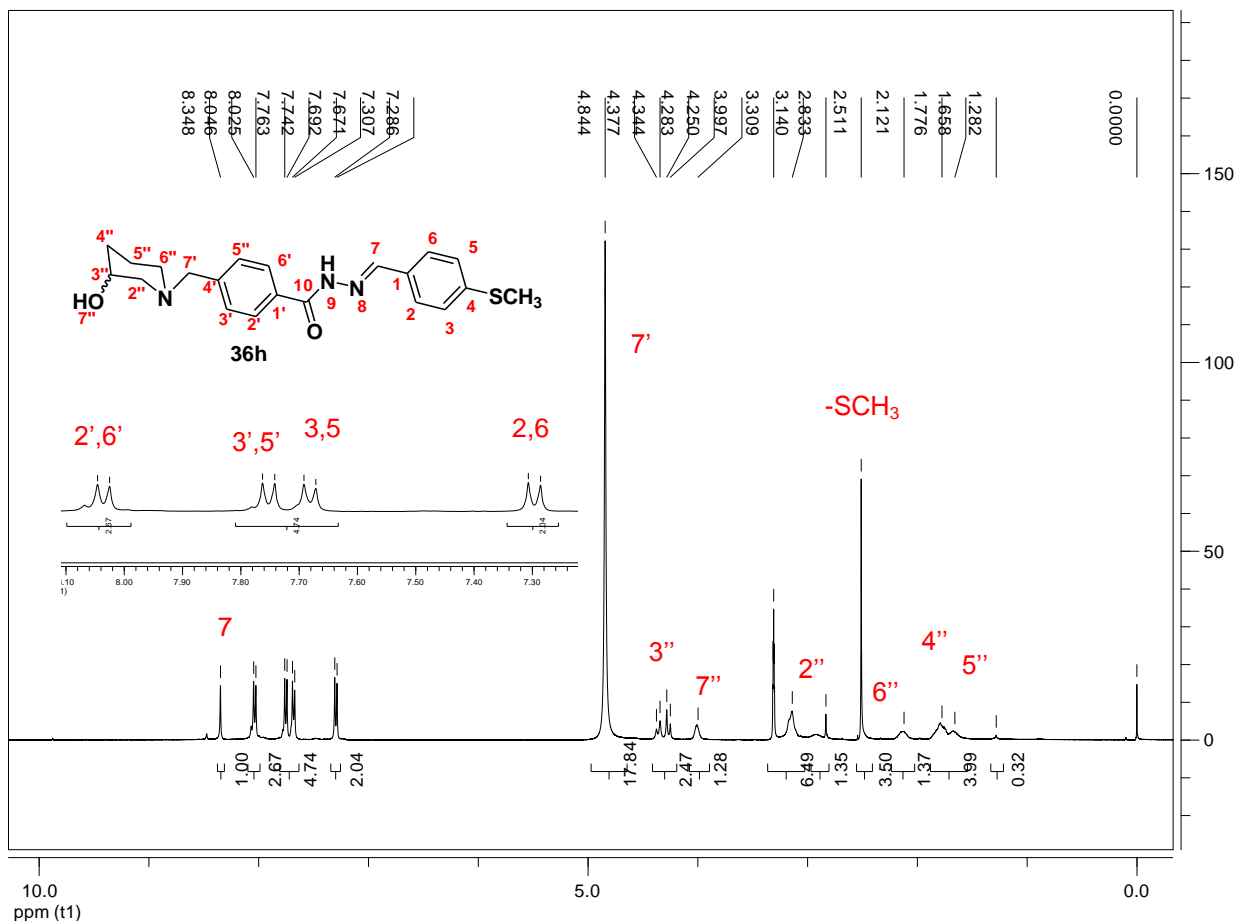




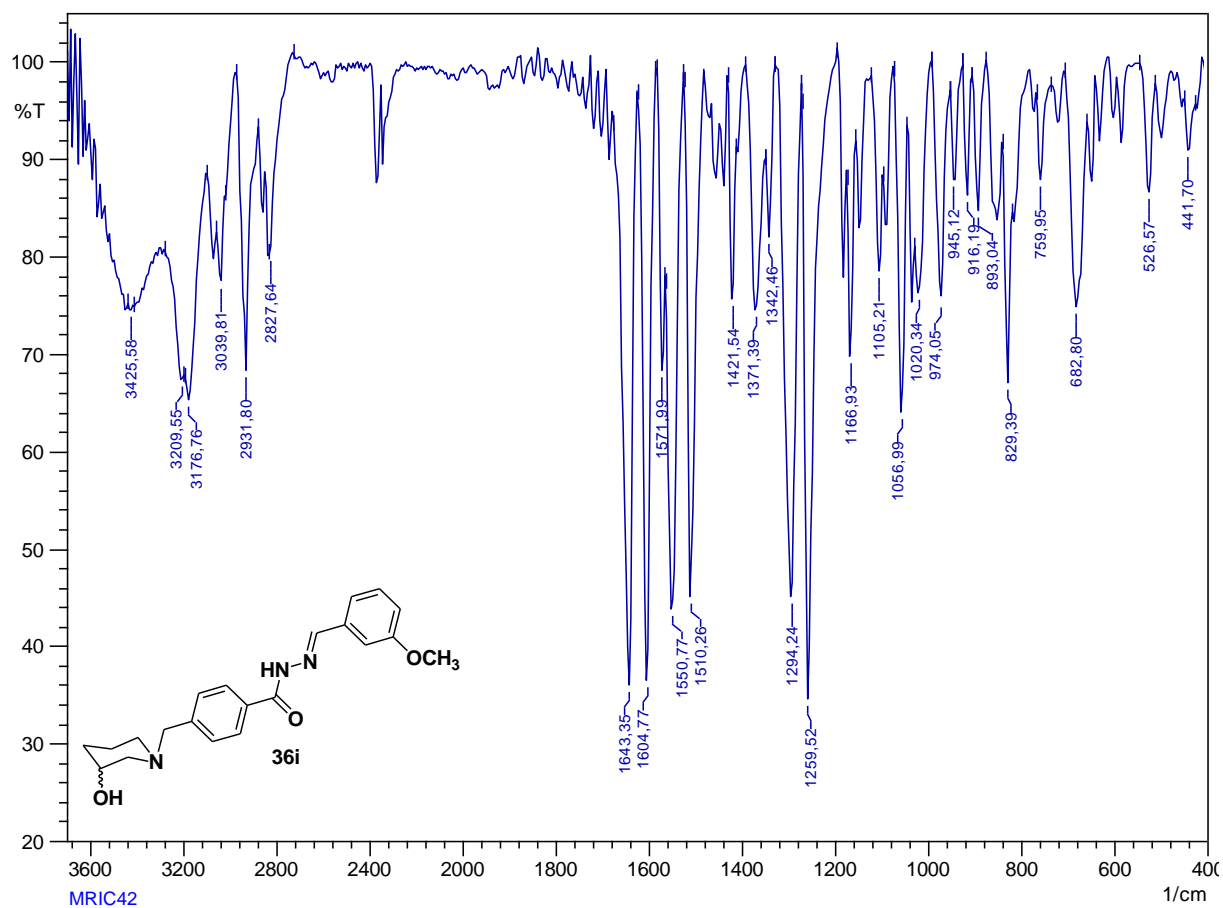
**Espectro 26:** Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) do produto *N'*-(4-nitrobenzilideno)-4-((3-hidroxipiperidin-1-il)metil)benzoilidrazina (**36g**).



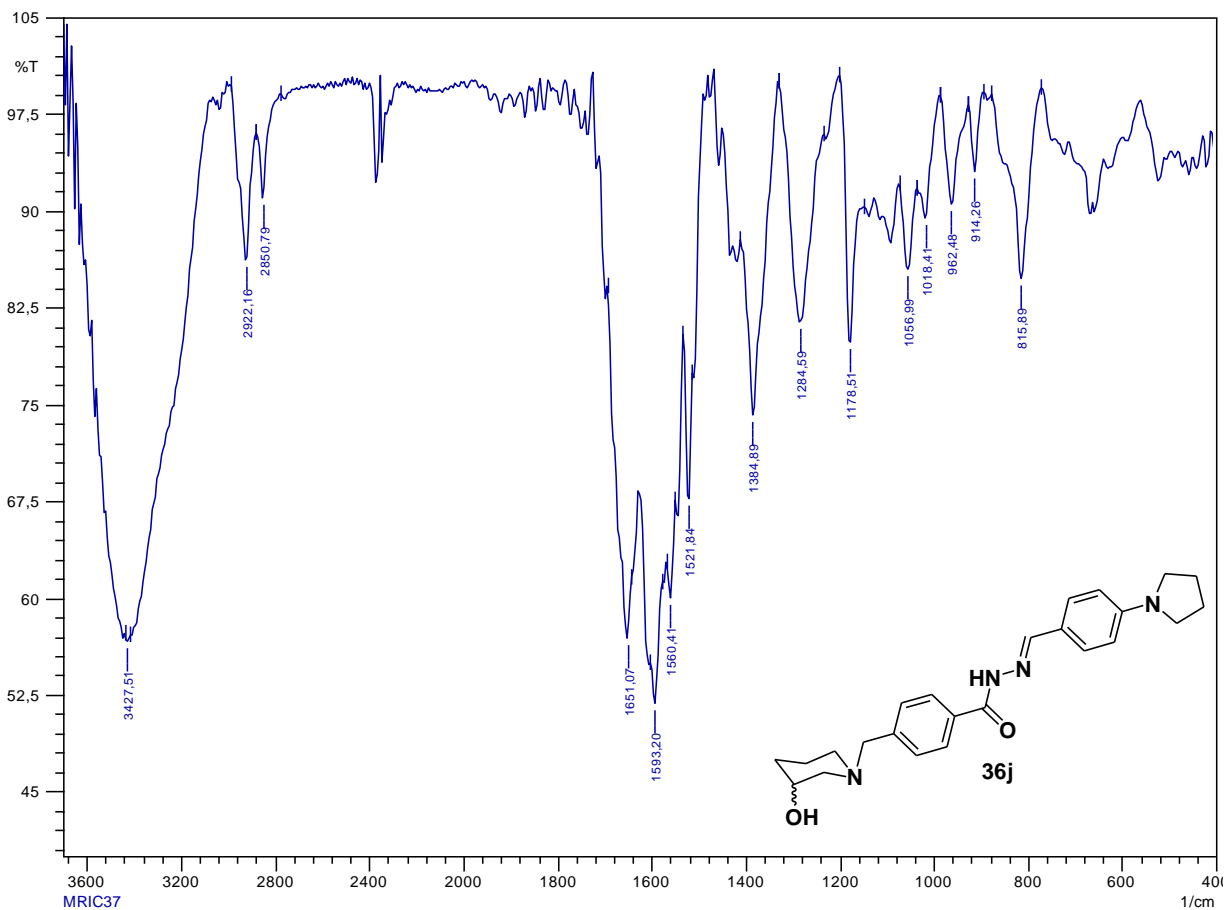
**Espectro 27:** Espectro no IV (KBr) do produto *N'*-(4-(metiltio)benzilideno)-4-((3-hidroxi piperidin-1-il)metil)benzoilidrazina (**36h**).



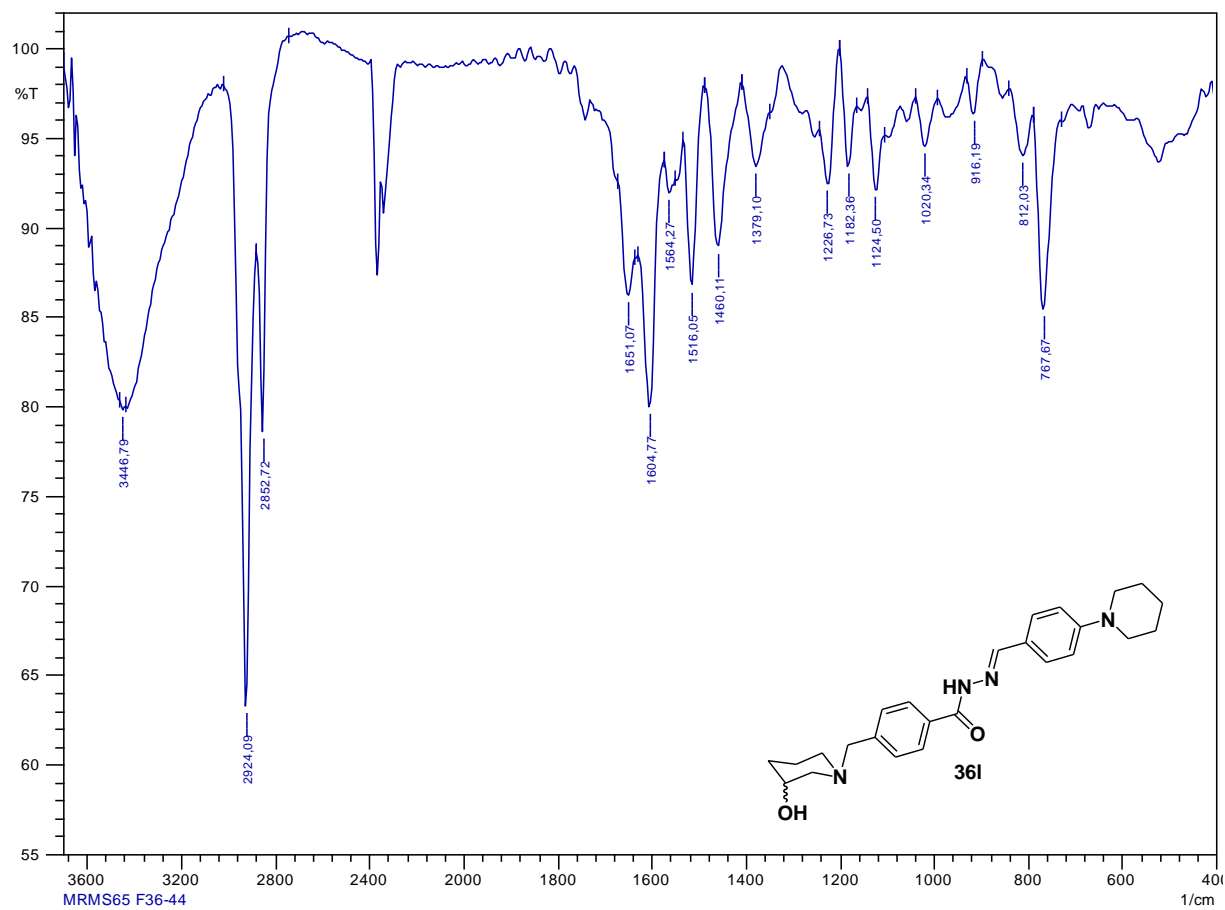
**Espectro 28:** Espectro de RMN <sup>1</sup>H (400MHz, CD<sub>3</sub>OD) do *N'*-(4-(metiltio)benzilideno)-4-((3-hidroxipiperidin-1-il)metil)benzoilidrazina (**36h**).



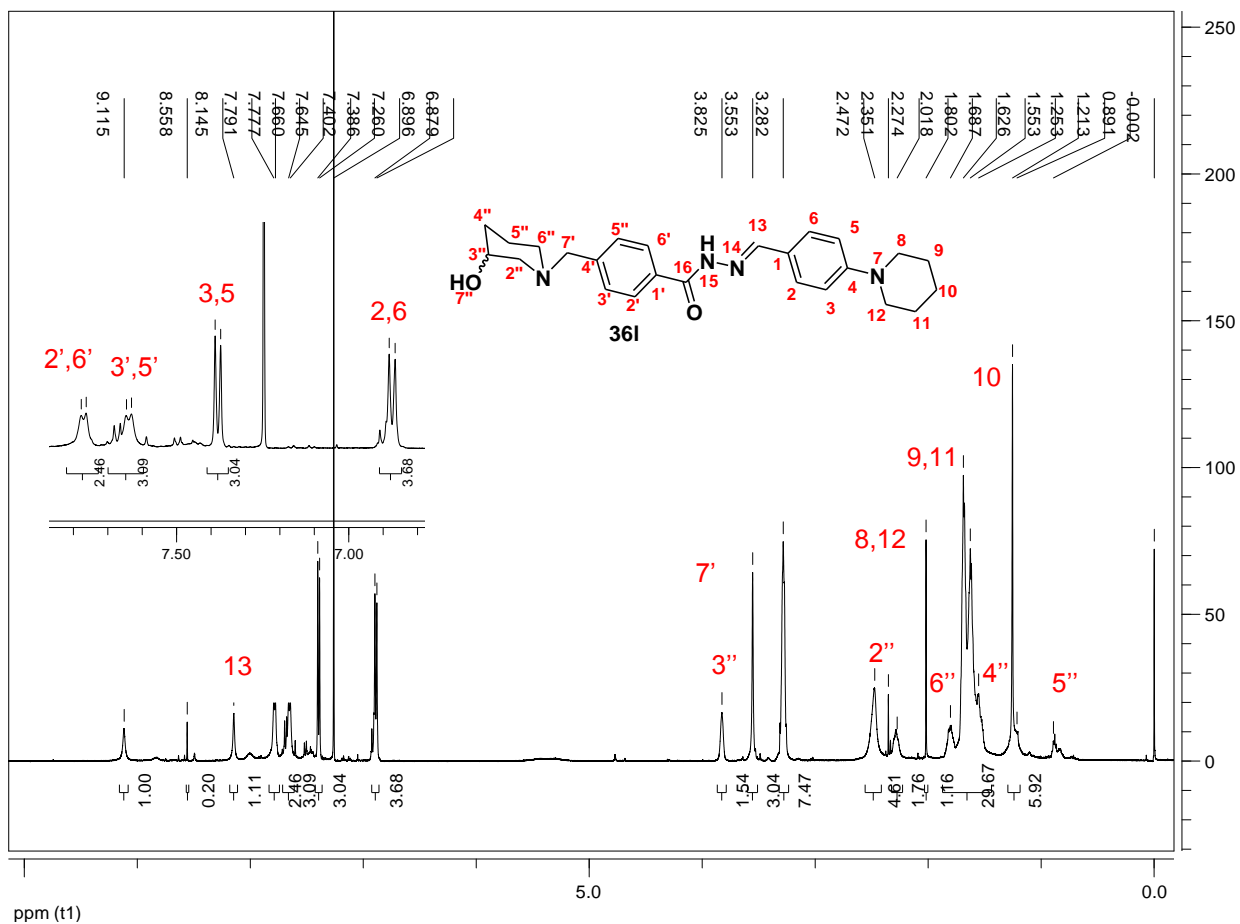
**Espectro 29.** Espectro no IV (KBr) do produto *N'*-(3-metoxibenzilideno)-4-((3-hidroxipiperidin-1-il)metil)benzoilidrazina (**36i**).



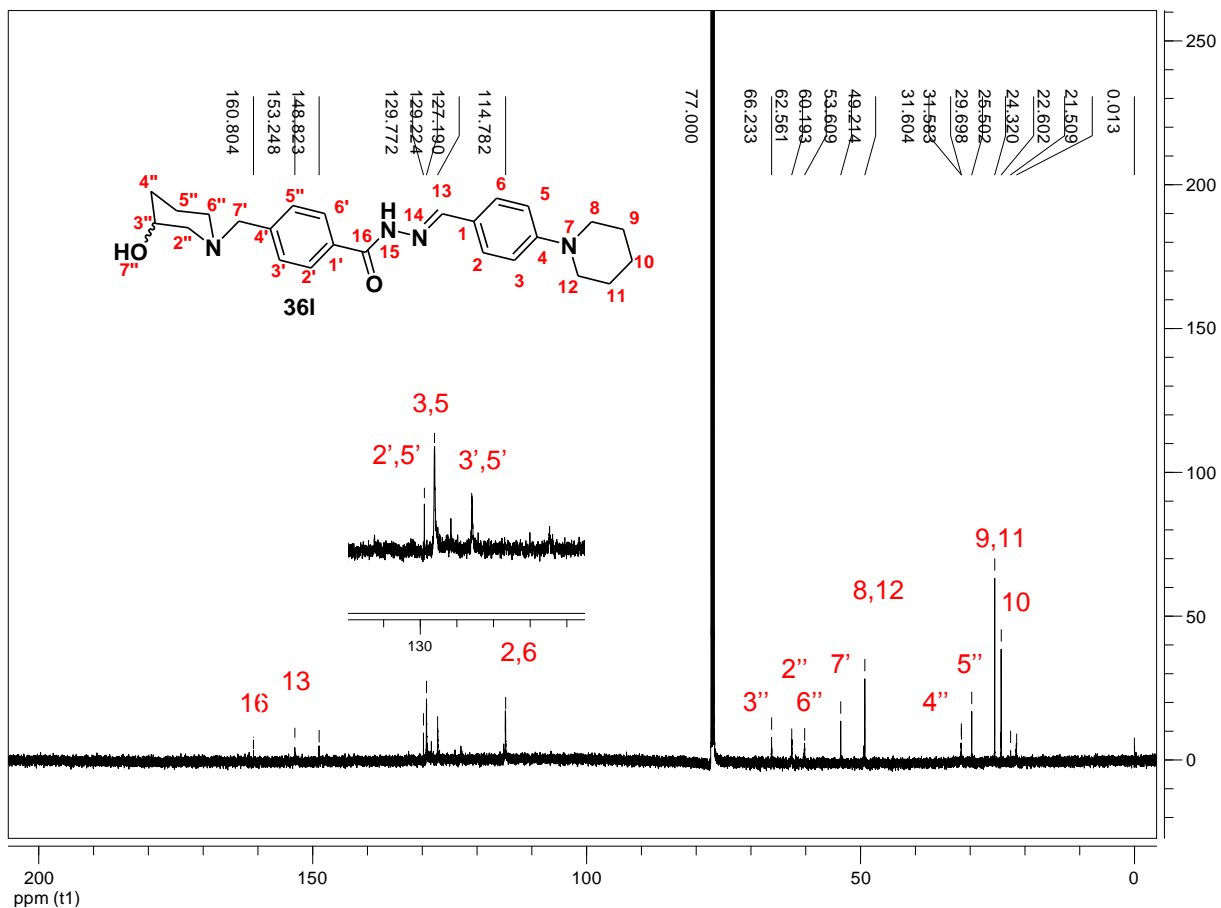
**Espectro 30:** Espectro no IV(KBr) do produto *N'*-(4-(pirrolidin-1-il)benzilidene)-4-((3-hidroxi-piperidin-1-il)metil)benzoilidrazina (**36j**).



**Espectro 31:** Espectro no IV(KBr) do produto *N'*-(4-(piperidin-1-il)benzilidene)-4-((3-hidroxipiperidin-1-il)metil)benzoilidrazina (**36I**).

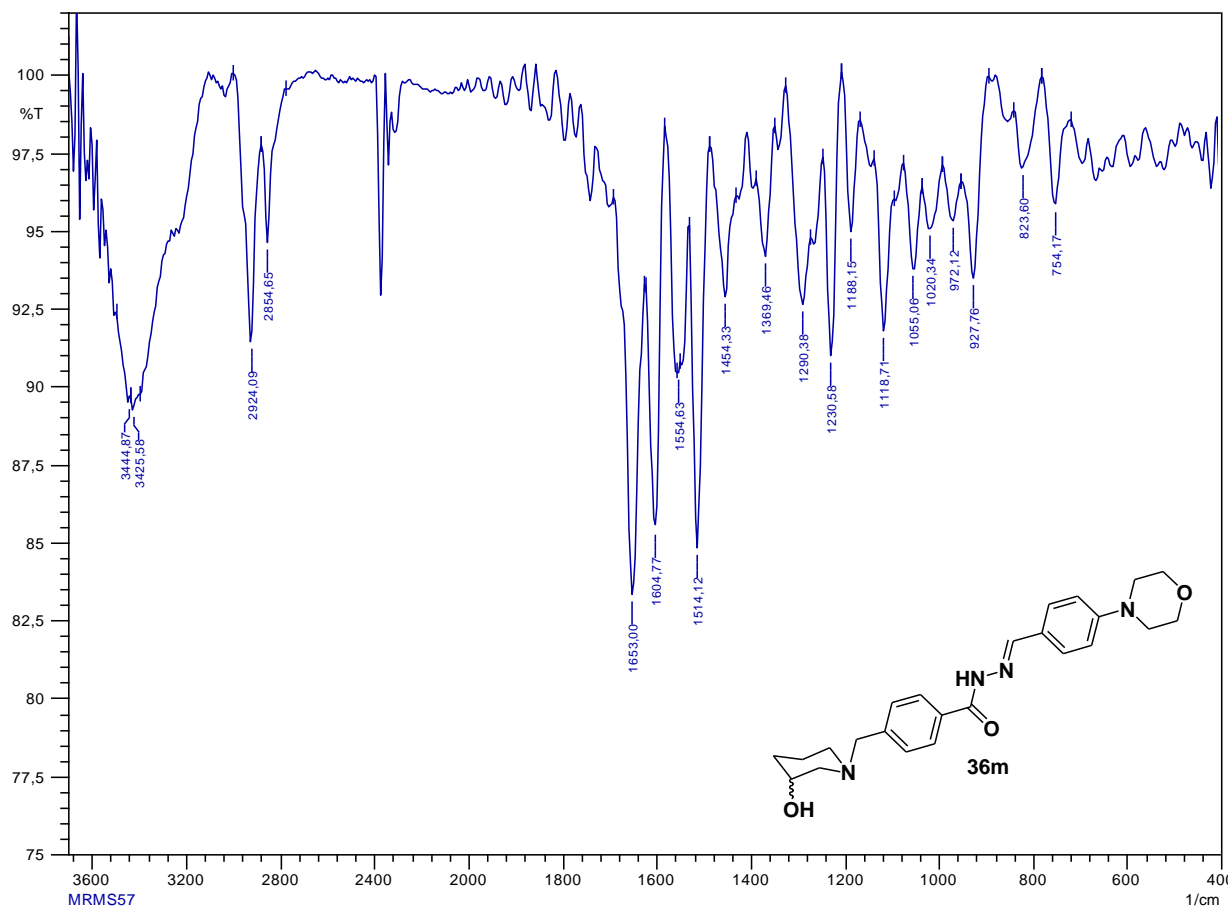


**Espectro 32:** Espectro de RMN de 1H (400MHz, CDCl<sub>3</sub>) do produto *N'*-(4-(piperidin-1-il)benzilideno)-4-((3-hidroxipiperidin-1-il)metil)benzoilidrazina (**36l**).

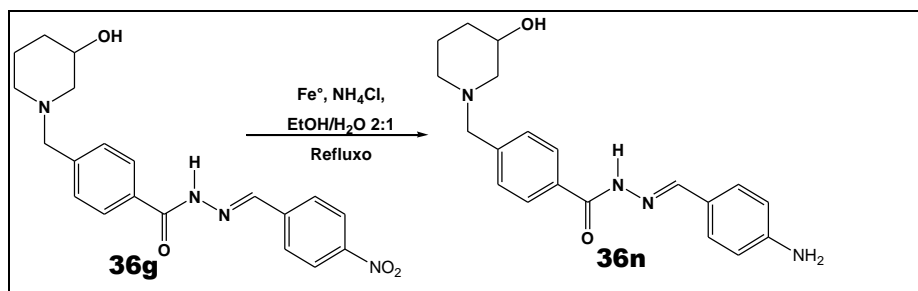


**Espectro 33:** Espectro de RMN de <sup>13</sup>C (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>) de *N'*-(4-(piperidin-1-il)benzilideno)-4-((3-hidroxipiperidin-1-il)metil)benzoilidrazina (**36I**).



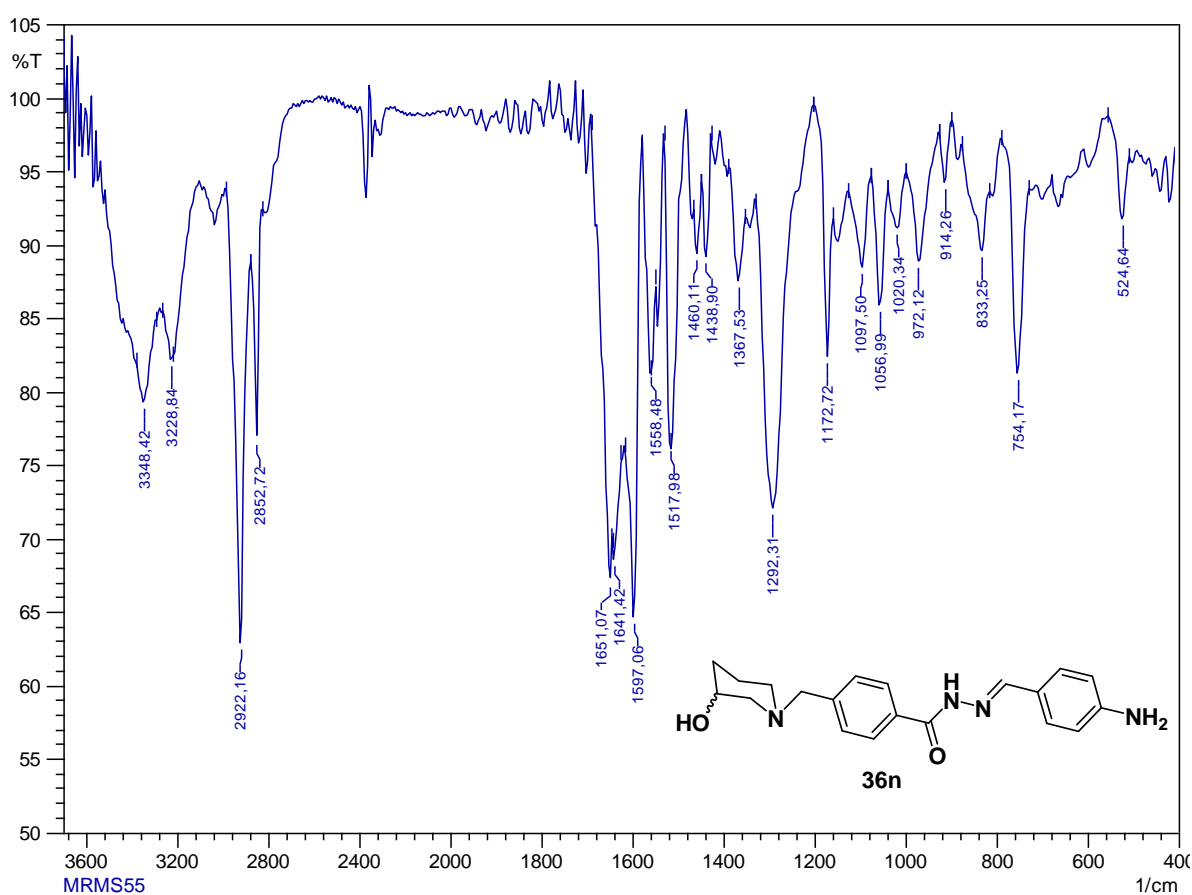


**Espectro 34:** Espectro no IV(KBr) do produto *N'*-(4-morfolinobenzilidene)-4-((3-hidroxipiperidin-1-il)metil)benzoilidrazina (**36m**).

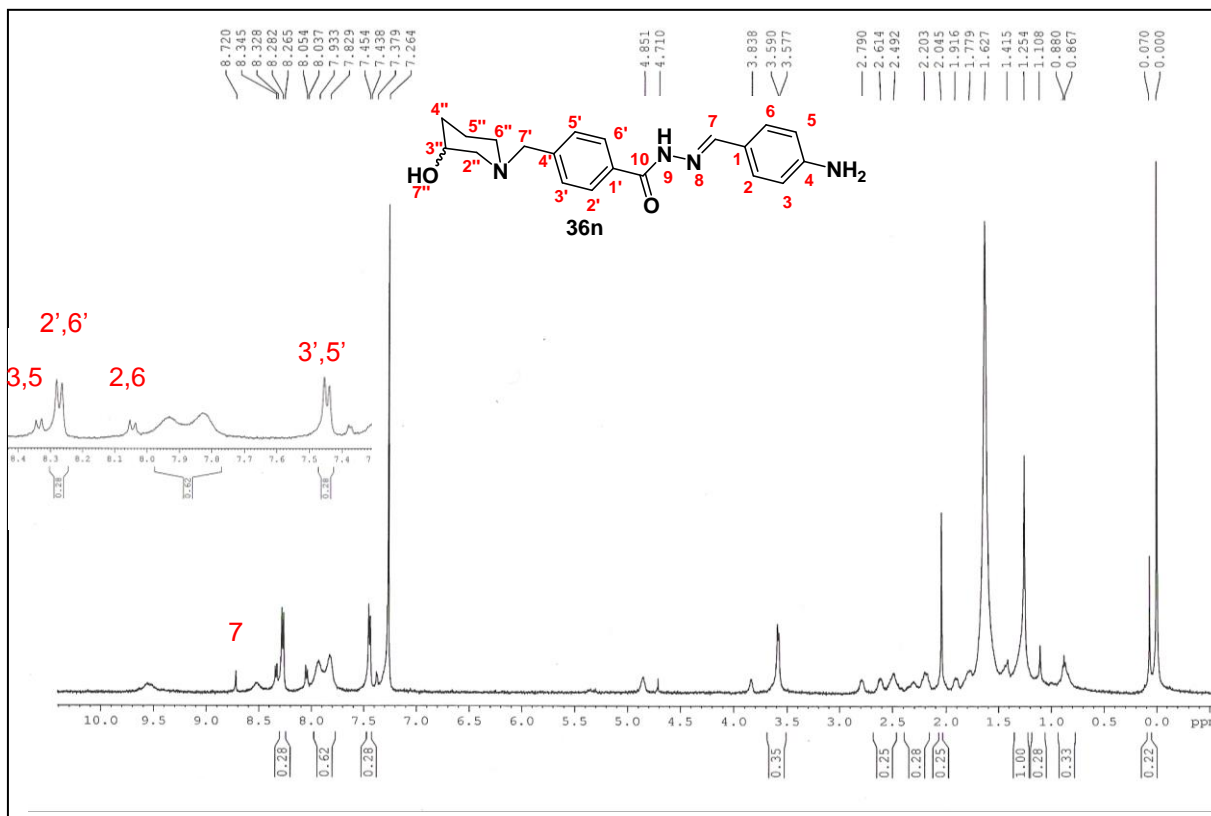


**Esquema 8:** Reação de redução da acilidrazona **36g**:

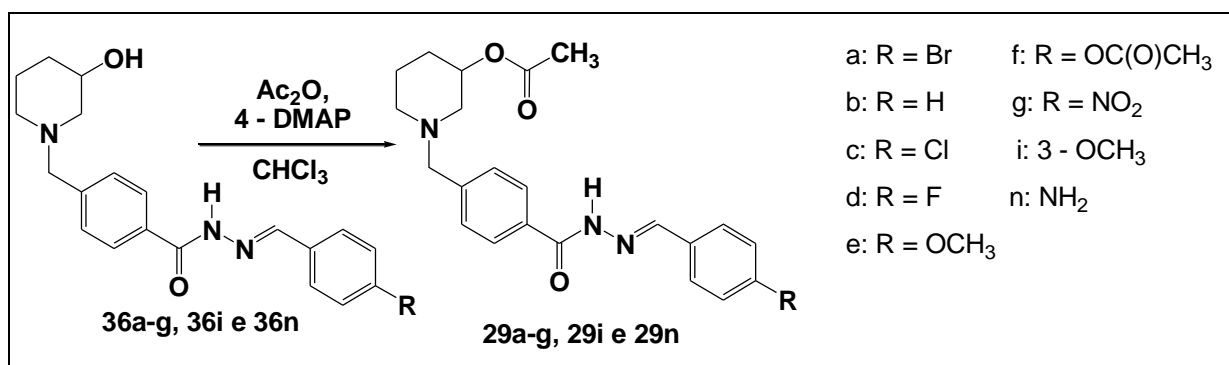
O derivado 4-amino *N*-acilidrazônico **36h**, foi obtido a partir da redução quimiosseletiva da *N*-acilidrazona **36g**, por emprego de  $\text{NH}_4\text{Cl}/\text{Fe}^\circ$ ,<sup>65</sup> com rendimento de 93% após purificação por coluna.



**Espectro 35:** Espectro no IV (KBr) do produto *N'*-(4-amino-benzilideno)-4-((3-hidroxipiperidin-1-il)metil)benzoilidrazina (**36n**).

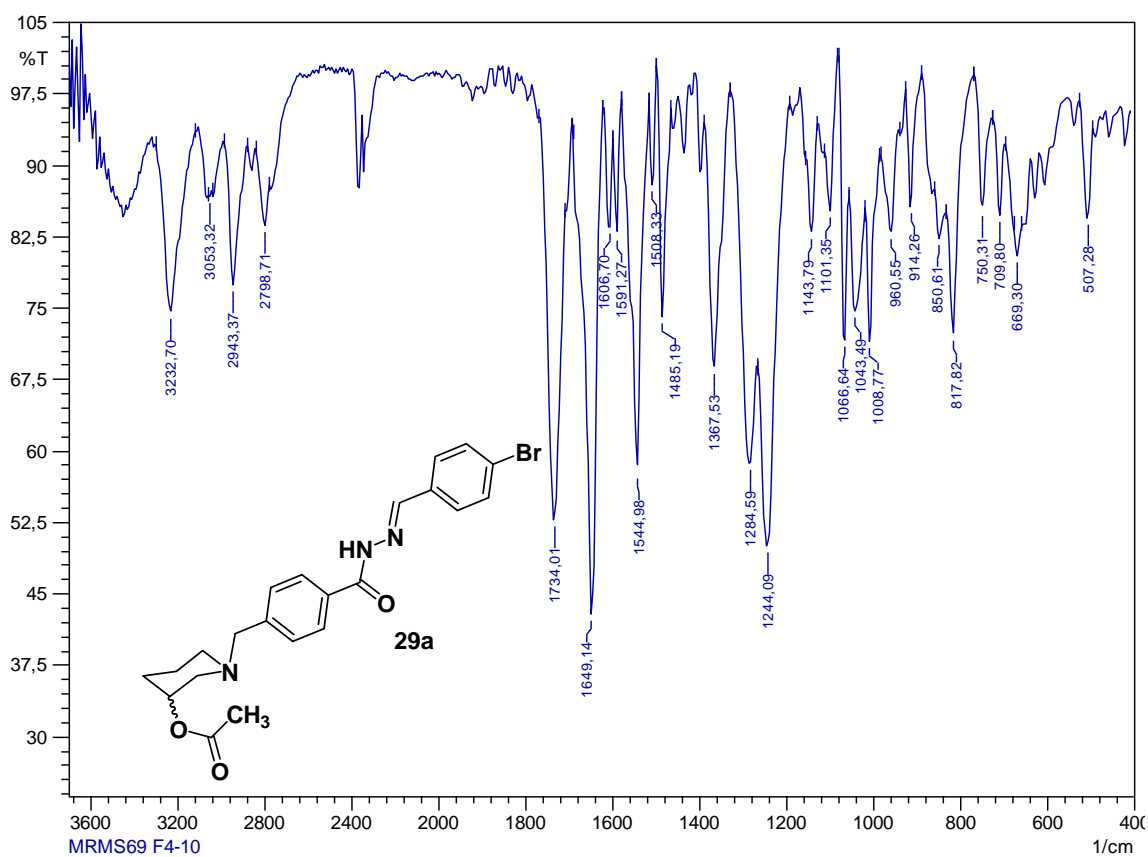


**Espectro 36:** Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) do produto *N'*-(4-aminobenzilideno)-4-((3-hidroxipiperidin-1-il)metil)benzoilidrazina (**36n**).

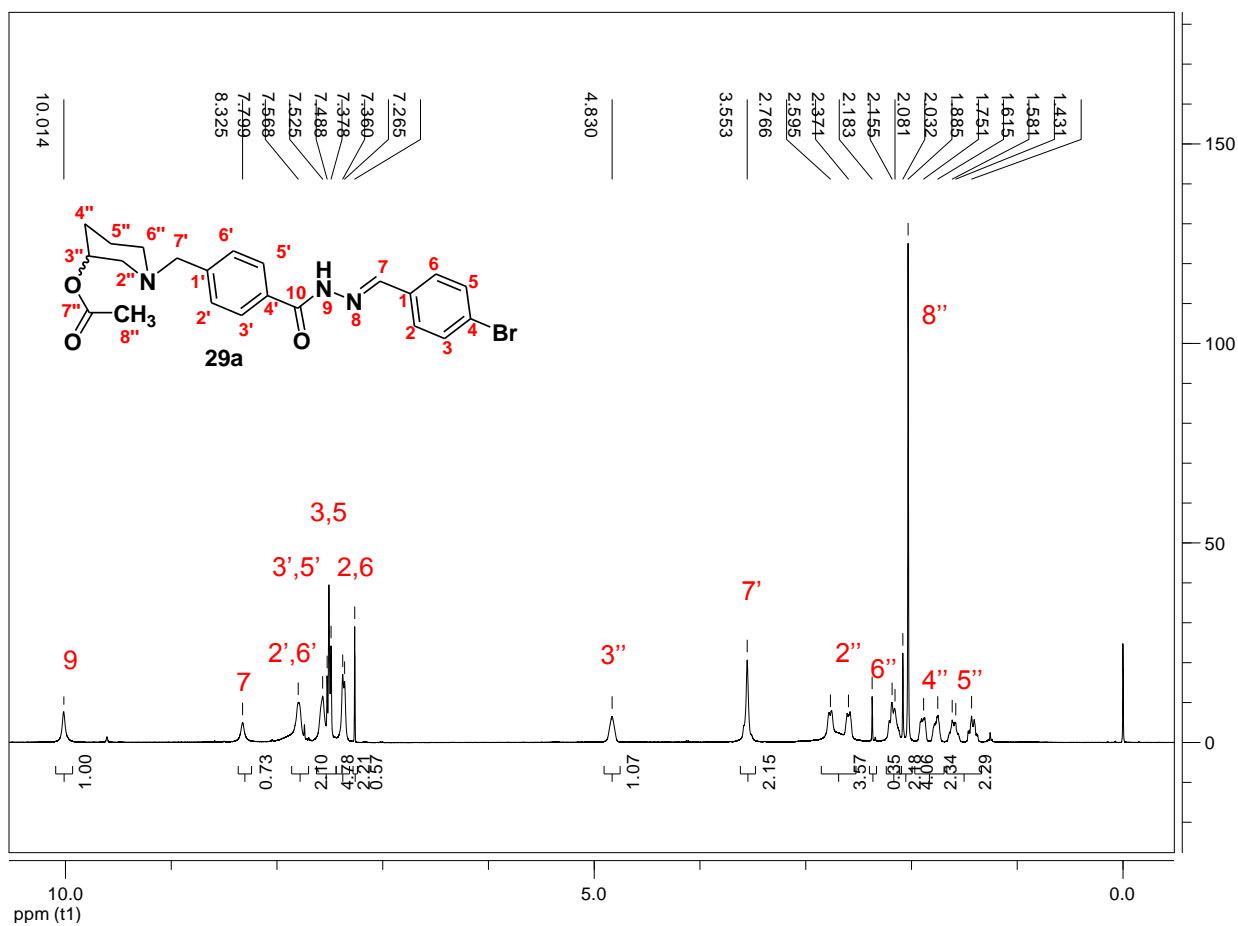


**Esquema 9:** Reação de acetilação das acilidrazonas **36a-g**, **36i** e **36n**

A acetilação do grupo alcoólico da acilidrazona **36a** com  $\text{Ac}_2\text{O}/\text{DMAP}/\text{CHCl}_3$ , conforme descrito na literatura<sup>66</sup>, forneceu um sólido branco com 87,9% de rendimento, após purificação em coluna. A análise do espectro no Infravermelho do produto obtido **29a** (Espectro 37), comparada a análise da acilidrazona **36a**, observa-se o desaparecimento da banda de estiramento de OH e o aparecimento de uma banda de estiramento axial de C=O em  $1734\text{ cm}^{-1}$  que pode ser atribuída ao álcool acetilado, sugere o sucesso na reação.



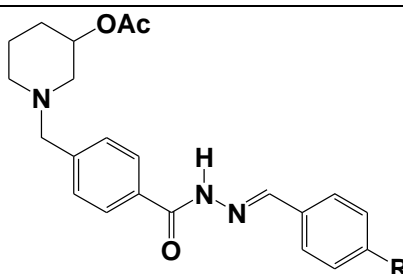
**Espectro 37:** Espectro no IV (KBr) do produto acetato de 1-(4-(4-bromobenzilidenoaminocarbamoil)-benzil)piperidin-3-ila (**29a**).



**Espectro 38:** Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) do produto acetato de 1-(4-(4-bromobenzilidenoaminocarbamoil)-benzil)piperidin-3-ila (**29a**).H

A acetilação do grupo alcoólico das acilidrazonas **36b-g** e **36i** com  $\text{Ac}_2\text{O}/4\text{-DMAP}/\text{CHCl}_3$ , conforme descrito na literatura<sup>66</sup>, forneceu os produtos com um bom rendimento de 83 a 90 % (Esquema 08, Tab. 07).

**Tabela 07:** Acilidrazonas hidroxiacetiladas **29a-g**, **29i** e **29n** e seus respectivos rendimento e pontos de fusão.



Substancia	R	Rendimento (%)	Ponto de fusão (°C)
<b>29a</b>	Br	88	140-150
<b>29b</b>	H	85	117-124
<b>29c</b>	Cl	87	100-102
<b>29d</b>	F	86	117-122
<b>29e</b>	$\text{OCH}_3$	86	123-129
<b>29f</b>	$\text{OC(O)CH}_3$	89	145-150
<b>29g</b>	$\text{NO}_2$	90	160-165
<b>29i</b>	3- $\text{OCH}_3$	83	120-125
<b>29n</b>	$\text{NH}_2$	83	164-170

Analisando os espectros no IV dos produtos obtidos **29b-g**, **29i** e **29n** e comparando aos espectros das acilidrazonas de partida, observa-se o desaparecimento da banda de  $\nu_s$  de OH e o aparecimento de uma banda de  $\nu_s$  de C=O em  $1700\text{-}1730\text{ cm}^{-1}$  que pode ser atribuída ao álcool acetilado. Isto sugere o sucesso na acetilação das respectivas acilidrazonas.

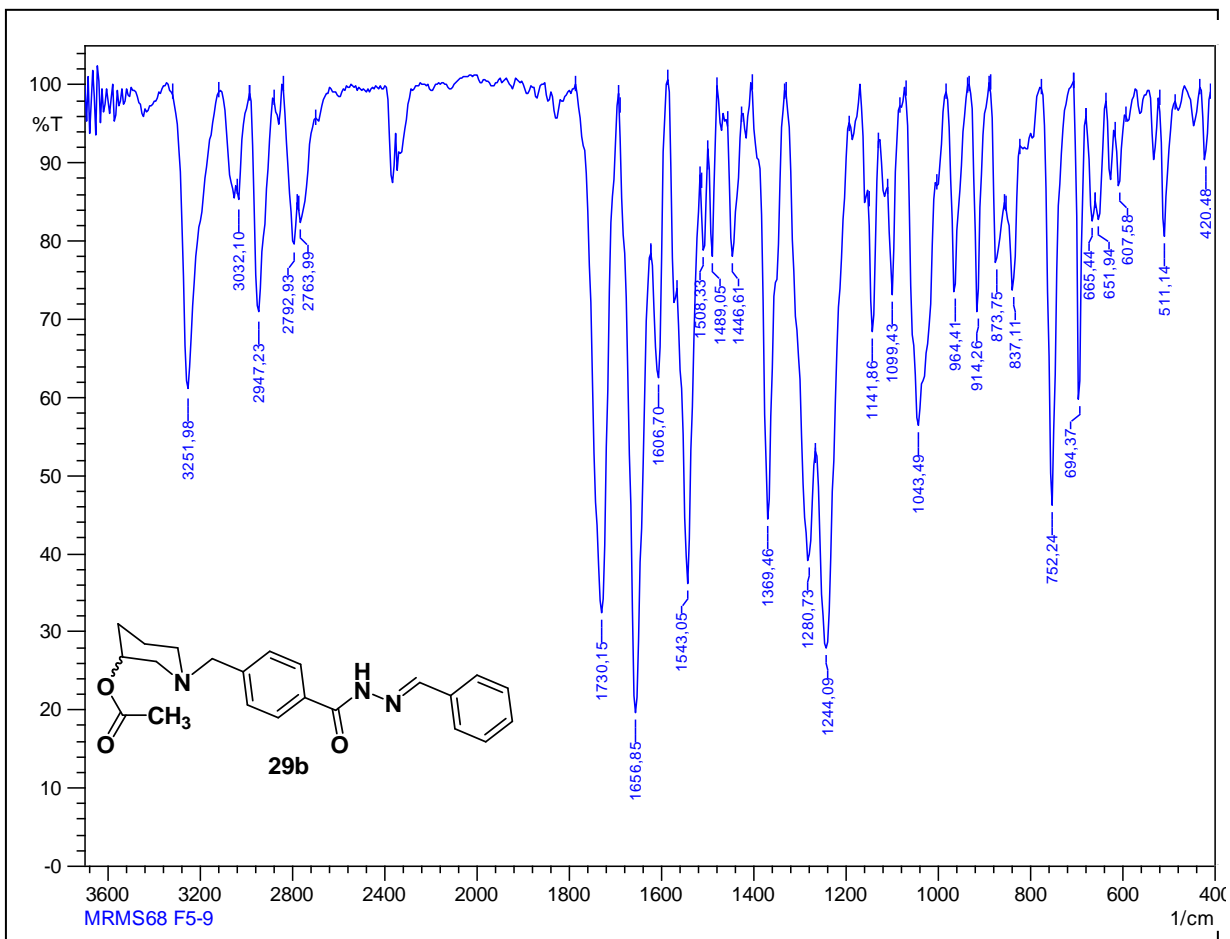
Uma vez que nem todos os dados de RMN  $^{13}\text{C}$  e bidimensionais HMQC e HMBC das acilidrazonas-alvo acetiladas **29b-g**, **29i** e **29n** não estavam disponíveis sua caracterização estrutural preliminar foi realizada pela análise conjunta de seus espectros no IV e dos espectros de RMN de  $^1\text{H}$ , comparando com dados já disponíveis para outras arilidrazonas desta série, com padrão estrutural homólogo. Os dados de RMN  $^1\text{H}$  dos compostos **29b-g**, **29i** e **29n** estão descritos na Tabela 08.

Respeitando um padrão estrutural comum, em todos os espectros de RMN  $^1\text{H}$  observam-se 4 sinais diferentes de hidrogênios aromáticos na região de 7-10 ppm, com multiplicidades e constantes de acoplamento condizentes com a regioquímica

dos substituintes das subunidades aromáticas, além dos sinais de H alifáticos do anel piperidínico na região de 1,0-6,0 ppm e comparando às acilidrazonas de partida observa-se o aparecimento de um sinal de hidrogênio metílico próximo a 2 ppm.

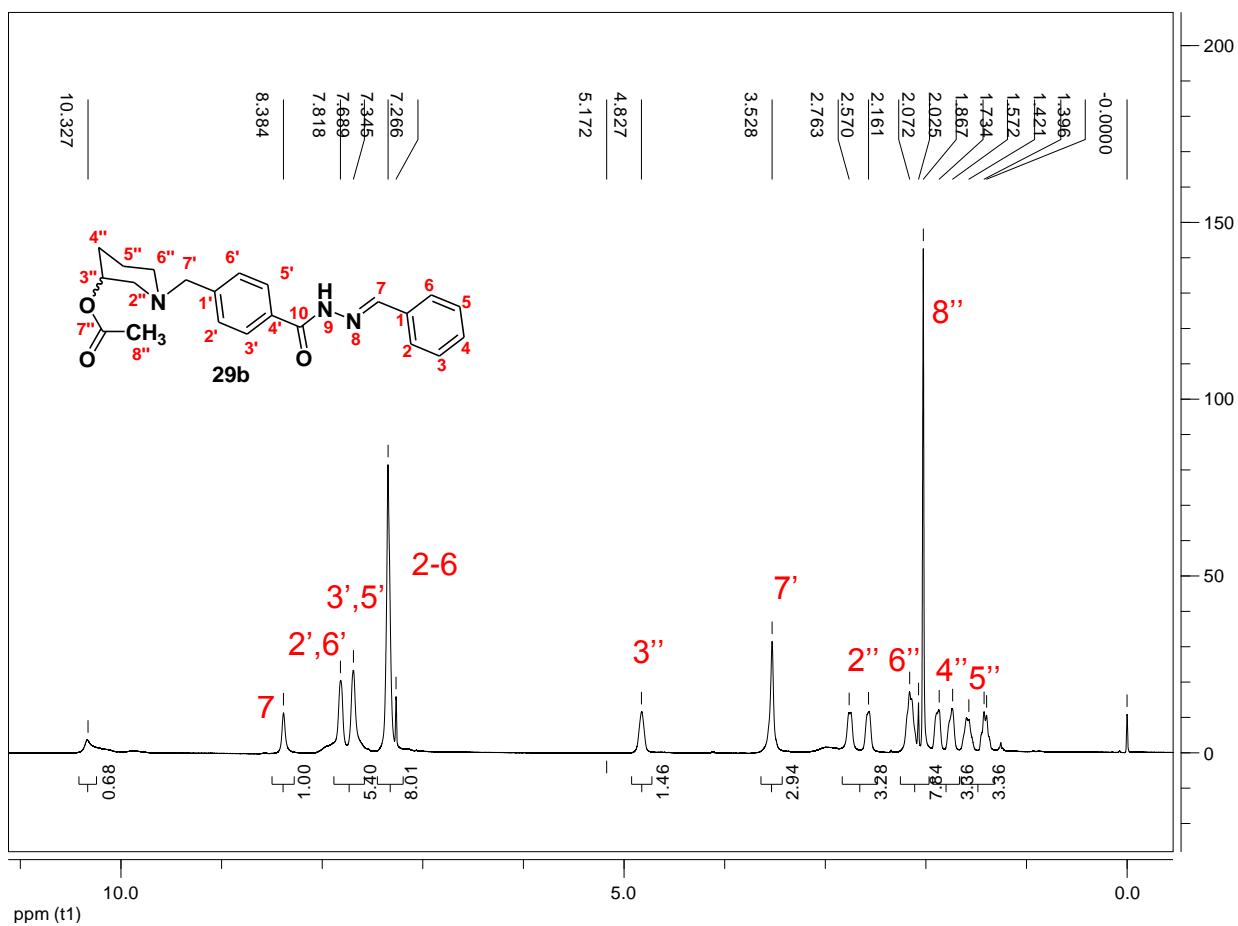
**Tabela 8:** dados de RMN de  $^1\text{H}$  [ $\delta$ , m, j(Hz)] (400MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) das acilidrazonas acetiladas **29b-g, 29i e 29n**.

H	29b	29c	29d	29e	29f	29g	29h
2,6		7,33	7,06, t, 8,0	6,88, d, 8,0	6,38, d, 8,0	7,40, d, 8,0	6,60
3,5	7,34	7,35	7,37, d, 8,0	7,35, d, 8,0	7,11, d, 8,0	7,81	7,37
7	8,38, s	8,33, s	8,35, s	8,29, s	8,31, s	8,50, s,	8,20, s
2',6'	7,70	7,65	7,70	7,67, d, 8,0	7,74	7,88	8,82
3',5'	7,82	7,79	7,80	7,79, d, 8,0	7,79	8,24, d, 8,0	7,50
7'	3,54, s	3,55, s	3,56, s	3,54, s	3,56, s	3,57, s	3,57, s
2''	2,76 e 2,57, m	2,59 e 2,76, m	2,61 e 2,79, m	2,58 e 2,75, m	2,58 e 2,78, m	2,61 e 2,77, m	2,58 e 2,77, m
3''	4,83, m	4,82, m	4,83, m	4,83, m	4,83, m	4,83, m	4,84, m
4''	1,87 e 1,73, m	1,77 e 1,89, m	1,75 e 1,89, m	1,74 e 1,87, m	1,61 e 1,75, m	1,72 e 1,90, m	1,75 e 1,87, m
5''	1,42 e 1,57 m	1,41 e 1,59, m	1,26 e 1,43, m	1,26 e 1,42, m	1,26 e 1,43, m	1,44 e 1,62, m	1,40 e 1,59, m
6''	2,57 e 2,76, m	1,16 e 2,08, m	2,08 e 2,19 m	2,08 e 2,17, m	2,18, m	2,20, m	2,19, m
8''	2,02, s	2,03, s	2,03, s	2,03, s	2,03, s	2,04, s	2,02, s

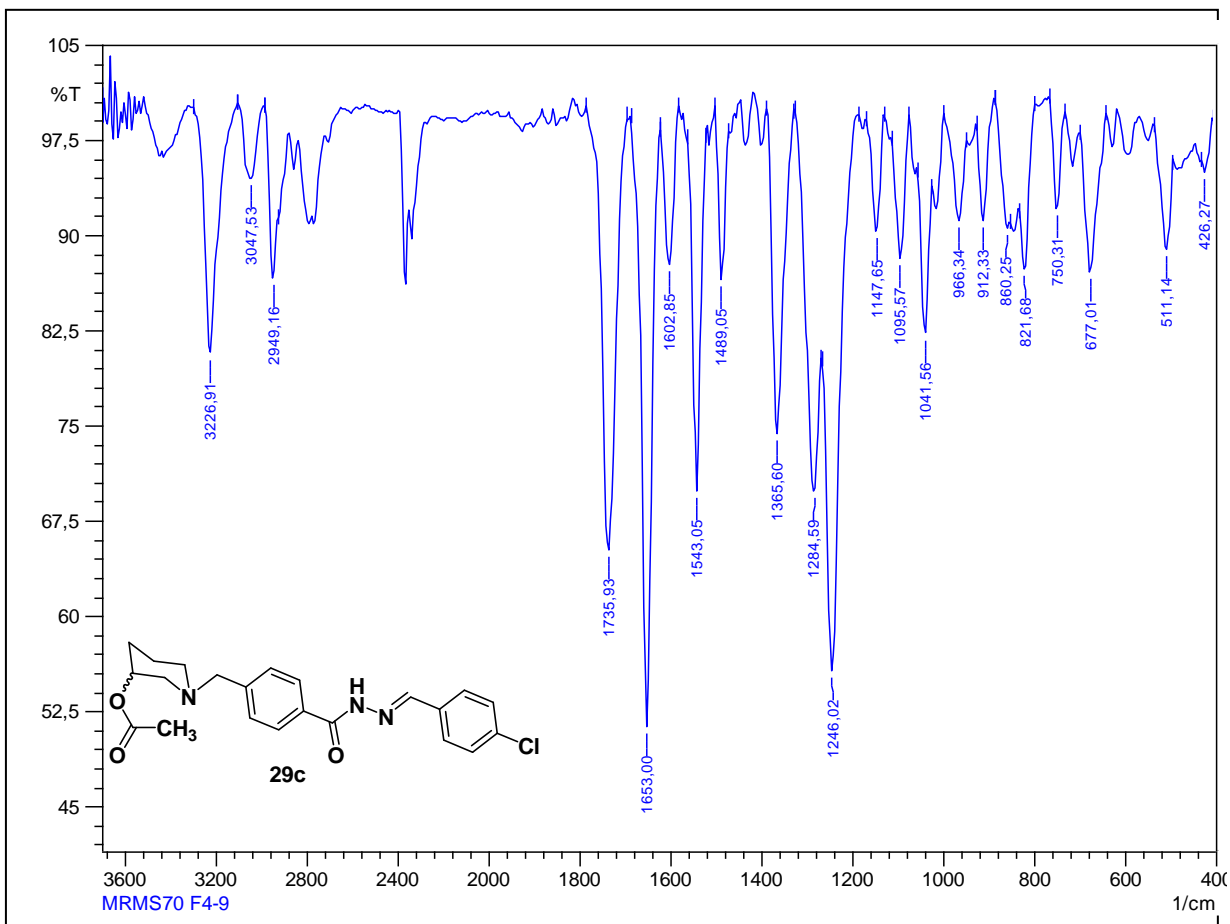


**Espectro 39:** Espectro no IV (KBr) do produto acetato de 1-(4-(benzilidenoaminocarbamoil)benzil)-piperidin-3-ila (**29b**).

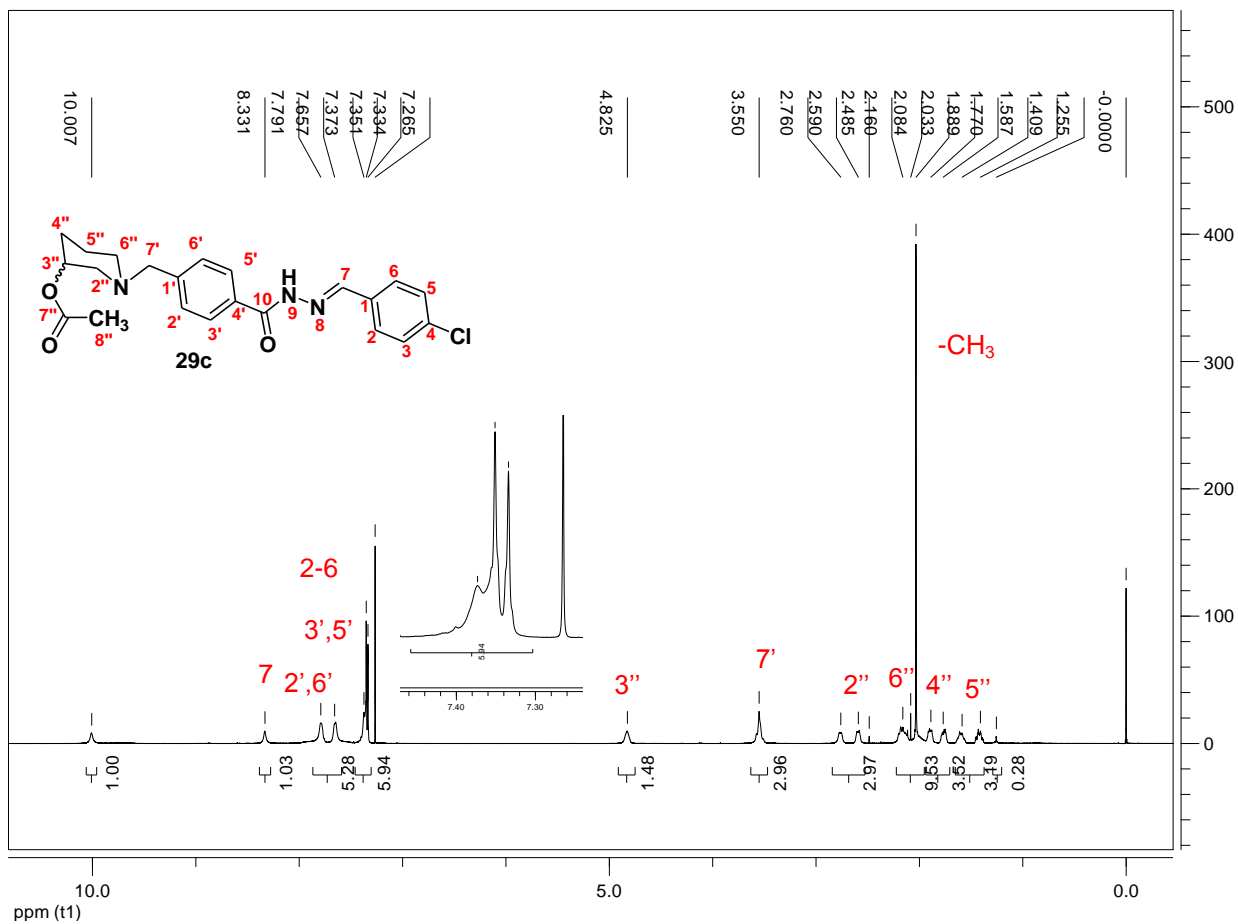




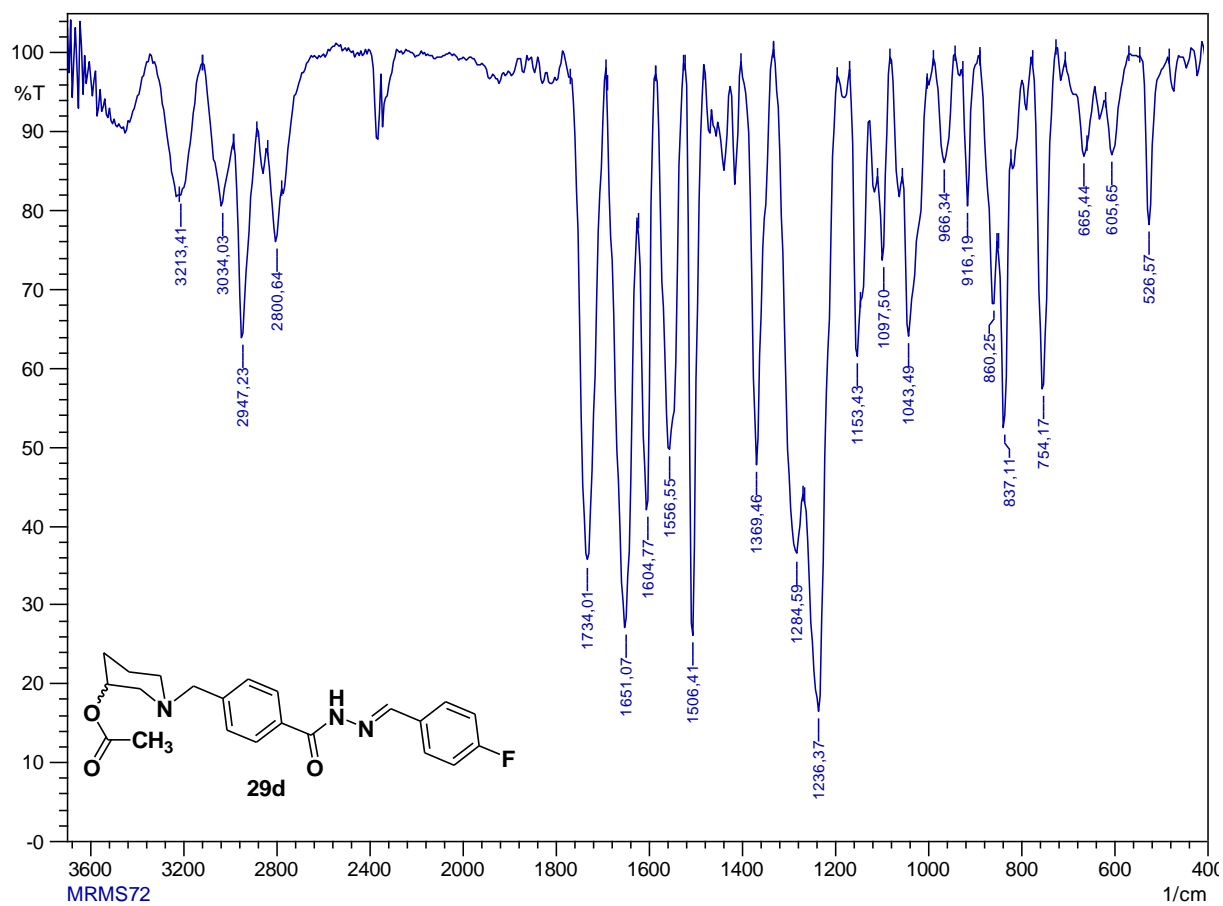
**Espectro 40:** Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (400MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) do produto acetato de 1-(4-(benzilidenoamino-carbamoil)benzil)piperidin-3-ila (**29b**).



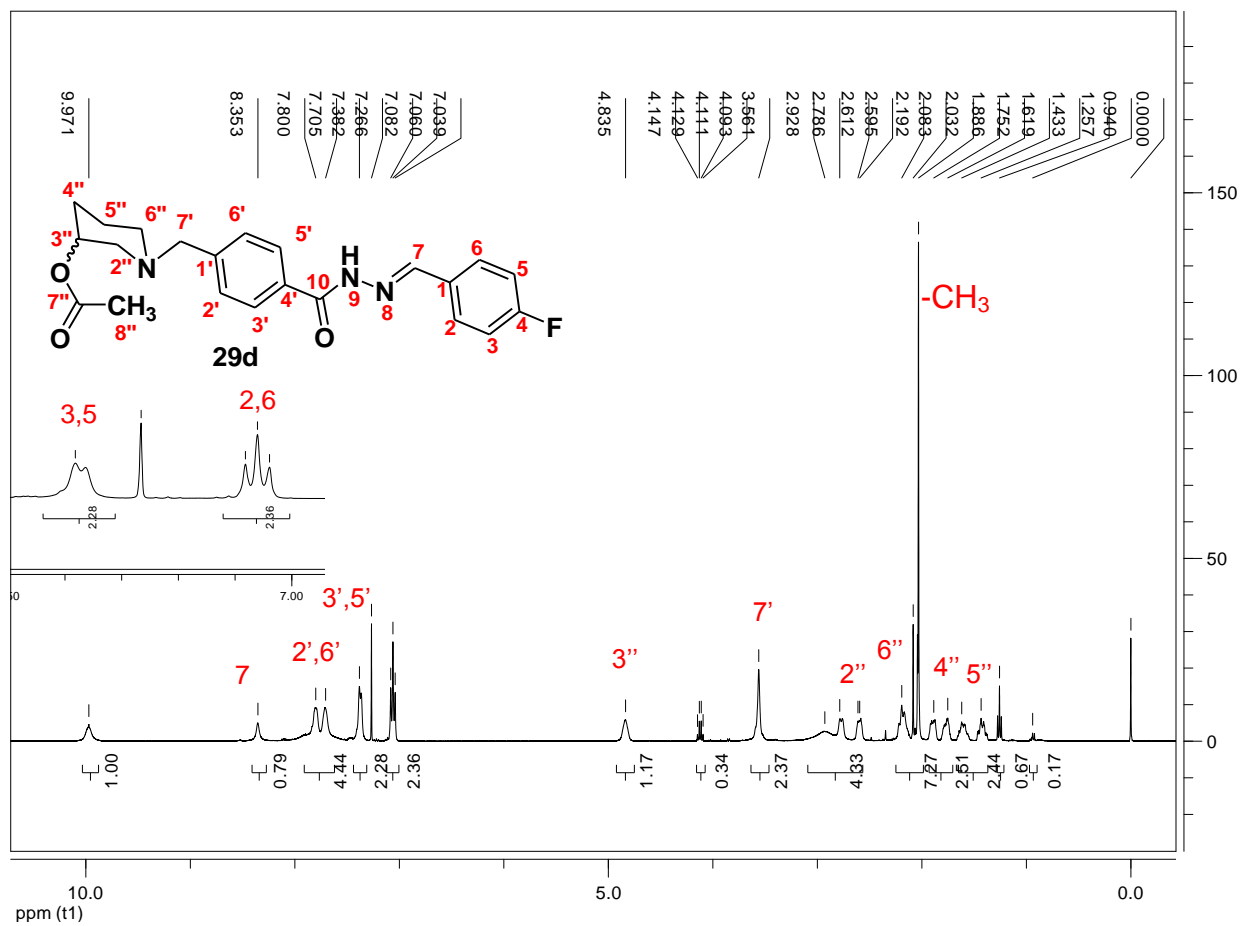
**Espectro 41:** Espectro no IV (KBr) do produto acetato de 1-(4-(4-clorobenzilidenoaminocarbamoil)-benzil)piperidin-3-ila (**29c**).



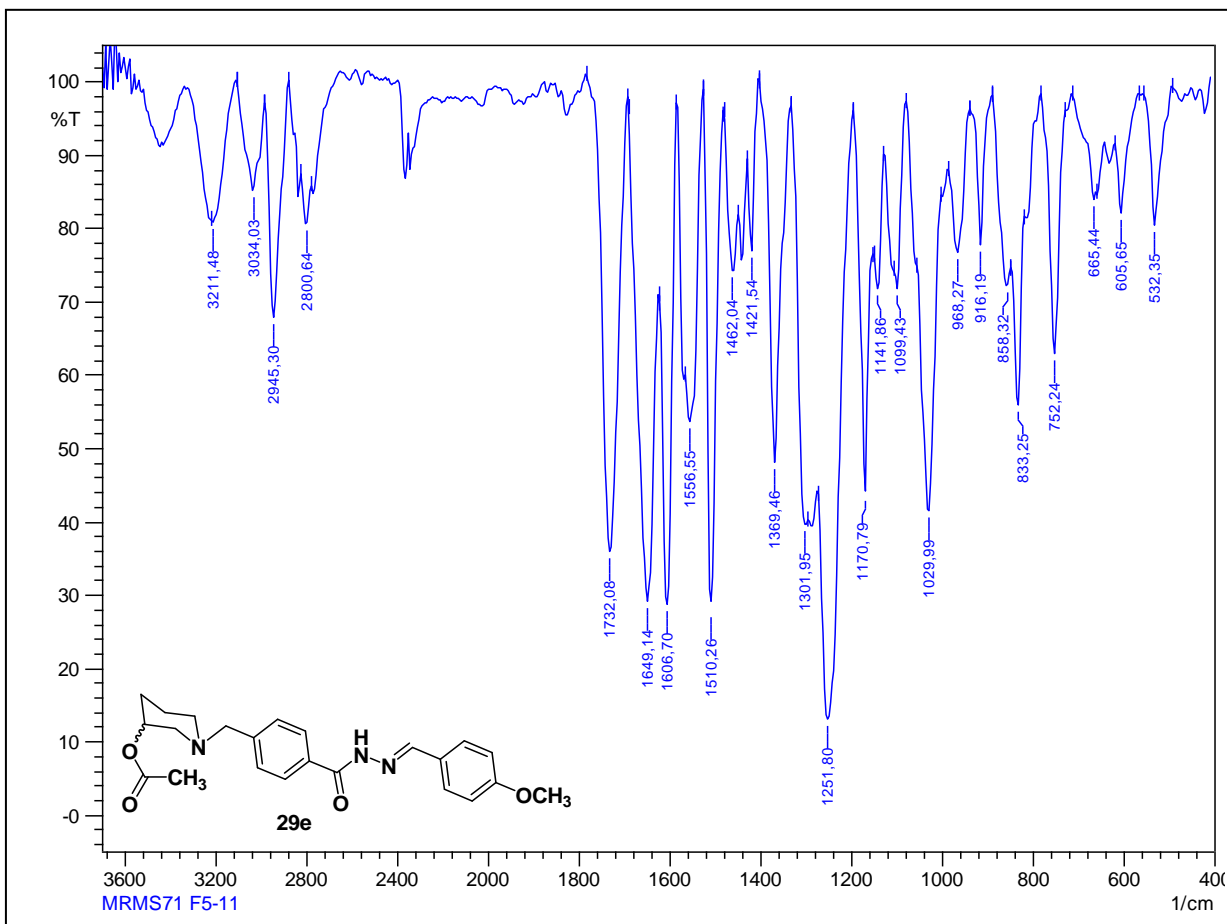
**Espectro 42:** Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) do produto acetato de 1-(4-(4-clorobenzilidenoaminocarbamoil)benzil)piperidin-3-ila (**29c**).



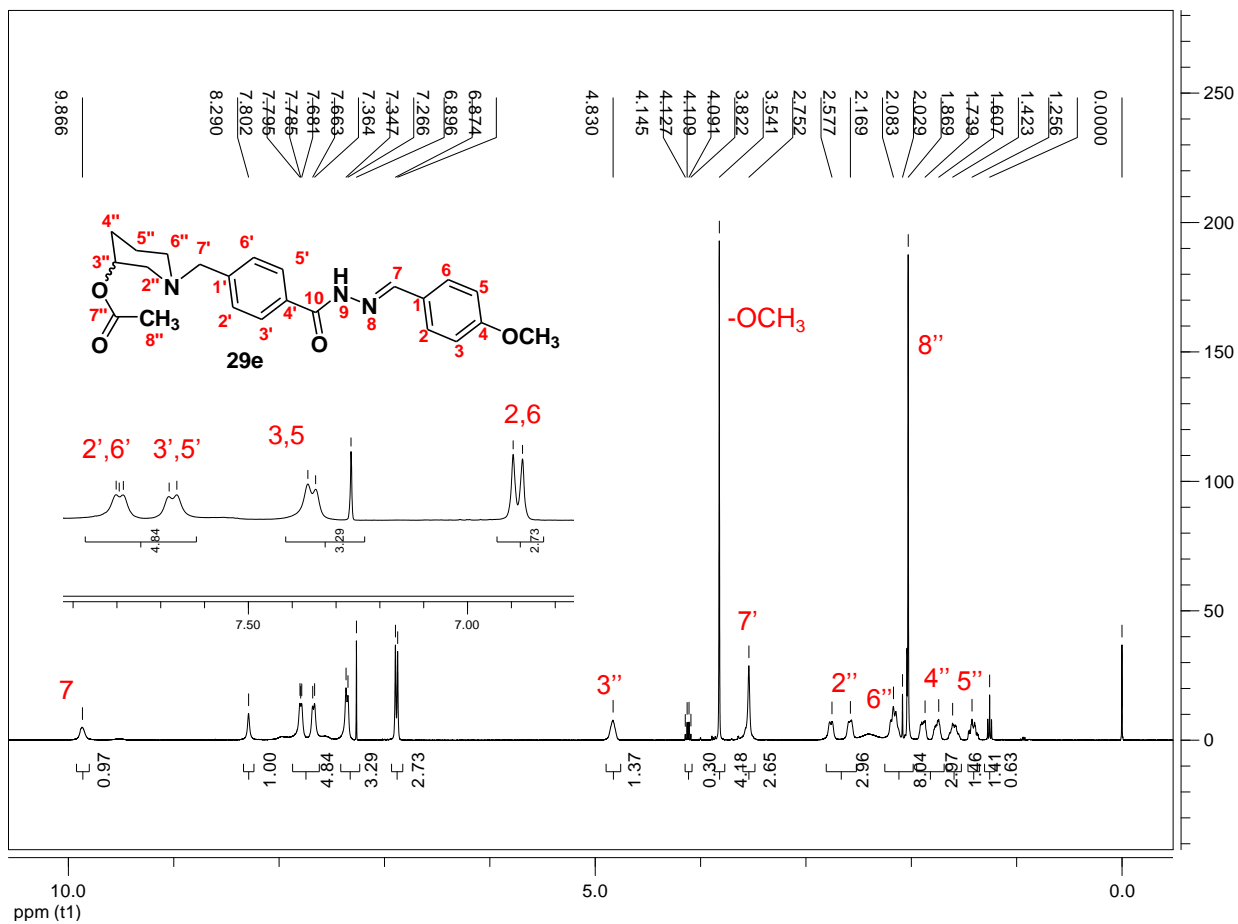
**Espectro 43:** Espectro no IV (KBr) do produto acetato de 1-(4-(4-fluorobenzilidenoaminocarbamoil)-benzil)piperidin-3-ila (**29d**).



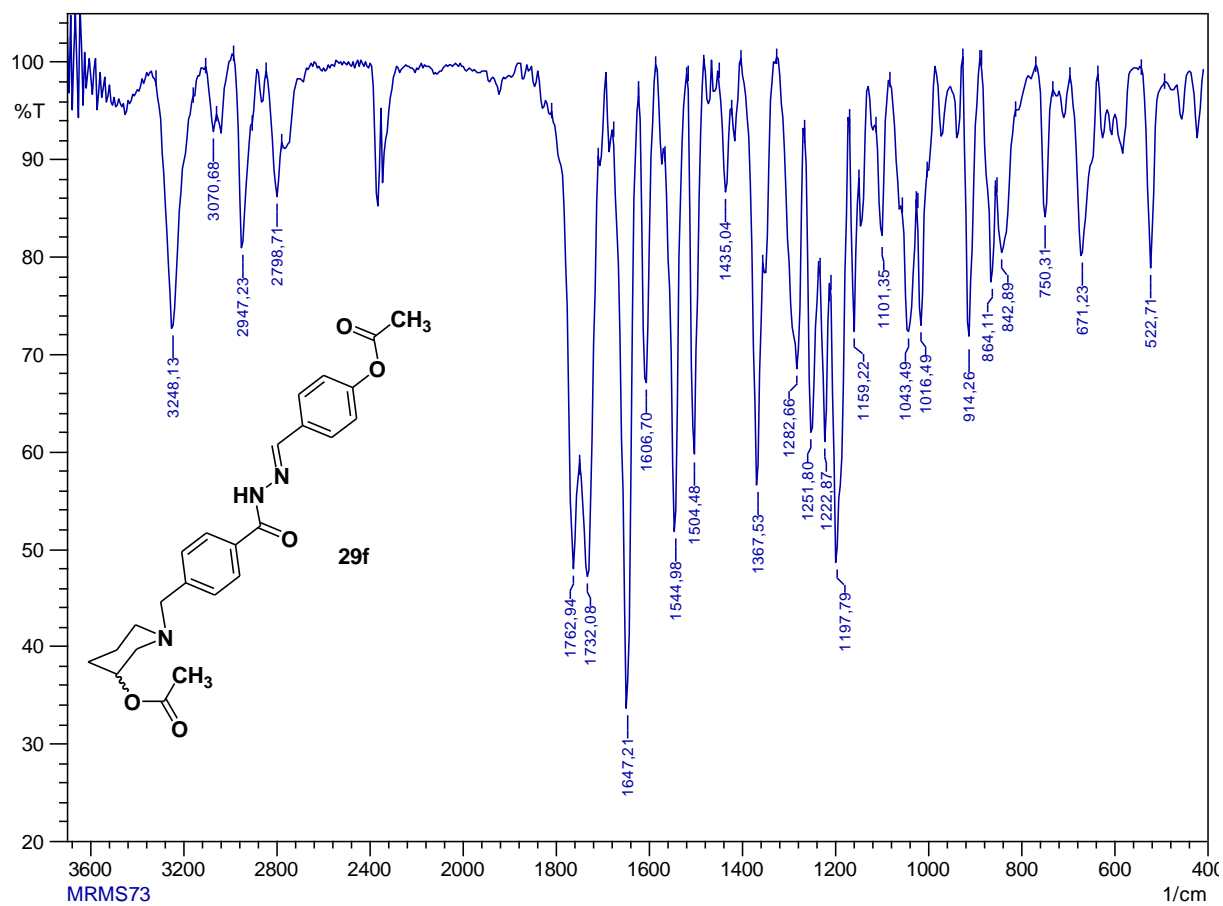
**Espectro 44:** Espectro de RMN de <sup>1</sup>H (400MHz, CDCl<sub>3</sub>) do produto acetato de 1-(4-(4-fluorobenzilidenoaminocarbamoil)benzil)piperidin-3-ila (**29d**).



**Espectro 45** Espectro no IV (KBr) do produto acetato de 1-(4-(4-metoxibenzilidenoaminocarbamoil)-benzil)piperidin-3-ila (**29e**).

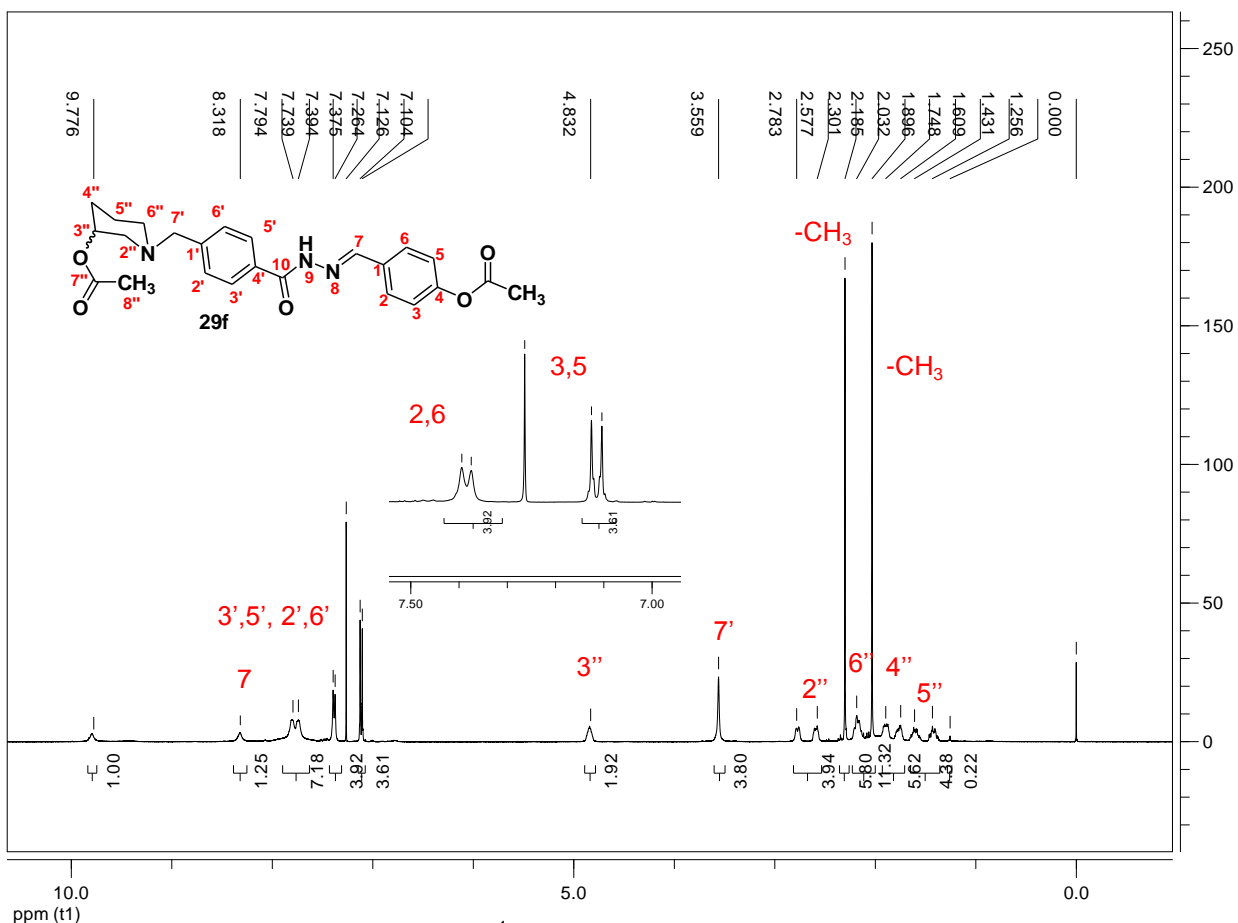


**Espectro 46:** Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (400MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) do produto acetato de 1-(4-(4-metoxibenzil-idenoaminocarbamoil)benzil)piperidin-3-ila (**29e**).

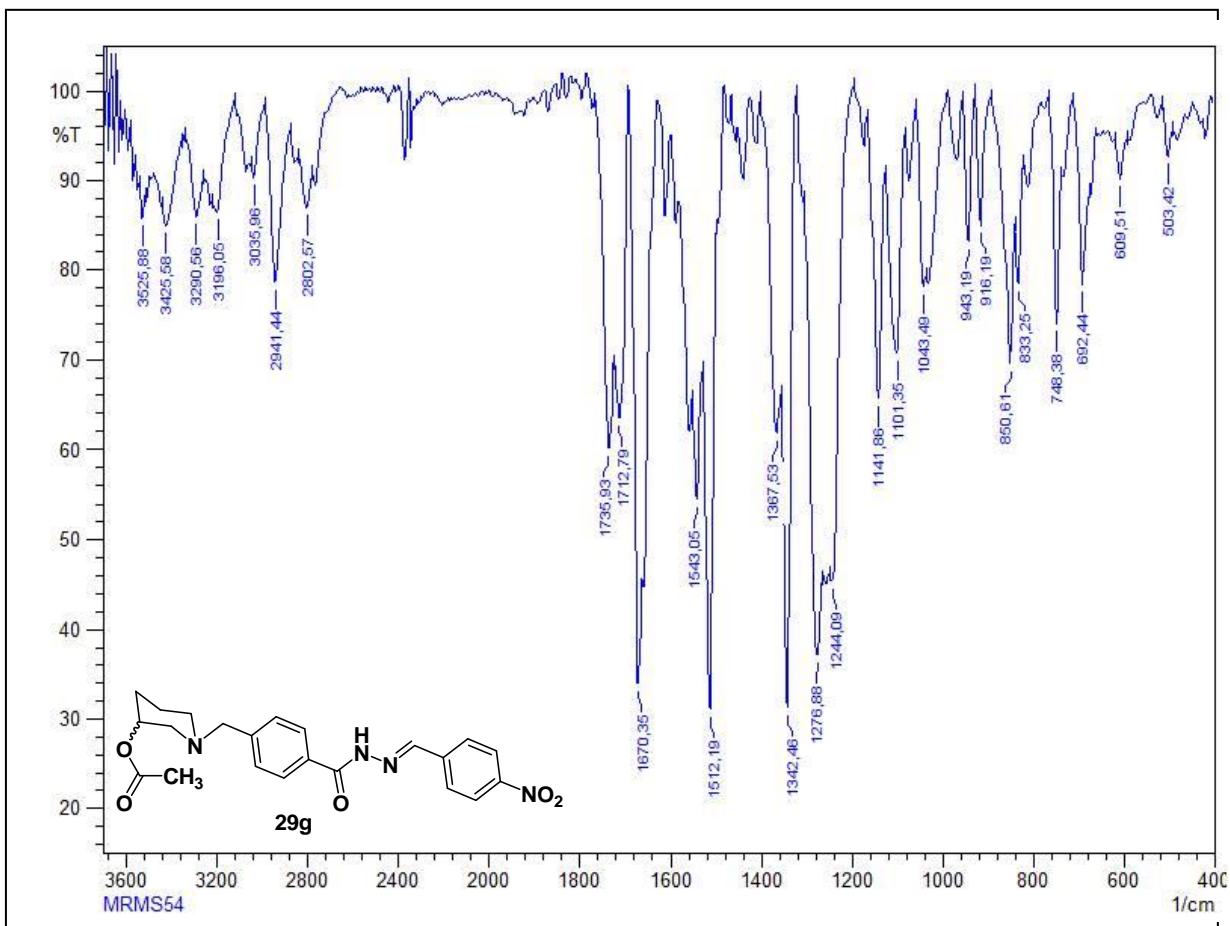


**Espectro 47** Espectro no IV (KBr) do produto acetato de 1-(4-(4-acetobenzilidenoaminocarbonyl)-benzil)piperidin-3-ila (**29f**).

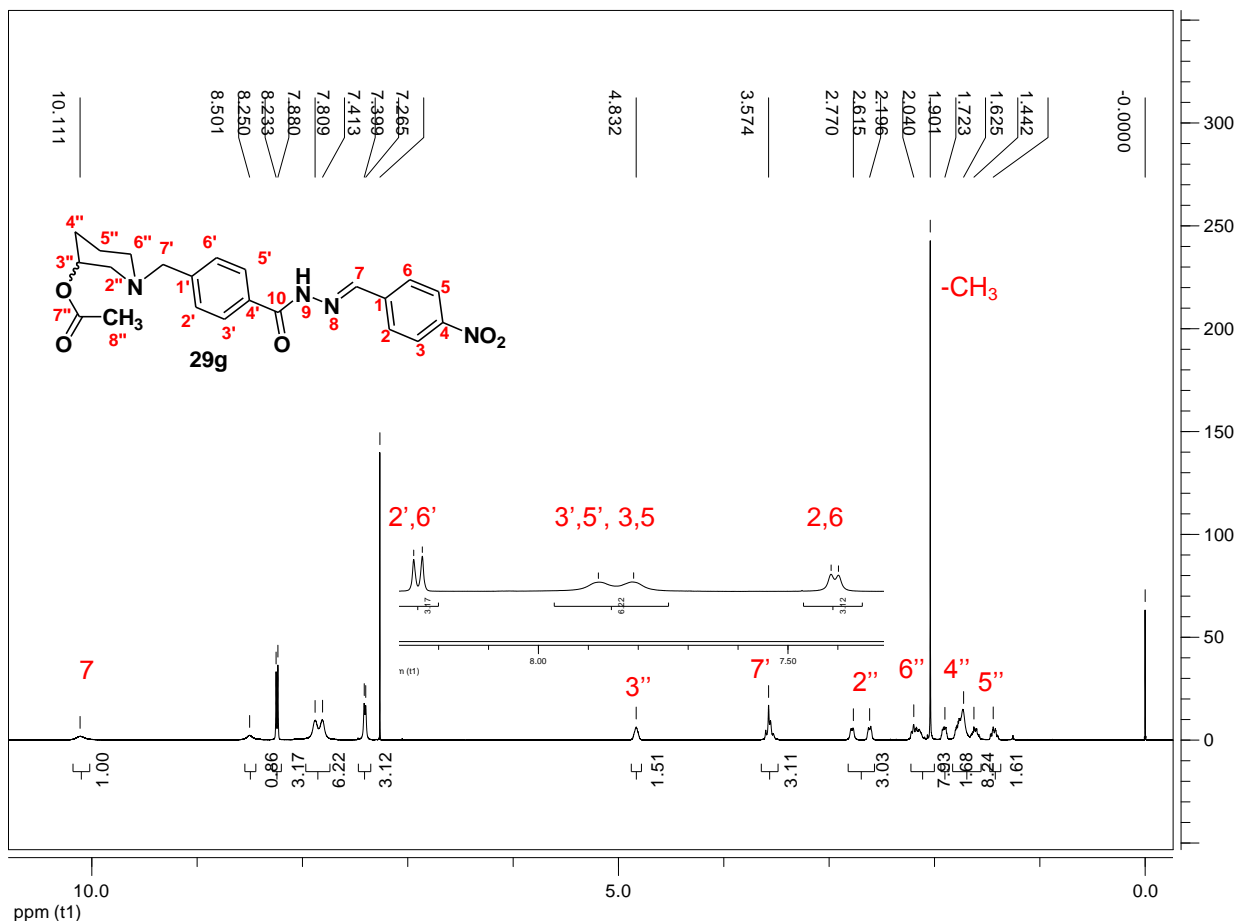




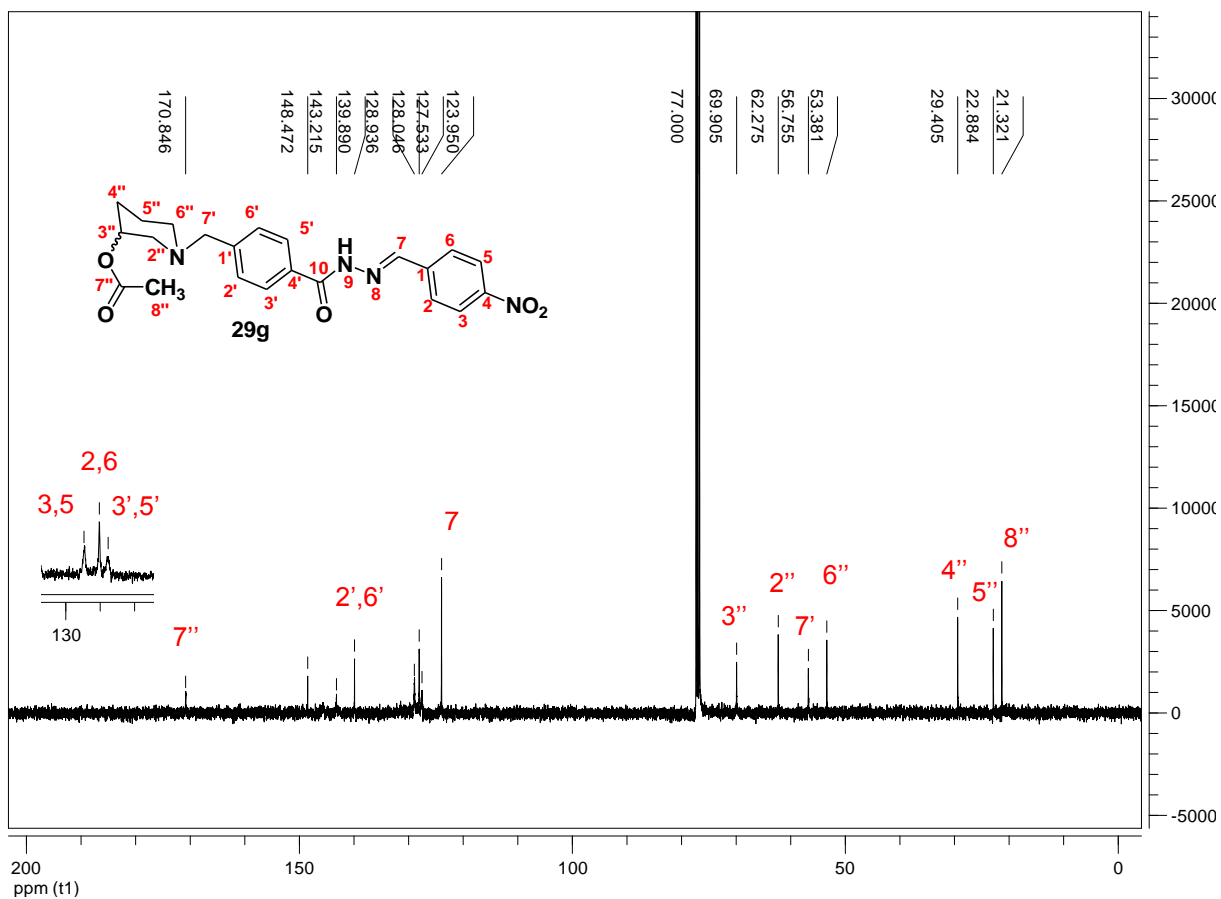
**Espectro 48:** Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (400MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) do acetato de 1-(4-(4-acetobenzilidenoaminocarbamoil)benzil)piperidin-3-ila (**29f**).



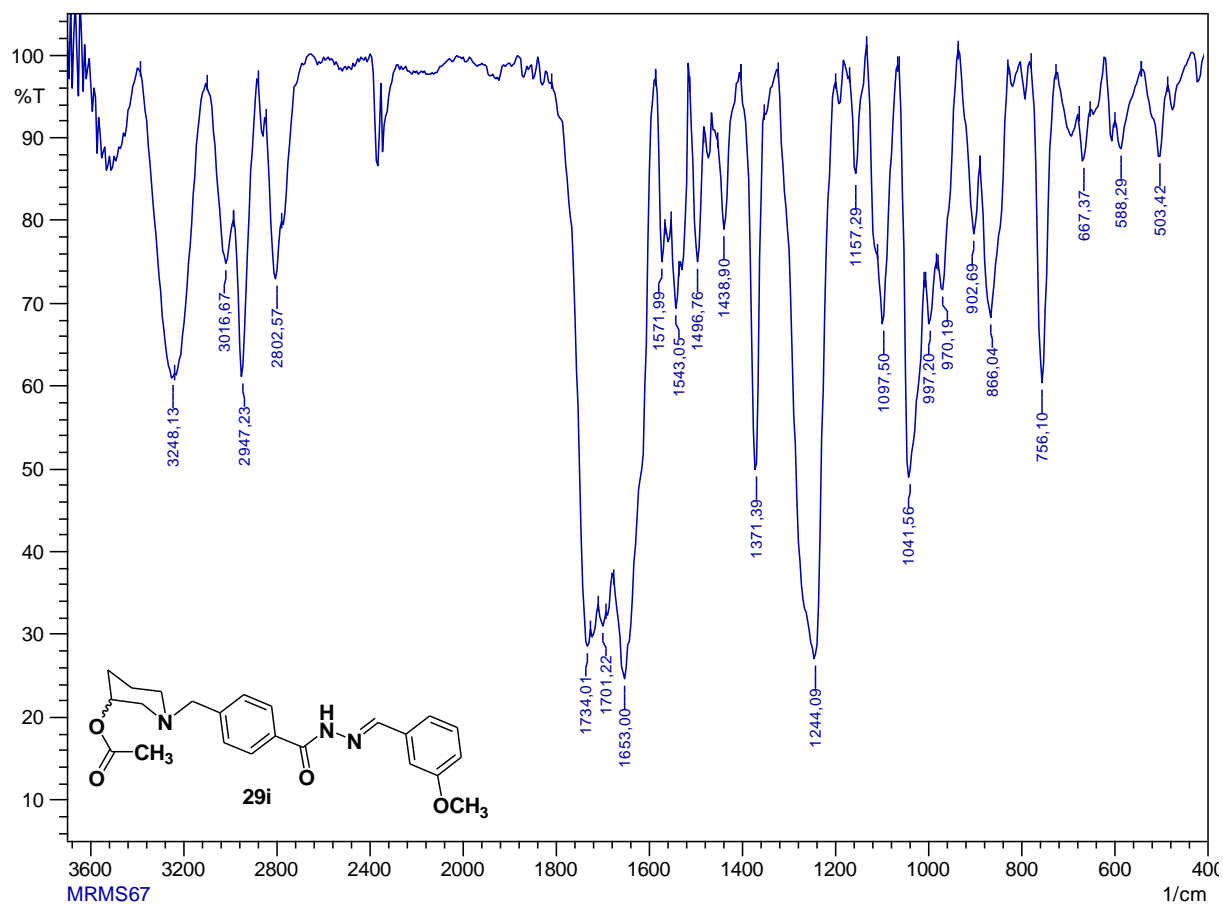
**Espectro 49:** Espectro no IV (KBr) do produto acetato de 1-(4-(4-nitrobenzilidenoaminocarbamoil)-benzil)piperidin-3-ila (**29g**).



**Espectro 50:** Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) do produto acetato de 1-(4-(4-nitrobenzil-idenoaminocarbamoil)benzil)piperidin-3-ila (**29g**).

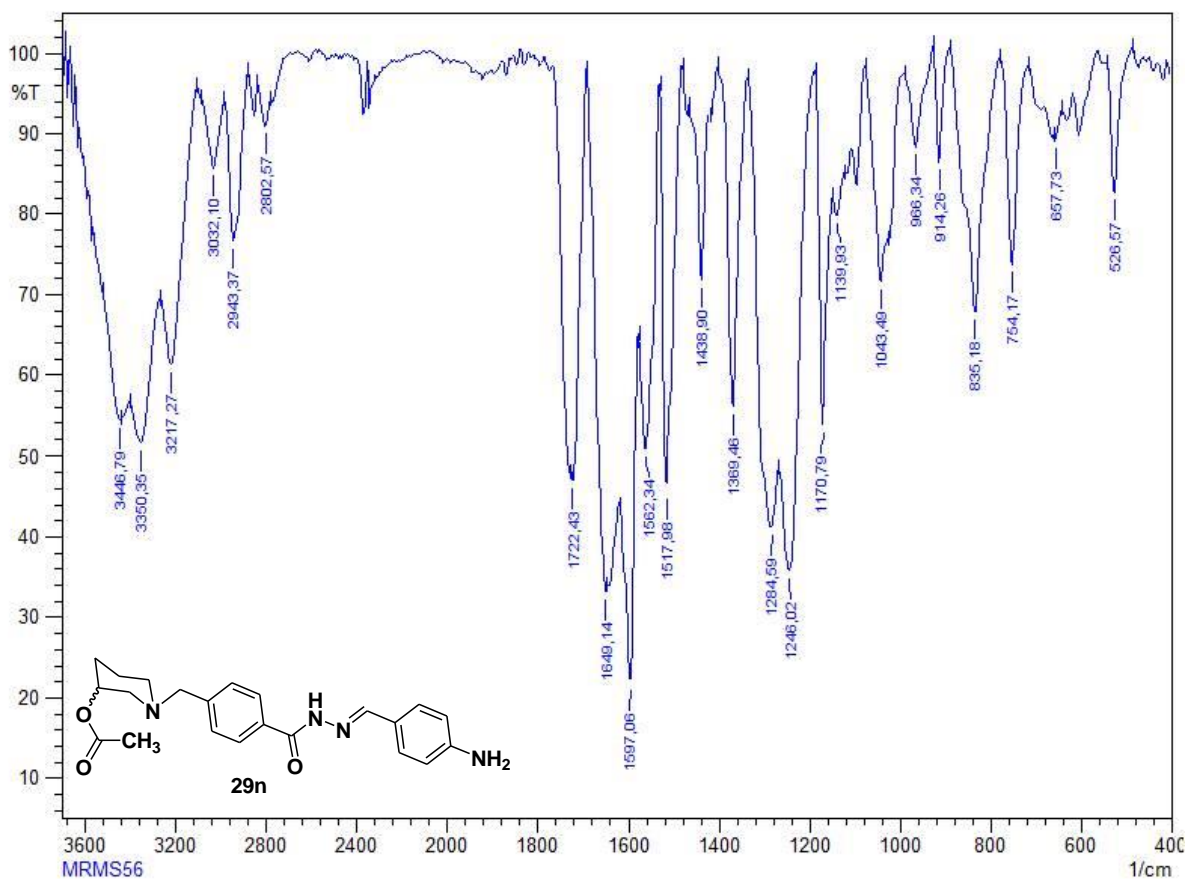


**Espectro 51:** Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) do produto acetato de 1-(4-(4-nitrobenzilidenoaminocarbamoil)benzil)piperidin-3-ila (**29g**).

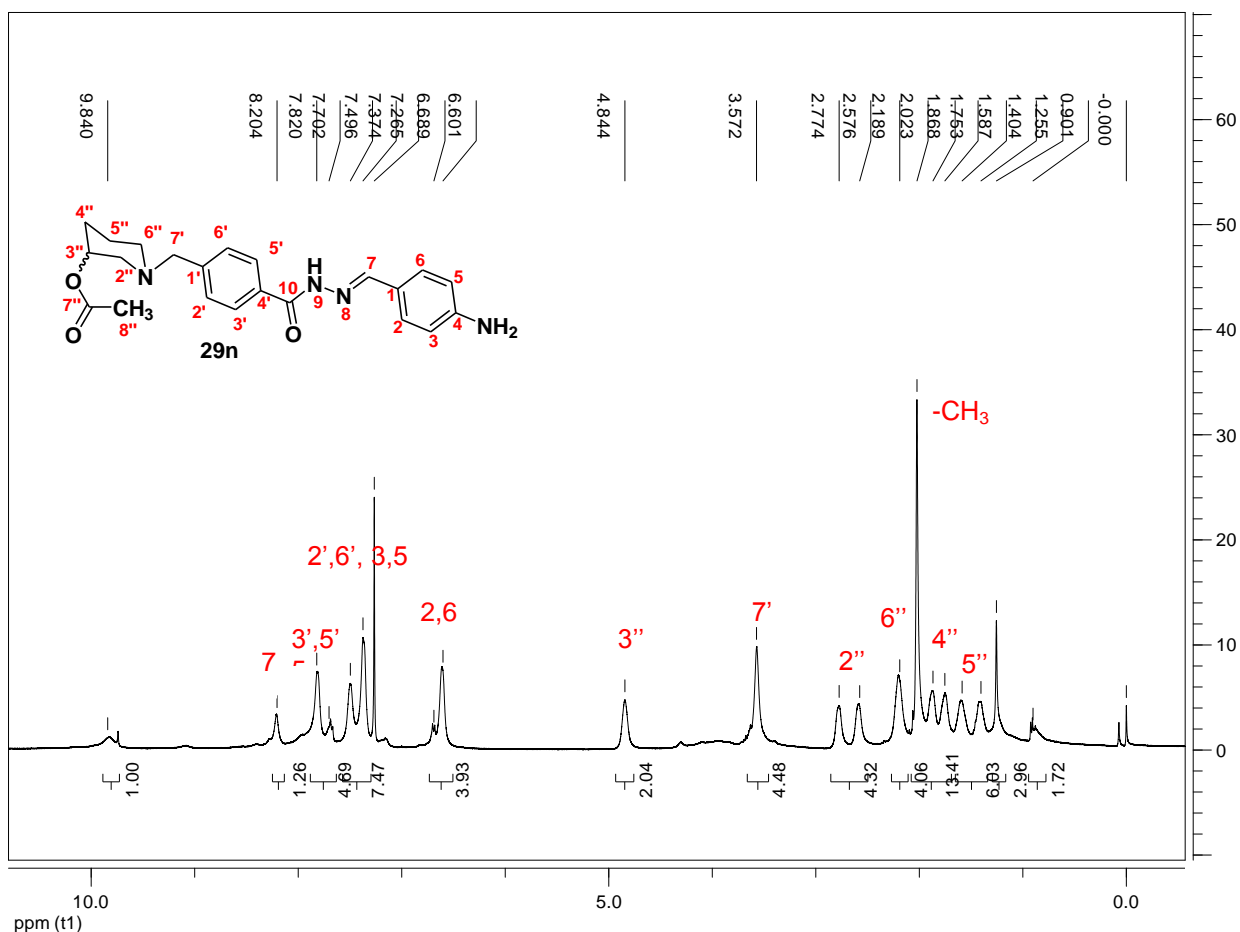


**Espectro 52:** Espectro no IV (KBr) do produto acetato de 1-(4-(3-metoxibenzilidenoaminocarbamoil)-benzil)piperidin-3-ila (**29i**).

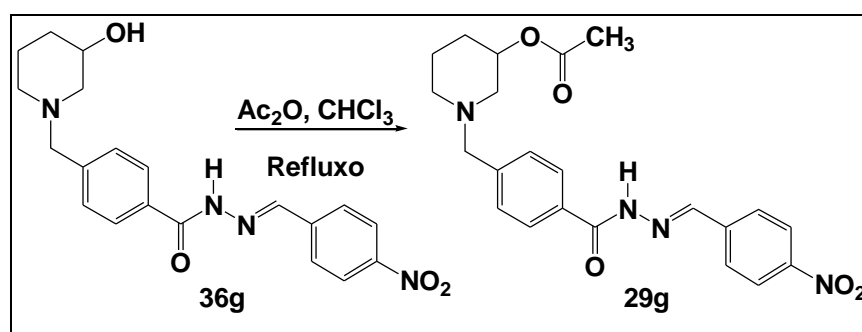
O derivado 4-amino *N*-acilidrazônico acetilado **29n** foi obtido através de uma redução quimiosseletiva da acilidrazona acetilada **29g** com  $\text{Fe}^0/\text{NH}_4\text{Cl}$ <sup>65</sup> com rendimento de 83% após purificação em coluna.



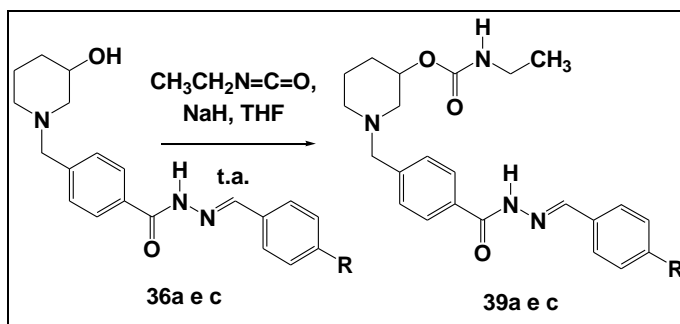
**Espectro 53:** Espectro no IV (KBr) do produto acetato de 1-(4-(4-aminobenzilidenoaminocarbamoil)-benzil)piperidin-3-ila (**29n**).



**Espectro 54:** Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) do produto acetato de 1-(4-(4-aminobenzil- idenoaminocarbamoil)benzil)piperidin-3-ila (**29n**).



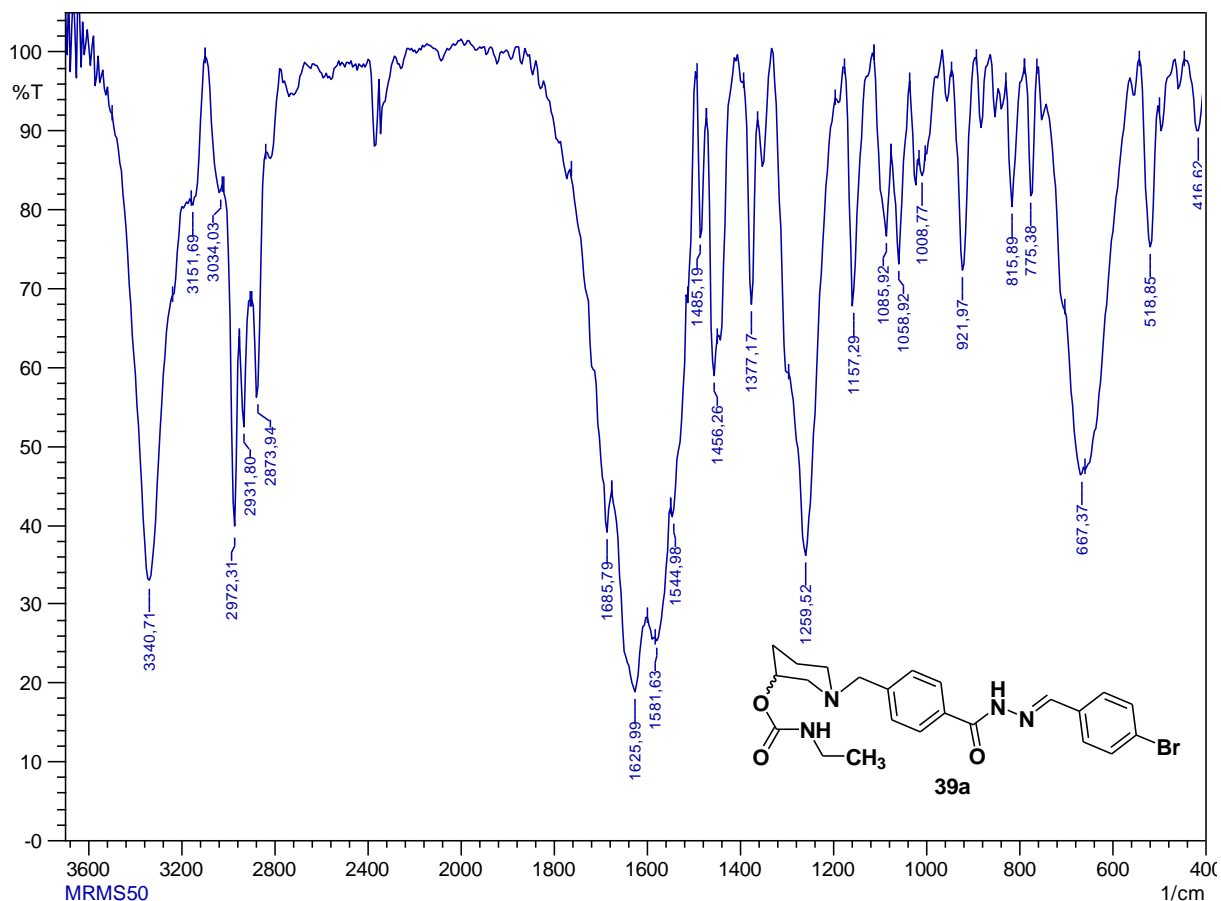
Outra metodologia<sup>61</sup>, descrita na literatura, sem utilização do 4-DMAP, também foi testada. Partindo-se de 100 mg da acilidrazona **36g**, 0,12 mL de anidrido acético em 5 mL de  $\text{CHCl}_3$ , sob refluxo, obteve-se 15,9 mg de um produto que foi analisado por espectrometria no IV, cujo espectro mostrou-se igual ao do produto de acetilação utilizando 4-DMAP.



**Esquema 10:** Reação de carbamoilação das acilidrazonas **36a e c**.

Para a preparação da serie **39**, foi realizado um teste adicionando-se NaH/EtNCO/THF à acilidrazona **36a**. Após elaboração<sup>67</sup>, obteve-se o carbamato puro com 70,5% de rendimento.

Analisando o espectro no IV do produto obtido (Espectro 55) e comparando-o à análise da acilidrazona **36a**, observa-se o aparecimento de uma banda forte em  $3340\text{ cm}^{-1}$  que pode ser atribuída a  $\nu_s$  N-H, além da sobreposição de bandas de C=O em 1625, sugerem a conversão de **36a** a **39a**.

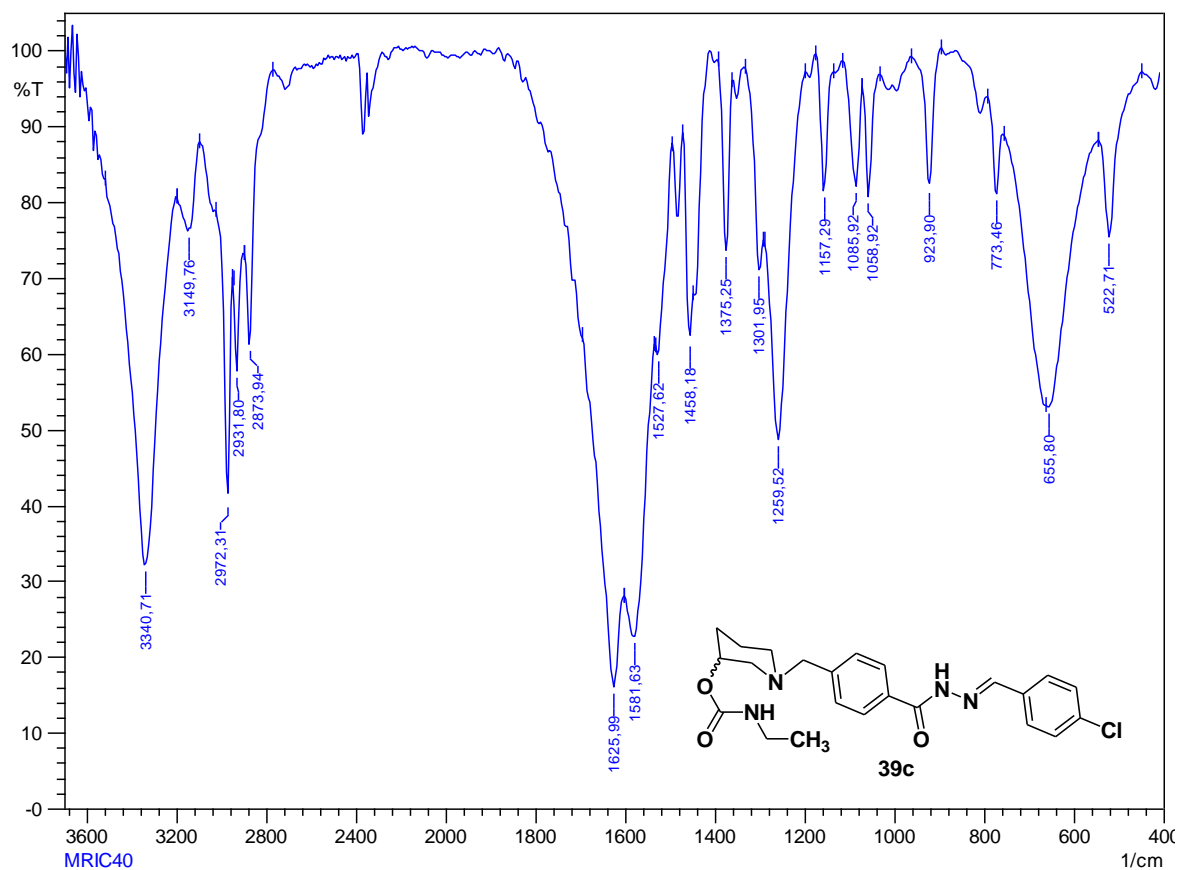


**Espectro 55:** Espectro no IV (KBr) do produto 1-(4-(4-bromobenzilidenoaminocarbamoil)-benzil)piperidin-3-il carbamato de etila (**39a**).



Para avaliação da reprodutibilidade da metodologia de carbamoilação realizada anteriormente, repetiu-se as mesmas condições experimentais para a acilidrazona **36c** e obteve-se o produto puro **39c** com 72,6% de rendimento.

Analisando o espectro no IV do produto obtido (Espectro 52) e comparando-o a análise da acilidrazona **36c**, observa-se o aparecimento de uma banda forte em  $3340\text{ cm}^{-1}$  que pode ser atribuída a  $\nu_s$  N-H, além da sobreposição de bandas de  $\nu_s$  C=O em 1625, sugerem a conversão de **36c** a **39c**.



**Espectro 56:** Espectro no IV (KBr) do produto 1-(4-(4-clorobenzilidenoaminocarbamoil)-benzil)piperidin-3-il carbamato de etila (**39c**).

## 6. Avaliação farmacológica

### 6.1. Ensaios de atividade inibitória de acetilcolinesterase

Todas as 21 acilidrazonas sintetizadas como derivados híbridos do donepezil **LFQM-54-58**, **LFQM-65-69**, **LFQM-72-75**, **LFQM-77**, **LFQM-83-88**, com substituintes -OH, -OAc ou -OCONEt na posição 3 da subunidade piperidínica foram avaliadas, quanto à capacidade inibitória *in vitro* de AChE, pelo método de Ellman modificado.<sup>72,73</sup>

Para tanto foi utilizada AChE comercial, purificada de *Electrophorus electricus*. Inicialmente foi realizada uma triagem, na concentração 0,1 mM das substancias-teste (Fig. 14), que levaram à seleção dos compostos com % de inibição superior a 50 para determinação das curvas dose-resposta e potência inibitória.

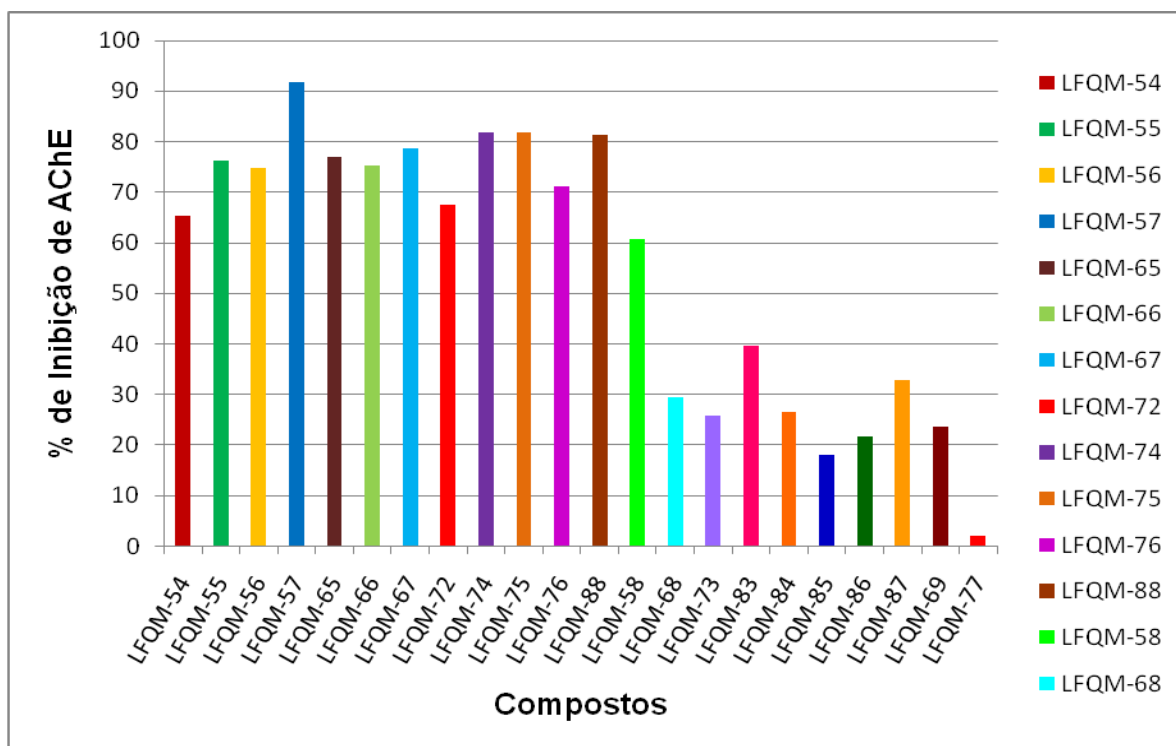


Figura 14: Efeito das acilidrazonas (100µmol/Kg) no ensaio de inibição da AChE.

As substancias **LFQM-54-58**, **LFQM-65-67** e **LFQM-72**, **LFQM-74**, **LFQM-75** e **LFQM-88** foram então avaliadas em 6 concentrações distintas, gerando curvas dose-resposta que permitiram a determinação dos valores de IC<sub>50</sub> (Tabela 9, Fig.15).

A análise comparativa destes resultados revelou que os derivados acilidrazônicos hidroxilados foram mais potentes do que os derivados acetilados, que por sua vez foram ainda mais potentes que os carbamatos correspondentes. Os derivados acilidrazônicos hidroxilados na subunidade piperidínica apresentaram atividade inibitória da AchE de 65 a 91% e IC<sub>50</sub> de 3,02 a 30,54 µM, sendo **LFQM-57** (3,02 µM) a mais potente da série avaliada, seguida de **LFQM-67** (IC<sub>50</sub> = 8,89 µM), **LFQM-88** (IC<sub>50</sub> = 10,50 µM), **LFQM-75** (IC<sub>50</sub> = 11,00 µM), **LFQM-74** (IC<sub>50</sub> = 12,30) e **LFQM-55** (IC<sub>50</sub> = 12,35 µM).

**Tabela 9:** Efeito das acilidrazonas (100µmol/Kg) no ensaio de inibição da AChE e Concentração necessária para reduzir a atividade da AChE em 50% (IC<sub>50</sub>).

Código	R1	R2	% de inibição	IC <sub>50</sub> (µM)
LFQM-54	OH	H	65,305	30,54
LFQM-55	OH	Br	76,203	12,35
LFQM-56	OH	Cl	74,827	25,43
LFQM-57	OH	NO <sub>2</sub>	91,675	3,02
LFQM-65	OH	OCH <sub>3</sub>	76,891	14,08
LFQM-66	OH	Pirrolidinil	75,176	15,64
LFQM-67	OH	F	78,804	8,89
LFQM-72	OH	NH <sub>2</sub>	67,622	21,91
LFQM-74	OH	Morfolinil	81,874	12,30
LFQM-75	OH	Piperidinil	81,789	11,00
LFQM-88	OH	SCH <sub>3</sub>	81,279	10,50
LFQM-58	Ac	NO <sub>2</sub>	60,681	33,74
LFQM-68	Ac	Br	29,563	-
LFQM-73	Ac	NH <sub>2</sub>	25,732	-
LFQM-83	Ac	H	39,737	-
LFQM-84	Ac	Cl	26,414	-
LFQM-85	Ac	OCH <sub>3</sub>	18,12	-
LFQM-86	Ac	F	21,663	-
LFQM-87	Ac	Ac	32,757	-
LFQM-69	Carb	Br	23,69	-
LFQM-77	Carb	Cl	2,122	-

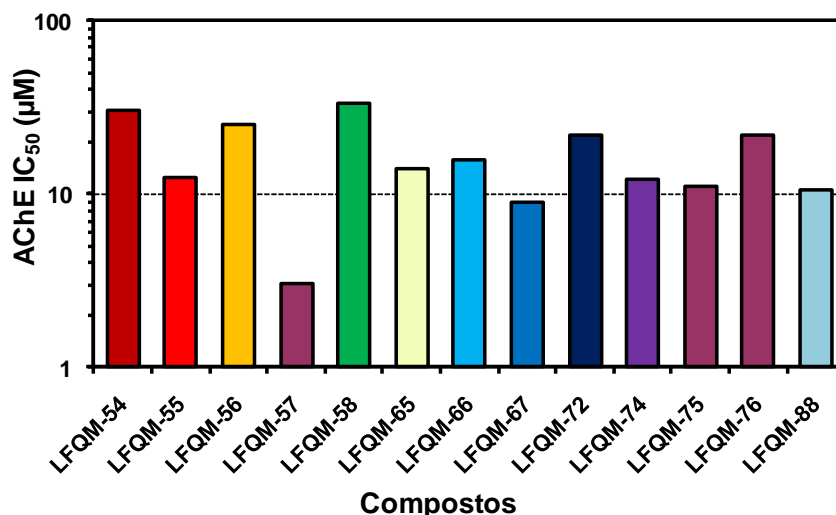


Figura 15: Concentração dos compostos necessária para inibir a atividade da AChE em 50% (IC<sub>50</sub>).

## 6.2. Avaliação da atividade anti-inflamatória

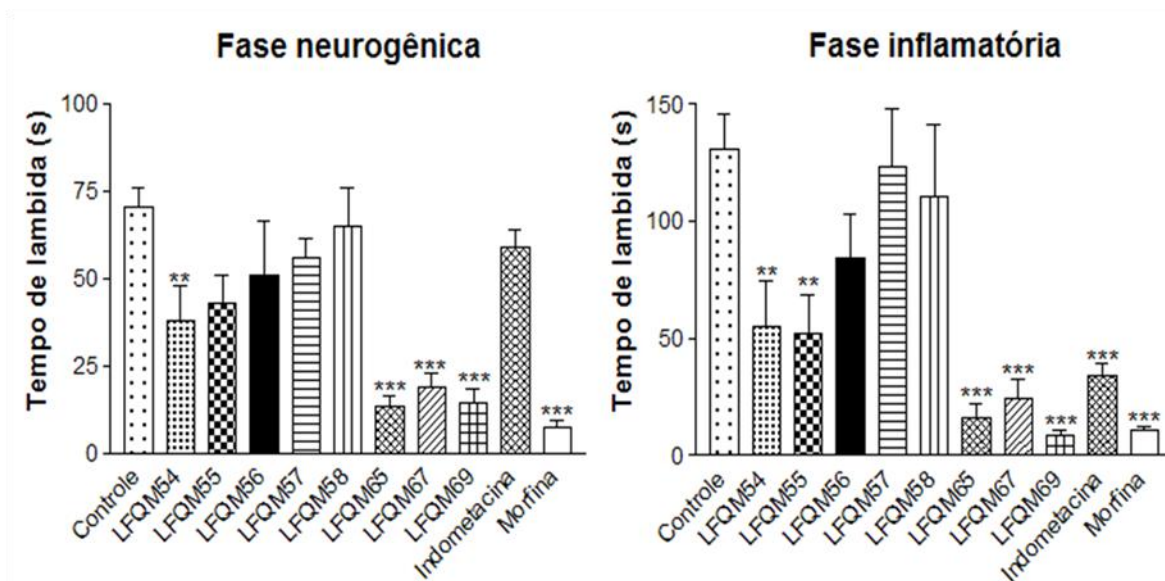
### 6.2.1. Ensaio de hiperalgisia induzida por formalina

A avaliação das propriedades analgésicas associadas ao efeito anti-inflamatório agudo foi realizada pelo ensaio de hiperalgisia induzida em pata de camundongo, pela administração intraplantar de 20 µL de formalina a 10%.

Este ensaio normalmente é utilizado como modelo neste tipo de avaliação, no qual roedores exibem comportamento nociceptivo espontâneo reconhecido e quantificado pela observação das lambidas ou agitação da pata afetada. Este ensaio é caracterizado por duas fases distintas de avaliação. A primeira fase, chamada neurogênica ou fase inicial e que compreende os primeiros 5 minutos, está associada à excitação de nociceptores periféricos. Numa segunda fase, já sob efeito de mediadores inflamatórios, é avaliada a resposta de sensibilização central dos animais à sensação dolorosa mediada por citocinas e quimiocinas oriundas do processo inflamatório tecidual.<sup>68, 69</sup>

Os resultados preliminares do ensaio de formalina (Fig. 16), na dose única de 100 µmol/kg por substância-teste, indicaram que as substâncias **LFQM-54 (36b)**, **LFQM-65 (36e)**, **LFQM-67 (36i)** e **LFQM-69 (29a)** apresentaram atividade antinociceptiva significativa, comparada à morfina e indometacina, utilizadas como padrões positivo e negativo, respectivamente. Na fase inflamatória, as substâncias **LFQM-54 (36b)**, **LFQM-55 (36a)**, **LFQM-65 (36e)**, **LFQM-67 (36i)** e **LFQM-69 (29a)**,

demonstraram propriedades anti-inflamatórias bastante evidentes, comparando-se à indometacina (100  $\mu\text{mol/kg}$ ) e à morfina (39  $\mu\text{mol/kg}$ ), respectivamente.

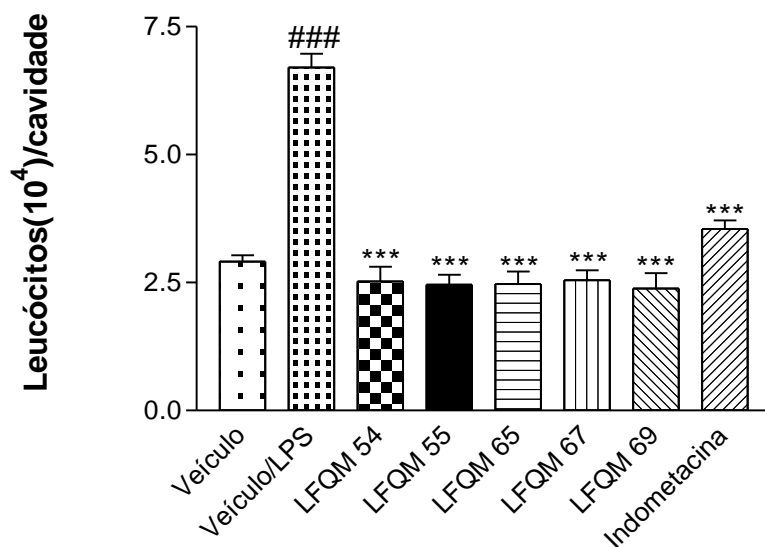


**Figura 16:** Efeito das substâncias-teste **LFQM-54**, **LFQM-55**, **LFQM-65**, **LFQM-67** e **LFQM-69** (100  $\mu\text{mol/kg}$ ), indometacina (100  $\mu\text{mol/kg}$ ) e morfina (39  $\mu\text{mol/kg}$ ) sobre as fases neurogênica e inflamatória do teste de formalina.

### 6.2.2. Ensaio de peritonite induzida por LPS

Com base no resultado anterior, elegemos adicionalmente o ensaio de peritonite para avaliação da atividade anti-inflamatória de **LFQM-54** (36b), **LFQM-55** (36a), **LFQM-65** (36e), **LFQM-67** (36i) e **LFQM-69** (29a). O LPS é um lipopolissacarídeo proveniente de *Echerichia coli*, que induz desgranulação de células do sistema mononuclear fagocitário e ativa os macrófagos. Quando administrado na cavidade peritoneal do camundongo, o LPS induz um extravasamento vascular aumentado, um dos sinais primários da inflamação, e que é um passo chave na formação inflamatória de exsudato, seguido por um recrutamento tempo-dependente de células migratórias, especialmente neutrófilos.

Neste modelo farmacológico, foi observada uma redução expressiva do número de células migratórias no lavado peritoneal, após a administração das substâncias-teste, corroborando uma possível ação anti-inflamatória (Fig. 16).<sup>70,71</sup>

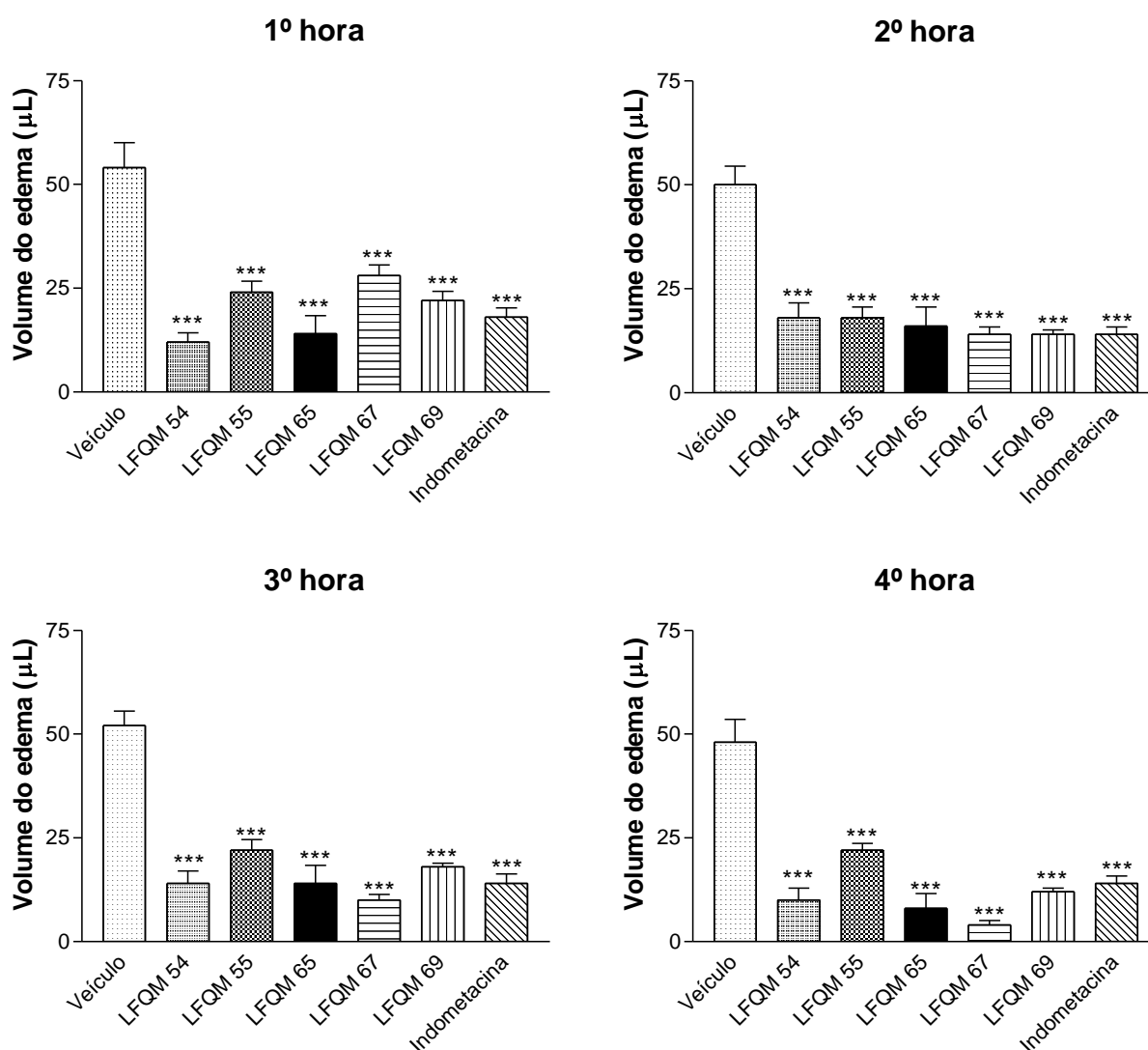


**Figura 16:** Efeito das acilidrazonas **LFQM-54**, **LFQM-55**, **LFQM-65**, **LFQM-67** e **LFQM-69** (100 µmol/kg, via i.p.), no ensaio de peritonite induzida por LPS em camundongos. Teste de ANOVA, seguido pós-teste de Newman-Kells (\*\*p<0,05).

### 6.2.3. Ensaio de edema em pata de camundongo induzido por carragenina

A administração subcutânea de carragenina em uma das patas em ratos ou camundongos provoca uma reação inflamatória reprodutível por ser padrão irritante contínuo para análise de inflamação aguda e de fármacos anti-inflamatorios. O processo inflamatório induzido por carragenina se instala imediatamente após sua administração, resultante da ação combinada da liberação de prostaglandinas, bradicinina, histamina, taquicinas e espécies reativas de oxigênio. Nesta condição, os neutrófilos facilmente migram para os locais de inflamação e a resposta inflamatória é quantificada pelo aumento no tamanho da pata (edema) dos animais que é modulado por inibidores de moléculas específicas dentro da cascata inflamatória.<sup>69</sup>

Os resultados obtidos neste ensaio, com medidas do volume da pata de hora em hora, durante 4 horas após a administração sub-cutanea de carragenina em uma das patas de camundongos (Fig. 18) evidenciaram que as substancias-teste foram capazes de reduzir significativamente o edema induzido, de modo muito semelhante ao observado no grupo tratado com indometacina.



**Figura 18:** Efeito das acilidrazonas **LFQM-54**, **LFQM-55**, **LFQM-65**, **LFQM-67** e **LFQM-69** (100 µmol/kg, via i.p.), no ensaio de edema de pata de camundongo induzido por carragenina. Teste de ANOVA, seguido pós-teste de Newman-Kells (\*\*p<0,05).

As curvas de expressão dose-resposta levaram à determinação dos valores de IC<sub>50</sub> (Tab. 10) das moléculas-teste, evidenciando que as mais potentes foram **LFQM-67** e **LFQM-69**, ambas com IC<sub>50</sub> < 3 µM, e portanto mais de 10 vezes mais potentes do que **LFQM-65** que foi a 3<sup>a</sup> molécula mais ativa dos 5 candidatos avaliados.

**Tabela 10:** Dados das medidas de IC<sub>50</sub> de **LFQM-54 (36b)**, **LFQM-55 (36a)**, **LFQM-65 (36e)**, **LFQM-67 (36l)** e **LFQM-69 (29a)** no ensaio de edema de pata de camundongo

Código	R1	R2	IC <sub>50</sub>
<b>LFQM-54</b>	OH	H	64,48 μmol
<b>LFQM-55</b>	OH	Br	87,49 μmol
<b>LFQM-56</b>	OH	Cl	-
<b>LFQM-57</b>	OH	NO <sub>2</sub>	-
<b>LFQM-65</b>	OH	OCH <sub>3</sub>	35,94 μmol
<b>LFQM-67</b>	OH	F	< 3 μmol
<b>LFQM-58</b>	Ac	NO <sub>2</sub>	-
<b>LFQM-69</b>	Carb	Br	< 3 μmol

Surpreendentemente, **LFQM-67** foi uma das substâncias com maior potência anti-inflamatória e a segunda mais potente na inibição da AChE, seguido de **LFQM-55**, também outro derivado hidroxilado, que mostrou boa atividade inibitória da AChE e anti-inflamatória. Por outro lado, **LFQM-69**, que teve a posição 3-piperidínica carbamoilada, foi extremamente potente no modelo inflamatório, mas perdeu atividade inibitória da AChE.

Este conjunto de resultados sugere que a subunidade piperidínica com um grupamento hidroxila livre na posição C-3 é fundamental farmacoforicamente para a atividade dupla anti-inflamatória e anticolinesterásica detectadas, sendo que quaisquer modificações de funcionalização nesta posição levam à perda de perfil duplo de atividade.

Entretanto, este estudo permitiu a identificação também de um novo candidato a protótipo de fármaco anti-inflamatório, **LFQM-69**, sem expressiva propriedade anticolinesterásica. Por outro lado, os derivados **LFQM-74**, **LFQM-75** e **LFQM-88**, que se mostraram potentes inibidores de AChE, ainda não foram



avaliados em modelos de inflamação, podendo contribuir para a identificação de outros candidatos com perfil duplo inovadores.

## 7. Parte Experimental

### 7.1. Química

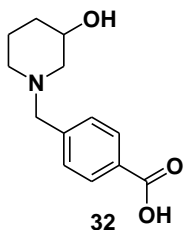
#### 7.1.1. Generalidades:

Os espectros de RMN foram registrados em espectrômetro da marca BRUKER modelo ARX200 de 4,7 Tesla do Laboratório de Ressonância Magnética Nuclear do Instituto de Química da Universidade Federal de São Carlos (UFSCar), operando a 200 MHz para  $^1\text{H}$  e 50 MHz  $^{13}\text{C}$  e no Laboratório Multiusuário de Análise por RMN (LAMAR) no Núcleo de Pesquisa de Produtos Naturais (NPPN) da Universidade Federal do Rio de Janeiro, em equipamentos Varian modelo MR 400 (400 MHz para  $^1\text{H}$  e 100 MHz para  $^{13}\text{C}$ ) e VNMRSYS 500 (500 MHz para  $^1\text{H}$  e 125 MHz para  $^{13}\text{C}$ ). As amostras foram solubilizadas em  $\text{CDCl}_3$  ou  $\text{CD}_3\text{OD}$ , utilizando como referência interna o TMS. Os valores de deslocamento químico são dados em ppm e as constantes de acoplamento  $J$  em Hertz. Os espectros na região do infravermelho (IV) foram registrados em aparelho da marca Shimadzu modelo Prestig-21, acoplado a um microcomputador munido com o software IR solution, do LABIQ (Laboratório Interdisciplinar de Química) da Universidade Federal de Alfenas (UNIFAL). As análises foram feitas em pastilhas de brometo de potássio (KBr) e as absorções expressas em números de ondas ( $\text{cm}^{-1}$ ). As faixas de fusão foram medidas em triplicata, em equipamento Marte (PFM II), com amostras trituradas e empacotadas em tubos capilares.

Para cromatografia em camada delgada (CCD) foram utilizadas folhas cromatográficas de sílica gel, w/UV254, na espessura de  $0,2\ \mu\text{m}$ , em suporte de alumínio. A visualização das substâncias foi realizada em lâmpada de UV  $\lambda = 254$  ou  $365\ \text{nm}$ , reveladores químicos de iodo-cloroplatinado, 2,4-dinitrofenilidrazina ou em câmara de iodo sublimado. Para a remoção dos solventes, foram utilizados evaporadores rotatórios da marca Ika®-Werke, modelo HB4 basic e Heidolph, modelo Laborata 4000, além de sistema de alto-vácuo, quando necessário. Os solventes utilizados foram de grau P.A, tratados adicionalmente segundo a literatura,<sup>74</sup> quando necessário e os reagentes comerciais utilizados das marcas Acros, Sigma-Aldrich e Merck. As purificações em coluna aberta, quando necessárias, foram realizadas em colunas de vidro de diferentes diâmetros e comprimentos, utilizando como fase estacionária gel

de sílica Acros 70-230 mesh e sistemas eluentes de diferentes constituições e gradientes de concentração.

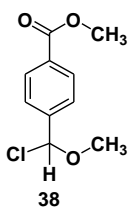
### 7.1.2. Aminoação redutiva entre o 4-carboxibenzaldeído (30) e a 3-hidroxipiperidina (31).



Em um balão de fundo redondo de duas bocas, foram adicionados 3,5 mmols do aldeído (30) e 3,5 mmols da amina (31) em 20 mL de MeOH seco e o pH foi ajustado em 5 – 6 com HOAc, seguido da adição de 20 mmols de NaBH<sub>3</sub>CN. A mistura reacional foi agitada sob refluxo a 60°C por 3 horas e a reação foi acompanhada por CCD, utilizado como eluente acetato de etila/metanol (7 : 3). Após 3 horas, verificou-se que a reação havia se completado, então a mistura reacional foi acidificada a pH~2 e em seguida alcalinizada a pH~12 com hidróxido de sódio aquoso (20%). O metanol foi removido sob pressão reduzida e a fase aquosa alcalina, extraída com CHCl<sub>3</sub> (3 x 10mL). As fases orgânicas foram combinadas, lavada com 25 mL de solução aquosa saturada de NaCl, seca com MgSO<sub>4</sub>, filtrada e concentrada sob vácuo.<sup>56,57</sup>

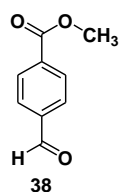
### 7.1.3. Esterificação do 4-carboxibenzaldeído (30)

#### Condição 1: Esterificação do 4-carboxibenzaldeído (30) com cloreto de tionila



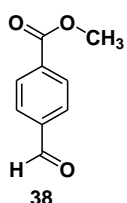
Em um balão de fundo redondo de duas bocas, foram adicionados 1,25 mmol do ácido (30), 5 mL de cloreto de tionila e 2 gotas de DMF. A solução foi agitada sob refluxo por 3 horas e acompanhada por CCD (eluente: hexano/acetato de etila 7:3). Após este tempo, o solvente foi cuidadosamente removido sob pressão reduzida e foram adicionados 5 mL de metanol. A solução resultante foi agitada, a temperatura ambiente por 1 hora, quando a reação se completou<sup>58</sup> Secou-se o metanol e o resíduo foi seco a vácuo e pesado, fornecendo 92% de rendimento.

### Condição 2: Esterificação do 4-carboxibenzaldeído (30) com iodometano



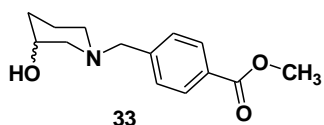
Em um balão de uma boca, foram adicionados 2,5 mmols de 4-carboxibenzaldeído (**30**), 2,5 mmols de  $K_2CO_3$  e 10 mL de  $CH_2Cl_2$ . A solução resultante foi agitada à temperatura ambiente *overnight*. Após este tempo, foi feita CCD e adicionou-se 0,4 mL de  $CH_3I$ . Após conversão, a mistura reacional foi lavada com 10 mL de água destilada. A fase aquosa foi extraída com  $CH_2Cl_2$  (3 x 10 mL). As fases orgânicas foram combinadas, lavada com 25 mL de solução aquosa saturada de NaCl, seca com  $MgSO_4$ , filtrada e concentrada sob vácuo.<sup>59</sup> O resíduo foi purificado em coluna fornecendo 84% de rendimento do produto puro como um sólido branco (PF = 59-63°C).

### Condição 3: Esterificação do 4-carboxibenzaldeído (30) com cloreto de tionila



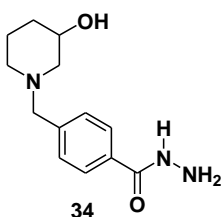
Em um balão de fundo redondo de duas bocas, foram adicionados 2 mmols do ácido **30**, 5 mL de  $CH_2Cl_2$ , 3 mmols (0,22 mL) de cloreto de tionila e duas gotas de DMF. A solução foi agitada *overnight* sob refluxo e acompanhada por CCD (eluente: hexano/acetato de etila: 7:3). Após este tempo, o solvente foi cuidadosamente removido sob pressão reduzida e 5 mL de metanol foram adicionados. A solução resultante foi agitada, a temperatura ambiente por 1 hora, quando a reação se completou.<sup>58</sup> Secou-se o MeOH e o resíduo foi purificado em coluna, resultando num sólido branco com 94% de rendimento (PF = 58-62°C).  $^1H$ NMR (200 MHz,  $CDCl_3$ ):  $\delta$  (ppm) 10,11 (s, 1H, -CHO), 8,21 (d, 2H,  $H_2, H_6, J=7,9$ Hz), 7,96 (d, 2H,  $H_3, H_5, J=8,3$ Hz) 3,97 (s, 3H  $CH_3$ );  $^{13}C$ NMR (50 MHz):  $\delta$  (ppm) 191,6 (CHO), 130,2 ( $C_2, C_6$ ), 129,5 ( $C_3, C_5$ ), 52,5 (- $CH_3$ ), IV (KBr)  $cm^{-1}$ : 2735 a 2997 ( $\nu C-H$ ), 1724 e 1707, ( $\nu C=O$ ) 1280 e 1111 ( $\delta -C(O)O-$ ).

#### 7.1.4. Aminação redutiva entre o 4-formilbenzoato de metila (38) e 3-hidroxipiperidina (31)



Em um balão de uma boca pesou-se 0,4416 mmol do éster (38), 0,8832 mmol da amina (31) e adicionou-se 2 mL de metanol deixando-se sob agitação por 1 hora. Em outro balão de uma boca, pesou-se 0,2208 mmol de ZnCl<sub>2</sub> anidro e 0,4416 mmol de NaBH<sub>3</sub>CN e adicionou-se 2 mL de metanol, deixando-se sob agitação por 1 hora e ambas soluções foram preparadas em atmosfera de N<sub>2</sub>. Após 1 hora, juntou-se as duas soluções, deixando-a sob agitação e acompanhando-a por CCD. Quando a reação se completou, adicionou-se solução aquosa de NaOH 0,1 M até pH~11. Evaporou-se a maior parte do metanol sob pressão reduzida e extraiu-se com CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (3 X 15 mL). A fase orgânica foi lavada com 20 mL de solução aquosa saturada de NaCl, seca com MgSO<sub>4</sub>, filtrada e concentrada sob vácuo<sup>60</sup> e o resíduo foi purificado em coluna fornecendo 75,6% de rendimento do produto puro como sólido branco (PF = 77-79°C). <sup>1</sup>HNMR (200 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ (ppm) 7,97 (*d*, 2H, H<sub>2</sub>, H<sub>6</sub>, *J*=8,0 Hz), 7,37 (*d*, 2H, H<sub>3</sub>, H<sub>5</sub>, *J*=8,0 Hz), 3,89 (*s*, 3H CH<sub>3</sub>), 3,77 (*m*, 1H, H<sub>3'</sub>), 3,53 (*s*, 2H, H<sub>7</sub>), 3,16 (*s<sub>L</sub>*, 1H, H<sub>7</sub>) 2,55 (*m*, 2H, H<sub>2'</sub>), 2,34 (*m*, 2H, H<sub>6'</sub>), 1,73 (*m*, 2H, H<sub>4'</sub>), 1,49 (*m*, 2H, H<sub>5'</sub>); <sup>13</sup>CNMR (50 MHz): δ (ppm) 166,8 (C=O), 144,6 (C<sub>1</sub>), 129,3 (C<sub>2</sub>, C<sub>6</sub>), 129,1 (C<sub>4</sub>), 128,7 (C<sub>3</sub>, C<sub>5</sub>), 66,2 (C<sub>3'</sub>), 62,4 (C<sub>7</sub>), 60,3 (C<sub>2'</sub>), 53,2 (C<sub>6'</sub>), 51,8 (C<sub>9</sub>), 31,8 (C<sub>4'</sub>), 21,8 (C<sub>5'</sub>); IV (KBr) cm<sup>-1</sup>: 3346 (ν<sub>s</sub>O-H), 2933 e 2791(ν<sub>s</sub>C-H), 1716 (ν<sub>s</sub>C=O), 1282 e 111 (δ<sub>s</sub>-C(O)O-)

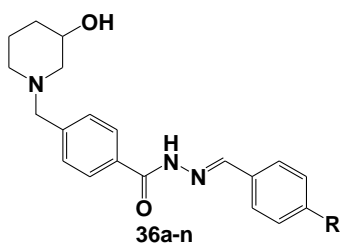
#### 7.1.5. Preparação da hidrazida 34



Em um balão de uma boca foram adicionados 0,7412 mmol do 4-((3-hidroxipiperididin-1-il)metil]benzoato de metila (33), 2 mL de etanol e 0,5 mL de monidrato de hidrazina a 68%. A solução resultante foi refluxada e acompanhada por CCD. Após 3 horas, a reação se completou.<sup>63</sup> Após várias tentativas de extração, com CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, CHCl<sub>3</sub>, acetato de etila e variação de pH, o rendimento era baixo, então para maximizar o isolamento, numa segunda tentativa, evaporou o EtOH e o excesso de hidrazina sob pressão reduzida, obtendo assim a hidrazida com ~100% de

rendimento (PF = 132-140°C).  $^1\text{H NMR}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  (ppm) 7,27 (s, 1H,  $\text{H}_{10}$ ), 7,57 (s, 1H,  $\text{H}_9$ ), 7,70 (d, 2H,  $\text{H}_2$  e  $\text{H}_6$ ,  $J=4,0$  Hz), 7,38 (d, 2H,  $\text{H}_3$  e  $\text{H}_5$ ,  $J=8,0$  Hz), 3,54 (s, 2H,  $\text{H}_7$ ), 2,47 ( $s_L$ , 2H,  $\text{H}_2'$ ), 3,81 ( $s_L$ , 1H,  $\text{H}_3'$ ), 1,80 (m, 2H,  $\text{H}_4'$ ), 1,56 (m, 2H,  $\text{H}_5'$ ) 2,28 ( $s_L$ , 2H,  $\text{H}_6'$ ), 4,74 (s, 1H,  $\text{H}_7'$ );  $^{13}\text{C NMR}$  (100 MHz):  $\delta$  (ppm) 168,6 (C=O), 142,6 ( $\text{C}_1$ ), 129,2 ( $\text{C}_2$ ,  $\text{C}_6$ ), 131,5 ( $\text{C}_4$ ), 127,1 ( $\text{C}_3$ ,  $\text{C}_5$ ), 66,3 ( $\text{C}_{3'}$ ), 60,3 ( $\text{C}_7$ ), 62,5 ( $\text{C}_2'$ ), 53,6 ( $\text{C}_6'$ ), 31,6 ( $\text{C}_4'$ ), 21,6 ( $\text{C}_5'$ ); IV (KBr)  $\text{cm}^{-1}$ : 3448 ( $\nu_{\text{s}}\text{O-H}$ ), 1651 ( $\nu_{\text{s}}\text{C=O}$ ).

### 7.1.6. Procedimento geral para obtenção das acilidrazonas 36



Em um balão de uma boca, foram adicionados 1 equivalente da hidrazida **34**, 1,2 equivalente do aldeído **35**, 5 mL de etanol e 2 gotas de HCl concentrado. A solução resultante foi agitada à temperatura ambiente e acompanhada por CCD (eluente: acetato de etila/metanol 8:2). Concentrou-se o etanol sob pressão reduzida,<sup>64</sup> obtendo um sólido que foi purificado em coluna.

*N'*-(4-bromobenzilideno)-4-[(3-hidroxi-piperidin-1-il)metil]benzoilidrazina (**36a**) foi obtido como um sólido branco com 91% de rendimento e faixa de fusão de 198 a 203°C.  $^1\text{H NMR}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  (ppm) 11,21 (s, 1H,  $\text{H}_7$ ), 10,48 (d, 2H,  $\text{H}_2$  e  $\text{H}_6$ ,  $J=8,0$  Hz), 10,36 (d, 2H,  $\text{H}_3$  e  $\text{H}_5$ ,  $J=8,0$  Hz), 10,81 (d, 2H,  $\text{H}_2'$  e  $\text{H}_6'$ ,  $J=8,0$  Hz), 10,63 (d, 2H,  $\text{H}_3'$  e  $\text{H}_5'$ ,  $J=8,0$  Hz), 6,52 (s, 2H,  $\text{H}_7$ ), 5,73 (m, 2H,  $\text{H}_2''$ ), 6,66 ( $s_L$ , 1H,  $\text{H}_3''$ ), 4,69 (m, 2H,  $\text{H}_4''$ ), 4,51 (m, 2H,  $\text{H}_5''$ ), 5,09 (m, 2H,  $\text{H}_6''$ ), 6,29 (s, 1H,  $\text{H}_7''$ );  $^{13}\text{C NMR}$  (100 MHz):  $\delta$  (ppm) 165,4 (C=O), 133,1 ( $\text{C}_1$ ), 129,5 ( $\text{C}_2$ ,  $\text{C}_6$ ), 142,0 ( $\text{C}_4$ ), 131,9 ( $\text{C}_3$ ,  $\text{C}_5$ ), 131,8 ( $\text{C}_1'$ ), 129,2 ( $\text{C}_2'$ ,  $\text{C}_6'$ ), 124,7 ( $\text{C}_4'$ ), 127,7 ( $\text{C}_3'$ ,  $\text{C}_5'$ ), 66,5 ( $\text{C}_{3''}$ ), 60,4 ( $\text{C}_7'$ ), 62,7 ( $\text{C}_2''$ ), 53,3 ( $\text{C}_6''$ ), 32,3 ( $\text{C}_4''$ ), 22,5 ( $\text{C}_5''$ ); IV (KBr)  $\text{cm}^{-1}$ : 3232 ( $\nu_{\text{s}}\text{O-H}$  e  $\nu_{\text{s}}\text{N-H}$ ), 1641 ( $\nu_{\text{s}}\text{C=O}$ ).

*N*-benzilideno-4-((3-hidroxi-piperidin-1-il)metil)benzoilidrazina (**36b**) foi obtido como um sólido branco com 90% de rendimento e faixa de fusão de 194 a 200°C.  $^1\text{H NMR}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  (ppm) 8,34 (s, 1H,  $\text{H}_7$ ), 7,38 (t, 1H,  $\text{H}_4$ ), 7,53 (d, 2H,  $\text{H}_2$  e  $\text{H}_6$ ,  $J=8,0$  Hz), 7,47 (t, 2H,  $\text{H}_3$  e  $\text{H}_5$ ,  $J=8,0$  Hz), 7,96 (d, 2H,  $\text{H}_2'$  e  $\text{H}_6'$ ,  $J=8,0$  Hz), 7,93

(*d*, 2H, H<sub>3'</sub> e H<sub>5'</sub>, *J*=8,0 Hz), 4,85 (*s*, 2H, H<sub>7'</sub>), 2,94 (*m*, 2H, H<sub>2''</sub>), 3,78 (*m*, 1H, H<sub>3''</sub>), 1,85 (*m*, 2H, H<sub>4''</sub>), 1,61 (*m*, 2H, H<sub>5''</sub>), 2,33 (*m*, 2H, H<sub>6''</sub>); IV (KBr) cm<sup>-1</sup>: 3412 (ν<sub>s</sub>O-H), 3172 (ν<sub>s</sub>N-H), 1645 (ν<sub>s</sub>C=O).

*N'*-(4-clorobenzilideno)-4-((3-hidroxipiperidin-1-il)metil)benzoilidrazina (**36c**) foi obtido como um sólido branco com 96% de rendimento e faixa de fusão de 210 a 215°C. <sup>1</sup>HNMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ (ppm) 8,32 (*s*, 1H, H<sub>7</sub>), 7,51 (*d*, 2H, H<sub>2</sub> e H<sub>6</sub>, *J*=8,0 Hz), 7,44 (*d*, 2H, H<sub>3</sub> e H<sub>5</sub>, *J*=8,0 Hz), 7,91 (*d*, 2H, H<sub>2'</sub> e H<sub>6'</sub>, *J*=8,0 Hz), 7,83 (*d*, 2H, H<sub>3'</sub> e H<sub>5'</sub>, *J*=8,0 Hz), 4,83 (*s*, 2H, H<sub>7'</sub>), 2,89 (*m*, 2H, H<sub>2''</sub>), 3,65 (*m*, 1H, H<sub>3''</sub>), 1,74 (*m*, 2H, H<sub>4''</sub>), 1,29 (*m*, 2H, H<sub>5''</sub>), 2,10 (*m*, 2H, H<sub>6''</sub>), 4,55 (*s*, 1H, H<sub>7''</sub>); IV (KBr) cm<sup>-1</sup>: 3408 (ν<sub>s</sub>O-H e ν<sub>s</sub>N-H), 1658 (ν<sub>s</sub>C=O).

*N'*-(4-fluorobenzilideno)-4-((3-hidroxipiperidin-1-il)metil)benzoilidrazina (**36d**) foi obtido como um sólido branco com 86% de rendimento e faixa de fusão de 225 a 232°C. <sup>1</sup>HNMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ (ppm) 11,02 (*s*, 1H, H<sub>7</sub>), 10,56 (*t*, 2H, H<sub>2</sub> e H<sub>6</sub>, *J*=16,0 Hz), 10,54 (*t*, 2H, H<sub>3</sub> e H<sub>5</sub>, *J*=8,0 Hz), 10,60 (*d*, 2H, H<sub>2'</sub> e H<sub>6'</sub>, *J*=8,0 Hz), 10,15 (*d*, 2H, H<sub>3'</sub> e H<sub>5'</sub>, *J*=8,0 Hz), 6,32 (*s*, 2H, H<sub>7'</sub>), 5,56 (*m*, 2H, H<sub>2''</sub>), 6,43 (*m*, 1H, H<sub>3''</sub>), 4,60 (*m*, 2H, H<sub>4''</sub>), 4,29 (*m*, 2H, H<sub>5''</sub>), 4,85 (*m*, 2H, H<sub>6''</sub>), 6,06 (*s*, 1H, H<sub>7''</sub>); <sup>13</sup>CNMR (100 MHz): δ (ppm) 165,0 (C=O), 114,2 (C<sub>1</sub>), 115,4 (C<sub>2</sub>, C<sub>6</sub>), 131,2 (C<sub>4</sub>), 129,3 (C<sub>3</sub>, C<sub>5</sub>), 131,4 (C<sub>1'</sub>), 127,2 (C<sub>2'</sub>, C<sub>6'</sub>), 129,9 (C<sub>4'</sub>), 129,1 (C<sub>3'</sub>, C<sub>5'</sub>), 66,0 (C<sub>3''</sub>), 59,9 (C<sub>7</sub>), 62,1 (C<sub>2''</sub>), 52,7 (C<sub>6''</sub>), 31,8 (C<sub>4''</sub>), 22,1 (C<sub>5''</sub>); IV (KBr) cm<sup>-1</sup>: 3408 (ν<sub>s</sub>O-H e ν<sub>s</sub>N-H), 1649 (ν<sub>s</sub>C=O).

*N'*-(4-metoxibenzilideno)-4-((3-hidroxipiperidin-1-il)metil)benzoilidrazina (**36e**) foi obtido como um sólido branco com 88% de rendimento e faixa de fusão de 198 a 195°C. <sup>1</sup>HNMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ (ppm) 8,28 (*s*, 1H, H<sub>7</sub>), 6,99 (*d*, 2H, H<sub>2</sub> e H<sub>6</sub>, *J*=8,0 Hz), 7,78 (*d*, 2H, H<sub>3</sub> e H<sub>5</sub>, *J*=8,0 Hz), 7,89 (*d*, 2H, H<sub>2'</sub> e H<sub>6'</sub>, *J*=8,0 Hz), 7,49 (*d*, 2H, H<sub>3'</sub> e H<sub>5'</sub>, *J*=8,0 Hz), 4,84 (*s*, 2H, H<sub>7'</sub>), 2,86 (*m*, 2H, H<sub>2''</sub>), 3,65 (*m*, 1H, H<sub>3''</sub>), 1,73 (*m*, 2H, H<sub>4''</sub>), 1,25 (*m*, 2H, H<sub>5''</sub>), 2,06 (*m*, 2H, H<sub>6''</sub>); IV (KBr) cm<sup>-1</sup>: 3425 (ν<sub>s</sub>O-H e ν<sub>s</sub>N-H), 1643 (ν<sub>s</sub>C=O).

*N'*-(4-hidroxibenzilideno)-4-((3-hidroxipiperidin-1-il)metil)benzoilidrazina (**36f**) foi obtido como um sólido amarelo com 86% de rendimento e faixa de fusão de 158 a 163°C. IV (KBr)  $\text{cm}^{-1}$ : 3255 ( $\nu_{\text{s}}\text{O-H}$  e  $\nu_{\text{s}}\text{N-H}$ ), 1653 ( $\nu_{\text{s}}\text{C=O}$ ).

*N'*-(4-nitrobenzilideno)-4-((3-hidroxipiperidin-1-il)metil)benzoilidrazina (**36g**) foi obtido como um sólido amarelo com 91% de rendimento e faixa de fusão de 210 a 214°C.  $^1\text{HNMR}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  (ppm) 11,18 (s, 1H,  $\text{H}_7$ ), 10,80 (d, 2H,  $\text{H}_2$  e  $\text{H}_6$ ,  $J=8,0$  Hz), 11,05 (d, 2H,  $\text{H}_3$  e  $\text{H}_5$ ,  $J=8,0$  Hz), 10,68 (d, 2H,  $\text{H}_2'$  e  $\text{H}_6'$ ,  $J=8,0$  Hz), 10,23 (d, 2H,  $\text{H}_3'$  e  $\text{H}_5'$ ,  $J=8,0$  Hz), 6,39 (s, 2H,  $\text{H}_7'$ ), 5,60 (m, 2H,  $\text{H}_2''$ ), 6,50 (m, 1H,  $\text{H}_3''$ ), 4,66 (m, 2H,  $\text{H}_4''$ ), 4,35 (m, 2H,  $\text{H}_5''$ ), 4,91 (m, 2H,  $\text{H}_6''$ ), 6,13 (s, 1H,  $\text{H}_7''$ );  $^{13}\text{CNMR}$  (100 MHz):  $\delta$  (ppm) 165,2 (C=O), 141,9 ( $\text{C}_1$ ), 127,9 ( $\text{C}_2$ ,  $\text{C}_6$ ), 145,7 ( $\text{C}_4$ ), 129,1 ( $\text{C}_3$ ,  $\text{C}_5$ ), 148,1 ( $\text{C}_1'$ ), 131,0 ( $\text{C}_2'$ ,  $\text{C}_6'$ ), 140,0 ( $\text{C}_4'$ ), 127,3 ( $\text{C}_3'$ ,  $\text{C}_5'$ ), 66,1 ( $\text{C}_3''$ ), 60,0 ( $\text{C}_7$ ), 62,2 ( $\text{C}_2''$ ), 52,9 ( $\text{C}_6''$ ), 31,9 ( $\text{C}_4''$ ), 22,2 ( $\text{C}_5''$ ); IV (KBr)  $\text{cm}^{-1}$ : 3311 ( $\nu_{\text{s}}\text{O-H}$  e  $\nu_{\text{s}}\text{N-H}$ ), 1656 ( $\nu_{\text{s}}\text{C=O}$ ).

*N'*-(4-(metiltio)benzilideno)-4-((3-hidroxipiperidin-1-il)metil)benzoilidrazina (**36h**) foi obtido como um sólido amarelo com 65% de rendimento e faixa de fusão de 195 a 205°C.  $^1\text{HNMR}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  (ppm) 8,35 (s, 1H,  $\text{H}_7$ ), 7,30 (d, 2H,  $\text{H}_2$  e  $\text{H}_6$ ,  $J=8,0$  Hz), 7,68 (d, 2H,  $\text{H}_3$  e  $\text{H}_5$ ,  $J=8,0$  Hz), 8,03 (d, 2H,  $\text{H}_2'$  e  $\text{H}_6'$ ,  $J=8,0$  Hz), 7,75 (d, 2H,  $\text{H}_3'$  e  $\text{H}_5'$ ,  $J=8,0$  Hz), 4,84 (s, 2H,  $\text{H}_7'$ ), 3,14 (m, 2H,  $\text{H}_2''$ ), 4,34 (m, 1H,  $\text{H}_3''$ ), 1,78 (m, 2H,  $\text{H}_4''$ ), 1,66 (m, 2H,  $\text{H}_5''$ ), 2,12 (m, 2H,  $\text{H}_6''$ ), 4,00 (s, 1H,  $\text{H}_7''$ ); IV (KBr)  $\text{cm}^{-1}$ : 3406 ( $\nu_{\text{s}}\text{O-H}$  e  $\nu_{\text{s}}\text{N-H}$ ), 1643 ( $\nu_{\text{s}}\text{C=O}$ ).

*N'*-(3-metoxibenzilideno)-4-((3-hidroxipiperidin-1-il)metil)benzoilidrazina (**36i**) foi obtido como um sólido branco com 78% de rendimento e faixa de fusão de 189 a 195°C. IV (KBr)  $\text{cm}^{-1}$ : 3425 e 3209 ( $\nu_{\text{s}}\text{O-H}$  e  $\nu_{\text{s}}\text{N-H}$ ), 1643 ( $\nu_{\text{s}}\text{C=O}$ ).

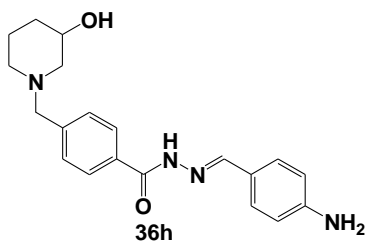
*N'*-(4-(pirrolidin-1-il)benzilideno)-4-((3-hidroxipiperidin-1-il)metil)benzoilidrazina (**36j**) foi obtido como um sólido amarelo com 54% de rendimento e faixa de fusão de 172 a 180°C. IV (KBr)  $\text{cm}^{-1}$ : 3427 ( $\nu_{\text{s}}\text{O-H}$  e  $\nu_{\text{s}}\text{N-H}$ ), 1651 ( $\nu_{\text{s}}\text{C=O}$ ).



*N'*-(4-(piperidin-1-il)benzilideno)-4-((3-hidroxi-piperidin-1-il)metil)benzoilidrazina (**36l**) foi obtido como um sólido amarelo com 59% de rendimento e faixa de fusão de 178 a 186°C. <sup>1</sup>HNMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ (ppm) 8,14 (s, 1H, H<sub>7</sub>), 6,89 (d, 2H, H<sub>2</sub> e H<sub>6</sub>, *J*=8,0 Hz), 7,39 (d, 2H, H<sub>3</sub> e H<sub>5</sub>, *J*=8,0 Hz), 7,78 (d, 2H, H<sub>2'</sub> e H<sub>6'</sub>, *J*=8,0 Hz), 7,65 (d, 2H, H<sub>3'</sub> e H<sub>5'</sub>, *J*=8,0 Hz), 3,55 (s, 2H, H<sub>7'</sub>), 2,47 (m, 2H, H<sub>2''</sub>), 3,82 (m, 1H, H<sub>3''</sub>), 1,55 (m, 2H, H<sub>4''</sub>), 0,89 (m, 2H, H<sub>5''</sub>), 1,80 (m, 2H, H<sub>6''</sub>); <sup>13</sup>CNMR (100 MHz): δ (ppm) 160,8 (C=O), 114,8 (C<sub>2</sub>, C<sub>6</sub>), 129,2 (C<sub>3</sub>, C<sub>5</sub>), 129,8 (C<sub>2'</sub>, C<sub>6'</sub>), 127,2 (C<sub>3'</sub>, C<sub>5'</sub>), 66,2 (C<sub>3''</sub>), 60,2 (C<sub>7'</sub>), 62,6 (C<sub>2''</sub>), 53,6 (C<sub>6''</sub>), 31,6 (C<sub>4''</sub>), 29,7 (C<sub>5''</sub>), 49,2 (C<sub>8</sub>, C<sub>12</sub>), 25,5 (C<sub>9</sub>, C<sub>11</sub>), 24,3 (C<sub>10</sub>); IV (KBr) cm<sup>-1</sup>: 3446 (ν<sub>s</sub>O-H e ν<sub>s</sub>N-H), 1651 (ν<sub>s</sub>C=O).

*N'*-(4-morfolinobenzilidene)-4-((3-hidroxi-piperidin-1-il)metil)benzoilidrazina (**36m**) foi obtido como um sólido esverdeado com 67% de rendimento e faixa de fusão de 186 a 195°C. IV (KBr) cm<sup>-1</sup>: 3425 (ν<sub>s</sub>O-H e ν<sub>s</sub>N-H), 1653 (ν<sub>s</sub>C=O).

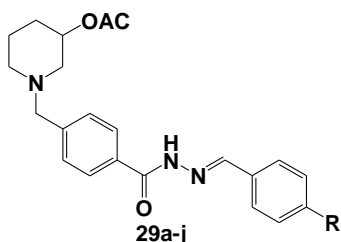
### 7.1.7. Procedimento para obtenção da acilidrazona 36n



Em um balão de uma boca, adicionou-se 0,2092 mmol da nitroacilidrazona **36g**, 0,1255 mmol de NH<sub>4</sub>Cl, 1,0460 mmol de Fe<sup>o</sup> e 4,5 mL de EtOH/H<sub>2</sub>O 2:1. O meio reacional foi refluxado por 1 hora e filtrado em Celite<sup>®</sup>. A solução resultante foi concentrada sob pressão reduzida<sup>65</sup> e o resíduo resultante foi purificado em coluna, obtendo-se um sólido amarelo com 92,5 % de rendimento. <sup>1</sup>HNMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ (ppm) 8,72 (s, 1H, H<sub>7</sub>), 8,04 (d, 2H, H<sub>2</sub> e H<sub>6</sub> *J*=8 Hz), 8,33 (d, 2H, H<sub>3</sub> e H<sub>5</sub>, *J*=8 Hz), 8,27 (d, 2H, H<sub>2'</sub> e H<sub>6'</sub> *J*=8 Hz), 7,44 (d, 2H, H<sub>3'</sub> e H<sub>5'</sub>, *J*=8 Hz), IV (KBr) cm<sup>-1</sup>: 3348 e 3228 (ν<sub>s</sub>N-H e O-H), 1651 (ν<sub>s</sub>C=O acilidrazona).

### 7.1.8. Procedimento para obtenção das acilidrazonas acetiladas.

#### Condição 1:



Em um balão de uma boca, adicionou-se um equivalente da acilidrazona **36**, 0,05 equivalente de 4-DMAP, 10 equivalentes de anidrido acético e 5 mL de  $\text{CHCl}_3$ . A solução resultante foi agitada sob refluxo e acompanhada por CCD. Após conversão, o solvente foi seco sob pressão reduzida e o resíduo foi purificado em coluna<sup>66</sup>.

Acetato de 1-(4-(4-bromobenzilidenoaminocarbamoil)-benzil)piperidin-3-ila (**29a**) foi obtido como um sólido branco com 88% de rendimento e faixa de fusão de 140 a 150°C.  $^1\text{HNMR}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  (ppm) 10,01(s, 1H,  $\text{H}_9$ ), 8,32 (s, 1H,  $\text{H}_7$ ), 7,26 (2H,  $\text{H}_2$  e  $\text{H}_6$ ), 7,38 (2H,  $\text{H}_3$  e  $\text{H}_5$ ), 7,80 (2H,  $\text{H}_2'$  e  $\text{H}_6'$ ), 7,52 (2H,  $\text{H}_3'$  e  $\text{H}_5'$ ), 3,55 (s, 2H,  $\text{H}_7$ ), 2,77 (*m*, 2H,  $\text{H}_2''$ ), 4,83 (*m*, 1H,  $\text{H}_3''$ ), 1,88 (*m*, 2H,  $\text{H}_4''$ ), 1,61 (*m*, 2H,  $\text{H}_5''$ ), 2,18 (*m*, 2H,  $\text{H}_6''$ ), 2,03 (s, 3H,  $\text{H}_8''$ ); IV (KBr)  $\text{cm}^{-1}$ : 3232 ( $\nu_{\text{N-H}}$ ), 1734 ( $\nu_{\text{C=O}}$  éster), 1651 ( $\nu_{\text{C=O}}$  acilidrazona).

Acetato de 1-(4-(benzilidenoaminocarbamoil)benzil)-piperidin-3-ila (**29b**) foi obtido como um sólido branco com 85% de rendimento e faixa de fusão de 117 a 124°C.  $^1\text{HNMR}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  (ppm) 10,32(s, 1H,  $\text{H}_9$ ), 8,38 (s, 1H,  $\text{H}_7$ ), 7,34 (5H,  $\text{H}_2$  a  $\text{H}_6$ ), 7,82 (2H,  $\text{H}_2'$  e  $\text{H}_6'$ ), 7,69 (2H,  $\text{H}_3'$  e  $\text{H}_5'$ ), 3,52 (s, 2H,  $\text{H}_7$ ), 2,76 (*m*, 2H,  $\text{H}_2''$ ), 4,83 (*m*, 1H,  $\text{H}_3''$ ), 1,87 (*m*, 2H,  $\text{H}_4''$ ), 1,57 (*m*, 2H,  $\text{H}_5''$ ), 2,16 (*m*, 2H,  $\text{H}_6''$ ), 2,02 (s, 3H,  $\text{H}_8''$ ); IV (KBr)  $\text{cm}^{-1}$ : 3251 ( $\nu_{\text{N-H}}$ ), 1730 ( $\nu_{\text{C=O}}$  éster), 1656 ( $\nu_{\text{C=O}}$  acilidrazona).

Acetato de 1-(4-(4-clorobenzilidenoaminocarbamoil)-benzil)piperidin-3-ila (**29c**) foi obtido como um sólido branco com 87% de rendimento e faixa de fusão de 100 a 102°C.  $^1\text{HNMR}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  (ppm) 10,01(s, 1H,  $\text{H}_9$ ), 8,33 (s, 1H,  $\text{H}_7$ ), 7,33 (2H,  $\text{H}_2$  e  $\text{H}_6$ ), 7,35 (2H,  $\text{H}_3$  e  $\text{H}_5$ ), 7,65 (2H,  $\text{H}_2'$  e  $\text{H}_6'$ ), 7,79 (2H,  $\text{H}_3'$  e  $\text{H}_5'$ ), 3,55 (s, 2H,  $\text{H}_7$ ), 2,76 (*m*, 2H,  $\text{H}_2''$ ), 4,82 (*m*, 1H,  $\text{H}_3''$ ), 1,89 (*m*, 2H,  $\text{H}_4''$ ), 1,43 (*m*, 2H,

H<sub>5''</sub>), 2,19 (*m*, 2H, H<sub>6''</sub>), 2,03 (*s*, 3H, H<sub>8''</sub>); IV (KBr) cm<sup>-1</sup>: 3226 (ν<sub>s</sub>N-H), 1735 (ν<sub>s</sub>C=O éster), 1653 (ν<sub>s</sub>C=O acilidrazona).

Acetato de 1-(4-(4-fluorobenzilidenoaminocarbamoil)benzil)piperidin-3-ila (**29d**) foi obtido como um sólido branco com 86% de rendimento e faixa de fusão de 117 a 122°C. <sup>1</sup>HNMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ (ppm) 9,97(*s*, 1H, H<sub>9</sub>), 8,35 (*s*, 1H, H<sub>7</sub>), 7,06 (*t*, 2H, H<sub>2</sub> e H<sub>6</sub>, *J*=8 Hz), 7,37 (*d*, 2H, H<sub>3</sub> e H<sub>5</sub>, *J*=8 Hz), 7,70 (2H, H<sub>2'</sub> e H<sub>6'</sub>), 7,80 (2H, H<sub>3'</sub> e H<sub>5'</sub>), 3,56 (*s*, 2H, H<sub>7</sub>), 2,79 (*m*, 2H, H<sub>2''</sub>), 4,83 (*m*, 1H, H<sub>3''</sub>), 1,89 (*m*, 2H, H<sub>4''</sub>), 1,43 (*m*, 2H, H<sub>5''</sub>), 2,19 (*m*, 2H, H<sub>6''</sub>), 2,03 (*s*, 3H, H<sub>8''</sub>); IV (KBr) cm<sup>-1</sup>: 3213 (ν<sub>s</sub>N-H), 1734 (ν<sub>s</sub>C=O éster), 1651 (ν<sub>s</sub>C=O acilidrazona).

Acetato de 1-(4-(4-metoxibenzilidenoaminocarbamoil)-benzil)piperidin-3-ila (**29e**) foi obtido como um sólido branco com 86% de rendimento e faixa de fusão de 123 a 129°C. <sup>1</sup>HNMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ (ppm) 9,87(*s*, 1H, H<sub>9</sub>), 8,29 (*s*, 1H, H<sub>7</sub>), 6,88 (*d*, 2H, H<sub>2</sub> e H<sub>6</sub>, *J*=8 Hz), 7,35 (*d*, 2H, H<sub>3</sub> e H<sub>5</sub>, *J*=8 Hz), 7,67 (*d*, 2H, H<sub>2'</sub> e H<sub>6'</sub>, *J*=8 Hz), 7,79 (*d*, 2H, H<sub>3'</sub> e H<sub>5'</sub>, *J*=8 Hz), 3,54 (*s*, 2H, H<sub>7</sub>), 2,75 (*m*, 2H, H<sub>2''</sub>), 4,83 (*m*, 1H, H<sub>3''</sub>), 1,87 (*m*, 2H, H<sub>4''</sub>), 1,42 (*m*, 2H, H<sub>5''</sub>), 2,17 (*m*, 2H, H<sub>6''</sub>), 2,03 (*s*, 3H, H<sub>8''</sub>), 3,82 (*s*, 3H, OCH<sub>3</sub>); IV (KBr) cm<sup>-1</sup>: 3211 (ν<sub>s</sub>N-H), 1732 (ν<sub>s</sub>C=O éster), 1649 (ν<sub>s</sub>C=O acilidrazona).

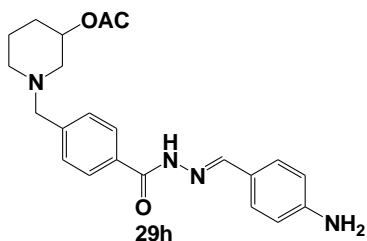
Acetato de 1-(4-(4-acetobenzilidenoaminocarbamoil)-benzil)piperidin-3-ila (**29f**) foi obtido como um sólido branco com 89% de rendimento e faixa de fusão de 145 a 150°C. <sup>1</sup>HNMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ (ppm) 9,78(*s*, 1H, H<sub>9</sub>), 8,32 (*s*, 1H, H<sub>7</sub>), 6,38 (*d*, 2H, H<sub>2</sub> e H<sub>6</sub>, *J*=8 Hz), 7,11 (*d*, 2H, H<sub>3</sub> e H<sub>5</sub>, *J*=8 Hz), 7,74 (2H, H<sub>2'</sub> e H<sub>6'</sub>), 7,79 (2H, H<sub>3'</sub> e H<sub>5'</sub>), 3,56 (*s*, 2H, H<sub>7</sub>), 2,78 (*m*, 2H, H<sub>2''</sub>), 4,83 (*m*, 1H, H<sub>3''</sub>), 1,75 (*m*, 2H, H<sub>4''</sub>), 1,43 (*m*, 2H, H<sub>5''</sub>), 2,18 (*m*, 2H, H<sub>6''</sub>), 2,03 (*s*, 3H, H<sub>8''</sub>), 3,30 (*s*, 3H, CH<sub>3</sub>); IV (KBr) cm<sup>-1</sup>: 3248 (ν<sub>s</sub>N-H), 1762 e 1732 (ν<sub>s</sub>C=O éster), 1647 (ν<sub>s</sub>C=O acilidrazona).

Acetato de 1-(4-(4-nitrobenzilidenoaminocarbamoil)benzil)piperidin-3-ila (**29g**) foi obtido como um sólido amarelo com 90% de rendimento e faixa de fusão de 160 a 165°C. <sup>1</sup>HNMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ (ppm) 10,11(*s*, 1H, H<sub>9</sub>), 8,50 (*s*, 1H, H<sub>7</sub>), 7,40 (*d*, 2H, H<sub>2</sub> e H<sub>6</sub>, *J*=8 Hz), 7,81 (2H, H<sub>3</sub> e H<sub>5</sub>), 7,88 (2H, H<sub>2'</sub> e H<sub>6'</sub>), 8,24 (*d*, 2H, H<sub>3'</sub> e H<sub>5'</sub>, *J*=8 Hz), 3,57 (*s*, 2H, H<sub>7</sub>), 2,77 (*m*, 2H, H<sub>2''</sub>), 4,83 (*m*, 1H, H<sub>3''</sub>), 1,90 (*m*, 2H, H<sub>4''</sub>), 1,62

(*m*, 2H, H<sub>5''</sub>), 2,20 (*m*, 2H, H<sub>6''</sub>), 2,04 (*s*, 3H, H<sub>8''</sub>); <sup>13</sup>CNMR (100 MHz): δ (ppm) 170,8 (C<sub>7''</sub>), 128,0 (C<sub>2</sub>, C<sub>6</sub>), 129,0 (C<sub>3</sub>, C<sub>5</sub>), 139,9 (C<sub>2'</sub>, C<sub>6'</sub>), 127,5 (C<sub>3'</sub>, C<sub>5'</sub>), 69,9 (C<sub>3''</sub>), 56,7 (C<sub>7'</sub>), 62,3 (C<sub>2''</sub>), 53,4 (C<sub>6''</sub>), 29,4 (C<sub>4''</sub>), 22,9 (C<sub>5''</sub>), 21,3 (C<sub>5''</sub>); IV (KBr) cm<sup>-1</sup>: 3290 (ν<sub>s</sub>N-H), 1735 (ν<sub>s</sub>C=O éster), 1670 (ν<sub>s</sub>C=O acilidrazona).

Acetato de 1-(4-(3-metoxibenzilidenoaminocarbamoil)-benzil)piperidin-3-ila (**29i**) foi obtido como um sólido branco com 83% de rendimento e faixa de fusão de 120 a 125°C. IV (KBr) cm<sup>-1</sup>: 3248 (ν<sub>s</sub>N-H), 1734 (ν<sub>s</sub>C=O éster), 1653 (ν<sub>s</sub>C=O acilidrazona).

### 7.1.9. Procedimento para obtenção das acilidrazonas acetilada **29n**

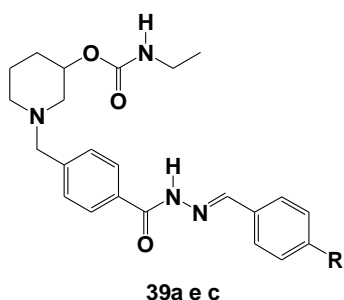


Em um balão de duas bocas adicionou-se 0,2356 mmol da nitroacilidrazona acetilada (**29g**), 0,1413 mmol de NH<sub>4</sub>Cl, 1,1780 mmol de Fe<sup>o</sup> e 4,5 mL de EtOH/H<sub>2</sub>O 2:1. O meio reacional foi refluxado por 1 hora, filtrado em Celite<sup>®</sup>. A solução resultante foi concentrada sob pressão reduzida e o resíduo resultante foi purificado em coluna, obtendo um sólido amarelo<sup>65</sup>, com 83 % de rendimento (PF = 164-170°C). <sup>1</sup>HNMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ (ppm) 9,84 (*s*, 1H, H<sub>9</sub>), 8,20 (*s*, 1H, H<sub>7</sub>), 6,60 (2H, H<sub>2</sub> e H<sub>6</sub>), 7,37 (2H, H<sub>3</sub> e H<sub>5</sub>), 8,82 (2H, H<sub>2'</sub> e H<sub>6'</sub>), 7,50 (2H, H<sub>3'</sub> e H<sub>5'</sub>), 3,57 (*s*, 2H, H<sub>7</sub>), 2,77 (*m*, 2H, H<sub>2''</sub>), 4,84 (*m*, 1H, H<sub>3''</sub>), 1,87 (*m*, 2H, H<sub>4''</sub>), 1,59 (*m*, 2H, H<sub>5''</sub>), 2,19 (*m*, 2H, H<sub>6''</sub>), 2,02 (*s*, 3H, H<sub>8''</sub>); IV (KBr) cm<sup>-1</sup>: 3446 e 3350 (ν<sub>s</sub>N-H), 1722 (ν<sub>s</sub>C=O éster), 1649 (ν<sub>s</sub>C=O acilidrazona).

### Condição 2

Em um balão de uma boca adicionou-se o 0,2623 mmol da acilidrazona **37g**, 0,12 mL de anidrido acético e 5 mL de CHCl<sub>3</sub>. A solução resultante foi agitada sob refluxo e acompanhada por CCD. Após conversão, o solvente foi concentrado sob pressão reduzida, vertido em gelo e o precipitado separado por filtração.<sup>65</sup> O produto continuava na água, então fez extração com CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, concentrou sob pressão reduzida e o resíduo puro foi pesado dando 15,9 mg.

### 7.1.10. Procedimento para obtenção das acilidrazonas carbamoiladas



Em um balão de uma boca, adicionou-se o 1 equivalente da acilidrazona **36a** ou **36c**, 2 equivalentes de hidreto, devidamente lavado com hexano seco, 10 mL de THF seco e 1,5 equivalente de isocianato de etila. A solução resultante foi agitada a temperatura ambiente e acompanhada por CCD. Após conversão, o solvente foi concentrado sob pressão reduzida e o resíduo foi purificado em coluna.<sup>67</sup>

1-(4-(4-bromobenzilidenoaminocarbamoil)-benzil)piperidin-3-il carbamato de etila (**39a**) foi obtido como um sólido branco com 71% de rendimento e faixa de fusão de 131 a 140°C. IV (KBr)  $\text{cm}^{-1}$ : 3340 ( $\nu_{\text{s}}\text{N-H}$ ), 1625 (sobreposição de  $\nu_{\text{s}}\text{C=O}$  carbamato e  $\nu_{\text{s}}\text{C=O}$  acilidrazona).

1-(4-(4-clorobenzilidenoaminocarbamoil)-benzil)piperidin-3-il carbamato de etila (**39c**). foi obtido como um sólido branco com 73% de rendimento e faixa de fusão de 100 a 102°C. IV (KBr)  $\text{cm}^{-1}$ : 3340 ( $\nu_{\text{s}}\text{N-H}$ ), 1625 (sobreposição de  $\nu_{\text{s}}\text{C=O}$  carbamato e  $\nu_{\text{s}}\text{C=O}$  acilidrazona).

## 7.2. Avaliação farmacológica

A avaliação farmacológica dos compostos-alvo foi realizada em laboratórios colaboradores ao LFQM. Os ensaios *in vitro* para avaliação da atividade anticolinesterásica, foram realizados pelos grupos dos profs. Dr. Newton G. Castro e Dra. Mônica S. Rocha, do departamento de Farmacologia Básica e Clínica da Universidade Federal do Rio de Janeiro- UFRJ.

A avaliação do perfil anti-inflamatório foi realizada sob orientação do Prof. Dr. Alexandre Giusti-Paiva, no Laboratório de Fisiologia da Universidade Federal de Alfenas – Unifal-MG. Estes ensaios envolveram protocolos de identificação, quantificação e caracterização da atividade anti-inflamatória em camundongos, utilizando ensaios como formalina, edema de pata induzido por carragenina e peritonite induzida por LPS.

### 7.2.1 Avaliação da atividade Colinesterásica

Cada amostra foi avaliada quanto à inibição de acetilcolinesterase, pelo método de Ellman.<sup>72</sup> O ensaio foi modificado em relação ao anteriormente descrito,<sup>73</sup> usando-se a acetilcolinesterase purificada de *Electrophorus electricus* (tipo V-S, Sigma). A enzima foi dissolvida em solução-tampão de fosfato de sódio (0,1 M, pH 7,4) a 50 U/ml e mantida congelada. A reação de hidrólise da acetiltiocolina (0,5 mM, Sigma, EUA) foi acompanhada por 5 min em espectrofotômetro de microplacas SpectraMax 250 (Molecular Devices, EUA) a 412 nm, em volume de 0,2 ml (pH 7,4), à temperatura ambiente (22–25 °C). A velocidade máxima de reação foi obtida por regressão linear de 10 pontos consecutivos com o programa SoftMax Pro (Molecular Devices). Imediatamente antes de cada ensaio, a atividade da enzima era avaliada, ajustando-se a concentração da solução de trabalho de modo a ter uma velocidade de reação no grupo controle (sem inibidor) entre 0,1 e 0,2 unidades de densidade óptica por minuto. Os ensaios foram realizados em triplicata, sempre com um grupo controle (sem inibidor), e os valores de velocidade de reação na presença das amostras foram expressos como porcentagem da média do grupo controle.

As amostras foram dissolvidas em dimetilsulfóxido anidro (P.A., Vetec, Brasil) a 0,1 M ou 0,2 M e inicialmente testadas em concentração fixa de 0,1 mM, para triagem. A concentração final de dimetilsulfóxido no ensaio (0,1% ou 0,05% v/v) não tem efeito significativo na atividade de acetilcolinesterase. As amostras que inibiram mais que 50% a atividade enzimática na triagem foram testadas em seis concentrações e estimativas da  $CI_{50}$  foram obtidas por regressão não-linear com o programa Prism (GraphPad), usando a expressão:  $V (\%) = 100 \cdot (1 + c \cdot CI_{50}^{-1})^{-1}$ , onde  $c$  é a concentração da amostra e  $V$  é a velocidade de reação (média das triplicatas). Todos os experimentos foram repetidos pelo menos uma vez, e os valores relatados são médias das repetições.

## **7.2.2 Avaliação da atividade anti-inflamatória**

### **7.2.2.1 Animais**

Para a avaliação anti-inflamatória foram utilizados camundongos Swiss machos ( $25 \pm 5$ g) provenientes do Biotério Central da Universidade Federal de Alfenas – UNIFAL. Os animais foram tratados com ração comercial e água “ad libitum”, durante todo experimento, garantida sua adaptação por 7 dias em sala climatizada a  $23 \pm 2^{\circ}$  C, e em caixas de polipropileno adequadas à sua manutenção. Foram privados de comida durante cerca de 8 horas antes de cada experimento e ao término, os animais foram sacrificados com halotano. Para os experimentos, os animais foram subdivididos e mantidos separadamente em grupos.

### **7.2.2.2 Ensaio de hiperalgesia induzida por formalina**

Para este ensaio os animais ( $n=7$  por grupo) foram pré-tratados com as substâncias-teste em dose única de 100  $\mu$ mol/Kg (v.o.), veículo - 1% de DMSO em salina (10 mL/Kg, v.o.), indometacina (100  $\mu$ mol/Kg, v.o.) ou morfina (39  $\mu$ mol/Kg, i.p.) Após uma hora ou 30 minutos no caso da morfina, os animais receberam uma injeção intraplantar de formalina 10% - 20  $\mu$ L na pata direita. Após aplicação os animais foram colocados em um cilindro transparente, onde se observou o tempo em segundos de lambida da pata direita em duas fases distintas: fase neurogênica de 0-5 minutos e fase inflamatória de 20-30 minutos após a injeção da formalina.<sup>68</sup>

### **7.2.2.3 Teste de peritonite induzida por lipopolissacarídeo**

Os animais (n=6) foram tratados com as substâncias-teste nas doses 100  $\mu\text{mol/Kg}$  (v.o.), veículo - 1% de DMSO em salina (10 mL/Kg, v.o.) ou indometacina (100  $\mu\text{mol/Kg}$ , v.o.) uma hora antes da aplicação do agente inflamatório LPS (lipopolissacarídeo proveniente de *E. coli* sorotipo 026:B6-Sigma, 500  $\mu\text{g/Kg}$ , i.p). Quatro horas após injeção de LPS, os camundongos foram sacrificados por deslocamento cervical e as células da cavidade peritoneal foram retiradas por injeção de 5mL de PBS contendo 0,5% de citrato de sodio. Os abdomens foram gentilmente massageados e a suspensão de células livre de sangue foi cuidadosamente aspirada por uma seringa. Os lavados peritoneais foram colocados em tubos plásticos e a contagem total de células foi imediatamente realizada em câmara de Neubauer.<sup>70</sup>

### **7.2.2.4 Ensaio de edema em pata de camundongo induzido por carragenina**

Para este teste, os animais (n=5 por grupo) foram tratados com as substâncias-teste nas doses 100  $\mu\text{mol/Kg}$  (v.o.), veículo - 1% de DMSO em salina (10 mL/Kg, v.o.) ou indometacina (100  $\mu\text{mol/Kg}$ , v.o.). Após 1 hora dos pré-tratamentos, foi induzido o edema de pata pela injeção intraplantar de carragenina 2% em uma das patas posteriores. Antes da administração da carragenina (hora basal), após uma, duas, três e quatro horas da administração da carragenina, a pata teste do animal foi imersa até a região tíbio-társica com o uso de um pletismômetro. O volume do edema foi calculado pela diferença entre os tempos medidos e a hora basal.<sup>69</sup>

### **7.2.2.5 Análise estatística**

Os resultados obtidos foram analisados por análise de variância de uma via (ANOVA) seguida pelos pós-teste de Newman-Kells. Os resultados com  $p < 0.05$  foram considerados estatisticamente significativos.



## 8. Conclusões

Uma nova série de compostos híbridos (série **29**), contemplando a subunidade *N*-benzil-piperidínica do donepezil e a subunidade carbamato da rivastigmina, relacionadas à ação anticolinesterásica, além da função *N*-acilidrazona, descrita como um importante bióforo anti-inflamatório, candidatos a fármacos simbióticos, capazes de atuar como anticolinesterásicos e anti-inflamatorios na Doença de Alzheimer foi sintetizada a partir do 4-carbóxi-benzaldeído e da 3-hidroxi-piperidina.

Todas as 21 acilidrazonas sintetizadas **LFQM-54-58**, **LFQM-65-69**, **LFQM-72-75**, **LFQM-77**, **LFQM-83-88**, com substituintes –OH, -OAC ou –OCONEt na posição 3 da subunidade piperidínica foram avaliadas, quanto à capacidade inibitória de AChE, inicialmente na concentração 0,1 mM. Destas, 13 apresentaram inibição acima de 50% e foram selecionadas para determinação das curvas dose-resposta e potência inibitória. Os derivados acilidrazônicos hidroxilados na subunidade piperidínica apresentaram atividade inibitória da AChE de 65 a 91% e IC<sub>50</sub> de 3,02 a 30,54 µM, sendo **LFQM-57** (3,02 µM) a mais potente da série avaliada.

A atividade anti-inflamatória das substâncias **LFQM-54**, **LFQM-56**, **LFQM-57**, **LFQM-58**, **LFQM-65**, **LFQM-67** e **LFQM-69** foi avaliada inicialmente no modelo de hiperalgesia induzido por formalina, na dose única de 100 µmol/kg. Na fase inflamatória, as substâncias **LFQM-54**, **LFQM-55**, **LFQM-65**, **LFQM-67** e **LFQM-69**, demonstraram propriedades anti-inflamatórias bastante evidentes e foram selecionadas para avaliação nos modelos de peritonite induzida por LPS e edema de pata induzido por carragenina que corroboraram uma possível atividade anti-inflamatória. As curvas de expressão dose-resposta levaram à determinação dos valores de IC<sub>50</sub> das moléculas-teste, evidenciando que as mais potentes foram **LFQM-67** e **LFQM-69**, ambas com IC<sub>50</sub> < 3 µmolar.

**LFQM-67** foi uma das substâncias com maior potência anti-inflamatória e a segunda mais potente na inibição da AChE. Por outro lado, **LFQM-69**, que teve a posição 3-piperidínica carbamoilada, foi extremamente potente no modelo inflamatório, mas perdeu atividade inibitória da AChE. Estes resultados sugerem que a subunidade piperidínica com um grupamento hidroxila livre na posição C-3 é

fundamental farmacoforicamente para a atividade dupla anti-inflamatória e anticolinesterásica.

Além disso, este estudo permitiu a identificação também de um novo candidato a protótipo de fármaco anti-inflamatório, **LFQM-69**, sem expressiva propriedade anticolinesterásica e os derivados **LFQM-74**, **LFQM-75** e **LFQM-88**, que se mostraram potentes inibidores de AChE, ainda não foram avaliados em modelos de inflamação, podendo contribuir para a identificação de outros candidatos com perfil duplo inovadores.

## 9. Referências:

1. GOOCH, M., D.; STENNETT, D. Molecular basis of Alzheimer's disease. *American Journal of Health-System Pharmacy*. **53**, 1545-1557. **1996**
2. FRANCIS, P. T. e colaboradores. The cholinergic hypothesis of Alzheimer's disease: a review of progress. *Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry*. **66**, 137-147. **1999**
3. TERRY, A. V.; BUCCAFUSCO, J. J. The Cholinergic Hypothesis of Age and Alzheimer's Disease-Related Cognitive Deficits: Recent Challenges and Their Implications for Novel Drug Development. *Journal of Pharmacology Experimental Therapeutics*. **306**, 821-827. **2003**
4. ROBBINS, S. L. *Patologia Estrutural e Funcional*. 6ª ed. RJ: Guanabara koogan, **2006**.
5. <http://www.healthline.com/adamcontent/alzheimer-disease>, acesso em 08/2008.
6. BLENNOW, K.; LEON M. J.; ZETTERBERG, H. Alzheimer's disease. *The Lancet*. **368**, 387-403. **2006**
7. CACABELOS, R. Pharmacogenomics in Alzheimer's disease. *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry*. **2**, 59-84. **2002**
8. [www.alzheimermed.com.br/m3.aps?cod-pagina=1011](http://www.alzheimermed.com.br/m3.aps?cod-pagina=1011), acesso em 08/2008.
9. RANG, H. P. e colaboradores. *Farmacologia*. 5ª ed. RJ: Elsevier, 564-566. **2003**
10. FELICE, F. G.; FERREIRA, S. T.  $\beta$ -Amyloid Production, Aggregation, and Clearance as Targets for Therapy in Alzheimer's Disease. *Cellular and Molecular Neurobiology*. **22**, 545-563. **2002**
11. GLENNER, G. G.; WONG, C. W. Alzheimer's disease: Initial report of the purification and characterization of a novel cerebrovascular amyloid protein *Biochemical and Biophysical Research Communications*. **120**, 885-890. **1984**

12. MASTERS, C. L. e colaboradores. Amyloid plaque core protein in Alzheimer disease and Down syndrome *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America*. **82**, 4245-4529. **1985**
13. KANG, J. The precursor of Alzheimer's disease amyloid A4 protein resembles a cell-surface receptor. *Nature*. **325**, 733-736. **1987**
14. SELKOE, D. J. The molecular pathology of Alzheimer's disease. *Neuron*. **6**, 487-498. **1991**
15. SELKOE, D. J. Amyloid  $\beta$ -Protein and the Genetics of Alzheimer's Disease. *The Journal of Biological Chemistry*. **271**, 18295-18298. **1996**.
16. GEULA, C. Aging renders the brain vulnerable to amyloid beta-protein neurotoxicity. *Nature Medicine* **4**, 827-831. **1998**
17. LORENZO, A. YANKNER, B. A.  $\beta$ -Amyloid neurotoxicity requires fibril formation and is inhibited by Congo red. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America*. **91**, 12243-12247. **1994**,
18. PIKE, C. J. e colaboradores. Neurodegeneration Induced by  $\beta$ -Amyloid Peptides in vivo: The Role of Peptide Assembly State. *The journal of Neuroscience*. **13**, 1676-1687. **1993**
19. SELKOE, C. J. Amyloid  $\beta$ -protein precursor: new clues to the genesis of Alzheimer's disease. *Current Opinion in Neurobiology*. **4**, 708-716. **1994**.
20. VERBEEK, M. M.; RUITER, D. J.; WALL, R. M. The role of amyloid in the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Biological Chemistry*. **378**, 937-950. **1997**.
21. CRUZ E SILVA, E. F. e colaboradores. Inhibition of Protein Phosphatase 1 Stimulates Secretion of Alzheimer Amyloid Precursor Protein. *Molecular Medicine*. **1**, 535-541. **1995**
22. GANDY, S.; GREEGNARD, P. Processing of alzheimer  $\beta$ -amyloid precursor Protein: cell biology, regulation, and role in Alzheimer disease *International Reviews of Neurobiology*. **36**, 29-50. **1994**.

23. GIACOBINI, E. From Molecular Structure to Alzheimer Therapy. *The Japanese Journal of Pharmacology*. **74**, 225-241. **1997**.
24. NUMAN, J.; SMALL, D. H. Regulation of APP cleavage by  $\alpha$ -,  $\beta$ - and  $\gamma$ -secretases *Federation of European Biochemical Societies Letters*. **483**, 6-10. **2000**.
25. IWATSUBO, T.; e colaboradores. Visualization of A $\beta$ 42(43) and A $\beta$ 40 in senile plaques with end-specific A $\beta$  monoclonals: Evidence that an initially deposited species is A $\beta$ 42(43). *Neuron*. **3**, 45-53. **1994**.
26. ESLER, W. P.; WOLFE, M. S. A portrait of Alzheimer secretases - new features and familiar faces. *Science*. **293**, 1449-1454. **2001**.
27. SCHEUNER, D. e colaboradores. Secreted amyloid beta-protein similar to that in the senile plaques of Alzheimer's disease is increased in vivo by the presenilin 1 and 2 and APP mutations linked to familial Alzheimer's disease. *Nature Medicine*. **2**, 864-870. **1996**
28. SMALL, D. H.; MCLEAN, C. A. J. Alzheimer's Disease and the Amyloid  $\beta$  Protein: What Is the Role of Amyloid? *Neurochem*. **73**, 443-449. **1999**.
29. [www.alzheimermed.com.br/m3.aps?cod-pagina=1014](http://www.alzheimermed.com.br/m3.aps?cod-pagina=1014), acesso em 08/2008.
30. VIEGAS JR., C. e colaboradores. Produtos naturais como candidatos a fármacos úteis no tratamento do mal de Alzheimer. *Química Nova*. **27**, 4, 655-660. **2004**.
31. CASTRO, A.; MARTINEZ, A. Peripheral and Dual Binding Site Acetylcholinesterase Inhibitors: Implications in treatment of Alzheimer's Disease. *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry*, **1**, 267-272. **2001**.
32. <http://ncbr.chemi.muni.cz/group/lcc/acetylcholinesterase.html>
33. SOREQ, H.; SEIDMAN, S. Acetylcholinesterase — new roles for an old actor. *Neuroscience*. **2** 294-302 **2001**
34. CAMPS, P.; MUÑOZ-TORREDO, D.; Cholinergic Drugs in Pharmacotherapy of Alzheimer's Disease. *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry*. **2**, 11-25. **2002**.

35. GOODMAN, L. S.; GILMAN, A. Goodman & Gilman: As bases farmacológicas da terapêutica. 11<sup>a</sup> ed. Rio de Janeiro: MacGraw-Hill Interamericana do Brasil, **2006**.
36. [www.alzheimermed.com.br/m3.aps?cod-pagina=1020](http://www.alzheimermed.com.br/m3.aps?cod-pagina=1020), acesso em 08/2008.
37. VIEGAS JR,C. e colaboradores. New selective acetylcholinesterase inhibitors designed from natural piperidine alkaloids. *Bioorganic e Medicinal Chemistry*. **13**, 4184–4190. **2005**.
38. FUENTES, P. G., SLACHEVSKY, A. Enfermedad de Alzheimer: Actualización en terapia farmacológica. *Revista Medica de Chile*. **133**, 224-230. **2005**.
39. [www.alzheimermed.com.br/m3.aps?cod-pagina=1023](http://www.alzheimermed.com.br/m3.aps?cod-pagina=1023), acesso em 08/2008.
40. VIEGAS JR., C. e colaboradores. New Anti-Alzheimer Drugs from Biodiversity: The Role of the Natural Acetylcholinesterase Inhibitors. *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry*. **5**, 915-926. **2005**.
41. O'NEIL, M. F.; *Drug Discovery Today* **10**, 1333. **2005**.
42. ORDENTLICH, A e colaboradores. Functional Characteristics of the Oxyanion Hole in Human Acetylcholinesterase. *The journal of biological chemistry*. **273**, 19509. **1998**.
43. COLLETIER, J. P. e colaboradores. Structural insights into substrate traffic and inhibition in acetylcholinesterase. *The EMBO Journal*. **25**, 2746–2756, **2006**
44. SINGH, A. K.; SPASSOVA, D. Effects of Hexamethonium, Phenothiazines, Propranolol and Ephedrine on Acetylcholinesterase Carbamylation by Physostigmine, Aldicarb and Carbaryl: Interaction between the Active Site and the Functionally Distinct Peripheral Sites in Acetylcholinesterase. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Pharmacology, Toxicology and Endocrinology*. 119C, 97. **1998**.
45. DARVESH, S. e colaboradores. Carbamates with Differential Mechanism of Inhibition Toward Acetylcholinesterase and Butyrylcholinesterase. *Journal of Medicinal Chemistry*. **51**, 4200–4212. **2008**.

46. POLINSKY, R. J. Clinical Pharmacology of Rivastigmine: A New-Generation Acetylcholinesterase Inhibitor for the Treatment of Alzheimer's Disease. *Clinical Therapeutics*. **20** (4), 634-647. **1998**.
47. YU, Q.S. e colaboradores. Carbamate analogues of (-)-physostigmine: in vitro inhibition of acetyl- and butyrylcholinesterase. *Febs Letters*. 234(1), 127-130. **1988**.
48. SPENCER, C. M.; NOBLE, S. Rivastigmine: A Review of its Use in Alzheimer's Disease. *Drugs e Aging* **13**, 391. **1998**.
49. AL-JAFARI, A. A. e colaboradores. Kinetics of Human Erythrocyte Acetylcholinesterase Inhibition by a Novel Derivative of Physostigmine: Phenserine *Biochemical and Biophysical Research Communications*. **248**(1), 180-185. **1988**.
50. MUSTAZZA, C. e colaboradores. Synthesis and cholinesterase activity of phenylcarbamates related to Rivastigmine, a therapeutic agent for Alzheimer's disease. *European Journal of Medicinal Chemistry*. **37**, 91. **2002**.
51. BOLOGNESI, M. L. e colaboradores. Design, Synthesis, and Biological Evaluation of Conformationally Restricted Rivastigmine Analogues. *Journal of Medicinal Chemistry*. **47**, 5945. **2004**.
52. SCIPIONE, L. e colaboradores. 4-Aminopyridine derivatives with anticholinesterase and anti-amnesic activity. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*. **18**, 309-312. **2008**.
53. RIZZO, S. e colaboradores. A. Benzofuran-Based Hybrid Compounds for the Inhibition of Cholinesterase Activity,  $\beta$ -Amyloid Aggregation, and A $\beta$  Neurotoxicity. *Journal of Medicinal Chemistry*. **51**, 2883-2886. **2008**.
54. VASTO, S. e colaboradores. Inflammation, genes and zinc in Alzheimer's disease. *Brain Research Reviews*. **58**, 96 - 105. **2008**.
55. STUCHBURY, G. E. MUNCH G. Alzheimer's associated inflammation, potential drug targets and future therapies. *Journal of Neural Transmission*. **112**, 429-453. **2005**.

56. MENEGATTI, R. e colaboradores. Design, Synthesis and Pharmacological Profile of Novel Dopamine D2 Receptor Ligands. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*. **11**, 4807-4813. **2003**.
57. SHEPARTZ, A. BRESLOW, R. Hydrolysis of an Amide in a Carboxypeptidase Model Using Co( 111) and Bifunctional Catalysts. *Journal of American Chemistry Society*. **109**(6), 1814-1826. **1987**.
58. LIMA, L. M. e colaboradores. Synthesis and Anti-Inflammatory Activity of Phthalimide Derivatives, Designed as New Thalidomide Analogues. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*. **10**, 3067-3073. **2002**.
59. AVILA-ZARRAGA, J. G.; MARTINEZ, R. Efficient methylation of carboxylic acids with potassium hydroxide/methyl sulfoxide and iodomethane. *Synthetic Communications*. **31**(14), 2177-2183. **2001**.
60. KIM, L. M. e colaboradores. Zinc-Modified Cyanoborohydride as a Selective Reducing Agent. *Journal of Organic Chemistry*. **50**, 1927-1932. **1985**.
61. GILCHRIST, THOMAS L. Heterocyclic chemistry. 3<sup>a</sup>. Ed., cap. 3; **1997**.
62. RUBIRALTA, M.; GIRALT, E.; DIEZ, A. Piperidine Structure, Preparation, Reactivity and Synthetic Applications of Piperidine and its derivatives. **1991**.
63. ROMERO, N. C. e colaboradores. Synthesis, trypanocidal activity and docking studies of novel quinoxaline-N-acylhydrazones, designed as cruzain inhibitors candidates. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*. **17**, 641-642. **2009**.
64. BARREIRO, E. J. e colaboradores. Synthesis and analgesic activity of novel N-acylarylhydrazones and isosters, derived from natural safrole. *European Journal of Medicinal Chemistry*. **35**, 187-203. **2000**.
65. MAIA, R. C. e colaboradores. Synthesis and analgesic profile of conformationally constrained N-acylhydrazone analogues: Discovery of novel N-arylideneamino quinazolin-4(3H)-one compounds derived from natural safrole. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*. **17**, 6517. **2009**.
66. HANSEN, M. M. E RIGGS, J. A. Novel Protecting Group for Hindered Phenols. *Tetrahedron Letters*. **39**, 2705-2706. **1998**.



67. BOLOGNESI, M. L. e colaboradores. Improved Structure-Activity Relationship Analysis of HIV-1 Protease Inhibitors Using Interaction Kinetic Data. *Journal of Medicinal Chemistry*. **47**, 5945. **2004**.
68. SANTOS, A. R. S.; CALIXTO, J. B. Further evidence for the involvement of tachykinin receptor subtypes in formalin and capsaicin models of pain in mice. *Neuropeptides* **31**(4), 381-389, **1997**.
69. VILELA, F. C. e colaboradores. Evaluation of the antinociceptive activity of extracts of *Sonchus oleraceus* L. in mice. *Journal of ethnopharmacology*. **124**, 306 – 310. **2009**.
70. FERRÁNDIZ, M. L.; ALCARAZ, M. J. Anti-inflammatory activity na inibition of arachidonic acid metabolism by flavonoids. *Agents Action* **32**, 283-288. **1991**.
71. LEITE, D. F.P. e colaboradores. ABCC transporter inhibition reduces zymosan-induced peritonitis. *Journal of Leukocyte Biology*, **82**, 630-637, **2007**
72. ELLMAN, G. L. e colaboradores. *Biochemical Pharmacology*. **7**, 88. **1961**
73. CASTRO, N. C. e colaboradores. CNS-selective noncompetitive cholinesterase inhibitors derived from thenatural piperidine alkaloid (-)-spectaline. *European Journal of Pharmacology*. **580** 339–349, **2008**.
74. PERRIM, D. D.; ARMARENGO W. L.F. Purification of Laboratory Chemicals. 3ª. Ed., Pergamon Press, **1988**.