

**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO**

**INSTITUTO DE CIÊNCIAS EXATAS**

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA**

**DISSERTAÇÃO**

**SÍNTESE E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE  
ANTICOLINESTERÁSICA DE NOVOS DERIVADOS DA  
PIPERINA**

**Sabrina Neves Santos**

**2013**



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO**

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

**SÍNTESE E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE  
ANTICOLINESTERÁSICA DE NOVOS DERIVADOS DA  
PIPERINA**

**SABRINA NEVES SANTOS**

*Sob Orientação do Professor*

**Dr. Arthur Eugen Kümmerle**

*Co-Orientação do Professor*

**Dr. Marco Edílson Freire de Lima**

Dissertação submetida como requisito Parcial para obtenção do grau de **Mestre** em Ciências, no Curso de Pós-Graduação em Química Área de concentração Química Orgânica.

**Seropédica, RJ**

**Julho de 2013**

**UFRRJ / Biblioteca Central / Divisão de Processamentos Técnicos**

547

S237s

T

Santos, Sabrina Neves, 1986-

Síntese e avaliação da atividade anticolinesterásica de novos derivados da piperina / Sabrina Neves Santos. - 2013.

135 f.: il.

Orientador: Arthur Eugen Kümmerle.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Curso de Pós-Graduação em Química, 2013.

Bibliografia: f. 83-89.

1. Química orgânica - Teses. 2. Pimenta-do-reino - Uso terapêutico - Teses. 3. Inibidores da colinesterase - Teses. 4. Alzheimer, Doença de - Tratamento - Teses. 5. Cinética enzimática - Teses. I. Kümmerle, Arthur Eugen, 1979-. II. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Curso de Pós-Graduação em Química. III. Título.

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO

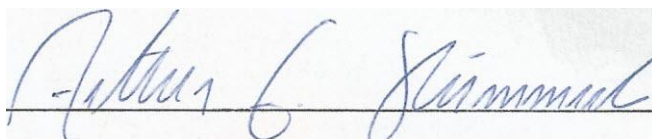
INSTITUTO DE CIÊNCIAS EXATAS

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

SABRINA NEVES SANTOS

Dissertação submetida como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Ciências, no curso de Pós-Graduação em Química, Área de Concentração em Química Medicinal.

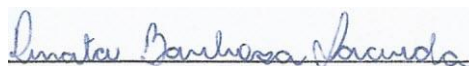
DISSERTAÇÃO APROVADA EM 17/07/2013



Dr. Arthur Eugen Kummerle (UFRRJ) - Orientador



Dr. Marco Edilson Freire de Lima (UFRRJ) - Co-Orientador



Dr<sup>a</sup>. Renata Barbosa Lacerda (Departamento de Química - UFRRJ)



Dr. Sergio Pinheiro (IQ - UFF)

## AGRADECIMENTOS

À minha mãe Mirian, pelo exemplo de vida, amor, educação, apoio, confiança, oportunidade e por todo o incentivo de que sempre precisei ao longo da minha vida.

Aos meus avós Helena (*in memoriam*) e Zoeli pelo amor e incentivo que foram essenciais ao longo da minha vida.

À minha irmã Tábatha pela amizade, amor e paciência em todos os momentos.

À toda a minha família, pelo incentivo e apoio e ajuda sempre que precisei durante toda minha vida.

Ao meu orientador, Dr. Arthur Eugen Kümmerle, pela orientação, dedicação, esforço, disposição em ajudar-me sempre e apoio dedicados a este trabalho.

Ao meu co-orientador, Dr. Marco Edilson Freire de Lima, pela orientação e apoio dedicados a este trabalho.

Aos professores da pós-graduação, pelo conhecimento adquirido durante todo o curso de pós-graduação em química

Aos meus amigos, Marcela Oliveira, Cristiane Frauches, Carol Passos e Danilo Souza pela amizade, carinho, apoio. Em especial a Mariana Albuquerque, por ter compartilhado comigo todos os momentos bons e ruins e cuja amizade e companheirismo foram essenciais ao longo destes anos.

As amigas Sabrina e Paula pela amizade, carinho e preocupação com minha trajetória pessoal e profissional.

À Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro pela disponibilidade para a concretização deste trabalho.

À CAPES pelo fornecimento da bolsa.

## RESUMO

Santos, Sabrina Neves. **Síntese e avaliação da atividade anticolinesterásica de novos derivados da piperina**. Dissertação (mestrado em Química Orgânica). Instituto de Ciências Exatas, Departamento de Química, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2013.

O aumento da expectativa de vida é um fenômeno mundial que mostra o relativo sucesso de políticas de saúde pública, no entanto, o aumento da expectativa de vida tem como efeito negativo o aparecimento de doenças degenerativas, típicas de idades mais avançadas, incluindo-se as várias formas de demência e entre estas, a mais importante é a Doença de Alzheimer (DA), patologia irreversível e progressiva caracterizada pela deterioração neuronal. Como resultado da neurodegeneração, a atividade de neurônios colinérgicos, que utilizam o neurotransmissor acetilcolina (ACh), é reduzida. Um dos mais promissores caminhos para tratar esta doença é aumentar o nível de acetilcolina no cérebro usando inibidores da acetilcolinesterase (AChE). Portanto, este trabalho tem como objetivo realizar modificações estruturais sobre a estrutura química da piperina e avaliar a influência de determinados parâmetros estruturais, como a flexibilidade conformacional e o impedimento estérico frente à atividade anticolinesterásica (AChE e BChE) destes compostos, bem como fazer um estudo cinético a fim de descobrir qual o perfil de inibição das enzimas AChE e BChE, a fim de buscar novos compostos que poderiam ser úteis no tratamento dos sintomas da DA.

PALAVRAS-CHAVE: Doença de Alzheimer, piperina, atividade anticolinesterásica.

## **ABSTRACT**

The increase in life expectancy is a worldwide occurrence that shows the relative success of public health politics, But the increase in life expectancy has a negative effect: the appearance of degenerative diseases typical of old age, including several forms of dementia, like Alzheimer's Disease (AD) that is certainly the most important. It is an irreversible and progressive disease characterized by neuronal deterioration. As a result this neuronal deterioration, the activity of cholinergic neurons that use the neurotransmitter acetylcholine (ACh) is reduced. One of the most promising approaches to treat this disease is to increase the level of acetylcholine in the brain using inhibitors of acetylcholinesterase (AChE). Therefore, this work aims to conduct structural modifications on the chemical structure of piperine and evaluate the influence of certain structural parameters, such as conformational flexibility and steric front of acetylcholinesterase activity (AChE and BChE) of these compounds, as well as make a kinetic study in order to discover what the profile of inhibition of AChE and BChE enzymes in order to find new compounds that could be useful in treating the symptoms of AD.

Key words: Alzheimer's disease, piperine, anticholinesterase activity

## Lista de Espectros

Espectro 1: Espectro no Infravermelho da Piperina. ....	91
Espectro 2: Espectro de RMN <sup>1</sup> H (500 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) da Piperina.....	92
Espectro 3: Espectro de DEPT-Q (100 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) da Piperina.....	93
Espectro 4: Espectro no Infravermelho do Ácido piperínico. ....	94
Espectro 5: Espectro de RMN <sup>1</sup> H (500 MHz, DMSO - D <sub>6</sub> ) do ácido piperínico. ....	95
Espectro 6: Espectro de DEPT-Q (100 MHz, DMSO - D <sub>6</sub> ) do ácido piperínico. ....	96
Espectro 7: Espectro no Infravermelho da 1-metilpiperazinila. ....	97
Espectro 8: Espectro de RMN <sup>1</sup> H (500 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) da amida 1-metilpiperazinila. ....	98
Espectro 9: Espectro de DEPT-Q (100 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) da amida 1-metilpiperazinila. ....	99
Espectro 10: Espectro no Infravermelho da 1-etilpiperazinila. ....	100
Espectro 11: Espectro de RMN <sup>1</sup> H (500 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) da amida 1-etilpiperazinila. ....	101
Espectro 12: Espectro de DEPT-Q (100 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) da amida 1-etilpiperazinila. ....	102
Espectro 13: Espectro no Infravermelho da 1-fenilpiperazinila. ....	103
Espectro 14: Espectro de RMN <sup>1</sup> H (500 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) da amida 1-fenilpiperazinila. ....	104
Espectro 15: Espectro de DEPT-Q (100 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) da amida 1-fenilpiperazinila. ....	105
Espectro 16: Espectro no Infravermelho da 1-benzilpiperazinila.....	106
Espectro 17: Espectro de RMN <sup>1</sup> H (500 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) da amida 1-benzilpiperazinila. .....	107
Espectro 18: Espectro de DEPT-Q (100 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) da amida 1-benzilpiperazinila. .....	108
Espectro 19: Espectro de RMN <sup>1</sup> H (500 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) da amida 1-benzilpiperazinila hidrogenada. ....	109
Espectro 20: Espectro de DEPT-Q (100 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) da amida 1-benzilpiperazinila hidrogenada. ....	110
Espectro 21: Espectro de RMN <sup>1</sup> H (500 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) da amida [1-(5-(benzo[d][1,3]dioxol-5-il)pentil)piperidina] .....	111
Espectro 22: Espectro no Infravermelho do sal da 1-metilpiperazinila. ....	112
Espectro 23: Espectro de RMN <sup>1</sup> H (500 MHz, DMSO - D <sub>6</sub> ) do sal da amida 1-metil piperazinila. ....	113
Espectro 24: Espectro de DEPT-Q (100 MHz, DMSO - D <sub>6</sub> ) do sal da amida 1- metilpiperazinila. ....	114



Espectro 25: Espectro no Infravermelho do sal da 1-etilpiperazinila. ....	115
Espectro 26: Espectro de RMN <sup>1</sup> H (500 MHz, DMSO – D <sub>6</sub> ) do sal da amida 1-etilpiperazinila. ....	116
Espectro 27: Espectro de DEPT-Q (100 MHz, DMSO – D <sub>6</sub> ) do sal da amida 1-etilpiperazinila. ....	117
Espectro 28: Espectro no Infravermelho do sal da 1-benzilpiperazinila.....	118
Espectro 29: Espectro de RMN <sup>1</sup> H (500 MHz, DMSO – D <sub>6</sub> ) do sal da amida 1-benzilpiperazinila. ....	119
Espectro 30: Espectro de DEPT-Q (100 MHz, DMSO – D <sub>6</sub> ) do sal da amida 1-benzilpiperazinila. ....	120
Espectro 31: Espectro no Infravermelho do sal da 1-fenilpiperazinila. ....	121
Espectro 32: Espectro de RMN <sup>1</sup> H (500 MHz, DMSO – D <sub>6</sub> ) do sal da amida 1-fenilpiperazinila. ....	122
Espectro 33: Espectro de DEPT-Q (100 MHz, DMSO – D <sub>6</sub> ) do sal da amida 1-fenilpiperazinila. ....	123
Espectro 34: Espectro no Infravermelho do sal da amida 1-benzilpiperazinila hidrogenada. ....	124
Espectro 35: Espectro de RMN <sup>1</sup> H (500 MHz, DMSO – D <sub>6</sub> ) do sal da amida 1-benzilpiperazinila hidrogenada. ....	125
Espectro 36: Espectro de DEPT-Q (100 MHz, DMSO – D <sub>6</sub> ) do sal da amida 1-benzilpiperazinila hidrogenada. ....	126
Espectro 37: Espectro no Infravermelho do sal da amida [1-(5-(benzo[d][1,3]dioxol-5-il)pentil)piperidina].....	127
Espectro 38: Espectro de RMN <sup>1</sup> H (500 MHz, DMSO – D <sub>6</sub> ) do sal da amida [1-(5-(benzo[d][1,3]dioxol-5-il)pentil)piperidina] .....	128
Espectro 39: Espectro de DEPT-Q (100 MHz, DMSO – D <sub>6</sub> ) do sal da amida [1-(5-(benzo[d][1,3]dioxol-5-il)pentil)piperidina] .....	129
Espectro 40: Espectro de RMN <sup>1</sup> H (500 MHz, DMSO – D <sub>6</sub> ) do cloridrato da amida 1-metilpiperazinila. ....	130
Espectro 41: Espectro de DEPT-Q (100 MHz, DMSO – D <sub>6</sub> ) do cloridrato da amida 1-metilpiperazinila. ....	131
Espectro 42: Espectro de RMN <sup>1</sup> H (500 MHz, DMSO – D <sub>6</sub> ) do cloridrato da amida 1-etilpiperazinila. ....	132

Espectro 43: Espectro de DEPT-Q (100 MHz, DMSO – D <sub>6</sub> ) do cloridrato da amida 1-etilpiperazinila. ....	133
Espectro 44: Espectro de RMN <sup>1</sup> H (500 MHz, DMSO – D <sub>6</sub> ) do cloridrato da amida 1-fenilpiperazinila. ....	134
Espectro 45: Espectro de DEPT-Q (100 MHz, DMSO – D <sub>6</sub> ) do cloridrato da amida 1-fenilpiperazinila. ....	135

## Lista de Tabelas

Tabela 1: Características de fármacos que atuam no tratamento sintomático da Doença de Alzheimer .....	17
Tabela 2: Deslocamento químico de $^1\text{H}$ e $^{13}\text{C}$ para a piperina (1).....	23
Tabela 3: Deslocamento químico de $^1\text{H}$ e $^{13}\text{C}$ para o ácido piperínico (2) .....	25
Tabela 4: Deslocamento químico de $^1\text{H}$ e $^{13}\text{C}$ para a 1-metilpiperazinila (16a) .....	27
Tabela 5: Deslocamento químico de $^1\text{H}$ e $^{13}\text{C}$ para a 1-etilpiperazinila (16b) .....	29
Tabela 6: Deslocamento químico de $^1\text{H}$ e $^{13}\text{C}$ para a 1-benzilpiperazinila (16c) .....	30
Tabela 7: Deslocamento químico de $^1\text{H}$ e $^{13}\text{C}$ para a 1-fenilpiperazinila (16d). .....	31
Tabela 8: Deslocamento químico de $^1\text{H}$ e $^{13}\text{C}$ para a 1-benzilpiperazinila hidrogenada (17).....	33
Tabela 9: Deslocamento químico de $^1\text{H}$ e $^{13}\text{C}$ para a 1-(5-(benzo[d][1,3]dioxol-5-il)pentil)piperidina (20).....	35
Tabela 10: Deslocamento químico de $^1\text{H}$ e $^{13}\text{C}$ para o sal da 1-metilpiperazinila (21a). 37	
Tabela 11: Deslocamento químico de $^1\text{H}$ e $^{13}\text{C}$ para a 1-etilpiperazinila (21b) .....	38
Tabela 12: Deslocamento químico de $^1\text{H}$ e $^{13}\text{C}$ para o sal de 1-benzilpiperazinila (21c)40	
Tabela 13: Deslocamento químico de $^1\text{H}$ e $^{13}\text{C}$ para a sal de 1-fenilpiperazinila (21d) . 42	
Tabela 14: Deslocamento químico de $^1\text{H}$ e $^{13}\text{C}$ para a 1-(5-(benzo[d][1,3]dioxol-5-il)pentil)-1-metilpiperidinium (22) .....	43
Tabela 15: Deslocamento químico de $^1\text{H}$ e $^{13}\text{C}$ para o 4-(5-(benzo[d][1,3]dioxol-5-il)pentanoil)-1-benzil-1-metilpiperazin-1-ium (23).....	45
Tabela 16: Deslocamento químico de $^1\text{H}$ e $^{13}\text{C}$ para o cloridrato da 1-metilpiperazinila (24a) .....	46
Tabela 17: Deslocamento químico de $^1\text{H}$ e $^{13}\text{C}$ para o cloridrato da 1- etilpiperazinila (24b).....	47
Tabela 18: Deslocamento químico de $^1\text{H}$ e $^{13}\text{C}$ para o cloridrato da 1-fenilpiperazinila (24c) .....	49
Tabela 19: Valores de absorvâncias e concentrações do sal de metila da 1-metilpiperazinila (21a) utilizados para o cálculo do percentual de inibição da AChE... 51	
Tabela 20: Percentual de inibição de AChE pelo sal de metila da 1- metilpiperazinila (21a) .....	52

Tabela 21: Valores de $1/V^{\circ}$ e $1/[S]$ para o composto (21c) como demonstrativo de cálculo da cinética enzimática de AChE.....	53
Tabela 22: Rendimentos sintéticos e propriedades físicas das amidas (16a-d).....	57
Tabela 23: Sínteses, rendimentos e propriedades físicas das amidas reduzidas (17 e 20). .....	60
Tabela 24: Rendimentos sintéticos e propriedades físicas dos compostos .....	61
Tabela 25: Rendimentos sintéticos e propriedades físicas dos compostos (22 e 23) .....	63
Tabela 26: Rendimentos sintéticos e propriedades físicas dos compostos .....	64
Tabela 27: Tabela com os valores de $CI_{50}$ (AChE e BChE) dos compostos 21a -21d. ..	68
Tabela 28: Tabela com os valores de $CI_{50}$ (AChE e BChE) dos compostos 24a -24c. ..	74
Tabela 29: Tabela com os valores de $CI_{50}$ (AChE e BChE) dos compostos 22 e 23. ....	77

## **Lista de Esquemas**

Esquema 1: Mecanismo de hidrólise da ACh pela AChE.....	14
Esquema 2: Planejamento estrutural dos derivados da piperina (1) planejados a partir da donepezila (12). .....	20
Esquema 3: Reações envolvidas no método de Ellman .....	65

## Lista de Figuras

Figura 1: Frutos de <i>Piper nigrum</i> L.....	2
Figura 2: Estrutura da piperina e seus grupamentos funcionais. ....	3
Figura 3: Derivados sintéticos da piperina avaliados contra <i>T. cruzi</i> . (RIBEIRO et al,2004).....	4
Figura 4: Compostos mesiônicos com atividade biológica contra <i>T. cruzi</i> . (FERREIRA et al 2008).....	5
Figura 5: Compostos com atividade biológica contra <i>T. cruzi</i> . (FRANKLIM et al, 2008). ....	6
Figura 6: Placa senil e emaranhado neurofibrilar no córtex cerebral na Doença de Alzheimer .....	8
Figura 7: A. Visão 3D do sítio enzimático da AChE com sua tríade catalítica e acetilcolinesterase; B. Representação das ligações de hidrogênio do grupamento éster da AChE (PDB 2ACE). ....	10
Figura 8: Estruturas 2D e 3D da acetilcolina e seus grupos funcionais. ....	12
Figura 9: Representação da liberação e hidrólise da acetilcolina pela acetilcolinesterase na fenda sináptica.....	13
Figura 10: Estruturas dos fármacos inibidores da acetilcolinesterase utilizados no tratamento da Doença de Alzheimer em representação 2D (A) e 3D (B).....	18
Figura 11: Gráfico de atividade anticolinesterasica do sal de metila da 1-metilpiperazinila (21a) .....	52
Figura 12: Aparelhagem de soxhet .....	54
Figura 13: Mecanismo de formação do ácido piperínico (2) a partir da hidrólise da piperina (1). ....	56
Figura 14: Mecanismo de formação do cloreto de acila (15) utilizando cloreto de oxalila (COCl) <sub>2</sub> .....	57
Figura 15: Mecanismo de formação dos sais de amônio quaternário (21a-d).....	60
Figura 16: (A) Parâmetros físico-químicos de volume (MR=refratividade molar) e coeficiente de partição (logP) calculados para os compostos 21a-d e representação 3D (azul=áreas mais hidrofílicas e verde=área mais hidrofóbicas). (B) Gráficos de correlação entre os parâmetros físico-químicos (volume a esquerda e lipofilicidade a direita) e a potência de inibição dos compostos 21a-d.....	72

Figura 17: Representação das interações da donepezila com o interior da cavidade enzimática da AChE (PDB4EY7). (A) Representação das interações hidrofóbicas e (B) Representação das ligações de hidrogênio ..... 73

Figura 18: Representação da cavidade de acesso ao sítio catalítico da AChE (PDB4EY7) com o ligante donepezila no seu interior..... 76

## Lista de Gráficos

Gráfico 1: Gráfico de correlação de percentual de inibição enzimática de AChE (peixe elétrico tipo VI-S) x concentração dos compostos 21a-d ( $\mu\text{M}$ ). (A)  $\text{R}=\text{CH}_3$  (21a); (B)  $\text{R}=\text{CH}_2\text{CH}_3$  (21b); (C)  $\text{R}=\text{Ph}$  (21d); (D)  $\text{R}=\text{Bn}$  (21c). Os experimentos foram realizados em triplicata. % inibição AChE piperina 13,5% (200 $\mu\text{M}$ )..... 70

Gráfico 2: Gráfico de correlação de percentual de inibição enzimática de BuChE (soro equino) x concentração dos compostos 21a-d ( $\mu\text{M}$ ). (A)  $\text{R}=\text{CH}_3$  (21a); (B)  $\text{R}=\text{CH}_2\text{CH}_3$  (21b); (C)  $\text{R}=\text{Ph}$  (21d); (D)  $\text{R}=\text{Bnz}$  (21c). Os experimentos foram realizados em triplicata. % inibição AChE piperina 13,5% (200 $\mu\text{M}$ ). ..... 71

Gráfico 3: Gráfico de correlação de percentual de inibição enzimática de AChE (peixe elétrico tipo VI-S) x concentração dos compostos 24a-b ( $\mu\text{M}$ ). (A)  $\text{R}=\text{CH}_3$  (24a); (B)  $\text{R}=\text{CH}_2\text{CH}_3$  (24b); Os experimentos foram realizados em triplicata. % inibição AChE piperina 13,5% (200 $\mu\text{M}$ )..... 75

Gráfico 4: Gráfico de correlação de percentual de inibição enzimática de BChE (soro equino) x concentração dos compostos 24a-b ( $\mu\text{M}$ ). (A)  $\text{R}=\text{CH}_3$  (24a); (B)  $\text{R}=\text{CH}_2\text{CH}_3$  (24b); Os experimentos foram realizados em triplicata. % inibição AChE piperina 13,5% (200 $\mu\text{M}$ )..... 76

Gráfico 5: Gráfico de correlação de percentual de inibição enzimática de AChE (peixe elétrico tipo VI-S) x concentração dos compostos 22 e 23 ( $\mu\text{M}$ ). (A) (23); (B) (22); Os experimentos foram realizados em triplicata. % inibição AChE piperina 13,5% (200 $\mu\text{M}$ )..... 78

Gráfico 6: Gráfico de correlação de percentual de inibição enzimática de BChE (soro equino) x concentração dos compostos 22 e 23 ( $\mu\text{M}$ ). (A) (22); (B) (23); Os experimentos foram realizados em triplicata. % inibição AChE piperina 13,5% (200 $\mu\text{M}$ )..... 79

Gráfico 7: Gráfico de Lineweaver-Burk para a Cinética de inibição de AChE pelos compostos 21b (A) e 21c (B) e para cinética de inibição de BChE pelos compostos 21d (C) e 21c (D)..... 81



## ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

ABS - Absorvância

ACh - Acetilcolina

AChE - Acetilcolinesterase

AChE-Is - Inibidores seletivos da acetilcolinesterase

ACTI - Iodeto de acetiltiocolina

BChE - Butirilcolinesterase

BChE-Is - Inibidores seletivos da butirilcolinesterase

BCTI - Iodeto de butiriltiocolina

BSA - Albumina sérica bovina

CCF = Cromatografia de Camada Fina

CI<sub>50</sub> = Concentração Inibitória de 50%

d = duplete

DA - Doença de Alzheimer

dd = duplo duplete

DMSO = Dimetilsulfóxido

DTNB - Ácido 5,5'- ditiobis [2-nitrobenzóico]

IV = InfraVermelho

m = multiplete

MAO - Enzima monoaminoxidase

Pd/C = Paládio sobre Carbono

Pf = Ponto de Fusão

ppm = parte por milhão

RMN <sup>13</sup>C = Ressonância Magnética Nuclear de Carbono 13

RMN <sup>1</sup>H = Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio

s = simpleto

SNAc = Substituição Nucleofílica Acílica

SNC - Sistema nervoso central

t = tripleto

t.a. = temperatura ambiente

THF = Tetrahidrofurano

TMS = Tetrametilsilano

## SUMÁRIO

1. Introdução.....	1
1.1. A importância dos produtos naturais na indústria farmacêutica .....	1
1.2. O produto natural: Piperina .....	1
1.2.1. Estudos sobre atividades farmacológicas da piperina.....	3
1.3. Doença de Alzheimer.....	7
1.3.1. Colinesterases .....	9
1.4. A Acetilcolina.....	11
1.5. Tratamento da Doença de Alzheimer .....	15
1.5.1. Tratamentos Sintomáticos.....	15
1.5.1.1. Os inibidores da acetilcolinesterase (AChE-i).....	15
1.5.1.2. Os inibidores da butirilcolinesterase (BuChE-i) .....	18
2. Objetivos .....	19
2.1. Objetivo Geral .....	19
2.2. Objetivos Específicos.....	19
2.3. Planejamento Estrutural .....	20
3. Materiais e Métodos.....	21
3.1. Equipamentos.....	21
3.2. Materiais.....	21
3.3. Metodologia.....	22
3.3.1. Extração da Piperina (1).....	22
3.3.2. Hidrólise Básica da Piperina (1).....	24
3.3.3. Reação Geral de formação das amidas (16a-d).....	25
3.3.4. Reações de formação dos compostos reduzidos (17 e 19).....	32
3.3.5. Reação Geral de <i>N</i> -alquilação das Amidas (21 a-d).....	35

3.3.6.	Reação geral de formação dos cloridratos das amidas (24a-c) .....	45
3.3.7.	Ensaio Biológico.....	49
4.	Resultados e Discussões.....	54
4.1.	Isolamento da piperina (1) .....	54
4.2.	Preparação do ácido piperínico (2) .....	55
4.3.	Preparação das Amidas (16a-d).....	56
4.4.	Preparação das amidas saturadas (17 e 20).....	59
4.5.	Preparação dos sais de amônio quaternário (21 a-d, 22 e 23).....	60
4.5.1.	Caracterização dos sais de amônio quaternário insaturados (21 a-d).....	61
4.5.2.	Caracterização dos sais de amônio quaternário saturados (22 e 23) .....	62
4.6.	Síntese dos cloridratos (24a-c) .....	63
4.7.	Ensaio Químico – Biológico.....	64
4.7.1.	Ensaio de avaliação de atividade anticolinesterásica.....	64
4.7.2.	Cinética Enzimática .....	79
5.	Conclusão .....	82
6.	Referências Bibliográficas .....	83
7.	Anexos .....	90

# 1. Introdução

## 1.1. A importância dos produtos naturais na indústria farmacêutica

Os produtos naturais foram os principais componentes das farmacopéias por milhares de anos, sendo usados até fim do século XIX na forma de chás, infusões, e outras formulações farmacêuticas (BRODY, 2000). O isolamento de produtos naturais em forma pura, no final do século XIX, foi um passo decisivo para a criação da indústria farmacêutica. Ao usar produtos naturais bioativos como ponto de partida para o desenvolvimento de novos fármacos a indústria farmacêutica se depara, em geral, com a baixa concentração das substâncias selecionadas nas fontes naturais, o que muitas vezes inviabiliza sua exploração comercial. Porém, a síntese destas substâncias e de derivados planejados, permite frequentemente que se estabeleça o farmacóforo e que se module o perfil biológico (COSTA, 2009). Muitos produtos sintéticos em uso em clínica foram inspirados em produtos naturais e estes têm sido a fonte mais produtiva para o desenvolvimento de novos fármacos (HARVEY, 2000).

Embora o uso de produtos naturais *in natura* como insumos na indústria farmacêutica tenha decrescido ao longo dos últimos anos, estas substâncias ainda vêm sendo bastante usadas como fonte de inspiração. Dos 847 fármacos de baixo peso molecular (micromoléculas) lançados no mercado entre 1981 e 2006, 43 eram produtos naturais, 232 produzidos por semi-sínteses a partir de produtos naturais e 572 obtidos por síntese total. Entretanto, 262 entre estas últimas substâncias possuíam um grupo farmacofórico inspirado em produtos naturais ou poderiam ser considerados análogos de produtos naturais (SCHMIDT, 2008).

## 1.2. O produto natural: Piperina

A amida natural piperina (1) (*N*-piperidinil-5-(3,4-metilenodioxifenil)-2*E*-4*E*-pentadienamida) é o principal constituinte químico de *Piper nigrum L.* (Piperaceae), ocorrendo em maior proporção nos frutos da planta (SEMLER& GROSS, 1988) que são conhecidos popularmente como pimenta do reino. A *Piper nigrum L.* (**Figura 1**) tem seu uso bastante difundido na medicina popular da Índia, país de onde é originária, sendo que no Brasil seu principal uso é como condimento. Hoje, esta planta é cultivada

em mais de 100 municípios nos Estados do Pará, Espírito Santo, Bahia, Maranhão, Ceará, Paraíba e, recentemente, no Estado do Amapá, alcançando o Brasil no ano de 2004 uma produção de 30.000 toneladas por hectare/ano (DUARTE & ALBUQUERQUE, 2005).

A presença da piperina (1) na pimenta-do-reino foi descoberta pelo cientista dinamarquês Hans Christian Orstead, em 1820. Sua síntese química, entretanto, só foi realizada pela primeira vez em 1882 por Leopold Hugheimer, químico alemão famoso por sua metodologia de síntese de pirazinas, a síntese de Staedel-Hugheimer (FRANKLIN, 2013).

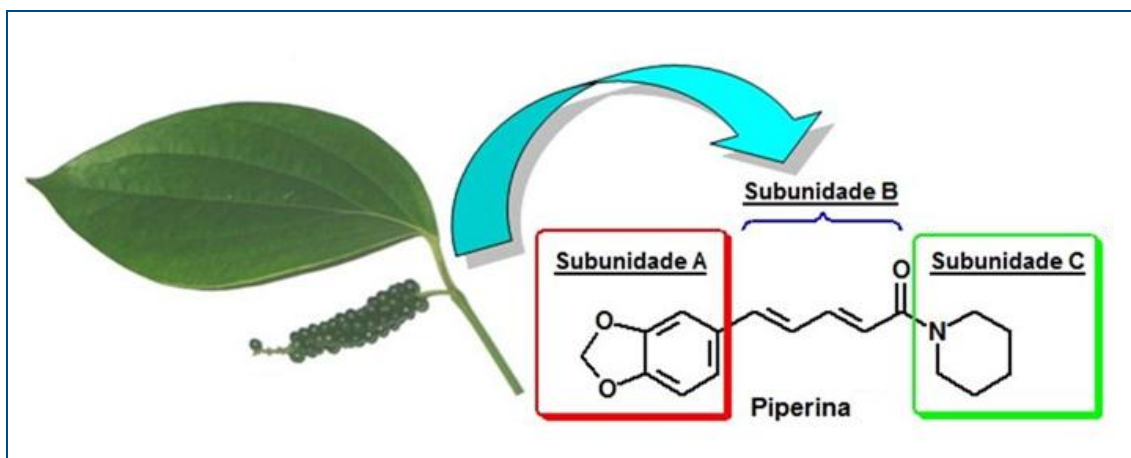


**Figura 1:** Frutos de *Piper nigrum* L.

Outro ponto relevante em relação a este produto natural é a sua abundância, sendo extraído com rendimentos de cerca de 3-7%, a partir dos frutos secos da planta (IKAN, 1991). Além disso, devido à maior ocorrência da amida nos frutos, a pimenta do reino constitui-se como uma fonte renovável para esta substância, visto que com manejo adequado pode-se realizar várias colheitas no ano sem comprometer a planta.

Sua estrutura pode ser dividida em três subunidades compostas por um grupo 1,3-benzodioxola (subunidade A), ao lado de uma cadeia de ácido pentadienóico (subunidade B) e a subunidade amina piperidinil (subunidade C) (**Figura 2**). No que diz respeito às propriedades físico-químicas da piperina, a molécula apresenta carbonos e

hidrogênios, com duas funções éter e uma função amida *N,N'*-di-substituída. Isso quer dizer que a molécula é quase apolar e, portanto, quase insolúvel em água. De fato, ela é solúvel em éter, álcool, clorofórmio e em solventes apolares.



**Figura 2:** Estrutura da piperina e seus grupamentos funcionais.

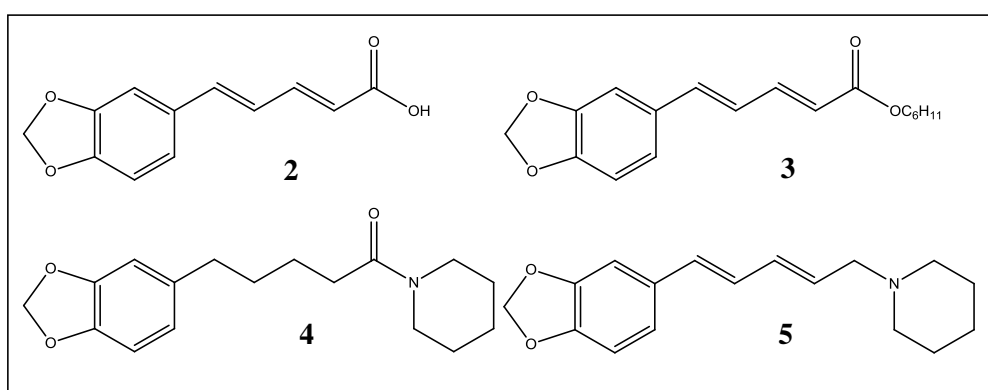
### 1.2.1. Estudos sobre atividades farmacológicas da piperina

A piperina (1) apresenta requisitos essenciais para sua utilização como molécula protótipo e/ou precursora para o desenvolvimento de novos fármacos: abundância, presença em fonte renovável, fácil isolamento, variadas atividades biológicas constatadas, além de possuir funcionalidades possíveis de sofrerem variadas manipulações sintéticas (RIBEIRO, 2004; FERREIRA *et al*, 2012)

Existe um número considerável de trabalhos na literatura descrevendo a avaliação da piperina, derivados e análogos frente a diferentes modelos de atividade biológica, tais como antibacteriana, antidepressiva e estimuladora da biossíntese de serotonina no sistema nervoso central (SNC), além de atividade em *Trypanosoma cruzi*, leishmania e atividade inseticida, essas últimas comprovadas pelo nosso grupo de pesquisa. Algumas destas serão discutidas a seguir.

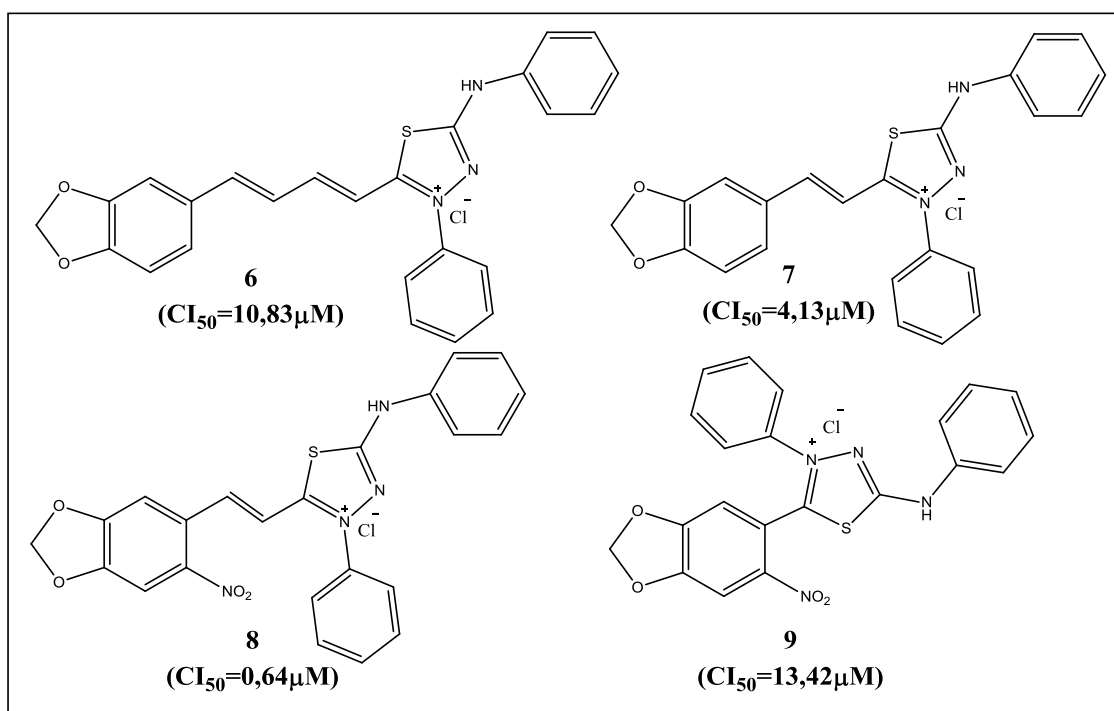
Em 2004 um trabalho realizado por nosso grupo, mostrou que a piperina e os derivados sintetizados apresentam atividade antiparasitária contra *Trypanosoma cruzi*, onde foi realizada a síntese alterando a subunidade amina piperidinil, também foram introduzidas modificações na subunidade ácido pentadienóico, reduzindo as duplas

ligações ou o grupamento carbonila e aumentando ou diminuindo a cadeia alifática. A piperina **1** apresentou atividade antiparasitária contra formas epimastigotas com  $CI_{50} = 7,36 \mu\text{M}$ . Este resultado preliminar motivou a avaliação de outros derivados sintetizados. O ácido piperínico **2** e o éster derivado **3** não apresentaram atividade tóxica em dose máxima para formas epimastigotas, o que levou a concluir que a presença do nitrogênio é importante para atividade estudada. A remoção das ligações duplas (derivado **4**) e da carbonila (derivado **5**) não interferem significativamente na atividade, o que sugere que tanto a conjugação quanto o grupamento carbonila não são essenciais para a atividade tripanocida. (RIBEIRO *et al.*, 2004).



**Figura 3:** Derivados sintéticos da piperina avaliados contra *T. cruzi*. (RIBEIRO *et al.*, 2004)

Descrevendo outro trabalho desenvolvido por nosso grupo onde Ferreira *et al.*, 2008, realizou a síntese de novos compostos mesiónicos do tipo cloretos de 1,3,4-tiodiazólico-2-fenilamina derivados da piperina, combinando assim o mesiónico com a parte da amida natural, tendo em mente o conceito de hibridação molecular (Viegas-Júnior *et al.*, 2007), os efeitos tóxicos desses compostos foram avaliados contra diferentes formas evolutivas de *Trypanosoma cruzi* e também contra células hospedeiras. Primeiramente, foi avaliado o efeito anti-proliferativo de nove derivados em formas epimastigotas de *T. cruzi*, tendo sido obtida  $CI_{50}$  entre 0,64 e 113,06  $\mu\text{M}$ . Os quatro derivados **6**, **7**, **8** e **9** ( **Figura 4**) que apresentaram melhores resultados foram avaliados contra macrófagos murinos. O composto **6** foi o que demonstrou melhor perfil de atividade (FERREIRA *et al.*, 2008).

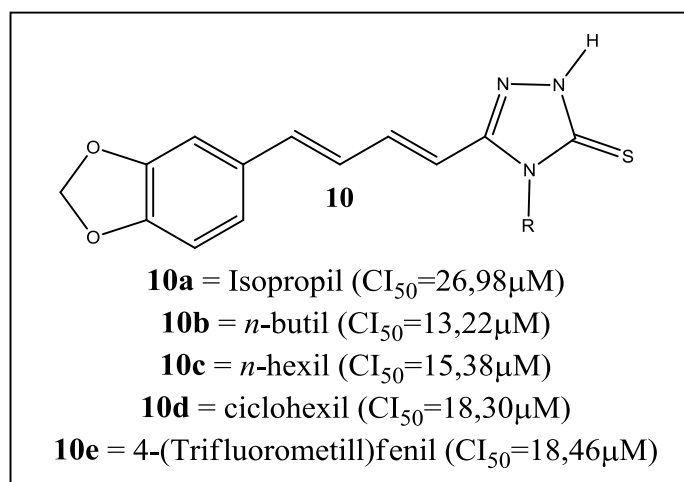


**Figura 4:** Compostos mesiônicos com atividade biológica contra *T. cruzi*.

(FERREIRA *et al* 2008)

Em outro trabalho realizado recentemente ainda pelo nosso grupo, Franklim e colaboradores (2013) descrevem a síntese e a avaliação da atividade tripanocida de treze novos derivados 1,2,4-triazol-3-tionas utilizando a hibridação molecular da piperina com o núcleo 1,2,4-triazol. Todos os compostos foram testados *in vitro* contra a forma de Y epimastigota proliferativa de *T. cruzi*. Os compostos **10a**, **10b**, **10c**, **10d** e **10e**, (**Figura 5**) mostraram valores de  $CI_{50}$  inferiores a 30  $\mu M$  em epimastigotas e foram selecionados para os ensaios de viabilidade celular em macrófagos peritoneais (MO) a partir de ratos Balb/c. Os MO foram tratados com os compostos selecionados nas concentrações de 0,5, 1,0, 2,5 e 5  $\mu g mL^{-1}$ . O número de células viáveis foi determinada por um ensaio de exclusão com corante azul de tripano após 72 horas de tratamento. Em todas as concentrações testadas, os cinco derivados mostraram não haver toxicidade significativa sobre as células hospedeiras, que apresenta valores de viabilidade celulares variando desde 85% a 95% (FRANKLIM *et al*, 2013).





**Figura 5:** Compostos com atividade biológica contra *T. cruzi*. (FRANKLIM *et al*, 2013).

Na literatura, trabalhos relacionam a atividade desta amida natural aos efeitos antidepressivos e também a uma melhora da cognição em todo o tratamento realizado através do estudo de Wattanathorn *et al* (2008) onde administraram-se piperina em ratos machos variando as concentrações 5, 10 e 20 mg/Kg por dia durante 4 semanas e suas atividade neurofarmacológicas foram determinadas em períodos variando de 1 a 4 semanas de tratamento. Os resultados mostram que a piperina, se mostrou eficiente em todas as dosagens.

Em 2009, Chonpathompikunlert *et al* estudaram o efeito da piperina sobre a memória espacial e a neurodegeneração em varias regiões do hipocampo em modelo animal da doença de Alzheimer. O estudo demonstrou que a piperina foi capaz de melhorar significativamente a memória espacial e a neurodegeneração. No entanto, não se pode excluir desse efeito a atividade da piperina sobre a regulação da monoamina oxidase (MAO) (LEE *et al*, 2005), resultando na elevação da serotonina e dopamina, neurotransmissores que também tem um papel importante na aprendizagem e memória.

O mecanismo subjacente é parcialmente relacionado com o aumento da densidade neuronal e a inibição da atividade da enzima acetilcolinesterase no hipocampo (CHONPATHOMPIKUNLERT *et al*, 2009). No entanto, novas pesquisas ainda são essenciais para entender o mecanismo preciso de ação da piperina na regulação da função cognitiva e suas atividades em modelos da doença de Alzheimer

O estudo das diferentes atividades biológicas da piperina e seus derivados é uma linha de pesquisa consolidada pelo nosso grupo de pesquisa, na UFRRJ. Este trabalho visa o estudo da atividade da amida natural e de seus derivados como inibidor de colinesterases, alguns derivados amidas (**16a** e **16d**) sintetizados neste trabalho foram sintetizadas e avaliadas anteriormente por (LOPES, 2011) para atividade inseticida em *Aedes Aegypti*.

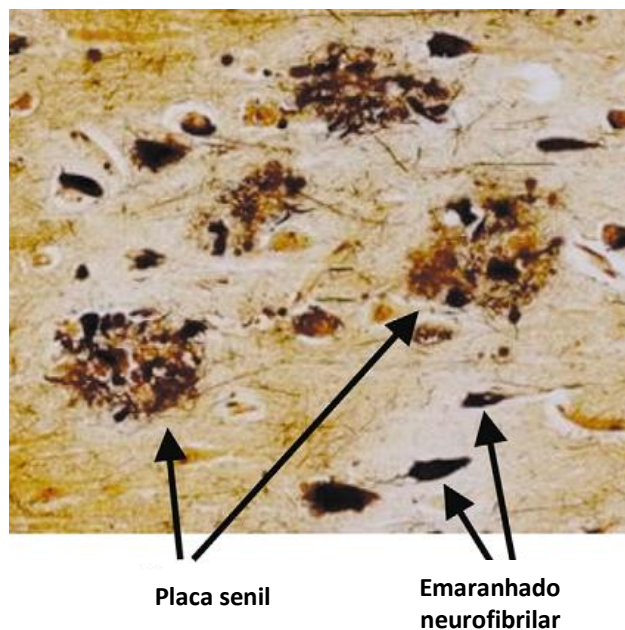
### **1.3. Doença de Alzheimer**

O aumento da expectativa de vida é um fenômeno mundial que mostra o relativo sucesso de políticas de saúde pública, e o Brasil se inclui entre os países em que as pessoas estão vivendo por mais tempo e em condições melhores de saúde. No entanto, o aumento da expectativa de vida tem como efeito negativo o aparecimento de doenças degenerativas, típicas de idades mais avançadas, incluindo-se as várias formas de demência e entre estas, a mais importante é a Doença de Alzheimer (DA) (CRI, 2008). Ao longo dos últimos anos estima-se que no Brasil há 1 milhão e 200 mil pessoas com a doença de Alzheimer. O número de pacientes estimado é de 35,6 milhões no mundo e esses números aumentarão significativamente para 65,7 milhões em 2030, e 115,4 milhões em 2050, sendo dois terços deles em países em desenvolvimento. Atualmente a eficácia dos medicamentos para estas condições é muito limitada, o que torna necessário a busca por tratamentos mais eficazes e melhores tolerados (SAYEG, 2013).

No mundo todo, o mal de Alzheimer é considerado um grande problema de saúde, devido ao enorme impacto causado ao indivíduo, família, sistema de saúde e à sociedade como um todo, uma vez que, metade dos pacientes é internado em instituições de saúde e o restante, recebe tratamento em casa, envolvendo em seus cuidados, familiares, parentes e amigos (FRANCIS *et al.*,1999; ZIMMERMAN & SOREQ, 2006).

O primeiro relato da DA foi dado pelo neurologista alemão Alois Alzheimer, em 1907, quando este diagnosticou pela primeira vez um quadro de doença progressiva em uma mulher de 51 anos que já sofria com os sintomas há quatro anos e meio. No entanto, somente em 1910, Kraepelin veio a denominar este quadro clínico como Doença de Alzheimer (FREITAS, 2002).

A DA é uma doença neurodegenerativa e progressiva associada à perda generalizada das funções mentais. Nas últimas décadas muito esforço tem sido realizado para tentar esclarecer as causas da DA com a esperança de que isso resulte no desenvolvimento de tratamentos farmacológicos mais seguros e efetivos (ORHAN *et al.*, 2007). Ao nível microscópico, as lesões características da DA são placas senis, ou neuríticas, e emaranhados neurofibrilares (**Figura 6**), nas estruturas do lobo temporal medial e áreas corticais do cérebro, juntamente com uma degeneração dos neurônios e das sinapses. Vários mecanismos patogênicos que estão por trás dessas mudanças têm sido estudados, incluindo a agregação A $\beta$  (oriunda de um peptídeo chamado beta-amilóide A-42) como o desenvolvimento e a deposição de placas, hiperfosforilação tal como a formação de emaranhados, disfunção neurovascular, e outros mecanismos, tais como alterações do ciclo celular, processos inflamatórios, estresse oxidativo e disfunção mitocondrial (HARDY & ALLSOP, 1991; HAASS, 1992; MUDHER & LOVESTONE, 2002).



**Figura 6:** Placa senil e emaranhado neurofibrilar no córtex cerebral na Doença de Alzheimer

Em 2009, esta teoria foi atualizada, sugerindo que a própria proteína  $\beta$ -amilóide, e não o peptídeo A $\beta$  seria a responsável principal pela DA (NIKOLAEV *et al.*, 2009). Nos estágios iniciais, ocorre a perda de memória recente e à medida que a

doença progride, novos sintomas aparecem, tais como confusão mental, mudanças de humor e irritabilidade. As funções cognitivas superiores, tais como linguagem, orientação e julgamento são bastante afetadas (MÖLSÄ *et al.*, 1986; WALDEMAR *et al.*, 2007). Finalmente, funções vitais são perdidas, levando à morte.

Embora ainda não exista cura, alguns compostos são úteis em retardar a deterioração cognitiva da DA (KATALINIC *et al.*, 2010). Os avanços obtidos na compreensão da evolução e das razões moleculares da gênese da DA têm demonstrado que o uso de inibidores de colinesterases pode ser uma das formas mais eficientes de controle da evolução da doença (VIEGAS, 2004). A estratégia baseia-se na correção da função colinérgica cerebral através do uso de agentes anticolinesterásicos que retificam o nível de acetilcolina (ACh) cerebral (KATALINIC *et al.*, 2010).

### **1.3.1. Colinesterases**

As colinesterases fazem parte de um grupo numeroso de enzimas classificadas como esterases, que de forma geral atuam sobre ligações éster produzindo um ácido carboxílico e um álcool (FRAGA, 2010). São enzimas que desempenham papéis importantes na neurotransmissão colinérgica central e periférica (NACHMANSON & ROTHENBERG, 1945) e são classificadas de acordo com suas propriedades catalíticas e especificidades a substratos, sensibilidade a inibidores e distribuição tecidual (MASSOULIÉ, 1993). Considera-se que as colinesterases constituam uma família de enzimas, que podem se subdividir em dois tipos principais: a acetilcolinesterase (AChE) que exibe uma especificidade para a acetilcolina e interrompe a transmissão dos impulsos nervosos pela rápida hidrólise desse neurotransmissor na membrana pós-sináptica da junção neuronal (PATOCKA *et al.*, 2004), e a butirilcolinesterase (BChE) que não é tão específica e catalisa a hidrólise deste neurotransmissor, porém, possui maior afinidade por substratos mais hidrofóbicos tais como a butirilcolina (CHATONNET & LOCKRIDGE, 1989).

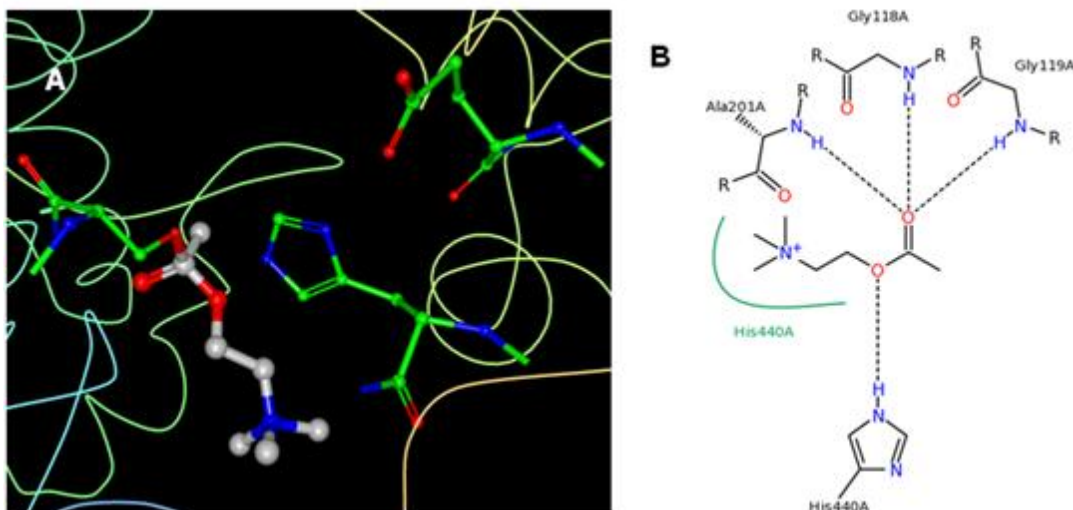
Adicionalmente, evidências sugerem que, apesar da ACh ser preferencialmente metabolizada pela AChE, a BChE pode atuar como um corregulador de sua atividade no SNC, uma vez que, a inibição dessa enzima aumenta de maneira dose dependente os níveis desse neurotransmissor no cérebro (GIACOBINE, 2000). Na ausência da AChE,

a BChE parece substituí-la na manutenção da integridade estrutural e fisiológica do sistema colinérgico (MESULAM *et al.*, 2002).

### 1.3.1.1. A Estrutura dos Sítios Ativos das Colinesterases

A primeira determinação da estrutura primária da AChE foi de uma espécie de peixe elétrico, *Eletraphorus electricus*, que possui abundante quantidade da enzima em seu órgão elétrico (SCHUMACHER, 1986; SUSSMAN, 1991). Posteriormente, as sequências da AChE de várias outras espécies foram obtidas, inclusive da humana (SOREQ, 1990).

O sítio ativo da AChE é considerado como tendo dois sub-sítios: um sub-sítio aniônico, onde a cadeia de nitrogênio quaternário da ACh carregada positivamente se liga e um sub-sítio esterásico onde está contida a tríade catalítica (Ser200, His440 e Glu327) (**Figura 7A**) e onde o grupamento éster da ACh se liga através das ligações de hidrogênio aos resíduos de Gly118 e 119 e Ala201 (**Figura 7B**) (NACHMANSOHN & WILSON, 1951; SILMAN *et al.*, 1994; TAYLOR & BROWN, 1999).



**Figura 7:** A. Visão 3D do sítio enzimático da AChE com sua tríade catalítica e acetilcolinesterase; B. Representação das ligações de hidrogênio do grupamento éster da AChE (PDB 2ACE).

Na borda ou superfície do canal do sítio ativo situa-se um segundo sítio aniônico que se tornou conhecido como sítio aniônico periférico (BOURNE *et al.*,

2005). Apesar da hidrólise do substrato ocorrer na tríade catalítica em ambas as colinesterases, algumas diferenças no curso catalítico como, por exemplo, o maior volume do centro ativo, pode ser importante na determinação da preferência pelo substrato e na afinidade pelo inibidor (EKHOLM, 2001).

Levando-se em consideração a grande homologia entre a AChE e a BChE, MILLARD & BROOMFIELD (1992), foi proposto por análise computacional um modelo para a BChE humana com base na estrutura da AChE. Nesse modelo, observou-se, conforme o esperado, uma grande similaridade do ponto de vista de estrutura terciária entre as enzimas. Uma diferença encontrada entre elas foi a presença de apenas um resíduo aromático na BChE na entrada do túnel que leva ao sítio ativo, enquanto a AChE possui 3. A ausência destes resíduos aromáticos explica porque o sítio ativo da BChE é mais espaçoso do que o da AChE.

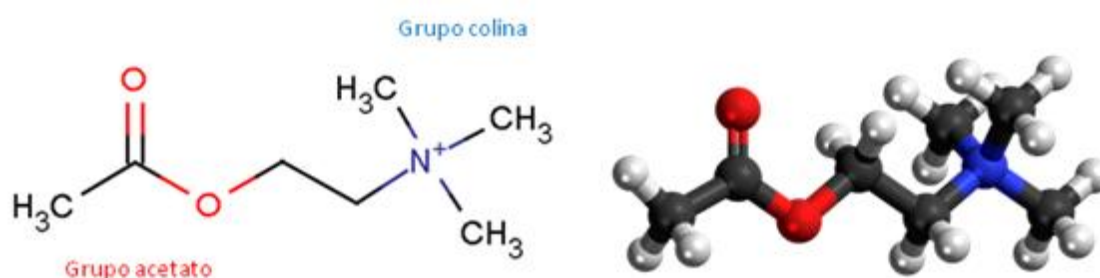
Adicionalmente, a AChE e BChE têm aproximadamente o mesmo número de aminoácidos por subunidade catalítica, 575 e 574 respectivamente, e suas diferenças no peso molecular são devidas a diferenças na glicosilação. A AChE tem 4 e a BChE tem 9 cadeias de carboidratos por subunidade. As ligações de dissulfeto de ambas as enzimas, estão localizadas exatamente na mesma posição, sugerindo dobramento protéico similar. As sequências de aminoácidos dos sítios ativos da AChE e BChE estão conservadas em muitas espécies estudadas e os resíduos de serina, histidina e glutamato são considerados importantes para a atividade catalítica de ambas. (MIKAMI, 2005).

#### **1.4. A Acetilcolina**

Desde o início da história evolucionária das espécies e antes do surgimento do sistema nervoso em animais, a acetilcolina (ACh) é considerada uma importante molécula sinalizadora, sendo encontrada em bactérias, protozoários, algas e plantas (KAWASHIMA & FUJI, 2003; GOTTI & CLEMENT, 2004). A neurotransmissão química foi investigada por Otto Loewi em 1921 que identificou a ACh como uma substância cardioativa liberada pelo nervo vago, nomeando-se inicialmente como “vagusstoff” (vagoessência) (VAN DER ZEE & LUITEN, 1999). Desde então, a ACh foi o primeiro composto a ser identificado como um neurotransmissor e passou a ser

amplamente estudado nas sinapses do SNC e sistema nervoso periférico (DESCARRIES *et al.*, 1997).

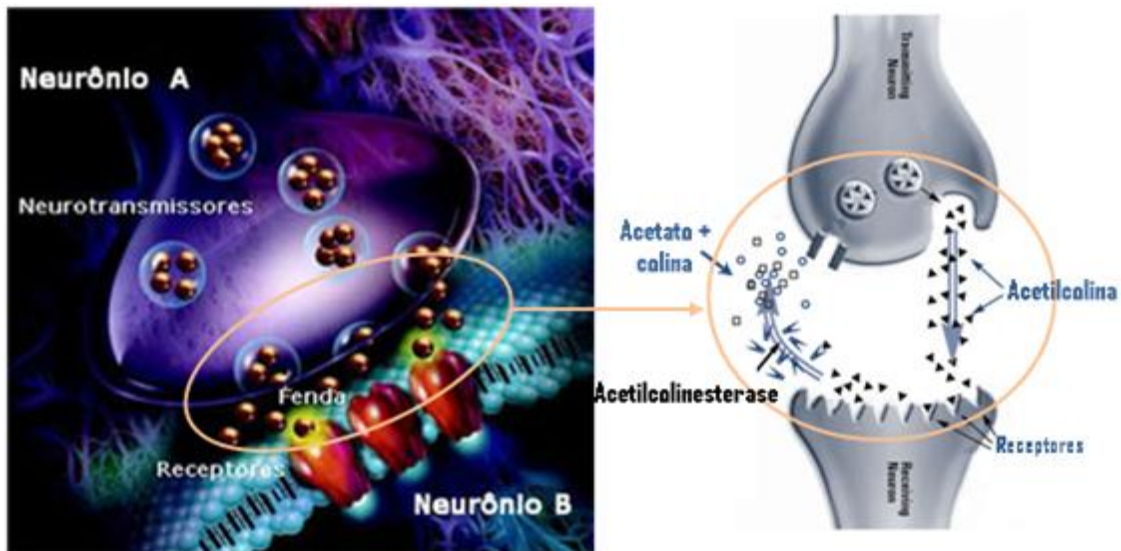
A ACh (**Figura 8**) é amplamente distribuída no cérebro, possui efeitos principalmente excitatórios que são efetivados pelos chamados receptores colinérgicos nicotínicos e muscarínicos que transmitem os sinais por mecanismos diferentes (CANEPA, *et al.*, 1966). Os receptores muscarínicos no cérebro atuam a nível pré-sináptico, e muitos dos efeitos comportamentais associados às vias colinérgicas parecem ser produzidos pela ação da ACh sobre estes receptores. Os receptores nicotínicos também estão disseminados no cérebro, porém de modo muito mais espaçoso do que os receptores muscarínicos. Os receptores nicotínicos de ACh exibem, em sua maioria, localização pré-sináptica e atuam ao facilitar a liberação de outros transmissores como glutamato e dopamina, embora atuem pós-sinapticamente em algumas situações (RANG *et al.*, 2004).



**Figura 8:** Estruturas 2D e 3D da acetilcolina e seus grupos funcionais.

A ACh é um neurotransmissor sintetizado pela célula transmissora ou pré-sináptica. Ela é armazenada em vesículas sinápticas até que um potencial de ação leve a uma despolarização da membrana plasmática das células pré-sinápticas. Isto resulta na entrada de Ca<sup>2+</sup>, seguida pela fusão de vesículas sinápticas com a membrana plasmática. A ACh é liberada na fenda sináptica e se difunde até o receptor, localizado na célula pós-sináptica. Aqui, a ACh se liga ao seu receptor, que pode atuar como um canal catiônico. O receptor sofre uma mudança conformacional logo após se ligar à ACh. Esta mudança na estrutura tridimensional resulta em uma entrada de Na<sup>+</sup>, que despolariza a membrana plasmática na célula pós-sináptica, gerando, então, um potencial de ação. É

necessário que a ACh seja removida da fenda sináptica antes que a sinapse seja capaz de responder a outro sinal. Isto requer a ação da AChE, que catalisa a hidrólise da ACh à colina, que é absorvida pelas células pré-sinápticas e usada na síntese de mais ACh. O acetato é transportado para outros tecidos e metabolizado. A **Figura 9** mostra, resumidamente, os eventos da transmissão colinérgica.



**Figura 9:** Representação da liberação e hidrólise da acetilcolina pela acetilcolinesterase na fenda sináptica.

O **Esquema 1** ilustra o mecanismo de hidrólise da ACh pela acetilcolinesterase que é iniciada pela ligação da ACh ao sítio ativo da acetilcolinesterase. As cadeias laterais de aminoácidos exercem importantes funções na formação do complexo enzima-substrato e, mais diretamente, no processo catalítico.

O primeiro passo, em qualquer reação envolvendo catálise enzimática, é a ligação do substrato ao sítio ativo da enzima. Isto é facilitado pelas interações entre o substrato e as cadeias laterais amino-acila da enzima, como visto anteriormente na **Figura 7**. Em geral, estas interações não são covalentes e incluem atrações eletrostáticas, ligações de hidrogênio e atrações de Van der Waals. Os fragmentos carregados negativamente podem interagir de maneira favorável com os grupos amino carregados positivamente. De fato, a atividade enzimática depende do pH, e tem um valor máximo em um pH consistente com o valor do  $pK_a$  de um fragmento histidina.

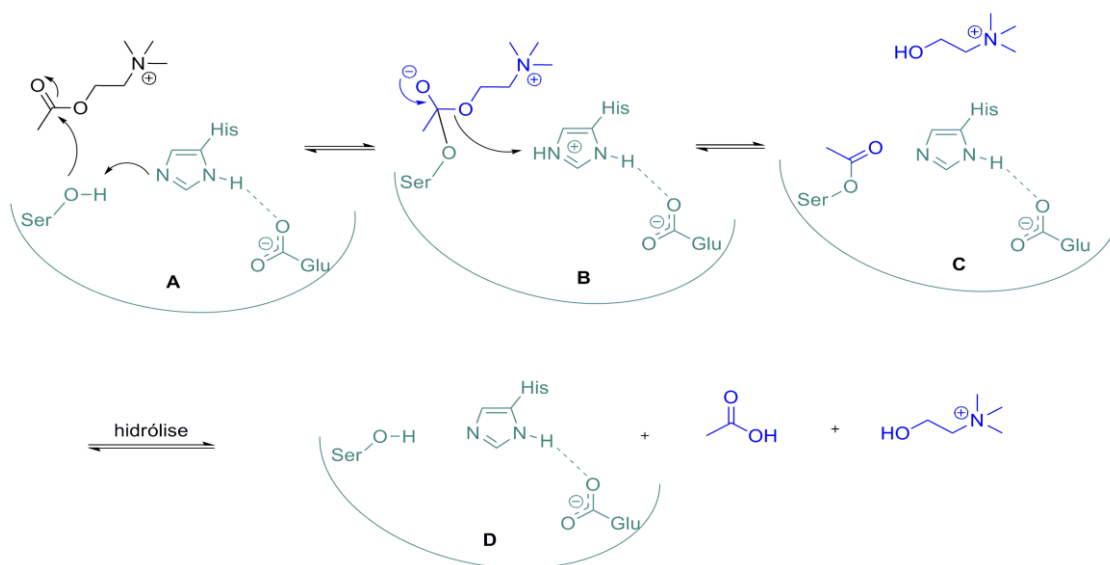
Além dos fragmentos de aminoácidos envolvidos na formação do complexo



enzima-substrato, há aqueles que estão envolvidos mais diretamente na catálise. Pode-se observar que o fragmento de serina está localizado no sítio ativo. O seu grupo hidroxila nucleofílico reage com o carbono do grupo acila da acetilcolina. A serina é acetilada e a colina é o grupo de saída.

O principal mecanismo da reação de acilação nesta, e em enzimas relacionadas, é bem conhecido (**Esquema 1**): a serina serve como um nucleófilo que ataca o carbono da carbonila do éster de acetilcolina, enquanto seu próton ligado a hidroxila é abstraído pela histidina (A). Isso resulta em um intermediário tetraédrico covalente (B). A regeneração do estado de hibridização  $sp^2$  (B→C) leva a acetilação da serina e liberação da colina. O papel exato da glutamina (da tríade catalítica) no mecanismo foi debatido no passado, mas estudos computacionais tornaram claro que a sua função é estabilizar a histidina protonada no estado de transição, e no intermediário acil-enzima (B), através de interações eletrostáticas (SANTOS, 2007).

Por fim, as colinesterases enquanto catalisadores precisam ser regeneradas. O fragmento de serina acetilado precisa ser hidrolisado antes que a reação se complete, para que a enzima seja capaz de catalisar uma nova reação. A hidrólise do fragmento serina acetilado resulta na formação de ácido acético. Uma vez que a colina e o ácido acético tenham deixado o sítio ativo, a enzima é capaz de ligar-se com mais substratos e repetir a reação catalítica.



**Esquema 1:** Mecanismo de hidrólise da ACh pela AChE.

## 1.5. Tratamento da Doença de Alzheimer

O conhecimento dos distúrbios de neurotransmissores na DA tem levado ao desenvolvimento de fármacos com efeitos sintomáticos, que são aprovados em muitos países. Estes fármacos atuam sobre o estado comportamental do paciente, mas não necessariamente na cura da doença. Avanços da pesquisa na patogênese molecular da DA também têm levado a novos fármacos como potenciais modificadores da doença, que agora vêm sendo utilizado em ensaios clínicos (FERRI *et al*, 2005).

### 1.5.1. Tratamentos Sintomáticos

Companhias farmacêuticas vêm apoiando fortemente a pesquisa e o desenvolvimento de fármacos que aumentem a capacidade cognitiva. Assim, a pesquisa a cerca da possibilidade de que a elevação no nível da ACh seja útil para melhorar os sinais de deficiência de aprendizagem (dificuldade em reter memórias recentes ou adquirir novos conhecimentos), apresenta-se como algo a ser explorado (SOARES, 2002).

#### 1.5.1.1. Os inibidores da acetilcolinesterase (AChE-i)

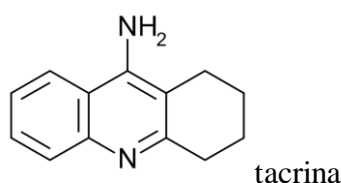
A hipótese colinérgica da doença de Alzheimer afirma que a degeneração dos neurônios colinérgicos nos núcleos do prosencéfalo basal provoca distúrbios nos terminais colinérgicos pré-sinápticos no hipocampo e no neocórtex, que são regiões de extrema importância para distúrbios de memória e outros sintomas cognitivos (TERRY, 2003).

Como resultado da neurodegeneração, a atividade de neurônios colinérgicos, aqueles que utilizam o neurotransmissor acetilcolina (ACh), é reduzida. Uma abordagem terapêutica para melhorar a neurotransmissão colinérgica é aumentar a disponibilidade de acetilcolina pela inibição da acetilcolinesterase, responsável pela degradação da acetilcolina na fenda sináptica (**Figura 9**) (FERRI *et al*, 2005).

Três domínios distintos na AChE constituem locais de ligação para inibidores: o bolsão acil do centro ativo, o subsítio colina do centro ativo e o sítio aniônico periférico. (TAYLOR & RADIC, 1994).

Alguns inibidores da AChE são utilizados terapêuticamente, enquanto outros tem mostrado uso como inseticidas, dependendo assim, do tipo de inibição que estes efetuam na enzima. Normalmente, inibidores reversíveis podem ser utilizados no tratamento paleativo da DA, gerando um aumento nas concentrações de ACh no córtex cerebral; ao mesmo tempo, evitando a degradação da ACh liberada pelos neurônios colinérgicos ainda não danificados pelo processo degenerativo.

Um dos primeiros fármacos sintéticos utilizados para o tratamento da DA foi a tacrina (**11**), mas devido ao seu elevado risco de hepatotoxicidade, com o tempo caiu em desuso (PENG, 1995). Outros fármacos, tais como, o donepezil (**12**), a rivastigmina (**13**) e a galantamina (**14**) (**Figura 10**), continuam sendo usados para o controle dos sintomas de DA. Somente o donepezil é utilizado para o tratamento da DA nos estágios mais avançados. (BIRKS, 2006).



O donepezil (**12**) foi o segundo medicamento a ser aprovado pelo FDA em 1996 e pela ANVISA em 2000 para o tratamento de DA e é um inibidor reversível da AChE. Vários estudos provaram sua eficácia terapêutica (ROGERS *et al.*, 1998). O donepezil (**12**) apresenta algumas vantagens, como sua meia-vida longa, de aproximadamente 70 horas, permitindo uma dose única diária. Não é hepatotóxico, sendo desnecessária a monitoração laboratorial.

A galantamina (**14**) é o fármaco mais recente aprovado pela FDA e pela ANVISA em 2001. Apresenta adicionalmente ação de modulação alostérica de receptores nicotínicos. Embora não esteja estabelecido com clareza o significado clínico dessa modulação, existe relação entre a cognição e os receptores nicotínicos. Tem meia vida de aproximadamente 7 horas, podendo ser administrada em duas doses diárias. (LEVIN & SIMON, 1998; CACABELOS *et al.*, 1999; CARAMELLI *et al.*, 2004).

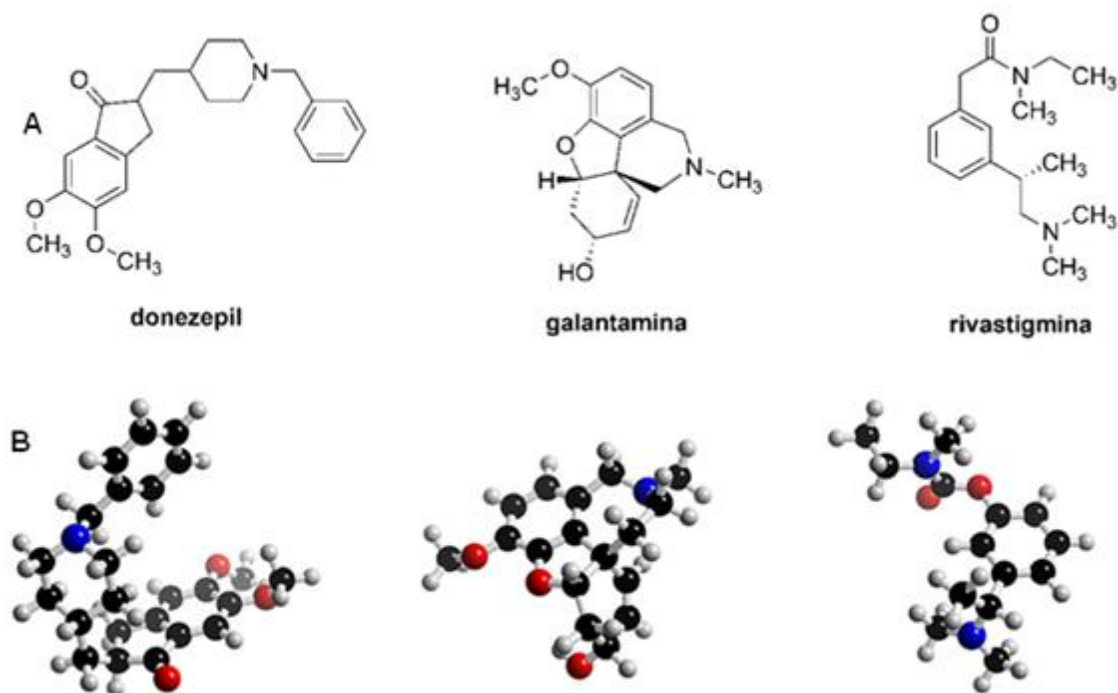
Do ponto de vista da seletividade da inibição colinesterásica, a galantamina (14) e donepezil (12) são inibidores seletivos da acetilcolinesterase, enquanto que a rivastigmina (13) inibe a acetilcolinesterase e também a butirilcolinesterase com afinidades semelhantes (BIRKS, 2006).

Apesar de haver diferenças farmacológicas entre os inibidores de colinesterases citados acima, não há vantagens evidentes na eficácia e no perfil de efeitos adversos, além de que esses fármacos não impedem a progressão da demência. Esses medicamentos agem na inibição das colinesterases e permitem uma ação temporal maior da ACh sobre os receptores colinérgicos. Tal fato permite a diminuição dos sintomas associados às fases iniciais da DA sem prejudicar, *a priori*, o metabolismo dos neurônios colinérgicos, mas não tem ação sobre as causas dessa doença. Deste modo, os aspectos cognitivos serão afetados para melhor, mas não o decorrer do processo degenerativo. Entre os efeitos adversos do uso destes medicamentos estão náuseas, problemas gastrointestinais, diarreia, perda de peso, bradicardia, síncope e insônia (DOWNEY, 2008).

**Tabela 1:** Características de fármacos que atuam no tratamento sintomático da Doença de Alzheimer

	Donepezil	Galantamina	Rivastigmina
<b>Indicação</b>	DA média a moderada	DA média a moderada	DA média a moderada
<b>Modo de ação</b>	Inibição seletiva da AChE	Inibição seletiva da AChE e modulação alostérica de receptores muscarínicos	Inibição lentamente reversível da AChE e BuChE
<b>Metabolismo CYP450</b>	Sim (CYP2D6 e CYP3A4)	Sim (CYP2D6 e CYP3A4)	Não, hidrolisado por esterases
<b>Meia vida</b>	Longa (70h)	Curta (7-8h)	Muito curta (1h)
<b>Doses por dia</b>	Uma	Duas	Duas
<b>Dose diária recomendada</b>	10mg / dia	16-24mg / dia	6-12mg / dia

DA=Doença de Alzheimer. AChE=acetilcolinesterase. BuChE=butirilcolinesterase. CYP450=citocromo P450



**Figura 10:** Estruturas dos fármacos inibidores da acetilcolinesterase utilizados no tratamento da Doença de Alzheimer em representação 2D (A) e 3D (B).

#### 1.5.1.2. Os inibidores da butirilcolinesterase (BuChE-i)

Evidências sugerem que a enzima butirilcolinesterase (BChE), intimamente relacionada com a AChE, tem um papel significante na DA (GREIG *et al.*, 2005; FARLOW, 2007), uma vez que está envolvida em funções neurais tais como a correção da neurotransmissão colinérgica e não-colinérgica. (MESULAM *et al.*, 2002).

Estudos indicam que inibidores seletivos da butirilcolinesterase (BChE-Is) elevam os níveis extracelulares de ACh no cérebro, melhorando o desempenho cognitivo em roedores (HARTMANN *et al.*, 2007), sem os clássicos efeitos colaterais adversos dos inibidores de acetilcolinesterase seletivos (AChE-Is) ou não seletivos, tais como náusea e vômito.

Além do aumento do desempenho cognitivo, aparentemente compostos inibidores seletivos da BChE, em culturas de células de neuroblastoma humano SK-N-SH, foram capazes de reduzir os níveis da proteína precursora do peptídeo  $\beta$ -amiloide

intra e extracelular, e secretadas foram reduzidos, sem afetar a viabilidade celular. Tratamento com ratos transgênicos mutantes que super expressava uma proteína precursora amilóide humana também resultou em baixos níveis de peptídeos  $\beta$ -amilóides cerebrais comparados aos controles. Assim, a inibição reversível seletiva da BChE no cérebro pode representar um tratamento para DA, pela melhoria não só da cognição como redução de marcadores neuropatológicos da doença.

## **2. Objetivos**

### **2.1. Objetivo Geral**

O objetivo deste trabalho é preparar e caracterizar, através de técnicas espectrométricas, uma série de derivados da piperina (**1**), e avaliar a atividade anticolinesterásica destes compostos frente à acetil e butirilcolinesterase, através do método de Ellman (ELLMAN *et al.*, 1961).

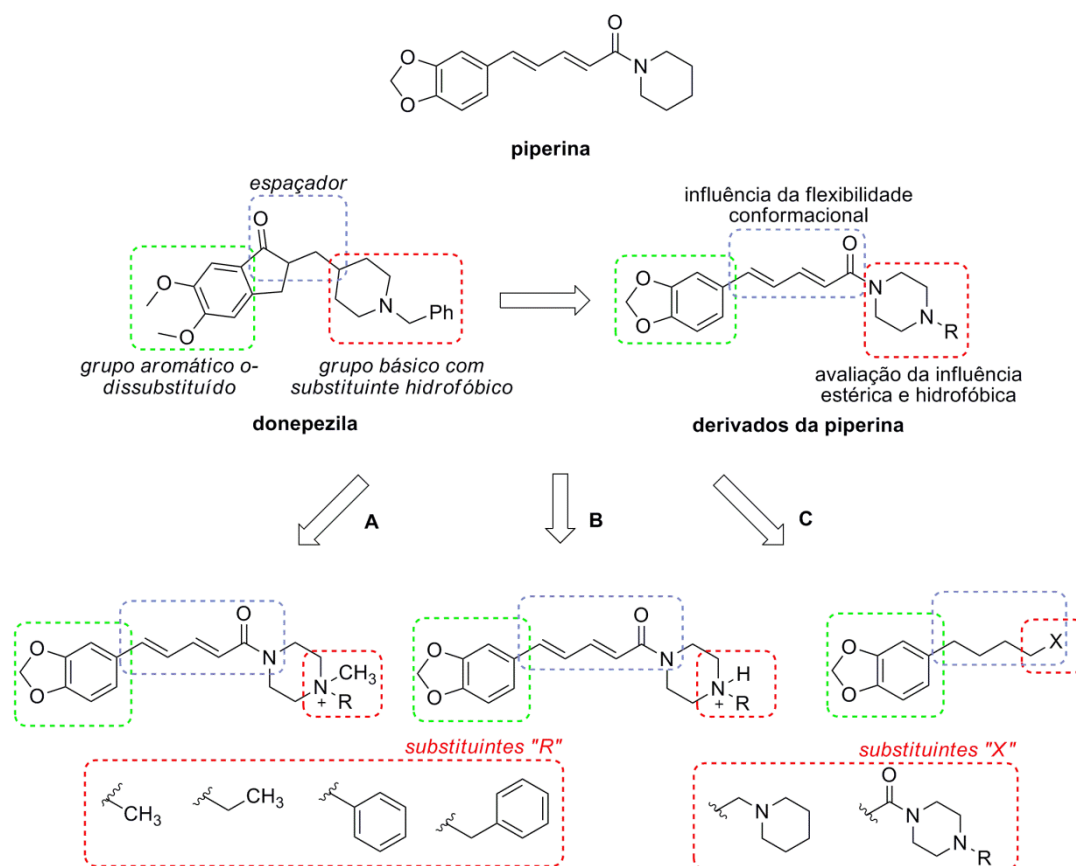
### **2.2. Objetivos Específicos**

- Fazer o isolamento de quantidades adequadas da amida natural piperina a partir de pimenta do reino (*Piper nigrum L.*).
- Realizar uma série de modificações, conforme planejamento estrutural (item 2.3), a partir da piperina, a fim de originar uma série de derivados saturados e insaturados.
- Caracterizar por métodos espectroscópicos de infravermelho, ressonância magnética nuclear de hidrogênio e carbono-13 (RMN de  $^1\text{H}$  e de  $^{13}\text{C}$ ), os novos derivados sintetizados;
- Avaliar a atividade inibitória dos compostos sintetizados sobre colinesterases utilizando o método de Ellman.

### 2.3. Planejamento Estrutural

O planejamento estrutural teve como objetivo o desenho de derivados da piperina inspirados no protótipo donepezila, avaliando a influência de determinados parâmetros estruturais, como a flexibilidade conformacional e o impedimento estérico frente às atividades anticolinesterásicas destes compostos.

Este planejamento teve origem no reconhecimento da similaridade estrutural entre o protótipo natural piperina (**1**) e a donepezila (**12**) (**Esquema 2**). Pôde-se perceber que ambos possuem uma subunidade aromática dissubstituída por grupos éter, dimetoxila e metilendioxila na donepezila e piperina, respectivamente. Identifica-se ainda um grupo espaçador; e um anel saturado de seis membros. Reconhecidamente, a subunidade benzilpiperidínica da donepezila é de grande importância para a atividade inibitória da acetilcolinesterase devido a seu nitrogênio básico e grupo lipofílico que interage com uma bolsa hidrofóbica dentro do sítio da colinesterase (**Esquema 2**).



**Esquema 2:** Planejamento estrutural dos derivados da piperina (**1**) planejados a partir da donepezila (**12**).

Como a diferença entre os protótipos era justamente a ausência deste importante grupo básico substituído por grupos hidrofóbicos, a nova série de derivados em **A** foi planejada pela troca do anel piperidínico na piperina (**1**) por uma piperazina substituída com grupos hidrofóbicos como metila, etila, fenila e benzila. Adicionalmente, objetivou-se a quaternização do nitrogênio básico pela introdução de uma metila, visando a aumentar a solubilidade dos compostos no bioensaio e também pela observação feita por nosso grupo de que esta substituição leva a um aumento da atividade inibitória das colinesterases (TORRES, 2012). Para se verificar a importância desta metilação, a série **B** foi planejada, onde pela síntese dos cloridratos poderíamos manter a solubilidade dos compostos, mas sem o efeito da metilação.

Por fim, a série **C** visou avaliar a influência da restrição conformacional exercida pela olefina entre o anel aromático e a piperazina, uma vez que o sítio ativo das colinesterases se localiza ao fim de um canal relativamente estreito e a maior liberdade conformacional poderia levar a um melhor encaixe com o sítio receptor.

### **3. Materiais e Métodos**

#### **3.1. Equipamentos**

Placas de agitação e aquecimento IKA; Rota evaporador IKA (modelo RV 10 digital) com banho IKA (modelo HB 10 digital); leitora de microplaca de 96 poços marca Bio-Rad (modelo i-Mark); Reator de microondas da marca CEM Discover; Os espectros de ressonância magnética nuclear (RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$ ) foram obtidos em espectro da Bruker 500MHz e 400MHz do Programa de Pós Graduação em Química (PPGQ), foi utilizado como referência interna o tetrametilsilano (TMS). Os solventes deuterados clorofórmio ( $\text{CDCl}_3$ ) e dimetilsulfóxido ( $\text{DMSO-}d_6$ ) foram usados na solubilização das amostras. Os espectros de infravermelho (IV) foram obtidos no espectrômetro da Bruker 1600 FT (PPGQ) e as amostras pulverizadas em pastilhas de KBr.

#### **3.2. Materiais**

Os reagentes e os solventes listados abaixo foram utilizados sem nenhum tratamento prévio - Iodeto de metila, bicarbonato de sódio, hidróxido de potássio, hidróxido de sódio, cloreto de oxalila, 1-metil piperazina, 1-etil piperazina, 1-benzil

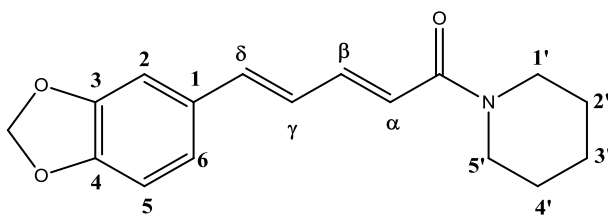


piperazina, água destilada, ácido clorídrico, acetonitrila, acetato de etila, dimetilsulfóxido, diclorometano, etanol, éter etílico, HCl (Vetec), metanol, hexano, tetrahidrofurano, tris-HCl (Amresco), ácido 5,5'- ditiobis [2-nitrobenzóico] (Sigma Aldrich), iodeto de acetiltiocolina (Sigma Aldrich), iodeto de butiriltiocolina (Sigma Aldrich), acetilcolinesterase de peixe elétrico tipo VI-S (Sigma Aldrich), butirilcolinesterase de soro equino (Sigma Aldrich), albumina sérica bovina (Sigma Aldrich).

### 3.3. Metodologia

#### 3.3.1. Extração da Piperina (1)

Numa aparelhagem de Soxhlet foram colocados 167g de pimenta do reino moída em um cartucho de papel de filtro e no balão de fundo redondo de 500mL foram adicionados 250 mL de etanol P.A para extração. O sistema foi mantido em refluxo por aproximadamente 48 horas. Após concentrar o extrato em evaporador rotatório, obteve-se um resíduo de aspecto viscoso. Adicionou-se ao mesmo 100 mL de uma solução alcoólica de hidróxido de potássio (KOH) 10% para que ocorresse a precipitação dos taninos e demais materiais fenólicos, contaminantes do meio na forma dos respectivos sais de potássio. Após filtração em funil de vidro para retirada do material precipitado, adicionou-se ao sobrenadante uma quantidade de água suficiente para o meio se tornar turvo, deixou-se a solução formada em repouso até a formação de 3,5 g (2%) de piperina na forma de cristais amarelo-claro no formato de agulhas que foram filtrados em funil de buchner. O sólido obtido foi lavado com uma pequena quantidade de água gelada e éter etílico gelado. (Pf: 128°C - Lit.: 125-127°C – IKAN, 1991)



Estrutura da Piperina (1)

**Dados de Infravermelho (pastilha em KBr, cm<sup>-1</sup>):**

$\nu$ C-H (Csp<sup>2</sup>) = 3008 (sistema aromático e cadeia insaturada)

$\nu$ C-H (Csp<sup>3</sup>) = 2937-2856 (metilenos do anel piperidínico e carbono do metilenodióxi)

$\nu$ C=O = 1633 (estiramento da carbonila de amida conjugada)

$\nu$ C –O– C= 1251 (estiramento do anel metilenodioxila)

$\nu$ C=C (Csp<sup>2</sup>) = 1583-1444 (vibração do esqueleto aromático e cadeia insaturada)

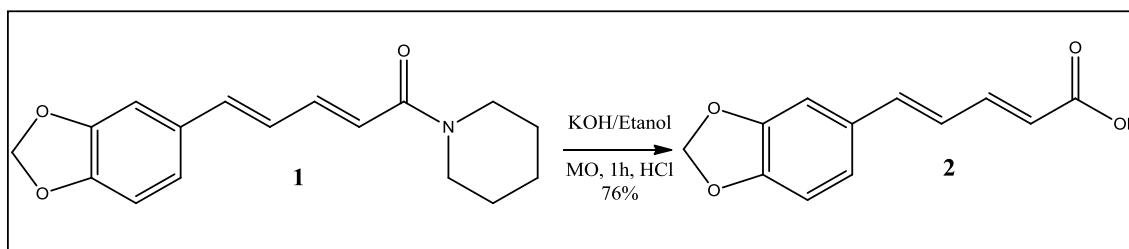
$\delta$ C-H (Csp<sup>2</sup>) = 925 (deformação angular de C-H para H isolado no sistema aromático)

$\delta$ C-H (Csp<sup>2</sup>) = 850,5 (deformação angular de C-H para 2H no sistema aromático)

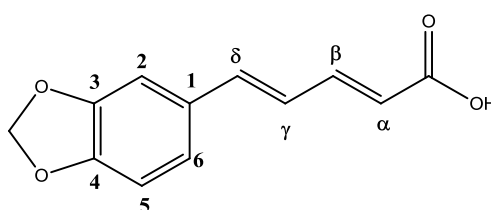
**Tabela 2:** Deslocamento químico de <sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C para a piperina (1)

Posição	$\delta$ <sup>1</sup> H (ppm)	$\delta$ <sup>13</sup> C (ppm)
1' e 5'	3,55 - 3,66 (d, 4H)	43,2; 46,9 (CH <sub>2</sub> )
2' e 4'	1,60 – 1,63 (m, 4H)	26,7(CH <sub>2</sub> )
3'	1,68 - 1,69 (m, 2H)	24,6 (CH <sub>2</sub> )
C=O	-----	165,4 (C)
$\alpha$	6,44 – 6,47 (d; 1H)	120,0 (CH)
$\beta$	7,40 – 7,45 (dd; 1H)	142,4 (CH)
$\gamma$	6,77 – 6,80(d, 1H)	125,3 (CH)
$\delta$	6,79 – 6,80 (d, 1H)	138,2 (CH)
1	-----	131,0 (C)
2	7,00 (d; 1H)	105,6 (CH)
3 e 4	-----	148,2 (C)
5	6,80 (d, 1H)	108,4 (CH)
6	6,90 - 6,92 (d; 1H)	122,5 (CH)
OCH <sub>2</sub> O	5,99 (s; 2H)	101,2 (CH <sub>2</sub> )

### 3.3.2. Hidrólise Básica da Piperina (1)



Em um balão de 125 mL foram colocados 2g de piperina (1) em 20 mL de hidróxido de potássio alcoólico 20%. A mistura reacional foi mantida em refluxo e agitação no reator de microondas por 60 minutos (temperatura de 95°C e 35 W de potência), passando de amarela a marrom com formação de precipitado. A reação foi acompanhada por cromatografia em camada final (CCF) eluída em hexano:acetato 50%. Após determinado o fim da reação, foi retirado o etanol da mistura em evaporador rotatório e, em seguida, acrescentou-se água quente ao resíduo formado, sendo a solução filtrada em Becher à quente. À solução do respectivo carboxilato, acrescentou-se ácido clorídrico concentrado até pH próximo de 3, ocorrendo a precipitação do ácido piperínico (2) na forma de sólido amarelo, filtrou-se em funil de Büchner e o sólido formado foi deixado secando naturalmente. Obteve-se 1,17g (76%) de ácido piperínico (2) na forma de um sólido amorfo de coloração marrom. (Pf: 219 °C - Lit. 216-217 °C - IKAN, 1991).



Ácido Piperínico (2)

#### Dados de Infravermelho (pastilha em KBr, cm<sup>-1</sup>):

vO-H = 3435,1 (estiramento da hidroxila do ácido carboxílico)

vC=O = 1679,9 (estiramento da carbonila do ácido carboxílico)

$\nu_{C=C} (C_{sp^2}) = 1604 - 1448$  (vibração do esqueleto aromático)

$\nu_{C-O-C} = 1255$  (estiramento do anel metilenodioxila)

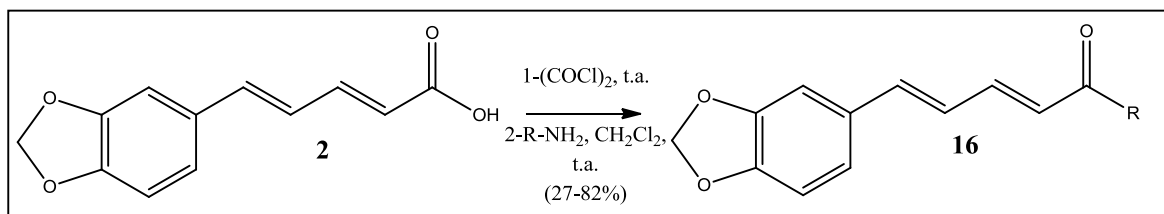
$\delta_{C-H} (C_{sp^2}) = 927,7$  (deformação angular de C-H para H isolado no sistema aromático)

$\delta_{C-H} (C_{sp^2}) = 850,5$  (deformação angular de C-H para 2H no sistema aromático)

**Tabela 3:** Deslocamento químico de  $^1H$  e  $^{13}C$  para o ácido piperínico (2)

Posição	$\delta \text{ } ^1H$ (ppm)	$\delta \text{ } ^{13}C$ (ppm)
OH	12,25(s;1H)	-----
C=O	-----	168,12 (C)
$\alpha$	5,93 – 5,96 (d; 1H)	121,6 (CH)
$\beta$	7,30 – 7,35 (dd; 1H)	145,12 (CH)
$\gamma$	6,94 – 6,95 (d, 1H)	125,3 (CH)
$\delta$	6,99 – 7,00 (m, 2H)	140,2 (CH)
1	-----	131,0 (C)
2	7,02 – 7,04 (d; 2H)	106,2 (CH)
3 e 4	-----	148,6 – 148,48 (C)
5	6,99 – 7,00 (d, 2H)	109,2 (CH)
6	7,02 – 7,04 (d; 1H)	123,6 (CH)
OCH <sub>2</sub> O	6,08 (s; 2H)	101,8 (CH <sub>2</sub> )

### 3.3.3. Reação Geral de formação das amidas (16a-d)

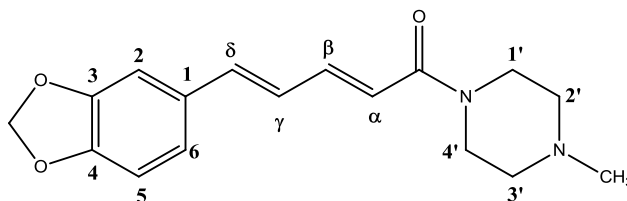


## Metodologia Geral:

Em um balão de fundo redondo, equipado com barra de agitação magnética e septo de borracha, previamente seco e mantido sob atmosfera inerte (N<sub>2</sub> seco) foram adicionadas quantidades adequadas de ácido piperínico (**2**) e cloreto de oxalila. A mistura reacional foi mantida a temperatura ambiente sob agitação constante. A evolução da reação foi acompanhada por CCF<sup>1</sup> até o consumo total do produto de partida. O excesso de cloreto de oxalila foi evaporado em evaporador rotatório. Ao cloreto de ácido (**15**) correspondente, foi adicionado volume apropriado de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (seco) e a solução resultante levada ao banho de gelo, sendo adicionada gota à gota sobre a solução quantidade adequada da amina de interesse. Ao término da reação o solvente foi evaporado sob fluxo contínuo de nitrogênio. O produto obtido foi particionado utilizando 50 mL de acetato de etila e 15 mL de solução de bicarbonato de sódio 5% (três vezes). A fase orgânica foi em seguida seca sob Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anidro e evaporada até a secura em evaporador rotatório gerando as amidas correspondentes.

### 3.3.3.1 Reação de formação da amida 1-metilpiperazinila (**16a**) [(2E,4E)-5-(benzo[d][1,3]dioxol-5-il)-1-(4-metilpiperazin-1-il)penta-2,4-dien-1-ona.

Conforme a metodologia geral apresentada, 300 mg (1,38 mmol) de ácido piperínico (**2**) foram reagidos com 2mL de cloreto de oxalila. O cloreto de acila (**15**) correspondente foi obtido na forma de um sólido marrom, o qual foi subsequentemente dissolvido em 2 mL de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> anidro e então reagido com 305 µL (2,75 mmol) de 1-metilpiperazina, fornecendo, após a recristalização em etanol/água, 130 mg (31%) da amida **16a** na forma de um sólido amorfo de coloração marrom (Pf: 172°C).



Estrutura da 1-metilpiperazinila (**16a**)

<sup>1</sup>O acompanhamento da formação do cloreto de ácido foi realizado de maneira indireta, pela adição de pequena quantidade do meio reacional sobre metanol, gerando o respectivo éster metílico.

**Dados de Infravermelho (pastilha em KBr, cm<sup>-1</sup>):**

$\nu_{\text{N-H}} = 3410$  (vibração de deformação axial do N-H)

$\nu_{\text{C-H}} (\text{Csp}^3) = 2900 - 2817$  (estiramento de metilenos da piperazina e carbono do metilenodióxi)

$\nu_{\text{C=O}} = 1635,5$  (estiramento da carbonila de amida conjugada)

$\nu_{\text{C=C}} (\text{Csp}^2) = 1585,4 - 1494,7$  (vibração do esqueleto aromático)

$\nu_{\text{C-O-C}} = 1255$  (estiramento do anel metilenodioxila)

$\delta_{\text{C-H}} (\text{Csp}^2) = 927,7$  (deformação angular de C-H para H isolado no sistema aromático)

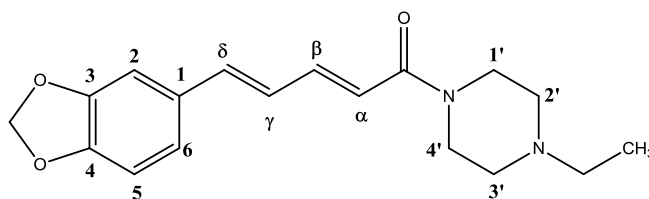
$\delta_{\text{C-H}} (\text{Csp}^2) = 854,4$  (deformação angular de C-H para 2H no sistema aromático)

**Tabela 4:** Deslocamento químico de <sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C para a 1-metilpiperazinila (**16a**)

Posição	$\delta^1\text{H}$ (ppm)	$\delta^{13}\text{C}$ (ppm)
1' e 4'	3,64 - 3,75 (m, 4H)	42,0; 45,0 (CH <sub>2</sub> )
2' e 3'	2,45 - 2,46 (m, 4H)	54,6; 55,2 (CH <sub>2</sub> )
CH <sub>3</sub>	2,34 (s, 3H)	45,9 (CH <sub>3</sub> )
C=O	-----	165,6 (C)
$\alpha$	6,41 - 6,44(d, 1H)	125,13 (CH)
$\beta$	7,42 - 7,47(dd; 1H)	148,2 (CH)
$\gamma$	6,75 - 6,77(d, 1H)	122,4 (CH)
$\delta$	6,81 (d, 1H)	138,2 (CH)
1	-----	130,9 (C)
2	7,00 - 7,01 (s; 1H)	105,6 (CH)
3 e 4	-----	143,1 (C)
5	6,79 - 6,80 (d, 1H)	108,5 (CH)
6	6,91 - 6,93(d, 1H)	119,2 (CH)
OCH <sub>2</sub> O	6,0 (sl; 2H)	101,3 (CH <sub>2</sub> )

### 3.3.3.2 Reação de formação da 1-etilpiperazinila (16b) [(2E,4E)-5-(benzo[d][1,3]dioxol-5-il)-1-(4-etilpiperazin-1-il)penta-2,4-dien-1-ona]

Conforme a metodologia geral apresentada, 300 mg (1,38 mmol) de ácido piperínico (2) foram reagidos com 2mL de cloreto de oxalila. O cloreto de acila (15) correspondente foi obtido na forma de um sólido marrom, o qual foi subsequentemente dissolvido em 2 mL de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> anidro e então reagido com 350 µL (2,76mmol) de 1-etilpiperazina e fornecendo 304,0mg (82%) da amida 16b na forma de um sólido amorfo de coloração marrom. (Pf: 182°C).



Estrutura da 1-etilpiperazinila (16b)

#### Dados de Infravermelho (pastilha em KBr, cm<sup>-1</sup>):

vN-H= 3410 (vibração de deformação axial do N-H)

vC-H (Csp<sup>3</sup>) = 2900 – 2800 (estiramento de metilenos da piperazina e carbono do metilenodióxi)

vC=O =1637,5 (estiramento da carbonila de amida conjugada)

vC=C (Csp<sup>2</sup>) = 1585-1442 (vibração do esqueleto aromático)

vC –O– C= 1247 (estiramento do anel metilenodioxila)

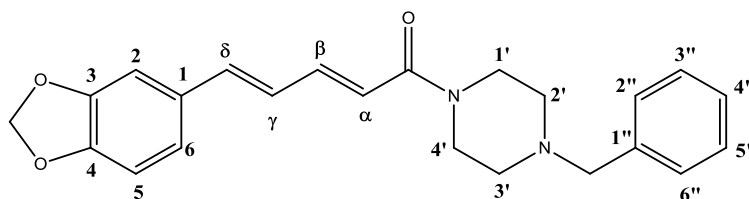
δC-H (Csp<sup>2</sup>) = 931,5 (deformação angular de C-H para H isolado no sistema aromático)

**Tabela 5:** Deslocamento químico de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  para a 1-etilpiperazinila (**16b**)

Posição	$\delta$ $^1\text{H}$ (ppm)	$\delta$ $^{13}\text{C}$ (ppm)
1'e 4'	3,64 (m, 4H)	45,6 (CH <sub>2</sub> )
2'e 3'	2,45 – 2,50 (m, 6H)	52,2 (CH <sub>2</sub> )
CH <sub>3</sub>	1,12 – 1,14 (t, 3H)	11,8 (CH <sub>3</sub> )
C=O	-----	165,5 (C)
CH <sub>2</sub>	2,45 – 2,50 (m, 6H)	41,9 (CH <sub>2</sub> )
$\alpha$	6,42 – 6,44 (d; 1H)	119,3 (CH)
$\beta$	7,42 – 7,47 (dd; 1H)	143,0 (CH)
$\gamma$	6,75 – 6,77 (d, 1H)	125,1 (CH)
$\delta$	6,81 – 6,82 (d, 1H)	138,7 (CH)
1	-----	130,9 (C)
2	7,0 – 7,01 (s; 1H)	105,7 (CH)
3 e 4	-----	148,2 (C)
5	6,79 – 6,80 (d, 1H)	108,5 (CH)
6	6,91 – 6,93 (d; 1H)	122,6 (CH)
OCH <sub>2</sub> O	6,0 (s; 2H)	101,3 (CH <sub>2</sub> )

### 3.3.3.3 Reação de formação da 1-benzilpiperazinila (**16c**) [(2E,4E)-5-(benzo[d][1,3]dioxol-5-il)-1-(4-benzilpiperazin-1-il)penta-2,4-dien-1-ona]

Conforme a metodologia geral apresentada, 200mg (0,92 mmol) de ácido piperínico (**2**) foram reagidos com 2mL de cloreto de oxalila. O cloreto de acila (**15**) correspondente foi obtido na forma de um sólido marrom, que então foi reagido com 0,323g (1,83mmol) de 1-benzilpiperazina solubilizada em 2 mL de diclorometano seco, fornecendo 92mg (27 %) da amida **16c** na forma de um sólido marrom. (Pf: 194 °C).

Estrutura da 1-benzilpiperazinila (**16c**)



**Dados de Infravermelho (pastilha em KBr, cm<sup>-1</sup>):**

$\nu_{\text{N-H}} = 3435$  (vibração de deformação axial do N-H)

$\nu_{\text{C-H}} (\text{Csp}^3) = 2947\text{-}2802$  (estiramento de metilenos da piperazina e carbono do metilenodióxi)

$\nu_{\text{C=O}} = 1637$  (estiramento da carbonila de amida conjugada)

$\nu_{\text{C=C}} (\text{Csp}^2) = 1593\text{-}1444$  (vibração do esqueleto aromático)

$\nu_{\text{C-O-C}} = 1249$  (estiramento do anel metilenodioxila)

$\delta_{\text{C-H}} (\text{Csp}^2) = 929$  (deformação angular de C-H para H isolado no sistema aromático)

$\delta_{\text{C-H}} (\text{Csp}^2) = 800,4$  (deformação angular de C-H para 2H no sistema aromático)

$\delta_{\text{C-H}} (\text{Csp}^2) = 738,7$  (deformação angular de C-H para 5H no sistema aromático)

**Tabela 6:** Deslocamento químico de <sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C para a 1-benzilpiperazinila (**16c**)

Posição	$\delta^1\text{H}$ (ppm)	$\delta^{13}\text{C}$ (ppm)
1' e 4'	3,64 – 3,75 (m, 4H)	42,0; 45,7 (CH <sub>2</sub> )
2' e 3'	2,49 (m, 4H)	52,7; 53,2 (CH <sub>2</sub> )
CH <sub>2</sub>	3,56 (s, 2H)	62,9 (CH <sub>2</sub> )
C=O	-----	165,4 (C)
1''	-----	137,6 (C)
2'' e 6''	7,35 (m; 5H)	126,1 (CH)
3'' e 5''	7,35 (m; 5H)	128,3 (CH)
4''	7,35 (m; 5H)	127,1 (CH)
$\alpha$	6,41 – 6,44 (d; 1H)	119,3 (CH)
$\beta$	7,42 – 7,47 (dd; 1H)	143,0 (CH)
$\gamma$	6,72 – 6,82 (m, 3H)	125,1 (CH)
$\delta$	6,72 – 6,82 (m, 3H)	138,7 (CH)
1	-----	130,9 (C)
2	7,01 (s; 1H)	105,6 (CH)
3 e 4	-----	148,2 (C)
5	6,72 – 6,82 (m, 3H)	108,4 (CH)

6	6,91 – 6,93 (d; 1H)	122,6 (CH)
OCH <sub>2</sub> O	6,0 (s; 2H)	101,3 (CH <sub>2</sub> )

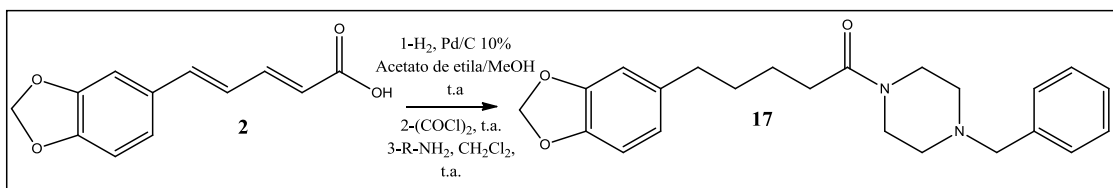
### 3.3.3.4. Reação de formação da 1-fenilpiperazinila (16d) [(2E,4E)-5-(benzo[d][1,3]dioxol-5-il)-1-(4-fenilpiperazin-1-il)penta-2,4-dien-1-ona]

A amida 1-fenilpiperazinila (**16d**) tem sua metodologia descrita por (LOPES, 2011).

**Tabela 7:** Deslocamento químico de <sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C para a 1-fenilpiperazinila (**16d**).

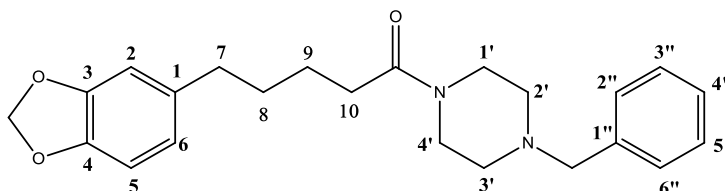
Posição	$\delta^1\text{H}$ (ppm)	$\delta^{13}\text{C}$ (ppm)
1'e 4'	3,22 – 3,25 (m, 4H)	41,98; 45,69 (CH <sub>2</sub> )
2'e 3'	3,79 – 3,90 (m, 4H)	49,42; 49,87(CH <sub>2</sub> )
C=O	-----	165,6(C)
$\alpha$	6,46 – 6,49 (d; 1H)	119,0 (CH)
$\beta$	7,47 – 7,52 (dd; 1H)	143,4 (CH)
$\gamma$	6,75 – 6,85 (m; 3H)	125,6 (CH)
$\delta$	6,92 – 6,98 (m; 4H)	139,0 (CH)
1	-----	130,8 (C)
2	7,02 (s; 1H)	105,7 (CH)
3 e 4	-----	148,3; 148,2 (C)
5	6,75 – 6,85 (m; 3H)	108,5 (CH)
6	6,92 – 6,98 (m; 4H)	122,7 (CH)
OCH <sub>2</sub> O	6,01 (s; 2H)	101,3 (CH <sub>2</sub> )
1''	-----	150,0 (C)
2''e 6''	6,92 – 6,98 (m; 4H)	116,6 (CH)
3''e 5''	7,29 – 7,33 (m; 2H)	129,2 (CH)
4''	6,75 – 6,85 (m; 3H)	120,5 (CH)

### 3.3.4 Reações de formação dos compostos reduzidos (17 e 19)



#### 3.3.4.1 Reação de formação da amida 1-benzilpiperazinila hydrogenada (17) [5-(benzo[d][1,3]dioxol-5-il)-1-(4-benzilpiperidin-1-il)pentan-1-ona]

Em um balão de fundo redondo, previamente seco, equipado com barra de agitação magnética e septo de borracha, 210 mg de ácido piperínico (2) (0,96 mmol) foi solubilizado em 10 mL de acetato de etila e 2mL de metanol. Após adicionou-se 10 mg de Pd/C 10%. A reação foi mantida sob atmosfera de hidrogênio e agitação constante. Após término da reação, determinada por CCF, a suspensão do catalisador foi filtrada à vácuo, utilizando terra de infusórios como agente filtrante, lavando em seguida com acetato de etila. O filtrado foi evaporado em evaporador rotatório, levando a formação de um sólido amorfo amarelo claro (18) com peso de 0,185g (87%). Após a hidrogenação do ácido piperínico a síntese da amida foi realizada de acordo com a metodologia geral descrita no item 3.3.3 onde, 0,160mg (0,720 mmol) de ácido piperínico hydrogenado (18) foram reagidos com 2mL de cloreto de oxalila. O cloreto de acila correspondente foi obtido na forma de um sólido marrom, o qual foi subsequentemente reagido com 0,380g (2,16mmol) de 1-benzilpiperazina solubilizada em diclorometano anidro e então forneceu 0,192 mg (70 %) de um óleo de coloração marrom.

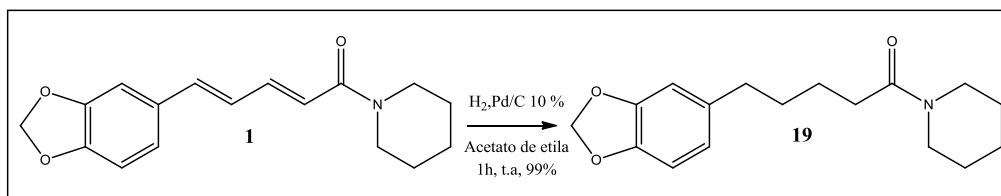


Estrutura da 1-benzilpiperazinila hydrogenada (17)

**Tabela 8:** Deslocamento químico de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  para a 1-benzilpiperazinila hidrogenada (17)

Posição	$\delta ^1\text{H}$ (ppm)	$\delta ^{13}\text{C}$ (ppm)
1' e 4'	3,46 – 3,48 (m, 4H)	45,4; 41,3 (CH <sub>2</sub> )
2' e 3'	2,45 – 2,50 (m, 4H)	53,0; 52,7(CH <sub>2</sub> )
C=O	-----	171,3 (C)
CH <sub>2</sub>	3,56 (s; 2H)	62,8 (CH <sub>2</sub> )
1	-----	136,1 (C)
2	6,69 (s; 1H)	108,6 (CH)
3 e 4	-----	147,5 (C)
5	6,73 – 6,74 (d; 1H)	108,1 (CH)
6	6,63 – 6,64 (d; 1H)	121,1 (CH)
7	2,56 – 2,59 (m; 2H)	33,1 (CH <sub>2</sub> )
8 e 9	1,64 – 1,65 (m; 3H)	35,4; 24,8 (CH <sub>2</sub> )
10	2,32 – 2,35 (m; 2H)	31,4 (CH <sub>2</sub> )
OCH <sub>2</sub> O	5,9 (s; 2H)	101,1 (CH <sub>2</sub> )
1''	-----	145,5 (C)
2'' e 6''	7,29 – 7,37 (m; 6H)	129,2 (CH)
3'' e 5''	7,29 – 7,37 (m; 6H)	128,4 (CH)
4''	7,29 – 7,37 (m; 6H)	127,4 (CH)

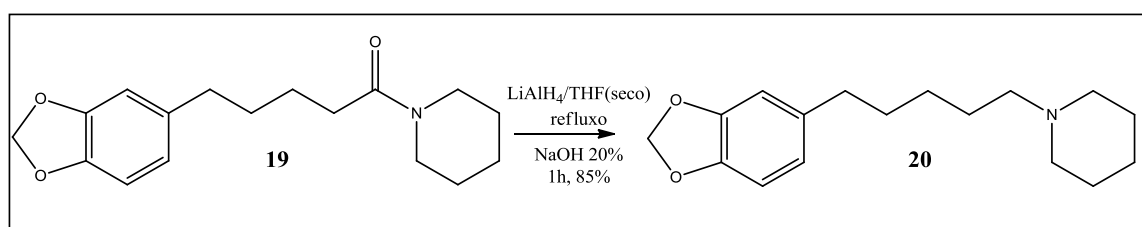
### 3.3.4.2 Reação de hidrogenação da piperina (1). Formação da tetraidropiperina (19) [5-(benzo[d][1,3]dioxol-5-il)-1-(piperidin-1-il)pentan-1-one]



Em um balão de 20 mL de capacidade, equipado com barra de agitação magnética e septo de borracha foi feita uma solução de 500 mg de piperina (1) em 10 mL de acetato de etila. A atmosfera do balão foi trocada por H<sub>2</sub> e, em seguida, após foram adicionados 20mg Pd/C (10%). A reação foi mantida sob atmosfera de

hidrogênio e agitação constante. Após término da reação, determinada por CCF, a suspensão do catalisador foi filtrada à vácuo, utilizando terra de infusórios como agente filtrante, lavando em seguida com acetato de etila. O filtrado foi evaporado em evaporador rotatório, levando a formação de 0,5026g (99%) da tetraidropiperina **19** na forma de um óleo de coloração amarelo claro. A natureza bem como a pureza deste produto foram determinadas por comparação com padrão disponível em nosso laboratório (LOPES, 2011; RIBEIRO, 2004) e foi utilizado diretamente na reação subsequente.

### 3.3.4.3 Reação de Redução da Carbonila. Formação da [1-(5-(benzo[d][1,3]dioxol-5-il)pentil)piperidina] (**20**)

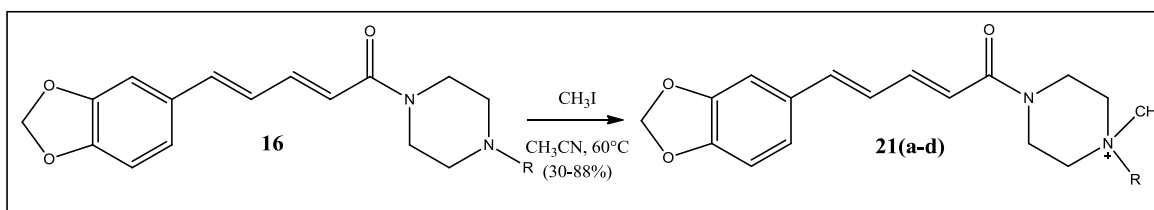


Em um balão de 25 mL de capacidade, equipado com barra de agitação magnética, septo de borracha e condensador de refluxo, mantido sob atmosfera inerte, foram solubilizados 210 mg de  $\text{LiAlH}_4$  em 11mL de THF seco. À esta solução foi adicionada gota à gota uma solução contendo 400 mg de tetraidropiperina (**19**) solubilizada em 6 mL de THF seco. A mistura reacional foi mantida sob refluxo por 1h. O término da reação foi averiguado por CCF. A reação foi resfriada em banho de gelo e tratada com 3,5 mL de solução aquosa de NaOH 20%, após esta etapa filtrou-se o meio resultante em büchner para retirada do material inorgânico precipitado. O solvente foi evaporado em evaporador rotatório, gerando 323,1 mg (85%) da amina **20** na forma um óleo de coloração marron.

**Tabela 9:** Deslocamento químico de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  para a 1-(5-(benzo[d][1,3]dioxol-5-il)pentil)piperidina (**20**)

Posição	$\delta^1\text{H}$ (ppm)
1	-----
2	6,69 (s; 1H)
3 e 4	-----
5	6,73 – 6,75 (d, 1H)
6	6,63 – 6,64 (d; 1H)
7	2,27 – 2,30 (m; 2H)
8	1,52 – 1,54 (m; 2H)
9	1,28 – 1,34 (m; 2H)
10	1,46 (m; 2H)
11	2,53 – 2,56 (t; 2H)
1' e 5'	2,38 (m; 4H)
2'; 3' e 4'	1,58 – 1,63 (m; 6H)
OCH <sub>2</sub> O	5,93 (s; 2H)

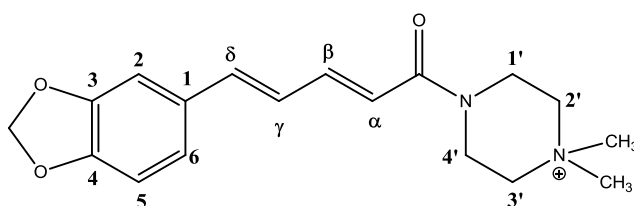
### 3.3.5 Reação Geral de *N*-alquilação das Amidas (**21 a-d**)



Em um tubo de reação de borossilicato próprio para reações sob alta pressão foi solubilizadas as amidas correspondente em acetonitrila e, em seguida, adicionado o iodeto de metila. O tubo foi selado e a reação mantida sob agitação à temperatura de  $60^\circ\text{C}$ . Após determinado o fim da reação por CCF, a reação foi resfriada em banho de gelo e em seguida filtrada em buchner à frio e lavada com acetonitrila gelada.

### 3.3.5.1. Reação de Alquilação da 1-metilpiperazinila. [iodeto de 4-((2E,4E)-5-(benzo[d][1,3]dioxol-5-il)penta-2,4-dienoil)-1,1-dimetilpiperazin-1-ium] (21a)

Conforme a metodologia geral apresentada, 50,6 mg (0,17 mmol) da 1-metilpiperazida (**16a**) foram solubilizados em 3mL de acetonitrila e reagida com 32  $\mu$ L (0,51 mmol) de iodeto de metila, observou-se formação de precipitado durante a reação. Após precipitação com éter etílico foram obtidos 53,6 mg (71%) do sal **21a** na forma de sólido marrom claro. (Pf: >250 °C).



Estrutura do sal de 1 – metilpiperazinila (**21a**)

#### Dados de Infravermelho (pastilha em KBr, $\text{cm}^{-1}$ ):

$\nu_{\text{C-H}}$  ( $\text{Csp}^3$ ) = 2952-2873 (estiramento de metilenos da piperazina)

$\nu_{\text{C=O}}$  = 1639 (estiramento da carbonila da amida conjugada)

$\nu_{\text{C=C}}$  ( $\text{Csp}^2$ ) = 1591-1440 (vibração do esqueleto aromático)

$\nu_{\text{C-O-C}}$  = 1247 (estiramento do anel metilenodioxila)

$\delta_{\text{C-H}}$  ( $\text{Csp}^2$ ) = 918 (deformação angular de C-H para H isolado no sistema aromático)

$\delta_{\text{C-H}}$  ( $\text{Csp}^2$ ) = 815,8 (deformação angular de C-H para 2H no sistema aromático)

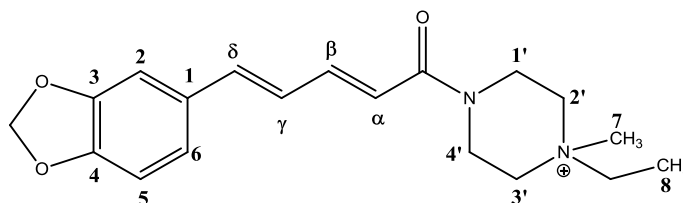
**Tabela 10:** Deslocamento químico de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  para o sal da 1-etilpiperazinila (**21a**)

Posição	$\delta$ $^1\text{H}$ (ppm)	$\delta$ $^{13}\text{C}$ (ppm)
1'e 4'	3,92 – 3,97 (m, 4H)	(CH <sub>2</sub> )*
2'e 3'	3,46 (m, 4H)	60,7 (CH <sub>2</sub> )
2 CH <sub>3</sub>	3,20 (s, 6H)	51,0 (CH <sub>3</sub> )
C=O	-----	165,2 (C)
$\alpha$	6,73 – 6,76 (d; 1H)	119,7 (CH)
$\beta$	7,31 – 7,36 (dd; 1H)	143,8 (CH)
$\gamma$	6,95 – 6,97 (d; 1H)	125,6 (CH)
$\delta$	6,98 – 6,99 (m; 2H)	139,5 (CH)
1	-----	131,9 (C)
2	7,21 (s; 1H)	106,0 (CH)
3 e 4	-----	148,5 (C)
5	6,98 – 6,99 (m; 2H)	109,1 (CH)
6	7,02 – 7,04 (d; 1H)	123,3 (CH)
OCH <sub>2</sub> O	6,0 (s; 2H)	101, 8(CH <sub>2</sub> )

\*sinal mascarado pelo solvente.

### 3.3.5.2 Reação de Alquilação da 1-etilpiperazinila. [iodeto de 4-((2E,4E)-5-(benzo[d][1,3]dioxol-5-il)penta-2,4-dienoil)-1-etil-1-metilpiperazin-1-ium] (**21b**)

Conforme a metodologia geral apresentada, 80,1 mg (0,25mmol) de 1-etilpiperazinila (**16b**) foram solubilizados em 3 mL de acetonitrila e reagido com 48  $\mu\text{L}$  (0,76mmol) de iodeto de metila. Após precipitação com éter etílico foram obtidos 92,4 mg (80%) do sal **21b** na forma de sólido marrom. (Pf: >250 °C).



Estrutura do sal de 1-etilpiperazinila (**21b**)



**Dados de Infravermelho (pastilha em KBr, cm<sup>-1</sup>):**

$\nu$ C-H (Csp<sup>3</sup>) = 2983-2858 (estiramento de metilenos da piperazina)

$\nu$ C=O = 1639 (estiramento da carbonila da amida conjugada)

$\nu$ C=C (Csp<sup>2</sup>) = 1587-1442 (vibração do esqueleto aromático)

$\nu$ C –O– C= 1244 (estiramento do anel metilenodioxila)

$\delta$ C-H (Csp<sup>2</sup>) = 918 (deformação angular de C-H para H isolado no sistema aromático)

$\delta$ C-H (Csp<sup>2</sup>) = 813 (deformação angular de C-H para 2H no sistema aromático)

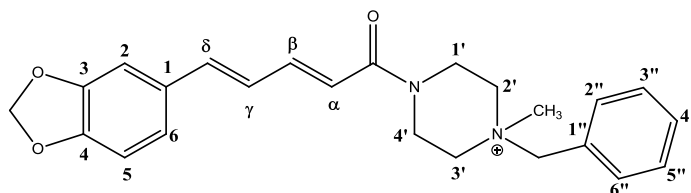
**Tabela 11:** Deslocamento químico de <sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C para a 1-etilpiperazinila (**21b**)

Posição	$\delta$ <sup>1</sup> H (ppm)	$\delta$ <sup>13</sup> C (ppm)
1' e 4'	3,42 – 3,54 (m, 6H)	(CH <sub>2</sub> )*
2' e 3'	3,42 – 3,54 (m, 6H)	(CH <sub>2</sub> )*
CH <sub>2</sub>	3,12 (sl, 3H)	59,2 (CH <sub>2</sub> )
C=O	-----	165,3 (C)
7 CH <sub>3</sub>	2,53(s; 3H)	45,77 (CH <sub>3</sub> )
8 CH <sub>3</sub>	1,27 – 1,32 (t; 3H)	7,60 (CH <sub>3</sub> )
$\alpha$	6,73 – 6,76 (d; 1H)	119,7 (CH)
$\beta$	7,33 (dd; 1H)	143,8 (CH)
$\gamma$	6,96 – 6,97 (d; 1H)	125,6 (CH)
$\delta$	6,99 – 7,00 (m, 2H)	139,5 (CH)
1	-----	131,1 (C)
2	7,22 (s; 1H)	106,7 (CH)
3 e 4	-----	148,5 (C)
5	6,99 – 7,00 (m, 2H)	109,1 (CH)
6	7,03 – 7,04 (d, 1H)	123,3 (CH)
OCH <sub>2</sub> O	6,0 (s; 2H)	101,8 (CH <sub>2</sub> )

\*Sinais mascarados pelo solvente.

### 3.3.5.3. Reação de Alquilação da 1-benzilpiperazinila. [iodeto de 4-((2E,4E)-5-(benzo[d][1,3]dioxol-5-il)penta-2,4-dienoil)-1-benzil-1-metilpiperazin-1-ium] (21c)

Conforme a metodologia geral apresentada, 50,0 mg (0,133mmol) de 1-benzilpiperazinila (**16c**) foram solubilizados em 3 mL de acetonitrila e reagido com 25  $\mu$ L (0,40mmol) de iodeto de metila. Após precipitação com acetato de etila foram obtidos 20,8 mg (30%) do sal **21c** na forma de sólido marrom. (Pf: 238 °C).



Estrutura do sal de 1-benzilpiperazinila (**21c**)

#### Dados de Infravermelho (pastilha em KBr, $\text{cm}^{-1}$ ):

$\nu_{\text{C-H}}$  ( $\text{Csp}^3$ ) = 2991-2889 (estiramento de metilenos do anel piperidínico)

$\nu_{\text{C=O}}$  = 1629 (estiramento da carbonila da amida conjugada)

$\nu_{\text{C=C}}$  ( $\text{Csp}^2$ ) = 1573-1444 (vibração do esqueleto aromático)

$\nu_{\text{C-O-C}}$  = 1255 (estiramento do anel metileno dióxi)

$\delta_{\text{C-H}}$  ( $\text{Csp}^2$ ) = 929 (deformação angular de C-H para H isolado no sistema aromático)

$\delta_{\text{C-H}}$  ( $\text{Csp}^2$ ) = 812,0 (deformação angular de C-H para 2H no sistema aromático)

$\delta_{\text{C-H}}$  ( $\text{Csp}^2$ ) = 703,9 (deformação angular de C-H para 5H no sistema aromático)

**Tabela 12:** Deslocamento químico de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  para o sal de 1-benzilpiperazinila (**21c**)

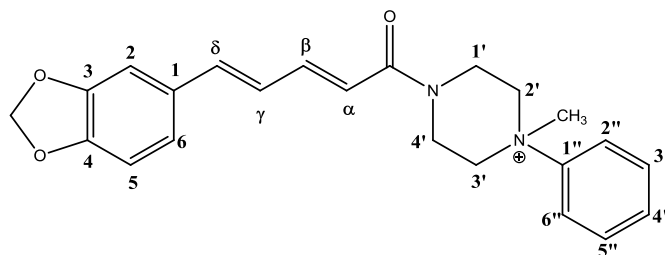
Posição	$\delta$ $^1\text{H}$ (ppm)	$\delta$ $^{13}\text{C}$ (ppm)
1' e 4'	3,52 – 3,60 (m, 3H)	(CH <sub>2</sub> )*
2' e 3'	3,85 – 4,29 (m, 3H)	(CH <sub>2</sub> )*
C=O	-----	165,2 (C)
CH <sub>3</sub>	3,06 (s; 3H)	45,2 (CH <sub>3</sub> )
CH <sub>2</sub>	4,68 (s; 2H)	67,5 (CH <sub>2</sub> )
$\alpha$	6,71 – 6,73 (d; 1H)	119,5 (CH)
$\beta$	7,31 – 7,36 (dd; 1H)	143,8 (CH)
$\gamma$	6,94 – 6,96 (d; 1H)	125,5 (CH)
$\delta$	6,97 – 6,98 (m; 2H)	139,5 (CH)
1	-----	127,7 (C)
2	7,21 (s; 1H)	106,0 (CH)
3 e 4	-----	148,4 (C)
5	6,97 – 6,98 (m; 2H)	109,0 (CH)
6	7,01 – 7,02 (d; 1H)	123,3 (CH)
OCH <sub>2</sub> O	6,07 (s; 2H)	101,8 (CH <sub>2</sub> )
1''	-----	131,0 (C)
2'' e 6''	7,53 – 7,56 (m; 5H)	133,6 (CH <sub>2</sub> )
3'' e 5''	7,53 – 7,56 (m; 5H)	130,9 (CH <sub>2</sub> )
4''	7,53 – 7,56 (m; 5H)	129,4 (CH <sub>2</sub> )

\*Sinais mascarados pelo solvente.

#### 3.3.5.4. Reação de N-alkilação da 1-fenilpiperazinila. [iodeto de 4-((2E,4E)-5-(benzo[d][1,3]dioxol-5-il)penta-2,4-dienoil)-1-metil-1-fenilpiperazin-1-ium] (**21d**).

Em um balão de 25 mL foram solubilizados 80 mg (0,22 mmol) da 1-fenilpiperazila (**16d**) em 3 mL de acetonitrila e adicionou-se iodeto de metila em excesso (3 eq.). A reação foi feita em refluxo sob agitação e temperatura de 60°C. Após 48 horas de reação determinou-se o fim da reação por CCF. Para isolamento do sal de amônio quaternário, o solvente foi evaporado em evaporador rotatório e depois adicionou-se éter etílico seco à solução, que ficou na geladeira por 24 horas para que

ocorresse a precipitação, após filtrou-se em buchner. Foram obtidos 53,8 mg (48%) do sal **21d** na forma de um sólido marrom. (Pf: 130 °C).



Estrutura do sal de 1-fenilpiperazina (**21d**)

**Dados de Infravermelho (pastilha em KBr,  $\text{cm}^{-1}$ ):**

$\nu_{\text{C-H}}$  ( $\text{Csp}^3$ ) = 2922-2868 (estiramento de metilenos da piperazina)

$\nu_{\text{C=O}}$  = 1639 (estiramento da carbonila da amida conjugada)

$\nu_{\text{C=C}}$  ( $\text{Csp}^2$ ) = 1589-1440 (vibração do esqueleto aromático)

$\nu_{\text{C-O-C}}$  = 1251 (estiramento do anel metilenodioxila)

$\delta_{\text{C-H}}$  ( $\text{Csp}^2$ ) = 925 (deformação angular de C-H para H isolado no sistema aromático)

$\delta_{\text{C-H}}$  ( $\text{Csp}^2$ ) = 817 (deformação angular de C-H para 2H no sistema aromático)

$\delta_{\text{C-H}}$  ( $\text{Csp}^2$ ) = 763 (deformação angular de C-H para 5H no sistema aromático)

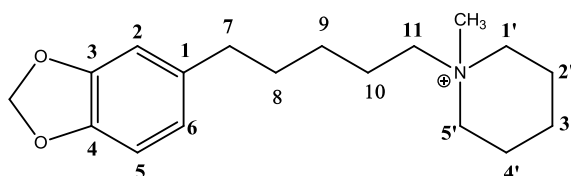
**Tabela 13:** Deslocamento químico de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  para a sal de 1-fenilpiperazinila (**21d**)

Posição	$\delta^1\text{H}$ (ppm)	$\delta^{13}\text{C}$ (ppm)
1'e 4'	3,73 – 4,05 (m, 4H)	(CH <sub>2</sub> )*
2'e 3'	4,19 – 4,41 (m, 4H)	(CH <sub>2</sub> )*
CH <sub>3</sub>	3,56 (s, 3H)	56,1 (CH <sub>3</sub> )
C=O	-----	165,3 (C)
$\alpha$	6,71 – 6,74 (d; 1H)	116,3 (CH)
$\beta$	7,30 – 7,34 (dd; 1H)	143,8 (CH)
$\gamma$	6,94 – 6,96 (m; 1H)	123,3 (CH)
$\delta$	7,02 – 7,03 (d, 1H)	139,5 (CH)
1	-----	131,1 (C)
2	7,25 (s; 1H)	106,7 (CH)
3 e 4	-----	148,5 (C)
5	6,98 – 6,99 (d; 1H)	109,0 (CH)
6	7,20 – 7,22 (d; 1H)	119,6 (CH)
OCH <sub>2</sub> O	6,0 (s; 2H)	101,8 (CH <sub>2</sub> )
1''	-----	131,1 (C)
2''e 6''	7,99 – 8,01 (d; 2H)	121,6 (CH)
3'e 5''	7,70 – 7,73 (t; 2H)	131,1 (CH)
4''	7,63 – 7,66 (t; 2H)	125,6 (CH)

\*sinais mascarados pelo solvente.

### 3.3.5.5. Reação de N-alkilação da 1-(5-(benzo[d][1,3]dioxol-5-il)pentil)piperidina. [iodeto de 1-(5-(benzo[d][1,3]dioxol-5-il)pentil)-1-metilpiperidinium] (**22**).

Conforme a metodologia geral apresentada, 80,0 mg (0,291 mmol) de 1-(5-(benzo[d][1,3]dioxol-5-il)pentil) piperidina (**20**) foram solubilizados em 3mL de acetonitrila e posteriormente reagido com 55  $\mu\text{L}$  (0,873 mmol) de iodeto de metila para produzir o respectivo sal na forma de um óleo de coloração amarelada, fornecendo 106,4 mg (88%) de produto. (Pf: 162 °C).



Estrutura do sal de 1-(5-(benzo[*d*][1,3]dioxol-5-il)pentil)-1-metilpiperidinium  
(22)

**Dados de Infravermelho (pastilha em KBr,  $\text{cm}^{-1}$ ):**

$\nu_{\text{C-H}}$  ( $\text{Csp}^3$ ) = 2939-2856 (estiramento de metilenos do anel piperidínico)

$\nu_{\text{C-O-C}}$  = 1240 (estiramento do anel metilenodioxila)

$\delta_{\text{C-H}}$  ( $\text{Csp}^2$ ) = 920 (deformação angular de C-H para H isolado no sistema aromático)

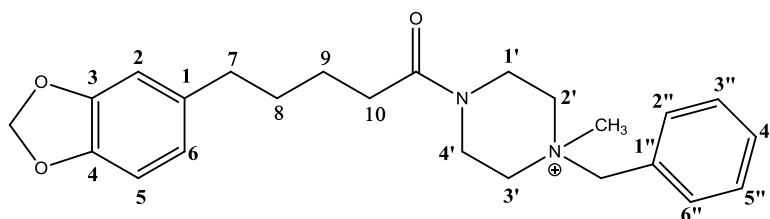
$\delta_{\text{C-H}}$  ( $\text{Csp}^2$ ) = 802 (deformação angular de C-H para 2H no sistema aromático)

**Tabela 14:** Deslocamento químico de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  para a 1-(5-(benzo[*d*][1,3]dioxol-5-il)pentil)-1-metilpiperidinium (22)

Posição	$\delta^1\text{H}$ (ppm)	$\delta^{13}\text{C}$ (ppm)
1	-----	136,2 (C)
2	6,82 – 6,83 (d; 1H)	109,2 (CH)
3 e 4	-----	147,6; 145,6 (CH)
5	6,84 (d, 1H)	108,5 (CH)
6	6,67 – 6,69 (d; 1H)	121,5 (CH)
7	2,27 – 2,30 (m; 2H)	35,0 ( $\text{CH}_2$ )
8	1,52 – 1,54 (m; 2H)	31,0 ( $\text{CH}_2$ )
9	1,28 – 1,31 (m; 2H)	25,7 ( $\text{CH}_2$ )
10	1,46 (m; 2H)	21,2 ( $\text{CH}_2$ )
11; 1' e 5'	3,29 – 3,32 (m; 6H)	60,4 ( $\text{CH}_2$ )
2' e 4'	3,29 – 3,32 (m; 6H)	19,7 ( $\text{CH}_2$ )
3'	1,58 – 1,63 (m; 6H)	21,2 ( $\text{CH}_2$ )
$\text{OCH}_2\text{O}$	5,98 (s; 2H)	101,1 ( $\text{CH}_2$ )
$\text{CH}_3$	3,01 (s; 3H)	47,5 ( $\text{CH}_3$ )

### 3.3.5.6. Reação de N-alkilação da 1-benzilpiperazinil hidrogenada. [iodeto de 4-(5-(benzo[d][1,3]dioxol-5-il)pentanoil)-1-benzil-1-metilpiperazin-1-ium] (23)

Conforme a metodologia geral apresentada, 50,0 mg (0,131 mmol) de 5-(benzo[d][1,3]dioxol-5-il)-1-(4-benzilpiperidin-1-il) pentan-1-ona (**17**) foram solubilizados em 3 mL de acetonitrila e posteriormente reagido com 25  $\mu$ L (0,394 mmol) de iodeto de metila. Após precipitação com acetato de etila foram obtidos 25,0 mg (36%) do sal **23** na forma de um sólido marrom claro.



Estrutura do sal da 1-benzilpiperazinila hidrogenada (**23**)

#### Dados de Infravermelho (pastilha em KBr, $\text{cm}^{-1}$ ):

$\nu_{\text{C-H}}$  ( $\text{Csp}^3$ ) = 2923-2856 (estiramento de metilenos da piperazina)

$\nu_{\text{C=O}}$  = 1639 (estiramento da carbonila da amida)

$\nu_{\text{C=C}}$  ( $\text{Csp}^2$ ) = 1490-1384 (vibração do esqueleto aromático)

$\nu_{\text{C-O-C}}$  = 1242 (estiramento do anel metileno dióxi)

$\delta_{\text{C-H}}$  ( $\text{Csp}^2$ ) = 925 (deformação angular de C-H para H isolado no sistema aromático)

$\delta_{\text{C-H}}$  ( $\text{Csp}^2$ ) = 808 (deformação angular de C-H para 2H no sistema aromático)

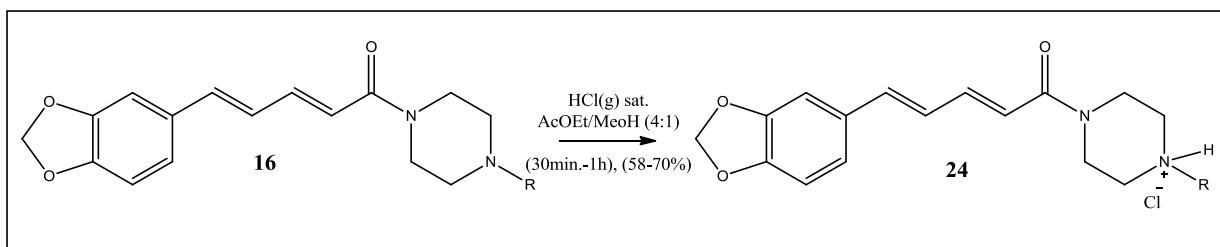
$\delta_{\text{C-H}}$  ( $\text{Csp}^2$ ) = 705 (deformação angular de C-H para 5H no sistema aromático)

**Tabela 15:** Deslocamento químico de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  para o 4-(5-(benzo[d][1,3]dioxol-5-il)pentanoil)-1-benzil-1-metilpiperazin-1-ium (23)

Posição	$\delta^1\text{H}$ (ppm)	$\delta^{13}\text{C}$ (ppm)
1'e 4'	(m, 4H)	(CH <sub>2</sub> )*
2'e 3'	3,72 – 4,18 (m, 3H)	58,87; 59,05(CH <sub>2</sub> )
C=O	-----	171,5 (C)
CH <sub>3</sub>	3,03 (s; 3H)	45,2 (CH <sub>3</sub> )
CH <sub>2</sub>	4,66 (s; 2H)	67,4 (CH <sub>2</sub> )
1	-----	136,3 (CH)
2	6,79 (s; 1H)	109,1 (CH)
3 e 4	-----	147,6; 145,6 (CH)
5	6,81 – 6,82 (d; 1H)	108,4 (CH)
6	6,64 – 6,66 (d; 1H)	121,4 (C)
7		32,1 (CH <sub>2</sub> )
8 e 9	1,51 – 1,56 (m; 4H)	34,9; 24,3 (CH <sub>2</sub> )
10	2,38 – 2,40 (m; 23H)	31,1 (CH <sub>2</sub> )
OCH <sub>2</sub> O	5,97 (s; 2H)	101,0 (CH <sub>2</sub> )
1''	-----	127,7 (C)
2''e 6''	7,55 (m; 5H)	133,6 (CH)
3''e 5''	7,55 (m; 5H)	129,4 (CH)
4''	7,55 (m; 5H)	130,8 (CH)

\*sinais mascarados pelo solvente.

### 3.3.6 Reação geral de formação dos cloridratos das amidas (24a-c)



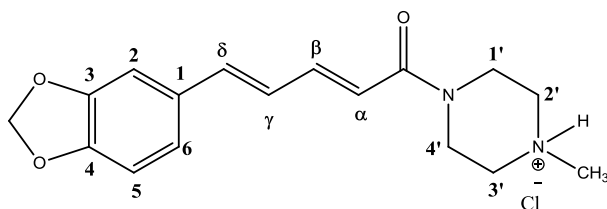
Em um tubo de ensaio a amida correspondente foi solubilizada em 3mL de acetato de etila/ metanol (4:1). A esta solução foi gotejada uma solução de acetato de



etila saturada de HCl, feita por borbulhamento de HCl<sub>(g)</sub> a frio. Após a adição, a solução resultante ficou sob agitação em banho de gelo. O precipitado formado foi filtrado em becher e lavado com acetato de etila gelado.

### 3.3.6.1. Reação de formação do cloridrato da 1-metilpiperazida. [cloridrato de 4-((2E,4E)-5-(benzo[d][1,3]dioxol-5-il)penta-2,4-dienoil)-1-metilpiperazina] (24a)

Conforme a metodologia geral apresentada, 50,0 mg (0,167 mmol) de 1-metilpiperazinila (**16a**) foi saturada com a solução de acetato/ HCl(g) saturado. A reação ficou em agitação em banho de gelo para produzir o respectivo cloridrato na forma de um sólido de coloração amarelada, fornecendo 39 mg (70%) de produto. (Pf: >250 °C).



Estrutura do cloridrato da 1-metilpiperazinila (**24a**)

**Tabela 16:** Deslocamento químico de <sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C para o cloridrato da 1-metilpiperazinila (**24a**)

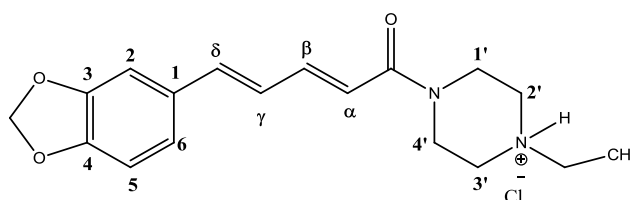
Posição	$\delta^1\text{H}$ (ppm)	$\delta^{13}\text{C}$ (ppm)
1'e 4'	3,43 – 4,50 (m, 4H)	(CH <sub>2</sub> )*
2'e 3'		(CH <sub>2</sub> )*
CH <sub>3</sub>	2,77 (s, 3H)	42,4 (CH <sub>3</sub> )
C=O	-----	165,1 (C)
$\alpha$	6,68 – 6,71 (d; 1H)	119,8 (CH)
$\beta$	7,28 – 7,33 (dd; 1H)	143,6 (CH)
$\gamma$	6,94 – 6,97 (m; 3H)	125,6 (CH)
$\delta$	6,94 – 6,97 (m; 3H)	139,3 (CH)
1	-----	131,0 (C)
2	7,20 (s; 1H)	106,0 (CH)
3 e 4	-----	148,4 (C)
5	6,94 – 6,97 (m; 3H)	109,0 (CH)

6	7,00 – 7,01 (d; 1H)	123,2 (CH)
OCH <sub>2</sub> O	6,0 (s; 2H)	101,8 (CH <sub>2</sub> )
H	10,95 (s; 1H)	-----

\*sinais mascarados pelo solvente.

### 3.3.6.2. Reação de formação do cloridrato da 1-etilpiperazinila. [[cloridrato de 4-((2E,4E)-5-(benzo[d][1,3]dioxol-5-il)penta-2,4-dienoil)-1-etilpiperazina] (24b)

Conforme a metodologia geral apresentada, 50,0 mg (0,159mmol) de 1-etilpiperazinila (**16b**) foi saturada com a solução de acetato/ HCl(g) saturado. A reação ficou em agitação em banho de gelo para produzir o respectivo cloridrato na forma de um sólido de coloração amarelada, fornecendo 33 mg (58 %) de produto. (Pf: >250 °C).



Estrutura do cloridrato da 1-etilpiperazinila (**24b**)

**Tabela 17:** Deslocamento químico de <sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C para o cloridrato da 1- etilpiperazinila (**24b**)

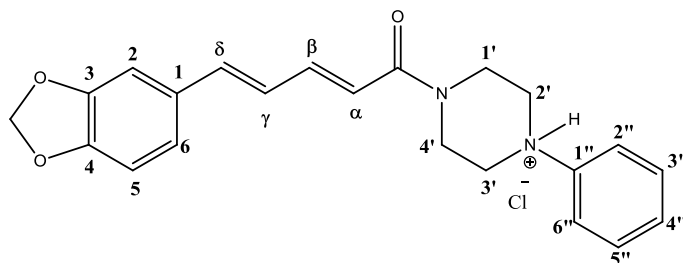
Posição	$\delta^1\text{H}$ (ppm)	$\delta^{13}\text{C}$ (ppm)
1'e 4'	2,94 – 3,12 (m, 4H)	(CH <sub>2</sub> )*
2'e 3'	3,49 – 4,53 (m, 4H)	(CH <sub>2</sub> )*
CH <sub>2</sub>	2,51 (s, 4H)	51,1 (CH <sub>2</sub> )
C=O	-----	165,1 (C)
H	10,96 (s;1H)	-----
CH <sub>3</sub>	1,25 – 1,28 (t;3H)	9,26 (CH <sub>3</sub> )
$\alpha$	6,69 – 6,72 (d; 1H)	119,8 (CH)
$\beta$	7,28 – 7,33 (dd; 1H)	143,6 (CH)
$\gamma$	6,93 – 6,97 (m; 3H)	125,6 (CH)
$\delta$	6,93 – 6,97 (m; 3H)	139,3 (CH)

1	-----	131,0 (C)
2	7,20 (s; 1H)	106,0 (CH)
3 e 4	-----	148,4 (C)
5	6,93 – 6,97 (m; 3H)	109,0 (CH)
6	7,00 – 7,02 (d; 1H)	123,2 (CH)
OCH <sub>2</sub> O	6,0 (s; 2H)	101,8 (CH <sub>2</sub> )

\*sinais mascarados pelo solvente.

### 3.3.6.3. Reação de formação do cloridrato da 1- fenilpiperazinil. [[cloridrato de 4-((2E,4E)-5-(benzo[d][1,3]dioxol-5-il)penta-2,4-dienoil)-1-fenilpiperazina] (24c)

Conforme a metodologia geral apresentada, 50,0 mg (0,138mmol) de 1-fenil piperazinila (**16d**) foi saturada com a solução de acetato/ HCl(g) saturado. A reação ficou em agitação em banho de gelo para produzir o respectivo cloridrato na forma de um sólido de coloração amarelada, fornecendo 36mg (60%) de produto. (Pf: 215 °C).



Estrutura do cloridrato da 1-fenilpiperazinila (**24c**)

**Tabela 18:** Deslocamento químico de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  para o cloridrato da 1-fenilpiperazina (24c)

Posição	$\delta^1\text{H}$ (ppm)	$\delta^{13}\text{C}$ (ppm)
1'e 4'	3,91 (m, 4H)	(CH <sub>2</sub> ) *
2'e 3'	3,37 (m, 4H)	(CH <sub>2</sub> )*
C=O	-----	165,0(C)
H		-----
$\alpha$	6,73 – 6,76 (d; 1H)	120,3(CH)
$\beta$	7,28 – 7,33 (dd; 1H)	143,1(CH)
$\gamma$	6,93 – 6,97 (m; 2H)	125,8(CH)
$\delta$	7,00 – 7,02 (m; 1H)	138,9(CH)
1	-----	131,1(C)
2	7,20 (s; 1H)	105,9(CH)
3 e 4	-----	148,4(C)
5	6,93 – 6,97 (m; 3H)	109,4(CH)
6	7,11 (d; 1H)	123,1(CH)
OCH <sub>2</sub> O	6,0 (s; 2H)	101,8 (CH <sub>2</sub> )
1''	-----	148,3(C)
2'' e 6''	7,39 (m; 4H)	(CH)
3'', 4'' e 5''	7,39 (m; 4H)	129,9(CH)

\*sinais mascarados pelo solvente.

### 3.3.7. Ensaios Químicos - Biológicos

#### 3.3.7.1. Avaliação da atividade anticolinesterásica

Para a avaliação da atividade anticolinesterásica, as seguintes soluções foram preparadas: (1) tampão tris/HCl 50 mM pH 8,0; (2) tampão tris/HCl 50 mM pH 8,0 contendo 0,1 % de albumina sérica bovina (BSA); (3) 5,5'-ditiobis-[2-nitrobenzoíco] (DTNB ou reagente de Ellman) 0,5 mM; (4) iodeto de acetiltiocolina (ACTI) 2,5 mM; (5) enzima acetilcolinesterase 0,22 U/mL; (6) iodeto de butiriltiocolina (BuCTI) 2,5 mM e (7) enzima butirilcolinesterase 0,22 U/mL.

Em uma placa de 96 cavidades, foram adicionados 25  $\mu\text{L}$  de iodeto de acetiltiocolina ou iodeto de butiriltiocolina dissolvidos no tampão (2); 125  $\mu\text{L}$  de DTNB dissolvidos no tampão (2); 50  $\mu\text{L}$  de tampão (2); 25  $\mu\text{L}$  dos compostos testados dissolvidos no solvente (cavidades em teste) ou (cavidades de controle). Em seguida foi medida a absorvância das cavidades ( $\lambda$  415nm), sendo esta leitura o branco da avaliação. Logo após, adicionou-se a cada cavidade 25  $\mu\text{L}$  da enzima AChE ou BChE (0,22 U/mL) dissolvida em de tampão (1). Em seguida, a absorvância foi medida ( $\lambda$  415 nm) a cada 13 segundos por 3 vezes. Dos valores de absorvância obtidos nestas leituras, subtraiu-se o valor do branco de cada cavidade. Como os ensaios foram feitos em triplicata, calculou-se a média de absorvância para cada uma destas. Desse modo, para cada concentração existem três valores de média nas três leituras observadas. A **tabela 19** mostra os cálculos feitos para o sal de metila da 1-metilpiperazinila (**21a**) como exemplo da metodologia aplicada.

Os ensaios para a avaliação da atividade anticolinesterásica foram realizados em triplicatas (para o cálculo do desvio-padrão) e em diferentes concentrações. Assim, foram confeccionados os gráficos (concentração x porcentagem de inibição) e calculados os valores de  $\text{CI}_{50}$  ( $\mu\text{M}$ ), com os respectivos desvios-padrões.

As soluções dos compostos testados foram preparadas em etanol absoluto ou água variando conforme sua solubilidade.

**Tabela 19:** Valores de absorvâncias e concentrações do sal de metila da 1-metilpiperazinila (**21a**) utilizados para o cálculo do percentual de inibição da AChE.

<b>Absorvâncias (1° leitura)</b>				
Conc. Sal ( $\mu\text{M}$ )	Média $\pm\sigma$ *1° Triplicata	Média $\pm\sigma$ *2° Triplicata	Média $\pm\sigma$ *3° Triplicata	Média $\pm\sigma$ * Controle
10	0,369 $\pm$ 0,019	0,381 $\pm$ 0,007	0,391 $\pm$ 0,002	0,481 $\pm$ 0,016
20	0,327 $\pm$ 0,008	0,369 $\pm$ 0,000	0,327 $\pm$ 0,007	0,469 $\pm$ 0,027
40	0,237 $\pm$ 0,019	0,235 $\pm$ 0,016	0,234 $\pm$ 0,018	0,478 $\pm$ 0,036
50	0,207 $\pm$ 0,022	0,210 $\pm$ 0,023	0,203 $\pm$ 0,004	0,466 $\pm$ 0,042
60	0,18 $\pm$ 0,035	0,191 $\pm$ 0,014	0,175 $\pm$ 0,010	0,473 $\pm$ 0,032

<b>Absorvâncias (2° leitura)</b>				
Conc. Sal ( $\mu\text{M}$ )	Média $\pm\sigma$ *1° Triplicata	Média $\pm\sigma$ *2° Triplicata	Média $\pm\sigma$ *3° Triplicata	Média $\pm\sigma$ * Controle
10	0,413 $\pm$ 0,028	0,406 $\pm$ 0,006	0,429 $\pm$ 0,009	0,538 $\pm$ 0,020
20	0,354 $\pm$ 0,006	0,392 $\pm$ 0,001	0,35 $\pm$ 0,082	0,5 $\pm$ 0,027
40	0,253 $\pm$ 0,020	0,251 $\pm$ 0,017	0,252 $\pm$ 0,018	0,505 $\pm$ 0,042
50	0,221 $\pm$ 0,023	0,225 $\pm$ 0,024	0,219 $\pm$ 0,004	0,508 $\pm$ 0,048
60	0,193 $\pm$ 0,035	0,205 $\pm$ 0,014	0,188 $\pm$ 0,008	0,506 $\pm$ 0,037

<b>Absorvâncias (3° leitura)</b>				
Conc. Sal ( $\mu\text{M}$ )	Média $\pm\sigma$ *1° Triplicata	Média $\pm\sigma$ *2° Triplicata	Média $\pm\sigma$ *3° Triplicata	Média $\pm\sigma$ * Controle
10	0,432 $\pm$ 0,023	0,435 $\pm$ 0,000	0,461 $\pm$ 0,000	0,575 $\pm$ 0,016
20	0,407 $\pm$ 0,015	0,443 $\pm$ 0,003	0,395 $\pm$ 0,087	0,568 $\pm$ 0,022
40	0,269 $\pm$ 0,021	0,267 $\pm$ 0,018	0,268 $\pm$ 0,019	0,536 $\pm$ 0,046
50	0,236 $\pm$ 0,024	0,241 $\pm$ 0,024	0,234 $\pm$ 0,003	0,546 $\pm$ 0,055
60	0,203 $\pm$ 0,034	0,218 $\pm$ 0,016	0,199 $\pm$ 0,007	0,535 $\pm$ 0,040

\* $\sigma$  = Desvio-padrão.

Desse modo, a absorvância observada refletiu diretamente a atividade enzimática (a enzima, no volume em que é adicionada não possui valor de absorvância relevante). Com isto foi possível comparar os valores de cada triplicata com o valor da triplicada do controle e calcular o percentual de inibição da seguinte maneira:

$$\text{Percentual de inibição} = 100 - (\text{Mt}/\text{Tc}) \times 100$$

Onde: Tc = Triplicada do controle; Mt = média da triplicata da concentração a ser calculada;

Por exemplo, a primeira triplicata na concentração 40  $\mu\text{M}$  na primeira leitura:

$$\text{Percentual de inibição} = 100 - (0,237/0,478) \times 100 = 50,4$$

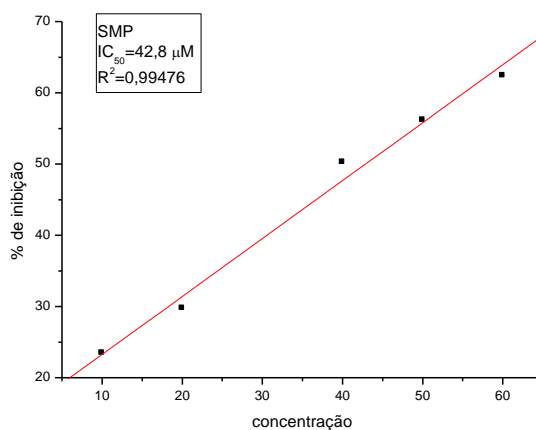
O mesmo foi feito para todas as triplicatas das demais concentrações. Com os valores obtidos calculou-se a média das triplicatas nas três leituras e o desvio-padrão correspondente. A tabela abaixo mostra o percentual de inibição de acetilcolinesterase do sal nas diferentes concentrações testadas.

**Tabela 20:** Percentual de inibição de AChE pelo sal de metila da 1- metilpiperazinila (21a)

Concentração( $\mu\text{M}$ )	% de Inibição $\pm\text{dp}^*$
10	23,47 $\pm$ 1,30
20	29,74 $\pm$ 0,51
40	50,27 $\pm$ 0,41
50	56,17 $\pm$ 0,51
60	62,41 $\pm$ 0,05

\* $\sigma$  = desvio padrão

A partir da porcentagem de inibição calculada para no mínimo três concentrações diferentes, foi possível gerar os gráficos (concentração x porcentagem de inibição), e utilizando o modelo matemático de regressão linear foram calculados os valores de  $\text{CI}_{50}$  (concentração efetiva que inibe 50% da atividade enzimática) conforme ilustrado na **Figura 11**.



**Figura 11:** Gráfico de atividade anticolinesterasica do sal de metila da 1- metilpiperazinila (21a)

### 3.3.7.2. Cinética Enzimática

A cinética de interação dos compostos com a AChE e BChE foi determinada através de gráficos de Lineweaver e Burk (LINEWEAVER & BURK, 1934). Nas 96 cavidades da placa foram adicionados: 25  $\mu\text{L}$  de substrato (iodeto de acetiltiocolina 0,4 mM – 2,5 mM) ou (iodeto de butiriltiocolina 0,3 mM – 2,5 mM) dissolvido em tampão (2), 125  $\mu\text{L}$  de DTNB (0,5 mM) dissolvido em tampão (2), 50  $\mu\text{L}$  de tampão (2), 25  $\mu\text{L}$  do composto dissolvido no solvente, 25  $\mu\text{L}$  de AChE ou BChE (0,22 U/mL) dissolvida em tampão (1). A absorvância foi medida ( $\lambda = 415\text{nm}$ ) a cada 13 segundos por 3 vezes. As concentrações de substrato variaram na ausência e na presença dos compostos.

Um exemplo da metodologia de cálculo utilizado para avaliação da cinética enzimática pode ser observado na **Tabela 21**, que mostra os valores de  $1/V_0$  e  $1/[S]$  obtidos para o composto **21c**. Com estes valores confeccionou-se então o gráfico de Lineweaver-Burk.

**Tabela 21:** Valores de  $1/V^\circ$  e  $1/[S]$  para o composto (**21c**) como demonstrativo de cálculo da cinética enzimática de AChE.

$1/[S]$	$1/V^\circ \pm \sigma^*$ (Controle)	$1/V^\circ (7\mu\text{M}) \pm \sigma^*$	$1/V^\circ (12\mu\text{M}) \pm \sigma^*$
25,00	5,590 $\pm$ 0,003	14,827 $\pm$ 0,004	28,301 $\pm$ 0,004
20,00	4,794 $\pm$ 0,018	10,613 $\pm$ 0,050	23,376 $\pm$ 0,001
11,76	3,066 $\pm$ 0,006	8,108 $\pm$ 0,004	15,490 $\pm$ 0,003
10,00	2,613 $\pm$ 0,034	7,171 $\pm$ 0,007	13,412 $\pm$ 0,000
6,66	2,251 $\pm$ 0,011	5,309 $\pm$ 0,010	10,440 $\pm$ 0,004
5,649	2,036 $\pm$ 0,008	4,934 $\pm$ 0,001	9,473 $\pm$ 0,004
5,00	1,920 $\pm$ 0,014	4,668 $\pm$ 0,016	8,579 $\pm$ 0,008
4,545	1,901 $\pm$ 0,015	4,225 $\pm$ 0,006	8,547 $\pm$ 0,000
4,166	1,809 $\pm$ 0,016	4,269 $\pm$ 0,002	8,426 $\pm$ 0,002
4,00	1,888 $\pm$ 0,030	4,255 $\pm$ 0,002	8,226 $\pm$ 0,007

$\sigma^*$ =desvio padrão

Com a análise dos gráficos obtidos neste experimento, foi possível deduzir os valores de  $K_M$  e  $V_{\text{máx}}$  (LINEWEAVER & BURK, 1934).



## 4. Resultados e Discussões

### 4.1. Isolamento da piperina (1)

A etapa inicial do trabalho consistiu no isolamento do produto natural a partir da pimenta-do-reino (IKAN, 1991), visando à obtenção de quantidades adequadas de piperina para posterior realização da síntese de seus derivados. A metodologia utilizada para a extração desta amida foi otimizada em vários trabalhos anteriores, realizados em nosso grupo de pesquisa (RIBEIRO, 2004; FERREIRA, 2006; LOPES, 2011) onde foi utilizada uma aparelhagem de Soxhlet, tendo etanol como solvente (**Figura 12**). Após extração e tratamentos adequados, a piperina foi obtida na forma de cristais amarelos, com rendimentos médios de 2% com relação à massa bruta total da pimenta-do-reino. O material foi obtido com grau de pureza adequado e sua estrutura foi confirmada através dos métodos de RMN e IV.



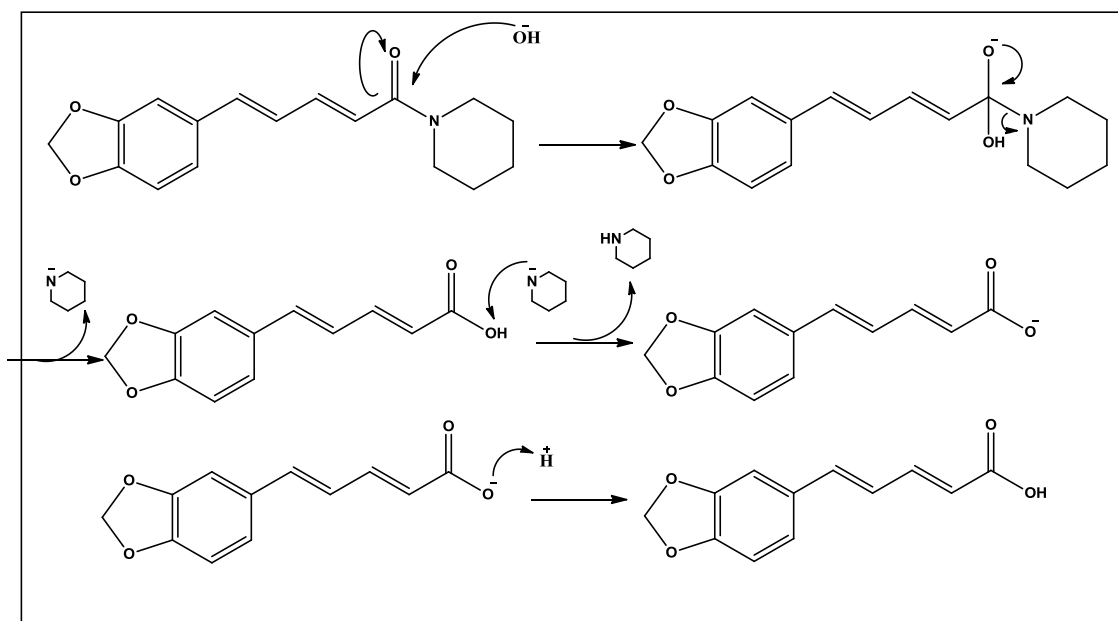
**Figura 12:** Aparelhagem de soxhet

No espectro de infravermelho (**Espectro 1**) pôde ser observada uma forte absorção em  $1633\text{ cm}^{-1}$ , indicando a presença da função carbonila amídica conjugada, além das absorções na região entre  $2940\text{-}2858\text{ cm}^{-1}$ , referentes às deformações axiais das ligações C-H e em  $1251\text{ cm}^{-1}$ , referente ao estiramento do metileno do grupo metilenodioxila. No espectro de RMN  $^1\text{H}$  (**Espectro 2**) observamos um simpleto em  $\delta$

5,99 ppm, característico dos hidrogênios do grupo metilenodioxila, um duplete em  $\delta$  6,44ppm, referente ao hidrogênio olefínico  $\alpha$  a carbonila amídica, um duplo duplete em  $\delta$  7,42 ppm, referente ao hidrogênio  $\beta$  a mesma carbonila. No espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  (**Espectro 3**) observamos deslocamentos em 165,45 ppm típico de carbonila amídica, deslocamento em 101,2 ppm referente ao carbono do grupo metilenodioxila, deslocamentos em 120,08 e 142,49 ppm referentes aos carbonos  $\alpha$  e  $\beta$ -carbonílicos respectivamente.

#### 4.2. Preparação do ácido piperínico (2)

A preparação do ácido piperínico (2) foi realizada através da hidrólise básica da função amida da piperina (1) em micro-ondas (FRANKLIM *et al*, 2013), que foi realizada em presença de hidróxido de potássio alcoólico que vai atuar como nucleófilo da reação de substituição nucleofílica acílica, gerando o ácido em etapas subseqüentes de adição e eliminação, para geração do respectivo carboxilato. A posterior adição de ácido clorídrico se deu para protonação do carboxilato, gerando o ácido piperínico (2) desejado. O uso da irradiação de micro-ondas permitiu a otimização desta reação de hidrólise, visto através da metodologia convencional a reação se passava durante 12h sob refluxo (RIBEIRO, 2004; RIBEIRO *et al*, 2004) A formação deste ácido foi confirmada através de análise de seus espectros de RMN e IV. No espectro de Infravermelho (**Espectro 4**) pôde ser observada uma forte absorção em  $1679\text{ cm}^{-1}$ , indicando a presença da função carbonila do ácido carboxílico conjugado e em  $1251\text{ cm}^{-1}$ , referente ao estiramento do metileno do grupo metilenodioxila, além da absorção em  $3435\text{ cm}^{-1}$  referente ao estiramento O-H do ácido carboxílico. No espectro de RMN  $^1\text{H}$  (**Espectro 5**) há presença de um simpleto em  $\delta$  12,0 ppm referindo-se ao hidrogênio da hidroxila do ácido e a ausência dos hidrogênios referentes ao anel piperidínico ( $\delta$  1,68-3,55 ppm) ligado ao carbono da amida. No espectro de  $^{13}\text{C}$  (**Espectro 6**) há presença de deslocamento em 168,12 ppm referente a carbonila do ácido e deslocamento em 121,6 e 145,1ppm referentes aos carbonos  $\alpha$  e  $\beta$ -carbonílicos respectivamente. Novamente, os carbonos referentes a piperidina não estão presentes ( $\delta$  24,6-46,9 ppm), indicando inequivocamente a hidrólise da função amida.

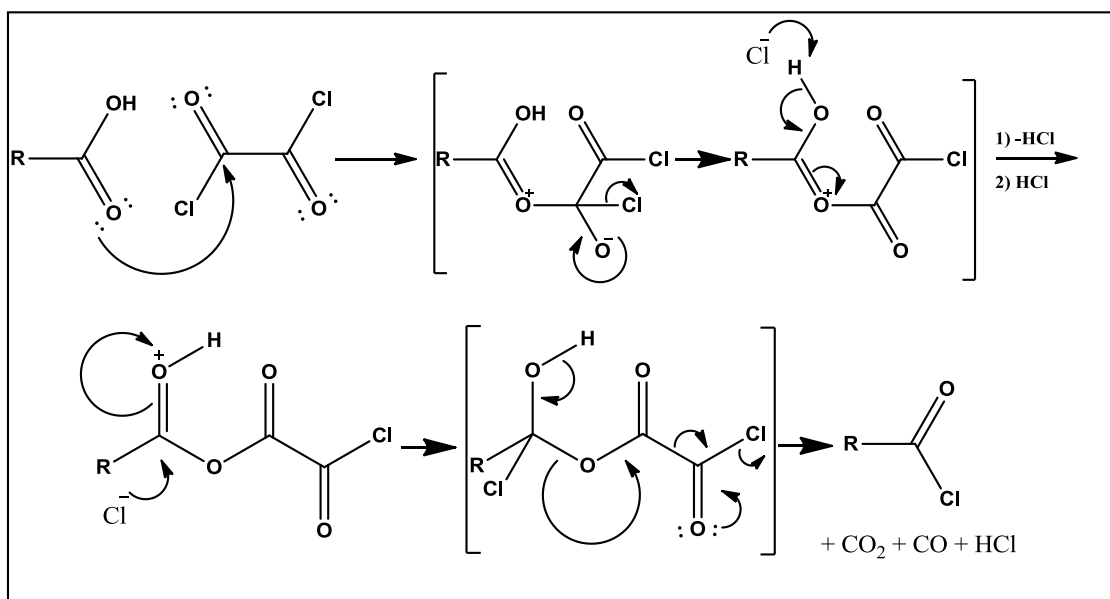


**Figura 13:** Mecanismo de formação do ácido piperínico (2) a partir da hidrólise da piperina (1).

#### 4.3. Preparação das Amidas (16a-d)

A síntese das amidas teve em comum a passagem pelo cloreto de ácido (**15**) com o objetivo de se sintetizar um intermediário mais reativo frente à reação de formação de amidas através da reação de Substituição Nucleofílica Acílica (S<sub>N</sub>Ac). Os cloretos de tionila (SOCl<sub>2</sub>) e oxalila (COCl)<sub>2</sub> são usualmente os reagentes de escolha para a síntese de cloretos de ácido, apresentando a vantagem de formarem subprodutos gasosos (SO<sub>2</sub>, CO, CO<sub>2</sub>) que não contaminam o produto (MARCH, 1985). A utilização do cloreto de oxalila se deveu ao fato deste ser mais reativo que o cloreto de tionila e as reações poderem ser realizadas em temperatura ambiente, mecanismo mostrado na **Figura 14**. Esta metodologia vem sendo empregada com êxito na síntese de diferentes derivados e análogos da piperina (RIBEIRO, 2004; FERREIRA, 2006; LOPES, 2011; FRANKLIM *et al*, 2013). Adicionalmente, o menor ponto de ebulição facilita o isolamento da reação que não necessita de grande aquecimento para evaporar o reagente excedente.

Por apresentarem alta reatividade, os cloretos de ácido sintetizados não foram quantificados ou purificados e foram todos considerados puros pelo acompanhamento da reação por cromatografia em camada fina.



**Figura 14:** Mecanismo de formação do cloreto de acila (**15**) utilizando cloreto de oxalila ( $\text{COCl}_2$ ).

A preparação das amidas (**16a-d**) foi realizada através da reação entre o intermediário cloreto de ácido e as aminas correspondentes, conforme metodologia descrita por (RIBEIRO, 2004; LOPES, 2011), apresentando rendimentos de 27 a 82% como descritos na **Tabela 22**. As amidas **16a** e **16d** foram sintetizadas anteriormente por Lopes, 2011.

**Tabela 22:** Rendimentos sintéticos e propriedades físicas das amidas (**16a-d**)

Composto	R	Rend.(%)	P.F °C	Aspecto Físico
(16a)	-CH <sub>3</sub>	31	172	Sólido marrom
(16b)	-CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	82	182	Sólido marrom
(16d)	-Ph	*	194	Sólido marrom
(16c)	-Bn	27	125	Sólido marrom

\* O rendimento está descrito por Lopes, 2011.

Através de análise dos espectros de infravermelho das amidas (**16a-d**), foi possível perceber que a subunidade 5-(3,4-metilenodioxifenil)-2(*E*)-4(*E*)-pentadienóico

do ácido estava presente em todos os derivados formados, devido a uma forte absorção em  $1635\text{ cm}^{-1}$ , sendo indicativo da presença da função carbonila amídica conjugada, além de gerar absorções na região entre  $2900\text{-}2800\text{ cm}^{-1}$ , referentes às deformações axiais das ligações C-H e em  $1255\text{ cm}^{-1}$ , referente ao estiramento do metileno do grupo metilenodioxila. No RMN  $^1\text{H}$  estas amidas apresentaram características bem semelhantes, diferenciando-se pelas modificações dos substituintes piperazínicos. Em todos os espectros de RMN  $^1\text{H}$  das amidas geradas foi observado um simpleto em  $\delta\ 6,0$  ppm, referente aos hidrogênios do grupamento metilenodioxila, um duplete variando entre  $\delta\ 6,41 - 6,44$  ppm referente ao hidrogênio olefínico  $\alpha$  à carbonila, um duplo duplete variando entre  $\delta\ 7,42 - 7,47$  ppm referente ao hidrogênio olefínico  $\beta$ -carbonílico. Também pode-se observar um multiplete variando entre  $\delta\ 3,64 - 3,75$  ppm referente aos hidrogênios piperazínicos 1' e 4' mais próximos ao nitrogênio amídico.

Os espectros diferenciam os compostos entre si pelos sinais referentes à metila em  $\delta\ 2,34$  ppm no composto **16a (espectro 8)**; àqueles referentes ao metileno em  $\delta\ 2,45 - 2,50$  ppm e a metila terminal em  $\delta\ 1,12 - 1,14$  ppm do composto **16b (espectro 11)**; no composto **16d (espectro 14)** pela presença dos sinais em  $\delta\ 6,92 - 6,98$  ppm referentes aos hidrogênios 2'' e 6'', em  $\delta\ 7,29 - 7,33$  ppm referentes aos hidrogênios 3'' e 5'', em  $6,75 - 6,85$  ppm referentes ao hidrogênio 4'' todos da fenila *N*-substituída; e no composto **16c (espectro 17)** devido à presença do simpleto em  $\delta\ 3,56$  ppm referente ao metileno benzílico e em  $\delta\ 7,35$  ppm referente aos hidrogênios benzílicos.

Nos espectros de DEPT-Q todos apresentaram deslocamentos comuns em  $101,3$  ppm referente ao grupo metilenodioxila, deslocamento em  $165$  ppm referente a carbonila amídica, deslocamentos em  $119$  e  $143$  ppm referentes aos carbonos  $\alpha$  e  $\beta$ -carbonílicos, respectivamente. Como diferenciação entre eles, o composto **16a (espectro 9)** apresentou do deslocamento referente à metila em  $\delta\ 45,9$  ppm; deslocamentos atribuídos ao metileno em  $41,9$  ppm, e a metila em  $\delta\ 11,8$  ppm foram observados para o composto **16b (espectro 12)**; no composto **16d (espectro 15)** observou-se a presença dos sinais em  $\delta\ 116,6$  ppm referente aos carbonos aromáticos 2'' e 6'', em  $\delta\ 129,2$  ppm referente aos carbonos aromáticos 3'' e 5'' e  $\delta\ 120,5$  ppm referente aos carbonos aromáticos 4'' todos da fenila *N*-substituída; e finalmente no composto **16c (espectro 18)** houve a presença dos deslocamentos em  $\delta\ 62,9$  ppm

referente ao metileno benzílico, em  $\delta$  129,1 ppm referente aos carbonos 2'' e 6'', em  $\delta$  128,3 ppm referente aos carbonos 3'' e 5'' e em  $\delta$  127,1 ppm referente ao carbono 4'' dos carbonos do anel aromático da benzila.

#### 4.4. Preparação das amidas saturadas (17 e 20)

Os compostos reduzidos (**17** e **20**) foram obtidos, inicialmente, pela redução de suas duplas ligações conjugadas e apresentaram em comum a primeira etapa realizada pela metodologia de RIBEIRO, 2004, onde realizou-se uma redução catalítica clássica, utilizando Pd/C 10% em atmosfera de H<sub>2</sub> (a pressão atmosférica) e acetato de etila como solvente. (RIBEIRO, 2004; FERREIRA, 2006; LOPES, 2011). Esta primeira etapa gerou os intermediários ácido piperínico hidrogenado (**18**) e tetraidropiperina **19** (não caracterizados por métodos espectroscópicos) com rendimentos bastante satisfatório de 75 e 99% respectivamente. Através do intermediário **18** realizou-se a síntese da amida **17** conforme metodologia descrita por (RIBEIRO, 2004; LOPES, 2011), apresentando rendimento de 70%. O intermediário **19** sofreu redução de sua carbonila amídica através de método descrito RIBEIRO, 2004, onde utilizou-se hidreto de lítio alumínio (LiAlH<sub>4</sub>) como agente redutor, gerando o produto **20** em 86% de rendimento. Os rendimentos sintéticos e as propriedades físicas dos compostos obtidos estão descritas na **Tabela 23**.

A caracterização estrutural por RMN <sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C confirmou a estrutura dos compostos sintetizados. Em **17**, observamos pelo RMN <sup>1</sup>H (**espectro 19**), a redução das ligações duplas conjugadas pelo desaparecimento dos sinais dupletos em  $\delta$  6,44ppm e  $\delta$  7,42 ppm, referentes aos hidrogênios olefínico  $\alpha$  e  $\beta$  a carbonila amídica e o aparecimento de multipletos entre  $\delta$  1,64 – 2,59 ppm com integrais totais de 8H referentes aos hidrogênios alifáticos 7-10. Adicionalmente, por RMN <sup>13</sup>C (**espectro 20**), **17** apresentou sinais com deslocamentos entre 35,4 e 24,8 ppm referentes aos carbonos alifáticos 7–10, que não existiam anteriormente, e deslocamentos em  $\delta$  62,8 ppm referente ao CH<sub>2</sub> benzílico.

Já para o composto **20**, através de RMN <sup>1</sup>H (**espectro 21**), foi observado novamente que os sinais referentes aos hidrogênios olefínicos  $\alpha$  e  $\beta$  à carbonila amídica desapareceram dando lugar a multipletos entre 1,28 e 2,56 ppm com integral total igual

a 10H, o que caracterizou a total redução tanto das ligações duplas da olefina, quanto da carbonila.

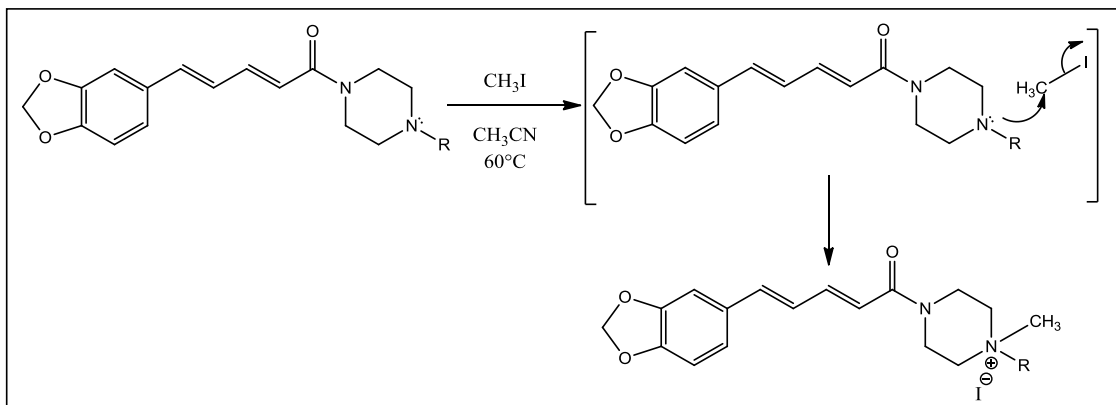
**Tabela 23:** Sínteses, rendimentos e propriedades físicas das amidas reduzidas (17 e 20).

Composto	Rend.(%)	Aspecto Físico
17	70*	Óleo marrom
20	85*	Óleo marrom

\*rendimento global (2 etapas)

#### 4.5. Preparação dos sais de amônio quaternário (21 a-d, 22 e 23)

A preparação dos respectivos sais de amônio quaternário foi realizada utilizando-se uma adaptação da metodologia descrita por Fraga (FRAGA, 1994) onde as amidas reagem com o iodeto de metila em um tubo selado, que foi utilizado devido à alta volatilidade do iodeto de metila, através do mecanismo de substituição nucleofílica bimolecular ( $S_N2$ ), onde o par de elétrons do nitrogênio amínico ataca a metila, liberando o iodo de forma concertada para formação dos sais de amônio quaternários (Figura 15).



**Figura 15:** Mecanismo de formação dos sais de amônio quaternário (21a-d)

#### 4.5.1. Caracterização dos sais de amônio quaternário insaturados (21 a-d)

Os sais de amônio insaturados (21 a-d) foram sintetizados a partir das amidas insaturadas (16 a-d) com rendimentos e propriedades físicas descritas na **Tabela 24**. Apresentaram espectros de infravermelho bem semelhantes entre si, com forte absorção entre 1240 e 1255  $\text{cm}^{-1}$ , referente ao estiramento do metileno do grupo metilenodioxila além das absorções na região entre 2900-2800  $\text{cm}^{-1}$ , referente às deformações axiais das ligações C-H.

No RMN  $^1\text{H}$  apresentaram características bem semelhantes, diferenciando-se pelas modificações da parte amídica. Em todos os espectros de RMN  $^1\text{H}$  das amidas geradas foi observado um simpleto variando entre  $\delta$  5,97 - 6,09 ppm, referente aos hidrogênios do grupamento metilenodioxila, um duplete variando entre  $\delta$  6,71 - 6,76 ppm referente ao hidrogênio olefínico  $\alpha$  a carbonila e um duplo duplete variando entre  $\delta$  7,31 - 7,36 ppm referente ao hidrogênio olefínico  $\beta$ -carbonílico. Também pôde-se observar um multipeto variando entre  $\delta$  3,92 - 4,41 ppm referentes aos hidrogênios piperazínicos 2' e 3' mais próximos ao nitrogênio amínico e um simpleto, que confirmou a formação dos sais de amônio pois não existia antes da alquilação, variando entre  $\delta$  3,06 - 3,56 ppm referente as metilas ligadas ao nitrogênio quaternário.

**Tabela 24:** Rendimentos sintéticos e propriedades físicas dos compostos

Composto	R	Rend.(%)	P.F °C	Aspecto Físico
(21a)	CH <sub>3</sub>	71	>250	Sólido marrom
(21b)	CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	80	>250	Sólido amarelo
(21d)	Ph	50	130	Sólido marrom
(21c)	Bnz	30	238	Sólido amarelo

A identificação dos compostos se deu pela análise de seus espectros que se diferenciam de acordo com os substituintes em R, onde foram observados sinais



referentes a metila em  $\delta$  3,20 ppm no composto **21a (espectro 23)**; os referentes ao CH<sub>2</sub> em  $\delta$  2,53 ppm, e ao CH<sub>3</sub> em  $\delta$  1,27 – 1,32 ppm do composto **21b (espectro 26)**; no composto **21d (espectro 32)**, existe a presença dos sinais em  $\delta$  7,63 ppm referente ao hidrogênio 4'', em  $\delta$  7,70 – 7,73 ppm referente ao hidrogênio 3'' e 5'' e em  $\delta$  7,99 – 8,01 ppm referente ao hidrogênio 2'' e 6'', todos da fenila *N*-substituída; no composto **21c (espectro 29)** há presença do simpleto em  $\delta$  4,68 ppm referente ao CH<sub>2</sub> benzílico e o multiplete em  $\delta$  7,35 – 7,56 ppm referente aos hidrogênios benzílicos.

Nos espectros de DEPT-Q todos apresentaram o deslocamento em 101,8 ppm referente ao grupo metilenodioxila, deslocamento em 165 ppm referente a carbonila amídica, deslocamentos em 119 e 143 ppm referentes aos carbonos  $\alpha$  e  $\beta$ -carbonílicos respectivamente. No composto **21a (espectro 24)** há presença do deslocamento da metila em  $\delta$  51,0 ppm; deslocamentos referentes ao CH<sub>2</sub> em 59,2 ppm, e ao CH<sub>3</sub> em  $\delta$  7,60 ppm do composto **21b (espectro 27)**; no composto **21d (espectro 33)**, existe a presença dos sinais em  $\delta$  121,9 ppm referente aos carbonos 2'' e 6'', em  $\delta$  131,1 ppm referente aos carbonos 3'' e 5'', todos carbonos aromáticos da fenila *N*-substituída; e finalmente, no composto **21c (espectro 30)** há presença dos deslocamentos em  $\delta$  67,59 ppm referente ao CH<sub>2</sub> benzílico e em  $\delta$  133,6 ppm referente aos carbonos 2'' e 6'', em  $\delta$  130,9 ppm referente aos carbonos 3'' e 5'' e em  $\delta$  129,4 ppm referente ao carbono 4'', todos referentes aos carbonos do anel aromático da benzila.

#### 4.5.2. Caracterização dos sais de amônio quaternário saturados (22 e 23)

Os sais de amônio saturados (**22 e 23**) foram sintetizados a partir das amidas saturadas (**20 e 17**) com rendimentos e propriedades físicas descritas na **Tabela 25**. Apresentaram parte de seus espectros de RMN <sup>1</sup>H semelhantes, com presença de um simpleto variando de  $\delta$  5,97 – 5,98 ppm, referente aos hidrogênios do grupamento metilenodioxila, um multiplete entre  $\delta$  1,29 – 1,56 ppm referente aos hidrogênios alifáticos 9 e um simpleto variando entre  $\delta$  3,01 – 3,03 ppm referente a metila dos sais.

A identificação final dos compostos foi feita pela análise de seus espectros que se diferenciam de acordo com os substituintes em R. No composto **23 (espectro 35)** foi observado um simpleto em  $\delta$  4,66 ppm referente ao CH<sub>2</sub> benzílico e um deslocamento

em  $\delta$  7,55 ppm referente aos hidrogênios benzílicos. No espectro de RMN  $^1\text{H}$  do composto **22** (**espectro 38**) observou-se um multipeto em  $\delta$  3,29 – 3,32 ppm referente ao hidrogênios alifáticos 11 confirmando que não há a presença da carbonila e aos hidrogênios piperidínicos 1'e 5'.

Os espectro de DEPT-Q apresentaram o deslocamento em  $\delta$  101 ppm referente ao grupo metilenodioxila e deslocamentos variando entre  $\delta$  24,3 – 25,7 referente ao carbono alifático 9. No composto **23** (**espectro 36**) há deslocamento em  $\delta$  171 ppm referente a carbonila amídica, deslocamentos em  $\delta$  57,4 ppm referente ao  $\text{CH}_2$  benzílico e em  $\delta$  133,4 ppm referente aos carbonos 2''e 6'' e em  $\delta$  129,4 ppm referente aos carbonos 3''e 5'' do anel aromático da benzila. Para o composto **22** (**espectro 39**) observou-se um deslocamento em  $\delta$  60,46 ppm referente ao hidrogênios alifáticos 11 confirmando novamente que não há a presença da carbonila e aos hidrogênios piperidínicos 1'e 5'.

**Tabela 25:** Rendimentos sintéticos e propriedades físicas dos compostos (**22 e 23**)

Composto	Rend.(%)	P.F °C	Aspecto Físico
A ( <b>23</b> )	36	*	Sólido marrom claro
B ( <b>22</b> )	88	162	Sólido marrom claro

\*não foi possível a caracterização do P.f pois o sólido é muito higroscópico.

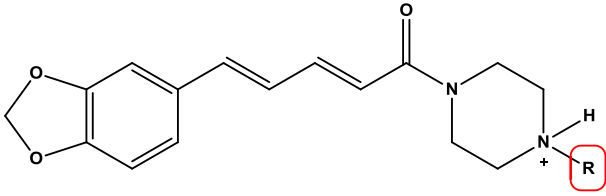
#### 4.6. Síntese dos cloridratos (**24a-c**)

A conversão de amins insolúveis em cloridratos é uma forma comum de torná-las solúveis em água e em ácido, os derivados amídicos realizam uma reação ácido base com o ácido clorídrico, através do par de elétrons do nitrogênio amínico presente na subunidade piperazínica, liberando o cloreto que fica como contra íon destes sais de amônio. Os cloridratos correspondentes (**24 a-c**) foram sintetizados pela reação das

amidas (**16a-c**) com uma solução saturada de HCl e apresentaram rendimentos e propriedades físicas como descritos na **tabela 26**.

Os cloridratos sintetizados apresentaram espectros de RMN  $^1\text{H}$  muito semelhantes aos sais de metil-amônio (**21 a,b e d**) anteriormente descritos, com sinais característicos das amidas como o simpleto variando entre  $\delta$  6,06 - 6,07 ppm referente aos hidrogênios do grupamento metilenodioxila, um duplete variando entre  $\delta$  6,68 – 6,76 ppm referente ao hidrogênio olefínico  $\alpha$  a carbonila e um duplo duplete variando entre  $\delta$  7,28 – 7,33 ppm referente ao hidrogênio olefínico  $\beta$ -carbonílico. A real caracterização de formação destes cloridratos, já que seus espectros de RMN  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  eram muito parecidos com os compostos de partida, veio através da observação dos simpletos referentes aos hidrogênios ligados ao nitrogênio, oriundos da protonação pelo HCl, entre  $\delta$  10,95 – 10,96 ppm.

**Tabela 26:** Rendimentos sintéticos e propriedades físicas dos compostos

				
Composto	R	Rend.(%)	P.F °C	Aspecto Físico
(24a)	CH <sub>3</sub>	70	>270	Sólido caramelo
(24b)	CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	59	>270	Sólido marrom
(24c)	Ph	65	215	Sólido amarelo

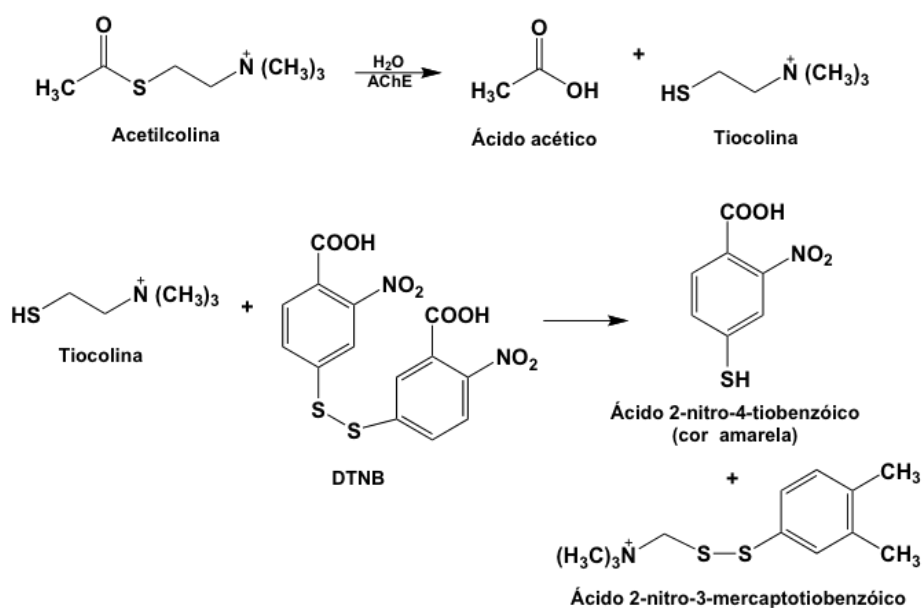
#### 4.7. Ensaios Químicos – Biológicos

##### 4.7.1. Ensaio de avaliação de atividade anticolinesterásica

Os ensaios para a avaliação da atividade anticolinesterásica foram realizados em micro placas de 96 poços em triplicata (para o cálculo do desvio padrão) e em diferentes concentrações. Após a adição da enzima, foi levada ao aparelho de ELISA e a absorvância foi medida em um comprimento de onda de 415nm. As absorvâncias obtidas foram utilizadas para o cálculo da porcentagem de inibição. Desse modo, os

gráficos (concentração x porcentagem de inibição) foram confeccionados e calculados os valores de  $CI_{50}$  ( $\mu M$ ), com os respectivos desvios padrões.

Estes ensaios se utilizaram de uma modificação do método de Ellman (ELLMAN *et al.*, 1961) que é um método colorimétrico onde as enzimas acetilcolinesterase ou butirilcolinesterase hidrolisam a acetilcolina em ácido acético ou butírico, respectivamente, e tiocolina. A tiocolina, que é o marcador da atividade enzimática, reage com o 5,5'-ditiobis-[2-nitrobenzóico] (DTNB ou reagente de Ellman) gerando o ácido 2-nitro-4-tiobenzóico que tem coloração amarela (**Esquema 3**).



**Esquema 3:** Reações envolvidas no método de Ellman

Neste método, inicialmente adicionou-se às cavidades o iodeto de acetilcolina ou iodeto de tiobutirilcolina, o DTNB, o tampão 0,1% BSA, os compostos em diferentes concentrações (cavidades teste) e etanol ou água (cavidades controle, onde a enzima não é inibida, ou seja, trabalha-se com 100% de atividade enzimática). Logo em seguida, fez-se a primeira leitura da absorvância, onde ainda não havia qualquer hidrólise do substrato. Esta leitura constituiu o branco da avaliação, ou seja, os valores obtidos nesta leitura foram os valores descontados na leitura final (após a hidrólise enzimática). Em seguida, após a adição da enzima às cavidades, os valores de absorvância foram medidos e a cada 13 segundos fez-se uma nova leitura, por três vezes seguidas. Dos valores de absorvância obtidos nestas leituras, subtraiu-se o valor do branco de cada

cavidade. Como os ensaios foram feitos em triplicata, calculou-se a média de absorvância para cada uma destas. Desse modo, para cada concentração foram calculados três valores de média nas três leituras observadas. A **Tabela 19** mostra os cálculos feitos para o sal de metila da 1-metilpiperazinila (**21a**) como exemplo da metodologia aplicada.

**Tabela 19** – Valores de absorvâncias e concentrações do sal de metila da 1-metilpiperazinila (**21a**) utilizados para o cálculo do percentual de inibição da AChE.

<b>Absorvâncias (1° leitura)</b>				
Conc. Sal ( $\mu\text{M}$ )	Média $\pm\sigma$ *1° Triplicata	Média $\pm\sigma$ *2° Triplicata	Média $\pm\sigma$ *3° Triplicata	Média $\pm\sigma$ * Controle
10	0,369 $\pm$ 0,019	0,381 $\pm$ 0,007	0,391 $\pm$ 0,002	0,481 $\pm$ 0,016
20	0,327 $\pm$ 0,008	0,369 $\pm$ 0,000	0,327 $\pm$ 0,007	0,469 $\pm$ 0,027
40	0,237 $\pm$ 0,019	0,235 $\pm$ 0,016	0,234 $\pm$ 0,018	0,478 $\pm$ 0,036
50	0,207 $\pm$ 0,022	0,210 $\pm$ 0,023	0,203 $\pm$ 0,004	0,466 $\pm$ 0,042
60	0,18 $\pm$ 0,035	0,191 $\pm$ 0,014	0,175 $\pm$ 0,010	0,473 $\pm$ 0,032
<b>Absorvâncias (2° leitura)</b>				
Conc. Sal ( $\mu\text{M}$ )	Média $\pm\sigma$ *1° Triplicata	Média $\pm\sigma$ *2° Triplicata	Média $\pm\sigma$ *3° Triplicata	Média $\pm\sigma$ * Controle
10	0,413 $\pm$ 0,028	0,406 $\pm$ 0,006	0,429 $\pm$ 0,009	0,538 $\pm$ 0,020
20	0,354 $\pm$ 0,006	0,392 $\pm$ 0,001	0,35 $\pm$ 0,082	0,5 $\pm$ 0,027
40	0,253 $\pm$ 0,020	0,251 $\pm$ 0,017	0,252 $\pm$ 0,018	0,505 $\pm$ 0,042
50	0,221 $\pm$ 0,023	0,225 $\pm$ 0,024	0,219 $\pm$ 0,004	0,508 $\pm$ 0,048
60	0,193 $\pm$ 0,035	0,205 $\pm$ 0,014	0,188 $\pm$ 0,008	0,506 $\pm$ 0,037
<b>Absorvâncias (3° leitura)</b>				
Conc. Sal ( $\mu\text{M}$ )	Média $\pm\sigma$ *1° Triplicata	Média $\pm\sigma$ *2° Triplicata	Média $\pm\sigma$ *3° Triplicata	Média $\pm\sigma$ * Controle
10	0,432 $\pm$ 0,023	0,435 $\pm$ 0,000	0,461 $\pm$ 0,000	0,575 $\pm$ 0,016
20	0,407 $\pm$ 0,015	0,443 $\pm$ 0,003	0,395 $\pm$ 0,087	0,568 $\pm$ 0,022
40	0,269 $\pm$ 0,021	0,267 $\pm$ 0,018	0,268 $\pm$ 0,019	0,536 $\pm$ 0,046
50	0,236 $\pm$ 0,024	0,241 $\pm$ 0,024	0,234 $\pm$ 0,003	0,546 $\pm$ 0,055
60	0,203 $\pm$ 0,034	0,218 $\pm$ 0,016	0,199 $\pm$ 0,007	0,535 $\pm$ 0,040

\* $\sigma$  = Desvio-padrão.

Desse modo, a absorvância observada refletiu diretamente a atividade enzimática (a enzima, no volume em que é adicionada não possui valor de absorvância relevante). Com isto foi possível comparar os valores de cada triplicata com o valor da triplicata do controle e calcular o percentual de inibição da seguinte maneira:

$$\text{Percentual de inibição} = 100 - (\text{Mt} / \text{Tc}) \times 100$$

Onde: Tc = Triplicada do controle; Mt = média da triplicata da concentração a ser calculada;

Por exemplo, a primeira triplicata na concentração 40  $\mu$ M na primeira leitura:

$$\text{Percentual de inibição} = 100 - (0,237/0,478) \times 100 = 50,4$$

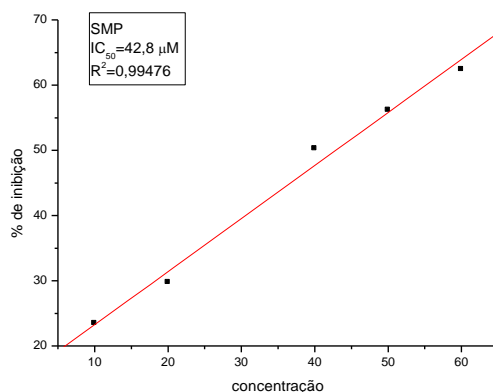
O mesmo foi feito para todas as triplicatas das demais concentrações. Com os valores obtidos calculou-se a média das triplicatas nas três leituras e o desvio-padrão correspondente. A tabela abaixo mostra o percentual de inibição de AChE do composto (21a) nas diferentes concentrações testadas.

**Tabela 20** – Percentual de inibição de AChE pelo sal de metila da 1-metilpiperazina (21a)

Concentração ( $\mu$ M)	% de Inibição $\pm$ dp*
10	23,47 $\pm$ 1,30
20	29,74 $\pm$ 0,51
40	50,27 $\pm$ 0,41
50	56,17 $\pm$ 0,51
60	62,41 $\pm$ 0,05

\* $\sigma$  = desvio padrão

A partir da porcentagem de inibição calculada para no mínimo três concentrações diferentes, foi possível gerar os gráficos (concentração x porcentagem de inibição), e utilizando o modelo matemático de regressão linear foram calculados os valores de CI<sub>50</sub> (concentração efetiva que inibe 50% da atividade enzimática) conforme ilustrado na **Figura 11**.



**Figura 11:** Atividade anticolinérgica do sal de metila da 1-metilpiperazinila (**21a**)

A avaliação farmacológica da série de sais das amidas piperazínicas (**21a-d**) mostrou  $CI_{50}$  variando de 13,8 a 42,8  $\mu M$ , frente à AChE, e  $CI_{50}$  variando de 18,2 a 94,2  $\mu M$ , para a inibição da BuChE (**Tabela 27**). Comparativamente à fisostigmina, um composto reconhecidamente inibidor de colinesterases ( $CI_{50}$  de 1,56  $\mu M$  AChE e 3,7  $\mu M$  BuChE), os derivados se mostraram pouco menos potentes, mas na mesma ordem de grandeza.

**Tabela 27:** Tabela com os valores de  $CI_{50}$  (AChE e BChE) dos compostos 21a -21d.

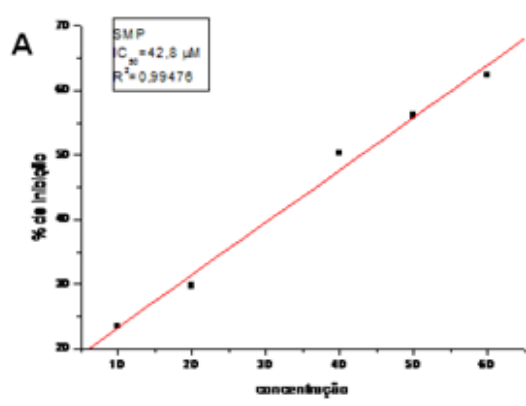
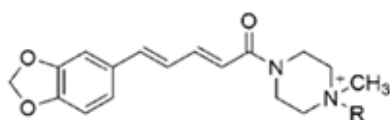
Composto	R	$CI_{50}(\mu M)$ AChE	$CI_{50}(\mu M)$ BChE
(21a)	-CH <sub>3</sub>	42,8	78,7
(21b)	-CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	24,7	94,2
(21c)	-Ph	23,5	18,2
(21d)	-Bn	13,8	22,0

De acordo com os resultados de inibição da AChE (**Gráfico 1**) foi possível observar que a afinidade dos compostos por esta enzima parece estar diretamente relacionada com a natureza dos substituintes “R” ligados ao nitrogênio amínico da piperazina, onde ocorre a formação do sal de amônio quaternário. Observou-se que não somente o volume do substituinte interfere na atividade, mas também sua natureza estereo-eletrônica. No composto **21b** ( $CI_{50}=24,7\mu M$ ) a adição de uma metila ao

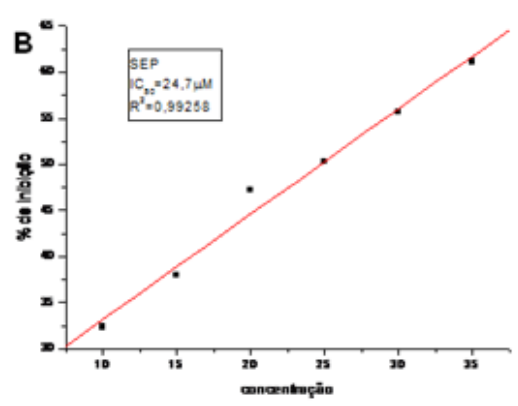
substituinte R aumentou em duas vezes a atividade do derivado, quando comparado com o composto **21a** ( $CI_{50}=42,8 \mu\text{M}$ ) mostrando que possivelmente o aumento do volume estérico e lipofilicidade poderia ser importante para essa atividade. Esta correlação se mostra bastante razoável quando analisamos os resultados para os outros derivados da série, onde podemos observar que conforme há um aumento do caráter aromático dos substituintes e conseqüentemente do volume e lipofilicidade, há um aumento significativo da atividade já que os derivados com substituintes fenila **21d** ( $CI_{50}=23,5\mu\text{M}$ ) e benzila **21c** ( $CI_{50}=13,8 \mu\text{M}$ ) se mostraram como os mais ativos frente à AChE.

A **figura 16A** mostra os valores calculados dos parâmetros físico-químicos associados tanto ao volume, quanto com a lipofilicidade dos substituintes em “R” (calculados com os programas ChemDraw e MarvinSketch) para os substituintes, onde é possível visualizar as diferenças em termos espaciais. A construção de gráficos correlacionando estas propriedades físico-químicas com as  $CI_{50}$  dos compostos, mostrou uma boa correlação com  $R^2$  de 0,749 e 0,675, respectivamente e, apesar de possuir poucos pontos (apenas quatro), sugerem a influência direta do aumento destes parâmetros com a potência de inibição enzimática (**Figura 16B**).

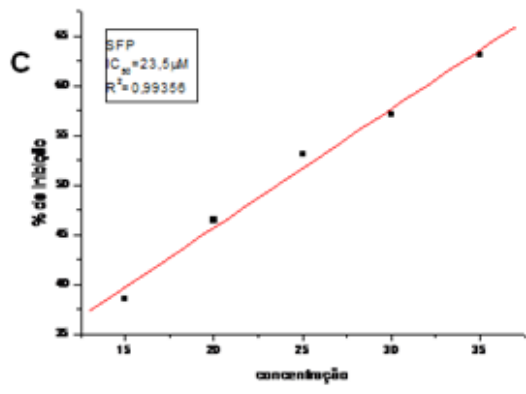




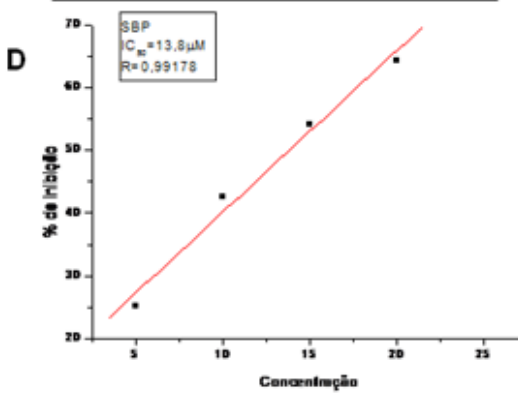
Conc. ( $\mu M$ )	% de inibição $\pm dp^*$
10	23,47
20	29,74
40	50,27
50	56,17
60	62,41



Conc. ( $\mu M$ )	% de inibição $\pm dp^*$
10	32,37
15	38,03
20	47,18
25	50,35
30	55,69
35	61,12

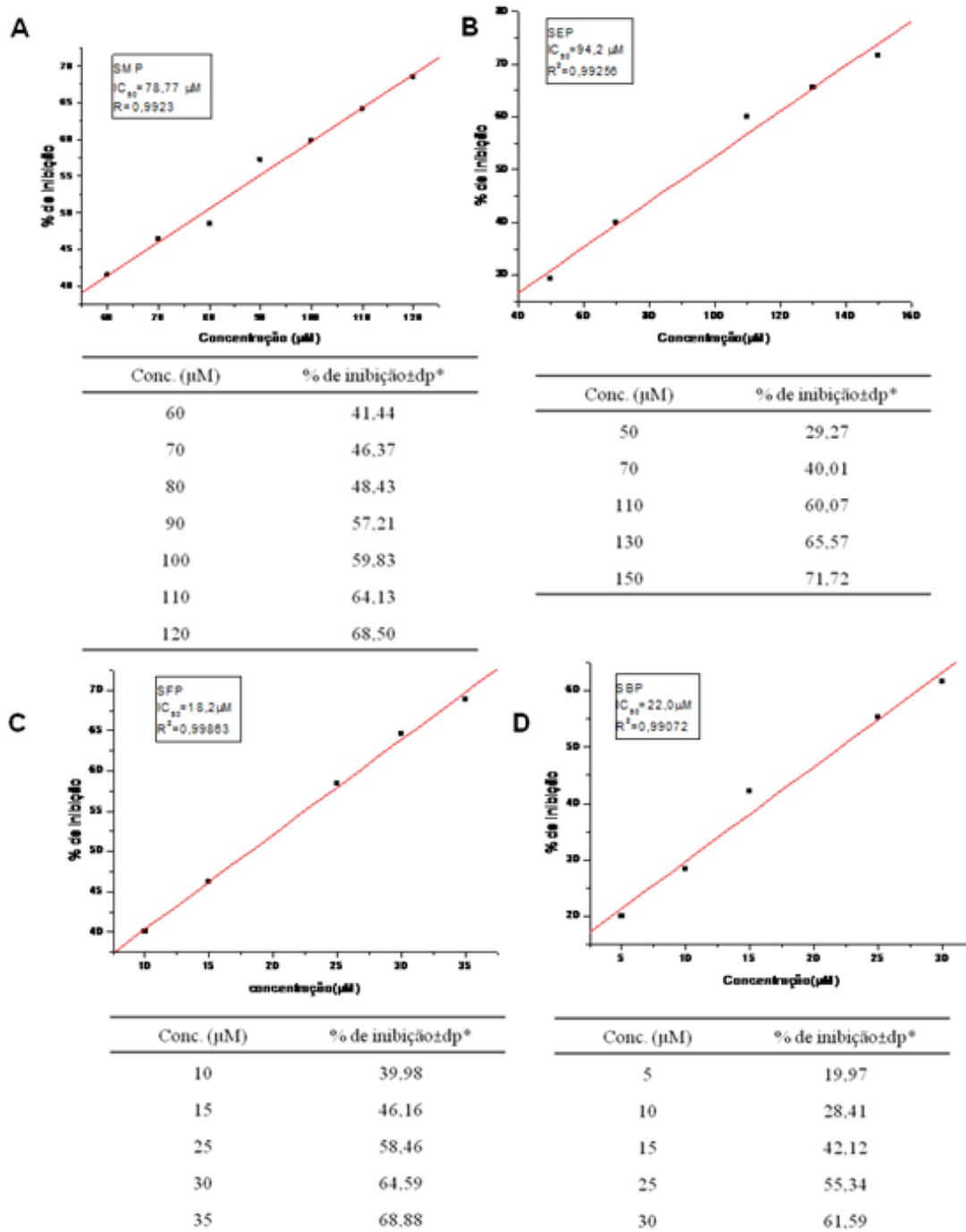
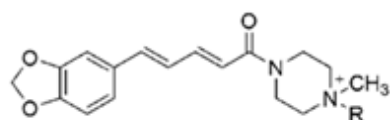


Conc. ( $\mu M$ )	% de inibição $\pm dp^*$
15	38,59
20	46,49
25	53,16
30	57,12
35	63,15



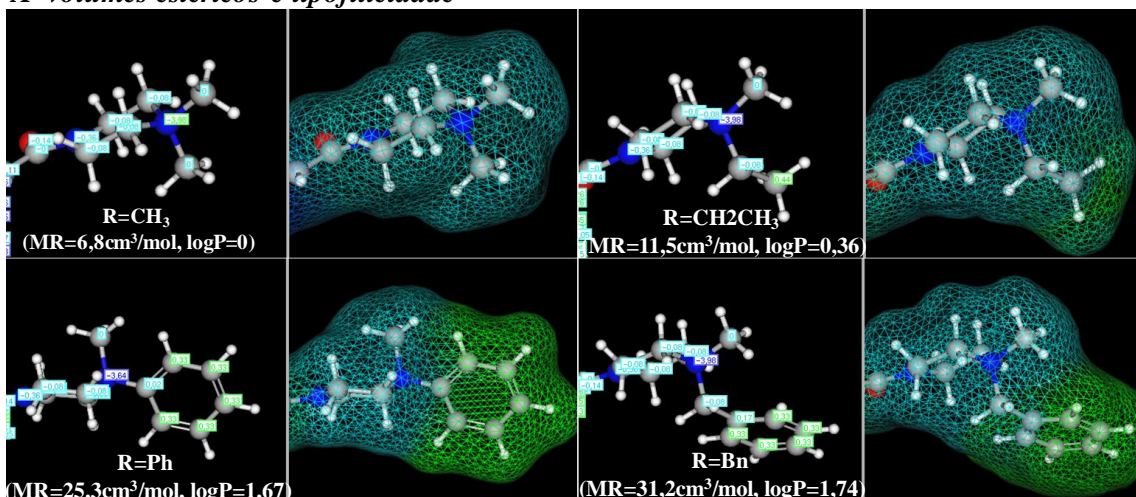
Conc. ( $\mu M$ )	% de inibição $\pm dp^*$
5	25,23
10	42,66
15	54,04
20	64,38

**Gráfico 1:** Gráfico de correlação de percentual de inibição enzimática de AChE (peixe elétrico tipo VI-S) x concentração dos compostos **21a-d** ( $\mu M$ ). (A)  $R=CH_3$  (**21a**); (B)  $R=CH_2CH_3$  (**21b**); (C)  $R=Ph$  (**21d**); (D)  $R=Bn$  (**21c**). Os experimentos foram realizados em triplicata. % inibição AChE piperina 13,5% (200 $\mu M$ ).

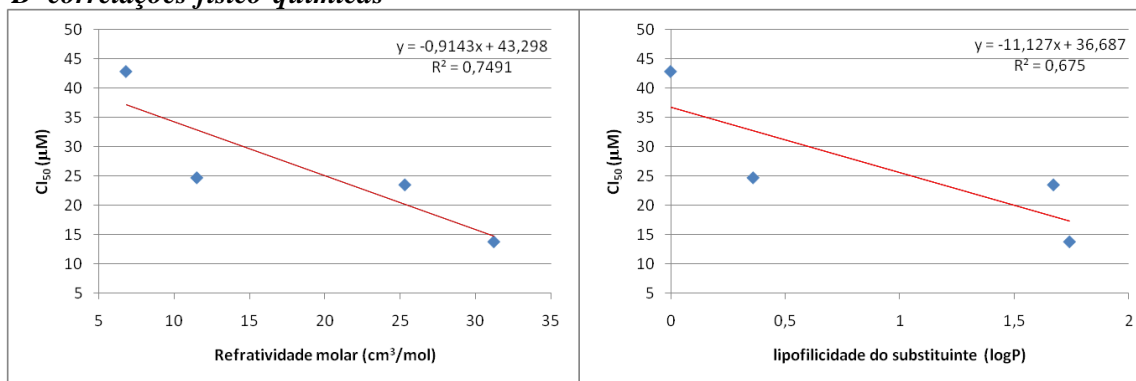


**Gráfico 2:** Gráfico de correlação de percentual de inibição enzimática de BuChE (soro equino) x concentração dos compostos **21a-d** (µM). (A) R=CH<sub>3</sub> (**21a**); (B) R=CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub> (**21b**); (C) R= Ph (**21d**); (D) R= Bnz (**21c**). Os experimentos foram realizados em triplicata. % inibição AChE piperina 13,5% (200µM).

### A- volumes estéricos e lipofilicidade



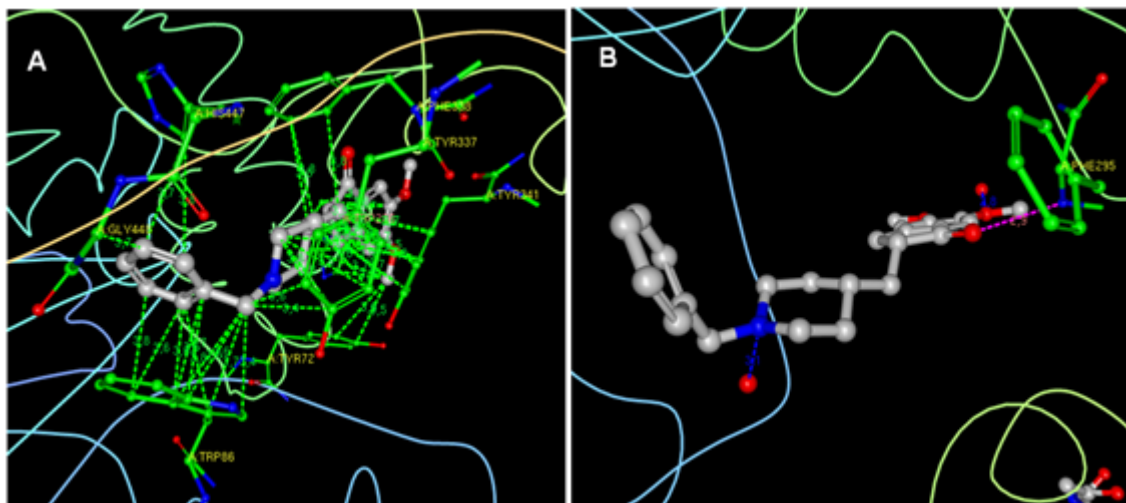
### B- correlações físico-químicas



**Figura 16:** (A) Parâmetros físico-químicos de volume (MR=refratividade molar) e coeficiente de partição (logP) calculados para os compostos 21a-d e representação 3D (azul=áreas mais hidrofílicas e verde=área mais hidrofóbicas). (B) Gráficos de correlação entre os parâmetros físicos-químicos (volume a esquerda e lipofilicidade a direita) e a potência de inibição dos compostos 21a-d frente a AChE.

Como demonstrado, o aumento do volume e lipofilicidade dos substituintes aumenta a potência inibitória sobre a AChE e dentre os derivados testados o que obteve melhor valor de  $CI_{50}$  para AChE foi o composto benzilado **21c** ( $CI_{50}=13,8 \mu M$ ). A partir destes resultados, pôde-se supor que estes substituintes estivessem realizando interações hidrofóbicas com os resíduos de aminoácidos aromáticos presentes no sítio. De fato, a partir da observação das interações da donepezila, protótipo da série, com a AChE (**Figura 17A**), podemos perceber que os substituintes ligados a piperidina se localizam numa região hidrofóbica do sítio onde temos resíduos de aminoácidos como a Tyr337 e Trp86. A benzila, em especial, poderia fazer interações de empilhamento  $\pi$ - $\pi$  com o resíduo aromático de triptofano (Trp86), assim como hidrofóbica com a tirosina

(Tyr337) através de seu metileno, fazendo com que houvesse de fato uma melhor interação e inibição da enzima. Adicionalmente, pela **Figura 17B**, podemos perceber que as interações polares nesta região do sítio praticamente inexistem, reforçando a hipótese da importância dos grupos lipofílicos nesta região.



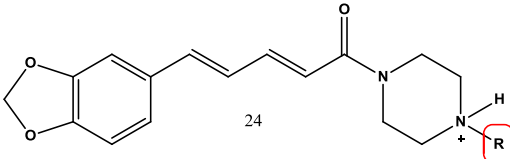
**Figura 17:** Representação das interações da donepezila com o interior da cavidade enzimática da AChE (PDB4EY7). (A) Representação das interações hidrofóbicas e (B) Representação das ligações de hidrogênio

Frente à butirilcolinesterase esses compostos apresentaram um comportamento um pouco diferente com  $CI_{50}$  variando de 18,2 a 94,2 $\mu$ M. Como podemos observar no composto **21b** ( $CI_{50}$ =94,2 $\mu$ M, R=CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>) a adição de uma metila ao substituinte “R” não se mostrou favorável a atividade mostrando que este aumento do volume estérico (grupo alifático) prejudicaria a atividade do derivado quando comparado com o composto **21a** ( $CI_{50}$ =78,7 $\mu$ M, R=CH<sub>3</sub>), diferentemente dos resultados frente a AChE. Observamos, no entanto, que a presença de anéis aromáticos foi de grande importância para as atividades inibitórias de ambas às enzimas estudadas, visto que os derivados **21c** e **21d** apresentaram também um aumento significativo da atividade frente à BChE ( $CI_{50}$ =22,0 $\mu$ M e  $CI_{50}$ =18,2 $\mu$ M). Este último (**21d**) foi o que melhor inibiu a BChE, com uma potência maior que a galantamina ( $CI_{50}$ =24,4 $\pm$ 2,84 $\mu$ M em BChE), um dos fármacos utilizados comercialmente para o tratamento da DA (BECHER et al., 2005; GEISSLER et al., 2010). Provavelmente os substituintes aromáticos devem estar fazendo interações diferenciadas daquelas frente à AChE, possivelmente não só com resíduos de aminoácidos hidrofóbicos, mas principalmente com resíduos aromáticos

presentes no sítio catalítico. Essa mudança poderia ser explicada pelo maior volume do sítio da BChE, onde os compostos poderiam assumir outra forma de interação com o mesmo.

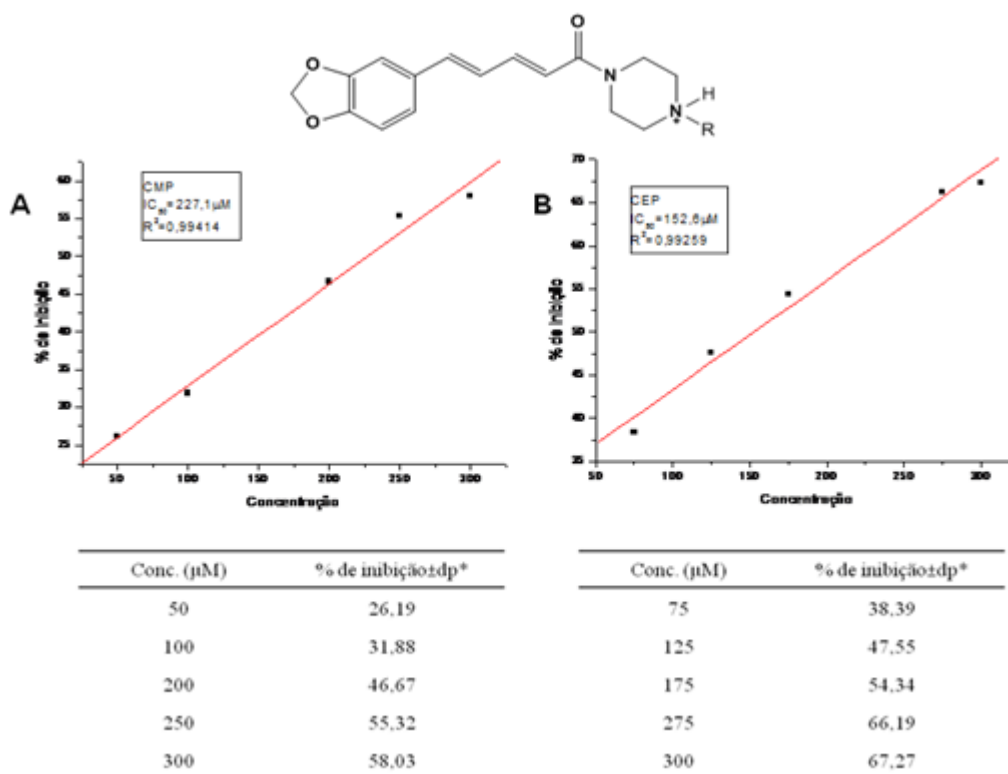
Também observando as interações polares da donepezila com o sítio catalítico da AChE (**Figura 17B**), percebemos que o nitrogênio básico de sua piperidina encontrava-se realizando uma ligação de hidrogênio via uma molécula de água no sítio que poderia ser perdida por conta da presença dos nitrogênios quaternários em nossos compostos. Com base nisso, sintetizamos os cloridratos das metil, etil e fenil-piperazinas (**24a-c**) procurando fazer com que os compostos continuassem solúveis em meio aquoso, facilitando assim o teste farmacológico, e ao mesmo tempo eliminando o grupo alquila ligado covalentemente que impedia a ligação de hidrogênio. Os resultados de inibição enzimática encontram-se na **tabela 28**, sendo que o cloridrato de fenil 1-piperazinil não pôde ser testado devido a problemas de solubilidade.

**Tabela 28:** Tabela com os valores de  $CI_{50}$  (AChE e BChE) dos compostos 24a -24c.

			
Composto	R	$CI_{50}(\mu M)$ AChE	$CI_{50}(\mu M)$ BChE
(24a)	-CH <sub>3</sub>	227,1	133,0
(24b)	-CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	152,6	78,0
(24c)	-Ph	-	-

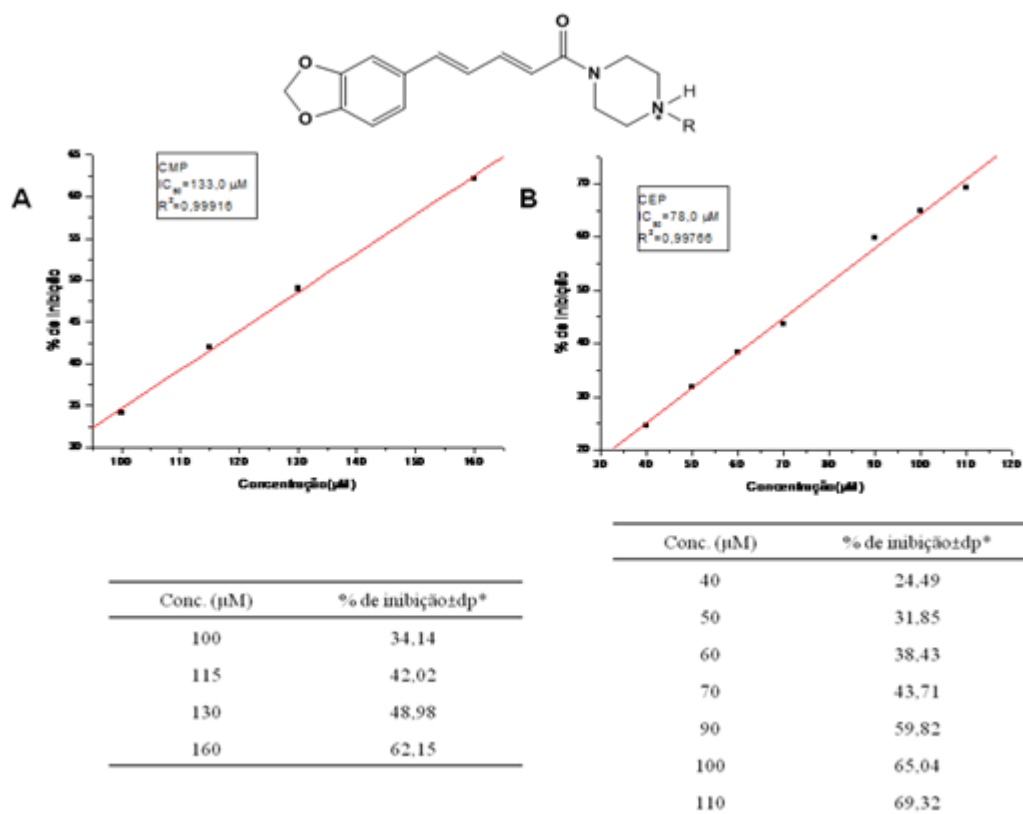
Podemos observar nos **gráficos 3 e 4** que a perda do volume estérico da metila dos sais de amônio quaternários na formação dos cloridratos, assim como da carga positiva fixa sobre o nitrogênio, não foi favorável para a atividade frente a ambas as enzimas estudadas. Em AChE ambos os cloridratos testados **24a** ( $CI_{50}=227,1\mu M$ ) e **24b** ( $CI_{50}=152,6\mu M$ ) tiveram uma perda significativa da atividade quando comparado com os respectivos sais de amônio **21a e b**. Esses compostos foram praticamente seis vezes menos ativo que os sais de alquil-amônio. Em BChE apesar desta substituição também não ter favorecido a atividade, a perda foi menos significativa onde o composto **24a** ( $CI_{50}=133,0\mu M$ ) foi apenas duas vezes menos ativo que o respectivo sal, enquanto o

composto **24b** ( $CI_{50}=78,0\mu\text{M}$ ) não demonstrou diferença significativa de atividade. Assim, aparentemente a formação da subunidade de amônio quaternário pela ligação covalente de uma metila se mostra mais favorável a atividade em nossa série.

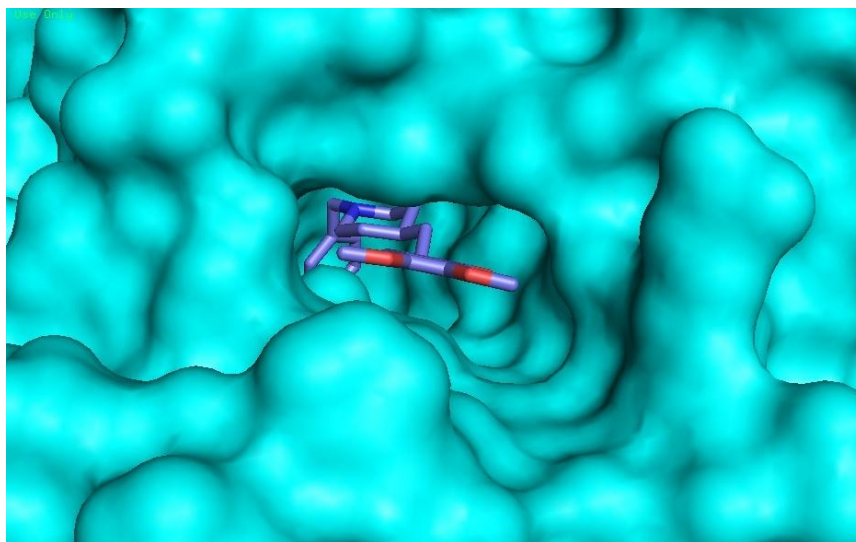


**Gráfico 3:** Gráfico de correlação de percentual de inibição enzimática de AChE (peixe elétrico tipo VI-S) x concentração dos compostos **24a-b** ( $\mu\text{M}$ ). (A)  $R=\text{CH}_3$  (**24a**); (B)  $R=\text{CH}_2\text{CH}_3$  (**24b**); Os experimentos foram realizados em triplicata. % inibição AChE piperina 13,5% ( $200\mu\text{M}$ ).

Os compostos saturados foram propostos, pois o acesso ao sítio catalítico da AChE se mostra como uma cavidade relativamente estreita oriunda na face externa, como demonstrado na **Figura 18**, onde se encontra a donepezila. Desta forma, a restrição conformacional ocasionada pelas duplas ligações dos compostos testados poderiam ser prejudiciais a atividade por impedir o melhor acomodamento dos inibidores.



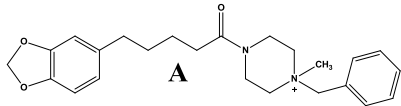
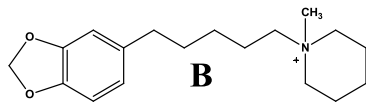
**Gráfico 4:** Gráfico de correlação de percentual de inibição enzimática de BChE (soro equino) x concentração dos compostos **24a-b** (µM). (A) R=CH<sub>3</sub> (**24a**); (B) R=CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub> (**24b**); Os experimentos foram realizados em triplicata. % inibição AChE piperina 13,5% (200µM).



**Figura 18:** Representação da cavidade de acesso ao sítio catalítico da AChE (PDB4EY7) com o ligante donepezila no seu interior.

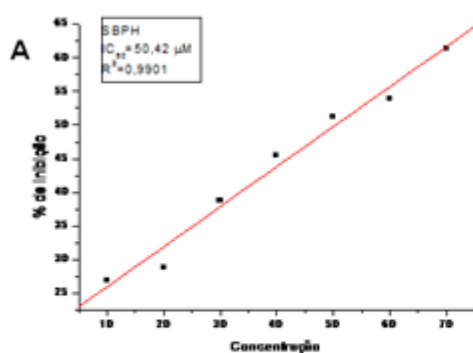
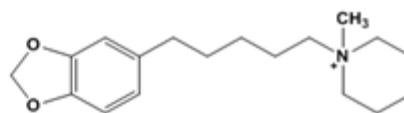
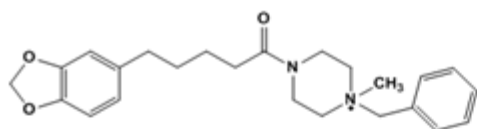
A avaliação farmacológica da série saturada (**22** e **23**) mostrou  $CI_{50}$  variando de 50,4 a 76,3  $\mu\text{M}$ , frente à AChE, e  $CI_{50}$  variando de 21,9 a 39,5  $\mu\text{M}$ , para a inibição da BuChE (**Tabela 29**).

**Tabela 29:** Tabela com os valores de  $CI_{50}$  (AChE e BChE) dos compostos 22 e 23.

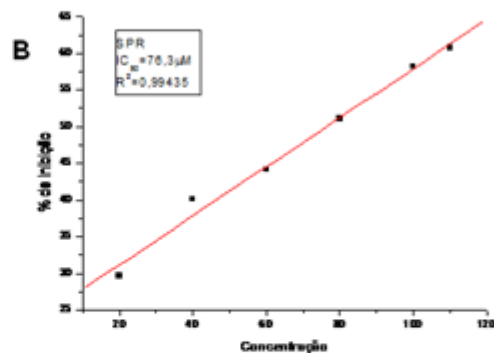
		
<b>Composto</b>	<b><math>CI_{50}(\mu\text{M})</math> AChE</b>	<b><math>CI_{50}(\mu\text{M})</math> BChE</b>
(A)23	76,3	39,5
(B)22	50,4	21,9

No entanto, como observamos nos **Gráficos 5** e **6**, a geração de maior flexibilidade conformacional não se mostrou favorável na inibição da AChE visto que o composto **23** ( $CI_{50}= 50,0\mu\text{M}$ ) quando comparado com o composto insaturado **21c** ( $CI_{50}= 13,8\mu\text{M}$ ) apresentou uma perda razoável de aproximadamente quatro vezes em termos de potência. Na BuChE foi observado que a flexibilidade conformacional não influenciou na atividade inibitória quando comparado os compostos **23** ( $CI_{50}= 21,9 \mu\text{M}$ ) e **21c** ( $CI_{50}= 22,0 \mu\text{M}$ ). O composto **22** é diferenciado do restante dos compostos da nossa série, pois queríamos verificar também se a retirada da carbonila amídica seria importante para a atividade, esse composto apresentou uma atividade razoável frente a AChE ( $CI_{50}= 39,1 \mu\text{M}$ ), mas o mesmo não foi observado em BChE ( $CI_{50}= 76,3 \mu\text{M}$ ). Possivelmente essa melhor atividade frente a AChE se deve a maior flexibilidade da molécula fazendo com que haja uma adaptação melhor a cavidade do sítio catalítico da AChE que é menor que o da BChE.



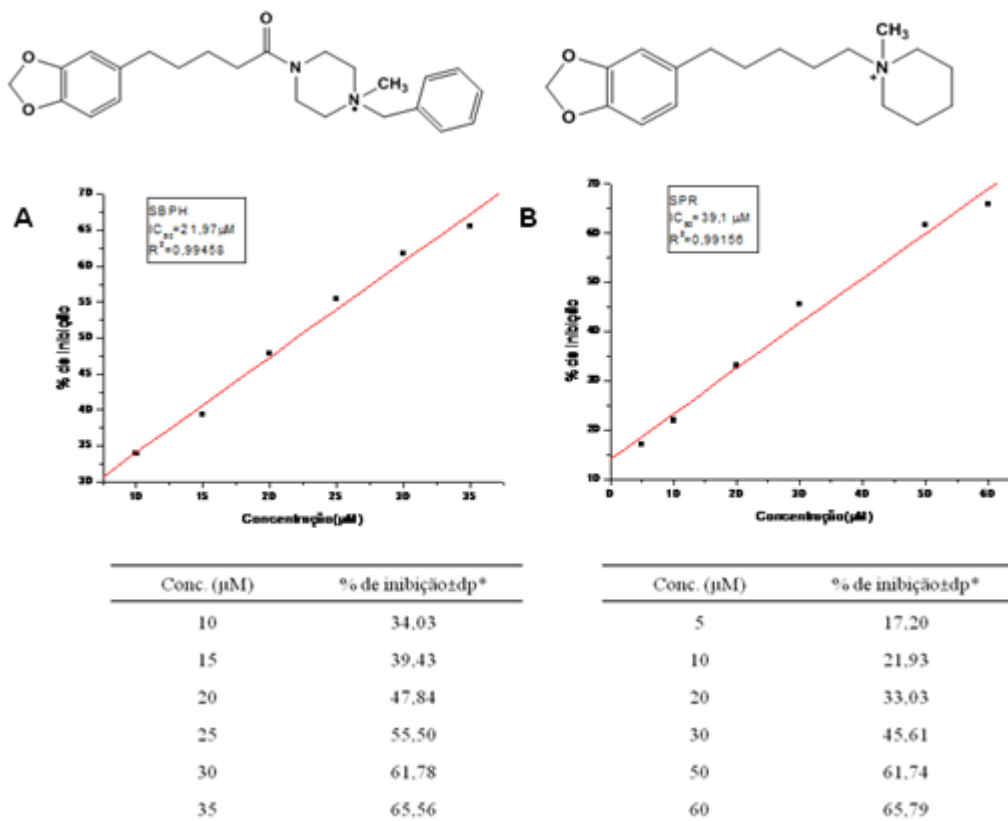


Conc. (µM)	% de inibição ± dp*
10	26,83
20	28,80
30	38,70
40	45,57
50	51,31
60	53,89
70	61,45



Conc. (µM)	% de inibição ± dp*
20	29,64
40	40,07
60	44,10
80	51,07
100	58,23
110	60,78

**Gráfico 5:** Gráfico de correlação de percentual de inibição enzimática de AChE (peixe elétrico tipo VI-S) x concentração dos compostos **22** e **23** (µM). (A) (**23**); (B) (**22**); Os experimentos foram realizados em triplicata. % inibição AChE piperina 13,5% (200µM).



**Gráfico 6:** Gráfico de correlação de percentual de inibição enzimática de BChE (soro equino) x concentração dos compostos **22** e **23** ( $\mu M$ ). (A) (**22**); (B) (**23**); Os experimentos foram realizados em triplicata. % inibição AChE piperina 13,5% (200 $\mu M$ ).

#### 4.7.2. Cinética Enzimática

Após as análises de inibição enzimática dos compostos sintetizados, houve a necessidade de se identificar a natureza desta inibição. Diferentemente da donepezila, as amidas sintetizadas apresentavam um nitrogênio quaternário que poderia realizar interações de maneira diferenciada do protótipo. Segundo alguns autores (GHOSAL *et al*, 1972; GEISLER *et al*, 2010), a carga gerada neste nitrogênio poderia mimetizar o grupamento colina do substrato acetilcolina, conferindo uma inibição do tipo competitiva, ou seja, haveria uma competição pelo sítio catalítico, modo este de interação diferente da donepezila, que é um inibidor não competitivo (TORRES,2012).

Com este intuito, selecionamos os compostos **21d** e **21c** para analisar a cinética enzimática em BChE porque foram os compostos que apresentaram melhores atividades

inibitórias e os compostos **21c** e **21b** para análise da cinética em AChE pois o composto **21c** apresentou a melhor atividade inibitória em AChE e o composto **21b** porque além de apresentar uma das melhores atividades frente a AChE também queríamos avaliar através da cinética enzimática se seu substituinte R alquil poderia mudar o mecanismo de interação com o sítio catalítico.

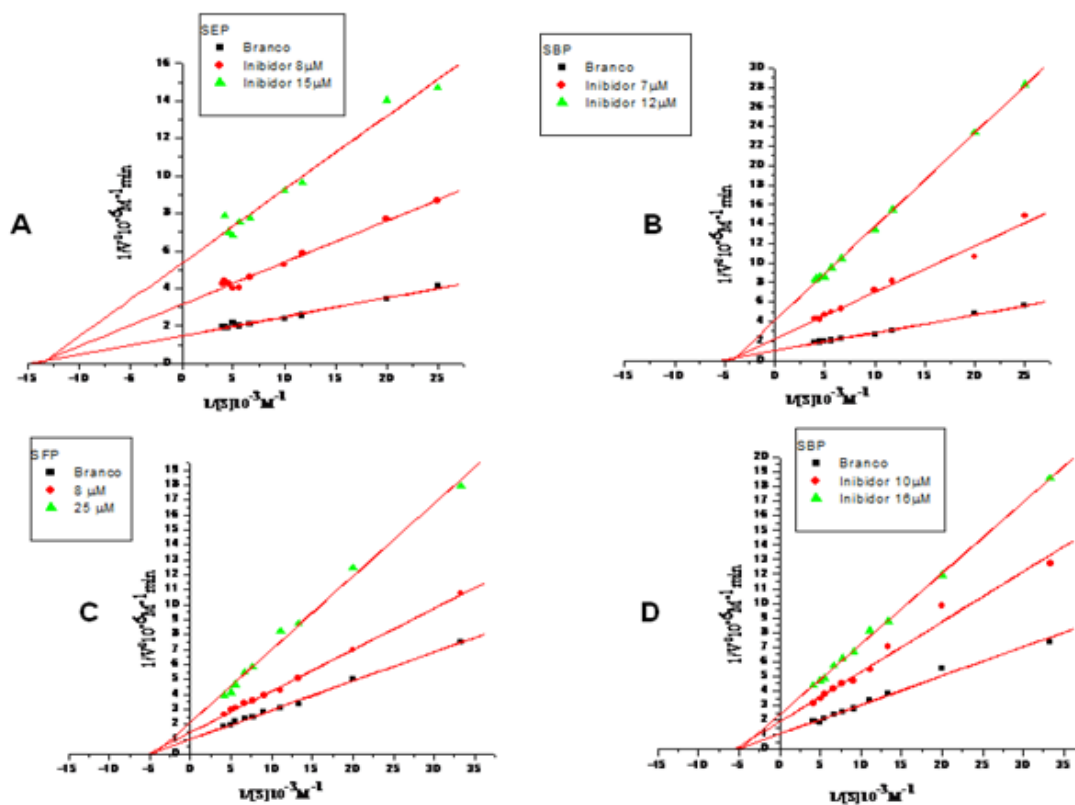
A cinética enzimática foi realizada segundo o método de Ellman já descrito na parte experimental deste trabalho (FRANCIS *et al.*, 1999; BAYNES, 1991). Um exemplo da metodologia de cálculo utilizado para avaliação da cinética enzimática pode ser observado na **Tabela 21**, que mostra os valores de  $1/V_0$  e  $1/[S]$  obtidos para o composto **21c**. Com estes valores, confeccionou-se então o gráfico de Lineweaver-Burk (LINEWEAVER & BURK, 1934).

**Tabela 21:** Valores de  $1/V^\circ$  e  $1/[S]$  para o composto **21c** como demonstrativo de cálculo da cinética enzimática de AChE.

$1/[S]$	$1/V^\circ \pm \sigma^*$ (Controle)	$1/V^\circ(7\mu M) \pm \sigma^*$	$1/V^\circ(12\mu M) \pm \sigma^*$
25,00	5,590 $\pm$ 0,003	14,827 $\pm$ 0,004	28,301 $\pm$ 0,004
20,00	4,794 $\pm$ 0,018	10,613 $\pm$ 0,050	23,376 $\pm$ 0,001
11,76	3,066 $\pm$ 0,006	8,108 $\pm$ 0,004	15,490 $\pm$ 0,003
10,00	2,613 $\pm$ 0,034	7,171 $\pm$ 0,007	13,412 $\pm$ 0,000
6,66	2,251 $\pm$ 0,011	5,309 $\pm$ 0,010	10,440 $\pm$ 0,004
5,649	2,036 $\pm$ 0,008	4,934 $\pm$ 0,001	9,473 $\pm$ 0,004
5,00	1,920 $\pm$ 0,014	4,668 $\pm$ 0,016	8,579 $\pm$ 0,008
4,545	1,901 $\pm$ 0,015	4,225 $\pm$ 0,006	8,547 $\pm$ 0,000
4,166	1,809 $\pm$ 0,016	4,269 $\pm$ 0,002	8,426 $\pm$ 0,002
4,00	1,888 $\pm$ 0,030	4,255 $\pm$ 0,002	8,226 $\pm$ 0,007

$\sigma^*$ =desvio padrão

O **gráfico 7** mostra as avaliações cinéticas relativas aos compostos **21b**, **21c**, em AChE e **21d** e **21c** em BChE, ambos em duas concentrações.



**Gráfico 7:** Gráfico de Lineweaver-Burk para a Cinética de inibição de AChE pelos compostos **21b** (A) e **21c** (B) e para cinética de inibição de BChE pelos compostos **21d** (C) e **21c** (D).

Com base na análise dos gráficos de Lineweaver-Burk dos compostos testados neste estudo cinético, pode-se observar que todos os compostos agem como inibidores não competitivos, que são caracterizados pela interação do inibidor em um sítio próprio de ligação, e não no sítio ativo da enzima. Diferentemente do descrito na literatura (GHOSAL *et al*, 1972; GEISSLER *et al*, 2010), observou-se que a carga positiva destes derivados não mimetiza a subunidade colina dos substratos endógenos, visto que não há uma competição diretamente com o substrato pelo sítio catalítico da enzima.

## 5. Conclusão

O planejamento estrutural da série de amidas derivadas da piperina (**1**) se mostrou bem sucedido, uma vez que os compostos sintetizados apresentaram maior potência de inibição da AChE ( $CI_{50}$  de 13,8 à 42,8 $\mu$ M) comparado ao protótipo natural **1** que só inibiu a atividade enzimática em 13,5% à 200 $\mu$ M.

De modo geral, a geração de carga positiva na série de derivados das aminas quaternárias levou a um ganho considerável de potência devido, provavelmente, às diferenças de interações entre estes e a enzima, uma vez que, a presença de cargas nos derivados pode levar a interações iônicas, o que não ocorreria na piperina. Adicionalmente, foi visto que quando esta carga era fixa, através da metilação das aminas, os compostos se apresentavam com maior potência comparativamente aos sais de amônio quaternários oriundos da formação dos cloridratos, demonstrando a importância do grupamento metila e seu caráter hidrofóbico na interação com a enzima.

A potência dos sais de amônio quaternários em AChE parece também estar relacionada ao volume e à natureza estereo-eletrônicas dos grupos acrescentados à molécula. Como demonstrado, o aumento do volume e da lipofilicidade aumenta consideravelmente a potencia inibitória. No entanto, em BChE essa potência parece estar mais relacionada com o caráter aromático dos substituintes, visto que apenas o aumento do volume estérico, derivado metilado **21a** para o etilado **21b**, levou a uma perda na potência inibitória ( $CI_{50} = 78,8\mu$ M e 94,2  $\mu$ M, respectivamente).

A flexibilidade conformacional gerada pelos compostos saturados não se mostrou favorável à inibição da AChE. No entanto, em BChE foi observado que essa flexibilidade não influencia a atividade inibitória, provavelmente devido às diferenças de volume entre as colinesterases, o que provavelmente permite que os mesmos se acomodem de maneira diferente.

No estudo cinético observamos que os compostos testados agem como inibidores não competitivos, ou seja, interagem com sítios da AChE e BChE diferentes do sítio de ligação dos substratos naturais, indicando que o amônio quaternário nesta série de derivados não leva a uma mimetização da subunidade colina da ACh e BuCh.

Finalmente, o processo sintético de obtenção dos compostos se mostrou exequível e reprodutível e todos os compostos obtidos foram totalmente caracterizados por técnicas de RMN  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  e IV.

Os resultados obtidos neste trabalho somam-se aos anteriormente descritos pelo nosso grupo, evidenciando a potencialidade da amida natural piperina (**1**) como precursora de novas moléculas aplicáveis à modulação de fenômenos biológicos, especificamente neste trabalho a inibição de colinesterases.

## 6. Referências Bibliográficas

BAYNES, J. W. **Bioquímica médica**. Tradução da 2ª Edição. Rio de Janeiro: Mosby Elsevier, 1991. ISBN: 978-85-352-2298-2.

BECHER, P. G.; BEUCHAT, J.; GADEMANN, K.; JÜTTNER, F. Nostocarboline: Isolation and Synthesis of a New Cholinesterase Inhibitor from *Nostoc* 78-12A. **Journal of Natural Products**. v. 68, p. 1793-1795, 2005.

BIRKS, J.; HARVEY, R. J. Donepezil for dementia due to Alzheimer's disease. **Cochrane Database of Systematic Reviews**. (1), CD001190, 2006.

BOURNE, Y.; RADIC, Z.; KOLB, H. C.; SHARPLESS, K. B.; MARCHOT, P. Structural insights into conformational flexibility at the peripheral site and within the active center gorge of AChE. **Chemico-Biological Interactions**. v. 157, p. 159-165, 2005.

BRODY, D. E.; BRODY, A. R. **As Sete Maiores Descobertas Científicas da História** Parte 2, Cia das Letras, São Paulo, 2000.

CACABELOS, R.; TAKEDA, M.; WINBLAD, B. The glutamatergic system and neurodegeneration in dementia: preventive strategies in Alzheimers disease. **International Journal of Geriatric Psychiatry**. v. 14, p. 3-47, 1999.

CANEPA, F. G.; PAULING, P.; SORUM, H. Structure of acetylcholine and other substrates of cholinergic systems. **Nature**. v. 210, p. 907, 1966.

CARAMELLI, P.; CHAVES, M. L. F.; Engelhardt E, *et al.* Effects of galantamine on attention and memory in Alzheimers disease measured by computerized neuropsychological tests: results of the Brazilian Multi-Center galantamine study (GAL-BRA-01). **Arquivos de Neuro-Psiquiatria**. v. 62, p. 379-384, 2004.

CHATONNET, A.; LOCKRIDGE, O. Comparison of butyrylcholinesterase and acetylcholinesterase. **The Biochemical Journal**. Londres, v. 260, n.3, p. 625-634, 1989.

CHONPATHOMPIKUNLERT, P; WATTANATHORN, J; MUCHIMAPURA, S. Piperine, the main alkaloid of Thai black pepper, protects against neurodegeneration and cognitive impairment in animal model of cognitive deficit like condition of Alzheimer's disease. **Food And Chemical Toxicology**. v.48 , p.798-802, 2010.

COSTA, P. R. R.; Produtos naturais como ponto de partida para a descoberta de novas substâncias bioativas: Candidatos a fármacos com ação antiofídica, anticâncer e antiparasitária. **Revista virtual de química**. v.1, n.1, p. 58-66. 2009.

CRI - CENTO DE REFERÊNCIA DO IDOSO DO HC/UFMG. Dados coletados com base nas informações do DATASUS (Sistema de Informações Ambulatoriais do SUS - (SAI/SUS)), e pela Gerência de Medicamentos Excepcionais (Superintendência de Assistência Farmacêutica/SES/MG), 2008.

DESCARRIES, L.; LISIGER, V.; STERIADE M. Diffuse transmission by acetylcholine in the CNS. **Progress in Neurobiology**. v. 53, p. 603-625, 1997.

DOWNEY, D. Pharmacologic management of Alzheimer Diseases. **Journal of Neuroscience Nursing**. v. 40, n.1, p. 55-59, 2008.

DUARTE M. L. R.; ALBUQUERQUE F. C. Sistema de Produção da Pimenteira-do-reino, Embrapa Amazônia Oriental, 2005. Disponível em <<http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Pimenta/PimenteiradoReino/paginas/importancia.htm>> acesso em 06/03/2013.

EKHOLM, M. Predicting relative binding free energies of substrate and inhibitors of acetylcholin- and butyrylcholinesterases. **Journal of Molecular Structure-Theochem**. v. 572, p. 25-34, 2001

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

FARLOW, M. R. Effective pharmacologic management of Alzheimer's disease. **American Journal of Medicine**. v. 120, p. 388-397, 2007.

FERREIRA, W. S.; FRANKLIM, T. N.; LOPES, N. D.; DE LIMA, M. E. F. Piperina, seus Análogos e Derivados: Potencial como Antiparasitários. **Rev. Virtual Quim**. v.4, n. 3, p. 208-224. Data de publicação na Web: 2 de julho de 2012

FERREIRA, W. S.; FREIRE-DE-LIMA, L.; SARAIVA, V. B.; ALISSON-SILVA, F.; MENDONÇA-PREVIATO, L.; PREVIATO, O.; ECHEVARRIA, A.; DE LIMA, M. E. F. Novel 1,3,4-thiadiazolium-2-phenylamine chlorides derived from natural piperine as trypanocidal agents: Chemical and biological studies. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**. v. 16, pág. 2984–2991, 2008.

FERREIRA, W.S., **Utilização da piperina como protótipo na síntese de novos antichagásicos da classe das 1,3,4-tiadiazólio-2-fenilaminidas**. Dissertação (Mestre em Ciências, Química Orgânica) – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro – Seropédica, Rio de Janeiro. 197 p. 2006.

- FERRI, C. P.; PRINCE, M.; BRAYNE, C.; BRODATY, H.; FRATIGLIONI, L.; GANGULI, M.; HALL, K.; HASEGAWA, K.; HENDRIE, H.; HUANG, Y.; JORM, A.; MATHERS, C.; MENEZES, P. R.; RIMMER, E.; SCAZUFCA, M. **The Lancet**. 366, 2112, 2005.
- FRAGA, A. S. **Acetilcolinesterase, butirilcolinesterase, carboxilesterase e a resistência de peixes neotropicais aos pesticidas organofosforados**. Tese (Doutorado em biociências). Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Rio de Janeiro - Rio de Janeiro, 2010.
- FRAGA, C. A. M. **Síntese e Avaliação Farmacológica de Novos Derivados Prostaciclina-miméticos**. Dissertação (Mestrado em Química Orgânica)-IQ, Universidade Federal do Rio de Janeiro. Rio de Janeiro – Rio de Janeiro, 1994.
- FRANCIS, P. T.; PALMER, A. M.; SNAPE, M.; WILCOCK, G. K. J. The cholinergic hypothesis of Alzheimer's disease: a review of progress. **Journal of Neurology Neurosurgery and Psychiatry**. v. 66, p. 137-147, 1999.
- FRANKLIM, T. N.; FREIRE-DE-LIMA, L.; DINIZ, J. N. S.; PREVIATO, J. O.; CASTRO, R. N.; MENDONÇA-PREVIATO, L.; DE LIMA, M. E. F. Design, Synthesis and Trypanocidal Evaluation of Novel 1,2,4-Triazoles-3-thiones Derived from Natural Piperine. **Molecules**. v. 18, pág. 6366-6382, 2013.
- FREITAS, E. V.; *et al.* **Tratado de Geriatria e Gerontologia**. Guanabara Koogan, 2002.
- GEISSLER, T.; BRANDT, W.; PORZEL, A.; SCHLESNIZIG, D.; KEHLEN, A.; WESSJOHANN, L.; ARNOLD, N. Acetylcholinesterase inhibitors from the toadstool *Cortinarius infractus*. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**. v. 18, p. 2173-2177, 2010.
- GHOSAL, S.; BHATTACH, S. K.; MEHTA, R. Naturally occurring and synthetic beta-carbolines as cholinesterase inhibitors. **Journal of Pharmaceutical Sciences**. v. 61, n. 5, p. 808, 1972.
- GIACOBINE, E. In: Giacobin, E. (ed.), Cholinesterases and cholinesterase inhibitors. p. 181-226, 2000.
- GOTTI, C.; CLEMENT, F. Neuronal nicotinic receptors: from structure to pathology. **Progress in Neurobiology**. v. 74, p. 363-396, 2004.
- GREIG, N. H.; UTSUKI, T.; INGRAM, D. K. Selective butyrylcholinesterase inhibition elevates brain acetylcholine, augments learning and lowers Alzheimer beta-amyloid peptide in rodent. **Proceedings of the national academy of sciences of the united states of America**. v. 102, p. 17413-17418, 2005.
- HAASS, C.; SCHLOSSMACHER, M. G.; HUNG, A. Y.; VIGO, C. P.; MELLON, A.; OSTASZEWSKI, B. L.; LIEBERBURG, I.; KOO, E. H.; SCHENK, D.; TELOW, D. B.; SELKOE, D. J. Amyloid  $\beta$ -peptide is produced by cultured cells during normal metabolism. **Nature**. v.359, p. 322-325, 1992.



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.

HARTMANN, J.; KIEWERT, C.; DUYSSEN, E. G. Excessive hippocampal acetylcholine levels in acetylcholinesterase-deficient mice are moderated by butyrylcholinesterase activity. **Journal of Neurochemistry**. v. 100, p. 1421-1429, 2007.

HARVEY, A. Strategies for discovery drugs from previously unexplored natural products. **Drug Discovery Today**, v. 5, n. 7, p.297, 2000.

IKAN, R. In: Natural Products: A Laboratory Guide, Academic Press, 2nd Edition: 233-238, 1991.

KATALINIC, M.; KUSAK, G.; DOMACINOVIC, J.; SINKO, G.; JELIC, D.; ANTOLOVIC, R.; DOVARIK, Z. Structural aspects of flavonoids as inhibitors of human butyrylcholinesterase. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 45, p. 186-192, 2010.

KAWASHIMA, K.; FUJII, T. The lymphocytic cholinergic system and its contribution to the regulation of immune activity. **Life Sciences**. v. 74, p. 675- 696, 2003.

LEE, S. A.; HONG, S. S.; HAN, X. H.; HWANG, J. S.; OH, G. J.; LEE, K. S.; LEE, M. K.; HWANG, B.Y.; RO, J. S. Piperine from the fruits of *Piper longum* with inhibitory effect on monoamine oxidase and antidepressant-like activity. **Chemistry Pharmacology Bull.** v.53, p. 832–835, 2005.

LEVIN, E.D., SIMON, B.B. Nicotinic acetylcholine involvement in cognitive function in animals. **Psychopharmacology**. v.138, p.217-230, 1998.

LINEWEAVER, H. BURK, D. The determination of enzyme dissociation constants. **Journal American Chemistry Society**. v. 56, p. 658-666; 1934.

LOPES, N. D. **síntese de derivados da amida natural piperina e avaliação da atividade inseticida contra larvas de *aedes aegypti***. Dissertação (Mestre em ciências, Química Orgânica) – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro – Seropédica, Rio de Janeiro. 2011.

MARCH, J. **Advanced Organic Chemistry-Reactions: Mecanism and Struture**. John Willey & Sons, 3<sup>o</sup>ed.: 388, 437, 438, 1095, 1099, 1100 e 1101, 1985.

MASSOULIÉ, J.; PEZZEMENTE, L.; BON, S.; KREJCI, S.; VALLETTE, F. M. Molecular and cellular biology of cholinesterases. **Progress in Neurobiology**. v. 41, p. 31-91, 1993.

MESULAM, M. M.; GUILLOZET, A. ; SHAW, P. Acetylcholinesterase knock out sestablish central cholinergic pathways and can use butyrylcholinesterase to hydrolyze acetylcholine. **Neuroscience**. v. 110, p. 627-639, 2002.

MIKAMI, L. R. **Variabilidade dos Exons 2 e 4 do gene BChE e sua relação com a atividade da butirilcolinesterase.** Curitiba, Tese (Doutorado em ciências biológicas) – Área de genética. Universidade Federal do Paraná. Curitiba, 2005.

MILLARD, C. B.; BROOMFIELD, C. A. A computer model of glycosylated human butyrylcholinesterase. **Biochemical and Biophysical Research Communications.** San Diego, v. 189, p. 1280-1286, 1992.

MÖUSÄ, P.K.; MARTTILA, R. J.; RINNE, U. K. Survival and cause of death in Alzheimer's disease and multi-infarct dementia. **Acta Neurological Scandinavica.** v. 74, n. 2, p. 103-107, 1986.

MUDHER, A.; LOVESTONE, S. Alzheimer's disease – do tauists and baptists finally shake hands? **Trends in Neurosciences.** v. 25, n. 1, p. 22-25, 2002.

NACHMANSOHN, D.; ROTHENBERG, M. A. Studies on cholinesterase .1. On the specificity of the enzyme in nerve tissue. **Journal of Biological Chemistry.** v. 158, p. 653-666, 1945.

NACHMANSOHN, D.; WILSON, I. B. The enzymic hydrolysis and synthesis of acetylcholine. **Advances in Enzymology and Related Subjects of Biochemistry.** v. 12, p. 259-339, 1951.

NIKOLAEV, A.; MCLAUGHLIN, T.; O'LEARY, D.; TESSIER-LAVIGNE, M. APP binds DR6 to trigger axon pruning and neuron death via distinct caspases. **Nature.** v. 457, p. 981-990, 2009.

ORHAN, I.; KARTAL, M.; TOSUN, F.; SENER, B. Screening of Various Phenolic Acids and Flavonoid Derivatives for Their Anticholinesterase Potential. **Zeitschrift für Naturforschung,** v. 62, p. 829-832, 2007.

PATOCKA, J.; KUCA, K.; JUN, D. Acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase - important enzymes of human body. **Acta Medica,** Hradec Králové, v. 47, n.4, p.215-228, 2004.

PENG, L. F. Acetylcholinesterase inhibition by territrems B derivatives. **Journal Natural Products.** v.58, p. 857-862, 1995.

RANG, H.P.; DALE, M.M.; RITTER, J.M. **Farmacologia,** 5ª edição. Elsevier. p. 920, 2004. ISBN: 8535213686.

RIBEIRO, T. S., **Transformações químicas no alcalóide natural piperina e avaliação da atividade tóxica sobre *Trypanosoma cruzi*.** Dissertação (Mestre em Ciências, Química Orgânica) – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro – Seropédica, Rio de Janeiro. 2004.

RIBEIRO, T. S.; FREIRE-DE-LIMA, L.; PREVIATO, J. O.; MENDONÇA-PREVIATO, L.; HEISE, N.; DE LIMA, M. E. F. Toxic effects of natural piperine and

its derivatives on epimastigotes and amastigotes of *Trypanosoma cruzi*. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**. v.14, n. 13, pág. 3555–3558, 2004.

ROGERS, S.L.; DOODY, R.S.; MOHS, R. C. Friedhoff LT and the Donepezil Study Group. Donepezil improves cognition and global function in Alzheimer disease: a 15-week, double blind double blind, placebo-controlled study. **Archives of Internal Medicine**. v.158, p.1021-1031, 1998.

SAYEG, Norton (Ed.). **Doença de Alzheimer**. Disponível em: <www.alzheimermed.com.br>. Acesso em: 22 fev. 2013.

SCHMIDT, B.; RIBNICK, D. M.; POULEV, A.; LOGENDRA, S.; CEFALU, W.T.; RASKIN, I. **Metabolism, Clinical and Experimental**, 57, S3 [CrossRef]; 2008.

SCHUMACHER, M.; CAMP, S.; MAULET, Y.; NEWTON, M.; MACPHEEQUIGLEY, K.; TAYLOR, S.S.; FRIEDMAN, T.; TAYLOR, P. Primary structures of *Torpedo-californica* acetylcholinesterase deduced from its cDNA sequence. **Nature**. v. 319, p. 407-409, 1986.

SEMLER, U., GROSS, G. G. Distribution of piperine in vegetative parts of *Piper nigrum*. **Phytochemistry**. v. 27, n.5, p. 1566-1567, 1988.

SILMAN, I.; HAREL, M.; AXELSEN, P.; RAVES, M.; SUSSMAN, J. L. Three-dimensional structure of acetylcholinesterase and of its complexes with anticholinesterase agents. **Biochemical Society transactions**. v. 22, p.745-749, 1994.

SOARES, E. S. Ácidos fenólicos como antioxidantes. **Rev. Nutr.**, v. 15, p. 71-81, 2002.

SOREQ, H.; BEN-AZIZ, R.; PRODY, C.A.; SEIDMAN, S.; GNATT, A.; NEVILLE, L.; LIEMAN-HURWITZ, J.; LEV-LEHMAN, E.; GINZBERG, D.; LIPIDOT-LIFSON, Y. Molecular cloning and construction of the coding region for human acetylcholinesterase reveals a G + C-rich attenuating structure. **Proceedings of the National Academy of Science**. v. 87, p. 9688-9692, 1990.

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

TAYLOR, P.; BROWN, J, H. Acetylcholine. In: Siegel, G. J., Agranoff, B. W., Albers, R. W., Molinoff, P. B. (Ed). *Basic Neurochemistry: Molecular, Cellular, Medical Aspects*. **Lippincott-Raven Publishers Philadelphia**, p. 214-242, 1999.

TAYLOR, P.; RADIC, Z. Cholinesterases: from genes to proteins. **Annual Review Pharmacology and Toxicology**. v. 34, p. 281-320, 1994.

TERRY, A. V. J; BUCCAFUSCO, J. J. **Journal Pharmacology Exp.ther.**, v. 306, p. 821, 2003.

TORRES, J. M., LIRA, A. F.; SILVA, D. R.; GUZZO, L. M.; SANT'ANNA, C. M. R.; KÜMMERLE, A. E.; RUNJANEK, V. M. R. Structural insights into cholinesterases

inhibition by harmane b-carbolinum derivatives: A kinetics – molecular modeling approach. **Phytochemistry**, v. 81, p. 34-40, 2012.

VAN DER ZEE, E. A.; LUITEN, P. G. M. Muscarine acetylcholine receptors in the hippocampus, neocortex and amygdala: a review of immunocytochemical localization in relation to learning and memory. **Progress and Neurobiology**. v. 58, p. 409-471, 1999.

VIEGAS, C. J.; DA SILVA, V. B.; FURLAN, M.; ALBERTO, C. M. F.; BARREIRO, E. J. Produtos Naturais como candidatos a fármacos úteis no tratamento do Mal de Alzheimer. **Química Nova**, v. 27, n. 4, p. 655-660, 2004.

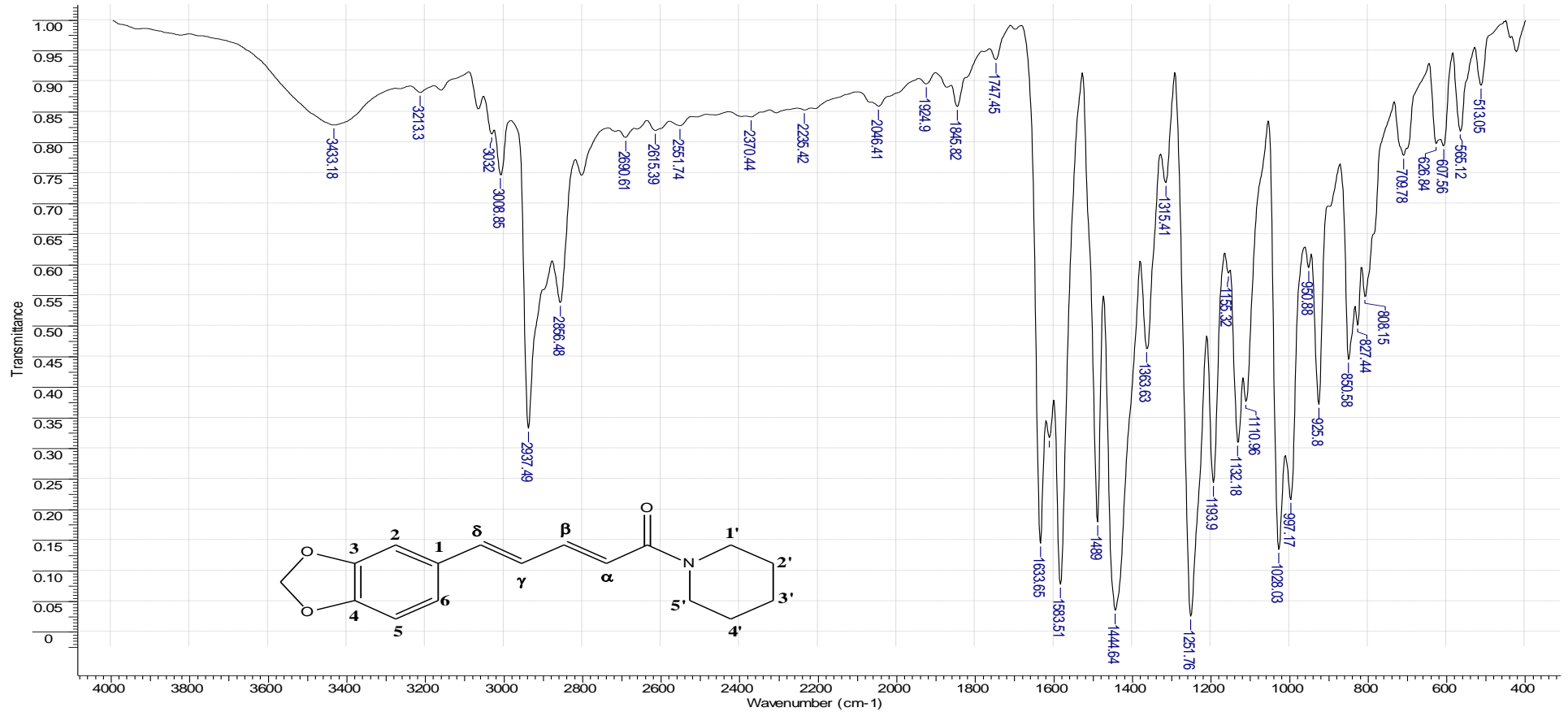
WALDEMAR, G.; DUBOIS, B.; EMER, M. The Category Cued Recall test in very mild Alzheimer's disease: discriminative validity and correlation with semantic memory functions. **European Journal of Neurology**. v. 14, n. 1, p. 102-108, 2007.

WATTANATHORN, J; CHOPATHOMPIKUNLERT,P; MUCHIMAPURA, S; PRIPREM, A ; TANKAMNERDTHAI, O; Piperine, the potencial functional food for mood and cognitive disorders. **Food Chemistry Toxicological**. v. 46 n.9, p. 3106 – 3110,2008.

ZIMMERMAN, G.; SOREQ, H. Termination and beyond: acetylcholinesterase as a modulator of synaptic transmission. **Cell and Tissue Research**. v. 326, p. 655–669, 2006.

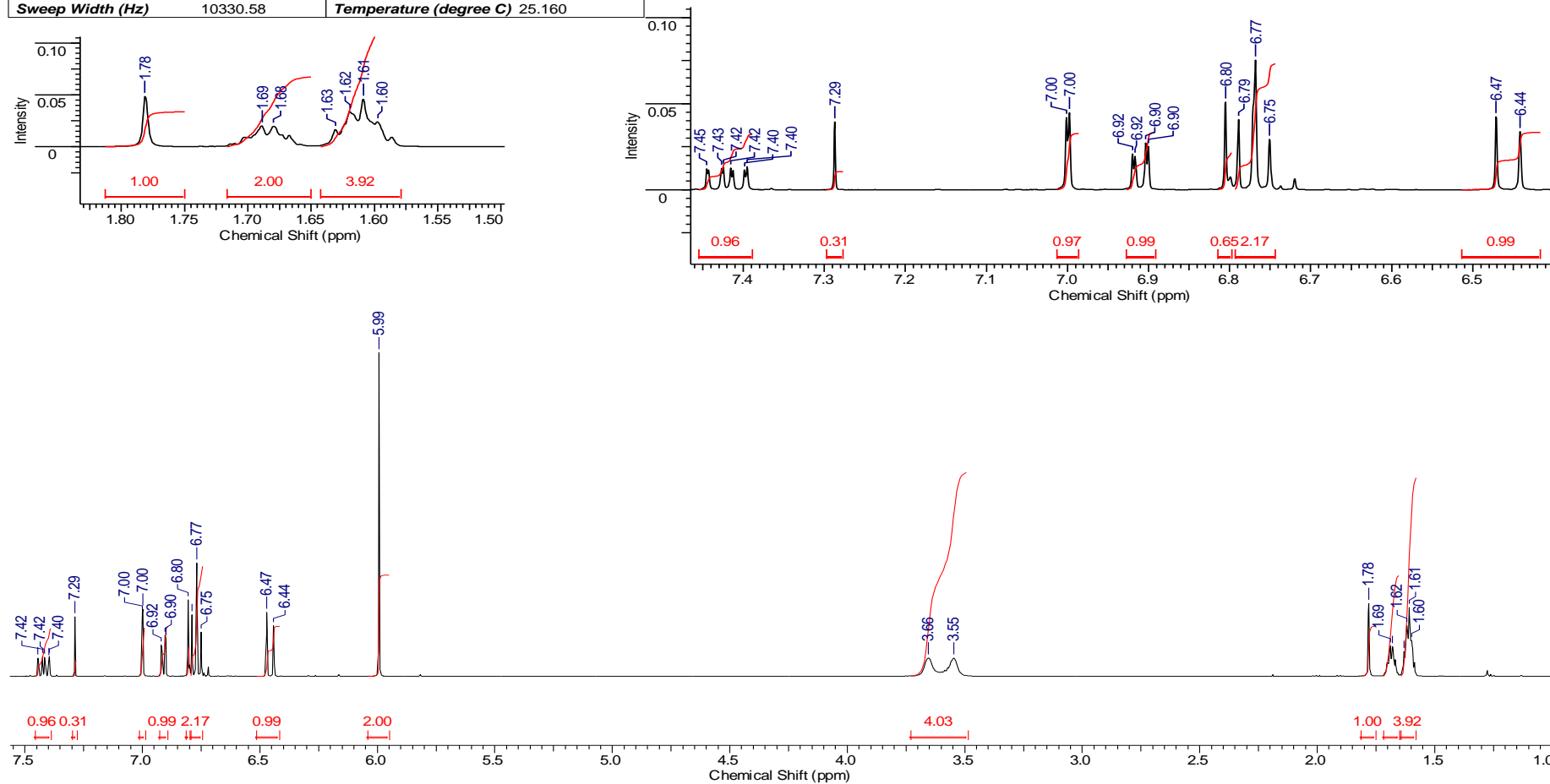
## **7. Anexos**

<b>Title</b>	PIPERINA - SABRINA - PROF. ARTHUR		<b>File Name</b>	C:\USERS\MATHEUS FERREIRA\DOWNLOADS\PIPERINA - SABRINA - PROF. ARTHUR.0			
<b>Date Stamp</b>	03/04/2013 10:49:18.049 (GMT-3)		<b>Date</b>	29 Apr 2013 14:39:42	<b>Technique</b>	Infrared	
<b>Instrument</b>	VERTEX 70	<b>Spectral Region</b>	IR	<b>X Axis</b>	Wavenumber (cm-1)	<b>Y Axis</b>	Transmittance
<b>Spectrum Range</b>	399.2520 - 3996.3760	<b>Points Count</b>	1866	<b>Data Spacing</b>	1.9288		



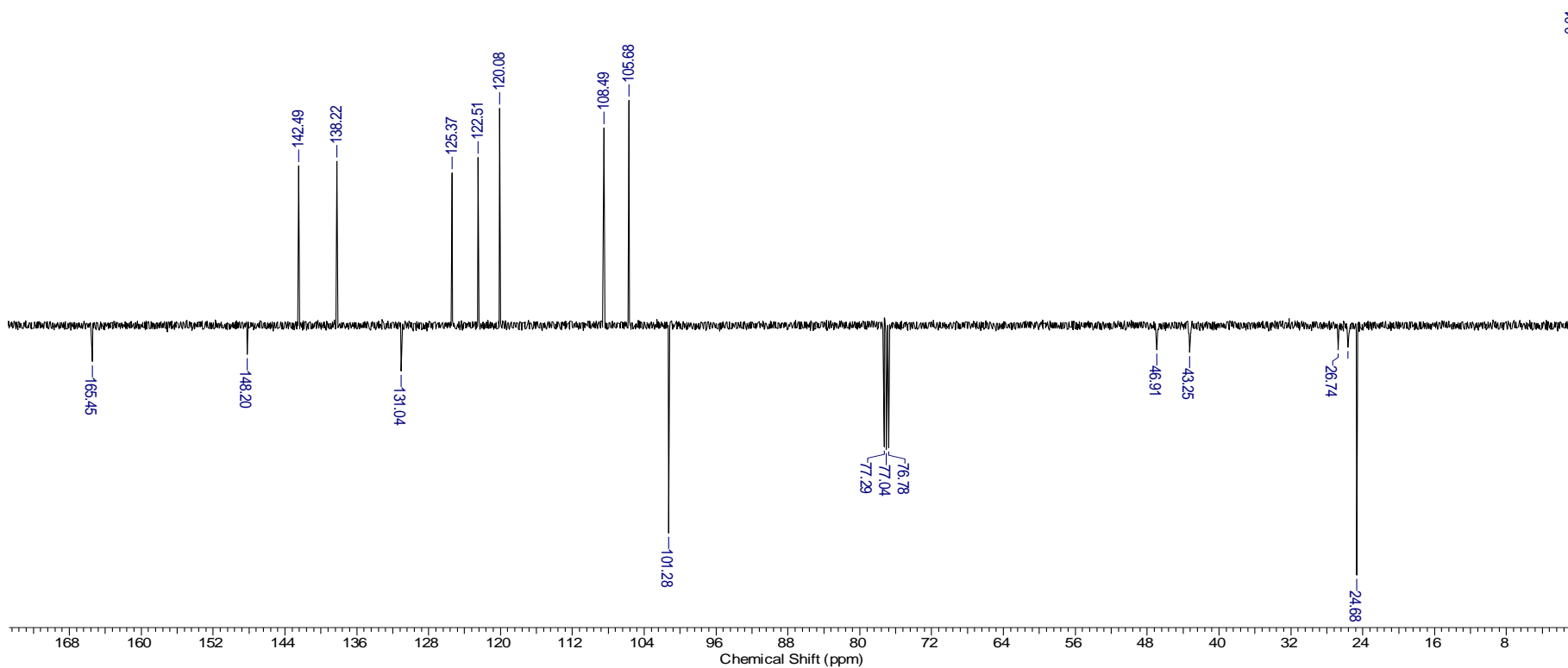
**Espectro 1: Espectro no Infravermelho da Piperina.**

<b>Acquisition Time (sec)</b>	3.1719	<b>Comment</b>	AMOSTRA: PIPERINA (PROTON) - 500MHZ SOLVENTE: CDCl3	
<b>Date</b>	11 Jan 2012 14:48:34	<b>File Name</b>	E:\sabrina_009001r	
<b>Frequency (MHz)</b>	500.13	<b>Nucleus</b>	1H	<b>Original Points Count</b>
<b>Points Count</b>	32768	<b>Pulse Sequence</b>	zg30	32768
<b>Sweep Width (Hz)</b>	10330.58	<b>Temperature (degree C)</b>	25.160	
		<b>Solvent</b>	CHLOROFORM-D	



**Espectro 2: Espectro de RMN  $^1\text{H}$  (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) da Piperina**

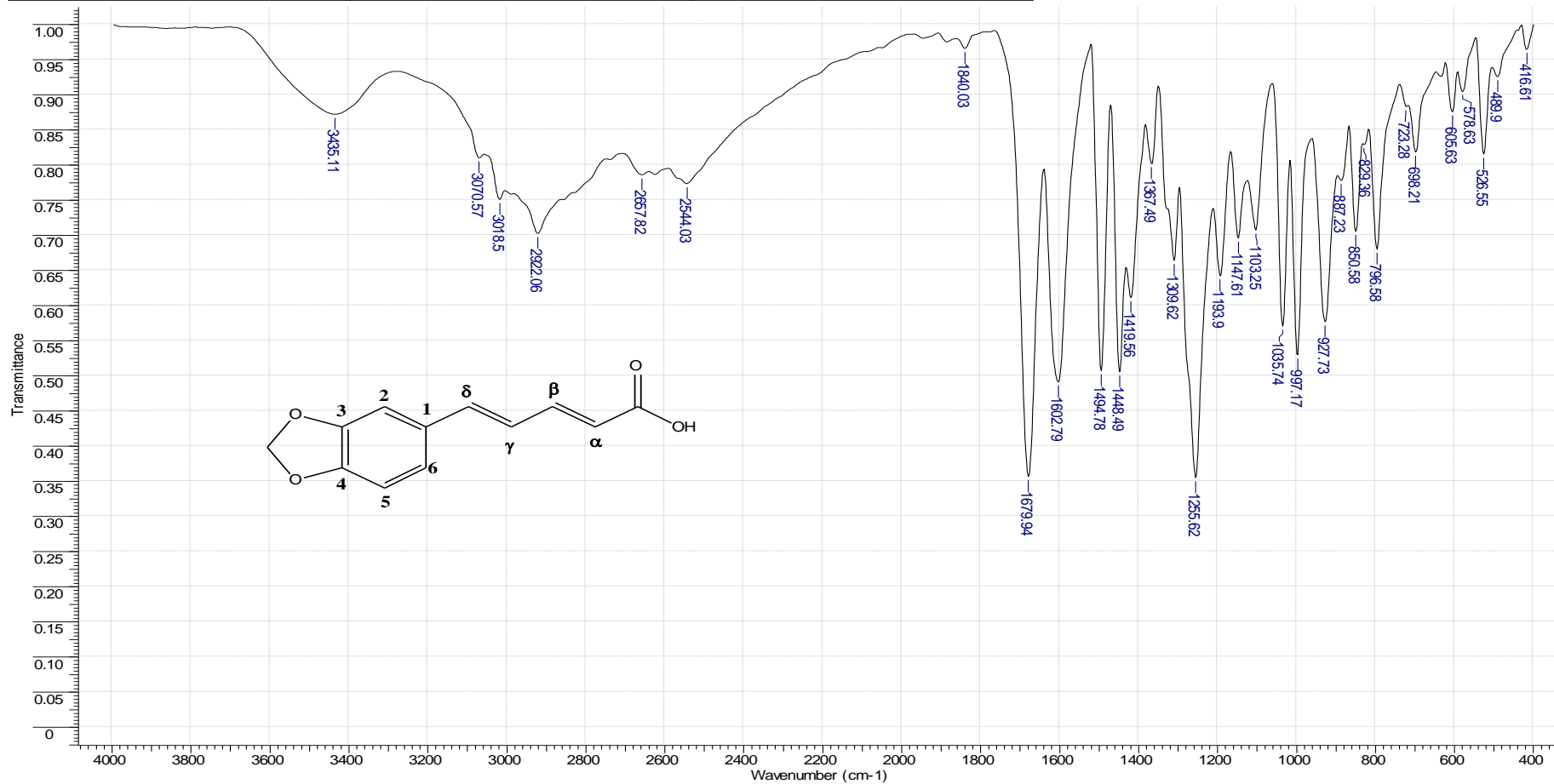
<b>Acquisition Time (sec)</b>	1.1010	<b>Comment</b>	AMOSTRA: PIPERINA (DEPTQ) - 500MHZ SOLVENTE: CDCl3				
<b>Date</b>	11 Jan 2012 15:38:40	<b>File Name</b>	D:\sabrina_010001r				
<b>Frequency (MHz)</b>	125.76	<b>Nucleus</b>	13C	<b>Number of Transients</b>	164	<b>Original Points Count</b>	32768
<b>Points Count</b>	32768	<b>Pulse Sequence</b>	deptqgppsp	<b>Solvent</b>	CHLOROFORM-D		
<b>Sweep Width (Hz)</b>	29761.90	<b>Temperature (degree C)</b>	25.160				



**Espetro 3: Espetro de DEPT-Q (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>) da Piperina.**

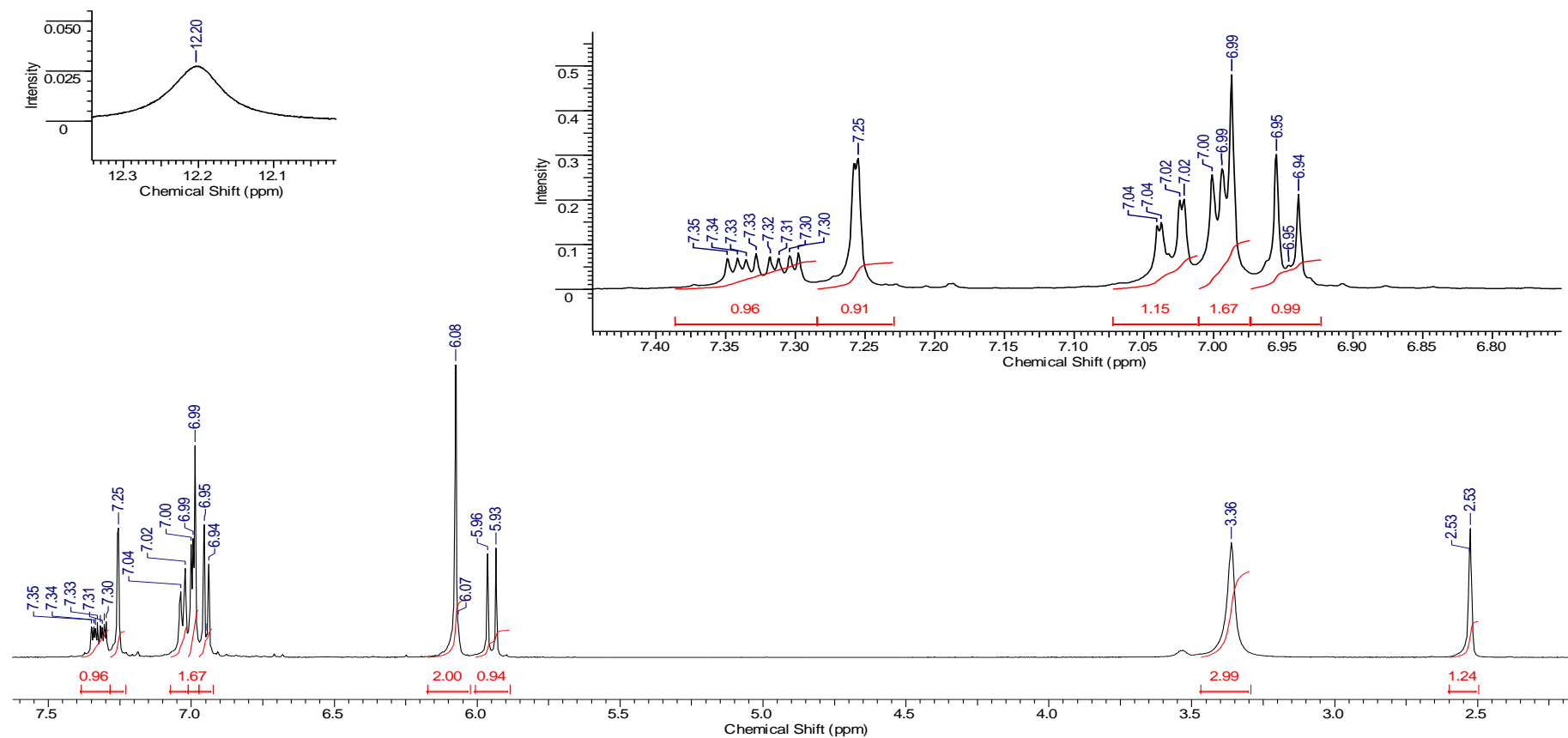


<b>Title</b>	AP - SABRINA - PROF. ARTHUR	<b>File Name</b>	C:\USERS\MATHEUS FERREIRA\DOWNLOADS\AP - SABRINA - PROF. ARTHUR.0		
<b>Date Stamp</b>	03/04/2013 10:59:25.340 (GMT-3)	<b>Date</b>	29 Apr 2013 14:39:42	<b>Technique</b>	Infrared
<b>Instrument</b>	VERTEX 70	<b>Spectral Region</b>	IR	<b>X Axis</b>	Wavenumber (cm-1)
<b>Spectrum Range</b>	399.2520 - 3996.3760	<b>Points Count</b>	1866	<b>Y Axis</b>	Transmittance
				<b>Data Spacing</b>	1.9288



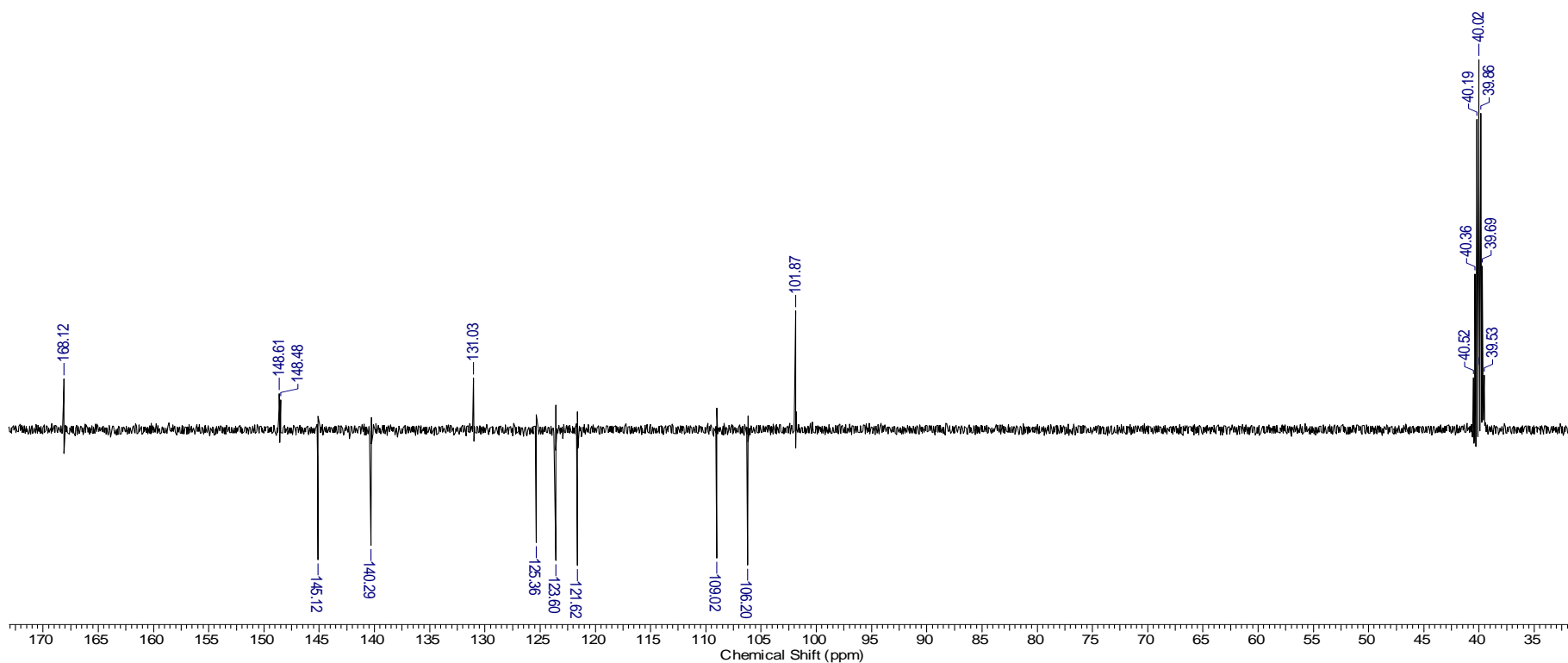
**Espectro 4: Espectro no Infravermelho do Ácido piperínico.**

Acquisition Time (sec)	3.1719	Comment	AMOSTRA: AP (PROTON) - 500MHZ SOLVENTE: DMSO				
Date	11 Jan 2012 15:30:28	File Name	D:\sabrina_013001r		Frequency (MHz)	500.13	
Nucleus	1H	Number of Transients	16	Original Points Count	32768	Pulse Sequence	zg30
Solvent	DMSO-D6	Sweep Width (Hz)	10330.58	Temperature (degree C)	25.160		



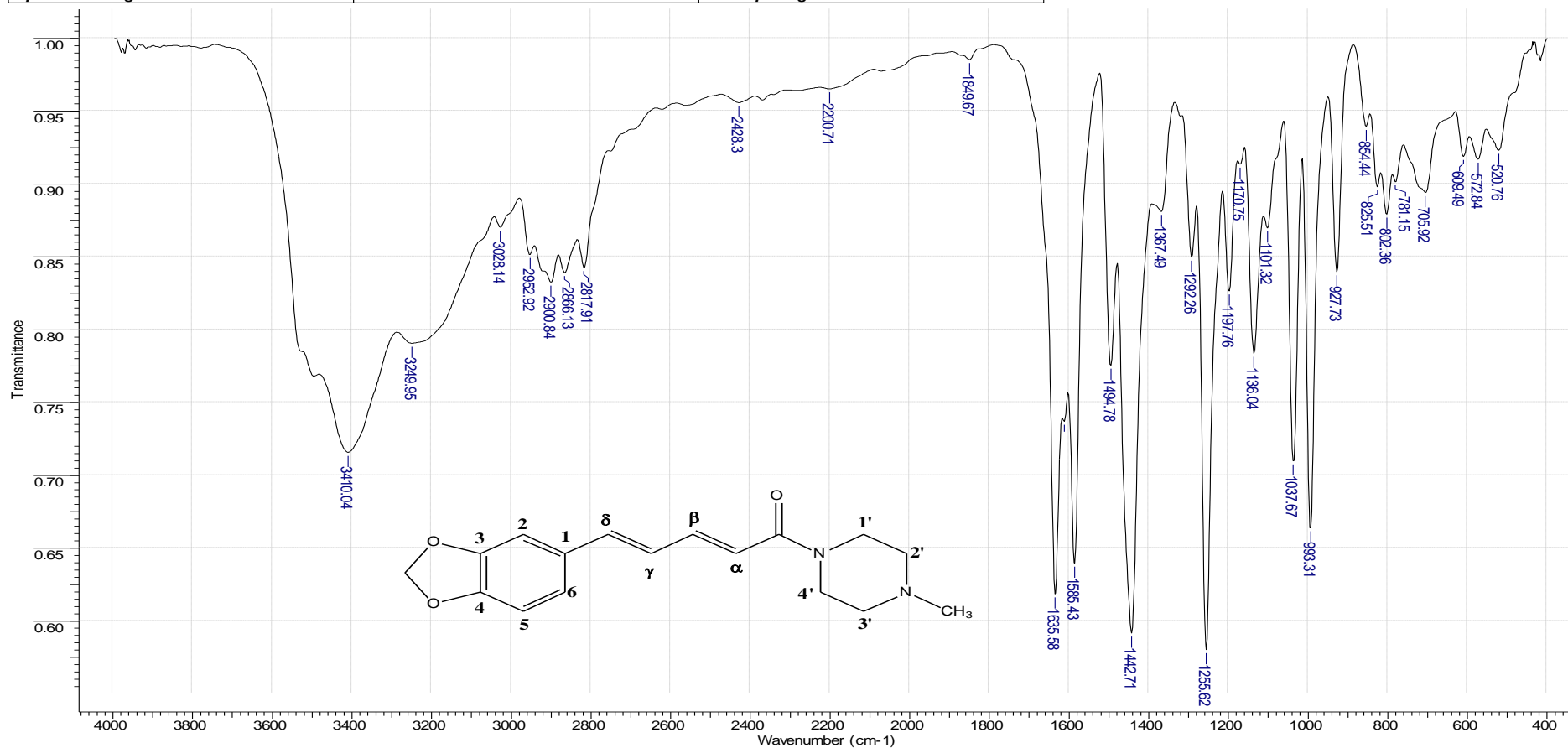
**Espectro 5: Espectro de RMN  $^1\text{H}$  (500 MHz, DMSO - D6) do ácido piperínico.**

<b>Acquisition Time (sec)</b>	1.1010	<b>Comment</b>	AMOSTRA: AP (DEPTQ) - 500MHZ SOLVENTE: DMSO	<b>Date</b>	11 Jan 2012 15:43:20		
<b>File Name</b>	D:\sabrina_014001r		<b>Frequency (MHz)</b>	125.76	<b>Nucleus</b>	13C	
<b>Number of Transients</b>	212	<b>Original Points Count</b>	32768	<b>Points Count</b>	32768	<b>Pulse Sequence</b>	deptqgppsp
<b>Solvent</b>	DMSO-D6	<b>Sweep Width (Hz)</b>	29761.90	<b>Temperature (degree C)</b>	25.160		



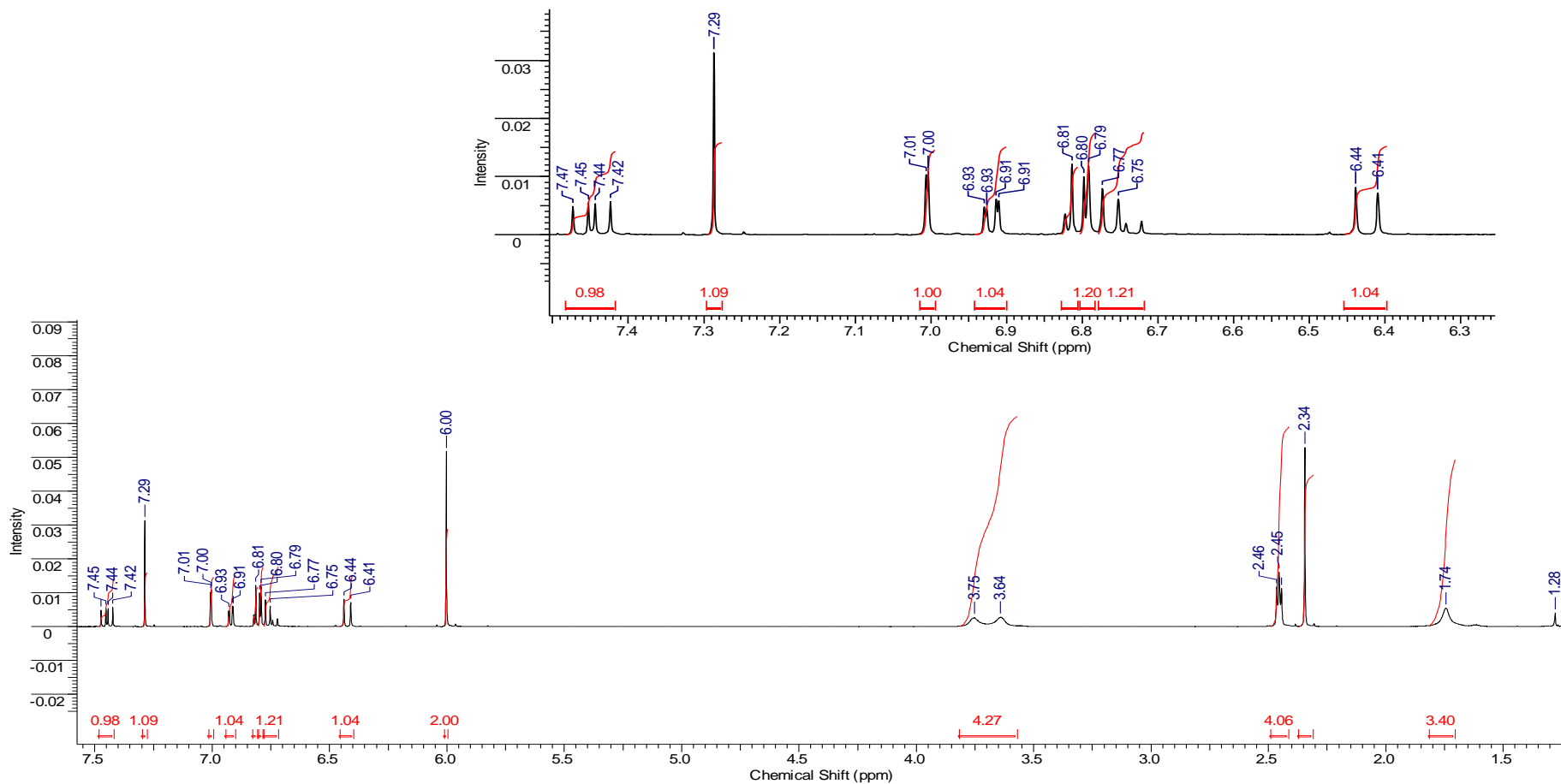
**Espectro 6: Espectro de DEPT-Q (100 MHz, DMSO - D6) do ácido piperínico.**

<b>Title</b>	MP - SABRINA - PROF. ARTHUR	<b>File Name</b>	C:\USERS\MATHEUS FERREIRA\DOWNLOADS\MP - SABRINA - PROF. ARTHUR.0		
<b>Date Stamp</b>	03/04/2013 12:46:30.296 (GMT-3)	<b>Date</b>	29 Apr 2013 14:39:42	<b>Technique</b>	Infrared
<b>Instrument</b>	VERTEX 70	<b>Spectral Region</b>	IR	<b>X Axis</b>	Wavenumber (cm-1)
<b>Spectrum Range</b>	399.2520 - 3996.3760	<b>Points Count</b>	1866	<b>Y Axis</b>	Transmittance
				<b>Data Spacing</b>	1.9288



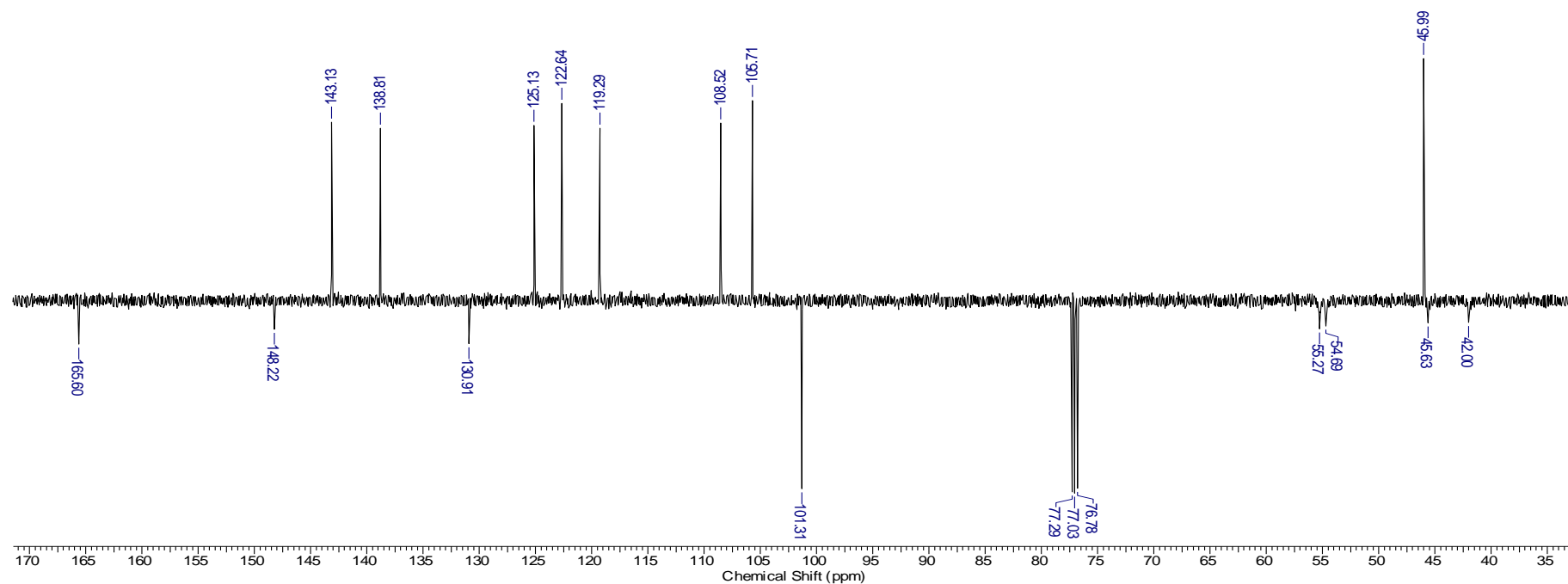
**Espectro 7: Espectro no Infravermelho da 1-metilpiperazina.**

<b>Acquisition Time (sec)</b>	3.1719	<b>Comment</b>	AMOSTRA: MP (PROTON) - 500MHZ SOLVENTE: CDCl3	<b>Date</b>	03 Nov 2011 09:02:52
<b>File Name</b>	E:\sabrina_001001r	<b>Frequency (MHz)</b>	500.13	<b>Nucleus</b>	1H
<b>Number of Transients</b>	16	<b>Original Points Count</b>	32768	<b>Points Count</b>	32768
<b>Solvent</b>	CHLOROFORM-D	<b>Sweep Width (Hz)</b>	10330.58	<b>Pulse Sequence</b>	zg30
				<b>Temperature (degree C)</b>	25.160



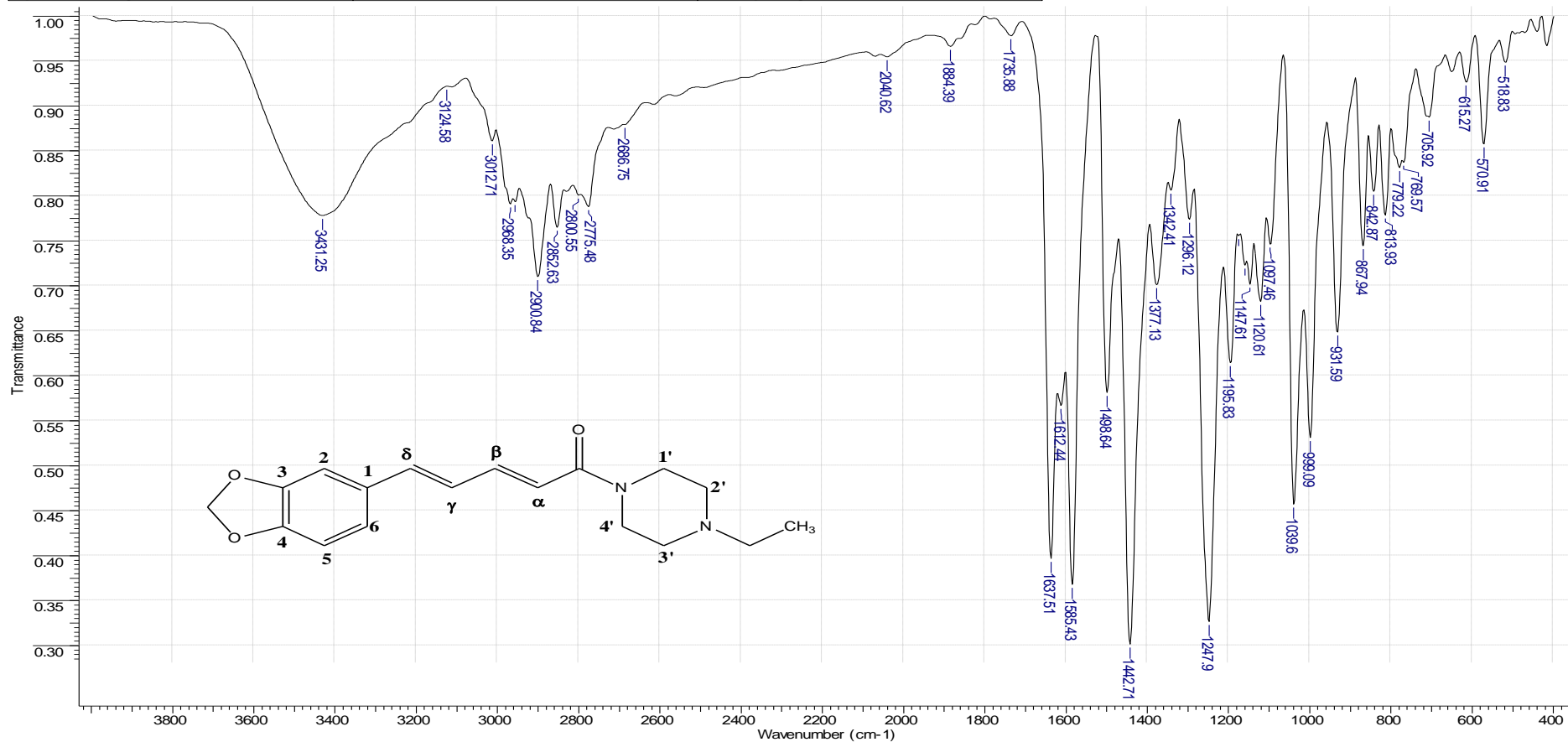
**Espectro 8: Espectro de RMN  $^1\text{H}$  (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) da amida 1-metilpiperazinila.**

<b>Acquisition Time (sec)</b>	1.1010	<b>Comment</b>	AMOSTRA: MP (DEPTQ) - 500MHZ SOLVENTE: CDCl3	<b>Date</b>	11 Jan 2012 15:38:30		
<b>File Name</b>	D:\sabrina_012001r		<b>Frequency (MHz)</b>	125.76	<b>Nucleus</b>	13C	
<b>Number of Transients</b>	183	<b>Original Points Count</b>	32768	<b>Points Count</b>	32768	<b>Pulse Sequence</b>	deptqgppsp
<b>Solvent</b>	CHLOROFORM-D		<b>Sweep Width (Hz)</b>	29761.90	<b>Temperature (degree C)</b>	25.160	



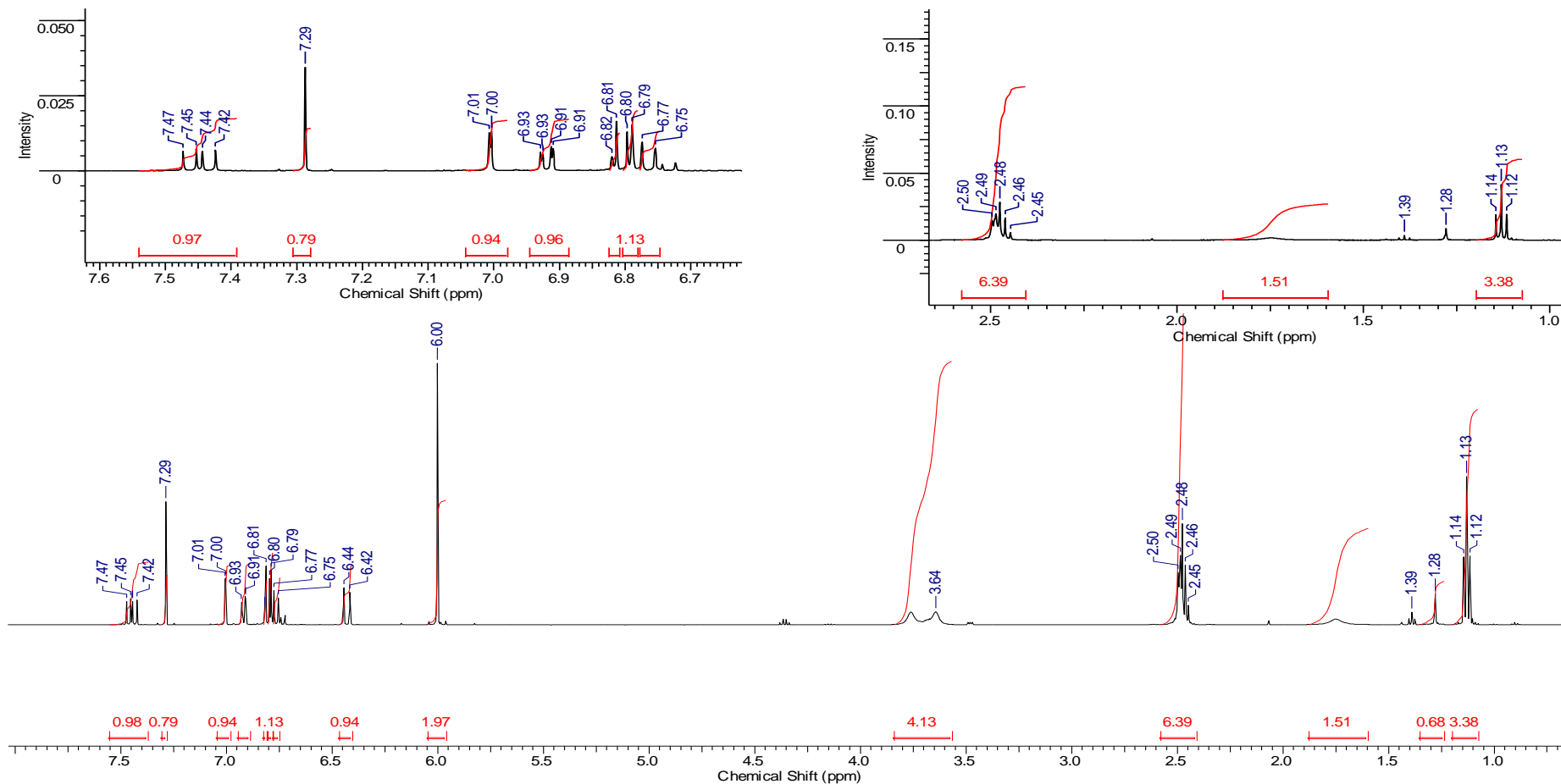
**Espectro 9: Espectro de DEPT-Q (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>) da amida 1-metilpiperazínica.**

<b>Title</b>	EP - SABRINA - PROF. ARTHUR	<b>File Name</b>	C:\USERS\MATHEUS FERREIRA\DOWNLOADS\EP - SABRINA - PROF. ARTHUR.0		
<b>Date Stamp</b>	03/04/2013 11:07:56.963 (GMT-3)	<b>Date</b>	29 Apr 2013 14:39:42	<b>Technique</b>	Infrared
<b>Instrument</b>	VERTEX 70	<b>Spectral Region</b>	IR	<b>X Axis</b>	Wavenumber (cm-1)
<b>Spectrum Range</b>	399.2520 - 3996.3760	<b>Points Count</b>	1866	<b>Y Axis</b>	Transmittance
				<b>Data Spacing</b>	1.9288



**Espectro 10: Espectro no Infravermelho da 1-etilpiperazina.**

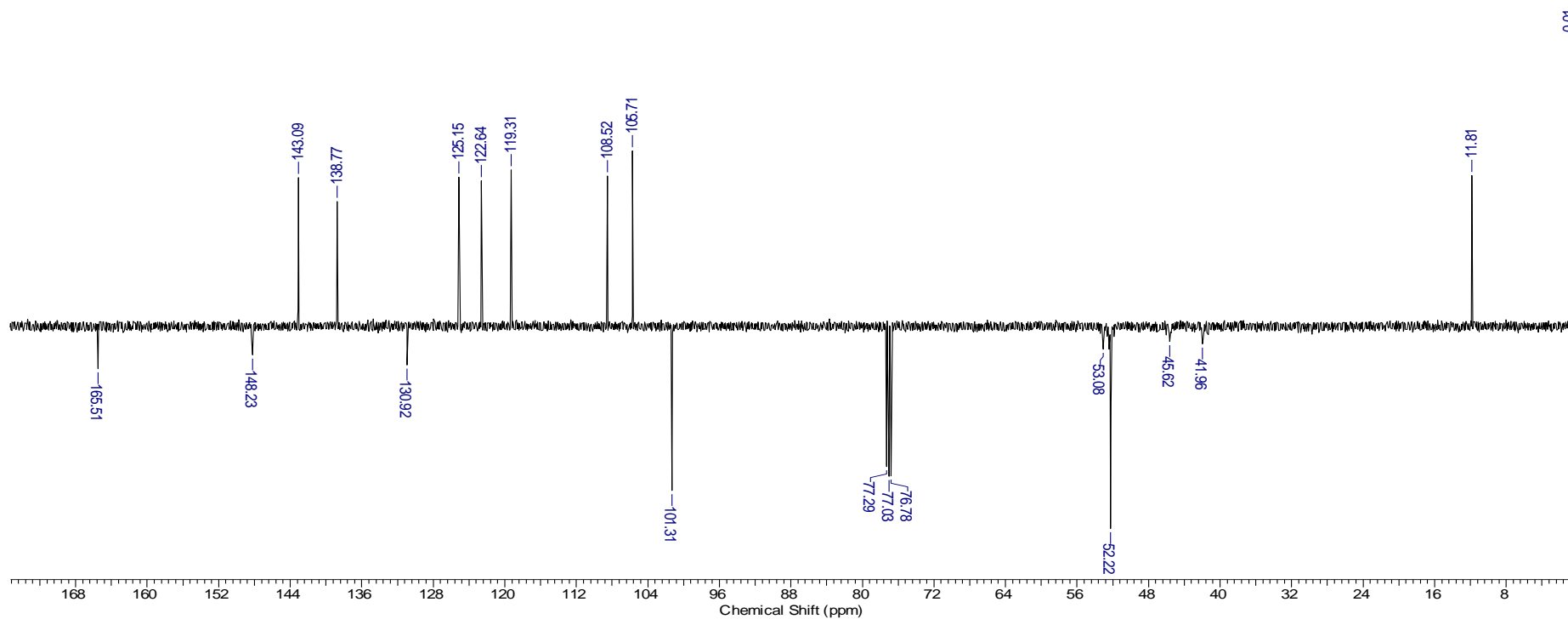
<b>Acquisition Time (sec)</b>	3.1719	<b>Comment</b>	AMOSTRA: EP (PROTON) - 500MHZ SOLVENTE: CDCl3	<b>Date</b>	03 Nov 2011 09:09:22		
<b>File Name</b>	D:\sabrina_002001r		<b>Frequency (MHz)</b>	500.13	<b>Nucleus</b>	1H	
<b>Number of Transients</b>	16	<b>Original Points Count</b>	32768	<b>Points Count</b>	32768	<b>Pulse Sequence</b>	zg30
<b>Solvent</b>	CHLOROFORM-D		<b>Sweep Width (Hz)</b>	10330.58	<b>Temperature (degree C)</b>	25.160	



**Espectro 11: Espectro de RMN <sup>1</sup>H (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>) da amida 1-etilpiperazina.**

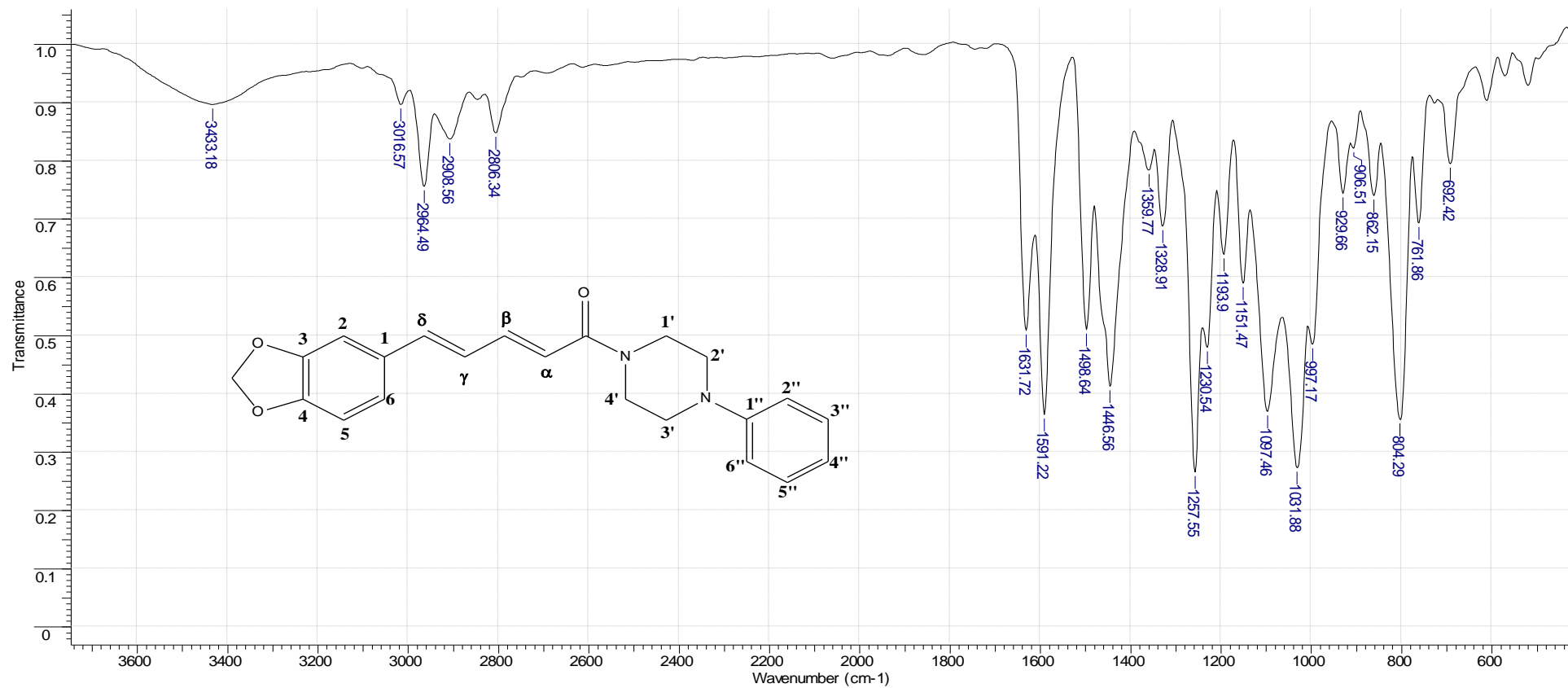


<b>Acquisition Time (sec)</b>	1.1010	<b>Comment</b>	AMOSTRA: EP (DEPTQ) - 500MHZ SOLVENTE: CDCl3		<b>Date</b>	11 Jan 2012 15:38:34	
<b>File Name</b>	D:\sabrina_011001r		<b>Frequency (MHz)</b>	125.76	<b>Nucleus</b>	13C	
<b>Number of Transients</b>	164	<b>Original Points Count</b>	32768	<b>Points Count</b>	32768	<b>Pulse Sequence</b>	deptqgppsp
<b>Solvent</b>	CHLOROFORM-D		<b>Sweep Width (Hz)</b>	29761.90	<b>Temperature (degree C)</b>	25.160	



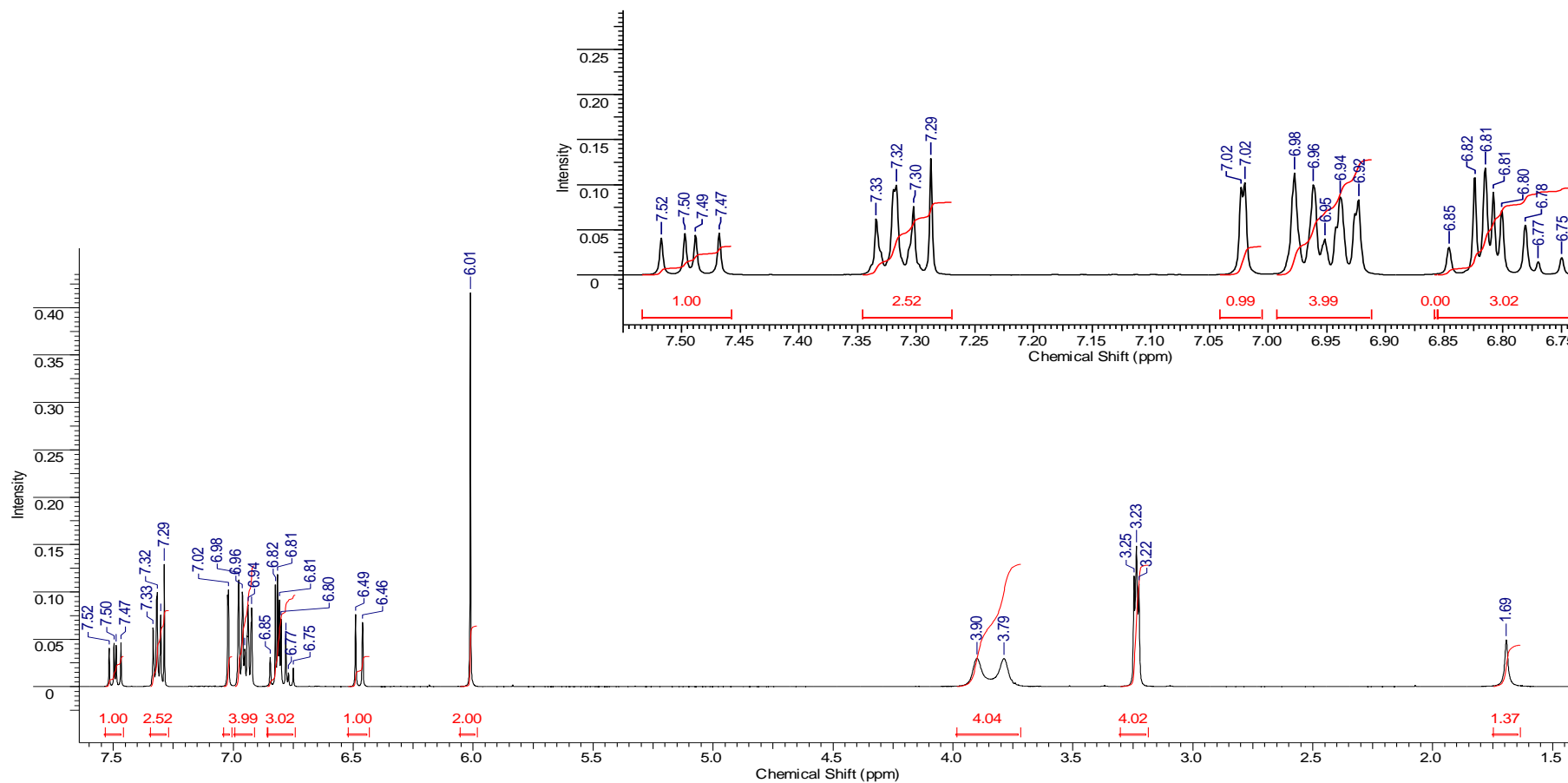
**Espectro 12: Espectro de DEPT-Q (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) da amida 1-etilpiperazínica.**

<b>Title</b>	FP - SABRINA NEVES - ARTHUR	<b>File Name</b>	G:\PARA MEU MEU AMOR\FP - SABRINA NEVES - ARTHUR.0		
<b>Date Stamp</b>	04/04/2013 14:07:38.400 (GMT-3)	<b>Date</b>	29 Apr 2013 14:39:42	<b>Technique</b>	Infrared
<b>Instrument</b>	VERTEX 70	<b>Spectral Region</b>	IR	<b>X Axis</b>	Wavenumber (cm-1)
<b>Spectrum Range</b>	399.2520 - 3996.3760	<b>Points Count</b>	1866	<b>Data Spacing</b>	1.9288
				<b>Y Axis</b>	Transmittance



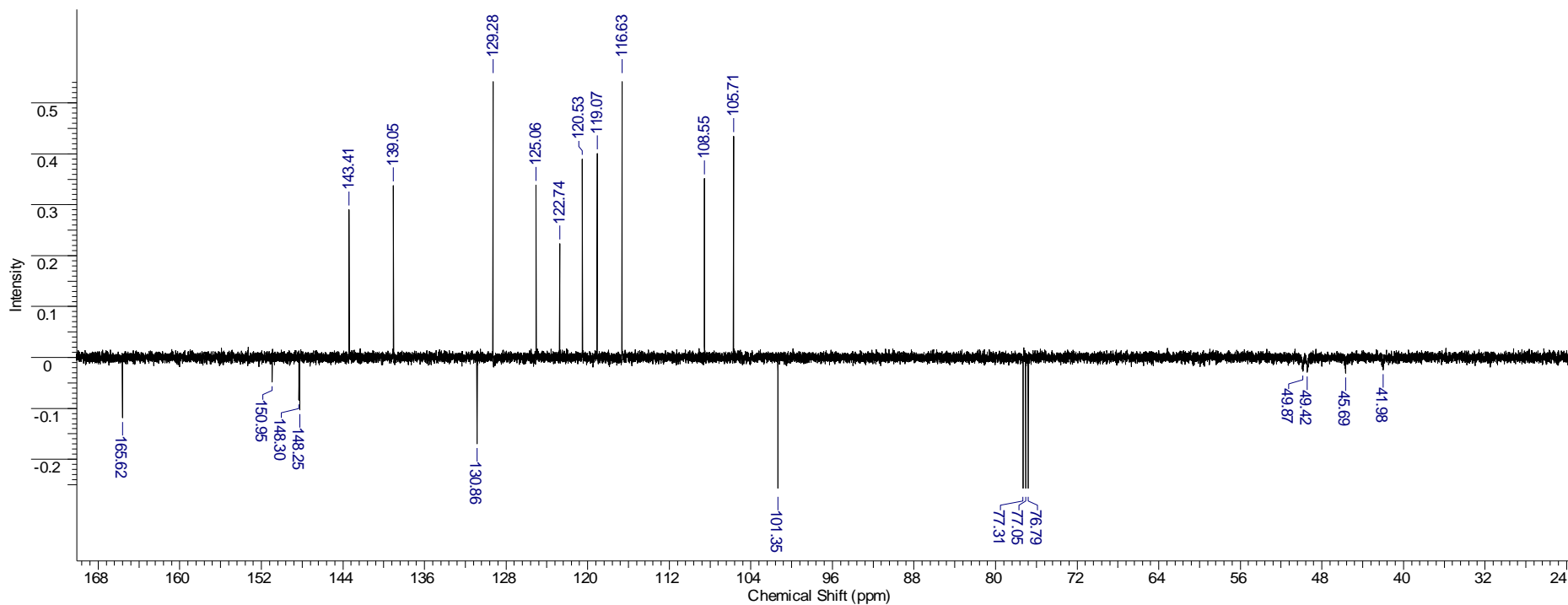
**Espectro 13: Espectro no Infravermelho da 1-fenilpiperazina.**

<b>Acquisition Time (sec)</b>	3.1719	<b>Comment</b>	AMOSTRA: FP (PROTON) - 500MHZ SOLVENTE: CDCl3	<b>Date</b>	14 Aug 2012 13:12:54		
<b>File Name</b>	E:\sabrina_026001r		<b>Frequency (MHz)</b>	500.13	<b>Nucleus</b>	1H	
<b>Number of Transients</b>	16	<b>Original Points Count</b>	32768	<b>Points Count</b>	32768	<b>Pulse Sequence</b>	zg30
<b>Solvent</b>	CHLOROFORM-D		<b>Sweep Width (Hz)</b>	10330.58	<b>Temperature (degree C)</b>	21.160	



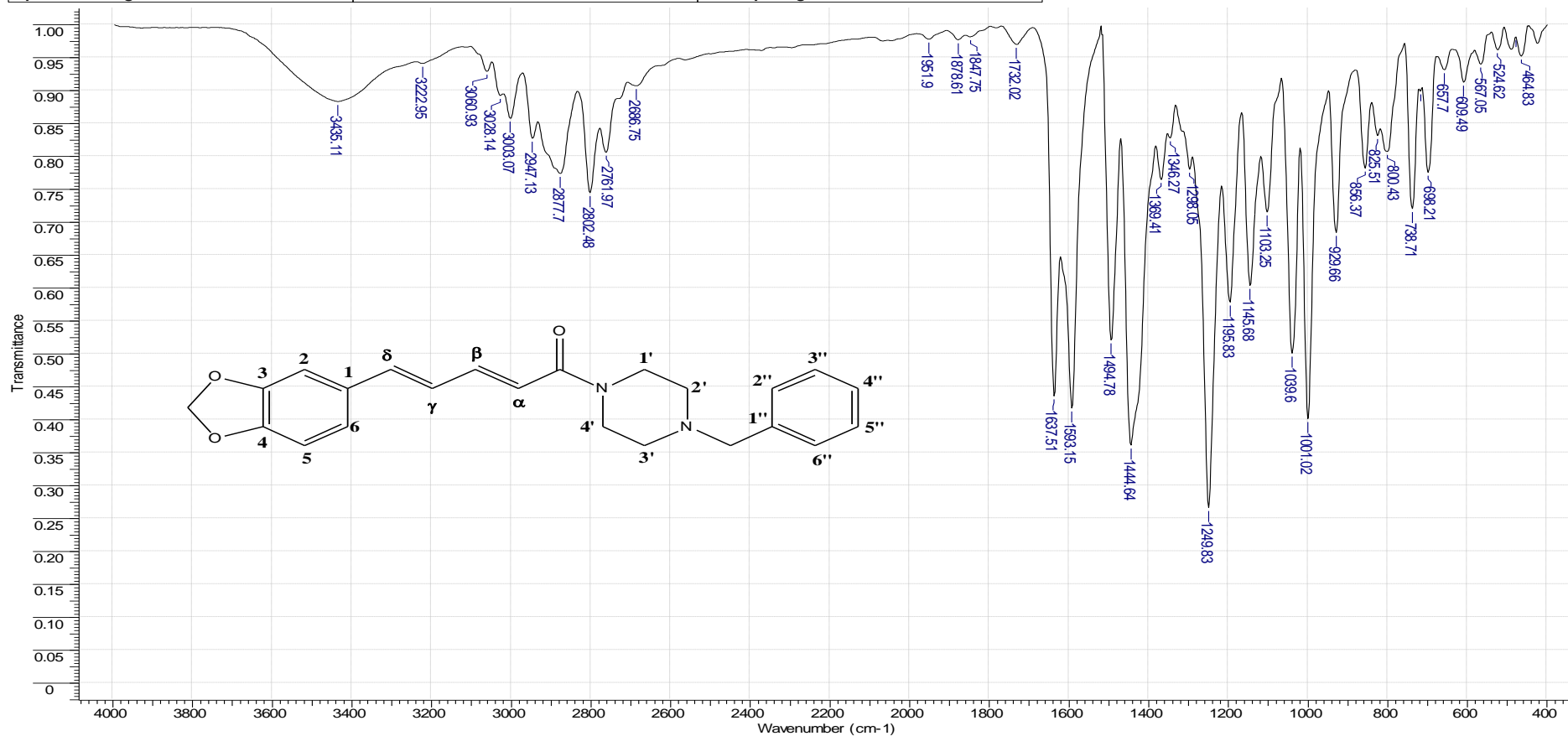
**Espectro 14: Espectro de RMN  $^1\text{H}$  (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) da amida 1-fenilpiperazina.**

<b>Acquisition Time (sec)</b>	1.1010	<b>Comment</b>	AMOSTRA: FP (DEPT Q) - 500MHZ SOLVENTE: CDCl3	<b>Date</b>	14 Aug 2012 13:27:26
<b>File Name</b>	E:\sabrina_027001r			<b>Frequency (MHz)</b>	125.76
<b>Number of Transients</b>	256	<b>Original Points Count</b>	32768	<b>Points Count</b>	32768
<b>Solvent</b>	CHLOROFORM-D			<b>Sweep Width (Hz)</b>	29761.90
				<b>Nucleus</b>	<sup>13</sup> C
				<b>Pulse Sequence</b>	deptqgppsp
				<b>Temperature (degree C)</b>	21.160



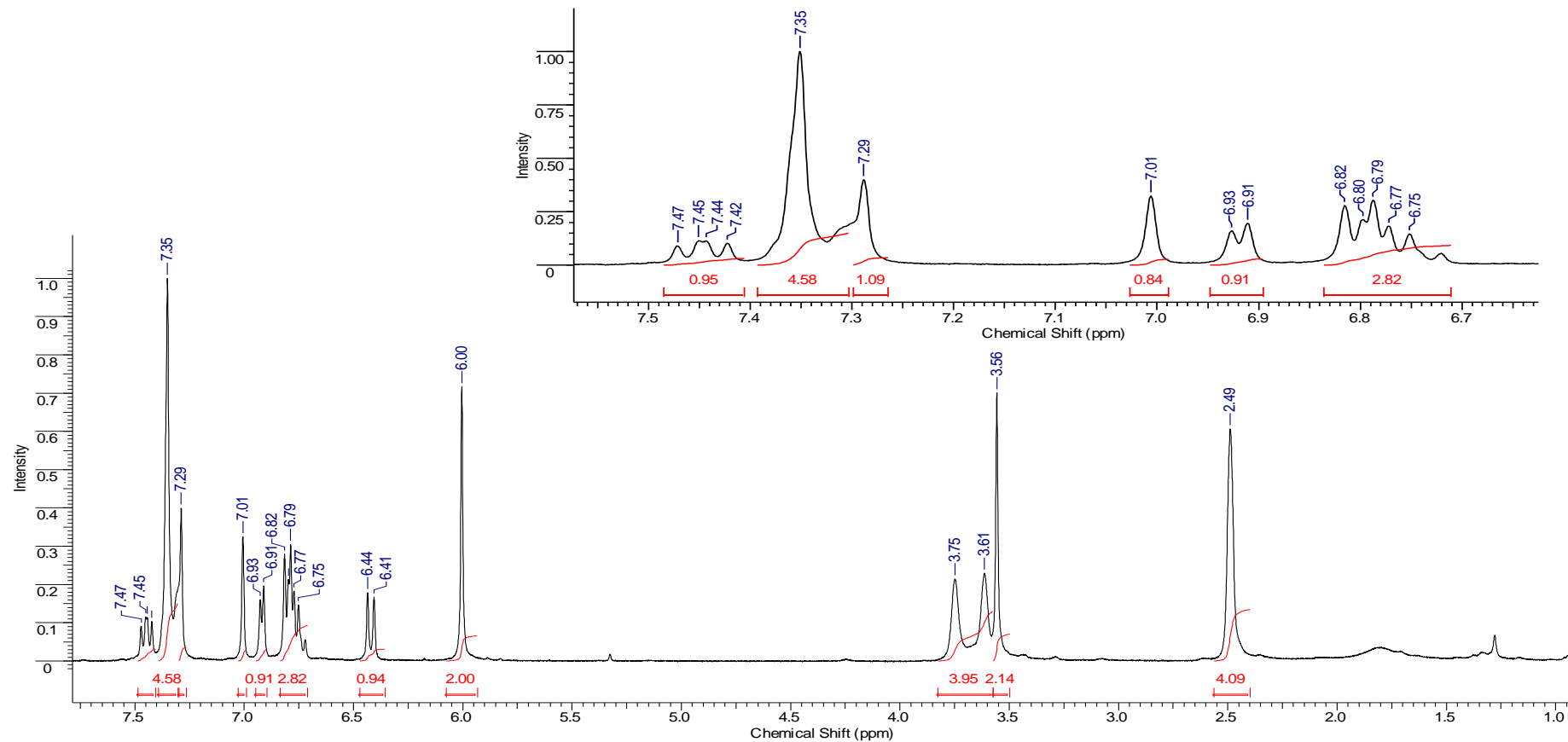
**Espectro 15: Espectro de DEPT-Q (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>) da amida 1-fenilpiperazina.**

<b>Title</b>	BP - SABRINA - PROF. ARTHUR	<b>File Name</b>	C:\USERS\MATHEUS FERREIRA\DOWNLOADS\BP - SABRINA - PROF. ARTHUR.1		
<b>Date Stamp</b>	03/04/2013 11:18:06.519 (GMT-3)	<b>Date</b>	29 Apr 2013 14:39:42	<b>Technique</b>	Infrared
<b>Instrument</b>	VERTEX 70	<b>Spectral Region</b>	IR	<b>X Axis</b>	Wavenumber (cm-1)
<b>Spectrum Range</b>	399.2520 - 3996.3760	<b>Points Count</b>	1866	<b>Y Axis</b>	Transmittance
				<b>Data Spacing</b>	1.9288



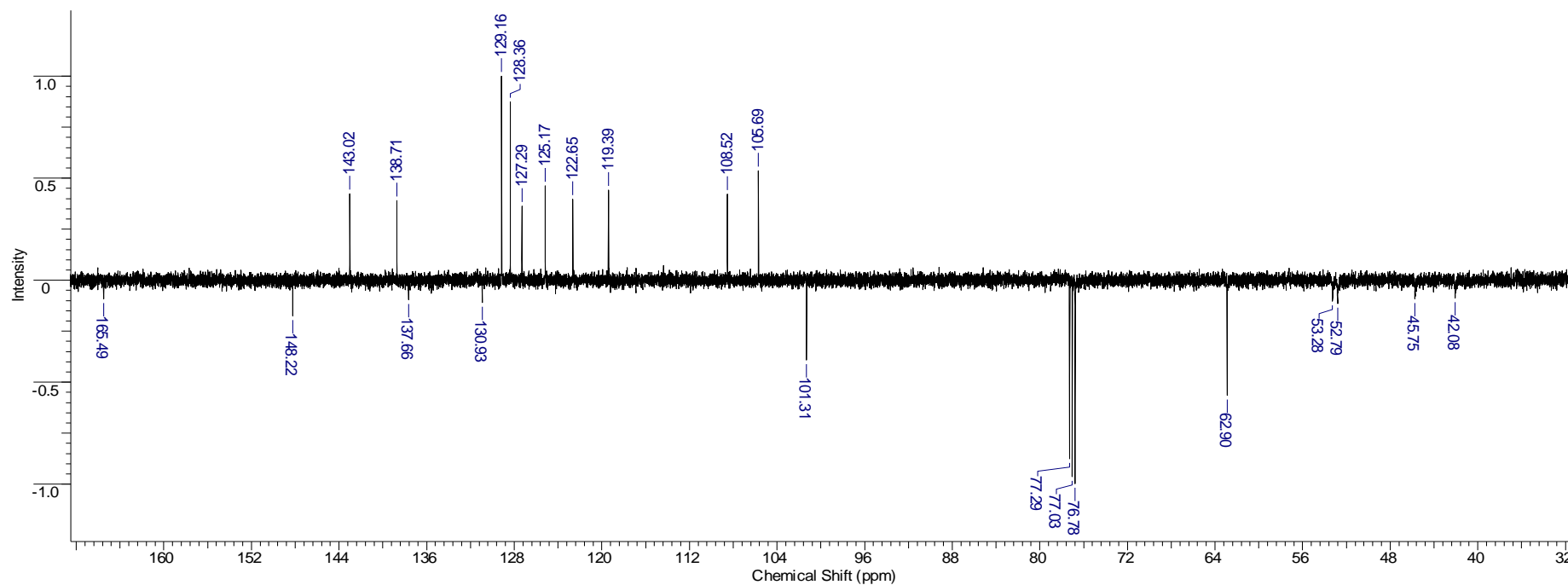
**Espectro 16: Espectro no Infravermelho da 1- benzilpiperazina.**

<b>Acquisition Time (sec)</b>	3.1719	<b>Comment</b>	AMOSTRA: BP SAB (PROTON) - 500MHZ SOLVENTE: CDCl3		
<b>Date</b>	11 Sep 2012 13:30:30	<b>File Name</b>	E:\sabrina_030001r		
<b>Frequency (MHz)</b>	500.13	<b>Nucleus</b>	1H	<b>Number of Transients</b>	16
<b>Points Count</b>	32768	<b>Pulse Sequence</b>	zg30	<b>Original Points Count</b>	32768
<b>Sweep Width (Hz)</b>	10330.58	<b>Temperature (degree C)</b>	21.160	<b>Solvent</b>	CHLOROFORM-D



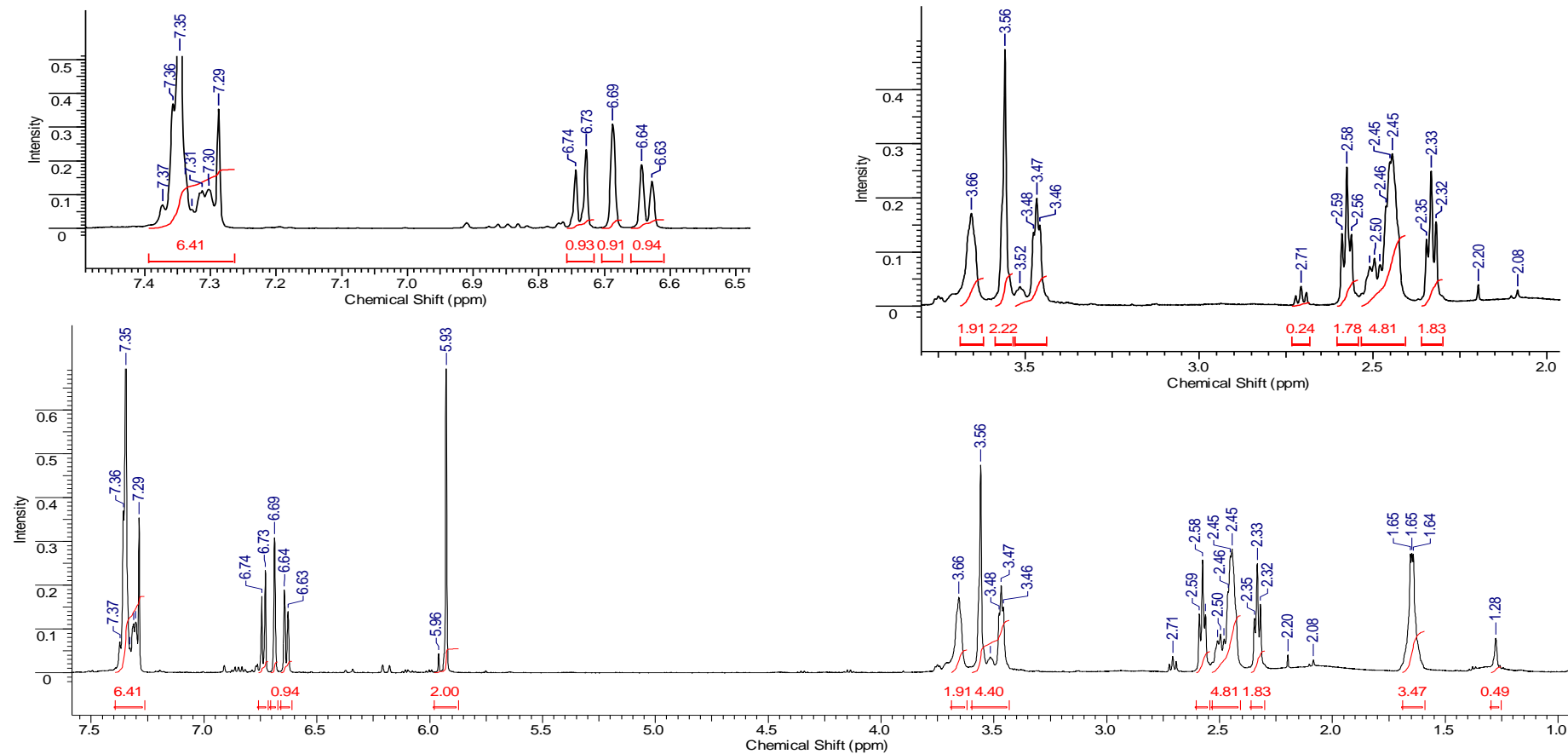
**Espectro 17: Espectro de RMN <sup>1</sup>H (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>) da amida 1-benzilpiperazínica.**

<b>Acquisition Time (sec)</b>	1.1010	<b>Comment</b>	AMOSTRA: BP SAB (DEPT Q) - 500MHZ SOLVENTE: CDCl3				
<b>Date</b>	11 Sep 2012 14:04:58	<b>File Name</b>	E:\sabrina_031001r				
<b>Frequency (MHz)</b>	125.76	<b>Nucleus</b>	13C	<b>Number of Transients</b>	500	<b>Original Points Count</b>	32768
<b>Points Count</b>	32768	<b>Pulse Sequence</b>	deptqgppsp		<b>Solvent</b>	CHLOROFORM-D	
<b>Sweep Width (Hz)</b>	29761.90	<b>Temperature (degree C)</b>	21.160				



**Espectro 18: Espectro de DEPT-Q (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>) da amida 1-benzilpiperazinila.**

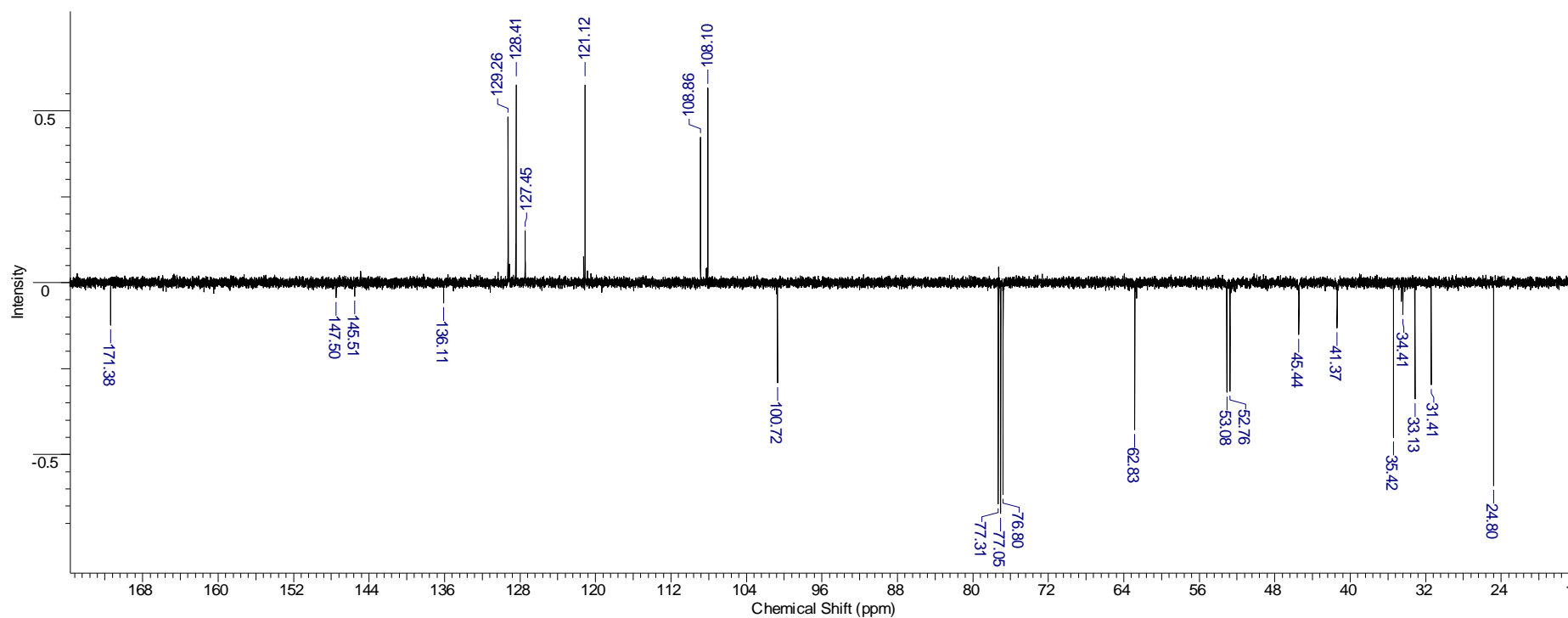
<b>Acquisition Time (sec)</b>	3.1719	<b>Comment</b>	AMOSTRA: BPH (PROTON) - 500MHZ SOLVENTE: CDCL3		
<b>Date</b>	16 Apr 2013 14:04:10	<b>File Name</b>	E:\sabrina_043001r		
<b>Frequency (MHz)</b>	500.13	<b>Nucleus</b>	1H	<b>Number of Transients</b>	16
<b>Points Count</b>	32768	<b>Pulse Sequence</b>	zg30	<b>Solvent</b>	CHLOROFORM-D
<b>Sweep Width (Hz)</b>	10330.58	<b>Temperature (degree C)</b>	20.560	<b>Original Points Count</b>	32768



**Espectro 19: Espectro de RMN  $^1\text{H}$  (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) da amida 1-benzilpiperazínica hidrogenada.**

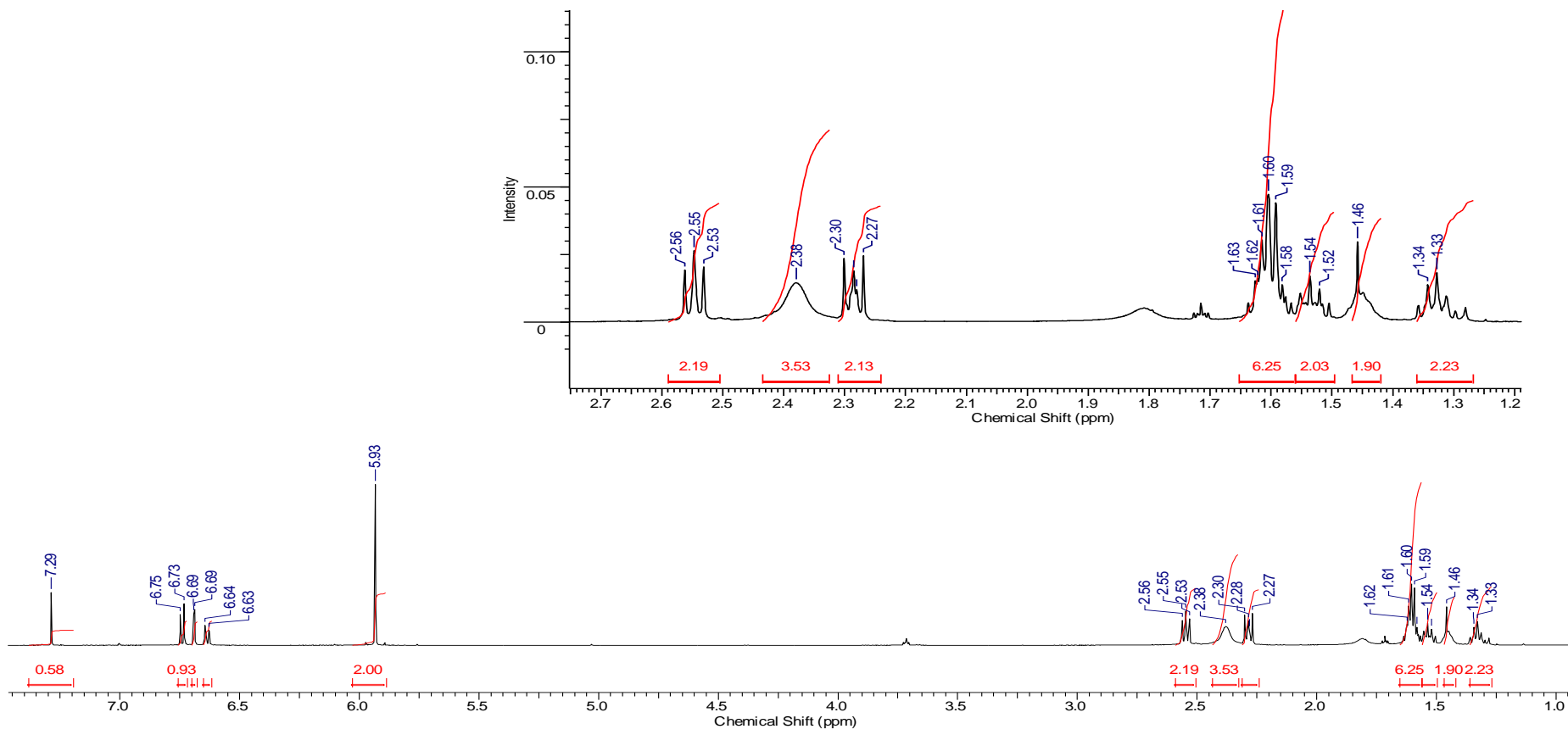


<b>Acquisition Time (sec)</b>	1.1010	<b>Comment</b>	AMOSTRA: BPH (DEPT Q) - 500MHZ SOLVENTE: CDCL3	<b>Date</b>	16 Apr 2013 14:32:36
<b>File Name</b>	E:\sabrina_044001r	<b>Frequency (MHz)</b>	125.76	<b>Nucleus</b>	13C
<b>Number of Transients</b>	512	<b>Original Points Count</b>	32768	<b>Points Count</b>	32768
<b>Solvent</b>	CHLOROFORM-D	<b>Sweep Width (Hz)</b>	29761.90	<b>Pulse Sequence</b>	deptqgppsp
				<b>Temperature (degree C)</b>	20.760



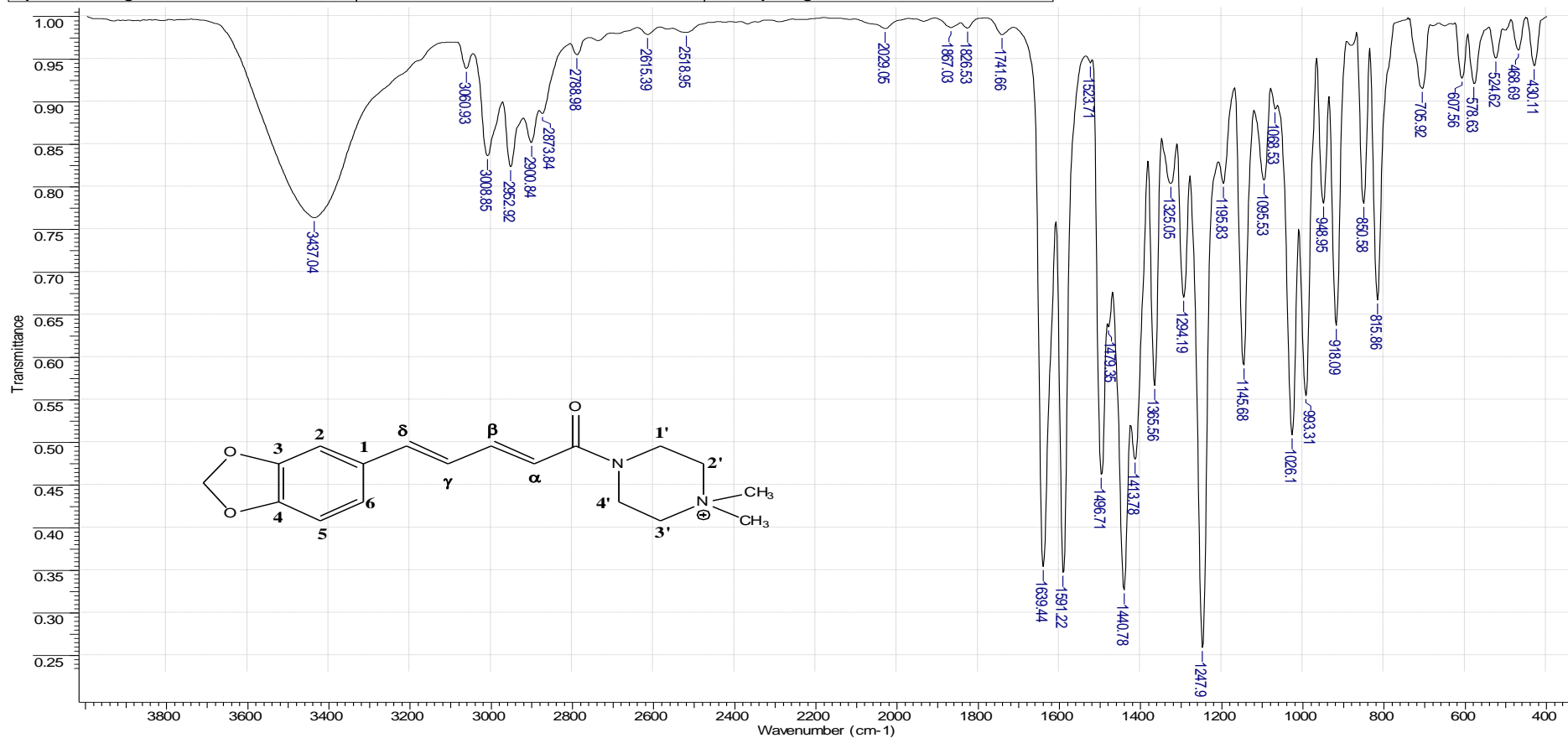
**Espectro 20: Espectro de DEPT-Q (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>) da amida 1-benzilpiperazinila hidrogenada.**

<b>Acquisition Time (sec)</b>	3.1719	<b>Comment</b>	AMOSTRA: PR (PROTON) - 500MHZ SOLVENTE: CDCl3	<b>Date</b>	23 Nov 2011 13:03:54		
<b>File Name</b>	D:\sabrina_003001r		<b>Frequency (MHz)</b>	500.13	<b>Nucleus</b>	1H	
<b>Number of Transients</b>	16	<b>Original Points Count</b>	32768	<b>Points Count</b>	32768	<b>Pulse Sequence</b>	zg30
<b>Solvent</b>	CHLOROFORM-D		<b>Sweep Width (Hz)</b>	10330.58	<b>Temperature (degree C)</b>	25.160	



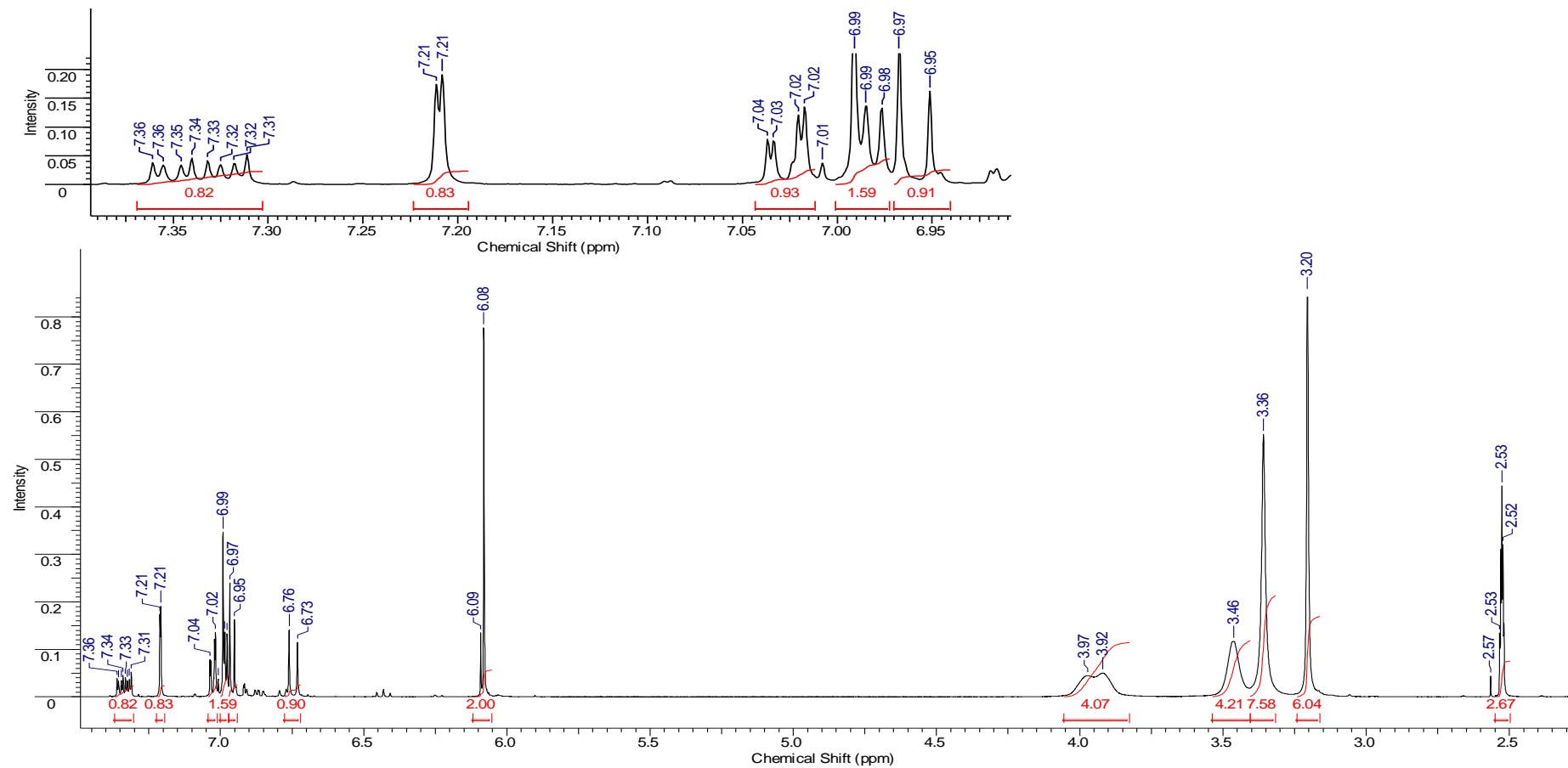
**Espectro 21: Espectro de RMN <sup>1</sup>H (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>) da amida [1-(5-(benzo[d][1,3]dioxol-5-il)pentil)piperidina]**

<b>Title</b>	SMP - SABRINA - PROF. ARTHUR	<b>File Name</b>	C:\USERS\MATHEUS FERREIRA\DOWNLOADS\SMP - SABRINA - PROF. ARTHUR.0		
<b>Date Stamp</b>	03/04/2013 14:15:00.525 (GMT-3)	<b>Date</b>	29 Apr 2013 14:39:42	<b>Technique</b>	Infrared
<b>Instrument</b>	VERTEX 70	<b>Spectral Region</b>	IR	<b>X Axis</b>	Wavenumber (cm-1)
<b>Spectrum Range</b>	399.2520 - 3996.3760	<b>Points Count</b>	1866	<b>Y Axis</b>	Transmittance
				<b>Data Spacing</b>	1.9288



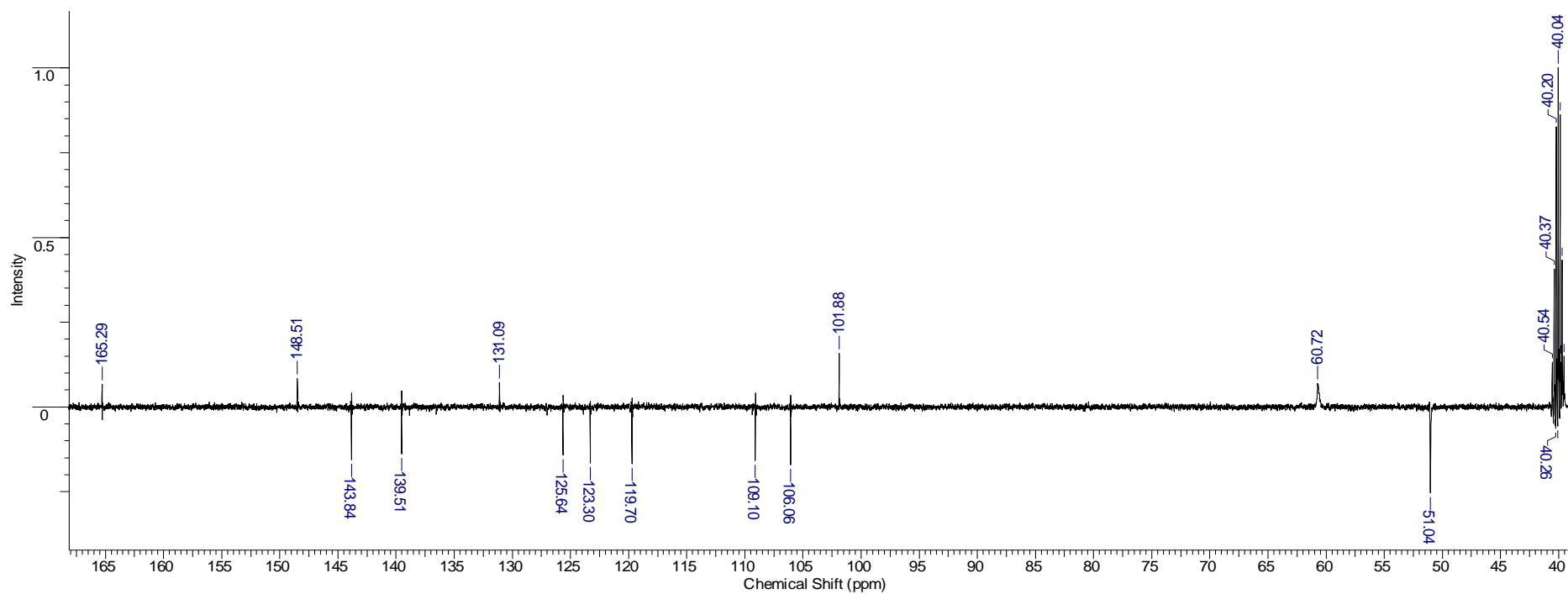
**Espectro 22: Espectro no Infravermelho do sal da 1-metilpiperazinila.**

<b>Acquisition Time (sec)</b>	3.1719	<b>Comment</b>	AMOSTRA: SMP (PROTON) - 500MHZ SOLVENTE: CDCI3				
<b>Date</b>	11 Jan 2012 10:43:28	<b>File Name</b>	E:\sabrina_006001r		<b>Frequency (MHz)</b>	500.13	
<b>Nucleus</b>	1H	<b>Number of Transients</b>	16	<b>Original Points Count</b>	32768	<b>Pulse Sequence</b>	zg30
<b>Solvent</b>	DMSO-D6	<b>Sweep Width (Hz)</b>	10330.58	<b>Temperature (degree C)</b>	25.160		



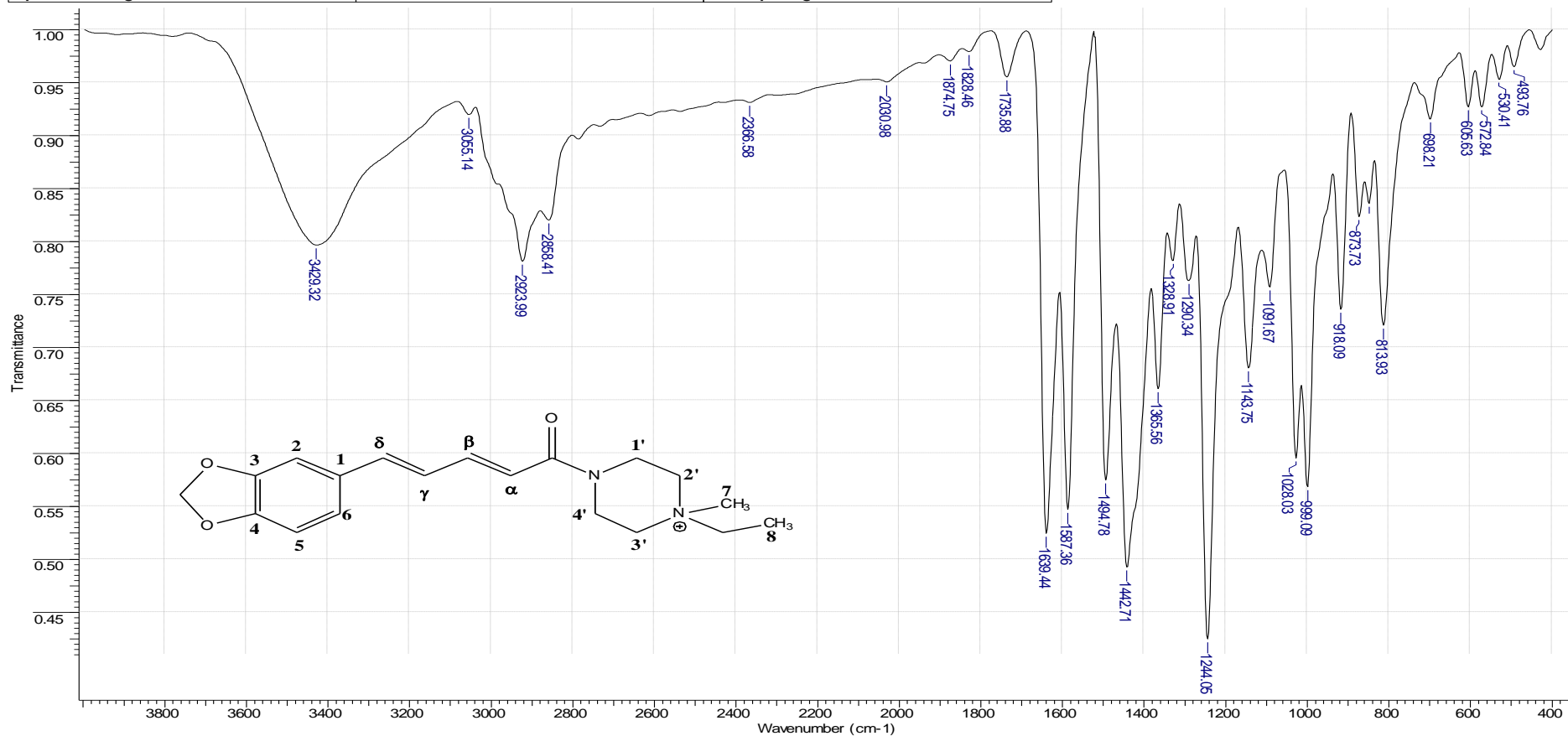
**Espectro 23: Espectro de RMN <sup>1</sup>H (500 MHz, DMSO – D6) do sal da amida 1-metil piperazinila.**

<b>Acquisition Time (sec)</b>	1.1010	<b>Comment</b>	AMOSTRA: SMP (DEPTQ) - 500MHZ SOLVENTE: CDCl3	<b>Date</b>	11 Jan 2012 11:01:04
<b>File Name</b>	E:\sabrina_007001r	<b>Frequency (MHz)</b>	125.76	<b>Nucleus</b>	<sup>13</sup> C
<b>Number of Transients</b>	256	<b>Original Points Count</b>	32768	<b>Points Count</b>	32768
<b>Solvent</b>	DMSO-D6	<b>Sweep Width (Hz)</b>	29761.90	<b>Temperature (degree C)</b>	25.160
				<b>Pulse Sequence</b>	deptqgppsp



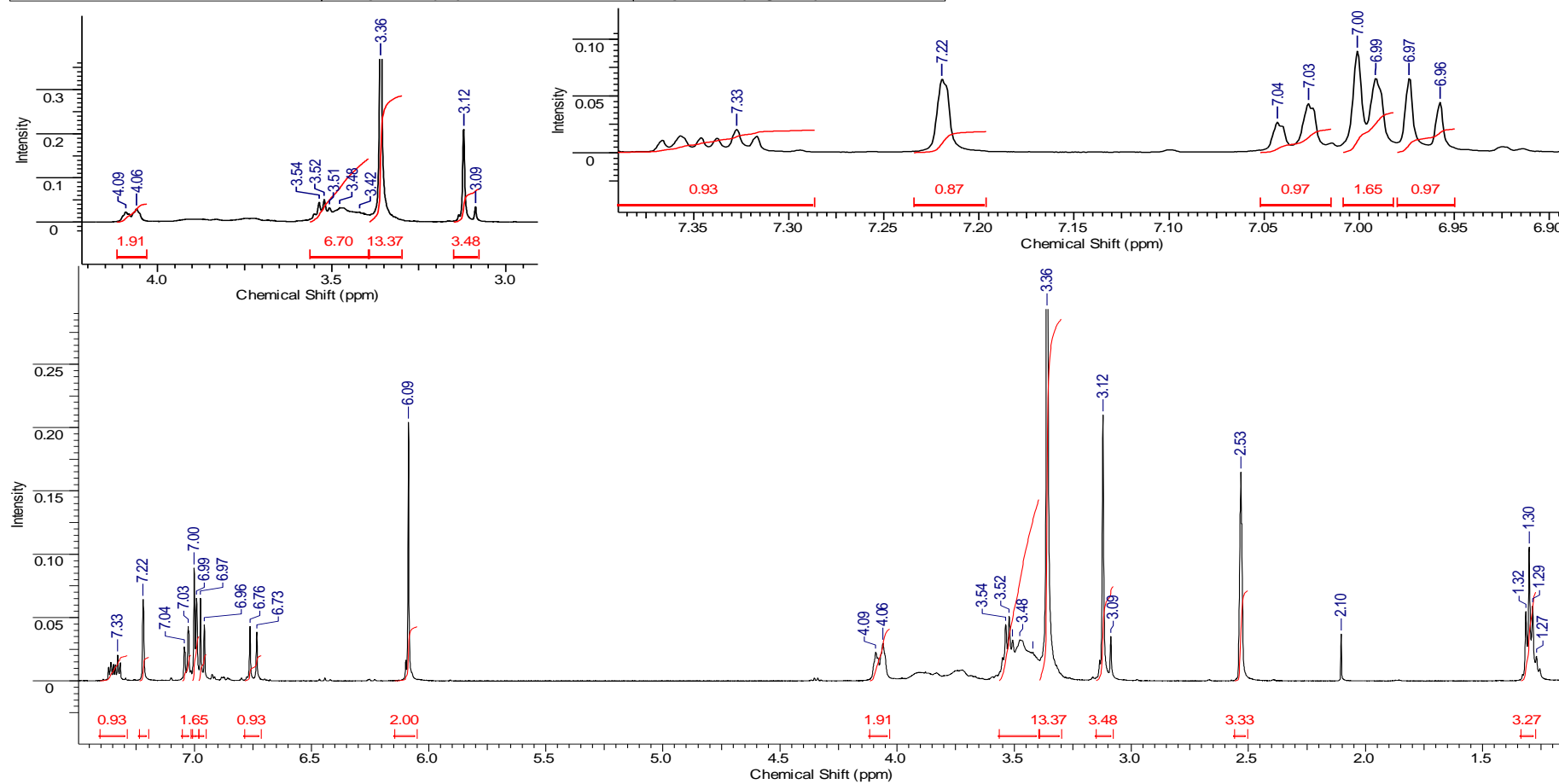
**Espectro 24: Espectro de DEPT-Q (100 MHz, DMSO – D6) do sal da amida 1-metilpiperazinila.**

<b>Title</b>	SEP - SABRINA - PROF. ARTHUR	<b>File Name</b>	CAUSERS\MATHEUS FERREIRA\DOWNLOADS\SEP - SABRINA - PROF. ARTHUR.0		
<b>Date Stamp</b>	03/04/2013 14:04:49.059 (GMT-3)	<b>Date</b>	29 Apr 2013 14:39:42	<b>Technique</b>	Infrared
<b>Instrument</b>	VERTEX 70	<b>Spectral Region</b>	IR	<b>X Axis</b>	Wavenumber (cm-1)
<b>Spectrum Range</b>	399.2520 - 3996.3760	<b>Points Count</b>	1866	<b>Data Spacing</b>	1.9288
				<b>Y Axis</b>	Transmittance



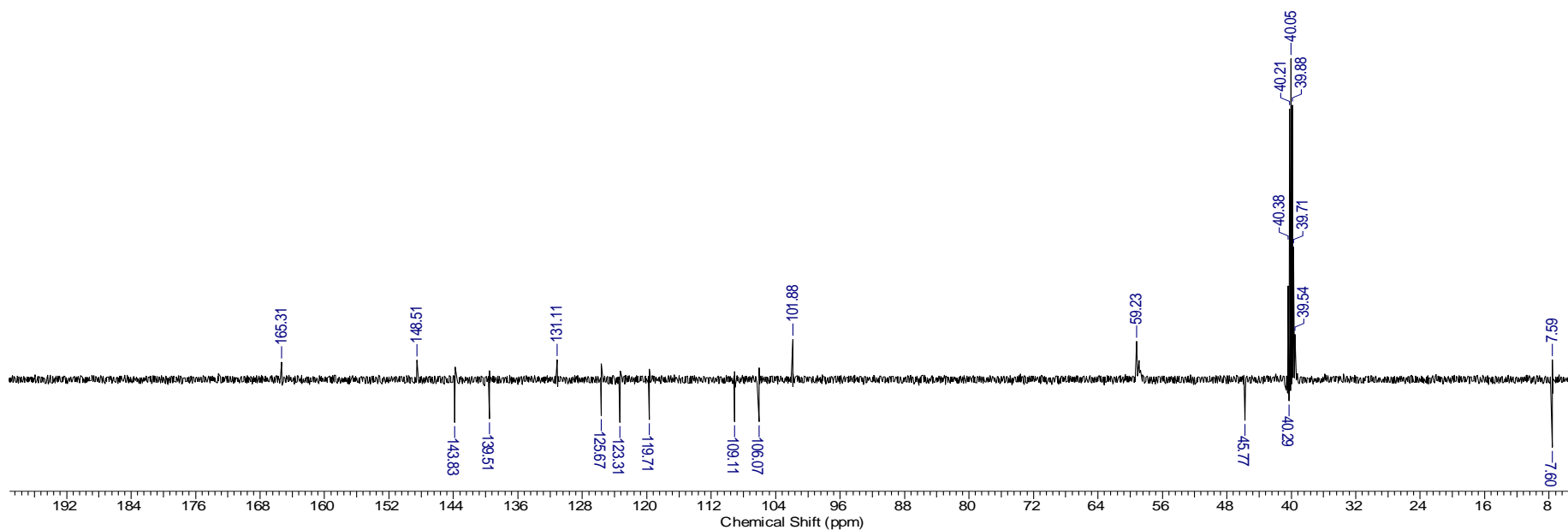
**Espectro 25: Espectro no Infravermelho do sal da 1-etilpiperazina.**

Acquisition Time (sec)	3.1719	Comment	AMOSTRA: SEP (PROTON) - 500MHZ SOLVENTE: DMSO				
Date	11 Jan 2012 10:19:28	File Name	E:\sabrina_004001r		Frequency (MHz)	500.13	
Nucleus	1H	Number of Transients	16	Original Points Count	32768	Pulse Sequence	zg30
Solvent	DMSO-D6	Sweep Width (Hz)	10330.58	Temperature (degree C)	25.160		



**Espectro 26: Espectro de RMN <sup>1</sup>H (500 MHz, DMSO – D6) do sal da amida 1-etilpiperazinila.**

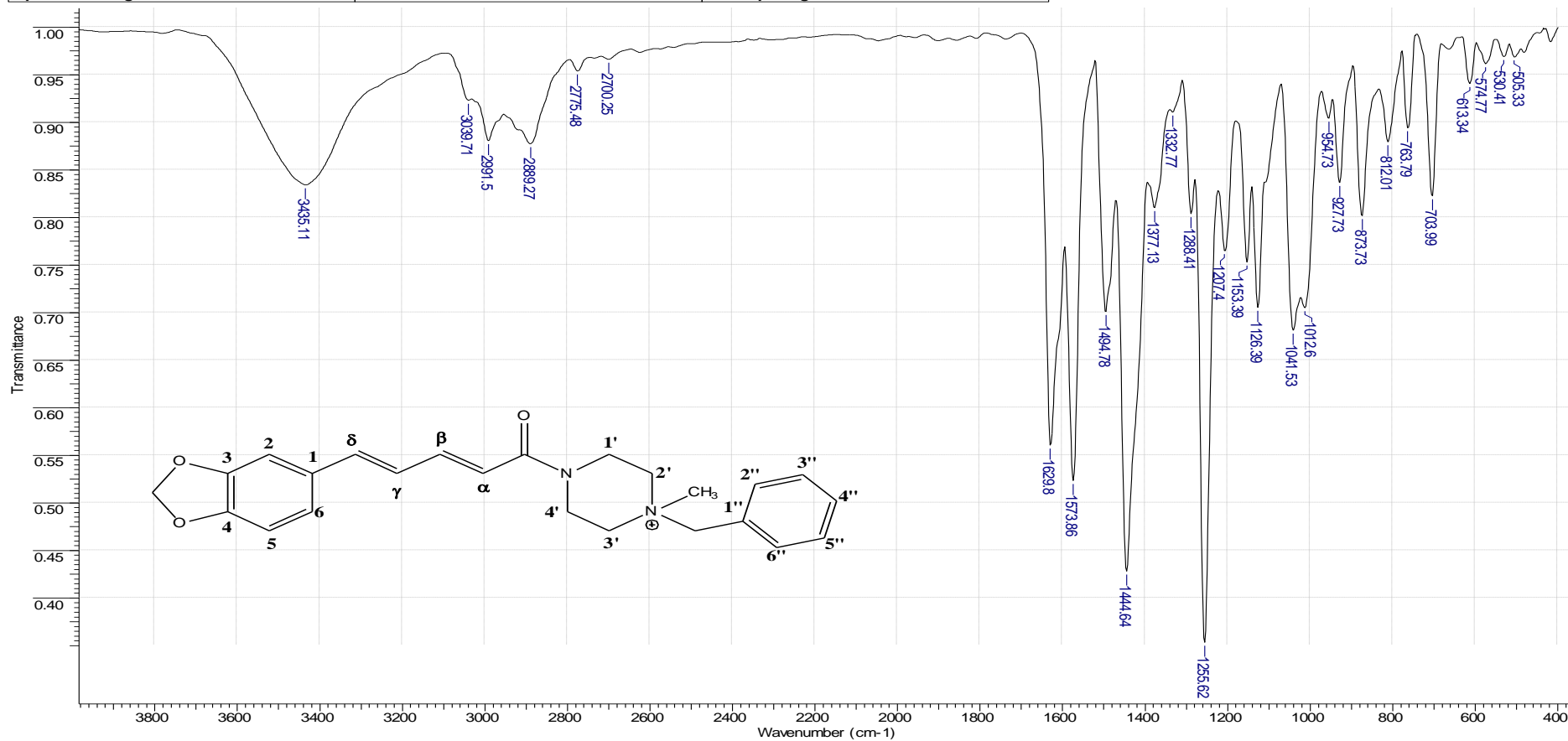
<b>Acquisition Time (sec)</b>	1.1010	<b>Comment</b>	AMOSTRA: SEP (DEPTQ) - 500MHZ SOLVENTE: CDCI3	<b>Date</b>	11 Jan 2012 10:34:44		
<b>File Name</b>	D:\sabrina_005001r		<b>Frequency (MHz)</b>	125.76	<b>Nucleus</b>	13C	
<b>Number of Transients</b>	256	<b>Original Points Count</b>	32768	<b>Points Count</b>	32768	<b>Pulse Sequence</b>	deptqgppsp
<b>Solvent</b>	DMSO-D6	<b>Sweep Width (Hz)</b>	29761.90	<b>Temperature (degree C)</b>	25.160		



**Espectro 27: Espectro de DEPT-Q (100 MHz, DMSO – D6) do sal da amida 1-etilpiperazínula.**

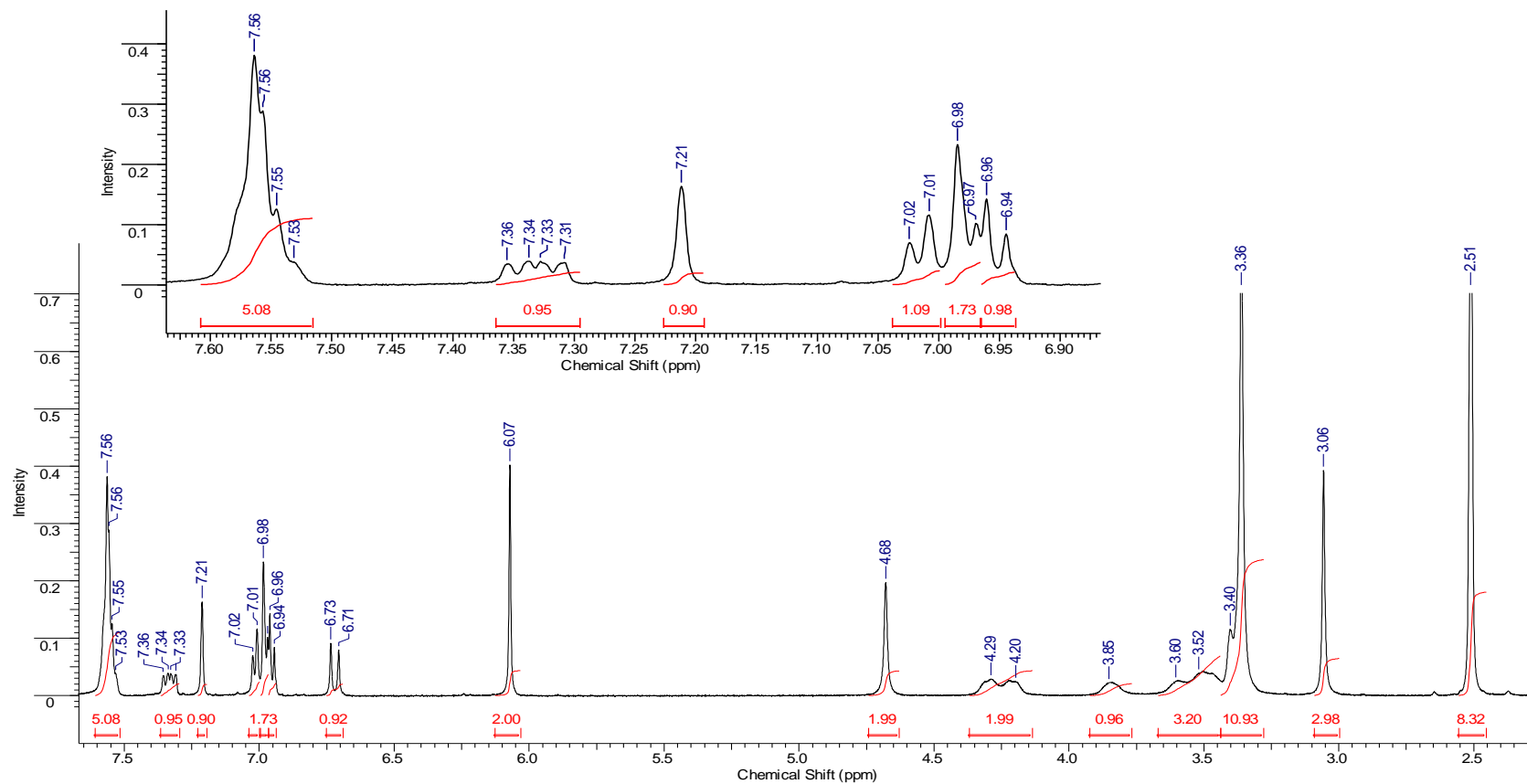


<b>Title</b>	SBP - SABRINA - PROF. ARTHUR		<b>File Name</b>	C:\USERS\MATHEUS FERREIRA\DOWNLOADS\SBP - SABRINA - PROF. ARTHUR.0			
<b>Date Stamp</b>	03/04/2013 12:56:51.207 (GMT-3)		<b>Date</b>	29 Apr 2013 14:39:42	<b>Technique</b>	Infrared	
<b>Instrument</b>	VERTEX 70	<b>Spectral Region</b>	IR	<b>X Axis</b>	Wavenumber (cm-1)	<b>Y Axis</b>	Transmittance
<b>Spectrum Range</b>	399.2520 - 3996.3760	<b>Points Count</b>	1866	<b>Data Spacing</b>	1.9288		



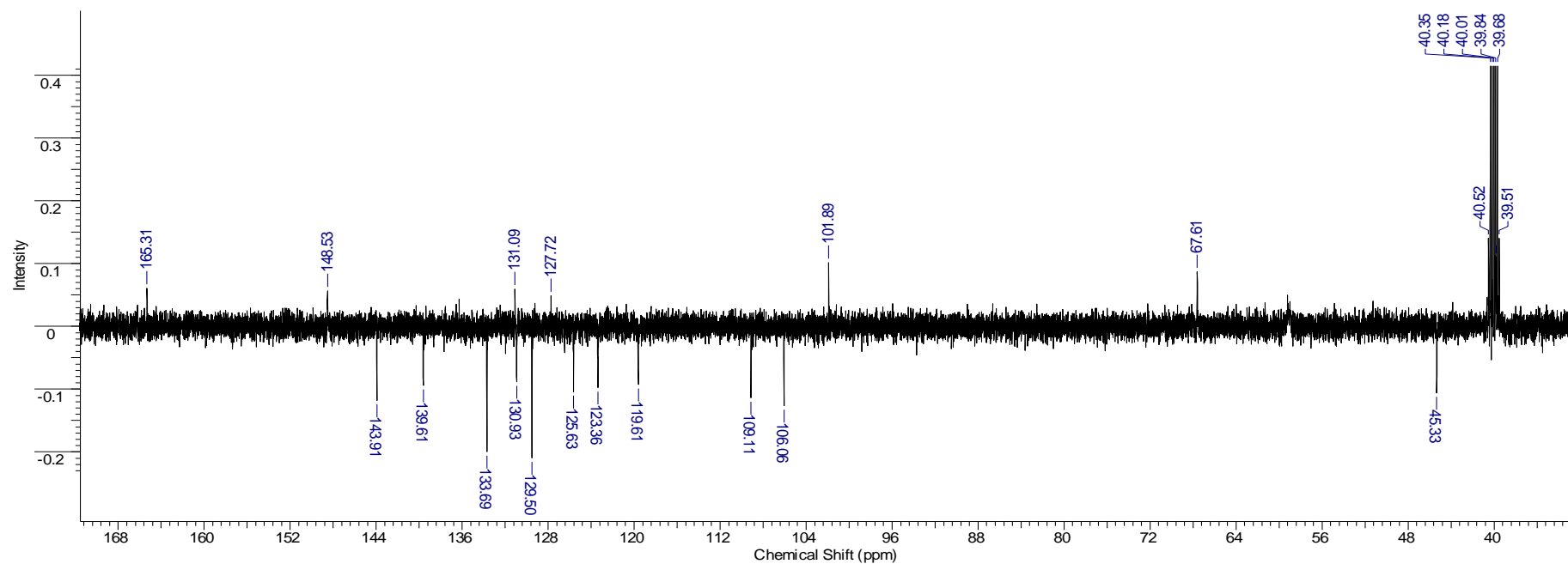
**Espectro 28: Espectro no Infravermelho do sal da 1-benzilpiperazina.**

<b>Acquisition Time (sec)</b>	3.1719	<b>Comment</b>	AMOSTRA: SBP(PROTON) - 500MHZ SOLVENTE: DMSO				
<b>Date</b>	16 Apr 2013 10:21:56	<b>File Name</b>	E:\sabrina_037001r		<b>Frequency (MHz)</b>	500.13	
<b>Nucleus</b>	1H	<b>Number of Transients</b>	16	<b>Original Points Count</b>	32768	<b>Pulse Sequence</b>	zg30
<b>Solvent</b>	DMSO-D6	<b>Sweep Width (Hz)</b>	10330.58	<b>Temperature (degree C)</b>	27.000		



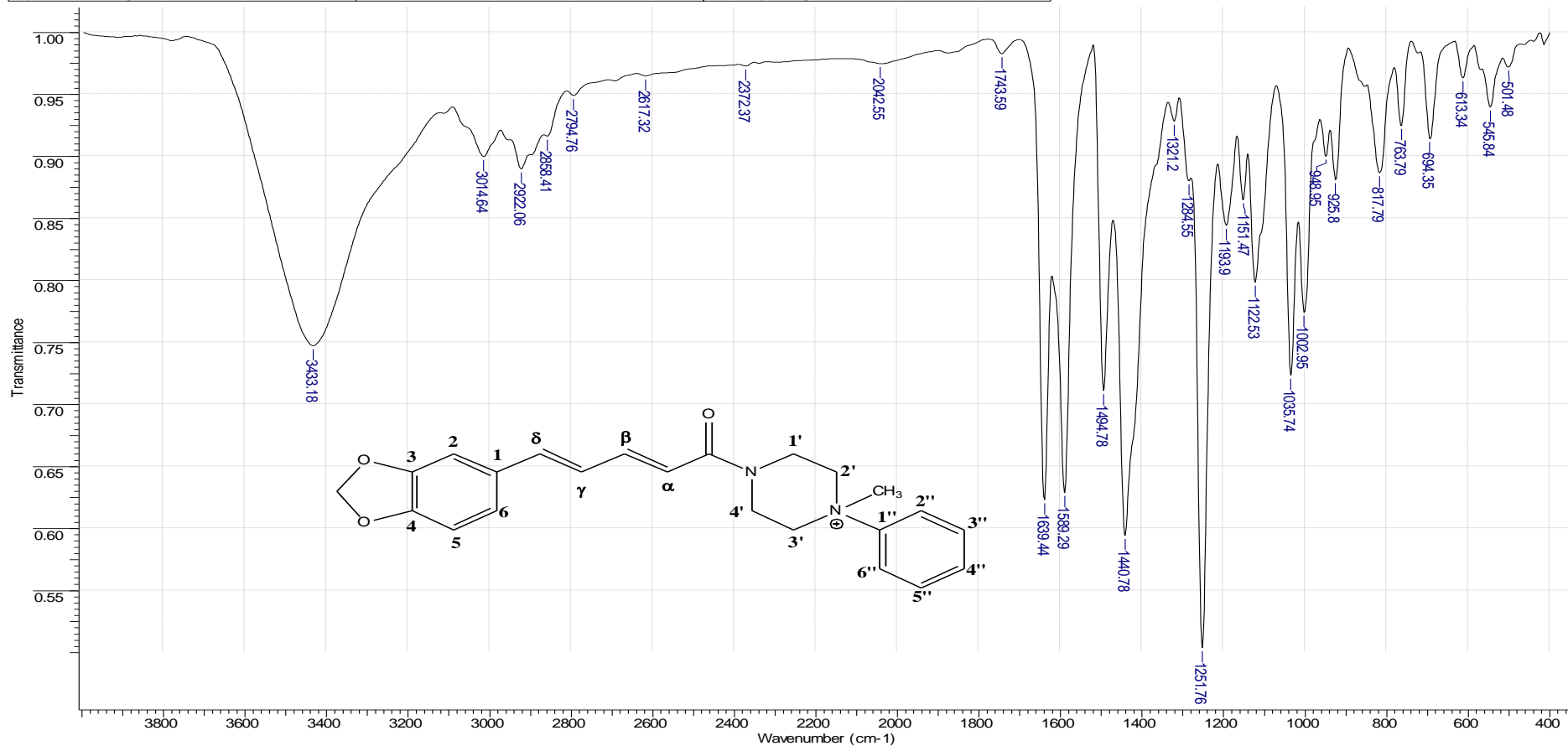
**Espectro 29: Espectro de RMN <sup>1</sup>H (500 MHz, DMSO – D6) do sal da amida 1-benzilpiperazina.**

<b>Acquisition Time (sec)</b>	1.1010	<b>Comment</b>	AMOSTRA: SBP - 02 (DEPT Q) - 500MHZ SOLVENTE: DMSO		
<b>Date</b>	19 Sep 2012 09:34:38	<b>File Name</b>	E:\sabrina_033001r		
<b>Frequency (MHz)</b>	125.76	<b>Nucleus</b>	13C	<b>Number of Transients</b>	256
<b>Points Count</b>	32768	<b>Pulse Sequence</b>	deptqgppsp	<b>Solvent</b>	DMSO-D6
<b>Temperature (degree C)</b>	22.160			<b>Original Points Count</b>	32768
				<b>Sweep Width (Hz)</b>	29761.90



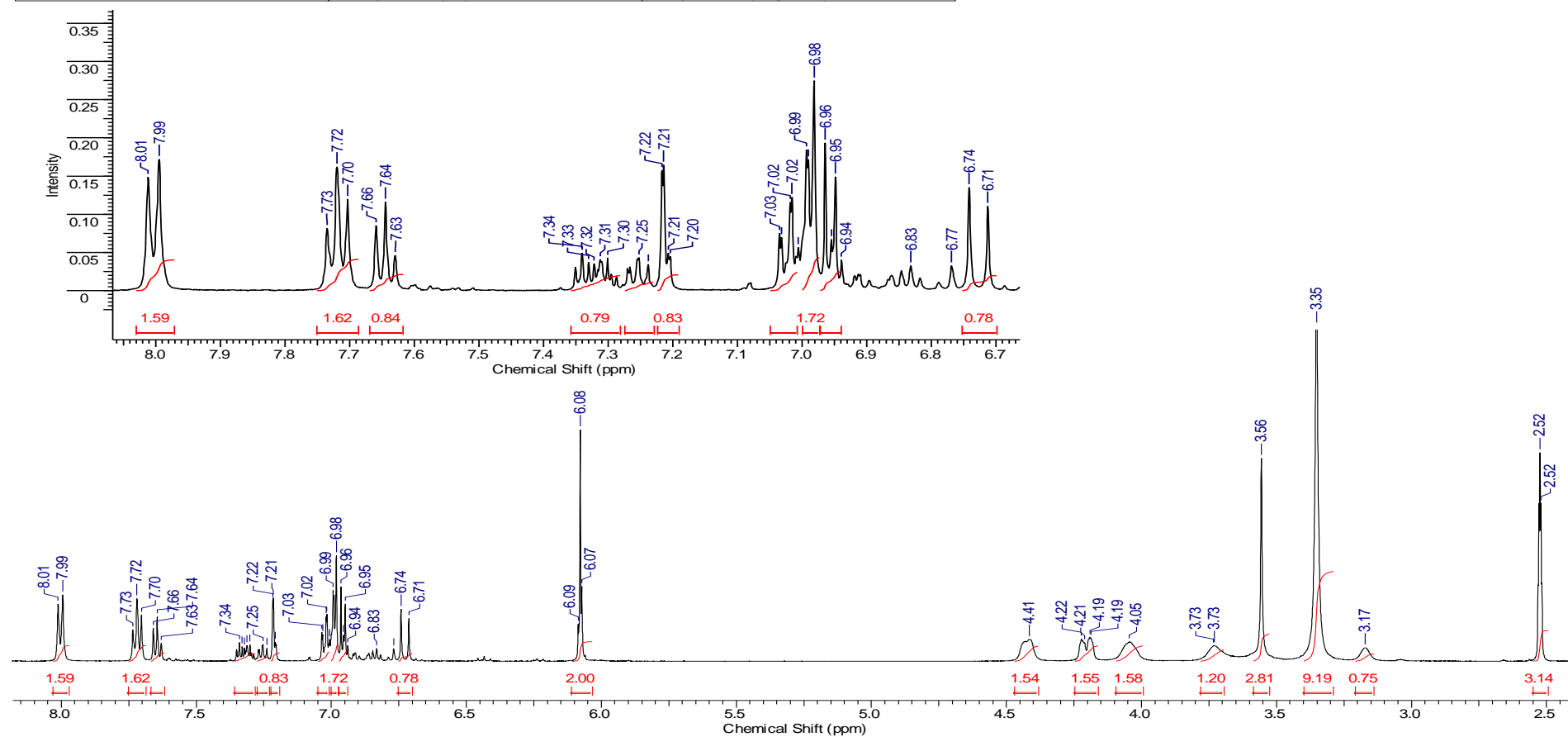
**Espectro 30: Espectro de DEPT-Q (100 MHz, DMSO – D6) do sal da amida 1-benzilpiperazínila.**

<b>Title</b>	SFP - SABRINA - PROF. ARTHUR	<b>File Name</b>	CAUSERS\MATHEUS FERREIRA\DOWNLOADS\SFP - SABRINA - PROF. ARTHUR.0		
<b>Date Stamp</b>	03/04/2013 13:56:54.509 (GMT-3)	<b>Date</b>	29 Apr 2013 14:39:42	<b>Technique</b>	Infrared
<b>Instrument</b>	VERTEX 70	<b>Spectral Region</b>	IR	<b>X Axis</b>	Wavenumber (cm-1)
<b>Spectrum Range</b>	399.2520 - 3996.3760	<b>Points Count</b>	1866	<b>Y Axis</b>	Transmittance
				<b>Data Spacing</b>	1.9288



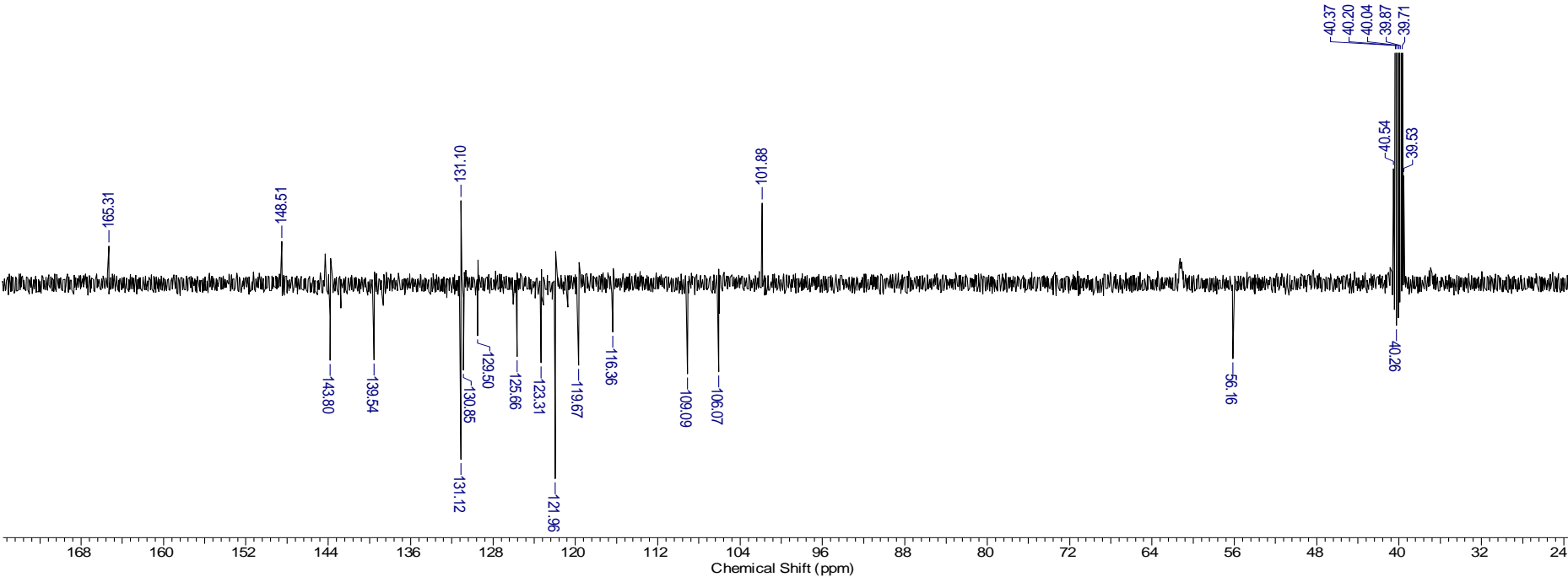
**Espectro 31: Espectro no Infravermelho do sal da 1-fenilpiperazina.**

<b>Acquisition Time (sec)</b>	3.1719	<b>Comment</b>	AMOSTRA: SFP (PROTON) - 500MHZ SOLVENTE: DMSO				
<b>Date</b>	11 Jan 2012 15:49:16	<b>File Name</b>	E:\sabrina_015001r		<b>Frequency (MHz)</b>	500.13	
<b>Nucleus</b>	1H	<b>Number of Transients</b>	16	<b>Original Points Count</b>	32768	<b>Pulse Sequence</b>	zg30
<b>Solvent</b>	DMSO-D6	<b>Sweep Width (Hz)</b>	10330.58	<b>Temperature (degree C)</b>	25.160		



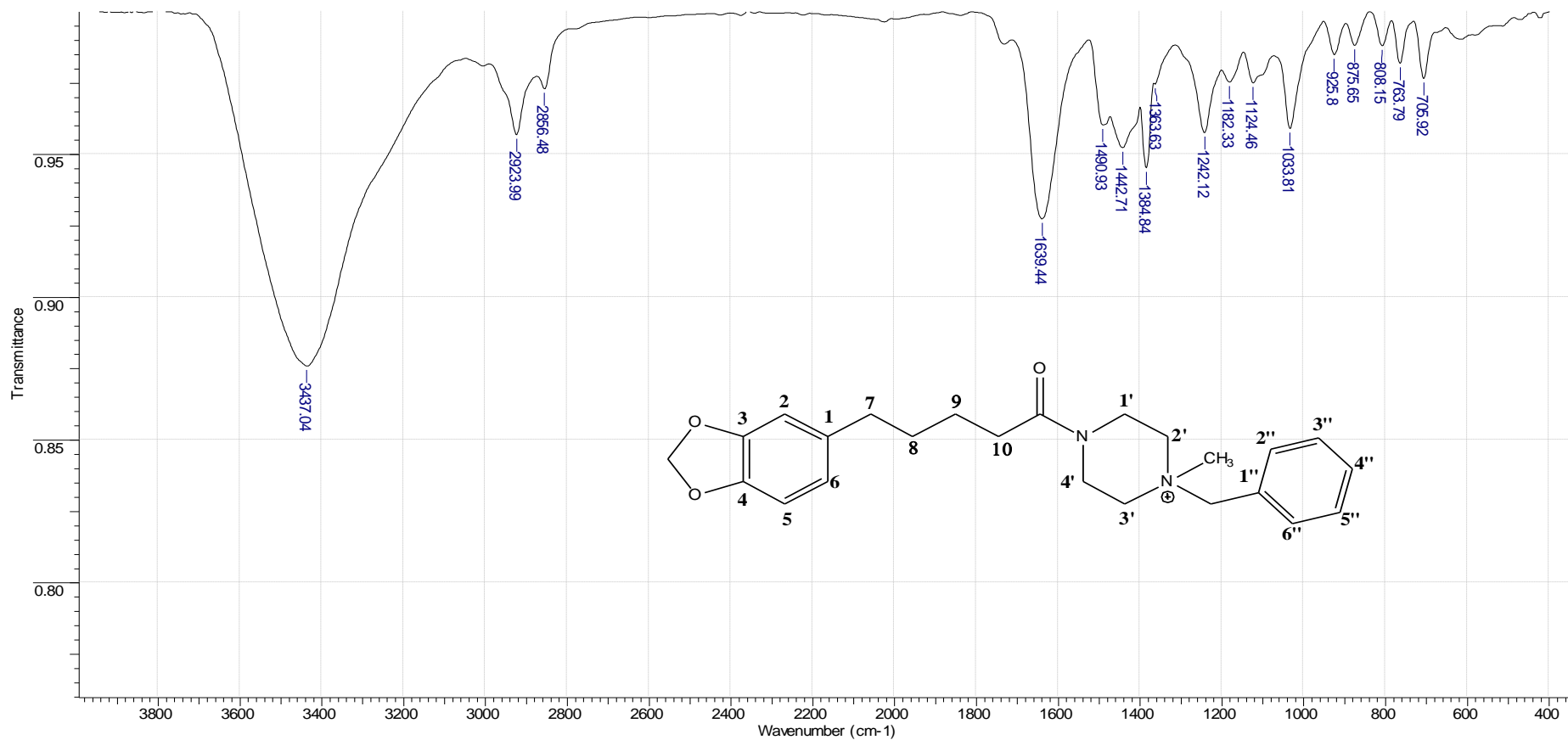
**Espectro 32: Espectro de RMN <sup>1</sup>H (500 MHz, DMSO – D6) do sal da amida 1-fenilpiperazina.**

<b>Acquisition Time (sec)</b>	1.1010	<b>Comment</b>	AMOSTRA: SFP (DEPTQ) - 500MHZ SOLVENTE: DMSO	<b>Date</b>	11 Jan 2012 16:04:18		
<b>File Name</b>	D:\sabrina_016001r		<b>Frequency (MHz)</b>	125.76	<b>Nucleus</b>	13C	
<b>Number of Transients</b>	256	<b>Original Points Count</b>	32768	<b>Points Count</b>	32768	<b>Pulse Sequence</b>	deptqgppsp
<b>Solvent</b>	DMSO-D6	<b>Sweep Width (Hz)</b>	29761.90	<b>Temperature (degree C)</b>	25.160		



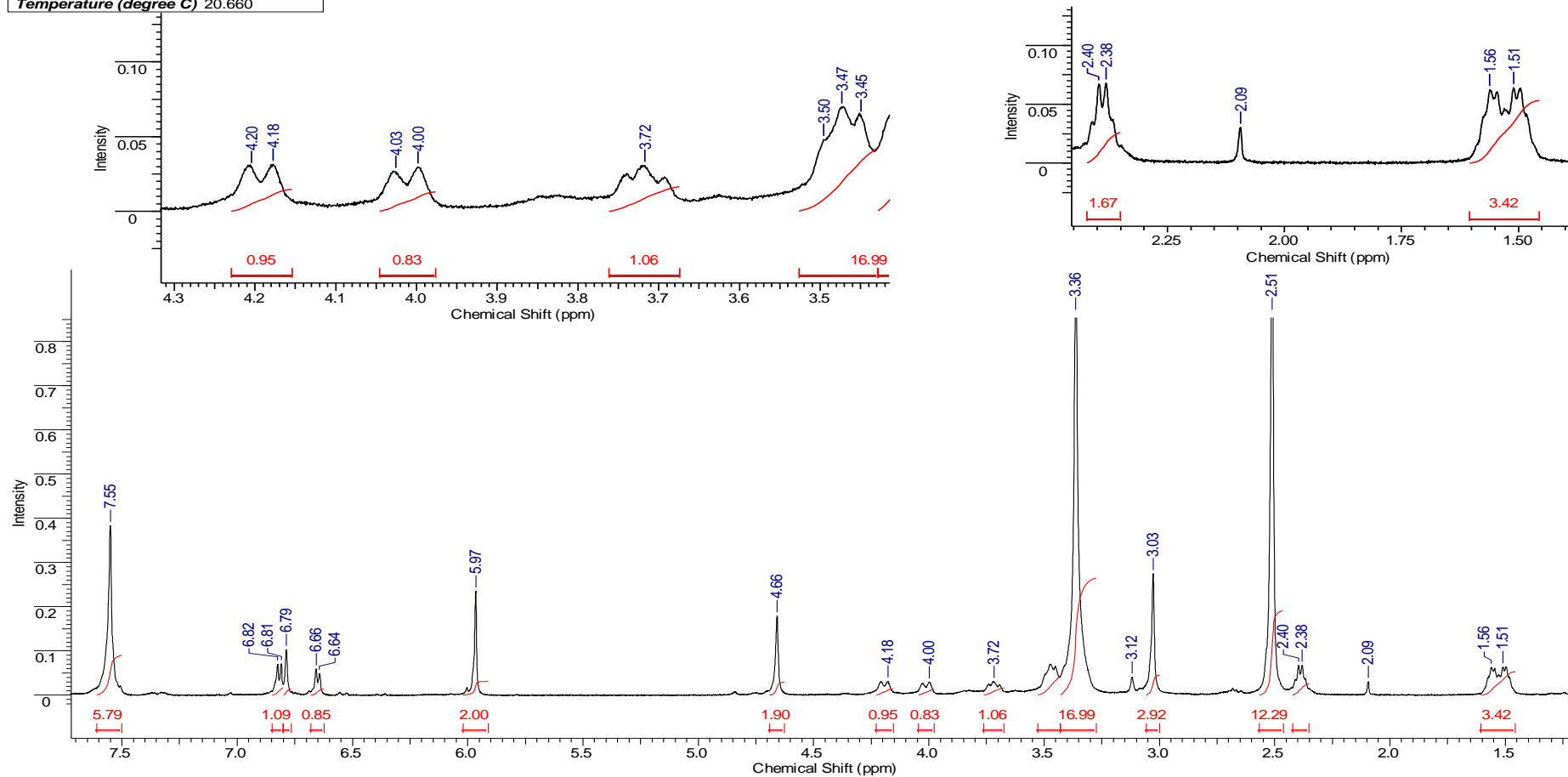
**Espectro 33: Espectro de DEPT-Q (100 MHz, DMSO – D6) do sal da amida 1-fenilpiperazinila.**

<b>Title</b>	SBPH - SABRINA - PROF.ARTHUR		<b>File Name</b>	C:\USERS\SABRINA\DOWNLOADS\SBPH - SABRINA - PROF.ARTHUR.0			
<b>Date Stamp</b>	11/04/2013 09:32:30.384 (GMT-3)		<b>Date</b>	14 May 2013 17:26:02	<b>Technique</b>	Infrared	
<b>Instrument</b>	VERTEX 70	<b>Spectral Region</b>	IR	<b>X Axis</b>	Wavenumber (cm-1)	<b>Y Axis</b>	Transmittance
<b>Spectrum Range</b>	399.2520 - 3996.3760	<b>Points Count</b>	1866	<b>Data Spacing</b>	1.9288		



**Espectro 34: Espectro no Infravermelho do sal da amida 1-benzilpiperazinila hidrogenada.**

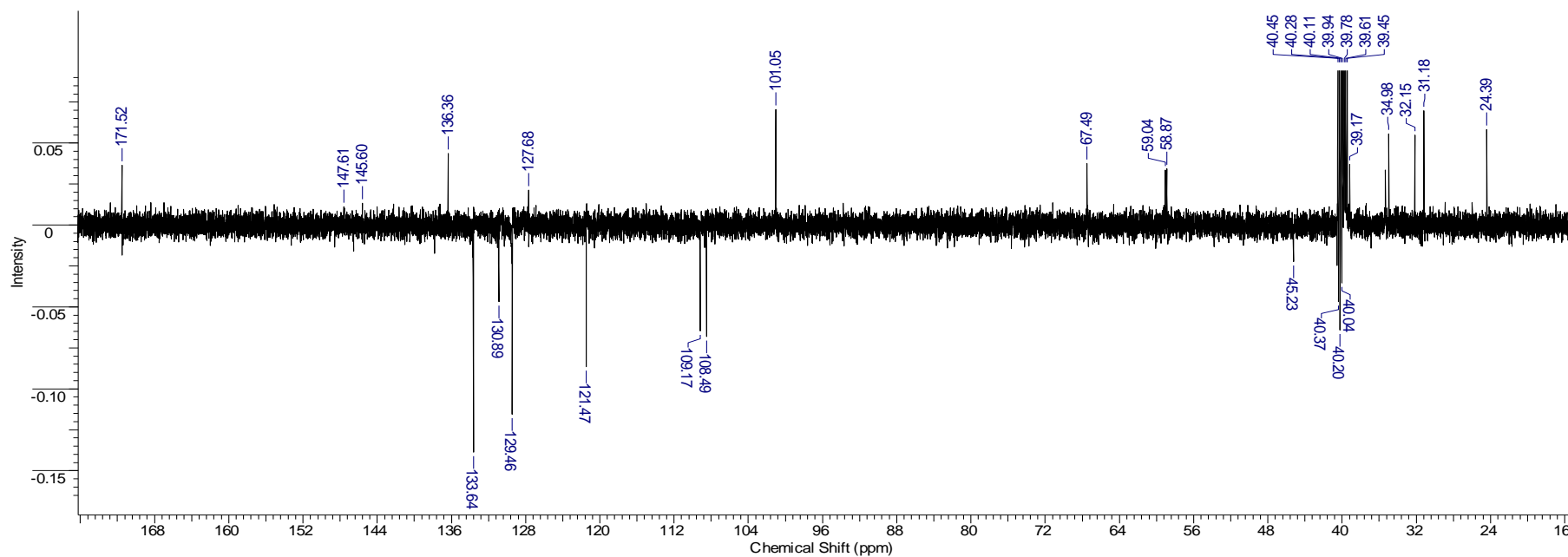
<b>Acquisition Time (sec)</b>	3.1719	<b>Comment</b>	AMOSTRA: SBPH (PROTON) - 500MHZ SOLVENTE: DMSO		
<b>Date</b>	16 Apr 2013 14:37:08	<b>File Name</b>	E:\sabrina_045001r		
<b>Frequency (MHz)</b>	500.13	<b>Nucleus</b>	1H	<b>Number of Transients</b>	16
<b>Points Count</b>	32768	<b>Pulse Sequence</b>	zg30	<b>Solvent</b>	DMSO-D6
<b>Temperature (degree C)</b>	20.660			<b>Original Points Count</b>	32768
				<b>Sweep Width (Hz)</b>	10330.58



**Espectro 35: Espectro de RMN <sup>1</sup>H (500 MHz, DMSO – D6) do sal da amida 1-benzilpiperazinila hidrogenada.**

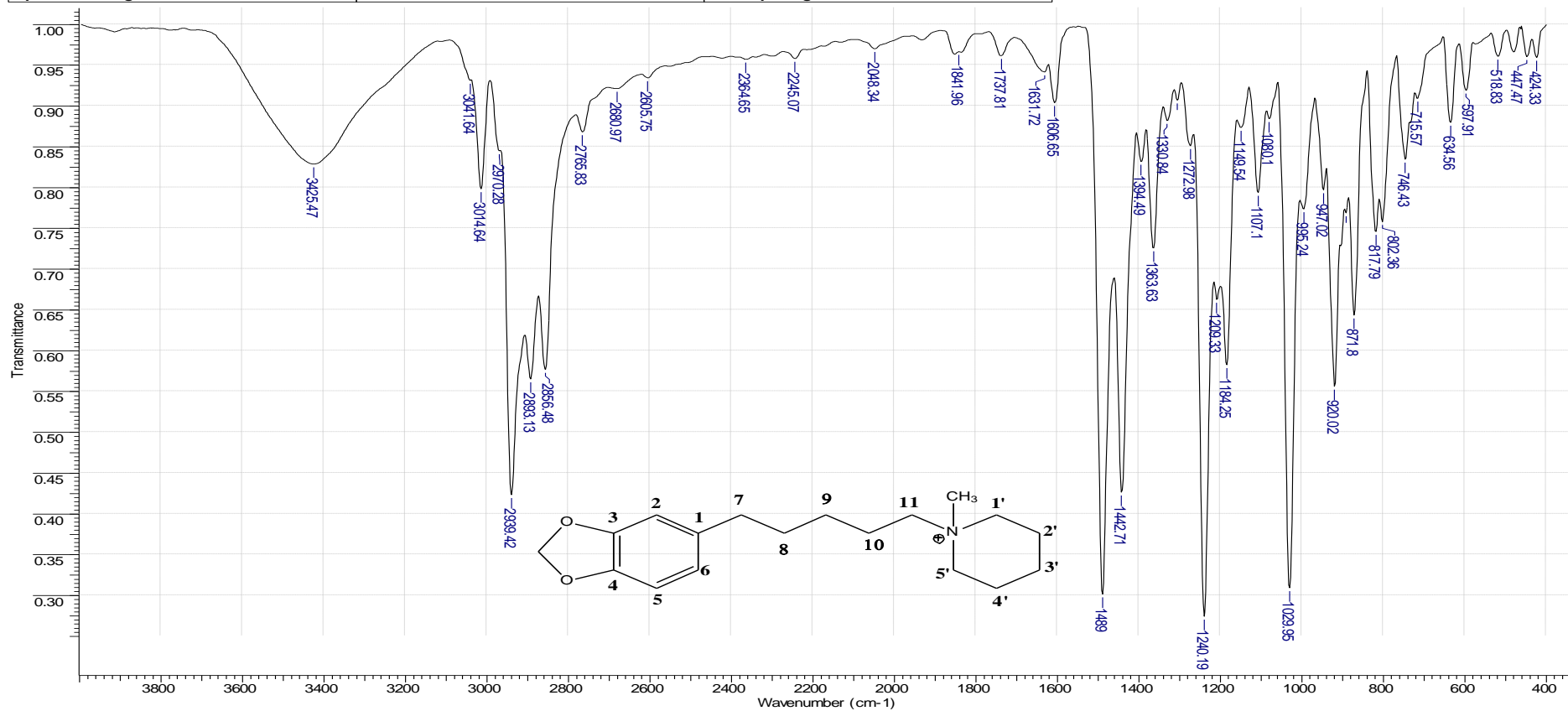


<b>Acquisition Time (sec)</b>	1.1010	<b>Comment</b>	AMOSTRA: SBPH 2 (DEPT Q) - 500MHZ SOLVENTE: DMSO		
<b>Date</b>	15 Apr 2013 10:45:36	<b>File Name</b>	E:\sabrina_036001r		
<b>Frequency (MHz)</b>	125.76	<b>Nucleus</b>	13C	<b>Number of Transients</b>	1000
<b>Points Count</b>	32768	<b>Pulse Sequence</b>	deptqgppsp	<b>Solvent</b>	DMSO-D6
<b>Temperature (degree C)</b>	20.160			<b>Original Points Count</b>	32768
				<b>Sweep Width (Hz)</b>	29761.90



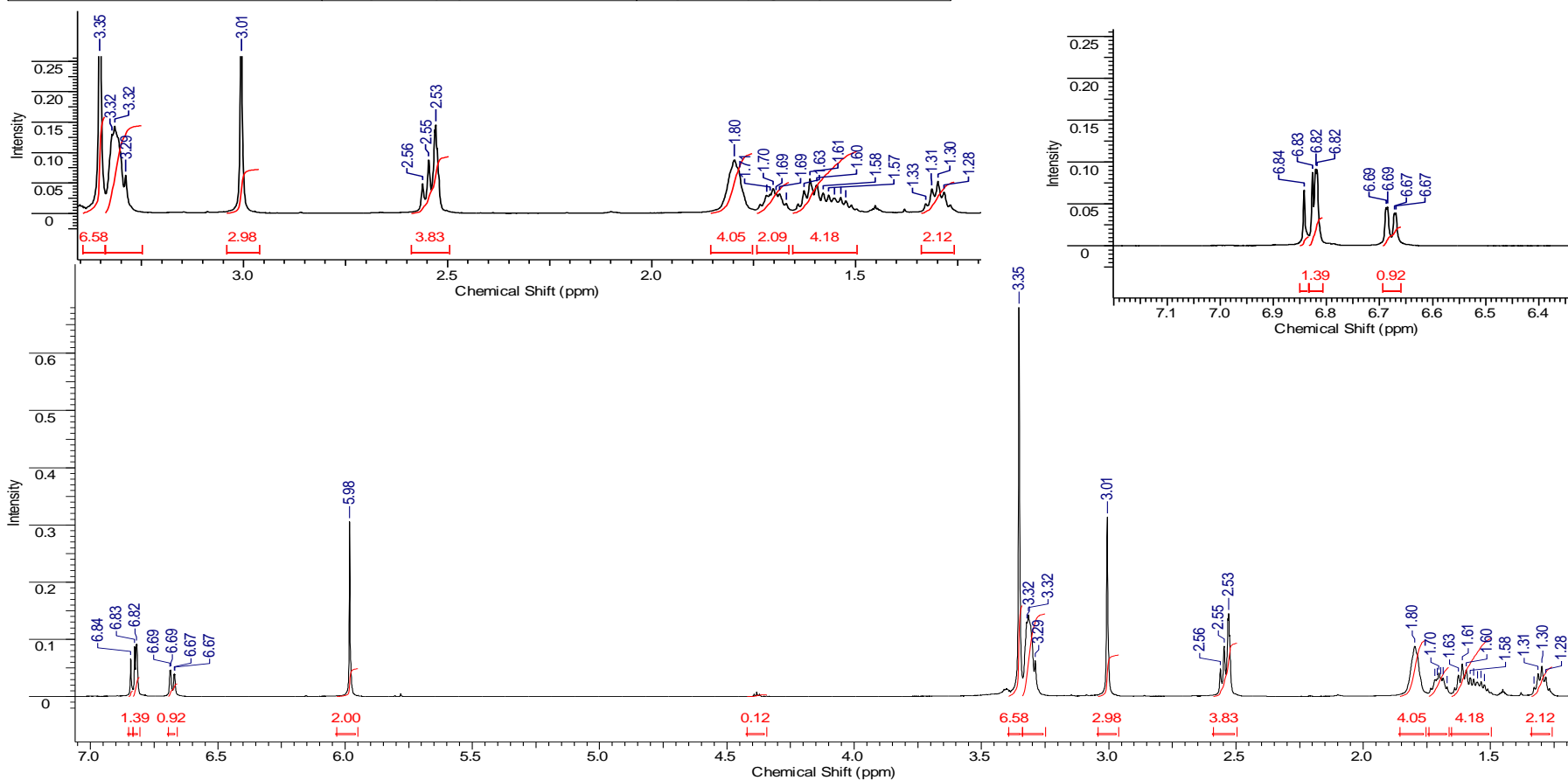
**Espectro 36: Espectro de DEPT-Q (100 MHz, DMSO – D6) do sal da amida 1-benzilpiperazina hidrogenada.**

<b>Title</b>	SPR - SABRINA - PROF. ARTHUR	<b>File Name</b>	C:\USERS\MATHEUS FERREIRA\DOWNLOADS\SPR - SABRINA - PROF. ARTHUR.0		
<b>Date Stamp</b>	03/04/2013 13:47:49.390 (GMT-3)	<b>Date</b>	29 Apr 2013 14:39:42	<b>Technique</b>	Infrared
<b>Instrument</b>	VERTEX 70	<b>Spectral Region</b>	IR	<b>X Axis</b>	Wavenumber (cm-1)
<b>Spectrum Range</b>	399.2520 - 3996.3760	<b>Points Count</b>	1866	<b>Y Axis</b>	Transmittance
				<b>Data Spacing</b>	1.9288



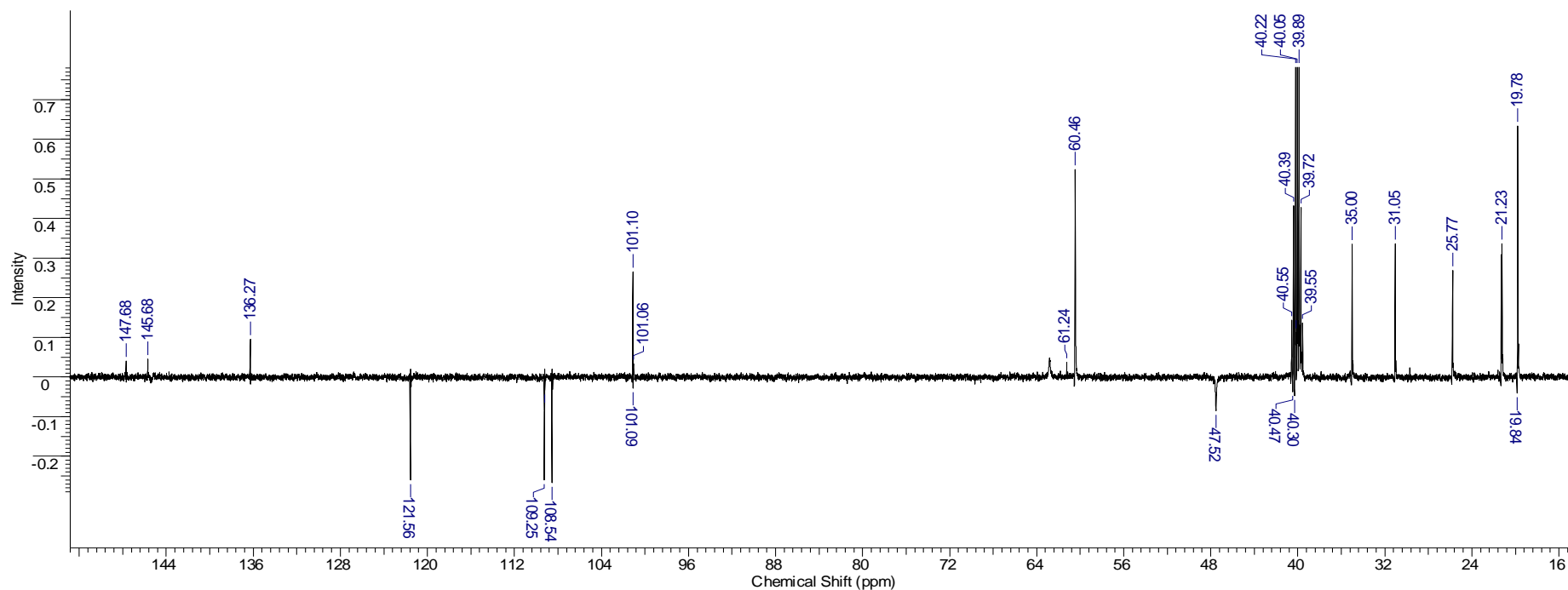
**Espectro 37: Espectro no Infravermelho do sal da amida [1-(5-(benzo[d][1,3]dioxol-5-il)pentil)piperidina]**

Acquisition Time (sec)	3.1719	Comment	AMOSTRA: SPR (PROTON) - 500MHZ SOLVENTE: DMSO				
Date	25 Jan 2012 10:36:50	File Name	E:\sabrina_018001r		Frequency (MHz)	500.13	
Nucleus	1H	Number of Transients	16	Original Points Count	32768	Pulse Sequence	zg30
Solvent	DMSO-D6	Sweep Width (Hz)	10330.58	Temperature (degree C)	25.160		



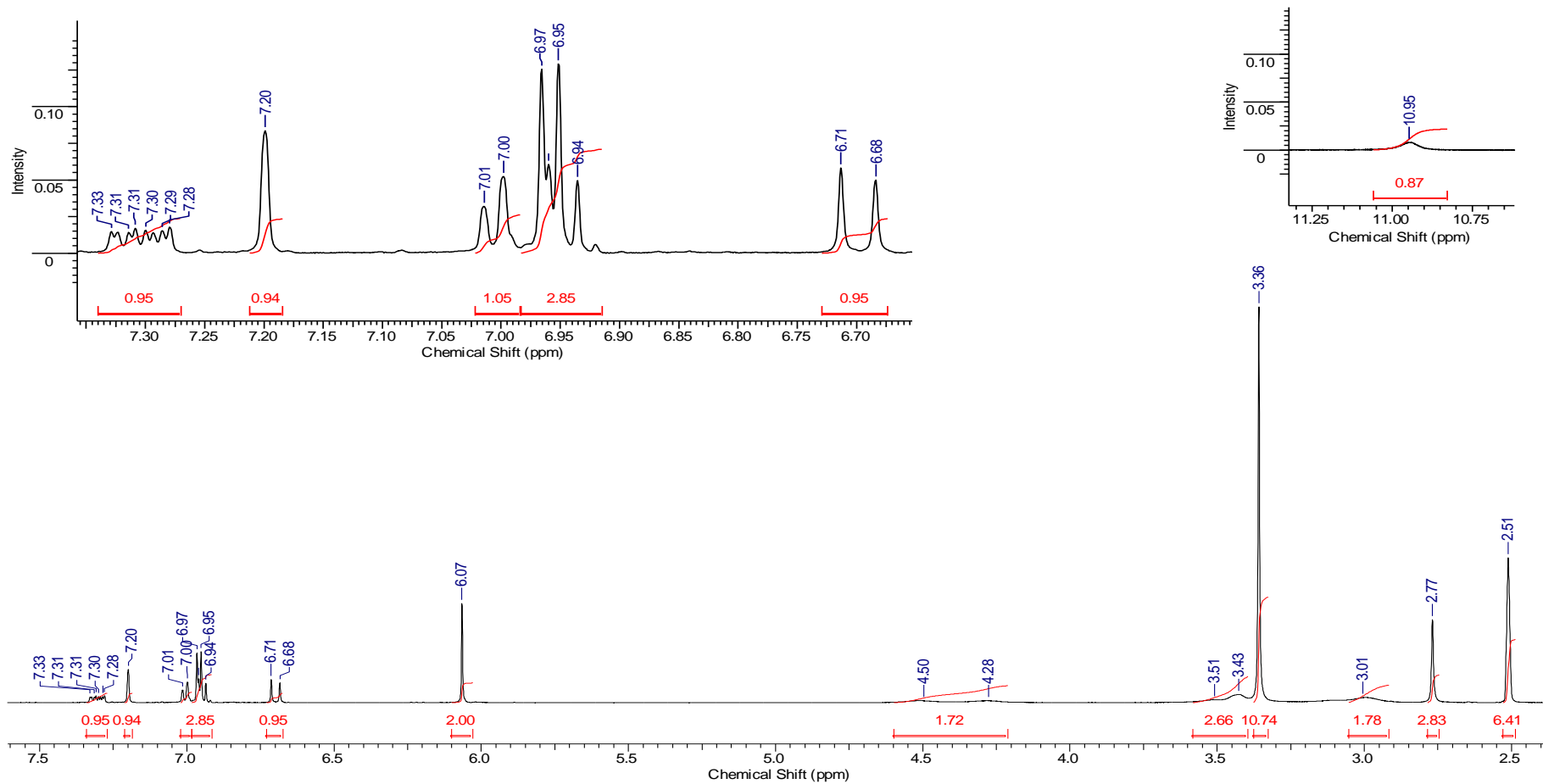
**Espectro 38: Espectro de RMN <sup>1</sup>H (500 MHz, DMSO – D6) do sal da amida [1-(5-(benzo[d][1,3]dioxol-5-il)pentil)piperidina]**

<b>Acquisition Time (sec)</b>	1.1010	<b>Comment</b>	AMOSTRA: SPR (DEPTQ) - 500MHZ SOLVENTE: DMSO	<b>Date</b>	25 Jan 2012 11:02:48
<b>File Name</b>	E:\sabrina_019001r	<b>Frequency (MHz)</b>	125.76	<b>Nucleus</b>	<sup>13</sup> C
<b>Number of Transients</b>	461	<b>Original Points Count</b>	32768	<b>Points Count</b>	32768
<b>Solvent</b>	DMSO-D6	<b>Sweep Width (Hz)</b>	29761.90	<b>Temperature (degree C)</b>	25.160
				<b>Pulse Sequence</b>	deptqgppsp



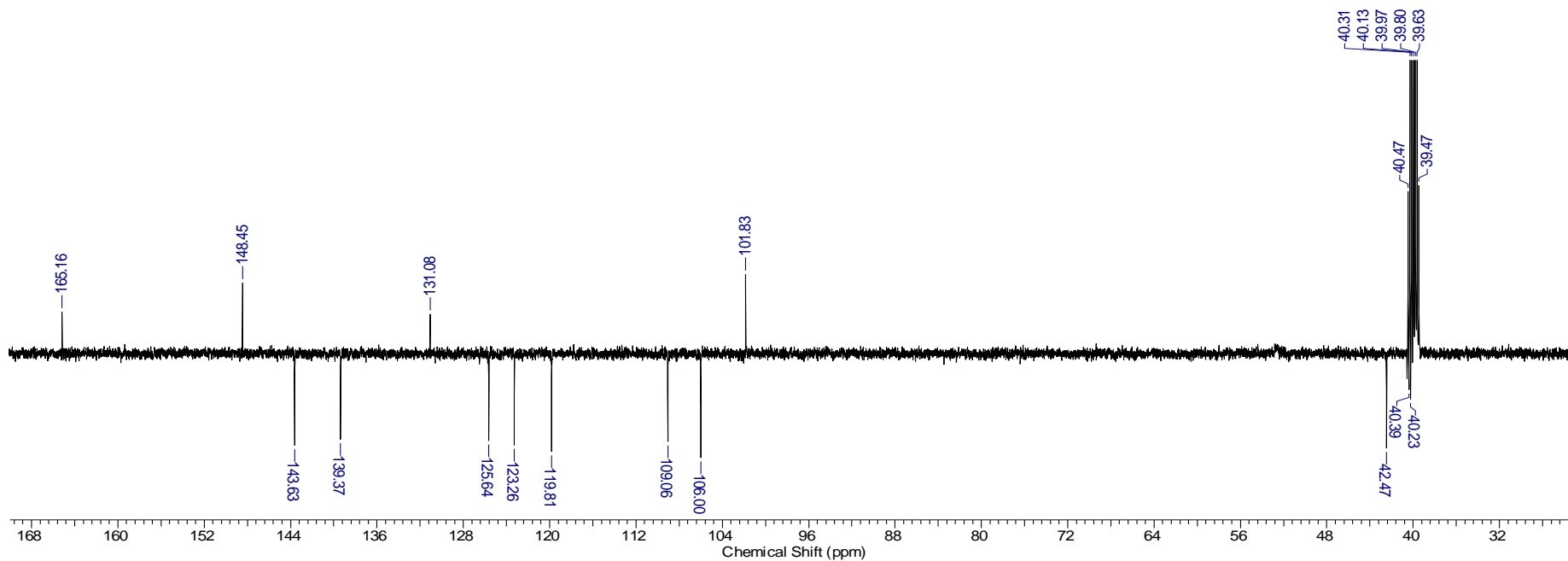
**Espectro 39: Espectro de DEPT-Q (100 MHz, DMSO – D6) do sal da amida [1-(5-(benzo[d][1,3]dioxol-5-il)pentil)piperidina]**

<b>Acquisition Time (sec)</b>	3.1719	<b>Comment</b>	AMOSTRA: CMP (1H) - 500MHZ SOLVENTE: DMSO	<b>Date</b>	16 Apr 2013 11:25:08		
<b>File Name</b>	E:\sabrina_039001r	<b>Frequency (MHz)</b>	500.13	<b>Nucleus</b>	1H	<b>Number of Transients</b>	16
<b>Original Points Count</b>	32768	<b>Points Count</b>	32768	<b>Pulse Sequence</b>	zg30	<b>Solvent</b>	DMSO-D6
<b>Temperature (degree C)</b>	27.000					<b>Sweep Width (Hz)</b>	10330.58



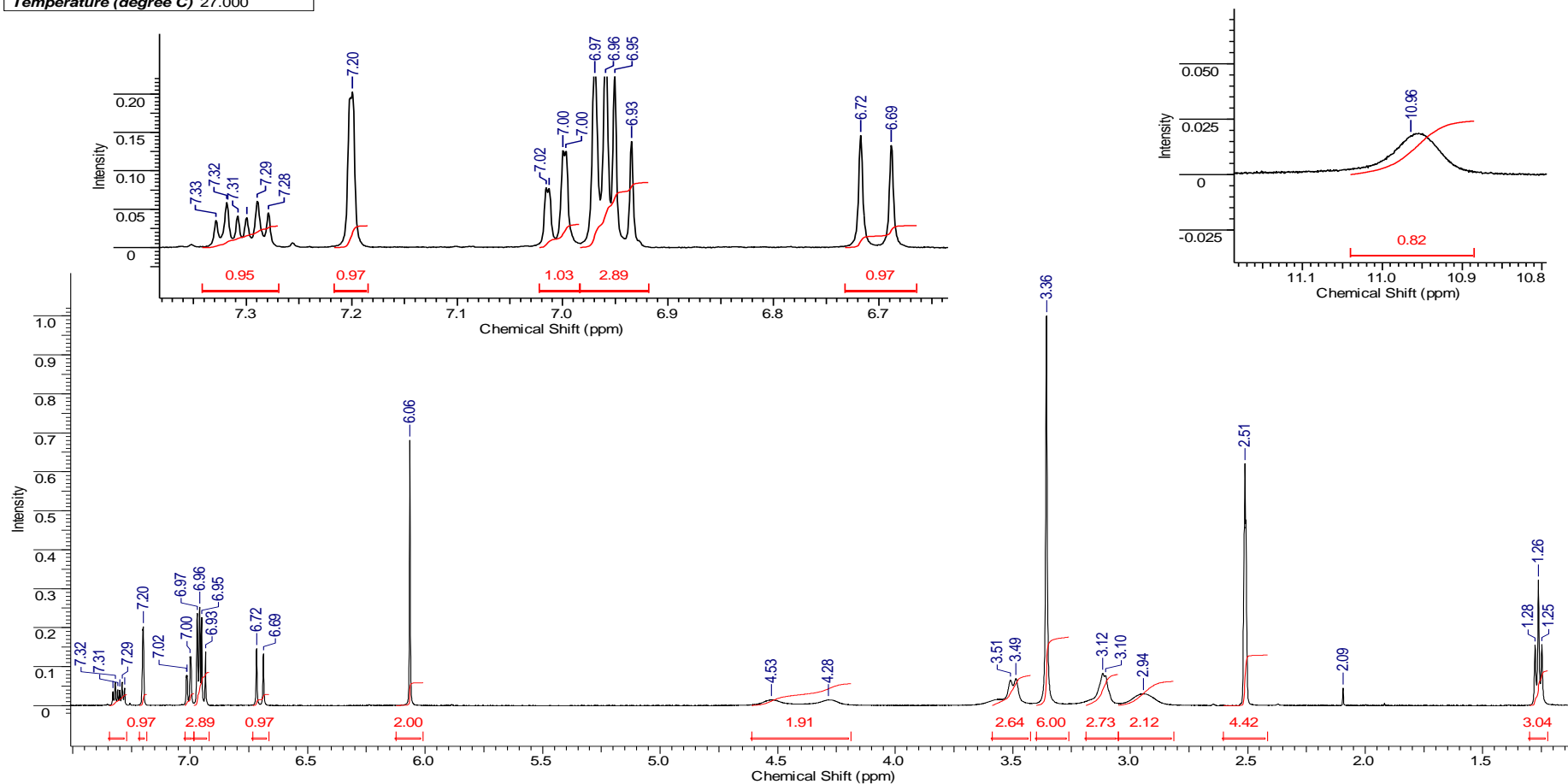
**Espectro 40: Espectro de RMN <sup>1</sup>H (500 MHz, DMSO – D6) do cloridrato da amida 1-metilpiperazínica.**

<b>Acquisition Time (sec)</b>	1.1010	<b>Comment</b>	AMOSTRA: CMP (DEPTQ) - 500MHZ SOLVENTE: DMSO	<b>Date</b>	16 Apr 2013 13:27:02
<b>File Name</b>	E:\sabrina_040001r			<b>Frequency (MHz)</b>	125.76
<b>Number of Transients</b>	512	<b>Original Points Count</b>	32768	<b>Points Count</b>	32768
<b>Solvent</b>	DMSO-D6	<b>Sweep Width (Hz)</b>	29761.90	<b>Temperature (degree C)</b>	27.000
				<b>Nucleus</b>	13C
				<b>Pulse Sequence</b>	deptqgppsp



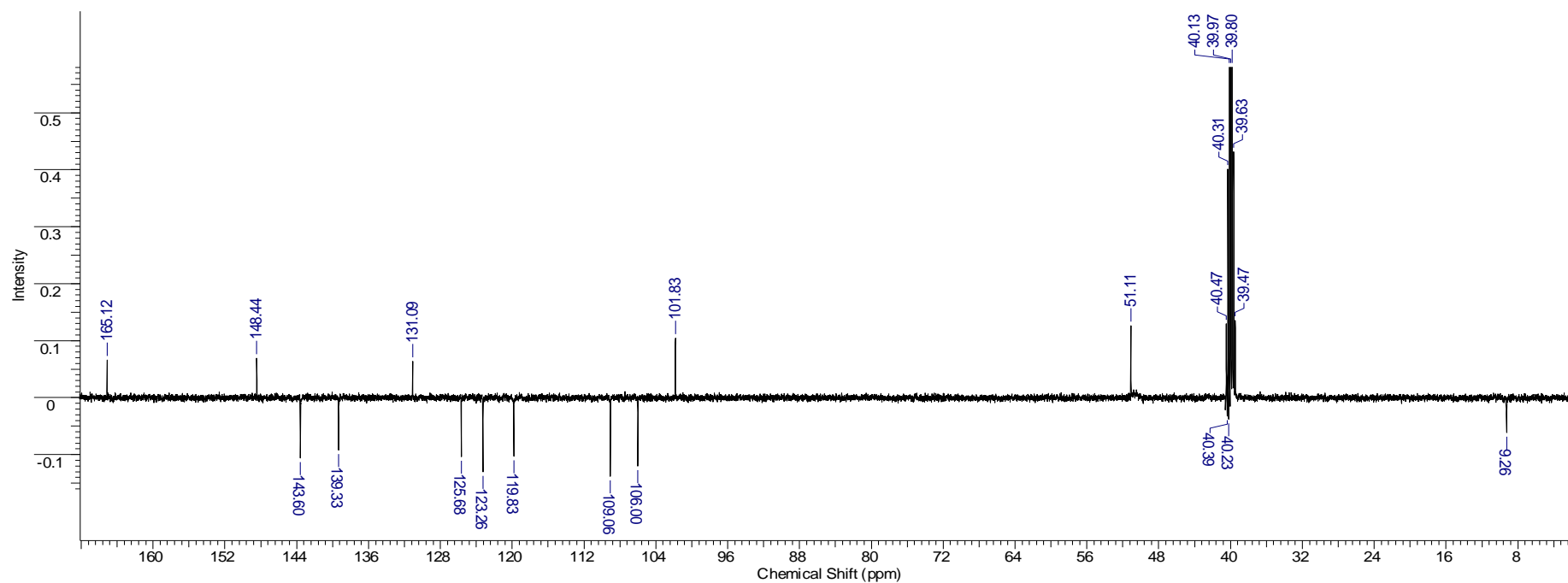
**Espectro 41: Espectro de DEPT-Q (100 MHz, DMSO – D6) do cloridrato da amida 1-metilpiperazinila.**

Acquisition Time (sec)	3.1719	Comment	AMOSTRA: CEP (1H) - 500MHZ SOLVENTE: DMSO	Date	16 Apr 2013 13:31:12
File Name	E:\sabrina_041001r	Frequency (MHz)	500.13	Nucleus	1H
Original Points Count	32768	Pulse Sequence	zg30	Solvent	DMSO-D6
Temperature (degree C)	27.000	Points Count	32768	Number of Transients	16
				Sweep Width (Hz)	10330.58



**Espectro 42: Espectro de RMN  $^1\text{H}$  (500 MHz, DMSO – D6) do cloridrato da amida 1-etilpiperazínica.**

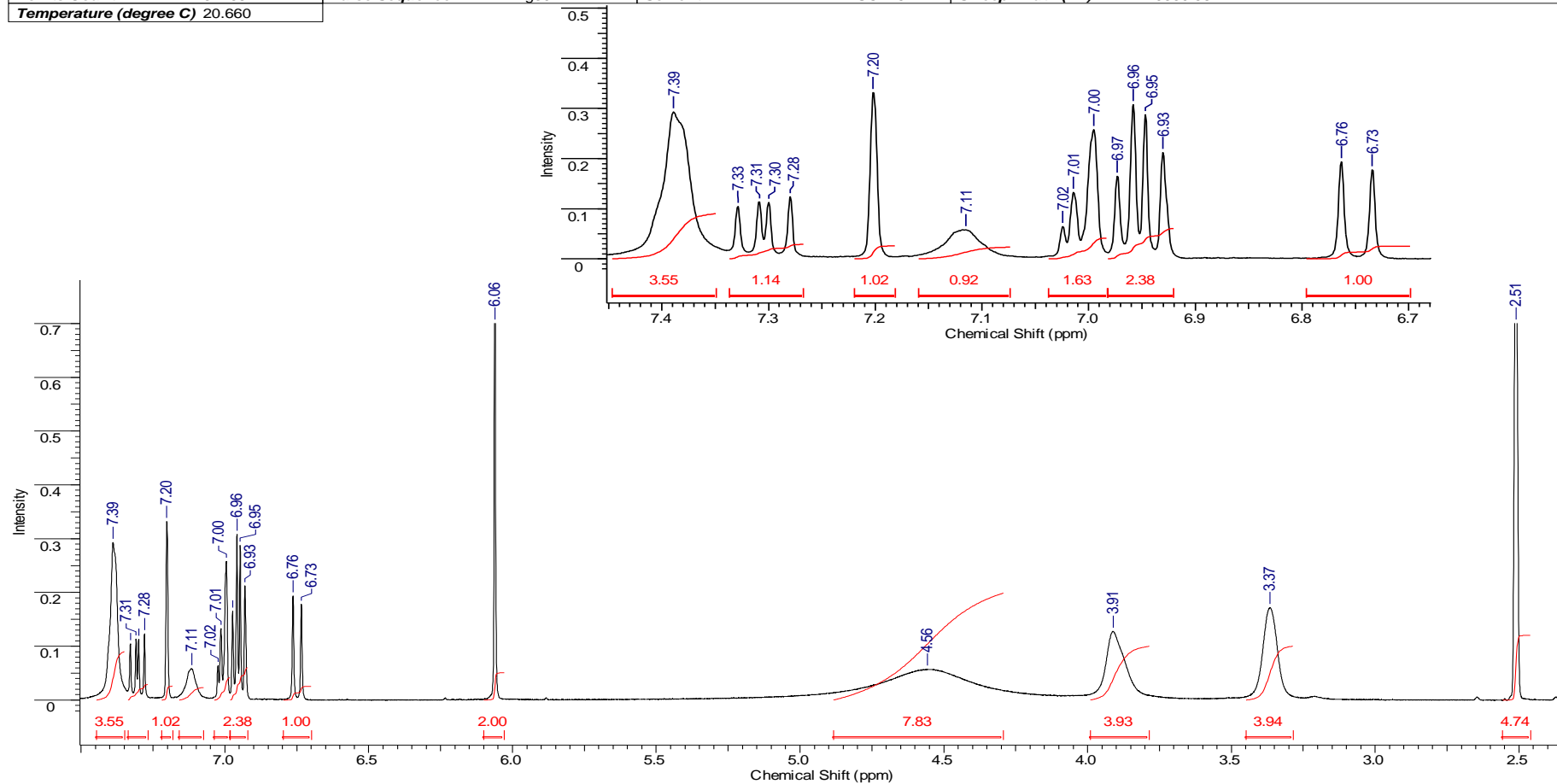
<b>Acquisition Time (sec)</b>	1.1010	<b>Comment</b>	AMOSTRA: CEP (DEPTQ) - 500MHZ SOLVENTE: DMSO	<b>Date</b>	16 Apr 2013 13:52:40
<b>File Name</b>	E:\sabrina_042001r	<b>Frequency (MHz)</b>	125.76	<b>Nucleus</b>	13C
<b>Number of Transients</b>	512	<b>Original Points Count</b>	32768	<b>Points Count</b>	32768
<b>Solvent</b>	DMSO-D6	<b>Sweep Width (Hz)</b>	29761.90	<b>Temperature (degree C)</b>	21.360
				<b>Pulse Sequence</b>	deptqgppsp



**Espectro 43: Espectro de DEPT-Q (100 MHz, DMSO – D6) do cloridrato da amida 1-etilpiperazínica.**

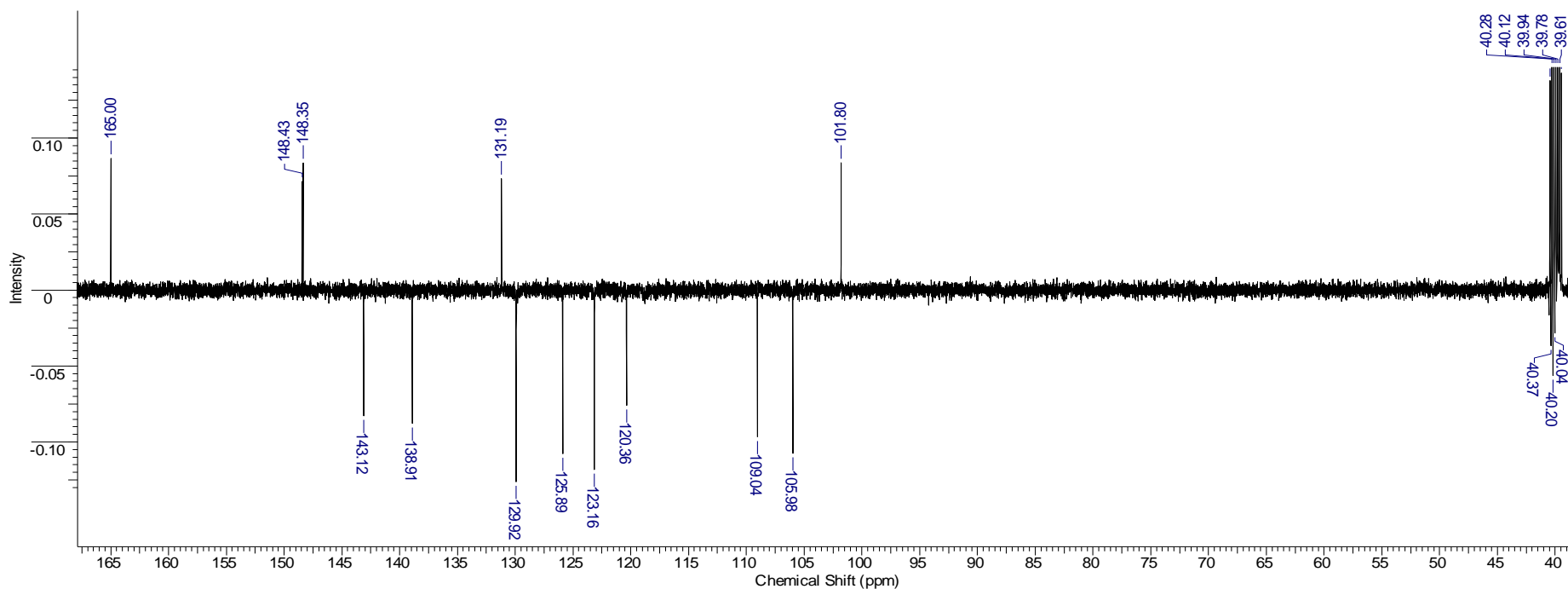


<b>Acquisition Time (sec)</b>	3.1719	<b>Comment</b>	AMOSTRA: CFP (PROTON) - 500MHZ SOLVENTE: DMSO		
<b>Date</b>	15 May 2013 08:21:16	<b>File Name</b>	E:\47pdata\1\_047001r		
<b>Frequency (MHz)</b>	500.13	<b>Nucleus</b>	1H	<b>Number of Transients</b>	16
<b>Points Count</b>	32768	<b>Pulse Sequence</b>	zg30	<b>Solvent</b>	DMSO-D6
<b>Temperature (degree C)</b>	20.660			<b>Sweep Width (Hz)</b>	10330.58



**Espectro 44: Espectro de RMN <sup>1</sup>H (500 MHz, DMSO – D6) do cloridrato da amida 1-fenilpiperazina.**

<b>Acquisition Time (sec)</b>	1.1010	<b>Comment</b>	AMOSTRA: CFP (DEPT Q) - 500MHZ SOLVENTE: DMSO	<b>Date</b>	15 May 2013 09:08:06
<b>File Name</b>	E:\48\pdata\1\_048001r	<b>Frequency (MHz)</b>	125.76	<b>Nucleus</b>	<sup>13</sup> C
<b>Number of Transients</b>	870	<b>Original Points Count</b>	32768	<b>Points Count</b>	32768
<b>Solvent</b>	DMSO-D6	<b>Sweep Width (Hz)</b>	29761.90	<b>Temperature (degree C)</b>	20.860
				<b>Pulse Sequence</b>	deptqgppsp



**Espectro 45: Espectro de DEPT-Q (100 MHz, DMSO – D6) do cloridrato da amida 1-fenilpiperazina.**