UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE QUÍMICA
Programa de Pós-graduação em Química

CAMILA ANCHAU WEGERMANN

**Interações de ligantes imínicos com peptídeos
amiloides e metais essenciais implicados em processos
neurodegenerativos**

Versão corrigida da Tese defendida

São Paulo

Data do Depósito na SPG:
28/02/2018

CAMILA ANCHAU WEGERMANN

**Interações de Ligantes Imínicos com Peptídeos
Amiloides e Metais Essenciais Implicados em
Processos Neurodegenerativos**

*Tese apresentada a Instituto de Química da
Universidade de São Paulo para obtenção
do Título de Doutora em Química*

Orientadora: Profa. Dra. Ana Maria da Costa Ferreira

São Paulo
2018

Dedicatória

Ao meu esposo, o homem da minha vida, Julio Cesar da Rocha pelo incentivo e apoio incondicional.

Agradecimentos

Àquele que dá forças ao cansado e multiplica as forças ao que não tem nenhum vigor. Agradeço a Deus por ser meu caminho, meu ânimo, minha inspiração.

Desejo agradecer aos meus professores pela orientação e supervisão ao longo destes anos.

Sou imensamente grata à professora Dra. Ana Maria da Costa Ferreira por me encorajar e me guiar neste caminho árduo. Certamente um dos aspectos mais marcantes da professora Ana Maria é a ousadia em buscar novos caminhos e relacionamentos promissores. A professora nunca se esquece de um aluno ou colaborador, vai além do essencial e faz o papel de mãe, de advogada, de psicóloga, o que for preciso para nos ajudar nessa jornada.

Minha gratidão também ao professor Dr. Luigi Casella pelo período em que me acolheu e supervisionou na Universidade de Pavia/Itália. Agradeço deveras pelas contribuições significativas ao meu projeto e pela colaboração ao longo destes anos.

Ao professor Dr. Enrico Monzani (Universidade de Pavia) meu muito obrigada, em especial pelas contribuições com a parte espectroscópica de todo o trabalho. O professor Enrico, é sem dúvidas um cientista/professor talentoso há quem devo muito neste projeto.

Sou grata à professora Dra. Maria Teresa Machini, do Instituto de Bioquímica da USP, pela colaboração no que tange à obtenção dos peptídeos, e pelas contribuições com a interpretação dos resultados e processos de síntese.

Desejo agradecer ao professor Dr. Luiz Antônio Sodré Costa, pelas contribuições com o projeto referentes aos cálculos teóricos. Agradeço também ao professor Dr. Willian Tássio Gomes Novato e à bacharel Laura Duarte Loureiro também pelas contribuições em química computacional com o presente trabalho.

A Me. Janaina Vilcachagua, pelo auxílio com a obtenção e interpretação dos espectros de RMN. Sou grata pelo zelo em que tem tratado este projeto, pelos ensinamentos e, em especial, pela amizade.

Aos professores da banca de qualificação e de defesa pela disponibilidade e certamente pelas contribuições com o projeto.

Agradeço à Dra. Valentina Pirota pelo acolhimento no laboratório de bioinorgânica ao longo dos nove meses em que estive na Itália e pelas infindáveis discussões que certamente trouxeram à luz diversas questões valiosas para este trabalho. Valentina tem sido uma grande amiga e colaboradora desde então. Me recebeu como um membro de sua família o que certamente tornou a minha jornada muito mais produtiva e gratificante. Tive sorte em conhecê-la.

Meu estimado aluno de iniciação científica, meu parceiro de pesquisa, que tem resistido bravamente nesse caminho desafiador desde que decidi fazer parte da equipe. Mauricio Oshiro é uma pessoa única e admirável. Meus sinceros agradecimentos por toda a contribuição com o projeto, por se fazer presente, sempre respeitoso e esforçado. Espero que esta parceria possa ainda gerar muitos frutos.

Agradeço aos técnicos do laboratório, Maria A. Paiva Lopes e Dr. Ricardo Couto, pelo suporte referente à todas incumbências de laboratório. Agradeço pela paciência, pela simpatia, em especial, pela amizade. Sem vocês estaríamos perdidos!

Ao Laboratório de Química Supramolecular e Nanotecnologia (IQ-USP), aos professores Dr. Henrique Toma e Dr. Koiti Araki por disporem o laboratório e equipamentos sem restrições para nosso uso. Em especial, sou grata ao técnico Dr. Alceu Totti pelo acompanhamento e suporte durante todo o processo.

Meu marido, parceiro e sobretudo amigo, Julio Cesar da Rocha. Você tem sido meu guia, meu professor, meu conselheiro e saber que apesar de nossas individualidades temos construídos juntos uma história pelo sucesso e felicidade do outro, me faz te escolher todos os dias. Ninguém sabe tão bem o quanto este tempo tem sido tão penoso e desafiador quanto nós. Embarcamos atados nesta jornada e sou muito grata por tê-lo comigo. Sobretudo, sou grata pela sua integridade, seu conhecimento acima da média e empatia que certamente trouxeram grandes contribuições para este projeto em todos os âmbitos. Muito obrigada por tudo!

Às minhas estimadas amigas Dr. Adriana Pires Vieira, Me. Cléia Justino Nunes e Me. Ana Paula Mangoni pela amizade e companheirismo, minha imensa gratidão. Somos terapeutas, cozinheiras e incentivadoras umas das outras. Obrigada por estenderem a mão quando precisei, pelas longas conversas, pelas risadas, pelas críticas, por tudo. Vocês são amigas mais chegadas que um irmão. Muito obrigada por tudo.

A minha irmã e cunhado Talita Wegermann e Linconl Ferreira Moreira, minha mãe Andrea Conde Anchau, minha avó Carmen Conde Anchau pelo apoio, torcida e por fazerem tudo o que está ao seu alcance pelo meu bem. Amo vocês.

Aos meus avós Guinter Wegermann e Ilma Alebrandt Wegermann e meu pai Edgar Wegermann, minha gratidão. Meus sogros Geni Teresinha da Rocha, Valério Luis da Rocha, meus cunhados Ana da Rocha e Ricardo Netto minhas sinceras estimas e consideração. Todos vocês moram no meu coração.

Aos amigos Dr. Kassio Zanoni, Me. Danilo Stingen, Me. Mauricio Portioli, entre tantos outros pela amizade e contribuições com o trabalho.

Aos colegas de grupo (Brasil), Daniel de Oliveira Tavares Alves Martins, Francisco Fernandes Neto, Veridiana de Freitas Tofik, Rodrigo Boni Fazzi, Me. Rodrigo Bernardi Miguel, Marcelo Cecconi Portes e Dr. Eduardo Guimarães Vieira meu muito obrigada. Tem sido uma aventura e um imenso prazer fazer parte deste grupo.

Aos meus colegas e amigos de grupo (Itália), Dra. Aurora Pacini, Andrea Capucciacci, Dra. Eliana Lo Presti e Dr. Simone Dell'Acqua meus sinceros agradecimentos. Este tempo tão curto e tão especial que passei com vocês me conduziu a um rico aprendizado que não se paga.

Aos órgãos de fomento Fapesp, Capes, CNPq, Instituto de química da USP e Universidade de São Paulo.

Resumo

Wegermann, C.A. **Interações de ligantes imínicos com peptídeos amiloides e metais essenciais implicados em processos neurodegenerativos**, 2018, 180 p. Tese (Doutorado) - Programa de Pós-Graduação em Química. Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

A terapia de quelação tem sido descrita na literatura como uma ferramenta importante no combate de processos neurodegenerativos como a doença de Alzheimer (AD). Esta doença é caracterizada pela agregação de peptídeos β -amiloides, formando fibrilas, que parece ser induzida ou facilitada em presença de íons metálicos como Cu^{2+} , Zn^{2+} ou Fe^{3+} . Vários compostos já foram testados e descritos como ligantes competitivos para coordenar e retirar estes íons dos agregados proteicos em condições patológicas, na chamada “hipótese da cascata amiloide”. O presente projeto visou investigar a reatividade de ligantes imínicos, derivados de oxindóis, na quelação de cobre(II) e zinco(II), numa tentativa de inibir ou evitar a formação de agregados relacionados à AD. Foram sintetizados seis compostos imínicos, sendo duas hidrazonas inéditas: isahim e isahpy e quatro bases de Schiff: isapn, misapn, isaen e misaen, as três últimas também inéditas. Os compostos foram caracterizados por espectroscopia FTIR, RMN, UV/VIS e por análise elementar CHN e espectrometria de massas ESI-MS/MS. Os valores das constantes de estabilidade ($\log \beta$ 2,7 – 5,1) para a formação dos complexos $[\text{ML}]^{2+}$ e do aduto $[(\text{A}\beta_{1-16})_2 \cdot \text{isahim}]$ em solução aquosa foram determinadas por espectroscopia UV/VIS. As formas de interação dos compostos isapn, misapn e isahim com o peptídeo $\text{A}\beta_{1-16}$ foram analisadas por espectroscopia ^1H RMN, observando-se uma forte interação com as histidinas His6, His13 e His14 e com os carboxilatos do peptídeo. A eficácia dos ligantes foi testada frente ao processo de inibição da agregação do peptídeo $\text{A}\beta_{1-40}$ na presença e ausência de íons Cu^{2+} ou Zn^{2+} por turbidimetria. Estudos de docking e dinâmica molecular suportam que a interação dos ligantes imínicos com o peptídeo $\text{A}\beta_{1-16}$ ocorre nos mesmos sítios de coordenação dos íons metálicos. Os resultados indicam que os compostos aqui estudados podem atuar como eficientes inibidores de agregação dos peptídeos amiloides implicados na AD.

Palavras-chave: ligantes imínicos; peptídeos amiloides; doença de Alzheimer; cobre; zinco.

Abstract

Wegermann, C.A. **Interactions of imine ligands with amyloid peptides and essential metals implicated in neurodegenerative processes**, 2018, 180 p., Ph. D. Thesis – Graduate Program in Chemistry. Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

Chelation therapy has been considered in the literature an important tool in neurodegenerative processes like Alzheimer disease (AD). This disease is characterized by aggregation of β -amyloid peptides that seems to be improved in the presence of metal ions, particularly copper, zinc and iron. Several compounds have been tested and reported as competitive ligands to withdrawal these metal ions from protein aggregates in pathologic conditions, in the “amyloid cascade hypothesis”. The present project aims to investigate the reactivity of imine ligands, particularly those derived from oxindoles, in the chelation of copper(II) and zinc(II) ions trying to inhibit or avoid aggregate formation related to AD. Six iminic compounds were synthesized, being two of them hydrazones: isahim and isahpy and four Schiff bases: isapn, misapn, isaen, and misaen. The compounds were characterized by spectroscopic analysis (FTIR, NMR, UV/VIS), elemental analysis CHN and mass spectrometry ESI-MS/MS. The corresponding stability constants ($\log \beta_{2,7-5,1}$) for each complex formation $[ML]^{2+}$ as well as for the adduct $[(A\beta_{1-16})_2 \cdot isahim]$ in aqueous solution were determined by UV/VIS spectroscopy. Interactions of compounds isapn, misapn and isahim with the $A\beta_{1-16}$ peptide were detected and analyzed by 1H NMR spectroscopy, indicating a strong interaction among the compounds and the histidines His6, His13 e His14 as well as the carboxylate residues in the peptides. The ligands efficiency toward the inhibition aggregation process for the $A\beta_{1-40}$ peptide were evaluated in the presence, and in absence of Cu^{2+} or Zn^{2+} ions by turbidimetry. Computational calculations (docking and molecular dynamics) indicated that the interaction of the imine ligand with the $A\beta_{1-16}$ peptide occurs in the metal coordination sites. The results indicate that these imine compounds studied may act as efficient inhibitors of amyloid peptides implicated in AD.

Keywords: imine ligands; amyloid peptides; Alzheimer disease; copper; zinc.

Sumário

Introdução	26
I.1 Bases moleculares da doença de Alzheimer	27
I.1.1 Hipótese da cascata amiloide e do íon metálico	28
I.2 Estratégias terapêuticas	35
I.2.1 Terapia de quelação	37
I.2.2 Bases de Schiff como potenciais agentes quelantes	39
I.3 Isatina em sistemas biológicos	42
Objetivos	47
Técnicas de Caracterização	48
Análise elementar	48
Espectroscopia vibracional na região do infravermelho	48
Espectrometria de massas	48
Ressonância magnética nuclear (RMN)	48
Espectroscopia eletrônica na região do ultravioleta/visível (UV/VIS)	49
Capítulo 1 - Síntese e Caracterização de Ligantes Oxindolimínicos	50
1.1 Considerações iniciais	50
1.2 Parte experimental	51
1.2.1 Síntese do ligante isahim	51
1.2.2 Síntese do ligante isahpy	51
1.2.3 Síntese do ligante isapn	52
1.2.4 Síntese do ligante misapn	52
1.2.5 Síntese do Ligante Isaen	53
1.2.6 Síntese do ligante misaen	53
1.2.7 Secagem dos solventes	54

1.3 Resultados e discussão	55
1.3.1 Caracterização dos compostos por espectroscopia no infravermelho (FTIR)	58
1.3.1.1 Análise por espectroscopia vibracional FTIR das hidrazonas isahim e isahpy	58
1.3.1.2 Análise por espectroscopia no infravermelho FTIR dos compostos isapn, misapn, isaen e misaen.....	63
1.3.2 Caracterização dos compostos por espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN)	69
1.3.2.1 Análise de RMN do composto isahpy	69
1.3.2.2 Análise RMN do composto isahim	73
1.3.2.3 Estudo do aquecimento e identificação dos isômeros <i>E</i> - e <i>Z</i> -isahim por ¹ H RMN	79
1.3.2.4 Análise de espectroscopia RMN do composto isapn.....	83
1.3.2.5 Análise de RMN do composto misapn.....	90
1.3.3 Caracterização dos compostos por espectroscopia eletrônica de UV/VIS	92
1.3.3.1 Bases de Schiff	92
1.3.3.2 Hidrazonas	94
1.3.4 Análise das Estabilidades Relativas dos Ligantes Isahim e Isahpy por DFT	101
1.4 Conclusões	103
Capítulo 2 - Síntese e Caracterização do peptídeo amiloide – β(1-16)	
.....	105
2.1 Considerações iniciais	105
2.2 Parte Experimental.....	106
2.2.1 Obtenção do peptídeo	106
2.3 Resultados e discussão	107
2.3.1 Síntese do peptídeo.....	107
2.3.1.1 Síntese manual	107
2.3.1.2 Intumescimento da resina	108

2.3.1.3 Desproteção da resina	109
2.3.1.4 Reação de acoplamento.....	111
2.3.1.5 <i>Capping</i>	114
2.3.2 Caracterização do peptídeo por RMN	116
2.4 Conclusões	118
Capítulo 3 - Estudos de inibição da agregação de peptídeos amilóides-β em presença de ligantes oxindólicos	119
3.1 Considerações iniciais	119
3.2 Parte experimental	120
3.2.1 Determinação da constante de equilíbrio entre $A\beta_{1-16}$ e isahim.....	120
3.2.2 Obtenção das respectivas constantes de estabilidade M - L	120
3.2.3 Ensaio de turbidimetria.....	121
3.2.5 Estudos de interação dos ligantes com peptídeo $A\beta_{1-16}$ acompanhados por espectroscopia de RMN	122
3.3 Resultados e Discussão	124
3.3.1 Determinação dos valores das constantes de estabilidade	124
3.3.1.1 Determinação da constante de equilíbrio entre $A\beta_{1-16}$ e isahim.....	124
3.3.1.2 Determinação das constantes de equilíbrio para as espécies metal-hidrazonas e metal-bases de Schiff	125
3.3.2 Ensaios de inibição da agregação por turbidimetria	130
3.3.3 Estudos de interação dos ligantes com peptídeo $A\beta_{1-16}$ através de espectroscopia de RMN.....	137
3.3.3.1 Estudos de interação entre o peptídeo $A\beta_{1-16}$ e o ligante isahim em água	139
3.3.3.2 Estudos de interação do peptídeo $A\beta_{1-16}$ com o ligante isapn.....	142
3.3.3.3 Estudos de interação do peptídeo $A\beta_{1-16}$ com o ligante misapn.....	146
3.3.4 Estudo da interação de $A\beta_{1-16}$, isapn ou isahim e Zn^{2+} por RMN.....	148

3.3.5 Análise de Interação por Métodos Computacionais	151
3.4 Conclusões	154
3.5 Perspectivas	156
Referências	157
Anexos - 1	169
A1.1 Dados Isatina	169
A1.2 Espectros de RMN 2D	170
A1.2.1 Isahpy	170
A1.2.2 Isahim	172
Anexos - 2	178
A2.1 Análises Padrão de Acompanhamento de Sínteses Peptídicas	178
Anexos - 3	179
Anexos - 4	180

Lista de Figuras

- Figura 1.** Reação de hidrólise da acetilcolina (ACh) catalisada pela enzima acetilcolinesterase (AChE) para produzi a colina (Chol) e o ácido acético. 27
- Figura 2.** Adaptada da literatura^[23]. À direita, processo de clivagem e à esquerda, processo de clivagem não-amiloidogênica da glicoproteína transmembrana precursora amiloide, a APP. O processo não-amiloidogênico resulta na formação de um peptídeo clivado pelas proteínas α e γ -secretases. A via amiloidogênica é responsável pela clivagem da APP pelas proteases β e γ -secretases tendo como produto a formação do peptídeo A β de sequência 1-39/43 no domínio extracelular. O peptídeo A β , pode agregar-se formando oligômeros estáveis^[23]. 29
- Figura 3.** (A) Representação das possíveis conformações do peptídeo A β_{1-42} : verde – folhas- β ; vermelho: hélices; cinza: turns^[26]. (B) Representação da estrutura terciária do tipo β -strand (folhas- β pregueadas) em oligômeros tóxicos^[27]. A estrutura flexível do peptídeo contribui para a formação de diferentes tipos de agregados como dímeros, oligômeros, protofibrilas e fibrilas^[3,23,25-29]. 30
- Figura 3.** Diferença entre um neurônio saudável (A) e um neurônio lesionado (B) pela formação de emaranhados neurofibrilares amiloides^[17]. 31
- Figura 4.** Proposta da cascata amiloide e suas implicações. A proteína transmembranica precursora amiloide é clivada pelas proteases α e γ -secretases gerando os A β . Os peptídeos amiloides se dimerizam formando agregados maiores tais como oligômeros, protofibrilas e fibrilas. Os oligômeros, em particular são responsáveis por bloquear as sinapses levando à perda de memória^[30]. 32
- Figura 5.** Figura adaptada da literatura^[35]. Estruturas propostas dos complexos Cu(I/II)-A $\beta_{40/42}$ e Zn(II)-A $\beta_{40/42}$ e suas respectivos valores das constantes de estabilidade propostas em pH fisiológico. 33
- Figura 6.** Figura adaptada da literatura^[41]. Representação da interação de metais como Cu²⁺, Zn²⁺ e Fe²⁺ com monômeros A β , oligômeros A β e protofibrilas. A agregação de A β induzida por íons metálicos pode levar a geração de ROS, danos neurológicos e consequente perda das funções cognitivas. APP sofre clivagem a catalisada por γ - e β –

secretase que produz a espécie A β monomérica. Na presença de metais, a espécie A β monomérica tende a se agregar.....	35
Figura 7. Representação esquemática das estruturas dos fármacos usados no tratamento da doença de Alzheimer.....	36
Figura 8. Representação esquemática das estruturas do Clioquinol (CQ) e da Thioflavina – T (ThT).....	38
Figura 9. Classificação da estrutura de uma base de Schiff oriunda da classe das iminas ^[62]	40
Figura 10. Reatividade de iminas na presença de água (hidrólise), de aminas primárias (troca) e de outra imina (metátase).....	40
Figura 11. Vitâmero de piridoxamina (vitamina B6) reagindo com ácido pirúvico para formar bases de Schiff consideravelmente estáveis em condições fisiológicas. A última etapa de reação, hidrólise da base de Schiff, somente ocorre através de processos catalíticos controlados.....	41
Figura 12. Combinação das estruturas dos fármacos Resveratrol e Clioquinol a fim de produzir novos compostos com propriedades quelante, antioxidante e intercalante ^[47]	42
Figura 13. Pesquisa relacionada ao número de trabalhos publicados baseados em estudos com derivados ou compostos associados à isatina. O gráfico de barras representa o número de artigos publicados até 2015 envolvendo o termo chave ‘isatina’. O gráfico de pizza acima, representa o percentual de cada doença estudada com compostos derivados da isatina. O programa SciFinder foi usado na pesquisa base usando como primeiro termo chave a palavra isatina, seguido da remoção de artigos duplicados e, por fim, a adição de palavras chaves relacionadas à cada doença pesquisada.....	44
Figura 14. Representação estrutural dos possíveis tautômeros formados pela isatina (1H-indol-2,3-diona).	45
Figura 15. Representação esquemática da interação de ALR2/55 via ligação de hidrogênio. O composto 55, ácido (3Z)-3-ciano-3{5-fluoro-2-hidroxi-1-[(4-metilfenil)metil]-1,2-diidro-3H-indol-3-ilideno} propanoico, é aplicado como um inibidor da aldose redutase (ALR2) ^[86]	45

Figura 16. Representação esquemática dos tautômeros do complexo [Cu(isapn)] ⁿ⁺ nas formas ceto-ceto (1A), ceto-enol (1B) e enol-enol (1C). A influência do complexo foi estudada na oxidação de carboidratos ^[87]	46
Figura 17. Representação das sínteses dos ligantes isahim, isahpy, misapn, isapn, misaen e isaen a partir da isatina. Diferentes amina foram usadas nas sínteses. Proporção 2:1 (isatina: amina) para isapn e isaen, e 1:1 para os demais ligantes.	56
Figura 18. Mecanismo proposto de formação de uma imina ^[65]	57
Figura 19. Espectro vibracional FTIR na região de infravermelho do composto isahim. Análise obtida em pastilhas de KBr. As demais atribuições encontram-se descritas no texto.	61
Figura 20. Espectro vibracional na região de infravermelho do composto isahpy. Análise obtida em pastilhas de KBr. As demais atribuições encontram-se descritas no texto.	62
Figura 21. Espectro vibracional na região de infravermelho do composto isapn. Análise obtida em pastilhas de KBr. As demais atribuições encontram-se descritas no texto. Ar _{oop} (<i>Aromatic_out of plane</i>).	65
Figura 22. Espectro vibracional na região de infravermelho do composto misapn. Análise obtida em pastilhas de KBr. As demais atribuições encontram-se descritas no texto. Ar _{oop} (<i>Aromatic_out of plane</i>).	66
Figura 23. Espectro vibracional na região de infravermelho do composto isaen. Análise obtida em pastilhas de KBr. As demais atribuições encontram-se descritas no texto. Ar _{oop} (<i>Aromatic_out of plane</i>).	67
Figura 24. Espectro vibracional na região de infravermelho do composto misaen. Análise obtida em pastilhas de KBr. As demais atribuições encontram-se descritas no texto. Ar _{oop} (<i>Aromatic_out of plane</i>).	68
Figura 25. Espectro ¹ H RMN (400 MHz, DMSO-d ₆) do composto isahpy. O espectro sobreposto representa a ampliação dos sinais da região aromática 8,5 – 6,7 ppm.	71
Figura 26. Espectro ¹³ C RMN (400 MHz, DMSO-d ₆) do composto isahpy. A imagem sobreposta representa a ampliação de todo o espectro, indicando que foram obtidos apenas sinais típicos de carbonos insaturados.	72

Figura 27. Espectro de ^1H RMN (400 MHz) do composto isahim obtido a temperatura ambiente em DMSO- d_6 . O espectro evidencia a presença de dois compostos, E-isahim e Z-isahim.	74
Figura 28. Espectro de ^1H RMN (400 MHz) do composto Z-isahim obtido em DMSO- d_6 . O espectro foi adquirido quatro dias após aquecimento	76
Figura 29. Espectro ^{13}C RMN (DMSO- d_6 , 400 MHz) para a espécie Z-isahim obtido à temperatura ambiente quatro dias após o aquecimento.....	78
Figura 30. Possíveis estruturas para a molécula isahim considerando os efeitos de isomeria geométrica e tautomeria. A presença do grupo hidrazina possibilita também a formação do grupo azo ($\text{N}=\text{N}$) por conjugação.....	79
Figura 31. Região expandida 13,6-8,4 ppm. Espectros de ^1H RMN (400 MHz) do composto isahim em DMSO- d_6 . Os espectros foram obtidos na sequência: (E1) T.A., (E2) 80°C, (E3) 25°C e (E4) a T.A. quatro dias após o aquecimento.....	80
Figura 32. Região expandida 4-6,7 ppm. Espectros de ^1H RMN (400 MHz) do composto isahim em DMSO- d_6 . Os espectros foram obtidos na sequência: (E1) T.A., (E2) 80°C, (E3) 25°C e (E4) a T.A. quatro dias após o aquecimento.....	81
Figura 33. Região expandida 4,2-2,3 ppm. Espectros de ^1H RMN (400 MHz) do composto isahim em DMSO- d_6 . Os espectros foram obtidos na sequência: (E1) T.A., (E2) 80°C, (E3) 25°C e (E4) a T.A. quatro dias após o aquecimento.....	81
Figura 34. Formas ceto-hidrazonas para o isahim. O esquema representa o processo de transformação do isômero E-isahim para Z-isahim evidenciadas através das análises cinéticas do composto em DMSO.....	82
Figura 35. Espectro de ^1H RMN (400 MHz) para o composto isapn. Os sinais mais intensos são atribuídos aos isômeros Z/Z-isapn.	84
Figura 36. Análise estrutural do composto isapn. Nesta representação, encontra-se destacada a possibilidade ceto/enol dos isômeros E/Z embora possam existir as formas Z/Z e E/E.	85
Figura 37. Espectro ^1H RMN (400 MHz) do composto isapn em DMSO- d_6 . Representação das atribuições dos sinais da espécie majoritária (82%) e das espécies minoritárias (12% e 6%) observadas em solução. (a) expansão da região próxima a 10,5	

- 11,0 ppm; (b) expansão da região 6,70 - 8,10 ppm; (c) expansão da região 3,90 - 4,60 ppm; (d) expansão da região de 2,10 - 2,50 ppm..... 87

Figura 38. Espectro de ^{13}C RMN para o composto isapn em DMSO- d_6 (400 MHz). As atribuições em azul pertencem à espécie minoritária (12%) Z/Z-isapn e as atribuições em preto à espécie majoritária (82%) E/E-isapn..... 89

Figura 39. Espectro de ^1H RMN (800 MHz) obtido em DMSO- d_6 . As integrações foram feitas para cada conjunto de sinais cujo deslocamento encontra-se destacado no espectro. O composto misapn apresenta pelo menos quatro isômeros. 91

Figura 40. Espectro de ^1H RMN (800 MHz) obtido em DMSO- d_6 . Cada espectro representa um conjunto de sinais selecionados cujas atribuições estão destacadas na figura anterior.

Figura 41. Espectros de UV/VIS dos compostos misapn, misaen, isapn e isaen em DMSO. Isapn, $\epsilon(289\text{ nm})\ 1,4 \times 10^4\ \text{L.mol}^{-1}\text{cm}^{-1}$ e $\epsilon(384\text{ nm})\ 6,4 \times 10^2\ \text{L.mol}^{-1}\text{cm}^{-1}$; isaen, $\epsilon(294\text{ nm})\ 1,2 \times 10^4\ \text{L.mol}^{-1}\text{cm}^{-1}$ e $\epsilon(386\text{ nm})\ 3,5 \times 10^3\ \text{L.mol}^{-1}\text{cm}^{-1}$; misapn, $\epsilon(290\text{ nm})\ 5,8 \times 10^3\ \text{L.mol}^{-1}\text{cm}^{-1}$ e $\epsilon(385\text{ nm})\ 1,9 \times 10^3\ \text{L.mol}^{-1}\text{cm}^{-1}$; misaen, $\epsilon(293\text{ nm})\ 4,8 \times 10^3\ \text{L.mol}^{-1}\text{cm}^{-1}$, $\epsilon(346\text{ nm})\ 1,3 \times 10^3\ \text{L.mol}^{-1}\text{cm}^{-1}$ e $\epsilon(390\text{ nm})\ 1,5 \times 10^3\ \text{L.mol}^{-1}\text{cm}^{-1}$. Os comprimentos de onda indicados na figura são relativos ao composto isapn, indicando em vermelho no espectro..... 94

Figura 42. Comparação dos espectros de UV/Vis dos compostos isahim **(a)** e isahpy **(b)** nas concentrações de 100 mM (caminho óptico, 5 mm) e 25 mM (caminho óptico, 10 mm). Os espectros foram obtidos em DMSO..... 95

Figura 43. Espectros de UV/VIS do composto isahim obtidos em metanol, clorofórmio e DMSO. Todas as soluções foram preparadas a partir da diluição de uma solução concentrada do composto em DMSO nos respectivos solventes de estudo. **(a)** Espectros obtidos na concentração de 100 μM , analisados em cubeta de caminho óptico 5 mm. **(b)** Espectros obtidos na concentração de 25 μM , analisados em cubeta de caminho óptico 10 mm. 97

Figura 44. Espectros de UV/VIS do composto isahpy obtidos em metanol, clorofórmio e DMSO. Todas as soluções foram preparadas a partir da diluição de uma solução concentrada do composto em DMSO nos respectivos solventes de estudo. **(a)** Espectros

obtidos na concentração de 100 μM , analisados em cubeta de caminho óptico 5 mm. **(b)** Espectros obtidos na concentração de 25 μM , analisados em cubeta de caminho óptico 10 mm. 98

Figura 45. Representação esquemática das possibilidades de equilíbrio das formas ceto-enol-azo dos isômeros E/Z estudadas por UV/VIS. As formas E-enol são favorecidas em meio polar enquanto que as formas Z-ceto são favorecidas em meio apolar. Em concentrações mais elevadas, as formas agregadas intermediadas por ligações de hidrogênio intermoleculares são mais prováveis. Em meio básico a desprotonação do enol leva às formas azo-enolato.100

Figura 46. Espectro eletrônicos UV-VIS dos compostos isahim e isahpy em diferentes meios: ácido, básico e neutro.101

Figura 47. Comparação entre os isômeros Z e E para o isahim e o isahpy. As espécies mais estáveis são as formas Z- e E-ceto.102

Figura 48. Aparato para síntese peptídica em fase sólida. Os reatores, de aparelhagem simples, contêm um funil alongado com placa sinterizada com uma entrada elevada para argônio. A entrada do argônio promove a agitação da resina de baixo para cima. A torneira em “T” possui uma entrada para argônio, uma entrada para a mangueira de vácuo que coliga o funil ao erlenmeyer e uma fechadura para que o argônio e o vácuo não estejam abertos ao mesmo tempo.108

Figura 49. Representação esquemática da fórmula química da Resina *Rink Amide MBHA resin LL*.109

Figura 50. Representação esquemática da estrutura do grupo protetor Fmoc comumente usado na síntese de peptídeos em fase sólida.109

Figura 51. (a) (3 min) Remoção do grupamento Fmoc via β -eliminação tendo como subprodutos o dibenzofulveno, dióxido de carbono e o aminoácido. A piperidina responsável pela abstração do próton também pode reagir com o dibenzofulveno capturando-o rapidamente e impedindo a reação reversa com a amina liberada. **(b)** (7 min) mecanismo de abstração do próton e remoção do Fmoc por β -eliminação a partir da amina secundária piperidina.111

Figura 52. (a) A ‘Etapa de Racemização’ envolve a ativação da carboxilato pela inserção de um grupo substituinte lábil. A etapa segue com a adição de uma base para abstração de um próton e posterior ataque nucleofílico da amina à carboxila. (b) Reação de Acoplamento utilizando os ativadores HOBt e PyBOP e a base DIEA. Tem-se como padrão refazer a etapa para se obter um maior rendimento. (c) Representação das estruturas de HOBt, PyBOP e DIEA.....	113
Figura 53. Etapa de proteção dos resíduos amínicos (capping) que não reagiram durante o processo de acoplamento do aminoácido.....	115
Figura 54. Etapa de extração do peptídeo A β ₁₋₁₆ da resina.	116
Figura 55. Espectro de ¹ H RMN (400 MHz) do peptídeo A β ₁₋₁₆ em D ₂ O. O quadrado rosa indica região aromática expandida e em violeta a região dos C ^{α} H e prótons remanescentes da cadeia lateral. As atribuições foram feitas baseadas na literatura ^[110]	117
Figura 56. Representação da metodologia de análise de inibição da agregação do peptídeo A β ₁₋₄₀ juntamente com o metal (Cu ²⁺ ou Zn ²⁺), na presença de um ligante a ser testado.	122
Figura 57. Titulação do composto isahim com o peptídeo A β ₁₋₁₆ em meio aquoso. A titulação foi monitorada por espectroscopia UV/VIS. Concentração inicial de isahim 50 μ mol/l. Observação da formação da espécie [(A β ₁₋₁₆) ₂ .isahim].	124
Figura 58. Espectros UV/VIS da titulação de isahim com A β ₁₋₁₆ em água, como função do tempo. (Vermelho) Isahim; (Preto) isahim: A β ₁₋₁₆ (1:1), 0 h. (Azul) isahim: A β ₁₋₁₆ (1:1), após 2h; (Verde) isahim: A β ₁₋₁₆ (1:1), após 12h; concentração inicial: 50 μ mol/L.....	125
Figura 59. Espectros UV/VIS referente à titulação do ligante <i>misapn</i> com Cu ²⁺ em tampão Hepes pH 7,4 (%DMSO máxima = 3,8%). Figura à esquerda, Concentração inicial do ligante: [<i>misapn</i>] ₀ = 1,47x10 ⁻⁴ mol.L ⁻¹ . Figura à direita, Concentrações finais [<i>misapn</i>] = 1,44x10 ⁻⁴ mol.L ⁻¹ ; [Cu ²⁺] = 2,91x10 ⁻⁴ mol.L ⁻¹	126
Figura 60. Espectros UV/VIS referente à titulação do ligante <i>isapn</i> com Cu ²⁺ em tampão Hepes pH 7,4 (%DMSO máxima = 3%). Figura à esquerda, Concentração inicial do ligante: [<i>isapn</i>] ₀ = 2,41x10 ⁻⁴ mol.L ⁻¹ . Concentrações finais [<i>isapn</i>] = 2,32x10 ⁻⁴ mol.L ⁻¹ [Cu ²⁺] = 2,90x10 ⁻⁴ mol.L ⁻¹ . Figura à direita, Concentração inicial do ligante: [<i>isapn</i>] ₀ =	

3,62x10⁻⁴ mol.L⁻¹ Concentrações finais [isapn] = 3,43x10⁻⁴ mol.L⁻¹; [Cu²⁺] = 4,54x10⁻⁴ mol.L⁻¹.....127

Figura 61. Espectros UV/VIS referente à titulação do ligante isapn com Zn²⁺ em tampão Hepes pH 7,4. Concentração inicial do ligante: [isapn]₀ = 2,32x10⁻⁴ mol.L⁻¹ Concentrações finais [isapn] = mol.L⁻¹; [Cu²⁺] = 2,90x10⁻⁴ mol.L⁻¹.....127

Figura 62. Espectros UV/VIS referente à titulação do ligante isahim com Cu²⁺ em tampão fosfato 1,0 mmol.L⁻¹, pH 7,4. Concentração inicial do ligante: [isahim]₀=100,2 mmol.L⁻¹. Concentrações finais [isahim] =97,7 mM; [Cu²⁺] = 213,6 mmol.L⁻¹.....128

Figura 63. Espectros UV/VIS referente à titulação do ligante isahpy com Cu²⁺ em 7:3 (H₂O:MECN). Concentração inicial do ligante: [isahpy]₀ = 166,7 mmol.L⁻¹. Concentrações finais [isahpy] = 4,23 μmol.L⁻¹; [Cu²⁺] = 263,0 mmol.L⁻¹.....128

Figura 64. Ensaios de inibição da agregação do peptídeo Aβ₁₋₄₀ induzida por íons Cu²⁺ e Zn²⁺ por turbidimetria. Inibidor: *isahim* ou *isahpy*. Ensaios de inibição **(A)** controle para Aβ₁₋₄₀ + ligante ou Aβ₁₋₄₀ + metal; **(B)** na presença do íon Zn²⁺; **(C)** na presença de íons Cu²⁺. Na presença dos íons cobre o ligante isahim foi testado em três concentrações diferentes, a saber: Aβ₁₋₄₀/Cu²⁺/*isahim*, 1:1:n (n = 1 ou 4) e 1:2:1. [Aβ₁₋₄₀] = 25 μM..132

Figura 65. Ensaios de inibição da agregação do Aβ₁₋₄₀ induzida por Cu²⁺ e Zn²⁺ por turbidimetria. Ensaios de inibição **(A)** na presença de Cu²⁺ e de isapn; **(B)** na presença de Zn²⁺ e de isapn; **(C)** na presença de Cu²⁺ e de misapn; **(D)** na presença de Zn²⁺ e de misapn. Na presença dos Cu²⁺ os ligantes *isapn* e *misapn* foram testados em diferentes concentrações: Aβ₁₋₄₀/Cu²⁺/ligante, 1:1:n (n = 1, 3 e 6), enquanto na presença de Zn²⁺, os ligantes foram testados apenas na proporção Aβ₁₋₄₀/Zn²⁺/ligante, 1:1:6.134

Figura 66. Experimento controle ¹H RMN (400 MHz) referente à titulação do peptídeo Aβ₁₋₁₆ com 30% de DMSO, em tampão fosfato (1mmol/L) pH 7,4. **(1):** ¹H RMN de Aβ₁₋₁₆ (3 mmol/L) em tampão. Neste caso o espectro não apresentou boa resolução. **(2):** ¹H RMN de Aβ₁₋₁₆ contendo 8% DMSO. **(3)** ¹H RMN de Aβ₁₋₁₆ contendo 30% DMSO. **(Acima)** Região expandida entre 6,5 ppm e 8,7 ppm. **(Abaixo)** Região expandida entre 0,5 ppm e 4,6 ppm.....138

- Figura 67.** Espectros de ^1H RMN (400 MHz) obtidos durante a titulação do peptídeo $\text{A}\beta_{1-16}$ com o composto isahim. Seleção da região referente ao C^βH dos resíduos de histidina H6, H13 e H14. 139
- Figura 68.** Espectro de ^1H RMN (400 MHz) obtido durante a titulação do peptídeo $\text{A}\beta_{1-16}$ com o composto *isahim*. Linhas preta e azul representam o primeiro e último espectros registrados respectivamente. **Espectro acima:** região expandida dos hidrogênios C^βH do resíduo aspartato D1 e D7. **Espectro abaixo:** região expandida dos hidrogênios C^αH do resíduo glutamato E3 e E11 e do resíduo lisina K16. 140
- Figura 70.** Espectros ^1H RMN (400 MHz) de $\text{A}\beta_{1-16}$ titulado com o ligante isapn. Expansão da região entre 8,30 ppm a 8,70 ppm cujos sinais são atribuídos ao hidrogênio dos resíduos histidínicos. O deslocamento dos sinais das histidinas é contrário ao observado para o DMSO. 143
- Figura 71.** Espectros 1D de ^1H RMN (400 MHz) de $\text{A}\beta_{1-16}$ titulado com o ligante *isapn*. Os espectros foram obtidos em tampão fosfato (D_2O) 1mM, pH 7,4. Volumes da solução de *isapn* preparada em DMSO- d_6 foram sendo adicionados sucessivamente. **(Acima)** expansão da região entre 4,7 – 3,6 ppm evidenciando um deslocamento significativo nos sinais dos hidrogênios H^β do resíduo serina S8 H^β . **(Abaixo)** expansão da região de 3,4 – 2-4 ppm obtido para os resíduos D1 e D7 referentes aos H^β 145
- Figura 72.** Espectro de ^1H RMN (400 MHz) tampão fosfato pH 7,4 (máximo de DMSO 30%) referente à titulação do peptídeo $\text{A}\beta_{1-16}$ com o composto *misapn*. Região de 8,30 ppm a 8,60 ppm. Sinais evidentes histidina 8,46 ppm (His 13), 8,47 ppm (His13) e 8,48 ppm (His 6). 146
- Figura 73.** Espectro de ^1H RMN (400 MHz) tampão fosfato pH 7,4 (máximo de DMSO 30%) referente à titulação do peptídeo $\text{A}\beta_{1-16}$ com o composto *misapn*. **(Acima)** Região de 5,8 ppm a 8,10 ppm. Sinais evidentes: fenilalanina (F4), histidina (H) e tirosina (Y10). **(Abaixo)** Região de 2,30 ppm a 3,30 ppm. Sinais evidentes: histidina e aspartato. 147
- Figura 74.** Espectros 1D de ^1H RMN (400 MHz) de $\text{A}\beta_{1-16}$ e *isapn* titulados com uma solução de perclorato de zinco. Expansão dos sinais dos resíduos de histidina. 149
- Figura 75.** Espectros 1D de ^1H RMN (400 MHz) de $\text{A}\beta_{1-16}$ e *isapn* titulados com uma solução de perclorato de zinco. A solução inicial ($\text{A}\beta_{1-16}$ + *isapn*) foi preparada com

tampão fosfato (D₂O) 1 mM e a solução salina em D₂O. **(Acima)** expansão na região de alto campo. **(Abaixo)** expansão na região aromática.....150

Figura 76. Espectros 1D de ¹H RMN (400 MHz) de Aβ₁₋₁₆ e *isahim* titulados com uma solução de perclorato de zinco. Expansão do sinal dos resíduos de histidina.151

Figura 77. Acima: simulação das três principais etapas de interação isahim-Aβ₁₋₁₆. Abaixo: principais resíduos que interagem com isômero *E*-isahim.152

A1. 1. Espectro de ¹H RMN (300 MHz) do precursor ISATINA em DMSO-d₆.169

A1. 2. Espectro de UV/VIS da isatina em metanol, meio ácido e meio básico.169

A1. 3. Espectro 2D, COSY (400 MHz) do composto isahpy em DMSO-d₆.170

A1. 4. Espectro 2D de 2D-HMQC, (400 MHz) para o isahpy em DMSO-d₆.170

A1. 5. Espectro 2D HMBC (400 MHz), do composto isahpy em DMSO-d₆. (Abaixo) expansão da região aromática do espectro.171

A1. 6. Espectro 2D de COSY (400 MHz) em DMSO-d₆ do composto isahim expandido na região aromática. Espectro obtido quatro dias após o preparo da amostra.172

A1. 7. Espectro de 1H-1H-COSY (400 MHz) do composto isahim recém preparado em DMSO-d₆.172

A1. 8. Espectro 2D HMQC (400 MHz) do composto isahim em DMSO-d₆. Expansão da região de alto campo 4,5-1,5 ppm. (Abaixo) expansão da região aromática do espectro.173

A1. 9. Espectro 2D HMBC do isahim (400 MHz). (Acima) expansão da região de alto campo. (Abaixo) expansão da região aromática do espectro.174

A1. 10. Espectro 2D HMBC do isapn (500 MHz), DMSO-d₆.175

A1. 11. Espectro 2D HSQC do isapn (500 MHz), DMSO-d₆.176

A1. 12. Espectro 2D COSY em DMSO-d₆ em 500 MHz.177

A3. 1. Constante obtida a partir das proporções entre Aβ₁₋₁₆ e Isahim. Os cálculos foram feitos no programa **HypSpec2014**^[119]. Titulação do composto *isahim* com o peptídeo Aβ₁₋₁₆ em meio aquoso Concentração inicial de isahim 50 μM. Observação da formação da espécie [(Aβ₁₋₁₆)₂.isahim].179

Lista de Tabelas

Tabela 1. Sequência de aminoácidos que compõem as principais frações de peptídeo amiloide estudadas. Os peptídeos $A\beta_{1-40}$ e $A\beta_{1-42}$ são os peptídeos produzidos no organismo.	29
Tabela 2. Regras de Lipinsk aplicadas aos compostos Tacrina, Donepezila e Galantamina ^[51]	37
Tabela 3. Atribuições tentativas dos picos dos espectros vibracionais na região do infravermelho para os compostos isahim e isahpy.	60
Tabela 4. Atribuições das bandas dos espectros vibracionais na região do infravermelho para os compostos isapn, misapn, isaen e misaen.	64
Tabela 5. Atribuições dos espectros RMN do composto isahpy em DMSO-d ₆	70
Tabela 6. Análise dos deslocamentos dos sinais do espectro de ¹ H RMN (400 MHz) inicial do composto isahim obtido em DMSO-d ₆ à temperatura ambiente.	73
Tabela 7. Atribuições dos deslocamentos químicos do espectro ¹ H RMN do composto isahim.	75
Tabela 8. Atribuições dos espectros ¹ H- e ¹³ C RMN do isapn em DMSO-d ₆	86
Tabela 9. Dados de absorção na região do UV/VIS da isatina e seus derivados misapn, misaen, isapn e isaen.	93
Tabela 10. Dados de absorção na região do UV/VIS das hidrazonas isahim e isahpy.	96
Tabela 11. Aminoácidos usados na síntese do $A\beta_{1-16}$	114
Tabela 12. Constantes de equilíbrio (expressas como valores de log β) obtidas para os complexos de Cu ²⁺ e Zn ²⁺ com todos os compostos oxindólicos.	129
Tabela 13. Cálculo da relação entre a concentração de isapn (L) e do peptídeo $A\beta_{1-40}$ (P) - [L]/[P] - para que sejam competitivos frente à coordenação aos íons Cu ²⁺	136

Abreviações e Siglas

A β	β -amiloide peptídeo
AD	Doença de Alzheimer (<i>Alzheimer's Disease</i>)
APP	Proteína precursora amiloide (<i>Amyloid Precursor Protein</i>)
BBB	Barreira hematoencefálica (<i>Brain Blood Barrier</i>)
CHN	Análise elementar de carbono, hidrogênio e nitrogênio
COSY	Espectroscopia de correlação ^1H - ^1H (<i>Correlation Spectroscopy</i>)
CQ	Clioquinol
DCM	Diclorometano
DFT	Teoria do funcional da densidade (<i>Density Functional Theory</i>)
DIEA	N,N-diisopropiletilamina
DMF	Dimetilformamida
DMSO	Dimetilssulfóxido
ESI+	Ionização eletrospray (<i>Electrospray Ionization</i>)
Fmoc	9 -fluorenilmetoxycarbonil
FTIR	Espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier (<i>Fourier-transform Infrared Spectroscopy</i>)
HMBC	Espectroscopia de correlação ^{13}C - ^1H (<i>Heteronuclear Multiple Bond Correlation</i>)
HOBt	Hidróxidobenzotriazol
HPLC	Cromatografia líquida de alta eficiência (<i>High Performance Liquid Chromatography</i>)
HSQC	Espectroscopia de correlação ^{13}C - ^1H (<i>Heteronuclear Single-Quantum Correlation</i>)
LC/ESI-MS	Cromatografia a líquido acoplado a espectrometria de massas no modo tandem (<i>Liquid Chromatography-electrospray Ionization-</i>

tandem Mass Spectrometry)

LPQ	Laboratório de Química e Peptídeos
PyBOP	Hexafluorofosfato de benzotriazol-1-il-oxitripirrolidinafosfonio
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
RNS	Espécie reativas de nitrogênio (<i>Reactive Nitrogen Species</i>)
ROS	Espécies reativas de oxigênio (<i>Reactive Oxygen Species</i>)
SCN	Sistema nervoso central (CSN = <i>central nervous system</i>)
ThT	Tioflavina - T
UV/VIS	Ultravioleta - Visível

Aminoácidos

D	Ácido aspártico (Asp)	L	Leucina (Leu)
E	Ácido glutâmico (Glu)	K	Lisina (Lys)
A	Alanina (Ala)	M	Metionina (Met)
R	Arginina (Arg)	P	Prolina (Pro)
N	Asparagina (Asn)	S	Serina (Ser)
C	Cisteína (Cys)	Y	Tirosina (Tyr)
F	Fenilalanina (Phe)	T	Treonina (Thr)
G	Glicina (Gly)	W	Triptófano (Trp)
Q	Glutamina (Gln)	V	Valina (Val)
H	Histidina (His)	L	Leucina (Leu)
I	Isoleucina (Ile)		

Introdução

Caracterizam-se como Doenças Neurodegenerativas aquelas que são capazes de causar lesões cerebrais muitas vezes irreversíveis, alterando as funções cognitivas e autônomas do indivíduo portador deste mal^[1-3].

São exemplos comuns das doenças neurodegenerativas a doença de Alzheimer (AD, *do inglês, Alzheimer Disease*), que representa cerca de 50-70% dos casos, doença de Parkinson, doença de Huntington, e doença de Príon, mais conhecida como “doença da vaca louca”, entre outras^[4].

Pesquisas têm mostrado que o envelhecimento pode ser um fator associado ao desenvolvimento destas doenças especialmente para a AD^[5,6]. Existem duas formas pelas quais a AD se manifesta: a mais comum conhecida como LOAD (*Late Onset Alzheimer's Disease*), ou seja, doença de início tardio que se inicia por volta dos 60 anos de idade e a doença familiar FAD (*Familial Alzheimer's Disease*). Esta última ocorre antes dos 60 anos de idade e possui uma forte componente genética sendo caracterizada por cerca de 1% a 6% dos casos^[7]. Ambas as formas possuem as mesmas características e desenvolvimento patológico.

Em 2015 estimou-se um número de pessoas no mundo acometidas por esse mal de cerca de 47,5 milhões com projeções para cerca de 75,6 milhões em 2030 e 135,5 milhões para 2050^[4]. Em todo o mundo em torno de 50 milhões de pessoas possuem algum tipo de demência, tendo sido registrados cerca 10 milhões de novos casos por ano. A doença de Alzheimer é classificada como uma das demências mais comuns com estimativas de 60-70% dos casos^[8]. No Brasil não existem estimativas precisas a respeito da incidência da AD ou demências em geral, contudo as projeções indicam que com o aumento da taxa populacional de idosos, o número de pessoas afetadas por doenças neurodegenerativas tende a crescer significativamente^[9].

O diagnóstico das demências não depende de um exame específico e usualmente requer uma avaliação *post mortem*. Contudo, exames clínicos que envolvam a avaliação do histórico familiar do paciente e testes neurológicos cognitivos - focais, agnosia, incontinência urinária, entre outros - são realizados criteriosamente a fim de se identificar um padrão que leve a um provável diagnóstico^[10,11].

As terapias em vigência apenas tratam dos sintomas de depressão, ansiedade, e auxiliam no tratamento de sintomas cognitivos como a perda da memória, no entanto

não impedem a progressão da doença [12]. Com a evolução do quadro e sem solução aparente, o paciente propende a transtornos, dependência e constrangimentos. Os custos relacionados aos tratamentos sintomáticos são muitas vezes elevados e tornam a questão ainda mais fastidiosa tanto para o paciente quanto para seus entes próximos.

I.1 Bases moleculares da doença de Alzheimer

Avanços têm sido realizados a fim de se desvendar as verdadeiras causas moleculares da AD e, por consequência, o tratamento ou mesmo a cura. Muitos deles têm indicado a formação de depósitos de aglomerados fibrilares capazes de danificar as células neurais levando à atrofia em determinadas regiões cerebrais. Outros estudos têm indicado a formação excessiva de Espécies Reativas de Oxigênio (*Reactive Oxygen Species* - ROS) que também são um fator contribuinte para o envelhecimento[13].

A formação de emaranhados neurofibrilares da proteína Tau e a hipótese colinérgica estão entre as causas mais discutidas. Destacam-se ainda a hipótese da cascata amiloide e a hipótese do íon metálico[14].

A chamada **hipótese colinérgica** está associada à redução dos níveis da enzima acetiltransferase (ChAT, do inglês: *Choline Acetyltransferase*) responsável por catalisar a síntese do neurotransmissor acetilcolina (ACh, do inglês: *Acetylcholine*) vinculado aos processos de aprendizagem e memória[15,16].

A concentração da ACh no sistema é também regulada pela enzima acetilcolinesterase (AChE, do inglês: *Acetylcholinesterase*) a partir da produção da colina e do ácido acético conforme pode ser observado na **Figura 1** Erro! Fonte de referência não encontrada.[15,17].

Figura 1. Reação de hidrólise da acetilcolina (ACh) catalisada pela enzima acetilcolinesterase (AChE) para produzi a colina (Chol) e o ácido acético.

Por outro lado, o **acúmulo de emaranhados neurofibrilares da proteína Tau** também está relacionado a AD. A proteína Tau faz parte da família das proteínas associadas aos microtúbulos (*microtubule-associated proteins* – MAP) e tem como função estabilizar os microtúbulos durante a maturação e crescimento dos neuritos.

Em pessoas diagnosticadas com a AD, os emaranhados neurofibrilares insolúveis e intracelulares da proteína Tau são encontrados no estágio hiperfosforilado comprometendo as funções biológicas e morfológicas dos neurônios^[16,18–20].

I.1.1 Hipótese da cascata amiloide e do íon metálico

A hipótese da cascata amiloide propõe que o desequilíbrio na produção de peptídeos amiloides- β leva à formação de agregados solúveis neurotóxicos e depósitos insolúveis extracelulares relacionados à AD^[21].

O peptídeo A β deriva da clivagem da glicoproteína transmembrânica precursora amiloide (*Amyloid Precursor Protein* - APP), descrita pela primeira vez por *Hard, J. A.* e *Higgins, G. A*^[17].

A APP pode ser clivada por três proteases α -secretase, β -secretase e γ -secretase. Dependendo da proteína que cliva a APP o processo é identificado como amiloidogênico e não-amiloidogênico como pode ser observado na **Figura 2**.

Pelo processo não-amiloidogênico, a APP é clivada pela α -secretase dentro da sequência A β para produzir um fragmento solúvel que é novamente clivado pela proteína γ -secretase resultando na formação de um peptídeo P3.

O processo de maior interesse para o estudo da doença Alzheimer é descrito pela via amiloidogênica que implica na clivagem da APP pela proteína β -secretase seguido da clivagem pela proteína γ -secretase para produzir o peptídeo solúvel A β . O fragmento liberado contém entre 39 a 43 resíduos e situa-se entre a intramembrana e o segmento extracelular. Após a clivagem, o peptídeo A $\beta_{1-39/43}$ é então, liberado no domínio extracelular^[22,23].

Figura 2. Adaptada da literatura^[23]. À direita, processo de clivagem e à esquerda, processo de clivagem não-amiloidogênica da glicoproteína transmembrana precursora amiloide, a APP. O processo não-amiloidogênico resulta na formação de um peptídeo clivado pelas proteínas α e γ -secretases. A via amiloidogênica é responsável pela clivagem da APP pelas proteases β e γ -secretases tendo como produto a formação do peptídeo A β de sequência 1-39/43 no domínio extracelular. O peptídeo A β , pode agregar-se formando oligômeros estáveis^[23].

Os seguimentos mais comuns do peptídeo amiloide são os de 40 e 42 aminoácidos, respectivamente. Ambos são considerados tóxicos, contudo o fragmento A β_{1-42} , por ser mais hidrofóbico é considerado o mais nocivo uma vez que se agrega mais rapidamente^[24].

Na **Tabela 1** são mostradas formas mais comuns dos peptídeos estudados na literatura. Os seguimentos A β_{1-40} e A β_{1-42} são as formas produzidas no organismo, enquanto as frações A β_{1-28} e A β_{1-16} são os fragmentos mais estudados na literatura em função de sua elevada solubilidade.

Tabela 1. Sequência de aminoácidos que compõem as principais frações de peptídeo amiloide estudadas. Os peptídeos A β_{1-40} e A β_{1-42} são os peptídeos produzidos no organismo.

Peptídeo	Sequência
A β_{1-16}	DAEFRHDSGYEVHHQK
A β_{1-28}	DAEFRHDSGYEVHHQKLVFFAEDVGSNK
A β_{1-40}	DAEFRHDSGYEVHHQKLVFFAEDVGSNKGAIIGLMVGGVV
A β_{1-42}	DAEFRHDSGYEVHHQKLVFFAEDVGSNKGAIIGLMVGGVVIA

A agregação dos peptídeos A β induz a formação de depósitos extracelulares insolúveis ricos em estruturas secundárias do tipo folha- β pregueadas podendo ser paralelas ou antiparalelas cujas estruturas são mantidas por ligações de hidrogênio^[25].

Figura 3. (A) Representação das possíveis conformações do peptídeo A β_{1-42} : verde – folhas- β ; vermelho: hélices; cinza: turns^[26]. (B) Representação da estrutura terciária do tipo β -strand (folhas- β pregueadas) em oligômeros tóxicos^[27]. A estrutura flexível do peptídeo contribui para a formação de diferentes tipos de agregados como dímeros, oligômeros, protofibrilas e fibrilas^[3,23,25-29].

Dessa forma a hipótese da cascata amiloide implica na formação progressiva de oligômeros e protofibrilas até a formação dos emaranhados fibrilares extracelulares que se depositam nos axônios e dendritos dos neurônios^[17] como representado nas **Figura 3.**

Figura 3. Diferença entre um neurônio saudável (A) e um neurônio lesionado (B) pela formação de emaranhados neurofibrilares amiloides^[17].

Embora os emaranhados fibrilares insolúveis desempenhem um papel importante na AD, os oligômeros solúveis têm sido identificados como as formas mais tóxicas de agregados A β . Por serem capazes de se ligar às proteínas receptoras das membranas sinápticas, bloqueiam as transferências de informação e induzem à perda de memória^[30] como observado na **Figura 4**.

Ainda que o diagnóstico da AD seja embasado na formação de depósitos insolúveis extracelulares de agregados amiloides (placas amiloides), estes mesmos depósitos são encontrados em 20-40% de cérebros de pacientes saudáveis^[2] sugerindo que a hipótese da cascata amiloide não se desenvolva especificamente dessa forma.

Cérebros de pacientes diagnosticados com a doença de Alzheimer possuem uma elevada concentração de íons metálicos, tais como Zn²⁺ e Cu²⁺ na ordem de milimol por litro nos depósitos fibrilares.

Dessa forma, a hipótese do íon metálico se complementa à hipótese da cascata amiloide dado que se observam fatores como: desequilíbrio na homeostase dos íons metálicos, o aumento dos níveis de estresse oxidativo além do aumento da formação de emaranhados fibrilares acelerados pela presença desses metais^[25,31].

Figura 4. Proposta da cascata amiloide e suas implicações. A proteína transmembranica precursora amiloide é clivada pelas proteases α e γ -secretases gerando os A β . Os peptídeos amiloides se dimerizam formando agregados maiores tais como oligômeros, protofibrilas e fibrilas. Os oligômeros, em particular são responsáveis por bloquear as sinapses levando à perda de memória^[30].

Íons, tais como Cu^{2+} , Zn^{2+} entre outros, contribuem para a modulação e o aumento da velocidade de agregação. Esta afirmação é justificada pelas formas de coordenação e pela estabilidade dos compostos formados via coordenação metálica^[31,32].

Os modos de coordenação do íon Cu^{2+} são descritos na literatura em **componente I** formado em um pH em torno de 6,5, e **componente II** que ocorre à um pH em torno de 8,0. Em pH 7,4, os dois componentes coexistem conforme representado na **Figura 5**.

Em **I**, verifica-se uma estrutura quadrado planar distorcida, formada pela coordenação à uma amina e pela carbonila da amida provenientes do aminoácido terminal Asp1, seguido pela coordenação dos nitrogênios imidazólicos das histidinas His6 e His13 ou His14. Ainda, na quinta posição (não representado) um carboxilato encontra-se coordenado.

Em **II**, a desprotonação da amida que liga os resíduos Asp1 e Ala2 induz à coordenação destes aminoácidos à molécula através da amina terminal Asp1, do

nitrogênio desprotonado e da carbonila de amida do resíduo Glu3. O grupo imidazol da His6 completa o quarto ponto de coordenação.. Um carboxilato permanece ligado^[25,33,34].

O Zn^{2+} também se liga preferencialmente aos resíduos de histidina His13 ou His14 e His6 e aos grupamentos carboxilatos provenientes dos aminoácidos Asp1 e Glu11, tanto no plano equatorial quanto axial. A ligação no plano axial também pode ocorrer via coordenação à amina terminal Asp1^[13,25,35].

Apesar dos modos de coordenação não estarem plenamente definidos, pode-se afirmar que o sítio de coordenação preferencial ocorre na sequência peptídica que contém os primeiros dezesseis aminoácidos^[13,36]. Esta afirmação é válida não apenas para os íons Cu^{2+} e Zn^{2+} como também para outros^[37,38].

Figura 5. Figura adaptada da literatura^[35]. Estruturas propostas dos complexos Cu(I/II)-Aβ40/42 e Zn(II)-Aβ40/42 e suas respectivos valores das constantes de estabilidade propostas em pH fisiológico.

A literatura retrata vários métodos aplicados na determinação da constante de estabilidade das espécies metal – Aβ utilizando diferentes tamanhos de peptídeo tais como Aβ₁₋₁₆, Aβ₁₋₂₈, Aβ₁₋₄₀ e Aβ₁₋₄₂^[39,40]. Contudo, o valor da constante de dissociação mais aceita na literatura é de $K_{d(app)}$ na ordem de 10⁻¹⁰M para o íon Cu^{2+} e de 1-10x10⁻⁶ M

para o Zn^{2+} em pH 7,4. Para o Cu^+ , a constante de dissociação prevista é da ordem de 10^{-8}M ^[39-44].

As formas de coordenação do íon Cu^{2+} às fibrilas amiloides são similares às formas de coordenação nas formas agregadas^[45,46]. Nesse caso, o íon metálico não afeta a estrutura fibrilar dos agregados formados, embora induza a associação entre as fibrilas^[46]. A exposição dos peptídeos $\text{A}\beta$ a esses íons metálicos leva a um processo acelerado da formação de agregados fibrilares aumentando os danos causados por estresse oxidativo.

Altas concentrações de íons metálicos têm sido encontrados nesses depósitos sendo que a interação destes metais com $\text{A}\beta$ além de induzir sua agregação também contribuem significativamente para a formação de espécies reativas de oxigênio^[47,48]. Esses íons podem ainda modular a estrutura e a atividade redox da APP^[49].

Existem diversas espécies químicas que contribuem para o estresse oxidativo dentre elas, o superóxido ($\text{O}_2^{\bullet-}$), o peróxido de hidrogênio H_2O_2 e as espécies reativas de nitrogênio (RNS), tal como o radical óxido nítrico ($\text{NO}^{\bullet}$). A presença de íons metálicos tais como o Fe^{3+} e o Cu^{2+} na presença de H_2O_2 pode desencadear a produção de radicais livres mais potentes que o H_2O_2 através das conhecidas reações Fenton (equação 1 e 2) e Tipo-Fenton (equação 3). É conhecido também que as espécies $\text{Cu-A}\beta_{1-40/42}$ podem catalisar a formação de espécies reativas de oxigênio^[40].

Desta forma, a **hipótese do íon metálico** complementa a **hipótese da cascata amiloide** como representado na **Figura 6**, sugerindo que além do processo de auto-agregação dos peptídeos $\text{A}\beta$, a presença de íons metálicos eleva a velocidade de produção de placas senis, dos oligômeros tóxicos e dos danos causados pelo aumento de espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio. Todo o processo implica na perda da homeostase destes íons metálicos e, por consequência, induz a efeitos danosos ao sistema nervoso central como um todo^[41].

Figura 6. Figura adaptada da literatura^[41]. Representação da interação de metais como Cu^{2+} , Zn^{2+} e Fe^{2+} com monômeros A β , oligômeros A β e protofibrilas. A agregação de A β induzida por íons metálicos pode levar a geração de ROS, danos neurológicos e consequente perda das funções cognitivas. APP sofre clivagem catalisada por γ - e β -secretase que produz a espécie A β monomérica. Na presença de metais, a espécie A β monomérica tende a se agregar.

I.2 Estratégias terapêuticas

Os medicamentos disponíveis para o tratamento de pacientes com AD visam amenizar sintomas como agitação, depressão, delírios, entre outros. Contudo, nenhum tratamento até hoje apresentou melhoras significativas ou reversão do quadro patológico.

Um dos medicamentos mais reportados na literatura é a tacrina (nome comercial: Cognex[®]) que foi retirada do mercado em função dos fortes efeitos colaterais. Fármacos como a donepezila (nome comercial: Aricept[®]), rivastigmina (nome comercial: Exelon[®]), galantamina (nome comercial: Razadyne[®]) são usados como inibidores da acetilcolinesterase, enzima responsável por degradar a acetilcolina. A memantina (nome comercial: Namenda[®]) também é um princípio ativo aplicado como antagonista de

receptores N-metil-D-aspartato (NMDA)^[17]. As representações das estruturas podem ser vistas na **Figura 7**.

Figura 7. Representação esquemática das estruturas dos fármacos usados no tratamento da doença de Alzheimer.

Dada a complexidade da AD e suas inúmeras causas, a produção de um fármaco vinculado a um único alvo terapêutico pode ser insuficiente para o tratamento desta doença. Em geral, um fármaco para a DA, entre outros fatores, deve apresentar:

- Capacidade antioxidante;
- Capacidade quelante;
- Constante de estabilidade moderada a boa;
- Seletividade para íons metálicos;
- Capacidade de atravessar a barreira hematoencefálica

Nesse contexto, a barreira hematoencefálica é considerada um dos principais desafios no desenvolvimento de fármacos com ação no SNC. Ela está localizada na interface entre o sangue e o tecido cerebral, o qual é formado por células endoteliais caracterizadas pelas junções apertadas (estreitas). A função da barreira é a de manter a homeostase do SNC (sistema nervoso central), proteger o cérebro do ambiente

extracelular e garantir um constante suplemento de nutrientes via transportes específicos^[50].

Sabendo que a barreira hematoencefálica requer uma série de pré-requisitos como lipofilicidade, formação de ligações de hidrogênio, baixa massa molecular entre outros, poucos dos compostos testados são eficazes.^[50] Os medicamentos acima descritos têm essas características, embora não sejam tão eficazes.

Uma das formas mais conhecidas para se prever se um determinado composto poderá ou não ser farmacologicamente ativo ou não via oral é a chamada Regras de Lipinsk. Ao todo as cinco regras preveem as propriedades moleculares necessárias para que um composto seja capaz de cruzar a barreira hematoencefálica. As regras são: (1º) Não possuir mais do que 5 doadores de hidrogênio; (2º) Não possuir mais do que 10 aceptores de hidrogênio; (3º) Peso molecular abaixo de 400 g/mol; (4º) Um coeficiente de partição, log P, menor do que 5.5; (5º) Número de ligações rotativas menor do que 10^[51].

Os compostos Tacrina, Donepezila e Galantamina, são exemplo de compostos que se adequam à estes parâmetros propostos por Lipinsk como representado na **Tabela 2**.

Tabela 2. Regras de Lipinsk aplicadas aos compostos Tacrina, Donepezila e Galantamina^[51].

Composto	miLogP	MW	nON	nOHNH	nrotb
Tacrina	3.05	198.269	2	2	0
Donepezila	4.1	379.5	4	0	6
Galantamina	2.623	305.418	4	2	5

*miLogP – Coeficiente de partição; MW – Massa molecular; nON – Número de aceptores de hidrogênio; nOHNH – Número de doadores de hidrogênio; nrotb: Número de ligações rotativas.

I.2.1 Terapia de quelação

A terapia por quelação já é bem estabelecida em outras doenças que requerem o “sequestro” ou a coordenação de metais presentes em excesso no organismo, como por exemplo, a talassemia, causada por excesso de ferro no organismo e a doença de Wilson, decorrente do excesso de cobre no fígado e no cérebro dos pacientes^[52,53]. Para ambos os casos, o tratamento ocorre pela ligação destes metais aos agentes quelantes capazes de formar espécies muito estáveis e eliminá-los do organismo.

Há diversos critérios a serem considerados na terapia por quelação, entre eles a estabilidade dos complexos gerados no organismo, possibilidade de serem metabolizados e tamanho molecular. Por essa razão, há uma considerável dificuldade em se estabelecer compostos que permitam uma atividade anti-A β .

O clioquinol (CQ), como representado na **Figura 8** um derivado da quinolina, que tem como substituintes iodo, cloro e hidroxila, constitui um desses complexantes propostos para íons Cu²⁺, Zn²⁺ e Fe³⁺. Já existem estudos em fase clínica para este composto envolvendo a terapia de quelação para a AD^[54–56]. O CQ pode coordenar-se aos íons zinco e cobre e ainda consegue cruzar a barreira hematoencefálica. Esse composto também mostrou-se efetivo em estudos visando o decréscimo dos depósitos de A β e uma de suas vantagens é a possibilidade de ser administrado por via oral^[57].

Figura 8. Representação esquemática das estruturas do Clioquinol (CQ) e da Thioflavina – T (ThT).

Estudos de captação de íons cobre e zinco promovidos por derivados da tioflavina-T (ThT) também mostraram ser efetivos na inibição da agregação de placas A β . Thioflavinas-T (**Figura 8**) são corantes que apresentam uma elevada afinidade por proteínas amilóides, sendo usadas como marcadores de depósitos amiloides nos tecidos por fluorescência^[54].

A tioflavina-T tem sido alvo de diversos estudos como precursor para o desenvolvimento de agentes de diagnóstico dada às suas propriedades fluorescentes e de interação com as placas A β . Estudos realizados por Pilar Gonzalez-Duarte e colaboradores mostraram que o tratamento com análogos da ThT, quando iodados, apresentam constantes de estabilidade na faixa de $\log \beta_1 = 10 - 14$ ^[58].

Tão relevantes quanto os ligantes ThT ou CQ, as bases de Schiff são consideradas uma importante classe de ligantes capazes de se coordenarem a íons metálicos em diferentes estados de oxidação e formar diversas estruturas. Complexos com bases de Schiff podem ainda mimetizar o sítio ativo de sistemas biológicos, como enzimas antioxidantes, tais como catalases e superóxido dismutases (SOD)^[59]. Desta forma podem também atuar contra possíveis danos oxidativos causados por íons metálicos, implicados em doenças como Alzheimer ou Parkinson^[60].

Quelantes como EDTA (ácido etilenodiamino tetra-acético), DTPA (ácido dietilenotriaminopentacético) e TPEN (N,N,N',N', tetrakis (2-piridilmetil)etilenodiamino) apesar de apresentarem elevadas constantes de estabilidade não são capazes de atravessar a barreira hematoencefálica. De fato, alguns deles são utilizados no diagnóstico *post mortem* de cérebros de pacientes afetados pela AD devido a sua capacidade quelante podem dissolver os emaranhados fibrilares^[61].

1.2.2 Bases de Schiff como potenciais agentes quelantes

Bases de Schiff são estruturas caracterizados pela ligação C=N, sendo que o radical ligado ao nitrogênio deve ser um grupamento alquila ou arila^[62] (**Figura 9**).

As primeiras bases de Schiff foram descritas por Hugo Schiff (Frankfurt/Alemanha - 1834-1915), então aluno de Friedrich Wohler, o qual desenvolveu a sua tese “Über einige Naphthyl-und Phenyl-derivate” (***Alguns Derivados de Naftil e Fenil***). Seus compostos foram apresentados como uma classe de bases aromáticas pertencentes às iminas^[63]. Em 1867, Schiff fez uma breve publicação intitulada “***Uma Nova Série de Bases Orgânicas***”, daí o nome Bases de Schiff^[63]

Iminas em geral, são formadas pela reação entre uma amina primária e um aldeído, ou uma cetona. A condensação entre estes grupamentos produz, além da imina, água. Por se tratar de uma reação de equilíbrio, a presença de água pode induzir à hidrólise da ligação C=N. Embora essas iminas sejam relativamente estáveis, a premissa de equilíbrio requer que as condições de síntese sejam apropriadas para se obter uma maior rendimento^[64].

Figura 9. Classificação da estrutura de uma base de Schiff oriunda da classe das iminas^[62].

Além da reação de hidrólise, iminas também são susceptíveis a reações de troca favorecida na presença de outras aminas primárias e de metátese decorrente da mistura de duas iminas (**Figura 10**)^[64,65].

Embora as bases de Schiff sejam susceptíveis a uma série de reações, dependendo de sua estrutura, a estabilidade da molécula pode ser favorecida independentemente do meio ao qual esteja condicionada.

Figura 10. Reatividade de iminas na presença de água (hidrólise), de aminas primárias (troca) e de outra imina (metátase).

Estes casos são comuns para bases associadas à grupamentos aromáticos como a vitamina B6 (**Figura 11**) que têm as suas estabilidades contempladas pela ressonância formada entre a ligação C=N e a porção aromática da molécula. A vitamina B6, por

exemplo, mesmo atuando em meio fisiológico somente sofre hidrólise via processos catalíticos^{[65][66]}.

Figura 11. Vitâmero de piridoxamina (vitamina B6) reagindo com ácido pirúvico para formar bases de Schiff consideravelmente estáveis em condições fisiológicas. A última etapa de reação, hidrólise da base de Schiff, somente ocorre através de processos catalíticos controlados.

Bases de Schiff, assim como outros compostos orgânicos que contenham uma dupla ligação podem formar isômeros geométricos. Quando associados à grupos amina e carbonilas podem formar ligações intramoleculares e se apresentar nas formas tautoméricas (ceto-enólica) influenciando suas propriedades químicas e espectroscópicas^[67].

Cigán, M. e colaboradores, por exemplo, publicaram uma série de trabalhos com compostos derivados da isatina cujas estruturas apresentam isomeria E/Z reguladas por ligações de hidrogênio intramolecular provenientes do grupamento azo com o oxigênio da isatina^[68]. Eles têm demonstrado que essas espécies apresentam propriedades fotocromicas, cujos espectros eletrônicos, RMN e fluorescência dos isômeros são alterados em função da concentração e polaridade do solvente^[68-72].

Esses estudos revelam os esforços realizados a fim de se desenvolver novas estratégias terapêuticas que visem a obtenção de estruturas capazes de interagir com múltiplos alvos^[73]. A versatilidade das iminas em termos de reatividade e capacidade quelante faz com que esses compostos sejam almejados no desenvolvimento de potenciais fármacos para a AD^[61]

Exemplos de estratégias sintéticas para o desenvolvimento de potenciais fármacos envolvem a união de diferentes estruturas a fim de se obter um efeito sinérgico.

A combinação das estruturas do Resveratrol, medicamento conhecido por possuir propriedades anti-inflamatórias e antitumorais, e do Clioquinol, fármaco promissor para doenças neurodegenerativas, como discutido acima, é um exemplo disso (**Figura 12**).

Figura 12. Combinação das estruturas dos fármacos Resveratrol e Clioquinol a fim de produzir novos compostos com propriedades quelante, antioxidante e intercalante^[47].

Como proposto por Li, S. Y. e colaboradores, a associação destas estruturas levou à produção de novas moléculas com habilidade de quelar íons Cu^{2+} inibindo a agregação dos peptídeos $\text{A}\beta_{1-42}$ e atuam como antioxidantes reduzindo a produção de ROS geradas *in situ*^[47].

Iminas em geral podem ser facilmente moduladas para fins específicos. O estudo dessas estruturas torna-se, portanto, uma ferramenta fundamental na descoberta de novas tecnologias, materiais e potenciais fármacos.

1.3 Isatina em sistemas biológicos

A isatina e seus derivados vêm sendo estudados há décadas. Erdmann, O. L. e Laurent, A. foram os primeiros a sintetizar a isatina em 1841 de forma independente. As estratégias de síntese envolviam a oxidação do corante índigo usando ácido crômico e

nítrico^[74,75]. Desde então, diversos métodos de síntese da isatina e derivados têm sido avaliados, entre eles, destaca-se o método de *Sandmeyer*^[76].

Na natureza a isatina é encontrada em tecidos e no cérebro de ratos^[77] e em raízes e folhas das plantas do gênero *isatis* amplamente usadas na medicina tradicional chinesa na forma de chás para doenças como influenza e gripe^[78,79]. Em humanos, isatina é um metabólito de compostos indólicos como triptofano, sendo detectada em fluidos.

Nas últimas décadas, compostos derivados da isatina têm recebido grande atenção em função das suas aplicações catalíticas e biológicas. A isatina é um bloco construtor significativamente versátil uma vez que pode sofrer diversas modificações estruturais a fim de se modular suas propriedades redox, lipofílicas e hidrofílicas, geométricas entre outras. Substituições podem ocorrer especialmente via ataque nucleofílico nos carbonos C2 e C3 das carbonilas^[80,81].

A versatilidade estrutural e o elevado grau de conjugação dessa molécula permitem que sua cor, propriedades ópticas, solubilidade, reatividade e atividade biológica sejam facilmente moduladas por meio de modificações estruturais.

Do ponto de vista da química de coordenação, a isatina e seus derivados são classificados como bons agentes quelantes, devido a presença dos grupos N, O doadores. O modo de coordenação pode ser definido pela natureza do centro metálico^[82].

O número de publicações até o ano de 2015 (**Figura 13**) envolvendo o termo isatina mostrou que grande parte das pesquisas envolvendo essa molécula estão voltadas para a área medicinal e terapêutica. Dentre elas destacam-se pesquisas voltadas para a área de doenças tumorais (25%), antimicrobianas (19%), antivirais (12%) e anti-inflamatórias (10%).

Figura 13. Pesquisa relacionada ao número de trabalhos publicados baseados em estudos com derivados ou compostos associados à isatina. O gráfico de barras representa o número de artigos publicados até 2015 envolvendo o termo chave 'isatina'. O gráfico de pizza acima, representa o percentual de cada doença estudada com compostos derivados da isatina. O programa SciFinder foi usado na pesquisa base usando como primeiro termo chave a palavra isatina, seguido da remoção de artigos duplicados e, por fim, a adição de palavras chaves relacionadas à cada doença pesquisada.

A isatina e seus derivados são suscetíveis a sofrer tautomerismo ceto-enólico como representado na **Figura 14**^[69,82,83] e, em função disso podem apresentar diferentes modos de coordenação influenciando os processos redox e ainda podem formar ligações de hidrogênio.

Figura 14. Representação estrutural dos possíveis tautômeros formados pela isatina (1H-indol-2,3-diona).

Settimo, F. D. e colaboradores descreveram compostos indólicos capazes de inibir a atividade da enzima aldose redutase (ALR2) [84,85]. A presença de um grupo ciano à estas estruturas aumenta a coplanaridade da estrutura promovendo uma melhor interação com o sítio ativo da a enzima ALR2. A **Figura 15** representa as formas de interação com um dos compostos desenvolvidos em seu grupo, composto 55, (3Z)-3-ciano-3{5-fluoro-2-hidroxi-1-[(4-metilfenil)metil]-1,2-diidro-3H-indol-3-ilideno} propanoico, com a enzima via ligação de hidrogênio[86]. Acredita-se que a estabilidade gerada a partir dessas interações intermoleculares sejam um dos fatores fundamentais para a ação inibitória destes compostos.

Figura 15. Representação esquemática da interação de ALR2/55 via ligação de hidrogênio. O composto 55, ácido (3Z)-3-ciano-3{5-fluoro-2-hidroxi-1-[(4-metilfenil)metil]-1,2-diidro-3H-indol-3-ilideno} propanoico, é aplicado como um inibidor da aldose redutase (ALR2)[86].

A influência do tautomerismo ceto-enólico sobre a oxidação de carboidratos foi observada para os complexos $[\text{Cu}(\text{isapn})]^{n+}$ cujo ligante apresenta dois grupamentos de isatina^[81]. Segundo observado por Cerchiaro, G. e colaboradores, a presença de dois anéis oxindólicos levam ao equilíbrio de três sistemas ceto-ceto, ceto-enol, enol-enol que podem ser preferencialmente formados pela variação de pH (**Figura 16**). Como a etapa intermediária de oxidação dos carboidratos é a enolização catalisada em meio básico, o aumento da concentração de íons hidróxido levou a conclusão de que a reatividade do complexo é também influenciada pela formação do enol^[87].

Figura 16. Representação esquemática dos tautômeros do complexo $[\text{Cu}(\text{isapn})]^{n+}$ nas formas ceto-ceto (1A), ceto-enol (1B) e enol-enol (1C). A influência do complexo foi estudada na oxidação de carboidratos^[87].

Em nosso grupo de pesquisa, diversos complexos metálicos com diferentes ligantes derivados de isatina vêm sendo estudados já há alguns anos e em sua maioria mostraram-se muito estáveis e apresentaram propriedades antitumorais promissoras^[88-93]. Inspirados por esses estudos, ampliamos mais recentemente nossas investigações para outros ligantes, contendo diversos grupamentos, e para outras atividades biológicas, igualmente interessantes, como atividade antiparasitária e atividade inibidora de proteína.

Objetivos

Com o intuito de contribuir com pesquisas de novos agentes terapêuticos que possam ser úteis na chamada terapia de quelatação de íons metálicos na Doença de Alzheimer (DA), o presente trabalho visou fundamentalmente a síntese, caracterização e estudos biológicos de derivados imínicos de oxindóis e seus respectivos complexos com íons de Cu(II) ou Zn(II).

Os objetivos específicos foram os seguintes:

- Síntese dos compostos isapn, isaen, misapn, misaen, isahpy e isahim e caracterização dos compostos por RMN, FTIR, UV/VIS, CHN e espectrometria de massas.
- Síntese do peptídeo A β ₁₋₁₆ e caracterização por espectrometria de massas e RMN.
- Estudo da interação dos compostos isapn, misapn e isahim com o peptídeo A β ₁₋₁₆ por espectroscopia de RMN.
- Estudo da interação do composto isahim com o peptídeo Ab1-16 por espectroscopia CD.
- Determinação das constantes de estabilidade M-L (M = metal, L=ligante) por espectroscopia eletrônica.
- Análise do potencial inibidor dos compostos isapn, misapn, isahim e isahpy frente à agregação do peptídeo A β ₁₋₄₀ induzido pela presença dos íons Cu²⁺ e Zn²⁺ por turbidimetria.

Técnicas de Caracterização

Análise elementar

As análises elementares (CHN) foram feitas na Central Analítica do Instituto de Química, utilizando um Analisador Elementar CNH Perkin-Elmer 2400, com determinação de porcentagens de carbono, hidrogênio e nitrogênio com precisão de 0,01%. Resultados com reprodutibilidade dentro de 0,5 a 1% são aceitáveis.

Espectroscopia vibracional na região do infravermelho

Os espectros vibracionais foram obtidos na região do infravermelho, entre 4000 - 400 cm^{-1} em pastilha de KBr, previamente seco em estufa a 120°C. Os espectros foram coletados com uma resolução de 4 cm^{-1} e acumulação de 32 varreduras em média em um espectrofotômetro ABB BOMEM, modelo MB com transformada de Fourier.

Espectrometria de massas

Os espectros de massa dos compostos sintetizados foram obtidos através da Central Analítica do Instituto de Química da USP. As medidas foram feitas com Equipamento de massas LC-MS Microtof por infusão direta. Espectrogramas ESI-MS/MS foram usualmente obtidos e utilizados na verificação de espécies isoladas e verificação de sua pureza.

Ressonância magnética nuclear (RMN)

800MHz: Os espectros de RMN foram obtidos em equipamento Bruker AIII 800 MHz, criosonda TCI com 4 canais (1H, 13C, 15N e 2H). Essas análises foram realizadas na Central Analítica do Instituto de Química da USP. **500 MHz:** Os espectros de 1D e 2D de RMN foram realizados em equipamento Bruker Avance III, 500 MHz, sonda de 5 mm TXI com canais dedicados para 1H, 13C e 15N, de detecção inversa e com gradiente de campo, registrados na Central Analítica do Instituto de Química da USP. **400 MHz:**

Também foram obtidos espectros de 1D e 2D de RMN 400 MHz, equipamento Bruker, com canais dedicados para ^1H , ^{13}C e ^{15}N , de detecção inversa e com gradiente de campo. Estas análises foram realizadas no Departamento de Química da Università di Pavia, em Pavia, Itália, durante estágio-sanduíche de Camila Wegermann.

Os deslocamentos químicos foram indicados em partes por milhão (ppm) relativo aos sinais dos núcleos de hidrogênio residuais dos solventes, referenciados ao tetrametilsilano (TMS).

Espectroscopia eletrônica na região do ultravioleta/visível (UV/VIS)

Os espectros eletrônicos na região de Ultravioleta/Visível (UV/Vis) foram registrados em espectrofotômetro UV-1650PC da Shimadzu utilizando cubetas de quartzo, de caminho óptico de 1,000 cm. Apenas os espectros das bases de Schiff e respectivos complexos foram registradas neste equipamento.

Os espectros de absorbância na região de Ultravioleta/Visível (UV/Vis) foram também coletados em um espectrofotômetro Hewlett-Packard, modelo HP8453, com rede de diodos ou em um espectrofotômetro de sonda óptica Guided Wave, modelo 260, utilizando cubetas de quartzo de caminho óptico de 1,000 cm. Apenas os espectros das hidrazonas e respectivos complexos foram registradas neste equipamento.

Capítulo 1 - Síntese e Caracterização de Ligantes Oxindolíminicos

1.1 Considerações iniciais

No presente capítulo encontra-se descrita a síntese e a caracterização de seis compostos imínicos produzidos a partir do mesmo precursor, a isatina. Quatro destes podem ser classificados como bases de Schiff: isapn, isaen, misapn e misaen e dois como hidrazonas isahim e isahpy.

A nomenclatura empregada foi sistematizada a partir da isatina (isa) e das aminas correspondentes isapn: 1,3 – propanodiamina (pn); isaen: etilenodiamina (en); isahim: 2-hidrazinil-4,5-dihidro-1H-imidazol (him) e isahpy: 2-hidrazinil piridina. Isapn e isaen são bases de Schiff que contém dois anéis oxindolíminicos condensados às aminas enquanto que misapn e misaen apenas um, cujo nome se inicia com ‘m’ de mono.

Técnicas espectroscópicas de FTIR, UV/VIS, RMN bem como espectrometria de massas e análise elementar foram utilizadas na caracterização desses compostos.

Como essas estruturas podem apresentar isomeria geométrica, caracterizações por RMN e UV/VIS foram feitas a fim de se identificar as proporções existentes de cada isômero e suas formas de interação.

1.2 Parte experimental

1.2.1 Síntese do ligante isahim

O ligante *isahim*, (3*Z*)-3-[2-(4,5-dihidro-1*H*-imidazol-2-il)hidrazinilideno]-1,3-dihidro-2*H*-indol-2-ona, foi preparado a partir da adição de uma solução de isatina (1*H*-indol-2,3-diona, 6,8 mmol) obtida em 50,0 mL de diclorometano previamente seco seguido da adição do sal ácido da hidrazina (hidrobromito de 2-hidrazinil-4,5-dihidro-1*H*-imidazol, 6,98 mmol). A reação foi preparada a temperatura ambiente e em constante agitação por três horas. Embora se tenha utilizado o sal ácido da hidrazina, adicionou-se uma gota de HCl concentrado (37 %) a fim de aumentar o rendimento da reação via catálise ácida. Verificou-se após a adição do ácido, ainda no início da reação, a formação de um sólido amarelo. O material foi filtrado e lavado com diclorometano em abundância seguido por éter etílico gelado. Rendimento: 69,3%

Solúvel em metanol, etanol, dimetilsufóxido, dimetilformamida, dimetilacetamida, baixa solubilidade em acetonitrila e acetona. O composto apresenta solubilidade em água de modo que a purificação do material foi feita neste solvente através a solubilização seguida da precipitação a frio.

Espectrometria de massas (+ESI-MS): $C_{11}H_{11}N_5O$, MM = 229,24 g mol^{-1} , $[C_{11}H_{11}N_5O+H]^+$, $[C_{11}H_{11}N_5O Na]^+$, m/z = 230,1032, 252,0839. Análise elementar, (*isahim*·H₂O $C_{11}H_{11}N_5O$, MM = 229,24 g mol^{-1}): *Cal.* 53,43/5,30/28,32; *Exp.* 53,10/5,21/27,94.

1.2.2 Síntese do ligante isahpy

A síntese do ligante *Isahpy*, (3*Z*)-3-[2-(piridin-2-il)hidrazinilideno]-1,3-dihidro-2*H*-indol-2-ona, foi feita de modo semelhante ao *isahim* pela adição de isatina (1*H*-indol-2,3-diona, 2,8 mmol) e da hidrazina (2-hidrazinil piridina, 2.28 mmol) em 50 mL de diclorometano previamente seco a temperatura ambiente por três horas sob agitação. Duas gotas de ácido clorídrico concentrado (37 %) foram adicionadas ao balão de reação a fim de aumentar o rendimento via catálise ácida. Após a adição de ácido iniciou-se a

formação de um sólido amarelo o qual foi filtrado e lavado com diclorometano em abundância seguido por éter etílico. Rendimento: 74,3%.

Solúvel em metanol, etanol, dimetilsufóxido, dimetilformamida, dimetilacetamida e baixa solubilidade em acetonitrila e acetona. Assim como o *isahim*, o composto *isahpy* apresenta solubilidade em água e por esta razão foi purificado por precipitação neste mesmo solvente.

Espectrometria de massas (+ESI-MS): $C_{13}H_{10}N_4O$, $MM = 238,25 \text{ g mol}^{-1}$, $[C_{13}H_{10}N_4O+H]^+$, $[C_{13}H_{10}N_4O+Na]^+$, $m/z = 239,0915$ e $261,0738$. Análise elementar, (**isahpy**, $C_{13}H_{10}N_4O$, $MM = 238,25 \text{ g mol}^{-1}$): *Cal.* 65,54/4,23/23,52; *Exp.* 65,44/4,06/22,61.

1.2.3 Síntese do ligante isapn

O compostos isapn, (3*E*,3'*E*)-3,3'-(propano-1,3-diildiazanililideno)di(1,3-dihidro-2*H*-indol-2-ona), foi sintetizado de modo similar aos procedimentos descritos acima. A temperatura ambiente, 19,9 mmol de isatina foram adicionados a 100 mL de etanol previamente seco e a mistura foi agitada até completa solubilização. Em seguida, 9,7 mmol de 1,3-propoanodiamina foram adicionados à solução de isatina e uma solução marrom formou-se imediatamente. Duas gotas de ácido clorídrico (37 %) foram adicionadas e um sólido amarelo formou-se imediatamente. O sistema foi mantido nas mesmas condições durante cinco horas. O sólido obtido foi filtrado e lavado com metanol em abundância seguido de éter etílico. Rendimento, 81%.

Solúvel em DMSO, DMF e dimetilacetamida; solubilidade a quente, etanol e metanol.

Espectrometria de massas (+ESI-MS): $C_{19}H_{16}N_4O_2$, $MM = 332,36 \text{ g mol}^{-1}$, $[C_{19}H_{16}N_4O_2+Na]^+$, $m/z = 355,1164$. Análise elementar, (**isapn**, $C_{19}H_{16}N_4O_2$, $MM = 332,36 \text{ g mol}^{-1}$): *Cal.* 67,99/4,73/16,52; *Exp.* 68,7/4,85/16,9.

1.2.4 Síntese do ligante misapn

Para a síntese do composto misapn, (3*E*)-3-[(3-aminopropil)imino]-1,3-dihidro-2*H*-indol-2-ona, 20 mmol de isatina foram adicionadas a 100 mL de diclorometano

previamente seco e a mistura foi aquecida até completa solubilização do material. Após resfriamento até a temperatura ambiente foram adicionados 20,0 mL de 1,3-propanodiamina à solução de isatina levando a imediata formação de uma solução marrom. Duas gotas de ácido clorídrico (37 %) foram adicionadas e logo após a adição, um sólido amarelo formou-se imediatamente. Após quatro horas sob as mesmas condições, o sólido foi filtrado e lavado com uma mistura DCM:Metanol (50% v/v) seguido por éter etílico. Rendimento, 32,2%.

Solúvel em etanol, metanol, DMSO, DMF e dimetilacetamida.

Espectrometria de massas (+ESI-MS): $C_{11}H_{13}N_3O$, MM = 203,24 $gmol^{-1}$, $[C_{11}H_{13}N_3O+H]^+$, $[C_{11}H_{13}N_3O+Na]^+$ e $[C_{11}H_{13}N_3O+K]^+$, m/z = 204,1127, 226,0947 e 242,1279. Análise elementar, (**misapn·0,7DCM**, $C_{11}H_{13}N_3O$, MM = 203,24 $gmol^{-1}$): Cal. 53,3/5,5/16,0; Exp. 53,58/5,75/15,84.

1.2.5 Síntese do Ligante Isaen

Assim como para os demais compostos, o *isaen*, (3*E*)-3-{3-[(*E*)-(2-oxo-1,2-dihidro-3*H*-indol-3-ilideno)amino]propilideno}-1,3-dihidro-2*H*-indol-2-ona, foi sintetizado a partir da solubilização de 10,5 mmol de isatina em 30 mL de etanol previamente seco, seguido pela adição de 5 mmol de etilenodiamina gerando uma solução marrom. A adição de duas gotas de ácido clorídrico concentrado (37 %) levou a precipitação de um sólido amarelo. O sistema foi mantido a temperatura ambiente agitação constante durante quatro horas. O sólido obtido foi filtrado, lavado com metanol em abundância seguido por éter etílico. Rendimento, 41,2%.

Solúvel em DMSO, DMF e dimetilacetamida. Solubilidade a quente, metanol, etanol.

Espectrometria de massas (+ESI-MS): $C_{18}H_{14}N_4O_2$, MM = 318,33 $gmol^{-1}$, $[C_{18}H_{14}N_4O_2+H]^+$, m/z= 319,1188. Análise elementar, (**isaen·H₂O**, $C_{18}H_{14}N_4O_2$, MM = 318,33 $gmol^{-1}$): Cal. 566,34/5,20/16,31; Exp. 66,0/4,6/17,1.

1.2.6 Síntese do ligante misaen

Para a síntese do composto misaen, 9,45 mmol de isatina foram adicionados a 100 mL de diclorometano previamente seco e a mistura foi aquecida e agitada até completar a solubilização do material. A temperatura ambiente foi adicionada 10 mmol de etilenodiamina e a solução ficou marrom. Em seguida, foram adicionadas duas gotas de ácido clorídrico (37 %) e um sólido amarelo claro formou-se imediatamente. O sistema foi mantido a temperatura ambiente e constante agitação magnética durante três horas. O sólido amarelo foi filtrado rapidamente lavado com uma mistura DCM:Metanol (50% v/v) e, em seguida, lavado com éter etílico. Rendimento, 59%.

Solúvel em metanol, etanol, DMSO, DMF, dimetilacetamida.

Espectrometria de massas (+ESI-MS): $C_{10}H_{11}N_3O$, MM = 189,22 $gmol^{-1}$, $[C_{10}H_{11}N_3O+H]^+$, $m/z = 190,2$. Análise elementar, (**misaen**·**H₂O**, $C_{10}H_{11}N_3O \cdot H_2O$, MM = 207,23 $gmol^{-1}$): *Cal.* 58,0/6,32/20,28; *Exp.* 58,56/5,74/19,69.

1.2.7 Secagem dos solventes

O diclorometano foi seco pela adição de sais de sulfato de sódio anidro, cloreto de cálcio anidro ou hidreto de cálcio ao solvente. Em todos os casos, após a adição do agente secante, o solvente foi mantido em repouso por cerca de 20 min e filtrado em seguida. Após a filtração, o solvente foi imediatamente utilizado nas sínteses descritas acima.

A secagem do metanol ou etanol foi feita de acordo com a literatura^[94]. Ao solvente foram adicionadas fitas polidas de magnésio metálico e iodo. A mistura então foi refluxada até que toda a solução roxa (cor obtida em função do iodo) se tornasse incolor. A solução incolor foi então destilada e o solvente seco foi armazenado em frasco contendo peneira molecular ativada. Em todas as sínteses, o solvente seco foi utilizado imediatamente após a coleta.

1.3 Resultados e discussão

Todos os ligantes foram preparados através da condensação de Schiff (condensação aldólica), empregando-se a catálise ácida entre as aminas primárias e a β -carbonila^[95] da isatina, reagente em comum em todas as sínteses, com sucessiva formação da imina (**Figura 17**). Dado que as solubilidades dos compostos são distintas, cada síntese foi feita prevendo-se a precipitação do composto formado a partir da solução de reação. O diclorometano foi utilizado na síntese dos compostos isahim, isahpy, misapn e misaen, enquanto que o etanol foi escolhido para a síntese dos ligantes isapn e isaen. A proporção dos reagentes também foi controlada a fim de se evitar a formação de produtos secundários.

Para os compostos misaen e misapn, quantidades equivalentes de amina e isatina foram aplicadas nas sínteses com um ligeiro excesso da diamina para favorecer a formação do composto condensado com apenas uma amina. Uma estratégia oposta foi aplicada na síntese dos ligantes isapn e isaen, para os quais a relação estequiométrica utilizada foi de 2:1 (amina: isatina) com um ligeiro excesso de isatina para garantir a formação da diamina duplamente condensada.

Figura 17. Representação das sínteses dos ligantes isahim, isahpy, misapn, isapn, misaen e isaen a partir da isatina. Diferentes aminas foram usadas nas sínteses. Proporção 2:1 (isatina: amina) para isapn e isaen, e 1:1 para os demais ligantes.

Todos os ligantes obtidos na forma de pó apresentam cor amarela, típico de bases de Schiff e compostos imínicos em geral. De acordo com o mecanismo proposto na literatura^[65], (**Figura 18**) o processo de formação da imina pode ser favorecido na faixa de pH 4,0 a 6,0. A protonação ocorre no grupamento hidroxila da espécie carboxilamina resultando na liberação de uma molécula de água e na formação da imina. Contudo, a protonação da amina (ou hidrazina) em pH muito ácido (abaixo de 4,0) pode atuar como um grupo protetor da amina impedindo o ataque nucleofílico do nitrogênio à carbonila bem como, acima do pH 6,0 o meio se torna suficiente neutro para impedir a catálise ácida.

Figura 18. Mecanismo proposto de formação de uma imina^[65].

O pH, no entanto, não foi controlado, visto que os solventes usados nas reações eram orgânicos. A adição do catalisador foi feita baseando-se na inicialização da formação de precipitado considerando-se assim a formação do produto. Embora a água seja um subproduto da reação, o solvente usado na síntese foi tratado (seco) previamente a fim de se garantir que o equilíbrio da reação fosse favorecido no sentido da formação dos produtos.

1.3.1 Caracterização dos compostos por espectroscopia no infravermelho (FTIR)

1.3.1.1 Análise por espectroscopia vibracional FTIR das hidrazonas isahim e isahpy

A atribuição das bandas de absorção dos espectros na região do infravermelho corrobora a formação das estruturas esperadas para os compostos isahim e isahpy (**Figura 19 e Figura 20**). Os espectros evidenciaram a presença do grupamento oxindólico a partir de bandas típicas do anel aromático e da γ -lactama bem como dos grupos piridina e imidazol.

A lactama pode ser caracterizada a partir de bandas próximas a região de 3300 cm^{-1} características do estiramento da ligação N-H de amida e a partir de uma absorção intensa na região de 1700 cm^{-1} devido ao estiramento da carbonila de amidas cíclicas. Em ambos os casos se observou a presença do grupamento γ -lactama a partir das absorções $\nu(\text{N-H})$ de amida (3300 cm^{-1} , isahim e 3221 cm^{-1} , isahpy) e $\nu(\text{C=O})$ da carbonila (1712 cm^{-1} , isahim e 1695, isahpy)^[96,97]. Como esperado, a frequência de estiramento C=O para o composto isahpy é menor do que para isahim. Fatores que aumentam a deslocalização eletrônica como a maior conjugação π no isahpy reduzem o caráter de dupla ligação da carbonila em um deslocamento da banda para menores frequências^[97].

Bandas típicas do anel oxindólico também foram observadas nas regiões de 1600 cm^{-1} a 1400 cm^{-1} características dos estiramentos C=C e C=N de anel aromático e de imina^[98]. Verifica-se que o conjunto de sinais nesta região para o espectro do composto isahpy é maior do que para o composto isahim. A presença do anel aromático do grupamento oxindólico, ainda pode ser observada através das bandas situadas na região próxima a 750 cm^{-1} característica de anéis orto-dissubstituídos como é o caso da isatina. As bandas de estiramento da amina ou hidrazona (N-H) também foram observadas em 3120 cm^{-1} e 3090 cm^{-1} para isahim e em 3140 cm^{-1} e 3070 cm^{-1} para isahpy.

As bandas alargadas na região de 3000 cm^{-1} podem ser atribuídas aos estiramentos O-H da água de hidratação oriunda, sobretudo como subproduto da reação de síntese dos compostos^[99]. As frequências de estiramento da fração enólica O-H normalmente encontram-se nesta região^[96].

As demais frequências observadas nos espectros podem ser atribuídas a uma gama de absorções as quais, na ausência de análises mais aprofundadas, podem ser indistinguíveis. Na região de $1300\text{-}1000\text{ cm}^{-1}$ podem ser observados sinais característicos dos estiramentos $\nu(\text{C-N})$ de amina, $\nu(\text{C-O})$, $\nu(\text{C-C})$ próximo a 1200 cm^{-1} e do desdobramento $\delta(\text{C-H})$ ^[97].

As atribuições das bandas dos espectros vibracionais FTIR dos compostos isahim e isahpy estão descritas na **Tabela 3**.

Tabela 3. Atribuições tentativas dos picos dos espectros vibracionais na região do infravermelho para os compostos isahim e isahpy.

Atribuições para os espectros FTIR (isahim)	
Atribuição	Absorção (cm⁻¹)
v(N-H) de amida	3300
v(N-H) de amina e hidrazona:	3120 e 3090
v(C-O)	1712
v(C=C e C=N)	1654, 1607, 1490 e 1456
v(C-N), v(C-O), v(CC) e δ(CH)	1373, 1339, 1299, 1257, 1212, 1191, 1143, 1080 e 1007
δ(C-H) anel aromático orto-dissubstituído	757, 692, 675, 627 e 580
demais bandas	977, 928, 825, 794, 794, 492 e 460
Atribuições para os espectros FTIR (isahpy)	
Atribuição	Absorção (cm⁻¹)
v(N-H) de amida	3221
v(N-H) de amina e hidrazona:	3140 e 3070
v(C-H)	2900 e 2820
v(C-O)	1695, 1630 e 1600
v(C=C e C=N)	1571, 1512, 1467, 1454 e 1435
v(C-N), v(C-O), v(C-C) e δ(C-H)	1343, 1298, 1271, 1209, 1170, 1102 e 999
δ(C-H) anel aromático orto-dissubstituído	777, 732, 683 e 640
demais bandas	924, 563, 493 e 454

Figura 19. Espectro vibracional FTIR na região de infravermelho do composto isahim. Análise obtida em pastilhas de KBr. As demais atribuições encontram-se descritas no texto.

Figura 20. Espectro vibracional na região de infravermelho do composto isahpy. Análise obtida em pastilhas de KBr. As demais atribuições encontram-se descritas no texto.

1.3.1.2 Análise por espectroscopia no infravermelho FTIR dos compostos isapn, misapn, isaen e misaen

Dado que os compostos obtidos apresentam estruturas bastante similares pode-se assumir que os espectros obtidos na região do infravermelho também o sejam (**Figura 21, Figura 22, Figura 23 e Figura 24**). Observam-se bandas características da presença de isatina na região de $3200\text{--}3400\text{ cm}^{-1}$, típicas da ligação NH de amida cíclica. Para amidas secundárias, em especial para lactamas, observa-se uma única banda referente às frequências de estiramento N-H na região de $3180\text{ a }3350\text{ cm}^{-1}$ como observado em todos os compostos. As bandas atribuídas a aminas primárias comumente encontram-se na mesma região e se distinguem por apresentar dois picos como é o caso dos compostos misapn e misaen que apresentam um par de picos característicos do estiramento N-H de amina nas regiões de $3080\text{ e }3050\text{ cm}^{-1}$ e $3335\text{ e }3270\text{ cm}^{-1}$ respectivamente^[97].

Na região de $2880\text{--}3090\text{ cm}^{-1}$ observa-se bandas típicas do estiramento C-H dos grupos metilênicos e aromáticos. Comumente os estiramentos C-H para alcanos, alcenos e aromáticos são pouco intensos e ocorrem na região de $2850\text{ a }3100\text{ cm}^{-1}$ sendo, portanto, difíceis de serem diferenciados uns dos outros^[76].

A presença do grupamento oxindólico também foi observada através das bandas características do estiramento C=O de amida próximos à região de 1700 cm^{-1} para todos os compostos. O anel aromático, bem como a imina, foi também caracterizado através das bandas típicas na região de $1600\text{ cm}^{-1}\text{ a }1400\text{ cm}^{-1}$ característicos do estiramento C=N. O conjunto de bandas próximas à região de 750 cm^{-1} é característico da presença do anel aromático do grupamento oxindólico típico de anel orto-dissubstituído.

As atribuições das bandas dos espectros vibracionais FTIR dos compostos isapn, isaen, misapn e misaen estão descritas na **Tabela 4**.

Tabela 4. Atribuições das bandas dos espectros vibracionais na região do infravermelho para os compostos isapn, misapn, isaen e misaen.

Atribuições para os espectros FTIR (isapn/isaen)	
Atribuição	Absorção (cm⁻¹)
v(N-H) de amida	3202 / 3270
v(C-H)	3091 e 2970 / 2890
v(C-O)	1743 / 1743
v(C=C e C=N)	1654, 1610 e 1460 / 1653, 1613, 1590, 1460 e 1435
v(C-N), v(C-O), v(CC) e δ(CH)	1380, 1355, 1339, 1259, 1208, 1104 e 1036 / 1341, 1289, 1259, 1207, 1101 e 1017
δ(C-H) anel aromático orto-dissubstituído	735, 725, 711, 648 e 600 / 741, 687 e 618
demais bandas	934, 793 e 497 / 988, 933, 869, 799, 494 e 402
Atribuições para os espectros FTIR (misapn/misaen)	
Atribuição	Absorção (cm⁻¹)
v(N-H) de amida	3230 / 3420
v(NH) de amina	3080 e 3050 / 3335 e 3270
v(C-H)	2974 / 3050, 2935 e 2880
v(C-O)	1750 / 1747
v(C=C e C=N)	1654, 1610, 1460 e 1430 / 1620 e 1470
v(C-N), v(C-O), v(CC) e δ(CH)	1380, 1353, 1340, 1256, 1205 e 1099 / 1380, 1331, 1197, 1124, 1107, 1077 e 1045
δ(C-H) anel aromático orto-dissubstituído	735, 646 e 595 / 740, 671, 642 e 610
demais bandas	933, 796 e 497 / 992, 965, 875 e 490

Figura 21. Espectro vibracional na região de infravermelho do composto isapn. Análise obtida em pastilhas de KBr. As demais atribuições encontram-se descritas no texto. Ar_oop (*Aromatic_out of plane*).

Figura 22. Espectro vibracional na região de infravermelho do composto misapn. Análise obtida em pastilhas de KBr. As demais atribuições encontram-se descritas no texto. Ar_oop (*Aromatic_out of plane*).

Figura 23. Espectro vibracional na região de infravermelho do composto isaen. Análise obtida em pastilhas de KBr. As demais atribuições encontram-se descritas no texto. Ar_oop (Aromatic_out of plane).

Figura 24. Espectro vibracional na região de infravermelho do composto misaen. Análise obtida em pastilhas de KBr. As demais atribuições encontram-se descritas no texto. Ar_oop (*Aromatic_out of plane*).

1.3.2 Caracterização dos compostos por espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN)

Os resultados das análises RMN para todos os ligantes foram consistentes com as estruturas esperadas. Os espectros dos precursores, bem como as análises obtidas por Silva, B.N.M. Da, e colaboradores para derivados de isatina^[76] foram usadas como referências na caracterização dos compostos.

1.3.2.1 Análise de RMN do composto isahpy

O espectro ¹H RMN (**Figura 25**) do composto isahpy (DMSO-d₆, 400 MHz, temperatura ambiente) indica um produto de elevada pureza e não evidencia a formação de isômeros geométricos. O espectro apresenta oito sinais sendo dois singletos nas regiões de 12,80 ppm (H12) e 11,12 ppm (H1) com integração para dois hidrogênios e seis sinais na região dos aromáticos com integração total para oito hidrogênios.

Quatro deles são bem definidos, todos com integração para um hidrogênio cada: 8,28 ppm (H15), 7,86 ppm (H17), 7,90 ppm (H7) e 6,95 ppm (H6). Os outros dois sinais são multipletos: um entre 7,60 – 7,56 ppm atribuído à sobreposição dos sinais H9 e H18 e outro entre 7,10 – 7,05 ppm referente aos hidrogênios H8 e H16. A soma das integrações dos sinais está de acordo com a estrutura proposta de formula molecular C₁₃H₁₀N₄O.

Estruturas similares a este composto apresentam o mesmo conjunto de sinais para os hidrogênios ácidos (NH) na região próxima a 11,0 ppm para o hidrogênio do grupamento oxindólico e na região próxima a 12,0 ppm para o hidrogênio de hidrazina^[76,100].

A análise 2D-HMBC (**A1. 5**) permitiu diferenciar os singletos observados nas regiões de 12,80 ppm e 11,12 ppm. O singleto em 11,12 ppm foi atribuído ao H1 do grupamento oxindólico devido aos acoplamentos observados com os carbonos da γ -lactama. Um acoplamento fraco entre o singleto em 12,80 ppm e o sinal em 159 ppm pertencente ao carbono C13 da piridina levou a conclusão de que este singleto pode ser atribuído ao H12 da hidrazina.

Tal como esperado, o espectro de carbono ^{13}C RMN (400 MHz, DMSO- d_6) apresenta um conjunto de treze sinais dentre os quais, os sinais em 164,1 ppm, 155,7 ppm, 141,5 ppm, 130,6 ppm e 121,5 ppm podem ser atribuídos aos carbonos quaternários C2 (carbonila), C13 (imina, piridina), C5, C3 (imina) e C4 respectivamente. Carbonos quaternários apresentam intensidades mais baixas nos espectros de ^{13}C RMN sendo que carbonos de carbonilas são mais deslocados por serem mais desblindados devido à proximidade ao oxigênio. Os demais sinais estão evidenciados no espectro representado na **Figura 26**. As análises 2D (**Anexos A1 - Espectros de RMN 2D**) corroboraram as atribuições das análises 1D.

Nenhum indicio da formação de tautômeros foi observado nos espectros de RMN, o que indica que a espécie em solução se refere à forma ceto.

Na **Tabela 5** encontram-se descritas as atribuições dos sinais de RMN do composto isahpy.

Tabela 5. Atribuições dos espectros RMN do composto isahpy em DMSO- d_6 .

^1H -RMN		^{13}C RMN	
(δ , ppm)	Atribuição	(δ , ppm)	Atribuição
12,8	s, 1H, H12	164,1	C2
11,12	s, 1H, H1	155,7	C13
8,28	d, $J = 4.4$ Hz, 1H, H15	149,1	C15
7,86	dd, 1H, H17	141,5	C5
7,58	t, $J = 7.6$ Hz, 2H, H9 e H18	139,7	C17
7,30	t, $J = 7.4$ Hz, 1H, H7	130,6	C3
7,10-7,05	m, 2H, H8 e H16	130,4	C7
6,95	d, $J = 7,8$ ppm, 1H, H6	123,0	C8
		121,5	C4
		120,1	C9
		119,4	C16
		111,6	C6
		108,0	C18

Figura 25. Espectro ¹H RMN (400 MHz, DMSO-d₆) do composto isahpy. O espectro sobreposto representa a ampliação dos sinais da região aromática 8,5 – 6,7 ppm.

Figura 26. Espectro ^{13}C RMN (400 MHz, DMSO- d_6) do composto isahpy. A imagem sobreposta representa a ampliação de todo o espectro, indicando que foram obtidos apenas sinais típicos de carbonos insaturados.

1.3.2.2 Análise RMN do composto isahim

Ao contrário do composto isahpy, o espectro de ^1H RMN (400 MHz, DMSO- d_6) do isahim mostrou-se mais complexo devido à formação de uma mistura de isômeros geométricos de acordo com a **Figura 27**. O espectro de hidrogênio apresentou mais sinais do que o esperado para a composição proposta sendo diferenciados em dois conjuntos de sinais com integrações distintas de proporções 5:1 indicando a presença de pelo menos duas espécies em solução.

O perfil dos sinais de baixa intensidade é muito semelhante ao conjunto de sinais com maiores integrações. A proximidade dos deslocamentos químicos e a mesma multiplicidade entre os dois conjuntos de sinais indica a formação de isômeros geométricos E/Z.

Na **Tabela 6** encontram-se descritos os deslocamentos químicos e as integrações de cada sinal do espectro.

Tabela 6. Análise dos deslocamentos dos sinais do espectro de ^1H RMN (400 MHz) inicial do composto isahim obtido em DMSO- d_6 à temperatura ambiente.

(δ , ppm), atribuição	Ressonância	Integração	Proporção (+ intenso: - intenso)
(12,87), H12	Singleto	0,12 (0,02 + 0,1)	5:1
(11,30 e 10,85), H1	Singleto	0,2 e 1,0	5:1
*(9,09 e 8,70), H14/H17	Singleto	0,3 e 1,6	-
(8,11 e 7,60), H9	Dubleto	1,0 e 0,2	5:1
(7,42), H7	Multipleto	1,2 (0,2 + 1,0)	5:1
(7,12), H8	Multipleto	1,2 (0,2 + 1,0)	5:1
(6,95), H6	Multipleto	1,2 (0,2 + 1,0)	5:1
(3,83 e 3,78), H15 e H16	Singleto alargado	1,0 e 4,7	5:1

Figura 27. Espectro de ¹H RMN (400 MHz) do composto isahim obtido a temperatura ambiente em DMSO-d₆. O espectro evidencia a presença de dois compostos, E-isahim e Z-isahim.

Considerando a complexidade do espectro obtido, o sistema foi submetido ao aquecimento na tentativa de se prever as prováveis estruturas de cada isômero. Esse ensaio possibilitou isolar apenas um isômero, a partir do qual, toda a caracterização em solução foi estabelecida.

O espectro que contém o isômero isolado foi obtido quatro dias após o aquecimento até 80°C e encontra-se representado na **Figura 28**.

Neste espectro observa-se dois singletos em 12,86 ppm e 11,30 ppm atribuídos aos hidrogênios amínicos H12 e H1, respectivamente (**Tabela 7**). Embora sejam sinais estreitos, as integrações para estes sinais não correspondem a equivalência de um hidrogênio. A existência de tautômeros ceto-enólicos, bem como a interação dos hidrogênios com o solvente são fatores que influenciam no cálculo das integrações dos hidrogênios ácidos.

O hidrogênio do grupamento imidazólico H14, por sua vez pode ser atribuído ao singlete alargado em 9,09 ppm. Comumente, hidrogênios ligados a nitrogênios tendem a apresentar um espectro mais alargado cujas intensidades não necessariamente devem ser consideradas. Esse fenômeno é típico em sistemas onde as constantes de troca N-H são intermediárias ou lentas induzindo a um espectro com banda mais alargada. Neste caso, a conjugação do hidrogênio induz ao alargamento do sinal^[97].

O singlete alargado em 3,83 ppm com integração para quatro hidrogênios pode ser atribuído aos hidrogênios metilênicos pertencentes ao grupamento imidazólico H15/H16.

Tabela 7. Atribuições dos deslocamentos químicos do espectro ¹H RMN do composto isahim.

¹ H-RMN		¹³ C-RMN	
(δ , ppm)	Atribuição	(δ , ppm)	Atribuição
12,87	s, 1H, H12	162,7	C2
11,29	s, 1H, H1	159,2	C13
9,09	s, 1H, H14	143,9	C5
7,60	d, $J = 7,5$ Hz, 1H, H9	139,2	C3
7,42	t, $J = 7,7$ Hz, 1H, H7	133,3	C7
7,13	t, $J = 7,6$ Hz, 1H, H8	123,5	C8
6,97	d, $J = 7,8$ Hz, 1H, H6	122,2	C9
		112,2	C6
		44,1	C15 e C16

Figura 28. Espectro de ¹H RMN (400 MHz) do composto Z-isahim obtido em DMSO-d₆. O espectro foi adquirido quatro dias após aquecimento

Os espectros 2D-RMN (**A1. 6** - **A1. 9**) e o de ^{13}C RMN foram examinados em conjunto com o espectro ^1H RMN a fim de se determinar a estrutura do ligante.

O espectro ^{13}C RMN encontra-se representado na **Figura 29**. As atribuições para essas análises encontram-se descritas na **Tabela 7**.

De acordo com a fórmula molecular do isahim $\text{C}_{10}\text{H}_{11}\text{N}_5\text{O}$, o espectro de ^{13}C RMN possui dez sinais cujos deslocamentos químicos e intensidades estão de acordo com a estrutura proposta.

Os sinais mais deslocados em 162,7 ppm e 159,2 ppm foram atribuídos, com auxílio das análises 2D aos carbonos C2 e C13 respectivamente. Os sinais de mais baixa intensidade foram atribuídos aos carbonos da lactama enquanto o sinal em 44,1 ppm foi atribuído aos carbonos metilênicos do grupamento imidazólico.

Figura 29. Espectro ^{13}C RMN (DMSO-d₆, 400 MHz) para a espécie Z-isahim obtido à temperatura ambiente quatro dias após o aquecimento.

1.3.2.3 Estudo do aquecimento e identificação dos isômeros *E*- e *Z*-isahim por ^1H RMN

Diversas espécies são prováveis para hidrazonas derivadas do grupamento oxindólico, visto que podem apresentar além da isomeria geométrica, tautomeria^[70,101]. Estas diferentes espécies podem coexistir e não necessariamente são diferenciáveis em solução uma vez que são fruto da deslocalização eletrônica e da ressonância do sistema de elétrons π . Conforme representado na **Figura 30**, verifica-se a possibilidade de pelo menos seis isômeros para o ligante isahim.

Figura 30. Possíveis estruturas para a molécula isahim considerando os efeitos de isomeria geométrica e tautomeria. A presença do grupo hidrazina possibilita também a formação do grupo azo ($\text{N}=\text{N}$) por conjugação.

Como descrito anteriormente, a solução de isahim foi aquecida na tentativa de se isolar uma única espécie em DMSO.

Esse experimento consistiu na aquisição de quatro espectros de ^1H RMN nesta ordem: *temperatura ambiente* (**E1**) – *aquecido à 80°C* (**E2**) – *resfriado a 25 °C* (**E3**) –

temperatura ambiente após quatro dias em repouso (**E4**). O espectro obtido após quatro dias em repouso (**E4**) foi o que apresentou um conjunto de sinais característicos de uma única espécie em solução. Para melhor compreensão da análise adotaremos as siglas **E1**, **E2**, **E3** e **E4** para denominar cada espectro.

As regiões de cada conjunto de espectros (13-8 ppm, 8-6 ppm e 4-2 ppm), encontram-se representadas nas **Figura 31**, **Figura 32** e **Figura 33** respectivamente.

Figura 31. Região expandida 13,6-8,4 ppm. Espectros de ¹H RMN (400 MHz) do composto isahim em DMSO-d₆. Os espectros foram obtidos na sequência: (**E1**) T.A., (**E2**) 80°C, (**E3**) 25°C e (**E4**) a T.A. quatro dias após o aquecimento.

Figura 32. Região expandida 4-6,7 ppm. Espectros de ^1H RMN (400 MHz) do composto isahim em DMSO- d_6 . Os espectros foram obtidos na sequência: **(E1)** T.A., **(E2)** 80°C, **(E3)** 25°C e **(E4)** a T.A. quatro dias após o aquecimento.

Figura 33. Região expandida 4,2-2,3 ppm. Espectros de ^1H RMN (400 MHz) do composto isahim em DMSO- d_6 . Os espectros foram obtidos na sequência: **(E1)** T.A., **(E2)** 80°C, **(E3)** 25°C e **(E4)** a T.A. quatro dias após o aquecimento.

Curiosamente, observa-se uma inversão das intensidades dos sinais no espectro aquecido **E2** em relação ao espectro **E1**. Ao longo das análises, verificou-se ainda a separação dos sinais que compunham os multipletos em 7,15-7,08 ppm e 6,97-6,93 ppm em dubletos e tripletos (**Figura 32**).

Estes fatores, como se suspeitava, são indícios da presença de duas espécies em solução presentes no espectro **E1**. Além disso, verificou-se que a espécie favorecida a 80°C permaneceu mesmo após o resfriamento conforme observado nos espectros **E3** e **E4**.

O principal indício da formação de isômeros E/Z foi verificado pela análise dos dubletos de hidrogênio aromático em 7,60 ppm e 8,11 ppm. Dentre os quatros sinais aromáticos, estes sinais foram o que apresentaram maior deslocamento químico.

O dubleto em 7,60 ppm é característico do hidrogênio (H9) aromático altamente desblindado. Conforme demonstrado na **Figura 34**, a proximidade do nitrogênio da hidrazina N12 ao hidrogênio aromático no isômero *E*-isahim, poderia levar à desblindagem do mesmo e consequente deslocamento para baixo campo (7,60 ppm → 8,11 ppm).

Figura 34. Formas ceto-hidrazonas para o isahim. O esquema representa o processo de transformação do isômero *E*-isahim para *Z*-isahim evidenciadas através das análises cinéticas do composto em DMSO.

Deste modo, pode-se afirmar que a espécie majoritária no espectro **E1** é isômero *E*-isahim e após o aquecimento o isômero *Z*-isahim é a espécie favorecida.

As mudanças observadas no singlete em 12,87 ppm também apontam para a formação de isômeros geométricos (**Figura 31**). No espectro **E1**, a integração para o singlete em 12,87 ppm é de aproximadamente 0,2 sendo elevada para 1,0 após o aquecimento em **E3** e **E4**. Como discutido anteriormente, esse singlete pertence ao H12 de hidrazina. Na conformação *E*-isahim, este hidrogênio fica sujeito as interações com o solvente, as quais são atenuadas na forma *Z*-isahim em função da ligação de hidrogênio intramolecular^[101].

Desta forma, após o aquecimento, prevê-se a estabilização do sistema pela formação do isômero na forma *cis*: *E*-isahim → *Z*-isahim.

1.3.2.4 Análise de espectroscopia RMN do composto isapn

O espectro de ¹H RMN (400 MHz, DMOS-d6) do composto isapn apresenta um conjunto de quatro sinais intensos nas regiões típicas para anéis aromáticos de integrações equivalentes sendo destes dois dubletos e dois tripletos (**Figura 35**).

Todas as atribuições dos espectros ¹H e ¹³C RMN foram feitas com auxílio das técnicas 2D de RMN (**A1. 10**, **A1. 11** e **A1. 12**).

Como esperado para oxindóis^[76] o singlete em 10,80 ppm foi atribuído ao hidrogênio ácido de β-lactama H1, com integrações equivalentes aos dos hidrogênios aromáticos.

Na região de alto campo, observa-se um tripleto em 4,15 ppm e um multipeto na em 2,36 – 2,17 ppm. Hidrogênios metilênicos normalmente encontram-se na região de 1,2 ppm a 1,4 ppm^[97], contudo quando associadas à carbonos vinílicos ou iminas são deslocados para mais alto campo em função da anisotropia da dupla ligação. Quanto mais distantes da dupla ligação, menor é o efeito retirador eletrônico e menos deslocado deverá encontrar-se o sinal^[97]. Por essa razão atribui-se o multipeto em 2,36 – 2,17 ppm ao hidrogênio metilênico H13 e o tripleto em 4,15 ppm aos hidrogênios metilênicos H12 ou H14.

Pelo menos três espécies foram observadas em solução de DMSO no espectro de RMN com integrações distintas, em proporções de 82%:12%:6% (**Figura 35**).

Figura 35. Espectro de ^1H RMN (400 MHz) para o composto isapn. Os sinais mais intensos são atribuídos aos isômeros Z/Z-isapn.

Assim como as hidrazonas, as bases de Schiff também podem apresentar isomeria geométrica em torno da ligação C=N cujas estruturas podem ser diferenciadas por técnicas espectroscópicas ou mesmo por difratometria de raio X^[102]. Evidentemente, as interações das bases de Schiff com o solvente podem favorecer o aparecimento destas estruturas bem como o surgimento de tautômeros típicos em lactamas e análogos.

A análise conformacional do composto isapn indica várias possibilidades estruturais *E/E*, *E/Z* e *Z/Z* dado que a molécula possui duas duplas ligações C=N (**Figura 36**). Dentre estas possibilidades, a forma enólica pode formar ligações de hidrogênio intramoleculares.

Figura 36. Análise estrutural do composto isapn. Nesta representação, encontra-se destacada a possibilidade ceto/enol dos isômeros *E/Z* embora possam existir as formas *Z/Z* e *E/E*.

Ao avaliar as possibilidades estruturais para este composto, observa-se que na forma *Z*, o hidrogênio metilênico H12 encontra-se próximo ao oxigênio O10 do grupamento oxindol. Essa aproximação pode induzir ao deslocamento do sinal para baixo campo no espectro de RMN em função da desblindagem do próton.

Três tripletos em 4,44 ppm, 4,35 ppm e 4,15 ppm são atribuídos ao hidrogênio H12, cada um deles pertencente a um isômero distinto (**Figura 37b**). Por conta disso, espera-se que o sinal em 4,44 ppm, o mais deslocado dentre os três tripletos, seja atribuído ao isômero *Z/Z*-isapn e, por consequência, à espécie majoritária (82%) em DMSO. Por posicionar-se mais afastadamente do oxigênio, o tripleto em 4,15 ppm pode ser atribuído ao isômero *E/E*-isapn, enquanto, o sinal de menor integração em 4,35 ppm pode ser atribuído ao isômero *E/Z*-isapn.

Como destacado na **Figura 37**, os demais sinais do espectro também evidenciam pelo menos três sinais de mesma multiplicidade em deslocamentos químicos próximos levando a hipótese de que de fato três isômeros estão presentes em solução.

Na **Tabela 8** encontram-se descritas as atribuições dos sinais de RMN do composto isapn.

Tabela 8. Atribuições dos espectros ^1H - e ^{13}C RMN do isapn em DMSO- d_6 .

Atribuições dos espectros de RMN do composto <i>Z/Z-Isapn</i> (82%)			
^1H-RMN		^{13}C RMN	
(δ, ppm)	Atribuição	(δ, ppm)	Atribuição
10,80	s, 2H, H(1)	164,0	C2
7,86	d, 2H, H(9), J = 7,7 Hz	155,5	C3
7,42	t, 2H, H(7), J = 7,7 Hz e 1,0 Hz	146,0	C5
7,04	t, 2H, H(8), J = 7,7 Hz e 1,0 Hz	133,8	C7
6,90	d, 2H, H(6), J = 7,7 Hz	127,8	C9
4,15	t, 4H, H(12), J = 6,7 Hz	122,6	C8
2,36-2,17	m, 2H, H(13)	117,0	C4
		111,4	C6

Atribuições dos espectros de RMN do composto <i>E/E-Isapn</i> (12%)			
^1H-RMN		^{13}C RMN	
(δ, ppm)	Atribuição	(δ, ppm)	Atribuição
10,89	s, 2H, H(1)	160,0	C2
7,80	d, 2H, H(9), J = 7,7 Hz	154,1	C3
7,50	t, 2H, H(7)	144,9	C5
6,99	t, 2H, H(8)	133,3	C7
6,85	d, 2H, H(6), J = 7,8 Hz	127,6	C9
4,44	t, 4H, H(12), J = 6,7 Hz	122,0	C8
2,36-2,17	m, 2H, H(13)	117,0	C4
		110,9	C6

Figura 37. Espectro ^1H RMN (400 MHz) do composto isapn em DMSO-d_6 . Representação das atribuições dos sinais da espécie majoritária (82%) e das espécies minoritárias (12% e 6%) observadas em solução. (a) expansão da região próxima a 10,5 – 11,0 ppm; (b) expansão da região 6,70 - 8,10 ppm; (c) expansão da região 3,90 – 4,60 ppm; (d) expansão da região de 2,10 – 2,50 ppm.

A presença de mais de uma espécie em solução de DMSO deuterado também foi observada por análise de ^{13}C RMN (**Figura 38**).

Muito embora para complexos de cobre com este ligante tenham sido identificadas estruturas que apresentaram equilíbrio tautomérico: $[\text{Cu}(\text{ceto}/\text{ceto-isapn})]^{2+} \rightleftharpoons [\text{Cu}(\text{ceto}/\text{enol-isapn})]^+ \rightleftharpoons [\text{Cu}(\text{enol}/\text{enol-isapn})]$, os espectros de RMN em solução de DMSO- d_6 não retrataram essa possibilidade^[87].

Espectros de ^{13}C RMN para sistemas ceto-enólicos tendem a apresentar um deslocamento químico em torno de 160-170 ppm para carbonilas C=O, e deslocamentos abaixo de 150 ppm para carbonos sp^2 em sistemas enólicos^[103,104]. Os sinais atribuídos ao carbono C2 do grupamento γ -lactama, tanto ao produto majoritário quanto minoritário, possuem deslocamentos químicos em 164,0 ppm e 160, 0 ppm respectivamente, os quais descartam a presença de tautômeros na forma enólica para o ligante livre. Os sinais em 155,5 ppm e 154,1 ppm são típicos de carbonos de iminas e, portanto, podem ser atribuídos ao carbono C3. Os sinais entre 110 ppm a 146 ppm podem ser atribuídos aos carbonos aromáticos enquanto os sinais em 32 ppm e 52 ppm aos carbonos metilênicos.

Figura 38. Espectro de ^{13}C RMN para o composto isapn em DMSO- d_6 (400 MHz). As atribuições em azul pertencem à espécie minoritária (12%) Z/Z-isapn e as atribuições em preto à espécie majoritária (82%) E/E-isapn

1.3.2.5 Análise de RMN do composto misapn

O composto misapn, análogo ao composto isapn, diferencia-se por possuir uma amina terminal ao invés de um grupamento oxindólico.

Este composto, assim como os demais pode formar isômeros geométricos bem como tautômeros. Contudo, a amina terminal possibilita a formação de ligações de hidrogênio inter e intramoleculares com a carbonila do indol levando à formação de novas espécies.

O espectro de hidrogênio do misapn foi comparado aos espectros de ^1H RMN do composto isapn (**Figura 39**).

Na região de 10,90 ppm são observados um conjunto de singletos característicos do hidrogênio H1, pertencente à lactama.

Para facilitar a interpretação do espectro, a soma das integrações destes sinais foi definida como um hidrogênio. A partir da integração destes conjuntos de sinais considerou-se a integração dos demais conjunto de sinais.

Na região de 6,85 ppm até 7,50 ppm são encontrados múltiplos sinais, de natureza aromática, cuja integração é equivalente à quatro hidrogênios. Entre 4,45 – 4,00 ppm são observados seis tripletos característicos dos hidrogênios alifáticos H12. A integração destes sinais corresponde a dois hidrogênios.

Três tripletos de integração equivalente à dois prótons também foram evidenciados na região de 3,01 ppm à 2,89 ppm atribuídos aos hidrogênios H14 adjacentes à amina terminal. E por fim, um conjunto de seis quintetos de integração equivalente à dois prótons, apresentam um deslocamento químico entre 2,32 ppm a 1,89 ppm. Estes sinais foram atribuídos aos hidrogênios H13 da molécula.

Um singlete alargado foi observado em 7,96 ppm atribuído aos hidrogênios da amina.

O espectro indica a formação de diferentes isômeros, o que torna a sua interpretação complexa. Contudo, os deslocamentos químicos, as ressonâncias bem como as integrações do mesmo estão de acordo com a estrutura proposta.

A presença do diclorometano, solvente onde a síntese foi realizada, também foi observada no espectro, como proposto ainda pela análise elementar. As atribuições dos prótons encontram-se destacadas na **Figura 39**.

Figura 39. Espectro de ¹H RMN (800 MHz) obtido em DMSO-d₆. As integrações foram feitas para cada conjunto de sinais cujo deslocamento encontra-se destacado no espectro. O composto misapn apresenta pelo menos quatro isômeros.

Figura 40. Espectro de ^1H RMN (800 MHz) obtido em DMSO-d_6 . Cada espectro representa um conjunto de sinais selecionados cujas atribuições estão destacadas na figura anterior.

1.3.3 Caracterização dos compostos por espectroscopia eletrônica de UV/VIS

1.3.3.1 Bases de Schiff

Os espectros eletrônicos na região do UV/VIS registrados em DMSO de todos os compostos, bem como as suas absorvidades molares encontram-se descritas na **Tabela**

9 e representadas na **Figura 41**. Em todos os espectros as bandas características do precursor isatina nas regiões próximas a 290 nm e 380 nm foram observadas.

Tabela 9. Dados de absorção na região do UV/VIS da isatina e seus derivados misapn, misaen, isapn e isaen.

Composto	Solvente	λ (nm)	ϵ (M ⁻¹ cm ⁻¹)
<i>isatina</i>	DMSO	293, 384	(5,6.10 ³), (1,6.10 ³)
	Metanol	297, 416	(1,3.10 ³), (3,1.10 ²)
	DMSO:H ₂ O (7:3)	302, 420	
	DMSO:H ₂ O (7:3) pH 2,0	296, 392	
	DMSO:H ₂ O (7:3) pH 12,0	258, 294, 380, 448	

	Solvente	λ (nm)	ϵ (M ⁻¹ cm ⁻¹)	A (0,1 mM)
<i>isapn</i>	DMSO	289, 384	(1,4.10 ⁴) (6,4.10 ²)	(384 nm) 0,442
	Metanol	297, 418	(2,7.10 ³) (4,8.10 ³)	(418 nm) 0,064
<i>isaen</i>	DMSO	294, 386	(1,2.10 ⁴) (3,5.10 ³)	(386 nm) 0,334
<i>misapn</i>	DMSO	290, 385	(5,8.10 ³) (1,9.10 ³)	(384 nm) 0,193
<i>misaen</i>	DMSO	293, 346, 390	(4,8.10 ³) (1,3.10 ³) (1,5.10 ³)	(386 nm) 0,142

O espectro da isatina obtido em metanol apresenta bandas em 297 nm e 416 nm atribuídas às transições $\pi \rightarrow \pi^*$ e $n \rightarrow \pi^*$ respectivamente^[105]. Em DMSO, o máximo da banda em 416 nm é deslocado para 380 nm. Os espectros dos ligantes em DMSO, apresentam bandas em regiões próximas às da isatina, às são atribuídas às mesmas transições do precursor.

Observa-se ainda um efeito hipercrômico nos espectros dos compostos isapn e isaen em relação aos compostos misapn e misaen, uma vez que a concentração do grupamento oxindólico (característico da isatina) nestes ligante é maior em relação aos ligantes formados a partir de apenas uma isatina equivalente. De fato, na mesma concentração, as absorbâncias dos espectros isapn e isaen, praticamente dobram em relação aos compostos misapn e misaen.

Figura 41. Espectros de UV/VIS dos compostos misapn, misaen, isapn e isaen em DMSO. Isapn, $\epsilon(289 \text{ nm}) 1,4 \times 10^4 \text{ L.mol}^{-1}\text{cm}^{-1}$ e $\epsilon(384 \text{ nm}) 6,4 \times 10^2 \text{ L.mol}^{-1}\text{cm}^{-1}$; isaen, $\epsilon(294 \text{ nm}) 1,2 \times 10^4 \text{ L.mol}^{-1}\text{cm}^{-1}$ e $\epsilon(386 \text{ nm}) 3,5 \times 10^3 \text{ L.mol}^{-1}\text{cm}^{-1}$; misapn, $\epsilon(290 \text{ nm}) 5,8 \times 10^3 \text{ L.mol}^{-1}\text{cm}^{-1}$ e $\epsilon(385 \text{ nm}) 1,9 \times 10^3 \text{ L.mol}^{-1}\text{cm}^{-1}$; misaen, $\epsilon(293 \text{ nm}) 4,8 \times 10^3 \text{ L.mol}^{-1}\text{cm}^{-1}$, $\epsilon(346 \text{ nm}) 1,3 \times 10^3 \text{ L.mol}^{-1}\text{cm}^{-1}$ e $\epsilon(390 \text{ nm}) 1,5 \times 10^3 \text{ L.mol}^{-1}\text{cm}^{-1}$. Os comprimentos de onda indicados na figura são relativos ao composto isapn, indicando em vermelho no espectro.

1.3.3.2 Hidrazonas

Os espectros dos compostos isahim e isahpy em DMSO exibem não apenas máximos de absorção distintos em diferentes concentrações como também diferentes relações de intensidades entre as bandas de um mesmo espectro (**Figura 42**). Em resumo, a variação de concentração implica em um novo espectro de cada composto.

Deste modo, observou-se que os comprimentos de onda máximos de cada banda e as absorções dependem do solvente no qual o material composto é solubilizado e de suas concentrações evidenciando que esses sistemas indicam um distanciamento da lei de Lambert-Beer.

Tem sido proposto na literatura que tanto o ambiente químico quanto a concentração são fatores que afetam o comportamento de hidrazonas aptas a formarem ligações de hidrogênio intermoleculares^[70,106,107]. Neste caso, dímeros ou sistemas de agregados, por vezes, são formados para estabilização dessas espécies em solução.

As energias destas interações podem afetar significativamente as propriedades eletrônicas da molécula no que tange a formação de tautômeros ou isômeros. Estas características podem ser encontradas tanto em solução quanto no sólido^[96,101].

Figura 42. Comparação dos espectros de UV/Vis dos compostos isahim **(a)** e isahpy **(b)** nas concentrações de 100 mM (caminho óptico, 5 mm) e 25 mM (caminho óptico, 10 mm). Os espectros foram obtidos em DMSO.

Como demonstrado na **Figura 42**, a razão de intensidade entre os máximos em 323 nm e 397 nm no espectro eletrônico do isahim é de 3,5 e reduz à 0,05 com a diluição. A redução entre os máximos em 373 nm e 475 nm passa de 6,5 para 2,9 no espectro do isahpy. As variações das razões de intensidade nos espectros eletrônicos do isahim e do isahpy em função da diluição são indícios das interações inter e intramoleculares existentes para essas estruturas.

Em vista disso, três solventes foram testados a fim de se verificar a natureza das interações intermoleculares em três ambientes químicos: apolar ou pouco polar (clorofórmio), prótico polar (metanol) e aprótico polar (DMSO) para os quais comportamentos distintos foram observados em duas concentrações 25 μM e 100 μM.

Os valores dos máximos de absorção em diferentes meios encontram-se descritos na **Tabela 10**.

Tabela 10. Dados de absorção na região do UV/VIS das hidrazonas isahim e isahpy.

<i>isahim</i>	λ (nm), 25 μ M	λ (nm), 100 μ M
Metanol	259, 292, 320, 338, 405	265, 302, 343*
DMSO	267, 323*, 346, 397	267, 323, 342*, 397
Clorofórmio	265, 323, 400	265, 323, 343*, 397
DMSO/H ₂ O (7:3)	252, 264, 318, 390	
DMSO/H ₂ O (7:3) pH 2,0	251, 265, 318, 390	
DMSO/H ₂ O (7:3) pH 12,0	249, 285, 350, 400	

<i>isahpy</i>	λ (nm), 25 μ M	λ (nm), 100 μ M
Metanol	253, 363	252, 365, 475
DMSO	260, 372, 462	255, 373, 475
Clorofórmio	260, 368, 386*	258, 369, 382*, 495
DMSO/H ₂ O (7:3)	255, 369	
DMSO/H ₂ O (7:3) pH 2,0	252, 368	
DMSO/H ₂ O (7:3) pH 12,0	256, 293, 375, 440	

* ombro

Ambos os compostos apresentam comportamentos similares com relação às variações de concentração (**Figura 43** e **Figura 44**).

Na concentração de 100 μ M (caminho óptico de 5 mm), os espectros apresentam pequenas variações em relação aos máximos de absorção 267 nm e 323 nm para isahim e 252 nm e 365 nm para isahpy como observado nas **Figura 43a** e **Figura 44a**. Este cenário mostrou-se completamente diferente quando as soluções foram diluídas a 25 μ M (caminho óptico de 10 mm), para os quais, é possível observar o efeito do solvente sobre as interações intermoleculares dos ligantes dado que os espectros eletrônicos mudam em função da polaridade do solvente (**Figura 43b** e **Figura 44b**).

O máximo de absorção em 323 nm do espectro do isahim em clorofórmio 25 μ M sofre um deslocamento batocrômico para 346 nm em metanol e em DMSO. Adicionalmente, em ambiente polar, se pôde observar um aumento de intensidade das bandas na região de 397 nm (**Figura 43b**).

O composto isahpy diluído apresenta um comportamento ligeiramente distinto do composto isahim já que os espectros em diferentes solventes apresentam um máximo de absorção na região de 360 nm muito próximos, de modo que não se evidencia o efeito da polaridade do solvente sobre as transições que originam essa banda (**Figura 44b**).

Figura 43. Espectros de UV/VIS do composto isahim obtidos em metanol, clorofórmio e DMSO. Todas as soluções foram preparadas a partir da diluição de uma solução concentrada do composto em DMSO nos respectivos solventes de estudo. **(a)** Espectros obtidos na concentração

de 100 μM , analisados em cubeta de caminho óptico 5 mm. **(b)** Espectros obtidos na concentração de 25 μM , analisados em cubeta de caminho óptico 10 mm.

Figura 44. Espectros de UV/VIS do composto isahpy obtidos em metanol, clorofórmio e DMSO. Todas as soluções foram preparadas a partir da diluição de uma solução concentrada do composto em DMSO nos respectivos solventes de estudo. **(a)** Espectros obtidos na concentração

de 100 μM , analisados em cubeta de caminho óptico 5 mm. **(b)** Espectros obtidos na concentração de 25 μM , analisados em cubeta de caminho óptico 10 mm.

Observa-se, portanto, que em elevadas concentrações, as interações intermoleculares prevalecem em detrimento as interações com o solvente permitindo a formação de agregados, os quais mantêm as suas propriedades eletrônicas inferindo em espectros UV/VIS similares independente do solvente.

Por outro lado, a diluição do meio implica em uma interação com o solvente mais significativa. Neste caso, solventes mais polares induziriam a formação de tautômeros enólicos e ambientes apolares tenderiam a favorecer a formação da ligação intramolecular de hidrogênio (**Figura 45**).

Propriedades similares aos nossos compostos foram observadas em outros estudos. Jakusová, K. e colaboradores estudaram as propriedades eletrônicas de isatina-fenilsemicarbazonas propondo que as ligações de hidrogênio intermoleculares induzem a planarização da molécula contribuindo para o aumento da conjugação^[71,101,108]. Em complemento, Cigán, M. e colaboradores demonstraram usando DFT (Teoria do funcional da densidade, do inglês: *Density Functional Theory*) que em metanol o composto isatina-fenilhidrazona (isa=N-NH-fenil), muito similar ao composto isahpy exibe maior estabilidade na forma enólica ^[70,101].

Figura 45. Representação esquemática das possibilidades de equilíbrio das formas cetona-enol-azo dos isômeros E/Z estudadas por UV/VIS. As formas E-enol são favorecidas em meio polar enquanto que as formas Z-ceto são favorecidas em meio apolar. Em concentrações mais elevadas, as formas agregadas intermediadas por ligações de hidrogênio intermoleculares são mais prováveis. Em meio básico a desprotonação do enol leva às formas azo-enolato.

Deve-se considerar ainda a possibilidade da formação de espécies azo, cuja conjugação implica em transições de menor energia.

Os espectros de RMN e UV/Vis coletados em DMSO, têm mostrado que com a adição de TBAF (hidróxido de tetrabutilamônio), as espécies azo (N=N) de hidrazonas derivadas de isatina são favorecidas pela desprotonação do grupamento enol levando a uma estrutura planar, altamente conjugada^[70].

Embora os valores de pKa dos ligantes não tenham sido determinados, uma vez que em meio aquoso neutro os compostos precipitam, os espectros de UV/VIS em meio

básico apresentam um deslocamento batocrômico das bandas em 320 nm para regiões de menor energia.

As bandas em 350-400 nm do espectro de isahim, e 440 nm do espectro de isahpy, quando comparadas ao espectro do precursor isatina (**A1. 2** e **Tabela 9**) em meio básico e aos valores da literatura, claramente indicam que a espécie desprotonada provoca alterações na estrutura de modo a induzir o aumento da conjugação do sistema os quais poderiam ser justificados pela formação azo-isômeros como verificado nos espectros eletrônicos representados na **Figura 46**.

Figura 46. Espectro eletrônicos UV-VIS dos compostos isahim e isahpy em diferentes meios: ácido, básico e neutro.

As análises de UV/VIS para as hidrazonas retratam a possibilidade de formação de várias espécies devido as formas tautoméricas e aos isômeros E/Z. Como constatado em estudos similares^[68-71,101,108], estas espécies estão sujeitas ao ambiente químico e à concentração levando a diferentes propriedades espectroscópicas.

1.3.4 Análise das Estabilidades Relativas dos Ligantes Isahim e Isahpy por DFT

Análise DFT foi usada para calcular as energias das estruturas otimizadas E/Z nas formas ceto/enol/azo dos ligantes isahim e isahpy. Os cálculos foram conduzidos em fase gasosa a 298,15 K e 1 atm.

Para ambos os ligantes, as formas *Z*/ceto são favorecidas energeticamente em relação aos demais isômeros como pode ser verificado na **Figura 47**.

Figura 47. Comparação entre os isômeros *Z* e *E* para o isahim e o isahpy. As espécies mais estáveis são as formas *Z*- e *E*-ceto.

O isômero *E*-ceto apresenta-se como a segunda espécie mais estável tanto para isahim quanto para o isahpy. A diferença entre a espécie *Z*-ceto e *E*-ceto é de 3940 kcal/mol para isahim e de 12215 kcal/mol para isahpy.

As menores energias obtidas para as formas *Z*-ceto estão de acordo com a possibilidade de estabilização por ligação de hidrogênio intramolecular entre a hidrazina (-NH-N) e a carbonila do grupamento oxindólico.

Estes estudos foram realizados em colaboração com o grupo de pesquisa do professor Dr. Luiz Antônio Sodré Costa do Departamento de Química da Universidade Federal de Juiz de Fora (UFJF).

1.4 Conclusões

Quatro bases de Schiff: isapn, isaen, misapn e misaen, e duas hidrazonas: isahim e isahpy foram sintetizadas e caracterizadas por diferentes técnicas espectroscópicas e analíticas, como possíveis compostos com atividade quelante para íons de cobre e zinco.

Na forma sólida, foi observada a presença das carbonilas de amida conforme verificado pelos espectros FTIR sugerindo a formação de espécies na forma ceto. Em conjunto com as análises de espectrometria de massas e elementar, os espectros FTIR atestam a formação das estruturas propostas e não apresentam evidências da presença de nenhum dos precursores usados.

A caracterização das estruturas em solução foi feita por análise de RMN em DMSO-d₆ para as hidrazonas e para os compostos misapn e isapn. Em todos os casos foram observadas a presença de mais de um isômero em solução, atribuídos à formação das espécies E/Z. Não foram observados indícios da formação de tautômeros em solução para estes compostos.

O estudo por RMN com o composto isahim em solução via aquecimento até 80°C mostrou que o isômero E-isahim pode ser considerado o mais estável. Para o isapn, três isômeros distintos foram observados, a saber E/E, E/Z e Z/Z cujas proporções definidas em DMSO foram respectivamente 82%, 12% e 6%.

Os espectros eletrônicos das bases de Schiff possuem um perfil similar ao precursor isatina, sendo que as intensidades dos compostos formados por dois anéis oxindólicos são maiores que os compostos formados por apenas uma isatina.

Em função das inúmeras possibilidades de interação inter e intramolecular das hidrazonas, os espectros eletrônicos desses compostos foram testados em duas concentrações 25 µM e 100 µM e em ambientes químicos distintos (MeOH, DMSO e CH₃Cl). Os espectros foram comparados com resultados já apresentados na literatura para estruturas parecidas, inferindo-se que em soluções concentradas as interações intermoleculares existentes entre os compostos prevalecem sobre as interações com o solvente, independentemente do meio. Por outro lado, quando diluídas essas estruturas estão sujeitas às interações com o solvente, acarretando em diferentes espectros eletrônicos.

Um exame mais detalhado do efeito do pH sobre os espectros eletrônicos das hidrazonas mostrou que essas estruturas ao serem desprotonadas podem gerar espécies de elevada conjugação, cujos máximos de absorção são deslocados para o vermelho.

De acordo com os cálculos teóricos DFT aplicados às estruturas das hidrazonas em fase gasosa, tem-se observado que a forma ceto apresenta maior estabilidade, e adicionalmente sendo o isômero *E* mais estável que o isômero na forma *Z*.

Capítulo 2 - Síntese e Caracterização do peptídeo amiloide – $\beta(1-16)$

2.1 Considerações iniciais

No presente capítulo, são apresentadas a síntese e a caracterização do peptídeo amiloide- β ($A\beta_{1-16}$) o qual foi utilizado em diversos estudos de interação peptídeo – ligante por diferentes técnicas (**Capítulo 3**). A síntese desse material, apesar de envolver uma série de etapas, tem como prerrogativa a redução dos custos e do tempo de obtenção via outras fontes.

Esse peptídeo foi então sintetizado em duas oportunidades durante este trabalho. A primeira em colaboração com o grupo do Professor Doutor Luigi Casella no Laboratório de Inorgânica, Departamento de Química, Universidade de Pavia, Pavia, Itália, durante um estágio realizado em 2015. Na segunda, esta síntese foi realizada em colaboração com o grupo da Profa. Maria Teresa Machini, no Laboratório de Química e Peptídeos (LPQ) do Departamento de Bioquímica da USP.

Esse peptídeo tem sido objeto de estudo em pesquisas relacionadas à doença de Alzheimer em função da sua fácil obtenção, elevada solubilidade em água e sobretudo ser a fração que contém o alvo preferencial de íons metálicos agravantes da AD, tais como o Cu^{2+} e o Zn^{2+} .

A síntese do $A\beta_{1-16}$ foi feita em fase sólida, em várias etapas, as quais envolvem a adição dos dezesseis aminoácidos a fim de se obter a sequência {DAEFRHDSGYEVHHQK}. Após a obtenção do material, o peptídeo foi purificado por cromatografia e caracterizado por 1H RMN.

2.2 Parte Experimental

2.2.1 Obtenção do peptídeo

Laboratório de Inorgânica, Departamento de Química, Universidade de Pavia - O peptídeo $A\beta_{1-16}$ foi sintetizado manualmente em fase sólida via estratégia Fmoc empregando-se a Rink Amide MBHA resin LL (100-200 mesh). Utilizou-se apuradamente 500 mg da resina cuja grau de substituição de sítios é 0,64 mmol/g.

Após a adição dos aminoácidos e consequente construção da cadeia polimérica a resina foi removida e o composto purificado por HPLC. Maiores detalhes da síntese do peptídeo estão descritos nos resultados e discussão (2.3).

Laboratório de química e peptídeos (LPQ), Departamento de Bioquímica/USP - O peptídeo $A\beta_{1-16}$ foi sintetizado manualmente via fase sólida empregando-se o uso de micro-ondas como descrito na literatura^[109]. Todas as reações foram monitoradas por análise do Teste Kaiser (**Anexos A2.1**).

2.3 Resultados e discussão

2.3.1 Síntese do peptídeo

A síntese do peptídeo A β ₁₋₁₆ foi feita ‘manualmente’ conforme descrito na literatura^[110,111] tendo como metodologia padrão os ciclos:

- Clivagem do grupo protetor (seja da resina ou do aminoácido acoplado ao polímero);
- Lavagem;
- Acoplamento (adição de um aminoácido à cadeia);
- Lavagem;
- *Capping* (proteção da resina);
- Lavagem;

Todas as etapas envolvidas na síntese estão descritas e discutidas nos itens seguintes.

2.3.1.1 Síntese manual

Atualmente podem ser empregadas diferentes técnicas para obtenção de peptídeos. Os métodos a serem empregados irão depender de fatores como polaridade, tamanho da cadeia, possibilidade de agregação, quantidade desejada. Uma das mais simples e econômicas a serem empregadas são as sínteses manuais.

A síntese de peptídeo em fase sólida (SPPS, do inglês: *Solid Phase Peptide Synthesis*) tem se consolidado como um procedimento bastante eficaz e rentável na produção de peptídeos, especialmente os de cadeias mais curtas. Essa técnica consiste na ancoragem do peptídeo através do carbono terminal em uma resina insolúvel e a subsequente construção da cadeia peptídica a partir da adição de aminoácidos protegidos.

O aparato de síntese pode ser facilmente construído com um funil cilíndrico e alongado de placa sinterizada e um kitassato, adaptados para a entrada de nitrogênio ou argônio como fonte para a agitação da resina (**Figura 48**).

Figura 48. Aparato para síntese peptídica em fase sólida. Os reatores, de aparelhagem simples, contêm um funil alongado com placa sinterizada com uma entrada elevada para argônio. A entrada do argônio promove a agitação da resina de baixo para cima. A torneira em "T" possui uma entrada para argônio, uma entrada para a mangueira de vácuo que coliga o funil ao erlenmeyer e uma fechadura para que o argônio e o vácuo não estejam abertos ao mesmo tempo.

Por se tratar de uma síntese em fase sólida, o peptídeo fica protegido em um suporte insolúvel permitindo que os demais reagentes e produtos liberados em solução sejam removidos por simples filtração.

2.3.1.2 Intumescimento da resina

Para a síntese do A β ₁₋₁₆ utilizou-se como suporte a resina *Rink Amide MBHA resin LL* (100-200 mesh) como representado na **Figura 49**, com uns graus de substituição de 0,64 mmol/g. A matriz polimérica é constituída de copolímeros (stireno-1% DVB). Sobre a aparelhagem representada na **Figura 48**, foi adicionada a resina e 20,0 mL de DMF anidro, cuja mistura foi mantida sob fluxo de argônio por 1h e 30 min. A resina foi filtrada e o processo de intumescimento foi repetido.

A resina *Rink Amine MBHA resin LL* (100-200 mesh) é uma versão especial da resina *Rink Amine MBHA* clássica que apresenta uma capacidade de carregamento (*loading*) baixa, ideal para a síntese de peptídeos longos e difíceis. A resina utilizada contém um grau de substituição de 0,64 mmols/g.

Figura 49. Representação esquemática da fórmula química da Resina *Rink Amide MBHA resin LL*.

2.3.1.3 Desproteção da resina

Comumente tanto a resina como os aminoácidos a serem inseridos vêm acoplados com um grupamento protetor a fim de evitar possíveis agregações ou interações (reações) indesejadas. Neste caso, o grupo protetor utilizado foi o *Fmoc*, 9-fluorenilmetoxicarbonil (**Figura 50**). Derivados do *Fmoc* são amplamente utilizados como grupos protetores de α -aminas. Estes compostos, em especial, têm sido usados a fim de prevenir a polimerização, uma vez que os aminoácidos são ativados^[112].

Figura 50. Representação esquemática da estrutura do grupo protetor *Fmoc* comumente usado na síntese de peptídeos em fase sólida.

O *Fmoc* pode ser removido via (beta)-eliminação induzida na presença de aminas secundárias. Essas aminas são usadas por serem mais estáveis aos ácidos

correspondentes e por serem capazes de capturar eficientemente o dibenzofulveno (**Figura 51**), um subproduto da reação de eliminação. Dentre as muitas possibilidades de remoção deste grupo protetor, encontra-se a piperidina, uma base usada principalmente na concentração de 20% em DMF cuja reação pode levar aproximadamente 5 min. Esse procedimento comumente é repetido por um tempo prolongado de aproximadamente 7 min para maior eficiência.

A reação de desproteção da resina libera dióxido de carbono e o Fmoc como mostrado na **Figura 51(a)**, deixando uma amina livre para o ataque nucleofílico e consequente síntese da amida. O processo de remoção do Fmoc foi feito em duas etapas, ambas pela adição de uma solução de piperidina 20% em DMF anidro sendo a primeira deixada agitar por um período de 3 min e na segunda etapa por um período de 7 min.

O filtrado foi recolhido e submetido a análise espectrofotométrica para avaliação da concentração de Fmoc liberado (**Anexos 2 - Análise espectrofotométrica da concentração de Fmoc**), a qual foi acompanhada por espectroscopia UV-VIS a fim de controlar essa quantidade de Fmoc (9-metilideno-9H-fluoreno) liberado na reação. Esta análise é uma etapa importante do processo, visto que a quantidade de Fmoc liberada é um indicativo se a desproteção ocorreu com eficácia ou não. A resina foi então lavada com DMF anidro durante 5 min e filtrada. O processo foi repetido duas vezes.

Figura 51. (a) (3 min) Remoção do grupamento Fmoc via β -eliminação tendo como subprodutos o dibenzofulveno, dióxido de carbono e o aminoácido. A piperidina responsável pela abstração do próton também pode reagir com o dibenzofulveno capturando-o rapidamente e impedindo a reação reversa com a amina liberada. **(b)** (7 min) mecanismo de abstração do próton e remoção do Fmoc por β -eliminação a partir da amina secundária piperidina.

2.3.1.4 Reação de acoplamento

As reações de acoplamento consistem no ataque nucleofílico de uma amina a um grupo carboxílico ativado por um grupamento retirador eletrônico e na consequente formação da amida. As etapas de acoplamento envolvem a ativação da carbonila auxiliada por uma base, seguido do ataque da amina (**Figura 52**). Esse procedimento conduz à racemização que é indesejada^[112].

Sais de fosfônio como o PyBOP (hexafluorofosfato de benzotriazol-1-il-oxitripirrolidinafosfônio) geralmente são empregados nesta etapa por serem bastante

ativos bastando apenas um equivalente de base (comumente DIEA, N,N-diisopropiletilamina) para reagir. Em geral nas etapas de acoplamento são adicionados HOBt (Hidróxidobenzotriazol), que também é aplicado como um agente de acoplamento, sendo ainda vantajoso por reduzir a racemização^[112,113] (**Figura 52**).

Na etapa de acoplamento é importante levar em consideração os fatores estéreos gerados pelos radicais R¹ dos aminoácidos, os quais podem dificultar o ataque nucleofílico do átomo de nitrogênio. A reatividade da carboxila dos ácidos carboxílicos, é outro fator que também deve ser considerado. Em alguns casos, um tempo maior de reação deve ser aplicado. O rendimento pode ser aumentado repetindo-se o processo.

Após lavagem com DMF anidro, procedeu-se à adição dos aminoácidos começando pela adição do último aminoácido do peptídeo, neste caso a lisina protegida pelo Fmoc. Em todos os casos foi usado um excesso três vezes maior do que o grau de substituição da resina a fim de garantir o acoplamento eficiente.

Anteriormente à adição do aminoácido, foi adicionada uma solução de DMF contendo HOBt, PyBOP e de DIEA conforme a **Figura 52(a)**. A adição da base e dos ativadores foi feita com um excesso três vezes maior do que o grau de substituição da resina para HOBt e PyBOP e com um excesso seis vezes maior para DIEA.

Foram adicionados 281 mg de Fmoc-Lys(BOC)-OH à resina na presença dos ativadores HOBt e PyBOP, conforme a **Figura 52(b)**. A mistura foi agitada com argônio durante 60 min e lavada três vezes com DMF anidro sob agitação constante por 5 min. Após lavagem, o processo de acoplamento foi repetido (neste caso, por 45 min) e a resina foi novamente lavada três vezes com DMF.

Figura 52. (a) A ‘Etapa de Racemização’ envolve a ativação da carboxilato pela inserção de um grupo substituinte lábil. A etapa segue com a adição de uma base para abstração de um próton e posterior ataque nucleofílico da amina à carboxila. **(b)** Reação de Acoplamento utilizando os ativadores HOBt e PyBOP e a base DIEA. Tem-se como padrão refazer a etapa para se obter um maior rendimento. **(c)** Representação das estruturas de HOBt, PyBOP e DIEA.

A adição dos aminoácidos segue partindo sempre do último aminoácido da cadeia. Na **Tabela 11** estão reportados os aminoácidos, bem como as quantidades e os tempos de acoplamento.

Tabela 11. Aminoácidos usados na síntese do A β_{1-16} .

Aminoácido		Natureza química	Acoplamentos	(Min)	
				1°	2°
16(K)	Fmoc-Lys(BOC)-OH	Básico	2	60	45
15(Q)	Fmoc-Gln(Trt)-OH	Polar	2	60	45
14(H)	Fmoc-His(Trt)-OH	Básico	2	60	45
13(H)	Fmoc-His(Trt)-OH	Básico	2	60	45
12(V)	Fmoc-Val-OH	Hidrofóbico	2	60	45
11(E)	Fmoc-Glu(OtBu)-OH	Ácido	2	60	45
10(Y)	Fmoc-Tyr(tBu)-OH	Polar	2	60	45
9(G)	Fmoc-Gly-OH	Polar	2	60	45
8(S)	Fmoc-Ser(tBu)-OH	Polar	2	60	45
7(D)	Fmoc-Asp(OtBu)-OH	Ácido	2	60	45
6(H)	Fmoc-His(Trt)-OH	Básico	2	60	45
5(R)	Fmoc-Arg(Pbf)-OH	Básico	2	60	45
4(F)	Fmoc-Phe-OH	Hidrofóbico	2	60	45
3(E)	Fmoc-Glu(OtBu)-OH	Ácido	2	60	45
2(A)	Fmoc-Ala-OH	Hidrofóbico	2	60	45
1(D)	Fmoc-Asp(OtBu)-OH	Ácido	2	60	45

Por se tratar de uma síntese manual e de um tempo aproximado de três horas para cada adição de aminoácido, a síntese, obrigatoriamente, exigiu alguns dias para ser finalizada. Neste caso, o procedimento de lavagem da resina quando deixada de um dia para o outro, exigiu o uso de vários solventes para eliminação de prováveis impurezas e garantia do armazenamento da resina seca. O processo de lavagem seguido foi:

- Três lavagens com DMF, 5 min cada;
- Três lavagens com diclorometano, 5 min cada;
- Duas lavagens com isopropanol, 5 min cada;
- Duas lavagens com éter etílico, 5 min cada.

Ao retornar à síntese, retomou-se a etapa de intumescimento da resina como descrito anteriormente.

2.3.1.5 Capping

A fim de se evitar a formação de um maior número sequências indesejáveis durante a síntese, esta etapa tem por finalidade bloquear os eventuais grupos amínicos

ancorados na resina, mas que não reagiram através da formação de amidas. Essa ‘cobertura’ deve ser feita após o acoplamento por um simples tratamento da resina com um excesso de anidrido acético e uma base, em geral cloreto de benzoíla ou piridina^[114].

Após a lavagem da resina, uma solução de 15 mL de 4,7% de anidrido acético e 4,0% de piridina em DMF foi adicionada ao sistema, sob agitação constante durante 15 min. Posteriormente, a resina foi lavada três vezes com DMF. Refez-se o processo, porém com um tempo menor de 7 min (**Figura 53**).

Figura 53. Etapa de proteção dos resíduos amínicos (capping) que não reagiram durante o processo de acoplamento do aminoácido.

Uma vez finalizada a adição de todos os aminoácidos requeridos para a síntese do peptídeo, procedeu-se à última etapa de síntese a partir da remoção do peptídeo, a com a adição de uma solução altamente concentrada de ácido trifluoracético (TFA). O ácido (solução aquosa 95% TFA) tem como função protonar as aminas promovendo a extração da resina, como também remover todos os grupos protetores da cadeia lateral do peptídeo. Contudo, a elevada concentração e reatividade deste ácido promovem a formação de carbocátions altamente reativos, os quais devem imediatamente ser removidos. Por esta razão, alguns captadores de carbocátions devem ser adicionados concomitantemente.

Considerando que para cada 1,0 g de resina-peptídeo devem ser adicionados 25,0 mL da solução de THF, foram adicionados aproximadamente 30 mL da presente solução para um total de 1,124 g de resina-peptídeo formados **Figura 54**.

Figura 54. Etapa de extração do peptídeo A β ₁₋₁₆ da resina.

A adição da solução de THF, deixada em constante agitação durante 3 horas, foi seguida da filtração e lavagem com a mesma solução. O filtrado contendo o peptídeo foi recolhido, concentrado a pressão reduzida e, por fim, a esta solução foi adicionado éter etílico para promover a precipitação. A solução foi estocada na geladeira por uma noite e um precipitado branco se formou o qual foi filtrado e liofilizado e estocado no freezer ainda impuro.

2.3.2 Caracterização do peptídeo por RMN

O espectro de ¹H-RMN (400 MHz) do peptídeo foi obtido em D₂O a fim de se caracterizar os aminoácidos presentes na estrutura e de se verificar a pureza do material. Os sinais foram atribuídos conforme descrito na literatura^[37,110,111] e encontram-se de acordo com o esperado.

As atribuições dos sinais estão descritas na **Figura 55**. Não foram observados sinais adicionais de possíveis fragmentos e aminoácidos livres. O espectro foi comparado ao espectro de peptídeos A β ₁₋₁₆ obtido nas mesmas condições, proveniente da Aldrich, o qual apresentou o mesmo espectro.

Figura 55. Espectro de ^1H RMN (400 MHz) do peptídeo $\text{A}\beta_{1-16}$ em D_2O . O quadrado rosa indica região aromática expandida e em violeta a região dos C^αH e prótons remanescentes da cadeia lateral. As atribuições foram feitas baseadas na literatura^[110].

2.4 Conclusões

Baseado nos resultados, o peptídeo $A\beta_{1-16}$ foi sintetizado com sucesso manualmente em fase sólida, via estratégia Fmoc, empregando-se a Rink Amide MBHA resin LL (100-200 mesh).

Procedeu-se à síntese em várias etapas, que envolveram o preparo da resina, adição dos aminoácidos protegidos pelo grupamento Fmoc, a desproteção do grupamento e a consequente repetição das etapas.

Por fim, a análise por ^1H RMN (400 MHz) utilizada para a determinação da estrutura do peptídeo mostrou evidências de que o material se encontra de acordo com o esperado e, comparativamente, forneceu o mesmo espectro de amostra padrão ($A\beta_{1-16}$ proveniente da Aldrich, com pureza 97%).

Capítulo 3 - Estudos de inibição da agregação de peptídeos amilóides- β em presença de ligantes oxindólicos

3.1 Considerações iniciais

O peptídeo amiloide - β (1-40) / (1-42) descrito como $A\beta_{1-40}$ ou $A\beta_{1-42}$ é uma das principais proteínas associadas às causas da doença de Alzheimer (AD)^[115]. A neodegenerescência observada nessa doença é usualmente associada à presença de agregados fibrilares de peptídeos amiloides - β no cérebro dos doentes.

A produção de emaranhados fibrilares no organismo origina-se a partir da auto-agregação desses peptídeos agravada pela coordenação à diferentes íons metálicos tais como Cu^{2+} e Zn^{2+} que catalisam a formação de agregados e podem gerar espécies reativas de oxigênio^[116,117]. Os danos causados por estes fatores levam à senilidade progressiva, dentre vários sintomas.

Diversos estudos têm demonstrado que o sítio de coordenação dos íons metálicos ao peptídeo são as histidinas presentes na porção hidrofílica da proteína, contidos nos primeiros dezesseis aminoácidos^[13], razão pela qual o peptídeo $A\beta_{1-16}$ tem sido utilizado em diversos estudos de quelação dos íons metálicos, como um modelo de mais fácil obtenção e de elevada solubilidade.

No presente capítulo, a partir de análises de turbidimetria verificou-se o efeito inibidor dos compostos oxindólicos isapn, misapn, isahpy e isahim, frente a reação de agregação do peptídeo $A\beta_{1-40}$ na presença de íons Cu^{2+} ou Zn^{2+} em diferentes proporções.

A partir de estudos espectroscópicos 1H RMN foram avaliadas as possíveis formas de interação desses ligantes com os resíduos peptídeo $A\beta_{1-16}$.

Como suporte para estes estudos foram consideradas as constantes de estabilidade ligante - metal e, mais especificamente, do ligante isahim - peptídeo, uma vez que se detectou forte interação entre os ligantes derivados de oxindóis e os peptídeos amiloides.

3.2 Parte experimental

3.2.1 Determinação da constante de equilíbrio entre A β ₁₋₁₆ e isahim

A interação entre o composto isahim e o peptídeo A β ₁₋₁₆ foi estudada por espectroscopia eletrônica na região do UV/VIS. Uma solução aquosa (3,0 mL) de 50 μ mol/L de isahim foi titulada com até 90 μ L de uma solução aquosa de A β ₁₋₁₆ de concentração 1,84 mmol/L a fim de se atingir a equivalência entre o ligante e o peptídeo. A cada adição um espectro UV/VIS foi registrado e os espectros obtidos foram analisados pelo programa **HypSpec2014**^[118].

Adição de cobre ao sistema. Após se atingir a proporção 1:1 (isahim: peptídeo) procedeu-se com uma nova titulação pela adição de alíquotas de 4 μ L de uma solução 48 mmol/L de Cu(ClO₄)₂·6H₂O até a obtenção de uma proporção 1:1:1 (isahim: peptídeo: Cu²⁺).

3.2.2 Obtenção das respectivas constantes de estabilidade M - L

Determinação das constantes de equilíbrio para as espécies metal-bases de Schiff. Misapn + Cu²⁺: 120 μ L de uma solução 14,8 mmol/L de misapn preparada em DMSO foi adicionada à 3,0 mL de uma solução tampão Hepes pH 7,4. Em seguida, a solução do ligante foi titulada com um volume total de 40 μ L de uma solução aquosa de CuCl₂·2H₂O de concentração 19,9 mmol/L.

Isapn + Cu²⁺: 130 μ L de uma solução 5,8 mmol/L de isapn preparada em DMSO foi adicionada à 3,0 mL de uma solução tampão Hepes pH 7,4. Em seguida, a solução do ligante foi titulada com um volume total de 110 μ L de uma solução aquosa de Cu(NO₃)₂ de concentração 5,80 mmol/L. A titulação também foi realizada visando-se aumentar a concentração do ligante. Neste caso, utilizou-se 200 μ L da solução de isapn diluída em 3,0 mL do tampão Hepes pH 7,4. A solução do ligante foi titulada com um volume total de 180 μ L de uma solução aquosa de Cu(NO₃)₂.

Isapn (diluído) + Zn²⁺: 30 μ L de uma solução 5,8 mmol/L de isapn preparada em DMSO foi adicionada à 2,4 mL de uma solução tampão Hepes pH 7,4. A solução do

ligante foi titulada com um volume total de 310 μL de $\text{Zn}(\text{NO}_3)_2$ de concentração 4,56 mmol/L.

Os espectros UV/VIS obtidos foram analisados pelo programa HypSpec2014^[119] ou Microsoft Excel.

Determinação das constantes de equilíbrio para as espécies metal-hidrazonas. Em uma cubeta de quartzo contendo 3,0 mL de tampão fosfato 1mmol/L foram adicionados 64 μL de uma solução de isahim (DMSO, 4,8 mM) e um espectro foi registrado. Em seguida foram feitas adições sucessivas de uma solução aquosa de $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (8,94 mmol/L) totalizando 20 μL . Ao término da titulação as concentrações analíticas de cada componente eram $[\text{isahim}]_f = 97,8 \text{ mmol/L}$ e $[\text{Cu}^{2+}]_f = 214 \text{ mmol/L}$.

Procedeu-se de forma similar para a obtenção da constante de estabilidade para a formação do complexo $[\text{Zn}(\text{isahim})]^{2+}$. Em uma cubeta contendo 3,0 mL de tampão fosfato 1mmol/L foram adicionados 45,0 μL de uma solução de isahim (34,6 mmol/L) seguido da adição de 100,0 μL de uma solução aquosa de Cu^{2+} adicionados sucessivamente ao longo da titulação.

Os dados dos espectros UV/VIS obtidos foram tratados usando-se o software Microsoft Excel.

3.2.3 Ensaio de turbidimetria

As análises de turbidimetria das soluções dos peptídeos amilóides foram baseadas em procedimentos já descritos na literatura^[118]. A agregação é induzida pela adição de íons cobre(II) ou zinco(II) e na presença do ligante cuja atividade inibidora da agregação se deseja verificar. Para tal, 1,0 mg do peptídeo $\text{A}\beta_{1-40}$ foi solubilizado em água deionizada previamente tratada com resina Chelex por doze horas, filtrada com filtro *Millipore* 0,24 μm e sonicada duas vezes durante cinco minutos cada. A solução do peptídeo foi filtrada com filtro *Millipore* 0,24 μm para remover prováveis agregados presentes e analisada por espectroscopia UV/VIS monitorando-se o comprimento de onda em 276 nm, com $\varepsilon = 1450 \text{ (mol/L)}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$, a fim de se determinar a concentração do monômero $\text{A}\beta_{1-40}$. A concentração inicial de monômero determinada foi de 0,22 mmol/L.

Soluções-mãe (2 mmol/L) dos ligantes *isahim* ou *isahpy* e dos sais $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ e ZnCl_2 foram preparados em DMSO e em água deionizada, respectivamente.

As reações foram realizadas em tampão fosfato (1mmol/L, pH 7,4), previamente tratado com resina Chelex por 24 horas e filtrado com filtro *Millipore* 0,24 μm . O preparo das amostras foi feito pela adição do tampão fosfato, peptídeo, solução do metal e por fim, pela adição do ligante a fim de se atingir uma concentração final de 20 $\mu\text{mol/L}$ para cada componente.

A concentração final de DMSO em solução foi $\leq 1\%$ tanto na amostra controle quanto nas demais. Todas as reações foram incubadas a 37°C por 24 horas em constante agitação e analisadas por UV/VIS na região de 600 nm. Cada amostra foi analisada por pelo menos três vezes tendo sido agitada entre cada medida, conforme esquema apresentado na **Figura 56**.

Figura 56. Representação da metodologia de análise de inibição da agregação do peptídeo $\text{A}\beta_{1-40}$ juntamente com o metal (Cu^{2+} ou Zn^{2+}), na presença de um ligante a ser testado.

O procedimento aplicado aos ensaios de turbidimetria para os compostos *isapn* e *misapn*, foi similar ao aplicado para os compostos *isahim* e *isahpy*, contudo, a concentração final de todos os componentes da reação foi 25 $\mu\text{mol/L}$.

3.2.5 Estudos de interação dos ligantes com peptídeo $\text{A}\beta_{1-16}$ acompanhados por espectroscopia de RMN

Titulação do peptídeo $\text{A}\beta_{1-16}$ com DMSO em tampão fosfato (pH 7,4) - experimento controle. Aliquotas de 50 μL e 200 μL de DMSO foram adicionadas à uma solução de 600 μL (3 mmol/L) de $\text{A}\beta_{1-16}$, resultando em proporções aproximadas do

solvente de 8% e 30% respectivamente. A cada adição de DMSO, um espectro foi registrado por ^1H RMN (400MHz).

Titulação do peptídeo $\text{A}\beta_{1-16}$ com isahim em água (D_2O) acompanhada por ^1H RMN. Alíquotas de um volume total de 32 μL de isahim 34 mmol/L à uma solução aquosa (em D_2O) de 790 μL do peptídeo $\text{A}\beta_{1-16}$ 11,8 mmol/L para dar uma concentração final de 1,3 mmol/L do peptídeo e uma proporção estequiométrica de 1:1,15 ($\text{A}\beta_{1-16}$: isahim). Um espectro de ^1H RMN (400 MHz) foi registrado a cada alíquota adicionada.

Titulação do peptídeo $\text{A}\beta_{1-16}$ com isapn e misapn em tampão fosfato (pH 7,4) acompanhadas por espectroscopia de ^1H RMN. Utilizando um equipamento Bruker (400 MHz), os experimentos espectroscopia de ^1H RMN para o peptídeo $\text{A}\beta_{16}$ foram feitos em tampão fosfato (1 mmol/L), pH 7,4 em D_2O . Os compostos isapn e misapn foram solubilizados em DMSO- d_6 e usados como titulantes nos estudos de titulação do $\text{A}\beta_{1-16}$. As titulações foram preparadas em tubos de RMN onde os ligantes eram adicionados a cada análise.

Isapn: Um total de 330 μL de uma solução de isapn (DMSO) 14,0 mmol/L foram adicionados sucessivamente diretamente a um tubo de RMN contendo 540 μL de tampão fosfato (1mmol/L, pH 7,4) e 160 μL de uma solução aquosa (D_2O) do peptídeo $\text{A}\beta_{1-16}$ 14,0 mmol/L para atingir uma proporção estequiométrica equivalente à 1,0:2,2 ($\text{A}\beta_{1-16}$: isapn). Após cada adição de ligante, o correspondente espectro de ^1H RMN (400 MHz) foi registrado. Concentração máxima de DMSO: 32%.

Misapn: Adições sucessivas de um total de 230 μL de misapn, 18,6 mmol/L, solubilizado em DMSO, foram feitas em uma solução tamponada de 460 μL (1mmol/L, pH 7,4, tampão fosfato) e 240 μL do peptídeo $\text{A}\beta_{1-16}$ para atingir uma proporção estequiométrica equivalente à 1,0: 2,0 ($\text{A}\beta_{1-16}$: misapn). Após cada adição de ligante, o correspondente espectro de ^1H RMN (400 MHz) foi registrado. Concentração máxima de DMSO: 25%.

3.3 Resultados e Discussão

3.3.1 Determinação dos valores das constantes de estabilidade

3.3.1.1 Determinação da constante de equilíbrio entre $A\beta_{1-16}$ e isahim

O espectro UV/VIS do composto isahim ($50 \mu\text{mol/L}$) apresenta em solução aquosa bandas em 246 nm, 265 nm e 343 nm (**Figura 57**). Sucessivas adições de $A\beta_{1-16}$ levaram ao decréscimo da intensidade da banda em 343 nm e o surgimento de uma nova banda em 320 nm, com um ponto isobéstico bem definido. Observou-se ainda um processo dependente do tempo a partir do monitoramento dessa banda, após 2h e 12h (**Figura 58**). A banda em 265 nm, em ambos os casos, apresentou um aumento de intensidade significativo. O ponto isobéstico indica a formação de um aduto $[(A\beta_{1-16})_2\text{isahim}]$ cuja constante de formação $\log \beta_{\text{est}}$ obtida em água corresponde ao valor de $8,86 \pm 0,002$.

Figura 57. Titulação do composto isahim com o peptídeo $A\beta_{1-16}$ em meio aquoso. A titulação foi monitorada por espectroscopia UV/VIS. Concentração inicial de isahim $50 \mu\text{mol/L}$. Observação da formação da espécie $[(A\beta_{1-16})_2\text{isahim}]$.

Devido ao elevado valor da constante de ligação isahim- $A\beta_{1-16}$, pode-se presumir que este seja um fator responsável pelo aumento da agregação observado com o peptídeo $A\beta_{1-40}$ na presença do ligante isahim como evidenciado nos experimentos de turbidimetria (ítem 3.3.2).

Figura 58. Espectros UV/VIS da titulação de isahim com $A\beta_{1-16}$ em água, como função do tempo. (Vermelho) Isahim; (Preto) isahim: $A\beta_{1-16}$ (1:1), 0 h. (Azul) isahim: $A\beta_{1-16}$ (1:1), após 2h; (Verde) isahim: $A\beta_{1-16}$ (1:1), após 12h; concentração inicial: 50 $\mu\text{mol/L}$.

3.3.1.2 Determinação das constantes de equilíbrio para as espécies metal-hidrazonas e metal-bases de Schiff

Conforme descrito no item 3.2.2 procedeu-se à determinação das correspondentes constantes de formação das espécies M-L. Utilizando também espectroscopia UV/VIS, determinou-se as constantes de formação das espécies metal-ligante, com hidrazonas e bases de Schiff, para $M = \text{Cu}^{2+}$ e Zn^{2+} .

A **Figura 59** mostra as variações espectrais observadas em cada caso. Para o ligante misapn observa-se um aumento da absorbância da banda em 290 nm com simultâneo deslocamento para 310 nm a medida que a concentração dos íons Cu^{2+} aumenta em solução. Além disso, a uma diminuição na intensidade da banda em 390 nm

e o surgimento de outra banda em 470 nm, com ponto isobéstico em aproximadamente 410 nm. No caso de titulação com íons de zinco não se observaram mudanças espectrais significativas.

Figura 59. Espectros UV/VIS referente à titulação do ligante *misapn* com Cu^{2+} em tampão Hepes pH 7,4 (%DMSO máxima = 3,8%). **Figura à esquerda,** Concentração inicial do ligante: $[\text{misapn}]_0 = 1,47 \times 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$. **Figura à direita,** Concentrações finais $[\text{misapn}] = 1,44 \times 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$; $[\text{Cu}^{2+}] = 2,91 \times 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$.

Para o ligante isapn, conforme mostrado na **Figura 60** (titulação com Cu^{2+}) e **Figura 61** (titulação com Zn^{2+}) verificou-se a diminuição e o aumento da banda em 388 nm e em 474 nm, respectivamente com formação de um ponto isobéstico em aproximadamente 420 nm. No caso de zinco, a banda em 388 nm diminui enquanto outra surge em 490 nm, com ponto isobéstico em aproximadamente 440 nm.

Figura 60. Espectros UV/VIS referente à titulação do ligante *isapn* com Cu^{2+} em tampão Hepes pH 7,4 (%DMSO máxima = 3%). **Figura à esquerda,** Concentração inicial do ligante: $[\text{isapn}]_0 = 2,41 \times 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$. Concentrações finais $[\text{isapn}] = 2,32 \times 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$ $[\text{Cu}^{2+}] = 2,90 \times 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$. **Figura à direita,** Concentração inicial do ligante: $[\text{isapn}]_0 = 3,62 \times 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$ Concentrações finais $[\text{isapn}] = 3,43 \times 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$; $[\text{Cu}^{2+}] = 4,54 \times 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$.

Figura 61. Espectros UV/VIS referente à titulação do ligante *isapn* com Zn^{2+} em tampão Hepes pH 7,4. Concentração inicial do ligante: $[\text{isapn}]_0 = 2,32 \times 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$ Concentrações finais $[\text{isapn}] = \text{mol.L}^{-1}$; $[\text{Cu}^{2+}] = 2,90 \times 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$.

A formação dos complexos de $\text{Cu}^{2+}/\text{Zn}^{2+}$ -hidrazona foram observadas a partir dos espectros UV/VIS como representado na **Figura 62**. Na formação do complexo $[\text{Cu}(\text{isahim})]^{2+}$ a banda em 354 nm decresce em intensidade à medida que a banda em

490 nm aumenta. A formação do complexo $[\text{Zn}(\text{isahim})]^{2+}$ é evidenciado pela diminuição da banda em 353 nm.

A formação do complexo $[\text{Cu}(\text{isahpy})]^{2+}$ também foi observada pelo decréscimo da banda do ligante em 360 nm e pelo aumento da banda em 465 nm (**Figura 63**).

Figura 62. Espectros UV/VIS referente à titulação do ligante isahim com Cu^{2+} em tampão fosfato $1,0 \text{ mmol.L}^{-1}$, pH 7,4. Concentração inicial do ligante: $[\text{isahim}]_0 = 100,2 \text{ mmol.L}^{-1}$. Concentrações finais $[\text{isahim}] = 97,7 \text{ mM}$; $[\text{Cu}^{2+}] = 213,6 \text{ mmol.L}^{-1}$.

Figura 63. Espectros UV/VIS referente à titulação do ligante isahpy com Cu^{2+} em 7:3 (H_2O : MeCN). Concentração inicial do ligante: $[\text{isahpy}]_0 = 166,7 \text{ mmol.L}^{-1}$. Concentrações finais $[\text{isahpy}] = 4,23 \text{ }\mu\text{mol.L}^{-1}$; $[\text{Cu}^{2+}] = 263,0 \text{ mmol.L}^{-1}$.

Complexos formado a partir do ligante isahpy são, em geral, insolúveis em sistema tamponado. A fim de se obter um parâmetro da estabilidade do complexo formado optou-se pelo uso de uma mistura de 70% de água e 30% de acetonitrila onde se pode determinar a constante de estabilidade do complexo formado. No caso de titulação com íons de zinco para este ligante não se observaram modificações espectrais significativas.

Os equilíbrios abaixo foram considerados e na maioria dos casos a espécie predominante formada em solução foi [ML] (1:1):

Baseado nos resultados desses experimentos, construiu-se a **Tabela 12**, que mostra os valores determinados para as várias constantes de formação ou de estabilidade das espécies metal-ligante.

Tabela 12. Constantes de equilíbrio (expressas como valores de $\log \beta$) obtidas para os complexos de Cu^{2+} e Zn^{2+} com todos os compostos oxindólicos.

Constante de equilíbrio				
Composto	Íon Metálico	Solvente	Proporção	$\log \beta$
Isahim	Cu^{2+}	PBS (pH 7,4)	$[Cu(isahim)]^{2+}$ (1:1)	$4,77 \pm 0,002$
	Zn^{2+}	PBS (pH 7,4)	$[Zn(isahim)]^{2+}$ (1:1)	$2,82 \pm 0,04$
	$A\beta_{1-16}$	Água	$(A\beta_{1-16})_2 \cdot isahim$ (2:1)	$8,86 \pm 0,002$
Isahpy	Cu^{2+}	$H_2O/MeCN$ (1:1)	$[Cu(isahpy)]^{2+}$ (1:1)	$5,11 \pm 0,09$
Isapn	Cu^{2+}	Hepes (pH 7,4)	$[Cu(isapn)]^{2+}$	$4,40 \pm 0,02$
	Zn^{2+}	Hepes (pH 7,4)	$[Zn(isapn)]^{2+}$	$2,74 \pm 0,03$
Misapn	Cu^{2+}	Hepes (pH 7,4)	$[Cu(misapn)]^{2+}$	$3,50 \pm 0,02$

Esses valores indicam que as espécies metal-ligante são bastante estáveis, com valores de $\log \beta$ entre 2,7 e 5,1.

3.3.2 Ensaios de inibição da agregação por turbidimetria

Análises de turbidimetria têm sido aplicadas como uma metodologia típica padrão para determinar o grau de fibrilização das proteínas amilóides^[120]. As medidas de turbidimetria referentes à auto-agregação do peptídeo $A\beta_{1-40}$, assim como da agregação induzida por Cu^{2+} e Zn^{2+} , foram realizadas em tampão fosfato (1 mmol/L, pH 7,4) e monitoradas a 600 nm.

Embora tenha sido provado que o pH ótimo para aumentar a agregação do $A\beta_{1-40}$ seja entre 5-6, a fim de se obter análises padronizadas, o pH fisiológico foi escolhido para a execução destas medidas. Além do mais, neste pH pode-se promover uma melhor competição entre os ligantes e o peptídeo, visto que em pH ácido existe a possibilidade destes ligantes encontrarem-se na forma protonada^[120]. Não obstante, como é sabido, os íons Cu^{2+} e Zn^{2+} catalisam o processo de agregação e consequente fibrilização da proteína amiloide^[121,122].

Normalmente, análises por turbidimetria são avaliadas em 400-405 nm por UV/VIS. Contudo, uma vez que os ligantes isahim e isahpy absorvem nesse comprimento de onda, essa região não seria adequada para quantificar os agregados formados. Logo, as medidas foram obtidas a 600 nm onde os ligantes não apresentam absorbância com intensidade significativa. O aumento da absorbância em 600 nm indica o aumento da concentração de agregados fibrilares em solução.

Na presença de íons Cu^{2+} , o ligante isahim apresenta moderada influência no processo de inibição do peptídeo $A\beta_{1-40}$ (1:1:1, $A\beta_{1-40}$: Cu^{2+} : isahim). No entanto, com aumento da proporção de ligante de 1:1:1 para 1:1:4 (sistema, $A\beta_{1-40}$: Cu^{2+} : isahim) a absorbância medida apresentou um decréscimo indicando uma melhor performance do ligante, e uma provável competição pelo metal (**Figura 64**).

Entretanto, em experimentos similares com o composto isahpy não se observou evidência de inibição na condição 1:1:1 (sistema, $A\beta_{1-40}$: Cu^{2+} : isahpy) em comparação com o controle. Uma das possíveis explicações para este resultado é o fato de o complexo $[Cu(isahim)]^{2+}$ formado ser insolúvel em água, o que pode levar a interferências nas análises. De fato, a absorbância do sistema $A\beta_{1-40}$: Cu^{2+} : isahpy é maior do que o próprio controle $A\beta_{1-40}$: Cu^{2+} .

Quando a agregação do peptídeo foi induzida na presença de íons Zn^{2+} , o ligante isahpy exibiu um perfil de inibição melhor do que o controle. Contudo, quando comparado ao ligante isahim, sua atividade foi menor.

A – Controles ($A\beta_{1-40} + M^{2+}$) ou ($A\beta_{1-40} + \text{Ligante}$)

B – Zinco ($A\beta_{1-40} + Zn^{2+} + \text{Ligante}$)

C – Cobre ($A\beta_{1-40} + Cu^{2+} + \text{Ligante}$)

Figura 64. Ensaios de inibição da agregação do peptídeo $A\beta_{1-40}$ induzida por íons Cu^{2+} e Zn^{2+} por turbidimetria. Inibidor: *isahim* ou *isahpy*. Ensaios de inibição **(A)** controle para $A\beta_{1-40} + \text{ligante}$ ou $A\beta_{1-40} + \text{metal}$; **(B)** na presença do íon Zn^{2+} ; **(C)** na presença de íons Cu^{2+} . Na presença dos íons cobre o ligante *isahim* foi testado em três concentrações diferentes, a saber: $A\beta_{1-40}/Cu^{2+}/isahim$, 1:1:n (n = 1 ou 4) e 1:2:1. $[A\beta_{1-40}] = 25 \mu M$.

Os ensaios de agregação para os ligantes isapn e misapn foram conduzidos em três proporções de $A\beta_{1-40}$: Cu^{2+} :ligante, a saber 1:1:n, onde $n=1,3$ ou 6.

O decréscimo das absorvâncias em a 600 nm para as condições em que o ligante se encontrava em maior quantidade indica um processo competitivo entre o ligante e o peptídeo pelo íon metálico. Na presença de zinco, os ligantes foram testados apenas nas condições 1:1:6 ($A\beta_{1-40}$: Zn^{2+} : ligante) contudo nenhuma inibição foi observada. De fato, um aumento da absorvância foi verificado em relação ao controle, para ambos esses ligantes **(Figura 65)**.

Entretanto, nos experimentos com cobre(II) observou-se inibição acentuada da agregação em presença dos ligantes isapn ou misapn nas diferentes proporções.

Figura 65. Ensaios de inibição da agregação do $\text{A}\beta_{1-40}$ induzida por Cu^{2+} e Zn^{2+} por turbidimetria. Ensaios de inibição **(A)** na presença de Cu^{2+} e de isapn; **(B)** na presença de Zn^{2+} e de isapn; **(C)** na presença de Cu^{2+} e de misapn; **(D)** na presença de Zn^{2+} e de misapn. Na presença dos Cu^{2+} os ligantes *isapn* e *misapn* foram testados em diferentes concentrações: $\text{A}\beta_{1-40}/\text{Cu}^{2+}/\text{ligante}$, 1:1:n ($n = 1, 3$ e 6), enquanto na presença de Zn^{2+} , os ligantes foram testados apenas na proporção $\text{A}\beta_{1-40}/\text{Zn}^{2+}/\text{ligante}$, 1:1:6.

Baseado nestes dados, pode-se concluir que todos os ligantes testados foram ativos. Os ligantes isapn e misapn parecem ser mais eficientes como inibidores da agregação provocada com íons Cu^{2+} que com íons Zn^{2+} .

O ligante isahim foi efetivo na inibição da agregação induzida pelos dois íons metálicos Cu^{2+} e Zn^{2+} . Já o isahpy foi ativo frente a íons Zn^{2+} , mas não frente aos íons Cu^{2+} , o que pode ser devido à formação de um complexo insolúvel.

Ao considerar as constantes de estabilidade do metal-ligante e do metal-peptídeo pode-se estabelecer uma previsão da quantidade necessária de ligante para que seja competitivo com o peptídeo. Um experimento de fluorescência realizado por Ma, Q. F., e colaboradores mostrou que para remover completamente o cobre do peptídeo $\text{A}\beta_{1-16}$ seria necessária uma quantidade 120 vezes maior do aminoácido glicina em relação ao peptídeo^[111].

A constante de estabilidade da espécie $\text{Cu}^{2+}\cdot\text{A}\beta_{1-40}$ é $6,3 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$ ($\log \beta = 5,8$)^[123] enquanto que a constante para o $[\text{Cu}(\text{isapn})]^{2+}$ é de $2,5 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$ ($\log \beta = 4,4$).

Conforme demonstrado na **Tabela 13**, para que o ligante isapn, por exemplo, seja considerado competitivo, a proporção molar empregada deve ser maior (cerca de 1:25, $\text{A}\beta_{1-40}:\text{isapn}$) do que a quantidade utilizada nos experimentos de turbidimetria, para os quais a proporção máxima de ligante foi de 1:6 ($\text{A}\beta_{1-40}:\text{isapn}$).

A mesma análise serve para os demais ligantes. Embora, valha ressaltar que mesmo na proporção 1:1, os ensaios de turbidimetria mostraram que os ligantes apresentam considerável capacidade de inibição.

Tabela 13. Cálculo da relação entre a concentração de isapn (L) e do peptídeo A β_{1-40} (P) - [L]/[P] - para que sejam competitivos frente à coordenação aos íons Cu²⁺.

Dados	
Estequiometria 1:1 (Cu ²⁺ : Quelante)	
Reação de formação do complexo Cu ²⁺ -A β_{1-40}	Reação de formação do complexo [Cu(isapn)] ²⁺
$Cu^{2+} + A\beta_{1-40} \rightleftharpoons [Cu(A\beta_{1-40})]$	$Cu^{2+} + L \rightleftharpoons [CuL]$
Definições	Constantes de equilíbrio
$A\beta_{1-40} = [P]$	$K_{[CuP]} = 6,3 \times 10^5 M^{-1}$
$isapn = [L]$	$K_{[CuL]} = 2,5 \times 10^4 M^{-1}$
Equações*	
$[CuP] < [CuL]$ (eq. 1)	
$[CuP] = K_{[CuP]} \cdot [Cu] \cdot [P]$ (eq. 2)	$[CuL] = K_{[CuL]} \cdot [Cu] \cdot [L]$ (eq. 3)
$K_{[CuP]} = \frac{[CuP]}{[Cu] \cdot [P]}$	$K_{[CuL]} = \frac{[CuL]}{[Cu] \cdot [L]}$
Substituído (3) e (2) em (1)	
$K_{[CuP]}[Cu][P] < K_{[CuL]}[Cu][L]$	
$6,3 \times 10^5 M^{-1} \cdot [Cu][P] < 2,5 \times 10^4 M^{-1} \cdot [Cu][L]$	
$[L] > 25[P]$	

Levando-se em conta apenas o estudo controle, observou-se que na presença apenas do ligante (isahim, isahpy e isapn), o peptídeo A β_{1-40} sofre um aumento da agregação em relação a auto-agregação como pode ser observado nas **Figura 64** e **Figura 65**.

Sob essa perspectiva, um estudo da interação do peptídeo com os ligantes foi realizado, usando espectroscopia de RMN, a fim de se elucidar as formas de inibição da agregação. Para tal análise, o peptídeo A β_{1-16} foi utilizado ao invés do A β_{1-40} uma vez que o sítio de coordenação ocorre nesta fração da proteína bem como em função de sua elevada solubilidade e ausência de processos de auto-agregação^[13,110,111].

3.3.3 Estudos de interação dos ligantes com peptídeo A β ₁₋₁₆ através de espectroscopia de RMN

Os estudos de RMN do peptídeo A β ₁₋₁₆ foram realizados em soluções aquosas (D₂O) e em tampão fosfato pH 7,4. As atribuições dos sinais do peptídeo foram feitas de acordo com a literatura^[37,110,111].

O espectro de ¹H RMN do A β ₁₋₁₆, bem como as suas atribuições, pode ser observado na **Figura 55 do Capítulo 2**, a partir do qual, pode-se entender melhor os espectros em presença dos ligantes, podendo-se prever ou identificar as interações peptídeo-ligante.

O efeito do DMSO sobre o peptídeo, em tampão fosfato (1 mM; pH 7,4), pode ser observado na **Figura 66**.

O experimento controle consistiu na adição total de até 30 % de DMSO à solução tamponada do peptídeo. Como observado em todas as análises de RMN com DMSO-d₆ e D₂O, à medida em que soluções contendo DMSO foram adicionadas, os espectros apresentaram desvios para maiores deslocamentos químicos.

Embora o primeiro espectro não tenha apresentado boa resolução, pôde-se identificar algumas alterações em função da adição do solvente. A adição de DMSO produziu pequenas alterações nos sinais do C ^{γ} H glutamato (Glu, E3) e do C ^{β} H da serotonina (Ser, S8) indicando uma provável interação destes aminoácidos com o meio. Não foram observadas outras mudanças espectrais significativas.

Estes resultados indicam que embora tenham sido adicionadas quantidades suficientemente elevadas de DMSO sobre os sistemas ligante – peptídeo, o solvente não deve ser responsável pelas demais alterações observadas nos testes realizados com os compostos oxindolíminicos ou derivados de hidrazonas, visto que aparentemente apenas os sinais de glutamato e de serotonina foram afetados neste caso.

Figura 66. Experimento controle ^1H RMN (400 MHz) referente à titulação do peptídeo A β ₁₋₁₆ com 30% de DMSO, em tampão fosfato (1mmol/L) pH 7,4. **(1):** ^1H RMN de A β ₁₋₁₆ (3 mmol/L) em tampão. Neste caso o espectro não apresentou boa resolução. **(2):** ^1H RMN de A β ₁₋₁₆ contendo 8% DMSO. **(3)** ^1H RMN de A β ₁₋₁₆ contendo 30% DMSO. **(Acima)** Região expandida entre 6,5 ppm e 8,7 ppm. **(Abaixo)** Região expandida entre 0,5 ppm e 4,6 ppm.

3.3.3.1 Estudos de interação entre o peptídeo A β ₁₋₁₆ e o ligante isahim em água

A interação do composto isahim com o peptídeo A β ₁₋₁₆ foi estudada através de titulação do acompanhada por espectroscopia ^1H RMN (400 MHz). Para fins de discussão, as figuras dos espectros foram separadas por regiões de diferentes deslocamentos químicos.

Na **Figura 67**, que mostra a região entre 8,3 e 8,7 ppm, observa-se um ligeiro deslocamento e perda de definição na região de 8,5 ppm cujos sinais são atribuídos aos hidrogênios ϵ C $^{\epsilon}$ H dos resíduos de histidina (His6, His14 e His13).

Figura 67. Espectros de ^1H RMN (400 MHz) obtidos durante a titulação do peptídeo A β ₁₋₁₆ com o composto isahim. Seleção da região referente ao C $^{\epsilon}$ H dos resíduos de histidina H6, H13 e H14.

Na **Figura 68**, cujo espectro está compreendido na região entre 2,5 ppm a 4,5 ppm, é possível notar pequenos deslocamentos dos sinais atribuídos aos hidrogênios α (C $^{\alpha}$ H), correspondentes aos aminoácidos glutamato (Glu, E3 e E11) e lisina (Lys, K16). Esses deslocamentos também foram observados para os hidrogênios β (C $^{\beta}$ H) dos resíduos aspartato (Asp, D1, D7).

Figura 68. Espectro de ^1H RMN (400 MHz) obtido durante a titulação do peptídeo $\text{A}\beta_{1-16}$ com o composto *isahim*. Linhas preta e azul representam o primeiro e último espectros registrados respectivamente. **Espectro acima:** região expandida dos hidrogênios C^βH do resíduo aspartato D1 e D7. **Espectro abaixo:** região expandida dos hidrogênios C^αH do resíduo glutamato E3 e E11 e do resíduo lisina K16.

Estes resultados indicam que o composto isahim, em solução aquosa interage com o fragmento A β ₁₋₁₆ através dos mesmos resíduos que compõem a esfera de coordenação dos íons Cu²⁺ e Zn²⁺ (na espécie M²⁺:A β), ou seja, com as histidinas os carboxilatos próximos^[116].

As hidrazonas derivadas de isatina exibem uma isomerização E/Z que em alguns casos podem ser distintas por análise de RMN como foi observado na discussão do **Capítulo 1**. Em solução aquosa, o espectro de ¹H RMN do isahim exibe pelo menos dois dubletos atribuídos ao hidrogênio H9 aromático da molécula, verificados em 7,99 ppm (para o isômero E) e em 7,51 ppm (para o isômero Z), em uma proporção de 25% e 75% respectivamente (**Figura 69(a)**).

A **Figura 69(b)** denota as regiões onde aparecem os sinais característicos do ligante isahim (3,7 -4,0 ppm e 6,8 – 8,0 ppm). Nota-se que a adição do ligante sobre o peptídeo desloca todos os sinais de hidrogênio do primeiro espectro sendo que o hidrogênio H9 é um dos mais afetados. A titulação também indicou a presença dos isômeros, tendo o hidrogênio H9 detectado nas regiões de 7,81 ppm (isômero-*E*) e 7,50 ppm (isômero-*Z*).

Além do mais, a proporção existente entre estes isômeros é de 3:1 (*E:Z*). Esta proporção é mantida até o final da titulação.

Figura 69. Espectro de ^1H RMN (400 MHz) durante a titulação do $\text{A}\beta_{1-16}$ com *isahim*. **(a)** região expandida dos prótons aromáticos do ligante *isahim*. **(b)** Região expandida dos hidrogênios pertencentes aos grupamentos metilênicos do anel imidazólico.

3.3.3.2 Estudos de interação do peptídeo $\text{A}\beta_{1-16}$ com o ligante isapn

Seguindo a metodologia descrita para o composto isahim, a interação do peptídeo A β ₁₋₁₆ com o composto isapn foi analisada por titulação e acompanhada por espectroscopia de ¹H RMN (400 MHz). O ligante isapn não é solúvel em água, por esta razão, este composto foi solubilizado em DMSO e adicionado a uma solução aquosa de tampão fosfato (1mmol/L) contendo uma pequena quantidade de DMSO. Sucessivas adições de isapn foram realizadas até atingir a proporção de 1,0 : 2,2 (A β ₁₋₁₆ : isapn).

Tal qual observado no caso do composto isahim, verifica-se (**Figura 70**) uma forte interação do ligante com os resíduos das histidinas His(14), His(13), e His(6). Quase todos os sinais espectro apresentam um deslocamento para campo baixo até um equivalente de isapn, incluindo o DMSO. Este solvente, contudo, não interage com o peptídeo.

Figura 70. Espectros ¹H RMN (400 MHz) de A β ₁₋₁₆ titulado com o ligante isapn. Expansão da região entre 8,30 ppm a 8,70 ppm cujos sinais são atribuídos ao hidrogênio dos resíduos histidínicos. O deslocamento dos sinais das histidinas é contrário ao observado para o DMSO.

Os sinais das histidinas, seguem um deslocamento para campo baixo até aproximar-se da equivalência. Adições subsequentes de isapn não apenas causam um deslocamento oposto ao do DMSO para campo mais alto, como também conduzem a uma inversão das intensidades dos hidrogênios das His14 e His6 em relação ao hidrogênio da His13, seguido de alargamento.

Os sinais dos resíduos próximos às histidinas também se mostraram consideravelmente afetados (**Figura 71**). Ao observar os sinais característicos dos resíduos de ácido aspártico D(1) e D(7) verifica-se, da mesma forma que para a histidina, um deslocamento oposto ao observado para o DMSO. Ainda, observa-se que a região do espectro que contém os hidrogênios β do resíduo de serina S(8), adjacente à histidina H(7) também sofre um deslocamento para campo alto opostamente ao DMSO.

A interação com os hidrogênios α da serina S(8) não parece ser tão intensa quanto com os hidrogênios β , o que indica possivelmente a interação do ligante com os grupos carboxilatos dos resíduos próximos às histidinas.

Figura 71. Espectros 1D de ^1H RMN (400 MHz) de $\text{A}\beta_{1-16}$ titulado com o ligante *isapn*. Os espectros foram obtidos em tampão fosfato (D_2O) 1mM, pH 7,4. Volumes da solução de *isapn* preparada em DMSO-d_6 foram sendo adicionados sucessivamente. **(Acima)** expansão da região entre 4,7 – 3,6 ppm evidenciando um deslocamento significativo nos sinais dos hidrogênios H^β do resíduo serina S8H^β . **(Abaixo)** expansão da região de 3,4 – 2,4 ppm obtido para os resíduos D1 e D7 referentes aos H^β .

3.3.3.3 Estudos de interação do peptídeo A β ₁₋₁₆ com o ligante misapn

Os espectros de ¹H RMN obtidos da titulação do peptídeo A β ₁₋₁₆ com o ligante misapn (**Figura 72**) indicam resultados similares para os obtidos com o ligante isapn. Os deslocamentos observados para os sinais da histidina, associados às mudanças de perfil do sinal, indicam, novamente, que estes resíduos foram os mais afetados pela presença do ligante.

Em função dos sinais característicos dos hidrogênios metilênicos do ligante, os quais são observados na região de 3,0 ppm, não foi possível avaliar os efeitos do ligante sobre essa perspectiva, visto que os mesmos se sobrepõem aos da histidina C ^{β} H.

Contudo, como observado na **Figura 73**, assim como para os estudos com o isapn, o ligante misapn parece também afetar significativamente os resíduos aspartato D1 e D7, os quais deslocam-se em sentido contrário aos demais sinais do espectro.

Figura 72. Espectro de ¹H RMN (400 MHz) tampão fosfato pH 7,4 (máximo de DMSO 30%) referente à titulação do peptídeo A β ₁₋₁₆ com o composto *misapn*. Região de 8,30 ppm a 8,60 ppm. Sinais evidentes histidina 8,46 ppm (His 13), 8,47 ppm (His13) e 8,48 ppm (His 6).

Figura 73. Espectro de ^1H RMN (400 MHz) tampão fosfato pH 7,4 (máximo de DMSO 30%) referente à titulação do peptídeo A β ₁₋₁₆ com o composto *misapn*. (**Acima**) Região de 5,8 ppm a

8,10 ppm. Sinais evidentes: fenilalanina (F4), histidina (H) e tirosina (Y10). (**Abaixo**) Região de 2,30 ppm a 3,30 ppm. Sinais evidentes: histidina e aspartato.

Pode-se supor, que assim como para os demais ligantes, o misapn também interage com os resíduos próximos às histidinas e consequentemente ao sítio de coordenação do peptídeo.

A interação mais eficaz do composto isapn em relação ao misapn ou mesmo à hidrazona isahim, pode ser um indício de que o grupamento oxindolimínico exerça um efeito propiciador da interação.

Embora a natureza destas interações não tenha sido considerada, entende-se que o fato de se poder estabelecer ligações de hidrogênio via hidrogênios ácidos presentes nos ligantes e interações de sobreposição π em função da aromaticidade e consequente planaridade da molécula, as interações 'ligante – peptídeo' ocorram por uma destas vias.

3.3.4 Estudo da interação de $A\beta_{1-16}$, isapn ou isahim e Zn^{2+} por RMN

Na tentativa de se verificar o efeito competitivo do isapn e do peptídeo $A\beta_{1-16}$ frente à presença de íons metálicos, procedeu-se com um estudo de titulação da mistura 1:1 dos competidores com a adição sucessiva de $Zn(ClO_4)_2 \cdot 6H_2O$.

Syme, C.D. e Viles, J.H.,^[110] usando espectroscopia 1H RMN demonstraram que a adição de $ZnCl_2$ aos peptídeos $A\beta_{1-16}$ e $A\beta_{1-28}$ gera perturbações significativas nos espectros. As mais notáveis envolvem o alargamento do tripleto dos hidrogênios Ser8 αH , e deslocamento dos sinais da Asp7 e Val12. As histidinas His $\delta/\epsilon H$ e tirosina Tyr10 $\delta/\epsilon H$ incluem os prótons mais afetados a ponto de desaparecer quando quantidades equivalentes (1 eq.) de Zn^{2+} foram adicionadas^[110]. Esses espectros foram coletados em soluções D_2O ou 90% H_2O :10% D_2O em pH7,8^[110].

A adição sucessiva de Zn^{2+} à mistura isapn: $A\beta_{1-16}$ (1:1) em tampão fosfato evidenciaram o alargamento dos sinais das histidinas (**Figura 74**). Contudo, não foram observadas perturbações em outros sinais do espectro (**Figura 75**).

Esses resultados indicam que o efeito dos íons Zn^{2+} na presença do ligante são atenuados em vista das análises apresentadas por Syme, C.D. e Viles, J.H.,^[110]. A interação do isapn (e dos demais ligantes testados) com os mesmos resíduos do peptídeo que

compõe o sitio de ligação dos íons metálicos pode indicar um efeito “protetor” exercido pelo ligante inibindo a coordenação do íon metálico ao peptídeo.

A mesma análise foi feita para o ligante isahim, para o qual também não foram observadas mudanças nos sinais dos aminoácidos ao qual o zinco se coordena. Contudo mudanças foram observadas para o sinal das histidinas com o aumento da quantidade de zinco em solução (**Figura 76**).

Deste modo, prevê-se que o processo de inibição da agregação não ocorra por mecanismos de competição, mas sim via interação do ligante com o sítio ativo. Como observado pelas análises de turbidimetria, uma equivalência de 1:1:1 ($A\beta_{1-40}$:ligante: M^{2+}) foi considerada suficiente para se observar um processo de inibição da agregação.

Figura 74. Espectros 1D de 1H RMN (400 MHz) de $A\beta_{1-16}$ e *isapn* titulados com uma solução de perclorato de zinco. Expansão dos sinais dos resíduos de histidina.

Figura 75. Espectros 1D de ^1H RMN (400 MHz) de $\text{A}\beta_{1-16}$ e isapn titulados com uma solução de perclorato de zinco. A solução inicial ($\text{A}\beta_{1-16}$ + isapn) foi preparada com tampão fosfato (D_2O) 1

mM e a solução salina em D₂O. **(Acima)** expansão na região de alto campo. **(Abaixo)** expansão na região aromática.

Figura 76. Espectros 1D de ¹H RMN (400 MHz) de Aβ₁₋₁₆ e *isahim* titulados com uma solução de perclorato de zinco. Expansão do sinal dos resíduos de histidina.

3.3.5 Análise de Interação por Métodos Computacionais

Estudos de docking e dinâmica molecular (*Molecular Docking and Dynamics*) foram aplicados a fim de se compreender as formas de interação entre o composto isahim e o peptídeo Aβ₁₋₁₆.

Atribuiu-se as condições de pH fisiológico (pH 7,2), meio aquoso, onde os resíduos Glu (pKa 4,07), Asp (pKa 3,86) e His (pKa 6,10) encontram-se desprotonados produzindo os respectivos carboxilatos enquanto a Lis (pKa 10,6) encontra-se protonada.

Para tal simulação, o ligante foi inserido no centro de massa de três peptídeos Aβ₁₋₁₆ estendidos distribuídos à uma distância de 23 Å entre si. A primeira etapa de simulação indica que o ligante converge para os vértices dos peptídeos de modo que as interações produzidas nestas posições são mais intensas (**Figura 77**).

Como esperado, observou-se ainda que interações significativas estão aptas a ocorrer entre os hidrogênios ácidos do ligante e os carboxilatos dos resíduos Asp7, Glu11 e Gln15. Por outro lado, a proximidade da Lis16 protonada à carbonila do ligante isahim indica uma provável ligação de hidrogênio entre estes grupamentos. Verificou-se uma proximidade da His13 à uma distância de 5 Å.

Figura 77. Acima: simulação das três principais etapas de interação isahim-A β_{1-16} . Abaixo: principais resíduos que interagem com isômero *E*-isahim.

Os espectros de RMN analisados apresentam algumas discrepâncias em relação às condições impostas para o experimento computacional. Dois experimentos de RMN foram executados, o primeiro em meio aquoso sem um controle de pH definido e o segundo, realizado em pH 7,4 em tampão fosfato. A variação de pH ou a presença tampão fosfato são fatores que podem alterar parcialmente as esferas de interação peptídeo-isahim. Embora as análises de RMN tenham evidenciado uma interação muito mais efetiva do ligante com os resíduos histidina, os cálculos são consistentes e dão suporte aos resultados experimentais.

Estes estudos foram realizados em colaboração com o grupo de pesquisa do professor Dr. Luiz Antônio Sodré Costa do Departamento de Química da Universidade Federal de Juiz de Fora (UFJF).

3.4 Conclusões

Foram determinadas as constantes de estabilidade para os complexos de cobre com ligantes oxindolimínicos $[\text{Cu}(\text{isapn})]^{2+}$, $[\text{Cu}(\text{misapn})]^{2+}$ e com as hidrazonas $[\text{Cu}(\text{isahim})]^{2+}$ e $[\text{Cu}(\text{isahpy})]^{2+}$, que apresentaram valores da ordem de 10^4 . Determinou-se ainda a constante de formação para o aduto $(\text{Isahim})_2 \cdot \text{A}\beta_{1-16}$ cujo valor foi da ordem de 10^8 .

As constantes de estabilidade para estes complexos apontam para espécies de elevada estabilidade com potencial aplicação para serem usados como agentes competitivos frente às espécies metaladas do peptídeo $\text{A}\beta_{1-16}$. Baseado em nossos resultados e nas constantes de estabilidade M-L e M-P (onde, M: metal; L: ligante; P: peptídeo) a relação calculada entre a quantidade de isapn para o peptídeo $\text{A}\beta_{1-40}$ deve ser de aproximadamente 25:1 para se ter uma boa competitividade, considerando espécies M:L (1:1).

A reatividade de peptídeo $\text{A}\beta_{1-16}$ foi estudada na presença dos ligantes *isahim*, *isapn* e *misapn* por espectroscopia de RMN e pode-se observar que todos os compostos são capazes de interagir com as histidinas e em especial com os carboxilatos dos resíduos de aminoácidos próximos a essas histidinas. Estes mesmos grupamentos são utilizados na coordenação de íons cobre ou zinco, facilitando a agregação do peptídeo. Titulações de $\text{A}\beta_{1-16}$ na presença dos ligantes *isapn* e *isahim* foram feitas com a adição de uma solução aquosa (D_2O) de íons Zn^{2+} . Esperar-se-ia que, caso o peptídeo se coordenasse diretamente ao Zn^{2+} , significativas perturbações seriam evidenciadas no espectro nas regiões 0,94-0,78 ppm (Val11) e o desaparecimento dos sinais dos resíduos S8 (4,42 ppm) Y10 e H14, H13 e H6 (7,1-6,8 ppm).

As análises de turbidimetria indicaram que, ainda em concentrações menores dos que as necessárias para um mecanismo competitivo para a quelatação dos íons Cu^{2+} e Zn^{2+} , os ligantes exibem atividade inibidora considerável do processo de coordenação e da consequente agregação do peptídeo $\text{A}\beta_{1-42}$.

As interações peptídeo-ligante sugerem uma proteção do sítio de coordenação do metal no peptídeo amiloide, o que pode ser um dos indícios do mecanismo pelo qual esses ligantes atuam, sendo capazes de inibir a agregação do peptídeo.

Os estudos por espectroscopia ^1H RMN consentem com as análises teóricas de dinâmica molecular referentes a interação do ligante *isahim* com $\text{A}\beta_{1-16}$. Esses estudos

indicam que o isahim converge para os resíduos de fronteira do peptídeo e com o aminoácido aspartato (Asp7) via ligações de hidrogênio distante a menos de 5Å.

3.5 Perspectivas

O presente projeto objetivou o estudo da inibição da agregação do peptídeo amiloide β induzido pela presença dos íons metálicos Cu^{2+} e Zn^{2+} a partir de compostos oxindolímínicos. Os estudos de turbidimetria mostraram resultados promissores frente ao processo de inibição como também análises espectroscópicas evidenciaram a interação destes compostos com a fração hidrofílica do peptídeo, em especial com os resíduos histidina e aspartato.

Neste cenário, a fim de se prever o potencial farmacológico destes compostos estudos como a lipofilicidade e toxicidade das bases livres e das espécies carregadas são metas a serem realizadas.

Análises de EPR (espectroscopia paramagnética eletrônica) com a finalidade de se obter informações acerca do potencial antioxidante e das formas de interação do sistema Cu^{2+} -peptídeo-ligante são objetivos em andamento.

Como se sabe, a doença de Alzheimer possui várias vertentes, para as quais os compostos testados neste projeto podem apresentar potencial farmacológico. O estudo dos complexos das bases livres aplicadas poderia ser viável em testes para inibição da acetilcolinesterase ou mesmo como catalisadores da hidrólise de peptídeos amiloide e α -cisteína.

Em nosso grupo, diversos compostos derivados de grupamentos oxindolimininas têm sido testados apresentando resultados promissores para diversas patologias como antitumorais, antibactericidas, ou mesmo como catalisadores e blocos construtores. Dada a versatilidade estrutural dos compostos produzidos neste projeto, estas bases podem ser facilmente aplicadas em qualquer um destes estudos.

Referências

1. GRØNTVEDT, G. R.; SCHRÖDER, T. N.; SANDO, S. B.; WHITE, L.; BRÅTHEN, G.; DOELLER, C. F. Alzheimer's disease. **Current Biology**, v. 28, n. 11, p. R645–R649, 2018.
2. KEPP, K. P. Bioinorganic Chemistry of Alzheimer ' s Disease. 2012.
3. ROSS, C. A.; POIRIER, M. A. Protein aggregation and neurodegenerative disease. **Nature Medicine**, v. 10, n. 7, p. S10, 2004.
4. WHO. The Epidemiology and Impact of Dementia: Current State and future trends. **First WHO Ministerial Conference on Global Action Against Dementia**, p. 1–4, 2015.
5. WHALLEY, K. Neurodegenerative diseases: Age concerns. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 8, n. 8, p. 572–573, 2007.
6. CUMMINGS, J. L. Cognitive and behavioral heterogeneity in Alzheimer's disease: Seeking the neurobiological basis. **Neurobiology of Aging**, v. 21, n. 6, p. 845–861, 2000.
7. BEKRIS, L. M.; YU, C. E.; BIRD, T. D.; TSUANG, D. W. Review article: Genetics of Alzheimer disease. **Journal of Geriatric Psychiatry and Neurology**, v. 23, n. 4, p. 213–227, 2010.
8. ORGANIZATION, W. H. **Dementia**. Disponível em: <<http://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/dementia>>. Acesso em: 2 jun. 2018.
9. BURLÁ, C.; CAMARANO, A. A.; KANSO, S.; FERNANDES, D.; NUNES, R. Panorama prospectivo das demências no Brasil: um enfoque demográfico. **Ciência & Saúde Coletiva**, v. 18, n. 10, p. 2949–2956, 2013.
10. APRAHAMIAN, I. Doença de Alzheimer: revisão da epidemiologia e diagnóstico * Alzheimer ' s disease : an epidemiology and diagnosis review. p. 27–35, 2009.
11. ULEP, M. G.; SARAON, S. K.; MCLEA, S. Alzheimer Disease. **TJNP: The Journal for Nurse Practitioners**, v. 14, n. 3, p. 129–135, [s.d.].
12. **Medications for Memory Loss**. Disponível em: <https://www.alz.org/alzheimers_disease_standard_prescriptions.asp>. Acesso em: 18 fev. 2018.
13. ROWINSKA-ZYREK, M.; SALERNO, M.; KOZLOWSKI, H. Neurodegenerative diseases - Understanding their molecular bases and progress in the development of potential treatments. **Coordination Chemistry Reviews**, v. 284, p. 298–312, 2015.

14. QAZI, T. J.; QUAN, Z.; MIR, A.; QING, H. Epigenetics in Alzheimer ' s Disease : Perspective of DNA Methylation. p. 1026–1044, 2018.
15. PIPLANI, P.; JAIN, A.; DEVI, D.; ANJALI; SHARMA, A.; SILAKARI, P. Design, synthesis and pharmacological evaluation of some novel indanone derivatives as acetylcholinesterase inhibitors for the management of cognitive dysfunction. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, v. 26, n. 1, p. 215–224, 2018.
16. MUNOZ, D. G.; FELDMAN, H. Causes of Alzheimer's disease. v. 162, n. 1, p. 65–72, 2000.
17. DE FALCO, A.; CUKIERMAN, D. S.; HAUSER-DAVIS, R. A.; REY, N. A. Doença de Alzheimer: Hipóteses etiológicas e perspectivas de tratamento. **Química Nova**, v. 39, n. 1, p. 63–80, 2016.
18. DE PAULA, V. J. R.; GUIMARÃES, F. M.; FORLENZA, O. V. Papel da proteína Tau na fisiopatologia da demência frontotemporal. **Revista de Psiquiatria Clínica**, v. 36, n. 5, p. 212–217, 2009.
19. RAMACHANDRAN, G.; MILAN-GARCES, E. A.; UDGAONKAR, J. B.; PURANIK, M. Resonance Raman spectroscopic measurements delineate the structural changes that occur during tau fibril formation. **Biochemistry**, v. 53, n. 41, p. 6550–6565, 2014.
20. TEPPER, K.; BIERNAT, J.; KUMAR, S.; WEGMANN, S.; TIMM, T.; HÜBSCHMANN, S.; REDECKE, L.; MANDELKOW, E. M.; MÜLLER, D. J.; MANDELKOW, E. Oligomer formation of tau protein hyperphosphorylated in cells. **Journal of Biological Chemistry**, v. 289, n. 49, p. 34389–34407, 2014.
21. FALLER, P.; HUREAU, C. Bioinorganic chemistry of copper and zinc ions coordinated to amyloid- β peptide. **Dalton Trans.**, n. 7, p. 1080–1094, 2009.
22. HARDY, J.; SELKOE, D. J. The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: Progress and problems on the road to therapeutics. **Science**, v. 297, n. 5580, p. 353–356, 2002.
23. NICOLAS, M.; HASSAN, B. A. Amyloid precursor protein and neural development. **Development**, v. 141, n. 13, p. 2543–2548, 2014.
24. OLOFSSON, A.; LINDHAGEN-PERSSON, M.; SAUER-ERIKSSON, A. E.; ÖHMAN, A. Amide solvent protection analysis demonstrates that amyloid- β (1–40) and amyloid- β (1–42) form different fibrillar structures under identical conditions. **Biochemical Journal**, v. 404, n. 1, p. 63–70, 2007.
25. FALLER, P.; HUREAU, C.; BERTHOUMIEU, O. Role of Metal Ions in the Self-

assembly of the Alzheimer ' s Amyloid - β Peptide. **Inorganic Chem**, v. 52, p. 12193–12206, 2013.

26. BALL, K. A.; PHILLIPS, A. H.; NERENBERG, P. S.; FAWZI, N. L.; WEMMER, D. E.; HEAD-GORDON, T. Homogeneous and Heterogeneous Tertiary Structure Ensembles of Amyloid- β Peptides. 2011.

27. GREMER, L.; SCHÖLZEL, D.; SCHENK, C.; REINARTZ, E.; LABAHN, J.; RAVELLI, R. B. G.; TUSCHE, M.; LOPEZ-IGLESIAS, C.; HOYER, W.; HEISE, H.; WILLBOLD, D.; SCHRÖDER, G. F. Fibril structure of amyloid- b (1 – 42) by cryo – electron microscopy. v. 119, n. October, p. 116–119, 2017.

28. STROUD, J. C.; LIU, C.; TENG, P. K.; EISENBERG, D. Toxic fibrillar oligomers of amyloid- β have cross- β structure. v. 109, n. 20, p. 7717–7722, 2012.

29. RITTER, C.; ADRIAN, M.; RIEK-LOHER, D.; BOHRMANN, B.; DO, H.; SCHUBERT, D.; RIEK, R. 3D structure of Alzheimer ' s amyloid- β (1 – 42) fibrils. 2005.

30. HEFTI, F.; GOURE, W. F.; JERECIC, J.; IVERSON, K. S.; WALICKE, P. A.; KRAFFT, G. A. The case for soluble A β oligomers as a drug target in Alzheimer's disease. **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 34, n. 5, p. 261–266, 2013.

31. TÖUGU, V.; TIIMAN, A.; PALUMAA, P. Interactions of Zn(ii) and Cu(ii) ions with Alzheimer's amyloid-beta peptide. Metal ion binding, contribution to fibrillization and toxicity. **Metallomics**, v. 3, n. 3, p. 250, 2011.

32. FEAGA, H. A.; MADUKA, R. C.; FOSTER, M. N.; SZALAI, V. A. Affinity of Cu⁺ for the copper-binding domain of the amyloid- β peptide of Alzheimer's disease. **Inorganic Chemistry**, v. 50, n. 5, p. 1614–1618, 2011.

33. DREW, S. C.; BARNHAM, K. J. The Heterogeneous Nature of Cu²⁺ Interactions with Alzheimer's Amyloid- β Peptide. **Accounts of Chemical Research**, v. 44, n. 11, p. 1146–1155, 2011.

34. BORGHESANI, V.; ALIES, B.; HUREAU, C. Cu^{II} Binding to Various Forms of Amyloid- β Peptides: Are They Friends or Foes? **European Journal of Inorganic Chemistry**, p. 7–15, 2017.

35. ATRIÁN-BLASCO, E.; CONTE-DABAN, A.; HUREAU, C. Mutual interference of Cu and Zn ions in Alzheimer's disease: perspectives at the molecular level. **Dalton Trans.**, v. 46, n. 38, p. 12750–12759, 2017.

36. TSVETKOV, P. O.; KULIKOVA, A. A.; GOLOVIN, A. V.; TKACHEV, Y. V.; ARCHAKOV, A. I.; KOZIN, S. A.; MAKAROV, A. A. Minimal Zn²⁺ binding site of amyloid- β .

Biophysical Journal, v. 99, n. 10, p. 84–86, 2010.

37. NARAYAN, P.; KRISHNARJUNA, B.; VISHWANATHAN, V.; JAGADEESH KUMAR, D.; BABU, S.; RAMANATHAN, K. V.; EASWARAN, K. R. K.; NAGENDRA, H. G.; RAGHOTHAMA, S. Does Aluminium Bind to Histidine? An NMR Investigation of Amyloid β 12 and Amyloid β 16 Fragments. **Chemical Biology and Drug Design**, v. 82, n. 1, p. 48–59, 2013.

38. BUDIMIR, A. Metal ions, Alzheimer's disease and chelation therapy. **Acta Pharmaceutica**, v. 61, n. 1, p. 1–14, 2011.

39. ALIES, B.; RENAGLIA, E.; RÓZGA, M.; BAL, W.; FALLER, P.; HUREAU, C. Cu(II) affinity for the Alzheimer's peptide: Tyrosine fluorescence studies revisited. **Analytical Chemistry**, v. 85, n. 3, p. 1501–1508, 2013.

40. NASICA-LABOUZE, J.; NGUYEN, P. H.; STERPONE, F.; BERTHOUMIEU, O.; BUCHETE, N. V.; COTÉ, S.; DE SIMONE, A.; DOIG, A. J.; FALLER, P.; GARCIA, A.; LAIO, A.; LI, M. S.; MELCHIONNA, S.; MOUSSEAU, N.; MU, Y.; PARAVASTU, A.; PASQUALI, S.; ROSENMAN, D. J.; STRODEL, B.; TARUS, B.; VILES, J. H.; ZHANG, T.; WANG, C.; DERREUMAUX, P. Amyloid β Protein and Alzheimer's Disease: When Computer Simulations Complement Experimental Studies. **Chemical Reviews**, v. 115, n. 9, p. 3518–3563, 2015.

41. FALLER, P.; HUREAU, C. A bioinorganic view of Alzheimer's disease: When misplaced metal ions (Re)direct the electrons to the wrong target. **Chemistry - A European Journal**, v. 18, n. 50, p. 15910–15920, 2012.

42. JIANG, D.; ZHANG, L.; GRANT, G. P.; DUDZIK, C. G.; CHEN, S.; PATEL, S.; HAO, Y.; MILLHAUSER, G. L.; ZHOU, F. Elevated Copper Binding Strength of Amyloid-beta Aggregates Enables Their Copper Sequestration from Albumin: a Pathway to Accumulation of Copper in Senile Plaques. **Biochemistry**, 2012.

43. ALIES, B.; BADEI, B.; FALLER, P.; HUREAU, C. Reevaluation of copper(I) affinity for amyloid- β peptides by competition with ferrozine - An unusual copper(I) indicator. **Chemistry - A European Journal**, v. 18, n. 4, p. 1161–1167, 2012.

44. XIAO, Z.; GOTTSCHLICH, L.; VAN DER MEULEN, R.; UDAGEDARA, S. R.; WEDD, A. G. Evaluation of quantitative probes for weaker Cu(I) binding sites completes a set of four capable of detecting Cu(I) affinities from nanomolar to attomolar. **Metalomics : integrated biometal science**, v. 5, n. 5, p. 501–13, 2013.

45. FALLER, P.; HUREAU, C.; BERTHOUMIEU, O. Role of metal ions in the self-

assembly of the Alzheimer's amyloid- β peptide. **Inorganic Chemistry**, v. 52, n. 21, p. 12193–12206, 2013.

46. KARR, J. W.; SZALAI, V. A. Cu(II) binding to monomeric, oligomeric, and fibrillar forms of the Alzheimer's disease amyloid- β peptide. **Biochemistry**, v. 47, n. 17, p. 5006–5016, 2008.

47. LI, S. Y.; WANG, X. B.; KONG, L. Y. Design, synthesis and biological evaluation of imine resveratrol derivatives as multi-targeted agents against Alzheimer's disease. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 71, p. 36–45, 2014.

48. BONDY, S. C.; GUO-ROSS, S. X.; TRUONG, A. T. Promotion of transition metal-induced reactive oxygen species formation by β -amyloid. **Brain Research**, v. 799, n. 1, p. 91–96, 1998.

49. DONNELLY, P. S.; CARAGOUNIS, A.; DU, T.; LAUGHTON, K. M.; VOLITAKIS, I.; CHERNY, R. A.; SHARPLES, R. A.; HILL, A. F.; LI, Q. X.; MASTERS, C. L.; BARNHAM, K. J.; WHITE, A. R. Selective intracellular release of copper and zinc ions from bis(thiosemicarbazonato) complexes reduces levels of Alzheimer disease amyloid- β peptide. **Journal of Biological Chemistry**, v. 283, n. 8, p. 4568–4577, 2008.

50. SAILAJA. KALIDASU, Y. K. Validation of selected Anti- Alzheimer ' s drugs through Lipinski rule of five. **Journal of Pharmacy Research**, v. 5, n. 4, p. 2174–2177, 2012.

51. OF, I.; RULE, L.; FIVE, O. F. CHAPTER I –™ APPLICATION OF LIPINSKI RULE OF FIVE -. [s.d.].

52. FARRELL, N. Biomedical uses and applications of inorganic chemistry. An overview. **Coordination Chemistry Reviews**, v. 232, n. 1–2, p. 1–4, 2002.

53. EL BALKHI, S.; TROCELLO, J. M.; POUPON, J.; CHAPPUIS, P.; MASSICOT, F.; GIRARDOT-TINANT, N.; WOIMANT, F. Relative exchangeable copper: A new highly sensitive and highly specific biomarker for Wilson's disease diagnosis. **Clinica Chimica Acta**, v. 412, n. 23–24, p. 2254–2260, 2011.

54. SCHÄFER, S.; PAJONK, F. G.; MULTHAUP, G.; BAYER, T. A. Copper and clioquinol treatment in young APP transgenic and wild-type mice: Effects on life expectancy, body weight, and metal-ion levels. **Journal of Molecular Medicine**, v. 85, n. 4, p. 405–413, 2007.

55. MELOV, S. ... and C is for Clioquinol ' – the A β β Cs of Alzheimer ' s disease ' v. **Trend Neurosc.** 25, n. 3, p. 121–123, 2002.

56. DI VAIRA, M.; BAZZICALUPI, C.; ORIOLI, P.; MESSORI, L.; BRUNI, B.; ZATTA, P. Clioquinol, a drug for Alzheimer's disease specifically interfering with brain metal metabolism: Structural characterization of its zinc(II) and copper(II) complexes. **Inorganic Chemistry**, v. 43, n. 13, p. 3795–3797, 2004.

57. ADLARD, P. A.; CHERNY, R. A.; FINKELSTEIN, D. I.; GAUTIER, E.; ROBB, E.; CORTES, M.; VOLITAKIS, I.; LIU, X.; SMITH, J. P.; PEREZ, K.; LAUGHTON, K.; LI, Q. X.; CHARMAN, S. A.; NICOLAZZO, J. A.; WILKINS, S.; DELEVA, K.; LYNCH, T.; KOK, G.; RITCHIE, C. W.; TANZI, R. E.; CAPPAL, R.; MASTERS, C. L.; BARNHAM, K. J.; BUSH, A. I. Rapid Restoration of Cognition in Alzheimer's Transgenic Mice with 8-Hydroxy Quinoline Analogs Is Associated with Decreased Interstitial A β . **Neuron**, v. 59, n. 1, p. 43–55, 2008.

58. RODRÍGUEZ-RODRÍGUEZ, C.; DE GROOT, N. S.; RIMOLA, A.; ÁLVAREZ-LARENA, Á.; LLOVERAS, V.; VIDAL-GANCEDO, J.; VENTURA, S.; VENDRELL, J.; SODUPE, M.; GONZÁLEZ-DUARTE, P. Design, selection, and characterization of thioflavin-based intercalation compounds with metal chelating properties for application in alzheimer's disease. **Journal of the American Chemical Society**, v. 131, n. 4, p. 1436–1451, 2009.

59. PRZYBYLSKI, P.; HUCZYNSKI, A.; PYTA, K.; BRZEZINSKI, B.; BARTL, F. Biological Properties of Schiff Bases and Azo Derivatives of Phenols. **Current Organic Chemistry**, v. 13, n. 2, p. 124–148, 2009.

60. MELOV, S.; WOLF, N.; STROZYK, D.; DOCTROW, S. R.; BUSH, A. I. Mice transgenic for Alzheimer disease β -amyloid develop lens cataracts that are rescued by antioxidant treatment. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 38, n. 2, p. 258–261, 2005.

61. CUAJUNGCO, M. P.; LEES, G. J. Diverse effects of metal chelating agents on the neuronal cytotoxicity of zinc in the hippocampus. 1998.

62. IUPAC. **Compendium of Chemical Terminology Gold Book**. Version 2. ed. [s.l.] IUPAC, 2014.

63. TIDWELL, T. T. Hugo (Ugo) Schiff, Schiff bases, and a century of β -lactam synthesis. **Angewandte Chemie - International Edition**, v. 47, n. 6, p. 1016–1020, 2008.

64. MEYER, C. D.; JOINER, C. S.; STODDART, J. F. Template-directed synthesis employing reversible imine bond formation. **Chemical Society Reviews**, v. 36, n. 11, p. 1705, 2007.

65. CLAYDEN, J.; GREEVES, N.; WARREN, S. **Organic Chemistry**. [s.l: s.n.].
66. WONDRAK, G. T. Reactivity-based drug discovery using vitamin B(6)-derived pharmacophores. **Mini Rev Med Chem**, v. 8, n. 5, p. 519–528, 2008.
67. KHARADI, G. J. Antioxidant, tautomerism and antibacterial studies of Fe(III)-1,2,4- triazole based complexes. **Spectrochimica Acta - Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 110, p. 311–316, 2013.
68. CIGÁŇ, M.; GÁPLOVSKÝ, M.; JAKUSOVÁ, K.; DONOVALOVÁ, J.; HORVÁTH, M.; FILO, J.; GÁPLOVSKÝ, A. Isatin N2-diphenylhydrazones: new easily synthesized Vis-Vis molecular photoswitches. **RSC Advances**, v. 5, n. 77, p. 62449–62459, 2015.
69. CIGÁŇ, M.; JAKUSOVÁ, K.; DONOVALOVÁ, J.; FILO, J.; HORVÁTH, M.; GÁPLOVSKÝ, A. Fluorescence of isatin N-phenylsemicarbazones: Aggregation and hydrazide-hydrazonol tautomerism. **Journal of Physical Organic Chemistry**, v. 28, n. 5, p. 337–346, 2015.
70. CIGÁŇ, M.; JAKUSOVÁ, K.; GÁPLOVSKÝ, M.; FILO, J.; DONOVALOVÁ, J.; GÁPLOVSKÝ, A. Isatin phenylhydrazones: anion enhanced photochromic behaviour. **Photochemical & Photobiological Sciences**, p. 2064–2073, 2015.
71. JAKUSOVÁ, K.; CIGÁŇ, M.; DONOVALOVÁ, J.; GÁPLOVSKÝ, M.; SOKOLÍK, R.; GÁPLOVSKÝ, A. Light initiated E-Z and Z-E isomerization of isatinphenylsemicarbazones: Tautomeric equilibrium effect. **Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry**, v. 288, p. 60–69, 2014.
72. JAKUSOVÁ, K.; CIGÁŇ, M.; DONOVALOVÁ, J.; GÁPLOVSKÝ, M.; M.; GARAJ, V.; GÁPLOVSKÝ, M.; A. Isatinphenylsemicarbazones as efficient colorimetric sensors for fluoride and acetate anions - Anions induce tautomerism. **Spectrochimica Acta - Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 123, p. 421–429, 2014.
73. RODRÍGUEZ-RODRÍGUEZ, C.; TELPOUKHOVSKAIA, M.; ORVIG, C. The art of building multifunctional metal-binding agents from basic molecular scaffolds for the potential application in neurodegenerative diseases. **Coordination Chemistry Reviews**, v. 256, n. 19–20, p. 2308–2332, 2012.
74. KHAN, F. A.; MAALIK, A. Advances in pharmacology of isatin and its derivatives: A review. **Tropical Journal of Pharmaceutical Research**, v. 14, n. 10, p. 1937–1942, 2015.
75. POPP, P. D. The Chemistry of Isatin. **Advances in Heterocyclic Chemistry**, v. 18, n. C, p. 1–58, 1975.

76. DA SILVA, B. N. M.; BASTOS, R. S.; SILVA, B. V.; PINTO, A. C. Síntese de 5-nitro-isatina e 5-cloro-isatina a partir da isonitrosoacetanilida. **Química Nova**, v. 33, n. 10, p. 2279–2282, 2010.

77. WATKINS, P.; CLOW, A.; GLOVER, V.; HALKET, J.; PRZYBOROWSKA, A.; SANDLER, M. Isatin, regional distribution in rat brain and tissues. **Neurochemistry international**, v. 17, n. 2, p. 321–3, 1990.

78. CHEN, M.; GAN, L.; LIN, S.; WANG, X.; LI, L.; LI, Y.; ZHU, C.; WANG, Y.; JIANG, B.; JIANG, J.; YANG, Y.; SHI, J. Alkaloids from the root of *Isatis indigotica*. **Journal of Natural Products**, v. 75, n. 6, p. 1167–1176, 2012.

79. JACKSON, P.; ATTALLA, M. I. N-Nitrosopiperazines form at high pH in post-combustion capture solutions containing piperazine: a low-energy collisional behaviour study. **Rapid communications in mass spectrometry: RCM**, v. 24, n. 24, p. 3567–3577, 2010.

80. KAUR, M.; SINGH, M.; CHADHA, N.; SILAKARI, O. **Oxindole: A chemical prism carrying plethora of therapeutic benefits**. [s.l.] Elsevier Ltd, 2016. v. 123

81. BHOJGUDE, S. S.; BHUNIA, A.; BIJU, A. T. Employing Arynes in Diels-Alder Reactions and Transition-Metal-Free Multicomponent Coupling and Arylation Reactions. **Accounts of Chemical Research**, v. 49, n. 9, p. 1658–1670, 2016.

82. SELEEM, H. S.; MOSTAFA, M.; STEFAN, S. L. Structural Diversity of 3d Complexes of an Isatinic Quinolyl Hydrazone. v. 1, n. 5, p. 67–72, 2011.

83. KLEINPETER, E.; BÖLKE, U.; KOCH, A. Subtle trade-off existing between (anti)aromaticity, push-pull interaction, keto-enol tautomerism, and steric hindrance when defining the electronic properties of conjugated structures. **Journal of Physical Chemistry A**, v. 114, n. 28, p. 7616–7623, 2010.

84. BAGROV, F. V. Condensation of 3-Hydroxyimino-2-butanone Hydrazone. v. 37, n. 1, p. 15–19, 2001.

85. PRIMOFIORE, G.; SETTIMO, F. DA; TALIANI, S.; MARINI, A. M.; NOVELLINO, E.; GRECO, G.; LAVECCHIA, A.; TRINCAVELLI, L.; COSTA, B.; MARTINI, C. Novel N- (Arylalkyl) indol-3-ylglyoxylylamides Targeted as Ligands of the Benzodiazepine Receptor: Synthesis , Biological Evaluation , and Molecular Modeling Analysis of the Structure-Activity Relationships †. p. 2286–2297, 2001.

86. F., D. S.; G., P.; A., D. S.; C., L. M.; F., S.; E., N.; G., G.; A., L.; E., B.; DA SETTIMO, F.; PRIMOFIORE, G.; DA SETTIMO, A.; LA MOTTA, C.; SIMORINI, F.; NOVELLINO, E.; GRECO,

G.; LAVECCHIA, A.; BOLDRINI, E. Novel, highly potent aldose reductase inhibitors: Cyano(2-oxo-2,3-dihydroindol-3-yl)acetic acid derivatives. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 46, n. 8, p. 1419–1428, 2003.

87. CERCHIARO, G.; SABOYA, P. L.; DA COSTA FERREIRA, A. M.; TOMAZELA, D. M.; EBERLIN, M. N. Keto-enolic equilibria of an isatin-schiff base copper(II) complex and its reactivity toward carbohydrate oxidation. **Transition Metal Chemistry**, v. 29, n. 5, p. 495–504, 2004.

88. CERCHIARO, G.; MARIA, A. Oxindoles and Copper Complexes with Oxindole-derivatives as Potential Pharmacological Agents Oxindoles and Copper Complexes with Oxindole-derivatives as Potential Pharmacological Agents. v. 17, n. 8, p. 1–36, 2006.

89. FERREIRA, A. M. C.; DOS SANTOS, M. L. P.; PEREIRA, E. M.; DAMASCENO, M. O.; ALVES, W. A. Mimics of copper proteins: structural and functional aspects. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 72, p. 51–7, 2000.

90. KATKAR, P.; COLETTA, A.; CASTELLI, S.; SABINO, G. L.; COUTO, R. A. A.; DA COSTA FERREIRA, A. M.; DESIDERI, A. Effect of oxindolimine copper(Cu^{II}) and zinc(Zn^{II}) complexes on human topoisomerase I activity. **Metallomics**, v. 6, n. 1, p. 117–125, 2014.

91. ANDRADE, W.; AFONSO, S.; FILHO, D. A.; ALMEIDA, R. H. DE; MARIA, A.; COSTA, D. Diimine copper (II) complexes as building blocks for microporous catalytic materials. v. 6, p. 294–299, 2003.

92. SILVA, P. P.; GUERRA, W.; DOS SANTOS, G. C.; FERNANDES, N. G.; SILVEIRA, J. N.; DA COSTA FERREIRA, A. M.; BORTOLOTTI, T.; TERENCE, H.; BORTOLUZZI, A. J.; NEVES, A.; PEREIRA-MAIA, E. C. Correlation between DNA interactions and cytotoxic activity of four new ternary compounds of copper(II) with N-donor heterocyclic ligands. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 132, n. 1, p. 67–76, 2014.

93. CERCHIARO, G.; MICKE, G. A.; TAVARES, M. F. M.; DA COSTA FERREIRA, A. M. Kinetic studies of carbohydrate oxidation catalyzed by novel isatin-Schiff base copper(II) complexes. **Journal of Molecular Catalysis A: Chemical**, v. 221, n. 1–2, p. 29–39, 2004.

94. PERRIN, D. D.; ARMAREGO, W. L. F. **Purification of laboratory chemicals**. 3rd ed. ed. [s.l.] Pergamon Press, 1988.

95. CERCHIARO, G.; FERREIRA, A. M. D. C. Oxindoles and copper complexes with oxindole-derivatives as potential pharmacological agents. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 17, n. 8, p. 1473–1485, 2006.

96. SILVERSTEIN, R. M.; WEBSTER, X. F.; KIEMLE, D. J. **Identificação espectrométrica de compostos orgânicos**. 6. ed. Rio de Janeiro: LTC, 2000.
97. PAVIA, D. L.; LAMPMAN, G. M.; KRIZ, G. S. **Introduction to Spectroscopy**. 3. ed. [s.l.] Brooks/Cole, 2001.
98. YOUSSEF, A. S. A.; HEMDAN, M. M.; EMARA, S. A.; KAMEL, R. M. Action of Hydrazines on 2-(2-Oxindolin-3-ylidene)malononitrile, (E , Z)-Ethyl 2-cyano-2-(2-oxindolin-3-ylidene)acetate and Isatin- β -thiosemicarbazone as a Source of Spiro Indoline-pyrazole Systems. **Journal of Heterocyclic Chemistry**, v. 52, n. 5, p. 1331–1336, set. 2015.
99. BOLOTIN, D. S.; IL'IN, M. V.; KOLESNIKOV, I. E.; SUSLONOV, V. V.; NOVOZHILOV, Y.; RONZHINA, O.; KRASAVIN, M.; BOYARSKIY, V. P.; KOEN, R.; ROODT, A. Fluorescent (pyrazolyl acetoxime)Zn^{II}complexes: Synthetic, structural, and photophysical studies. **Inorganica Chimica Acta**, v. 455, 2017.
100. JUDITH PERCINO, M.; CERÓN, M.; CASTRO, M. E.; RAMÍREZ, R.; SORIANO, G.; CHAPELA, V. M. (E)-2-[(2-hydroxybenzylidene)amino]phenylarsonic acid Schiff base: Synthesis, characterization and theoretical studies. **Journal of Molecular Structure**, v. 1081, p. 193–200, 2015.
101. JAKUSOVÁ, K.; DONOVALOVÁ, J.; GÁPLOVSKÝ, M.; CIGÁŇ, M.; STANKOVIČOVÁ, H.; GÁPLOVSKÝ, A. Self-association, tautomerism and E-Z isomerization of isatin- phenylsemicarbazones - Spectral study and theoretical calculations. **Journal of Physical Organic Chemistry**, v. 26, n. 10, p. 805–813, 2013.
102. DAVIDOVICH, P.; NOVIKOVA, D.; TRIBULOVICH, V.; SMIRNOV, S.; GURZHIY, V.; MELINO, G.; GARABADZHIU, A. First X-ray structural characterization of isatin Schiff base derivative. NMR and theoretical conformational studies. **Journal of Molecular Structure**, v. 1075, p. 450–455, 2014.
103. MARTINS, L. R. R.; CORTEZ, L. E. R.; DIAS-FILHO, B. P.; NAKAMURA, C. V.; FERREIRA, A. G.; CORTEZ, D. A. G. Atribuição dos deslocamentos químicos dos átomos de ¹H e ¹³C do acetato de acantoaustralida. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 16, n. 4, p. 490–496, 2006.
104. BHAND, S.; PATIL, R.; SHINDE, Y.; LANDE, D. N.; RAO, S. S.; KATHAWATE, L.; GEJJI, S. P.; WEYHERMÜLLER, T.; SALUNKE-GAWALI, S. Tautomerism in o-hydroxyanilino-1,4-naphthoquinone derivatives: Structure, NMR, HPLC and density functional theoretic investigations. **Journal of Molecular Structure**, v. 1123, p. 245–

260, 2016.

105. KHALIL, M. M. H. Molybdenum and Tungsten Tricarbonyl Complexes of Isatin with Triphenylphosphine. v. 2008, p. 6–9, 2008.

106. ADAMOVA, G. M.; POPONOVA, R. V. No Title. p. 1408–1413, 1981.

107. LANDGE, S. M.; TKATCHOUK, E.; BENÍTEZ, D.; LANFRANCHI, D. A.; ELHABIRI, M.; GODDARD, W. A.; APRAHAMIAN, I. Isomerization mechanism in hydrazone-based rotary switches: Lateral shift, rotation, or tautomerization? **Journal of the American Chemical Society**, v. 133, n. 25, p. 9812–9823, 2011.

108. CIGÁŇ, M.; JAKUSOVÁ, K.; DONOVALOVÁ, J.; SZÖCS, V.; GÁPLOVSKÝ, A. Electronic Supplementary Information (ESI) Isatin N -phenylsemicarbazone : Effect of substituent and concentration on. p. 1–16, 2014.

109. OKUDA-SHINAGAWA, N. M.; MOSKALENKO, Y. E.; JUNQUEIRA, H. C.; BAPTISTA, M. S.; MARQUES, C. M.; MACHINI, M. T. Fluorescent and Photosensitizing Conjugates of Cell-Penetrating Peptide TAT(47-57): Design, Microwave-Assisted Synthesis at 60 °C, and Properties. **ACS Omega**, v. 2, n. 11, p. 8156–8166, 2017.

110. SYME, C. D.; VILES, J. H. Solution ¹H NMR investigation of Zn²⁺ and Cd²⁺ binding to amyloid-beta peptide (Aβ) of Alzheimer's disease. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics**, v. 1764, n. 2, p. 246–256, 2006.

111. MA, Q.-F.; HU, J.; WU, W.-H.; LIU, H.-D.; DU, J.-T.; FU, Y.; WU, Y.-W.; LEI, P.; ZHAO, Y.-F.; LI, Y.-M. Characterization of copper binding to the peptide amyloid-β(1–16) associated with Alzheimer's disease. **Biopolymers**, v. 83, n. 1, p. 20–31, set. 2006.

112. ATHERTON, E.; BURY, C.; SHEPPARD, R. C.; WILLIAMS, B. J. Stability of fluorenylmethoxycarbonylamino groups in peptide synthesis. Cleavage by hydrogenolysis and by dipolar aprotic solvents. **Tetrahedron Letters**, v. 20, n. 32, p. 3041–3042, 1979.

113. AIBERICIO, F.; PONS, M.; PEDROSO, E.; GIRALT, E. Comparative Study of Supports for Solid-Phase Coupling of Protected-Peptide Segments. **Journal of Organic Chemistry**, v. 54, n. 2, p. 360–366, 1989.

114. DUEHOLM, K. L.; EGHOLM, M.; BEHRENS, C.; CHRISTENSEN, L.; HANSEN, H. F.; VULPIUS, T.; PETERSEN, K. H.; BERG, R. H.; NIELSEN, P. E.; BUCHARDT, O. Synthesis of Peptide Nucleic Acid Monomers Containing the Four Natural Nucleobases: Thymine, Cytosine, Adenine, and Guanine and Their Oligomerization. **Journal of Organic Chemistry**, v. 59, n. 19, p. 5767–5773, 1994.

115. BALLARD, C.; GAUTHIER, S.; CORBETT, A.; BRAYNE, C.; AARSLAND, D.; JONES, E. Alzheimer's disease. **The Lancet**, v. 377, n. 9770, p. 1019–1031, 2011.

116. FALLER, P.; HUREAU, C.; LA PENNA, G. Metal ions and intrinsically disordered proteins and peptides: from Cu/Zn amyloid-beta to general principles. **Acc Chem Res**, v. 47, p. 2252–2259, 2014.

117. FURLAN, S.; HUREAU, C.; FALLER, P.; LA PENNA, G. Modeling copper binding to the amyloid- β peptide at different pH: Toward a molecular mechanism for Cu reduction. **Journal of Physical Chemistry B**, v. 116, n. 39, p. 11899–11910, 2012.

118. RODRÍGUEZ-RODRÍGUEZ, C.; SÁNCHEZ DE GROOT, N.; RIMOLA, A.; ALVAREZ-LARENA, A.; LLOVERAS, V.; VIDAL-GANCEDO, J.; VENTURA, S.; VENDRELL, J.; SODUPE, M.; GONZÁLEZ-DUARTE, P. Design , Selection , and Characterization of Thioflavin-Based Intercalation Compounds with Metal Chelating Properties for Application in Alzheimer ' s Disease. **J Am Chem Soc.**, v. 131, n. 4, p. 1436–1451, 2009.

119. GANS, P.; SABATINI, A.; VACCA, A. Investigation of equilibria in solution. Determination of equilibrium constants with the HYPERQUAD suite of programs. **Talanta**, v. 43, n. 10, p. 1739–1753, 1996.

120. ZHANG, Q.; HU, X.; WANG, W.; YUAN, Z. Study of a Bifunctional A β Aggregation Inhibitor with the Abilities of Antiamyloid- β and Copper Chelation. **Biomacromolecules**, v. 17, n. 2, p. 661–668, 2016.

121. ZAWISZA, I.; RÓZGA, M.; BAL, W. Affinity of copper and zinc ions to proteins and peptides related to neurodegenerative conditions (A β , APP, α -synuclein, PrP). **Coordination Chemistry Reviews**, v. 256, n. 19–20, p. 2297–2307, 2012.

122. ROYCHAUDHURI, R.; YANG, M.; HOSHI, M. M.; TELOW, D. B. Amyloid β -protein assembly and Alzheimer disease. **Journal of Biological Chemistry**, v. 284, n. 8, p. 4749–4753, 2009.

123. HATCHER, L. Q.; HONG, L.; BUSH, W. D.; CARDUCCI, T.; SIMON, J. D.; HATCHER, L. Q.; HONG, L.; BUSH, W. D.; CARDUCCI, T.; SIMON, J. D. Quantification of the Binding Constant of Copper (II) to the Amyloid-Beta Peptide. **J. Phys. Chem.**, v. 112, n. 11, p. 8160–8164, 2007.

Anexos - 1

A1.1 Dados Isatina

A1. 1. Espectro de ¹H RMN (300 MHz) do precursor ISATINA em DMSO-d₆.

A1. 2. Espectro de UV/VIS da isatina em metanol, meio ácido e meio básico.

A1.2 Espectros de RMN 2D

A1.2.1 Isahpy

A1. 3. Espectro 2D, COSY (400 MHz) do composto isahpy em DMSO-d₆.

A1. 4. Espectro 2D de 2D-HMQC, (400 MHz) para o isahpy em DMSO-d₆.

A1. 5. Espectro 2D HMBC (400 MHz), do composto isahpy em DMSO-d₆. (Abaixo) expansão da região aromática do espectro.

A1.2.2 Isahim

A1. 6. Espectro 2D de COSY (400 MHz) em DMSO-d₆ do composto isahim expandido na região aromática. Espectro obtido quatro dias após o preparo da amostra.

A1. 7. Espectro de 1H-1H-COSY (400 MHz) do composto isahim recém preparado em DMSO-d₆.

A1. 8. Espectro 2D HMQC (400 MHz) do composto isahim em DMSO-d₆. Expansão da região de alto campo 4,5-1,5 ppm. (Abaixo) expansão da região aromática do espectro.

A1. 9. Espectro 2D HMBC do isahim (400 MHz). (Acima) expansão da região de alto campo. (Abaixo) expansão da região aromática do espectro.

isapn_26062015 dms0.004.esp

HMBC

A1. 10. Espectro 2D HMBC do isapn (500 MHz), DMSO-d₆.

isapn_26062015 dms0.003.esp

HSQC

A1. 11. Espectro 2D HSQC do isapn (500 MHz), DMSO- d_6 .

isapn cosy.esp

A1. 12. Espectro 2D COSY em DMSO- d_6 em 500 MHz.

Anexos – 2

A2.1 Análises Padrão de Acompanhamento de Sínteses Peptídicas

Teste de Kaiser. O teste de Kaiser serve para analisar a presença de aminas primárias através da reação com ninhidrina. A reação pode ser observada pela formação de uma intensa coloração azul. No caso de aminas secundárias se observa uma coloração vermelho acastanhado. Os testes seguem com o seguinte procedimento:

Transferência de alguns grânulos da resina para um tubo de ensaio.

Adição ao tubo das soluções de ninhidrina (5g em 100 mL de etanol), fenólica (80g de fenol em 20 mL de etanol) e salina de KCl (2 mL de uma solução aquosa 0,001 M de KCl em 98 mL de piridina).

Aquecimento da solução contendo a resina a 100°C durante 5 min. Se ficar azul, o teste é positivo.

Análise espectrofotométrica da concentração de Fmoc. A análise da concentração de Fmoc é necessária cada vez que se procede com a reação de desproteção da resina ou da cadeia peptídica. Normalmente, à cada adição de um aminoácido (reação de acoplamento) procede-se com a reação de desproteção com a consequente liberação de Fmoc. A análise consiste nas seguintes etapas:

- Lavagem da resina com DMF e filtração da solução de lavagem.
- Diluição de uma porção da solução em um volume conhecido de piperidina:DMF (1:4).
- Agitação da mistura e repouso por alguns minutos.
- Análise do máximo de absorção em 301 nm.
- Cálculo da concentração de Fmoc a partir da Absortividade Molar ($\epsilon = 7800\text{cm}^{-1}\text{M}^{-1}$).

Anexos – 3

A3. 1. Constante obtida a partir das proporções entre A β_{1-16} e Isahim. Os cálculos foram feitos no programa **HypSpec2014**^[119]. Titulação do composto *isahim* com o peptídeo A β_{1-16} em meio aquoso Concentração inicial de isahim 50 μ M. Observação da formação da espécie [(A β_{1-16}) $_2$.isahim].

Anexos - 4

Ácido aspártico

Asp (D)

Ácido Glutâmico

Glu (A)

Alanina

Ala (A)

Aspargina

Asn (N)

Arginina

Arg (R)

Cisteína

Cys (C)

Fenilalanina

Phe(F)

Glicina

Gly (G)

Glutamina

Gln (Q)

Histidina

His (H)

Isoleucina

Ile (I)

Leucina

Leu (L)

Lisina

Lys (K)

Metionina

Met (M)

Prolina

Pro (P)

Serina

Ser (S)

Tirosina

Try (Y)

Treonina

Thr (T)

Triptofano

Trp (W)

Valina

Val (V)