



UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS



MATHEUS DE FREITAS SILVA

**SÍNTESE E AVALIAÇÃO FARMACOLÓGICA DE ANÁLOGOS TRIAZÓLICOS E
CINAMOIL-N-ACILIDRAZÔNICOS MULTIALVO CONTRA AS DOENÇAS DE
ALZHEIMER E PARKINSON**

Alfenas/MG

2020

MATHEUS DE FREITAS SILVA

**SÍNTESE E AVALIAÇÃO FARMACOLÓGICA DE ANÁLOGOS TRIAZÓLICOS E
CINAMOIL-N-ACILIDRAZÔNICOS MULTIALVO CONTRA AS DOENÇAS DE
ALZHEIMER E PARKINSON**

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

Orientador: Prof. Dr. Claudio Viegas Jr.
Coorientadora: Dra. Vanessa Silva Gontijo

Alfenas/MG

2020

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)
Sistema de Bibliotecas da Universidade Federal de Alfenas

Silva, Matheus de Freitas.
S586s Síntese e avaliação farmacológica de análogos triazólicos e cinamoil-N-
acilidrazônico multialvo contra as doenças de Alzheimer e Parkinson /
Matheus de Freitas Silva - Alfenas/MG, 2020.
224 f. : il. --

Orientador: Cláudio Viegas Jr.
Tese (Doutorado em Química) - Universidade Federal de Alfenas, 2020.
Bibliografia.

1. Doença de Alzheimer. 2. Doença de Parkinson. 3. Curcumina. 4.
Resveratrol. I. Viegas Jr., Cláudio. II. Título.

CDD-547

MATHEUS DE FREITAS SILVA

"SÍNTESE E AVALIAÇÃO FARMACOLÓGICA DE ANÁLOGOS TRIAZÓLICOS E CINAMOIL-N-ACILIDRAZÔNICOS MULTIALVO CONTRA AS DOENÇAS DE ALZHEIMER E PARKINSON"

A Banca examinadora, abaixo assinada, aprova a Tese apresentada como parte dos requisitos para a obtenção do título de Doutor em Química pela Universidade Federal de Alfenas. Área de concentração: Química Orgânica

Aprovado em: 17/02/2020

Prof. Dr. Claudio Viegas Júnior

Assinatura:

Prof. Dr. Carlos Alberto Manssour Fraga

Assinatura:

Prof. Dr. Luis Octávio Regasini

Assinatura:

Prof. Dr. Marcos Vinícios Salles Dias

Assinatura:

Profa. Dra. Carla Speroni Ceron

Assinatura:

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho a todos que perseguem seus sonhos com paixão, não importando os obstáculos no caminho. Aos professores que lutam todos os dias para passar a diante um legado construído com muita dedicação, trabalho, suor e privações. A todos os alunos e pesquisadores que constroem Ciência de verdade em um país tomado pela ignorância do desconhecimento e do falso saber. Aos pacientes de doenças sem cura, em especial aos acometidos por doenças neurodegenerativas, sua perseverança, força e fé são combustíveis para pessoas como nós, que dedicam suas vidas e esforços na busca incessante de novas alternativas que possam amenizar ou sanar suas dores e medos. Por fim, aos novos cientistas, essa caminhada nunca termina, sempre haverá um “por quê” a ser respondido, boa sorte para vocês e bom trabalho!

AGRADECIMENTOS

Agradeço inicialmente a Deus, por todas as oportunidades e pela força, pois acredito que sempre haverá um “porquê” que não poderá ser respondido, e sua resposta estará nele.

Agradeço a minha família, em especial aos meus pais, José Pereira e Cristina, meu irmão Thiago e minha esposa Josidel, por todo o apoio, confiança e paciências nas etapas mais difíceis.

Agradeço a todos os amigos que dividiram comigo essa experiência incrível que é a pós-graduação, em especial devo destacar Matheus Siqueira e Marco Aurélio Boaventura, que estão comigo e com a Josi desde o princípio e estiveram conosco em todas as etapas dessa longa caminhada.

Agradeço aos companheiros do laboratório em Pesquisa em Química Medicinal (PeQuiM) em especial a Letícia Coelho, Júlia Schulz e Ellen Lima, minhas alunas de iniciação científica, sem as quais esse trabalho não teria a magnitude que carrega hoje.

Agradeço ao professor Dr. Andrea Tarozzi e a Dra. Letizia Pruccoli, que me receberam na Itália e com quem aprendi muito durante minha estadia em Rimini e Bolonha.

Agradeço a todos os nossos colaboradores, no Brasil e na Itália, pelo trabalho incrível realizado, cujos resultados estão expostos e discutidos neste manuscrito.

Agradeço a todos os alunos que passaram pelas minhas aulas durante esse período, saibam que eu aprendi com eles tanto quanto, se não mais, do que eles comigo.

Por fim, agradeço muito ao meu amigo, padrinho e orientador Dr. Claudio Viegas Jr. Pela confiança depositada em mim durante os últimos 10 anos. Tive o prazer de iniciar meu trabalho com ele em 2011, depois da iniciação científica, de dois anos de mestrado e de quatro anos de doutorado só tenho a agradecer por todos os ensinamentos, toda a cobrança, toda a paciência, toda a confiança e por ter acreditado em mim desde o início.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001, FAPEMIG, INCT-INOVAR e CNPq.

“Cada pessoa deve trabalhar para o seu aperfeiçoamento e, ao mesmo tempo, participar da responsabilidade coletiva por toda a humanidade.”

Marie Curie (1867-1934)

RESUMO

As doenças neurodegenerativas (DNs) são um grupo de doenças neurológicas que têm como principais exemplos a doença de Alzheimer (DA) e a doença de Parkinson (DP) e apresentam alguns aspectos fisiopatológicos comuns, como a precipitação de proteínas insolúveis, neuroinflamação e desbalanço na homeostase dos processos anti e pró-oxidativos no cérebro. São doenças progressivas, debilitantes, com arsenal terapêutico muito restrito e, até o momento, incuráveis. Este trabalho teve por objetivos o planejamento, síntese, caracterização e avaliação farmacológica de duas famílias de compostos planejados a partir da hibridação molecular de fragmentos estruturais da curcumina (**1**) e do resveratrol (**2**). Estas duas séries se diferenciam pela natureza das subunidades estruturais advindas da curcumina e do resveratrol, conectados por uma subunidade espaçadora *N*-acilidrazona (série 1). Na série 2, a subunidade *N*-acilidrazona ligada a um sistema triazólico 1,4-dissubstituído serve de conexão entre um sistema 4-hidróxi-3-metóxi-arila, inspirado na curcumina, e um sistema tipo-estireno substituído, que mimetiza um dos fragmentos aromáticos do resveratrol (ou curcumina). Dos 10 compostos obtidos na série 1, pode-se destacar **PQM-161**, **PQM-163** e **PQM-164** que apresentaram o melhor perfil de atividade, sendo que possuem atividade antioxidante frente a diferentes agentes pró-oxidantes (CE_{50} DPPH= 19,98; 29,91 e 0,93 μ M e Cl_{50} *t*-BOOH= 0,71; 0,20 e 0,51 μ M, respectivamente) e atividade neuroprotetora contra toxicidade induzida por 6-OHDA e agregados de α -sinucleína, modelos para estudo da atividade neuroprotetora na DP. Estudos adicionais evidenciaram que **PQM-161** e **PQM-164** possuem um mecanismo de ação antioxidante intracelular relacionado à ativação do fator nuclear eritroide 2 relacionado ao fator 2 (Nrf2). Novos estudos estão sendo realizados a fim de verificar a capacidade de **PQM-164** atuar, também, como anti-neuroinflamatório. Dentre as 13 substâncias obtidas na série 2, **PQM-233** foi o que apresentou a melhor capacidade de inibição da atividade de acetilcolinesterase (AChE, Cl_{50} = 20,6 μ M), com atividade antioxidante direta (CE_{50} DPPH= 30,44 μ M e inibição de *t*-BOOH a 10 μ M de 29,79%) e neuroprotetora frente à neurotoxicidade induzida por oligômeros β A. Todas as substâncias obtidas neste trabalho tiveram sua toxicidade verificada por ensaios de MTT frente a células de neuroblastoma humano do tipo SH-SY5Y e células renais de primatas (VERO), sendo que as substâncias mais ativas destacadas não apresentaram toxicidade detectável nas concentrações avaliadas. Por fim, podemos concluir que os objetivos propostos foram atingindo, **PQM-164** e **PQM-233** apresentaram propriedades multialvo frente a DNs, respectivamente DP e DA.

Palavras-chave: Doença de Alzheimer. Doença de Parkinson. Curcumina. Resveratrol.

ABSTRACT

Neurodegenerative diseases (NDs) are a group of neurological diseases, with Alzheimer's (AD) and Parkinson's (PD) diseases as main examples, which show some common pathophysiological aspects such as deposition of insoluble proteins, neuroinflammation, imbalance in the homeostasis of pro- and anti-oxidant processes into the brain. They are progressive, debilitating, with very restrict therapeutical arsenal and, to date, incurable. The goal of this work was the design, synthesis, characterization and pharmacological evaluation of two new series of compounds planned by molecular hybridization of structural fragments of curcumin (**1**) and resveratrol (**2**). These two series differ by the nature of the structural subunits derived from curcumin and resveratrol, connected by an *N*-acyl-hydrazone spacer subunit (series 1). In the series 2, the *N*-acyl-hydrazone function is linked to a 1,4-disubstituted triazole system as a connection between a 4-hidroxy-3-methoxy-aryl system, inspired in curcumin, and a substituted styrene-type system that mimics one of the aromatic fragments of resveratrol (or curcumin). Among 10 compounds from series 1, one may highlight **PQM-161**, **PQM-163** and **PQM-164** that showed good antioxidant activity towards different pro-oxidant agents (ED_{50} DPPH = 19.98; 29.91 and 0.93 μ M and IC_{50} *t*-BOOH = 0.71; 0.20 and 0.51 μ M, respectively) and neuroprotective activity against 6-OHDA and α -synuclein aggregates induced toxicity, which is a model for evaluation the neuroprotection in PD. Additional studies evidenced that compounds **PQM-161** and **PQM-164** have a mechanism of intracellular antioxidant activity related to the activation of the nuclear factor erythroid 2-related (Nrf2). Further on-going studies aim to verify the anti-neuroinflammatory activity of **PQM-164**. Among 13 substances from series 2, **PQM-233** showed the best capacity to inhibit acetylcholinesterase (AChE) activity (IC_{50} = 20.6 μ M), with direct antioxidant activity (EC_{50} DPPH= 30.44 μ M and inhibition of *t*-BOOH at 10 μ M of 29.79%) and neuroprotective activity against β A oligomers-induced toxicity. All compounds from this work had their toxicity evaluated towards human neuroblastoma cells (SH-SY5Y) and primate renal cell (VERO) in the MTT test and the most active substances highlighted showed no detectable toxicity at the tested concentrations. Finally, we can conclude that the proposed objectives were reaching, **PQM-164** and **PQM-233** presented multi-target properties against NDs, respectively PD and AD.

Keywords: Alzheimer disease. Parkinson disease. Curcumin. Resveratrol.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Estrutura química da Curcumina (1) e Resveratrol (2).....	19
Figura 2 - Mecanismo de indução de Nrf 2 por substâncias aceptoras de Michael. (a) – Nrf 2 não liberado segue para degradação. (b) – Nrf 2 livre após reação de Michel com Keap 1 ou por indução da fosforilação de Nrf 2 e consequente translocação nuclear.	21
Figura 3 - Estruturas químicas dos fármacos tacrina (3), rivastigmina (4), donepezil (5), galantamina (6) e memantina (7) utilizados no tratamento da DA.....	23
Figura 4 - Estruturas químicas dos fármacos L-dopa (8) e rasagilina (9), utilizados no tratamento da DP.....	26
Figura 5 - Equilíbrio ceto-enólico da curcumina em meio fisiológico.	27
Figura 6 - Sítios funcionais da curcumina.....	28
Figura 7 - Via metabólica da Curcumina (1) em ratos.	30
Figura 8 - Isomerização do resveratrol por ação de luz UV.....	31
Figura 9 - Planejamento para obtenção do híbrido 12 a partir do flurbiprofeno (10) e chalcona (11).....	34
Figura 10 - Obtenção do composto 14, ativo contra DA a partir da estrutura do resveratrol (9).	35
Figura 11 - Planejamento por hibridação molecular das famílias das moléculas sintetizadas neste trabalho.	37
Figura 12 - Rota sintética para obtenção da primeira série alvo.....	39
Figura 13 - Proposta mecanística para a reação <i>one-pot</i> de obtenção da hidrazida (17 ou 18) partindo do ácido cinâmico 15 ou 16.....	40
Figura 14 - Espectro de absorção na região do infravermelho da (E)-3(4-hidróxi-3- metóxfenil)acrilidrazida 17 (ATR).....	41
Figura 15 - Espectro de RMN de ¹ H da (E)-3(4-hidróxi-3-metóxfenil)acrilidrazida 17 (300 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆).....	42
Figura 16 - Espectro de RMN de ¹³ C da (E)-3(4-hidróxi-3-metóxfenil) acilidrazida 17 (75 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆).....	43
Figura 17 - Proposta mecanística da reação de acoplamento da hidrazida 17 ou 18 com os aldeídos funcionalizados 19.....	44

Figura 18 - Espectro de absorção na região do infravermelho da 2- <i>N</i> -(4-hidróxi-3-metóxi-benzil)-3-(4-hidróxi-3-metóxi-fenil)acriloidrazida (PQM-164) (ATR).....	45
Figura 19 - Espectro de RMN de ¹ H da 2- <i>N</i> -(4-hidróxi-3-metóxi-benzil)-3-(4-hidróxi-3-metóxi-fenil)-acriloidrazida (PQM-164) (300 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆).....	47
Figura 20 - Espectro de RMN de ¹ H da 2- <i>N</i> -(4-hidróxi-3-metóxi-benzil)-3-(4-hidróxi-3-metóxi-fenil)acriloidrazida (PQM-164) em diferentes temperaturas (300 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆).....	48
Figura 21 - Espectro de RMN de ¹³ C da 2- <i>N</i> -(4-hidróxi-3-metóxi-benzil)-3-(4-hidróxi-3-metóxi-fenil)acriloidrazida (PQM-164) (75 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆).....	49
Figura 22 - Mapa de correlação HSQC de 2- <i>N</i> -(4-hidróxi-3-metóxi-benzil)-3-(4-hidróxi-3-metóxi-fenil)acriloidrazida (PQM-164).....	50
Figura 23 - Mapa de correlação HMBC de 2- <i>N</i> -(4-hidróxi-3-metóxi-benzil)-3-(4-hidróxi-3-metóxi-fenil)acriloidrazida (PQM-164).....	51
Figura 24 - Espectros de Massas da 2- <i>N</i> -(4-hidróxi-3-metóxi-benzil)-3-(4-hidróxi-3-metóxi-fenil)acriloidrazida (PQM-164) (ESI-MS).....	52
Figura 25 - Rota sintética para obtenção da segunda série alvo.....	53
Figura 26 - Proposta mecanística para redução do aldeído 20 para o álcool 21	54
Figura 27 - Espectro de absorção na região do IV de 2-metóxi-benzeno-1,4-diol (21) (ATR).....	55
Figura 28 - Espectro de RMN de ¹ H de 2-metóxi-benzeno-1,4-diol (21) (300 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆).....	56
Figura 29 - Espectro de RMN de ¹³ C de 2-metóxi-benzeno-1,4-diol (21) (75 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆).....	57
Figura 30 - Proposta mecanística de reação para formação de 4-(azidometil)-2-metóxi-fenol (22).....	58
Figura 31 - Espectro de absorção na região do infravermelho de 4-(azidometil)-2-metóxi-fenol (22) (ATR).....	59
Figura 32 - Espectro de RMN de ¹ H de 4-(azidometil)-2-metóxi-fenol (22) (300 MHz, CDCl ₃).....	60
Figura 33 - Espectro de RMN de ¹³ C de 4-(azidometil)-2-metóxi-fenol (22) (75 MHz, CDCl ₃).....	61
Figura 34 - a) Proposta de mecanismo de reação para formação do 1,2,3-triazol-1,4-dissubstituído segundo Sharpless. b) Proposta de mecanismo de	

reação para formação do 1,2,3-triazol-1,4-dissubstituído 24 segundo Fokin.....	63
Figura 35 - Espectro na região do infravermelho de propil-1-(4-hidróxi-3-metóxi-benzil)-1 <i>H</i> -1,2,3-triazol-4-carboxilato (24) (ATR).	64
Figura 36 - Espectro de RMN de ¹ H de propil-1-(4-hidróxi-3-metóxi-benzil)-1 <i>H</i> -1,2,3-triazol-4-carboxilato (24) (300 MHz, CD ₃ OD).	65
Figura 37 - Espectro de RMN de ¹³ C de propil-1-(4-hidróxi-3-metóxi-benzil)-1 <i>H</i> -1,2,3-triazol-4-carboxilato (24) (75 MHz, CD ₃ OD).	66
Figura 38 - Proposta de mecanismo de reação da hidrazinólise para formação de 1-(4-hidróxi-3-metóxi-benzil)-1 <i>H</i> -1,2,3-triazol-4-carbohidrazida (25).	67
Figura 39 - Espectro na região do infravermelho de 1-(4-hidróxi-3-metóxi-benzil)-1 <i>H</i> -1,2,3-triazol-4-carbohidrazida (25) (ATR).	68
Figura 40 - Espectro de RMN de ¹ H de 1-(4-hidróxi-3-metóxi-benzil)-1 <i>H</i> -1,2,3-triazol-4-carbohidrazida (25) (300 MHz, DMSO – <i>d</i> ₆).	69
Figura 41 - Espectro de RMN de ¹³ C de 1-(4-hidróxi-3-metóxi-benzil)-1 <i>H</i> -1,2,3-triazol-4-carbohidrazida (25) (75 MHz, DMSO – <i>d</i> ₆).	70
Figura 42 - Mecanismo de reação do acoplamento para formação dos triazóis finais da série 2.	71
Figura 43 - Espectro de absorção na região do infravermelho de (<i>E</i>)-1-(4-hidróxi-3-metóxi-benzil)- <i>N'</i> -(4-hidróxi-3-metóxi-benzilideno)-1 <i>H</i> -1,2,3-triazol-4-carbohidrazida (PQM-233) (ATR).	72
Figura 44 - Espectro de RMN de ¹ H de (<i>E</i>)-1-(4-hidróxi-3-metóxi-benzil)- <i>N'</i> -(4-hidróxi-3-metóxi-benzilideno)-1 <i>H</i> -1,2,3-triazol-4-carbohidrazida (PQM-233) (300 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆).	73
Figura 45 - Espectro de RMN de ¹³ C de (<i>E</i>)-1-(4-hidróxi-3-metóxi-benzil)- <i>N'</i> -(4-hidróxi-3-metóxi-benzilideno)-1 <i>H</i> -1,2,3-triazol-4-carbohidrazida (PQM-233) (75 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆).	74
Figura 46 - Mapa de correlação HSQC de (<i>E</i>)-1-(4-hidróxi-3-metóxi-benzil)- <i>N'</i> -(4-hidróxi-3-metóxi-benzilideno)-1 <i>H</i> -1,2,3-triazol-4-carbohidrazida (PQM-233).	75
Figura 47 - Mapa de correlação HMBC de (<i>E</i>)-1-(4-hidróxi-3-metóxi-benzil)- <i>N'</i> -(4-hidróxi-3-metóxi-benzilideno)-1 <i>H</i> -1,2,3-triazol-4-carbohidrazida (PQM-233).	76

Figura 48 - Espectro de Massas de (<i>E</i>)-1-(4-hidróxi-3-metóxi-benzil)- <i>N'</i> -(4-hidróxi-3-metóxi-benzilideno)-1 <i>H</i> -1,2,3-triazol-4-carbohidrazida (PQM-233) (ESI-MS).....	77
Figura 49 - Avaliação de inibição de AChE da série de derivados dos ácidos cinâmicos.....	80
Figura 50 - Avaliação de inibição de AChE da série dos triazóis.....	81
Figura 51 - Resultados de ancoragem para os compostos PQM-230 complexado com 4EY7 (A) e 1ZGC (B), C) PQM-233 complexado com 1ZGC, e D) PQM-232 complexado com 1Q84. As ligações de hidrogênio são representadas como traços amarelos.	83
Figura 52 - Gráfico com os valores de CC ₅₀ dos derivados dos ácidos cinâmicos frente às células SH-SY5Y.	85
Figura 53 - Gráfico com os valores de CC ₅₀ dos triazóis frente às células SH-SY5Y....	86
Figura 54 - Espectro de absorção na região do UV- <i>vis</i> de PQM-161 com soluções contendo Fe ²⁺ , Fe ³⁺ , Cu ²⁺ e Zn ²⁺	92
Figura 55 - Espectro de absorção na região do UV- <i>vis</i> de PQM-163 com soluções contendo Fe ²⁺ , Fe ³⁺ , Cu ²⁺ e Zn ²⁺	93
Figura 56 - Espectro de absorção na região do UV- <i>vis</i> de PQM-164 com soluções contendo Fe ²⁺ , Fe ³⁺ , Cu ²⁺ e Zn ²⁺	93
Figura 57 - Capacidade indutora de PQM-161 e PQM-164 nos níveis de glutathiona (GSH).	94
Figura 58 - Capacidade indutora de PQM-233 nos níveis de glutathiona (GSH).	95
Figura 59 - Capacidade de ativação de Nrf 2 por PQM-161 e PQM-164 em diferentes tempos de tratamento.	97
Figura 60 - Expressão gênica decorrentes da ativação de Nrf 2 por PQM-161 e PQM-164	98
Figura 61 - Estrutura minimizada do domínio Keap1 BTB com PQM-161 ligado covalentemente a C151. O ligante é mostrado em laranja, enquanto os resíduos de proteína são coloridos em ciano escuro.	100
Figura 62 - Atividade neuroprotetora de PQM-161 , PQM-163 e PQM-164 frente a toxicidade induzida por 6-OHDA.	103
Figura 63 - Atividade neuroprotetora de PQM-164 e PQM-161 após 24h de tratamento frente a toxicidade induzida por 6-OHDA.	103
Figura 64 - Imagens coletadas após análise no microscópio de fluorescência.	104

Figura 65 - Inibição da agregação de α -sinucleína por PQM-161 , PQM-163 e PQM-164	105
Figura 66 - Atividade neuroprotetora de PQM-233 contra citotoxicidade induzida por oligômeros OA β	106
Figura 67 – Expressão génica relativa de diferentes marcadores inflamatórios quantificados por PCR empregando macrófagos humanos derivados de células THP-1 diferenciados por PMA. A) e D) expressão relativa de iNOS; B) e E) expressão relativa de IL-1 β ; C) e F) expressão relativa de TNF- α	108
Figura 68 - Compostos com ligações rotativas fixadas durante os experimentos de ancoragem (setas laranja). Diedros não destacados neste quadro foram definidos como livres para girar, exceto os títulos de amida.	144

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Propriedades moleculares e parâmetros farmacocinéticos previsto por estudos computacionais obtidos pelo software QikProp 3.1 (Schrödinger).	79
Tabela 2 - Resultados de energia de interação dos complexos.	81
Tabela 3 - Valores de CE ₅₀ para capacidade sequestrante de DPPH.....	87
Tabela 4 - Valores das diferentes abordagens nos testes de inibição de t-BOOH pelos compostos sintetizados.	89
Tabela 5 - Atividade antioxidante derivada da capacidade quelante de Fe ²⁺ pelos compostos líderes.	91
Tabela 6 - Resultados da Energia de Interação Linear (EIL) para os complexos ligante-proteína formados pela ligação covalente de PQM161 a C151 do domínio BTB de Keap1. Os dados estão expressos como kcal / mol.	99
Tabela 7 - Atividade inibitória de monoaminoxidase dos compostos líderesda série PQM-161, PQM-163 e PQM-164	101
Tabela 8 - Avaliação de toxicidade dos compostos mais ativos em células Renais de primatas (VERO).....	109
Tabela 9 - Dados obtidos após purificação dos produtos de acoplamento dos derivados cinâmicos.....	114
Tabela 10 - Dados obtidos após purificação dos produtos de acoplamento dos derivados triazólicos.....	126
Tabela 11 - Resultados do acoplamento do conjunto para os ligantes de referência contra as quatro conformações de AChE. As posições selecionadas de acordo com a estratégia de acoplamento de conjuntos (ou seja, a conformação da AChE que fornece a menor pontuação do XP) são destacadas em negrito, alcançando 100% de taxa de sucesso ao considerar RMSD ≤ 2,0 Å.....	145
Tabela 12 – Sequência de primer para RT-PCR quantitativo.....	146
Tabela 13 – Sequências de <i>primers</i> utilizados nas reações de RT-PCR	148

LISTA DE ABREVIÇÕES, SIGLAS E SÍMBOLOS

6-OHDA -	6-hidróxidopamina
ACh -	Acetilcolina
AChE -	Acetilcolinesterase
ADME -	Propriedades de absorção, distribuição, metabolismo e excreção
ALH -	Aceptores de ligação de hidrogênio
APP -	Proteína precursora de amiloide
ARE -	Elemento de resposta antioxidante
ATP -	Adenosina trifosfato
ATR -	Refletância total atenuada
BuCh -	Butirilcolina
BuChE -	Butirilcolinesterase
Cc -	Cromatografia em coluna
CC ₅₀ -	Concentração capaz de induzir 50 % de citotoxicidade
CE ₅₀ -	Concentração capaz de reduzir 50 % do efeito
CI ₅₀ -	Concentração capaz de inibir 50 % da atividade
CI _{n50} -	Concentração capaz de incrementar 50 % da atividade
Co-T -	Cotratamento
COX -	Ciclooxigenase
<i>d</i> -	Dupleto
DA -	Doença de Alzheimer
DCFH-DA -	Diacetato de dicloro-diidro-fluoresceína
<i>dd</i> -	Duplodupleto
DH -	Doença de Huntington
DLH -	Doadores de ligação de hidrogênio
DMF -	Dimetilformamida
DMSO -	Dimetilsulfóxido
DN(s) -	Doença(s) neurodegenerativas(s)
DNA -	Ácido desoxirribonucleico
DP -	Doença de Parkinson
DPPH -	2,2-difenil-1-picrilhidrazila
EDAC ou EDC -	1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida

EELE -	Energia eletrostática média
EIL -	Energia de interação linear
ELISA -	Ensaio de imun absorção enzimática
ERN -	Espécies reativas de nitrogênio
ERO -	Espécies reativas de oxigênio
ESI -	Ionização por eletrospray
EVDW -	Energia eletrostática de Van der Waals
GCLC -	Glutamato-Cisteína ligase
GSH -	Glutationa
GSK-3 β -	Quinase glicogênio sintase-3 β
GSS -	Glutationa sintase
GSTP1 -	Glutationa S-transferase P1
HMBC -	do inglês, <i>heteronuclear multiple bonds correlation</i>
HOBT -	<i>N</i> -hidróxibenzotriazol
HRMS -	do inglês, <i>high resolution mass spectrometry</i>
HSQC -	do inglês, <i>heteronuclear single quantum coherence</i>
id -	Indeterminado
IL -	Interleucina
in -	Inativo
iNOS -	do inglês, <i>Inducible Nitric oxide synthases</i>
IV -	Infravermelho
<i>J</i> -	Acoplamento químico
JPND -	Programa europeu comum de pesquisa sobre doenças neurodegenerativas
Keap1 -	Kelch-like ECH-associado a proteína 1
L-dopa -	Levodopa
LPS -	Lipopolissacarídeos
<i>m</i> -	Multiplete
MAO -	Monoamina oxigenase
MCB -	Monoclorobimania
MTT -	Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil) tetrazólico
NF- κ B -	Fator nuclear kappa B
NMDA -	Receptores <i>N</i> -metil- <i>D</i> -aspartato
NQO1 -	NADPH quinona desidrogenase

Nrf 2 -	Fator nuclear eritróide relacionado ao fator 2
OH-1 -	Heme oxigenase 1
PF -	Ponto de fusão
PMA -	do inglês, <i>Phorbol 12-myristate 13-acetate</i>
PNs -	Produtos naturais
Pr -	Precipitação
Pre-T -	Pré-tratamento
PSA -	Áreas de superfície de <i>Van der Waals</i> de átomos de nitrogênio e oxigênio polares
QPlogBB -	Permeabilidade na barreira hematoencefálica
QPlogp oc/ag -	Coeficiente de partição octanol/água
QPlogS -	Solubilidade aquosa
QPPCaco -	Permeabilidade em ensaio com célula Caco, modelo para absorção intestinal
RMN -	Ressonância nuclear magnética
s -	Simpleto
SAP -	Sítio aniônico periférico
SH-SY5Y -	Células neuronais proveniente de neuroblastoma humano
SN -	Substância negra
SNC -	Sistema nervoso central
t -	Tripleto
t.a. -	Temperatura ambiente
t-BOOH -	<i>tert</i> -butil hidroperóxido
THF -	Tetrahidrofurano
TNF- α -	Fator de necrose tumoral α
UV -	Ultravioleta
% de abs. oral -	Porcentagem de absorção humana por <i>vía</i> oral
λ -	Comprimento de ondas expresso em nanômetros
δ -	Deslocamento químico expressado em parte por milhão (ppm)
β A -	Peptídeo β -amiloide

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	19
1.1	ASPECTOS COMUNS DAS DOENÇAS NEURODEGENERATIVAS	19
1.2	DOENÇA DE ALZHEIMER	21
1.3	DOENÇA DE PARKINSON.....	24
1.4	CURCUMINA	27
1.4.1	A Química da Curcumina	27
1.4.2	Alvos moleculares da curcumina nas doenças NDs.....	28
1.4.3	Limitações no uso terapêutico da curcumina.....	29
1.5	RESVERATROL	31
1.5.1	A Química do Resveratrol.....	31
1.5.2	Alvos moleculares do Resveratrol como agente neuroprotetor	32
1.5.3	Limitações no uso terapêutico do resveratrol	32
1.6	NOVAS ESTRATÉGIAS NO TRATAMENTO DAS DNS.....	33
2	OBJETIVOS	36
2.1	OBJETIVOS GERAIS	36
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	36
3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	38
3.1	QUÍMICA	38
3.1.1	Série 1: Síntese e dos derivados N-acilidrazônicos (PQM-160 a PQM-164 e PQM-196 a PQM-200).	39
3.1.2	Série 2: Síntese dos derivados triazólicos N-acilidrazônicos (PQM 229-241).....	52
3.2	AVALIAÇÃO FARMACOLÓGICA	78
3.2.1	Estudos in silico para predição de propriedades de absorção, distribuição, metabolismo e excreção (ADME).....	78
3.2.2	Avaliação da capacidade de inibição da enzima AChE.....	80
3.2.3	Avaliação da citotoxicidade dos compostos frente a células de neuroblastoma humano SH-SY5Y via MTT	85
3.2.4	Determinação do perfil antioxidante.....	86
3.2.5	Avaliação da capacidade de ativação da produção de glutaciona (GSH) intracelular	94

3.2.6	Capacidade de ativação de fator nuclear eritroide 2 relacionado ao fator 2 (Nrf 2).....	95
3.2.7	Avaliação da capacidade de inibição de monoaminoxidase (MAO).....	101
3.2.8	Atividade neuroprotetora.....	102
3.2.9	Avaliação da atividade anti-inflamatória em culturas de monócitos leucêmicos humanos (THP-1).	106
3.2.10	Avaliação da citotoxicidade em células renais (VERO)	108
4	PARTE EXPERIMENTAL	110
4.1	QUÍMICA	110
4.1.1	Generalidades.....	110
4.1.2	Abordagem sintética utilizada na obtenção dos compostos sintetizados.....	111
4.2	ATIVIDADE FARMACOLÓGICA.....	135
4.2.1	Avaliação da atividade inibitória de AChE	135
4.2.2	Avaliação in vitro das atividades antioxidante, quelante de metais e neuroprotetora.....	136
4.2.3	Modelagem molecular para Nrf2	142
4.2.4	Modelagem molecular para AChE.....	143
4.2.5	Quantificação de RNA via Real-time PCR.	145
4.2.6	Inibição da formação de aglomerados de α -sinucleína	146
4.2.7	Avaliação da atividade anti-inflamatória em células THP-1	147
4.2.8	Avaliação de citotoxicidade em células VERO	148
5	CONCLUSÕES	149
	REFERÊNCIAS.....	151
	ANEXOS	168

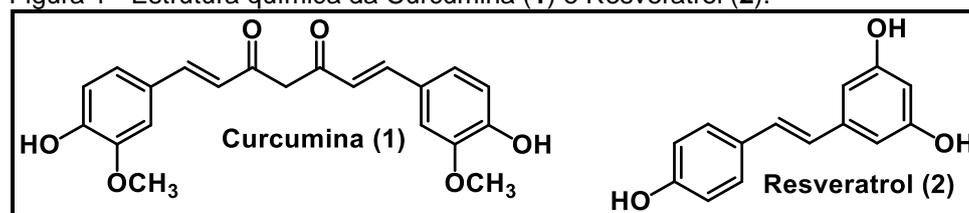
1 INTRODUÇÃO

Doenças neurodegenerativas (DNs) é um grupo de doenças com aspectos comuns, caracterizadas por uma perda contínua, progressiva e seletiva da anatomia e fisiologia do sistema neuronal. Alguns exemplos dessas patologias são a doença de Parkinson (PD) doença de Alzheimer (DA) e doença de Huntington (DH) (COYLE, 1993; LIN, 2006).

Essas DNs tem uma série de aspectos comuns, onde podemos destacar o desequilíbrio de espécies reativas de oxigênio (ERO). O encéfalo é especialmente vulnerável a danos oxidativos devido a presença de altas concentrações de oxigênio e metais redox como cobre e ferro (VALKO, 2007). Atualmente não temos fármacos no mercado capazes de curar as DNs, isso se deve ao fato de não compreendermos por completo a fisiopatologia dessas doenças (SCATENA, 2007).

Neste contexto a natureza pode fornecer interessantes fontes de substâncias ativas capazes de modular diversos aspectos ligados ao controle do estresse oxidativo como a curcumina (1) e o resveratrol (2) (FIGURA 1) (ALDAWSARI, 2016; SHISHODIA, 2013; SILVA, 2018c). Embasado nesta capacidade de modulação biológica os produtos naturais (PNs) vem sendo usados como fontes de inspiração para planejamento e síntese de novos compostos bioativos a fim de encontrar novos candidatos a fármacos neuroprotetores (SILVA, 2018b).

Figura 1 - Estrutura química da Curcumina (1) e Resveratrol (2).



Fonte: do autor.

1.1 ASPECTOS COMUNS DAS DOENÇAS NEURODEGENERATIVAS

A doença de Alzheimer, doença de Parkinson e doença de Huntington são alguns exemplos de doenças neurodegenerativas (EUROPEAN UNION JOINT PROGRAMME - NEURODEGENERATIVE DISEASE RESEARCH, 2018a).

Segundo o programa europeu comum de pesquisa sobre doenças neurodegenerativas (JPND), 16% da população europeia com mais de 60 anos

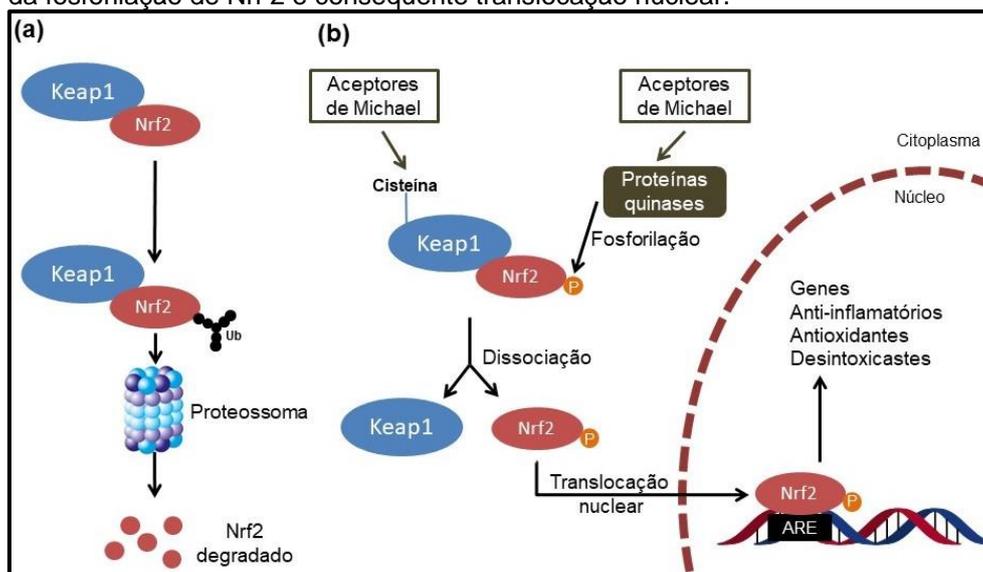
apresenta algum tipo de DN e as estimativas para 2030 é que um quarto desta população seja atingida por alguma DN. Anualmente, a união europeia gasta mais de 130 bilhões de euros nos cuidados de pacientes com DNs, sendo as mais comuns a doença de Alzheimer (DA) e a doença de Parkinson (DP) (EUROPEAN UNION JOINT PROGRAMME - NEURODEGENERATIVE DISEASE RESEARCH, 2018b).

A proteotoxicidade é um outro importante aspecto comum nas DNs, ou seja, o acúmulo de proteínas insolúveis que acarreta em morte neuronal. Este acúmulo ocorre em diferentes regiões do cérebro e com diferentes tipos de proteínas como a β -amiloide, no caso da DA, ou α -sinucleína, no caso da DP, mas desencadeiam citotoxicidade semelhante, via estresse oxidativo ou neuroinflamação (THIBAudeau, 2018).

O estresse oxidativo é o resultado do desbalanceamento entre a produção e a degradação de espécies reativas de oxigênio (ERO) e de nitrogênio (ERN) e pode ser relacionado com disfunções mitocondriais, comuns nas DNs. Este desequilíbrio desempenha um importante papel no desenvolvimento de várias DNs. Para combatê-lo nosso organismo conta com uma complexa maquinaria celular, tendo como um dos sistemas de defesas mais importantes o conjunto fator nuclear eritroide relacionado ao fator 2 – elemento de resposta antioxidante (Nrf2-ARE). A via antioxidante Nrf2-ARE tem sido bastante estudada como um alvo terapêutico, sua ativação leva a resultados antioxidantes muito expressivos (IZUMI, 2018).

Ao nível citoplasmático, o Nrf2 encontra-se ligado a uma proteína chamada kelch-like ECH-associado à proteína 1 (Keap1) e esse complexo, Keap1/Nrf2 é a forma inativa do Nrf2. Uma vez ativado por fosforilação, o Nrf2 se desconecta de Keap 1 e, já na forma livre, é translocado ao núcleo das células, onde reconhece ARE, uma região específica do DNA, e inicia a expressão gênica de proteínas desintoxicantes, antioxidantes e anti-inflamatórias (FIGURA 2, pg. 21) (SILVA, 2018c). A ativação de Nrf2 desempenha papéis importantes nas DNs como o aumento da produção e liberação de glutatona (GSH), um poderoso antioxidante e importante no tratamento da DP e a inibição da glicogênio sintase-3 β cinase (GSK-3 β), enzima superexpressa na DA, responsável por modular a morte neuronal programada (apoptose) (MCBEAN, 2017; SALAZAR, 2006).

Figura 2 - Mecanismo de indução de Nrf 2 por substâncias aceptoras de Michael. (a) – Nrf 2 não liberado segue para degradação. (b) – Nrf 2 livre após reação de Michel com Keap 1 ou por indução da fosforilação de Nrf 2 e consequente translocação nuclear.



Fonte: Adaptado de (SILVA, 2018c).

1.2 DOENÇA DE ALZHEIMER

A DA é a principal causa de demência na população mundial com mais de 65 anos (BELLOZI, 2019; VIEGAS, 2004) e, em 2015, segundo a *Alzheimer's Disease International*, houve o registro cerca de 46,8 milhões de pessoas com DA no mundo, com custos globais de tratamento que chegam a cerca de 800 bilhões de dólares. Estimativas apontam que em 2030 teremos 63% da população idosa no mundo com DA, exigindo gastos que ultrapassarão 1 trilhão de dólares (PRINCE, 2015).

A DA é uma desordem neurológica normalmente relacionada à idade, que acarreta perda de memória, mudanças de personalidade e comportamento, e declínio na capacidade de raciocínio, funções motoras e executivas, variando de indivíduo para indivíduo. As desordens cerebrais características da DA são decorrentes da perda de conectividade interneuronal, além da morte massiva de neurônios, principalmente em áreas como o córtex frontal e o hipocampo (VIEGAS, 2005a). A DA se inicia com uma série de eventos em nível molecular, que acarreta em um descontrole de produção e funcional de diferentes sistemas neurotransmissores, principalmente no sistema colinérgico, causando os efeitos cognitivos e psiquiátricos característicos da doença (ROSINI, 2008). O déficit de acetilcolina (ACh) é uma resposta, principalmente, à perda de neurônios colinérgicos e a presença de níveis

anormais de acetilcolinesterase (AChE) nas fendas sinápticas, enzima que hidrolisa a ACh em colina e acetato (BARAI, 2018; ISLAM, 2016).

A agregação e depósito de fragmentos de peptídeo β -amiloide (β A) no meio extracelular neuronal é atualmente aceita como uma das principais causas de instalação da DA. Por uma disfunção ainda não muito bem esclarecida, enzimas como secretases β e γ podem clivar a proteína percussora de amiloide (APP), gerando peptídeos β A₁₋₄₀ e β A₁₋₄₂ que possuem alta capacidade de agregação, produzindo protofibrilas insolúveis, responsáveis pela instalação de um processo inflamatório, dentre outros efeitos patológicos. Estudos sugerem que oligômeros β A se difundem no parênquima cerebral e alteram a função sináptica, com perdas neuronais seletivas no córtex e hipocampo, regiões caracteristicamente acometidas na DA (HAASS, 2007; TAROZZI, 2010b; VIEGAS, 2011). Dentre os mecanismos de toxicidade mediados por peptídeo β A está a desregulação entre produção e consumo de ERO que, em parte, tem influência na morte neuronal. Estudos apontam que ERO são oriundas de interações diretas com metais e indiretas com a cadeia de transporte de elétrons das mitocôndrias, acarretando uma desregulação na atividade das secretases, induzindo a produção de β A e criando ciclo complexo de eventos interconexos que reforçam o estresse oxidativo e a morte neuronal, com o conseqüente agravamento do quadro clínico da DA (TAROZZI, 2010a; ZHAN, 2019).

O processo inflamatório cerebral tem um papel muito importante na patologia da DA, com envolvimento de vários mediadores inflamatórios, como citocinas, quimiocinas e proteínas complementares, influenciando a formação das placas senis. A presença das placas senis no cérebro acarreta na ativação de micróglia com a conseqüente instalação de um processo inflamatório, principalmente mediado por interleucinas (IL)-1 e IL-6, TNF- α (fator de necrose tumoral α) e ciclooxigenases-1 e 2 (COX-1 e COX-2). Desta forma, a inflamação acarreta um *feedback* positivo, estimulando um aumento na expressão de APP e na formação de novas placas senis (DIAS VIEGAS, 2018; REALE, 2012; WALSH, 2004).

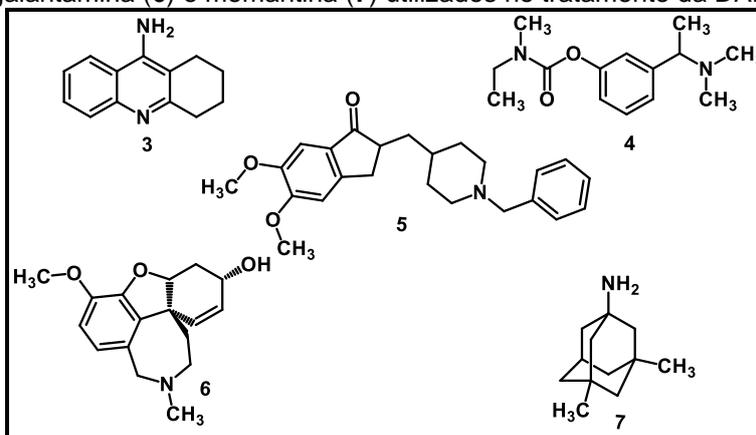
A proteína tau desempenha um papel fundamental na estabilização da estrutura de microtúbulos. Estas proteínas, em estado fisiológico, são fosforiladas e absorvidas. Entretanto, na DA, ocorre um processo de hiperfosforilação da proteína tau, desestruturando os microtúbulos e a liberação de fragmentos insolúveis desta proteína, que forma enovelados fibrilares insolúveis, se depositando intracelularmente

e reforçando o processo neurotóxico e neuroinflamatório. (CHUKWU, 2018; JIANG, 2007; MI, 2006).

Substâncias inibidoras de AChE como a tacrina (**3**), rivastigmina (**4**), donepezil (**5**) e a galantamina (**6**) (FIGURA 3, pg. 24) constituem, o restrito arsenal terapêutico disponível para o tratamento de DA, sendo que a tacrina foi descontinuada em vários países por sua hepatotoxicidade (DELGARZIA, 2003; MOHAMED, 2016; PAULA, 2009). Pelo seu mecanismo de ação, estes fármacos tem a capacidade de aumentar a concentração de ACh na fenda sináptica pela inibição de sua enzima de regulação e, portanto, melhorar capacidades cognitivas, de raciocínio e o retardo do déficit cognitivo relacionado a doença. A galantamina (**6** FIGURA 3, pg. 24), um composto de origem natural, foi a primeira substância de ação dupla aprovada pela (*Food and Drug Administration*) FDA (2001), apresentando um potente perfil inibidor de AChE e também efeito agonista dos receptores nicotínicos do neurônio pré-sinápticos, induzindo a liberação de ACh na fenda sináptica. (SAMADI, 2010; SILVA, 2018b; VIEGAS, 2005b).

A memantina (**7**, FIGURA 3, pg. 24) é o mais recente fármaco aprovado contra a DA (2003) e é também a primeira substância de uma nova classe terapêutica que atua nos receptores de glutamato. Na terapêutica, é indicada a pacientes em estágios moderados e avançados da doença (ARAÚJO, 2006). Seu mecanismo de ação singular é devido ao seu efeito antagonista não-competitivo de receptores *N*-metil-*D*-aspartato (NMDA) de glutamato. Este receptor, quando estimulado em excesso, leva a ativação de neurônios pós-sinápticos, levando a um aumento no influxo de Ca^{2+} nas mitocôndrias, com alterações em suas funções, além da produção de fatores pró-apoptóticos e, por fim, à morte neuronal (BAJIC, 2016).

Figura 3 - Estruturas químicas dos fármacos tacrina (**3**), rivastigmina (**4**), donepezil (**5**), galantamina (**6**) e memantina (**7**) utilizados no tratamento da DA.



Fonte: do autor.

1.3 DOENÇA DE PARKINSON

A DP é a segunda doença neurodegenerativa mais incidente no mundo, perdendo apenas para a DA, segundo relatório da organização mundial de saúde publicado em 2006. O número de casos de DP no mundo variam entre 10-14 casos para cada 100.000 pessoas (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2006), porém, recentemente a organização *Parkinson's Foundation* publicou um estudo que apontou em 2010 uma incidência de DP de 572 casos para cada 100.000 estadunidenses (MARRAS, 2018). Essa mesma instituição estima que hoje são mais de 10 milhões de pessoas com DP no mundo, só nos EUA os custos atribuídos aos portadores de DP chegam a 25 bilhões de dólares por ano (PARKINSON'S FOUNDATION, 2018).

Clinicamente, a DP é caracterizada por tremores em repouso, rigidez articular, dificuldade no processo de caminhar e instabilidade postural. Patologicamente observa-se perda neuronal na substância negra (SN) do encéfalo, o que acarreta na diminuição da produção de dopamina. Apesar da presença de disfunção mitocondrial, neuroinflamação, estresse oxidativo e processos de apoptose estarem envolvidos na perda progressiva de neurônios dopaminérgicos o mecanismo da DP ainda não é completamente compreendido (ZHAO, 2017).

A dopamina é um neurotransmissor importante no processo de controle motor. Está envolvida no controle dos movimentos, da rigidez muscular, nos estímulos musculares e na compensação muscular. Na patogênese da DP, a morte de neurônios dopaminérgicos promove a queda nos níveis de dopamina e conseqüentemente acarreta efeitos motores como tremores em repouso, dificuldade de locomoção e perda de rigidez postural e efeitos não motores como depressão, constipação e distúrbios comportamentais (CHEN, 2018a; DAUER, 2003).

A monoamina oxidase-B (MAO-B) e o processo de recaptação pré-sináptica de dopamina, são as principais vias de diminuição dos níveis de dopamina na fenda sináptica, sendo que MAO-B desempenha o papel de degradar a dopamina remanescente na fenda sináptica. Uma possível inibição de MAO-B pode acarretar no aumento significativo das concentrações de dopamina, e possivelmente, auxiliar no déficit dopaminérgico da DP (POEWE, 2017).

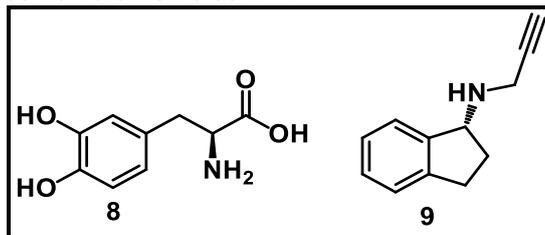
Observando-se usuários de drogas de abuso que desenvolviam quadros clínicos semelhantes a DP, descobriu-se que a inibição do complexo I das mitocôndrias acarretava em depleção do volume da SN e acúmulos de proteínas como

α -sinucleína e ubiquitina no cérebro, além do aumento da formação de ERO e sua consequente neurotoxicidade (LIN, 2006). O complexo I da mitocôndria desempenha um papel importante na recuperação e oxidação do NADH no ciclo de respiração celular, ou seja, atua diretamente em reações de oxidação e redução (GUERRERO-CASTILLO, 2017).

A proteína α -sinucleína é uma proteína presente normalmente nos neurônios. Em estado fisiológico essa proteína é encontrada na forma monomérica e tem a habilidade de interagir com a ATP sintase, nome dado a classe de enzimas responsáveis pela síntese do ATP, e aumenta significativamente a eficiência da síntese de ATP (LUDTMANN, 2016). Porém, por motivos ainda não muito bem determinados, no quadro fisiopatológico da DP a α -sinucleína desempenha um papel importante na doença, ela é a principal constituinte dos chamados corpos de Lewy, aglomerados proteicos insolúveis encontrados em meio ao tecido cerebral de pacientes com DP (LIN, 2006). Estudos recentes demonstram que os corpos de Lewy podem interagir de diferentes formas com a mitocôndria, podendo interferir da síntese de ATP e em processos de formação de ERO. Foi também constatado que os agregados de α -sinucleína podem induzir a produção de ERO por *via* não enzimática, além de induzir a morte celular de neurônios (LUDTMANN, 2018).

Os tratamentos para DP podem ser diferenciados em tratamentos farmacológicos e não farmacológicos. Tratamentos não farmacológicos envolvem uma série de modificações no estilo de vida do paciente como melhora da alimentação, com adição de alimentos conhecidamente antioxidantes e início de uma rotina de exercícios físicos e fisioterapia, afim de diminuir a deterioração muscular dos mesmos (XU, 2010; YANG, 2015). Já os tratamentos farmacológicos envolvem, principalmente, alvos moleculares relacionados com o aumento dos níveis de dopamina no SNC, como o uso do precursor de dopamina L-dopa (**8**). Fármacos também podem atuar em alvos moleculares não dopaminérgicos, como a rasagilina (**9**) que é um inibidor irreversível de MAO-B e visa o combate do estresse oxidativo (FIGURA 4) (POEWE, 2017).

Figura 4 - Estruturas químicas dos fármacos L-dopa (8) e rasagilina (9), utilizados no tratamento da DP.



Fonte: do autor.

No Brasil, desde 2012 é adotado um protocolo geral para tratamento da DP. Este documento traz como fármaco de primeira escolha a levodopa (L-dopa, 8), visando a diminuição dos tremores e espasmos musculares, um dos primeiros sintomas da doença (BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2010). A L-dopa, uma vez em nosso corpo, é rapidamente metabolizada pela enzima dopa-descarboxilase resultando na biossíntese da dopamina. A L-dopa é coadministrada com α -metildopa-hidrazina (Carbidopa) que é um inibidor periférico de descarboxilase incapaz de atravessar a barreira hematoencefálica, que atua inibindo as descarboxilases periféricas e garantindo que a L-dopa atinja altas concentrações no SNC (DOUSA, 2003). O tratamento com L-dopa não é tão simples, considerando que cada paciente responde de maneira distinta às diferentes doses do medicamento, leva-se tempo para encontrar a dosagem e a rotina de tratamento individualizada. O tratamento prolongado com L-dopa pode levar a efeitos colaterais graves como psicose, dependência e alguns efeitos cognitivos (COOLS, 2006). Recentemente dados genéticos e bioquímicos sugerem que na presença de altos níveis de dopamina, a concentração de α -sinucleína aumenta, bem como a tendência à autoagregação e formação de oligômeros. Esses oligômeros podem induzir a morte celular, fato esse que pode explicar o aparecimento do déficit cognitivos com o uso prolongado da L-dopa. (LUDTMANN, 2018).

Em 2017 o ministério da saúde adicionou ao protocolo de tratamento para DP, de 2010, o uso da rasagilina (FIGURA 4, pg. 26), está é indicada para tratamento de DP de origem idiopática podendo ser administrada sozinha ou em associação com L-dopa (BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2010). A rasagilina é um inibidor irreversível de MAO-B de segunda geração, sua eficácia terapêutica é evidente, porém, assim como a L-dopa, exige uma atenção com o regime de tratamento empregado em cada paciente e apresenta seus melhores resultados quando associada a L-dopa (MÍNGUEZ-MÍNGUEZ, 2013).

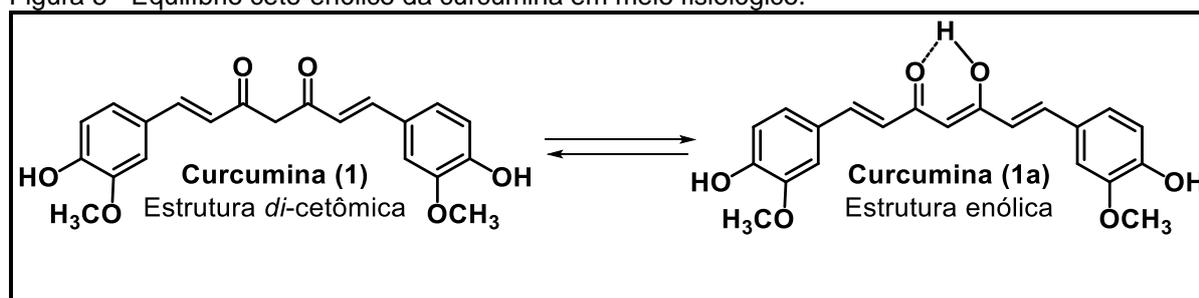
1.4 CURCUMINA

A curcumina (**1**) é um composto dicetônico, isolado a partir do rizoma de *Curcuma longa*, comum no continente indiano, que esteve sob investigação clínica quanto a diferentes atividades biológicas (AMIN et al., 2015; PARK et al., 2013). Relatos na literatura mostram que a curcumina tem propriedades antioxidante, anti-inflamatória e neuroprotetora (STRIMPAKOS, 2008). Estudos mostram que a curcumina é capaz de modular diferentes vias de sinalização envolvidas no desenvolvimento e agravamento dos quadros de DNs (AKINYEMI, 2017; AWASTHI, 2018; YIN, 2010). No entanto, a curcumina pode ser facilmente metabolizada e tem baixa biodisponibilidade, devido à estrutura dicetônica (WU, 2015).

1.4.1 A Química da Curcumina

Em meio fisiológico a curcumina (**1**) encontra-se em equilíbrio ceto-enólico (FIGURA 5, pg. 28), sendo estabilizada por ligação de hidrogênio intramolecular quando em sua forma enólica (**1a**), enquanto em forma cetônica apresenta pontos aceptores de ligação de hidrogênio intermolecular com os oxigênios dos grupos carbonílas (STRIMPAKOS, 2008).

Figura 5 - Equilíbrio ceto-enólico da curcumina em meio fisiológico.

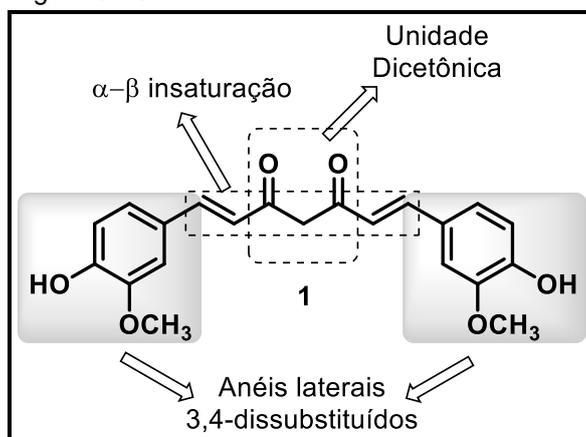


Fonte: do autor.

Estudos com a curcumina e derivados demonstram que suas estruturas moleculares apresentam características importantes para suas atividades biológicas observadas (FIGURA 6) (BAUM, 2004). A unidade dicetônica e o padrão de substituição 3,4 dos anéis aromáticos apresentam importante contribuição para atividade quelante de metais e consequente inibição da formação de ERO e de fator nuclear kappa B (NF- κ B) (BAUM, 2004). Os anéis 3,4-dissubstituídos apresentaram

características farmacofóricas, sendo o padrão natural da curcumina, 4-hidróxi 3-metóxi foi indispensável para atividade antioxidante, como foi reportado recentemente na literatura e corroborado com resultados obtidos neste trabalho (DIAS, 2017). Por fim, as insaturações α,β -carbonílicas, caracteristicamente presentes nas chalconas são também subunidades farmacofóricas para a atividade indutora de Nrf2, uma vez que o carbono β da insaturação é um sítio aceptor de Michael, reação presente no processo de indução de Nrf2, tanto *via* inibição de Keap1 quanto na indução da liberação do Nrf2 *via* fosforilação do mesmo (SILVA, 2018c).

Figura 6 - Sítios funcionais da curcumina



Fonte: Do autor.

1.4.2 Alvos moleculares da curcumina nas doenças NDs

A curcumina foi descrita na literatura como um composto capaz de agir em diferentes alvos moleculares e, conseqüentemente, modular diferentes aspectos nas doenças neurodegenerativas (MONROY, 2013).

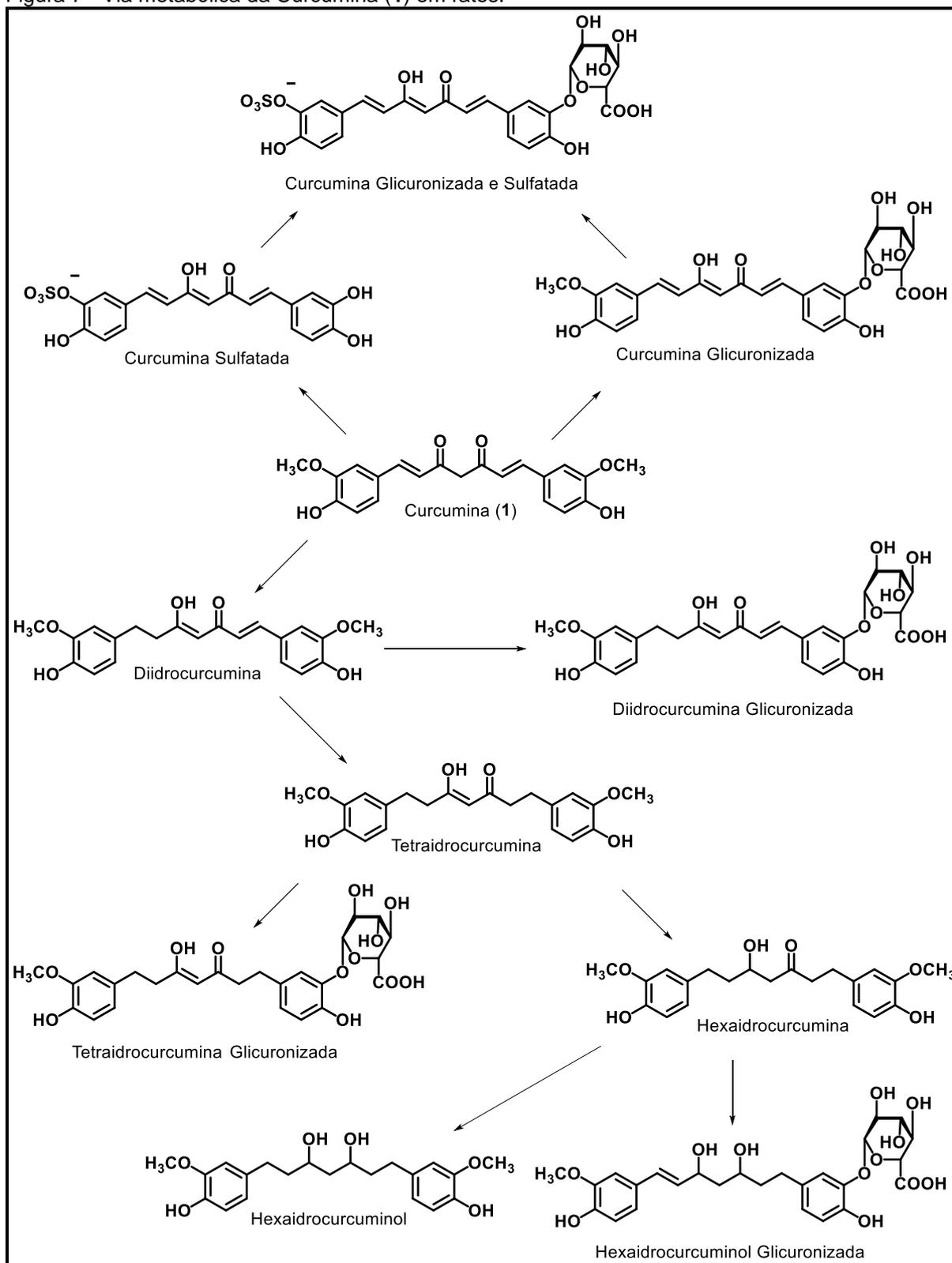
A curcumina apresenta atividade sobre alvos comuns a diferentes DNs e alvos específicos. Quando olhamos as DNs de forma geral são, geralmente, observados quadros graves de estresse oxidativo. A curcumina foi capaz de desencadear um potente efeito antioxidante em culturas de *Drosophila* o qual pode estar relacionado com possível ativação de Nrf 2 (CHEN, 2018b). Além do efeito antioxidante também foi observado efeito quelante de metais, principalmente cobre e ferro, metais normalmente encontrados em altas concentrações em DNs (BAUM, 2004). Por fim, a curcumina tem efeito anti-neuroinflamatório descrito em culturas de células da glia, quadro que também está presente em todas as DNs conhecidas (YU, 2018).

Além de alvos comuns a curcumina também mostrou-se capaz de agir em alvos específicos de DP e DA. No caso da DA foi capaz de atuar na inibição da formação de aglomerados de proteína β -amiloide e na supressão de marcadores genéticos que são responsáveis pela síntese de AChE (AKINYEMI, 2017; AWASTHI, 2018; ORTECA, 2018). Nos quadros da DP a curcumina demonstrou-se eficaz na prevenção da formação dos corpos de Lewis pela inibição da expressão de genes que ativam a produção de α -sinucleína, bem como, a formação de seus aglomerados e também auxiliou no aumento dos níveis de dopamina devido ao efeito neuroprotetor de neurônios dopaminérgicos expostos a estresse oxidativo (MYTHRI, 2012; OLIVERI, 2019; SANG, 2018).

1.4.3 Limitações no uso terapêutico da curcumina

Sabidamente a curcumina (**1**) apresenta importantes propriedades farmacológicas, entretanto alguns problemas são observados quando esta é utilizada em estudos *in vivo*. Os principais desafios a serem vencidos estão relacionados à sua baixa taxa de absorção, distribuição tecidual limitada, rápida metabolização e, conseqüente, baixo tempo de meia vida (ANAND, 2007; LI, 2015a). A absorção da curcumina (**1**) quando administrada *via* oral é lenta, pela dificuldade de absorção no trato gastrintestinal e sua estrutura sofre metabolismo de primeira passagem, fato este que leva a uma drástica diminuição de sua concentração sanguínea (FIGURA 7, pg. 31). Esse aspecto limita o uso da curcumina (**1**) como agente terapêutico (IRESON, 2002; LI, 2015b).

Figura 7 - Via metabólica da Curcumina (1) em ratos.



Fonte: Adaptado de (BELKACEMI, 2011)

1.5 RESVERATROL

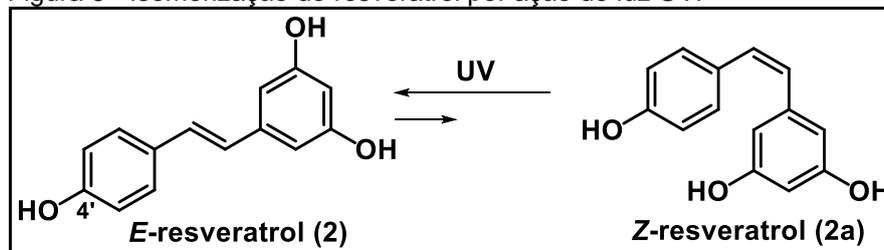
O resveratrol (**2**) foi isolado a primeira vez por Takaoka e colaboradores, das raízes do *Hellebore* branco em 1939, desde então tem sido encontrado em uvas, vinhos, amendoim, amoras, pinheiros e outras fontes naturais. Estudos têm demonstrado uma atividade de citoproteção em doenças cardíacas, metabólicas e neurodegenerativas (XU, 2015). Nos últimos anos, diversas propriedades biológicas relevantes para tratamento de DNAs estão sendo atribuídas ao resveratrol (**2**) e seus derivados sintéticos, tais como anti-inflamatória, antioxidante e anti-proteogregante (JARDIM, 2018; ZHENG, 2018).

1.5.1 A Química do Resveratrol

O resveratrol (**2**) (3,4',5-triidroxestilbeno $C_{14}H_{12}O_3$), é um derivado do resorcinol, que foi isolado pela primeira vez de uma planta japonesa, *Veratrum grandiflorum*, ele está presente na natureza na forma *E* e *Z*, sendo que a forma *E* é a mais estável e conseqüentemente a mais abundante (AGGARWAL, 2004). Apesar de apresentar certa estabilidade natural e não ser uma molécula lábil o resveratrol (**2**) é susceptível a isomerização induzida por luz ultravioleta (UV), sendo que 80% das moléculas do isômero *Z* em solução são convertidas ao isômero *E* em apenas 1 hora sob luz UV (FIGURA 8) (NEVES, 2012).

A atividade biológica do resveratrol foi atribuída, principalmente, à insaturação *E* e à presença do grupo hidróxila na posição 4', fato este que está atrelado aos híbridos de ressonância do resveratrol, enquanto as hidróxilas nas posições 3 e 5 são menos reativas (CAI, 2003; CAO, 2003; MATSUOKA, 2002; OHGUCHI, 2003).

Figura 8 - Isomerização do resveratrol por ação de luz UV.



Fonte: do autor.

1.5.2 Alvos moleculares do Resveratrol como agente neuroprotetor

Recentemente o resveratrol (**2**) tem sido descrito como uma molécula bastante versátil no tratamento de DNs, atuando em diferentes pontos do desenvolvimento fisiopatológico da doença (BASTIANETTO, 2015; REGE, 2014).

Um dos primeiros efeitos biológicos do resveratrol reportado foi o efeito antioxidante, tendo sido descrito na década de 90. Sua atividade foi atribuída à inibição de MAO-A e quelante de biometais, principalmente o ferro (BELGUENDOUZ, 1997; HAN, 1990). Atualmente sabemos muito a respeito da atividade antioxidante do resveratrol (**2**), este atua ao nível mitocondrial em células neuronais sendo capaz de melhorar o funcionamento da mitocôndria induzindo o processo redox natural da mesma, através da indução da expressão de enzimas antioxidantes mitocondriais (JARDIM, 2018; SÁNCHEZ-MELGAR, 2019).

Em nível de proteotoxicidade o resveratrol não foi capaz de inibir a formação de aglomerados proteicos insolúveis, mas atuou na indução da solubilização de aglomerados β -amiloides em células neuronais. O resveratrol foi capaz de promover o clearance pela ativação seletiva de proteossomas que promovem a degradação do peptídeo β -amiloide (MARAMBAUD, 2005).

Recentemente foi relatada a atividade sinérgica do resveratrol (**2**) com pequenas concentrações de L-dopa frente a modelos *in vivo* de DP. Foram realizados estudos com camundongos transgênicos e os resultados demonstraram que, além das atividades anti-inflamatória e neuroprotetora, a coadministração de resveratrol e L-dopa a 5mg/Kg teve sua atividade equivalente a L-dopa a 8mg/Kg (LIU, 2019).

1.5.3 Limitações no uso terapêutico do resveratrol

Apesar dos bons resultados biológicos e farmacológicos, o resveratrol (**7**) apresenta baixa biodisponibilidade *in vivo*, dificultando que este atinja seu tecido alvo. Apesar de ser rapidamente absorvido, apenas 30% da dose administrada por *via* oral atinge a circulação, uma vez que o restante sofre conjugação com sulfatos e ácido glicurônico ou é metabolizado pela microbiota intestinal, e é rapidamente excretado (BELLINA, 2015; NEVES, 2012).

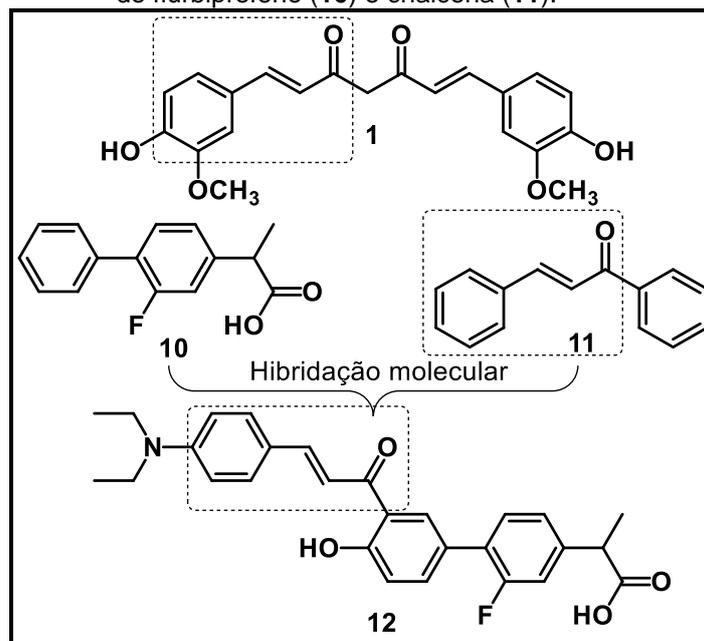
1.6 NOVAS ESTRATÉGIAS NO TRATAMENTO DAS DNs

As DNs são um grupo de doenças com características multifatoriais, envolvendo alterações fisiológicas, bioquímicas e químicas, mediadas por diferentes vias de ativação (CAVALLI, 2008). Existem três estratégias terapêuticas para tratamento deste tipo de patologia: a) a utilização de dois ou mais fármacos, b) a utilização de dois ou mais princípios ativos na mesma formulação ou, c) um só fármaco contendo atributos estruturais que lhe garantam agir em múltiplos alvos concomitantemente. Esta última estratégia é a mais recente, baseada no conceito de polifarmacologia, e que tem despertado o interesse da comunidade científica como um novo paradigma no desenho de moléculas racionalmente planejadas (DIAS, 2014).

Os PNs vêm sendo utilizados como modelos estruturais no planejamento de fármacos contra a DNs já há algum tempo, a exemplo do volume de trabalhos publicados na literatura. A curcumina (**1**) e o resveratrol (**2**) são exemplos de destaque recentes de PNs com potencial ação frente as DNs (FIGURA 1, pg 19), haja visto seus perfis de atividade múltipla já discutidos (LI, 2014; REPOSSI, 2015; SILVA, 2018a; VILLAFLORES, 2012; YIN, 2010).

Recentemente Cao e colaboradores (2018) publicaram a síntese e avaliação da atividade neuroprotetora de compostos planejados a partir do flurbiprofeno (**10**), um anti-inflamatório comercial, e chalconas (**11**), composto natural que apresenta grande semelhança estrutural com a curcumina (**1**) (FIGURA 9, pg. 35). Neste trabalho os autores demonstram híbridos com atividade multialvo para o tratamento da DA, o composto mais ativo **12** apresentou capacidade de inibir a agregação de β -amiloide (78% autoinduzida e 95% induzida por Cu^{2+} a 25 μM), inibição de MAO-A (75% a 10 μM) e MAO-B (48% a 10 μM), atividade quelante de metais e atividade antioxidante (3,3 equivalentes Trolox) (CAO, 2018).

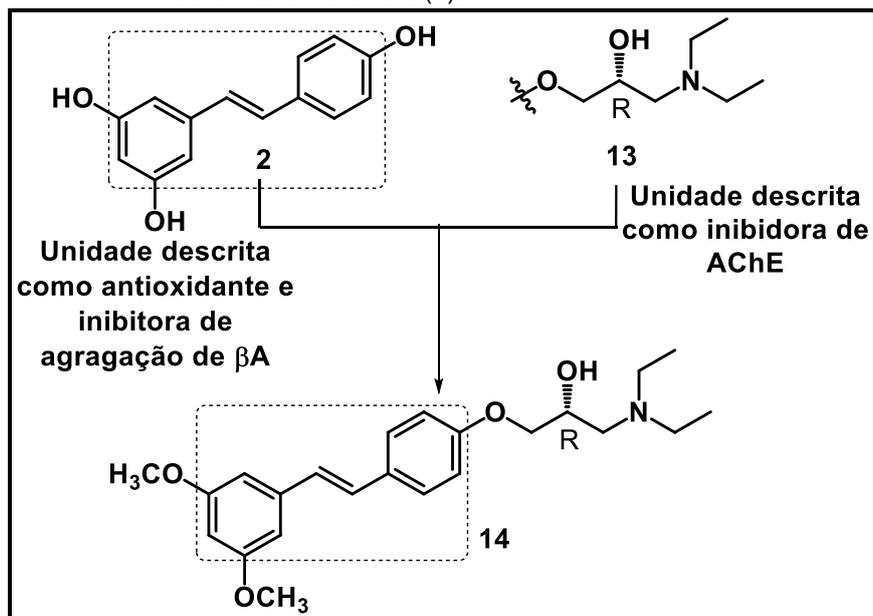
Figura 9 - Planejamento para obtenção do híbrido **12** a partir do flurbiprofeno (**10**) e chalcona (**11**).



Fonte: do autor.

Zheng e colaboradores (2018) publicaram a síntese e avaliações de derivados do resveratrol (**2**) com atividade multialvo para o tratamento da DA. Neste trabalho os pesquisadores sintetizaram derivados do resveratrol específicos para atividade de inibição seletiva de AChE, inibidores de agregação da proteína β A e antioxidante (FIGURA 10, pg. 36). Neste contexto foram sintetizados uma série de compostos onde o mais ativo (**14**) apresentou Cl_{50} para AChE de 24,04 μ M, capacidade de inibir 40 % da agregação de β A à 25 μ M, atividade antioxidante de 1,2 vezes mais potente que o trolox e uma capacidade de neuroproteção de 75% contra neurotoxicidade induzida por peróxido de hidrogênio. Esse perfil de atividade deixou claro o potencial multialvo dos derivados do resveratrol (**2**) (ZHENG, 2018).

Figura 10 - Obtenção do composto **14**, ativo contra DA a partir da estrutura do resveratrol (**9**).



Fonte: do autor.

Considerando os aspectos apresentados este trabalho buscou sintetizar e avaliar compostos híbridos inspirados na curcumina (**1**) e resveratrol (**2**). Foram sintetizadas duas famílias de compostos, uma família de derivados cinâmicos e uma de triazóis, esses compostos foram avaliados quanto a sua capacidade de inibição de AChE, atividade neuroprotetora, antioxidante, quelante de metais e mediadora de proteínas específicas como Nrf 2. Para a família de derivados cinâmicos os resultados obtidos destacaram as moléculas **PQM-161** e **PQM-164** que contemplam atividade antioxidantes diretas e indiretas, inibidora de neurotoxicidade induzida por 6-hidróxidopamina (6-OHDA) α -sinucleína e indutora da produção de GSH por ativação de Nrf2. Enquanto que para a família de triazóis podemos destacar **PQM-233**, que apresentou atividade inibitória de AChE, antioxidante e neuroprotetora contra oligômeros β A.

2 OBJETIVOS

Este trabalho teve por objetivo a síntese de duas famílias de novos compostos planejados por hibridação molecular, uma técnica de planejamento molecular já consagrada que visa a união de duas ou mais estruturas químicas provenientes de moléculas distintas em uma nova estrutura. O objetivo desta técnica é unir em uma nova estrutura as atividades biológicas observadas nas moléculas modelos para a hibridação. No caso deste trabalho a curcumina (**1**) e o resveratrol (**2**) foram os modelos escolhidos por possuírem os efeitos biológicos já descritos anteriormente, o planejamento pode ser observado na FIGURA 11 (pg. 38).

2.1 OBJETIVOS GERAIS

Os objetivos gerais deste trabalho foram:

- a) Síntese de uma série de híbridos moleculares curcumina-resveratrol e avaliação das atividades antioxidante, neuroprotetora e inibitória de AChE (Figura 11, pg. 38) visando identificar compostos bioativos inovadores com perfil multialvo para o futuro tratamento de doenças neurodegenerativas;
- b) investigar a relação estrutura-atividade por modificações no padrão de substituição do anel **B**, subunidade estrutural advinda da curcumina (**1**) e dos anéis **C** e **D**, subunidades provenientes da estrutura do resveratrol (**2**);
- c) investigar a influência de espaçadores distintos *N*-acilidrazônicos ou triazol-*N*-acilidrazônicos (**E** e **F**) na busca por melhor perfil farmacodinâmico.

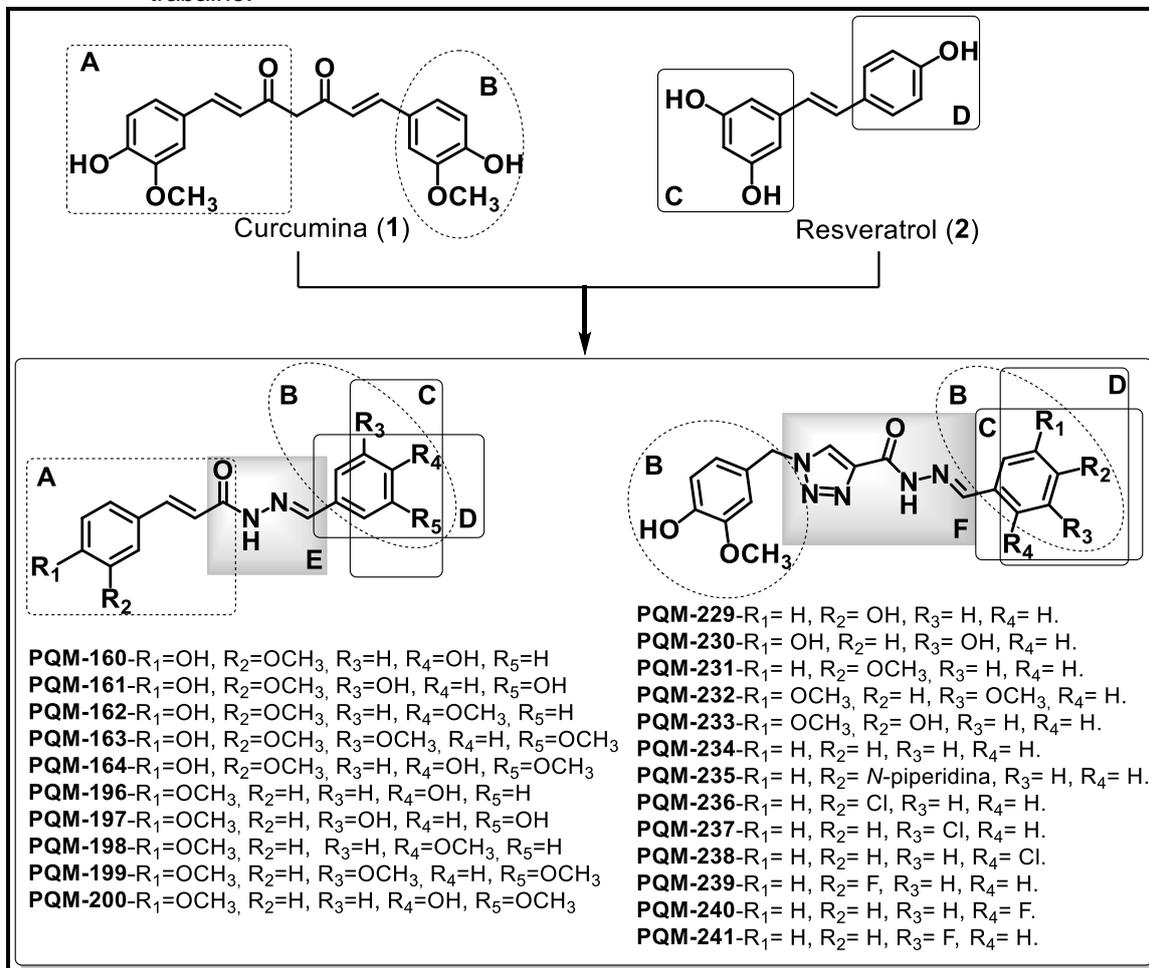
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Os objetivos específicos deste trabalho foram:

- a) Síntese das 2 séries-alvo de derivados híbridos curcumina-resveratrol (FIGURA 11, pg. 38);
- b) avaliação *in vitro* da atividade inibitória de AChE, antioxidante e neuroprotetora das séries-alvo;
- c) avaliação a relação estrutura-atividade na modulação de um perfil de ação multialvo;

- d) estudo de possíveis mecanismos de ação das substâncias mais promissoras;
- e) avaliação preliminar de aspectos relacionados à toxicidade.

Figura 11 - Planejamento por hibridação molecular das famílias das moléculas sintetizadas neste trabalho.



Fonte: do autor.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Esta seção está dividida em três partes. Na primeira é descrita a síntese dos derivados cinâmicos (**PQM 160-164** e **PQM196-200**); na segunda parte é descrita a síntese dos triazóis inéditos (**PQM 229-241**) e, finalmente, na terceira parte são apresentados os resultados referentes aos testes biológicos realizados com as substâncias-alvo sintetizadas.

3.1 QUÍMICA

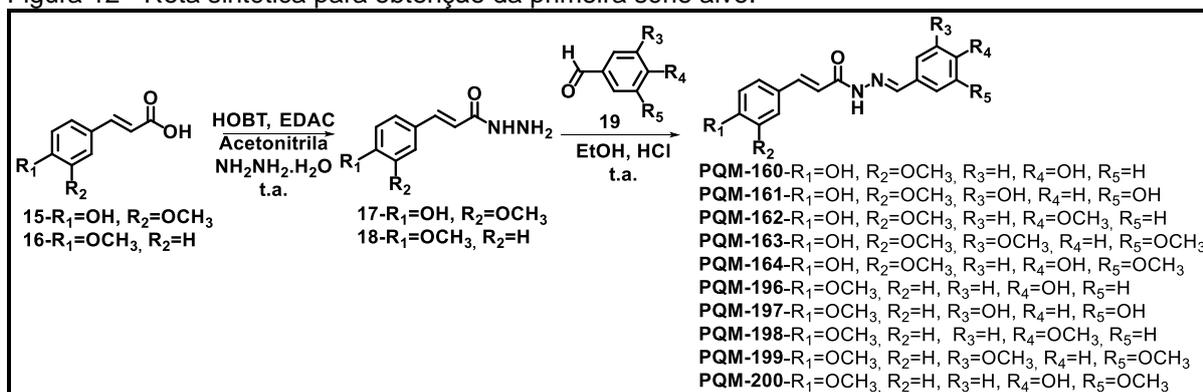
Na série 1 (FIGURA 11, pg. 38) foi utilizada a subunidade **A** e os anéis aromáticos com padrão de substituição semelhantes a **B**, **C** e **D**, o padrão de substituição da subunidade **A** foi modificado para avaliarmos o impacto destes nas atividades biológicas desta série. Como espaçador, estrutura responsável por unir as subunidades hibridizadas, foi escolhido um grupo *N*-acilidrazônico (**E**), uma estrutura descrita como privilegiada por apresentar características auxofóricas bastante relevantes na atividade anti-inflamatória pretendida e na etapa farmacocinética (FRAGA, 2006).

Na série 2 (FIGURA 11, pg. 38) seguimos utilizando os padrões de substituição dos anéis **B**, **C** e **D** como inspiração inicial, nesta série além de anéis semelhantes a **B**, **C** e **D** utilizados na série 1 foram adicionados diferentes substituintes, de acordo com a disponibilidade, a fim de avaliarmos as contribuições auxofóricas das diferentes características físico-químicas e espaciais dos substituintes utilizados. Como espaçador da série 2, foi utilizado o grupo *N*-acilidrazônico acoplado a um anel 1,2,3-triazólico 1,4-dissubstituído (**F**). Esta modificação garante à série 2 uma liberdade conformacional um pouco maior que na série 1 pela presença do carbono *sp*³ entre o anel **B** e o triazol, não muda muito a distância entre as extremidades da molécula e nem adiciona muita massa molar aos compostos, por fim, apesar de ainda possuir uma insaturação α,β -carbonílica, o carbono β carbonílico não apresenta características eletrofílicas como encontrado na série 1, sendo portanto menos reativo comoceptor de adição de Michael, por exemplo.

3.1.1 Série 1: Síntese e dos derivados *N*-acilidrazônicos (PQM-160 a PQM-164 e PQM-196 a PQM-200).

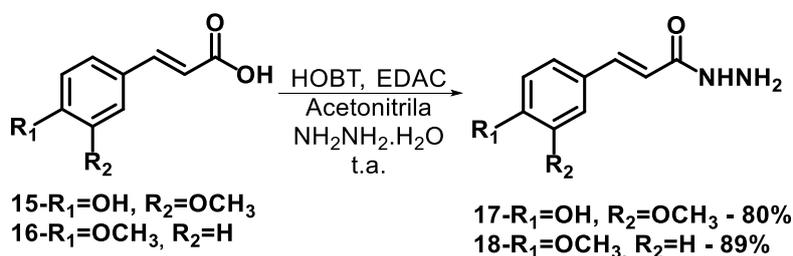
A síntese da série de *N*-acilidrazonas (PQM 160-164 e PQM 196-200) consistiu de duas etapas (FIGURA 12): a) inicialmente o ácido cinâmico comercial (15, ácido ferúlico ou 16, ácido 4-metóxi-cinâmico) foi convertido a um intermediário mais reativo pelo tratamento com *N*-hidróxibenzotriazol (HOBT) e 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida (EDAC) na presença de acetonitrila, gerando a respectiva hidrazida (17 ou 18) com a adição de uma solução de monodrato de hidrazina. b) posteriormente, a hidrazida (17 ou 18) foi submetida a uma reação de acoplamento por catálise ácida com diferentes tipos de aldeídos substituídos (19) para dar origem aos derivados de *N*-acilidrazônicos PQM-160 a 164 e PQM-196 a 200.

Figura 12 - Rota sintética para obtenção da primeira série alvo.



Fonte: do autor.

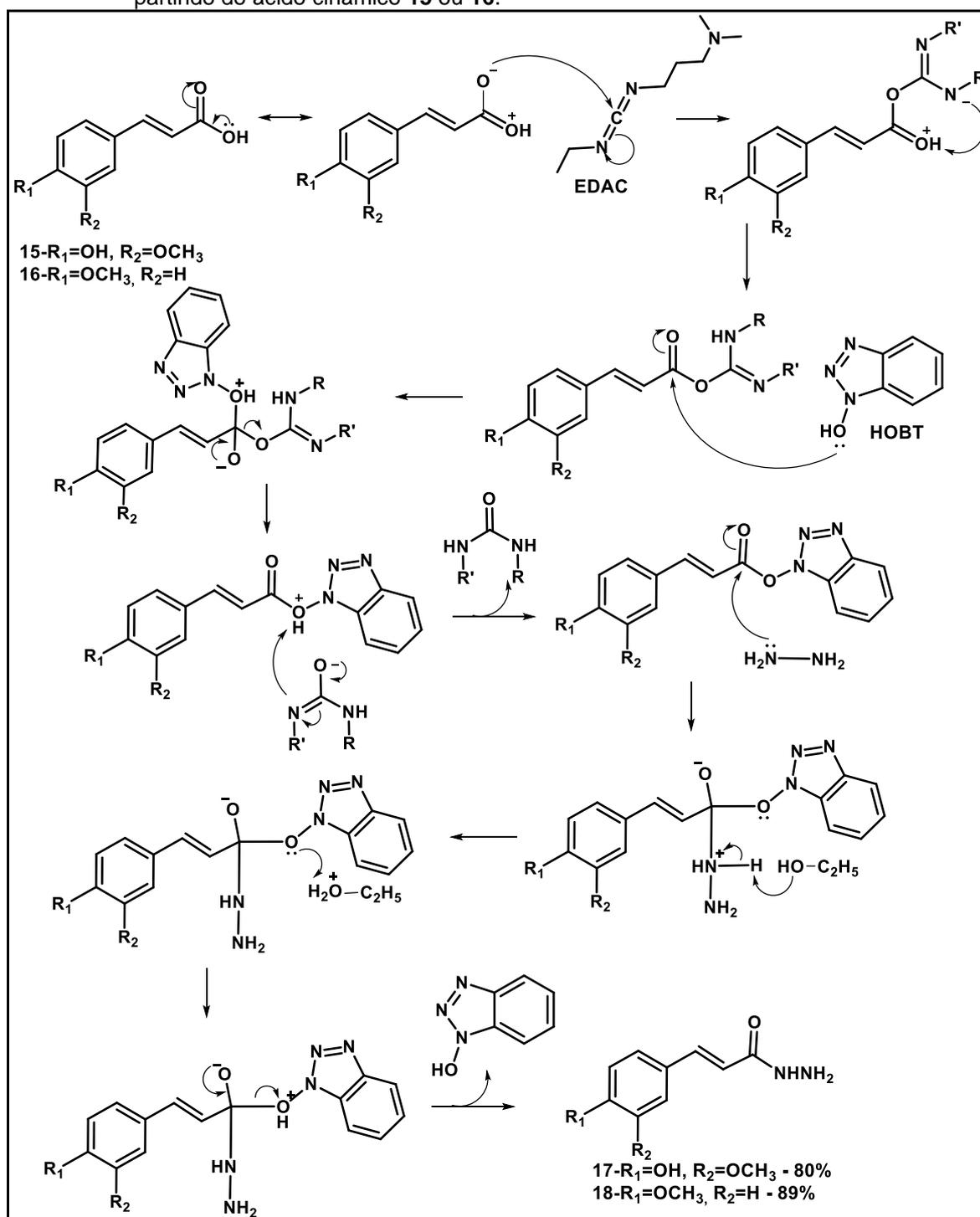
3.1.1.1 Síntese da hidrazida (17 ou 18) a partir do ácido cinâmico (15 ou 16).



A hidrazida (17 ou 18) foi obtida em uma reação *one-pot*, à 25°C, a partir do ácido cinâmico adequado (15 ou 16), convertido a um éster ativado através do seu tratamento com o HOBT e EDAC (FIGURA 13, pg. 41). Este éster é convertido à hidrazida (17 ou 18) por uma reação de adição-eliminação a partir do monodrato de hidrazina adicionado (FIGURA 13, pg. 41) (CARVALHO, 2012). Esta reação é

relativamente rápida, envolvendo uma primeira etapa de aproximadamente 1-1,5 h e a segunda é praticamente imediata. A sequência reacional foi realizada sem isolamento dos intermediários, com a purificação realizada *via* precipitação em solução aquosa saturada de carbonato de cálcio gelada, gerando a hidrazida (**17** ou **18**) com um rendimento de 80% para **17** e 89% para **18**.

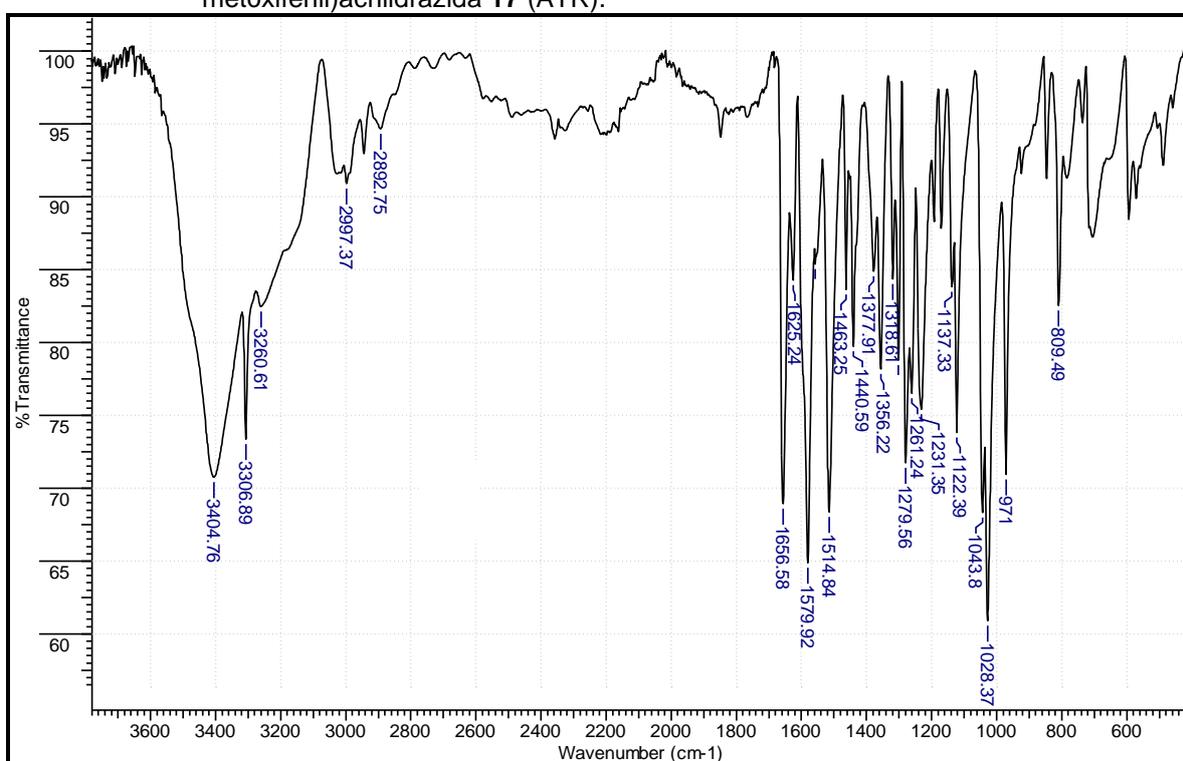
Figura 13 - Proposta mecanística para a reação *one-pot* de obtenção da hidrazida (**17** ou **18**) partindo do ácido cinâmico **15** ou **16**.



Fonte: do autor.

Ambas hidrazidas **17** e **19** foram caracterizadas por espectroscopia no IV, RMN de ^1H e RMN de ^{13}C e Massas de alta resolução. Como exemplo desta caracterização, o espectro na região do IV (FIGURA 14) da substância **17** apresenta 2 bandas de estiramento de N-H em 3404 e 3306 cm^{-1} (NH_2), estiramento de O-H em 3260 cm^{-1} , deformação angular fora do plano de C-H de alcenos em 2997 cm^{-1} , estiramento de C-H sp_3 em 2892 cm^{-1} , estiramento de C=O de hidrazida em 1656 cm^{-1} , estiramento de C=C em 1579 cm^{-1} , deslocamento angular de N-H em 1514 cm^{-1} , deslocamento angular de C-H sp_3 da metila em 1440 cm^{-1} e estiramento de C-O em 1028 cm^{-1} .

Figura 14 - Espectro de absorção na região do infravermelho da (*E*)-3(4-hidróxi-3-metóxi-fenil)acrilidrazida **17** (ATR).

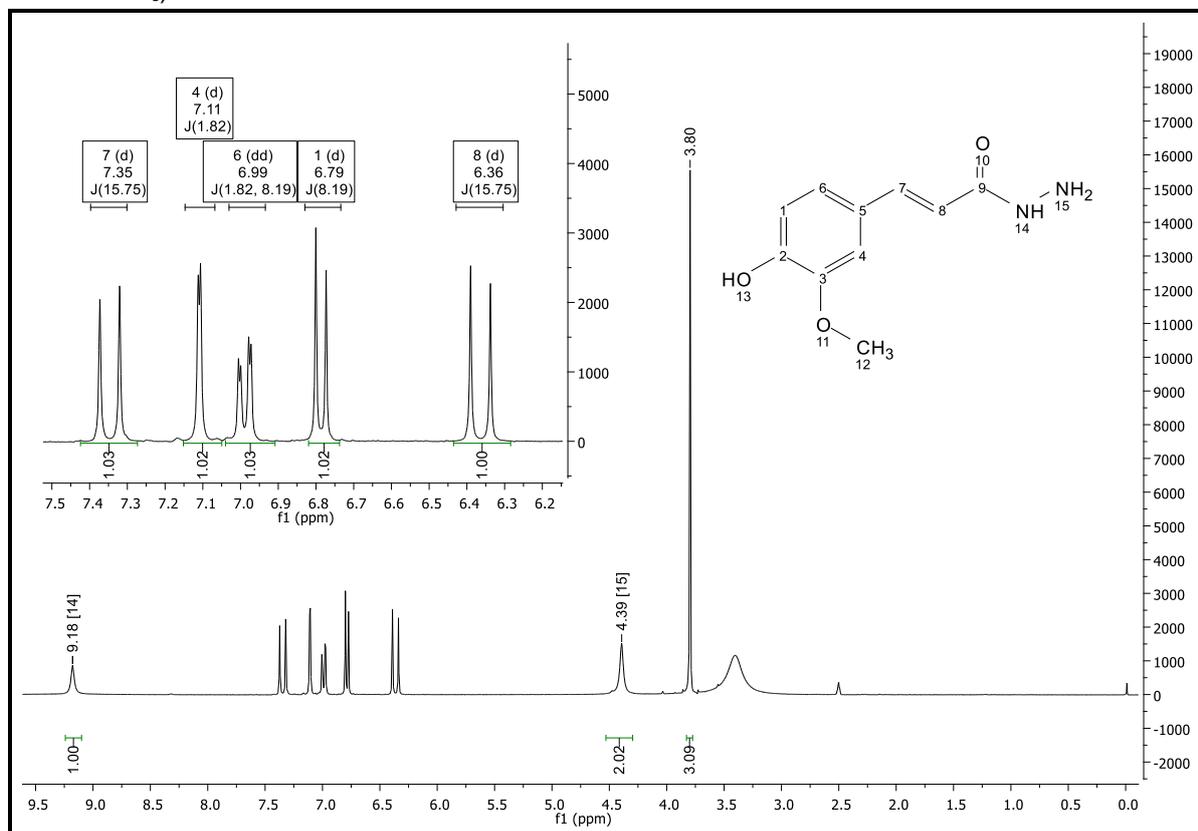


Fonte: do autor.

No espectro de RMN de ^1H (FIGURA 15, pg 43) observou-se a presença dos seguintes sinais: um simpleto em δ 3,80, referente aos hidrogênios da metóxila H-12, além dos dupletos em δ 6,36 e 7,35 (ambos com $J = 15,75$ Hz, 1H) referentes aos hidrogênios da insaturação α e β carbonílica H-8 e H-7, respectivamente, os valores de acoplamento encontrados, próximos a 15,8 Hz é um valor comum para acoplamentos *trans* H-H por meio de uma ligação dupla. Também foram identificados os sinais referentes aos hidrogênios aromáticos em δ 6,79 (*d*, $J = 8,12$ Hz, 1H) referente a H-1; 6,99 (*dd*, $^3J_{6,1} = 1,82$ Hz e $^4J_{6,4} = 8,19$ Hz, 1H) referente a H-6 e 7,11 (*d*, $J = 1,82$ Hz, 1H) referente a H-4, os valores de acoplamento encontrados são

característicos de sistemas aromáticos. Por fim um simpleto em δ 9,18, que pode ser atribuído ao hidrogênio α carbonílico do grupamento amídico H-14, sinal esse que caracteriza o sucesso da conversão do ácido ferúlico na hidrazida **17** (PAVIA, 2015).

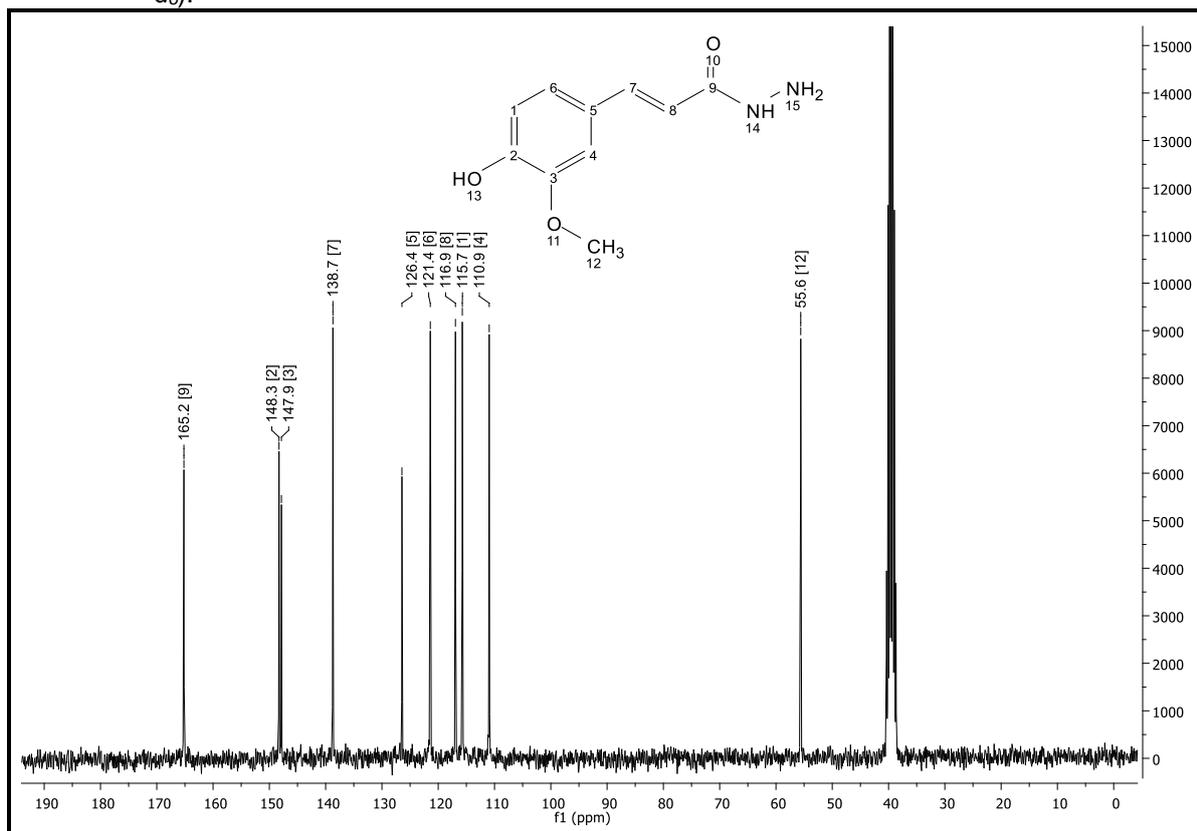
Figura 15 - Espectro de RMN de ^1H da (*E*)-3(4-hidróxi-3-metóxi-fenil)acrilidrazida **17** (300 MHz, DMSO- d_6).



Fonte: do autor.

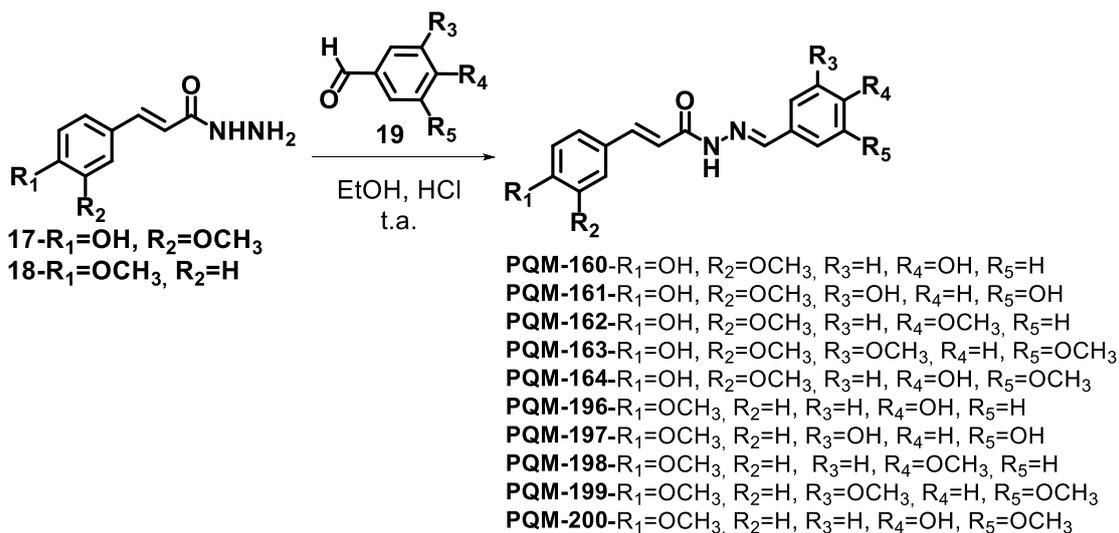
No espectro de RMN de ^{13}C (FIGURA 16, pg 44) podemos observar todos os sinais relativos aos 10 carbonos da estrutura de **17**, com destaque para o sinal em δ 165,2 em região característica de carbonila de amidas (155-185 ppm), referente ao carbono carbonílico de hidrazida, além dos sinais em δ 148,3; δ 147,9; δ 126,5; δ 121,4; δ 115,7 e δ 110,9, referentes aos carbonos do anel e os sinais em δ 138,7 (β) e δ 116,9 (α), referentes aos carbonos da insaturação α,β -carbonílica.

Figura 16 - Espectro de RMN de ^{13}C da (*E*)-3(4-hidróxi-3-metóxi-fenil) acilidrazida **17** (75 MHz, DMSO- d_6).



Fonte: do autor.

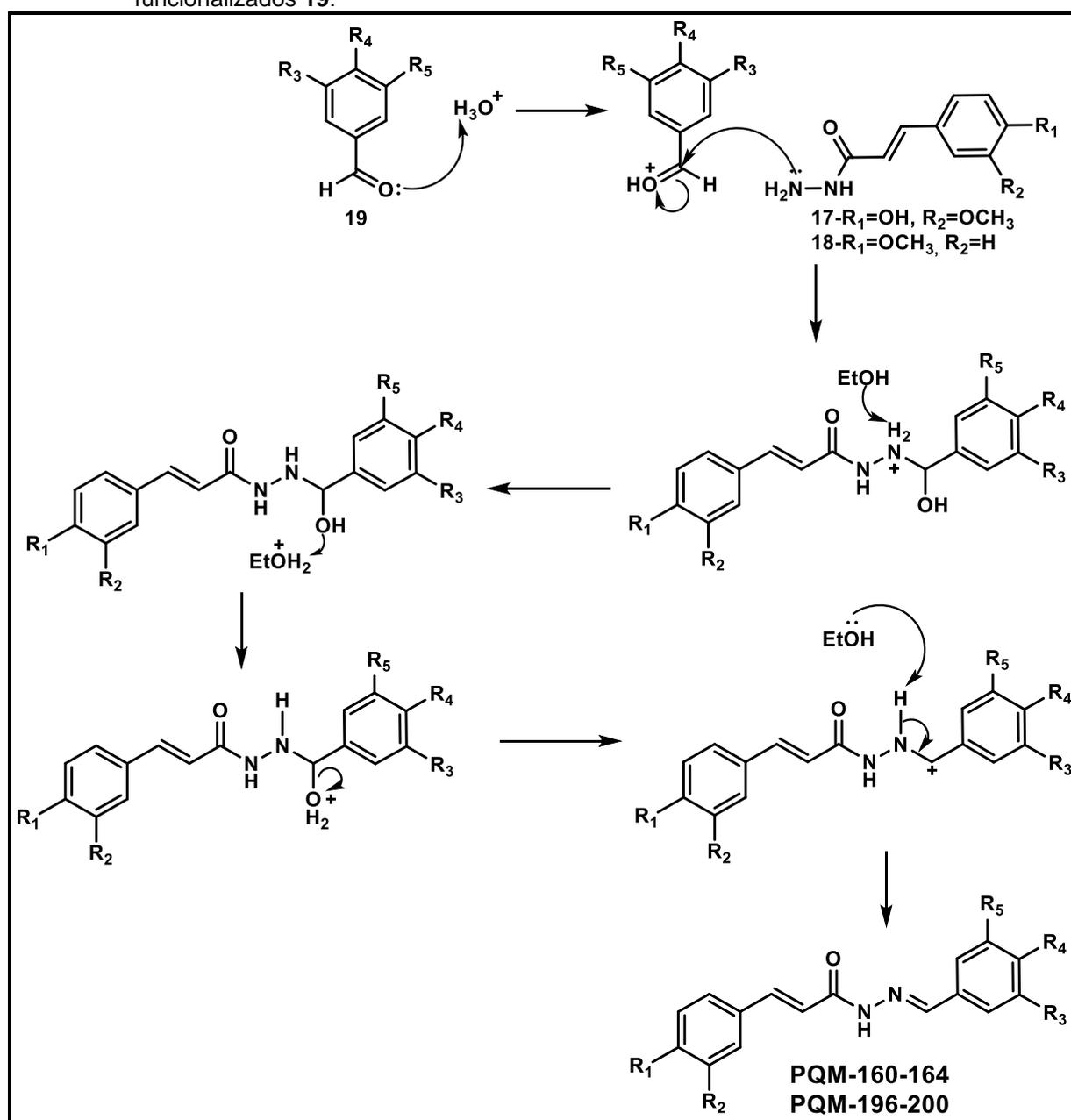
3.1.1.2 Síntese das *N*-acilidrazonas (**PQM-160-164** e **PQM-196-200**).



Esta etapa do trabalho consistiu na obtenção das *N*-acilidrazonas (**PQM 160-164** e **PQM 196-200**). A metodologia empregada foi adaptada de Lima e colaboradores (2000) e utilizou meio ácido para favorecer o acoplamento entre a hidrazida **17** (ou **18**) e os aldeídos funcionalizados **19** (LIMA, 2000). Inicialmente o

ácido clorídrico protona a carbonila do aldeído, tornando-a, assim, mais eletrofílica, o que facilitará o ataque pelo nucleófilo. O par de elétrons do *N* terminal da hidrazida ataca o carbono carbonílico, dando origem a um intermediário protonado, que por prototropismo leva à formação de um intermediário oxônio, que atua como grupo abandonador em uma reação de eliminação para formação da ligação π e consequente formação da função *N*-acilhidrazona de **PQM-160 a 164** e **PQM-196 a 200** (FIGURA 17). Os rendimentos desta etapa sintética foram entre 30-98%, de acordo com o aldeído utilizado, após purificação adequada (TABELA 9, pg. 113).

Figura 17 - Proposta mecanística da reação de acoplamento da hidrazida **17** ou **18** com os aldeídos funcionalizados **19**.

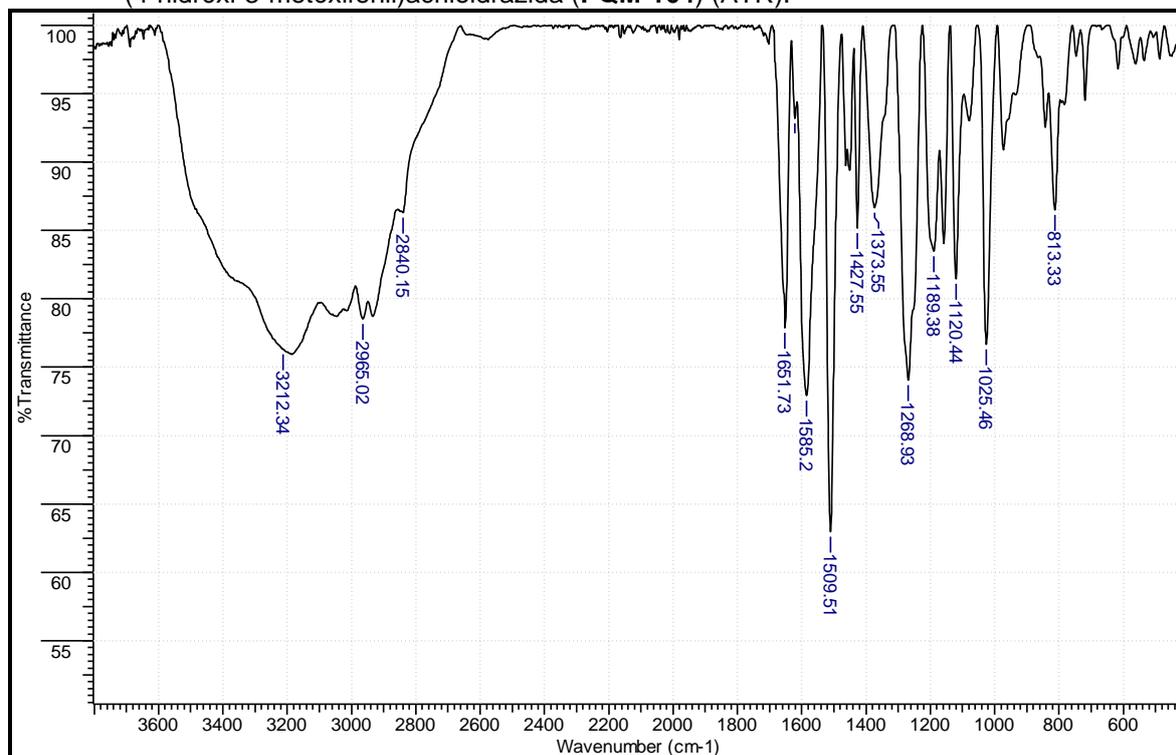


Fonte: do autor.

A caracterização estrutural dos derivados *N*-acilidrazônicos **PQM-160** a **164** e **PQM-196** a **200** foi feita por análise dos dados espectroscópicos de RMN de ^1H e de RMN de ^{13}C , IV e espectrometria de massas de alta resolução. Como exemplo de caracterização para esta série de compostos, será apresentada aqui a caracterização do composto **PQM-164**.

O espectro na região do IV de **PQM-164** (FIGURA 18) apresenta todas as bandas esperadas para a estrutura, dentre elas podemos destacar a banda de estiramento de N-H em 3212 cm^{-1} , estiramento de O-H acima de 2965 cm^{-1} , deformação angular fora do plano de C-H de alcenos em 2965 cm^{-1} , estiramento de C=O de acilidrazona em 1651 cm^{-1} , estiramento de C=C em 1585 cm^{-1} , deformação angular de N-H em 1509 cm^{-1} e estiramento de C-O em 1025 cm^{-1} .

Figura 18 - Espectro de absorção na região do infravermelho da 2-*N*-(4-hidróxi-3-metóxi-benzil)-3-(4-hidróxi-3-metóxi-fenil)acriloidrazida (**PQM-164**) (ATR).



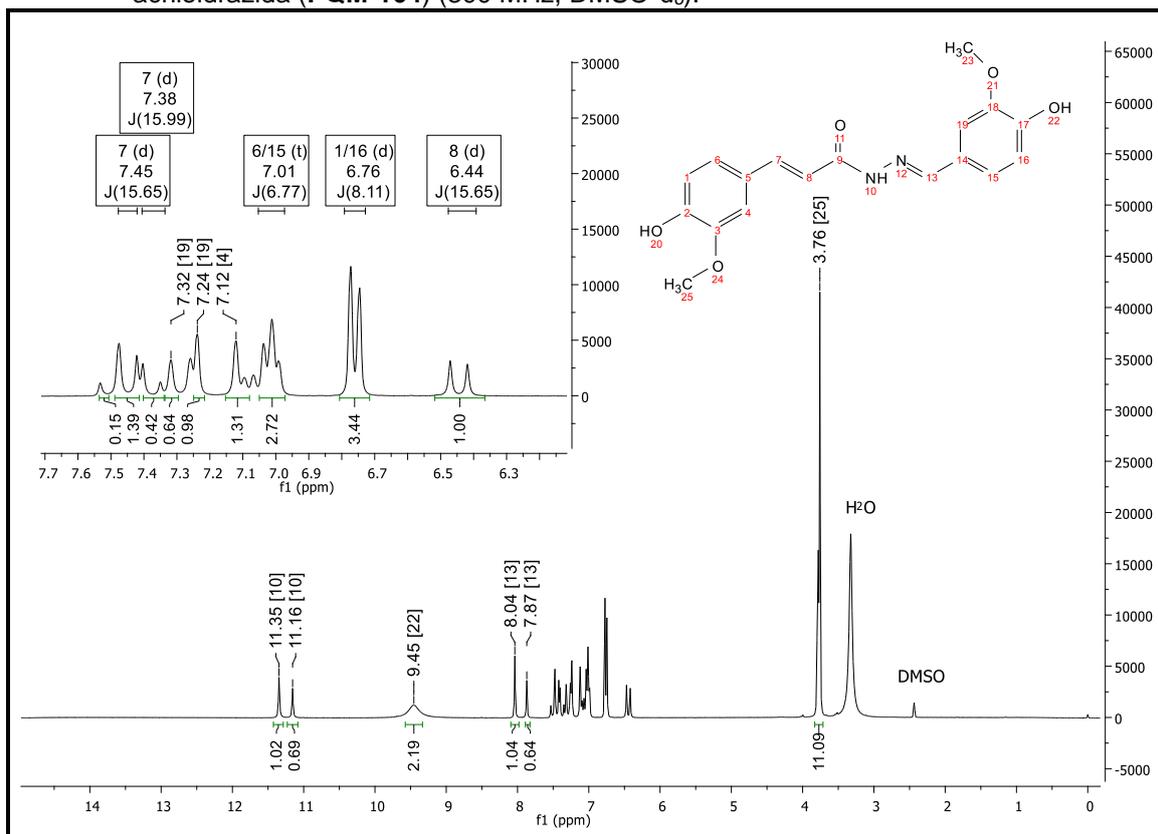
Fonte: do autor.

No espectro de RMN de ^1H (FIGURA 19, pg 48), podemos observar um simpleto em δ 11,35 e 11,16 referentes a H-10 da ligação HN-N, simpletos em δ 8,04 e δ 7,87 referente ao hidrogênio H-13 da ligação N=CH, além dos dupletos em δ 7,45 e 6,44 (ambos com $J=15,65\text{ Hz}$, 1H) referentes aos hidrogênios H-8 e H-7 da instauração α - β carbonílica, respectivamente, o dupletos em 7,38 ($J=15,99\text{ Hz}$, 1H) também pode ser atribuído a hidrogênio H-7 do rotâmero. Os hidrogênios aromáticos

podem ser atribuídos aos simpletos em δ 7,32; 7,24 e 7,12; ao tripleto centrado em δ 7,01 e ao duplete em δ 6,76 ($J=8,11$ Hz, 4H) também foi possível observar um simpleto em δ 3,76 referente aos hidrogênios metoxílicos e os demais sinais relativos aos hidrogênios aromáticos.

É interessante notarmos que aparecem alguns sinais duplicados no espectro de RMN de ^1H , bem como suas integrais não parecem compatíveis com as integrais esperadas para a molécula pura. Na verdade, nota-se que a maioria dos sinais apresentam valores de integrais duas vezes maior que os esperados, o que poderia ser devido ao fato de que a ligação dupla no espaçador *N*-acilidrazônico pode formar isômeros *E* e *Z*. Contudo, a ligação HN-N deste mesmo grupo também apresenta livre rotação, podendo formar um equilíbrio entre os rotâmeros antiperiplanar e *syn*-periplanar, quando em solução. A coexistência de rotâmeros em derivados cinâmicos *N*-acilidrazônicos já havia sido anteriormente descrita por Carvalho e cols. (CARVALHO, 2012). Neste trabalho temos indicativos no espectro de RMN de ^1H que nos sugere a presença de rotâmeros e não isômeros *E* e *Z*. Palla e cols. (1986) realizaram um estudo detalhado quanto ao comportamento conformacional de *N*-acilidrazonas, evidenciando que o sinal de H-10 foi descrito em um deslocamento químico que pode variar de δ 10,67 a 10,43 para o isômero *E* ou variar de δ 14,40 a 14,02 para o isômero *Z*, dependendo do rotâmero formado. Na figura 20, observa-se que **PQM-164** apresenta o hidrogênio H-10 com deslocamento de δ 11,23 e não possui nenhum sinal na próxima a δ 14,0, sugerindo a presença única do isômero *E*. Outro sinal que corrobora a formação do isômero *E* é o do hidrogênio H-13, já descrito em um deslocamento químico que pode variar de δ 8,23 a 8,07 para o isômero *E* ou, pode ou não, ser encontrado em δ 7,12 para o isômero *Z* (PALLA, 1986). De fato, na figura 20, **PQM-164** apresenta o sinal relativo a H-13 com deslocamentos químicos de δ 8,13 e 7,95, confirmando sua configuração *E*. O mapa de correlação Noesy de **PQM-164** (FIGURA A20, pg. 179) corrobora a obtenção do isômero *E* pela correlação entre os hidrogênios H10 e H13.

Figura 19 - Espectro de RMN de ^1H da 2-*N*-(4-hidróxi-3-metóxi-benzil)-3-(4-hidróxi-3-metóxi-fenil)-acriloidrazida (**PQM-164**) (300 MHz, $\text{DMSO-}d_6$).

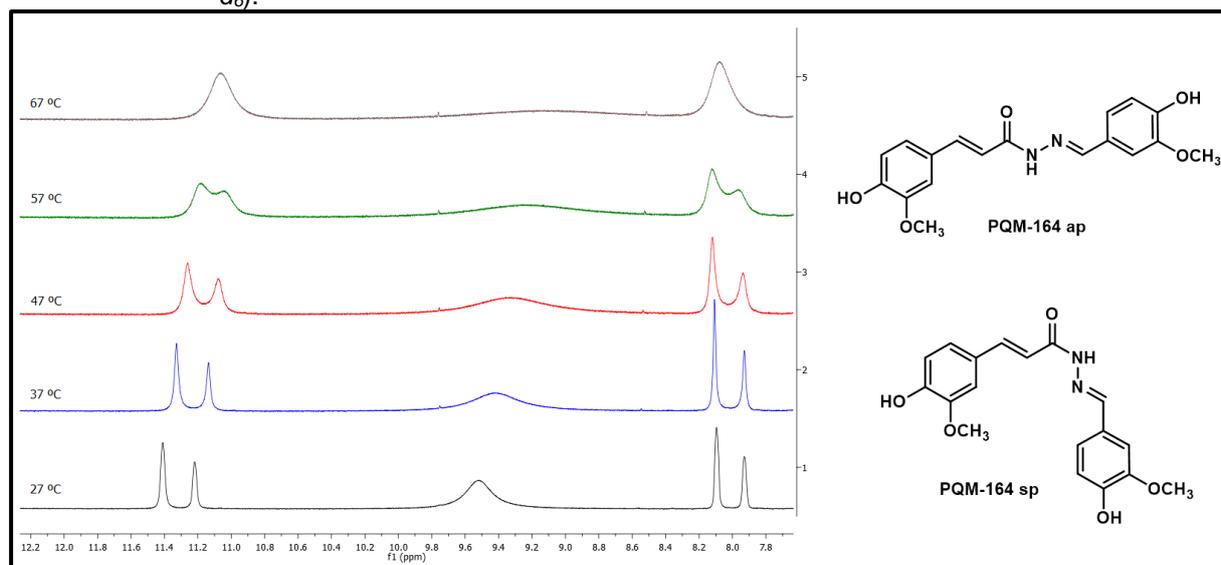


Fonte: do autor.

Para confirmar a hipótese da presença de rotâmeros de **PQM-164**, responsável pela ocorrência de duplicidade de sinais, foram obtidos os espectros de RMN de ^1H em gradiente de temperatura a 27, 37, 47, 57 e 67 °C. Na FIGURA 20 (Pg. 49) verificam-se dois pares de simpletos referentes aos hidrogênios H-10 e H-13 no espectro obtido a 27 °C. Entretanto, a obtenção sequencial de espectros com o aumento gradual da temperatura, leva a uma aproximação dos sinais até que, a 67°C, ocorre sua total coalescência, gerando apenas 2 sinais do tipo simpleto em δ 11,06 e δ 8,08, referentes a H-10 e H-13, respectivamente. A formação de apenas um sinal para cada hidrogênio em alta temperatura confirmou a presença de rotâmeros, sendo que, com o aumento da temperatura, o rotâmero *syn*-periplanar (*sp*, menos estável) é convertido ao antiperiplanar (*ap*, mais estável), cuja conformação é termodinamicamente mais favorável.

Também podemos observar que na temperatura de 37°C, temperatura média do nosso corpo, teremos mistura de rotâmeros. Caso apenas um dos conformeros seja o ativo essa mistura pode trazer algumas complicações quanto a potencia das moléculas sintetizadas.

Figura 20 - Espectro de RMN de ^1H da 2-*N*-(4-hidróxi-3-metóxi-benzil)-3-(4-hidróxi-3-metóxi-fenil)acriloidrazida (**PQM-164**) em diferentes temperaturas (300 MHz, $\text{DMSO-}d_6$).



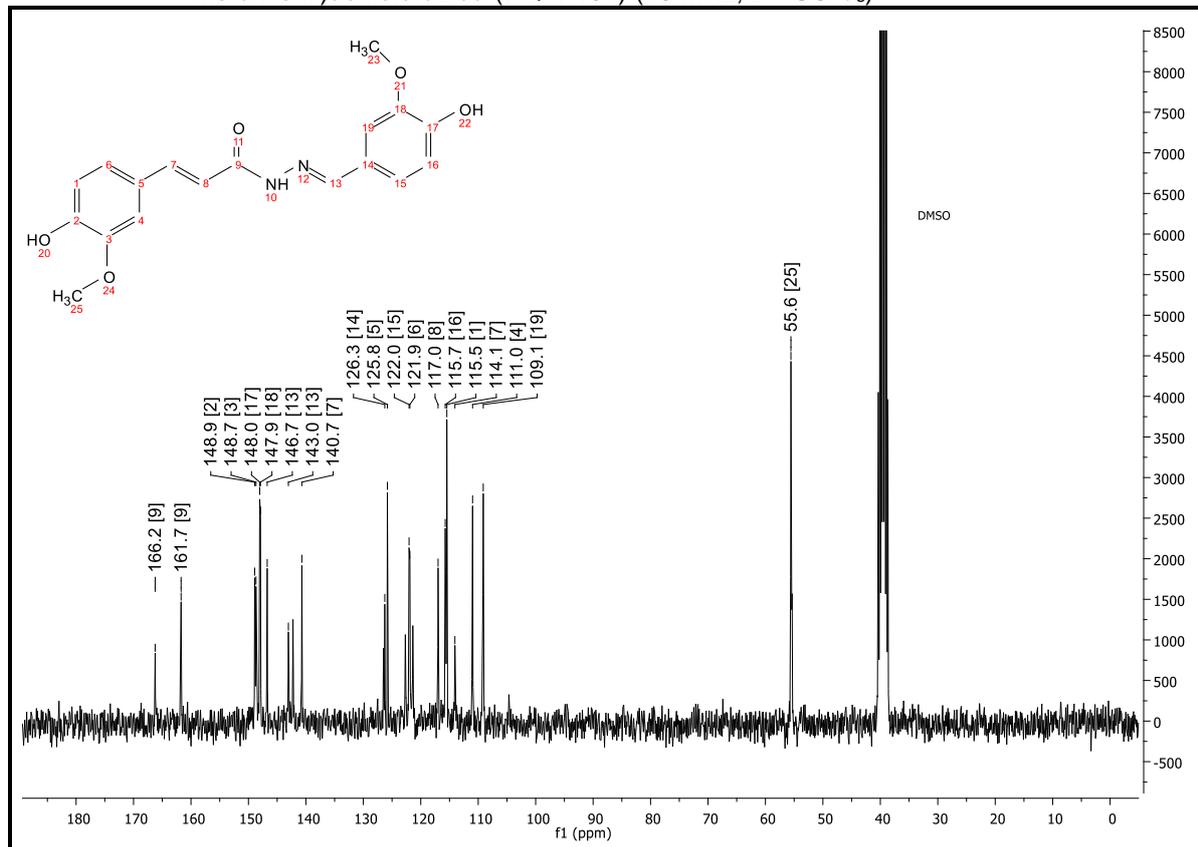
Fonte: do autor.

No espectro de RMN de ^{13}C (FIGURA 21, pg 50) podemos observar todos os sinais relativos aos carbonos da estrutura de **PQM-164**. O carbono carbonílico de acilidrazona foi identificado em δ 166,2 e 161,7; além dos sinais em δ 140,7 e δ 117,0, referentes aos carbonos da insaturação α,β -carbonílica C-7 e C-8, respectivamente. Em δ 148,9; 148,7; 148,0 e 147,9 foram observados os sinais atribuídos aos carbonos funcionalizados do sistema arilidrazônico. Também podemos observar os sinais em δ 146,7 e 143,0 referentes ao carbono sp^2 da acilidrazona, carbono este que corrobora a obtenção da acilidrazona desejada. No espectro de RMN de ^{13}C também podemos verificar alguns indícios da presença dos rotâmeros, assim como o RMN de ^1H , temos alguns indícios associados com a presença dos rotâmeros e não dos isômeros, Carvalho e colaboradores (2012) descreve valores de deslocamento químico para carbonila da *N*-acilidrazona de cada rotâmero variando entre δ 160 e 166 e o deslocamento químico do carbono da ligação $\text{N}=\text{CH}$ da *N*-acilidrazona de cada rotâmero variando entre δ 142 e 144 (CARVALHO, 2012).

Palla e Cols. (1986) sugerem que quando o espectro é obtido em $\text{DMSO-}d_6$, o isômero *E* apresenta valores de deslocamento químico de carbonila em δ 165 e valores de deslocamento químico do carbono da ligação $\text{N}=\text{CH}$ em δ 144, nestas condições o isômero *Z* não apresentaria sinal nenhum. Quando a obtenção do espectro passou a ser feita em CDCl_3 apenas o isômero *Z* apresentou valores de deslocamento químico, sinal referente a carbonila em δ 164 e sinal referentes a ligação $\text{N}=\text{CH}$ em δ 137, nestas condições o isômero *E* passou a não apresentar sinal

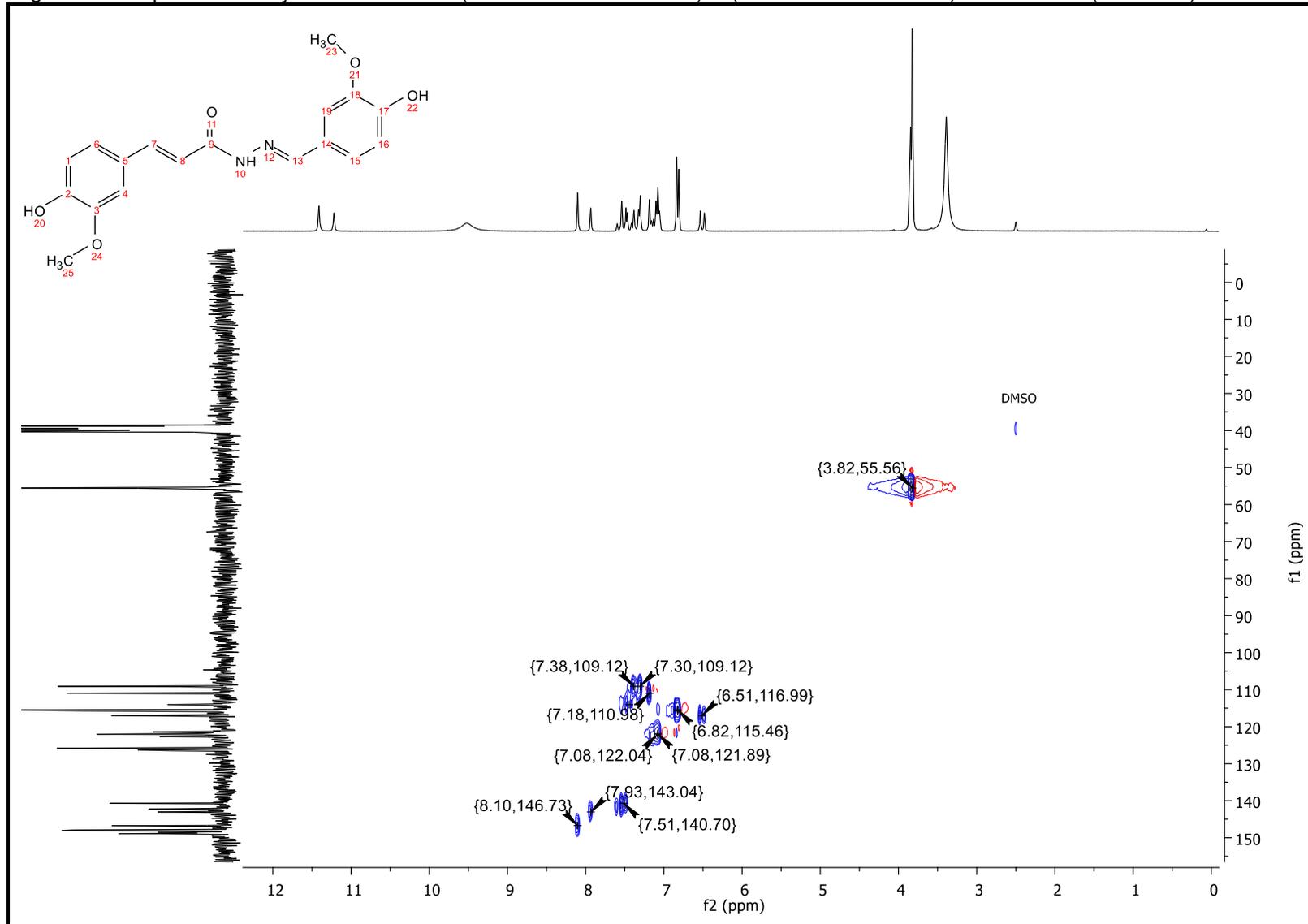
nenhum (PALLA, 1986). Neste contexto podemos observar no espectro de ^{13}C da figura 22, obtido em meio a $\text{DMSO-}d_6$, sinais atribuídos a carbonila em δ 161 e 166 e valores atribuídos a ligação $\text{N}=\text{CH}$ em δ 143 e 146, estes dados corroboram a obtenção de uma mistura dos rotâmeros do isômero *E* de **PQM-164**.

Figura 21 - Espectro de RMN de ^{13}C da 2-*N*-(4-hidróxi-3-metóxi-benzil)-3-(4-hidróxi-3-metóxi-fenil)acriloidrazida (**PQM-164**) (75 MHz, $\text{DMSO-}d_6$).



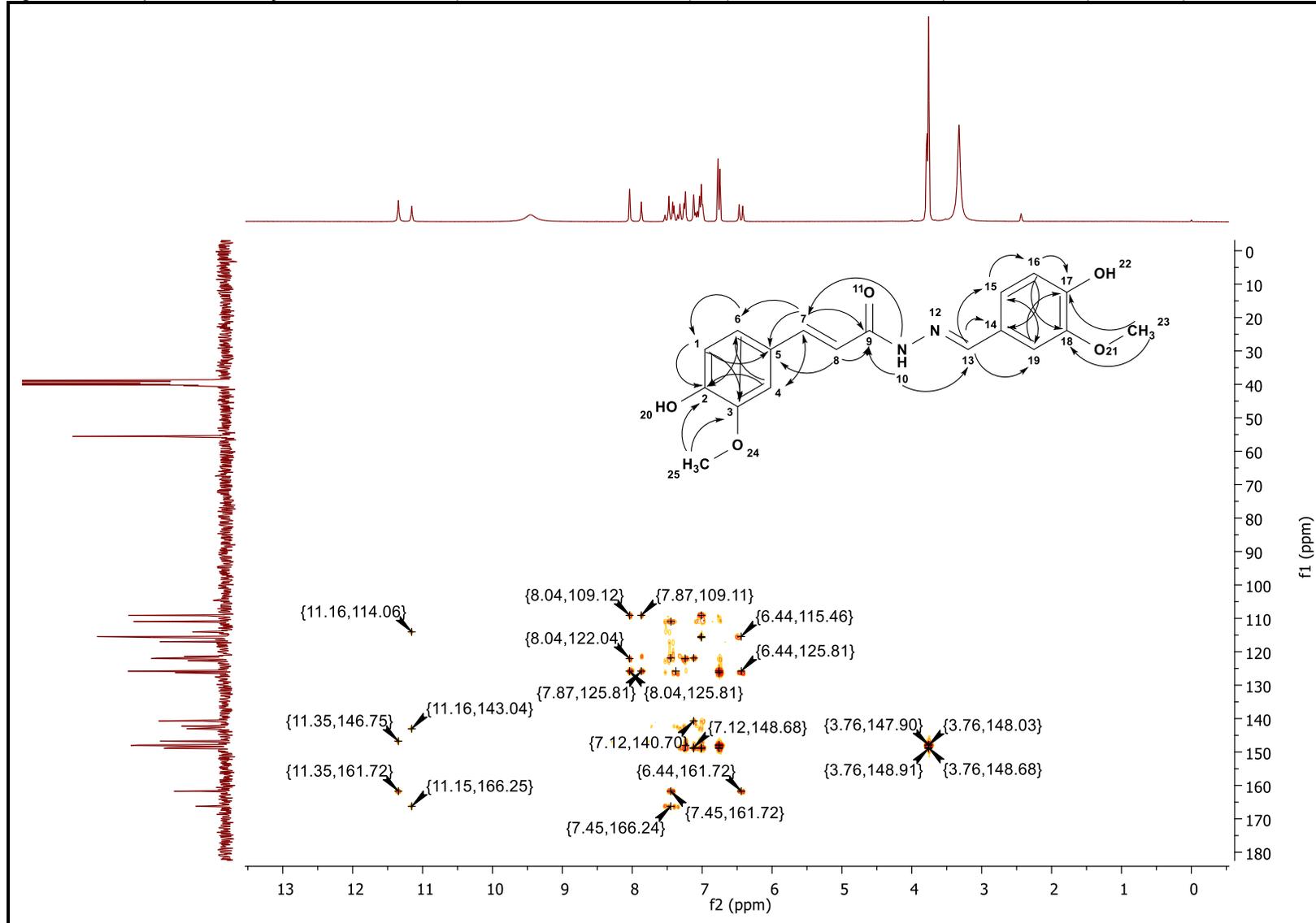
Fonte: do autor.

Foram utilizados os mapas de correlação HSQC (FIGURA 22, pg. 51) e HMBC (FIGURA 23, pg. 52) para atribuição inequívoca dos sinais do RMN de ^1H e RMN de ^{13}C discutidos anteriormente.

Figura 22 - Mapa de correlação HSQC de 2-N-(4-hidróxi-3-metóxi-benzil)-3-(4-hidróxi-3-metóxi-fenil)acriloidrazida (**PQM-164**).

Fonte: do autor.

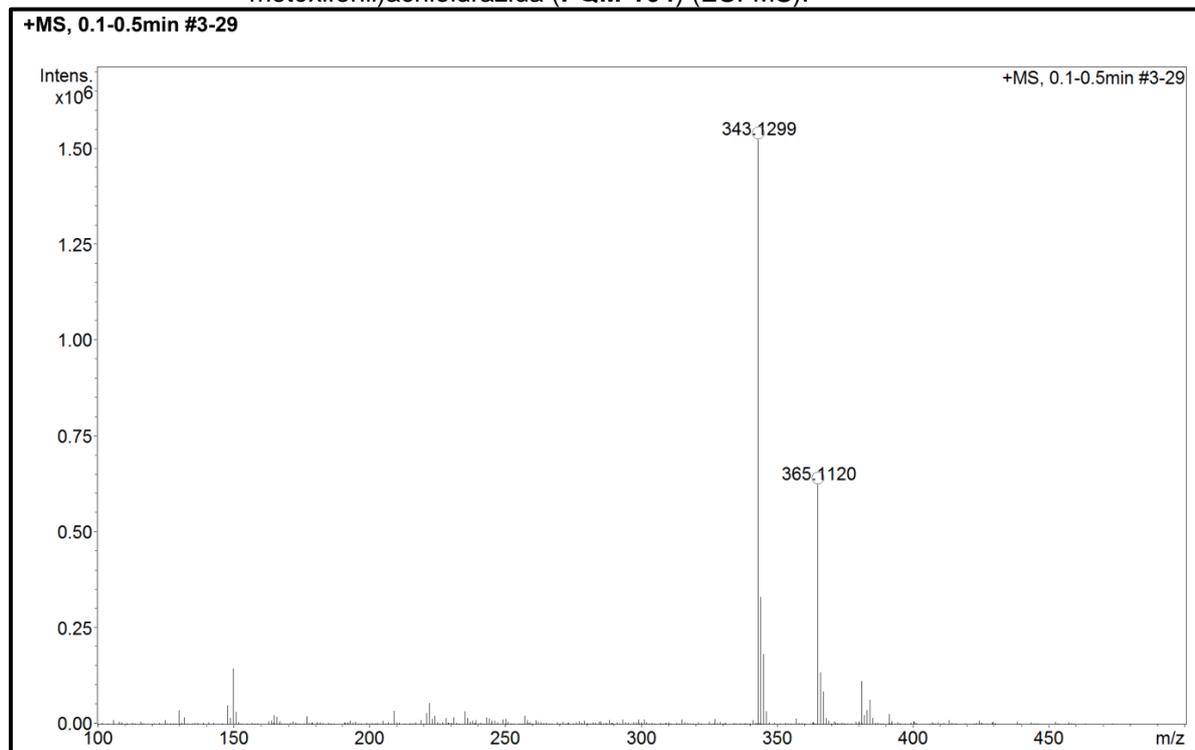
Figura 23 - Mapa de correlação HMBC de 2-N-(4-hidróxi-3-metóxi-benzil)-3-(4-hidróxi-3-metóxi-fenil)acriloidrazida (**PQM-164**).



Fonte: do autor.

No espectro de massas de alta resolução (FIGURA 24) ficam claros os picos em 343,1299 m/z referente ao íon molecular e em 365,1120 m/z referente ao aduto com sódio, as massas previstas foram 343,1288 m/z e 365,1113 m/z , respectivamente. Estes dados corroboram a obtenção da molécula desejada.

Figura 24 - Espectros de Massas da 2-*N*-(4-hidróxi-3-metóxi-benzil)-3-(4-hidróxi-3-metóxi-fenil)acriloidrazida (**PQM-164**) (ESI-MS).



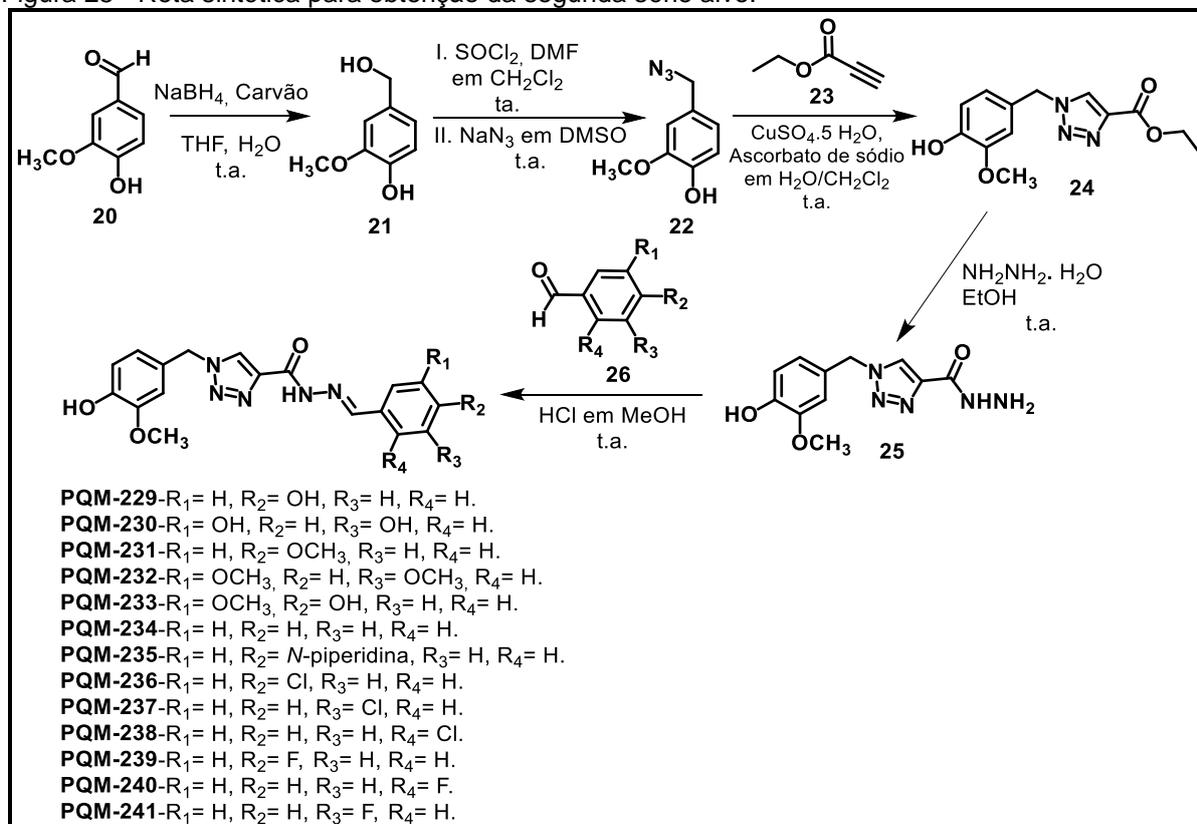
Fonte: do autor.

3.1.2 Série 2: Síntese dos derivados triazólicos *N*-acilidrazônicos (**PQM 229-241**).

A síntese dos derivados triazólicos *N*-acilidrazônicos (**PQM 229-241**) é compreendida de cinco etapas (FIGURA 25, pg. 54): a) inicialmente o aldeído vanílico (**20**) é reduzido ao álcool primário (**21**) correspondente pela reação de redução com boridreto de sódio e carvão ativado em THF e água. b) seguida por uma reação do álcool com cloreto de tionila em diclorometano que leva a formação de um cloreto reativo, que em seguida é convertido a azida orgânica **22**; c) uma reação do tipo *click* entre a azida orgânica **22** e o alcino terminal, propiolato de etila (**23**) leva a formação do éster triazólico **24**; d) que por sua vez, é convertido a hidrazida intermediária **25** pela reação com monidrato de hidrazina em meio metanólico; e) finalmente a hidrazida **25** é submetida ao acoplamento por catálise ácida, com diferentes aldeídos

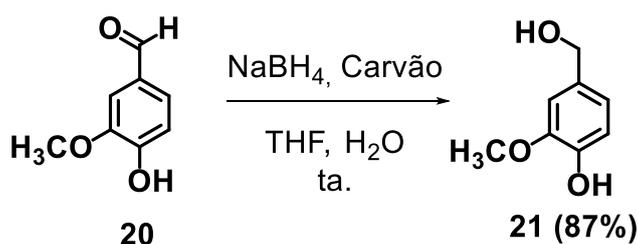
funcionalizados (**26**) dando origem aos derivados triazólicos *N*-acilidrazônicos (PQM-229-241).

Figura 25 - Rota sintética para obtenção da segunda série alvo.



Fonte: do autor.

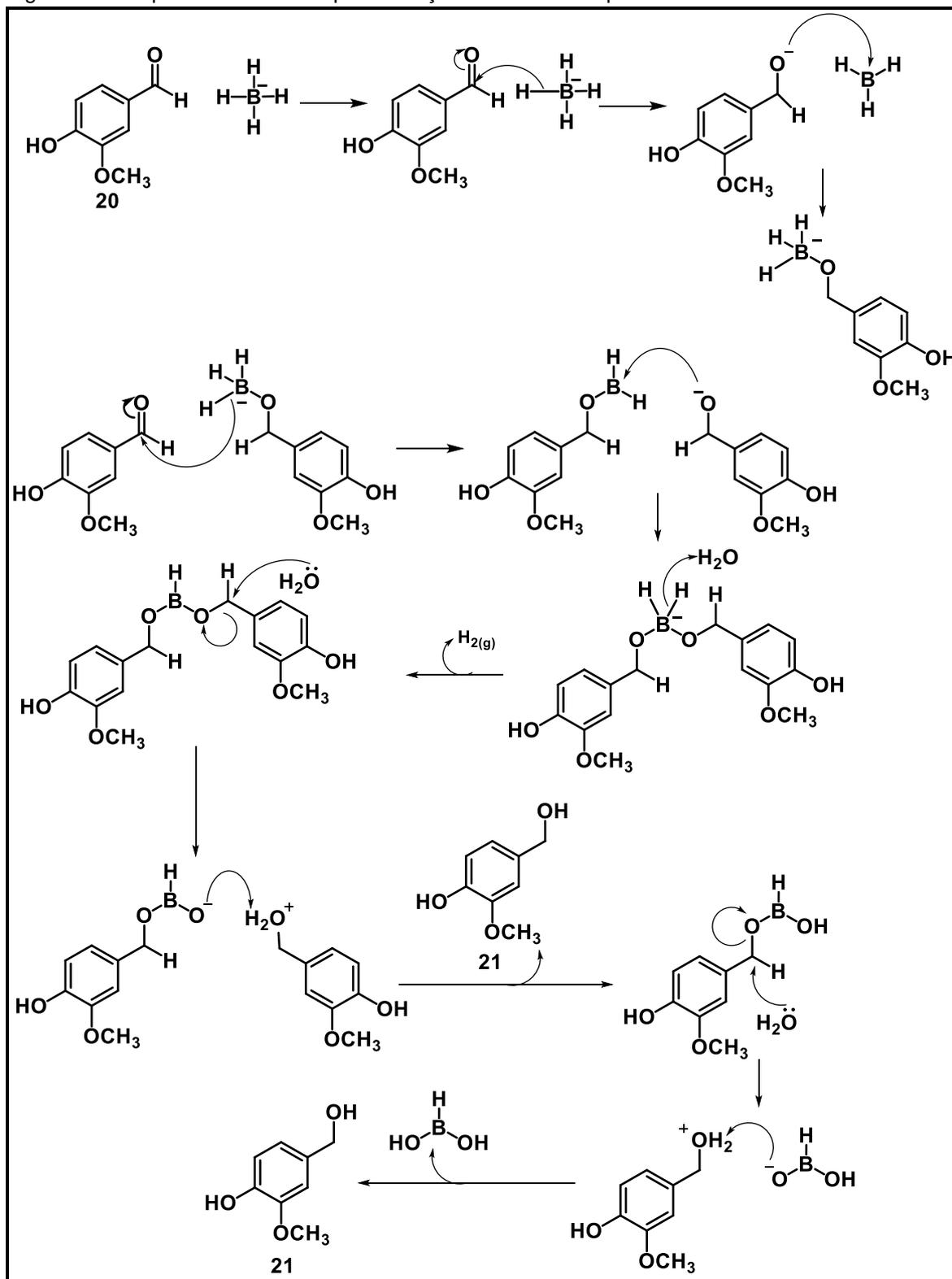
3.1.2.1 Síntese do álcool **21** a partir do aldeído vanílico **20**.



Para a síntese do álcool vanílico **21** empregou-se o aldeído vanílico (**20**) como material de partida, o qual foi submetido à uma reação de redução na presença do agente redutor borohidreto de sódio (NaBH₄) em THF (FIGURA 26, pg 55), sob catálise com carvão ativo, que possibilita choques entre as moléculas de aldeído e borohidreto mais efetivamente (SETAMDIDEH, 2006). O meio reacional foi mantido sob agitação magnética a temperatura ambiente por 35 minutos. Após este período realizou-se uma extração líquido-líquido com H₂O e CH₂Cl₂. A reação leva a formação

de um sólido branco cristalino após evaporação da fase orgânica e apresentou rendimento de 87%.

Figura 26 - Proposta mecanística para redução do aldeído **20** para o álcool **21**.

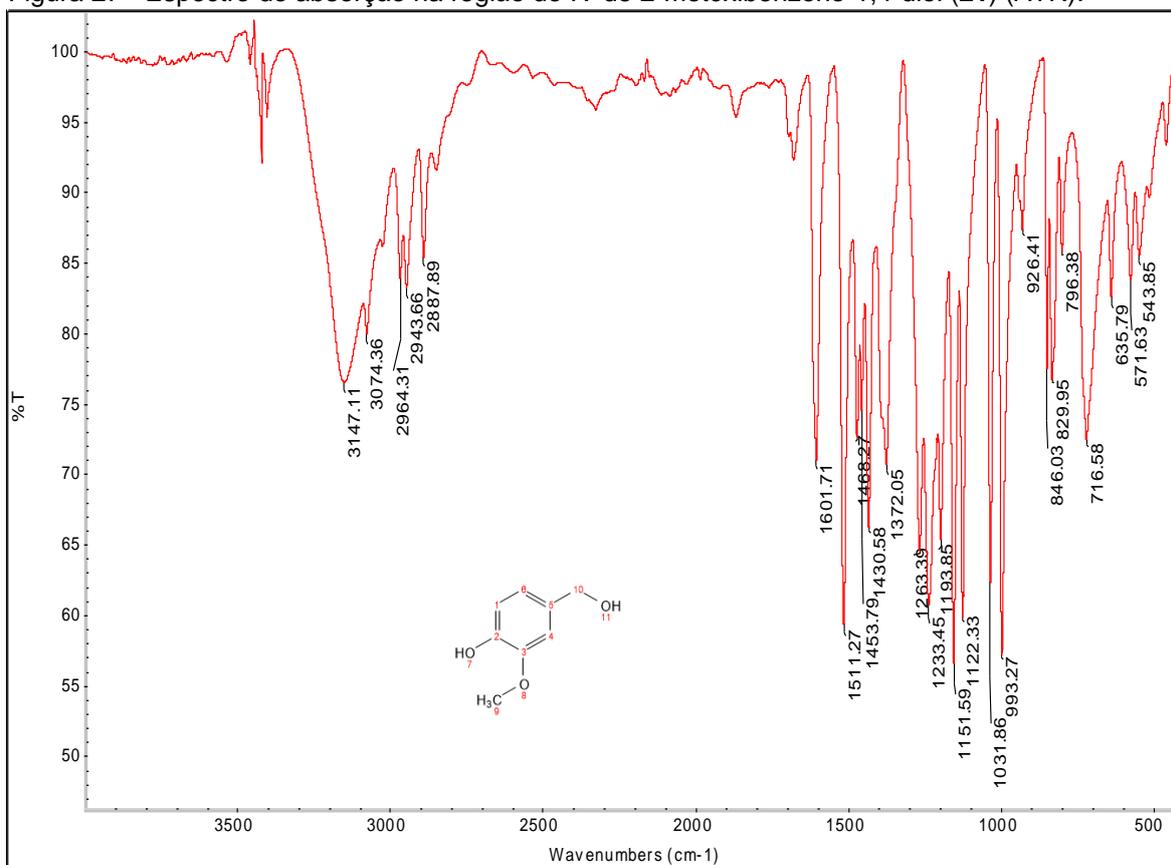


Fonte: do autor.

A estrutura do álcool-composto **21** foi confirmada pela análise dos dados espectroscópicos de Ressonância Magnética Nuclear de ^1H e de ^{13}C e IV.

No espectro na região do IV (FIGURA 27) foram observadas as principais bandas esperadas para a estrutura proposta: bandas de estiramento de estiramento de O-H em 3147 cm^{-1} , deformação angular fora do plano de C-H aromático em 2964 cm^{-1} , estiramento de C-H sp^3 em 2887 cm^{-1} , estiramento de C=C em 1601 cm^{-1} , deformação angular simétrica de C-H sp^3 da metila em 1430 cm^{-1} , deformação angular assimétrica de C-H sp^3 da metila em 1372 cm^{-1} e estiramento de C-O em 1031 cm^{-1} .

Figura 27 - Espectro de absorção na região do IV de 2-metóxi-benzeno-1,4-diol (**21**) (ATR).

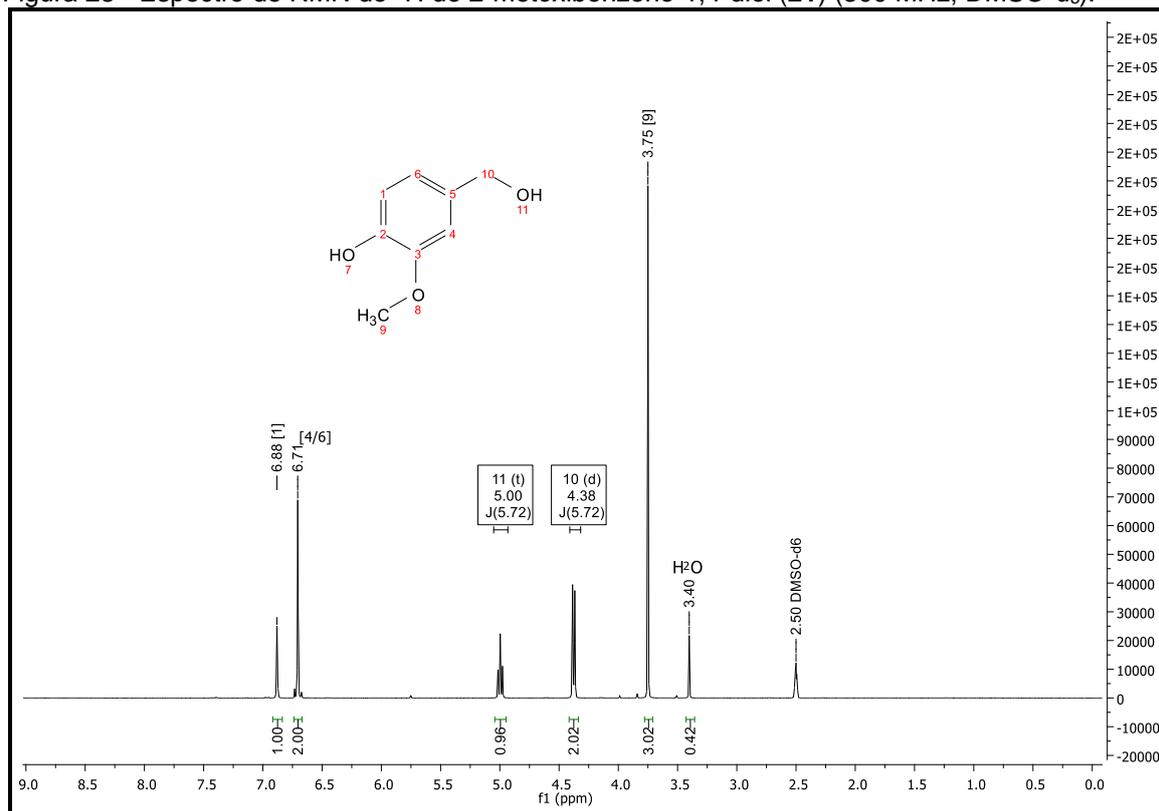


Fonte: do autor.

No espectro de RMN de ^1H (FIGURA 28, pg 57) observou-se a presença de um simpleto em δ 6,88 e um simpleto em δ 6,71 (2H) referentes aos hidrogênios aromáticos H-1 e; H-4 e H-6, respectivamente, também podemos encontrar um tripleto centrado em δ 5,00 ($J = 5,72\text{ Hz}$) referente ao hidrogênio da hidróxila do substituinte metanólico, um duplete em δ 4,38 ($J = 5,72\text{ Hz}$) referente aos os hidrogênios metanólicos H-10 e um simpleto em δ 3,75 referentes aos hidrogênios da metóxila H-9. Neste espectro é importante observar o sinal em δ 4,38 que se apresenta como um

duplete com integral para 2H, este sinal é atribuído aos hidrogênios H-10 e se apresenta como um duplete, por realizar acoplamento com o hidrogênio hidroxílico, esse sinal é o responsável por diferenciar o álcool **21** do aldeído vanílico, utilizado como material de partida, no aldeído o hidrogênio H-10 era o hidrogênio ligado a carbonila do aldeído, seu sinal era esperado na faixa de δ 7,5 na forma de um simpleto, por não se acoplar com nenhum outro hidrogênio na vizinhança.

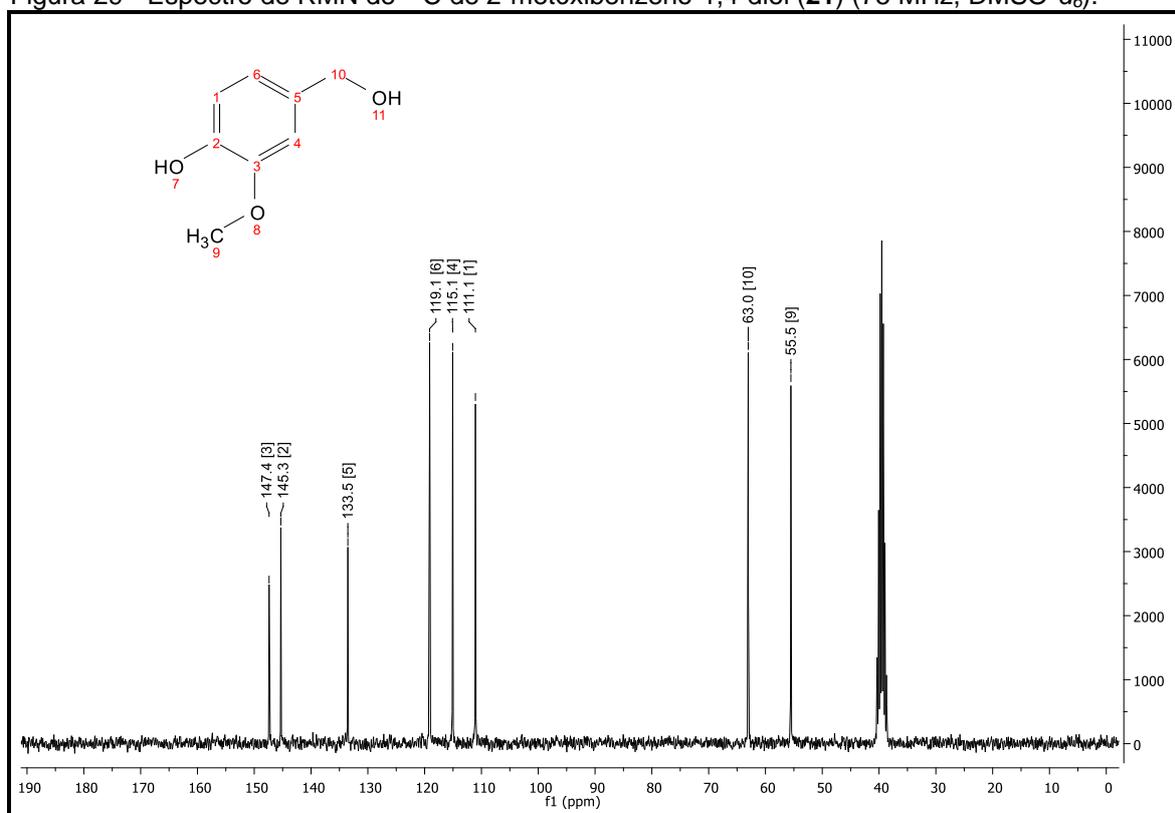
Figura 28 - Espectro de RMN de ^1H de 2-metóxi-benzeno-1,4-diol (**21**) (300 MHz, DMSO-d_6).



No espectro de RMN de ^{13}C (FIGURA 29, pg 58) podemos ver os sinais de todos os carbonos da estrutura proposta. Em δ 147,4 e δ 145,3 os sinais dos carbonos aromáticos substituídos ligados diretamente a heteroátomos C-3 e C-2, respectivamente, em δ 133,5 temos o sinal de C-5, carbono aromático substituído e ligado a metila do metanol e em δ 119,1, δ 115,1 e δ 111,1 os sinais dos carbonos aromáticos não substituídos C-6, C-4 e C-1, respectivamente. O sinal em δ 63,0 é atribuído ao carbono metanólico C-10 e em δ 55,5 o sinal do carbono da metóxila C-9. No espectro de RMN de ^{13}C é interessante chamarmos a atenção para a ausência de sinal acima de δ 160, região onde seria esperado sinal de carbonilas de aldeídos, a ausência de sinais nesta faixa de deslocamento químico, que indica a ausência do

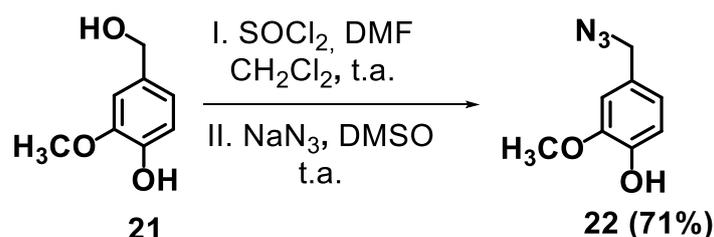
material de partida **20**, junto à presença do sinal em δ 63,0, atribuído ao carbono C-10, corroboram a obtenção do álcool **21**.

Figura 29 - Espectro de RMN de ^{13}C de 2-metóxi-benzeno-1,4-diol (**21**) (75 MHz, $\text{DMSO-}d_6$).



Fonte: do autor.

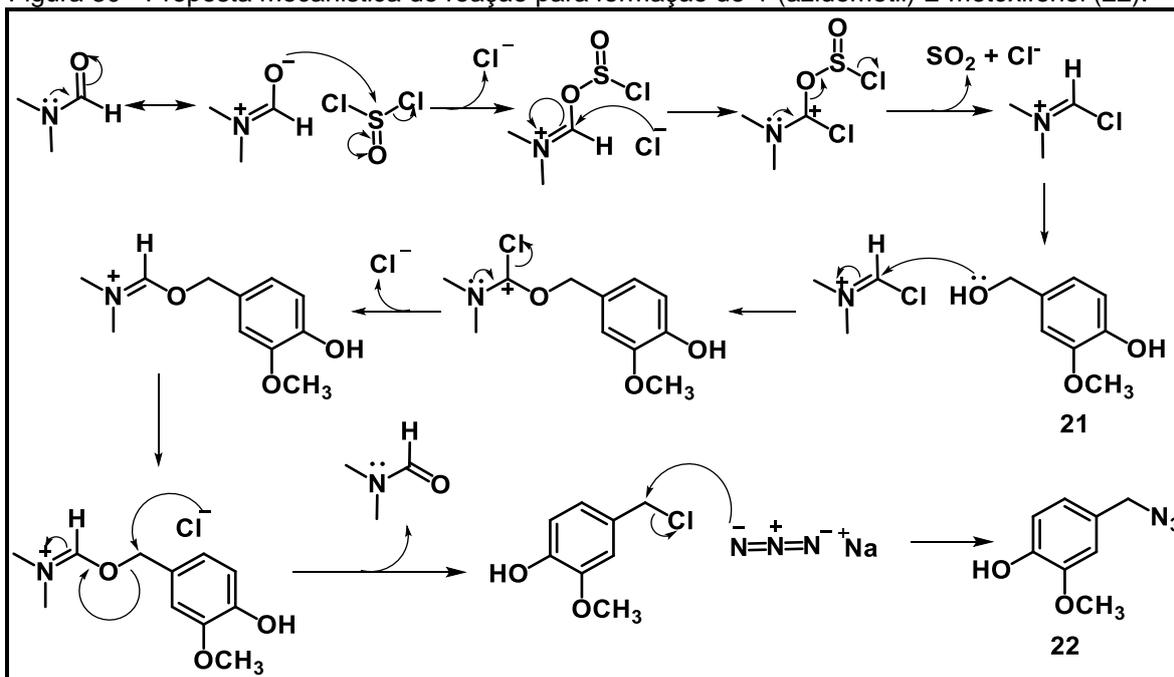
3.1.2.2 Síntese da azida orgânica (**22**).



O álcool proveniente da etapa anterior (**21**) é submetido a uma reação *one-pot* onde, em um primeiro momento, tem-se a conversão do álcool no cloreto correspondente, por uma reação com cloreto de tionila e DMF. Em seguida o excesso de cloreto de tionila e o DMF são retirados por rota-evaporação, obtendo-se um óleo amarelo-castanho. Após a obtenção do cloreto, a próxima etapa de síntese consistiu na introdução de um grupo azido para a obtenção da azida orgânica correspondente, 4-(azidometil)-2-metóxi-fenol (**22**, FIGURA 30, pg. 59). O método escolhido para esta transformação foi adaptado daquele descrito por Gontijo e cols. (2015) que utilizaram

como reagente uma solução pré-preparada de azida de sódio (0,5 mol/L) em DMSO na proporção de 1,1 equivalente molar para cada equivalente do halogeneto (GONTIJO, 2015). A aplicação desse método ao álcool-composto (**21**) levou à obtenção da azida orgânica **22** com 71% de rendimento, em 23 horas de reação à temperatura ambiente. A azida orgânica (**22**) foi caracterizada pela análise dos seus espectros de RMN de ^1H , de ^{13}C e IV.

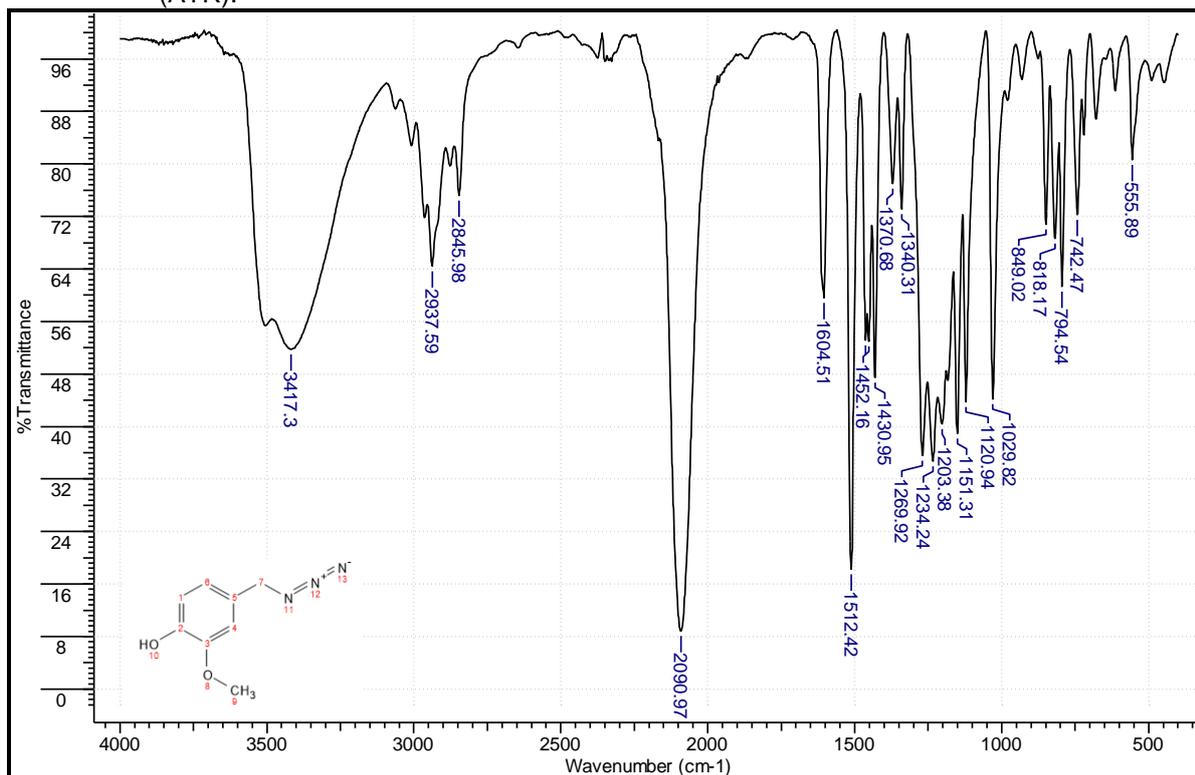
Figura 30 - Proposta mecanística de reação para formação de 4-(azidometil)-2-metóxfenol (**22**).



Fonte: do autor.

No espectro na região do IV (FIGURA 31, pg. 60) observa-se todas as bandas característica da estrutura proposta, a maioria já descrita anteriormente. Nesta reação é importante chamarmos a atenção para a banda em 3417 cm^{-1} , característica do estiramento da ligação O-H, que comprova que a reação foi seletiva a apenas uma hidróxila e a banda intensa em 2090 cm^{-1} , banda característica de azidas, referente ao estiramento do grupo $-\text{N}_3$. Estas duas bandas indicam a obtenção do produto desejado.

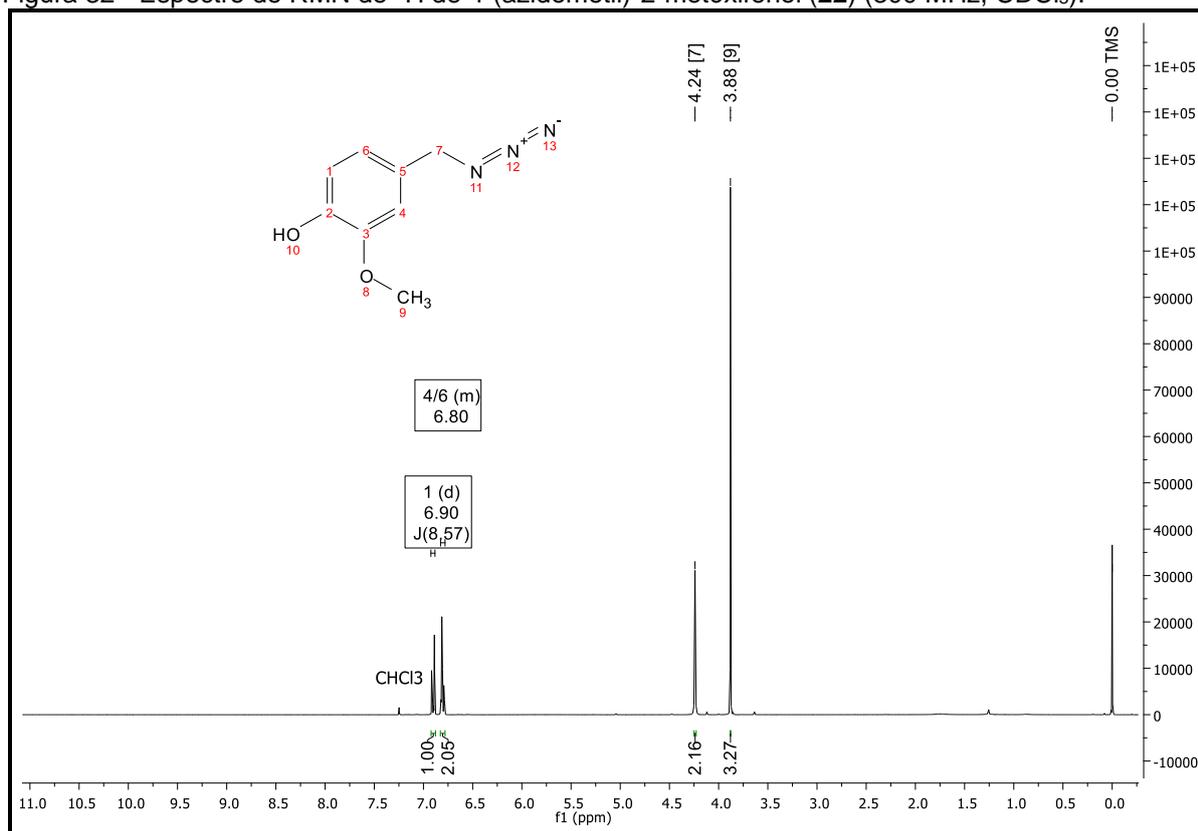
Figura 31 - Espectro de absorção na região do infravermelho de 4-(azidometil)-2-metóxfenol (**22**) (ATR).



Fonte: do autor.

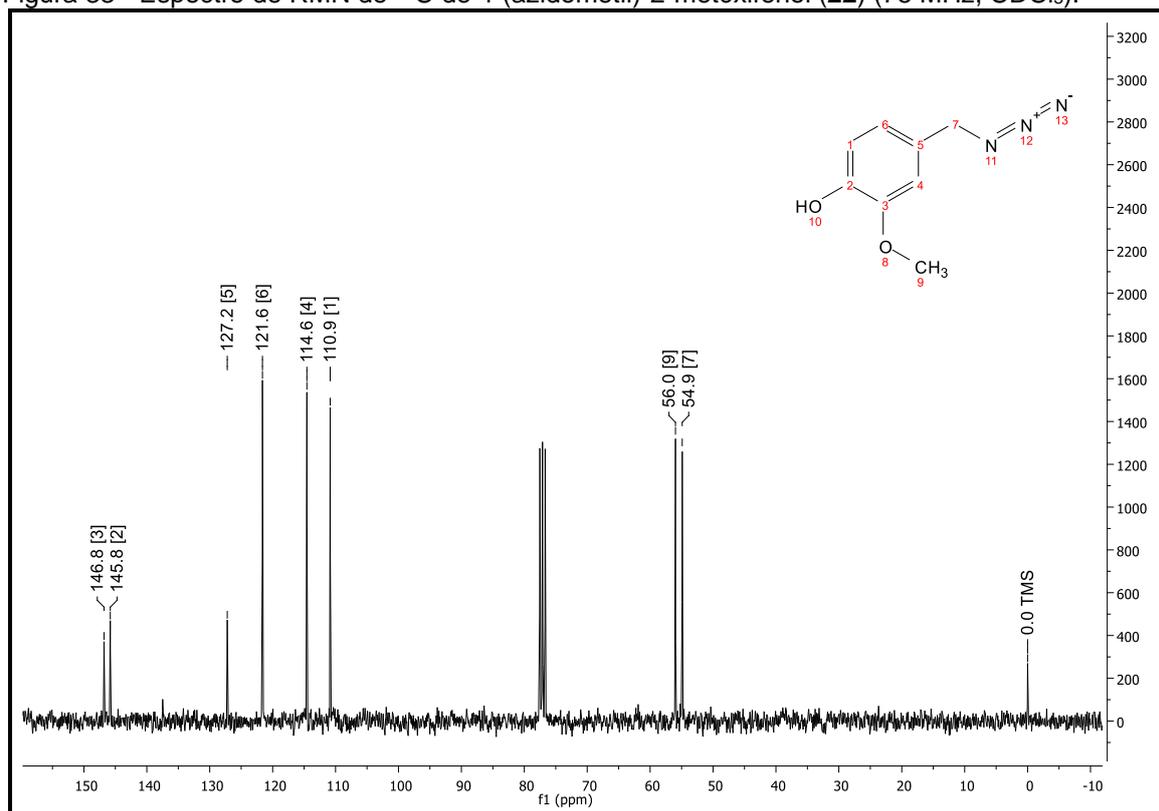
No espectro de RMN de ^1H (FIGURA 32, pg. 61) encontra-se em δ 6,90 um duplete ($J=8,57$ Hz) referente ao hidrogênio aromático H-1, um multipletto em δ 6,83-6,78 referente aos hidrogênios H-4 e H-6 do anel, simpleto em δ 4,24 referente aos hidrogênios H-7. Também podemos ver um simpleto em δ 3,88 referente aos hidrogênios da metóxila H-9.

Figura 32 - Espectro de RMN de ^1H de 4-(azidometil)-2-metóxi-fenol (**22**) (300 MHz, CDCl_3).



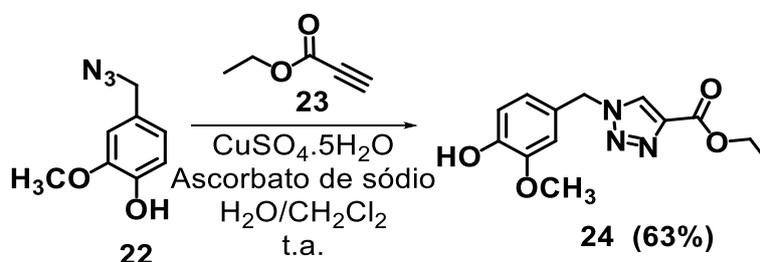
Fonte: do autor.

No espectro de RMN de ^{13}C (FIGURA 33, pg. 62) pode-se verificar todos os sinais referentes a estrutura desejada. Podemos chamar atenção para os sinais em δ 127,2 e 54,9 referente aos C-5 e C-7 respectivamente, os deslocamentos destes dois sinais em comparação com os dados de RMN ^{13}C do material de partida corroboram que a reação ocorreu na hidróxila do álcool primário, levando a obtenção da azida desejada.

Figura 33 - Espectro de RMN de ^{13}C de 4-(azidometil)-2-metóxfenol (**22**) (75 MHz, CDCl_3).

Fonte: do autor.

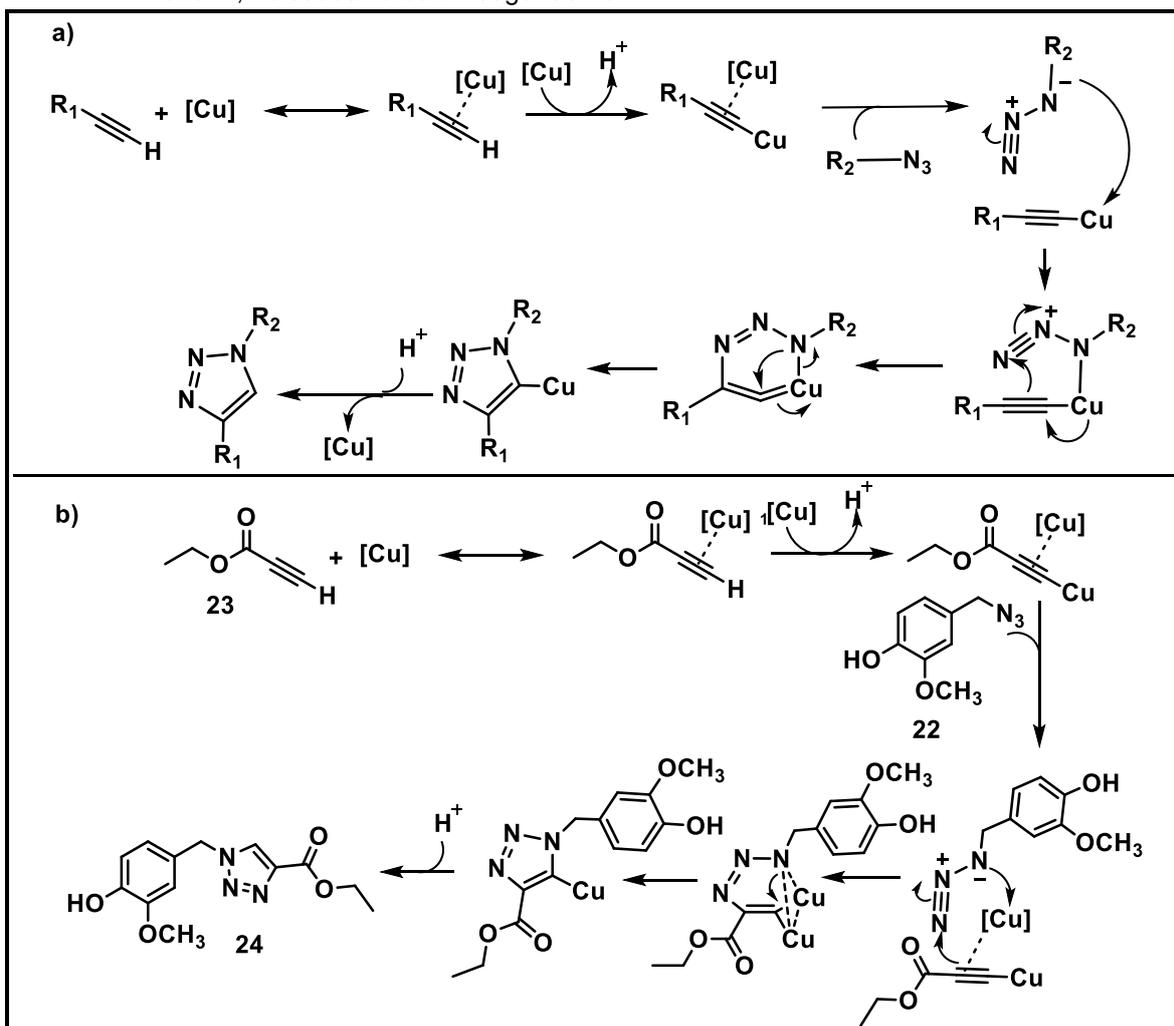
3.1.2.3 Obtenção do triazol **24** pela reação do tipo *click*.



Para a síntese regiosseletiva do 1,2,3 triazol-1,4-dissubstituído foram utilizados a azida (**22**) e o alcino comercial propiolato de etila (**23**), catalisados por ascorbato de sódio e sulfato de cobre. Essa reação de cicloadição foi descrita pela primeira vez em 2002, pelo nobelista de química Dr. Karl Barry Sharpless, cujo mecanismo exato ainda não foi esclarecido. Inicialmente, Sharpless propôs um mecanismo (FIGURA 34, a, pg. 64) envolvendo a formação de um anel de 6 membros, contendo um carbono com hibridação *sp* em sua estrutura e sendo, portanto, uma estrutura muito instável e reativa (ROSTOVTSEV, 2002).

Mais tarde, em 2005, Sharpless e cols. estudaram mais detalhadamente os intermediários daquele mecanismo proposto, inclusive com cálculos computacionais das prováveis energias envolvidas em cada etapa do mecanismo (HIMO, 2005). Dentre os colaboradores de Sharpless em 2005 estava o Dr. Valery V. Folkin que junto com sua equipe, em 2013, propôs um novo mecanismo de reação, onde seriam necessários dois átomos de Cu^+ para a reação ocorrer (FIGURA 34, **b**, pg. 64), passando inicialmente por uma complexação de um átomo de Cu^+ com uma das ligações π do alcino, um segundo átomo de Cu^+ substituiria o H do alcino, formando um intermediário com 2 átomos de Cu. Em uma etapa subsequente, o átomo de Cu complexado com a ligação π do alcino complexa com um dos nitrogênios da azida, ao mesmo tempo que o par de elétrons da ligação π ataca outro átomo de N da azida, formando um complexo bidentado a dois átomos de Cu. Numa etapa seguinte, ocorre a contração do anel e a concomitante saída de um dos átomos de Cu para a formação do 1,2,3-triazol-1,4,5-trissubstituído. Em uma última etapa um H^+ retira o segundo átomo de Cu, gerando finalmente a composto 1,2,3-triazol-1,4-dissubstituído (**24**) (WORRELL, 2013).

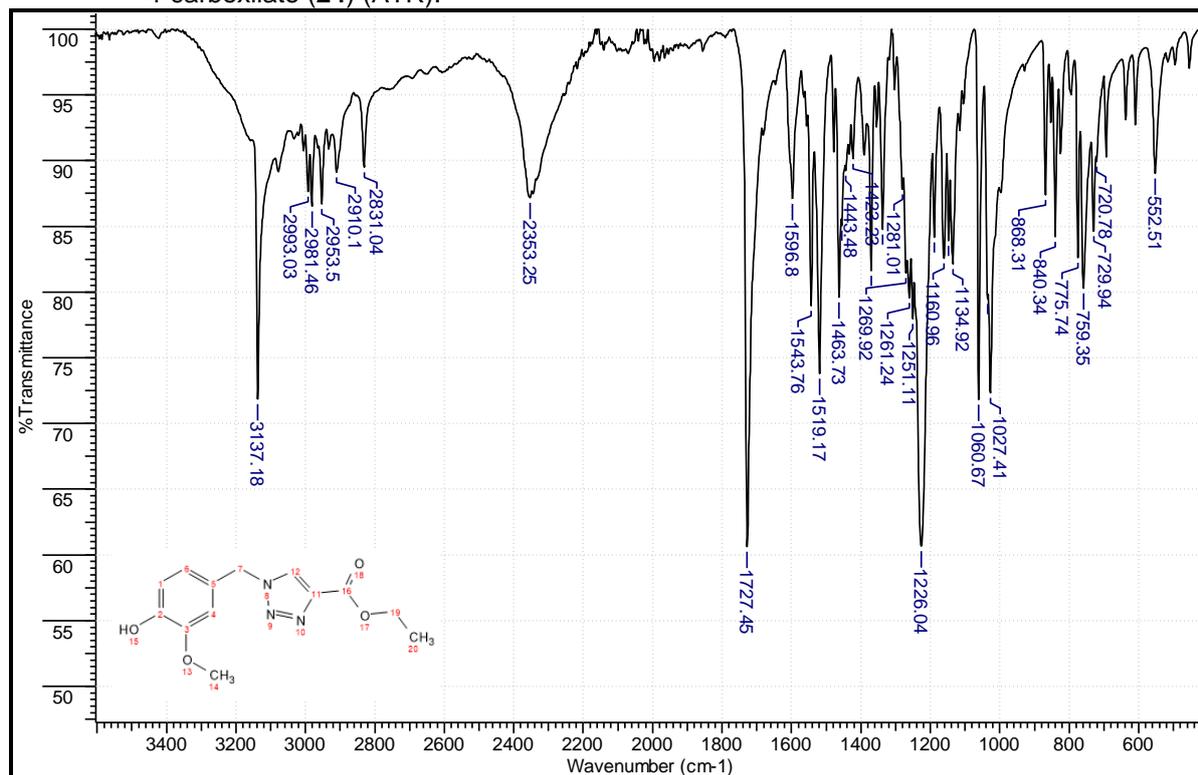
Figura 34 - **a)** Proposta de mecanismo de reação para formação do 1,2,3-triazol-1,4-dissubstituído segundo Sharpless. **b)** Proposta de mecanismo de reação para formação do 1,2,3-triazol-1,4-dissubstituído **24** segundo Fokin.



Fonte: do autor.

No espectro na região do IV (FIGURA 35, pg. 65) podemos observar todas as bandas referentes ao triazol proposto, podemos chamar atenção para a banda em 1727 cm^{-1} , banda característica de carbonila de éster. Além das demais já discutidas anteriormente.

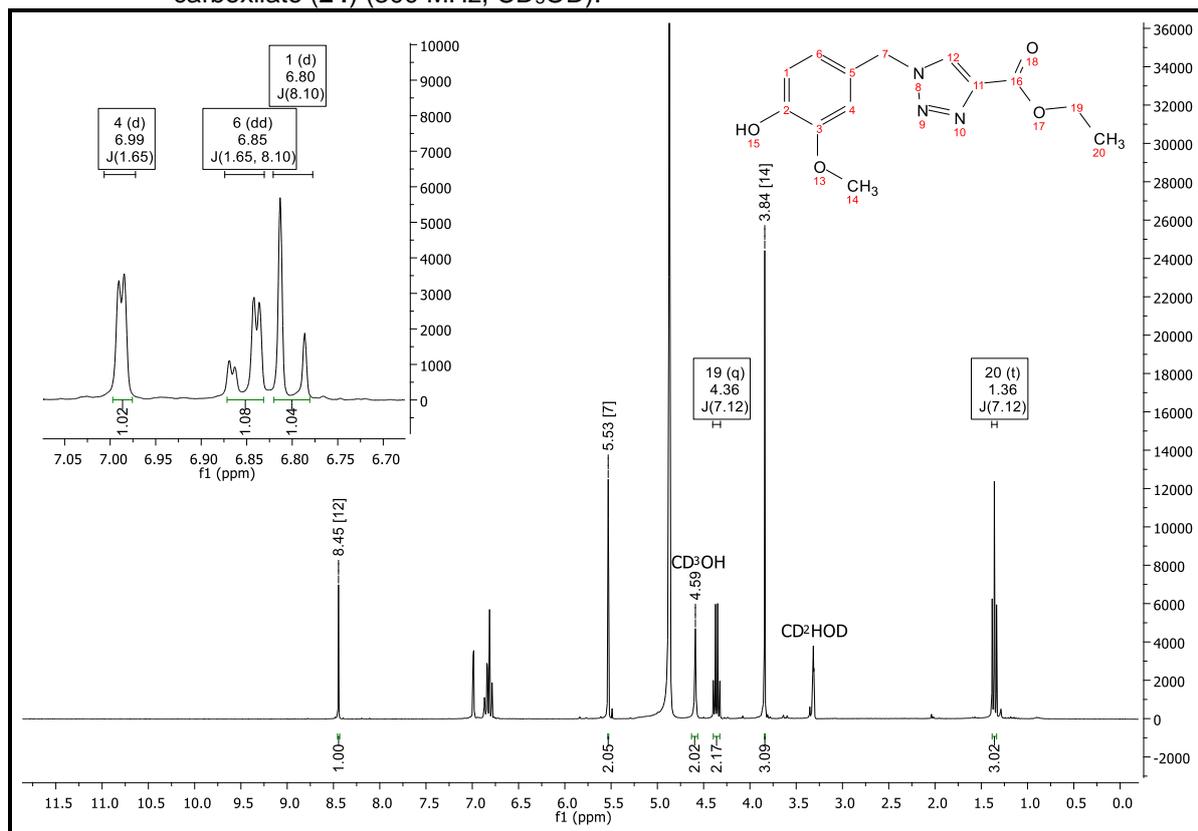
Figura 35 - Espectro na região do infravermelho de propil-1-(4-hidróxi-3-metóxi-benzil)-1H-1,2,3-triazol-4-carboxilato (**24**) (ATR).



Fonte: do autor.

No espectro de RMN de ¹H (FIGURA 36, pg. 66) pode-se observar em δ 8,45 um simpleto referente ao hidrogênio do anel triazólico H-12, sinal característico da obtenção do produto desejado. O duplete em δ 6,99 ($J = 1,65$ Hz), o duplo-duplete em δ 6,85 ($J = 1,65; 8,10$ Hz) e um duplete em δ 6,80 ($J = 8,10$ Hz) respectivos aos sinais dos hidrogênios aromáticos H-4, H-6 e H-1. Em δ 5,53 temos um simpleto referente aos hidrogênios H-7, seguido do quadruplete em δ 4,36 ($J = 7,12$ Hz) dos hidrogênios H-19, um simpleto em δ 3,84 referente aos hidrogênios da metóxila e em δ 1,36 o tripleto ($J = 7,13$ Hz) referente aos hidrogênios H-20. Todos estes sinais apontam para a obtenção do éster triazólico desejado. Neste espectro podemos observar alguns sinais interessantes, iniciando pelo sinal em δ 8,45 que se apresenta como simpleto por não haver nenhum outro hidrogênio na sua vizinhança para fazer acoplamento e apresenta um deslocamento químico descrito na literatura como característico de hidrogênios de sistemas triazólicos 1,4-dissubstituídos (JIARANA KULWANITCH, 2012; MOHAMMADI-KHANAPOSHTANI, 2015); também podemos observar o quadruplete em δ 4,36 e o tripleto em 1,38 que são sinais oriundos do alcino **23**, que após a reação *click* formaram o grupamento éster da molécula **24**.

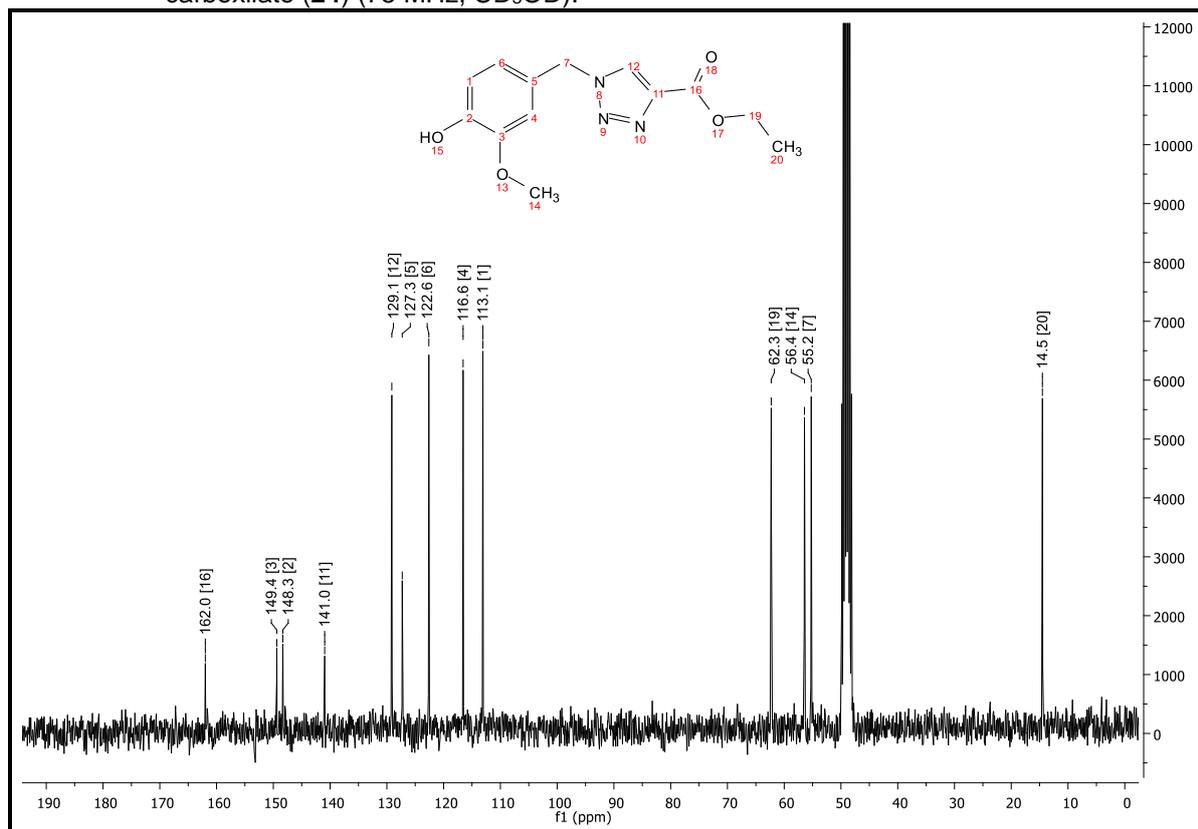
Figura 36 - Espectro de RMN de ^1H de propil-1-(4-hidróxi-3-metóxi-benzil)-1*H*-1,2,3-triazol-4-carboxilato (**24**) (300 MHz, CD_3OD).



Fonte: do autor.

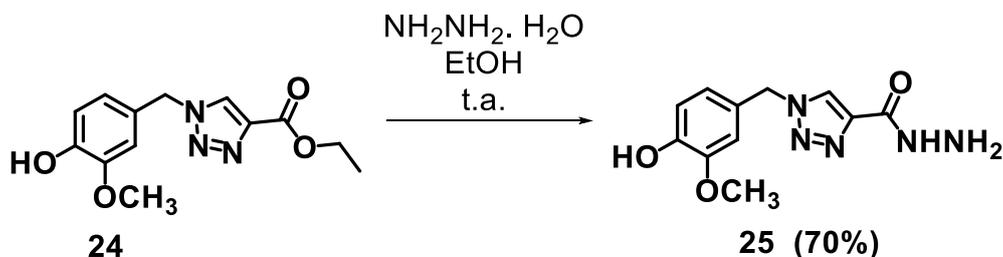
No espectro de RMN de ^{13}C (FIGURA 37, pg. 67) verificou-se todos os sinais referentes a estrutura desejada. Em δ 162,0 o sinal da carbonila do éster, em seguida temos os sinais em δ 141,0 referente ao C-11 e em δ 129,1 referente ao C-12, ambos carbonos do anel triazólico que aponta o sucesso da reação. Com menores deslocamentos temos os carbonos C-19 em δ 62,3; em δ 55,2 o carbono C-7, que liga o anel triazólico ao anel benzênico e em δ 14,5 o sinal da metila terminal C-20. Neste espectro é importante destacarmos a carbonila em δ 162,0 que corresponde a faixa de deslocamento químico esperado para carbonilas de ésteres (PAVIA, 2015).

Figura 37 - Espectro de RMN de ^{13}C de propil-1-(4-hidróxi-3-metóxi-benzil)-1*H*-1,2,3-triazol-4-carboxilato (**24**) (75 MHz, CD_3OD).



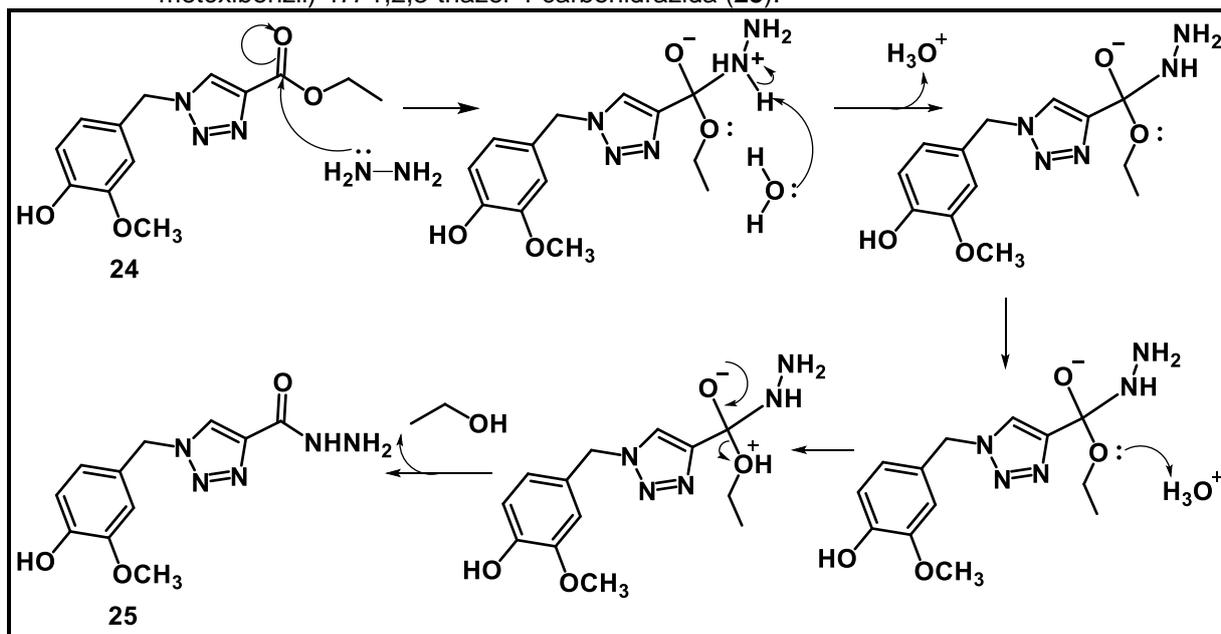
Fonte: do autor.

3.1.2.4 Reação de hidrazinólise para obtenção da hidrazida intermediária (**25**)



Nesta etapa obtivemos o intermediário chave para a síntese das moléculas alvo, a hidrazida **25**. A reação de hidrazinólise ocorre entre um éster e o monohidrato de hidrazina e resulta na hidrazida e etanol (FIGURA 38, pg. 68) (ROMEIRO, 2009). Inicialmente os elétrons livres do nitrogênio da hidrazina atacam o carbono carbonílico do éster **24**, formando um intermediário reativo, em seguida uma transferência de prótons mediada por solvente dá origem à hidrazida **25** com a saída de uma molécula de etanol. Esta etapa ocorre a temperatura ambiente (25°C - 30°C) e apresenta rendimentos de aproximadamente 70%.

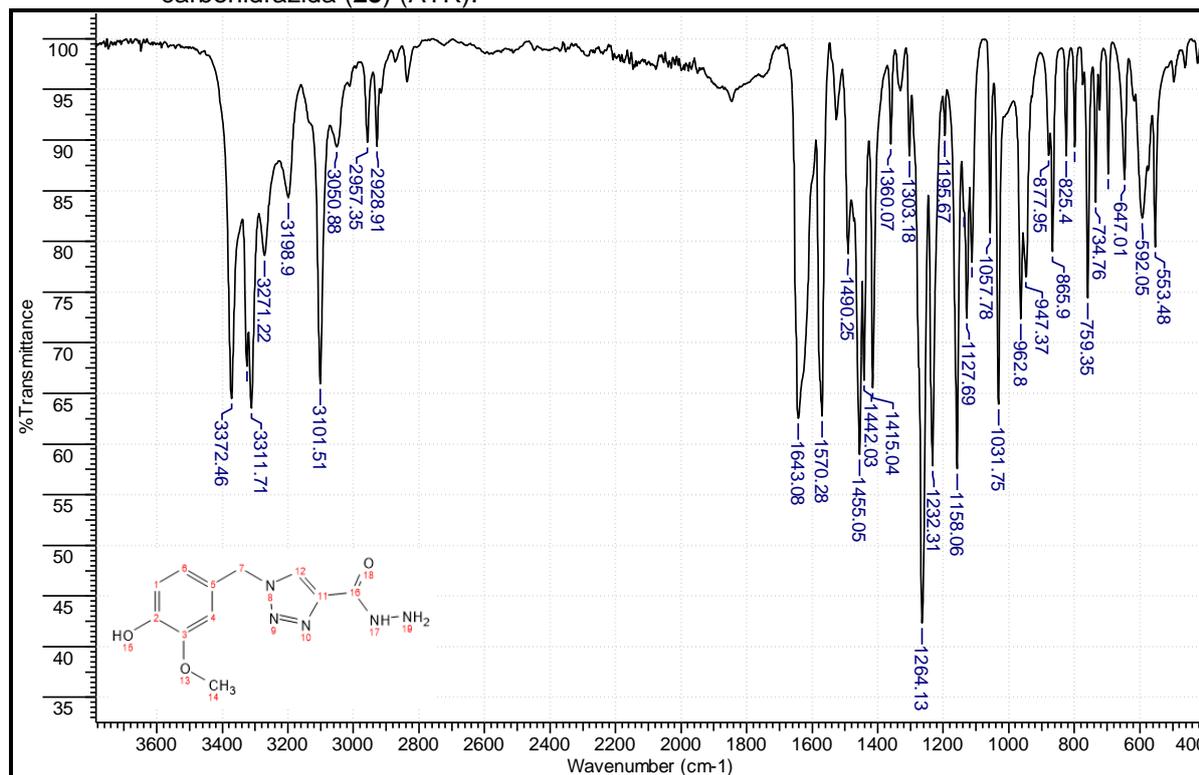
Figura 38 - Proposta de mecanismo de reação da hidrazinólise para formação de 1-(4-hidróxi-3-metóxi-benzil)-1*H*-1,2,3-triazol-4-carbohidrazida (25).



Fonte: do autor.

No espectro na região do IV (FIGURA 39, pg. 69) podemos destacar algumas bandas que são cruciais para apontar o sucesso da reação. Duas bandas em 3372 e 3311 cm^{-1} , estas bandas são características do estiramento da ligação N-H da hidrazida e a banda em 1643 cm^{-1} que pode ser atribuída ao estiramento da ligação C=O da carbonila de hidrazidas. As demais bandas da estrutura já foram discutidas e também podem ser encontradas.

Figura 39 - Espectro na região do infravermelho de 1-(4-hidróxi-3-metóxi-benzil)-1*H*-1,2,3-triazol-4-carbohidrazida (**25**) (ATR).

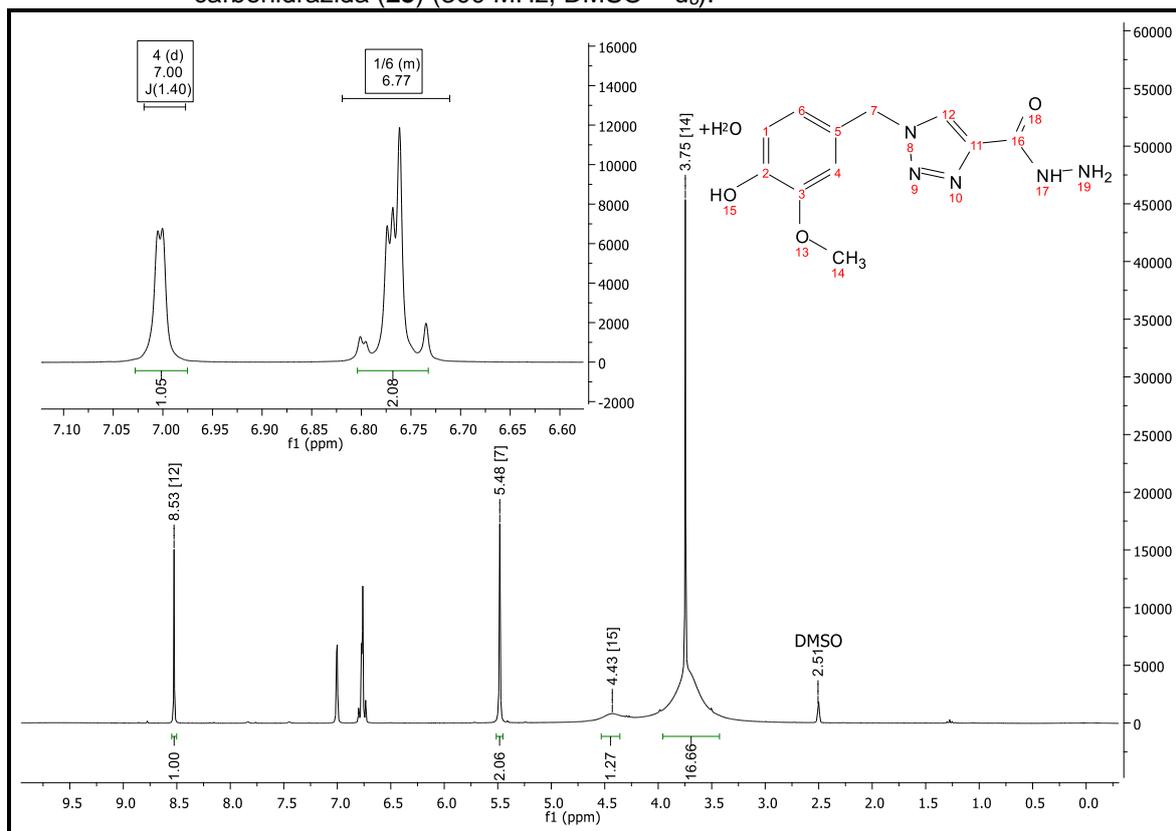


Fonte: do autor.

No espectro de RMN de ¹H (FIGURA 40, pg. 70) podemos ter uma confirmação da obtenção da estrutura esperada, por identificarmos um sinal do hidrogênio do núcleo triazólico H-12 em δ 8,53, seguido de um duplete em δ 7,00 ($J= 1,40$ Hz) referente ao H-4 e um multiplete entre δ 6,82-6,71 que podem ser atribuídos aos hidrogênios aromáticos H-1 e H-5 e H-6, respectivamente. Podemos encontrar também os sinais referentes aos hidrogênios H-7 e aos hidrogênios H-14 da metóxila, respectivamente, em δ 5,48 e 3,75; este último sobreposto ao sinal de H₂O residual do DMSO utilizado como solvente, por isso do valor da integral.

Além desses dados, foi obtido um mapa de correlação NOESY (FIGURA A41, pg. 189) para nos certificarmos que o padrão de substituição do anel triazólico foi realmente 1,4dissubstituído, os resultados corroboram a regioquímica do anel.

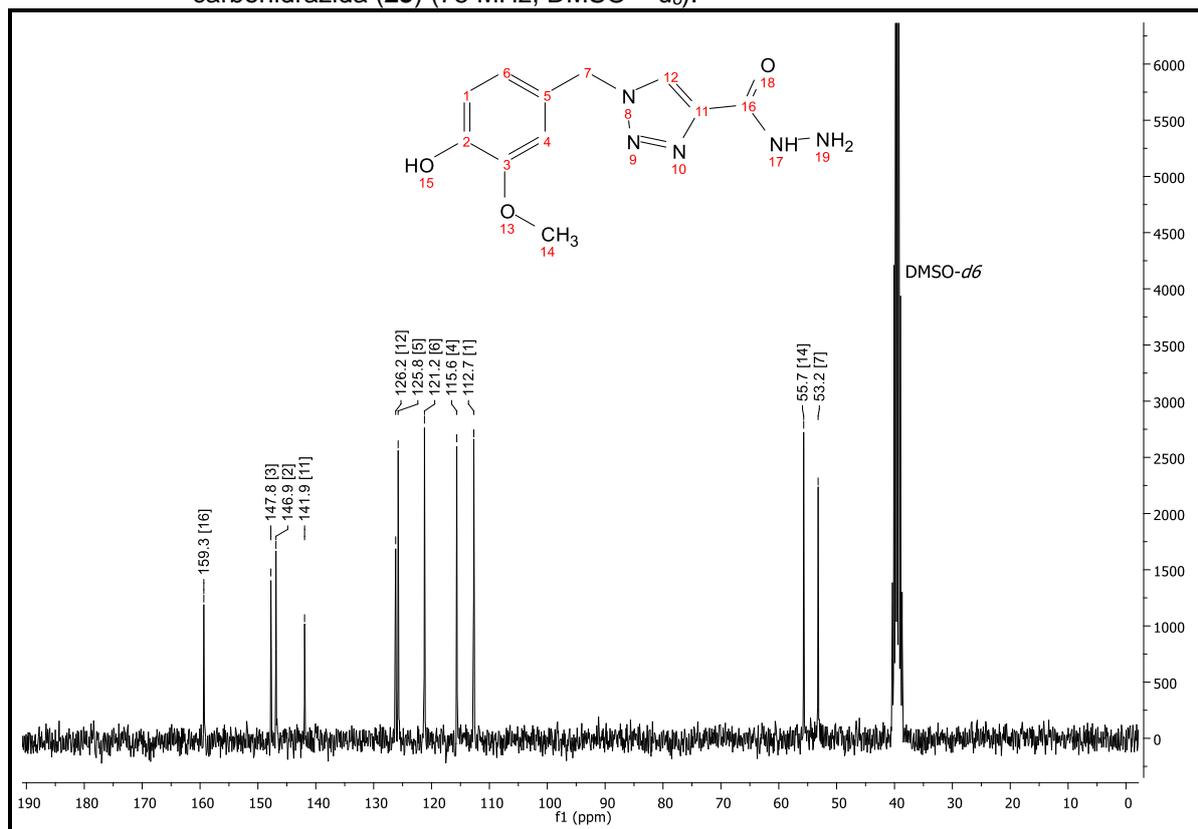
Figura 40 - Espectro de RMN de ^1H de 1-(4-hidróxi-3-metóxi-benzil)-1*H*-1,2,3-triazol-4-carbohidrazida (**25**) (300 MHz, $\text{DMSO} - d_6$).



Fonte: do autor.

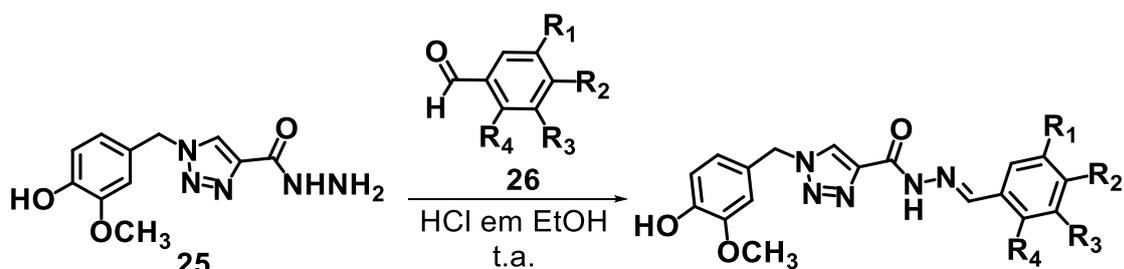
No espectro de RMN de ^{13}C (FIGURA 41, pg. 71) observou-se todos os sinais que corroboram com a estrutura desejada, entre os quais podemos destacar em δ 159,3 o sinal do carbono carbonílico da hidrazida, em δ 141,9 o sinal referente ao carbono triazólico substituído C-11, o carbono triazólico não substituído tem seu sinal em δ 126,2. Por fim no espectro de RMN de ^{13}C também é interessante notarmos o deslocamento do sinal do carbono carbonílico de δ 162 (FIGURA 37, pg.67) para 159,4; uma vez que o oxigênio é mais eletronegativo que o nitrogênio, portanto carbonos carbonílicos de ésteres possuem um deslocamento químico superior a carbonos carbonílicos de hidrazidas.

Figura 41 - Espectro de RMN de ^{13}C de 1-(4-hidróxi-3-metóxi-benzil)-1*H*-1,2,3-triazol-4-carbohidrazida (**25**) (75 MHz, DMSO - d_6).



Fonte: do autor.

3.1.2.5 Síntese das 1,2,3-triazóis-*N*-acilidrazonas (**PQM-229-241**).

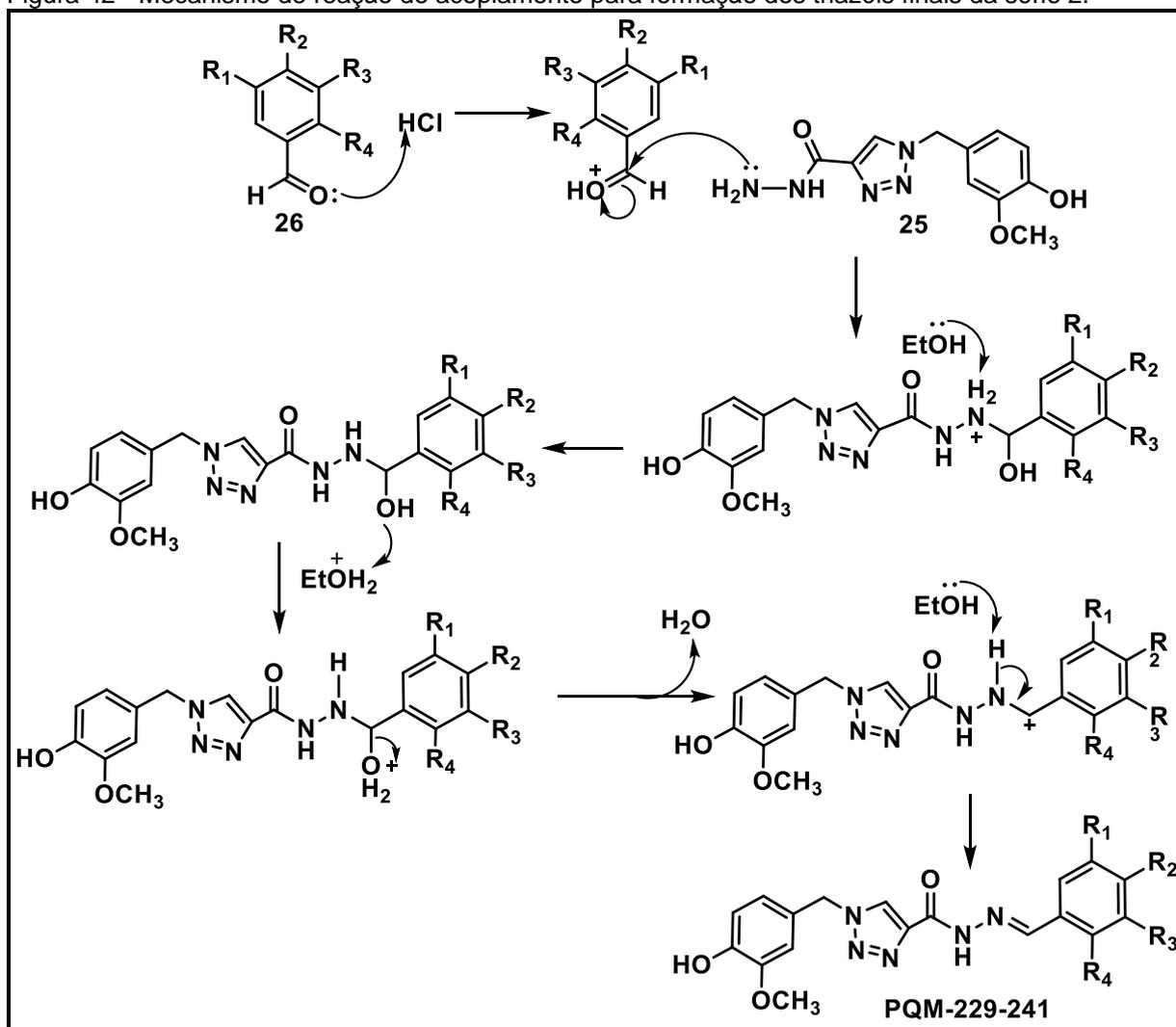


- PQM-229**- $R_1 = \text{H}$, $R_2 = \text{OH}$, $R_3 = \text{H}$, $R_4 = \text{H}$.
PQM-230- $R_1 = \text{OH}$, $R_2 = \text{H}$, $R_3 = \text{OH}$, $R_4 = \text{H}$.
PQM-231- $R_1 = \text{H}$, $R_2 = \text{OCH}_3$, $R_3 = \text{H}$, $R_4 = \text{H}$.
PQM-232- $R_1 = \text{OCH}_3$, $R_2 = \text{H}$, $R_3 = \text{OCH}_3$, $R_4 = \text{H}$.
PQM-233- $R_1 = \text{OCH}_3$, $R_2 = \text{OH}$, $R_3 = \text{H}$, $R_4 = \text{H}$.
PQM-234- $R_1 = \text{H}$, $R_2 = \text{H}$, $R_3 = \text{H}$, $R_4 = \text{H}$.
PQM-235- $R_1 = \text{H}$, $R_2 = N$ -piperidina, $R_3 = \text{H}$, $R_4 = \text{H}$.
PQM-236- $R_1 = \text{H}$, $R_2 = \text{Cl}$, $R_3 = \text{H}$, $R_4 = \text{H}$.
PQM-237- $R_1 = \text{H}$, $R_2 = \text{H}$, $R_3 = \text{Cl}$, $R_4 = \text{H}$.
PQM-238- $R_1 = \text{H}$, $R_2 = \text{H}$, $R_3 = \text{H}$, $R_4 = \text{Cl}$.
PQM-239- $R_1 = \text{H}$, $R_2 = \text{F}$, $R_3 = \text{H}$, $R_4 = \text{H}$.
PQM-240- $R_1 = \text{H}$, $R_2 = \text{H}$, $R_3 = \text{H}$, $R_4 = \text{F}$.
PQM-241- $R_1 = \text{H}$, $R_2 = \text{H}$, $R_3 = \text{F}$, $R_4 = \text{H}$.

A reação para obtenção dos compostos finais é uma reação de acoplamento em meio ácido entre a hidrazida **25** e aldeídos com padrões de substituição diferente.

O mecanismo de reação (FIGURA 42) é semelhante ao apresentado anteriormente (FIGURA 17, pg. 45). As reações de acoplamento apresentaram rendimentos na faixa de 73% - 88%, os produtos de acoplamento foram purificados por precipitação em etanol gelado e o excesso de solvente retirado sob vácuo, em linha de alto vácuo. Como exemplo de caracterização estrutural dos 1,2,3-triazóis-*N*-acilidrazonas, os espectros que serão discutidos a seguir são referente à caracterização de (*E*)-1-(4-hidróxi-3-metóxi-benzil)-*N*-(4-hidróxi-3-metóxi-benzilideno) -1*H*-1,2,3-triazol-4-carbohidrazida (**PQM-233**).

Figura 42 - Mecanismo de reação de acoplamento para formação dos triazóis finais da série 2.

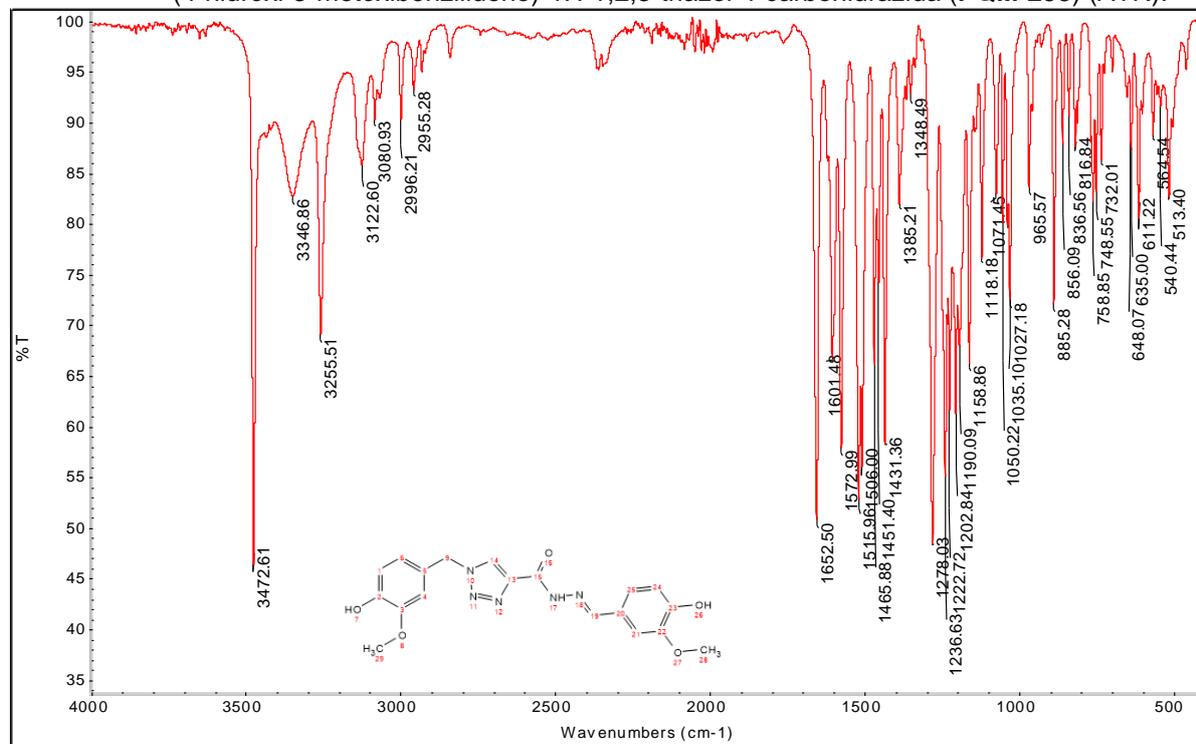


Fonte: do autor.

No espectro de absorção na região do IV (FIGURA 43) podemos observar todas as bandas referente a molécula desejada, com destaque para banda em 3472 cm⁻¹ referente ao estiramento da ligação N-H do grupo *N*-acilidrazona, a banda em 3346 cm⁻¹ referente ao estiramento da ligação O-H, a banda em 1652 cm⁻¹ referente ao

estiramento da ligação C=O de hidrazidas e em 1572 cm^{-1} banda referente a deformação angular da ligação N-H. As demais bandas já discutidas anteriormente também podem ser observadas.

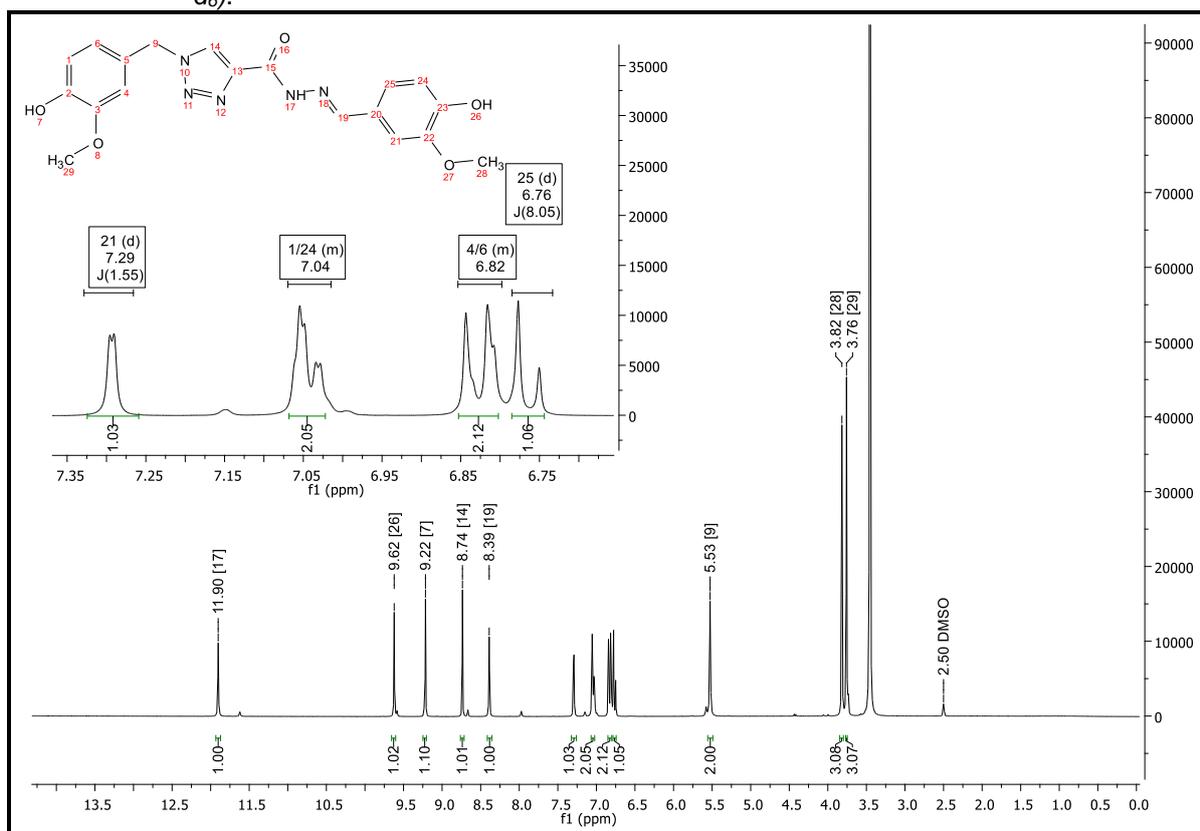
Figura 43 - Espectro de absorção na região do infravermelho de (*E*)-1-(4-hidróxi-3-metóxi-benzil)-*N*-(4-hidróxi-3-metóxi-benzilideno)-1*H*-1,2,3-triazol-4-carbohidrazida (**PQM-233**) (ATR).



Fonte: do autor.

No espectro de RMN de ^1H (FIGURA 44, pg 74) podemos observar todos os sinais referentes a molécula **PQM-233**, podemos destacar um simpleto em δ 11,90 referente ao hidrogênio H-17 ligado ao N do grupo *N*-acilidrazona, um simpleto em δ 8,74 referente a H-14 do anel triazólico, um simpleto em δ 8,39 referente ao hidrogênio H-19 da ligação N=CH, sinal este que corrobora o sucesso da reação de acoplamento e que, assim como discutido anteriormente, sugere a obtenção do isômero *E*. Os demais sinais referem aos hidrogênios aromáticos e as metóxilas também podem ser observados. Além do sinal do H-14 fica interessante observar o duplete centrado em δ 7,29; o multiplete em δ 7,07-7,01; o duplete em δ 6,78 e o simpleto δ 3,82 os quais são atribuídos os hidrogênios aromáticos e da metóxila provenientes do aldeído utilizado no acoplamento para a obtenção de **PQM-233**.

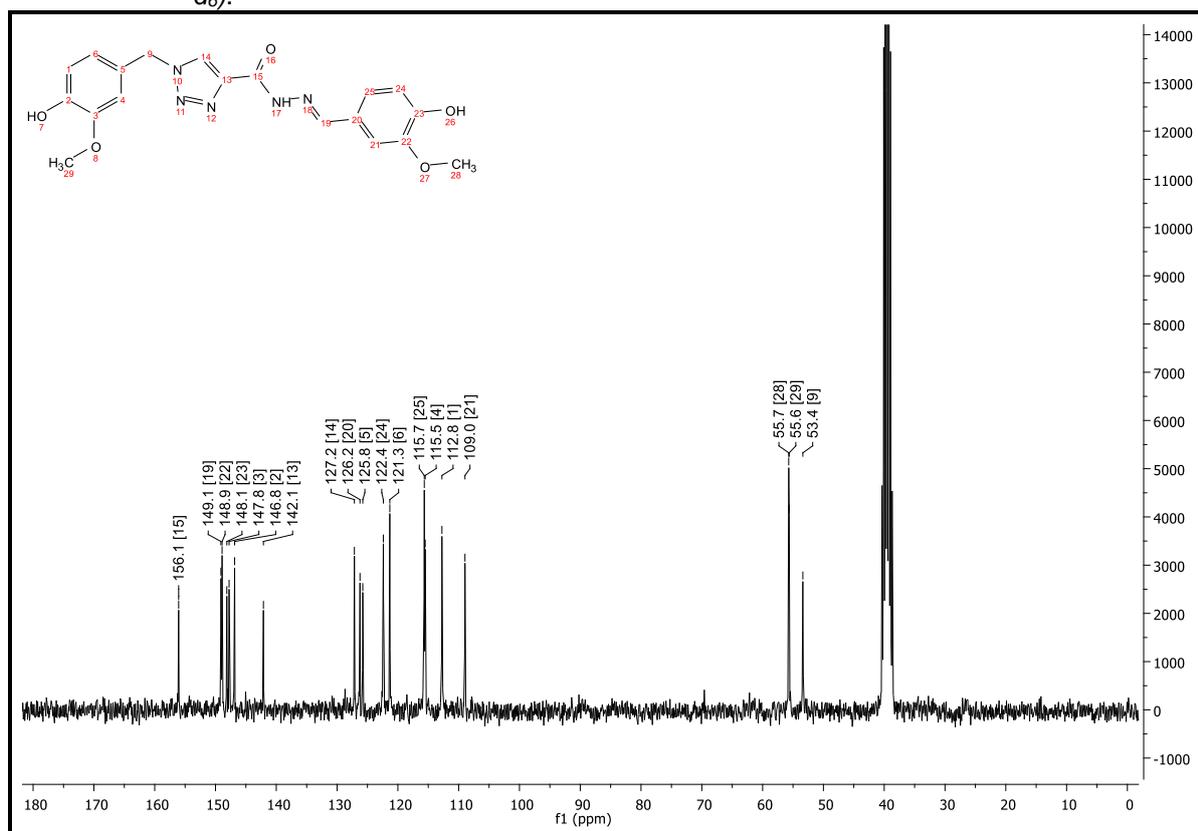
Figura 44 - Espectro de RMN de ^1H de (*E*)-1-(4-hidróxi-3-metóxi-benzil)-*N*-(4-hidróxi-3-metóxi-benzilideno)-1*H*-1,2,3-triazol-4-carbohidrazida (**PQM-233**) (300 MHz, $\text{DMSO-}d_6$).



Fonte: do autor.

No espectro de RMN de ^{13}C (FIGURA 45, pg 75) observa-se todos os sinais referentes à estrutura desejada, além dos sinais aromáticos e dos carbonos metoxílicos podemos apontar o sinal em δ 156,1 referente ao carbono carbonílico C-15, em δ 149,1 o sinal do carbono C-19, carbono da ligação $\text{N}=\text{CH}$ e o sinal em δ 127,2 referente ao carbono do anel triazólico C-14, que corroboram o sucesso da reação de acoplamento. Os demais sinais já discutidos anteriormente também podem ser encontrados no espectro.

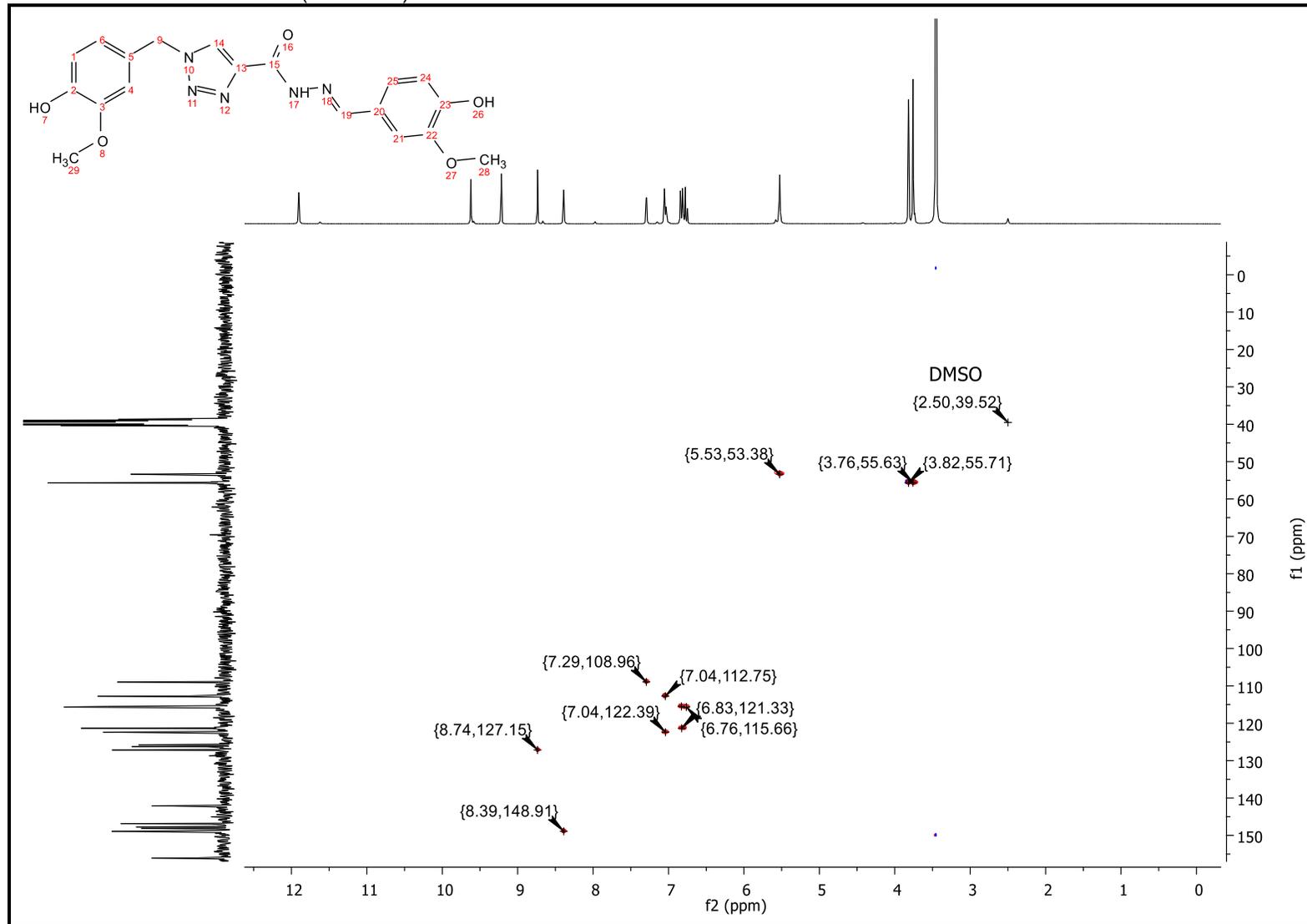
Figura 45 - Espectro de RMN de ^{13}C de (*E*)-1-(4-hidróxi-3-metóxi-benzil)-*N'*-(4-hidróxi-3-metóxi-benzilideno)-1*H*-1,2,3-triazol-4-carbohidrazida (**PQM-233**) (75 MHz, $\text{DMSO-}d_6$).



Fonte: do autor.

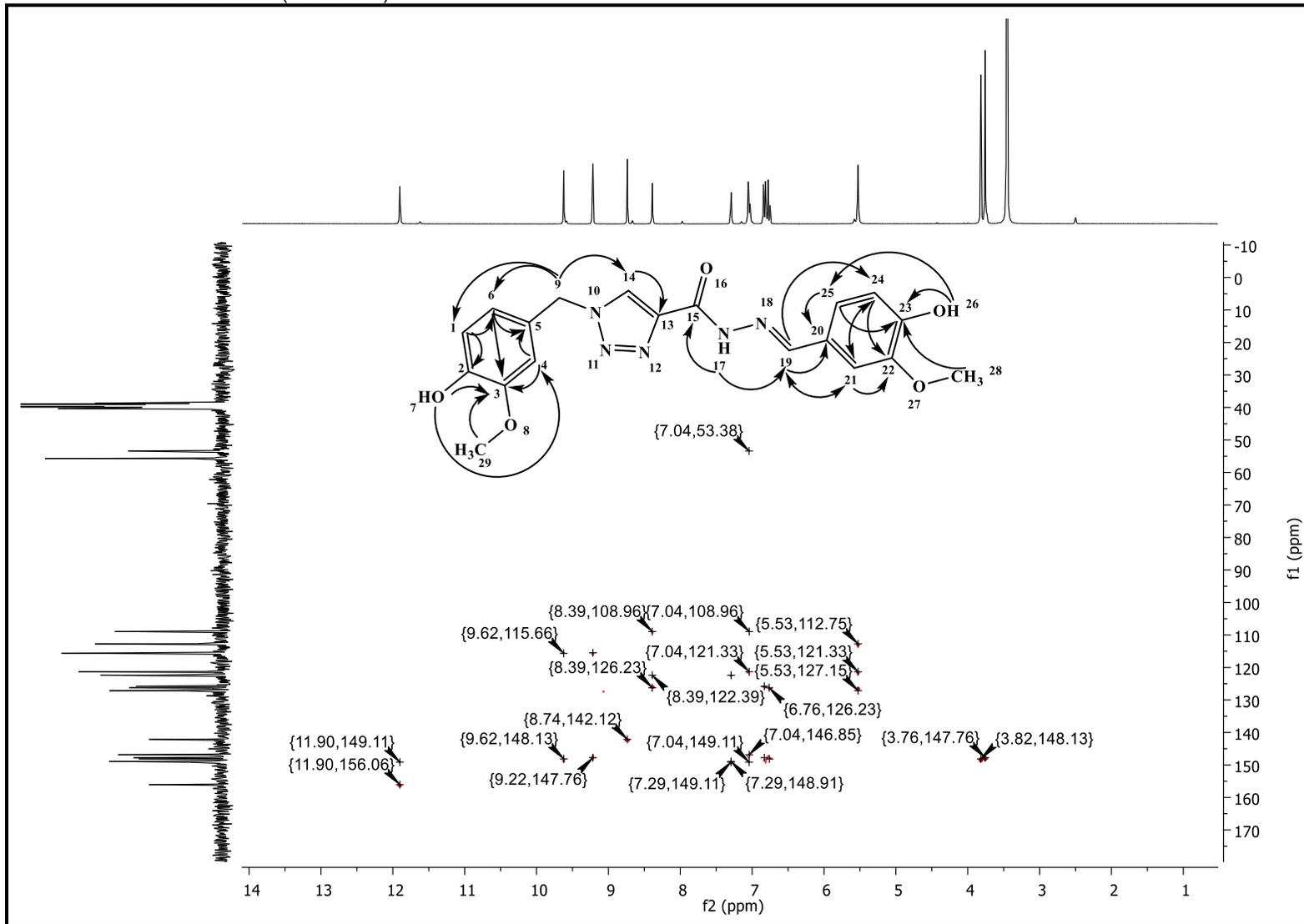
Foram utilizados os mapas de correlação HSQC (FIGURA 46, pg. 76) e HMBC (FIGURA 47, pg. 77) para atribuição inequívoca dos sinais do RMN de ^1H e RMN de ^{13}C discutidos anteriormente. Quando analisamos os deslocamentos químicos da ligação $-\text{CH}=\text{N}$ do grupo *N*-acilidrazônico, foram verificados valores no RMN de ^1H e ^{13}C na região de 8,25-8,71 ppm e 145,2-150,7 ppm, respectivamente, esses valores evidenciam a obtenção do isômero *E* após a reação de acoplamento (CUNHA, 2003).

Figura 46 - Mapa de correlação HSQC de (*E*)-1-(4-hidróxi-3-metóxi-benzil)-*N'*-(4-hidróxi-3-metóxi-benzilideno)-1*H*-1,2,3-triazol-4-carbohidrazida (**PQM-233**).



Fonte: do autor.

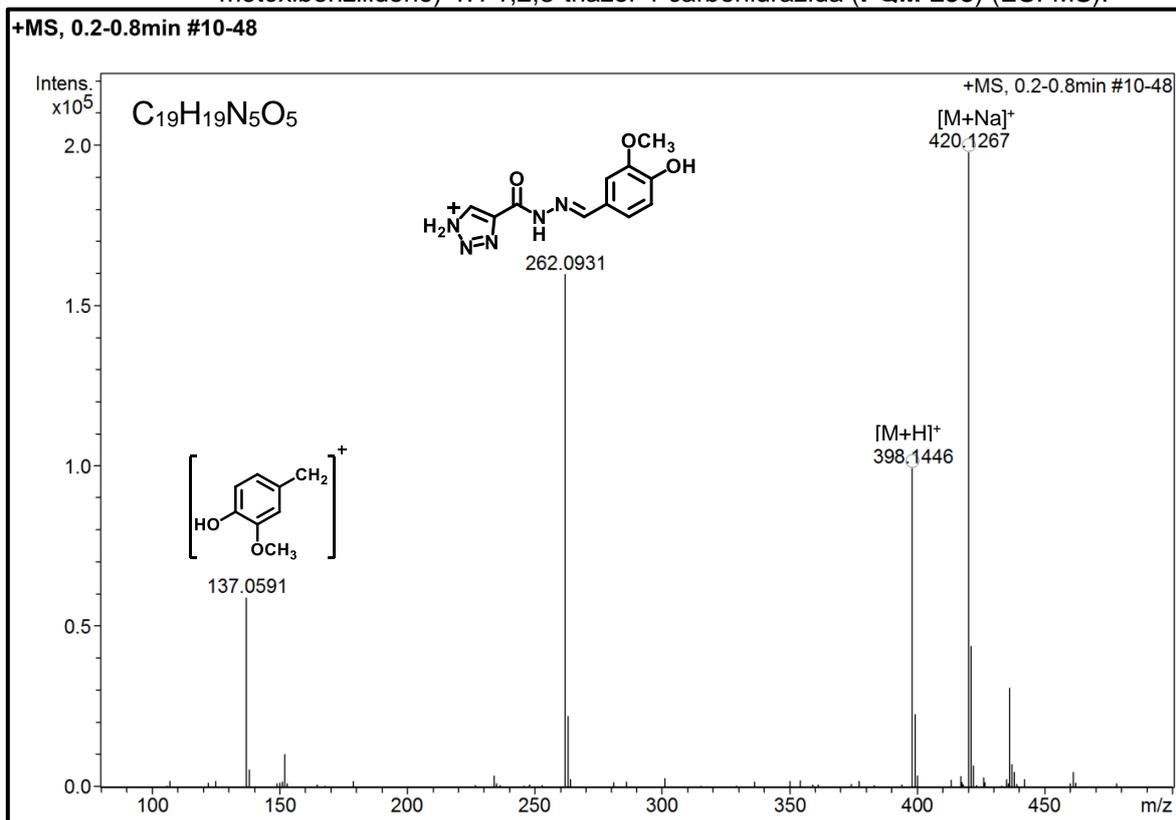
Figura 47 - Mapa de correlação HMBC de (*E*)-1-(4-hidróxi-3-metóxi-benzil)-*N'*-(4-hidróxi-3-metóxi-benzilideno)-1*H*-1,2,3-triazol-4-carboidrazida (**PQM-233**).



Fonte: do autor.

No espectro de massas de alta resolução (FIGURA 48) podemos identificar 4 sinais, sendo que os sinais referentes a molécula íntegra são o pico íon molecular $[M+H]^+$ em $m/z = 398,1446$ e o pico íon molecular $[M+Na]^+$ em $m/z = 420,1267$, cujos valores calculados foram $398,1464 m/z$ e $420,1284 m/z$, respectivamente.

Figura 48 - Espectro de Massas de (*E*)-1-(4-hidróxi-3-metóxi-benzil)-*N'*-(4-hidróxi-3-metóxi-benzilideno)-1*H*-1,2,3-triazol-4-carbohidrazida (**PQM-233**) (ESI-MS).



Fonte: do autor.

3.2 AVALIAÇÃO FARMACOLÓGICA

Nesta seção serão expostos e discutidos os resultados da atividade biológica dos híbridos descritos anteriormente. Os compostos submetidos aos testes biológicos tiveram seu grau de pureza determinado *via* HPLC e todos apresentaram valores superiores a 95% de pureza (Anexo II).

3.2.1 Estudos *in silico* para predição de propriedades de absorção, distribuição, metabolismo e excreção (ADME)

Sabendo que compostos como a curcumina, resveratrol e chalconas em geral possuem dificuldades e limitações farmacocinéticas, sobretudo quanto à absorção oral, distribuição e permeabilidade na barreira hematoencefálica (BHE) (CHURCHES, 2014; CONG, 2019; NGOUNGOURE, 2014). Foram obtidos alguns indicativos quanto a esses parâmetros para as moléculas-alvo deste trabalho, procedeu-se uma avaliação *in silico* de previsão dos parâmetros de absorção, distribuição, metabolismo e excreção (ADME), os estão demonstrados na TABELA 1 (pg. 80). Os resultados demonstram que todas as moléculas apresentaram alta capacidade de absorção por via oral, variando de 73 a 100%. Com relação às moléculas da série de derivados cinâmicos podemos destacar que todas apresentaram predição de absorção em membrana em células Caco (QPPCaco) adequados, com valores médios aos valores de referência, se compararmos com valores calculados para o donepezil, podemos sugerir que **PQM-160**, **PQM-161**, **PQM-164** e **PQM-197** teriam certa dificuldade ou limitações nessa absorção, mas ainda assim, com exceção de **PQM-161**, são melhores que a curcumina. A predição de permeabilidade na BHE (QPlogBB) sugere que o acesso ao SNC por todas as moléculas da série seria mediano e bem mais baixo que o donepezil, fármaco que sabidamente acessa o SNC e, mais uma vez com exceção de **PQM-161**, todas seriam melhores que a curcumina no acesso ao SNC.

No caso da série de triazóis podemos verificar que todas as moléculas apresentaram alta capacidade de serem absorvidas por via oral, com absorção entre 72 e 92%. Quanto à predição em células Caco (QPPCaco) indica uma permeabilidade mediana se comparado com os valores do donepezil, sendo que, com exceção de **PQM-229**, **PQM-230** e **PQM-233**, todas apresentaram valores melhores que a curcumina. Quanto à permeabilidade na BHE (QPlogBB) os resultados preditivos

indicam que nossos compostos teria uma certa dificuldade no acesso ao SNC quando comparado aos valores do donepezil.

Tabela 1 – Propriedades moleculares e parâmetros farmacocinéticos previsto por estudos computacionais obtidos pelo software QikProp 3.1 (Schrödinger).

Compostos	QPlogP _{oc/ag}	ALH	DLH	PSA	% de abs. oral	QPlogS	QPPCaco	QPlogBB
PQM160	2,43	4,8	3	101,3	83,12	-3,888	221,5	-1,77
PQM161	2,26	5,5	4	123,8	72,93	-3,579	67,7	-2,41
PQM162	3,23	4,8	2	87,7	100	-4,336	724,0	-1,21
PQM163	3,28	5,5	2	96,5	100	-4,388	769,7	-1,25
PQM164	2,53	5,5	3	109,5	84,72	-3,976	250,5	-1,77
PQM196	3,16	4,0	2	79,6	96,13	-4,207	680,5	-1,17
PQM197	2,39	4,8	3	102,0	82,43	-3,881	208,1	-1,80
PQM198	4,00	4,0	1	66,0	100	-4,645	2224,4	-0,62
PQM199	3,99	4,8	1	74,8	100	-4,659	2364,6	-0,65
PQM200	3,25	4,8	2	87,7	100	-4,276	769,7	-1,17
PQM229	1,73	7,3	3	124,8	72,28	-3,595	92,7	-2,09
PQM230	1,07	8,0	4	147,3	61,12	-3,282	36,2	-2,57
PQM231	2,48	7,3	2	111,2	85,85	-3,911	303,7	-1,56
PQM232	2,54	8,0	2	120,1	86,24	-4,056	303,7	-1,65
PQM233	1,79	8,0	3	133,0	73,14	-3,708	98,7	-2,15
PQM234	2,45	6,5	2	102,4	85,70	-3,817	303,2	-1,48
PQM235	3,58	7,5	2	104,4	92,35	-5,709	303,2	-1,63
PQM236	2,92	6,5	2	102,4	88,48	-4,519	303,2	-1,34
PQM237	2,84	6,5	2	102,4	87,96	-4,287	303,2	-1,34
PQM238	2,68	6,5	2	100,7	88,97	-3,839	388,8	-1,30
PQM239	2,67	6,5	2	102,4	86,99	-4,154	303,2	-1,38
PQM240	2,47	6,5	2	102,1	85,90	-3,837	305,7	-1,46
PQM241	2,62	6,5	2	102,4	86,73	-4,045	303,2	-1,39
Curcumina	2,93	7,0	3	110,3	82,36	-3,396	234,4	-2,03
Donepezil	4,44	5,5	0	46,3	100	-4,338	894,5	0,12

Fonte: do autor.

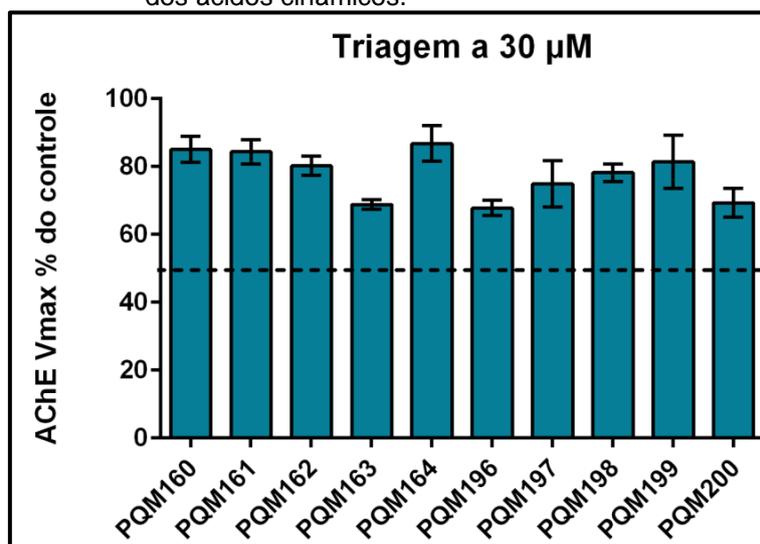
Legenda: **QPlogP_{oc/ag}** – Coeficiente de partição octanol/água (-2,0 a 6,5); **ALH** – Aceptores de ligação de hidrogênio (2 a 20); **DLH** – Doadores de ligação de hidrogênio (0 a 6); **PSA** – Áreas de superfície de Van der Waals de átomos de nitrogênio e oxigênio polares (7 a 200); **% de abs. oral** – Porcentagem de absorção humana por via oral (<25% - baixa e >80% - alta); **QPlogS** – Solubilidade aquosa (-6,5 a 0,5); **QPPCaco** – Permeabilidade em ensaio com célula Caco, modelo para absorção intestinal (<25 – baixa e >500 – alta); **QPlogBB** – Permeabilidade na barreira hematoencefálica (-3,0 a 1,2).

Sabendo das limitações das técnicas *in silico* quanto a sua reprodutibilidade em sistemas complexo, como estudos *in vivo*, optamos por seguir com as análises *in vitro* de todas as moléculas sintetizadas, sabendo que poderiam apresentar problemas de solubilidade e farmacocinética.

3.2.2 Avaliação da capacidade de inibição da enzima AChE

Este teste foi realizado no laboratório de Farmacologia Molecular da Universidade Federal do Rio de Janeiro utilizando metodologia descrita anteriormente (VIEGAS.; BOLZANI; PIMENTEL; *et al.*, 2005) com modificações. Nesse teste, a enzima AChE hidrolisa o substrato acetilcolina e resulta em tiocolina, que reage com 5,5'-ditio-bis (2-nitrobenzóico) (DTNB - reagente de Ellman), para produzir 2-nitrobenzoato-5-mercaptopicolina e 5-tio-2-nitrobenzoato que resultam em uma coloração púrpura que pode ser detectada a 405 nm (ELLMAN, 1961). Foi realizado uma triagem com todos os compostos sintetizados na concentração de 30 μM (concentração padrão para triagem). A FIGURA 49 apresenta o percentual de atividade da AChE e podemos ver a atividade inibidora dos derivados dos ácidos cinâmicos (**PQM-160 a 164** e **PQM-196 a 200**), nestes resultados podemos verificar que não houve inibição significativa de AChE por nenhuma das substâncias.

Figura 49 - Avaliação de inibição de AChE da série de derivados dos ácidos cinâmicos.

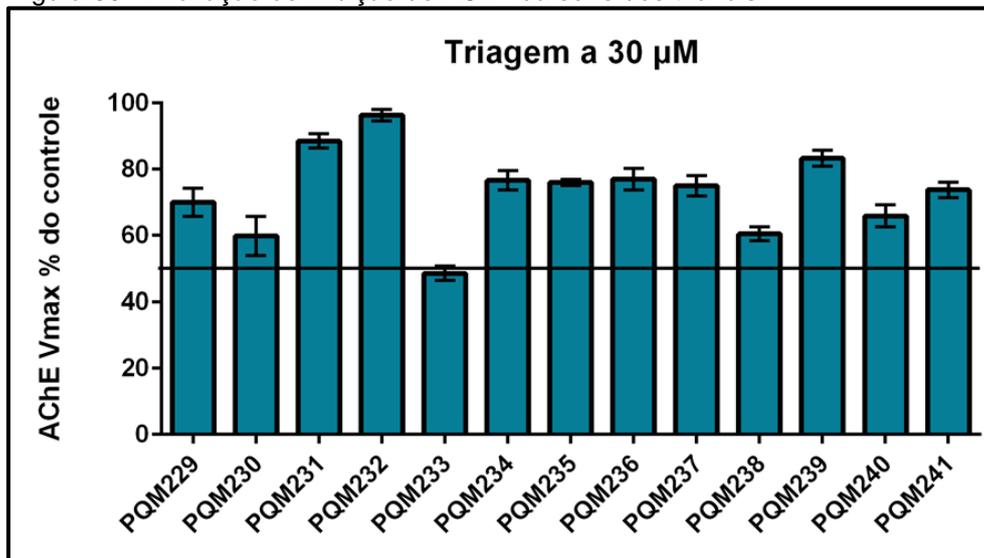


Fonte: do autor.

A FIGURA 50 (pg. 82) expressa o percentual de inibição de AChE por parte dos triazóis sintetizados neste trabalho (**PQM 229-241**), neste conjunto de resultados podemos identificar **PQM-233**, que apresentou uma inibição de AChE maior que 50% na concentração avaliada, posteriormente este teve seu Cl_{50} para AChE determinado. Apesar de **PQM-233** apresentar uma concentração inibitória 50 (Cl_{50}) de 20,22 μM , relativamente alto se comparado ao Donepezil (0,026 μM , (DIAS, 2017)), apresentou

um resultado bem melhor que a Curcumina ($CI_{50} = 132,13 \mu\text{M}$, (DIAS, 2017)) e baixo o suficiente para a continuação dos estudos, a fim de verificar uma possível atividade multialvo desta molécula.

Figura 50 - Avaliação de inibição de AChE da série dos triazóis.



Fonte: do autor.

Para melhor compreensão dos resultados de inibição de AChE pela série de triazóis foi realizado um estudo de modelagem molecular com os compostos mais ativos, **PQM-230** e **PQM-233**, para finalidade de comparação também foi realizado o *docking* molecular de **PQM-232**, o menos ativo da série. Os resultados de *docking score* podem ser vistos na TABELA 2.

Tabela 2 - Resultados de energia de interação dos complexos.

Substâncias	<i>Docking Score</i>				Conjunto de <i>Docking</i>	
	1ZGC	1Q84	2CKM	4EY7	Score	PDB ID
PQM-230	-10,670	-9,630	-8,191	-10,684	-10,684	4EY7
PQM-232	-8,787	-9,146	-8,466	-8,829	-9,146	1Q84
PQM-233	-10,196	-9,389	-8,098	-8,784	-10,196	1ZGC
Donepezil	-11,136	-10,064	-12,575	-17,941	-17,941	4EY7
Curcumina	-10,515	-9,136	-9,865	-9,984	-10,515	1ZGC
Resveratrol	-9,798	-10,531	-7,326	-9,224	-10,531	1Q84

Fonte: do autor.

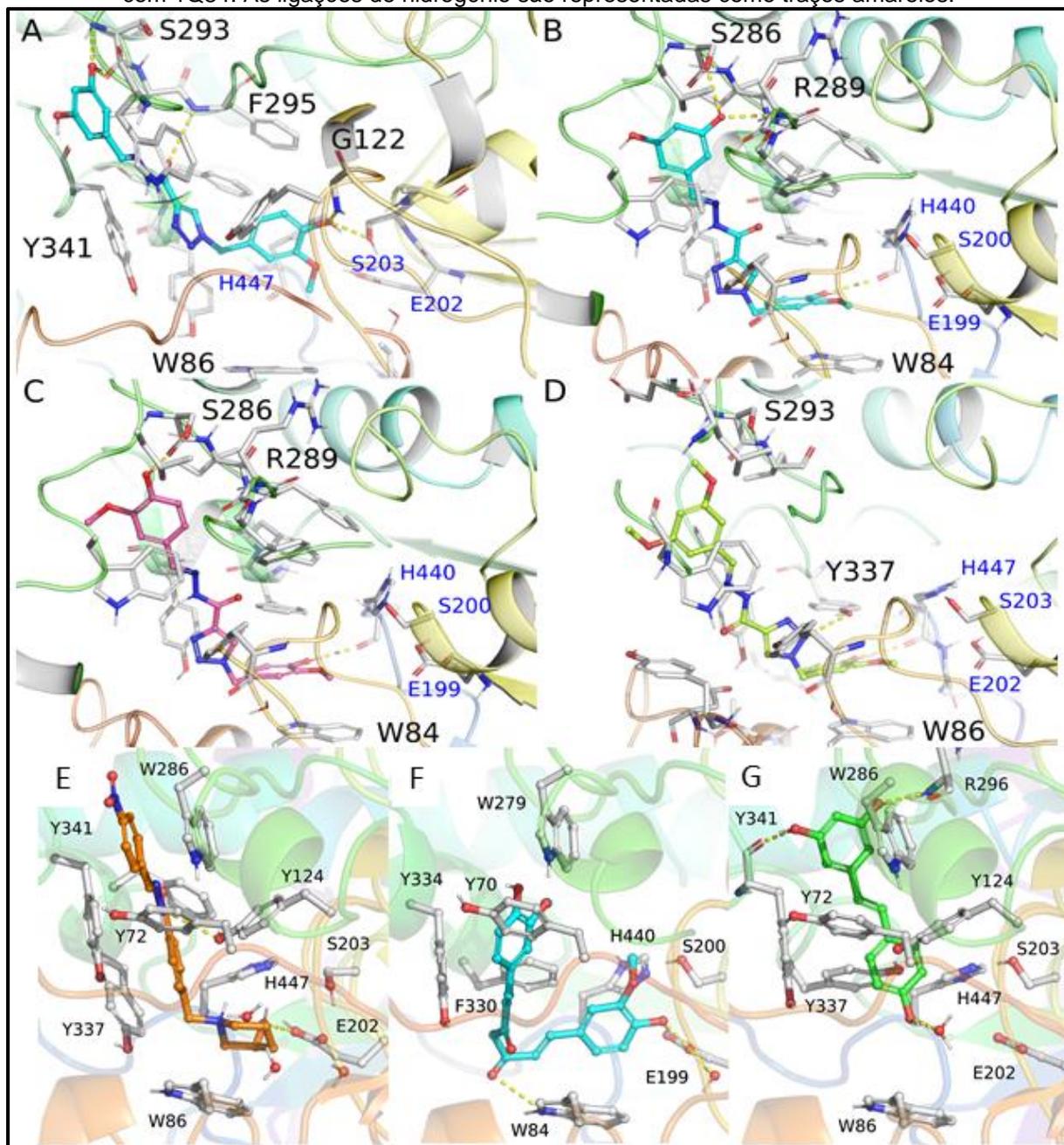
Os resultados apontam que cada composto interage melhor com diferentes conformações de AChE, mas com energias de ancoragem semelhantes, **PQM-230** (-10,684; 4EY7), **PQM-232** (-9,146; 1Q84) e **PQM-233** (-10,196; 1ZGC), com valores próximos da curcumina (-10,515; 1ZGC) e do resveratrol (-10,531; 1Q84), todas com menos afinidade que o Donepezil (-17.941).

O modo de interação das moléculas sintetizadas neste trabalho com as diferentes conformações de AChE são semelhantes. O anel 4-hidróxi-3-metóxi, proveniente da hidrazida intermediária se encontra no fundo da cavidade enzimática realizando uma ligação de hidrogênio entre a hidróxila fenólica e resíduos de aminoácidos S200 ou S203, dependendo da conformação da enzima. Enquanto que o anel substituído, proveniente dos aldeídos utilizados na síntese fica mais exposto ao solvente próximo do sítio aniônico periférico (SAP) (FIGURA 51, pg. 84). Podemos observar que **PQM-230** interage com as conformações de AChE 4EY7 e 1ZGC com energias de ancoragem semelhantes, mas modos de interação diferentes, sendo a forma observada na estrutura 1ZGC idêntica à prevista para o composto **PQM-233** frente a mesma conformação de AChE.

Na interação de **PQM-230** com a conformação 1ZGC (pontuação de ancoragem = -10,67, FIGURA 51B, pg. 84), três ligações de hidrogênio foram previstas: (i) um grupo hidróxila do anel metóxfenol realiza uma ligação de hidrogênio o resíduo H440, (ii) o grupo hidróxila do anel 3,5-diidróxifenil faz duas ligações de hidrogênio com AChE, doando uma ligação para o resíduos da cadeia lateral S286 e aceitando outra do resíduo da cadeia principal A289. A conformação 1ZGC da AChE permitiu que o grupo 2-metóxfenol fosse empacotado entre os resíduos aromáticos T84 e P330 no fundo da cavidade, fazendo interações favoráveis ao empilhamento π .

A molécula **PQM-233** faz as mesmas interações encontradas para **PQM-230** na conformação 1ZGC, exceto que a hidróxila do anel 2-metóxfenol ligado a grupo N-acilidrazônico é capaz de produzir apenas uma ligação de hidrogênio com o resíduo da cadeia lateral S286, na entrada do sítio de ligação, enquanto que o grupo metóxil fica exposto ao solvente (FIGURA 51C, pg. 84). No composto **PQM-232**, a presença de dois grupos metóxila ligados ao anel exposto ao solvente, incapazes de estabelecer ligações de hidrogênio com SAP (Figura 51D, pg. 84), foi prejudicial para a sua afinidade por AChE quando comparado a **PQM-230** e **PQM-233**.

Figura 51 - Resultados de ancoragem para os compostos **PQM-230** complexado com 4EY7 (A) e 1ZGC (B), C) **PQM-233** complexado com 1ZGC, D) **PQM-232** complexado com 1Q84, E) **PQM-57** complexado com 4EY7, F) Curcumina complexada com 1ZGC e G) Resveratrol complexado com 1Q84. As ligações de hidrogênio são representadas como traços amarelos.



Fonte: do autor.

Quando observamos a molécula **PQM-57** (FIGURA 51E), potente inibidora de AChE sintetizada por nosso laboratório em trabalhos anteriores, possui um modo de ligação bastante similar ao observado experimentalmente para o donepezil, com o grupo 3-hydroxipiperidinyl interagindo no fundo da cavidade da AChE, principalmente com *Trp86* através de interação cátion-pi e ligação de hidrogênio do grupo hidroxila com a cadeia lateral do *Glu202* (2.9 Å). Interações do tipo *stacking* ou cátion-pi,

obsevas para vários inibidores potentes da AChE descritos na literatura, não estão presentes no composto **PQM-233**.

No composto **PQM-57**, o grupo NAH está localizado no meio da cavidade, possivelmente fazendo ligação de hidrogênio entre o nitrogênio do grupo amida com a cadeia lateral da Tyr-124 (3.4 Å), o qual é um resíduo de aminoácido com significativa flexibilidade, podendo adotar em solução uma conformação que otimize esta interação. No composto mais potente, **PQM-233**, o grupo NAH está localizado na entrada do sítio de ligação, mais exposto ao solvente e interagindo por ligação de hidrogênio com a cadeia principal da Phe-295. Por fim, o composto **PQM-57** possui interação de *stacking* com a cadeia lateral do Trp-279 do PAS, interação esta importante para a seletividade e potência de diversos inibidores duais da AChE. Esta interação também não foi predita para o composto **PQM-233** nas conformações 4EY7 e 1ZGC da enzima.

No modo de ligação predito para a curcumina (FIGURA 51F, pg. 84), uma unidade 2-metoxifenol encontra-se interagindo no fundo da cavidade enzimática, fazendo ligação de hidrogênio com a cadeia lateral do Glu202 (2.8 Å), porém sem interagir através de *stacking* com Trp-86. Uma das carbonilas da curcumina faz ligação de hidrogênio com a cadeia lateral do Trp-84 (3.3 Å). A segunda unidade 2-meoxifenol está localizada próxima ao PAS, exposta ao solvente, porém sem realizar interações do tipo *stacking* com os resíduos Trp-279 e Tyr-70.

O resveratrol teve seu melhor modo de ligação predito na conformação da AChE **1Q84** (FIGURA 51G, pg. 84), realizando uma ligação de hidrogênio entre a hidroxila do grupo fenol e uma molécula de água conservada (2.9 Å), porém sem alcançar o fundo da cavidade enzimática, enquanto o anel aromático do fenol está empacotado por interações do tipo T-*stacking* com os resíduos Tyr-337 e Tyr-124. O grupo 3,5-diidroxil interage na entrada da cavidade através de duas ligações de hidrogênio entre cada hidroxila com a cadeia principal da Arg-296 (2.8 Å) e a cadeia principal da Tyr-341 (2.7 Å). Não foram preditas interações de *stacking* do resveratrol com os resíduos aromáticos do PAS.

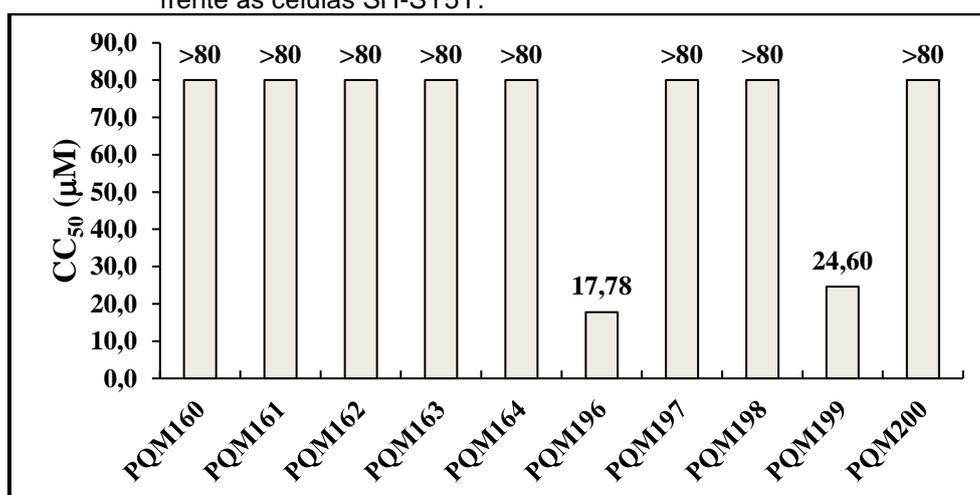
Portanto, podemos concluir que o modo de interação de PQM-233 é bastante semelhante a interação que podemos encontrar na curcumina e no resveratrol, todas elas com a ausência das interações do tipo *stacking*.

3.2.3 Avaliação da citotoxicidade dos compostos frente a células de neuroblastoma humano SH-SY5Y *via* MTT

A avaliação de citotoxicidade foi realizada com todos os compostos sintetizados em diferentes concentrações (80-2,5 μM) e frente a células de neuroblastoma humano SH-SY5Y. O teste foi realizado *via* MTT (brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil) tetrazólico), que é um teste rápido e objetivo que verifica viabilidade celular por meio de detecção de reações colorimétricas. O MTT (coloração amarela), quando incubado com células vivas é reduzido por enzimas mitocondriais (succinato-desidrogenases) formando cristais de formazana (coloração violeta). A quantidade de cristais formados é diretamente proporcional ao número de células vivas. Assim, quanto mais escura a coloração, ao final da reação, maior é viabilidade celular e a atividade da cadeia respiratória (MOSMANN, 1983).

Este teste é especialmente importante de ser realizado no início dos testes biológicos, pois impede a continuação de estudos com moléculas que aparentemente são ativas, porém tóxicas para as células neuronais. Neste aspecto os derivados cinâmicos **PQM-196** e **PQM-199** (FIGURA 52), com concentração citotóxica 50 (CC_{50}) de 17,78 e 24,60 μM respectivamente, foram evidenciados por sua alta toxicidade neuronal, ao contrário das demais substâncias da série que demonstraram ótima segurança e toxicidade não detectada neste teste.

Figura 52 - Gráfico com os valores de CC_{50} dos derivados dos ácidos cinâmicos frente às células SH-SY5Y.

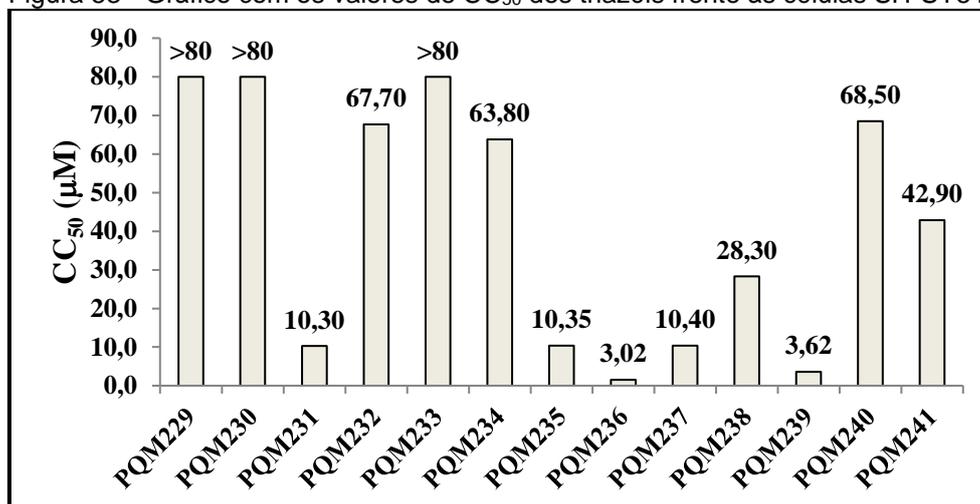


Fonte: do autor.

No caso dos triazóis (FIGURA 53, pg. 86), a toxicidade neuronal foi maior se comparada com a série cinâmica. Porém, podemos destacar **PQM-229**, **PQM-230** e

PQM-233 que não apresentaram toxicidade e ainda **PQM-232** ($CC_{50} = 67,70 \mu\text{M}$), **PQM-234** ($CC_{50} = 63,80 \mu\text{M}$) e **PQM-240** ($CC_{50} = 68,50 \mu\text{M}$) que apresentaram baixa toxicidade. O restante das substâncias apresentaram alta citotoxicidade contra células neuronais SH-SY5Y, justificando seu descarte em avaliações adicionais.

Figura 53 - Gráfico com os valores de CC_{50} dos triazóis frente às células SH-SY5Y.



Fonte: do autor.

Esses valores de toxicidade foram considerados relevante devido as concentrações utilizadas nos testes subsequentes.

3.2.4 Determinação do perfil antioxidante

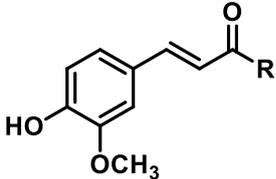
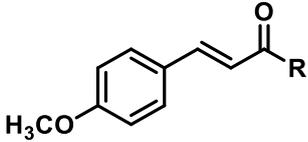
Devido à importância dos aspectos oxidativos no desenvolvimento fisiopatológico das doenças neurodegenerativas, foi realizada uma série de ensaios para avaliação do perfil antioxidante das moléculas-alvo, tanto quanto à atividade direta, quanto à indireta. O conjunto de resultados obtidos nos levou a realizar avaliações com modelos que mimetizam o estresse oxidativo da DP.

3.2.4.1 Avaliação da capacidade sequestrante de radicais livres gerados por 2,2-difenil-1-picrilidrazilo (DPPH)

Inicialmente todas as moléculas foram avaliadas quanto à capacidade sequestrante do radical DPPH, em diferentes concentrações dos compostos-teste (200-1,56 mg/L), possibilitando o cálculo da concentração efetiva 50 (CE_{50} em μM).

Ácido ascórbico e trolóx foram utilizados como antioxidantes de referência e os resultados estão mostrados na TABELA 3.

Tabela 3 - Valores de CE_{50} para capacidade sequestrante de DPPH

Der. Ácido cinâmico	CE_{50} (μ M)	Triazóis	CE_{50} (μ M)	
	PQM-160	34,5	PQM-229	> 200
	PQM-161	19,98	PQM-230	> 200
	PQM-162	25,32	PQM-231	> 200
	PQM-163	29,91	PQM-232	> 200
	PQM-164	0,93	PQM-233	30,44
	PQM-196	> 200	PQM-234	> 200
	PQM-197	> 200	PQM-235	81,51
	PQM-198	> 200	PQM-236	131,5
	PQM-199	> 200	PQM-237	190,9
	PQM-200	> 200	PQM-238	> 200
Padrões	CE_{50} (μ M)	PQM-239	59,00	
Ácido Ascórbico	14,92	PQM-240	138,5	
Trolóx	27,76	PQM-241	62,65	

Fonte: do autor.

Quando analisamos os resultados dos derivados cinâmicos, podemos verificar que os compostos sintetizados a partir do ácido ferúlico (**PQM-160** a **PQM-164**) apresentaram atividade antioxidante significativa, enquanto as substâncias sintetizadas a partir do ácido 4-metóxi cinâmico (**PQM-196** a **PQM-200**) não tiveram atividade antioxidante direta. Este fato nos leva a concluir que o padrão de substituição 4-hidróxi-3-metóxi presente no anel aromático do ácido ferúlico é indispensável para atividade antioxidante. Isso fica ainda mais evidente ao verificar-se que o composto **PQM-164**, que apresenta este mesmo padrão de substituição nos dois anéis aromáticos, foi o composto com melhor atividade antioxidante direta, exibindo um CE_{50} de 0,93 μ M, muito mais potente que os demais e que os compostos de referência. Recentemente, DIAS (2017) comparou atividade antioxidante entre compostos derivados do ácido ferúlico e do ácido iso-ferúlico e nossos resultados corroboram os resultados publicados, evidenciando que o padrão de substituição do ácido ferúlico é, de fato, determinante para uma boa atividade antioxidante (DIAS, 2017).

Já os compostos triazólicos **PQM-229** a **241** não apresentaram capacidade antioxidante significativa se comparados com os padrões. Porém, podemos destacar **PQM-233**, que apresentou um CE_{50} de 30,44 μ M, significativamente próximo ao valor de CE_{50} do trolóx (27,76 μ M). Se observarmos a congruência de resultados de **PQM-**

233, relativos as atividades de inibição de AChE (pg. 86) e do potencial antioxidante, podemos destaca-la como uma molécula com potencial atividade multialvo para DA.

3.2.4.2 Avaliação da inibição de produção de ERO induzida por *terc*-butil hidroperóxido (*t*-BOOH).

Em prosseguimento à determinação do perfil antioxidante dos compostos-alvo, foi realizada uma bateria de análises quanto à inibição de formação de EROs induzida por *t*-BOOH em culturas de células de neuroblastoma (SH-SY5Y). Este teste emprega o diacetato de dicloro-diidrofluoresceína (DCFH-DA), um reagente capaz de gerar fluorescência quando em contato com EROs, que é, então, detectada em leitor de microplaca (excitação a $\lambda = 485$ nm e emissão a $\lambda = 535$ nm).

Dois tipos de tratamento foram empregados nesta etapa experimental, cotratamento e pré-tratamento. O primeiro visa verificar a capacidade das moléculas bloquearem a formação de EROs pelas células induzidas por *t*-BOOH, uma vez que *t*-BOOH e o composto-teste são colocados ao mesmo tempo em contato com as células. O segundo visa verificar a capacidade das células de armazenar o composto de estudo e, em um segundo momento, inibir a formação de EROs induzida por *t*-BOOH. Neste segundo caso, as células são colocadas em contato com a substância-teste por 24h e, depois, o meio de cultura é descartado e adicionado *t*-BOOH. Os resultados estão expressos na TABELA 4, pg. 89.

Tabela 4 - Valores das diferentes abordagens nos testes de inibição de t-BOOH pelos compostos sintetizados.

Substâncias	Co-T 100 μ M t-BOOH (10 μ M) % Inib.	Cl ₅₀ (μ M) Co-T 100 μ M t-BOOH	Pre-T 100 μ M t-BOOH (10 μ M) % Inib.
PQM-160	49,64	-	-
PQM-161	75,86	0,71 (Fig. A89)	24,76
PQM-162	55,98	-	-
PQM-163	75,39	0,19 (Fig. A90)	in
PQM-164	77,36	0,51 (Fig. A91)	27,12
PQM-196	id	-	-
PQM-197	46,05	-	-
PQM-198	in	-	-
PQM-199	id	-	-
PQM-200	24,01	-	-
PQM-229	in	-	20,58
PQM-230	in	-	14,07
PQM-233	29,79	-	35,16

Fonte: do autor.

Legenda: id – Indeterminado. in – Inativo

O teste de co-tratamento foi realizado inicialmente com todos os compostos que apresentaram segurança no teste de citotoxicidade, a fim de confirmar os resultados do estudo com DPPH e verificar possível inibição indireta da formação de EROs, ou seja, ação do composto teste em inibir proteínas e cofatores pró-oxidantes ou ativar proteínas e cofatores antioxidantes.

Esse primeiro estudo foi feito com a concentração de 10 μ M dos compostos teste e 100 μ M de t-BOOH e os resultados estão expressos em % de inibição da formação de EROs. Podemos observar que os resultados corroboram os apresentados pelo DPPH, mostrando os derivados do ácido ferúlico bons antioxidantes, com exceção de **PQM-160**, todos os derivados ferúlicos apresentaram inibição de mais de 50% da formação de EROs na concentração testada, enquanto os derivados do ácido 4-metóxi-cinâmico não tiveram atividade antioxidante relevante.

Os compostos que inibiram mais de 70% a 10 μ M tiveram seu Cl₅₀ determinado, são eles **PQM-161** (Cl₅₀ = 0,71 μ M), **PQM-163** (Cl₅₀ = 0,19 μ M) e **PQM-164** (Cl₅₀ = 0,51 μ M). O fato de estes valores de Cl₅₀ serem significativamente menores que os encontrados na avaliação de DPPH nos sugerem que pode haver uma congruência

de mecanismos de ação, ou seja, estas moléculas podem atuar como antioxidantes diretos, reagindo com os radicais livres formados dando origem a radicais livres muito mais estáveis, e como antioxidantes indiretos, agindo na ativação de processos antioxidantes celulares ou na inibição da formação de EROs pela célula.

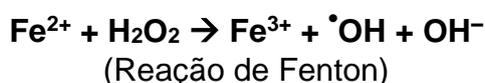
Os compostos líderes passaram pelo teste de pré-tratamento na concentração de 10 μM (TABELA 4, pg 89) neste teste as células neuronais se mostraram incapazes de armazenar **PQM-163**, porém, apresentaram capacidade de armazenar **PQM-161** e **PQM-164** que foram capazes de inibir 24,76% e 27,14% da formação de EROs, respectivamente. Neste teste também fica clara a importância do teste de citotoxicidade feito inicialmente, notem que na TABELA 4 (pg 89) o resultado da inibição da formação de EROs a 10 μM por **PQM-196** e **PQM-199** é apresentado como indeterminado, isso significa que no teste de co-tratamento com t-BOOH esses dois compostos apresentaram uma significativa diminuição na concentração de EROs em relação às células não tratada, porém, isso não ocorre devido ao fato de inibirem a formação de EROs, mas sim a sua alta toxicidade (FIGURA 52, pg 85). Ou seja, a diminuição da concentração de EROs no meio realmente ocorre, mas não devido a inibição de sua formação, mas sim devido a diminuição do número de células vivas no meio de cultura, este foi um caso de falso positivo evitado pelo teste inicial de citotoxicidade.

Já possuindo os resultados de citotoxicidade da segunda família de moléculas, de derivados triazólicos, foram realizados os testes de atividade antioxidante com os compostos **PQM-229**, **PQM-230** e **PQM-233**, os quais não apresentaram citotoxicidade (FIGURA 53, pg 86). Os resultados de co-tratamento frente a t-BOOH corroboraram os resultados de DPPH, onde **PQM-229** e **PQM-230** não apresentaram atividade. Por outro lado, **PQM-233**, quando utilizado na concentração de 10 μM , apresentou uma inibição de 29,79 % da formação de EROs induzida por t-BOOH. Quanto ao teste de pré-tratamento frente a t-BOOH as três moléculas avaliadas apresentaram atividade na concentração de 10 μM (**PQM-229** = 20,58%, **PQM-230** = 14,07% e **PQM-233**= 35,16%). Estes resultados sugerem que **PQM-233** apresenta atividade antioxidante direta (estabilização dos radicais livres já formados) e indireta (ativação de maquinaria celular que culmina em atividade antioxidante), além da atividade inibitória de AChE já descrita, porém **PQM-229** e **PQM-230** apresentaram apenas atividade antioxidante indireta, ou seja, a atividade é mediada pela indução

e/ou inibição de algum outro parâmetro envolvido no equilíbrio oxidativo das células neuronais.

3.2.4.3 Avaliação da capacidade quelante de metais e inibição de formação de ERO induzido por Fe^{2+} e H_2O_2

Em quadros de doenças neurodegenerativas uma das formas mais descritas para a formação de radicais livres altamente reativos são as reações com metais, especialmente ferro (Fe^{2+}) e cobre (Cu^{2+}). A reação de Fenton é uma reação do Fe^{2+} com H_2O_2 que origina um radical hidróxil, altamente reativo e conseqüentemente citotóxico (JOMOVA, 2010).



Considerando essa possibilidade as moléculas mais ativas foram avaliadas quanto à capacidade de inibir a reação de Fenton, demonstrando possível atividade quelante do Fe^{2+} , evitando, portanto, sua oxidação para conseqüente formação do radical hidróxila. O experimento foi realizado utilizando as moléculas testes na concentração de 10 μM em contato com células SH-SY5Y e os resultados são demonstrados na TABELA 5, podemos notar uma boa atividade de inibição da reação de Fenton das três substâncias, com destaque para **PQM-163** e **PQM-164** apresentando a capacidade de inibir em 79,7 % e 88,0%, respectivamente, à formação de ERO derivada da reação de Fenton.

Tabela 5 - Atividade antioxidante derivada da capacidade quelante de Fe^{2+} pelos compostos líderes.

Substâncias	% de inibição de oxidação a 10 μM
PQM-161	52,85
PQM-163	79,72
PQM-164	87,95

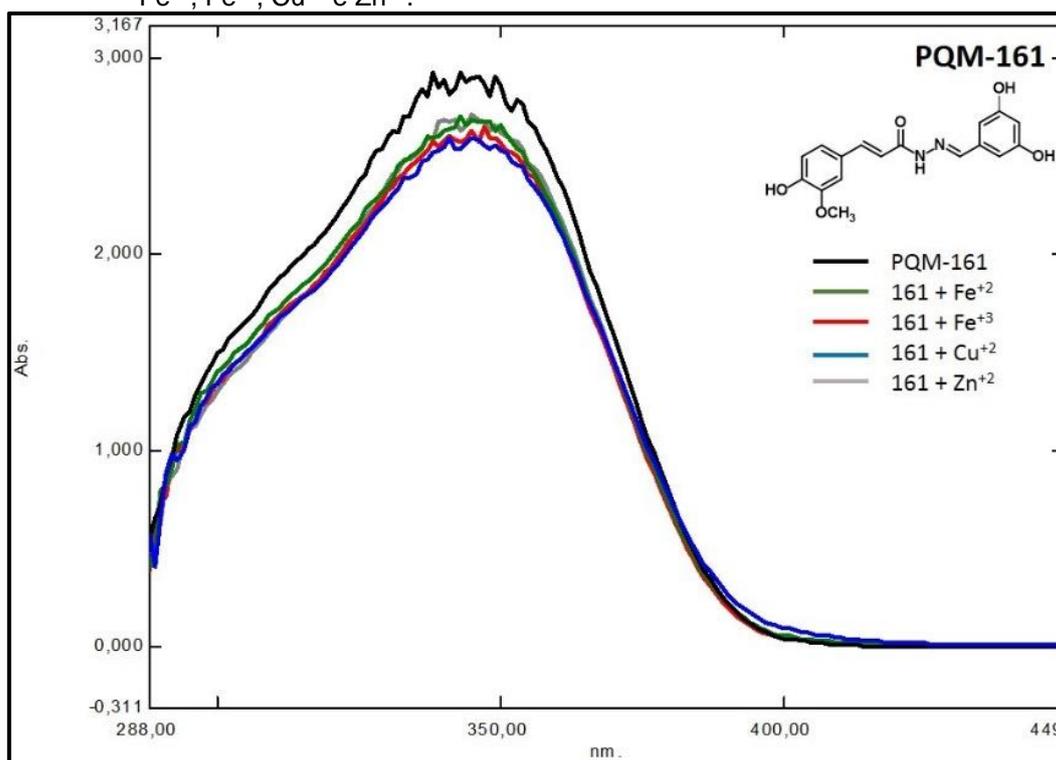
Fonte: do autor.

Para a confirmação da propriedade quelante de metais foi realizado um estudo *in vitro* onde uma solução das moléculas em estudo a 20 μM foi colocada em contato com soluções de diferentes metais e foi obtido um espectro de absorção na região do UV-vis. O deslocamento da curva de absorção do espectro da molécula pura (em preto

nas figuras) em relação com as curvas obtidas das soluções das moléculas com os diferentes metais indica possível formação do quelato.

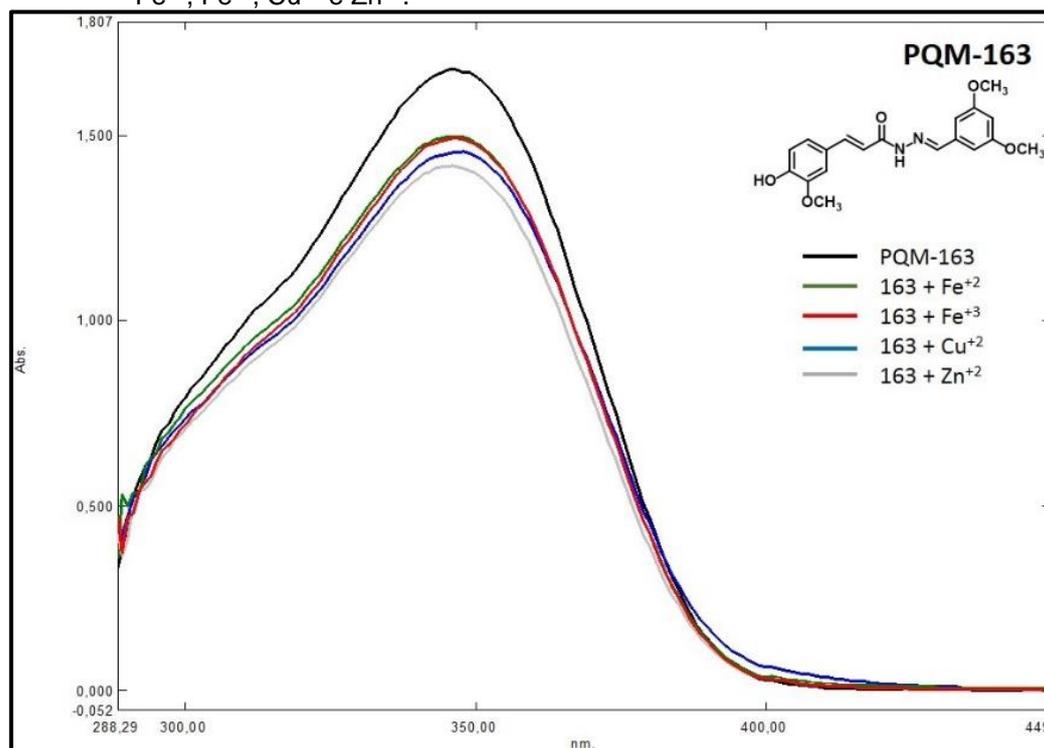
Como podemos observar as três moléculas foram capazes de quelar todos os metais avaliados (FIGURA 54, **PQM-161**; FIGURA 55, pg. 93, **PQM-163**; FIGURA 56, pg. 93, **PQM-164**).

Figura 54 - Espectro de absorção na região do UV-vis de **PQM-161** com soluções contendo Fe^{2+} , Fe^{3+} , Cu^{2+} e Zn^{2+} .



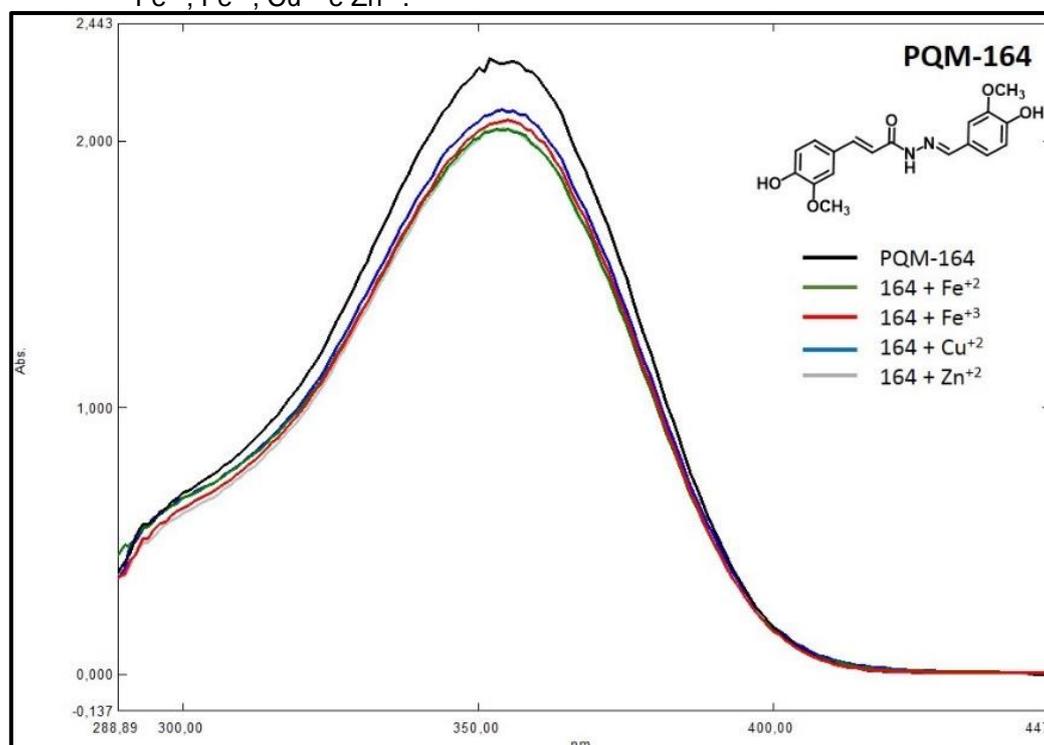
Fonte: do autor.

Figura 55 - Espectro de absorção na região do UV-vis de **PQM-163** com soluções contendo Fe^{2+} , Fe^{3+} , Cu^{2+} e Zn^{2+} .



Fonte: do autor.

Figura 56 - Espectro de absorção na região do UV-vis de **PQM-164** com soluções contendo Fe^{2+} , Fe^{3+} , Cu^{2+} e Zn^{2+} .

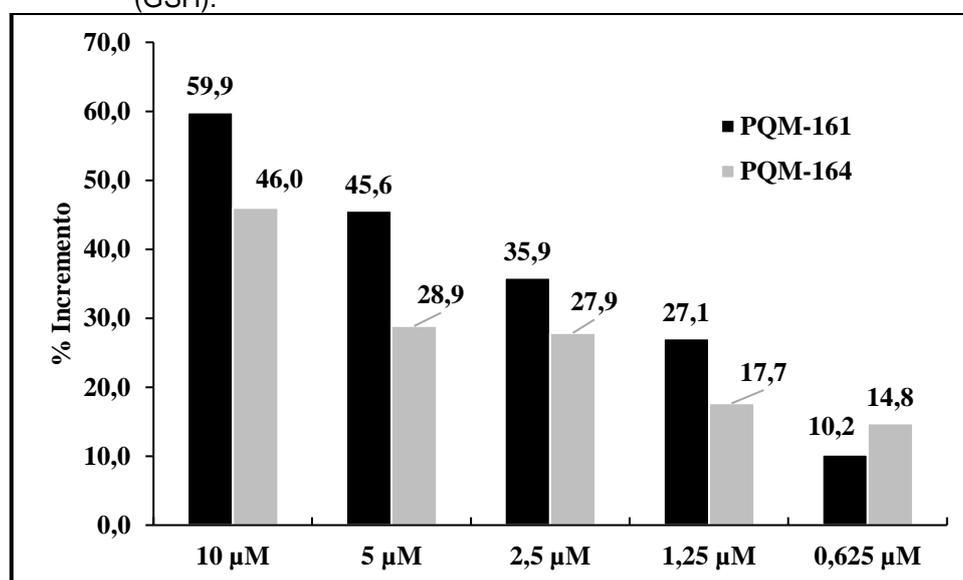


Fonte: do autor.

3.2.5 Avaliação da capacidade de ativação da produção de glutathiona (GSH) intracelular

Um dos principais antioxidantes naturais do SNC é a GSH, responsável por agir sobre as EROs formadas durante o processo metabólico fisiológico, sendo uma das principais responsáveis pela depleção de H_2O_2 formado no metabolismo (PHANIENDRA, 2015). No quadro da DP, um dos primeiros sinais observados é o declínio dos níveis de GSH no SNC, associado a uma diminuição da substância negra de origem idiopática (ANDERSEN, 2004). Considerando a importância da GSH no desenvolvimento da DP, na sua atividade antioxidante para DA e considerando como mandatória a presença de atividade no ensaio de pré-tratamento contra citotoxicidade induzida por *t*-BOOH (TABELA 4, pg. 89). Foi avaliada a capacidade de **PQM-161**, **PQM-164** (FIGURA 57) e **PQM-233** (FIGURA 58, pg. 95) induzirem um aumento dos níveis de GSH em células neuronais SH-SY5Y *via* método colorimétrico empregando monoclorobimania (MCB) como sonda para detecção do GSH.

Figura 57 - Capacidade indutora de **PQM-161** e **PQM-164** nos níveis de glutathiona (GSH).

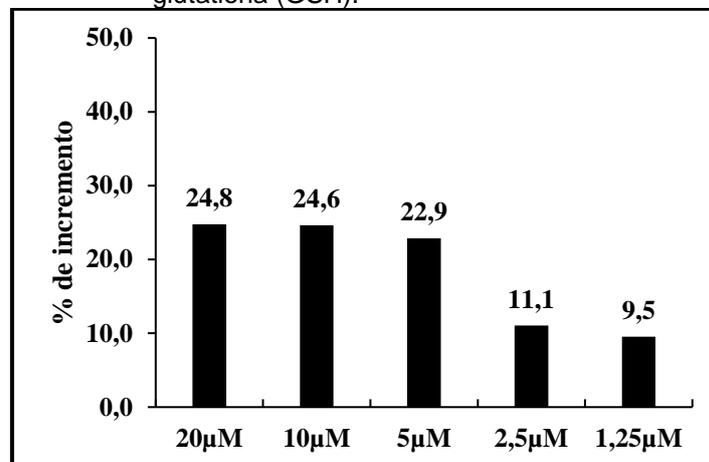


Fonte: do autor.

Observa-se que ambas substâncias apresentam atividade indutora de GSH, com destaque para **PQM-161** que apresentou um concentração de incremento 50 (CI₅₀) de 7,02 µM, enquanto que **PQM-164** apresentou maior capacidade indutora de GSH que **PQM-161** apenas na concentração mais baixa de 0,625 µM, já na

concentração de 10 μM apresentou 46,01 % de aumento nos níveis de GSH quando comparado com células não tratadas.

Figura 58 - Capacidade indutora de **PQM-233** nos níveis de glutathiona (GSH).



Fonte: do autor.

Podemos observar que **PQM-233** foi capaz de induzir a liberação de GSH em células neuronais, porém sua atividade é bastante discreta se compararmos com **PQM-161** e **PQM-164**. Esse perfil de atividade frente a indução de GSH corrobora os resultados das avaliações da atividade antioxidante descritas na TABELA 4 (pg. 89) onde **PQM-161** e **PQM-164** apresentaram valores de inibição da liberação de ROS superiores a **PQM-233**.

Esses resultados, apesar de mais discretos, não desqualificam essa atividade de indução de GSH e consequente atividade antioxidante como uma atividade auxiliar no tratamento da DA, sendo esse resultado interessante no ponto de vista da obtenção de um composto multialvo frente a fisiopatologia da DA.

3.2.6 Capacidade de ativação de fator nuclear eritroide 2 relacionado ao fator 2 (Nrf 2).

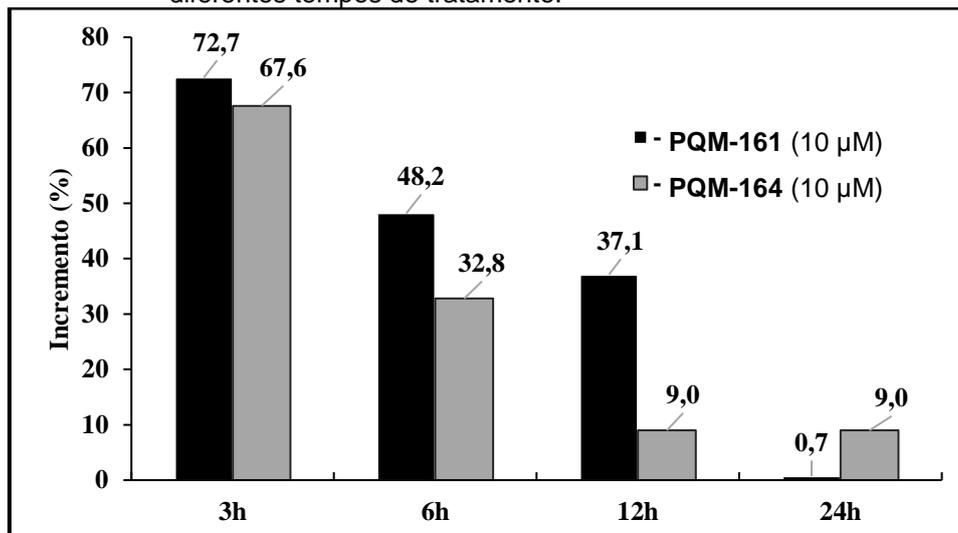
O Nrf 2 é um fator de transcrição muito importante na ativação de processador antioxidantes e regenerativos nas células. Quando na forma inativa o Nrf 2 encontra-se ligado a Keap1 no região citoplasmática da célula, quando a célula fica sob estresse oxidativo o Nrf 2 é forforilado, se desconecta da Keap1 e migra para o núcleo celular onde reconhece e interage com uma área específica do DNA, conhecida como elementos de resposta antioxidante (ARE), essa interação acarreta na ativação de

diferentes processos antioxidantes como, por exemplo, a síntese de GSH (DESHMUKH, 2017). Essa influência sobre os processos antioxidantes de Nrf2 fez do mesmo um promissor alvo farmacológico, a literatura demonstra que moléculas com capacidade de realizar adição de Michael, como é o caso de derivados cinâmicos, são potencialmente ativadores de Nrf 2 (SILVA, 2018c), esse indicativo junto ao fato de **PQM-161**, **PQM-164** e **PQM-233** apresentarem atividade indutora de GSH nos levou a estudar a capacidade destas moléculas em ativarem Nrf 2.

Para este teste, inicialmente foi realizado um procedimento para separação dos conteúdos proteicos citoplasmático e nuclear da célula, sendo o estudo conduzido apenas com o conteúdo nuclear, por se tratar do local onde se encontra o Nrf2 ativo (Nrf 2 livre). Essa avaliação foi realizada na concentração de 10 μ M das substâncias-teste e em quatro tempos diferentes, 3, 6, 12 e 24 h. Os resultados estão expressos em % de ativação de Nrf2 em relação ao controle negativo, o qual consiste no cultivo de célula apenas com meio de cultura padrão. Esse teste é um ensaio imunocolorimétrico que consiste em 4 etapas: na primeira o Nrf2 livre no meio reconhece e se liga a sequência de nucleotídeos conhecidos do ARE; em uma segunda etapa foi adicionado um anticorpo anti-Nrf2, que se liga diretamente ao Nrf2 a ser detectado; na terceira etapa foi adicionado um segundo anticorpo, que se liga ao primeiro e está acoplado a uma enzima que catalisa a reação colorimétrica responsável pela detecção do equipamento e, em uma quarta etapa, foi adicionado o substrato para a reação colorimétrica seguida da leitura dos resultados que estão expressos na FIGURA 59 (pg. 97).

Neste estudo **PQM-233** não apresentou capacidade de ativação de Nrf 2, portanto, sua indução dos níveis de GSH ocorre por outras vias bioquímicas que não dependem da ativação de Nrf 2.

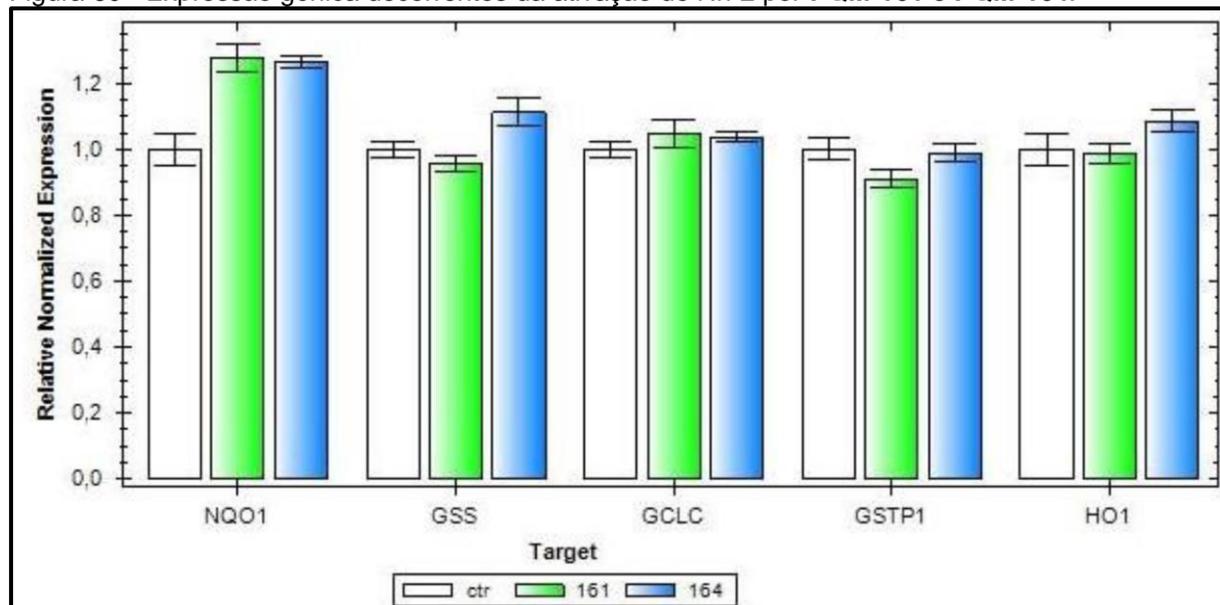
Figura 59 - Capacidade de ativação de Nrf 2 por **PQM-161** e **PQM-164** em diferentes tempos de tratamento.



Fonte: do autor.

Nos resultados podemos avaliar que ambas moléculas avaliadas apresentaram capacidade de induzir ativação de Nrf 2, os perfis de ação das duas também são semelhantes, tendo seu pico de ação em 3 h (**PQM-161**= 72,7% e **PQM-164**= 67,6%) a qual decai com o passar do tempo. A substância **PQM-161** apresentou maiores porcentagens de ativação que **PQM-164** em 3, 6 e 12 h, porém após 24h, **PQM-161** decai a valores muito baixos (0,7% de ativação), enquanto que **PQM-164** mantém sua atividade de 9% de ativação, mesma atividade após 12 h do tratamento. A fim de se confirmar a ativação de Nrf 2 e verificar o sucesso de sua interação com a região ARE do DNA foram realizadas quantificações da expressão gênica de alguns genes que têm sua expressão controlada por Nrf2: NADPH quinona desidrogenase 1 (NQO1), Glutathione sintetase (GSS), Glutamato-Cisteína ligase (GCLC), Glutathione S-transferase P1 (GSTP1) e Heme oxigenase 1 (HO-1).

Os resultados mostrados na FIGURA 60 (pg. 98) indicam que as células tratadas com **PQM-161** e **PQM-164** por 24h expressaram maior concentração do gene NQO1. Esse resultado deixara claro que as moléculas-teste não só foram capazes de induzir a translocação nuclear de Nrf2, como também modularam a interação do Nrf2 com o DNA, desencadeando a ativação de alguns genes especificamente controlados por Nrf 2.

Figura 60 - Expressão gênica decorrentes da ativação de Nrf 2 por **PQM-161** e **PQM-164**.

Fonte: do autor.

Com o objetivo de avaliar o possível mecanismo de ação dos compostos **PQM-161** e **PQM-164**, os mais ativos da série de derivados cinâmicos, e racionalizar seu efeito no sistema Keap 1/Nrf 2, foram realizados estudos de modelagem molecular incluindo simulações de docking e dinâmica molecular (DM).

A proteína Keap1 é conhecida por ser inativada por pequenas moléculas com caráter eletrofílico que se ligam à proteína através da formação de ligações covalentes em resíduos de cisteína reativos. Em particular, o resíduo específico C151 do domínio Keap1 BTB (*Broad complex, Tramtrack, and Bric-a-Brac*) mostrou-se essencial para a atividade proteica, uma vez que o Keap1 mutante C151W (ausência do resíduo C151) foi considerado inativa de forma constitutiva (CLEASBY, 2014). Além disso, alguns inibidores de Keap1 e ativadores de Nrf2 foram co-cristalizados recentemente com o domínio Keap1 BTB covalentemente ligado a C151 (CLEASBY, 2014; HUERTA, 2016; PINTO, 2018) ou demonstraram ativar Nrf2/ARE *via* ligação com C151 através da formação de ligação covalente (OHNUMA, 2010).

Com base nestas considerações, supomos que o **PQM-161** e **PQM-164** poderiam interagir razoavelmente com o resíduo C151 do domínio Keap1 BTB, atuando como aceptores de reação de Michael, de modo similar aos inibidores covalentes co-cristalizados, contendo subunidades carbonila α,β -insaturadas (CLEASBY, 2014; HUERTA, 2016). Por este motivo, foram utilizados estudos de ancoragem molecular para prever a formação das ligações covalentes produzidas pela adição de Michael no grupo tiol de C151 do domínio KB1 de BTB ao carbono

insaturado das moléculas avaliadas. Devido à alta similaridade estrutural dos dois compostos, apenas o **PQM-161** foi analisado e a estrutura do domínio BTB da Keap 1 humana em complexo com o ligante covalente CDDO (código PDB 4CXT) foi usada para este estudo (CLEASBY, 2014).

O protocolo de acoplamento covalente implementado no software Gold foi aplicado para avaliar as orientações de ligação do ligante após a formação da ligação covalente com C151. O procedimento de acoplamento gerou 5 disposições possíveis, que foram ainda estudadas submetendo os 5 complexos covalentes ligante-proteína correspondentes a 30 ns de simulações DM em ambiente de água. Os resultados foram então analisados em termos de energia de interação ligante-proteína, a fim de avaliar a confiabilidade das ligações covalentes previstas do ponto de vista energético. Para tanto, utilizou-se a abordagem de energia de interação linear (EIL). As avaliações de EIL permitem calcular as interações entre o ligante e os resíduos de proteína circundantes das possibilidades geradas através de simulações DM. Contribuições eletrostáticas e de Van der Waals são calculadas para cada DM instantâneo e os valores obtidos são então usados para derivar a energia de interação total média ligante-proteína. As trajetórias DM extraídas dos últimos 10 ns da simulação DM foram usadas para os cálculos, para um total de 100 snapshots (com um intervalo de tempo de 100 ps). Os valores médios de EIL (aEIL) obtidos para os diferentes complexos ligante-proteína formados pela ligação covalente de **PQM-161** a C151 do domínio Keap1 BTB são relatados na TABELA 6 como a soma da energia eletrostática média (EELE) e de Van der Waals (EVDW), as contribuições estão expressas em kcal/mol.

Tabela 6 - Resultados da Energia de Interação Linear (EIL) para os complexos ligante-proteína formados pela ligação covalente de **PQM161** a C151 do domínio BTB de Keap1. Os dados estão expressos como kcal / mol.

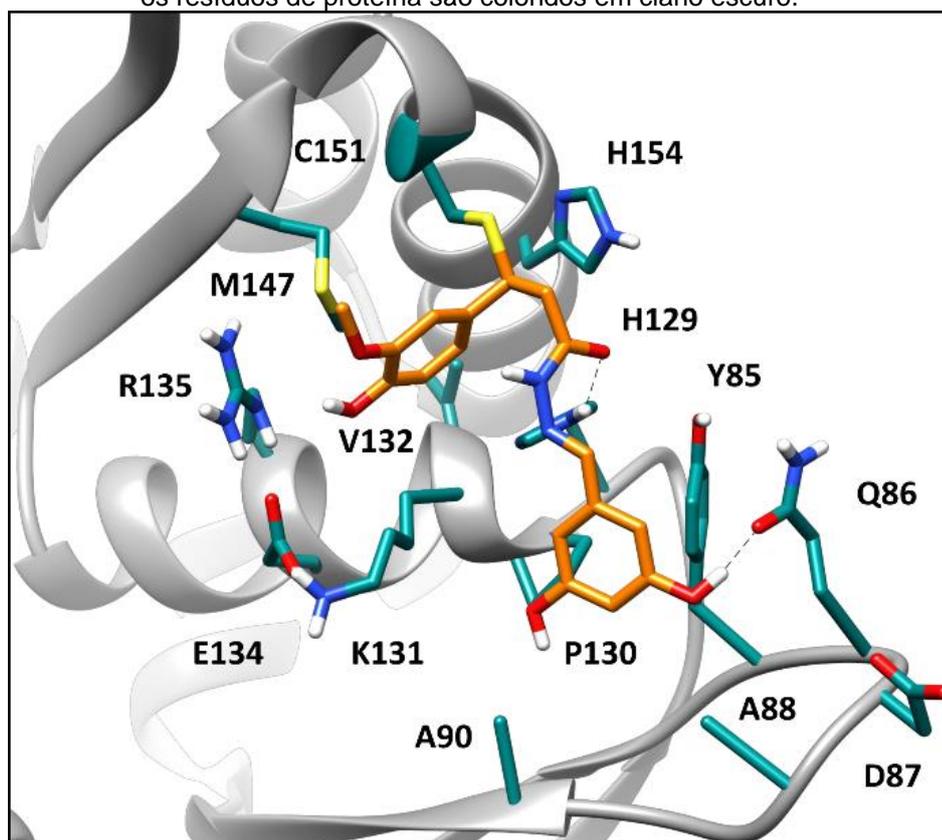
Posição	EELE	EVDW	EIL
1	-7.1	-23.5	-30.6
2	-7.0	-24.5	-31.5
3	-13.5	-22.8	-36.4
4	3.2	-24.2	-21.0
5	-13.0	-18.3	-31.2

Fonte: do autor.

Os cálculos da EIL demonstraram que a ligação representa em **3** (TABELA 6) como a ligação covalente mais favorecida energeticamente, mostrando um valor

médio de energia total (-36,4 kcal/mol) excedendo de 5 kcal/mol até 15 kcal/mol os outros complexos covalentes previstos pelo docking. A FIGURA 61 mostra a posição de ligação **3** (TABELA 6, pg. 99) de **PQM-161** ligado covalentemente a C151 obtida a partir dos últimos 10 ns de simulação de DM.

Figura 61 - Estrutura minimizada do domínio Keap1 BTB com **PQM-161** ligado covalentemente a C151. O ligante é mostrado em laranja, enquanto os resíduos de proteína são coloridos em ciano escuro.



Fonte: do autor.

O anel metóxfenílico, diretamente ligado ao carbono alquilado, foi colocado em uma bolsa de formato elipsoidal bastante volumosa adjacente a C151, formada por H129, K131, V132, E134, R135, M147 e H154. Em particular, o ligante apresentou interações hidrofóbicas com H129 e com as cadeias carbônicas de K131 e M147, que estão localizadas no lado inferior e superior da bolsa, respectivamente. Inversamente, o fragmento benzeno-1,3-dihidroxílico do ligante encontra-se numa bolsa mais exposta ao solvente, delimitada por Y85, Q86, D87, A88, A90, H129 e P130 formando interações lipofícas com os mesmos. Além disso, observa-se uma interação de empilhamento em forma de T com Y85 e uma ligação H com a cadeia lateral de Q86. Finalmente, forma-se uma ligação H adicional entre o oxigênio da carbonila do ligante e o H129.

3.2.7 Avaliação da capacidade de inibição de monoaminoxidase (MAO)

Reconhecidamente, na DP ocorre um aumento dos níveis basais da enzima monoaminoxidase B (MAO-B), motivo pelo qual inibidores de MAO-B descritos na literatura apresentaram capacidade de induzir melhoras significativas em quadros de DP, tanto vinculada às disfunções motoras quanto a prevenção de morte neuronal induzida pela ação pró-oxidante de MAO-B na degradação da dopamina (CHAN, 2018). A enzima MAO-A, é uma enzima conhecida por degradar outros neurotransmissores como serotonina, norepinefrina e epinefrina e está mais associada ao tratamento de doenças psicológicas como a depressão (CATTO, 2006).

Considerando a importância da atividade das enzimas MAO na fisiopatologia da DP a capacidade inibitória de **PQM-161**, **PQM-163** e **PQM-164** frente a essas enzimas foram avaliadas. Podemos observar que todos os compostos apresentaram atividade inibitória, porém observa-se que nenhuma das moléculas foi significativamente seletiva, apresentando valores muito próximos para inibição de MAO-A e MAO-B (TABELA 7).

Tabela 7 - Atividade inibitória de monoaminoxidase dos compostos líderes da série **PQM-161, PQM-163 e PQM-164**.

Substâncias	% inhibition (10 μ M) MAO-A	% inhibition (10 μ M) MAO-B
PQM-161	55	38
PQM-163	64	47
PQM-164	49	43

Fonte: do autor.

Na literatura vemos uma tendência a buscar inibição seletiva de MAO-B para tratamento da DP, uma vez que MAO-A é responsável pela inibição de neurotransmissores cuja metabolização não influencia no quadro da DP (CHAN, 2018). Contudo na literatura podemos encontrar muitos dados da correlação entre DP e a depressão. Em 2012, a *Parkinson Foundation* liberou um relatório que salienta que a depressão é a principal responsável pela queda da qualidade de vida de quase 60% dos pacientes com DP, apresentando um impacto maior que problemas com mobilidade, comunicação e dores (*NATIONAL PARKINSON FOUNDATION*, 2012). Trabalhos recentes continuam discutindo a incidência significativa da depressão nos quadros de DP (DEHIYAN, 2018; KUA, 2018), ou seja, o fato destas moléculas não

serem seletivas para MAO-B não necessariamente as torna menos atrativas, uma vez que a inibição de MAO-A pode ajudar nos quadros de depressão associados à progressão da DP.

3.2.8 Atividade neuroprotetora

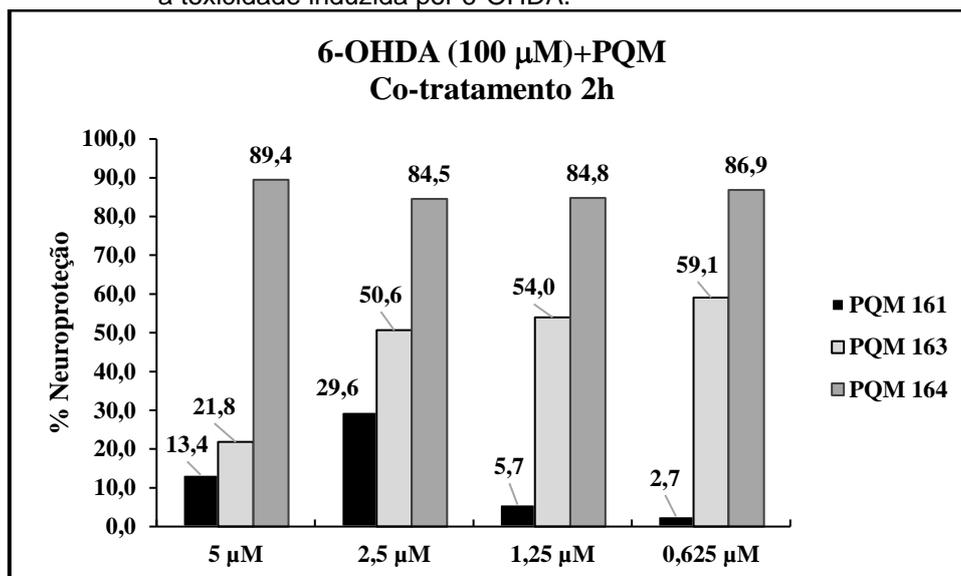
Os resultados de atividade neuroprotetora, descritas a seguir, tiveram por objetivo verificar a capacidade das substâncias testes em protegerem as células neuronais de toxinas que atuam na modulação de morte neuronal por diferentes vias.

3.2.8.1 Efeitos sobre a citotoxicidade induzida por 6-OHDA

A 6-hidróxidopamina (6-OHDA) é uma substância utilizada para mimetizar os danos causados pela dopamina em modelos de DP. É um análogo da dopamina que é capaz de gerar peróxido de hidrogênio quando metabolizada pelos neurônios além de inibir enzimas mitocondriais ligadas à cascata de respiração celular acarretando um déficit metabólico no neurônio. A morte neuronal induzida por 6-OHDA ocorre por vias da apoptose, acarretando ativação final de caspase 3 (ALVAREZ-FISCHER, 2008).

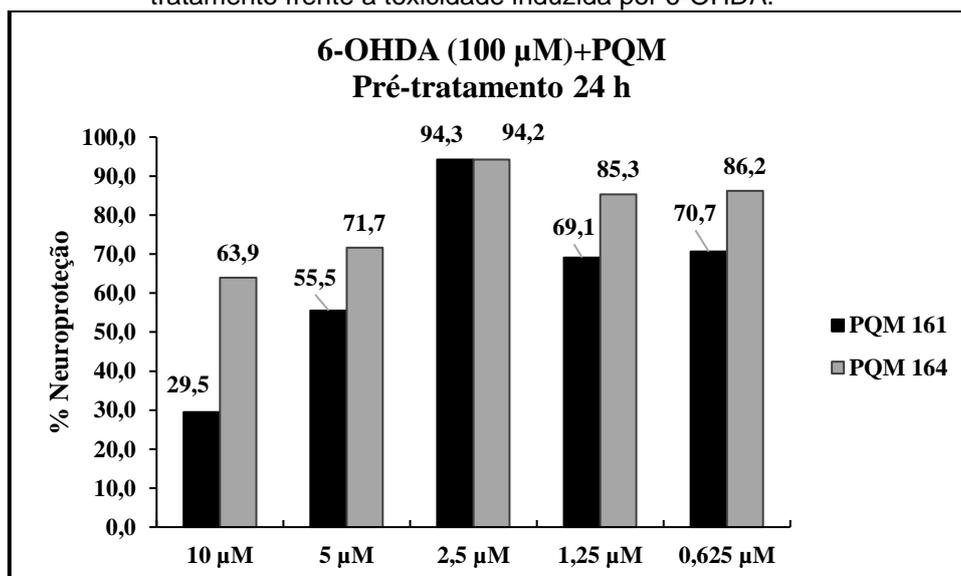
Neste contexto as substâncias líderes **PQM-161**, **PQM-163** e **PQM-164** foram avaliadas quanto a capacidade de inibir a citotoxicidade induzida por 6-OHDA. As moléculas foram testadas em diferentes concentrações (5-0,625 μM) e foi utilizada uma solução de 6-OHDA a 100 μM para induzir citotoxicidade. No caso de **PQM-161** podemos observar atividade neuroprotetora nas concentrações de 5 μM e 2,5 μM , nas concentrações mais baixas não houve resultado significativo, já **PQM-163** e **PQM-164**, com destaque para **PQM-164**, demonstraram atividade neuroprotetora em todas as concentrações avaliadas, sendo esta atividade não dependente da concentração (FIGURA 62, pg. 103). Diante do fato de que **PQM-161** e **PQM-164** já haviam demonstrado resultados em modelo de pré-tratamento de 24h, frente a *t*-BOOH (TABELA 4, pg 89), foi realizado um teste de pré-tratamento de 24h com **PQM-161** e **PQM-164** frente a neurotoxicidade induzida por 6-OHDA e, corroborando os resultados anteriores, foi verificado efeito neuroprotetor em todas as concentrações avaliadas (FIGURA 63, pg. 103).

Figura 62 - Atividade neuroprotetora de **PQM-161**, **PQM-163** e **PQM-164** frente a toxicidade induzida por 6-OHDA.



Fonte: do autor.

Figura 63 - Atividade neuroprotetora de **PQM-164** e **PQM-161** após 24h de tratamento frente a toxicidade induzida por 6-OHDA.



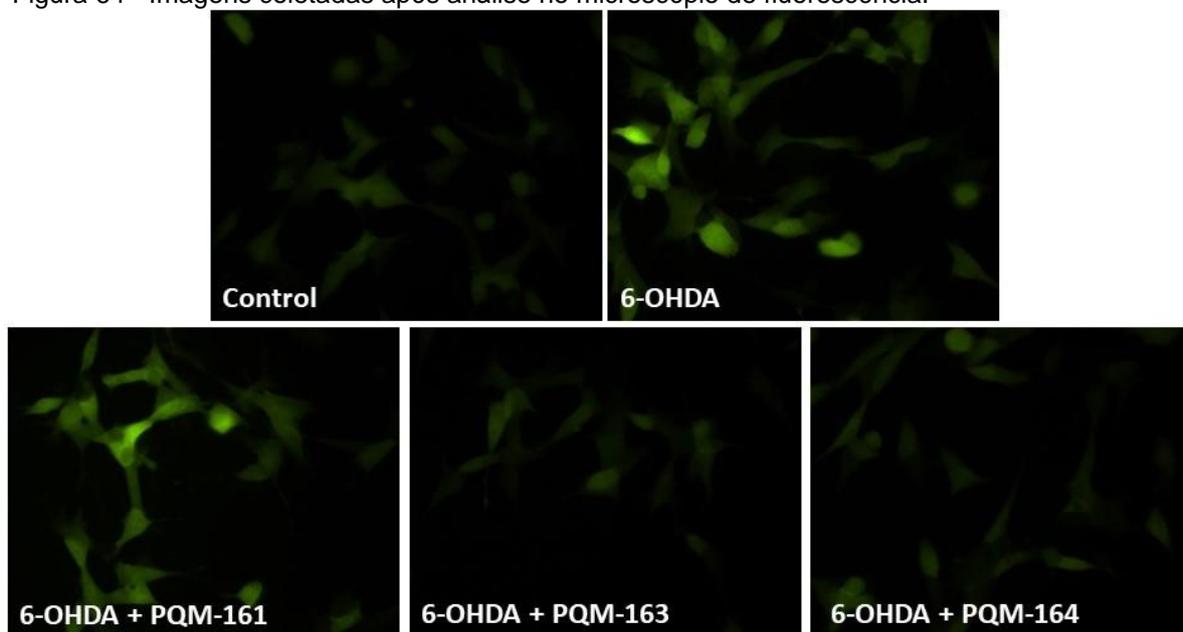
Fonte: do autor.

3.2.8.2 Efeitos sobre a citotoxicidade induzida por α -sinucleína

Devido à importância da agregação da proteína α -sinucleína na formação dos corpos de Lewy, característicos na fisiopatologia da DP, as substâncias-líder **PQM-161**, **PQM-163** e **PQM-164** foram, também, avaliadas quanto à capacidade de inibir a agregação desta proteína. Para este teste foram utilizadas as substâncias na concentração de 2,5 μ M e células neuronais geneticamente modificadas (TagGFP2- α -synuclein SH-SY5Y). Essa linhagem celular, quando tratada com 6-OHDA (100 μ M),

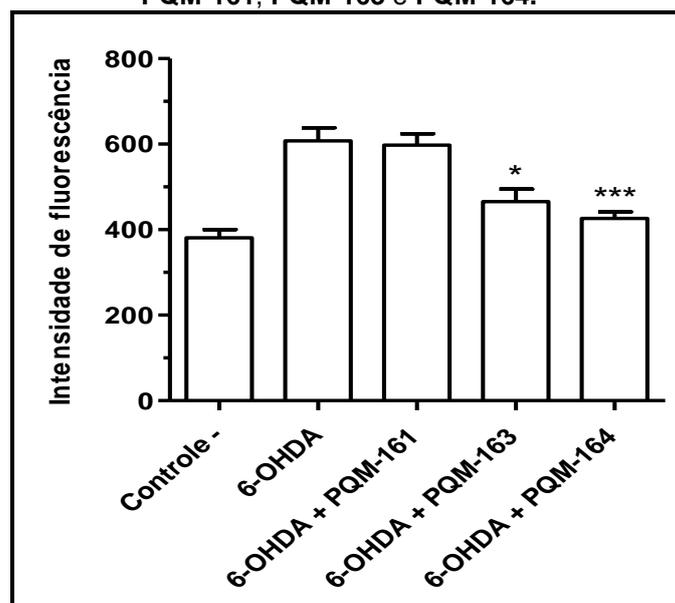
gera agregação de α -sinucleína e, conseqüente, a formação de corpos de Lewy. Os resultados expressam a fluorescência das células, detectada em microscópio de fluorescência (FIGURA 64), sendo a intensidade detectada, proporcional à concentração de α -sinucleína insolúvel em meio intracelular. Na FIGURA 65 (pg. 105) podemos observar nitidamente que **PQM-161** não apresentou atividade sobre a agregação de α -sinucleína. Ao contrário, os compostos **PQM-163** e **PQM-164**, foram bastante ativos, com destaque para **PQM-164** cujos resultados demonstram que as células tratadas apresentaram uma concentração proteica estatisticamente igual ao controle negativo (células não-induzidas), evidenciando o efeito inibitório marcante sobre a formação dos agregados proteicos de α -sinucleína.

Figura 64 - Imagens coletadas após análise no microscópio de fluorescência.



Fonte: do autor.

Figura 65 - Inibição da agregação de α -sinucleína por **PQM-161**, **PQM-163** e **PQM-164**.



Fonte: do autor.

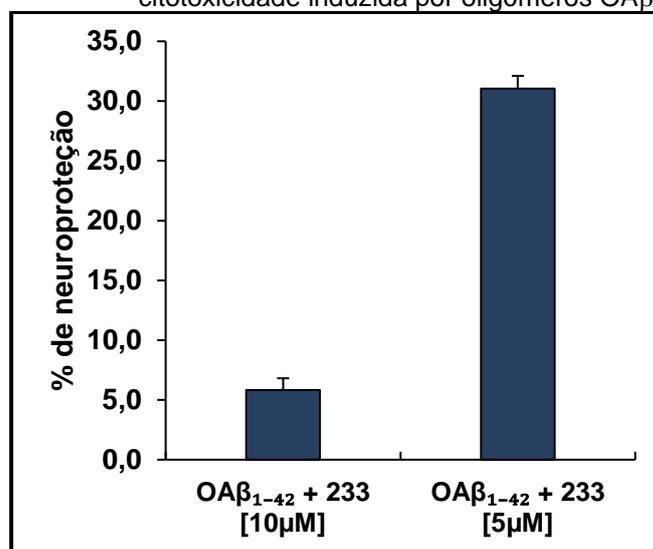
Legenda: Teste de significância 1 way ANOVA, sendo que, * - $P < 0,01$ e *** - $P < 0,001$

3.2.8.3 Efeitos sobre a toxicidade induzida por peptídeo β -amiloide (β A)

Os emaranhados insolúveis de proteína β -amiloide (β A) é um importante aspecto na fisiopatologia da DA, com vários relatos que sua concentração está diretamente relacionada à severidade do quadro na DA. Pesquisas recentes relatam que substâncias multialvo, com atividade concomitante sobre AChE e β A tem levado a bons resultados no tratamento da DA (AWASTHI, 2018). Levando em consideração a importância da atividade sobre β A e o fato da literatura demonstrar atividade de derivados da curcumina (ORTECA, 2018) e do resveratrol (ZHENG, 2018) sobre agregados proteicos de β A, e ainda que **PQM-233** demonstrou atividade inibitória de AChE significativa ($CI_{50} = 20,22 \mu\text{M}$), decidimos por avaliar a capacidade de **PQM-233** em inibir a neurotoxicidade induzida por β A. Neste ensaio foram utilizadas duas concentrações diferentes de **PQM-233** (10 e $5 \mu\text{M}$) e proteína β A na concentração de $10 \mu\text{M}$ em cultura de células SH-SY5Y, cujos resultados estão expressos na FIGURA 66 (pg. 106). Podemos verificar que **PQM-233** foi capaz de diminuir a neurotoxicidade induzida por β A nas duas concentrações avaliadas. Ademais, merece destaque o fato de sua atividade não ter sido dependente da concentração utilizada no tratamento, tendo sua melhor atividade na concentração de $5 \mu\text{M}$, com neuroproteção de 31,05

%. Esse fenômeno pode ser devida a uma dificuldade na solubilização de **PQM-233** no meio de cultura.

Figura 66 - Atividade neuroprotetora de **PQM-233** contra citotoxicidade induzida por oligômeros OA β .



Fonte: do autor.

É importante destacar que o conjunto de dados disponíveis apontam que **PQM-233** agrega três atividades sobre alvos moleculares importantes da DA, sendo inibidor de AChE (CI_{50} = 20,22 μ M), antioxidante frente ao estresse oxidativo, seja induzido por DPPH (CE_{50} = 30,44 μ M) ou por *t*-BOOH (co-*t* = 29,79% e pré-*t* = 24,77% de inibição da formação de EROs na concentração de 10 μ M) e neuroprotetor contra agregados de β A.

3.2.9 Avaliação da atividade anti-inflamatória em culturas de monócitos leucêmicos humanos (THP-1).

Afim de finalizar os estudos focando em efeitos sobre os principais aspectos neuropatológicos das DNs foi realizada a avaliação da atividade anti-inflamatória das moléculas mais ativas de cada série, **PQM-161** e **PQM-164** dentre os derivados cinâmicos e **PQM-233** dentre os triazóis.

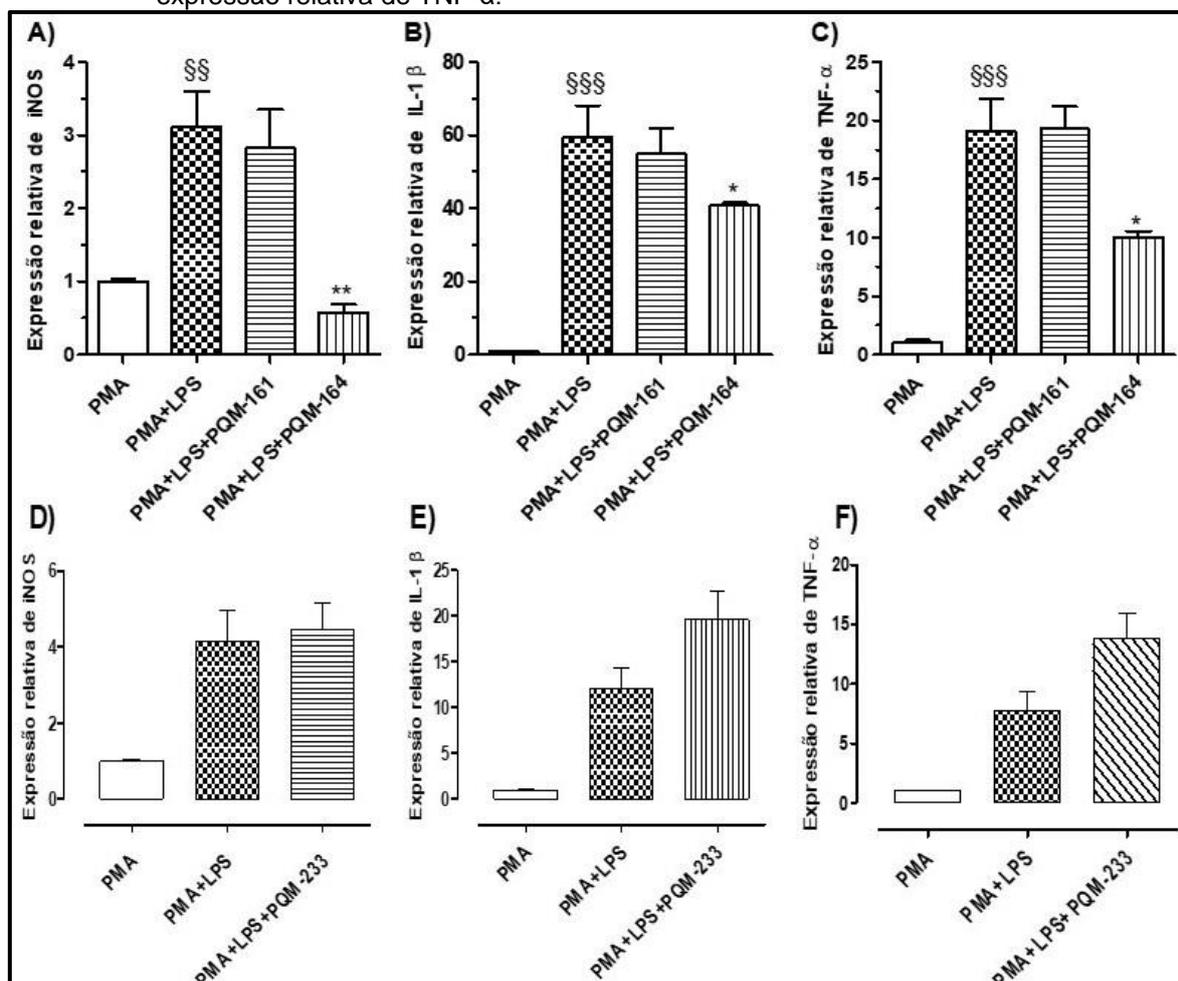
Para esta etapa foram utilizadas culturas de células THP-1 que quando tratados com forbol 12-miristato 13-acetato (PMA) são diferenciados a macrófagos. Essa linhagem de células foi utilizada pela facilidade no manuseio e cultivo, bem como pelas semelhanças citológicas e metabólicas entre os macrófagos derivados de THP 1 e macrófagos humanos nativos (BØLLING, 2019).

Uma vez que os monócitos foram diferenciados a macrófagos foram utilizados lipopolissacarídeos (LPS) para induzir uma resposta inflamatória e induzir a expressão gênica de marcadores característicos da inflamação. A expressão gênica relativa desses marcadores comparando células tratadas e não tratadas com as substâncias testes estão expressas na FIGURA 67 (pg. 108).

As enzimas óxido nítrico sintases independente de cálcio (iNOS) são enzimas produtoras de óxido nítrico muito pouco expressas em condições fisiológicas, mas que têm sua expressão bastante exacerbada durante processos inflamatórios. A interleucina 1 β (IL-1 β), por sua vez, é uma proteína responsável por diferentes sinalizações celulares, tanto de sinais de inibição ou indução quanto modulação de eventos celulares, está particularmente aumentada em processos inflamatórios. Por fim, o fator de necrose tumoral α (TNF- α) é uma citocina produzida principalmente por macrófagos, responsável por modular diferentes processos da resposta imune, principalmente o processo inflamatório (GLASS, 2010). A expressão gênica do ácido ribonucleico mensageiro (mRNA) para produção desses quatro marcadores inflamatórios foram quantificados nesta etapa do trabalho.

A avaliação anti-inflamatória foi realizada com **PQM-161**, **PQM-164** e **PQM-233** (10 μ M), que apresentaram o perfil multialvo mais completo frente aos modelos estudados anteriormente para DP e DA, respectivamente. Nitidamente podemos constatar que **PQM-161** e **PQM-233** não apresentaram atividade anti-inflamatória na concentração avaliada (FIGURA 67, pg.108), não demonstrando capacidade de modular nenhum dos marcadores inflamatórios quantificados nesta avaliação. Já **PQM-164** apresentou resultados interessantes em todos os marcadores avaliados. Podemos observar que frente à expressão gênica de iNOS (gráfico **A** FIGURA 67, pg. 108) os níveis foram ainda menores que para as células diferenciadas não induzidas por LPS. Ao analisarmos a expressão gênica de IL-1 β e TNF- α (gráficos **B** e **C**, respectivamente, FIGURA 67, pg. 108) podemos evidenciar que ambos marcadores tiveram suas expressões reduzidas por **PQM-164** quando comparados às células diferenciadas e tratadas apenas com LPS.

Figura 67 – Expressão gênica relativa de diferentes marcadores inflamatórios quantificados por PCR empregando macrófagos humanos derivados de células THP-1 diferenciados por PMA. A) e D) expressão relativa de iNOS; B) e E) expressão relativa de IL-1 β ; C) e F) expressão relativa de TNF- α .



Legenda: PMA – Células THP-1 tratadas com PMA. LPS – Células THP-1 tratadas com PMA + LPS. 161 e 164 – Células THP-1 tratadas com PMA + LPS + **PQM-161** ou **PQM-164** ou **PQM-233** (10 μ M).
Fonte: do autor.

3.2.10 Avaliação da citotoxicidade em células renais (VERO)

Uma vez identificadas as moléculas mais ativas em ambas as séries sintetizadas, e sabendo da sua segurança frente a cultura de neuroblastoma (item 3.2.3, pg 85), foram realizados testes de citotoxicidade frente a células renais de primatas (VERO), para melhor compreensão da segurança terapêutica na utilização destas moléculas.

Os testes de viabilidade celular via MTT frente a culturas de células VERO são amplamente utilizados para mensurar possível citotoxicidade de compostos sintéticos (VANDHANA, 2020; VERMA, 2019). Neste trabalho o teste de citotoxicidade foi conduzido com os compostos **PQM-161**, **PQM-164** e **PQM-233**, compostos mais

ativos de cada família, utilizando-se uma faixa de concentração de 500 a 0,48 µg/mL e o tempo de tratamento foi de 48h. Após esse período, foi realizado o teste de viabilidade celular empregando MTT, como descrito anteriormente. Os valores de concentração citotóxica 50 (CC₅₀) estão expressos em µM na TABELA 8.

Tabela 8 - Avaliação de toxicidade dos compostos mais ativos em células Renais de primatas (VERO).

Substâncias	Replicata (CC ₅₀ µM)			Média	DP
PQM-161	679,09	622,20	653,74	651,68	28,5
PQM-164	652,74	572,42	603,59	609,58	40,5
PQM-233	573,15	624,46	624,31	607,30	29,6

Fonte: do autor.

Podemos observar que as três substâncias avaliadas apresentaram valores de CC₅₀ acima de 600 µM, muito distantes dos valores de tratamento utilizados para os estudos das atividades biológicas descritas neste trabalho, assegurando uma janela de segurança muito adequada e sugerindo citotoxicidade insignificante.

4 PARTE EXPERIMENTAL

Nesta seção serão descritas as etapas experimentais química e biológica do trabalho.

4.1 QUÍMICA

A seguir serão descritas as metodologias utilizadas para síntese e purificação dos compostos obtidos neste trabalho bem como os materiais e equipamentos utilizados no processo.

4.1.1 Generalidades

Os espectros na região do IV foram gerados em um espectrômetro de IV Nicolet iSso FTIR (Thermo Scientific USA) acoplado a Pike Gladi ATR technologies e os perfis cromatográficos das substâncias foram obtidos por aparelho de UHPLC modelo Ultimate 3000 (Thermo Scientific) no laboratório de análises e caracterização de fármacos (LACFar) da Universidade Federal de Alfenas (UNIFAL-MG). Os espectros de RMN de ^1H e de ^{13}C foram obtidos em um espectrômetro Bruker AC-300 operando a 300 MHz para RMN de ^1H e de 75 MHz para RMN de ^{13}C do Laboratório de Ressonância Nuclear Magnética da UNIFAL-MG. Os espectros de RMN de ^{13}C e ^1H foram manipulados utilizando software MestReNova e as numerações utilizadas nos compostos foram geradas automaticamente pelo software. As análises por espectrometria de massas foram realizadas em espectrômetro BRUKER COMPASS com ionização por electrospray. Os cromatogramas para teste de pureza dos compostos finais foram realizados em HPLC Shimadzu Prominence (Tokyo, Japão) modelo LC-10 com injetor automático e detector UV/VIS a 300 nm equipado com coluna analítica C18 - (Shimadzu CLC-ODS, 250 mm x 4,4 mm diâmetro interno x 5 um). As análises foram conduzidas em um sistema isocrático com duas fases onde A era composta de metanol e B acetonitrila com concentração constante de 90% de A e 10% de B. Os ensaios foram conduzidos em 20°C a um fluxo de 0,7 mL/min. Todos os reagentes utilizados na síntese foram adquiridos da Sigma-Aldrich, sem purificações adicionais. As cromatografias em camada delgada foram realizadas em folha de gel de sílica 60 F₂₅₄, da marca Merck e as purificações por cromatografia em

coluna foram realizadas em gel de sílica flash (220-440 mesh, 0,035 mm – 0,075 mm), da marca Sigma-Aldrich. A visualização das substâncias foi feita em câmara de UV ($\lambda = 254$ ou 365 nm) ou com revelador de iodocloroplatinado. Os solventes diclorometano, etanol, trietilamina e dimetilformamida foram secos ou destilados de acordo com a literatura (PERRIN, 1997). As faixas de fusão foram estabelecidas em equipamento Marte (PFM II) com amostra triturada e empacotada em tubo capilar, sem correção. A predição *in silico* dos parâmetros ADME foram obtidos foram realizados utilizando software QikProb 3.1 desenvolvido pela Schrodinger® (Nova York, EUA).

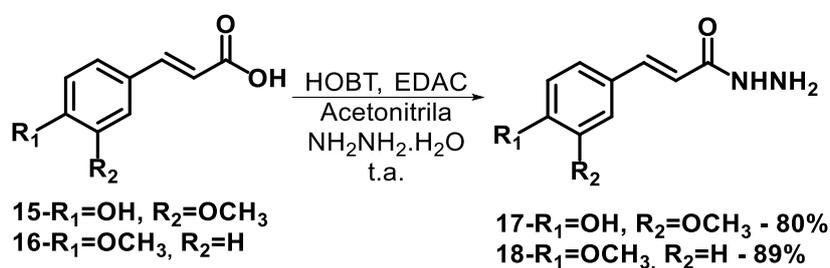
4.1.2 Abordagem sintética utilizada na obtenção dos compostos sintetizados.

A seguir estão descritos os procedimentos realizados em bancada e a caracterização detalhada das substâncias finais e intermediários obtidos neste trabalho.

4.1.2.1 Síntese e obtenção dos derivados cinâmicos (PQM-160-164/196-200).

A seguir serão descritos os procedimentos para síntese de cada intermediário e dos produtos finais da série 1 de derivados cinâmicos, bem como serão expostos os dados de caracterização de cada substância obtida.

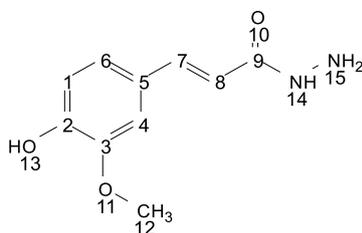
4.1.2.1.1 Síntese das hidrazinas (**15** e **16**)



Uma solução de ácido cinâmico (300 mg, 1,55 mmol (**15**) ou 1,68 mmol (**16**), 1 eq.) em 10 mL de acetonitrila foi adicionada em um balão de fundo redondo de 25 mL, em seguida, foram adicionados HOBT (258 mg, 1,2 eq.) seguido do EDAC (366 mg, 1,2 eq.). A mistura foi mantida sob agitação à aproximadamente 25°C por uma hora e meia. Uma solução de monohidrato de hidrazina (0,774 mL, 10 eq.) em 5 mL de

acetonitrila foi acondicionada em outro balão de fundo redondo de 50 mL, esta solução foi resfriada em banho de gelo até aproximadamente 0 °C. O conteúdo do primeiro balão foi adicionado ao segundo lentamente, durante o processo o segundo balão foi mantido em banho de gelo. A reação foi encerrada com o término da adição (CARVALHO, 2012).

Para isolamento do produto a acetonitrila é rotaevaporada e adicionou-se solução aquosa de carbonato de sódio concentrada, a solução foi agitada vigorosamente e colocada no freezer por 6h. O precipitado formado foi isolado por filtração e lavado com etanol gelado em abundância, fornecendo um sólido branco (**17**, 258 mg, 1,24 mmol), no caso da hidrazida do ácido ferúlico ou um sólido bege (**18**, 288 mg, 1,50 mmol), no caso da hidrazida do ácido 4-metóxi cinâmico.



(*E*)-3-(3-hidróxi-4-metóxi-fenil)acriloidrazida (**17**).

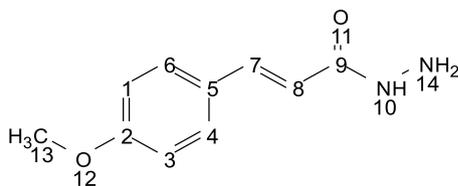
Rendimento: 80%. **Aspecto Físico:** Sólido branco.

Fórmula molecular: C₁₀H₁₂N₂O₃ **Massa Molecular:** 208,0848 g/mol.

IV ($\nu_{\text{máx}}$, cm⁻¹, **ATR**) (Figura 14, pg 43): 3404, 3306, 3260, 2997, 1656, 1579 e 1028.

RMN de ¹H (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm) (Figura 15, pg 44): 9,18 (s, 1H, N-NH); 7,35 (d, *J* = 15,75 Hz, 1H, HC=CH); 7,11 (d, *J* = 1,82 Hz, 1H, Ar-H₄); 6,99 (dd, *J* = 1,82 e 8,19 Hz, 1H, Ar-H₆); 6,79 (d, *J* = 8,19 Hz, 1H, Ar-H₁); 6,36 (d, *J* = 15,75 Hz, 1H, HC=CH); 4,39 (s, 2H, HN-NH₂) e 3,80 (s, 3H, O-CH₃).

RMN de ¹³C (75 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm) (Figura 16, pg 45): 165,2; 148,3; 147,9; 138,7; 126,5; 121,4; 116,9; 115,7; 110,9 e 55,6.



(*E*)-3-(4-metóxi-fenil)acriloidrazida (**18**)

Rendimento: 89%. **Aspecto Físico:** Sólido bege.

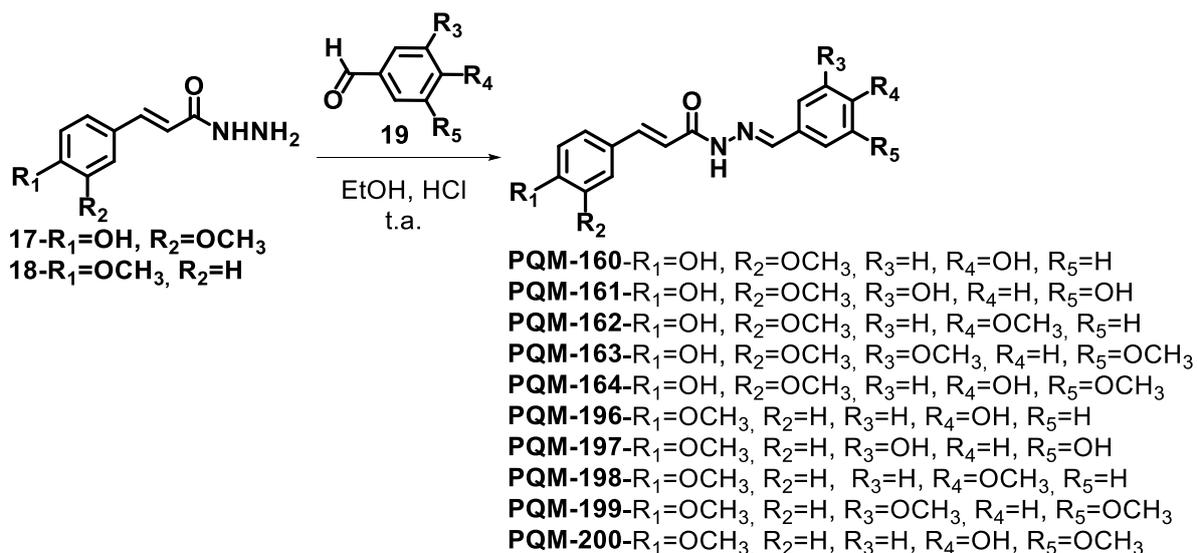
Fórmula molecular: C₁₀H₁₂N₂O₂ **Massa Molecular:** 192,0899 g/mol.

IV ($\nu_{\text{máx}}$, cm⁻¹, **ATR**) (Figura A1, Anexo I): 3253, 3187, 2938, 1651, 1586 e 1027.

RMN de ^1H (300 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm) (**Figura A2**, Anexo I): 9,26 (s, 1H, N-NH); 7,48 (d, $J = 8,82$ Hz, 2H, Ar-H_{4,6}); 7,37 (d, $J = 15,83$ Hz, 1H, HC=CH); 6,94 (d, $J = 8,79$ Hz, 2H, Ar-H_{1,3}); 6,39 (d, $J = 15,83$ Hz, 1H, HC=CH) e 3,76 (s, 3H, O-CH₃).

RMN de ^{13}C (75 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm) (**Figura A3**, Anexo I): 165,4; 160,7; 138,3; 129,5; 128,0; 118,2; 114,8 e 55,7.

4.1.2.1.2 Síntese das *N*-acilidrazonas – Derivados ferúlicos (**PQM 160-164/196-200**).



Para obtenção das moléculas planejadas adicionou-se 10 mL de etanol seco, o aldeído adequado (**19**) (1,2 eq.) e o HCl (4 eq.), em um balão de fundo redondo de 50 mL, essa solução foi colocada sob agitação e adicionou-se a hidrazida (**17**, 100 mg, 0,4806 mmol ou **18**, 100 mg, 0,5206 mmol, 1 eq.), previamente solubilizada em etanol seco, sob a solução contendo o aldeído e o ácido clorídrico. A solução resultante foi mantida sob agitação magnética por 24 horas a temperatura aproximada de 25°C (DIAS VIEGAS, 2018).

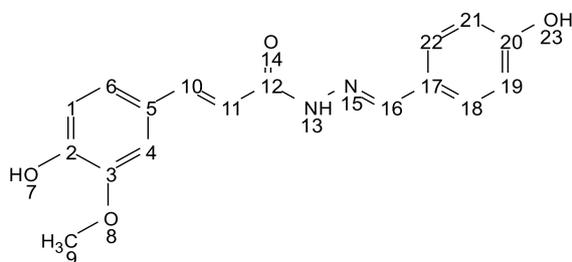
O método de purificação dos produtos foi realizado de diferentes maneiras para cada produto final e pode ser observado na TABELA 9 (pg. 114).

Tabela 9 - Dados obtidos após purificação dos produtos de acoplamento dos derivados cinâmicos.

PQM	Quantidade obtida.	Método de purificação	Rendimento do acoplamento (%)
160	131 mg (0,418 mmol)	CC el: acetato de etila/hexano – 6/4	87
161	47 mg (0,144 mmol)	CC el: acetato de etila/hexano – 6/4	30
162	94 mg (0,288 mmol)	CC el: acetato de etila/hexano – 8/2	60
163	91 mg (0,255 mmol)	Pr em etanol gelado.	53
164	89 mg (0,260 mmol)	Pr em etanol gelado.	54
196	151 mg (0,510 mmol)	Pr em etanol gelado.	98
197	45 mg (0,145 mmol)	CC el: acetato de etila/hexano – 8/2	28
198	89 mg (0,286 mmol)	Pr em etanol gelado.	55
199	165 mg (0,484 mmol)	Pr em etanol gelado.	93
200	149 mg (0,458 mmol)	CC el: acetato de etila/hexano – 8/2	88

Fonte: do autor.

Legenda: CC – Cromatografia em coluna; Pr – Precipitação; el – Eluente.



(*E*)-3-(4-hidróxi-3-metóxi-fenil)-*N*-(4-hidróxi-benzilideno)acriloidrazida (**PQM-160**)

Rendimento global: 78%. **Aspecto Físico:** Sólido amarelado. **PF:** 262 °C.

Pureza: 99,3 %

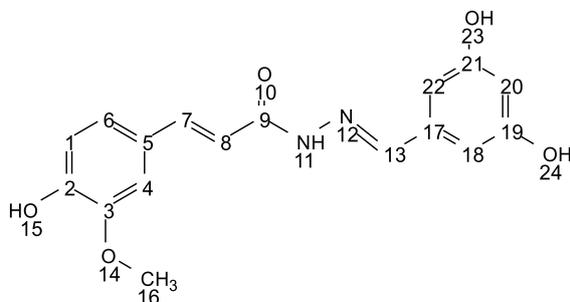
Fórmula molecular: C₁₇H₁₆N₂O₄ **Massa Molecular:** 312,1110 g/mol.

HRMS (ESI) *m/z*: (Figura A7, Anexo I) calculado [M]⁺: 313,1188 g/mol; encontrado [M]⁺: 313.1187 g/mol

IV (*v*_{máx}, cm⁻¹, **ATR**) (Figura A4, Anexo I): 3075, 3014, 2921, 2828, 1678, 1606, 1580, 1455, 1350 e 1102.

RMN de ¹H (300 MHz, DMSO- *d*₆) δ (ppm) (Figura A5, Anexo I): 11,41 e 11,17 (s, 1H, N-NH), 9,53 (s, 1H, OH-7); 8,55 (s, 1H, OH-23); 8,12 e 7,95 (s, 1H, N=CH); 7,69 (d, *J*=

8,63 Hz, 2H, Ar-H_{19,21}); 7,63–7,54 (m, 2H, Ar-H_{18,22}), 7,51 e 7,37 (d, $J=15,11$ e $15,95$ Hz, 1H, HC=CH); 7,26 e 7,18 (s, 1H, Ar-H₄); 7,06 (d, $J = 7,11$ Hz, 1H, Ar-H₆); 6,91–6,78 (m, 6H, Ar-H_{1,6,11}); 6,49 (d, $J = 15,11$ Hz, 1H, HC=CH) e 3,85 e 3,82 (s, 3H, CH₃).
RMN de ¹³C (75 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm) (**Figura A6**, Anexo I): 166,3; 161,8; 160,4; 147,9; 146,5; 143,2; 130,2; 128,9; 128,7; 126,3; 125,2; 121,9; 115,8; 111,0 e 55,6.



(*E*)-*N'*-(3,5-dihóxi benzilideno)-3-(4-hidróxi-3-metóxi fenil)acriloidrazida (**PQM-161**)

Rendimento global: 27%. **Aspecto:** Sólido marrom. **PF:** 232 °C.

Pureza: 99,3 %

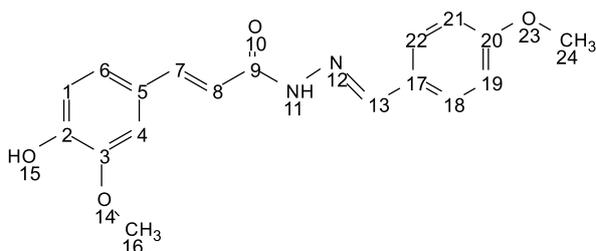
Fórmula molecular: C₁₇H₁₆N₂O₅ **Massa Molecular:** 328,1059 g/mol.

HRMS (ESI) *m/z*: (**Figura A11**, Anexo I) calculado [M]⁺: 329,1137 g/mol; encontrado [M]⁺: 329,1141 g/mol

IV (ν máx, cm⁻¹, **ATR**) (**Figura A8**, Anexo I): 3374, 3230, 3047, 2962, 1622, 1585, 1467, 1343 e 1018.

RMN de ¹H (300 MHz, CD₃OD) δ (ppm) (**Figura A9**, Anexo I): 7,96 e 7,82 (s, 1H, N=CH); 7,66 e 7,43 (d, $J = 15,41$ e $15,64$ Hz, 1H, HC=CH); 7,16 (d, $J = 1,31$ Hz, 1H, Ar-H₄); 7,09 (dd, $J = 1,31$; 8,07 Hz, 1H, Ar-H₆); 6,82 (d, $J = 8,07$ Hz, 1H, Ar-H₁); 6,72 (d, $J = 2,17$ Hz, 2H, Ar-H_{18,22}); 6,47 (d, $J = 15,41$ Hz, 1H, HC=CH); 6,32 (s, 1H, Ar-H₂₀), 3,90 (s, 3H, CH₃) e 3,35 (s, 2H, OH_{23,24}).

RMN de ¹³C (75 MHz, CD₃OD) δ (ppm) (**Figura A10**, Anexo I): 165,8; 160,0; 149,6; 149,4; 146,0; 145,1; 144,3; 137,3; 128,3; 123,6; 123,4; 116,6; 111,8; 107,1 e 55,5.



(*E*)-3-(4-hidróxi-3-metóxi fenil)-*N'*-(4-metóxi benzilideno)acriloidrazida (**PQM-162**)

Rendimento global: 53%. **Aspecto:** Sólido amarelo claro. **PF:** 226 °C.

Pureza: 99,9 %

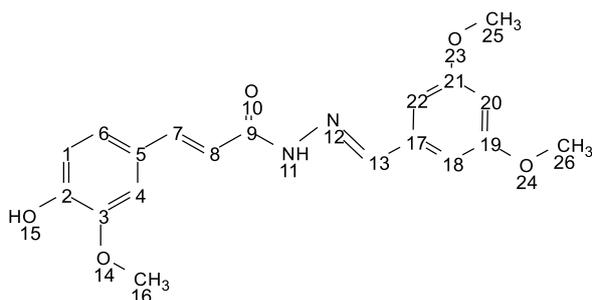
Fórmula molecular: C₁₈H₁₈N₂O₄ **Massa Molecular:** 326,1267 g/mol.

HRMS (ESI) m/z: (Figura A15, Anexo I) calculado [M]⁺: 327,1345 g/mol; encontrado [M]⁺: 327,1343 g/mol

IV (ν máx, cm⁻¹, ATR) (Figura A12, Anexo I): 3116, 3046, 2928, 2833, 1651, 1605, 1507, 1420, 1398 e 1031.

RMN de ¹H (300 MHz, CD₃OD) δ (ppm) (Figura A13, Anexo I): 8,08 e 7,95 (s, 1H, N=CH); 7,75 (d, J = 8,83 Hz, 2H, Ar-H_{19,21}); 7,66 e 7,45 (d, J = 15,61 e 15,95 Hz, 1H, HC=CH); 7,17 (d, J = 1,81 Hz, 1H, Ar-H₄); 7,10 (dd, J = 1,81; 8,22 Hz, 1H, Ar-H₆); 6,97 (d, J = 8,86 Hz, 2H, Ar-H_{18,22}); 6,83 (d, J = 8,22 Hz, 1H, Ar-H₁); 6,48 (d, J = 15,61 Hz, 1H, HC=CH); 3,90 (s, 3H, CH₃₋₁₆) e 3,83 (s, 3H, CH₃₋₂₄).

RMN de ¹³C (75 MHz, CD₃OD) δ (ppm) (Figura A14, Anexo I): 165,7; 163,2; 150,4; 149,3; 145,0; 144,0; 130,5; 129,8; 128,1; 123,5; 116,6; 116,4; 115,3; 111,8; 56,4 e 55,9.



(*E*)-*N'*-(3,5-dimetóxi benzilideno)-3-(4-hidróxi-3-metóxi fenil)acriloidrazida (**PQM-163**)

Rendimento global: 47%. **Aspecto:** Sólido bege. **PF:** 214 °C.

Pureza: 99,7 %

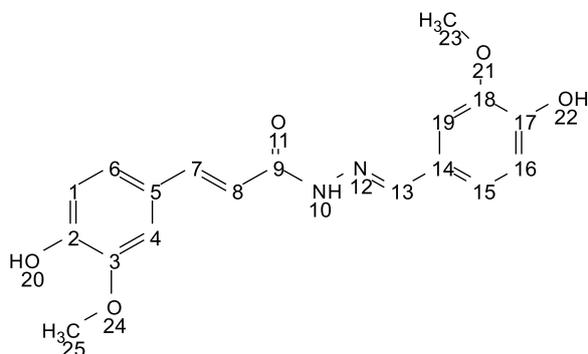
Fórmula molecular: C₁₉H₂₀N₂O₅ **Massa Molecular:** 356,1372 g/mol.

HRMS (ESI) m/z: (Figura A19, Anexo I) calculado [M]⁺: 357,1450 g/mol; encontrado [M]⁺: 357,1453 g/mol

IV (ν máx, cm⁻¹, ATR) (Figura A16, Anexo I): 3153, 3055, 2934, 2833, 1660, 1628, 1587, 1423, 1363, 1054.

RMN de ¹H (300 MHz, DMSO- *d*₆) δ (ppm) (Figura A17, Anexo I): 11,43 e 11,21 (s, 1H, N-NH); 8,10 e 7,93 (s, 1H, N=CH); 7,50 (d, 1H, J = 15,67 MHz, HC=CH); 7,38 e 7,31 (s, 2H, Ar-H_{18,24}); 7,20–7,12 (*m*, 1H, Ar-H₄); 7,08 (*t*, 3H, Ar-H_{1,6}); 6,82 (d, J = 8,13 Hz, 3H, Ar-H_{1,8,20}); 6,51 (d, J = 15,67 MHz, HC=CH); 3,85 e 3,82 (s, 9H, CH₃).

RMN de ^{13}C (75 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm) (**Figura A18**, Anexo I): 162,0; 160,7; 149,0; 148,8; 146,1; 142,4; 141,2; 136,5; 126,2; 122,8; 122,0; 116,7; 115,7; 111,0; 104,8; 102,3; 55,5; 55,4; 55,2 e 55,0.



(*E*)-*N'*-(4-hidróxi-3-metóxi-benzilideno)-3-(4-hidróxi-3-metóxi-fenil)acriloidrazida (**PQM-164**)

Rendimento global: 48,1%. **Aspecto:** Sólido amarelo. **PF:** 157 °C.

Pureza: 99,9 %

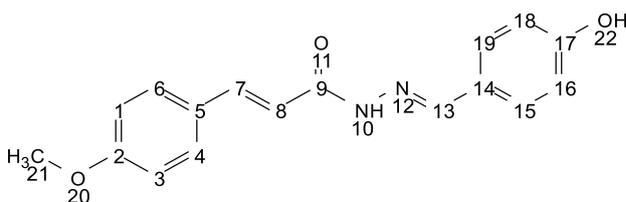
Fórmula molecular: $\text{C}_{18}\text{H}_{18}\text{N}_2\text{O}_5$ **Massa Molecular:** 342,1216 g/mol.

HRMS (ESI) m/z : (Figura 24, pg. 53): calculado $[\text{M}]^+$: 343,1288 g/mol; encontrado $[\text{M}]^+$: 343,1299g/mol

IV ($\nu_{\text{máx}}$, cm^{-1} , **ATR**) (Figura 18, pg. 47): 3212, 2965, 2840, 1651, 1582, 1509, 1373 e 1025.

RMN de ^1H (300 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm) (Figura 19, pg. 49): 11,35 e 11,16 (s, 1H, N-NH); 9,45 (s, 2H, OH); 8,04 e 7,87 (s, 1H, N=CH); 7,45 e 7,38 (d, $J = 15,65$ e $15,99$ Hz, 1H, HC=CH); 7,32 e 7,24 (s, 1H, Ar-H₁₉); 7,01 (t, $J = 6,77$ Hz, 4H, Ar-H_{6,15}); 6,76 (d, $J = 8,11$ Hz, 4H, Ar-H_{1,16}); 6,44 (d, $J = 15,65$ Hz, 1H, HC=CH) e 3,76 (s, 12H, CH₃).

RMN de ^{13}C (75 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm) (Figura 21, pg. 51): 166,2 e 161,7; 148,9; 148,7; 148,0; 147,9; 146,7 e 143,0; 140,7 e 114,1; 126,3; 125,8; 122,0; 121,9; 117,0; 115,7; 115,5; 111,0; 109,1 e 55,56.



(*E*)-*N'*-((*E*)-4-hidróxi-benzilideno)-3-(4-metóxi-fenil)acriloidrazida (**PQM-196**)

Rendimento global: 76%. **Aspecto:** Sólido amarelo claro. **PF:** 254 °C.

Pureza: 99,9 %

Fórmula molecular: C₁₇H₁₆N₂O₃ **Massa Molecular:** 296,1161 g/mol.

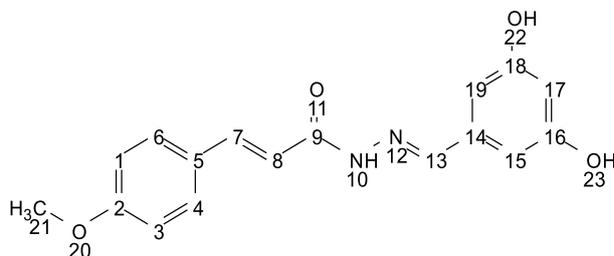
Isolamento: Precipitação em etanol gelado.

HRMS (ESI) m/z: (Figura A24, Anexo I) calculado [M]⁺: 297,1239 g/mol; encontrado [M]⁺: 297,1231 g/mol

IV (ν máx, cm⁻¹, ATR) (Figura A21, Anexo I): 3250, 3012, 2898, 1636, 1602, 1562, 1458, 1365 e 1022.

RMN de ¹H (300 MHz, DMSO- *d*₆) δ (ppm) (Figura A22, Anexo I): 11,41 e 11,21 (s, 1H, N-NH); 9,92 (s, 1H, OH); 8,12 e 7,95 (s, 1H, N=CH); 7,61-7,51 (*m*, 4H, Ar-H_{1,3,16,18}); 7,43 (*d*, *J* = 15,67 Hz, 1H, HC=CH); 6,99 (*d*, *J* = 8,17 Hz, 2H, Ar-H_{15,19}); 6,83 (*d*, *J* = 8,08 Hz, 2H, Ar-H_{4,6}); 6;54 (*d*, *J* = 15,67 Hz, 1H, HC=CH); e 3,79 (s, 3H, CH₃).

RMN de ¹³C (75 MHz, DMSO- *d*₆) δ (ppm) (Figura A23, Anexo I): 166,5; 162,0; 161,1; 147,1; 143,7; 130,3; 129,8; 129,3; 129,0; 125,8; 116,2; 114,9 e 55,7.



N'-(3,5-diidróxibenzilideno)-3-(4-metóxfenil)acriloidrazida (**PQM-197**).

Rendimento global: 22%. **Aspecto:** Sólido bege. **PF:** 211 °C.

Pureza: 95,0 %

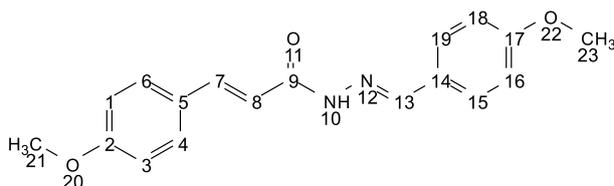
Fórmula molecular: C₁₇H₁₆N₂O₄ **Massa Molecular:** 312,1110 g/mol.

HRMS (ESI) m/z: (Figura A28, Anexo I) calculado [M]⁺: 313,1188 g/mol; encontrado [M]⁺: 313,1193 g/mol

IV (ν máx, cm⁻¹, ATR) (Figura A25, Anexo I): 3252, 3061, 2843, 1662, 1589, 1551, 1465, 1304, 1289 e 1043.

RMN de ¹H (300 MHz, DMSO- *d*₆) δ (ppm) (Figura A26, Anexo I): 11,49 e 11,30 (s, 1H, N-NH); 9,44 (s, 4H, OH); 8,02 e 7,85 (s, 1H, N=CH); 7,61-7,51 (*m*, 4H, Ar-H_{4,6}); 7,37 (*d*, *J* = 15,97 Hz, 1H, HC=CH); 7,06-6,96 (*m*, 4H, Ar-H_{1,3}); 6,61-6,57 (*m*, 4H, Ar-H_{15,19}); 6;53 (*d*, *J* = 15,97 Hz, 1H, HC=CH); 6,26 (s, 2H, Ar-H₁₇) e 3,80 (s, 6H, CH₃).

RMN de ¹³C (75 MHz, DMSO- *d*₆) δ (ppm) (Figura A27, Anexo I): 166,2; 160,7; 158,7; 146,6; 143,3; 136,1; 129,4; 127,3; 117,7; 114,5; 105,2; 104,4 e 55,3.



N-(4-metóxi-benzilideno)-3-(4-metóxi-fenil)acriloidrazida (**PQM-198**).

Rendimento global: 44%. **Aspecto:** Sólido branco. **PF:** 278 °C.

Pureza: 99,9 %

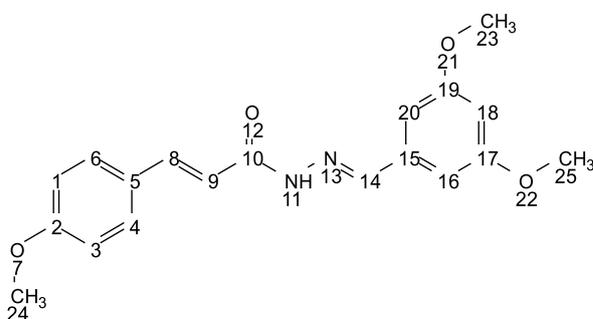
Fórmula molecular: C₁₈H₁₈N₂O₃ **Massa Molecular:** 310,1317 g/mol.

HRMS (ESI) *m/z*: (Figura A32, Anexo I) calculado [M]⁺: 311,1396 g/mol; encontrado [M]⁺: 311,1385 g/mol

IV (*v* máx, cm⁻¹, ATR) (Figura A29, Anexo I): 3007, 2929, 1647, 1600, 1508, 1421, 1253 e 1028.

RMN de ¹H (300 MHz, DMSO- *d*₆) δ (ppm) (Figura A30, Anexo I): 11,46 e 11,30 (s, 1H, N-NH); 8,18 e 8,00 (s, 1H, N=CH); 7,74-7,65 e 7,62-7,51 (*m*, 4H, Ar-H-4, 6, 15, 19); 7,45 (*d*, *J* = 15,90 Hz, 1H, HC=CH); 7,01 (*d*, *J* = 8,59 Hz, 8H, Ar-H-1, 3, 16, 18); 6,55 (*d*, *J* = 15,90 Hz, 1H, HC=CH); e 3,80 (s, 12H, CH₃).

RMN de ¹³C (75 MHz, DMSO- *d*₆) δ (ppm) (Figura A31, Anexo I): 166,1; 160,8; 160,61; 146,2; 142,7; 129,9; 129,4; 128,7; 128,4; 117,8; 114,5; 114,3; e 55,3.



N-(3,5-dimeoxibenzilideno)-3-(4-metóxi-fenil)acriloidrazida (**PQM-199**)

Rendimento global: 74%. **Aspecto:** Sólido amarelo claro. **PF:** 228 °C.

Pureza: 99,9 %

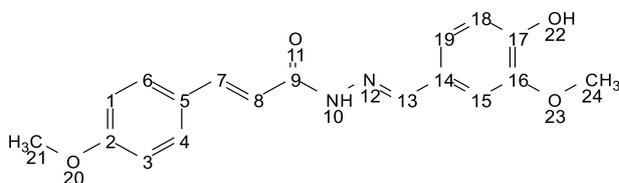
Fórmula molecular: C₁₉H₂₀N₂O₄ **Massa Molecular:** 340,1423 g/mol.

HRMS (ESI) *m/z*: (Figura 36, Anexo I) calculado [M]⁺: 341,1501 g/mol; encontrado [M]⁺: 341,1482 g/mol

IV (*v* máx, cm⁻¹, ATR) (Figura A33, Anexo I): 3166, 3139, 3045, 2933, 2834, 1663, 1602, 1582, 1419, 1382, 1053.

RMN de ^1H (300 MHz, piridina- d_5) δ (ppm) (**Figura A34**, Anexo I): 12,62 e 12,60 (s, 1H, N-NH) 8,65 e 8,41 (s, 1H, N=CH); 8,23 e 8,03(d, $J = 15,60$ e $15,91$ Hz, 1H, HC=CH); 7,72 (d, $J = 8,48$ Hz, 2H, Ar-H_{4,6}); 7,52 (d, $J = 8,42$ Hz, 2H, Ar-H_{4,6}); 7,29 (dd, $J = 1,48$; $9,36$ Hz, 4H, Ar-H_{16,20}); 7,03-6,88 (m, 6H, Ar-H_{1,3,9}); 6,78 e 6,72 (s, 1H, Ar-H₁₈); 3,77 (s, 9H, CH_{3-23,24,25}); 3,68 (s, 3H, CH₃₋₂₃); 3,65 (s, 3H, CH₃₋₂₅) e 3,63 (s, 3H, CH₃₋₂₄).

RMN de ^{13}C (75 MHz, piridina- d_5) δ (ppm) (**Figura A35**, Anexo I): 168,2; 163,8; 162,1; 162,0; 147,4; 143,4; 143,3; 142,3; 137,8; 130,8; 130,3; 129,0; 128,6; 118,6; 116,2; 115,3; 106,1; 103,8; 102,9 e 55,8.



N-(4-hidróxi-3-metóxi-benzilideno)-3-(4-metóxi-fenil)acriloidrazida (**PQM-200**)

Rendimento global: 70%. **Aspecto:** Sólido amarelo claro. **PF:** 263 °C.

Pureza: 99,9 %

Fórmula molecular: C₁₈H₁₈N₂O₄ **Massa Molecular:** 326,1267 g/mol.

HRMS (ESI) m/z : (**Figura A40**, Anexo I) calculado $[M]^+$: 327,1345 g/mol; encontrado $[M]^+$: 327,1355 g/mol

IV (ν máx, cm⁻¹, **ATR**) (**Figura A37**, Anexo I): 3274, 2997, 2839, 1651, 1600, 1511, 1442, 1274 e 1017.

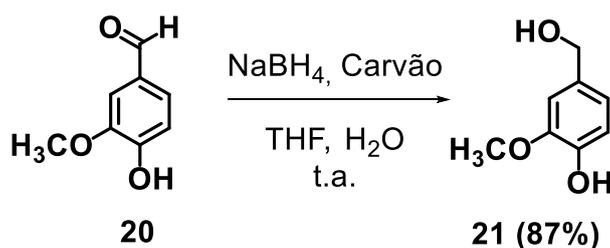
RMN de ^1H (300 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm) (**Figura A38**, Anexo I): 11,63 e 11,27 (s, 1H, N-NH) 8,12 e 7,92 (s, 1H, N=CH); 7,67 (d, $J = 8,58$ Hz, 1H, Ar-H₁₈); 7,60-7,51 (m, 4H, Ar-H_{7,15,18,19}); 7,41 (d, $J = 15,72$ Hz, 1H, HC=CH); 7,28 (dd, $J = 1,60$; $8,07$ Hz, 2H, Ar-H_{15,19}); 7,08-6,92 (m, 8H, Ar-H_{1,3,4,6}); 6,60 (d, $J = 15,72$ Hz, 1H, HC=CH); e 3,80 (s, 6H, CH₃).

RMN de ^{13}C (75 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm) (**Figura A39**, Anexo I): 166,5; 162,0; 161,2; 161,0; 150,2; 147,3; 146,9; 143,5; 142,0; 140,3; 130,2; 129,8; 127,8; 120,7; 118,4; 114,9; 112,8; 112,6; 112,3; 56,0 e 55,8.

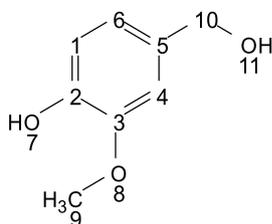
4.1.2.2 Síntese e obtenção dos derivados triazólicos (PQM-229-241)

A seguir serão descritos os procedimentos para síntese de cada intermediário e dos produtos finais da série 2 de triazóis, bem como serão expostos os dados de caracterização de cada substância obtida.

4.1.2.2.1 Síntese do álcool **21**



Inicialmente uma solução de aldeído vanílico (2 g, 13,15 mmol, 1 eq.) em 10 mL de THF foi colocada em balão de fundo redondo de 100 mL, a solução foi colocada sob agitação vigorosa, em seguida adicionou-se o carvão ativado (158 mg, 1 eq.) seguido do NaBH₄ (249 mg, 0,5 eq.), a solução ficou em agitação por 1 minuto. Em sequência adicionam-se lentamente ao balão 2 mL de H₂O destilada, a solução resultante foi mantida sob agitação por mais 2 minutos. Por fim adicionam-se mais 5 mL de H₂O destilada e agitou-se a solução por mais 5 minutos, ao término desse tempo a reação foi encerrada (SETAMDIDEH, 2006). Para o isolamento do álcool inicialmente adicionam-se 10 mL de H₂O destilada, a solução aquosa foi filtrada para retirada do carvão ativado e extraída exhaustivamente com CH₂Cl₂, a fase orgânica foi rotaevaporada e obteve-se o produto puro em forma de cristais brancos (**21**, 1,763 g, 11,44 mmol).



4-(hidróximetil)-2-metóxfenol (**21**)

Rendimento: 87%. **Aspecto Físico:** Sólido branco.

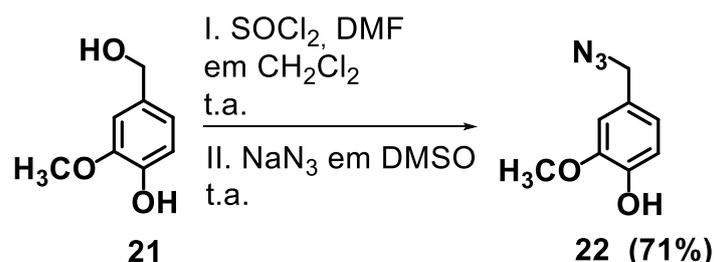
Fórmula molecular: C₈H₁₀O₃ **Massa Molecular:** 154,0630 g/mol

IV ($\nu_{\text{máx}}$, cm⁻¹, **ATR**) (Figura 27, pg. 56): 3147, 2964, 2887, 1601, 1430, 1372 e 1031.

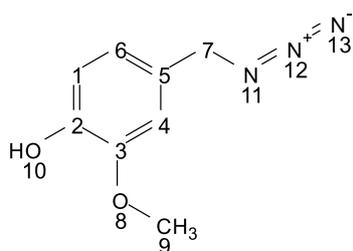
RMN de ^1H (300 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ (ppm) (Figura 28, pg. 58): 6,88 (s, 1H, Ar-H₁); 6,71 (s, 2H, Ar-H_{4,6}); 5,00 (t, $J = 5,72$ Hz, 1H, OH₁₁); 4,38 (d, $J = 5,72$ Hz, 2H, -CH₂-) e 3,75 (s, 3H, -CH₃).

RMN de ^{13}C (75 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ (ppm) (Figura 29, pg. 54): 147,4; 145,3, 133,5; 119,1; 115,1; 111,1; 63,03 e 55,52

4.1.2.2.2 Síntese da azida **22**



Nesta etapa da rota sintética, inicialmente, em um balão de fundo redondo de 50 mL foi adicionado o álcool-composto **21** da reação anterior (1 g, 6,50 mmol, 1 eq.), cloreto de tionila (1 ml, 2 eq.) e DMF (4 gotas) em 15 mL de CH_2Cl_2 , a reação foi mantida sob agitação magnética por aproximadamente duas horas, ao fim desse tempo a solução foi rotaevaporada a fim de retirar todo o solvente e o excesso de cloreto de tionila. Posteriormente, foi adicionado ao balão 26 mL de uma solução a 0,5 M de NaN_3 (13 mmol, 2 eq.) em DMSO, a solução resultante foi mantida sob agitação magnética por aproximadamente 16 horas (MARTINU, 2000). Ao verificar o consumo total do material de partida por placa de cromatografia em camada delgada (CCD) a reação foi encerrada. Para o isolamento do produto adicionam-se 20 mL de H_2O destilada a solução e realizou-se exaustiva extração com clorofórmio, a fase orgânica foi rotaevaporada e o produto foi purificado com auxílio de cromatografia em coluna utilizando sílica flash e empregando como eluente, acetato de etila:hexano (9:1), obtendo um óleo castanho, a azida orgânica **22** (827 mg, 4,62 mmol).



4-(azidometil)-2-metóxfenol (**22**).

Rendimento: 71%. **Aspecto Físico:** Óleo castanho.

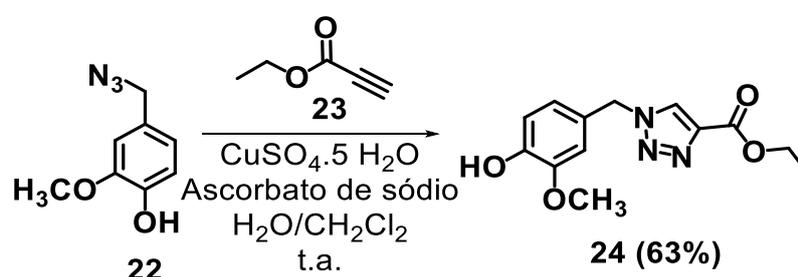
Fórmula molecular: C₈H₉N₃O₂ **Massa Molecular:** 179,0695 g/mol.

IV (ν máx, cm⁻¹, **ATR**) (Figura 31, pg. 60): 3417, 2937, 1845, 2090, 1604, 1512, 1430, 1370 e 1029

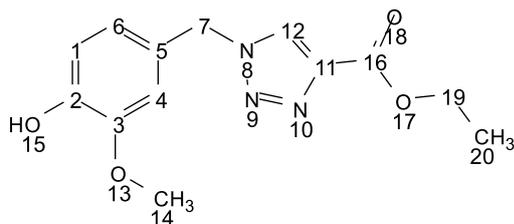
RMN de ¹H (300 MHz, CDCl₃) δ (ppm) (Figura 32, pg. 61): 6,90 (*d*, *J* = 8,57 Hz, 1H, Ar-H₁); 6,80 (*m*, 2H, Ar-H_{4,6}); 4,24 (*s*, 2H, -CH₂-) e 3,88 (*s*, 3H, -CH₃).

RMN de ¹³C (75 MHz, CDCl₃) δ (ppm) (Figura 33, pg. 62): 146,8; 154,8; 127,2; 114,6; 110,9; 56,0 e 54,9.

4.1.2.2.3 Síntese do 1,2,3-triazol **24**



A azida **22** (375 mg, 2,09 mmol, 1 eq.) foi adicionada em balão de fundo redondo de 50 mL, seguida de 8 mL solvente da reação (uma mistura de H₂O e CH₂Cl₂ na proporção de 1:1 (v:v), propiolato de etila (**23**, 205 mg, 1 eq.), CuSO₄ (133 mg, 0,4 eq.) e ascorbato de sódio (83 mg, 0,2 eq.) a reação foi mantida em agitação magnética por 20h a aproximadamente 20 °C (BAI, 2014). A reação foi encerrada ao verificar o consumo total do material de partida *via* CCD. A reação foi elaborada adicionando-se 5 mL de água à mistura reacional, que foi extraída com CH₂Cl₂ (3 x 8 mL). A fase orgânica obtida foi lavada com uma mistura formada de uma solução de EDTA 50% m/v e NH₄OH concentrado, misturadas na proporção de 1:1 para eliminar o Cu(II) residual. As fases orgânicas reunidas foram secadas com Na₂SO₄ anidro e, após filtração, o solvente foi removido sob pressão reduzida. O resíduo obtido foi purificado em cromatografia em coluna com gel de sílica (eluente: CH₂Cl₂ 100%). A evaporação do solvente, sob pressão reduzida, forneceu o produto **24** (365 mg, 1,32 mmol) como um sólido amarelado.



etil 1-(4-hidróxi-3-metóxi-benzil)-1*H*-1,2,3-triazol-4-carboxilato (**24**).

Rendimento: 63%. **Aspecto Físico:** Sólido amarelado.

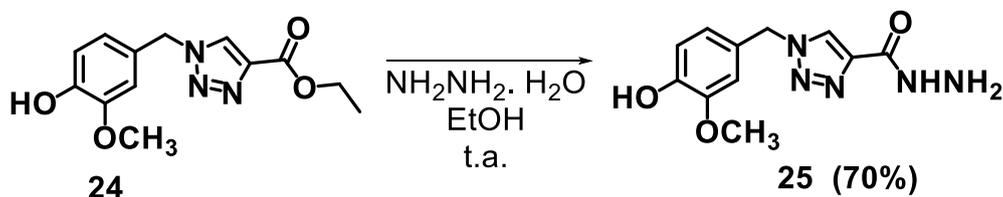
Fórmula molecular: C₁₃H₁₅N₃O₄ **Massa Molecular:** 277,1063 g/mol.

IV ($\nu_{\text{máx}}$, cm⁻¹, **ATR**) (Figura 35, pg. 65): 3137, 2981, 2831, 2353, 1727, 1519, 1228 e 1027.

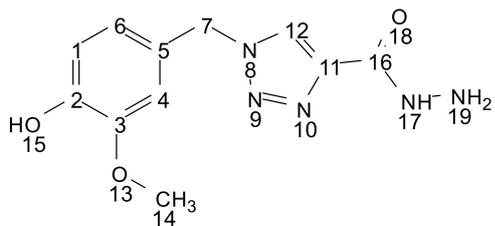
RMN de ¹H (300 MHz, CD₃OD) δ (ppm) (Figura 36, pg. 66): 8,45 (s, 1H, N-CH=C-); 6,99 (d, $J = 1,77$ Hz, 1H, Ar-H₄); 6,85 (dd, $J = 1,77$ e 8,10 Hz, 1H, Ar-H₆); 6,80 (d, $J = 8,10$ Hz, 1H, Ar-H₁); 5,53 (s, 2H, C-CH₂-N); 4,36 (q, $J = 7,12$ Hz, 2H, O-CH₂-CH₃); 3,84 (s, 3H, -CH₃) e 1,36 (t, $J = 7,12$ Hz, 3H, O-CH₂-CH₃).

RMN de ¹³C (75 MHz, CD₃OD) δ (ppm) (Figura 37, pg. 67): 162,0; 149,4; 148,3; 141,0; 129,1; 127,3; 122,6; 116,6; 113,1; 62,3; 56,4; 55,2 e 14,5.

4.1.2.2.4 Síntese da hidrazida-1,2,3-triazol **25**



Para a obtenção da hidrazida intermediária foi adicionado em um balão de 50 mL o triazol **24** (300 mg, 1,08 mmol, 1 eq.), 10 mL de etanol e o monidrato de hidrazina (0,640 mL, 10 eq.), a solução foi mantida sob agitação magnética por 17h a aproximadamente 20 °C (ROMEIRO, 2009). Durante a reação o produto começa a precipitar no meio reacional, a reação foi encerrada ao verificar o consumo total do material de partida por CCD, o balão foi levado à geladeira por 5h. A eliminação do solvente, por filtração e lavagem com etanol gelado, forneceu o produto **25** (200 mg, 0,756 mmol) como um sólido bege.



1-(4-hidróxi-3-metóxi-benzil)-1*H*-1,2,3-triazol-4-carboidrazida (**25**)

Rendimento: 70%. **Aspecto Físico:** Sólido bege.

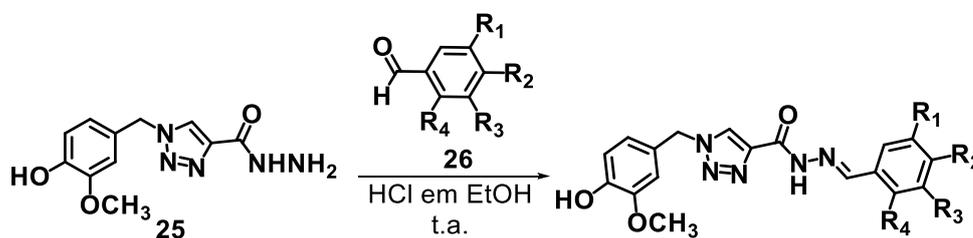
Fórmula molecular: C₁₁H₁₃N₅O₃ **Massa Molecular:** 263,1018 g/mol.

IV ($\nu_{\text{máx}}$, cm⁻¹, **ATR**) (Figura 39, pg. 68): 3372, 3311, 3101, 2928, 1643, 1570 e 1031.

RMN de ¹H (300 MHz, DMSO - *d*₆) δ (ppm) (Figura 40, pg. 69): 8,53 (s, 1H, N-CH=C-); 7,00 (*d*, *J* = 1,40 Hz, 1H, Ar-H₄); 6,77 (*m*, 2H, Ar-H_{1,6}); 5,48 (s, 2H, C-CH₂-N) e 3,75 (s, 16H, -CH₃ + H₂O residual).

RMN de ¹³C (75 MHz, DMSO - *d*₆) δ (ppm) (Figura 41, pg. 70): 159,4; 147,8; 146,9; 141,9; 126,2; 125,8; 121,2, 115,64; 112,7; 55,7 e 53,2.

4.1.2.2.5 Síntese das 1,2,3-triazóis-*N*-acilidrazonas (**PQM-229-241**)



PQM-229-R₁ = H, R₂ = OH, R₃ = H, R₄ = H.
PQM-230-R₁ = OH, R₂ = H, R₃ = OH, R₄ = H.
PQM-231-R₁ = H, R₂ = OCH₃, R₃ = H, R₄ = H.
PQM-232-R₁ = OCH₃, R₂ = H, R₃ = OCH₃, R₄ = H.
PQM-233-R₁ = OCH₃, R₂ = OH, R₃ = H, R₄ = H.
PQM-234-R₁ = H, R₂ = H, R₃ = H, R₄ = H.
PQM-235-R₁ = H, R₂ = *N*-piperidina, R₃ = H, R₄ = H.
PQM-236-R₁ = H, R₂ = Cl, R₃ = H, R₄ = H.
PQM-237-R₁ = H, R₂ = H, R₃ = Cl, R₄ = H.
PQM-238-R₁ = H, R₂ = H, R₃ = H, R₄ = Cl.
PQM-239-R₁ = H, R₂ = F, R₃ = H, R₄ = H.
PQM-240-R₁ = H, R₂ = H, R₃ = H, R₄ = F.
PQM-241-R₁ = H, R₂ = H, R₃ = F, R₄ = H.

Para obtenção das 1,2,3-triazóis-*N*-acilidrazonas planejadas foi utilizada a mesma metodologia descrita anteriormente. Adicionou-se 10 mL de etanol seco, o aldeído adequado (**26**, 1,2 eq.) e o HCl (5eq.), em um balão de fundo redondo de 50 mL, essa solução foi colocada sob agitação magnética e adicionou-se a hidrazida (**25**, 100 mg, 0,3801 mmol, 1 eq.), previamente solubilizada no menor volume possível de etanol seco, sob a solução contendo o aldeído e o ácido clorídrico. A solução

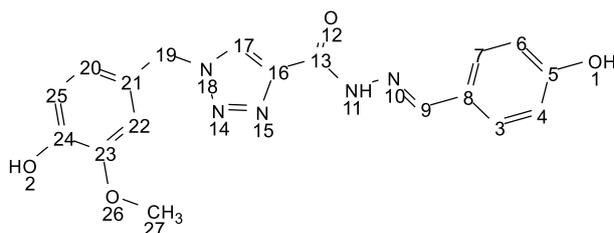
resultante foi mantida sob agitação magnética por 24 horas a temperatura aproximada de 20°C (DIAS VIEGAS, 2018). Os métodos de purificação dos produtos finais são observados na TABELA 10.

Tabela 10 - Dados obtidos após purificação dos produtos de acoplamento dos derivados triazólicos.

PQM	Quantidade obtida	Método de purificação	Rendimento do acoplamento (%)
229	107 mg (0,293 mmol)	Pr em acetato de etila	77
230	110mg (0,289 mmol)	Pr em etanol gelado	76
231	123 mg (0,323 mmol)	Pr em etanol gelado	85
232	118 mg (0,289 mmol)	Pr em etanol gelado.	76
233	127 mg (0,319 mmol)	Pr em etanol gelado.	84
234	87 mg (0,247 mmol)	Pr em etanol gelado.	65
235	146 mg (0,335 mmol)	Pr em etanol gelado	88
236	124 mg (0,323 mmol)	Pr em etanol gelado.	85
237	117 mg (0,304 mmol)	Pr em etanol gelado.	80
238	123 mg (0,323 mmol)	Pr em etanol gelado	85
239	107 mg (0,289 mmol)	Pr em etanol gelado	76
240	102 mg (0,277 mmol)	Pr em etanol gelado	73
241	103 mg (0,278 mmol)	Pr em etanol gelado	73

Fonte: do autor.

Legenda: Pr – Precipitação



(*E*)-1-(4-hidróxi-3-metóxi-benzil)-*N*-(4-hidróxi-benzilideno)-1*H*-1,2,3-triazol-4-carboidrazida (**PQM-229**)

Rendimento global: 20%. **Aspecto Físico:** Sólido amarelado. **PF:** 274 °C.

Pureza: 99,1 %

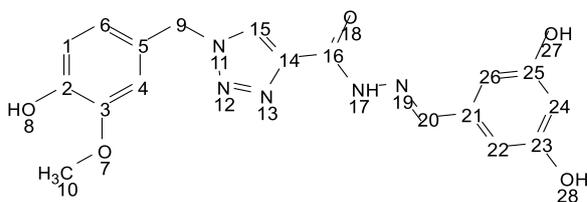
Fórmula molecular: C₁₈H₁₇N₅O₄ **Massa Molecular:** 367,1281 g/mol.

HRMS (ESI) *m/z*: (Figura A45, Anexo I) calculado [M]⁺: 368,1359 g/mol; encontrado [M]⁺: 368,1351 g/mol

IV (ν máx, cm^{-1} , **ATR**) (**Figura A42**, Anexo I): 3331, 3237, 1645, 1600, 1433, 1367 e 1036.

RMN de ^1H (300 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ (ppm) (**Figura A43**, Anexo I): 11,83 (s, 1H, N-NH); 9,93 (s, 1H, OH₂); 9,13 (s, 1H, OH₁); 8,72 (s, 1H, N-CH=C); 8,41 (s, 1H, N=CH); 7,53 (d, $J = 8,61$ Hz, 2H, Ar-H_{3,7}); 7,05 (d, $J = 1,59$ Hz, 1H, Ar-H₂₂); 6,87-6,75 (m, 4H, Ar-H_{4,6,20,25}); 5,53 (s, 2H, Ar-CH₂-N); 3,77 (s, 3H, O-CH₃).

RMN de ^{13}C (75 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ (ppm) (**Figura A44**, Anexo I): 159,3; 155,8; 148,4; 147,6; 146,7; 142,0; 128,8; 126,9; 126,0; 125,2; 121,1; 115,6; 115,5; 112,6; 55,5 e 53,2.



(*E*)-*N*-(3,5-di-hidróxi-benzilideno)-1-(4-hidróxi-3-metóxi-benzil)-1*H*-1,2,3-triazol-4-carboidrazida (**PQM-230**)

Rendimento global: 20%. **Aspecto:** Sólido marrom. **PF:** 185 °C.

Pureza: 98,1 %

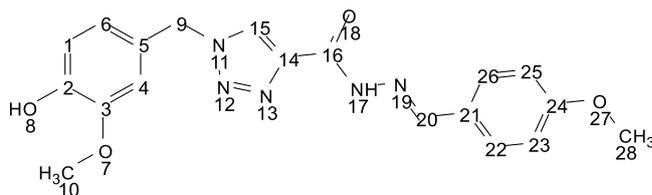
Fórmula molecular: $\text{C}_{18}\text{H}_{17}\text{N}_5\text{O}_5$ **Massa Molecular:** 383,1230 g/mol.

HRMS (ESI) m/z : (**Figura A49**, Anexo I) calculado $[\text{M}]^+$: 384,1308 g/mol; encontrado $[\text{M}]^+$: 384,1292 g/mol

IV (ν máx, cm^{-1} , **ATR**) (**Figura A46**, Anexo I): 3536, 3217, 1671, 1590, 1470, 1323 e 1009.

RMN de ^1H (300 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ (ppm) (**Figura A47**, Anexo I): 11,97 (s, 1H, N-NH); 9,50 (s, 2H, OH_{27,28}); 9,20 (s, 1H, OH₈); 8,77 (s, 1H, N-CH=C); 8,33 (s, 1H, N=CH); 7,05 (s, 1H, Ar-H₁); 6,87-6,73 (m, 2H, Ar-H_{4,6}); 6,58 (s, 2H, Ar-H₂₂); 6,28 (s, 1H, Ar-H₂₄); 5,54 (s, 2H, Ar-CH₂-N); 3,77 (s, 3H, O-CH₃).

RMN de ^{13}C (75 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ (ppm) (**Figura A48**, Anexo I): 158,6; 156,0; 148,5; 147,6; 146,7; 141,8; 135,9; 127,0; 126,0; 121,1; 115,5; 112,6; 105,1; 104,4; 55,5 e 53,2.



(*E*)-1-(4-hidróxi-3-metóxi-benzil)-*N'*-(4-metóxi-benzilideno)-1*H*-1,2,3-triazol-4-carboidrazida (**PQM-231**)

Rendimento global: 22%. **Aspecto:** Sólido bege. **PF:** 196 °C.

Pureza: 90,9 %

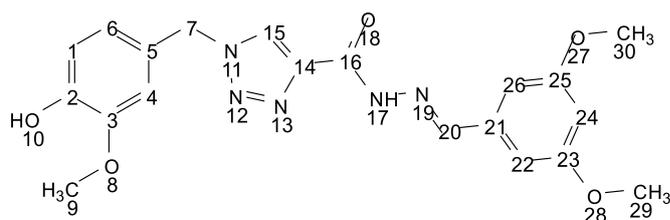
Fórmula molecular: C₁₉H₁₉N₅O₄ **Massa Molecular:** 381,1437 g/mol.

HRMS (ESI) *m/z*: (Figura A53, Anexo I) calculado [M]⁺: 382,1515 g/mol; encontrado [M]⁺: 382,1494 g/mol

IV (*v* máx, cm⁻¹, **ATR**) (Figura A50, Anexo I): 3340, 3298, 1652, 1600, 1436, 1370 e 1022.

RMN de ¹H (300 MHz, DMSO- *d*₆) δ (ppm) (Figura A51, Anexo I): 11,91 (s, 1H, N-NH); 8,74 (s, 1H, N-CH=C); 8,64 (s, 1H, OH), 8,47 (s, 1H, N=CH); 7,82 (d, *J* = 8,81 Hz, 2H, Ar-H_{22,26}); 7,64 (d, *J* = 8,77 Hz, 2H, Ar-H_{23,25}); 7,10-6,97 (*m*, 3H, Ar-H_{1,4,6}); 5,54 (s, 2H, Ar-CH₂-N); 3,81 (s, 3H, O-CH₃₋₁₀) e 3,77 (s, 3H, O-CH₃₋₂₈).

RMN de ¹³C (75 MHz, DMSO- *d*₆) δ (ppm) (Figura A52, Anexo I): 161,6; 160,4; 155,9; 148,0; 146,7; 141,9; 129,9; 128,6; 127,0; 126,0; 121,1; 115,5; 114,2; 112,6; 55,5; 55,2 e 53,2.



(*E*)-*N'*-(3,5-dimetóxi-benzilideno)-1-(4-hidróxi-3-metóxi-benzil)-1*H*-1,2,3-triazol-4-carboidrazida (**PQM-232**)

Rendimento global: 20%. **Aspecto:** Sólido bege. **PF:** 220 °C.

Pureza: 97,9 %

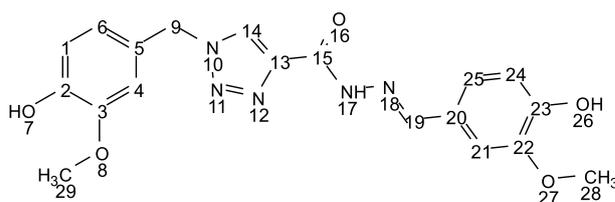
Fórmula molecular: C₂₀H₂₁N₅O₅ **Massa Molecular:** 411,1543 g/mol.

HRMS (ESI) *m/z*: (Figura A57, Anexo I) calculado [M]⁺: 412,1621 g/mol; encontrado [M]⁺: 412,1603 g/mol

IV (*v* máx, cm⁻¹, **ATR**) (Figura A54, Anexo I): 3413, 3243, 1647, 1591, 1453, 1310 e 1034.

RMN de ^1H (300 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm) (**Figura A55**, Anexo I): 12,06 (s, 1H, N-NH); 9,15 (s, 1H, OH); 8,76 (s, 1H, N-CH=C); 8,64 e 8,45 (s, 1H, N=CH); 7,06 (d, $J = 2,25$ Hz, 2H, Ar-H_{22,26}); 6,86-6,78 (m, 3H, Ar-H_{1,4,6}); 6,67 (t, $J = 2,28$ Hz, 1H, Ar-H₂₄); 5,54 (s, 2H, Ar-CH₂-N); 3,80 (s, 3H, O-CH₃₋₉); 3,79 (s, 6H, O-CH_{3-29,30}) e 3,77 (s, 3H, O-CH₃₋₂₉)

RMN de ^{13}C (75 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm) (**Figura A56**, Anexo I): 161,5; 160,6; 156,1; 148,0; 146,7; 141,7; 136,2; 127,1; 121,1; 115,5; 112,6; 106,0; 104,7; 102,3; 55,3 e 53,2.



(*E*)-1-(4-hidroxi-3-metóxi-benzil)-*N'*-(4-hidroxi-3-metóxi-benzilideno)-1*H*-1,2,3-triazol-4-carboidrazida (**PQM-233**)

Rendimento global: 22%. **Aspecto:** Sólido amarelo claro. **PF:** 222 °C.

Pureza: 99,9 %

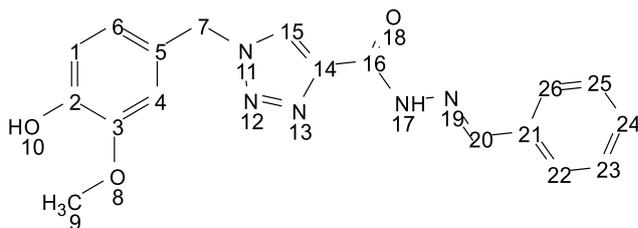
Fórmula molecular: C₁₉H₁₉N₅O₅ **Massa Molecular:** 397,1386 g/mol.

HRMS (ESI) m/z : (Figura 48, pg. 77): calculado [M]⁺: 398,1464 g/mol; encontrado [M]⁺: 398,1446 g/mol

IV (ν máx, cm⁻¹, **ATR**) (Figura 43, pg. 73): 3473, 3346, 3255, 1652, 1601, 1572, 1465, 1278 e 1027.

RMN de ^1H (300 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm) (Figura 44, pg. 74): 11,90 (s, 1H, N-NH); 9,62 (s, 1H, OH₂₆); 9,22 (s, 1H, OH₇); 8,74 (s, 1H, N-CH=C); 8,39 (N=CH); 7,29 (dd, $J = 1,55$ Hz, 1H, Ar-H₂₁); 7,07-7,01 (m, 2H, Ar-H_{1,24}); 6,85-6,80 (m, 2H, Ar-H_{4,6}); 6,75 (d, $J = 8,05$ Hz, 1H, Ar-H₂₅); 5,53 (s, 2H, Ar-CH₂-N); 3,82 (s, 3H, CH₃₋₂₈) e 3,76 (s, 3H, CH₃₋₂₉).

RMN de ^{13}C (75 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm) (Figura 45, pg. 75): 156,1; 149,1; 148,9; 148,1; 147,8; 146,9; 142,1; 127,2; 126,2; 125,8; 122,4; 121,3; 115,7; 115,5; 112,8; 109,0; 55,7; 55,6 e 53,4.



(*E*)-*N'*-benzilideno-1-(4-hidróxi-3-metóxi-benzil)-1*H*-1,2,3-triazol-4-carboidrazida (**PQM-234**)

Rendimento global: 17%. **Aspecto:** Sólido castanho. **PF:** 215 °C.

Pureza: 96,8 %

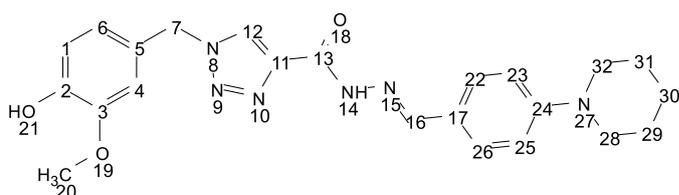
Fórmula molecular: C₁₈H₁₇N₅O₃ **Massa Molecular:** 351,1331 g/mol.

HRMS (ESI) *m/z*: (Figura A61, Anexo I) calculado [M]⁺: 374,1229 g/mol; encontrado [M]⁺: 374,1217 g/mol

IV (*v* máx, cm⁻¹, **ATR**) (Figura A58, Anexo I): 3376, 3264, 1662, 1567, 1435, 1373 e 1044.

RMN de ¹H (300 MHz, DMSO- *d*₆) δ (ppm) (Figura A59, Anexo I): 8,78 (s, 1H, N-CH=C); 8,54 (s, 1H, N=CH); 7,70 (*d*, *J* = 5,42 Hz, 2H, Ar-H_{22,26}); 7,48-7,41 (*m*, 3H, Ar-H_{23,24,25}); 7,06 (s, 1H, Ar-H₁); 6,81 (*dd*, *J* = 8,15 e 18,24 HZ, 2H, Ar-H_{4,6}); 5,54 (s, 2H, Ar-CH₂-N); e 3,77 (s, 3H, O-CH₃).

RMN de ¹³C (75 MHz, DMSO- *d*₆) δ (ppm) (Figura A60, Anexo I): 156,1; 148,1; 147,6; 146,7; 141,8; 134,2; 130,0; 128,7; 127,1; 127,0; 126,0; 121,1; 115,5; 112,6; 55,5 e 53,2.



(*E*)-1-(4-hidróxi-3-metóxi-benzil)-*N'*-(4-(piperidinil)benzilideno)-1*H*-1,2,3-triazol-4-carboidrazida (**PQM-235**)

Rendimento global: 23%. **Aspecto:** Sólido amarelo. **PF:** 225 °C.

Pureza: 97,4 %

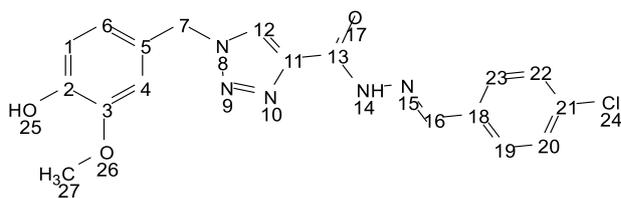
Fórmula molecular: C₂₃H₂₆N₆O₃ **Massa Molecular:** 434,2066 g/mol.

HRMS (ESI) *m/z*: (Figura A65, Anexo I) calculado [M]⁺: 435,2145 g/mol; encontrado [M]⁺: 435,2119 g/mol

IV (ν máx, cm^{-1} , **ATR**) (**Figura A62**, Anexo I): 3386, 3281, 2425, 2357, 1663, 1570, 1451, 1276 e 1011.

RMN de ^1H (300 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ (ppm) (**Figura A63**, Anexo I): 12,05 e 11,68 (s, 1H, N-NH); 8,87 (s, 1H, N-CH=C); 8,78 e 8,49 (s, 1H, N=CH); 7,96-7,47 (m, 4H, Ar-H-22, 23, 25, 26); 7,05 (s, 1H, Ar-H-1); 6,86-6,76 (m, 3H, Ar-H-4, 6); 5,55 (s, 2H, Ar-CH₂-N); 3,76 (s, 3H, O-CH₃); 3,52-3,36 (m, 4H, Pip-H-28, 32) e 1,94-1,53 (m, 6H, Pip-H-29, 30, 31).

RMN de ^{13}C (75 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ (ppm) (**Figura A64**, Anexo I): 158,9; 156,0; 147,6; 146,8; 141,8; 139,4; 128,3; 127,5; 127,0; 126,0; 125,8; 121,1; 115,5; 112,7; 55,6; 53,2; 23,7 e 22,0.



(*E*)-*N*-(4-clorobenzilideno)-1-(4-hidróxi-3-metóxi-benzil)-1*H*-1,2,3-triazol-4-carboidrazida (**PQM-236**)

Rendimento global: 22%. **Aspecto:** Sólido branco. **PF:** 268 °C.

Pureza: 99,9 %

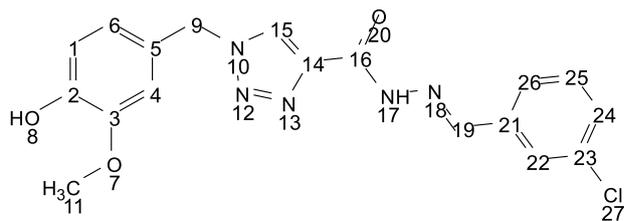
Fórmula molecular: $\text{C}_{18}\text{H}_{16}\text{ClN}_5\text{O}_3$ **Massa Molecular** 385,0942 g/mol.

HRMS (ESI) m/z : (**Figura A69**, Anexo I) calculado $[\text{M}]^+$: 386,1020 g/mol; encontrado $[\text{M}]^+$: 368,1000 g/mol

IV (ν máx, cm^{-1} , **ATR**) (**Figura A66**, Anexo I): 3427, 3263, 3066, 1662, 1607, 1553, 1461, 1240 e 1029.

RMN de ^1H (300 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ (ppm) (**Figura A67**, Anexo I): 12,16 (s, 1H, N-NH); 9,17 (s, 1H, OH); 8,78 (s, 1H, N-CH=C); 8,52 (s, 1H, N=CH); 7,72 (d, $J = 8,32$ Hz, 2H, Ar-H-20, 22); 7,52 (d, $J = 8,32$ Hz, 2H, Ar-H-19, 23); 7,06 (s, 1H, Ar-H-1); 6,91-6,69 (m, 2H, Ar-H-4, 6); 5,54 (s, 2H, Ar-CH₂-N); e 3,77 (s, 3H, O-CH₃).

RMN de ^{13}C (75 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ (ppm) (**Figura A68**, Anexo I): 156,1; 147,6; 146,8; 146,7; 141,7; 134,4; 133,2; 128,9; 128,6; 127,2; 126,0; 121,1; 115,5; 112,6; 55,5 e 53,2.



(*E*)-*N*-(3-clorobenzilideno)-1-(4-hidroxi-3-metóxi-benzil)-1*H*-1,2,3-triazol-4-carboidrazida (**PQM-237**)

Rendimento global: 21%. **Aspecto:** Sólido branco. **PF:** 234 °C.

Pureza: 99,9 %

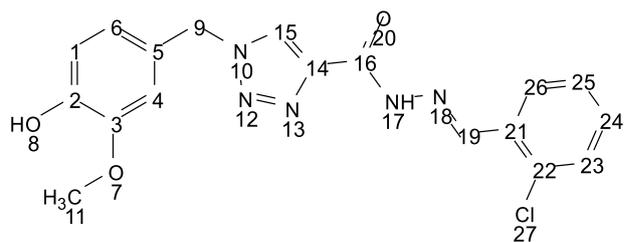
Fórmula molecular: C₁₈H₁₆ClN₅O₃ **Massa Molecular** 385,0942 g/mol.

HRMS (ESI) *m/z*: (Figura A73, Anexo I) calculado [M]⁺: 386,1020 g/mol; encontrado [M]⁺: 386,0998 g/mol.

IV (*v* máx, cm⁻¹, **ATR**) (Figura A70, Anexo I): 3317, 3212, 3055, 1682, 1596, 1568, 1462, 1341, 1240 e 1034.

RMN de ¹H (300 MHz, DMSO- *d*₆) δ (ppm) (Figura A71, Anexo I): 12,21 (s, 1H, N-NH); 9,16 (s, 1H, OH); 8,79(s, 1H, N-CH=C); 8,52 (s, 1H, N=CH); 7,75 (s,1H, Ar-H₂₂); 7,64 (*d*, *J* = 3,67 Hz, 1H, Ar-H₂₆); 7,49 (*d*, *J* = 4,54 Hz, 2H, Ar-H_{24,25}); 7,06 (s, 1H, Ar-H₁); 6,81 (*q*, *J* = 8,24 Hz, 2H, Ar-H_{4,6}); 5,55 (s, 2H, Ar-CH₂-N); e 3,77 (s, 3H, O-CH₃).

RMN de ¹³C (75 MHz, DMSO- *d*₆) δ (ppm) (Figura A72, Anexo I): 156,2; 147,6; 146,7; 146,4; 141,6; 133,6; 130,7; 129,6; 127,3; 126,1; 126,0; 125,8; 121,1; 115,5; 112,6; 55,6 e 53,2.



(*E*)-*N*-(2-clorobenzilideno)-1-(4-hidroxi-3-metóxi-benzil)-1*H*-1,2,3-triazol-4-carboidrazida (**PQM-238**)

Rendimento global: 22%. **Aspecto:** Sólido branco. **PF:** 229 °C.

Pureza: 99,2 %

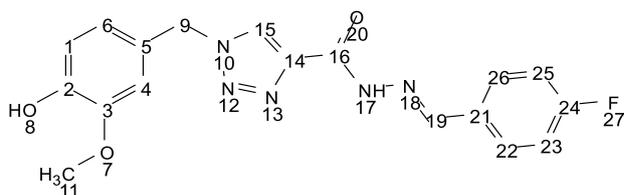
Fórmula molecular: C₁₈H₁₆ClN₅O₃ **Massa Molecular** 385,0942 g/mol.

HRMS (ESI) *m/z*: (Figura A77, Anexo I) calculado [M]⁺: 386,1020 g/mol; encontrado [M]⁺: 386,1003 g/mol.

IV (ν máx, cm^{-1} , **ATR**) (**Figura A74**, Anexo I): 3402, 3249, 1654, 1606, 1517, 1434, 1368, 1244 e 1047.

RMN de ^1H (300 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ (ppm) (**Figura A75**, Anexo I): 12,37 (s, 1H, N-NH); 9,16 (s, 1H, OH); 9,96 (s, 1H, N-CH=C); 8,78 (s, 1H, N=CH); 8,04-7,97 (m, 1H, Ar-H-23); 7,55-7,50 (m, 1H, Ar-H-26) 7,49-7,41 (m, 2H, Ar-H-24, 25); 7,06 (s, 1H, Ar-H-1); 6,89-6,72 (m, 2H, Ar-H-4, 6); 5,55 (s, 2H, Ar-CH₂-N); e 3,77 (s, 3H, O-CH₃).

RMN de ^{13}C (75 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ (ppm) (**Figura A76**, Anexo I): 156,2; 147,6; 146,7; 144,2; 141,6; 131,4; 129,8; 127,5; 127,2; 126,8; 126,0; 121,1; 115,5; 112,6; 55,6 e 53,2.



(*E*)-*N*-(4-fluorobenzilideno)-1-(4-hidróxi-3-metóxi-benzil)-1*H*-1,2,3-triazol-4-carboidrazida (**PQM-239**)

Rendimento global: 20%. **Aspecto:** Sólido branco. **PF:** 257 °C.

Pureza: 99,9 %

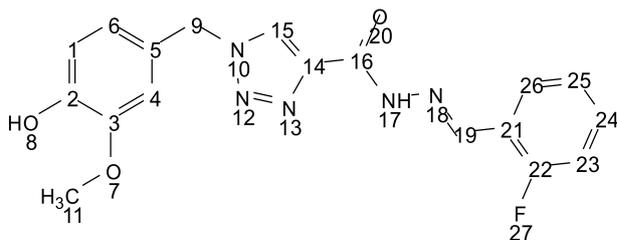
Fórmula molecular: C₁₈H₁₆FN₅O₃ **Massa Molecular** 369,1237 g/mol.

HRMS (ESI) *m/z*: (**Figura A81**, Anexo I) calculado [M]⁺: 392,1134 g/mol; encontrado [M]⁺: 392,1124 g/mol.

IV (ν máx, cm^{-1} , **ATR**) (**Figura A78**, Anexo I): 3423, 3263, 3069, 1663, 1603, 1440, 1373, 1240 e 1030.

RMN de ^1H (300 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ (ppm) (**Figura A79**, Anexo I): 12,09 (s, 1H, N-NH); 9,17 (s, 1H, OH) 8,77 (s, 1H, N-CH=C); 8,53 (s, 1H, N=CH); 7,76 (dd, $J = 5,97$ e 7,98 Hz, 2H, Ar-H-23, 25); 7,30 (t, $J = 8,66$ Hz, 2H, Ar-H-22, 26); 7,06 (s, 1H, Ar-H-1); 6,89-6,71 (m, 2H, Ar-H-4, 6); 5,54 (s, 2H, Ar-CH₂-N); e 3,77 (s, 3H, O-CH₃).

RMN de ^{13}C (75 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ (ppm) (**Figura A80**, Anexo I): 163,0 (*d*, $J = 248,08$ Hz); 156,1; 147,6; 147,0; 146,7; 141,8; 130,8 (*d*, $J = 1,98$ Hz); 129,2 (*d*, $J = 8,61$ Hz); 127,1; 126,0; 121,1; 116,0; 115,6 (*d*, $J = 14,33$ Hz); 112,6; 55,5 e 53,2.



(*E*)-*N'*-(3-fluorobenzilideno)-1-(4-hidróxi-3-metóxi-benzil)-1*H*-1,2,3-triazol-4-carboidrazida (**PQM-240**)

Rendimento global: 19%. **Aspecto:** Sólido branco. **PF:** 225 °C.

Pureza: 99,9 %

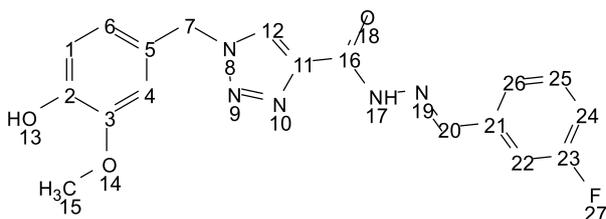
Fórmula molecular: C₁₈H₁₆FN₅O₃ **Massa Molecular** 369,1237 g/mol.

HRMS (ESI) *m/z*: (Figura A85, Anexo I) calculado [M]⁺: 370,1315 g/mol; encontrado [M]⁺: 370,1292 g/mol.

IV (*v* máx, cm⁻¹, **ATR**) (Figura A82, Anexo I): 3373, 3261, 3065, 1651, 1567, 1450, 1370, 1239 e 1034.

RMN de ¹H (300 MHz, DMSO- *d*₆) δ (ppm) (Figura A83, Anexo I): 12,27 (s, 1H, N-NH); 9,16 (s, 1H, OH); 8,79 (s, 2H, N-CH=C e N=CH); 7,94 (t, *J* = 7,46 Hz, 1H, Ar-H₂₃); 7,55-7,43 (m, 1H, Ar-H₂₆); 7,29 (t, *J* = 9,06 Hz, 2H, Ar-H_{24,25}); 7,06 (s, 1H, Ar-H₁); 6,86-6,74 (m, 2H, Ar-H_{4,6}); 5,55 (s, 2H, Ar-CH₂-N); e 3,77 (s, 3H, O-CH₃).

RMN de ¹³C (75 MHz, DMSO- *d*₆) δ (ppm) (Figura A84, Anexo I): 160,7 (*d*, *J* = 249,86 Hz); 156,1; 147,6; 146,7; 141,6; 140,8; 131,9 (*d*, *J* = 8,17 Hz); 127,2; 126,3; 126,0; 124,8 (*J* = 2,43 Hz); 121,8 (*d*, *J* = 9,97 Hz); 121,1; 115,9 (*d*, *J* = 20,82 Hz); 115,5; 112,6; 55,5 e 53,2.



(*E*)-*N'*-(2-fluorobenzilideno)-1-(4-hidróxi-3-metóxi-benzil)-1*H*-1,2,3-triazol-4-carboidrazida (**PQM-241**)

Rendimento global: 17%. **Aspecto:** Sólido branco. **PF:** 251 °C.

Pureza: 99,7 %

Fórmula molecular: C₁₈H₁₆FN₅O₃ **Massa Molecular** 369,1237 g/mol.

HRMS (ESI) *m/z*: (Figura A89, Anexo I) calculado [M]⁺: 392,1134 g/mol; encontrado [M]⁺: 392,1113 g/mol.

IV (ν máx, cm^{-1} , **ATR**) (**Figura A86**, Anexo I): 3320, 3149, 3066, 2836, 1682, 1598, 1463, 1357, 1253 e 1032.

RMN de ^1H (300 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ (ppm) (**Figura A87**, Anexo I): 12,19 (s, 1H, N-NH); 9,16 (s, 1H, OH); 8,78 (s, 1H, N-CH=C); 8,54 (s, 1H, N=CH); 7,55-7,46 (m, 3H, Ar-H-22, 24, 26); 7,31-7,24 (m, 1H, Ar-H-25); 7,06 (s 1H, Ar-H-1); 6,86-6,75 (m, 2H, Ar-H-4, 6); 5,55 (s, 2H, Ar-CH₂-N); e 3,77 (s, 3H, O-CH₃).

RMN de ^{13}C (75 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ (ppm) (**Figura A88**, Anexo I): 162,3 (d, $J = 244,08$ Hz); 156,2; 147,6; 146,7; 141,7; 136,8 (d, $J = 7,61$ Hz); 130,8 (d, $J = 7,62$ Hz); 127,2; 126,0; 123,5; 121,1; 116,8 (d, $J = 21,29$ Hz); 115,5; 113,0; 112,7; 55,6 e 53,2.

4.2 ATIVIDADE FARMACOLÓGICA

A seguir serão descritas as metodologias para realização dos experimentos biológicos e químicos com as moléculas obtidas neste trabalho.

4.2.1 Avaliação da atividade inibitória de AChE

Para avaliação *in vitro* da inibição de EeAChE (E.C.3.1.1.7, tipo V-S, purificada de *Electrophorus electricus*) e eqBuChE (E.C. 3.1.1.8, purificada de soro equino), o ensaio cinético foi realizado de acordo com o método de Ellman (ELLMAN, 1961) modificado, utilizando placas de 96 poços conforme descrito previamente (CASTRO, 2008; LEMES, 2016). Em cada poço da microplaca foram adicionados 20 μL da enzima (0,5 U/mL) e 5 μL de ácido 5,5'-ditiobis-(2-nitrobenzóico) (10 μM) em tampão fosfato de sódio (0,1 M, pH 7.4), 100 μL das soluções dos compostos avaliados (duas vezes mais concentrado), juntamente com 55 μL de tampão fosfato (0,1M, pH 7,4) atingindo o volume de 180 μL . Após 10 minutos, 20 μL do substrato apropriado (iodeto de acetilcolina ou butirilcolina, concentração final de 0,5 M) foram adicionados e a absorbância foi lida em um espectrofotômetro SpectraMax 250 (*Molecular Devices*) a 412 nm durante 5 minutos com intervalos de 12 s. Curvas de progressão foram adquiridas através do *software* softmax PRO 5.0 (*Molecular Devices*) a partir da qual a velocidade máxima de hidrólise foi calculada e a análise realizada com o *software* prisma (Graphpad). Os dados da competição dos substratos de duas experiências foram reunidos e analisados por ajuste global de modelos de inibição alternados, selecionados por critérios de probabilidade (CASTRO, 2008). Todos os reagentes

foram adquiridos da marca Sigma-Aldrich (Brazil). Os compostos avaliados foram solubilizados em DMSO (0,05 M) e diluídos em tampão fosfato para as concentrações descritas imediatamente antes do ensaio. O solvente não teve nenhum efeito detectável na concentração mais alta utilizada (0,2% v/v).

4.2.2 Avaliação *in vitro* das atividades antioxidante, quelante de metais e neuroprotetora

4.2.2.1 Determinação da atividade sequestrante de DPPH

A habilidade dos compostos da série de híbridos sintetizados em sequestrar os radicais livres DPPH foi avaliada de acordo com método descrito por Gontijo 2012 com modificações (GONTIJO, 2012). Os compostos foram avaliados nas concentrações de 100, 50, 25 e 12.5µM. Uma alíquota de 4 mL da amostra foi adicionada à 1 mL da solução de DPPH (0.5 mM em etanol). A solução foi homogeneizada em vortex e após 30 minutos a absorbância foi medida a 517 nm. Cada solução foi analisada em triplicata e as médias dos valores foi plotada para obtenção do CE₅₀. Trolox e ácido ascórbico foram utilizados como padrões. A capacidade sequestrante de radicais foi representada como porcentagem de inibição de acordo com a equação: % capacidade sequestrante = [(absorbância do controle – absorbância da amostra)/absorbância do do controle] × 100.

4.2.2.2 Avaliação da capacidade quelante de biometais Cu⁺², Fe⁺², Fe⁺³ e Zn⁺²

A investigação da capacidade dos compostos de quelar biometais foi realizada utilizando o espectrofotômetro UV-vis (Shimadzu) seguindo a metodologia descrita por Chen e colaboradores (CHEN, 2011) Foram preparadas soluções de 20 µM dos compostos em metanol e soluções de 20 µM dos compostos em presença de 20 µM de CuSO₄, FeSO₄, FeCl₃ e ZnCl₂. Os espectros foram obtidos em temperatura ambiente em cubeta de quartzo.

4.2.2.3 Culturas celulares

Células de neuroblastoma humano (SH-SY5Y) foram cultivadas em meio mínimo essencial de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) suplementadas com 10% de soro fetal bovino, 2 mmol/L-glutamina, 50 U/mL penicilina e 50 µg/mL estreptomicina. Foram incubadas a 37°C com 5% CO₂.

4.2.2.4 Determinação da neurotoxicidade induzida pelos compostos (MTT)

A viabilidade celular foi avaliada em termos de atividade mitocondrial pelo ensaio de MTT (brometo de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-2H-tetrazólio), como descrito previamente por Tarozzi (2007) (TAROZZI, 2007). As células foram semeadas em placas de 96 poços 2 x 10⁴ células/poço, incubadas por 24h e posteriormente tratadas com os compostos testes nas concentrações adequadas (80-2,5 µM) e encubadas novamente por 24 h a 37 °C em 5% CO₂. Em seguida, o sobrenadante foi retirado e foi adicionado à solução de MTT (5 mg/mL) em solução salina balanceada de Hank (HBSS) por 2 h a 37 °C em 5% CO₂. Após lavagem com HBSS, os cristais de formazano foram dissolvidos em 150 µL de isopropanol. A quantidade de formazano foi medida (570 nm, referência filtro 690 nm) utilizando um leitor de microplacas (VICTOR™ X3, Perkin Elmer, Waltham, MA, USA). A neurotoxicidade foi expressa como a concentração do composto capaz de inibir 50% da viabilidade celular.

4.2.2.5 Determinação da inibição de formação intracelular de ERO induzidas por *t*-BOOH

A formação de ERO foi determinada utilizando uma sonda fluorescente diacetato de 2'-7'-dicloro-diidrofluorescina (DCFH-DA), como reportada previamente por Tarozzi, 2007, como modificações (TAROZZI, 2007). Primeiramente as células SH-SY5Y foram semeadas em placas de 96 poços com 3 x 10⁴ cel/poço, no caso do co-tratamento ou 2 x 10⁴ cel/poço, no caso do pré-tratamento e incubadas por 24 h a 37 °C em 5% CO₂. Em seguida o meio de cultura foi removido e 100 µL de DCFH-DA (10 µg/mL) foi adicionado em cada poço e mantido a temperatura ambiente por 30 minutos. Após este período de incubação a solução de DCFH-DA é descartada e é

adicionado 100 μL dos compostos testes nas concentrações adequadas (10-0,625 μM) e 100 μL de *t*-BOOH em diferentes concentrações (50, 100 e 200 μM) em cada poço. A formação de ERO foi determinada (excitação a 485 nm e emissão a 535 nm) utilizando um leitor de microplacas nos tempos de 15, 30 e 45 minutos. Em paralelo o teste foi repetido, mas com o tratamento das células com os compostos testes 24h antes da adição do *t*-BOOH e leitura nos tempos 15, 30 e 45 minutos, as concentrações utilizadas foram as mesmas do co-tratamento.

4.2.2.6 Determinação da inibição de formação intracelular de ERO induzidas por H_2O_2 e metais

Primeiramente as células SH-SY5Y foram semeadas em placas de 96 poços com 3×10^4 cel/poço e incubadas por 24 h a 37 °C em 5% CO_2 . Após o período de incubação, o meio de cultura foi removido e 100 μL de DCFH-DA (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$) foi adicionado em cada poço. Após 30 minutos de incubação a temperatura ambiente a solução de DCFH-DA foi descartada em seguida 50 μL , das várias concentrações dos compostos (10-0,625 μM), 100 μL H_2O_2 (100 μM ou 200 μM) e 50 μL de $\text{FeSO}_4/\text{H}_2\text{O}$ (50 μM) foram adicionados a cada poço. A formação de ERO foi determinada (excitação a 485 nm e emissão a 535 nm) utilizando um leitor de microplacas nos tempos 15, 30 e 45 minutos.

4.2.2.7 Determinação dos níveis intracelular de glutathiona (GSH)

As concentrações celulares de GSH foram determinadas pelo ensaio fluorimétrico com monoclorobimano (MCB) em placas de 96 poços (SEBASTIÀ, 2003). Inicialmente as células foram semeadas nas placas de 96 poços com 2×10^4 cel/poços, incubadas por 24 horas, posteriormente foram feitos os tratamentos com diferentes concentrações (10-0,625 μM) dos compostos estudados e a placa foi incubada por mais 24h a 37 °C em 5% CO_2 . O sobrenadante foi descartado e foi adicionado MCB (50 μM) em HBSS por 30 min a 37 °C em 5% CO_2 . A quantidade de GSH foi medida (excitação a 360 nm e emissão a 465 nm) utilizando um leitor de microplaca. Os valores são expressos como uma porcentagem das células de controle.

4.2.2.8 Avaliação da atividade inibitória de MAO

Os ensaios de inibição da monoamina oxidase (MAO) humana foram realizados utilizando método baseado em fluorescência, usando kynuramine como substrato não seletivo MAO A e MAO B (PISANI, 2016). Foram utilizadas MAO A e MAO B recombinantes humanas (microsomas a partir de células de inseto infectadas com baculovírus; Sigma-Aldrich). As reações foram realizadas em triplicatas em placas de 96 poços de fundo redondo pretas (Greiner). As amostras foram pré-incubadas 20 min a 37 ° C antes de adicionar soluções de MAO, em seguida, incubadas por mais 30 min. A fluoresceína foi registrada em comprimentos de onda de excitação/emissão de 320/400 nm num leitor de fluoresceína de microplacas de 96 poços (Tecan Infinite M100 Pro). As atividades inibitórias foram determinadas por meio de regressões não lineares realizadas com o software GraphPad Prism 5.0 e são expressas como porcentagem de inibição a 10 µM. Os resultados são a média de três experimentos independentes.

4.2.2.9 Determinação da atividade indutora de Nrf2

Obtenção dos pellets nuclear e citoplasmático: O experimento foi realizado em cultura de células SH-SY5Y, a separação do conteúdo citoplasmático do nuclear foi realizado utilizando Kit de extração nuclear da empresa *Active Motif* e a concentração de Nrf2 foi determinada utilizando kit TrsndSM[®] Nrf2 também da empresa *Active Motif*. Inicialmente as células foram semeadas em placa de petri de 100 mm com 7,5x10⁶ células por placa e incubadas por 24h a 37 °C em 5% CO₂. Após período de incubação foi realizado o tratamento das células com a substância teste a 10 µM em diferentes tempos (3 h, 6 h, 12 h e 24 h). Após o tempo de tratamento o meio de cultura foi retirado e as células foram coletadas com auxílio de raspador celular e transferidas para um tubo falcom e levado para centrifugação a 4 °C, 500 rpm por 5 minutos, ao término da centrifugação o sobrenadante foi descartado e passou-se a trabalhar com o pellet formado. Em seguida o pellet formado foi suspenso em 500 µL de uma solução de tampão fosfato-salino (PBS) e inibidor de fosfatase e transferido para um ependorff de 2 mL, em seguida foram adicionados 25 µL de detergente (presente no kit) e homogeneizou-se com auxílio de vortex, por fim o ependorff foi centrifugado por 30 segundos a 14.000 rpm a 4 °C, o sobrenadante, contendo a fração citoplasmática das

células, foi transferido para outro ependorff rotulado e armazenado a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$, o precipitado segue para próxima etapa. O pellet formado anteriormente foi suspenso em $50\text{ }\mu\text{L}$ de solução de lise completa (presente no kit) e homogeneizado com auxílio de vortex, em seguida o ependorff foi deixado em gelo por 30 minutos sob agitação, em seguida, foi novamente levado ao vortex por 30 segundos e centrifugado a 14.000 rpm a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 10 minutos, o sobrenadante, contendo a fração nuclear das células, foi transferido para ependorff rotulado e armazenado a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Teste de Bradford: Inicialmente foi preparada uma curva padrão utilizando albumina de soro bovino (BSA) como proteína a ser detectada, foi preparada uma curva utilizando um branco e os volumes de $0\text{ }\mu\text{L}$, $2\text{ }\mu\text{L}$, $5\text{ }\mu\text{L}$, $10\text{ }\mu\text{L}$ e $20\text{ }\mu\text{L}$ de BSA em um total de $800\text{ }\mu\text{L}$ de solução em H_2O bidestilada. Em seguida preparou-se soluções contendo $2\text{ }\mu\text{L}$ de amostra e $798\text{ }\mu\text{L}$ de H_2O bidestilada, por fim foi adicionado $200\text{ }\mu\text{L}$ da sonda *Bio-Rad protein dye*, e foi realizada a leitura de absorbância a 595 nm . Utilizando os dados da curva de calibração determinou-se a concentração de proteína em cada amostra em $\mu\text{g}/\mu\text{L}$.

Teste de Elisa para determinação da ativação de Nrf2: Inicialmente preparou-se as amostras em uma concentração de $0,5\text{ }\mu\text{g}/\mu\text{L}$, para os cálculos desta etapa foram utilizados os resultados do teste de Bradford. Foi utilizada placa de ELISA de 96 poços na qual estava imobilizada a sequência de oligonucleotídeos que possuem a área específica que se liga a forma ativa do Nrf2 presente no extrato nuclear avaliado ($5'$ -GTACAGTGA CT CAGCAGAATCTG- $3'$). Inicialmente $10\text{ }\mu\text{L}$ de amostra foram adicionados a cada poço da placa de ELISA, a placa foi incubada por uma hora a temperatura ambiente e sob agitação. Ao término desta etapa o solvente foi descartado e a placa foi lavada três vezes com solução específica para este fim (wash buffer). Em uma segunda etapa foi adicionado $100\text{ }\mu\text{L}$ da solução de anticorpos primários (anti-Nrf2), a placa foi mantida em repouso por uma hora a temperatura ambiente, em seguida a placa foi lavada mais três vezes com solução de lavagem. A terceira etapa consistiu na adição de $100\text{ }\mu\text{L}$ de uma solução contendo o anticorpo secundário complexado com enzima horseradish peroxidase (HRP), após adição do segundo anticorpo a placa foi mantida em repouso a temperatura ambiente por uma hora, após o tempo de incubação foi realizada três lavagens com solução apropriada.

A quarta e última etapa consistiu na adição de uma solução colorimétrica presente no kit utilizado *Development Solution*, após incubação de 15 minutos foi adicionada a segunda solução, *Stop Solution* e foi realizada a leitura da placa a 450 nm.

4.2.2.10 Neuroproteção frente a proteína β -amiloide ou 6-OHDA

6-OHDA. Primeiramente as células SH-SY5Y foram semeadas em placas de 96 poços com 3×10^4 cel/poço e incubadas por 24 h a 37 °C em 5% CO₂. No caso da avaliação de co-tratamento, em seguida o meio de cultura foi descartado e adicionou-se 50 μ L das soluções dos compostos testes (10-0,625 μ M) e 50 μ L de 6-OHDA (100 μ M) em cada poço, a placa foi então incubada por 2h a 37 °C em 5% CO₂. Terminado o período de tratamento o conteúdo da placa foi descartado e adicionou-se 100 μ L de meio completo (DMEM + 10% FBS) a cada poço e a placa foi novamente incubada por 22h a 37 °C em 5% CO₂. No caso da avaliação de pré-tratamento, em seguida o meio de cultura foi descartado e adicionou-se 100 μ L de uma solução dos compostos testes (10-0,625 μ M) em cada poço e a placa foi incubada por mais 24 h a 37 °C em 5% CO₂, em seguida o meio foi novamente descartado e adicionado 100 μ L de uma solução de 6-OHDA (100 μ M) em cada poço, a placa foi então incubada por 2h a 37 °C em 5% CO₂. Terminado o período de tratamento o conteúdo da placa foi descartado e adicionou-se 100 μ L de meio completo (DMEM + 10% FBS) a cada poço e a placa foi novamente incubada por 22h a 37 °C em 5% CO₂. Em ambos procedimentos, por fim foi realizado um teste de MTT, como descrito anteriormente.

Oligômeros β -amiloide. Primeiramente as células SH-SY5Y foram semeadas em placas de 96 poços com 3×10^4 cel/poço e incubadas por 24 h a 37 °C em 5% CO₂. Em seguida o meio de cultura é descartado e adicionou-se 50 μ L das soluções dos compostos testes (10-0,625 μ M) e 50 μ L de uma solução de proteína β -amiloide em HBSS (10 μ M) em cada poço, a placa foi então incubada por 4h a 37 °C em 5% CO₂. Terminado o período de tratamento o conteúdo da placa foi descartado e adicionou-se 100 μ L de MTT a cada poço e a placa foi novamente incubada por 1h a 37 °C em 5% CO₂, em seguida foi adicionado 10 μ L de uma solução de Tween-20 em H₂O (10 %) em cada poço e a placa foi colocada em agitação a 37 °C por 10 minutos. Por fim os 110 μ L contidos em cada poço da placa foram transferidos para uma nova placa, a quantidade de formazano foi medida (570 nm, referência filtro 690 nm) utilizando um

leitor de microplacas (VICTOR™ X3, Perkin Elmer, Waltham, MA, USA). Os resultados foram expressos como % de neuroproteção comparados ao controle negativo (células não tratadas com composto teste).

4.2.3 Modelagem molecular para Nrf2

Análise de ancoragem covalente. Estudos de ancoragem molecular foram realizados utilizando a estrutura de raios-X do domínio BTB de Keap1 em complexo com o ligante covalente ligado ao CDDO (código PDB 4CXT) (CLEASBY, 2014). Após remoção do ligante de raios-X da proteína, o composto **PQM161** foi submetido ao protocolo de acoplamento covalente implementado no software Gold (VERDONK, 2003). Os cálculos foram realizados considerando a adição de Michael do grupo tiol da cisteína C151 ao carbono eletrofílico insaturado do ligante, β ao grupo carbonila, como a reação que leva à formação da ligação covalente. Os cálculos de acoplamento produziram 100 orientações diferentes de ligação que foram agrupadas usando um corte de 2.0 Å de RMSD, o conjunto de poses preenchidas com pelo menos 10 conformações foram levadas em conta. Como resultado, 5 grupos de poses foram analisados. A pose top-score pertencente a cada cluster foi levada em consideração para análises posteriores.

Simulações de dinâmica molecular. Os 5 complexos ligante-proteína gerados por docking covalente foram estudados através de simulações de dinâmicas moleculares (DM) com AMBER 16. Antes das simulações DM, um dímero do domínio Keap1 BTB foi construído aplicando a matriz de transformação conforme relatado no arquivo PDB da proteína. Estrutura de raios-X (código PDB 4CXT). Cada complexo foi submetido a um protocolo de DM já aplicado em estudos de predição de poses (DAL PIAZ, 2016; DE LEO, 2018). O sistema foi primeiro minimizado através de 5000 passos de descida mais íngreme seguidos por gradiente conjugado até que uma convergência de 0,05 kcal/(mol Å²) fosse alcançada. Os complexos minimizados foram então usados como ponto de partida para três etapas de DM subsequentes, para um total de 30 ns de simulação de DM. Uma simulação de volume constante de 0,5 ns, na qual a temperatura do sistema foi elevada de 0 a 300 K foi inicialmente realizada. No segundo passo, o sistema foi equilibrado através de uma simulação de pressão constante de 3 ns, mantendo a temperatura no valor constante de 300 K com o uso do termostato de

Langevin. Tanto na minimização como nos dois primeiros passos de DM, foi aplicado um potencial harmônico de 10 kcal/(mol · Å²) aos carbonos da proteína. No passo final da DM, 26,5 ns de simulação de pressão constante foram realizados sem qualquer restrição de posição, deixando assim todo o sistema livre. Todas as simulações foram realizadas usando eletrostática de malha de partículas de Ewald com um corte de 10 Å para interações não ligadas e condições de contorno periódicas. Uma etapa de simulação de 2,0 fs foi empregada, pois todas as ligações envolvendo átomos de hidrogênio foram mantidas rígidas usando o algoritmo SHAKE, e os parâmetros GAFF foram usados para o ligante, cujas cargas parciais foram calculadas com o método AM1-BCC conforme implementado no conjunto Antechamber de AMBER 16. As avaliações da energia de interação linear (EIL) foram realizadas entre o ligando covalentemente ligado e os resíduos de proteína localizados dentro de um raio de 12 Å. O módulo ccpraj de AMBER 16 foi empregado para os cálculos usando as trajetórias extraídas dos últimos 10 ns da simulação de DM, para um total de 100 instantâneos (com um intervalo de tempo de 100 ps).

4.2.4 Modelagem molecular para AChE

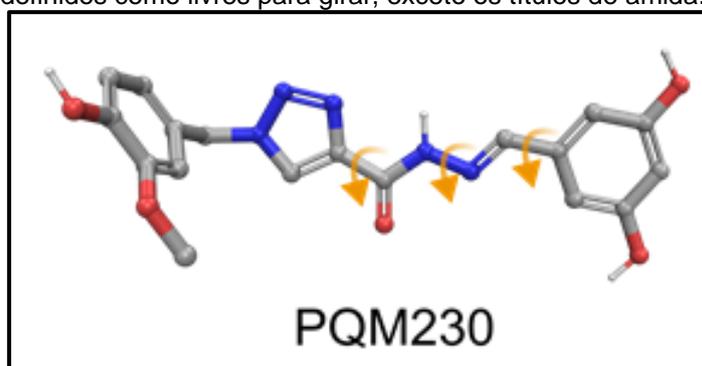
Nós avaliamos os possíveis modos de ligação dos compostos no sítio de ligação AChE através de estudos de ancoragem molecular. Devido às significativas mudanças conformacionais observadas no sítio aniônico periférico (JOHNSON, 2006), selecionamos três conformações representativas da AChE seguindo uma estratégia de acoplamento adotada em um estudo anterior (CESCHI, 2016; LOPES, 2017) além da estrutura da AChE humana complexada com donepezil (CHEUNG, 2012) (código PDB 4EY7). A estratégia de acoplamento consiste na ancoragem dos compostos em cada conformação do receptor, com o objetivo de considerar a flexibilidade da proteína (CRAIG, 2010; GUEDES, 2014, 2018). As estruturas selecionadas foram 1ZGC (HAVIV, 2005) (*Torpedo californica*), 2CKM (RYDBERG, 2006) (*Torpedo californica*), 1Q84 (BOURNE, 2004) (*Mus musculus*) e 4EY7 (CHEUNG, 2012) (*Homo sapiens*).

As estruturas dos receptores foram preparadas com a ferramenta Assistente de Preparação de Proteína da Schrödinger Suite 2018-4 (MADHAVI SASTRY, 2013) e os estados de protonação dos resíduos de aminoácidos foram preditos usando PROPKA com $pH = 7$. Finalmente, uma otimização da rede de ligação de hidrogênio

dos complexos proteína-ligantes foi realizada para ajustar a orientação dos átomos de hidrogênio, seguido por uma minimização de energia dos átomos de hidrogênio.

Os compostos foram concebidos e preparados com LigPrep do Maestro para estabelecer os isômeros, estados de protonação e tautômeros com Epik (GREENWOOD, 2010; SHELLEY, 2007) no $pH = 7,0 \pm 0,4$. Aplicamos restrições de rotação a algumas ligações para manter a planaridade observada para os compostos durante os experimentos de ancoragem (FIGURA 68). A ligação rotativa do grupo amida foi mantida fixa à conformação *trans* em todos os compostos.

Figura 68 - Compostos com ligações rotativas fixadas durante os experimentos de ancoragem (setas laranja). Diedros não destacados neste quadro foram definidos como livres para girar, exceto os títulos de amida.



Fonte: do autor.

Os experimentos de acoplamento foram realizados com o programa de acoplamento molecular Glide (FRIESNER, 2004, 2006) da Maestro no modo de precisão XP, indicado para ligantes altamente flexíveis e para reduzir falsos positivos. Todas as estruturas foram alinhadas à conformação 1ZGC usando a ferramenta da Pymol. As redes receptoras foram centradas no ligando nativo presente no complexo 1Q84 (X: 98,06; Y: 53,14 e Z: 22,06). Também foram reduzidos os ligantes cocrystalizados na sua respectiva conformação de AChE e às estruturas não nativas (isto é, *cross-docking*) para validar o protocolo de acoplamento. Selecionamos a posição do ligante de acordo com a pontuação mais baixa do XP entre todas as quatro conformações de AChE.

Validação do Docking do Ensemble

Nós ancoramos os quatro ligantes de referência em todas as conformações de AChE selecionadas para validar a estratégia de acoplamento de conjuntos. É possível

notar que essa estratégia nos permitiu selecionar a pose de ligação correta ($\text{RMSD} \leq 2,0 \text{ \AA}$) de todos os ligantes com o menor *docking score* (TABELA 11). Curiosamente, apesar de o donepezil ser o menor composto de referência, o modo de ligação experimental foi encontrado apenas contra a conformação nativa de AChE (isto é, 4EY7). Isso pode ser devido ao perfil químico distinto dos outros ligantes baseados na tacrina que induz a enzima a adotar uma conformação diferente. Assim, os resultados do encaixe reforçam a importância em considerar múltiplas estruturas representativas da AChE para considerar a flexibilidade do receptor, aumentando a chance de encontrar o modo de ligação experimentalmente observado.

Tabela 11 - Resultados do acoplamento do conjunto para os ligantes de referência contra as quatro conformações de AChE. As posições selecionadas de acordo com a estratégia de acoplamento de conjuntos (ou seja, a conformação da AChE que fornece a menor pontuação do XP) são destacadas em negrito, alcançando 100% de taxa de sucesso ao considerar $\text{RMSD} \leq 2,0 \text{ \AA}$.

Ligantes de Referência	1ZGC		1Q84		2CKM		4EY7	
	Score	RMSD	Score	RMSD	Score	RMSD	Score	RMSD
1ZGC	-18,873	1,411	-18,553	1,515	-18,989	1,618	-17,273	12,382
1Q84	-18,246	1,439	-19,085	0,833	-12,208	4,773	-11,546	6,852
2CKM	-17,954	4,255	-16,969	3,608	-20,525	1,234	-13,255	5,905
4EY7	-11,136	2,436	-10,064	3,250	-12,575	4,235	-17,941	0,594
Taxa de sucesso	50%		50%		50%		25%	

Fonte: do autor.

4.2.5 Quantificação de RNA *via Real-time PCR*.

As células SH-SY5Y foram semeadas em placas de 100 mm a 2×10^6 células/placa, incubadas durante 24 h e em seguida foram tratadas com os compostos **PQM-161** e **PQM-164** ($10 \mu\text{M}$) e incubadas novamente por 24 h, as incubações ocorreram a $37 \text{ }^\circ\text{C}$ e 5% de CO_2 . No final da incubação, as células foram tripsinizadas e centrifugadas a 6000 rpm durante 5 min a $4 \text{ }^\circ\text{C}$ para obter o pelet. O ARN foi isolado do sedimento utilizando o kit *PureLink® RNA Mini* (Life technologies, Carlsbad, CA, EUA). As amostras foram lisadas e homogeneizadas na presença de isotiocianato de guanidínio, um sal caotrópico capaz de proteger o RNA de RNases endógenas. Após homogeneização, adicionou-se etanol à amostra. A amostra foi então processada através de um cartucho giratório contendo uma membrana à base de sílica, à qual o RNA se liga. O RNA total purificado foi eluído em água isenta de RNase e depois

quantificado com o espectrofotômetro *NanoVue Plus* (GE Healthcare, Chicago, Illinois, EUA) para PCR quantitativa em tempo real (qRT-PCR). A transcrição reversa do RNA foi realizada utilizando o *SuperScript® VILO MasterMix* (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA). A síntese da primeira cadeia de cDNA foi realizada com 1 µg de RNA total. O sistema CFX Connect™ Real Time (Bio-Rad, Hercules, CA, EUA) foi usado para amplificação e quantificação em tempo real. As reações de PCR de cada amostra foram realizadas em triplicata com volume final de 20 µL em uma placa de 96 poços. A mistura de PCR contendo 2 µL de cDNA [10 ng / µL], 10 µL de SYBR™ Select Master Mix (Invitrogen) e primers a uma concentração final de 300 nM foi amplificada com as seguintes condições: desnaturação inicial a 95 °C por 3 min, seguido de 40 ciclos de amplificação a 95 °C durante 3 s e 60 °C durante 30 s. Após a reação de amplificação, a análise da curva de fusão foi realizada a partir de 65 °C e aumentando para 95 °C com 5 aquisições / °C. A expressão relativa normalizada foi calculada de acordo com o método $2^{-\Delta\Delta Cq}$ com TBP e B2M (Life Technologies) como genes de referência e células não tratadas como controle. As sequências de primers usadas neste estudo estão listadas na TABELA 12.

Tabela 12 – Sequência de primer para RT-PCR quantitativo.

Gene	Forward/Reverse	Sequencia de 5' pra 3'
NF-E2 related factor 2 (Nrf2)	For	AGTGGATCTGCCAACTACTC
	Rev	CATCTACAAACGGGAATGTCTG
NAD(P)H dehydrogenase quinone 1 (NQO1)	For	GGGATCCACGGGGACATGA
	Rev	ATTTGAATTCGGGCGTCTGC
B2M	For	CTTCCATTCTCTGCTGGATGACG
	Rev	GCGGGCATTCTGAAGCTGACAGCA
TBP	For	CACATCACAGCTCCCCACCA
	Rev	TGCACAGGAGCCAAGAGTGAA

Fonte: do autor.

4.2.6 Inibição da formação de aglomerados de α -sinucleína

As células TagGFP2- α -sinucleína SH-SY5Y foram semeadas em placa de 96 poços a 2×10^4 células / poço, incubadas durante 24 h e, posteriormente, tratadas com 6-OHDA (100 µM) durante 2 h na presença dos compostos **PQM-161**, **PQM-163** e **PQM-164** (2,5 µM) a 37 °C em 5% de CO₂. No final da incubação, a agregação de α -

sinucleína foi detectada usando um microscópio invertido de fluorescência (Eclipse Ti-E, Nikon Instruments Spa, Florença, Itália). A intensidade da fluorescência é diretamente proporcional à agregação de α -sinucleína. Os dados são expressos como intensidade média de fluorescência.

4.2.7 Avaliação da atividade anti-inflamatória em células THP-1

As células THP-1 foram semeadas em placas de 6 poços, $2,5 \times 10^6$ células por poço, e incubadas com PMA (5ng/mL) por 24h a 37°C e 5% de CO₂. Posteriormente, as células foram incubadas com LPS (1 μ g/mL) na presença dos compostos **PQM-161**, **PQM-164** e **PQM-233** (10 μ M) por 24h a 37°C e 5% de CO₂. Após o período de incubação as células foram centrifugadas a 6000 rpm por 5 min a 4°C para obtenção dos pellets. O RNA foi isolado a partir dos pellets obtidos utilizando *PureLink[®] RNA Mini Kit* (Life technologies, Carlsbad, CA, USA). As amostras foram lizadas na presença de isotiocianato de guanidina, um sal capaz de proteger o RNA das RNases endógenas. Após a homegeização, etanol foi adicionado a amostra e a solução foi processada através do *Spin Cartidge* contendo uma membrana à base de sílica capaz de isolar o RNA. O RMN total purificado foi eluído em água livre de RNases e quantificado através de espectrometria utilizando *NanoVue Plus spectrophotometer* (GE Healthcare, Chicago, Illinois, USA) para quantificação de Real-Time PCR (qRT-PCR). A transcrição reversa do RNA foi realizada utilizando *SuperScript[®] VILO MasterMix* (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). Inicialmente o cDNA foi sintetizado a partir de 1 μ g de RNA total. O sistema *CFX Connect[™] Real Time* (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) foi utilizado para a ampliação e quantificação por real time. As reações de PCR de cada amostra foram realizadas em triplicata, com volume final de 20 μ L em placa de 96 poços. A solução de PCR contém 2 μ L de cDNA (10 ng/L), 10 μ L de *SYBR[™] Select Master Mix* (Invitrogen) e primers na concentração final de 300 nM, a amplificação foi realizada nas seguintes condições: desnaturação inicial a 95°C por 3 min, seguido de 40 ciclos de amplificações a 95 °C por 3 seg e 60 °C por 30 seg. Após as reações de amplificação foi realizada uma curva de Melting iniciando a 65 °C e elevando até 95 °C com 5 leituras/°C. Expressão relativa foi calculada de acordo com método $2^{-\Delta\Delta Cq}$ com β -Actin e GAPDH (*Life technologies*) como padrões e células não tratadas como controle. As sequências dos *primers* usados neste estudo estão na TABELA 13 (pg. 148).

Tabela 13 – Sequências de *primers* utilizados nas reações de RT-PCR

Gene name	Forward/Reverse	5' to 3' Sequence
iNOS	For	TGAACTACGTCCTGTCCCCT
	Rev	CTCTTCTCTTGGGTCTCCGC
IL-1 β	For	TGATGGCTTATTACAGTGGCAATG
	Rev	GTAGTGGTGGTCCGGAGATTGC
TNF- α	For	ATCTTCTCGAACCCCGAGTG
	Rev	GGGTTTGCTACAACATGGGC

Fonte: do autor.

4.2.8 Avaliação de citotoxicidade em células VERO

A avaliação da citotoxicidade das substâncias foi realizada utilizando-se o método de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5- difenil-2H-tetrazólio (MTT) (Sigma-Aldrich, EUA). Células VERO foram cultivadas em meio DMEM (Vitrocell embriolife, Brasil) contendo 5 % de soro fetal bovino (Vitrocell embriolife, Brasil), respectivamente, e antibióticos penicilina e estreptomicina (Vitrocell embriolife, Brasil) em uma concentração de 1×10^4 células por poço em placas de 96 poços (TPP, Suíça). Após 24 horas de incubação a 37 °C e 5 % de CO₂, as células foram tratadas em triplicata com diversas concentrações (500-0,48 $\mu\text{g}/\text{mL}$) das substâncias testes, diluídas de maneira seriada. As células serão incubadas a 37 °C a 5% de CO₂ por 48 horas. Posteriormente, foram adicionados 10 μL de MTT (5 mg/mL) em cada um dos poços, e as células incubadas a 37 °C e 5% de CO₂ durante 4 horas. Em seguida, o meio foi removido e foram adicionados 100 μL de dimetilsufóxido (DMSO) em cada poço para a solubilização dos cristais de formazano. A absorbância de cada poço foi medida no leitor de microplacas Anthos Zenyth 200rt (Biochrom, Reino Unido) a 570 nm. A citotoxicidade das substâncias testes foi obtida através da seguinte fórmula: $[(A-B) / A \times 100]$ onde **A** representa a absorbância do controle de células e **B** a absorbância das células tratadas com as diferentes concentrações das substâncias. A concentração citotóxica em 50% das células foi determinada através de regressão linear.

5 CONCLUSÕES

Neste trabalho obteve-se êxito na síntese e caracterização das duas famílias de compostos propostas inicialmente, originando 23 substâncias, com rendimentos globais de 17 a 78 %. Inicialmente os resultados da predição *in silico* dos parâmetros farmacocinéticos apontou que as moléculas teriam certa dificuldade de permeação nas barreiras biológicas bem como nas etapas farmacocinéticas.

Os resultados de triagem farmacológica evidenciaram que a série de derivados cinâmicos (série 1) não apresentou atividade inibitória de AChE, mas uma significativa propriedade antioxidante. Por outro lado, a série de triazóis (série 2) apresentou capacidade de inibir AChE, porém sem atividade antioxidante significativa. Diante destes dados iniciais, e considerando vários aspectos descritos na literatura e discutidos na introdução deste documento acerca da importância do estresse oxidativo não só para a DA, mas também para outras doenças neurodegenerativas, como a doença de Parkinson (DP), os compostos da série de derivados cinâmicos passaram a ser avaliados quanto a um possível perfil farmacológico frente à DP. Por outro lado, os resultados dos triazóis seguiram com o foco em DA. A série 1, contemplou 10 novas substâncias (**PQM-160 a 164** e **PQM-196 a 200**), com padrão molecular híbrido curcumina-resveratrol, dentre as quais, pode-se destacar **PQM-161** e **PQM-164**, que apresentaram um perfil antioxidante bastante completo, agindo diretamente como estabilizadores de radicais livres induzidos por DPPH (**PQM-161** $CE_{50} = 19,98 \mu\text{M}$ e **PQM-164** $CE_{50} = 0,93 \mu\text{M}$) e indiretamente, modulando a inibição intracelular de formação de EROs induzidos por *t*-BOOH em células neuronais (**PQM-161** $CI_{50} = 0,71 \mu\text{M}$ e **PQM-164** $CI_{50} = 0,51 \mu\text{M}$), tanto em análises de co-tratamento, como em pré-tratamento. Os resultados obtidos sugeriram que a diminuição na produção de EROs seria consequência da indução na produção de GSH, decorrente do tratamento das células neuronais com **PQM-161** e **PQM-164** em diferentes intervalos de tempo. Posteriormente, foi possível confirmar este mecanismo, ficando evidente que o aumento dos níveis de GSH é, de fato, devido à ativação de Nrf2, propriedade identificada para ambos compostos e comprovada por estudos de *docking* molecular e expressão gênica. Ademais, foi identificado o efeito de **PQM-164** sobre o acúmulo de proteína α -sinucleína, que apesar de não inibir o acúmulo, foi capaz de promover o *clearance* das proteínas já acumuladas, reduzindo a concentração de α -sinucleína insolúvel nas células tratadas a praticamente níveis

basais. Por fim, foi evidenciada a atividade anti-inflamatória de **PQM-164**, sendo capaz de diminuir significativamente a expressão gênica de iNOS, IL-1 β e TNF- α .

A série 2, composta por 13 derivados triazólicos de padrão molecular inédito (**PQM-229 a 241**), revelou o composto **PQM-233** com atividade inibitória de AChE significativa (CI₅₀ = 20,22 μ M), além de atividade antioxidante direta (CE₅₀ = 30,44 μ M) para inibição de formação de radicais livres induzidos por DPPH e indireta, inibindo 29,79% da formação de EROs induzida por *t*-BOOH, quando realizado co-tratamento e inibição de 35,16 % da formação de EROs induzida por *t*-BOOH, quando em pré-tratamento por 24 h. O **PQM-233** também demonstrou atividade neuroprotetora significativa contra toxicidade induzida pela proteína β A (31,05 % de neuroproteção a 5 μ M), porém sem efeito anti-inflamatório significativo.

Além disso, cabe destacar que nenhuma das substâncias-líder deste trabalho apresentou atividade tóxica relevante, tendo sido avaliadas quanto à neurotoxicidade e nefrotoxicidade. Apesar das demonstrações de problemas em permeabilidade de membranas, observados nos resultados *in silico*, as moléculas líderes demonstraram habilidade de permear barreiras celulares e ativar Nrf 2.

Diante dos expostos, é possível concluir que tanto **PQM-164**, quanto **PQM-233** representam inovação na busca por novos ligantes bioativos, podendo ser adicionalmente estudados e desenvolvidos como candidatos promissores de protótipos de candidatos a fármacos contra doenças neurodegenerativas, especialmente DA e DP

REFERÊNCIAS

- AGGARWAL, Bharat B.; BHARDWAJ, Anjana; AGGARWAL, Rishi S.; SEERAM, Navindra P.; SHISHODIA, Shishir; TAKADA, Yasunari. Role of resveratrol in prevention and therapy of cancer: preclinical and clinical studies. **Anticancer research**, v. 24, n. 5A, p. 2783–840, 2004.
- AKINYEMI, Ayodele Jacob; OBOH, Ganiyu; FADAKA, Adewale Oluwaseun; OLATUNJI, Babawale Peter; AKOMOLAFE, Seun. Curcumin administration suppress acetylcholinesterase gene expression in cadmium treated rats. **NeuroToxicology**, v. 62, p. 75–79, 2017.
- ALDAWSARI, Fahad S.; AGUIAR, Rafael Pazinato; WIIRZLER, Luiz Alexandre Marques; AGUAYO-ORTIZ, Rodrigo; ALJUHANI, Naif; CUMAN, Roberto Kenji Nakamura; MEDINA-FRANCO, José L.; SIRAKI, Arno G.; VELÁZQUEZ-MARTÍNEZ, Carlos A. Anti-inflammatory and antioxidant properties of a novel resveratrol–salicylate hybrid analog. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 26, n. 5, p. 1411–1415, 2016.
- ALVAREZ-FISCHER, Daniel; HENZE, Carmen; STRENGE, Corinna; WESTRICH, Jan; FERGER, Boris; HÖGLINGER, Günter U.; OERTEL, Wolfgang H.; HARTMANN, Andreas. Characterization of the striatal 6-OHDA model of Parkinson’s disease in wild type and α -synuclein-deleted mice. **Experimental Neurology**, v. 210, n. 1, p. 182–193, 2008.
- AMIN, A. R. M. Ruhul; HAQUE, Abedul; RAHMAN, Mohammad Aminur; CHEN, Zhuo Georgia; KHURI, Fadlo Raja; SHIN, Dong Moon. Curcumin Induces Apoptosis of Upper Aerodigestive Tract Cancer Cells by Targeting Multiple Pathways. **Plos One**, v. 10, n. 4, p. 1–11, 2015.
- ANAND, Preetha; KUNNUMAKKARA, Ajaikumar B.; NEWMAN, Robert A.; AGGARWAL, Bharat B. Bioavailability of Curcumin: Problems and Promises. **Molecular Pharmaceutics**, v. 4, n. 6, p. 807–818, 2007.
- ANDERSEN, Julie K. Oxidative stress in neurodegeneration: Cause or consequence? **Nature Reviews Neuroscience**, v. 10, n. 7, p. S18, 2004.
- ARAÚJO, Rosana S.; PONDÉ, Milena P. Eficácia da memantina na doença de Alzheimer em seus estágios moderado a grave. **Jornal Brasileiro de Psiquiatria**, v. 55, n. 2, p. 148–153, 2006.
- AWASTHI, Manika; UPADHYAY, Arun K.; SINGH, Swati; PANDEY, Veda P.; DWIVEDI, Upendra N. Terpenoids as promising therapeutic molecules against Alzheimer’s disease: amyloid beta- and acetylcholinesterase-directed pharmacokinetic and molecular docking analyses. **Molecular Simulation**, v. 44, n. 1, p. 1–11, 2018.
- BAI, Suping; LI, Shihong; XU, Jinbin; PENG, Xin; SAI, Kiran; CHU, Wenhua; TU, Zhude; ZENG, Chenbo; MACH, Robert H. Synthesis and Structure–Activity

Relationship Studies of Conformationally Flexible Tetrahydroisoquinoliny Triazole Carboxamide and Triazole Substituted Benzamide Analogues as σ 2 Receptor Ligands. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 57, n. 10, p. 4239–4251, 2014.

BAJIC, Vladan; MILOVANOVIC, Emina Sudar; SPREMO-POTPAREVIC, Biljana; ZIVKOVIC, Lada; STANIMIROVIC, Julijana; BOGDANOVIC, Nikola; ISENOVIC, Esma R. Treatment of Alzheimer ' s Disease : Classical Therapeutic Approach. **Current Pharmaceutical Analysis**, v. 12, p. 82–90, 2016.

BARAI, Priyal; RAVAL, Nisith; ACHARYA, Sanjeev; BORISA, Ankit; BHATT, Hardik; ACHARYA, Niyati. Neuroprotective effects of bergenin in Alzheimer's disease: Investigation through molecular docking, in vitro and in vivo studies. **Behavioural Brain Research**, v. 356, n. August 2018, p. 18–40, 2018.

BASTIANETTO, Stéphane; MÉNARD, Caroline; QUIRION, Rémi. Neuroprotective action of resveratrol. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1852, n. 6, p. 1195–1201, 2015.

BAUM, Larry; NG, Alex. Curcumin interaction with copper and iron suggests one possible mechanism of action in Alzheimer's disease animal models. **Journal of Alzheimer's Disease**, v. 6, n. 4, p. 367–377, 2004.

BELGUENDOZ, Leih; FREMONT, Lucie; LINARD, Alain. Resveratrol Inhibits Metal and Independent Peroxidation of Porcine Low-Density Lipoproteins. **Biochemical Pharmacology**, v. 53, p. 1347–1355, 1997.

BELKACEMI, Abdenour; DOGGUI, Sihem; DAO, Lé; RAMASSAMY, Charles. Challenges associated with curcumin therapy in Alzheimer disease. **Expert Reviews in Molecular Medicine**, v. 13, n. November, p. e34, 2011.

BELLINA, Fabio; GUAZZELLI, Nicola; LESSI, Marco; MANZINI, Chiara. Imidazole analogues of resveratrol: synthesis and cancer cell growth evaluation. **Tetrahedron**, v. 71, n. 15, p. 2298–2305, 2015.

BELLOZI, Paula M. Q.; CAMPOS, Aline C.; VIEGAS, Flávia P. D.; SILVA, Matheus De F.; MACHADO, Rafael P.; VAZ, Sarah M.; RIQUEL, Mariana M.; CARNEIRO-JUNIOR, Wellerson de O.; LIMA, Isabel V. de A.; SALIBA, Soraya W.; VAZ, Gabriela Neves; VIEGAS, Claudio; DE OLIVEIRA, Antônio C. P. New multifunctional AChE inhibitor drug prototypes protect against A β -induced memory deficit. **Neurological Sciences**, p. 1–5, 2019.

BØLLING, A. K.; OLDERBØ, B. P.; SAMUELSEN, J. T.; RUKKE, H. V. Establishing a macrophage model with relevance for oral methacrylate monomer exposures: Attenuated Staphylococcus aureus-induced cytokine release from human macrophages. **Dental Materials**, v. 35, n. 10, p. 235–248, 2019.

BOURNE, Yves; KOLB, Hartmuth C.; RADIĆ, Zoran; SHARPLESS, K. Barry; TAYLOR, Palmer; MARCHOT, Pascale. Freeze-frame inhibitor captures acetylcholinesterase in a unique conformation. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 101, n. 6, p. 1449–

1454, 2004.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE, Secretaria de Atenção à Saúde. Protocolo clínico e diretrizes terapêuticas da doença de Parkinson. p. 1–24, 2010.

CAI, Yu Jun; FANG, Jian Guo; MA, Lan Ping; YANG, Li; LIU, Zhong Li. Inhibition of free radical-induced peroxidation of rat liver microsomes by resveratrol and its analogues. **Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease**, v. 1637, n. 1, p. 31–38, 2003.

CAO, Huai; PAN, Xulin; LI, Cong; ZHOU, Chun; DENG, Fengyi; LI, Taohong. Density functional theory calculations for resveratrol. **Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters**, v. 13, n. 11, p. 1869–1871, 2003.

CAO, Zhongcheng; YANG, Jie; XU, Rui; SONG, Qin; ZHANG, Xiaoyu; LIU, Hongyan; QIANG, Xiaoming; LI, Yan; TAN, Zhenghuai; DENG, Yong. Design, synthesis and evaluation of 4'-OH-flurbiprofen-chalcone hybrids as potential multifunctional agents for Alzheimer's disease treatment. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 26, n. 5, p. 1102–1115, 2018.

CARVALHO, Samir a.; FEITOSA, Larisse O.; SOARES, Márcio; COSTA, Thadeu E. M. M. M. M.; HENRIQUES, Maria G.; SALOMÃO, Kelly; DE CASTRO, Solange L.; KAISER, Marcel; BRUN, Reto; WARDELL, James L.; WARDELL, Solange M. S. V. S. V.; TROSSINI, Gustavo H. G. G.; ANDRICOPULO, Adriano D.; DA SILVA, Edson F.; FRAGA, Carlos A. M. M. Design and synthesis of new (E)-cinnamic N-acylhydrazones as potent antitrypanosomal agents. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 54, p. 512–521, 2012.

CASTRO, Newton G.; COSTA, Rodrigo S.; PIMENTEL, Luisa S. B.; DANUELLO, Amanda; ROMEIRO, Nelilma C.; VIEGAS, Cláudio; BARREIRO, Eliezer J.; FRAGA, Carlos A. M.; BOLZANI, Vanderlan S.; ROCHA, Monica S. CNS-selective noncompetitive cholinesterase inhibitors derived from the natural piperidine alkaloid (-)-spectaline. **European Journal of Pharmacology**, v. 580, n. 3, p. 339–349, 2008.

CATTO, Marco; NICOLOTTI, Orazio; LEONETTI, Francesco; CAROTTI, Andrea; FAVIA, Angelo Danilo; SOTO-OTERO, Ramón; MÉNDEZ-ÁLVAREZ, Estefanía; CAROTTI, Angelo. Structural insights into monoamine oxidase inhibitory potency and selectivity of 7-substituted coumarins from ligand- and target-based approaches. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 49, n. 16, p. 4912–4925, 2006.

CAVALLI, Andrea; BOLOGNESI, Maria Laura; MINARINI, Anna; ROSINI, Michela; TUMIATTI, Vincenzo; RECANATINI, Maurizio; MELCHIORRE, Carlo. Multi-target-Directed Ligands To Combat Neurodegenerative Diseases. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 51, n. 3, p. 347–372, 2008.

CESCHI, Marco Antonio; DA COSTA, Jessie Sobieski; LOPES, João Paulo Bizarro; CÂMARA, Viktor Saraiva; CAMPO, Leandra Franciscato; BORGES, Antonio César de Amorim; GONÇALVES, Carlos Alberto Saraiva; DE SOUZA, Daniela Fraga; KONRATH, Eduardo Luis; KARL, Ana Luiza Martins; GUEDES, Isabella Alvim; DARDENNE, Laurent Emmanuel. Novel series of tacrine-tianeptine hybrids:

Synthesis, cholinesterase inhibitory activity, S100B secretion and a molecular modeling approach. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 121, p. 758–772, 2016.

CHAN, Hugh H.; TSE, Man Kit; KUMAR, Saravana; ZHUO, Lang. A novel selective MAO-B inhibitor with neuroprotective and anti-Parkinsonian properties. **European Journal of Pharmacology**, v. 818, n. July 2017, p. 254–262, 2018.

CHEN, Leilei; XIE, Junxia. Dopamine in Parkinson's Disease: Precise Supplementation with Motor Planning. **Neuroscience Bulletin**, v. 34, n. 5, p. 873–874, 2018. a.

CHEN, Shu-Han Shang-Ying; CHEN, Yuan; LI, Yan-Ping; CHEN, Shu-Han Shang-Ying; TAN, Jia-Heng; OU, Tian-Miao; GU, Lian-Quan; HUANG, Zhi-Shu. Design, synthesis, and biological evaluation of curcumin analogues as multifunctional agents for the treatment of Alzheimer's disease. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 19, n. 18, p. 5596–5604, 2011.

CHEN, Yong; LIU, Xin; JIANG, Chenmin; LIU, Liang; ORDOVAS, Jose M.; LAI, Chao Qiang; SHEN, Lirong. Curcumin supplementation increases survival and lifespan in *Drosophila* under heat stress conditions. **BioFactors**, v. 44, n. 6, p. 577–587, 2018. b.

CHEUNG, Jonah; RUDOLPH, Michael J.; BURSHTYEN, Fiana; CASSIDY, Michael S.; GARY, Ebony N.; LOVE, James; FRANKLIN, Matthew C.; HEIGHT, Jude J. Structures of human acetylcholinesterase in complex with pharmacologically important ligands. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 55, n. 22, p. 10282–10286, 2012.

CHUKWU, Jessica E.; PEDERSEN, Jan T.; PEDERSEN, Lars; VOLBRACHT, Christiane; SIGURDSSON, Einar M.; KONG, Xiang Peng. Tau Antibody Structure Reveals a Molecular Switch Defining a Pathological Conformation of the Tau Protein. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, p. 1–11, 2018.

CHURCHES, Quentin I.; CAINE, Joanne; CAVANAGH, Kate; EPA, V. Chandana; TRANBERG, C. Elisabet; MEYER, Adam G.; VARGHESE, Jose N.; DUGGAN, Peter J.; CHURCHES, Quentin I.; CAINE, Joanne; CAVANAGH, Kate; EPA, V. Chandana; WADDINGTON, Lynne; TRANBERG, C. Elisabet; MEYER, Adam G.; VARGHESE, Jose N.; STRELTSOV, Victor; DUGGAN, Peter J. Naturally occurring polyphenolic inhibitors of Amyloid Beta aggregation. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, 2014.

CLEASBY, Anne; YON, Jeff; DAY, Philip J.; RICHARDSON, Caroline; TICKLE, Ian J.; WILLIAMS, Pamela A.; CALLAHAN, James F.; CARR, Robin; CONCHA, Nestor; KERNS, Jeffrey K.; QI, Hongwei; SWEITZER, Thomas; WARD, Paris; DAVIES, Thomas G. Structure of the BTB domain of Keap1 and its interaction with the triterpenoid antagonist CDDO. **PLoS ONE**, v. 9, n. 6, p. 15–21, 2014.

CONG, Lin; DONG, Xiyu; WANG, Yan; DENG, Yulin; LI, Bo; DAI, Rongji. On the role of synthesized hydroxylated chalcones as dual functional amyloid- β aggregation and

ferroptosis inhibitors for potential treatment of Alzheimer's disease. **European Journal of Medicinal Chemistry**, 2019.

COOLS, Roshan. Dopaminergic modulation of cognitive function-implications for L-DOPA treatment in Parkinson's disease. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 30, n. 1, p. 1–23, 2006.

COYLE, Joseph T.; PUTTFARCKEN, Pamela. Oxidative stress, glutamate and neurodegenerative disorders. **Science**, v. 262, p. 689–95, 1993.

CRAIG, Ian R.; ESSEX, Jonathan W.; SPIEGEL, Katrin. Ensemble docking into multiple crystallographically derived protein structures: An evaluation based on the statistical analysis of enrichments. **Journal of Chemical Information and Modeling**, v. 50, n. 4, p. 511–524, 2010.

CUNHA, Anna C.; FIGUEIREDO, Juliana M.; TRIBUTINO, Jorge L. M.; MIRANDA, Ana L. P.; CASTRO, Helena C.; ZINGALI, Russolina B.; FRAGA, Carlos A. M.; DE SOUZA, Maria Cecília B. V.; FERREIRA, Vitor F.; BARREIRO, Eliezer J. Antiplatelet properties of novel N-substituted-phenyl-1,2,3-triazole-4-acylhydrazone derivatives. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 11, n. 9, p. 2051–2059, 2003.

DAL PIAZ, Fabrizio; VERA SALTOS, Mariela Beatriz; FRANCESCHELLI, Silvia; FORTE, Giovanni; MARZOCCO, Stefania; TUCCINARDI, Tiziano; POLI, Giulio; NEJAD EBRAHIMI, Samad; HAMBURGER, Matthias; DE TOMMASI, Nunziatina; BRACA, Alessandra. Drug Affinity Responsive Target Stability (DARTS) Identifies Laurifolioside as a New Clathrin Heavy Chain Modulator. **Journal of Natural Products**, v. 79, n. 10, p. 2681–2692, 2016.

DAUER, William; PRZEDBORSKI, Serge. Parkinson's Disease: Mechanisms and Models. **Neuron**, Totowa, NJ, v. 39, p. 889–909, 2003.

DE LEO, Marinella; HUALLPA, Conny Guillen; ALVARADO, Britt; GRANCHI, Carlotta; POLI, Giulio; DE TOMMASI, Nunziatina; BRACA, Alessandra. New diterpenes from *Salvia pseudorosmarinus* and their activity as inhibitors of monoacylglycerol lipase (MAGL). **Fitoterapia**, v. 130, n. July, p. 251–258, 2018.

DEHIYAN, Anuradha; SINGH, Sarabjeet. Study on Gender Specific Variability of Gastrointestinal, Genitourinary and Depression Related Non Motor Symptoms of Parkinson Disease. **International Journal of Medical and Dental Sciences**, v. 7, n. 2, p. 1657–1662, 2018.

DELGARZIA, V. W. Pharmacologic Treatment of Alzheimer's Disease : An Update. **American family physician**, v. 68, n. 7, p. 1365–1372, 2003.

DESHMUKH, Prashant; UNNI, Sruthi; KRISHNAPPA, Gopinatha; PADMANABHAN, Balasundaram. The Keap1–Nrf2 pathway: promising therapeutic target to counteract ROS-mediated damage in cancers and neurodegenerative diseases. **Biophysical Reviews**, v. 9, n. 1, p. 41–56, 2017.

DIAS, Kris S. T.; VIEGAS, Claudio. Multi-Target Directed Drugs : A Modern Approach

for Design of New Drugs for the treatment of Alzheimer ' s Disease. **Current neuropharmacology**, v. 12, n. 3, p. 239–255, 2014.

DIAS, Kris Simone T.; DE PAULA, Cynthia T.; DOS SANTOS, Thiago; SOUZA, Isis N. O.; BONI, Marina S.; GUIMARÃES, Marcos J. R.; DA SILVA, Fernanda M. R.; CASTRO, Newton G.; NEVES, Gilda A.; VELOSO, Clarice C.; COELHO, Márcio M.; DE MELO, Ivo Souza F.; GIUSTI, Fabiana C. V.; GIUSTI-PAIVA, Alexandre; DA SILVA, Marcelo L.; DARDENNE, Laurent E.; GUEDES, Isabella A.; PRUCCOLI, Letizia; MORRONI, Fabiana; et al. Design, synthesis and evaluation of novel feruloyl-donepezil hybrids as potential multitarget drugs for the treatment of Alzheimer's disease. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 130, p. 440–457, 2017.

DIAS VIEGAS, Flávia Pereira; DE FREITAS SILVA, Matheus; DIVINO DA ROCHA, Miguel; CASTELLI, Maísa Rosa; RIQUIEL, Mariana Máximo; MACHADO, Rafael Pereira; VAZ, Sarah Macedo; SIMÕES DE LIMA, Laís Medeiros; MANCINI, Karla Cristine; MARQUES DE OLIVEIRA, Patrícia Cruz; MORAIS, Élide Parreira; GONTIJO, Vanessa Silva; DA SILVA, Fernanda Motta R.; D'ALINCOURT DA FONSECA PEÇANHA, Dora; CASTRO, Newton Gonçalves; NEVES, Gilda A.; GIUSTI-PAIVA, Alexandre; VILELA, Fabiana Cardoso; ORLANDI, Lidiane; et al. Design, synthesis and pharmacological evaluation of N -benzyl-piperidiny-aryl-acylhydrazone derivatives as donepezil hybrids: Discovery of novel multi-target anti-alzheimer prototype drug candidates. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 147, p. 48–65, 2018.

DOUSA, M. K.; WEINSHILBOUM, R. M.; MUENTER, M. D.; OFFORD, K. P.; DECKER, P. A.; TYCE, G. M. L-DOPA biotransformation: Correlations of dosage, erythrocyte catechol O-methyltransferase and platelet SULT1A3 activities with metabolic pathways in Parkinsonian patients. **Journal of Neural Transmission**, v. 110, n. 8, p. 899–910, 2003.

ELLMAN, G. L.; COURTNEY, K. D.; ANDRES, V. JR.; FEATHERSTONE, R. M. A New and Rapid Colorimetric of Acetylcholinesterase Determination. **Biochemical Pharmacology**, v. 7, p. 88–95, 1961.

EUROPEAN UNION JOINT PROGRAMME - NEURODEGENERATIVE DISEASE RESEARCH. **What is Neurodegenerative Disease?** 2018a. Disponível em: <<https://www.neurodegenerationresearch.eu/about/what/>>.

EUROPEAN UNION JOINT PROGRAMME - NEURODEGENERATIVE DISEASE RESEARCH. **Why Choose Neurodegenerative Diseases?** 2018b. Disponível em: <<https://www.neurodegenerationresearch.eu/about/why/>>.

FRAGA, Carlos A. M.; BARREIRO, Eliezer J. Medicinal Chemistry of N-Acylhydrazones : New Lead-Compounds of Analgesic , Antiinflammatory and Antithrombotic Drugs. **Current Medicinal Chemistry**, v. 13, p. 167–198, 2006.

FRIESNER, Richard A.; BANKS, Jay L.; MURPHY, Robert B.; HALGREN, Thomas A.; KLICIC, Jasna J.; MAINZ, Daniel T.; REPASKY, Matthew P.; KNOLL, Eric H.; SHELLEY, Mee; PERRY, Jason K.; SHAW, David E.; FRANCIS, Perry; SHENKIN, Peter S. Glide: A New Approach for Rapid, Accurate Docking and Scoring. 1. Method

and Assessment of Docking Accuracy. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 47, n. 7, p. 1739–1749, 2004.

FRIESNER, Richard A.; MURPHY, Robert B.; REPASKY, Matthew P.; FRYE, Leah L.; GREENWOOD, Jeremy R.; HALGREN, Thomas A.; SANSCHAGRIN, Paul C.; MAINZ, Daniel T. Extra precision glide: Docking and scoring incorporating a model of hydrophobic enclosure for protein-ligand complexes. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 49, n. 21, p. 6177–6196, 2006.

GLASS, Christopher K.; SAIJO, Kaoru; WINNER, Beate; MARCHETTO, Maria Carolina; GAGE, Fred H. Mechanisms Underlying Inflammation in Neurodegeneration. **Cell**, v. 140, n. 6, p. 918–934, 2010.

GONTIJO, Vanessa Silva; DE SOUZA, Thiago Corrêa; ROSA, Isael Aparecido; SOARES, Marisi Gomes; DA SILVA, Marcelo Aparecido; VILEGAS, Wagner; VIEGAS, Cláudio; DOS SANTOS, Marcelo Henrique. Isolation and evaluation of the antioxidant activity of phenolic constituents of the *Garcinia brasiliensis* epicarp. **Food Chemistry**, v. 132, n. 3, p. 1230–1235, 2012.

GONTIJO, Vanessa Silva; ESPURI, Patrícia Ferreira; ALVES, Rosemeire Brondi; DE CAMARGOS, Luiz Fernando; SANTOS, Fábio Vieira Dos; DE SOUZA JUDICE, Wagner Alves; MARQUES, Marcos José; FREITAS, Rossimiriam Pereira. Leishmanicidal, antiproteolytic, and mutagenic evaluation of alkyltriazoles and alkylphosphocholines. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 101, p. 24–33, 2015.

GREENWOOD, Jeremy R.; CALKINS, David; SULLIVAN, Arron P.; SHELLEY, John C. Towards the comprehensive, rapid, and accurate prediction of the favorable tautomeric states of drug-like molecules in aqueous solution. **Journal of Computer-Aided Molecular Design**, v. 24, n. 6–7, p. 591–604, 2010.

GUEDES, Isabella A.; DE MAGALHÃES, Camila S.; DARDENNE, Laurent E. Receptor-ligand molecular docking. **Biophysical Reviews**, v. 6, n. 1, p. 75–87, 2014.

GUEDES, Isabella A.; PEREIRA, Felipe S. S.; DARDENNE, Laurent E. Empirical scoring functions for structure-based virtual screening: Applications, critical aspects, and challenges. **Frontiers in Pharmacology**, v. 9, p. 1–18, 2018.

GUERRERO-CASTILLO, Sergio; BAERTLING, Fabian; KOWNATZKI, Daniel; WESSELS, Hans J.; ARNOLD, Susanne; BRANDT, Ulrich; NIJTMANS, Leo. The Assembly Pathway of Mitochondrial Respiratory Chain Complex I. **Cell Metabolism**, v. 25, n. 1, p. 128–139, 2017.

HAASS, Christian; SELKOE, Dennis J. Soluble protein oligomers in neurodegeneration: lessons from the Alzheimer's amyloid beta-peptide. **Nature reviews. Molecular cell biology**, v. 8, n. 2, p. 101–112, 2007.

HAN, Yong Nam; RYU, Shi Yong; HAN, Byung Hoon. Antioxidant Activity of Resveratrol Closely Correlates with Its Monoamine oxidase-A Inhibitory Activity. **Archives of Pharmacal Research**, v. 13, n. 2, p. 132–135, 1990.

HAVIV, Haim; WONG, Dawn M.; GREENBLATT, Harry M.; CARLIER, Paul R.; PANG, Yuan Ping; SILMAN, Israel; SUSSMAN, Joel L. Crystal packing mediates enantioselective ligand recognition at the peripheral site of acetylcholinesterase. **Journal of the American Chemical Society**, v. 127, n. 31, p. 11029–11036, 2005.

HIMO, Fahmi; LOVELL, Timothy; HILGRAF, Robert; ROSTOVTSEV, Vsevolod V.; NOODLEMAN, Louis; SHARPLESS, K. Barry; FOKIN, Valery V. Copper(I)-catalyzed synthesis of azoles. DFT study predicts unprecedented reactivity and intermediates. **Journal of the American Chemical Society**, v. 127, n. 1, p. 210–216, 2005.

HUERTA, Carlos; JIANG, Xin; TREVINO, Isaac; BENDER, Christopher F.; FERGUSON, Deborah A.; PROBST, Brandon; SWINGER, Kerren K.; STOLL, Vincent S.; THOMAS, Philip J.; DULUBOVA, Irina; VISNICK, Melean; WIGLEY, W. Christian. Characterization of novel small-molecule NRF2 activators: Structural and biochemical validation of stereospecific KEAP1 binding. **Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects**, v. 1860, n. 11, p. 2537–2552, 2016.

IRESON, Christopher R.; JONES, Donald J. L.; ORR, Samantha; COUGHTRIE, Michael W. H.; BOOCOCK, David J.; WILLIAMS, Marion L.; FARMER, Peter B.; STEWARD, William P.; GESCHER, Andreas J. Metabolism of the Cancer Chemopreventive Agent Curcumin in Human and Rat Intestine. **Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention**, v. 11, n. January, p. 105–111, 2002.

ISLAM, Mullah Muhaiminul; GURUNG, Arun Bahadur; BHATTACHARJEE, Atanu; AGUAN, Kripamoy; MITRA, Sivaprasad. Human serum albumin reduces the potency of acetylcholinesterase inhibitor based drugs for Alzheimer's disease. **Chemico-Biological Interactions**, v. 249, p. 1–9, 2016.

IZUMI, Yasuhiko; KATAOKA, Harue; INOSE, Yuri; AKAIKE, Akinori; KOYAMA, Yutaka; KUME, Toshiaki. Neuroprotective effect of an Nrf2-ARE activator identified from a chemical library on dopaminergic neurons. **European Journal of Pharmacology**, v. 818, p. 470–479, 2018.

JARDIM, Fernanda Rafaela; DE ROSSI, Fernando Tonon; NASCIMENTO, Marielle Xavier; DA SILVA BARROS, Renata Gabriele; BORGES, Paula Agrizzi; PRESCILIO, Isabella Cristina; DE OLIVEIRA, Marcos Roberto. Resveratrol and Brain Mitochondria: a Review. **Molecular Neurobiology**, v. 55, n. 3, p. 2085–2101, 2018.

JIANG, Ling Feng; YAO, Tian Ming; ZHU, Zhi Liang; WANG, Chong; JI, Liang Nian. Impacts of Cd(II) on the conformation and self-aggregation of Alzheimer's tau fragment corresponding to the third repeat of microtubule-binding domain. **Biochimica et Biophysica Acta - Proteins and Proteomics**, v. 1774, n. 11, p. 1414–1421, 2007.

JARANAIKULWANITCH, Jutamas; GOVITRAPONG, Piyarat; FOKIN, Valery V.; VAJRAGUPTA, Opa. From BACE1 Inhibitor to Multifunctionality of tryptoline and tryptamine triazole derivatives for Alzheimer's disease. **Molecules**, v. 17, n. 7, p. 8312–8333, 2012.

JOHNSON, G.; MOORE, S. W. The peripheral anionic site of acetylcholinesterase:

structure, functions and potential role in rational drug design. **Current pharmaceutical design**, v. 12, n. 2, p. 217–25, 2006.

JOMOVA, Klaudia; VONDRAKOVA, Dagmar; LAWSON, Michael; VALKO, Marian. Metals, oxidative stress and neurodegenerative disorders. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 345, n. 1–2, p. 91–104, 2010.

KUA, Zhong Jie; PACHANA, Nancy A.; BYRNE, Gerard J.; O’SULLIVAN, John D.; MARSH, Rodney; TORBEY, Elizabeth; SILBURN, Peter A.; MELLICK, George D.; DISSANAYAKA, Nadeeka N. W. How Well Do Caregivers Detect Depression and Anxiety in Patients With Parkinson Disease? **Journal of Geriatric Psychiatry and Neurology**, v. 31, n. 5, p. 227–236, 2018.

LEMES, Laís Flávia Nunes; DE ANDRADE RAMOS, Giselle; DE OLIVEIRA, Andressa Souza; DA SILVA, Fernanda Motta R.; DE CASTRO COUTO, Gina; DA SILVA BONI, Marina; GUIMARÃES, Marcos Jorge R.; SOUZA, Isis Nem O.; BARTOLINI, Manuela; ANDRISANO, Vincenza; DO NASCIMENTO NOGUEIRA, Patrícia Coelho; SILVEIRA, Edilberto Rocha; BRAND, Guilherme D.; SOUKUP, Ondřej; KORÁBEČNÝ, Jan; ROMEIRO, Nelilma C.; CASTRO, Newton G.; BOLOGNESI, Maria Laura; ROMEIRO, Luiz Antonio Soares. Cardanol-derived AChE inhibitors: Towards the development of dual binding derivatives for Alzheimer’s disease. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 108, p. 687–700, 2016.

LI, Jinglei; LEE, Il Woo; SHIN, Gye Hwa; CHEN, Xiguang; PARK, Hyun Jin. Curcumin-Eudragit® E PO solid dispersion: A simple and potent method to solve the problems of curcumin. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 94, p. 322–332, 2015. a.

LI, Jinglei; SHIN, Gye Hwa; CHEN, Xiguang; PARK, Hyun Jin. Modified curcumin with hyaluronic acid: Combination of pro-drug and nano-micelle strategy to address the curcumin challenge. **Food Research International**, v. 69, p. 202–208, 2015. b.

LI, Su Yi; WANG, Xiao Bing; KONG, Ling Yi. Design, synthesis and biological evaluation of imine resveratrol derivatives as multi-targeted agents against Alzheimer’s disease. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 71, p. 36–45, 2014.

LIMA, Patrícia C.; LIMA, Lídia M.; DA SILVA, Kelli Cristine M.; LÉDA, Paulo Henrique O.; DE MIRANDA, Ana Luisa P.; FRAGA, Carlos A. M.; BARREIRO, Eliezer J. Synthesis and analgesic activity of novel N-acylarylhydrazones and isosters, derived from natural safrole. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 35, n. 2, p. 187–203, 2000.

LIN, Michael T.; BEAL, M. Flint. Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in neurodegenerative diseases. **Nature**, v. 443, n. 7113, p. 787–795, 2006.

LIU, Qianqian; ZHU, Dashuai; JIANG, Peien; TANG, Xinyu; LANG, Qiuhan; YU, Qinyi; ZHANG, Shaozhi; CHE, Yongzhe; FENG, Xizeng. Resveratrol synergizes with low doses of L-DOPA to improve MPTP-induced Parkinson disease in mice. **Behavioural Brain Research**, v. 367, n. February, p. 10–18, 2019.

LOPES, João P. B.; DA COSTA, Jessie S.; CESCHI, Marco A.; GONÇALVES, Carlos A. S.; KONRATH, Eduardo L.; KARL, L. M.; GUEDES, Isabella A.; DARDENNE, Laurent E. Chiral bistacrine analogues: Synthesis, cholinesterase inhibitory activity and a molecular modeling approach. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 28, n. 11, p. 2218–2228, 2017.

LUDTMANN, M. H. R.; ANGELOVA, P. R.; NINKINA, N. N.; GANDHI, S.; BUCHMAN, V. L.; ABRAMOV, A. Y. Monomeric Alpha-Synuclein Exerts a Physiological Role on Brain ATP Synthase. **Journal of Neuroscience**, v. 36, n. 41, p. 10510–10521, 2016.

LUDTMANN, Marthe H. R.; ANGELOVA, Plamena R.; HORROCKS, Mathew H.; CHOI, Minee L.; RODRIGUES, Margarida; BAEV, Artyom Y.; BEREZHNOV, Alexey V.; YAO, Zhi; LITTLE, Daniel; BANUSHI, Blerida; AL-MENHALI, Afnan Saleh; RANASINGHE, Rohan T.; WHITEN, Daniel R.; YAPOM, Ratsuda; DOLT, Karamjit Singh; DEVINE, Michael J.; GISSEN, Paul; KUNATH, Tilo; JAGANJAC, Morana; et al. α -synuclein oligomers interact with ATP synthase and open the permeability transition pore in Parkinson's disease. **Nature Communications**, v. 9, n. 1, p. 2293, 2018.

MADHAVI SASTRY, G.; ADZHIGIREY, Matvey; DAY, Tyler; ANNABHIMOJU, Ramakrishna; SHERMAN, Woody. Protein and ligand preparation: Parameters, protocols, and influence on virtual screening enrichments. **Journal of Computer-Aided Molecular Design**, v. 27, n. 3, p. 221–234, 2013.

MARAMBAUD, Philippe; ZHAO, Haitian; DAVIES, Peter. Resveratrol promotes clearance of Alzheimer's disease amyloid- β peptides. **Journal of Biological Chemistry**, v. 280, n. 45, p. 37377–37382, 2005.

MARRAS, C.; BECK, J. C.; BOWER, J. H.; ROBERTS, E.; RITZ, B.; ROSS, G. W.; ABBOTT, R. D.; SAVICA, R.; VAN DEN EEDEN, S. K.; WILLIS, A. W.; TANNER, CM. Prevalence of Parkinson's disease across North America. **npj Parkinson's Disease**, v. 4, n. 1, p. 21, 2018.

MARTINU, Tomas; DAILEY, William P. Facile One-Pot Preparation of 3-Chloro-2-(chloromethyl)propene and an ab Initio Study of the Deamination Reaction of Nitrosoaziridine. **The Journal of Organic Chemistry**, v. 65, n. 20, p. 6784–6786, 2000.

MATSUOKA, Atsuko; TAKESHITA, Kenji; FURUTA, Ayumi; OZAKI, Masayasu; FUKUHARA, Kiyoshi; MIYATA, Naoki. The 4'-hydroxy group is responsible for the in vitro cytogenetic activity of resveratrol. **Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 521, n. 1–2, p. 29–35, 2002.

MCBEAN, G. J.; LÓPEZ, M. G.; WALLNER, F. K. Redox-based therapeutics in neurodegenerative disease. **British Journal of Pharmacology**, v. 174, n. 12, p. 1750–1770, 2017.

MI, Kaihong; JOHNSON, Gail V. W. The role of tau phosphorylation in the pathogenesis of Alzheimer's disease. **Current Alzheimer research**, v. 3, n. 5, p.

449–63, 2006.

MÍNGUEZ-MÍNGUEZ, Sara; SOLÍS-GARCÍA DEL POZO, Julián; JORDÁN, Joaquín. Rasagiline in Parkinson's disease: A review based on meta-analysis of clinical data. **Pharmacological Research**, v. 74, p. 78–86, 2013.

MOHAMED, Tarek; SHAKERI, Arash; RAO, Praveen P. N. Amyloid Cascade in Alzheimer's Disease: Recent Advances in Medicinal Chemistry. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 113, p. 258–272, 2016.

MOHAMMADI-KHANAPOSHTANI, Maryam; SAEEDI, Mina; ZAFARGHANDI, Narges Shamsaei; MAHDAVI, Mohammad; SABOURIAN, Reyhaneh; RAZKENARI, Elahe Karimpour; ALINEZHAD, Heshmatollah; KHANAVI, Mahnaz; FOROUMADI, Alireza; SHAFIEE, Abbas; AKBARZADEH, Tahmineh. Potent acetylcholinesterase inhibitors: Design, synthesis, biological evaluation, and docking study of acridone linked to 1,2,3-triazole derivatives. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 92, p. 799–806, 2015.

MONROY, Adriana; LITHGOW, Gordon J.; ALAVEZ, Silvestre. Curcumin and neurodegenerative diseases. **BioFactors**, v. 39, n. 1, p. 122–132, 2013.

MOSMANN, Tim. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**, v. 65, n. 1–2, p. 55–63, 1983.

MYTHRI, R. B.; BHARATH, M. M. S. Curcumin: A Potential Neuroprotective Agent in Parkinson's Disease. **Current Pharmaceutical Design**, v. 18, n. 1, p. 91–99, 2012.

NATIONAL PARKINSON FOUNDATION. Parkinson Report. **Fall Winter**, v. 23, n. 3, 2012.

NEVES, R.; LUCIO, M.; L.C. LIMA, J.; REIS, S. Resveratrol in Medicinal Chemistry: A Critical Review of its Pharmacokinetics, Drug-Delivery, and Membrane Interactions. **Current Medicinal Chemistry**, v. 19, n. 11, p. 1663–1681, 2012.

NGOUNGOURE, Viviane L. Ndam; SCHLUESENER, Jan; MOUNDIPA, Paul F.; SCHLUESENER, Hermann. Natural polyphenols binding to amyloid : A broad class of compounds to treat different human amyloid diseases. **Mol. Nutr. Food Res.**, p. 1–13, 2014.

OHGUCHI, Kenji; TANAKA, Toshiyuki; KIDO, Tadashi; BABA, Kimiye; IINUMA, Munekazu; MATSUMOTO, Kenji; AKAO, Yukihiro; NOZAWA, Yoshinori. Effects of hydroxystilbene derivatives on tyrosinase activity. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 307, n. 4, p. 861–863, 2003.

OHNUMA, Tomokazu; NAKAYAMA, Shinji; ANAN, Eisaburo; NISHIYAMA, Takahito; OGURA, Kenichiro; HIRATSUKA, Akira. Activation of the Nrf2/ARE pathway via S-alkylation of cysteine 151 in the chemopreventive agent-sensor Keap1 protein by faltarindiol, a conjugated diacetylene compound. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 244, n. 1, p. 27–36, 2010.

OLIVERI, Valentina. Toward the discovery and development of effective modulators of α -synuclein amyloid aggregation. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 167, p. 10–36, 2019.

ORTECA, Giulia; TAVANTI, Francesco; BEDNARIKOVA, Zuzana; GAZOVA, Zuzana; RIGILLO, Giovanna; IMBRIANO, Carol; BASILE, Valentina; ASTI, Mattia; RIGAMONTI, Luca; SALADINI, Monica; FERRARI, Erika; MENZIANI, Maria Cristina. Curcumin derivatives and A β -fibrillar aggregates: An interactions' study for diagnostic/therapeutic purposes in neurodegenerative diseases. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 26, n. 14, p. 4288–4300, 2018.

PALLA, Gerardo; PREDIERI, Giovanni; DOMIANO, Paolo; VIGNALI, Carlo; TURNER, Walter. Conformational behaviour and E/Z isomerization of N-acyl and N-arylohydrazones. **Tetrahedron**, v. 42, n. 13, p. 3649–3654, 1986.

PARK, Wungki; RUHUL AMIN, A. R. M.; CHEN, Zhuo Georgia; SHIN, Dong M. New perspectives of curcumin in cancer prevention. **Cancer Prevention Research**, v. 6, n. 5, p. 387–400, 2013.

PARKINSON'S FOUNDATION. **Statistics**. 2018. Disponível em: <<https://www.parkinson.org/Understanding-Parkinsons/Statistics>>.

PAULA, A. A. N.; MARTINS, J. B. L.; DOS SANTOS, M. L.; NASCENTE, L. de C.; ROMEIRO, L. A. S.; AREAS, T. F. M. A.; VIEIRA, K. S. T.; GAMBÔA, N. F.; CASTRO, N. G.; GARGANO, R. New potential AChE inhibitor candidates. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 44, n. 9, p. 3754–3759, 2009.

PAVIA, Donald L.; LAMPMAN, Gary M.; KRIZ, George S.; VYVYAN, James R. **Introdução á espectroscopia**. 4^a ed. Washington: Cengage, 2015.

PERRIN, D. D.; ARMARENGO, W. L. F. **Purification of laboratory chemicals**. 4. ed. Canberra: Butterworth-Heinemann, 1997.

PHANIENDRA, Alugoju; JESTADI, Dinesh Babu; PERIYASAMY, Latha. Free Radicals: Properties, Sources, Targets, and Their Implication in Various Diseases. **Indian Journal of Clinical Biochemistry**, v. 30, n. 1, p. 11–26, 2015.

PINTO, Andrea; EL ALI, Zeina; MONIOT, Sébastien; TAMBORINI, Lucia; STEEGBORN, Clemens; FORESTI, Roberta; DE MICHELI, Carlo. Effects of 3-Bromo-4,5-dihydroisoxazole Derivatives on Nrf2 Activation and Heme Oxygenase-1 Expression. **ChemistryOpen**, v. 7, n. 11, p. 858–864, 2018.

PISANI, Leonardo; FARINA, Roberta; CATTO, Marco; IACOBAZZI, Rosa Maria; NICOLOTTI, Orazio; CELLAMARE, Saverio; MANGIATORDI, Giuseppe Felice; DENORA, Nunzio; SOTO-OTERO, Ramon; SIRAGUSA, Lydia; ALTOMARE, Cosimo Damiano; CAROTTI, Angelo. Exploring Basic Tail Modifications of Coumarin-Based Dual Acetylcholinesterase-Monoamine Oxidase B Inhibitors: Identification of Water-Soluble, Brain-Permeant Neuroprotective Multitarget Agents. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 59, n. 14, p. 6791–6806, 2016.

POEWE, Werner; SEPPI, Klaus; TANNER, Caroline; HALLIDAY, Glenda M.; BRUNDIN, Patrik; VOLKMANN, Jens; SCHRAG, Anette Eleonore; LANG, Anthony E. PARKINSON DISEASE. **Nature Reviews Disease Primers**, v. 3, 2017.

PRINCE, Martin; WIMO, Anders; GUERCHET, Maëlenn; GEMMA-CLAIRE, Ali; WU, Yu-Tzu; PRINA, Matthew. World Alzheimer Report 2015: The Global Impact of Dementia - An analysis of prevalence, incidence, cost and trends. **Alzheimer's Disease International**, p. 84, 2015.

REALE, M.; KAMAL, M. A.; VELLUTO, L.; GAMBI, D.; DI NICOLA, M.; GREIG, N. H. Relationship between inflammatory mediators, Abeta levels and ApoE genotype in Alzheimer disease. **Current Alzheimer research**, v. 9, n. 4, p. 447–457, 2012.

REGE, Shraddha D.; GEETHA, Thangiah; GRIFFIN, Gerald D.; BRODERICK, Tom L.; BABU, Jeganathan Ramesh. Neuroprotective effects of resveratrol in Alzheimer disease pathology. **Frontiers in Aging Neuroscience**, v. 6, n. AUG, p. 1–27, 2014.

REPOSSI, G.; DAIN, A.; TARRES, M. C.; DAS, U. N.; EYNARD, A. R. Beneficial action of resveratrol: How and why? **Nutrition**, v. 32, p. 1–5, 2015.

ROMEIRO, Nelilma C.; AGUIRRE, Gabriela; HERNÁNDEZ, Paola; GONZÁLEZ, Mercedes; CERECETTO, Hugo; ALDANA, Ignacio; PÉREZ-SILANES, Silvia; MONGE, Antonio; BARREIRO, Eliezer J.; LIMA, Lúcia M. Synthesis, trypanocidal activity and docking studies of novel quinoxaline-N-acylhydrazones, designed as cruzain inhibitors candidates. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, v. 17, n. 2, p. 641–652, 2009.

ROSINI, Michela; SIMONI, Elena; BARTOLINI, Manuela; CAVALLI, Andrea; CECCARINI, Luisa; PASCU, Nicoleta; MCCLYMONT, David W.; TAROZZI, Andrea; BOLOGNESI, Maria L.; MINARINI, Anna; TUMIATTI, Vincenzo; ANDRISANO, Vincenza; MELLOR, Ian R.; MELCHIORRE, Carlo. Inhibition of Acetylcholinesterase, β -Amyloid Aggregation, and NMDA Receptors in Alzheimer's Disease: A Promising Direction for the Multi-target-Directed Ligands Gold Rush. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 51, n. 15, p. 4381–4384, 2008.

ROSTOVTSEV, Vsevolod V.; GREEN, Luke G.; FOKIN, Valery V.; SHARPLESS, K. Barry. A stepwise Huisgen cycloaddition process: Copper(I)-catalyzed regioselective "ligation" of azides and terminal alkynes. **Angewandte Chemie - International Edition**, v. 41, n. 14, p. 2596–2599, 2002.

RYDBERG, Edwin H.; BRUMSHTEIN, Boris; GREENBLATT, Harry M.; WONG, Dawn M.; SHAYA, David; WILLIAMS, Larry D.; CARLIER, Paul R.; PANG, Yuan Ping; SILMAN, Israel; SUSSMAN, Joel L. Complexes of Alkylene-linked tacrine dimers with *Torpedo californica* acetylcholinesterase: Binding of bis(5)-tacrine produces a dramatic rearrangement in the active-site gorge. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 49, n. 18, p. 5491–5500, 2006.

SALAZAR, María; ROJO, Ana I.; VELASCO, Diego; DE SAGARRA, Rosa María; CUADRADO, Antonio. Glycogen synthase kinase-3 β inhibits the xenobiotic and antioxidant cell response by direct phosphorylation and nuclear exclusion of the

transcription factor Nrf2. **Journal of Biological Chemistry**, v. 281, n. 21, p. 14841–14851, 2006.

SAMADI, Abdelouahid; MARCO-CONTELLES, José; SORIANO, Elena; ÁLVAREZ-PÉREZ, Mónica; CHIOUA, Mourad; ROMERO, Alejandro; GONZÁLEZ-LAFUENTE, Laura; GANDÍA, Luis; RODA, José M.; LÓPEZ, Manuela G.; VILLARROYA, Mercedes; GARCÍA, Antonio G.; RÍOS, Cristóbal de los. Multipotent drugs with cholinergic and neuroprotective properties for the treatment of Alzheimer and neuronal vascular diseases. I. Synthesis, biological assessment, and molecular modeling of simple and readily available 2-aminopyridine-, and 2-chloropyridine-. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 18, n. 16, p. 5861–5872, 2010.

SÁNCHEZ-MELGAR, A.; ALBASANZ, J. L.; GUIXÀ-GONZÁLEZ, R.; SALEH, N.; SELENT, J.; MARTÍN, M. The antioxidant resveratrol acts as a NON-SELECTIVE adenosine receptor agonist. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 135, n. February, p. 261–273, 2019.

SANG, Qiuling; LIU, Xiaoyang; WANG, Libo; QI, Ling; SUN, Wenping; WANG, Weiyao; SUN, Yajuan; ZHANG, Haina. Curcumin protects an SH-SY5Y cell model of Parkinson's disease against toxic injury by regulating HSP90. **Cellular Physiology and Biochemistry**, v. 51, n. 2, p. 681–691, 2018.

SCATENA, Roberto; MARTORANA, Giuseppe E.; BOTTONI, Patrizia; BOTTA, Giorgia; PASTORE, Paola; GIARDINA, Bruno. An update on pharmacological approaches to neurodegenerative diseases. **Expert Opinion on Investigational Drugs**, v. 16, n. 1, p. 59–72, 2007.

SEBASTIÀ, Jordi; CRISTÒFOL, Rosa; MARTÍN, Manuela; RODRÍGUEZ-FARRÉ, Eduard; SANFELIU, Coral. Evaluation of fluorescent dyes for measuring intracellular glutathione content in primary cultures of human neurons and neuroblastoma SH-SY5Y. **Cytometry. Part A: the journal of the International Society for Analytical Cytology**, v. 51, n. 1, p. 16–25, 2003.

SETAMDIDEH, Davood; ZEYNIZADEH, Behzad. Mild and Convenient Method for Reduction of Carbonyl Compounds with the NaBH₄ / Charcoal System in Wet THF. **Zeitschrift für Naturforschung B**, p. 0–6, 2006.

SHELLEY, John C.; CHOLLETI, Anuradha; FRYE, Leah L.; GREENWOOD, Jeremy R.; TIMLIN, Mathew R.; UCHIMAYA, Makoto. Epik: A software program for pKa prediction and protonation state generation for drug-like molecules. **Journal of Computer-Aided Molecular Design**, v. 21, n. 12, p. 681–691, 2007.

SHISHODIA, Shishir. Molecular mechanisms of curcumin action: Gene expression. **BioFactors**, v. 39, n. 1, p. 37–55, 2013.

SILVA, Matheus de Freitas; COELHO, Letícia Ferreira; GUIRELLI, Isadora Mitestainer; PEREIRA, Rodrigo Machado; FERREIRA-SILVA, Guilherme Álvaro; GRARAVELLI, Graciana Y.; HORVATH, Renato de Oliveira; CAIXETA, Ester Siqueira; IONTA, Marisa; VIEGAS, Claudio. Synthetic resveratrol-curcumin hybrid derivative inhibits mitosis progression in estrogen positive MCF-7 breast cancer cells.

Toxicology in Vitro, v. 50, n. November 2017, p. 75–85, 2018. a.

SILVA, Matheus de Freitas; DIAS, Kris Simone Tranches; GONTIJO, Vanessa Silva; ORTIZ, Cindy Juliet Cristancho; VIEGA, Claudio. Multi-Target Directed Drugs as a Modern Approach for Drug Design Towards Alzheimer's Disease: an update. **Current Medicinal Chemistry**, v. 25, p. 1–35, 2018. b.

SILVA, Matheus de Freitas; PRUCCOLI, Letizia; MORRONI, Fabiana; SITA, Giulia; SEGHETTI, Francesca; VIEGAS, Claudio; TAROZZI, Andrea. The Keap1/Nrf2-ARE Pathway as a Pharmacological Target for Chalcones. **Molecules**, v. 23, n. 7, p. 1803, 2018. c.

STRIMPAKOS, Alexios S.; SHARMA, Ricky A. Curcumin: Preventive and Therapeutic Properties in Laboratory Studies and Clinical Trials. **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 10, n. 3, p. 511–546, 2008.

TAROZZI, Andrea; MERLICCO, A.; MORRONI, F.; BOLONDI, C.; DI IORIO, P.; CICCARELLI, R.; ROMANO, S.; GIULIANI, P.; HRELIA, P. Guanosine protects human neuroblastoma cells from oxidative stress and toxicity induced by Amyloid-beta peptide oligomers. **J Biol Regul Homeost Agents**, v. 24, n. 3, p. 297–306, 2010. a.

TAROZZI, Andrea; MORRONI, Fabiana; HRELIA, Silvana; ANGELONI, Cristina; MARCHESI, Alessandra; CANTELLI-FORTI, Giorgio; HRELIA, Patrizia. Neuroprotective effects of anthocyanins and their in vivo metabolites in SH-SY5Y cells. **Neuroscience Letters**, v. 424, n. 1, p. 36–40, 2007.

TAROZZI, Andrea; MORRONI, Fabiana; MERLICCO, Adriana; BOLONDI, Cecilia; TETI, Gabriella; FALCONI, Mirella; CANTELLI-FORTI, Giorgio; HRELIA, Patrizia. Neuroprotective effects of cyanidin 3-O-glucopyranoside on amyloid beta (25-35) oligomer-induced toxicity. **Neuroscience Letters**, v. 473, n. 2, p. 72–76, 2010. b.

THIBAudeau, Tiffany A.; ANDERSON, Raymond T.; SMITH, David M. A common mechanism of proteasome impairment by neurodegenerative disease-associated oligomers. **Nature Communications**, v. 9, n. 1, p. 1097, 2018.

VALKO, Marian; LEIBFRITZ, Dieter; MONCOL, Jan; CRONIN, Mark T. D.; MAZUR, Milan; TELSER, Joshua. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. **International Journal of Biochemistry and Cell Biology**, v. 39, n. 1, p. 44–84, 2007.

VANDHANA, T.; LOURDURAJ, A. J. Clement. Investigation of cytotoxicity and antimicrobial activity of green synthesized Fe 1-2x Zn x Ti x nanoparticles via Justicia Adathoda. **Materials Chemistry and Physics**, v. 239, n. May 2019, p. 122032, 2020.

VERDONK, Marcel L.; COLE, Jason C.; HARTSHORN, Michael J.; MURRAY, Christopher W.; TAYLOR, Richard D. Improved protein-ligand docking using GOLD. **Proteins: Structure, Function and Genetics**, v. 52, n. 4, p. 609–623, 2003.

VERMA, Ruchi; BOSHOF, Helena I. M.; ARORA, Kriti; BAIRY, Indira; TIWARI, Mradul; BHAT, Varadaraj G.; SHENOY, Gautham G. Synthesis, antitubercular evaluation, molecular docking and molecular dynamics studies of 4,6-disubstituted-2-oxo-dihydropyridine-3-carbonitriles. **Journal of Molecular Structure**, v. 1197, p. 117–133, 2019.

VIEGAS, Cláudio; BOLZANI, Vanderlan Da Silva; BARREIRO, Eliezer J.; FRAGA, Carlos Alberto Manssour. New anti-Alzheimer drugs from biodiversity: the role of the natural acetylcholinesterase inhibitors. **Mini reviews in medicinal chemistry**, v. 5, n. 10, p. 915–926, 2005. a.

VIEGAS, Claudio; BOLZANI, Vanderlan S.; FURLAN, Maysa; FRAGA, Carlos M.; BARREIRO, Eliezer J. Produtos naturais como candidatos a fármacos úteis no tratamento do mal de Alzheimer. **Química Nova**, v. 27, n. 4, p. 631–639, 2004.

VIEGAS, Cláudio; BOLZANI, Vanderlan S.; PIMENTEL, Luísa S. B.; CASTRO, Newton G.; CABRAL, Rafael F.; COSTA, Rodrigo S.; FLOYD, Corinne; ROCHA, Mônica S.; YOUNG, Maria C. M.; BARREIRO, Eliezer J.; FRAGA, Carlos A. M. New selective acetylcholinesterase inhibitors designed from natural piperidine alkaloids. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, v. 13, n. 13, p. 4184–4190, 2005. b.

VIEGAS, Flávia P. D.; SIMÕES, Maria Cecília R.; ROCHA, Miguel D. Da; CASTELLI, Maísa R.; MOREIRA, Marcella S.; V. JUNIOR, Claudio. Alzheimer's Disease: Characterization, Evolution and Implications of the Neuroinflammatory Process. **Revista Virtual de Química**, v. 3, n. 4, p. 286–306, 2011.

VILLAFLORES, Oliver B.; CHEN, Ying Ju; CHEN, Chih Ping; YEH, Jui Ming; WU, Tzong Yuan. Curcuminoids and resveratrol as anti-Alzheimer agents. **Taiwanese Journal of Obstetrics and Gynecology**, v. 51, n. 4, p. 515–525, 2012.

WALSH, Sally; AISEN, Paul S. Inflammatory processes and Alzheimer's disease. **Expert Review of Neurotherapeutics**, v. 4, n. 5, p. 793–798, 2004.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Neurological disorders: public health challenges. p. 1–232, 2006.

WORRELL, B. T.; MALIK, J. A.; FOKIN, V. V. Direct Evidence of a Dinuclear Copper Intermediate in Cu(I)-Catalyzed Azide–Alkyne Cycloadditions. **Science (New York, N.Y.)**, v. 340, n. 6131, p. 457–460, 2013.

WU, Jianzhang; CAI, Zhijian; WEI, Xiaoyan; CHEN, Minxiao; YING, Shilong; SHI, Lingyi; XU, Ren-Ai; HE, Fan; LIANG, Guang; ZHANG, Xiuhua. Anti-Lung Cancer Activity of the Curcumin Analog JZ534 In Vitro. **BioMed Research International**, v. 1, p. 1–10, 2015.

XU, Q.; PARK, Y.; HUANG, X.; HOLLENBECK, A.; BLAIR, A.; SCHATZKIN, A.; CHEN, H. Physical activities and future risk of Parkinson disease. **Neurology**, v. 75, n. 4, p. 341–348, 2010.

XU, Qinhong; ZONG, Liang; CHEN, Xin; JIANG, Zhengdong; NAN, Ligang; LI, Jiahui;

DUAN, Wanxing; LEI, Jianjun; ZHANG, Lun; MA, Jiguang; LI, Xuqi; WANG, Zheng; WU, Zheng; MA, Qingyong; MA, Zhenhua. Resveratrol in the treatment of pancreatic cancer. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1348, n. 1, p. 10–19, 2015.

YANG, Fei; LAGERROS, Ylva Trolle; BELLOCCO, Rino; ADAMI, Hans-olov; FANG, Fang; PEDERSEN, Nancy L.; WIRDEFELDT, Karin. Physical activity and risk of Parkinson ' s disease in the Swedish National March Cohort. **Brain**, n. 138, p. 269–275, 2015.

YIN, Wenke; LI, Yu. Curcumin Upregulate Expression of HO-1 and Nrf-2 in SHSY5Y Cells. In: 2010 4TH INTERNATIONAL CONFERENCE ON BIOINFORMATICS AND BIOMEDICAL ENGINEERING 2010, **Anais...** : IEEE, 2010.

YU, Yangyang; SHEN, Qian; LAI, Yihong; PARK, Sun Y.; OU, Xingmei; LIN, Dongxu; JIN, Meiling; ZHANG, Weizhen. Anti-inflammatory effects of curcumin in microglial cells. **Frontiers in Pharmacology**, v. 9, n. APR, p. 1–10, 2018.

ZHAN, Qichen; SHI, Xianqing; WANG, Ting; HU, Jinhui; ZHOU, Jiahong; ZHOU, Lin; WEI, Shaohua. Design and synthesis of thymine modified phthalocyanine for A β protofibrils photodegradation and A β peptide aggregation inhibition. **Talanta**, v. 191, p. 27–38, 2019.

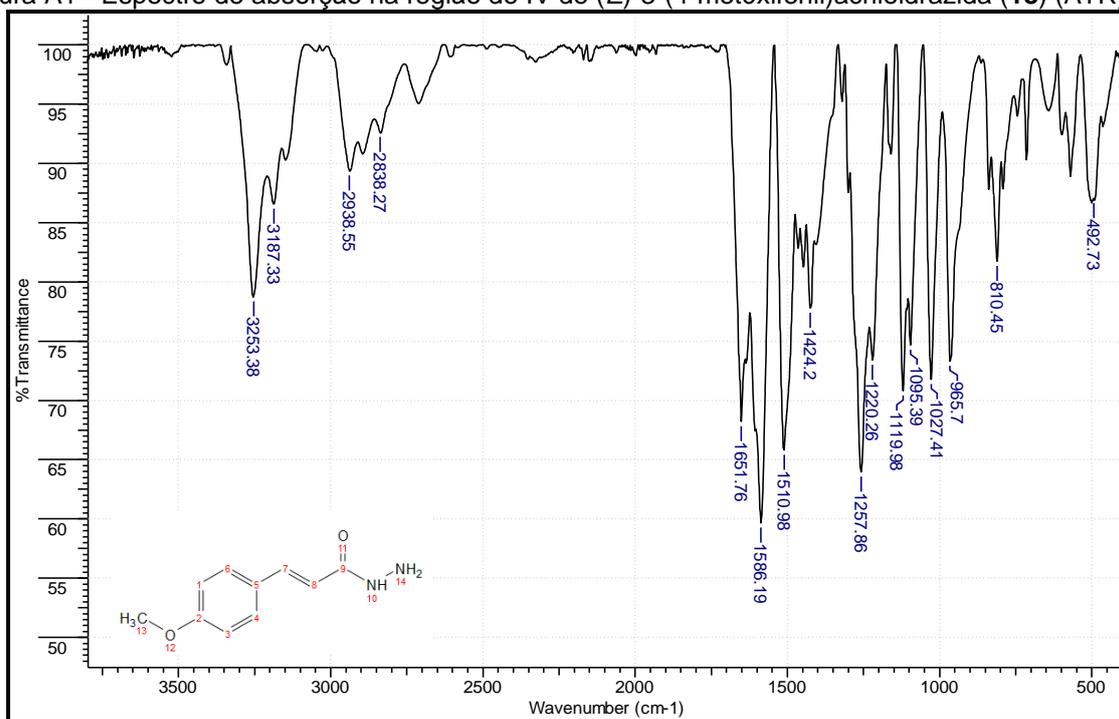
ZHAO, Xiaofei; WANG, Jun; HU, Song; WANG, Renping; MAO, Yongjun; XIE, Junxia. Neuroprotective effect of resveratrol on rotenone-treated C57BL/6 mice. **NeuroReport**, v. 28, n. 9, p. 498–505, 2017.

ZHENG, Yunxiao; QIANG, Xiaoming; XU, Rui; SONG, Qing; TIAN, Chaoquan; LIU, Hongyan; LI, Wei; TAN, Zhenghuai; DENG, Yong. Design, synthesis and evaluation of pterostilbene β -amino alcohol derivatives as multifunctional agents for Alzheimer's disease treatment. **Bioorganic Chemistry**, v. 78, n. 10, p. 298–306, 2018.

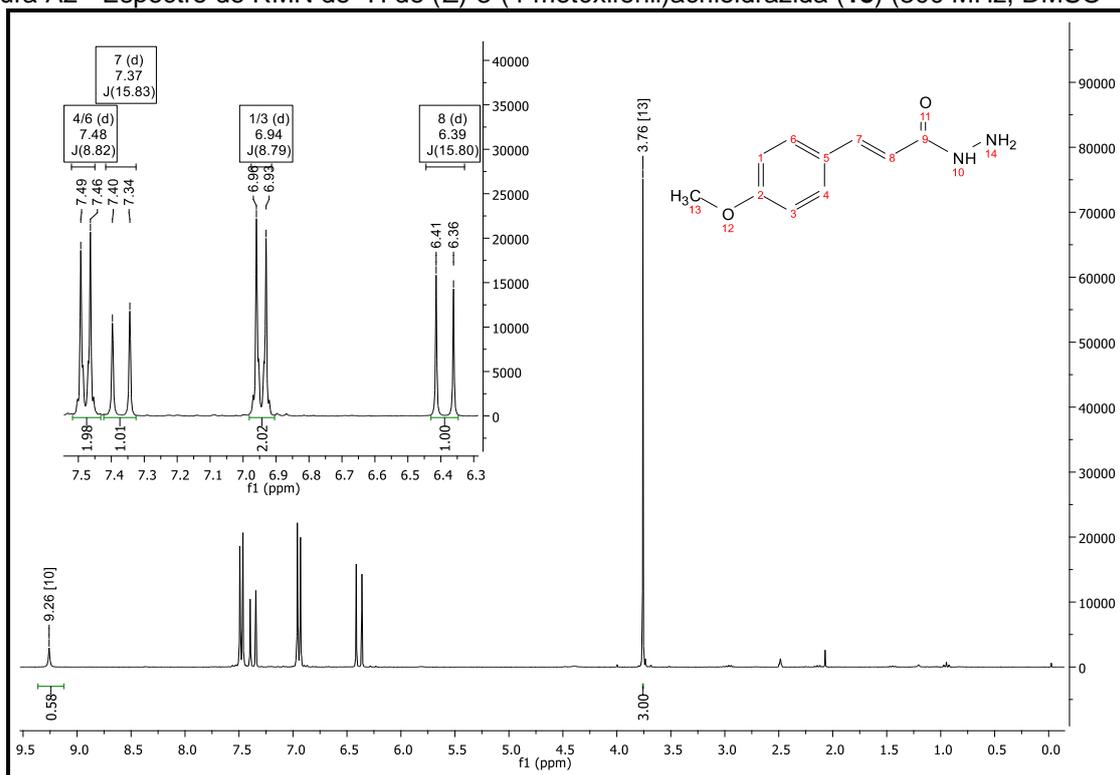
ANEXOS

DADOS DE CARACTERIZAÇÃO

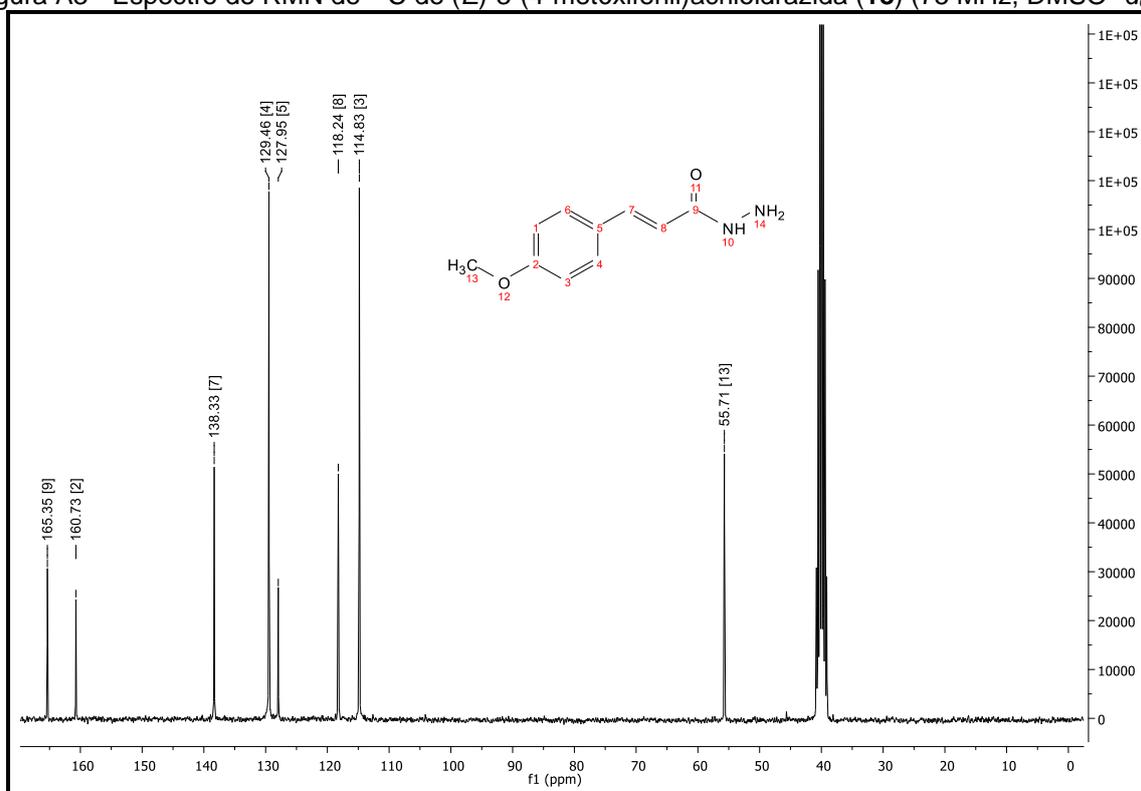
COMPOSTOS DERIVADOS DOS ÁCIDOS CINÂMICOS.

Figura A1 - Espectro de absorção na região do IV de (*E*)-3-(4-metóxfenil)acriloidrazida (**18**) (ATR).

Fonte: do autor.

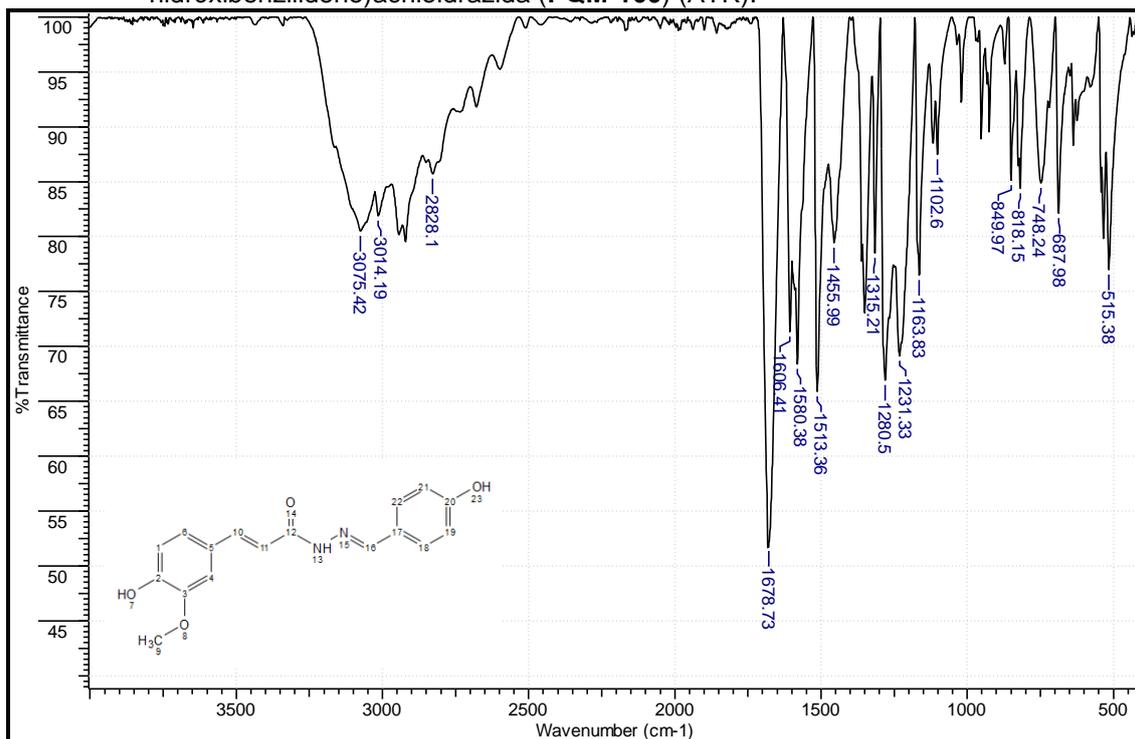
Figura A2 - Espectro de RMN de ^1H de (*E*)-3-(4-metóxi)fenilacriloidrazida (**18**) (300 MHz, $\text{DMSO-}d_6$).

Fonte: do autor.

Figura A3 - Espectro de RMN de ^{13}C de (*E*)-3-(4-metóxi)fenilacriloidrazida (**18**) (75 MHz, $\text{DMSO-}d_6$).

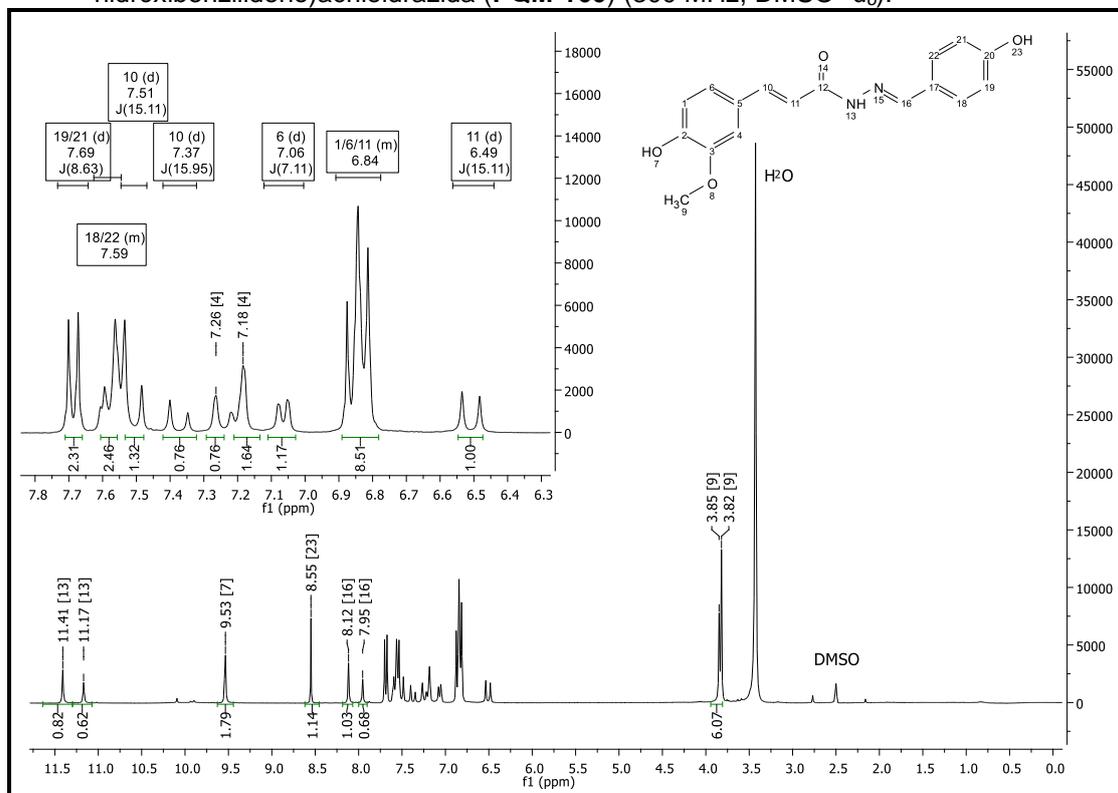
Fonte: do autor.

Figura A4 - Espectro de absorção na região do IV de (*E*)-3-(4-hidróxi-3-metóxi-fenil)-*N*-(4-hidróxi-benzilideno)acriloidrazida (**PQM-160**) (ATR).



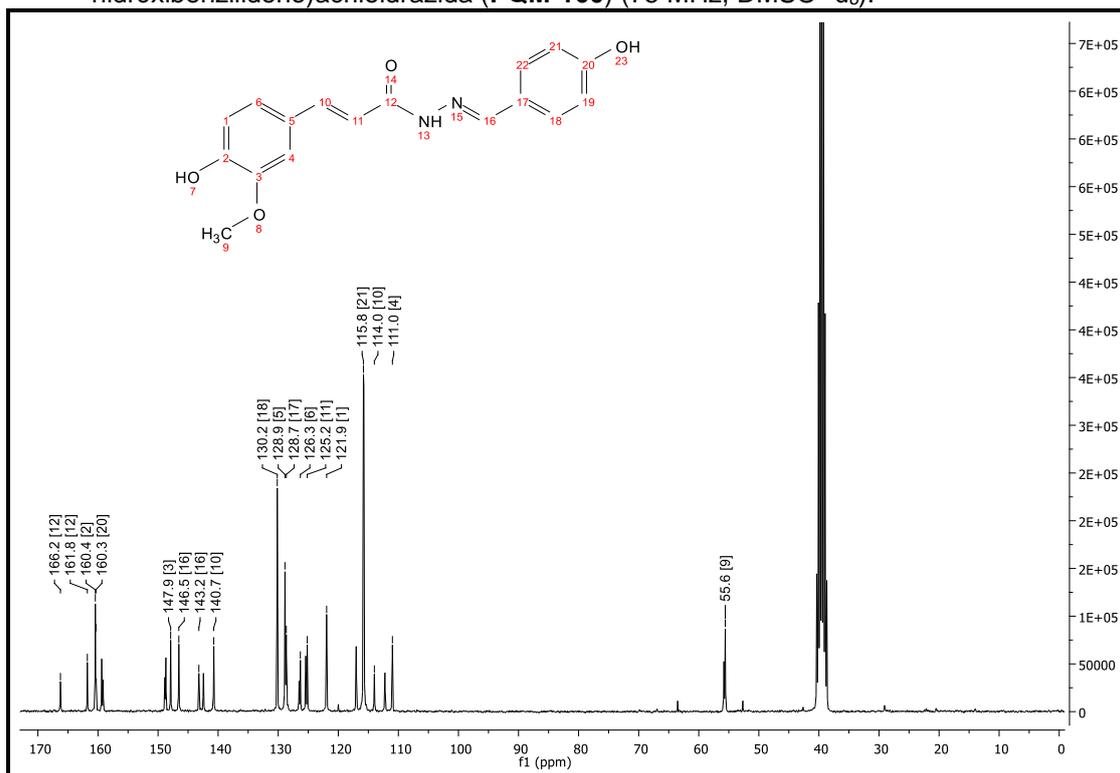
Fonte: do autor.

Figura A5 - Espectro de RMN de ^1H de (*E*)-3-(4-hidróxi-3-metóxi-fenil)-*N*-(4-hidróxi-benzilideno)acriloidrazida (**PQM-160**) (300 MHz, $\text{DMSO-}d_6$).



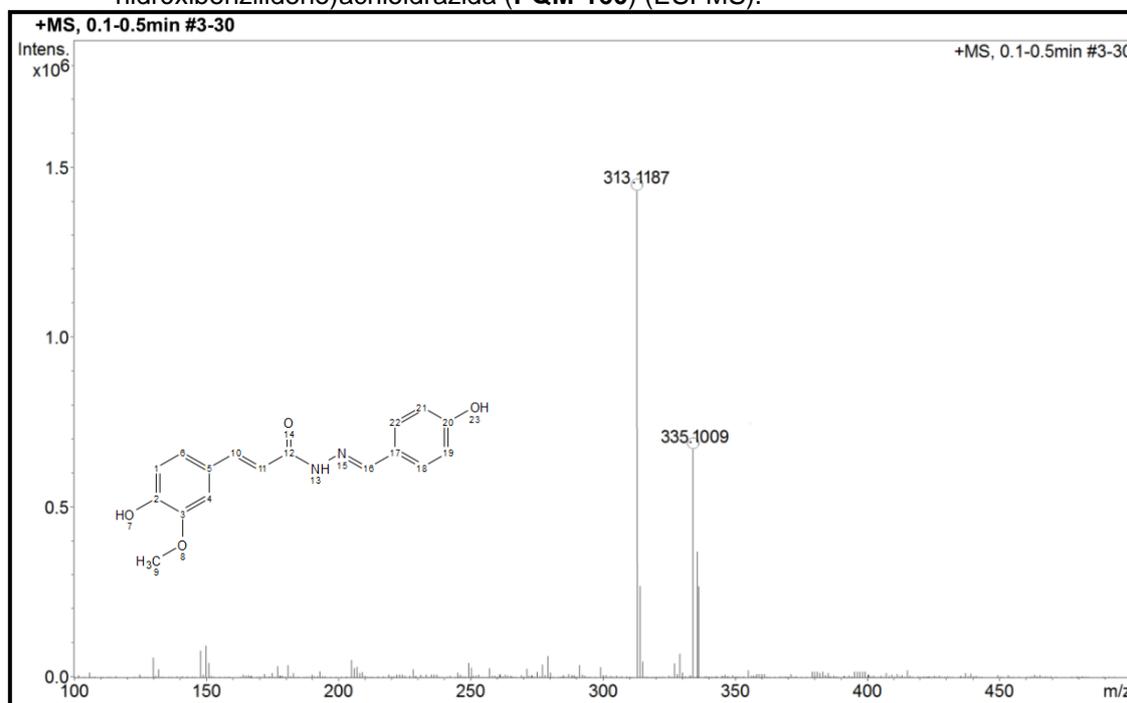
Fonte: do autor.

Figura A6 - Espectro de RMN de ^{13}C de (*E*)-3-(4-hidróxi-3-metóxi-fenil)-*N*-(4-hidróxi-benzilideno)acriloidrazida (**PQM-160**) (75 MHz, $\text{DMSO-}d_6$).



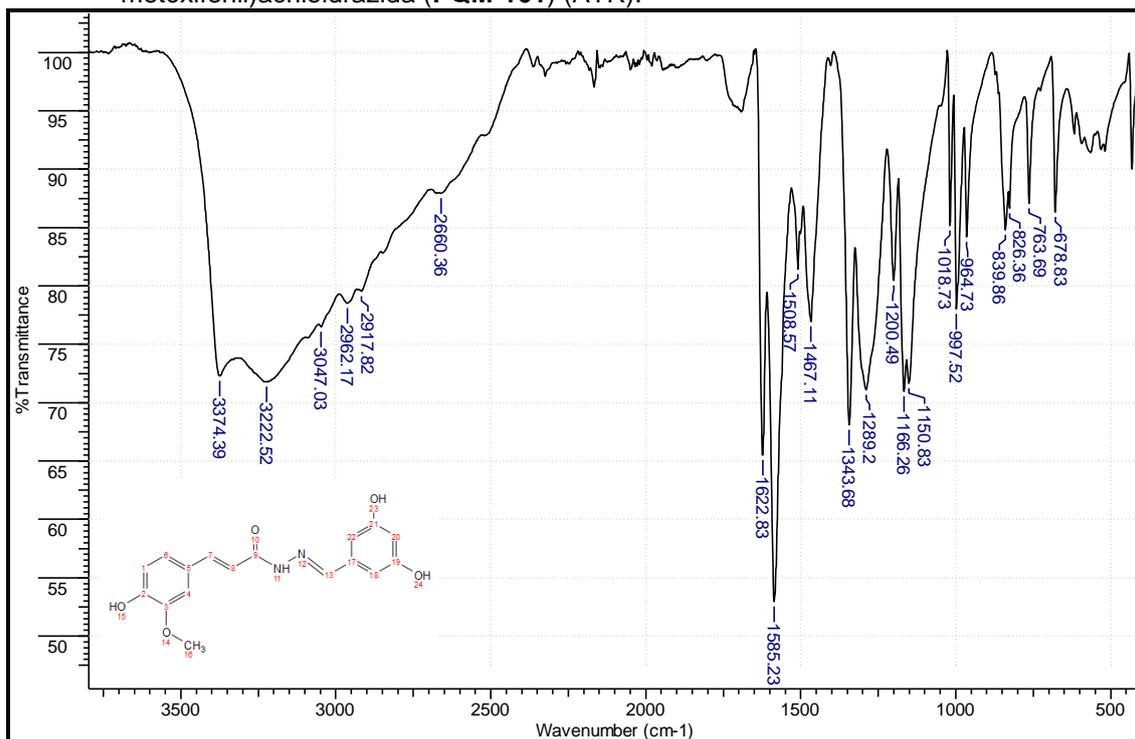
Fonte: do autor.

Figura A7 - Espectro de massas de (*E*)-3-(4-hidróxi-3-metóxi-fenil)-*N*-(4-hidróxi-benzilideno)acriloidrazida (**PQM-160**) (ESI-MS).



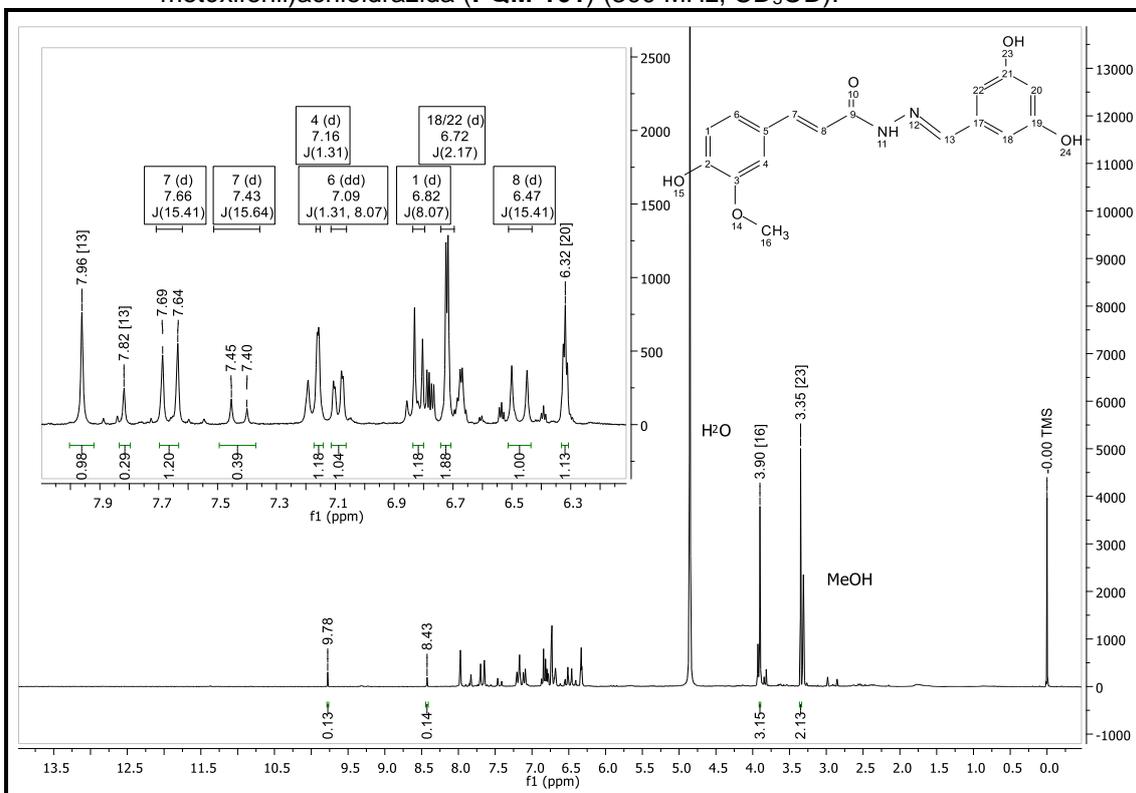
Fonte: do autor.

Figura A8 - Espectro de absorção na região do IV de (*E*)-*N'*-(3,5-dihidróxibenzilideno)-3-(4-hidróxi-3-metóxi-fenil)acriloidrazida (**PQM-161**) (ATR).



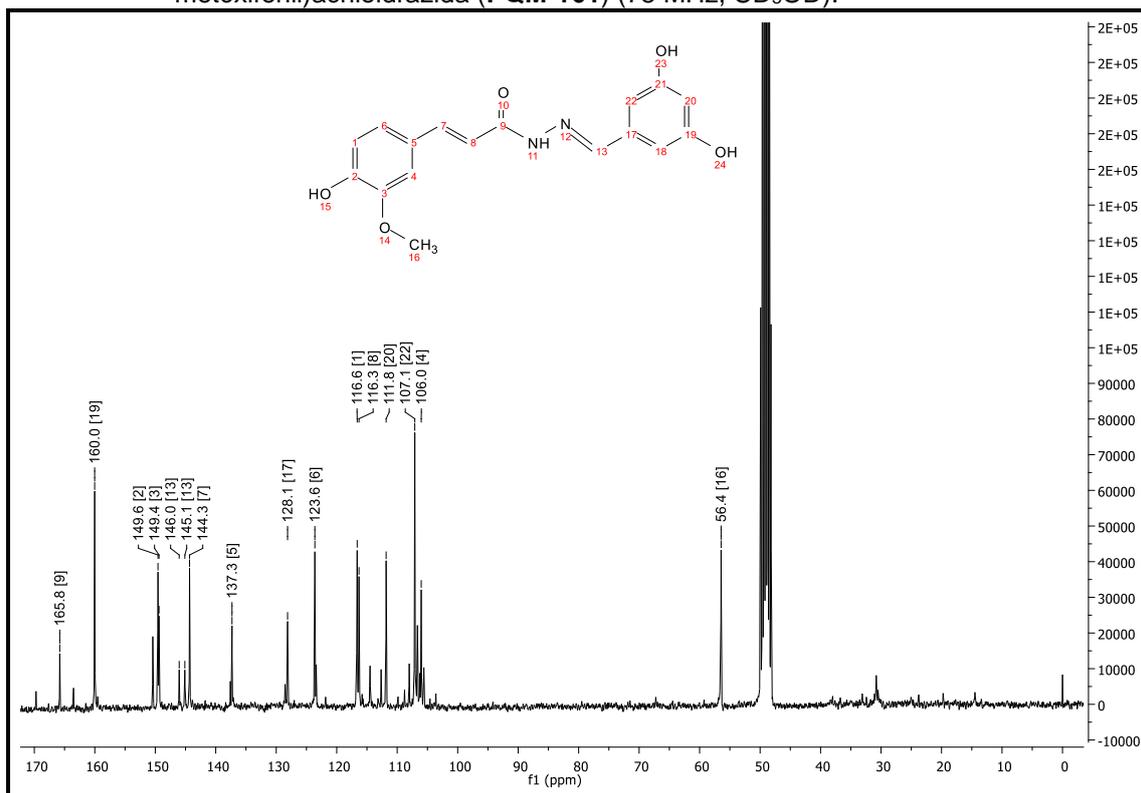
Fonte: do autor.

Figura A9 - Espectro de RMN de ¹H de (*E*)-*N'*-(3,5-dihidróxibenzilideno)-3-(4-hidróxi-3-metóxi-fenil)acriloidrazida (**PQM-161**) (300 MHz, CD₃OD).



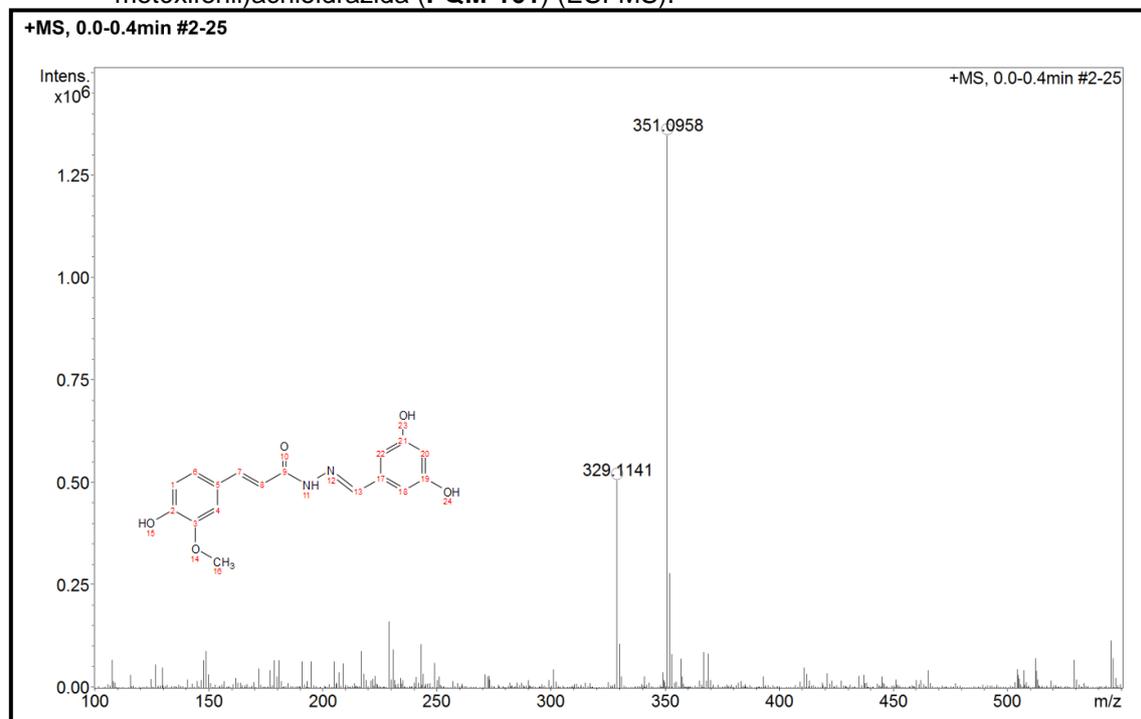
Fonte: do autor.

Figura A10 - Espectro de RMN de ^{13}C de (*E*)-*N'*-(3,5-dihidróxibenzilideno)-3-(4-hidróxi-3-metóxi-fenil)acriloidrazida (**PQM-161**) (75 MHz, CD_3OD).



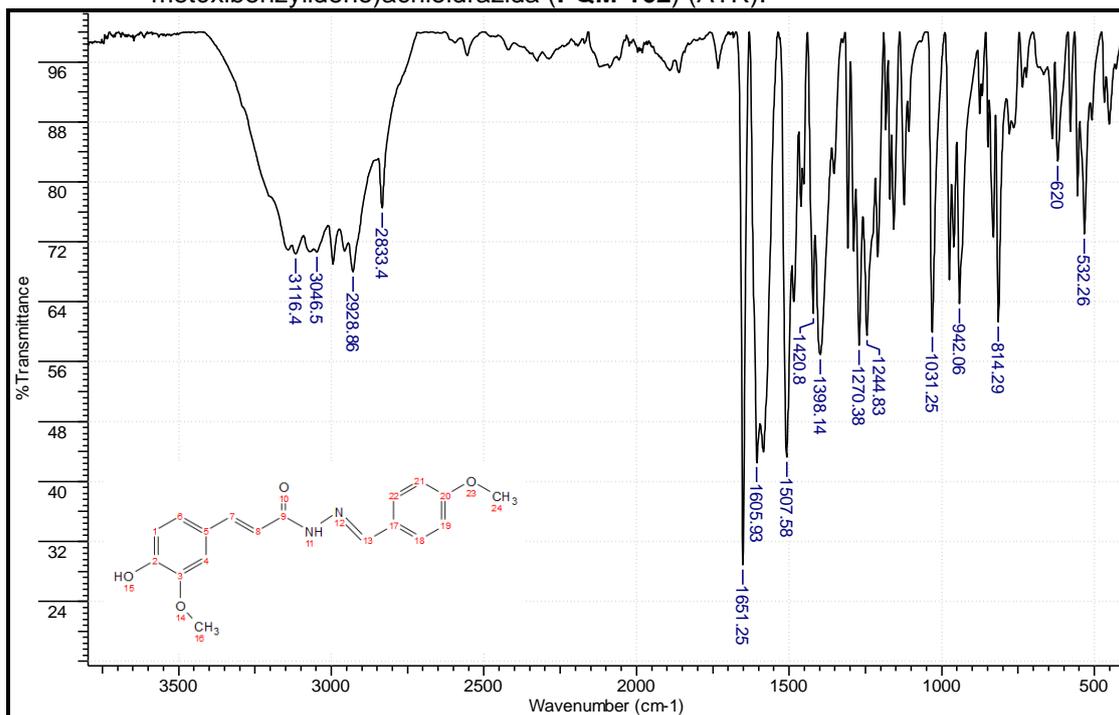
Fonte: do autor.

Figura A11 - Espectro de massas de (*E*)-*N'*-(3,5-dihidróxibenzilideno)-3-(4-hidróxi-3-metóxi-fenil)acriloidrazida (**PQM-161**) (ESI-MS).



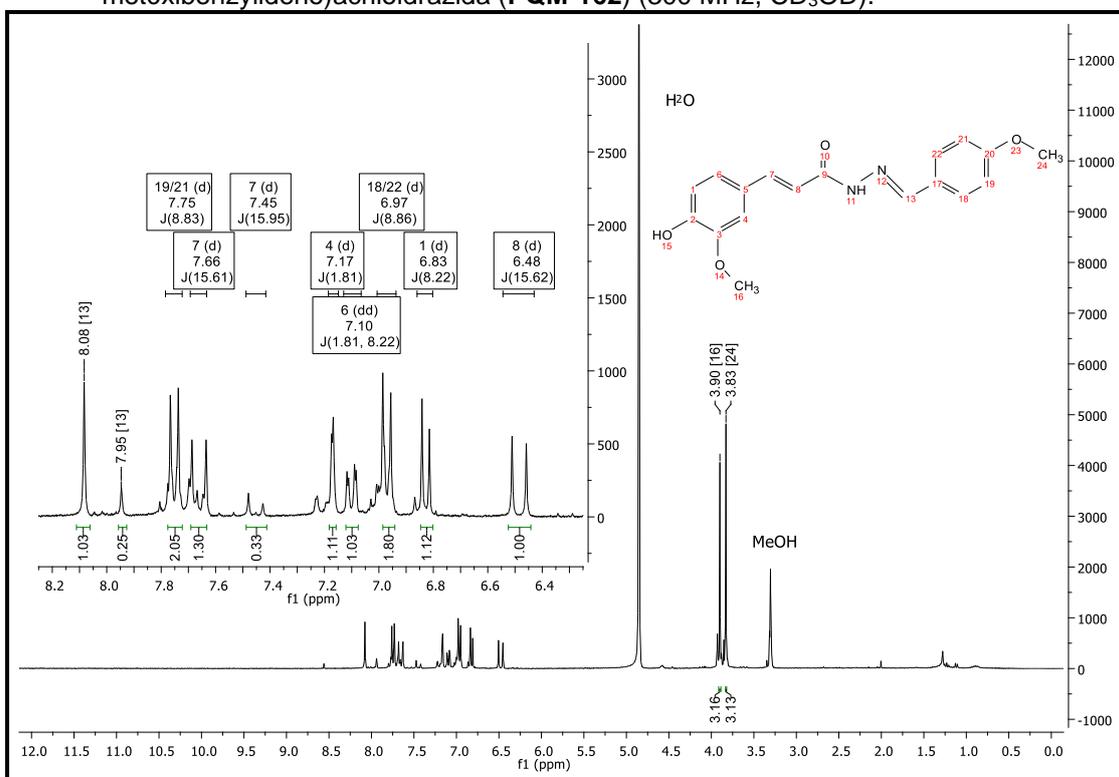
Fonte: do autor.

Figura A12 - Espectro de absorção na região do IV de (*E*)-3-(4-hidróxi-3-metóxi-fenil)-*N'*-(4-metóxi-benzilideno)acriloidrazida (**PQM-162**) (ATR).



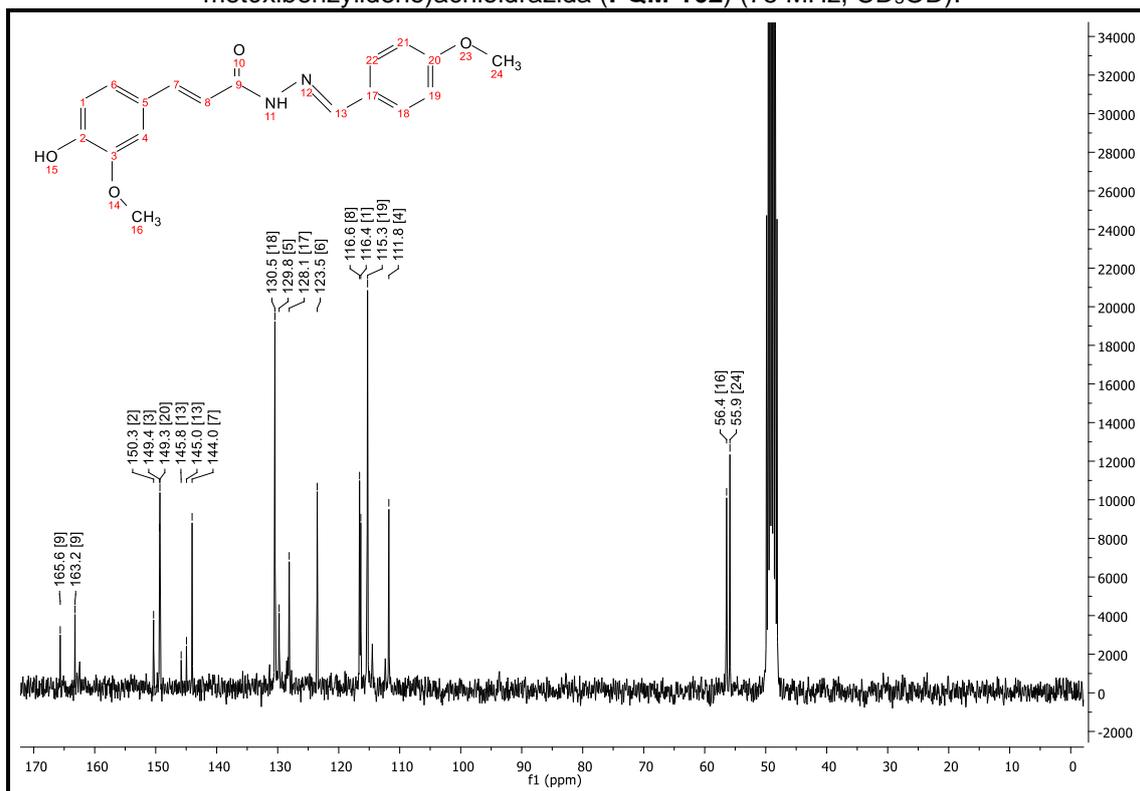
Fonte: do autor.

Figura A13 - Espectro de RMN de ¹H de (*E*)-3-(4-hidróxi-3-metóxi-fenil)-*N'*-(4-metóxi-benzilideno)acriloidrazida (**PQM-162**) (300 MHz, CD₃OD).



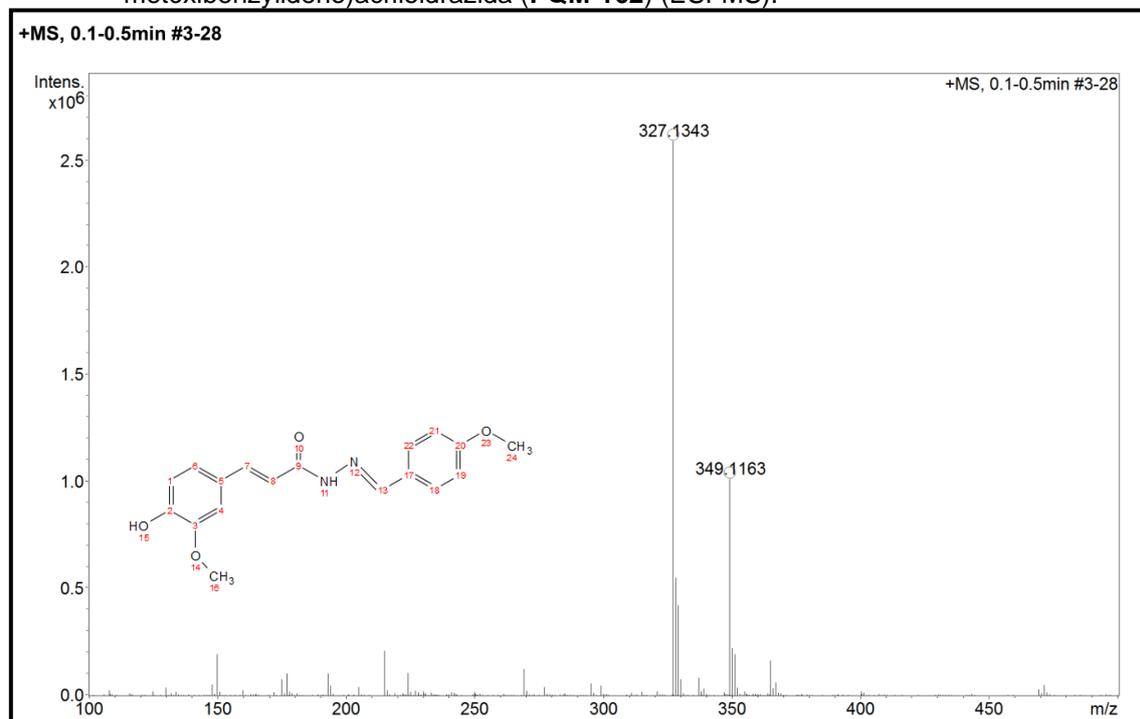
Fonte: do autor.

Figura A14 - Espectro de RMN de ^{13}C de (*E*)-3-(4-hidróxi-3-metóxi-fenil)-*N'*-(4-metóxi-benzilideno)acriloidrazida (**PQM-162**) (75 MHz, CD_3OD).



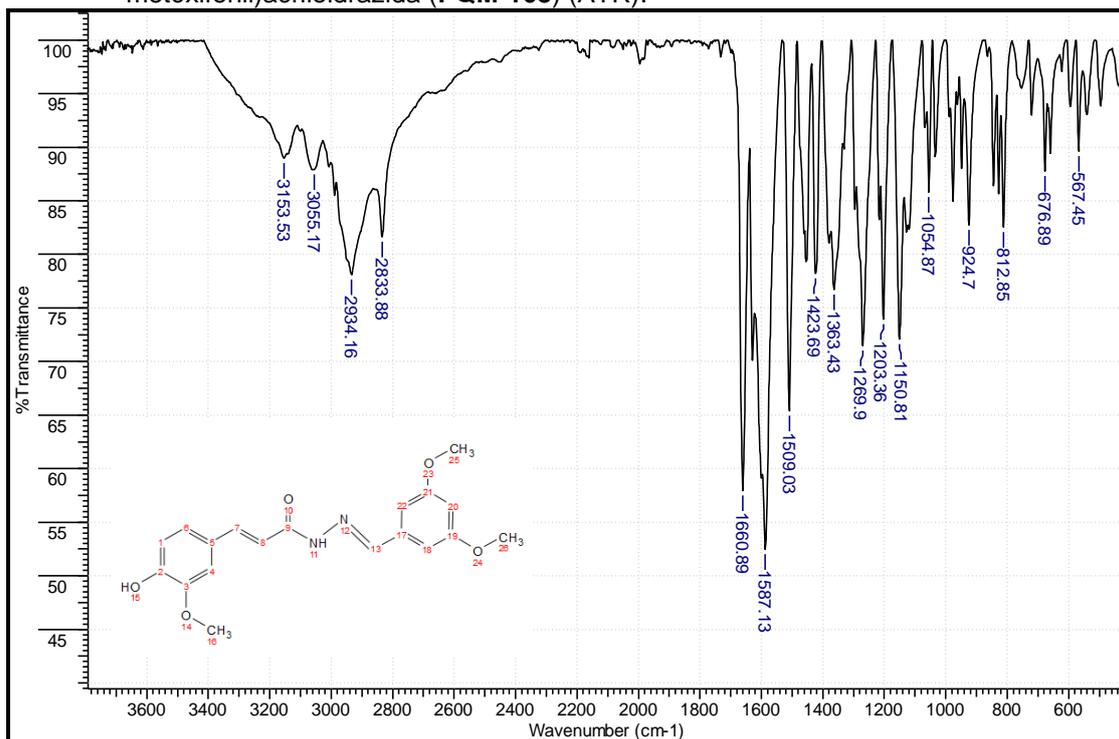
Fonte: do autor.

Figura A15 - Espectro de massas de (*E*)-3-(4-hidróxi-3-metóxi-fenil)-*N'*-(4-metóxi-benzilideno)acriloidrazida (**PQM-162**) (ESI-MS).



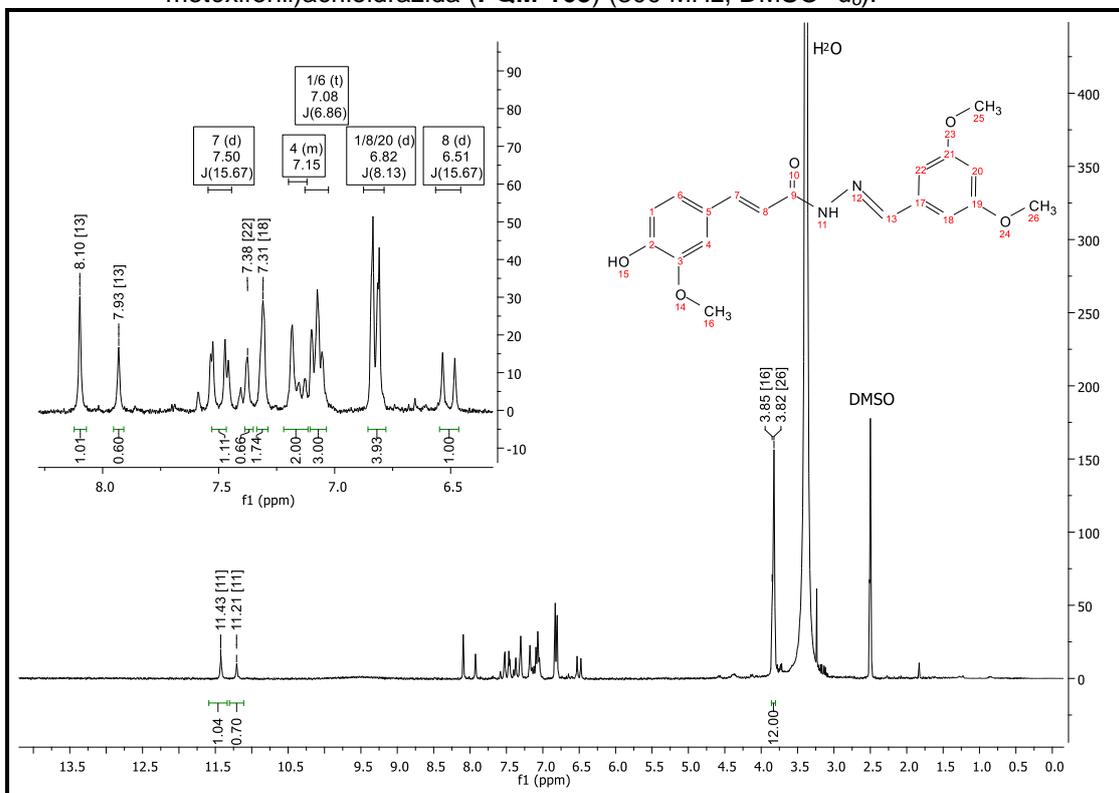
Fonte: do autor.

Figura A16 - Espectro de absorção na região do IV de (*E*)-*N'*-(3,5-dimetóxi benzilideno)-3-(4-hidróxi-3-metóxi fenil)acriloidrazida (**PQM-163**) (ATR).



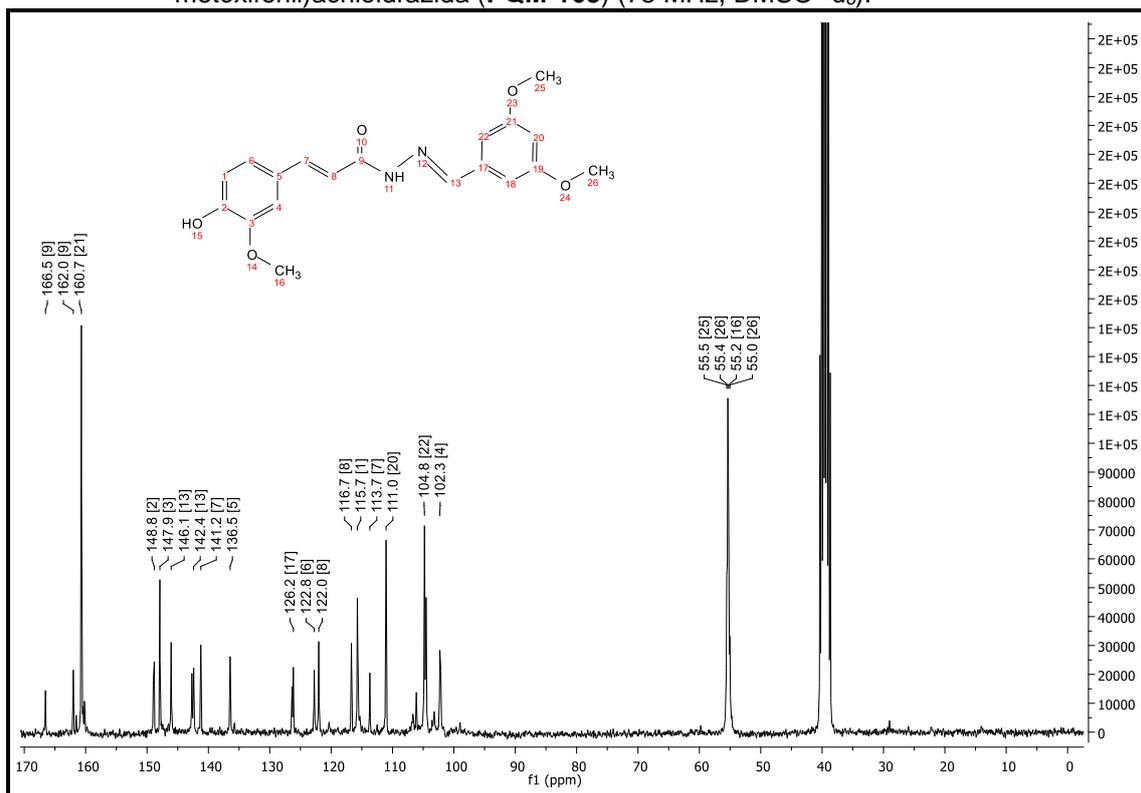
Fonte: do autor.

Figura A17 - Espectro de RMN de ¹H de (*E*)-*N'*-(3,5-dimetóxi benzilideno)-3-(4-hidróxi-3-metóxi fenil)acriloidrazida (**PQM-163**) (300 MHz, DMSO-*d*₆).



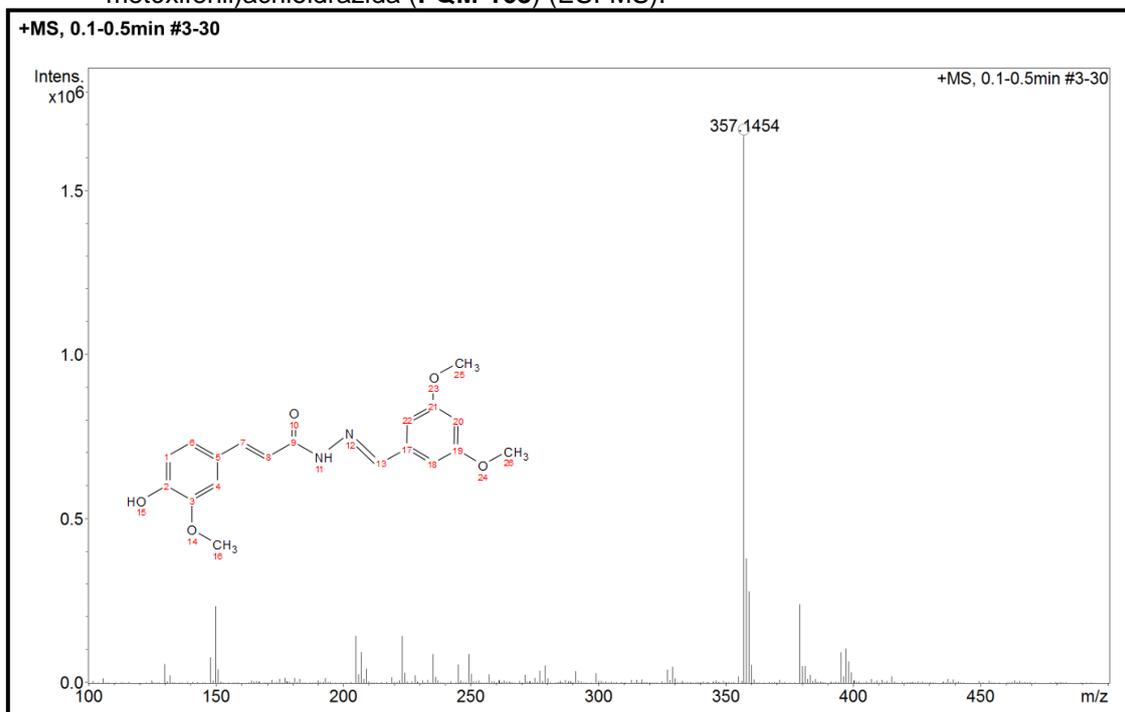
Fonte: do autor.

Figura A18 - Espectro de RMN de ^{13}C de (*E*)-*N'*-(3,5-dimetóxi-benzilideno)-3-(4-hidróxi-3-metóxi-fenil)acriloidrazida (**PQM-163**) (75 MHz, DMSO- d_6).



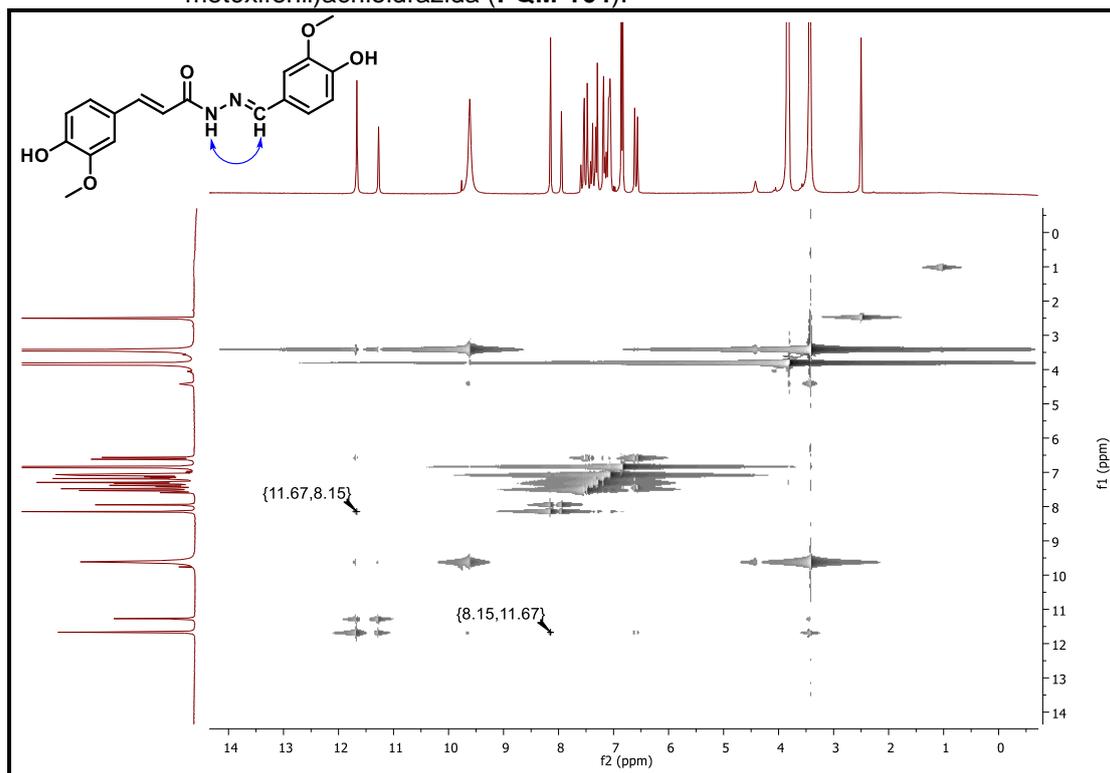
Fonte: do autor.

Figura A19 - Espectro de massas de (*E*)-*N'*-(3,5-dimetóxi-benzilideno)-3-(4-hidróxi-3-metóxi-fenil)acriloidrazida (**PQM-163**) (ESI-MS).



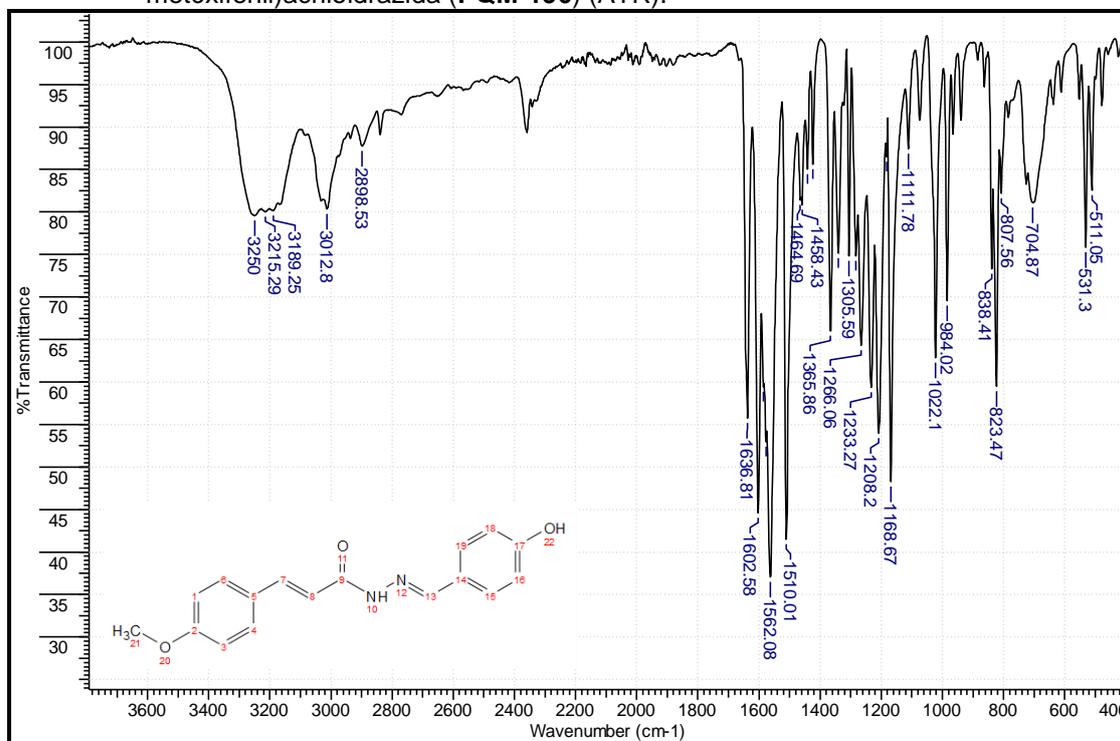
Fonte: do autor.

Figura A 20 - Mapa de correlação Noesy de 2-*N*-(4-hidróxi-3-metóxi-benzil)-3-(4-hidróxi-3-metóxi-fenil)acriloidrazida (**PQM-164**).



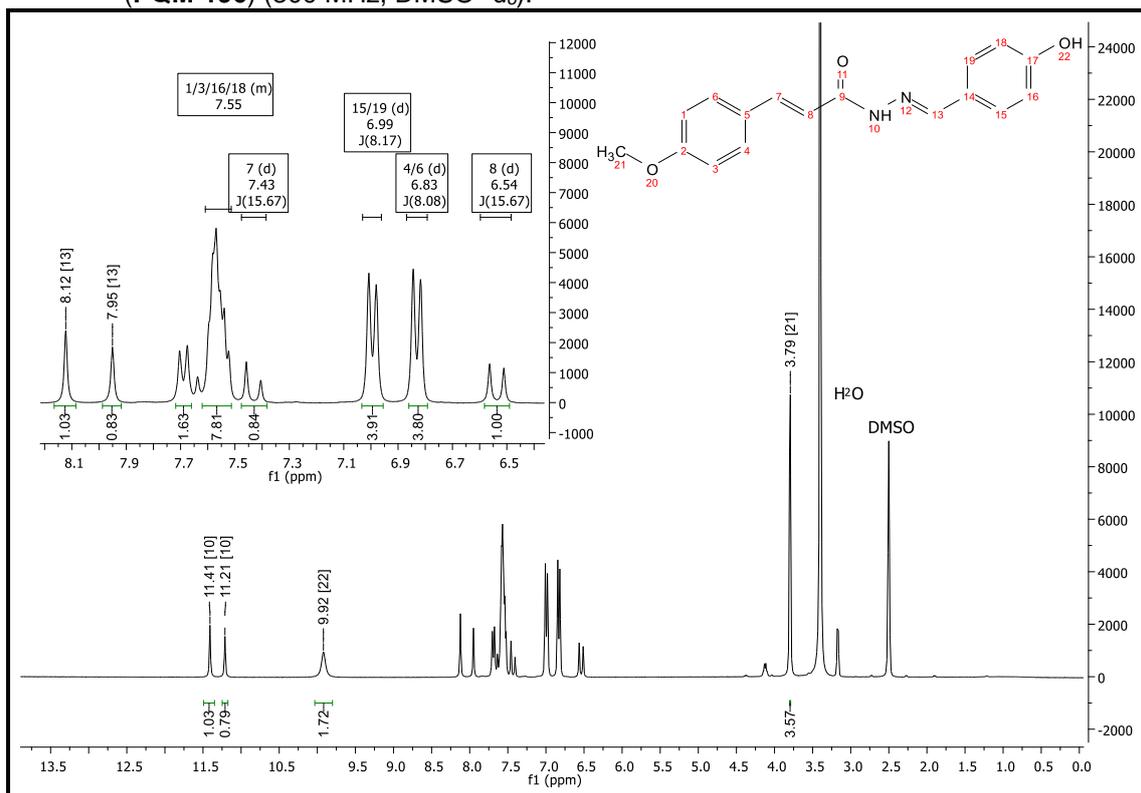
Fonte: do autor.

Figura A21 - Espectro de absorção na região do IV de (*E*)-*N'*-((*E*)-4-hidróxi-benzilideno)-3-(4-metóxi-fenil)acriloidrazida (**PQM-196**) (ATR).



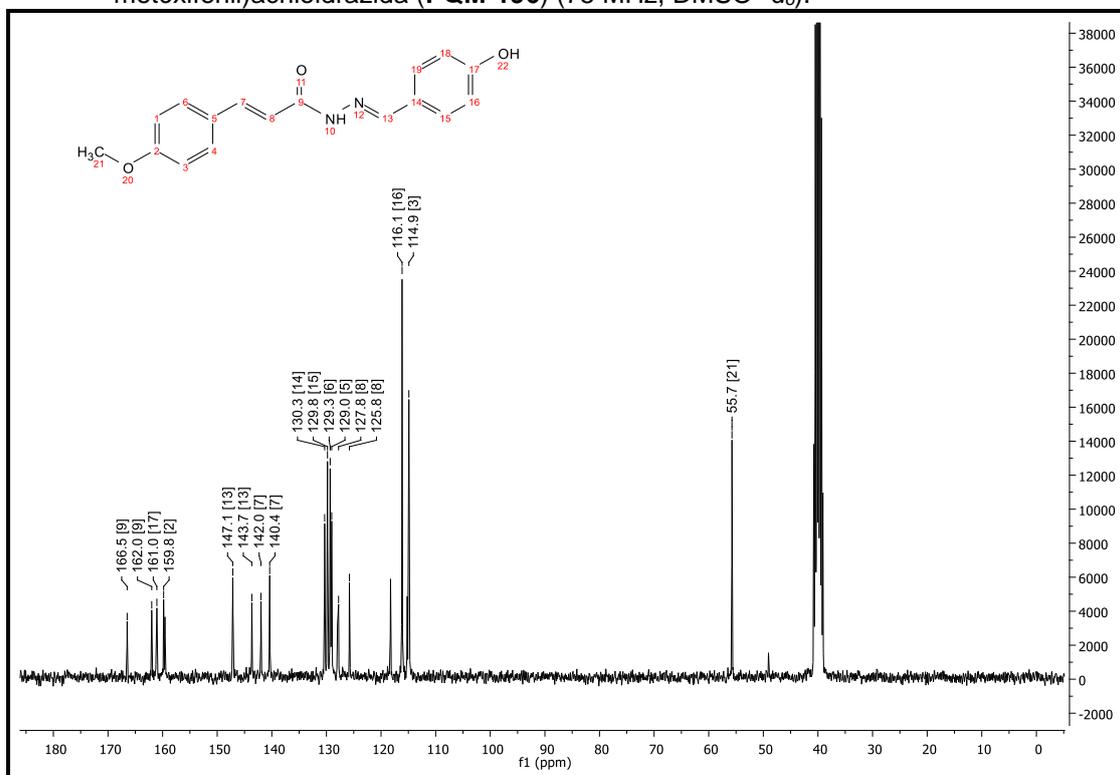
Fonte: do autor.

Figura A22 - Espectro de RMN de ^1H de (*E*)-*N'*-((*E*)-4-hidróxibenzilideno)-3-(4-metóxfenil)acriloidrazida (**PQM-196**) (300 MHz, $\text{DMSO-}d_6$).



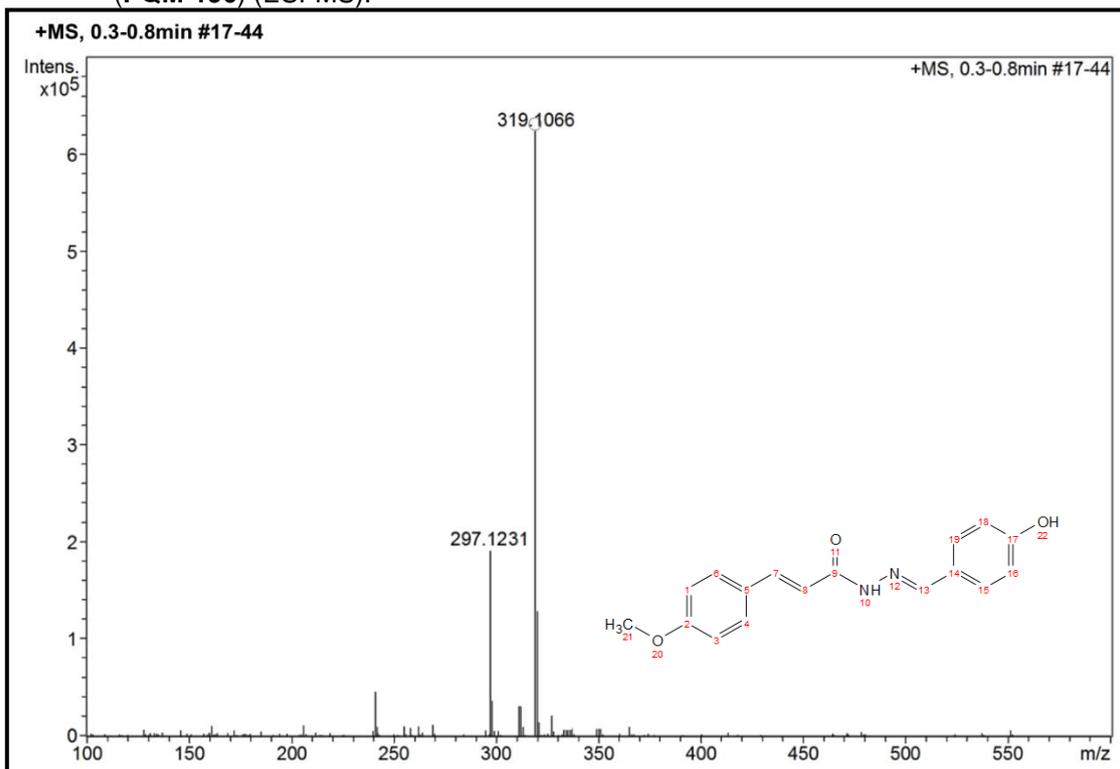
Fonte: do autor.

Figura A23 - Espectro de RMN de ^{13}C de (*E*)-*N'*-((*E*)-4-hidróxibenzilideno)-3-(4-metóxfenil)acriloidrazida (**PQM-196**) (75 MHz, $\text{DMSO-}d_6$).



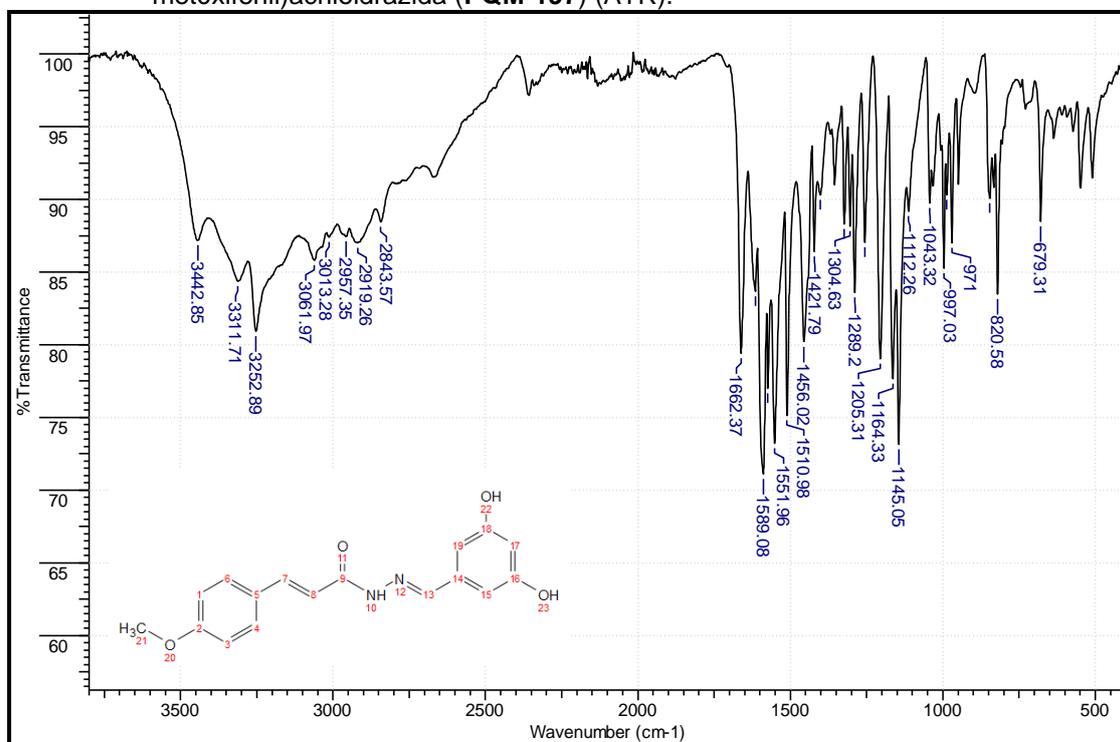
Fonte: do autor.

Figura A24 - Espectro de massas de (*E*)-*N'*-((*E*)-4-hidróxibenzilideno)-3-(4-metóxfenil)acriloidrazida (**PQM-196**) (ESI-MS).



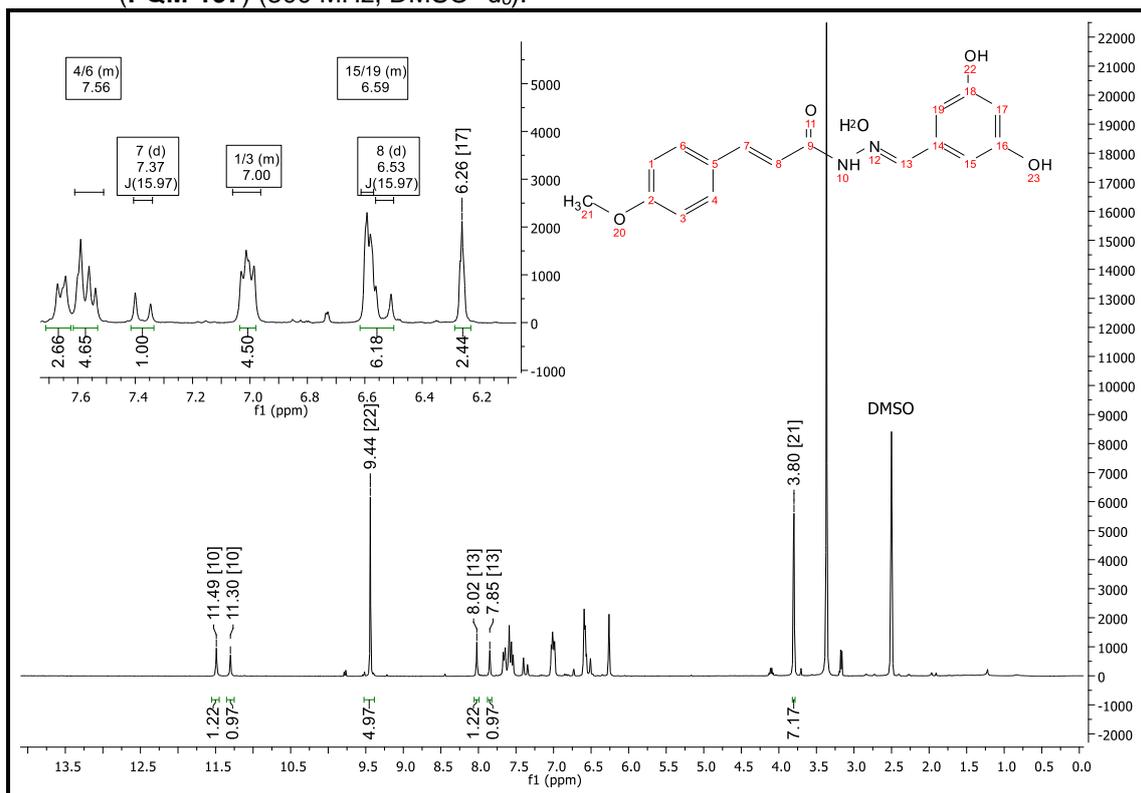
Fonte: do autor.

Figura A25 - Espectro de absorção na região do IV de *N'*-(3,5-dihidróxibenzilideno)-3-(4-metóxfenil)acriloidrazida (**PQM-197**) (ATR).



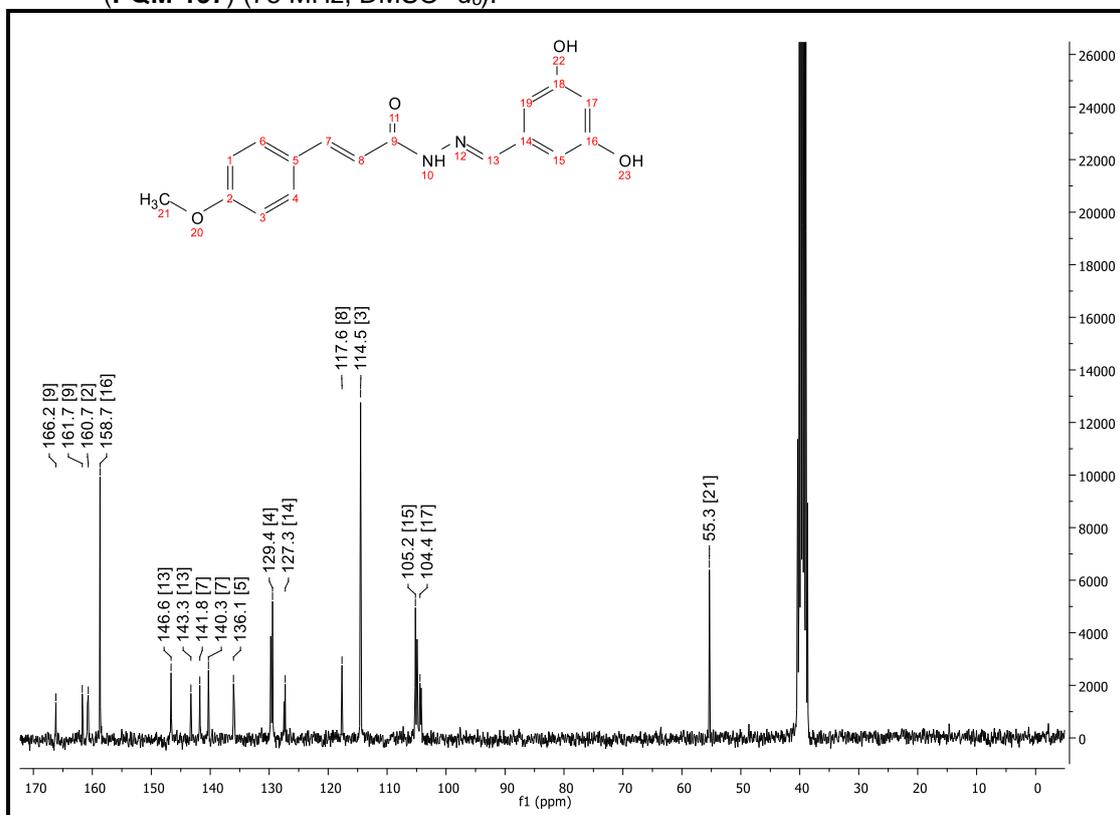
Fonte: do autor.

Figura A26 - Espectro de RMN de ^1H de *N'*-(3,5-dihidróxibenzilideno)-3-(4-metóxfenil)acriloidrazida (PQM-197) (300 MHz, $\text{DMSO-}d_6$).



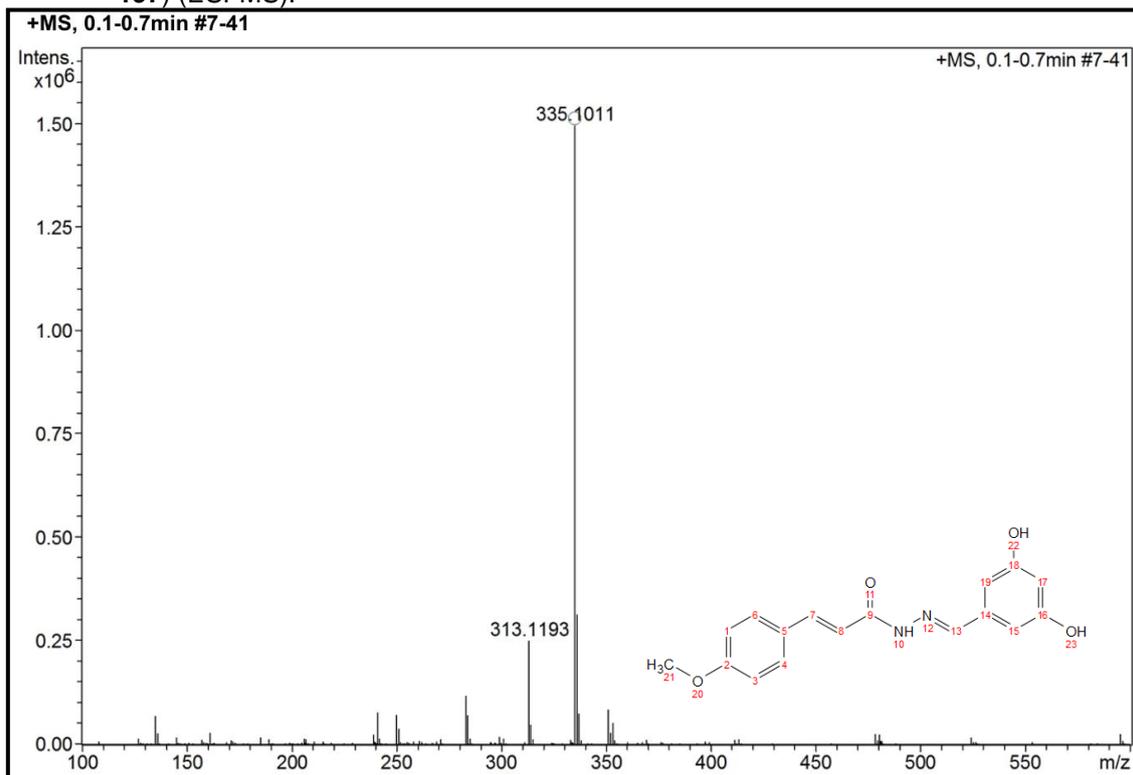
Fonte: do autor.

Figura A27 - Espectro de RMN de ^{13}C de *N'*-(3,5-dihidróxibenzilideno)-3-(4-metóxfenil)acriloidrazida (PQM-197) (75 MHz, $\text{DMSO-}d_6$).



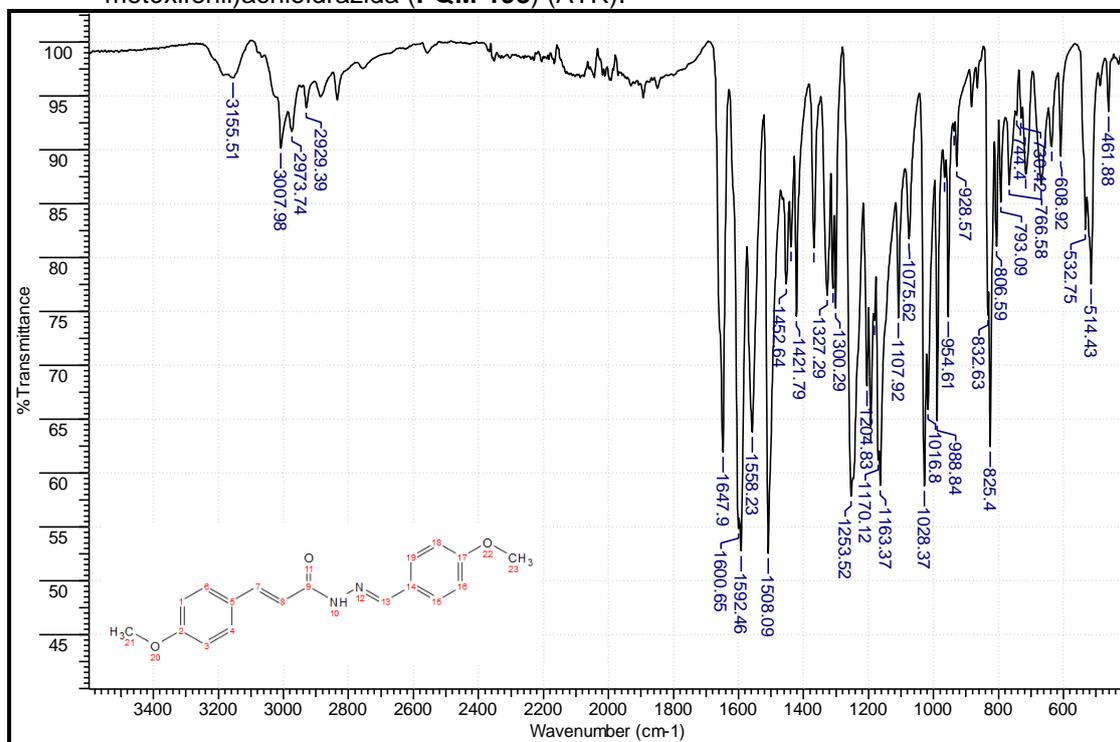
Fonte: do autor.

Figura A28 - Espectro de massas de *N'*-(3,5-dihidróxibenzilideno)-3-(4-metóxfenil)acriloidrazida (**PQM-197**) (ESI-MS).



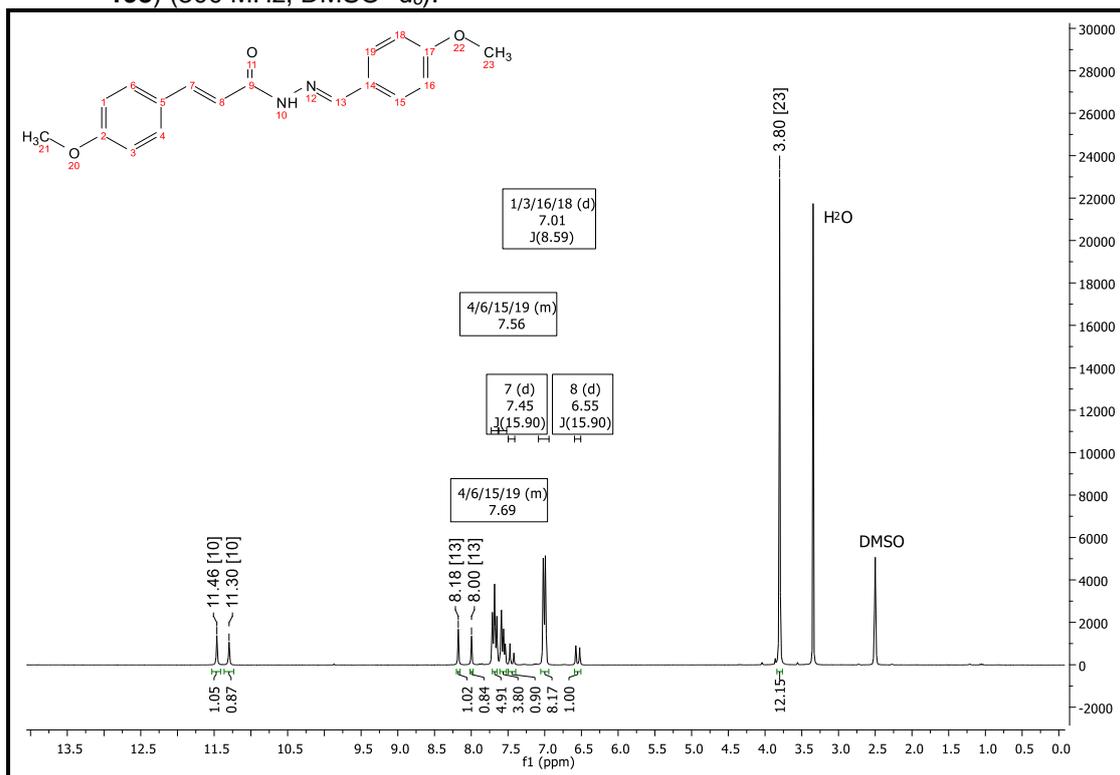
Fonte: do autor.

Figura A29 - Espectro de absorção na região do IV de *N'*-(4-metóxibenzilideno)-3-(4-metóxfenil)acriloidrazida (**PQM-198**) (ATR).



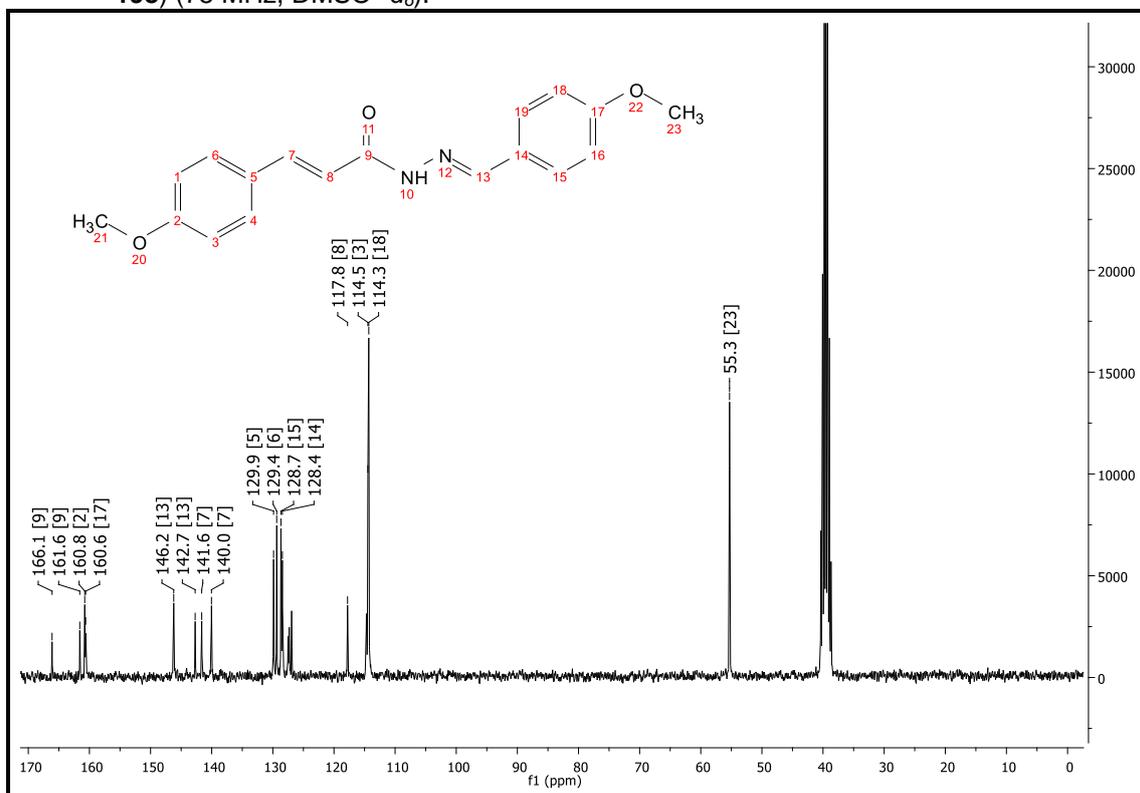
Fonte: do autor.

Figura A30 - Espectro de RMN de ^1H de *N*-(4-metóxi-benzilideno)-3-(4-metóxi-fenil)acriloidrazida (**PQM-198**) (300 MHz, $\text{DMSO-}d_6$).

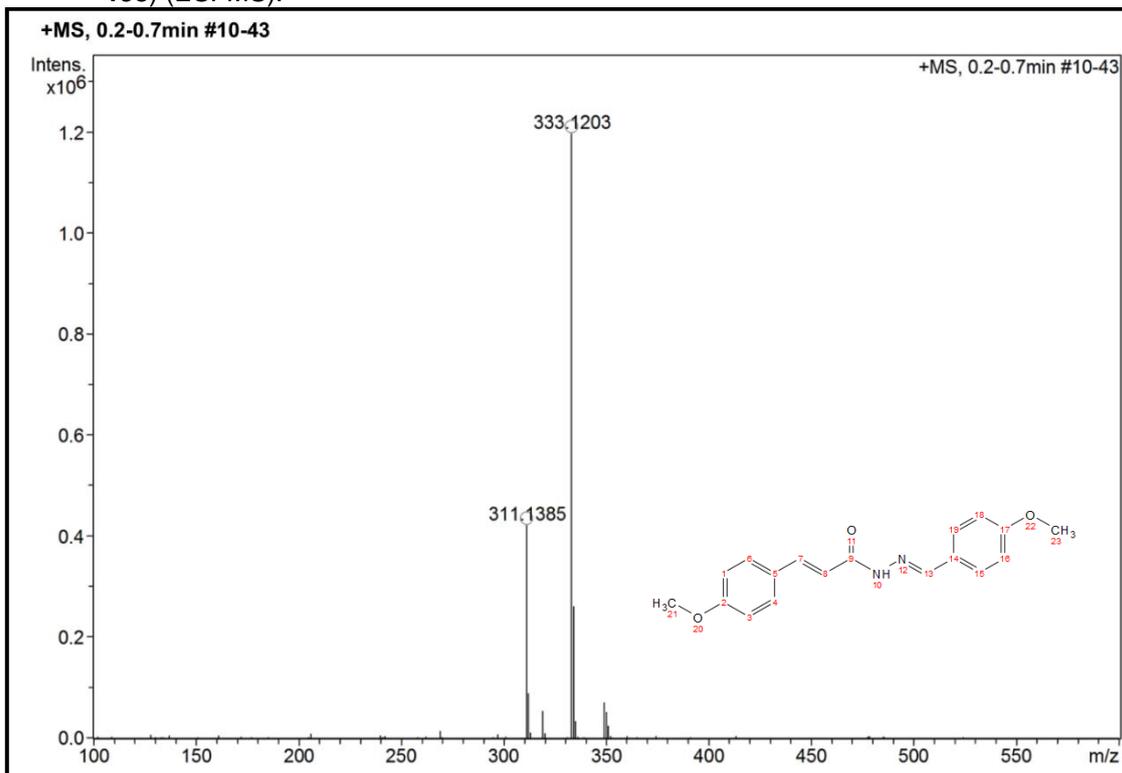


Fonte: do autor.

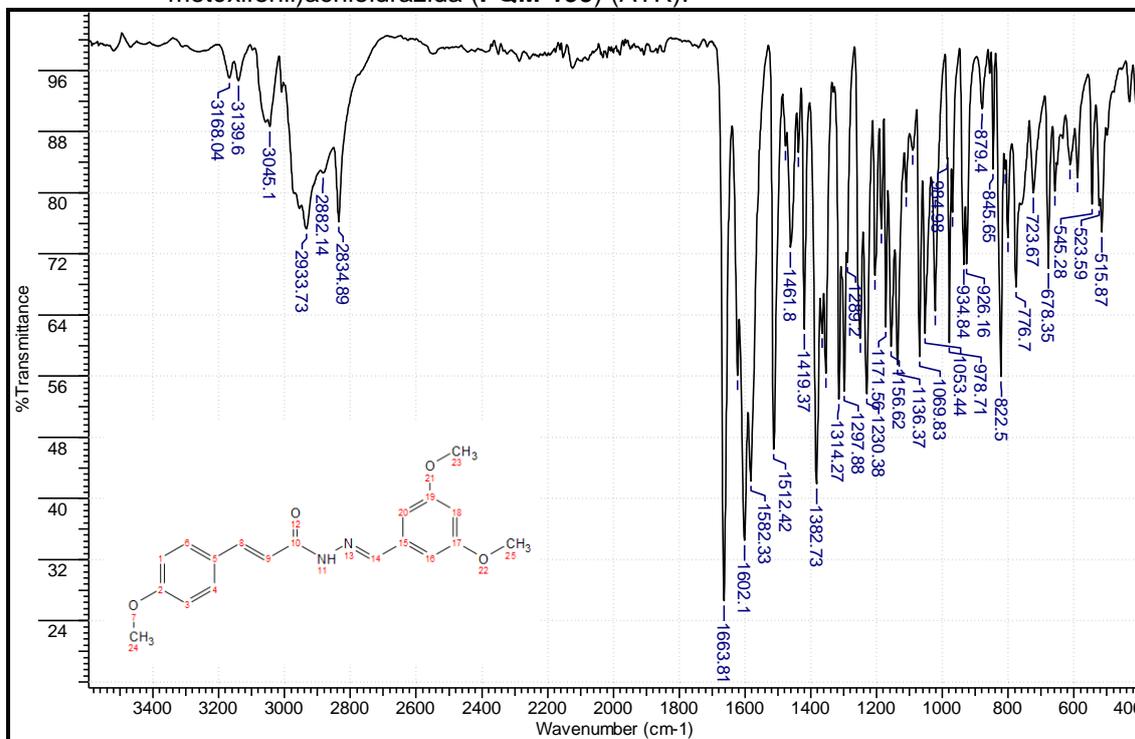
Figura A31 - Espectro de RMN de ^{13}C de *N*-(4-metóxi-benzilideno)-3-(4-metóxi-fenil)acriloidrazida (**PQM-198**) (75 MHz, $\text{DMSO-}d_6$).



Fonte: do autor.

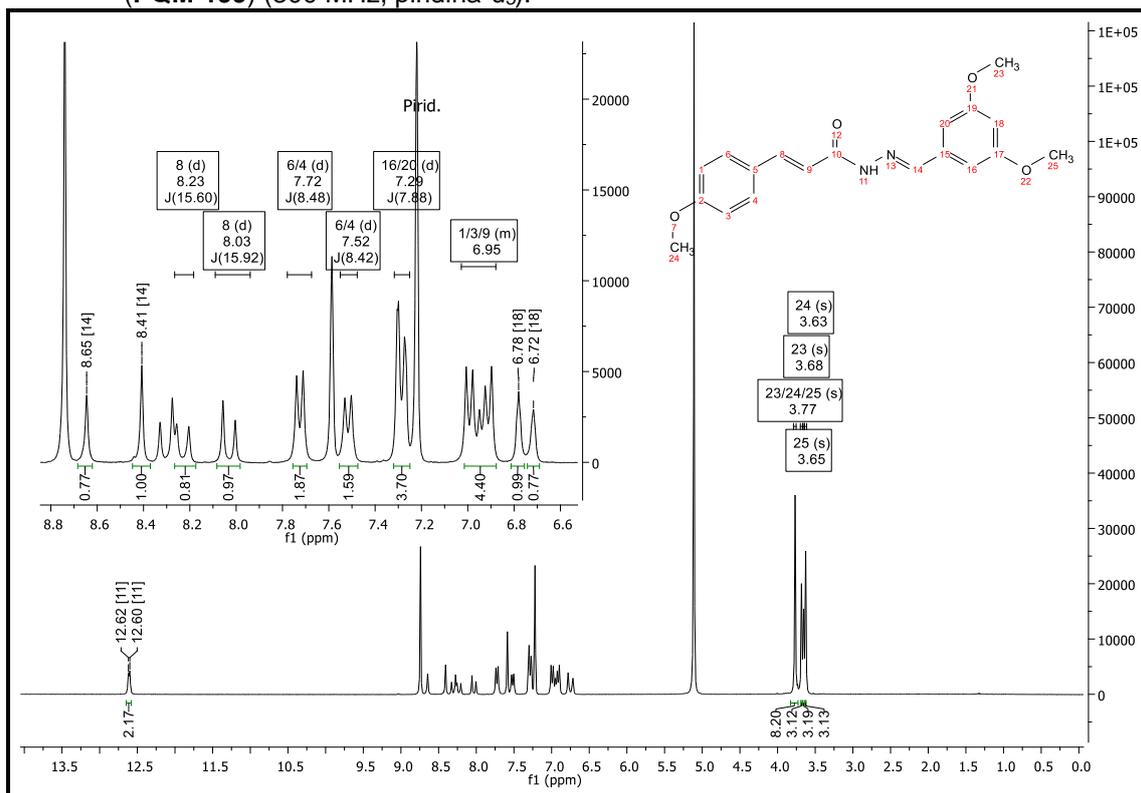
Figura A32 - Espectro de massas de *N*-(4-metóxi-benzilideno)-3-(4-metóxi-fenil)acriloidrazida (**PQM-198**) (ESI-MS).

Fonte: do autor.

Figura A33 - Espectro de absorção na região do IV de *N*-(3,5-dimeoxibenzilideno)-3-(4-metóxi-fenil)acriloidrazida (**PQM-199**) (ATR).

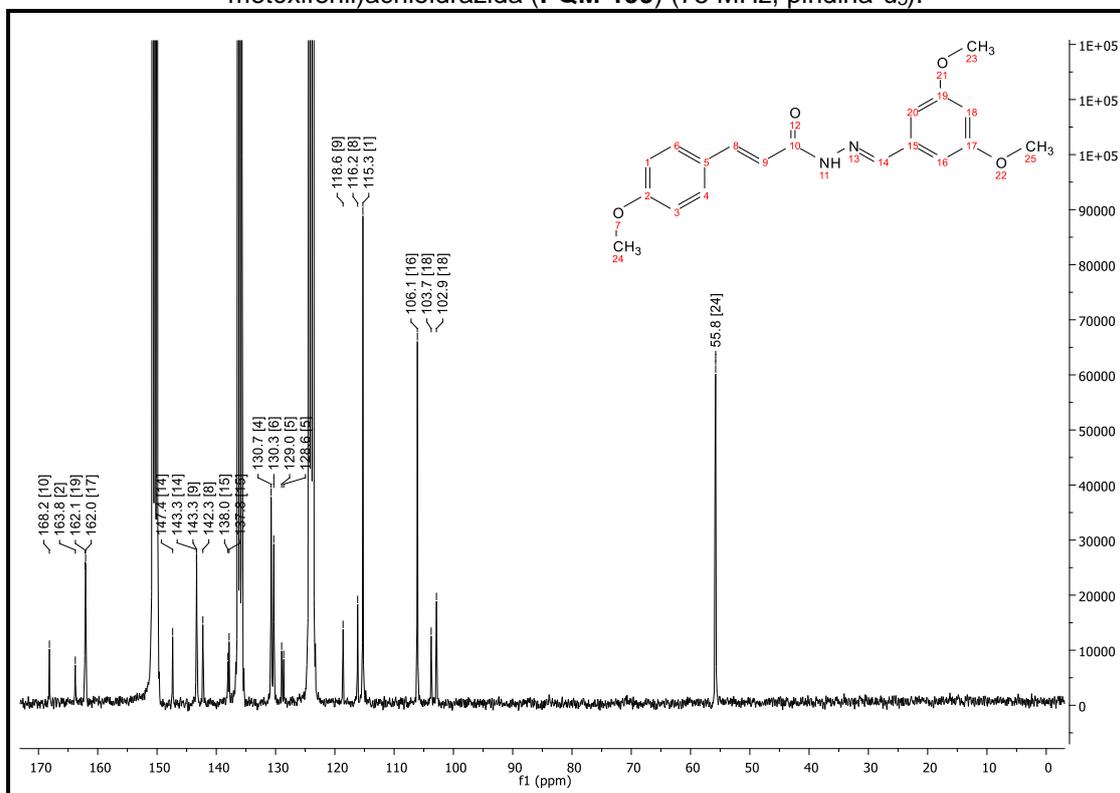
Fonte: do autor.

Figura A34 - Espectro de RMN de ^1H de *N*-(3,5-dimeoxibenilideno)-3-(4-metóxfenil)acriloidrazida (**PQM-199**) (300 MHz, piridina- d_5).



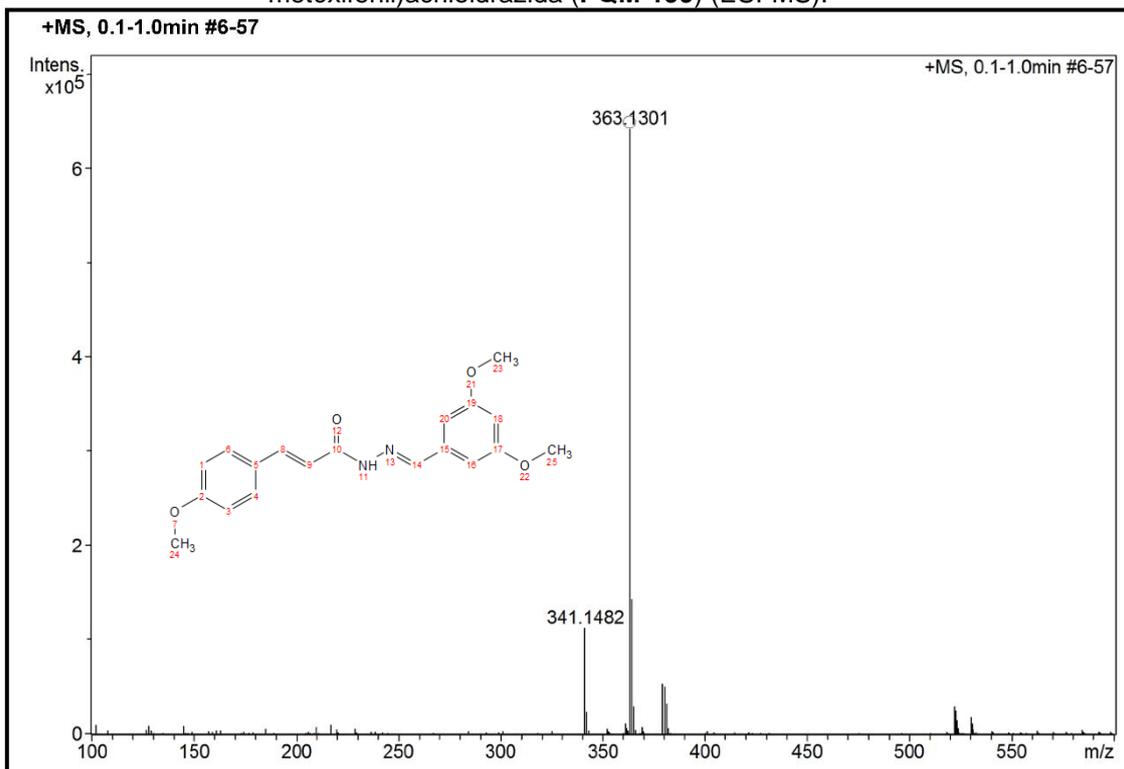
Fonte: do autor.

Figura A35 - Espectro de RMN de ^{13}C de *N*-(3,5-dimeoxibenilideno)-3-(4-metóxfenil)acriloidrazida (**PQM-199**) (75 MHz, piridina- d_5).



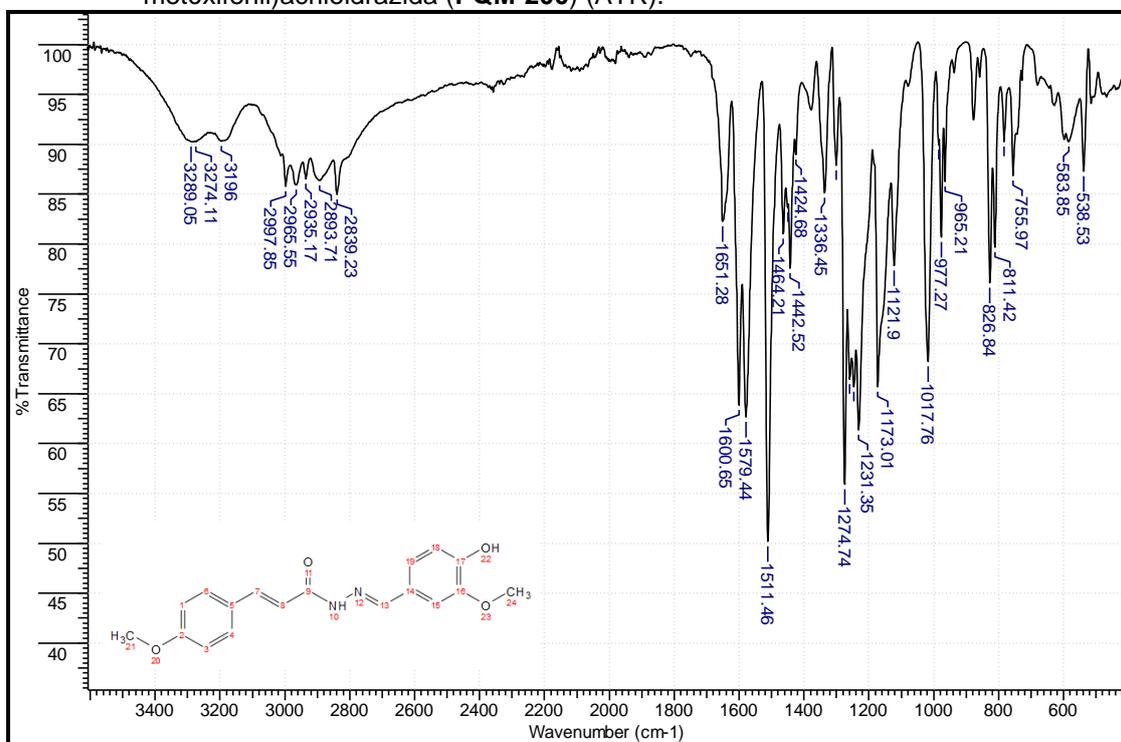
Fonte: do autor.

Figura A36 - Espectro de massas de *N*-(3,5-dimeoxibenzilideno)-3-(4-metóxfenil)acriloidrazida (**PQM-199**) (ESI-MS).



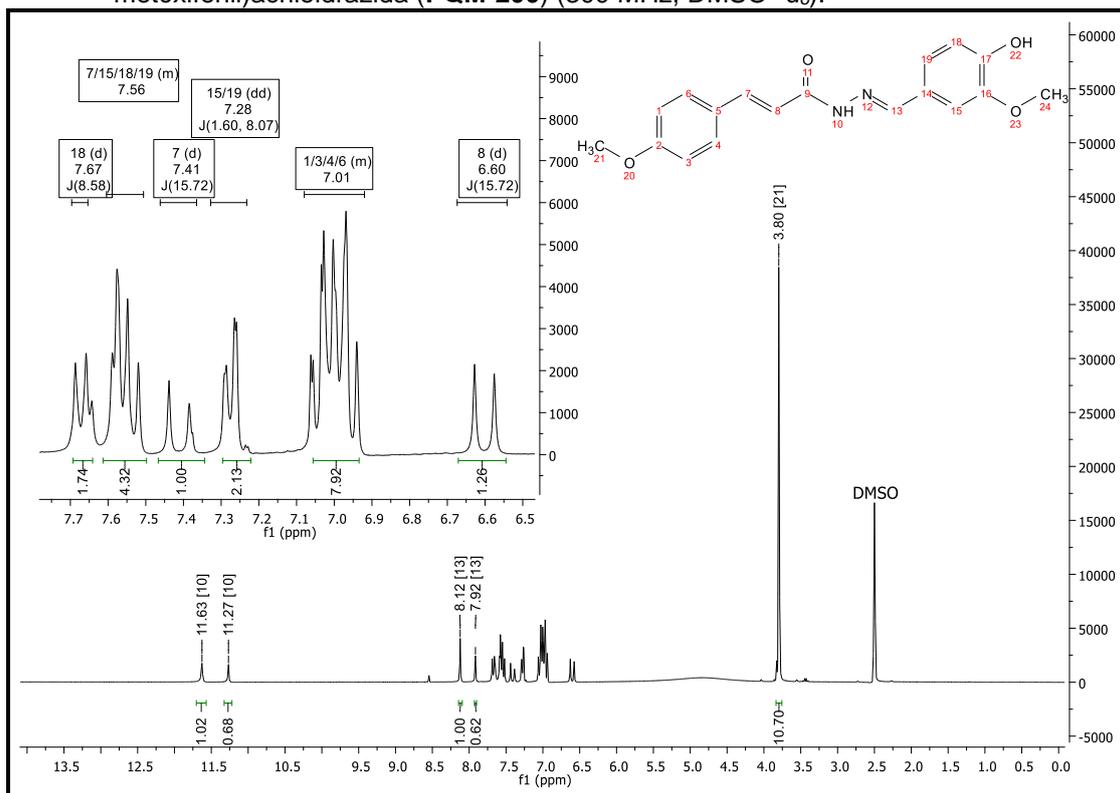
Fonte: do autor.

Figura A37 - Espectro de absorção na região do IV de *N*-(4-hidróxi-3-metóxi-benzilideno)-3-(4-metóxfenil)acriloidrazida (**PQM-200**) (ATR).



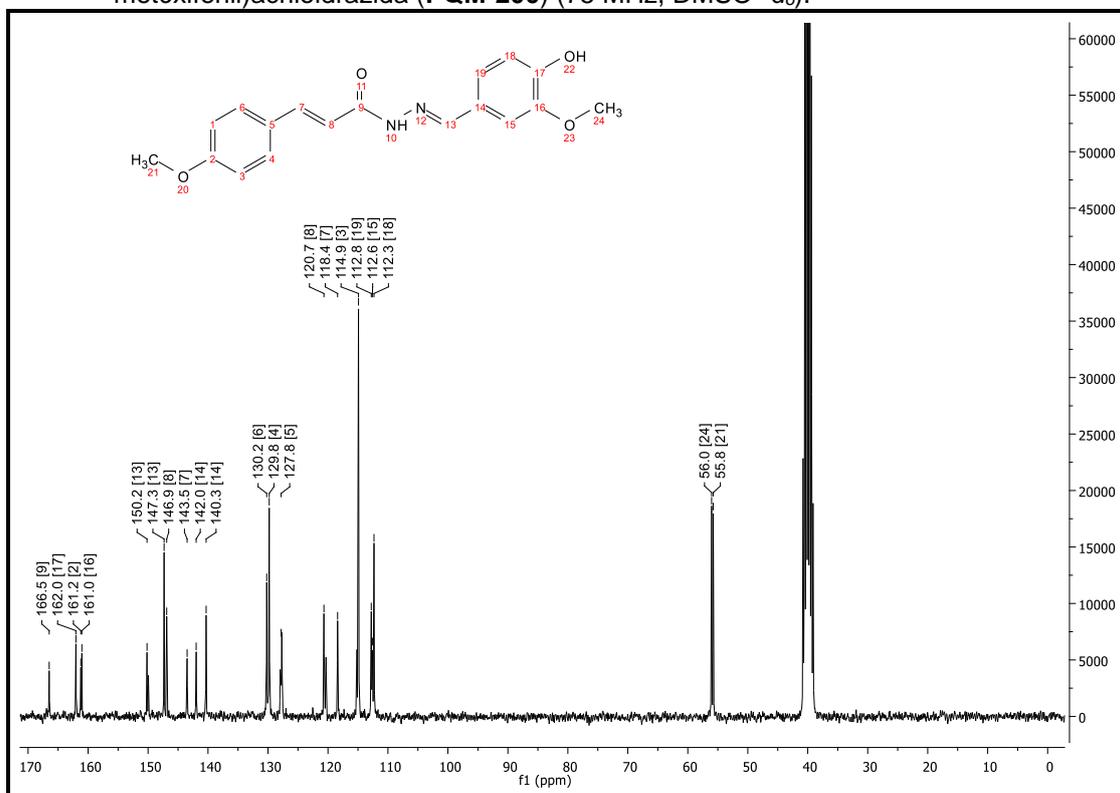
Fonte: do autor.

Figura A38 - Espectro de RMN de ^1H de *N*-(4-hidróxi-3-metóxi-benzilideno)-3-(4-metóxi-fenil)acriloidrazida (**PQM-200**) (300 MHz, $\text{DMSO-}d_6$).



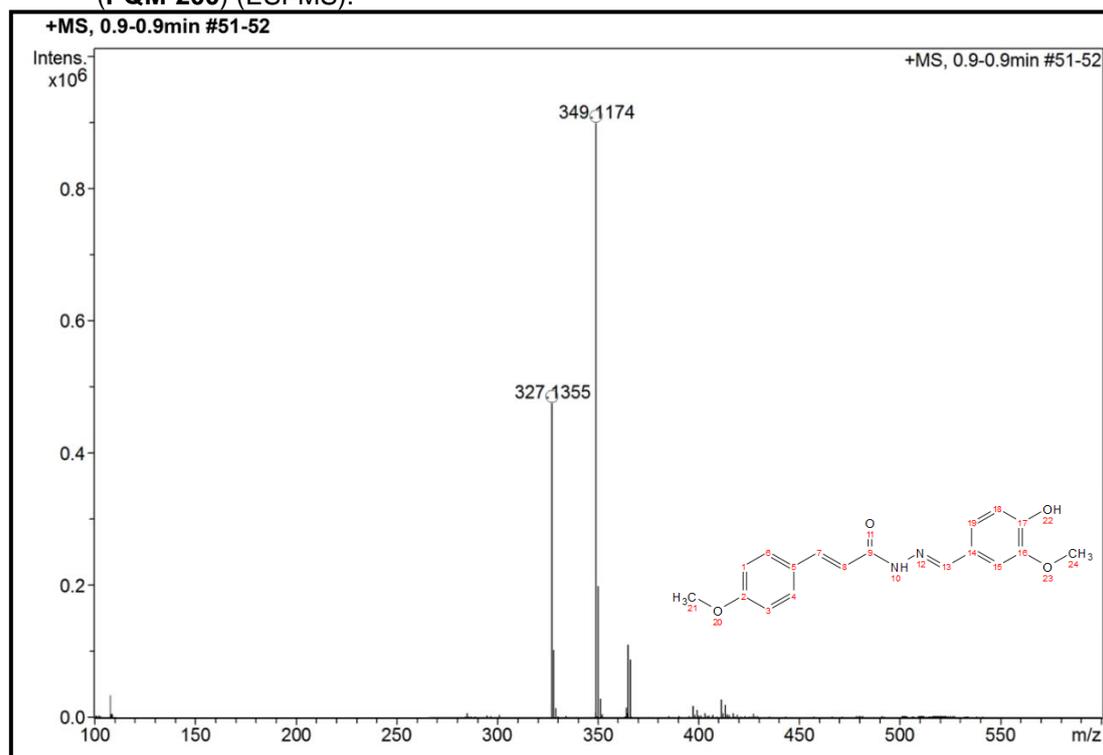
Fonte: do autor.

Figura A39 - Espectro de RMN de ^{13}C de *N*-(4-hidróxi-3-metóxi-benzilideno)-3-(4-metóxi-fenil)acriloidrazida (**PQM-200**) (75 MHz, $\text{DMSO-}d_6$).



Fonte: do autor.

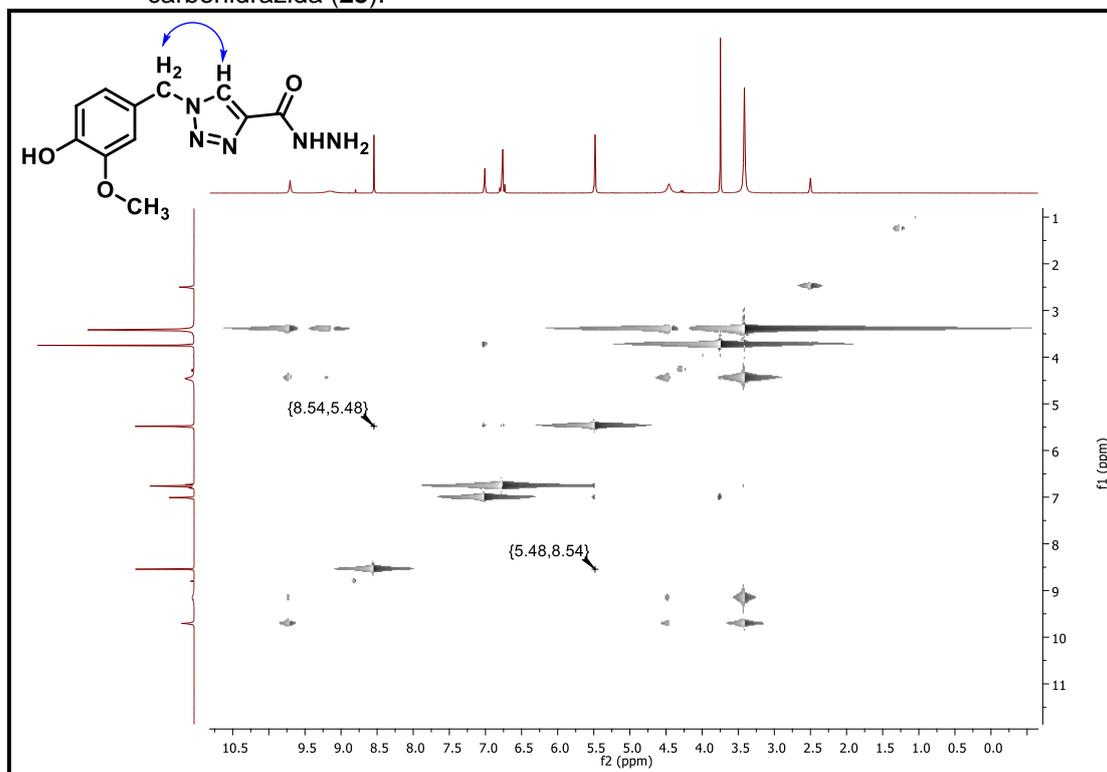
Figura A40 - Espectro de massas de *N*-(4-hidróxi-3-metóxi-benzilideno)-3-(4-metóxi-fenil)acriloidrazida (PQM-200) (ESI-MS).



Fonte: do autor.

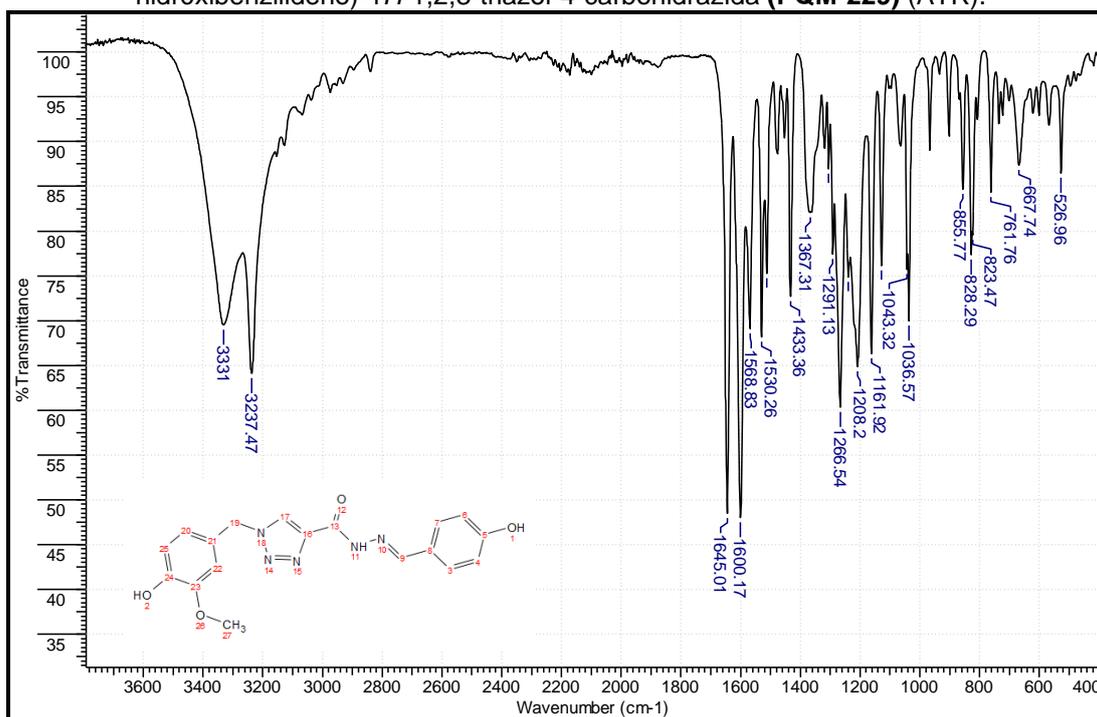
COMPOSTOS TRIAZÓLICOS.

Figura A41 - Mapa de correlação Noesy de de 1-(4-hidróxi-3-metóxi-benzil)-1*H*-1,2,3-triazol-4-carbohidrazida (**25**).



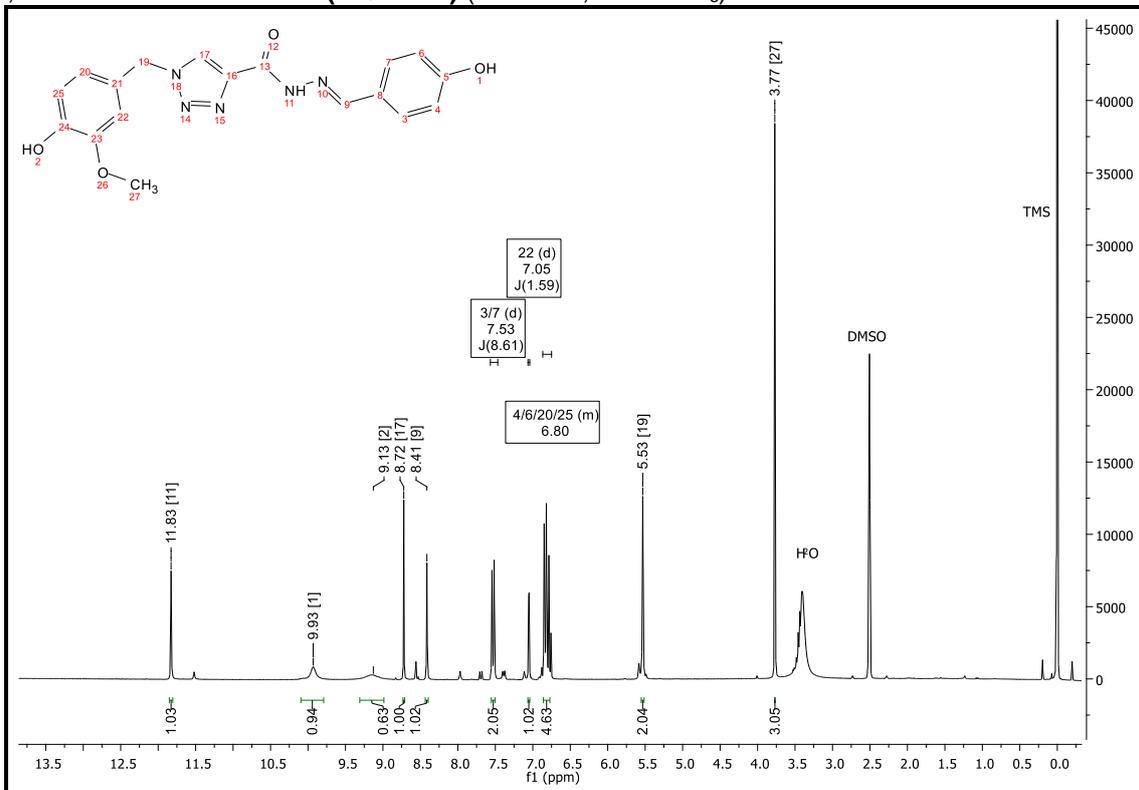
Fonte: do autor.

Figura A42 - Espectro de absorção na região do IV de (*E*)-1-(4-hidróxi-3-metóxi-benzil)-*N*-(4-hidróxi-benzilideno)-1*H*-1,2,3-triazol-4-carbohidrazida (**PQM-229**) (ATR).



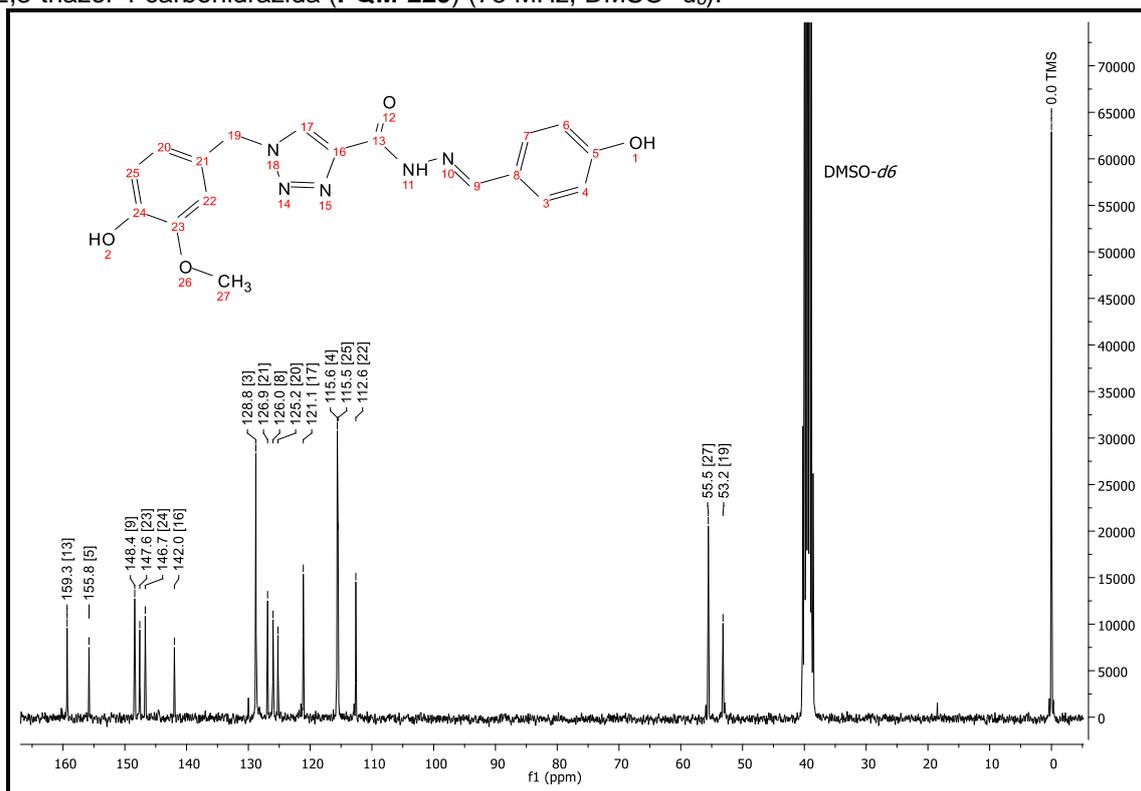
Fonte: do autor.

Figura A43 - Espectro de RMN de ¹H de (*E*)-1-(4-hidróxi-3-metóxi-benzil)-*N*-(4-hidróxi-benzilideno)-1*H*-1,2,3-triazol-4-carbohidrazida (**PQM-229**) (300 MHz, DMSO-*d*₆).



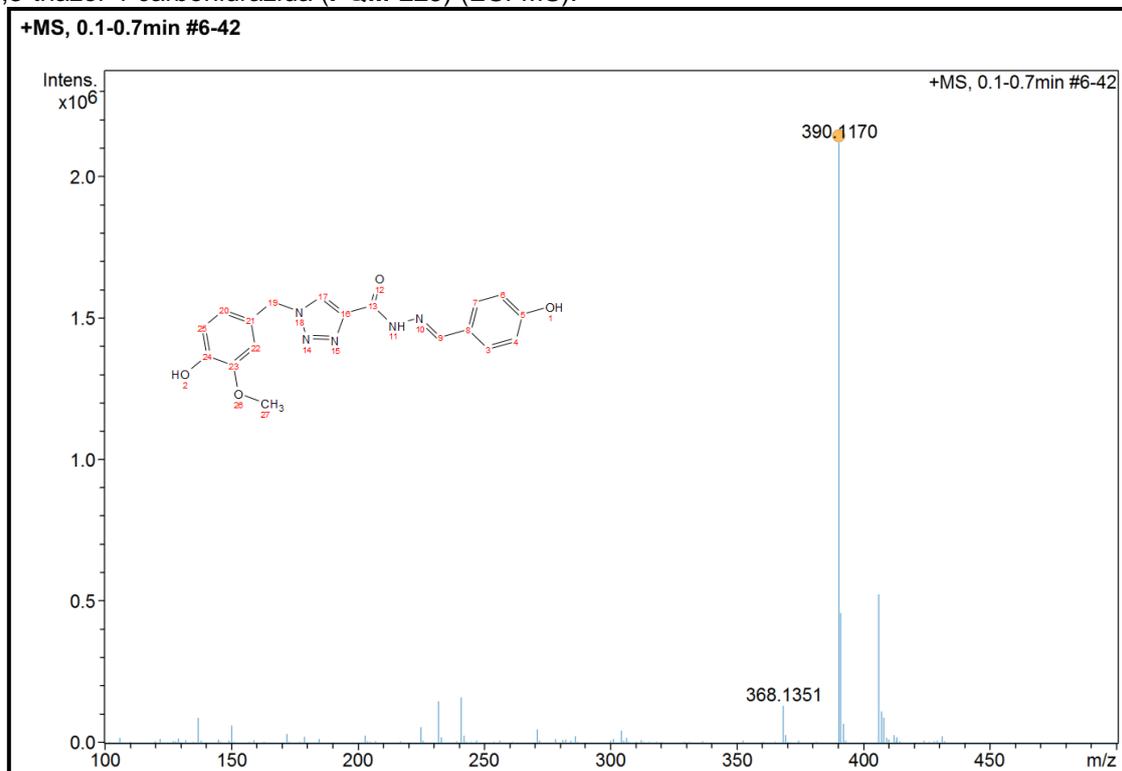
Fonte: do autor.

Figura A44 - Espectro de RMN de ^{13}C de (*E*)-1-(4-hidróxi-3-metóxi-benzil)-*N*-(4-hidróxi-benzilideno)-1*H*-1,2,3-triazol-4-carbohidrazida (**PQM-229**) (75 MHz, $\text{DMSO-}d_6$).



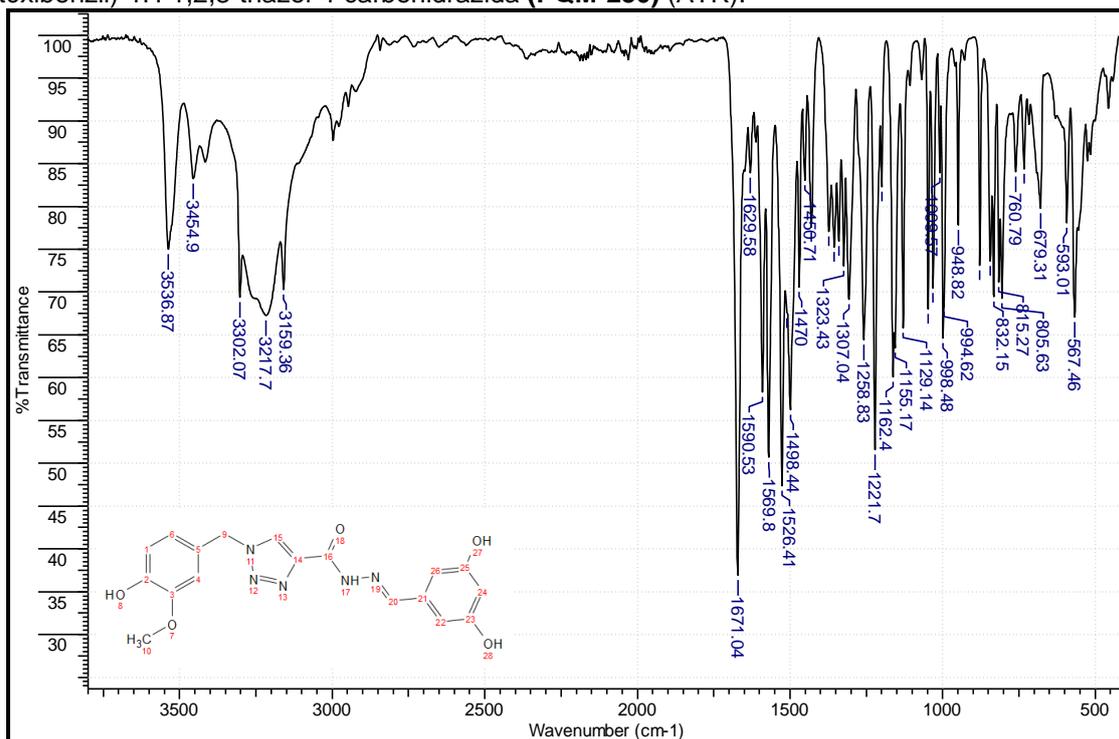
Fonte: do autor.

Figura A45 - Espectro de massas de (*E*)-1-(4-hidróxi-3-metóxi-benzil)-*N*-(4-hidróxi-benzilideno)-1*H*-1,2,3-triazol-4-carbohidrazida (**PQM-229**) (ESI-MS).



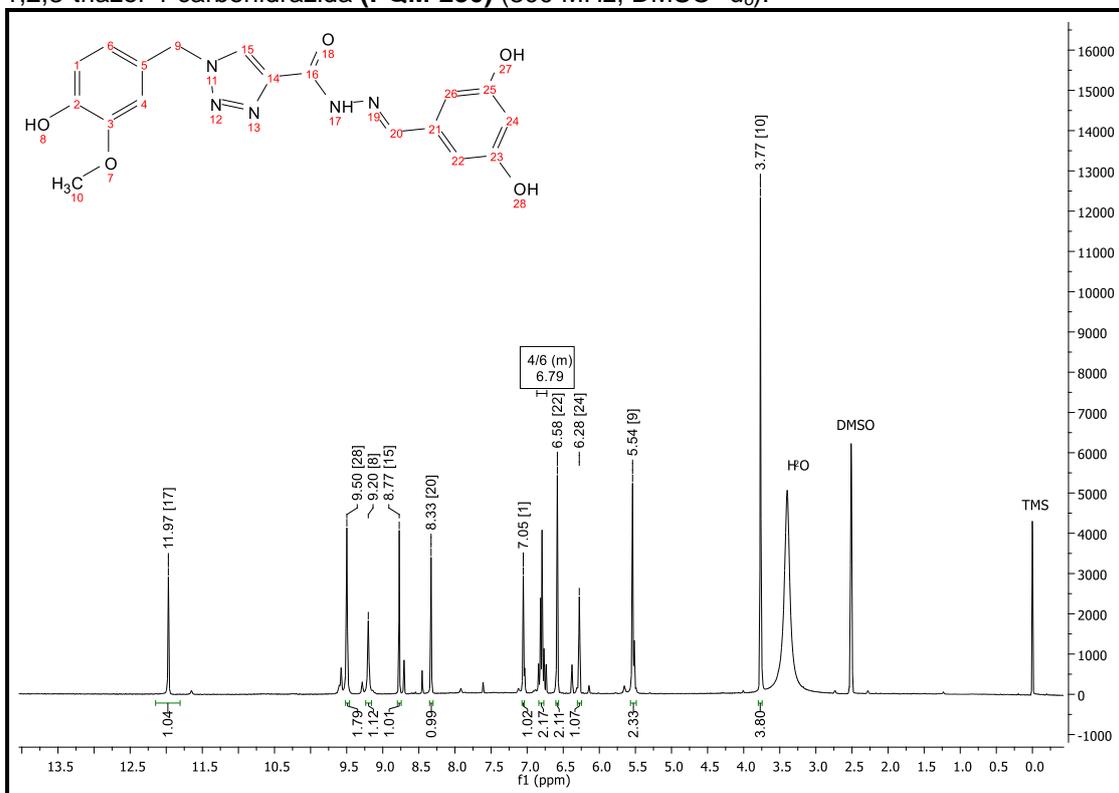
Fonte: do autor.

Figura A46 - Espectro de absorção na região do IV de (*E*)-*N*-(3,5-dihidróxibenzilideno)-1-(4-hidróxi-3-metóxi-benzil)-1*H*-1,2,3-triazol-4-carbohidrazida (**PQM-230**) (ATR).



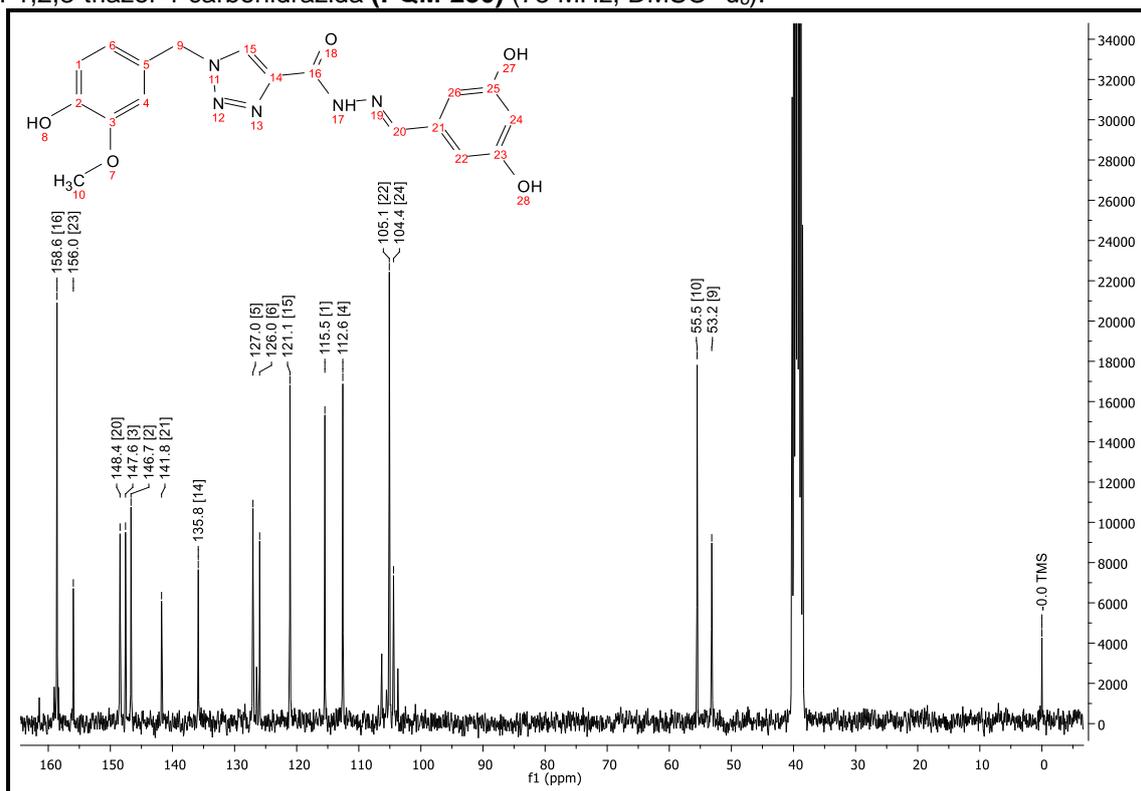
Fonte: do autor.

Figura A47 - Espectro de RMN de ^1H de (*E*)-*N*-(3,5-dihidróxibenzilideno)-1-(4-hidróxi-3-metóxi-benzil)-1*H*-1,2,3-triazol-4-carbohidrazida (**PQM-230**) (300 MHz, $\text{DMSO-}d_6$).



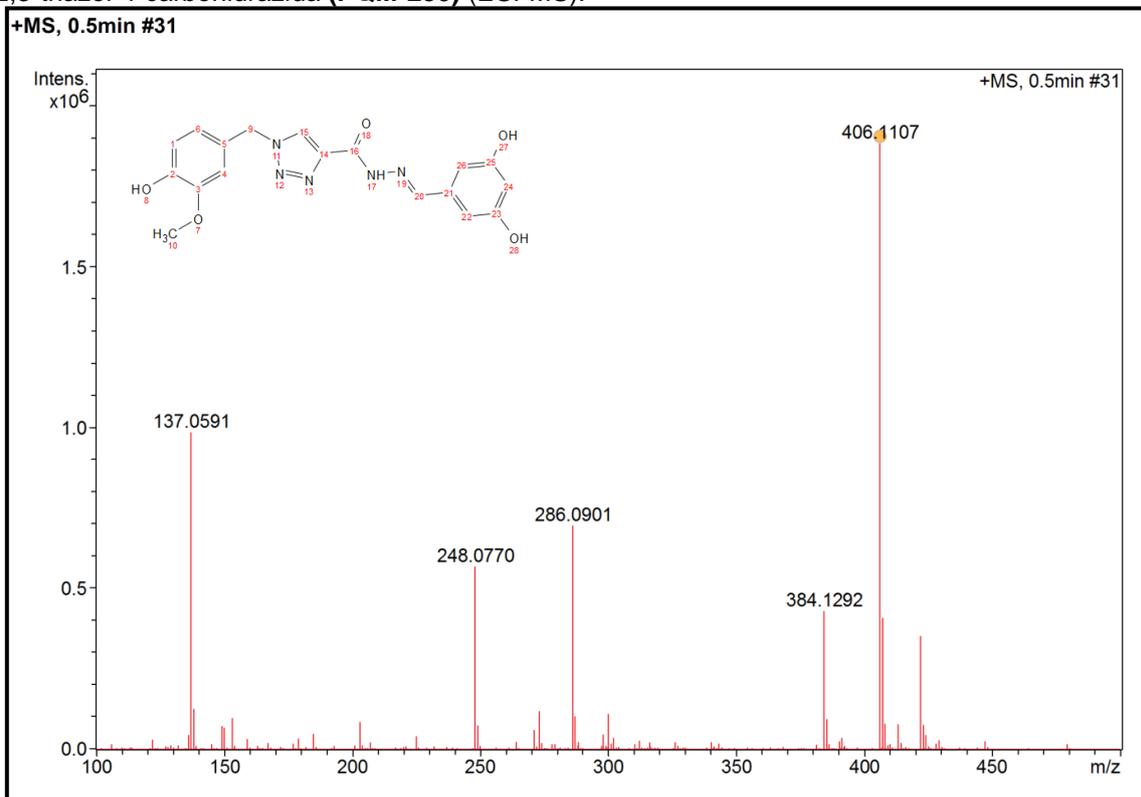
Fonte: do autor.

Figura A48 - Espectro de RMN de ^{13}C de (*E*)-*N*-(3,5-dihidróxibenzilideno)-1-(4-hidróxi-3-metóxi-benzil)-1*H*-1,2,3-triazol-4-carbohidrazida (**PQM-230**) (75 MHz, DMSO- d_6).



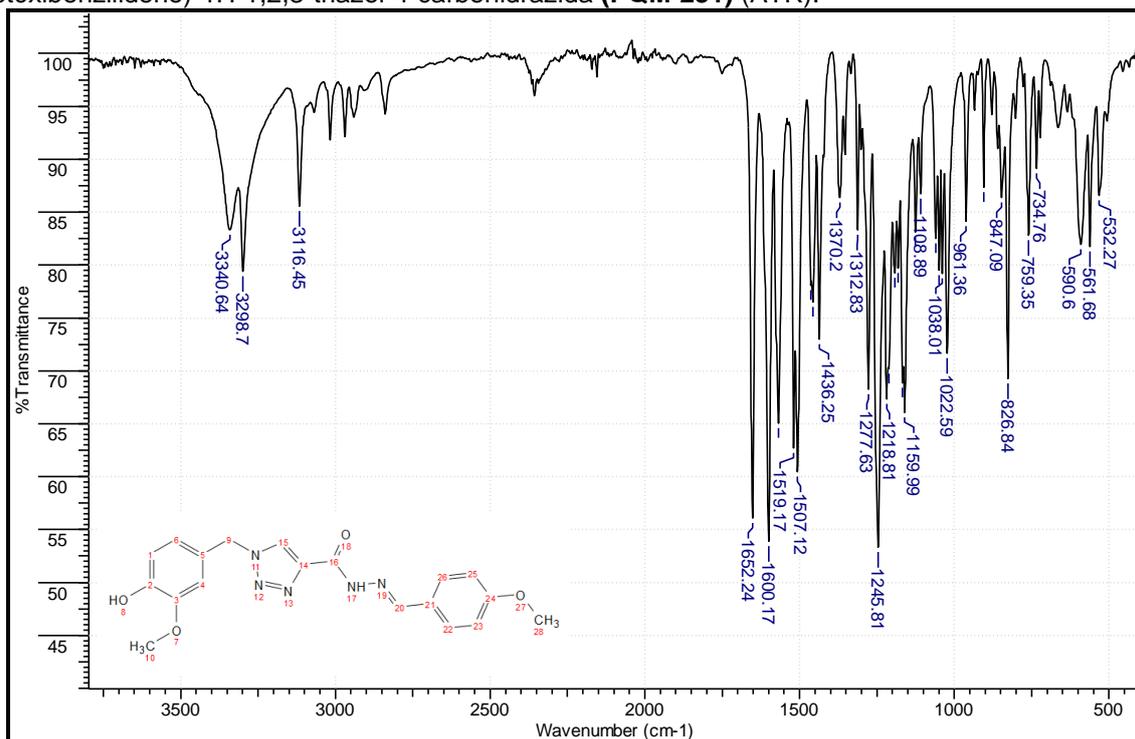
Fonte: do autor.

Figura A49 - Espectro de massas de (*E*)-*N*-(3,5-dihidróxibenzilideno)-1-(4-hidróxi-3-metóxi-benzil)-1*H*-1,2,3-triazol-4-carbohidrazida (**PQM-230**) (ESI-MS).



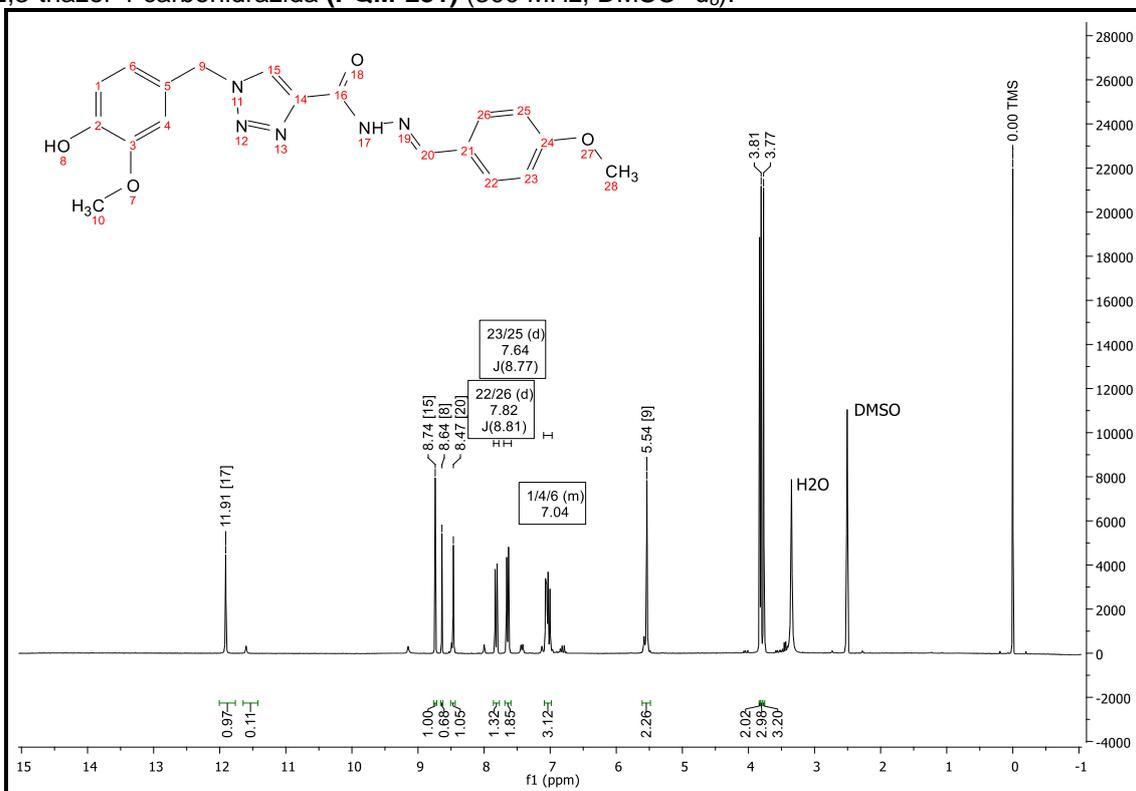
Fonte: do autor.

Figura A50 - Espectro de absorção na região do IV de (*E*)-1-(4-hidróxi-3-metóxi-benzil)-N'-(4-metóxi-benzilideno)-1H-1,2,3-triazol-4-carbohidrazida (**PQM-231**) (ATR).



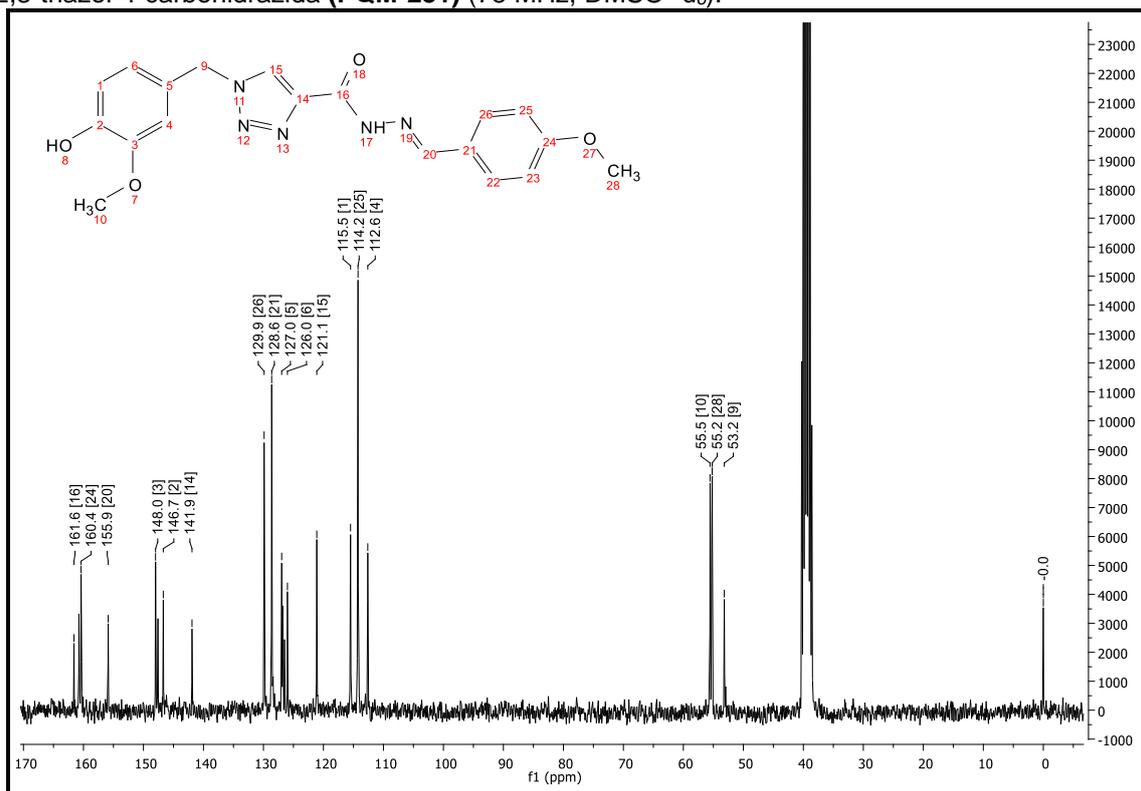
Fonte: do autor.

Figura A51 - Espectro de RMN de ¹H de (*E*)-1-(4-hidróxi-3-metóxi-benzil)-N'-(4-metóxi-benzilideno)-1H-1,2,3-triazol-4-carbohidrazida (**PQM-231**) (300 MHz, DMSO- d₆).



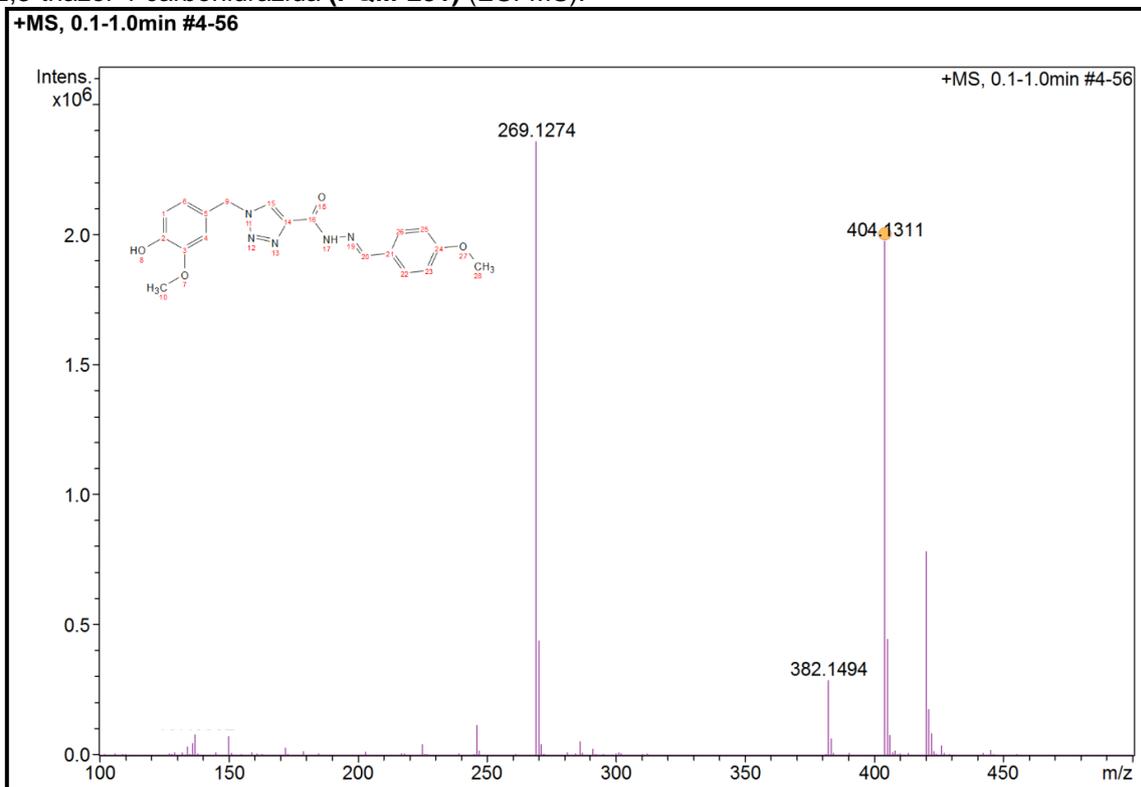
Fonte: do autor.

Figura A52 - Espectro de RMN de ^{13}C de (*E*)-1-(4-hidróxi-3-metóxi-benzil)-*N'*-(4-metóxi-benzilideno)-1*H*-1,2,3-triazol-4-carbohidrazida (**PQM-231**) (75 MHz, $\text{DMSO-}d_6$).



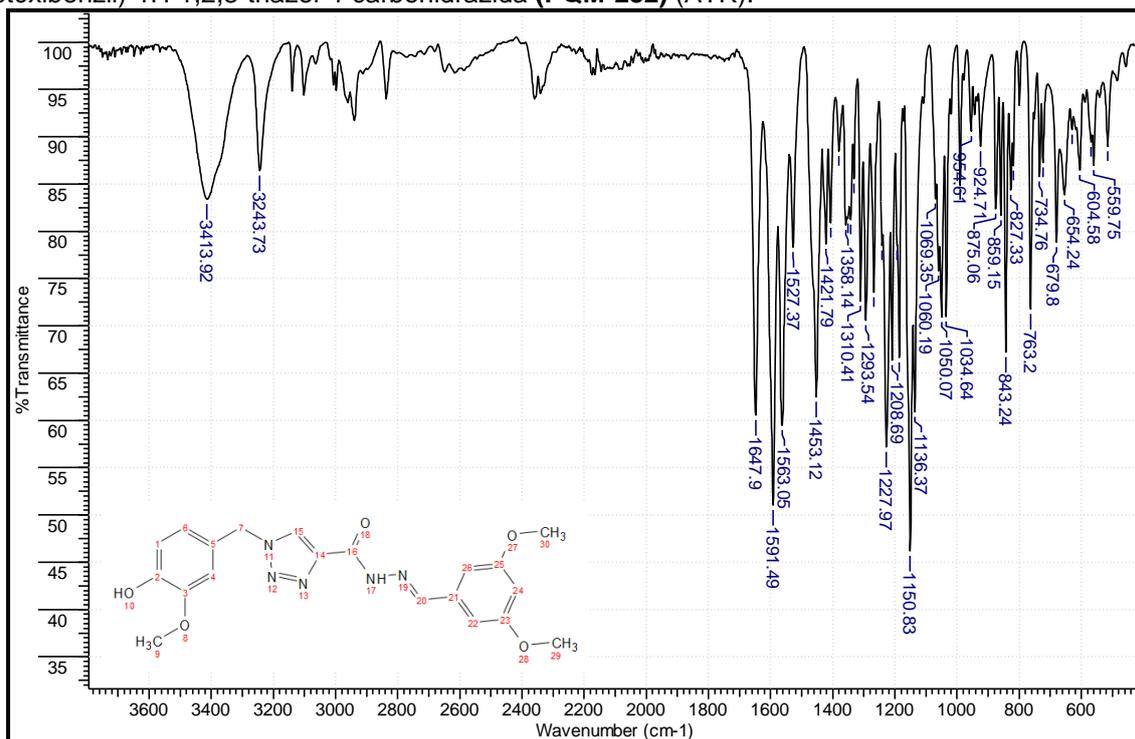
Fonte: do autor.

Figura A53 - Espectro de massas de (*E*)-1-(4-hidróxi-3-metóxi-benzil)-*N'*-(4-metóxi-benzilideno)-1*H*-1,2,3-triazol-4-carbohidrazida (**PQM-231**) (ESI-MS).



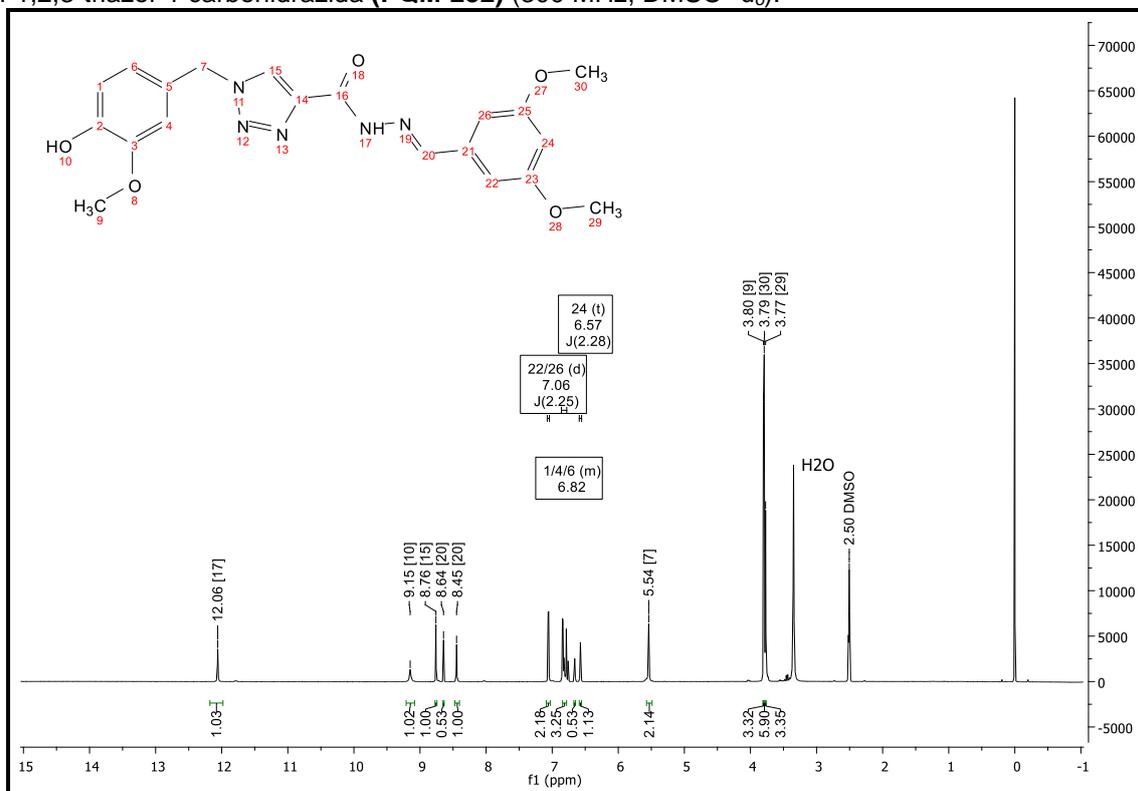
Fonte: do autor.

Figura A54 - Espectro de absorção na região do IV de (*E*)-*N*'-(3,5-dimetóxi-benzilideno)-1-(4-hidróxi-3-metóxi-benzil)-1*H*-1,2,3-triazol-4-carbohidrazida (**PQM-232**) (ATR).



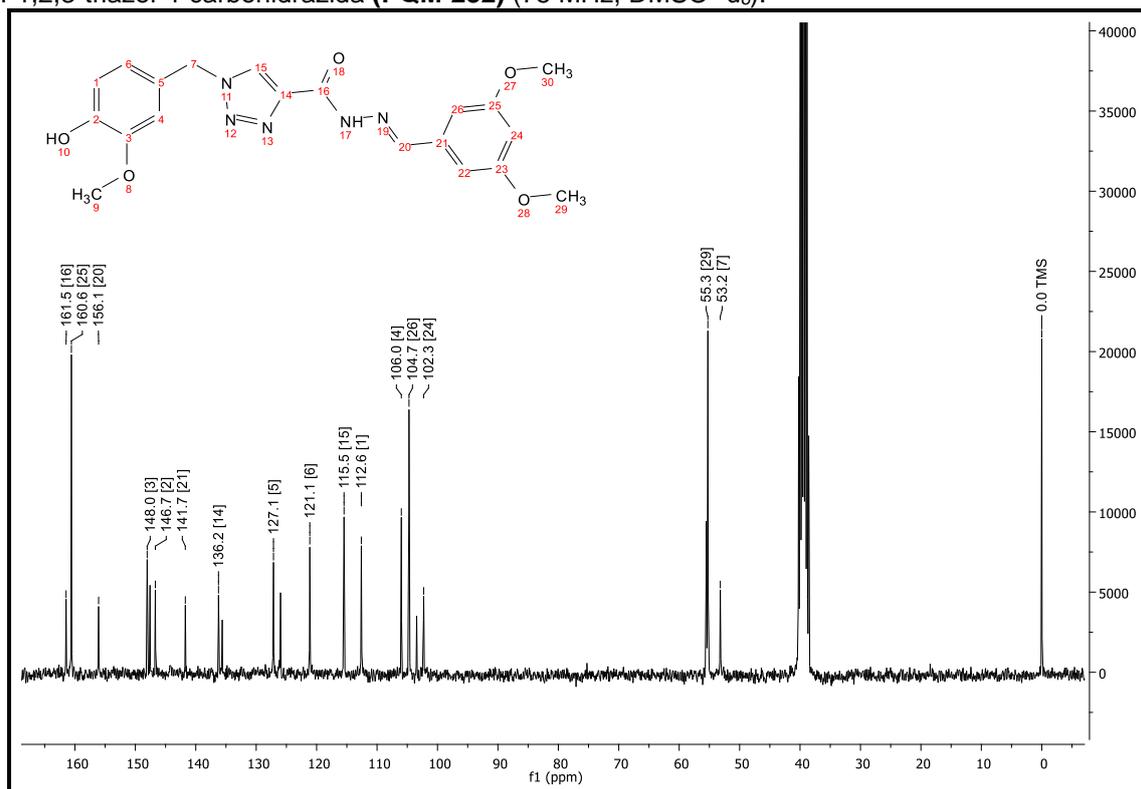
Fonte: do autor.

Figura A55 - Espectro de RMN de ¹H de (*E*)-*N*'-(3,5-dimetóxi-benzilideno)-1-(4-hidróxi-3-metóxi-benzil)-1*H*-1,2,3-triazol-4-carbohidrazida (**PQM-232**) (300 MHz, DMSO- *d*₆).



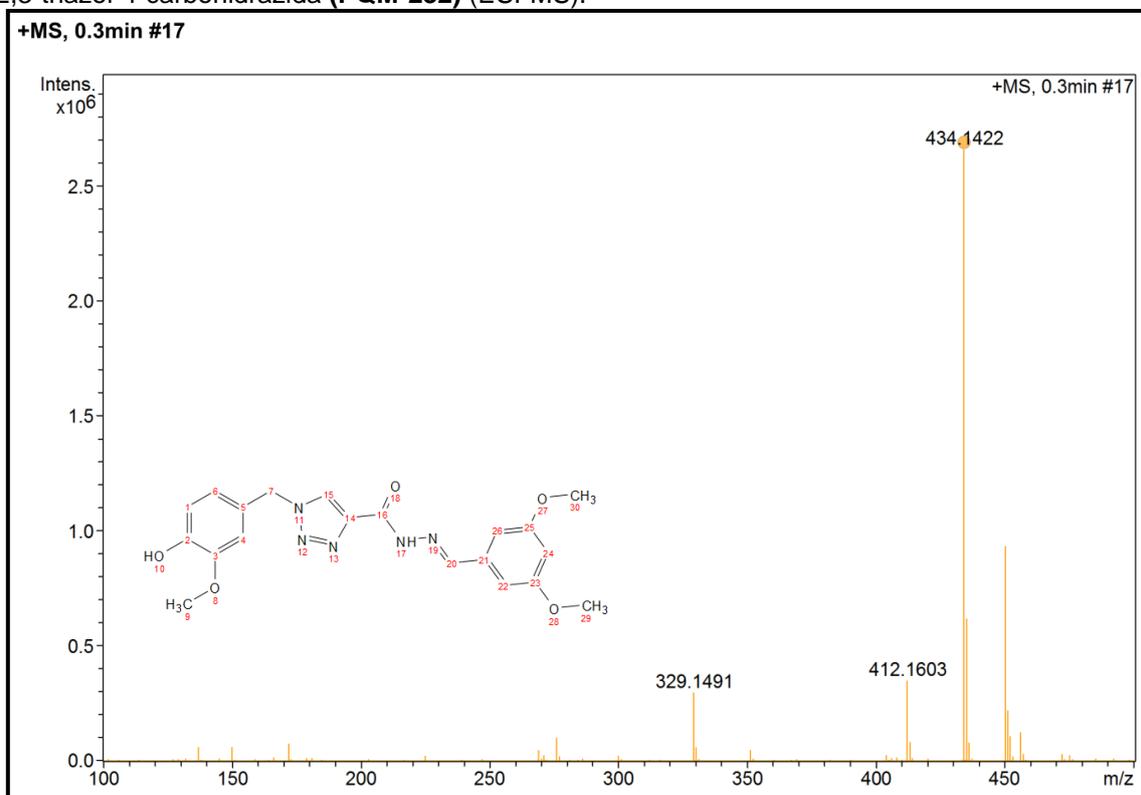
Fonte: do autor.

Figura A56 - Espectro de RMN de ^{13}C de (*E*)-*N'*-(3,5-dimetóxi-benzilideno)-1-(4-hidróxi-3-metóxi-benzil)-1*H*-1,2,3-triazol-4-carbohidrazida (**PQM-232**) (75 MHz, DMSO- d_6).



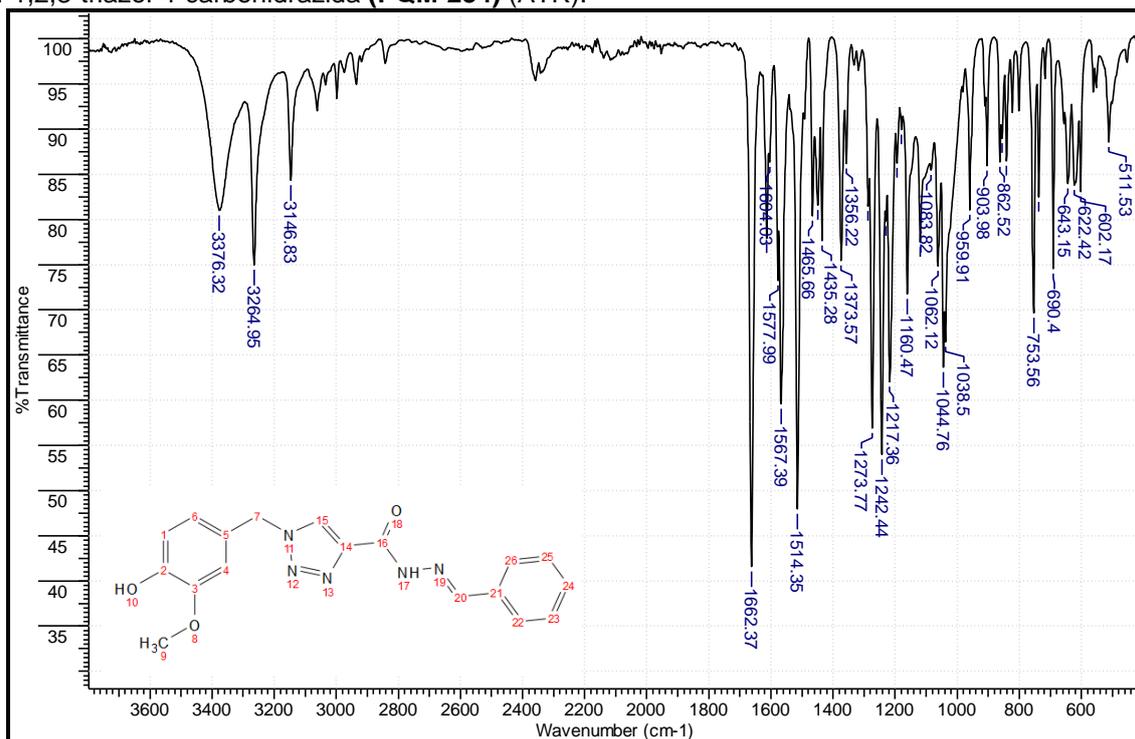
Fonte: do autor.

Figura A57 - Espectro de massas de (*E*)-*N'*-(3,5-dimetóxi-benzilideno)-1-(4-hidróxi-3-metóxi-benzil)-1*H*-1,2,3-triazol-4-carbohidrazida (**PQM-232**) (ESI-MS).



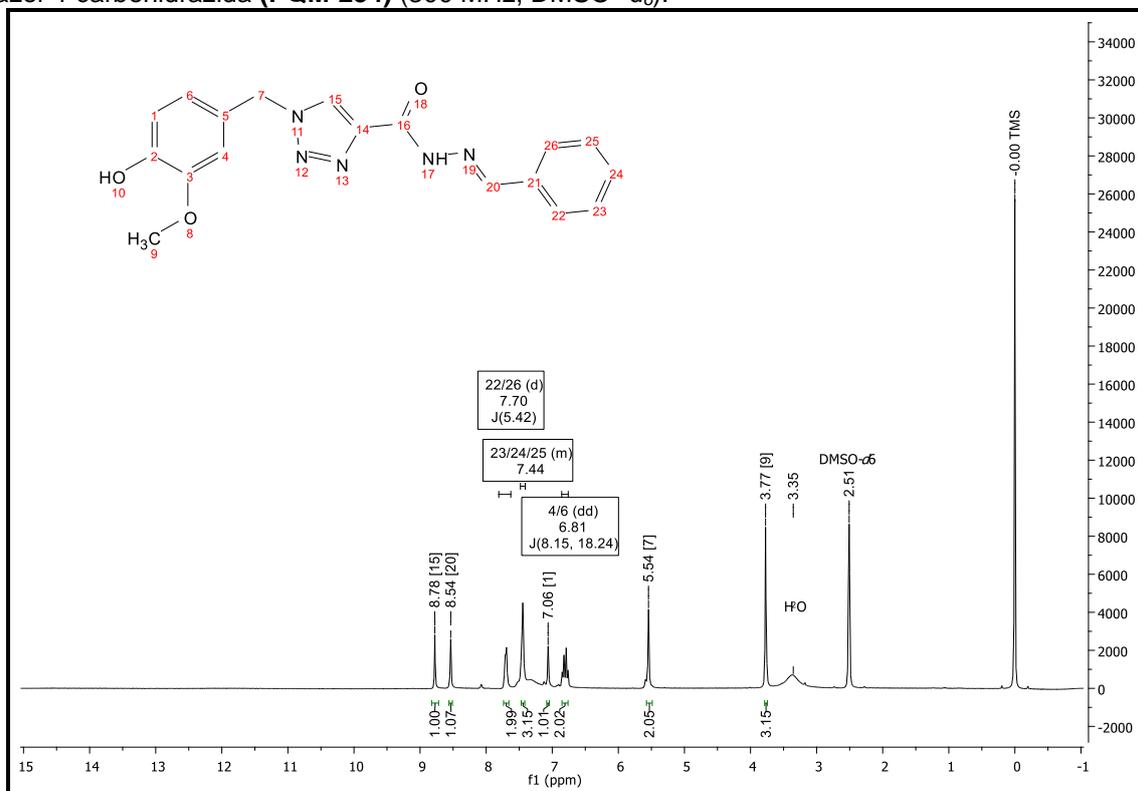
Fonte: do autor.

Figura A58 - Espectro de absorção na região do IV de (*E*)-*N*'-benzilideno-1-(4-hidróxi-3-metóxi-benzil)-1*H*-1,2,3-triazol-4-carbohidrazida (**PQM-234**) (ATR).



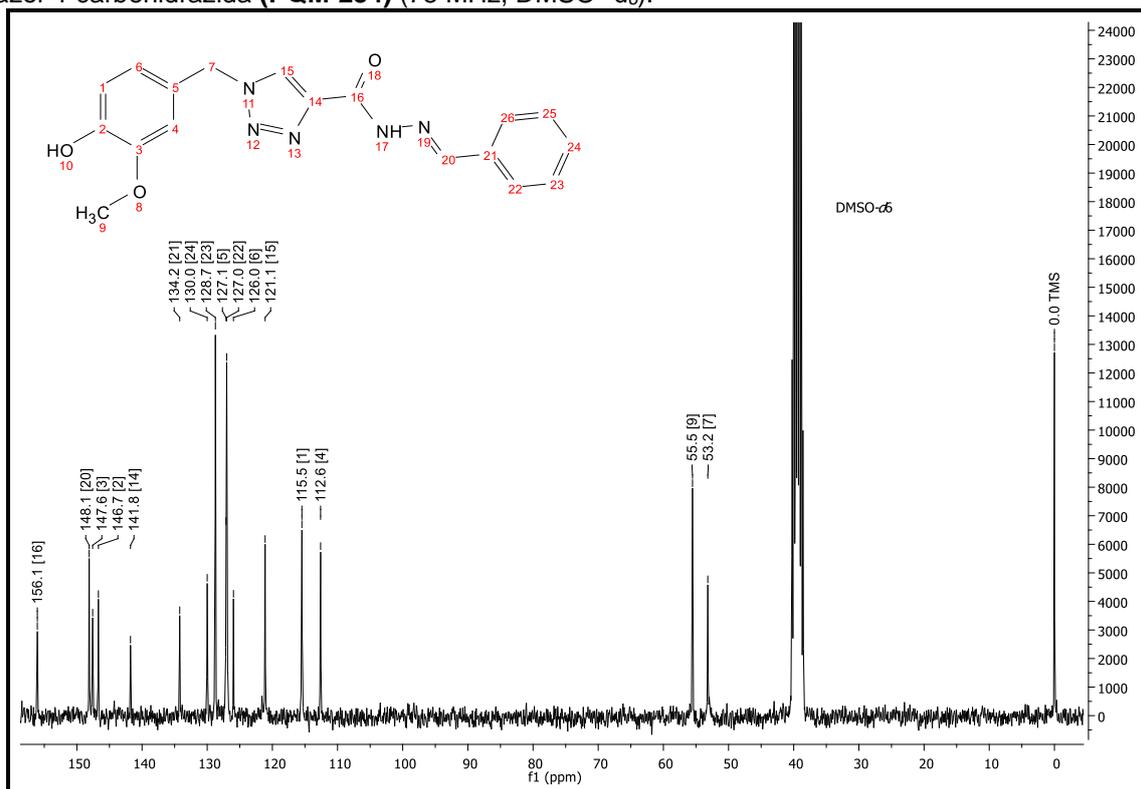
Fonte: do autor.

Figura A59 - Espectro de RMN de ¹H de (*E*)-*N*'-benzilideno-1-(4-hidróxi-3-metóxi-benzil)-1*H*-1,2,3-triazol-4-carbohidrazida (**PQM-234**) (300 MHz, DMSO-*d*₆).



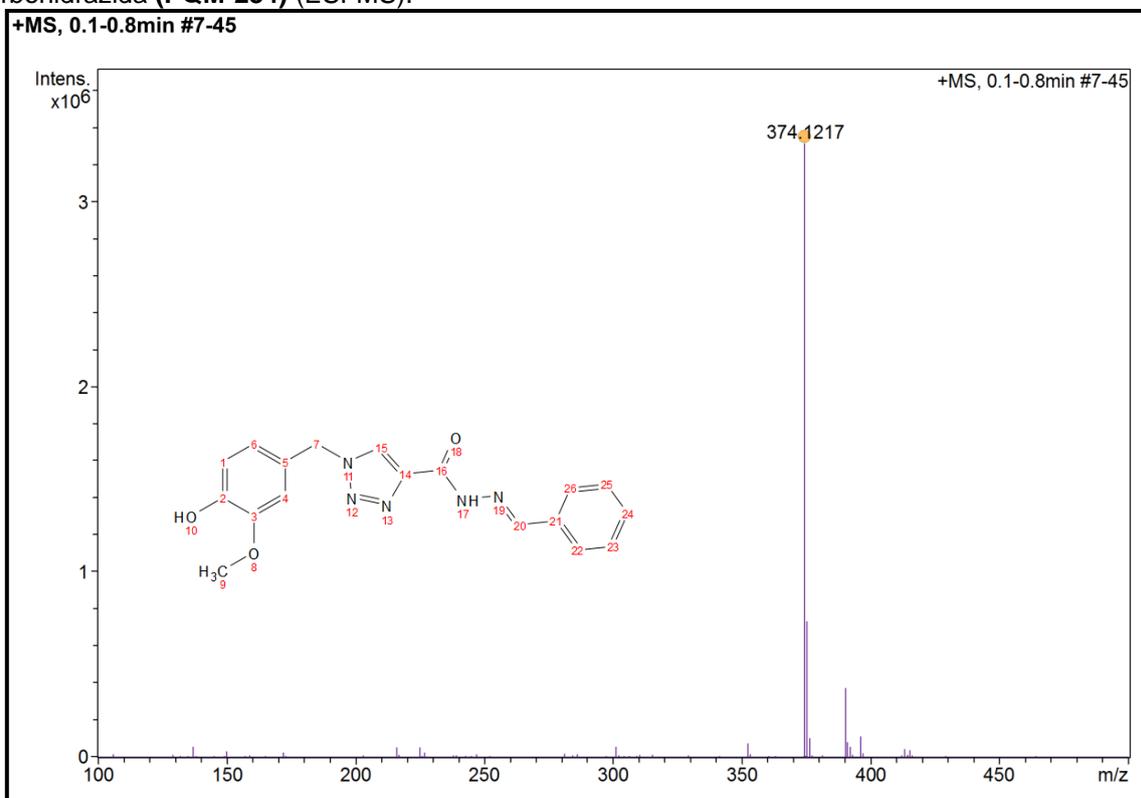
Fonte: do autor.

Figura A60 - Espectro de RMN de ^{13}C de (*E*)-*N'*-benzilideno-1-(4-hidróxi-3-metóxi-benzil)-1*H*-1,2,3-triazol-4-carbohidrazida (**PQM-234**) (75 MHz, $\text{DMSO-}d_6$).



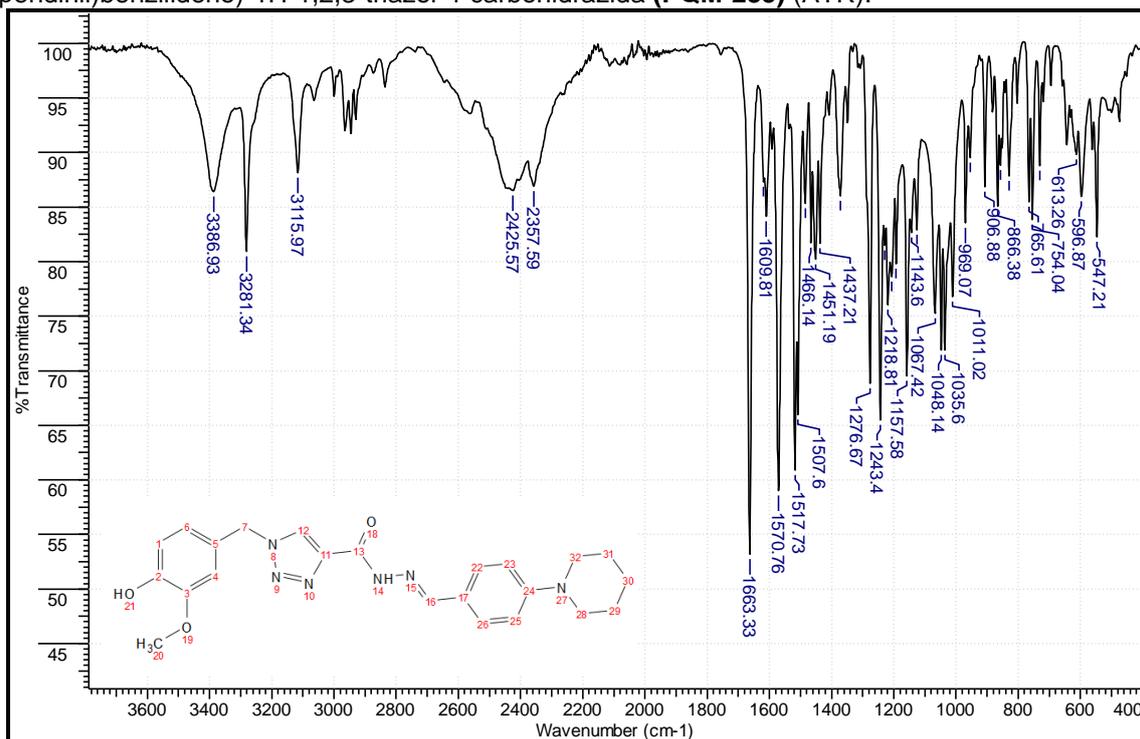
Fonte: do autor.

Figura A61 - Espectro de massas de (*E*)-*N'*-benzilideno-1-(4-hidróxi-3-metóxi-benzil)-1*H*-1,2,3-triazol-4-carbohidrazida (**PQM-234**) (ESI-MS).



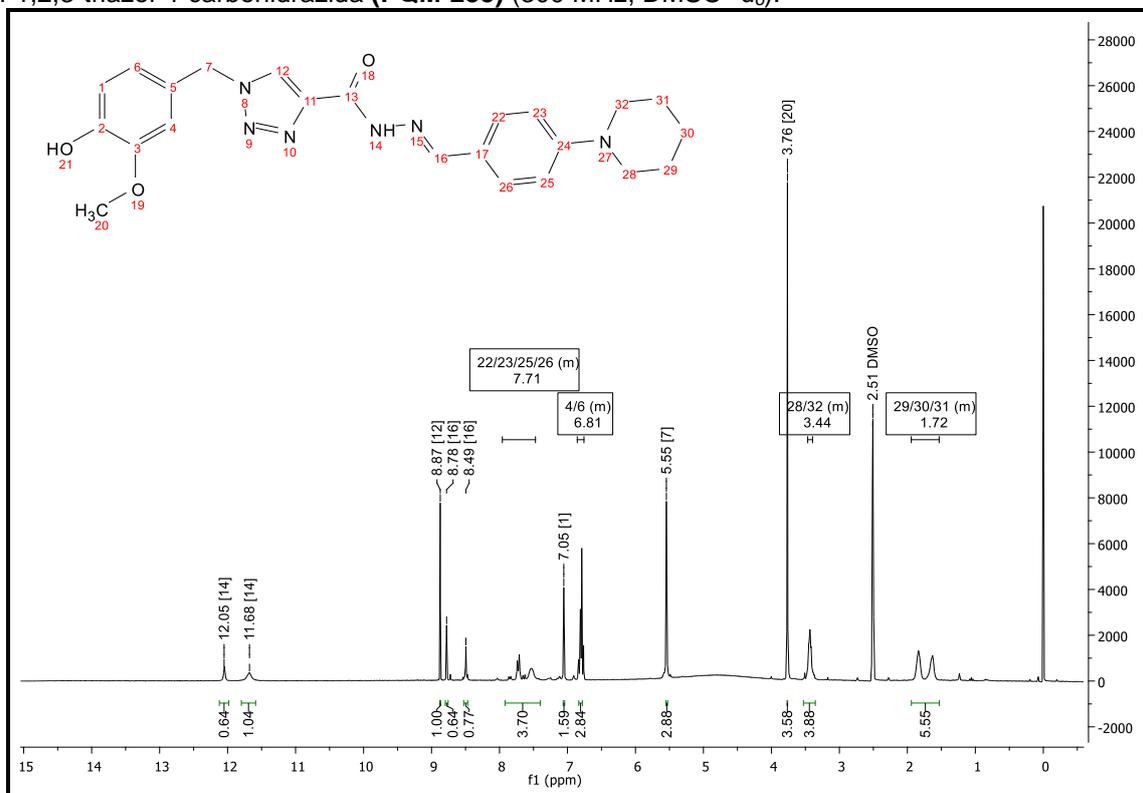
Fonte: do autor.

Figura A62 - Espectro de absorção na região do IV de (*E*)-1-(4-hidróxi-3-metóxi-benzil)-N'-(4-(piperidinil)benzilideno)-1H-1,2,3-triazol-4-carbohidrazida (**PQM-235**) (ATR).



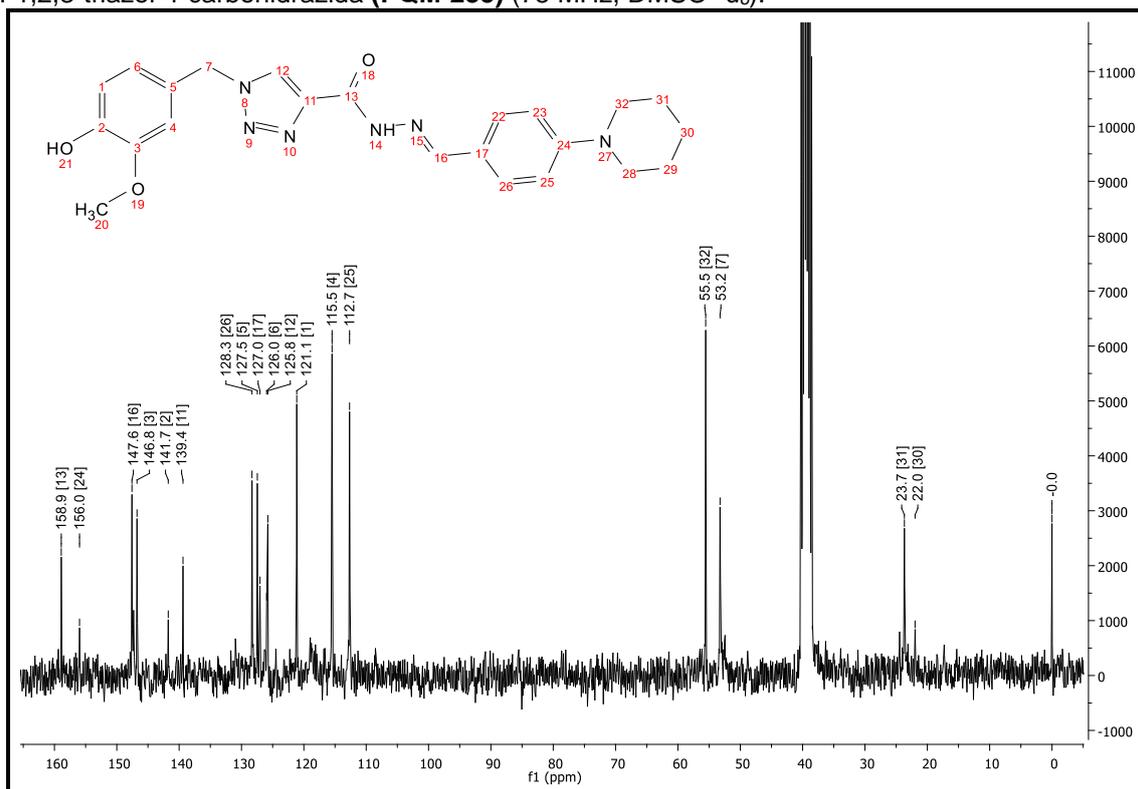
Fonte: do autor.

Figura A63 - Espectro de RMN de ¹H de (*E*)-1-(4-hidróxi-3-metóxi-benzil)-N'-(4-(piperidinil)benzilideno)-1H-1,2,3-triazol-4-carbohidrazida (**PQM-235**) (300 MHz, DMSO- *d*₆).



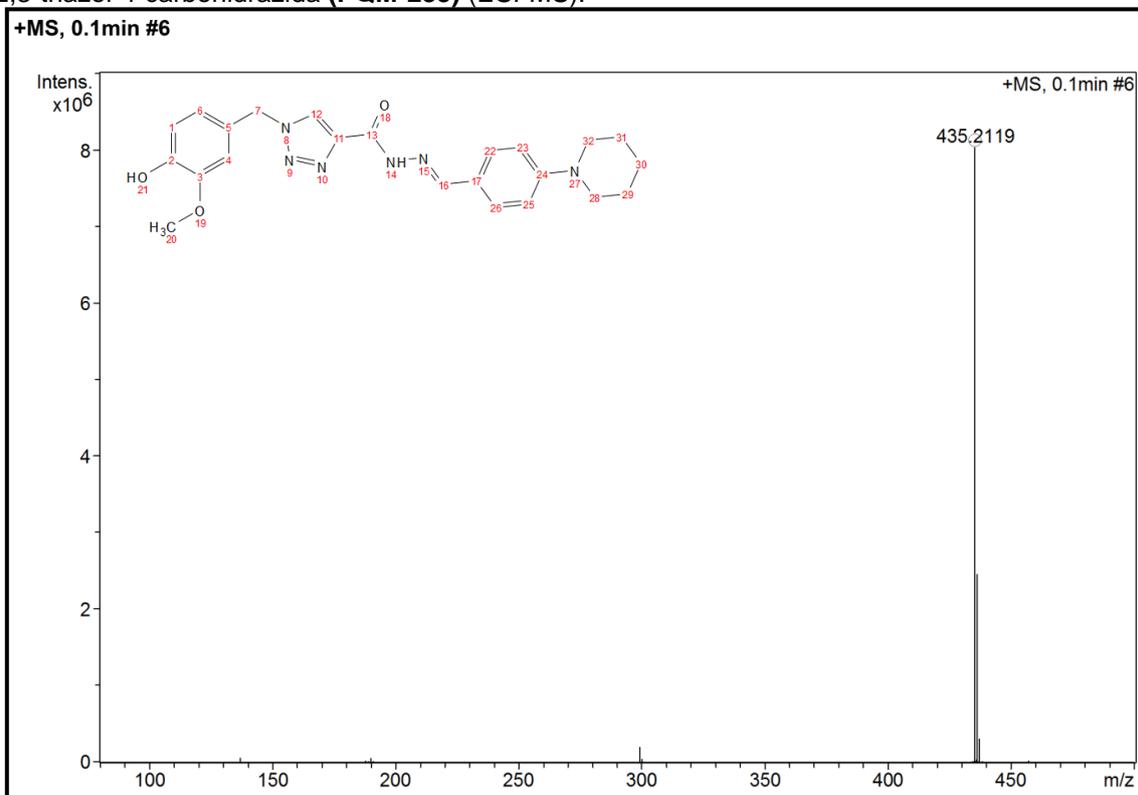
Fonte: do autor.

Figura A64 - Espectro de RMN de ^{13}C de (*E*)-1-(4-hidróxi-3-metóxi-benzil)-*N'*-(4-(piperidinil)benzilideno)-1*H*-1,2,3-triazol-4-carbohidrazida (**PQM-235**) (75 MHz, DMSO- d_6).



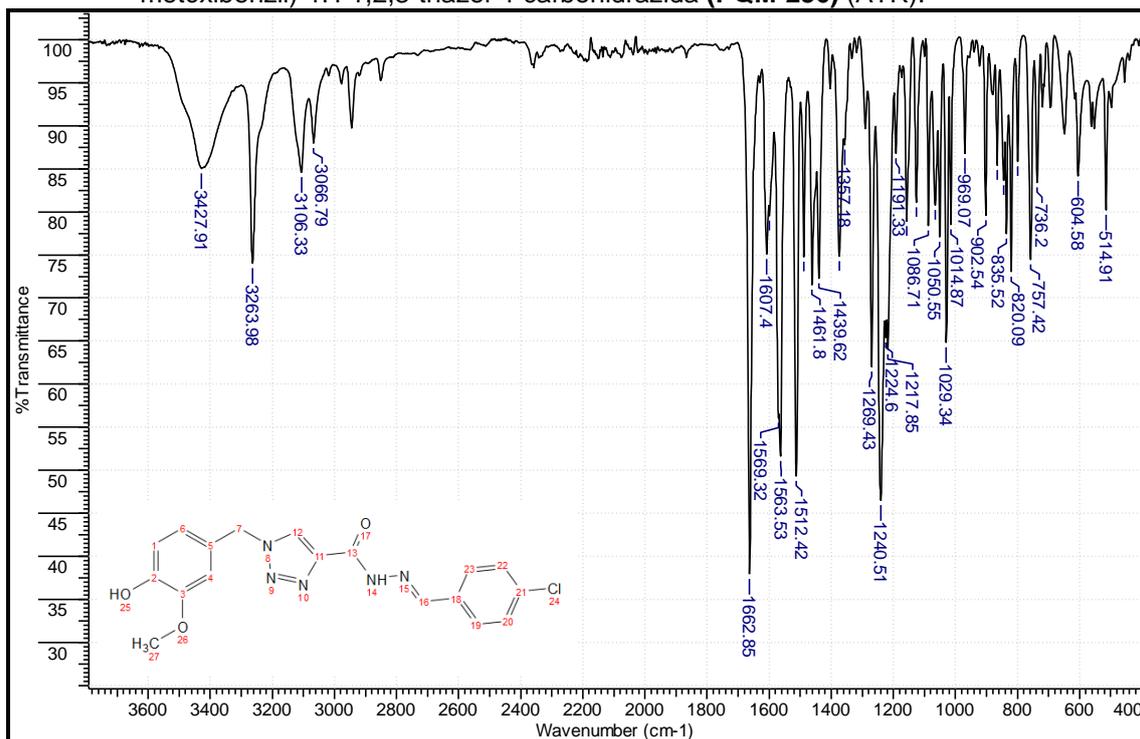
Fonte: do autor.

Figura A65 - Espectro de massas de (*E*)-1-(4-hidróxi-3-metóxi-benzil)-*N'*-(4-(piperidinil)benzilideno)-1*H*-1,2,3-triazol-4-carbohidrazida (**PQM-235**) (ESI-MS).



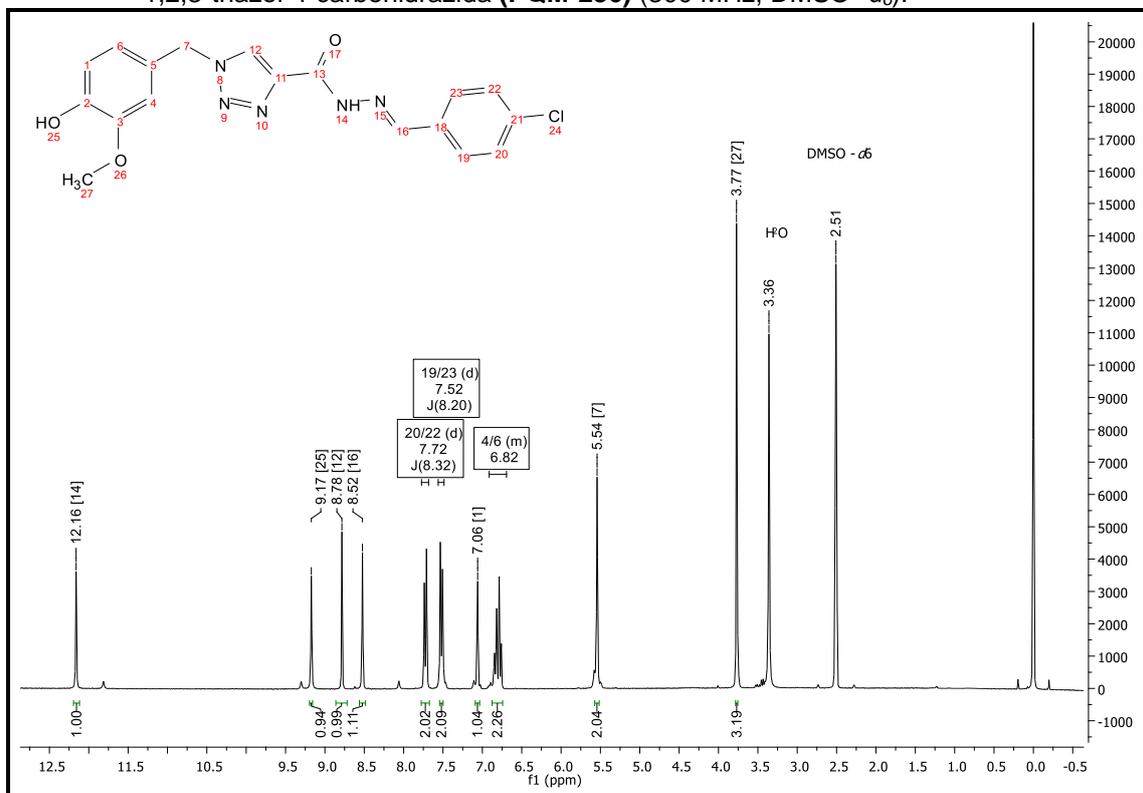
Fonte: do autor.

Figura A66 - Espectro de absorção na região do IV de (*E*)-*N'*-(4-clorobenzilideno)-1-(4-hidróxi-3-metóxi-benzil)-1*H*-1,2,3-triazol-4-carbohidrazida (**PQM-236**) (ATR).



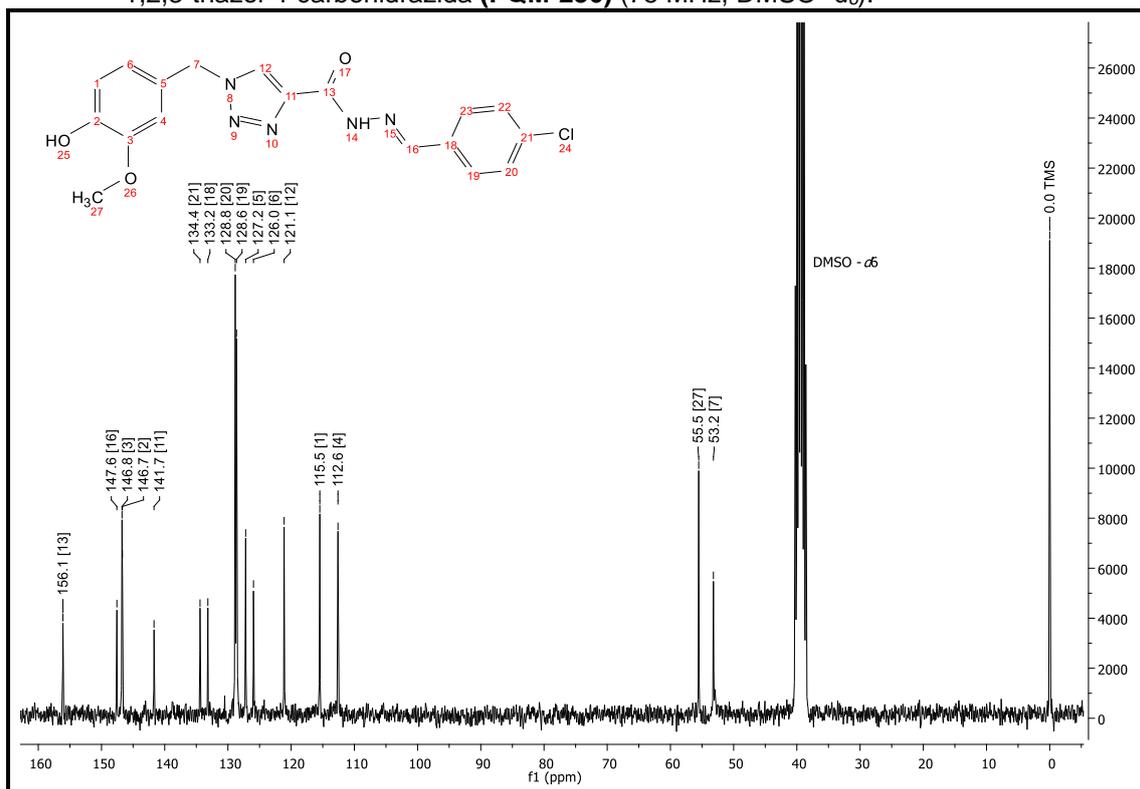
Fonte: do autor.

Figura A67 - Espectro de RMN de ¹H de (*E*)-*N'*-(4-clorobenzilideno)-1-(4-hidróxi-3-metóxi-benzil)-1*H*-1,2,3-triazol-4-carbohidrazida (**PQM-236**) (300 MHz, DMSO-*d*₆).



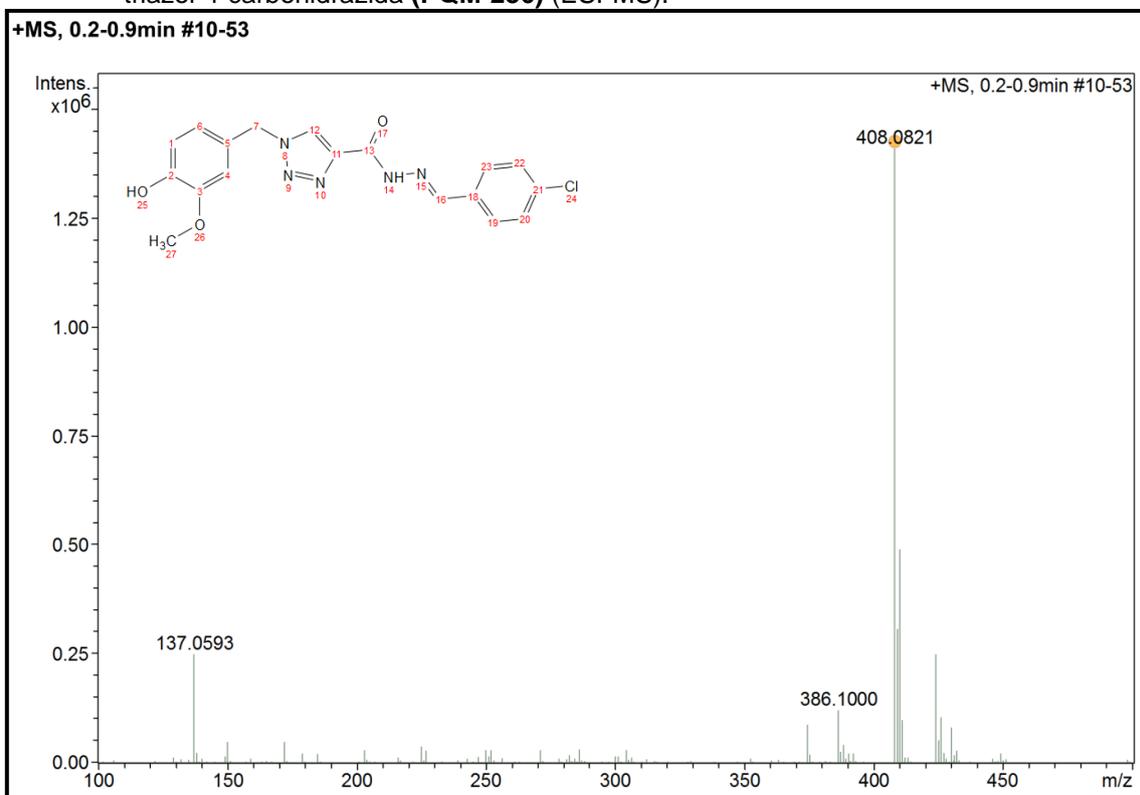
Fonte: do autor.

Figura A68 - Espectro de RMN de ^{13}C de (*E*)-*N'*-(4-clorobenzilideno)-1-(4-hidróxi-3-metóxi-benzil)-1*H*-1,2,3-triazol-4-carbohidrazida (**PQM-236**) (75 MHz, $\text{DMSO-}d_6$).



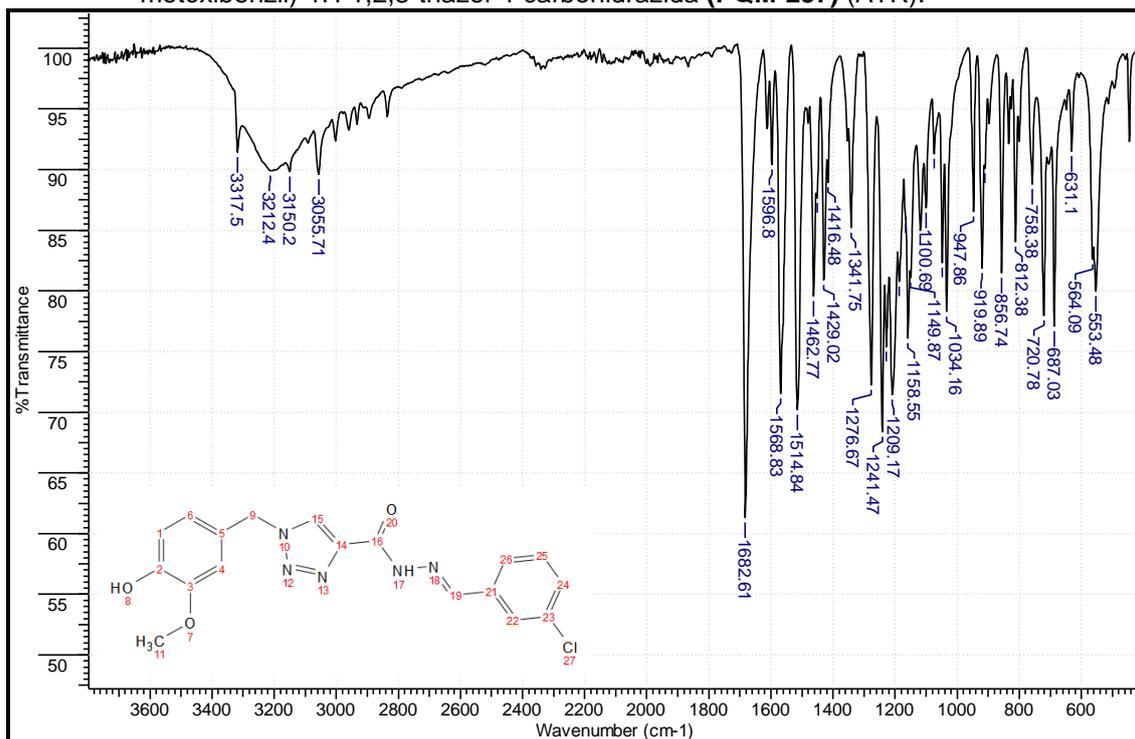
Fonte: do autor.

Figura A69 - Espectro de massas de (*E*)-*N'*-(4-clorobenzilideno)-1-(4-hidróxi-3-metóxi-benzil)-1*H*-1,2,3-triazol-4-carbohidrazida (**PQM-236**) (ESI-MS).



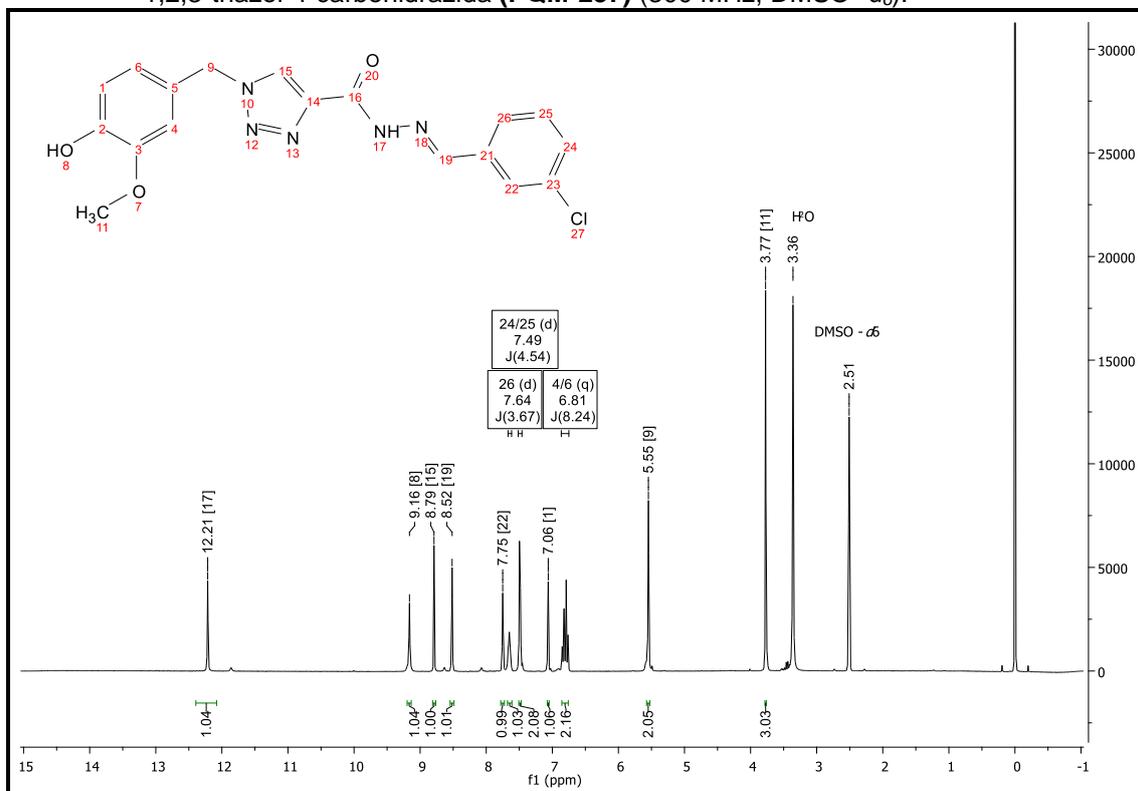
Fonte: do autor.

Figura A70 - Espectro de absorção na região do IV de (*E*)-*N'*-(3-clorobenzilideno)-1-(4-hidróxi-3-metóxi-benzil)-1*H*-1,2,3-triazol-4-carbohidrazida (**PQM-237**) (ATR).



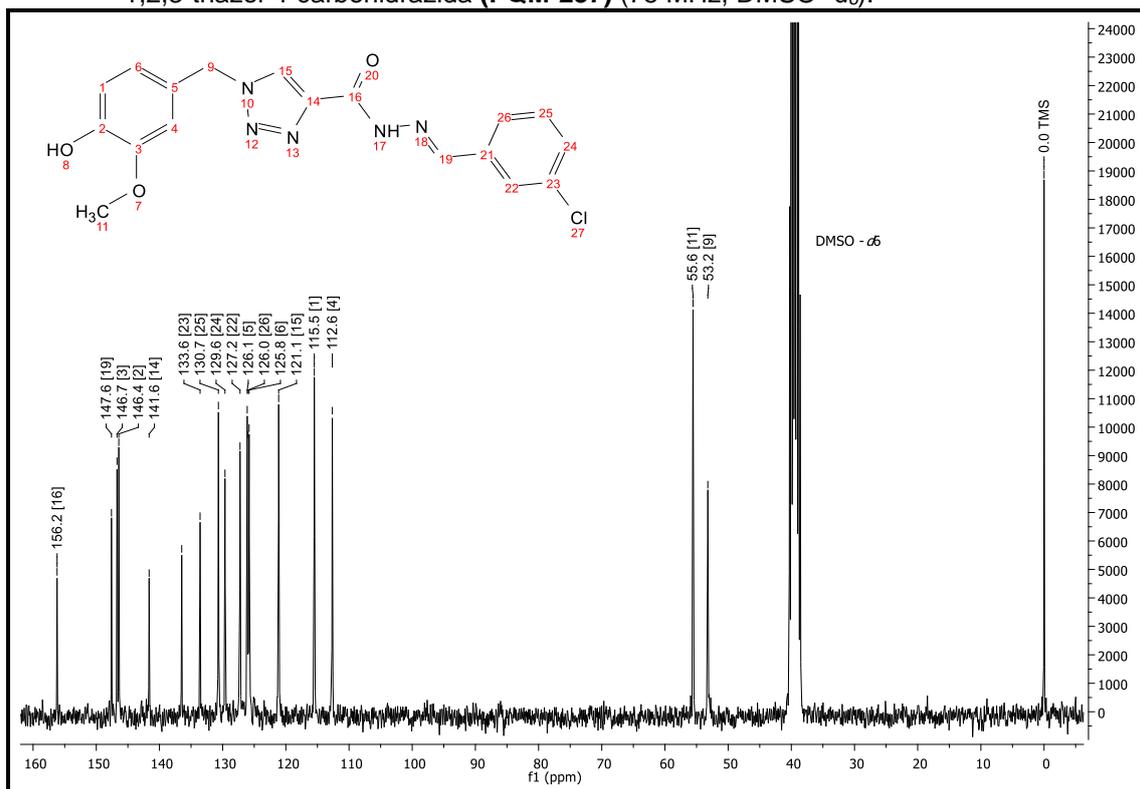
Fonte: do autor.

Figura A71 - Espectro de RMN de ¹H de (*E*)-*N'*-(3-clorobenzilideno)-1-(4-hidróxi-3-metóxi-benzil)-1*H*-1,2,3-triazol-4-carbohidrazida (**PQM-237**) (300 MHz, DMSO-*d*₆).



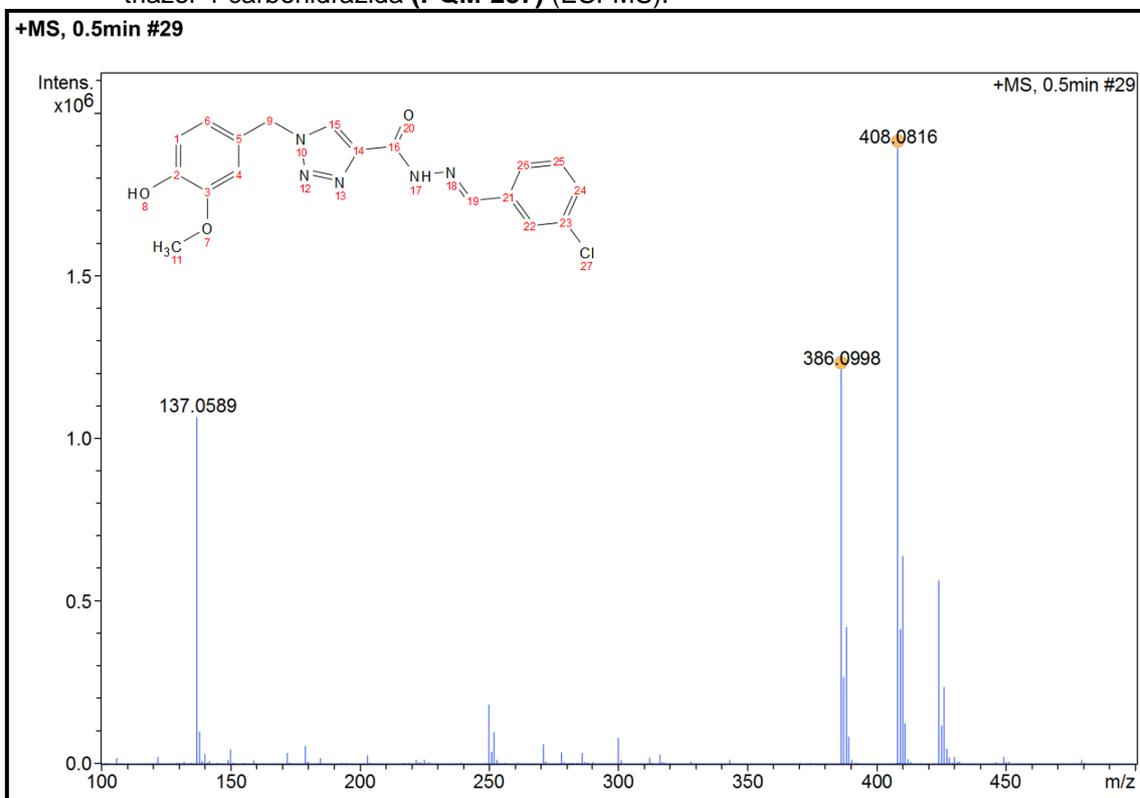
Fonte: do autor.

Figura A72 - Espectro de RMN de ^{13}C de (*E*)-*N'*-(3-clorobenzilideno)-1-(4-hidróxi-3-metóxi-benzil)-1*H*-1,2,3-triazol-4-carbohidrazida (**PQM-237**) (75 MHz, $\text{DMSO-}d_6$).



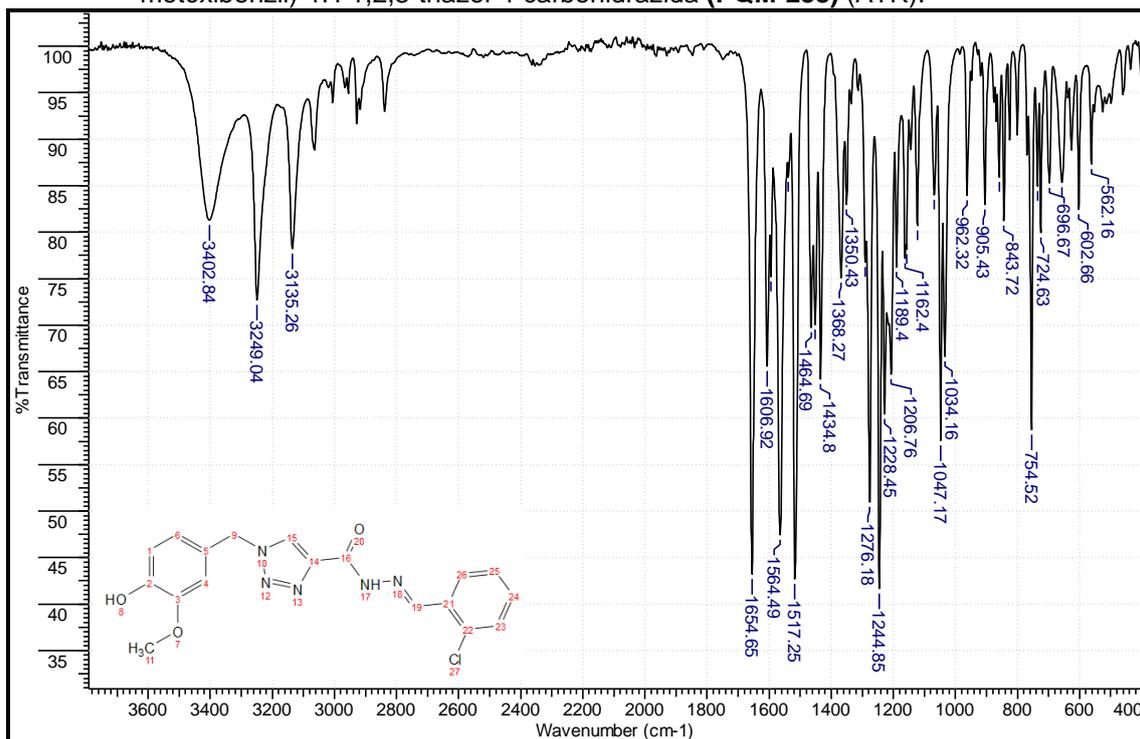
Fonte: do autor.

Figura A73 - Espectro de massas de (*E*)-*N'*-(3-clorobenzilideno)-1-(4-hidróxi-3-metóxi-benzil)-1*H*-1,2,3-triazol-4-carbohidrazida (**PQM-237**) (ESI-MS).



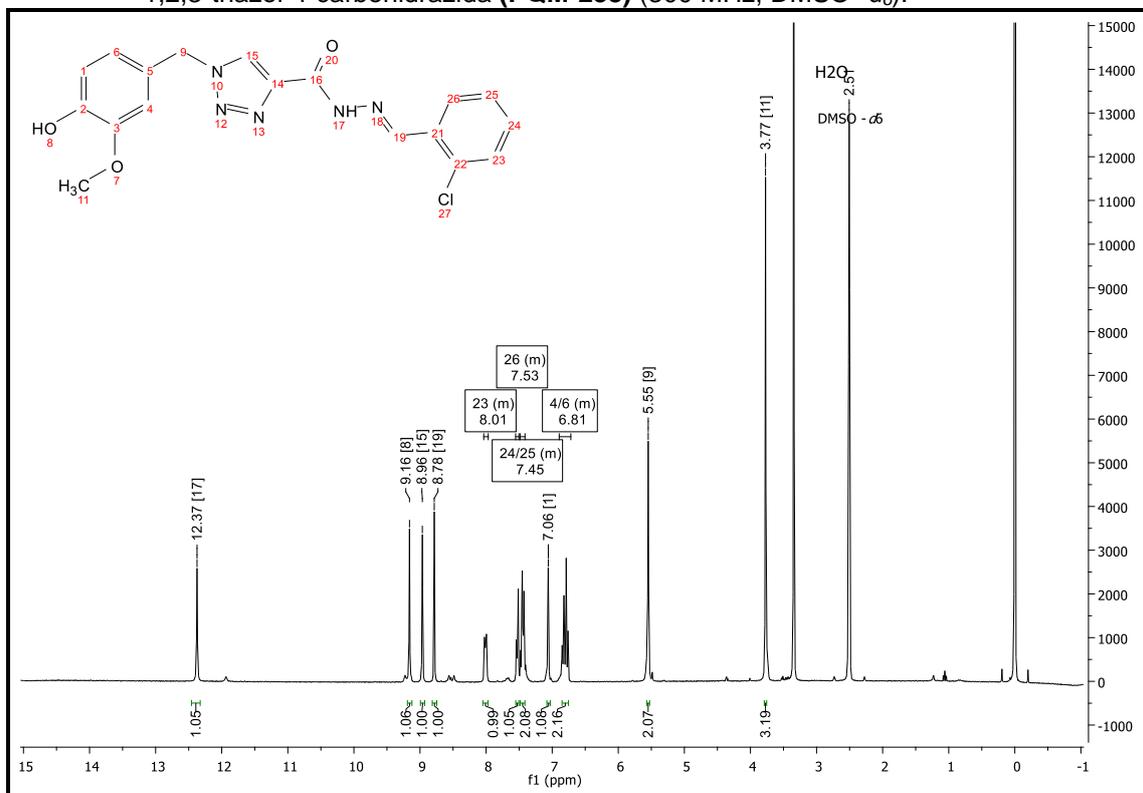
Fonte: do autor.

Figura A74 - Espectro de absorção na região do IV de (*E*)-*N'*-(2-clorobenzilideno)-1-(4-hidróxi-3-metóxi-benzil)-1H-1,2,3-triazol-4-carbohidrazida (**PQM-238**) (ATR).



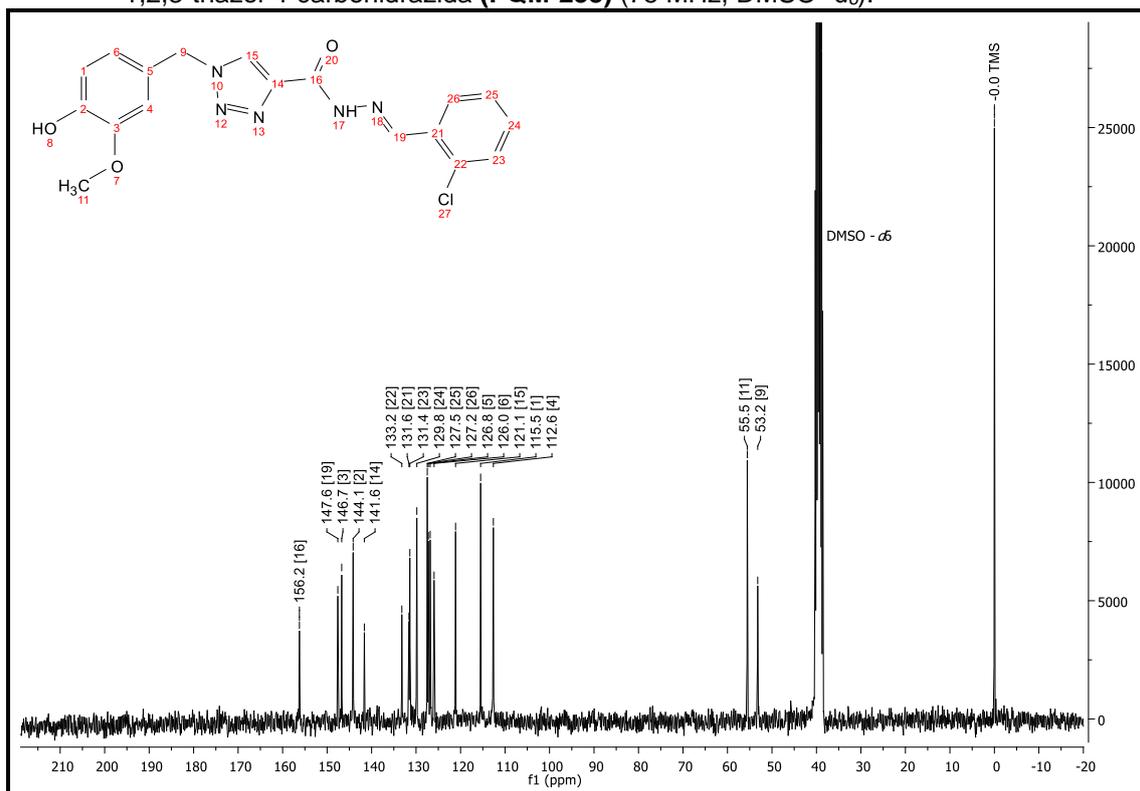
Fonte: do autor.

Figura A75 - Espectro de RMN de ^1H de (*E*)-*N'*-(2-clorobenzilideno)-1-(4-hidróxi-3-metóxi-benzil)-1H-1,2,3-triazol-4-carbohidrazida (**PQM-238**) (300 MHz, $\text{DMSO}-d_6$).



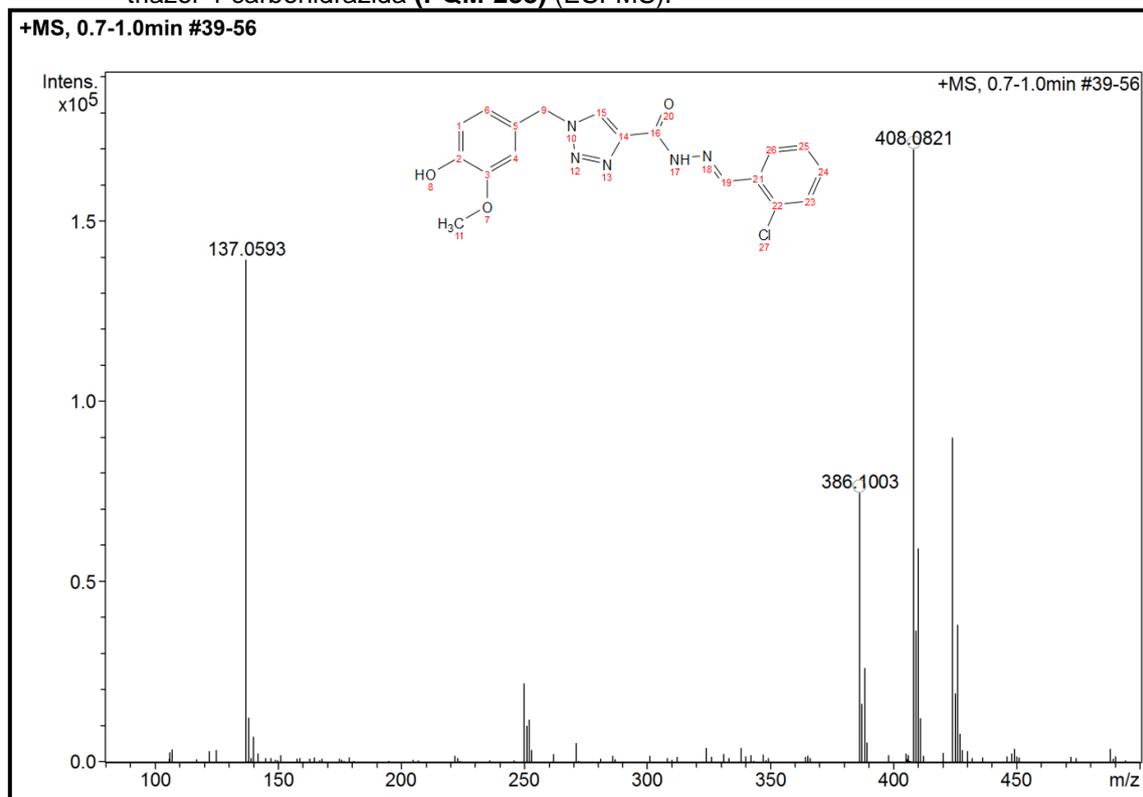
Fonte: do autor.

Figura A76 - Espectro de RMN de ^{13}C de (*E*)-*N'*-(2-clorobenzilideno)-1-(4-hidróxi-3-metóxi-benzil)-1*H*-1,2,3-triazol-4-carbohidrazida (**PQM-238**) (75 MHz, $\text{DMSO-}d_6$).



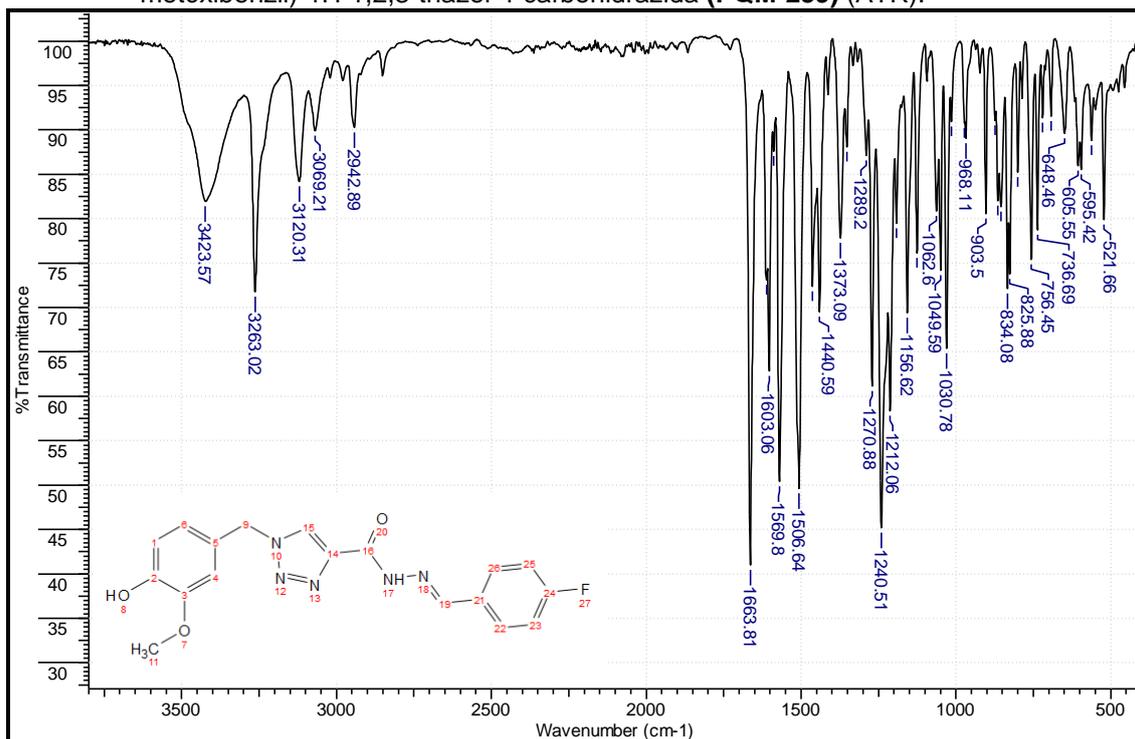
Fonte: do autor.

Figura A77 - Espectro de massas de (*E*)-*N'*-(2-clorobenzilideno)-1-(4-hidróxi-3-metóxi-benzil)-1*H*-1,2,3-triazol-4-carbohidrazida (**PQM-238**) (ESI-MS).



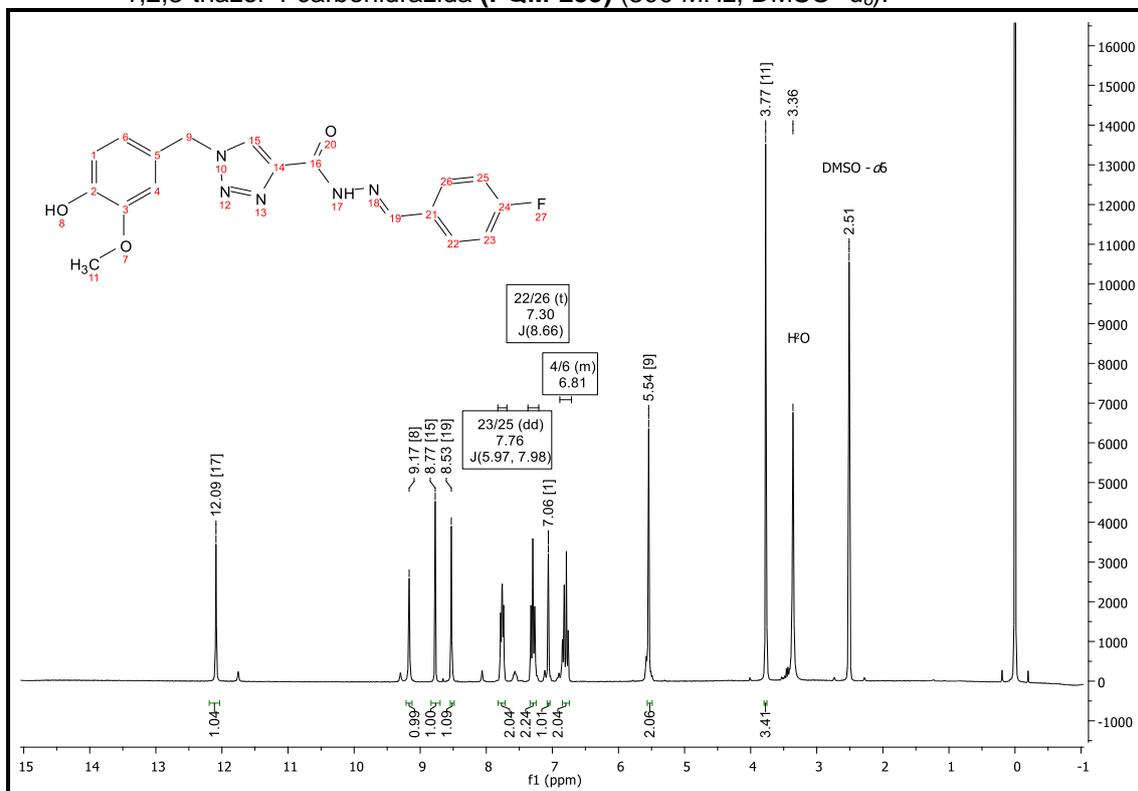
Fonte: do autor.

Figura A78 - Espectro de absorção na região do IV de (*E*)-*N'*-(4-fluorobenzilideno)-1-(4-hidróxi-3-metóxi-benzil)-1*H*-1,2,3-triazol-4-carbohidrazida (**PQM-239**) (ATR).



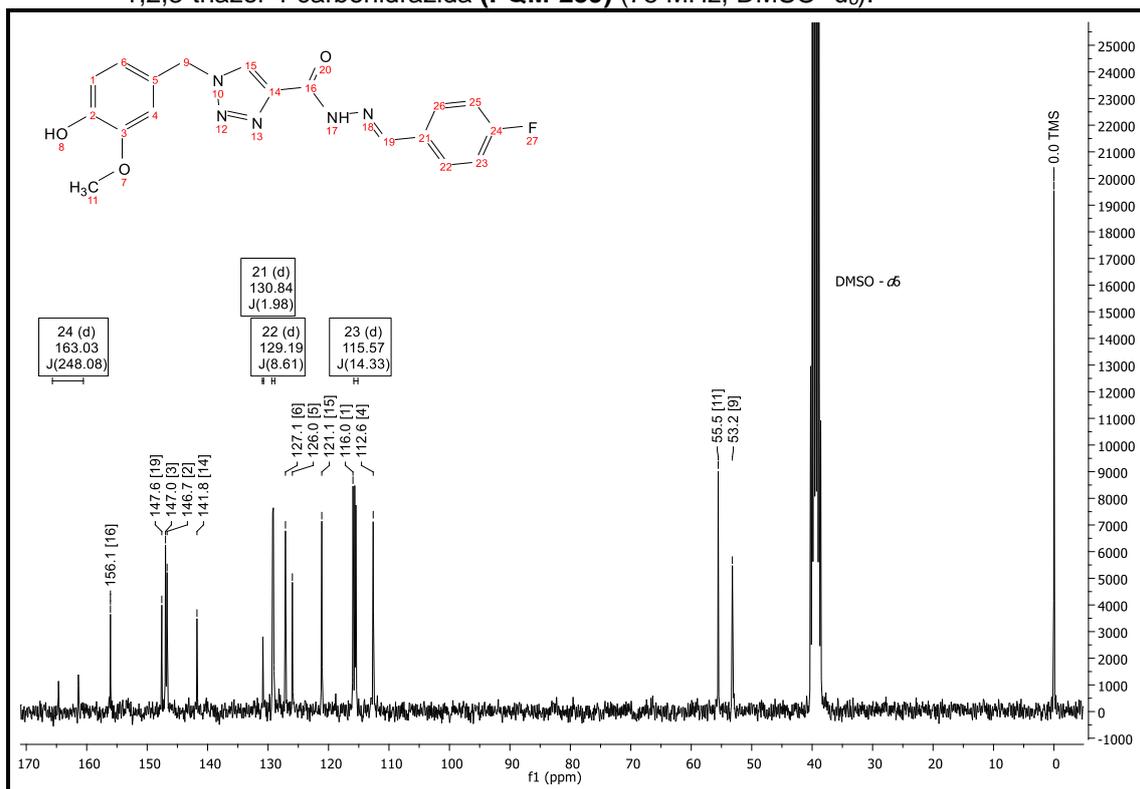
Fonte: do autor.

Figura A79 - Espectro de RMN de ¹H de (*E*)-*N'*-(4-fluorobenzilideno)-1-(4-hidróxi-3-metóxi-benzil)-1*H*-1,2,3-triazol-4-carbohidrazida (**PQM-239**) (300 MHz, DMSO-*d*₆).



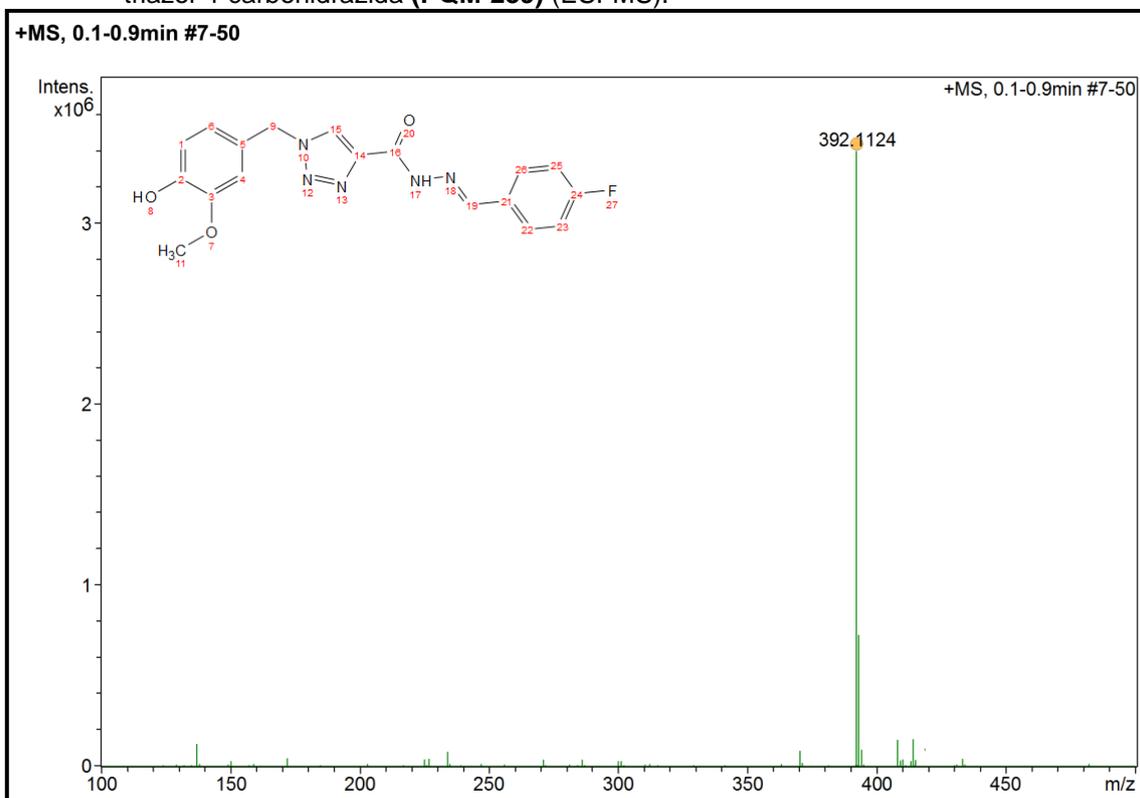
Fonte: do autor.

Figura A80 - Espectro de RMN de ^{13}C de (*E*)-*N'*-(4-fluorobenzilideno)-1-(4-hidróxi-3-metóxi-benzil)-1*H*-1,2,3-triazol-4-carbohidrazida (**PQM-239**) (75 MHz, $\text{DMSO-}d_6$).



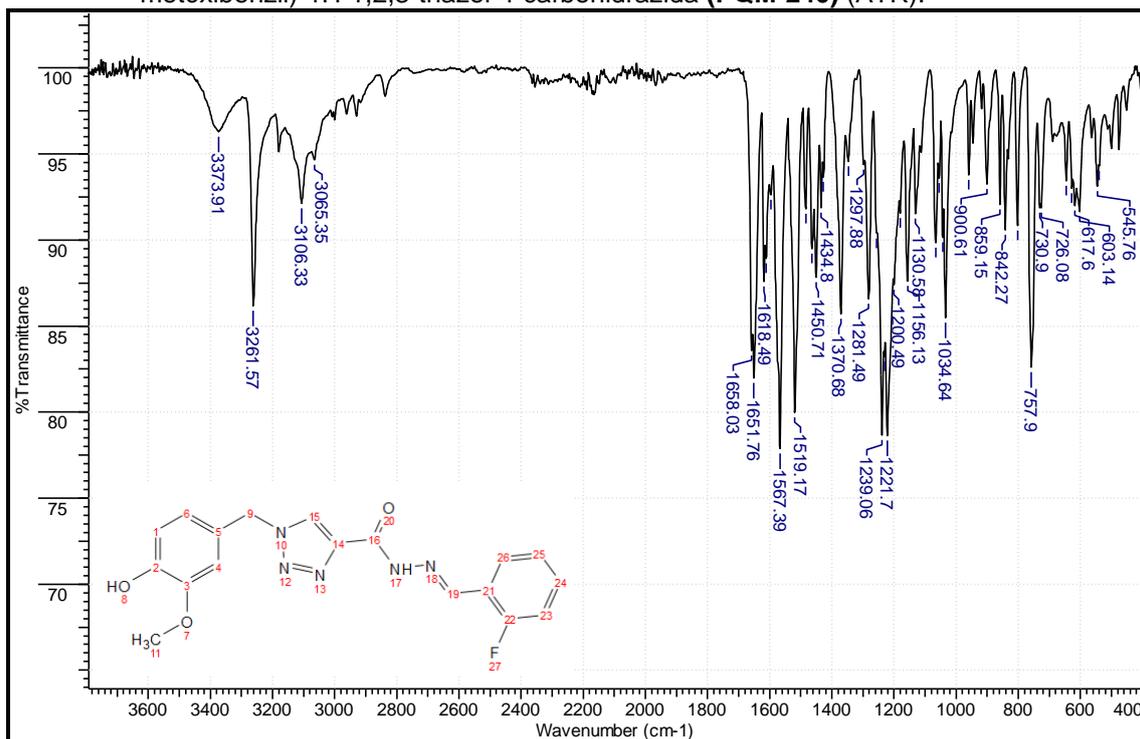
Fonte: do autor.

Figura A81 - Espectro de massas de (*E*)-*N'*-(4-fluorobenzilideno)-1-(4-hidróxi-3-metóxi-benzil)-1*H*-1,2,3-triazol-4-carbohidrazida (**PQM-239**) (ESI-MS).



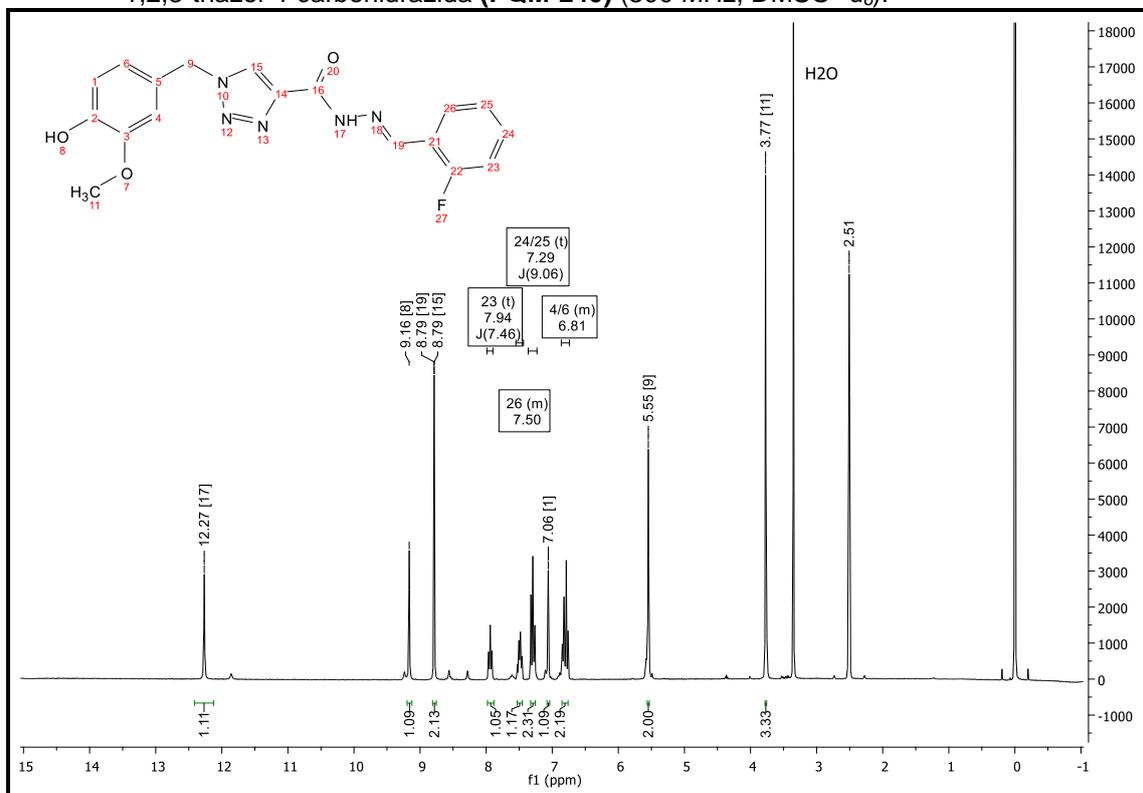
Fonte: do autor.

Figura A82 - Espectro de absorção na região do IV de (*E*)-*N'*-(3-fluorobenzilideno)-1-(4-hidróxi-3-metóxi-benzil)-1*H*-1,2,3-triazol-4-carbohidrazida (**PQM-240**) (ATR).



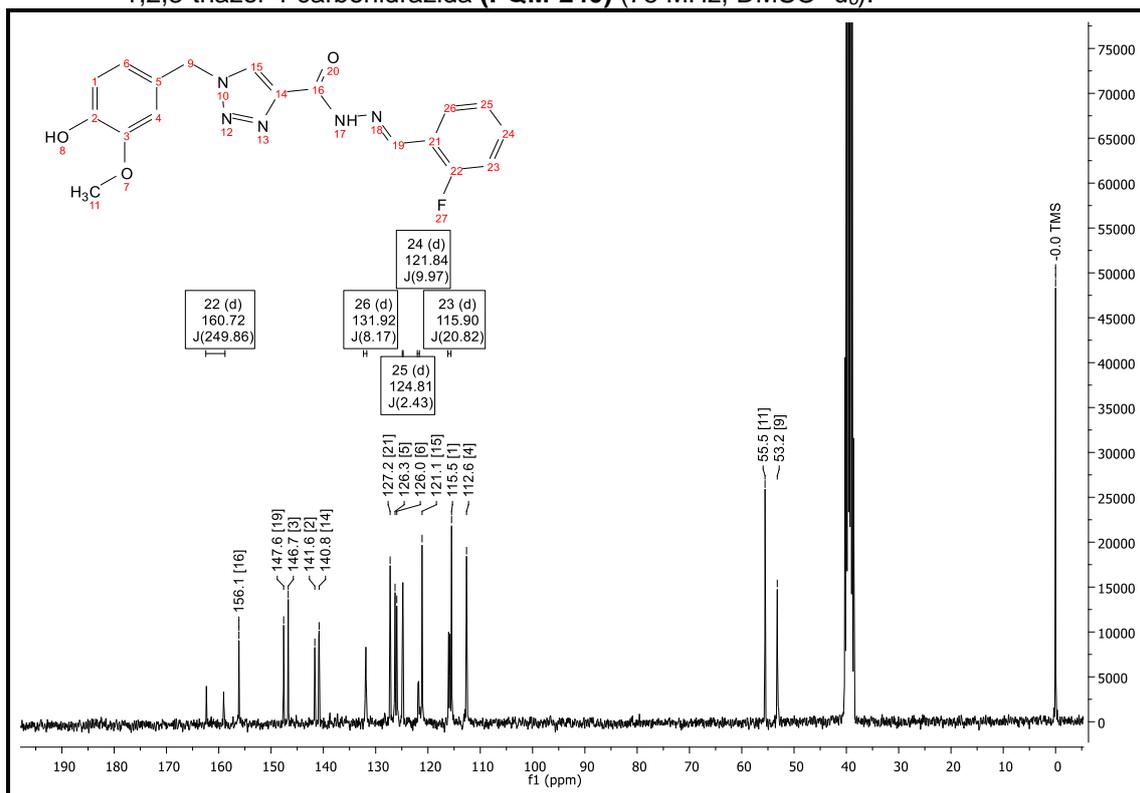
Fonte: do autor.

Figura A83 - Espectro de RMN de ¹H de (*E*)-*N'*-(3-fluorobenzilideno)-1-(4-hidróxi-3-metóxi-benzil)-1*H*-1,2,3-triazol-4-carbohidrazida (**PQM-240**) (300 MHz, DMSO-*d*₆).



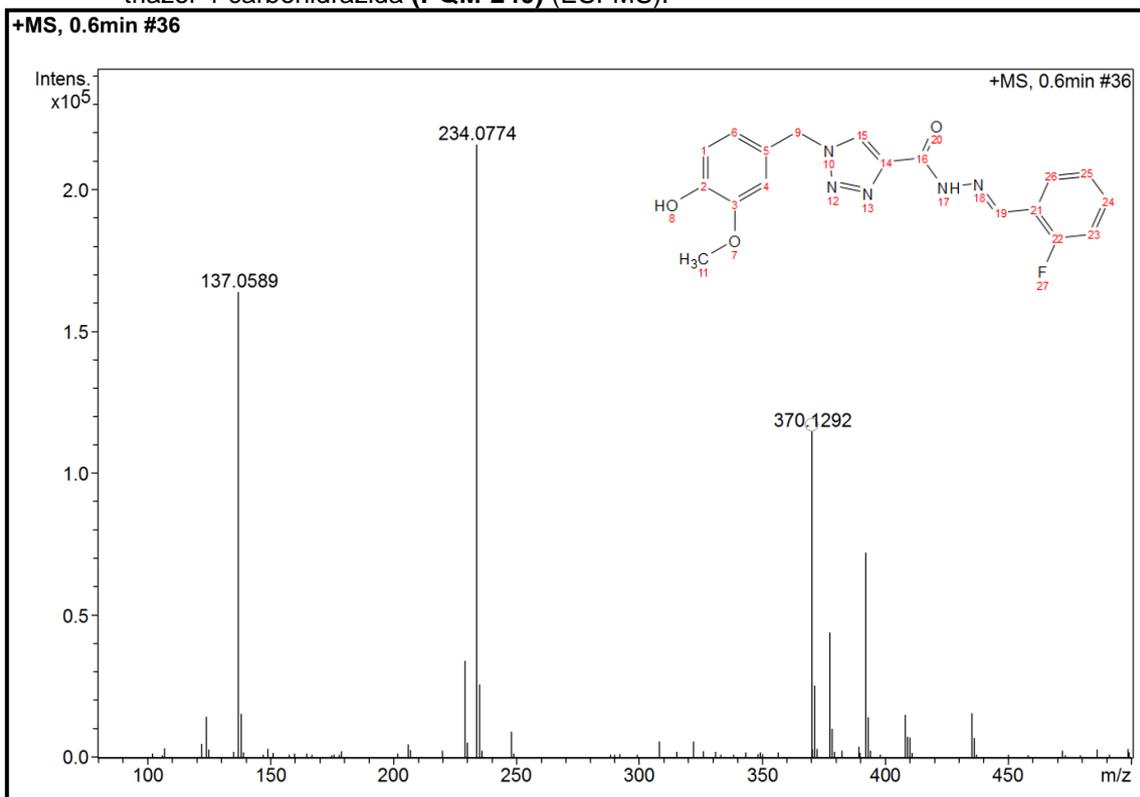
Fonte: do autor.

Figura A84 - Espectro de RMN de ^{13}C de (*E*)-*N'*-(3-fluorobenzilideno)-1-(4-hidróxi-3-metóxi-benzil)-1*H*-1,2,3-triazol-4-carbohidrazida (**PQM-240**) (75 MHz, $\text{DMSO-}d_6$).



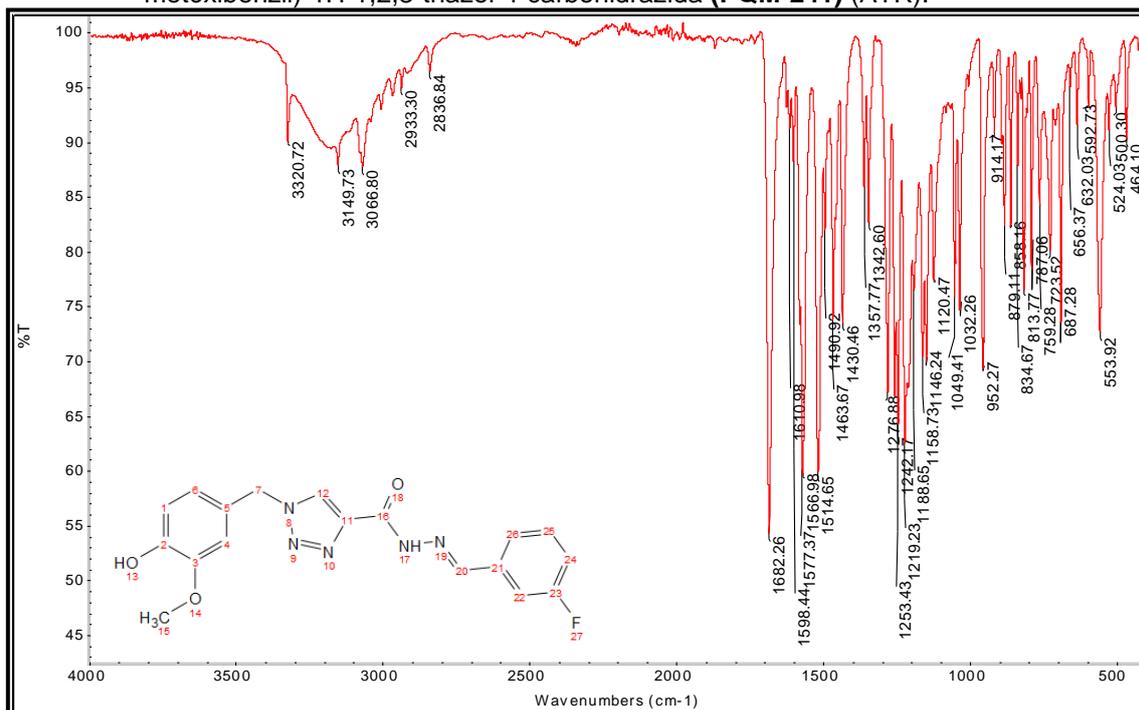
Fonte: do autor.

Figura A85 - Espectro de massas de (*E*)-*N'*-(3-fluorobenzilideno)-1-(4-hidróxi-3-metóxi-benzil)-1*H*-1,2,3-triazol-4-carbohidrazida (**PQM-240**) (ESI-MS).



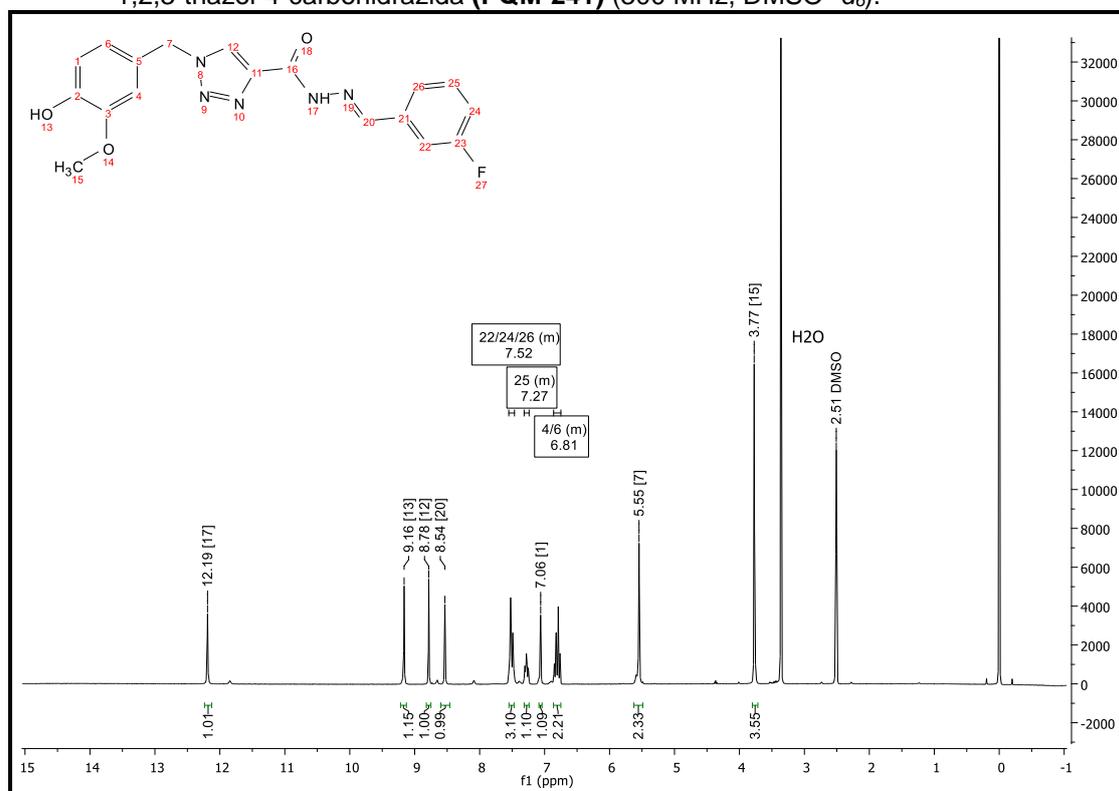
Fonte: do autor.

Figura A86 - Espectro de absorção na região do IV de (*E*)-*N'*-(2-fluorobenzilideno)-1-(4-hidróxi-3-metóxi-benzil)-1*H*-1,2,3-triazol-4-carbohidrazida (**PQM-241**) (ATR).



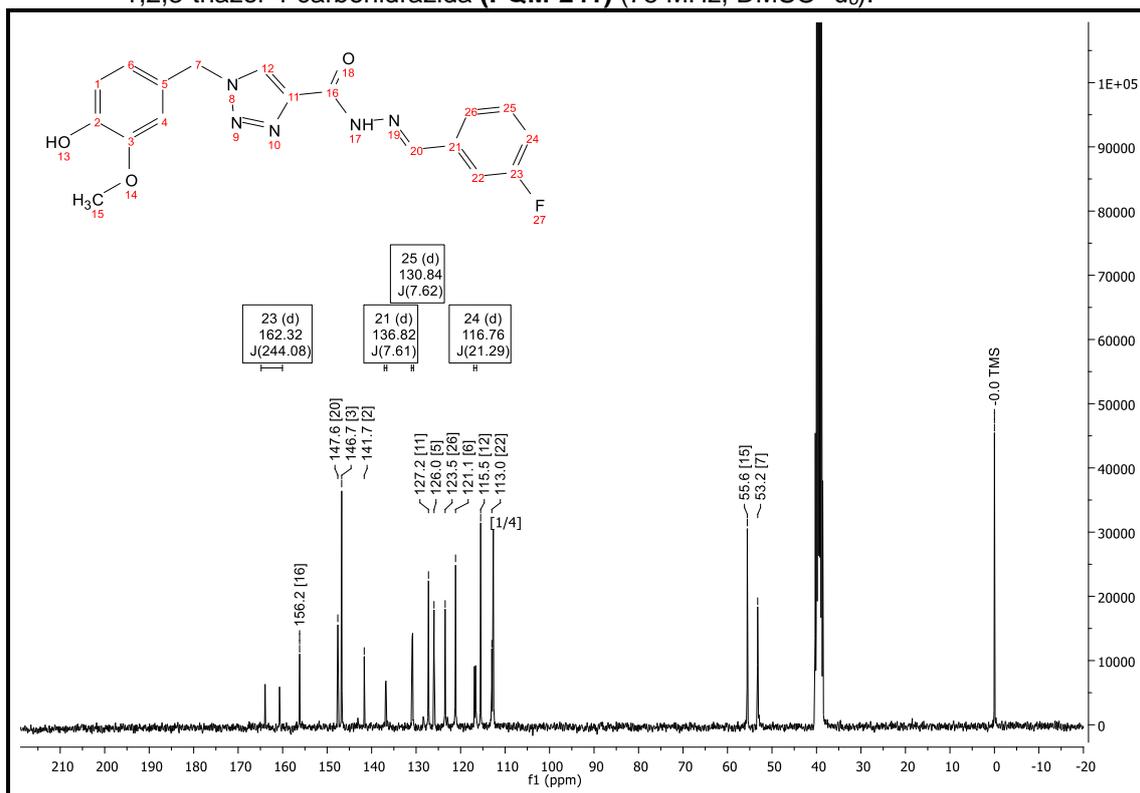
Fonte: do autor.

Figura A87 - Espectro de RMN de ^1H de (*E*)-*N'*-(2-fluorobenzilideno)-1-(4-hidróxi-3-metóxi-benzil)-1*H*-1,2,3-triazol-4-carbohidrazida (**PQM-241**) (300 MHz, $\text{DMSO-}d_6$).



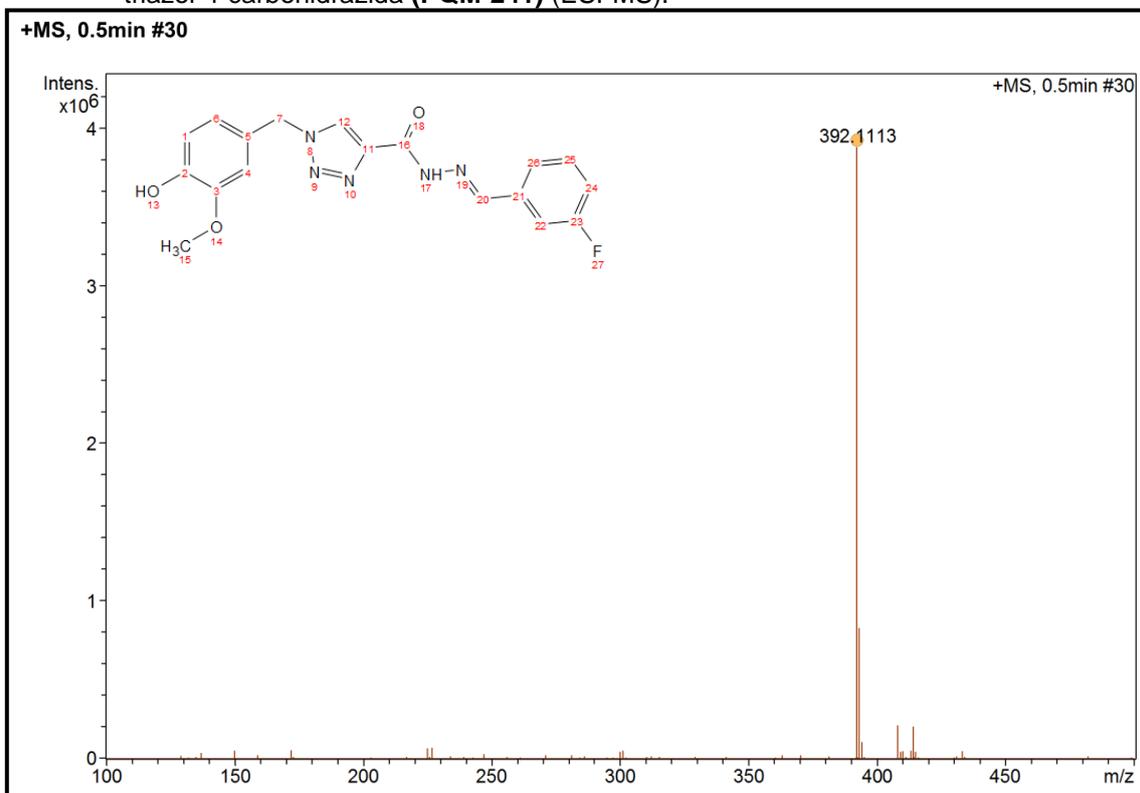
Fonte: do autor.

Figura A88 - Espectro de RMN de ^{13}C de (*E*)-*N'*-(2-fluorobenzilideno)-1-(4-hidróxi-3-metóxi-benzil)-1*H*-1,2,3-triazol-4-carbohidrazida (**PQM-241**) (75 MHz, $\text{DMSO-}d_6$).



Fonte: do autor.

Figura A89 - Espectro de massas de (*E*)-*N'*-(2-fluorobenzilideno)-1-(4-hidróxi-3-metóxi-benzil)-1*H*-1,2,3-triazol-4-carbohidrazida (**PQM-241**) (ESI-MS).

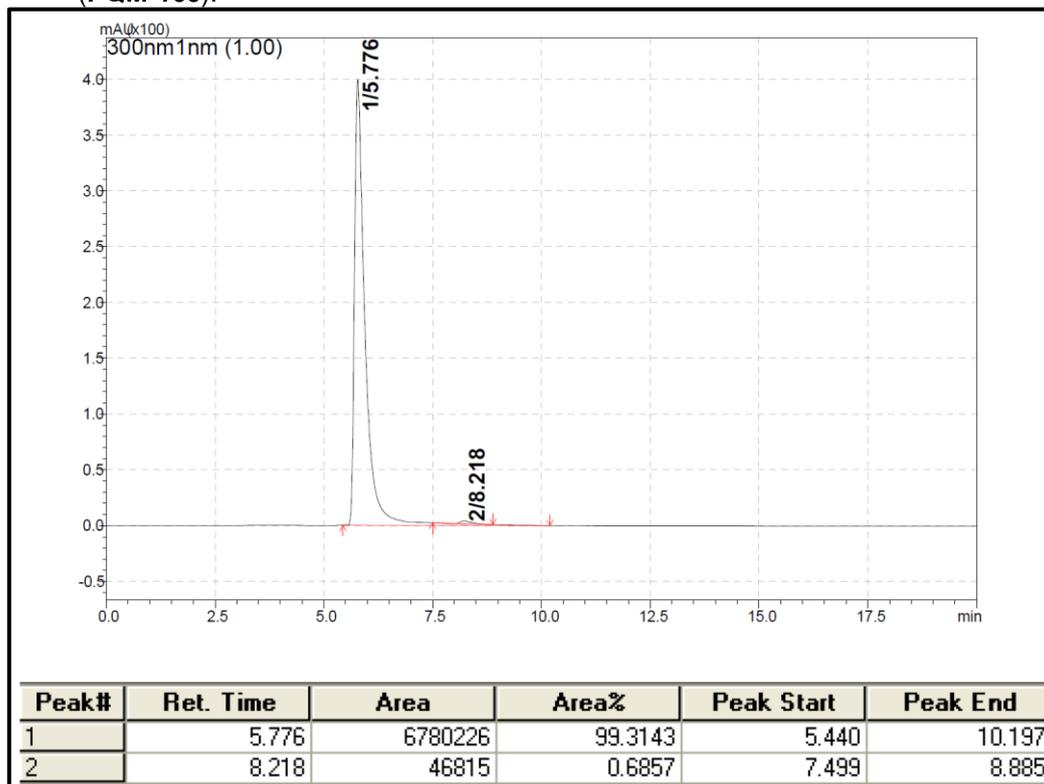


Fonte: do autor.

CROMATOGRAMAS PARA DETERMINAÇÃO DE PUREZA POR HPLC

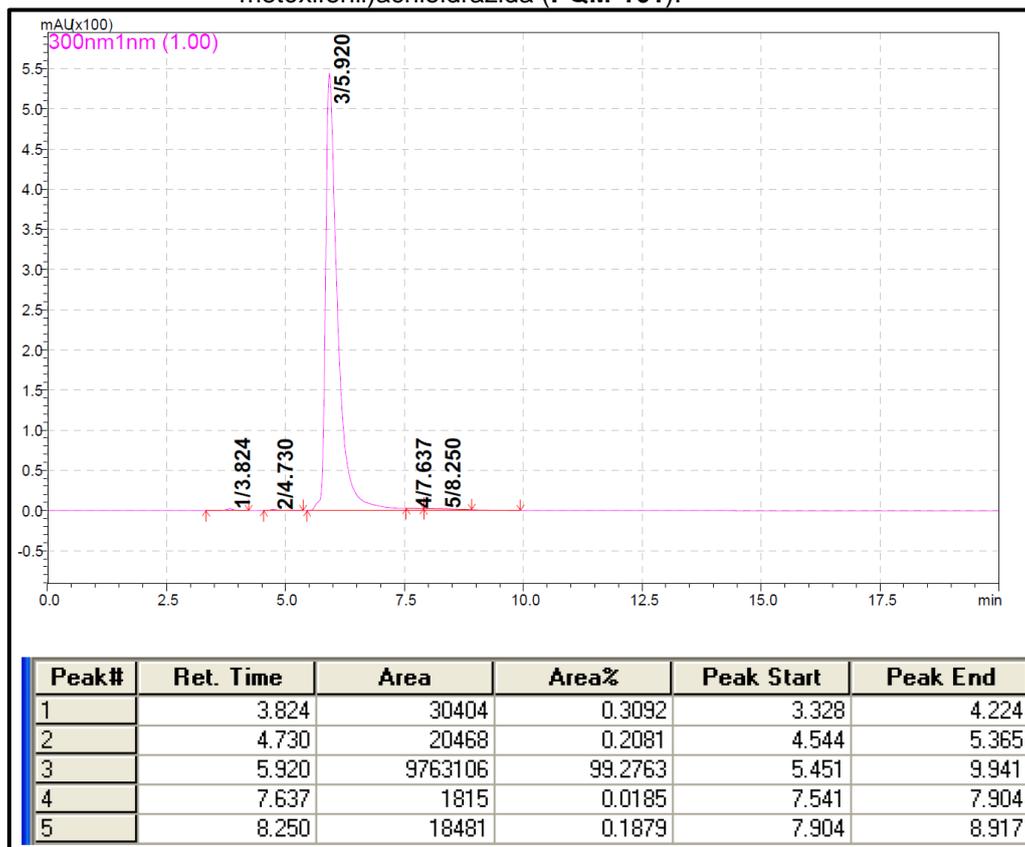
COMPOSTOS DERIVADOS DOS ÁCIDOS CINÂMICOS.

Figura A90 - Cromatograma de (*E*)-3-(4-hidróxi-3-metóxi-fenil)-*N*-(4-hidróxibenzilideno)acriloidrazida (PQM-160).



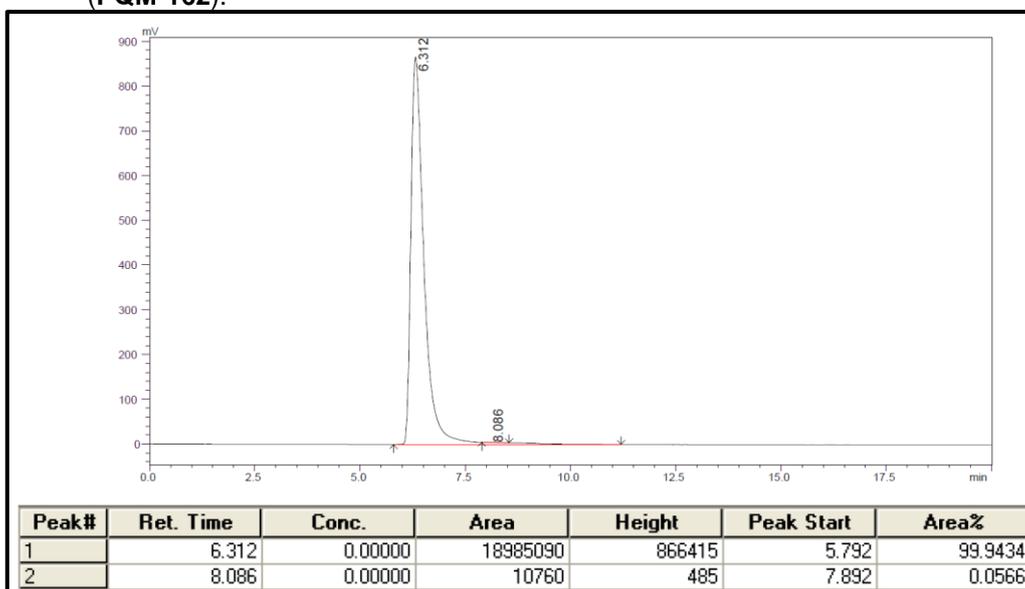
Fonte: do autor.

Figura A91 - Cromatograma de (*E*)-*N'*-(3,5-dihróxibenzilideno)-3-(4-hidróxi-3-metóxi-fenil)acriloidrazida (PQM-161).



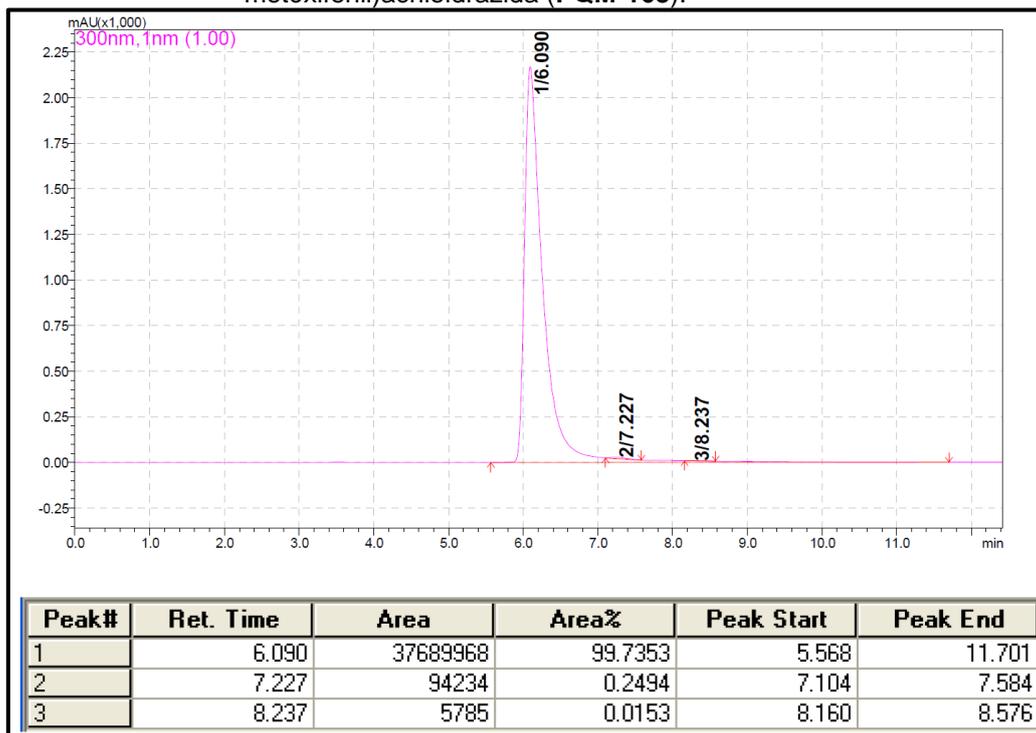
Fonte: do autor.

Figura A92 - Cromatograma de (*E*)-3-(4-hidróxi-3-metóxi-fenil)-*N'*-(4-metóxi-benzilideno)acriloidrazida (PQM-162).



Fonte: do autor.

Figura A93 - Cromatograma de (E)-N'-(3,5-dimetóxicbenzilideno)-3-(4-hidróxi-3-metóxicfenil)acriloidrazida (PQM-163).



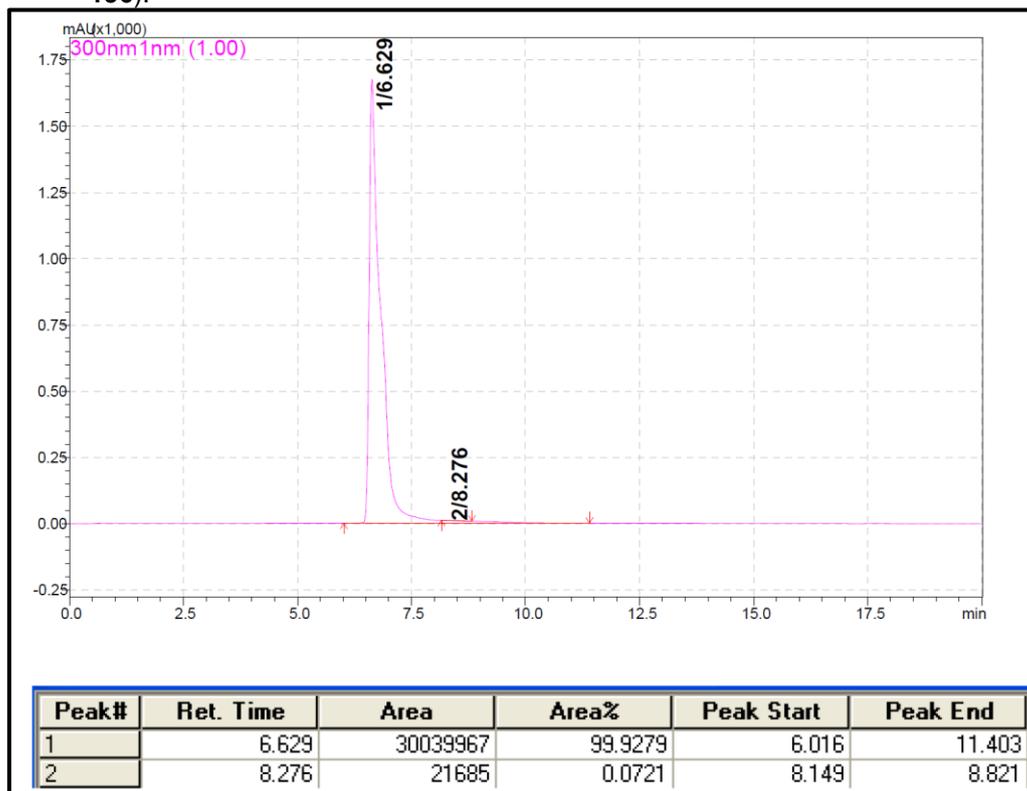
Fonte: do autor.

Figura A94 - Cromatograma de 2-N-(4-hidróxi-3-metóxicbenzil)-3-(4-hidróxi-3-metóxicfenil)-acriloidrazida (PQM-164).



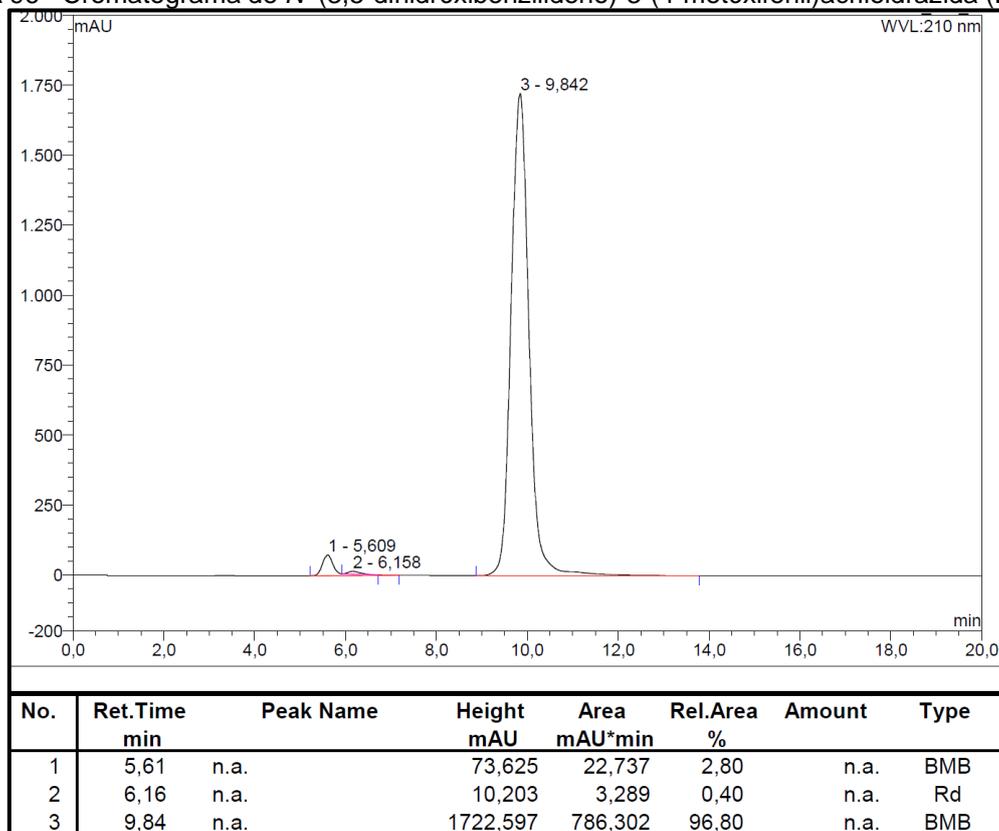
Fonte: do autor.

Figura A95 - Cromatograma de (E)-N'-((E)-4-hidróxibenzilideno)-3-(4-metóxfenil)acriloidrazida (PQM-196).

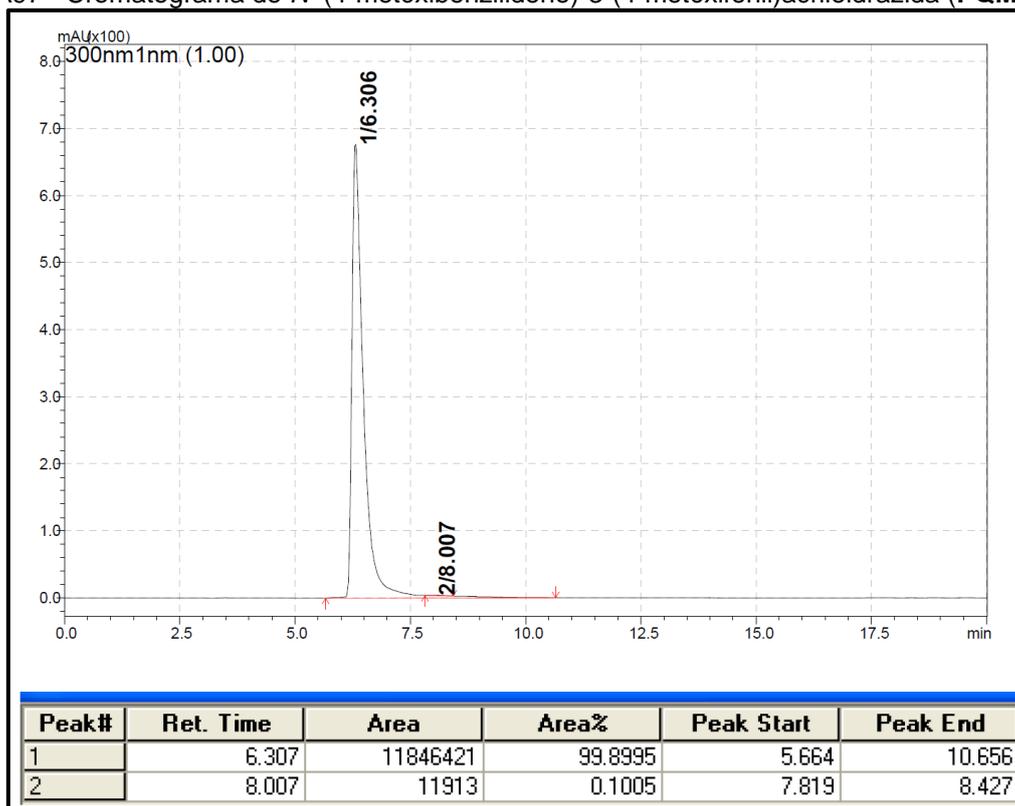


Fonte: do autor.

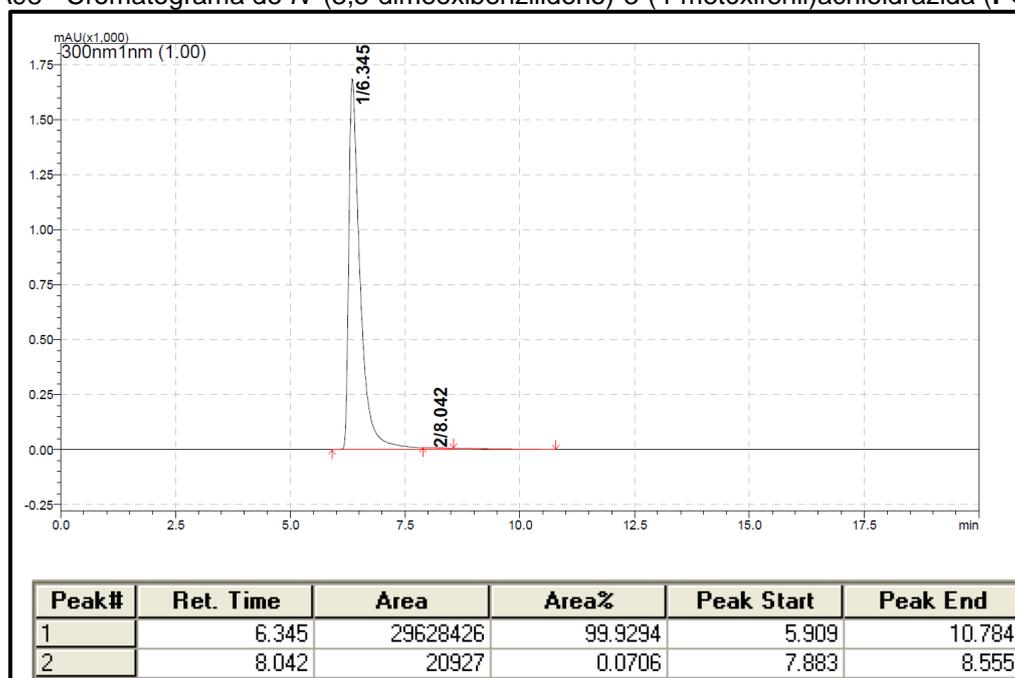
Figura A 96 - Cromatograma de N'-(3,5-dihidróxibenzilideno)-3-(4-metóxfenil)acriloidrazida (PQM-197)



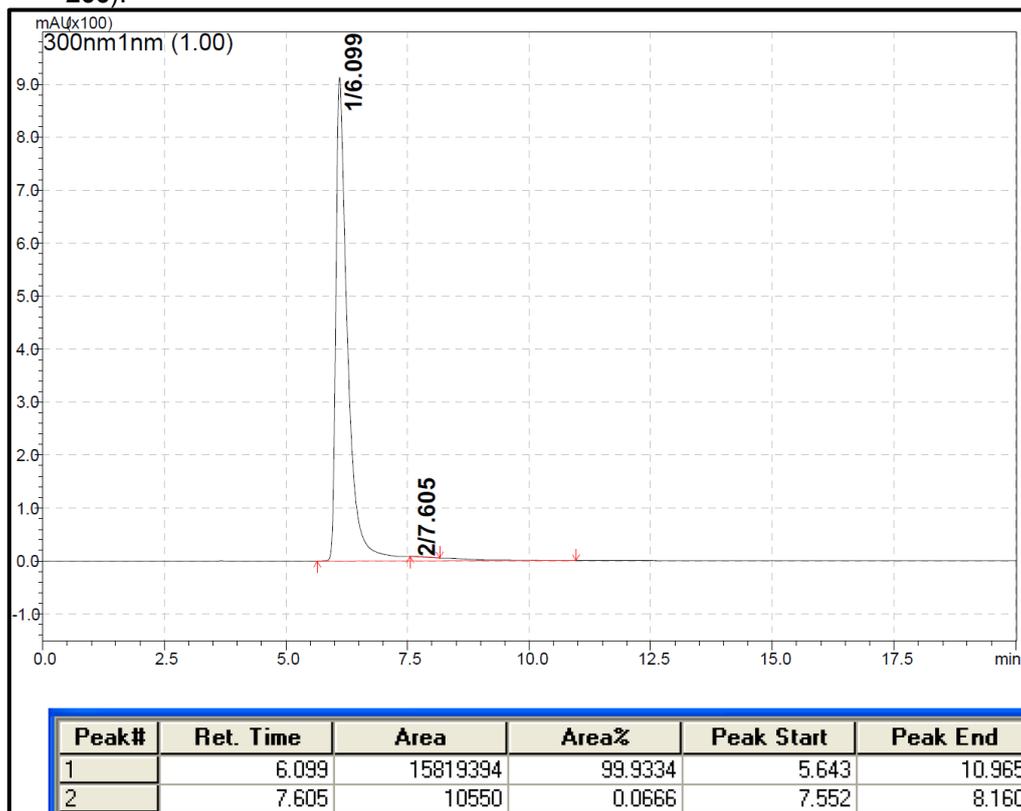
Fonte: do autor.

Figura A97 - Cromatograma de *N*-(4-metóxi-benzilideno)-3-(4-metóxi-fenil)acriloidrazida (PQM-198).

Fonte: do autor.

Figura A98 - Cromatograma de *N*-(3,5-dimeoxibenzilideno)-3-(4-metóxi-fenil)acriloidrazida (PQM-199).

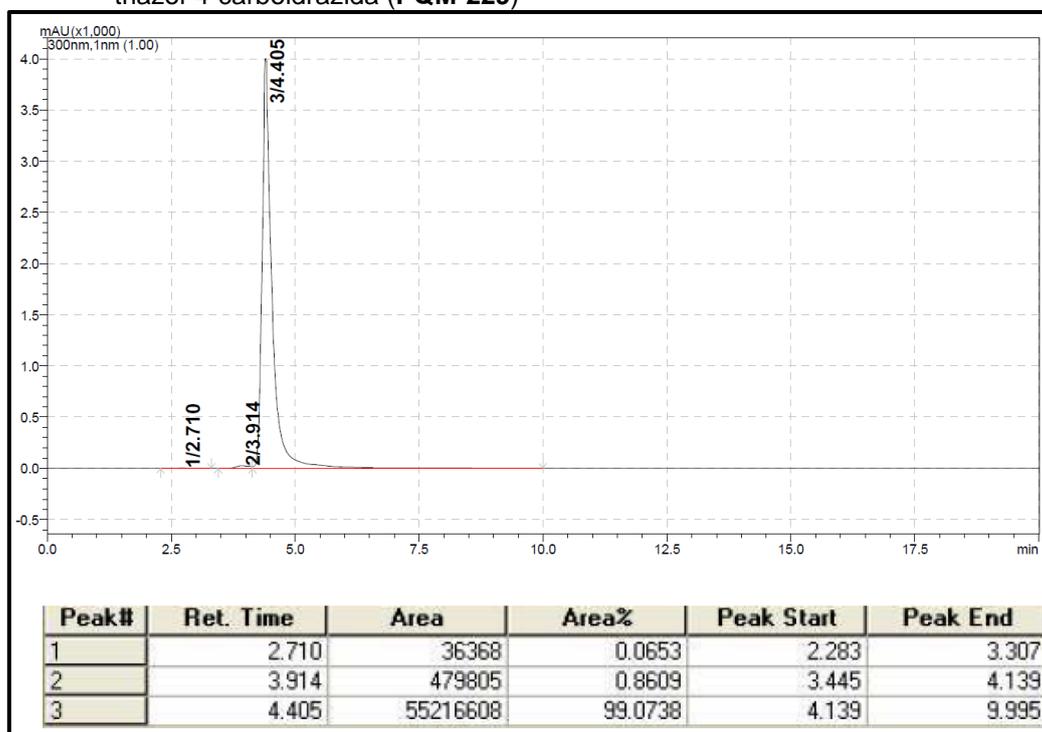
Fonte: do autor.

Figura A99 - Cromatograma de *N*-(4-hidróxi-3-metóxi-benzilideno)-3-(4-metóxi-fenil)acriloidrazida (PQM-200).

Fonte: do autor.

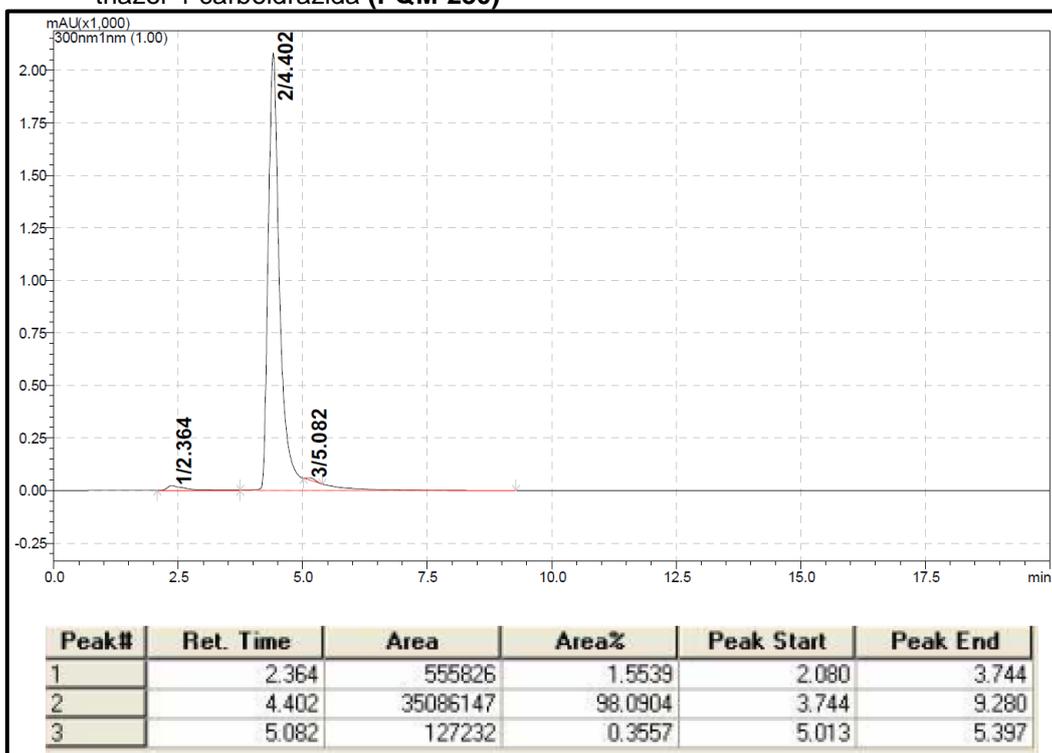
COMPOSTOS DERIVADOS TRIAZÓLICOS

Figura A 100 - Cromatograma de (*E*)-1-(4-hidróxi-3-metóxi-benzil)-*N*-(4-hidróxi-benzilideno)-1*H*-1,2,3-triazol-4-carboidrazida (**PQM-229**)



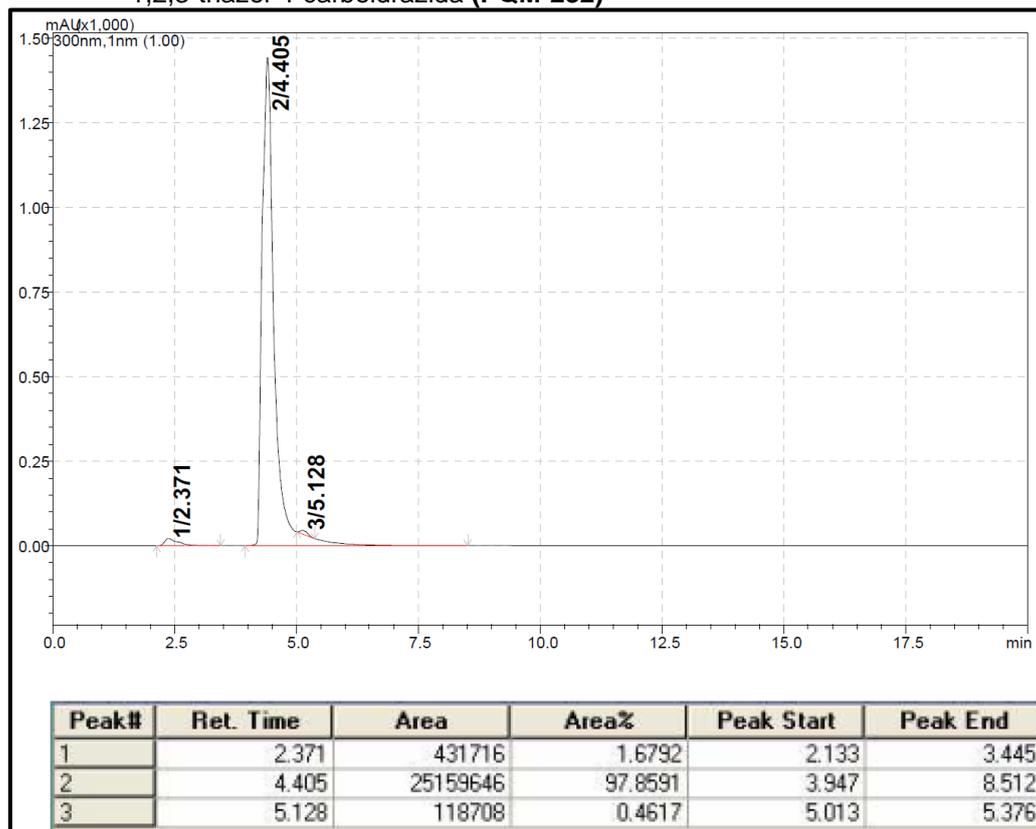
Fonte: do autor.

Figura A 101 – Cromatograma de (*E*)-*N*-(3,5-diidróxi-benzilideno)-1-(4-hidróxi-3-metóxi-benzil)-1*H*-1,2,3-triazol-4-carboidrazida (**PQM-230**)



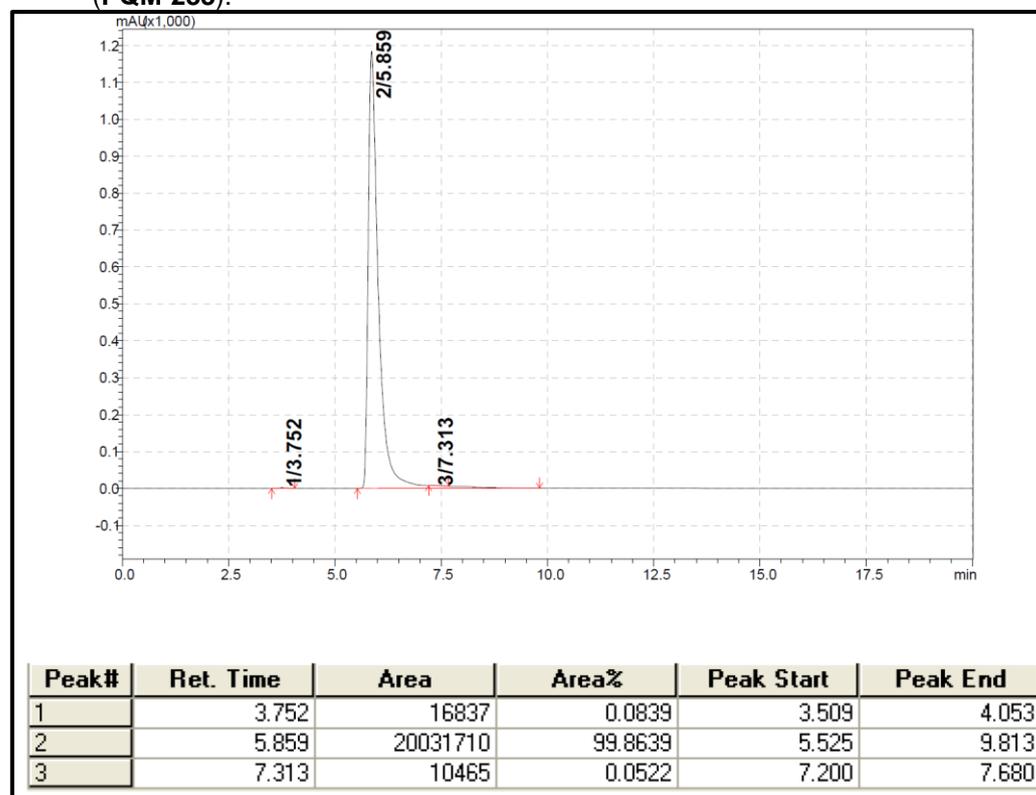
Fonte: do autor.

Figura A 102 – Cromatograma de (*E*)-*N'*-(3,5-dimetóxi benzilideno)-1-(4-hidróxi-3-metóxi benzil)-1*H*-1,2,3-triazol-4-carboidrazida (**PQM-232**)



Fonte: do autor.

Figura A103 - Cromatograma de 2-*N*-(4-hidróxi-3-metóxi benzil)-3-(4-hidróxi-3-metóxi fenil)acriloidrazida (**PQM-233**).



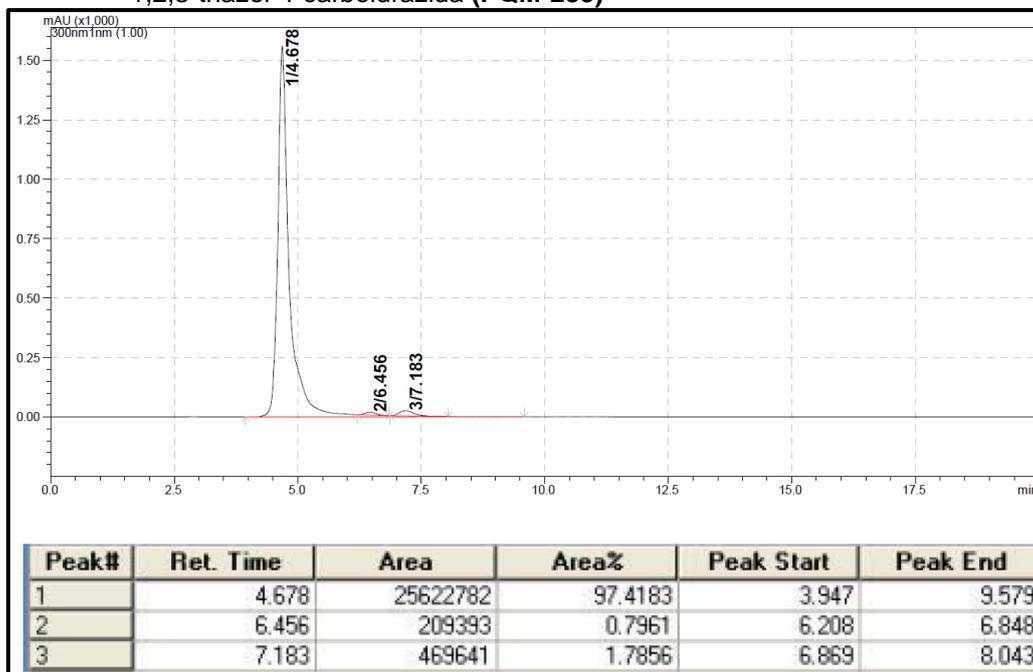
Fonte: do autor.

Figura A 104 – Cromatograma de (*E*)-*N*'-benzilideno-1-(4-hidróxi-3-metóxi-benzil)-1*H*-1,2,3-triazol-4-carboidrazida(**PQM-234**)



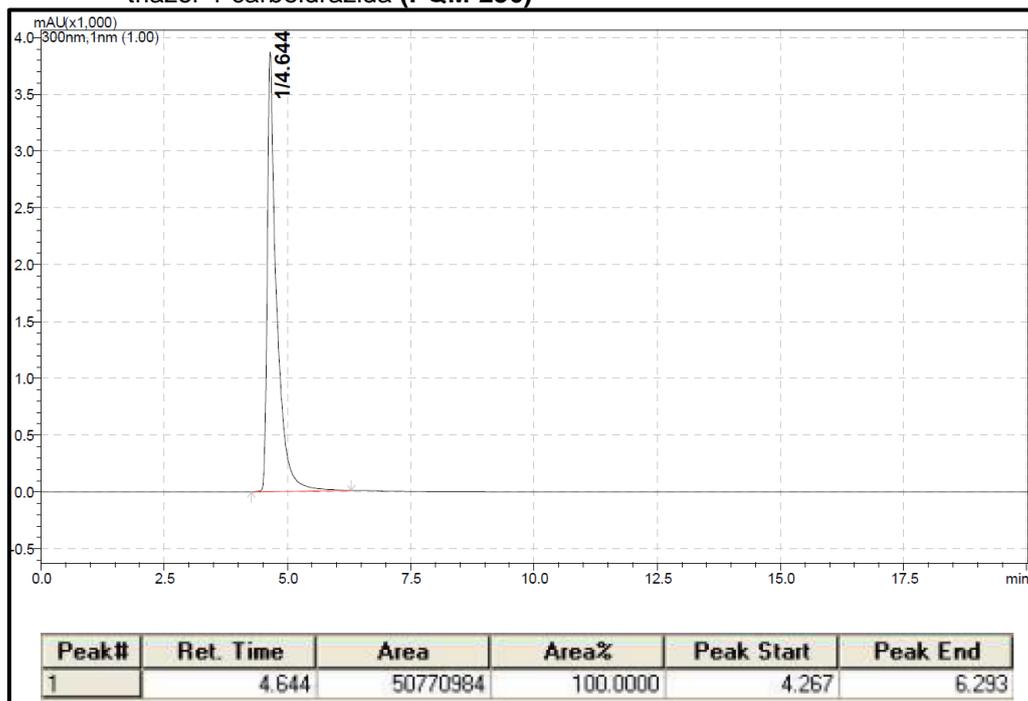
Fonte: do autor.

Figura A 105 - Cromatograma de (*E*)-1-(4-hidróxi-3-metóxi-benzil)-*N*'-(4-(piperidinil)benzilideno)-1*H*-1,2,3-triazol-4-carboidrazida (**PQM-235**)



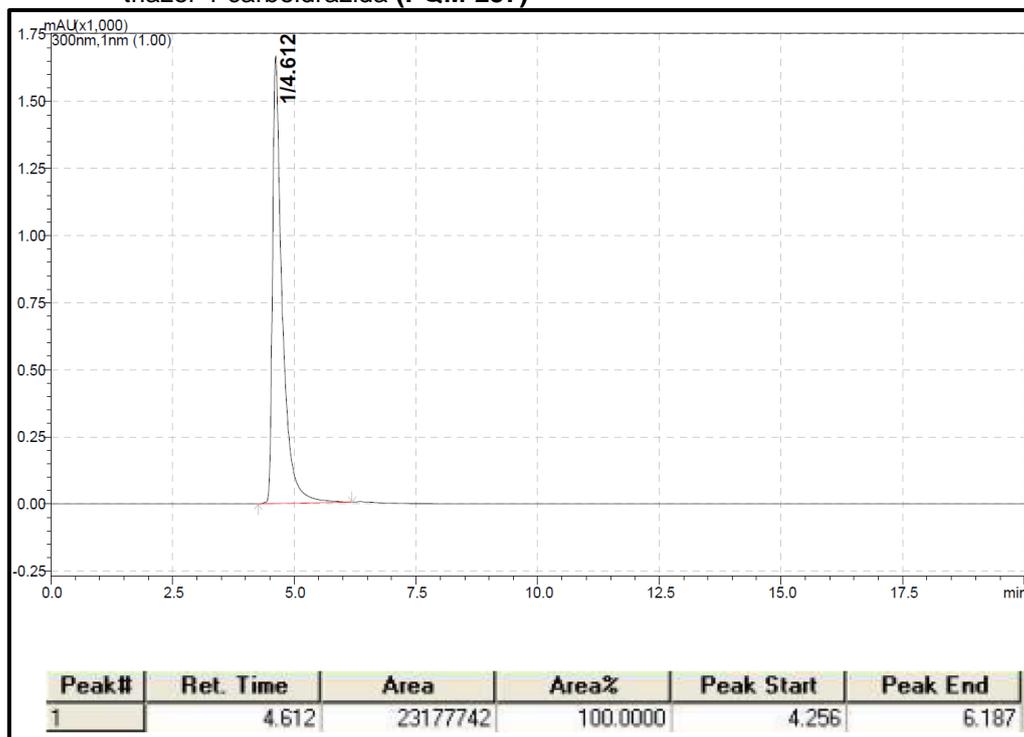
Fonte: do autor.

Figura A 106 - Cromatograma de (*E*)-*N*-(4-clorobenzilideno)-1-(4-hidróxi-3-metóxi-benzil)-1*H*-1,2,3-triazol-4-carboidrazida (**PQM-236**)



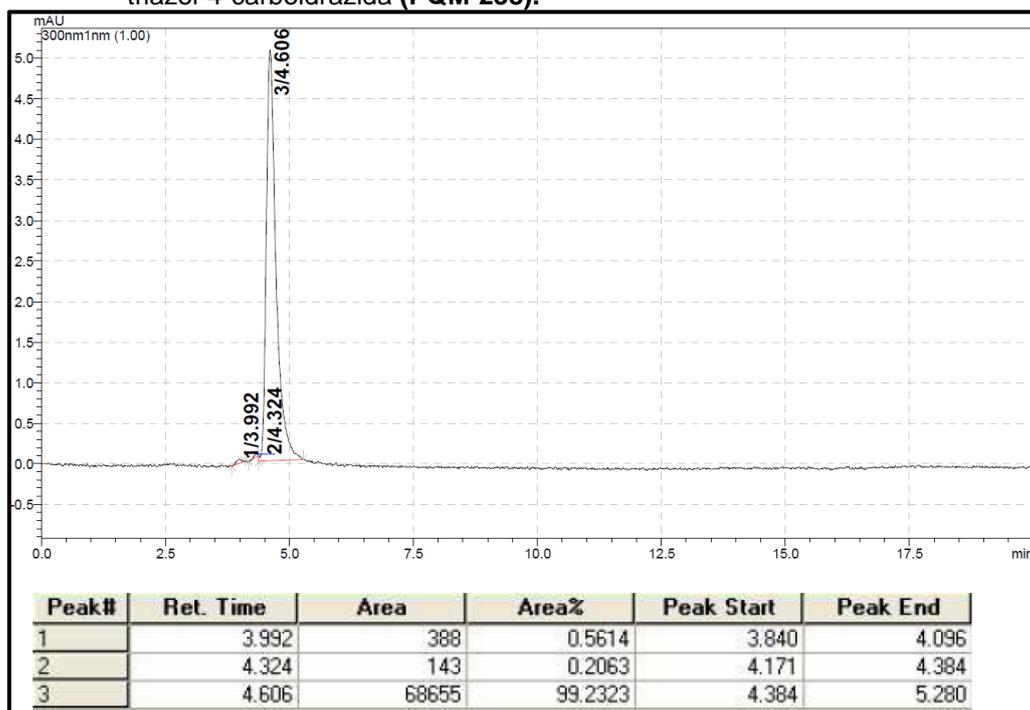
Fonte: do autor.

Figura A 107 - Cromatograma de (*E*)-*N*-(3-clorobenzilideno)-1-(4-hidróxi-3-metóxi-benzil)-1*H*-1,2,3-triazol-4-carboidrazida (**PQM-237**)



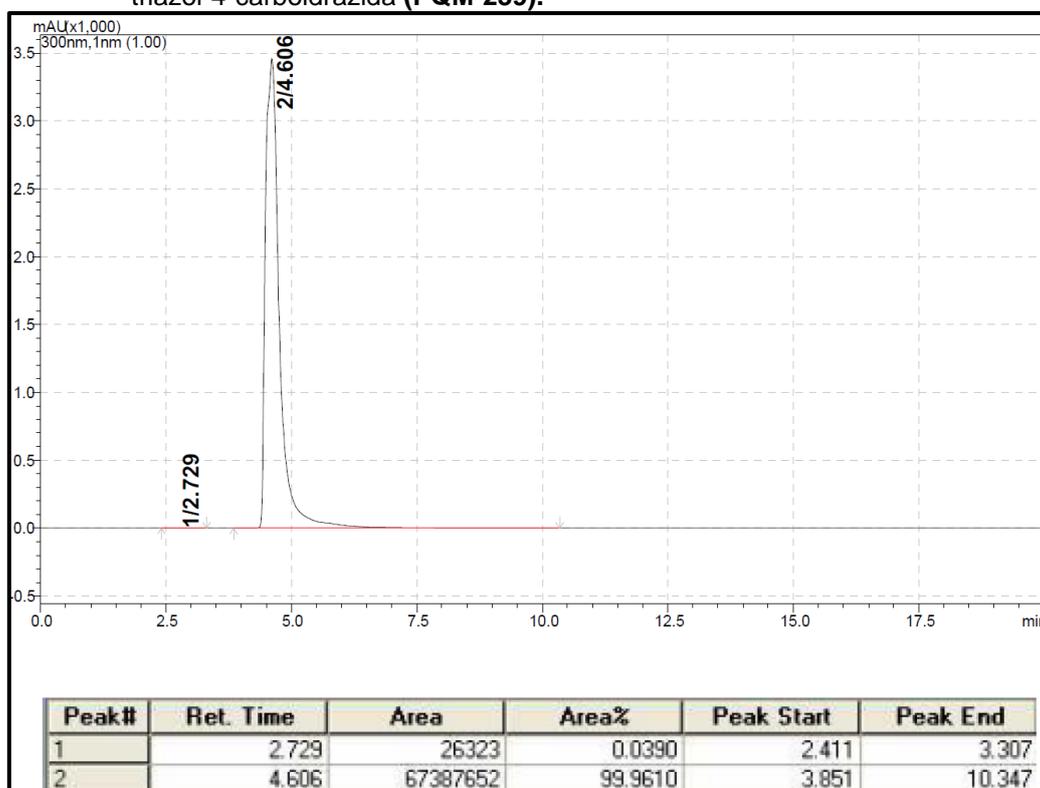
Fonte: do autor.

Figura A 108 - Cromatograma de (*E*)-*N*-(2-clorobenzilideno)-1-(4-hidróxi-3-metóxi-benzil)-1*H*-1,2,3-triazol-4-carboidrazida (**PQM-238**).



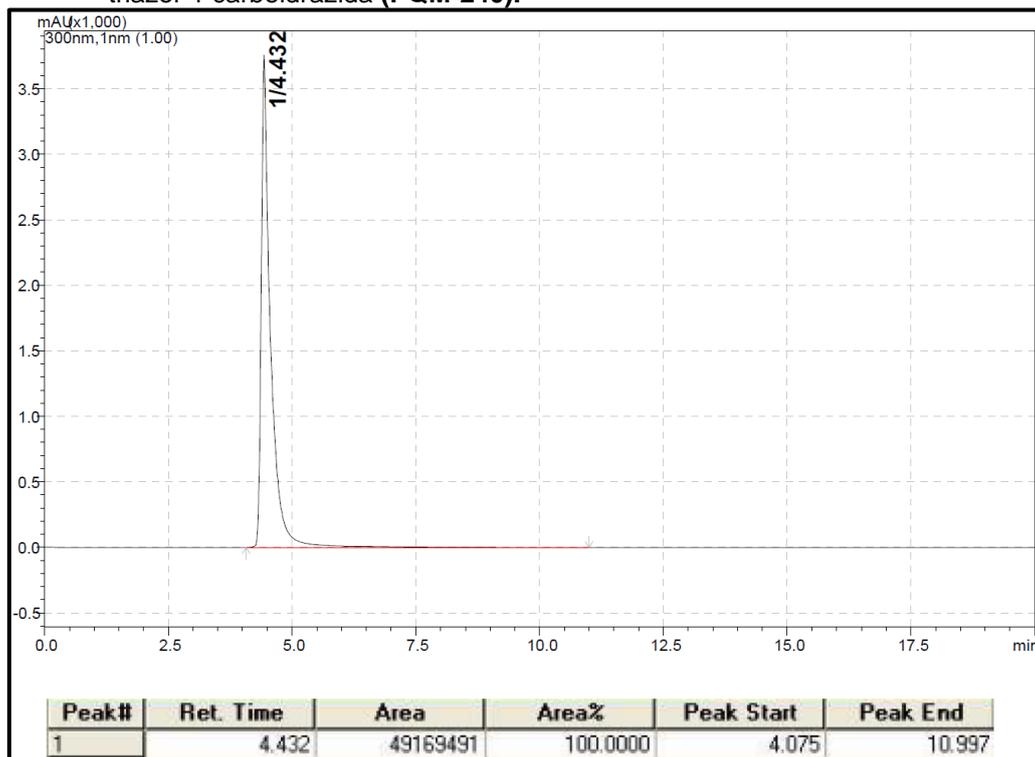
Fonte: do autor.

Figura A 109 - Cromatograma de (*E*)-*N*-(4-fluorobenzilideno)-1-(4-hidróxi-3-metóxi-benzil)-1*H*-1,2,3-triazol-4-carboidrazida (**PQM-239**).



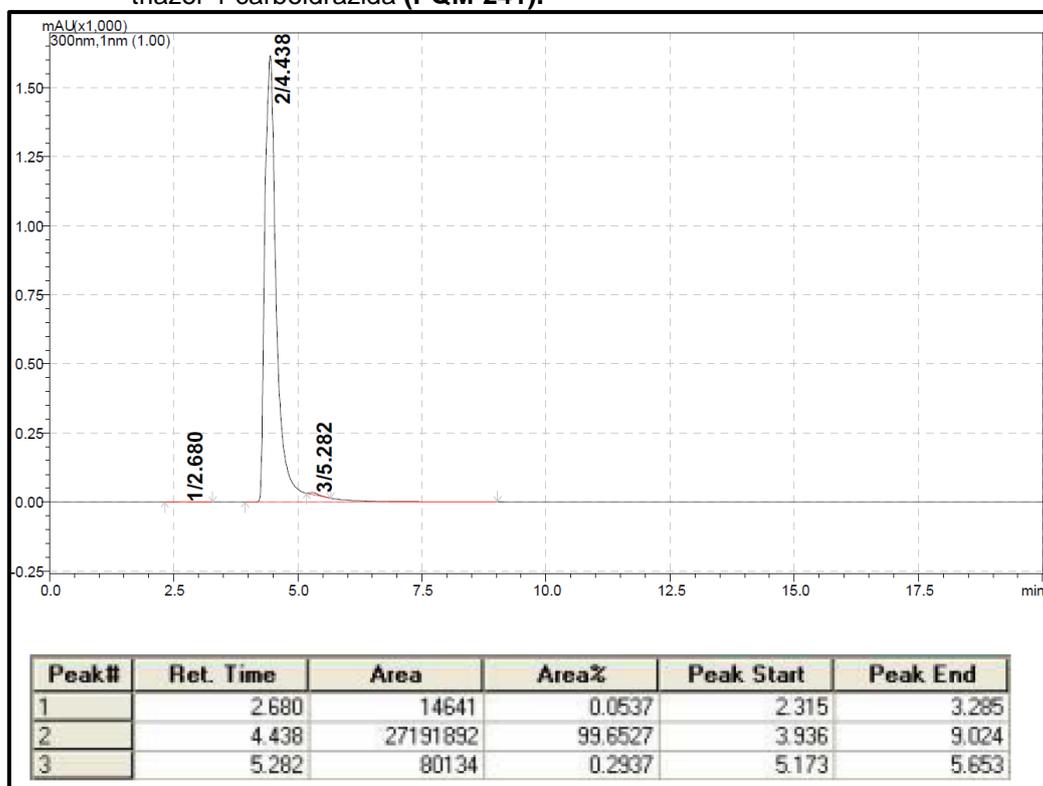
Fonte: do autor.

Figura A 110 - Cromatograma de (*E*)-*N'*-(3-fluorobenzilideno)-1-(4-hidróxi-3-metóxi-benzil)-1*H*-1,2,3-triazol-4-carboidrazida (**PQM-240**).



Fonte: do autor.

Figura A 111 - Cromatograma de (*E*)-*N'*-(2-fluorobenzilideno)-1-(4-hidróxi-3-metóxi-benzil)-1*H*-1,2,3-triazol-4-carboidrazida (**PQM-241**).



Fonte: do autor.