

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO

INSTITUTO DE QUÍMICA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

TESE

**SÍNTESE E AVALIAÇÃO FARMACOLÓGICA DE NOVOS 3-AMINO-
1,2,4-TRIAZÓIS COMO INIBIDORES DE ENZIMAS ENVOLVIDAS NA
DOENÇA DE ALZHEIMER**

Daiana de Fatima Portella Franco

Março/2020



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO

**INSTITUTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA**

**SÍNTESE E AVALIAÇÃO FARMACOLÓGICA DE NOVOS 3-AMINO-
1,2,4-TRIAZÓIS COMO INIBIDORES DE ENZIMAS ENVOLVIDAS NA
DOENÇA DE ALZHEIMER**

DAIANA DE FATIMA PORTELLA FRANCO

Sob Orientação do Professor

Dr. Arthur Eugen Kümmerle

Tese submetida como requisito Parcial para obtenção do grau de **Doutora** em Química, no Programa de Pós-Graduação em Química Área de concentração Química.

Seropédica, RJ

Março de 2020

Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro
Biblioteca Central / Seção de Processamento Técnico

Ficha catalográfica elaborada
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

F825s Franco, Daiana de Fatima Portella , 25/02/1988-
SÍNTESE E AVALIAÇÃO FARMACOLÓGICA DE NOVOS 3-AMINO
1,2,4-TRIAZÓIS COMO INIBIDORES DE ENZIMAS ENVOLVIDAS
NA DOENÇA DE ALZHEIMER / Daiana de Fatima Portella
Franco. - Rio de Janeiro, 2020.
283 f.

Orientador: Arthur Eugen Kümmerle.
Tese(Doutorado). -- Universidade Federal Rural do Rio
de Janeiro, Programa de Pós-graduação em Química, 2020.

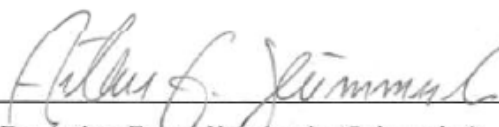
1. Alzheimer. 2. Colinesterase . 3. 1,2,4-triazóis.
4. Quelantes. 5. Microondas. I. Eugen Kümmerle,
Arthur, 23/08/1979-, orient. II Universidade Federal
Rural do Rio de Janeiro. Programa de Pós-graduação em
Química III. Título.

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

DAIANA DE FATIMA PORTELLA FRANCO

Tese submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Doutora em Ciências**, no Programa de Pós- Graduação em Química, Área de Concentração em Química.

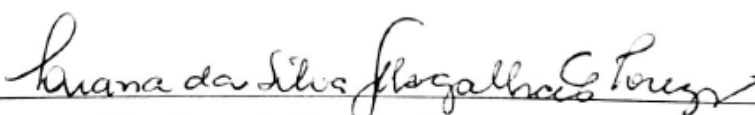
APROVADA EM 13/03/2020



Prof. Dr. Arthur Eugen Kümmerle (Orientador) – IQ-UFRRJ



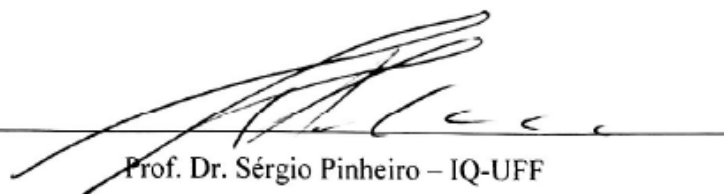
Prof. Dra. Áurea Echevarria Aznar Neves Lima – IQ-UFRRJ



Prof. Dra. Luana da Silva Magalhães Forezi – IQ-UFF



Dr. Vagner Dantas Pinho – Microbiologica LTDA



Prof. Dr. Sérgio Pinheiro – IQ-UFF

Dedico este trabalho aos presidentes
que mais investiram em Ciência e Tecnologia,
Lula e Dilma.

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela vida que me permite experimentar o mundo, a ciência.

Aos meus pais, Aparecida de Fatima e Julio Cesar, por me ensinarem a importância do estudo, e por sempre investirem na minha formação.

Ao meu irmão, Julio Cesar por ser exemplo de determinação, pois assim foi possível alcançar mais uma conquista.

Ao meu marido, André Alves, pela paciência e por entender os momentos de minha ausência. Obrigada pela amizade, incansável apoio e por todo amor!

A meus amigos do LadMOL-QM, Sabrina, Luciana, Thiago, Nathalia, Larissa, Bruno, Marcus, Gabriela, Gabriel, Leonardo, Marina, Felipe em especial ao meu IC Lucas pelo suporte nos momentos mais decisivos. A amizade de vocês não entra no Lattes, mas engrandece o meu ser. Muito obrigada!

Ao meu orientador, Dr. Arthur Eugen Kummerle, pelos ensinamentos e oportunidade.

Aos professores do programa de pós-graduação do Departamento de Química, agradeço pelos cursos ministrados e por dividirem comigo suas experiências e conhecimentos.

Aos técnicos do IQ-UFRRJ, em especial ao Maurício Matos pelo esmero na realização dos espectros de RMN.

Ao discente Me. Lucas de Oliveira e Prof. Dra. Rosane Nora, pela realização dos ensaios da atividade antioxidantes. Obrigada pela disposição.

Ao discente Me. Thiago Pereira em parceria com o laboratório de fotoquímica LFDEN-UFRJ, pela realização dos ensaios de complexação. Obrigada pela disposição.

À **CAPES** pela concessão da minha bolsa de estudos.

À **CAPES**, ao **CNPq** e à **FAPERJ** pelo auxílio financeiro para a execução deste e de outros projetos.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001

RESUMO

A Doença de Alzheimer é um distúrbio neurodegenerativo crônico, capaz de provocar perda progressiva de memória e outras funções. Trata-se de uma doença complexa, de natureza multifatorial e origem indeterminada. Caracteriza-se pela diminuição de atividade colinérgica neuronal; deposição de agregados proteicos anômalos; neuroinflamação; disfunção na homeostase metálica; e estresse oxidativo. Atualmente, o tratamento baseia-se no controle sintomático, principalmente com o uso de inibidores colinesterásicos. Devido aos insucessos dos resultados clínicos da maioria dos candidatos a fármacos anti-Alzheimer, a estratégia baseada no uso de compostos multi-alvos, tem ganhado bastante relevância neste campo. Assim, o objetivo deste trabalho é a síntese e avaliação farmacológica de séries híbridas de 1,3-amino-1,2,4-triazóis como multialvos para o tratamento da doença de Alzheimer, baseada na troca isostérica não-clássica da triazinas pelo 3-amino-1,2,4-triazóis; e hibridação molecular com o fármaco clássico donepezil. Os compostos contendo o núcleo 1,3-amino-1,2,4-triazóis foram obtidos através da síntese regioseletiva a partir de *N*-acil-2-metil-isotiuréia *N*-Boc usando irradiação por microondas (R = 45 a 88%). Seguida das etapas de alquilação (37% - 79%); aminação (35% - 66%); e desproteção do grupo Boc (85% - 96%) para se obter os produtos finais, os quais foram todos caracterizados por RMN ¹H e ¹³C. Os amino-1,2,4-triazóis portadores do substituinte R₁=NO₂ (AChE; CI₅₀ = 0,386; IS= 5,86) e R₁= Bz (BChE; CI₅₀ = 0,416, IS= 3,66) apresentaram as maiores atividades inibitórias frente às colinesterases AChE e BuChE respectivamente, além de apresentarem inibição mista nos ensaios de cinética enzimática. Ademais, o estudo de ancoramento molecular mostrou as principais interações entre compostos amino-1,2,4-triazóis como os resíduos W86, W286 e Y124 do sítio ativo da AChE. Entretanto, os amino-1,2,4-triazóis não mostraram atividades antioxidantes no ensaio de DPPH. Por fim, resultados espectroscópicos de emissão de fluorescências indicaram a formação do complexo entre os amino-1,2,4-triazóis contendo R₁: H; R₁: 2-OH; e R₁: 2-piridina com íons metálicos, Zn²⁺, Cu²⁺, Al³⁺, Fe³⁺. Os resultados foram promissores, visto que foram obtidos compostos mais ativos e seletivos que o protótipo, e com capacidade de complexar com íons metálicos, propriedades importantes para o emprego como compostos anti-Alzheimer. Como perspectiva, a série de amino-1,2,4-triazóis será submetida a ensaios inibição de agregação Aβ e neurotoxicidade; e exploração de novas séries variando substituintes no grupo benzilpiperazina.

PALAVRAS-CHAVE: Alzheimer, colinesterase, multialvos, 1,2,4-triazóis, microondas.

ABSTRACT

Alzheimer's Disease is a chronic neurodegenerative disorder, capable of provoking progressive loss of memory and other functions. It is a complex disease, multifactorial and with an unknown origin. Characterized by decrease of cholinergic neuronal activity; deposition of anomalous protein aggregates; neuroinflammation; disfunction of metallic homeostasis; and oxidative stress. Currently, the treatment is based on symptomatic control, mainly with cholinesterase inhibitors. Due the unsuccessful clinical results of most of the drug candidates against Alzheimer's Disease, the strategy based on multitargets compounds, has been being very relevant in this context. Therefore, the objective of this paper is synthesis and pharmacological evaluation of a hybrid series of 1,3-amino-1,2,4-triazoles as multitarget for Alzheimer's Disease treatment, based on non-classic isosteric exchange of triazines for 3-amino-1,2,4-triazoles; and molecular hybridization with the classic drug donepezil. The compounds containing 1,3-amino-1,2,4-triazoles nucleus were obtained through the regioselective synthesis from N-acyl-2-methyl-isothiourea N-Boc using microwave irradiation (Y= 45% - 88%). Followed by alkylation reactions (37% - 79%); amination (35% - 66%); and deprotection of Boc group (85% - 96%), obtaining the final products, which were characterized by RMN ^1H and ^{13}C . The amino-1,2,4-triazoles carrier $\text{R}_1 = \text{NO}_2$ (AChE; $\text{IC}_{50} = 0,386$; $\text{IS} = 5,86$) and $\text{R}_1 = \text{Bz}$ (BChE; $\text{IC}_{50} = 0,416$, $\text{IS} = 3,66$) presented the highest inhibitory activities to the cholinesterases AChE and BuChE respectively, in addition, presented mixed inhibition profile in the assays of enzymatic kinetics. Furthermore, the molecular docking has showed the mainly interactions between the 1,3-amino-1,2,4-triazoles with the residue W86, W286 and Y124 of AChE active site. However, the 1,3-amino-1,2,4-triazoles have not showed antioxidant activities in DPPH assay. In the end, spectroscopic results of fluorescent emission indicate the formation of the triazole complex containing R_1 : H; R_1 : 2-OH; e R_1 : 2-pyridine with metallic ions, Zn^{2+} , Cu^{2+} , Al^{3+} , Fe^{3+} . The results were promising, because were obtained more active compounds than the prototype, including the capacity of complexing with metallic ions, important properties to defeat Alzheimer. As a perspective, the series of amino-1,2,4-triazoles will be send to assays of βA aggregation inhibition and neurotoxicity; and the exploration of new series varying substituents in benzylpiperazine group.

KEY-WORDS: Alzheimer, cholinesterase, multitargets, 1,2,4-triazoles, microwave .

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Estimativa do número de pessoas com demência (2015 e 2050) e crescimento percentual (2015-2050).....	2
Figura 2: Atrofia do tecido cerebral.	4
Figura 3: Interação entre múltiplos fatores da DA: propagação da P _{Tau} , déficit colinérgico, disfunção metálica, inflamação, amiloide e estresse oxidativo.	6
Figura 4: Sinapse colinérgica. Mecanismo biológico envolvido na síntese da acetilcolina (3) a partir da colina (1) e acetilcoenzima A (2) catalisa pela enzima colina acetiltransferase (a); armazenamento (b); interação com receptores (c); decomposição da acetilcolina (3) pela enzima acetilcolinesterase (d); e retorno da colina ao terminal axônio para síntese de mais acetilcolina (3) (e).....	7
Figura 5: Ilustração de neurônios em condições fisiológicas normais (A) e neurônios de indivíduos com DA cercados por placas amilóides (em amarelo) (B). Esquema de clivagem normal pelas enzimas α -, γ -secretases (à esquerda) e anormal pelas enzimas β -, γ -secretases (à direita) da APP; posterior deposição de agregados A β de no cérebro (C).	9
Figura 6: A - Neurônios normais nos quais proteínas Tau se encontram ligadas aos microtúbulos e os estabilizam. B - Neurônios de indivíduos com DA nos quais a proteína Tau sofre hiperfosforilação resultando na dissociação dos microtúbulos e a formação filamentos neurofibrilares. C- A fosforilação da Tau mediada por cinases (a) desencadeia a dissociação desta proteína da superfície do microtúbulo (b). A tau hiperfosforiladas resultantes começam a se (c) para formar filamentos helicoidais emparelhados (PHF) (d), finalmente se agrupam em emaranhados neurofibrilares (d).	11
Figura 7: O sítio ativo de acetilcolinesterase humana (hAChE) (A; pdb 4ey4) e butirilcolinesterase humana (hBChE) (B; pdb 1p0i)..	16
Figura 8: Inibidores colinesterásicos comercialmente disponíveis para o tratamento da DA..	17
Figura 9: Sinapse colinérgica na ausência (A) e a na presença de um inibidor colinesterásicos (IAChE) (B).	18
Figura 10: Antagonista do receptor de N-metil-D-aspartato (NMDA) disponível para o tratamento da DA.....	19
Figura 11: Compostos de inibidores de β -secretase e γ -secretase.	21
Figura 12: Compostos que possuem como alvo a proteína Tau.	23
Figura 13: Estrutura de MPACs planejados para o tratamento da DA.....	24

Figura 14: Principais compostos antioxidantes planejados para o tratamento da DA.....	25
Figura 15: Compostos anti- inflamatórios em ensaios clínicos para o tratamento da DA.	27
Figura 16: Descoberta de fármacos via abordagem reducionista de 'uma molécula-um-alvo' (A) e descoberta de fármacos a partir de'ligante direcionado a multialvo' (MTDL).....	28
Figura 17: Compostos multialvos, Ladostigil (37), baseado na Rigastigmina (6).	29
Figura 18: Compostos multialvos (39-41 e 43) baseados na Rigastigmina (6).....	30
Figura 19: Compostos multialvos (44, 46, 49 e 50) baseados na tacrina (4).....	31
Figura 20: Compostos multialvos (52, 54 e 55) baseados no donepezil (5).....	32
Figura 21: Estrutura química dos 1,2,3-triazóis e 1,2,4-triazóis e respectivos tautômeros.	33
Figura 22: Fármacos comerciais contendo o núcleo 1,2,4-triazol (62-67).....	34
Figura 23: Compostos bioativos com núcleo 3-amino-1,2,4-triazol (68-76).	35
Figura 24: Estratégias sintéticas descritas para a síntese de 3-amino-1 <i>H</i> -1,2 <i>H</i> -triazóis 1,5-dissubstituídos.	36
Figura 25: Atribuição dos principais sinais da 2-metil isotiouréia (104)	46
Figura 26: Atribuição comparativa dos principais sinais da 2-metil isotiouréia (104) e 2-metil isotiouréia- <i>N</i> -Boc (100).....	48
Figura 27: Atribuição comparativa dos principais sinais da 2-metil isotiouréia- <i>N</i> -Boc (100) e os compostos <i>N</i> -acil-2-metil-isotiuréia- <i>N</i> -Boc (98a-s).....	52
Figura 28: Espectro de RMN ¹ H do composto <i>N</i> -acil-2-metil-isotiuréia- <i>N</i> -Boc (98l). Setas lisas: sinais provenientes do produto de partida. Setas vermelhas: sinais novos resultado da formação do produto de interesse	53
Figura 29: Espectro de RMN ¹³ C/ DeptQ do composto <i>N</i> -acil-2-metil-isotiuréia- <i>N</i> -Boc (98l). Setas lisas: sinais provenientes do produto de partida. Setas vermelhas: sinais novos resultado da formação do produto de interesse	53
Figura 30: Atribuição comparativa dos principais sinais dos compostos <i>N</i> -acil-2-metil-isotiuréia- <i>N</i> -Boc (98a-s) e os 3-amino-1,2,4-triazol <i>N</i> -Boc (96a-aa).....	60
Figura 31: Espectro de RMN ¹ H do composto tert-butil 3-amino-1,2,4-triazol <i>N</i> -Boc (96n). Setas lisas: sinais provenientes do produto de partida. Setas vermelhas: sinais novos resultado da formação do produto de interesse.	60

Figura 32: Espectro de RMN ^{13}C / DeptQ do composto tert-butil 3-amino-1,2,4-triazol N-Boc (96n). Setas lias: sinais provenientes do produto de partida. Setas vermelhas: sinais novos resultado da formação do produto de interesse	61
Figura 33: Atribuição comparativa dos principais sinais dos compostos 3-amino-1,2,4-triazol N-Boc (96a-aa) e os 3-amino-1,2,4-triazóis- <i>N</i> -alquilados (92a-z).....	63
Figura 34: Espectro de RMN ^1H do composto 3-amino-1,2,4-triazóis- <i>N</i> -alquilados (92o). Setas lias: sinais provenientes do produto de partida. Setas vermelhas: sinais novos resultado da formação do produto de interesse	64
Figura 35: Espectro de RMN ^{13}C DeptQ do composto 3-amino-1,2,4-triazóis- <i>N</i> -alquilados (92o). Setas lias: sinais provenientes do produto de partida. Setas vermelhas: sinais novos resultado da formação do produto de interesse	64
Figura 36: Atribuição comparativa dos principais sinais dos compostos 3-amino-1,2,4-triazóis- <i>N</i> -alquilados (92a-z) e os 3-amino-propinil-piperazil-1,2,4-triazóis- <i>N</i> -Boc (91a-z)..	68
Figura 37: Espectro de RMN ^1H do composto 3-amino-propinil-piperazil-1,2,4-triazol N-Boc (911). Setas lias: sinais provenientes do produto de partida. Setas vermelhas: sinais novos resultado da formação do produto de interesse.	68
Figura 38: Espectro de RMN ^{13}C / DeptQ do composto <i>N</i> -acil-2-metil-isotioréia- <i>N</i> -Boc (981). Setas lias: sinais provenientes do produto de partida. Setas vermelhas: sinais novos resultado da formação do produto de interesse.	69
Figura 39: Atribuição comparativa dos principais sinais dos compostos 3-amino-propinil-piperazil-1,2,4-triazóis- <i>N</i> -Boc (91b e 91c) e os 3-amino-propinil-piperazil-1,2,4-triazóis (90b e 90c).	71
Figura 40: Atribuição comparativa dos principais sinais dos compostos 3-amino-propinil-piperazil-1,2,4-triazóis- <i>N</i> -Boc (96a; 91a-z) e os 3-amino-propinil-piperazil-1,2,4-triazóis (89a; 90a-ab).....	74
Figura 41: Espectro de RMN ^1H do composto <i>N</i> -acil-2-metil-isotioréia- <i>N</i> -Boc (981). Setas lias: sinais provenientes do produto de partida. Setas vermelhas: sinais novos resultado da formação do produto de interesse.....	75
Figura 42: Espectro de RMN ^{13}C / DeptQ do composto <i>N</i> -acil-2-metil-isotioréia- <i>N</i> -Boc (981). Setas lias: sinais provenientes do produto de partida. Setas vermelhas: sinais novos resultado da formação do produto de interesse	75
Figura 43: Perfil do gráfico de Lineweaver-Burk apresentado por cada inibição enzimática. A) Competitiva; B) Incompetitiva; C) Mista; D) Não-competitiva.....	81

Figura 44: Análise da posição de encaixe do composto 89a, destaque em verde, na cavidade enzimática da EeAChE (PDB 1C2B) à esquerda. Análise da posição de ancoramento do composto 89a em verde na cavidade de acesso ao sítio catalítico da EeAChE a partir da superfície hidrofóbica. Figura gerada com PyMol 1.7.x (DeLano Scientific LLC).....	88
Figura 45: Análise da posição de encaixe do composto 89a, destaque em verde, na cavidade enzimática da EeAChE (PDB 1C2O) à esquerda; e na cavidade enzimática da EeAChE (PDB 1EEA) à direita. Figura gerada com PyMol 1.7.x (DeLano Scientific LLC).....	88
Figura 46: Sobreposição do sítio ativos das enzimas hAChE (PDB 4EY7) em lilás e enzimas EeAChE (PDB 1C2B) em verde. Figura gerada com PyMol 1.7.x (DeLano Scientific LLC).	90
Figura 47: Análise da sobreposição do sítio ativos das enzimas hAChE (PDB 4EY7) em lilás e enzimas EeAChE (PDB 1C2B) em verde. Figura gerada com PyMol 1.7.x (DeLano Scientific LLC).....	90
Figura 48: Análise das principais interações moleculares entre o composto 54a, destaque em amarelo, com a enzima hAChE (PDB 4EY7). Figura gerada com PyMol 0. 1.7.x (DeLano Scientific LLC).....	91
Figura 49: Análise das principais interações moleculares entre o composto 89a, destaque em rosa, com a enzima hAChE (PDB 4EY7). Figura gerada com PyMol 1.7.x (DeLano Scientific LLC).	92
Figura 50: Análise das principais interações moleculares entre o composto 90p, destaque em rosa, com a enzima hAChE (PDB 4EY7). Figura gerada com PyMol 1.7.x (DeLano Scientific LLC).	93
Figura 51: Análise das principais interações moleculares dos compostos 89a (em verde) e 90p (em rosa) sobrepostos com a cavidade enzimática da hAChE (PDB 4EY7). Figura gerada com PyMol 1.7.x (DeLano Scientific LLC).....	93
Figura 52: Reação de oxirredução: ação de um antioxidante provoca a redução do DPPH (cor púrpura) e formação da difenil-picril-hidrazina (cor amarelo).....	94
Figura 53: Proposição dos modos de complexação de 89a, 90b e 90r com Zn ²⁺ , Cu ²⁺ , Al ³⁺ e Fe ³⁺	97
Figura 54. A: Espectro de absorbância de 89a (2,6 x 10 ⁻⁵ M) em EtOH/H ₂ O (50/50, v/v, Tris/HCl pH= 7) antes e após adição de Zn ²⁺ , Cu ²⁺ , Al ³⁺ e Fe ³⁺ . B: Espectro de absorbância de Zn(NO ₃) ₂ , Cu(NO ₃) ₂ , Al(NO ₃) ₃ e Fe(NO ₃) ₃ (2 x 10 ⁻⁵ M) em EtOH/H ₂ O (50/50, v/v, Tris/HCl pH= 7).....	97
Figura 55: Espectro de fotoluminescência de composto 89a (2,6 x 10 ⁻⁵ M) em EtOH/H ₂ O (50/50, v/v, Tris/HCl pH= 7) antes e após adição de Zn ²⁺ , Cu ²⁺ , Al ³⁺ e Fe ³⁺	98

Figura 56: Espectro de absorvância de **90r** (2×10^{-5} M) em EtOH/H₂O (50/50, v/v, Tris/HCl pH= 7) antes e após adição de Zn²⁺, Cu²⁺, Al³⁺ e Fe³⁺. B: Espectro de fotoluminescência de **90r** (2×10^{-5} M) em EtOH/H₂O (50/50, v/v, Tris/HCl pH= 7) antes e após adição de Zn²⁺, Cu²⁺, Al³⁺ e Fe³⁺..... 99

Figura 57: Espectro de absorvância de **90r** (2×10^{-5} M) em EtOH/H₂O (50/50, v/v, Tris/HCl pH= 7) antes e após adição de Zn²⁺, Cu²⁺, Al³⁺ e Fe³⁺. B: Espectro de fotoluminescência de **90r** (2×10^{-5} M) em EtOH/H₂O (50/50, v/v, Tris/HCl pH= 7) antes e após adição de Zn²⁺, Cu²⁺, Al³⁺ e Fe³⁺..... 99

LISTA DE ESQUEMAS

Esquema 1: Planejamento da série dos 3-amino-1,2,4-triazóis- <i>N</i> -1,5-trissubstituídos (89a-d).	39
Esquema 2: Planejamento estrutural da nova série dos 3-amino-1,2,4-triazóis- <i>N</i> -1,5-trissubstituídos (90a-aa).....	40
Esquema 3: Análise retrossintética inicial para a obtenção do composto	42
Esquema 4: Análise retrossintética inicial para a obtenção do composto (90ab) portador da subunidade benzilpiperidina ligada ao triazol, vizinho ao grupamento aril.	43
Esquema 5: Reação de oxidação de Pinnick para a obtenção dos ácidos carboxílicos (102a-e).	43
Esquema 6: Esquema de intermediários para a obtenção dos ácidos carboxílicos (102a-e)....	45
Esquema 7: Reação de oxidação de <i>S</i> -metilação para a obtenção da 2-metil isotiouréia (104).	45
Esquema 8: Esquema de intermediários para a obtenção da 2-metil isotiouréia (104).	46
Esquema 9: Reação de proteção da 2-metil isotiouréia (104) para a obtenção da 2-metil isotiouréia- <i>N</i> -Boc (100).....	47
Esquema 10: Esquema de intermediários para a obtenção da 2-metil isotiouréia- <i>N</i> -Boc (100).	48
Esquema 11: Reação de acilação para a obtenção de <i>N</i> -acil-2-metil-isotiuréia- <i>N</i> -Boc (98a-s).	49
Esquema 12: Esquema de intermediários para formação dos cloretos de ácidos (101a-j).....	51
Esquema 13: Esquema de intermediários para a segunda etapa sintética para obtenção de <i>N</i> -acil-2-metil-isotiuréia- <i>N</i> -Boc (98a-s)	51
Esquema 14: Reação de obtenção de 1-benzil-4-hidrazinilpiperidina (108).....	52
Esquema 15: Esquema de intermediários para a obtenção da 1-benzil-4-hidrazinilpiperidina (108)	54
Esquema 16: Reação de ciclização para a obtenção de 3-amino-1,2,4-triazol <i>N</i> -Boc (96a-aa).	55
Esquema 17: Importância do grupamento Boc para o aumento da reatividade e seletividade	57

Esquema 18: Esquema de intermediários para a obtenção dos 3-amino-1,2,4-triazóis- <i>N</i> -Boc (96a-aa).....	58
Esquema 19: Reação de <i>N</i> -alquilação para a obtenção dos 3-amino-1,2,4-triazóis- <i>N</i> -alquilados (92a-z).	61
Esquema 20: Esquema de intermediários para a obtenção dos 3-amino-1,2,4-triazóis- <i>N</i> -alquilados (92a-z).	60
Esquema 21: Reação de ciclização para a obtenção da benzilpiperazina (93).....	61
Esquema 22: Esquema de intermediários para a obtenção da benzilpiperazina (93).....	62
Esquema 23: Reação de aminação para a obtenção dos 3-amino-propinil-piperazil-1,2,4-triazóis <i>N</i> -Boc (91a-z).	62
Esquema 24: Esquema de intermediários para a obtenção dos 3-amino-propinil-piperazil-1,2,4-triazóis- <i>N</i> -Boc (91a-z).....	63
Esquema 25: Reação de <i>O</i> -demetilação para a obtenção dos 3-amino-propinil-piperazil-1,2,4-triazóis- <i>N</i> -Boc (91c'-d').	64
Esquema 26: Esquema de intermediários para a obtenção dos 3-amino-propinil-piperazil-1,2,4-triazóis- <i>N</i> -Boc (91c'-d').	71
Esquema 27: Reação de desproteção para a obtenção dos 3-amino-propinil-piperazil-1,2,4-triazóis (89a; 90a-ab).....	72
Esquema 28: Esquema de intermediários para a obtenção dos 3-amino-propinil-piperazil-1,2,4-triazóis (89a; 90a-ab).....	74
Esquema 29: Reação ocorrida no ensaio de Ellman.....	76

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Tabela de rendimentos reacionais, pontos de fusão e característica física dos ácidos carboxílicos (102a-e).	44
Tabela 2: Tabela de rendimentos reacionais, pontos de fusão e característica física dos <i>N</i> -acil-2-metil-isotiuréia- <i>N</i> -Boc (98a-s).	50
Tabela 3: Tabela de rendimentos reacionais, pontos de fusão e característica física dos 1,5-diaril-3-amino-1,2,4-triazol <i>N</i> -Boc (96a-aa).	56
Tabela 4: Protocolo de otimização sintética do 1,5-difenil-3-amino-1,2,4-triazol	57
Tabela 5: Tabela de rendimentos reacionais dos 3-amino-1,2,4-triazóis- <i>N</i> -alquilados (92a-z).	62
Tabela 6: Tabela de rendimentos reacionais dos 3-amino-propinil-piperazil-1,2,4-triazóis <i>N</i> -Boc (91a-z).	66
Tabela 7: Tabela de rendimentos reacionais, pontos de fusão e característica física dos 3-amino-propinil-piperazil-1,2,4-triazóis (90b e 90c)	70
Tabela 8: Tabela de rendimentos reacionais, pontos de fusão e característica física dos 3-amino-propinil-piperazil-1,2,4-triazóis (89a; 90a-ab).....	73
Tabela 9: Atividade anticolinesterásica dos derivados 3-amino-propinil-piperazil-1,2,4-triazol (90a-ab).....	77
Tabela 10: Parâmetros cinéticos de 90m, 90p e 90w em AChE e BChE.	83
Tabela 11: Ação antioxidante dos compostos (89a; 90a-ab) a de 350µM em DPPH.	895
Tabela 12: Concentrações dos inibidores utilizados nos ensaios de estudo do mecanismo de inibição enzimática. Concentração do inibidor (µM)	139

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1: Crescimento do número (em milhões) de pessoas com demência de acordo com a renda (ADI, 2015).....	1
Gráfico 2: Previsão dos custos globais com a demência (2015-2030) (ADI, 2015).	2
Gráfico 3: Gráficos de Lineweaver-Burk da cinética de inibição em EeAChE do composto 90w.	84
Gráfico 4: Gráficos de Lineweaver-Burk da cinética de inibição em e EqBChE do composto 90w.	84
Gráfico 5: Gráficos de Lineweaver-Burk da cinética de inibição em EeAChE do composto 90p.	85
Gráfico 6: Gráficos de Lineweaver-Burk da cinética de inibição em EqBChE do composto 90p.	85
Gráfico 7: Gráficos de Lineweaver-Burk da cinética de inibição em EeAChE do composto 90m.	86
Gráfico 8: Gráficos de Lineweaver-Burk da cinética de inibição em EqBChE do composto 90m.	86

LISTA DE ABREVIATURA

ACh – Acetilcolina

AChE – Acetilcolinesterase

ACN – Acetonitrila

ACTI – Iodeto de acetiltiocolina

APP – Proteína precursora amiloide

ATP – Adenosina trifosfato

A β – β -amilóide

BACE1 – beta secretase 1

BBB – Barreira hematocefálica (*Blood–brain barrier*)

BCTI – Iodeto de butiriltiocolina

BSA – Albumina Sérica Bovina

BuCh – Butirilcolina

BuChE – Butirilcolinesterase

CaMKII – proteína cinase dependente de Ca²⁺/calmodulina

CAS – Sítio catalítico

CCD – Cromatografia em camada delgada

CdK5 – Proteína cinase dependente de ciclina 5

ChaT – Colina Acetil Transferase

DA – Doença de Alzheimer

DCM – diclorometano

DMF – Dimetilformamida

DMSO – Dimetilsulfóxido

DNA – Ácido desoxirribonucleico (*deoxyribonucleic acid*)

DTNB – Ácido 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzóico

EeAChE – Acetilcolinesterase de enguia elétrica

EqBChE – Butirilcolinesterase de soro equino

ERNs – Espécies reativas de oxigênio

EROs – Espécies reativas de nitrogênio

FDA – *Food and Drug Administration*

GPx – Glutathione peroxidase

GSK3-B – Glicogênio sintase cinase 3 beta

hAChE – Acetilcolinesterase humana

IC₅₀ – Concentração inibitória média

IGF – interconversão de grupo funcional

IL-1b – Interleucina – 1b

IL-6 – Interleucina - 6

IL-8 – Interleucina – 8

IS – Índice de Seletividade

K_i – Constante de afinidade para inibição do tipo competitiva

K_i' – Constante de afinidade para inibição do tipo não-competitiva

K_m – Constante de Michaelis-Menten

LMTX – Azul de metileno

MAO-A – Monoamina oxidase - A

MAO-B – Monoamina oxidase - B

MAPK p38– Proteínas quinases p38 ativadas por mitógenos

MPAC – Moderadores da Interação Proteína-Metal (*Metal-Protein Attenuating Compounds*)

MTDL – Ligante direcionado a múltiplos alvos (*Multiple-target- directed ligand*)

MW – Microondas (*microwave*)

NFTs – Filamentos neurofibrilares (*neurofibrillary tangles*)

NINCDS-ADRDA – Instituto Nacional sobre Envelhecimento e a Associação de Alzheimer (*National Institute of Neurologic and Communicative Disorders and Stroke and the Alzheimer Disease and Related Disorders Association*)

NMDA – *N*-metil D-Aspartato

P.E. – Ponto de ebulição

P.F. – Ponto de fusão

PAS – Sítio aniônico periférico

PBT-1 – Prana Biotechnology-1 (clioquinol),

PBT-2 – Prana Biotechnology-2

PDB – Banco de dados de proteínas (*Protein Data Bank*)

PIB – Produto interno bruto

PHF – Filamento helicoidais emparelhados

PKA – Proteína quinase A

PM6 – Método semi-empírico de parametrização 6 (*Parameterization Method 6*)

PTau – Proteína Tau

RMN – Ressonância magnética nuclear

RNA – Ácido ribonucleico

SAR – Relação estrutura-atividade (*Structure-activity relationship*)

S_N2 – Substituição nucleofílica bimolecular

SOD – Superóxido dismutase

THF – tetraidrofurano

TMS – Tetrametilsilano

TNF- α – Fator de Necrose Tumoral Alfa

WHO – Organização Mundial de Saúde (*World Health Organization*)

*V*_{máx} – Velocidade máxima

SUMÁRIO

1. Introdução.....	1
1.1. Definição de Demência e Impacto na Sociedade.....	1
1.2. Aspectos gerais da Doença de Alzheimer.....	3
1.3. Bases Moleculares da DA.....	5
1.3.1. Hipótese do déficit colinérgico	6
1.3.2. Hipótese Amilóide.....	8
1.3.3. Hipótese de propagação da Ptau.....	10
1.3.4. Neuroinflamação	11
1.3.5. Extresse oxidativo	12
1.3.6. Hipótese metálica	13
1.4. Tratamento e possíveis estratégias terapêuticas da DA	14
1.4.1. Inibidores de Colinesterases	15
1.4.2. Antagonistas do receptoro NMDA	19
1.5. Novas Estratégias terapêuticas da DA	19
1.5.1. A β como alvo terapêutico da DA	20
1.5.2. P τ como alvo terapêutico da DA.....	21
1.5.3. Agentes Quelantes e MPCAs.....	23
1.5.4. Extresse oxidativo e disfunção mitocondrial com abordagem terapêutica.....	23
1.5.5. Neuroinflamação com abordagem terapêutica.....	26
1.6. Compostos multialvos relacionados ao tratamento da DA.....	27
1.7. Triazóis	33
1.7.1. 3-amino-1,2,4-Triazóis	35
2. OBJETIVOS.....	37
2.1. Objetivo Geral.....	37
2.2. Objetivos esocíficos	37
2.3. Planejamento Estrutural	37
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	41
3.1. Planejamento Sintético.....	41
3.2. Síntese de Ácidos carboxílicos aromáticos (102a-e)	43
3.3. Síntese de 2-metil isotiouréia (104)	45
3.4. Síntese de 2-metil isotiouréia- <i>N</i> -Boc (100)	47
3.5. Síntese de <i>N</i> -acil-2-metil-isotiuréia- <i>N</i> -Boc (98a-s)	48

3.6. Síntese da 1-benzil-4-hidrazinilpiperidina (107)	54
3.7. Síntese de 3-amino-1,2,4-triazóis- <i>N</i> -Boc (96a-aa)	55
3.8. Síntese de 3-amino-1,2,4-triazóis- <i>N</i> -alquilados (92a-z)	61
3.9. Síntese de Benzilpiperazina (93)	65
3.10. Síntese de 3-amino-propinil-piperazil-1,2,4-triazóis- <i>N</i> -Boc (91a-z).....	65
3.11. Síntese de 3-amino-propinil-piperazil-1,2,4-triazóis- <i>N</i> -Boc (91c'-d').....	69
3.12. Síntese de 3-amino-propinil-piperazil-1,2,4-triazóis (90a-ab)	72
3.13. Avaliação <i>in vitro</i> da atividade anticolinesterásica dos derivados 3-amino-propinil-piperazil-1,2,4-triazóis (90a-ab)	76
3.14. Estudo do mecanismo de inibição enzimática dos derivados 3-amino-propinil-piperazil-1,2,4-triazóis (90m, p, w)	80
3.15. Estudo de interação enzimática <i>in silico</i> dos derivados 3-amino-propinil-piperazil-1,2,4-triazóis	86
3.16. Avaliação da atividade antioxidante pelo método de DPPH dos derivados 3-amino-propinil-piperazil-1,2,4-triazóis (89a; 90a-ab).....	94
3.17. Estudo da complexação dos derivados 3-amino-propinil-piperazil-1,2,4-triazóis (89a; 90b e 90r) frente aos íons Zn^{2+} , Cu^{2+} , Al^{3+} , Fe^{3+}	96
4. CONCLUSÃO.....	100
5. PARTE EXPERIMENTAL.....	103
5.1. Metodologia Sintética	103
5.1.1. Síntese de Ácidos carboxílicos aromáticos (102a-e)	104
5.1.2. Síntese de 2-metil isotiouréia (104).....	104
5.1.3. Síntese de 2-metil isotiouréia- <i>N</i> -Boc (100)	105
5.1.4. Síntese de <i>N</i> -acil-2-metil-isotiuréia- <i>N</i> -Boc (98a-s)	106
5.1.5. Síntese da 1-benzil-4-hidrazinilpiperidina (107).....	110
5.1.6. Síntese de 3-amino-1,2,4-triazóis- <i>N</i> -Boc (96a-aa)	111
5.1.7. Síntese de 3-amino-1,2,4-triazóis- <i>N</i> -alquilados (92a-z).....	119
5.1.8. Síntese de Benzilpiperazina (93)	125
5.1.9. Síntese de 3-amino-propinil-piperazil-1,2,4-triazóis- <i>N</i> -Boc (91a-z).....	126
5.1.10. Síntese de 3-amino-propinil-piperazil-1,2,4-triazóis- <i>N</i> -Boc (91c'-d').....	133
5.1.11. Síntese de 3-amino-propinil-piperazil-1,2,4-triazóis (90a-ab).....	134
5.2. Avaliação <i>in vitro</i> da atividade anticolinesterásica dos derivados 3-amino-propinil-piperazil-1,2,4-triazóis (90a-ab)	145
5.3. Estudo do mecanismo de inibição enzimática dos derivados 3-amino-propinil-piperazil-1,2,4-triazóis (90m, p, w)	145

5.4. Estudo de interação enzimática <i>in silico</i> dos derivados 3-amino-propinil-piperazil-1,2,4-triazóis	146
5.5. Avaliação da atividade antioxidante pelo método de DPPH dos derivados 3-amino-propinil-piperazil-1,2,4-triazóis (89a; 90a-ab).....	147
5.6. Estudo da complexação dos derivados 3-amino-propinil-piperazil-1,2,4-triazóis (89a; 90b e 90r) frente aos íons Zn^{2+} , Cu^{2+} , Al^{3+} , Fe^{3+}	148
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	149
7. ANEXOS	164

1. Introdução

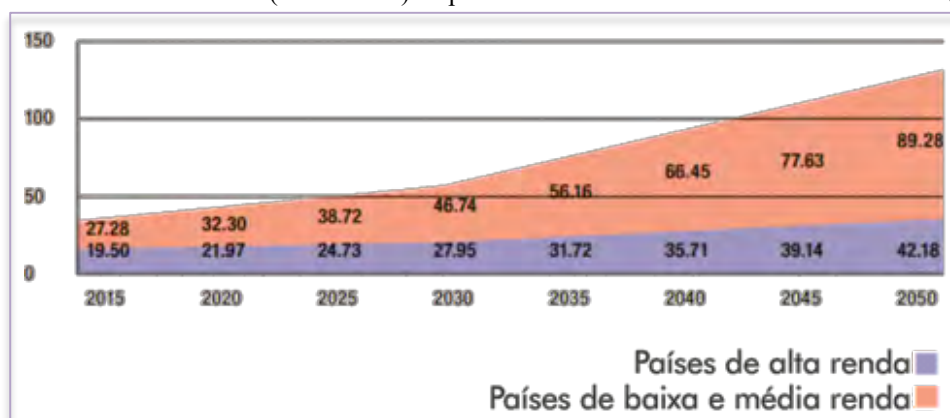
1.1. Definição de Demência e Impacto na Sociedade

Demência é um termo genérico relacionado a um conjunto de síndromes, geralmente, de origem crônica e progressiva, capaz de causar a deterioração das funções cognitivas. Geralmente, tais danos são acompanhados e ocasionalmente antecidos de um comprometimento do controle emocional, motivacional e do comportamento social. Embora a idade seja um fator preponderante para o desenvolvimento da demência, esta não é uma característica normal do envelhecimento (WHO, 2019).

A demência representa uma das principais causas de incapacidade e dependência entre os indivíduos portadores da doença, demandando cuidados durante todo o curso desta enfermidade, além de gerar impacto significativo – psicológico, social e econômico – diretamente na vida dos cuidadores, familiares e bem na sociedade em geral (WHO, 2019).

Segundo relatório realizado pela Associação Internacional de Alzheimer (ADI, 2015), estima-se haver cerca de 46,8 milhões de pessoas com demência no mundo em 2015, sendo que 58 % vivem em países de baixa e média renda. Os dados também revelam que este número praticamente dobrará a cada 20 anos, o que significa 74,7 milhões de casos em 2030 e 131,5 milhões em 2050, sendo o maior aumento nos países em desenvolvimento, correspondendo 68 % dos casos totais de demência em 2050 (Gráfico 1 e Figura 1). Estima-se o surgimento aproximadamente 9,9 milhões de novos casos de demência por ano no mundo, o que significa um novo caso diagnosticado a cada 3,2 segundos, e a previsão é de que em 2050, haverá um novo caso a cada segundo (ADI, 2015).

Gráfico 1: Crescimento do número (em milhões) de pessoas com demência de acordo com a renda (ADI, 2015)



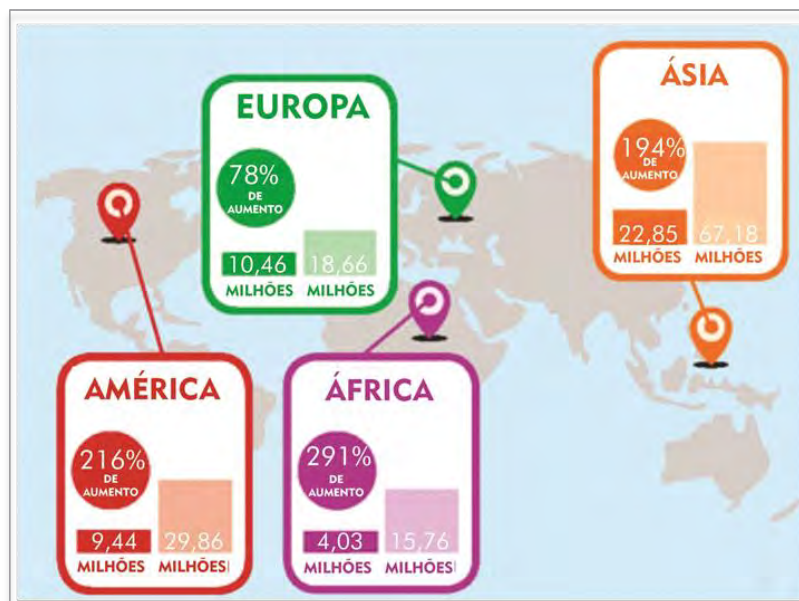
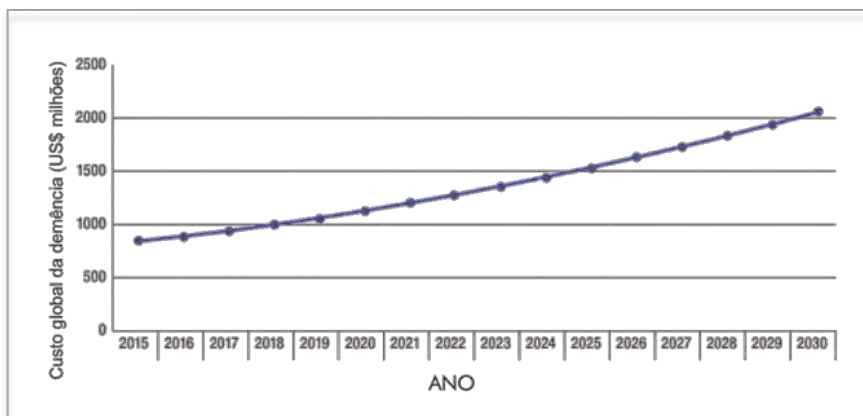


Figura 1: Estimativa do número de pessoas com demência (2015 e 2050) e crescimento percentual (2015-2050) (adaptado de ADI, 2015)

Ademais, o custo atribuído à demência em todo o mundo é de US \$ 818 bilhões em 2015, o que representa 1,09 % do PIB global. Esse consumo está relacionado com custos com assistência médica, assistência social e cuidados informais. Projeta-se que esse valor alcance US\$ 2 trilhões em 2030 (Gráfico 2) (ADI, 2015).

Gráfico 2: Previsão dos custos globais com a demência (2015-2030) (ADI, 2015).



Considerando a prevalência de demência no Brasil e a população de idosos de aproximadamente 15 milhões de pessoas, a estimativa da demência na população brasileira é de 1,1 milhão. Todavia os dados sobre prevalência e incidência da Demência no Brasil em geral, restringem-se a pequenas áreas geográficas e a determinados períodos de tempo (HERRERA *et al*,2002; NITRINI *et al*,2004; CHAVES *et al*,2009). Recentemente, uma

revisão realizada por Boff e colaboradores revelaram taxas de demência na população brasileira variando de 5,1 a 17,5 % (BOFF *et. al*, 2015).

Existem muitas formas de demência e entre as mais comuns estão: Doença de Alzheimer (DA); Demência vascular; Demência com corpos de Lewy (agregados anormais de proteína dentro das células nervosas); Demência fronto-temporal (degeneração do lobo frontal do cérebro, incluindo a doença de Pick), sendo a DA a mais representativa, correspondendo cerca de 60% a 70% dos casos totais (ALZ, 2019).

1.2. Aspectos gerais da Doença de Alzheimer

O primeiro relato da Doença de Alzheimer foi realizado pelo psiquiatra e neuropatologista alemão Alois Alzheimer, em 1906, na 37ª convenção dos psiquiatras do sudoeste da Alemanha, baseado no caso de uma paciente, chamada Auguste Deter, que sofria de perda de memória, linguagem, desorientação e alucinações. Após o falecimento da paciente aos 56 anos, exames *post-mortem* revelaram um cérebro atrófico e com sinais de deposições protéicas anômalas, o que levou Alzheimer a concluir que tratava-se de um caso específico de demência. Mais tarde, em 1910, seu colega de trabalho Emil Kraepelin nomeou tal doença em sua homenagem (MAURER *et al.*, 1997).

Em geral, a doença se manifesta inicialmente como perda de memória de recente e, à medida que a doença progride, os sintomas tornam-se mais significativos e severos, incluindo problemas de linguagem, incapacidade de realizar cálculos e de usar objetos e ferramentas do cotidiano, desorientação, tornando o portador da DA cada vez mais dependente (SMALL, *et al.*, 1997; LINDEBOOM & WEINSTEIN, 2004). Ademais, são observados, frequentemente, sintomas relacionados a distúrbios comportamentais, como agressividade, alucinações, hiperatividade, irritabilidade, insônia e depressão (RASKIND *et al.*, 1995). Eventualmente, a doença avança ainda mais para complicação da imobilidade, embolia pulmonar e/ou pneumonia e, finalmente, para a morte. Em média o período de sobrevivência do portador da DA é de 6 a 12 anos após o início da doença (HARDMAN *et al.*, 1996).

Histopatologicamente, a DA é caracterizada por perda maciça de neurônios, perda de tecido em todo o cérebro, degeneração neurovascular e interrupção da função sináptica envolvendo vários sistemas de neurotransmissão, começando no hipocampo, área que desempenha papel essencial nas funções cognitivas (Figura 2) (RAUK, 2009; SERRANO-POZO *et al.*, 2011).

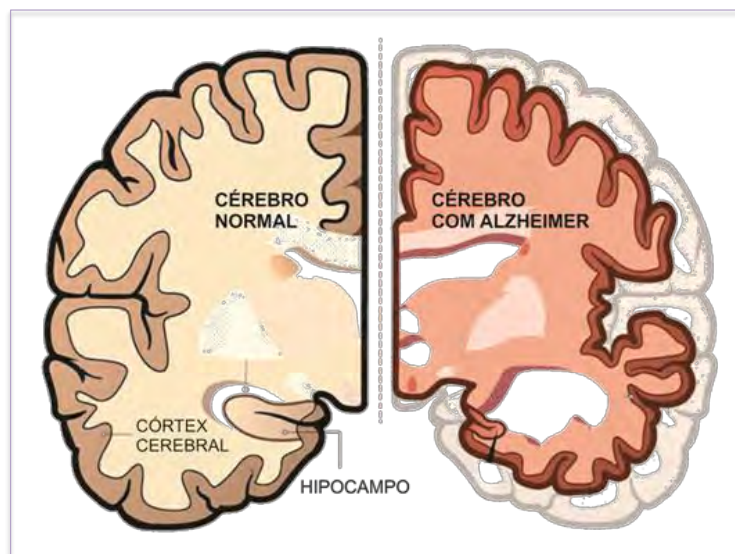


Figura 2: Atrofia do tecido cerebral (Adaptado de DREW, 2018).

Microscopicamente, suas principais características são: a presença de placas neuríticas na superfície extracelular dos neurônios, constituídas por agregados de peptídeos β -amilóide ($A\beta$); depósitos intracelulares de filamentos neurofibrilares insolúveis compostos por formas hiperfosforiladas da proteína *tau* (PTau) (Figura 3) (MATTSON, 2004; HANGER *et al.*, 2009; MAWUENYEGA, 2010; SERRANO-POZO *et al.*, 2011). A DA também está associada a outros eventos bioquímicos como déficit do neurotransmissor acetilcolina (CRAIG, *et al.*, 2011), estresse oxidativo (HOLMES, 2011), neuroinflamação (SU *et al.*, 2011), e disfunção da homeostase metálica (Figura 3) (GREENOUGH *et al.*, 2013).

No entanto, não existe um teste simples para realizar o diagnóstico. Este baseia-se na identificação das modificações cognitivas específicas, como descrito nos critérios do *National Institute of Neurologic and Communicative Disorders and Stroke and the Alzheimer Disease and Related Disorders Association* (NINCDS-ADRDA) (MCKHANN *et al.*, 1984). Apesar de melhorias significativas nos exames de imagem cerebral, a confirmação segura da DA só é obtida ao examinar o cérebro após a morte. Há novas pesquisas sobre o desenvolvimento de testes que podem detectar biomarcadores da doença de Alzheimer, mas isso permanece em estágio inicial (ALZ, 2019).

O risco de desenvolver a DA pode ser influenciado por fatores genéticos e exógenos, no entanto, o fator de risco mais relevante é a idade (BLENNOW *et al.*, 2006). O número de casos desta doença aumenta substancialmente com o avanço da idade, numericamente, a porcentagem de indivíduos com DA praticamente duplica a cada 5 anos de idade a partir dos 60 anos. A prevalência desta demência é 1 % em indivíduos 60 anos, mas mostra um

incremento percentual quase exponencial com o aumento da idade, de modo que a prevalência é em torno de 30 % em pessoas com 85 anos (JORM, 1991).

Os fatores de risco genéticos causam DA em casos raros, principalmente devido a mutações na APP ou presenilina (LEVY-LAHAD, *et al.*, 1995), que é um constituinte do complexo da enzima γ -secretase que degrada a APP em A β , e devido a mutações nas isoformas da apolipoproteína transportadora de colesterol (ApoE) (MATTSON, 2004). Tais mutações genéticas estão fortemente associadas a casos raros (WOLLMER, 2010; Mattson, 2004), chamado de DA familiar, que corresponde cerca de 5 % do total dos casos, e são caracterizados por seu aparecimento prematuro, ocorrendo antes dos 65 anos e, por isso também é chamada de DA de início precoce (MONCZOR, 2005).

Já os fatores de risco exógenos incluem: trauma acerebral (ALZ, 2019), tabagismo (REITZ *et al.*, 2007; BARNES & YAFFE, 2011), obesidade (GUSTAFSON, *et al.*, 2003; WHITMER *et al.*, 2007), diabetes (BLENNOW *et al.*, 2006; MAYEUX, 2003), hipertensão (LAUNER, *et al.*, 2000; BARNES & YAFFE, 2011), colesterol (NOTKOLA, 1998; SOARES & SPARKS, 2008), níveis elevados de homocisteína (IRIZARRY *et al.*, 2005; MORRIS, 2003), e exposição exógena a metais (MIL & BENGA, 2006), incluindo chumbo (LOEF, 2011), mercúrio (MUTTER, 2010), e alumínio (NERI & Hewitt, 1991; Tomljenovic, 2001; Bondy, 2010)

O risco de desenvolver DA pode ser reduzido, evitando os fatores de risco exógenos, além de promover estímulos à capacidade neuronal (LINDSAY *et al.*, 2002; VALENZUELA *et al.*, 2011), como ler, se envolver em um hobby, jogar xadrez, fazer palavras cruzadas e quebra-cabeças; tocar instrumentos musicais (ALZ, 2019); ter boa alimentação, através da ingestão de vitamina B12, folato, antioxidantes como vitamina E, ácidos graxos insaturados, cereais e peixes (MORRIS, 2009; TAEPAVARAPRUK & SONG 2010); e realizar atividades físicas regulares (LINDSAY *et al.*, 2002; DEWEERDT, 2011).

1.3. Bases Moleculares da DA

A DA é uma doença heterogênea conduzida pela interação entre múltiplos fatores deletérios. Sua origem e o modo exato como estes fatores contribuem para o progresso da doença continuam indeterminados até o momento (RANG & DALE, 2015). Estas irresoluções levaram a propostas de várias hipóteses baseadas nas alterações dos aspectos moleculares e fisiopatológicos observadas no cérebro do portador da DA, como uma tentativa

de explicar a complexidade e a natureza multifatorial da DA. Entre as mais importantes hipóteses estão: déficit colinérgico, amiloide, propagação da P_{Tau}, estresse oxidativo, inflamação e disfunção metálica (LIU *et al.*, 2019; DU *et al.*, 2018) (Figura 3).

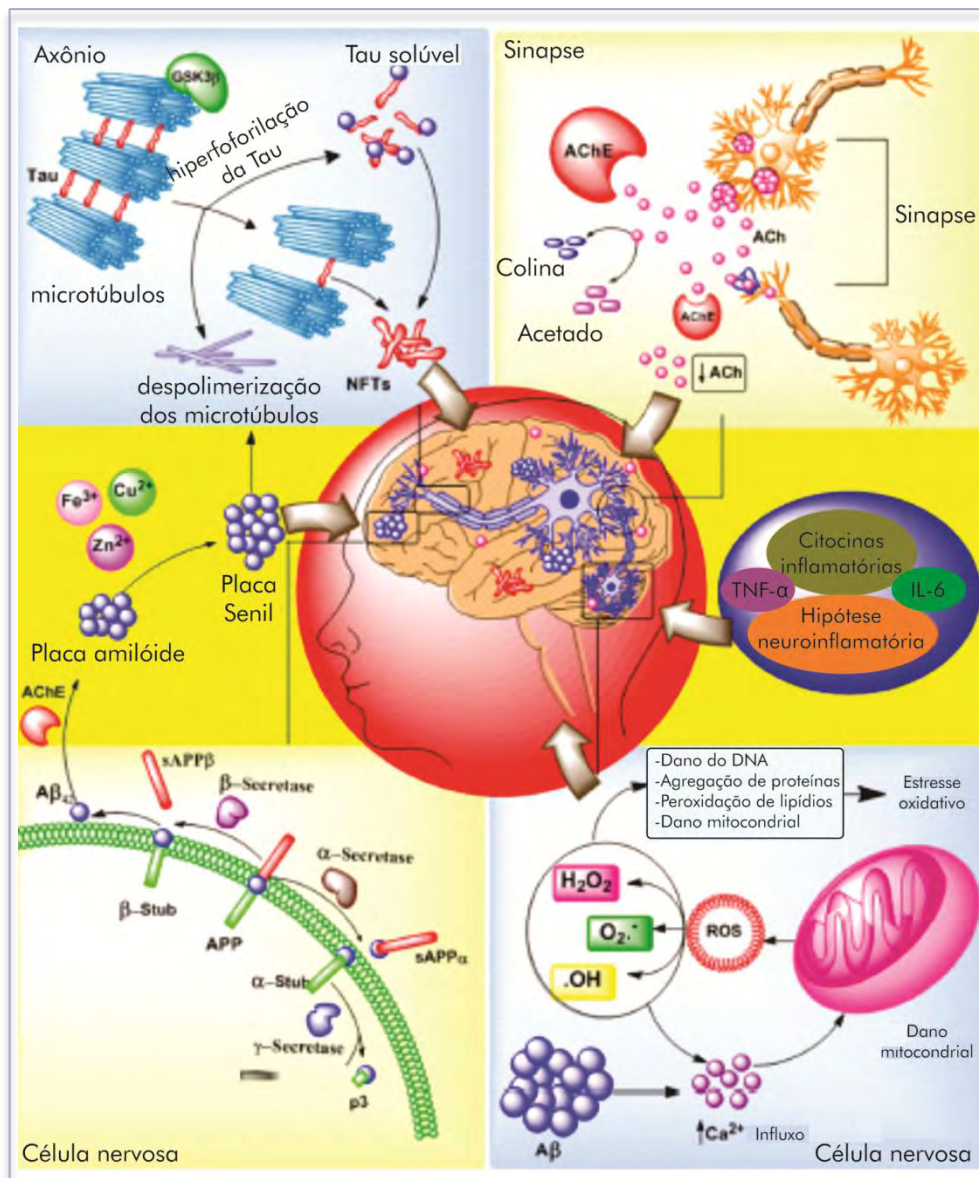


Figura 3: Interação entre múltiplos fatores da DA: propagação da P_{Tau}, déficit colinérgico, disfunção metálica, inflamação, amiloide e estresse oxidativo (Adaptado de SINGH *et al.*, 2016)

1.3.1. Hipótese do déficit colinérgico

A região conhecida como núcleo basal de Meynert, é responsável pela produção da enzima colina acetiltransferase (ChAT), a qual é transportada para estruturas-alvo – hipocampo, córtex cerebral e amígdala, entre outros – onde a partir da colina (1) e da acetilcoenzima A (2) esta enzima catalisa a reação de síntese da acetilcolina (3) que é um neurotransmissor responsável por regular o desempenho cognitivo e o processo de

aprendizado e memória (Figura 4). Uma vez sintetizada, parte da acetilcolina (3) é transportada e armazenada em vesículas sinápticas (Figura 4). Após ser liberada inteiramente por exocitose, a acetilcolina interage especificamente com os receptores colinérgicos presentes nas membranas pré e pós-sinápticas, transmitindo a mensagem entre os neurônios, ou sofre hidrólise pela enzima acetilcolinesterase (AChE), gerando como produtos um acetato e colina (Figura 4) (RANG & DALE, 2015).

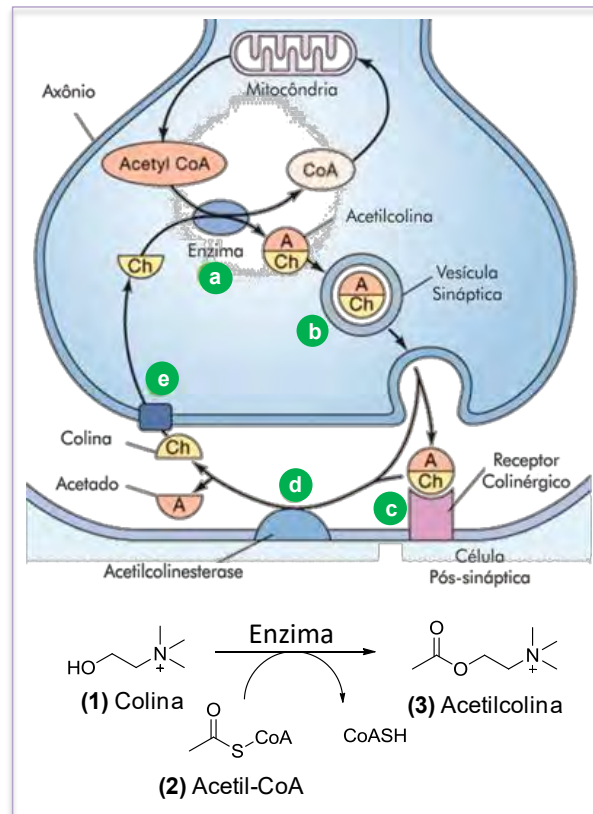


Figura 4: Sinapse colinérgica. Mecanismo biológico envolvido na síntese da acetilcolina (3) a partir da colina (1) e acetilcoenzima A (2) catalisada pela enzima colina acetiltransferase (a); armazenamento (b); interação com receptores (c); decomposição da acetilcolina (3) pela enzima acetilcolinesterase (d); e retorno da colina ao terminal axônico para síntese de mais acetilcolina (3) (e) (Adaptado de PHILPOTEDUCATION, 2019)

Na DA, observa-se a redução dos neurônios colinérgicos, assim como atrofia cerebral, especialmente no córtex, no hipocampo, nos gânglios basais de Meynert e na área septal, causando déficit de transmissão colinérgica. Estudos mostraram um declínio contínuo de acetilcolina, ChAT e AChE em cérebro de pacientes com DA. Essas observações somada ao papel do sistema colinérgico na memória e nos processos de aprendizagem no cérebro humano levaram a hipótese colinérgica da DA, a qual postula que a degeneração do sistema colinérgico contribui expressivamente com o comprometimento das funções cognitivas em indivíduos com DA (KASA, *et al.*, 1997).

A hipótese colinérgica forneceu a base racional para o desenvolvimento de estratégias que visam melhorar a neurotransmissão colinérgica. Níveis sinápticos de acetilcolina podem ser aumentados inibindo a AChE, usando precursores de acetilcolina, aumentando a liberação de acetilcolina ou agonistas muscarínicos, entretanto a única abordagem eficaz comprovada no tratamento dos sintomas cognitivos e funcionais da DA foi baseada nos inibidores colinesterásicos.

1.3.2. Hipótese Amilóide

A hipótese de amilóide foi publicada pela primeira vez em 1991 por John Hardy e David Allso, em virtude da identificação de mutações patogênicas no gene da proteína precursora A β (APP) no cromossomo 21, também encontrada em indivíduos portadores da Síndrome de Down, os quais apresentam depósitos de A β no final da infância ou no início da idade adulta e desenvolvem posteriormente as características neuropatológicas clássicas da DA (HARDY & ALLSOP, 1991). Tal observação sugeriu que o metabolismo de APP e a deposição de A β eram os eventos cruciais na DA. Deste modo, postularam que o peptídeo A β , desempenha um papel central na origem da doença devido sua neurotoxicidade, capaz de levar à formação das placas senis e desencadear uma sequência de eventos, resultando na morte celular (HARDY & SELKOE, 2002; QUON *et al.*, 1991).

Os peptídeos A β derivam da clivagem da APP, uma proteína de membrana integral altamente conservada e cuja expressão está localizada principalmente em torno da sinapse do tecido neuronal. Embora seu papel principal não seja completamente compreendido, sua importância essencial para a plasticidade neuronal e a formação de sinapses é reconhecida. A APP pode ser transformada pela enzima α -secretase, depois pela enzima γ -secretase na via não amiloidogênica; este processo não produz A β insolúvel. Na via amiloidogênica, a APP é primeiramente clivada pela β -secretase e depois pela γ -secretase, produzindo peptídeos A β fibrilogênicos que possui diferentes tamanhos, de 38 a 42 aminoácidos (Figura 5) (HARDY & SELKOE, 2002; RAJASEKHAR & GOVINDARAJU, 2018).

Existem dois tipos principais de peptídeos A β que têm um papel direto na formação das placas e na neurotoxicidade induzida, os resíduos de 40 e 42 aminoácidos, respectivamente: A β ₁₋₄₀ e A β ₁₋₄₂. Apesar de o primeiro fragmento ser o mais comum, atualmente o segundo, considerado mais hidrofóbico, possui um maior potencial amiloidogênico, embora ambos

sejam capazes de agregar e originar protofibrilas, fibrilas e, por fim, placas insolúveis (HARDY & SELKOE, 2002; RAJASEKHAR & GOVINDARAJU, 2018).

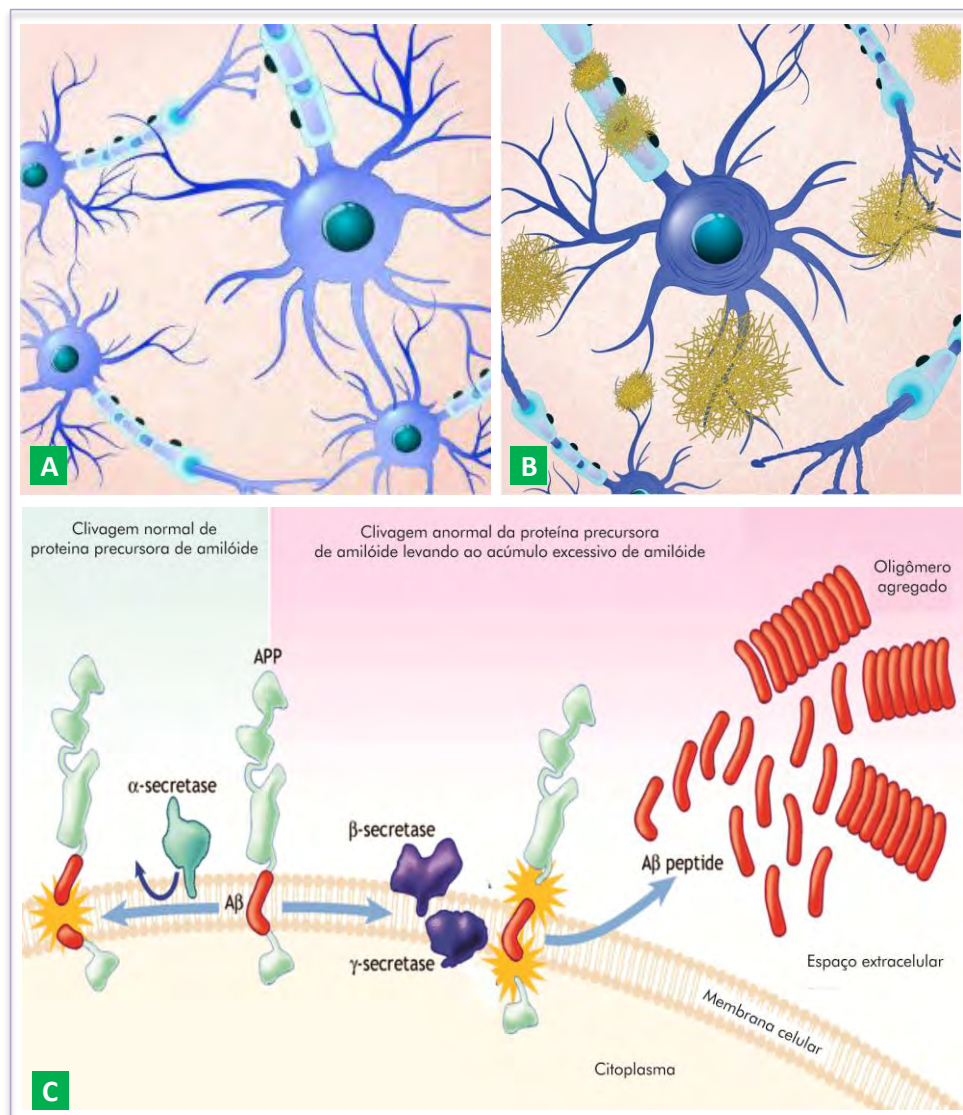


Figura 5: Ilustração de neurônios em condições fisiológicas normais (A) e neurônios de indivíduos com DA cercados por placas amiloides (em amarelo) (B). Esquema de clivagem normal pelas enzimas α -, γ -secretases (à esquerda) e anormal pelas enzimas β -, γ -secretases (à direita) da APP; posterior deposição de agregados A β de no cérebro (C) (Adaptado de SHUTTERSTOCK, 2019; PATTERSON *et al.*, 2008;)

O acúmulo progressivo de A β eventualmente leva a sequência de eventos patológicos, incluindo, bloqueio da sinalização sináptica e atividade neuronal alterada; ativação de microglia e astrócitos reativos, levando a resposta inflamatória local; dano neuronal; estresse oxidativo; ativação de cinases, resultando na hiperfosforilação da proteína que origina emaranhados neurofibrilares e; em última análise, morte neuronal e perda sináptica (PANEK, *et al.*, 2017).

Ademais, foi observado que na doença de Alzheimer, colinesterases estão presentes principalmente em placas neuríticas, por conseguinte, verificou-se que, além de sua função catalítica, as colinesterases possuem a capacidade de auxiliar nos processos de formação A β fibrillas reforçando o processo de neurodegeneração celular (INESTROSA, *et. al.*, 2001).

1.3.3. Hipótese de propagação da Ptau

Emaranhados neurofibrilares são outro marcador intracelular da DA (BRAAK & BRAAK, 1996; BRAAK, *et al.*, 1999), compostos principalmente pela P τ , que são proteínas associadas aos microtúbulos, presente principalmente no axônio. Tais proteínas ao se ligarem aos microtúbulos promovem estabilização destes, possibilitando o transporte de substâncias importantes entre os neurônios (Figura 6-A) (BU'EE *et al.*, 2000; IQBAL *et al.*, 2010).

A fosforilação da P τ por cinases provoca a dissociação da P τ dos microtúbulos. Em condições normais, há um equilíbrio dinâmico constante entre fosforilação e desfosforilação da P τ , mantendo assim a morfologia do neurônio. No entanto, o excesso de fosforilação da P τ resulta na sua dissociação dos microtúbulos, levando à perda gradual da função dos microtúbulos, do transporte axonal seguida de disfunção sináptica, e perda neuronal (Figura 6-B e C). Além disso, a P τ hiperfosforilada se agrega para formar filamentos helicoidais emparelhados (PHF), finalmente se agrupam em emaranhados neurofibrilares (NFTs) e se depositam dentro do neurônio, conferindo lesão tóxica adicional, causando à morte dos neurônios (Figura 6-C) (JAKOB-ROETNE & JACOBSEN, 2009; MACCIONI *et al.*, 2010).

A hipótese de propagação da P τ foi introduzida em 2009, e defende que a taupatia geralmente aparece primeiro em áreas específicas e depois resulta na propagação autocatalítica da cascata de agregação de P τ a todos os neurônios interconectados (FROST, *et al.*, 2009). Apesar da P τ desempenhar um papel importante na DA, a hipótese P τ por si só não é suficiente para explicar todas as condições sintomáticas observadas na DA (LANSDALL, 2014).

Ambas as hipóteses estão intimamente ligadas entre si, já que os agregados A β e a hiperfosforilação da P τ juntos, desempenham um papel crucial no avanço da DA. Não existe um consenso sobre a identificação do evento que inicia a DA, há estudos que defendem a teoria de que os agregados A β desencadeia a taupatia e outros o contrário (SELKOE & HARDY, 2016). Entretanto, estudos recentes evidenciam que peptídeos A β podem induzir a

hiperfosforilação da proteína P_{Tau}, entretanto os fatores que desencadeiam este desequilíbrio ainda não são bem entendidos (LANSDALL, 2014; BLOOM, 2014).

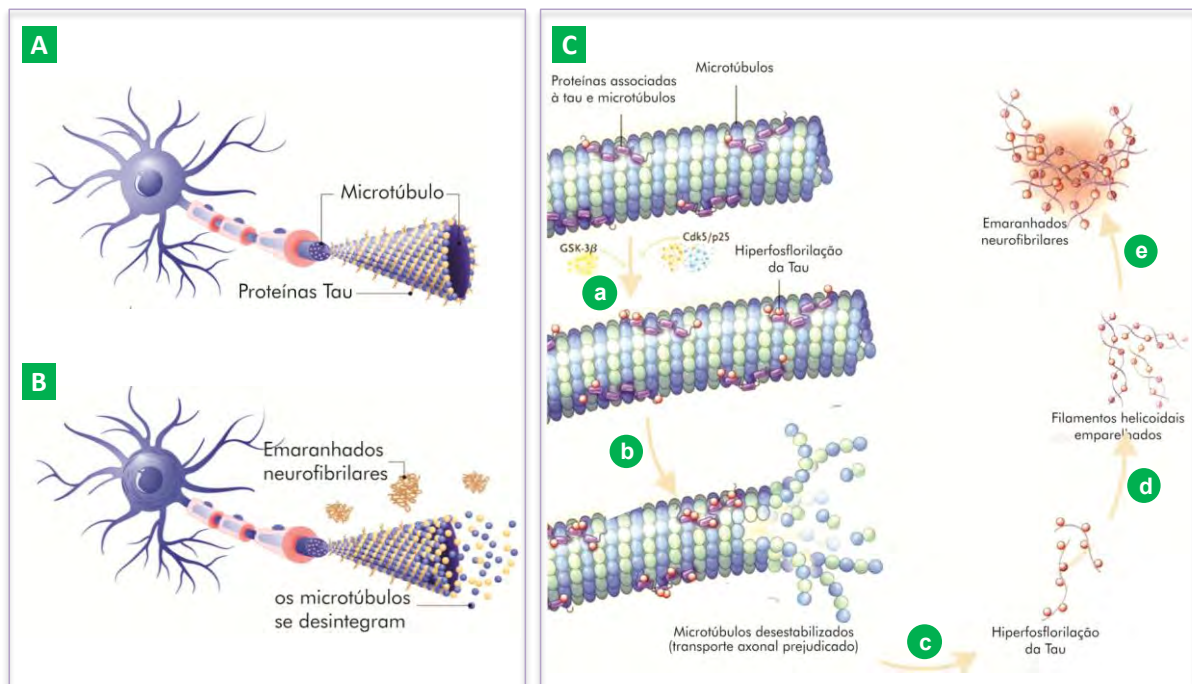


Figura 6: A - Neurônios normais nos quais proteínas Tau se encontram ligadas aos microtúbulos e os estabilizam. B - Neurônios de indivíduos com DA nos quais a proteína Tau sofre hiperfosforilação resultando na dissociação dos microtúbulos e a formação filamentos neurofibrilares. C- A fosforilação da Tau mediada por cinases (a) desencadeia a dissociação desta proteína da superfície do microtúbulo (b). A tau hiperfosforiladas resultantes começam a se (c) para formar filamentos helicoidais emparelhados (PHF) (d), finalmente se agrupam em emaranhados neurofibrilares (NFTs) (e) (Adaptado de SHUTTERSTOCK, 2019; DXLINE, 2019)

1.3.4. Neuroinflamação

A resposta inflamatória no cérebro é outra característica relevante da DA, geralmente inflamação crônica, caracterizada principalmente por elevado número de leucócitos e macrófagos mononucleares no sistema nervoso central, como células da glia – astrócitos e microglia. Células microgliais são macrófagos específicos do SNC, e elas representam 10 a 15 % de todo as células do cérebro (SANTOS *et al.*, 2016).

Tais células são extremamente importantes porque possuem funções imunes, as quais, em condições fisiológicas, reconhecem patógenos, detritos, proteínas danificadas e mal dobradas e células danificadas e inicia sua degradação e remoção através de reações controladas. No entanto, em condições fisiopatológicas, como a morte neuronal, dão origem a reações exacerbadas a médio prazo (TUPPO & ARIAS, 2005). Dessa forma, nas doenças neurodegenerativas, um *loop de feedback* positivo é criado entre a morte neuronal e a neuroinflamação.

Na DA, placas senis, NFT e neurônios danificados ou mortos ativam a microglia para iniciar a inflamação, induzindo mediadores pró-inflamatórios, como a interleucina 1 beta (IL-1) e a interleucina 6 (IL-6) e o fator de necrose tumoral (TNF- α), fator quimiotático interleucina 8 (IL-8), proteína inflamatória macrofágica, prostaglandinas, leucotrienos, fator de coagulação, protease e inibidores de protease; que ativam as vias de morte neuronal (TUPPO & ARIAS, 2005; TOWN *et al.*, 2005). Além de causar danos localizado no cérebro, o que contribui ainda mais para a morte neuronal (HALLIDAY *et al.*, 2000; PERRY & HOLMES, 2014)

Estudos mostraram que microglia exibem maior atividade em pacientes com DA do que no grupo controle (MCGEER *et al.*, 1988). Ademais, também foi descrito que a concentração de aglomerados de células microgliais próximas a placas senis e neurônios contendo NFTs em portadores da DA é geralmente 2-5 vezes maior do que em indivíduos normais (MCGEER & MCGEER, 2010).

1.3.5. Estresse oxidativo

Estudos mostram que existem evidências que o estresse oxidativo é crucial para a evolução da DA (LIU *et al.*, 2015), atuando, tanto como causa quanto como consequência, nos processos inflamatórios em geral, característicos das doenças neurodegenerativas (SCHWAB & MCGEER, 2008).

O cérebro é um órgão que possui alta atividade energética, logo requer um alto consumo de oxigênio, que corresponde 20% do oxigênio absorvido pelo corpo, o que confere as células neuronais maior vulnerabilidade ao estresse oxidativo (MOHSENZADEGAN *et al.*, 2012). A demanda de energia é suprida pela fosforilação oxidativa mitocondrial e esse processo leva à formação de espécies reativas de oxigênio (EROs). Estas EROs e de nitrogênio (ERNs), em baixas concentrações são importantes para a manutenção do estado celular redox, funcionamento adequado do sistema imune e sinalização celular adequada. Além disso, sugere-se que os hidroperóxidos contribuem para a maturação dos eritrócitos e participam da diferenciação e proliferação celular (RANG & DALE, 2015).

Em condições normais, estas espécies normalmente não mostram danos oxidativos particularmente altos, pois existem mecanismos de proteção – que incluem enzimas como a superóxido dismutase (SOD), a catalase e a glutathiona peroxidase (GPx), além de compostos antioxidantes como as vitaminas C e E. O estresse oxidativo ocorre quando os mecanismos de

proteção antioxidante ficam sobrecarregados, resultado da produção excessiva dessas espécies reativas (VALKO *et al.*, 2007). De maneira geral, o estresse oxidativo no cérebro de pacientes com DA está manifestado pelo aumento da oxidação proteica, peroxidação lipídica, oxidação do DNA e RNA mensageiro e formação de EROs, resultando em consequências deletérias ao funcionamento celular (NUNOMURA *et al.*, 2006; POCERNICH & BUTTERFIELD, 2012).

Estudos têm encontrado alterações mitocondriais em indivíduos com DA, o que pode contribuir para aumentar o estresse oxidativo, visto que as mitocôndrias, quando sofrem alguma disfunção, podem tanto aumentar a liberação de EROs como também provocar uma crise energética através da depleção de ATP. Os neurônios são particularmente afetados pelas mutações no DNA das mitocôndrias, visto que sua principal fonte energética é a cadeia transportadora de elétrons mitocondrial (BENEVENTO, 2011).

A A β desenvolve papel central no aumento do estresse oxidativo em portadores de Doença de Alzheimer. Na mitocôndria, estes agregados β A inibem a cadeia transportadora de elétrons, diminui a taxa respiratória e induz a liberação de EROs (BENEVENTO, 2011). Além disso, a peroxidação lipídica parece preceder a formação dos emaranhados neurofibrilares intraneurais.

1.3.6. Hipótese metálica

Os íons metálicos desempenham um papel importante na manutenção da homeostase, atuam como cofatores essenciais nas metaloproteínas, função mitocondrial e função neuronal (POPESCU & NICHOL, 2011).

Em cérebros saudáveis, os íons metálicos são mantidos em um nível muito baixo, sua concentração é rigorosamente regulada através da barreira hematoencefálica (ZHENG & MONNOT, 2012). Quando ocorre um desequilíbrio no sistema de regulação de íons metálicos, estes provocam consequências citotóxicas para a sobrevivência das células, como aumento da resposta ao estresse oxidativo e o envelhecimento incorreto de proteínas, contribuindo com a evolução de doenças neurodegenerativas (JOMOVA *et al.*, 2010; MUHOBERAC & VIDAL, 20013). Diversos estudos demonstram alterações da homeostase metálica, incluindo ferro (Fe), cobre (Cu) e zinco (Zn) em paciente com a DA. No entanto, não apenas os metais fisiológicos têm sido implicados na patogênese desta doença, mas

também alguns metais considerados tóxicos, tais como o alumínio, o chumbo e o mercúrio (BAKULSKI *et al.*, 2012; PENDERGRASS *et al.*, 1997).

Metais de transição, como ferro e cobre, podem induzir o aumento do estresse oxidativo no cérebro, através das reações de Haber-Weiss e Fenton, ao produzir EROs e ERNs, as quais são responsáveis por gerar danos extremos às células nervosas (ZHU *et al.*, 2007; BONDA *et al.*, 2011).

Em neurônios vulneráveis na DA, o ferro ligado ao RNA pode sofrer oxidação via reação de Fenton causando anormalidades no RNA, principalmente no RNA ribossômico, resultando uma redução significativa da síntese de proteínas. O cobre exerce distúrbios oxidativos semelhantes no tecido neuronal. Além de interagir com a APP sofrendo redução de cobre (II) a cobre (I), provocando o aumento da produção de intermediário radicalar hidroxila. Ademais, algumas enzimas pró-oxidantes (como xantina oxidase, ferroxidase, óxido nítrico sintase) podem ser ativadas indiretamente por esses íons metálicos (BONDA *et al.*, 2011; BARNHAM *et al.*, 2004).

Os íons metálicos de transição estão envolvidos na agregação e toxicidade de placas A β (KAWAHARA, 2005; WALTON, 2013). Sabe-se que íons metálicos (Cu, Fe, Zn e Al) encontram-se em altas concentrações de em placas senis e que os íons cobre e zinco aceleram a agregação de A β para formar placas senis. Ademais, biometais, especialmente zinco e cobre, estão coordenados diretamente com A β (LOVELL *et al.*, 1998; DONG *et al.*, 2003).

E entre outras consequências citotóxicas, destaca-se a capacidade do ferro de ativar a morte celular programada conhecida como ferroptose, independente do estresse oxidativo e de outras vias de morte celular (BELAIDI & BUSH, 2016).

1.4. Tratamento e possíveis estratégias terapêuticas da DA

Atualmente a terapia utilizada não é capaz de curar a doença. Os medicamentos comercialmente disponíveis atuam somente no controle dos transtornos cognitivos e redução na progressão da doença (FISH *et al.*, 2019). Ademais, diversas abordagens terapêuticas têm sido aplicadas no tratamento dos sintomas comportamentais como, agitação, depressão, alucinações e delírios, que são mais frequentes com a progressão da enfermidade (SERENIKI *et al.*, 2008).

O tratamento sintomático da DA baseia-se em dois modos de ação diferentes: inibidores de colinesterases e antagonismo do receptor de N-metil-D-aspartato (NMDA) (Figura 4) (FISH, *et al.*, 2019).

1.4.1. Inibidores de Colinesterases

A colinesterase pertence à família das serina hidrolases presentes nas sinapses colinérgicas, é responsável por catalisar a hidrólise dos ésteres de colina, permitindo que o neurônio colinérgico, após ser ativado, restitua seu estado de repouso. Existem duas formas de colinesterase codificadas por dois genes distintos, acetilcolinesterase (AChE, EC 3.1.1.7) e butirilcolinesterase (BuChE, E.C. 3.1.1.18) (MASSOULIE, *et al.*, 1993).

Estão distribuídas de maneira distinta através dos tecidos, sendo a AChE encontrada principalmente no sistema nervoso central e periférico, nas junções neuromuscular e na membrana dos eritrócitos (QUINN 1987; ARAÚJO, 2016). Enquanto que a BuChE é amplamente distribuída em vários tecidos, como: plasma, pulmões, fígado, coração, sistema nervoso central e periférico, principalmente de origem glial (MACK & ROBITZKI, 2000; ÇOKUĞRAŞ & TURK, 2003; ZAKUT *et al* 1991; MESULAM, *et al* 2002). Como a BuChE está localizada principalmente nos tecidos periféricos e uma quantidade muito pequena está presente na região do cérebro, a inibição periférica da BuChE está associada aos efeitos colaterais (ANAND & SINGH, 2012).

A AChE e BuChE apresentam semelhanças estruturais, sendo que seus aminoácidos apresentam aproximadamente 65 % de homologia. Ambas possuem um canal estreito de aproximadamente 20 Å de profundidade, no qual se encontra o sítio aniônico periférico (PAS) localizado na entrada deste canal; e o sítio de acilação catalítica (CAS) situado na extremidade inferior deste canal (ROSENBERRY *et al.*, 2017).

Tríades catalíticas de AChE humano (hAChE) e BuChE humano (hBuChE) consistem em aminoácidos conservados: Ser203, His447, Glu334 em hAChE e Ser198, His438, Glu325 em hBuChE (SHAFFERMAN, *et al.*, 1992). Além da tríade catalítica, o sítio ativo contém: sítio de ligação de acil, responsável por acomodar o grupo acil do substrato durante a catálise (BRUS *et al.*, 2014); sítio de ligação de colina, capaz de estabilizar a subunidade colina no sítio ativo através de interações cátion-p.; cavidade oxiânion, capaz de formar fortes ligações de hidrogênio com o oxigênio carboxílico da ACh e ajudar na estabilização da carga negativa gerada durante o reação de hidrólise (FRANJESEVIC *et al*, 2019).

Embora o CAS de ambas as enzimas seja conservado, as duas enzimas possuem diferenças espaciais nos resíduos de aminoácidos que formam o PAS e a sítio de ligação de acil. A diferença mais significativa refere-se à presença dos aminoácidos aromáticos no sítio ativo da AChE (Tyr72, Tyr124, Trp,286, Tyr337, Phe295, Phe297), enquanto na hBuChE estão presentes resíduos alifáticos (Asn68, Gln119, Ala277, Leu286, Val288, Ala328), permitindo que o BuChE acomode substratos mais volumosos. Tais características estruturais contribuem para a seletividade das duas enzimas tanto em relação aos substratos quanto os inibidores (TAYLOR, *et al.*, 1994; BRUS, *et al.*, 2014).

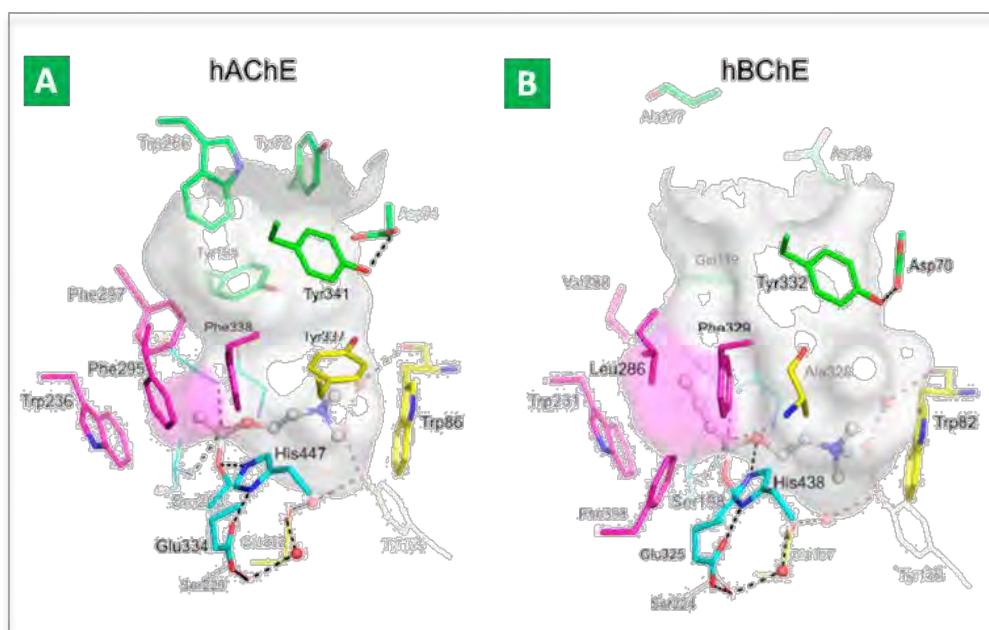


Figura 7: O sítio ativo de acetilcolinesterase humana (hAChE) (A; pdb 4ey4) e butirilcolinesterase humana (hBChE) (B; pdb 1p0i). A molécula de substrato de acetilcolina (ACh) ou butirilcolina (BCh) estão representadas em *balls and sticks*. O canal é representado por sua superfície molecular em cinza e a cavidade do grupo acila em magenta. Os resíduos da tríade catalítica (em palitos) e do sítio oxianion (em linhas) estão representados em ciano. Os principais resíduos aromáticos da cavidade de ligação à colina estão em amarelo. Os resíduos do PAS localizados na borda do canal profundo estão em verde. As moléculas de água estrutural conservadas estão representadas em esferas vermelhas. As ligações de hidrogênio estão representadas por linhas tracejadas (ROSENBERY *et al.*, 2017)

A AChE hidrolisa preferencialmente a ACh, enquanto a BuChE é inespecífica ou pseudo-colinesterase, isto é, menos seletiva e atua hidrolisando tanto a ACh quanto a butirilcolina (BuCh) em quantidades comparáveis (PEZZEMENTI, *et al.*, 2011).

Embora aproximadamente 95 % da atividade das colinesterases sejam devido à AChE em um cérebro humano normal, com o avanço da doença seu nível diminui para 10 a 15 % do valor normal no cérebro de uma pessoa com DA, enquanto a atividade de BuChE aumenta para 120 %, o equivalente a uma variação da razão BuChE: AChE de 0,6 para 1,1, indicando

que BuChE desempenha um papel crítico para a hidrólise de ACh na fase tardia da DA (GREIG, *et al.*, 2001; MUSHTAQ, *et al.*, 2014).

Além de sua função catalítica, ambas as enzimas exibem várias funções não colinérgicas (não enzimáticas) relacionadas à formação de A β (INESTROSA, *et al.*, 2002). Com relação à AChE foi determinado que o local de ligação aniônica periférica (PAS), localizado na entrada do canal catalítico da enzima, está envolvido na formação de amilóide. A AChE interage com o peptídeo A β via o resíduo de triptofano (Trp279) localizado na PAS e forma um complexo estável que inicia a fibrilogênese A β . O emprego de moléculas ativas capazes de interagir com o sítio periférico representa uma abordagem alternativa de inibir a formação de A β (LAHIRI, *et al.*, 2004; CASTRO, *et al.*, 2001; INESTROSA, *et al.*, 1996). Entre os inibidores de colinesterases estão: tacrina (4), donepezil (5), rivastigmina (6) e galantamina (7) (Figura 8).

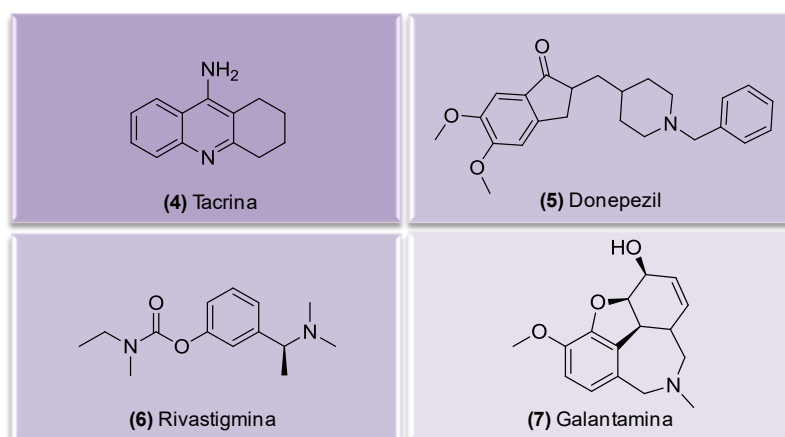


Figura 8: Inibidores colinesterásicos comercialmente disponíveis para o tratamento da DA.

O mecanismo de ação dos inibidores de primeira geração envolve o bloqueio de curta duração do sítio catalítico da enzima colinesterase, que retarda a degradação metabólica da ACh e conseqüentemente aumenta a disponibilidade desse neurotransmissor na fenda sináptica, intensificando a transmissão colinérgica (Figura 9) (MUÑOZ-TORRERO, 2008; SILVA, 2002).

A tacrina (4) foi o primeiro fármaco aprovado para o tratamento da DA leve a moderada em 1993 pelo FDA. É considerado um inibidor reversível não competitivo e não seletivo da AChE, meia-vida curta e alta incidência de efeitos adversos e hepatotoxicidade que o levou a ser descontinuado (ENGELHARDT *et al.*, 2005).

O donepezil (**5**) é o segundo fármaco da classe aprovado pelo FDA em 1996. Trata-se de um inibidor não competitivo reversível altamente seletivo da AChE, único aprovado para o tratamento de sintomas severos em 2006. Apresenta vantagens como não ser hepatotóxico e possuir meia-vida longa, de aproximadamente 70 horas, permitindo dose única diária (SUGIMOTO *et al.*, 2002).

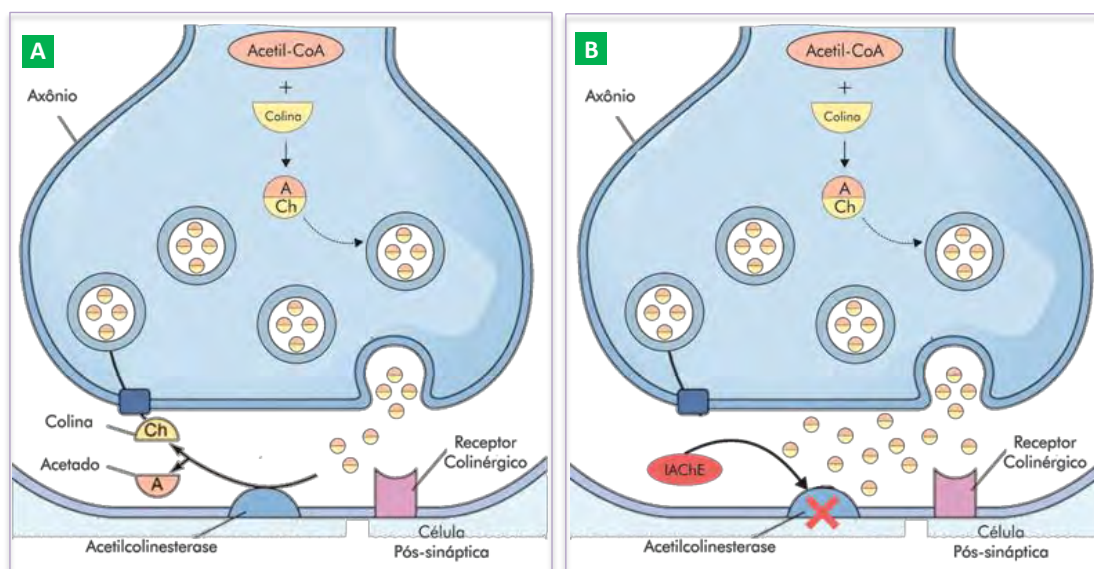


Figura 9: Sinapse colinérgica na ausência (A) e na presença de um inibidor colinésterásicos (IChE) (B).

A rivastigmina (**6**) é um fármaco aprovado no ano 2000 capaz de reagir covalentemente com o sítio ativo das enzimas, sendo classificada como um inibidor irreversível pseudo-seletivo de AChE e BUCHE. A dissociação enzimática ocorre, porém é mais lenta. Sua meia vida plasmática é curta, em torno de uma hora, mas a inibição da enzima persiste por em torno de 10 a 12 horas, por isso é administrada duas vezes ao dia. Apresenta efeitos gastrointestinais, porém não é hepatotóxica. Ademais, foi lançada uma formulação transdérmica de liberação lenta (COREY-BLOOM *et al.*, 1998; ENGELHARDT *et al.*, 2003).

A galantamina (**7**) é um alcalóide terciário descoberto acidentalmente em 1950. No entanto, foi aprovado apenas em 2001 para o tratamento da DA leve a moderada. É um inibidor seletivo, competitivo e reversível da AChE. Todavia, diferentemente dos outros inibidores de AChE, possui ação moduladora sobre os receptores nicotínicos, mas sem relevância clínica esclarecida. Além do mais, a galantamina apresenta baixa hepatotoxicidade e efeitos colaterais como, náuseas, vômitos, diarreia, perda de peso, tontura, dor de cabeça e cansaço (RASKIND, *et al.*, 2000; BARTOLUCCI, *et al.*, 2001; ANAND & SINGH, 2013).

Diversos estudos tem demonstrado que além da inibição da hidrólise da ACh, os AChEIs comercializados exibem uma série de efeitos neuroprotetores que extrapolam a melhoria sintomática da cognição e sugerem o fato de que estes podem modificar positivamente a progressão da DA, desafiando seriamente a visão predominante de que esses medicamentos são apenas um tratamento sintomático da DA. Dentre os AChEIs comercializados, o donepezil é capaz de inibir *in vitro* os dois primeiros eventos da cascata neurotóxica da DA, nomeadamente a formação de A β , bem como a agregação de A β , o que provavelmente explica a aparente superioridade de donepezil (5) nos estudos de neuroproteção com esses medicamentos (MUÑOZ-TORRERO, 2008).

1.4.2. Antagonistas do receptor de NMDA

A memantina (8) (Figura 10), por enquanto o único representante da classe dos antagonistas de receptores de NMDA, foi o primeiro fármaco aprovado pela FDA para tratar os sintomas de DA moderada à severa. Ela regula a atividade do glutamato, que é liberado em grandes quantidades por células danificadas pela DA e por alguns outros distúrbios neurológicos. Quando o glutamato alcança os receptores do tipo NMDA nas células de superfície, o cálcio flui livremente para dentro da célula, o que pode levar à degeneração celular. A memantina (8) tem a capacidade de evitar esta sequência destrutiva (LIPTON, EAL., 1994; MIGUEL-HIDALGO *et al.*, 2002; BULLOCK, *et al.*, 2006).

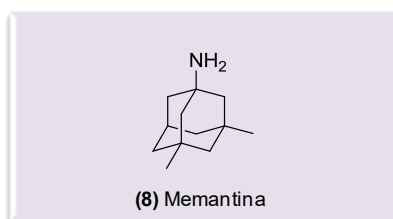


Figura 10: Antagonista do receptor de *N*-metil-D-aspartato (NMDA) disponível para o tratamento da DA.

1.5. Novas Estratégias terapêuticas da DA

Durante as últimas duas décadas, enormes esforços científicos e econômicos foram investidos para desvendar os mecanismos subjacentes à DA, para identificar alvos biológicos e eventos patológicos importantes, a fim de descobrir novos fármacos mais eficazes contra o progresso da doença. Nesse contexto, muitas estratégias terapêuticas emergiram baseadas nas diferentes hipóteses moleculares da DA, como as descritas anteriormente, resultando em

estudos clínicos de inúmeros candidatos a fármacos, em torno de 244 na década de 2002–2012 (CUMMINGS *et al.*, 2014), sendo 22,3 % desses tendo A β como alvo terapêutico.

1.5.1. A β como alvo terapêutico da DA

Os peptídeos A β há muito tempo são vistos como um alvo potencial para a DA, que dominou a pesquisa de novos fármacos nos últimos vinte anos (CUMMINGS *et al.*, 2016). As estratégias atuais para o tratamento da DA, baseadas na hipótese de A β , estão principalmente divididas nas seguintes categorias: inibidores da β - e γ -secretase, utilizados para inibir a produção de A β ; fármacos antiagregação (incluindo quelantes de metais), que são utilizados para inibir a agregação de A β ; fármacos reguladores da atividade de proteases, que são usadas para eliminar placas A β ; e imunoterapia (GOLDE, 2014).

As enzimas secretases são responsáveis pelo processamento de APP que formam peptídeos A β , sendo assim os inibidores desta classe enzimática visam reduzir a formação de peptídeos A β . Até o momento, nenhum inibidor da β -secretases (BACE1) passou nos ensaios clínicos. Recentemente, três inibidores da BACE1, lanabecestat (**9**), verubecestat (**10**), e atabecestat (**11**) falharam em ensaios clínicos, apesar de serem capazes de diminuir os níveis de peptídeos A β (EGAN *et al.*, 2018; TIMMERS *et al.*, 2018; AIZFORUM, 2019). O elenbecestat (E2609) (**12**) é outro inibidor da BACE1 capaz de reduzir os níveis de A β no líquido cefalorraquidiano em até 80% que, entretanto foi descontinuado em testes de fase clínica III (Figura 11) (WOLFE, 2008; AIZFORUM, 2019).

O semagacestat (LY-450139) (**13**), inibidor não seletivo da γ -secretase, e avagacestat (**14**) (BMS-708163), inibidor seletivo da γ -secretase - ou seja, conduz o bloqueio da clivagem do PPA, sem interferir na ação da γ -secretase sobre o receptor Notch, tiveram estudos descontinuados na fase III e fase I respectivamente (HENLEY, *et al.*, 2009; BLENNOW *et al.*, 2013; DOODY *et al.*, 2013; CORIC *et al.*, 2009). O Begacestat (GSI-953) (**15**) inibidor seletivo da γ -secretase tem apresentado resultados promissores em ensaios clínicos de Fase I (MARTONE *et al.*, 2009; HOPKINS, 2012). Atualmente, também encontram-se em fase clínica, os moduladores da γ -secretase NIC5-15 (**16**) e E2012 (**17**), os quais são capazes de diminuir a concentração de A β sem afetar a clivagem do Notch (Figura 11) (GROSSMAN, *et al.*, 2009; HASHIMOTO, *et al.*, 2010).

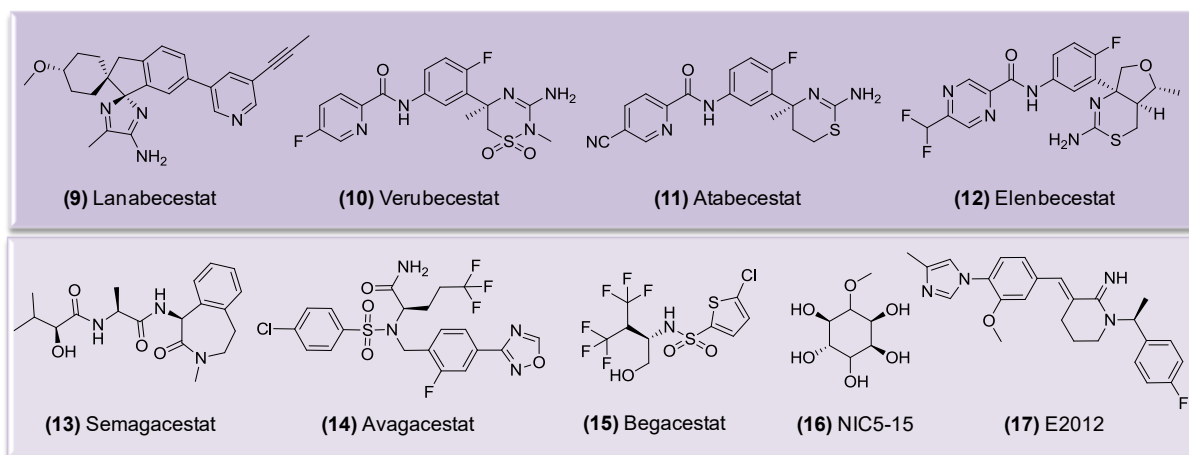


Figura 11: Compostos de inibidores de β -secretase e γ -secretase

A imunoterapia é a intervenção do sistema imunológico para obter a resposta imune necessária ao tratamento da doença (OTT, 2018). Várias imunoterapias foram desenvolvidas e testadas em estudos clínicos a fim de remover os agregados proteicos neurotóxicos, peptídeo A β ou P τ au. A imunoterapia na DA pode ser amplamente dividida em duas categorias principais: imunização ativa (A β ou Tau é administrada aos pacientes como um antígeno); e imunização passiva (anticorpos contra A β ou Tau são administrados ao paciente) (FETTELSCHOSS, *et al.*, 2014). A primeira vacina ativa contra a DA (AN1792) desenvolvida pela ELAN apresentou alguns efeitos benéficos, como redução do declínio cognitivo, entretanto, esta foi suspensa devido a efeitos colaterais graves, como o desenvolvimento de meningoencefalite (GILMAN, *et al.*, 2005; BAYER, *et al.*, 2005; HOLMES, *et al.*, 2008). Atualmente, existem cinco vacinas em fase de testes: ACI-24 e Lu AF20513 em Fase I; e ABvac40, Affitope AD02 e UB311 em fase clínica II (AIZFORUM, 2019).

Anticorpos monoclonais humanizados direcionados contra A β como, bapineuzumab e ponezumab falharam em ensaios clínicos, e seus estudos foram descontinuados. Neste momento, vários estudos de imunização passiva estão em desenvolvimento: crenezumab em fase II; gantenerumabe, solanezumab e aducanumab em fase III (AIZFORUM, 2019).

1.5.2. P τ au como alvo terapêutico da DA

Os NFTs intracelulares contendo P τ au provocam grande impacto na evolução da DA. Várias estratégias terapêuticas adotadas para testar a hipótese de P τ au incluem: a inibição da fosforilação da P τ au ou das enzimas cinases envolvidas na fosforilação da P τ au, (glicogênio sintase-cinase-3b (GSK3b), cinase-5 dependente de ciclina (Cdk5), O-GlcNAcase, proteína

cinase A (PKA) e e proteína cinase II dependente de calmodulina (CaMKII), inibição da agregação de P_{Tau} e melhora de sua depuração; estabilização de microtúbulos; e imunoterapia (GOLDE, 2014; PANZA, *et al.*, 2016).

O azul de metileno (**18**) foi o primeiro composto descrito capaz de dissolver os filamentos da P_{Tau} hiperfosforilada *in vitro*. Sua relevância clínica foi validada na segunda fase dos ensaios clínicos em pacientes com DA, entretanto não atingiu os critérios desejáveis para a melhoria das funções cognitivas (GAUTHIER, *et al.*, 2016; WISCHIK, *et al.*, 2015; SERIPA, *et al.*, 2016). Outro derivado do azul de metileno, leuco-metiltionínio (LMTX) (**19**), encontra-se no momento em ensaios clínicos de fase III (Figura 12).

GSK3b desempenha um papel essencial na regulação da fosforilação da P_{Tau}, além de se envolver no processamento de peptídeos A β (PHIEL, *et al.*, 2003; ROCKENSTEIN, *et al.*, 2007). Muitos inibidores de GSK3b foram desenvolvidos, incluindo indirubin (**20**) e paullone (**21**) (DOLAN & JOHNSON, 2010), contudo, a alta citotoxicidade e os efeitos colaterais indesejáveis impediram que esses inibidores de GSK3b entrassem em ensaios clínicos. O tideglusib (**22**) é um inibidor da GSK3b que, em estudos pré-clínicos, mostrou reduções na fosforilação da P_{Tau}, redução da perda de neurônios, melhora do aprendizado e da memória em um modelo de camundongo, entretanto foi descontinuado na fase clínica II, pois não demonstrou eficácia no aprimoramento dos parâmetros cognitivos (PANZA, *et al.*, 2016; AIZFORUM, 2019) (Figura 12).

Outra importante proteína quinase associada à P_{Tau} é o Cdk5. A disfunção do Cdk5 contribui para placas senis, emaranhados neuro-brônquicos, dano sináptico, disfunção mitocondrial e apoptose neuronal dependente do ciclo celular. Todavia, inibidores de Cdk5 apresentaram efeitos colaterais adversos, os quais limitaram sua utilidade prática (LIU, *et al.*, 2016).

No que se refere à imunoterapia, vacinas ativas direcionadas para proteína tau (ACI35 e AADvac-1) e vacinas passivas (BIIB092 e ABBv-8E12) estão atualmente em fases de ensaios clínicos I e II (AIZFORUM, 2019).

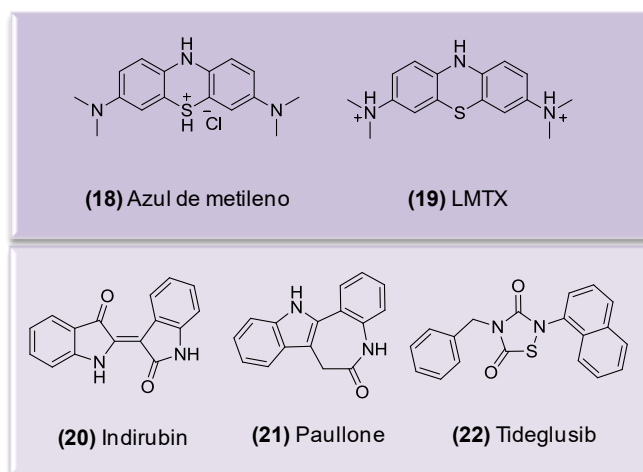


Figura 12: Compostos que possuem como alvo a proteína Tau

1.5.3. Agentes Quelantes e MPACs

A formação do complexo de A β -metal (Cu, Fe e Zn) e a toxicidade decorrente estão no centro da hipótese metálica (BUSH & TANZI, *et al.*, 2008; SAVELIEFF, *et al.*, 2013). Diferentes tipos de estratégias foram desenvolvidas para restabelecer a homeostase metálica. Uma dessas estratégias é uso de agentes quelantes de metais, a fim de diminuir os níveis dos íons metálicos indiretamente no cérebro. No entanto, não existem evidências conclusivas de eficiência dessa teoria, além de haver a possibilidade de causar deficiência de íons metálicos periféricos, uma vez que agentes quelantes não apresentam especificidade para os íons metálicos complexados com A β , podendo resultar em graves efeitos adversos (PARDRIDGE, 2009; DEDEOGLU, *et al.*, 2004). Essa é a razão pela qual o desenvolvimento do medicamento contra a alteração da homeostase dos íons metálicos se concentra no desenvolvimento de compostos atenuantes de proteínas metálicas (MPAC do inglês, *Metal-Protein Attenuating Compounds*).

Os MPAC possuem afinidade moderada pelos íons metálicos, de modo que não removem indiscriminadamente os biometais. Assim, os MPAC inibem somente as interações anormais entre o íon e o peptídeo A β , já que competem com o peptídeo pelas ligações com metal, o que resulta na remoção metais do complexo A β -metal, e consequentemente, na dissolução e remoção dos agregados A β (HUANG *et al.*, 2004; BARNHAM *et al.*, 2004).

O 5-cloro-7-iodo-quinolin-8-ol (clioquinol ou PBT-1) (**23**), primeiro MPAC a ser proposto como candidato a fármaco para a terapia da DA, é um quelante de Cu, Zn e Fe, lipofílico, capaz de atravessar a barreira hematoencefálica (BBB) em cobaias. Estudos mostraram a capacidade do clioquinol (**23**) de diminuir os níveis de peptídeos A β_{42} no plasma

e a deposição de amiloide no cérebro atribuída à remoção de metais das placas, além de evitar o declínio cognitivo, entretanto tais estudos foram suspensos na segunda fase de ensaios clínicos (CHERNY *et al.*, 2001; DORAISWAMY & FINEFROC, 2004; BAREGGI *et al.*, 2012). Uma nova geração de compostos derivados do clioquinol tem sido estudada por diferentes grupos de pesquisa. Atualmente o PBT-2 (**24**), quelante de Cu, Zn e Fe, em ensaios clínicos de fase II, mostrou ser capaz de reduzir a agregação de peptídeos A β , limitar a toxicidade dos oligômeros e redistribuir íons metálicos nos neurônios (CROUCH *et al.*, 2011; FAUX *et al.*, 2010; BUSH, 2008) (Figura 13).

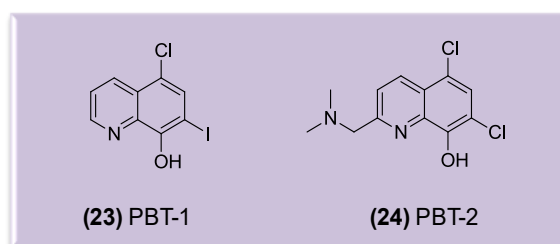


Figura 13: Estrutura de MPACs planejados para o tratamento da DA

1.5.4. *Extesse oxidativo e disfunção mitocondrial como abordagem terapêutica*

Nas doenças neurodegenerativas, há condição de estresse oxidativo, decorrente de um desequilíbrio entre a geração de compostos oxidantes e a atuação dos sistemas de defesa antioxidante (BUTTERFIELD & LAUDERBACK, 2002; GIBSON *et al.*, 2004; MOHMMAD, *et al.*, 2006). Deste modo, o emprego de antioxidantes foi considerado uma abordagem terapêutica plausível para a redução dos danos induzidos pelos radicais livres (PERSSON *et al.*, 2014; TEIXEIRA *et al.*, 2013).

A vitamina E, também conhecida como α -tocoferol (**25**), é um antioxidante que se encontra em estudo clínico atualmente (AIZFORUM, 2019). Um estudo populacional mostrou redução do risco da DA pela ingestão alimentar de vitamina E (MORRIS *et al.*, 2002). No entanto, os dados para comprovação de sua eficácia no tratamento da DA são insuficientes (ISAAC, *et al.*, 2008). Além disso, outra pesquisa demonstrou que altas doses de vitamina E provocavam aumento do risco de morte, especialmente em pacientes com doença arterial coronariana (MILLER *et al.*, 2005) (Figura 14).

O extrato *Ginkgo biloba* contém princípios ativos que promovem a redução de radicais livres no tecido nervoso (LUO *et al.*, 2002). Contudo, uma pesquisa baseada em inúmeros ensaios clínicos apontou que os benefícios de extrato *Ginkgo biloba* para o tratamento do

comprometimento cognitivo da DA foram incertos e inconsistentes (BIRKS & EVANS, 2009).

Polifenóis já foram descritos como agentes neuroprotetores. O *trans*-3,5,4'-trihidroxiestilbeno, também conhecido como resveratrol (**26**), foi testado em diferentes modelos da doença, tanto *in vivo* quanto *in vitro*, apresentando resultados positivos como neuroprotetor e inibidor da agregação de A β (RICHARD *et al.*, 2011; REGE *et al.*, 2015). Estudos realizados com a quercetina (**27**) demonstraram que ela contribui significativamente na proteção das células neuronais contra a neurotoxicidade causada pelo estresse oxidativo (HEO & LEE, 2004), amenizando os efeitos deletérios do peptídeo A β (ANSARI *et al.*, 2009) (Figura 14).

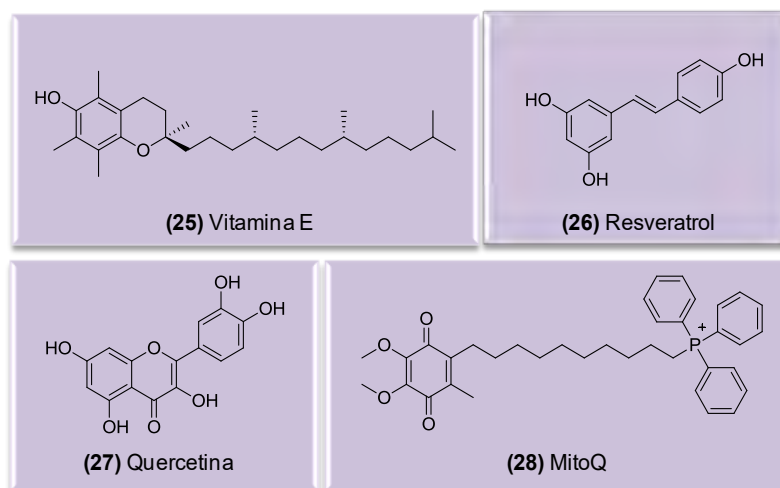


Figura 14: Principais compostos antioxidantes planejados para o tratamento da DA

Ademais, tendo em vista que as mitocôndrias são uma importante fonte de EROs e são particularmente vulneráveis ao estresse oxidativo, o emprego de estratégias terapêutica a partir de antioxidantes direcionados às mitocôndrias mostram-se promissores no tratamento da DA. O MitoQ (**28**) é um antioxidante ativo por via oral, que compreende uma fração de ubiquinona, ligada por uma cadeia alifática de 10 carbonos ao cátion trifenilfosfônio, que direciona sua captação seletiva para as mitocôndrias de maneira dependente do potencial de membrana. Uma vez internalizado pelas mitocôndrias, ele adsorve nas bicamadas fosfolipídicas, onde é facilmente reduzido à forma ativa de ubiquinol MitoQH₂, que exerce suas propriedades antioxidantes (ROSS *et al.*, 2008). O MitoQ é um candidato antioxidante promissor para o tratamento de pacientes com DA, que encontra-se em testes de fase clínica II (AIZFORUM, 2019) (Figura 14).

1.5.5. Neuroinflamação como abordagem terapêutica

A neuroinflamação é vista como um evento precoce na DA, e, portanto, o direcionamento a vias inflamatórias é considerado uma estratégia para o tratamento da DA (AMANI, *et al.*, 2018; PHILLIPS *et al.* 2014; SANTOS *et al.* 2016).

Os anti-inflamatórios naproxeno (**29**) e o celecoxib (**30**) tiveram a eficácia terapêutica analisada em ensaios clínicos de fase III, e como resultado foi observado que estes não foram capazes, isoladamente, de retardar ou prevenir o aparecimento de DA e declínio cognitivo. Além disso, causaram efeitos adversos, incluindo hipertensão, problemas gastrointestinais e vasculares ou cardíacos, portanto, esses ensaios clínicos de fase III foram descontinuados (Figura 15). (LYKETSOS *et al.*, 2007)

ALZT-OP1 (**31**) é uma terapia combinada de dois medicamentos aprovados pela FDA, a saber, cromolina (**32**) e ibuprofeno (**33**), para o tratamento da DA. O ibuprofeno (**33**) é um fármaco um anti-inflamatório não esteróidal - suprime a liberação de citocinas - que demonstrou ter um efeito significativo na DA. Já a cromolina (**32**) é capaz de inibir a agregação do monômero A β evitando a formação de oligômeros e fibrilas *in vitro* e *in vivo*. O ALZT-OP1 (**31**) está atualmente passando por ensaios clínicos de fase III, e os resultados são promissores (HORI *et al.*, 2015; BUDNI *et al.*, 2016) (Figura 15).

A talidomida (**34**) é um agente imunomodulador que exibe atividade anti-inflamatória ao impedir a produção de TNF- α e também está na fase II de ensaios clínicos (ALKAM *et al.*, 2008) (Figura 15).

O etanercept é um anticorpo monoclonal recombinante humano que liga à citocina pró-inflamatória TNF- α e impede sua ação. Aprovado pela FDA para várias doenças reumatológicas e inflamatórias da pele, falhou em fornecer melhorias significativas nos testes cognitivos e comportamentais na DA (HOLMES *et al.*, 2011; BUTCHART *et al.*, 2015).

O neflamapimod (**35**) é um inibidor da isoforma alfa das proteínas cinases ativadas por mitógenos p38 (p38 MAPK), conhecidas por ativar citocinas pró-inflamatórias. Na microglia, o p38 MAPK ativa a liberação do TNF- α e IL-1b em resposta a vários tipos de estresses, como o peptídeo A β ₄₂. Nos neurônios, a p38 MAPK está envolvida na localização da P τ e da plasticidade neuronal (ROY *et al.*, 2015). O neflamapimod (**35**) mostrou ser capaz de diminuir em 50 % a agregação de A β e reduzir o nível de citocinas pró-inflamatórias tal como

a IL-1b em modelo de camundongos (Tg2576), atualmente encontra-se na segunda fase de ensaios clínicos (ALAM, 2015) (Figura 15).

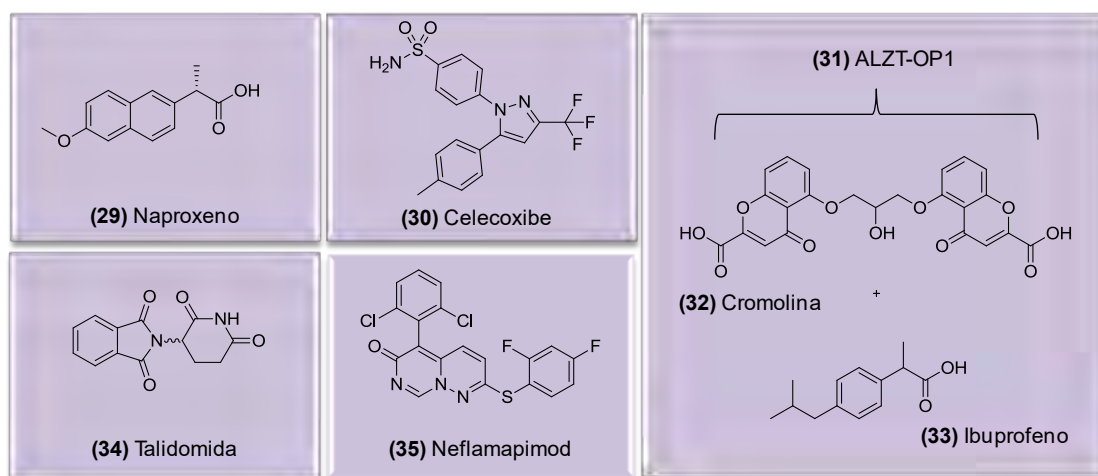


Figura 15: Compostos anti- inflamatórios em ensaios clínicos para o tratamento da DA

1.6. Compostos multialvos relacionados ao tratamento da DA

Apesar de um grande número de candidatos a fármacos anti-Alzheimer ter sido submetido a ensaios clínicos, a maioria falhou (99,6 %) em vários estágios de estudos (RAJASEKHAR & GOVINDARAJU, 2014). Tais limitações de eficiência e segurança terapêutica podem ser explicadas pelo desenvolvimento de candidatos a fármacos ocorrerem de acordo com o paradigma de Ehrlich 'uma molécula-um-alvo' para tratar um distúrbio neurodegenerativo complexo de origem multifatorial, como é reconhecida a DA (Figura 16) (SINGH *et al.*, 2016).

Assim sendo, uma nova abordagem tem ganhado aceitação, baseada no desenvolvimento de compostos químicos únicos capazes de modular vários alvos diferentes simultaneamente na cascata neurotóxica, com perfis superiores de eficácia e segurança. Essa abordagem levou a um novo paradigma na química medicinal, a estratégia de planejamento de 'ligante direcionado a multialvo' (MTDL) (CAVALLI *et al.*, 2008; ZHANG, 2005; MILLAN, 2009; MORPHY & RANKOVIC, 2009) (Figura 16). Tal abordagem normalmente envolve o uso de compostos híbridos sintéticos, planejados racionalmente para incorporar em uma única estrutura pelo menos duas subunidades farmacofóricas diferentes (SINGH *et al.*, 2016).

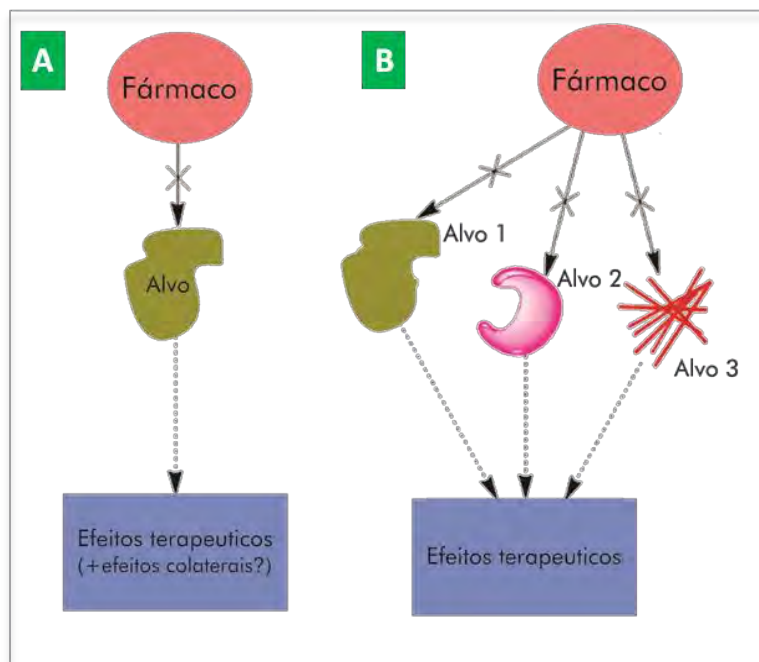


Figura 16: Descoberta de fármacos via abordagem reducionista de 'uma molécula-um-alvo' (A) e descoberta de fármacos a partir de ligante direcionado a multialvo' (MTDL) (Adaptado de SINGH *et al.*, 2016).

O uso de medicamentos multifuncionais possui vantagens sobre a polifarmácia clássica, uma vez que reduz o risco de interações medicamentosas e simplifica estudos farmacocinéticos e farmacodinâmicos, fabricação, formulação e também os esquemas terapêuticos (SCHMITT *et al.*, 2004).

Portanto, a abordagem multifuncional pode ser essencial para o tratamento eficaz da DA. As pesquisas atuais baseadas em MTDLs têm conquistado bastante relevância, de modo que, inúmeros compostos híbridos foram planejados, sintetizados e avaliados contra diferentes alvos envolvidos na DA. O emprego mais frequente da estratégia multifuncional relacionadas a DA envolve a AChE como um dos alvos, baseado nos grupos farmacofóricos de medicamentos já comercializado (ZHANG *et al.*, 2019, DIAS *et al.*, 2015).

O composto Ladostigil (**37**) é um híbrido desenvolvido por Youdim a partir da rivastigmina (**6**) e rasagilina (**36**), inibidor seletivo da MAO-B (Figura 17). Este composto híbrido possui atividade inibitória frente às colinesterases (AChE e BuChE) e as monoamina oxidases do cérebro (MAO-A e MAO-B). Ademais, Ladostigil (**37**) apresentou ações neuroprotetoras, como a regulação do processamento de APP vias sinalização de proteínas cinase ativadas por mitógeno; estabilização do potencial da membrana mitocondrial; e proteção contra apoptose neuronal induzida pelo estresse oxidativo. Recentemente, o Ladostigil (**37**) completou fase II de ensaios clínicos com baixa dose para DA se mostrando

bem tolerável e reduzindo a perda de massa encefálica em tratamentos de 3 anos (YOUDIM, 2006).

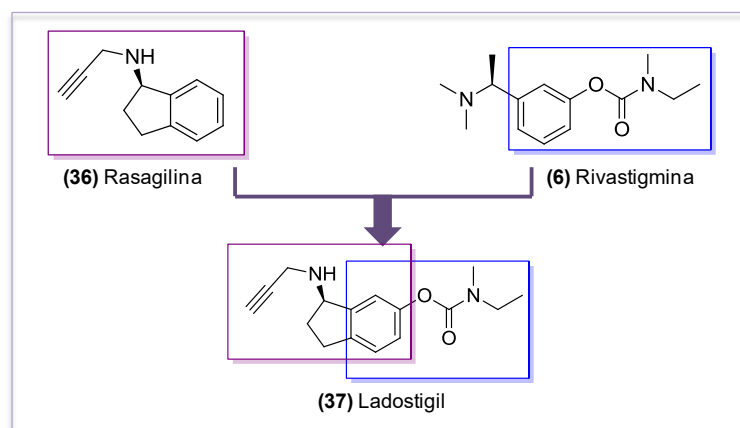


Figura 17: Compostos multialvos, Ladostigil (37), baseado na Rigastigmina (6)

Yuan *et al.* sintetizaram uma série de derivados híbridos do resveratrol (26) e do pterostilbeno (38) - metabólitos fenólicos de plantas que apresentam potentes propriedades antioxidante, anti-inflamatória e de neuroproteção - como a subunidade farmacofórica da Rivastigmina, carbamoíla (6). Os derivados (39-41) foram os mais ativos, com atividade inibitória moderada frente AChE e BuChE e além de exibirem efeito neuroprotetor (YUAN *et al.*, 2014) (Figura 18).

Recentemente, Sang *et al.* sintetizaram uma série de compostos híbridos, a partir da Rivastigmina (6) e Escutelarina (42) - flavonóide com propriedades farmacológicas antioxidante, anti-inflamatória, quelante metálico e neuroprotetora. O composto híbrido (43) exibiu atividade inibitória frente AChE e BuChE ($CI_{50} = 0,57$ e $22,6 \mu M$, respectivamente), e cinética de inibição do tipo mista, uma vez que se liga ao PAS e CAS da AChE. Também, apresentou boa atividade antioxidante, com valor 1,3 vezes maior que o padrão trolox - um análogo da vitamina E. Além disso, mostrou capacidade de atravessar a BBB *in vitro* e uma significativa melhora cognitiva em camundongos ICR tratados com escopolaminas (SANG *et al.*, 2015) (Figura 18).

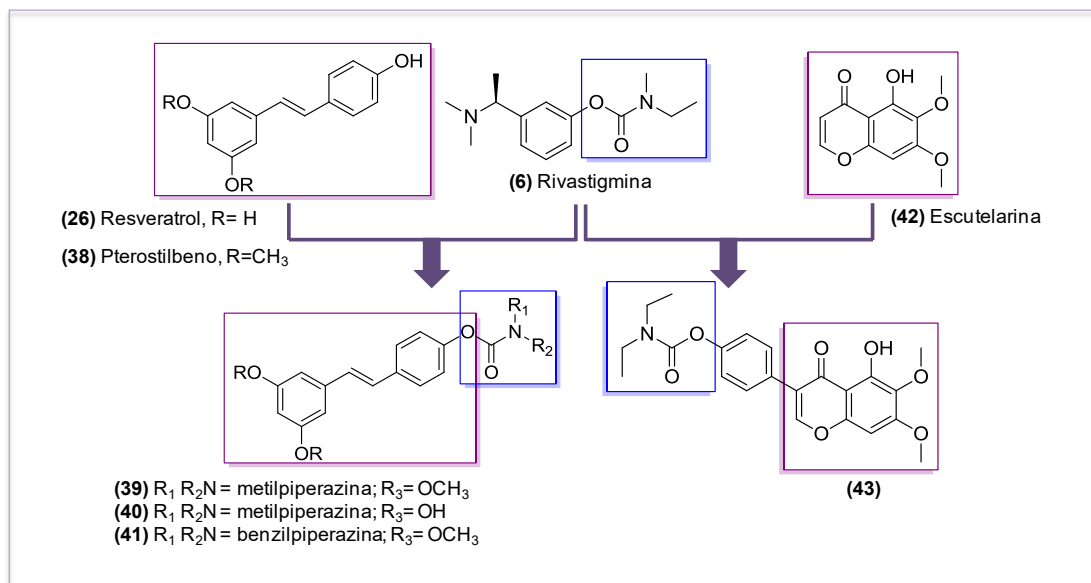


Figura 18: Compostos multialvos (39-41 e 43) baseados na Rivastigmina (6)

Zha e colaboradores relataram uma nova família de híbridos a partir de da tacrina (4) e benzofurano (44). O composto sintetizado (45) apresentou um perfil interessante como um inibidor frente AChE humana e BACE-1 ($CI_{50} = 0,86$ nM para AChE , $CI_{50} = 1,35$ μ M para BACE-1) e 61,3 % de inibição na agregação de A β auto-induzida a 10 μ M. Estudos adicionais *in vivo* confirmaram que o composto sintetizado (45) foi capaz de gerar melhora cognitiva em camundongos ICR tratados com escopolaminas e não apresentaram hepatotoxicidade significativa (ZHA *et al.*, 2016) (Figura 19).

Outra série de híbrido da tacrina (4) e 4-oxo-4H-cromeno (46) foi sintetizada por Fernandez-Bachiller e colaboradores, tendo como base a escolha da tacrina (4) para inibição da AChE e da subunidade do derivado flavonóide de 4-oxo-4H-cromeno (46) para inibição de BACE-1. O composto mais promissor, foi o híbrido (47), que mostrou inibição contra AChE humana e BACE-1 ($CI_{50} = 8,0$ nM para AChE, $CI_{50} = 2,8$ μ M para BACE-1), atividade antioxidante 1,3 vezes mais potente do que o padrão trolox e boa permeabilidade do sistema nervoso central (SNC) no ensaio de permeabilidade artificial em membrana paralela para barreira hemato-encefálica (PAMPA-BBB) (FERNANDEZ-BACHILLER *et al.*, 2012) (Figura 19).

Jiang e colaboradores relataram uma nova série de híbridos, a partir de tacrina (4) e o composto (48) (inibidor da GSK-3b, $CI_{50} = 1,1$ nM). O híbrido mais promissor (49) apresentou ótima atividade inibidora frente às enzimas AChE humana e GSK-3b ($CI_{50} = 6,5$ nM para AChE, $CI_{50} = 66$ nM para GSK-3b), além de apresentar boa ação sobre o peptídeo

A β auto-induzido com taxa inibitória de 46 % da agregação a 20 μ M, inibição da hiperfosforilação da P τ em células de neuroblastoma N2 α -Tau de camundongo, baixa hepatotoxicidade e melhora cognitiva significativa *in vivo* em camundongos ICR tratados com escopolamina (JIANG *et al.*, 2018) (Figura 19).

Além disso, foi relatada a síntese do híbrido (**50**) por Fernandez-Bachiller e colaboradores a partir da tacrina (**4**) e o quelante clioquinol (**12**), o qual apresentou atividade inibidora contra AChE humana ($CI_{50} = 5,5$ nM) e capacidade de complexar com íons Cu^{2+} com base na espectrometria UV-vis. A absorção máxima do composto (**50**) em e tampão Tris sofreu um desvio de 242 nm para 248 nm com a adição de $CuSO_4$, indicando a formação do complexo (**50**)- Cu^{2+} (FERNANDEZ-BACHILLER *et al.*, 2010) (Figura 19).

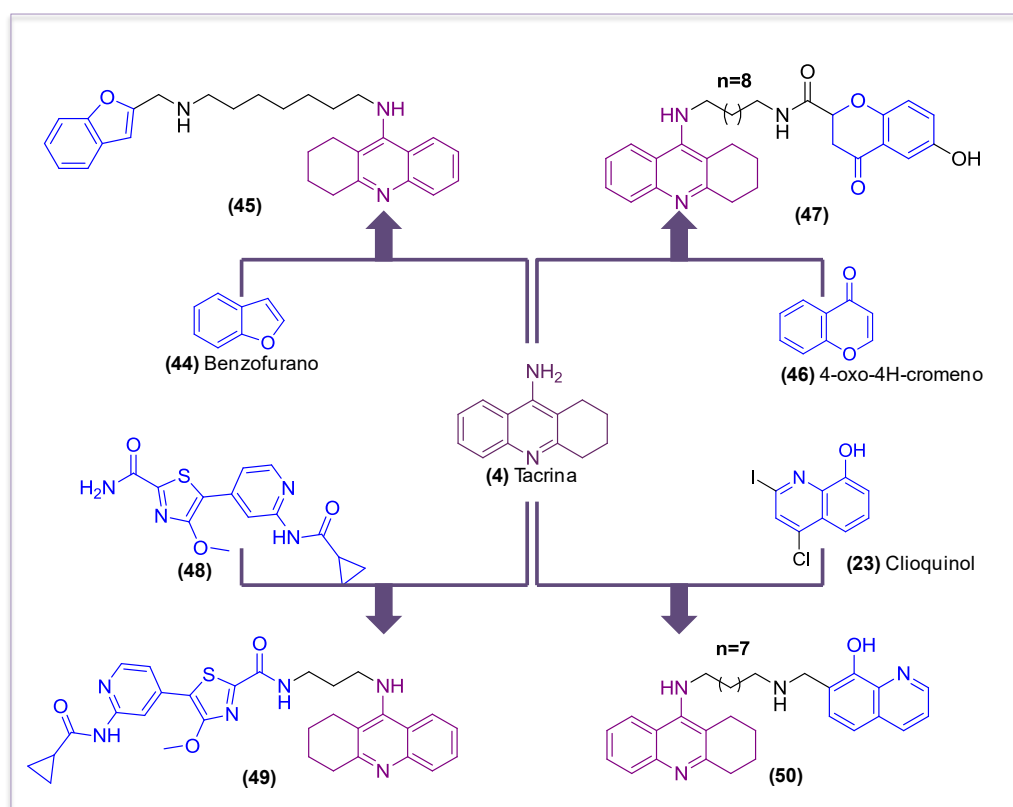


Figura 19: Compostos multialvos (**44**, **46**, **49** e **50**) baseados na tacrina (**4**)

Yan *et al.*, relataram um novo composto híbrido (**52**), a partir do donepezil (**5**) e curcumina (**51**), extraída do rizoma de *Curcuma longa L.*, o qual exibiu inibição contra AChE ($CI_{50} = 0,187$ μ M), propriedade quelante dos metais Cu^{2+} e Fe^{2+} baseada nos resultados de espectrometria UV-vis, inibição de 45,3 % da agregação do peptídeo A β auto-induzido a 20 μ M e efeito antioxidante significativo (YAN *et al.*, 2017) (Figura 20).

Ademais, em diversos estudos, derivados da 5,6-diariltriazina foram descritos com amplas aplicações, incluindo a atividade inibidora de AChE (SINHA *et al.*, 2014) e neuroprotetora (IRANEJADE *et al.*, 2010). Baseado nestes estudos, Shidore e colaboradores desenvolveram uma nova série de diariltiazol planejada através da troca isostera entre triazina pelo núcleo tiazólico, e hibridação molecular, a partir da união entre a subunidade farmacofórica do donepezil (**5**), a qual é descrita por interagir com o CAS da AChE, e grupamento diaril vicinal (**53**), previsto por docking molecular, ser capaz de interagir com o PAS da AChE. O composto mais ativo, foi o híbrido (**54**), capaz de inibir as enzimas hAChE e eqBuChE ($CI_{50} = 0,30 \pm 0,01 \mu M$; $CI_{50} = 1,84 \pm 0,03 \mu M$ respectivamente) e cinética de inibição enzimática mista da AChE, ou seja, evidenciando sua interação simultânea com CAS e PAS. O composto (**54**) também inibiu a inibição na agregação de A β AChE-induzida ($27,65\mu \pm 2,91 \%$) e apresentou propriedades antioxidantes e antiapoptóticas *in vitro*. Além disso, o composto (**54**) demonstrou propriedade de neuroproteção *in vivo* diminuindo a toxicidade induzida por A β_{1-42} , atenuando níveis anormais de A β_{1-42} , PTau, caspase-3 clivada e proteína PARP clivada, e também exibiu boa absorção oral e foi bem tolerado até 2000 mg/kg, por dose sem mostrar toxicidade. Assim sendo, tal série híbrida mostrou-se ser um potente MTDL para o tratamento da DA (Figura 20) (SHIDORE *et al.*, 2016).

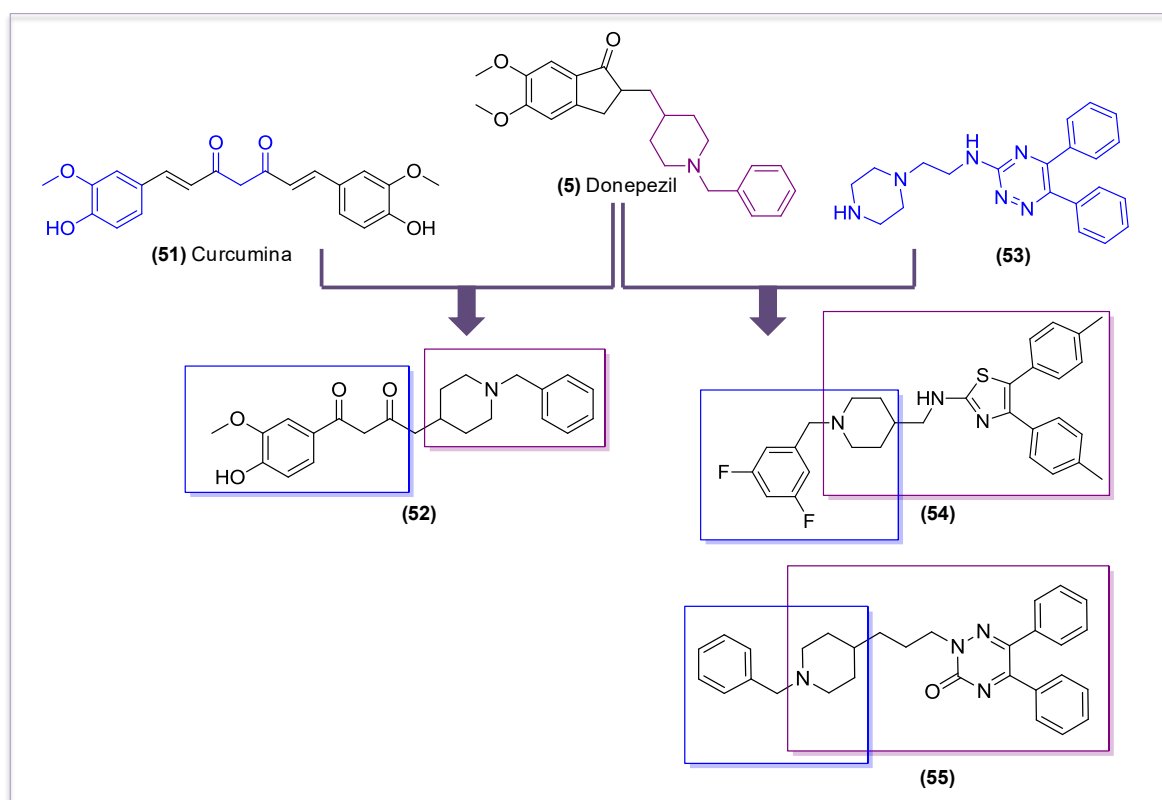


Figura 20: Compostos multialvos (**52**, **54** e **55**) baseados no donepezil (**5**)

Recentemente, Tripathi e colaboradores descreveram uma série de novos híbridos desenvolvidos a partir do núcleo bifênil-3-oxo-1,2,4-triazina ligado por *n* espaçadores alquils a subunidade benzilpiperidina. O composto **(55)** (*n* = 3) apresentou a melhor atividade inibitória frente à AChE $CI_{50} = 0,2 \pm 0,01 \mu\text{M}$ e cinética de inibição não competitiva. Também exibiu deslocamento significativo de iodeto de propídio do sítio aniônico PAS da AChE ($22,22 \pm 1,11 \%$) e estudos *in silico* confirmaram que **(55)** interage simultaneamente com o PAS e CAS da AChE. Além disso, o composto **(55)** exibiu CI_{50} igual a $83,8 \pm 6,87 \mu\text{M}$ contra a linhagem celular de neuroblastoma e também, apresentou boa permeabilidade ao SNC nos ensaios PAMPA-BBB e uma significativa melhora cognitiva em camundongos ICR tratados com escopolaminas (TRIPATHI *et al.*, 2017) (Figura 20).

1.7. Triazóis

Um grande volume de pesquisas foi realizado sobre triazol e seus derivados, o que comprovou a importância desse grupamento heterocíclico. Os triazóis contêm um anel de cinco membros de dois átomos de carbono e três átomos de nitrogênio (JOULE & MILLS, 2010). Até agora não há indicações de que esses heterociclos ocorram na natureza, portanto os triazóis são exclusivamente de origem sintética (ALVAREZ-BUILLA *et al.*, 2011).

Os triazóis são substâncias básicas heteroaromáticas com seis elétrons π . Existem duas formas isotéricas de acordo com a posição dos três átomos de nitrogênio, isto é, 1,2,3-triazol e 1,2,4-triazol. Cada um destes possui três tautômeros que diferem pela posição em que o hidrogênio se encontra ligado ao nitrogênio (JOULE & MILLS, 2010; ALVAREZ-BUILLA *et al.*, 2011) (Figura 21). No entanto, as estruturas **58** e **61** não são aromáticas (carbono sp^3) e são raramente mencionadas na literatura.

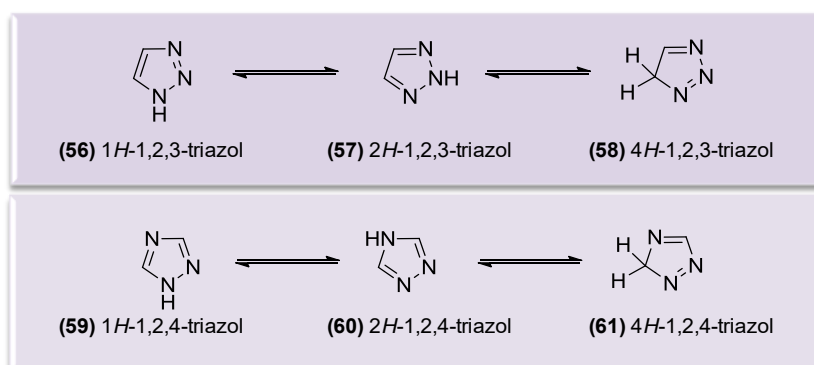


Figura 21: Estrutura química dos 1,2,3-triazóis e 1,2,4-triazóis e respectivos tautômeros

A aromaticidade e a densidade eletrônica elevada do triazol permitem exercer diversas interações fracas, como ligações de hidrogênio, íon-dipolo, cátion- π , efeito hidrofóbico, força de van der Waals e coordenação, possibilitando seu emprego em vários campos da ciência (CURTIS *et al.*, 2008; KATRITZKY *et al.*, 2010; BAI *et al.*, 2008;). Além disso, o anel de triazol também é um isómero importante de oxazol, tiazol, imidazol, pirazol e assim por diante (SONG & DENG, 2018).

Compostos contendo o núcleo [1,2,4]-triazólicos exibem ampla aplicação na agroquímica, química medicinal e de coordenação, bem como na ciência de materiais (BAI *et al.*, 2007; MOULIN *et al.*, 2010; CHANG *et al.*, 2011). Na química medicinal, esse heterociclo é usado como um isómero de ligação *cis* da amida tanto para mimetizar peptídeos, quanto para o desenvolvimento de medicamentos, que resulta em otimização das propriedades farmacológicas do composto correspondente (CHEN *et al.*, 2001; BOEGLIN, *et al.*, 2003). O anel triazólico também permite que seus derivados interajam facilmente com uma variedade de enzimas e receptores no sistema biológico, o que resulta em vasta atividade biológica, como propriedades antibacterianas, antifúngicas, antivirais, anticoagulantes, anti-inflamatórias, anticâncer e antioxidantes etc (ZHOU & WANG, *et al.*, 2012; PETRIKKOS & SKIADA, 2007; PENG, *et al.*, 2013). Até agora, um grande número de medicamentos à base de triazol tem sido amplamente utilizado na clínica, como o antifúngico Fluconazol (**62**), Voriconazol (**63**) e Itraconazol (**64**), como anticâncer o Letrozol (**65**) e Anastrozol (**66**), como antiviral a Ribavirina (**67**) (MI, *et al.*, 2007; MI, *et al.*, 2008) (Figura 22).

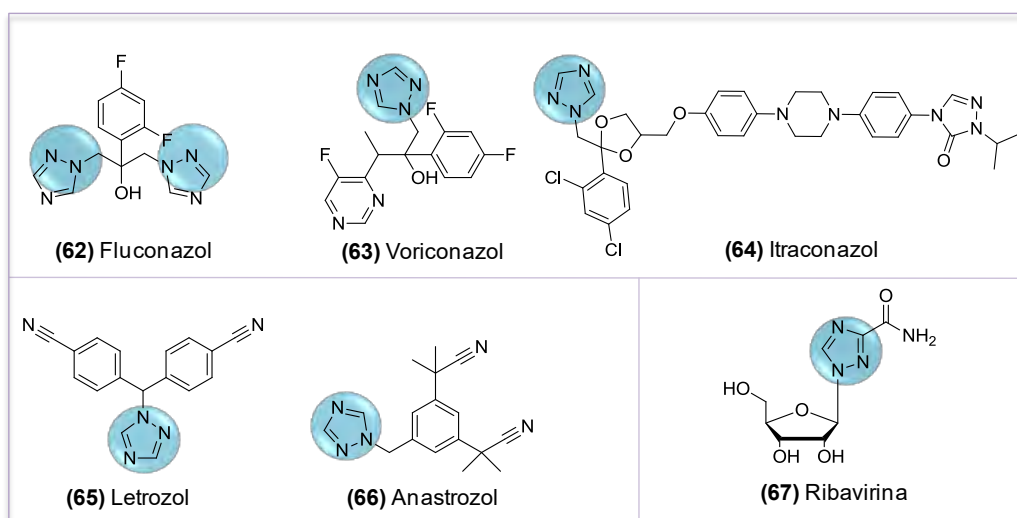


Figura 22: Fármacos comerciais contendo o núcleo 1,2,4-triazol (**62-67**)

1.7.1. 3-Amino-1,2,4-triazóis

Na literatura, compostos contendo o núcleo 3-amino-1,2,4-triazóis foram descritos como agente anti-inflamatório (**68**) (BOZO, *et al.*, 1989); inibidor da proteína eosinofília (**69**) (NAITO, *et al.*, 1996); inibidor da metionina aminopeptidase (**70**) (MARINO, *et al.*, 2007); modulador alostérico positivo seletivo do receptor nicotínico $\alpha 7$ de acetilcolina (**71**) (WINTERER, *et al.*, 2013); receptor NPY (**72**) (FAUCHERE, *et al.*, 2000); inibidor de quitinase (**74**) (MAZUR, *et al.*, 2018); inibidor potente das cinases (**75**) (MIN, *et al.*, 2016; DENG, *et al.*, 2011), e inibidor da demetilase específica de lisina-1 (LSD-1) (**76**) (KUTZ, *et al.*, 2014), (Figura 23).

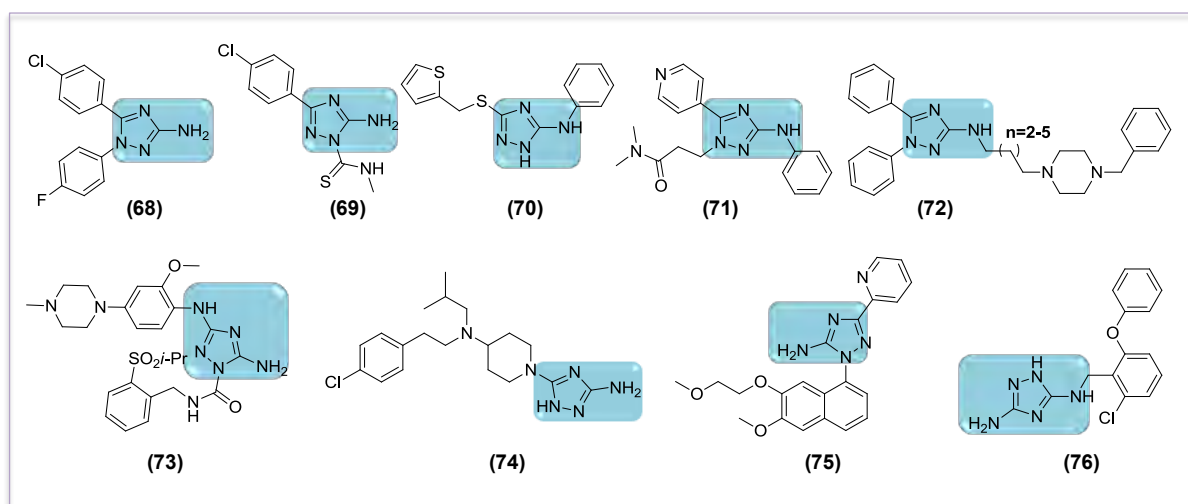


Figura 23: Compostos bioativos com núcleo 3-amino-1,2,4-triazol (**68-76**).

Existe uma demanda contínua por novos métodos eficientes para a síntese dos 3-amino-1,2,4-triazóis. Os métodos sintéticos mais comuns para a preparação de compostos 3-amino-1,2,4-triazóis envolvem ciclocondensação intramolecular de amidoguanidinas (KAKWANI, *et al.*, 2011; CHERNYSHEV & CHERNYSHEVA 2010; CHERNYSHEV, *et al.*, 2010; CHERNYSHEV, *et al.*, 2009; DOLZHENKO, *et al.*, 2009), condensação térmica de cianoimidatos com hidrazina (YIN, *et al.*, 2009; ZARGUIL, *et al.*, 2008), e adição 1,3-dipolar de derivados hidrazonoil e carbodiimidas (YEN, *et al.*, 2016).

No entanto, a síntese do núcleo 1,5-diaril-3-amino 1,2,4-triazóis é pouco explorada. A primeira metodologia descrita por Katritzky (KATRITZKY, *et al.*, 2001) e adaptada à síntese em fase sólida por Houghten (YU, *et al.*, 2003), descreve a obtenção de compostos 1,5-diaril-3-amino 1,2,4-triazóis através de uma reação de ciclização entre uma espécie eletrofílica (*N*-acilguanidinas derivadas do benzotriazol ou *N*-acil carbamidotioato) e outra nucleofílica

(alquil ou aril hidrazinas substituídas). Entretanto, tal reação requer longo tempo reacional e gerar baixos rendimentos quando ambos os substratos portam substituintes arilas. Além de, em muitos casos, não ser capaz de produzir derivados amino triazóis 3-*N,N*-não substituído (Figura 24).

A segunda metodologia, descrita por Szilagyí (BOZO, *et al.*, 1989), lança mão da reação entre o núcleo 1,3,4-oxadiazólium perclorato e cianamida. Apesar do melhor alcance e rendimentos reacionais comparados ao método de Katritzky, a natureza explosiva do ácido perclórico e dos sais de perclorato torna esta metodologia perigosa e não indicada para síntese em maiores escalas (CHURCHILL, *et al.*, 2006; SCHILT & MCBRIDE, 1979) (Figura 25).

O terceiro procedimento foi descrito recentemente por Shen (SHEN, *et al.*, 2015), no qual descreve a arilação do carbono na posição 1 de amino-triazóis por meio de um acoplamento Negishi. Apesar dos bons rendimentos e do escopo descrito, o alto custo desta reação e suas condições drásticas na desproteção final (H₂SO₄ 6 M, 80 °C, 16 h) limitam esta reação em alguns casos (Figura 24).

Por fim, Santos e colaboradores desenvolveram um protocolo simples de síntese regioseletiva para obtenção 1,5-diaril-3-amino-1,2,4-triazóis *N*-protegido ou desprotegidos, através da otimização do procedimento de Katritzky usando *N*-acil-*N*-Boc-carbamidotoioatos sob radiação de microondas, a partir da qual foi obtidos bons rendimentos e baixos tempos de reacionais para diversos compostos aromáticos (SANTOS *et al.*, 2019) (Figura 24).

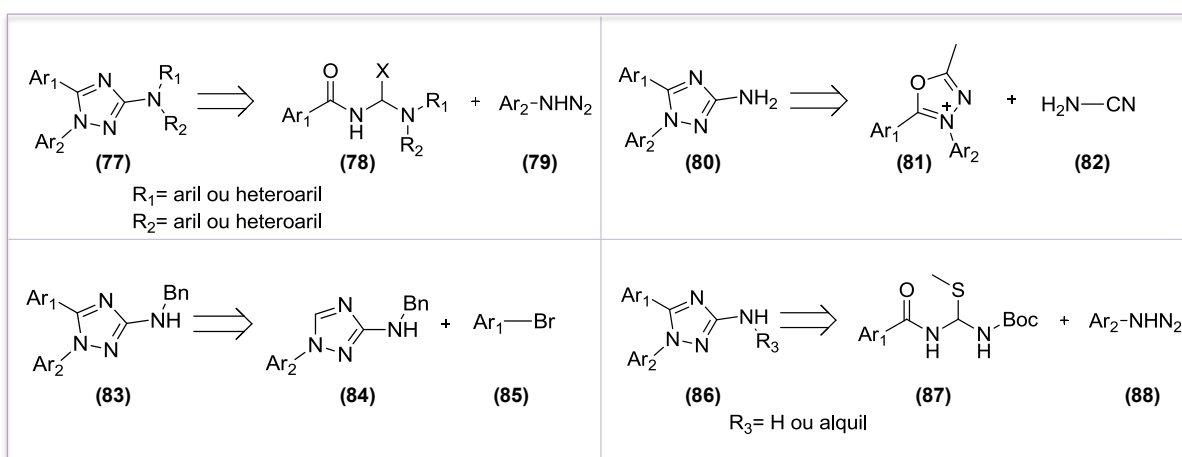


Figura 24: Estratégias sintéticas descritas para a síntese de 3-amino-1*H*-1,2*H*-triazóis 1,5-dissubstituídos

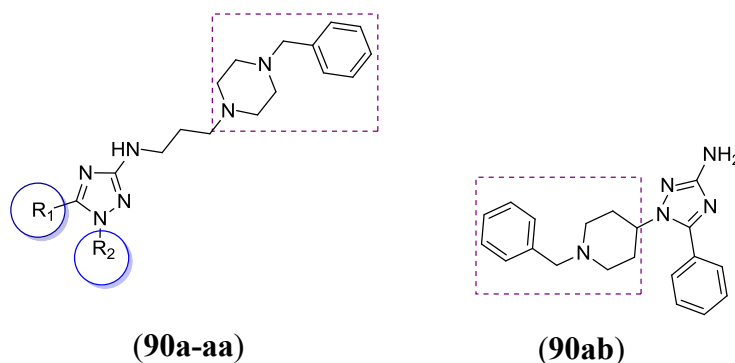
2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

Este trabalho tem como objetivo geral a síntese e a avaliação farmacológica de compostos inéditos derivados da série contendo o núcleo 3-amino-1,2,4-triazol-*N*-1,5-trisubstituídos (**90a-ab**) planejados como inibidores de colinesterases.

2.2. Objetivos Específicos

- Realizar a síntese regioseletiva dos compostos triazólicos propostos como possíveis agentes inibidores enzimáticos realizando derivatizações em R₁ e R₂ do núcleo 3-amino-1,2,4-triazóis-*N*-1,5-trisubstituídos (**90a-ab**);



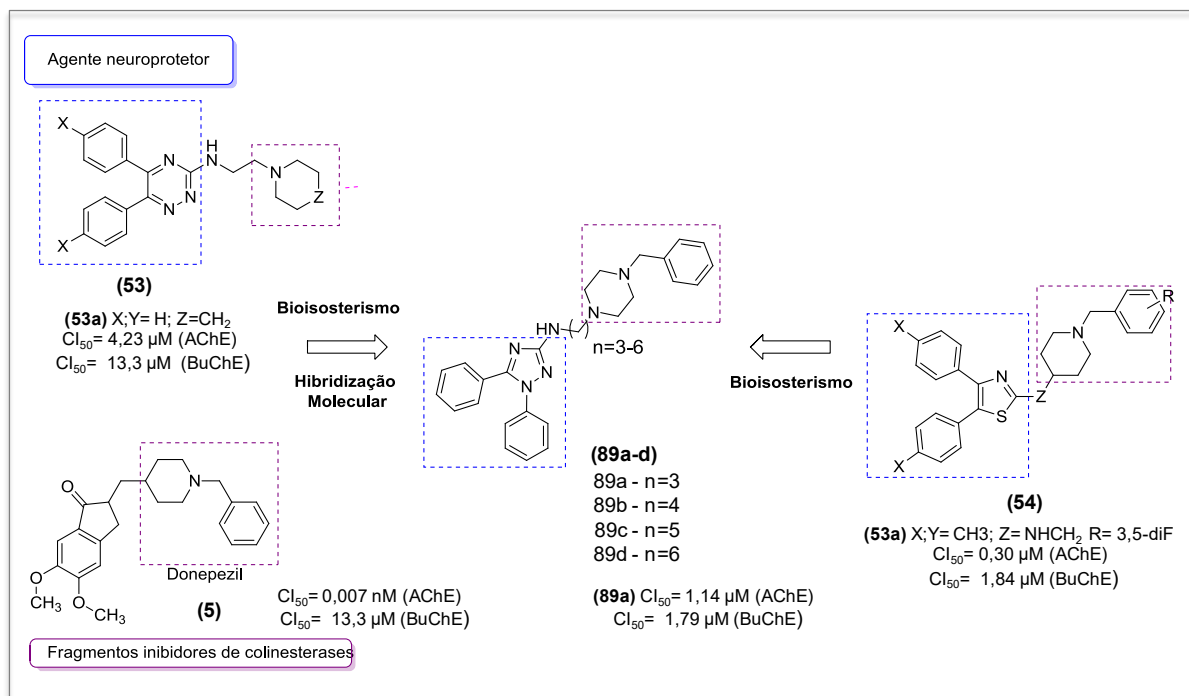
- Avaliação do perfil e da cinética de inibição de AChE e BuChE pelos derivados sintetizados utilizando o método de Ellman;
- Avaliação da atividade antioxidante da série de compostos sintetizados utilizando o método DPPH| (radical 1,1-diphenil-2-picrilhidrazil);
- Avaliação quanto a capacidade dos compostos planejados complexarem com metais envolvidos com a DA;
- Investigação por método teórico de modelagem molecular do perfil de interação da série de compostos sintetizados;

2.3. Planejamento estrutural

Derivados diaril vicinais da triazina foram descritos na literatura como supressores da geração de EROs e morte celular induzida por estresse oxidativo (**53**); bem como, inibidores de colinesterases (ChEs) e agentes neuroprotetores potentes (**54**). Estudos subsequentes também demonstraram séries híbridas de derivados diaril vicinais como potentes MTDL para

o tratamento da DA (55, seção 1.7). (Sinha, *et al.*, 2014; Iranejade, *et al.*, 2010; Tripathi, *et al.*, 2017) (Esquema 1).

Fundamentando-se na literatura, nosso grupo desenvolveu uma série inédita de compostos 3-amino-1,2,4-triazóis-*N*-1,5-trissubstituídos (89a-d) planejada através da estratégia de bioisosterimos (LIMA & BARREIRO, 2005), através da qual permitiu realizar a troca isostérica do núcleo triazínico (53) e tiazólico (54) pelo 1,2,4-triazol; e da hibridização molecular (BARREIRO & FRAGA, 2008), a qual promoveu a união entre a subunidade benzilpiperazina (roxo) (5), capaz de mimetizar o grupo farmacofórico do medicamento donepezil, responsável por interagir no CAS da enzima AChE; e e grupamento diaril vicinal (azul) (53), descrito como sendo capaz de interagir com o PAS da AChE. Ademais, foi proposta exploração da distância da cadeia alifática entre o triazol e a amina cíclica, na cavidade hidrofóbica da acetilcolinesterase. Este estudo resultou em uma série de compostos (89a-d) capaz de inibir as colinesterases com bons valores de CI_{50} de até 1 μ M, apresentando modo de inibição enzimática tipo misto, ou seja, comprovando a interação simultânea dos sítios CAS e PAS, sendo o composto contendo 3 carbonos de espaçador o mais ativo (89a) (Esquema 1).



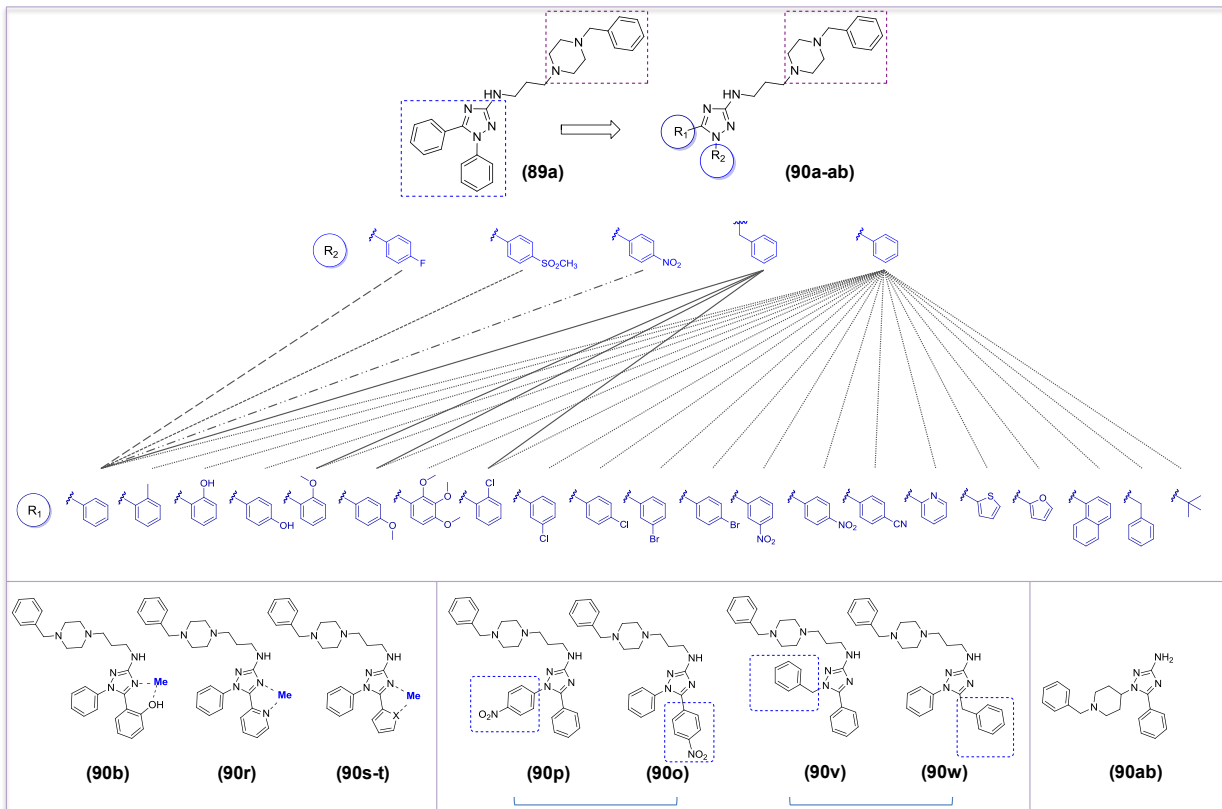
Esquema 1: Planejamento da série dos 3-amino-1,2,4-triazóis-*N*-1,5-trissubstituídos (89a-d) (Santos *et al.*, 2019)

Mediante aos resultados obtidos, o presente estudo se propõem a dar prosseguimento ao estudo de relação estrutura atividade (SAR) dos 3-amino-1,2,4-triazóis-*N*-1,5-trissubstituídos.

Desse modo, o planejamento da nova série (**90a-aa**) descrita neste trabalho baseia-se na manutenção do núcleo 1,5-diaril-3-amino-1,2,4-triazol ligado a subunidade benzilpirerazina, por grupo alquil com 3 carbonos de distância, em função da melhor atividade obtida da série homóloga. Ademais, propõe-se a exploração da natureza dos substituintes dos anéis aromáticos, R₁ e R₂, a fim de investigar a relevância da diversidade de interações moleculares e propriedades físico-químicas introduzidas pelas modificações propostas (Esquema 2).

A fenila (**89a**) foi adotada como aromático de referência, visto que não possui qualquer funcionalização, permitindo avaliar o efeito de cada substituição nos anéis aromáticos sobre as atividades farmacológicas. Os aromáticos substituídos (**90a-q**) em diferentes posições foram planejados de modo a explorar as diferenças entre as propriedades físico-químicas destes substituintes: grupos doadores e retiradores de elétrons, doadores e aceptores de ligação hidrogênio, lipofílicos e hidrofílicos. O núcleo naftila (**90u**) foi escolhido para examinar possíveis interações hidrofóbicas adicionais existentes no sítio de ligação. O grupo benzila (**90v-w**) foi escolhido com o intuito de avaliar o efeito da maior liberdade conformacional desse substituinte frente às interações hidrofóbicas no sítio ativo. Já, o grupamento terc-butila (**90x**) foi selecionado a fim de avaliar a importância das interações realizadas pelo anel benzênico no sítio enzimático. Por fim, a subunidade 2-OH fenila (**90b**) bem como os grupamentos heteroaromáticos, o-piridina (**90r**), o-furfural (**90s**) e o-tiofeno (**90t**) foram selecionados em decorrência da capacidade de formação de um provável sítio de complexação com metais e, conseqüentemente, a possibilidade de serem empregados no tratamento da DA com a finalidade de restabelecer a homeostase metálica (Esquema 2).

Ademais, foram propostos dois pares de isômeros constitucionais com o propósito de investigar se a posição na qual os substituintes estão ligados ao triazol interfere nas interações com os resíduos de aminoácidos das colinesterases (**90o**) e (**90p**), bem como (**90v**) e (**90w**) (Esquema 2). Finalmente, foi proposta a síntese do composto (**90ab**), no qual a subunidade benzilpipridina, responsável pela inibição do CAS, encontra-se ligado diretamente ao triazol, vizinho ao grupamento aril, com finalidade de avaliar se essa mudança de posição do grupo farmacofórico provoca alguma alteração no modo de encaixe deste no sítio ativo, refletindo na sua atividade inibitória (Esquema 2).



Esquema 2: Planejamento estrutural da nova série dos 3-amino-1,2,4-triazóis-*N*-1,5-trissubstituídos (90a-aa) (Santos *et al.*, 2019)

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Planejamento Sintético

O planejamento sintético dos compostos 3-amino-propinil-piperazil-1,2,4-triazóis-*N*-1,5-trissubstituídos (**90a-ab**) se fez lançando mão de ferramenta de análise retrossintética. Além disso, a rota planejada baseou-se nos resultados anteriores do LaDMol-QM que descreveram o desenvolvimento de um protocolo eficiente de síntese regioseletiva de derivados 1,5-diaril-3-amino-1,2,4-triazóis (**89-d**), em baixos tempos reacionais e bons rendimento (SANTOS *et al.*, 2019). Tais estudos demonstraram a importância do grupo lábil *tert*-butiloxicarbonil (Boc), também retiradores de elétrons, ligado a subunidade $-C=NH(S-CH_3)$, para a regioseletividade e o aumento da reatividade. Também foi observado que as reações de derivatização do grupamento amídico só ocorriam na presença do grupo Boc.

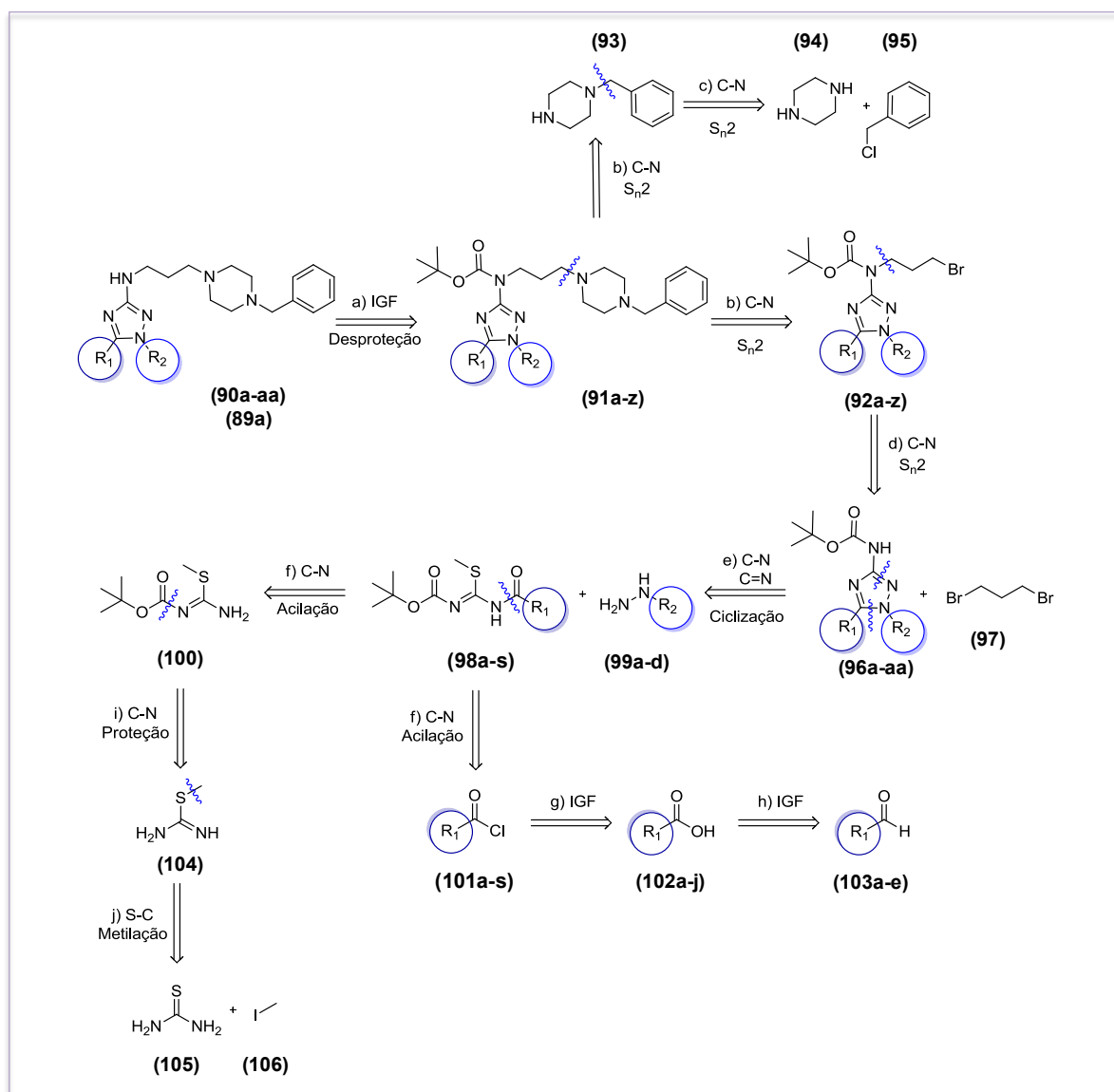
Neste contexto, inicialmente foi proposta uma interconversão de grupos funcionais, a partir da qual foi identificado como precursor o respectivo 1,5-diaril-3-amino-propinil-piperazil-1,2,4-triazol-*N*-Boc (**91a-z**) com o grupamento Boc. Tal etapa se dá através da exploração da reação de desproteção (etapa a). A necessidade do grupamento Boc até o final da rota sintética está na sua capacidade de tornar tal composto menos polar, o que auxilia nos processos de purificação dos produtos da etapa de aminação (etapa b) (Esquema 3).

Assim sendo, a partir de uma desconexão C-N identifica-se o composto 1,5-diaril-3-amino-1,2,4-triazol *N*-alquilados (**92a-z**) e benzilpiperazina (**93**) como precursores, sendo essa etapa proporcionada pela reação de substituição nucleofílica bimolecular (S_N2). A benzilpiperazina é obtida através de uma desconexão C-N, ao explorar uma reação de S_N2 através de seus precursores comerciais identificados: piperazina (**94**) e cloreto de benzila (**95**) (Esquema 3)

Em seguida, através de uma desconexão N-C (etapa d), se identificou o 1,5-diaril-3-amino-3-amino-1,2,4-triazol *N*-Boc (**96a-aa**) e o 1,3-dibromopropano (**97**) como precursor, obtido via reação de S_N2 , na qual o grupo Boc é imprescindível para que a alquilação ocorra (etapa d) (Esquema 3).

Através de uma desconexão C-N e uma desconexão C=N (etapa e), foi possível identificar os compostos *N*-acil-*S*-metilisotiouréia *N*-Boc (**98a-s**), contendo os substituintes R_1

e hidrazina (**99a-d**), comerciais portando os substituintes R₂ como precursores 1,5-diaril-3-amino-3-amino-1,2,4-triazol *N*-Boc (**96a-aa**), ao explorar reações de ciclização (Esquema 3).



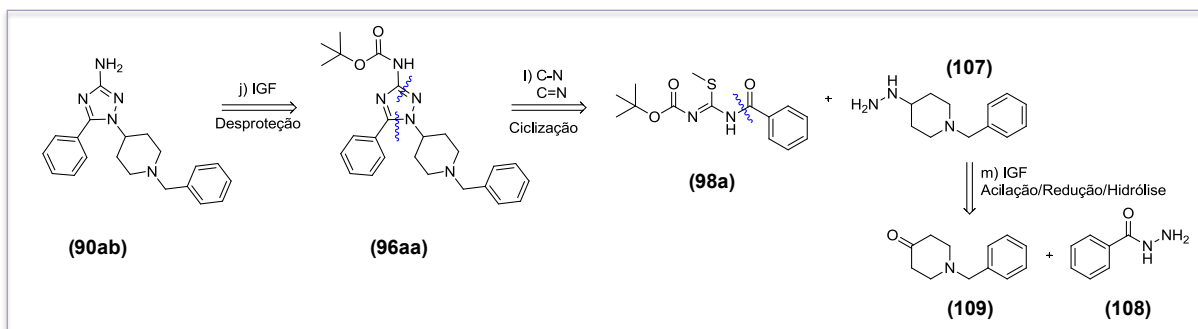
Esquema 3: Análise retrossintética inicial para a obtenção do composto (**90a-aa**)

Em seguida, através de outra desconexão C-N (etapa f), se identificou como precursores 2-metil-isotiuréia *N*-Boc (**100**) e o cloreto de benzoíla (**101a-s**), etapa esta, obtida via reação de acilação. Através de uma IGF foi possível identificar os ácidos carboxílicos (**102a-j**) como precursor dos cloretos de benzoíla (**101a-s**). Subsequentemente, foi possível identificar os aldeídos (**103a-e**) como precursores dos respectivos ácidos carboxílicos (**102a-j**) através de uma IGF (Esquema 3).

A partir de um desconexão C-N, foi identificado a 2-metil-isotiuréia (**104**) como precursor, obtida através da reação de proteção com grupo Boc comercial via substituição

nucleofílica acíclica. Por fim, uma desconexão S-C (etapa i), evidencia a tiuréia (**105**) e o iodeto de metila (**106**) como precursores da 2-metil-isotiuréia, ao explorar a reação de substituição nucleofílica (Esquema 3).

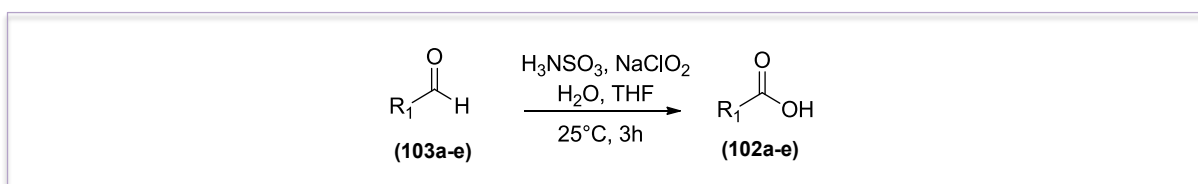
Para a obtenção do composto (**90ab**), foi identificado como precursor o 3-amino-1,2,4-triazol-N-Boc (**90aa**) correspondente através de uma interconversão de grupos funcionais, a qual é realizada pela reação de desproteção, (etapa j) (Esquema 4). Na sequência, através de uma desconexão C-N e uma desconexão C=N (etapa l), foi possível identificar a N-benzoil-S-metilisotiuréia N-Boc (**98a**) e a 1-benzil-4-hidrazinilpiperidina (**108**) como precursores do composto (**90ab**), ao explorar reações ciclização. E finalmente, foi possível identificar como precursor da 1-benzil-4-hidrazinilpiperidina (**107**), a benzohidrazida (**108**) e a 1-benzilpiperidin-4-ona (**109**) através de uma IGF (Esquema 4).



Esquema 4: Análise retrossintética inicial para a obtenção do composto (**90ab**) portador da subunidade benzilpiperidina ligada ao triazol, vizinho ao grupamento aril.

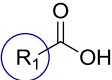
3.2. Sínteses de ácidos carboxílicos aromáticos (**102a-e**)

Inicialmente foi necessário sintetizar alguns dos ácidos carboxílicos (**102a-e**) que não foram adquiridos comercialmente. Esta etapa teve como produto de partida os aldeídos (**103a-e**) correspondentes, na presença de clorito de sódio (NaClO_2) e ácido sulfâmico (H_3NSO_3) via oxidação de Pinnick (Esquema 5) (QING-LI et al., 2009). Os produtos foram isolados e obtidos como sólidos e seus respectivos pontos de fusão determinados. Os rendimentos dos produtos sintetizados foram considerados ótimos variando entre 91-98 % (Tabela 1).



Esquema 5: Reação de oxidação de Pinnick para a obtenção dos ácidos carboxílicos (**102a-e**)

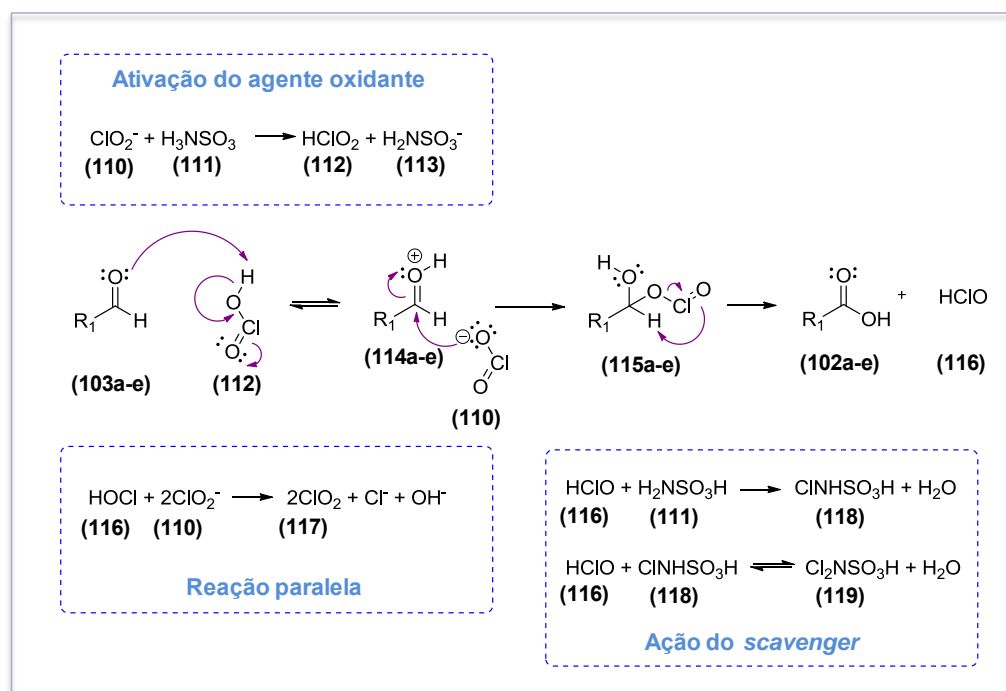
Tabela 1: Tabela de rendimentos reacionais, pontos de fusão e característica física dos ácidos carboxílicos (**102a-e**)

					
Composto	R ₁	Rendimento (%)	PF (C)	PF (C) lit.	Aspecto
102a	2-OCH ₃ -Ph	94	90 - 94	98 -100	Sólido branco
102b	4-CN-Ph	91	215 - 218	219 -221	Sólido branco
102c	2-tiofeno	98	100 -105	125 -127	Sólido branco
102d	2-furano	91	125 -129	128 -132	Sólido marrom
102e	2-Naftila	95	155 -158	157 -160	Sólido bege

Existem várias metodologias de oxidação de aldeídos, por exemplo, o uso de agentes oxidantes fortes como o reagente de Jones e o permanganato de potássio. No entanto, poucos métodos são aplicáveis a uma variedade de grupos funcionais. A oxidação de Pinnick pela qual os aldeídos podem ser oxidados em seus ácidos carboxílicos correspondentes usando clorito de sódio (NaClO₂), sob condições ácidas brandas, pode ser útil mesmo para sistemas que contêm grupos funcionais sensíveis ou grupos estereoquimicamente impedidos, além de ter custo relativamente baixo.

O mecanismo proposto para a oxidação de Pinnick envolve, sob condições ácidas, a formação da forma oxidante ativa, isto é, o ácido cloroso (**112**). Então o par de elétrons do oxigênio carbonílico dos aldeídos (**103a-e**) abstrai o próton do ácido cloroso (**112**). Na sequência, ocorre o ataque do par de elétrons do oxigênio do clorito (**110**) ao centro eletrofílico dos carbonos carbonílicos (**114a-e**), resultando nos intermediários (**115a-e**), que sofre um rearranjo pericíclico, no qual o hidrogênio do aldeído é transferido para o oxigênio ligado ao cloro, o que leva a liberação do ácido hipocloroso (HOCl) (**116**) e a formação dos ácidos carboxílicos de interesse (**102a-e**) (LINDGREN & NILSSON, 1973; KRAUS & TASCHNER, 1980; KURTI & CZAKO, 2005).

Contudo, o ácido hipocloroso (HOCl) (**116**) gerado é por si só um oxidante reativo, capaz de reagir paralelamente como o clorito (ClO_2^-) (**110**). Portanto, a reação requer o uso de um *scavenger* para remover o ácido hipocloroso (**116**). Neste caso, foi empregado o ácido sulfâmico (H₃NSO₃) (**111**) já que este tem a propriedade de atuar como tal.

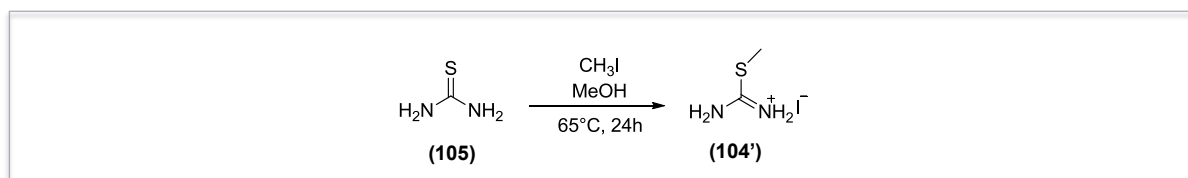


Esquema 6: Esquema de intermediários para a obtenção dos ácidos carboxílicos (102a-e) (Adaptado de LINDGREN & NILSSON, 1973; KRAUS & TASCHNER, 1980; KURTI & CZAKO, 2005).

3.3. Síntese de 2-metil isotiouréia (104)

A síntese da 2-metil isotiouréia (104) foi realizada via reação de *S*-metilação da tiuréia (105) (HICKEY *et al*, 2012), como exibido no esquema a seguir (Esquema 7). Foi obtido o sal da 2-metil isotiouréia (104') como um sólido amarelo após evaporação, com rendimento bruto igual a 90 % e ponto de fusão igual a 238-240 °C com decomposição (literatura igual a 244 °C com decomposição).

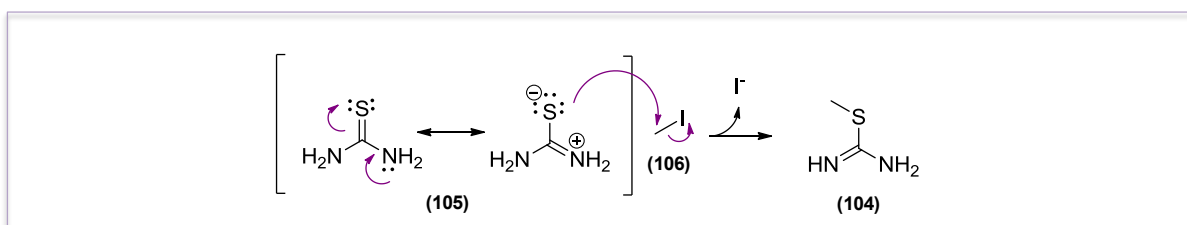
A reação de *S*-metilação foi realizada a partir de tiuréia (105) e iodeto de metila em metanol (MeOH), sob refluxo, na qual o enxofre da tiuréia age como nucleófilo e o iodeto de metila como fonte de metila eletrofílica (Esquema 7).



Esquema 7: Reação de oxidação de *S*-metilação para a obtenção da 2-metil isotiouréia (104').

O mecanismo proposto para a reação de *S*-metilação está descrito a seguir (Esquema 8). A ligação dupla entre carbono e enxofre é fraca devido a pobre sobreposição entre os orbitais $2sp^2$ do carbono e $3sp^2$ do enxofre, de modo que a presença do nitrogênio nas tioaminas possibilita a estabilização da ligação dupla através de conjugação, como é

observado nas estruturas ressonantes da tiuréia (**105**), aumentando a nucleofilicidade do enxofre. Na primeira etapa, o enxofre da tiuréia (**105**), negativamente carregado, atua como nucleófilo e ataca o carbono ligado ao iodo (**106**). De maneira concertada, a ligação nucleófilo-carbono vai se formando, enquanto a ligação C-I vai se rompendo, até o iodeto ser liberado e assim formar a 2-metil isotiuréia (**104**) (CLAYDEN *et al.*, 2012).



Esquema 8: Esquema de intermediários para a obtenção da 2-metil isotiuréia (**104**) (Adaptado de CLAYDEN *et al.*, 2012).

Para confirmar a formação da 2-metil isotiuréia da tiuréia (**104**) foram realizados experimentos de determinação estrutural como RMN ^1H e $^{13}\text{C}/\text{DeptQ}$ em dmsO-d_6 (anexo 1 e 2). Alguns sinais característicos possibilitaram a comprovação da formação deste composto, como o simpleto referente aos hidrogênios metílicos da S-CH_3 , com deslocamento químico característico de prótons desblindado por átomos eletronegativo, como é o caso do enxofre, em 2,58 ppm, integrando 3 hidrogênios. E outro simpleto largo em δ 8,89 ppm, integrando aproximadamente 4 hidrogênios, correspondendo aos hidrogênios amídicos. Já no espectro de RMN $^{13}\text{C}/\text{DeptQ}$, foram observados dois sinais, um em campo alto com deslocamentos em δ 13,55 referente ao carbono metílico da S-CH_3 , que apesar de estar ligado diretamente ao um átomo eletronegativo, encontra-se blindado pela nuvem eletrônica polarizável do enxofre. E outro em campo baixo com deslocamento em 171,09 ppm, característico de compostos carbonílicos – desblindados em decorrência do efeito de eletronegatividade, hibridização sp^2 e anisotropia magnética (PAVIA *et al.*, 2012).

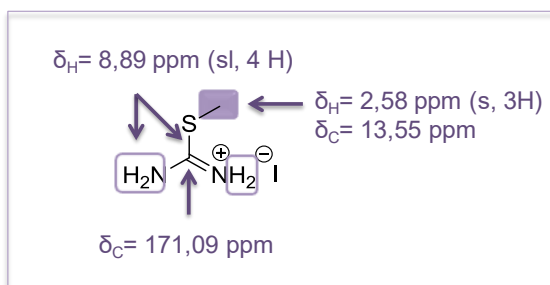
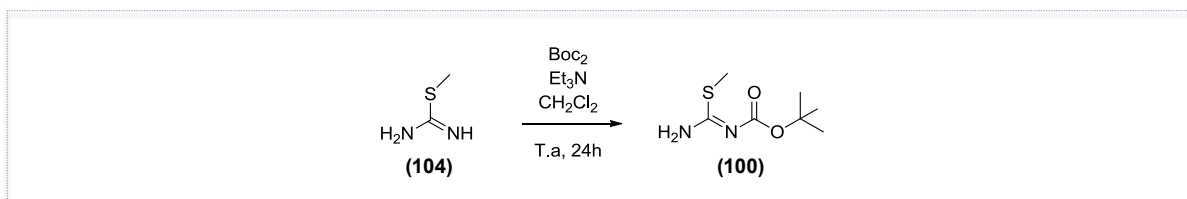


Figura 25: Atribuição dos principais sinais da 2-metil isotiuréia (**104**)

3.4. Síntese de 2-metil isotiouréia-*N*-Boc (100)

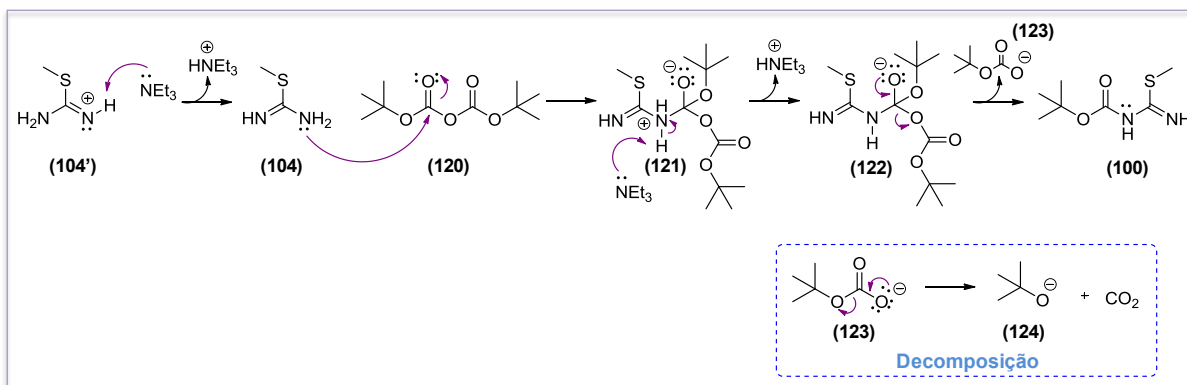
A reação de proteção da 2-metil isotiouréia (**104**) foi realizada a partir do tratamento desta com o di-*tert*-butil-dicarbonato [(Boc)₂O] em meio básico, como mostrada no esquema abaixo (Esquema 9) (KRAUS *et al.*, 2009). O produto obtido foi extraído e isolado, apresentando-se na forma de sólido branco e com rendimento igual a 85 %. Este foi caracterizado por técnicas espectroscópicas de RMN ¹H e ¹³C/ DeptQ, e determinado de ponto de fusão igual a 75-78 °C (literatura igual a 77 °C).



Esquema 9: Reação de proteção da 2-metil isotiouréia (**104**) para a obtenção da 2-metil isotiouréia-*N*-Boc (**100**)

Ademais, com o intuito de evitar a proteção dos dois grupos nitrogenados, foi utilizado excesso da 2-metil isotiouréia (**104**) (2 eq), além da adição lenta do [(Boc)₂O] (**121**) no meio reacional.

O mecanismo proposto para a reação de proteção da 2-metil isotiouréia (**104**) passa por uma reação de substituição nucleofílica acílica. Inicialmente, o nitrogênio (NH₂) da 2-metil isotiouréia (**104**) age como nucleófilo e ataca o carbono carboxílico do [(Boc)₂O] (**120**). Conseqüentemente, a ligação C=O se quebra e um intermediário tetraédrico é formado (**121**), seguida da abstração do hidrogênio do amônio por uma base presente no meio, neste caso a trietilamina (Et₃N). O intermediário tetraédrico (**122**) formado é instável, assim, o íon carbonato é eliminado, já que é uma base mais fraca que a amina, restituindo, então, a ligação dupla, resultando na formação da 2-metil isotiouréia *N*-protegida (**100**). O carbonato de *tert*-butil eliminado sofre decomposição em CO₂ (gás) e *tert*-butóxido. É válido ressaltar que, nesta reação é necessário utilizar um excesso de base para que esta possa reagir com o próton liberado na reação e impedir a inativação da amina nucleofílica da 2-metil isotiouréia (**104**) (Esquema 10) (CLAYDEN *et al.*, 2012).



Esquema 10: Esquema de intermediários para a obtenção da 2-metil isotiuréia-*N*-Boc (**100**) (Adaptado de CLAYDEN *et al.*, 2012).

Com o propósito de determinar a formação do 2-metil isotiuréia-*N*-Boc (**100**) foram realizados experimentos de determinação estrutural como RMN ^1H e ^{13}C / DeptQ em $\text{dms}\text{-d}_6$ (em anexo 3 e 4). No espectro de RMN ^1H , foi observado o surgimento de um novo sinal, um singleto em 1,41 ppm com integração igual a nove hidrogênios referente aos hidrogênios metílicos da subunidade terc-butila do Boc. No espectro de RMN ^{13}C / DeptQ, foi observado a presença de um sinal em campo alto, em 28,17 ppm referente aos carbonos metílicos do grupo terc-butila, além dos sinais referente aos carbonos quaternário: um em 78,11 ppm, que condiz com deslocamento químico de átomos de carbono desblindado pelo átomo de oxigênio eletronegativo, com o carbono quaternário do grupo terc-butila; e outro sinal referente ao carbono do carbamato, com deslocamento em 160,98 ppm, característico de compostos carbonílicos.

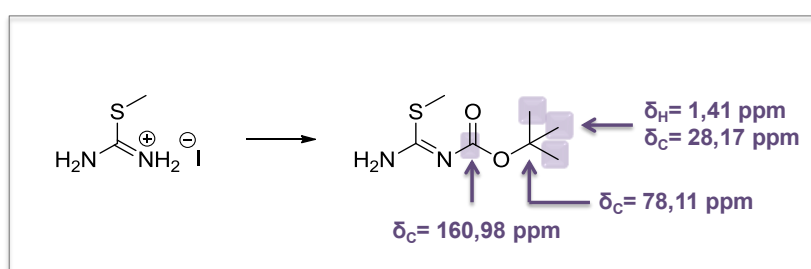
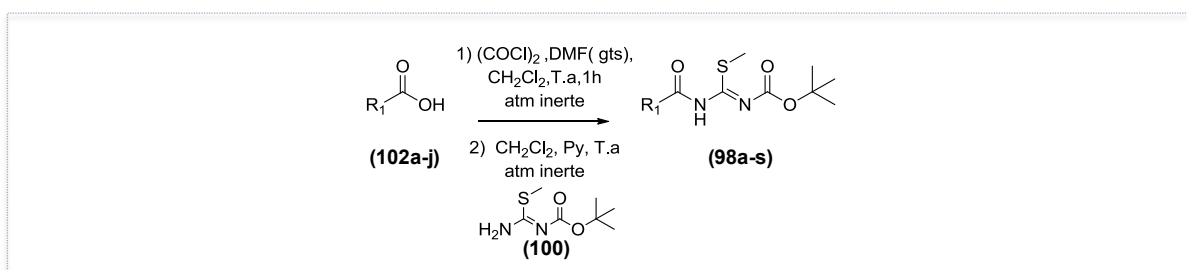


Figura 26: Atribuição comparativa dos principais sinais da 2-metil isotiuréia (**104**) e 2-metil isotiuréia-*N*-Boc (**100**).

3.5. Síntese das *N*-acil-2-metil-isotiuréia *N*-Boc (**98a-s**)

Os compostos *N*-acil-*S*-metilisotiuréia *N*-Boc (**98a-s**) foram sintetizados a partir dos respectivos cloretos de ácidos (**101a-s**) com a 2-metil isotiuréia *N*-protegida (**100**) (SANTOS *et al.*, 2019). Entretanto, houve a necessidade de sintetizar alguns dos cloretos de ácidos a partir da reação entre os ácidos carboxílicos – os sintetizados previamente (**102a-e**) e os

disponíveis no laboratório ($R_1 = 2\text{-CH}_3\text{-Ph}$; $4\text{-OCH}_3\text{-Ph}$; $4\text{-NO}_2\text{-Ph}$; 4-CN-Ph ; 2-piridina; Bz) – e o cloreto de oxalila, na presença de DMF como catalisador, para a obtenção dos respectivos cloretos de ácido (**101a-j**), seguida da segunda etapa reacional entre os cloretos de acila – os recém-formados (**101a-j**) e os disponíveis no laboratório ($R_1 = \text{Ph}$; 3,4,5-tri- $\text{OCH}_3\text{-Ph}$; 2-Cl-Ph; 3-Cl-Ph; 4-Cl-Ph; 3-Br-Ph; 4-Br-Ph; 3- $\text{NO}_2\text{-Ph}$; terc-butila) – com a 2-metil isotiurêia *N*-protegida (**100**) (Esquema 11). Os produtos foram obtidos como sólidos de colorações diversas. Estes foram isolados, purificados através da técnica cromatográfica líquida de adsorção em coluna tipo flash e fase normal, e caracterizada por técnicas espectroscópicas de RMN de ^1H e ^{13}C / DeptQ e determinação de ponto de fusão (Tabela 2). Foram obtidos bons rendimentos reacionais na faixa de 41 - 69 %.



Esquema 11: Reação de acilação para a obtenção de *N*-acil-2-metil-isotiurêia-*N*-Boc (**98a-s**).

É importante destacar a importância de realizar esta reação de acilação em atmosfera inerte, de modo a evitar reações paralelas indesejadas, já que o cloreto de oxalila e os cloretos de acilas sintetizados são muito reativos ao ponto sofrerem hidrólise ao reagir com a água da atmosfera. Também é essencial secar os solventes utilizados, no entanto, este procedimento não foi realizado, o que resultou em baixos rendimentos desta etapa.

Como os cloretos de acila são os mais reativos entre os derivados dos ácidos carboxílicos, não seria possível reagir o ácido carboxílico com o íon cloreto, já que o cloreto é uma base mais fraca e mais facilmente eliminada que a hidroxila. Logo, para sua preparação é necessário lançar mão de reagentes especiais, como os cloretos de tionila e oxalila. A estratégia desta síntese consiste em converter a hidroxila em um melhor grupo de saída. Além do mais, as reações catalisadas pelo DMF ocorrem via reagente de Vilsmeier (sal de halometiliminium) (**132**), o qual possui caráter mais eletrofílico que o cloreto de oxalila (VILSMEIER & HAACK, 1927; LI 2006).

Tabela 2: Tabela de rendimentos reacionais, pontos de fusão e característica física dos *N*-acil-2-metil-isotiuuréia-*N*-Boc (**98a-s**).

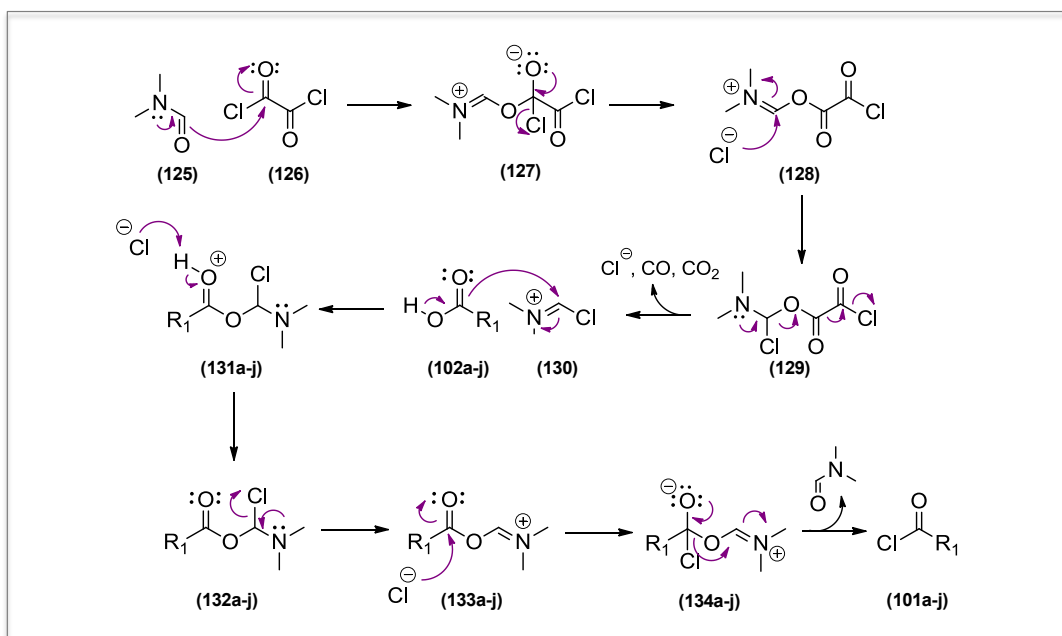
Composto	R ₁	Rendimento ^{a,b} (%)	PF (C)	Aspecto
98a	Ph	70 ^b	100-103	Sólido branco
98b	2-CH ₃ -Ph	69 ^{a,b}	70-74	Sólido branco
98c	2-OCH ₃ -Ph	41 ^{a,b}	88-91	Sólido amarelo
98d	4-OCH ₃ -Ph	68 ^{a,b}	97-102	Sólido branco
98e	3,4,5-tri-OCH ₃ -Ph	56 ^b	121-124	Sólido branco
98f	2-Cl-Ph	62 ^b	72-75	Sólido branco
98g	3-Cl-Ph	59 ^b	99-103	Sólido branco
98h	4-Cl-Ph	63 ^b	109-111	Sólido branco
98i	3-Br-Ph	59 ^b	85-87	Sólido branco
98j	4-Br-Ph	66 ^b	93-96	Sólido branco
98k	3-NO ₂ -Ph	36 ^b	136-142	Sólido bege
98l	4-NO ₂ -Ph	58 ^{a,b}	150-155	Sólido amarelo
98m	4-CN-Ph	58 ^{a,b}	156-158	Sólido branco
98n	2-piridina	45 ^{a,b}	114-118	Sólido branco
98o	2-furano	69 ^{a,b}	92-95	Sólido amarelo
98p	2-tiofeno	69 ^{a,b}	60-61	Sólido amarelo
98q	terc-butila	68 ^b	59-61	Sólido branco
98r	2-Naftila	55 ^{a,b}	121-125	Sólido marrom
98s	Bz	52 ^{a,b}	79-82	Sólido amarelo

^aSíntese do cloreto de acila a partir do ácido carboxílico correspondente; ^bReação de acilação entre o cloreto de acila e a 2-metil-isotiuuréia-*N*-Boc

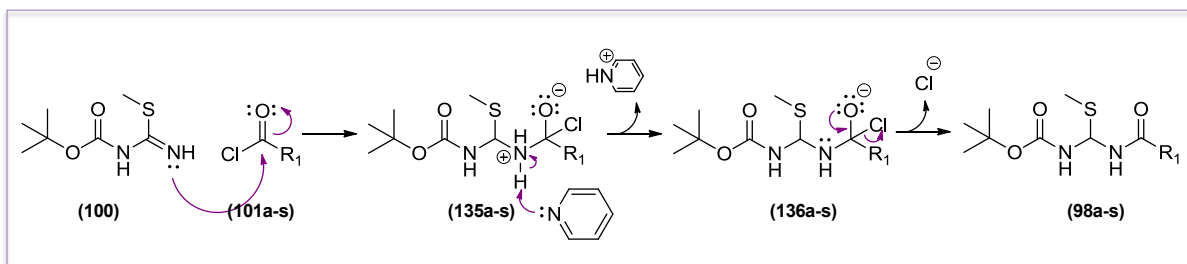
O mecanismo passa por uma reação de substituição nucleofílica acílica (CLAYDEN *et al.*, 2012) no qual, inicialmente, ocorre o ataque nucleofílico do par de elétrons não-ligantes do oxigênio carbonílico, presente na estrutura do DMF (**125**) ao centro eletrofílico do carbono carboxílico do cloreto de oxalila (**126**) para formar o intermediário íon imidoíla (**127**), que na sequência, restitui a ligação dupla, resultando na eliminação do íon cloreto e formação do respectivo éster imidoílico (**128**). Então, o íon cloreto ataca nucleofílicamente o carbono mais eletrofílico do íon imínico (**128**), levando a quebra da ligação dupla e formação do intermediário (**129**). Este sofre descarboxilação, que resulta no cloreto de imidoíla (**130**) altamente eletrofílico, que é rapidamente atacado nucleofílicamente pelo par de elétrons do oxigênio carboxílico do ácido carboxílico (**102a-j**), provocando a quebra da ligação dupla

N=C, levando a formação do intermediário (**131a-j**). Subsequentemente, ocorre a abstração de próton pelo íon cloreto, que gera a cloro-amina intermediária (**132a-j**). Posteriormente ocorre a restituição da ligação dupla e eliminação do íon cloreto, resultando no o intermediário (**133a-j**), que sofre ataque nucleofílico do íon cloreto sobre o carbono carbonílico de sua estrutura, formando um intermediário tetraédrico instável (**134a-j**). Então, a ligação dupla é restituída, seguida da eliminação grupo abandonador que representa a base mais fraca, neste caso é a dimetilformamida, que por sua vez, resulta na formação do cloreto de acila correspondente (**101a-j**) (Esquema 12) (VILSMEIER & HAACK, 1927; LI 2006).

A segunda etapa sintética também é regida por uma substituição nucleofílica acílica como mostrado no esquema seguinte (Esquema 13), na qual o centro eletrofílico do cloreto de acila (**101a-s**) sofre ataque nucleofílico do par de elétrons do nitrogênio presente na 2-metil isotiuréia *N*-Boc (**100**), formando o intermediário tetraédrico instável (**135a-s**). Em seguida, ocorre a abstração do hidrogênio amídico por uma base presente no meio, neste caso a piridina. Por fim, o cloreto é eliminado do intermediário (**136a-s**), regenerando a ligação dupla C=O e levando a formação dos *N*-acil-2-metil-isotiuréia-*N*-Boc (**98a-s**). Cabe destacar a necessidade de haver base em excesso nesta reação para que esta possa reagir com o próton liberado e impedir a inativação da amina nucleofílica (**100**).



Esquema 12: Esquema de intermediários para formação dos cloretos de ácidos (**101a-j**) (Adaptado de (LI, 2006).



Esquema 13: Esquema de intermediários para a segunda etapa sintética para obtenção de *N*-acil-2-metil-isotiuréia-*N*-Boc (**98a-s**)

A análise dos espectros de RMN de ^1H e ^{13}C / DeptQ (anexo 5-33) permitiu evidenciar a formação das *N*-acil-*S*-metilisotiuréia *N*-Boc (**98a-s**) a partir de sinais característicos comuns a todos os compostos sintetizados desta classe. Nos espectros de RMN ^1H , além dos sinais comuns ao produto de partida (**100**), foi observado uma aumento do deslocamento químico em comparação ao sinal de hidrogênio amídico do produto *N*-acil-*S*-metilisotiuréia *N*-Boc (**98a-s**), variando de 8,58 ppm para 12,27-13,62 ppm (Figura 27). Esta distição é decorrente principalmente do campo anisotrópico gerado pelos elétrons π presentes no grupo carbonila ligado diretamente ao nitrogênio da *N*-acil-*S*-metilisotiuréia *N*-Boc (**98a-s**), que permite que os hidrogênios amídicos fiquem desblindados. Além disso, foram observados os sinais característicos de cada substituinte R_1 . Para exemplificar, no espectro referente ao composto (**98I**) (Figura 27) observa-se dois dupletos em 8,42 e 8,30 seguindo uma padrão de anéis para-disubstituídos, integrando 2 hidrogênios cada, na faixa de deslocamento químico característica de hidrogênios ligados ao anel aromático (Figura 28).

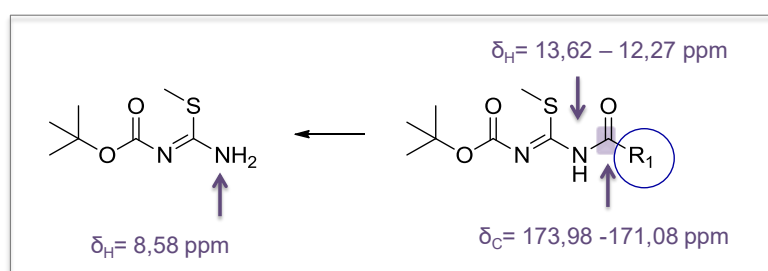


Figura 27: Atribuição comparativa dos principais sinais da 2-metil isotiuréia-*N*-Boc (**100**) e os compostos *N*-acil-2-metil-isotiuréia-*N*-Boc (**98a-s**).

Já nos espectros de RMN ^{13}C / DeptQ foi observado o surgimento do sinal de carbono quaternário com deslocamento químico característico de carbonos amídicos e dos sinais característicos de cada substituinte R_1 (Figura 27). Como exemplo, no espectro referente ao composto (**98I**), além dos sinais comuns ao produto de partida (**100**), observou-se o sinal em 174,28 referente ao carbonoamídicos, bem como os sinais do anel aromático: os carbonos metínicos em orto ao grupo nitro em 130,95 ppm; os carbonos metínicos em meta ao grupo

nitro em 123,37 ppm; o carbono quaternário ligado diretamente ao grupo nitro em 150,21 ppm; e o carbono quaternário ligado a carbonila em 142,03 ppm (Figura 29).

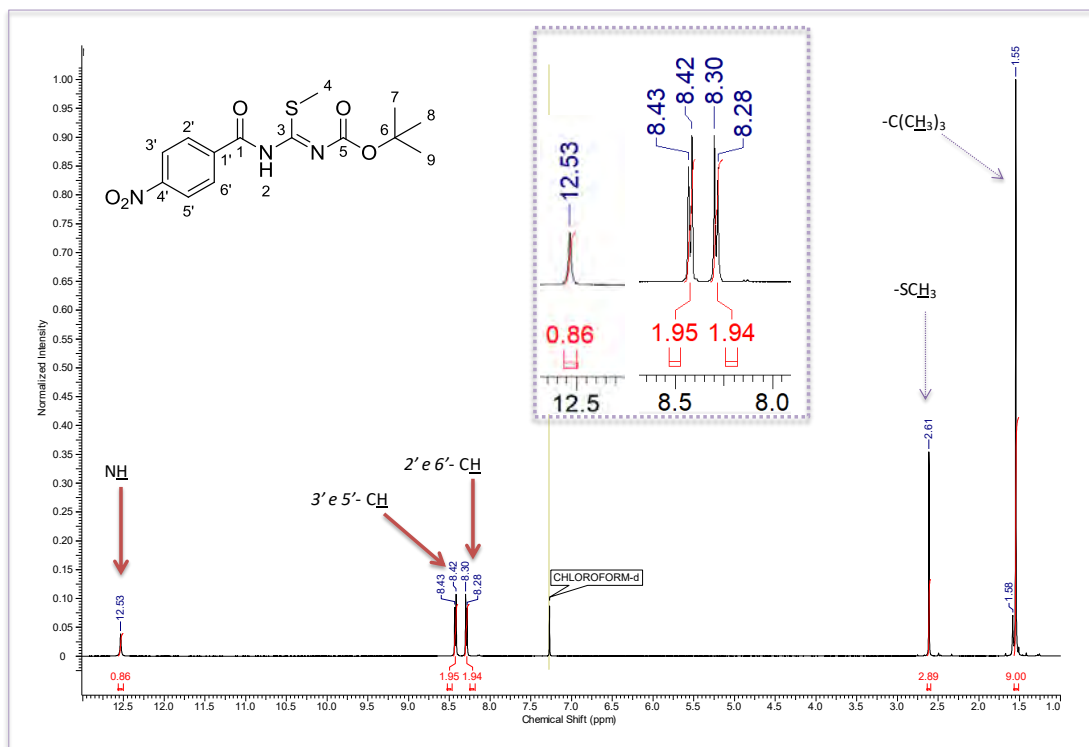


Figura 28: Espectro de RMN ^1H do composto *N*-acil-2-metil-isotiurêia-*N*-Boc (**98I**). Setas lilas: sinais provenientes do produto de partida. Setas vermelhas: sinais novos resultado da formação do produto de interesse

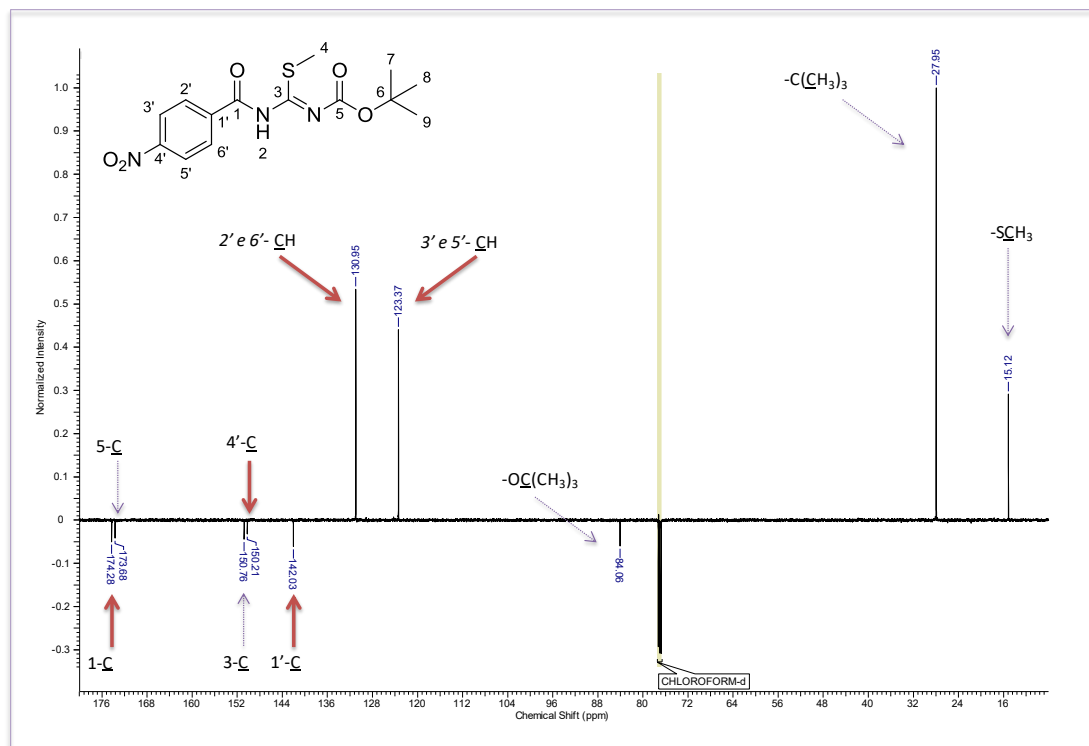
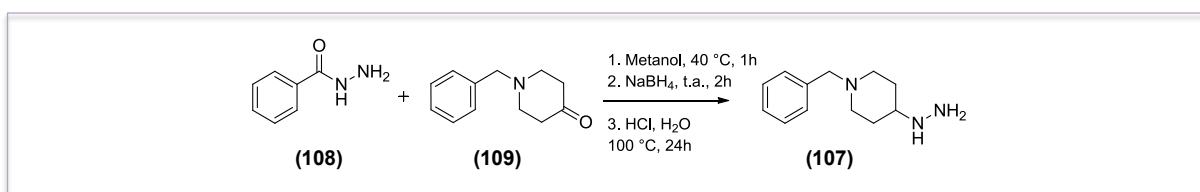


Figura 29: Espectro de RMN ^{13}C / DEPTQ do composto *N*-acil-2-metil-isotiurêia-*N*-Boc (**98I**). Setas lilas: sinais provenientes do produto de partida. Setas vermelhas: sinais novos resultado da formação do produto de interesse

3.6. Síntese da 1-benzil-4-hidrazinilpiperidina (107)

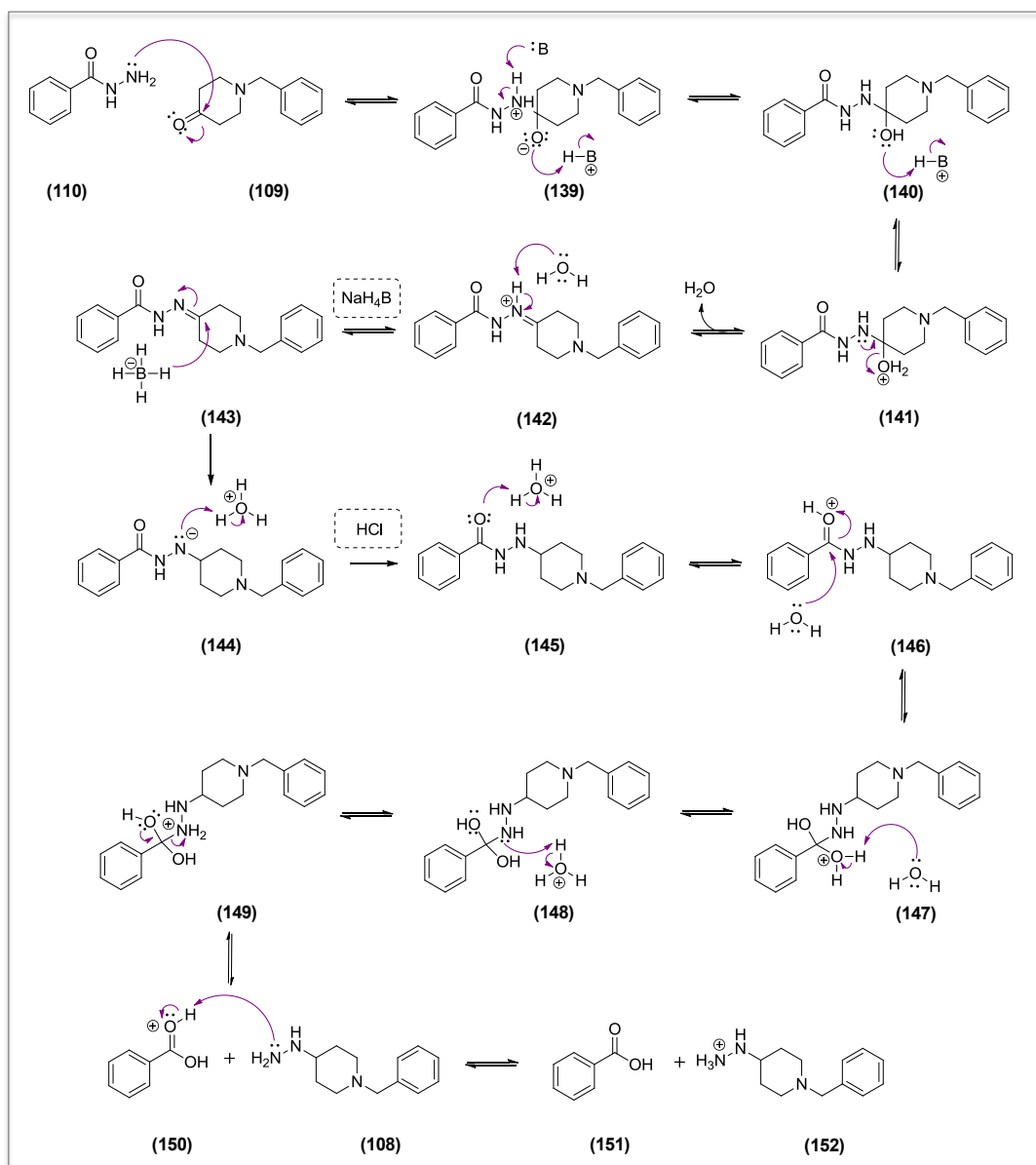
A síntese da 1-benzil-4-hidrazinilpiperidina (107) foi realizada em três etapas reacionais. A primeira constituiu na reação entre a hidrazida benzóica (108) e a 1-benzilpiperidin-4-ona (109) em metanol, para a obtenção da *N*-acilhidrazona correspondentes (VERHEIJEN *et al*, 2009). A segunda etapa consistiu na reação de redução *one-pot* da *N*-acilhidrazona obtida anteriormente, na presença de boro hidreto de sódio como agente redutor. A última etapa trata-se de uma reação de hidrólise ácida, a partir da adição do ácido clorídrico, para formar a 1-benzil-4-hidrazinilpiperidina (107). O produto obtido (107) foi isolado e apresentou-se na forma de óleo marrom com rendimento reacional razoável de 54%.



Esquema 14: Reação de obtenção de 1-benzil-4-hidrazinilpiperidina (107)

Inicialmente, o mecanismo proposto passa por uma adição nucleofílica acíclica, no qual, o nitrogênio da hidrazida age (108) como um nucleófilo, adicionando-se ao grupo carbonila da cetona (109), resultando na quebra da ligação dupla, intermediário (137). Em seguida, uma base presente no meio promove as transferências de próton, com ganho de um próton pelo íon alcóxido e perda de um próton pelo íon amônio, levando a intermediário tetraédrico neutro (138), que é protonado, levando a formação do intermediário (139). Em seguida ocorre a eliminação de água e formação da dupla ligação entre carbono e nitrogênio, o que resulta no intermediário positivo (140). Logo, uma base presente no meio reacional abstrai o hidrogênio, levando a *N*-acilhidrazona (141) (Esquema 15). Na sequência, a adição de borohidreto de sódio promove uma reação de redução da imina, via uma adição nucleofílica acíclica, através da qual ocorre um ataque nucleofílico do íon hidreto ao carbono carbonílico da hidrazona (141), formando um íon amideto (142), que em meio prótico, é protonado resultando na acetohidrazina (143). Por fim, a última etapa é regida por uma reação de substituição nucleofílica acíclica catalisada por ácido, este por sua vez protona a carbonila oxigênio (143), aumentando a suscetibilidade ao ataque nucleofílico do carbono carbonílico do intermediário (144). Em seguida, o par de elétrons do oxigênio da água ataca o carbono carbonílico (144), levando ao intermediário tetraédrico (145), que está em equilíbrio com o intermediário tetraédrico neutro (146). Então, ocorre a protonação deste intermediário no nitrogênio (146),

já que o nitrogênio é uma base mais forte que o oxigênio. Logo após, o intermediário (147) colapsa, restituindo à dupla ligação e eliminando a base mais fraca, neste caso a hidrazina de interesse (107), bem como resultando na formação do ácido benzoico (148) como subproduto. Por fim, a hidrazina é protonada (150), o que evita que ocorra a reação reversa (Esquema 15).

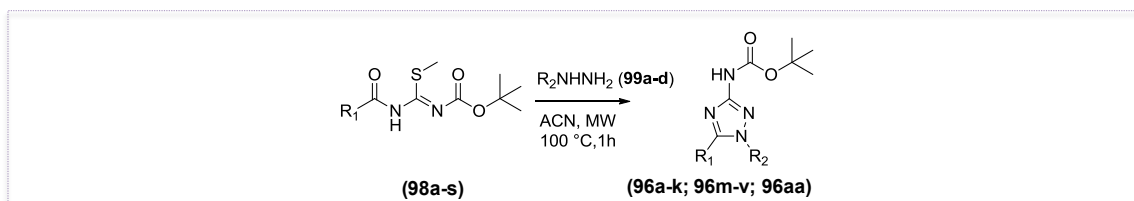


Esquema 15: Esquema de intermediários para a obtenção da 1-benzil-4-hidrazinilpiperidina (108)

3.7. Síntese de *tert*-butil 3-amino-1,2,4-triazol *N*-Boc (96a-aa)

Os compostos 3-amino-1,2,4-triazol *N*-Boc (96a-aa) foram sintetizados a partir das *S*-metil-*N*-acilisotioureias *N*-Boc (98a-s) e das R₂-hidrazinas (99a-d), empregando irradiação de microondas, seguindo o protocolo otimizado por Santos *et al* (Esquema 16). Os produtos foram obtidos como sólidos de diferentes cores, os quais foram purificados através da técnica cromatográfica líquida em coluna tipo flash e fase normal, e caracterizados por técnicas

espectroscópicas de RMN de ^1H e ^{13}C e determinação de ponto de fusão (Tabela 3). Foram obtidos rendimentos razoáveis à bons na faixa de 45 - 89 % apresentados na tabela abaixo.



Esquema 16: Reação de ciclização para a obtenção de 3-amino-1,2,4-triazol N-Boc (**96a-aa**)

Tabela 3: Tabela de rendimentos reacionais, pontos de fusão e característica física dos 1,5-diaril-3-amino-1,2,4-triazol N-Boc (**96a-aa**)

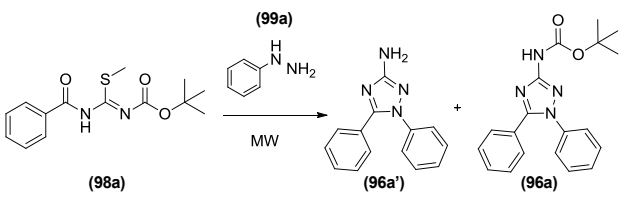
Composto	R ₁	R ₂	Rendimento (%)	PF (C)	Aspecto
96a	Ph	Ph	87	146-151	Sólido branco
96b	2-CH ₃ -Ph	Ph	73	92-101	Sólido branco
96c	2-OCH ₃ -Ph	Ph	80	151-156	Sólido branco
96d	4-OCH ₃ -Ph	Ph	62	164-167	Sólido amarelo
96e	3,4,5-triOCH ₃ -Ph	Ph	65	148-155	Sólido amarelo
96f	Ph	4-F-Ph	66	144-146	Sólido bege
96g	2-Cl-Ph	Ph	80	94-99	Sólido amarelo
96h	3-Cl-Ph	Ph	88	95-130	Sólido amarelo
96i	4-Cl-Ph	Ph	67	139-143	Sólido amarelo
96j	3-Br-Ph	Ph	84	100-110	Sólido amarelo
96k	4-Br-Ph	Ph	81	143-147	Sólido marrom
96l	Ph	4-SO ₂ CH ₃ -Ph	75	179-184	Sólido laranja
96m	3-NO ₂ -Ph	Ph	71	153-155	Sólido amarelo
96n	4-NO ₂ -Ph	Ph	56	166-168	Sólido amarelo
96o	Ph	4-NO ₂ -Ph	61	145-151	Sólido amarelo
96p	4-CN-Ph	Ph	89	93-96	Sólido branco
96q	2-piridina	Ph	85	165-167	Sólido branco
96r	2-furano	Ph	61	233 D*	Sólido marrom
96s	2-tiofeno	Ph	69	190-192	Sólido bege
96t	terc-butil	Ph	69	142-144	Sólido amarelo
96u	2-Naft	Ph	48	110-119	Sólido bege
96v	Bz	Ph	46	160-166	Sólido bege
96w	Ph	Bz	80	156-159	Sólido branco
96x	2-OCH ₃ -Ph	Bz	45	169-172	Sólido amarelo
96y	4-OCH ₃ -Ph	Bz	68	180-183	Sólido branco
96z	4-Cl-Ph	Bz	84	122-125	Sólido branco
96aa	Ph	Bzpiperidinil	65	-	Sólido branco

*D: Decomposição

A síntese orgânica assistida por microondas tem atraído atenção nos últimos anos. Seu uso na síntese orgânica tem demonstrado benefícios em comparação ao aquecimento convencional, devido ao aquecimento seletivo, redução nos tempos reacionais e maiores rendimentos químicos (PEREIRA *et al*, 2018).

O protocolo sintético para obtenção de *N*-protegido ou *N*-desprotegido 1,5-difenil-amino-1,2,4-triazóis (**96a** e **96a'**) desenvolvido por nosso grupo demonstrou que a irradiação de micro-ondas foi eficaz para aumentar os rendimentos reacionais, levando ao produto protegido (**96a**) em rendimentos de 87 % em 40 minutos (Tabela 4, entrada 7), além de ser muito eficiente na obtenção do produto desprotegido 1,5-difenil-3-amino-1,2,4-triazol (**96a'**) com maior rendimento (82 %) (Tabela 4, entrada 6) e menor tempo de reação (1 h) que aquecimento convencional.

Tabela 4: Protocolo de otimização sintética do 1,5-difenil-3-amino-1,2,4-triazol

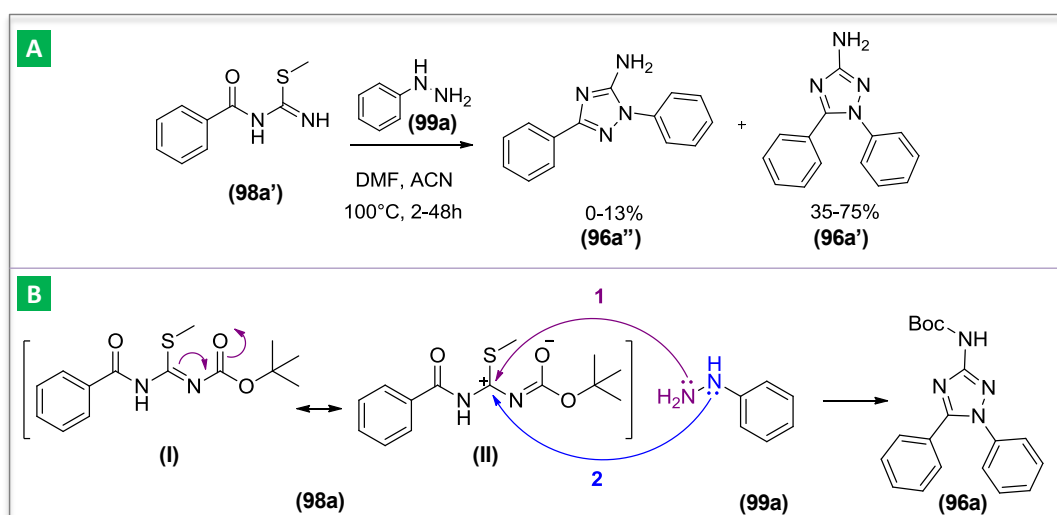


Entrada	Solvente	Temperatura (C)	Tempo (min)	96a'%	96a''%
1	DMF	100 ^a	40 min	-	71
2	DMF	100 ^a	48 h	76	-
3	ACN	100 ^a	40 min	-	74
4	ACN	100 ^a	48 h	-	-
5	DMF	100 ^b	40 min	-	79
6	DMF	150 ^b	60 min	82	-
7	ACN	100 ^b	40 min	-	87
8	ACN	150 ^b	60 min	-	-

^a Aquecimento convencional. ^b Irradiação de micro-ondas.

Ademais, vale destacar a importância do grupamento Boc para o aumento da reatividade e seletividade do produto de partida (**98a**). Inicialmente Santos e colaboradores propuseram a síntese do 1,5-difenil-3-amino-1,2,4-triazol (**96a'**) a partir da *N*-acil-S-metilisotiureia (**98a'**) desprotegida e hidrazina **99a**. Entretanto, foram obtidos os dois regioisômeros, 1,3-difenil-5-amino-1,2,4-triazol (**96a'**) e 1,5-difenil-3-amino-1,2,4-triazol (**96a**) com baixos rendimentos. Desse modo foi sugerida a inserção do grupo Boc com intuito de aumentar a reatividade e conferir seletividade à etapa de ciclização (Esquema 17- A). O grupamento Boc possui a propriedade de retirar elétrons por ressonância, desse modo, através

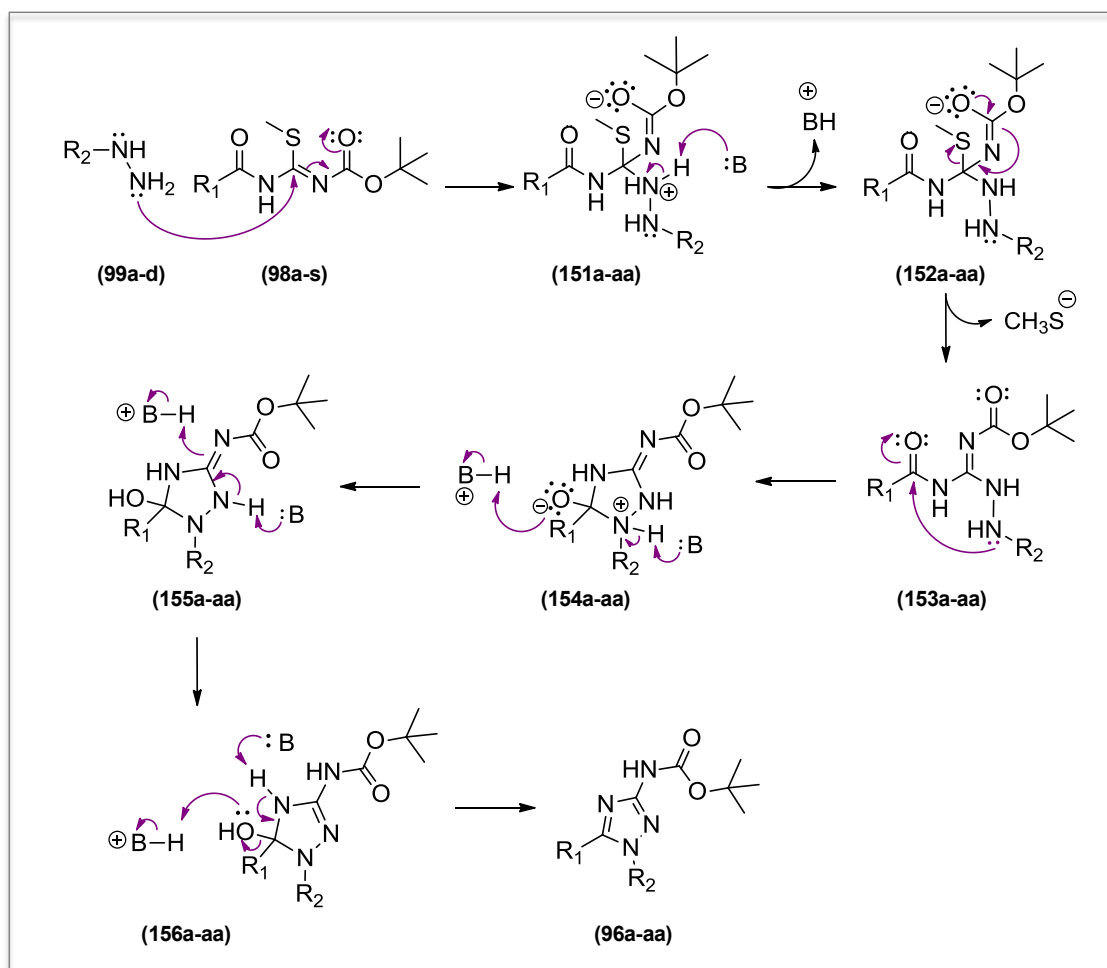
de sua forma canônica pode-se constatar a diminuição da densidade eletrônica do carbono ligado ao enxofre, o que aumenta sua susceptibilidade ao ataque nucleofílico (Esquema 17- B). Além disso, a subunidade Boc é volumosa e confere restrição espacial para a aproximação de nucleófilos que também possuam volume espacial associado. Neste contexto, a fenil hidrazina (**99a**) possuiu dois nitrogênios nucleofílicos, o primeiro (roxo) é mais propenso a realizar o ataque nucleofílico, pois seus pares de elétrons encontram-se mais disponíveis; e o segundo nitrogênio (azul) que possuiu elétrons deslocalizados pelo anel benzênico, ou seja, possui menor nucleofilicidade e um volume associado decorrente da fenila ligada diretamente à ele, o que dificulta sua aproximação ao centro eletrofílico ($\underline{\text{C}}=\text{NH}(\text{S}-\text{CH}_3)$) da *N*-acil-*S*-metilisotiureia protegida pelo Boc (**98a**). Desse modo, a presença do grupamento Boc seleciona a aproximação do nitrogênio (roxo) em detrimento ao nitrogênio (azul) e esta alteração na rota sintética permitiu a obtenção de apenas um dos regioisômeros, o 1,5-diaril-3-amino-1,2,4-triazóis *N*-protegido (**96a**) ou *N*-desprotegido (**96a'**).



Esquema 17: Importância do grupamento Boc para o aumento da reatividade e seletividade

O mecanismo proposto para a formação do 1,5-diaril-3-amino-1,2,4-triazol *N*-Boc (**96a-aa**) consiste, inicialmente, na primeira etapa de adição do nitrogênio mais nucleofílico da hidrazina (**99**) ao carbono da *S*-metil tiouréia ($\underline{\text{C}}=\text{NH}(\text{S}-\text{CH}_3)$) (**98a-s**), ocasionando a formação do intermediário tetraédrico instável (**151a-aa**) e abstração do próton amídico por uma base presente no meio reacional, resultando no intermediário (**152a-aa**). Em seguida, a ligação dupla $\text{C}=\text{NH}$ é restituída, levando a liberação do grupo metilsulfeto, formando o intermediário (**153a-aa**). Este sofre ciclização intramolecular, através do ataque do nitrogênio secundário da hidrazina ao carbono carboxílico, resultando no intermediário instável (**154a-**

aa). Então, ocorrem seguidas transferências de próton (**155a-aa**), até a desidratação do intermediário (**156a-aa**) resultando nos compostos 3-amino-1,2,4-triazol *N*-Boc (**96a-aa**).



Esquema 18: Esquema de intermediários para a obtenção dos 3-amino-1,2,4-triazóis- *N*-Boc (**96a-aa**).

A análise dos sinais nos espectros de RMN ^1H e ^{13}C / DeptQ foi essencial para determinar o sucesso da reação de ciclização proposta, bem como para caracterizar a formação dos 1,5-diaril-3-amino-1,2,4-triazol *N*-Boc (**96a-aa**) (anexos 35-70). A principal evidência da formação dos compostos triazólicos foi a ausência do simpleto próximo a 2,6 ppm referente ao hidrogênio metílico (S-CH_3) (Figura 30). Ademais, foram observados o surgimento de novos sinais em campo baixo, na faixa de deslocamento químico característica de hidrogênios ligados ao anel aromático, provenientes do substituinte aromáticos em R_2 . Como representante aos demais compostos triazólicos obtidos nesta etapa, no espectro referente ao composto (**96n**) observa-se, além dos sinais comuns ao produto de partida (**98l**), dois multipletos, referente: aos hidrogênios metínicos H_9 , H_{10} e H_{11} , em 7,47-7,45 ppm; e aos hidrogênios metínicos H_8 e H_{12} , em 7,39 -7,36 ppm (Figura 31). E por fim, no espectro de RMN ^{13}C / DeptQ foi observado a alteração dos sinais dos carbonos quaternários C_1 e C_2 para

campos mais altos, bem como a presença de novos sinais, na faixa de deslocamento químico característica de carbonos aromático (Figura 30) Como exemplo no espectro referente ao composto (**96n**), observa-se três sinais referente aos carbonos metínicos: C_{9'} e C_{11'}, em 125,79 ppm; C_{10'} em 129,62 ppm; e C_{8'} e C_{12'} em 129,67 ppm. Além do sinal referente ao carbono quaternário C_{7'} em 133,22 ppm (Figura 32).

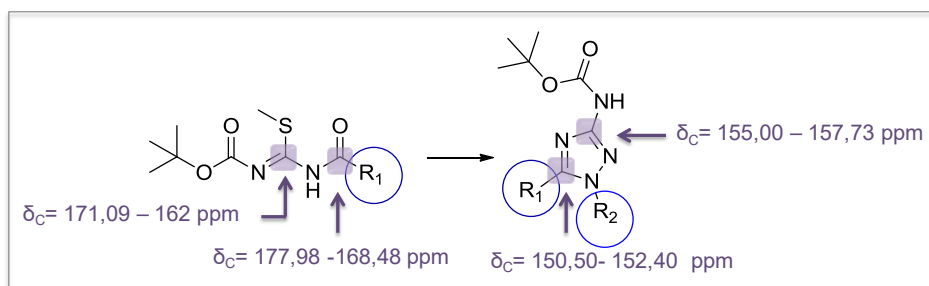


Figura 30: Atribuição comparativa dos principais sinais dos compostos *N*-acil-2-metil-isotiuurêa-*N*-Boc (**98a-s**) e os 3-amino-1,2,4-triazol *N*-Boc (**96a-aa**)

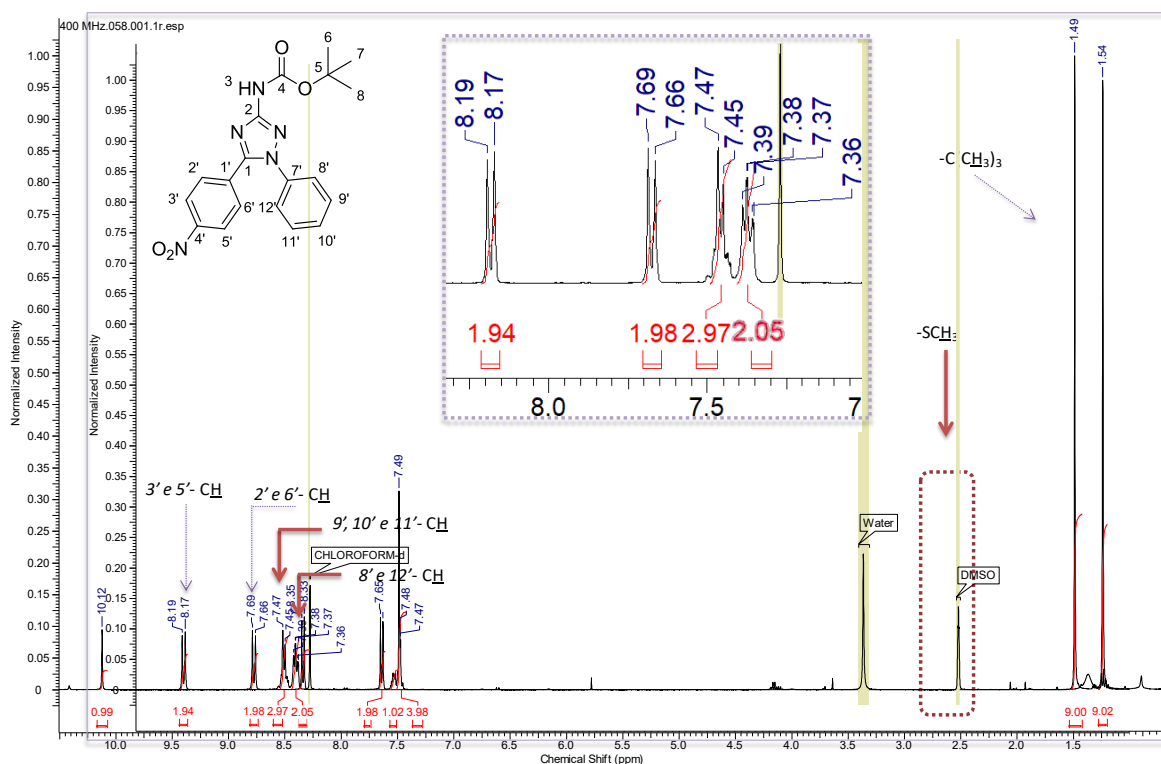


Figura 31: Espectro de RMN ¹H do composto tert-butil 3-amino-1,2,4-triazol *N*-Boc (**96n**). Setas lias: sinais provenientes do produto de partida. Setas vermelhas: sinais novos resultado da formação do produto de interesse

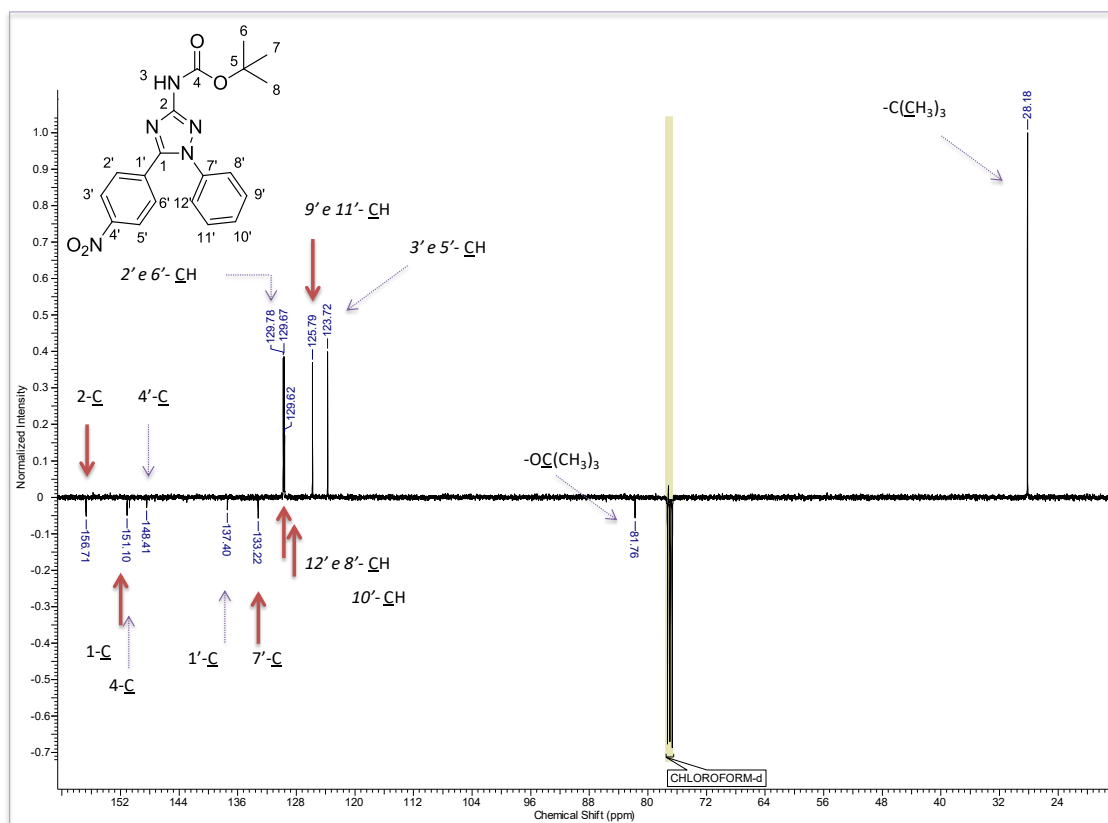
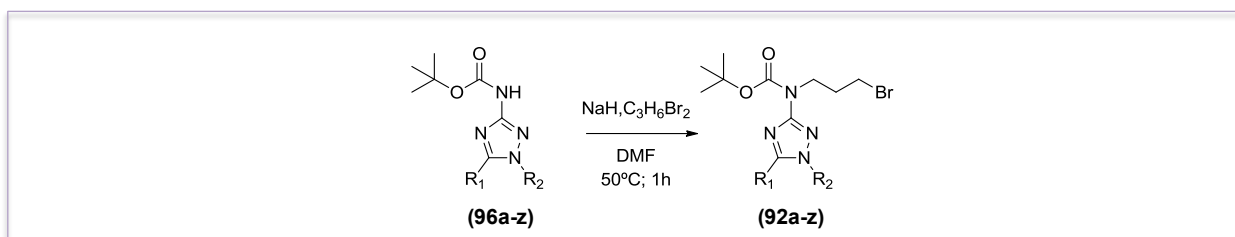


Figura 32: Espectro de RMN ^{13}C / DeptQ do composto tert-butil 3-amino-1,2,4-triazol *N*-Boc (**96n**). Setas lisas: sinais provenientes do produto de partida. Setas vermelhas: sinais novos resultado da formação do produto de interesse

3.8. Síntese de 3-amino-1,2,4-triazóis- *N*-alquilados (**92a-z**)

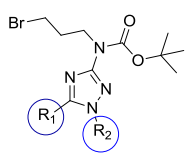
Os compostos (**92a-z**) foram sintetizados via reação de *N*-alquilação a partir da tert-butil 1,5-diaril-3-amino-1,2,4-triazol *N*-Boc (**96a-z**), hidreto de sódio (NaH) como base e 1,3-dibromopropano em dimetilformamida (DMF) anidro a 60 °C durante 1 hora (Esquema 19) (SANTOS *et al*, 2019). Os produtos sintetizados foram purificados através de cromatografia líquida em coluna flash, e obtidos com óleos castanhos. Posteriormente, foram caracterizados por técnica de espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN) de ^1H e ^{13}C / DeptQ (Tabela 5). Os rendimentos reacionais foram considerados de razoáveis a bons, variando entre 37-79 %.



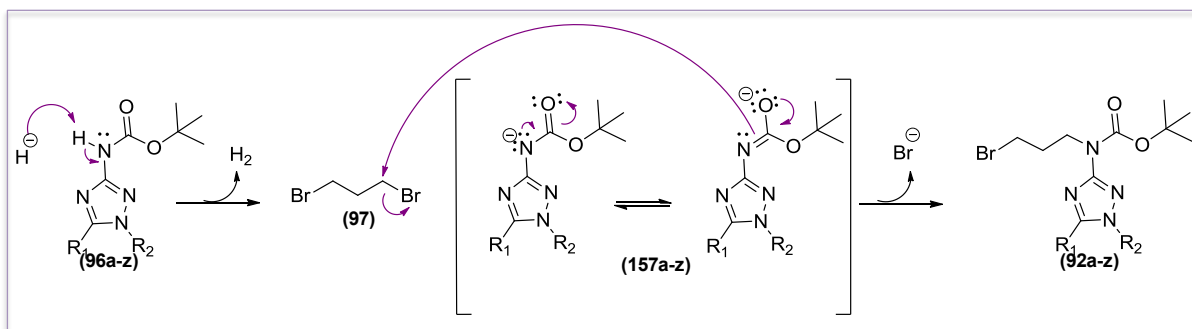
Esquema 19: Reação de *N*-alquilação para a obtenção dos 3-amino-1,2,4-triazóis- *N*-alquilados (**92a-z**)

É importante destacar, que a reação foi realizada em atmosfera inerte para que não ocorressem reações paralelas indesejadas, como reação ácido-base entre hidreto de sódio e água presente na atmosfera. Ademais, cabe destacar que, reações de bisalquilação podem competir com a reação de monoalquilação, em questão. Foi observada a formação de um subproduto mais apolar, que não foi isolado e caracterizado por técnicas espectroscópicas, acredita-se que este seja o produto bisalquilado, que pode ser devido o excesso utilizado do agente alquilante, que provavelmente resultou nos rendimentos razoáveis dos compostos desejados (**92a-z**) (Tabela 5).

Tabela 5: Tabela de rendimentos reacionais dos 3-amino-1,2,4-triazóis- *N*-alquilados (**92a-z**)

							
Composto	R ₁	R ₂	Rendimento (%)	Composto	R ₁	R ₂	Rendimento (%)
92a	Ph	Ph	71	92n	Ph	4-NO ₂ -Ph	74
92b	2-CH ₃ -Ph	Ph	65	92o	4-NO ₂ -Ph	Ph	72
92c	2-OCH ₃ -Ph	Ph	60	92p	4-CN-Ph	Ph	43
92d	4-OCH ₃ -Ph	Ph	71	92q	2-piridina	Ph	78
92e	3,4,5-triOCH ₃ -Ph	Ph	70	92r	2-furano	Ph	60
92f	Ph	4-F-Ph	75	92s	2-tiofeno	Ph	55
92g	2-Cl-Ph	Ph	53	92t	terc-butil	Ph	75
92h	3-Cl-Ph	Ph	45	92u	2-Naftila	Ph	43
92i	4-Cl-Ph	Ph	79	92v	Bz	Ph	75
92j	3-Br-Ph	Ph	58	92w	Ph	Bz	57
92k	4-Br-Ph	Ph	37	92x	2-OCH ₃ -Ph	Bz	40
92l	Ph	4-SO ₂ CH ₃ -Ph	73	92y	4-OCH ₃ -Ph	Bz	55
92m	3-NO ₂ -Ph	Ph	70	92z	4-Cl-Ph	Bz	46

Esta reação passa por um mecanismo de substituição nucleofílica bimolecular (S_N2), no qual, inicialmente o hidreto abstrai o próton do nitrogênio amídico do 1,5-diaril-3-amino-1,2,4-triazol N-Boc (**96a-z**), formando o amideto correspondente (**157a-z**) e gás hidrogênio. Na sequência, o amideto (**157a-z**) formado atua como nucleófilo e ataca o carbono ligado ao bromo (**97**). De maneira concertada, a ligação C—Br é quebrada, enquanto a ligação C—Né formada. A reação se completa com a total eliminação do brometo, que é um bom grupo abandonador e então, formação do composto (**92a-z**) (Esquema 20) (CAREY & SUNDBERG, 2008).



Esquema 20: Esquema de intermediários para a obtenção dos 3-amino-1,2,4-triazóis- *N*-alquilados (**92a-z**) (Adaptado de CAREY & SUNDBERG, 2008)

A fim de se confirmar a formação dos compostos (**92a-z**) foram realizados experimentos de determinação estrutural de RMN ^1H e ^{13}C / DeptQ dos compostos sintetizados (anexo 71-98). Um dos indicativos da formação destes compostos no espectro de RMN ^1H foi a presença dos sinais na região de hidrogênio metilênicos da cadeia alquílica: multiplete em torno de 2,30 ppm; e dois sinais de tripletos, com deslocamento químico de aproximadamente 3,10 e 4,10 ppm, em decorrência de estar ligados ao nitrogênio e bromo respectivamente (Figura 33), como apresentado no espectro do composto (**92o**), através do qual se observa o multiplete em 2,32 ppm referente ao hidrogênio $\text{H}_{2''}$; e os tripleto em 3,55 ppm referente ao hidrogênio $\text{H}_{3''}$ e em 4,02 ppm referente ao hidrogênio $\text{H}_{1''}$ (Figura 34). Além disso, no espectro de RMN ^1H não foi observado o sinal referente ao hidrogênio ligado ao N amídico presente nos produtos de partida (**92a-z**), corroborando para a confirmação da obtenção dos compostos (**92a-z**) (Figura 34). No espectro de RMN ^{13}C / DeptQ ficou evidente a presença de três sinais de carbono metilênico na região de carbono sp^3 , como observado no espectro do composto (**92o**), os sinais em 30,61 ppm, 31,77 ppm, 46,81 ppm referentes aos carbonos $\text{C}_{2''}$, $\text{C}_{3''}$ e $\text{C}_{1''}$ respectivamente. (Figura 35).

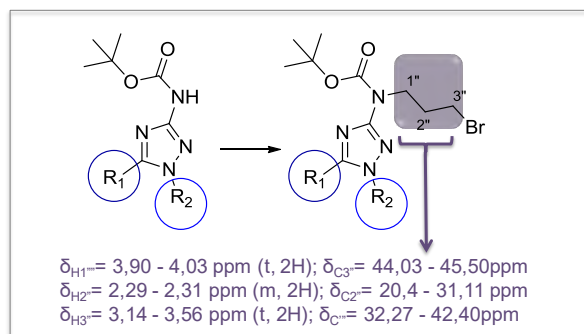


Figura 33: Atribuição comparativa dos principais sinais dos compostos 3-amino-1,2,4-triazol *N*-Boc (**96a-aa**) e os 3-amino-1,2,4-triazóis- *N*-alquilados (**92a-z**)

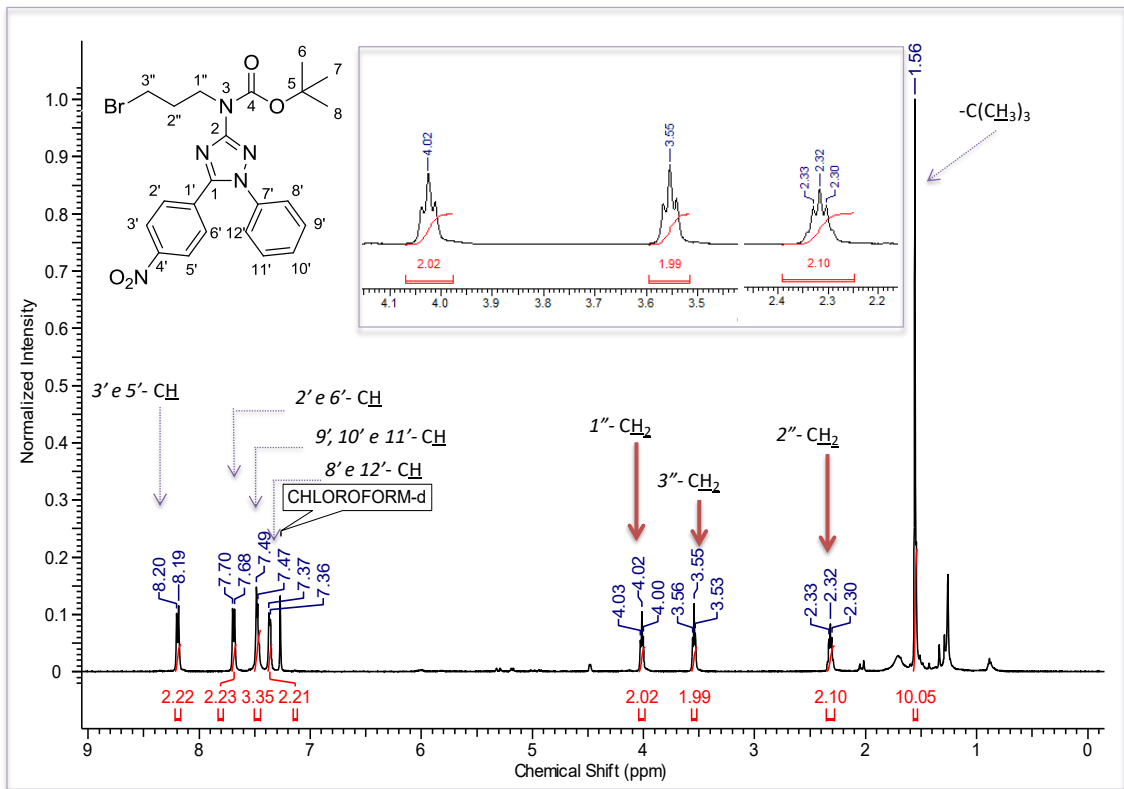


Figura 34: Espectro de RMN ^1H do composto 3-amino-1,2,4-triazóis-*N*-alquilados (**92o**). Setas lisas: sinais provenientes do produto de partida. Setas vermelhas: sinais novos resultado da formação do produto de interesse

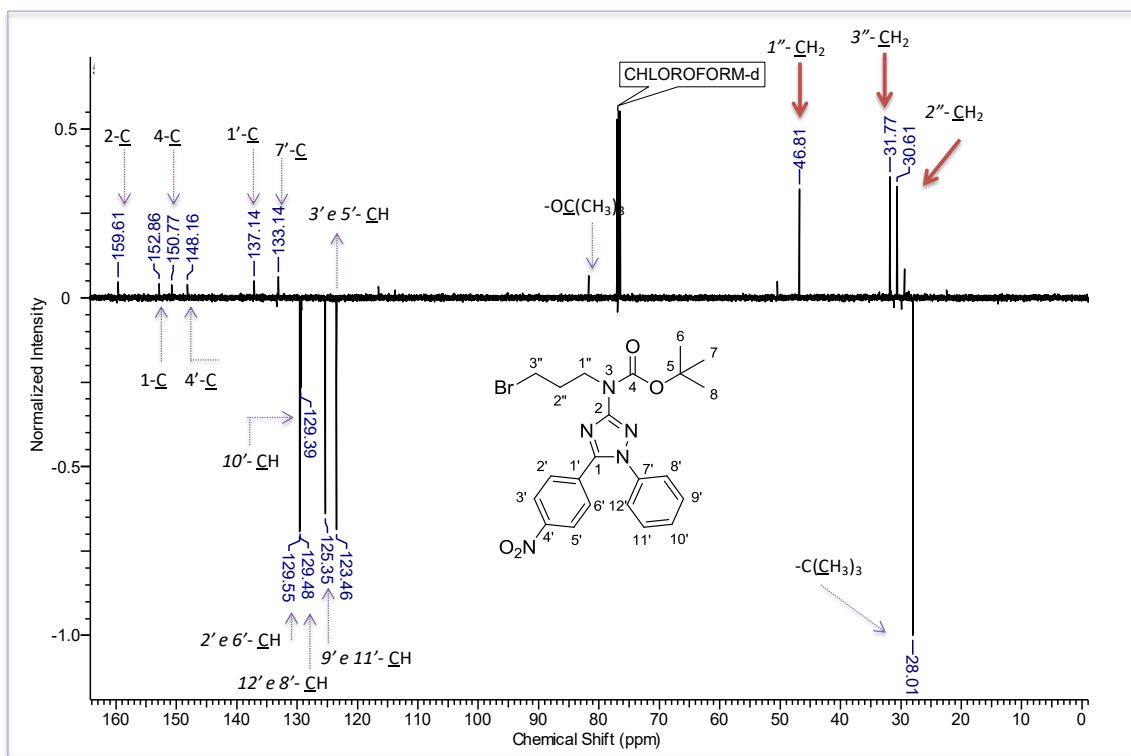
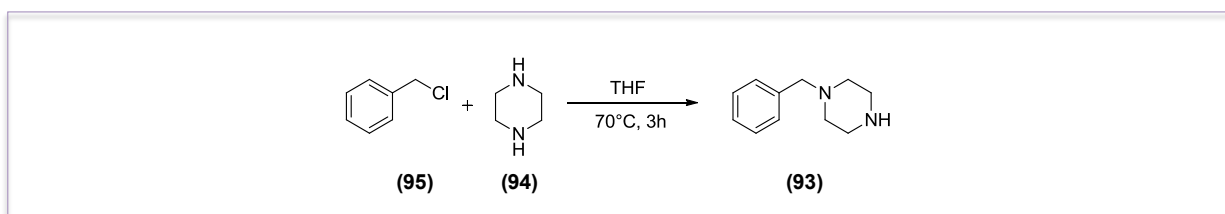


Figura 35: Espectro de RMN ^{13}C DeptQ do composto 3-amino-1,2,4-triazóis-*N*-alquilados (**92o**). Setas lisas: sinais provenientes do produto de partida. Setas vermelhas: sinais novos resultado da formação do produto de interesse

3.9. Síntese de benzilpiperazina (93)

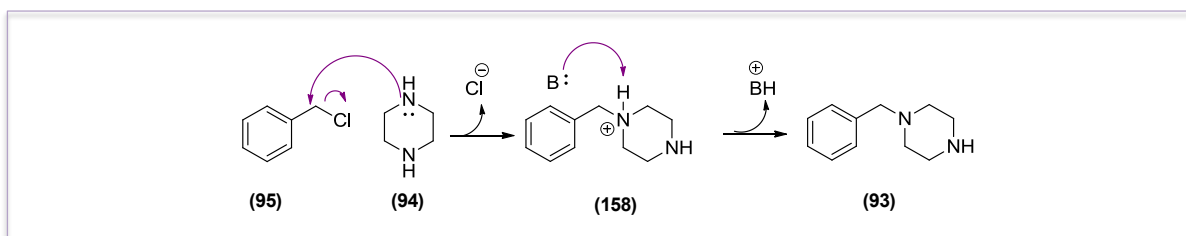
A benzilpiperazina (**93**) foi sintetizada a partir da piperazina e cloreto de benzila via reação de substituição nucleofílica bimolecular (S_N2), segundo o esquema abaixo (Esquema 21) (SANTOS *et al*, 2019). O produto foi isolado e obtido como um sólido branco com rendimento igual a 89 % e ponto de fusão igual a 81-84 °C.

A fim de evitar a formação do produto de bisalquilação, foi realizado o controle estequiométrico da reação, no qual foi utilizado um excesso de piperazina frente ao cloreto de benzila.



Esquema 21: Reação de ciclização para a obtenção da benzilpiperazina (**93**)

Bem como a reação descrita anteriormente, esta reação é regida pelo mecanismo de substituição nucleofílica bimolecular (S_N2), no qual, inicialmente ocorre o ataque nucleofílico do par de elétrons do nitrogênio piperazínico (**94**) ao carbono metilênico ligado ao cloro (**95**), causando simultaneamente, a formação da ligação nucleófilo-carbono e rompimento da ligação C-Cl até a completa eliminação do cloreto, e conseqüentemente, formação do intermediário protonado (**158**). Por fim, a própria piperazina presente em excesso no meio reacional, atua como base abstraindo o próton do nitrogênio positivo, levando a formação da benzil piperazina (**93**) (Esquema 22) (CAREY & SUNDBERG, 2008).

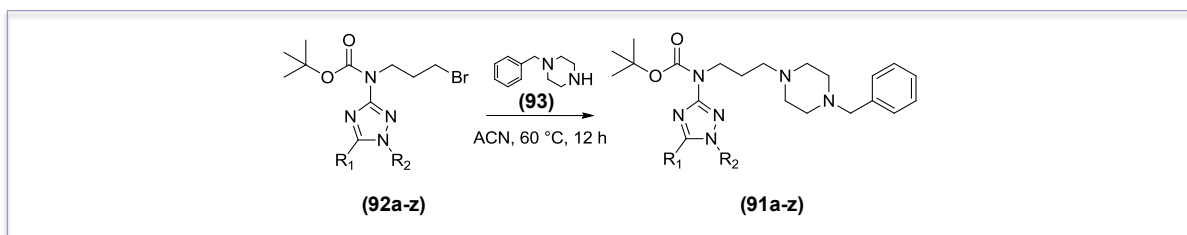


Esquema 22: Esquema de intermediários para a obtenção da benzilpiperazina (**93**) (Adaptado de Carey & Sundberg, 2008)

3.10. Síntese de 3-amino-propinil-piperazil-1,2,4-triazol N-Boc (91a-z)

A etapa de obtenção dos compostos 3-amino-propinil-piperazil-1,2,4-triazóis- N-Boc (**91a-z**) se deu a partir dos 3-amino-1,2,4-triazóis- N-alkilados sintetizados anteriormente

(**91a-z**) e da benzil-piperazina (**93**), via reação de aminação, conforme demonstrado no esquema 23. Os produtos obtidos foram isolados e purificados através de cromatografia líquida em coluna flash, para a obtenção dos produtos como óleos castanhos de diferentes tonalidades. Após, estes foram caracterizados por técnica de RMN de ^1H e ^{13}C / DeptQ. Os rendimentos reacionais foram considerados de razoáveis a bons, variando entre 35 - 66 % conforme apresentados na tabela a seguir (Tabela 6).

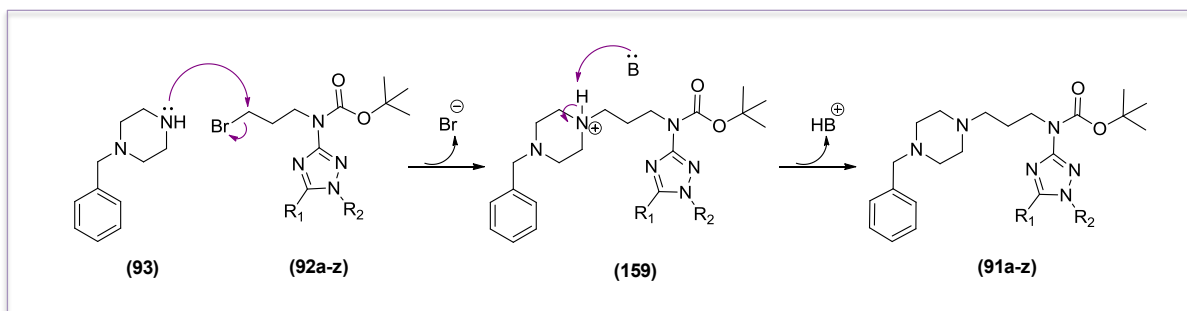


Esquema 23: Reação de aminação para a obtenção dos 3-amino-propinil-piperazil-1,2,4-triazóis *N*-Boc (**91a-z**)

Tabela 6: Tabela de rendimentos reacionais dos 3-amino-propinil-piperazil-1,2,4-triazóis *N*-Boc (**91a-z**).

Compostos	R ₁	R ₂	Rendimento (%)	Compostos	R ₁	R ₂	Rendimento (%)
91a	Ph	Ph	66	91n	4-NO ₂ -Ph	Ph	53
91b	2-CH ₃ -Ph	Ph	35	91a	Ph	4-NO ₂ -Ph	57
91c	2-OCH ₃ -Ph	Ph	36	91p	4-CN-Ph	Ph	55
91d	4-OCH ₃ -Ph	Ph	38	91q	2-piridina	Ph	48
91e	3,4,5-triOCH ₃ -Ph	Ph	48	91r	2-furano	Ph	52
91f	2-Cl-Ph	Ph	47	91s	2-tiofeno	Ph	55
91g	3-Cl-Ph	Ph	49	91t	terc-butil	Ph	56
91h	4-Cl-Ph	Ph	41	91u	2-Naftila	Ph	51
91i	3-Br-Ph	Ph	59	91v	Bz	Ph	55
91j	4-Br-Ph	Ph	54	91w	Ph	Bz	39
91k	Ph	4-F-Ph	35	91x	2-OCH ₃ -Ph	Bz	35
91l	Ph	4-SO ₂ CH ₃ -Ph	42	91y	4-OCH ₃ -Ph	Bz	35
91m	3-NO ₂ -Ph	Ph	43	91z	4-Cl-Ph	Bz	56

Esta reação também passa por um mecanismo de S_N2, no qual, a amina (**93**) atua como nucleófilo, através do par de elétrons não ligantes do nitrogênio, capaz de promover o ataque nucleofílico ao carbono metilênico ligado ao bromo nos compostos (**92a-z**) (Esquema 24), de maneira semelhante ao descrito anteriormente (CAREY & SUNDBERG, 2008).



Esquema 24: Esquema de intermediários para a obtenção dos 3-amino-propinil-piperazil-1,2,4-triazóis-*N*-Boc (**91a-z**). (Adaptado de CAREY & SUNDBERG, 2008).

Os produtos obtidos foram confirmados através das técnicas de RMN ^1H e ^{13}C / DeptQ (anexo 99-124). No espectro de RMN ^1H para os derivados (**91a-z**) foram observados o surgimento de um multipletto em campo baixo, em torno de 2,10 - 2,8 ppm, integrando dez hidrogênios, referentes a oito hidrogênios metilênicos provenientes do anel piperazínico e 2 hidrogênios da cadeia alquílica ligado ao anel piperazínico (Figura 36). Também foi observada a presença de um simpleto referente aos hidrogênios metilênicos entre os aneis benzênico e piperazínico em aproximadamente 3,50 - 3,65 ppm, que aparece nesta faixa de deslocamento por estar ligado a um átomo eletronegativo e por decorrência do efeito anisotrópico gerado pelo anel benzênico, capaz de desblindar os prótons deste anel. Além disso, observou-se o aumento sinais na região de aromáticos, correspondendo ao anel aromático de subunidade benzilpiperazina (Figura 36). Como representante dos compostos 3-amino-propinil-piperazil-1,2,4-triazóis-*N*-Boc, o espectro do composto (**91I**) evidencia a presença de um multipletto em 2,69 ppm referente ao hidrogênios metilênicos $\text{H}_{3''-7''}$ e o simpleto em 3,58 ppm referente ao hidrogênios metilênicos $\text{H}_{8''}$, bem como o multipletto em 7,27 ppm referente aos hidrogênios aromáticos proveniente da subunidade benzil piperazina adicionada nesta etapa reacional (Figura 37). Já no espectro RMN ^{13}C / DeptQ, além dos sinais comuns ao produto de partida, foram observados os sinais dos carbonos metilênicos piperazínico na faixa de 49,20- 55,90 ppm, e o carbono benzílico entre 62,10-63-20 ppm. Assim como, os sinais em campo baixo, referentes aos carbonos metínicos e quatrenário aromáticos acrescentado nesta etapa (Figura 37). Como exemplo se observa no espectro referente ao composto (**91I**) a presença de dois sinais dos carbonos metilênicos provnientes do anel piperazínico: em 49,64 ppm referente aos carbonos $\text{C}_{6''}$ e $\text{C}_{7''}$; e em 55,33 ppm referente aos carbonos $\text{C}_{4''}$ e $\text{C}_{5''}$, bem como o sinal do carbono benzênico $\text{C}_{8''}$ em 62,42 ppm. Ademais foram observados os sinais referentes aos carbonos metínicos aromáticos acrescentado nesta etapa, na faixa 125,53-130,71 ppm (Figura 38).

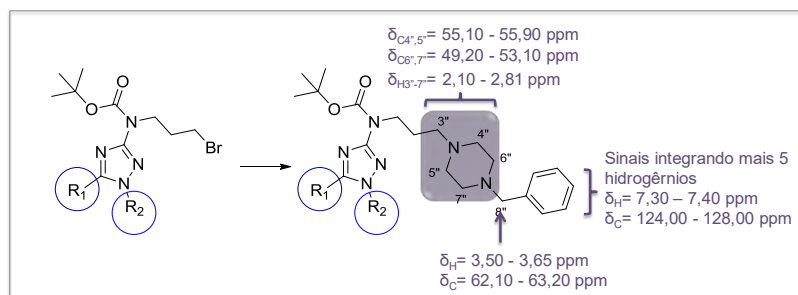


Figura 36: Atribuição comparativa dos principais sinais dos compostos 3-amino-1,2,4-triazóis-*N*-alquilados (**92a-z**) e os 3-amino-propinil-piperazil-1,2,4-triazóis-*N*-Boc (**91a-z**)

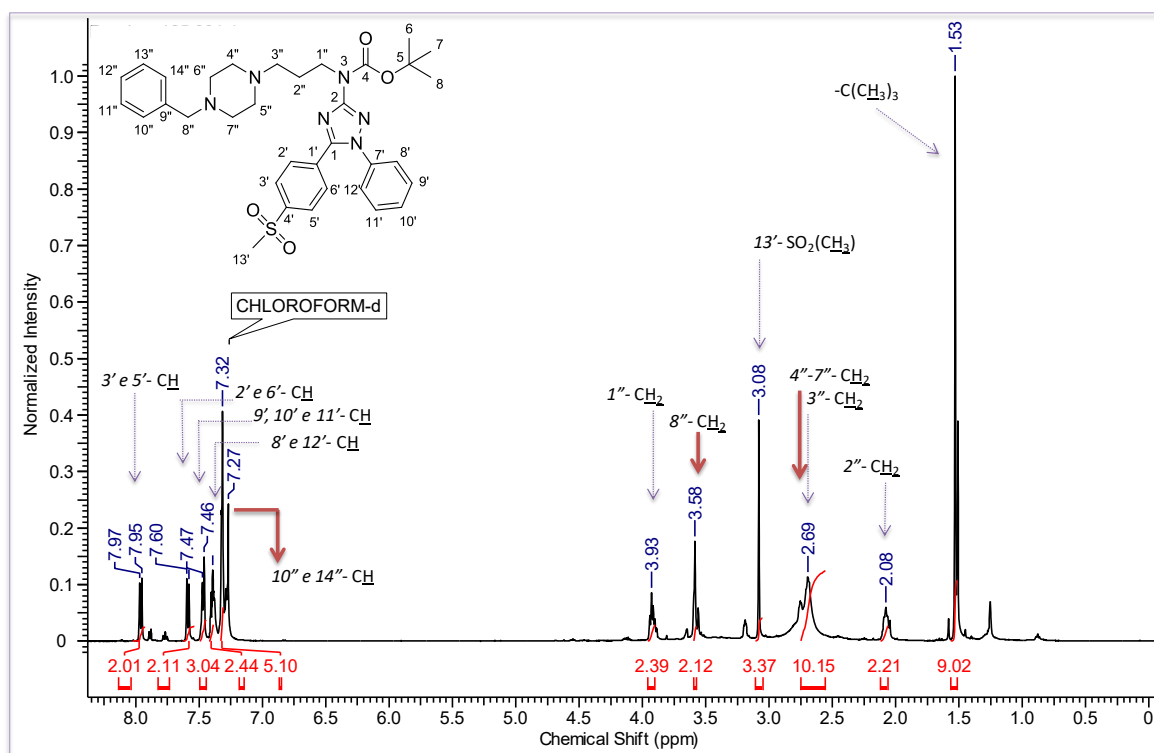


Figura 37: Espectro de RMN ^1H do composto 3-amino-propinil-piperazil-1,2,4-triazol *N*-Boc (**911**). Setas lilais: sinais provenientes do produto de partida. Setas vermelhas: sinais novos resultado da formação do produto de interesse

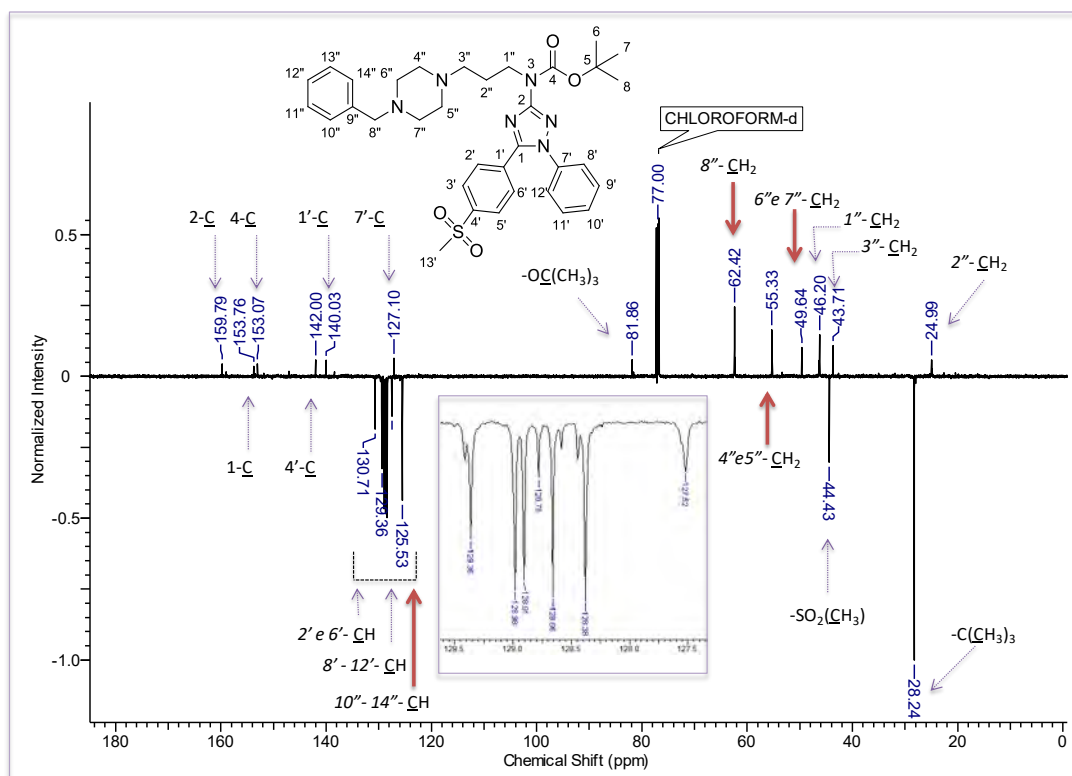
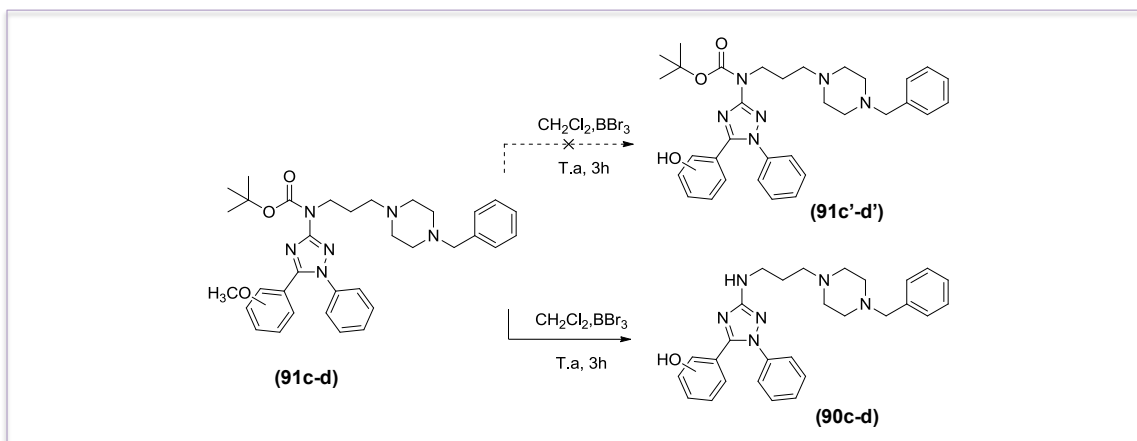


Figura 38: Espectro de RMN ^{13}C / DeptQ do composto *N*-acil-2-metil-isotriurina-*N*-Boc (**98I**). Setas lilais: sinais provenientes do produto de partida. Setas vermelhas: sinais novos resultado da formação do produto de interesse

3.11. Síntese de 3-amino-propinil-piperazil-1,2,4-triazol *N*-Boc (**91c'-d'**)

Como o intuito de sintetizar os compostos (**91c'-d'**) contendo o substituinte hidroxila na posição *orto* e *para* ($R_1 = 2\text{-OH-Ph}$; 4-OH-Ph) foi implementada a reação de *O*-demetilação, a partir dos 3-amino-propinil-piperazil-1,2,4-triazóis *N*-Boc (**91c-d**) correspondentes, na presença de tribrometo de boro (BBr_3) em diclorometano (ZHAO *et al.*, 2012) (FRANCO *et al.*, 2015). Esta estratégia foi tomada, visto que os intermediários 3-amino-1,2,4-triazóis-*N*-Boc contendo substituinte hidroxila apresentariam problemas de quimioseletividade no momento da alquilação no grupo amídico. Foram isolados dois produtos, respectivamente, como óleo marrom e sólido de branco e ponto de fusão igual a 131-133 °C. Estes foram caracterizados por técnicas espectroscópicas e seus rendimentos foram considerados bons, iguais a 55% e 84% respectivamente (Tabela 7).



Esquema 25: Reação de *O*-demetilação para a obtenção dos 3-amino-propinil-piperazil-1,2,4-triazóis-*N*-Boc (**91c'-d'**).

Tabela 7: Tabela de rendimentos reacionais, pontos de fusão e característica física dos 3-amino-propinil-piperazil-1,2,4-triazóis (**90b** e **90c**)

Composto	R ₁	R ₂	Rendimento (%)	PF (C)	Aspecto
90b	2-OH-Ph	Ph	55%	-	Óleo castanho
90c	4-OH-Ph	Ph	84%	153-156	Sólido branco

Ao examinar os espectros RMN ¹H e ¹³C/ DeptQ (em anexo) observou-se que a reação foi efetiva ao demetilar os produtos de partida, já que não foram observados sinais referentes à presença da metoxila entre 3,7- 3,80 ppm no espectro de RMN ¹H e nem entre 55,10- 56,50 ppm no espectro de RMN ¹³C. Em contra partida, no espectro de RMN ¹H do composto **90c** foi observado o sinal simpleto em 9,98 ppm referente ao hidrogênio fenólico (H_{OH}). Entretanto, também foi observada a ausência dos sinais característicos do grupo Boc: metila entre 1,47-1,50 ppm no espectro de RMN ¹H; os sinais entre 28,20-29,60 ppm referente ao carbono metílico e sinais entre 81,30-89,00 ppm referente ao carbono quaternário no espectro de RMN ¹³C. Ou seja, esta etapa gerou “one pot“ os compostos finais 3-amino-propinil-piperazil-1,2,4-triazóis (**90b** e **90c**). Provavelmente, a desproteção do Boc foi provocada pela presença de ácido bromídrico gerado *in situ* decorrente da reação de *O*-demetilação.

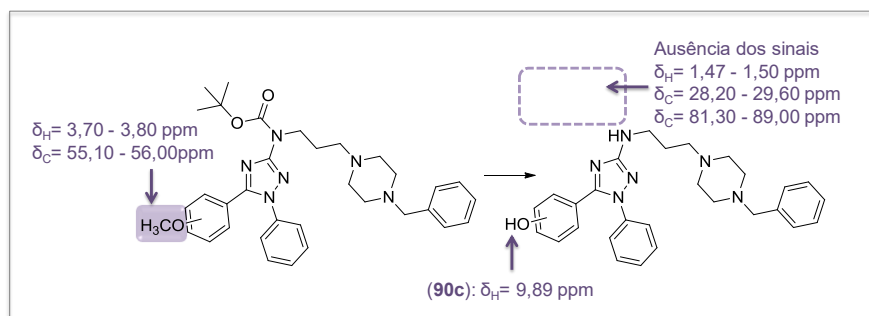
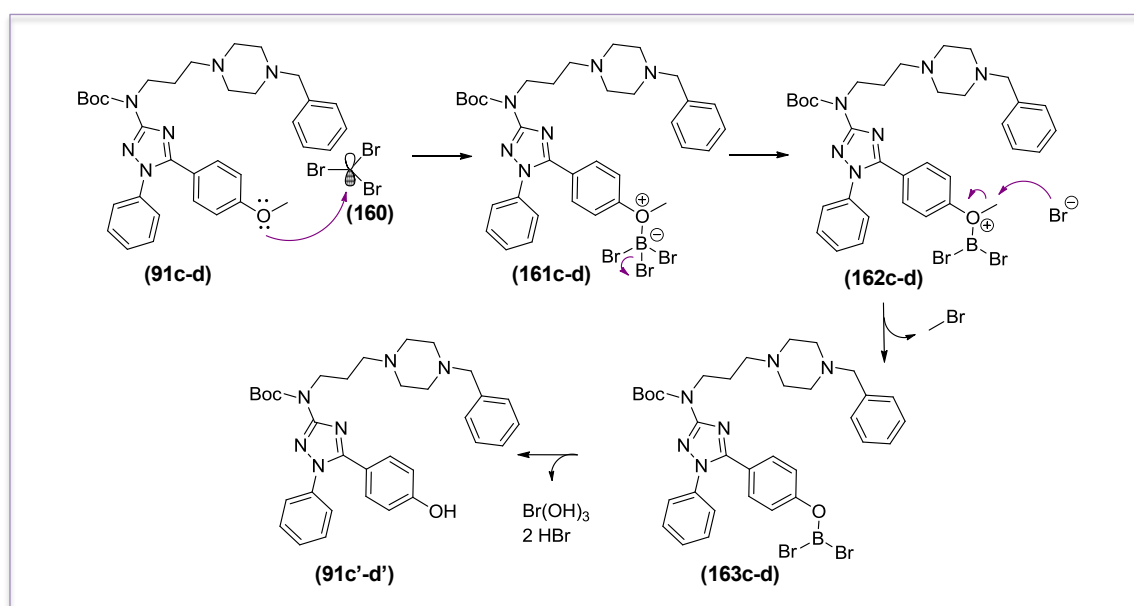


Figura 39: Atribuição comparativa dos principais sinais dos compostos 3-amino-propinil-piperazil-1,2,4-triazóis-*N*-Boc (**91b** e **91c**) e os 3-amino-propinil-piperazil-1,2,4-triazóis (**90b** e **90c**)

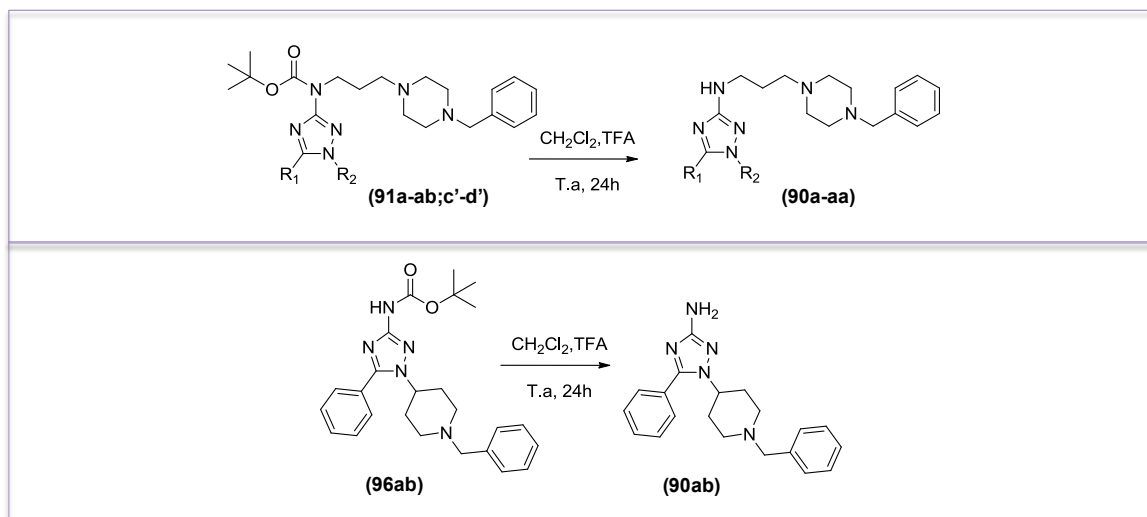
O mecanismo de *O*-demetilação é apresentado pelo esquema 26. Os compostos de boro trivalentes têm um orbital p vazio, por isso são muito eletrofílicos e possuem preferência por se ligarem com o oxigênio. Desse modo, a reação se inicia com o ataque do par de elétrons proveniente do oxigênio do éter (**91c-d**) ao orbital vazio do ácido Lewis BBr_3 (**160**), formando o intermediário (**161c-d**). Em seguida, ocorre a eliminação de um equivalente de brometo, originando o intermediário (**162c-d**) e levando a uma reação $\text{S}_{\text{N}}2$, no qual o brometo ataca o átomo de carbono metílico do intermediário (**162c-d**), formando o intermediário dibromo(organo)borano (**163c-d**). O dibromo(organo)borano sofre então hidrólise para gerar o composto (**91c'-d'**), tri-hidróxido de boro ($\text{B}(\text{OH})_3$) e ácido bromídrico (HBr) (CLAYDEN *et al*, 2001). A etapa mecanística referente a desproteção do grupo Boc é descrita detalhadamente na seção seguinte (3.12.)



Esquema 26: Esquema de intermediários para a obtenção dos 3-amino-propinil-piperazil-1,2,4-triazóis-*N*-Boc (**91c'-d'**) (Adaptado de CLAYDEN *et al*, 2001).

3.12. Síntese de 3-amino-propinil-piperazil-1,2,4-triazol (90a-ab)

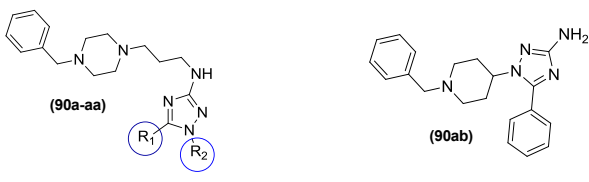
A última etapa sintética consistiu na reação de desproteção dos compostos 3-amino-propinil-piperazil-1,2,4-triazol N-Boc (**91a-z**; **96aa**) em meio ácido, para a obtenção dos 3-amino-propinil-piperazil-1,2,4-triazol (**90a-ab**) exceto (**90b-c**) (Esquema 27) (SANTOS *et al*, 2019).



Esquema 27: Reação de desproteção para a obtenção dos 3-amino-propinil-piperazil-1,2,4-triazóis (**89a**; **90a-ab**)

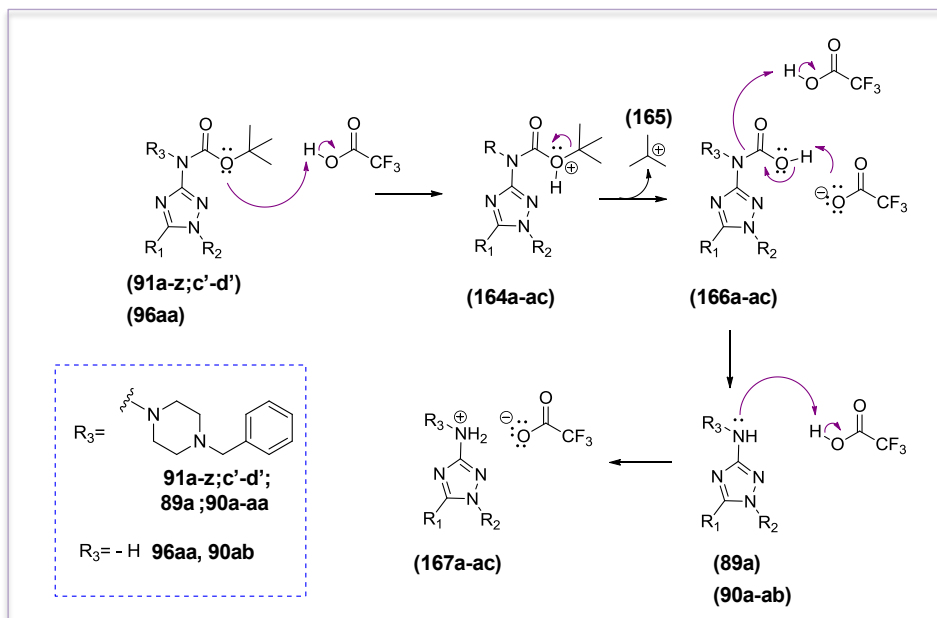
Os produtos foram isolados e, a maioria, obtidos como óleos de coloração castanha. Os demais se apresentaram na forma de sólidos, cujos pontos de fusão foram determinados e expostos na tabela abaixo. Os rendimentos reacionais foram considerados ótimos variando entre 85-96 % (Tabela 7). Entretanto, o composto **90q** não foi formado.

Tabela 8: Tabela de rendimentos reacionais, pontos de fusão e característica física dos 3-amino-propinil-piperazil-1,2,4-triazóis (**89a**; **90a-ab**)

					
Composto	R ₁	R ₂	Rendimento (%)	PF (C)	Aspecto
89a	Ph	Ph	94	-	Óleo castanho
90a	2-CH ₃ -Ph	Ph	95	128-133	Sólido branco
90b	2-OH-Ph	Ph	-	-	-
90c	4-OH-Ph	Ph	-	-	-
90d	2-OCH ₃ -Ph	Ph	89	-	Óleo castanho
90e	4-OCH ₃ -Ph	Ph	91	-	Óleo castanho
90f	3,4,5-triOCH ₃ -Ph	Ph	93	-	Óleo castanho
90g	Ph	4-F-Ph	90	56-60	Sólido bege
90h	2-Cl-Ph	Ph	91	76-79	Sólido bege
90i	3-Cl-Ph	Ph	93	147-149	Sólido bege
90j	4-Cl-Ph	Ph	96	90-95	Sólido bege
90k	3-Br-Ph	Ph	89	-	Óleo castanho
90l	4-Br-Ph	Ph	90	101-105	Sólido marrom
90m	Ph	4-SO ₂ CH ₃ -Ph	92	-	Óleo castanho
90n	3-NO ₂ -Ph	Ph	89	-	Óleo castanho
90o	4-NO ₂ -Ph	Ph	95	123-127	Sólido amarelo
90p	Ph	4-NO ₂ -Ph	96	172-176	Sólido amarelo
90q	4-CN-Ph	Ph	87	-	Óleo castanho
90r	2-piridina	Ph	93	-	Óleo castanho
90s	2-furano	Ph	91	-	Óleo castanho
90t	2-tiofeno	Ph	91	92-96	Sólido amarelo
90u	2-Naftila	Ph	86	-	Óleo castanho
90v	Bz	Ph	89	-	Óleo castanho
90w	Ph	Bz	92	-	Óleo castanho
90x	terc-butil	Bz	90	-	Óleo castanho
90y	2-OCH ₃ -Ph	Bz	80	-	Óleo castanho
90z	4-OCH ₃ -Ph	Bz	85	-	Óleo castanho
90aa	4-Cl-Ph	Bz	92	102-105	Sólido bege
90ab	Ph	Bz-piperidinil	90	76-105	Sólido bege

O mecanismo descrito para a desproteção do grupamento Boc se inicia com a protonação do oxigênio carboxílico (**96a**; **91a-z**; **c'-d'**), formando intermediário protonado (**164a-ac**). Em seguida o grupo terc-butil é eliminado como cátion (**165**), resultando na formação do ácido carbâmico (**166a-ac**). Posteriormente, o intermediário (**166a-ac**) sofre descarboxilação, levando à amina livre (**89a**; **90a-ab**). Entretanto, como a reação ocorre em condições ácidas, a amina é protonada (**167a-ac**), havendo a necessidade de neutralização da

reação ao fim do processo. Vale ressaltar que é importante executar a reação em sistema aberto, a fim de eliminar os gases formados (CO_2 e isobutileno), deslocando assim o equilíbrio da reação para o completo consumo dos reagentes.



Esquema 28: Esquema de intermediários para a obtenção dos 3-amino-propinil-piperazil-1,2,4-triazóis (**89a; 90a-ab**) (Adaptado de CLAYDEN *et al.*, 2001)

Para confirmar a formação dos 3-amino-propinil-piperazil-1,2,4-triazóis (**89a; 90a-ab**) foram realizados experimentos de determinação estrutural como RMN ^1H e ^{13}C (anexo 125 - 182). De forma representativa aos demais compostos finais da série dos 3-amino-propinil-piperazil-1,2,4-triazóis (**89a; 90a-ab**) ilustra-se as atribuições dos sinais de (**90o**), no qual se observa a manutenção dos sinais das subunidade benzilpiperazina e do biaril-1,2,4-triazol no espectros de RMN ^1H e $^{13}\text{C}/\text{DeptQ}$ (Figuras 41 e 42). E como o principal indício de formação dos compostos finais, se identifica a ausência do singlete referente às metilas em torno de 1,47- 1,50 ppm no espectros de RMN ^1H e dos sinais do carbono metílico entre 28,20-29,60 e dos quaternários entre 81,30-89,00 ppm 155,00-153,00 ppm e no espectros ^{13}C referentes ao grupamento Boc removido nesta etapa (Figuras 40, 41 e 42).

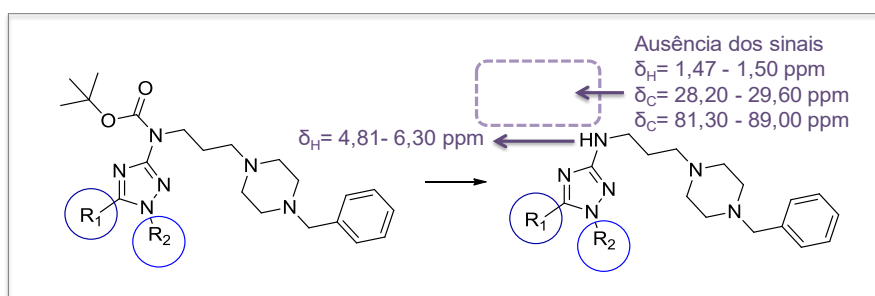


Figura 40: Atribuição comparativa dos principais sinais dos compostos 3-amino-propinil-piperazil-1,2,4-triazóis-*N*-Boc (**96a; 91a-z**) e os 3-amino-propinil-piperazil-1,2,4-triazóis (**89a; 90a-ab**)

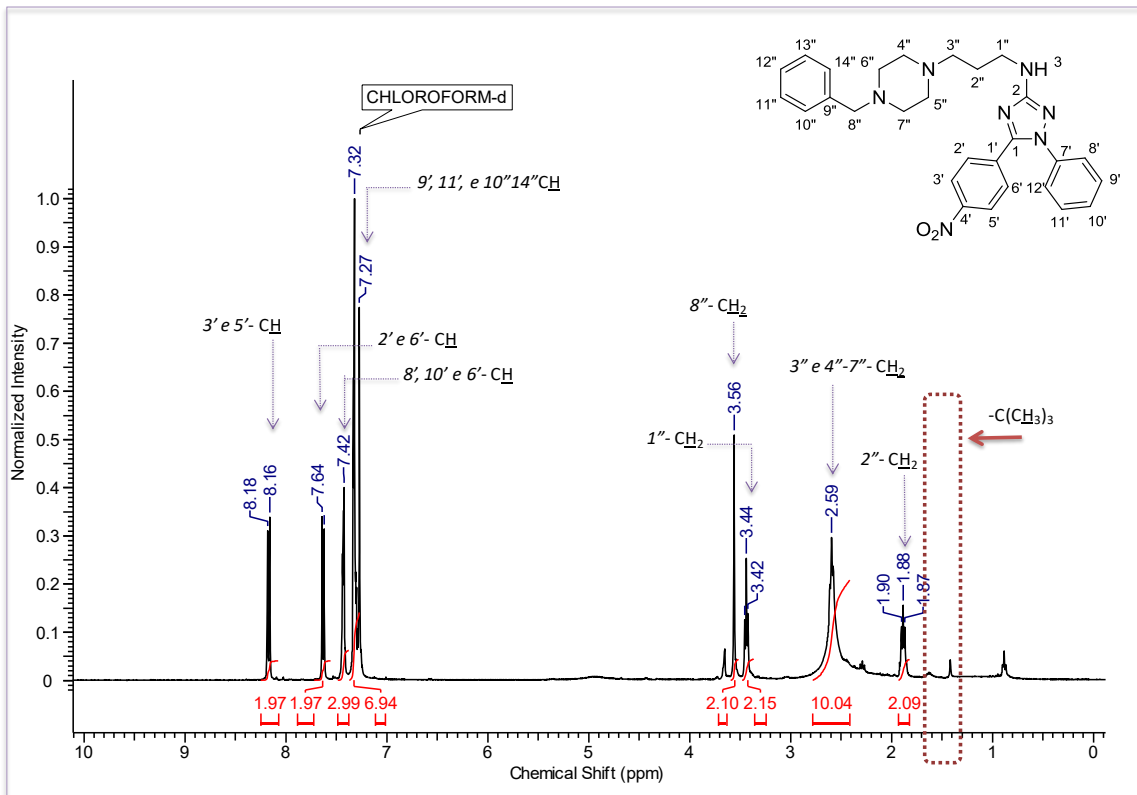


Figura 41: Espectro de RMN ^1H do composto *N*-acil-2-metil-isotiurêia-*N*-Boc (**981**). Setas lisas: sinais provenientes do produto de partida. Setas vermelhas: sinais novos resultado da formação do produto de interesse

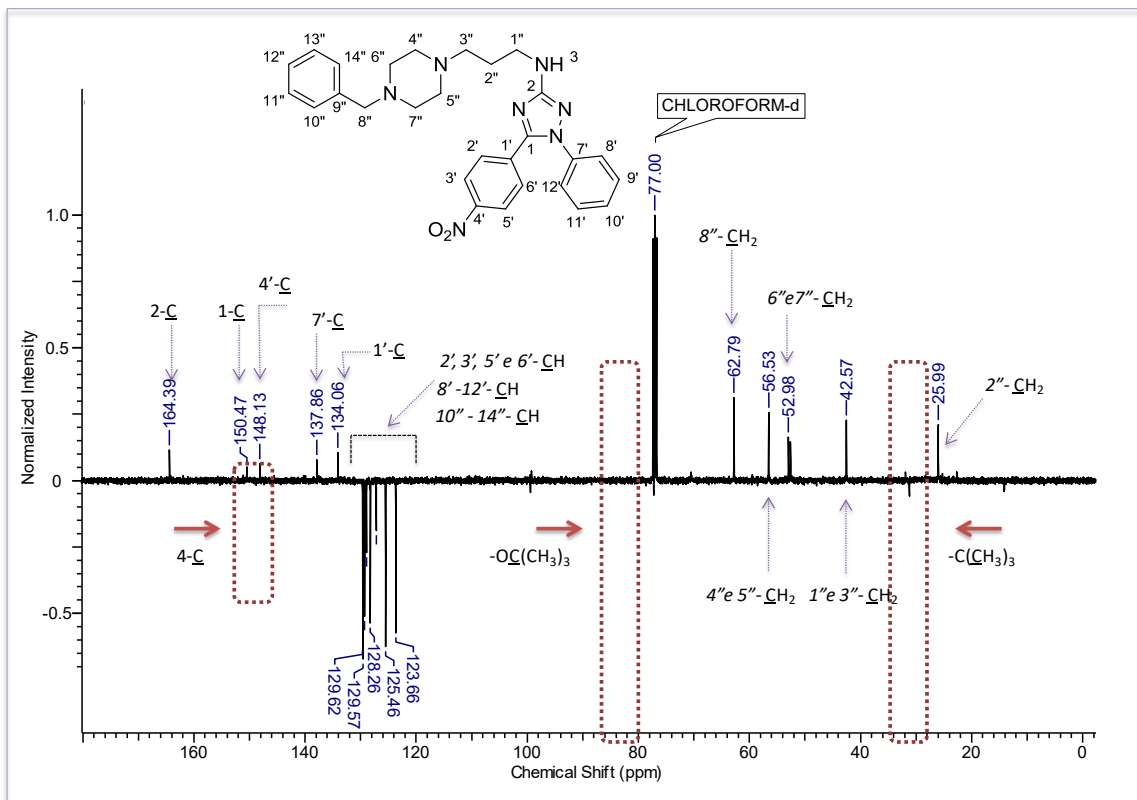
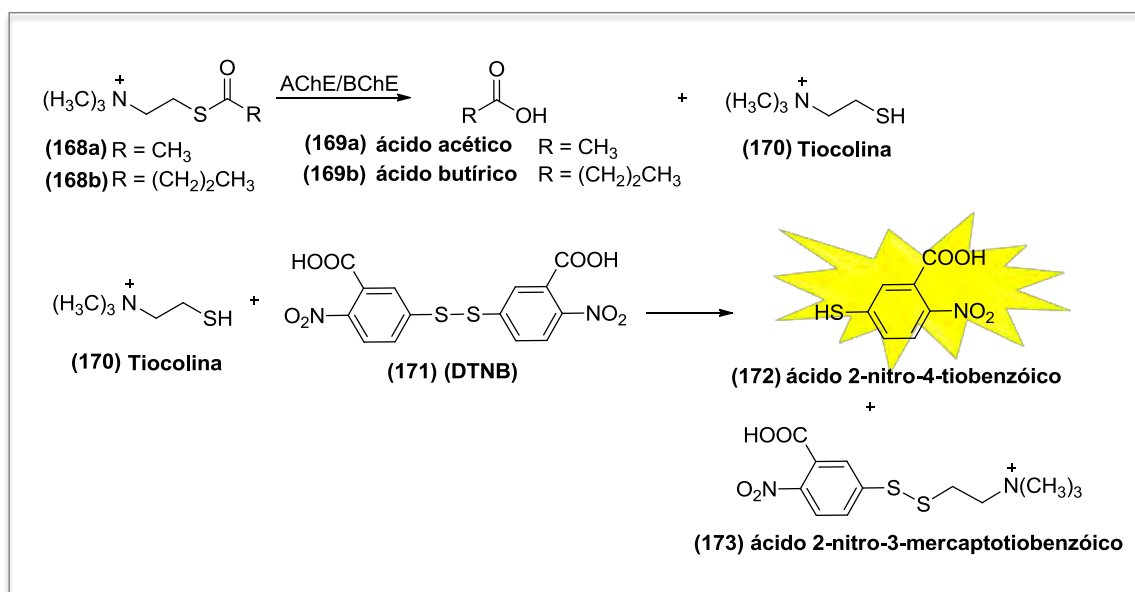


Figura 42: Espectro de RMN ^{13}C / DeptQ do composto *N*-acil-2-metil-isotiurêia-*N*-Boc (**981**). Setas lisas: sinais provenientes do produto de partida. Setas vermelhas: sinais novos resultado da formação do produto de interesse

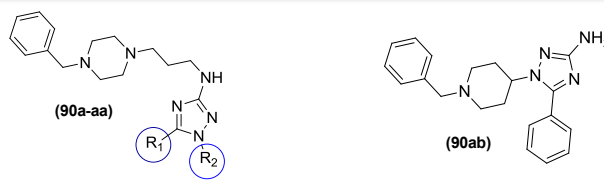
3.13. Avaliação *in vitro* da atividade anticolinesterásica dos derivados 3-amino-propinil-piperazil-1,2,4-triazol (90a-ab).

Os ensaios de inibição frente à AChE e BuChE, dos compostos (90a-ab) exceto (90q), foram realizados utilizando o método de Ellman (ELLMAN, 1961), tendo a donezepila como composto de referência. Este teste consiste na clivagem enzimática da acetiltiocolina (168a) ou butiriltiocolina (168b) promovida pela AChE ou BChE, levando a formação de ácido acético (169a) ou butírico (169b), respectivamente, e tiocolina (170). A tiocolina (170) é o marcador da atividade enzimática, que reage com o DTNB (171) e leva a formação do ácido 2-nitro-4-tiobenzóico (172) e do ácido 2-nitro-3-mercaptotiobenzóico (173). O produto (173) apresenta coloração amarela, a qual pode ser quantificada por medida da absorbância em um leitor de placas equipado com filtro de luz a $\lambda = 415$ nm. Desta forma, a atividade da enzima é medida de maneira indireta por meio da reação do produto de clivagem enzimática com um reagente pró-cromofórico (Esquema 29).



Todos os compostos testados apresentaram boas atividades inibitórias frente à AChE, exceto 90ab que não foi ativo. Nestes ensaios, o composto menos potente foi o 90z ($R_1 = 4\text{-MeOPh}$ e $R_2 = \text{Bz}$) o qual apresentou valor de $CI_{50} = 18,09 \mu\text{M}$ e o mais ativo foi o 90p ($R_1 = 4\text{-NO}_2\text{Ph}$ e $R_2 = \text{Ph}$), o qual apresentou valores de $CI_{50} = 0,3858 \mu\text{M}$. Os respectivos resultados de CI_{50} obtidos nos ensaios de inibição frente às colinesterases encontram-se na Tabela 8.

Tabela 9: Atividade anticolinesterásica dos derivados 3-amino-propinil-piperazil-1,2,4-triazol (**90a-ab**) e a donepezila (**5**)



Composto	R ₁	R ₂	CI ₅₀ (μM)		Dp ^a		IS
			AChE ^b	BChE ^b			
89a	Ph	Ph	1,14	0,031	1,79	0,060	1,57
90a	2-CH ₃ -Ph	Ph	3,110	0,205	4,1617	0,379	1,34
90b	2-OH-Ph	Ph	2,2493	0,214	1,297	0,092	0,58
90c	4-OH-Ph	Ph	1,857	0,022	7,807	0,490	4,20
90d	2-OCH ₃ -Ph	Ph	2,574	0,165	1,570	0,056	0,61
90e	4-OCH ₃ -Ph	Ph	1,683	0,117	11,48	0,561	6,82
90f	3,4,5-triOCH ₃ -Ph	Ph	1,369	0,128	10,241	0,279	7,48
90g	Ph	4-F-Ph	1,048	0,064	3,351	0,150	3,20
90h	2-Cl-Ph	Ph	1,759	0,114	4,952	0,466	2,82
90i	3-Cl-Ph	Ph	1,678	0,157	4,038	0,192	2,41
90j	4-Cl-Ph	Ph	2,163	0,112	8,213	0,571	3,80
90k	3-Br-Ph	Ph	2,549	0,142	4,121	0,146	1,62
90l	4-Br-Ph	Ph	2,195	0,163	5,684	0,081	2,59
90m	Ph	4-SO ₂ CH ₃ -Ph	0,664	0,030	20,173	0,454	30,38
90n	3-NO ₂ -Ph	Ph	0,412	0,011	6,483	0,264	15,74
90o	4-NO ₂ -Ph	Ph	0,555	0,048	12,450	0,374	22,43
90p	Ph	4-NO ₂ -Ph	0,386	0,022	2,069	0,171	5,36
90q	4-CN-Ph	Ph	-	-	-	-	-
90r	2-piridina	Ph	2,915	0,282	9,335	0,455	3,20
90s	2-furano	Ph	3,146	0,281	4,176	0,271	1,33
90t	2-tiofeno	Ph	2,370	0,173	3,258	0,205	1,37
90u	2-Naftila	Ph	1,289	0,128	0,635	0,025	0,49
90v	Bz	Ph	1,523	0,049	0,416	0,032	0,27
90w	Ph	Bz	2,359	0,215	0,766	0,043	0,32
90x	terc-butil	Bz	4,654	0,221	0,703	0,012	0,15
90y	2-OCH ₃ -Ph	Bz	17,757	0,887	2,294	0,134	0,13
90z	4-OCH ₃ -Ph	Bz	18,090	0,261	4,945	0,321	0,27
90aa	4-Cl-Ph	Bz	0,773	0,051	1,903	0,181	2,46
90ab	Ph	Bzpiperidinil	>500		88,233	0,591	-
Donepezila (5)			0,007	0,0002	2,39	0,105	341,43

^aConcentração necessária para inibir 50% da atividade colinesterásica, dados obtidos ± desvio padrão (DP) de triplicatas de ensaios independentes; ^bAChE de enguia elétrica; ^cBChE de soro equino; Índice de seletividade (IS) é dado como BuChE CI₅₀/AChE CI₅₀.

Ao analisar o perfil de inibição da AChE, foi identificado uma tendência entre os compostos (**90m-p**) contendo substituintes fortemente retiradores de elétron, os quais apresentaram um aumento de atividade inibitória muito expressivo, alcançando valores de CI₅₀ entre 0,386 a

0,664 μM , aproximadamente 3 vezes mais potentes e mais seletivo que o composto de referência sem substituintes (**89a**) (CI_{50} = 1,14 μM). Além, de serem mais ativos que o protótipo **53a** (CI_{50} = 4,23 μM , frente a AChE; CI_{50} = 13,3 μM frente a BuChE) e equiparáveis ao protótipo **54a** (CI_{50} = 0,30 μM , frente a AChE; CI_{50} = 1,84 μM frente a BuChE), entretanto mais seletivo.

Entretanto, apesar da avaliação de um grande número de compostos portando diferentes substituintes, de maneira geral foram observadas variações sutis entre as atividades inibitórias que ficaram na faixa de CI_{50} = 1 a 4 μM . Além disso, essa pequena influência dos substituintes avaliados frente a AChE sugere que a subunidade diarila esteja interagindo com o PAS, já que a este sítio é possui maior volume, podendo provavelmente comportar melhor os distintos substuintes. Essas alterações afetariam de forma muito mais expressiva os valores de atividade caso a subunidade diarila estivesse interagindo com o CAS, visto que a cavidade deste sítio possui um volume diminuto.

Entre os compostos (**90g-l**) portadores de substituintes fracamente retiradores de elétron não foi observado ganho de atividade inibitória frente a AChE em comparação ao protótipo sem substituinte, estes apresentaram atividade aproximadamente duas vezes menor que este (CI_{50} = 1,678 a 2,549 μM). Exceto o composto (**90g**) portando o substituinte 4-F-Ph em R_1 , que se apresentou equipotente ao protótipo (**89a**), exibindo atividade inibitória igual a CI_{50} = 1,04 μM . Dois fatores podem estar influenciando este resultado, o fato do flúor ser mais eletronegativo e/ou possuir menor volume que os demais halogênios.

Em relação aos compostos (**90a-f**) contendo substituintes fortemente doadores de elétrons, pode-se dizer que estes também não garantiram aumento da atividade inibitória (CI_{50} = 1,369 a 2,57 μM) em comparação ao composto de referência (**89a**). Também, verificou-se que substituintes na posição *orto* (**90b e 90d**) mostrou ser desfavorável ao comparar os mesmos substituintes em posição *para* (**90c e 90e**). Além disso, o composto (**90a**) portando o substituinte 2-MePh (CI_{50} = 3,11 μM), fracamente doador de elétrons, apresentou atividade inibitória três vezes menor que o protótipo.

Ao comparar os perfis de atividade inibitória dos anéis aromáticos (**90r-w**), observa-se que os heteroaromáticos apresentaram menores atividades que a fenila (**89a**) (CI_{50} = 2,371 a 3,146 μM). Todavia, os aromáticos que não possuíam heteroátomos inseridos no anel apresentaram atividade equiparáveis a fenila CI_{50} = (1,289 a 1,5227 μM), com exceção do composto **90w** (CI_{50} = 2,359 μM). Além do mais, a importância da presença do anel benzênico

para a atividade foi comprovada mediante ao resultado obtido a partir do composto **90x**, no qual a fenila foi substituída pelo grupamento terc-butil, e que foi responsável pela diminuição da atividade, dispondo de CI_{50} igual a 4,654 μM .

Todos os compostos avaliados frente à BChE mostraram boas atividades inibitórias, sendo o composto **90m** menos ativo ($R_1= 4\text{-Ph}$ e $R_2= 4\text{-SO}_2\text{CH}_3\text{-Ph}$) o qual apresentou valor de CI_{50} igual a 2,017 μM e o composto **90v** o mais ativo ($R_1= \text{Bz}$ e $R_2= \text{Ph}$), o qual apresentou valores de CI_{50} igual a 0,416 μM .

De maneira geral, ao analisar o perfil de atividade dos compostos frente à BChE não foi observado uma correlação clara entre a atividade inibitória e os efeitos eletrostáticos dos substituintes. Contudo, verificou-se que substituintes na posição *orto* (**90b e 90d**) foi bem tolerado entre os ativadores fortes do que em outras posições apresentando atividade inibitória igual a $CI_{50}= 1,29$ e 1,57 μM respectivamente.

Também foi constatado que substituintes com um carbono sp_3 diretamente ligado ao triazol, isto é, benzil e terc-butil, foram responsáveis por aumentar expressivamente a atividade de inibição, como verificado para os compostos **90v-x** ($CI_{50}= 0,416, 0,766$ e 0,704 μM respectivamente). Além disso, o composto **90v** contendo o grupo naftil ligado na posição beta resultou em ótima atividade inibitória frente à BChE o qual apresentou valores de CI_{50} igual a 0,634 μM .

Em decorrência dos ótimos resultados apresentados pelos compostos contendo o grupamento benzil (**90v-w**), foi sugerido a realização da síntese de uma série contendo o substituinte benzil em R_2 e 2-MeO, 4-MeO e 4-Cl em R_1 (**90y-aa**). Os resultados mostraram que a inserção de substituintes nesta série não foi favorável, já que apresentou menor atividade que os protótipos (**90v-w**), com valores de CI_{50} iguais a 2,29, 4,97 e 1,90 μM respectivamente.

A série benzilica (**90y-aa**) também foi avaliada frente a AChE, de modo que foi verificado um prejuízo significativo nas atividades inibitórias dos compostos com os substituintes 2-MeO e 4-MeO em R_1 (**90y-z**), que apresentaram valores de CI_{50} iguais a 17,75 e 18,09 μM respectivamente. Todavia, o composto **90aa** ($R_1= 4\text{-Ph}$ e $R_2= 4\text{-SO}_2\text{CH}_3\text{-Ph}$) exibiu aumento considerável da atividade inibitória, com CI_{50} igual a 0,773 μM , o que sugere que a extensão proveniente do carbono metilênico, bem como a adição do átomo de cloro, possibilitou o ganho de interação do tipo ligação de halogênio no sítio ativo. Desse modo

seria interessante explorar outros substituintes halogenados nesta série a fim de validar ou não a existência deste tipo de interação, assim como, analisar a influencia do volume dos átomos de halogênio para a interação com a enzima.

De modo geral, a série benzilica (**90y-aa**) se mostrou interessante, pois a partir da adição de substituintes é possível modular a atividade de inibição dos compostos, visto que a butiril não tolera substituinte, em contrapartida a acetil comporta substituintes halogenados.

Por fim, também foi avaliado o perfil de inibição frente à AChE e BChE do composto **90ab**, o qual possui o grupamento benzilpiperidina ligado diretamente ao triazol na posição 5. Como resultado, foi observado que este composto não apresentou atividade inibitória frente às enzimas colinesterases. Este resultado prova que a subunidade benzilpiperidina ligada diretamente ao triazol e vizinha ao grupamento aril prejudica o seu encaixe no sítio ativo das respectivas enzimas. Provavelmente este prejuízo está relacionado às restrições espaciais da enzima, o que sugere que o grupo benzilpiperidina é a subunidade responsável pela interação com o CAS, entretanto, em virtude do volume adicional conferido pelo anel benzênico vicinal, a entrada e passagem da benzilpiperidina pelo canal estreito até o CAS esteja impedida, causando essa perda abrupta de atividade. Este resultado não seria tão expressivo, se a subunidade benzilpiperidina intergisse com o PAS, já este sítio se encontrar mais próximo à face externa das enzimas colinesterases, ou seja, não promove uma restrição estérica tão impeditiva à interação.

Outro ponto que se soma a esta hipótese, é a diferença de atividade apresentada por cada enzima, a AChE obteve um CI_{50} maior que 500 μM , já para a BChE foi observado um valor de CI_{50} igual a 80 μM , este resultado reflete na largura do canal destas enzimas, como o canal da BChE é mais largo devido a presença de resíduos alquílicos, possivelmente, o grupo benzilpiperidina consegue alcançar um pouco mais o CAS do que alcançaria frente a AChE que possui um canal mais estreito devido a existência de resíduos aromáticos, gerando uma maior restrição e consequentemente, um maior prejuízo à interação.

3.14. Estudo do mecanismo de inibição enzimática dos derivados 3-amino-propinil-piperazil-1,2,4-triazol

Os inibidores das enzimas são compostos capazes de diminuir ou interromper a catálise enzimática. Existem dois tipos de inibidores, os reversíveis e os irreversíveis, cuja diferença básica está na estabilidade gerada pela ligação entre o complexo enzima-substrato

(ES): os irreversíveis conduzem à inativação total da enzima, geralmente por formação de ligações covalentes; já os reversíveis levam a formação de um complexo dinâmico com a enzima. Os inibidores reversíveis podem ser classificados como competitivo, incompetitivo, não-competitivo e misto, de acordo com o seu mecanismo de inibição. A avaliação do mecanismo de inibição pode ser feita quantitativamente pela cinética do estado estacionário, a partir do efeito que o inibidor produz nas constantes cinéticas K_m e $V_{m\acute{a}x}$, facilmente reveladas no gráfico de duplo recíproco, também denominado gráfico de Lineweaver-Burk (Figura 33) (NELSON, 2018).

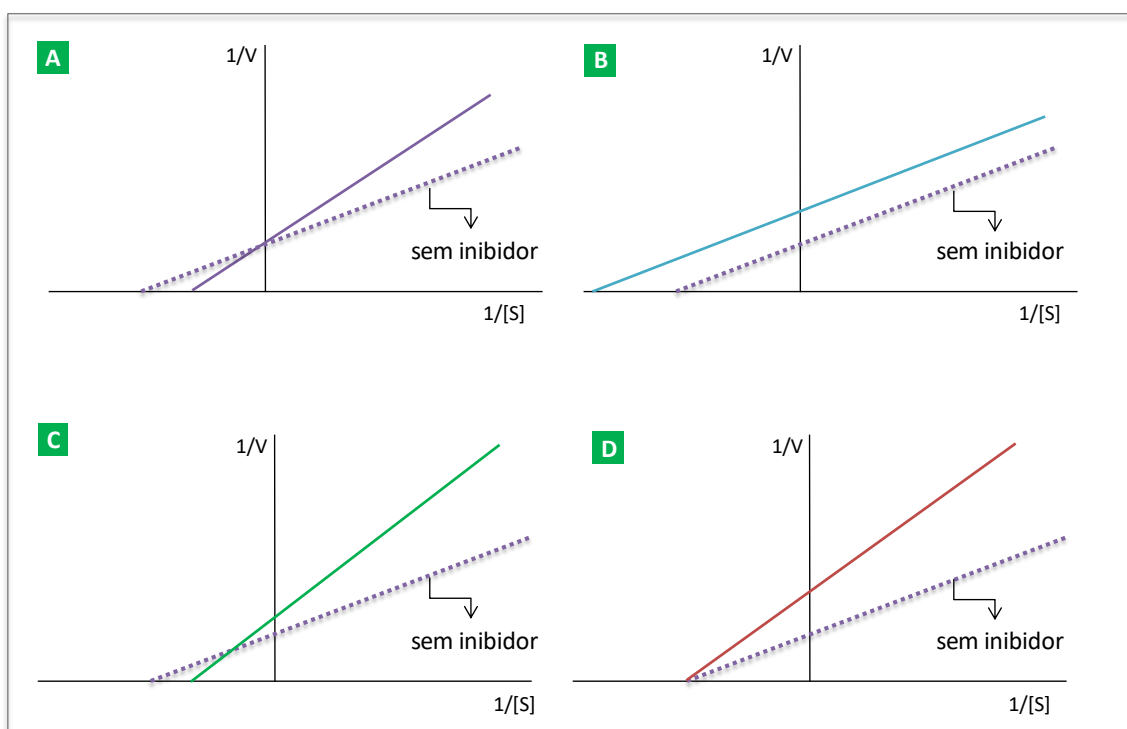


Figura 43: Perfil do gráfico de Lineweaver-Burk apresentado por cada inibição enzimática. A) Competitiva; B) Incompetitiva; C) Mista; D) Não-competitiva.

A inibição competitiva é aquela em que o inibidor compete com o substrato pelo sítio catalítico da enzima, formando um complexo enzima-inibidor (EI) que é semelhante ao complexo enzima-substrato (ES), através da qual observa-se um aumento dos valores de K_m enquanto $V_{m\acute{a}x}$ se mantém constante (Figura 43-A). Os inibidores incompetitivos ligam-se somente ao complexo ES, em um sítio originado mediante a alteração conformacional da enzima, promovida pela ligação com o substrato, formando o complexo ternário ESI. Neste caso, tanto K_m quanto $V_{m\acute{a}x}$ são reduzidos na presença do inibidor (Figura 43-B) (NELSON, 2018). Já os inibidores misto ligam-se à enzima tanto nos sítios que participam na ligação ao substrato como também aos sítios que participam da catálise, identificada pela diminuição do

$V_{m\acute{a}x}$, e aumento do K_m (Figura 43-C) (VOET & VOET, 2013). A inibição n\~{a}o-competitiva \~{e} um caso particular da inibição mista, na qual o inibidor liga-se reversivelmente a um s\~{i}tio alost\~{e}rico da enzima, que n\~{a}o o s\~{i}tio ativo, podendo estar ligado ou n\~{a}o ao mesmo tempo que o substrato, caracterizada pela diminuição dos valores de $V_{m\acute{a}x}$ enquanto K_m se mant\~{e}m constante (Figura 43-D) (CAMPOS, 1999; BERG et al., 2002).

Com o intuito de compreender o tipo de inibição promovida pelos compostos testados frente \~{a}s colinesterases, realizaram-se ensaios de cin\~{e}tica enzim\~{a}tica em ambas as enzimas para tr\~{e}s dos compostos sintetizados (**90m**, **90p** e **90w**). A seleç\~{a}o dos compostos **90m** e **90p** ocorreu por estes apresentarem \~{o}timas atividades inibit\~{o}rias em frente \~{a} AChE e BuChE respectivamente. J\~{a} o composto **90w** foi selecionado por apresentar a maior seletividade para a AChE.

A cin\~{e}tica enzim\~{a}tica foi realizada segundo o m\~{e}todo de Ellman j\~{a} descrito anteriormente (ELLMAN, 1961). A velocidade m\~{a}xima da enzima, a constante de Michaelis-Menten (K_m), e conseq\~{u}entemente, o gr\~{a}fico de Lineweaver-Burk ($1/V^o$ em funç\~{a}o de $1/[S]$) foram obtidos a partir do programa GraphPad Prism.

Sendo assim, atrav\~{e}s dos valores das constantes cin\~{e}ticas e do perfil do gr\~{a}fico de Lineweaver-Burk foi observado para os tr\~{e}s compostos (**90m**, **90p** e **90w**) a diminuição do $V_{m\acute{a}x}$, e aumento do K_m para ambas as enzimas (Tabela 9 e Gr\~{a}fico 3-9). Esse padr\~{a}o característico indica um tipo misto de inibição que reflete a interaç\~{a}o dos compostos (**90m**, **90p** e **90w**) tanto com o CAS (inibição competitiva) quanto com o PAS (inibição n\~{a}o-competitiva) das enzimas AChE e BuChE. Desde modo, estes compostos al\~{e}m de afetarem a atividade catal\~{i}tica de degradação da ACh via inibição do CAS, estes resultados representam um indicativo que tais compostos podem inibir a formaç\~{a}o de A β mediante a inibição do PAS da AChE, visto que este s\~{i}tio foi descrito como sendo capaz de interagir com o pept\~{i}deo A β via triptofano 279 para forma complexo est\~{a}vel que inicia a fibrilog\~{e}nese da A β (INESTROSA *et al*, 2000).

Tabela 10: Parâmetros cinéticos de **90m**, **90p** e **90w** em AChE e BChE.

Concentração (μM)	$V_{\text{máx}} \pm \text{DP}$ ($1 \times 10^3 \text{ nM/min}$)	$K_m \pm \text{DP}$ ($1 \times 10^3 \text{ nM}$)	$K_i \text{ (nM)} \pm \text{DP}^a$	$K_i' \text{ (nM)} \pm \text{DP}^b$
Composto 90m em AChE				
0	$6,56 \pm 0,322$	$53,64 \pm 4,850$		
0,5	$3,24 \pm 0,112$	$106,49 \pm 6,779$	$0,07 \pm 0,002$	$0,28 \pm 0,008$
0,8	$2,24 \pm 0,149$	$107,10 \pm 7,495$		
Composto 90m em BuChE				
0	$5,70 \pm 0,098$	$95,61 \pm 3,029$		
18	$3,75 \pm 0,171$	$164,15 \pm 4,72$	$6,15 \pm 0,082$	$16,41 \pm 0,210$
22	$3,18 \pm 0,167$	$196,45 \pm 15,061$		
Composto 90p em AChE				
0	$5,89 \pm 0,3279$	$40,19 \pm 3,260$		
0,3	$5,67 \pm 0,0007$	$76,66 \pm 2,305$	$0,07 \pm 0,002$	$0,35 \pm 0,006$
0,5	$4,36 \pm 0,1537$	$80,91 \pm 6,498$		
Composto 90p em BuChE				
0	$6,83 \pm 0,358$	$85,88 \pm 3,599$		
1	$6,02 \pm 0,197$	$124,55 \pm 6,010$	$1,79 \pm 0,127$	$4,79 \pm 0,315$
3	$5,88 \pm 0,226$	$172,05 \pm 1,061$		
Composto 90w em AChE				
0	$7,16 \pm 0,144$	$57,76 \pm 2,721$		
1,4	$5,00 \pm 0,210$	$67,13 \pm 0,757$	$0,67 \pm 0,017$	$2,51 \pm 0,052$
3,4	$3,50 \pm 0,147$	$89,93 \pm 5,380$		
Composto 90w em BuChE				
0	$5,23 \pm 0,066$	$101,61 \pm 3,946$		
0,7	$3,43 \pm 0,204$	$256,35 \pm 5,869$	$0,16 \pm 0,002$	$0,42 \pm 0,005$
0,9	$2,62 \pm 0,193$	$271,90 \pm 11,748$		

Constante de afinidade para inibição competitiva; ^b Constante de afinidade para inibição não-competitiva; Dados obtidos \pm desvio padrão (DP) de triplicatas de ensaios independentes.

Como os compostos atuam através de inibição mista, foi calculado, para cada composto, as constantes de afinidade K_i (inibição competitiva) e K_i' (inibição não-competitiva) que expressam o grau de interação entre os respectivos compostos e cada sítio (CAS e PAS respectivamente) das enzimas colinesterases em questão, numericamente, significa que quanto menor o valor, maior a interação inibidores e enzima.

Primeiramente, a maior seletividade do composto **90m** frente a AChE, foi comprovada através da comparação das constantes de inibição obtidas para cada enzimas, onde observou-se que a constantes de inibição competitiva (K_i) foi 87,85 vezes menor para AChE ($K_i = 0,07\mu\text{M}$) do que para a BuChE ($K_i = 6,15 \mu\text{M}$), e a constantes de inibição não-competitiva

(K_i) foi 58,60 vezes menor para AChE ($K_i = 0,28\mu\text{M}$) do que para a BuChE ($K_i = 16,41\mu\text{M}$), mostrando maior afinidade do composto **90m** frente a AChE em ambos os sítios (CAS e PAS) do que na BuChE, entretanto com maior contribuição da inibição competitiva. Tal resultado ratifica os resultados obtidos pela atividade inibitória, no qual o composto **90m** é mais seletivo para a BuChE. Também, foi possível observar que as interações no CAS contribuem de modo mais expressivo para a atividade inibitória da AChE, visto que o compostos **90m** apresentou valor de K_i menor que K_i' ($K_{i\text{BuChE}}$ 2,62 vezes menor que $K_{i'\text{BuChE}}$), o que indica que o composto **90m** tem maior afinidade no CAS do que o PAS da AChE.

Gráfico 3: Gráficos de Lineweaver-Burk da cinética de inibição em EeAChE do composto **90w**.

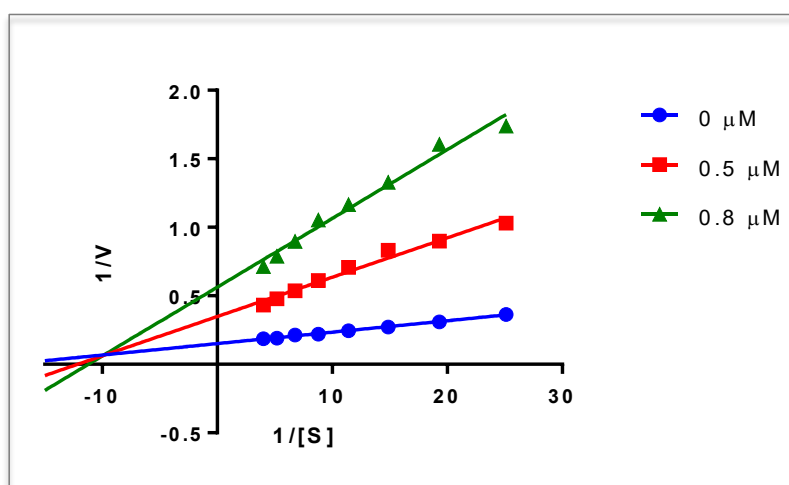
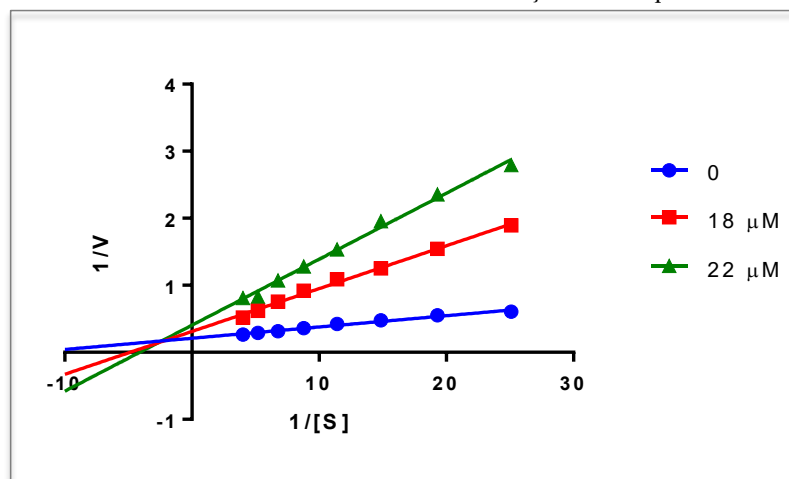


Gráfico 4: Gráficos de Lineweaver-Burk da cinética de inibição em e EqBChE do composto **90w**.



Ao comparar os valores obtidos das constantes de afinidade, K_i e K_i' do composto **90p** frente a cada enzima, observa-se que estas constantes foram aproximadamente de 2,5 a 5 vezes menores para AChE ($K_i = 0,07\mu\text{M}$; $K_i' = 0,35\mu\text{M}$) que para BuChE ($K_i = 1,79\mu\text{M}$; $K_i' = 4,79\mu\text{M}$). Ou seja, os menores valores das constantes de afinidade apresentado, tanto

para a inibição do tipo competitiva (K_i) quanto para a não-competitiva (K_i'), evidenciam uma maior afinidade do composto **90p** frente a AChE em ambos os sítios (CAS e PAS), e conseqüentemente, maior atividade inibitória em AChE do que em BChE, o que corroboram com os dados obtidos pela atividade de inibição, no qual o composto **90p** é mais seletivo para a AChE. Ademais, foi constatado que as interações existentes no CAS auxiliam de modo mais significativo para a atividade inibitória, já que o valores de K_i é menor do que K_i' para AChE (K_i foi 5 vezes menor que K_i'), indicando que o composto **90p** tem maior afinidade no CAS do que o PAS AChE.

Gráfico 5: Gráficos de Lineweaver-Burk da cinética de inibição em EeAChE do composto **90p**.

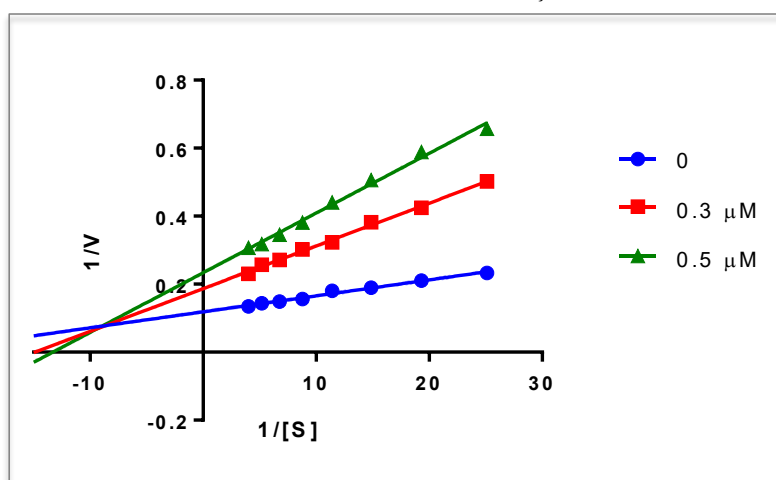
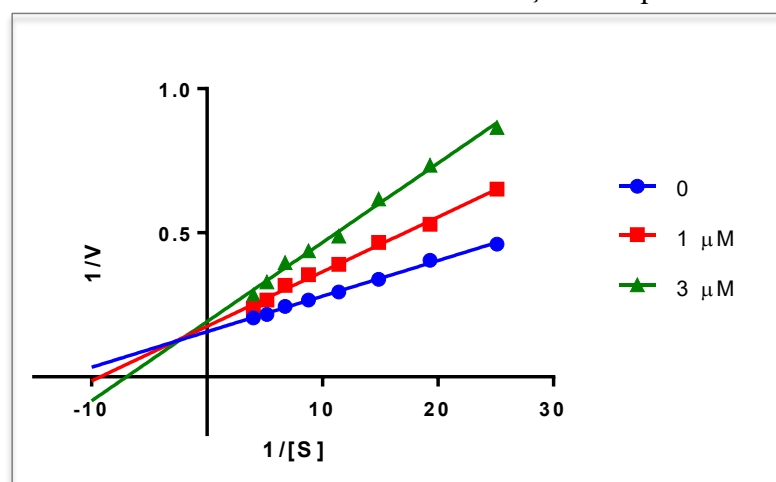


Gráfico 6: Gráficos de Lineweaver-Burk da cinética de inibição em EqBChE do composto **90p**.



Por fim, para o composto **90w**, quando comparamos os valores de suas constantes de inibição competitiva (K_i) e não-competitiva (K_i') de cada enzimas, observa-se que estas foram aproximadamente 5 vezes menores para BChE ($K_i = 0,16 \mu\text{M}$; $K_i' = 0,42 \mu\text{M}$) do que para a AChE ($K_i = 0,67 \mu\text{M}$; $K_i' = 2,51 \mu\text{M}$), mostrando maior afinidade do composto **90w**

frente a BuChE em ambos os sítios (CAS e PAS), logo, maior atividade inibitória em BuChE do que em AChE, o que ratifica os resultados obtidos pela atividade inibitória, no qual o composto **90w** é mais seletivo para a BuChE. Além do mais, foi possível observar que as interações no CAS contribuem de modo mais expressivo para a atividade inibitória da BuChE, visto que o composto **90p** apresentou valor de K_i menor que K_i' (K_i 2,62 vezes menor que K_i'), o que indica que o composto **90w** tem maior afinidade no CAS do que o PAS da BChE.

Gráfico 7: Gráficos de Lineweaver-Burk da cinética de inibição em EeAChE do composto **90m**.

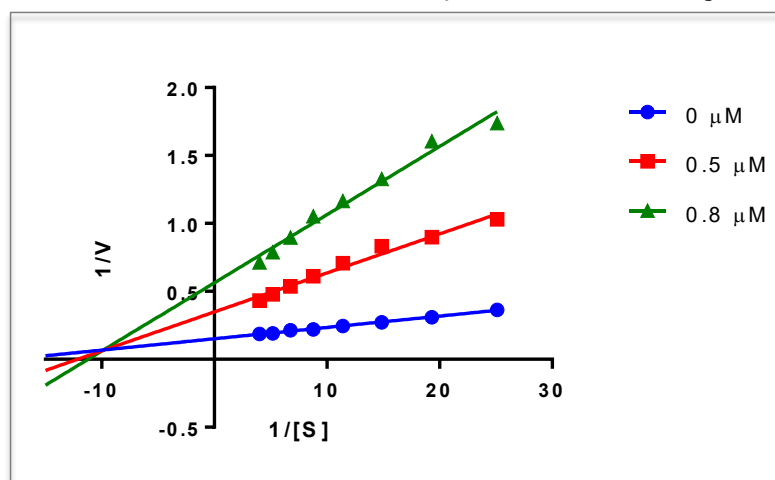
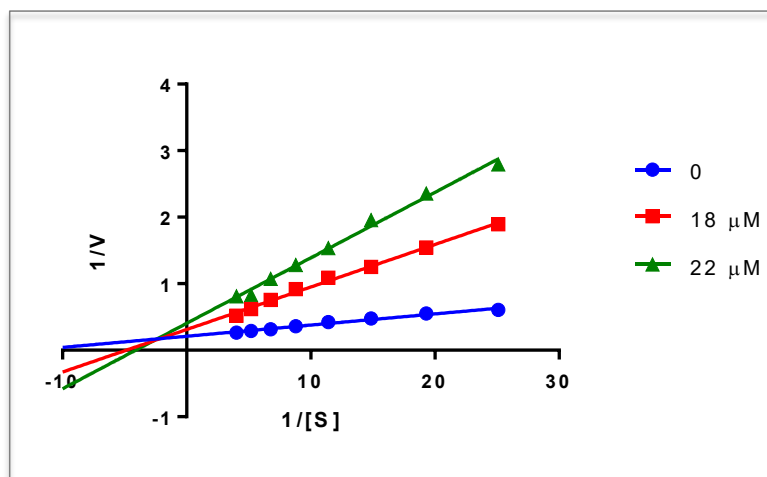


Gráfico 8: Gráficos de Lineweaver-Burk da cinética de inibição em EqBChE do composto **90m**.



3.15. Estudo de interação enzimática *in silico* dos derivados 3-amino-propinil-piperazil-1,2,4-triazol

As colinesterases possuem dois locais de ligação conhecidos: o CAS, onde as enzimas hidrolisam seus substratos; e o PAS, ambos localizados nas extremidades de um longo canal

no sítio ativo destas enzimas. Ambos os locais foram explorados no estudo de ancoragem, para determinar como ocorre a interação desses compostos no sítio ativo da AChE.

Para a realização do estudo de ancoramento molecular (*docking*) foi empregada a metodologia descrita na literatura por Santos *et. al.* na qual foi realizada a previsão da interação de derivados diaril-3-amino-1,2,4- triazóis (**89a-d**) com a enzima AChE a partir do programa GOLD 5.6 (CCDC Software Ltd., Cambridge, UK) e a estrutura cristalográfica da AChE de enguia elétrica (*Electrophorus electricus*) (EeAChE) obtida no banco de dados de proteínas (PDB, do inglês *Protein Data Bank*) de código 1CB2 e resolução de 4,5 Å. Ademais, foram utilizados o raio de ligação a 15 Å em torno de átomo de oxigênio do resíduo da serina 203 e a função Goldscore e para a previsão da interação dos compostos com a EeAChE.

No programa GOLD, as funções de encaixe produzem valores de *scores* que são valores adimensionais, entendidas como “pontuações de aptidão”. A pontuação de cada pose identificada é calculada como o negativo da soma de uma série de termos de energia envolvidos no processo de interação proteína-ligante, para que quanto mais positiva a pontuação, melhor a interação. Os valores de *scores* são um guia de quão boa é a posição do ancoramento, o que significa que uma pontuação mais alta indica uma melhor interação entre o ligando e o local de ligação.

Então, os compostos triazólicos (**89a**, **90a-ab**) foram previamente tratados, através da minimização de energia via método semi-empírico PM6, considerando suas respectivas formas catiônicas, visto que em meio biológico (pH=7), estes encontram-se protonados.

Após o ancoramento molecular dos compostos (**89a**, **90a-ab**) no sítio ativo da EeAChE, os resultados exibiram os compostos ancorados com a subunidade diaril voltada para o interior da cavidade enzimática, isto é, no CAS, tendo como interação principal, a cátion π entre o resíduo triptofano 86 e a fenila. E também, da subunidade benzilpiperazina interagindo na face externa da EeAChE, isto é, no PAS, através de uma π - π com o triptofano 286 e um dos anéis benzênico ligado ao triazol (Figura 44). Os resultados deste modelo também estabeleceram o valor de score para o protótipo **89a** ($R_1 = \text{Ph}$ e $R_2 = \text{Ph}$) igual a 74,43, bem como o composto **90v** e **y-z** apresentando as melhores interações, o que contrasta com o resultado do ensaio enzimático, no qual **90y-z** apresentam as piores atividades inibitórias frente à EeAChE. Segundo este modelo, os compostos com piores interações estão **90o-p**, com valores de score iguais a 78,32 e 78,63 respectivamente, surpreendentemente, estes

compostos foram os mais ativos nos ensaios enzimáticos. Assim sendo, ficou evidente que tal metodologia não foi capaz de prever o modo de interação composto-enzima.

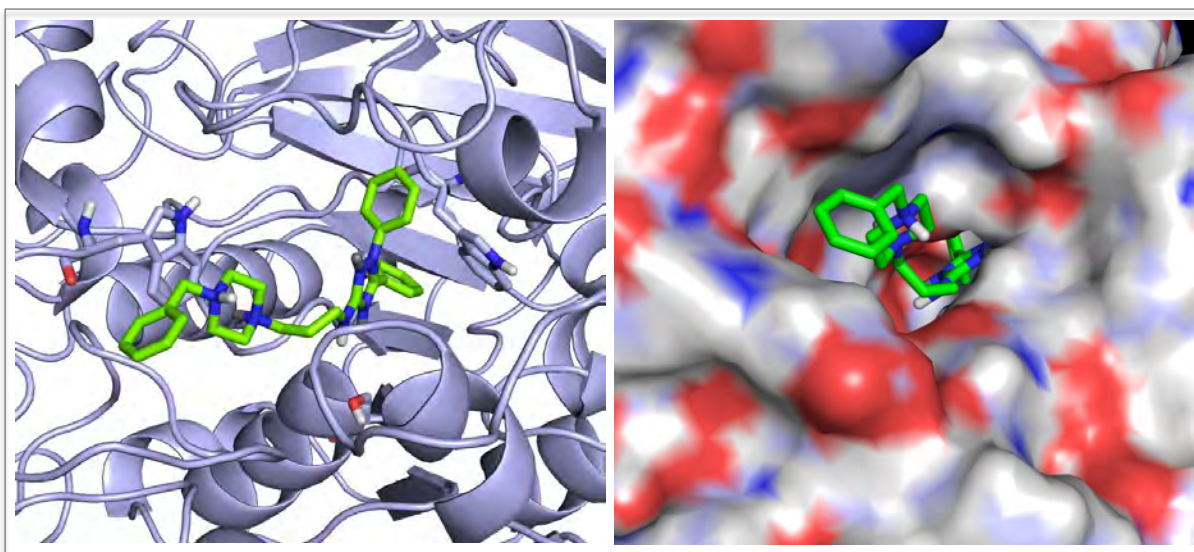


Figura 44: Análise da posição de encaixe do composto **89a**, destaque em verde, na cavidade enzimática da EeAChE (PDB 1C2B) à esquerda. Análise da posição de ancoramento do composto **89a** em verde na cavidade de acesso ao sítio catalítico da EeAChE a partir da superfície hidrofóbica. Figura gerada com PyMol 1.7.x (DeLano Scientific LLC).

Neste contexto, foram avaliadas as demais estruturas cristalográficas da EeAChE disponíveis no PDB (1CO2 e 1EEA), utilizando a função Goldscore e o raio de ligação a 15 e 20 Å em torno de átomo de oxigênio do resíduo de serina presente no CAS. Entretanto, ao analisar as poses obtidas nestes novos ensaios, constatou-se que ambos, exibiram os compostos ancorados com a subunidade diaril interagindo com o CAS e a subunidade benzilpiperazina interagindo com o PAS assim como o modelo anterior (Figura 45).

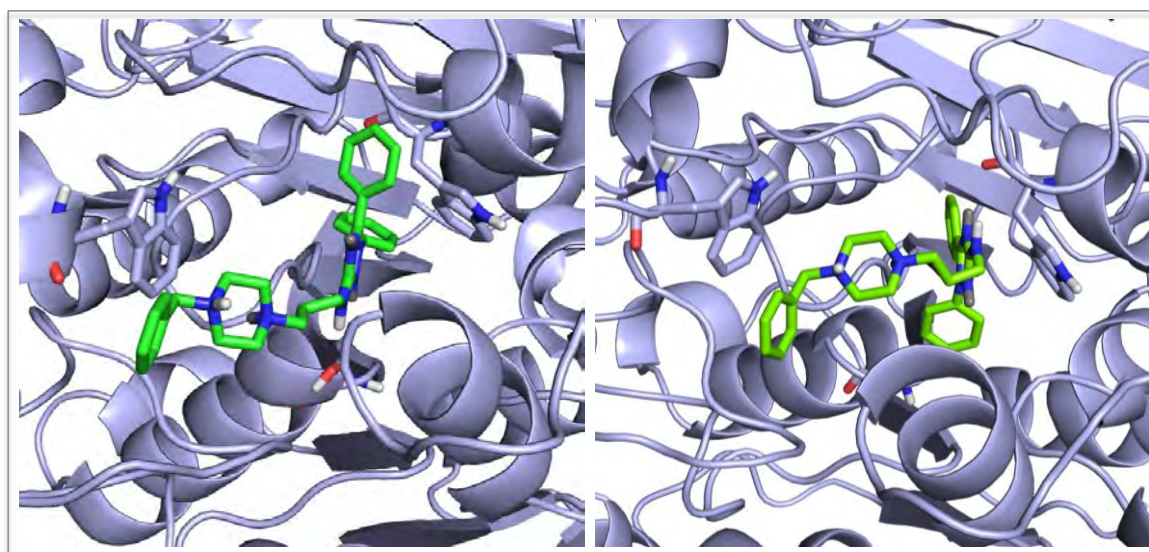


Figura 45: Análise da posição de encaixe do composto **89a**, destaque em verde, na cavidade enzimática da EeAChE (PDB 1C2O) à esquerda; e na cavidade enzimática da EeAChE (PDB 1EEA) à direita. Figura gerada com PyMol 1.7.x (DeLano Scientific LLC).

Ponderando essa discordância, acredita-se que o modo de interação seja oposto ao observado pelo método de ancoramento obtidos com os cristais de para a EeAChE, ou seja subunidade diáril voltada para fora e benzilpiperazina para dentro. Como observado nos ensaios enzimáticos (Seção 3.13), a maioria dos substituintes avaliados geraram pequena influência sobre as atividades inibitória frente a AChE, o que indicou que a subunidade diáril esteja voltada para a fase externa da enzima, mais ampla, capaz de comportar melhor os variados substituintes. Outra evidência trata-se da perda de atividade do composto **90ab**, provavelmente em função da impossibilidade da passagem da subunidade benzilpiperazina pelo canal estreito da AChE, decorrente ao volume adicional do anel benzênico vicinal, que faz supor que a interação da subunidade benzilpiperazina e com CAS seja essencial para atividade, assim como ocorre com a donepezila (**5**),

Provavelmente essa tendência de interação inversão da posição de interação dos compostos no sítio ativo das enzimas esteja relacionada com o dinamismo característicos das enzimas. Ou seja, no momento da formação do cristal, tal enzima adquiriu determinada conformação, o que propiciou um canal mais largo, o que possibilitou o encaixe do composto volumoso ao CAS ao passar pelo canal estreito da EeAChE. Esta questão poderia ser resolvida a partir de experimentos de ancoramento que fossem capazes de reproduzir a flexibilidade da enzima, que leva no encaixe induzido dos substratos. Estes experimentos baseiam-se em cálculo semi-empíricos, entretanto possuem um custo computacional mais elevado.

Um levantamento na literatura revelou o estudo *in silico* de Shidore e colaboradores (SHIDORE *et al*, 2016), no qual é descrito o modo de interação de diárltriazois, estruturalmente muito semelhante aos diárltriazois estudados neste trabalho. Os autores utilizaram o programa Maestro 9.0. (Schrödinger Software, LLC, New York, NY, USA) e a estrutura cristalográfica da AChE humana (hAChE) co-cristalizada com o donepezil, obtida no PDB com código 4EY7 e resolução de 2,35 Å, considerando o ligante para formar a grade no sítio ativo. Neste estudo, os autores descreveram, as subunidades diárltriazois e benzilpiperidina interagindo com o PAS (externo) e CAS (interno) da AChE, respectivamente, semelhante ao modo de interação do donepezil, que se liga através do grupo benzilpiperidina ao CAS e a subunidade dimetoxiindanona ao PAS.

Mesmo AChE humana não sendo a mesma enzima empregada nos ensaios de atividade (Seção 3.13), decidiu-se utilizá-la pois uma análise no visual do sítio ativo através

da sobreposição das enzimas no programa PyMol mostrou serem bastante semelhantes (Figura 46 e 47).

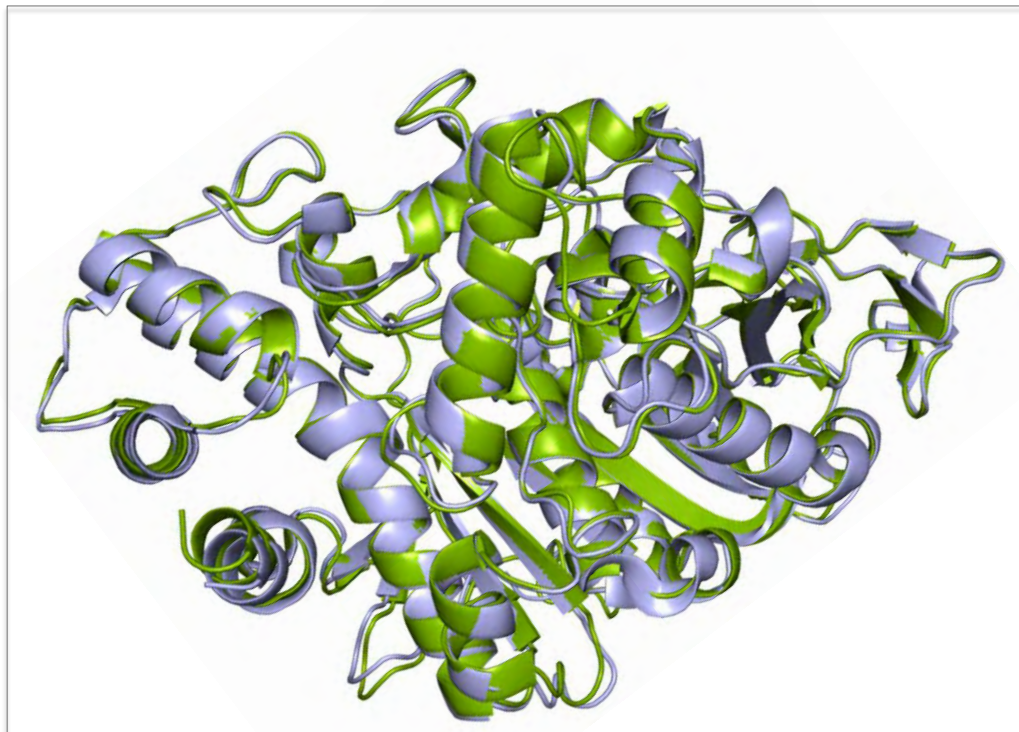


Figura 46: Sobreposição do sítio ativos das enzimas hAChE (PDB 4EY7) em lilás e enzimas EeAChE (PDB 1C2B) em verde. Figura gerada com PyMol 1.7.x (DeLano Scientific LLC).

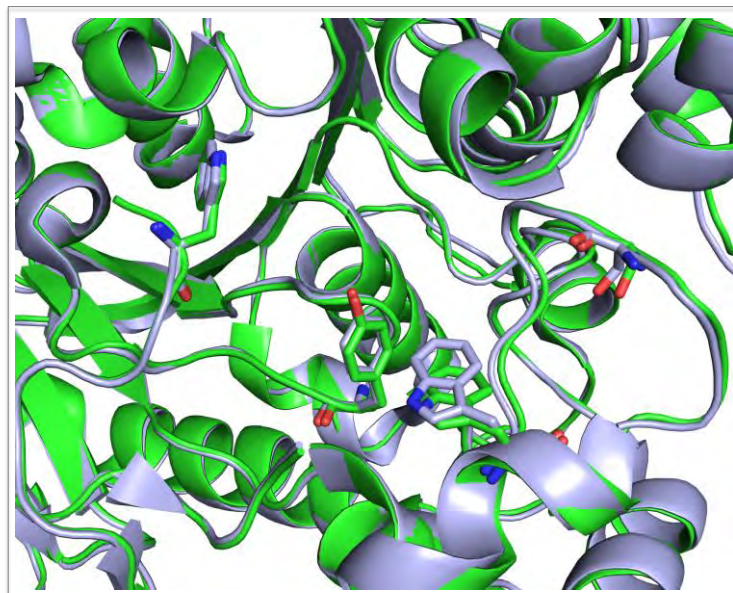


Figura 47: Análise da sobreposição do sítio ativos das enzimas hAChE (PDB 4EY7) em lilás e enzimas EeAChE (PDB 1C2B) em verde. Figura gerada com PyMol 1.7.x (DeLano Scientific LLC).

Entretanto como o artigo de referência utilizava o programa Maestro 9.0. para o ancoramento, diferente do programa disponível para este estudo, foi realizado inicialmente a

validação do método, a partir do ancoramento do composto **54a** relatado no experimento de Shidore *et al.* para saber se este era reproduzível no programa programa GOLD 5.6.

Inicialmente, foi realizado os experimentos de *redocking* do ligante co-cristalizado no sítio ativo da hAChE, a fim de selecionar a função de pontuação que melhor prever as interações no sítio ativo em questão. Sendo assim, os valores obtidos de RMSD para cada função de pontuação muito bons, menores que 1, sendo o menor valor, igual à 0,32 Å, oriundo da função GoldScore. Deste modo esta função foi escolhida para ser utilizada no experimento de ancoragem dos compostos triazólicos

Então, o composto **54a** foi ancorado na enzima hAChE utilizados o raio de ligação de 20 Å em torno de átomo de oxigênio do resíduo de tirosina 124 e a função Goldscore selecionada para a previsão da interação deste composto. Ao analisar o resultado, foi constatada que o método implementado foi capaz de prever as mesmas interações descritas pelo autor, sendo as principais: fortes interações $\pi - \pi$ entre o grupo benzilpiperidina e o resíduo do sítio aniônico triptofano 86; grupo piperidina disposto na cavidade hidrofóbica dos resíduos de tirosina 337, fenilalanina 338 e histidina 447; grupo diariltiazol disposto no PAS interagindo com os resíduos de tirosina 72, tirosina 124, triptofano 286, serina 293 e tirosina 341; formação de ligação de hidrogênio entre o grupo amídico e o resíduo tirosina 124; e formação de ligação de hidrogênio entre o átomo de flúor e o resíduo tirosina 133 no CAS (Figura 48).

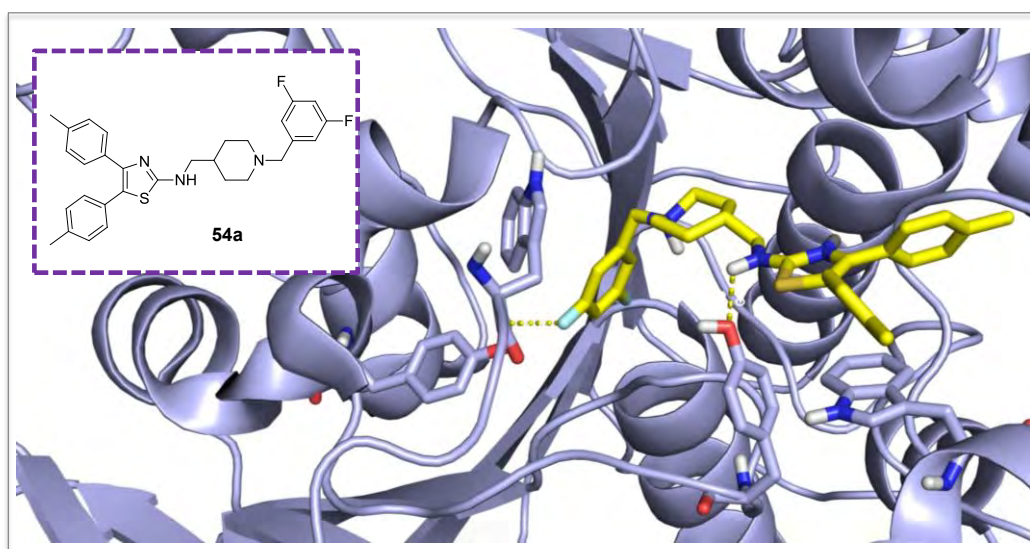


Figura 48: Análise das principais interações moleculares entre o composto **54a**, destaque em amarelo, com a enzima hAChE (PDB 4EY7). Figura gerada com PyMol 0. 1.7.x (DeLano Scientific LLC).

Desse modo foi realizado o ancoramento no sítio da AChE dos compostos **89a** ($R_1 = \text{Ph}$ e $R_2 = \text{Ph}$), e **90p** ($R_1 = 4\text{-Ph}$ e $R_2 = 4\text{-NO}_2\text{-Ph}$), o mais ativo da série para avaliar as interações existentes a partir do método validado previamente com a AChE humana. Os valores de *scores* obtidos foram 75,04 e 93,37 para os compostos **89a** e **90p** respectivamente. Este resultado evidencia que esta metodologia corresponde melhor à diferença de atividade encontrada entre estes compostos nos ensaios experimentais de enzimáticos (Seção 3.13).

Ademais, os resultados exibiram ambos os compostos **89a** e **90p** ancorados com a subunidade benzilpiperazina direcionada para o interior da cavidade enzimática, no CAS, onde o grupamento piperazina encontra-se acomodada na cavidade hidrofóbica dos resíduos de tirosina 337, fenilalanina 338 e histidina 447, realizando forte interação $\pi\text{-}\pi$ com o resíduo do triptofano 86 do sítio aniônico, de modo semelhante à benzilpiperidina do fármaco donepezil (Figura 49-51). E ainda, a subunidade diariltriazol se encontra disposta na face externa da hAChE, interagindo favoravelmente com os resíduos de tirosina 72, tirosina 124, triptofano 286, serina 293 e tirosina 341 no PAS, bem como através de fortes interações $\pi\text{-}\pi$ entre o anel triazólico e benzóico simultaneamente com o resíduo triptofano 286, similarmente ao anel dimetoxiindanona do donepezil. Além do mais, foi observada formação de ligação de hidrogênio entre o grupo amídico dos compostos **89a** e **90p** com o resíduo tirosina 124. E por fim, a existência de interações adicionais realizada pelo compostos **90p** como a presença de ligações de hidrogênio entre o oxigênio do grupo nitro e os resíduos serina 293, o que justifica a maior atividade inibitória do compostos **90p** encontrada (Figura 49-51).

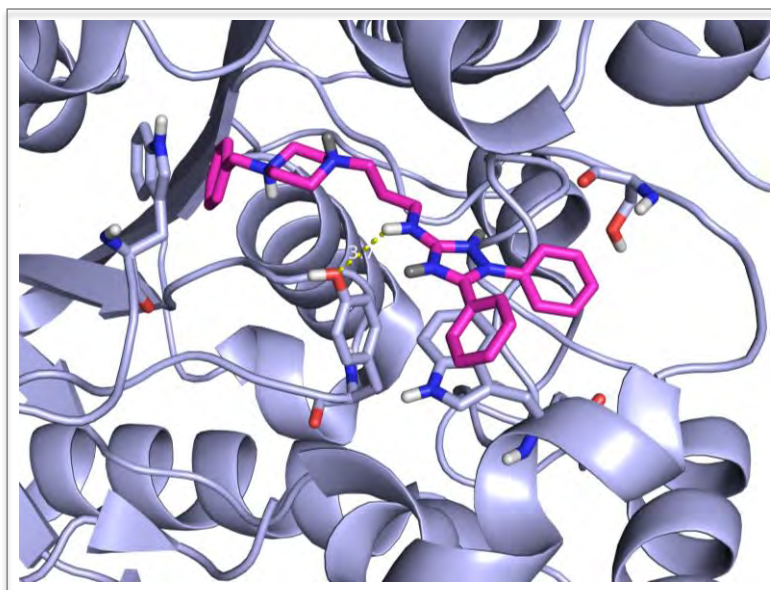


Figura 49: Análise das principais interações moleculares entre o composto **89a**, destaque em rosa, com a enzima hAChE (PDB 4EY7). Figura gerada com PyMol 1.7.x (DeLano Scientific LLC).

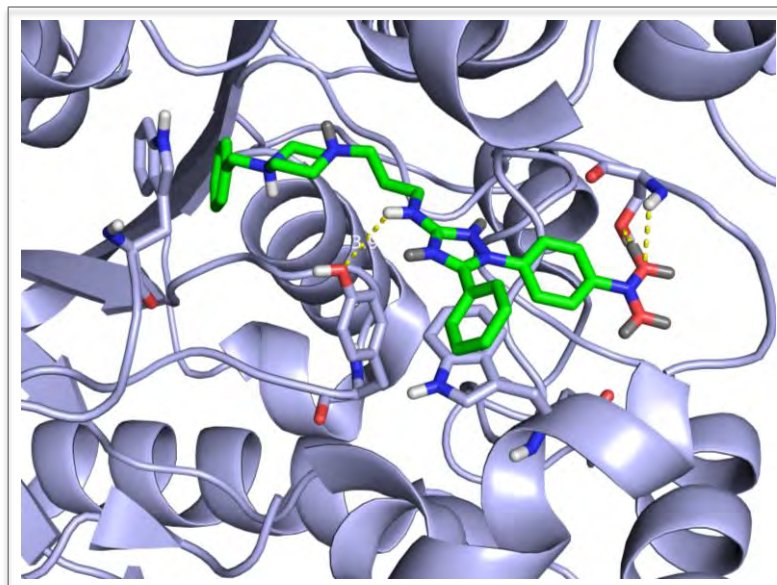


Figura 50: Análise das principais interações moleculares entre o composto **90p**, destaque em rosa, com a enzima hAChE (PDB 4EY7). Figura gerada com PyMol 1.7.x (DeLano Scientific LLC).

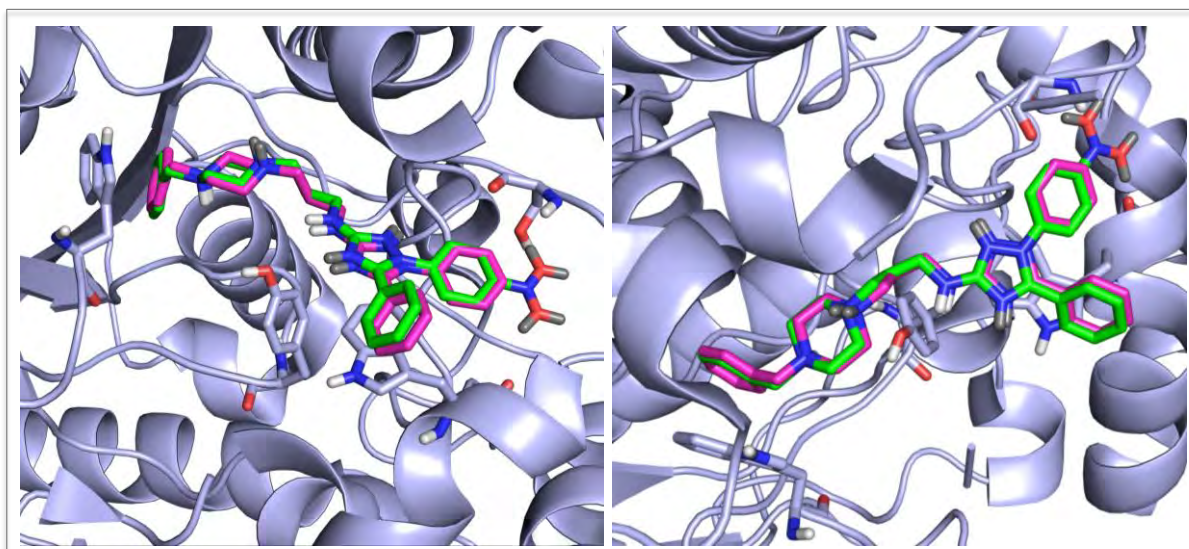


Figura 51: Análise das principais interações moleculares dos compostos **89a** (em verde) e **90p** (em rosa) sobrepostos com a cavidade enzimática da hAChE (PDB 4EY7). Figura gerada com PyMol 1.7.x (DeLano Scientific LLC).

Portanto esta última metodologia foi capaz exprimir a diferença entre os compostos **89a** e **90p** de maneira satisfatória, além de mostrar as principais interações entre tais composto e a hAChE. Entretanto este modelo não foi capaz de prever a ordem de atividade obtida no ensaio enzimático experimental para todos os demais compostos triazólicos. De todo modo, este estudo carece de mais aperfeiçoamento, o que sugere-se como perspectiva, a obtenção do cristal co-cristalizado com um representante da série 3-amino-propinil-piperazil-

1,2,4-triazol, a fim de provocar o encaxe induzido da enzima, e conseqüentemente uma disposição ideal dos resíduos no sítio ativo para estudo futuros.

3.16. Avaliação da atividade antioxidante pelo Método de DPPH

A avaliação da atividade antioxidante foi realizada através do método de DPPH (SALGUEIRO & CASTRO, 2016), baseado na reação de oxirredução, que ocorre através da transferência de elétrons, pela ação de um antioxidante, provocando a redução do DPPH, de cor púrpura, e conseqüentemente, a formação da difenil-picril-hidrazina, de coloração amarela (Figura 52). Este processo proporciona assim a mudança de coloração na solução, o que causa o decréscimo da absorção em 515/520 nm, podendo este efeito ser monitorado a partir de um espectrofotômetro (CASTELO-BRANCO & TORRES, 2011; Figura. 42).

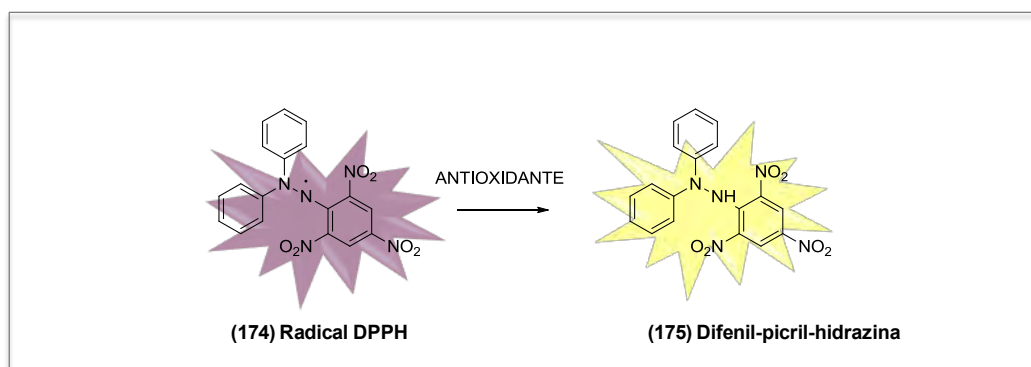


Figura 52: Reação de oxirredução: ação de um antioxidante provoca a redução do DPPH (cor púrpura) e formação da difenil-picril-hidrazina (cor amarelo)

Sendo assim os compostos 3-amino-propinil-piperazil-1,2,4-triazólicos (**89a**; **90a-ab**) foram avaliados quanto ao seu potencial antioxidante usando o teste DPPH (SALGUEIRO & CASTRO, 2016). A partir dos resultados obtidos de absorbância em 520 nm a uma concentração final dos compostos, foram determinadas as respectivas porcentagens de atividade antioxidante destes compostos como detalhado na tabela 11. Os compostos **90r** e **90s** portando substituintes heteroaromáticos apresentaram maior potencial antioxidante entre os compostos da série, de 30,82 e 29,92% respectivamente. Entretanto, estes resultados não foram satisfatórios, visto que o padrão positivo quercetina apresentou 52,20% de atividade antioxidante a 5µM, concentração muito inferior a testada para a série de 3-amino-1,2,4-triazóis (**89a**; **90a-ab**), o que pode-se concluir que estes compostos não possuem atividade antioxidante considerável.

Tabela 11: Ação antioxidante dos compostos (**89a**; **90a-ab**) a de 350 μ M em DPPH



Composto	R ₁	R ₂	Atividade Antioxidante (%) Dp ^a	
89a	Ph	Ph	19,58	0,0125
90a	2-CH ₃ -Ph	Ph	17,70	0,008
90b	2-OH-Ph	Ph	18,27	0,0056
90c	4-OH-Ph	Ph	24,57	0,0098
90d	2-OCH ₃ -Ph	Ph	20,03	0,0192
90e	4-OCH ₃ -Ph	Ph	13,15	0,0121
90f	3,4,5-tri-OCH ₃ -Ph	Ph	19,10	0,0026
90g	Ph	4-F-Ph	16,81	0,0075
90h	2-Cl-Ph	Ph	14,67	0,0748
90i	3-Cl-Ph	Ph	16,92	0,0036
90j	4-Cl-Ph	Ph	19,03	0,0099
90k	3-Br-Ph	Ph	18,84	0,0094
90l	4-Br-Ph	Ph	17,80	0,0166
90m	Ph	4-SO ₂ CH ₃ -Ph	14,05	0,0024
90n	3-NO ₂ -Ph	Ph	26,49	0,0029
90o	4-NO ₂ -Ph	Ph	16,18	0,0053
90p	Ph	4-NO ₂ -Ph	16,92	0,0039
90q	4-CN-Ph	Ph	-	
90r	2-piridina	Ph	30,82	0,0094
90s	2-furano	Ph	29,92	0,0061
90t	2-tiofeno	Ph	18,22	0,0090
90u	2-Naft	Ph	15,21	0,0046
90v	Bz	Ph	21,53	0,0323
90w	Ph	Bz	14,53	0,075
90x	terc-butil	Bz	23,22	0,0095
90y	2-OCH ₃ -Ph	Bz	24,37	0,0058
90z	4-OCH ₃ -Ph	Bz	11,82	0,0062
90aa	4-Cl-Ph	Bz	12,18	0,0087
90ab	Ph	Bzpiperidinil	12,40	0,0030

3.17. Estudo da complexação dos derivados 3-amino-propinil-piperazil-1,2,4-triazólicos **89a**, **90b** e **90r** frente a Zn^{2+} , Cu^{2+} , Al^{3+} e Fe^{3+}

As interações da radiação com a matéria podem fornecer informações sobre uma espécie química, na medida que esta é estimulada energeticamente, seja na forma de calor, energia elétrica, luz, entre outros. Antes de receber o estímulo, a molécula encontra-se predominantemente em seu estado de energia mais baixo, ou seja, no estado fundamental, e após o estímulo a molécula sofre uma transição para um estado de maior energia ou estado excitado. É possível obter informações sobre uma espécie química medindo-se a radiação eletromagnética emitida quando este retorna ao estado fundamental ou a quantidade de radiação eletromagnética absorvida decorrente da excitação. Os resultados dessas medidas são frequentemente expressos por meio do espectro, que se refere a um gráfico da radiação absorvida (espectroscopia de absorção) ou emitida (espectroscopia fluorescência e fosforescência) em função da frequência ou do comprimento de onda. Esse tipo de gráfico espectral é característico para uma dada molécula e algumas vezes é empregado para auxiliar na atribuição ou confirmação da identidade de uma espécie em particular (SKOOG, 2011). Por consequente, alterações na estrutura de tais espécies provocam mudança no gráfico espectral, o que pode fornecer informações úteis, como no caso do estudo da complexação de ligantes orgânicos com íons metálicos empregado neste trabalho.

Os derivados **89a**, **90b** e **90r** foram selecionados para avaliação das respectivas capacidades de complexação com os metais envolvidos na DA, i.e. Zn^{2+} , Cu^{2+} , Al^{3+} e Fe^{3+} , de acordo como o método descrito por Pereira e colaboradores (PEREIRA *et al.*, 2016). O composto **89a** foi utilizado como referência por não possuir substituintes ou anéis heteroaromáticos, enquanto **90b** e **90r** foram escolhidos por vislumbrarmos possíveis sítios de complexação do tipo 1,5 e 1,4, respectivamente (Figura 53). Sendo assim, foram realizadas análises espectroscópicas de absorção e emissão dos compostos frente a Zn^{2+} , Cu^{2+} , Al^{3+} e Fe^{3+} .

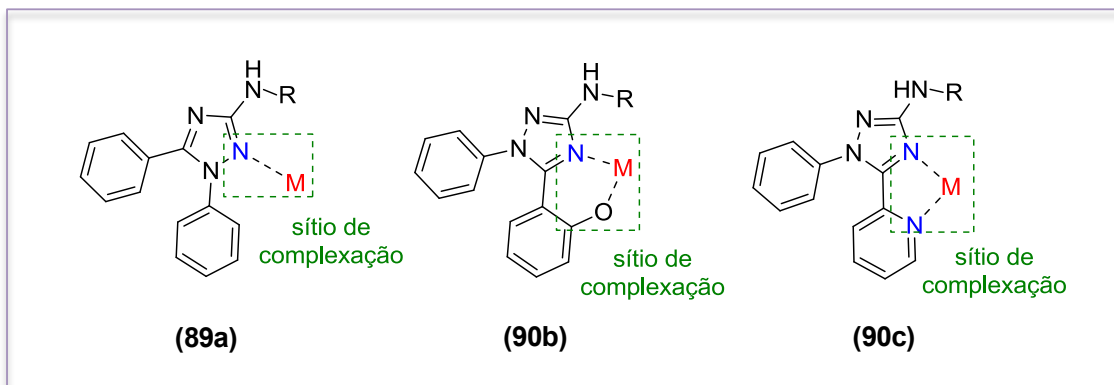


Figura 53: Proposição dos modos de complexação de **89a**, **90b** e **90r** com Zn^{2+} , Cu^{2+} , Al^{3+} e Fe^{3+}

O espectro de UV/vis de **89a** (Figura 44 - A) apresentou máximo de absorção em 287 nm e, após adição dos sais não foi observado uma variação significativa da banda com máximo em 287 nm frente aos íons Zn^{2+} , Cu^{2+} , Al^{3+} , exceto para o Fe^{3+} onde foi observado um aumento na banda de máxima absorção. Assim sendo, estes resultados não foram conclusivos para a possível formação de complexo entre o composto **89a** e os íons Zn^{2+} , Cu^{2+} , Al^{3+} , visto que não ocorreu alteração no espectro na absorção na presença destes íons. Além disso, o espectro de absorção dos sais (Figura 44 - B), mostrou que o $FeNO_3$ absorve na mesma região que o composto **89a**, sendo assim, o aumento de absorção observado na presença do íon Fe^{3+} , não garante a formação do complexo, já que, há a possibilidade de ser referente a absorção respectivo sal.

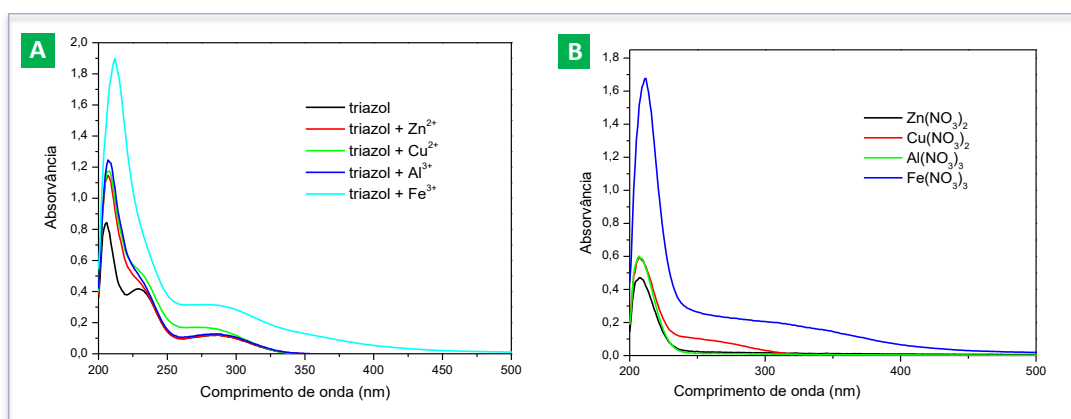


Figura 54. A: Espectro de absorbância de **89a** ($2,6 \times 10^{-5}$ M) em EtOH/ H_2O (50/50, v/v, Tris/HCl pH= 7) antes e após adição de Zn^{2+} , Cu^{2+} , Al^{3+} e Fe^{3+} . **B:** Espectro de absorbância de $Zn(NO_3)_2$, $Cu(NO_3)_2$, $Al(NO_3)_3$ e $Fe(NO_3)_3$ (2×10^{-5} M) em EtOH/ H_2O (50/50, v/v, Tris/HCl pH= 7)

Devido ao resultado inconclusivo referente a análise de absorção, avaliações espectroscópicas de emissão de fluorescências foram realizadas e demonstraram que a excitação do composto **89a** em 287 nm gerou alteração no espectro de emissão na presença

dos íons Cu^{2+} e Fe^{3+} , indicando a formação do complexo de triazol com estes metais, o que não foi observado na presença de Zn^{2+} , Al^{3+} (Figura 45).

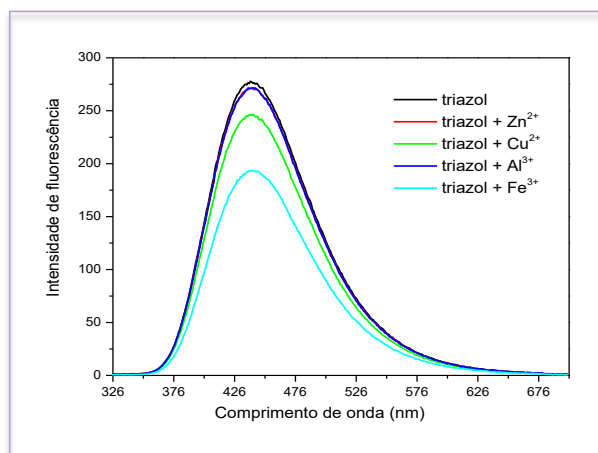


Figura 55: Espectro de fotoluminescência de composto **89a** ($2,6 \times 10^{-5}$ M) em EtOH/H₂O (50/50, v/v, Tris/HCl pH = 7) antes e após adição de Zn^{2+} , Cu^{2+} , Al^{3+} e Fe^{3+}

O espectro de UV/vis de **90b** e **90r** apresentou máximo de absorção em 279 nm e, depois da adição dos sais também não foi constatado alteração considerável da banda de absorção máxima frente aos íons Zn^{2+} , Cu^{2+} , Al^{3+} , enquanto para o Fe^{3+} houve novamente um aumento de absorção, possivelmente pelos mesmos motivos descritos anteriormente. Do mesmo modo, os resultados de absorção não foram conclusivos para a formação de complexo entre os compostos **90b** e **90r** e os respectivos íons Zn^{2+} , Cu^{2+} , Al^{3+} , Fe^{3+} .

Com o intuito de novamente avaliar a complexação por fluorescência, os compostos **90b** e **90r** foram excitados em 279 nm na ausência e presença dos íons metálicos Zn^{2+} , Cu^{2+} , Al^{3+} , Fe^{3+} , e assim obtidos os espectros de emissão de fluorescências. Os resultados espectroscópicos para o composto **90b** demonstraram que a excitação provocou a diminuição da intensidade de emissão na presença dos quatro íons metálicos Zn^{2+} , Cu^{2+} , Al^{3+} , Fe^{3+} , indicando a formação dos complexos do triazol com todos os metais ensaiados. Já no caso do composto **90r** também foi observada a diminuição da intensidade de emissão, mas de modo menos pronunciado do que o observado para o composto **90b**, na presença dos íons Zn^{2+} , Cu^{2+} , Fe^{3+} . Já o íon Al^{3+} não foi capaz de alterar o espectro de emissão de **90r**, o que indica que diferentemente dos outros três íons, este triazol não é capaz de complexar Al^{3+} .

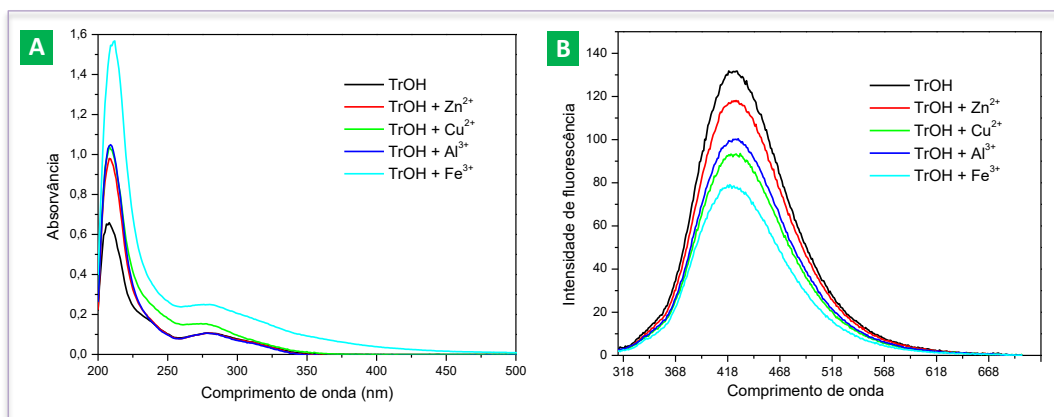


Figura 56. A: Espectro de absorvância de **90b** (2×10^{-5} M) em EtOH/H₂O (50/50, v/v, Tris/HCl pH= 7) antes e após adição de Zn²⁺, Cu²⁺, Al³⁺ e Fe³⁺. B: Espectro de fotoluminescência de **90b** (2×10^{-5} M) em EtOH/H₂O (50/50, v/v, Tris/HCl pH= 7) antes e após adição de Zn²⁺, Cu²⁺, Al³⁺ e Fe³⁺

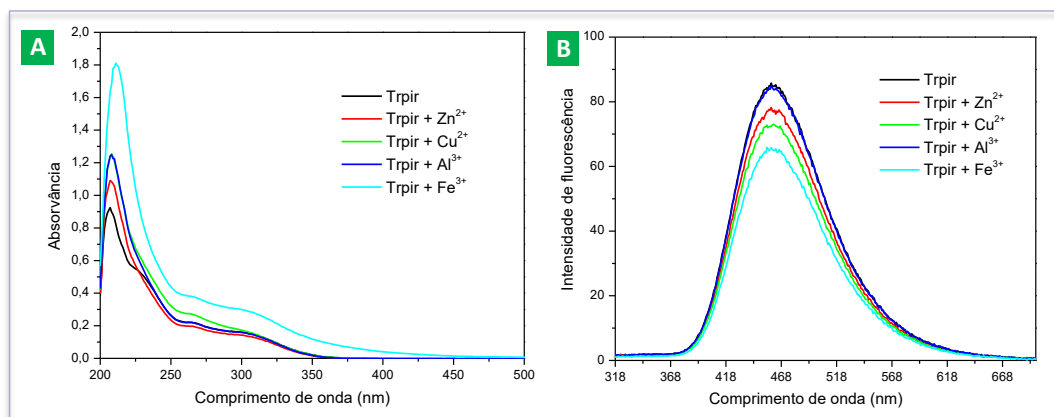


Figura 57: Espectro de absorvância de **90r** (2×10^{-5} M) em EtOH/H₂O (50/50, v/v, Tris/HCl pH= 7) antes e após adição de Zn²⁺, Cu²⁺, Al³⁺ e Fe³⁺. B: Espectro de fotoluminescência de **90r** (2×10^{-5} M) em EtOH/H₂O (50/50, v/v, Tris/HCl pH= 7) antes e após adição de Zn²⁺, Cu²⁺, Al³⁺ e Fe³⁺

Tais resultados demonstram a capacidade dos compostos **89a**, **90b** e **90r** de formarem complexos com os íons metálicos. Aparentemente o núcleo aminotriazol por si só seria capaz de complexar a metais como em **89a**, sendo que o perfil de complexação pode ser modulado / alterado de acordo com os substituintes aromáticos / heteroaromáticos ligados a ele, como demonstrado para **90b** e **90r**. Estes resultados, que foram realizados em meios com presença de água, apontam para possibilidade destes compostos serem empregados no tratamento da DA com a finalidade de restabelecer a homeostase metálica.

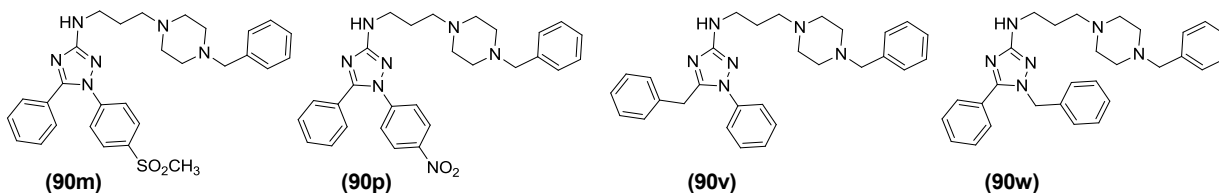
Com o intuito de ratificar os resultados obtidos por este trabalho que indicaram a formação dos complexos, serão realizados experimentos de RMN de ¹H e espectroscopia de massas. Além do mais, novos experimentos para determinar a constante e estequiometria de complexação entre os compostos **89a**, **90b** e **90r** e os íons metálicos serão executados, a fim de classificá-los como quelantes tradicionais ou MPACs, dependendo do grau de seletividade obtido.

4. CONCLUSÃO

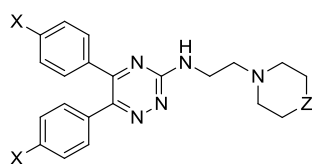
Neste trabalho foram sintetizados 29 compostos 3-amino-propinil-piperazil-1,2,4-triazol (**89a**, **90a-ab**), sendo 28 inéditos. Todos os compostos foram caracterizados por espectroscopia de RMN ^1H e ^{13}C , exceto o composto **90q** não apresentou pureza adequada e assim não foi caracterizado.

As metodologias sintéticas propostas para a síntese da série 3-amino-propinil-piperazil-1,2,4-triazol (**89a**, **90a-ab**) planejada se mostraram satisfatórias, apresentando rendimentos de razoáveis a bons.

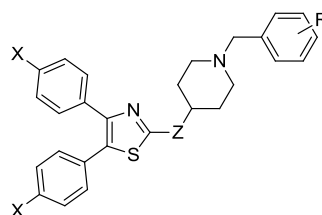
Os ensaios de inibição enzimática das colinesterases demonstraram que todos os compostos (**89a**, **90a-ab**), exceto o composto **90q**, foram capazes de inibir a AChE e BChE. Sendo os compostos portadores dos substituintes fortemente retiradores os mais ativos frente a AChE, entre os quais o composto **90p** foi o mais potente ($\text{CI}_{50} = 0,386 \mu\text{M}$, $\text{IS} = 5,36$). Entre os melhores inibidores da BuChE estão os compostos **90v** ($\text{CI}_{50} = 0,416 \mu\text{M}$, $\text{IS} = 0,27$) e **90w** ($\text{CI}_{50} = 0,766 \mu\text{M}$, $\text{IS} = 0,32$) contendo como substituintes a subunidade benzila em R_1 e R_2 respectivamente. Além disso, o composto **90m** apresentou maior seletividade ($\text{CI}_{50} = 0,664 \mu\text{M}$, $\text{IS} = 33,38$) para a AChE.



Ademais, vale resaltar, que ao comparar a série os compostos mais ativos da série dos protótipos, os resultados de inibição enzimática obtidos neste trabalho foram melhores que o protótipo **53a** ($\text{CI}_{50} = 4,23 \mu\text{M}$, frente a AChE; $\text{CI}_{50} = 13,3 \mu\text{M}$ frente a BuChE) e equiparáveis ao protótipo **54a** ($\text{CI}_{50} = 0,30 \mu\text{M}$, frente a AChE; $\text{CI}_{50} = 1,84 \mu\text{M}$ frente a BuChE) exceto pela seletividade.



(53a) X;Y= H; Z=CH₂

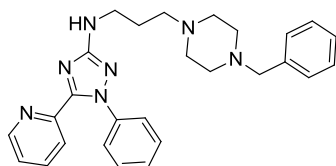


(54a) X;Y= CH₃; Z= NHCH₂ R= 3,5-diF

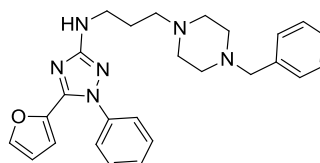
A partir dos ensaios de cinética enzimática, constatou-se que os compostos **(90m, 90p e 90w)** apresentaram inibição tipo mista, ou seja, inibe o CAS (inibição competitiva) quanto com o PAS (inibição não-competitiva) das enzimas AChE e BChE. Desse modo, estes compostos além de afetarem a atividade catalítica de degradação da ACh via inibição do CAS, possivelmente inibem a formação de A β mediante a inibição do PAS da AChE.

Os ensaios *in silico* indicaram que a posição de ancoramento dos compostos se dá através da subunidade benzilpiperazina direcionada para o interior da cavidade enzimática, no CAS, bem como, a subunidade diariltriazol disposta na face externa da hAChE, de modo semelhante à ao fármaco donepezil. Além disso, foi possível prever as principais interações entre compostos **(89a e 90p)** como os resíduos triptofano 86, triptofano 286 e tirosina124 do sítio ativo da AChE.

Os compostos **90r e 90s** portando substituintes heteroaromáticos apresentaram maior potencial antioxidante entre os compostos da série, de 30,82 e 29,92 % respectivamente a 350 μ M. Entretanto este resultado mostrou que estes compostos não possuem atividade antioxidante considerável, visto que comparativamente o padrão positivo quercetina apresentou 52,20% de atividade antioxidante a uma concentração muito inferior, 5 μ M.

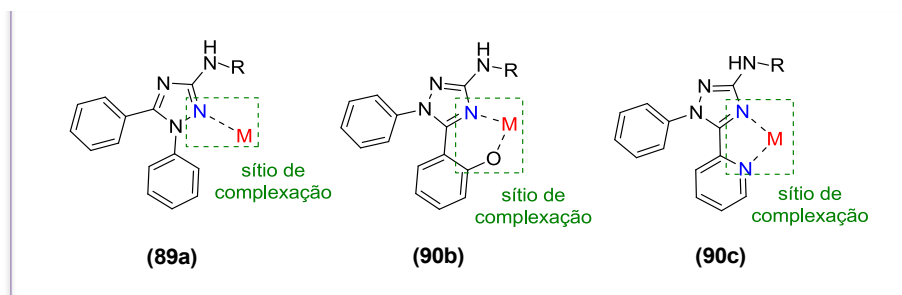


(90r)



(90s)

Os resultados espectroscópicos de emissão de fluorescências demonstraram a formação do complexo de triazol **(89a; 90b; 90r)** com íons metálicos, sendo que o perfil de complexação pode ser modulado / alterado de acordo com os substituintes aromáticos / heteroaromáticos ligados a ele, o que aponta para possibilidade destes compostos serem empregados no tratamento da DA com a finalidade de restabelecer a homeostase metálica.



Como perspectiva, os compostos **(89a; 90a-ab)** serão submetidos a ensaios *in vitro* da agregação de placas β -amilóide, visto que foram capazes de inibir o PAS; ensaio *in vitro* de neurotoxicidade; ensaios *in vivo* de alteração comportamental em modelo de DA induzida em camundongos. Bem como a exploração de novas séries.

5. PARTE EXPERIMENTAL

5.1. Metodologia sintética

A fase orgânica das reações foi seca com sulfato de sódio anidro, filtrada e o solvente foi evaporado à pressão reduzida em evaporador rotatório, modelo RV 10 digital e banho IKA, modelo HB 10 digital.

O acompanhamento das reações foi feito através da técnica de cromatografia em camada fina analítica (CCD), na qual foram utilizadas placas de alumínio Kieselgel 60 (HF-254, Merck) com 0,2 mm de espessura. A visualização das substâncias em CCD foi realizada em lâmpada ultra violeta (254-365 nm).

A purificação dos compostos foi realizada a partir da técnica de cromatografias líquida de adsorção em coluna flash, Isolera Biotage, modelo ISO-4SV (IQ-UFRRJ). Para a confecção da pastilha, utilizou-se sílica gel 70-230 mesh (Merck). E como fase móvel, os solventes foram utilizados de acordo com as propriedades físico-químicas de cada composto.

Os espectros de RMN ^1H foram obtidos em aparelhos Bruker Avance-500 e Bruker Avance-400 (IQ-UFRRJ), operando a 500 MHz e 400 MHz, respectivamente. As amostras foram dissolvidas em CDCl_3 , DMSO-d_6 ou acetona- d_6 , contendo tetrametilsilano como referência interna e colocadas em tubos de 5 mm de diâmetro.

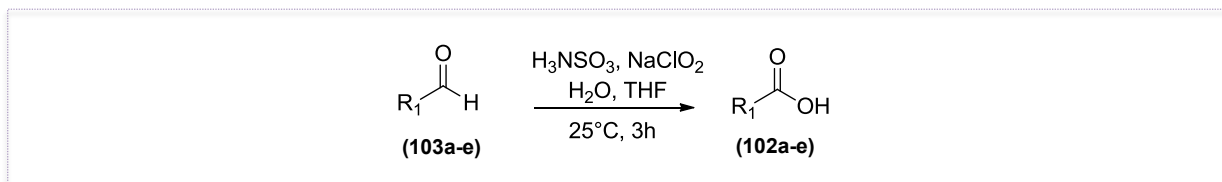
Os espectros de RMN ^{13}C foram obtidos operando a 125 MHz e à 100MHz, em aparelho Bruker Avance-500 e Bruker Avance-400 (IQ-UFRRJ), respectivamente, e as amostras foram dissolvidas em CDCl_3 , DMSO-d_6 ou acetona- d_6 , contendo TMS como referência interna.

As áreas dos sinais foram obtidas por integração eletrônica e sua multiplicidade descrita com: s-singlete / sl-singlete largo / d-dublete / t-triplete / q-quarteto / m-multiplete / dd-duplo dublete.

Os pontos de fusão foram determinados em aparelho AAKER modelo PFM-II e os valores não foram corrigidos.

5.1.1. Sínteses de ácidos carboxílicos aromáticos (102a-e)

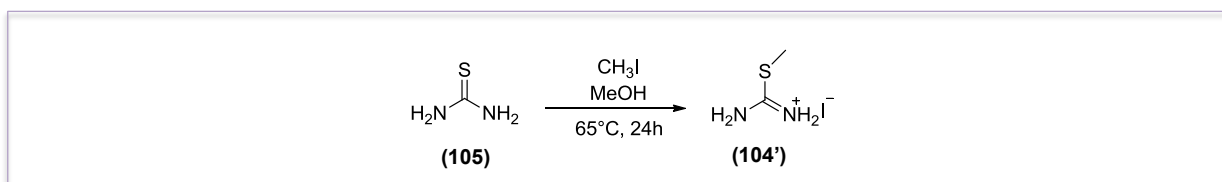
(QING-LI *et al.*, 2009)



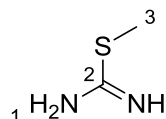
Em um balão de 50 ml foi solubilizado o aldeído correspondente (**103a-e**) (4,5 mmol) em uma mistura de THF (16 ml) e água (4 mL) à $0^\circ C$. Em seguida foi adicionado gota a gota ácido sulfâmico (H_3NSO_3) (16,01 mmol) dissolvido em água (2 ml), e clorito de sódio ($NaClO$) (16,01 mmol) dissolvido em água (2 ml). Após a completa adição, a reação foi mantida sob agitação e temperatura ambiente durante 2 horas. O fim da reação foi confirmado através da técnica de CCD utilizando hexano: acetato de etila 30 % como eluente. A reação foi diluída com solução saturada de cloreto de amônio (NH_4Cl) (20 ml) e extraída com acetato de etila (3x 30 ml). Finalmente, a fase orgânica combinada foi seca com sulfato de sódio anidro ($NaSO_4$) e concentrada sob vácuo, para fornecer os ácidos carboxílicos (**102a-e**).

5.1.2. Síntese de 2-metil isotiouréia (104)

(HICKEL *et al.*, 2012)



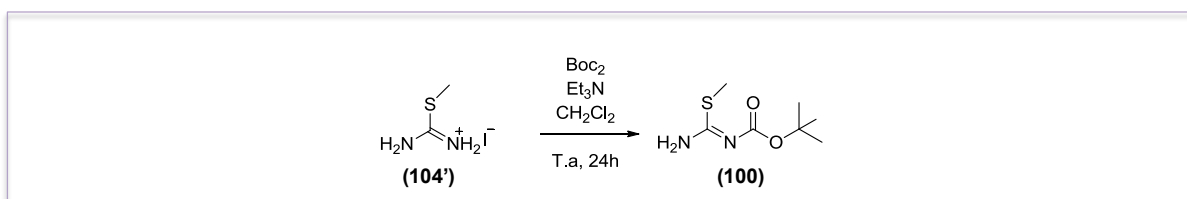
Em um tubo de borosilicato selado, a tioureia (13,13 mmol) (**105**) foi solubilizada em 10 ml de metanol, seguida da adição de iodometano (26,27 mmol). A reação foi deixada em refluxo durante 24 horas. Após este período, foi confirmado o término da reação através da técnica de CCD utilizando diclorometano: metanol 5 % como eluente, e por fim a mistura reacional foi concentrada em evaporador rotatório obtendo o sal (**104'**) como sólido amarelo de rendimento bruto igual a 90 % e ponto de fusão igual a $238-240^\circ C$ com decomposição (literatura igual a $244^\circ C$ com decomposição).



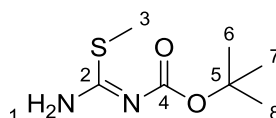
RMN¹H (500 MHz) DMSO-d₆ / TMS (δ-ppm): NH₂= 8,89 (s, 2H); H₃= 2,58 (s,3H);
RMN¹³C (125 MHz) DMSO-d₆ / TMS (δ-ppm): C₂= 171,09; C₃= 13,55.

5.1.3. Síntese de 2-metil isotiouréia-N-Boc (100)

(KRAUS *et al.*, 2009)



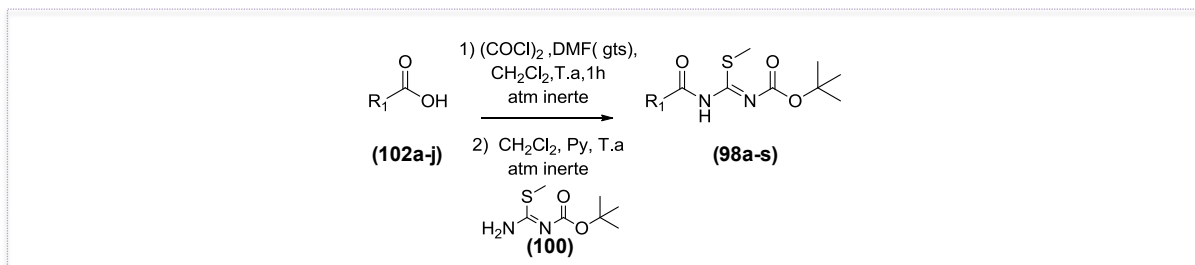
Em um balão de 100 mL foram dissolvidos 13,74 mmol de 2-metil isotiouréia (**104**) em 30 ml de diclorometano. A solução foi resfriada em banho de gelo até a temperatura igual a 0 °C e então, foi adicionado 13,74 mmol de trietilamina (Et₃N), seguida, da adição gota a gota de di-tert-butil dicarbonato (BocO₂) (6,88 mmol) (**100**) dissolvidos em 10 ml diclorometano durante 45 minutos. A reação foi mantida sob agitação durante 24 horas, em temperatura ambiente. Ao fim deste período, foi confirmado o fim da reação através da técnica de CCD utilizando hexano: acetato de etila 30 % como eluente, e então, a mistura reacional foi diluída com 30 ml de diclorometano e a fase orgânica lavada com água (3 x 20 ml), seca com sulfato de sódio anidro (NaSO₄) e concentrada em evaporador rotatório. Primeiramente, foi obtido o composto (**100**) na forma de óleo que, ao ser resfriado no freezer, cristalizou-se formando um sólido amorfo branco com rendimento de 85 % e ponto de fusão igual a 75-78 °C (literatura igual a 77 °C).



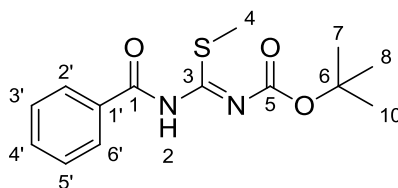
RMN¹H (400 MHz) DMSO-d₆ / TMS (δ-ppm): NH₂= 8,58 (s, 2H); H₃= 2,32 (s,3H); H_{6,7,8}= 1,41 (s, 9H); **RMN¹³C (100 MHz) DMSO-d₆ / TMS (δ-ppm):** C₂= 160,98; C₃= 28,17; C₄=171,87; C₅= 78,11; C_{6,7,8}= 13,13.

5.1.4. Síntese das *N*-acil-2-metil-isotiuréia *N*-Boc (98a-s)

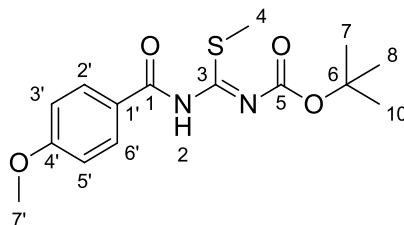
(SANTOS *et al.*, 2019)



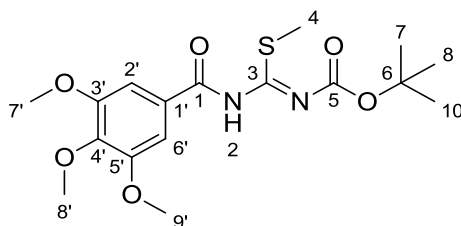
Em um balão de 25 mL foram dissolvidos 0,986 mmol do ácido carboxílico correspondente (**102a-j**) – os sintetizados previamente (**102a-e**) e os disponíveis no laboratório ($R_1 = 2\text{-CH}_3\text{-Ph}$; $4\text{-OCH}_3\text{-Ph}$; $4\text{-NO}_2\text{-Ph}$; 4-CN-Ph ; 2-piridina; Bz) – em 5 mL de diclorometano, e então, foram adicionados 4,93 mmols de cloreto de oxalila e 2 gts de dimetilformamida (DMF) em atmosfera inerte. Após 2 horas a reação foi concentrada em evaporador rotatório, para obter os respectivos cloretos de ácido (**101a-j**). Em seguida, foram diluídos em 5 mL de diclorometano os cloretos de acila (**101a-s**) – os recém-formados (**101a-j**) e os disponíveis no laboratório ($R_1 = \text{Ph}$; 3,4,5-tri- $\text{OCH}_3\text{-Ph}$; 2- Cl-Ph ; 3- Cl-Ph ; 4- Cl-Ph ; 3- Br-Ph ; 4- Br-Ph ; 3- $\text{NO}_2\text{-Ph}$; terc-butila) – adicionado gota à gota sobre uma solução contendo 0,986 mmol da 2-metil isotiouréia-*N*-Boc (**104'**) e 2,46 mmols de piridina em 10 mL de diclorometano. A reação foi mantida sob agitação e temperatura ambiente durante até 72 horas. O término da reação foi monitorado através da técnica de CCD utilizando hexano: acetato de etila 10 % como eluente. A mistura reacional foi diluída em 20 mL de diclorometano e lavada com solução aquosa de bicarbonato de sódio 10 % (NaHCO_3) (3 x 10 mL). A fase orgânica foi seca com sulfato de sódio anidro (NaSO_4) e evaporada em evaporador rotatório, desse modo, foi obtido os produtos sólidos. Este foi purificado por cromatografia em coluna flash, utilizando coluna snap 10 g ultra, eluída com gradiente hexano: acetato de etila 5 a 10 %. Foram obtidos bons rendimentos reacionais na faixa de 41 - 69 %.



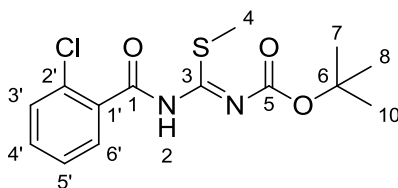
RMN ¹H (500 MHz) CDCl₃ (δ-ppm): H₄ = 2,59 (s, 3H); H_{7,8,9} = 1,54 (s, 9H); H_{2',6'} = 8,29 (d, 2H); H_{3',5'} = 7,47 (sl, 2H); H_{4'} = 7,56 (sl, 1H). **RMN ¹³C (100 MHz) CDCl₃ (δ-ppm):** C₁ = 172,00; C₄ = 14,92; C_{7,8,9} = 27,98; C_{2',6'} = 130,12; C_{3',5'} = 128,25; C_{4'} = 132,81.



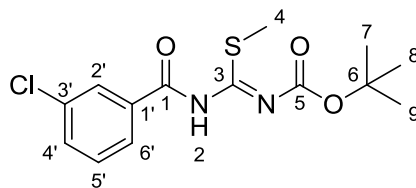
RMN ¹H (500 MHz) CDCl₃ (δ-ppm): H₄ = 2,49 (s, 3H); H_{7,8,9} = 1,46 (s, 9H); H_{2',6'} = 8,10 (d, 2H); H_{3',5'} = 7,59 (d, 2H), H_{7'} = 3,85 (s, 3H). **RMN ¹³C (100 MHz) CDCl₃ (δ-ppm):** C₁ = 171,08; C₃ = 151,12; C₄ = 14,86; C₅ = 175,51; C₆ = 83,26, C_{7,8,9} = 27,98; C_{1'} = 129,31; C_{2',6'} = 132,32; C_{3',5'} = 113,49; C_{4'} = 163,99; C_{7'} = 55,43.



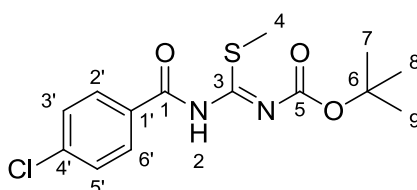
RMN ¹H (500 MHz) CDCl₃ (δ-ppm): H₂ = 12,54 (sl, 1H); H₄ = 2,58 (s, 3H); H_{7,8,9} = 1,53 (s, 9H); H_{2',6'} = 7,60 (s, 2H); H_{7',9'} = 3,92 (s, 6H); H_{8'} = 3,93 (s, 3H). **RMN ¹³C (125 MHz) CDCl₃ (δ-ppm):** C₁ = 171,40; C₃ = 150,74; C₄ = 14,56; C₅ = 175,05; C₆ = 83,25, C_{7,8,9} = 27,72; C_{1'} = 131,49; C_{2',6'} = 107,10; C_{3',5'} = 152,49; C_{4'} = 142,67; C_{7',9'} = 55,81; C_{8'} = 60,08.



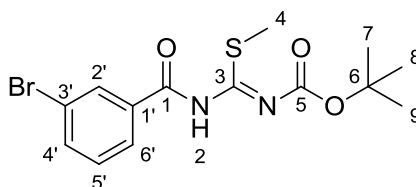
RMN ¹H (500 MHz) CDCl₃ (δ-ppm): H₂ = 12,27 (sl, 1H); H₄ = 2,50 (s, 3H); H_{7,8,9} = 1,53 (s, 9H); H_{3',4',5',6'} = 7,34-7,45 (m, 4H). **RMN ¹³C (125 MHz) CDCl₃ (δ-ppm):** C₄ = 14,66; C_{7,8,9} = 27,71; C_{3'} = 130,85; C_{4'} = 131,89; C_{5'} = 126,32; C_{6'} = 127,12.



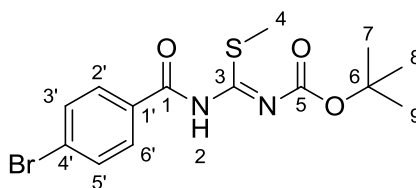
RMN ^1H (500 MHz) CDCl_3 (δ -ppm): $\text{H}_2 = 12,51$ (sl, 1H); $\text{H}_4 = 2,59$ (s, 3H); $\text{H}_{7,8,9} = 1,54$ (s, 9H); $\text{H}_{2'} = 8,23$ (s, 1H); $\text{H}_{4'} = 7,53$ (d, 1H); $\text{H}_{5'} = 7,40$ (t, 1H); $\text{H}_{6'} = 8,13$ (d, 1H). **RMN ^{13}C (125 MHz) CDCl_3 (δ -ppm):** $\text{C}_4 = 14,74$; $\text{C}_{7,8,9} = 27,71$; $\text{C}_{2'} = 129,31$; $\text{C}_{4'} = 133,46$; $\text{C}_{5'} = 132,41$; $\text{C}_{6'} = 128,00$.



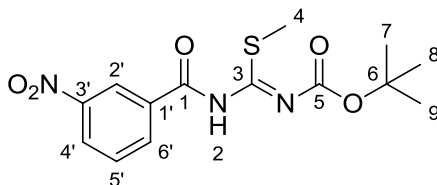
RMN ^1H (500 MHz) CDCl_3 (δ -ppm): $\text{H}_2 = 12,54$ (sl, 1H); $\text{H}_4 = 2,58$ (s, 3H); $\text{H}_{7,8,9} = 1,53$ (s, 9H); $\text{H}_{2',6'} = 8,21$ (d, 2H); $\text{H}_{3',5'} = 7,42$ (d, 2H). **RMN ^{13}C (100 MHz) CDCl_3 (δ -ppm):** $\text{C}_1 = 172,63$; $\text{C}_3 = 150,95$; $\text{C}_4 = 14,97$; $\text{C}_5 = 174,93$; $\text{C}_6 = 83,64$; $\text{C}_{7,8,9} = 27,98$; $\text{C}_{1'} = 135,14$; $\text{C}_{2',6'} = 131,48$; $\text{C}_{3',5'} = 128,5$; $\text{C}_{4'} = 139,17$.



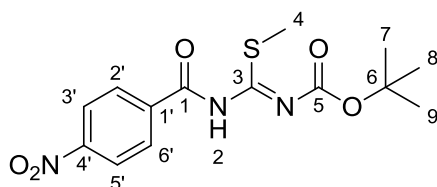
RMN ^1H (500 MHz) CDCl_3 (δ -ppm): $\text{H}_2 = 12,53$ (sl, 1H); $\text{H}_4 = 2,64$ (s, 3H); $\text{H}_{7,8,9} = 1,55$ (s, 9H); $\text{H}_{2'} = 9,11$ (s, 1H); $\text{H}_{4'} = 8,39$ (d, 1H); $\text{H}_{5'} = 7,65$ (t, 1H); $\text{H}_{6'} = 8,57$ (d, 1H). **RMN ^{13}C (125 MHz) CDCl_3 (δ -ppm):** $\text{C}_1 = 173,37$; $\text{C}_3 = 150,76$; $\text{C}_4 = 15,13$; $\text{C}_5 = 174,22$; $\text{C}_6 = 84,02$; $\text{C}_{7,8,9} = 27,96$; $\text{C}_{1'} = 138,46$; $\text{C}_{2'} = 126,94$; $\text{C}_{3'} = 114,05$; $\text{C}_{4'} = 135,52$; $\text{C}_{5'} = 129,36$; $\text{C}_{6'} = 125,05$.



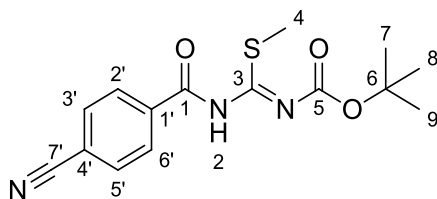
RMN ¹H (500 MHz) CDCl₃ (δ-ppm): H₂ = 12,53 (sl, 1H); H₄ = 2,57 (s, 3H); H_{7,8,9} = 1,53 (s, 9H); H_{2',6'} = 8,11 (d, 2H); H_{3',5'} = 7,59 (d, 2H). **RMN ¹³C (125 MHz) CDCl₃ (δ-ppm):** C₁ = 172,40; C₄ = 14,72; C_{7,8,9} = 27,72; C_{2',6',3',5'} = 131,33.



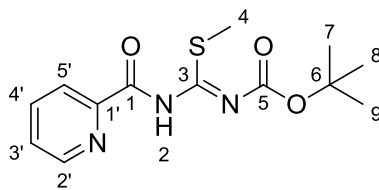
RMN ¹H (500 MHz) CDCl₃ (δ-ppm): H₂ = 12,53 (sl, 1H); H₄ = 2,63 (s, 3H); H_{7,8,9} = 1,55 (s, 9H); H_{2'} = 9,11 (s, 1H); H_{4'} = 8,56 (d, 1H); H_{5'} = 7,65 (t, 1H); H_{6'} = 8,39 (d, 1H). **RMN ¹³C (125 MHz) CDCl₃ (δ-ppm):** C₄ = 14,86; C_{7,8,9} = 27,70; C_{2'} = 124,78; C_{4'} = 126,70 ; C_{5'} = 129,11; C_{6'} = 135,25.



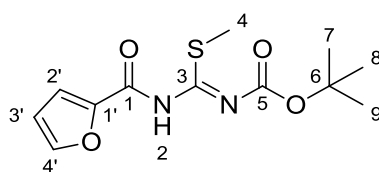
RMN ¹H (500 MHz) CDCl₃ (δ-ppm): H₂ = 12,53 (sl, 1H); H₄ = 2,61 (s, 3H); H_{7,8,9} = 1,55 (s, 9H); H_{2',6'} = 8,29 (d, 2H); H_{3',5'} = 8,42 (d, 2H). **RMN ¹³C (100 MHz) CDCl₃ (δ-ppm):** C₅ = 173,68; C₃ = 150,21; C₄ = 15,12; C₅ = 174,28; C₆ = 84,06, C_{7,8,9} = 27,95; C_{1'} = 142,03; C_{2',6'} = 130,95; C_{3',5'} = 123,37; C_{4'} = 150,76.



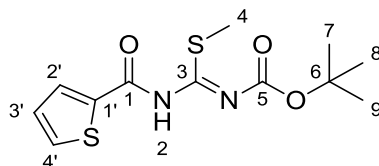
RMN ¹H (500 MHz) CDCl₃ (δ-ppm): H₂ = 12,52 (sl, 1H); H₄ = 2,60 (s, 3H); H_{7,8,9} = 1,54 (s, 9H); H_{2',6'} = 8,35 (d, 2H); H_{3',5'} = 7,75 (d, 2H). **RMN ¹³C (125 MHz) CDCl₃ (δ-ppm):** C₁ = 173,98; C₃ = 150,78; C₄ = 15,07; C₅ = 174,05; C₆ = 84,00, C_{7,8,9} = 27,96; C_{1'} = 140,47; C_{2',6'} = 130,39 C_{3',5'} = 132,07; C_{4'} = 115,78; C_{7'} = 118,34.



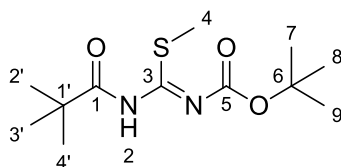
RMN ^1H (500 MHz) CDCl_3 (δ -ppm): $\text{H}_2 = 13,62$ (sl, 1H); $\text{H}_4 = 2,50$ (s, 3H); $\text{H}_{7,8,9} = 1,62$ (s, 9H); $\text{H}_{2'} = 8,77$ (d, 1H); $\text{H}_{3'} = 7,58$ (t, 1H); $\text{H}_{4'} = 7,94$ (t, 1H); $\text{H}_{5'} = 8,28$ (d, 1H). **RMN ^{13}C (100 MHz) CDCl_3 (δ -ppm):** $\text{C}_1 = 168,48$; $\text{C}_3 = 162,90$; $\text{C}_4 = 14,54$; $\text{C}_5 = 159,80$; $\text{C}_6 = 81,23$; $\text{C}_{7,8,9} = 28,00$; $\text{C}_{1'} = 148,12$; $\text{C}_{2'} = 148,86$; $\text{C}_{3'} = 127,43$; $\text{C}_{4'} = 137,82$; $\text{C}_{5'} = 123,49$.



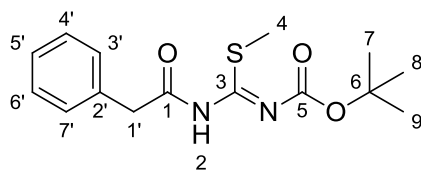
RMN ^1H (400 MHz) CDCl_3 (δ -ppm): $\text{H}_2 = 12,29$ (sl, 1H); $\text{H}_4 = 2,51$ (s, 3H); $\text{H}_{7,8,9} = 1,53$ (s, 9H); $\text{H}_{2'} = 7,31$ (d, 1H); $\text{H}_{3'} = 6,53$ (sl, 1H); $\text{H}_{4'} = 7,64$ (sl, 1H). **RMN ^{13}C (100 MHz) CDCl_3 (δ -ppm):** $\text{C}_4 = 14,74$; $\text{C}_{7,8,9} = 27,95$; $\text{C}_{2'} = 118,93$; $\text{C}_{3'} = 112,06$; $\text{C}_{4'} = 147,07$.



RMN ^1H (500 MHz) CDCl_3 (δ -ppm): $\text{H}_2 = 12,40$ (sl, 1H); $\text{H}_4 = 2,55$ (s, 3H); $\text{H}_{7,8,9} = 1,52$ (s, 9H); $\text{H}_{2'} = 7,90$ (d, 1H); $\text{H}_{3'} = 7,13$ (t, 1H); $\text{H}_{4'} = 7,59$ (d, 1H). **RMN ^{13}C (125 MHz) CDCl_3 (δ -ppm):** $\text{C}_1 = 170,78$; $\text{C}_3 = 150,88$; $\text{C}_4 = 14,86$; $\text{C}_5 = 171,91$; $\text{C}_6 = 83,51$; $\text{C}_{7,8,9} = 27,97$; $\text{C}_{1'} = 142,57$; $\text{C}_{2'} = 133,48$; $\text{C}_{3'} = 128,23$; $\text{C}_{4'} = 133,08$.



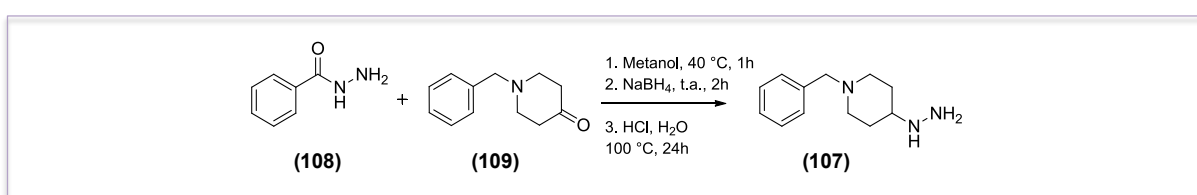
RMN ^1H (500 MHz) CDCl_3 (δ -ppm): $\text{H}_4 = 2,40$ (s, 3H); $\text{H}_{7,8,9} = 1,53$ (s, 9H); $\text{H}_{2',3',4'} = 1,27$ (s, 9H). **RMN ^{13}C (125 MHz) CDCl_3 (δ -ppm):** $\text{C}_4 = 14,31$; $\text{C}_{7,8,9} = 27,71$; $\text{C}_{2',3',4'} = 26,74$.



RMN ¹H (500 MHz) CDCl₃ (δ-ppm): H₄ = 2,36 (s, 3H); H_{7,8,9} = 1,47 (s, 9H); H₁ = 3,76 (sl, 2H); H_{3',4',5',6',7'} = 7,29-7,37 (m, 5H).

5.1.5. Síntese da 1-benzil-4-hidrazinilpiperidina (107)

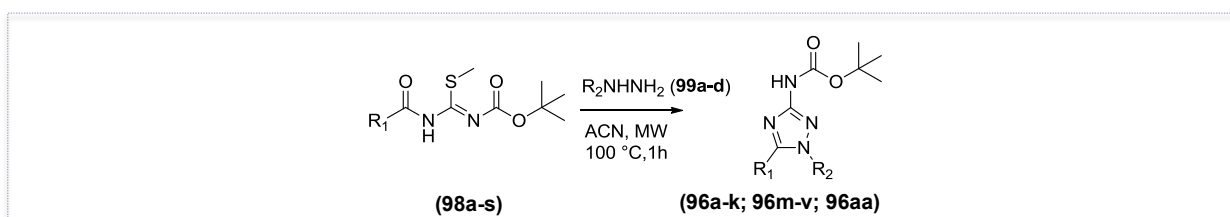
(VERHEIJEN *et al.*, 2009)



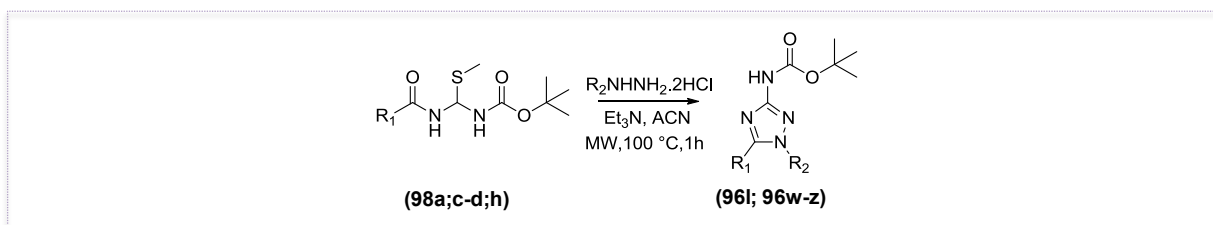
Em um tubo de borosilicato selado foram solubilizados 3,672 mmols de hidrazida benzóica (**108**) e 3,672 mmols de 1-benzilpiperidin-4-ona (**109**) em 10 mL de metanol. A mistura reacional foi mantida em agitação por 1 h a 40 °C. A solução foi resfriada em banho de gelo e 7,344 mmols de borohidreto de sódio foram adicionados lentamente. Após 2 h o solvente foi evaporado e o resíduo foi particionada entre diclorometano (30 mL) e solução saturada de bicarbonato de sódio (30 mL). A fase orgânica foi seca em sulfato de sódio e concentrada em evaporador rotatório originando um sólido amarelo. A este sólido foi adicionado 10 mL de água e 5 mL de ácido clorídrico. A solução aquosa ficou em aquecimento em tubo selado e agitação a 100 °C *overnight* e depois esta solução foi resfriada em banho de gelo e o ácido benzoico precipitado foi filtrado em funil de buchener. O filtrado foi concentrado em evaporador rotatório gerando o produto (**107**).

5.1.6. Síntese de 3-amino-1,2,4-triazol N-Boc (96a-aa)

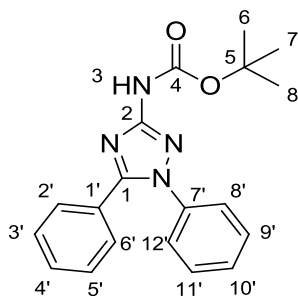
(SANTOS *et al.*, 2019)



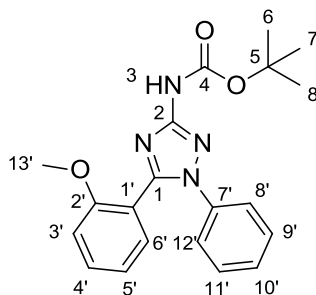
Em um tubo selado foram solubilizados 0,983 mmols de *N*-acil-2-metil-isotiurêia *N*-Boc (**98a-s**) e 1,081 mmols de fenilhidrazina (**99a-c;108**) ($R_2 = \text{Ph}$; e $R_2 = 4\text{-F}$; $R_2 = 4\text{-NO}_2$) em 3 mL de acetonitrila (ACN), em seguida a reação foi mantida sob agitação a 100 °C. Após 1 hora, o fim da reação confirmado por CCD eluída com hexano: acetato de etila 30 %. Então, a mistura reacional foi concentrada em evaporador rotatório. Os produtos (**96a-k**; **96m-v**; **96aa**) foram obtidos como sólidos de diferentes cores, os quais foram isolados, purificado através da técnica cromatográfica líquida de adsorção em coluna flash e fase normal, eluídos com gradiente hexano: acetato de etila 10 a 50 %. Foram obtidos bons rendimentos reacionais na faixa de 46-89 %. Foram caracterizados por técnicas espectroscópicas de RMN de ^1H e ^{13}C e determinados os respectivos pontos de fusão.



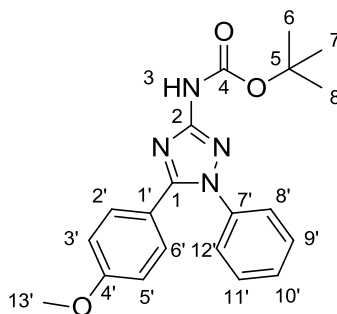
Em um tubo selado de borossilicato foram solubilizados 0,983 mmol de *N*-acil-2-metil-isotiurêia *N*-Boc (**98a-c-d-h**) e 1,081 mmol de hidrazina diHCl (**99d-e**) ($R_2 = 4\text{-SO}_2\text{CH}_3\text{-Ph}$; e $R_2 = \text{Bz}$) e 9,00 mmol de trietilamina em 3 ml de acetonitrila, então a reação foi mantida sob agitação a 100 °C. Depois de 1 hora, o término da reação confirmado por CCD eluída com hexano:acetato de etila 30 %. Em seguida, a mistura reacional foi lavada com bicarbonato de sódio (3 x 30 mL) e seca com sulfato de sódio anidro (NaSO_4). A fase orgânica combinada foi concentrada com evaporador rotatório, em seguida, purificada via cromatografia flash, utilizando coluna snap 10g ultra, eluída com gradiente hexano: acetato de etila 10 a 50 %. Os produtos (**96i**; **96w-z**) foram obtidos como sólidos e rendimentos reacionais na faixa de 45-88 %. Estes foram caracterizados por técnicas espectroscópicas de RMN de ^1H e ^{13}C e determinados os respectivos pontos de fusão.



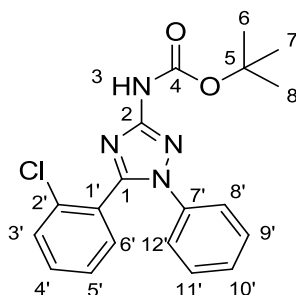
RMN ¹H (400 MHz) CDCl₃ (δ-ppm): H_{6,7,8} = 1,52 (s, 9H); H_{2',6',9',11'} = 7,34 - 7,39 (m, 8H); H_{8',12'} = 7,49 (d, 2H). **RMN ¹³C (100 MHz) CDCl₃ (δ-ppm):** C₁ = 151,32; C₂ = 156,33; C₄ = 153,05; C₅ = 81,34; C_{6,7,8} = 28,21; C_{1'} = - ; C_{2',6'} = 125,75; C_{3',5'} = 128,93; C_{4'} = 130,11; C_{8',12'} = 129,23; C_{9',11'} = 128,50; C_{10'} = 128,91.



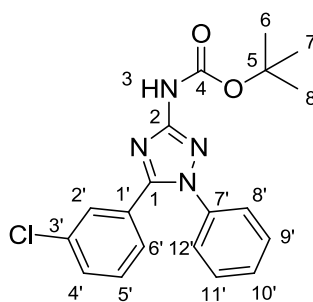
RMN ¹H (400 MHz) CDCl₃ (δ-ppm): H₃ = 7,66 (sl, 1H); H_{6,7,8} = 1,51 (s, 9H); H_{3'} = 6,78 (d, 1H); H_{4'} = 7,41 (t, 1H); H_{5'} = 7,03 (t, 1H); H_{6'} = 7,56 (d, 1H); H_{8',9',10',11',12'} = 7,28-7,30 (m, 5H). **RMN ¹³C (100 MHz) CDCl₃ (δ-ppm):** C₁ = 151,39; C₂ = 156,88; C₄ = 156,22; C₅ = 81,12; C_{6,7,8} = 28,16; C_{1'} = 117,46; C_{2'} = 156,24; C_{3'} = 111,19; C_{4'} = 131,96; C_{5'} = 120,80; C_{6'} = 131,37; C_{7'} = 138,70; C_{8',12'} = 128,57; C_{9',11'} = 123,43; C_{10'} = 127,65; C_{13'} = 54,76.



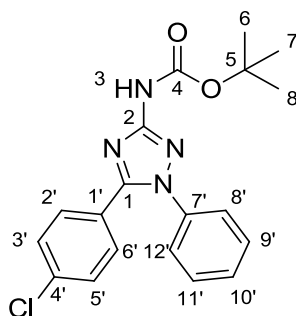
RMN ¹H (500 MHz) CDCl₃ (δ-ppm): H₃ = 7,59 (sl, 1H); H_{6,7,8} = 1,51 (s, 9H); H_{2',6',8',12'} = 7,40 (m, 7H); H_{3',5'} = 6,83 (d, 2H); H_{13'} = 3,81 (s, 3H). **RMN ¹³C (125 MHz) CDCl₃ (δ-ppm):** C₁ = 151,28 ; C₂ = 155,94; C₄ = - ; C₅ = 81,34 ; C_{6,7,8} = 28,18 ; C_{1'} = - ; C_{2',6'} = 130,43; C_{3',5'} = 113,94; C_{4'} = 161,01; C_{7'} = 138,11; C_{8',12'} = 129,25; C_{9',11'} = 125,82; C_{10'} = 128,77; C_{13'} = 55,31.



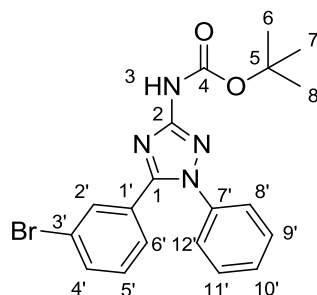
RMN ^1H (500 MHz) CDCl_3 (δ -ppm): $\text{H}_{6,7,8} = 1,52$ (s, 9H); $\text{H}_{3'-12'} = 7,25-7,45$ (m, 9H). **RMN ^{13}C (125 MHz) CDCl_3 (δ -ppm):** $\text{C}_1 = 150,58$; $\text{C}_2 = 156,30$; $\text{C}_4 = 151,18$; $\text{C}_5 = 81,47$; $\text{C}_{6,7,8} = 28,19$; $\text{C}_{1'} = 137,47$; $\text{C}_{2'} = 127,85$; $\text{C}_{3'} = 111,65$; $\text{C}_{4'} = 131,83$; $\text{C}_{5'} = 128,18$; $\text{C}_{6'} = 130,07$; $\text{C}_{7'} = 133,78$; $\text{C}_{8',12'} = 128,95$; $\text{C}_{9',11'} = 123,77$; $\text{C}_{10'} = 126,97$.



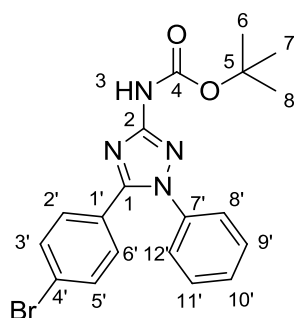
RMN ^1H (500 MHz) CDCl_3 (δ -ppm): $\text{H}_{6,7,8} = 1,51$ (s, 9H); $\text{H}_{2'-12'} = 7,23-7,80$ (m, 9H). **RMN ^{13}C (125 MHz) CDCl_3 (δ -ppm):** $\text{C}_1 = 151,28$; $\text{C}_2 = 156,46$; $\text{C}_4 = 151,55$; $\text{C}_5 = 81,46$; $\text{C}_{6,7,8} = 28,16$; $\text{C}_{1'} = 137,61$; $\text{C}_{2'} = 130,26$; $\text{C}_{3'} = 114,05$; $\text{C}_{4'} = 128,97$; $\text{C}_{5'} = 129,72$; $\text{C}_{6'} = 126,88$; $\text{C}_{7'} = 134,64$; $\text{C}_{8',12'} = 125,72$; $\text{C}_{9',11'} = 129,39$; $\text{C}_{10'} = 129,15$.



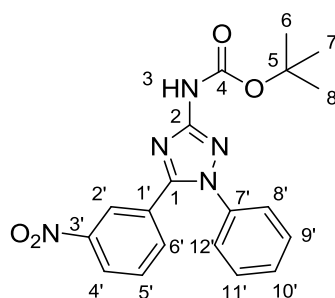
RMN ^1H (400 MHz) CDCl_3 (δ -ppm): $\text{H}_3 = 7,94$ (sl, 1H); $\text{H}_{6,7,8} = 1,48$ (s, 9H); $\text{H}_{2'-6'} = 7,41$ (m, 5H); $\text{H}_{8',12'} = 7,29$ (d, 2H); $\text{H}_{9',11'} = 7,38$ (d, 2H). **RMN ^{13}C (100 MHz) CDCl_3 (δ -ppm):** $\text{C}_1 = 151,33$; $\text{C}_2 = 156,47$; $\text{C}_4 = 151,93$; $\text{C}_5 = 81,37$; $\text{C}_{6,7,8} = 28,14$; $\text{C}_{1'} = 136,37$; $\text{C}_{2',6'} = 125,74$; $\text{C}_{3',5'} = 129,50$; $\text{C}_{4'} = 129,00$; $\text{C}_{7'} = 125,78$; $\text{C}_{8',12'} = 130,18$; $\text{C}_{9',11'} = 128,82$; $\text{C}_{10'} = 137,75$.



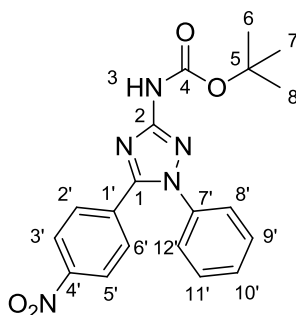
RMN ^1H (500 MHz) CDCl_3 (δ -ppm): $\text{H}_{6,7,8} = 1,52$ (s, 9H); $\text{H}_{2',12'} = 7,17$ -7,72 (m, 9H). **RMN ^{13}C (125 MHz) CDCl_3 (δ -ppm):** $\text{C}_1 = 151,25$; $\text{C}_2 = 156,42$; $\text{C}_4 = 151,47$; $\text{C}_5 = 81,49$; $\text{C}_{6,7,8} = 28,17$; $\text{C}_{1'} = 137,61$; $\text{C}_{2'} = 133,18$; $\text{C}_{3'} = 122,61$; $\text{C}_{4'} = 129,92$; $\text{C}_{5'} = 131,84$; $\text{C}_{6'} = 127,30$; $\text{C}_{7'} = 129,18$; $\text{C}_{8',12'} = 125,72$; $\text{C}_{9',11'} = 129,39$; $\text{C}_{10'} = 129,16$.



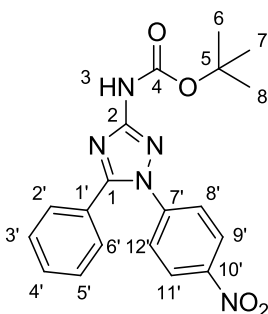
RMN ^1H (500 MHz) CDCl_3 (δ -ppm): $\text{H}_3 = 8,07$; $\text{H}_{6,7,8} = 1,50$ (s, 9H); $\text{H}_{2',12'} = 7,34$ -7,47 (m, 9H). **RMN ^{13}C (125 MHz) CDCl_3 (δ -ppm):** $\text{C}_1 = 151,34$; $\text{C}_2 = 156,47$; $\text{C}_4 = 151,90$; $\text{C}_5 = 81,38$; $\text{C}_{6,7,8} = 28,15$; $\text{C}_{1'} = 136,68$; $\text{C}_{2',6'} = 130,36$; $\text{C}_{3',5'} = 131,82$; $\text{C}_{4'} = 124,82$; $\text{C}_{7'} = 126,11$; $\text{C}_{8',12'} = 129,40$; $\text{C}_{9',11'} = 125,74$; $\text{C}_{10'} = 129,09$.



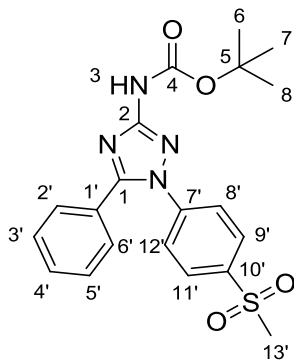
RMN ^1H (500 MHz) CDCl_3 (δ -ppm): $\text{H}_3 = 8,35$ (sl, 1H); $\text{H}_{6,7,8} = 1,54$ (s, 9H); $\text{H}_{2',12'} = 7,37$ -8,25 (m, 9H). **RMN ^{13}C (125 MHz) CDCl_3 (δ -ppm):** $\text{C}_1 = 150,61$; $\text{C}_2 = 156,61$; $\text{C}_4 = 151,17$; $\text{C}_5 = 81,70$; $\text{C}_{6,7,8} = 28,18$; $\text{C}_{1'} = 137,28$; $\text{C}_{2'} = 124,72$; $\text{C}_{3'} = 148,16$; $\text{C}_{4'} = 123,77$; $\text{C}_{5',6'} = 134,40$; $\text{C}_{7'} = 128,92$; $\text{C}_{8',12'} = 125,82$; $\text{C}_{9',11'} = 129,70$; $\text{C}_{10'} = 129,67$.



RMN ^1H (400 MHz) CDCl_3 (δ -ppm): $\text{H}_{6,7,8} = 1,54$ (s, 9H); $\text{H}_{2',6'} = 7,68$ (d, 2H); $\text{H}_{3',5'} = 8,18$ (d, 2H); $\text{H}_{8',12'} = 7,36$ - $7,47$ (m, 5H). **RMN ^{13}C (100 MHz) CDCl_3 (δ -ppm):** $\text{C}_1 = 151,05$; $\text{C}_2 = 156,71$; $\text{C}_4 = 151,10$; $\text{C}_5 = 81,76$; $\text{C}_{6,7,8} = 28,18$; $\text{C}_{1'} = 137,40$; $\text{C}_{2',6'} = 129,78$; $\text{C}_{3',5'} = 123,72$; $\text{C}_4 = 148,41$; $\text{C}_7 = 133,22$; $\text{C}_{8',12'} = 129,67$; $\text{C}_{9',11'} = 125,79$; $\text{C}_{10'} = 129,62$.

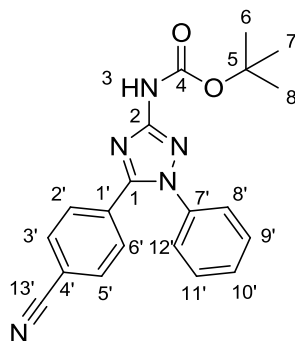


RMN ^1H (400 MHz) $\text{DMSO-}d_6$ (δ -ppm): $\text{H}_3 = 10,12$ (sl, 1H); $\text{H}_{6,7,8} = 1,49$ (s, 9H); $\text{H}_{2',6'} = 7,65$ - $7,74$ (m, 5H); $\text{H}_{8',12'} = 7,65$ (d, 2H); $\text{H}_{9',11'} = 8,34$ (d, 2H). **RMN ^{13}C (100 MHz) $\text{DMSO-}d_6$ (δ -ppm):** $\text{C}_1 = 152,38$; $\text{C}_2 = 157,53$; $\text{C}_4 = 153,88$; $\text{C}_5 = 80,19$; $\text{C}_{6,7,8} = 28,61$; $\text{C}_{1'} = 127,85$; $\text{C}_{2',6'} = 126,48$; $\text{C}_{3',5'} = 129,50$; $\text{C}_4 = 131,21$; $\text{C}_7 = 143,08$; $\text{C}_{8',12'} = 129,52$; $\text{C}_{9',11'} = 125,52$; $\text{C}_{10'} = 147,19$.

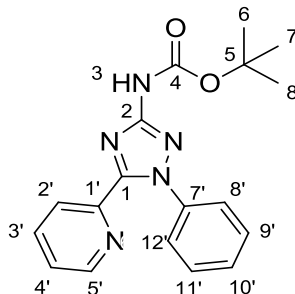


RMN ^1H (400 MHz) CDCl_3 (δ -ppm): $\text{H}_3 = 7,96$ (sl, 1H); $\text{H}_{6,7,8} = 1,50$ (s, 9H); $\text{H}_{2',6'} = 7,38$ - $7,47$ (m, 5H); $\text{H}_{8',12'} = 7,61$ (d, 2H); $\text{H}_{9',11'} = 7,95$ (d, 2H); $\text{H}_{13'} = 3,07$ (s, 3H). **RMN ^{13}C (100**

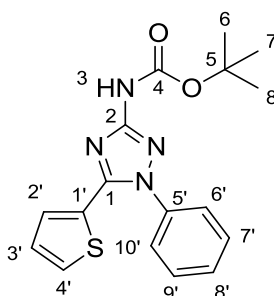
MHz) CDCl₃ (δ-ppm): C₁ = 151,12; C₂ = 156,94; C₄ = 153,56; C₅ = 81,66; C_{6,7,8} = 28,11; C_{1'} = 126,82; C_{2',6'} = 125,73; C_{3',5'} = 128,64; C_{4'} = 130,85; C_{7'} = 140,00; C_{8',12'} = 128,96; C_{9',11'} = 128,95; C_{10'} = 142,09; C_{13'} = 44,46.



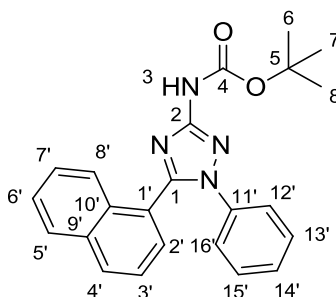
RMN ¹H (500 MHz) CDCl₃ (δ-ppm): H₃ = 7,52 (sl, 1H); H_{6,7,8} = 1,53 (s, 9H); H_{2',6'} = 7,59 (d, 2H); H_{3',5'} = 7,61 (d, 2H); H_{8',12'} = 7,35 (d, 2H); H_{9',11'} = 7,44 (m, 3H). **RMN ¹³C (125 MHz) CDCl₃ (δ-ppm):** C₁ = 151,05; C₂ = 156,66; C₄ = 151,17; C₅ = 81,72; C_{6,7,8} = 28,17; C_{1'} = 137,42; C_{2',6'} = 129,37; C_{3',5'} = 132,25; C_{4'} = 113,77; C_{7'} = 131,47; C_{8',12'} = 129,61; C_{9',11'} = 125,75; C_{10'} = 129,52; C_{13'} = 117,95.



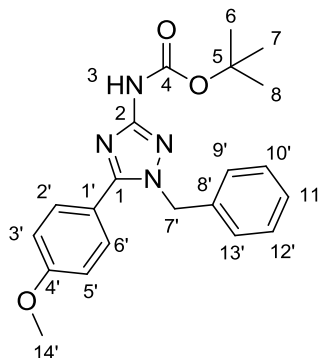
RMN ¹H (500 MHz) CDCl₃ (δ-ppm): H₃ = 7,94 (s, 1H); H_{6,7,8} = 1,49 (s, 9H); H_{2'} = 7,83 (d, 1H); H_{3'} = 7,75 (t, 1H); H_{4'} = 7,30 (t, 1H); H_{5'} = 8,49 (s, 9H); H_{8',12'} = 7,38 (m, 5H). **RMN ¹³C (125 MHz) CDCl₃ (δ-ppm):** C₁ = 151,29 ; C₂ = 156,12; C₄ = - ; C₅ = 81,33; C_{6,7,8} = 28,14; C_{1'} = 146,67; C_{2'} = 128,56 ; C_{3'} = 136,72 ; C_{4'} = 124,36 ; C_{5'} = 149,30; C_{7'} = 138,42; C_{8',12'} = 128,74; C_{9',11'} = 125,77; C_{10'} = 124,35.



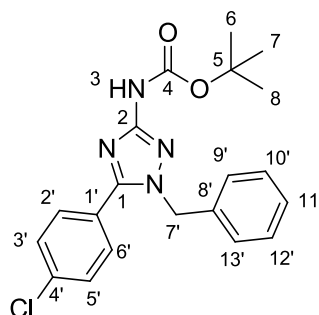
RMN ¹H (500 MHz) CDCl₃ (δ-ppm): H₃ = 7,61 (sl, 1H); H_{6,7,8} = 1,50 (s, 9H); H_{2'} = 7,04 (d, 1H); H_{3'} = 6,94 (t, 1H); H_{4'} = 7,37 (d, 1H); H_{6',10'} = 7,50 (m, 5H). **RMN ¹³C (125 MHz) CDCl₃ (δ-ppm):** C₁ = 148,38; C₂ = 156,21; C₄ = 151,17; C₅ = 81,32; C_{6,7,8} = 28,16; C_{1'} = 137,58; C_{2'} = 129,86; C_{3'} = 128,16; C_{4'} = 128,85; C_{5'} = 128,76; C_{6',10'} = 129,43; C_{7',9'} = 127,10; C_{8'} = 127,57.



RMN ¹H (500 MHz) CDCl₃ (δ-ppm): H₃ = 7,32 (sl, 1H); H_{6,7,8} = 1,55 (s, 9H); H_{2',4'} = 7,92 (m, 3H); H_{5',8'} = 7,50 (t, 2H); H_{6',7'} = 7,40 (m, 2H); H_{12',16'} = 7,16-7,26 (m, 5H). **RMN ¹³C (125 MHz) CDCl₃ (δ-ppm):** C₁ = 151,26; C₂ = 156,39; C₄ = 152,06; C₅ = 81,47; C_{6,7,8} = 28,22; C_{1'} = 137,52; C_{2'} = 124,84; C_{3'} = 125,15; C_{4'} = 130,71; C_{5'} = 128,39; C_{6'} = 126,50; C_{7'} = 127,29; C_{8'} = 128,98; C_{9'} = 133,56; C_{10'} = 131,27; C_{11'} = 125,50; C_{12',16'} = 128,87; C_{13',15'} = 124,12; C_{14'} = 127,98.



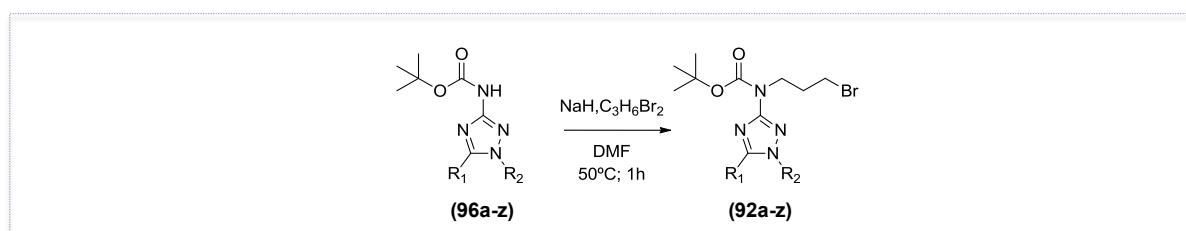
RMN ¹H (400 MHz) CDCl₃ (δ-ppm): H₃ = 7,50 (sl, 1H); H_{6,7,8} = 1,50 (s, 9H); H_{2',6'} = 7,49 (d, 2H); H_{3',5'} = 6,91 (d, 2H); H_{7'} = 5,37 (sl, 2H); H_{9',13'} = 7,19 (d, 2H); H_{10',11',12'} = 7,34 (m, 3H); H_{14'} = 3,84 (s, 3H). **RMN ¹³C (100 MHz) CDCl₃ (δ-ppm):** C₁ = 151,43; C₂ = 155,67; C₄ = 154,37; C₅ = 81,14; C_{6,7,8} = 28,19; C_{1'} = 119,67; C_{2',6'} = 130,14; C_{3',5'} = 114,17; C_{4'} = 161,08; C_{7'} = 52,66; C_{8'} = 136,05; C_{9',13'} = 126,71; C_{10',12'} = 128,83; C_{11'} = 127,84; C_{14'} = 55,35.



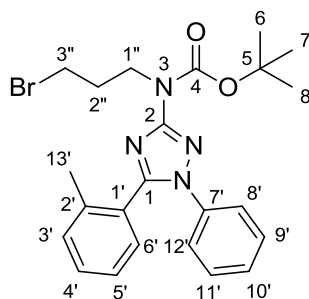
RMN ¹H (400 MHz) CDCl₃ (δ-ppm): H₃ = 7,57 (sl, 1H); H_{6,7,8} = 1,50 (s, 9H); H_{2',6'} = 7,40 (d, 2H); H_{3',5'} = 7,48 (d, 2H); H_{7'} = 5,36 (sl, 2H); H_{9',13'} = 7,17 (d, 2H); H_{10',11',12'} = 7,29-7,36 (m, 3H). **RMN ¹³C (100 MHz) CDCl₃ (δ-ppm):** C₁ = 151,37; C₂ = 155,89; C₄ = 153,37; C₅ = 81,33; C_{6,7,8} = 28,17; C_{1'} = 125,79; C_{2',6'} = 128,93; C_{3',5'} = 129,97; C_{4'} = 135,64; C_{7'} = 52,83; C_{8'} = 136,62; C_{9',13'} = 126,66; C_{10',12'} = 129,10; C_{11'} = 128,05.

5.1.7. Síntese de 3-amino-1,2,4-triazóis- N-alquilados (92a-z)

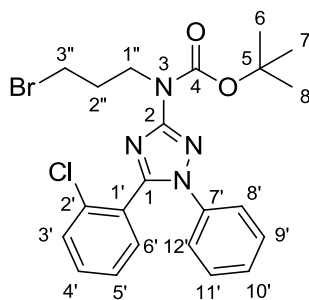
(SANTOS *et al.*, 2019)



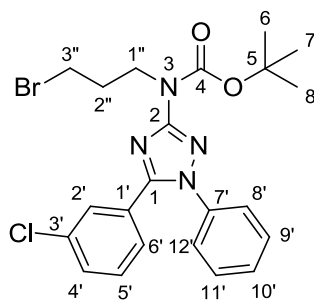
Em um tubo de borossilicato selado foram solubilizados 1,064 mmol do 3-amino-1,2,4-triazóis-N-Boc (96a-z) e 3,193 mmol de hidreto de sódio (NaH) em 7 ml de dimetilformamida anidro (DMF), seguida da adição do 1,3-dibromometano (3,193 mmol). A reação foi mantida em agitação e atmosfera inerte, a 50 °C durante 60 minutos. O monitoramento do término da reação foi feito por CCD eluída com hexano: acetato de etila 30 %. Em seguida, a reação foi diluída em 30 mL de acetato de etila e lavada com água (3 x 10ml). A fase orgânica foi seca com sulfato de sódio anidro (NaSO₄), concentrada em rota evaporador e purificada por cromatografia flash, utilizando coluna snap 10 g ultra, eluída com gradiente hexano:acetato de etila de 10 a 30 %. Os produtos (92a-z) foram obtidos com óleos castanhos e rendimentos reacionais variando entre 37-79 %. Por fim, foram caracterizados por RMN de ¹H e ¹³C.



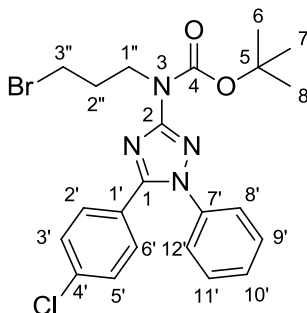
RMN ^1H (500 MHz) CDCl_3 (δ -ppm): $\text{H}_{6,7,8} = 1,54$ (s, 9H); $\text{H}_{3',4'} = 7,20 - 7,24$ (m, 2H); $\text{H}_{5',12'} = 7,37 - 7,48$ (m, 7H); $\text{H}_{13'} = 2,13$ (s, 1H); $\text{H}_{1''} = 3,99 - 4,02$ (t, 2H); $\text{H}_{2''} = 2,33 - 2,34$ (m, 2H); $\text{H}_{3''} = 3,54 - 3,56$ (t, 2H). **RMN ^{13}C (125 MHz) CDCl_3 (δ -ppm):** $\text{C}_1 = -$; $\text{C}_2 = -$; $\text{C}_4 = -$; $\text{C}_5 = 84,55$; $\text{C}_{6,7,8} = 27,96$; $\text{C}_{1'} = 137,25$; $\text{C}_{2'} = 135,05$; $\text{C}_{3'} = 128,73$; $\text{C}_{4'} = 127,67$; $\text{C}_{5'} = 129,85$; $\text{C}_6 = 130,33$; $\text{C}_7 = -$; $\text{C}_{8',12'} = 129,31$; $\text{C}_{9',11'} = 126,00$; $\text{C}_{10'} = 129,30$; $\text{C}_{13'} = 19,40$; $\text{C}_{1''} = 46,75$; $\text{C}_{2''} = 30,69$; $\text{C}_{2''} = 31,09$.



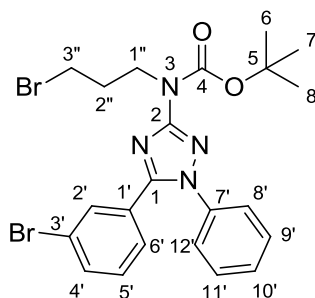
RMN ^1H (500 MHz) CDCl_3 (δ -ppm): $\text{H}_{6,7,8} = 1,55$ (s, 9H); $\text{H}_{3',5',8',11'} = 7,44 - 7,45$ (m, 4H); $\text{H}_{4'} = 7,26$ (m, 1H); $\text{H}_{6'} = 7,58$ (m, 1H); $\text{H}_{9'-11'} = 7,37$ (m, 3H); $\text{H}_{1''} = 3,99 - 4,01$ (t, 2H); $\text{H}_{2''} = 2,29 - 2,32$ (m, 2H); $\text{H}_{3''} = 3,53 - 3,56$ (t, 2H). **RMN ^{13}C (125 MHz) CDCl_3 (δ -ppm):** $\text{C}_1 = 151,95$; $\text{C}_2 = 159,53$; $\text{C}_4 = 153,29$; $\text{C}_5 = 81,78$; $\text{C}_{6,7,8} = 28,29$; $\text{C}_{1'} = 137,62$; $\text{C}_{2'} = 134,64$; $\text{C}_{3'} = 129,74$; $\text{C}_{4'} = 130,22$; $\text{C}_{5'} = 129,22$; $\text{C}_{6'} = 129,05$; $\text{C}_{7'} = 129,24$; $\text{C}_{8',12'} = 129,49$; $\text{C}_{9',11'} = 125,53$; $\text{C}_{10'} = 126,91$; $\text{C}_{1''} = 47,07$; $\text{C}_{2''} = 30,95$; $\text{C}_{3''} = 32,10$.



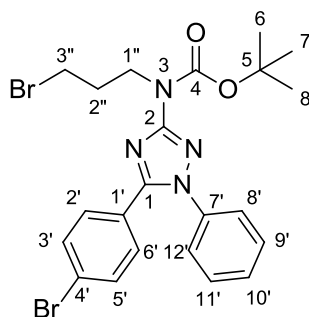
RMN ^1H (500 MHz) CDCl_3 (δ -ppm): $\text{H}_{6,7,8} = 1,54$ (s, 9H); $\text{H}_{2',8',12'} = 7,41$ (m, 3H); $\text{H}_{4',5',9'-11'}$ = 7,31 (m, 5H); $\text{H}_{6'} = 7,47 - 7,48$ (d, 1H); $\text{H}_{1''} = 4,02$ (t, 2H); $\text{H}_{2''} = 2,29 - 2,32$ (m, 2H); $\text{H}_{3''} = 3,54 - 3,56$ (t, 2H). **RMN ^{13}C (125 MHz) CDCl_3 (δ -ppm):** $\text{C}_1 = 150,96$; $\text{C}_2 = 159,43$; $\text{C}_4 = 153,32$; $\text{C}_5 = 81,68$; $\text{C}_{6,7,8} = 28,28$; $\text{C}_{1'} = 137,48$; $\text{C}_{2'} = 127,09$; $\text{C}_{3'} = 133,95$; $\text{C}_{4'} = 130,06$; $\text{C}_{5'} = 131,86$; $\text{C}_{6'} = 131,67$; $\text{C}_{7'} = 116,80$; $\text{C}_{8',12'} = 129,09$; $\text{C}_{9',11'} = 123,62$; $\text{C}_{10'} = 128,29$; $\text{C}_{1''} = 47,07$; $\text{C}_{2''} = 30,99$; $\text{C}_{3''} = 32,11$.



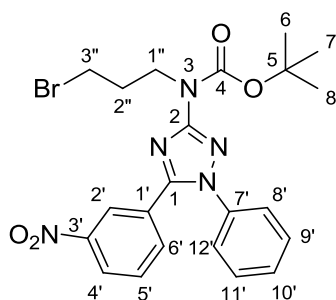
RMN ^1H (500 MHz) CDCl_3 (δ -ppm): $\text{H}_{6,7,8} = 1,54$ (s, 9H); $\text{H}_{2',6'} = 7,36$ (d, 2H); $\text{H}_{3',5'} = 7,32$ (d, 2H); $\text{H}_{8',12'} = 7,42 - 7,45$ (m, 5H); $\text{H}_{1''} = 3,97 - 4,00$ (t, 2H); $\text{H}_{2''} = 2,28 - 2,33$ (m, 2H); $\text{H}_{3''} = 3,53 - 3,55$ (t, 2H). **RMN ^{13}C (125 MHz) CDCl_3 (δ -ppm):** $\text{C}_1 = 152,05$; $\text{C}_2 = 159,23$; $\text{C}_4 = 153,04$; $\text{C}_5 = 81,47$; $\text{C}_{6,7,8} = 28,03$; $\text{C}_{1'} = 137,48$; $\text{C}_{2',6'} = 125,27$; $\text{C}_{3',5'} = 129,22$; $\text{C}_{4'} = 125,76$; $\text{C}_{7'} = 136,10$; $\text{C}_{8',12'} = 129,94$; $\text{C}_{9',11'} = 128,59$; $\text{C}_{10'} = 128,86$; $\text{C}_{1''} = 46,81$; $\text{C}_{2''} = 30,70$; $\text{C}_{3''} = 31,84$.



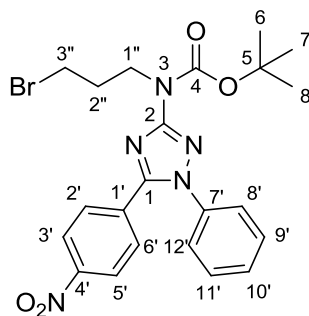
RMN ^1H (500 MHz) CDCl_3 (δ -ppm): $\text{H}_{6,7,8} = 1,55$ (s, 9H); $\text{H}_{2'} = 7,75$ (s, 1H); $\text{H}_{4'} = 7,31$ (d, 1H); $\text{H}_{5'} = 7,18$ (m, 1H); $\text{H}_{6'} = 7,53$ (d, 1H); $\text{H}_{8',10',12'} = 7,45$ (m, 2H); $\text{H}_{9'-11'} = 7,37$ (m, 3H); $\text{H}_{1''} = 3,98 - 4,01$ (t, 2H); $\text{H}_{2''} = 2,29 - 2,32$ (m, 2H); $\text{H}_{3''} = 3,53 - 3,56$ (t, 2H). **RMN ^{13}C (125 MHz) CDCl_3 (δ -ppm):** $\text{C}_1 = 151,81$; $\text{C}_2 = 159,53$; $\text{C}_4 = 153,28$; $\text{C}_5 = 81,79$; $\text{C}_{6,7,8} = 28,29$; $\text{C}_{1'} = 137,59$; $\text{C}_{2'} = 129,25$; $\text{C}_{3'} = 129,59$; $\text{C}_{4'} = 131,94$; $\text{C}_{5'} = 133,13$; $\text{C}_{6'} = 129,93$; $\text{C}_{7'} = 122,02$; $\text{C}_{8',12'} = 129,49$; $\text{C}_{9',11'} = 125,52$; $\text{C}_{10'} = 127,33$; $\text{C}_{1''} = 47,07$; $\text{C}_{2''} = 30,95$; $\text{C}_{3''} = 32,09$.



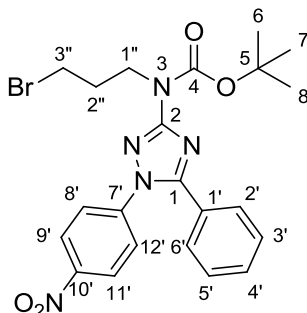
RMN ^1H (500 MHz) CDCl_3 (δ -ppm): $\text{H}_{6,7,8} = 1,54$ (s, 9H); $\text{H}_{2',12'} = 7,35 - 750$ (m, 9H); $\text{H}_{1''} = 3,98 - 4,01$ (t, 2H); $\text{H}_{2''} = 2,29 - 2,32$ (m, 2H); $\text{H}_{3''} = 3,53 - 3,56$ (t, 2H). **RMN ^{13}C (125 MHz) CDCl_3 (δ -ppm):** $\text{C}_1 = 152,37$; $\text{C}_2 = 159,52$; $\text{C}_4 = 153,37$; $\text{C}_5 = 81,76$; $\text{C}_{6,7,8} = 28,30$; $\text{C}_{1'} = 137,74$; $\text{C}_{2',6'} = 130,40$; $\text{C}_{3',5'} = 131,82$; $\text{C}_{4'} = 126,47$; $\text{C}_{7'} = 124,74$; $\text{C}_{8',12'} = 129,51$; $\text{C}_{9',11'} = 125,54$; $\text{C}_{10'} = 129,16$; $\text{C}_{1''} = 47,09$; $\text{C}_{2''} = 30,97$; $\text{C}_{3''} = 32,11$.



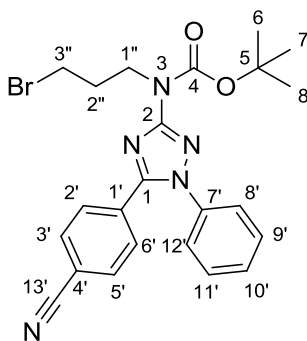
RMN ^1H (500 MHz) CDCl_3 (δ -ppm): $\text{H}_{6,7,8} = 1,56$ (s, 9H); $\text{H}_{2'} = 8,37$ (sl, 1H); $\text{H}_{4'} = 7,81$ (d, 1H); $\text{H}_{5'} = 7,53$ (t, 1H); $\text{H}_{6'} = 8,25$ (d, 1H); $\text{H}_{8',10',12'} = 7,46-7,49$ (m, 3H); $\text{H}_{9',11'} = 7,38$ (m, 2H); $\text{H}_{1''} = 4,01 - 4,03$ (t, 2H); $\text{H}_{2''} = 2,29 - 2,35$ (m, 2H); $\text{H}_{3''} = 3,54 - 356$ (t, 2H). **RMN ^{13}C (125 MHz) CDCl_3 (δ -ppm):** $\text{C}_1 = 150,92$; $\text{C}_2 = 159,74$; $\text{C}_4 = 153,15$; $\text{C}_5 = 81,95$; $\text{C}_{6,7,8} = 28,27$; $\text{C}_{1'} = 137,30$; $\text{C}_{2'} = 124,66$; $\text{C}_{3'} = 148,15$; $\text{C}_{4'} = 123,82$; $\text{C}_{5'} = 133,63$; $\text{C}_{6'} = 134,44$; $\text{C}_{7'} = 129,17$; $\text{C}_{8',12'} = 129,77$; $\text{C}_{9',11'} = 125,00$; $\text{C}_{10'} = 129,67$; $\text{C}_{1''} = 47,09$; $\text{C}_{2''} = 30,97$; $\text{C}_{3''} = 32,03$.



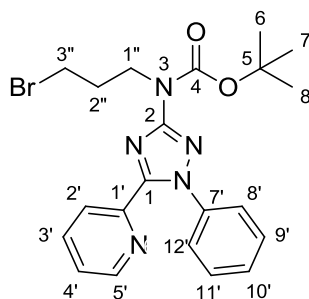
RMN ¹H (500 MHz) CDCl₃ (δ-ppm): H_{6,7,8} = 1,56 (s, 9H); H_{2',6'} = 7,68 (d, 2H); H_{3',5'} = 8,19 (d, 2H); H_{8',12'} = 7,70 (m, 2H); H_{9',11'} = 7,48 (m, 3H); H_{1''} = 4,00 - 4,03 (t, 2H); H_{2''} = 2,30 - 2,33 (m, 2H); H_{3''} = 3,53 - 3,56 (t, 2H). **RMN ¹³C (125 MHz) CDCl₃ (δ-ppm):** C₁ = 150,77; C₂ = 159,61; C₄ = 152,86; C₅ = 81,93; C_{6,7,8} = 28,01; C_{1'} = 137,14; C_{2',6'} = 129,48; C_{3',5'} = 123,46; C_{4'} = 129,39; C_{7'} = 133,14; C_{8',12'} = 129,55; C_{9',11'} = 125,35; C_{10'} = 148,16; C_{1''} = 46,81; C_{2''} = 30,61; C_{3''} = 31,77.



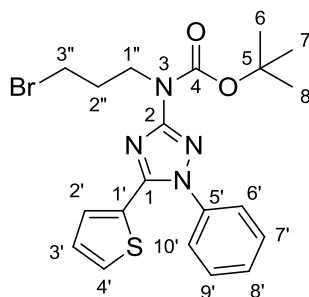
RMN-¹H (500 MHz) CDCl₃ (δ-ppm): **RMN ¹H (500 MHz) CDCl₃ (δ-ppm):** H_{6,7,8} = 1,57 (s, 9H); H_{2',6'} = 7,55 (d, 2H); H_{3',4'} = 8,26 (d, 2H); H_{8', 10, 12'} = 7,47 (m, 2H); H_{9', 11'} = 7,42 (m, 3H); H_{1''} = 4,02 - 4,05 (t, 2H); H_{2''} = 2,31 - 2,33 (m, 2H); H_{3''} = 3,52 - 3,55 (t, 2H). **RMN ¹³C (125 MHz) CDCl₃ (δ-ppm):** C₁ = 153,21; C₂ = 160,39; C₄ = 154,18; C₅ = 82,35; C_{6, 7, 8} = 28,53; C_{1'} = 127,19; C_{2', 6'} = 129,23; C_{3', 5'} = 125,50; C_{4'} = 131,11; C_{7'} = 142,83; C_{8', 12'} = 129,30; C_{9', 11'} = 125,00; C_{10'} = 147,15; C_{1''} = 47,23; C_{2''} = 31,07; C_{3''} = 32,30.



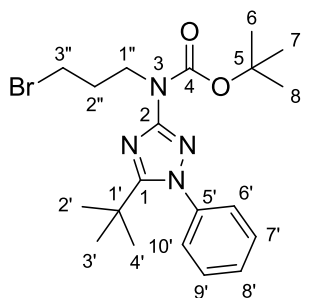
RMN ¹H (500 MHz) CDCl₃ (δ-ppm): H_{6,7,8} = 1,53 (s, 9H); H_{2',6'} = 8,16 - 8,18 (d, 2H); H_{3',5'} = 7,80 (d, 2H); H_{8', 12'} = 7,50 - 7,40 (m, 5H); H_{1''} = 3,98 - 4,01 (t, 2H); H_{2''} = 2,28 - 2,33 (m, 2H); H_{3''} = 3,55 - 3,52 (t, 2H). **RMN ¹³C (125 MHz) CDCl₃ (δ-ppm):** C₁ = -; C₂ = -; C₄ = -; C₅ = 81,94; C_{6, 7, 8} = 28,21; C_{1'} = 134,98; C_{2', 6'} = 129,87; C_{3', 5'} = 133,29; C_{4'} = 116,97; C_{7'} = 131,93; C_{8', 12'} = 130,13; C_{9', 11'} = 129,66; C_{10'} = 129,65; C_{1''} = 42,53; C_{2''} = 31,11; C_{3''} = 32,27.



RMN ^1H (500 MHz) CDCl_3 (δ -ppm): $\text{H}_{6,7,8} = 1,54$ (s, 9H); $\text{H}_{2'} = 7,89$ (d, 1H); $\text{H}_{3'} = 7,8$ (t, 1H); $\text{H}_{4'} = 7,35$ (m, 1H); $\text{H}_{5'} = 8,52$ (d, 1H); $\text{H}_{8',12'} = 7,41$ (m, 5H); $\text{H}_{1''} = 4,00$ (t, 2H); $\text{H}_{2''} = 2,32$ (m, 2H); $\text{H}_{3''} = 3,54$ (t, 2H). **RMN ^{13}C (125 MHz) CDCl_3 (δ -ppm):** $\text{C}_1 = -$; $\text{C}_2 = -$; $\text{C}_4 = -$; $\text{C}_5 = -$; $\text{C}_{6,7,8} = 28,53$; $\text{C}_{1'} = -$; $\text{C}_{2',12'} = -$; $\text{C}_{1''} = 47,39$; $\text{C}_{2''} = 29,94$; $\text{C}_{3''} = 32,27$.

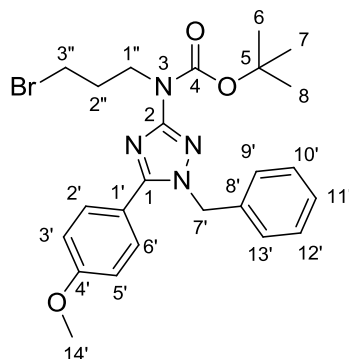


RMN ^1H (500 MHz) CDCl_3 (δ -ppm): $\text{H}_{6,7,8} = 1,56$ (s, 9H); $\text{H}_{2'} = 8,11$ (d, 1H); $\text{H}_{3'} = 7,20$ (m, 1H); $\text{H}_{4'} = 7,94$ (d, 1H); $\text{H}_{6',10'} = 7,30-7,80$ (m, 5H); $\text{H}_{1''} = 4,34 - 4,36$ (t, 2H); $\text{H}_{2''} = 2,42$ (m, 2H); $\text{H}_{3''} = 4,14 - 4,16$ (t, 2H). **RMN ^{13}C (125 MHz) CDCl_3 (δ -ppm):** $\text{C}_1 = 151,10$; $\text{C}_2 = 154,02$; $\text{C}_4 = 151,86$; $\text{C}_5 = 84,81$; $\text{C}_{6,7,8} = 27,68$; $\text{C}_{1'} = 142,76$; $\text{C}_{2'} = 131,20$; $\text{C}_{3'} = 125,8$; $\text{C}_{4'} = 128,80$; $\text{C}_{8',12'} = 129,42$; $\text{C}_{9',11'} = 126,11$; $\text{C}_{10'} = 129,41$; $\text{C}_{1''} = 45,13$; $\text{C}_{2''} = 20,34$; $\text{C}_{3''} = 37,64$.



RMN ^1H (500 MHz) CDCl_3 (δ -ppm): $\text{H}_{6,7,8} = 1,49$ (s, 9H); $\text{H}_{2',4'} = 1,25$ (s, 9H); $\text{H}_{6',8',10'} = 7,45-7,49$ (m, 3H); $\text{H}_{7',9'} = 7,39$ (m, 2H); $\text{H}_{1''} = 3,89 - 3,90$ (t, 2H); $\text{H}_{2''} = 2,21 - 2,27$ (m, 2H); $\text{H}_{3''} = 3,51 - 3,54$ (t, 2H). **RMN ^{13}C (125 MHz) CDCl_3 (δ -ppm):** $\text{C}_1 = 153,63$; $\text{C}_2 = 162,63$;

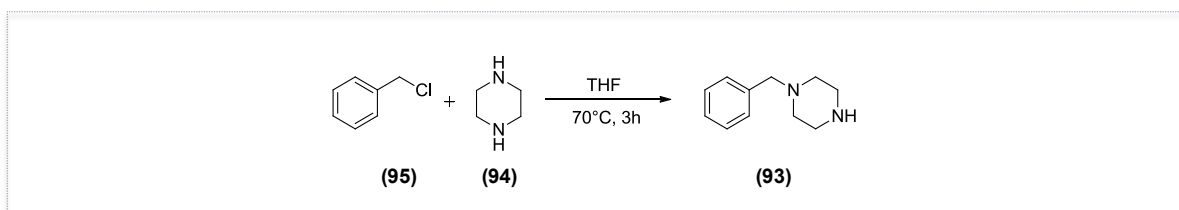
$C_4 = 157,33$; $C_5 = 80,86$; $C_{6,7,8} = 27,92$; $C_{1'} = 33,31$; $C_{2',3',4'} = 29,60$; $C_{5'} = 139,21$; $C_{6',10'} = 1128,63$; $C_{7',9'} = 127,85$; $C_{8'} = 129,49$.



RMN ^1H (500 MHz) CDCl_3 (δ -ppm): $H_{6,7,8} = 1,55$ (s, 9H); $H_{2',6'} = 7,87$ (d, 2H); $H_{3',5'} = 7,13$ (d, .H); $H_{7'} = 5,31$ (s, 2H); $H_{9',13'} = 7,35$ (m, 2H); $H_{10'-12'} = 7,33$ (m, 3H); $H_{14'} = 3,90$ (s, 3H); $H_{1''} = 4,43$ (t, 2H); $H_{2''} = 2,29$ (m, 2H); $H_{3''} = 4,17$ (t, 2H). **RMN ^{13}C (125 MHz) CDCl_3 (δ -ppm):** $C_1 = 148,28$; $C_2 = 149,79$; $C_4 = 148,91$; $C_5 = 85,00$; $C_{6,7,8} = 28,22$; $C_{1'} = 132,85$; $C_{2',6'} = 132,69$; $C_{3',5'} = 115,71$; $C_{4'} = 163,73$; $C_{7'} = 54,97$; $C_{8'} = 136,36$; $C_{9',13'} = 129,34$; $C_{10',12'} = 128,48$; $C_{11'} = 126,75$; $C_{14'} = 55,97$; $C_{1''} = 44,91$; $C_{2''} = 20,77$; $C_{3''} = 42,40$.

5.1.8. Síntese de benzilpiperazina (93)

(PETERSON *et al.*, 2009)

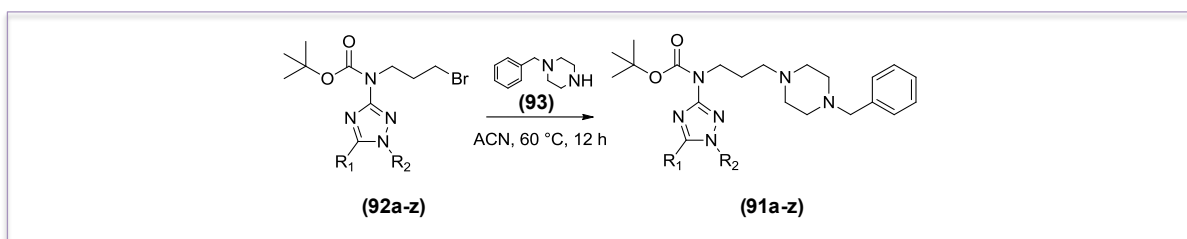


Em um tudo de borosilicato selado, 47,27 mmols de piperazina (**94**) foram solubilizados com 3,5 mL de tetraidrofurano anidro (THF) e a aquecida a 70 °C até a total solubilização da piperazina. Em seguida, foi adicionado 6,952 mmols de cloreto de benzila (**95**) gota a gota à mistura reacional. A mistura de reacional foi mantida em agitação e refluxo por 3 horas e monitorada através de CCD eluída com diclorometano: metanol 10 %. Após, mistura de reacional foi arrefecida e filtrada. Os sólidos foram lavados com THF (3 mL) e depois com EtOAc (3 mL). A fase orgânica combinada foi concentrada em evaporador rotatório, a qual foi então lavada com água básica com salmoura a 5 % e KOH (pH > 12). A camada aquosa foi extraída com diclorometano (3 x 10mL) e acetato de etila (10 mL). A fase

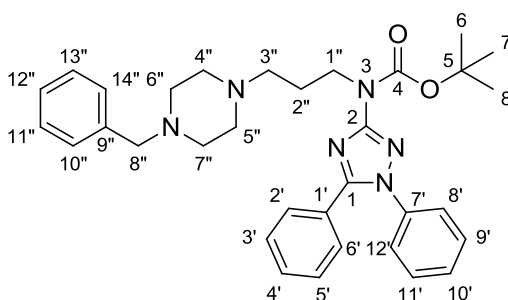
orgânica combinada foi seca com sulfato de sódio anidro (NaSO₄) e concentradas em evaporador rotatório. O produto bruto (**93**) foi purificado por cromatografia flash, utilizando coluna snap 25 g ultra, eluída com gradiente acetato de etila: metanol 10 a 30 %. Foi obtido um óleo que, posteriormente, cristalizou-se formando um sólido amorfo branco de rendimento bruto igual a 89 % e ponto de fusão igual a 81-84 °C.

5.1.9. Síntese de 3-amino-propinil-piperazil-1,2,4-triazol *N*-Boc (**91a-z**)

(SANTOS *et al.*, 2019)

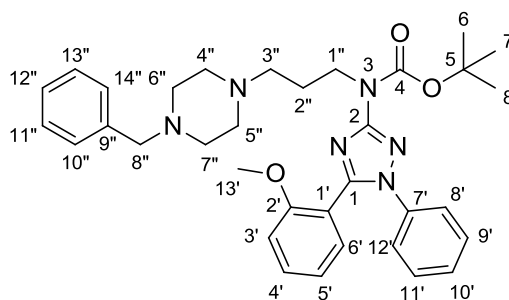


Em tubo selado foram solubilizados 0,5383 mmol de 3-amino-1,2,4-triazóis- *N*-alquilados (**92a-z**) e 1,077 mmol de benzilpiperazina (**93**) em 10 mL de acetonitrila (ACN). A reação foi mantida em agitação a 60 °C por 12 horas. O término da reação foi monitorado através de CCD eluída com diclorometano: metanol 10 %. Em seguida, a reação foi concentrada em rota evaporador e purificada por cromatografia flash, utilizando coluna snap 10 g ultra, eluída com gradiente diclorometano: metanol 1 a 30 %. Foram obtidos produtos (**91a-z**) na forma de óleos castanhos de diferentes tonalidades com rendimento variando entre 35-66 %. Por fim, foram caracterizados por técnica de RMN de ¹H e ¹³C.

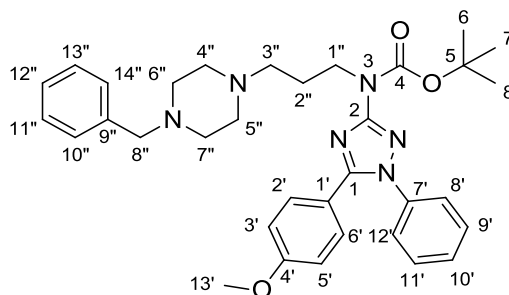


RMN ¹H (500 MHz) CDCl₃ (δ-ppm): H_{6,7,8} = 1,51 (s, 9H); H_{2'-6',8',9',11',10''-14''} = 7,28-7,40 (m, 13H); H_{8',12'} = 7,45-7,47 (m, 2H); H_{1''} = 3,89-3,92 (t, 2H); H_{2''} = 2,12 (m, 2H); H_{3''-7''} = 2,76-2,81(m, 10H); H_{8''} = 3,61 (s, 2H). **RMN ¹³C (125 MHz) CDCl₃ (δ-ppm):** C₁ = 153,33 C₂ = 159,03; C₄ = 153,43; C₅ = 81,59; C_{6,7,8} = 28,21; C_{1'} = - ; C_{2',6'} = 125,39; C_{3',5'} = 129,28; C_{4'} =

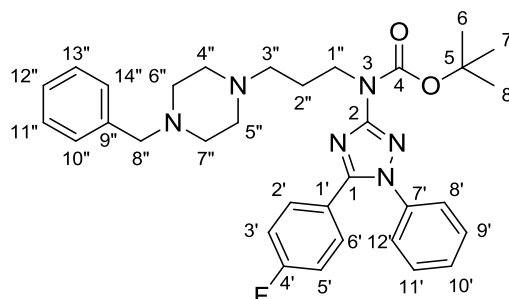
130,09; C₇' = 127,40; C_{8',12'} = 129,41; C_{9',11'} = 128,84; C_{10'} = 127,66; C_{13''} = 46,12; C_{2''} = 24,56; C_{3''} = 50,88; C_{4',5''} = 55,17; C_{6',7''} = 52,07; C_{8''} = 62,11; C_{10''-14'} = 128,47; C_{11''-13'} = 128,42.



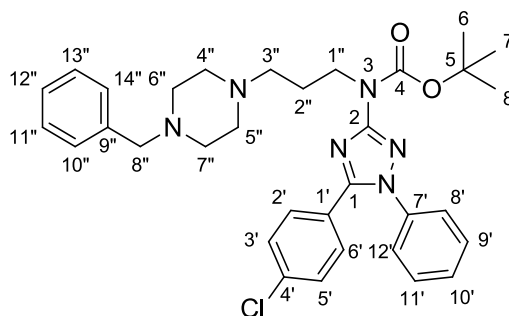
RMN ¹H (500 MHz) CDCl₃ (δ-ppm): H_{6,7,8} = 1,56 (s, 9H); H₃' = 7,04 (d, 1H); H₄' = 7,66-7,68 (t, 1H); H₅' = 7,16 (t, 1H); H₃' = 8,13-8,14 (t, 1H); H_{8'-12',10''-14''} = 7,29-7,30 (m, 2H); H_{13''} = 3,73 (s, 3H); H_{1''} = 3,21 (t, 2H); H_{2''} = 2,50 (m, 2H); H_{3''-7''} = 2,80 (m, 10H); H_{8''} = 3,57 (s, 2H). **RMN ¹³C (125 MHz) CDCl₃ (δ-ppm):** C₁ = - ; C₂ = - ; C₄ = - ; C₅ = - ; C_{6,7,8} = 27,99; C₁' = - ; C₃' = 111,45; C₄' = 133,17; C₅' = 122,29; C₆' = 135,66; C₇' = - ; C_{8',12'} = 129,00; C_{9',11'} = 128,80; C_{10'} = 128,96; C_{13'} = 55,96; C_{1''} = 43,51; C_{2''} = 20,37; C_{3''} = 42,60; C_{4',5''} = 55,95; C_{6',7''} = 49,21; C_{8''} = 62,35; C_{10''-14'} = 128,45; C_{11''-15'} = 128,40; C_{12''} = 127,51.



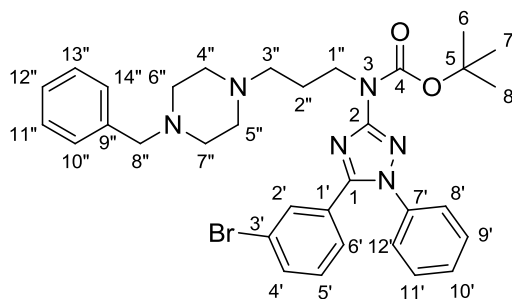
RMN ¹H (500 MHz) CDCl₃ (δ-ppm): H_{6,7,8} = 1,51 (s, 9H); H_{2',6',8',10',12'} = 7,40-7,41 (m, 5H); H_{3',5'} = 6,82-6,84 (d, 2H); H_{9',11'} = 7,37-7,39 (m, 2H); H_{13'} = 3,81 (s, 3H); H_{1''} = 3,87 (t, 2H); H_{2''} = 2,00 (m, 2H); H_{3''-7''} = 2,58 (m, 10H); H_{8''} = 3,54 (s, 2H); H_{10''-14''} = 7,27-7,32 (m, 5H). **RMN ¹³C (125 MHz) CDCl₃ (δ-ppm):** C₁ = 153,22; C₂ = 159,18; C₄ = 153,53; C₅ = 81,30; C_{6,7,8} = 28,31; C₁' = 119,94; C_{2',6'} = 130,43; C_{3',5'} = 113,91; C_{4'} = 160,89; C₇' = - ; C_{8',12'} = 129,34; C_{9',11'} = 129,31; C_{10'} = 128,74; C_{13'} = 55,31; C_{1'',3''} = 46,62; C_{2''} = 25,56; C_{4',5''} = 55,50; C_{6',7''} = 52,28; C_{8''} = 62,75; C_{9''} = 138,15; C_{10'',14''} = 128,29; C_{11'',13''} = 125,55; C_{12''} = 127,26.



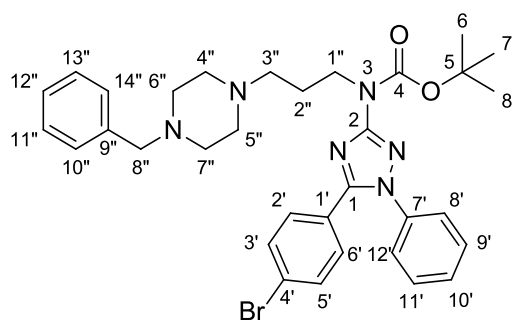
RMN ^1H (500 MHz) CDCl_3 (δ -ppm): $\text{H}_{6,7,8} = 1,53$ (s, 9H); $\text{H}_{2',6',9',11',10''-14''} = 7,33$ (m, 7H); $\text{H}_{3',5'} = 7,11$ (d, 2H); $\text{H}_{8',10',12'} = 7,46$ (m, 3H); $\text{H}_{1''} = 3,91$ (t, 2H); $\text{H}_{2''} = 2,05$ (m, 2H); $\text{H}_{3''-7''} = 2,73$ (m, 10H); $\text{H}_{8''} = 3,58$ (s, 2H). **RMN ^{13}C (125 MHz) CDCl_3 (δ -ppm):** $\text{C}_1 = 153,36$; $\text{C}_2 = 161,34$; $\text{C}_4 = 159,27$; $\text{C}_5 = 81,53$; $\text{C}_{6,7,8} = 28,29$; $\text{C}_{1'} = 127,33$; $\text{C}_{2',6'} = 130,20$; $\text{C}_{3',5'} = 116,24$; $\text{C}_{4'} = 163,33$; $\text{C}_{7'} = -$; $\text{C}_{8',12'} = 129,35$; $\text{C}_{9',11'} = 128,86$; $\text{C}_{1'',3''} = 46,41$; $\text{C}_{2''} = 25,24$; $\text{C}_{4'',5''} = 55,40$; $\text{C}_{6'',7''} = 52,53$; $\text{C}_{8''} = 62,56$; $\text{C}_{9''} = 134,00$; $\text{C}_{10''-14''} = 128,59$; $\text{C}_{11'',13''} = 128,33$; $\text{C}_{12''} = 127,38$.



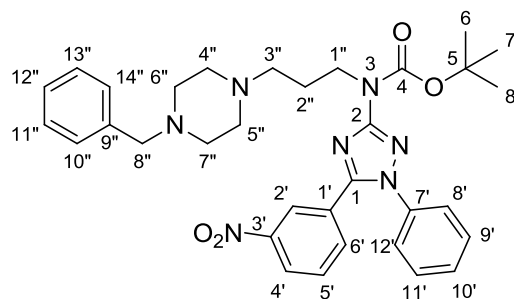
RMN ^1H (500 MHz) CDCl_3 (δ -ppm): $\text{H}_{6,7,8} = 1,54$ (s, 9H); $\text{H}_{2',-12',10''-14''} = 7,32-7,43$ (m, 14H); $\text{H}_{8',12'} = 4,5$ (m, 2H); $\text{H}_{1''} = 3,89$ (t, 2H); $\text{H}_{2''} = 1,96$ (m, 2H); $\text{H}_{3''-7''} = 2,48$ (m, 10H); $\text{H}_{8''} = 3,52$ (s, 2H). **RMN ^{13}C (125 MHz) CDCl_3 (δ -ppm):** $\text{C}_1 = 152,11$; $\text{C}_2 = 159,51$; $\text{C}_4 = 153,34$; $\text{C}_5 = 81,34$; $\text{C}_{6,7,8} = 28,28$; $\text{C}_{1'} = 126,08$; $\text{C}_{2',6'} = 129,43$; $\text{C}_{3',5'} = 130,17$; $\text{C}_{4'} = 136,6$; $\text{C}_{7'} = -$; $\text{C}_{8',12'} = 129,25$; $\text{C}_{9',11'} = 128,81$; $\text{C}_{10''} = 129,02$; $\text{C}_{1'',3''} = 46,76$; $\text{C}_{2''} = 28,53$; $\text{C}_{4'',5''} = 55,59$; $\text{C}_{6'',7''} = 52,83$; $\text{C}_{8''} = 62,96$; $\text{C}_{9''} = 137,77$; $\text{C}_{10''-14''} = 128,20$; $\text{C}_{11''-15''} = 125,49$; $\text{C}_{12''} = 127,49$.



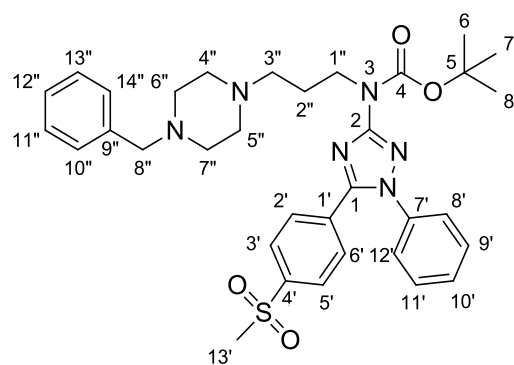
RMN ^1H (500 MHz) CDCl_3 (δ -ppm): $\text{H}_{6,7,8} = 1,52$ (s, 9H); $\text{H}_{2'} = 7,73$ (s, 11H); $\text{H}_{4',10''-14''} = 7,31$ $\text{H}_{6'} = 7,53$ (d, 1H); $\text{H}_{5'} = 7,16$ (t, 1H); $\text{H}_{8',10',12'} = 7,44$ (m, 2H); $\text{H}_{1''} = 3,89$ (t, 2H); $\text{H}_{2''} = 2,01$ (m, 2H); $\text{H}_{3'',7''} = 2,59$ (m, 10H); $\text{H}_{8''} = 3,55$ (s, 2H). **RMN ^{13}C (125 MHz) CDCl_3 (δ -ppm):** $\text{C}_1 = 151,68$; $\text{C}_2 = 159,46$; $\text{C}_4 = 153,34$; $\text{C}_5 = 81,53$; $\text{C}_{6,7,8} = 28,30$; $\text{C}_{1'} = -$; $\text{C}_{2'} = 133,09$; $\text{C}_{3'} = 122,61$; $\text{C}_{4'} = 129,35$; $\text{C}_{5'} = 131,91$; $\text{C}_{6'} = 129,18$; $\text{C}_{7'} = -$; $\text{C}_{8',12'} = 129,97$; $\text{C}_{9',11'} = 129,47$; $\text{C}_{1'',3''} = 46,57$; $\text{C}_{2''} = 29,70$; $\text{C}_{4'',5''} = 55,48$; $\text{C}_{6'',7''} = 52,85$; $\text{C}_{8''} = 62,72$; $\text{C}_{9''} = 137,62$; $\text{C}_{10''-14'} = 128,32$; $\text{C}_{11'',13''} = 125,51$; $\text{C}_{12''} = 127,31$.



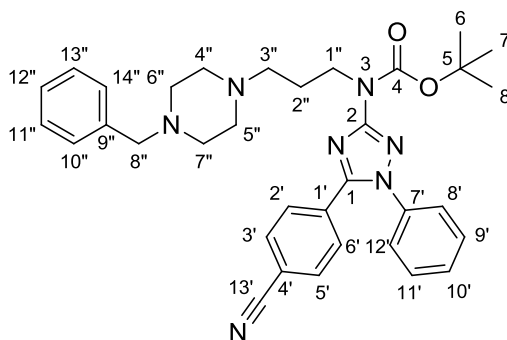
RMN ^1H (500 MHz) CDCl_3 (δ -ppm): $\text{H}_{6,7,8} = 1,52$ (s, 9H); $\text{H}_{2',6'} = 7,46$ (d, 2H); $\text{H}_{3',5',9',11'} = 7,35$ (m, 4H); $\text{H}_{8',10',12'} = 7,43$ (m, 3H); $\text{H}_{1''} = 3,88$ (t, 2H) $\text{H}_{2''} = 2,00$; (m, 2H); $\text{H}_{3'',7''} = 2,57$ (m, 10H); $\text{H}_{8''} = 3,54$ (s, 2H) $\text{H}_{10''-14''} = 7,31$ / (m, 5H). **RMN ^{13}C (125 MHz) CDCl_3 (δ -ppm):** $\text{C}_1 = 151,88$; $\text{C}_2 = 159,48$; $\text{C}_4 = 153,36$; $\text{C}_5 = 81,47$; $\text{C}_{6,7,8} = 28,31$; $\text{C}_{1'} = 126,53$; $\text{C}_{2',6'} = 130,40$; $\text{C}_{3',5'} = 131,80$; $\text{C}_{4'} = 124,68$; $\text{C}_{7'} = -$; $\text{C}_{8',12'} = 129,48$; $\text{C}_{9',11'} = 129,33$; $\text{C}_{10'} = 129,09$; $\text{C}_{1'',3''} = 46,62$; $\text{C}_{2''} = 25,55$; $\text{C}_{4'',5''} = 55,55$; $\text{C}_{6'',7''} = 52,78$; $\text{C}_{8''} = 62,80$; $\text{C}_{9''} = 137,77$; $\text{C}_{10''-14'} = 128,31$; $\text{C}_{11'',13''} = 125,52$; $\text{C}_{12''} = 127,29$.



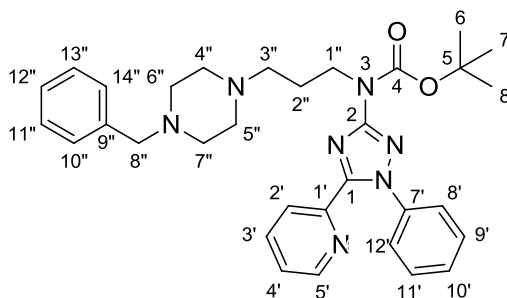
RMN ^1H (500 MHz) CDCl_3 (δ -ppm): $\text{H}_{6,7,8} = 1,53$ (s, 9H); $\text{H}_{2'} = 8,39$ (s, 1H); $\text{H}_{4'} = 7,83$; $\text{H}_{5'} = 7,54$ (t, 1H); $\text{H}_{6'} = 8,27$ (d, 1H); $\text{H}_{8',10',12'} = 7,49$ (m, 3H); $\text{H}_{9',11'} = 7,40$ (m, 2H); $\text{H}_{1''} = 3,94$ (t, 2H); $\text{H}_{2''} = 2,10$ (m, 2H); $\text{H}_{3''-7''} = 2,12$ (m, 10H); $\text{H}_{8''} = 3,61$ (s, 2H); $\text{H}_{10''-14''} = 7,34$ (m, 5H);
RMN ^{13}C (125 MHz) CDCl_3 (δ -ppm): $\text{C}_1 = -$; $\text{C}_2 = -$; $\text{C}_4 = -$; $\text{C}_5 = -$; $\text{C}_{6,7,8} = 28,29$; $\text{C}_{1'} = -$; $\text{C}_{2'} = 123,83$; $\text{C}_{3'} = -$; $\text{C}_{4'} = 124,68$; $\text{C}_{5'} = 129,11$; $\text{C}_{6'} = 134,51$; $\text{C}_{7'} = -$; $\text{C}_{8',12'} = 129,79$; $\text{C}_{9'-11'} = 129,44$; $\text{C}_{1''} = 46,36$; $\text{C}_{2''} = 29,70$; $\text{C}_{3''} = 43,92$; $\text{C}_{4'',5''} = 55,37$; $\text{C}_{6'',7''} = 52,44$; $\text{C}_{8''} = 62,45$; $\text{C}_{9''} = -$; $\text{C}_{10''-14''} = 128,42$; $\text{C}_{11'',13''} = 125,65$; $\text{C}_{12''} = 127,58$.



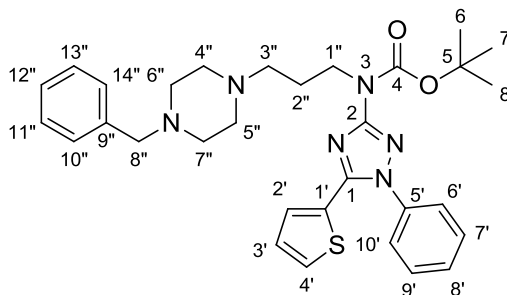
RMN ^1H (500 MHz) CDCl_3 (δ -ppm): $\text{H}_{6,7,8} = 1,55$ (s, 9H); $\text{H}_{2',4',6'} = 7,48$ (m, 3H); $\text{H}_{3',5'} = 7,41$ (m, 2H); $\text{H}_{8',12'} = 7,98$ (d, 2H); $\text{H}_{9',11'} = 7,60$ (d, 2H); $\text{H}_{13'} = 3,10$ (s, 3H); $\text{H}_{1''} = 3,94$ (t, 2H); $\text{H}_{2''} = 2,09$ (m, 2H); $\text{H}_{3''-7''} = 2,71$ (m, 10H); $\text{H}_{8''} = 3,60$ (s, 2H); $\text{H}_{10''-14''} = 7,33$ (m, 5H);
RMN ^{13}C (125 MHz) CDCl_3 (δ -ppm): $\text{C}_1 = 153,07$; $\text{C}_2 = 159,79$; $\text{C}_4 = 153,76$; $\text{C}_5 = 81,86$; $\text{C}_{6,7,8} = 28,24$; $\text{C}_{1'} = 127,11$; $\text{C}_{2',6'} = 128,99$; $\text{C}_{3',5'} = 128,66$; $\text{C}_{4'} = 128,83$; $\text{C}_{7'} = -$; $\text{C}_{8',12'} = 130,72$; $\text{C}_{9',11'} = 129,37$; $\text{C}_{10'} = 142,05$; $\text{C}_{13'} = 44,48$; $\text{C}_{1''} = 46,26$; $\text{C}_{2''} = 24,99$; $\text{C}_{3''} = 43,76$; $\text{C}_{4'',5''} = 55,38$; $\text{C}_{6'',7''} = 49,69$; $\text{C}_{8''} = 62,47$; $\text{C}_{9''} = 140,08$; $\text{C}_{10''-14''} = 128,43$; $\text{C}_{11'',13''} = 125,58$; $\text{C}_{12''} = 127,57$.



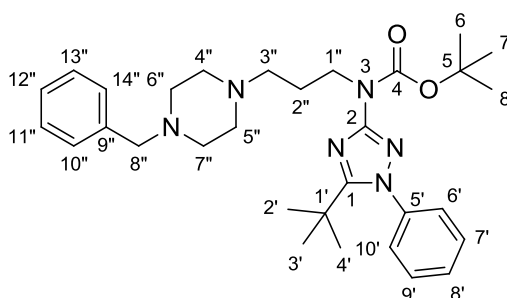
RMN ¹H (500 MHz) CDCl₃ (δ-ppm): H_{6,7,8} = 1,54 (s, 9H); H_{2',6'} = 7,62 (m, 4H); H_{8',10',12'} = 7,48 (m, 3H); H_{9',11',10''-14''} = 7,32 (m, 7H); H_{1''} = 3,91 (t, 2H); H_{2''} = 1,96 (m, 2H); H_{3''-7''} = 2,52 (m, 10H); H_{8''} = 3,53 (s, 2H). **RMN ¹³C (125 MHz) CDCl₃ (δ-ppm):** C₁ = 151,17; C₂ = 159,99; C₄ = 153,21; C₅ = 81,31; C_{6,7,8} = 28,31; C_{1'} = 131,81 ; C_{2',6'} = 129,27; C_{3',5'} = 132,25; C_{4'} = 118,06; C_{7'} = 137,52; C_{8',12'} = 129,67; C_{9',11'} = 129,41; C_{10'} = 129,49; C_{1'',3''} = 46,73; C_{2''} = 24,81; C_{4',5'} = 55,60; C_{6'',7''} = 52,69; C_{8''} = 62,94; C_{9''} = 137,52; C_{10''-14''} = 128,26; C_{11'',13''} = 125,58; C_{12''} = 127,19



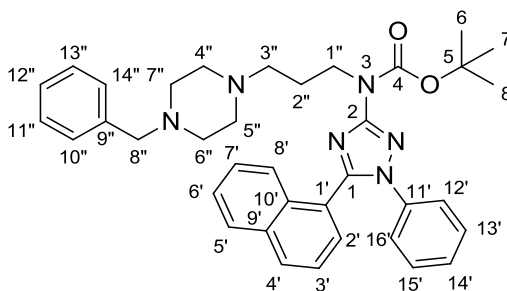
RMN ¹H (500 MHz) CDCl₃ (δ-ppm): H_{6,7,8} = 1,53 (s, 9H); H_{2'} = 7,92 (d, 1H); H_{3'} = 7,78 (t, 1H); H_{4'} = 7,26 (t, 1H); H_{5'} = 8,47 (d, 1H); H_{8'-12'} = 7,40 (m, 5H); H_{1''} = 3,89 (t, 2H) H_{2''} = 1,96; (m, 2H); H_{3''-7''} = 2,50 (m, 10H); H_{8''} = 3,52 (s, 2H) H_{10''-14''} = 7,32 (m, 5H). **RMN ¹³C (125 MHz) CDCl₃ (δ-ppm):** C₁ = 151,70; C₂ = 159,22; C₄ = 153,45; C₅ = 81,26; C_{6,7,8} = 28,29; C_{1'} = - ; C_{2'} = 124,40; C_{3'} = 136,70; C_{4'} = 124,37; C_{5'} = 149,22; C_{7'} = - ; C_{8',12'} = 129,25; C_{9',11'} = 128,73; C_{10'} = 128,48; C_{1'',3''} = 46,81; C_{2''} = 25,89; C_{4',5'} = 55,62; C_{6'',7''} = 52,98; C_{8''} = 62,96; C_{9''} = 138,58; C_{10''-14''} = 128,19; C_{11'',13''} = 125,53; C_{12''} = 127,06



RMN ^1H (500 MHz) CDCl_3 (δ -ppm): $\text{H}_{6,7,8} = 1,50$ (s, 9H); $\text{H}_{2'} = 7,50$ (d, 1H); $\text{H}_{3'} = 7,15$ (m, 1H); $\text{H}_{4'} = 7,41$ (d, 1H); $\text{H}_{5',10',10'',14''} = 7,31$ (m, 10H); $\text{H}_{1''} = 3,83$ (t, 2H); $\text{H}_{2''} = 1,94$ (m, 2H); $\text{H}_{3'',7''} = 2,55$ (m, 10H); $\text{H}_{8''} = 3,55$ (s, 2H). **RMN ^{13}C (125 MHz) CDCl_3 (δ -ppm):** $\text{C}_1 = 153,76$; $\text{C}_2 = 159,01$; $\text{C}_4 = 154,06$; $\text{C}_5 = 81,53$; $\text{C}_{6,7,8} = 28,50$; $\text{C}_{1'} = 136,84$; $\text{C}_{2',4'} = 130,25$; $\text{C}_{3'} = 129,55$; $\text{C}_{5'} = 126,20$; $\text{C}_{6',10'} = 129,37$; $\text{C}_{7',9'} = 129,20$; $\text{C}_{8'} = 128,33$; $\text{C}_{1'',3''} = 46,77$; $\text{C}_{2''} = 25,67$; $\text{C}_{4',5'} = 55,71$; $\text{C}_{6',7''} = 53,01$; $\text{C}_{8''} = 62,99$; $\text{C}_{9''} = 135,92$; $\text{C}_{10'',14''} = 128,51$; $\text{C}_{11'',13''} = 126,79$; $\text{C}_{12''} = 127,48$,



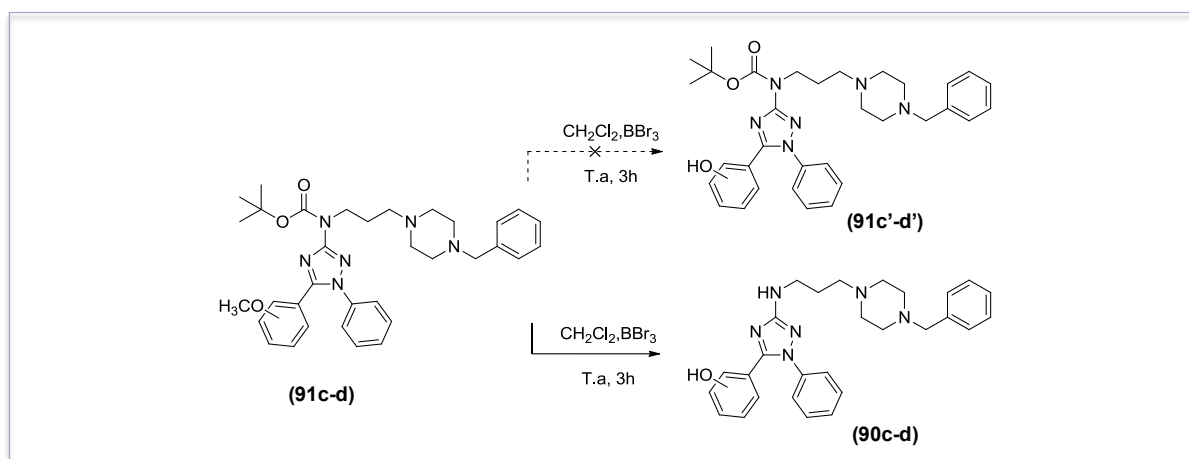
RMN ^1H (500 MHz) CDCl_3 (δ -ppm): $\text{H}_{6,7,8} = 1,47$ (s, 9H); $\text{H}_{2',4'} = 1,24$ (s, 9H); $\text{H}_{8',10',12'} = 7,47$ (m, 3H); $\text{H}_{9',11'} = 7,38$ (m, 2H); $\text{H}_{1''} = 3,79$ (t, 2H); $\text{H}_{2''} = 1,88$ (m, 2H); $\text{H}_{3'',7''} = 2,44$ (m, 10H); $\text{H}_{8''} = 3,51$ (s, 2H); $\text{H}_{10',14'} = 7,31$ (m, 5H). **RMN ^{13}C (125 MHz) CDCl_3 (δ -ppm):** $\text{C}_1 = -$; $\text{C}_2 = -$; $\text{C}_4 = -$; $\text{C}_5 = -$; $\text{C}_{6,7,8} = 29,68$; $\text{C}_{1'} = -$; $\text{C}_{2',3',4'} = 27,99$; $\text{C}_{5'} = -$; $\text{C}_{6',10'} = 128,97$; $\text{C}_{7',9'} = 128,67$; $\text{C}_{8'} = 129,51$; $\text{C}_{9',11'} = 128,84$; $\text{C}_{10'} = 127,66$; $\text{C}_{1''} = 46,12$; $\text{C}_{2''} = 24,56$; $\text{C}_{3''} = 50,88$; $\text{C}_{4',5'} = 55,17$; $\text{C}_{10'',11'',13'',14''} = 127,92$; $\text{C}_{12''} = 126,78$.



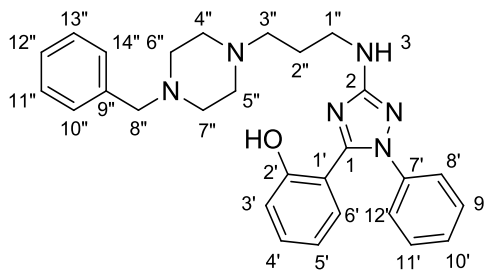
RMN ¹H (500 MHz) CDCl₃ (δ-ppm): H_{6,7,8} = 1,61 (s, 9H); H_{2',3',6',7';12'-16';10''-14''} = 7,36-7,59 (m, 14H); H_{1''} = 4,01 (t, 2H); H_{2''} = 2,12 (m, 2H); H_{3''-7''} = 2,71 (m, 10H); H_{8''} = 3,61 (s, 2H).
RMN ¹³C (125 MHz) CDCl₃ (δ-ppm): C₁ = 152,24; C₂ = 159,39; C₄ = 153,52; C₅ = 81,46; C_{6,7,8} = 28,34; C_{1'} = - ; C_{2',3'} = 123,84 ; C_{4'} = 128,07; C_{5',10',14''} = 128,97; C_{6'} = 124,83; C_{7'} = 125,16 ; C_{8'} = 127,24; C_{9'} = 133,56 ; C_{10'} = 131,37; C_{11'} = 125,51; C_{12',16'} = 130,67; C_{13',15'} = 129,30; C_{14'} = 128,39; C_{1'',3''} = 46,62; C_{2''} = 25,43; C_{4'',5''} = 55,49; C_{6'',7''} = 52,64; C_{8''} = 62,62; C_{11''-13''} = 128,29; C_{12''} = 126,49.

5.1.10. Síntese de 3-amino-propinil-piperazil-1,2,4-triazol N-Boc (91c'-d')

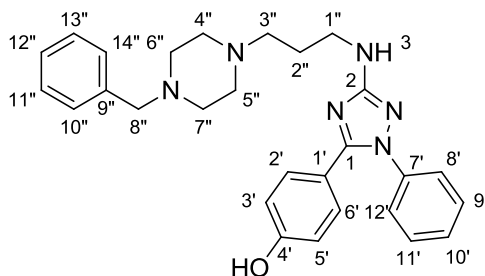
(FRANCO *et al.*, 2015)



Em tudo selado de borosilicato, foram adicionados 0,446 mmol de tribromoborano (BBr_3) a uma solução de 3-amino-propinil-piperazil-1,2,4-triazol N-Boc (**(91c-d)**) (0,223 mmol) em 2,5 mL de diclorometano, à 0 °C. Em seguida, a mistura reacional resultante ficou sob refluxo por 3 horas. Após, mistura reacional foi neutralizada com uma solução de hidróxido de sódio 1 % (NaOH) até $\text{pH} = 7$ e depois extraída com diclorometano, seca com sulfato de sódio anidro (NaSO_4) e concentrada em evaporador rotatório. No lugar dos compostos (**(91c')**) e (**(91d')**), foram obtidos os compostos finais (**(90b)**) e (**(90c)**) desprotegidos do Boc como um sólido branco e óleo castanho com rendimento bruto de 55 % e 84 % respectivamente.



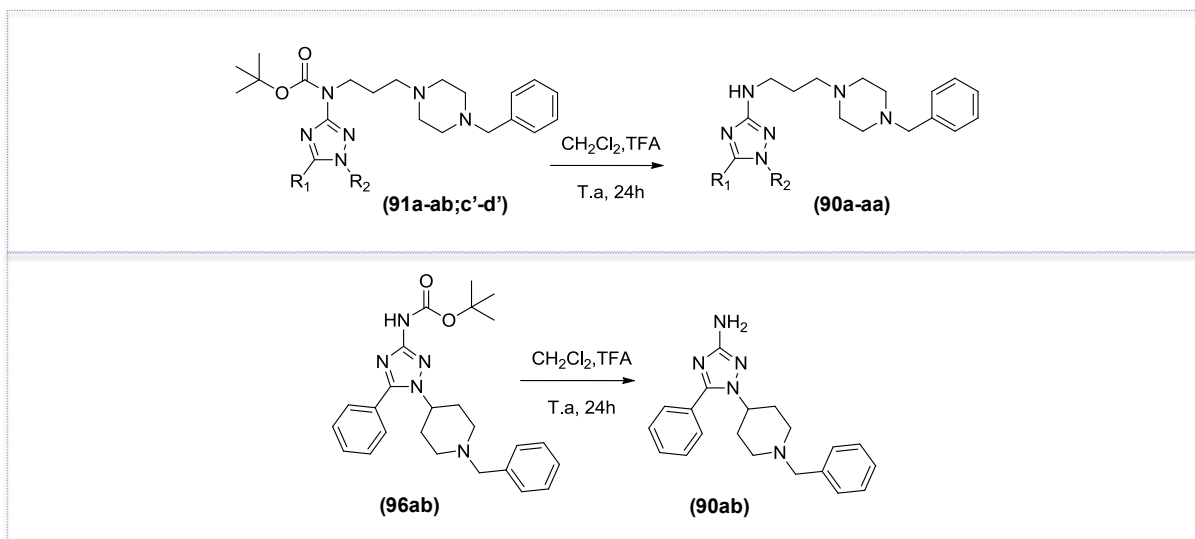
RMN ^1H (500 MHz) CDCl_3 (δ -ppm): $\text{H}_{3'}$ = 6,82 (d, 1H); $\text{H}_{4'}$ = 7,24 (t, 1H); $\text{H}_{5'}$ = 6,55 (t, 1H); $\text{H}_{6'}$ = 7,05 (d, 1H); $\text{H}_{3,8'-12',10''-14''}$ = 7,31-7,51 (m, 11H); $\text{H}_{13'}$ = 5,28 (sl, 1H); $\text{H}_{1''}$ = 3,43 (t, 2H); $\text{H}_{2''}$ = 1,85 (m, 2H); $\text{H}_{3'',-7''}$ = 2,55 (m, 10H); $\text{H}_{8''}$ = 3,54 (s, 2H). **RMN ^{13}C (125 MHz) CDCl_3 (δ -ppm):** C_1 = 150,25; C_2 = 161,52; $\text{C}_{1'}$ = 110,63; $\text{C}_{2'}$ = 157,57; $\text{C}_{3'}$ = 117,63; $\text{C}_{4'}$ = 129,45; $\text{C}_{5'}$ = 118,14; $\text{C}_{6'}$ = 131,49; $\text{C}_{7'}$ = 137,73; $\text{C}_{8',12'}$ = 129,07; $\text{C}_{9',-11'}$ = 127,95; $\text{C}_{1'',3''}$ = 42,50; $\text{C}_{2''}$ = 25,61; $\text{C}_{4'',5''}$ = 56,80; $\text{C}_{6'',7''}$ = 52,79; $\text{C}_{8''}$ = 62,72; $\text{C}_{9''}$ = 138,68; $\text{C}_{10'',14''}$ = 126,32; $\text{C}_{11'',-13''}$ = 126,35.



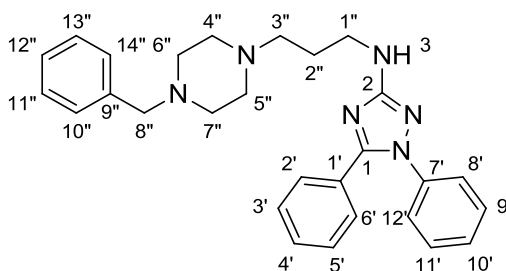
RMN ^1H (500 MHz) CDCl_3 (δ -ppm): $\text{H}_{2',6'}$ = 7,21 (d, 2H); $\text{H}_{3',5'}$ = 6,72 (d, 2H); $\text{H}_{8',10',12'}$ = 7,42 (m, 3H); $\text{H}_{9',11',10''-14''}$ = 7,29 (m, 7H); H_{OH} = 9,89 (m, 7H); $\text{H}_{1''}$ = 3,14 (t, 2H); $\text{H}_{2''}$ = 1,69 (m, 2H); $\text{H}_{3'',-7''}$ = 2,34 (m, 10H); $\text{H}_{8''}$ = 3,44 (s, 2H). **RMN ^{13}C (125 MHz) CDCl_3 (δ -ppm):** C_1 = 152,21; C_2 = 163,81; $\text{C}_{1'}$ = 118,89; $\text{C}_{2',6'}$ = 129,91; $\text{C}_{3',5'}$ = 115,22; $\text{C}_{4'}$ = 158,63; $\text{C}_{7'}$ = 138,26; $\text{C}_{8',12'}$ = 128,17; $\text{C}_{9',-11'}$ = 128,10; $\text{C}_{1'',3''}$ = 41,33; $\text{C}_{2''}$ = 26,38; $\text{C}_{4'',5''}$ = 55,72; $\text{C}_{6'',7''}$ = 52,66; $\text{C}_{8''}$ = 62,09; $\text{C}_{9''}$ = 138,59; $\text{C}_{10'',-14'}$ = 126,83; $\text{C}_{11'',13''}$ = 125,09; $\text{C}_{12''}$ = 127,77.

5.1.11. Síntese de 3-amino-propinil-piperazil-1,2,4-triazol (90a-ab)

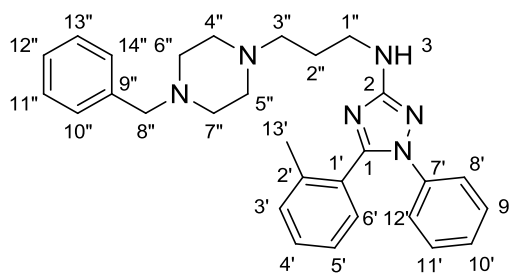
(SANTOS *et al.*, 2019)



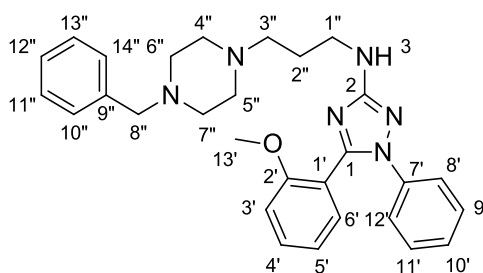
Em balão de 50 ml foram solubilizados 0,1701 mmol de 3-amino-propinil-piperazil-1,2,4-triazol (**90a-ab**) em 18 ml de diclorometano sob banho de gelo, seguida da adição de 5,954 mmol de ácido trifluoroacético. O banho de gelo foi retirado e a reação foi mantida em agitação a temperatura ambiente por 24 horas. O término da reação foi confirmado por CCD eluída com diclorometano: metanol 10 %. A mistura reacional foi neutralizada com uma solução de hidróxido de sódio 1 % (NaOH) até pH 7 e depois extraída com diclorometano, seca com sulfato de sódio anidro (NaSO₄) e concentrada em evaporador rotatório. Os produtos foram obtidos como óleos de coloração castanha ou como de sólidos, cujos pontos de fusão foram determinados. Os rendimentos reacionais variaram entre 85-96 %.



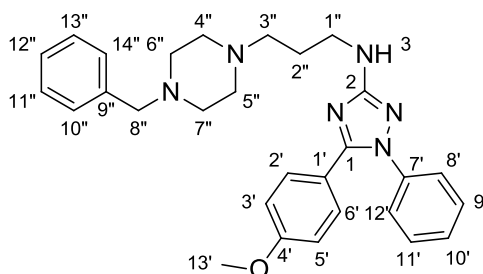
RMN-¹H (500 MHz) CDCl₃ (δ-ppm): H₃= 4,80 (sl,1H); H_{2'-6';9';11';10''-14''}= 7,33 (m, 12H); H_{9',10',11'} = 7,45 (m,3); H_{1''} = 3,43 (t, 2H); H_{2''} = 187 (m, 2H); H_{3''-7''} = 2,54 (m, 10H); H_{8''} = 3,54 (s, 2H). **RMN ¹³C (125 MHz) CDCl₃ (δ-ppm):** C₁ = 152,79; C₂ = 164,12; C_{1'}= 137,90 ; C_{2',6'} = 129,25; C_{3',5'}=129,19; C_{4'} = 129,7; C_{8',12'} = 128,76; C_{9',11'}= 128,42; C_{10'} = 128,52; C_{1'',3''} = 42,62; C_{2''} = 26,34; C_{4'',5''} = 56,61; C_{6'',7''} = 52,85; C_{8''} = 62,92; C_{9''} = 138,380; C_{10'', 14''} = 128,12; C_{11'',13''} = 125,25; C_{12''} = 127,80.



RMN ^1H (500 MHz) CDCl_3 (δ -ppm): $\text{H}_{3',-12',10',-14'}$ = 7,21-7,32 (m, 14H); $\text{H}_{1''}$ = 3,46 (t, 2H); $\text{H}_{2''}$ = 1,88 (m, 2H); $\text{H}_{3'',-7''}$ = 2,56 (m, 10H); $\text{H}_{8''}$ = 3,54 (s, 2H). **RMN ^{13}C (125 MHz) CDCl_3 (δ -ppm):** C_1 = 152,77; C_2 = 164,06; $\text{C}_{1',2'}$ = 137,28; C_3' = 130,01; C_4' = 127,07; C_5' = 129,92; C_6' = 130,55; $\text{C}_{7',8',12'}$ = 125,25; $\text{C}_{9',10',11'}$ = 128,20; $\text{C}_{13'}$ = 19,65; $\text{C}_{1'',3''}$ = 62,91; $\text{C}_{2''}$ = 26,30; $\text{C}_{4'',5''}$ = 56,78; $\text{C}_{6'',7''}$ = 52,87; $\text{C}_{8''}$ = 62,21; $\text{C}_{9''}$ = 138,02; $\text{C}_{10'',14''}$ = 125,92; $\text{C}_{11'',12'',13''}$ = 122,97.

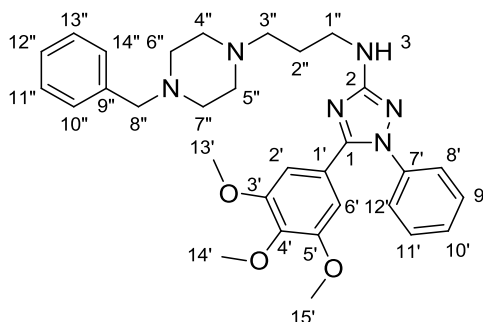


RMN ^1H (500 MHz) CDCl_3 (δ -ppm): H_3' = 7,06 (d, 1H); $\text{H}_{4',5'}$ = 7,65 (m, 2H); H_6' = 7,13 (d, 1H); $\text{H}_{3,8',-12',10',-14'}$ = 7,21-7,32 (m, 11H); $\text{H}_{13'}$ = 3,77 (s, 3H); $\text{H}_{1''}$ = 3,51 (t, 2H); $\text{H}_{2''}$ = 2,04 (m, 2H); $\text{H}_{3'',-7''}$ = 2,42 (m, 10H); $\text{H}_{8''}$ = 3,50 (s, 2H). **RMN ^{13}C (125 MHz) CDCl_3 (δ -ppm):** C_1 = 152,50; C_2' = 157,54; C_3' = 111,75; C_4' = 131,92; C_5' = 121,97; C_6' = 135,35; $\text{C}_{8',12'}$ = 129,11; $\text{C}_{9',10',11'}$ = 128,83; $\text{C}_{13'}$ = 55,94; $\text{C}_{1'',3''}$ = 42,68; $\text{C}_{2''}$ = 29,71; $\text{C}_{4'',5''}$ = 54,29; $\text{C}_{6'',7''}$ = 44,47; $\text{C}_{8''}$ = 62,97; $\text{C}_{10'',14''}$ = 128,29; $\text{C}_{11'',13''}$ = 128,16; $\text{C}_{12''}$ = 127,22.

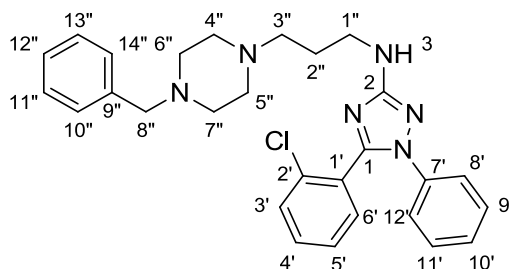


RMN ^1H (500 MHz) CDCl_3 (δ -ppm): $\text{H}_{2',6',8',-12',10',-14'}$ = 7,29-7,38 (m, 12H); $\text{H}_{3',5'}$ = 6,83 (d, 2H); $\text{H}_{13'}$ = 3,81 (s, 3H); $\text{H}_{1''}$ = 3,44 (sl, 2H); $\text{H}_{2''}$ = 2,02 (m, 2H); $\text{H}_{3'',-7''}$ = 2,80-2,92 (m,

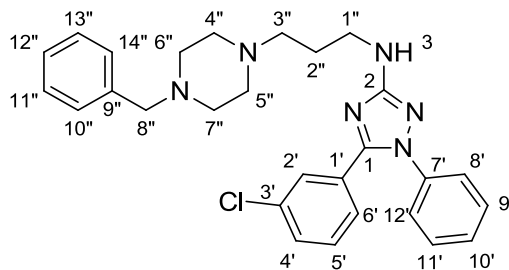
10H); $H_{8''} = 3,67$ (sl, 2H). **RMN ^{13}C (125 MHz) CDCl_3 (δ -ppm):** $C_1 = 152,80$; $C_2 = 163,64$; $C_{1'} = 120,30$; $C_{2',4'} = 130,21$; $C_{3',5'} = 113,89$; $C_{4'} = 160,72$; $C_{8',12'} = 129,48$; $C_{9',10',11'} = 129,24$; $C_{13'} = 55,27$; $C_{1'',3''} = 41,49$; $C_{2''} = 24,98$; $C_{4'',5''} = 55,53$; $C_{6'',7''} = 50,64$; $C_{8''} = 61,91$; $C_{9''} = 138,43$; $C_{10'',14''} = 128,56$; $C_{11'',13''} = 125,28$; $C_{12''} = 128,13$.



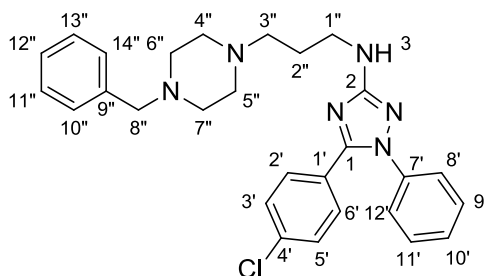
RMN ^1H (500 MHz) CDCl_3 (δ -ppm): $H_{2',6'} = 6,64$ (s, 2H); $H_{3',8'-12',10'',14''} = 7,30-7,43$ (m, 11H); $H_{1''} = 3,45$ (t, 2H); $H_{2''} = 2,03$ (m, 2H); $H_{3'',7''} = 2,72-2,94$ (m, 10H); $H_{8''} = 3,65$ (s, 2H). **RMN ^{13}C (125 MHz) CDCl_3 (δ -ppm):** $C_1 = 152,69$; $C_2 = 163,59$; $C_{2',6'} = 106,06$; $C_{3',5'} = 153,01$; $C_{4'} = 139,30$; $C_{8',10',12'} = 129,33$; $C_{9',11'} = 128,61$; $C_{13',15'} = 55,92$; $C_{14'} = 60,93$; $C_{1'',3''} = 41,42$; $C_{2''} = 29,70$; $C_{4'',5''} = 55,48$; $C_{6'',7''} = 50,52$; $C_{8''} = 61,92$; $C_{9''} = 138,48$; $C_{10'',14''} = 128,48$; $C_{11'',12'',13''} = 125,77$.



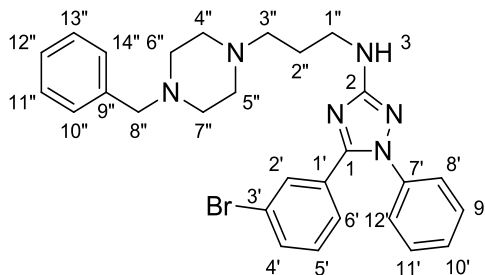
RMN ^1H (500 MHz) CDCl_3 (δ -ppm): $H_{3'} = 4,85$ (s, 11H); $H_{3',6',9',11',11'',13''} = 7,33$ (m, 9H); $H_{8',12'} = 7,53$ (d, 2H); $H_{10'',12'',14''} = 7,23$ (m, 3H); $H_{1''} = 3,40$ (t, 2H); $H_{2''} = 1,84$ (m, 2H); $H_{3'',7''} = 2,53$ (m, 10H); $H_{8''} = 3,54$ (s, 2H). **RMN ^{13}C (125 MHz) CDCl_3 (δ -ppm):** $C_1 = 151,07$; $C_2 = 163,94$; $C_{1'} = -$; $C_{2'} = 134,22$; $C_{3'} = 129,66$; $C_{4'} = 129,83$; $C_{5'} = 126,80$; $C_{6'} = 128,46$; $C_{7'} = 129,64$; $C_{8',12'} = 129,39$; $C_{9',11'} = 129,28$; $C_{10'} = 128,89$; $C_{1'',3''} = 42,46$; $C_{2''} = 26,03$; $C_{4'',5''} = 56,44$; $C_{6'',7''} = 52,70$; $C_{8''} = 62,69$; $C_{9''} = 137,80$; $C_{10''-14''} = 128,23$; $C_{11'',13''} = 125,33$; $C_{12''} = 127,07$.



RMN ¹H (500 MHz) CDCl₃ (δ-ppm): H₃ = 4,87 (sl, 1H); H₂ = 7,48 (s, 1H); H_{4',12',10',14'} = 7,36 (m, 8H); H_{1''} = 3,49 (t, 2H); H_{2''} = 1,91 (m, 2H); H_{3'',7''} = 2,58 (m, 10H); H_{8''} = 3,57 (s, 2H). **RMN ¹³C (125 MHz) CDCl₃ (δ-ppm):** C₁ = 150,09; C₂ = 163,93; C_{1'} = - ; C_{2'} = 126,78; C_{3'} = 133,53; C_{4'} = 131,05; C_{5'} = 131,44; C_{6'} = 126,69; C_{7'} = 128,63; C_{8',12'} = 128,98; C_{9',11'} = 128,69; C_{10'} = 129,75; C_{1'',3''} = 42,55; C_{2''} = 26,02; C_{4'',5''} = 56,54; C_{6'',7''} = 52,67; C_{8''} = 62,67; C_{9''} = 137,67; C_{10'',14''} = 127,86; C_{11'',13''} = 122,86; C_{12''} = 127,10.

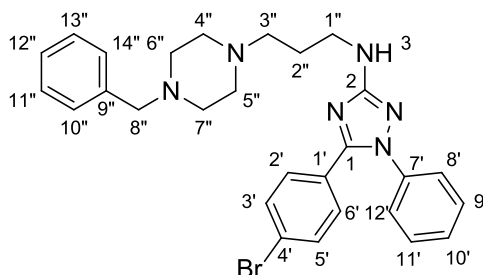


RMN ¹H (500 MHz) CDCl₃ (δ-ppm): H_{2',6'} = 7,25 (d, 2H); H_{3',5'} = 6,93 (d, 2H); H_{3',8',12',10',14''} = 7,31-7,49 (m, 10H); H_{1''} = 3,40 (t, 2H); H_{2''} = 1,85 (m, 2H); H_{3'',7''} = 2,50 (m, 10H); H_{8''} = 3,53 (sl, 2H). **RMN ¹³C (125 MHz) CDCl₃ (δ-ppm):** C₁ = 148,04; C₂ = 164,06; C_{1'} = 129,70; C_{2',6'} = 129,26; C_{3',5'} = 126,76; C_{8',12'} = 129,51; C_{9',11'} = 128,38; C_{10'} = 129,29; C_{1'',3''} = 42,65; C_{2''} = 26,49; C_{4'',5''} = 56,65; C_{6'',7''} = 53,07; C_{8''} = 63,05; C_{9''} = 138,13; C_{10'',14''} = 128,21; C_{11'',13''} = 126,76; C_{12''} = 127,03.

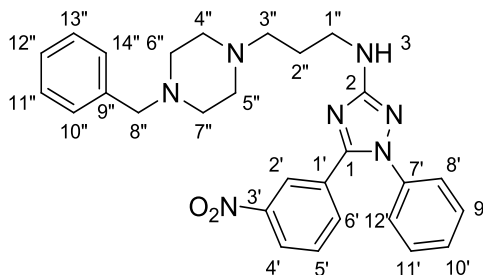


RMN ¹H (500 MHz) CDCl₃ (δ-ppm): H₃ = 4,80 (sl, 1H); H₂ = 7,71(s, 1H); H_{4',8',12'} = 7,4 (m, 3H); H₅ = 7,16 (t, 1H); H₆ = 7,52 (d, 1H); H_{9',11',10',14'} = 7,34 (m, 8H); H_{1''} = 3,44 (t, 2H); H_{2''}

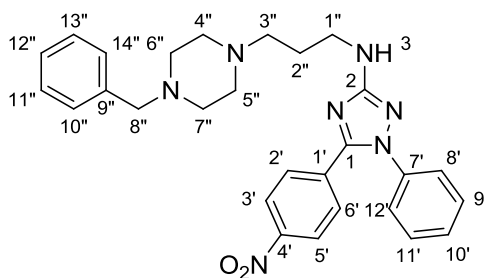
= 1,88 (m, 2H); $H_{3'',7''} = 2,58$ (m, 10H); $H_{8''} = 3,57$ (s, 2H). **RMN ^{13}C (125 MHz) CDCl_3 (δ -ppm):** $C_1 = 151,20$; $C_2 = 164,15$; $C_{1'} = 130,08$; $C_{2'} = 132,71$; $C_{3'} = 122,51$; $C_{4'} = 128,45$; $C_{5'} = 131,71$; $C_{6'} = 127,12$; $C_{7'} = -$; $C_{8',12'} = 129,34$; $C_{9',11'} = 129,26$; $C_{10'} = 129,83$; $C_{1'',3''} = 42,16$; $C_{2''} = 26,16$; $C_{4'',5''} = 56,56$; $C_{6'',7''} = 52,71$; $C_{8''} = 62,84$; $C_{9''} = 138,02$; $C_{10'',14''} = 128,22$; $C_{11'',13''} = 125,28$; $C_{12''} = 127,17$.



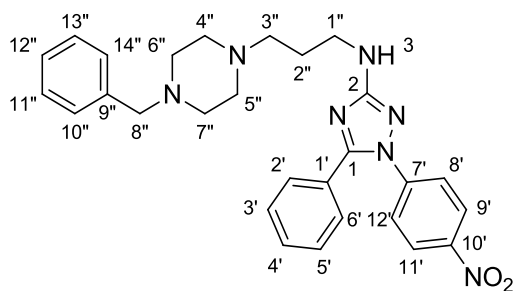
RMN ^1H (500 MHz) CDCl_3 (δ -ppm): $H_3 = 4,81$ (sl, 1H); $H_{2',6'} = 7,44$ (d, 2H); $H_{3',5',9',11',10'',13''} = 7,33$ (m, 3H); $H_{1''} = 3,44$ (t, 2H); $H_{2''} = 2,70$ (m, 2H); $H_{3'',7''} = 2,70$ (m, 10H); $H_{8''} = 3,59$ (s, 2H). **RMN ^{13}C (125 MHz) CDCl_3 (δ -ppm):** $C_1 = 151,78$; $C_2 = 164,04$; $C_{1'} = -$; $C_{2',6'} = 130,22$; $C_{3',5'} = 131,71$; $C_{4'} = 124,28$; $C_{7'} = 127,01$; $C_{8',12'} = 129,38$; $C_{9',11'} = 129,35$; $C_{10'} = 128,42$; $C_{1'',3''} = 42,12$; $C_{2''} = 25,68$; $C_{4'',5''} = 56,18$; $C_{6'',7''} = 49,87$; $C_{8''} = 62,52$; $C_{9''} = 138,12$; $C_{10'',14''} = 128,38$; $C_{11'',13''} = 125,30$; $C_{12''} = 127,41$.



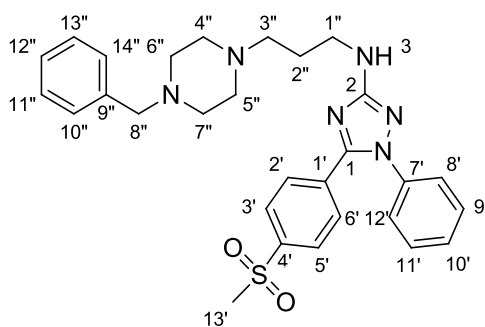
RMN ^1H (500 MHz) CDCl_3 (δ -ppm): $H_2 = 8,36$ (s, 1H); $H_4 = 8,22$ (d, 1H); $H_5 = 7,49$ (t, 1H); $H_6 = 7,74$ (d, 1H); $H_{3,8',12',10'',14''} = 7,30-7,43$ (m, 11H); $H_{1''} = 3,44$ (t, 2H); $H_{2''} = 1,87$ (m, 2H); $H_{3'',7''} = 2,57$ (m, 10H); $H_{8''} = 3,55$ (sl, 2H). **RMN ^{13}C (125 MHz) CDCl_3 (δ -ppm):** $C_1 = 150,38$; $C_2 = 164,38$; $C_{1'} = 129,86$; $C_{2'} = 123,74$; $C_{3'} = 148,17$; $C_{4'} = 124,29$; $C_{5'} = 129,55$; $C_{6'} = 134,29$; $C_{8',12'} = 129,67$; $C_{9',11'} = 129,30$; $C_{10'} = 129,00$; $C_{1'',3''} = 42,73$; $C_{2''} = 26,14$; $C_{4'',5''} = 56,68$; $C_{6'',7''} = 52,81$; $C_{8''} = 62,90$; $C_{9''} = 137,68$; $C_{10'',14''} = 128,26$; $C_{11'',13''} = 125,50$; $C_{12''} = 127,50$.



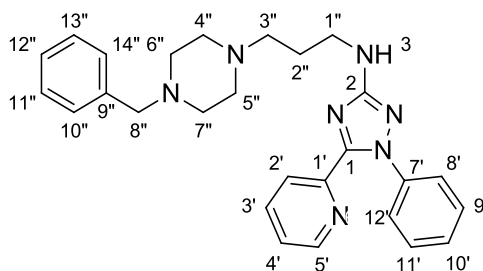
RMN ^1H (500 MHz) CDCl_3 (δ -ppm): $\text{H}_{2',6'}$ = 7,64 (d, 2H); $\text{H}_{3',5'}$ = 8,17 (d, 2H); $\text{H}_{8',10',12'}$ = 7,42 (m, 3H); $\text{H}_{9',11',10''-14''}$ = 7,32 (m, 7H); $\text{H}_{1''}$ = 3,44 (t, 2H); $\text{H}_{2''}$ = 1,88 (m, 2H); $\text{H}_{3'',7''}$ = 2,51 (m, 10H); $\text{H}_{8''}$ = 3,56 (s, 2H). **RMN ^{13}C (125 MHz) CDCl_3 (δ -ppm):** C_1 = 150,47; C_2 = 164,39; $\text{C}_{1'}$ = 134,06; $\text{C}_{2',6'}$ = 129,62; $\text{C}_{3',5'}$ = 123,66; $\text{C}_{4'}$ = 148,13; $\text{C}_{7'}$ = 129,57; $\text{C}_{8',12'}$ = 129,57; $\text{C}_{9',11'}$ = 129,28; $\text{C}_{10'}$ = 128,96; $\text{C}_{1'',3''}$ = 42,57; $\text{C}_{2''}$ = 25,99; $\text{C}_{4'',5''}$ = 56,53; $\text{C}_{6'',7''}$ = 52,98; $\text{C}_{8''}$ = 62,86; $\text{C}_{9''}$ = 137,86; $\text{C}_{10'',14''}$ = 128,26; $\text{C}_{11'',13''}$ = 125,46; $\text{C}_{12''}$ = 127,20.



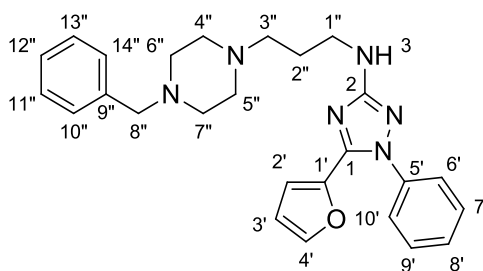
RMN ^1H (500 MHz) CDCl_3 (δ -ppm): $\text{H}_{2',-6', 8',12', 10''-14''}$ = 7,49-7,42 (m, 12H); $\text{H}_{9',11'}$ = 8,22 (d, 2H); $\text{H}_{1'', 4''-7''}$ = 3,55-3,44 (m, 19H); $\text{H}_{2''}$ = 1,96 (m, 2H); $\text{H}_{3''}$ = 3,19 (m, 10H); $\text{H}_{8''}$ = 4,09 (s, 2H). **RMN ^{13}C (125 MHz) CDCl_3 (δ -ppm):** C_1 = 153,39; C_2 = 162,90; $\text{C}_{1'}$ = 126,67; $\text{C}_{2',6'}$ = 129,42; $\text{C}_{3',5'}$ = 129,17; $\text{C}_{4'}$ = 130,11; $\text{C}_{7'}$ = - ; $\text{C}_{8',12'}$ = 130,63; $\text{C}_{9',11'}$ = 124,63; $\text{C}_{10'}$ = 146,49; $\text{C}_{1'',3''}$ = 40,34; $\text{C}_{2''}$ = 23,89; $\text{C}_{4'',5''}$ = 55,04; $\text{C}_{6'',7''}$ = 49,19; $\text{C}_{8''}$ = 61,09; $\text{C}_{9''}$ = 142,51; $\text{C}_{10'',14''}$ = 128,89; $\text{C}_{11'',13''}$ = 124,75.



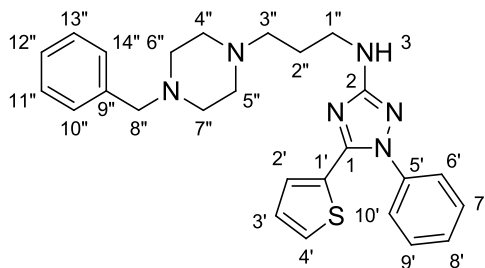
RMN ^1H (500 MHz) CDCl_3 (δ -ppm): $\text{H}_{3'} = 5,05$ (sl, 1H); $\text{H}_{2',6',10'',14''} = 7,32$ (m,10); $\text{H}_{8',12'} = 7,92$ (d, 2H); $\text{H}_{9',11'} = 7,7,81$ (d, 2H); $\text{H}_{1''} = 3,44$ (t, 2H); $\text{H}_{2''} = 2,01$ (m, 2H); $\text{H}_{3'',7''} = 2,87$ (m, 10H); $\text{H}_{8''} = 3,65$ (s, 2H). **RMN ^{13}C (125 MHz) CDCl_3 (δ -ppm):** $\text{C}_1 = 153,88$; $\text{C}_2 = 164,27$; $\text{C}_{1'} = 127,95$; $\text{C}_{2',6'} = 129,17$; $\text{C}_{3',5'} = 129,07$; $\text{C}_{4'} = 128,10$; $\text{C}_{7'} = -$; $\text{C}_{8',12'} = 130,79$; $\text{C}_{9',11'} = 129,69$; $\text{C}_{10'} = 142,60$; $\text{C}_{13'} = 44,70$; $\text{C}_{1'',3''} = 41,73$; $\text{C}_{2''} = 25,17$; $\text{C}_{4'',5''} = 55,86$; $\text{C}_{6'',7''} = 51,11$; $\text{C}_{8''} = 62,27$; $\text{C}_{9''} = 138,21$; $\text{C}_{10'',14''} = 128,78$; $\text{C}_{11'',13''} = 124,97$.



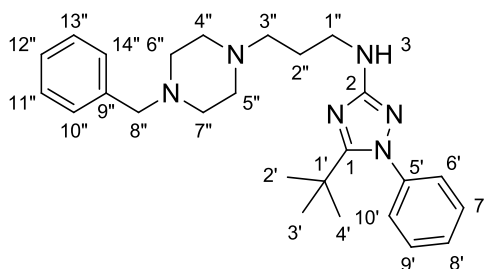
RMN ^1H (500 MHz) CDCl_3 (δ -ppm): $\text{H}_{2',3'} = 7,69$ (m, 2H); $\text{H}_{4',8',12',10'',14''} = 7,32$ (m, 11H); $\text{H}_{5'} = 8,50$ (d, 1H); $\text{H}_{1''} = 3,46$ (t, 2H); $\text{H}_{2''} = 1,94$ (m, 2H); $\text{H}_{3'',7''} = 2,70$ (m, 10H); $\text{H}_{8''} = 3,60$ (s, 2H). **RMN ^{13}C (125 MHz) CDCl_3 (δ -ppm):** $\text{C}_1 = 151,33$; $\text{C}_2 = 163,93$; $\text{C}_{1'} = 147,49$; $\text{C}_{2'} = 124,14$; $\text{C}_{3'} = 136,56$; $\text{C}_{4'} = 124,10$; $\text{C}_{5'} = 149,44$; $\text{C}_{7'} = -$; $\text{C}_{8',12'} = 129,36$; $\text{C}_{9',11'} = 128,85$; $\text{C}_{10'} = 128,05$; $\text{C}_{1'',3''} = 29,67$; $\text{C}_{2''} = 25,71$; $\text{C}_{4'',5''} = 56,11$; $\text{C}_{6'',7''} = 42,16$; $\text{C}_{8''} = 62,47$; $\text{C}_{9''} = 138,71$; $\text{C}_{10'',14''} = 128,35$; $\text{C}_{11'',13''} = 125,31$; $\text{C}_{12''} = 127,44$.



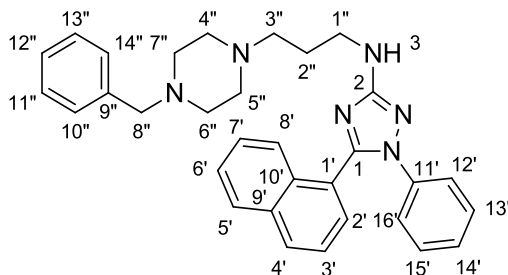
RMN ^1H (500 MHz) CDCl_3 (δ -ppm): $\text{H}_{3'} = 6,38$ (sl, 1H); $\text{H}_{2',4',6',10',10'',14''} = 7,27-7,49$ (m, 12H); $\text{H}_{1''} = 3,44$ (t, 2H); $\text{H}_{2''} = 2,06$ (m, 2H); $\text{H}_{3'',7''} = 2,85-3,04$ (m, 10H); $\text{H}_{8''} = 3,76$ (sl, 2H). **RMN ^{13}C (125 MHz) CDCl_3 (δ -ppm):** $\text{C}_1 = 144,81$; $\text{C}_2 = 163,65$; $\text{C}_{1'} = 142,20$; $\text{C}_{2'} = 111,54$; $\text{C}_{3'} = 112,61$; $\text{C}_{4'} = 144,12$; $\text{C}_{6',10'} = 129,29$; $\text{C}_{7',9'} = 129,21$; $\text{C}_{8'} = 129,71$; $\text{C}_{1''} = 41,06$; $\text{C}_{2''} = 29,67$; $\text{C}_{3''} = 55,16$; $\text{C}_{4'',5''} = 59,50$; $\text{C}_{6'',7''} = 49,77$; $\text{C}_{8''} = 61,49$; $\text{C}_{9''} = 137,89$; $\text{C}_{10'',14''} = 128,76$; $\text{C}_{11'',13''} = 126,06$.



RMN ^1H (500 MHz) CDCl_3 (δ -ppm): $\text{H}_{3,2'',10'',10''',14''}$ = 7,16-7,48 (m, 14H); $\text{H}_{1''}$ = 3,38 (t, 2H); $\text{H}_{2''}$ = 1,83 (m, 2H); $\text{H}_{3'',7''}$ = 2,51 (m, 10H); $\text{H}_{8''}$ = 3,53 (s, 2H). **RMN ^{13}C (125 MHz) CDCl_3 (δ -ppm):** C_1 = 153,03; C_2 = 163,75; $\text{C}_{1'}$ = 157,69; $\text{C}_{2'}$ = 128,97; $\text{C}_{3'}$ = 128,78; $\text{C}_{4'}$ = 129,58; $\text{C}_{5'}$ = 135,87; $\text{C}_{6',10'}$ = 129,53; $\text{C}_{7',9'}$ = 127,93; $\text{C}_{8'}$ = 127,55; $\text{C}_{1'',3''}$ = 42,42; $\text{C}_{2''}$ = 26,07; $\text{C}_{4'',5''}$ = 56,86; $\text{C}_{6'',7''}$ = 51,92; $\text{C}_{8''}$ = 62,67; $\text{C}_{9''}$ = 136,05; $\text{C}_{10'',12'',14''}$ = 126,25; $\text{C}_{11'',13''}$ = 126,79.

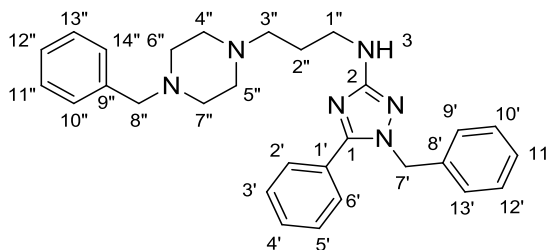


RMN ^1H (500 MHz) CDCl_3 (δ -ppm): $\text{H}_{2',3',4'}$ = 1,21 (sl, 9H); $\text{H}_{6',10',10'',14''}$ = 7,32-7,47 (m, 10H); $\text{H}_{1''}$ = 3,33 (t, 2H); $\text{H}_{2''}$ = 2,01 (m, 2H); $\text{H}_{3'',7''}$ = 2,70-3,00 (m, 10H); $\text{H}_{8''}$ = 3,71 (s, 2H). **RMN ^{13}C (125 MHz) CDCl_3 (δ -ppm):** C_2 = 134,24; $\text{C}_{1'}$ = 30,95; $\text{C}_{2',3',4'}$ = 29,57; $\text{C}_{6',10'}$ = 129,45; $\text{C}_{7',8',9'}$ = 128,82; $\text{C}_{1'',3''}$ = 40,75; $\text{C}_{2''}$ = 24,17; $\text{C}_{4'',5''}$ = 54,92; $\text{C}_{6'',7''}$ = 49,59; $\text{C}_{8''}$ = 61,33; $\text{C}_{9''}$ = 139,30; $\text{C}_{10'',12'',14''}$ = 127,97; $\text{C}_{11'',13''}$ = 128,42.

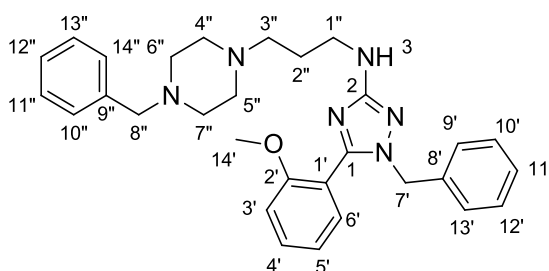


RMN ^1H (500 MHz) CDCl_3 (δ -ppm): $\text{H}_{2',8',12',16',10'',14''}$ = 7,17-8,03 (m, 17H); $\text{H}_{1'',8''}$ = 3,53 (sl, 4H); $\text{H}_{3'',7''}$ = 2,56 (m, 10H); $\text{H}_{2''}$ = 1,90 (sl, 2H). **RMN ^{13}C (125 MHz) CDCl_3 (δ -ppm):** C_1 = 151,58; C_2 = 164,03; $\text{C}_{1'}$ = 137,65; $\text{C}_{2'}$ = 124,63; $\text{C}_{3'}$ = 125,13; $\text{C}_{4'}$ = 126,78; $\text{C}_{5'}$ = 126,88; $\text{C}_{6',7'}$ = 123,21; $\text{C}_{8'}$ = 126,91; $\text{C}_{9'}$ = 133,32; $\text{C}_{10'}$ = 131,15; $\text{C}_{11'}$ = 126,18; $\text{C}_{12',16'}$ =

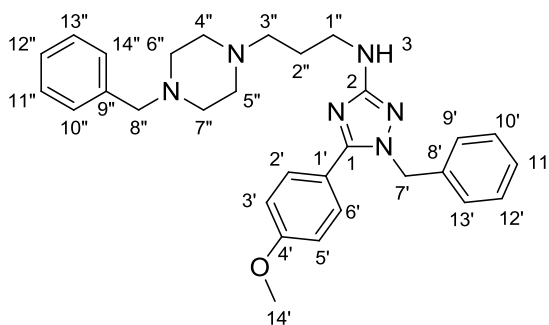
130,07; $C_{13',15'} = 128,58$; $C_{14'} = 128,03$; $C_{1''} = 42,58$; $C_{2''} = 26,15$; $C_{3''} = 53,00$; $C_{4'',5''} = 56,57$; $C_{6'',7''} = 52,74$; $C_{8''} = 62,70$; $C_{9''} = 137,80$; $C_{10'',14''} = 128,98$; $C_{11'',13''} = 127,92$; $C_{12''} = 124,63$.



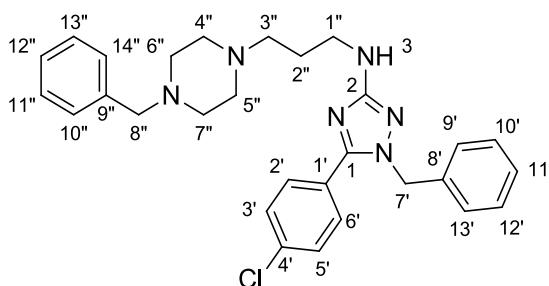
RMN ^1H (500 MHz) CDCl_3 (δ -ppm): $H_{2',6'} = 7,46$ (m, 2H); $H_{3',5'} = 7,40$ (m, 2H); $H_{4',10'-12',10''-14''} = 7,32$ (d, 9H); $H_{9',13'} = 7,18$ (m, 2H); $H_{7'} = 5,23$ (s, 2H); $H_{1''} = 3,38$ (t, 2H); $H_{2''} = 1,83$ (m, 2H); $H_{3'',7''} = 2,51$ (m, 10H); $H_{8''} = 3,53$ (s, 2H).
RMN ^{13}C (125 MHz) CDCl_3 (δ -ppm): $C_1 = 154,22$; $C_2 = 163,27$; $C_{1'} = -$; $C_{2',6'} = 124,835$; $C_{3',5'} = 128,24$; $C_{7'} = 52,17$; $C_{8'} = 136,09$; $C_{9',13'} = 128,57$; $C_{10',12'} = 128,52$; $C_{10''} = 129,88$; $C_{1'',3''} = 41,36$; $C_{2''} = 29,71$; $C_{4'',5''} = 59,56$; $C_{6'',7''} = 55,38$; $C_{8''} = 61,76$; $C_{9''} = -$; $C_{10''-14''} = 127,54$; $C_{11'',13''} = 126,44$.



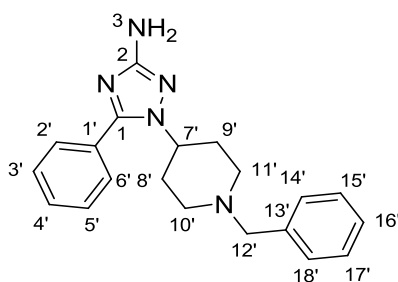
RMN ^1H (500 MHz) CDCl_3 (δ -ppm): $H_{2'} = 7,07$ (d, 1H); $H_{4',6'} = 7,66$ (m, 2H); $H_{5'} = 7,13$ (m, 1H); $H_{9'-13',10'',11'',13'',14''} = 7,32$ (d, 9H); $H_{12''} = 7,21$ (m, 1H); $H_{7'} = 5,09$ (s, 2H); $H_{14'} = 3,77$ (s, 3H); $H_{1''} = 3,04$ (t, 2H); $H_{2''} = 2,05$ (m, 2H); $H_{3'',7''} = 2,42$ (m, 10H); $H_{8''} = 3,52$ (s, 2H).
RMN ^{13}C (125 MHz) CDCl_3 (δ -ppm): $C_1 = 152,21$; $C_2 = -$; $C_{1'} = -$; $C_{2'} = 157,25$; $C_{3'} = 111,49$; $C_{4'} = 131,66$; $C_{5'} = 121,71$; $C_{6'} = 135,09$; $C_{7'} = 44,19$; $C_{9',13'} = 128,85$; $C_{10',12'} = 128,57$; $C_{1'',3''} = 42,39$; $C_{2''} = 29,42$; $C_{4'',5''} = 54,01$; $C_{6'',7''} = 51,22$; $C_{8''} = 62,68$; $C_{9''} = -$; $C_{10''-14''} = 128,03$; $C_{11'',13''} = 127,9$.



RMN ^1H (500 MHz) CDCl_3 (δ -ppm): $\text{H}_{2',6'}$ = 7,58 (d, 2H); $\text{H}_{3',5'}$ = 7,11 (d, 2H); $\text{H}_{9'-13',10''-14''}$ = 7,21-7,32 (m, 10H); $\text{H}_{7'}$ = 5,17 (s, 2H); $\text{H}_{14'}$ = 3,90 (s, 3H); $\text{H}_{1''}$ = 3,51 (sl, 2H); $\text{H}_{2''}$ = 2,07 (m, 2H); $\text{H}_{3''-7''}$ = 2,43-2,65 (m, 10H); $\text{H}_{8''}$ = 4,02 (sl, 2H). **RMN ^{13}C (125 MHz) CDCl_3 (δ -ppm):** C_1 = 146,58; C_2 = 163,16; $\text{C}_{1'}$ = 110,71; $\text{C}_{2',6'}$ = 131,61; $\text{C}_{3',5'}$ = 115,46; $\text{C}_{4'}$ = -; $\text{C}_{7'}$ = 53,90; $\text{C}_{8'}$ = 133,17; $\text{C}_{9',13'}$ = 129,10; $\text{C}_{10',12'}$ = 128,86; $\text{C}_{11'}$ = 128,26; $\text{C}_{1''}$ = 38,04; $\text{C}_{2''}$ = 29,67; $\text{C}_{3''}$ = 43,20; $\text{C}_{4'',5''}$ = 59,47; $\text{C}_{6'',7''}$ = 57,15; $\text{C}_{8''}$ = 63,04; $\text{C}_{9''}$ = 133,19; $\text{C}_{10'',14''}$ = 131,61; $\text{C}_{11'',13''}$ = 128,86; $\text{C}_{12''}$ = 128,26.



RMN ^1H (500 MHz) CDCl_3 (δ -ppm): $\text{H}_{2',6',8',10',12'}$ = 7,45 (d, 5H); $\text{H}_{3',5'}$ = 6,23 (m, 2H); $\text{H}_{9',11',10''-14''}$ = 7,33 (m, 1H); $\text{H}_{12''}$ = 7,26 (m, 1H); $\text{H}_{7'}$ = -; $\text{H}_{1''}$ = 3,40 (t, 2H); $\text{H}_{2''}$ = 1,83 (m, 2H); $\text{H}_{3''-7''}$ = 2,5 (m, 10H); $\text{H}_{8''}$ = 3,53 (s, 2H). **RMN ^{13}C (125 MHz) CDCl_3 (δ -ppm):** C_1 = 148,00; C_2 = 164,01; $\text{C}_{1'}$ = 129,65; $\text{C}_{2',6'}$ = 129,22; $\text{C}_{3',5'}$ = 128,47; $\text{C}_{4'}$ = -; $\text{C}_{7'}$ = 55,02; $\text{C}_{9',13'}$ = 126,72; $\text{C}_{10',12'}$ = 128,34; $\text{C}_{11'}$ = 126,98; $\text{C}_{1'',3''}$ = 42,60; $\text{C}_{2''}$ = 26,45; $\text{C}_{4'',5''}$ = 56,61; $\text{C}_{6'',7''}$ = 53,23; $\text{C}_{8''}$ = 63,00; $\text{C}_{9''}$ = 138,08; $\text{C}_{10''-14''}$ = 129,25; $\text{C}_{11''-13''}$ = 127,45.



5.2. Avaliação in vitro da atividade anticolinesterásica dos derivados 3-amino-propinil-piperazil-1,2,4-triazolícos (90a-ab)

A atividade anticolinesterásica foi determinada de acordo com o método adaptado de Ellman (ELLMAN, 1961). Todas as soluções utilizadas nos ensaios foram preparadas em tampão tris-HCl 0,02 M (pH = 7,5, ajustado com solução 1 M de HCl ou NaOH) e as soluções estoque dos compostos foram preparadas em DMSO (50 mM). Em uma placa de 96 poços de fundo plano foram adicionados 150 µL de solução do composto inibidor (**89a**; **90a-ab**; donepezila) em oito diferentes concentrações diluídas em série, as quais variaram de 100 - 0,00001 µM para AChE (fator de diluição = 10) e de 400 - 0,1 µM para BuChE (fator de diluição = 4). O controle veículo (DMSO - concentração final 0,2 % v / v para AChE e 0,8 % v / v para BuChE), foi utilizado como referência (controle negativo). Em seguida, foram adicionados 60 µL de ácido 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzóico (DTNB, reagente de Ellman) a 1,1 mM e 30 µL de acetilcolinesterase isolada de cérebro de enguia elétrica (EeAChE) ou butirilcolinesterase isolada de soro equino (EqBuChE) a 0,20 U/mL na presença de 1 mg/mL de albumina sérica bovina (BSA). A absorbância foi então registrada utilizando um leitor de placas iMark (Bio-Rad) equipado com um filtro de luz de = 415 nm e esta medida foi usada como uma referência em branco. Após uma incubação de 10 minutos a 25 °C, 24 µL de solução do substrato iodeto de acetiltiocolina (ACTI) ou iodeto de S-butiltiocolina (BCTI) a 2,75 mM foram adicionados e a absorbância foi registrada após 5 minutos de incubação a 25°C a $\lambda = 415$ nm por 3 vezes dentro de 60 segundos. A atividade enzimática foi calculada como porcentagem referente à média dos valores de absorbância medidos para o controle tratado com DMSO, descontada dos valores de referência em branco. Os ensaios foram realizados em triplicatas (para o cálculo do desvio-padrão) e os valores de CI_{50} foram calculados com auxílio do programa Graphpad Prism 7.0 utilizando o modelo de regressão não linear para a inibição dose-resposta.

5.3. Estudo do mecanismo de inibição enzimática dos derivados 3-amino-propinil-piperazil-1,2,4-triazolícos (90p;m;w)

O estudo cinético foi realizado de acordo com o método adaptado de Ellman (ELLMAN, 1961). Todas as soluções utilizadas nos ensaios foram preparadas em tampão tris-HCl 0,02 M (pH = 7,5, ajustado com solução 1 M de HCl ou NaOH) e as soluções estoque dos compostos foram preparadas em DMSO (50 mM). Em uma placa de 96 poços de fundo plano foram adicionados 150 µL de solução do composto inibidor (**90p**; **90m**; **90w**) em duas

concentrações diferentes (Tabela 12) distribuídas em oito conjuntos de triplicatas cada. Oito conjuntos de triplicatas tratados com DMSO (concentração final 0,0004 % v / v para AChE e 0,012 % v / v para BuChE), foram utilizados como controle negativo. A seguir, foram adicionados 60 µL de ácido 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzóico (DTNB, reagente de Ellman) a 1,1 mM e 30 µL de acetilcolinesterase isolada de cérebro de enguia elétrica (EeAChE) ou butirilcolinesterase isolada de soro equino (EqBuChE) a 0,20 U / mL na presença de 1 mg / mL de albumina sérica bovina (BSA). A absorbância foi então registrada utilizando um leitor de placas iMark (Bio-Rad) equipado com um filtro de luz de $\lambda = 415$ nm e esta medida usada como uma referência em branco. Após 10 minutos de incubação a 25 °C, 24 µL de solução do substrato iodeto de acetiltiocolina (ACTI) ou iodeto de S-butiltiocolina (BCTI) em oito concentrações diluídas em série (fator = 1,3) de 2,75 - 0,44 mM (concentração final: 0,25 - 0,04 mM) foram adicionados aos respectivos poços e a absorbância registrada após incubação durante 10 minutos a 25 °C a $\lambda = 415$ nm. Os gráficos recíprocos de Lineweaver-Burk foram obtidos por plotagem de um gráfico de $1 / \text{velocidade}$ versus $1 / [\text{substrato}]$ para o controle negativo e duas concentrações diferentes de inibidor. A regressão linear de cada conjunto de dados mostra um comportamento convergente, de forma que a região na qual as curvas convergem determina o tipo de inibição observada. Os valores de K_i , K_i' (constantes de inibição competitiva e não-competitiva respectivamente), K_m (constante de Michaelis-Menten) e $V_{\text{máx}}$ (velocidade máxima) foram calculados com auxílio do programa Graphpad Prism 7.0 usando modelos de regressão não linear para cinética enzimática - inibição e cinética enzimática - substrato versus velocidade.

Tabela 12: Concentrações dos inibidores utilizados nos ensaios de estudo do mecanismo de inibição enzimática. Concentração do inibidor (µM)

Composto	90m	90p	90w
AChE	0,50 e 0,80	0,30 e 0,50	1,40 e 3,40
BuChE	18,00 e 22,00	1,00 e 3,00	0,70 e 0,90

5.4. Estudos de interação enzimática *in silico*

O programa Spartan 14 (Wavefunction Inc.) foi utilizado para a construção e otimização dos modelos tridimensionais das estruturas químicas dos inibidores. Para tal, foi utilizado o método de cálculo semi-empírico Parameterization Method 6 (PM6) (STEWART, 2007).

O programa GOLD 5.6 (CCDC Software Ltd., Cambridge UK) foi utilizado para avaliar as interações *in silico* de entre os compostos (**89a**, **90a-ab**) e o sítio ativo da enzima da AChE. Inicialmente, o estudo de ancoramento molecular foi implementado com a AChE de enguia elétrica (*Electrophorus electricus*) (EeAChE), no qual foram utilizadas as três estruturas de EeAChE que estão disponíveis no *Protein Data Bank* (PDB), com códigos 1EEA (RAVES *et al.*, 1998), 1C2B (BOURNE *et al.*, 1999), e 1C2O (BIASINI *et al.*, 2014), segundo o método descrito por Santos e colaboradores (SANTOS *et al.*, 2019). Foram adicionados os átomos de hidrogênio às estruturas de cristalográficas da proteínas, baseadas em ionização e estados tautoméricos definidos pelo GOLD. O raio do sítio de ligação das enzimas foi testado a 15 e 20 Å em torno de átomos do resíduo de aminoácidos da serina, presente no CAS e utilizado a função GoldScore.

O estudo posterior de ancoramento molecular foi realizado a partir da AChE humana (hAChE), no qual foram utilizadas a estrutura com códigos 4EY7 (CHEUNG *et al.*, 2012). Foram adicionados os átomos de hidrogênio às estruturas cristalográficas da proteínas e extraído as moléculas de água. O raio do sítio de ligação das enzimas foi testado a 15 e 20 Å em torno de átomos do resíduo de aminoácidos da tirosina 124. Além disso, foi realizado o experimento de *redocking* para as diferentes funções de pontuação, sendo estas: ChemPLP, Goldscore, ASP e Chemscore, fim de selecionar, a partir dos valores obtidos de RMSD de cada função, a função que melhor se aplica ao estudo, ou seja, que apresenta o menor valor.

O estudo de ancoramento para cada composto avaliado gerou diversas posições de ligação, de modo que estas foram analisadas quantitativamente segundo pontuação adimensional apresentada (*Score*) e qualitativamente de acordo com sua posição de interação com os resíduos de aminoácidos.

5.5. Avaliação da atividade antioxidante pelo Método de DPPH dos derivados 3-amino-propinil-piperazil-1,2,4-triazólicos (90a-ab)

Os compostos 3-amino-propinil-piperazil-1,2,4-triazólicos (**89a**; **90a-ab**) foram avaliados quanto ao seu potencial antioxidante usando o teste DPPH (SALGUEIRO & CASTRO, 2016) no LabMed & LabMel, UFRRJ. Todas as soluções estoque dos compostos utilizadas nos ensaios foram preparadas em metanol (8 mM). Em uma placa de 96 poços de fundo plano foram adicionados 10 µl de solução do composto (**89a**; **90a-ab**; quercetina) e o

volume foi ajustado para 200 µl usando metanol, em triplicatas (para o cálculo do desvio-padrão). Como controle, foi pipetado uma alíquota de 210 µL de metanol espectroscópico, para ser utilizado como referência (controle negativo). Em seguida, 20 µl de solução de 2,2-difenil-1-picril-hidrazil recém preparada (DPPH, 10 mM em metanol) foram adicionados para cada poço contendo as amostras e o controle. O volume final de cada poço foi de 100 µl e concentração final de 350 µM. As placas foram incubadas sob abrigo de luz durante 30 minutos, e as leituras foram realizadas em espectrofotômetro ELISA (iMark, Bio-Rad), com UV fixo em 520 nm. A atividade antioxidante foi calculada como porcentagem referente à média dos valores de absorvância medidos para o controle tratado com metanol, descontada dos valores de referência em branco, de acordo com a seguinte equação:

$$AA\% = 100 - \frac{AbsA - AbsB}{AbsB} \times 100$$

*Onde: AbsA representa a absorvância da amostra com a solução do radical DPPH, AbsB representa o branco do ensaio, sendo este a absorvância do DPPH em solução metanólica.

5.6. Estudo da complexação dos derivados 3-amino-propinil-piperazil-1,2,4-triazólicos 89a, 90b e 90r frente a Zn^{2+} , Cu^{2+} , Al^{3+} e Fe^{3+}

Os compostos 3-amino-propinil-piperazil-1,2,4-triazólicos (**89a**; **90b**; **90r**) foram avaliados quanto a sua capacidade de complexação com Zn^{2+} , Cu^{2+} , Al^{3+} e Fe^{3+} de acordo como o método descrito por Pereira e colaboradores (PEREIRA *et al.*, 2016) no Laboratório de Fotoquímica David E. Nicodem, IQ/UFRJ. Assim sendo, soluções estoque dos metais (Zn^{2+} , Cu^{2+} , Al^{3+} e Fe^{3+}) (1 mM) foram preparadas em água (tampão Tris/HCl, pH = 7,0) enquanto que soluções estoque dos compostos alvos deste estudos (**89a**; **90b**; **90r**) (1mM) foram preparadas em etanol UV-HPLC. Aliquotas de 60-80 µL da solução estoque dos compostos estudados (**89a**; **90b**; **90r**) foram diluídas a 20-26 µM em 3ml de mistura etanol/H₂O (50/50, v/v, Tris/HCl pH = 7,0) até que a intensidade de absorção da banda máxima fosse observada na faixa entre 0,1-0,2. Os espectros de UV-vis foram obtidos em espectrofotômetro Shimadzu UV-2450 utilizando cubetas de quartzo com 1,0 cm de caminho ótico. Já os espectros de fotoluminescência foram obtidos em espectrofluorímetro Edinburgh FS5 com detector “single-photon counting” utilizando cubeta de quartzo com as quatro faces polidas e caminho ótico de 1,0 cm. Todos os espectros foram plotados utilizando o programa Origin 6.0.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADI. Alzheimer's Disease International. World Alzheimer Report 2015: The Global Impact of Dementia. An analysis of prevalence, incidence, cost trends. Disponível em: <https://www.alz.co.uk/research/world-report-2015>. Acesso em: 10 de dezembro de 2019.

AKIYAMA, H.; BARGER, S.; BARNUM, S.; BRADT, B.; BAUER, J.; COLE, G. M.; FINCH, C. E. Inflammation and Alzheimer's disease. **Neurobiology of aging**, v. 21, n. 3, p. 383-421, 2000.

ALAM, J. J. Selective Brain-Targeted Antagonism of p38 MAPK α Reduces Hippocampal IL-1 β Levels and Improves Morris Water Maze Performance in Aged Rats. **Journal Alzheimer's Disease**, v. 48, n. 1, p. 219–227, 2015.

ALKAM, T., NITTA, A., MIZOGUCHI, H., SAITO, K., SESHIMA, M., ITOH, A., YAMADA, K. NABESHIMA, T. Restraining tumor necrosis factor-alpha by thalidomide prevents the A β -induced impairment of recognition memory in mice. **Behav. Brain Res.**, v. 189, p.100-106, 2008.

ALVAREZ-BUILLA, J.; VAQUERO, J. J.; BARLUENGA, J.. Modern Heterocyclic Chemistry, v. 4. **John Wiley & Sons**, 2011.

ALZ. Alzheimer's Association 2011 Alzheimer's Disease Facts and Figures. Disponível em < http://www.alz.org/downloads/Facts_Figures_2011. Acesso em: 10 de dezembro de 2019.

ALZ. Alzheimer's Association 2016 Alzheimer's Disease Facts and Figures. Disponível em < https://www.who.int/health-topics/dementia#tab=tab_1. Acesso em: 10 de dezembro de 2019.

ALZ. Alzheimer's Association: Diagnosis. Disponível em < <https://www.alz.co.uk/info/diagnosis>. Acesso em: 10 de dezembro de 2019.

ALZ. Alzheimer's Association: Risk factors. Disponível em < <https://www.alz.co.uk/info/risk-factors>. Acesso em: 10 de dezembro de 2019.

ALZFORUM.Therapeutics. Disponível em < <https://www.alzforum.org/therapeutics/search>. Acesso em: 28 de dezembro de 2019.

AMANI, M.; SHOKOUHI, G.; SALARI, A. A. Minocycline prevents the development of depression-like behavior and hippocampal inflammation in a rat model of Alzheimer's disease. **Psychopharmacology**, v. 236, n. 4, p. 1281-1292, 2018.

ANAND, P.; SINGH, B.A review on cholinesterase inhibitors for Alzheimer's disease. **Archives of pharmacal research**, v. 36, n. 4, p. 375-399, 2013.

ANAND, P; SINGH, B. Synthesis and evaluation of novel 4-[(3H, 3aH, 6aH)-3-phenyl]-4, 6-dioxo-2-phenyldihydro-2H-pyrrolo [3, 4-d] isoxazol-5 (3H, 6H, 6aH)-yl] benzoic acid derivatives as potent acetylcholinesterase inhibitors and anti-amnesic agents. **Bioorganic & medicinal chemistry**, v. 20, n. 1, p. 521-530, 2012.

- ANSARI, M. A.; ABDUL, M.; JOSHI, G.; OPII, W.; BUTTERFIELD, A. Protective effect of quercetin in primary neurons against A β (1–42): relevance to Alzheimer's disease. **The Journal of nutritional biochemistry**, v. 20, n. 4, p. 269-275, 2009.
- ARAÚJO, C. R. M.; SANTOS, V. L. DOS A.; GONSALVES A. A. Acetilcolinesterase - AChE: Uma Enzima de Interesse Farmacológico. **Revista Virtual de Química**, v. 8, n. 6, p. 1818-1834, 2016.
- BAI, X.; ZHOU, C.; MI, J. Research and application of triazoles. **Chemical Research and Application**, v. 19, n. 7, p. 721, 2007.
- BAKULSKI, K. M.; ROZEK, L. S.; DOLINOY, D. C.; PAULSON, H. L.; HU, H. Alzheimer's Disease and Environmental Exposure to Lead: The Epidemiologic Evidence and Potential Role of Epigenetics. **Currunte Alzheimer Research**, v. 9, n. 5, p. 563-573, 2012.
- BAREGGI, S. R.; CORNELLI, U. Clioquinol: review of its mechanisms of action and clinical uses in neurodegenerative disorders. **CNS neuroscience & therapeutics**, v. 18, n. 1, p.41-46, 2012.
- BARNES, D. E.; YAFFE, K. The projected effect of risk factor reduction on Alzheimer's disease prevalence. **The Lancet Neurology**, v. 10, n. 9, p. 819-828, 2011.
- BARNHAM, K. J.; MASTERS, C. L.; BUSH, A. I. Neurodegenerative diseases and oxidative stress. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 3, p. 205–214, 2004.
- BARNHAM, KEVIN J.; MASTERS, COLIN L.; BUSH, ASHLEY I. Neurodegenerative diseases and oxidative stress. **Nature reviews Drug discovery**, v. 3, n. 3, p. 205-214, 2004.
- BARREIRO, E. J.; FRAGA, C. A. M.. **Química Medicinal: As bases moleculares da ação dos fármacos**. Artmed Editora, 2014.
- BARTOLUCCI, C.; PEROLA, E.; PILGER, C.; FELLS, G.; LAMBA, D. Three-dimensional structure of a complex of galanthamine (Nivalin®) with acetylcholinesterase from *Torpedo californica*: Implications for the design of new anti-Alzheimer drugs. **Proteins: structure, function, and bioinformatics**, v. 42, n. 2, p. 182-191, 2001.
- BAYER, A. J.; BULLOCK, R.; JONES, R. W.; WILKINSON, D.; PATERSON, K. R.; JENKINS, L.; MILLAIS, S. B. Evaluation of the safety and immunogenicity of synthetic A β 42 (AN1792) in patients with AD. **Neurology**, v. 64, n. 1, p. 94-101, 2005.
- BELAIDI, A. A.; BUSH, A. I. Iron neurochemistry in Alzheimer's disease and Parkinson's disease: Targets for therapeutics. **Journal of Neurochemistry**, v.139, 179–197, 2016.
- BENEVENTO, C. E. Disfunção mitocondrial induzida por peptídeos beta-amilóide. 2011.
- BERG, J. M.; TYMOCZKO, J. L.; STRVER, L. Bioquímica. 6ª Ed. Rio de Janeiro: **Guanabara Koogan**, 2008.
- BIASINI, M.; BIENERT, S.; WATERHOUSE, A.; ARNOLD, K.; STUDER, G.; SCHMIDT, T.; SCHWEDE, T. SWISS-MODEL: modelling protein tertiary and quaternary structure using evolutionary information. **Nucleic acids research**, v. 42, n. W1, p. W252-W258, 2014.

BIRKS, J.; GRIMLEY, E. V.; VAN DONGEN, M. Ginkgo biloba for cognitive impairment and dementia (Cochrane Review). **The Cochrane Library**, n. 4, p. 1-19, 2002.

BIRKS, J; EVANS, J. G. Ginkgo biloba for cognitive impairment and dementia. **Cochrane Database of Systematic Reviews**, v. 1, p. CD003120, 2007.

BLENNOW, K.; DE LEON, M. J.; ZETTERBERG, H. Alzheimer's disease. **Lancet**, v. v. 368, n. 9533, p. 387-403, 2006.

BLENNOW, K.; ZETTERBERG, H. Semagacestat's fall: where next for AD therapies. **Nat Med**, v. 19, n. 10, p. 1214-1215, 2013.

BLOOM, G. S. Amyloid- β and tau: the trigger and bullet in Alzheimer disease pathogenesis. **JAMA neurology**, v. 71, n. 4, p. 505-508, 2014.

BOEGLIN, D.; CANTEL, S.; HEITZ, A.; MARTINEZ, J.; FAHRENTZ, J. A. Solution and solid-supported synthesis of 3, 4, 5-trisubstituted 1, 2, 4-triazole-based peptidomimetics. **Organic letters**, v. 5, n. 23, p. 4465-4468, 2003.

BOFF, M. S.; SEKYIA, F. S.; DE CAMPOS B., CÁSSIO M.. Revisão sistemática sobre prevalência de demência entre a população brasileira. **Revista de Medicina**, v. 94, n. 3, p. 154-161, 2015.

BOLOGNIN, S.; MESSORI, L.; ZATTA, P. Metal ion physiopathology in neurodegenerative disorders. **Neuromolecular medicine**, v. 11, n. 4, p. 223-238, 2009.

BOND, M.; ROGERS, G.; PETERS, J.; ANDERSON, R.; HOYLE, M.; MINERS, A.; MOXHAM, T.; DAVIS, S.; THOLAKA, P.; WAILOO, A. The effectiveness and cost-effectiveness of donepezil, galantamine, rivastigmine and memantine for the treatment of Alzheimer's disease (review of Technology Appraisal No. 111): a systematic review and economic model. **Health technology assessment (Winchester, England)**, v. 16, n. 21, p. 1-470, 2012.

BONDA, D. J.; LEE, H. G.; BLAIR, J. A.; ZHU, X.; PERRY, G.; SMITH, M. A. Role of metal dyshomeostasis in Alzheimer's disease. **Metallomics**, v. 3, n. 3, p. 267-270, 2011.

BONDY, S. C. The neurotoxicity of environmental aluminum is still an issue. **Neurotoxicology**, v. 31, n. 5, p. 575-581, 2010.

BOURNE, Y.; GRASSI, J.; BOUGIS, P. E.; MARCHOT, P. Conformational flexibility of the acetylcholinesterase tetramer suggested by x-ray crystallography. **Journal of Biological Chemistry**, v. 274, n. 43, p. 30370-30376, 1999.

BOZO, E.; SZILÁGYI, G.; JANÁKY, J.1, 2, 4-triazoles, III: new 1, 5-diaryl-3-(substituted amino)-1H-1, 2, 4-triazoles as anti-inflammatory agents. **Archiv der Pharmazie**, v. 322, n. 10, p. 583-587, 1989.

BRAAK, E.; GRIFFING, K.; ARAI, K.; BOHL, J.; BRATZKE, H.; BRAAK, H. Neuropathology of Alzheimer's disease: what is new since A. Alzheimer?. **European archives of psychiatry and clinical neuroscience**, v. 249, n. 3, p. S14-S22, 1999.

BRAAK, H.; BRAAK, E. Evolution of the neuropathology of Alzheimer's disease. **Acta Neurologica Scandinavica**, v. 94, n. S165, p. 3-12, 1996.

BRUS, B.; URBAN, K.; TURK, S.; PISLAR, A.; COQUELLE, N.; KOS, J.; STOJAN, J.; COLLETIER, J.P.; GOBEC, S. Discovery, biological evaluation, and crystal structure of a novel nanomolar selective butyrylcholinesterase inhibitor. **Journal of medicinal chemistry**, v. 57, n. 19, p. 8167-8179, 2014.

BUDNI, J.; GARCEZ, M.; DE MEDEIROS, J.; CASSARO, E.; BELLETINE-SANTOS, T.; MINA, F.; QUEVEDO, J. The anti-inflammatory role of minocycline in Alzheimer's disease. **Current Alzheimer Research**, v. 13, n. 12, p. 1319-1329, 2016.

BUÉE, L.; BUSSIÈRE, T.; BUÉE-SCHERRER, V.; DELACOURTE, A.; HOF, P. R. Tau protein isoforms, phosphorylation and role in neurodegenerative disorders. **Brain Research Reviews**, v. 33, n. 1, p. 95-130, 2000.

BULLOCK, R.. Efficacy and safety of memantine in moderate-to-severe Alzheimer disease: the evidence to date. **Alzheimer Disease & Associated Disorders**, v. 20, n. 1, p. 23-29, 2006.

BUSH, A. I. Drug development based on the metals hypothesis of Alzheimer's disease. **Journal of Alzheimer's disease**, v. 15, n. 2, p. 223-240, 2008.

BUSH, A. I.; TANZI, R. E. Therapeutics for Alzheimer's disease based on the metal hypothesis. **Neurotherapeutics**, v. 5, n. 3, p. 421-432, 2008.

BUTCHART, J.; BROOK, L.; HOPKINS, V.; TEELING, J.; PÜNTENER, U.; CULLIFORD, D.; SHARPLES, R.; SHARIF, S.; MCFARLANE, B.; RAYBOULD, R.; THOMAS, R.; PASSMORE, P.. Etanercept in Alzheimer disease: a randomized, placebo-controlled, double-blind, phase 2 trial. **Neurology**, v. 84, n. 21, p. 2161-2168, 2015.

BUTTERFIELD, D. A.; LAUDERBACK, C. M. Lipid peroxidation and protein oxidation in Alzheimer's disease brain: potential causes and consequences involving amyloid β -peptide-associated free radical oxidative stress. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 32, n. 11, p. 1050-1060, 2002.

CAMPOS, L.S. Entender a Bioquímica. 2^a E. Lisboa: **Escolar Editora**, 1999.

CAREY, F. A. Organic chemistry. 4^a ed. New York: **Mc Graw Hill**, 2000.

CASTRO, A.; MARTINEZ, A. Peripheral and dual binding site acetylcholinesterase inhibitors: implications in treatment of Alzheimer's disease. **Mini reviews in medicinal chemistry**, v. 1, n. 3, p. 267-272, 2001..

CAVALLI, A.; BOLOGNESI, M.; MINARINI, A.; ROSINI, M.; TUMIATTI, V. Multi-target-directed ligands to combat neurodegenerative diseases. **Journal of medicinal chemistry**, v. 51, n. 3, p. 347-372, 2008.

CHANG, J. J.; WANG, Y.; ZHANG, H. Z.; ZHOU, C. H.; GENG, R. X.; JI, Q. G. Recent advances in researches of triazole-based supramolecular chemistry and medicinal drugs. **Chemical Journal of Chinese Universities**, v. 32, n. 9, p. 1970-1985, 2011.

CHAVES, M. L.; CAMOZZATO, A. L.; GODINHO, C.; PIAZENSKI, I.L; KAYE, J. Incidence of mild cognitive impairment and Alzheimer disease in Southern Brazil. **Journal of Geriatric Psychiatry and Neurology**, v. 22, n. 3, p. 181-187, 2009.

CHEIGNON, C.; TOMAS, M.; BONNEFONT-ROUSSELOT, D.; FALLER, P.; HUREAU, C.; COLLIN, F. Oxidative stress and the amyloid beta peptide in Alzheimer's disease. **Redox biology**, v. 14, p. 450-464, 2018.

CHEN, C.; DAGNINO, R.; HUANG, C. Q.; MCCARTHY, J. R. 1-Alkyl-3-amino-5-aryl-1H-[1, 2, 4] triazoles: novel synthesis via cyclization of N-Acyl-S-methylisothioureas with alkyhydrazines and their potent corticotropin-Releasing factor-1 (CRF1) receptor antagonist activities. **Bioorganic & medicinal chemistry letters**, v. 11, n. 24, p. 3165-3168, 2001.

CHERNY, R. A.; ATWOOD, C.; XILINAS, M.; GRAY, D.; JONES, W.; MCLEAN, C.; BARNHAM, K.; VOLITAKIS, I. Treatment with a copper-zinc chelator markedly and rapidly inhibits β -amyloid accumulation in Alzheimer's disease transgenic mice. **Neuron**, v. 30, n. 3, p. 665-676, 2001.

CHERNYSHEV, V. M.; CHERNYSHEVA, A. V. Recyclization of 2-(2, 5-dioxopyrrolidin-1-yl)-guanidine under the action of aliphatic amines. a novel method for the synthesis of 3-(5-amino-1h-1, 2, 4-triazol-3-yl) propanoic acid amides. **Chemistry of heterocyclic compounds**, v. 46, n. 5, p. 627-628, 2010.

CHERNYSHEV, V. M.; CHERNYSHEVA, A. V.; STARIKOVA, Z. A. Rearrangement of 2-(2, 5-Dioxopyrrolidin-1-yl) guanidine: An Efficient Synthesis and Structure of 3-(5-Amino-1H-1, 2, 4-triazol-3-yl) propanoic Acid and Derivatives. **Heterocycles**, v. 81, n. 10, p. 2291, 2010.

CHERNYSHEV, V. M.; CHERNYSHEVA, A. V.; TARANUSHICH, V. A. Optimization of the Synthesis of 5-Amino-1, 2, 4-triazol-3-ylacetic acid and bis (5-amino-1, 2, 4-triazol-3-yl) methane. **Russian Journal of Applied Chemistry**, v. 82, n. 2, p. 276-281, 2009.

CHEUNG, J.; RUDOLPH, M. J.; BURSHTeyN, F.; CASSIDY, M. S.; GARY, E. N.; LOVE, J.; HEIGHT, J. J. Structures of human acetylcholinesterase in complex with pharmacologically important ligands. **Journal of medicinal chemistry**, v. 55, n. 22, p. 10282-10286, 2012.

CHURCHILL, D. G. Chemical structure and accidental explosion risk in the research laboratory. **Journal of Chemical Education**, v. 83, n. 12, p. 1798, 2006.

CLAYDEN, J.; GREEVES, N.; WARREN, S.; WOTHERS, P. Organic chemistry. New York: **Oxford**, 2001.

ÇOKUĞRAŞ, A. N.; TURK, J. Butyrylcholinesterase: Structure and Physiological Importance. **Biochemistry**, v. 28, n. 2, p. 54- 61, 2003.

COREY, J.; BLOOM, J. E.; ANAND, R.; VEACH, J. A randomized trial evaluating the efficacy and safety of ENA 713 (rivastigmine tartrate), a new acetylcholinesterase inhibitor, in patients with mild to moderately severe Alzheimer's disease for the ENA 713 B352 Study Group. 1998.

CORIC, V.; VAN DYCK, C. H.; SALLOWAY, S.; ANDREASEN, N.; BRODY, M.; RICHTER, R. W.; SOININEN, H.; THEIN, S.; SHIOVITZ, T.; PILCHER, G.; COLBY, S.; ROLLIN, L.; DOCKENS, R.; PACHAI, C.; PORTELIUS, E.; ANDREASSON, U.; BLENNOW, K.; SOARES, H.; ALBRIGHT, C.; FELDMAN, H. H.; BERMAN R. M. Safety and Tolerability of the γ -Secretase Inhibitor Avagacestat in a Phase 2 Study of Mild to Moderate Alzheimer Disease. **Archives of Neurology**, v. 69, n. 11, p. 1430–1440, 2009.

CRAIG, L. A.; HONG, N. S.; MCDONALD, R. J. Revisiting the cholinergic hypothesis in the development of Alzheimer's disease. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, v. 35, n. 6, p. 1397-1409, 2011.

CROUCH, P. J.; SAVVA, M.; HUNG, L.; DONELLY, P.; MOT, A.; PARKER, S.; GREENOUGH, M.; VOLITAKIS, I.; ADLARD, P.. The Alzheimer's therapeutic PBT2 promotes amyloid- β degradation and GSK3 phosphorylation via a metal chaperone activity. **Journal of neurochemistry**, v. 119, n. 1, p. 220-230, 2011.

CUMMINGS, J. Drug development in Alzheimer's disease: the path to 2025. **Alzheimer's research & therapy**, v. 8, n. 1, p. 39, 2016.

CUMMINGS, J. L.; MORSTORF, T.; ZHONG, K. Alzheimer's disease drug-development pipeline: few candidates, frequent failures. **Alzheimer's Research & Therapy**, v. 6, n. 4, 2014.

CURTIS, A. D. M.; JENNINGS, N. Metalation of Azoles and Related Five-Membered Ring Heterocycles. In: Name Reactions. 3 Ed. Berlin: **Springer**, 2006.

DEDEOGLU, A.; CORMIER, K.; PAYTON, S.; TSEITLIN, K.; KREMSKY, J.; LAI, L.; LI, X.; MOIR, R.; TANZI, R.; BUSH, A.; KOWALL, N.; ROGERS, J. Preliminary studies of a novel bifunctional metal chelator targeting Alzheimer's amyloidogenesis. **Experimental Gerontology**, v. 39, n. 11-12, p. 1641-1649, 2004.

DENG, X.; WANG, J.; ZHANG, J.; SIM, T.; KIM, N.; SASAKI, T.; LUTHER, W. Discovery of 3, 5-diamino-1, 2, 4-triazole ureas as potent anaplastic lymphoma kinase inhibitors. **ACS medicinal chemistry letters**, v. 2, n. 5, p. 379-384, 2011.

DEWEERDT, S.. Prevention: activity is the best medicine. **Nature**, v. 475, n. 7355, p. S16-S17, 2011.

DIAS, K. S. T.; DE PAULA, C. T.; RIQUEL, M. M.; LAGO, S. T.; COSTA, K. C. M.; VAZ, S. M.; MACHADO, R. P.; LIMA, L. M. S.; VIEGAS JUNIOR, C. Aplicações Recentes da Abordagem de Fármacos Multialvo para o Tratamento da Doença de Alzheimer. **Revista Virtual de Química**, v. 7, n. 2, 609-648, 2015.

DOLAN, P. J.; JOHNSON, G. V. W. The role of tau kinases in Alzheimer's disease. **Current opinion in drug discovery & development**, v. 13, n. 5, p. 595, 2010.

DOLZHENKO, A. V.; PASTORIN, G.; DOLZHENKO, A. V.; CHUI, W. K. An aqueous medium synthesis and tautomerism study of 3 (5)-amino-1, 2, 4-triazoles. **Tetrahedron Letters**, v. 50, n. 18, p. 2124-2128, 2009.

DOMÍNGUEZ, J. M.; FUERTES, A.; OROZCO, L.; MONTE-MILLÁN, M.; DELGADO, E.; MEDINA, M. Evidence for irreversible inhibition of glycogen synthase kinase-3 β by tideglusib. **Journal of Biological Chemistry**, v. 287, n. 2, p. 893-904, 2012.

DONG, J.; ATWOOD, C. S.; ANDERSON, V. E.; SIEDLAK, S. L.; SMITH, M. A.; PERRY, G.; CAREY, P. R. Metal binding and oxidation of amyloid- β within isolated senile plaque cores: Raman microscopic evidence. **Biochemistry**, v. 42, n. 10, p. 2768-2773, 2003.

DOODY, R. S.; VELLAS, B.; JOFFE, S.; KIEBURTZ, K.; HE, F.; SUN, X.; THOMAS, R. G. Alzheimer's Disease Cooperative Study Steering Committee, Siemers E, Sethuraman G, Mohs R, Semagacestat Study Group. A phase 3 trial of semagacestat for treatment of Alzheimer's disease. **N Engl J Med**, v. 369, n. 4, p. 341-50, 2013..

DORAISWAMY, P. M.; FINEFROCK, A. E. Metals in Our Minds: Therapeutic Implications for Neurodegenerative Disorders. **The Lancet Neurology**, v. 3, n. 7, p. 431-434, 2004.

DOS SANTOS, P.; OZELA, P.; BRITO, M.; PINHEIRO, A.; PADILHA, E.; BRAGA, F.; DE PAULA DA S., C.; DOS SANTOS, C.; ROSA, J.; HAGE-MELIM, L. Alzheimer's disease: a review from the pathophysiology to diagnosis, new perspectives for pharmacological treatment. **Current medicinal chemistry**, v. 25, n. 26, p. 3141-3159, 2018.4
K. G. Mawuenyega, *Science*, 2010, 330, 1774.

DREW, L. An age-old story of dementia. **Nature**, v. 559, n. 7715, p. S2-S3, 2018.

DU, X.; WANG, X.; GENG, M. Alzheimer's disease hypothesis and related therapies **Translational Neurodegeneration** v. 7, n. 22, p. 2018.

DXLINE. Tau Protein. Disponível em: <http://dxline.info/diseases/tau-protein>. Acesso em: 16 de dezembro de 2019.

EGAN, M. F.; KOST, J.; TARIOT, P.; AISEN, P.; CUMMINGS, J.; VELLAS, B.; SUR, C.; MUKAI, Y.; VOSS, T.; FURTEK, C.; MAHONEY, E.; MOZLEY, L. H.; V., Rik; MO, Yi; MICHELSON, D. Randomized trial of verubecestat for mild-to-moderate Alzheimer's disease. **New England Journal of Medicine**, v. 378, n. 18, p. 1691-1703, 2018.

ELLMAN, G. L.; COURTNEY, K. D.; ANDRES JR, V.; FEATHERSTONE, R. M. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. **Biochemical pharmacology**, v. 7, n. 2, p. 88-95, 1961.

ENGELHARDT, E.; BERTOLUCCI, P.; BRITO-MARQUES, P. Efficacy of rivastigmine in the cognitive performance of patients

ENGELHARDT, E.; BRUCKI, S. M.; CAVALCANTI, J. L.; FORLENZA, O. V.; LAKS, J.; VALE, F. A. Treatment of Alzheimer's disease: recommendations and suggestions of the Scientific Department of Cognitive Neurology and Aging of the Brazilian Academy of Neurology. **Arquivos de neuro-psiquiatria**, v. 63, n. 4, p. 1104-1112, 2005.

FARINA, M.; AVILA, D. S.; DA ROCHA, J. B.; ASCHNER, M. Metals, oxidative stress and neurodegeneration: a focus on iron, manganese and mercury. **Neurochemistry international**, v. 62, n. 5, p. 575-594, 2013.

FAUCHERE, J. L.; ORTUNO, J. C.; DUHAULT, J.; BOUTIN, J. A.; LEVENS, N. European Patent EP 1044970, 2000. In: **Chem. Abstr.** 2000. p. 309-895.

FAUX, N. G.; RITCHIE, C.; GUNN, A.; REMBACH, A.; TSATSANIS, A.; BEDO, J.; HARRISON, J.; LANNFELT, L.. PBT2 rapidly improves cognition in Alzheimer's Disease: additional phase II analyses. **Journal of Alzheimer's Disease**, v. 20, n. 2, p. 509-516, 2010.

FERN N DE -BACHILLER, M. I.; PÉREZ, C.; MONJAS, L.. Novel tacrine– 8-hydroxyquinoline hybrids as multifunctional agents for the treatment of Alzheimer's disease, with neuroprotective, cholinergic, antioxidant, and copper-complexing properties. **Journal of medicinal chemistry**, v. 53, n. 13, p. 4927-4937, 2010.

FERN N DE -BACHILLER, M. I.; PÉREZ, C.; MONJAS, L.; RADEMANN, J.; RODRÍGUEZ-FRANCO, M. I. New Tacrine–4-Oxo-4 H-chromene hybrids as multifunctional agents for the treatment of Alzheimer's disease, with cholinergic, antioxidant, and β -amyloid-reducing properties. **Journal of medicinal chemistry**, v. 55, n. 3, p. 1303-1317, 2012.

FETTELSCHOSS, A.; ZABEL, F.; BACHMANN, M. F. Vaccination Against Alzheimer Disease: An Update on Future Strategies. **Human Vaccines & Immunotherapeutics**, v.10, n. 4, p. 847–851, 2014.

FINEFROCK, A. E.; BUSH, A. I.; DORAISWAMY, P. M. Current status of metals as therapeutic targets in Alzheimer's disease. **Journal of the American Geriatrics Society**, v. 51, n. 8, p. 1143-1148, 2003.

FISH, P. V.; STEADMAN, D.; BAYLE, E.; WHITING, P. New approaches for the treatment of Alzheimer's disease. **Bioorganic & medicinal chemistry letters**, v. 29, n. 2, p. 125-133, 2019.

FRANCO, D. F. P. Síntese de compostos cumarínicos-1,2,3-triazóis análogos ao Novobiocin planejados como inibidores da HSP-90. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, 2015.

FRANJESEVIC, A. J.; SILLART, S. B.; BECK, J. M.; VYAS, S.; CALLAM, C. S.; HADAD, C. M. Resurrection and Reactivation of Acetylcholinesterase and Butyrylcholinesterase. **Chemistry**, v. 25, p. 1 – 36, 2019

FROST, B.; JACKS, R. L.; DIAMOND, M. I. Propagation of tau misfolding from the outside to the inside of a cell. **Journal of Biological Chemistry**, v. 284, n. 19, p. 12845-12852, 2009.

GAUTHIER, S.; FELDMAN, H.; SCHNEIDER, L.; WILCOCK, G.; FRISONI, G.; HARDLUND, J.; MOEBIUS, H.. Efficacy and safety of tau-aggregation inhibitor therapy in patients with mild or moderate Alzheimer's disease: a randomised, controlled, double-blind, parallel-arm, phase 3 trial. **The Lancet**, v. 388, n. 10062, p. 2873-2884, 2016.

GH POPESCU, B. F.; NICHOL, H. Mapping brain metals to evaluate therapies for neurodegenerative disease. **CNS neuroscience & therapeutics**, v. 17, n. 4, p. 256-268, 2011.

Gh POPESCU, B. F.; NICHOL, H. Mapping brain metals to evaluate therapies for neurodegenerative disease. **CNS Neuroscience & Therapeutics**, v. 17, n. 4, p. 256-268, 2011.

GIBSON, G. L.; ALLSOP, D.; AUSTEN, B. M. Induction of Cellular Oxidative Stress by the β -amyloid Peptide Involved in Alzheimer's disease. **Protein and peptide letters**, v. 11, n. 3, p. 257-270, 2004.

GILMAN, S.; KOLLER, M; BLACK, R. S.; JENKINS, L.; GRIFFITH, S. G. AN1792 (QS-21)-201 Study Team. Clinical effects of Abeta immunization (AN1792) in patients with AD in an interrupted trial. **Neurology**, v. 64, n. 9, p. 1553-1562, 2005.

GOLDE, T. E. Open questions for Alzheimer's disease immunotherapy. **Alzheimer's research & therapy**, v. 6, n. 1, p. 3, 2014.

GOODMAN, L. S.; BRUNTON, L.; LAZO, J.; PARKER, K.. **Goodman and Gilman's the pharmacological basis of therapeutics**. New York: McGraw-Hill, 1996.

GREENOUGH, M. A.; CAMAKARIS, J.; BUSH, A. I. Metal dyshomeostasis and oxidative stress in Alzheimer's disease. **Neurochemistry international**, v. 62, n. 5, p. 540-555, 2013.

GREIG, N. H.; UTSUKI, T.; YU, Q.; ZHU, Xiaoxiang; HOLLOWAY, Harold; PERRY, TracyAnn; LEE, Bong; INGRAM, Donald; LAHIRI, Debomoy. A new therapeutic target in Alzheimer's disease treatment: attention to butyrylcholinesterase. **Current medical research and opinion**, v. 17, n. 3, p. 159-165, 2001.

GROSSMAN, H.; MARZLOFF, G.; LUO, X.; LEROITH, D.; SANO, M.; PASINETTI, G. NIC5-15 as a treatment for Alzheimer's: safety, pharmacokinetics and clinical variables. **Alzheimer's & Dementia: The Journal of the Alzheimer's Association**, v. 5, n. 4, p. P259, 2009.

GUSTAFSON, D.; ROTHENBERG, E.; BLENNOW, K.; STEEN, B.; SKOOG, I. An 18-year follow-up of overweight and risk of Alzheimer disease. **Archives of internal medicine**, v. 163, n. 13, p. 1524-1528, 2003.

HALLIDAY, G.; ROBINSON, S. R.; SHEPHERD, C.; KRIL, J. Alzheimer's disease and inflammation: a review of cellular and therapeutic mechanisms. **Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology**, v. 27, n. 1-2, p. 1-8, 2000.

HANGER, D. P.; ANDERTON, B. H.; NOBLE, W.. Tau phosphorylation: the therapeutic challenge for neurodegenerative disease. **Trends in molecular medicine**, v. 15, n. 3, p. 112-119, 2009.

HARB, T. B.; TORRES, P. B.; PIRES, J. S.; SANTOS, D. Y. A. C.; CHOW, F. Ensaio em microplaca do potencial antioxidante através do sistema quelante de metais para extratos de algas. **Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo**, v. 1, n. 1, p. 2-6, 2016.

HARDMAN, J. G.; LIMBIRD, L. E.; GILMAN, A. G.; GOODMAN, L. S.; GILMAN, A. **Goodman & Gilman's the pharmacological basis of therapeutics**, 5^a Ed., New York: McGraw-Hill, 1996.

HARDY, J.; ALLSOP, D. Amyloid deposition as the central event in the aetiology of Alzheimer's disease. **Trends in pharmacological sciences**, v. 12, p. 383-388, 1991.

HARDY, J.; SELKOE, D. J. The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: progress and problems on the road to therapeutics. **Science**, v. 297, n. 5580, p. 353-356, 2002.

HASHIMOTO, T.; ISHIBASHI, A.; HAGIWARA, H.; MURATA, Y.; TAKENAKA, O.; MIYAGAWA, T. E2012: A novel gamma-secretase modulator-pharmacology part. **Alzheimer's & Dementia: The Journal of the Alzheimer's Association**, v. 6, n. 4, p. S242, 2010.

HE, Q. L.; JIA, X. Y.; TANG, M. C.; TIAN, Z. H.; TANG, G. L.; LIU, W. Dissection of two acyl-transfer reactions centered on acyl-S-carrier protein intermediates for incorporating 5-chloro-6-methyl-O-methylsalicylic acid into chlorothricin. **ChemBioChem**, v. 10, n. 5, p. 813-819, 2009.

HENEKA, M. T.; CARSON, M. J.; EL KHOURY, J.; LANDRETH, G. E.; BROSSERON, F.; FEINSTEIN, D. L.; HERRUP, K. Neuroinflammation in Alzheimer's disease. **The Lancet Neurology**, v. 14, n. 4, p. 388-405, 2015.

HENLEY, D. B.; MAY, P.; DEAN, R.; SIEMERS, E. Development of semagacestat (LY450139), a functional γ -secretase inhibitor, for the treatment of Alzheimer's disease. **Expert opinion on pharmacotherapy**, v. 10, n. 10, p. 1657-1664, 2009.

HEO, H. J.; LEE, C. Y. Protective effects of quercetin and vitamin C against oxidative stress-induced neurodegeneration. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, n. 25, p. 7514-7517, 2004.

HERRERA JR, E.; CARAMELLI, P.; SILVEIRA, A. S. B. NITRINI, Ricardo. Epidemiologic survey of dementia in a community-dwelling Brazilian population. **Alzheimer Disease & Associated Disorders**, v. 16, n. 2, p. 103-108, 2002.

HICKEY, S. M.; KHOSA, S. K.; ROBSON, R. N.; WHITE, J.M.; LI, J.; HUANG, J. X. Synthesis and evaluation of cationic norbornanes as peptidomimetic antibacterial agents. **Organic & biomolecular chemistry**, v. 13, n. 22, p. 6225-6241, 2015.

HOLMES, C. Systemic inflammation and Alzheimer's disease. **Neuropathology and applied neurobiology**, v. 39, n. 1, p. 51-68, 2013.

HOLMES, C.; BOCHE, D.; WILONSON, D.; YADEGARFAR, G.; HOPKINS, V.; BAYER, A.; JONES, R.; BULLOCK, R. Long-term effects of A β 42 immunisation in Alzheimer's disease: follow-up of a randomised, placebo-controlled phase I trial. **The Lancet**, v. 372, n. 9634, p. 216-223, 2008.

HOLMES, C.; CUNNINGHAM, C.; ZOTOVA, E.; CULLIFORD, D.; PERRY, V. H. Proinflammatory cytokines, sickness behavior, and Alzheimer disease. **Neurology**, v. 77, n. 3, p. 212-218, 2011.

HOPKINS, C. R. ACS chemical neuroscience molecule spotlight on begacestat (GSI-953). **ACS Chemical Neuroscience**, v. 3, n.1, p. 3-4, 2012.

HORI, Y.; TAKEDA, S.; CHO, H.; WEGMANN, S.; SHOUP, T.; TAKAHASHI, K.; IRIMIA, D.; ELMALEH, D.; HYMAN, B.; HUDRY, E. A Food and Drug Administration-approved asthma therapeutic agent impacts amyloid β in the brain in a transgenic model of Alzheimer disease. **Journal of Biological Chemistry**, v. 290, n. 4, p. 1966-1978, 2015.

HUANG, W.; WEI, W.; SHEN, Z.. Drug-like chelating agents: a potential lead for Alzheimer's disease. **RSC Advances**, v. 4, n. 94, p. 52088-52099, 2014.

INESTROSA, N. C.; ALVAREZ, A.; PÉREZ, C.; MORENO, R.; VICENTE, M.; LINKER, C.; CASANUEVA, O.; SOTO, C.; GARRIDO, J. Acetylcholinesterase accelerates assembly of amyloid- β -peptides into Alzheimer's fibrils: possible role of the peripheral site of the enzyme. **Neuron**, v. 16, n. 4, p. 881-891, 1996.

INESTROSA, N. C.; FERRARI, G.; GARRIDO, J.; ALVAREZ, A.; OLIVARES, G.; BARRÍA, M.; BRONFMAN, M.; CHACÓN, M. Wnt signaling involvement in β -amyloid-dependent neurodegeneration. **Neurochemistry international**, v. 41, n. 5, p. 341-344, 2002.

IQBAL, K.; LIU, F.; GONG, C. X.; GRUNDKE-IQBAL, I. Tau in Alzheimer disease and related tauopathies. **Current Alzheimer Research**, v. 7, n. 8, p. 656-664, 2010.

IRIZARRY, M. C.; GUROL, M. E.; RAJU, S.; DIAZ-ARRASTIA, R.; LOCASCIO, J. J.; TENNIS M.; HYMAN, B. T.; GROWDON, J. H.; GREENBERG, S. M.; BOTTIGLIERI, T. Association of homocysteine with plasma amyloid β protein in aging and neurodegenerative disease. **Neurology**, v. 65, n. 9, p. 1402-1408, 2005.

ISAAC, M. G.; QUINN, R.; TABEL, N. Vitamin E for Alzheimer disease and mild cognitive impairment. **Cochrane Database of Systematic Reviews**, v. 3, p. CD002854, 2008.

JAKOB-ROETNE, R.; JACOBSEN, H. Alzheimer's disease: from pathology to therapeutic approaches. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 48, n. 17, p. 3030-3059, 2009.

JIANG, XY.; CHEN, TK.; ZHOU, JT.; HE, SY.; YANG, HY.; CHEN, Y. Dual GSK-3 β /AChE inhibitors as a new strategy for multitargeting anti-Alzheimer's disease drug discovery. **ACS medicinal chemistry letters**, v. 9, n. 3, p. 171-176, 2018.

JOMOVA, K.; VONDRAKOVA, D.; LAWSON, M.; VALKO, M. Metals, oxidative stress and neurodegenerative disorders. **Molecular and cellular biochemistry**, v. 345, n. 1-2, p. 91-104, 2010.

JORM, A. F. Cross-national comparisons of the occurrence of Alzheimer's and vascular dementias. **European archives of psychiatry and clinical neuroscience**, v. 240, n. 4-5, p. 218-222, 1991.

JOULE, J. A.; MILLS, K. Heterocyclic Chemistry. 5^a Ed., United Kingdom: **John Wiley & Sons**, 2010.

KAKWANI, M. D.; LELE, A. C.; RAY, M.; RAJAN, M. G. R.; DEGANI, M. S. Synthesis and preliminary biological evaluation of novel N-(3-aryl-1, 2, 4-triazol-5-yl) cinnamide derivatives as potential antimycobacterial agents: An operational Topliss Tree approach. **Bioorganic & medicinal chemistry letters**, v. 21, n. 21, p. 6523-6526, 2011.

KÁSA, P.; RAKONCZAY, Z.; GULYA, K. The cholinergic system in Alzheimer's disease. **Progress in neurobiology**, v. 52, n. 6, p. 511-535, 1997.

KATRITZKY, A. R.; RAMSDEN, C. A.; JOULE, J. A.; ZHDANKIN, V. V. Handbook of heterocyclic chemistry. 3^aEd. New York: **Elsevier**, 2010.

KATRITZKY, A. R.; ROGOVOY, B.; VVENDESKY, V.; KOVALENKO, K.; STEEL, P.; MARKOV, V.; FOROOD, B. Synthesis of N, N-disubstituted 3-amino-1, 2, 4-triazoles. **Synthesis**, v. 2001, n. 06, p. 0897-0903, 2001.

KAWAHARA, M. Effects of aluminum on the nervous system and its possible link with neurodegenerative diseases. **Journal of Alzheimer's Disease**, v. 8, n. 2, p. 171-182, 2005.

KRAUS, A.; GHORAI, P.; BIRNKAMMER, T.; SCHNELL, D.; ELZ, S.; SEIFERT, R.; BUSCHAUER, A. NG-Acylated Aminothiazolylpropylguanidines as Potent and Selective Histamine H2 Receptor Agonists. **ChemMedChem: Chemistry Enabling Drug Discovery**, v. 4, n. 2, p. 232-240, 2009.

KRAUS, G. A.; TASCHNER, M. J. Model studies for the synthesis of quassinoids. 1. Construction of the BCE ring system. **The Journal of Organic Chemistry**, v. 45, n. 6, p. 1175-1176, 1980.

KURTI, L.; CZAKO B. Strategic Applications of Named Reactions in Organic Synthesis. 1^a Ed. **Academic Press**, 2005.

KUTZ, C. J.; HOLSHOUSE, S. L.; MARROW, E. A.; WOSTER, P. M. 3, 5-Diamino-1, 2, 4-triazoles as a novel scaffold for potent, reversible LSD1 (KDM1A) inhibitors. **MedChemComm**, v. 5, n. 12, p. 1863-1870, 2014.

LAHIRI, D. K.; ROGERS, J. T.; GREIG, N. H.; SAMBAMURTI, K. Rationale for the development of cholinesterase inhibitors as anti-Alzheimer agents. **Current pharmaceutical design**, v. 10, n. 25, p. 3111-3119, 2004.

LANSDALL, C. J. An effective treatment for Alzheimer's disease must consider both amyloid and tau. **Bioscience Horizons: The International Journal of Student Research**, v. 7, 2014.

LAUNER, L.; ROSS, W.; PETROVITCH, H.; MASAKI, K.; FOLEY, D.; WHITE, L.; HAVLIK, R. Midlife blood pressure and dementia: the Honolulu-Asia aging study☆. **Neurobiology of aging**, v. 21, n. 1, p. 49-55, 2000.

LEVY-LAHAD, E.; WASCO, W.; POORKAJ, P.; ROMANO, D. M.; OSHIMA, J.; PETTINGELL, W. H.; YU, C. E.; JONDRO, P. D.; SCHMIDT, S. D.; WANG, K. Candidate gene for the chromosome 1 familial Alzheimer's disease locus. **Science**, v. 269, n. 5226, p. 973-977, 1995.

LI, J. J. VILSMEIER MECHANISM FOR ACID CHLORIDE FORMATION. IN: NAME REACTIONS. 3 ED, P. 605-607. **Springer**, Berlin, Heidelberg, 2006.

LIMA, M. L. BARREIRO, E. J. Bioisosterism: A Useful Strategy for molecular Modification and Drug Design. **Current Medicinal Chemistry**, v. 12, p. 23-49, 2005.

LINDEBOOM, Jaap; WEINSTEIN, H. Neuropsicologia do envelhecimento cognitivo, comprometimento cognitivo mínimo, doença de Alzheimer e comprometimento cognitivo vascular. **European journal of pharmacology**, v. 490, n. 1-3, p. 83-86, 2004.

LINDGREN, B. O.; NILSSON, T. Preparation of carboxylic acids from aldehydes (including hydroxylated benzaldehydes) by oxidation with chlorite. *Acta Chemica Scandinavica*, v. 27, p. 888-890, 1973.

LINDSAY, J.; LAURIN, D.; VERREAULT, R.; HÉBERT, R.; HELLIWELL, B.; HILL, G.; MCDOWELL, I. Risk factors for Alzheimer's disease: a prospective analysis from the Canadian Study of Health and Aging. **American journal of epidemiology**, v. 156, n. 5, p. 445-453, 2002.

LIPTON, S. A.; ROSENBERG, P. A. Excitatory amino acids as a final common pathway for neurologic disorders. **New England Journal of Medicine**, v. 330, n. 9, p. 613-622, 1994.

LIU, J.; LIU, Z.; ZHANG, Y.; YIN, F. A novel antagonistic role of natural compound icariin on neurotoxicity of amyloid β peptide. **The Indian journal of medical research**, v. 142, n. 2, p. 190, 2015.

LIU, P.-P.; XIE, Y.; MENG, X.-Y.; KANG, J.-S. History and progress of hypotheses and clinical trials for Alzheimer's disease. **Signal transduction and targeted therapy**, v. 4, n. 29, 2019.

LIU, SL.; WANG, C.; JIANG, T.; TAN, L.; XING, A.; YU, J. T. The role of Cdk5 in Alzheimer's disease. **Molecular neurobiology**, v. 53, n. 7, p. 4328-4342, 2016.

LIU, Z.; ZHANG, A.; SUN, H.; HAN, Y.; KONG, L.; WANG, X. Two decades of new drug discovery and development for Alzheimer's disease. **RSC advances**, v. 7, n. 10, p. 6046-6058, 2017.

LOEF, M.; MENDOZA, L. F.; WALACH, H. Lead (Pb) and the risk of Alzheimer's disease or cognitive decline: a systematic review. **Toxin Reviews**, v. 30, n. 4, p. 103-114, 2011.

LOVELL, M. A.; ROBERTSON, J. D.; TEESDALE, W. J.; CAMPBELL, J. L.; MARKESBERRY, W. R. Copper, iron and zinc in Alzheimer's disease senile plaques. **Journal of the neurological sciences**, v. 158, n. 1, p. 47-52, 1998.

LUO, Y.; SMITH, J.; PARAMASIVAM, V.; BURDICK, A.; CURRY, K.; BUFORD, J.; KHAN, I.; NETZER, W., XU, H.; BUTKO, Peter. Inhibition of amyloid- β aggregation and caspase-3 activation by the Ginkgo biloba extract EGb761. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 99, n. 19, p. 12197-12202, 2002.

LUO, Z.; LU, C.; YAN, J.; LIU, A.; LUO, H.; LI, X. Synthesis and evaluation of multi-target-directed ligands against Alzheimer's disease based on the fusion of donepezil and ebselen. **Journal of medicinal chemistry**, v. 56, n. 22, p. 9089-9099, 2013.

LYKETSOS, C. G.; BREITNER, J. C. S.; GREEN, R. C.; MARTIN, B. K.; C. MEINERT;; PIANTADOSI, S.; SABBAGH, M. Naproxen and celecoxib do not prevent AD in early results from a randomized controlled trial. **Neurology**, v. 68, n. 21, p. 1800-1808, 2007.

MACCIONI, R. B.; FARIÁS, G.; MORALES, I.; NAVARRETE, L. The Revitalized Tau Hypothesis on Alzheimer's Disease. **Archives of medical research**, v. 41, n. 3, p. 226-231, 2010.

- MACK, A.; ROBITZKI, A. The key role of butyrylcholinesterase during neurogenesis and neural disorders: an antisense-5'butyrylcholinesterase-DNA study, **Progress in Neurobiology**, v. 60, p. 607-628, 2000.
- MALINOW, R. New developments on the role of NMDA receptors in Alzheimer's disease. **Current opinion in neurobiology**, v. 22, n. 3, p. 559-563, 2012.
- MARINO, J. P.; FISHER, P.; HOFFMANN, G.; KIRKPATRICK, R.; JANSON, C.; JOHNSON, R.; MA, C. Highly potent inhibitors of methionine aminopeptidase-2 based on a 1, 2, 4-triazole pharmacophore. **Journal of medicinal chemistry**, v. 50, n. 16, p. 3777-3785, 2007.
- MARTONE, R.; L.; ZHOU, H.; ATCHISON, K.; COMERY, T.; XU, J.; HUANG, X.; GONG, X.; JIN, M.; KREFT, A.; HARRISON, B.; MAYER, S.; GONZALES, C. Begacestat (GSI-953): a novel, selective thiophene sulfonamide inhibitor of amyloid precursor protein γ -secretase for the treatment of Alzheimer's disease. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 331, n. 2, p. 598-608, 2009.
- MASSOULIÉ, J.; PEZZEMENTI, L.; SUZANNE, B.; KREJCI, E.; VALETTE, FM. Molecular and cellular biology of cholinesterases. **Progress in neurobiology**, v. 41, n. 1, p. 31-91, 1993.
- MATTSON, M. P. Pathways towards and away from Alzheimer's disease. **Nature**, v. 430, n. 7000, p. 631-639, 2004.
- MAURER, K.; VOLK, S.; GERBALDO, H. Auguste D and Alzheimer's disease. **The Lancet**, v. 349, n. 9064, p. 1546-1549, 1997.
- MAWUENYEGA, K. G.; SIGURDSON, W.; OVOD, V.; MUNSELL, L.; KASTEN, T.; MORRIS, J. C.; YARASHESKI, K. E.; BATEMAN, R. J. Decreased Clearance of CNS β -Amyloid in Alzheimer's Disease. **Science**, v. 330 n. 6012, p.1774, 2010.
- MAYEUX, R.. Epidemiology of neurodegeneration. **Annual review of neuroscience**, v. 26, n. 1, p. 81-104, 2003.
- MAZUR, M.; OLCZAK, J.; KORALEWSKI, R.; CZESTOWSKI, W.; JERDRZEJCKZAK, A.; GOLAB, J.; DZWONEK, K. Targeting acidic mammalian chitinase is effective in animal model of asthma. **Journal of medicinal chemistry**, v. 61, n. 3, p. 695-710, 2018.
- MCGEER, E. G.; MCGEER, P. L. Neuroinflammation in Alzheimer's disease and mild cognitive impairment: a field in its infancy. **Journal of Alzheimer's disease**, v. 19, n. 1, p. 355-361, 2010.
- MCGEER, P. L.; ITAGAKI, S.; MCGEER, E. G. Expression of the histocompatibility glycoprotein HLA-DR in neurological disease. **Acta neuropathologica**, v. 76, n. 6, p. 550-557, 1988.
- MCKHANN, G.; DRACHMAN, D.; FOLSTEIN, M.; KALTZMAN, R.; PRICE, D.; STADIAN, E. Clinical diagnosis of Alzheimer's disease: Report of the NINCDS-ADRDA Work Group* under the auspices of Department of Health and Human Services Task Force on Alzheimer's Disease. **Neurology**, v. 34, n. 7, p. 939-939, 1984.

MESULAM, M.; GUILLOZET, A.; SHAW, P.; QUINN, B. Widely spread butyrylcholinesterase can hydrolyze acetylcholine in the normal and Alzheimer brain. **Neurobiology of Disease**, v. 9, n. 1, p. 88e93, 2002.

MI, J. L.; WU, J.; ZHOU, C. H. Progress in anti-tumor agents: triazoles. **West China J. Pharm. Sci**, v. 23, p. 84-86, 2008.

MI, J. L.; ZHOU, C. H.; BAI, X. Advances in triazole antimicrobial agents. *Chin J Antibiotics*, v. 32, n. 10, p. 587-593, 2007.

MIGUEL-HIDALGO, J. J.; ALVAREZ, X. A.; CACABELOS, R.; QUACK, G. Neuroprotection by memantine against neurodegeneration induced by β -amyloid (1-40). **Brain research**, v. 958, n. 1, p. 210-221, 2002.

MILLAN, M. J. Dual-and triple-acting agents for treating core and co-morbid symptoms of major depression: novel concepts, new drugs. **Neurotherapeutics**, v. 6, n. 1, p. 53-77, 2009.

MILLER, E. R. 3RD; PASTOR-BARRIUSO, R.; DALAL, D.; RIEMERSMA, R. A.; APPEL, L. J.; GUALLAR, E. Meta-analysis: high dosage vitamin E supplementation may increase all-cause mortality. **Annals of Internal Medicine**, v. 142, n. 1, p. 37-46, 2005.

MIN, J.; GUO, K.; SURYADEVARA, P.; ZHU, F.; HOLBROOK, G.; CHEN, Y.; FEAU, C.; YOUNG, B.. Optimization of a novel series of ataxia-telangiectasia mutated kinase inhibitors as potential radiosensitizing agents. **Journal of medicinal chemistry**, v. 59, n. 2, p. 559-577, 2016.

MIU, A. C.; BENGA, O. J. Aluminum and Alzheimer's disease: A new look Alzheimer's Dis. 2006, 10, 179. **Journal of Alzheimer's Disease**, v. 10, no. 2-3, pp. 179-201, 2006.

MIU, A. C.; BENGA, O. J. Aluminum and Alzheimer's disease: A new look. **Alzheimer's Disease**, v. 10, n. 2-3, p. 179-201, 2006.

MOHMMAD ABDUL, H.; SULTANA, R.; KELLER, J.; ST. CLAIR, D. Mutations in amyloid precursor protein and presenilin-1 genes increase the basal oxidative stress in murine neuronal cells and lead to increased sensitivity to oxidative stress mediated by amyloid β -peptide (1-42), H₂O₂ and kainic acid: implications for Alzheimer's disease. **Journal of neurochemistry**, v. 96, n. 5, p. 1322-1335, 2006.

MOHSENZADEGAN, M.; MIRSHAFIEY, A. The immunopathogenic role of reactive oxygen species in Alzheimer disease. **Iranian Journal of Allergy, Asthma and Immunology**, p. 203-216, 2012.

MONCZOR, M. Diagnosis and treatment of Alzheimer's disease. **Current Medicinal Chemistry-Central Nervous System Agents**, v. 5, n. 1, p. 5-13, 2005.

MORPHY, R.; RANKOVIC, Z.. Designing multiple ligands-medicinal chemistry strategies and challenges. **Current pharmaceutical design**, v. 15, n. 6, p. 587-600, 2009.

MORRIS, M. C. The role of nutrition in Alzheimer's disease: epidemiological evidence. **European Journal of Neurology**, v. 16, p. 1-7, 2009.

MORRIS, M. C.; Evans, D. A.; Bienias, J. L.; Tangney, C. C.; Wilson, R. S. Vitamin E and cognitive decline in older persons. **Archives of neurology**, v. 59, n. 7, p. 1125-1132, 2002.

MORRIS, M. S. Homocysteine and Alzheimer's disease. **The Lancet Neurology**, v. 2, n. 7, p. 425-428, 2003.

MOULIN, A.; BIBIAN, M.; BLAYO, AL.; HABNOUNI, S.; MARTINEZ, J. Synthesis of 3, 4, 5-Trisubstituted-1, 2, 4-triazoles. **Chemical reviews**, v. 110, n. 4, p. 1809-1827, 2010.

MUHOBERAC, B. B.; VIDAL, R. Abnormal iron homeostasis and neurodegeneration. **Frontiers in aging neuroscience**, v. 5, p. 32, 2013.

MUÑOZ-TORRERO, D. Acetylcholinesterase inhibitors as disease-modifying therapies for Alzheimer's disease. **Current medicinal chemistry**, v. 15, n. 24, p. 2433-2455, 2008.

MUSHTAQ, G.; NIGEL, G.; JALALUDDIN, K.; MAHAMMAD, K. Status of acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase in Alzheimer's disease and type 2 diabetes mellitus. **CNS & Neurological Disorders-Drug Targets (Formerly Current Drug Targets-CNS & Neurological Disorders)**, v. 13, n. 8, p. 1432-1439, 2014.

MUTTER, J.; CURTH, A.; NAUMANN, J.; DETH, R.; WALACH, H.. Does inorganic mercury play a role in Alzheimer's disease? A systematic review and an integrated molecular mechanism. **Journal of Alzheimer's Disease**, v. 22, n. 2, p. 357-374, 2010.

NAEINI, AM Alavi; ELMADFA, I; DJAZAYERY, A.; BAREKATAIN, M.; GHAZVINI, M. R. A.; DJALALI, M.; FEIZI, A. The effect of antioxidant vitamins E and C on cognitive performance of the elderly with mild cognitive impairment in Isfahan, Iran: a double-blind, randomized, placebo-controlled trial. **European journal of nutrition**, v. 53, n. 5, p. 1255-1262, 2014.

NAITO, Y.; AKANOSHI, F.; TAKEDA, S.; OKADA, T.; KAJII, M.; NISHIMURA, H.; SUGIURA, M.; FUKAYA, C.; KAGITANI, Y. Synthesis and pharmacological activity of triazole derivatives inhibiting eosinophilia. **Journal of medicinal chemistry**, v. 39, n. 15, p. 3019-3029, 1996.

NELSON, D. L.; COX, M. M. *Princípios de Bioquímica de Lehninger*. 7^a ed. Porto Alegre: **Artmed Editora**, 2018.

NERI, L.; HEWITT, D. Aluminium, Alzheimer's disease, and drinking water. **The Lancet**, v. 338, n. 8763, p. 390, 1991.

NITRINI, R.; CARAMELLI, P.; HERRERA JR, E.; BAHIA, V.S.; CAIXETA, L.F.; RADANOVIC, M.; ANGHINAH, R.; CHARCHAT-FICHMAN, H.; PORTO, C.S.; CHARThERY, M.T.; HARTMANN, A.P. J.; HUANG, N.; SMID, J.; LIMA, E.P.; TAKADA, L.T.; TAKAHASHI, D,Y. Incidence of dementia in a community-dwelling Brazilian population. **Alzheimer Disease & Associated Disorders**, v. 18, n. 4, p. 241-246, 2004.

NOTKOLA, IL.; SULKAVA, R.; PEKKANEN, J.; ERKINJUNTTI, T.; EHNHOLM, C.; KIVINEN, P.; TUOMILEHTO, J.; NISSINEN, A. Serum total cholesterol, apolipoprotein E {FC12} e4 allele, and Alzheimer's disease. **Neuroepidemiology**, v. 17, n. 1, p. 14-20, 1998.

NUNOMURA, A.; CASTELLANI, R. J.; ZHU, X.; MOREIRA, P. I.; PERRY, G.; SMITH, M. A. Involvement of oxidative stress in Alzheimer disease. **Journal of neuropathology & experimental neurology**, v. 65, n. 7, p. 631-641, 2006.

OTT, P. A. Immunotherapy: Immune-modified Response Criteria - An Iterative Learning Process? **Nature Reviews Clinical Oncology**, v. 15, n. 5, p. 267–268 2018.

PANEK, D.; WICHUR, T.; GODYN, J.; PASIEKA, A.; MALAWSKA, B.. Advances toward multifunctional cholinesterase and β -amyloid aggregation inhibitors. **Future medicinal chemistry**, v. 9, n. 15, p. 1835-1854, 2017.

PANZA, F.; SOLFRIZZI, V.; SERIPA, D.; IMBIMBO, B.; LOZUPONE, M.; SANTAMATO, A.; ZECCA, C.; BARULLI, M.; BELLOMO, A.; PILOTTO, A.; DANIELE, A.; GRECO, A.. Tau-centric targets and drugs in clinical development for the treatment of Alzheimer's disease. **BioMed research international**, v. 2016, 2016.

PARDRIDGE, W. M. Alzheimer's disease drug development and the problem of the Blood Brain Barrier. **Alzheimer's and dementia**, v. 5, n. 5, p. 427-432, 2009.

PATTERSON, C., FEIGHTNER, J. W., GARCIA, A., HSIUNG, G.-Y. R., MACKNIGHT, C., SADOVNICK, A. D. Diagnosis and treatment of dementia: 1. Risk assessment and primary prevention of Alzheimer disease **Canadian Medical Association Journal**, v. 178, n. 5, p. 548-56, 2008.

PENDERGRASS, J. C.; HALEY, B. E.; VIMY, M. J. Tubulin in Rat Brain: Similarity to a Molecular Lesion in Alzheimer Diseased Brain. **Neurotoxicology**, v. 18, n. 2, p. 315-324, 1997.

PENG, XM.; CAI, GX.; ZHOU, CH. Recent developments in azole compounds as antibacterial and antifungal agents. **Current topics in medicinal chemistry**, v. 13, n. 16, p. 1963-2010, 2013.

PEREIRA, T. M. Síntese e avaliação farmacológica de novos derivados cumarínicos híbridos planejados como protótipos de teranósticos para doença de Alzheimer. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, 2018.

PEREIRA, T. M.; FRANCO, D. P.; VITÓRIO, F.; KUMMERLE, A. E. Coumarin Compounds in Medicinal Chemistry: Some Important Examples from the Last Years. **Curr. Top. Med. Chem.**, v. 18, p. 124-148, 2018.

PERRY, V. H.; HOLMES, C. Microglial Priming in Neurodegenerative Disease. **Nature Reviews. Neurology**, v. 10, n. 4, p. 217-224, 2014.

PERSSON, T.; POPESCU, B. O.; CEDAZO-MINGUEZ, A. Oxidative stress in Alzheimer's disease: why did antioxidant therapy fail? **Oxidative medicine and cellular longevity**, v. 2014, 2014.

PETERSON, Q. P.; HSU, D. C.; GOODE, D. R.; NOVOTNY, C. J.; TOTTEN, R. K.; HERGENROTHER, P. J. Procaspase-3 activation as an anti-cancer strategy: Structure–activity relationship of procaspase-activating compound 1 (PAC-1) and Its cellular co-

localization with caspase-3. **Journal of medicinal chemistry**, v. 52, n. 18, p. 5721-5731, 2009.

PETRIKKOS, G.; SKIADA, A. Recent advances in antifungal chemotherapy. **International journal of antimicrobial agents**, v. 30, n. 2, p. 108-117, 2007.

PEZZEMENTI, L.; NACHON, F.; CHATONNET, A. Evolution of acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase in the vertebrates: an atypical butyrylcholinesterase from the Medaka *Oryzias latipes*. **PLoS One**, v. 6, n. 2, 2011.

PHIEL, C. J.; WILSON, C. A.; LEE, V. M. Y.; KLEIN, P. S. GSK-3 α regulates production of Alzheimer's disease amyloid- β peptides. **Nature**, v. 423, n. 6938, p. 435-439, 2003.

PHILLIPS, E. C., CROFT, C. L., KURBATSKAYA, K., O'NEILL, M. J., HUTTON, M. L., HANGER, D. P., GARWOOD, C. J. NOBLE, W. Astrocytes and neuroinflammation in Alzheimer's disease. **Biochemical Society Transactions**, v. 42, n. 5, p. 1321–1325, 2014.

PHILPOTEDUCATION. Applications and skills. Disponível em: [https://www.philpoteducation.com/mod/book/view.php?id=832&chapterid=2869#/. Acesso em: 18 de dezembro de 2019.](https://www.philpoteducation.com/mod/book/view.php?id=832&chapterid=2869#/)

POCERNICH, C. B.; BUTTERFIELD, D. A. Elevation of glutathione as a therapeutic strategy in Alzheimer disease. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease**, v. 1822, n. 5, p. 625-630, 2012.

QUINN, D. M. Acetylcholinesterase: enzyme structure, reaction dynamics, and virtual transition states. **Chemical Reviews**, v. 87, n.5, p. 955–979, 1987.

QUON, D.; WANG, Y.; CATALANO, R.; SCARDINA, J. M.; MURAKAMI, K.; CORDELL, B. Formation of β -amyloid protein deposits in brains of transgenic mice. **Nature**, v. 352, n. 6332, p. 239-241, 1991.

RAJASEKHAR, K.; GOVINDARAJU, T. Current progress, challenges and future prospects of diagnostic and therapeutic interventions in Alzheimer's disease. **RSC advances**, v. 8, n. 42, p. 23780-23804, 2018.

RANG, R.; DALE, M. M.; RITTER, J. M.; FLOWER, R. J.; HENDERSON, G. **Farmacologia**. Elsevier Brasil, 2015.

RASKIND, M. A.; BARNES, ROBERT F. Alzheimer's disease: Treatment of noncognitive behavioral abnormalities. **Psychopharmacology: The fourth generation of progress**, p. 1427-1435, 1995.

RASKIND, M. A.; PESKIND, E. R.; WESSEL, T.; YUAN, W. Galantamine in AD: a 6-month randomized, placebo-controlled trial with a 6-month extension. **Neurology**, v. 54, n. 12, p. 2261-2268, 2000.

RAUK, A. The chemistry of Alzheimer's disease. **Chemical Society Reviews**, v. 38, n. 9, p. 2698-2715, 2009.

RAVES, M. L.; GILES, K.; SCHURAG, J. D.; SCHMID, M. F.; PHILIPS, G. N.; CHIU, W.; SUSSMAN, J. L. Quaternary structure of tetrameric acetylcholinesterase. In: **Structure and function of cholinesterases and related proteins**. Springer, Boston, MA, 1998. p. 351-356.

REGE, S. D.; GEETHA, T.; BRODERICK, T. L.; BABU, J. R. Resveratrol Protects β Amyloid-Induced Oxidative Damage and Memory Associated Proteins in H19-7 Hippocampal Neuronal Cells. **Current Alzheimer Research**, v. 12, n. 2, p.147-156, 2015.

REITZ, C.; DEN HEIJER, T.; VAN DUJIN, C.; HOFMAN A.; BRETELER, M. M. B.. Relation between smoking and risk of dementia and Alzheimer disease: the Rotterdam Study. **Neurology**, v. 69, n. 10, p. 998-1005, 2007.

RICHARD, T.; PAWLUS, A. D.; IGLÉSIAS, M. L.; PEDROT, E.; WAFFO-TEGUO, P.; MÉRILLON, J. M.; MONTI, J. P. Neuroprotective Properties of Resveratrol and Derivatives. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1215, v. 1, p. 103 -108, 2011.

RICHARD, T.; WAFFLO-TEGUO, P.; MÉRILLON, J. M.; MONTI, J. P.; PEDROT, E. Neuroprotective properties of resveratrol and derivatives. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1215, n. 1, p. 103, 2011.

ROCKENSTEIN, E.; TORRANCE, M.; ADAME, A. MANTE, M.; BAR-ON, P.; ROSE, J.; CREWS, L.; MASLIAH, E. Neuroprotective effects of regulators of the glycogen synthase kinase-3 β signaling pathway in a transgenic model of Alzheimer's disease are associated with reduced amyloid precursor protein phosphorylation. **Journal of Neuroscience**, v. 27, n. 8, p. 1981-1991, 2007.

ROSENBERRY, T. L.; BRAZZOLOTTO, X.; MACDONALD, I. R.; WANDHAMMER, M.; TROVASLET-LEROY, M.; DARVESH, S.; NACHON, F. Comparison of the Binding of Reversible Inhibitors to Human Butyrylcholinesterase and Acetylcholinesterase: A Crystallographic, Kinetic and Calorimetric Study. **Molecules**, v. 22, n. 2098, 2017.

ROSS, M. F.; PRIME, T.; ABAKUMOVA, I.; JAMES, A.; PORTEUS, C.; SMITH, R. Rapid and extensive uptake and activation of hydrophobic triphenylphosphonium cations within cells. **Biochemical Journal**, v. 411, n. 3, p. 633-645, 2008.

ROY, S. M.; GRUM-TOKARS, V.; SCHAVOCKY, J.; SAEED, F.; STANISZEWSKI, A.; TEICH, A.. Targeting human central nervous system protein kinases: An isoform selective p38 α MAPK inhibitor that attenuates disease progression in Alzheimer's disease mouse models. **ACS chemical neuroscience**, v. 6, n. 4, p. 666-680, 2015.

SALGUEIRO, F. B.; CASTRO, R. N. Comparação entre a composição química e capacidade antioxidante de diferentes extratos de própolis verde. **Química Nova**, v. 39, n. 10, p. 1192-1199, 2016.

SANG, Z.; LI, Yang; QIANG, X.; XIAO, G.; LIU, Q.; TAN, Z.; DENG, Y. Multifunctional scutellarin-rivastigmine hybrids with cholinergic, antioxidant, biometal chelating and neuroprotective properties for the treatment of Alzheimer's disease. **Bioorganic & medicinal chemistry**, v. 23, n. 4, p. 668-680, 2015.

SANTOS, L. E.; BECKMAN, D.; FERREIRA, S. T. Microglial dysfunction connects depression and Alzheimer's disease. **Brain, behavior, and immunity**, v. 55, p. 151-165, 2016.

SANTOS, S. N.; DE SOUZA, G. A.; PEREIRA, T. M.; FRANCO D. P.; DEL CISTIA, C. DE N.; SANT'ANNA, C. M. R.; LACERDA, R. B.; KUMMERLE A. E.; Regioselective microwave synthesis and derivatization of 1,5-diaryl-3-amino-1,2,4-triazoles and a study of their cholinesterase inhibition properties. **RSC Advances**, v. 9, n. 35, p. 20356-20369, 2019.

SAVELIEFF, M. G.; LEE, S.; LIU, Y.; LIM, M. H. Untangling amyloid- β , tau, and metals in Alzheimer's disease. **ACS chemical biology**, v. 8, n. 5, p. 856-865, 2013.

SAYKIN, A.; SHEN, L.; YAO, X.; KIM, S.; NHO, K.; RISACHER, S.; RAMANAN, V. Genetic studies of quantitative MCI and AD phenotypes in ADNI: Progress, opportunities, and plans. **Alzheimer's & Dementia**, v. 11, n. 7, p. 792-814, 2015.

SCHILT, A. A.; MCBRIDE, L.; LONG, J. R. **Perchloric acid and perchlorates**. Columbus, OH: GF Smith Chemical Company, 1979.

SCHMITT, B.; BERNHARDT, T.; MOELLER, H. J.; HEUSER, I.; FRÖLICH, L. Combination therapy in Alzheimer's disease. **CNS drugs**, v. 18, n. 13, p. 827-844, 2004.

SCHNEIDER, L. S. GEFFEN, Y. RABINOWITZ, J. THOMAS, R. G. SCHMIDT R, ROPELE S.; WEINSTOCK M. Ladostigil Study Group. Low-dose ladostigil for mild cognitive impairment: A phase 2 placebo-controlled clinical trial. **Neurology**, v 93, p. e1474-e1484, 2019

SCHWAB, C.; MCGEER, P. L. Inflammatory aspects of Alzheimer disease and other neurodegenerative disorders. **Journal of Alzheimer's Disease**, v. 13, n. 4, p. 359-369, 2008.

SELKOE, D. J.; HARDY, J. The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease at 25 years. **EMBO molecular medicine**, v. 8, n. 6, p. 595-608, 2016.

SERENIKI, A.; VITAL, M. A. B. F. A doença de Alzheimer: aspectos fisiopatológicos e farmacológicos. **Revista de psiquiatria do Rio Grande do Sul**, v. 30, n. 1, p. 0-0, 2008.

SERIPA, D.; SOLFRIZZI, V.; IMBIMBO, B.; DANIELE, A.; SANTAMATO, A.; LOZUPONE, M.. Tau-directed approaches for the treatment of Alzheimer's disease: focus on leuco-methylthioninium. **Expert review of neurotherapeutics**, v. 16, n. 3, p. 259-277, 2016.

SERRANO-POZO, A.; FROSCH, M. P.; MASLIAH, E.; HYMAN, B. T. Neuropathological alterations in Alzheimer disease. **Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine**, v. 1, n. 1, p. a006189, 2011.

SHARP, E. S.; GATZ, M. The relationship between education and dementia an updated systematic review. **Alzheimer disease and associated disorders**, v. 25, n. 4, p. 289, 2011.

SHEN, J.; WONG, B.; ZHANG, H. Negishi Approach to 1, 5-Disubstituted 3-Amino-1 H-1, 2, 4-triazoles. **Organic letters**, v. 17, n. 19, p. 4678-4681, 2015.

SHIDORE, M.; MACHHI, J.; SHINGALA, K.; MURUMKAR, P.; SHARMA, M. K.; AGRAWAL, N.; TRIPATHI, A.; PARIKH, Z.; PILLAI, P.; YADAV M. R.

Benzylpiperidine-linked diarylthiazoles as potential anti-Alzheimer's agents-synthesis and biological evaluation. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 59, n. 12, p. 5823-5846, 2016.

SHUTTERSTOCK. Disponível em: <https://www.shutterstock.com/pt/image-vector/alzheimers-disease-change-tau-protein-that-581982592> Acesso em: 16 de dezembro de 2019.

SILVA, P. Farmacologia, 6ª Ed., Rio de Janeiro: **Guanabara**, 2002.

SINGH, M.; KAUR, M.; CHADHA, N.; SILAKARI, O. Hybrids: a new paradigm to treat Alzheimer's disease. **Molecular diversity**, v. 20, n. 1, p. 271-297, 2016.

SINHA, A.; TAMBOLI, R. S.; SETH, B.; KANHED, A. M.; TIWARI, S. K.; AGARWAL, S.; NAIR, S.; GIRIDHAR, R.; CHATURVEDI, R. K.; YADAV, M. R. Neuroprotective Role of Novel Triazine Derivatives by Activating Wnt/ β Catenin Signaling Pathway in Rodent Models of Alzheimer's Disease. **Molecular Neurobiology**, v. 52, n. 1, p. 638-52, 2015.

SKOOG, D. A.; WEST, Donald M.; HOLLER, F. James. Fundamentos da química analítica. 8ª ed, **Editora Thomson**. 2006.

SMALL, G.; RABINS, P.; BARRY, P.; BUCKHOLTZ, N.; DEKOSKY, S.; FERRIS, S.; FINKEL, S.; GWYTHYER, L.; KHACHATURIAN, Z.; LEBOWITZ, B.; MCRAE, Thomas; MORRIS, J.; OAKLEY, F.; SCHNEIDER, L.; STREIM, J.; SUNDERLAND, T.; TERI, L.; TUNE, L.. Diagnosis and treatment of Alzheimer disease and related disorders: consensus statement of the American Association for Geriatric Psychiatry, the Alzheimer's Association, and the American Geriatrics Society. **Jama**, v. 278, n. 16, p. 1363-1371, 1997.

SOARES, H. D., SPARKS, D. L. Beyond Cholesterol: Statin Benefits in Alzheimer's Disease. In: Lau L. F.; Brodney M. A. (eds) Alzheimer's Disease. Topics in Medicinal Chemistry, v. 2, p. 53–80, Springer, Berlin, Heidelberg, 2008.

SONG, MX.; DENG, XQ. Recent developments on triazole nucleus in anticonvulsant compounds: a review. **Journal of enzyme inhibition and medicinal chemistry**, v. 33, n. 1, p. 453-478, 2018.

STEWART, J. JP. Optimization of parameters for semiempirical methods V: modification of NDDO approximations and application to 70 elements. **Journal of Molecular modeling**, v. 13, n. 12, p. 1173-1213, 2007.

SU, B.; WANG, X.; NUNOMURA, A.; MOREIRA, P.; LEE, G.; PERRY, G.; SMITH, A.; ZHU, X.. Oxidative stress signaling in Alzheimer's disease. **Current Alzheimer Research**, v. 5, n. 6, p. 525-532, 2008.

SUGIMOTO, H.; OGURA, H.; ARAI, Y.; IIMURA, Y.; YAMANASHI, Y. Research and development of donepezil hydrochloride, a new type of acetylcholinesterase inhibitor. **The Japanese journal of pharmacology**, v. 89, n. 1, p. 7-20, 2002.

SULTANA, R.; BUTTERFIELD, D. A. Redox proteomics studies of in vivo amyloid beta-peptide animal models of Alzheimer's disease: Insight into the role of oxidative stress. **PROTEOMICS–Clinical Applications**, v. 2, n. 5, p. 685-696, 2008.

TAEPAVARAPRUK, P.; SONG, C. Reductions of acetylcholine release and nerve growth factor expression are correlated with memory impairment induced by interleukin-1 β administrations: effects of omega-3 fatty acid EPA treatment. **Journal of neurochemistry**, v. 112, n. 4, p. 1054-1064, 2010.

TAYLOR, P.; RADIC, Z. The cholinesterases: from genes to proteins. **Annual review of pharmacology and toxicology**, v. 34, n. 1, p. 281-320, 1994.

TEIXEIRA J.; SILVA, T.; ANDRADE, P. B.; BORGES, F. Alzheimer's disease and antioxidant therapy: how long how far? **Current Medicinal Chemistry**, v. 20, n. 24, p. 2939–2952, 2013.

TIMMERS, M.; STREFFER, J.; TOMINAGA, Y.; SHIMIZU, H.; SHIRAISHI, A.; TATIKOLA, K.; SMEKENS, P.; BORJESSON-HANSON, A.; ANDREASEN, N.; BAQUERO, M. Pharmacodynamics of atabecestat (JNJ-54861911), an oral BACE1 inhibitor in patients with early Alzheimer's disease: randomized, double-blind, placebo-controlled study. **Alzheimer's research & therapy**, v. 10, n. 1, p. 85, 2018.

TOMLJENOVIC, L.. Aluminum and Alzheimer's disease: after a century of controversy, is there a plausible link?. **Journal of Alzheimer's Disease**, v. 23, n. 4, p. 567-598, 2011.

TOWN, T.; NIKOLIC, V.; TAN, J. The microglial" activation" continuum: from innate to adaptive responses. **Journal of neuroinflammation**, v. 2, n. 1, p. 24, 2005.

TRIPATHI, P. N.; SRIVASTAVA, P.; SHARMA, P.; TRIPATHI, M. K.; SETH, A.; TRIPATHI, A.; RAI, S. N.; SINGH, S. P.; SHRIVASTAVA, S. K. Biphenyl-3-oxo-1,2,4-triazine linked piperazine derivatives as potential cholinesterase inhibitors with anti-oxidant property to improve the learning and memory. **Bioorganic Chemistry**, v. 85 p. 82–96, 2019.

TUPPO, E. E.; ARIAS, H. R. The role of inflammation in Alzheimer's disease. **The international journal of biochemistry & cell biology**, v. 37, n. 2, p. 289-305, 2005.

VALENZUELA, M.; BRAYNE, C.; SACHDEV, P.; WILCOCK, G. Medical Research Council Cognitive Function and Ageing Study. Cognitive lifestyle and long-term risk of dementia and survival after diagnosis in a multicenter population-based cohort. **Am J Epidemiol**, v. 173, n. 9, p. 1004-12, 2011.

VALKO, M.; LEIBTFRITZ, D.; MONCOL, J.; CRONIN, M. T.; MAZUR, M.; TELSER, J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. **The international journal of biochemistry & cell biology**, v. 39, n. 1, p. 44-84, 2007.

VERHEIJEN, J. C.; RICHARD, D. J.; CURRAN, K.; KAPLAN, J. LEFEVER, M.; NOWAK, P.; LUCAS, J. Discovery of 4-morpholino-6-aryl-1 H-pyrazolo [3, 4-d] pyrimidines as highly potent and selective ATP-competitive inhibitors of the mammalian target of rapamycin (mTOR): optimization of the 6-aryl substituent. **Journal of medicinal chemistry**, v. 52, n. 24, p. 8010-8024, 2009.

VILSMEIER, A.; HAACK A. Über die Einwirkung von Halogenphosphor auf Alkyl-formanilide. Eine neue Methode zur Darstellung sekundärer und tertiärer *p*-Alkylamino-benzaldehyde. **Berichte der Deutschen Chemischen Gesellschaft**, v. 60, p. 119-122, 1927.

VOET, D.; VOET, J. G.; PRATT, C. W. Fundamentals of biochemistry: life at the molecular level. 5^a ed. **John Wiley & Sons** 2013.

WALTON, J. R. Aluminum involvement in the progression of Alzheimer's disease. **Journal of Alzheimer's Disease**, v. 35, n. 1, p. 7-43, 2013.

WHITMER, R.; GUNDERSON, E.; QUESENBERRY, C.; ZHOU, J.; YAFFE, K. Body mass index in midlife and risk of Alzheimer disease and vascular dementia. **Current Alzheimer Research**, v. 4, n. 2, p. 103-109, 2007.

WHO. Dementia: Key facts. Disponível em: <https://www.who.int/news-room/factsheets/detail/dementia>. Acesso em: 10 de dezembro de 2019.

WINTERER, G.; GALLINAT, J.; BRINKMEYER, J.; MUSSO, F.; KORNHUBER, J.; THUERAUF, N.; RUJESCU, D.; FAVIS, R.; SUN, Y.; FRANC, M.; TIMMERS, M. Allosteric alpha-7 nicotinic receptor modulation and P50 sensory gating in schizophrenia: a proof-of-mechanism study. **Neuropharmacology**, v. 64, p. 197-204, 2013.

WISCHIK, C. M.; STAFF, R.; WISCHIK, D.; BENTHAM, P.; MURRAY, A.; STOREY, J.; KARIN, K.; HARRINGTON, C. Tau aggregation inhibitor therapy: an exploratory phase 2 study in mild or moderate Alzheimer's disease. **Journal of Alzheimer's Disease**, v. 44, n. 2, p. 705-720, 2015.

WOLFE, M. S. Inhibition and modulation of γ -secretase for Alzheimer's disease. **Neurotherapeutics**, v. 5, n. 3, p. 391-398, 2008.

WOLLMER, M. A. Cholesterol-related genes in Alzheimer's disease. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular and Cell Biology of Lipids**, v. 1801, n. 8, p. 762-773, 2010.

WRACKMEYER, B.; KATRITSKY, A. R.; RAMSDEN, C. A.; SCRIVEN, E. F. V.; Comprehensive heterocyclic chemistry III. **Elsevier: Oxford**, p. 1181-1223, 2008.

YAN, J.; LIU, A.; HE, L.; LI, X.; WEI, H. Design, synthesis, and evaluation of multitarget-directed ligands against Alzheimer's disease based on the fusion of donepezil and curcumin. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 25, n. 12, p. 2946-2955, 2017.

YEN, WP.; KUNG, FC.; WONG, F. F. 1, 3-Dipolar Cycloaddition of Carbodiimides and Nitrilimines: Synthesis and Mechanistic Study of 5-Amino-1, 2, 4-triazoles. **European Journal of Organic Chemistry**, v. 2016, n. 13, p. 2328-2335, 2016.

YIN, P.; MA, W. B.; CHEN, Y.; DENG, Y.; HE, L. Highly efficient cyanoimidation of aldehydes. **Organic letters**, v. 11, n. 23, p. 5482-5485, 2009.;

YOUDIM, M. BH. The path from anti Parkinson drug selegiline and rasagiline to multifunctional neuroprotective anti Alzheimer drugs ladostigil and m30. **Current Alzheimer Research**, v. 3, n. 5, p. 541-550, 2006.

YU, Y.; OSTRESH, J. M.; HOUGHTEN, R. A. Solid-phase synthesis of 3-amino-1, 2, 4-triazoles. **Tetrahedron letters**, v. 44, n. 42, p. 7841-7843, 2003

YUAN, W.; SHANG, Z.; QIANG, X.; TAN, Z.; DENG, Y. Synthesis of pterostilbene and resveratrol carbamate derivatives as potential dual cholinesterase inhibitors and neuroprotective agents. **Research on Chemical Intermediates**, v. 40, n. 2, p. 787-800, 2014.

ZAKUT, H.; LIEMAN-HURWITZ, J.; ZAMIR, R.; SINDELL, L.; GINZBERG, D.; SOREQ, H. Chorionic villus cDNA library displays expression of butyrylcholinesterase: putative genetic disposition for ecological danger. **Prenatal Diagnosis**, v. 11, n.8, p. 597e6071991.

ZARGUIL, A.; BOUKHRIS, S.; ELFRIT, M. L.; SOUIZI, A.; ESSASSI, E. M. Easy access to triazoles, triazolopyrimidines, benzimidazoles and imidazoles from imidates. **Tetrahedron Letters**, v. 49, n. 41, p. 5883-5886, 2008.

ZHA, X.; LAMBA, D.; ZHANG, L.; LOU, Y.; XU, C.; KANG, D.; CHEN, L.. Novel tacrine–benzofuran hybrids as potent multitarget-directed ligands for the treatment of Alzheimer’s disease: design, synthesis, biological evaluation, and X-ray crystallography. **Journal of medicinal chemistry**, v. 59, n. 1, p. 114-131, 2016.

HANG, HY. One-compound-multiple-targets strategy to combat Alzheimer's disease. **FEBS letters**, v. 579, n. 24, p. 5260-5264, 2005.

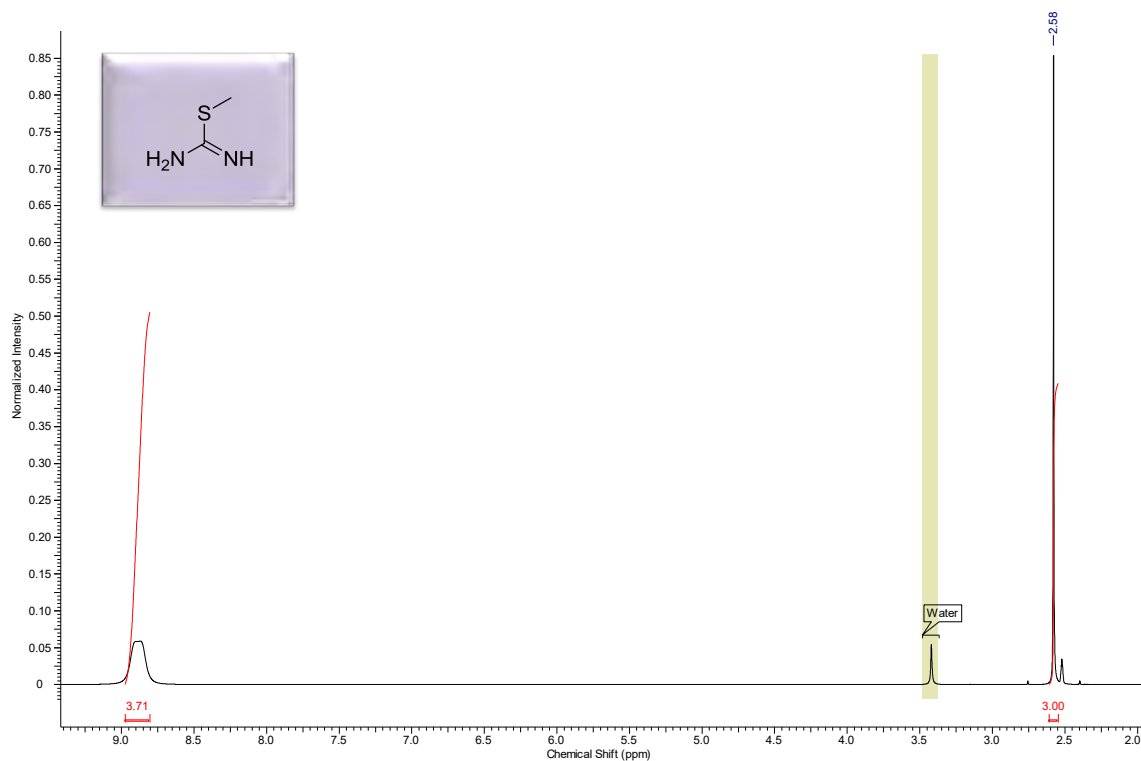
ZHANG, P.; XU, S.; ZHU, Z.; XU, J. Multi-target design strategies for the improved treatment of Alzheimer's disease. **European journal of medicinal chemistry**, v. 176, p. 228-247, 2019. ZHENG, W.; MONNOT, A. D. Regulation of brain iron and copper homeostasis by brain barrier systems: implication in neurodegenerative diseases. **Pharmacology & therapeutics**, v. 133, n. 2, p. 177-188, 2012.

ZHOU, C. H.; WANG, Y. Recent researches in triazole compounds as medicinal drugs. **Current medicinal chemistry**, v. 19, n. 2, p. 239-280, 2012.

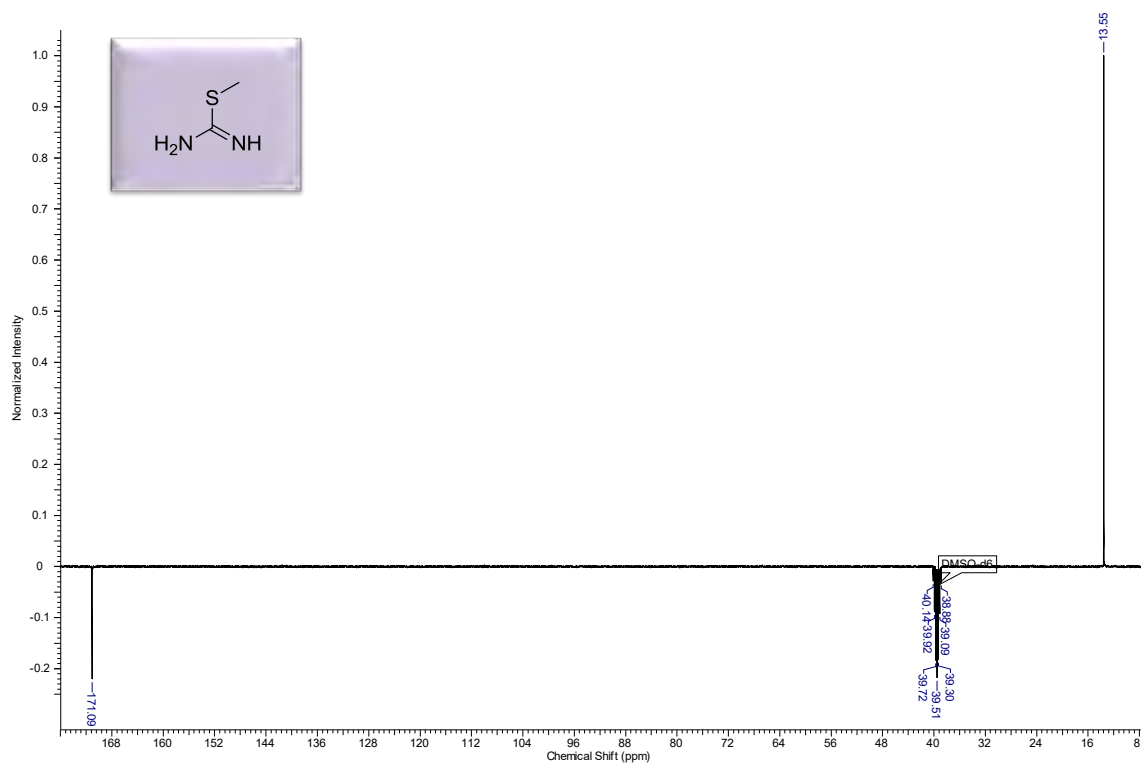
ZHU, X.; SU, B.; WANG, X.; SMITH, M. A.; PERRY, G. Causes of oxidative stress in Alzheimer disease. **Cellular and molecular life sciences**, v. 64, n. 17, p. 2202-2210, 2007.

7. ANEXOS

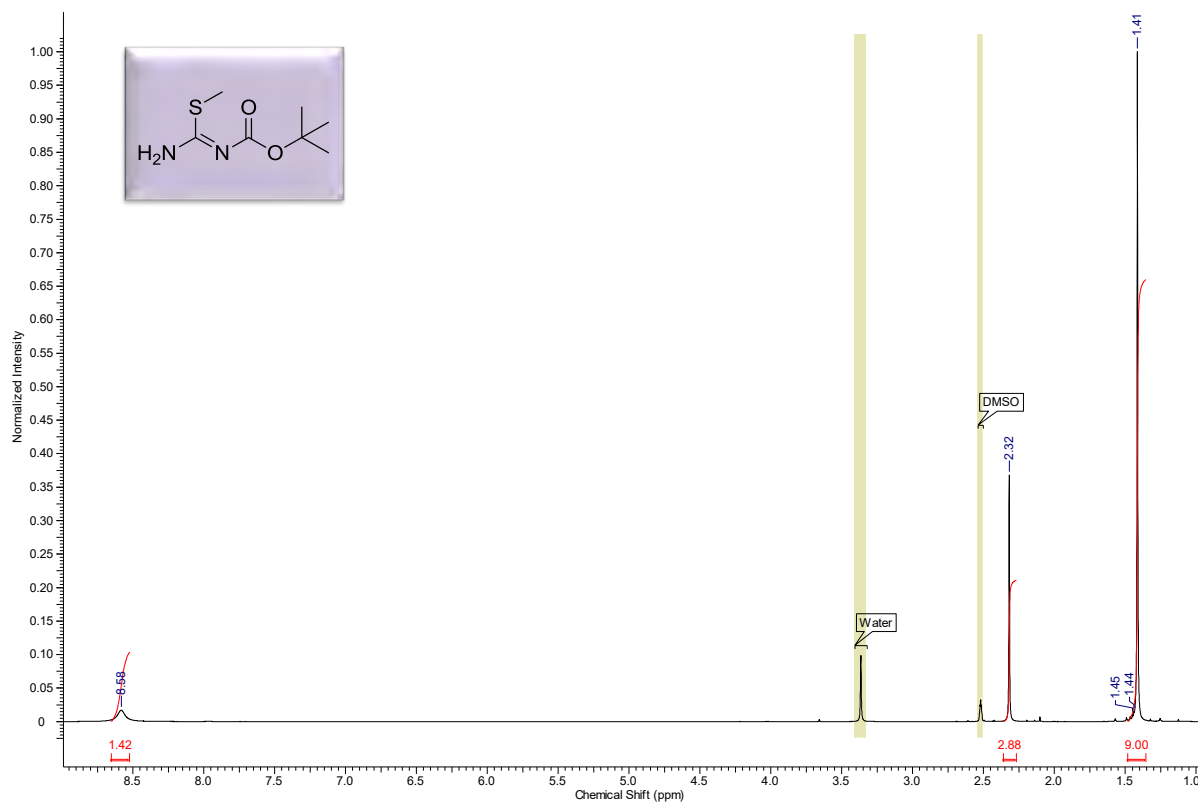
Anexo 1. Espectro de RMN ^1H do composto (**104**) em DMSO à 500MHz.



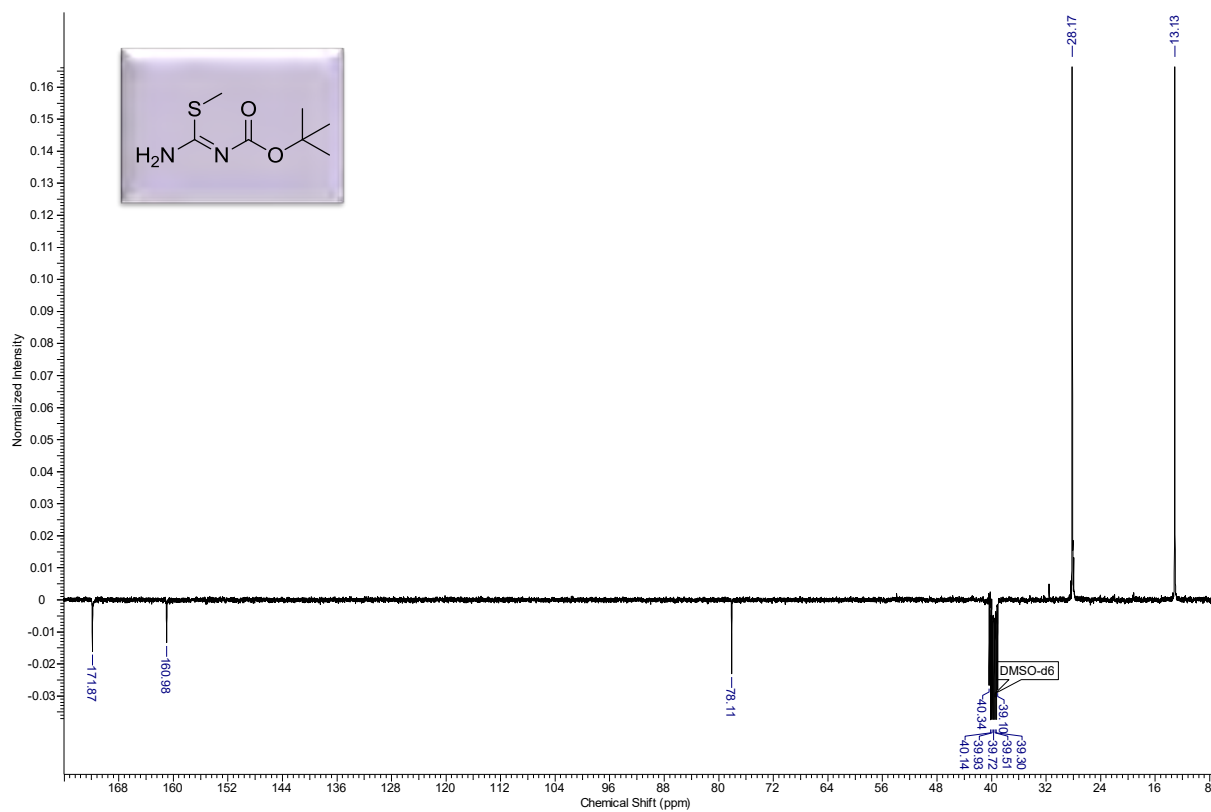
Anexo 2. Espectro de RMN ^{13}C do produto (**104**) em DMSO à 125MHz.



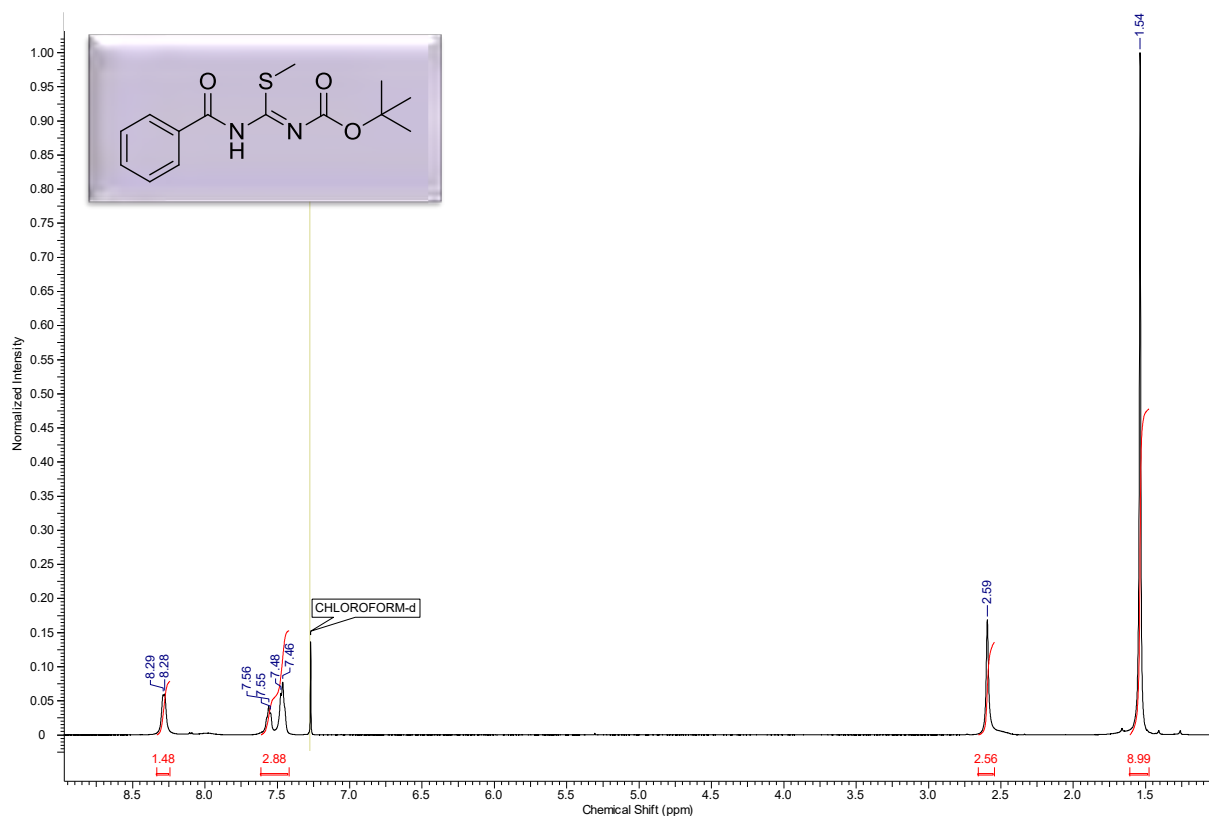
Anexo 3. Espectro de RMN ^1H do composto (100) em DMSO à 500MHz.



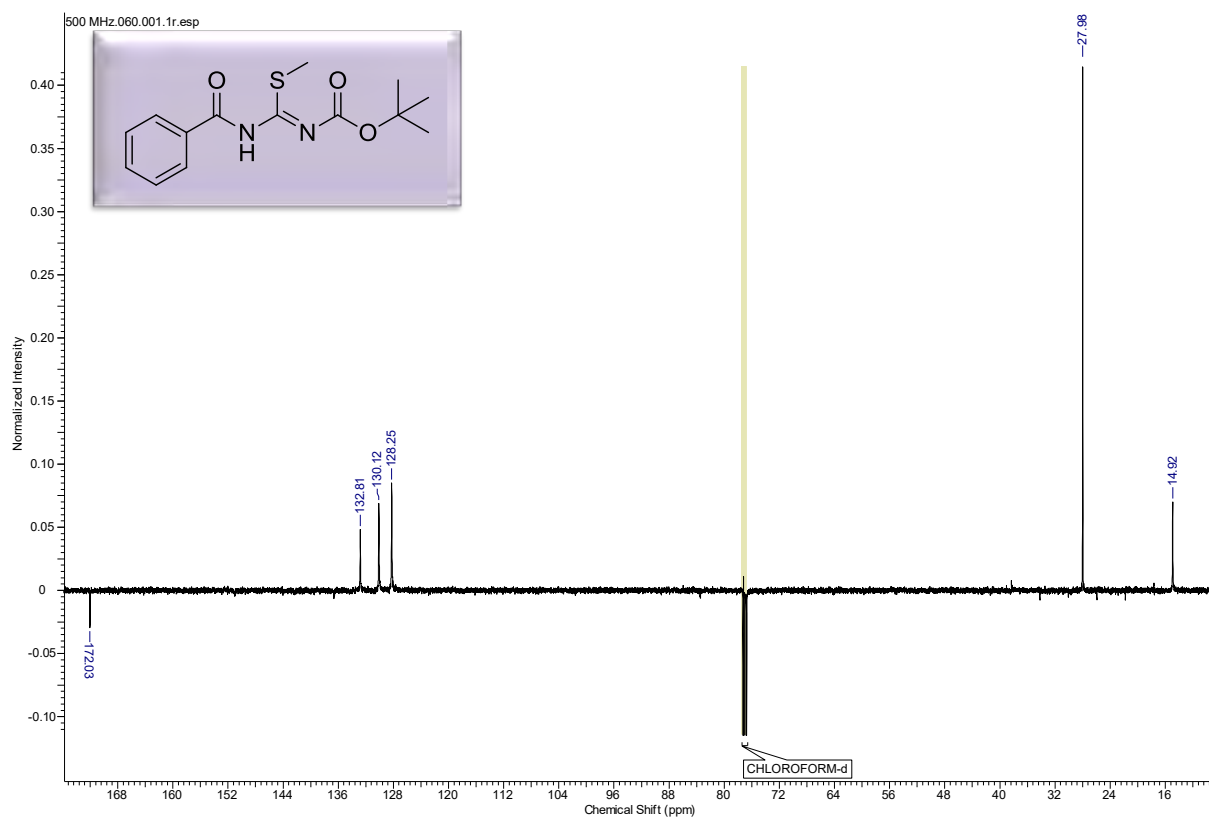
Anexo 4. Espectro de RMN ^{13}C do produto (100) em DMSO à 125MHz.



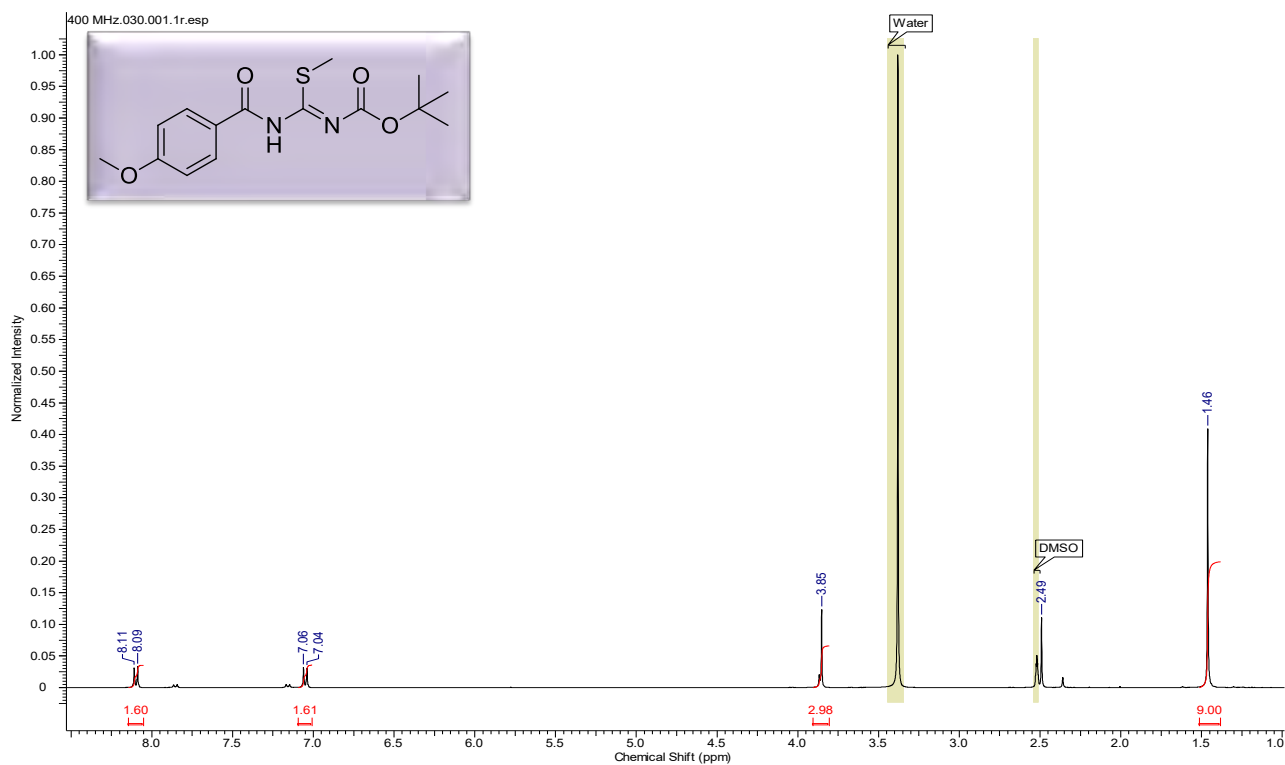
Anexo 5. Espectro de RMN ^1H do composto (**98a**) em CDCl_3 à 500MHz.



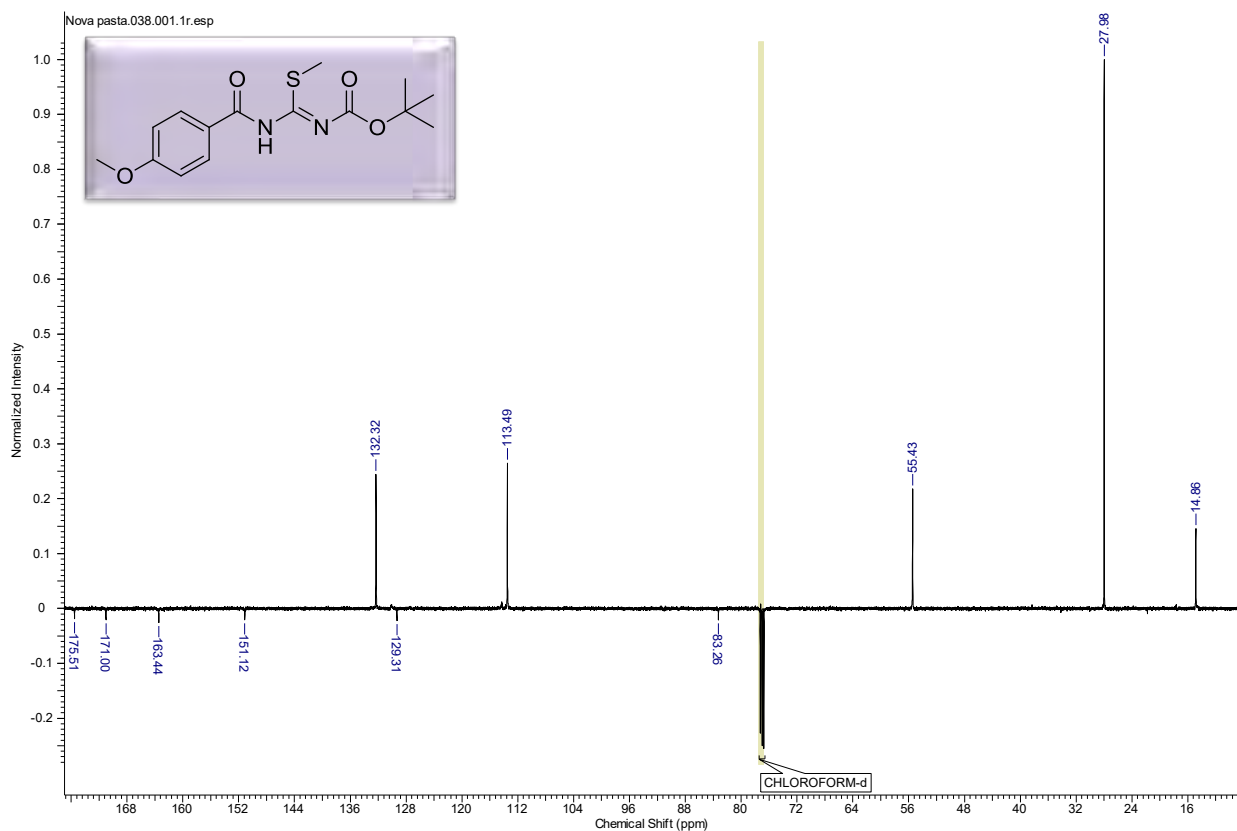
Anexo 6. Espectro de RMN ^{13}C do produto (**98a**) em CDCl_3 à 125MHz.



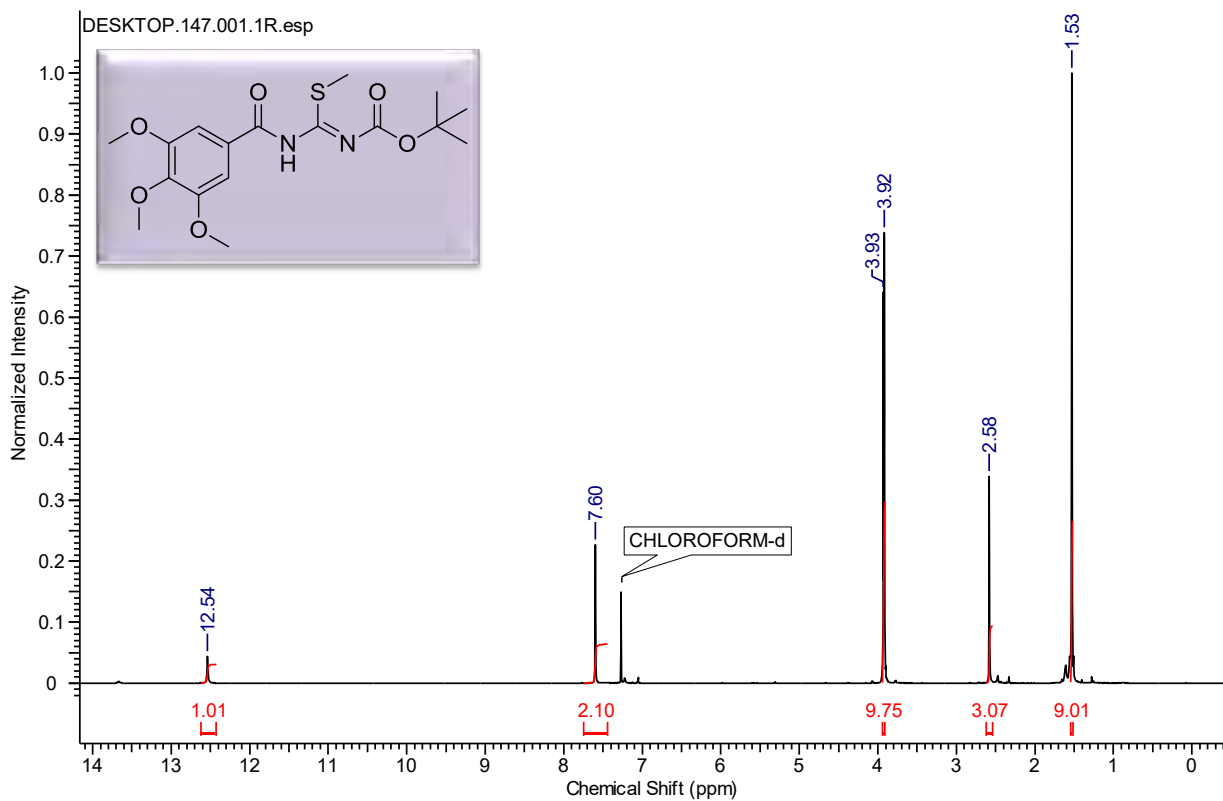
Anexo 7. Espectro de RMN ^1H do composto (**98d**) em CDCl_3 à 400MHz.



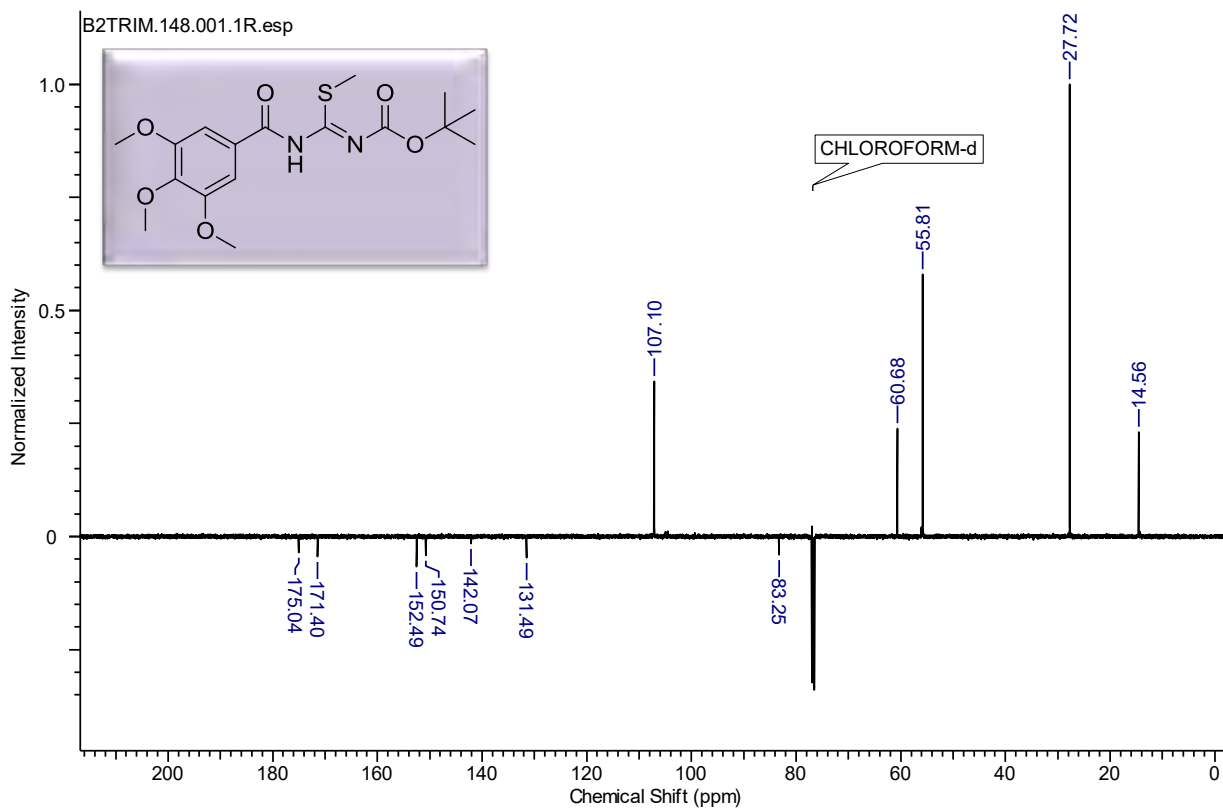
Anexo 8. Espectro de RMN ^{13}C do produto (**98d**) em CDCl_3 à 100MHz.



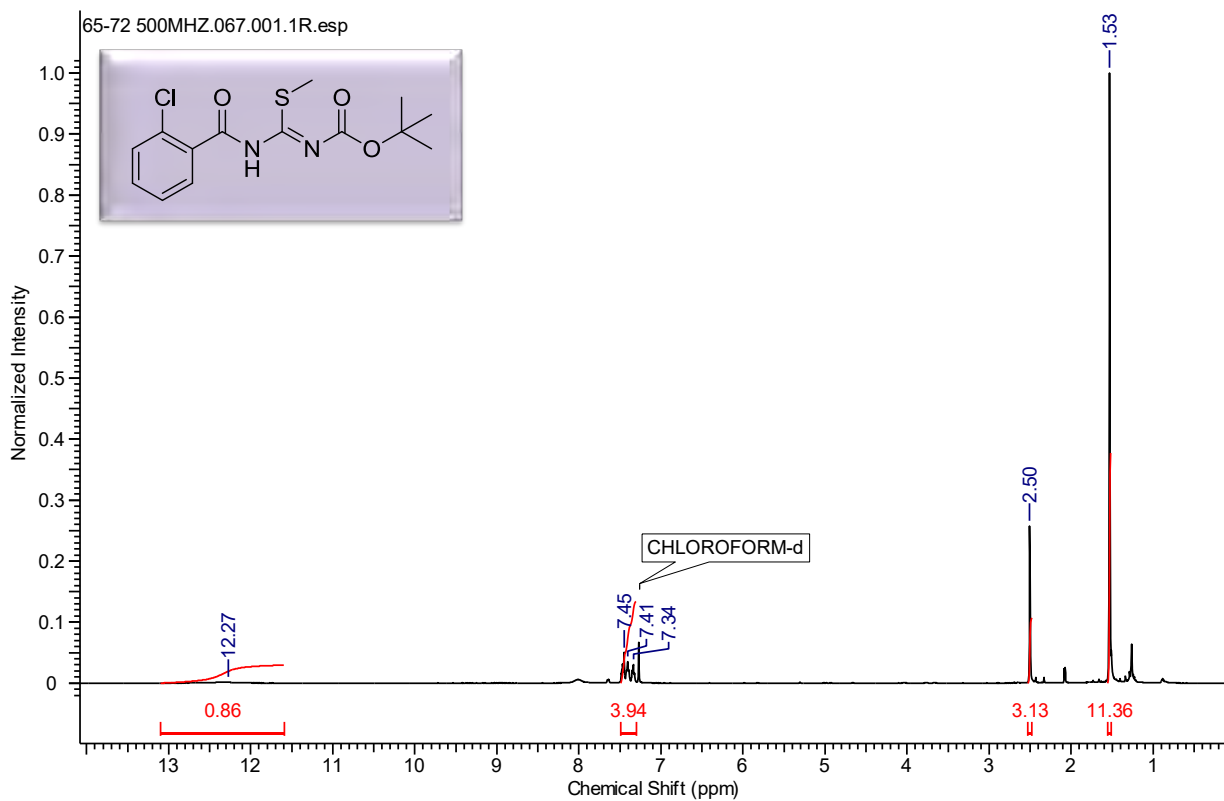
Anexo 9. Espectro de RMN ^1H do composto (98e) em CDCl_3 à 500MHz.



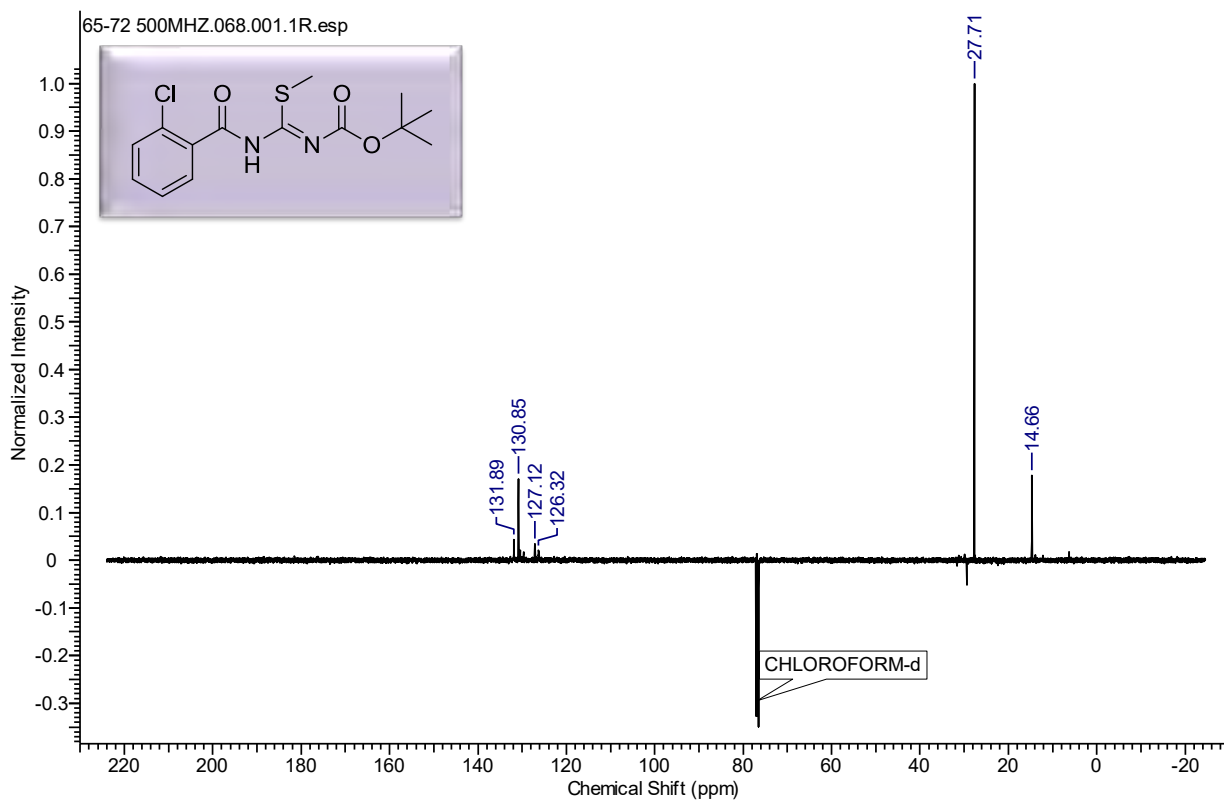
Anexo 10. Espectro de RMN ^{13}C do produto (98e) em CDCl_3 à 125MHz.



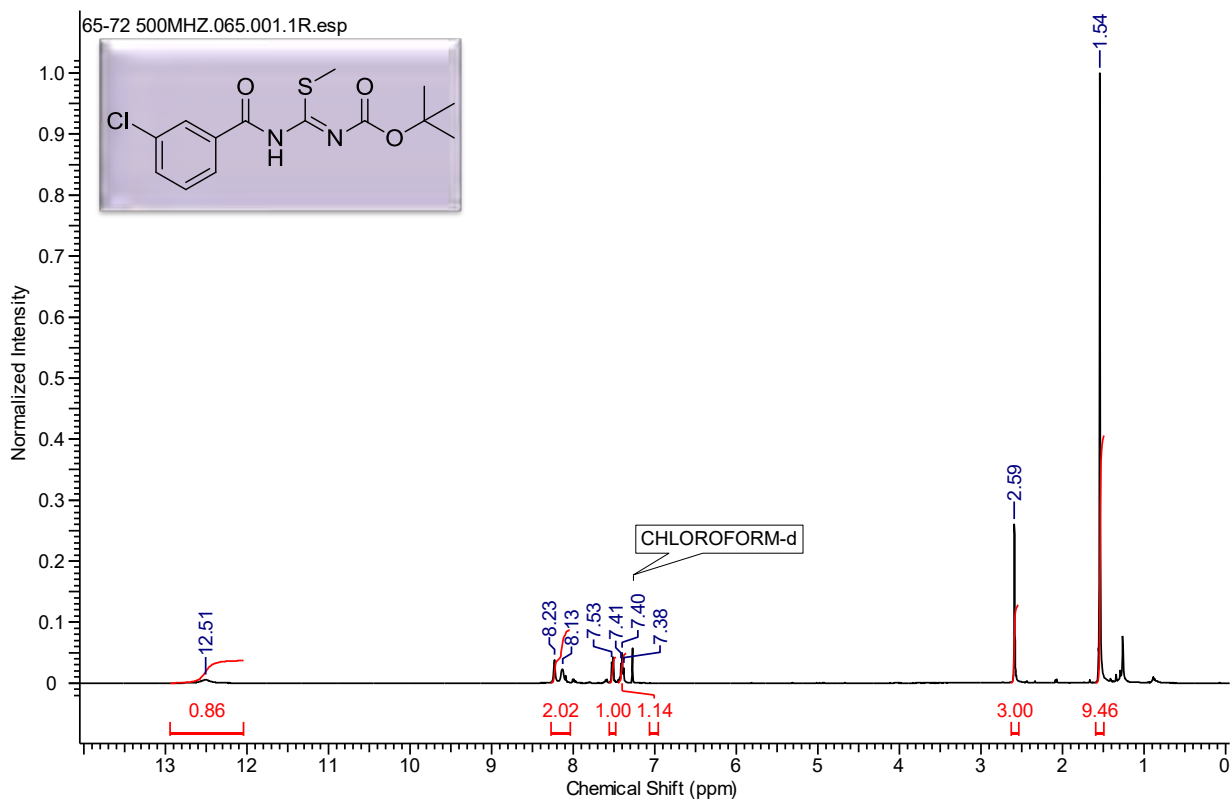
Anexo 11. Espectro de RMN ^1H do composto (**98f**) em CDCl_3 à 500MHz.



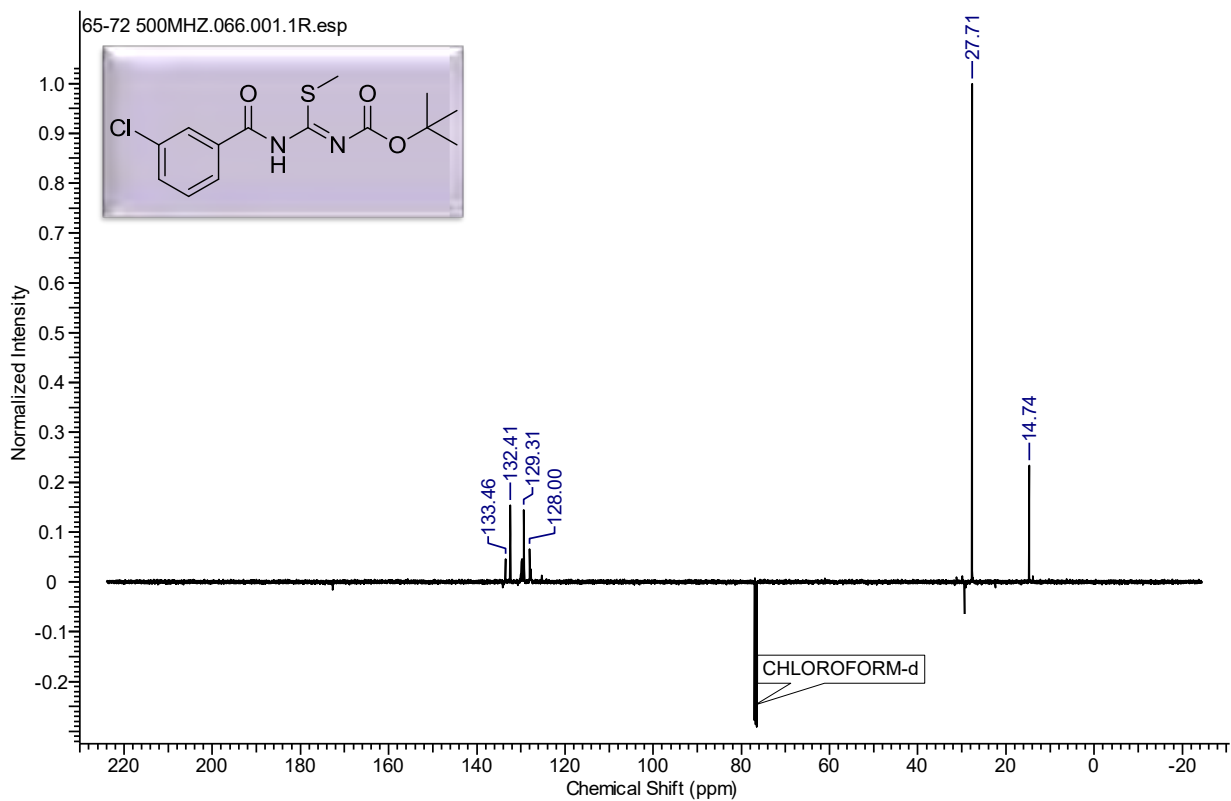
Anexo 12. Espectro de RMN ^{13}C do produto (**98f**) em CDCl_3 à 125MHz.



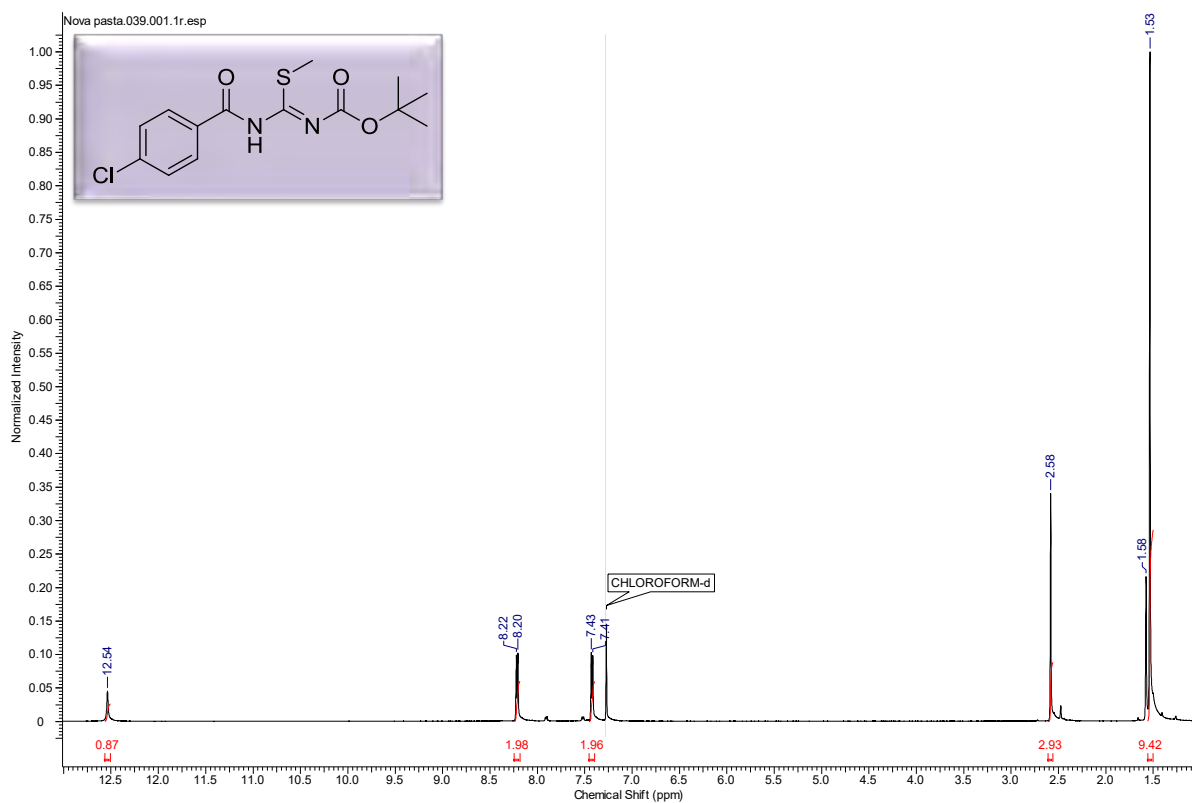
Anexo 13. Espectro de RMN ¹H do composto (98g) em CDCl₃ à 500MHz.



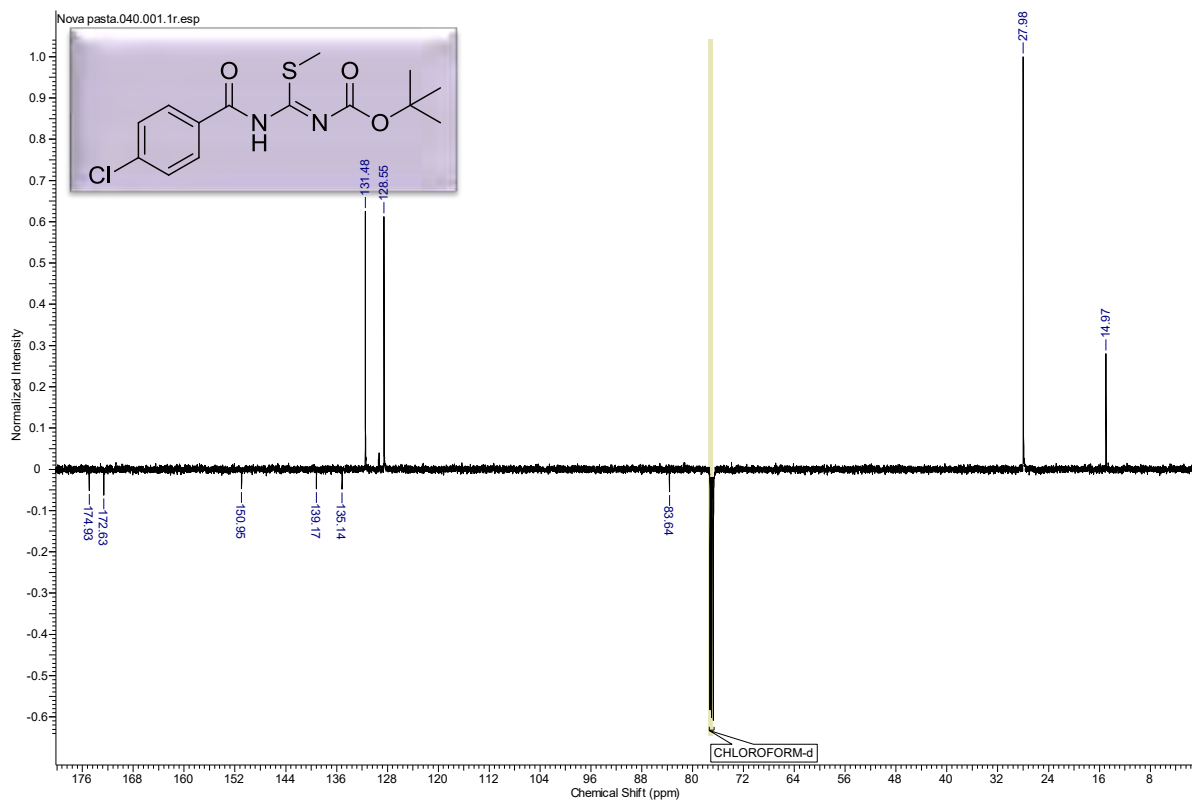
Anexo 14. Espectro de RMN ¹³C do produto (98g) em CDCl₃ à 125MHz.



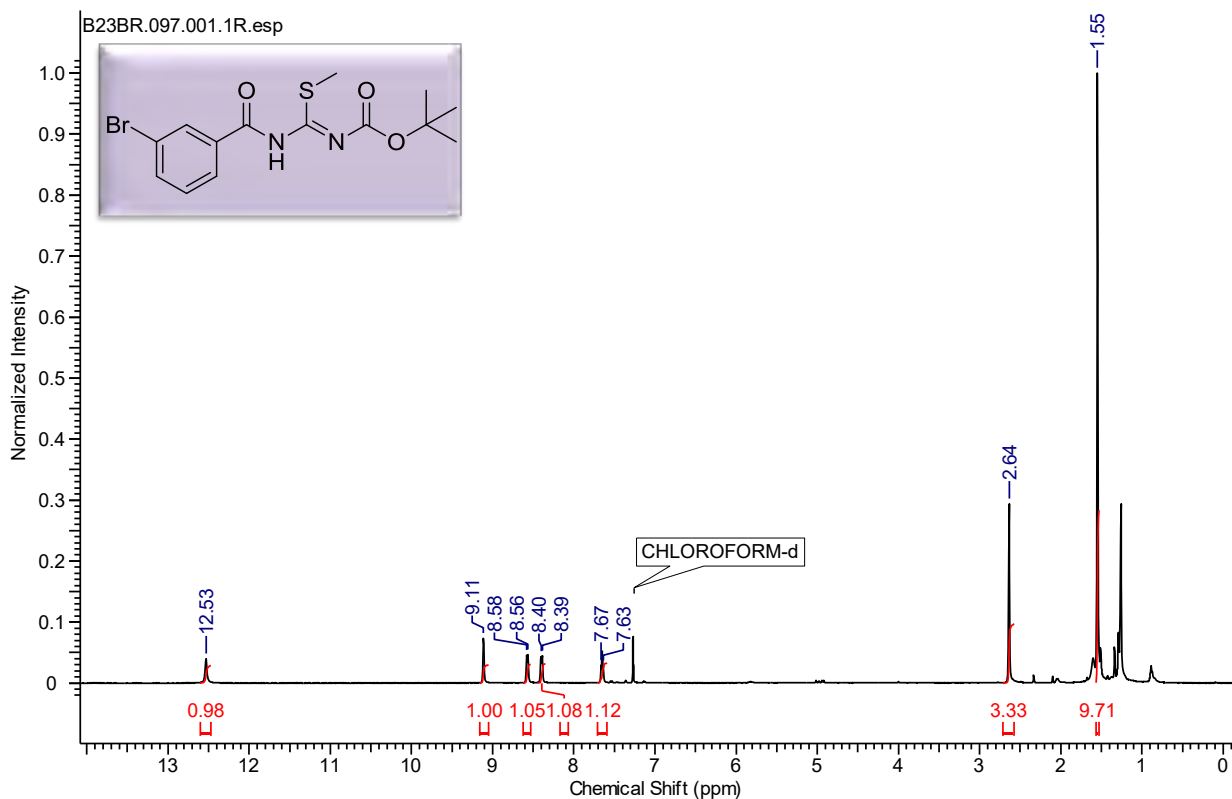
Anexo 15. Espectro de RMN ¹H do composto (98h) em CDCl₃ à 500MHz.



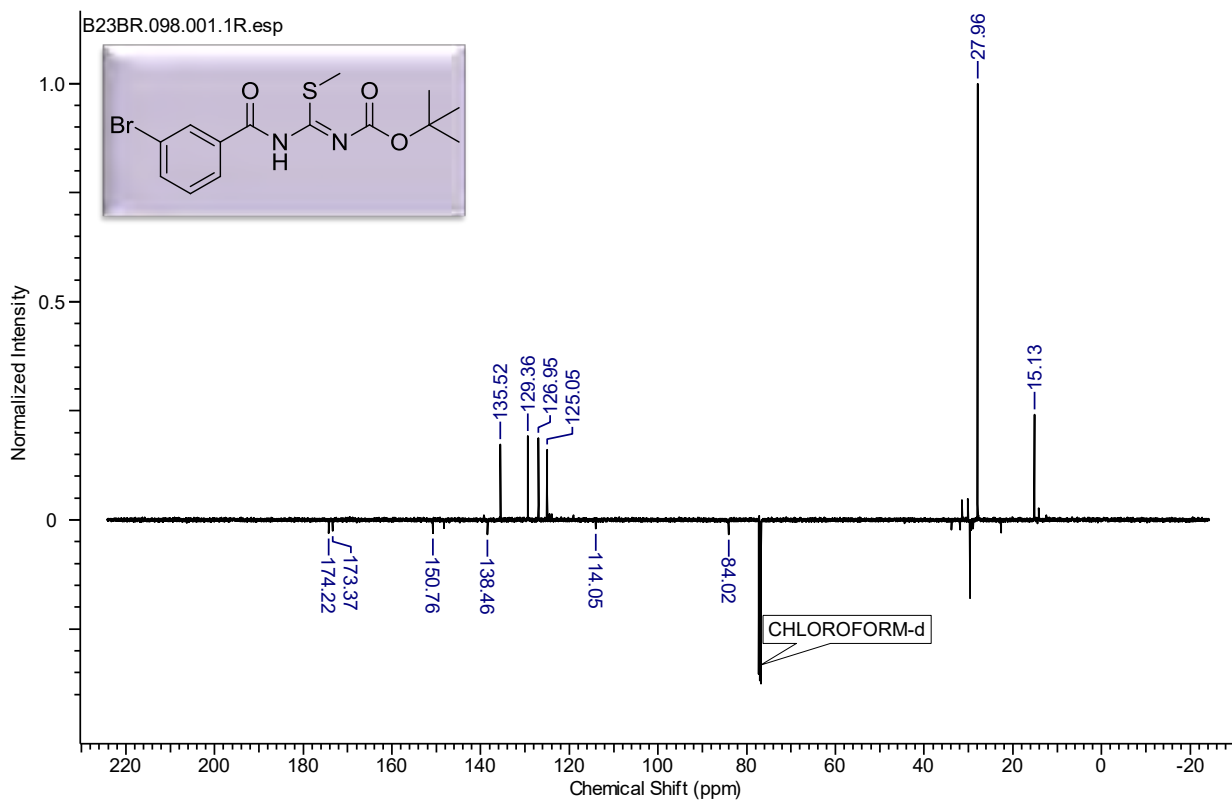
Anexo 16. Espectro de RMN ¹³C do produto (98h) em CDCl₃ à 125MHz.



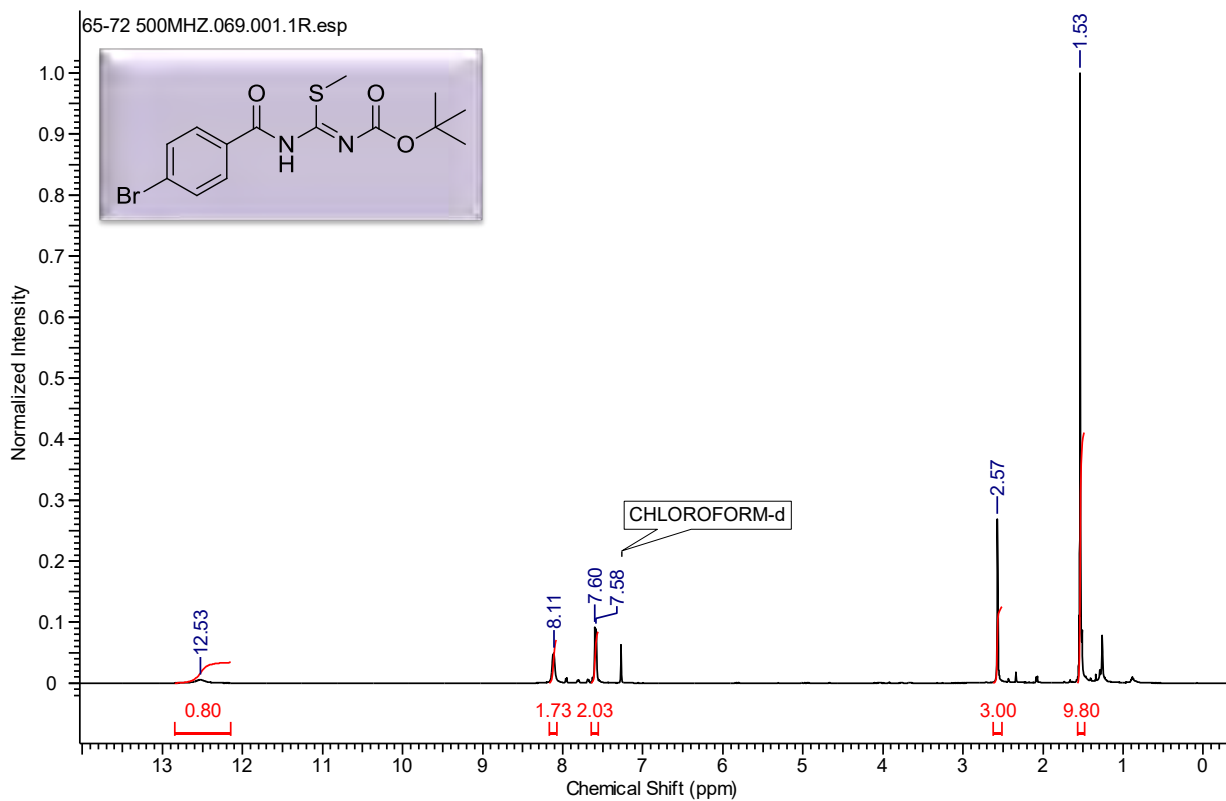
Anexo 17. Espectro de RMN ^1H do composto (**98i**) em CDCl_3 à 500MHz.



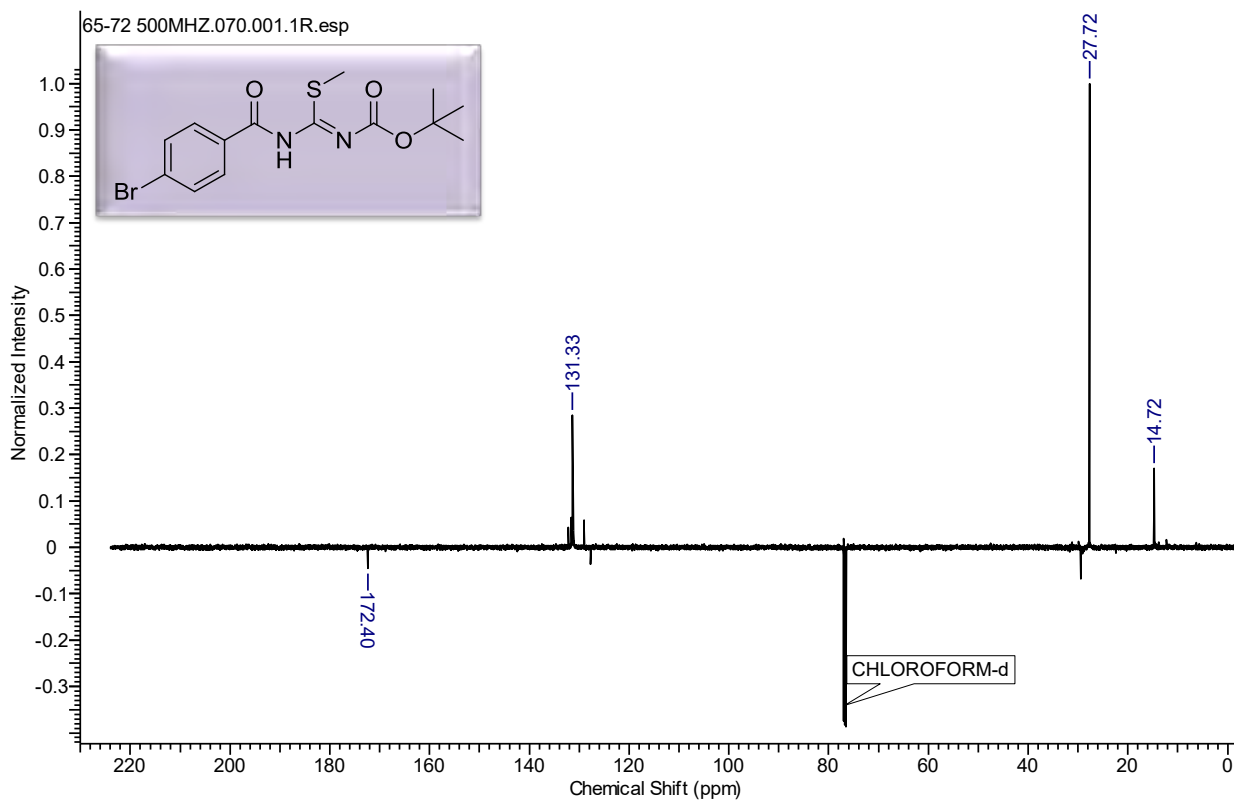
Anexo 18. Espectro de RMN ^{13}C do produto (**98i**) em CDCl_3 à 125MHz.



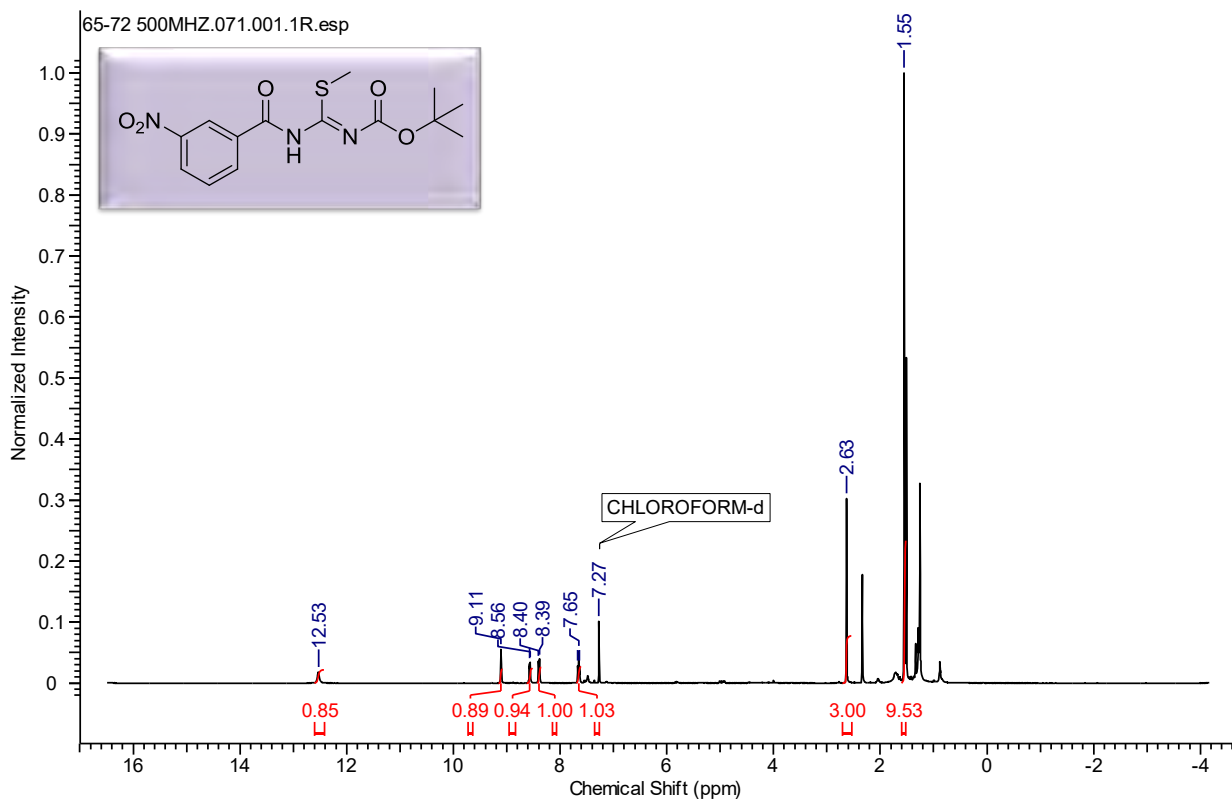
Anexo 19. Espectro de RMN ^1H do composto (98j) em CDCl_3 à 500MHz.



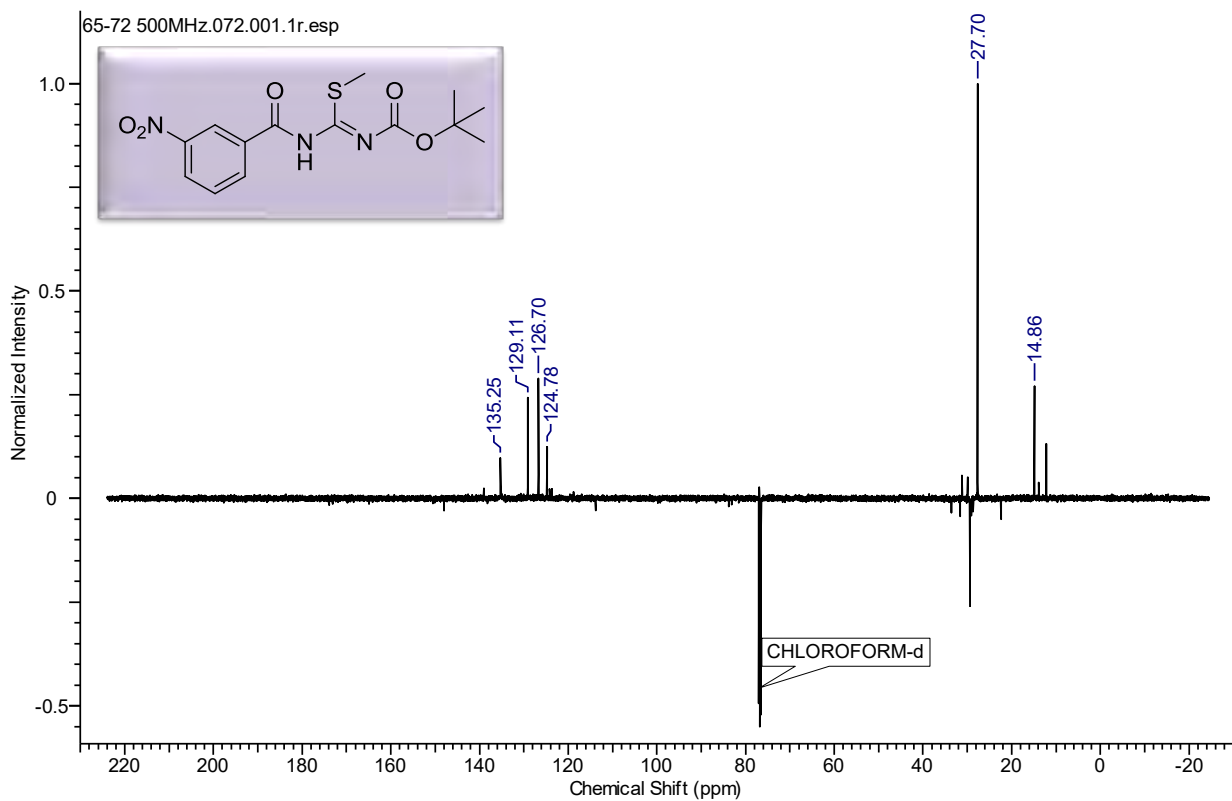
Anexo 20. Espectro de RMN ^{13}C do produto (98j) em CDCl_3 à 125MHz.



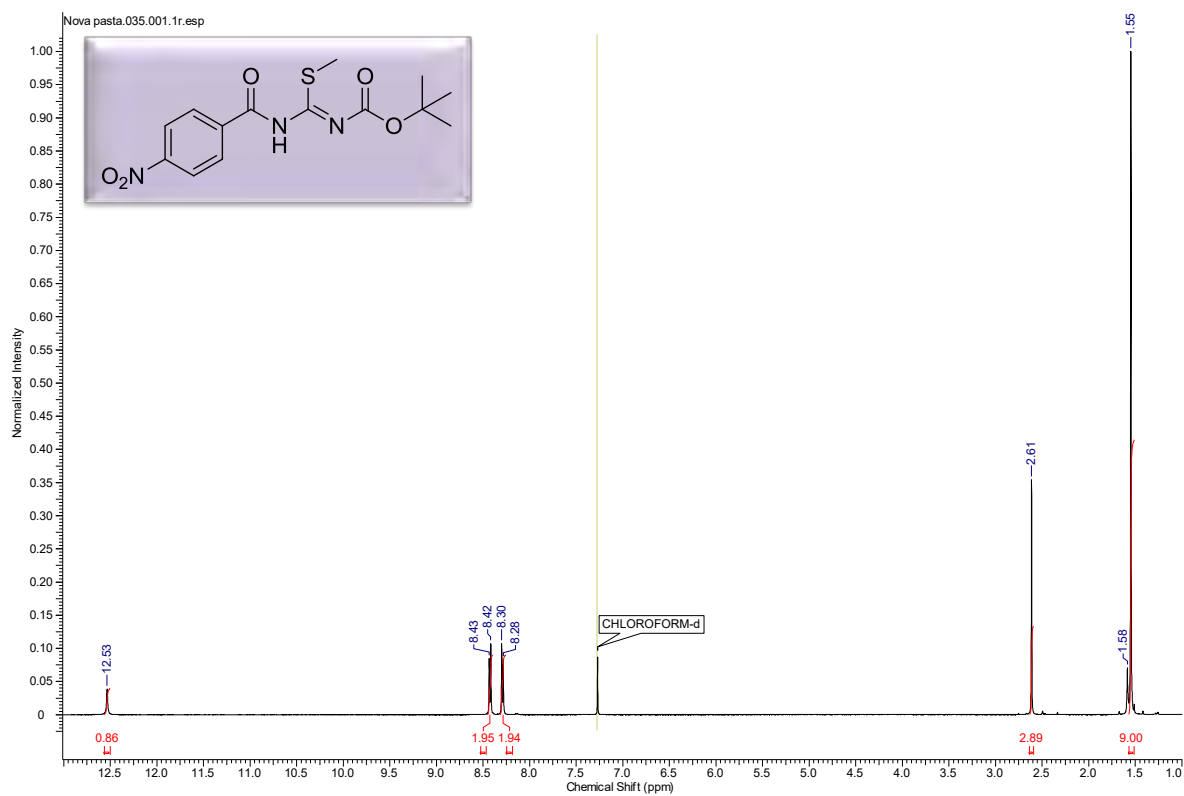
Anexo 21. Espectro de RMN ¹H do composto (98k) em CDCl₃ à 500MHz.



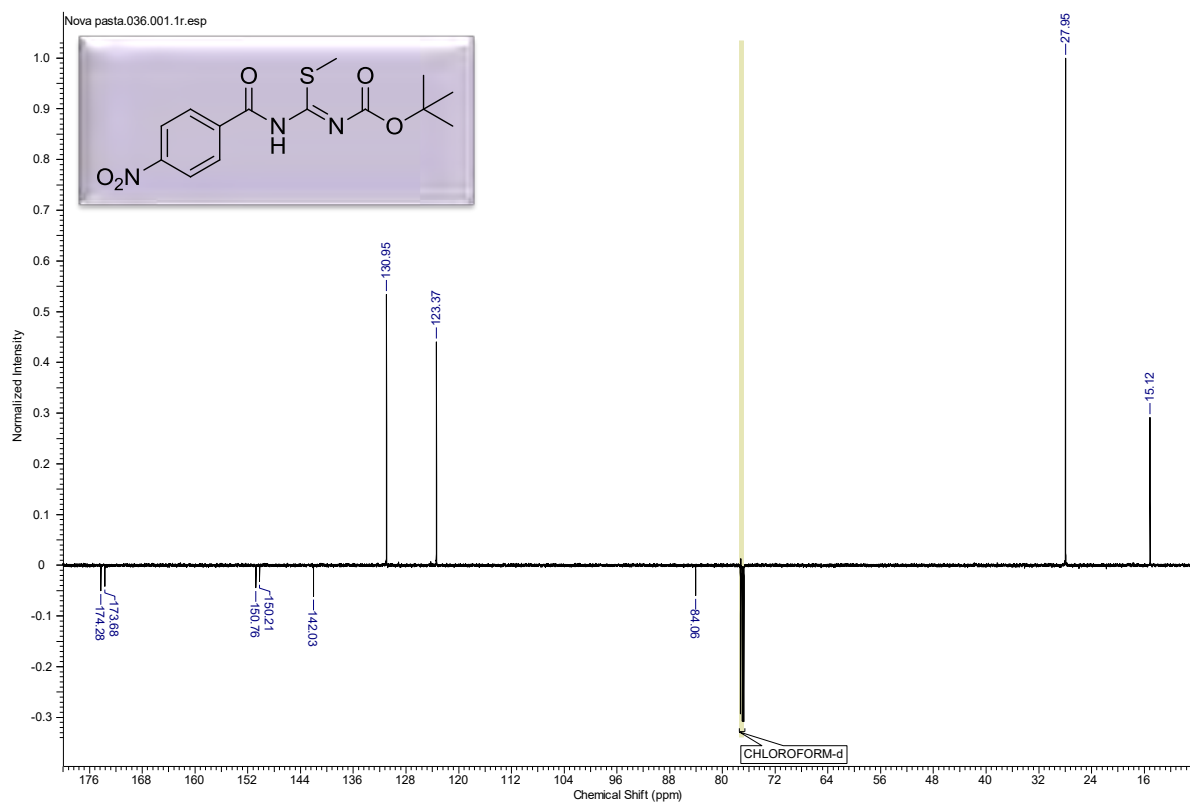
Anexo 22. Espectro de RMN ¹³C do produto (98k) em CDCl₃ à 125MHz.



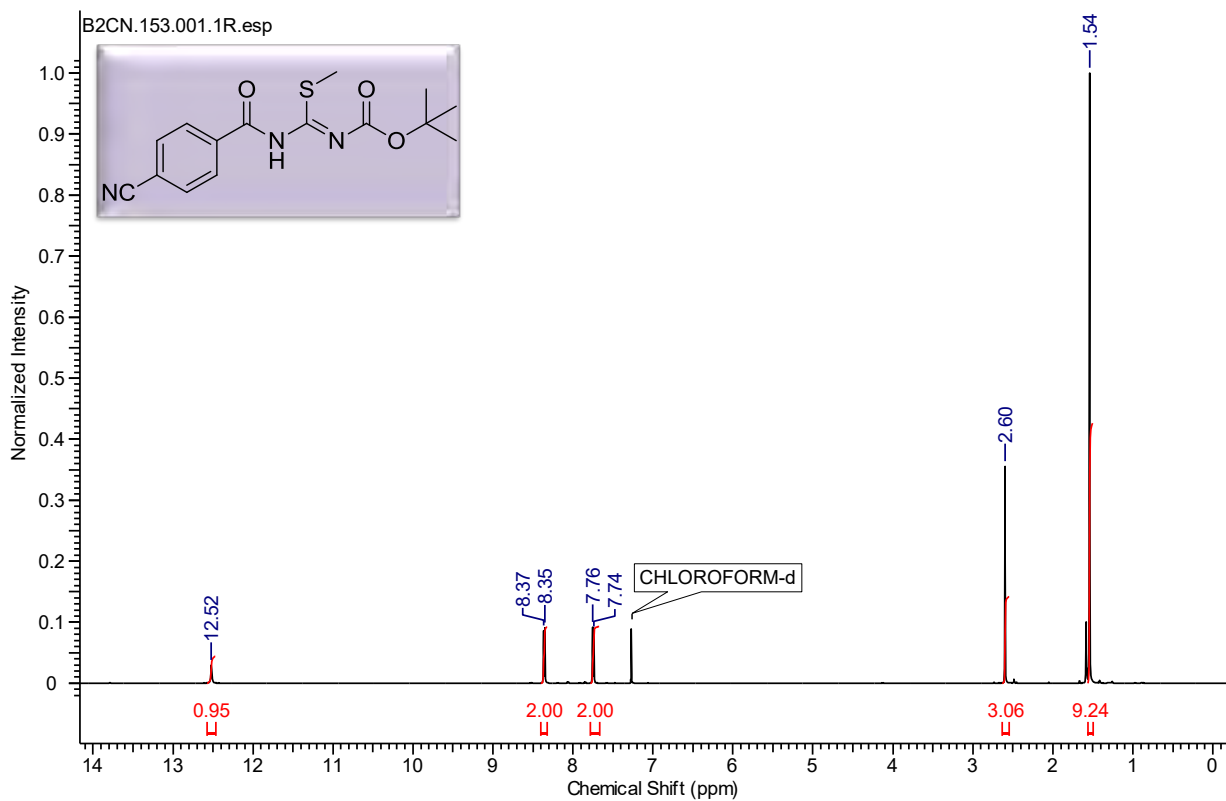
Anexo 23. Espectro de RMN ^1H do composto (98I) em CDCl_3 à 500MHz.



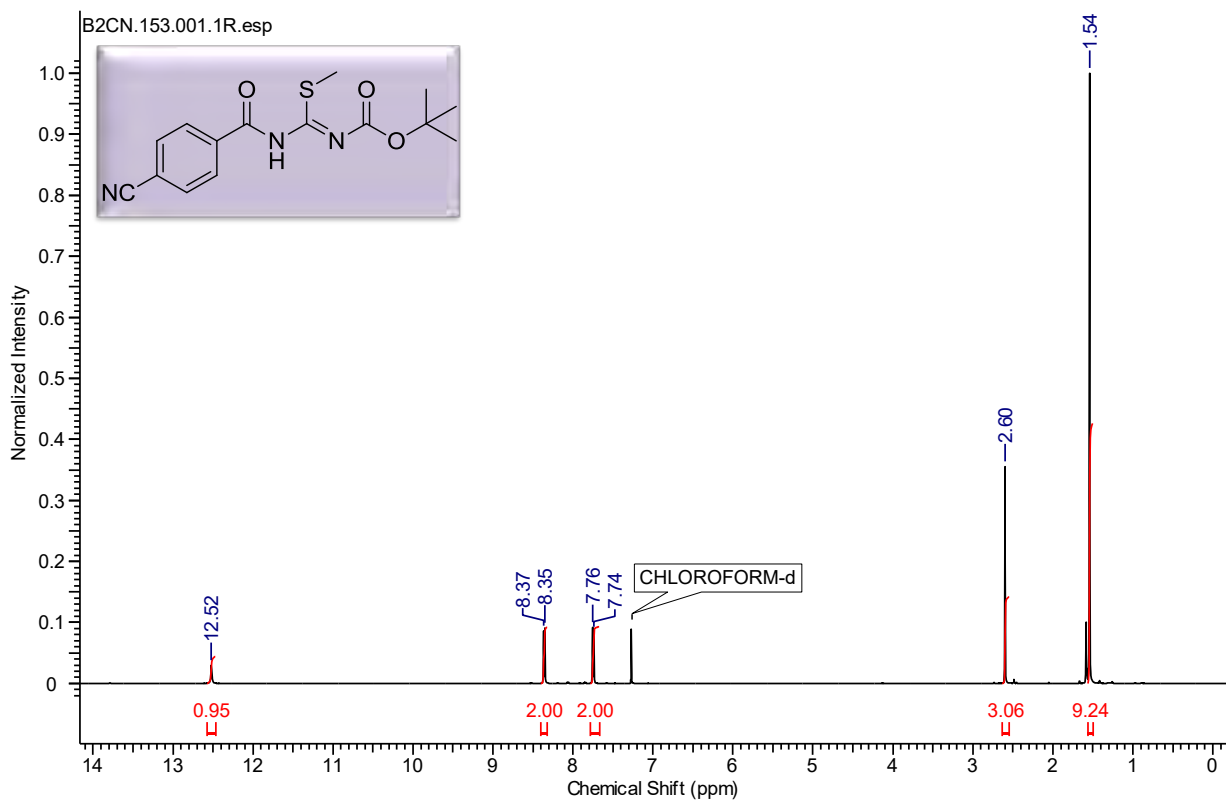
Anexo 24. Espectro de RMN ^{13}C do produto (98I) em CDCl_3 à 125MHz.



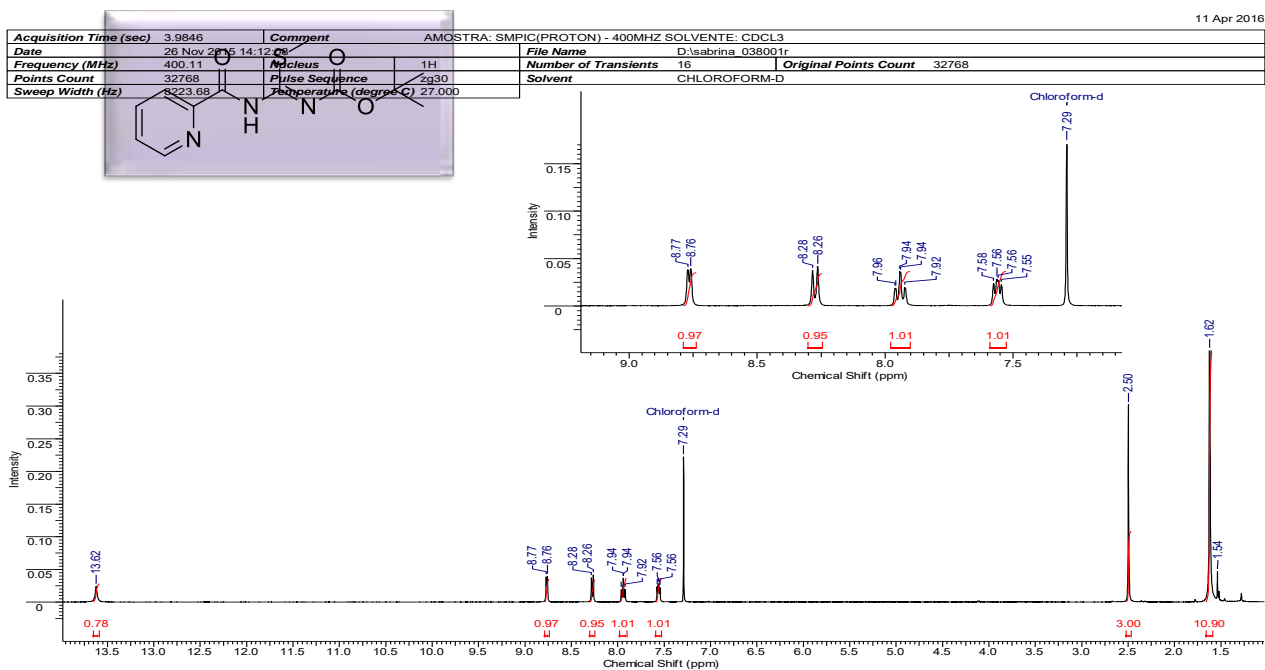
Anexo 25. Espectro de RMN ^1H do composto (**98m**) em CDCl_3 à 500MHz.



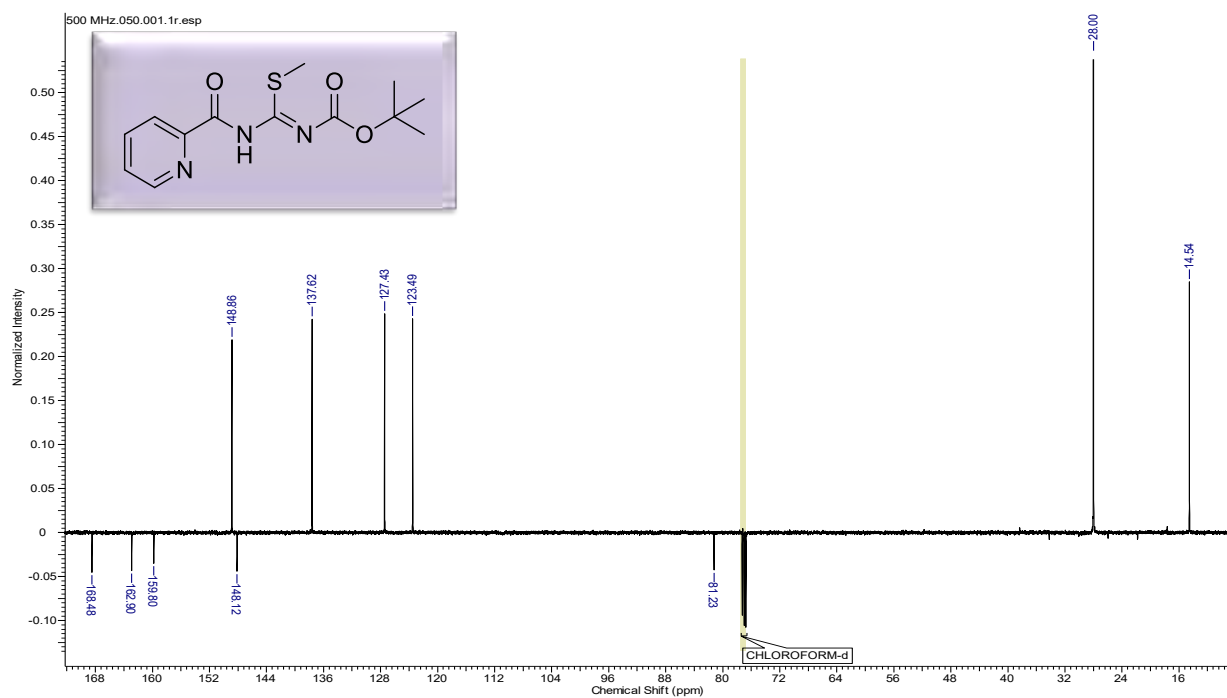
Anexo 26. Espectro de RMN ^{13}C do produto (**98m**) em CDCl_3 à 125MHz.



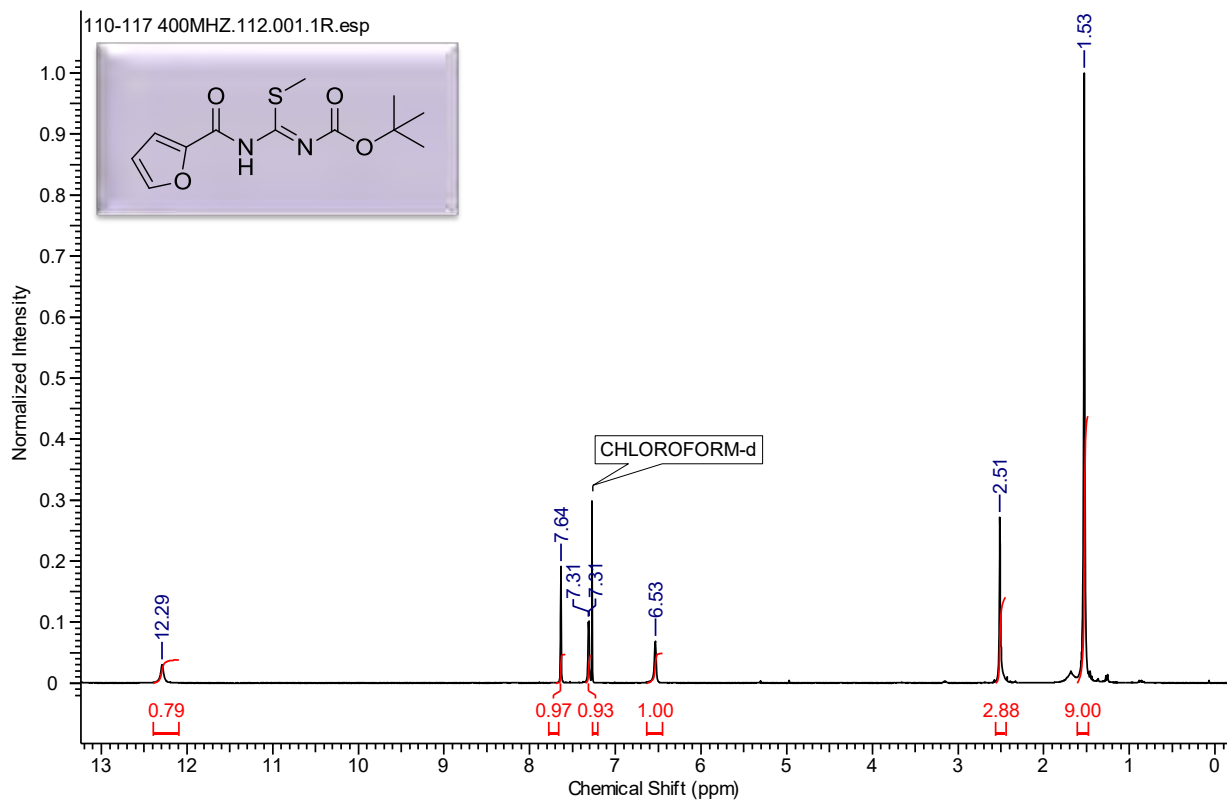
Anexo27. Espectro de RMN ^1H do composto (98n) em CDCl_3 à 500MHz.



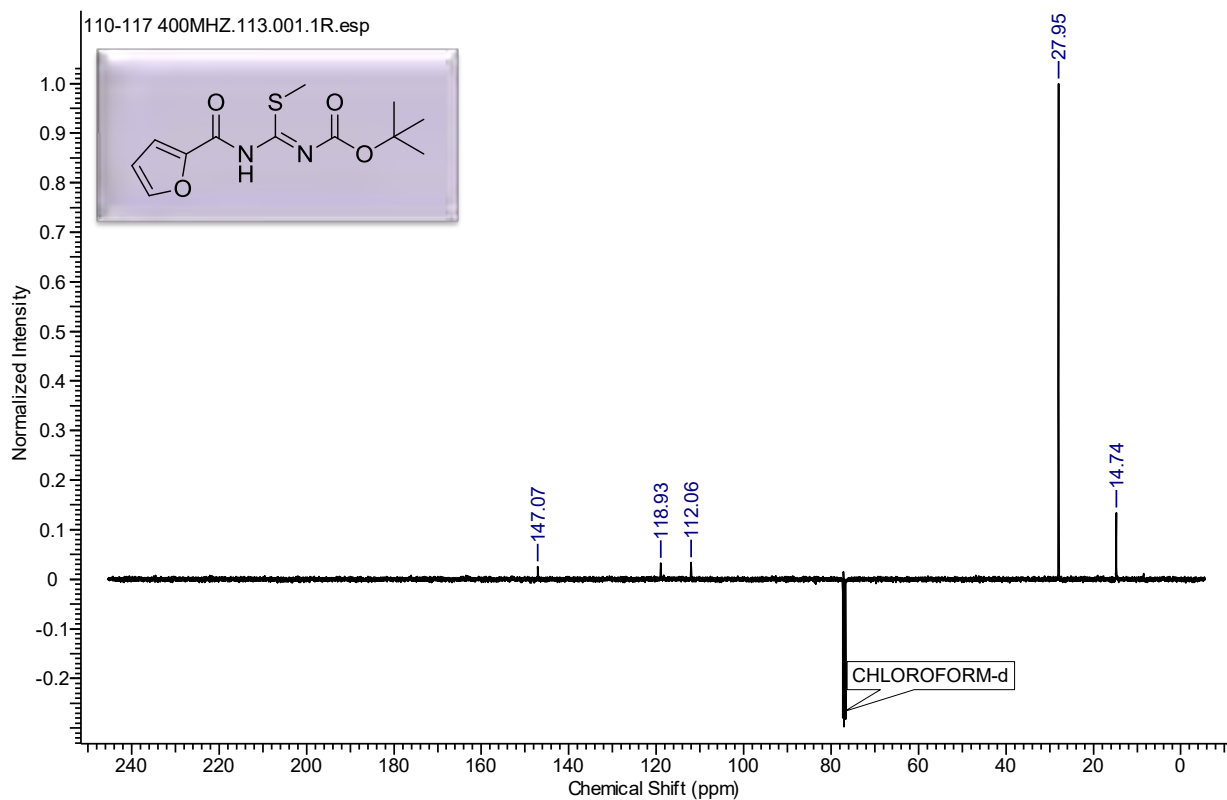
Anexo 28. Espectro de RMN ^{13}C do produto (98n) em CDCl_3 à 125MHz.



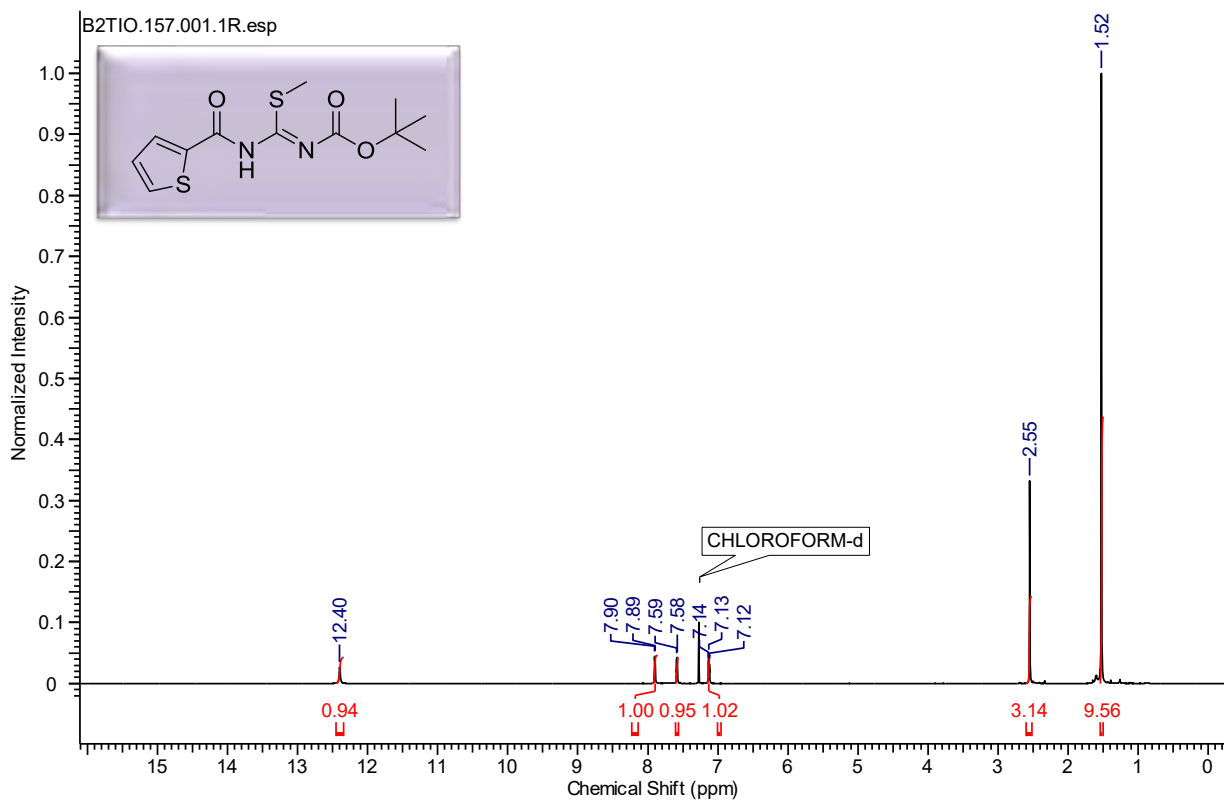
Anexo 29. Espectro de RMN ^1H do composto (**98o**) em CDCl_3 à 400MHz.



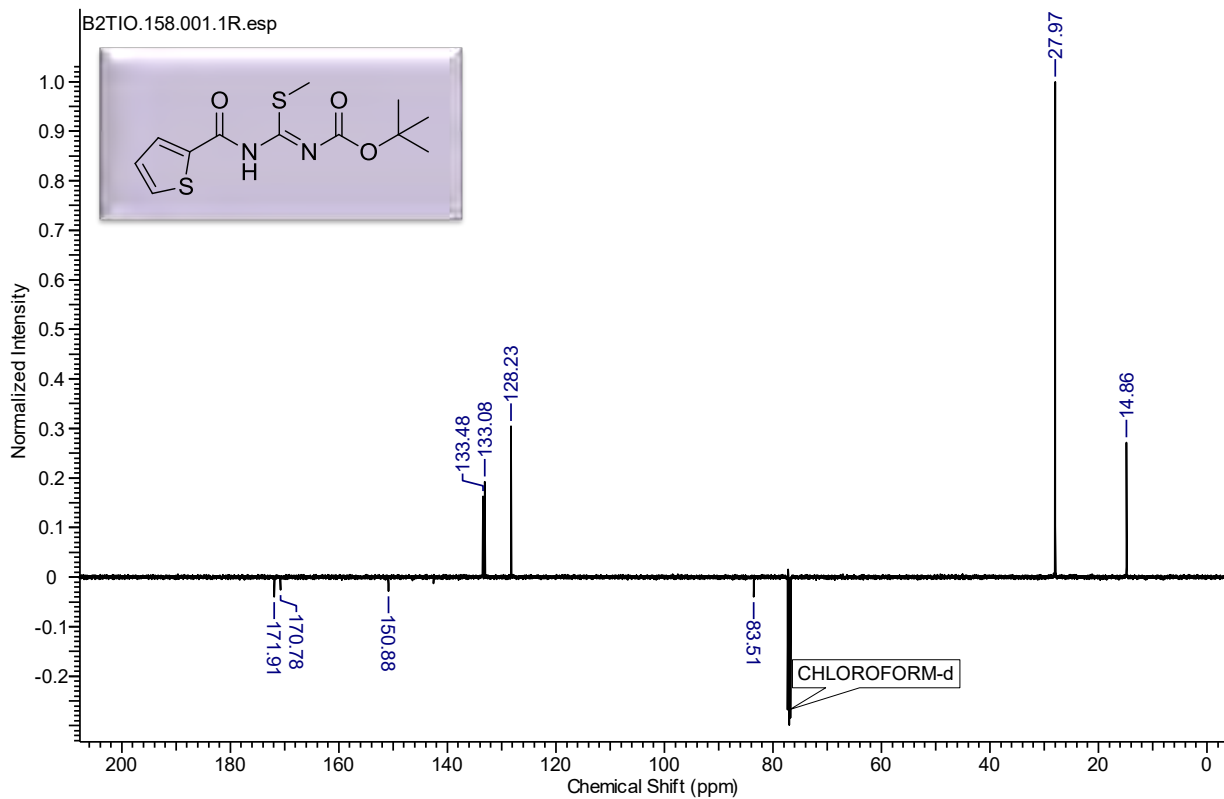
Anexo 30. Espectro de RMN ^{13}C do produto (**98o**) em CDCl_3 à 100MHz.



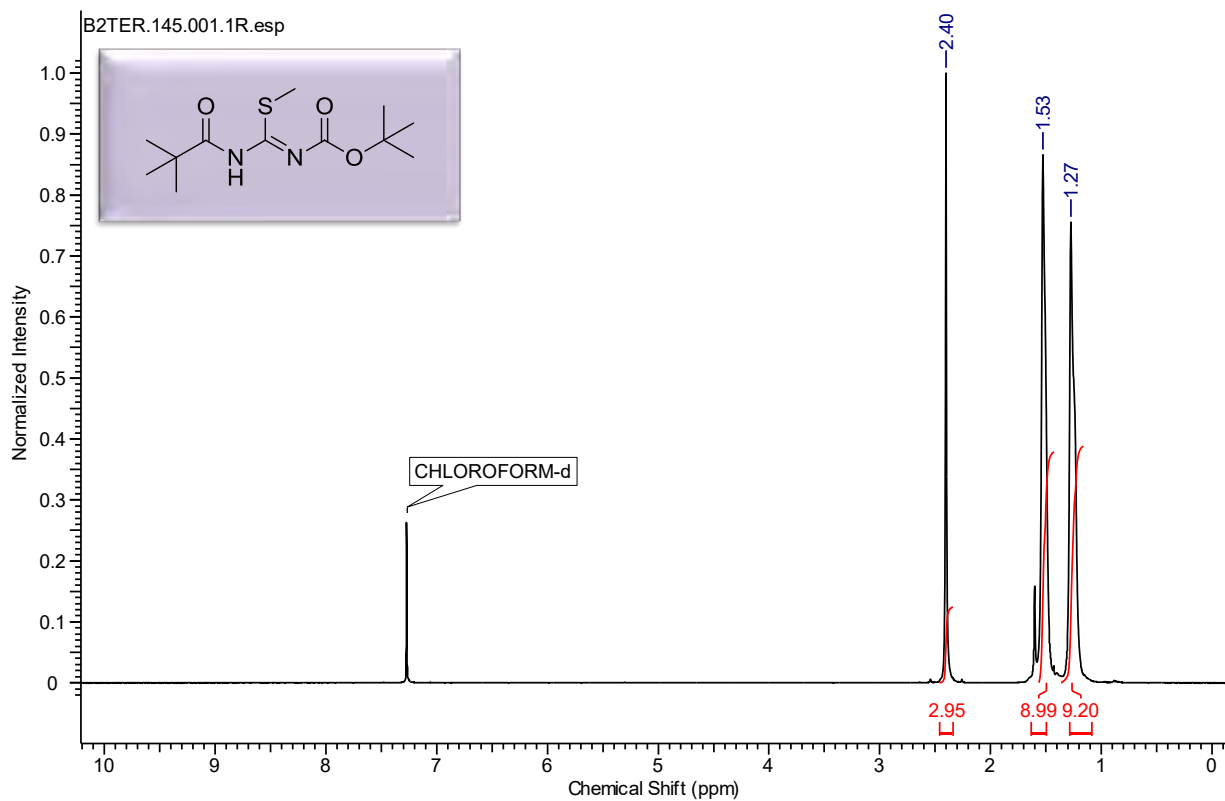
Anexo 31. Espectro de RMN ^1H do composto (**98p**) em CDCl_3 à 500MHz.



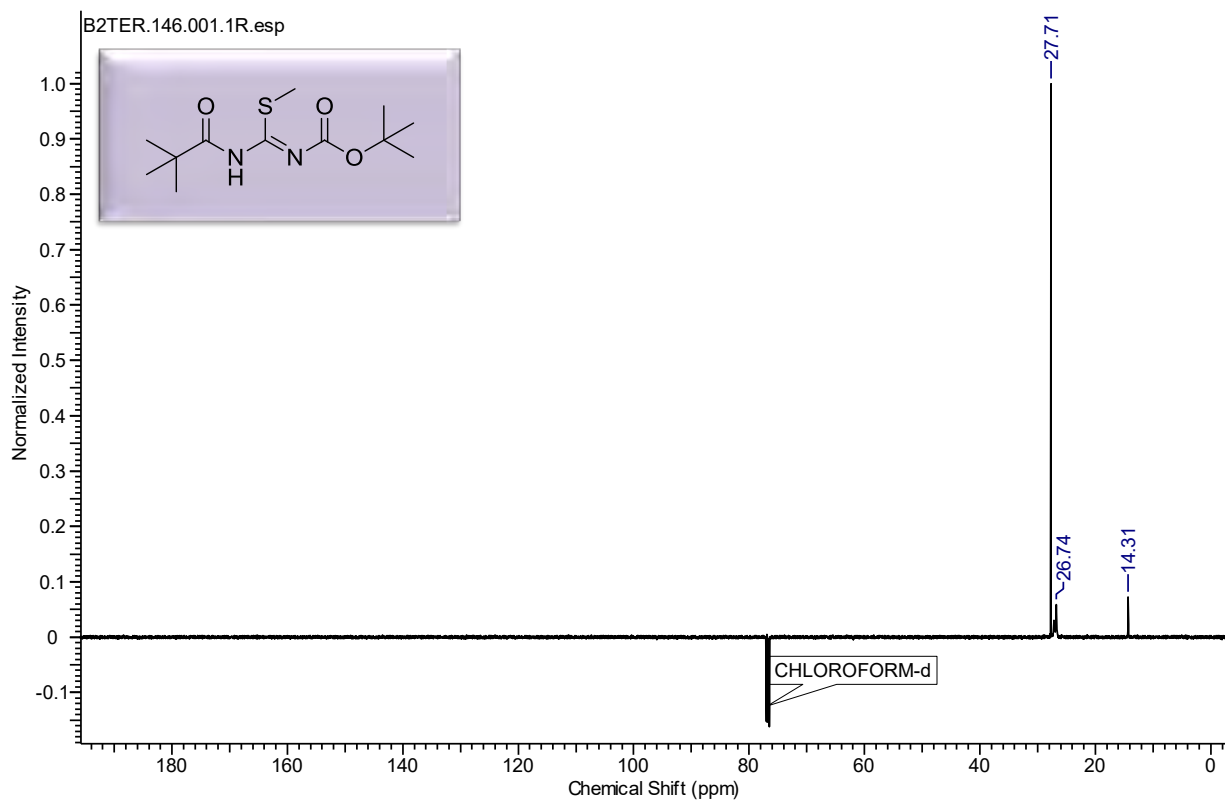
Anexo 32. Espectro de RMN ^{13}C do produto (**98p**) em CDCl_3 à 125MHz



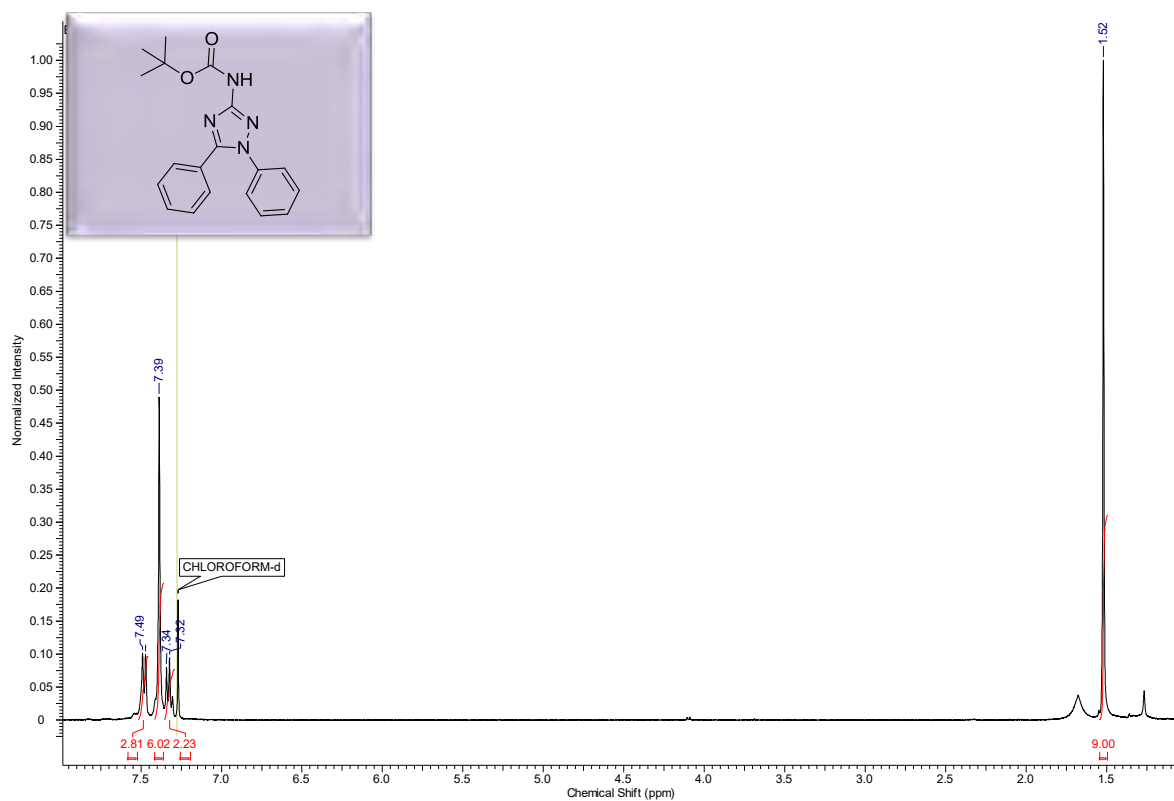
Anexo 33. Espectro de RMN ^1H do composto (**98q**) em CDCl_3 à 500MHz.



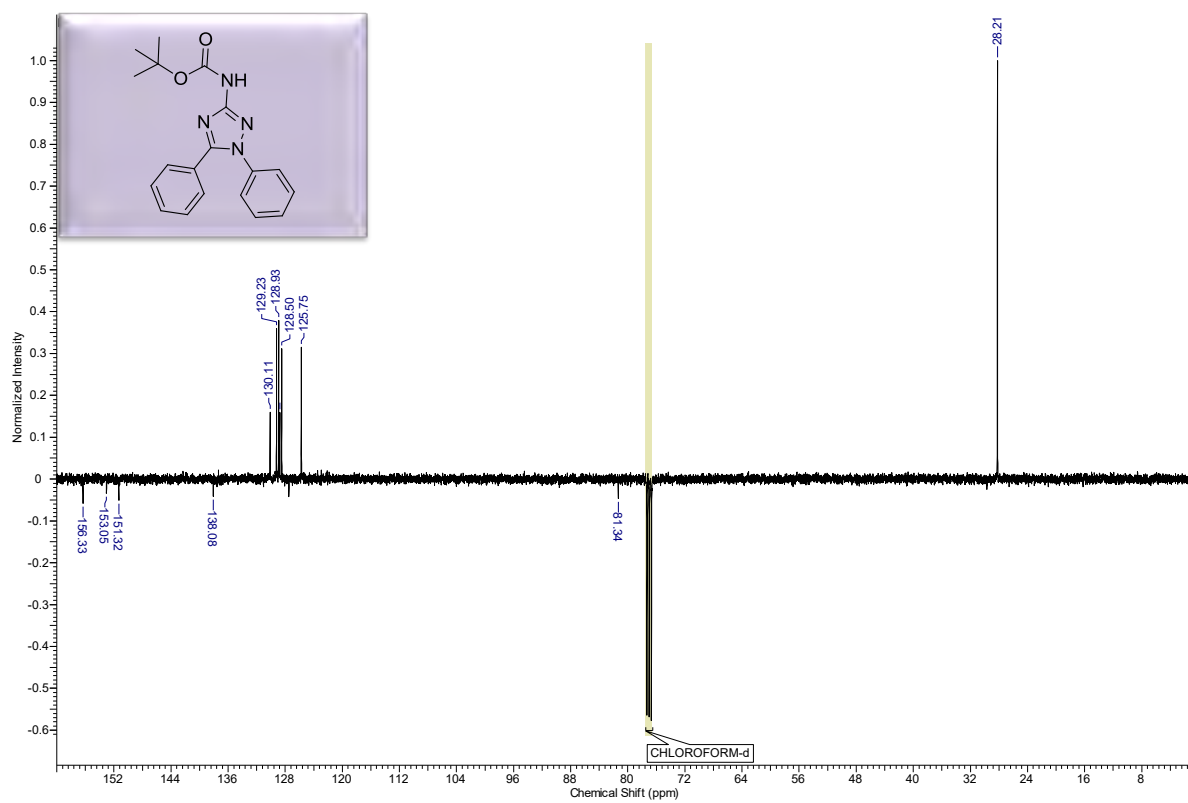
Anexo 34. Espectro de RMN ^{13}C do produto (**98q**) em CDCl_3 à 125MHz.



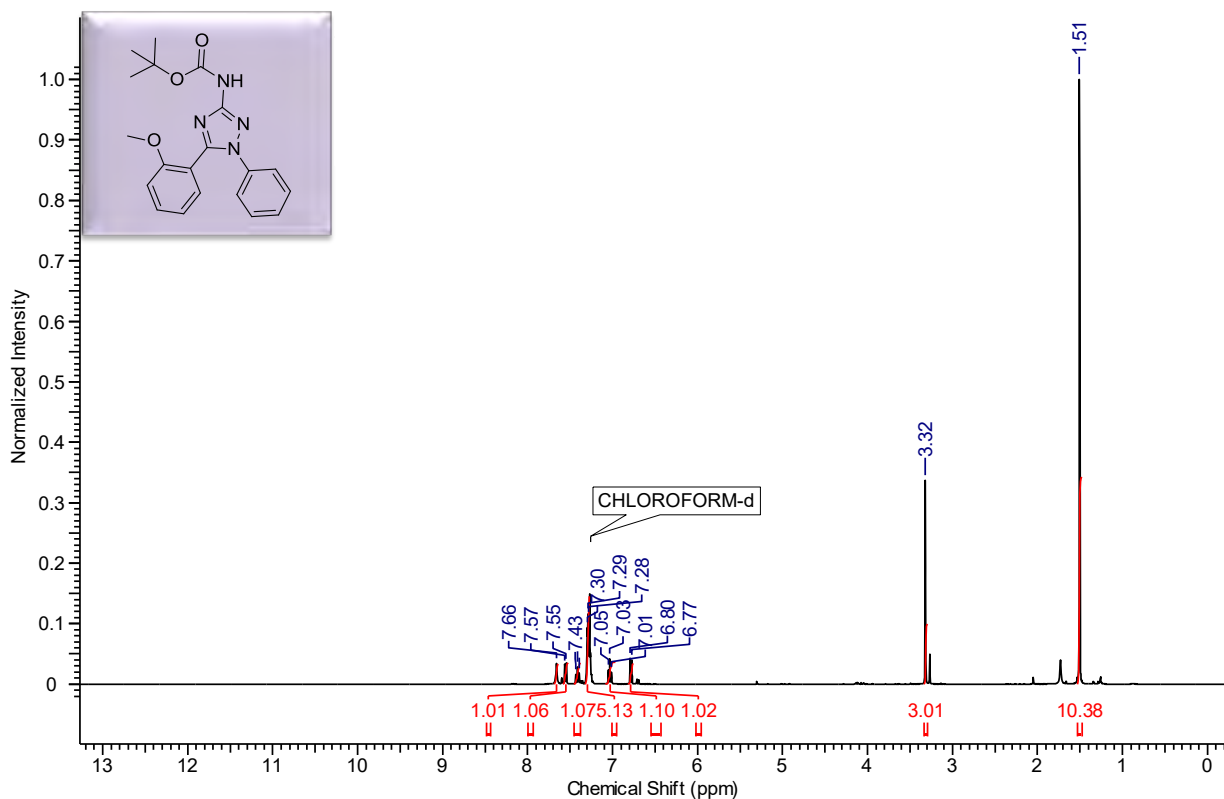
Anexo 35. Espectro de RMN ^1H do composto (96a) em CDCl_3 à 500MHz.



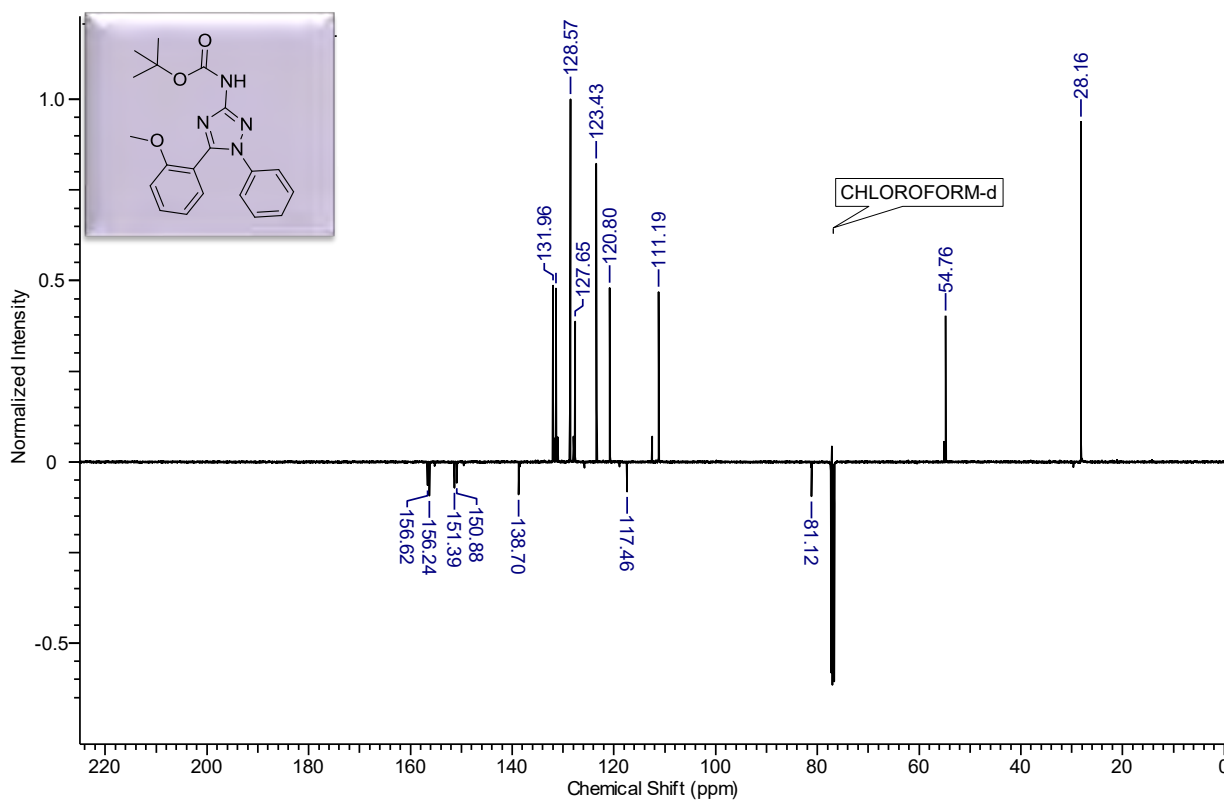
Anexo 36. Espectro de RMN ^{13}C do produto (96a) em CDCl_3 à 125MHz.



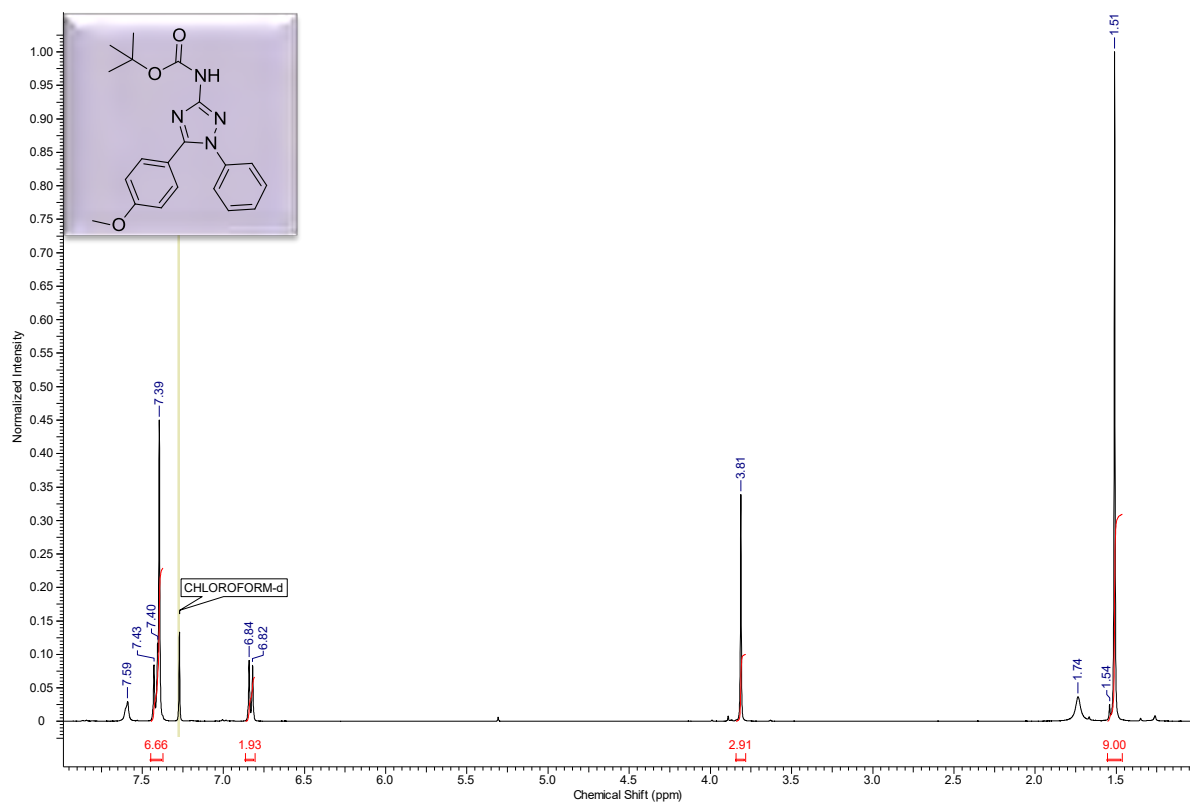
Anexo 37. Espectro de RMN ^1H do composto (96c) em CDCl_3 à 400MHz.



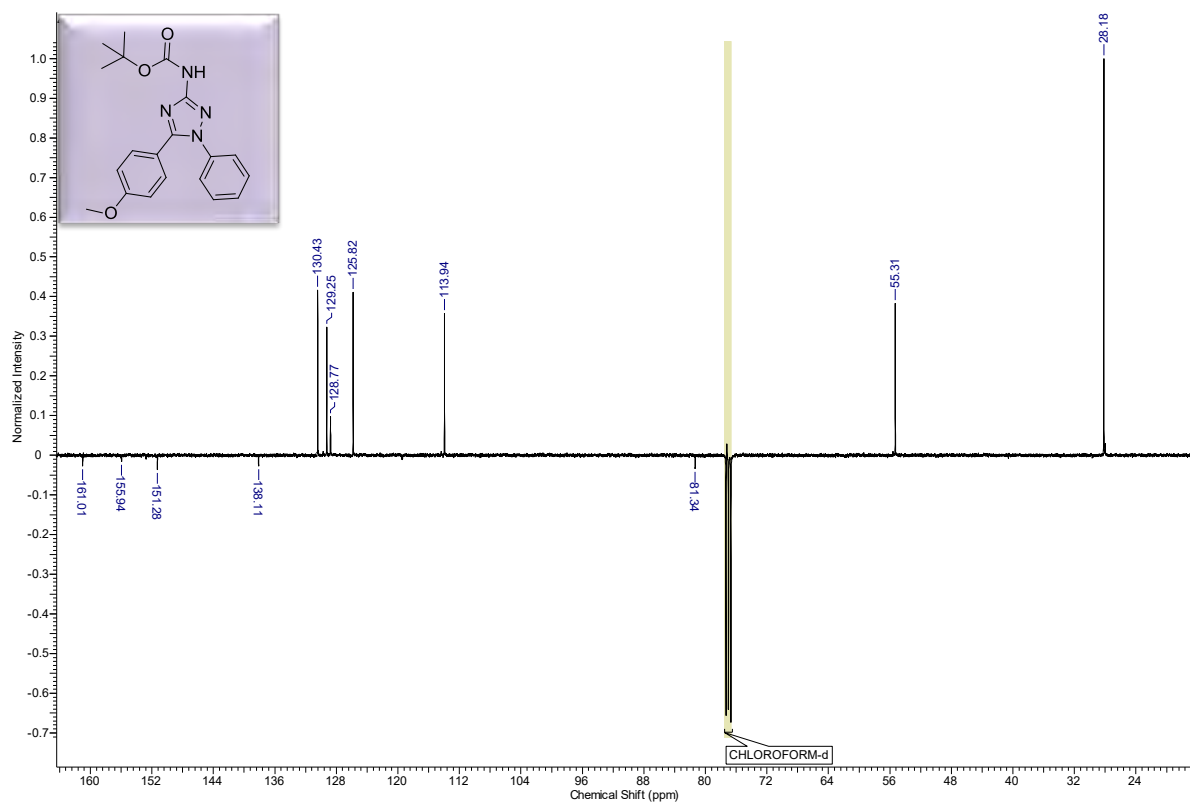
Anexo 38. Espectro de RMN ^{13}C do produto (96c) em CDCl_3 à 100MHz.



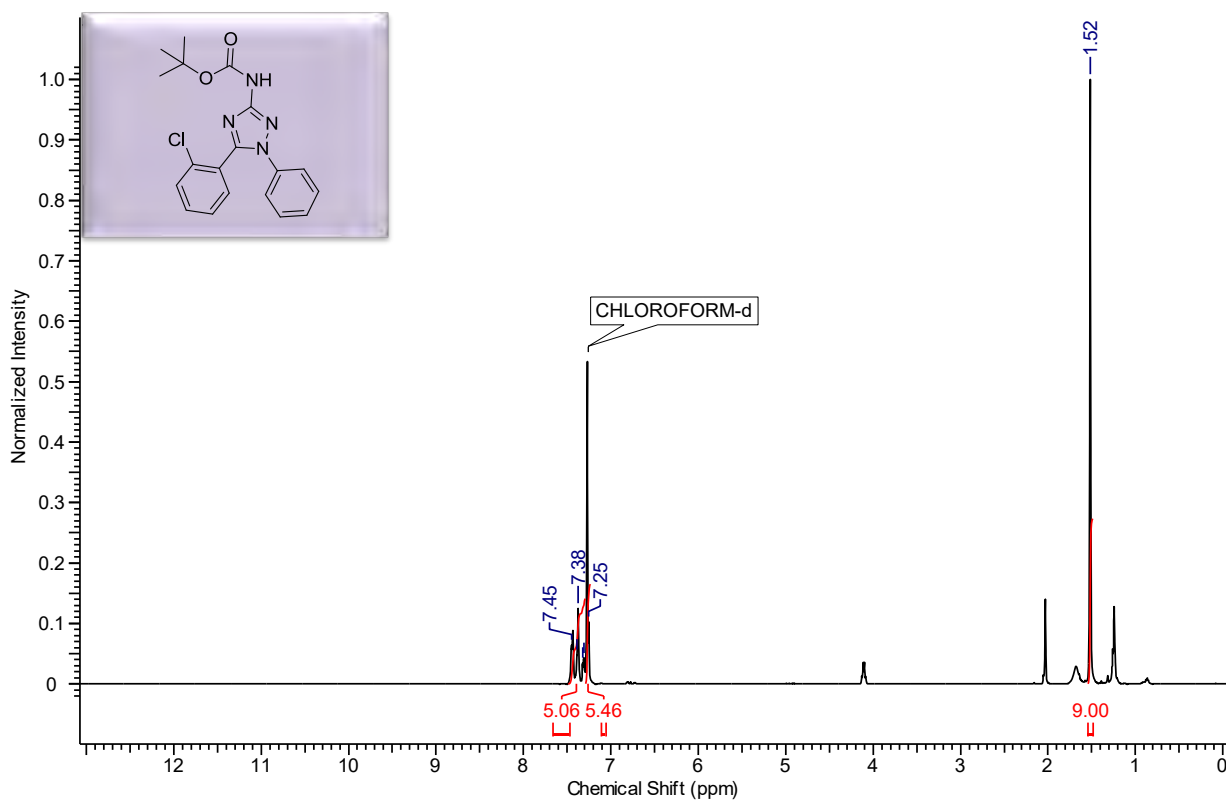
Anexo 39. Espectro de RMN ¹H do composto (96d) em CDCl₃ à 500MHz.



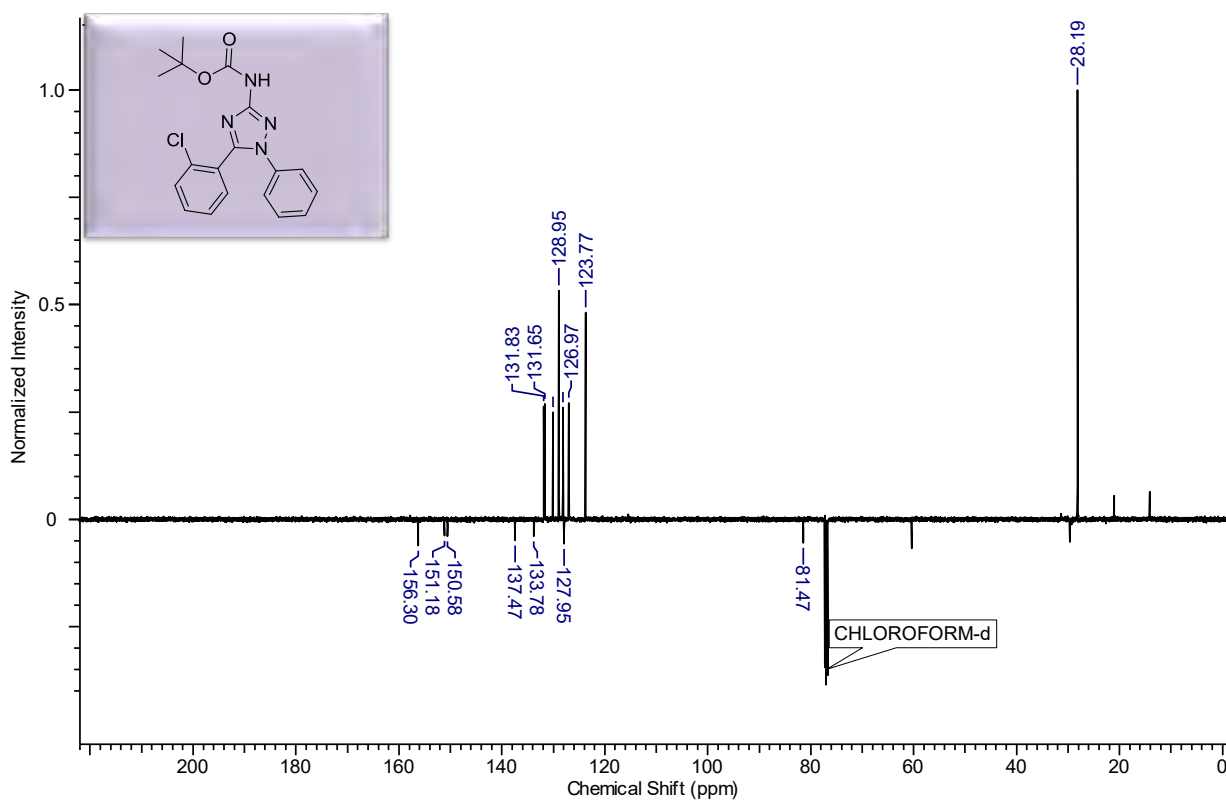
Anexo 40. Espectro de RMN ¹³C do produto (96d) em CDCl₃ à 125MHz.



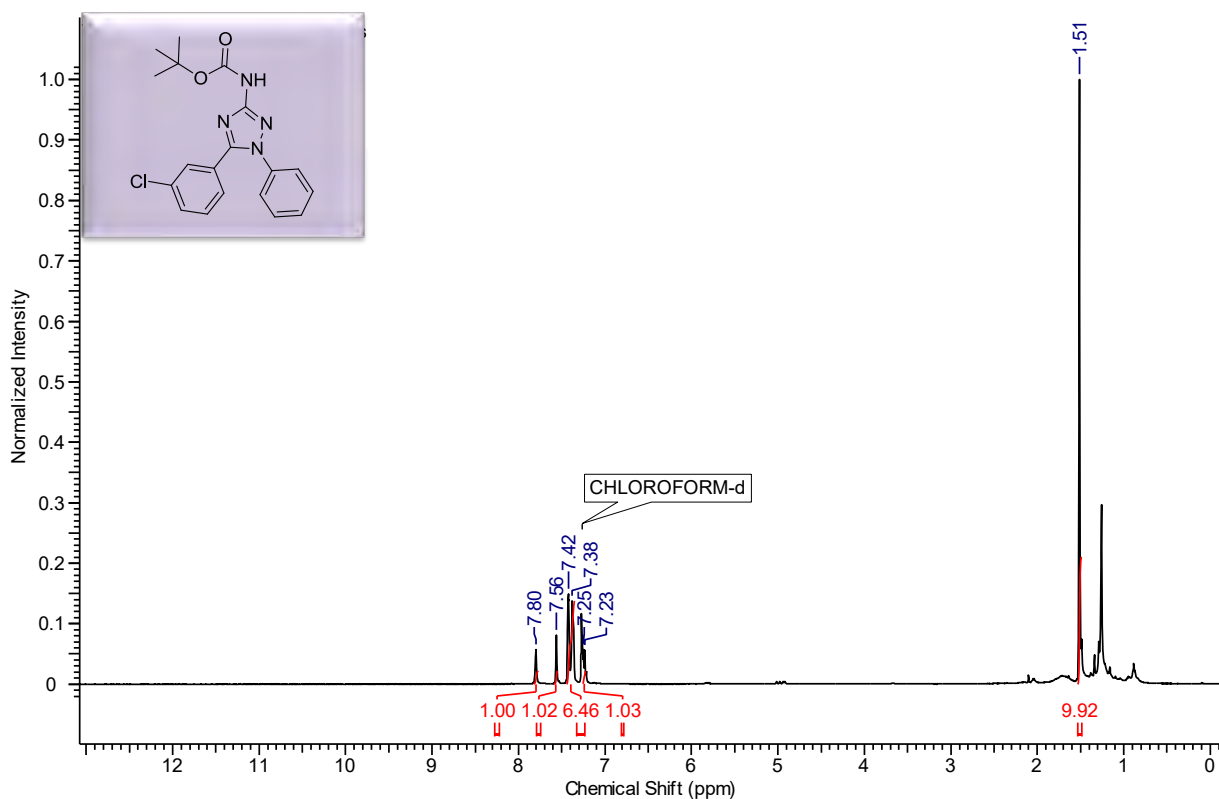
Anexo 41. Espectro de RMN ^1H do composto (**96g**) em CDCl_3 à 500MHz.



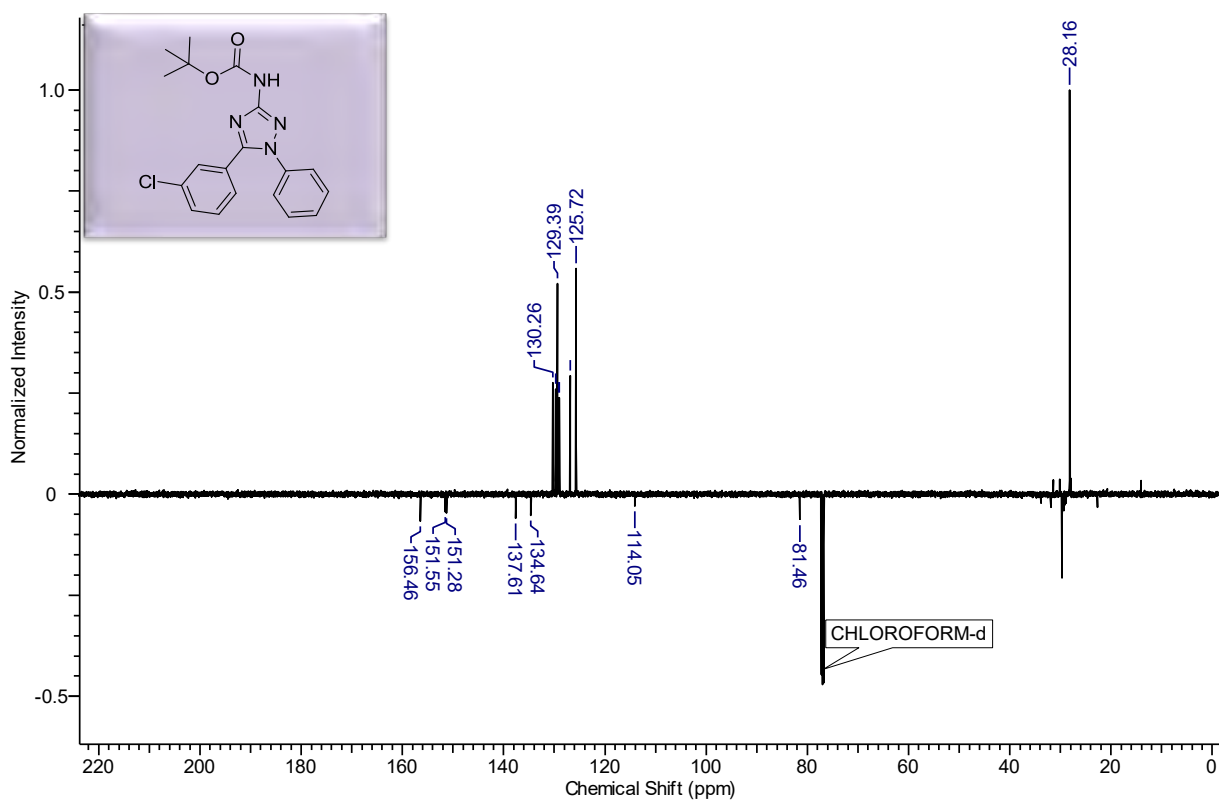
Anexo 42. Espectro de RMN ^{13}C do produto (**96g**) em CDCl_3 à 125MHz.



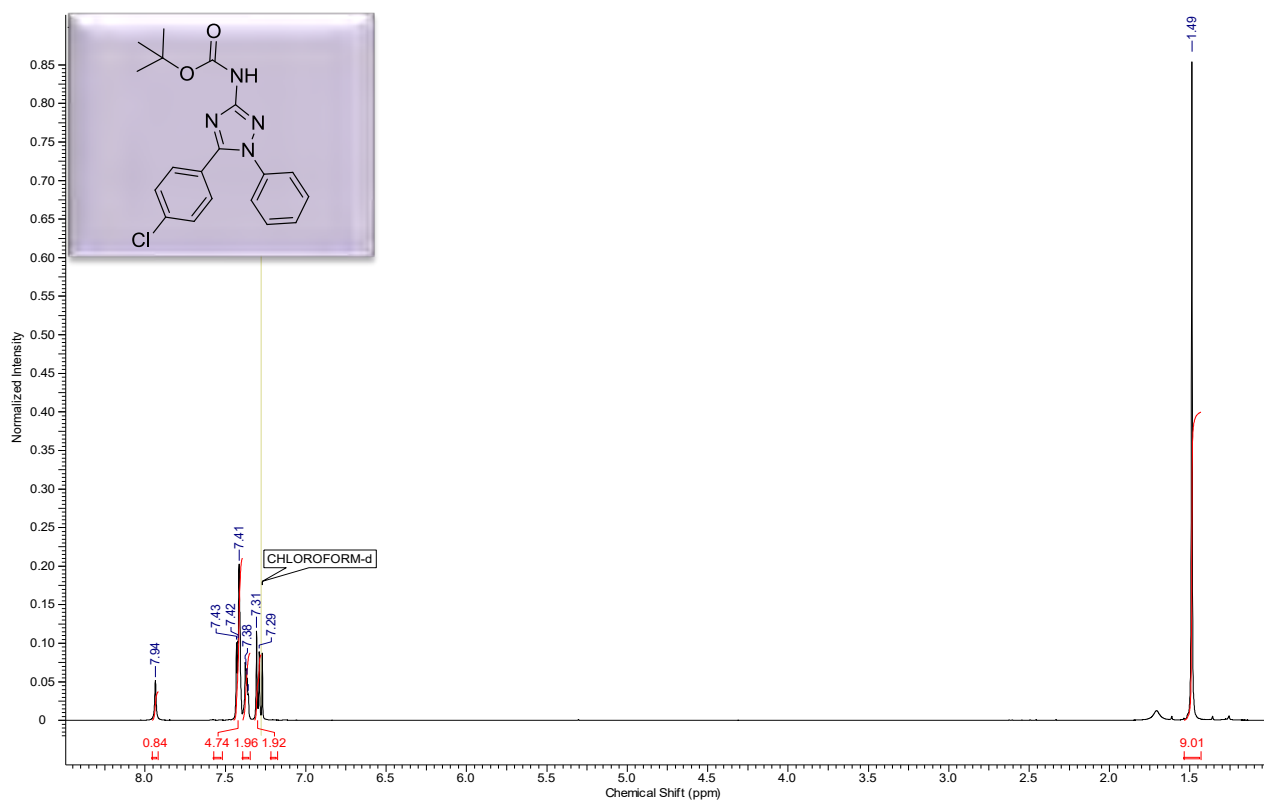
Anexo 43. Espectro de RMN ^1H do composto (**96h**) em CDCl_3 à 500MHz.



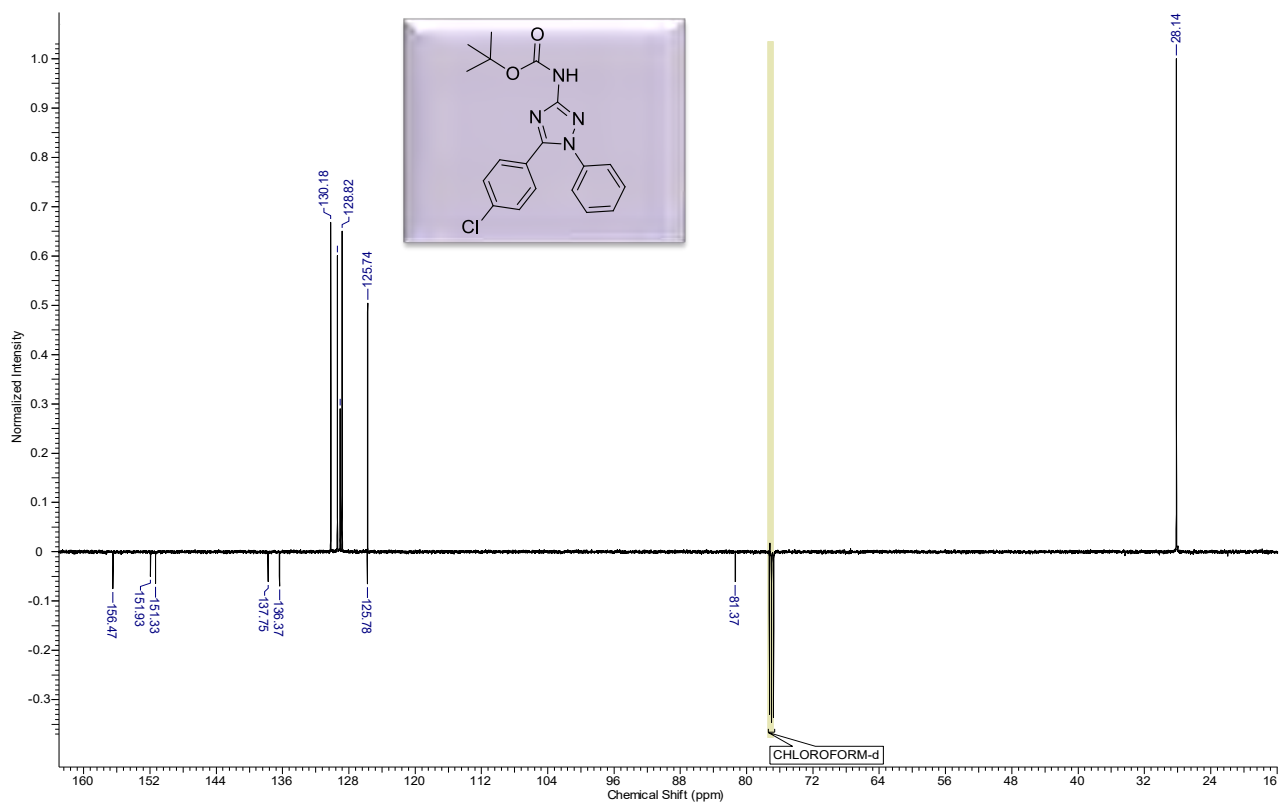
Anexo 44. Espectro de RMN ^{13}C do produto (**96h**) em CDCl_3 à 125MHz.



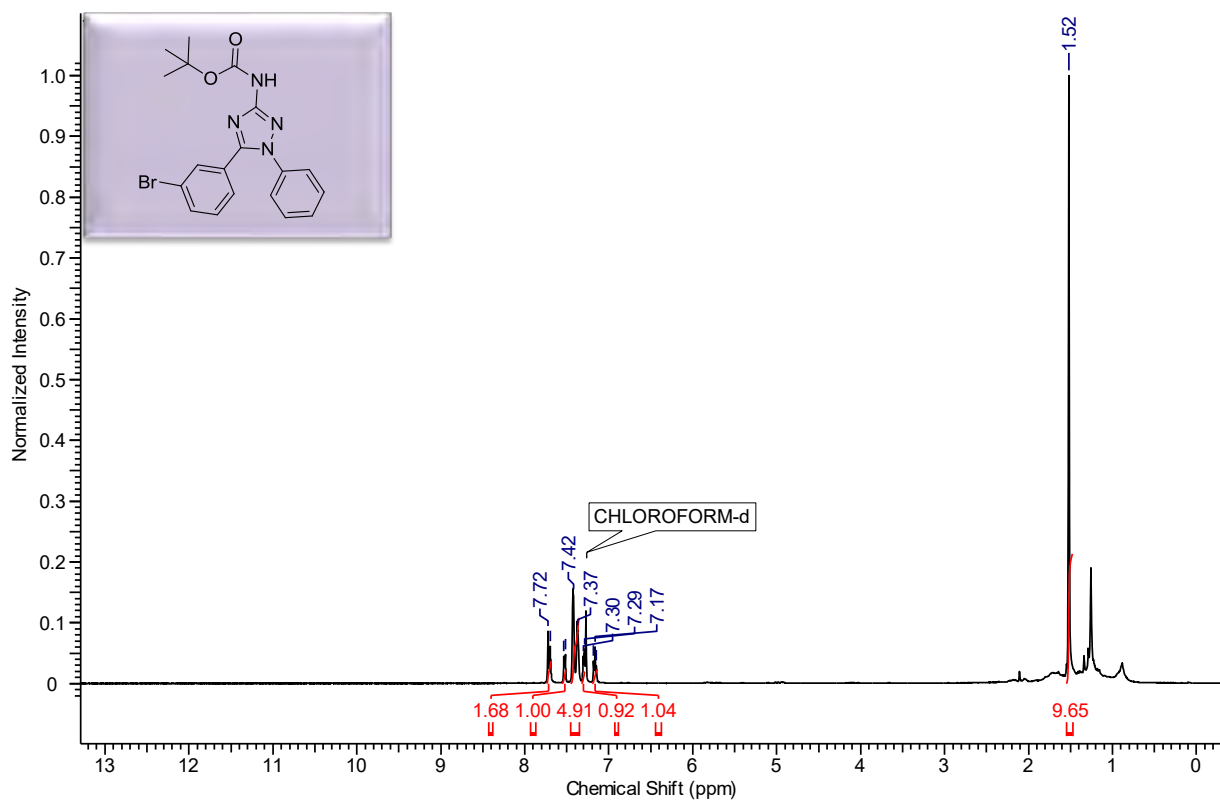
Anexo 45. Espectro de RMN ^1H do composto (96i) em CDCl_3 à 500MHz.



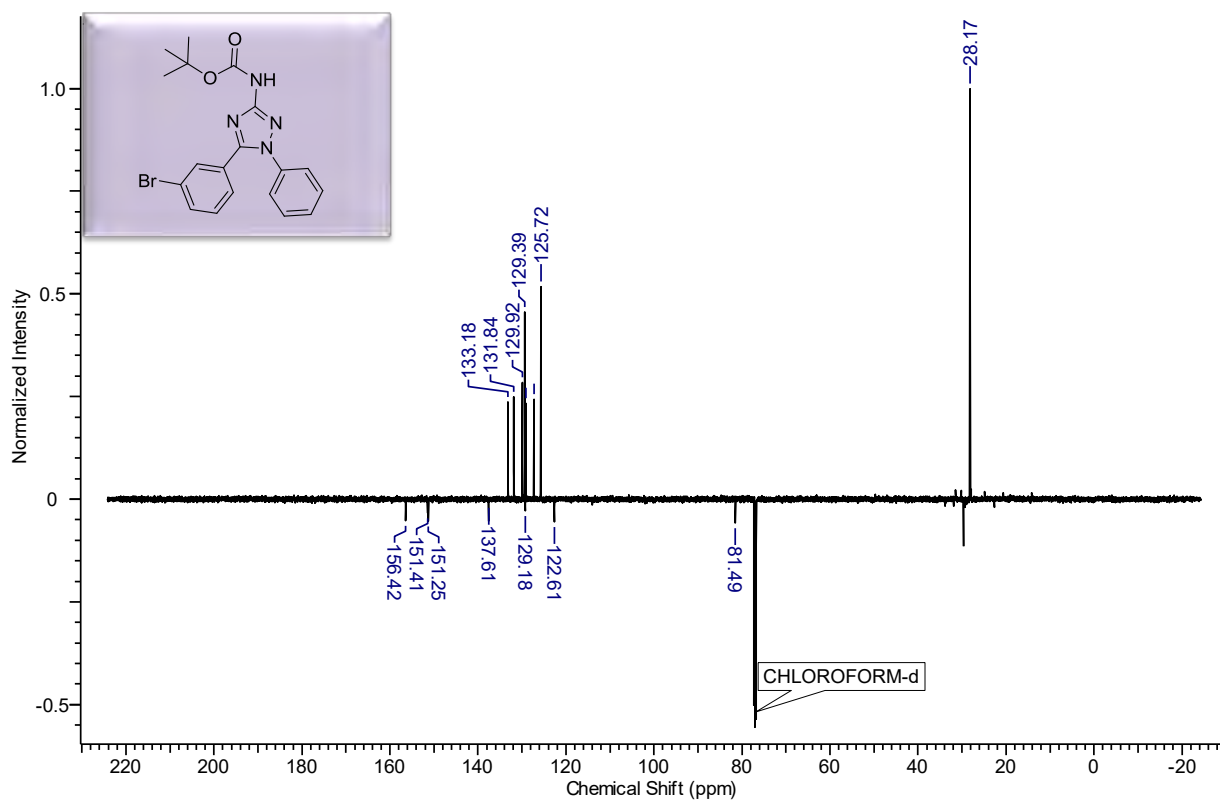
Anexo 46. Espectro de RMN ^{13}C do produto (96i) em CDCl_3 à 125MHz.



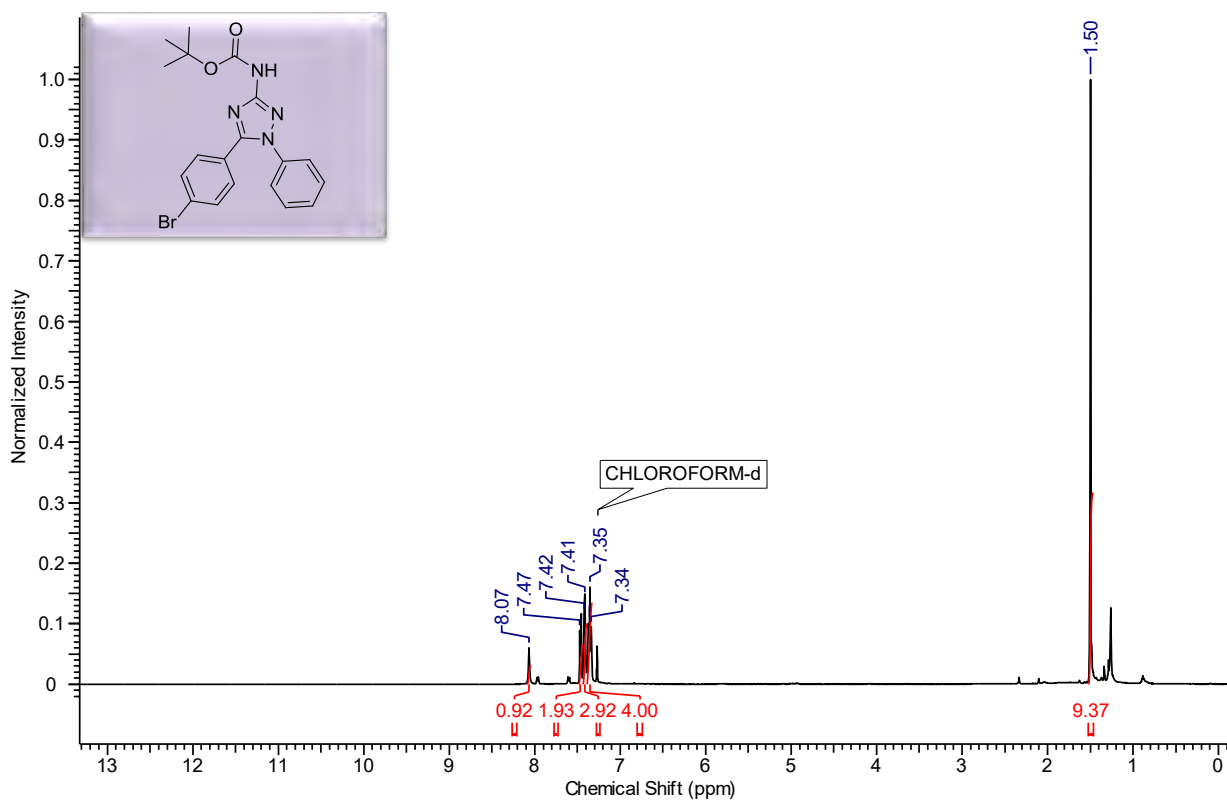
Anexo 47. Espectro de RMN ^1H do composto (96j) em CDCl_3 à 500MHz.



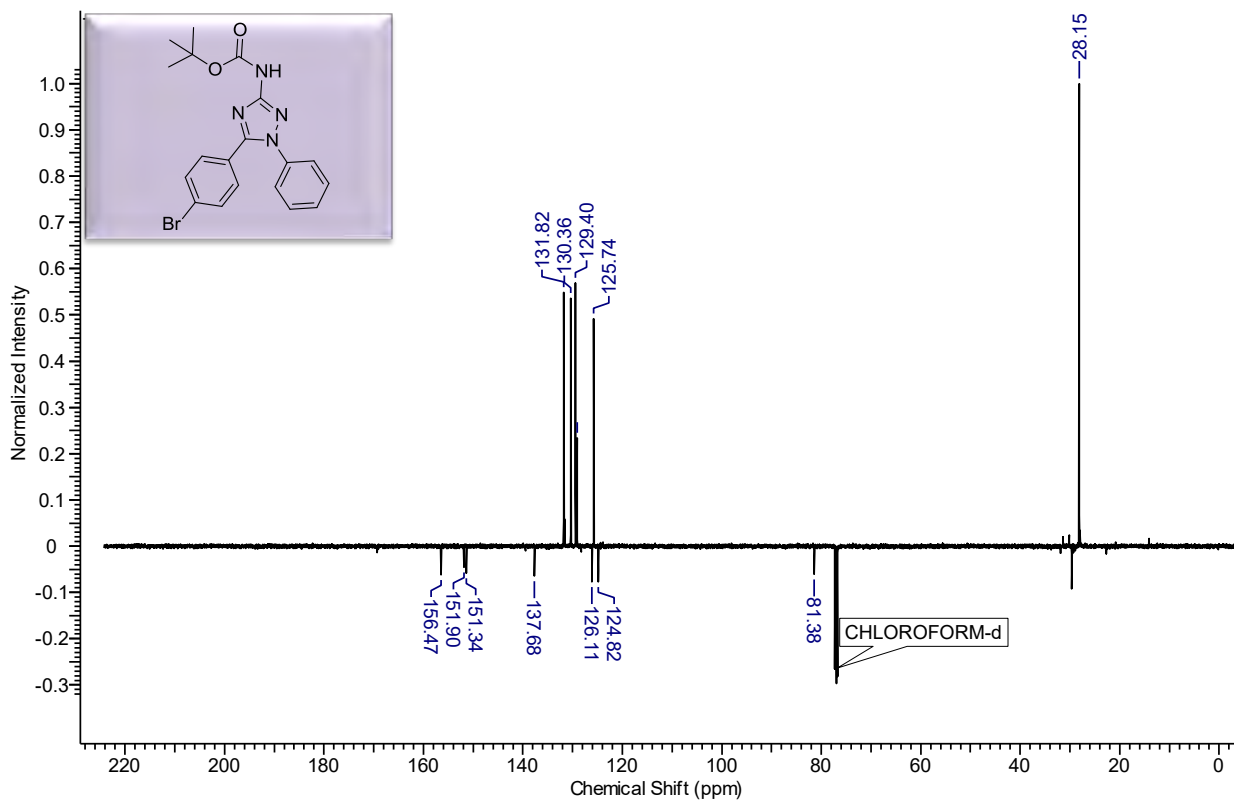
Anexo 48. Espectro de RMN ^{13}C do produto (96j) em CDCl_3 à 125MHz.



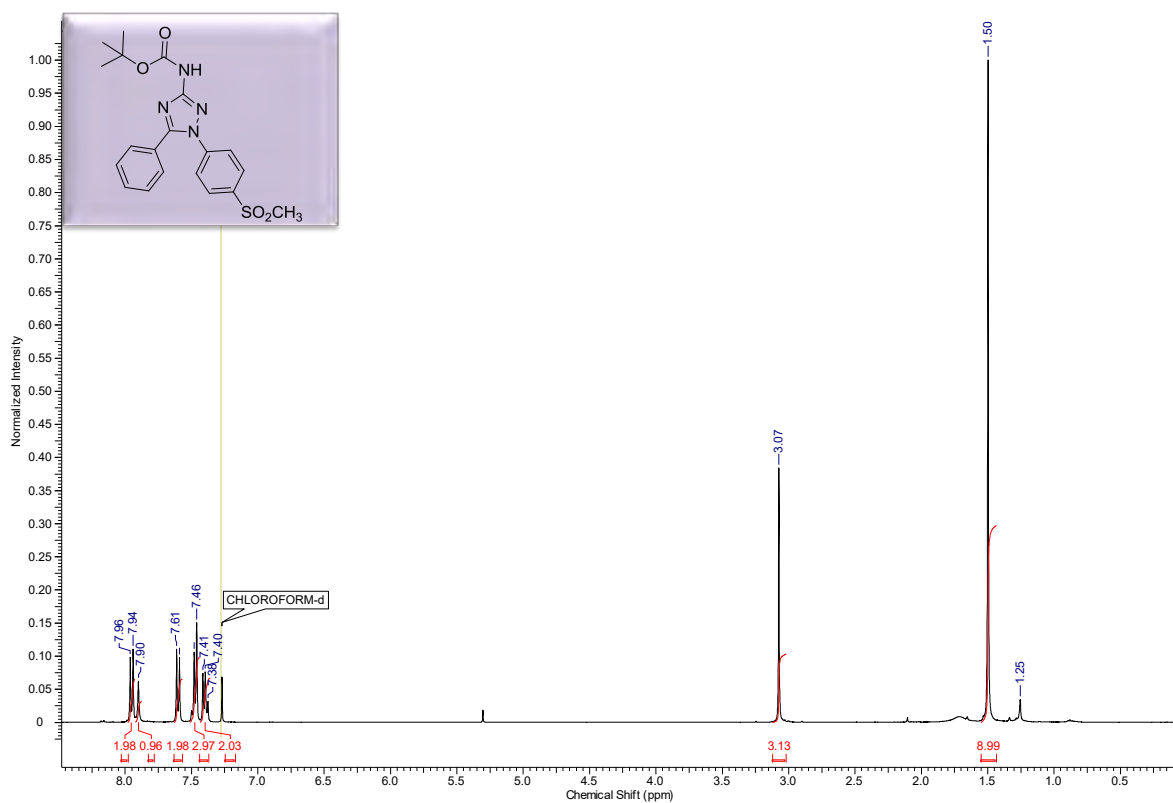
Anexo 49. Espectro de RMN ^1H do composto (96k) em CDCl_3 à 500MHz.



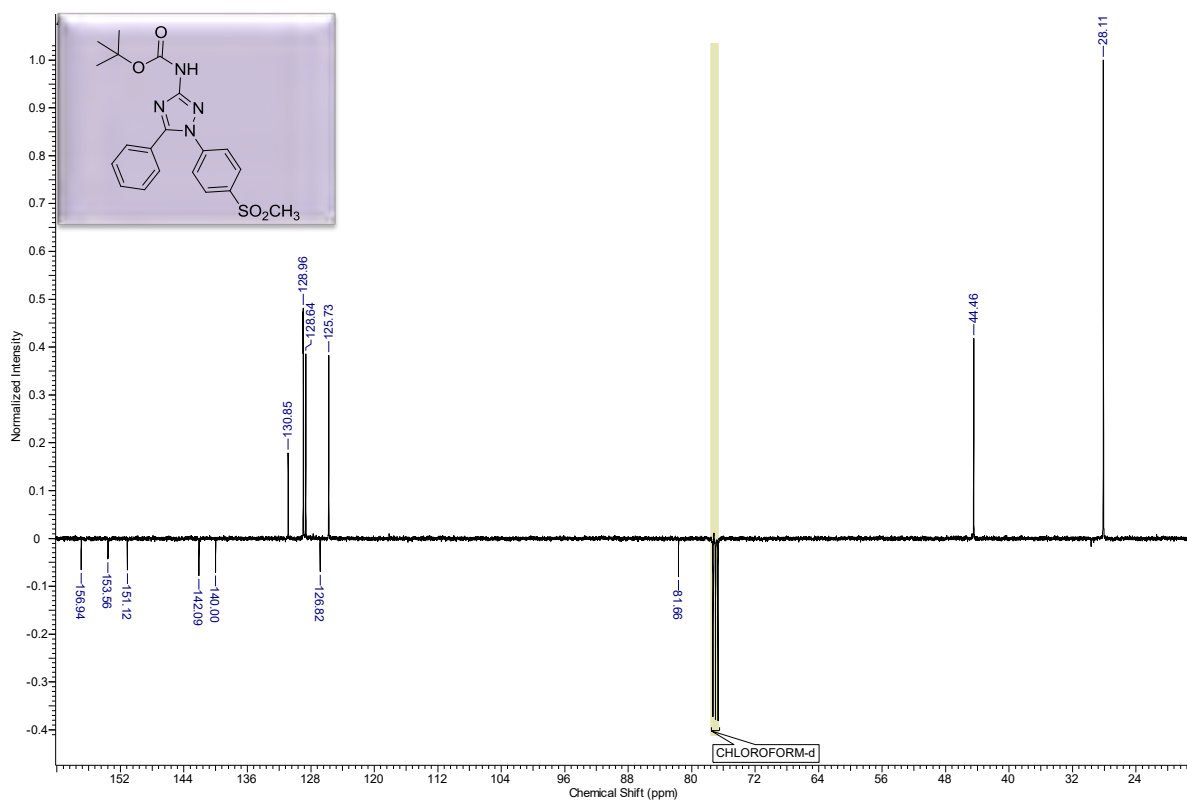
Anexo 50. Espectro de RMN ^{13}C do produto (96k) em CDCl_3 à 125MHz.



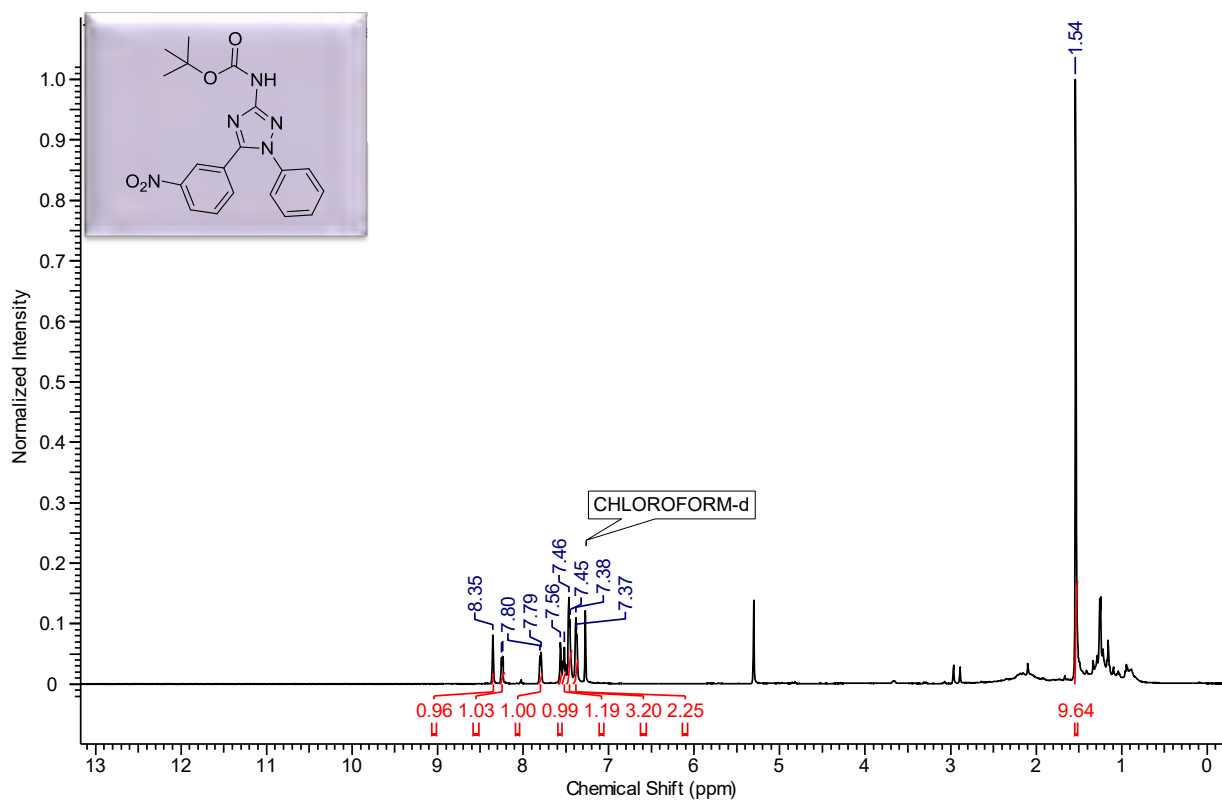
Anexo 51. Espectro de RMN ^1H do composto (96I) em CDCl_3 à 400MHz.



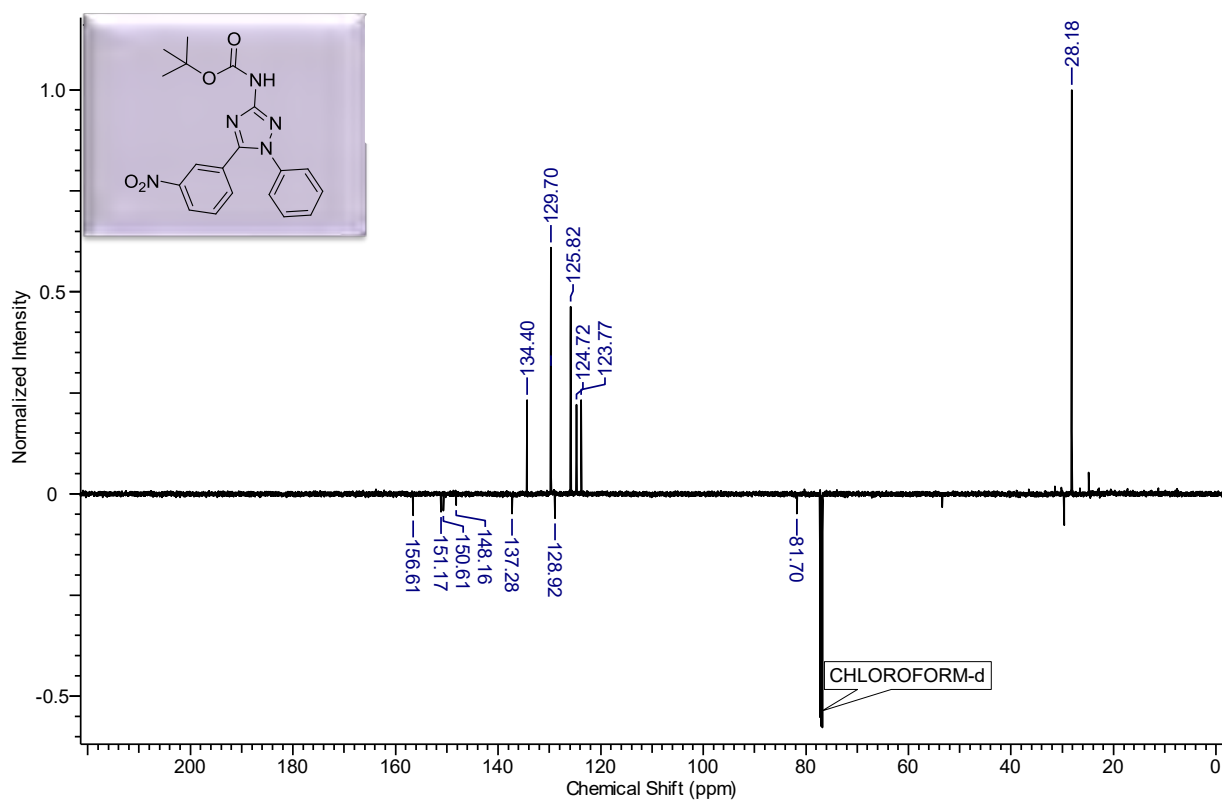
Anexo 52. Espectro de RMN ^{13}C do produto (96I) em CDCl_3 à 100MHz.



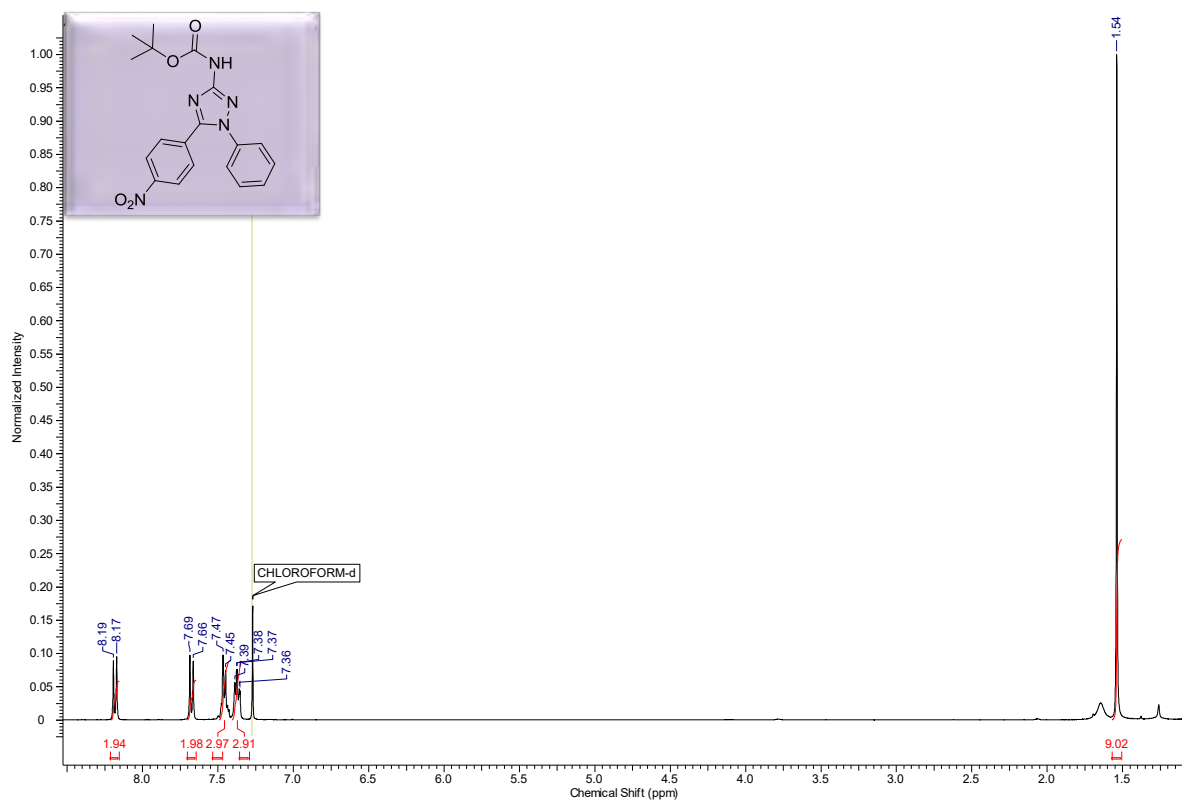
Anexo 53. Espectro de RMN ^1H do composto (**96m**) em CDCl_3 à 500MHz.



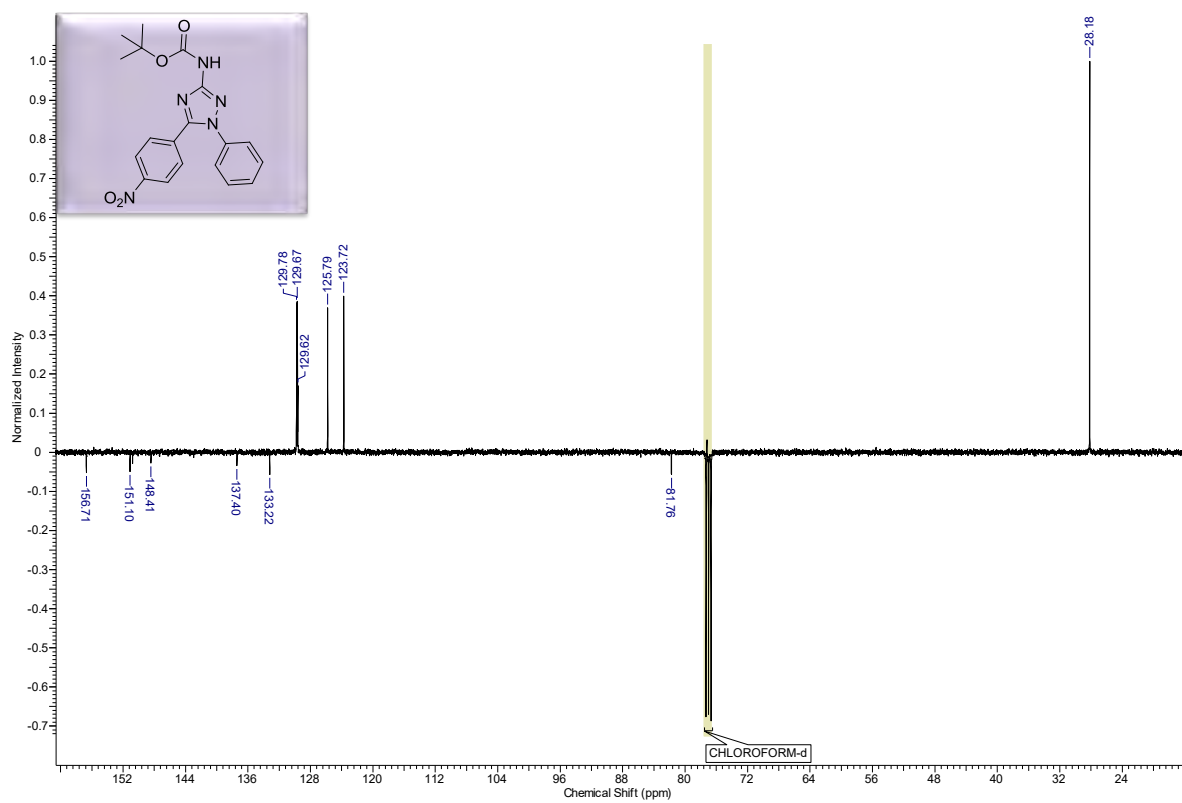
Anexo 54. Espectro de RMN ^{13}C do produto (**96m**) em CDCl_3 à 125MHz.



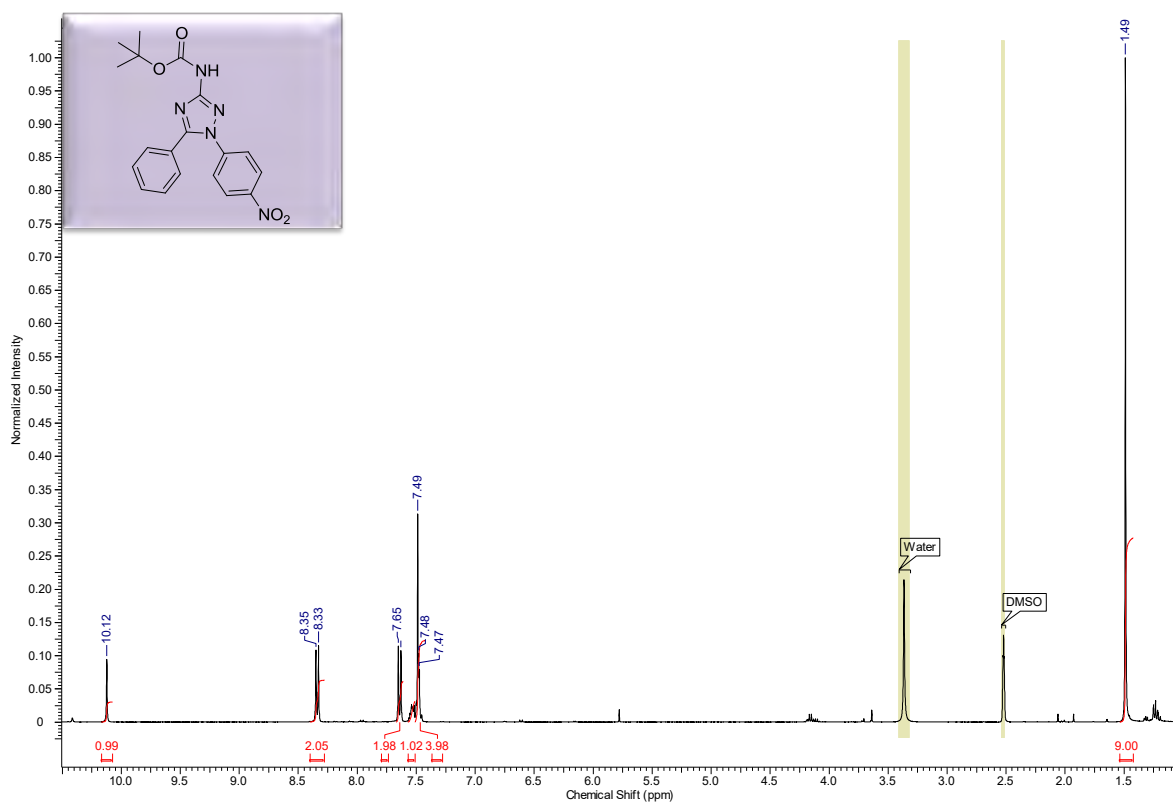
Anexo 55. Espectro de RMN ^1H do composto (96n) em CDCl_3 à 400MHz.



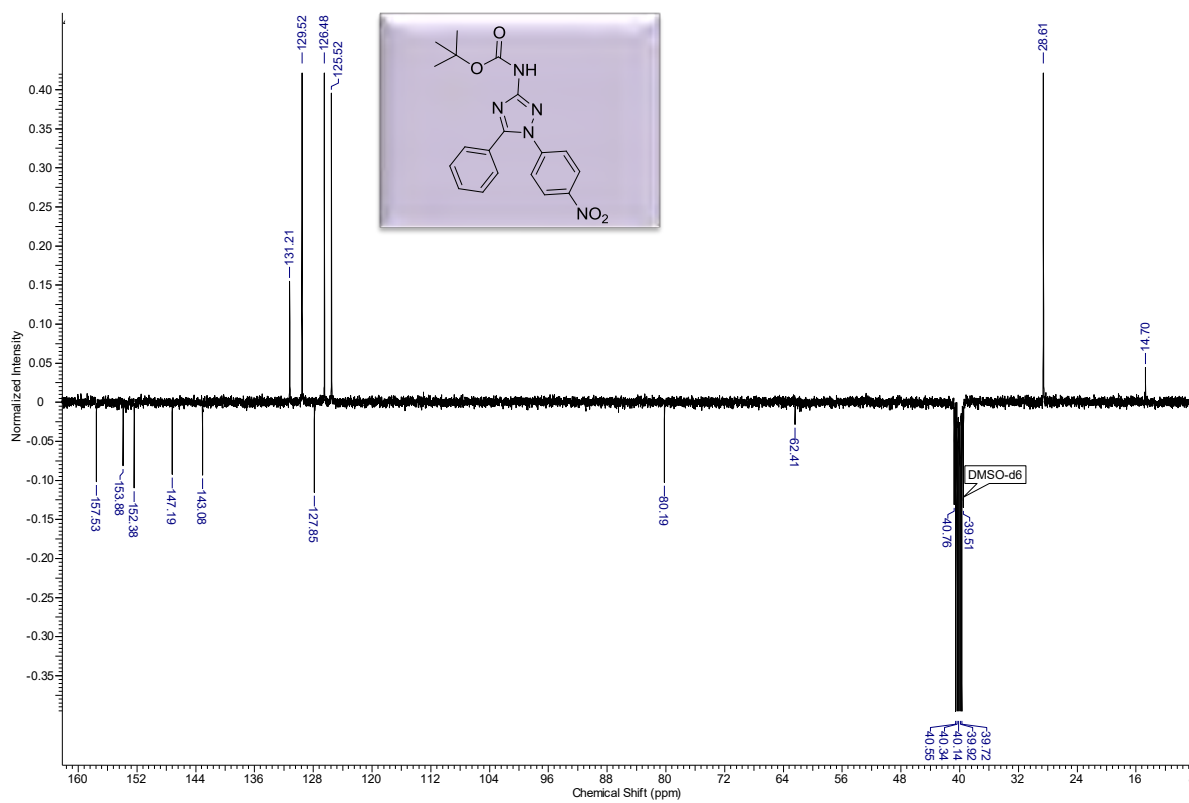
Anexo 56. Espectro de RMN ^{13}C do produto (96n) em CDCl_3 à 100MHz.



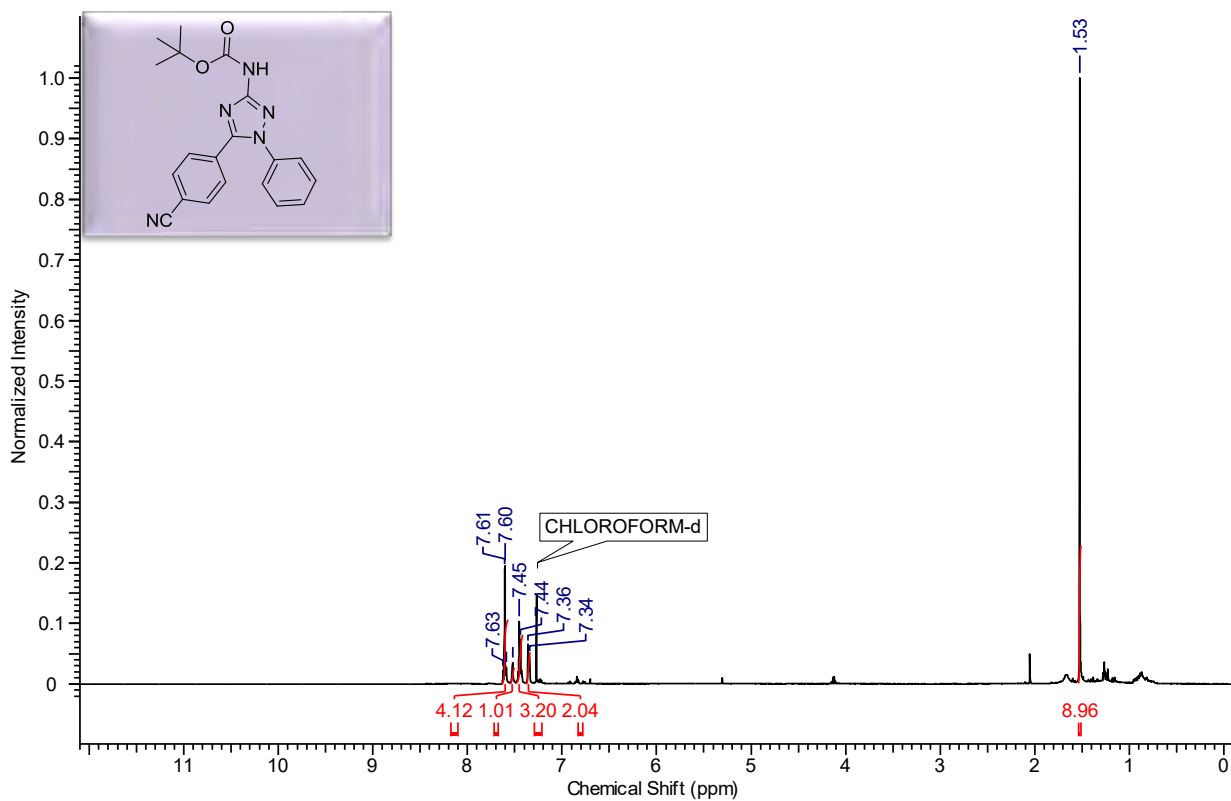
Anexo 57. Espectro de RMN ^1H do composto (96o) em DMSO à 400MHz.



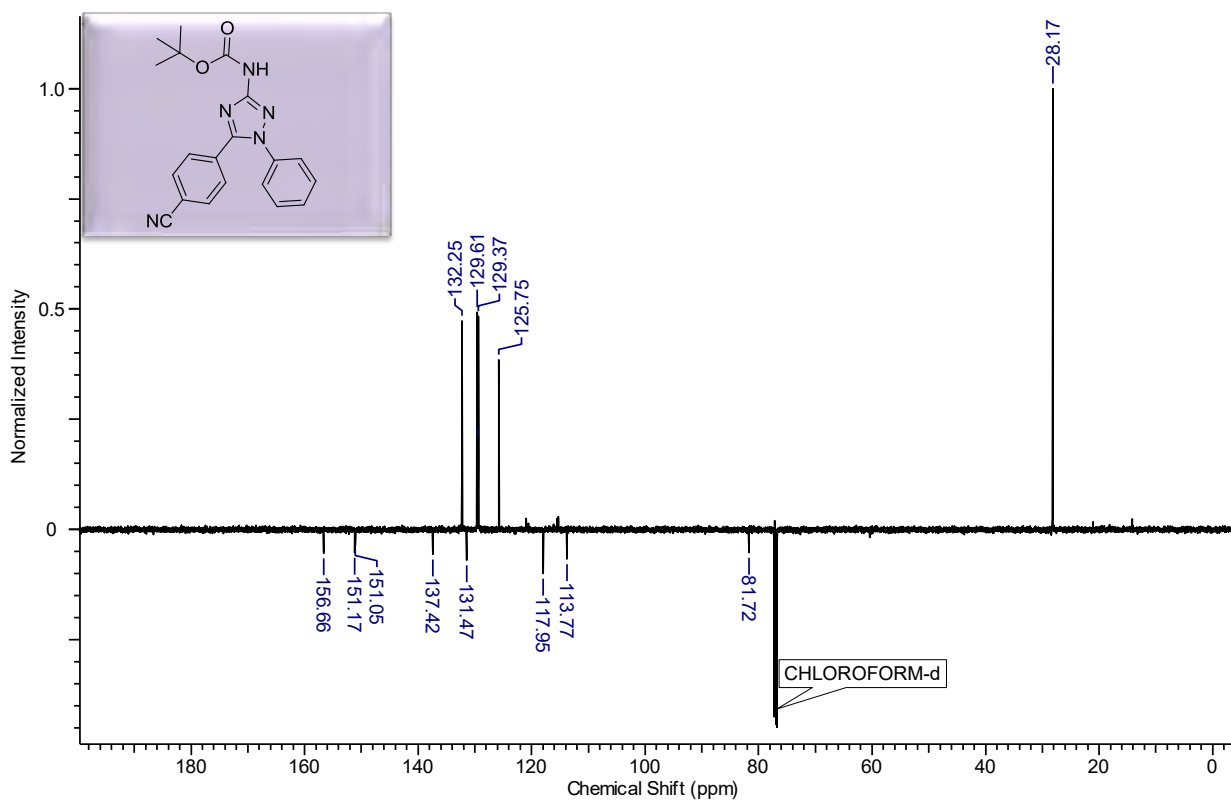
Anexo 58. Espectro de RMN ^{13}C do produto (96o) em DMSO à 100MHz.



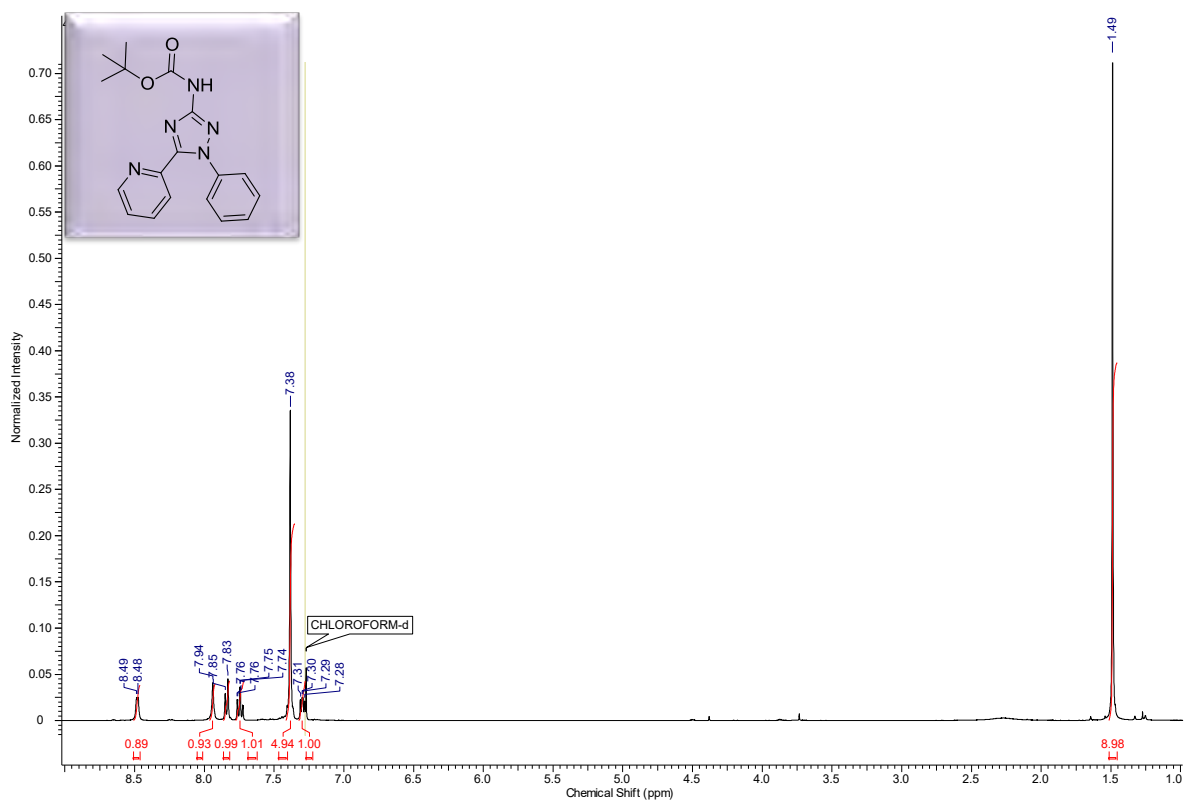
Anexo 59. Espectro de RMN ^1H do composto (**96p**) em CDCl_3 à 500MHz.



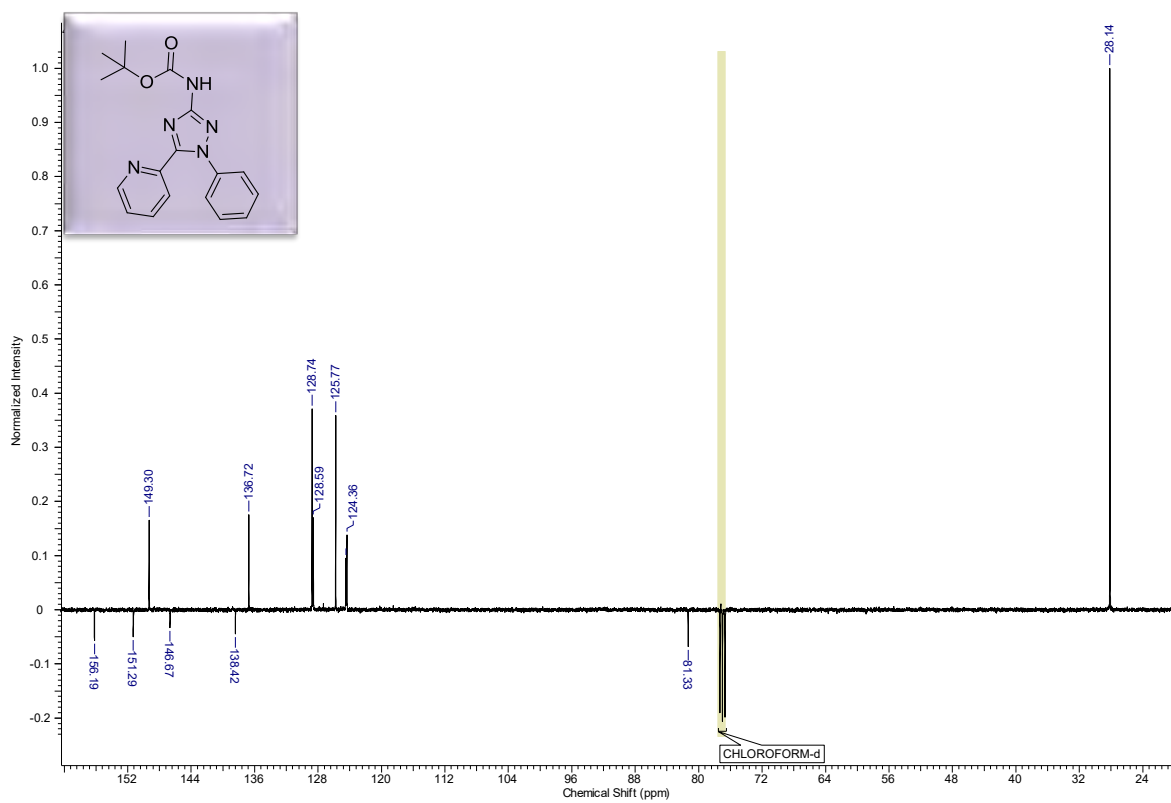
Anexo 60. Espectro de RMN ^{13}C do produto (**96p**) em CDCl_3 à 125MHz.



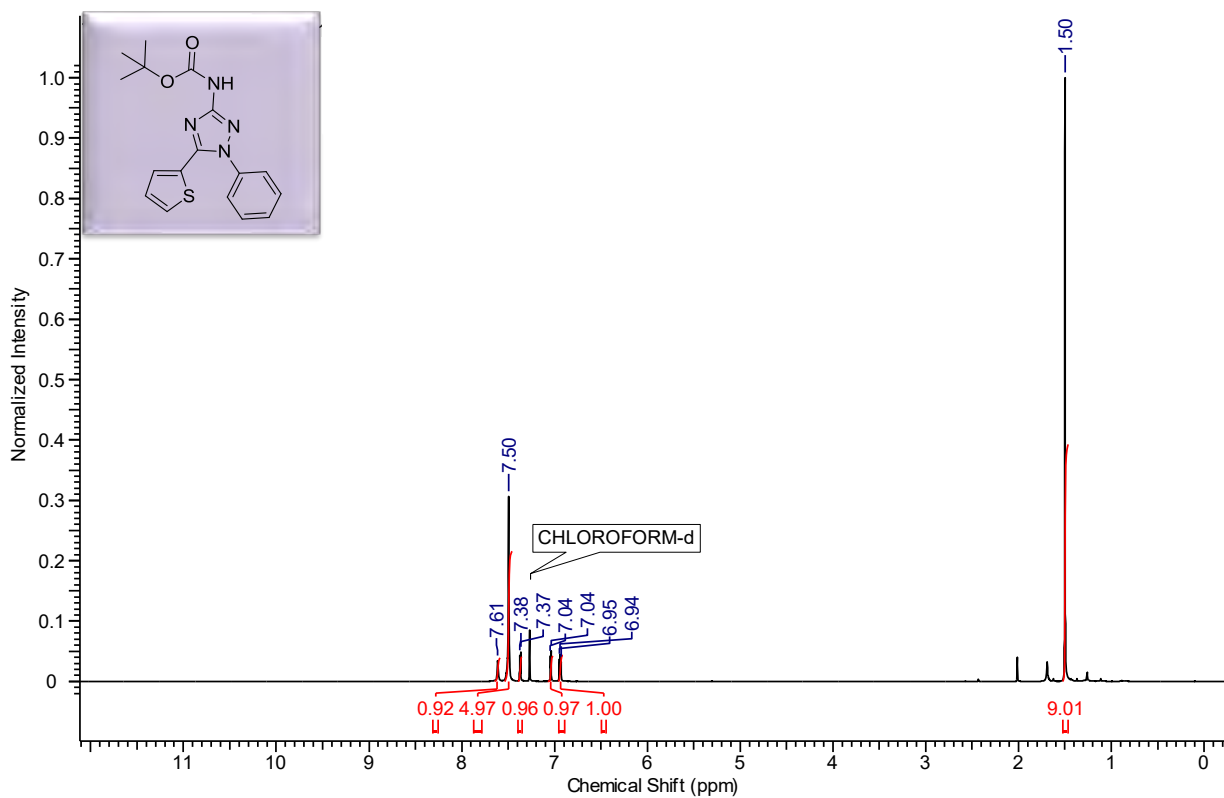
Anexo 61. Espectro de RMN ^1H do composto (96q) em CDCl_3 à 500MHz.



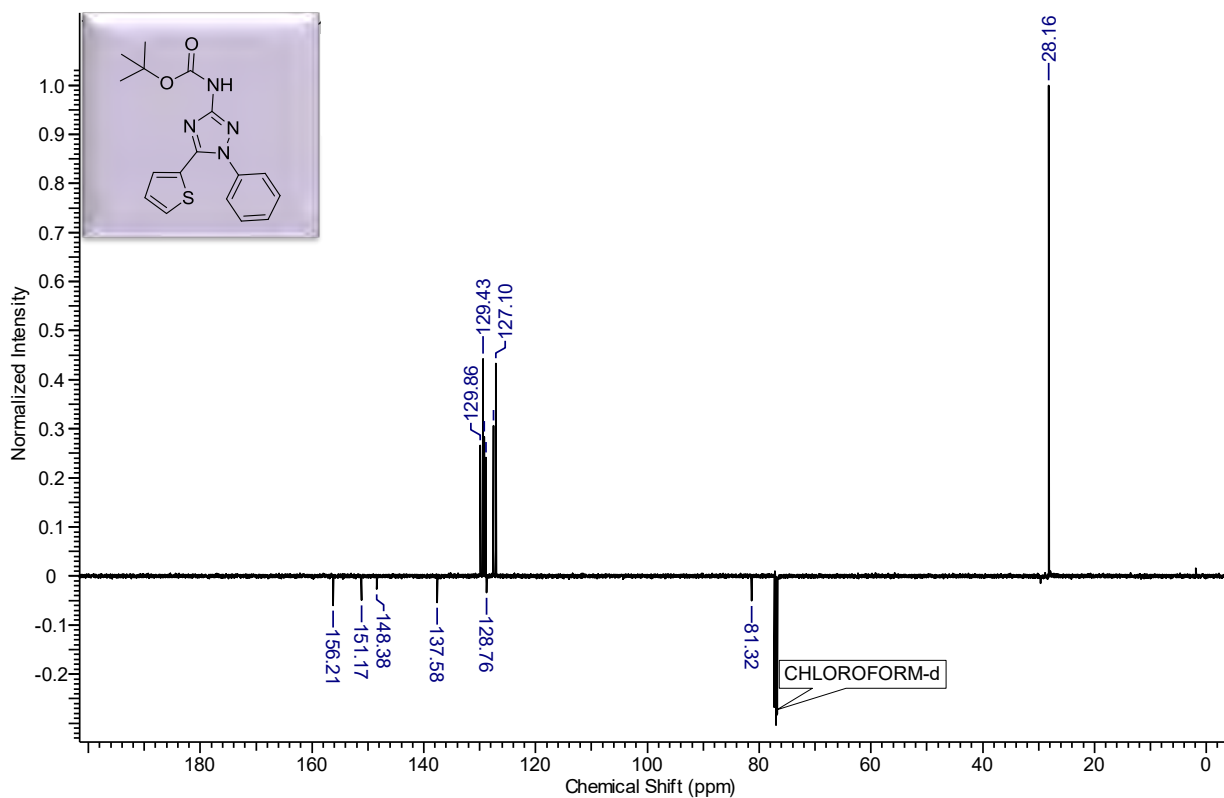
Anexo 62. Espectro de RMN ^{13}C do produto (96q) em CDCl_3 à 125MHz.



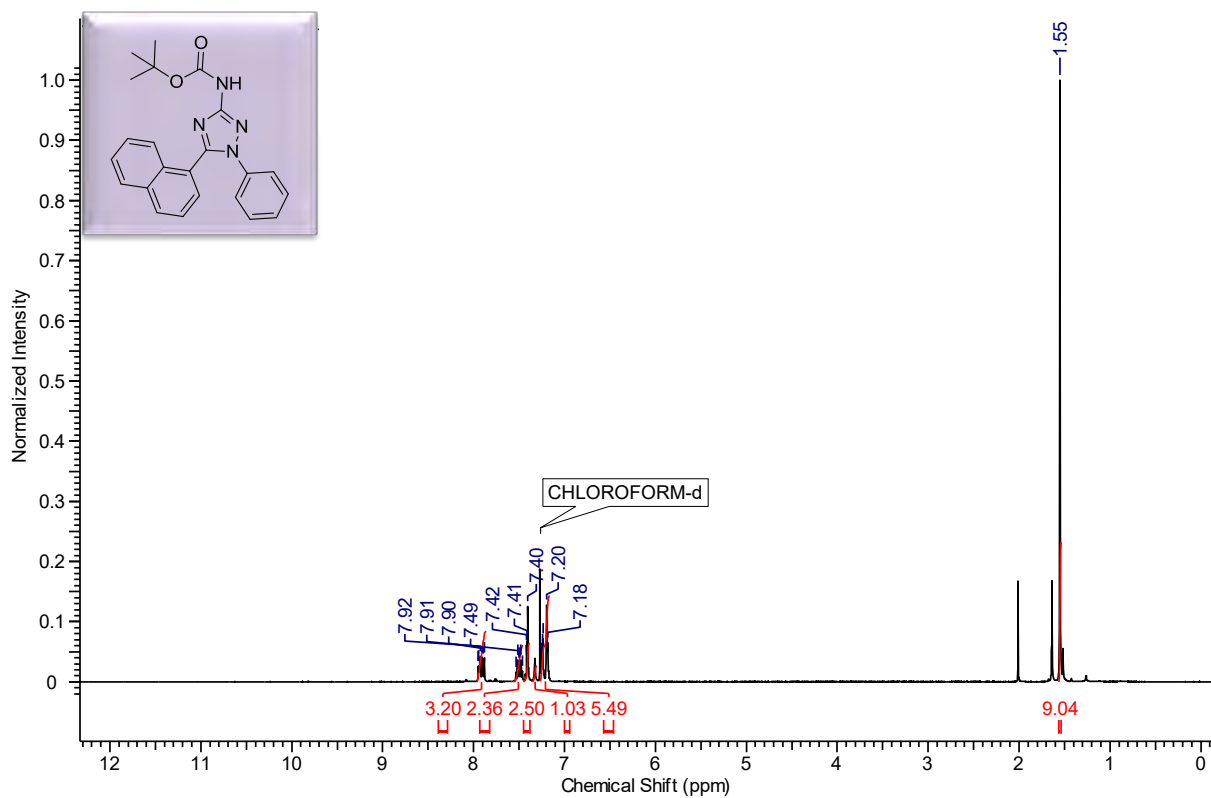
Anexo 63. Espectro de RMN ^1H do composto (96s) em CDCl_3 à 500MHz.



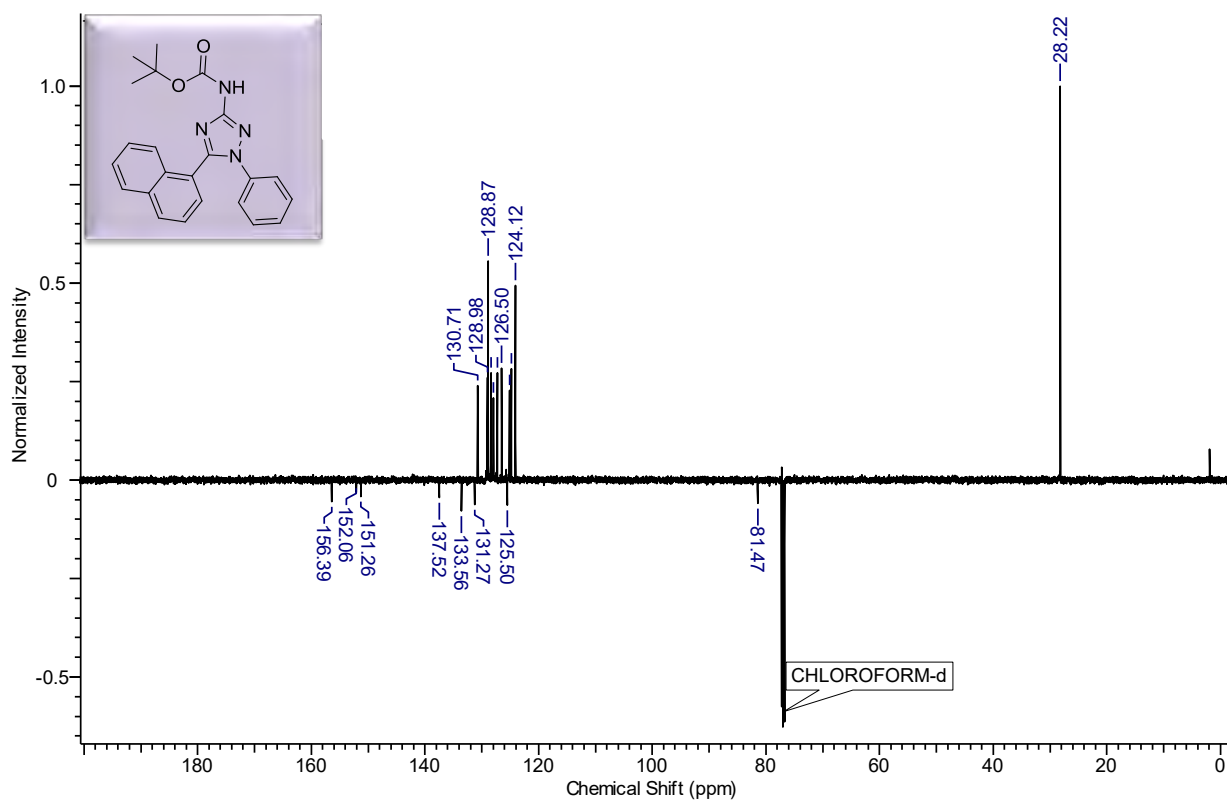
Anexo 64. Espectro de RMN ^{13}C do produto (96s) em CDCl_3 à 125MHz.



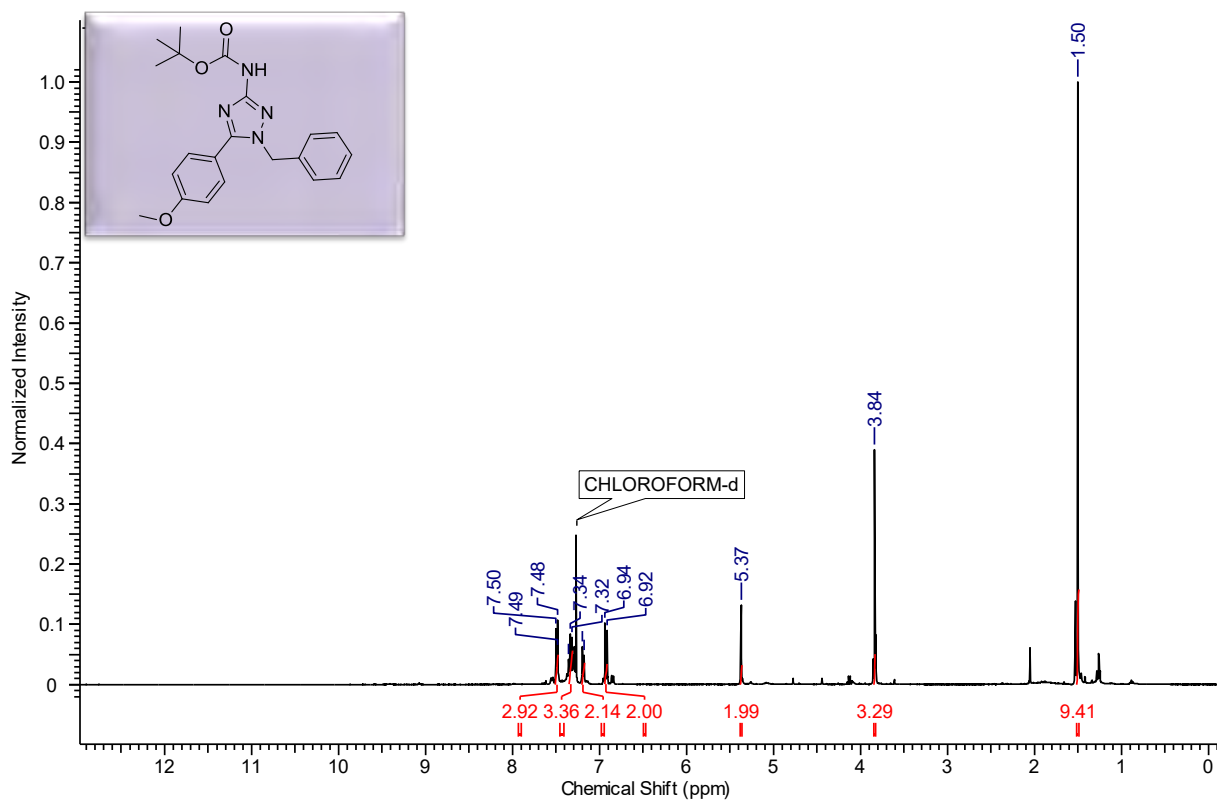
Anexo 65. Espectro de RMN ^1H do composto (**96u**) em CDCl_3 à 500MHz.



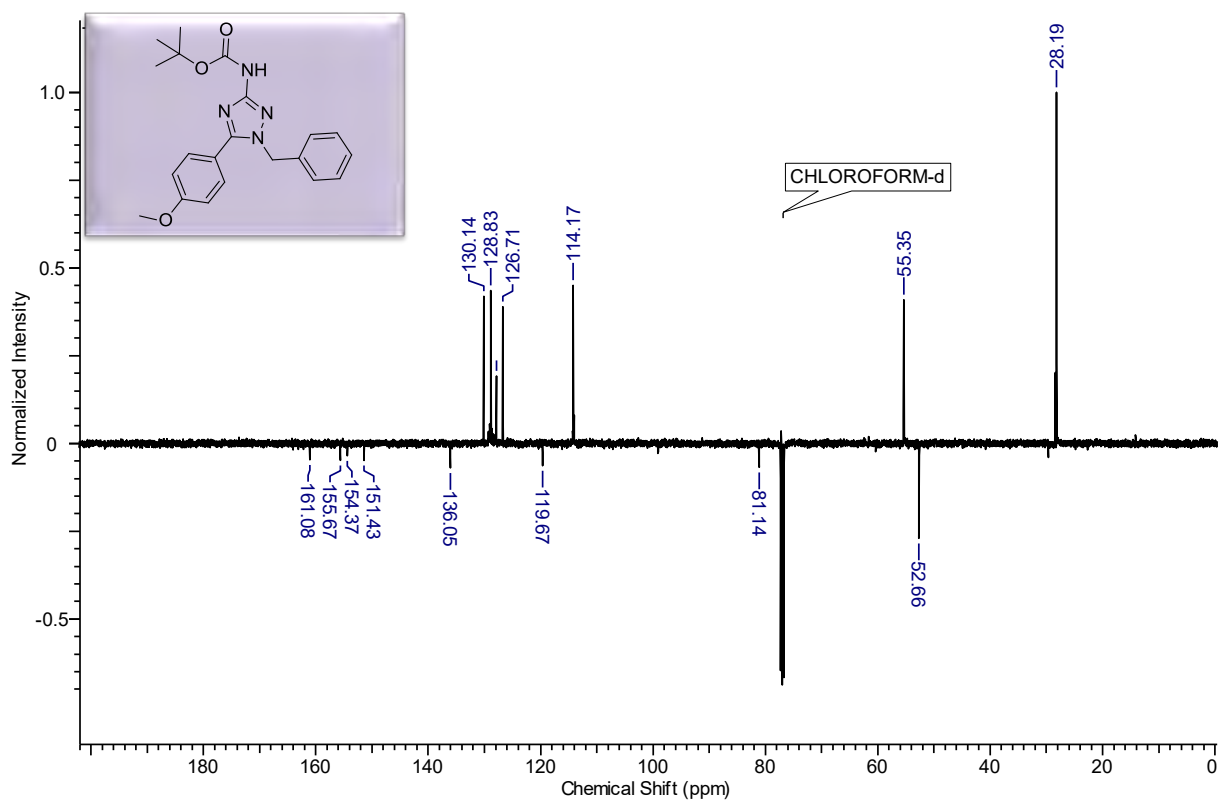
Anexo 66. Espectro de RMN ^{13}C do produto (**96u**) em CDCl_3 à 125MHz.



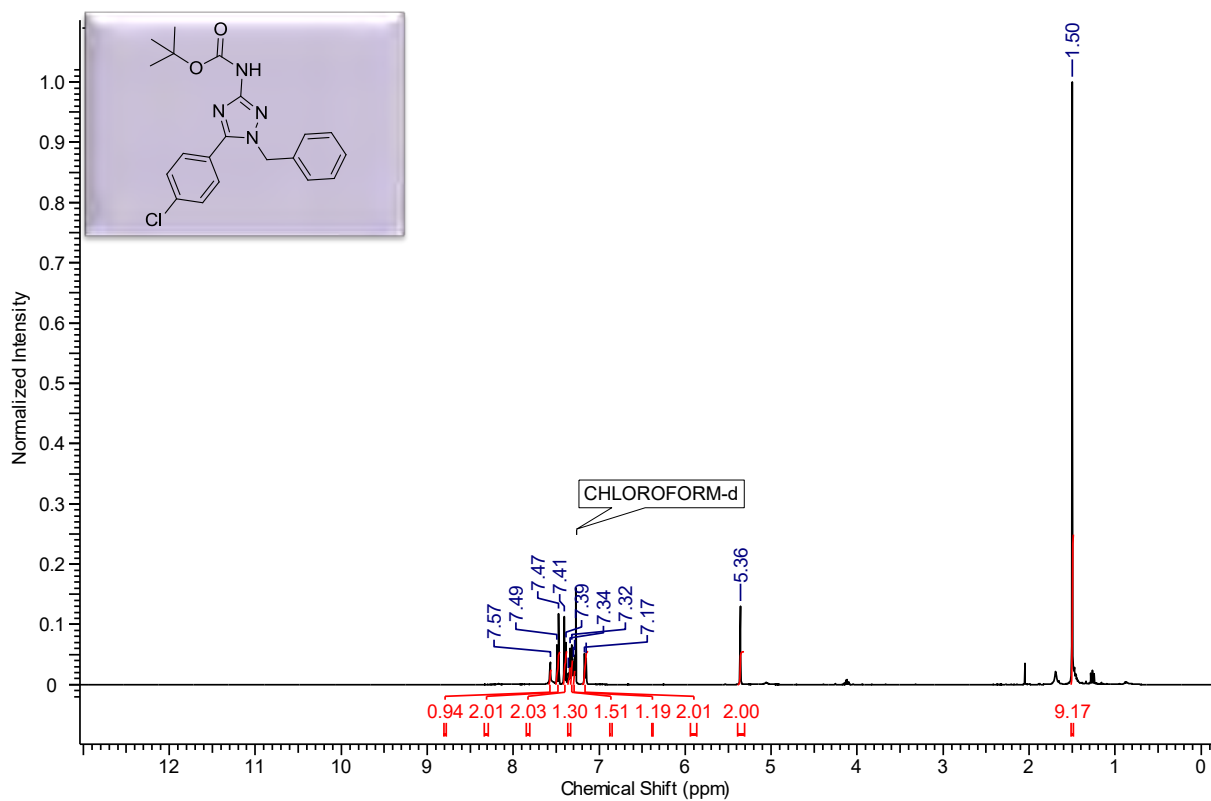
Anexo 67. Espectro de RMN ^1H do composto (**96y**) em CDCl_3 à 400MHz.



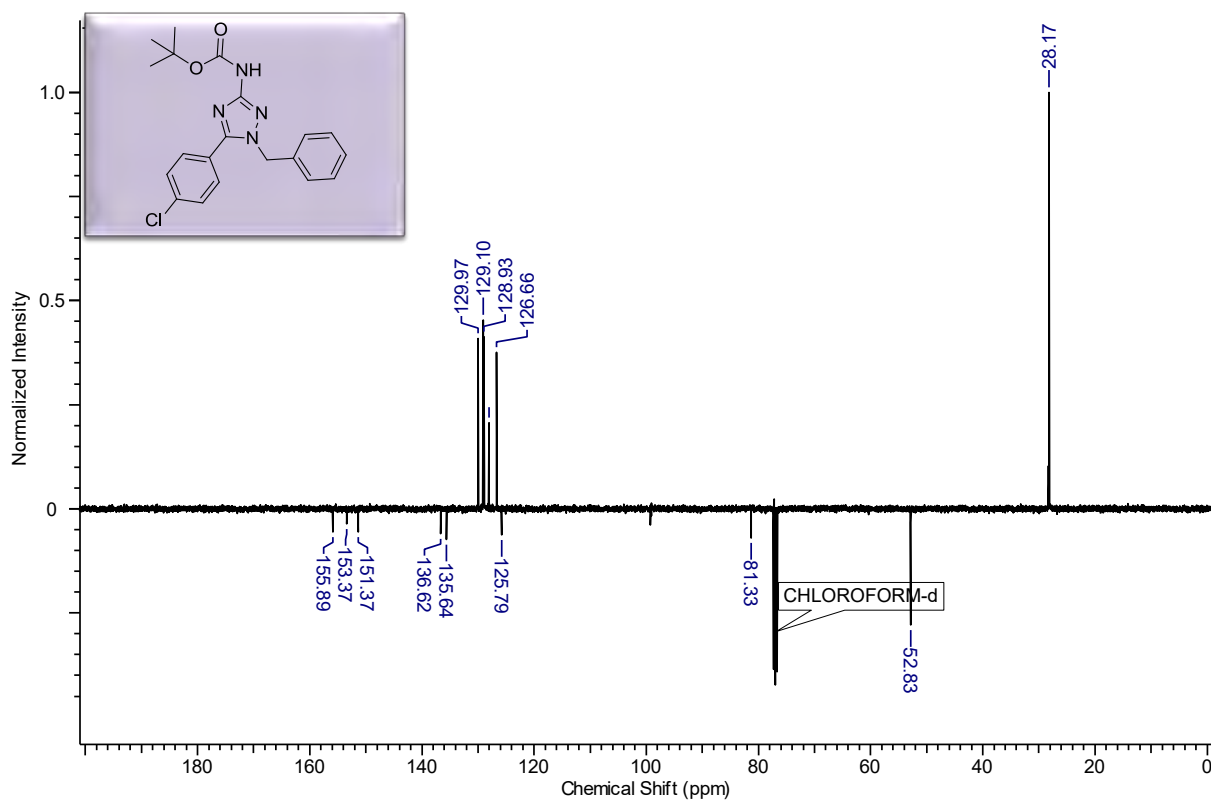
Anexo 68. Espectro de RMN ^{13}C do produto (**96y**) em CDCl_3 à 100MHz.



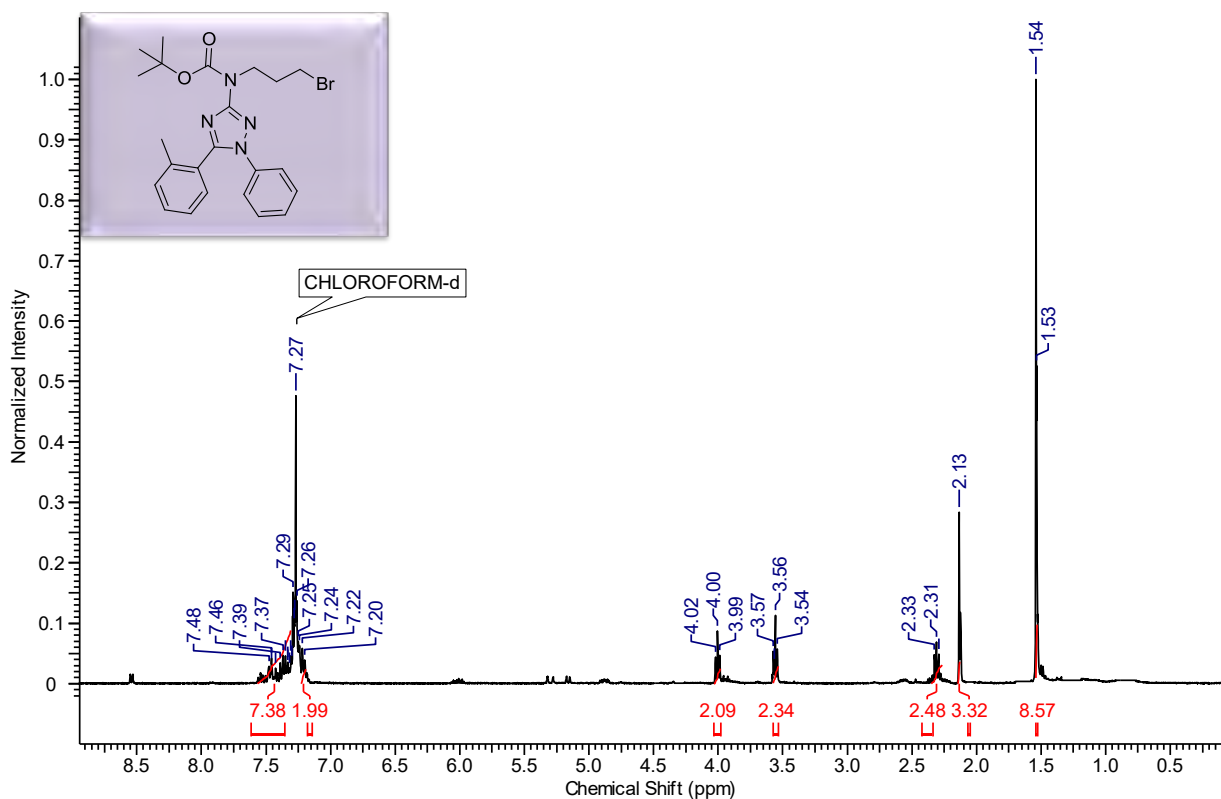
Anexo 69. Espectro de RMN ^1H do composto (**96z**) em CDCl_3 à 400MHz.



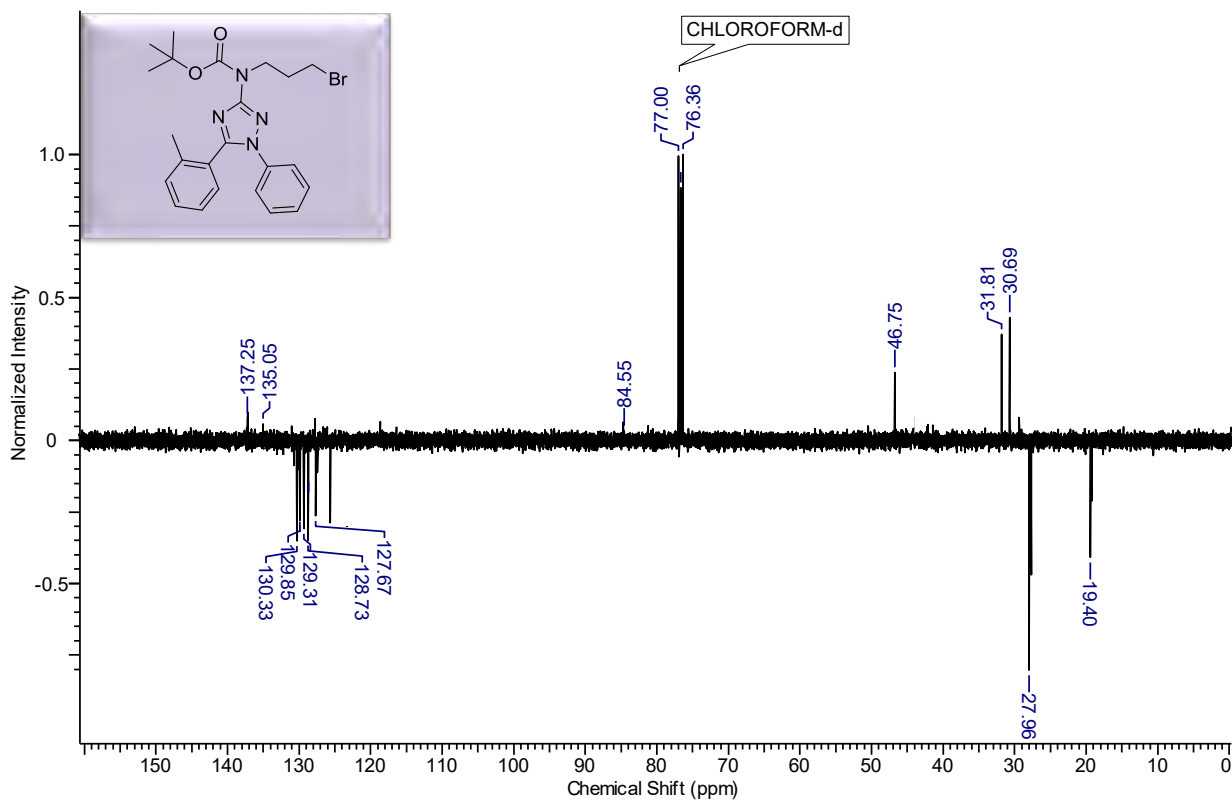
Anexo 70. Espectro de RMN ^{13}C do produto (**96z**) em CDCl_3 à 100MHz.



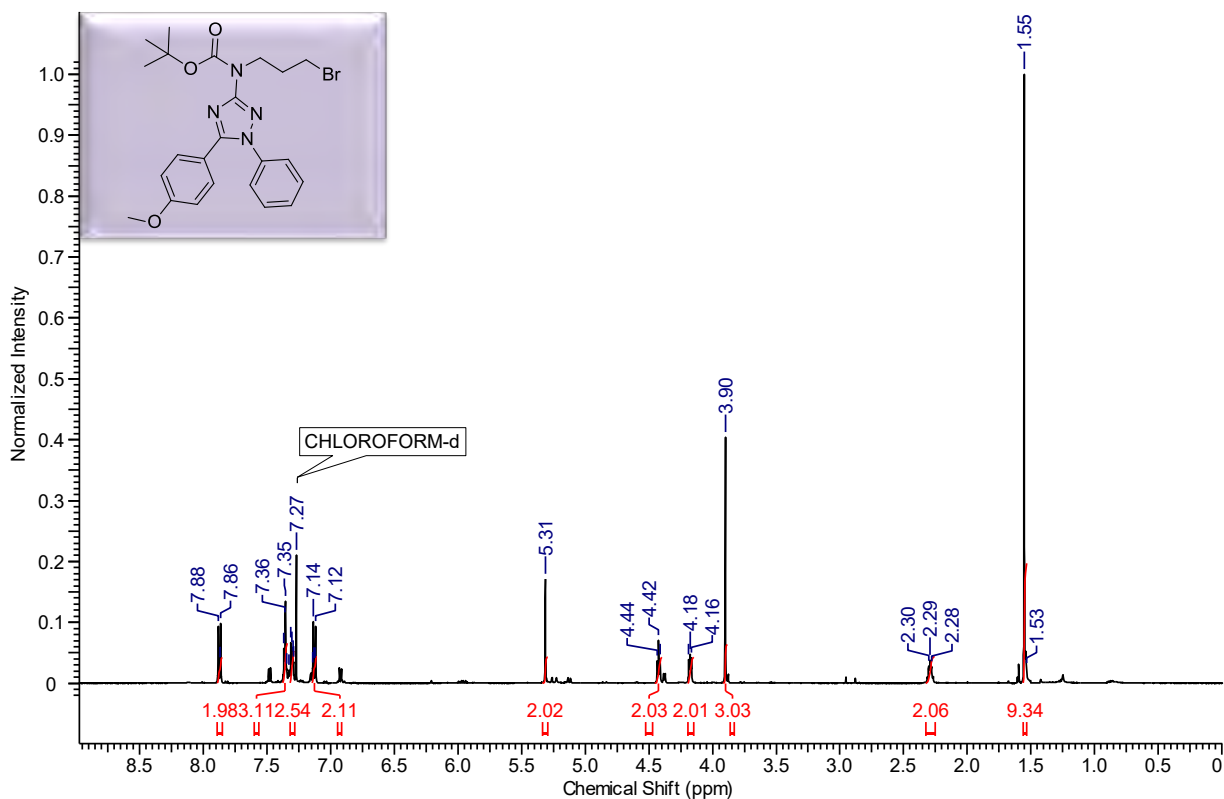
Anexo 71. Espectro de RMN ^1H do composto (92b) em CDCl_3 à 500MHz.



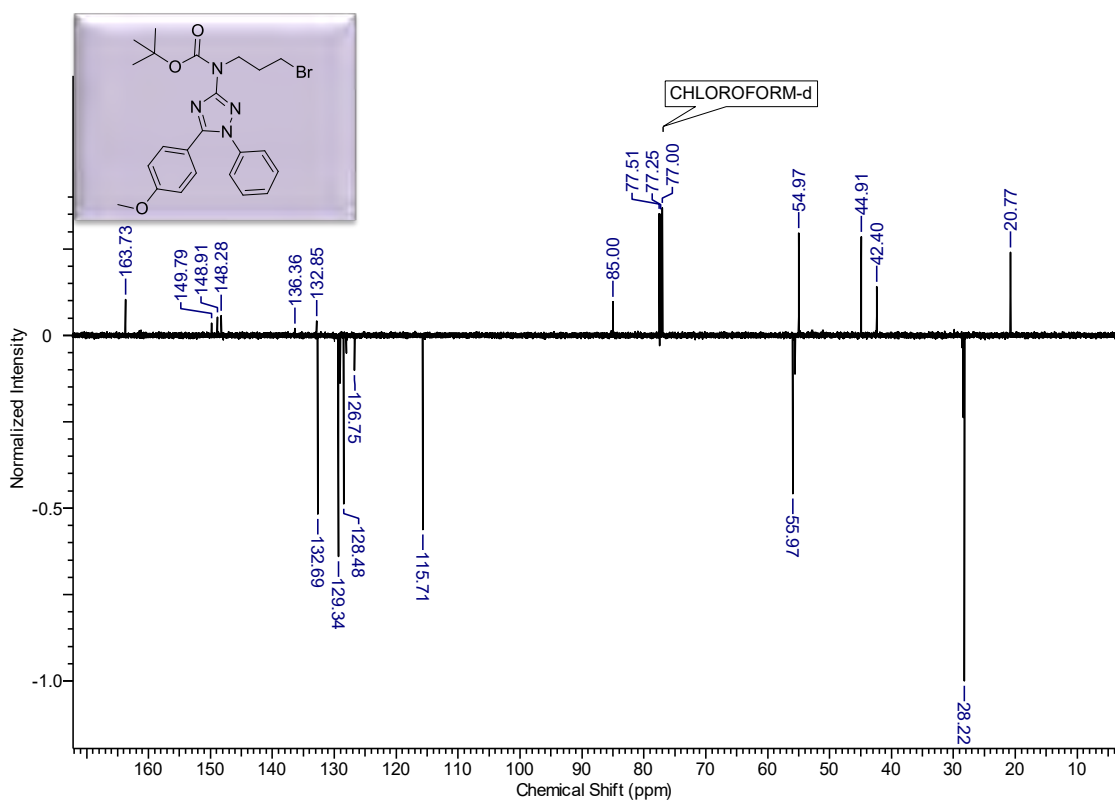
Anexo 72. Espectro de RMN ^{13}C do produto (92b) em CDCl_3 à 125MHz.



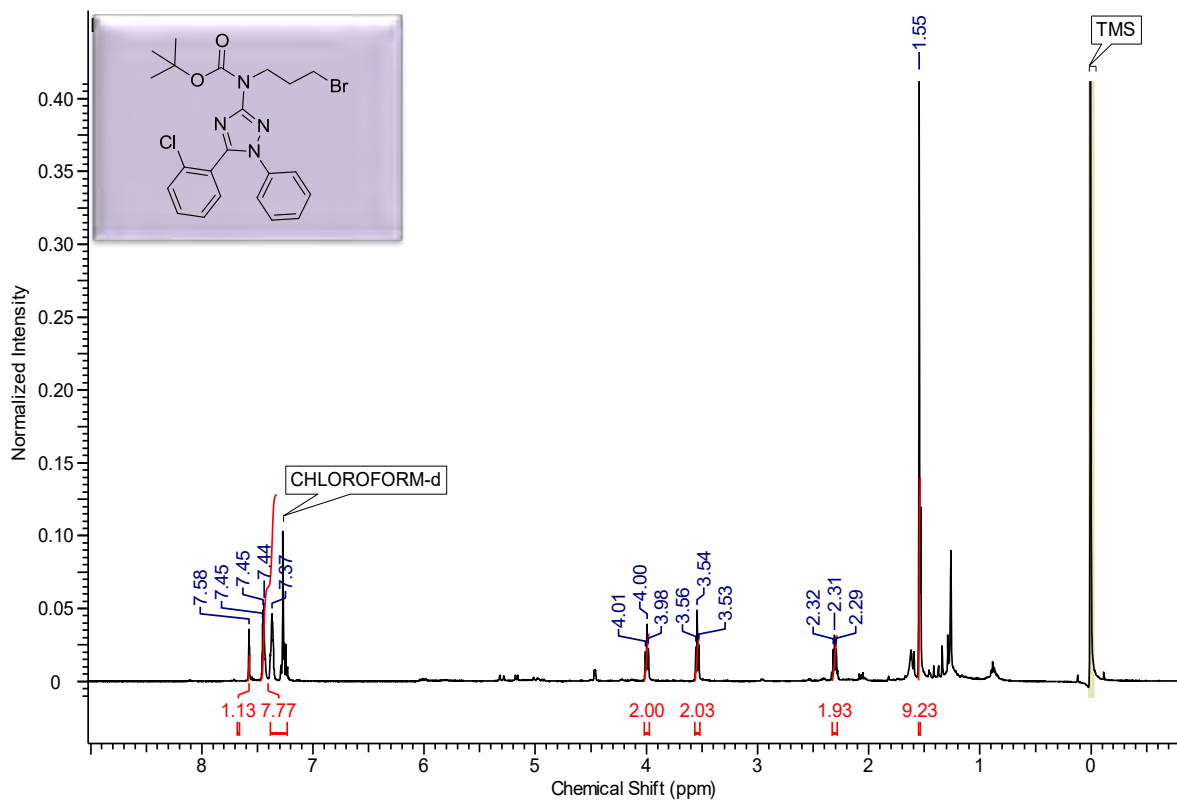
Anexo 73. Espectro de RMN ^1H do composto (92d) em CDCl_3 à 500MHz.



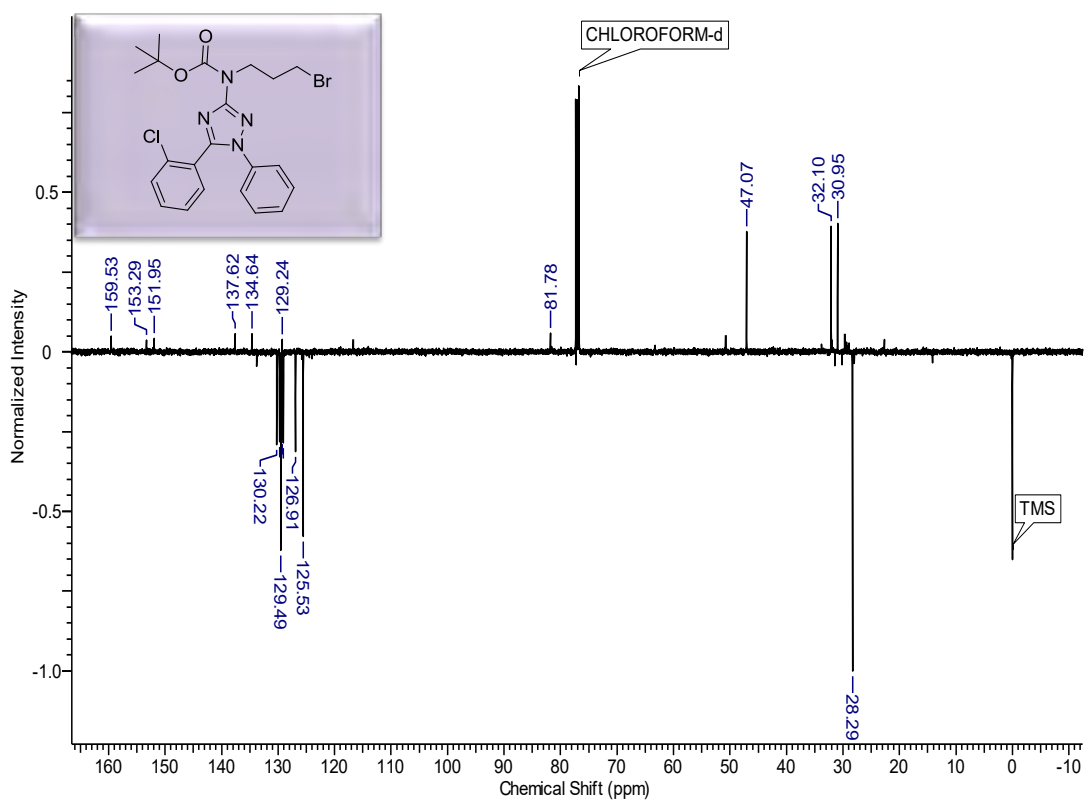
Anexo 74. Espectro de RMN ^{13}C do produto (92d) em CDCl_3 à 125MHz.



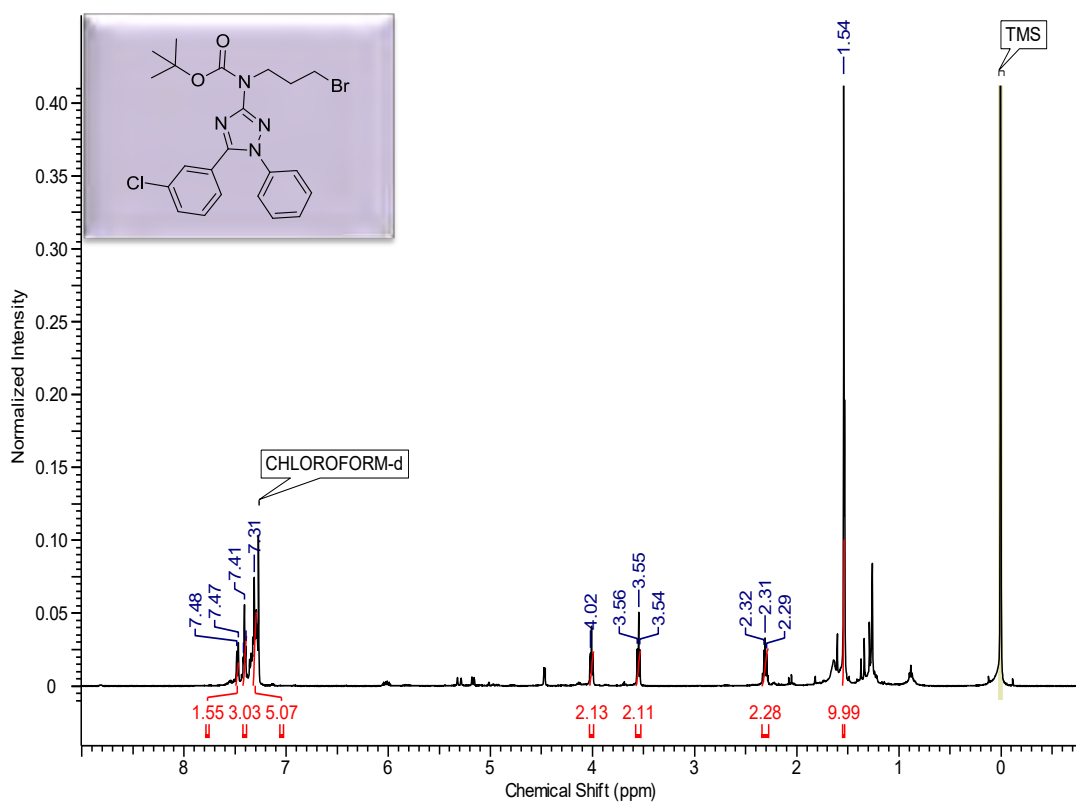
Anexo 75. Espectro de RMN ^1H do composto (92g) em CDCl_3 à 500MHz.



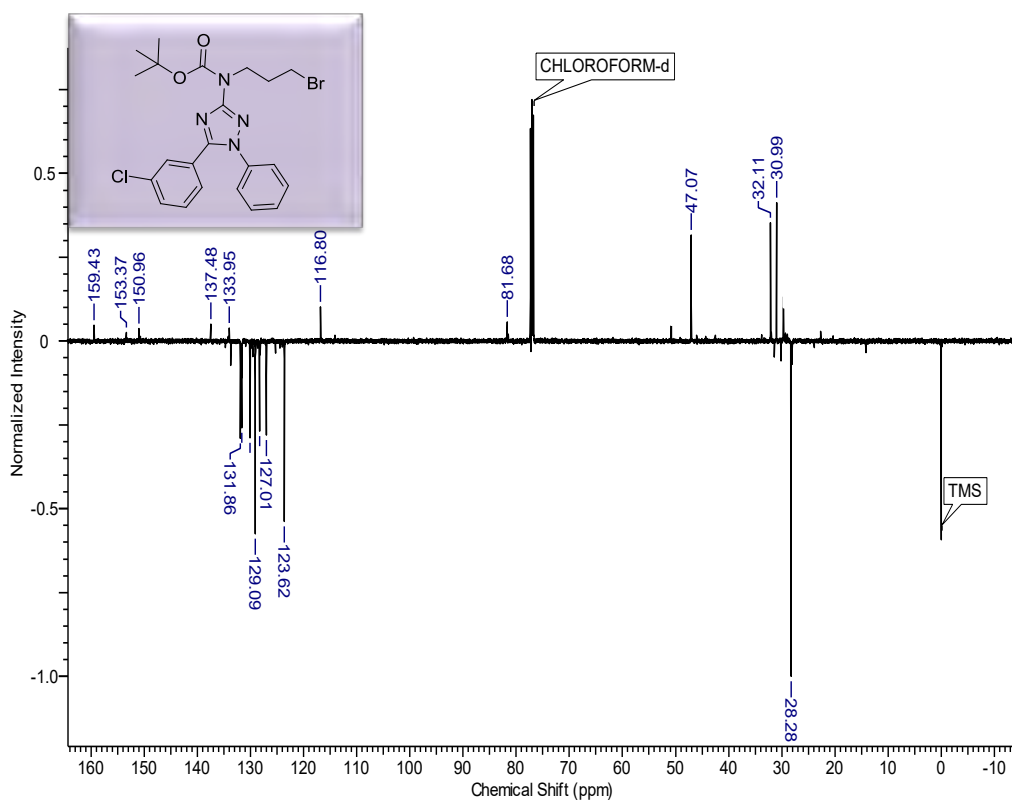
Anexo 76. Espectro de RMN ^{13}C do produto (92g) em CDCl_3 à 125MHz.



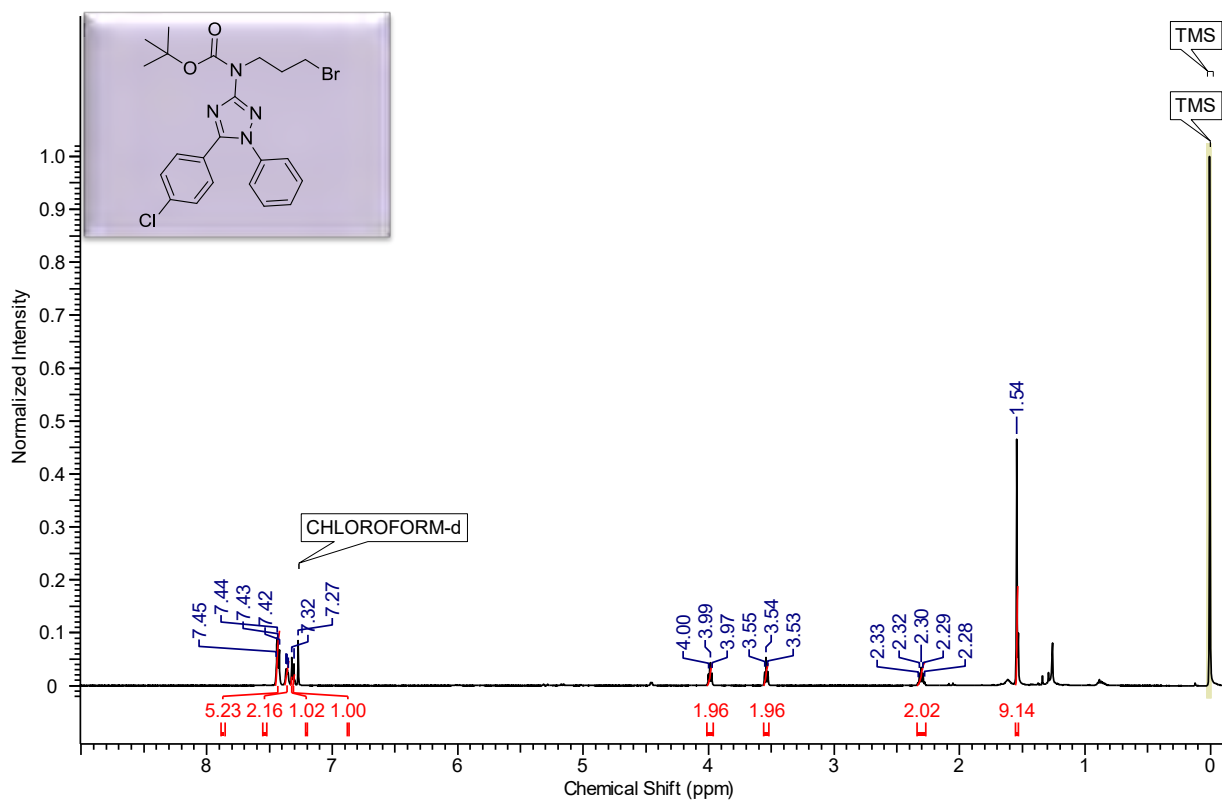
Anexo 77. Espectro de RMN ^1H do composto (92h) em CDCl_3 à 500MHz.



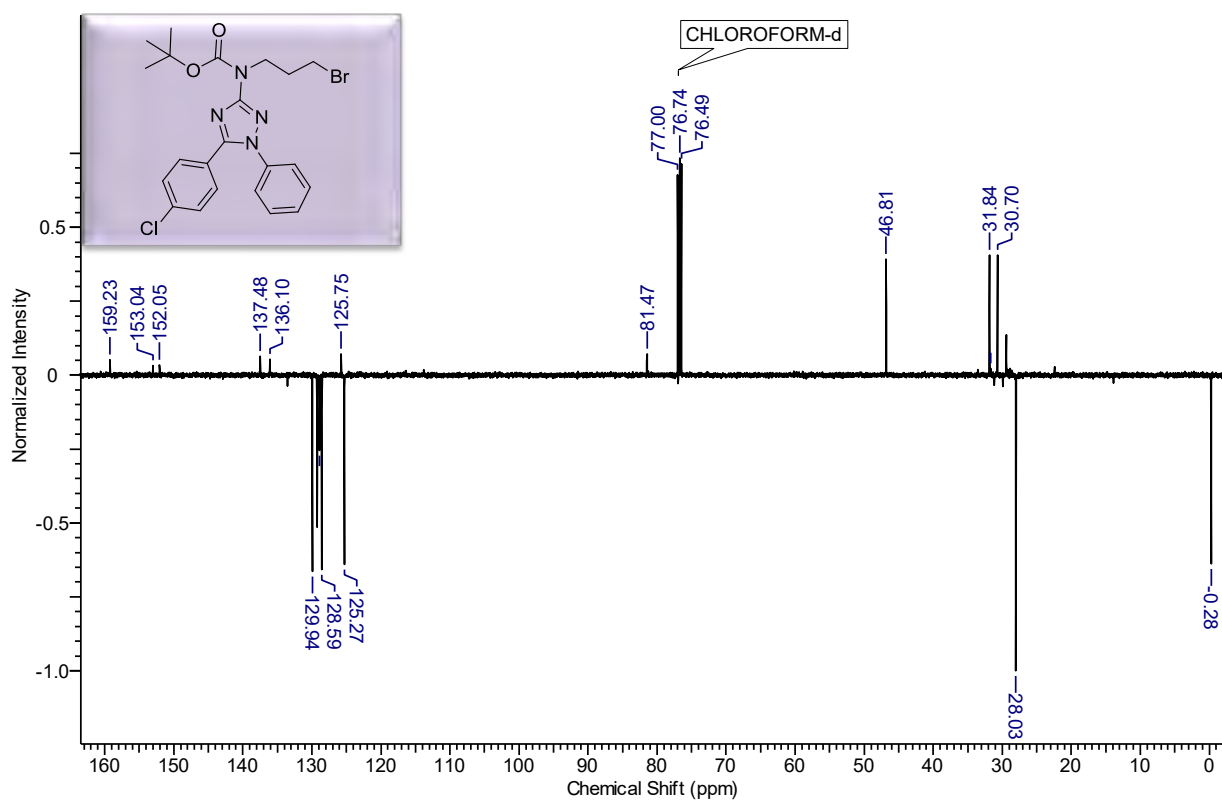
Anexo 78. Espectro de RMN ^{13}C do produto (92h) em CDCl_3 à 125MHz.



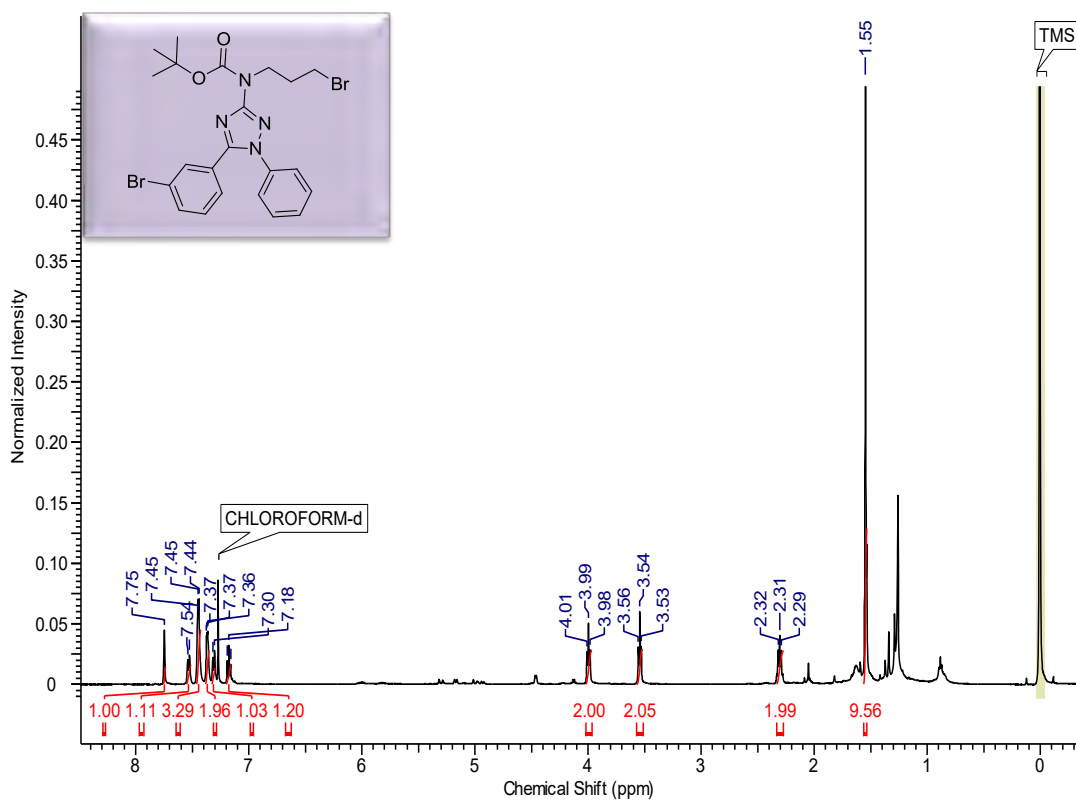
Anexo 79. Espectro de RMN ^1H do composto (92i) em CDCl_3 à 500MHz.



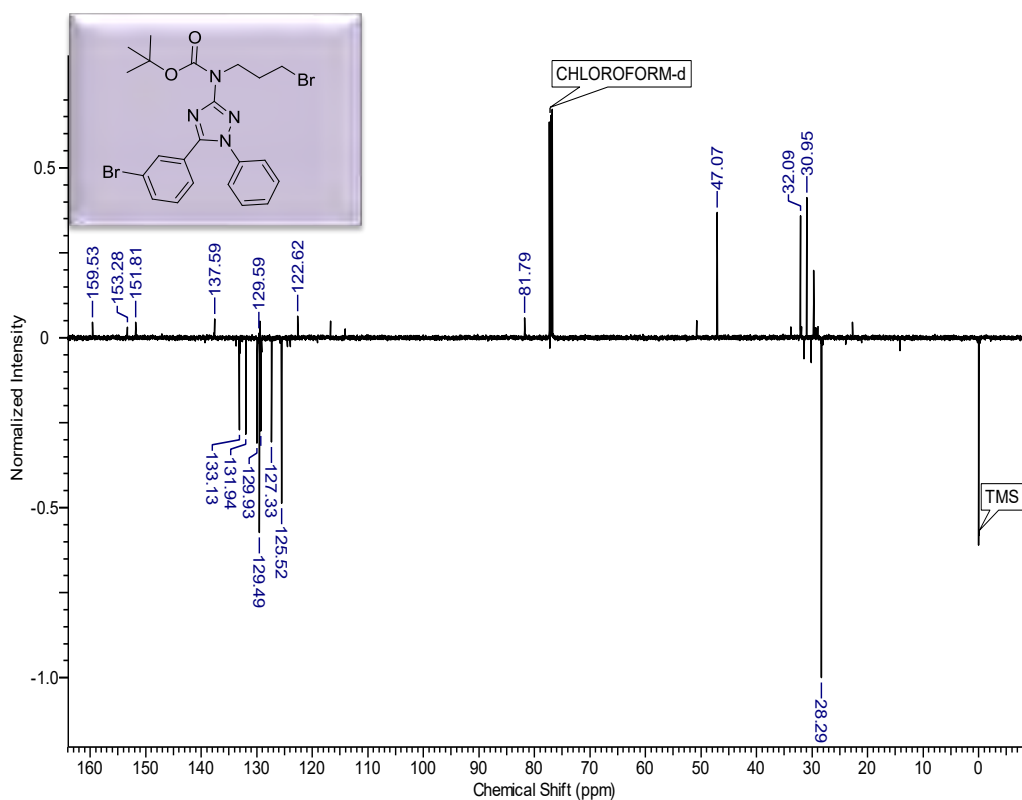
Anexo 80. Espectro de RMN ^{13}C do produto (92i) em CDCl_3 à 125MHz.



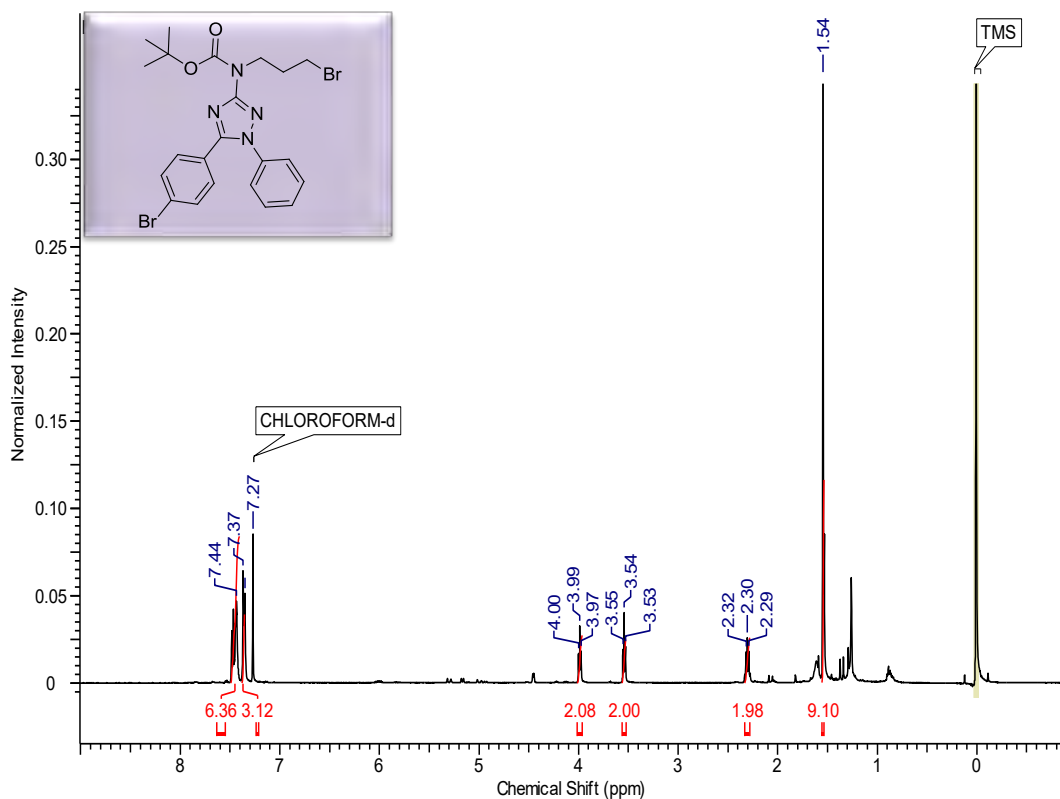
Anexo 81. Espectro de RMN ^1H do composto (92j) em CDCl_3 à 500MHz.



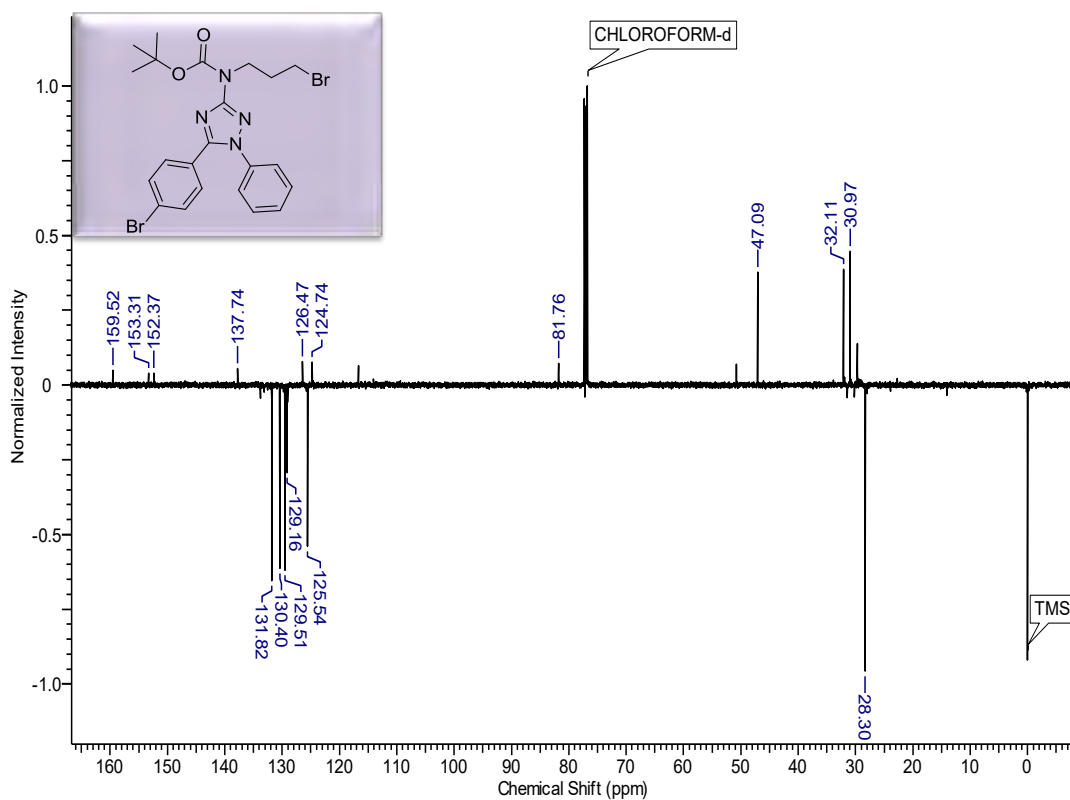
Anexo 82. Espectro de RMN ^{13}C do produto (92j) em CDCl_3 à 125MHz.



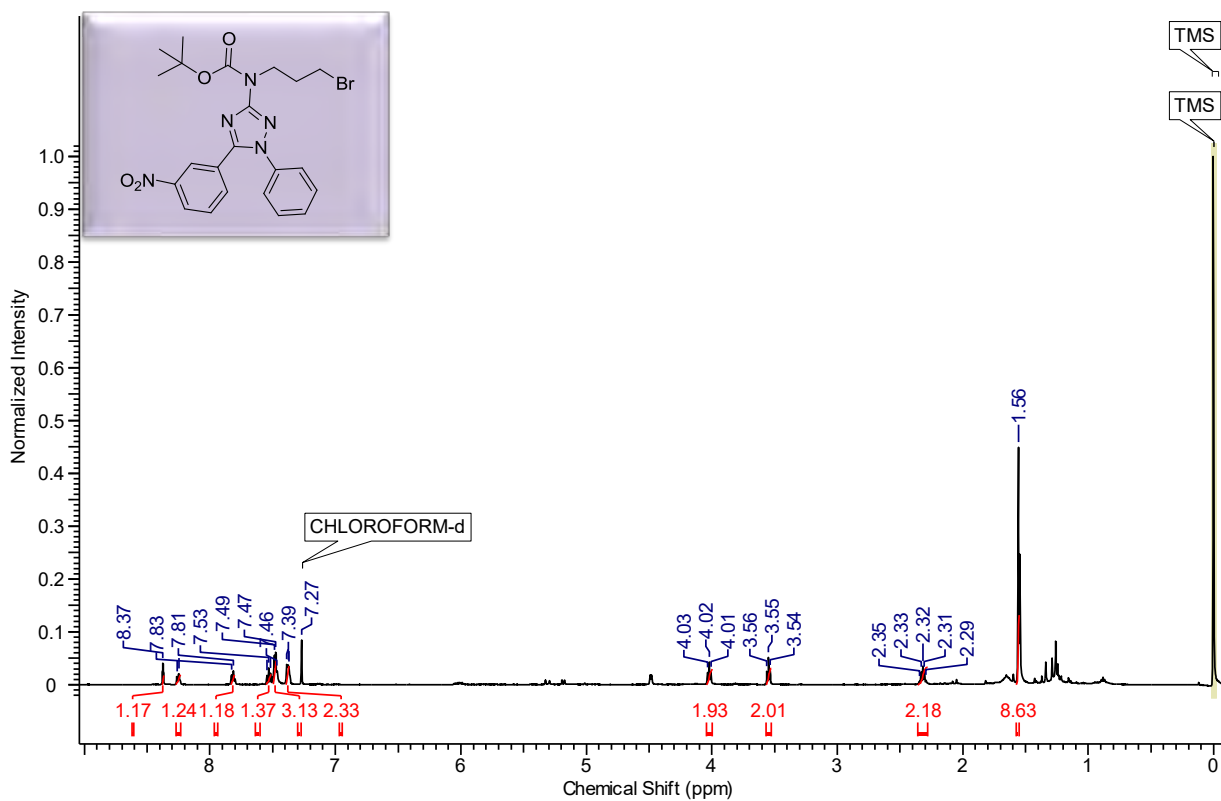
Anexo 83. Espectro de RMN ^1H do composto (92k) em CDCl_3 à 500MHz.



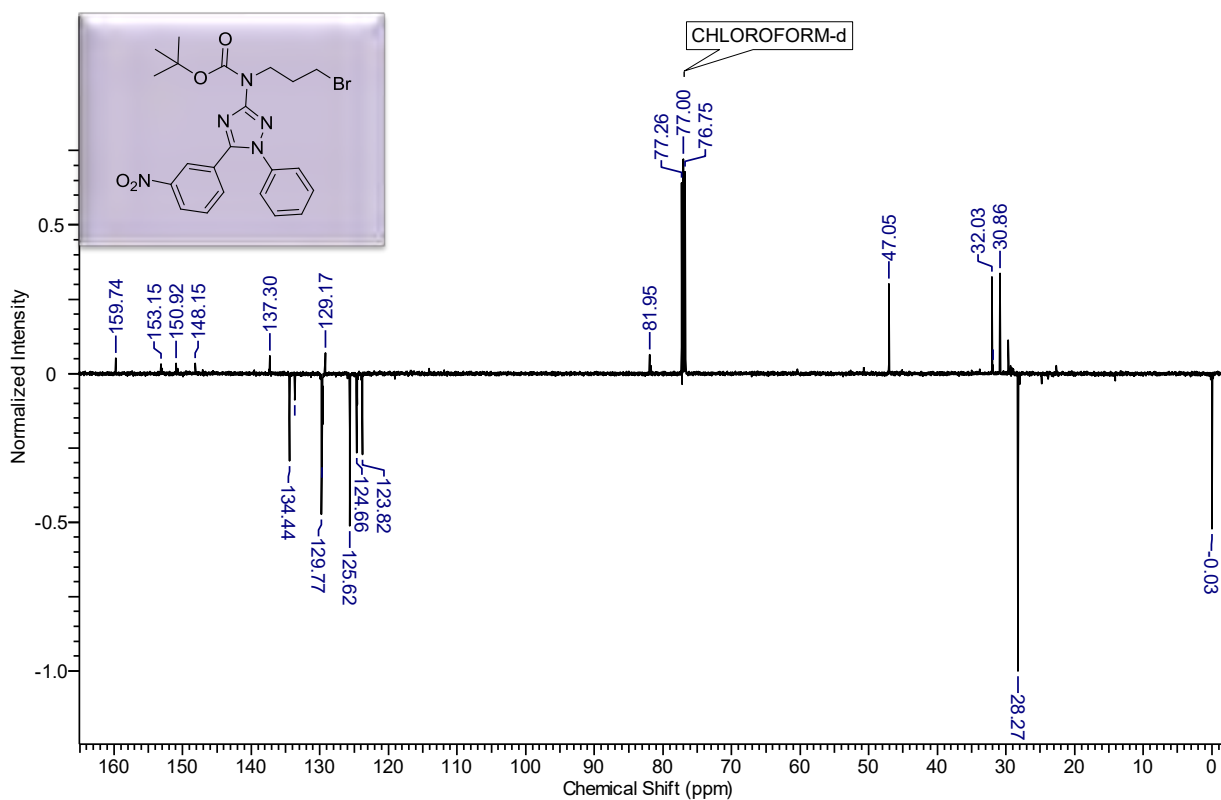
Anexo 84. Espectro de RMN ^{13}C do produto (92k) em CDCl_3 à 125MHz.



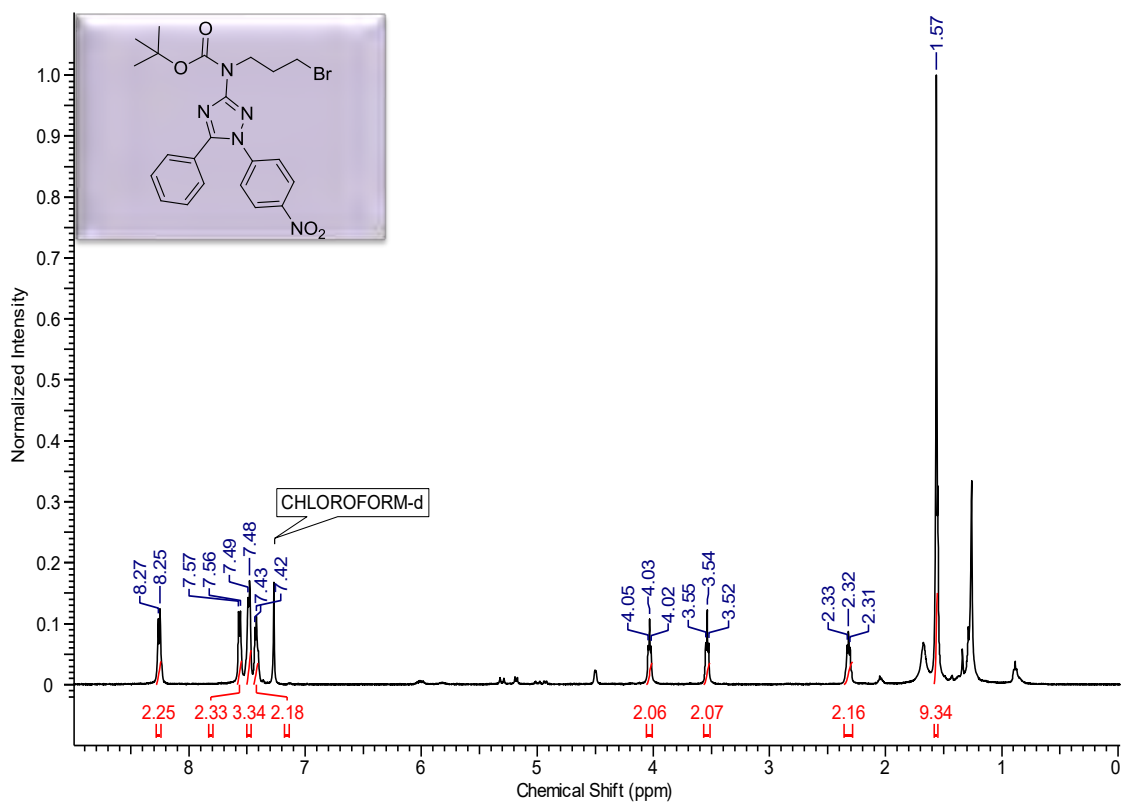
Anexo 85. Espectro de RMN ^1H do composto (92m) em CDCl_3 à 500MHz.



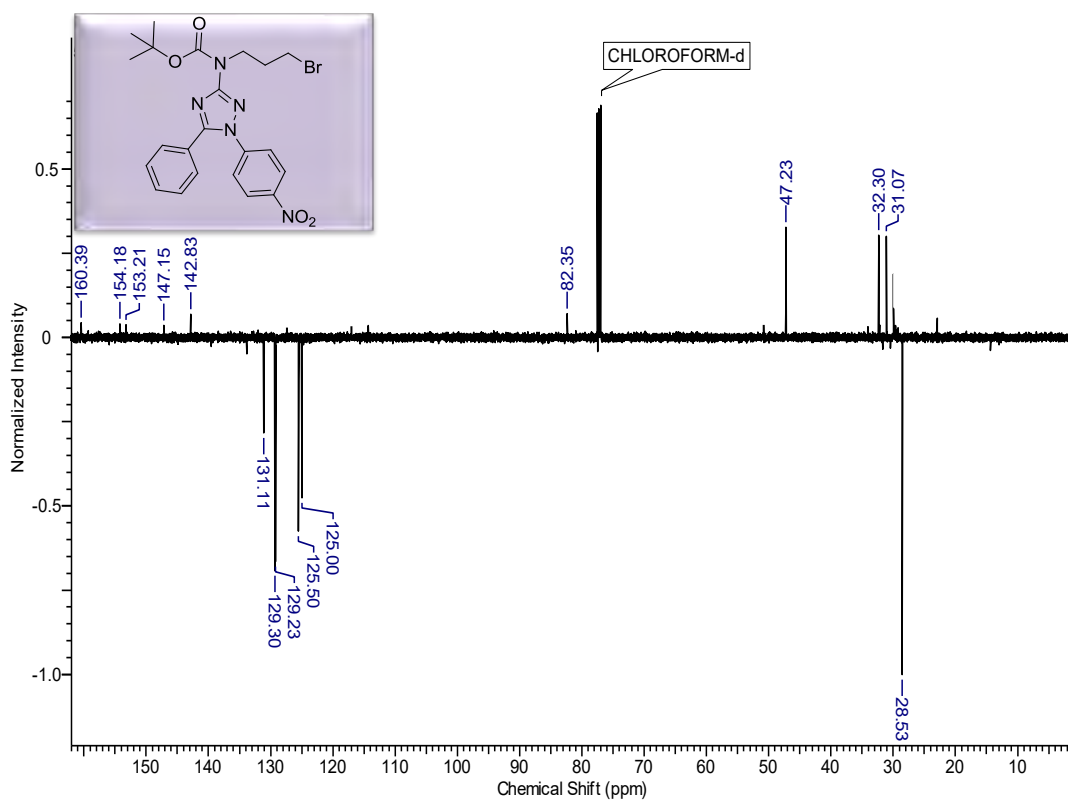
Anexo 86. Espectro de RMN ^{13}C do produto (92m) em CDCl_3 à 125MHz.



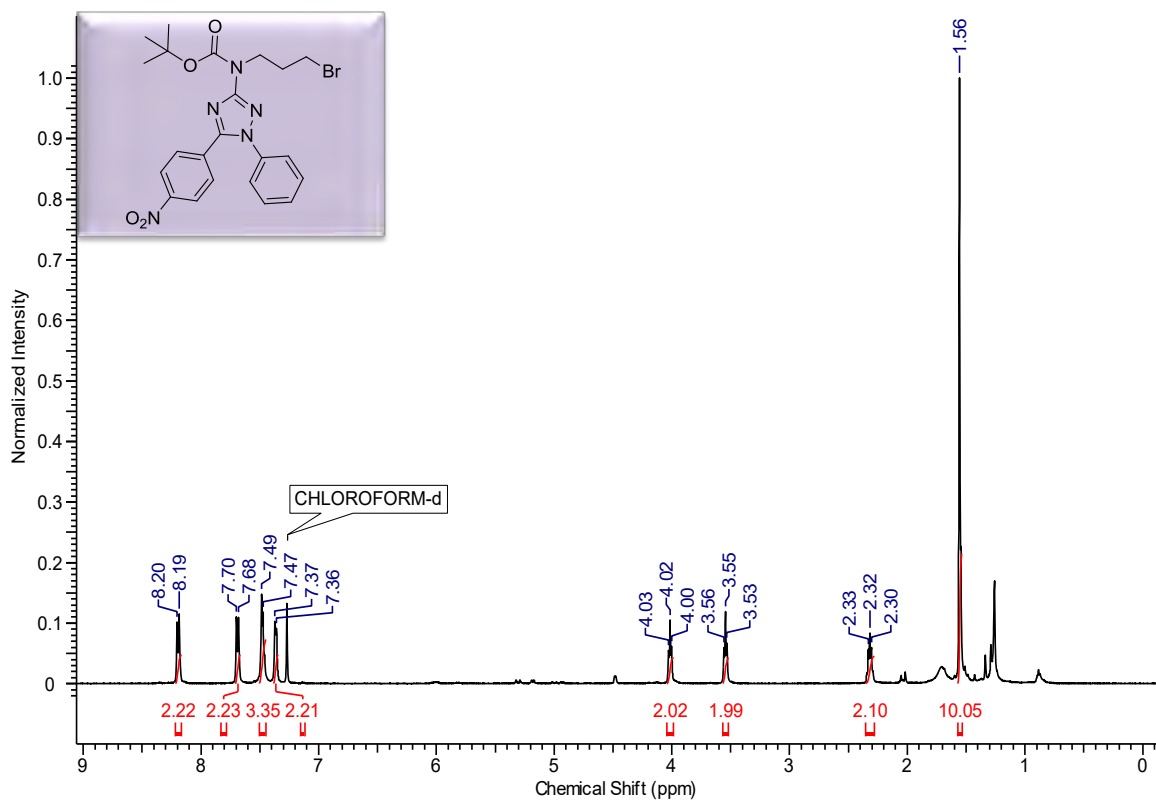
Anexo 87. Espectro de RMN ^1H do composto (92n) em CDCl_3 à 500MHz.



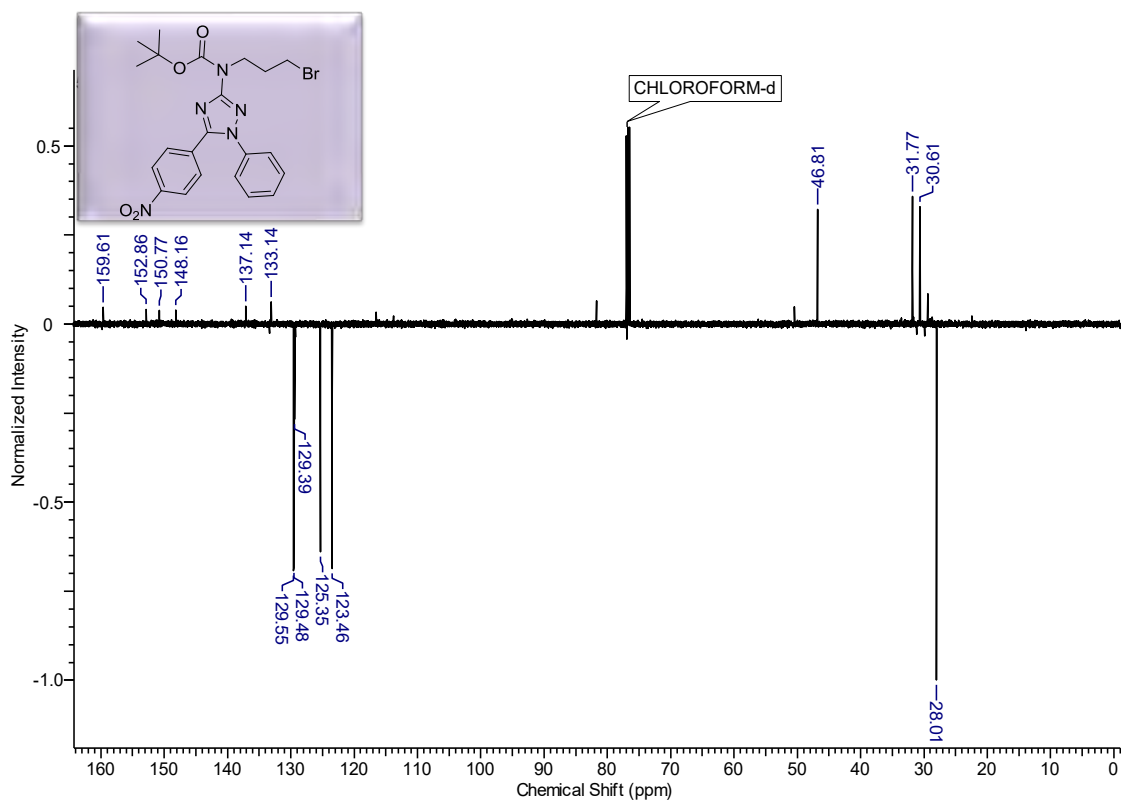
Anexo 88. Espectro de RMN ^{13}C do produto (92n) em CDCl_3 à 125MHz.



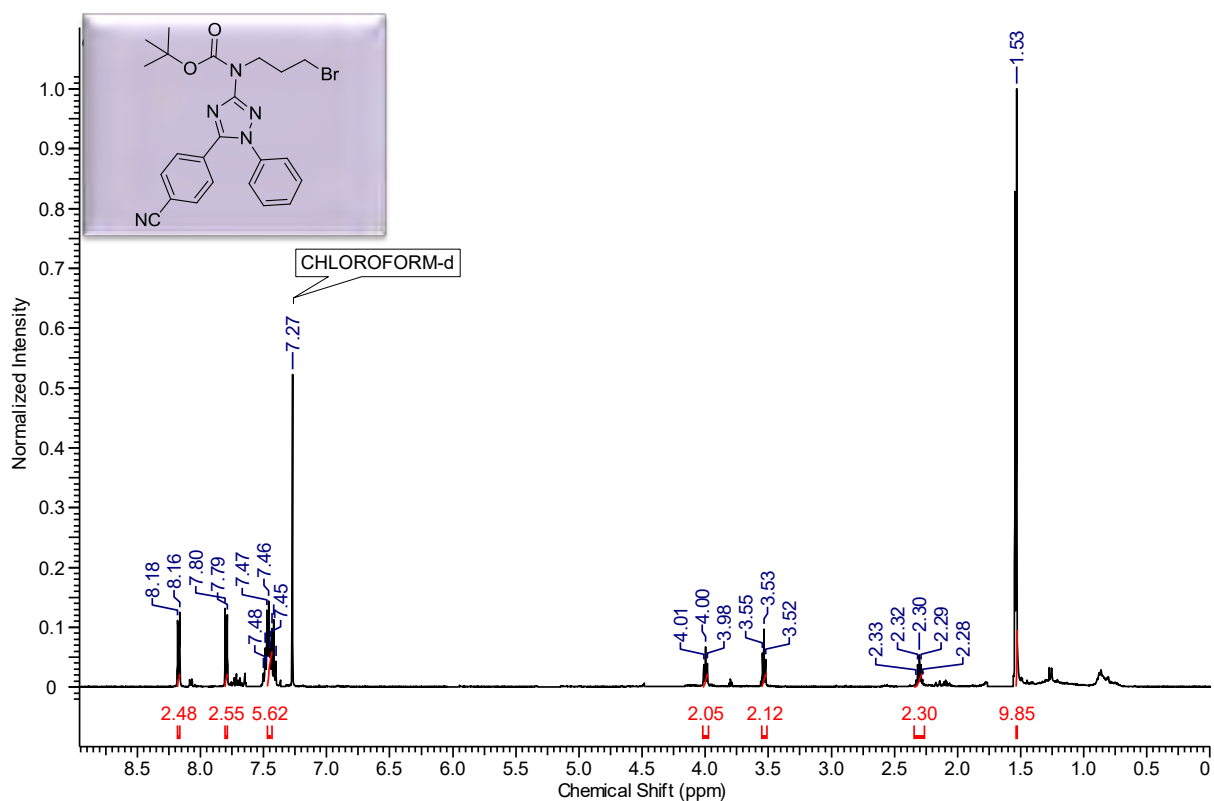
Anexo 89. Espectro de RMN ^1H do composto (92o) em CDCl_3 à 500MHz.



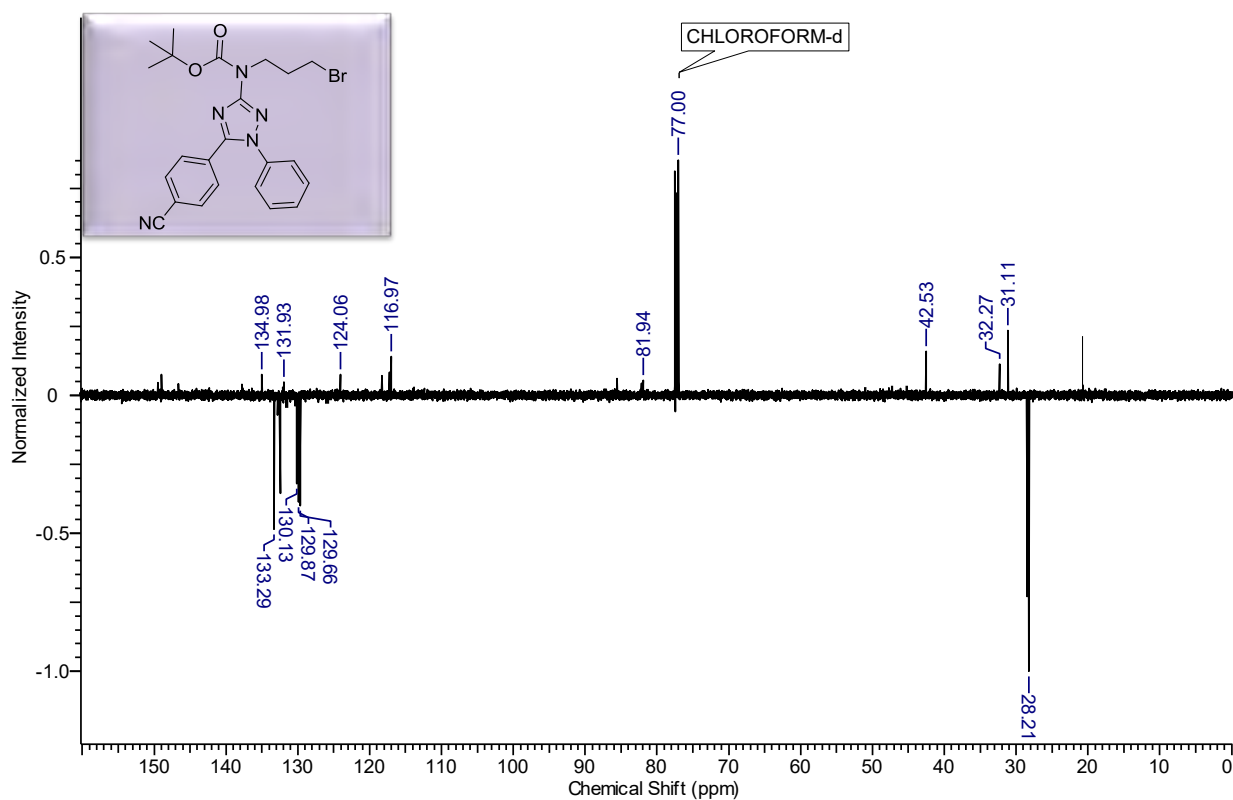
Anexo 90. Espectro de RMN ^{13}C do produto (92o) em CDCl_3 à 125MHz.



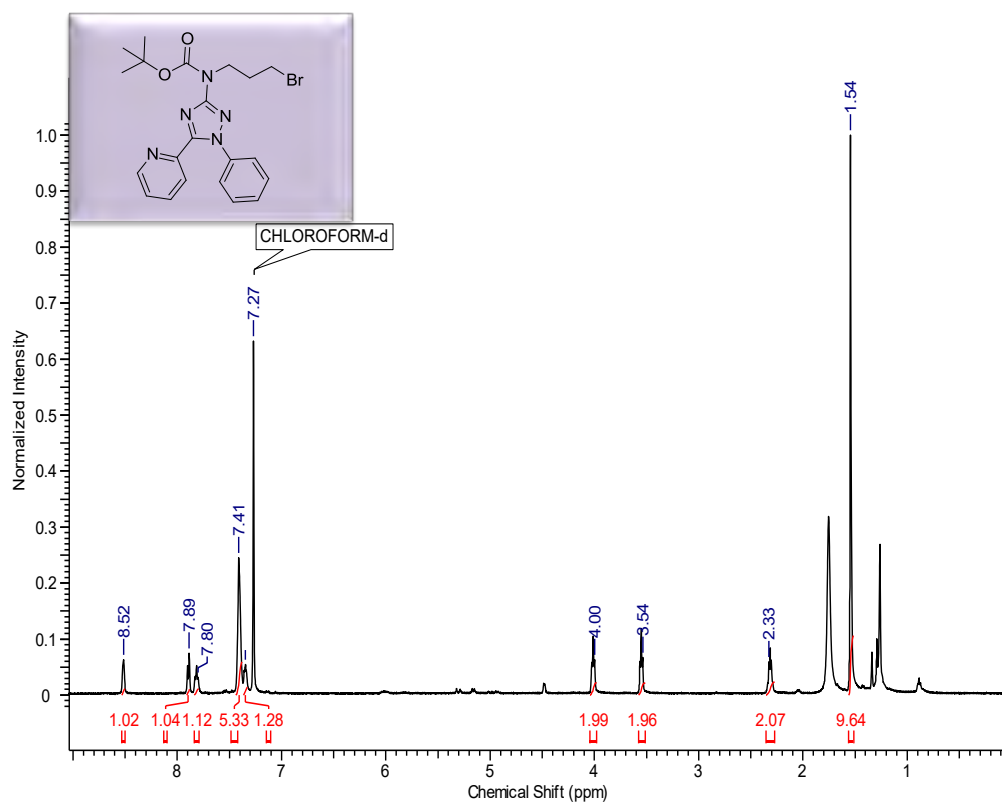
Anexo 91. Espectro de RMN ^1H do composto (92p) em CDCl_3 à 500MHz.



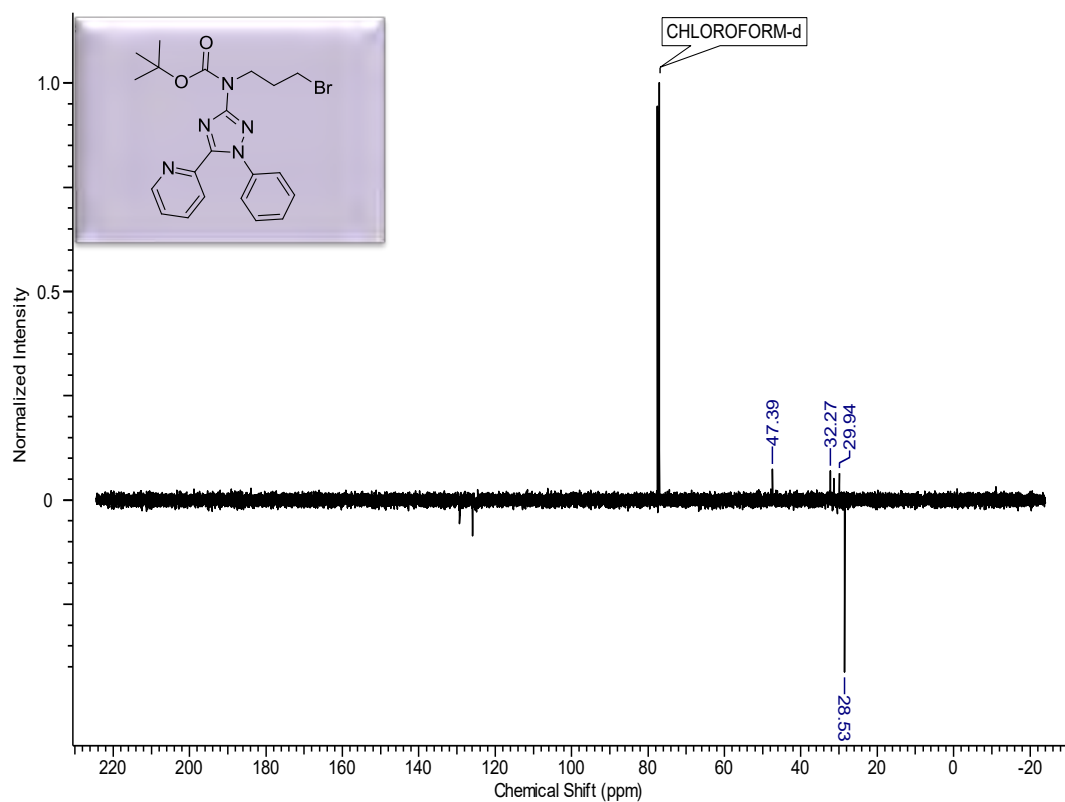
Anexo 92. Espectro de RMN ^{13}C do produto (92p) em CDCl_3 à 125MHz.



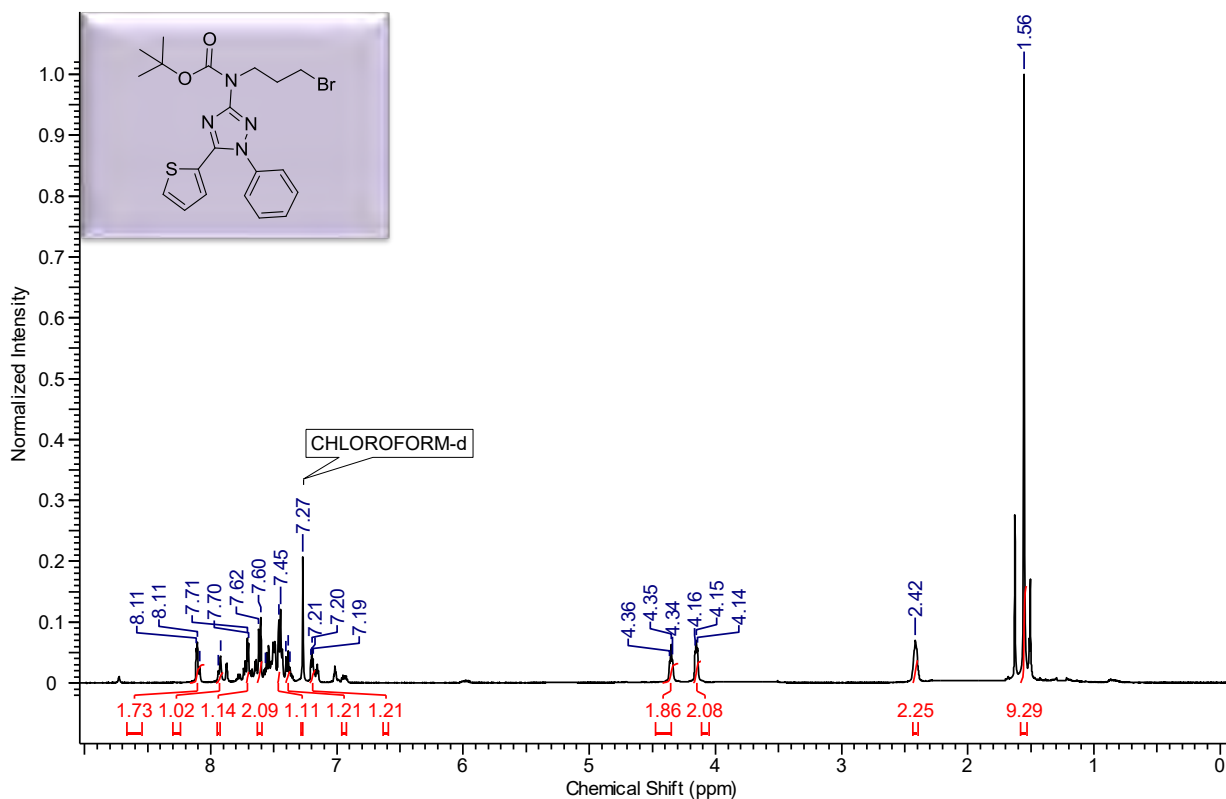
Anexo 93. Espectro de RMN ^1H do composto (92q) em CDCl_3 à 500MHz.



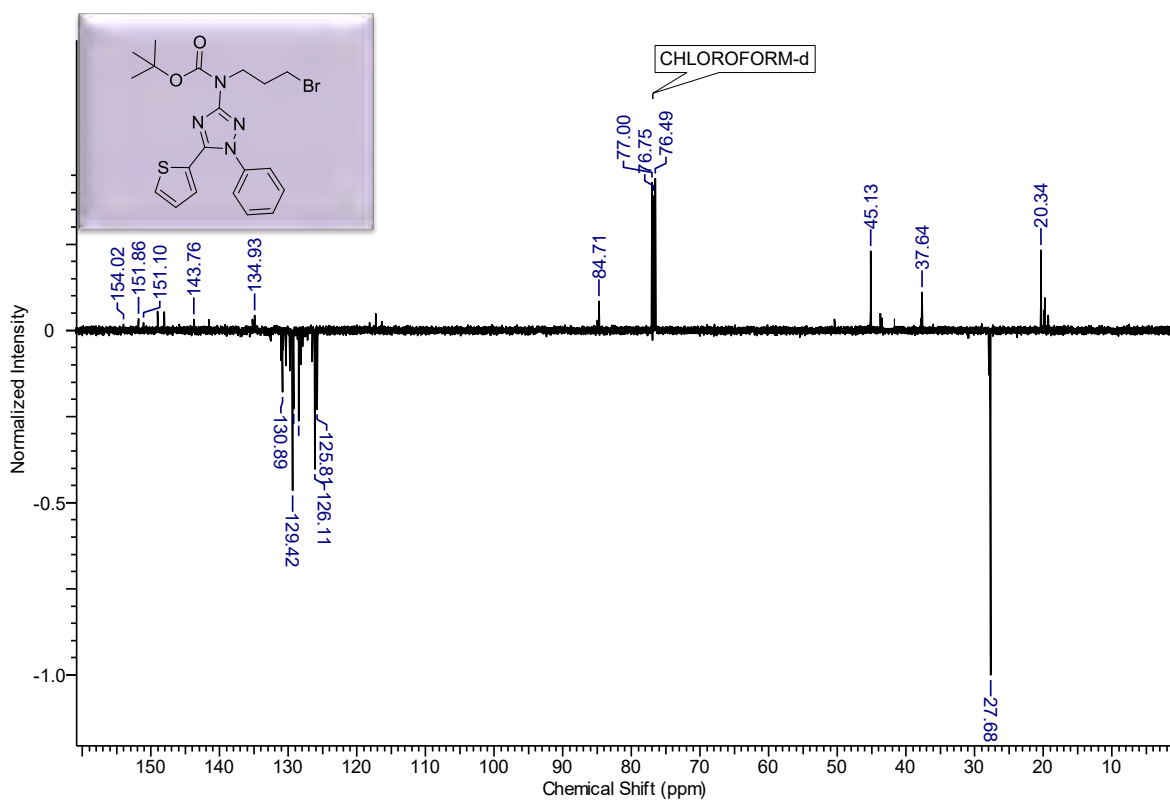
Anexo 94. Espectro de RMN ^{13}C do produto (92q) em CDCl_3 à 125MHz.



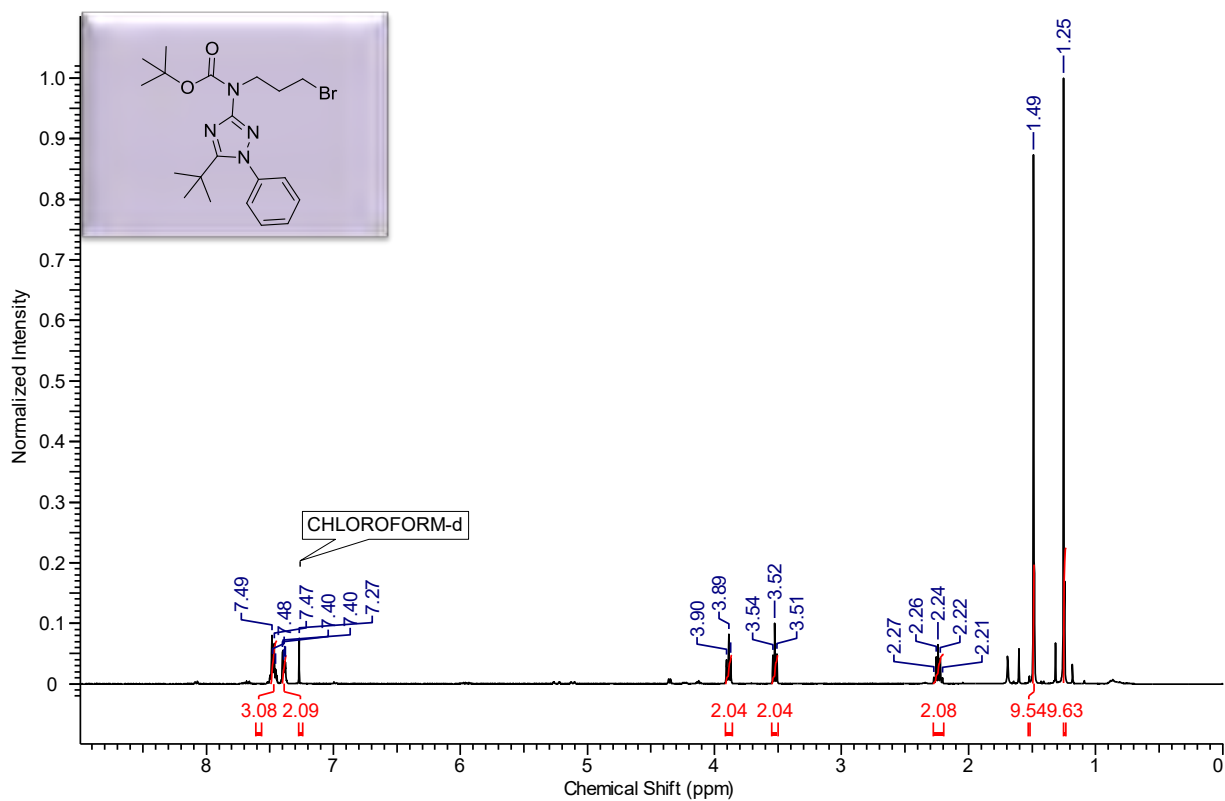
Anexo 95. Espectro de RMN ^1H do composto (92s) em CDCl_3 à 500MHz.



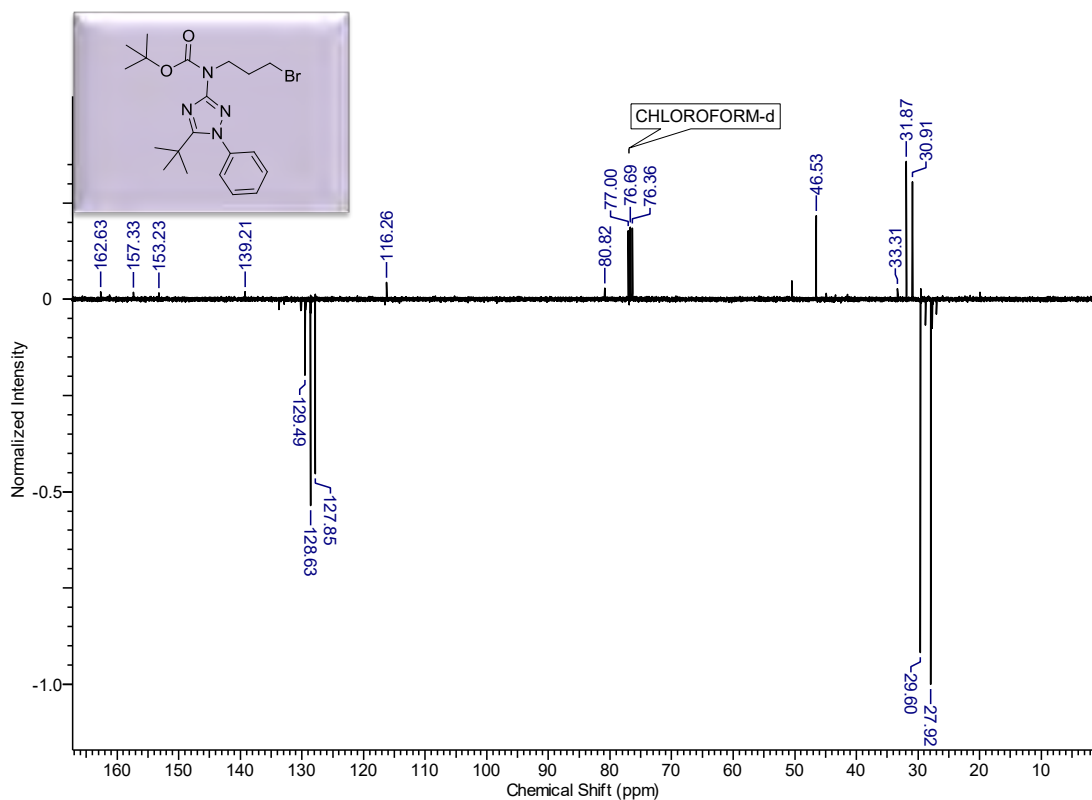
Anexo 96. Espectro de RMN ^{13}C do produto (92s) em CDCl_3 à 125MHz.



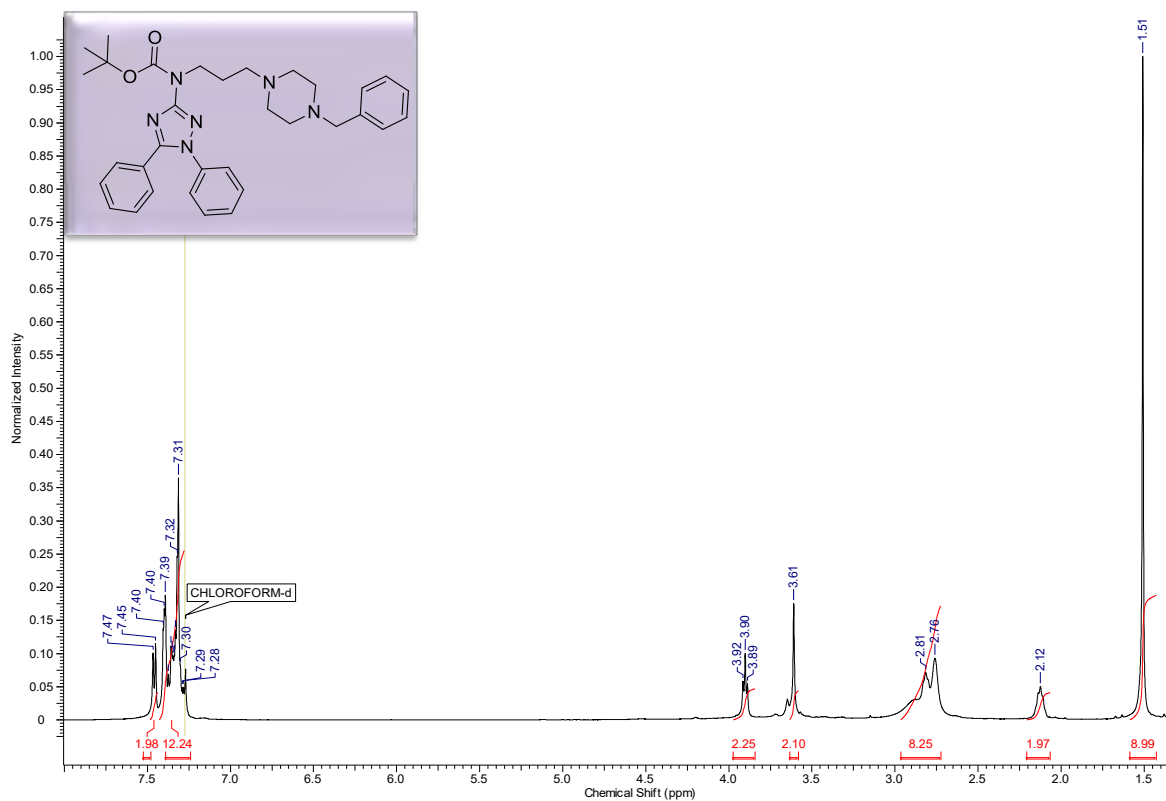
Anexo 97. Espectro de RMN ^1H do composto (92t) em CDCl_3 à 500MHz.



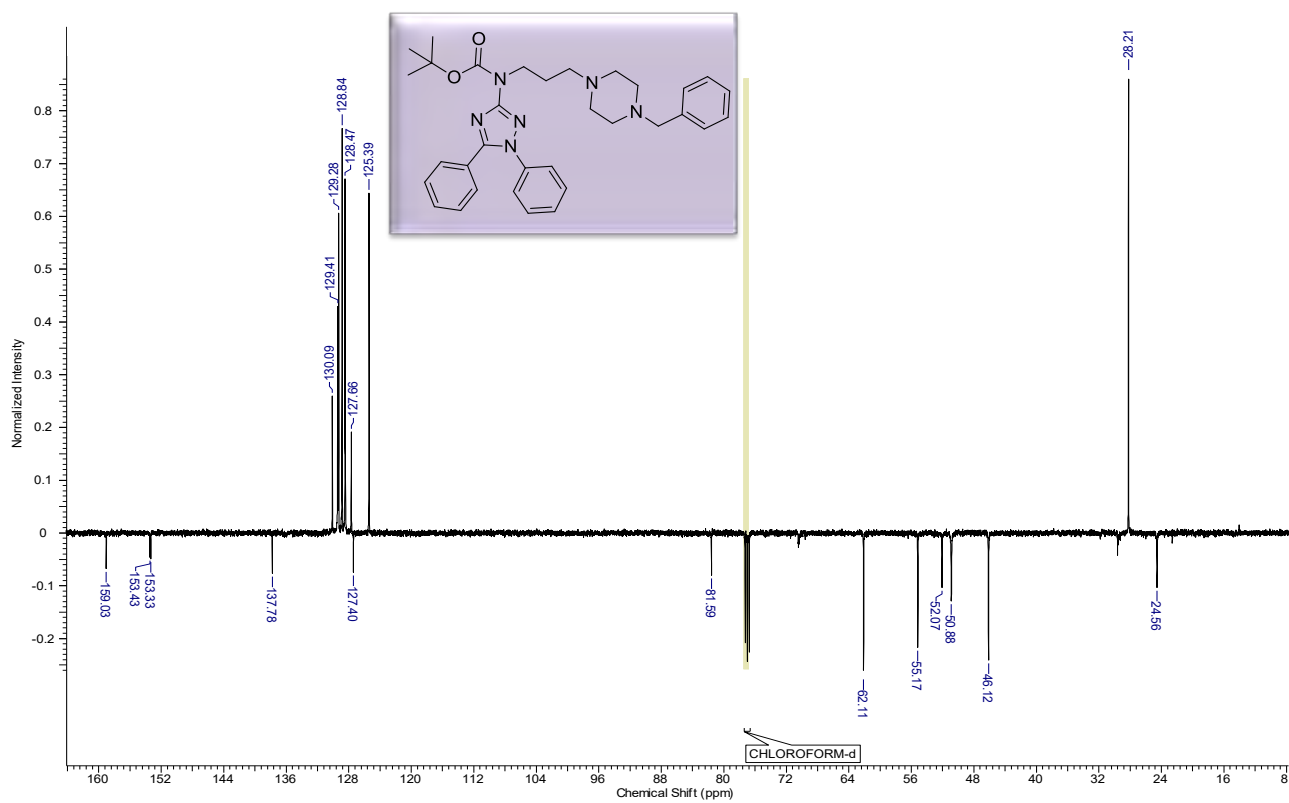
Anexo 98. Espectro de RMN ^{13}C do produto (92t) em CDCl_3 à 125MHz.



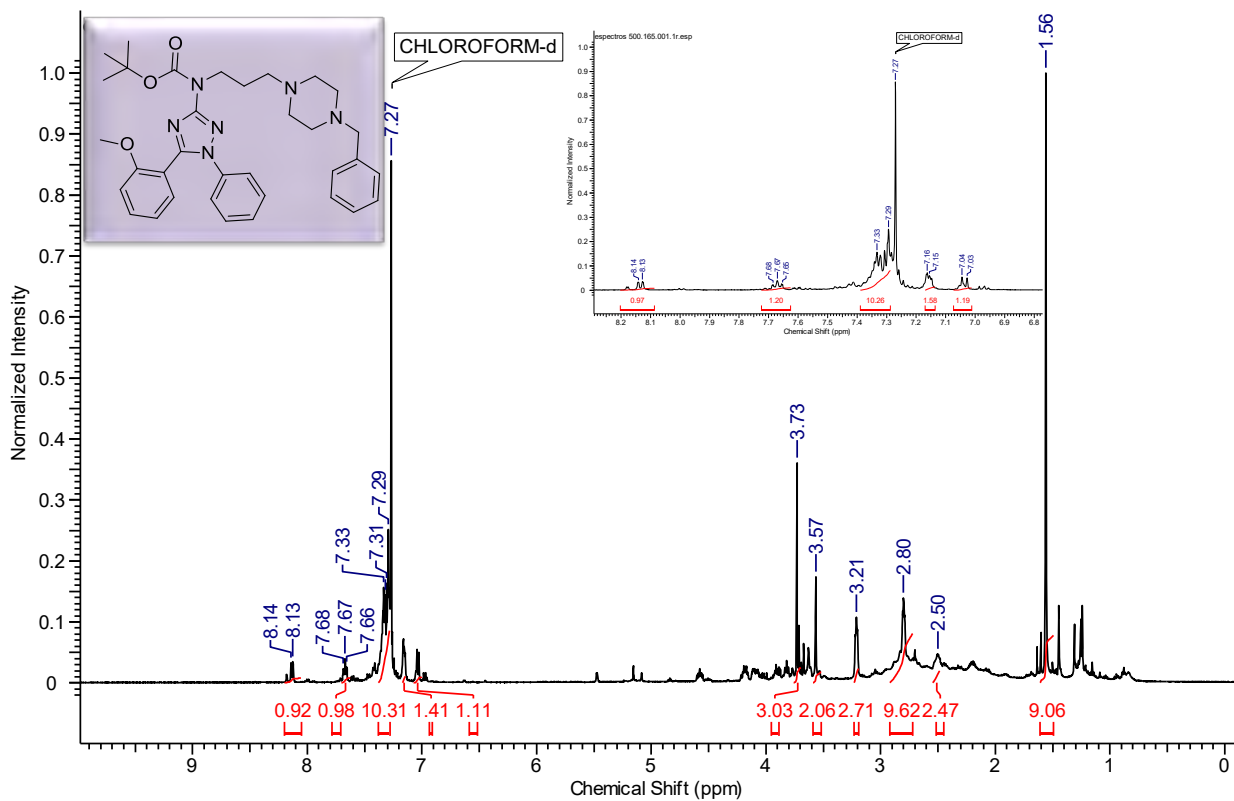
Anexo 99. Espectro de RMN ^1H do composto (91a) em CDCl_3 à 500MHz.



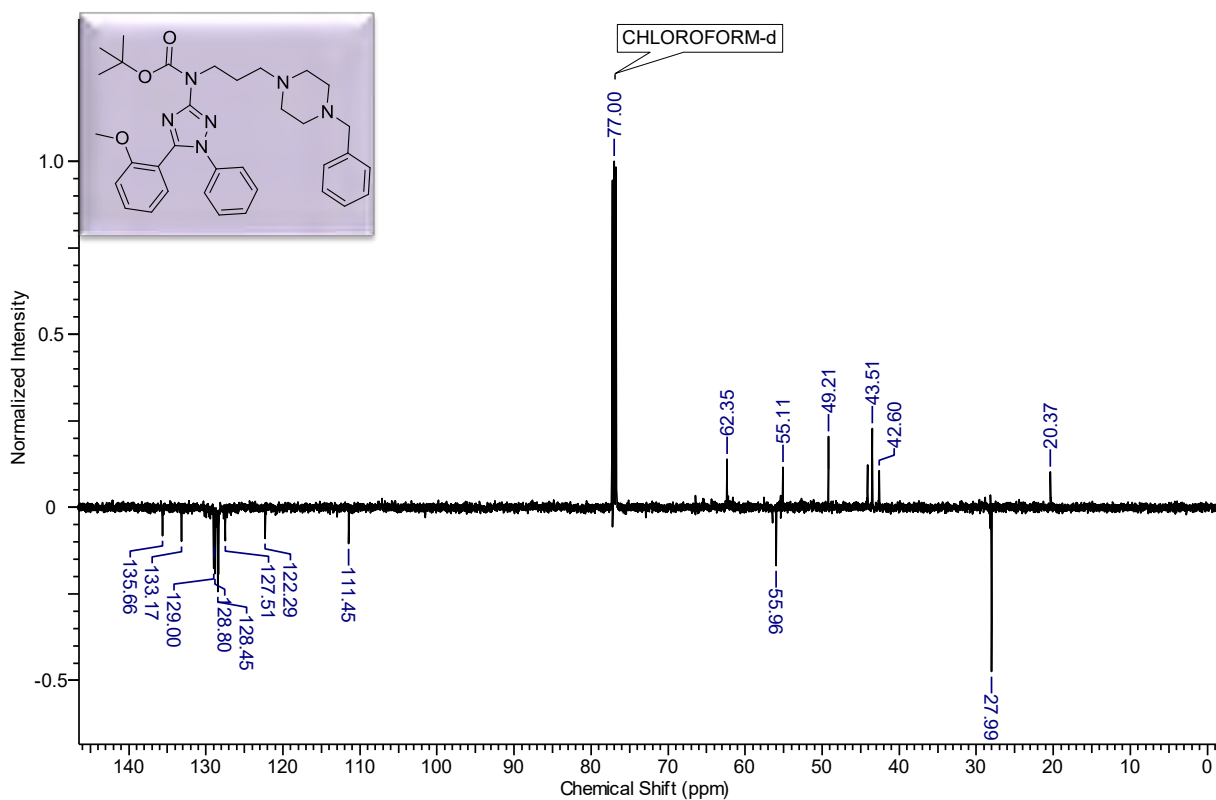
Anexo 100. Espectro de RMN ^{13}C do produto (91a) em CDCl_3 à 125MHz.



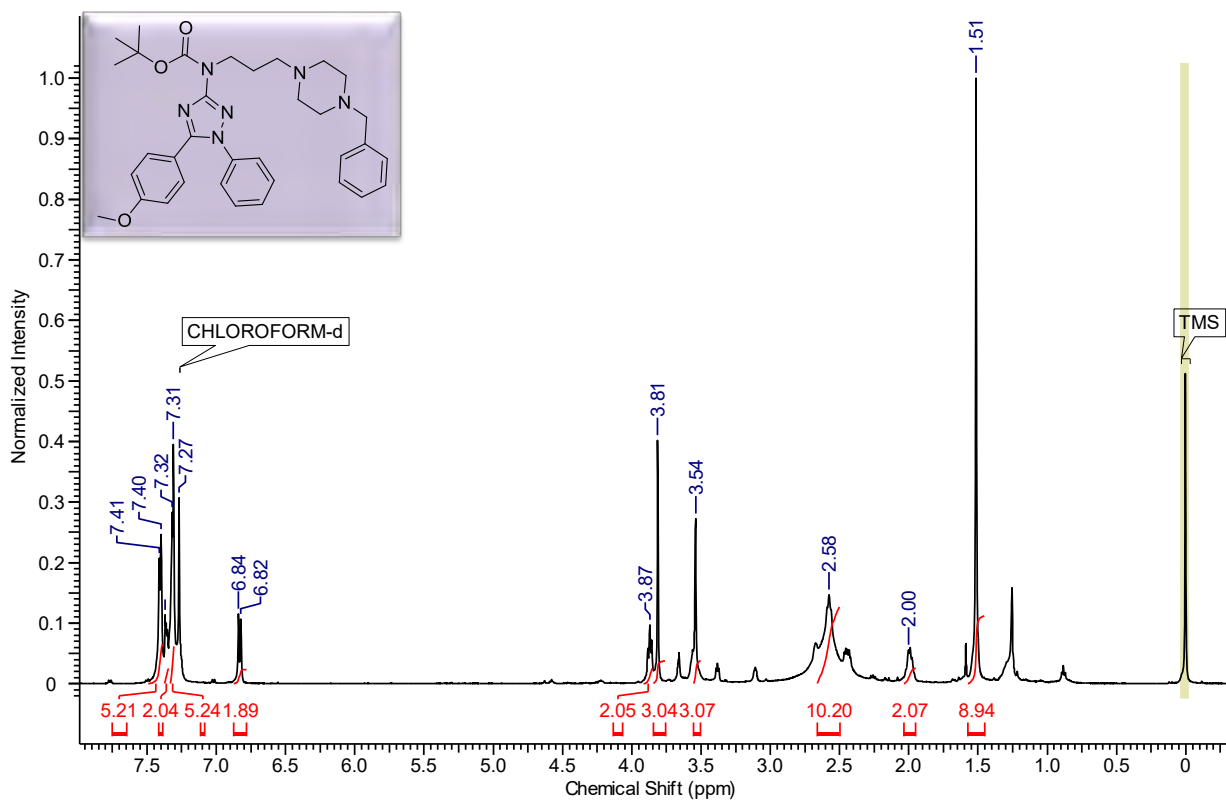
Anexo 101. Espectro de RMN ^1H do composto (91c) em CDCl_3 à 500MHz.



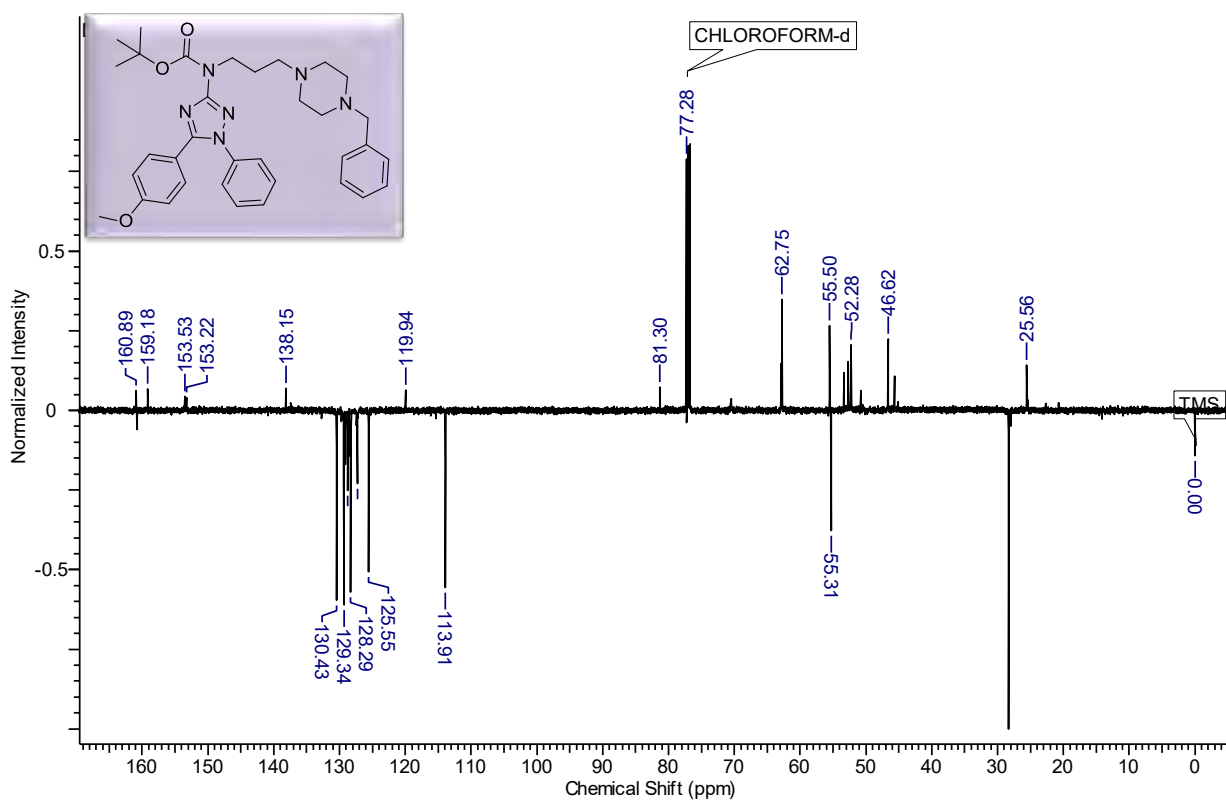
Anexo 102. Espectro de RMN ^{13}C do produto (91c) em CDCl_3 à 125MHz.



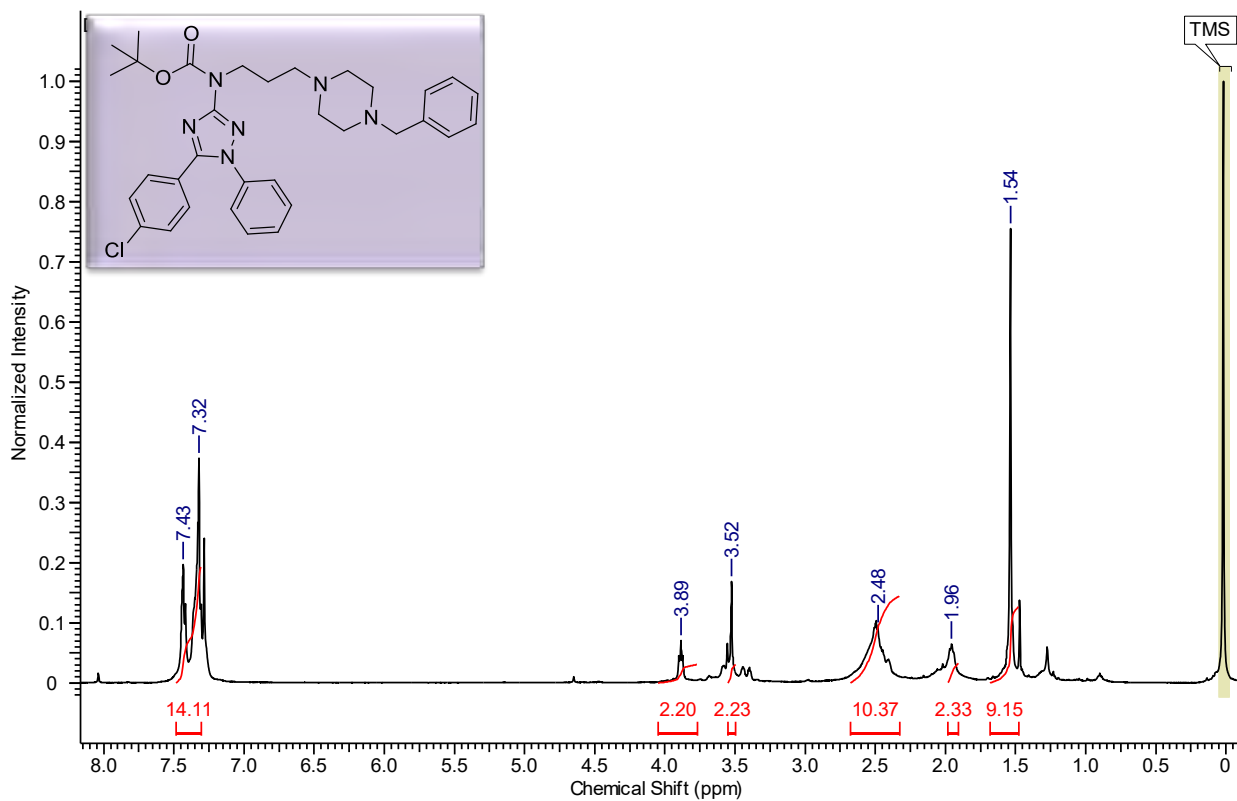
Anexo 103. Espectro de RMN ^1H do composto (91d) em CDCl_3 à 500MHz.



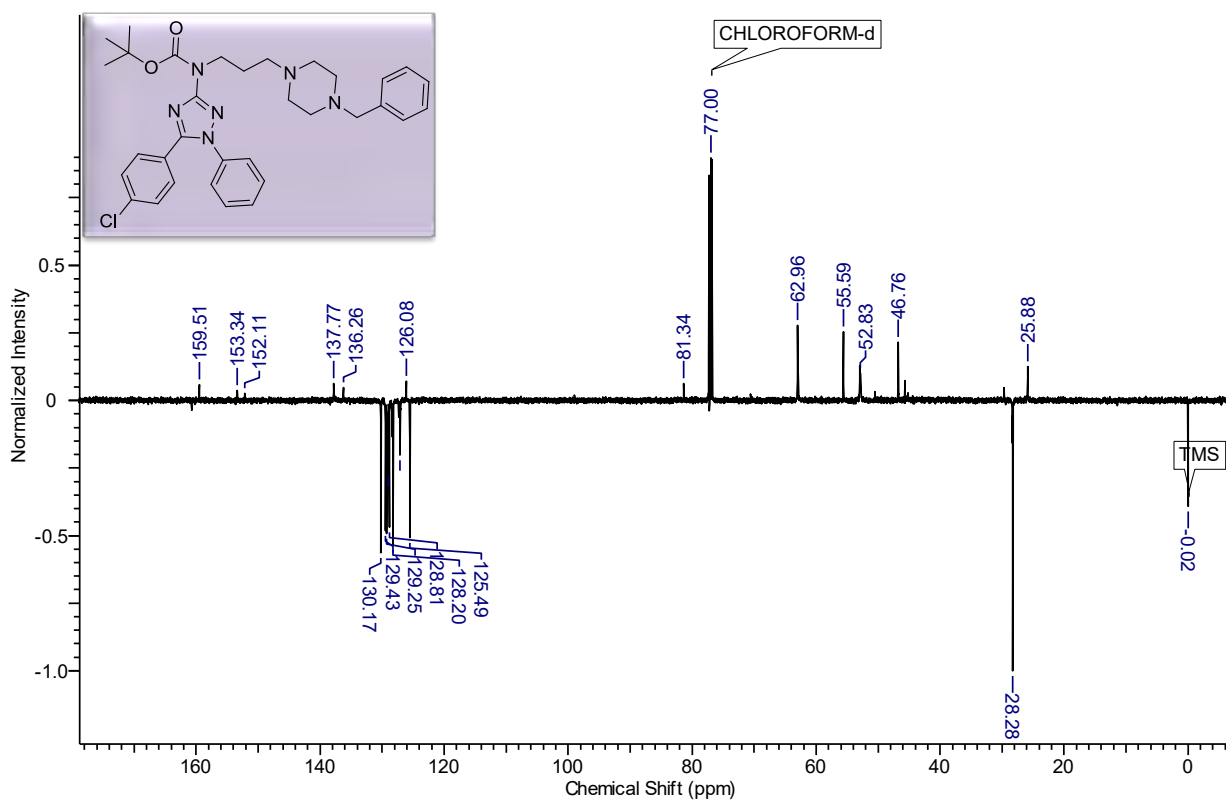
Anexo 104. Espectro de RMN ^{13}C do produto (91d) em CDCl_3 à 125MHz.



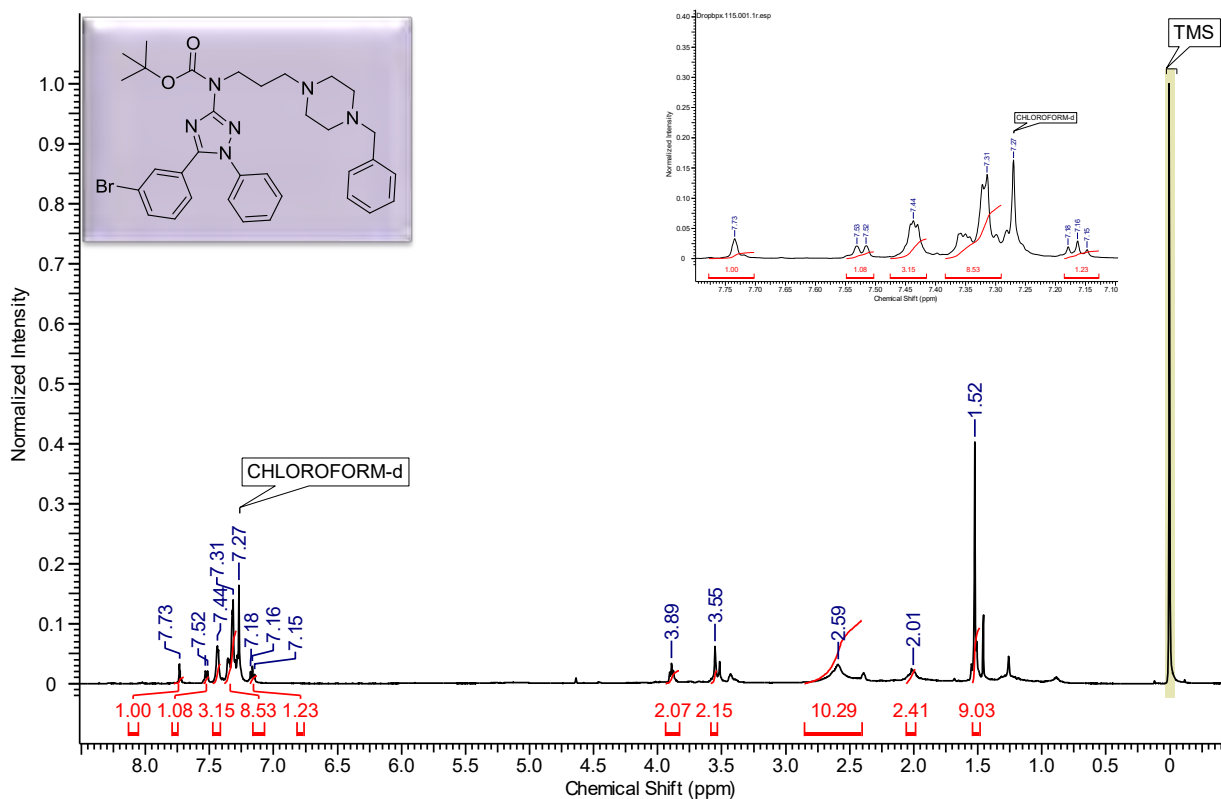
Anexo 105. Espectro de RMN ^1H do composto (91h) em CDCl_3 à 500MHz.



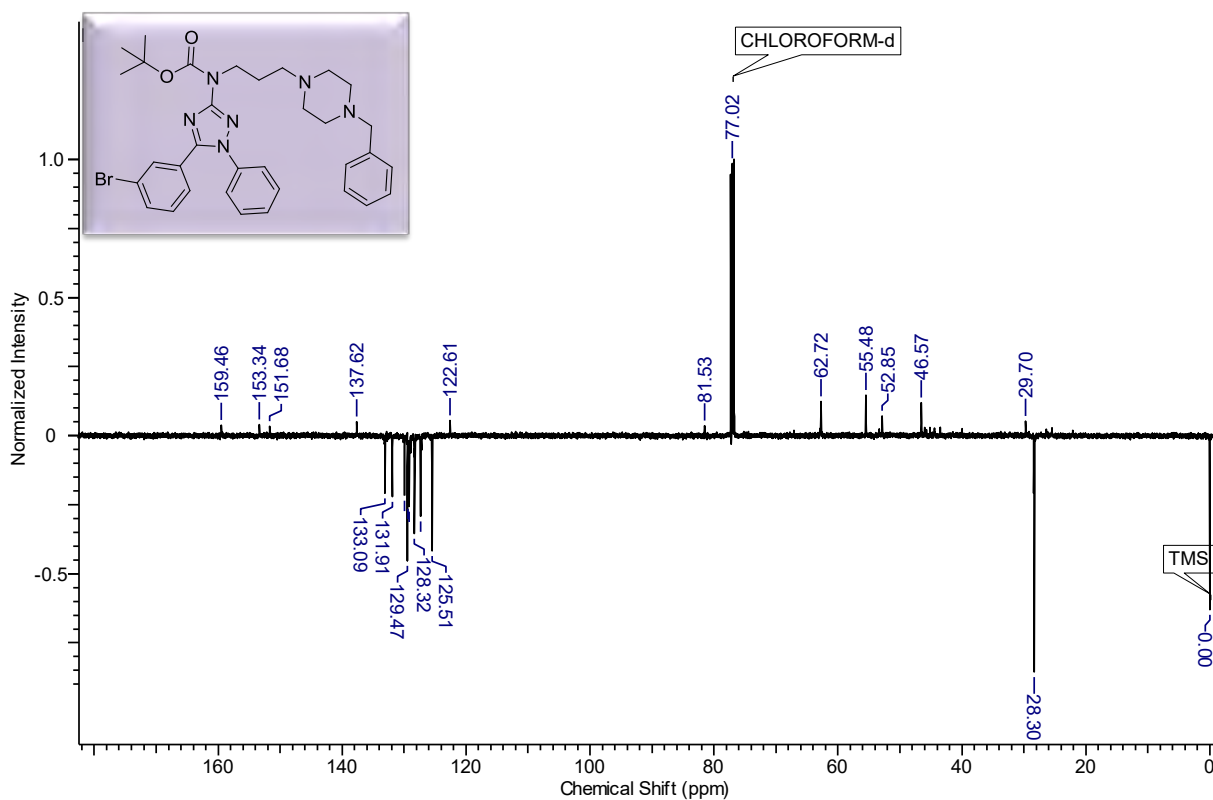
Anexo 106. Espectro de RMN ^{13}C do produto (91h) em CDCl_3 à 125MHz.



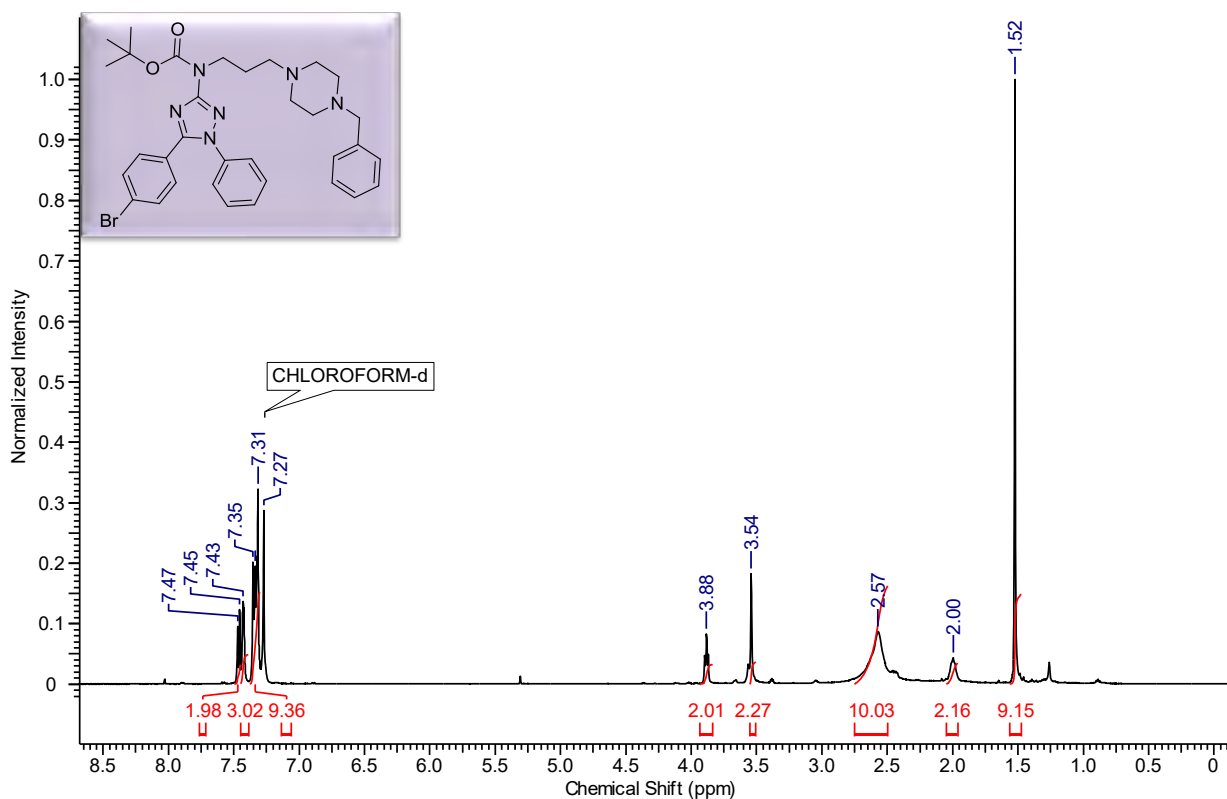
Anexo 107. Espectro de RMN ^1H do composto (91i) em CDCl_3 à 500MHz.



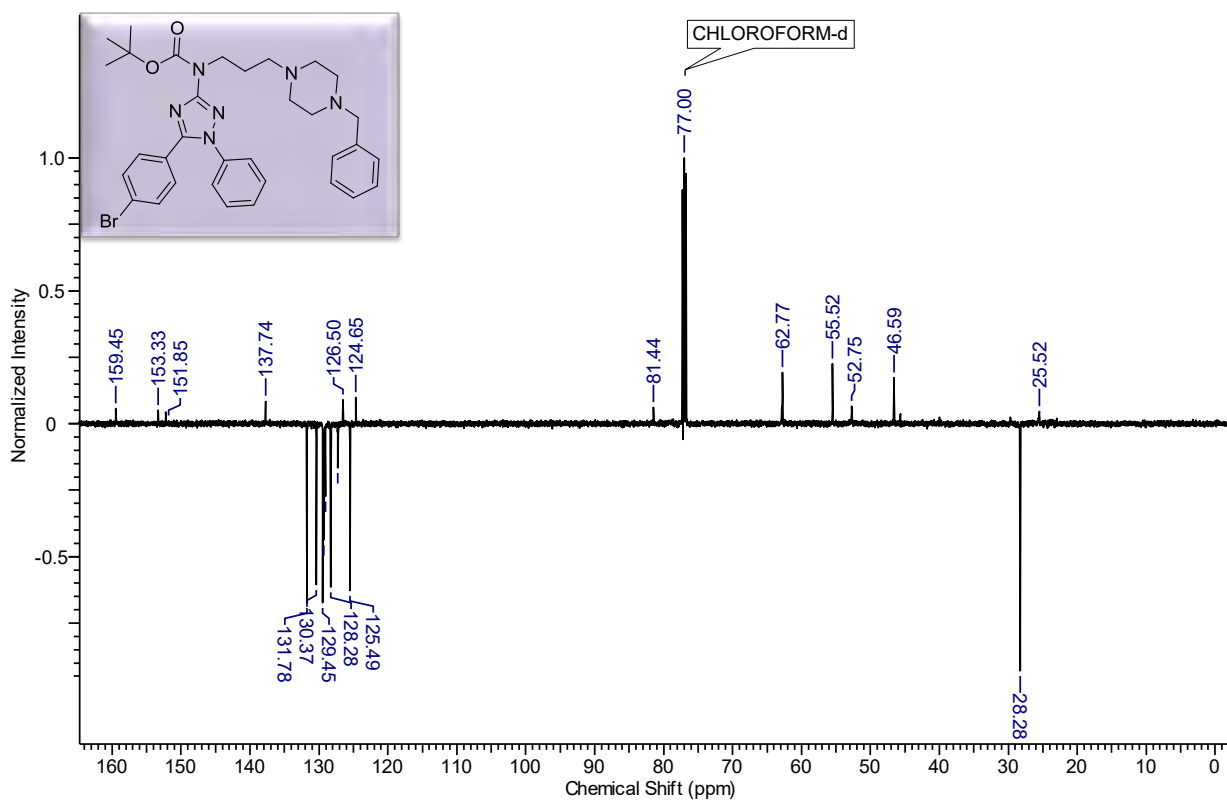
Anexo 108. Espectro de RMN ^{13}C do produto (91i) em CDCl_3 à 125MHz.



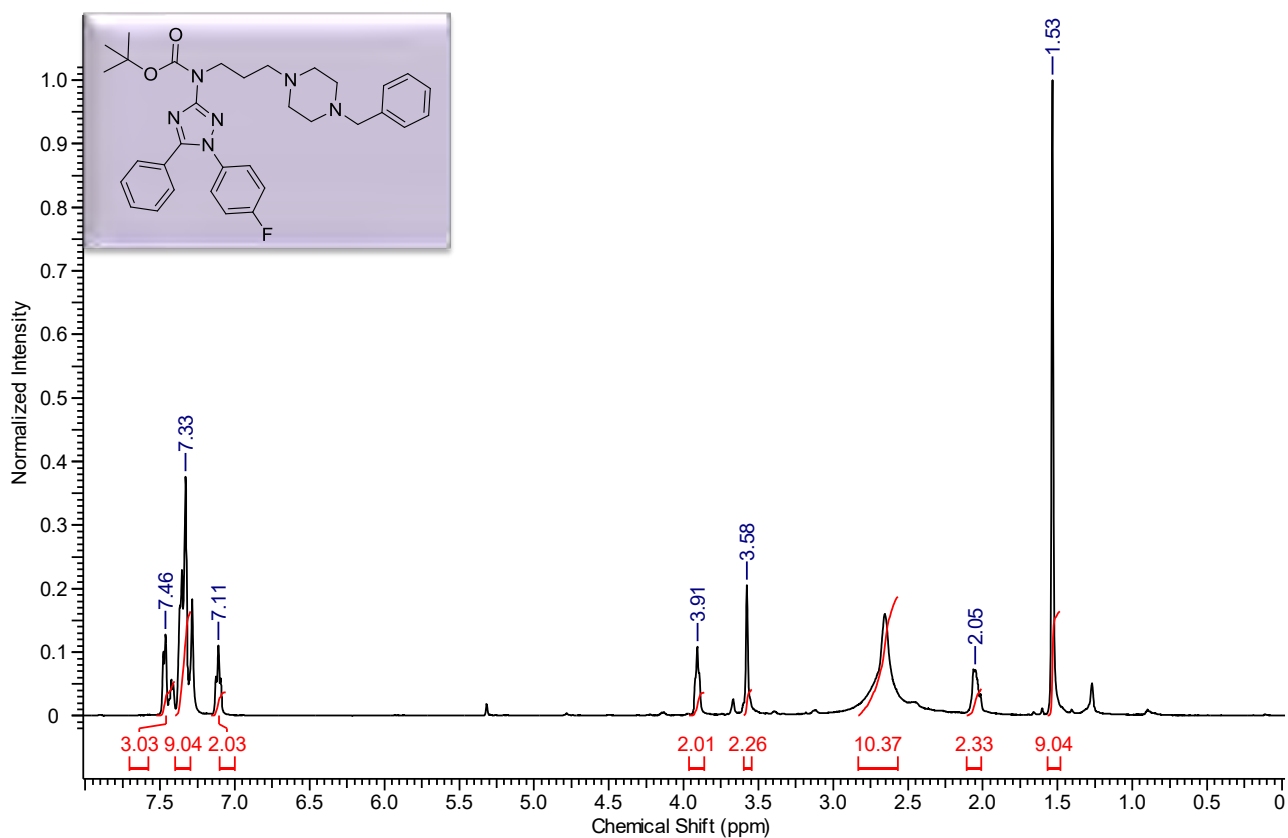
Anexo 109. Espectro de RMN ^1H do composto (91j) em CDCl_3 à 500MHz.



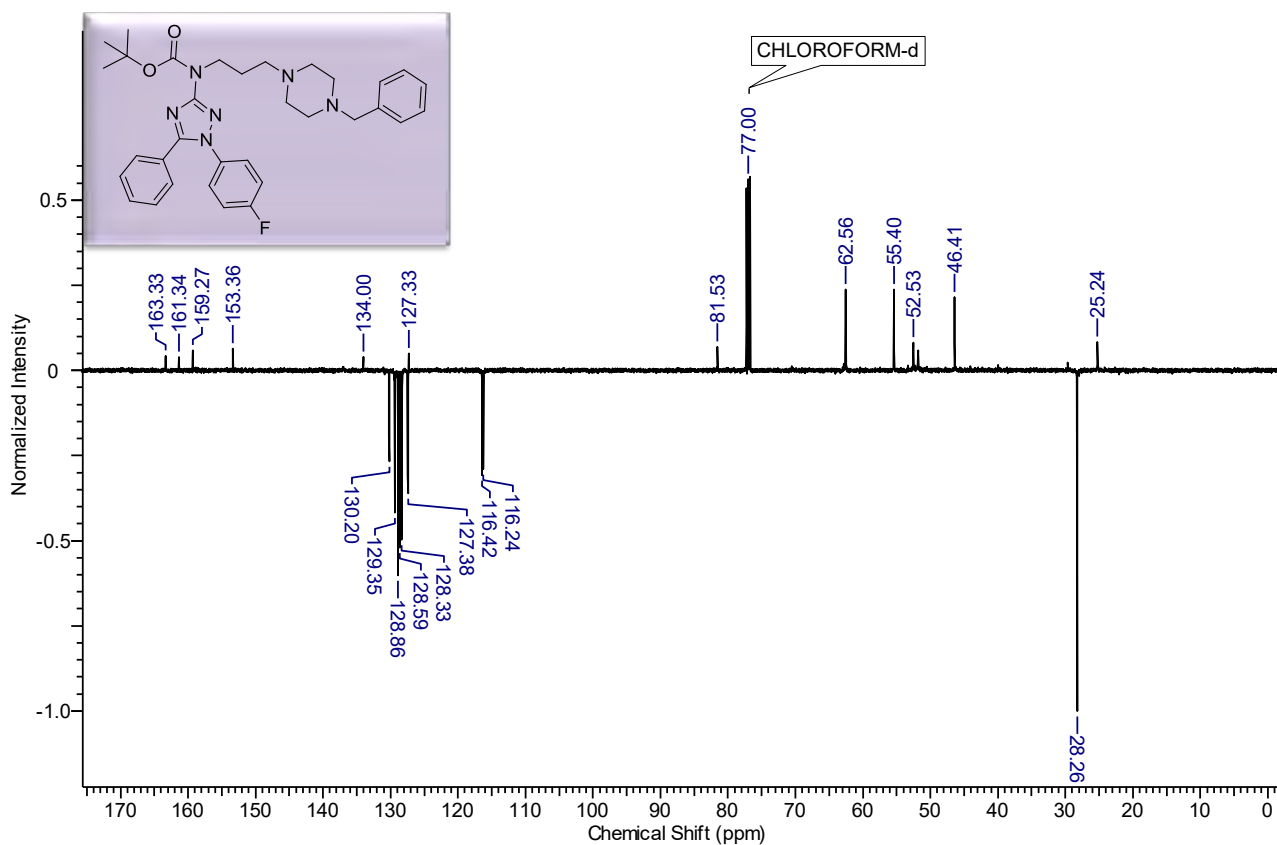
Anexo 110. Espectro de RMN ^{13}C do produto (91j) em CDCl_3 à 125MHz.



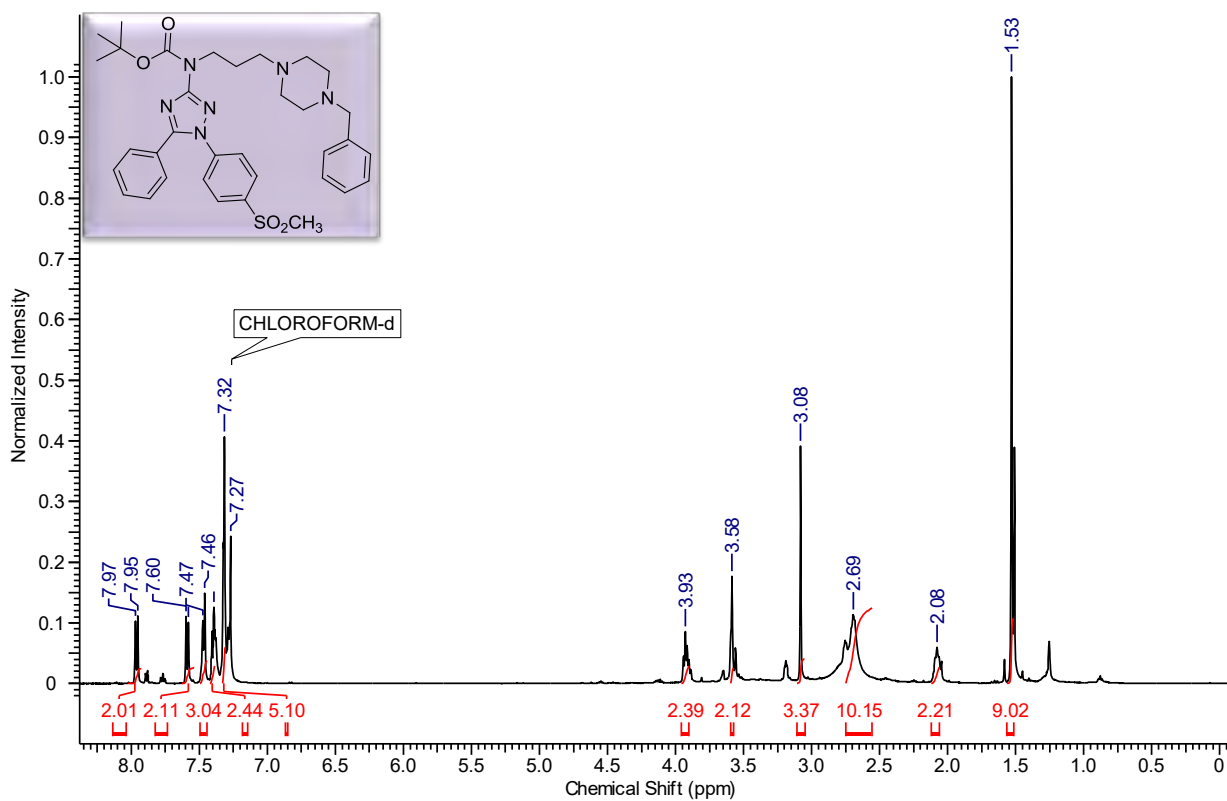
Anexo 111. Espectro de RMN ^1H do composto (91k) em CDCl_3 à 500MHz.



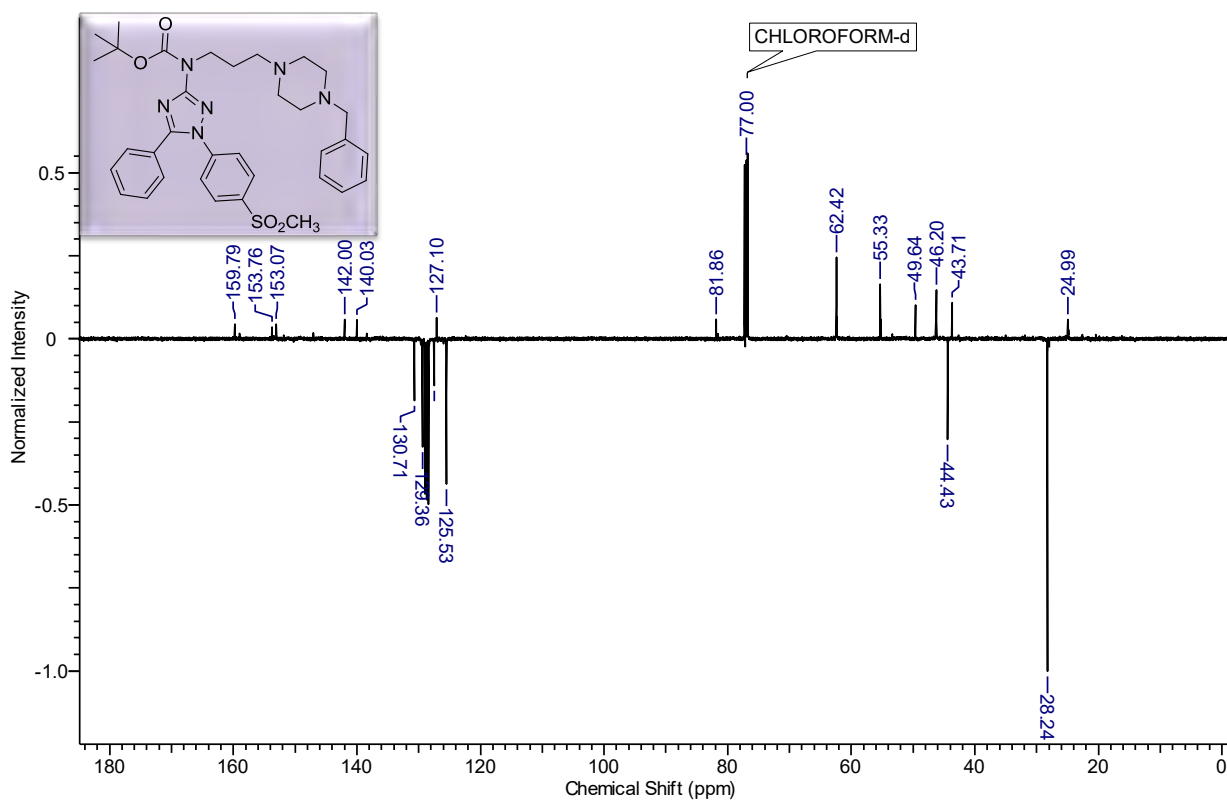
Anexo 112. Espectro de RMN ^{13}C do produto (91k) em CDCl_3 à 125MHz.



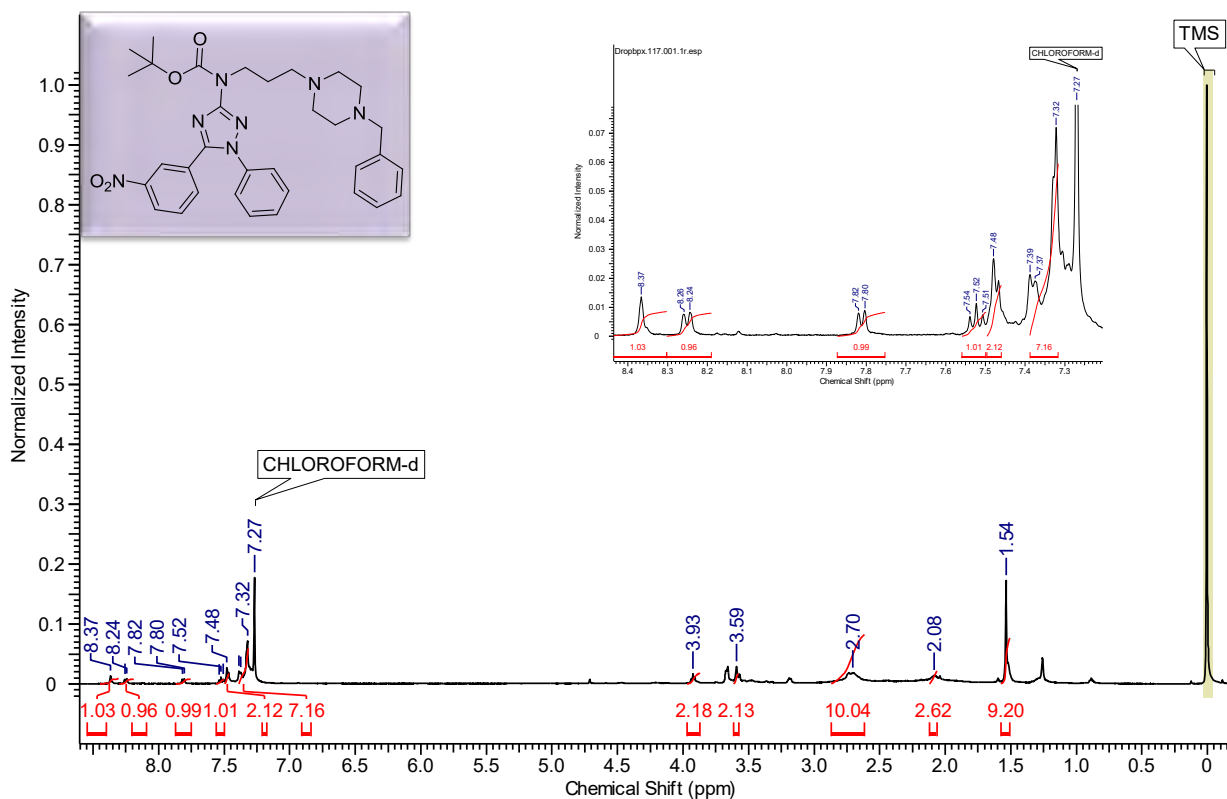
Anexo 113. Espectro de RMN ^1H do composto (911) em CDCl_3 à 500MHz.



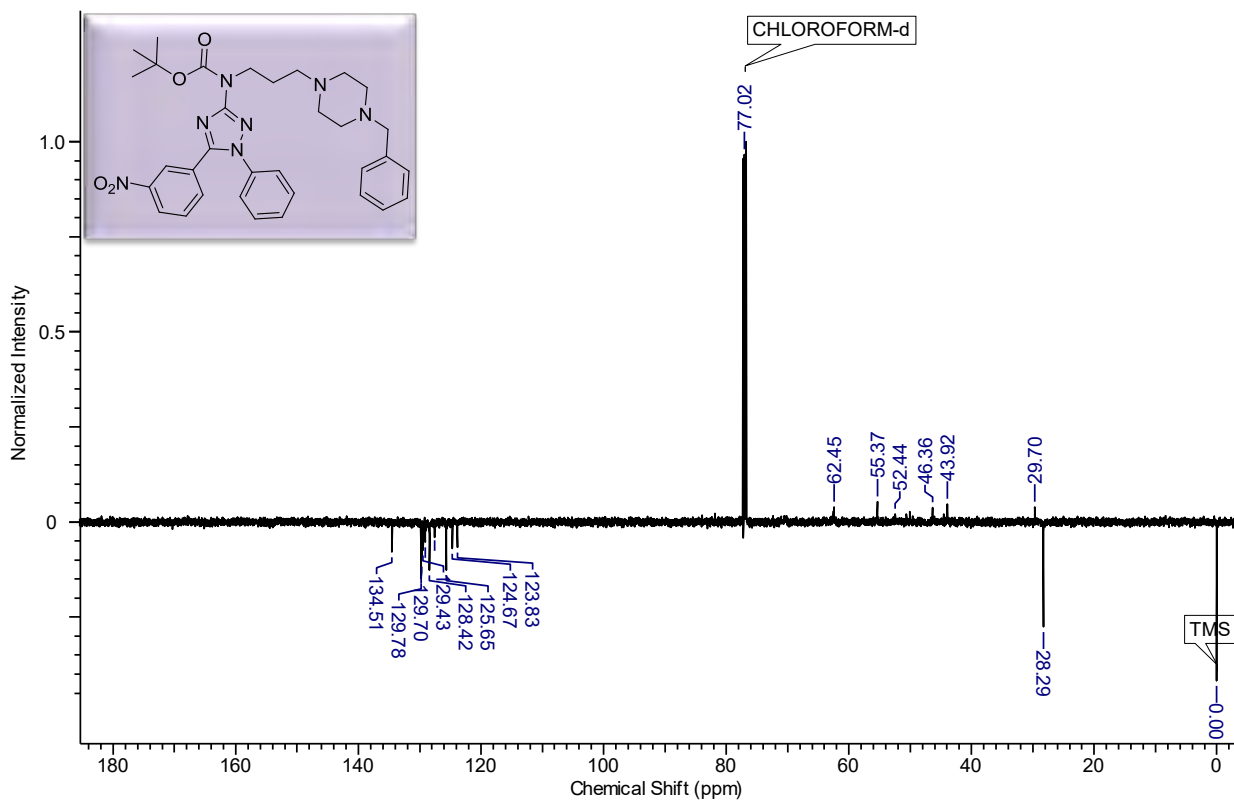
Anexo 114. Espectro de RMN ^{13}C do produto (911) em CDCl_3 à 125MHz.



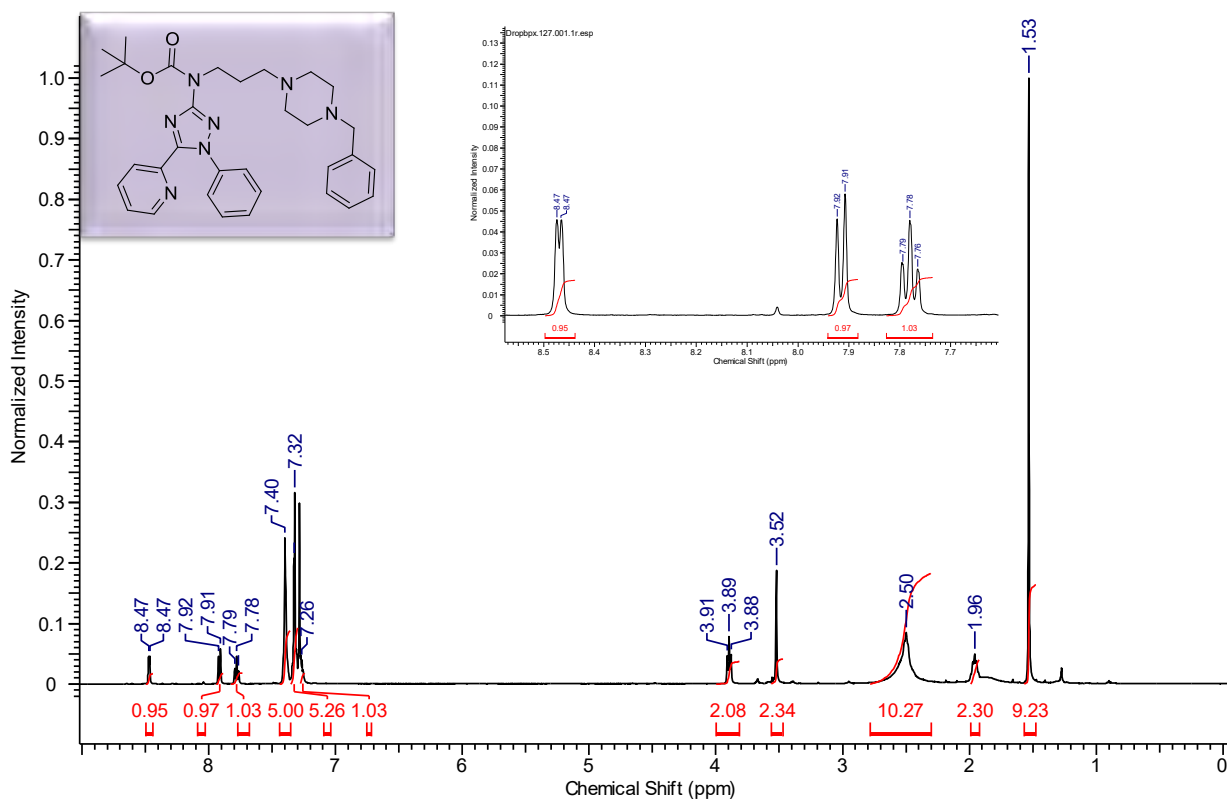
Anexo 115. Espectro de RMN ^1H do composto (91m) em CDCl_3 à 500MHz.



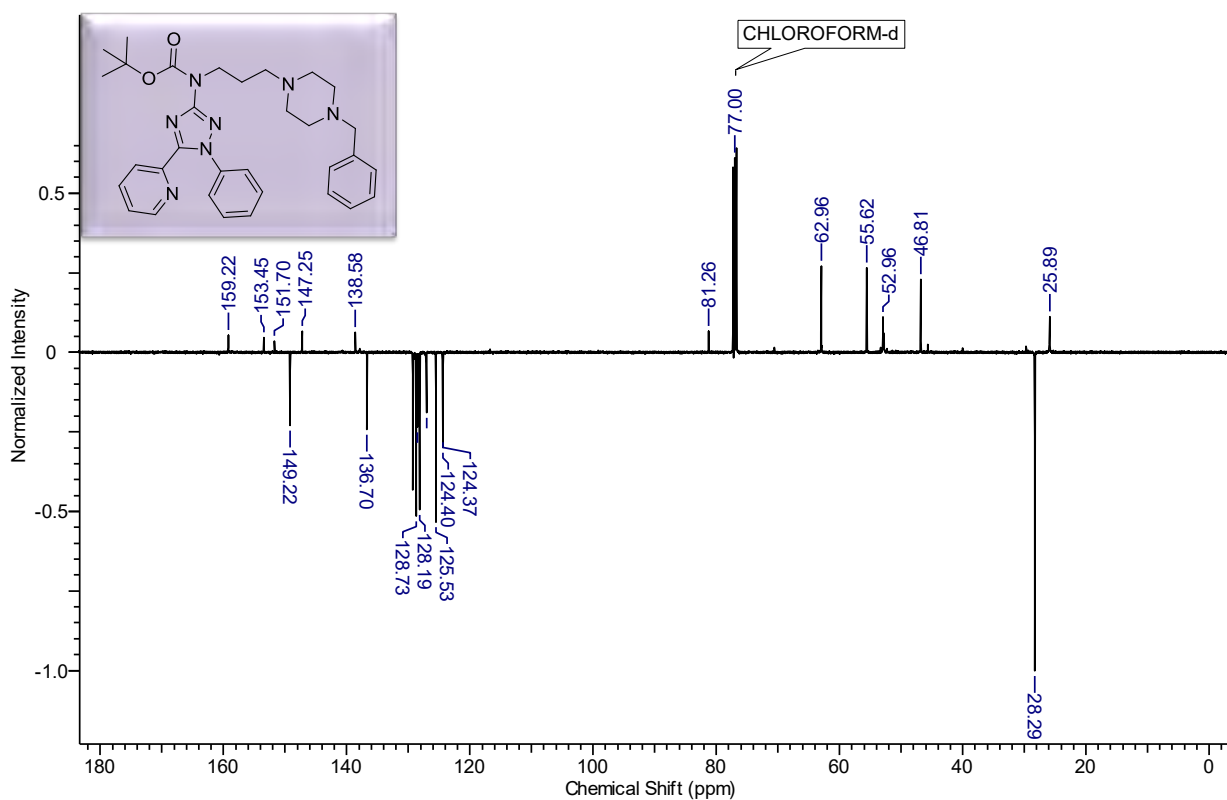
Anexo 116. Espectro de RMN ^{13}C do produto (91m) em CDCl_3 à 125MHz.



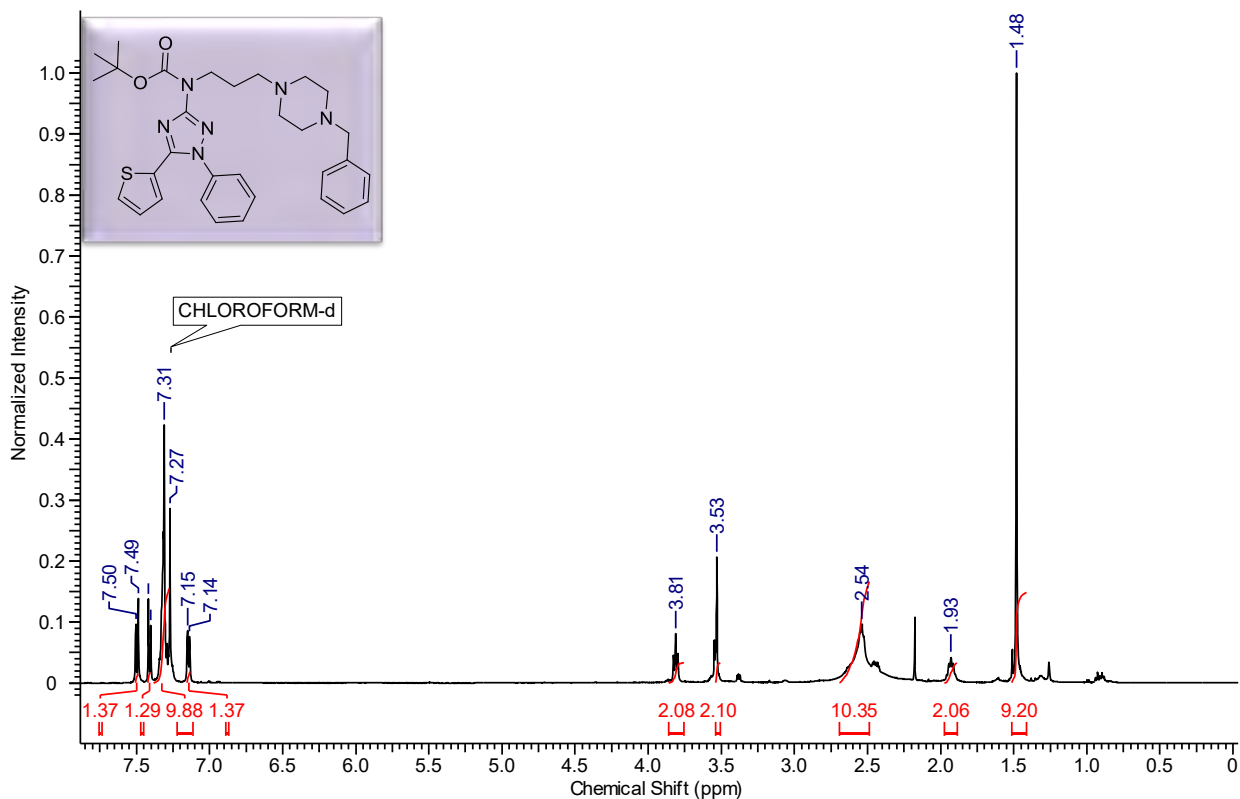
Anexo 117. Espectro de RMN ^1H do composto (91q) em CDCl_3 à 500MHz.



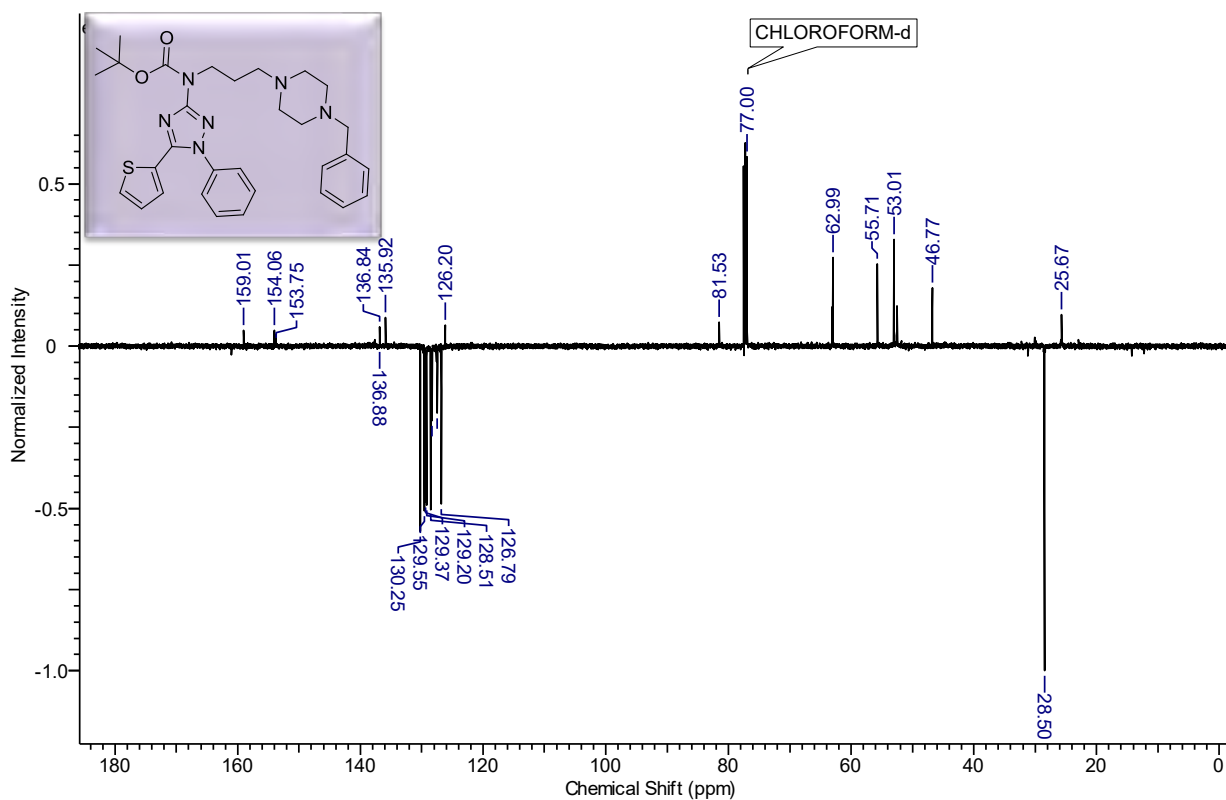
Anexo 118. Espectro de RMN ^{13}C do produto (91q) em CDCl_3 à 125MHz.



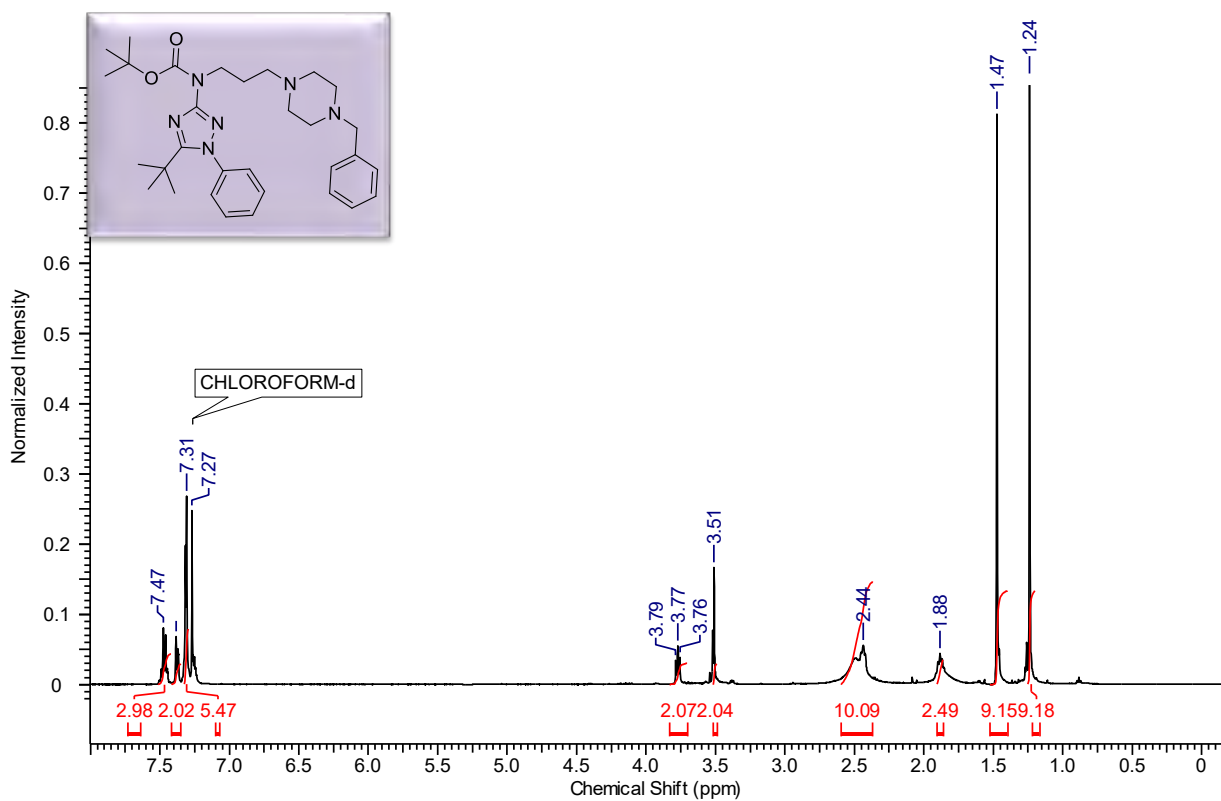
Anexo 119. Espectro de RMN ^1H do composto (91s) em CDCl_3 à 500MHz.



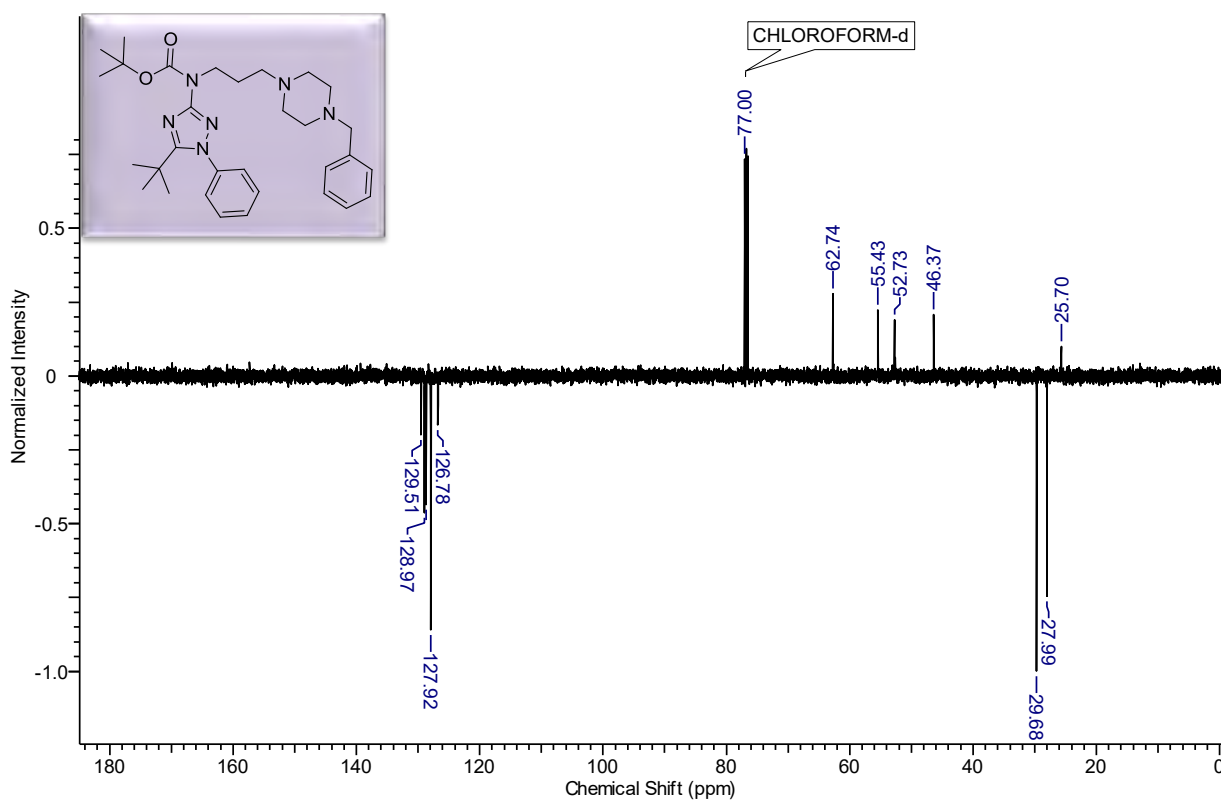
Anexo 120. Espectro de RMN ^{13}C do produto (91s) em CDCl_3 à 125MHz.



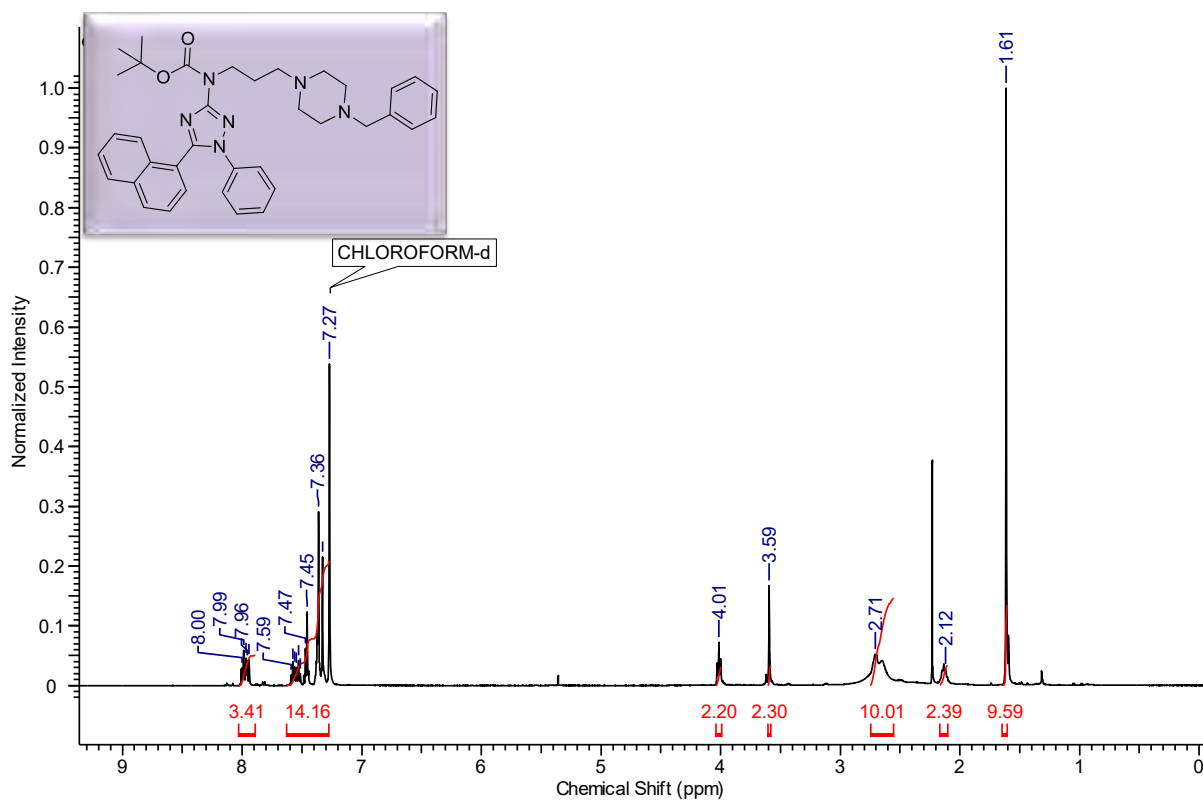
Anexo 121. Espectro de RMN ^1H do composto (91t) em CDCl_3 à 500MHz.



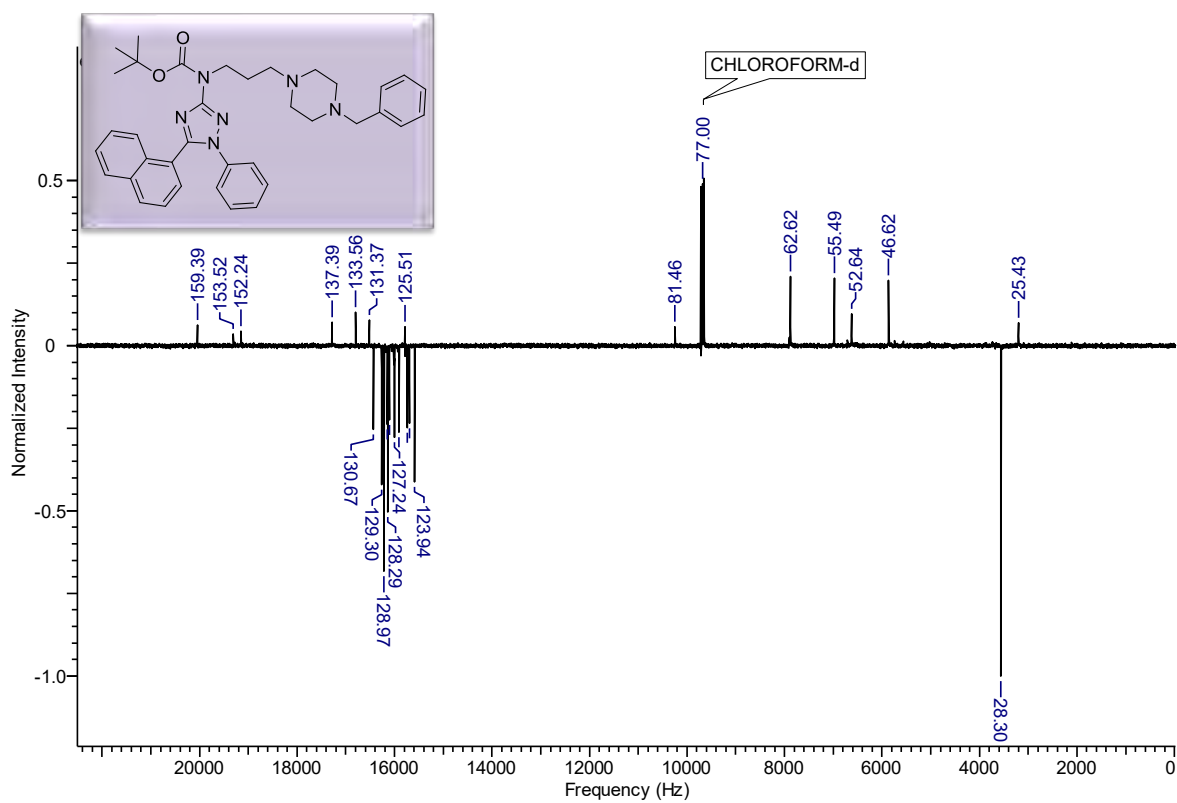
Anexo 122. Espectro de RMN ^{13}C do produto (91t) em CDCl_3 à 125MHz.



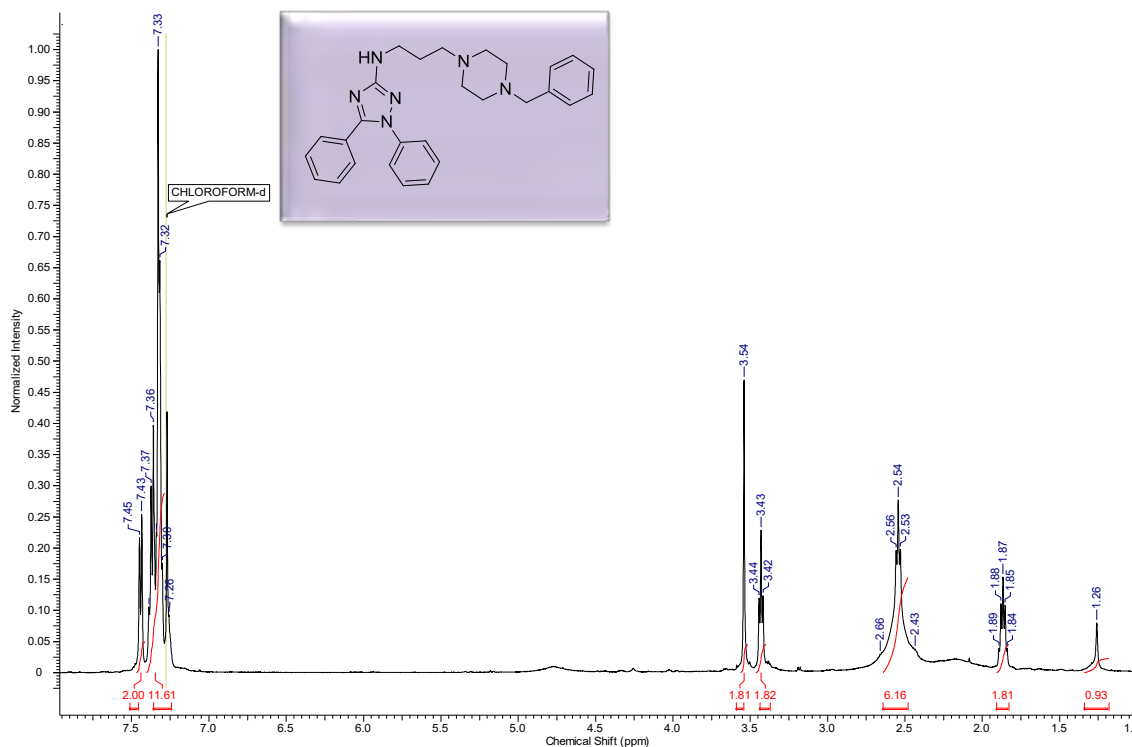
Anexo 123. Espectro de RMN ^1H do composto (91u) em CDCl_3 à 500MHz.



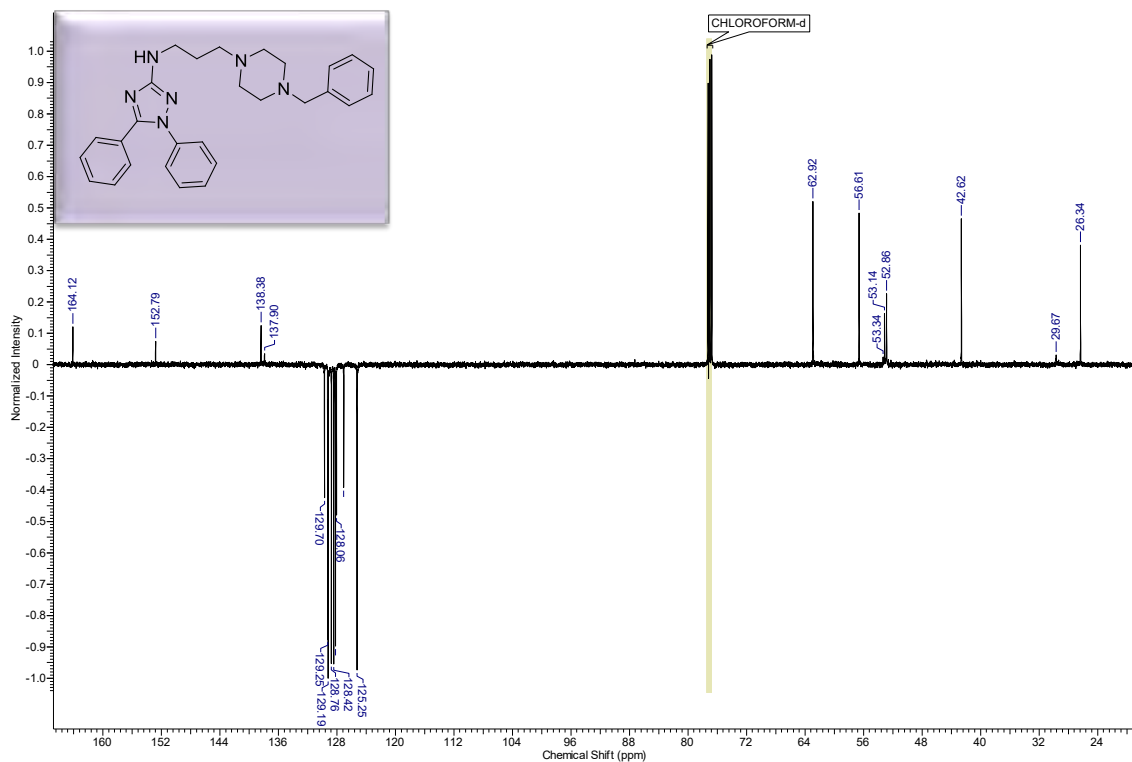
Anexo 124. Espectro de RMN ^{13}C do produto (91u) em CDCl_3 à 125MHz.



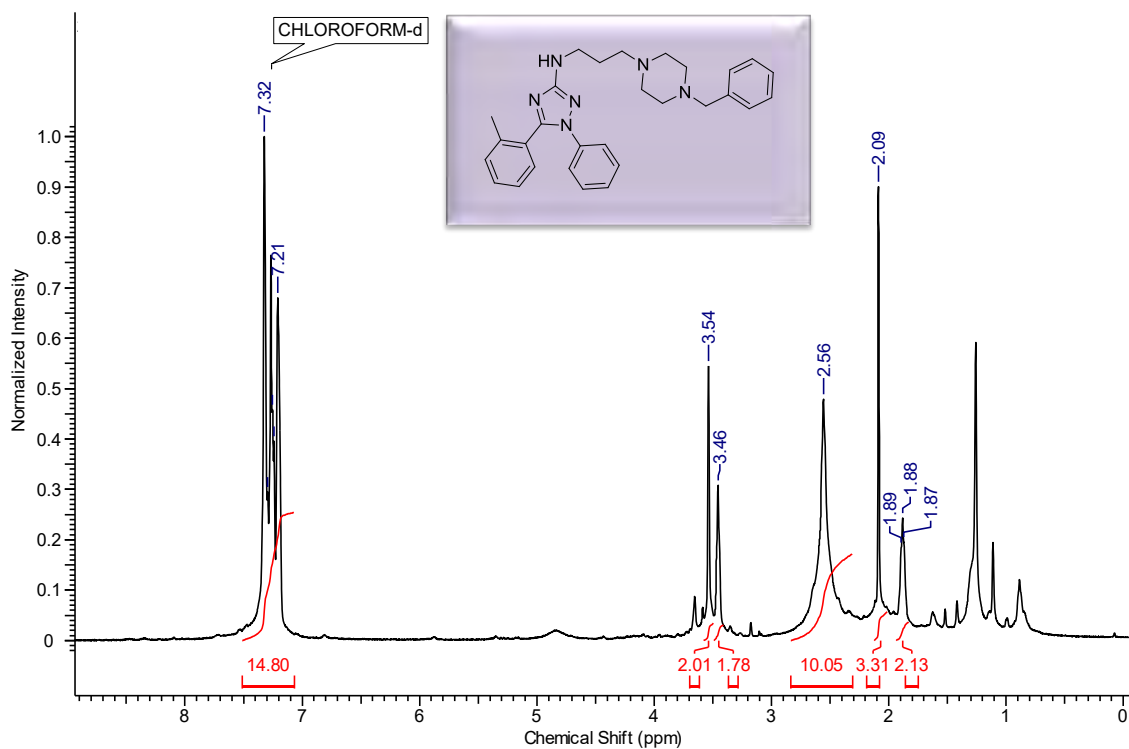
Anexo 125. Espectro de RMN ¹H do composto (89a) em CDCl₃ à 500MHz.



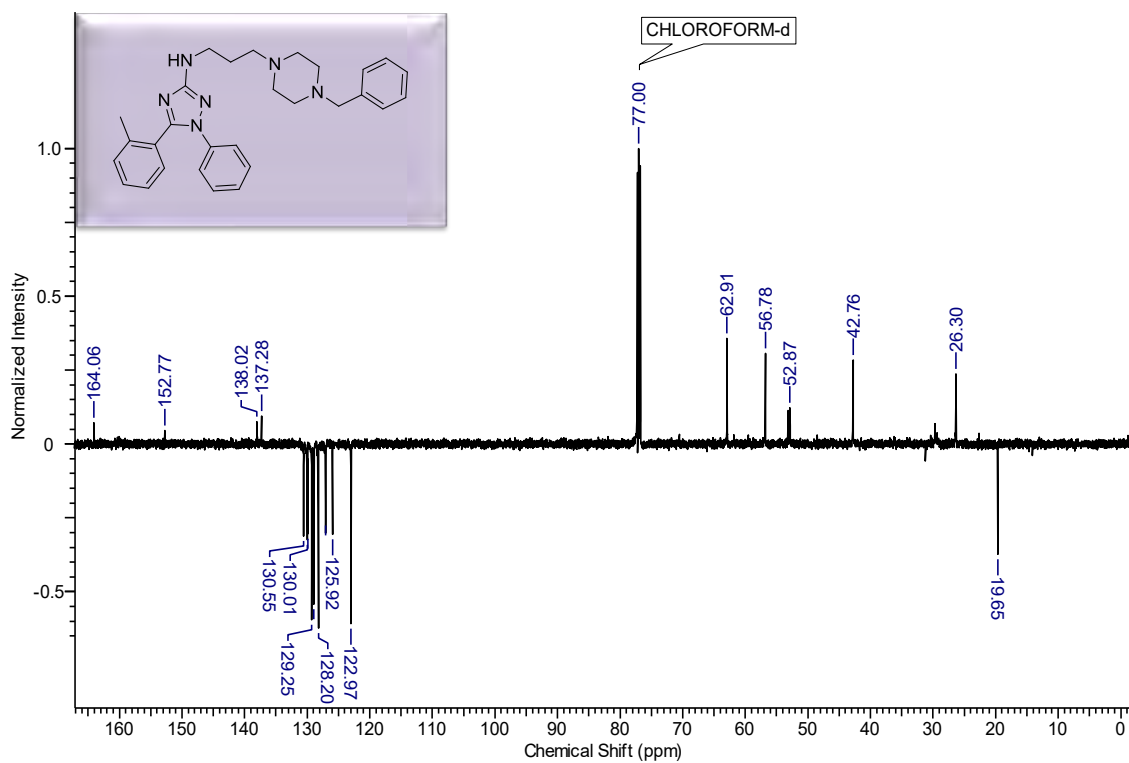
Anexo 126. Espectro de RMN ¹³C do produto (89a) em CDCl₃ à 125MHz.



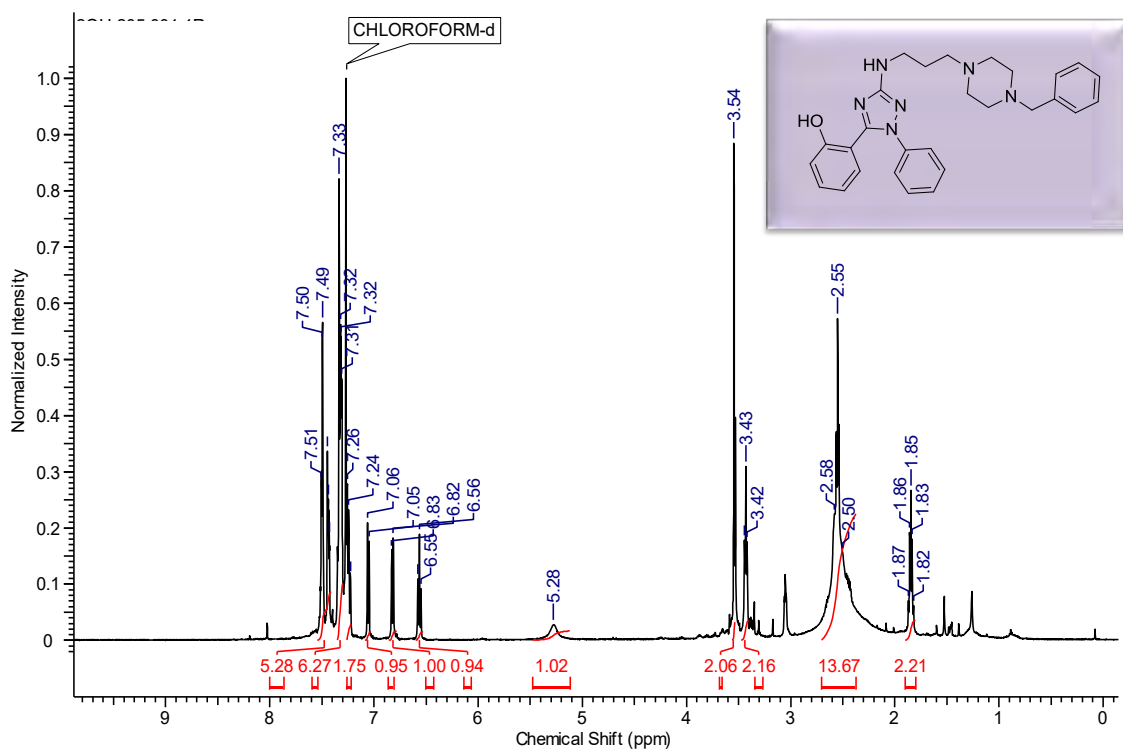
Anexo 127. Espectro de RMN ^1H do composto (90a) em CDCl_3 à 500MHz.



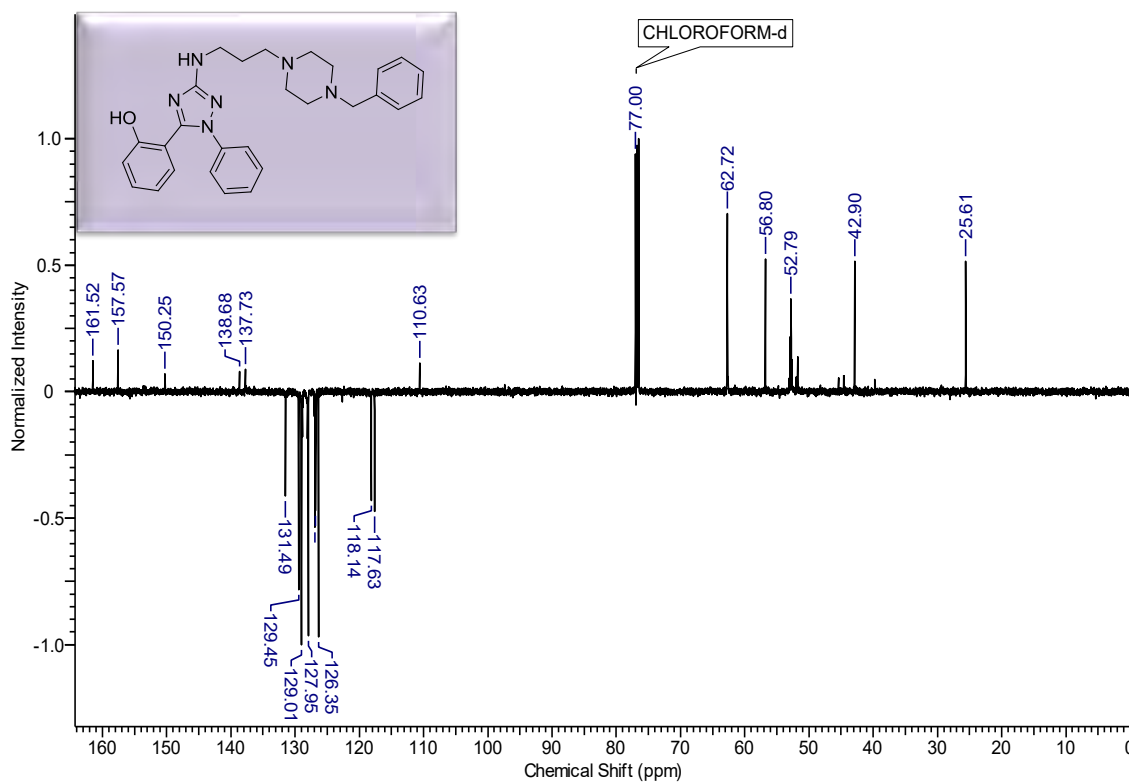
Anexo 128. Espectro de RMN ^{13}C do produto (90a) em CDCl_3 à 125MHz.



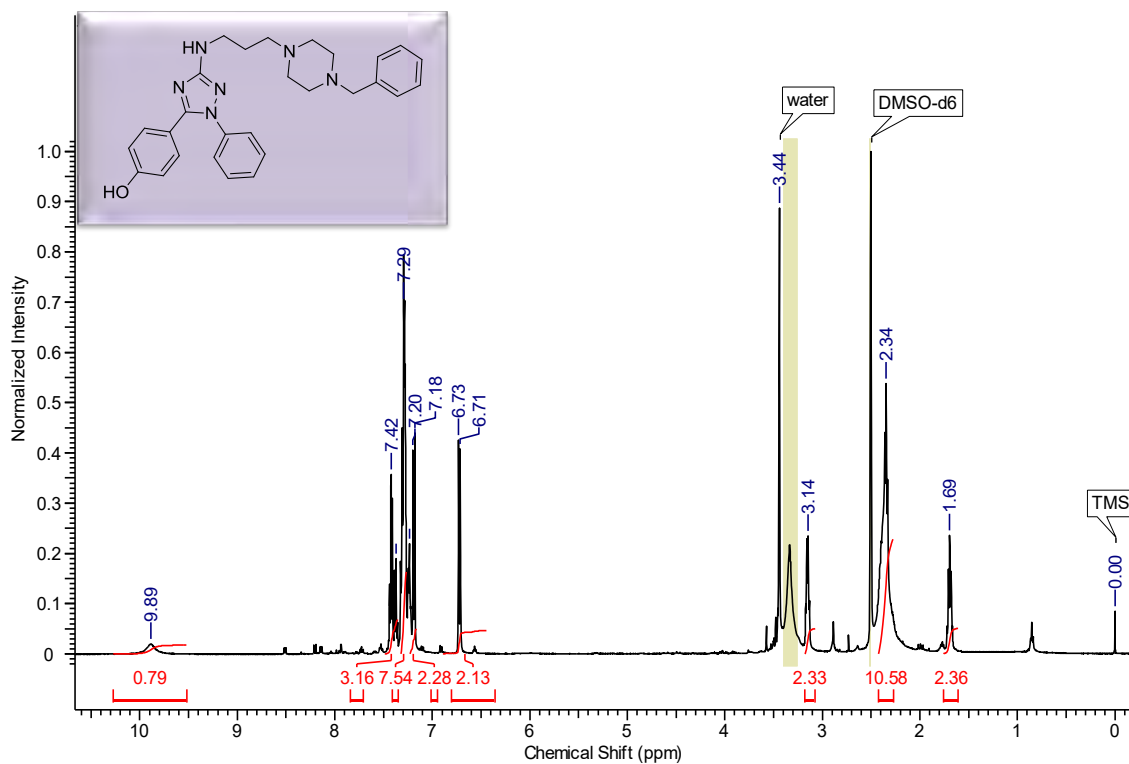
Anexo 129. Espectro de RMN ^1H do composto (90b) em CDCl_3 à 500MHz.



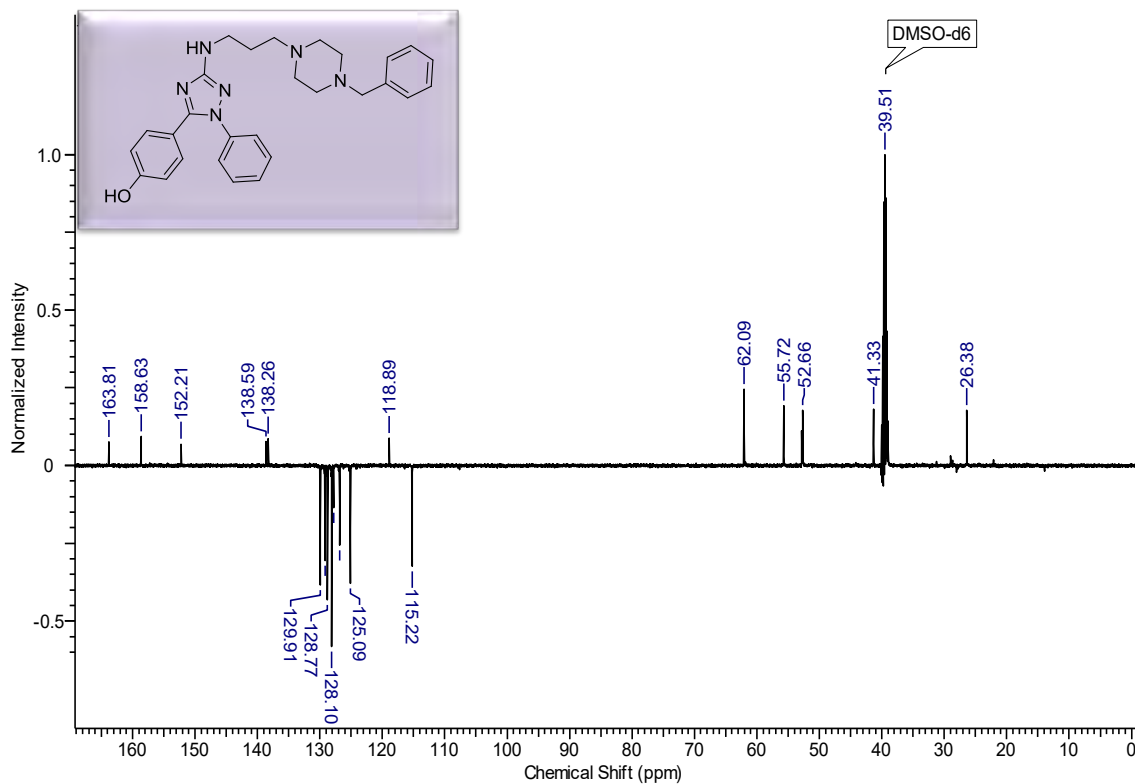
Anexo 130. Espectro de RMN ^{13}C do produto (90b) em CDCl_3 à 125MHz.



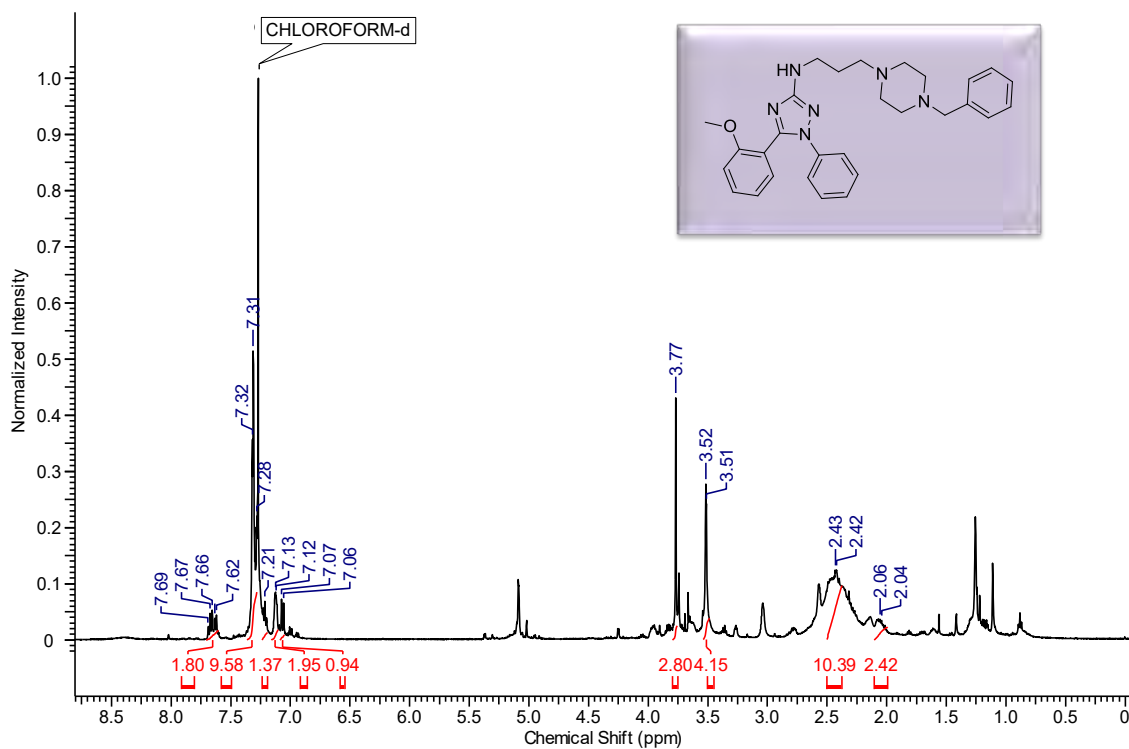
Anexo 131. Espectro de RMN ^1H do composto (90c) em DMSO à 500MHz.



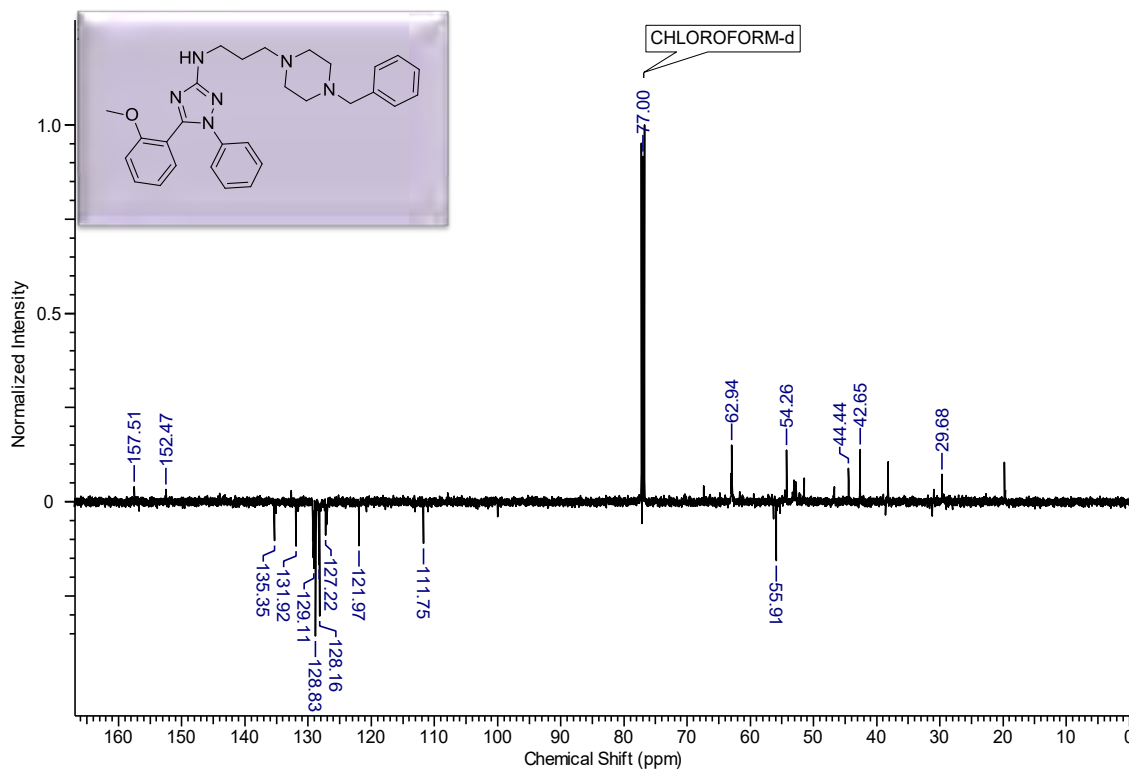
Anexo 132. Espectro de RMN ^{13}C do produto (90c) em DMSO à 125MHz.



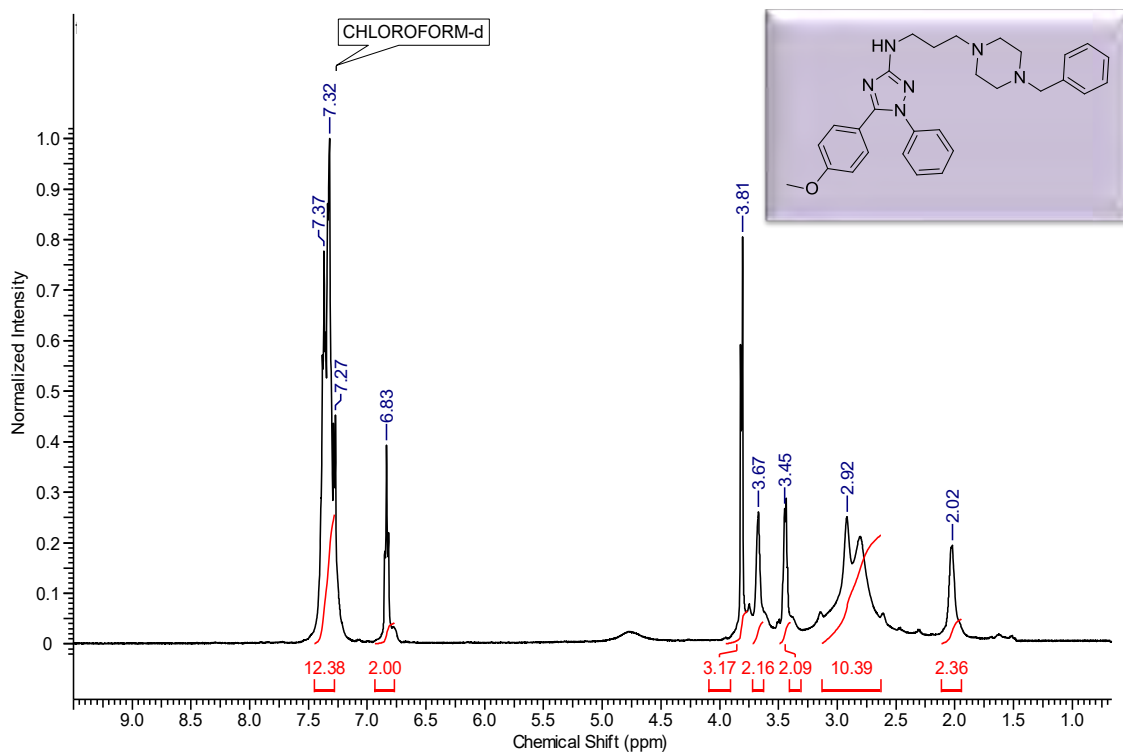
Anexo 133. Espectro de RMN ^1H do composto (90d) em CDCl_3 à 500MHz.



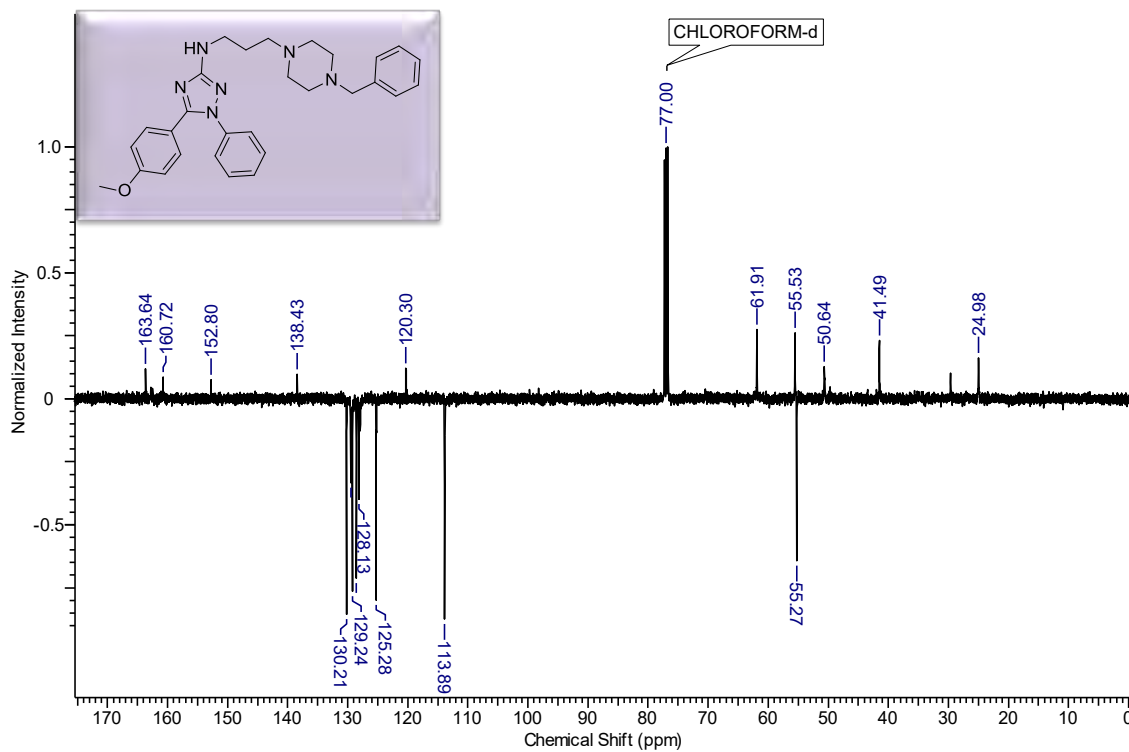
Anexo 134. Espectro de RMN ^{13}C do produto (90d) em CDCl_3 à 125MHz.



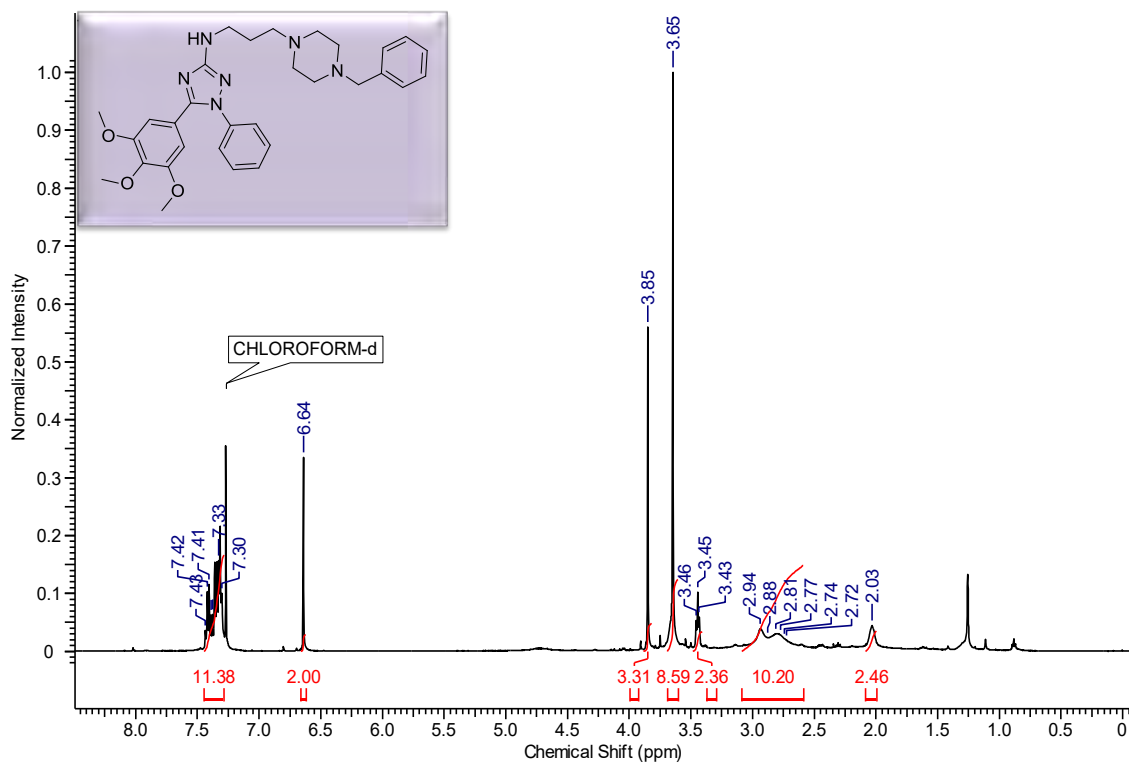
Anexo 135. Espectro de RMN ^1H do composto (90e) em CDCl_3 à 500MHz.



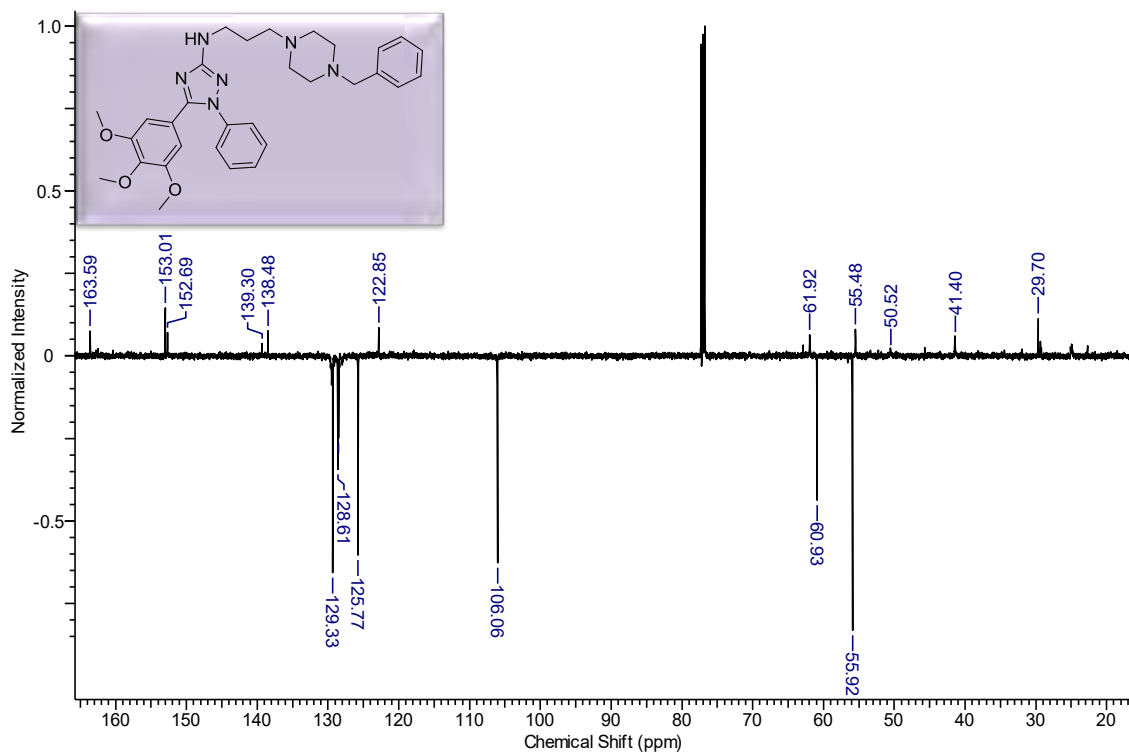
Anexo 136. Espectro de RMN ^{13}C do produto (90e) em CDCl_3 à 125MHz.



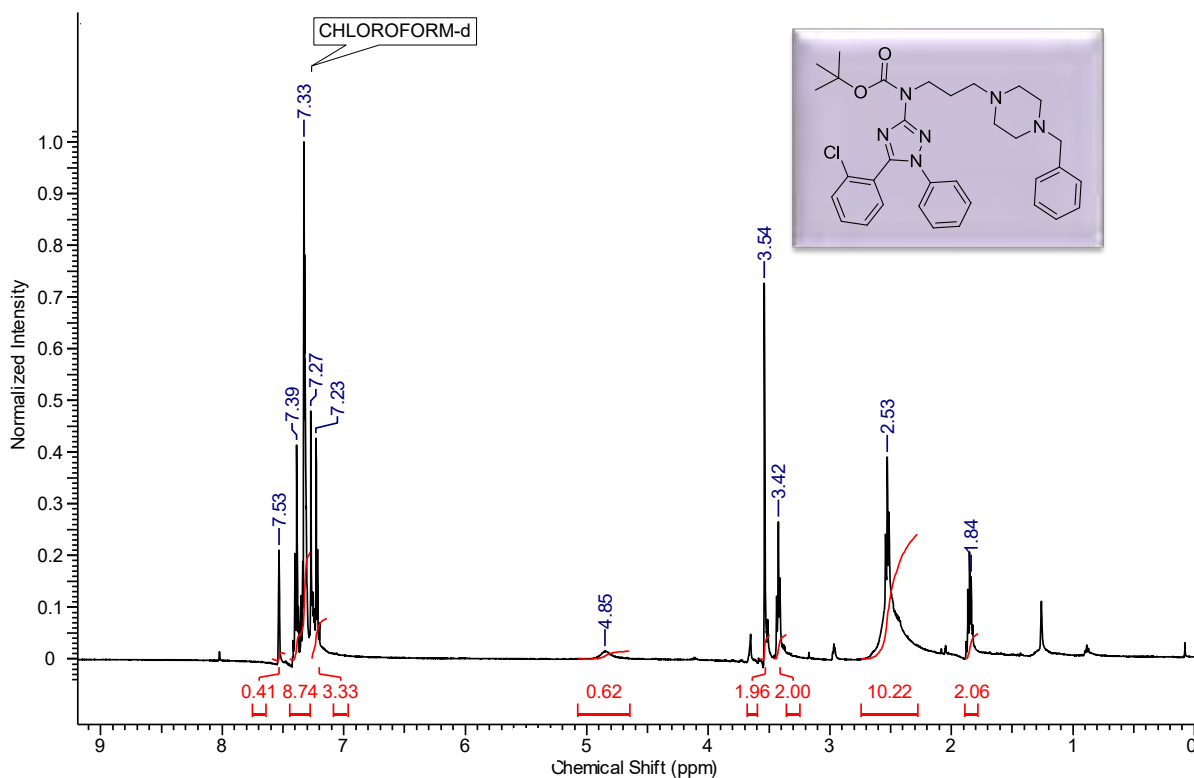
Anexo 137. Espectro de RMN ^1H do composto (90f) em CDCl_3 à 500MHz.



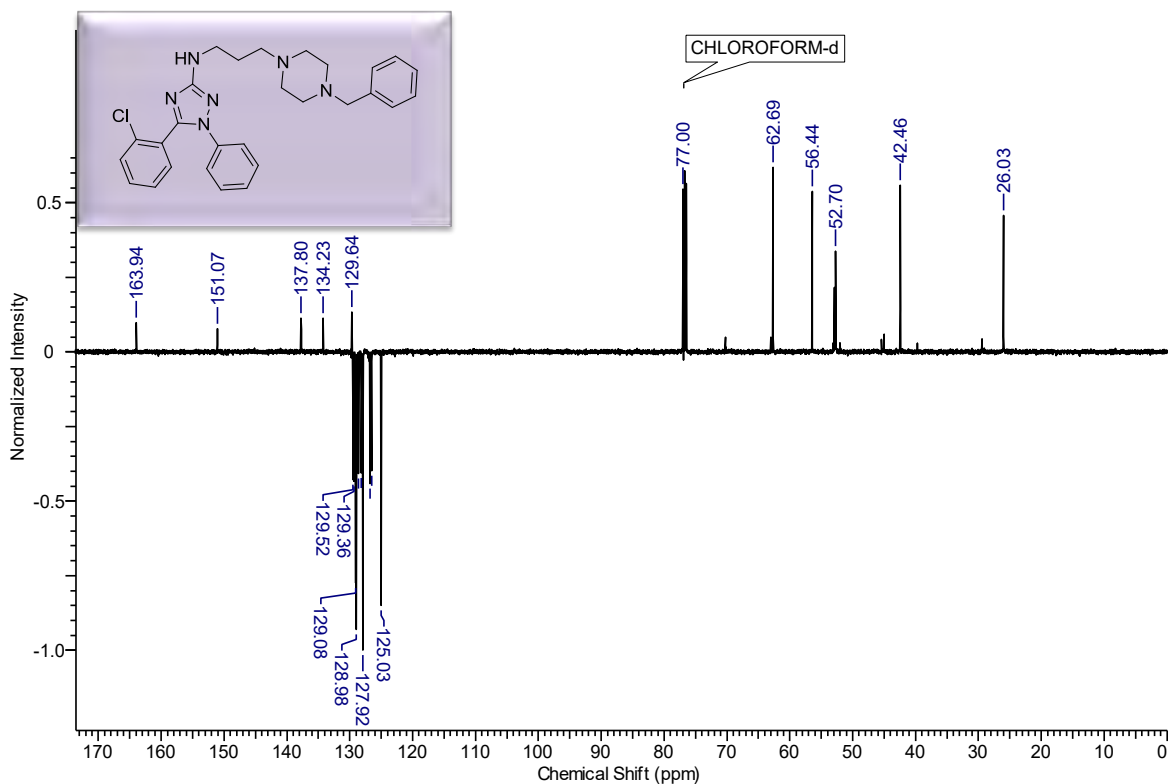
Anexo 138. Espectro de RMN ^{13}C do produto (90f) em CDCl_3 à 125MHz.



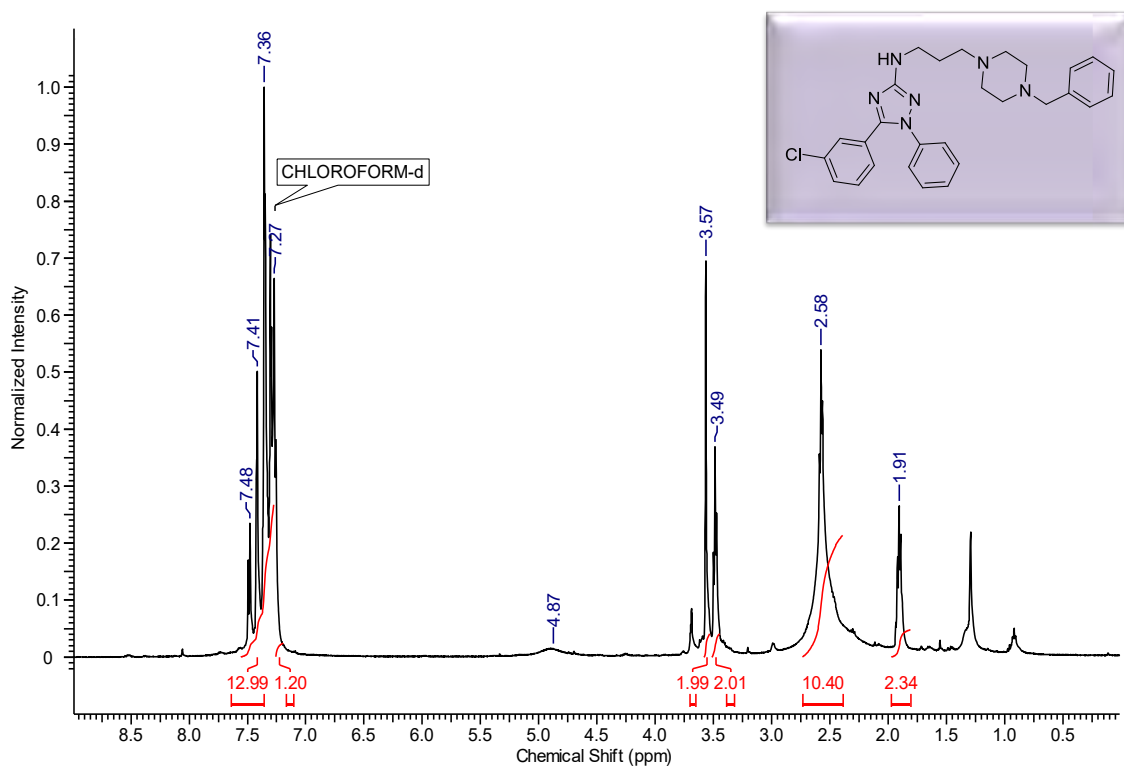
Anexo 141. Espectro de RMN ^1H do composto (90h) em CDCl_3 à 500MHz.



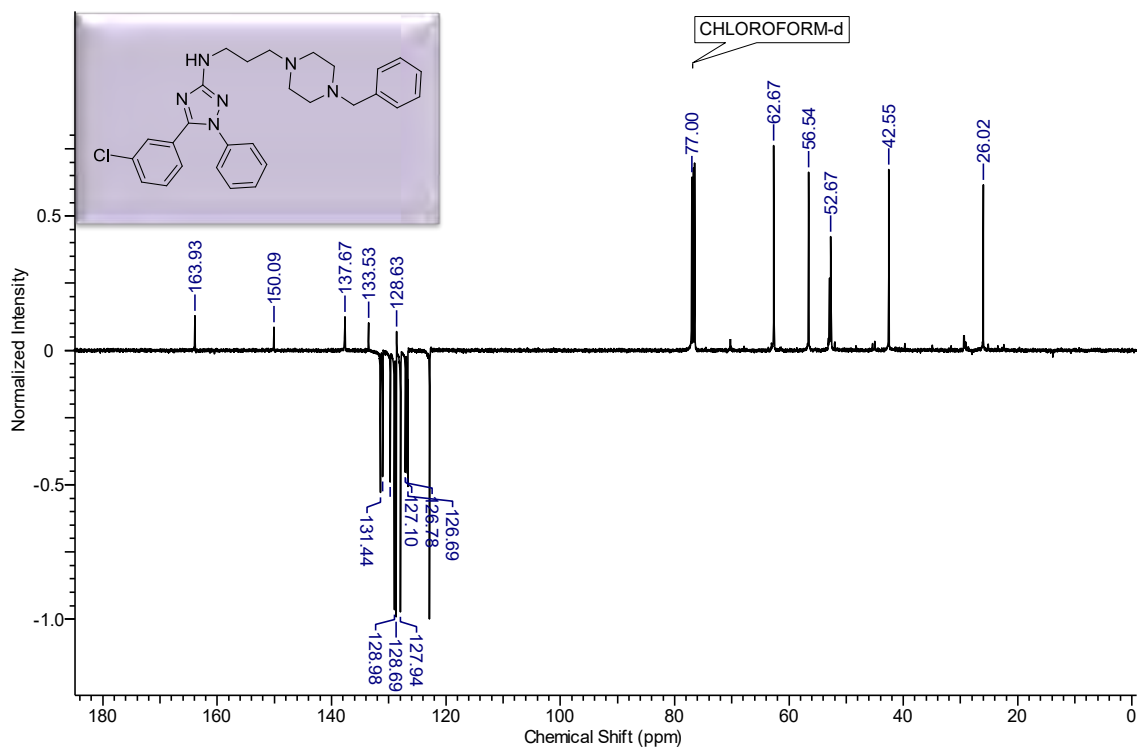
Anexo 142. Espectro de RMN ^{13}C do produto (90h) em CDCl_3 à 125MHz.



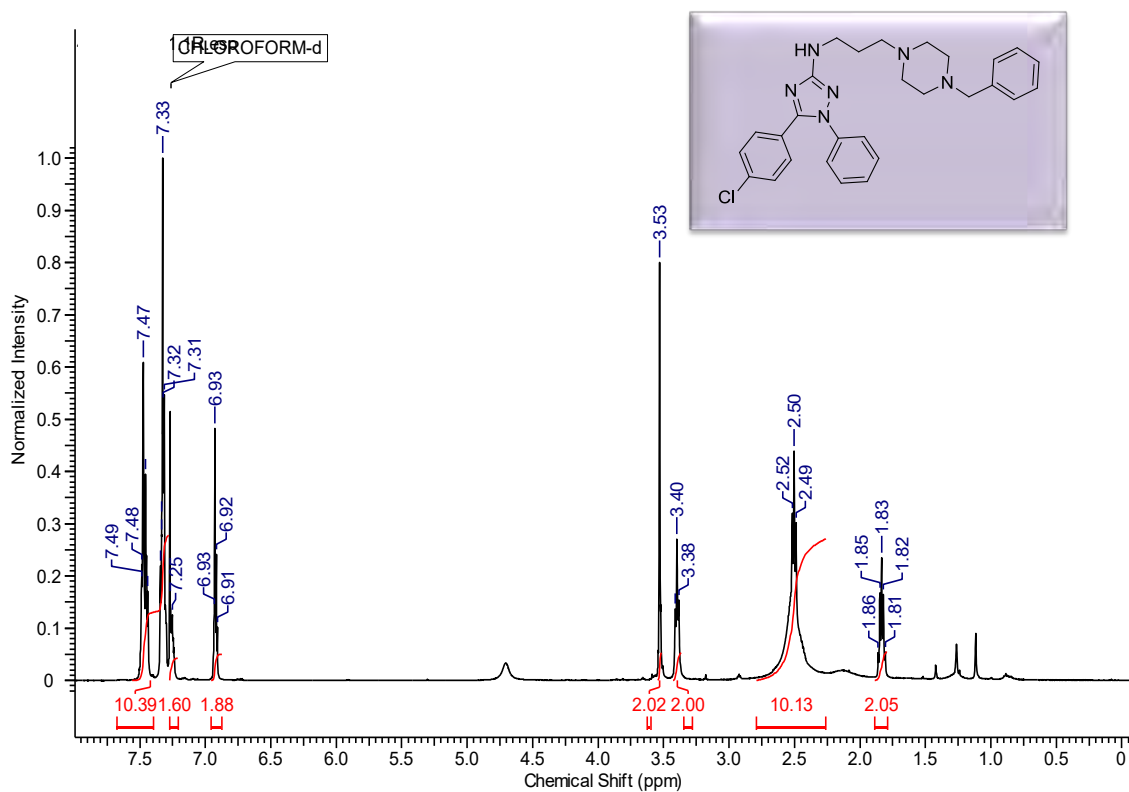
Anexo 143. Espectro de RMN ¹H do composto (90i) em CDCl₃ à 500MHz.



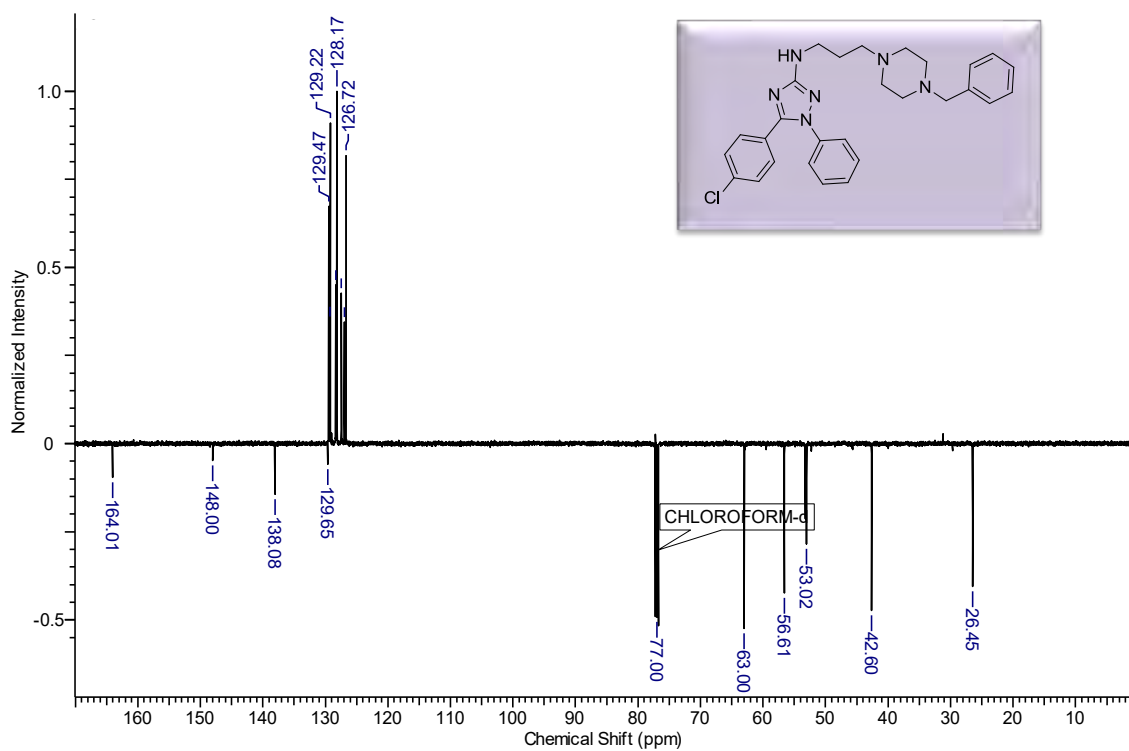
Anexo 144. Espectro de RMN ¹³C do produto (90i) em CDCl₃ à 125MHz.



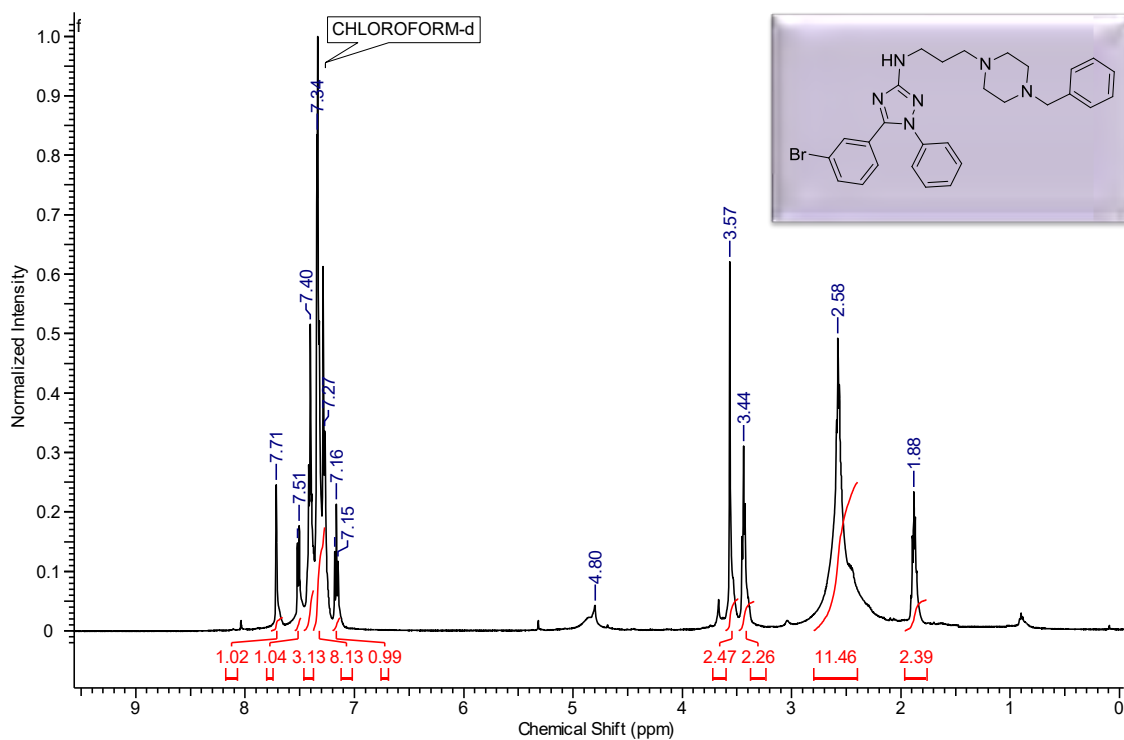
Anexo 145. Espectro de RMN ^1H do composto (90j) em CDCl_3 à 500MHz.



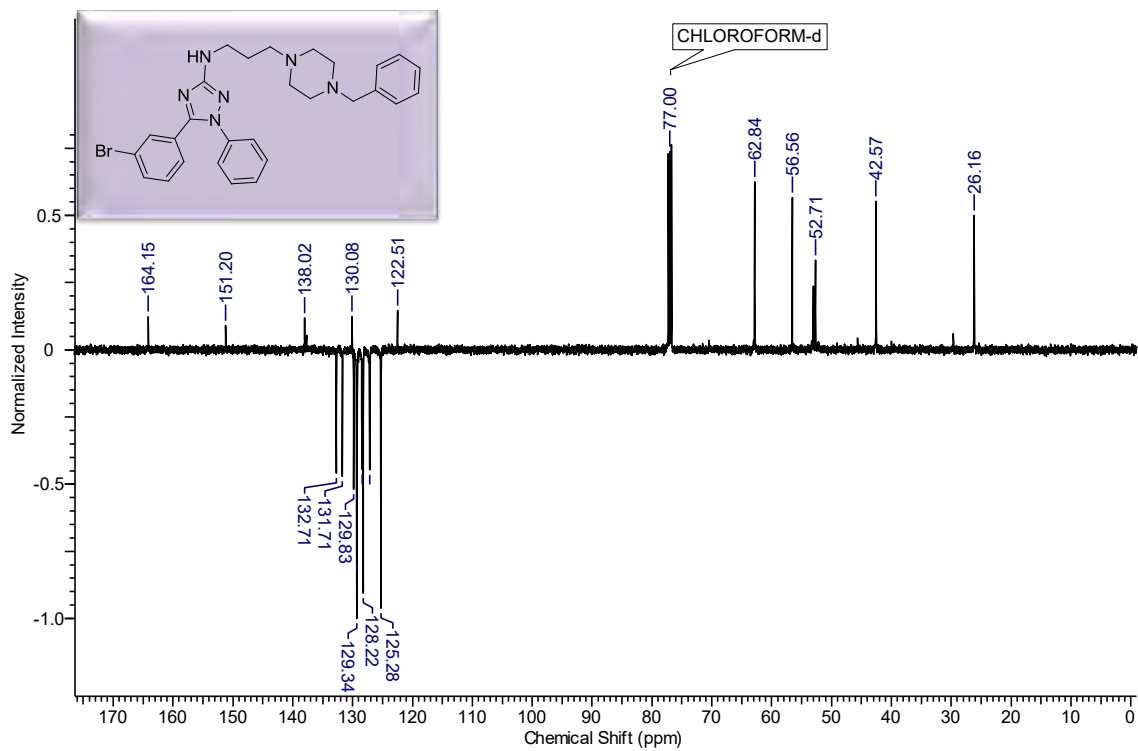
Anexo 146. Espectro de RMN ^{13}C do produto (90j) em CDCl_3 à 125MHz.



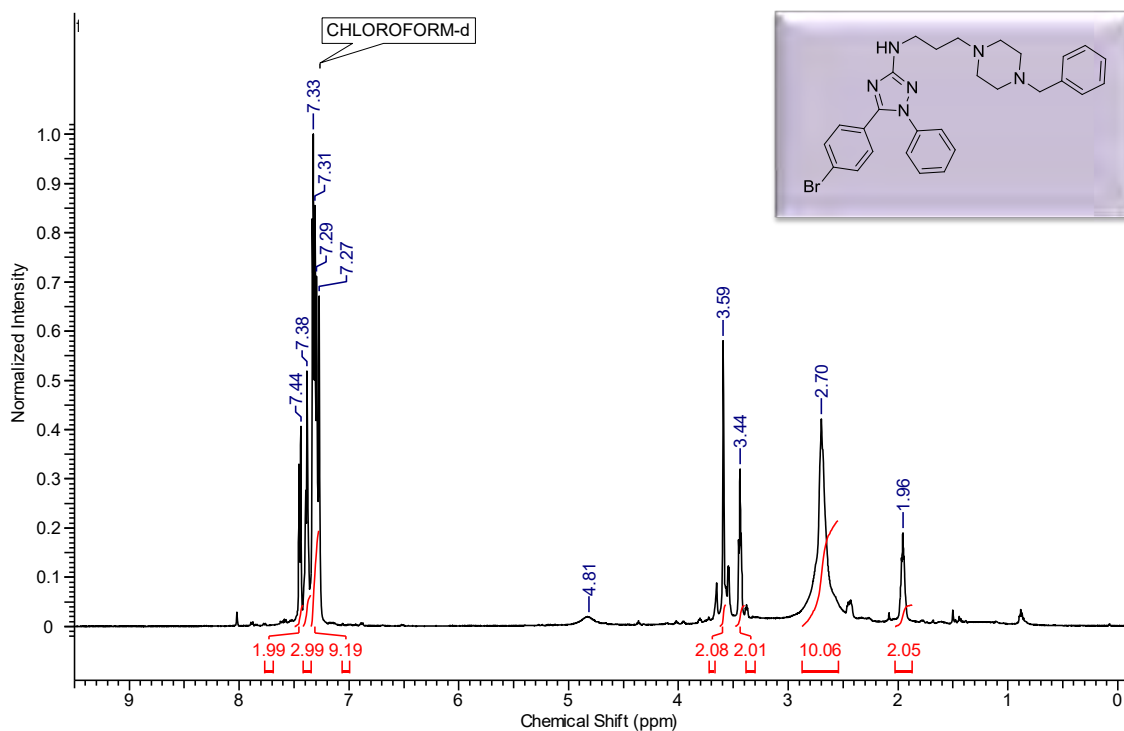
Anexo 147. Espectro de RMN ^1H do composto (90k) em CDCl_3 à 500MHz.



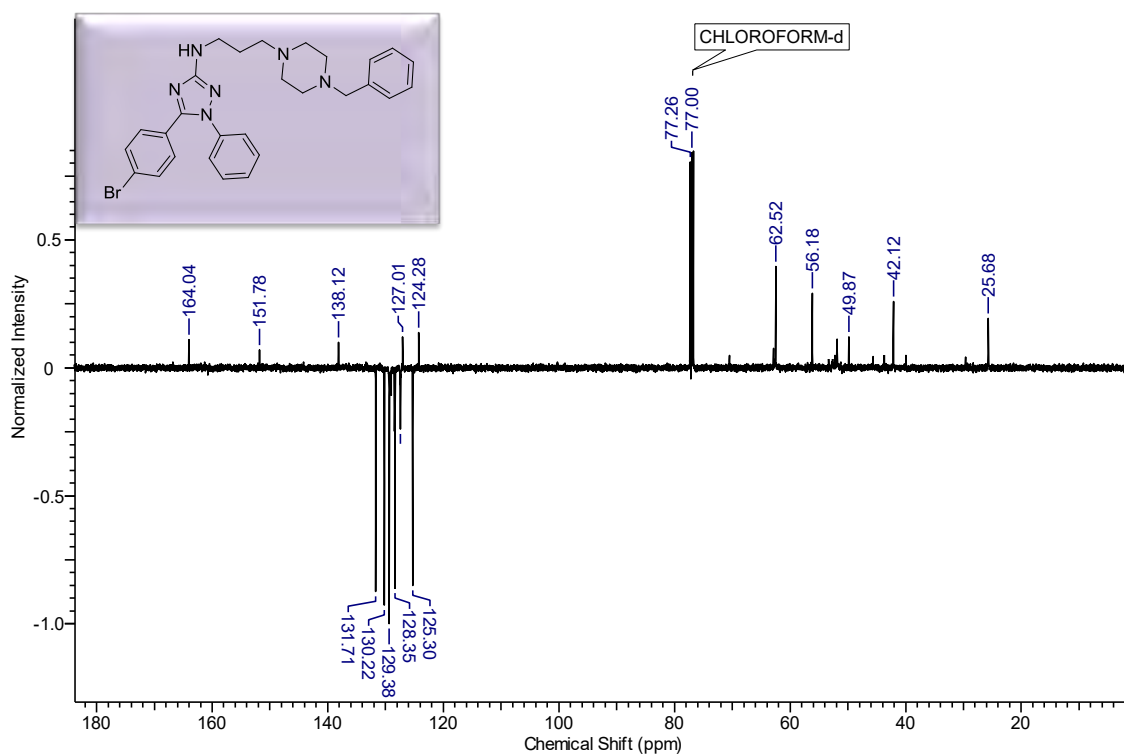
Anexo 148. Espectro de RMN ^{13}C do produto (90k) em CDCl_3 à 125MHz.



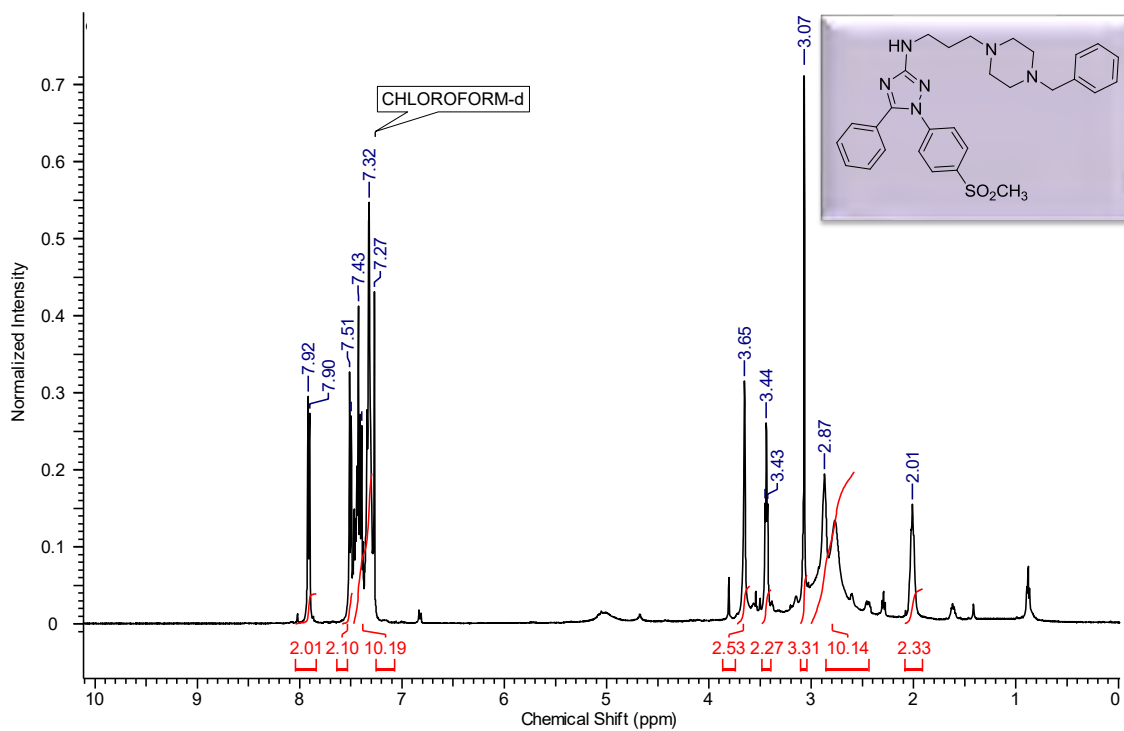
Anexo 149. Espectro de RMN ^1H do composto (90I) em CDCl_3 à 500MHz.



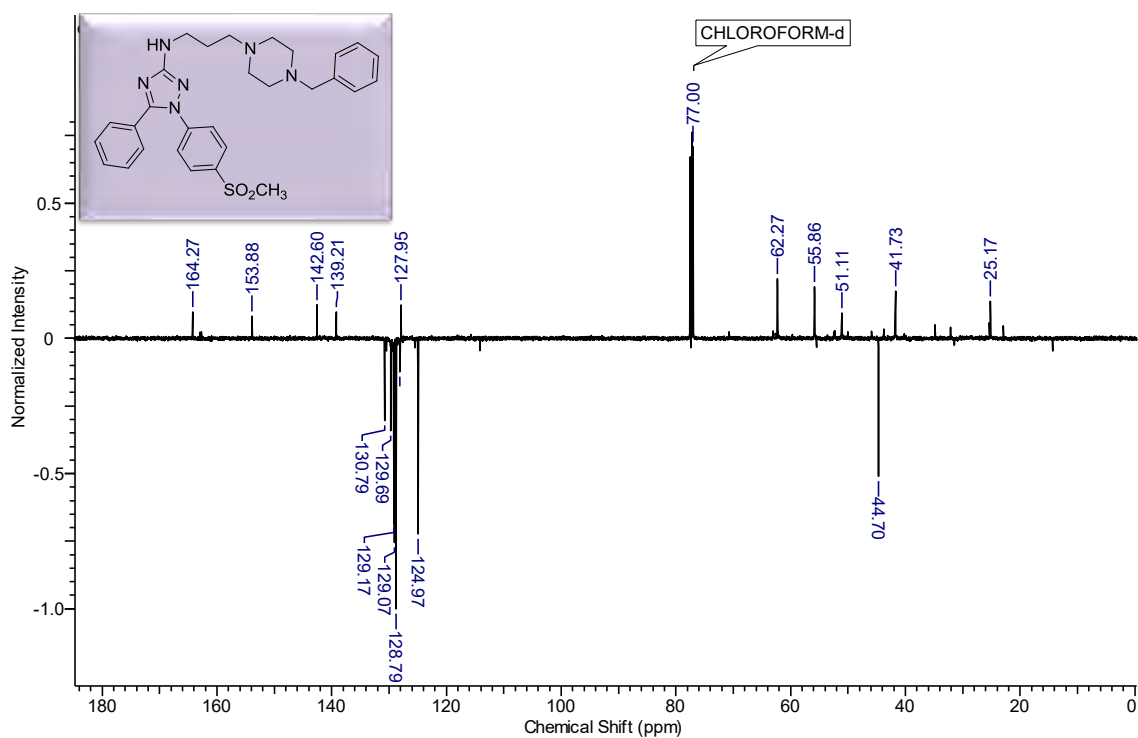
Anexo 150. Espectro de RMN ^{13}C do produto (90I) em CDCl_3 à 125MHz.



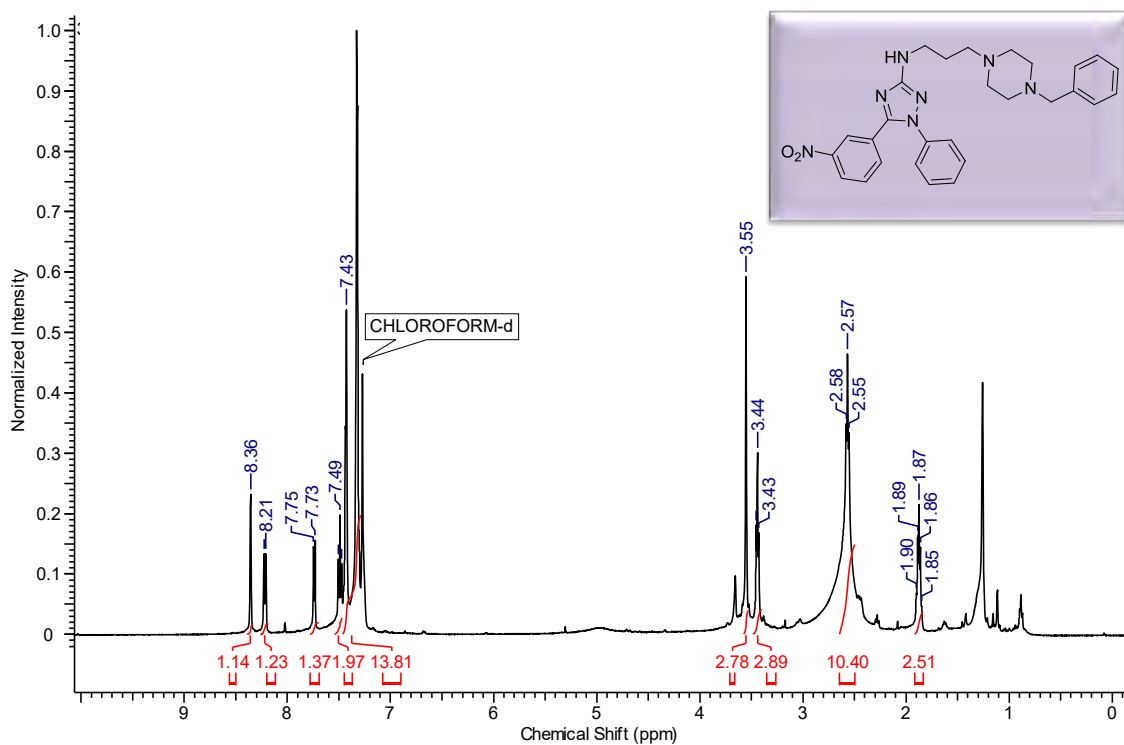
Anexo 151. Espectro de RMN ^1H do composto (90m) em CDCl_3 à 500MHz.



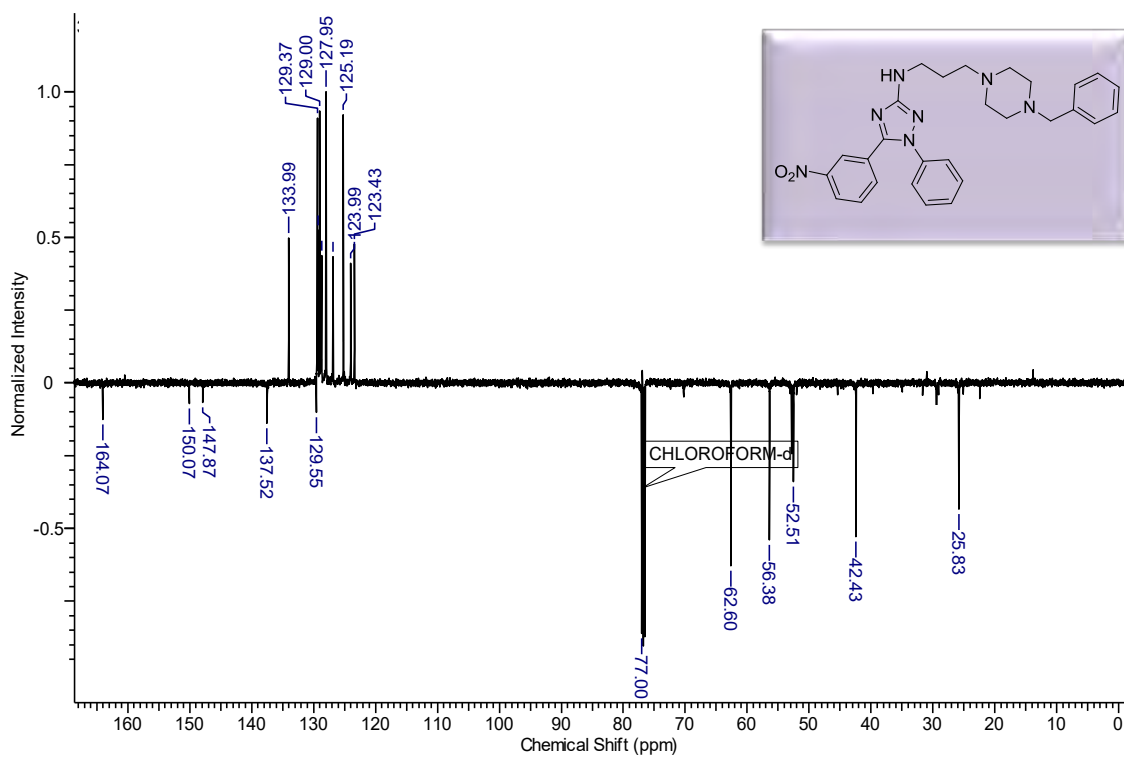
Anexo 152. Espectro de RMN ^{13}C do produto (90m) em CDCl_3 à 125MHz.



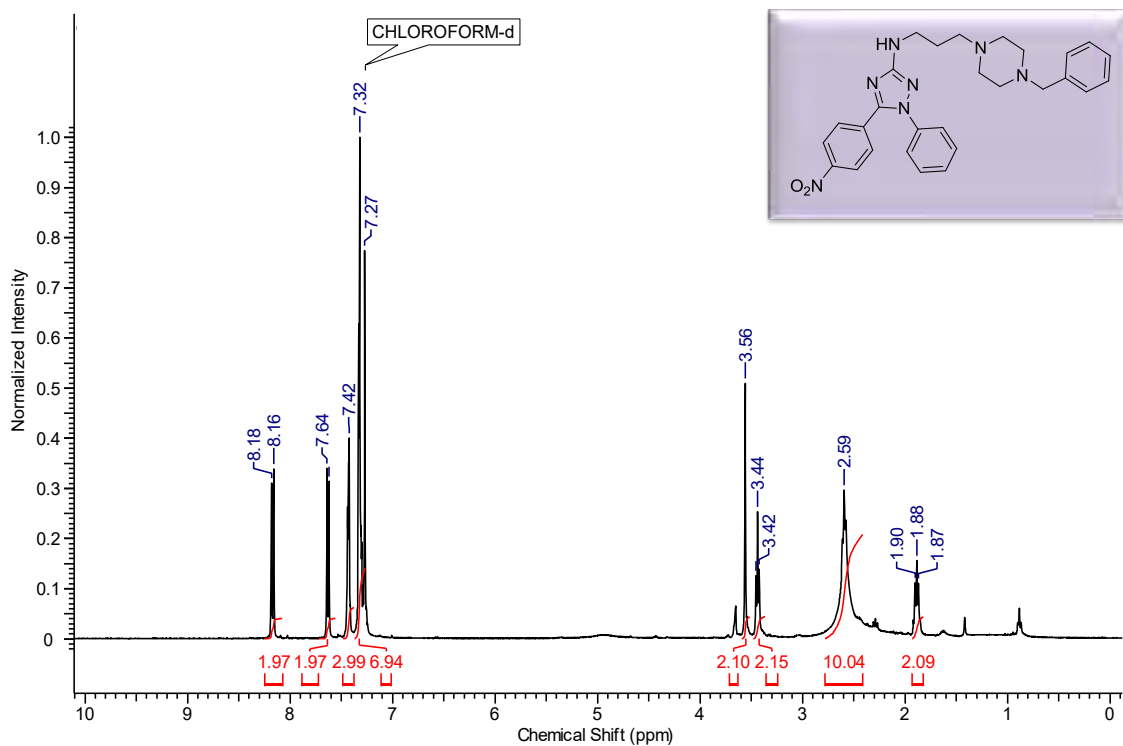
Anexo 153. Espectro de RMN ^1H do composto (90n) em CDCl_3 à 500MHz.



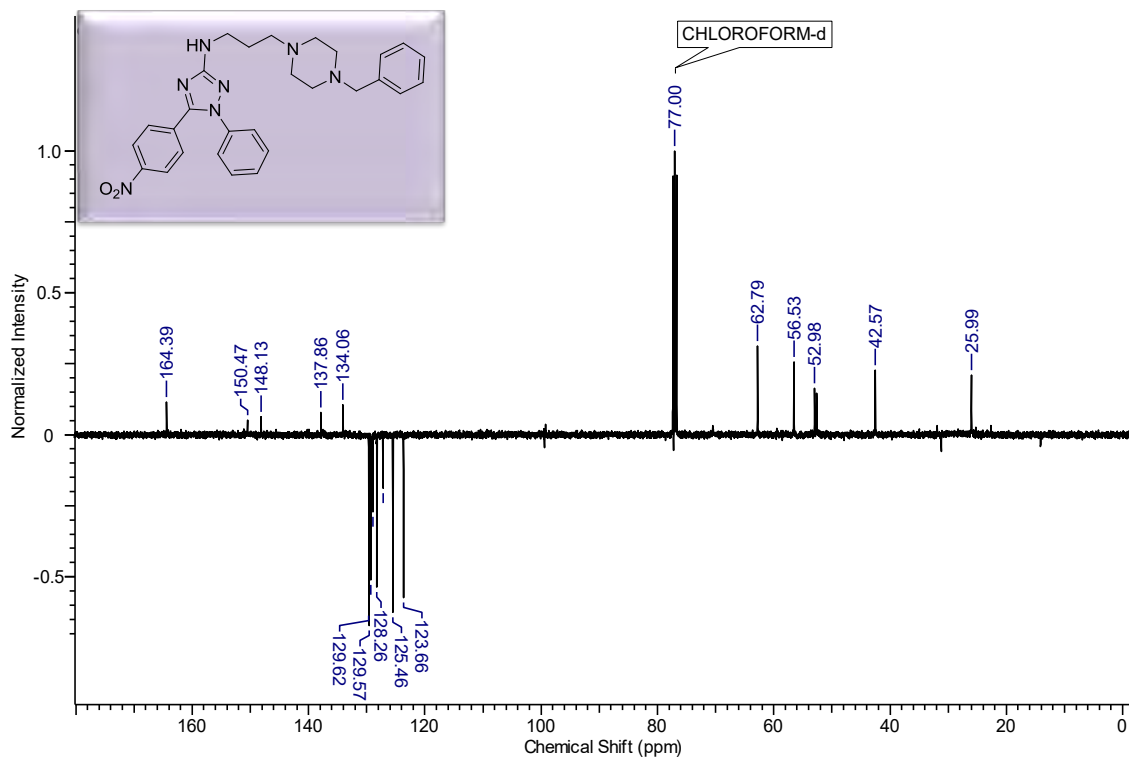
Anexo 154. Espectro de RMN ^{13}C do produto (90n) em CDCl_3 à 125MHz.



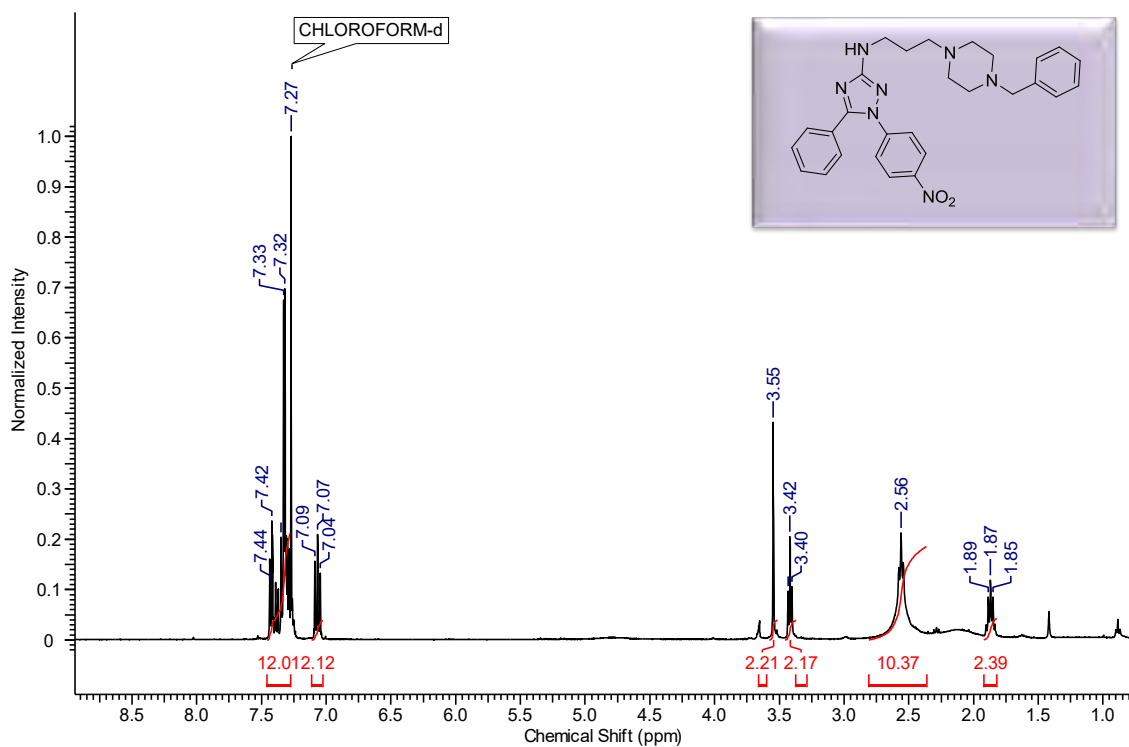
Anexo 155. Espectro de RMN ^1H do composto (90o) em CDCl_3 à 500MHz.



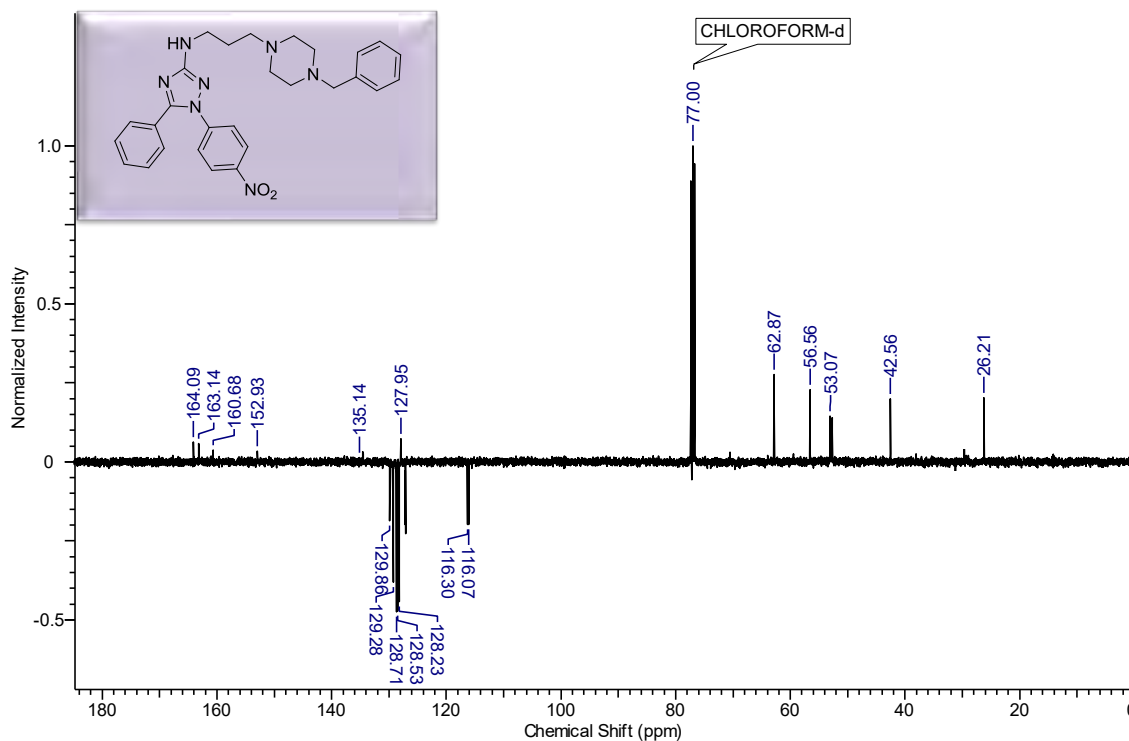
Anexo 156. Espectro de RMN ^{13}C do produto (90o) em CDCl_3 à 125MHz.



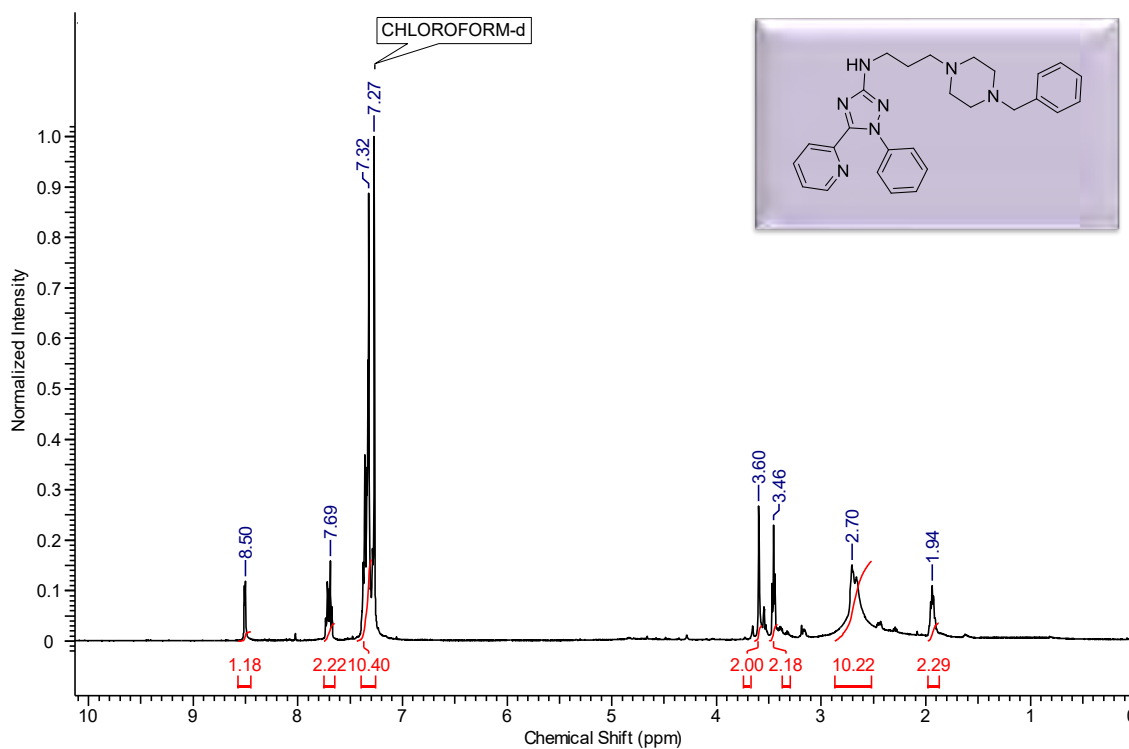
Anexo 157. Espectro de RMN ^1H do composto (90p) em CDCl_3 à 500MHz.



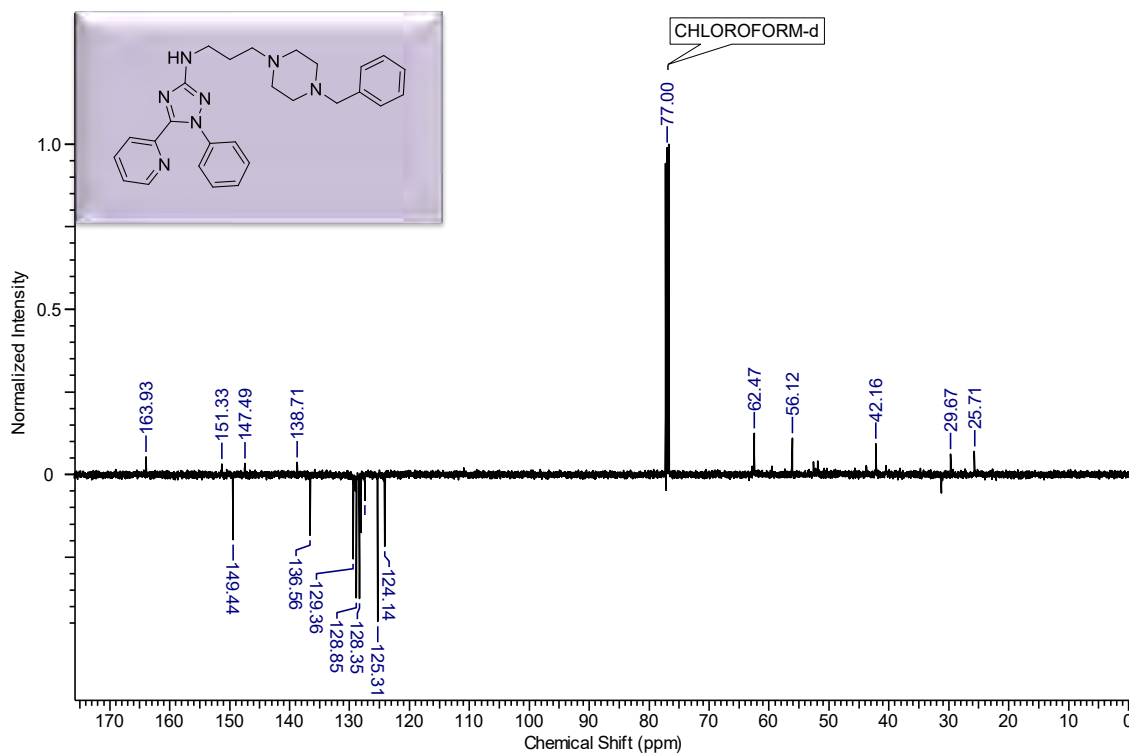
Anexo 158. Espectro de RMN ^{13}C do produto (90p) em CDCl_3 à 125MHz.



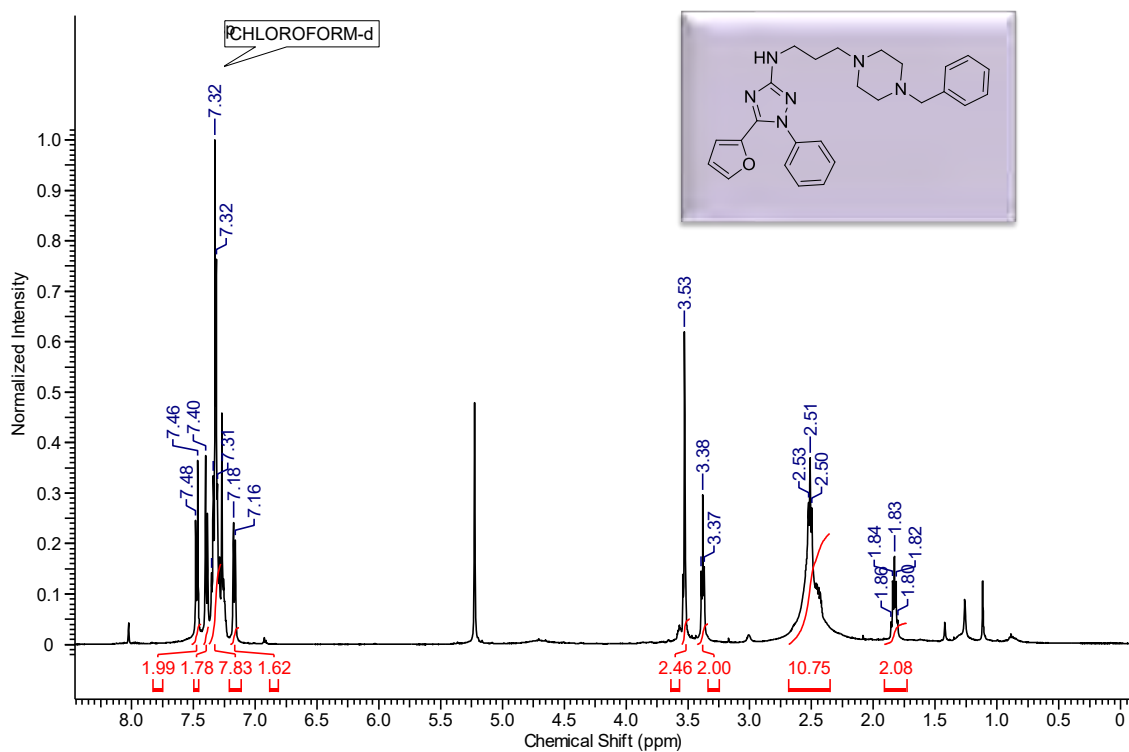
Anexo 161. Espectro de RMN ^1H do composto (90r) em CDCl_3 à 500MHz.



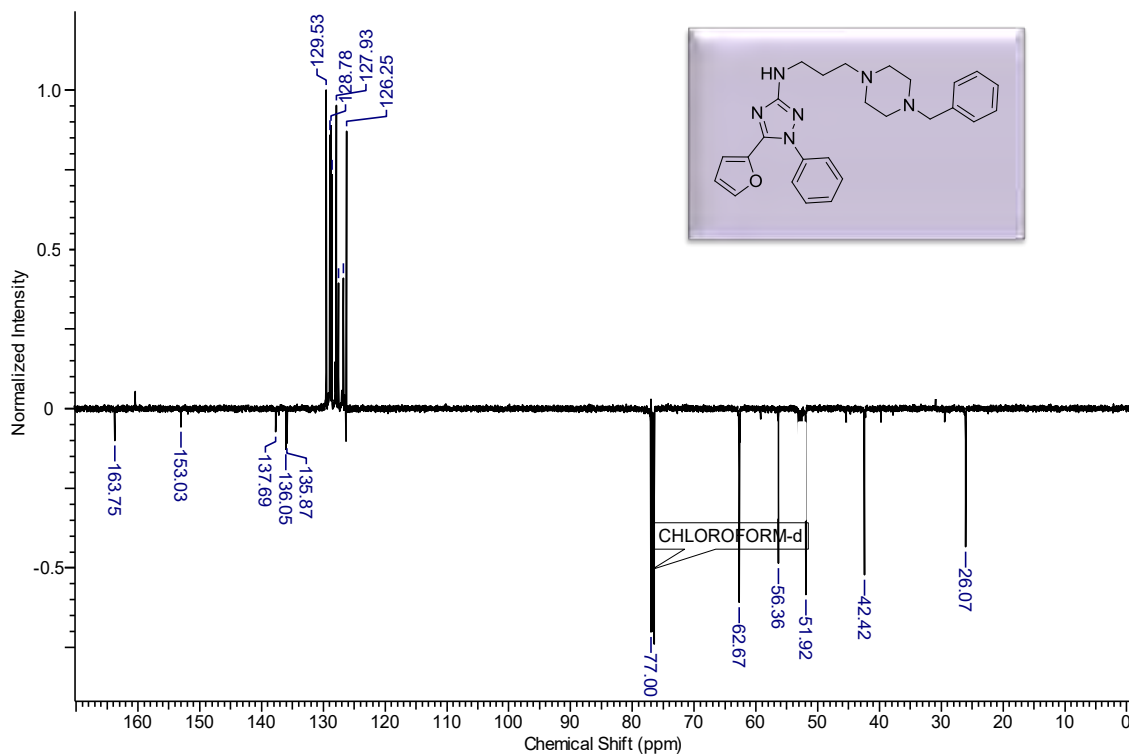
Anexo 162. Espectro de RMN ^{13}C do produto (90r) em CDCl_3 à 125MHz.



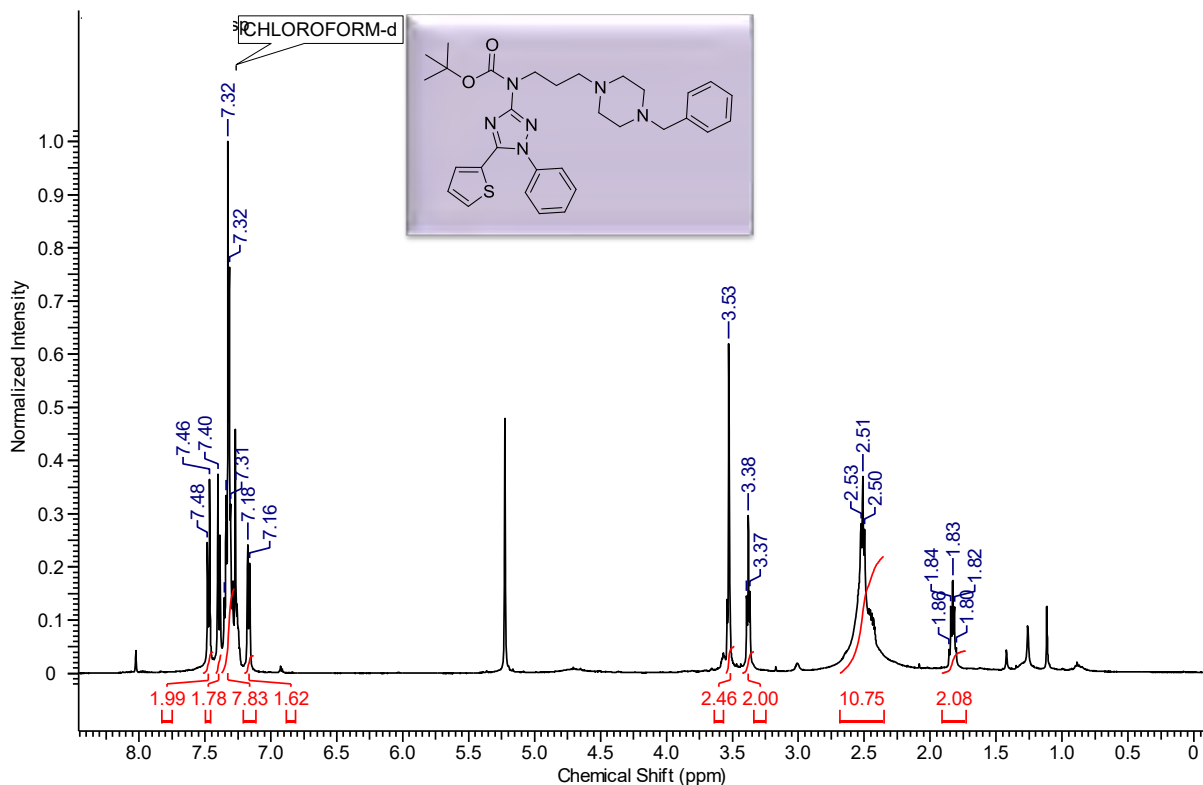
Anexo 163. Espectro de RMN ^1H do composto (90s) em CDCl_3 à 500MHz.



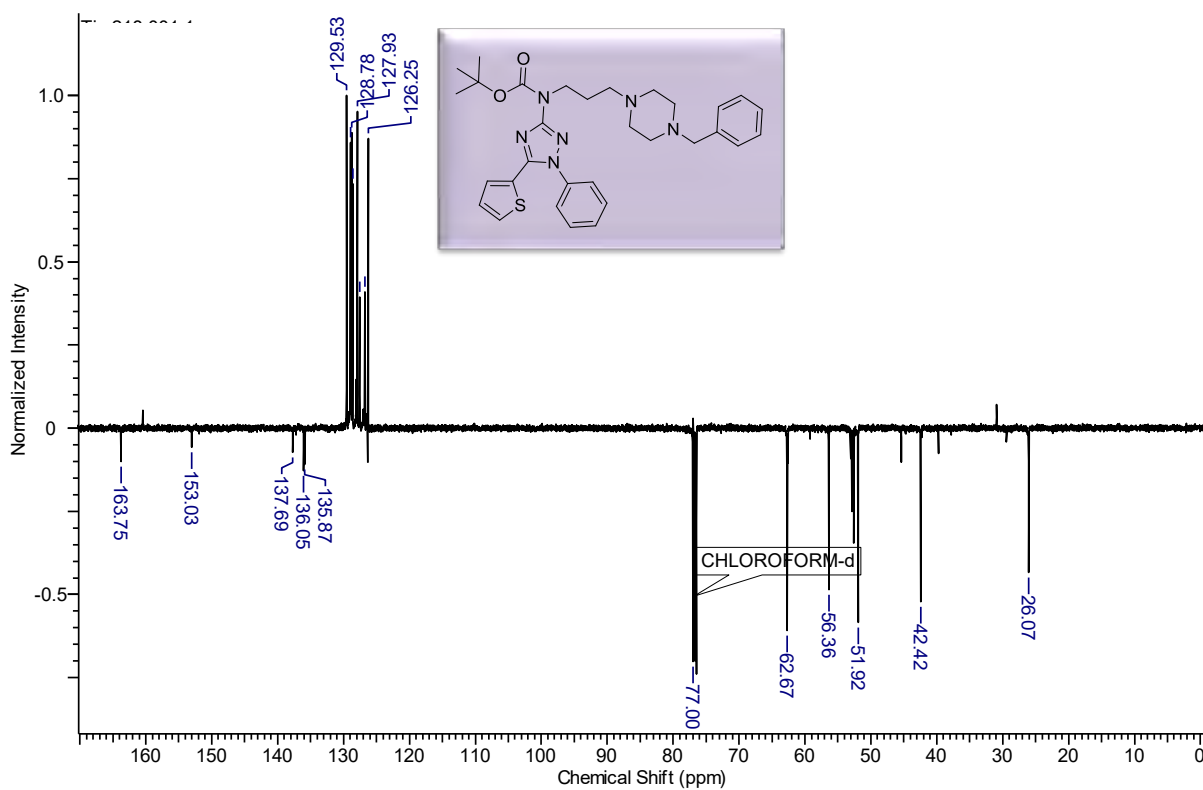
Anexo 164. Espectro de RMN ^{13}C do produto (90s) em CDCl_3 à 125MHz.



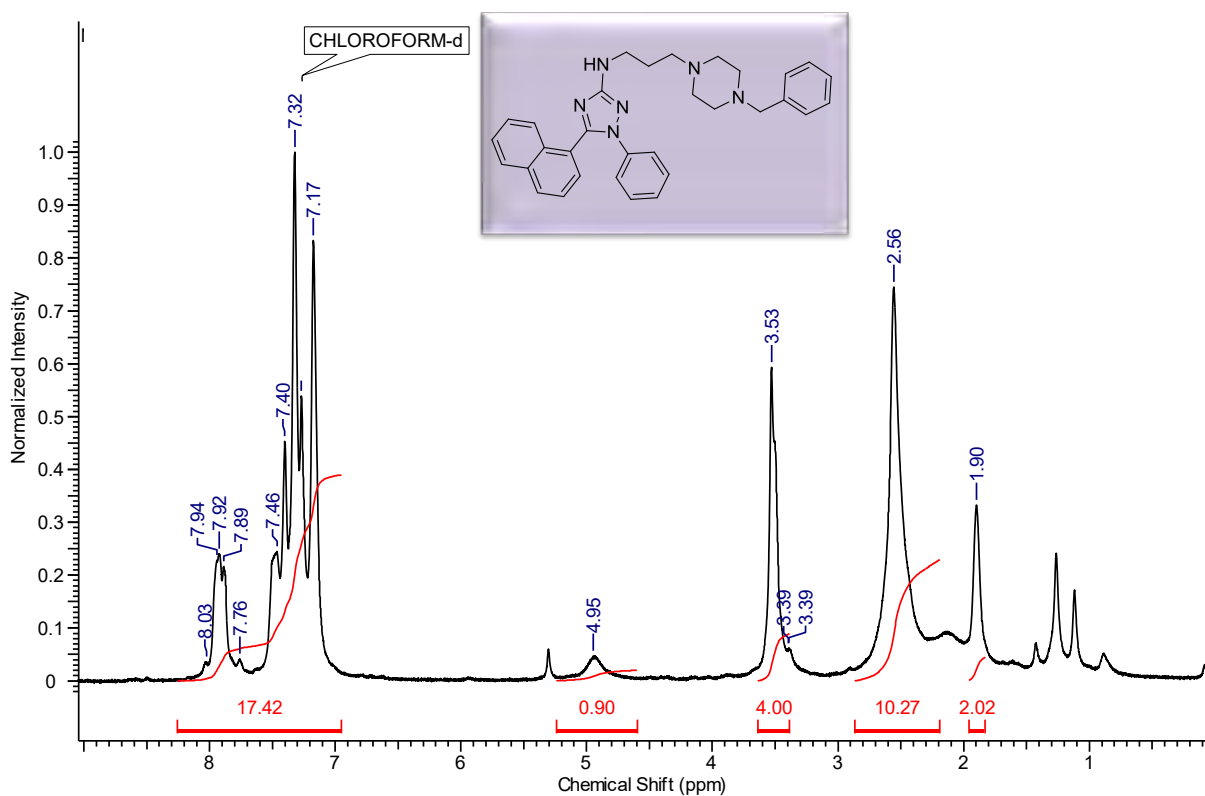
Anexo 165. Espectro de RMN ^1H do composto (90t) em CDCl_3 à 500MHz.



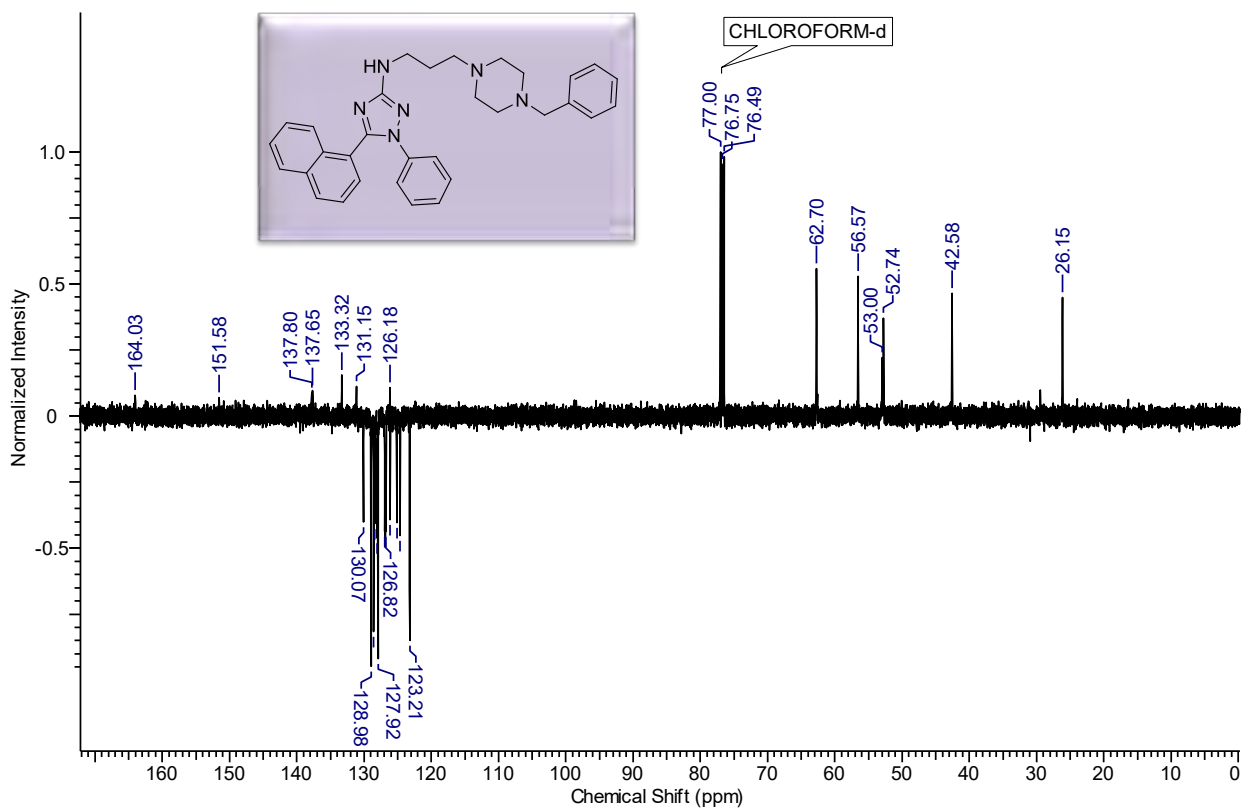
Anexo 166. Espectro de RMN ^{13}C do produto (90t) em CDCl_3 à 125MHz.



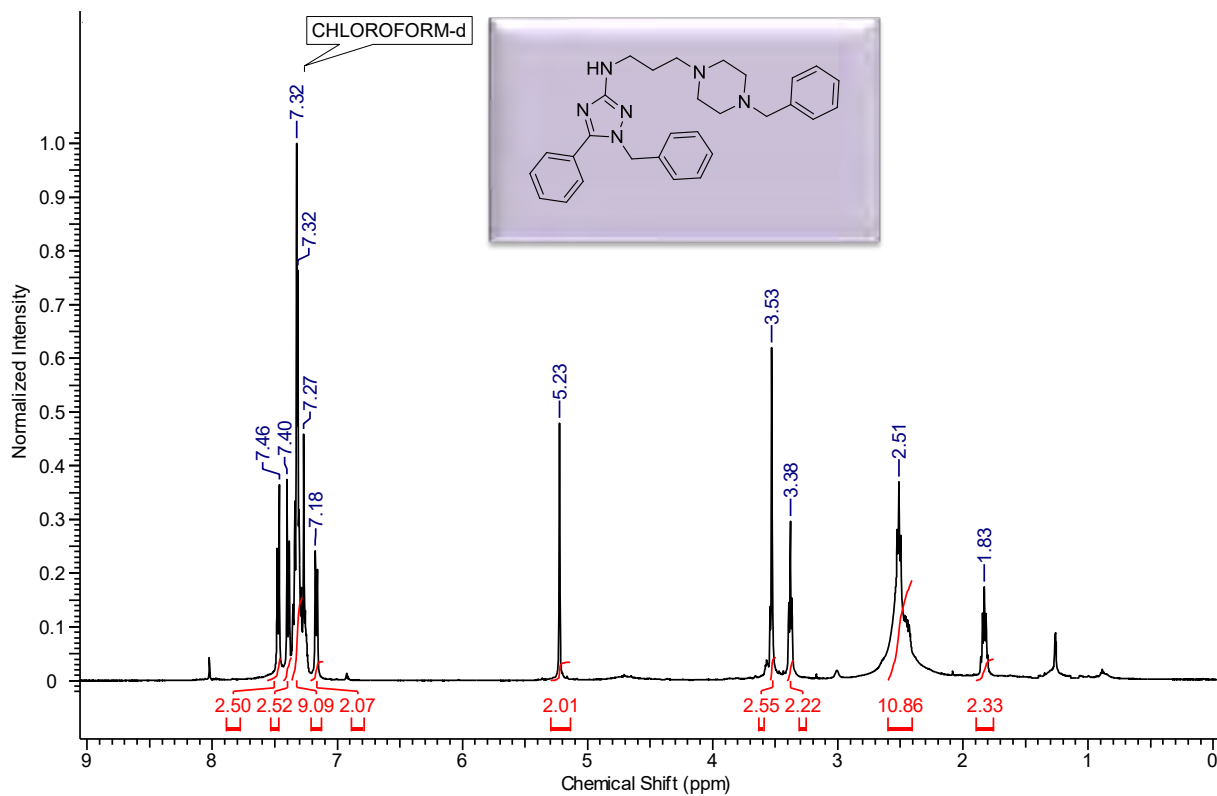
Anexo 167. Espectro de RMN ^1H do composto (90u) em CDCl_3 à 500MHz.



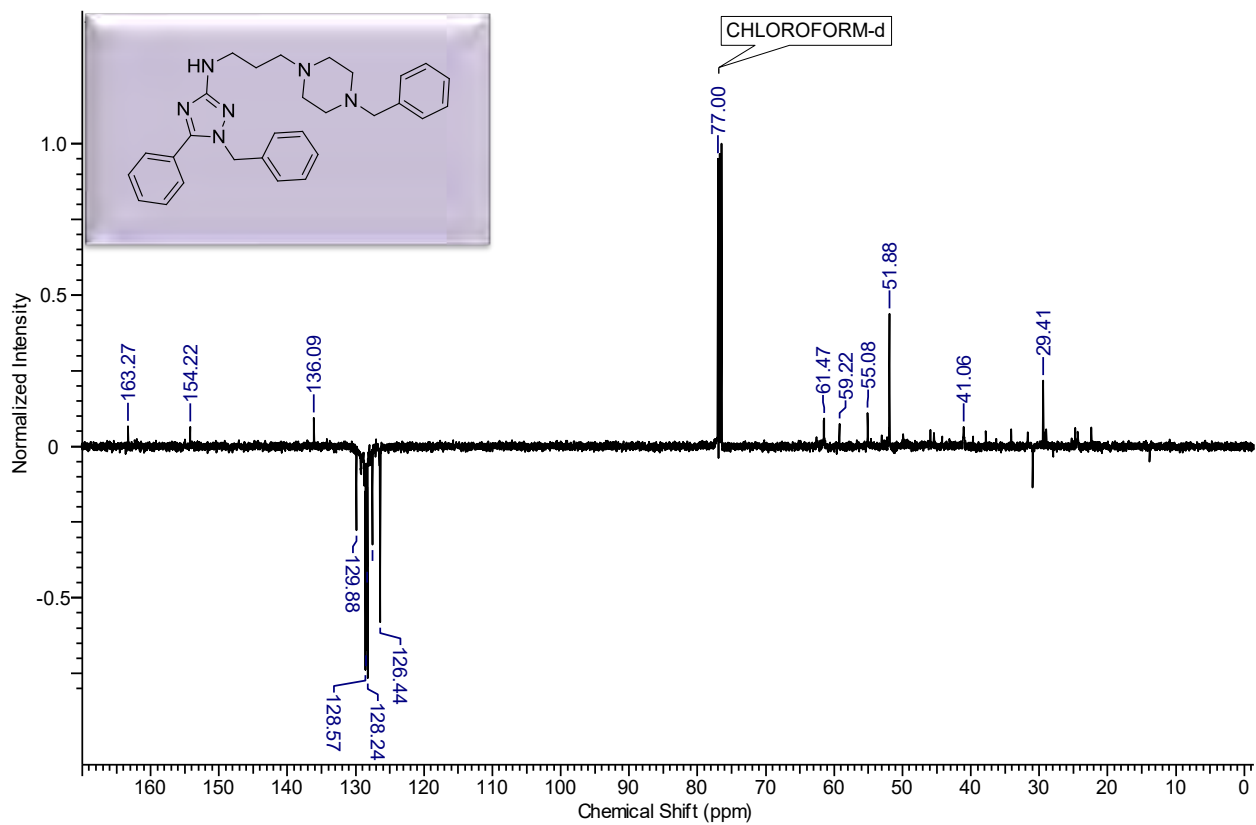
Anexo 168. Espectro de RMN ^{13}C do produto (90u) em CDCl_3 à 125MHz.



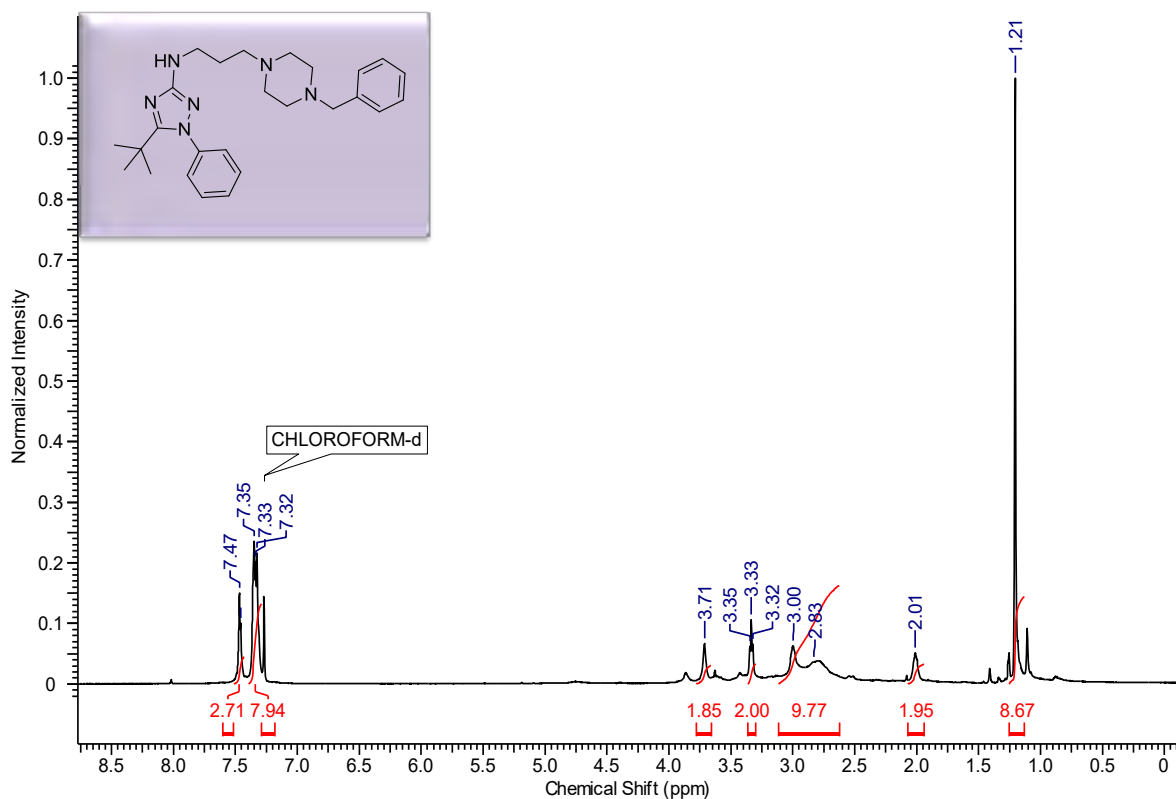
Anexo 171. Espectro de RMN ¹H do composto (90w) em CDCl₃ à 500MHz.



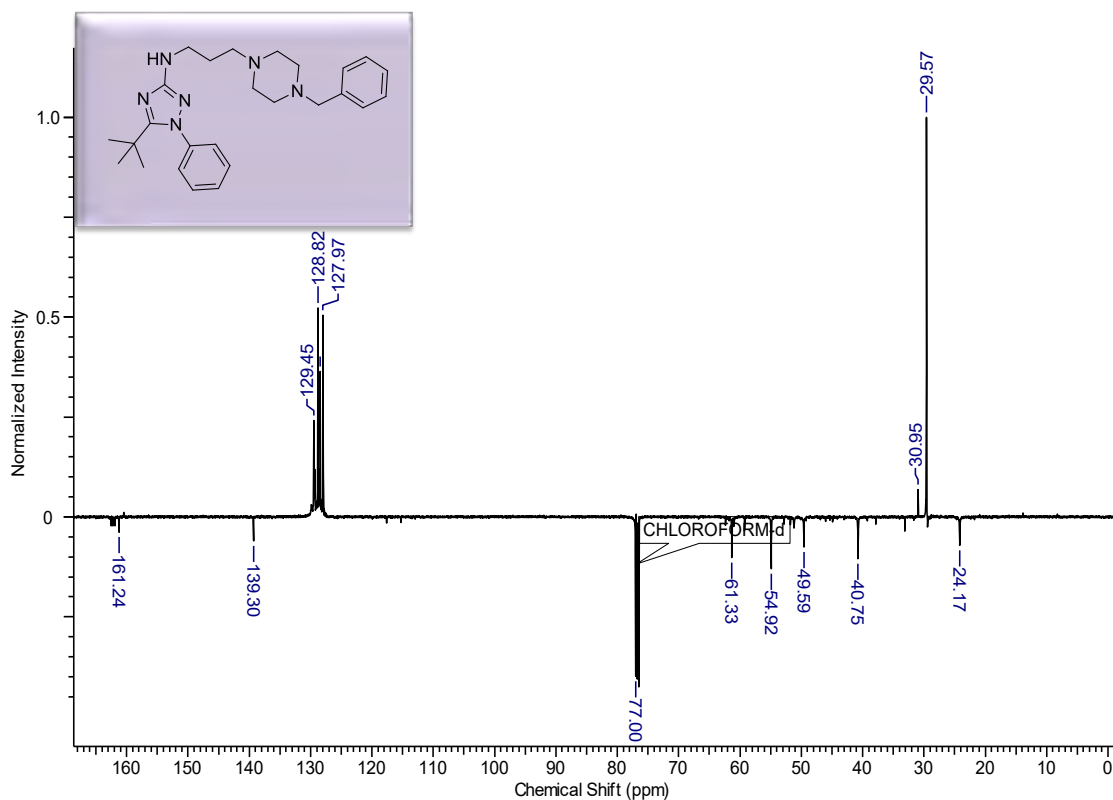
Anexo 172. Espectro de RMN ¹³C do produto (90w) em CDCl₃ à 125MHz.



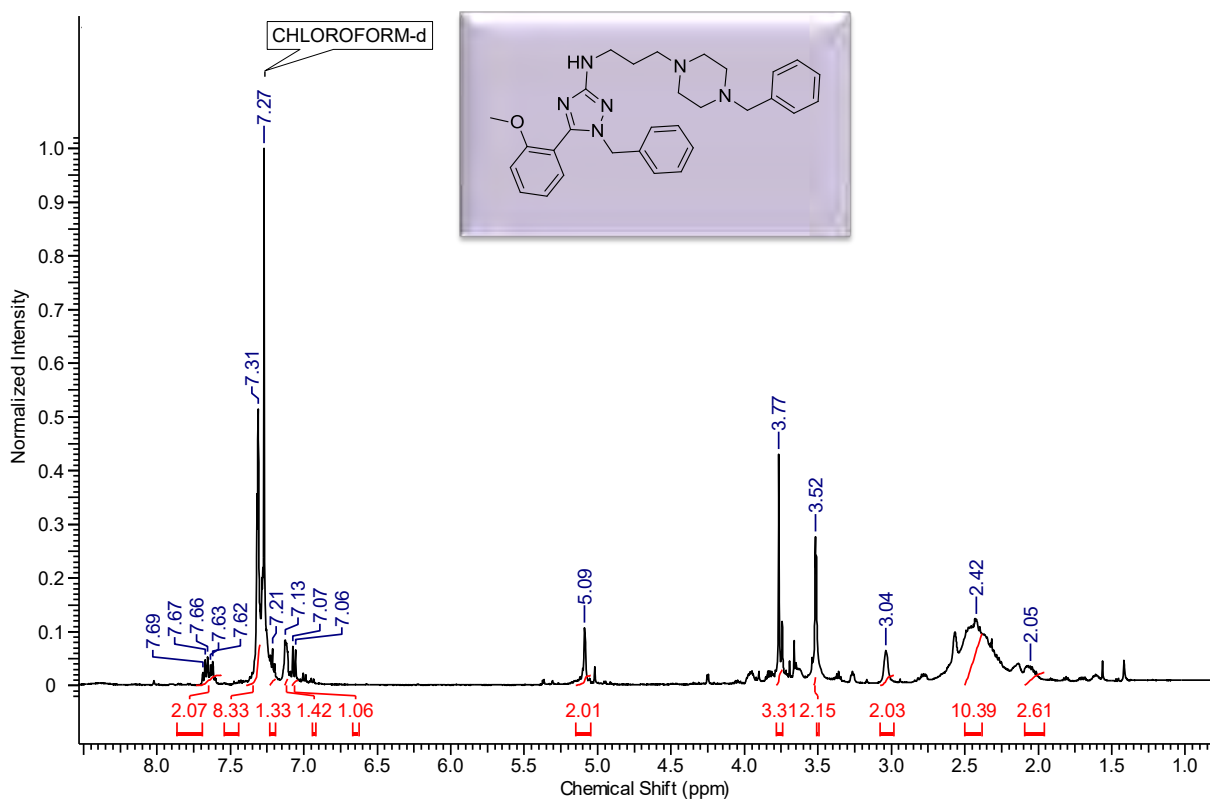
Anexo 173. Espectro de RMN ^1H do composto (90x) em CDCl_3 à 500MHz.



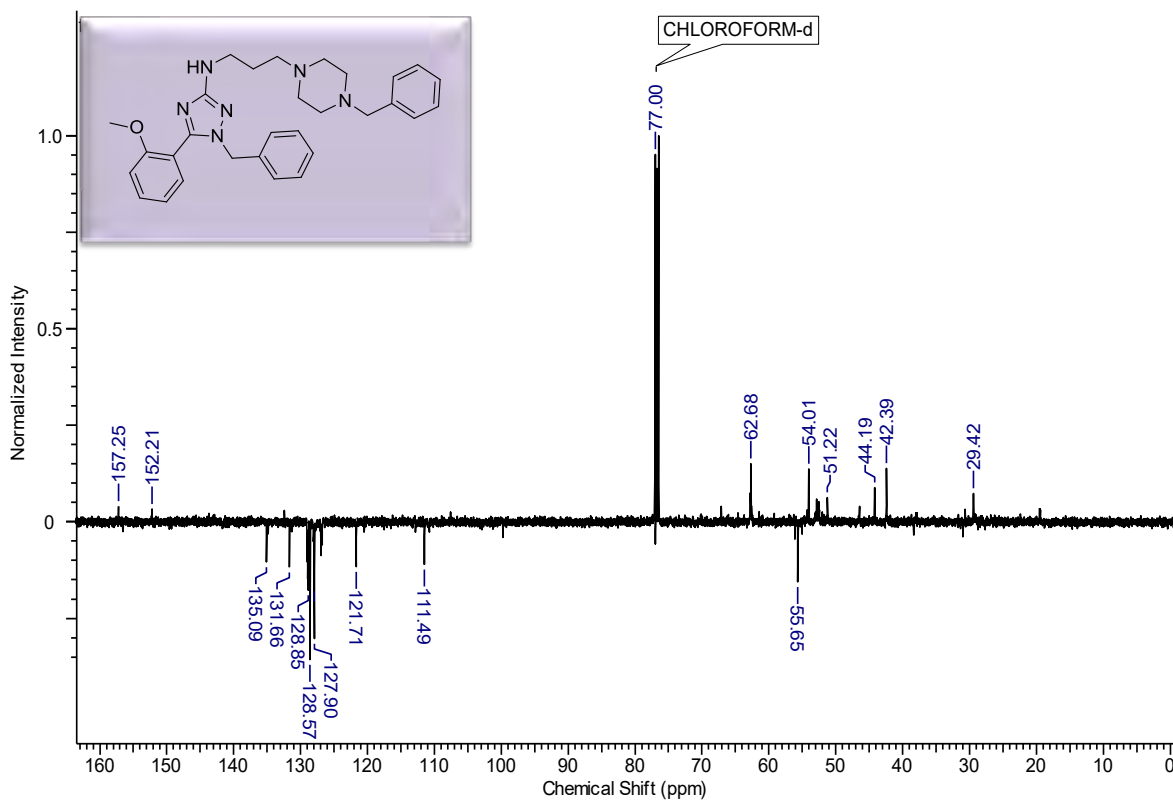
Anexo 174. Espectro de RMN ^{13}C do produto (90x) em CDCl_3 à 125MHz.



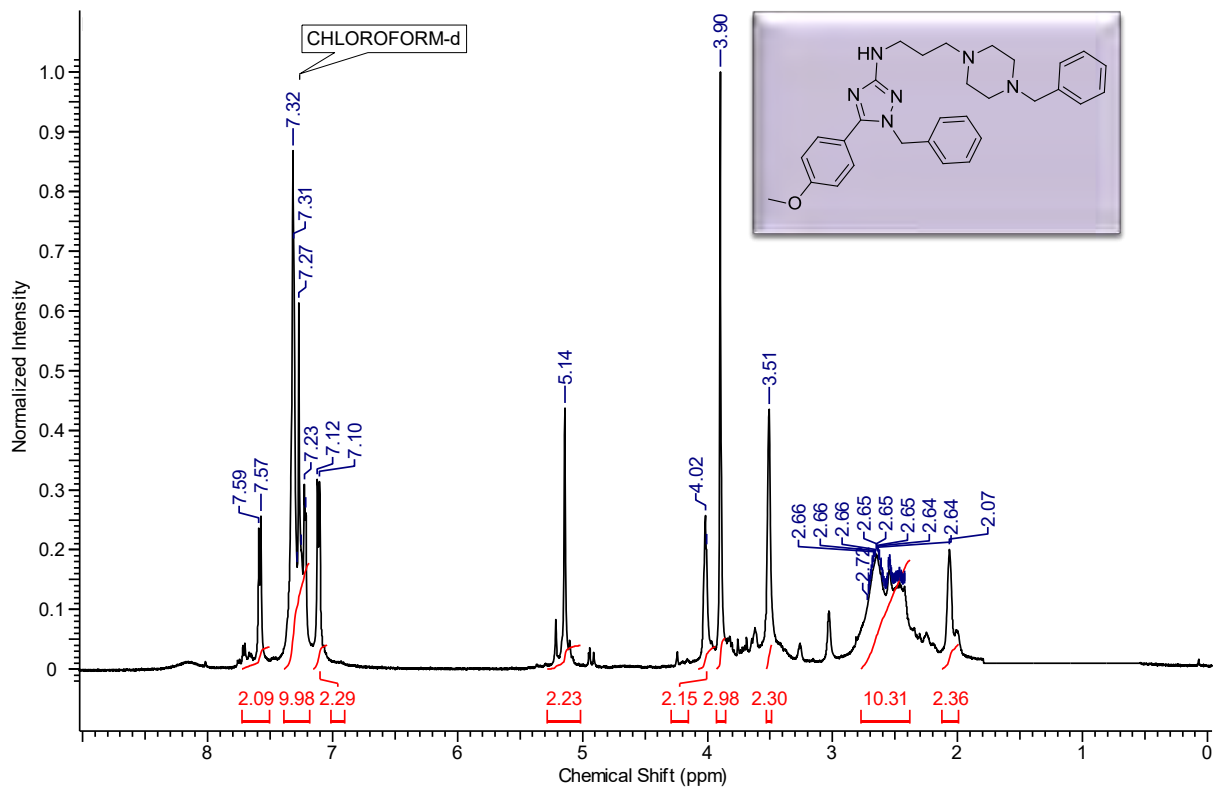
Anexo 175. Espectro de RMN ^1H do composto (90y) em CDCl_3 à 500MHz.



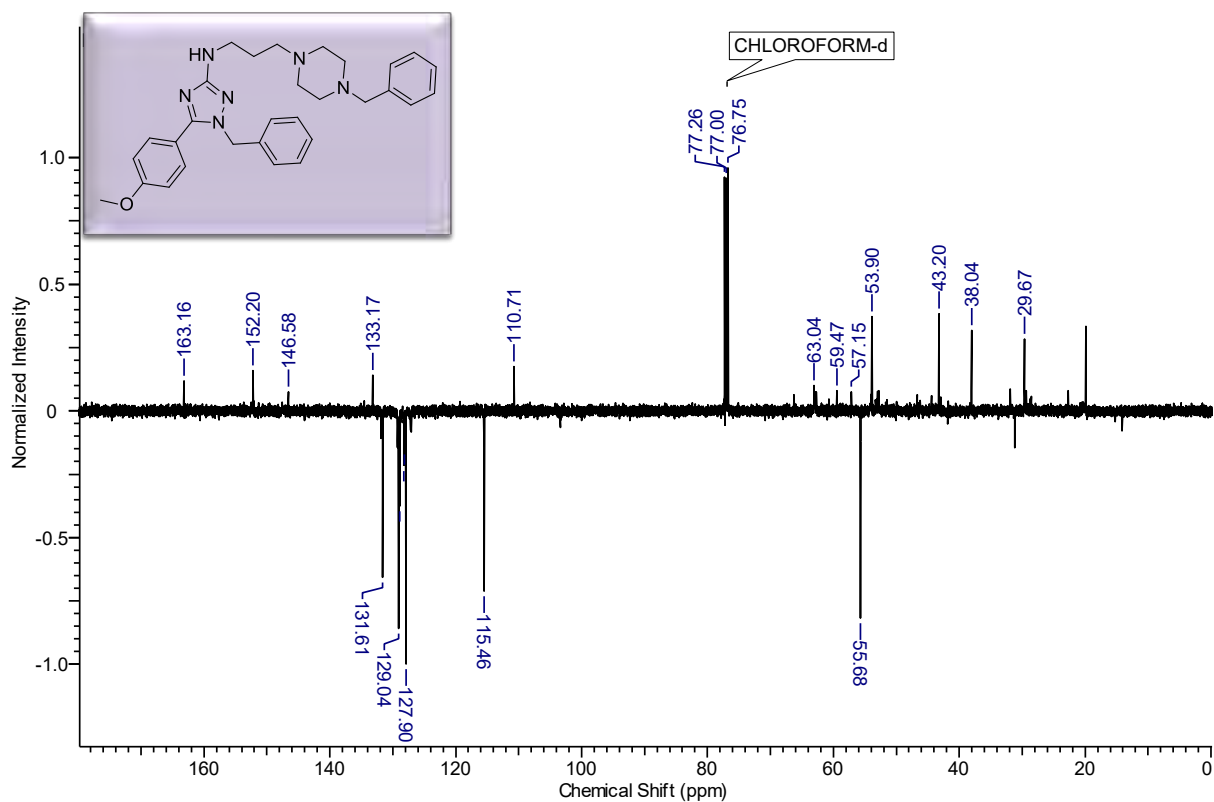
Anexo 176. Espectro de RMN ^{13}C do produto (90y) em CDCl_3 à 125MHz.



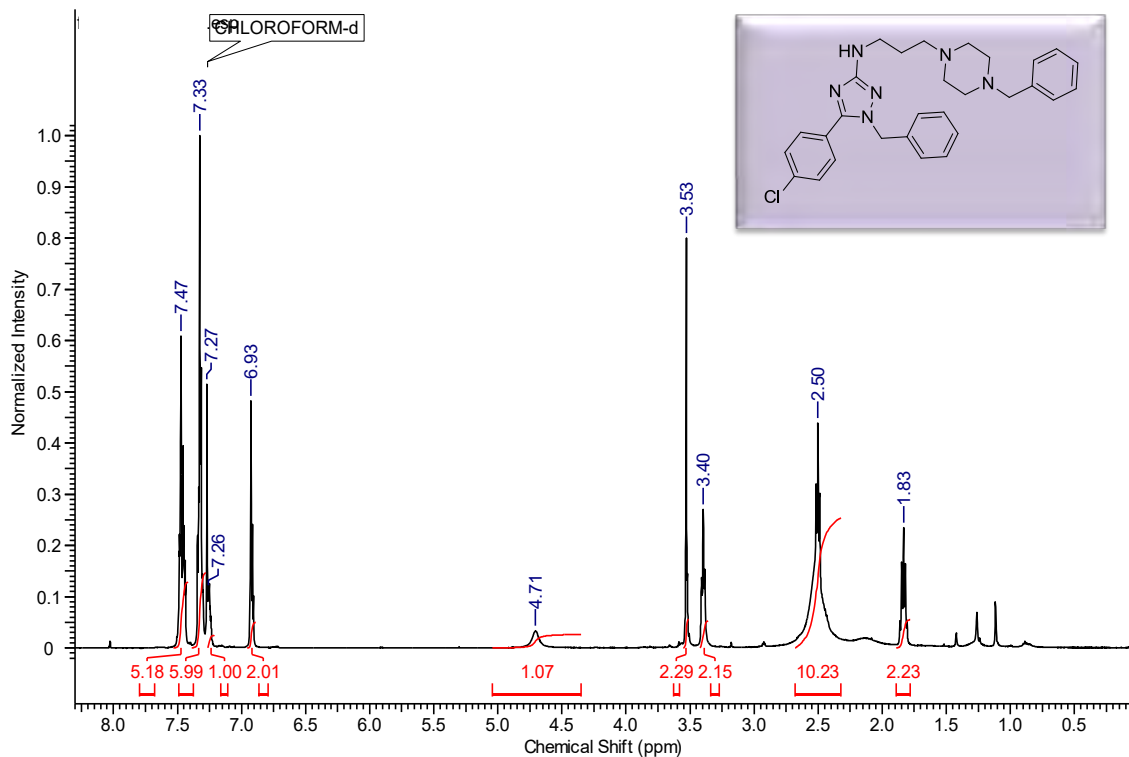
Anexo 177. Espectro de RMN ^1H do composto (90z) em CDCl_3 à 500MHz.



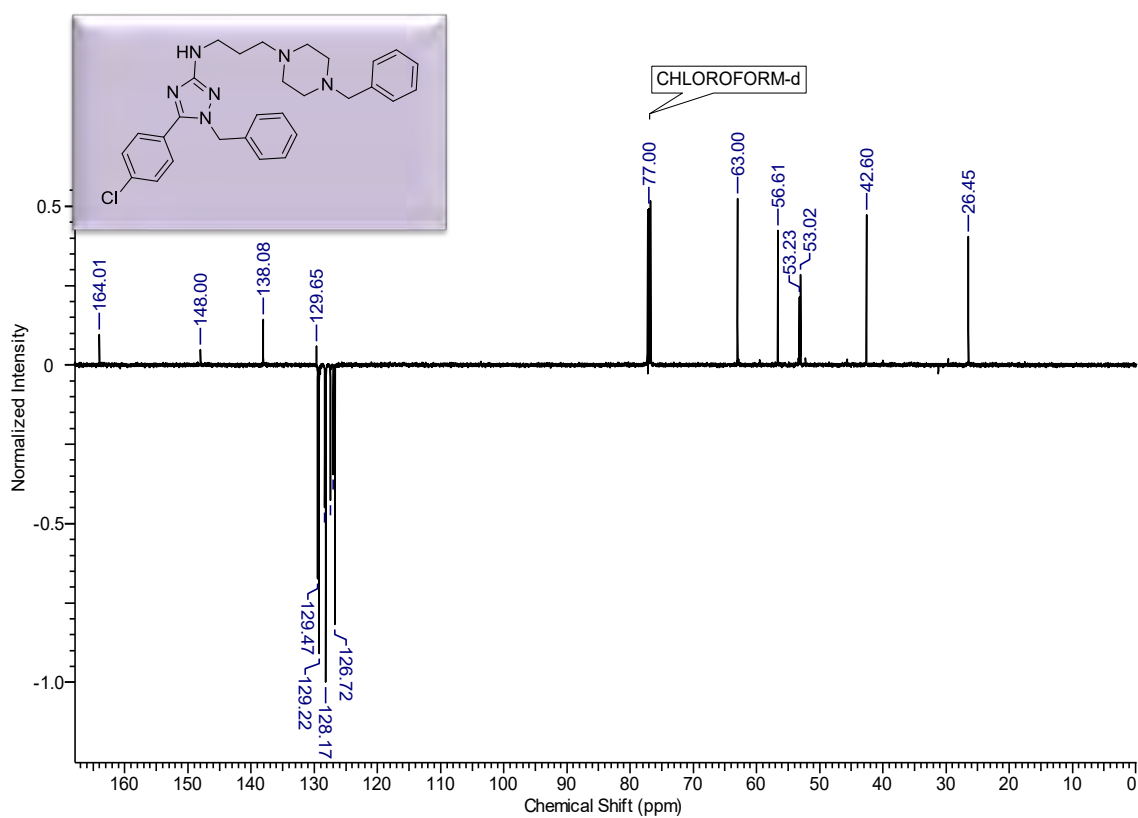
Anexo 178. Espectro de RMN ^{13}C do produto (**90z**) em CDCl_3 à 125MHz.



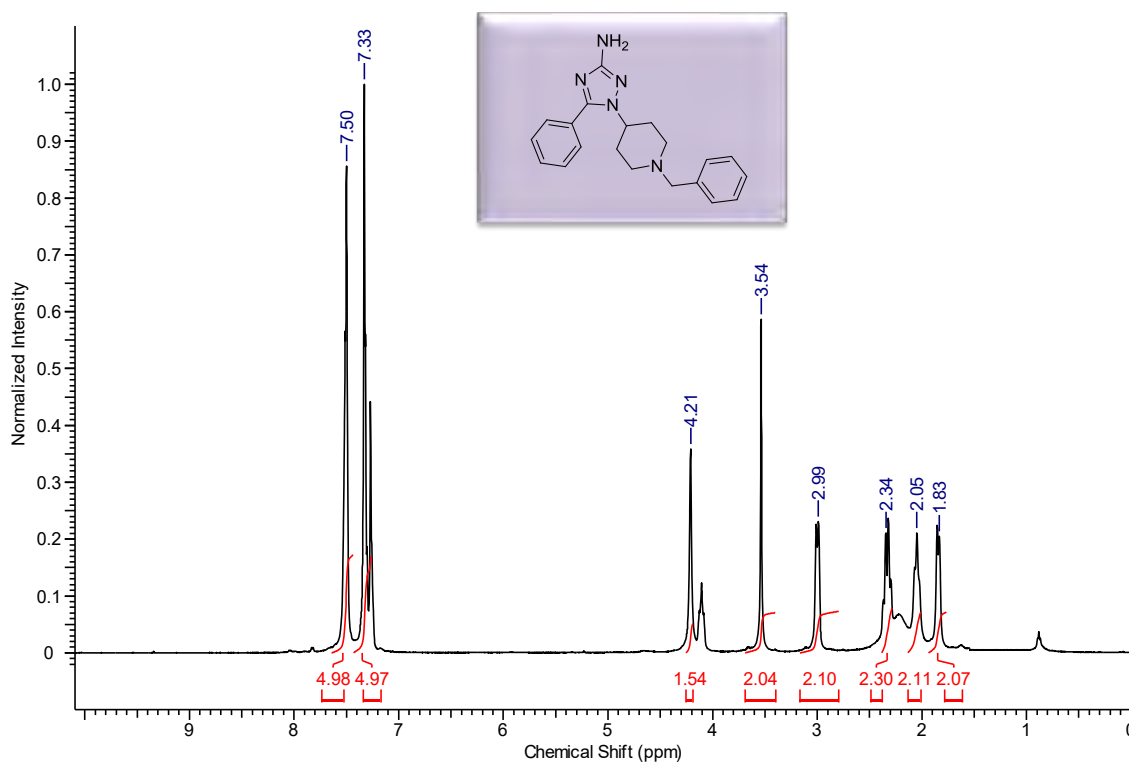
Anexo 179. Espectro de RMN ^1H do composto (**90aa**) em CDCl_3 à 500MHz.



Anexo 180. Espectro de RMN ¹³C do produto (90aa) em CDCl₃ à 125MHz.



Anexo 181. Espectro de RMN ^1H do composto (90ab) em CDCl_3 à 500MHz.



Anexo 182. Espectro de RMN ^{13}C do produto (90ab) em CDCl_3 à 125MHz.

