

UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE

Adriana Garcia

**Derivados adamantoides multialvos para a terapia da doença de Alzheimer:
testes *in vitro* e *in vivo* em modelos animais não convencionais**

Juiz de Fora

2025

Adriana Garcia

**Derivados adamantoides multialvos para a terapia da doença de Alzheimer:
testes *in vitro* e *in vivo* em modelos animais não convencionais**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Saúde da Universidade Federal de Juiz de Fora, como requisito parcial à obtenção do Título de Doutora em Saúde. Área de concentração: Saúde Brasileira.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Nádia Rezende Barbosa Raposo

Coorientador: Prof. Dr. Mauro Vieira de Almeida

Juiz de Fora

2025

Ficha catalográfica elaborada através do programa de geração automática da Biblioteca Universitária da UFJF, com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

Garcia, Adriana .

Derivados adamantoides multialvos para a terapia da doença de Alzheimer: testes in vitro e in vivo em modelos animais não convencionais / Adriana Garcia. -- 2025.

112 f. : il.

Orientadora: Nádia Rezende Barbosa Raposo

Coorientador: Mauro Vieira de Almeida

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Juiz de Fora, Faculdade de Medicina. Programa de Pós-Graduação em Saúde, 2025.

1. doença de Alzheimer. 2. acetilcolinesterase. 3. derivados adamantoides. 4. moléculas híbridas. 5. Caenorhabditis elegans. I. Raposo, Nádia Rezende Barbosa , orient. II. Almeida, Mauro Vieira de, coorient. III. Título.

Adriana Garcia

Derivados adamantoides multialvos para a terapia da doença de Alzheimer: testes *in vitro* e *in vivo* em modelos animais não convencionais

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Saúde da Universidade Federal de Juiz de Fora como requisito parcial à obtenção do título de Doutora em Saúde. Área de concentração: Saúde Brasileira.

Aprovada em 12 de setembro de 2025.

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Nádia Rezende Barbosa Raposo - Orientadora

Universidade Federal de Juiz de Fora

Prof. Dr. Mauro Vieira de Almeida - Coorientador

Universidade Federal de Juiz de Fora

Prof. Dr. Alexandre Cuin

Universidade Federal de Juiz de Fora

Profa. Dra. Roberta Passos do Espírito Santo

Universidade Federal de Juiz de Fora

Profa. Dra. Eloah Pereira Ávila

Universidade Federal de São João Del-Rei

Profa. Dra. Luciana Dornelas Pinto

Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro

Juiz de Fora, 15/09/2025.



Documento assinado eletronicamente por **Nadia Rezende Barbosa Raposo, Professor(a)**, em 15/09/2025, às 13:16, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Roberta Passos do Espirito Santo, Professor(a)**, em 15/09/2025, às 14:03, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Mauro Vieira de Almeida, Professor(a)**, em 15/09/2025, às 14:18, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Luciana Dornelas Pinto, Usuário Externo**, em 15/09/2025, às 14:22, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Alexandre Cuin, Professor(a)**, em 15/09/2025, às 15:58, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Eloah Pereira Ávila, Usuário Externo**, em 15/09/2025, às 16:44, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no Portal do SEI-Ufjf (www2.ufjf.br/SEI) através do ícone Conferência de Documentos, informando o código verificador **2616873** e o código CRC **578A7999**.

AGRADECIMENTOS

À Deus por se fazer presente em minha vida, em todos os momentos, me dando a certeza de que todo esforço para o bem é recompensado.

À minha orientadora, Professora Nádia Resende Barbosa Raposo, por apostar em mim e acreditar em meu potencial, você é um exemplo extraordinário como pessoa, professora e pesquisadora.

Ao meu coorientador, Professor Mauro Vieira de Almeida, por ter acreditado mais em mim do que eu mesma, por todos os ensinamentos, pela atenção e disponibilidade sempre que precisei.

À professora Heveline Silva, pela colaboração com os testes de viabilidade celular, em especial, pelo incentivo e por se fazer presente mesmo à distância.

Aos professores Hélio F. dos Santos pelos cálculos teóricos, José Marcello pelos testes com *Allium cepa* e Félix Soares pela colaboração com os testes *in vivo* deste trabalho.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Saúde que contribuíram de forma direta ou indireta para meu aprendizado.

Aos meus companheiros de profissão, funcionários do Departamento de Química, pela amizade, atenção e ajuda, em especial à Janaína e Barbara por me incentivarem diariamente nesses últimos 15 anos.

Aos amigos do Laboratório de Orgânica e do NUPICS, pelo aprendizado, dicas e risadas, vocês tornaram essa jornada mais leve.

À minha família e amigos por estarem sempre presentes em minha vida, me incentivando e torcendo por mim mesmo nas horas mais difíceis.

Ao Kleverton, meu marido, por toda compreensão com minhas ausências, estresses e às vezes choro. Obrigada por todo amor e cuidado, mas principalmente obrigada por ter me dado a razão para cada sacrifício feito valer a pena, nossos filhos Rafael e Felipe.

A todos que de algum modo, com seu olhar, sorriso, compreensão e apoio colaboraram com esta conquista, meus sinceros agradecimentos.

À UFJF e CNPq pelo apoio financeiro e por tornarem possível essa conquista.

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

Marie Curie

RESUMO

A doença de Alzheimer (DA) é caracterizada pela deposição de placas β -amiloides e pela formação de emaranhados neuro-fibrilares de proteína *tau*. Atualmente, no Brasil, apenas cinco medicamentos estão disponíveis para seu tratamento: donepezil, rivastigmina, galantamina (inibidores da enzima acetilcolinesterase – AChE), memantina (antagonista no receptor *N*-metil-D-aspartato - NMDAr) e o donanemabe (anticorpo monoclonal antiamiloidogênico). Esses tratamentos são incapazes de deter o avanço da perda neuronal, apenas melhorando temporariamente os sintomas, fazendo com que a busca por compostos mais eficazes se torne uma prioridade. A fim de contribuir para esta busca, o presente trabalho propôs sintetizar e caracterizar sete compostos adamantoides aminados que, devido a sua estrutura molecular híbrida, potencialmente seriam capazes de interagir tanto com a AChE quanto com o NMDAr. A síntese dos compostos orgânicos foi realizada em duas etapas: substituição da hidroxila do adamantano-1-metanol por iodo; seguida da substituição do iodo pelo grupo amino desejado. A caracterização foi feita por ressonância magnética nuclear (RMN) e espectroscopia vibracional na região de infravermelho (IV). Os compostos foram avaliados *in vitro* quanto à capacidade de inibição AChE (teste de Ellman) e atividade antioxidante frente ao 2,2-difenil-1-picril-hidrazila (DPPH). A citogenotoxicidade foi avaliada pelo teste *Allium cepa* e a toxicidade aguda pelo ensaio com *Artemia salina*. A citotoxicidade foi determinada em cultura de células gliais (U87) e fibroblasto de camundongo (L929) pelo teste MTT. O composto mais promissor dicloridrato de *N*¹-(tríciclo[3.3.1.1^{3,7}]dec-1-ilmetil)-1,4-butanodiamina (**AG03**) foi avaliado *in vivo* quanto a ação neurológica utilizando diferentes cepas *C. elegans*. Os resultados indicaram que a rota sintética proposta foi tecnicamente viável, sendo possível obter os compostos puros e com bons rendimentos (50 a 85%). *In vitro*, apresentaram alta capacidade de inibição da AChE (78 a 97%), entretanto, baixa atividade antioxidante (inferior a 35%). As amostras tiveram diferentes performances citotóxicas frente às células utilizadas. Dentre as moléculas sintetizadas, o **AG03** demonstrou maior capacidade de inibição enzimática (iAChE 97%), não foi citogenotóxico (para a concentração 0,06 mg/L) e não foi tóxico para as larvas do microcrustáceo *Artemia salina*. Como conclusão podemos afirmar que os compostos se mostraram promissores iAChE, sendo que o **AG03** apresentou efeito multialvo, agindo como modulador da resposta colinérgica e glutamatérgica nos ensaios *in vivo*. Dessa forma, o presente trabalho apresenta uma importante contribuição para a pesquisa de tratamentos para DA.

Palavras-chave: doença de Alzheimer; acetilcolinesterase; NMDAr; derivados adamantoides; moléculas híbridas; *Caenorhabditis elegans*.

ABSTRACT

Alzheimer's disease (AD) is characterized by the deposition of β -amyloid plaques and the formation of neurofibrillary tangles of *tau* protein. Currently, in Brazil, only five drugs are available for its treatment: donepezil, rivastigmine, galantamine (acetylcholinesterase inhibitors - AChE), memantine (an *N*-methyl-D-aspartate receptor antagonist - NMDA), and donanemab (an anti-amyloidogenic monoclonal antibody). These treatments are unable to prevent neuronal loss, temporarily avoiding the progression of the symptoms, making the search for more effective compounds a priority. To contribute to this goal, the present work aimed to synthesize and characterize seven adamantoid-aminated compounds with a hybrid molecular structure that could interact with AChE and NMDAR. The synthesis of the organic compounds was carried out in two steps: replacement of the hydroxyl group of adamantane-1-methanol with iodine, followed by replacement of the iodine with the amino group. Characterization was performed by nuclear magnetic resonance (NMR) and infrared vibrational spectroscopy (IR). The compounds were evaluated in vitro for AChE inhibition capacity (Ellman test) and antioxidant activity against 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH). Cytogenotoxicity was assessed by the *Allium cepa* test and acute toxicity by the *Artemia salina* assay. Cytotoxicity was determined in glial cells (U87) and mouse fibroblasts (L929) by the MTT test. The most promising compound, *N*¹-(tricyclo[3.3.1.1^{3,7}]dec-1-ylmethyl)-1,4-butanediamine dihydrochloride (**AG03**), was evaluated in vivo for neurological activity using different *C. elegans* strains. The results indicated that the proposed synthetic route was technically feasible, allowing the obtain pure compounds in good yields (50 to 85%). In vitro, they had high AChE inhibition capacity (78 to 97%), but low antioxidant activity (less than 35%). The samples had different cytotoxic effects against the cells used. Among the synthesized molecules, **AG03** demonstrated the greatest enzyme inhibition capacity (97% AChE), was not cytogenotoxic (at a concentration of 0.06 mg/L), and was not toxic to the larvae of the microcrustacean *Artemia salina*. Ultimately, the compounds exhibit high AChE inhibition, and **AG03** shows a multitarget effect, modulating cholinergic and glutamatergic responses in *in vivo* assays. Therefore, this work represents a relevant contribution to research on AD's treatments.

Keywords: Alzheimer disease; acetylcholinesterase; NMDAR; adamantoid derivatives; hybrid molecules; *Caenorhabditis elegans*.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1	–	População residente no Brasil (%) segundo grupos etários específicos, entre 1980 e 2022.....	19
Figura 2	–	Suscetibilidade genética à doença de Alzheimer (DA).....	21
Figura 3	–	Alterações no cérebro do paciente com Alzheimer.....	22
Figura 4	–	Mecanismo de patogênese na doença de Alzheimer.....	23
Figura 5	–	Sinapse colinérgica.....	25
Figura 6	–	Mecanismo da hidrólise da ACh no sítio ativo da AChE.....	26
Figura 7	–	Sítios ativos da acetilcolinesterase.....	27
Figura 8	–	Alterações cerebrais na cascata amiloide.....	28
Figura 9	–	Via não-amiloidogênica x via amiloidogênica.....	29
Figura 10	–	Via de sinalização PI3K/Akt/GSK-3.....	30
Figura 11	–	Tau perdendo sua função estrutural no microtúbulo.....	32
Figura 12	–	Toxicidade da <i>tau</i> na doença de Alzheimer (DA).....	33
Figura 13	–	Funções da micróglia na DA.....	34
Figura 14	–	Estrutura química dos fármacos aprovados pela FDA, como inibidores da acetilcolinesterase para o tratamento da DA.....	37
Figura 15	–	Estrutura química da tacrina.....	38
Figura 16	–	Farmacóforos do donepezil.....	38
Figura 17	–	Estrutura química da memantina.....	40
Figura 18	–	Cascata de ativação dos receptores NMDA x memantina.....	41
Figura 19	–	Alterações patológicas na doença de Alzheimer e possíveis intervenções farmacológicas.....	43
Figura 20	–	Esquema da síntese dos compostos aminados derivados do adamantano.....	46
Figura 21	–	Mecanismo proposto para substituição da hidroxila alcoólica por iodo utilizando a mistura de iodo/trifenilfosfina/imidazol.....	46
Figura 22	–	Aminas utilizadas para reagir com o iodeto de adamantila.....	48
Figura 23	–	Compostos propostos derivados da adamantila com as aminas escolhidas.....	48
Figura 24	–	Preparo dos bulbos de <i>Allium cepa</i>	51

Figura 25	–	Estruturas químicas de compostos com anel adamantano.....	56
Figura 26	–	Espectro de infravermelho do composto AG01	57
Figura 27	–	RMN de ^1H do composto AG01 (500 MHz, CD_3OD).....	58
Figura 28	–	RMN de ^{13}C do composto AG01 (125 MHz, CD_3OD).....	58
Figura 29	–	Espectro de infravermelho do composto AG02	59
Figura 30	–	RMN de ^1H do composto AG02 (500 MHz, CD_3OD).....	59
Figura 31	–	RMN de ^{13}C do composto AG02 (125 MHz, CD_3OD).....	60
Figura 32	–	Espectro de infravermelho do composto AG03	61
Figura 33	–	RMN de ^1H do composto AG03 (500 MHz, CD_3OD).....	61
Figura 34	–	RMN de ^{13}C do composto AG03 (125 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$).....	62
Figura 35	–	Espectro de infravermelho do composto AG04	63
Figura 36	–	RMN de ^1H do composto AG04 (500 MHz, CD_3OD).....	63
Figura 37	–	RMN de ^{13}C do composto AG04 (125 MHz, CD_3OD).....	64
Figura 38	–	Espectro de infravermelho do composto AG05	65
Figura 39	–	RMN de ^1H do composto AG05 (500 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$).....	65
Figura 40	–	RMN de ^{13}C do composto AG05 (125 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$).....	66
Figura 41	–	Espectro de infravermelho do composto AG06	66
Figura 42	–	RMN de ^1H do composto AG06 (500 MHz, CD_3OD).....	67
Figura 43	–	RMN de ^{13}C do composto AG06 (125 MHz, CD_3OD).....	67
Figura 44	–	Espectro de infravermelho do composto AG07	68
Figura 45	–	RMN de ^1H do composto AG07 (500 MHz, CD_3OD).....	69
Figura 46	–	RMN de ^{13}C do composto AG07 (125 MHz, CD_3OD).....	69
Figura 47	–	Viabilidade celular dos compostos AG01 a AG04 em glioblastoma humano.....	74
Figura 48	–	Viabilidade celular dos compostos AG05 a AG07 em glioblastoma humano.....	74
Figura 49	–	Viabilidade celular dos compostos AG01 a AG04 em fibroblasto de camundongo.....	75
Figura 50	–	Viabilidade celular dos compostos AG05 a AG07 em fibroblasto de camundongo.....	75
Figura 51	–	Índice mitótico (IM) nos diferentes tratamentos com o composto AG03	76
Figura 52	–	Análise de fases: índices profásico, metafásico, anafásico e telofásico...	77

Figura 53	–	Efeitos do AG03 e da memantina (MEM) na mortalidade e nos parâmetros corporais em <i>Caenorhabditis elegans</i> : parâmetros avaliados após 48 horas de exposição.....	81
Figura 54	–	Efeitos do tratamento com AG03 e memantina na alimentação e respostas mecanossensoriais em <i>C. elegans</i>	83
Figura 55	–	Efeito da variação das concentrações de AG03 no teste de bombeamento faríngeo em <i>C. elegans</i>	84
Figura 56	–	Anatomia e neurônios da faringe do <i>C. elegans</i>	85
Figura 57	–	Desenho esquemático dos neurônios mecanossensoriais na extremidade anterior e no corpo do <i>C. elegans</i>	86
Figura 58	–	Efeitos do tratamento com AG03 e memantina nos parâmetros da atividade locomotora em <i>C. elegans</i>	87

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	– Capacidade inibitória da acetilcolinesterase e atividade antioxidante.....	71
Tabela 2	– Atividade citotóxica frente as linhagens celulares - IC ₅₀ (μM ± DP).....	73
Tabela 3	– Percentual de alterações cromossômicas e micronúcleos.....	78
Tabela 4	– Concentração letal (CL ₅₀) que induz toxicidade aguda para <i>Artemia salina</i>	79

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Acetil-CoA	Acetil-coenzima A
ACh	Acetilcolina
AChE	Acetilcolinesterase
AMPA	ácido α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolpropiónico
ANOVA	Análise de Variância
ApoE	Apoliproteína E
APP	<i>Amyloid precursor protein</i> (Proteína precursora amiloide)
A β	Proteína β -amiloide
BACE	<i>β-amyloid cleaving enzyme</i> (β -secretase)
BDNF	<i>Brain derived neurotrophic fator</i> (Fator neurotrófico derivado do cérebro)
BHE	Barreira hematoencefálica
BuChE	Butirilcolinesterase
CAS	<i>Chemical Abstract Service</i>
CAS	<i>Catalytic Active Site</i> (Sítio ativo catalítico)
CCBs	Calcium Channel Blockers (bloqueador de canal de cálcio)
CE ₅₀	Concentração efetiva que inibe 50%
DA	Doença de Alzheimer
DMSO	Dimetilsulfóxido
DPPH	1,1-difenil-2-picrilhidrazil
EOAD	<i>Early Onset Alzheimer's Disease</i> (Doença de Alzheimer de início precoce)
ERNs	Espécies reativas de nitrogênio
EROs	Espécies reativas de oxigênio
EtOH	Etanol
EUA	Estados Unidos da América
fDA	<i>Familial Alzheimer's Disease</i> (Doença de Alzheimer familiar)
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
iAChE	Inibidores de acetilcolinesterase
IL	Interleucina
LOAD	<i>Late Onset Alzheimer's Disease</i> (Doença de Alzheimer de início tardio)
MABs	<i>Monoclonal antibody</i> (Anticorpos monoclonais)
MAPT	<i>Microtubule-associated Protein Tau</i>
MTT	brometo de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-2H tetrazólio

ND	Doenças neurodegenerativas
NFT	<i>Neurofibrillary tangles</i> (Emaranhados neurofibrilares)
NMDAr	Receptor de <i>N</i> -metil-D-aspartato
OMS	Organização Mundial de Saúde
ON	Óxido nítrico
P.A.	Para análise
PAS	<i>Peripheral anionic site</i> (sítio aniônico periférico)
PLCG2	gene da fosfolipase C γ 2
PSEN1	Presenilina 1
PSEN2	Presenilina 2
PTMs	<i>Post-translational modifications</i> (modificação pós-translacional)
SNC	Sistema nervoso central
SNP	Sistema nervoso periférico
TF	Transcription factors (fator transcricional)
TREM2	Receptor desencadeado expresso nas células mielóides 2
VGCCs	<i>Voltage-gated calcium channels</i> (canais de cálcio dependentes de voltagem)
WHO	World Health Organization

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	16
2	REVISÃO DE LITERATURA	18
2.1	DOENÇA DE ALZHEIMER (DA).....	19
2.1.1	Fisiopatologia da doença	22
2.1.1.1	<i>Hipótese colinérgica</i>	23
2.1.1.2	<i>Hipótese da cascata amiloide</i>	27
2.1.1.3	<i>Hipótese da proteína tau</i>	31
2.1.1.4	<i>Hipótese da neuroinflamação</i>	34
2.1.2	Tratamentos atuais	36
2.1.3	Compostos multialvos para terapia do Alzheimer	42
3	OBJETIVOS	44
3.1	GERAL.....	44
3.2	ESPECÍFICOS.....	44
4	PARTE EXPERIMENTAL	45
4.1	REAGENTES E EQUIPAMENTOS.....	45
4.2	SÍNTESE DOS DERIVADOS ADAMANTOIDES.....	46
4.3	INIBIÇÃO DA ACETILCOLINESTERASE.....	49
4.4	ATIVIDADE ANTIOXIDANTE	49
4.5	CITOTOXICIDADE.....	50
4.6	CITOGENOTOXICIDADE.....	50
4.7	TOXICIDADE AGUDA	52
4.8	TESTE <i>IN VIVO</i>	52
4.8.1	Manutenção e exposição de <i>C. elegans</i>	53
4.8.2	Ensaio de sobrevivência	54
4.8.3	Bombeamento faríngeo	54
4.8.4	Movimentos de cabeça	54
4.8.5	Resposta ao toque	54
4.8.6	Comprimento corporal e parâmetros locomotores por WormLab®	55
4.8.7	Ensaio de paralisia	55
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	56
5.1	SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DOS COMPOSTOS ORGÂNICOS.....	56

5.2	TESTES <i>IN VITRO</i>	70
5.3	TESTES <i>IN VIVO</i>	80
5.3.1	Ensaio de sobrevivência.....	81
5.3.2	Bombeamento faríngeo.....	82
5.3.3	Resposta ao toque.....	85
5.3.4	Parâmetros locomotores por WormLab®.....	86
6	CONCLUSÕES	89
	REFERÊNCIAS.....	90
	APÊNDICE A – Bandas de absorção no espectro de infravermelho dos compostos AGx (cm ⁻¹)	97
	APÊNDICE B – Deslocamentos químicos dos compostos AGx observados na caracterização por ressonância magnética nuclear – RMN	98
	ANEXO A - <i>Computational methodologies</i>	99

1 INTRODUÇÃO

A doença de Alzheimer (DA) é considerada uma doença neurodegenerativa, progressiva e incurável. De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS, 2025), existem no mundo aproximadamente 55 milhões de pessoas com demência, sendo que 60 - 70% desses casos são DA. Estima-se que até 2050 o número de pessoas com demência chegue a 152 milhões de pessoas, já que o número de casos dobra a cada 20 anos. O indivíduo com DA terá perda de memória, incapacidade de pensar e tomar decisões, alterações de comportamento e inability de executar tarefas diárias. Essa evolução da doença acaba incapacitando-o e tornando-o completamente dependente. A dependência gera um grande impacto físico, psicológico, social e econômico não só para o paciente e sua família, mas para toda a sociedade. Os gastos mundiais com a demência foram superiores a um trilhão de dólares em 2019 e acredita-se que em 2030 alcancem 2,8 trilhões. Desde 2008, a OMS declarou a demência como uma prioridade de saúde pública e em 2017 lançou o plano de ação global de resposta da saúde pública à demência 2017 – 2025 (do inglês “*Global action plan on the public health response to dementia 2017–2025*”). Posteriormente a OMS criou um portal com o objetivo de coletar dados e com isso facilitar o monitoramento da doença no mundo, chamado de *Global Dementia Observatory (GDO)*, que possui um repositório de boas práticas relacionadas à doença, com o objetivo de reforçar a troca de conhecimento entre as nações e o aprendizado mútuo, chamado *GDO Knowledge Exchange Platform* (OMS, 2017; Zhang *et al.*, 2020). No Brasil 100 mil novos casos são diagnosticados por ano e estima-se que 1,2 milhão de pessoas vivam com DA. Os centros de referência do Sistema Único de Saúde (SUS) oferecem tratamento multidisciplinar e gratuito, além dos medicamentos que ajudam a retardar a progressão da doença (Ministério da Saúde, 2025).

As alterações cognitivas e comportamentais observadas nas pessoas com a DA estão associadas à perda neuronal. Inicialmente a região afetada é o hipocampo, área do cérebro responsável pelo aprendizado e memória recente, posteriormente o córtex cerebral. Ao longo desse processo, observa-se o acúmulo e agregação de peptídeos beta amiloide ($A\beta$) no parênquima cerebral e sobre a superfície dos vasos sanguíneos, onde formam as placas β -amiloides. Observa-se também disfunção nas sinapses, hiperfosforilação da proteína *tau*, resposta neuro inflamatória, alteração no funcionamento das mitocôndrias cerebrais, aumento do estresse oxidativo devido a um aumento na quantidade de espécies reativas de oxigênio (EROs) geradas e como consequência desses processos, ocorre neurodegeneração. Todas essas alterações fazem com que a DA seja reconhecida como uma doença multifatorial (Ibrahim; Gabr, 2019).

Apesar de ter sido relatada em 1907 pelo médico alemão Alois Alzheimer, poucos avanços foram alcançados em seu tratamento (Zhang *et al.*, 2020). Apenas cinco medicamentos estão disponíveis: donepezil, rivastigmina, galantamina, memantina e donanemabe, os três primeiros são inibidores da enzima acetilcolinesterase (AChE) presente na fenda sináptica e responsável por diminuir a concentração do neurotransmissor acetilcolina (ACh) após a transmissão do impulso nervoso. Já a memantina é um antagonista não competitivo no receptor *N*-metil-D-aspartato (NMDAr) presente na membrana celular e que controla a entrada de cálcio no citoplasma (Bachurin; Bovina; Ustygov, 2017). O donanemabe é um anticorpo monoclonal que atua na redução das placas de proteína beta amiloide no cérebro, sendo indicado para pacientes com comprometimento cognitivo leve ou demência leve associados à doença de Alzheimer sintomática precoce (Gueorguieva *et al.*, 2023).

O maior impasse para a criação de novos compostos, que efetivamente tratem as disfunções e impeçam a progressão da doença, está associado à dificuldade de se estabelecer qual o alvo terapêutico mais apropriado. Por isso, compostos chamados de ligantes direcionados a múltiplos alvos (MTDL) (agem simultaneamente em alvos distintos por meio da combinação de dois ou mais grupos farmacofóricos em uma mesma molécula), têm sido considerados promissores (Mesiti *et al.* 2019; Rodríguez-Soacha; Scheiner; Decker, 2019). A molécula proposta também tem que atravessar a barreira hematoencefálica, sendo este, um dos maiores desafios a ser superado. Estruturas lipofílicas como a do anel adamantóide presente na memantina e na amantadina (utilizada no tratamento da doença de Parkinson), facilitam o acesso dessas substâncias aos neurônios. Nesses medicamentos há ainda um grupamento amino (NH₂) diretamente ligado ao adamantano e que apresenta um papel crucial na interação entre fármaco e seu receptor. Além destas características, o tamanho da cadeia carbônica também interfere na atividade farmacológica e, apesar de alguns estudos buscarem o tamanho ideal da cadeia, ainda não se conseguiu determinar a melhor relação entre a estrutura e a atividade (Mesiti *et al.*, 2019; Rosini *et al.*, 2019).

Em resumo, a melhora na qualidade de vida da população tem contribuído para o aumento da expectativa de vida. Arelado a isso observa-se um crescimento do número de casos da doença de Alzheimer. Paralelamente, a dificuldade de compreender todos os mecanismos dessa doença multifatorial, aliada a um tratamento que é incapaz de deter o avanço da perda neuronal, faz com que a busca por compostos mais eficazes se torne uma prioridade.

2 REVISÃO DA LITERATURA

A demência ou desordem neurocognitiva maior não é uma doença específica, mas um grupo de sintomas que ocorrem por causa de uma doença que é capaz de causar injúrias que, direta ou indiretamente, danificam o cérebro e destroem as células nervosas, causando perda das funções cognitivas (OMS, 2025). Como consequência há alterações na memória, no pensamento, no comportamento, nas emoções, na capacidade de realizar atividades cotidianas e na autonomia social. Os principais fatores de risco incluem idade avançada, diabetes, obesidade, hipertensão, sedentarismo, depressão, tabagismo, consumo excessivo de álcool, isolamento social e sexo. As mulheres têm reduções significativas nos hormônios sexuais a partir da menopausa e isto estaria associado a um aumento do risco de desenvolver doenças neurodegenerativas (Long; Benoist; Weidner, 2023; Pohl; Lin, 2018).

Dentre as doenças que causam demência temos a demência vascular, segunda maior causa de demência, que ocorre quando os vasos sanguíneos são danificados, bloqueados ou enfraquecidos, ocasionando uma hipoperfusão sanguínea e, por consequência, um fornecimento inadequado de oxigênio e nutrientes ao cérebro. O fornecimento insuficiente de nutrientes vitais e oxigênio pode induzir uma disfunção sináptica, com alteração da estrutura morfológica e do estado funcional das sinapses. A demência vascular isoladamente ou associada ao Alzheimer é responsável por 20 a 30% dos casos de demência (Engelhardt *et al*, 2011; Zhang *et al.*, 2025).

Já a demência com corpos de Lewy é caracterizada pela acumulação neuronal de alfa-sinucleína anormal, na forma de corpos de Lewy, dentro das células nervosas (essa alteração também é observada em pessoas com doença de Parkinson). Uma característica marcante da doença é o desenvolvimento de alterações visuoespaciais como alucinações e oscilações nos estados de alerta. Além disso, metade ou mais das pessoas com doença de corpos de Lewy, também desenvolvem sinais e sintomas de Parkinson (Wyman-Chick *et al*, 2024).

Na demência frontotemporal ocorre a degeneração do lobo frontal e temporal do cérebro, com atrofia do córtex devido a morte dos neurônios nessa região. Essa doença é um dos subgrupos da família de degeneração frontotemporal, sendo responsável por aproximadamente 10% dos casos de demência. Seus sintomas incluem alterações na fala, personalidade, comportamento, pouco controle de impulsos e descoordenação (Puppala *et al*, 2021).

Além dessas doenças citadas, a causa mais comum de demência, responsável por 60-70% dos casos, é a doença de Alzheimer. A principal característica da DA é a presença de depósitos de proteínas beta-amiloide ($A\beta$) e *tau* que se acumulam no cérebro a ponto de obstruir

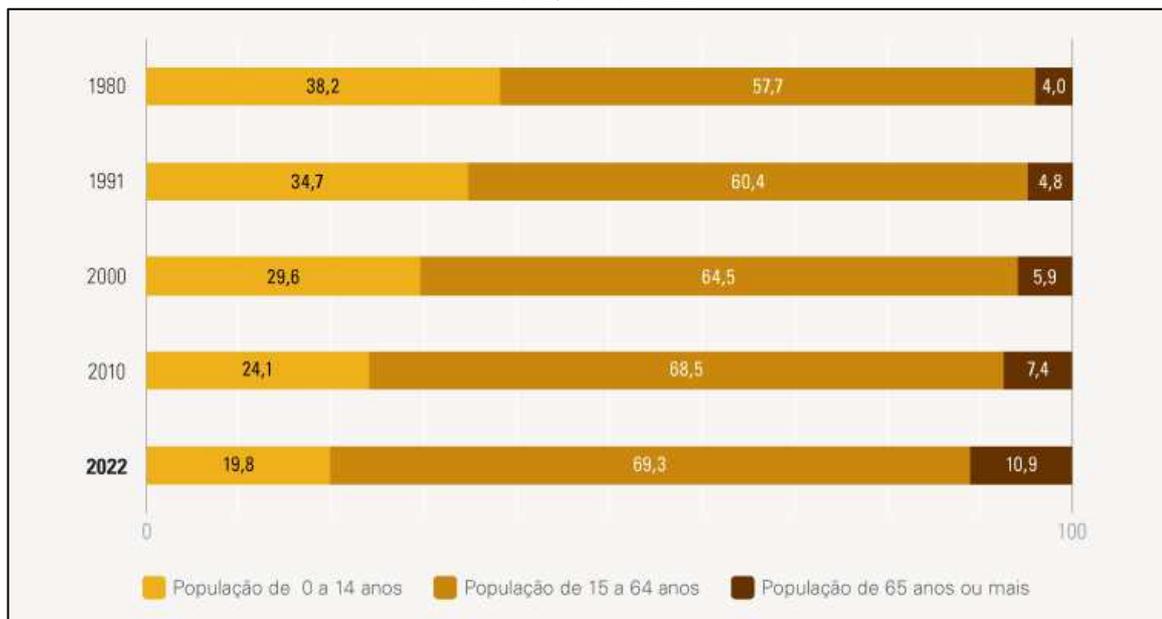
as funções cognitivas normais (Gauthier *et al.*, 2021). No presente trabalho iremos abordar a demência causada pela doença de Alzheimer e nos itens abaixo iremos discorrer sobre a origem da doença e as descobertas realizadas nos últimos anos.

2.1 DOENÇA DE ALZHEIMER

A doença de Alzheimer é reconhecida pela OMS como uma prioridade global em saúde pública e apesar dos avanços na compreensão desta doença desde que ela foi descrita em 1907 pelo médico alemão Alois Alzheimer, as suas causas ainda não são bem esclarecidas (OMS, 2025). O principal fator de risco para a DA é a idade avançada; nas últimas décadas houve uma melhoria na qualidade de vida, resultando em um aumento da expectativa de vida e, por consequência, um aumento do percentual de idosos na população mundial, fazendo com que o número de indivíduos com demência crescesse significativamente (Patterson, 2018).

Esse aumento na população idosa também é observado no Brasil e o Censo demográfico 2022 (IBGE, 2025) demonstra bem essa mudança no perfil populacional ao longo dos anos. Em 12 anos, o número de pessoas com 65 anos ou mais de idade cresceu 57,4%, em 2022 chegou a cerca de 22,2 milhões de pessoas (10,9%) contra 14 milhões (7,4%) em 2010. Esse percentual da população era de apenas 4% em 1980 (Figura 1).

Figura 1 – População residente no Brasil (%) segundo grupos etários específicos, entre 1980 e 2022.



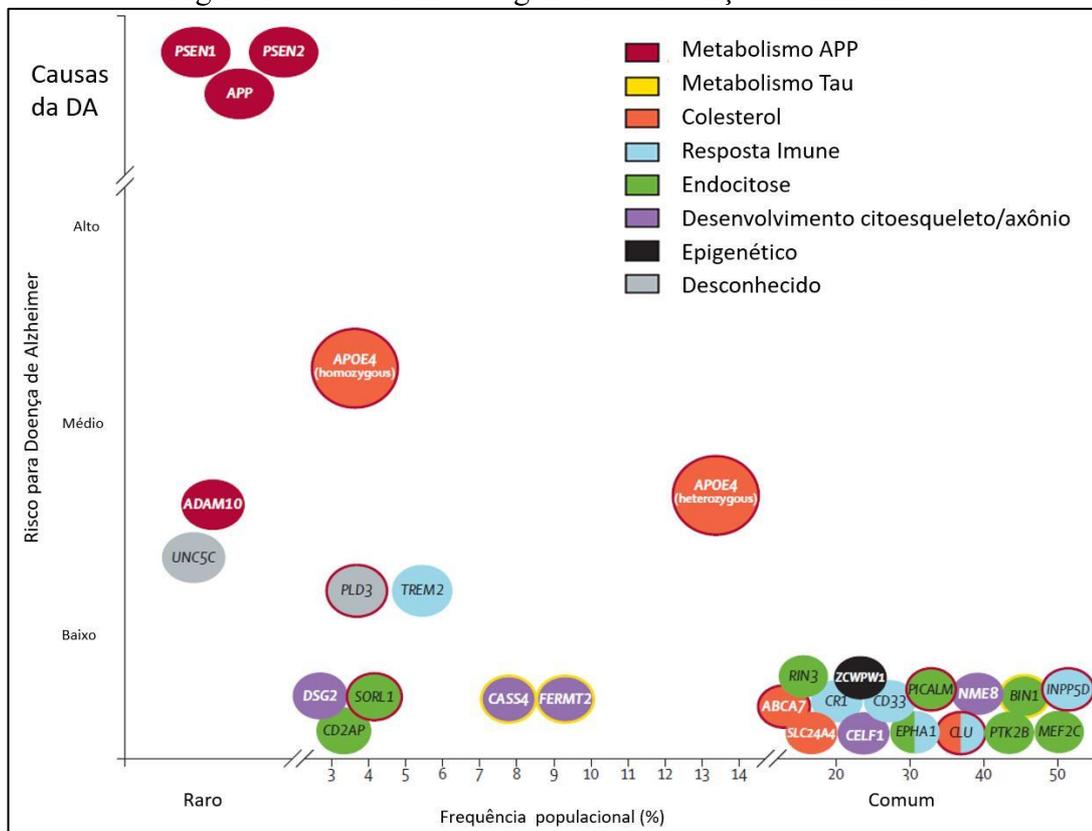
Fonte: Censo Demográfico 2022 (2025).

Existem duas formas da doença de Alzheimer, a mais comum delas é chamada doença de Alzheimer de início tardio ou esporádica e é responsável por mais de 90% dos casos de DA. A forma familiar da DA (fDA – do inglês *Familial Alzheimer's Disease*) é também conhecida como Alzheimer de início precoce (EOAD – do inglês *Early Onset Alzheimer's Disease*) e tem relação com mutações em três genes. O gene APP localizado no cromossomo 21, que codifica a proteína precursora amilóide (APP – do inglês *amyloid precursor protein*) responsável por 10-15% dos casos de EOAD. O gene presenilina 1 – PSEN1 (presente no cromossomo 14) e o gene presenilina 2 – PSEN2 (localizado no cromossomo 1). As proteínas codificadas pelo PSEN1 e PSEN2 fazem parte do núcleo catalítico do complexo gama secretase, que participa da quebra da APP e geração de $A\beta$, as mutações nesses genes são responsáveis por 18-50% dos casos de Alzheimer de início precoce. Pessoas com essas alterações genéticas desenvolvem os sintomas mais cedo, normalmente entre 30 e 50 anos de idade, enquanto na DA esporádica o início dos sintomas normalmente ocorre após 65 anos de idade (Krishnamurthy *et al.*, 2025).

A doença de Alzheimer de início tardio (LOAD – do inglês *Late Onset Alzheimer's Disease*) é provavelmente causada por uma interação entre fatores ambientais e genéticos – apesar de apenas um gene, localizado no cromossomo 19, chamado de apolipoproteína E (ApoE) estar comprovadamente associado ao aumento significativo na chance de o paciente desenvolver a forma esporádica da DA. A ApoE é sintetizada no fígado e no sistema nervoso central (pelos astrócitos e micróglia), está relacionada ao transporte e à homeostase lipídica entre as células e a regulação do metabolismo do colesterol (Krishnamurthy *et al.*, 2025). A ApoE apresenta 3 isoformas sendo o alelo $\epsilon 3$ o mais comum (Apo $\epsilon 2$ - 7%, Apo $\epsilon 3$ 79% e Apo $\epsilon 4$ 14%). A ApoE $\epsilon 2$ apresenta característica protetora e está associada a uma redução da deposição de $A\beta$ e do declínio cognitivo durante o envelhecimento. Já a ApoE $\epsilon 4$ não apenas aumentaria o risco de DA (em heterozigose esse aumento seria de 3-4 vezes e em homozigose 10 vezes), mas reduziria a idade de início da doença e estaria relacionada aos piores resultados clínicos observados, além de induzir a expressão de genes pró-inflamatórios (Goetzl, 2025). Isto ocorre porque o alelo ApoE $\epsilon 4$ promove uma depuração deficiente de $A\beta$ e *tau* pela barreira hematoencefálica, o que levaria a deposição destas no cérebro, prejudicando também a fagocitose microglial. Ela também modula muitas respostas fisiológicas e patológicas como metabolismo lipídico, neuroinflamação, fosforilação da *tau* e metabolismo da $A\beta$. A ApoE $\epsilon 4$ também estaria relacionada a patologias vasculares, mudanças no fluxo sanguíneo cerebral e a alteração na barreira hematoencefálica. É importante ressaltar que a taxa de produção de $A\beta$ não é alterada entre os genótipos, confirmando que a diferença entre alelos da ApoE afeta o processo de depuração de $A\beta$. (Chai *et al.*, 2021; Chen *et al.*, 2024).

Estudos usando milhares de amostras de genoma foram capazes de identificar mais de 30 fatores de risco genéticos, cada um conferindo separadamente apenas pequenos aumentos no risco de desenvolver o Alzheimer, mas que quando somados poderiam dobrar a chance de desenvolver a doença (Figura 2). Muitos desses genes – incluindo o receptor desencadeador expresso no gene 2 das células mieloides (TREM2), CD33 e o gene da fosfolipase C γ 2 (PLCG2) - são expressos predominantemente por micróglias no SNC, sugerindo que esse tipo de célula desempenha um papel importante na doença (Lane; Hardy; Schott, 2017; Scearce- Levie; Sanchez; Lewcock, 2020).

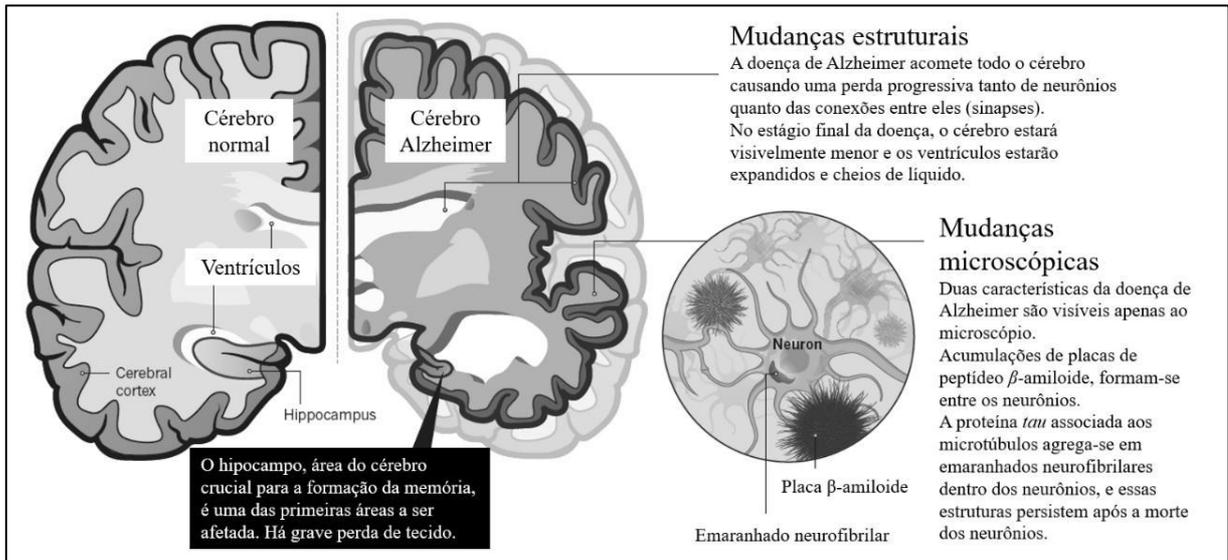
Figura 2 – Suscetibilidade genética à Doença de Alzheimer.



Fonte: Scheltens *et al.* (2016).

As alterações histopatológicas presentes no parênquima cerebral de pacientes portadores da doença de Alzheimer incluem depósitos extracelulares de placas senis (placa beta amiloide), acúmulo de filamentos anormais da proteína *tau* hiperfosforilada com subsequente formação de emaranhados neurofibrilares (NFT) intracelulares e neurodegeneração (Figura 3). Estas alterações se iniciam anos antes do surgimento dos primeiros sintomas. Como consequências desses processos patológicos ocorre perda sináptica e neuronal levando a atrofia macroscópica do cérebro e aumento no tamanho dos ventrículos (Du *et al.*, 2018; Fang *et al.*, 2019).

Figura 3 – Alterações no cérebro do paciente com Alzheimer



Fonte: Drew; Ashour (2018).

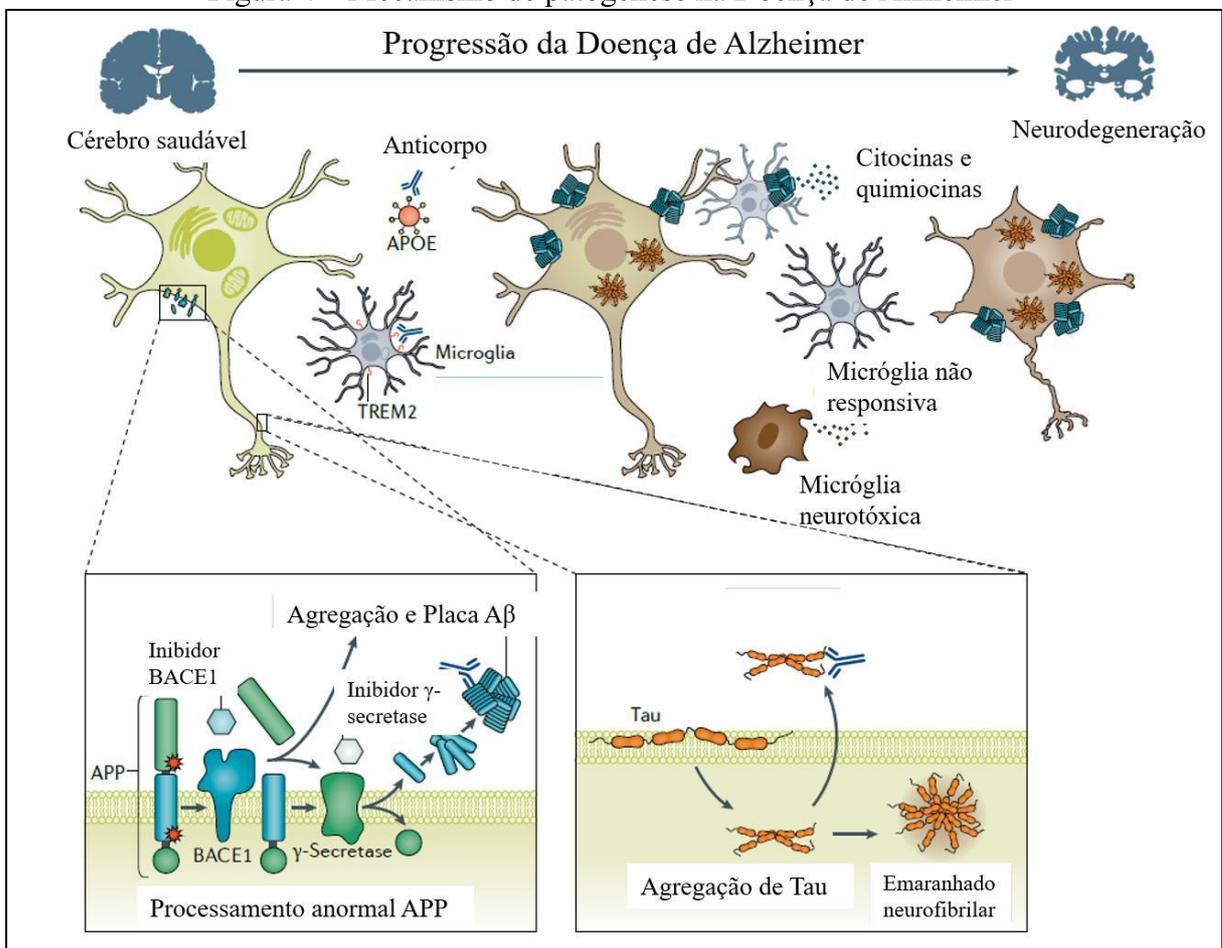
Atualmente não há cura para a DA, no entanto, alguns tratamentos podem retardar a progressão e/ou aliviar as manifestações da doença. Após o início dos sintomas, o quadro clínico pode ser classificado em 4 estágios. No estágio 1 (forma inicial) o paciente apresenta alterações na memória, na personalidade e nas habilidades visuais e espaciais. Já no estágio 2 (forma moderada) observa-se dificuldade para falar, realizar tarefas simples e coordenar movimentos; além de agitação e insônia. O estágio 3 é considerado a forma grave da doença e nele há oposição à execução de tarefas diárias, como dificuldade para comer, incontinência urinária e fecal e uma deficiência motora progressiva. Nesta fase, as capacidades físicas e cognitivas estão gravemente afetadas, fazendo com que os pacientes precisem de amplo apoio na vida diária. O estágio 4 é o terminal, no qual há uma restrição ao leito, mutismo, dor à deglutição e infecções intercorrentes. A partir do diagnóstico, a pessoa acometida por Alzheimer apresenta sobrevida média entre 8 e 10 anos (Eshraghi *et al.*, 2021; Ministério da Saúde, 2025).

2.1.1 Fisiopatologia da doença

Desde a descoberta do Alzheimer, os estudiosos vêm buscando uma explicação sobre as causas da doença, dentre elas algumas hipóteses ganharam destaque: a hipótese colinérgica que associa a disfunção do sistema colinérgico, devido à diminuição dos níveis de acetilcolina (ACh) na fenda sináptica, ao declínio cognitivo. Já a hipótese da cascata amiloide propõem que a neurodegeneração na doença de Alzheimer tem início com um desequilíbrio entre a produção

e a decomposição da proteína $A\beta$, consequência de uma depuração deficiente, que resultaria em sua agregação e deposição sob a forma de placas senis. A hipótese da proteína *tau* que associa o início da doença a presença de emaranhados neurofibrilares, compostos de fibras hiperfosforiladas da proteína *tau*. A hipótese da neuroinflamação que propõem que os astrócitos e as micróglias poderiam ser ativados por citocinas e, então, passariam a ser os principais emissores dos sinais neuroinflamatórios, atuando como mediadores inflamatórios essenciais que levariam à produção das placas de $A\beta$, assim como dos emaranhados da proteína *tau*. A Figura 4 demonstra a progressão da DA (Scearce-Levie; Sanchez; Lewcock, 2020; Velloso *et al.*, 2022; World Alzheimer Report, 2018).

Figura 4 – Mecanismo de patogênese na Doença de Alzheimer



Fonte: Scearce- Levie; Sanchez; Lewcock (2020).

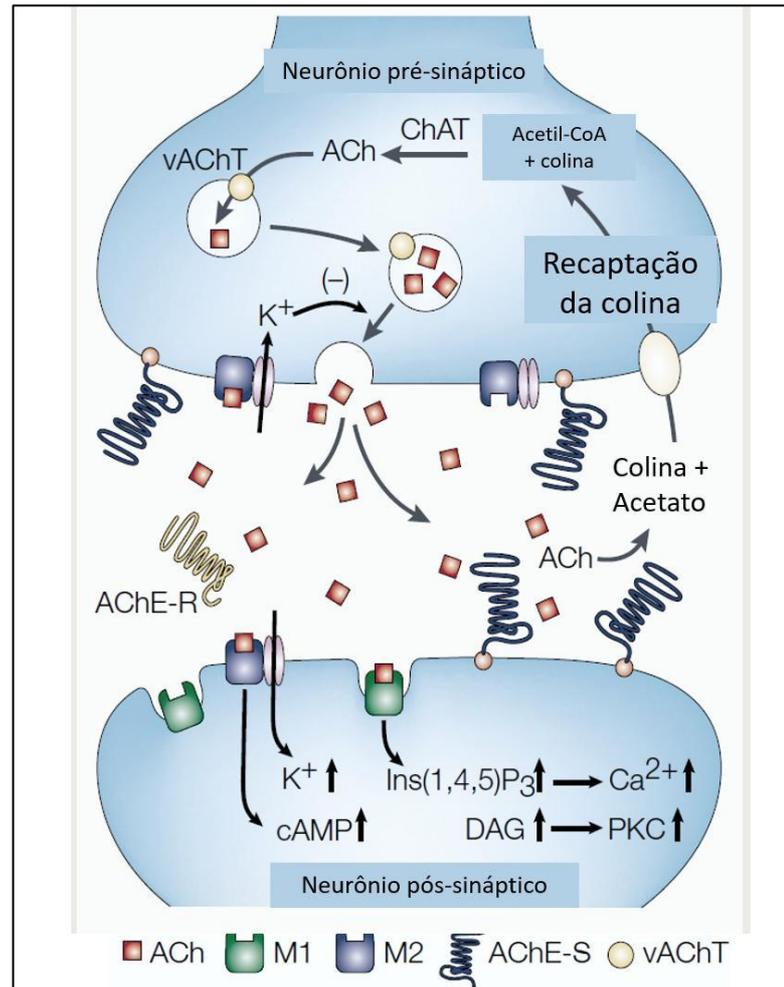
2.1.1.1 Hipótese colinérgica

Esta hipótese atribui os déficits cognitivos associados ao envelhecimento e à DA à disfunção colinérgica. O neurotransmissor acetilcolina (ACh) está envolvido em processos

fisiológicos como memória, atenção, aprendizagem, resposta ao estresse, sono, vigília e informações sensoriais. Para esta hipótese foram testadas algumas abordagens capazes de aprimorar a função colinérgica como: aumentar os níveis sinápticos de acetilcolina com o uso de precursores de ACh (lecitina, a colina e a acetil-L-carnitina), entretanto teve pouca aplicabilidade terapêutica, pois existia uma baixa penetração no sistema nervoso central através da barreira hematoencefálica. Aumentar a liberação de acetilcolina endógena pelo uso de medicamentos como a linopiridina, a 4-aminopiridina ou a besipiridina, também mostrou resultados terapêuticos insatisfatórios, devido aos graves efeitos colaterais. Por fim, inibir a acetilcolinesterase, a opção terapêutica que se mostrou mais viável, através da utilização de anticolinesterásicos que retardariam a hidrólise enzimática da acetilcolina, intensificando desta forma a transmissão colinérgica (Du *et al.*, 2018; Minett; Bertolucci, 2000).

A ACh é um importante neurotransmissor do sistema nervoso parassimpático, sendo capaz de sensibilizar dois subtipos de receptores: os receptores muscarínicos, predominantemente localizados no sistema nervoso periférico e os receptores nicotínicos, localizados predominantemente no sistema nervoso central (Barreiro; Fraga, 2015). A ACh é produzida no neurônio pré-sináptico a partir da colina e acetilcoenzima A (Acetil-CoA), sob catalise da enzima colina acetiltransferase (ChAT). A colina envolvida nesse processo pode ser recaptada da fenda sináptica ou armazenada na célula sob a forma de fosfatidilcolina ou fosforilcolina (Figura 5). Após a sua formação no citoplasma, a acetilcolina passa a ser armazenada em vesículas, por meio do transportador vesicular (vAChT), até que haja um estímulo que induza sua liberação na fenda sináptica. A entrada de cálcio (Ca^{2+}) na célula, por exemplo, gera um potencial de ação que leva à despolarização da membrana, permitindo a fusão das vesículas contendo ACh e, por consequência, a liberação desta na fenda sináptica. Após sua liberação, ela passa a interagir com os receptores colinérgicos presentes nas membranas pré- e pós-sinápticas. O receptor expresso na membrana pré-sináptica e que regula a liberação de acetilcolina por *feedback* negativo é o muscarínico - M2. Já os receptores M1 presentes na membrana pós-sináptica fazem a transdução do sinal, desencadeando uma resposta celular, via diacilglicerol (DAG), inositol-1,4,5-trifosfato (Ins(1,4,5)P₃) e proteína quinase dependente de cálcio (PKC). A acetilcolina, ao interagir com os receptores, propaga a informação. Após transmitir a mensagem, a molécula de ACh se desliga do receptor e volta a fenda sináptica onde sofre hidrólise catalisada pela acetilcolinesterase (AChE-S na forma de tetrâmero que fica aderida a junção neuromuscular ou AChE-R na forma de monômero, que fica solúvel na fenda sináptica) (Araújo; Santos; Gonsalves, 2016; Soreq; Seidman, 2001).

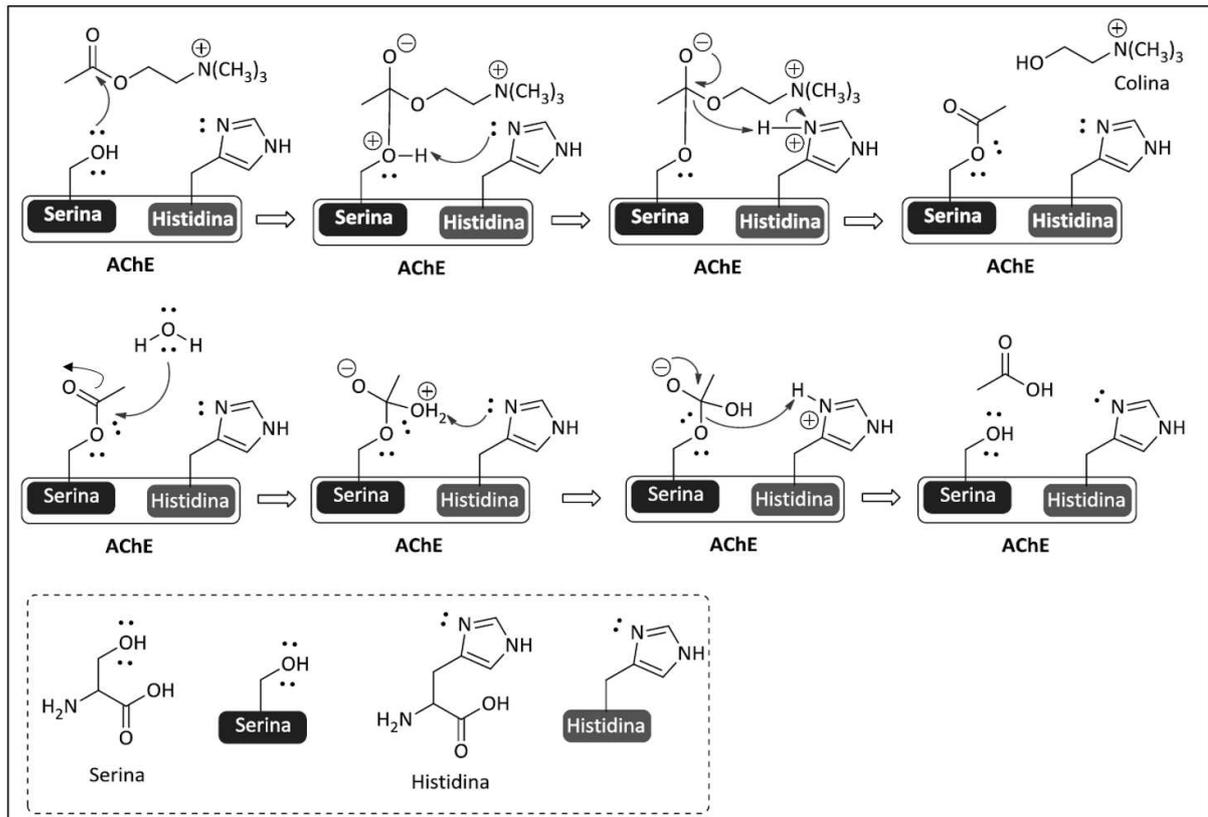
Figura 5 – Sinapse colinérgica



Fonte: Soreq; Seidman (2001).

Além da acetilcolinesterase (AChE) também está presente nas sinapses a butirilcolinesterase (BuChE). Apesar de semelhantes estruturalmente (seus aminoácidos apresentam aproximadamente 50% de homologia), apresentam diferenças quanto a sua distribuição nos tecidos, suas propriedades cinéticas e especificidade para com os seus substratos – BuChE é menos seletiva e atua hidrolisando tanto a ACh quanto a butirilcolina (BuCh). A BuChE também chamada colinesterase plasmática encontra-se, em sua maioria, no plasma sanguíneo, enquanto a AChE encontra-se mais abundantemente no sistema nervoso central, nas membranas dos eritrócitos e nos músculos esqueléticos. A AChE catalisa a hidrólise da acetilcolina em acetato e colina (Figura 6) no sítio esteérico que depende dos resíduos de histidina, que funcionam como um catalisador ácido-base, e de serina, que agem como um nucleófilo.

Figura 6 – Mecanismo da hidrólise da ACh



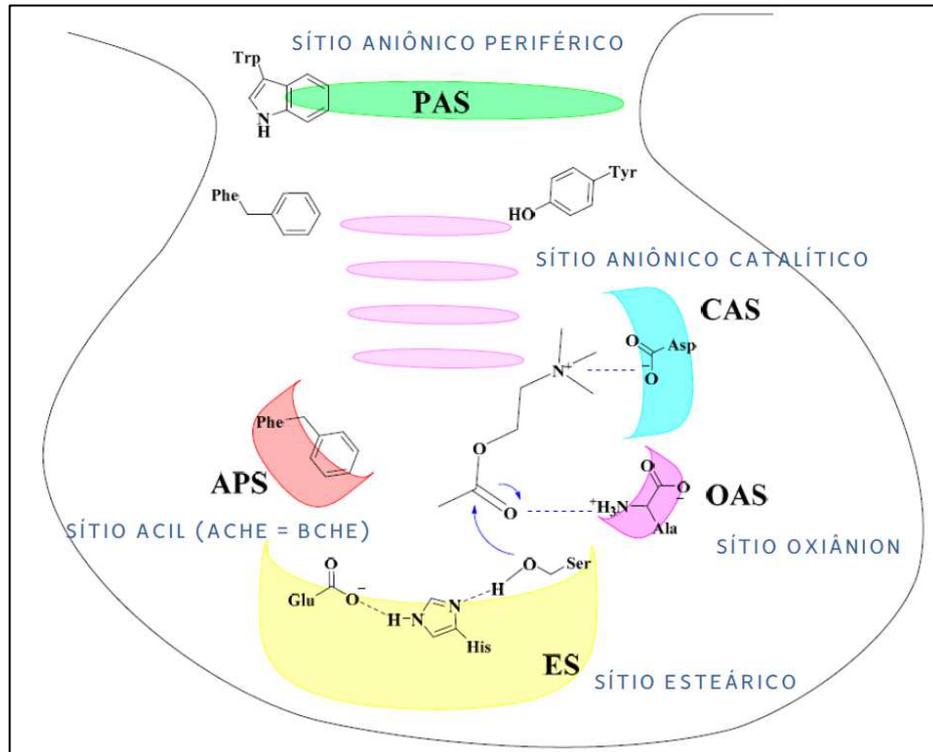
Fonte: Araújo; Santos; Gonsalves (2016).

Etapa I na primeira linha: A carbonila da ACh é atacada pelo par de elétrons da hidroxila do resíduo de serina. Na sequência a histidina atua como uma base retirando um próton do íon hidroxônio formado. Posteriormente a histidina protonada atua como um ácido, doando um próton para a unidade colina da ACh, que é então liberada;

Etapa II: A saída da unidade colina deixa a AChE acetilada e para que a enzima volte a ter atividade ela sofrerá hidrólise, com a água atuando como nucleófilo. Então, ácido acético é formado e o resíduo de serina é liberado, fazendo com que a enzima esteja pronta para atuar novamente.

A acetilcolinesterase possui ainda outro sítio ativo de interesse o Sítio Aniônico Catalítico (CAS), onde há uma interação entre a carga positiva do nitrogênio da ACh e a carga negativa produzida pelo resíduo de aspartato da AChE (Figura 7) (Alcorn et al., 2024; Araújo; Santos; Gonsalves, 2016). Dentre os 5 medicamentos disponíveis atualmente para o tratamento de Alzheimer, três são inibidores da acetilcolinesterase (Donepezil, Galantamina e Rivastigmina) e o mecanismo de ação destes medicamentos será abordado no item “2.1.2 Tratamentos atuais”

Figura 7 – Sítios ativos da Acetilcolinesterase



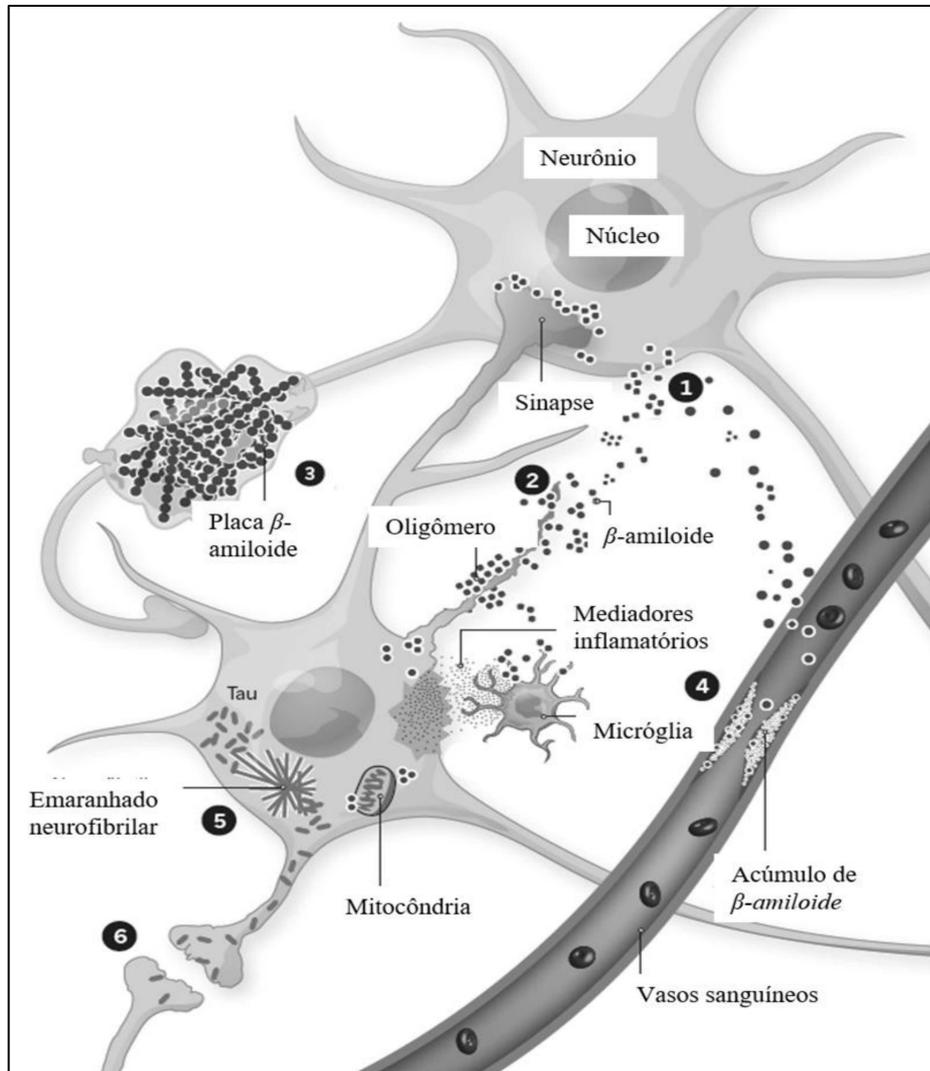
Fonte: Cavalcante *et al.* (2020).

2.1.1.2 Hipótese da cascata amiloide

Essa hipótese afirma que a deposição e agregação do peptídeo β -amiloide ($A\beta$) em diferentes regiões do cérebro é um evento precoce na doença de Alzheimer, que desencadearia a hiperfosforilação da proteína *tau*, resultando na formação de emaranhados neurofibrilares, além de outras modificações cerebrais características que são conhecidas como cascata amiloide (a sequência de eventos está demonstrada na Figura 8). Inicialmente o peptídeo β -amiloide é produzido pela clivagem da proteína precursora amiloide na membrana dos neurônios (1). No espaço entre os neurônios, a $A\beta$ forma oligômeros que interferem na função das sinapses (2). Esses oligômeros se juntam formando fibrilas que se agregam em placas, que interferem na função dos neurônios (3). Os depósitos β -amiloides no meio extracelular e nos vasos sanguíneos do cérebro ativam as micróglias que se juntam em torno dos neurônios afetados (4). Isso desencadeia a liberação de mediadores inflamatórios e pode contribuir para a perda de sinapses. Com a destruição das sinapses ocorre a liberação da proteína *tau* que participava da estrutura dos microtúbulos. A *tau* livre se agrega em emaranhados neurofibrilares dentro dos neurônios, deslocando organelas intracelulares (5). A *tau* passa através de sinapses

para outros neurônios, onde induz o desprendimento mais *taus* (6) (Drew; Ashour, 2018; Oasa *et al.*, 2024).

Figura 8 – Alterações cerebrais na Cascata Amiloide

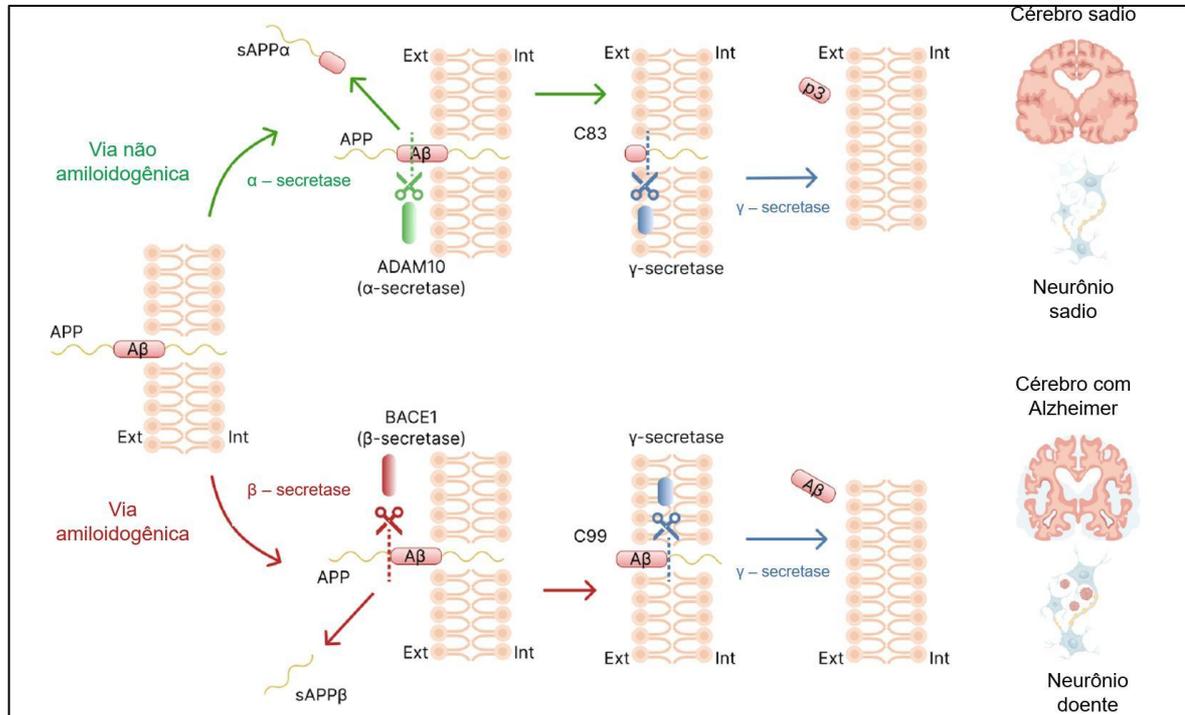


Fonte: Drew, L.; Ashour, M. (2018).

A proteína transmembrana chamada proteína precursora amiloide (APP) está presente em diferentes tipos de células, como a epitelial, muscular, astrócitos, micróglia e neurônios. Sua clivagem pode acontecer através de duas vias paralelas que se diferenciam uma da outra pelas enzimas envolvidas (Figura 9). Em condições saudáveis e normais, a APP é clivada pela via não amiloidogênica e há um equilíbrio entre a produção de $A\beta$ e sua depuração no cérebro humano. A atividade neuronal e a ativação dos receptores muscarínicos de ACh aumentam a produção de $sAPP\alpha$, favorecendo assim a via não amiloidogênica. Já em condições anormais – como mutações nos genes APP e PSEN, inflamação, desequilíbrio do estresse oxidativo, interações entre *tau* hiperfosforilada e APP, além de mecanismos de depuração de $A\beta$

desregulados – esse equilíbrio é perturbado e a APP é clivada através da via amiloidogênica, levando ao acúmulo de $A\beta$ no cérebro (Krishnamurthy *et al.*, 2025).

Figura 9 – Via não-amiloidogênica x via amiloidogênica



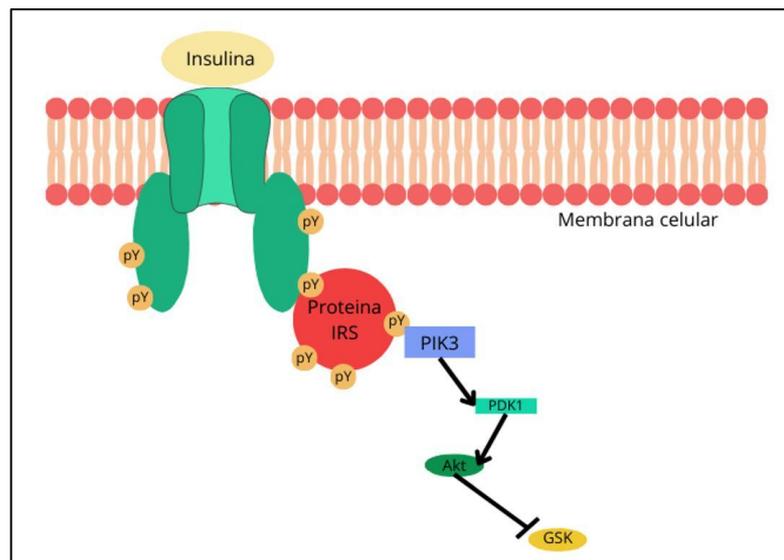
Fonte: Krishnamurthy *et al.* (2025).

Na via não-amiloidogênica α -secretase inicia a clivagem da APP, levando à produção de um fragmento C-terminal ancorado na membrana (CTF α) que possui 83 aminoácidos e de um peptídeo N-terminal solúvel (sAPP α). Em seguida o CTF α é clivado pela γ -secretase, gerando o peptídeo curto p3, que é solúvel e sem tendência a se agregar. Na via amiloidogênica a enzima β -secretase (BACE1 - do inglês *β -amyloid cleaving enzyme*) inicia a clivagem da APP, resultando na produção do peptídeo N-terminal solúvel sAPP β e do fragmento ancorado à membrana CTF β (com 99 aa). Esse fragmento ancorado será clivado pela γ -secretase, gerando um peptídeo que pode ter de 37 a 43 aminoácidos de comprimento, normalmente com predomínio $A\beta_{40}$ e $A\beta_{42}$ (Abeyasinghe; Deshapriya; Udawatte, 2020;). $A\beta_{40}$ é a isoforma mais prevalente, entretanto o maior potencial amiloidogênico é atribuído à fração $A\beta_{42}$. Esse peptídeo possui dois resíduos hidrofóbicos adicionais na porção C-terminal, potencializando a sua tendência à formação de agregados que iniciariam uma resposta inflamatória local. Os peptídeos $A\beta_{42}$ também se aderem aos receptores AMPA (ácido α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolpropiónico) – aos quais o neurotransmissor glutamato se liga – e aos canais de cálcio, aumentando o seu influxo e por consequência os níveis intracelulares de Ca^{2+} . Durante o

processo de agregação, $A\beta_{42}$ produz peróxido de hidrogênio, que é potencializado pelos íons de ferro (II) e cobre (II). Os íons metálicos presos dentro $A\beta$ são eletroquimicamente ativos e são capazes de produzir espécies reativas de oxigênio (ROS). Todas essas mudanças induzem a apoptose das células neuronais (Rosini *et al.*, 2019; Walker, 2016; Zhang *et al.*, 2020). A interação de duas moléculas beta-amiloide ($A\beta_{42}$) levaria à formação de dímeros, em seguida, ocorreria um acúmulo acelerado das protofibrilas, que levariam à formação das fibrilas, resultando nas placas amiloides depositadas no cérebro. Estudos atuais sugerem que os peptídeos $A\beta$ se acumulam por mais de uma década antes do aparecimento dos sintomas clínicos na DA (Oasa *et al.*, 2023).

Uma forma de regulação no balanço entre a ativação da via amiloidogênica x não amiloidogênica é dependente de insulina e feita pela via de sinalização celular PI3K/Akt/GSK-3 que pode ser vista de forma simplificada na Figura 10.

Figura 10 – Via de sinalização PI3K/Akt/GSK-3



Fonte: Elaborado pela autora (2025).

A fosfatidilinositol 3 quinase (PI3K) é uma proteína que participa dos processos de diferenciação celular e regulação da mitogênese, sendo indispensável também para o transporte de glicose. A ligação da insulina ao seu receptor ativa a fosforilação da proteína chamada de substrato receptor de insulina (IRS) que se liga a PI3K ativando-a. A PI3K ativada fosforila o lipídeo de membrana PIP2 (fosfatidilinositol-4,5-bifosfato) convertendo-o a PIP3 (fosfatidilinositol-3,4,5- trifosfato) que funciona com sítio de ligação para proteína quinase B (PKB) também chamada Akt, que passa a ser ativa, iniciando a sua via de sinalização celular. A Akt ativada fosforila a enzima glicogênio sintase quinase 3 ($GSK-3\beta$). A $GSK-3\beta$

normalmente se encontra ativada na célula e ao ser fosforilada torna-se inativa. Dessa forma há um direcionamento para a via não-amiloidogênica. A resistência à insulina altera a via de sinalização PI3K/Akt/GSK-3 levando a um aumento da atividade do GSK-3 β , favorecendo a via amiloidogênica e a fosforilação da proteína *tau* (Kciuk *et al.*, 2024).

A estratégia mais direta na terapia anti-A β buscaria reduzir a produção destes peptídeos através da atuação sobre as β - e γ -secretases. Entretanto agir sobre essas enzimas traria inevitáveis e indesejáveis efeitos colaterais pois ambas possuem muita similaridade estrutural com outras enzimas, sendo a seletividade para inibir apenas as enzimas de interesse um grande desafio. Como opção buscou-se induzir a depuração dos peptídeos A β , utilizando imunoterapia, entretanto, as substâncias testadas falharam nos testes clínicos por apresentarem sérios efeitos colaterais como sangramentos e convulsões. Alguns exemplos desta estratégia são: imunoterapia ativa com a vacina AN1792, imunoterapias passivas com os anticorpos monoclonais (MABs) como bapineuzumab (Pfizer/Johnson & Johnson), crenezumab (Genentech), solanezumab (Eli Lilly), ponezumab (Johnson & Johnson /Pfizer), aducanumab e lecanemab. A vacina AN1792 era um peptídeo A β_{42} sintético que apresentou bons resultados iniciais, mas cujo teste clínico foi interrompido porque 6% dos participantes apresentaram meningite asséptica. Falhas como essa lançaram ainda mais dúvidas sobre a teoria A β . A estratégia de visar apenas uma única sub-região funcional de A β poderia ser parcialmente responsável pela falha (Du *et al.*, 2018; Oasa *et al.*, 2024; Sims *et al.*, 2023).

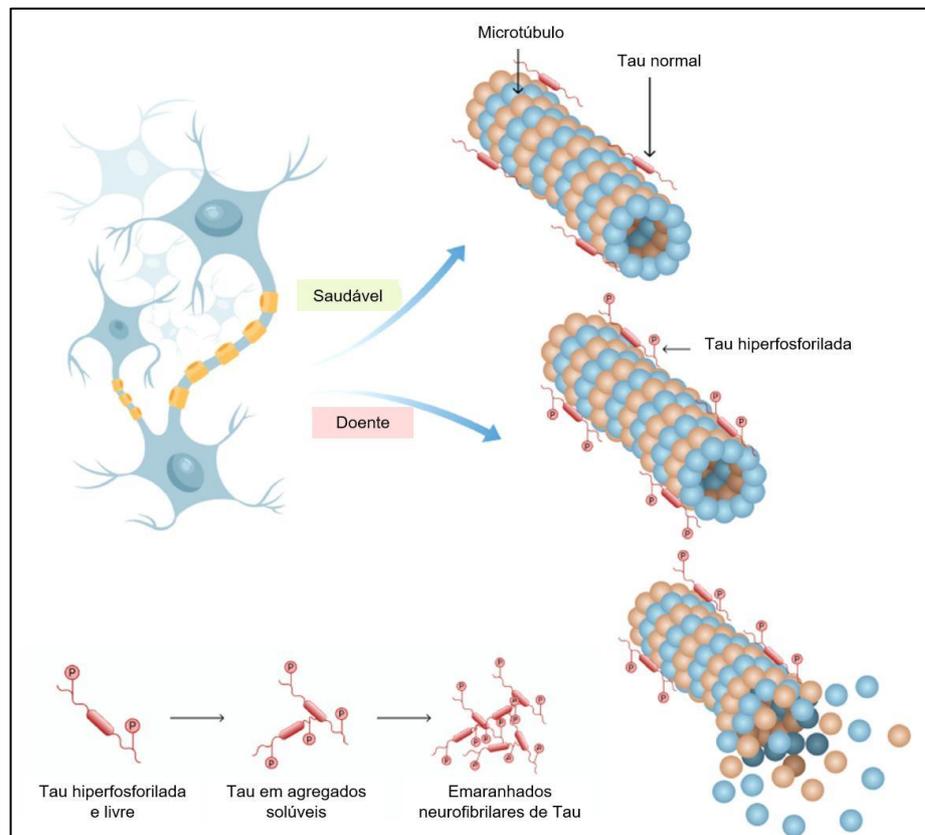
Em 2023, Yun Zhang e colaboradores publicaram na *Signal Transduction and Targeted Therapy* (Nature/sigtrans) uma revisão onde abordam a evolução da hipótese da Cascata Amiloide nos últimos 30 anos e principalmente a atual terapia anti-A β . Para os autores evidências crescentes mostrariam que a elevação dos níveis de A β no cérebro do paciente com DA pode ser consequência, e não causa, de problemas como disfunção neurovascular, alteração da homeostase do metabolismo de glicose, controle ineficiente do ciclo celular, disfunção autofágica e inflamação. E ainda, o A β solúvel, em níveis fisiológicos, participaria de funções importantes como a estimulação da diferenciação neuronal, a indução da potenciação de longo prazo (LTP), a melhora da recuperação cerebral de lesões, a inibição do estresse oxidativo, supressão tumoral e teria atividade antimicrobiana (Zhang, Y. *et al.*, 2023).

2.1.1.3 Hipótese da proteína *tau*

Em recente artigo de revisão, Ye e colaboradores (2024) destacaram a importância da *tau* como alvo para compreender os mecanismos fisiopatológicos da Doença de Alzheimer. A

tau é uma proteína associada ao microtúbulo (MAP), estando predominantemente presente nos axônios dos neurônios onde, sob condições fisiológicas, mantem a estabilidade e promove o crescimento do axônio (Figura 11). Os microtúbulos são essenciais para a manutenção da estrutura e formato dos axônios, permitindo o transporte de substâncias de uma extremidade à outra do neurônio. A fosforilação da *tau* é um processo que ocorre normalmente e que permite a interação desta com a tubulina, normalmente na proporção de um mol de proteína tau para 2 a 3 mols de fosfato (Krishnamurthy *et al.*, 2025). Quando ocorre a hiperfosforilação, a *tau* se desprende do microtúbulo e se desloca incorretamente (no inglês “*tau missorting*”) para o soma (corpo celular dos neurônios) e os dendritos, onde eventualmente forma agregados, os chamados emaranhados neurofibrilares. Esses, por sua vez, causam o comprometimento dos microtúbulos e, portanto, a interrupção de vários processos celulares, como proliferação, diferenciação, tráfego de proteínas e morfologia celular. Existem oito principais isoformas de *tau* codificadas pelo gene MAPT (do inglês *microtubule-associated protein Tau*), localizado no cromossomo 17 (17q21–q22) em humanos, destas, seis são expressas no cérebro (0N3R, 0N4R, 1N3R, 1N4R, 2N3R, 2N4R) (Buchholz; Zempel, 2024).

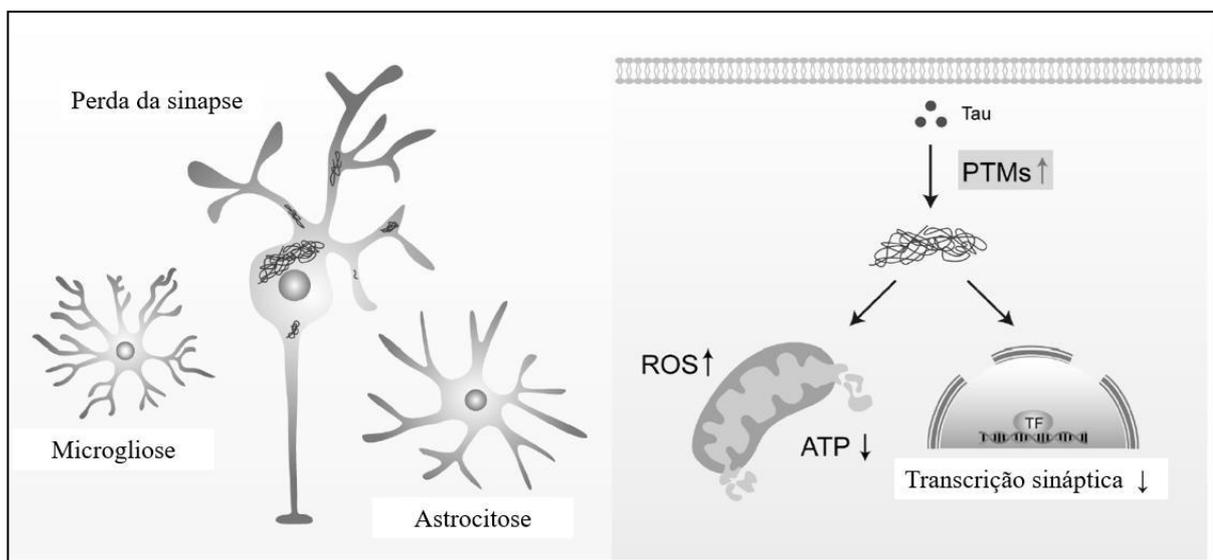
Figura 11 – Tau perdendo sua função estrutural no microtúbulo



Fonte: Krishnamurthy *et al.* (2025).

Estudos recentes têm mostrado que modificações pós-translacionais (PTMs – do inglês *post-translational modifications*) como a fosforilação, acetilação, glicosilação, metilação, dentre outras (em humanos a proteína *tau* pode sofrer 95 tipos de modificações pós-translacionais), participam da estabilidade, acumulação e depuração da *tau*. Algumas destas PTMs ocorrem tanto em condições fisiológicas quanto patológicas e algumas evidências indicam que essas modificações refletiriam a progressão da DA. A modificação pós-translacional mais estudada é a fosforilação da *tau*. Os níveis de fosforilação são controlados dinamicamente pelas proteínas quinases e fosfatases. PTMs anormais prejudicariam a afinidade da ligação *tau*-microtúbulos, aumentando assim a *tau* livre no citoplasma. Essa forma livre se acumularia promovendo a formação de agregados de *tau* – os chamados emaranhados neurofibrilares (do inglês *neurofibrillary tangles* – NFT), que causariam danos mitocondriais, prejudicando a plasticidade sináptica e induzindo neuroinflamação mediada por células gliais (Figura 12). Vários fatores como mutações, depuração de *tau* mediada por células gliais, atividade neuronal, envelhecimento e interações entre *tau* e outras proteínas patológicas afetariam a propagação da *tau* hiperfosforilada. As implicações e o mecanismo da toxicidade da *tau* nestas condições patológicas estariam criticamente envolvidos na indução/agravamento da neurodegeneração e dos défices cognitivos na DA (Ye *et al*, 2024).

Figura 12 – Toxicidade da *tau* na doença de Alzheimer



Fonte: YE *et al*. (2024).

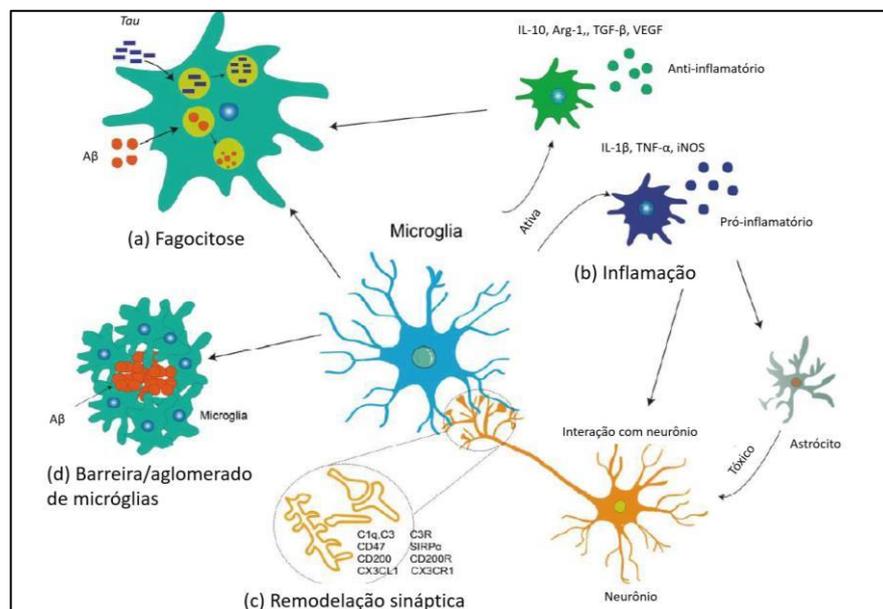
Modificações pós-traducionais anormais promovem o acúmulo de *tau*, o que resulta em danos nas mitocôndrias, deficiências sinápticas, gliose, neuroinflamação e, eventualmente, neurodegeneração. ATP: Trifosfato de adenosina; PTM: modificação pós-translacional; ROS: espécies reativas de oxigênio; TF: fator transcricional.

2.1.1.4 Hipótese da neuroinflamação

Esta hipótese afirma que a neuroinflamação tem um impacto significativo no desenvolvimento e progressão de doenças neurodegenerativas (ND). Inicialmente ela exerceria efeito protetor sobre o tecido facilitando a reparação tecidual e promovendo a remoção de detritos celulares. Entretanto, a sua ação prolongada impediria a regeneração, sendo um processo patogênico central em várias doenças neurológicas. A inflamação prolongada ativa as células endoteliais, prejudicando a integridade da barreira hematoencefálica (BHE) e, conseqüentemente, a funcionalidade das células gliais e dos neurônios. O processo de neurogênese também é afetado negativamente, os mediadores inflamatórios (citocinas inflamatórias, micro RNAs e componentes inflamatórios associados a vesículas extracelulares), perturbam as vias de reparo neural (Eshraghi *et al.*, 2021; Huang, Q. *et al.*, 2023).

No sistema nervoso central (SNC), as células imunológicas responsáveis por detectar alterações no microambiente cerebral são as micróglia, elas estabelecem contato direto com as sinapses neuronais, permitindo detectar com precisão a ativação neuronal. Também participam ativamente da remodelação sináptica, do dano neuronal e do reparo (Figura 13). No tecido cerebral normal, a micróglia, em repouso, exibe uma estrutura altamente ramificada. Entretanto, a micróglia sofre rápida ativação quando ocorre uma injúria no cérebro e sua morfologia se altera, há o desaparecimento de suas saliências e ela se torna amebiana e capaz de fagocitar (Bivona *et al.*, 2023; Sun *et al.*, 2024).

Figura 13 – Funções da Micróglia na DA



Fonte: Sun *et al.* (2024).

De forma simplificada, a micróglia ativada possuiria dois fenótipos: pró-inflamatório (M1) que promove a inflamação e a neurotoxicidade e o anti-inflamatório (M2) que limita a inflamação e facilita a cicatrização dos tecidos. No início da inflamação, a micróglia pró-inflamatória participa da fagocitose eliminando neurônios necróticos e detritos celulares, reduzindo a liberação de citocinas e quimiocinas inflamatórias, protegendo assim o cérebro. No entanto, se este fenótipo se tornar dominante, esse quadro se reverte e pode ocorrer a destruição da BHE, disfunção e lesão neuronal, além de redução da capacidade fagocitária. Já o perfil M2 exibe uma propensão para promover a neurogênese e aumentar a fagocitose. Pesquisas têm mostrado a coexistência dos fenótipos M1 e M2 no local da lesão, indicando uma relação antagônica, que colaboraria para manter a homeostase da resposta inflamatória. Além disso, a micróglia é capaz de fazer a transição entre esses fenótipos em resposta a mudanças no ambiente do SNC (Huang, Q. *et al.*, 2023).

Nas doenças neurodegenerativas como o Alzheimer, as micróglias superativadas, geram um microambiente inflamatório ao liberarem quantidades significativas de mediadores da inflamação. Algumas evidências mostram que a neuroinflamação existe no cérebro do paciente muito antes do surgimento de qualquer manifestação clínica do Alzheimer. Modelos animais têm demonstrado que a ativação da micróglia precede as patologias $A\beta$ e *tau* no cérebro de pacientes (Eshraghi *et al.*, 2021; Scearce- Levie; Sanchez; Lewcock, 2020).

Outra célula importante no processo de neuroinflamação é o astrócito que apresenta função regenerativa e neuro protetiva. Entretanto, em cérebros de pacientes com Alzheimer, exibe significativa diferença na morfologia e função, liberando grandes quantidades de interleucinas pró-inflamatórias como o fator necrosante tumoral (TNF- α) e a interleucina 1 β (IL-1 β). Esses astrócitos disfuncionais também são menos efetivos em remover o excesso de glutamato da fenda sináptica, liberam menos proteínas de adesão, o que prejudica a integridade da barreira hematoencefálica (BHE), alterando sua permeabilidade (Kciuk *et al.*, 2024).

Alguns estudos apontam que o próprio envelhecimento leva a uma pré-disposição à inflamação crônica de baixo grau, independente de um processo patológico, como resultado de diferentes mudanças fisiológicas relacionadas à idade (senescência celular, acúmulo de *debris* celulares), esse processo recebe o nome de *inflammaging*. Os mediadores inflamatórios periféricos cruzariam a barreira hematoencefálica e, posteriormente, aumentariam sua permeabilidade induzindo a neuroinflamação (Walker, 2019). Outras doenças inflamatórias crônicas também têm sido relacionadas à ativação crônica das células da glia, levando ao

aumento do estresse oxidativo e à maior deposição de proteínas tóxicas na DA (Huang, J. *et al.*, 2023).

Além destas, existem outras teorias que buscam relacionar o início do Alzheimer à outras alterações observadas nos cérebros dos pacientes, como a alteração do metabolismo dos metais no SNC. Já foi mencionado anteriormente no texto que metais como o cobre e o ferro podem ficar retidos e ativos dentro das placas β -amiloides produzindo espécies reativas de oxigênio e por consequência desencadeariam um desequilíbrio redox. Além destes metais, o zinco, que normalmente tem papel importante na sinalização neuronal e na neurotransmissão, também se encontra fora de homeostase em pacientes com doenças neurodegenerativas como o Alzheimer e o Parkinson. Estes metais de transição são considerados metais essenciais ou biometais por possuírem função fisiológica e ajudarem a manter os processos celulares. Entretanto, quando há um desequilíbrio em suas concentrações (normalmente se encontram com concentrações entre 100 e 1000 μM no SNC), levando a um acúmulo destes no cérebro, ocorre morte neuronal e sua captura através de compostos quelantes seria mais uma alternativa de tratamento (Adlard; Bush, 2006; Olasehinde; Olaniran; Okoh, 2019; Pinto *et al.*, 2010).

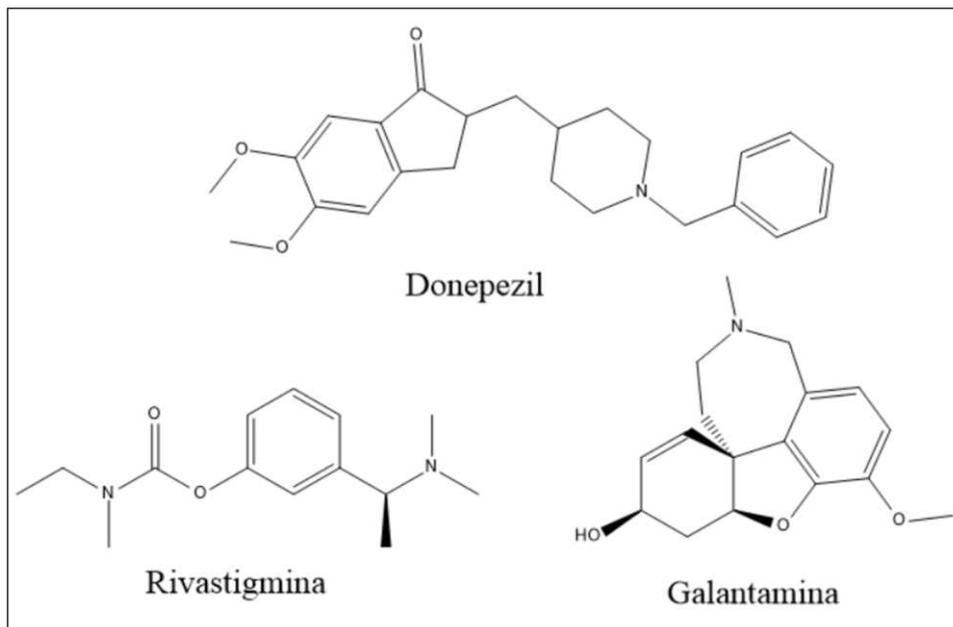
Alguns pesquisadores têm proposto que a doença de Alzheimer poderia ser chamada de diabetes tipo 3, uma referência ao quadro clínico de pessoas com a diabetes tipo 2, relacionando a origem do Alzheimer à maus hábitos de vida, como obesidade e sedentarismo, que resultariam em elevados níveis de açúcar no sangue que causaria danos a vários órgãos, incluindo o cérebro. Essa associação busca ressaltar a importância que a resistência à insulina e o metabolismo da glicose têm para a patogênese da DA. Atualmente sabe-se que mais de uma década antes do início dos sintomas de Alzheimer, já existe um declínio no metabolismo de glicose no cérebro. Além disso, os receptores de insulina estão presentes em várias regiões do cérebro, principalmente nas áreas relacionadas a memória e ao aprendizado, como no hipocampo e córtex cerebral e a desregulação da insulina no SNC estaria relacionada a várias desordens neurológicas e cognitivas, bem como no acúmulo de placas de $A\beta$ e NFTs. A alteração do transporte de insulina para o cérebro estaria relacionada a uma alteração de permeabilidade da BHE, causada por condições como hiperglicemia, obesidade, inflamação e dislipidemia (Goetzl, 2025; Kciuk *et al.*, 2024).

2.1.2 Tratamentos atuais

As abordagens terapêuticas da doença de Alzheimer, durante muitos anos, eram centradas na disfunção neuronal. Os tratamentos empregados traziam benefícios para os

pacientes ao reduzirem os sintomas da doença, através da regulação dos neurotransmissores com a utilização de inibidores da acetilcolinesterase, usados para tratar os estágios iniciais da doença, em suas formas leve a moderada (Figura 14). Os inibidores da AChE agem sobre os sítios ativos da enzima, inibindo-os e com isso reduzem a degradação do neurotransmissor. No entanto, estes medicamentos funcionam apenas durante um período limitado e não alteram o progresso da doença (Lalut *et al.*, 2020).

Figura 14 – Estrutura química dos fármacos aprovados pela FDA, como inibidores da acetilcolinesterase para o tratamento da doença de Alzheimer.

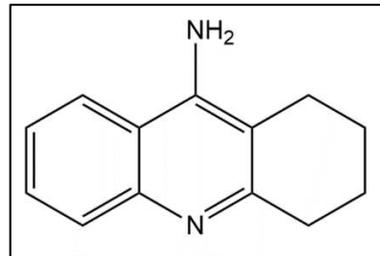


Fonte: Elaborado pela autora (2025).

O primeiro fármaco aprovado para tratamento da doença de Alzheimer foi o Cognex®, cujo princípio ativo é a tacrina. O FDA autorizou seu uso em 1993 e a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) em 1994 (Figura 15). A tacrina foi considerada um inibidor reversível da AChE (inibidor de primeira geração), entretanto, apresentou alta hepatotoxicidade (40% dos pacientes tratados), levando ao aumento das transaminases hepáticas, resultando em hepatite medicamentosa (mais de 90% dos casos envolvendo a hepatite medicamentosa ocorreu nas 12 primeiras semanas de tratamento), provocando a retirada da medicação em muitos pacientes. Além do efeito hepatotóxico, também causava efeitos colaterais colinérgicos como náuseas e cólicas abdominais, apresentava má disponibilidade oral (meia vida 2-4 horas), necessitando de quatro doses diárias, tornando sua utilização limitada, fazendo com que ela caísse em desuso a partir do surgimento dos iAChE de gerações mais novas. O mecanismo de interação da sua molécula consistia em interações de empilhamento- π entre seu anel quinolínico

e os resíduos de aminoácidos triptofano (Trp84) e fenilalanina (Phe330) do sítio ativo da enzima, na região do sítio aniônico periférico (PAS) (Barreiro; Fraga, 2015; Mesiti *et al*, 2019; Minett; Bertolucci, 2000).

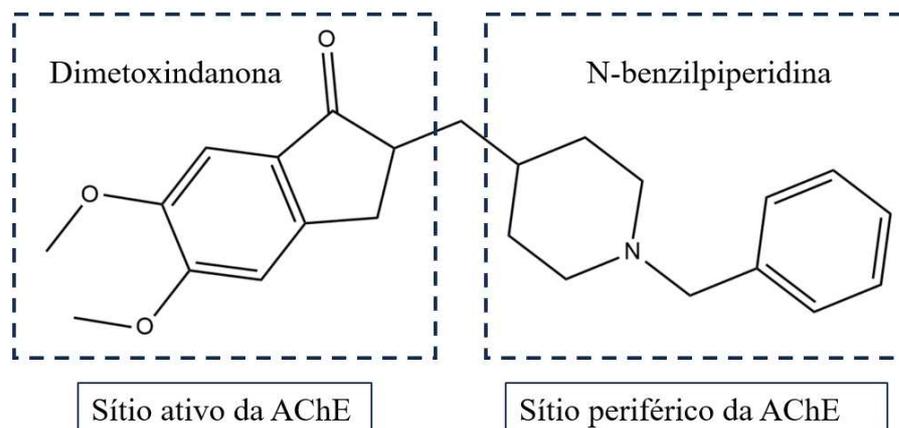
Figura 15 – Estrutura química da tacrina



Fonte: Elaborado pela autora (2024).

O donepezil (Aricept®) foi o segundo iAChE a surgir. Foi aprovado pela FDA em 1996 e pela ANVISA em 2000. As vantagens em relação à tacrina se devem a sua meia-vida longa, de aproximadamente 70 horas, permitindo dose única diária. Não apresentou hepatotoxicidade e os efeitos adversos gastrointestinais foram similares ao placebo, sendo utilizado para os casos leve a moderado da doença de Alzheimer. Sua molécula apresenta interação simultânea, atuando tanto no sítio aniônico catalítico (CAS) – subunidade dimetoxindanona – quanto no sítio periférico (PAS) – subunidade *N*-benzilpiperidina – da AChE como demonstrado na Figura 16. O donepezil é considerado o padrão ouro para o manejo da DA. É um iAChE seletivo e reversível que provou ser eficaz na melhoria da memória e da cognição com menor incidência de efeitos colaterais em comparação com outros iAChEs (Barreiro; Fraga, 2015; Mahmoud *et al.*, 2019; Mesiti *et al*, 2019).

Figura 16 – Farmacóforos do donepezil



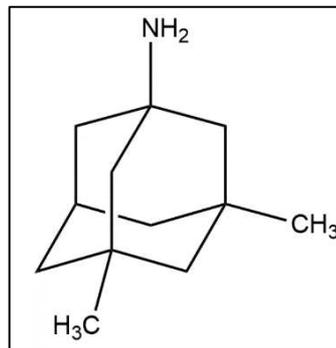
Fonte: Barreiro; Fraga (2015).

A rivastigmina, terceira droga aprovada da classe, tornou-se disponível na Europa em 1997 e em 1998 foi liberada pela ANVISA, sendo liberada pela FDA apenas em 2000. Possui como vantagem adicional em relação as duas primeiras, a capacidade de inibir também a butirilcolinesterase (BuChE). Essa enzima teria maior participação na degradação da acetilcolina à medida que a DA evolui. E sua inibição poderia ocasionar uma diminuição da toxicidade da proteína amiloide presente nas placas senis. Outra diferença em relação às iAChEs anteriores é o fato dela ser um inibidor pseudo-irreversível, ou seja, existe uma dissociação enzimática, porém, é mais lenta. A rivastigmina possui eficácia semelhante à do donepezil e da tacrina. Os efeitos colaterais e os benefícios cognitivos são dose-dependentes. Não é hepatotóxica, mas os efeitos gastrointestinais estão presentes em 20% ou mais dos pacientes. Apresenta posologia de duas doses diárias (Gomes; Koszuoski, 2005; Mesiti *et al*, 2019; Minett; Bertolucci, 2000).

A galantamina (Reminyl®), alcaloide extraído da *Galanthus worownii*, planta da família das Amarilidáceas, é o fármaco mais recente desse grupo, aprovada pela FDA e pela ANVISA em 2001. Ela tem um efeito adicional em relação às outras iAChEs, que é a atividade moduladora alostérica sobre os receptores nicotínicos, possibilitando o aumento da transmissão colinérgica e um possível efeito neuroprotetor questionável. Os receptores nicotínicos têm papel bem determinado na cognição, entretanto, essa modulação nicotínica no tratamento da doença de Alzheimer não está completamente elucidada. Os receptores nicotínicos pré-sinápticos controlam a liberação de neurotransmissores importantes para a memória e para o humor e o bloqueio desses receptores prejudicou a cognição. Entretanto, a ligação da galantamina com subtipos de receptores nicotínicos teve ação contrária, melhorando a função cognitiva e a memória (Barreiro; Fraga, 2015; Mesiti *et al*, 2019).

O medicamento de escolha para os casos severos da DA é a memantina. Ela faz parte de uma classe de medicamentos chamados de bloqueadores de canais de cálcio (CCBs – do inglês *calcium channel blockers*). Sua natureza lipofílica permite que ela atravesse a barreira hematoencefálica, característica essencial para que um medicamento seja ativo no tratamento de doenças cerebrais (Figura 17). Sua ação é como um antagonista não-competitivo sobre os receptores de *N*-metil-D-aspartato (NMDAr). Ela bloqueia o canal desses receptores glutamatérgicos de membrana impedindo, desta forma, a entrada de cálcio na célula. Essa ação é reversível e muito importante para impedir a excitotoxicidade. O cálcio desempenha um papel importante em muitos aspectos da fisiologia neuronal normal, incluindo a plasticidade sináptica e a aprendizagem. Além disso, o envelhecimento humano naturalmente causa perturbações na homeostase do cálcio (Abeysinghe; Deshapriya; Udawatte, 2020; Mesiti *et al*, 2019).

Figura 17 – Estrutura química da memantina



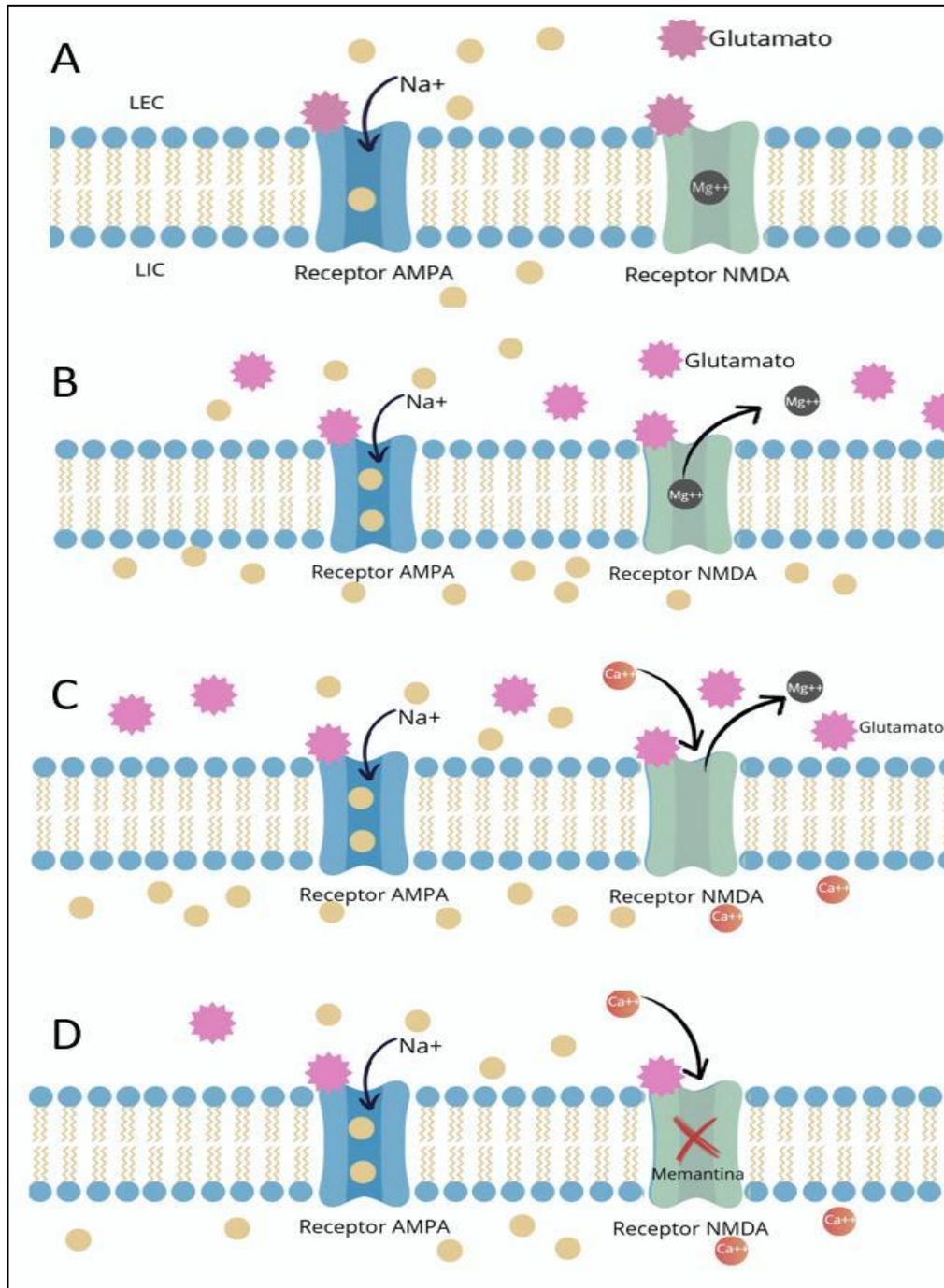
Fonte: Elaborado pela autora (2025).

Já o glutamato é um neurotransmissor excitatório e quando ocorre ligação excessiva deste ao NMDAr, há um aumento do influxo de Ca^{2+} na célula, que pode gerar perda da função sináptica e morte neuronal. Acredita-se que este processo esteja envolvido na neurodegeneração da DA. A Figura 18 esquematiza a sequência de eventos relacionados a ativação do receptor NMDA e seu bloqueio pela memantina. Inicialmente a baixa concentração de glutamato no meio extracelular (LEC) estimula apenas os receptores AMPA que se abrem e permitem a entrada de sódio na célula (LIC), o receptor de NMDA não é ativado e permanece bloqueado pelo magnésio (Mg^{2+}) (A). Com o aumento de sódio intracelular há uma repulsão ao magnésio que bloqueava o canal do rNMDA, juntamente com o aumento da concentração de glutamato extracelular, ocorrendo a ativação do receptor NMDA (B). Esse receptor ativado possibilita a entrada de íons cálcio na célula (C). Na presença de memantina há um bloqueio da entrada de cálcio no citoplasma (D). A memantina é um antagonista não competitivo de baixa afinidade, capaz de se ligar aos receptores NMDA com maior afinidade do que os íons Mg^{2+} conseguindo inibir o influxo prolongado de íons Ca^{2+} e desta forma reduzir os sintomas, bem como o dano neuronal. Essa regulação do cálcio é muito importante na aprendizagem e na memória pois ele participa da fisiologia neuronal, incluindo a plasticidade sináptica (Danta, 2020; Tan, Deng, Qing, 2012).

Além do glutamato, o oligômero da $A\beta$ induz o influxo de Ca^{2+} extracelular através de um outro tipo de canal de cálcio, chamado dependente de voltagem (VGCCs – do inglês *voltage-gated calcium channels*) presente na membrana plasmática. Após o potencial de ação, há liberação de glutamato nos terminais pré-sinápticos, o que facilita a entrada de cálcio em locais pós-sinápticos através dos VGCCs e canais NMDAr. Quando esta liberação de glutamato é excessiva, há uma maior carga pós-sináptica de cálcio causando a excitotoxicidade. Esse aumento intracelular de cálcio também promoveria a modulação da proteína precursora

amiloide, aumentaria a hiperfosforilação da *tau* e suprimiria a autofagia (Nimmrich, Eckert, 2013; Tan, Deng, Qing, 2012).

Figura 18 – Cascata de ativação dos receptores NMDA x memantina



Fonte: Elaborado pela autora (2025).

Recentemente o FDA (2024) e a Anvisa (2025) aprovaram o Donanemab para o tratamento do Alzheimer. Ele é um anticorpo monoclonal destinado aos casos de Alzheimer de início precoce e sintomático. Ele é um anticorpo IgG1 humanizado direcionado a um epítipo

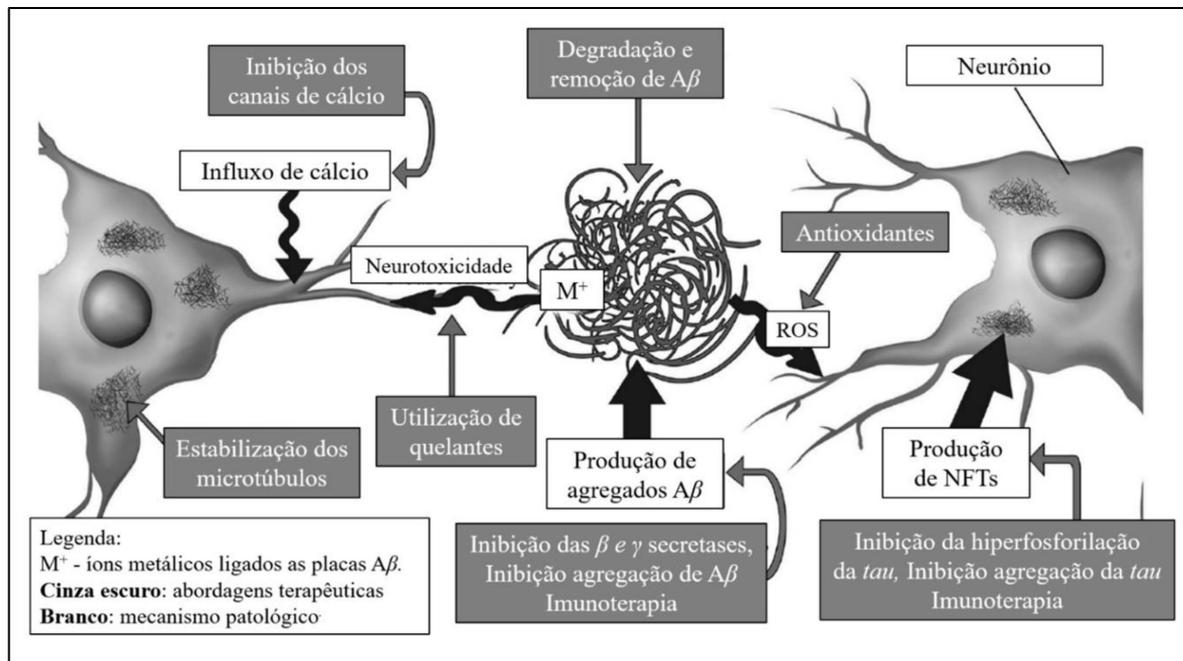
piroglutamato $A\beta$ N-terminal que está presente apenas em placas estabelecidas e não mostra ligação fora do alvo com outras espécies $A\beta$, neurotransmissores ou seus receptores. Nos ensaios clínicos observou-se redução das placas amiloides e melhora na cognição em comparação com pacientes que usaram placebo. A desvantagem deste medicamento está relacionada ao alto custo do tratamento e sua indicação apenas para os casos precoces de DA, outra desvantagem seria a falta de dados relacionados à sua utilização a longo prazo (Mintun *et al.* 2021).

2.1.3 Compostos multialvo para terapia do Alzheimer

Atualmente há uma compreensão de que doenças neurodegenerativas como as Doenças de Alzheimer, Huntington e Parkinson são multifatoriais, pois existem diferentes eventos que contribuem para seu surgimento e progressão. Essa natureza complexa, com diferentes alvos celulares envolvidos, induziu os cientistas a buscarem projetar ligantes que fossem direcionados a múltiplos alvos (MTDLs – do inglês *multitarget-directed ligands*), a fim de abordar as vias complementares envolvidas nas doenças (Ibrahim; Gabr, 2019). A escolha da estratégia para o designer dos MTDLs é motivada pela natureza dos objetivos, pela disponibilidade dos materiais de partida e pela viabilidade sintética. Sendo a síntese química considerada um fator limitante no desenvolvimento das moléculas multialvo, a seleção de estratégias sintéticas robustas e seguras é de extrema importância para a obtenção dos híbridos desejados (Mesiti *et al.*, 2019).

Os medicamentos atualmente disponíveis para doença de Alzheimer, são baseados em estratégias de alvo-único, mas o crescente consenso de que a DA é uma doença multifatorial, com diversas vias patológicas interligadas e desreguladas, impulsiona uma intensa pesquisa no desenho de MTDLs (Ibrahim; Gabr, 2019). A Figura 19 demonstra as principais hipóteses fisiopatológicas da DA, já discutidas anteriormente neste trabalho e os possíveis locais de intervenção. A síntese dos MTDLs é realizada através da combinação de grupos farmacofóricos de diferentes fármacos e com diferentes alvos, em uma única molécula. Esta estratégia já tem sido empregada com os atuais medicamentos utilizados na DA: o farmacóforo do Donepezil ligado a estruturas privilegiadas como flavonoides, cumarinas e quinolinas. Tacrina ligada ao ácido cinâmico buscando inibir a AChE e a agregação de $A\beta$. A Memantina combinada a Galantamina a fim de obter um iAChE que ao mesmo tempo é antagonista NMDAr, dentre outros (Mesiti *et al.*, 2019).

Figura 19 – Alterações patológicas na DA e possíveis intervenções farmacológicas



Fonte: Abeysinghe; Deshapriya; Udawatte (2020).

3 OBJETIVOS

3.1 GERAL

Avaliar a capacidade dos compostos sintetizados em interagir com diferentes alvos terapêuticos da Doença de Alzheimer, buscando identificar uma possível relação entre a estrutura química e sua atividade.

3.2 ESPECÍFICOS

- Sintetizar e purificar os ligantes aminados derivados do adamantano e caracterizá-los por métodos usuais de análise – espectroscopia na região do infravermelho e ressonância magnética nuclear (RMN) de ^1H e ^{13}C .
- Avaliar a atividade dos compostos sintetizados quanto ao potencial de inibição da enzima acetilcolinesterase (AChE) e a capacidade antioxidante pelo método DPPH.
- Avaliar a citotoxicidade dos compostos sintetizados em cultura de células gliais (U87) e a citogenotoxicidade pelo método do *Allium cepa*.
- Avaliar a atividade biológica frente aos receptores de NMDA e toxicidade aguda dos compostos através de estudos *in vivo* utilizando modelos animais não convencionais.
- Investigar a relação entre a estrutura (tamanho da cadeia carbônica e a modificação dos substituintes) e a atividade biológica.

4 PARTE EXPERIMENTAL

4.1 REAGENTES E EQUIPAMENTOS

Os reagentes e solventes (grau PA – para análise) utilizados para a síntese e purificação dos compostos são das marcas: Vetec, Merck, Sigma Aldrich, Isofar e Nuclear. A evolução das reações e pureza dos compostos foi acompanhada por cromatografia em camada delgada (CCD – cromatofolhas 60F254). Os reveladores utilizados foram: o vapor de iodo e luz ultravioleta. A purificação das reações foi realizada por extração líquido-líquido e cromatografia em coluna em sílica (CCS – sílica gel 60G 70-230 mesh ASTM) e recristalização.

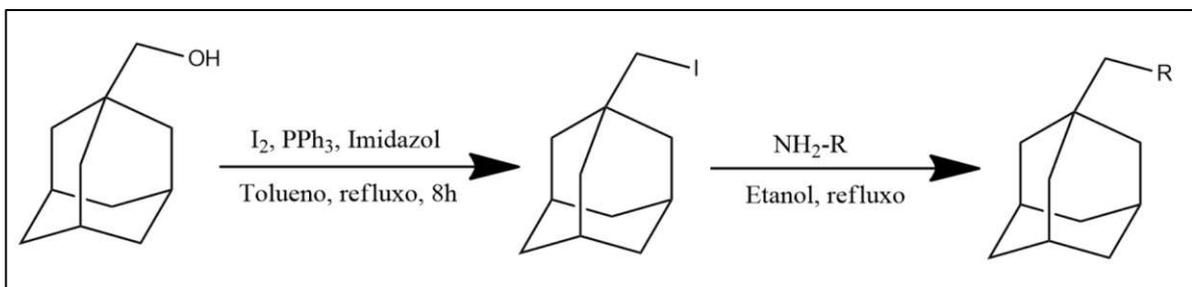
A determinação das faixas de fusão foi realizada com auxílio do aparelho digital (MQAPF/Microquímica). Os espectros na região do infravermelho foram registrados em um equipamento Brucker Alpha, com módulo de ATR (*Attenuated Total Reflectance*) de diamante, na região espectral de 4000 a 400 cm^{-1} , resolução de 4 cm^{-1} . Os espectros de ressonância magnética nuclear de ^1H e ^{13}C foram obtidos em metanol (CD_3OD) ou DMSO deuterados em um espectrômetro Bruker Avance III HD 500 MHz e os deslocamentos químicos (δ) foram expressos em parte por milhão (ppm). Os equipamentos mencionados estão alocados no Departamento de Química da UFJF. Todas as estruturas químicas desenhadas foram feitas utilizando o programa ChemDraw Ultra.

A memantina utilizada como padrão para comparação da atividade biológica no ensaio com *C. elegans* foi purificada a partir de caixas de amostras grátis dos comprimidos comerciais de Zider® (cloridrato de memantina 10 mg, caixa com 15 comprimidos). Os comprimidos foram triturados e misturados a diclorometano e posteriormente filtrados em funil de vidro com papel de filtro. O filtrado obtido foi deixado em repouso para evaporação lenta do solvente, obtendo-se cristais finos e brancos. Para confirmação da estrutura foi feito um espectro de ressonância magnética nuclear (RMN). A escolha do diclorometano ocorreu após um teste inicial no qual 2 comprimidos foram triturados com graal e pistilo (massa obtida 0,42g, da qual 20 mg eram cloridrato de memantina) e 0,05g do pó foi misturado a 5 mL de solvente (água, metanol, etanol, acetona, diclorometano). Em seguida foi feita uma filtração simples e o líquido obtido foi deixado em repouso para evaporação do solvente e posterior análise do sólido. A água, metanol e etanol solubilizaram outros componentes do comprimido além da memantina. Tanto a acetona quanto o diclorometano formaram soluções límpidas e com apenas uma mancha na CCD (eluente: diclorometano – diclorometano/metanol; revelador: vapor de iodo).

4.2 SÍNTESE DOS DERIVADOS ADAMANTOIDES

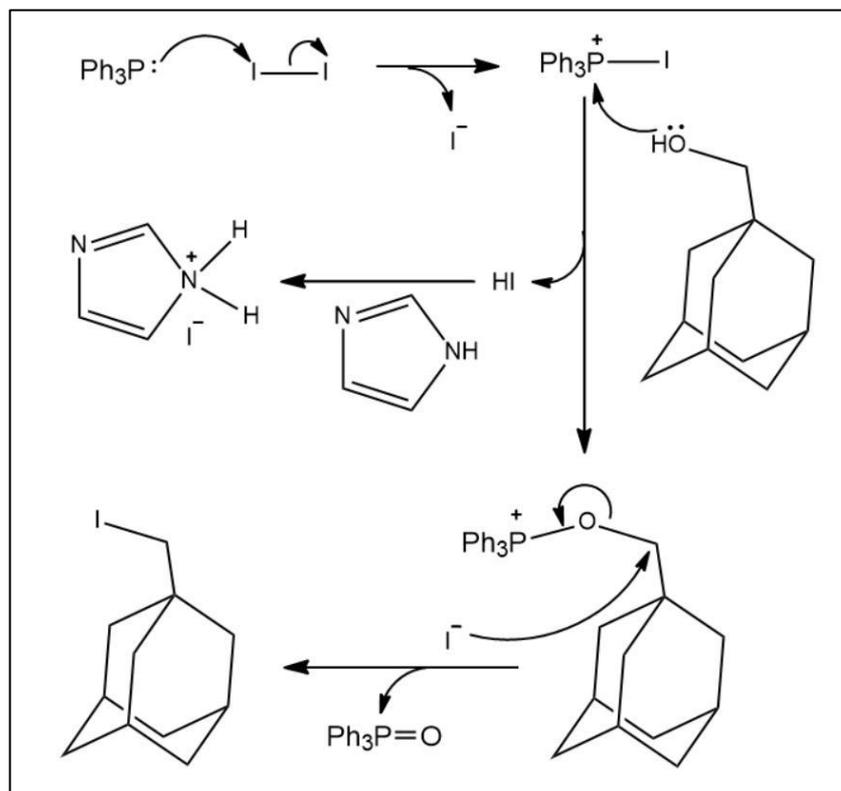
A síntese dos compostos aminados foi feita em duas etapas (Figura 20). Inicialmente fez-se a substituição da hidroxila primária do álcool adamantano-1-metanol por iodo por meio das condições propostas por Garegg e colaboradores (Garegg; Samuelsson, 1979). O mecanismo proposto para a reação utilizando-se imidazol como base e o iodo como eletrófilo é mostrado na Figura 21.

Figura 20 – Esquema geral da síntese dos compostos aminados derivados do adamantano



Fonte: Elaborado pela autora (2025).

Figura 21 – Mecanismo proposto para substituição da hidroxila alcoólica por iodo utilizando a mistura de iodo/trifenilfosfina/imidazol.



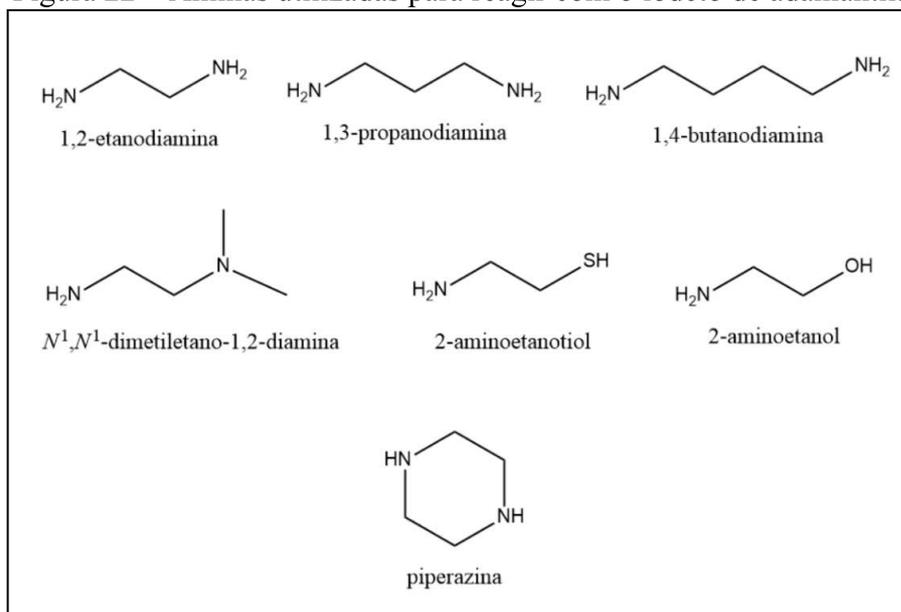
Fonte: Garegg *et al.* (1987).

Inicialmente (etapa I) a trifetilfosfina ataca o iodo formando uma espécie reativa dotada de uma carga positiva e iodeto, posteriormente o par de elétrons do oxigênio (proveniente do álcool) ataca o átomo de fósforo seguido de eliminação de ácido iodídrico (HI), o qual protona o imidazol formando o iodeto de imidazólio. O íon iodeto ataca o grupo R formando o derivado halogenado e, conseqüentemente, liberando o óxido de trifetilfosfina. A trifetilfosfina é um ativador eletrofilico utilizada para promover a conversão de hidroxilas alcoólicas em íons alcóxifosfônio que podem ser deslocados para gerar os respectivos haletos de alquila.

A síntese do precursor iodeto de adamantila foi feita adicionando-se em um balão de fundo redondo, 5 mmol de adamantanometanol, 7,5 mmol de trifetilfosfina, 7,5 mmol de imidazol e 7,5 mmol de iodo molecular em 30 ml de tolueno. A reação foi mantida sob agitação magnética e refluxo durante o período de 8 horas e acompanhada por CCD (eluentes hexano: diclorometano 9,5: 0,5 v/v; os reveladores: luz UV e vapor de iodo). Após o término da reação, esta foi submetida a extração líquido-líquido com solução aquosa de bissulfito de sódio e tolueno. O solvente da fase orgânica foi evaporado sob pressão reduzida e, em seguida, o resíduo foi purificado por cromatografia em coluna, utilizando hexano como eluente, fornecendo um sólido branco cristalino com rendimento 90%.

A segunda etapa da síntese foi a substituição nucleofílica do tipo S_N2 do iodeto pelo grupo amino desejado em meio alcoólico e sob refluxo. Os grupos indicados por R correspondem a: etilenodiamina; 1,3-propanodiamina; 1,4-butanodiamina; N^l, N^l -dimetiletano-1,2-diamina; 2-aminoetanotiol; 2-aminoetanol e piperazina (Figura 22). Para tal, adicionou-se em um balão de fundo redondo 1 mmol do iodeto de adamantila e 10 mmol da amina em etanol. Em seguida a reação foi levada a aquecimento (aproximadamente 90°C) com agitação magnética e acompanhada por CCD [eluentes diclorometano/metanol 9:1 (v/v) e os reveladores: luz UV e vapor de iodo] até que todo o iodeto de adamantila fosse consumido (considerado como final da reação). Após o término da reação, foi feita uma extração líquido-líquido (diclorometano e água) e a fase orgânica foi evaporada sob pressão reduzida. A purificação do produto obtido foi feita por meio da cromatografia em coluna de sílica. O produto obtido foi dissolvido em metanol e convertido a cloridrato através do gotejamento de ácido clorídrico PA até $\text{pH}=2$, posteriormente deixado em temperatura ambiente para que ocorresse a precipitação do produto sólido, que foi então filtrado. Os tempos de reação variaram bastante, de poucos dias a quase um mês, a depender da amina reagente. Aumento da temperatura e adição de mais amina reagente foram algumas adaptações feitas a fim de melhorar o ambiente reacional e deslocar o equilíbrio da reação em relação aos produtos, dessa forma obtendo bons rendimentos (50 a 85%) (Barbosa, 2014).

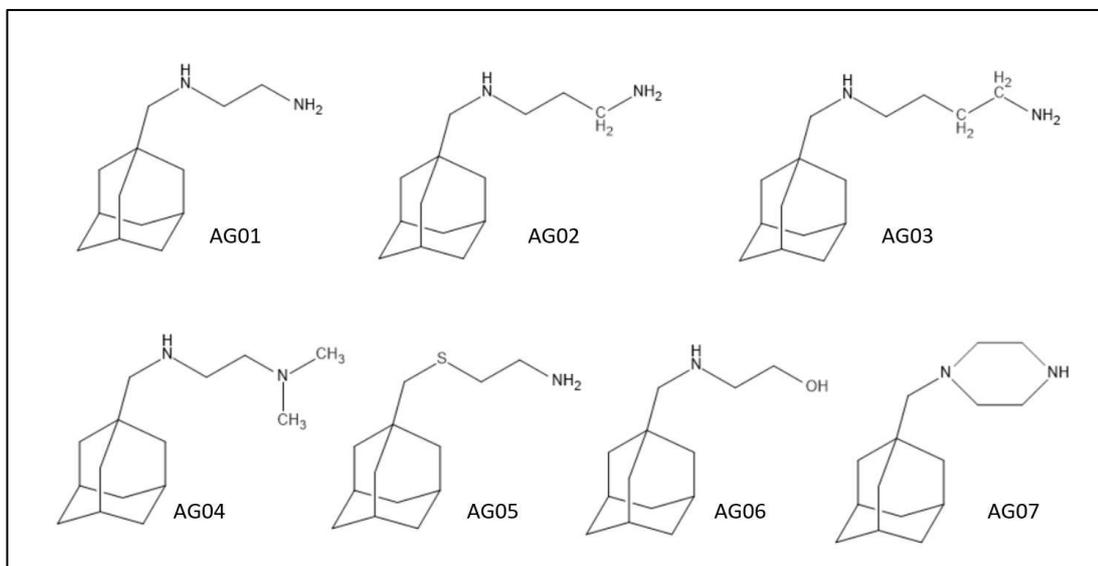
Figura 22 – Aminas utilizadas para reagir com o iodeto de adamantila



Fonte: Elaborado pela autora (2025).

A elucidação das estruturas químicas dos compostos foi realizada a partir de espectroscopia na região do infravermelho (IV) e por ressonância magnética nuclear (RMN) e faixa de fusão para os compostos sólidos. Para a caracterização por RMN, os compostos foram solubilizados em metanol deuterado (CD_3OD) ou DMSO deuterado. As estruturas moleculares podem ser vistas na Figura 23, inicialmente utilizamos diaminas com diferença no tamanho da cadeia carbônica, obtendo os compostos AG01, AG02 e AG03, posteriormente mantivemos o tamanho da cadeia carbônica e variamos os ligantes AG04, AG05, AG06 e AG07.

Figura 23 – Compostos propostos derivados da adamantila com as aminas escolhidas.



Fonte: Elaborado pela autora (2025).

4.3 INIBIÇÃO DA ACETILCOLINESTERASE

O teste de inibição da acetilcolinesterase seguiu metodologia descrita por Ellmam e colaboradores (1961) com adaptações. Foi feito em microplaca, na qual foram adicionadas diferentes concentrações dos compostos a serem testados em tampão Tris-HCl, 50 mM, pH 8,0, em seguida o substrato constituído de ácido ditiobisnitrobenzóico (DTNB) e acetilcolina e, por fim, a enzima acetilcolinesterase. A leitura da absorvância foi feita num leitor de microplaca em comprimento de onda fixo de 415 nm, em intervalos de 15 segundos e 41 ciclos a 37 °C e o IC₅₀ foi determinado por regressão não linear em GraphPad Prism 6.0 e representa qual a concentração é capaz de inibir 50% da hidrólise da acetilcolina. O experimento foi realizado em triplicata para cada concentração (Lucas *et al.*, 2019).

4.4 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

A atividade antioxidante *in vitro* foi avaliada pelo método espectrofotométrico utilizando DPPH (2,2-difenil-1-picrilidrazil), descrito por Sreejayan e Rao (1996) com algumas modificações. Para a realização do ensaio foi preparada uma solução de DPPH a 50 µM pela pesagem de 100 µg de DPPH solubilizado em 50 mL de etanol absoluto.

As amostras foram pesadas e solubilizadas em etanol PA, obtendo-se a concentração de 1.000 µg/mL. A partir dessa, foram realizadas diluições seriadas, tendo o etanol absoluto como diluente. Em microplaca de 96 poços, 150 µL de DPPH foram adicionados a uma alíquota de 50 µL das soluções previamente preparadas, resultando em solução final da faixa de concentrações-teste de 0,97 a 250 µg/mL. O controle negativo da amostra foi preparado para cada concentração, sendo 150 µL de etanol absoluto adicionado à 50 µL da solução teste. A mistura reacional foi então mantida durante 30 minutos ao abrigo da luz e à temperatura ambiente. Então, a absorvância foi medida em espectrofotômetro (Multiskan GO, Datamed, EUA) a 510 nm contra o controle negativo (etanol). Após a leitura da absorvância das amostras, foi calculada a inibição do radical DPPH utilizando a Equação 1:

$$\% \text{ inibição} = 100 \times (A_0 - A_a) / A_0 \text{ (Eq. 1)}$$

Sendo A₀ a absorção de controle negativo, e A_a a absorção da amostra de teste. Este cálculo foi utilizado para todas as concentrações das amostras e seus resultados foram plotados para construção de uma curva analítica de inibição *versus* concentração da amostra (µg/mL). O

valor CI_{50} foi calculado a partir da equação do gráfico de dispersão linear elaborada com o auxílio do *software* GraphPad Prism 6.0, o qual representa a concentração da substância que inibe 50% do radical DPPH. Todos os ensaios foram realizados em triplicata.

4.5 CITOTOXICIDADE

Para determinação da viabilidade celular foram utilizadas as linhagens: L929 (fibroblastos de camundongo) e U87 (células de glioblastoma humano). As células L929 foram distribuídas em meio de cultura RPMI 1640, suplementado com soro fetal bovino (FBS) 10% v/v, sendo 1×10^3 células/poço/100 μ L em placas com 96 poços que foram devidamente incubadas a 37 °C em atmosfera umedecida a 5% de CO_2 por 24 horas para total aderência. As células U87 foram distribuídas em meio de cultura DMEM, suplementado com piruvato de sódio (1% v/v) e soro fetal bovino (FBS) 10% v/v, sendo 3×10^3 células/poço/100 μ L em placas com 96 poços que foram devidamente incubadas a 37 °C em atmosfera umedecida a 5% de CO_2 por 24 horas para total aderência. Nos poços da placa contendo as células já aderidas, foram distribuídos 100 μ L de concentrações decrescentes (100, 10, 1, 0,1 e 0,01 μ M) da substância a ser testada, em quadruplicatas. As soluções-estoque dos compostos foram preparadas em DMSO e diluídas em meio de cultura com no máximo 1% v/v de DMSO. Para controle negativo foi utilizado 100 μ L de meio de cultura suplementado. Após a exposição aos compostos de investigação por 72h, as células foram incubadas com MTT (5 μ g/10 μ L/poço) durante 4 horas. A seguir, todo o líquido sobrenadante foi removido por aspiração e foram adicionados 100 μ L de DMSO/poço, sendo a viabilidade celular (proporcional à concentração dos sais de formazan – produto da redução mitocondrial do MTT nas células viáveis) determinada pela medida de absorbância a 570 nm em espectrofotômetro de microplacas (Mosmann, 1983). Os dados obtidos através dos ensaios citotóxicos foram normalizados considerando-se a viabilidade celular do controle negativo como 100% utilizando o *software* GraphPad Prism 8.0.

4.6 CITOGENOTOXICIDADE

O teste de citogenotoxicidade utilizando o ensaio em *Allium cepa* foi realizado em parceria com o laboratório de Citogenotoxicidade e Mutagênese Ambiental da UFJF. Seguimos o protocolo elaborado pelo grupo, que consiste em inicialmente deixar os bulbos de cebola de molho em água destilada para facilitar a remoção da casca escura, após essa remoção, o excesso de raízes mortas também foi retirado com a ajuda de um bisturi. Então as cebolas limpas foram

colocadas para pré-enraizamento em água destilada por 48 horas no escuro em temperatura ambiente, como demonstrado na Figura 24. A pré-exposição em água destilada serve para a emissão de raízes que serão posteriormente expostas aos tratamentos em um experimento de citogenotoxicidade, sendo que o ideal é que as raízes novas estejam com um tamanho entre 1 a 1,5 cm no momento da exposição. Após esse tempo, os bulbos foram lavados em água corrente e cuidadosamente secos evitando-se levar água para os tratamentos.

Figura 24 – Preparo dos bulbos de *Allium cepa*



Fonte: Elaborado pela autora (2024).

Optamos por testar apenas o **AG03** (derivado da butanodiamina) por ser o composto que apresentou maior atividade inibitória frente a acetilcolinesterase. Escolhemos cinco concentrações (5x; 2x; 1x; 0,5x; 0,2x) baseadas no IC₅₀ AchE (0,28 mmol/L) para essa amostra, variando de 1,4 mmol/L (5 vezes o IC₅₀) a 0,056 mmol/L (0,2 vezes o IC₅₀ encontrado no teste de inibição da acetilcolinesterase). Cada amostra foi feita em quadruplicata, e com leituras com diferentes tempos de exposição (24 horas e 48 horas), totalizando 40 bulbos de cebola expostos

ao tratamento. Inicialmente preparamos 500 mL de uma solução estoque de **AG03** a 2,8 mmol/L (equivalente a 10x IC₅₀ AchE – 0,28 mmol/L) e a partir dela foram feitas as cinco diluições (volume final necessário para o teste é de 400 mL de cada diluição). Como branco usamos apenas água destilada (quadruplicada e 2 tempos de exposição, sendo necessários 8 bulbos de cebola). Após a exposição, os bulbos foram lavados e cuidadosamente secos, em seguida parte das raízes foram coletadas e fixadas em solução de etanol/ácido acético (3:1, v/v – as raízes devem permanecer no fixador por pelo menos 24 horas antes da sua utilização) para posterior confecção das lâminas com tecido meristemático que será avaliado em busca de alterações citogenéticas. Outra parte das raízes foi macerada com o auxílio de um bisturi, em seguida adicionadas em tampão e filtradas (40µm). À solução resultante foi adicionado iodeto de propídeo – corante que se liga aos pares de bases nitrogenadas do DNA das células e apresenta fluorescência no vermelho – e realizada a citometria de fluxo.

4.7 TOXICIDADE AGUDA

O ensaio de toxicidade aguda empregando o microcrustáceo *Artemia salina* foi realizado de acordo com a metodologia descrita por Meyer e colaboradores (1982), com modificações. Os ovos encistados do microcrustáceo foram incubados em água marinha artificial preparada de acordo com Martins e colaboradores (2019), com pH 8-9, em temperatura ambiente. Após 48h de incubação, os ovos eclodiram, e 10 unidades do microcrustáceo foram coletadas e colocadas em poços contendo a amostra dissolvida em água marinha artificial, com concentrações variando de 10 a 1.000 µg/mL e o ensaio foi realizado em triplicata. O timol foi utilizado como fármaco de referência, na mesma faixa de concentração das amostras. Após 24 horas, os microcrustáceos sobreviventes foram contados e a porcentagem de morte foi calculada. A concentração letal a 50% (CL₅₀) representa a concentração da amostra que causou a morte de 50% dos organismos testados e foi calculada por análise Probit (Finney, 1971). O teste t de Student para amostras independentes foi utilizado para avaliar diferenças significativas dos valores de CL₅₀ entre os grupos de interesse.

4.8 TESTES *IN VIVO*

No presente estudo escolhemos o *Caenorhabditis elegans* como modelo animal de experimentação. O *C. elegans* é um pequeno nematódeo de vida livre encontrado em todo o mundo. Muitas características o tornam um excelente sistema experimental, incluindo seu

tamanho pequeno (as larvas recém-eclodidas têm 0,25 milímetros de comprimento e os adultos têm 1 milímetro de comprimento), ciclo de vida rápido (aproximadamente 3 dias a 25°C), transparência, além de ter o genoma completamente sequenciado (Cook *et al.*, 2019). São normalmente cultivados em placas de Petri com ágar contendo uma camada da bactéria *Escherichia coli*. Os ensaios com esse verme permitem analisar alterações comportamentais como uma lesão em um de seus 302 neurônios, além de testes com substâncias coloridas ou fluorescentes já que o corpo do animal é transparente. O *C. elegans* é um ótimo modelo para testar como fármacos e compostos bioativos afetam sua viabilidade e movimento, indicando os efeitos de toxinas em seu comportamento e ciclo de vida (Adedara *et al.*, 2025; Ma *et al.*, 2018). A utilização deste animal não convencional apresenta muitas vantagens como: baixo custo, menor ciclo biológico (que permite avaliar várias gerações em um curto tempo), reduzido espaço necessário para cultivo, muitos descendentes a cada geração, organismos simples e bem mapeados. Os ensaios permitem o estudo dos fenômenos biológicos semelhantes – em um ou mais aspectos – aos fenômenos em seres humanos; além do estudo do comportamento do animal, de um processo patológico espontâneo ou induzido (a ser investigado) (Cook *et al.*, 2019; Scorzoni *et al.*, 2018).

4.8.1 Manutenção e exposição do *C. elegans*

Para este estudo, a cepa de *C. elegans* (N2) utilizada foi a selvagem. Os vermes foram mantidos em placas de Meio de Crescimento de Nematoides (NGM) a 20°C. Para obter uma população sincronizada, vermes adultos grávidos foram coletados e tratados com uma solução branqueadora composta por 1% de hipoclorito de sódio (NaOCl) e 0,25 mol·L⁻¹ de hidróxido de sódio (NaOH), que lisava os adultos e liberava os ovos. Os ovos foram então incubados em tampão M9 na ausência de alimento por 16 a 24 h, resultando em larvas L1 sincronizadas (Porta-de-la-Riva, M., et al. 2012). Essas larvas L1 foram expostas em meio líquido a uma faixa de concentrações (1, 5, 10, 25, 50 e 100 µM) do composto **AG03** ou cloridrato de memantina por 1 h. Cada tratamento foi realizado em tubos de microcentrífuga estéreis de 1,5 mL contendo aproximadamente 250–300 nematoides em um volume final de 1 mL. Após a exposição, os vermes foram alocados em grupos de exposição aguda ou crônica. Para o grupo de exposição crônica, aproximadamente 100 vermes foram imediatamente transferidos para placas de NGM frescas semeadas com OP50 e incubadas a 20 °C até a realização dos ensaios comportamentais. Para o grupo de exposição aguda, os vermes foram lavados três vezes com tampão M9 para

remover qualquer composto residual, depois transferidos para placas de NGM semeadas e mantidos nas mesmas condições.

4.8.2 Ensaio de sobrevivência

Após o período de incubação, aproximadamente 100 animais por grupo e por experimento foram observados em um microscópio óptico (Olympus modelo SZ2-LGB) e classificados como vivos ou mortos após não responderem a estímulos mecânicos. Três experimentos independentes foram realizados (Porta-de-la-Riva, M., *et al.* 2012).

4.8.3 Bombeamento faríngeo

Utilizando um microscópio, o número de contrações faríngeas de cada verme na placa de tratamento foi contado por 10 s; os testes foram realizados em triplicata. Posteriormente, os valores para cada verme foram calculados como a média e expressos como bombeamento faríngeo/minuto. Dez vermes por grupo por experimento foram avaliados em três experimentos independentes (da Silva *et al.*, 2022).

4.8.4 Movimentos de Cabeça

Vermes previamente tratados, na fase adulta jovem, foram escolhidos aleatoriamente e colocados por 1 min em uma gota de tampão M9. Em seguida, o número de movimentos de cabeça de cada verme foi contado por 20 s. Três experimentos independentes foram realizados, com 10 vermes por grupo por experimento (da Silva *et al.*, 2022).

4.8.5 Resposta ao toque

A resposta ao toque foi avaliada estimulando-se suavemente a região da cabeça de cada verme com uma escova de cerdas finas. Um movimento para trás foi considerado uma resposta positiva. Vermes que não apresentaram reação após dez toques consecutivos foram classificados como não responsivos (da Silveira *et al.*, 2021).

4.8.6 Comprimento corporal e parâmetros locomotores por WormLab®

Para avaliar o comprimento corporal e o comportamento locomotor, os vermes foram transferidos após 48 h de tratamento para o tampão M9 e registrados por 30 segundos usando um estereomicroscópio equipado com uma câmera digital. Os vídeos foram analisados usando o software WormLab (MBF Bioscience, Williston, VT, EUA). O comprimento corporal foi medido automaticamente com base na função de esqueletização do verme do software. Além disso, parâmetros locomotores como velocidade de nado, taxa de iniciação de ondas, amplitude dinâmica e enrolamento foram extraídos das mesmas gravações (da Silva *et al.*, 2022). Três experimentos independentes foram realizados, com pelo menos 10 animais por grupo por experimento.

4.8.7 Ensaio de paralisia

Após a exposição descrita no item **4.8.1**, vermes da cepa CL2006 ([*dvIs2 (unc-54::A β 1-42 + rol-6(su1006))*]) foram mantidos a 15 °C em placas de NGM semeadas com *E. coli* OP50. Para o ensaio de paralisia, 50 vermes em estágio L4 foram transferidos para placas de NGM frescas e então incubados a 25 °C, iniciando a indução térmica da expressão do peptídeo A β 1-42. A partir do tempo zero, a paralisia foi avaliada a cada hora por até 12 horas. Os vermes foram considerados paralisados se não respondessem a um toque suave. (Leiteritz *et al.*, 2018)

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DOS COMPOSTOS ORGÂNICOS

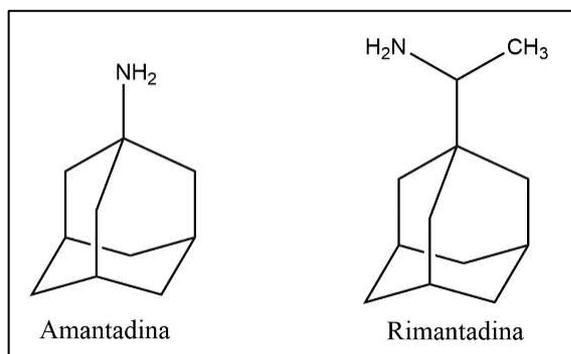
A iodeto de adamantila foi caracterizado por RMN de ^1H e de ^{13}C , apresentando os seguintes sinais:

RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3), δ (ppm): 1,51- 1,63 (m, 15H, H adamantila,); 1,96 (s, 3H, H adamantila); 3,02 (s, 2H, H1).

RMN de ^{13}C (125 MHz, CDCl_3), δ (ppm): 27,1 (C1); 28,8; 32,6; 36,7 e 42,2 (carbonos núcleo adamantila).

A presença do anel adamantano (triciclo[3.3.1.1^{3,7}]decano) nos compostos orgânicos lhes confere características lipofílicas que são essenciais para que eles consigam atravessar a barreira hematoencefálica. Essa estrutura química está presente em medicamentos que agem no SNC como a memantina, utilizada para tratar os pacientes com a DA e a amantadina, utilizada no tratamento daqueles com a Doença de Parkinson e na rimantadina, um fármaco antiviral de administração oral que era usado no tratamento de infecções de gripe pelo vírus influenza A (atualmente o seu uso para o tratamento de gripe já não é recomendado, devido à resistência) (Figura 25). Por essa razão, foi escolhida essa estrutura como grupo farmacóforo capaz de atuar sobre os NMDAr.

Figura 25 – Estruturas químicas de compostos com anel adamantano



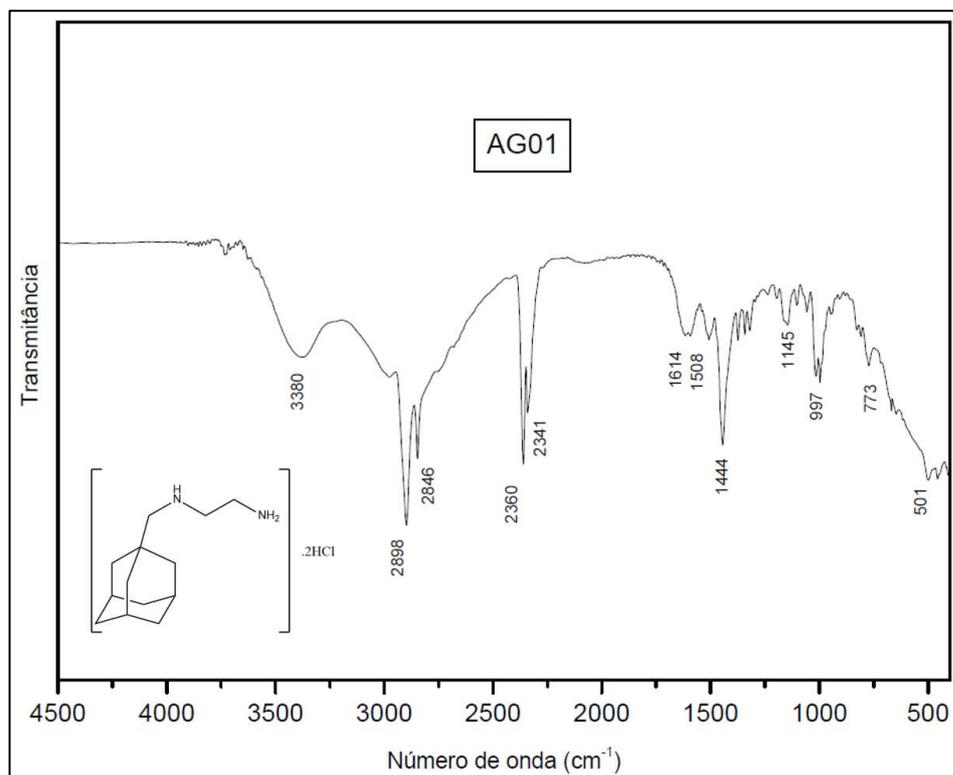
Fonte: Elaborado pela autora (2025).

A etapa seguinte foi a substituição do iodo pela amina desejada.

O composto orgânico **AG01**, dicloridrato de *N*¹-(triciclo[3.3.1.1^{3,7}]dec-1-ilmetil)-1,2-etanodiamina possui fórmula molecular $[\text{C}_{13}\text{H}_{24}\text{N}_2] \cdot 2\text{HCl}$ massa molar de 281,26 $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$ e apresentou ponto de decomposição superior a 250°C. No espectro de infravermelho (Figura 26)

pode ser observado a presença da banda de absorção em 3380 cm^{-1} referente à deformação axial da ligação N-H, além da presença da deformação axial característica da ligação C-H alifático em 2898 e 2846 cm^{-1} , e banda referente a deformação angular de CH_2 em 1444 cm^{-1} .

Figura 26 – Espectro de infravermelho do composto AG01

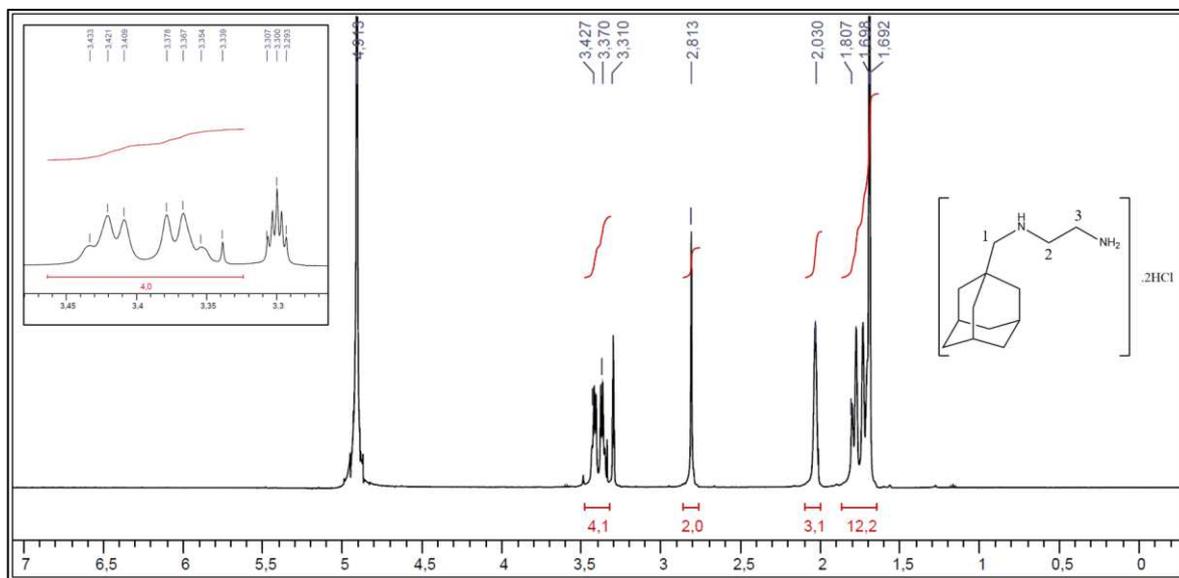


Fonte: Elaborado pela autora (2025).

Os espectros de RMN evidenciam a estrutura proposta e os sinais podem ser vistos nas Figuras 27 e 28. Os sinais de RMN de ^1H do núcleo adamantano aparecem entre 1,69-1,80 ppm (multiplete), com integral para 12 hidrogênios (CH_2), em 2,03 ppm observa-se sinal com integral para 3 hidrogênios, referente aos hidrogênios CH do adamantano. O sinal dos hidrogênios H1 aparece como um singlete em 2,81 ppm e os sinais de H2 e H3 aparecem como um multiplete entre 3,31-3,43 ppm. A expansão dessa área pode ser vista à esquerda na figura, onde também é possível ver o quinteto característico do solvente utilizado (metanol deuterado – CD_3OD). Não foi possível ver o sinal dos hidrogênios do NH no solvente utilizado. Observa-se um sinal intenso em aproximadamente 4,9 ppm referente a umidade presente no solvente. No RMN de carbono aparecem os sinais do adamantano em: 29,54 (Ada-3); 33,64 (Ada-1); 37,56 (Ada-4); 40,86 (Ada-2); os carbonos alifáticos 36,88 (carbono alifático 3); 47,24 (carbono alifático 2) 61,53 (carbono alifático 1). O septeto do CD_3OD aparece em 49,15 ppm. A numeração empregada para os átomos não se baseia na nomenclatura, tendo somente fins

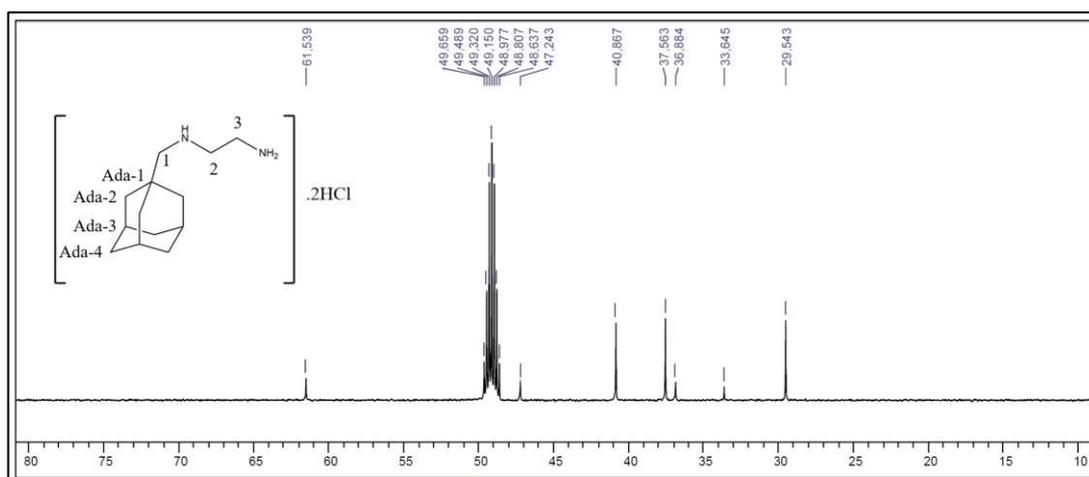
didáticos. As atribuições dos sinais foram feitas baseadas na literatura existente e com simulações de predições no programa ChemDraw.

Figura 27 – RMN de ^1H do composto **AG01** (500 MHz, CD_3OD)



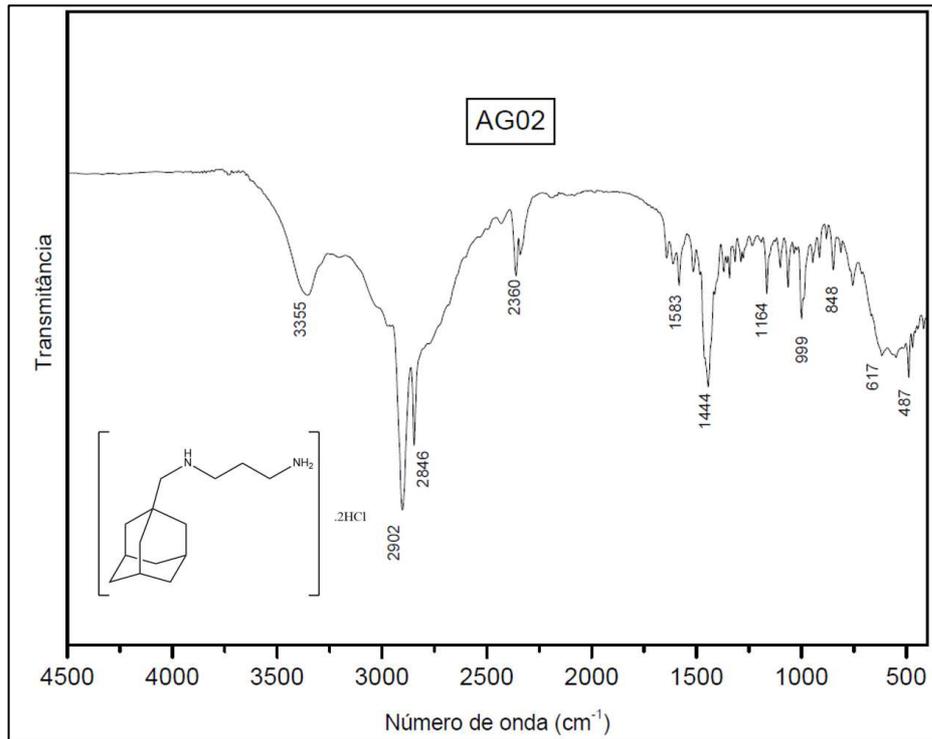
Fonte: Elaborado pela autora (2025).

Figura 28 – RMN de ^{13}C do composto **AG01** (125 MHz, CD_3OD)



Fonte: Elaborado pela autora (2025).

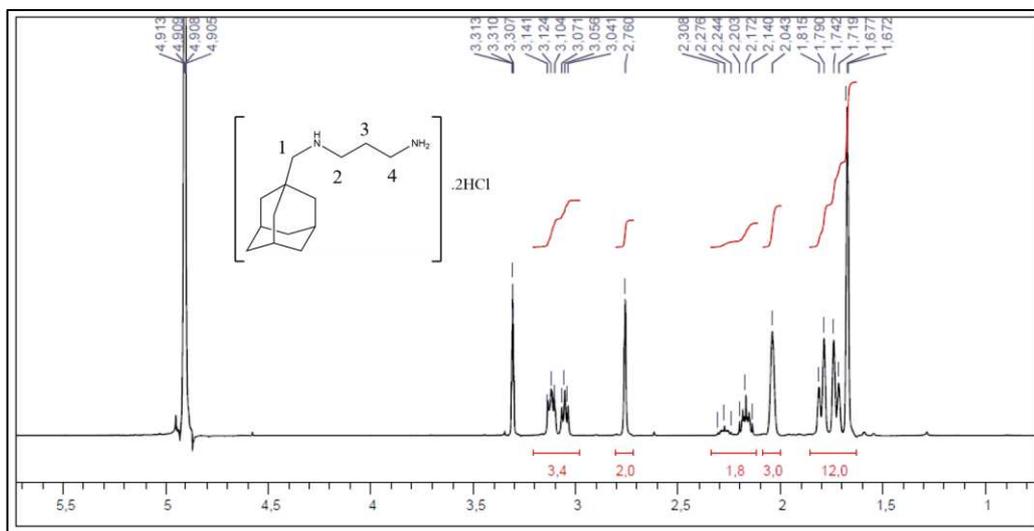
O composto orgânico **AG02**, dicloridrato de N^1 -(tricyclo[3.3.1.1^{3,7}]dec-1-ilmetil)-1,3-propanodiamina possui fórmula molecular $[\text{C}_{14}\text{H}_{26}\text{N}_2] \cdot 2\text{HCl}$ massa molar de $295,29 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$ e apresentou ponto de decomposição superior a 250°C . No espectro de infravermelho (Figura 29) pode ser observado a presença da banda de absorção em 3355 cm^{-1} referente à deformação axial da ligação N-H, além da presença da deformação axial característica da ligação C-H alifático em 2902 e 2846 cm^{-1} , e banda referente a deformação angular de CH_2 em 1444 cm^{-1} .

Figura 29 – Espectro de infravermelho do composto **AG02**

Fonte: Elaborado pela autora (2025).

Os sinais observados no RMN evidenciam a estrutura proposta e são descritos abaixo.

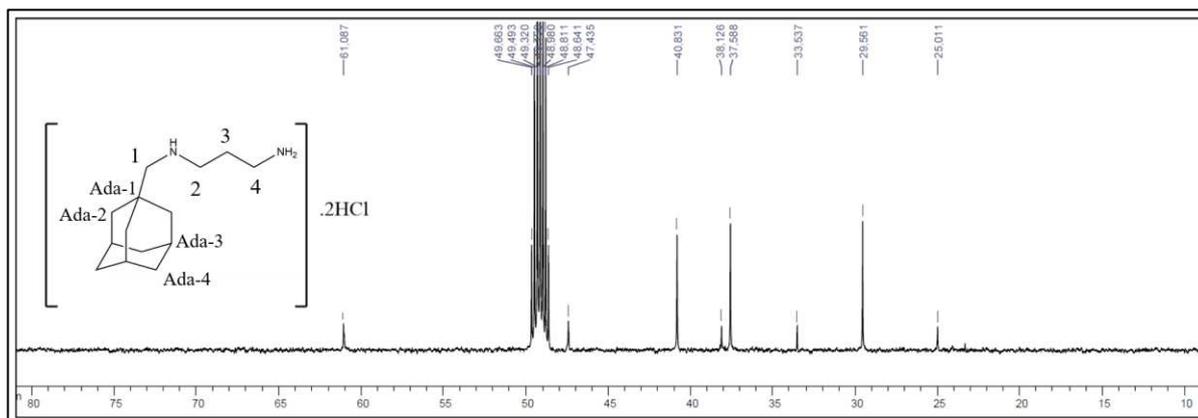
RMN de ^1H (500 MHz, CD_3OD), δ (ppm): 1,67- 1,81 (m, 12H, H adamantila,); 2,04 (s, 3H, H adamantila); 2,14-2,31 (m, 2H, H3); 2,76 (s, 2H, H1); 3,04-3,14 (m, 4H, H2 e H4). Em 3,31 ppm é possível ver o sinal da impureza do solvente (Figura 30).

Figura 30 – RMN de ^1H do composto **AG02** (500 MHz, CD_3OD)

Fonte: Elaborado pela autora (2025).

RMN de ^{13}C (125 MHz, CD_3OD), δ (ppm): 25,01 (C3); 29,56 (Ada-3); 33,53 (Ada-1); 37,58 (Ada-4); 38,12 (carbono alifático C4); 40,83 (Ada-2); 47,43 (carbono alifático C2) 61,08 (carbono alifático C1) (Figura 31). A numeração empregada não se baseia na nomenclatura, tendo somente fins didáticos.

Figura 31 – RMN de ^{13}C do composto **AG02** (125 MHz, CD_3OD)



Fonte: Elaborado pela autora (2025).

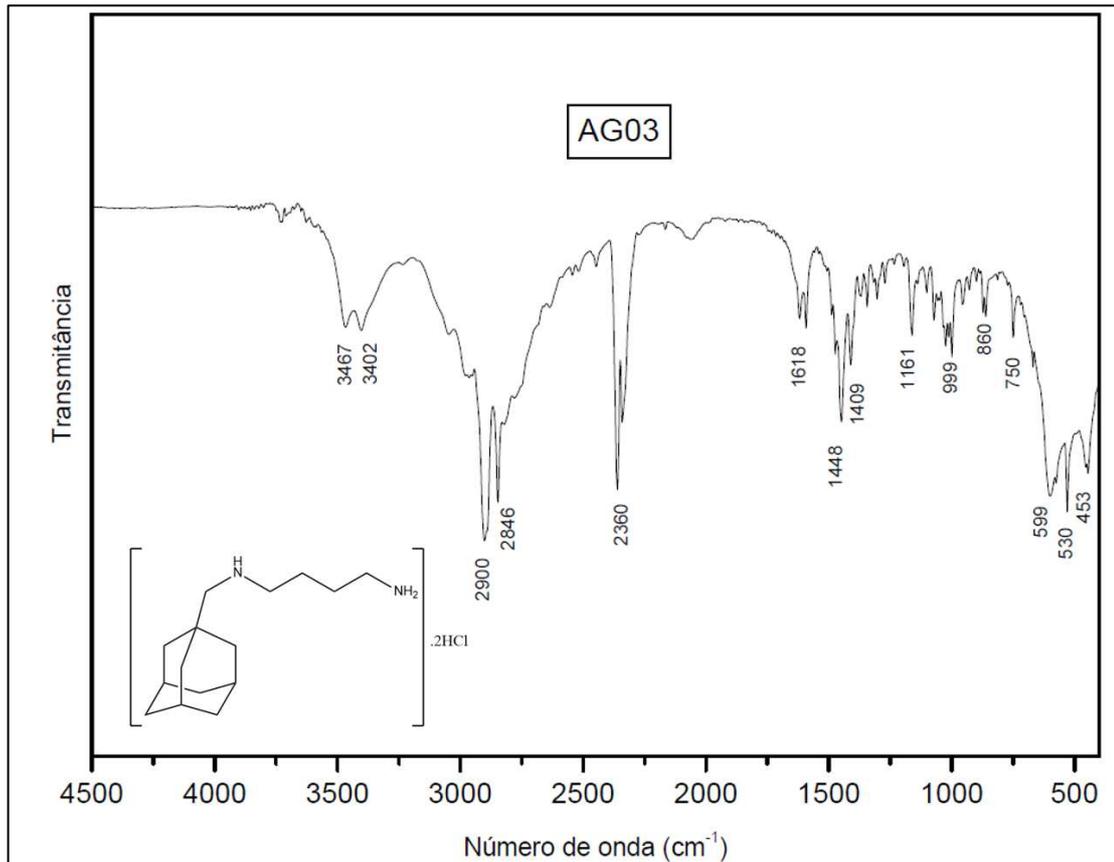
O composto orgânico **AG03**, Dicloridrato de N^1 -(tricyclo[3.3.1.1^{3,7}]dec-1-ilmetil)-1,4-butanodiamina possui fórmula molecular $[\text{C}_{15}\text{H}_{28}\text{N}_2] \cdot 2\text{HCl}$ massa molar de $309,32 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$ e apresentou ponto de decomposição superior a 250°C . No espectro de infravermelho (Figura 32) pode ser observado a presença das bandas de absorção em 3467 e 3402 cm^{-1} referentes à deformação axial da ligação N-H, além da presença da deformação axial característica da ligação C-H alifático em 2900 e 2846 cm^{-1} , e banda referente a deformação angular de CH_2 em 1448 cm^{-1} .

Os sinais observados no RMN de hidrogênio e carbono evidenciam a estrutura proposta e estão descritos abaixo:

RMN de ^1H (500 MHz, CD_3OD), δ (ppm): 1,66- 1,84 (m, 16H – 6CH_2 adamantila e CH_2 H3 e H4); 2,04 (s, 3H, CH adamantila); 2,74 (s, 2H, H1); 3,06 (m, 2H, H2). Em 3,31 temos um sinal com integral para 3 hidrogênios, 2H do H5 e um H do sinal do solvente metanol deuterado (Figura 33).

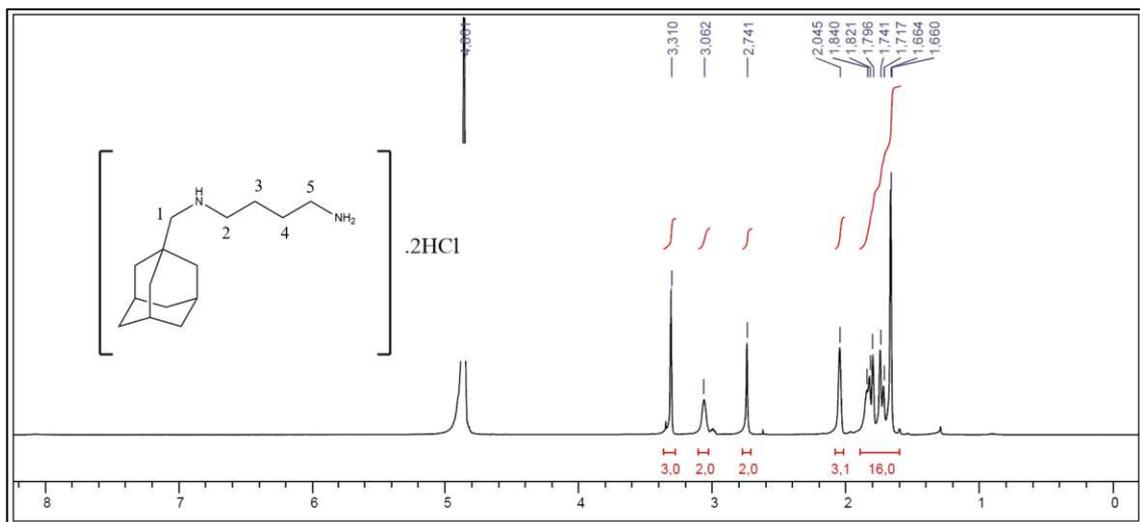
RMN de ^{13}C (125 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$), δ (ppm) – observa-se oito sinais no espectro referentes aos carbonos do composto orgânico e o septeto do solvente em 39,7 ppm: 21,60 (C3); 23,95 (C4); 27,36 (Ada-1 e Ada-3); 31,84 (Ada-4); 35,97 (Ada-2); 37,92 (C5); 47,36 (C2); 58,07 (C1) (Figura 34). A numeração empregada não se baseia na nomenclatura, tendo somente fins didáticos.

Figura 32 – Espectro de infravermelho do composto **AG03**

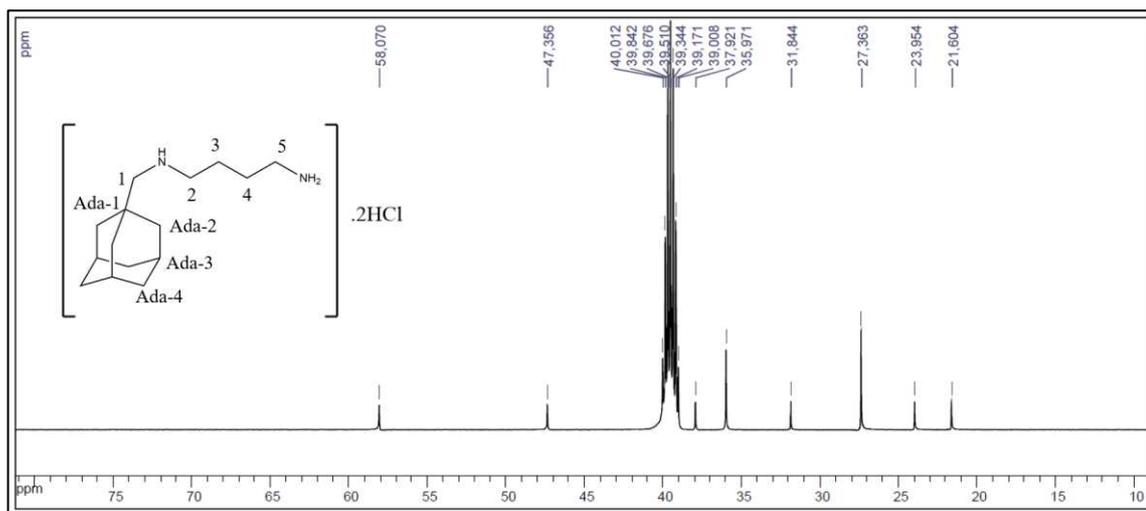


Fonte: Elaborado pela autora (2025).

Figura 33 – RMN de ^1H do composto **AG03** (500 MHz, CD_3OD)



Fonte: Elaborado pela autora (2025).

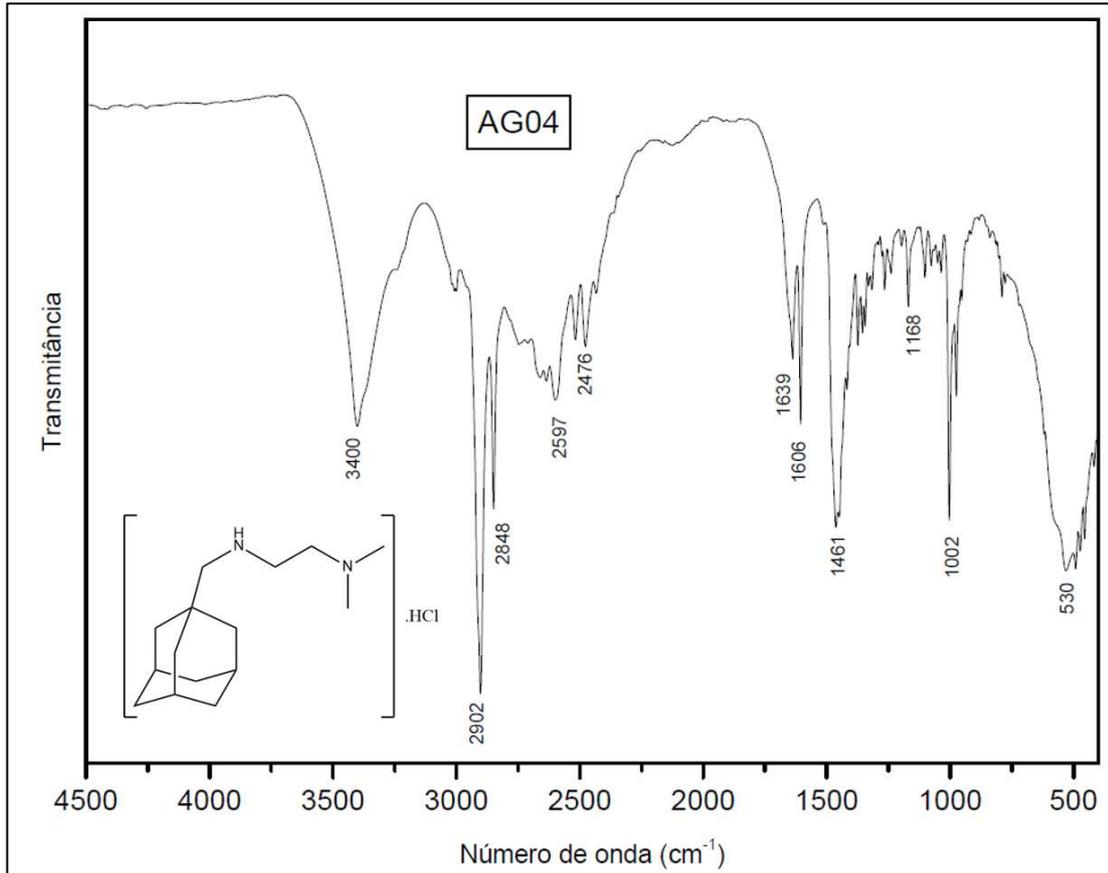
Figura 34 – RMN de ^{13}C do composto **AG03** (125 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$)

Fonte: Elaborado pela autora (2025).

O composto orgânico **AG04**, Dicloridrato de N^1, N^1 -Dimetil- N^2 -(triciclo[3.3.1.1^{3,7}]dec-1-ilmetil)-1,2-etanodiamina possui fórmula molecular $[\text{C}_{15}\text{H}_{28}\text{N}_2] \cdot 2\text{HCl}$ massa molar de $309,32 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ e apresentou ponto de decomposição superior a 250°C . No espectro de infravermelho (Figura 35) pode ser observado a presença da banda de absorção em 3400 cm^{-1} referente à deformação axial da ligação N-H, além da presença da deformação axial característica da ligação C-H alifático em 2902 e 2848 cm^{-1} , e banda referente a deformação angular de CH_2 em 1461 cm^{-1} .

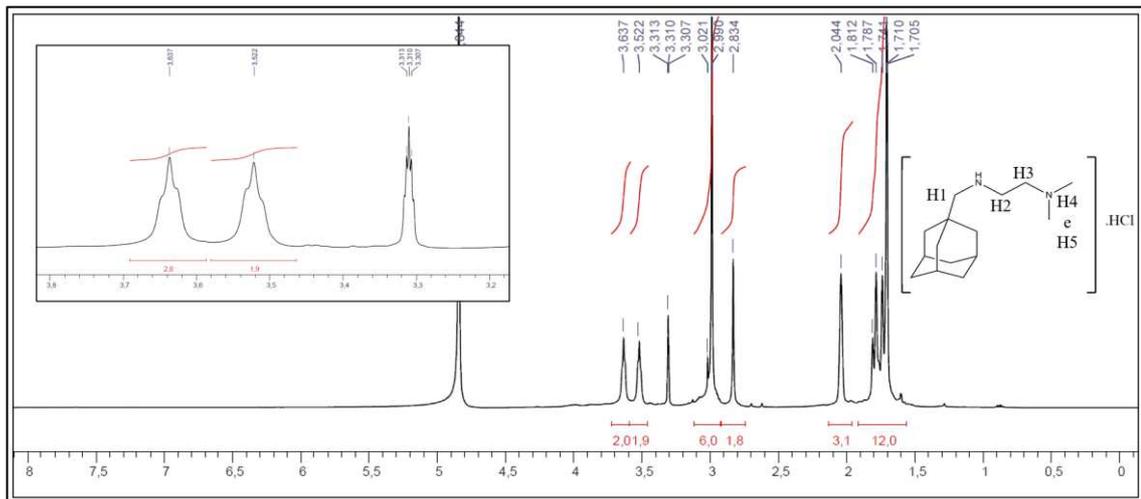
Os espectros de RMN do composto **AG04** evidenciam a obtenção do composto almejado e os sinais podem ser vistos na Figura 36 para o RMN de ^1H e 37 para o RMN de ^{13}C . Os sinais de RMN de ^1H referente aos CH_2 do núcleo adamantano podem ser observados entre 1,70-1,81 ppm (multipletto), com integral para 12 hidrogênios; em 2,04 ppm observa-se sinal com integral para 3 hidrogênios, referente aos hidrogênios CH do adamantano. O sinal dos hidrogênios H1 aparece como um singletto em 2,83 ppm, em 2,99 ppm é possível ver o sinal com integral para 6 hidrogênios dos CH_3 de H4 e H5. Os sinais correspondentes aos hidrogênios CH_2 de H2 e H3 aparecem como um multipletto entre 3,52-3,63 ppm. Além disso a expansão dessa área pode ser vista à esquerda na Figura, onde também é possível ver o quinteto característico do solvente utilizado (metanol deuterado). No RMN de carbono aparecem os sinais do adamantano em: 29,37 (Ada-3); 33,52 (Ada-1); 37,41 (Ada-4); 40,76 (Ada-2). Os carbonos C4 e C5 são equivalentes e apresentam sinal em 43,97 ppm. Para os demais carbonos alifáticos, observa-se: 44,66 (C3); 54,37(C2) e 61,49 (C1) ppm.

Figura 35 – Espectro de infravermelho do composto **AG04**



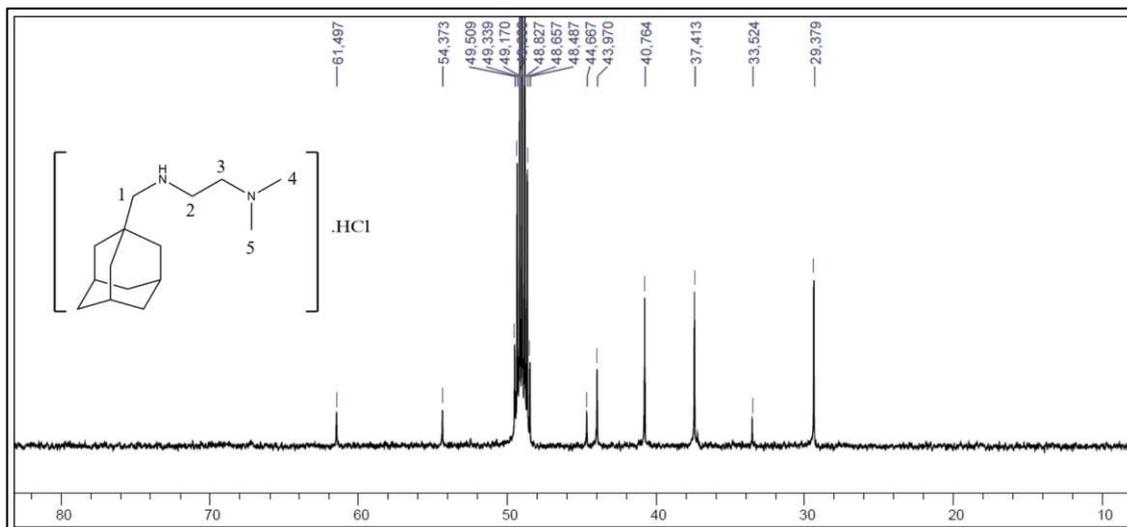
Fonte: Elaborado pela autora (2025).

Figura 36 – RMN de ^1H do composto **AG04** (500 MHz, CD_3OD)



Fonte: Elaborado pela autora (2025).

Figura 37 – RMN de ^{13}C do composto **AG04** (125 MHz, CD_3OD)



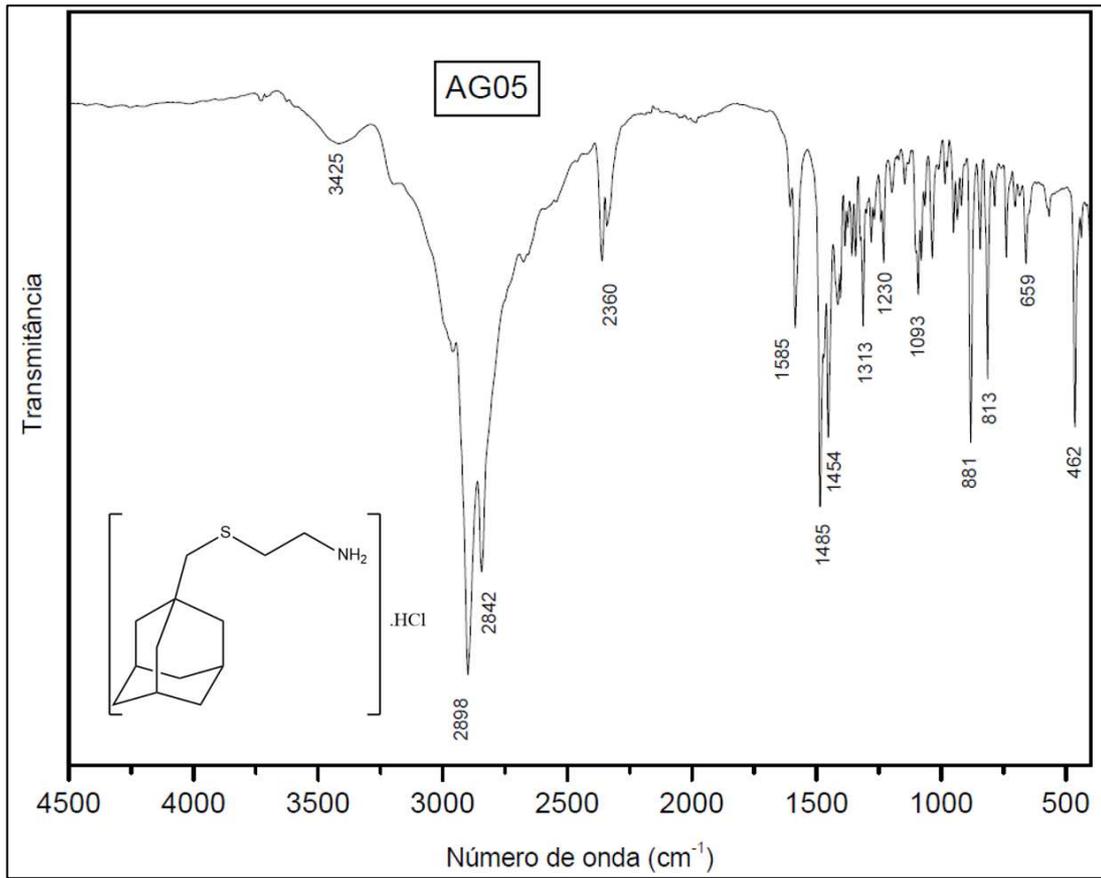
Fonte: Elaborado pela autora (2025).

O composto orgânico **AG05**, cloridrato de 2-[(tricyclo[3.3.1.1^{3,7}]dec-1-ilmetil)thio]etanoamina possui fórmula molecular $[\text{C}_{13}\text{H}_{23}\text{NS}]\cdot\text{HCl}$, massa molar de $261,85 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ e apresentou ponto de decomposição superior a 250°C . No espectro de infravermelho (Figura 38) pode ser observado a presença da banda de absorção em 3425 cm^{-1} referente à deformação axial da ligação N-H, além da presença da deformação axial característica da ligação C-H alifático em 2898 e 2842 cm^{-1} e banda referente a deformação angular de CH_2 em 1454 cm^{-1} . Observa-se também o surgimento de duas bandas de alta intensidade em 881 e 813 cm^{-1} referentes a deformação C-S.

RMN de ^1H (500 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$), δ (ppm): 1,51-1,64 (m, 12H, 6 CH_2 da adamantila); 1,93 (s, 3H, 3CH adamantila); 2,36 (s, 2H, H1); 2,69 e 2,90 (m, 2H, H2 e H3 respectivamente); 8,17 (s, 3H, $\text{NH}_2\cdot\text{HCl}$). Sinal residual do solvente dimetilsulfóxido (DMSO- d_6) em 2,5 ppm e da água no solvente em aproximadamente 3,3 ppm (Figura 39).

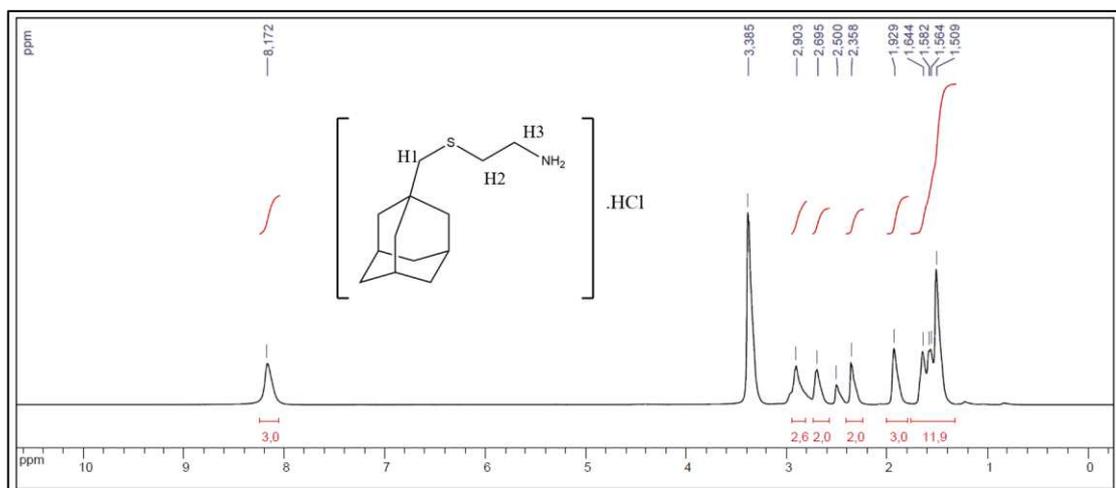
A alteração do solvente deuterado foi uma tentativa de melhor observar o sinal dos hidrogênios ligados a nitrogênio, o que realmente foi possível (normalmente ocorre uma troca entre o metanol e esses hidrogênios). Entretanto, ao substituir o metanol por DMSO, verificou-se uma perda de resolução dos sinais. No RMN de carbono aparecem os sinais: 27,83 (Ada-3); 30,11 (C3); 33,44 (Ada-1); 36,34 (Ada-4); 38,74 (C2); 41,07 (Ada-2); 46,11(C1). O septeto do solvente aparece em 39,7 ppm (Figura 40).

Figura 38 – Espectro de infravermelho do composto **AG05**



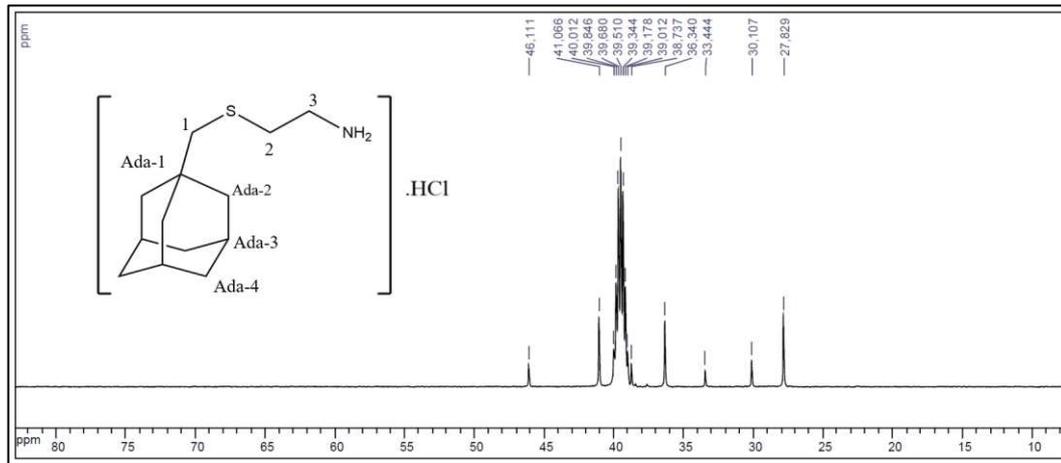
Fonte: Elaborado pela autora (2025).

Figura 39 – RMN de ^1H do composto **AG05** (500 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$)



Fonte: Elaborado pela autora (2025).

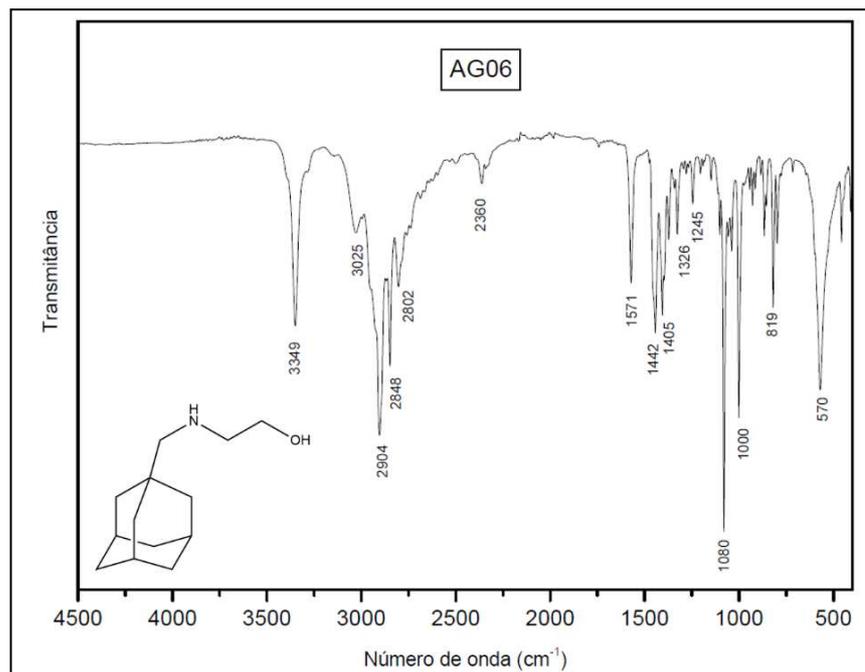
Figura 40 – RMN de ^{13}C do composto **AG05** (125 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$)



Fonte: Elaborado pela autora (2025).

O composto orgânico **AG06**, cloridrato de 2-[(tricyclo[3.3.1.1^{3,7}]dec-1-ilmetil)amino]etanol possui fórmula molecular $[\text{C}_{13}\text{H}_{23}\text{NO}]\cdot\text{HCl}$, massa molar de $245,79 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ e apresentou ponto de decomposição superior a 250°C . No espectro de infravermelho (Figura 41) pode ser observado a presença da banda de absorção em 3349 cm^{-1} referente à deformação axial da ligação N-H, além da presença da deformação axial característica da ligação C-H alifático em 2904 e 2848 cm^{-1} , e banda referente a deformação angular de CH_2 em 1442 cm^{-1} . Observa-se também o surgimento de banda intensa em 1080 cm^{-1} referente a deformação C-O.

Figura 41 – Espectro de infravermelho do composto **AG06**



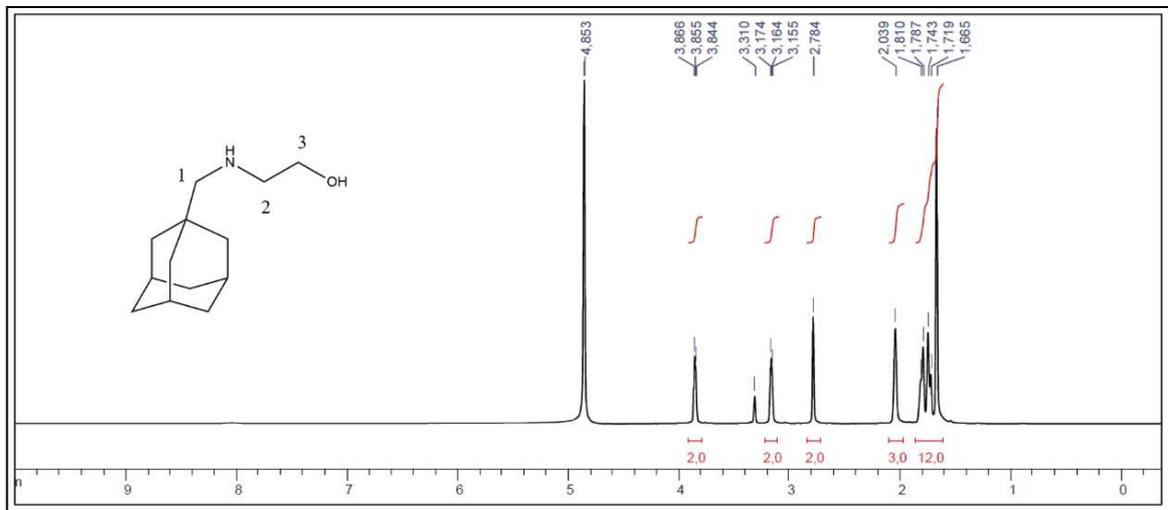
Fonte: Elaborado pela autora (2025).

Os sinais observados no RMN correspondem aos sinais esperados para a estrutura proposta e estão descritos abaixo.

RMN de ^1H (500 MHz, CD_3OD), δ (ppm): 1,66 – 1,81 (m, 12H – 6 CH_2 adamantila); 2,04 (s, 3H, adamantila); 2,78 (s, 2H, H1); 3,15 – 3,17 (m, 2H, H2). Em 3,84 – 3,86 (m, 2H, H3) (Figura 42).

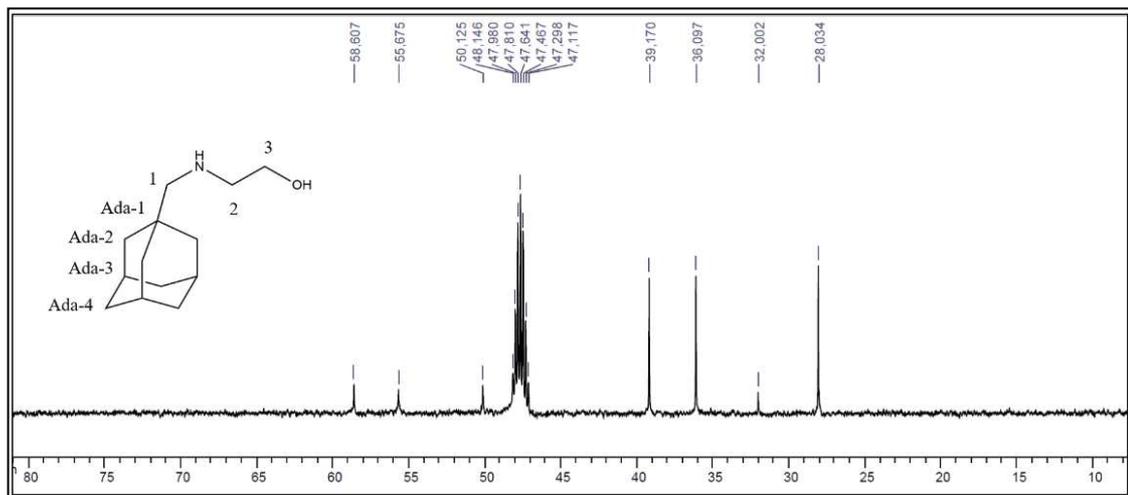
RMN de ^{13}C (125 MHz, CD_3OD), δ (ppm): 28,03 (Ada-3); 32,00 (Ada-1); 36,09 (Ada-4); 39,17 (Ada-2); 50,12 (C2); 55,67 (C1) e 58,60 (C3) (Figura 43).

Figura 42 – RMN de ^1H do composto **AG06** (500 MHz, CD_3OD)



Fonte: Elaborado pela autora (2025).

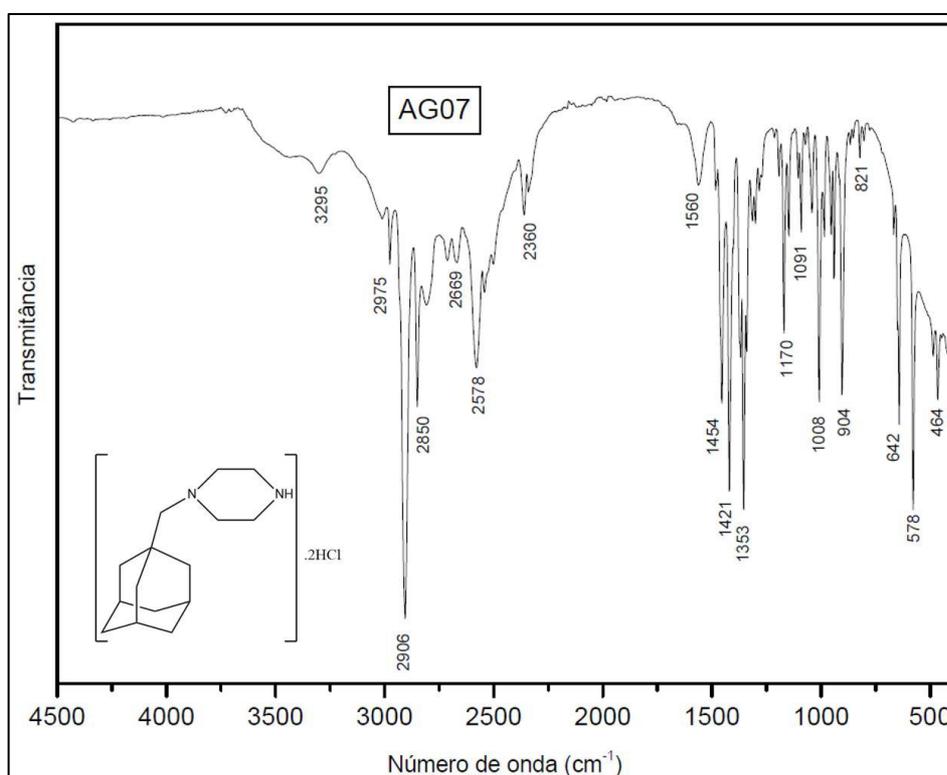
Figura 43 – RMN de ^{13}C do composto **AG06** (125 MHz, CD_3OD)



Fonte: Elaborado pela autora (2025).

O composto orgânico **AG07**, Dicloridrato de 1-(tríciclo[3.3.1.1^{3,7}]dec-1-ilmetil)piperazina possui fórmula molecular $[C_{15}H_{26}N_2] \cdot 2HCl$ massa molar de $307,30 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$ e apresentou ponto de decomposição superior a 250°C . No espectro de infravermelho (Figura 44) pode ser observado a presença da banda de absorção em 3295 cm^{-1} referente à deformação axial da ligação N-H, além da presença da deformação axial característica da ligação C-H alifático em 2906 e 2850 cm^{-1} , e banda referente a deformação angular de CH_2 em 1442 cm^{-1} . Observa-se também o surgimento de banda intensa em 1421 e 1353 cm^{-1} referente a deformação C-H.

Figura 44 – Espectro de infravermelho do composto **AG07**



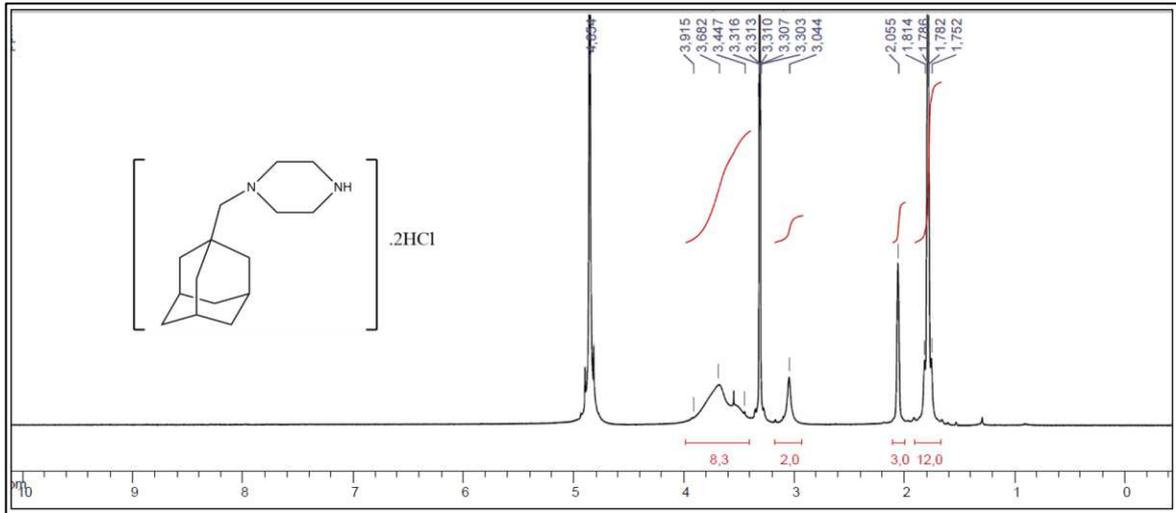
Fonte: Elaborado pela autora (2025).

Os sinais observados no espectro de ressonância magnética nuclear de hidrogênio e carbono evidenciam a estrutura proposta e estão descritos abaixo.

RMN de ^1H (500 MHz, CD_3OD), δ (ppm): 1,75 – 1,81 (m, 12H – 6CH_2 adamantila); 2,05 (s, 3H, adamantila); 3,04 (s, 2H, H1); 3,44 – 3,91 (m, 8H, 4CH_2 da piperazina) (Figura 45).

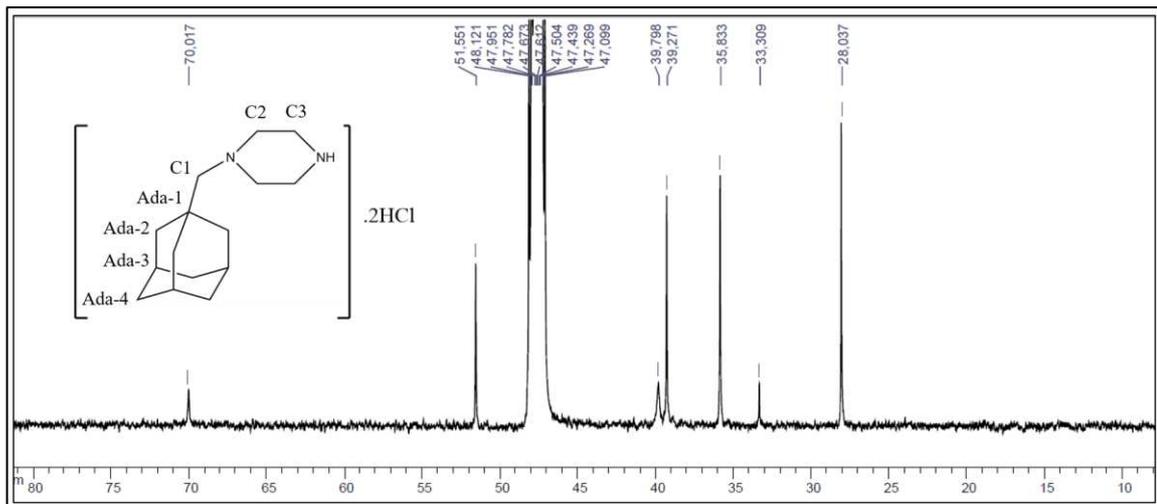
RMN de ^{13}C (125 MHz, CD_3OD), δ (ppm): 28,03 (Ada-3); 33,30 (Ada-1); 35,83 (Ada-4); 39,27 (Ada-2); 39,79 (C3); 51,55 (C2) e 70,01 (C1) (Figura 46).

Figura 45 – RMN de ^1H do composto **AG07** (500 MHz, CD_3OD)



Fonte: Elaborado pela autora (2025).

Figura 46 – RMN de ^{13}C do composto **AG07** (125 MHz, CD_3OD)



Fonte: Elaborado pela autora (2025).

Todos os compostos propostos foram sintetizados, purificados e caracterizados com êxito conforme demonstrado pelos espectros acima. Uma limitação encontrada na caracterização por IV foi devida a indisponibilidade de um pastilhador que permitisse a confecção de pastilhas de amostra em KBr para melhor visualização das bandas de NH nos espectros. Após a conclusão desta etapa do trabalho, os compostos seguiram para os testes *in vitro*.

5.2 TESTES *IN VITRO*

Após a síntese dos compostos foi realizado um estudo pré-clínico com testes que consigam verificar a capacidade do composto sintetizado agir sobre os alvos pretendidos, verificar as propriedades farmacológicas e conhecer os mecanismos de ação da molécula. E não somente isso, é preciso verificar a segurança destes compostos, fazer a determinação de doses seguras, avaliar a existência de efeitos indesejados e até tóxicos. Para isso são realizados testes *in vitro* e *in vivo* que buscam mimetizar as condições biológicas.

Os testes *in vitro* envolvem testes conduzidos fora de um organismo vivo e em um ambiente artificial. Permitem uma análise mais detalhada ou mais conveniente do que poderia ser feito com o organismo vivo inteiro. Os ensaios são mais simplificados e reativos em relação a resposta biológica, onde busca-se um ambiente favorável para que a interação entre o composto e o alvo ocorram sem os interferentes que estão presentes em um organismo vivo. Essa característica pode ser vista como uma limitação deste tipo de teste, pois ao envolver apenas partes das informações desses organismos, pode não representar precisamente o que acontece no organismo vivo, completo (O’Keeffe *et al.*, 2019). Podem ser baseados em reações físico-químicas ou usando componentes obtidos de um repositório, que inicialmente foram retirados de um organismo, separados, isolados, purificados e cultivados fora de seu ambiente biológico. Mesmo apresentando limitações, os modelos *in vitro* oferecem muita versatilidade, especialmente quando é necessário um estudo mais profundo do mecanismo de ação, além de serem uma ótima alternativa aos testes em animais, principalmente para as áreas nas quais os testes em animais foram restritos, como a área cosmética, a fim de comprovar segurança e eficácia. Em estudos toxicológicos se tornam uma opção na triagem em busca de substâncias que possuam efeitos tóxicos, além de diminuir custos e obter respostas rápidas (Wetmore, 2015). No presente trabalho realizamos os seguintes testes *in vitro*: teste de inibição da acetilcolinesterase, capacidade antioxidante, viabilidade celular, citogenotoxicidade e toxicidade aguda.

Os sete compostos orgânicos sintetizados foram testados *in vitro* a fim de verificar a capacidade de inibição da enzima acetilcolinesterase, devido a sua importância como alvo terapêutico na Doença de Alzheimer. Por se tratar de uma doença multifatorial, decidimos também avaliar a capacidade antioxidante dos compostos, pois as ERs participam ativamente do processo de dano tecidual. Os resultados dos testes podem ser vistos na Tabela 1.

Tabela 1 – Capacidade inibitória da acetilcolinesterase e atividade antioxidante

Código	MM (g.mol⁻¹)	% Inibição AChE	IC₅₀ AChE (mg/mL)	IC₅₀ AChE (mM)	DPPH % inibição
AG01	281,26	92,5%	0,22	0,78	22,6%
AG02	295,29	91,5%	0,43	1,48	26,2%
AG03	309,32	97,4%	0,06	0,21	19,9%
AG04	309,32	85,5%	0,23	0,75	33,3%
AG05	261,85	91,5%	0,03	0,12	30,0%
AG06	245,79	78,4%	0,17	0,72	21,9%
AG07	307,30	87,6%	0,25	0,81	34,2%

Fonte: Elaborado pela autora (2024).

Todos os testes foram feitos em triplicata.

Todos os compostos foram capazes de inibir a acetilcolinesterase, com percentual de inibição variando entre 78,4 e 97,4%, sendo que o AG03 alcançou 97,4% e um IC₅₀ de 0,06 mg/mL (equivalente a 0,21 mmol/L). Os resultados experimentais sugerem que a presença do grupo NH₂ terminal contribui para a inibição da enzima, pois os compostos com menor atividade apresentavam essa amina primária substituída por N(CH₃)₂ para o AG04, *N*-piperazina para o AG07 e a menor atividade foi observada no AG06 que possuía uma hidroxila no lugar da amina. Cálculos teóricos de *docking* enzimático para a AChE foram feitos em colaboração e os resultados podem ser vistos no “ANEXO A - Computational methodologies”. Os cálculos e simulações teóricas corroboram os dados experimentais e explicam as possíveis interações entre os compostos AGx sintetizados e a enzima acetilcolinesterase.

A variação no tamanho da cadeia carbônica não seguiu uma linearidade, já que o aumento da cadeia entre AG01 (2 carbonos entre as aminas) e AG02 (3 carbonos entre as aminas) não levou a alteração significativa na inibição enzimática, mas foi expressivo para o AG03 (4 carbonos entre as aminas).

Já com relação a capacidade antioxidante que avalia a habilidade do composto testado em neutralizar o radical livre da molécula do DPPH, todos apresentaram baixa capacidade antioxidante (variando entre 19,9 e 34,2%), sendo o AG07 o melhor entre eles. Diante dos resultados encontrados, não foi possível observar uma relação clara entre a estrutura da molécula e a capacidade antioxidante. Considera-se que o estresse oxidativo desempenha um papel importante na patogênese da DA. O cérebro apresenta uma vulnerabilidade única à lesão oxidativa, que está relacionada a fatores fisiológicos, anatômicos e funcionais. Por exemplo, o

cérebro representa apenas 2% do peso corporal, mas consome 20% de todo oxigênio do corpo, devido à sua alta taxa metabólica, ele se torna altamente vulnerável ao dano oxidativo. Além disso, a barreira hematoencefálica, que protege o cérebro de toxinas, também impede/reduz a absorção de alguns antioxidantes. (Shukla; Mishra; Pant, 2011). As espécies reativas (ERs) que incluem as espécies reativas de oxigênio (EROS – do inglês *reactive oxygen species* – ROS) e de nitrogênio (ERNs – do inglês *reactive nitrogen species* – RNS) são geradas normalmente como um processo fisiológico nas mitocôndrias, membranas celulares e no citoplasma. Essas ERs estão relacionadas com o crescimento celular, produção de ATP, fagocitose, sinalização celular, entre outras funções (Pisoschi; Pop, 2015). Normalmente o sistema antioxidante endógeno consegue manter essas substâncias em concentrações fisiológicas, entretanto, em determinadas patologias há um desequilíbrio nesse processo. Esse desbalanço entre a produção de espécies reativas de oxigênio/nitrogênio e a capacidade do organismo de neutralizar sua ação pelo sistema de defesa antioxidante, leva a um estresse oxidativo, favorecendo a perda da homeostasia do meio interno. Se não houver reestabelecimento desse balanço, o estresse oxidativo resultará em lesão celular, como a peroxidação dos lipídeos das membranas, modificações oxidativas das proteínas, lesão no ácido desoxirribonucleico (DNA), o que pode levar à perda de função, integridade e viabilidade celulares. O cérebro também apresenta defesa antioxidante modesta e capacidade regenerativa limitada, o que faz com que as ERs atuem como importantes mediadores de lesões no cérebro, que podem levar a neuroinflamação. Desta forma, a utilização de moléculas com capacidade antioxidante proporcionaria proteção contra o estresse oxidativo, sendo um importante alvo terapêutico na DA (Du *et al.*, 2018; Patel, 2016).

Para o estudo da viabilidade celular foram realizados ensaios em cultura de células empregando duas diferentes linhagens celulares, a linhagem L929 – fibroblasto de murinho saudável e a linhagem U87 - glioblastoma humano – tipo de câncer cerebral muito agressivo e invasivo, que consiste em células gliais que sofreram alterações genéticas e fenotípicas (Sengul *et al.*, 2022). As células foram expostas aos compostos por 72 horas e a viabilidade determinada pelo método espectrofotométrico de redução do sal brometo de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-2H tetrazólio (MTT). Os testes de citotoxicidade podem ser considerados padrões para a avaliação primária de atividades biológicas de substâncias ativas. Os métodos colorimétricos são baseados na conversão de um substrato para um produto colorido por enzimas intracelulares presentes em células metabolicamente ativas. Dessa forma, o número de células viáveis é diretamente proporcional a cor obtida no experimento. No método utilizado, o MTT inicialmente apresenta-se como uma solução aquosa de cor amarelada, há uma redução deste pelas enzimas desidrogenases mitocondriais, resultando em um composto insolúvel em água, de coloração

azul/roxa chamado formazan (Ediriweera; Tennekoon; Samarakoon, 2019). Os resultados deste teste estão na Tabela 2 e foram extraídos dos gráficos de viabilidades apresentados em seguida (Figuras 47 a 50).

Tabela 2 – Atividade citotóxica frente as linhagens celulares. IC₅₀ (μM ± DP)

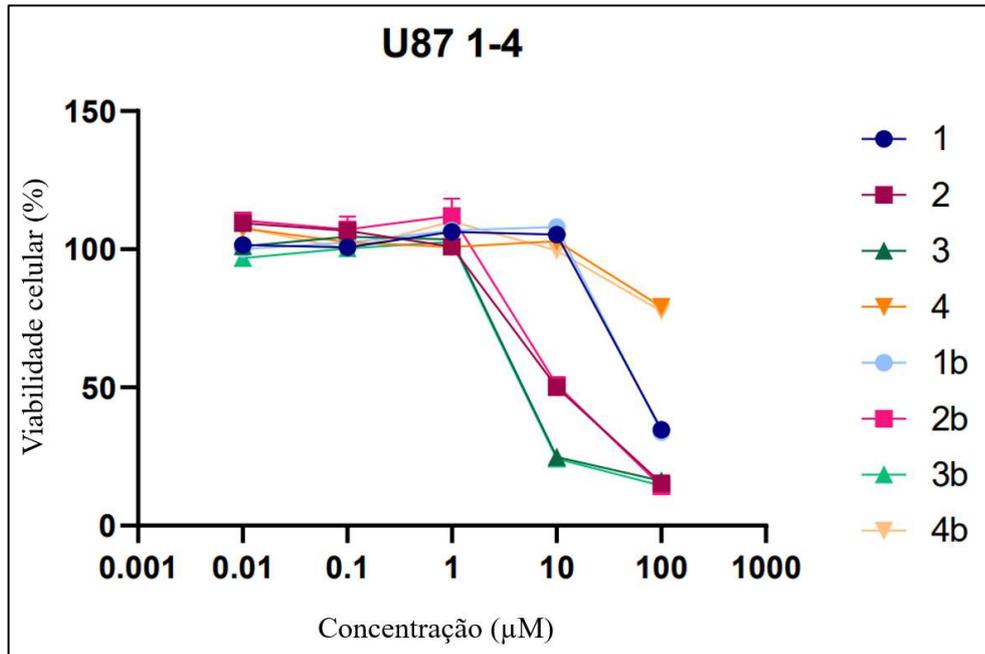
Composto	IC ₅₀ (μM ± DP)*	
	U87	L929
AG01	60,0 ± 1,0	39,2 ± 1,3
AG02	10,6 ± 0,4	32,7 ± 1,3
AG03	4,7 ± 0,1	24,5 ± 0,6
AG04	>100	>100
AG05	40,1 ± 1,8	36,6 ± 1,6
AG06	>100	>100
AG07	39,5 ± 0,4	36,9 ± 0,6

Fonte: Elaborado pela autora (2024).

*DP (Desvio padrão da quadruplicata de dois experimentos independentes).

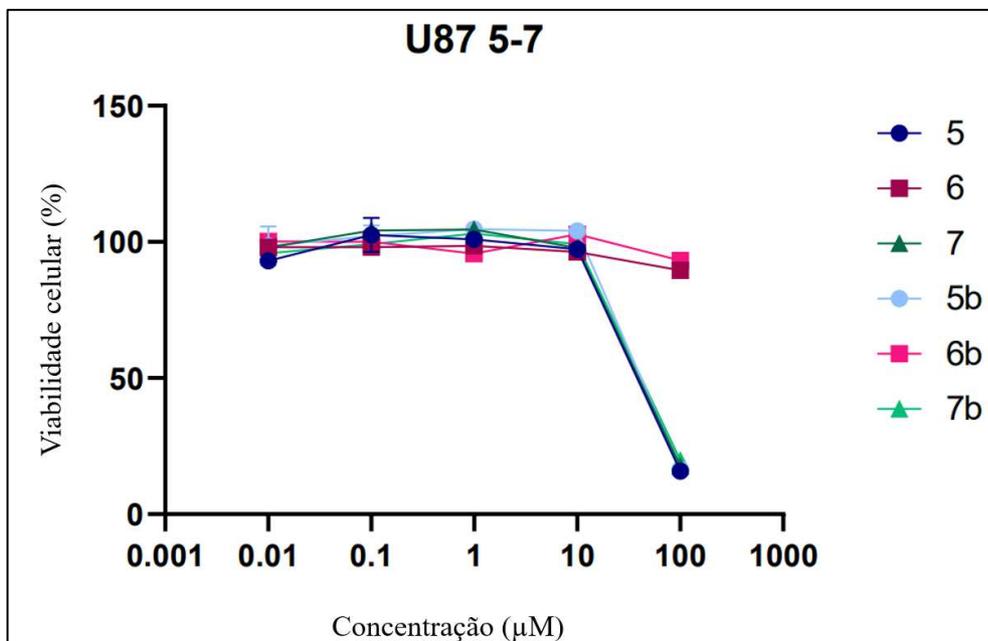
Podemos observar que as amostras tiveram diferentes performances citotóxicas frente a células utilizadas. Os compostos AG04 e AG06 não apresentaram atividade até a concentração máxima utilizada de 100 μM nas duas linhagens celulares. Já os compostos AG05 e AG07 se mostraram ativos na ordem de 40 μM tanto na U87 quanto na L929. Diferente do composto AG01 que se mostrou mais citotóxico na L929 (39,2 ± 1,3 uM) comparado à U87 (60,0 ± 1,0). Os compostos AG02 e AG03 em compensação apresentaram maior citotoxicidade nas células U87 (10,6±0,4 e 4,7 ±0,1, respectivamente) e foram de 3 a 5 vezes menos tóxicos nas células L929 (32,7 ±1,3 e 24,5 ± 0,6 respectivamente). Percebe-se que os compostos que possuem grupamentos NH₂ na extremidade da cadeia (AG01,02,03,05) são os que apresentaram maior citotoxicidade. Os compostos com menor citotoxicidade apresentam um nitrogênio terciário no final da cadeia (AG04) ou um OH no final da cadeia (AG06). O aumento progressivo da cadeia carbônica entre as aminas (compostos AG01, 02 e 03) contribuiu para o aumento da citotoxicidade em ambas as linhagens, entretanto foi significativamente maior para a linhagem U87, indicando que esta modificação pode induzir uma maior seletividade.

Figura 47 – Viabilidade celular dos compostos AG01 a AG04 em glioblastoma humano



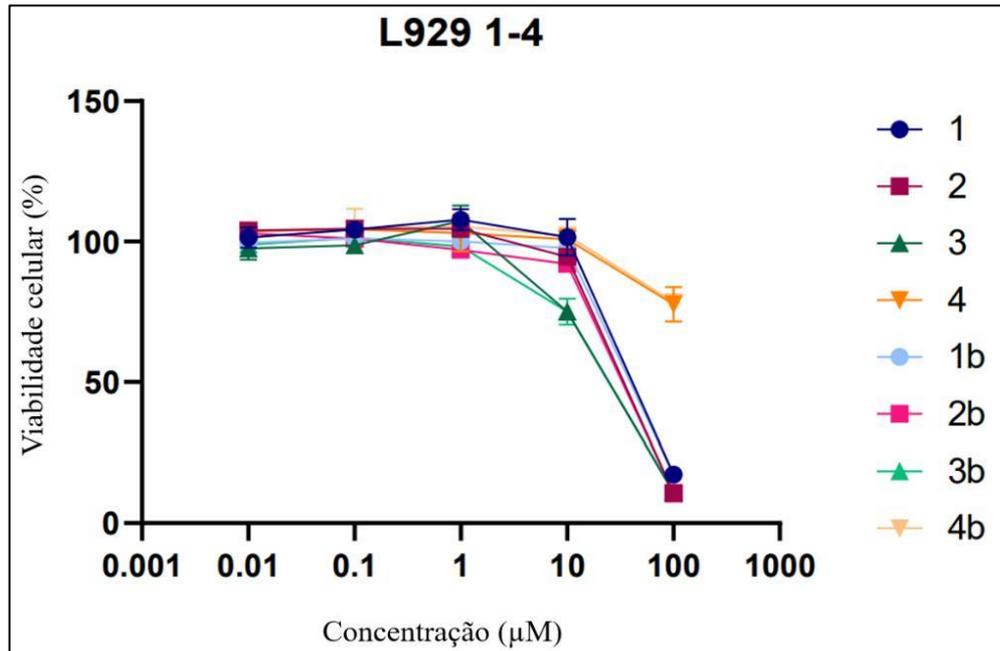
Fonte: Elaborado pela autora (2024). Os testes foram realizados em quadruplicata com dois experimentos independentes indicados pelo número e número seguido da letra “b” (segundo experimento) a fim de descartar erros de pesagem, por exemplo.

Figura 48 – Viabilidade celular dos compostos AG05 a AG07 em glioblastoma humano



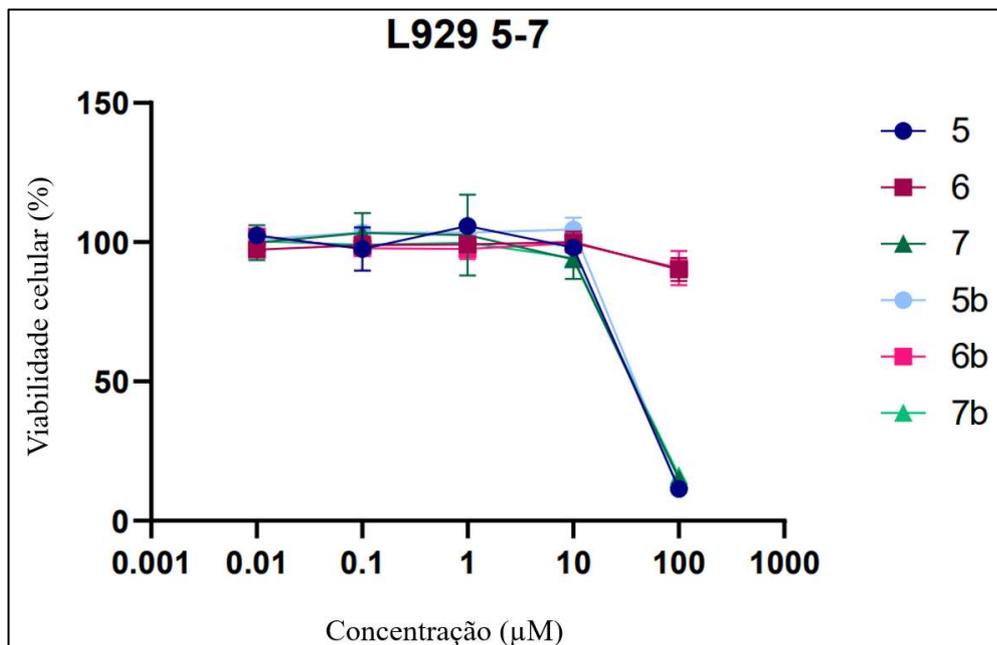
Fonte: Elaborado pela autora (2024). Os testes foram realizados em quadruplicata com dois experimentos independentes indicados pelo número e número seguido da letra “b” (segundo experimento) a fim de descartar erros de pesagem, por exemplo.

Figura 49 – Viabilidade celular dos compostos AG01 a AG04 em fibroblasto de camundongo



Fonte: Elaborado pela autora (2024). Os testes foram realizados em quadruplicata com dois experimentos independentes indicados pelo número e número seguido da letra “b” (segundo experimento) a fim de descartar erros de pesagem, por exemplo.

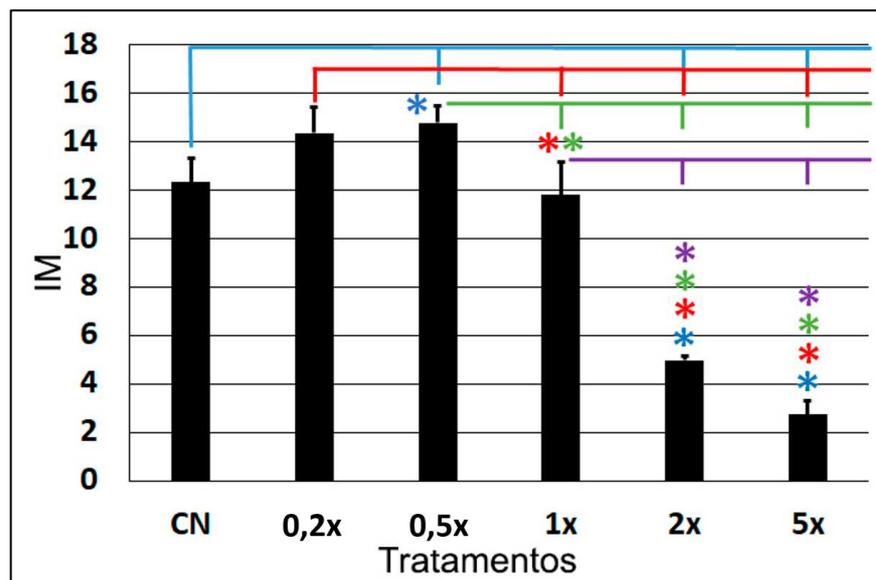
Figura 50 – Viabilidade celular dos compostos AG05 a AG07 em fibroblasto de camundongo



Fonte: Elaborado pela autora (2024). Os testes foram realizados em quadruplicata com dois experimentos independentes indicados pelo número e número seguido da letra “b” (segundo experimento) a fim de descartar erros de pesagem, por exemplo.

A avaliação de toxicidade de uma substância tem como objetivo prever seus possíveis efeitos nocivos quando em contato com o ser humano. O teste com o *Allium cepa* permite determinar se uma substância induz alterações consideradas genotóxicas nas células meristemáticas de cebolas. Os resultados da análise citogenética são mostrados nas Figuras 51 e 52. Na Figura 51 temos os dados de índice mitótico (IM, ou o percentual de células em divisão). Podemos notar que em relação ao controle negativo, o tratamento com o composto **AG03** na concentração 0,5x induz um aumento no percentual de células em divisão (ANOVA, Tukey, $p < 0,05$), sendo este aumento de 2 pontos percentuais. É possível observar, ainda, que os tratamentos 2x e 5x reduzem o percentual de células em divisão, sendo também estatisticamente diferente do controle negativo (ANOVA, Tukey, $p < 0,05$). Essa redução, em média para os dois tratamentos foi de 3,43 vezes no IM. Somente o tratamento 1x não apresentou diferença estatística em relação ao controle negativo. Outras comparações entre quaisquer duas médias são possíveis com os dados apresentados na Figura 51.

Figura 51 – Índice mitótico (IM) nos diferentes tratamentos com o composto **AG03**



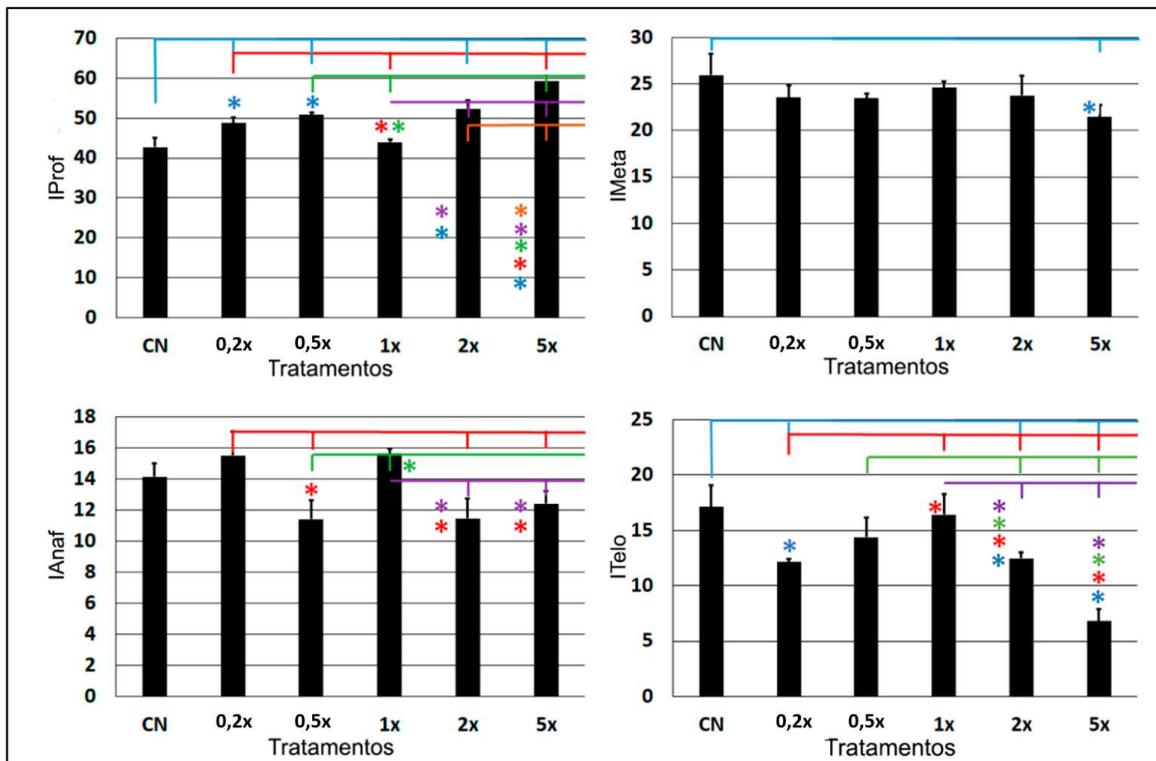
Fonte: Elaborado pela autora (2024).

As linhas na horizontal em azul, vermelho, verde e roxo demonstram as diferenças estatísticas (ANOVA, Tukey, $p < 0,05$) respectivamente em relação aos tratamentos controle negativo (CN), 0,2x, 0,5x e 1x. A partir destas linhas, a existência de traços perpendiculares indica diferenças estatísticas em relação ao tratamento de referência. Os asteriscos também demonstram tratamentos estatisticamente diferentes (ANOVA, Tukey, $p < 0,05$).

Já os resultados para a análise de fases (índices profásico, metafásico, anafásico e telofásico) são demonstrados na Figura 52. Ao observar os resultados para índice profásico

(IProf), percebemos que os tratamentos com 0,2x e 0,5x induzem aumento no percentual de prófases, o mesmo acontecendo para os tratamentos 2x e 5x (ANOVA, Tukey, $p < 0,05$). Estes aumentos são, respectivamente, na ordem de 1,14; 1,19; 1,22; 1,38 vezes em relação ao percentual de prófases do tratamento controle negativo. O tratamento com a concentração 1x não diferiu estatisticamente do controle negativo (ANOVA, Tukey, $p < 0,05$).

Figura 52 – Análise de fases após 24 horas de exposição ao composto **AG03**: Índices profásico, metafásico, anafásico e telofásico



Fonte: Elaborado pela autora (2024).

As linhas na horizontal em azul, vermelho, verde e roxo demonstram as diferenças estatísticas (ANOVA, Tukey, $p < 0,05$) respectivamente em relação aos tratamentos controle negativo (CN), 0,2x, 0,5x e 1x. A partir destas linhas, a existência de traços perpendiculares indica diferenças estatísticas em relação ao tratamento de referência. Os asteriscos também demonstram tratamentos estatisticamente diferentes (ANOVA, Tukey, $p < 0,05$).

Para índice metafásico (IMeta), apenas o tratamento 5x demonstrou diferença significativa em relação ao controle negativo, com redução de 4,52 pontos percentuais na quantidade de metáfases em 5x (ANOVA, Tukey, $p < 0,05$). Já em relação ao índice anafásico (IAnaf), nenhum tratamento demonstrou diferença significativa em relação ao controle negativo. No entanto comparações entre outras médias apresentaram efeitos significativos (ANOVA, Tukey, $p < 0,05$). Quando observamos os dados para índice telofásico (ITelo), os tratamentos 0,2x, 2x e 5x demonstraram reduções nos percentuais de telófase em relação ao

controle negativo (ANOVA, Tukey, $p < 0,05$). Outras comparações entre duas médias também são possíveis quando analisamos os dados apresentados na Figura 52.

Os resultados para alterações cromossômicas e micronúcleos são mostrados na Tabela 3. Os dois tipos de alterações, aneugênicas e clastogênicas, foram observadas e efeitos significativos foram observados somente para os tratamentos 2x e 5x. Nestes tratamentos ocorreu aumento no percentual de células portadoras destas alterações cromossômicas e de micronúcleos (ANOVA, Tukey, $p < 0,05$) (Tabela 3). Embora o percentual de alterações aneugênicas seja maior em relação ao percentual de alterações clastogênicas no tratamento 5x (7,24 *versus* 4,02), curiosamente ambas as alterações apresentam um acréscimo quase que idêntico em relação ao valor do controle negativo, um incremento de 2,25 vezes no percentual de alterações aneugênicas e 2,26 vezes no percentual de alterações clastogênicas (Tabela 3). Já quando olhamos para os resultados de micronúcleos há um incremento do percentual em relação ao controle de 2,70 pontos percentuais (ANOVA, Tukey, $p < 0,05$). Esses resultados indicam que o composto **AG03** induziu alterações citogênicas nas concentrações 2x e 5x, mas não houve diferença estatisticamente significativa entre as amostras de menores concentrações (1x, 0,5x e 0,2x) e o controle negativo (água destilada).

Tabela 3 – Percentual de alterações cromossômicas e micronúcleos após 24 horas de exposição ao composto **AG03**

Tratamentos	Alterações aneugênicas	Alterações clastogênicas	Micronúcleo
CN	3,21 ^a	1,78 ^a	0,78 ^a
0,2x	3,45 ^a	1,82 ^a	0,81 ^a
0,5x	3,78 ^a	2,11 ^a	1,11 ^a
1x	3,33 ^a	2,00 ^a	1,01 ^a
2x	6,26 ^b	3,71 ^b	2,37 ^b
5x	7,24 ^b	4,02 ^b	3,48 ^c

Fonte: Elaborado pela autora (2024).

Médias seguidas pelas mesmas letras não diferem estatisticamente (ANOVA, Tukey, $p < 0,05$).

A amostras também foram testadas quanto a toxicidade aguda frente as larvas de *Artemia salina* conforme metodologia descrita anteriormente. As variadas espécies de *Artemia sp* são largamente utilizadas em estudos de letalidade e avaliação toxicológica de substâncias. Esses microcrustáceos pertencentes à família Anostraca, são comumente encontrados em ambientes isolados em água com alta salinidade e relativamente quente, como lagos salgados, lagoas e minas de sal (Martins *et al.*, 2019; Ntungwe *et al.*, 2020). No bioensaio, as larvas de *Artemia sp* recém-eclodidas foram colocadas em contato com diferentes concentrações da

substância potencialmente tóxica e a taxa de sobrevivência das larvas após 24 horas de exposição foi observada. As larvas mortas/vivas foram contadas e a porcentagem de mortalidade foi calculada usando a equação de Abbott:

$$\% \text{ mortalidade} = [1 - (\text{n}^\circ \text{ vivos tratamento} / \text{n}^\circ \text{ vivos controle})] \times 100$$

Em seguida os valores de CL₅₀ foram encontrados através da análise Probit e os resultados podem ser vistos na Tabela 4. Valores de CL₅₀ < 1.000 µg/mL são considerados tóxicos frente o microcrustáceo (MEYER *et al.*, 1982).

Tabela 4 – Concentração letal (CL₅₀) que induz toxicidade aguda para *Artemia salina*

Amostras	CL ₅₀ (µg/mL ± DP)
AG01	72,4 ± 4,3
AG02	12,5 ± 3,0
AG03	>1.000
AG04	63,0 ± 5,4
AG05	57,5 ± 4,3
AG06	>1.000
AG07	83,7 ± 4,2
Timol	16,1 ± 3,0

Fonte: Elaborado pela autora (2025).

*DP (Desvio padrão, n=3).

Apesar dos compostos sintetizados terem estruturas semelhantes, houve grande diferença na toxicidade aguda para as larvas de *Artemia salina*, neste ensaio somente os compostos **AG03** e **AG06** não apresentaram toxicidade. O composto **AG03** foi sintetizado a partir da butanodiamina, apresentando maior cadeia carbônica (quatro grupos CH₂) entre as diaminas utilizadas. É interessante observar que o composto **AG02**, com cadeia carbônica com 3 grupos CH₂ entre as aminas foi o mais tóxico e que esse pequeno aumento no tamanho da cadeia consiga alterar tão drasticamente a toxicidade aguda para o microcrustáceo. Já o composto **AG06** foi sintetizado a partir do 2-aminoetanol e difere dos demais compostos por ter no lugar do grupo amino primário uma hidroxila. Esta alteração reduziu a toxicidade do composto, mas também a capacidade de inibir a atividade enzimática sobre a acetilcolinesterase.

5.3 TESTES *IN VIVO*

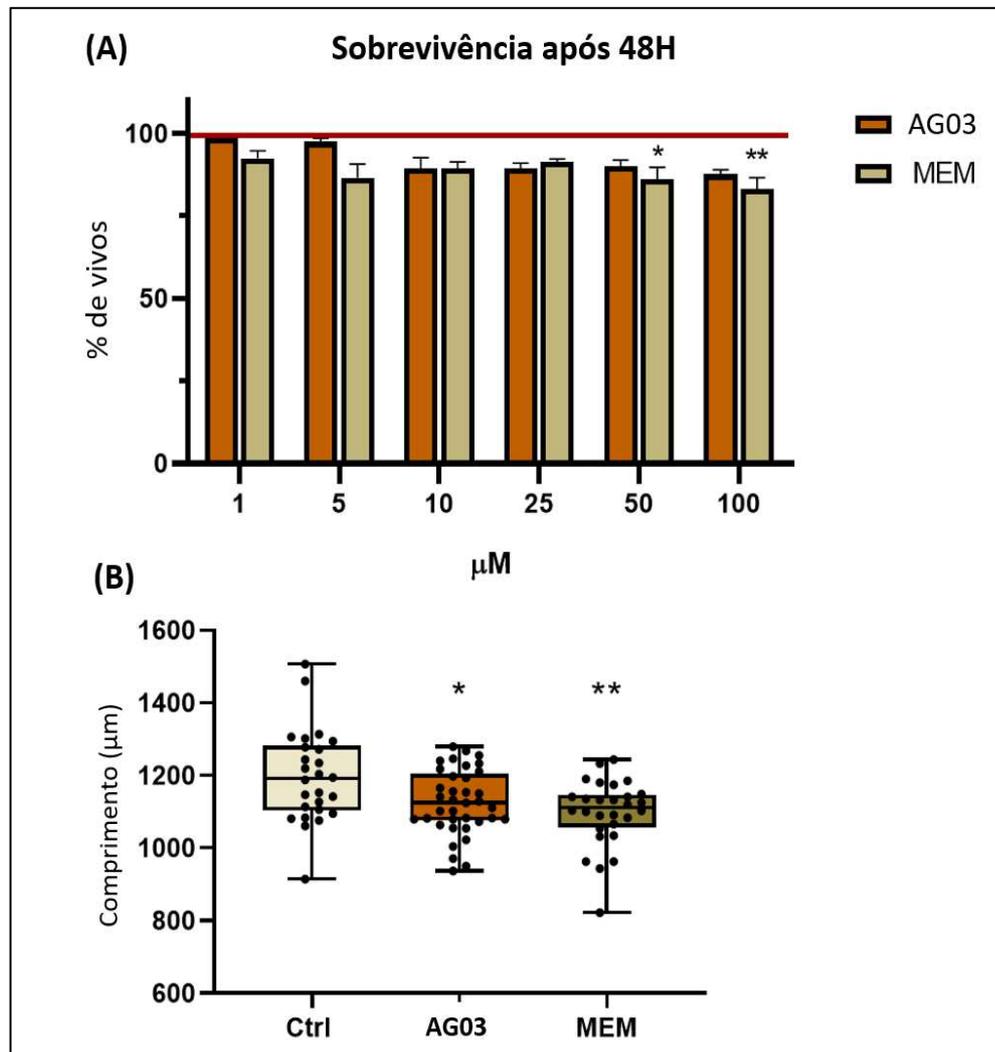
A busca por atividade biológica ganha em agilidade ao utilizar modelos *in vitro*, entretanto, após a triagem inicial, as substâncias mais promissoras ainda necessitam de testes mais complexos, como os *in vivo*, utilizando animais e/ou ensaios clínicos. No Brasil o CONCEA – Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal – órgão que regulamenta a experimentação com animais, lançou em 2019 o “Métodos alternativos ao uso de animais em pesquisa reconhecidos no Brasil”, um marco importante na busca pela proteção aos animais utilizados para propósitos científicos e didáticos (Moretto; Stephano, 2019). A primeira preocupação do CONCEA é o bem-estar animal e suas ações visam assegurar a dignidade e o respeito à vida. Esse mesmo órgão já havia criado em 2012 a Rede Nacional de Métodos Alternativos (RENAMA), cujo objetivo era de promover o desenvolvimento, a validação e a certificação de tecnologias e de métodos alternativos ao uso de animais para os testes de segurança e de eficácia de medicamentos e cosméticos. A utilização de organismos vivos não convencionais como o *Caenorhabditis elegans* (nematódeo da família *Rhabditidae*), surge como alternativa a uso de animais sencientes como roedores e coelhos (Filo Chordata, Subfilo Vertebrata). A finalidade desses ensaios é de substituir ou servir como prévia de um estudo *in vivo*, complementando e melhorando a sensibilidade e especificidade de estudos com animais. A utilização de organismos vivos não convencionais colabora com o princípio dos 4Rs (*replacement* = substituição, *reduction* = redução, *refinement* = refinamento e *refusal* = recusa ou *responsibility* = responsabilidade) para reduzir o uso de métodos que utilizem animais, substituir os métodos existentes por outros que sejam igualmente ou mais eficientes e refinar os métodos já consagrados para que se reduza o impacto das pesquisas no uso de animais, além da recusa a protocolos infrutíferos (Arck, 2019; Lee, 2020).

O *C. elegans* possui anatomia e fisiologia muito mais simples comparadas aos mamíferos, mesmo assim oferece perspectivas únicas como modelo neurotoxicológico, pois compartilha semelhanças com os humanos em várias vias de sinalização, a nível celular e molecular. Alguns ensaios comportamentais simples, como locomoção, bombeamento faríngeo e resposta ao toque, podem fornecer informações sobre o funcionamento do sistema neuronal e detectar anormalidades, sendo um indicador rápido e sensível para avaliar danos ao sistema nervoso (Adedara et al., 2025).

5.3.1 Ensaio de sobrevivência

Os efeitos da memantina e do **AG03** na sobrevivência e no comprimento corporal de *C. elegans* são mostrados na Figura 53. Este teste inicial é uma triagem para verificar se os compostos serão tóxicos para o animal e determinar qual concentração usar nos demais ensaios.

Figura 53 – Efeitos do **AG03** e da Memantina (MEM) na mortalidade e nos parâmetros corporais em *C. elegans*: Parâmetros avaliados após 48 horas de exposição



Fonte: Elaborado pela autora (2025)

(A) Porcentagem de animais vivos; (B) Comprimento corporal. Os experimentos foram conduzidos em três ensaios independentes. A significância estatística foi determinada pelo teste ANOVA de uma via, seguido pelo teste post hoc de Tukey. Os asteriscos indicam diferenças significativas em comparação ao grupo controle * $p < 0,05$ e ** $p < 0,005$.

A exposição a diferentes concentrações do **AG03** por 48 horas não afetou significativamente a sobrevivência do nematódeo em comparação ao grupo controle. No entanto, a exposição à memantina induziu uma diminuição significativa no número de nematoides vivos nas concentrações de 50 μM (87,7%, $p < 0,05$) e 100 μM (83,0%, $p < 0,005$). Devido a essa toxicidade da memantina, os testes subsequentes usarão a concentração de 25 μM para todos os ensaios. O comprimento corporal foi afetado por ambas as substâncias (**AG03** $p < 0,05$ e memantina, $p < 0,005$).

5.3.2 Bombeamento faríngeo

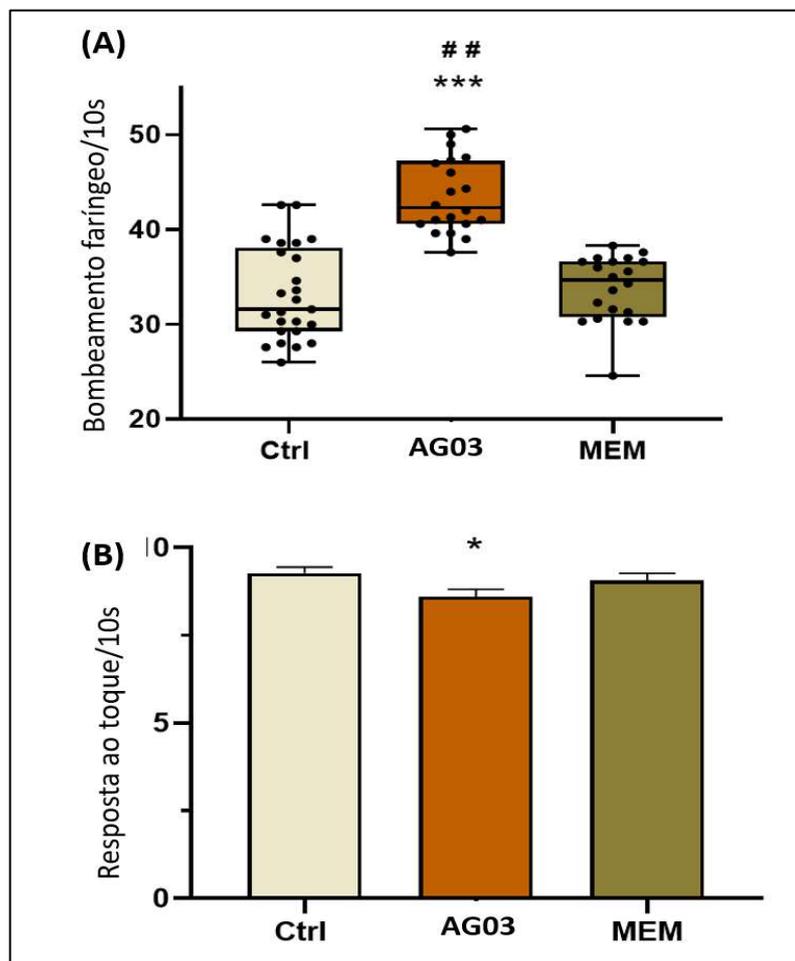
Os dados da Figura 54 mostram um aumento significativo no bombeamento faríngeo nos nematódeos tratados com **AG03** (contrações faríngeas médias de 43,5/10 segundos, $p < 0,001$) em comparação com o grupo controle (33,2/10s) e memantina (33,8/10s). Este aumento da frequência de bombeamento pode estar relacionado a um aumento na atividade colinérgica, devido à maior disponibilidade de ACh através da inibição da AChE de forma dose-dependente. Ou seja, a concentração utilizada (25 μM) foi capaz de estimular a contração muscular, mas não foi alta o suficiente para induzir hiperestimulação e paralisia do músculo faríngeo. A fim de comprovar essa relação dose-dependente repetimos o experimento aumentando gradativamente a concentração de **AG03** e realmente observamos uma redução de batimentos faríngeos, especialmente nas concentrações mais altas (Figura 55). No grupo controle a média de contrações faríngeas foi de 33,8 contrações em 10 segundos, enquanto para o composto **AG03** foi 28,0/10s e 25,3/10s ($p < 0,0001$) para as concentrações de 400 μM e 500 μM respectivamente.

A faringe do *C. elegans* possui um sistema nervoso próprio contendo 20 neurônios de 14 tipos diferentes e controla os movimentos rítmicos de alimentação. Esta rede é independente do sistema nervoso extrafaríngeo e entre estes neurônios, os mais importantes na regulação da taxa de bombeamento da faringe são os neurônios motores excitatórios colinérgicos MC, M2 e M4. Além destes, neurônios glutamatérgicos também fazem sinapse com os músculos radiais da faringe na inervação neuromuscular. Os M3(L/R) modulam o tempo de relaxamento faríngeo promovendo o relaxamento rápido do músculo faríngeo após a contração (Figura 56) (Vidal *et al.*, 2022).

A contração muscular depende da excitação da acetilcolina nos músculos faríngeos, causando a abertura do lúmen e, conseqüentemente, a entrada de bactérias, seguida por um ciclo de relaxamento glutamatérgico que facilita a ingestão de alimentos. Curiosamente, o

movimento da faringe continua (a uma taxa reduzida) mesmo após a ablação de todos os neurônios faríngeos, sugerindo que um sinal excitatório pode também se originar do sistema nervoso extrafaríngeo. No entanto, a eliminação da sinalização colinérgica leva a uma perda completa do bombeamento. A presença de substâncias anticolinérgicas em altas doses pode causar hiperestimulação colinérgica, resultando em hipercontração faríngea. Nesse caso, o lúmen permanece continuamente aberto, causando paralisia dos movimentos faríngeos e da alimentação (Izquierdo et al., 2021; Trojanowski et al., 2016).

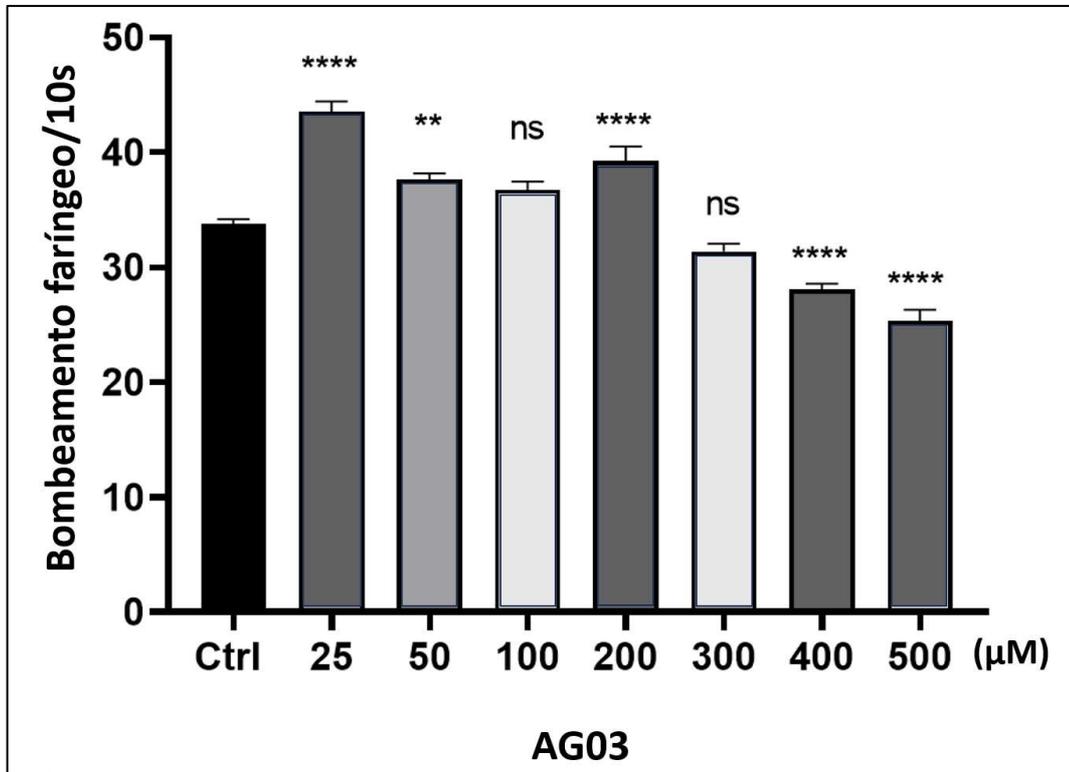
Figura 54 – Efeitos do tratamento com AG03 e Memantina na alimentação e respostas mecanossensoriais em *C. elegans*



Fonte: Elaborado pela autora (2025).

(A) Taxa de bombeamento faríngeo e (B) Resposta ao toque. Aproximadamente 10 animais por grupo foram avaliados em cada um dos três experimentos independentes. A análise estatística foi realizada por meio de ANOVA unidirecional seguida do teste post hoc de Tukey. Asteriscos indicam diferenças significativas em comparação com o grupo controle (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$). Hashtags indicam diferenças significativas em comparação com o grupo MEM ($p < 0,05$; ## $p < 0,001$).

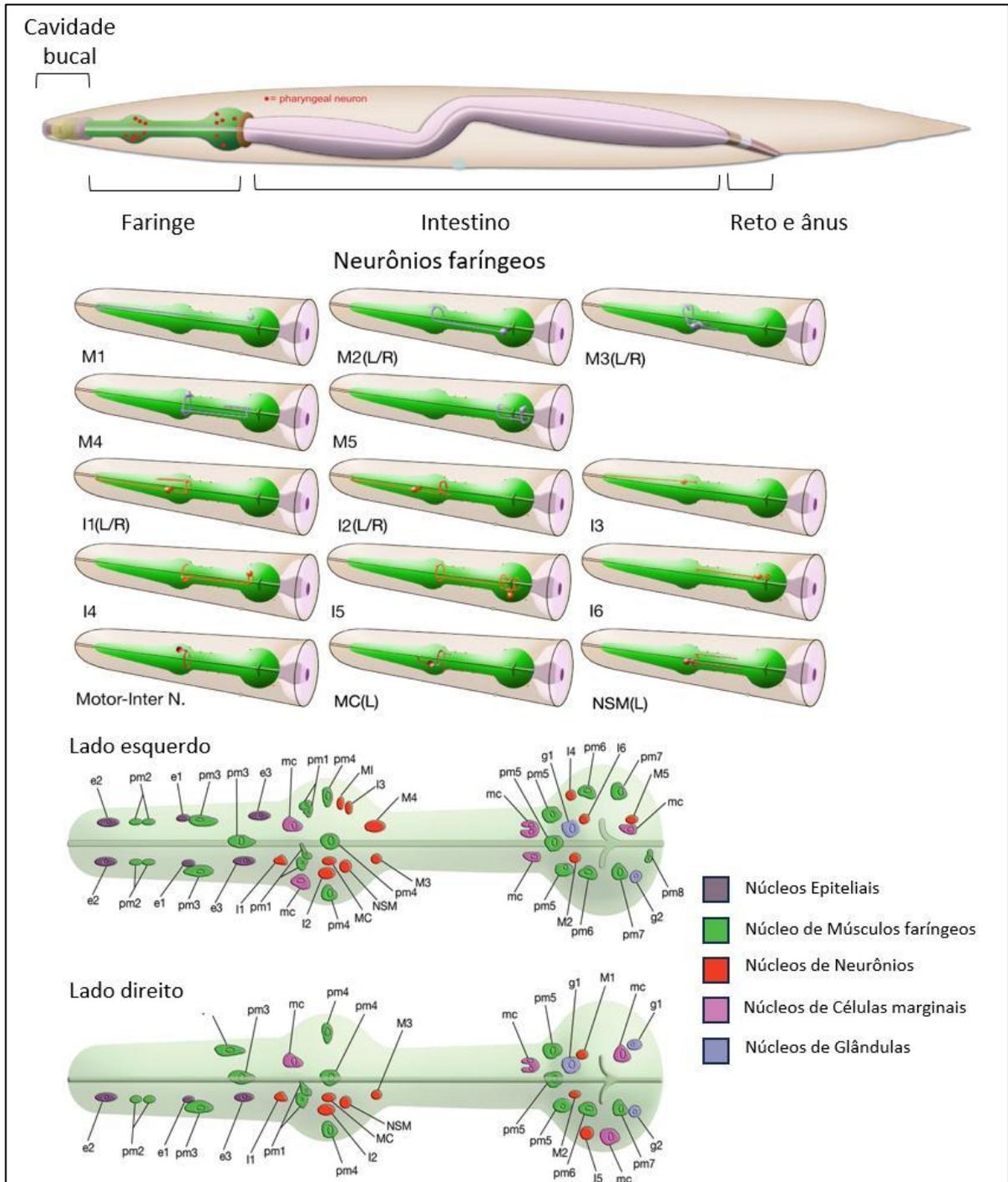
Figura 55 – Efeito da variação das concentrações de **AG03** no teste de bombeamento faríngeo em *C. elegans*



Fonte: Elaborado pela autora (2025).

Aproximadamente 10 animais por grupo foram avaliados em cada um dos três experimentos independentes. A análise estatística foi realizada por meio de ANOVA unidirecional seguida do teste post hoc de Tukey. Asteriscos indicam diferenças significativas em comparação com o grupo controle (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$) e as diferenças não significativas são indicadas por “ns”.

Figura 56 – Anatomia e neurônios da faringe do *Caenorhabditis elegans*



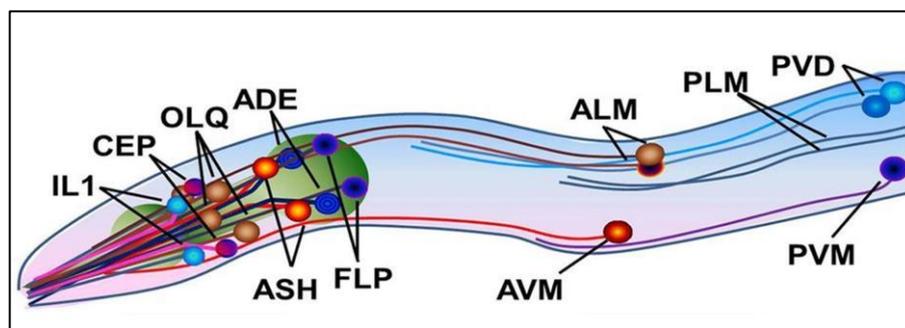
Fonte: WORMATLAS (2025).

5.3.3 Resposta ao toque

Os dados da Figura 54 mostram que o *C. elegans* não apresentou alteração na resposta ao toque após exposição à memantina. Porém, quando exposto ao **AG03**, houve redução na resposta ao toque ($p < 0,05$) em comparação ao grupo controle. O sistema sensorial é crucial

para a sobrevivência e no nematoide, o glutamato é o neurotransmissor responsável pelas respostas sensoriais. Os neurônios sensoriais ASH (Figura 57) regulam a resposta a estímulos sensoriais externos como o toque, liberando o neurotransmissor que atua no receptor ionotrópico de glutamato GLR-1 (receptor similar ao AMPA, não-NMDA). Esses neurônios estão localizados nos gânglios laterais de ambos os lados da cabeça do verme (Paltian et al., 2025).

Figura 57 – Desenho esquemático dos neurônios mecanossensoriais na extremidade anterior e no corpo do *C. elegans*



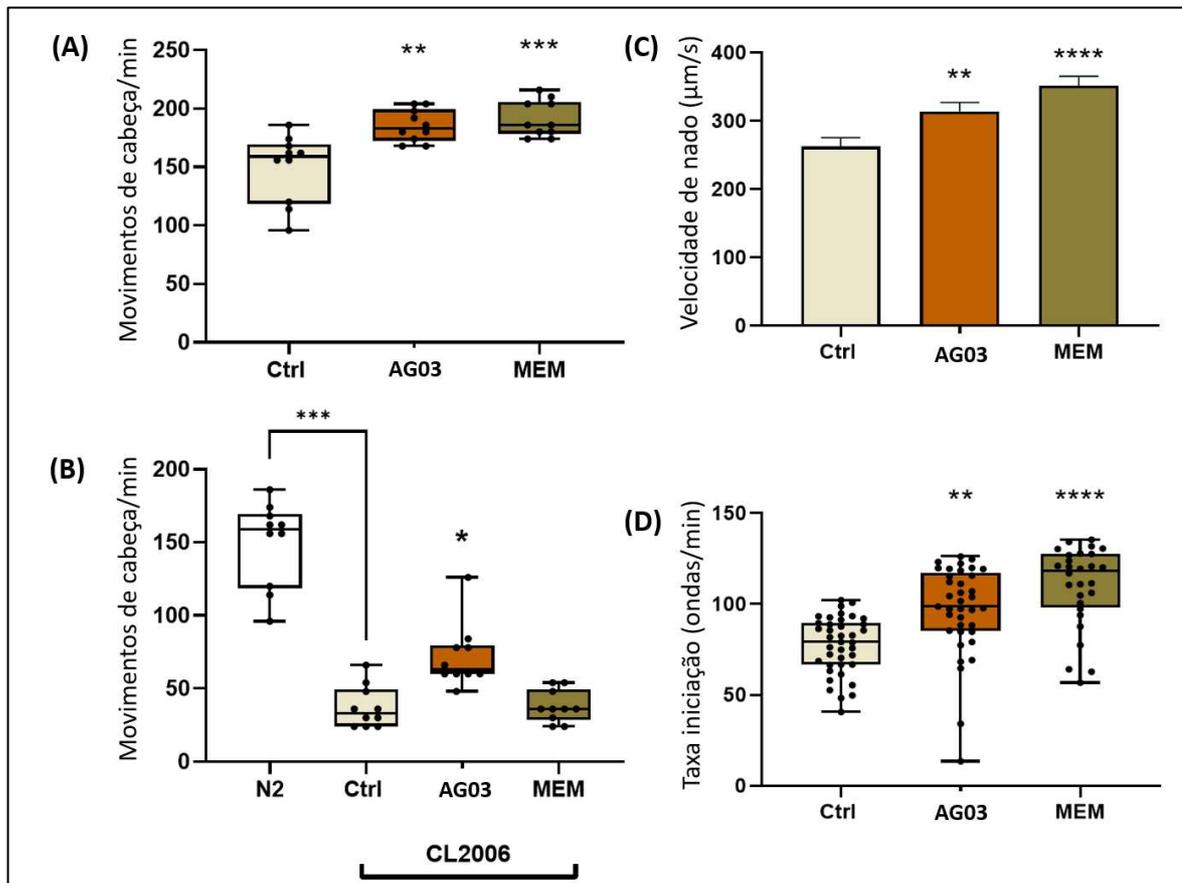
Fonte: Nam *et al.* (2013).

Esses resultados sugerem que o **AG03** afeta a mecanossensação, interferindo na neurotransmissão glutamatérgica, influenciando os neurônios ASH ou as vias de sinalização que eles controlam. A memantina atua como um antagonista não competitivo nos receptores do tipo NMDA (que são dependentes de voltagem para serem ativados), bloqueando seu canal iônico e, portanto, não apresenta diferença significativa no teste de resposta ao toque em comparação ao grupo controle.

5.3.4 Parâmetros locomotores

Analisando os parâmetros da atividade de locomoção dos nematoides expostos ao **AG03** e à memantina, observamos um aumento significativo nos movimentos de cabeça, na velocidade de nado e na taxa de iniciação de ondas para ambos os tratamentos. Conforme mostrado na Figura 58, ambas as substâncias aumentaram o número de movimentos de cabeça quando comparadas ao grupo controle (**AG03** 24,0%, $p < 0,01$; e Memantina 28,1%, $p < 0,001$). No grupo controle, o número de movimentos de cabeça foi de $149 \pm 29,2$, enquanto nos grupos **AG03** e memantina, foi de $185 \pm 13,7$ e $191 \pm 15,6$ batidas por minuto, respectivamente.

Figura 58 – Efeitos do tratamento com **AG03** e Memantina nos parâmetros da atividade locomotora em *C. elegans*



Fonte: Elaborado pela autora (2025).

(A) Movimentos de cabeça em vermes N2 selvagens. (B) Movimentos de cabeça na linhagem transgênica CL2006. (C) Velocidade de nado ($\mu\text{m/s}$). (D) Taxa de iniciação de onda (ondas/min). $N = 30$ vermes por grupo. A análise foi realizada usando o software WormLab. As análises estatísticas foram realizadas usando ANOVA unidirecional seguida pelo teste post hoc de Tukey ou Kruskal-Wallis seguido pelo teste de comparações múltiplas de Dunn quando a normalidade (Shapiro-Wilk) não foi satisfeita. Asteriscos indicam diferenças significativas em comparação ao grupo controle (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$).

O teste de movimentos de cabeça também foi realizado utilizando uma linhagem transgênica de *C. elegans* (CL2006), que expressa $A\beta$ humana entre as células musculares e essa se acumula levando o nematódeo à paralisia (Link, 1995). O **AG03** apresentou aumento de movimentos de cabeça e a memantina não mostrou diferença significativa entre os vermes tratados e os do controle. No grupo controle, o número de movimentos foi de $37,2 \pm 14,3$, enquanto no **AG03** foi de $72 \pm 21,9$. Essa melhora (93,5%) no movimento pode estar relacionada à capacidade multialvo do **AG03**, modulando a via colinérgica. Na taxa de iniciação de onda e na velocidade de nado, observamos um aumento no movimento em ambas as substâncias (Figura 58) quando comparadas ao controle (*C. elegans* selvagem - N2). Para o

grupo controle, a taxa de velocidade de nado foi de $262,6 \pm 79,9 \mu\text{m/s}$. O **AG03** apresentou um aumento na velocidade de 19,6% ($314,0 \pm 80,2 \mu\text{m/s}$; $p < 0,01$) e a memantina apresentou um aumento de 33,9% ($351,6 \pm 73,3 \mu\text{m/s}$; $p < 0,0001$).

O *C. elegans* se move gerando ondas curvas dorso-ventrais (DV) ao longo de seu corpo. Essa locomoção está fortemente relacionada aos sistemas GABAérgico e colinérgico. Em um lado do corpo, os neurônios motores liberam acetilcolina, que é responsável pela contração dos músculos. No lado oposto, os músculos relaxam devido à liberação de ácido gama-aminobutírico – GABA. Resultando no movimento sinusoidal do verme (Paltian et al., 2025). Outro neurotransmissor relacionado à atividade locomotora em *C. elegans* é o glutamato, que atua no NMR-1 (uma subunidade do receptor de glutamato ionotrópico do tipo NMDA) expresso nos interneurônios do circuito de controle locomotor. Brockie e colaboradores demonstraram que mutantes com deleção de NMR-1 interrompem o padrão de locomoção, aumentando a duração média do movimento para frente quando comparados aos vermes do tipo selvagem. Esse aumento do movimento para frente ocorre porque normalmente o *C. elegans* faz ajustes de trajetória alternando o sentido do movimento entre se locomover “para frente” ou “para trás” para contornar obstáculos ou ir em direção a comida e a inibição dos NMR-1 levaria a perda da capacidade desse ajuste de trajetória (Brockie et al., 2001).

Além disso, o padrão de atividade muscular muda de acordo com o ambiente, tanto em relação à cinemática quanto aos padrões de contrações da musculatura. Por exemplo, nadar (geralmente caracterizado por uma postura em forma de C) é diferente de rastejar em ágar (caracterizado por uma postura persistente em forma de S). Essa alternância locomotora é chamada de andadura e está relacionada a padrões funcionalmente distintos de atividade neural. Sendo essa transição entre os movimentos de nadar para rastejar frequentemente facilitada por aminas biogênicas como a dopamina e a serotonina. Além dessa mudança na forma de locomoção, ocorre também uma mudança no comportamento dos nematódeos quando transitam entre ambientes; por exemplo, forragear e bombeamento faríngeo são comportamentos presentes quando os vermes rastejam em meio sólido, mas ausentes quando nadam (Pierce-Shimomura et al., 2008; Vidal-Gade et al., 2011). Mesmo com essa diversidade de neurotransmissores e receptores envolvidos na atividade motora do *C. elegans*, os dados mostraram que o composto **AG03** exibiu atividade semelhante à memantina nos testes de parâmetros locomotores para a cepa selvagem (N2).

6 CONCLUSÕES

Os dados obtidos sugerem que todos os compostos sintetizados apresentaram baixa capacidade antioxidante pelo método do DPPH, entretanto, foram bons inibidores da enzima acetilcolinesterase, sendo o mais promissor dentre eles o composto **AG03** que apresentou maior capacidade de inibição enzimática (97,4 %), não apresentou toxicidade aguda para as larvas do microcrustáceo *Artemia salina* e não induziu mutações citogenotóxicas no ensaio com *Allium cepa* na concentração equivalente ao IC₅₀ AChE. As amostras **AG01**, **AG02**, **AG03** e **AG05**, que possuíam um grupamento NH₂ terminal, apresentaram maior citotoxicidade para as linhagens testadas que as amostras que possuíam esse grupamento substituído, reforçando a importância deste para a atividade biológica; essa relação também foi observada para a capacidade de inibição enzimática da acetilcolinesterase. O aumento da cadeia carbônica entre as aminas (**AG01**, **AG02** e **AG03**), aumentou a seletividade dos compostos, tornando-os mais citotóxicos para a linhagem de glioblastoma humano do que para a linhagem de fibroblastos de camundongo. Não podemos, entretanto, afirmar se esse aumento de seletividade tem relação com o tipo de célula ou com a condição dessa célula. Os fibroblastos utilizados são células saudáveis de tecido conjuntivo de camundongo, enquanto o glioblastoma tem origem em tecido tumoral glial humano. Os testes com *C. elegans* confirmaram a capacidade multialvo do composto **AG03**. Os testes de bombeamento faríngeo demonstraram o comportamento dose-dependente do **AG03** sobre o sistema colinérgico confirmando que em concentrações mais altas haveria uma paralisia da musculatura devido hiperestimulação colinérgica, resultando em hipercontração faríngea. E os testes de atividade locomotoram demonstraram não haver diferença estatisticamente significativa entre os resultados observados para o **AG03** e a Memantina, comprovando a ação de ambas as substâncias sobre o sistema glutamatérgico do *C. elegans*.

REFERÊNCIAS

ABEYSINGHE, A.A.D.T.; DESHAPRIYA, R.D.U.S.; UDAWATTE C. Alzheimer's disease; a review of the pathophysiological basis and therapeutic interventions. **Life Sciences**, V. 256, 117996, 2020.

ADEDARA *et al.* Versatility of *Caenorhabditis elegans* as a model organism for evaluating foodborne neurotoxins and food bioactive compounds in nutritional neuroscience. **Molecular Neurobiology**. V. 62, p.7205–7229, 2025.

ADI Alzheimer's Disease International / Symptoms of dementia.

Disponível em: <<https://www.alzint.org/about/symptoms-of-dementia/>> Acessado em: 26/03/2025.

ADLARD, P.A.; BUSH, A.I. Metals and Alzheimer's disease. **Journal of Alzheimer's Disease**. V.10, p.145–163, 2006.

ALCORN *et al.* Evaluation of *N*-alkyl isatins and indoles as acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase inhibitors. **Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry**. V. 39, N°. 1, 2024.

ARAÚJO, C. R. M.; SANTOS, V. L. dos A.; GONSALVES A. A. Acetilcolinesterase - AChE: uma enzima de interesse farmacológico. **Revista Virtual Química**. V. 8, N°. 6, p.1818-1834, 2016.

ARCK, P. C. When 3 Rs meet a forth R: replacement, reduction and refinement of animals in research on reproduction. **Journal of Reproductive Immunology** V.132, p. 54-59, 2019.

BACHURIN, S. O.; BOVINA, E.V.; USTYUGOV, A. A. Drugs in clinical trials for Alzheimer's disease: the major trends. **Medicinal Research Reviews**, V.37, N°. 5, p.1186-1225, 2017.

BARBOSA, G. **Síntese de derivados adamantoídes diaminados e amino álcoois, potenciais agentes farmacológicos**. Dissertação (Mestrado em Saúde) — Programa de Pós-Graduação em Saúde, Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora, 2014.

BARREIRO, E.J.; FRAGA, C.A.L. **Química Medicinal: as bases farmacológicas da ação dos fármacos**. 3ªed. Porto Alegre: Artmed, 2015.

BIVONA, G. *et al.* M. Microglial activation and priming in Alzheimer's disease: state of the art and future perspectives. **International Journal of Molecular Sciences**. V. 24, 884, 2023.

BUCHHOLZ, S; ZEMPEL, H. Suppression of mature *tau* isoforms prevents Alzheimer's disease-like amyloid-beta oligomer-induced spine loss in rodent neurons. **Neural Regeneration Research**. V.19, N°8, p. 1655-1657, 2024.

CHAI, A.B. *et al.* Apolipoprotein E isoform-dependent effects on the processing of Alzheimer's amyloid- β . **BBA - Molecular and Cell Biology of Lipids** V.1866, 158980, 2021.

CHEN, F. et al. The vascular contribution of APOE to Alzheimer's disease. **BRAIN**, V.147, p. 2946–2965, 2024.

COOK, S. J. *et al.* Whole-animal connectomes of both *Caenorhabditis elegans* sexes. **Nature**, V. 571, N°. 7763, p. 63–71, 2019.

DA SILVA, A.F., *et al.*, JM-20 affects GABA neurotransmission in *Caenorhabditis elegans*. **Neurotoxicology**, V.93, p. 37-44, 2022.

DA SILVEIRA, T. L., *et al.*, *Caenorhabditis elegans* as a model for studies on quinolinic acid-induced NMDAR-dependent glutamatergic disorders. **Brain Research Bulletin**. V.175, p. 90-98, 2021.

DANTA, C.C. Calcium channel blockers: a possible potential therapeutic strategy for the treatment of Alzheimer's dementia patients with SARSCoV-2 Infection. **ACS Chemical Neuroscience**. V.11, 2145–2148, 2020.

DREW, LIAM; ASHOUR, MOHAMED. An age-old story. **Nature**, V.559, 2018.

DU *et al.* Alzheimer's disease hypothesis and related therapies. **Translational Neurodegeneration**. V7, N°2, 2018.

EDIRIWEERA, M.K.; TENNEKOON K.H.; SAMARAKOON, S.R. In vitro assays and techniques utilized in anticancer drug discovery. **Journal of Applied Toxicology**. V.39, p. 38–71, 2019.

ELLMAN, G.L. *et al.* A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity, **Biochemical Pharmacology**, V.7, p. 88-95, 1961.

ESHRAGHI, M. *et al.* Alzheimer's disease pathogenesis: role of autophagy and mitophagy focusing in microglia. **International Journal of Molecular Sciences**. V. 22, 3330, 2021.

FANG, E.F. *et al.* Mitophagy inhibits amyloid- β and tau pathology and reverses cognitive deficits in models of Alzheimer's disease. **Nature Neuroscience**. V. 22, p. 401-412, 2019.

FINNEY, D.J. Statistical logic in the monitoring of reactions to therapeutic drugs. **Methods of Information in Medicine**. V.10(04), p. 237-245, 1971.

GAREGG, P. J.; SAMUELSSON, B. Novel reagent system for converting a hydroxy-group into an iodo-group in carbohydrates with inversion of configuration. **Journal of the Chemical Society, Chemical Communication**, n. 22, p. 978-980, 1979.

GAREGG, P. J. *et al.* A phosphorus nuclear magnetic resonance spectroscopic study of the conversion of hydroxy groups into iodo groups in carbohydrates using the iodinetriphenylphosphine-imidazole reagent. **Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions**. V. 2, n. 3, p. 271-274, 1987.

GAUTHIER, S.; ROSA-NETO P.; MORAIS J.A.; WEBSTER C. World Alzheimer report 2021: journey through the diagnosis of dementia. London, England: **Alzheimer's Disease International**. 2021.

GOETZL, E.J. Current developments in Alzheimer's disease. **The American Journal of Medicine**. V.138, p.15–20, 2025.

GOMES, A.M.; KOSZUOSKI, R. Evidências atuais do impacto terapêutico dos inibidores da acetilcolinesterase no transtorno cognitivo leve e na demência vascular. **Revista Psiquiátrica RS**. V.27(2), p.197-205, 2005.

GUEORGUIEVA, I *et al.* Donanemab population pharmacokinetics, amyloid plaque reduction, and safety in participants with Alzheimer's disease. **Clinical Pharmacology & Therapeutics**. V.113, N° 6, 2023

HUANG, J., *et al.* Inflammatory diseases, inflammatory biomarkers, and Alzheimer disease: an observational analysis and mendelian randomization. **Neurology**. V.100, N°6, 2023.

HUANG, Q., *et al.* Glycometabolic reprogramming of microglia in neurodegenerative diseases: insights from neuroinflammation. **Ageing and Disease**. V. 15, N° 3, 2023.

IBRAHIM, M. M.; GABR, M.T. Multitarget therapeutic strategies for Alzheimer's disease. **Neural Regeneration Research**. V.14(3), p. 437-440, 2019.

Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística – **IBGE/** Conheça o Brasil/ População/ Pirâmide etária. Disponível em: <<https://educa.ibge.gov.br/jovens/conheca-o-brasil/populacao/18318-piramide-etaria.html>>. Acessado em: 26/03/2025.

KCIUK, M. *et al.* Alzheimer's disease as type 3 diabetes: understanding the link and implications. **International Journal of Molecular Sciences**. V.25, N° 11955, 2024.

KRISHNAMURTHY, H. K. *et al.* An overview of the genes and biomarkers in Alzheimer's disease. **Ageing Research Reviews**. V. 104, n° 102599, 2025.

LALUT, J. *et al.* Rational design of novel benzisoxazole derivatives with acetylcholinesterase inhibitory and serotonergic 5-HT4 receptors activities for the treatment of Alzheimer's disease. **Nature/Scientific Reports**. V.10, N° 3014, 2020.

LANE, C. A.; HARDY J.; SCHOTT, J. M. Alzheimer's disease. **European Journal of Neurology**. V.25, p. 59–70, 2017.

LEE, K.H.; LEE, D.W.; KANG, B.C. The 'R' principles in laboratory animal experiments. **Laboratory Animal Research**. V. 36, N°45, 2020.

LEITERITZ, A., *et al.* Betaine reduces beta-amyloid-induced paralysis through activation of cystathionine-beta-synthase in an Alzheimer model of *Caenorhabditis elegans*. **Genes and Nutrition**. V.13, N°21, 2018.

LONG, S., BENOIST, C., WEIDNER, W. World Alzheimer report 2023: reducing dementia risk: never too early, never too late. London, England: **Alzheimer's Disease International**. 2023.

LUCAS, G.T. *et al.* Assessment of different pharmacological activities of Cayaponia Tayuya (Vell.) Cogn. **Journal of Multidisciplinary Engineering Science and Technology (JMEST)**. V.6, p.9391-9395, 2019.

MA, L. *et al.* *Caenorhabditis elegans* as a model system for target identification and drug screening against neurodegenerative diseases. **European Journal of Pharmacology**. V. 819, p. 169-180, 2018.

MAHMOUD *et al.* Neurobehavioral investigation and acetylcholinesterase inhibitory activity study for some new coumarin derivatives. **European Journal of Medicinal Chemistry**. V. 182, 2019.

MAKIN, S. The Amyloid hypothesis on trial: with the continued failure of potential drugs for Alzheimer's disease, is it time to look beyond amyloid- β as the root cause of the condition? **Nature**. V. 559, 2018.

MARTINS *et al.* New group of azastilbene analogs of resveratrol: synthesis, anticandidal activity and toxicity evaluation. **Journal of King Saud University – Science**. V.31, p. 158–163, 2019.

MESITI, F. *et al.* The chemistry toolbox of multitarget-directed ligands for Alzheimer's disease. **European Journal of Medicinal Chemistry**. V. 181, p. 111572, 2019.

MINETT, T.S.C.; BERTOLUCCI, P.H.F. Terapia colinérgica na doença de Alzheimer. **Revista Neurociências**. V.8, N°1, p. 11-14, 2000.

Ministério da Saúde/ Alzheimer: o que é, causas, sintomas, tratamento, diagnóstico e prevenção. Disponível em: <<http://saude.gov.br/saude-de-a-z/alzheimer>>. Acessado em: 26/03/2025.

MINTUN, M.A. *et al.* Donanemab in early Alzheimer's disease. **The New England Journal of Medicine**. V. 384, n°18, 1691-1704, 2021.

MORETTO, L. D.; STEPHANO, M. A. Métodos alternativos ao uso de animais em pesquisa reconhecidos no Brasil. São Paulo, Limay, 732 p. 2019.

MOSMANN, Tim. rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**. V.65, p. 55-63, 1983.

NAM, S.W. *et al.* *C. elegans* sensing of and entrainment along obstacles require different neurons at different body locations. **Scientific Reports**. V. 3, N° 3247, 2013.

NIMMIRICH, V.; ECKERT, A. Calcium channel blockers and dementia. **British Journal of Pharmacology**. V.169, p. 1203–1210, 2013.

NTUNGWE, E. *et al.* Artemia species: an important tool to screen general toxicity samples. **Current Pharmaceutical Design**. V.26, p. 2892-2908, 2020.

OASA, S.; KOUZNETSOVA, V.L.; TIIMAN, A.; VUKOJEVIC, V.; Igor F. TSIGELNY, I.F.; TERENIUS, L. Small molecule decoys of aggregation for elimination of A β -peptide toxicity. **ACS Chemical Neuroscience**. V.14, p.1575–1584, 2023.

OASA, S.; KOUZNETSOVA, V.L.; TSIGELNY, I.F.; TERENIUS, L. Small molecular decoys in Alzheimer's disease. **Neural Regeneration Research**. V.19, N°8, p.1658-1659, 2024.

O'KEEFFE, A. *et al.* Development of an in vitro media perfusion model of *Leishmania major* macrophage infection. **Plos One**. V.14, N°7, 2019.

OLASEHINDE, T. A.; OLANIRAN, A.O.; OKOH, A. I. Neuroprotective effects of some seaweeds against Zn – induced neuronal damage in HT-22 cells via modulation of redox imbalance, inhibition of apoptosis and acetylcholinesterase activity. **Metabolic Brain Disease**. V. 34, p.1615–1627, 2019.

OLIVEIRA, Geane Pereira de. **Indução Metabólica de fungos filamentosos pelas técnicas de co-cultivo, osmac e modulação epigenética: produção de metabólitos secundários com atividade neuro protetora**. 2019. 194 f. Tese [Doutorado em Ciências – Química] – Departamento de Química, Instituto de Ciências Exatas, Universidade Federal de Minas Gerais, Minas Gerais, 2019.

OMS - WHO/ Dementia: a public health priority. **WHO**, 2017. Disponível em: <<https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/dementia>>. Acessado em: 26/03/2025.

PATEL, MANISHA. Targeting oxidative stress in central nervous system disorders. **Trends in Pharmacological Sciences**, V. 37, N° 9, 2016.

PINTO, L.D. *et al.* Solution and solid state study of copper(II) ternary complexes containing amino acids of interest for brain biochemistry – 1: Aspartic or glutamic acids with methionine or cysteine. **Inorganica Chimica Acta**. V. 363, p. 2624–2630, 2010.

PISOSCHI, A.M.; POP, A. The role of antioxidants in the chemistry of oxidative stress: a review. **European Journal of Medicinal Chemistry**. V.97, p.55-74, 2015.

POHL, F; LIN, P. K. T. The potential use of plant natural products and plant extracts with antioxidant properties for the prevention/treatment of neurodegenerative diseases: *in vitro*, *in vivo* and clinical trials. **Molecules**. V. 23, N° 3283, 2018.

PORTA-DE-LA-RIVA, M., et al., Basic *Caenorhabditis elegans* methods: synchronization and observation. **Journal of Visualized Experiments**. V. 64, p. e4019, 2012.

RODRÍGUEZ-SOACHA, D. A.; SCHEINER, M.; DECKER, M. Multi-target-directed-ligands acting as enzyme inhibitors and receptor ligands. **European Journal of Medicinal Chemistry**. V.180, p. 690-706, 2019.

ROSINI, M. *et al.* Merging memantine and ferulic acid to probe connections between NMDA receptors, oxidative stress and amyloid-b peptide in Alzheimer's disease. **European Journal of Medicinal Chemistry**. V. 180, p.111-120, 2019.

SCEARCE-LEVIE, K.; SANCHEZ, E.P.; LEWCOCK, J.W. Leveraging preclinical models for the development of Alzheimer disease therapeutics. **Nature Reviews / Drug Discovery** V.19, 447-462, 2020.

SCORZONI, L. *et al.* Evaluation of *Caenorhabditis elegans* as a host model for *Paracoccidioides brasiliensis* and *Paracoccidioides lutzii*. **Pathogens and Disease**, V. 76, 2018.

SENGUL *et al.* Analysis of U87 glioma cells by dielectrophoresis. **Electrophoresis**. V. 43, p. 1357–1365, 2022.

SIMS, J.R. *et al.* Donanemab in early symptomatic Alzheimer disease: the trailblazer-ALZ 2 randomized clinical trial. **Journal American Medical Association (JAMA)**.V. 330, N° 6, 2023.

SHUKLA, V.; MISHRA, S. K.; PANT, H. Oxidative stress in neurodegeneration. **Advances in Pharmacological Sciences**. 13 p. 2011, Article ID 572634.

SOARES, M.V., *et al.*, Airborne toluene exposure causes germline apoptosis and neuronal damage that promotes neurobehavioural changes in *Caenorhabditis elegans*. **Environmental Pollution**. V.256, p.113406, 2020.

SOREQ, H.; SEIMAN, S. Acetylcholinesterase — new roles for an old actor. **Nature Reviews Neuroscience**, V. 2, 295, 2001.

SREEJAYAN, N.; RAO, M.N. Free radical scavenging activity of curcuminoids. **Arzneimittel-forschung**, V. 46, N°2, p.169-171, 1996.

SUN, Z. *et al.* Targeting microglia in Alzheimer's disease: pathogenesis and potential therapeutics strategies. **Biomolecules**, V. 14, p. 833, 2024.

TAN, Y.; DENG, Y.; QING, H. Calcium channel blockers and Alzheimer's disease. **Neural Regeneration Research**. V.7(2):137-140, 2012.

VELLOSA *et al.* Atividade anti-Alzheimer de substâncias oriundas de produtos naturais e de origem sintética. **Química Nova**, Vol. 45, No. 4, 435-454, 2022.

VIDAL *et al.* The enteric nervous system of the *C. elegans* pharynx is specified by the sine oculis-like homeobox gene *ceh-34*. **eLife**, V.11, N° e76003, 34p., 2022.

WALKER, K.A. Inflammation and neurodegeneration: chronicity matters. **Aging**, v. 11, n. 1, p.3-4, 2019.

WALKER, L.C. Proteopathic strains and the heterogeneity of neurodegenerative diseases. **Annual Review of Genetics**, v. 50, n. 1, p.329-346, 2016.

WETMORE, B.A. Quantitative in vitro-to-in vivo extrapolation in a high-throughput Environment. **Toxicology**, V. 332, p. 94-101, 2015.

WORMATLAS – A database featuring behavioral and structural anatomy of *Caenorhabditis elegans* and other nematodes, 2025.

Disponível em: <<https://www.wormatlas.org/>>. Acessado em: 29/07/25.

WYMAN-CHICK, K.A. *et al.* Differentiating prodromal dementia with Lewy bodies from prodromal Alzheimer's disease: a pragmatic review for clinicians. **Neurology and Therapy**, v.13, p.885–906, 2024.

YE, J.; WAN, H.; CHEN, S.; LIU, GP. Targeting *tau* in Alzheimer's disease: from mechanisms to clinical therapy. **Neural Regeneration Research**. V.19(7), p.1489-1498, 2024.

ZHANG, F. Q. *et al.* Current status and future prospects of stem cell therapy in Alzheimer's disease. **Neural Regeneration Research**. V.15(2), p.242-250, 2020.

ZHANG, Y *et al.* Amyloid β -based therapy for Alzheimer's disease: challenges, successes and future. **Signal Transduction and Targeted Therapy**. V.8, p.248, 2023.

ZHANG, X. *et al.* The emerging role of nitric oxide in the synaptic dysfunction of vascular dementia. **Neural Regeneration Research**. V.20(2), p.402-415, 2025.

**APÊNDICE A – Bandas de absorção no espectro de infravermelho dos compostos AGx
(cm⁻¹)**

	AG01	AG02	AG03	AG04	AG05	AG06	AG07
N-H (axial)	3380	3355	3467, 3402	3400	3425	3349	3295
C-H	2898	2902	2900	2902	2898	2904	2906
(axial alifático)	2846	2846	2846	2848	2842	2848	2850
CH ₂ (angular)	1444	1444	1448	1461	1454	1442	1421 1353
C-S	-	-	-	-	881 813	-	-
C-O	-	-	-	-	-	1080	-

**APÊNDICE B – Deslocamentos químicos dos compostos AGx observados na
caracterização por ressonância magnética nuclear – RMN**

RMN ¹H

	AG01 CD ₃ OD	AG02 CD ₃ OD	AG03 CD ₃ OD	AG04 CD ₃ OD	AG05 DMSO	AG06 CD ₃ OD	AG07 CD ₃ OD
Ada – CH ₂	1,6 -1,8	1,6-1,8	1,6-1,8	1,7-1,8	1,5-1,6	1,6-1,8	1,7-1,8
Ada – CH	2,0	2,0	2,0	2,0	1,9	2,0	2,0
H1	2,8	2,7	2,7	2,8	2,3	2,7	3,0
H2	3,3-3,4	3,0-3,1	3,0	3,5-3,6	2,6	3,1	3,4-3,9
H3	3,3-3,4	2,1- 2,3	1,6-1,8	3,5-3,6	2,9	3,8	3,4-3,9
H4	-	3,0-3,1	1,6-1,8	2,9	-	-	-
H5	-		3,31	2,9	-	-	-
NH ₂					8,1	-	-

RMN ¹³C

	AG01 CD ₃ OD	AG02 CD ₃ OD	AG03 DMSO	AG04 CD ₃ OD	AG05 DMSO	AG06 CD ₃ OD	AG07 CD ₃ OD
Ada – 1	33,6	33,5	27,3	33,5	33,4	32,0	33,3
Ada – 2	40,8	40,8	35,9	40,7	41,0	39,1	39,2
Ada – 3	29,5	29,5	27,3	29,3	27,8	28,0	28,0
Ada – 4	37,5	37,5	31,8	37,4	36,3	36,0	35,8
C1	61,5	61,0	58,0	61,4	46,1	55,6	70,0
C2	47,2	47,4	47,3	54,3	38,7	50,1	55,1
C3	36,8	25,0	23,9	44,6	30,1	58,6	39,7
C4	-	38,1	27,3	43,9	-	-	-
C5	-	-	37,9	43,9	-	-	-

ANEXO A - Computational methodologies

Docking simulation

For the docking simulation we used the 6U37 PDB structure for AChE [1], which contains an o-ethylmethylphosphonic acid ester group (VX) attached to Ser203, two molecules of glycerol (GOL) and the ligand (2E)-N-[2-(azepan-1-yl)ethyl]-2-(hydroxyimino) acetamide (PVQ - an oxima that acts as AChE reactivator). The structure was cleaned removing all non-standards residues and structural waters, keeping only the chain A. The grid box was defined using the PVQ ligand as reference, centered at $x = -25.034$, $y = 90.926$, $z = -8.203$ Å with search space of 30 and spacing 0.375 Å in all three directions. Only polar H atoms were considered for AChE with the residues in their standard protonation states at neutral pH. The simulations were made with the Autodock Vina v1.1.2 software [2] setting exhaustiveness = 8.

In order to validate the docking protocol, the FDA approved drugs donepezil (E20), (-)galantamine (GNT), (-)huperzine A (HUP) and rivastigmine (RIS) (Figure 1) were docked in the AChE binding site defined here. The best pose of each ligand was then compared to the X-ray structure available in the PDB with codes 6EY7 (E20), 6EY6 (GNT) and 6EY5 (HUP) [3].

In the last stage, the new compounds shown in Figure 2 (AGx) and the resveratrol (RSV) analogues (from ref. [4]) were docked in the AChE binding site.

Results and discussion

Docking simulation of the FDA approved drugs: The co-crystallized poses for the three ligands used as benchmarking were satisfactorily reproduced by the docking protocol (Figure 3). The RMSD was 0.721 (E20), 0.720 (GNT) and 0.696 Å (HUP) and all-important ligand-enzyme contacts are predicted in the simulation (Figure 4). It is important to emphasize that the docking protocol was independent of the reference X-ray structure (re-docking was not used here), therefore, the good agreement between predicted and experimental structures supports the docking setup.

Table 1 shows the docking results for all compounds analyzed, including the main hydrophobic, polar (C...H-bond) and conventional H-bond contacts, in addition to the calculated drug-receptor affinity. Among the FDA approved drugs, the E20 has the greatest affinity (-10.1 kcal/mol) and is a strong AChE inhibitor. It binds to AChE site gorge with the benzyl ring directed to the catalytic anionic site (CAS) and stacking to Trp86 residue of the

anionic domain (see Figure 5 for the definition of the main AChE binding site domains). The indanone ring is close to the peripheral anionic site (PAS) stacking to Trp286 and H-bonded to Phe295 of the acyl pocket. Besides, the piperidine ring are in close contact with Tyr124, Phe338 and Tyr341 residues (Figure 4a).

The HUP ligand also binds very favorable to the active site of AChE, with affinity of -9.0 kcal/mol (Figure 4b). This molecule is smaller than E20 but has a significant volume, which favors the contacts deep inside the binding gorge. The main anchor points are in the anionic domain, two H-bond with Tyr133 and Tyr337. Hydrophobic interactions are also observed at the CAS involving the residues Phe297 and Tyr449.

The GNT also binds at the CAS, with a H-bond between Ser203 and the benzofuran moiety being established. In addition, many hydrophobic contacts are predicted with His447 (CAS), Trp86 and Phe338 (anionic domain), Phe295 and Phe297 (acyl pocket) (Figure 4c).

The RIS compound showed the lowest affinity by AChE, -7.3 kcal/mol. This molecule binds the AChE with the N-ethyl-N-methylcarbamate group directed to the CAS domain, but the H-bonds with Tyr124 (PAS) and Tyr337 (anionic domain) keep the molecule close to the PAS (Figure 6). In addition, hydrophobic contacts between dimethylaminogroup and PAS (Trp286 and Tyr341) are also observed.

Docking simulation of the AGx derivatives: The AGx compounds proposed here have an adamantane group attached to a diamine derivative (Figure 2). All seven molecules showed affinity around -7.5 kcal/mol and have very similar binding modes (Table 1), with the adamantane group interacting with Trp86 and His447 (anionic domain and CAS) through hydrophobic contacts. The terminal amino group is pointed to the PAS and forms H-bond with several residues, mainly the Tyr in that region, namely, Tyr124, Tyr337 and Tyr341. Analyzing the Figures 7a,b we note that AG01 and AG02 assume similar conformation in the binding site, with the adamantane ring interacting with Trp86 and His447 (CAS domain) and the terminal amine group H-bonded to Tyr337 and His341 (PAS domain). When it comes to AG03, which has a butyl C-chain, the folding is not observed (Figure 7c) and the terminal amine group is in short contacts with Gln71 and Tyr72 in the PAS. Using the values of affinity in the last column of Table 1, we note very close values for ethyl (AG01), propyl (AG02) and butyl (AG03) derivatives, with the best affinity predicted for the propyl derivative (AG02, -7.6 kcal/mol), which suggests an optimal chain length within this homologue series. The compounds AG04, AG05 and AG06 were derived from AG01 with an ethyl C-chain. The alkylation of the terminal amine changes and weakens the binding mode, with the adamantane group directed to the PAS domain. Two important drug-receptor contacts were observed with Trp286 (PAS) and Ser293

(Acyl pocket) (Figure 7d). The loss of H-bonds with Tyr in the PAS domain led to affinity of only -6.4 kcal/mol, the worst values among all molecules screened (see Table 1). The AG05 and AG06 bind similarly to AG01; however, the change of the -NH group to -S in AG05 decreased the affinity to -7.2 kcal/mol due to loss of H-bond to Tyr337 (Figure 7e). On the other hand, the change of the terminal -NH₂ by OH (AG06) did not affect the binding mode or even the affinity, maintained the four essential anchor points Trp86, His447 (close to CAS) and Tyr337, Tyr341 (close to PAS) (Figure 7f). Lastly, the compound AG07 was analyzed, which presents a hydro-pyrazine ring. The binding mode and affinity is similar to AG01, but the H-bonds are less frequent (Figure 7g), which might support the importance of the free terminal amine for these compounds.

In summary, docking analysis of the new **AGx** compounds synthesized here indicates that **AG02** and **AG03** exhibits the key features of a potential AChE inhibitor: (i) an adamantane hydrophobic group moiety interacting with Trp86 and His447 (CAS domain), and (ii) an alkyl diamine chain forming H-bonds with PAS residues, mainly, Tyr337 and Tyr441. Among the series, **AG02** and **AG03** showed the highest affinities (-7.6 and -7.5 kcal mol⁻¹), both comparable to GNT (-7.8 kcal mol⁻¹), but lower than FDA-approved drugs: E20 (-10.1 kcal mol⁻¹) and HUP (-9.0 kcal mol⁻¹). Based on these results, we proposed a derivative with a phenyl group attached to the terminal amine in AG02 (labeled as AG02-m1 in Table 1). The affinity was significantly improved to -9.2 kcal/mol, with the binding mode presenting two important contacts observed for E20, which are the Trp86 (CAS) and Trp286 (PAS), besides the H-bond with Tyr124 (Figure 8).

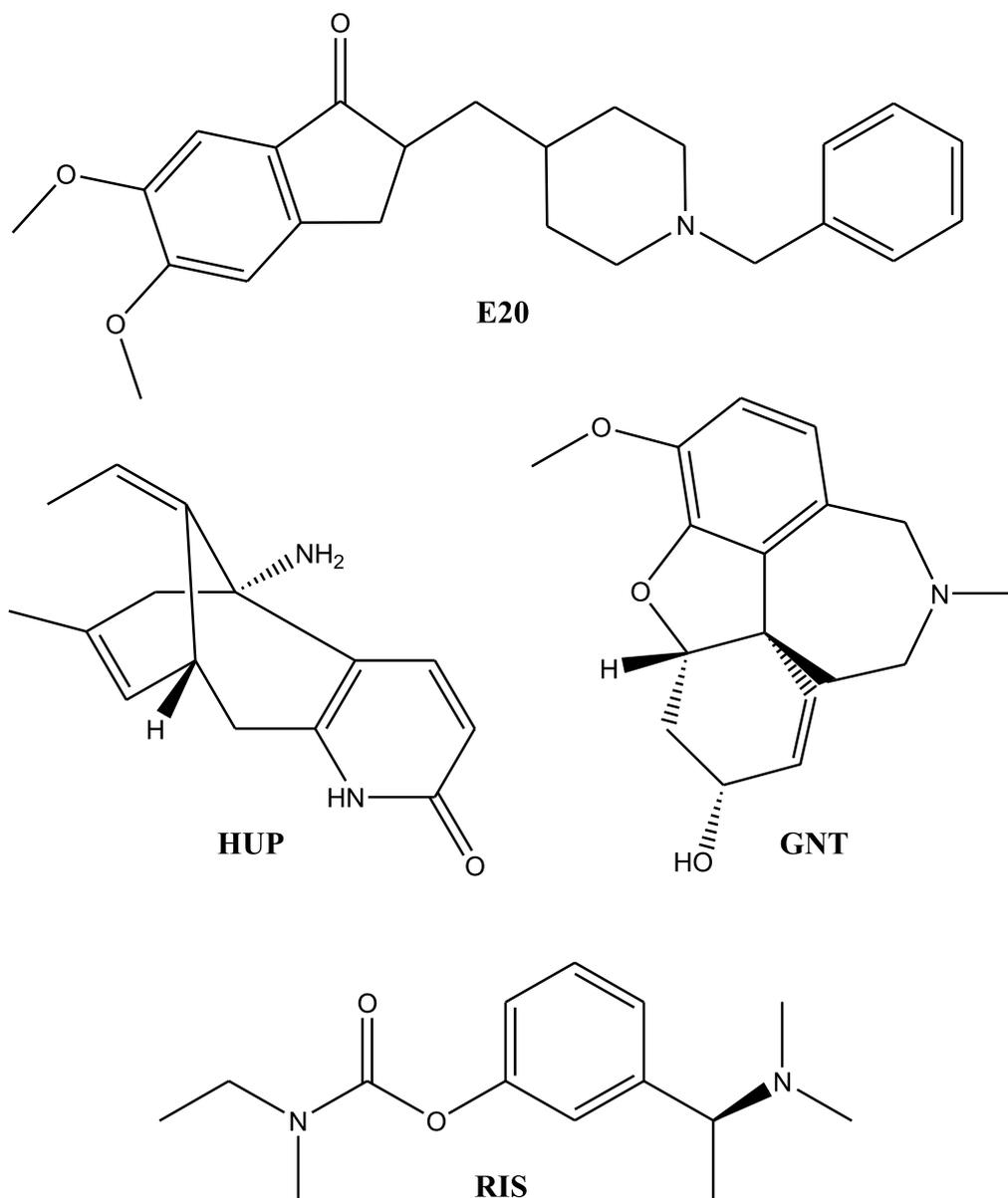


Figure 1. Structures of the FDA approved AChE inhibitors.

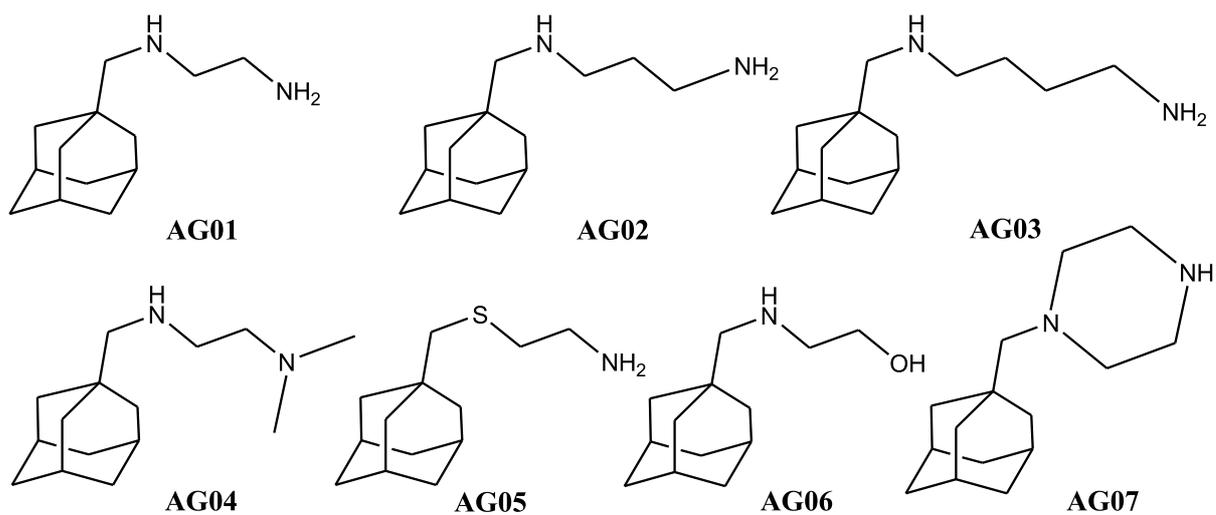


Figure 2. Potential AChE inhibitors evaluated in the present study.

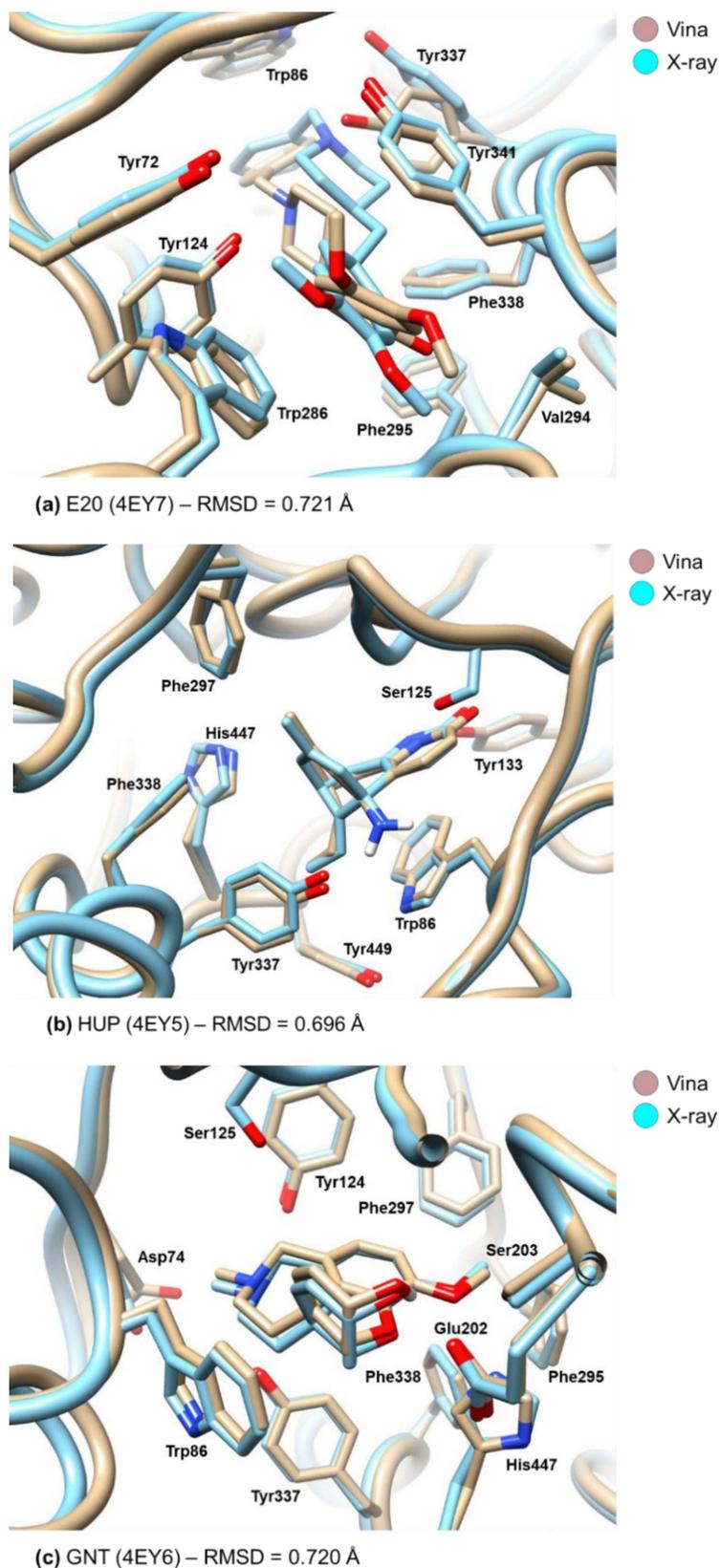


Figure 3. Overlap of the X-ray and docked (Vina) structures for the FDA approved drugs. The PDB code is shown in parenthesis and the RMSD using all residues is provided.

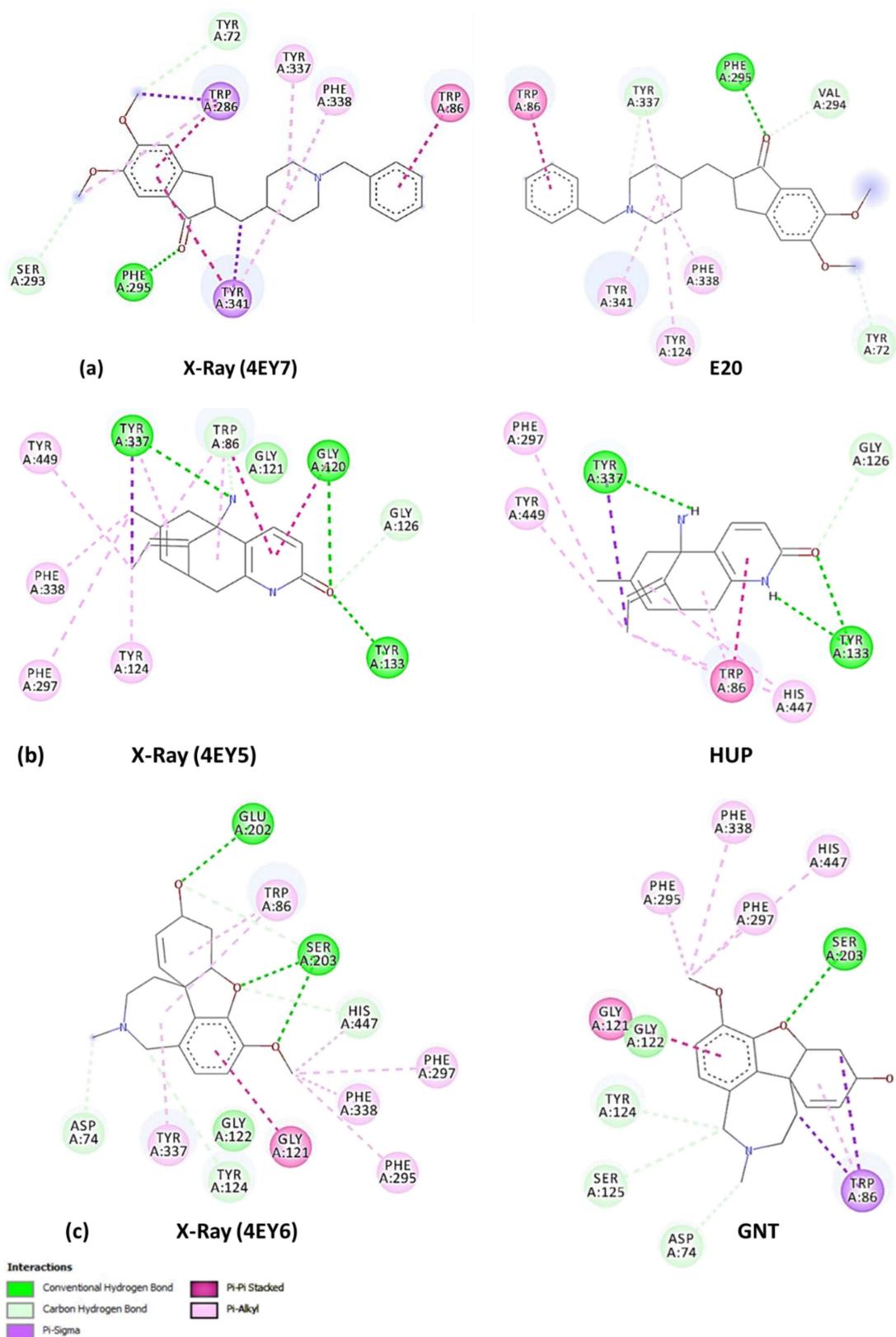


Figure 4. 2D representation of the drug-receptor interactions for the FDA approved drugs.

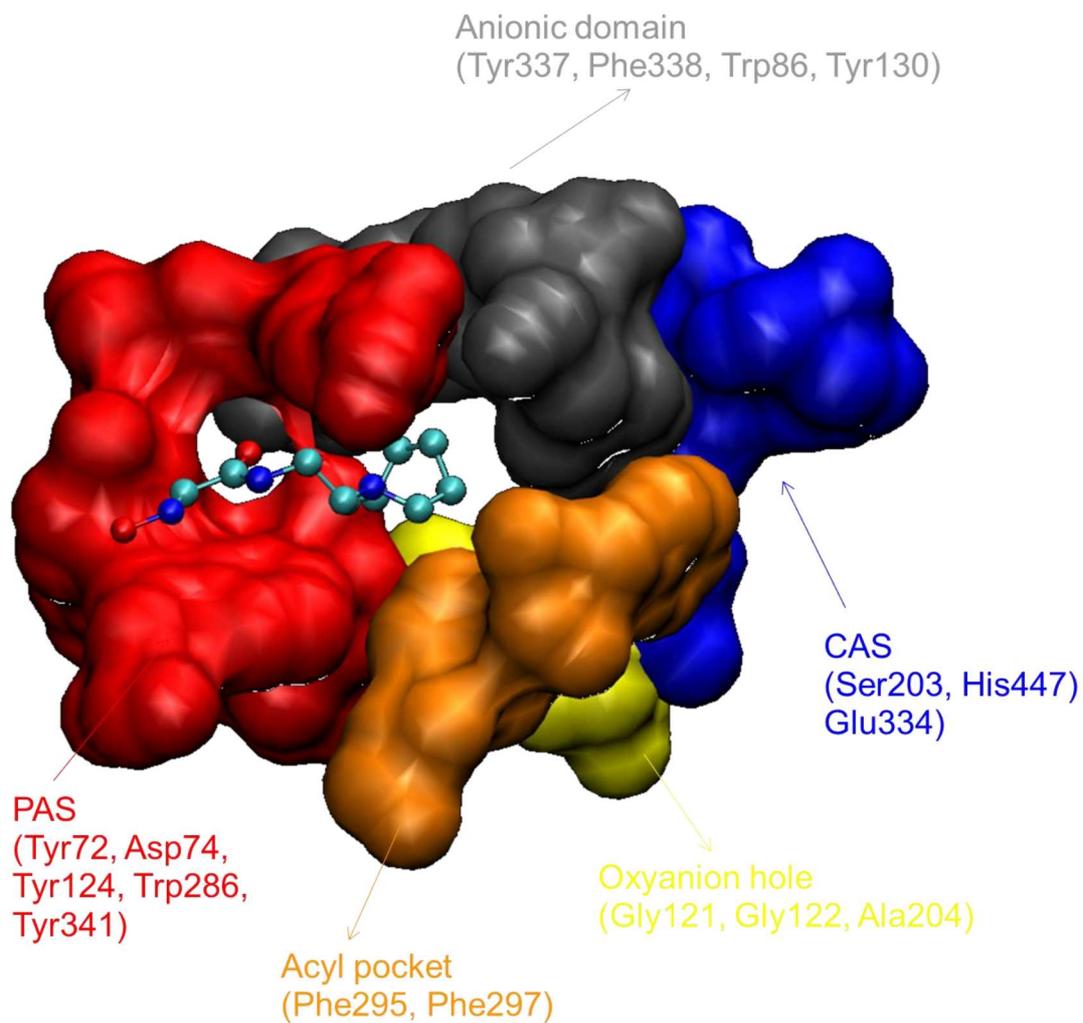


Figure 5. AChE binding site. The PDB 6U37 structure was used with the PVQ co-crystallized ligand.

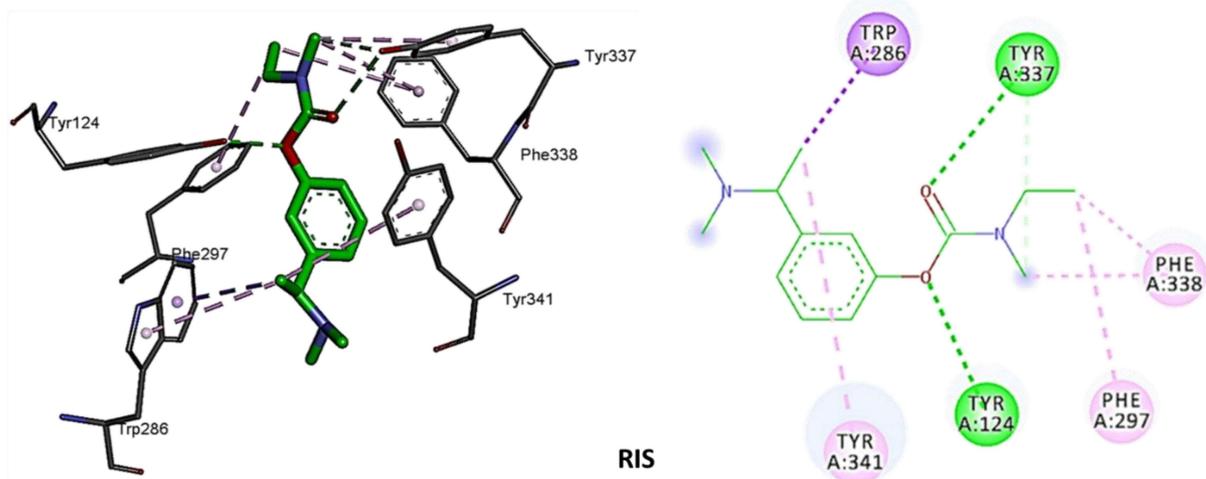


Figure 6. RIS...AChE binding mode.

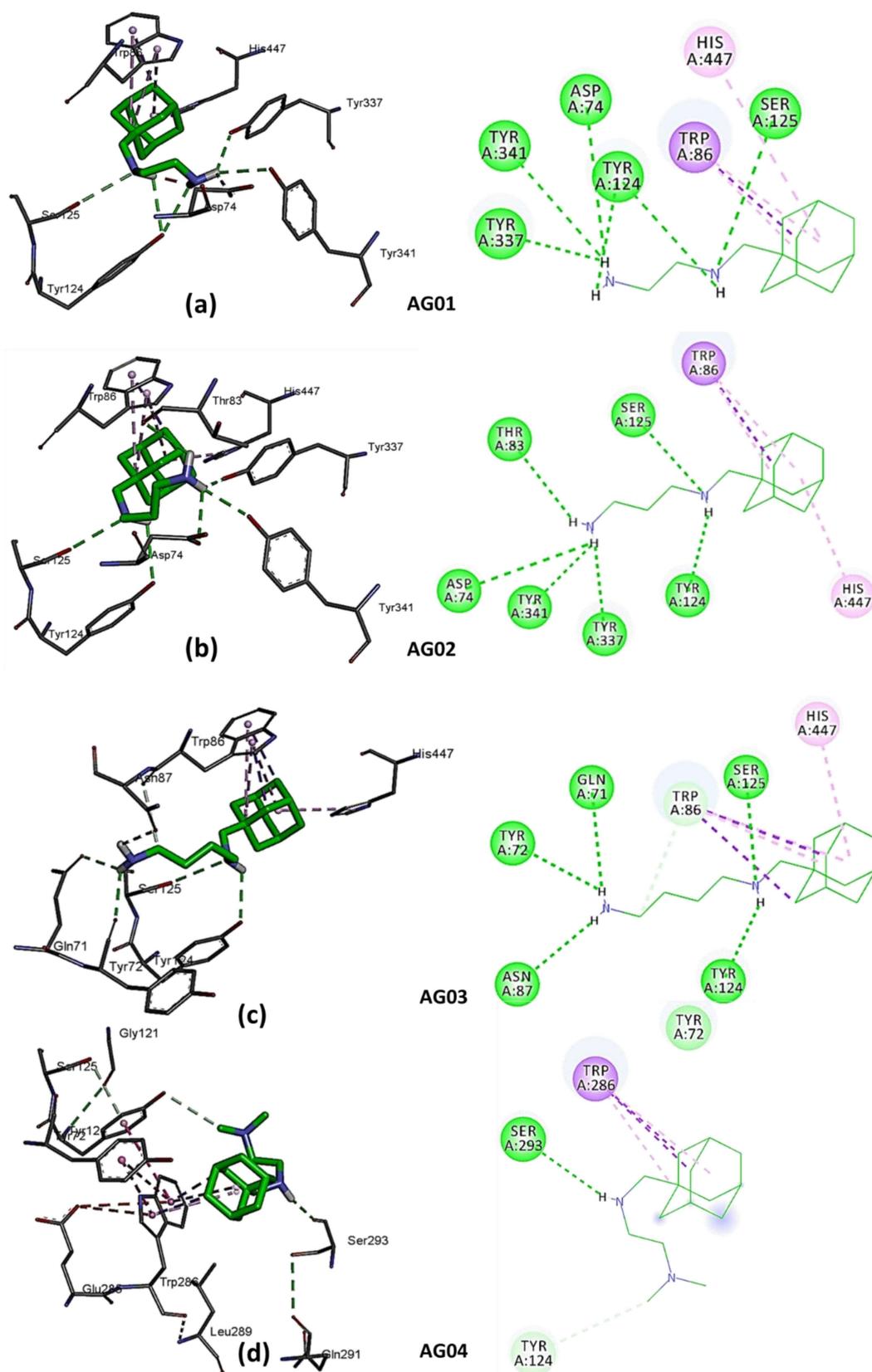
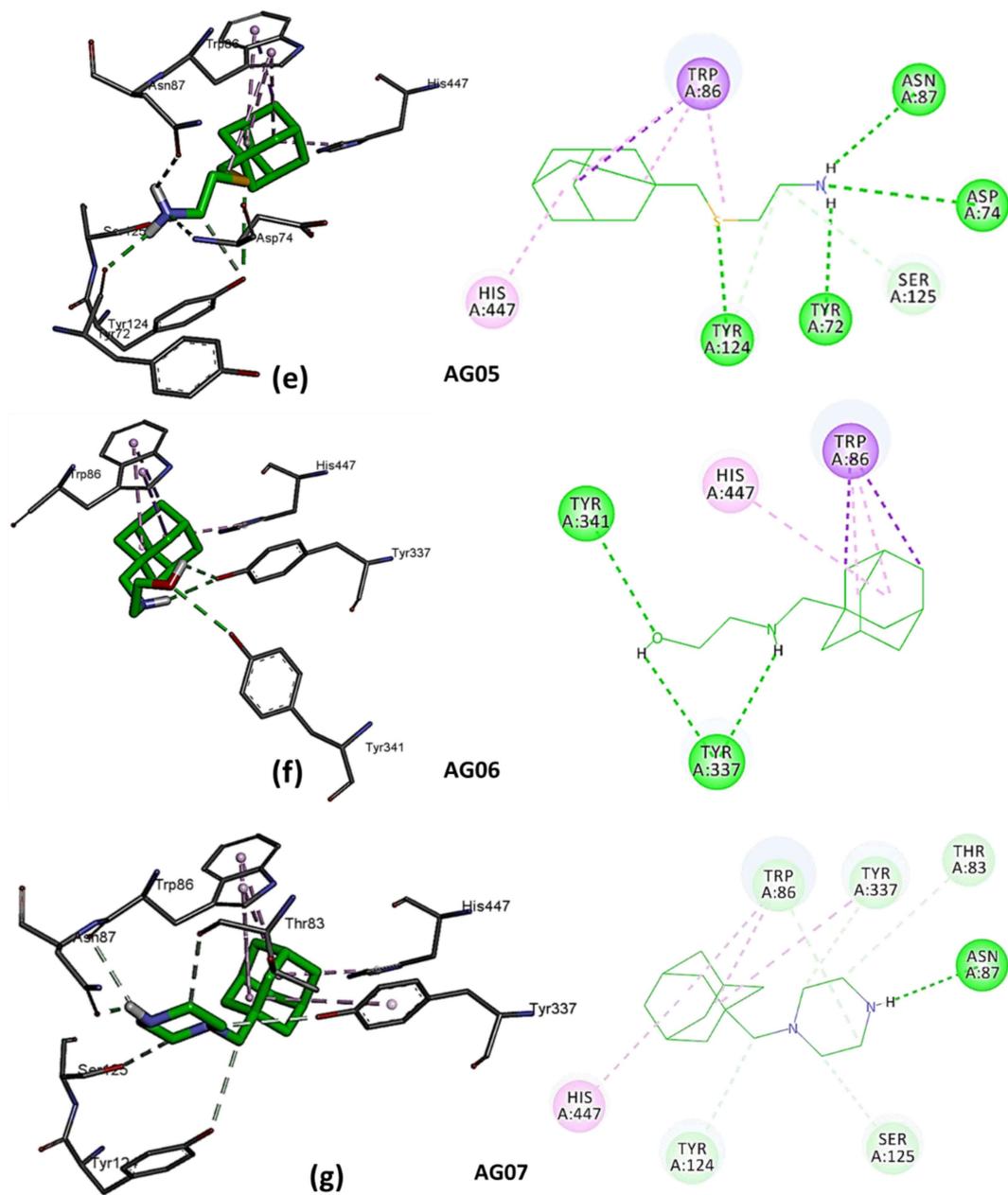


Figure 7. AGx...AChE binding mode.

Figure 7. *Continued.*

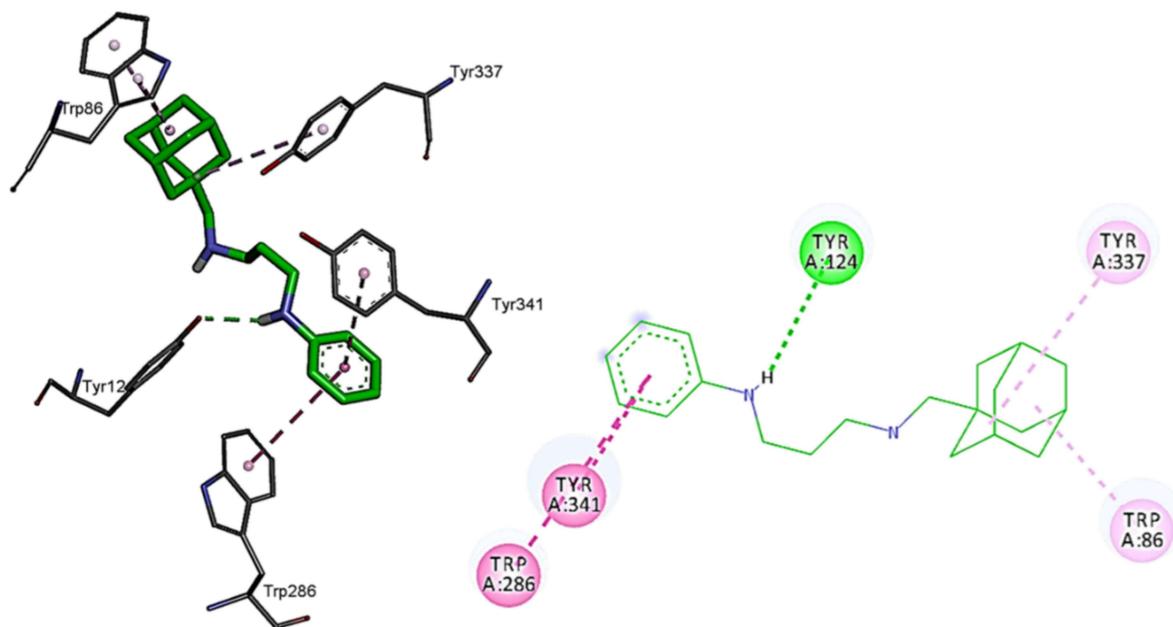


Figure 8. AG02-m1...AChE binding mode.

Table 1. Docking results.

	Hydrophobic	Polar	H-bond	Affinity / kcal mol ⁻¹
FDA approved drugs				
E20	Trp86, Tyr124, Phe338, Tyr341, Trp286	Tyr72, Val294, Tyr337	Phe295	-10.1
HUP	Trp86, Phe297, His447, Tyr449	Val126	Tyr133, Tyr337	-9.0
GNT	Trp86, Gly121, Phe295, Phe297, Phe338, His447	Asp74, Gly122, Tyr124, Ser125	Ser203	-7.8
RIS	Trp286, Phe297, Phe338, Tyr341		Tyr124, Tyr337	-7.3
AGx AChE inhibitors				
AG01	Trp86, His447		Asp74, Tyr124, Ser125, Tyr337, Tyr341	-7.4
AG02	Trp86, His447		Asp74, Thr83, Tyr124, Ser125, Tyr337, Tyr341	-7.6

AG03	His447	Trp86	Gln71, Tyr72, Asn87, Tyr124, Ser125	-7.5
AG04	Trp286	Tyr124	Ser293	-6.4
AG05	Trp86, His447	Ser125	Tyr72, Asp74, Asn87, Tyr124,	-7.2
AG06	Trp86, His447		Tyr337, Tyr341	-7.4
AG07	His447	Trp86, Tyr124, Ser125, Thr83, Tyr337	Asn87	-7.4
AG02-m1*	Trp86, Tyr337, Trp286, Tyr341		Tyr124	-9.2

*This molecule was proposed based on the AG02 and donepezil derivatives but was not synthesized.