

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

SÍNTESE, FOTOFÍSICA E MODELAGEM MOLECULAR DE COMPOSTOS
TENDO COMO ALVOS AS ENZIMAS COLINESTERASES E A PROTEÍNA BSA

Tese de Doutorado

FRANCIELA ARENHART SOARES

Orientadora: Profa. Dra. Leandra Franciscato Campo

Co-orientador: Prof. Dr. Marco Antonio Ceschi

Porto Alegre, março de 2020

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

FRANCIELA ARENHART SOARES

SÍNTESE, FOTOFÍSICA E MODELAGEM MOLECULAR DE COMPOSTOS
TENDO COMO ALVOS AS ENZIMAS COLINESTERASES E A PROTEÍNA BSA

Tese apresentada como requisito parcial para
a obtenção do grau de Doutora em Química

Profa. Dra. Leandra Franciscato Campo
Orientadora

Prof. Dr. Marco Antonio Ceschi
Co-orientador

Porto Alegre, março de 2020

CIP - Catalogação na Publicação

Soares, Franciela Arenhart
SÍNTESE, FOTOFÍSICA E MODELAGEM MOLECULAR DE
COMPOSTOS TENDO COMO ALVOS AS ENZIMAS COLINESTERASES E
A PROTEÍNA BSA / Franciela Arenhart Soares. -- 2020.
302 f.
Orientadora: Leandra Franciscato Campo.

Coorientador: Marco Antonio Ceschi.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal do Rio
Grande do Sul, Instituto de Química, Programa de
Pós-Graduação em Química, Porto Alegre, BR-RS, 2020.

1. Síntese Orgânica. 2. Colinesterases. 3.
Alzheimer. 4. Fluorescência. 5. BSA. I. Campo, Leandra
Franciscato, orient. II. Ceschi, Marco Antonio,
coorient. III. Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da UFRGS com os
dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Declaro que a presente tese foi realizada inteiramente por mim, Franciela Arenhart Soares e as colaborações devidamente referenciadas ao longo do texto. Este trabalho foi realizado no período entre março de 2016 e março de 2020 no Instituto de Química da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, sob orientação da professora Leandra Franciscato Campo e co-orientação do professor Marco Antonio Ceschi. A tese foi julgada adequada para obtenção do título de Doutora em Química pela banca examinadora.

“De todos os ódios, nenhum é maior que o da
ignorância pelo conhecimento”

Galileu Galilei – 1564-1642.

SUMÁRIO

1. Introdução	1
2. Revisão da Literatura	6
2.1. Doença de Alzheimer.....	6
2.2. Enzimas Colinesterases.....	9
2.3. Inibidores de Colinesterases	12
2.4. Híbridos multifuncionais no tratamento da DA.....	14
2.4.1. <i>Tianeptina</i>	18
2.4.2. <i>Lofina</i>	21
2.4.3. <i>Cinâmico</i>	24
2.5. Híbridos com ligação tripla.....	35
3. Fotofísica aplicada à farmacologia	38
4. Objetivo	44
4.1. Parte I – Ésteres tianeptínicos	44
4.2. Parte II – Híbridos multifuncionais	44
4.3. Parte III – Estudo fotofísico.....	45
4.4. Objetivos específicos	45
5. Resultados e discussões	47
5.1. Parte I - Ésteres tianeptínicos.....	47
5.1.1. <i>Síntese dos ésteres tianeptínicos</i>	47
5.1.2. <i>Avaliação biológica</i>	51
5.1.3. <i>Interações intermoleculares dos ésteres com a proteína BSA</i>	51
5.1.4. <i>Modelagem molecular – BSA</i>	59
5.1.5. <i>Conclusões parciais</i>	61
6. Considerações Finais	62
7. Parte experimental	64
7.1. Parte experimental – I.....	64

7.2.	Parte experimental - II	65
7.3.	Procedimentos sintéticos.....	65
7.3.1.	<i>Síntese dos ésteres tianeptínicos (2a-c)</i>	65
7.3.2.	<i>Éster metílico da Tianeptina (2a)</i>	66
7.3.3.	<i>Éster etílico da Tianeptina (2b)</i>	66
7.3.4.	<i>Éster propílico da Tianeptina (2c)</i>	67
7.3.5.	<i>Síntese dos ésteres tianeptínicos (2d-h)</i>	67
7.3.6.	<i>Éster butílico da tianeptina (2d)</i>	68
7.3.7.	<i>Éster pentílico da tianeptina (2e)</i>	68
7.3.8.	<i>Éster hexílico da tianeptina (2f)</i>	69
7.3.9.	<i>Éster heptílico da tianeptina (2g)</i>	70
7.3.10.	<i>Éster octílico da tianeptina (2h)</i>	70
8.	Apêndices	72
9.	Referências	72

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Representação esquemática da interação do dímero bis(7)-tacrina com os sítios catalítico (CAS) e periférico (PAS) da AChE. ⁸	2
Figura 2: Híbridos contendo o núcleo tacrina elaborados pelo grupo de pesquisa de Ceschi e colaboradores.	3
Figura 3: Estruturas moleculares dos ácidos ferúlico e cafeico, compostos promissores para o desenvolvimento de híbridos multialvo.....	3
Figura 4: Estrutura química do composto fluorescente “ <i>Pittsburgh Compound-B</i> ” ou PiB. ¹⁸	4
Figura 5: Representação esquemática da organização da Tese.	5
Figura 6: Ilustração da perda de massa encefálica decorrente da DA, adaptado de <i>National Institute of Aging</i> . ²⁴	7
Figura 7: Representação esquemática de um neurônio (a) e mecanismo da sinapse colinérgica (b). ³⁷	8
Figura 8: Representação dos aminoácidos dos sítios catalítico e periférico da AChE. (Adaptado de Bajda e col.). ⁴⁶	10
Figura 9: Estrutura molecular dos fármacos aprovados para o tratamento da DA.....	13
Figura 10: Homodímero mais potente na inibição da AChE obtido por Hu e col. AChE IC ₅₀ = 0,07 nM, BuChE IC ₅₀ = 26 nM.	14
Figura 11: Homo e heterodímeros bis(7)-tacrina e suas respectivas atividades inibitórias das enzimas colinesterases.....	14
Figura 12: Diferentes tipos de híbridos contendo o núcleo tacrina.	16
Figura 13: Híbridos contendo o núcleo tacrina sintetizados por nosso grupo de pesquisa.	17
Figura 14: Estrutura molecular da tianeptina, estrutura do éster etílico da tianeptina. ..	19
Figura 15: Híbridos da Tianeptina elaborados por Zhao e colaboradores. ⁷⁹	20
Figura 16: Híbridos tacrina-tianeptina e atividade inibitória IC ₅₀ frente às ChE ¹²	20
Figura 17: Modificações estruturais do híbrido tacrina-tianeptina sugeridas computacionalmente.....	21

Figura 18: Homo e heterodímeros contendo o núcleo lofina sintetizados em nosso grupo de pesquisa.....	22
Figura 19: Resultados da análise de modelagem molecular para o híbrido lofina-carboidrato com a enzima AChE.....	23
Figura 20: Resultados da análise de modelagem molecular para o híbrido lofina-carboidrato com a enzima BuChE.	24
Figura 21: Estrutura molecular do ácido cinâmico e seus derivados naturais.....	25
Figura 22: Dímeros derivados do ácido cinâmico.	26
Figura 23: Exemplos de moléculas bioativas contendo ligação tripla.....	35
Figura 24: Biomarcador fluorescente para a BuChE presente no plasma sanguíneo desenvolvido por Yoo e Han.	39
Figura 25: Estrutura da proteína BSA (PDB ID 4OR0).	41
Figura 26: Representação esquemática do mecanismo de FRET. Adaptado de Lakowicz. ¹⁴⁰	42
Figura 27: Espectro de RMN de ¹ H (CDCl ₃ , 400 MHz) do éster tianeptínico 2e.	49
Figura 28: Espectro de RMN de ¹³ C-APT (CDCl ₃ , 101 MHz) do éster tianeptínico 2e.	50
Figura 29: Espectro na região do infravermelho do éster tianeptínico 2e.	51
Figura 30: Efeitos da Tianeptina 1 e dos ésteres 2a-h no espectro de fluorescência da BSA a 20°C, λ _{ex} = 280 nm; [BSA] = 5 μM; [1, 2a-h] (μM) = 0 (a), 5 (b), 10 (c), 15 (d), 20 (e) e 25 (f), respectivamente. (pH = 7,4 tampão PBS).....	53
Figura 31: Gráficos de Stern-Volmer da supressão de fluorescência da BSA pela Tianeptina e pelos ésteres 2a-h. [BSA] = 5 μM; [1, 2a-h] (μM) = 0 (a), 5 (b), 10 (c), 15 (d), 20 (e) e 25 (f), respectivamente. (pH = 7,4 tampão PBS).....	55
Figura 32: Espectro de absorção no UV-vis da [BSA] = 5 μM em PBS (curva a); [Tianeptina] = 20 μM em PBS/DMSO (curva b); [2b] = 20 μM em PBS/DMSO (curva c); [2h] = 20 μM em PBS/DMSO (curva d); e [complexo BSA:2b] = 5:20 μM em PBS/DMSO (curva e). T = 20°C, pH = 7,4.	57
Figura 33: Sobreposição do espectro de emissão de fluorescência (λ _{exc} = 280 nm) com os espectros de absorção no UV-vis da [tianeptina] = 20 μM e do éster [2b] = 5 μM, em PBS, pH = 7,4, 25°C	58
Figura 34: Gráficos de log((F ₀ -F)/F) vs log(Q) para tianeptina 1 e para os ésteres 2a-h, a três diferentes temperaturas. [BSA] = 5 μM; [1, 2a-h] (μM) = 0 (a), 5 (b), 10 (c), 15 (d), 20 (e) e 25 (f), respectivamente. (pH = 7,4 tampão PBS).	59

Figura 35: Melhores posições obtidas à partir da modelagem molecular para a tianeptina 1 e para os ésteres 2a-h. Sítio IB na esquerda e IIA na direita.	60
Figura 36: Resíduos de amino ácidos ao redor do éster 2f no sítio IIA da BSA.	61

LISTA DE ESQUEMAS

Esquema 1: Proposta mecanística da hidrólise da acetilcolina pela tríade catalítica da AChE. ⁴⁹	11
Esquema 2: Síntese tetracomponente para obtenção no núcleo lofina. ⁹⁰	22
Esquema 3: Ésteres tianeptínicos.	44
Esquema 4: Híbridos envolvendo os núcleos tacrina, lofina e derivados do ácido cinâmico.	45
Esquema 5: Estrutura dos ésteres tianeptínicos obtidos por esterificação de Fischer da Tianeptina.	47

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Híbridos derivados dos núcleos donepezil e ácido cinâmico descritos na literatura.....	27
Tabela 2: Híbridos derivados do núcleo tacrina e ácido cinâmico descritos na literatura.	28
Tabela 3: Híbridos derivados do ácido cinâmico contendo diferentes núcleos reportados na literatura.	32
Tabela 4: Híbridos para o tratamento da DA contendo ligações triplas.....	36
Tabela 5: Condições reacionais e rendimento dos ésteres 2a-h.....	48
Tabela 6: Constantes de Stern-Volmer (K_{SV} kq), constante de ligação (K_b) e número de sítios ligantes (n) para a interação entre BSA-tianeptina 1 e para BSA-ésteres 2a-h ^a ...	56

LISTA DE ABREVIATURAS

- AChE** – Acetilcolinesterase
AF – Ácido Ferúlico
Arg – Arginina
Asp – Aspartato
A β – Placas Amilóides
BSA – Albumina Sérica Bovina
BuChE – Butirilcolinesterase
CAS – Sítio Catalítico Ativo
ChE – Enzimas Colinesterases
ChEI – Inibidores das Enzimas Colinesterases
DA – Doença de Alzheimer
EDC – 1-Etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida
FRET – Transferência de Energia por Ressonância de Förster
Glu – Glutamato
Gly – Glicina
His – Histidina
HOBt – Hidroxibenzotriazol
HSA – Albumina Sérica Humana
IC₅₀ – Concentração necessário para inibir 50% da atividade enzimática
IV – Infravermelho
MAO – Mono-amina Oxidase
PAS – Sítio Aniônico Periférico
Phe – Fenilalanina
RMN – Ressonância Magnética Nuclear
Ser – Serina
Trp – Triptofano
Tyr – Tirosina
UV-vis – Ultravioleta e visível

RESUMO

A busca por moléculas inibidoras das enzimas colinesterases (ChE) constitui uma das estratégias mais estudadas para o desenvolvimento de novos fármacos no tratamento da doença de Alzheimer (DA) segundo a hipótese colinérgica. Como a DA é uma doença multifatorial, tem-se estudado o desenvolvimento de moléculas híbridas, isto é, que atuam em mais de um alvo simultaneamente. A tianeptina, a tacrina, a lofina e o ácido cinâmico foram escolhidas como estruturas moleculares para a elaboração de híbridos. Este trabalho foi dividido em três partes, sendo a primeira dedicada a síntese de ésteres derivados do fármaco tianeptina, a segunda que trata da síntese de moléculas híbridas com variações estruturais provenientes dos núcleos tacrina, lofina e ácido cinâmico, e uma terceira parte em que foi realizado o estudo fotofísico das moléculas sintetizadas e das interações com a proteína BSA.

A tianeptina é um fármaco utilizado para o tratamento da depressão. Realizamos a síntese de ésteres da Tianeptina (através da esterificação de Fischer) com o intuito de investigar as suas interações com a proteína albumina sérica bovina (BSA) e as enzimas AChE e BuChE. Porém, os resultados de atividade biológica destes ésteres com as ChE não foram profícuos. Além dos ésteres, neste trabalho foram sintetizados híbridos contendo os núcleos lofina e tacrina unidos através de uma cadeia espaçadora metilênica (de dois a nove átomos de carbono) e derivados do ácido cinâmico contendo uma ligação tripla. A introdução de uma ligação tripla duplamente substituída na estrutura dos híbridos foi realizada a fim de se investigar, tanto experimentalmente e por modelagem molecular, os efeitos da mesma na interação com as ChE. A ligação tripla foi introduzida na estrutura do ácido cinâmico por meio da adição de um substituinte fenil-acetileno ao *para*-bromobenzaldeído via reação de acoplamento de Sonogashira, seguida de uma condensação de Knoevenagel com modificação de Doebner. Os híbridos foram obtidos por meio da reação de substituição acílica empregando agentes de acoplamento. Desta forma, foram sintetizadas cinco séries de compostos híbridos baseados nos núcleos tacrina, 6-cloro-tacrina, lofina, tacrina-alcóxi-cinamamida e lofina-alcóxi-cinamamida, totalizando trinta moléculas híbridas inéditas. Os híbridos tacrina-cinamamida apresentaram atividade inibitória das enzimas colinesterases com IC_{50} na escala de nanomolar, além de baixa citotoxicidade frente a três linhagens celulares distintas. Os híbridos lofina-cinamamida não apresentaram atividade frente as ChE, porém mostraram interações com a proteína BSA.

ABSTRACT

The search for enzyme cholinesterase inhibitory molecules (ChE) is one of the most studied strategies for the development of new drugs in the treatment of Alzheimer's disease (AD) according to the cholinergic hypothesis. As AD is a multifactorial disease, the development of hybrid molecules, that is, that act on more than one target simultaneously, has been studied. Tianeptine, tacrine, lophine and cinnamic acid were chosen as molecular structures for the development of hybrids. We divided this work into three parts: the first dedicated to the synthesis of esters derived from the drug Tianeptine; the second that deals with the synthesis of hybrid molecules with structural variations from the tacrine, lophine and cinnamic acid; and a third part in which it was carried out the photophysical study of the synthesized molecules and interactions with the BSA protein.

Tianeptine is a drug used to treat depression. We perform the synthesis of Tianeptine esters (through Fischer esterification) in order to investigate their interactions with the bovine serum albumin protein (BSA) and the enzymes AChE and BuChE. However, the results of biological activity of these esters with ChE were not fruitful. In addition to the esters, in this work were synthesized hybrids containing the nuclei lophine and tacrine joined through a methylenic linker (from two to nine carbon atoms) and derivatives of cinnamic acid containing a triple bond. The introduction of a double substituted triple bond in the structure of the hybrids was carried out in order to investigate, both experimentally and by molecular modeling, the effects on the interaction with the ChE. The triple bond was introduced into the cinnamic acid structure by adding a phenyl-acetylene substituent to para-bromo-benzaldehyde via the Sonogashira coupling reaction, followed by a Knoevenagel condensation with Doebner modification. The hybrids were obtained through the acyl substitution reaction using coupling agents. Thus, five series of hybrid compounds were synthesized based on the nuclei tacrine, 6-chloro-tacrine, lophine, tacrine-alkoxy-cinnamamide and lophine-alkoxy-cinnamamide, totaling thirty new hybrid molecules. The tacrine-cinnamamide hybrids showed inhibitory activity of the cholinesterase enzymes with IC_{50} on the nanomolar scale, in addition to low cytotoxicity against three different cell lines. The lophine-cinnamamide hybrids showed no activity against the ChE, but showed interactions with the BSA protein.

1. Introdução

As doenças neurodegenerativas são enfermidades complexas que afetam o cérebro causando morte neuronal de forma progressiva e irreversível, afetando a comunicação entre os neurônios e resultando em prejuízos no movimento, fala, memória e cognição do indivíduo.¹ São exemplos de doenças neurodegenerativas: doença de Parkinson, doença de Huntington e a demência, que agrupa a demência com corpos de Lewy e a doença de Alzheimer.

A doença de Alzheimer (DA) afeta diretamente as funções cognitivas, memória e fala, sendo a causa mais comum de demência em idosos.² Em 2016, estimava-se que cerca de 46,8 milhões de pessoas sofriam com a doença no mundo todo. Estudos recentes estimam que em 2050, mais de 140 milhões de pessoas serão afetadas pela doença.³ A DA é uma doença multifatorial, sendo o principal fator de risco a idade avançada. Porém, outros fatores como alimentação, diabetes, hipertensão, depressão e frequência de atividade física e cognitiva estão associados ao desenvolvimento da doença.⁴

Atualmente não existem medicamentos capazes de reverter os efeitos da DA, nem tampouco uma cura eficaz. A maior aposta dos cientistas nos últimos anos consiste na elaboração de uma vacina, mas mesmo esse projeto já foi cancelado e depois retomado.⁵ Os tratamentos disponíveis no mercado têm apenas caráter paliativo, isto é, que visam atenuar os sintomas da doença. Apesar de diminuírem os sintomas da DA, os fármacos atualmente comercializados apresentam efeitos colaterais associados como náuseas, perda de peso, dor de cabeça, entre outros.⁶ Os principais fármacos disponíveis no mercado foram elaborados segundo a hipótese colinérgica⁴ e atuam na inibição das enzimas acetilcolinesterase (AChE) e butirilcolinesterase (BuChE).

Dentro da hipótese colinérgica, a tacrina (9-amino-1,2,3,4-tetrahydroacridina) foi o primeiro fármaco aprovado pelo FDA (*Food and Drug Administration*) para o tratamento da DA. Contudo, seu uso foi descontinuado em 2013 devido aos efeitos hepatotóxicos.⁷ Devido à sua alta eficiência de inibição e afinidade com o sítio catalítico ativo da enzima AChE ($IC_{50} = 167$ nM), a busca por análogos mais potentes e mais seguros resultou em um grande número de moléculas sintetizadas contendo a tacrina como núcleo farmacofórico, isto é, como estrutura molecular base com afinidade pela enzima.

Pang e colaboradores sintetizaram uma série de compostos conhecidos como bis(n)-tacrina, onde duas unidades do núcleo tacrina estão separadas por uma cadeia metilênica espaçadora.⁸ Essa configuração estrutural permite que uma única molécula interaja duplamente com a enzima, ligando-se tanto ao sítio catalítico ativo (CAS do inglês, *catalytic active site*) quanto ao sítio aniônico periférico (PAS do inglês, *periferic anionic site*) simultaneamente (Figura 1). O composto bis(7)-tacrina mostrou-se mil vezes mais potente e mais seletivo para a enzima AChE do que o núcleo tacrina sozinho.

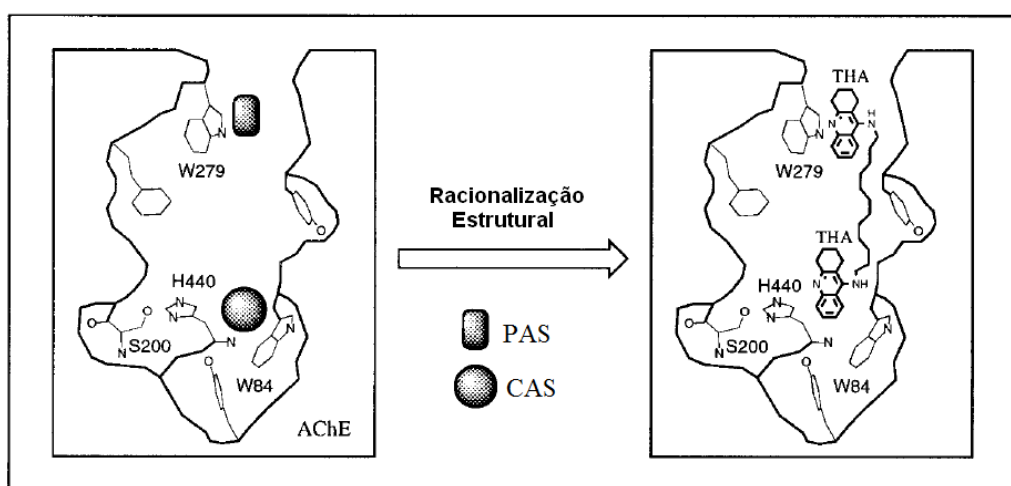


Figura 1: Representação esquemática da interação do dímero bis(7)-tacrina com os sítios catalítico (CAS) e periférico (PAS) da AChE.⁸

O estudo realizado por Pang e colaboradores na década de 90, iniciou a busca por moléculas que interagissem simultaneamente com o CAS e o PAS da enzima AChE, de modo que uma extensa biblioteca de compostos com dupla interação é encontrada na literatura.^{9,10} Essas novas moléculas, além da dupla interação enzimática, são desenhadas com base no caráter multifatorial da DA. Os compostos, chamados de híbridos, são moléculas que contém duas ou mais porções farmacofóricas elaboradas a partir de um estudo racional e que visa unir as características dos núcleos distintos sem perda da atividade biológica.¹¹

Nosso grupo de pesquisa tem estudado uma série de moléculas híbridas baseadas no núcleo tacrina com outros núcleos de importância farmacológica, como a Tianeptina¹², carboidratos¹³ e derivados quirais¹⁴ do núcleo tacrina (Figura 2). Tanto os híbridos tacrina-tianeptina e tacrina-carboidratos, bem como os homodímeros quirais derivados do

núcleo tacrina apresentaram alta atividade frente as enzimas colinesterases (ChE) com IC₅₀ na escala de nanomolar.

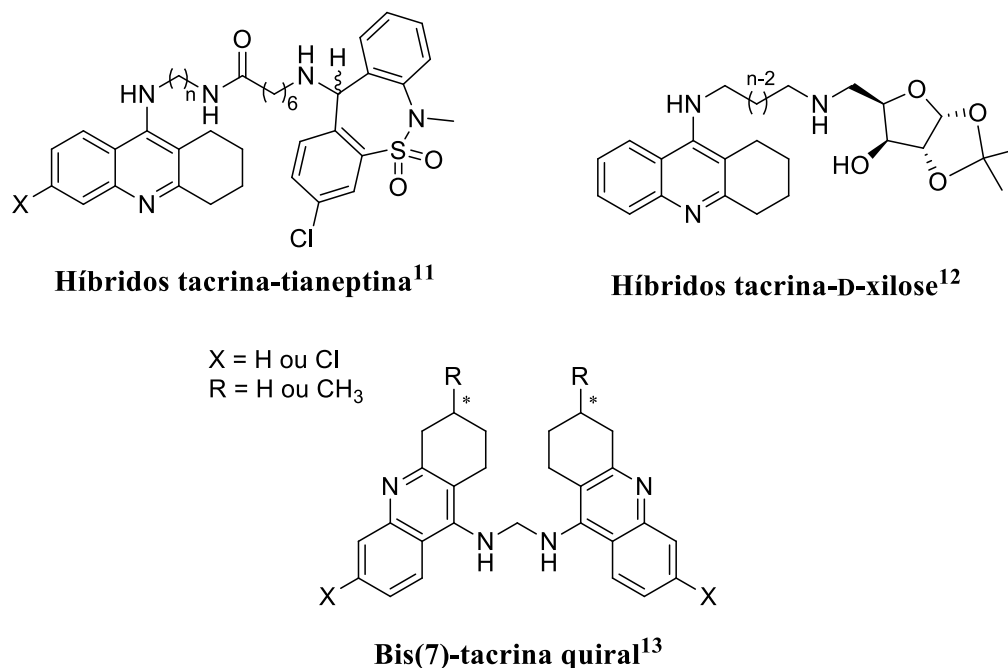


Figura 2: Híbridos contendo o núcleo tacrina elaborados pelo grupo de pesquisa de Ceschi e colaboradores.

No campo da química medicinal são consideradas estruturas privilegiadas moléculas que possuem afinidade por diferentes alvos biológicos e boas propriedades farmacofóricas (*dru-like properties*).¹⁵ Segundo essa lógica, tais compostos são considerados ideais para o desenvolvimento de novos híbridos multialvo. Os compostos como o ácido ferúlico e ácido cafeico são produtos naturais derivados do ácido cinâmico (Figura 3) e são incluídos dentro dessa classe de moléculas promissoras, pois tem demonstrado boa capacidade antioxidante e neutralização de radicais livres. Além disso, dado o caráter multifatorial da DA, esses compostos e seus derivados têm apresentado resultados promissores na literatura.¹

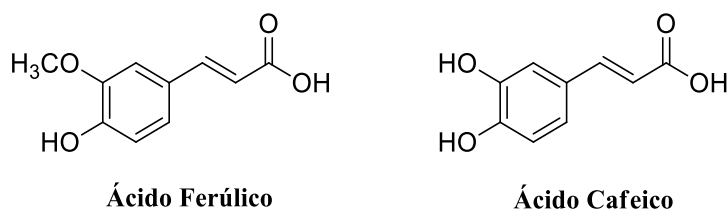
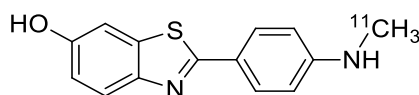


Figura 3: Estruturas moleculares dos ácidos ferúlico e cafeico, compostos promissores para o desenvolvimento de híbridos multialvo.

O diagnóstico definitivo da DA é realizado somente *post mortem* por meio da autópsia do cérebro. Antes disso, é considerado que o indivíduo “pode apresentar Alzheimer” ou que a DA seja o “caso mais provável” de problemas cognitivos e de memória.¹⁶ O desenvolvimento de técnicas de bioimageamento permitiu obter informações essenciais tanto para explorar processos biológicos como para fins de diagnóstico de doenças.¹⁷ No caso da DA, a molécula 2-(4'-[11]metilaminofenil)-6-hidroxi-benzotiazol (denominada de "*Pittsburgh Compound-B*" ou simplesmente PiB) é utilizada como traçador para a obtenção de imagens do cérebro por tomografia de emissão de pósitrons (*Positron Emission Tomography* - PET) a fim de auxiliar no diagnóstico precoce da doença (Figura 4).¹⁸ O PiB é uma molécula fluorescente que apresenta retenção acentuada em áreas do córtex conhecidas por conterem grandes quantidades de depósitos de proteínas amilóides, uma das causas associadas a DA. A espectroscopia de emissão de fluorescência representa uma das ferramentas mais poderosas para medir o quanto uma molécula de interesse, por exemplo o PiB, se liga a uma proteína ou a uma enzima. Neste sentido, como alguns dos compostos obtidos nesta Tese apresentaram fluorescência, direcionamos uma parte do trabalho para o estudo fotofísico almejando aliar esta propriedade com o desenvolvimento de biomarcadores fluorescentes de interesse no entendimento da DA.



PiB

Figura 4: Estrutura química do composto fluorescente "*Pittsburgh Compound-B*" ou PiB.¹⁸

Dentro deste contexto, o presente trabalho encontra-se dividido em três partes (Figura 5). Na primeira parte, buscou-se a preparação de ésteres derivados do antidepressivo tianeptina imbuídos dos bons resultados apresentados pelos híbridos tacrina-tianeptina do grupo de Ceschi e colaboradores.¹² Além da síntese de novos ésteres tianeptínicos, utilizou-se as espectroscopias de absorção no ultravioleta- visível (UV-vis) e emissão de fluorescência a fim de estudar as interações dos ésteres tianeptínicos com as proteínas albuminas utilizando como alvo a proteína BSA (*Bovine Serum Albumin*). A modelagem molecular foi outra ferramenta utilizada para entender os mecanismos destas interações.

Na segunda parte, buscou-se uma nova plataforma farmacofórica derivada do ácido cinâmico para o desenho de híbridos multifuncionais com potencial aplicação para a DA. O ácido cinâmico e seus derivados têm chamado atenção dos pesquisadores em química medicinal devido não só as propriedades antioxidantes, mas também pela eficácia frente às enzimas colinesterases, com híbridos apresentando valores de IC₅₀ na escala nanomolar.¹ A capacidade de inibição das enzimas colinesterases (AChE e BuChE) dos novos híbridos foi estudada, assim como os ensaios de citotoxicidade.

A terceira parte deste trabalho foi dedicada à caracterização fotofísica dos híbridos sintetizados. Utilizando a espectroscopia de absorção no UV-vis buscou-se estudar a interação dos híbridos com alguns metais envolvidos na DA. Do mesmo modo que para os derivados da tianeptina, foi realizado o estudo de interação com a proteína BSA por meio da espectroscopia de fluorescência e de modelagem molecular.

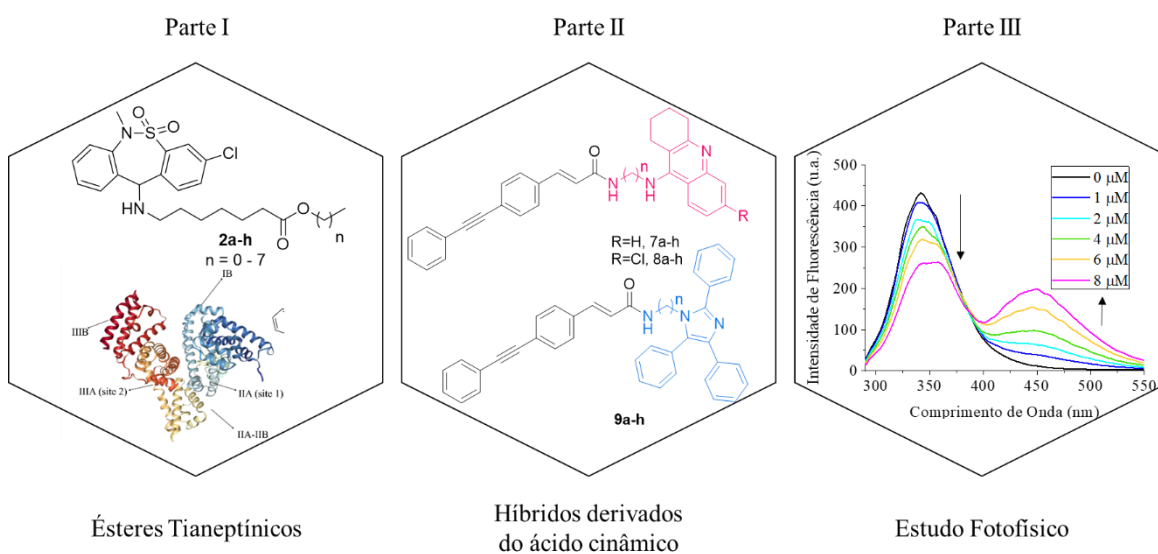


Figura 5: Representação esquemática da organização da Tese.

2. Revisão da Literatura

2.1. Doença de Alzheimer

A Doença de Alzheimer (DA) é uma doença neurodegenerativa progressiva que causa perda irreversível das funções cognitivas, afetando o córtex cerebral e o hipocampo.² Sendo a forma mais comum de demência (60-80% dos casos relatados), os primeiros sintomas da DA aparecem por volta dos 65 anos de idade, porém existem casos em que há ocorrência de DA antes dos 65 anos, sendo chamada de doença de Alzheimer precoce.¹⁹ Nos Estados Unidos, estima-se que a DA seja a sexta causa de morte, porém estudos recentes indicam que a DA pode chegar á terceira causa de morte, ficando atrás apenas de doenças cardiovasculares e cânceres.²⁰

As doenças neurodegenerativas estão entre os tratamentos clínicos mais caros existentes por se tratar de um tratamento prolongado. A doença tem duração média de 4 a 8 anos, podendo em alguns casos chegar a 20 anos.³ Os custos anuais de doenças como a DA são similares aos de tratamento das doenças cardíacas, sendo muito superiores ao custo do tratamento de um paciente com câncer. A venda de medicamentos para o tratamento da DA atingiu a cifra de 8 bilhões de dólares em 2017.²¹

Descoberta em 1906 por Alois Alzheimer, uma das principais características da doença consiste na perda significativa de massa cerebral (Figura 6) nas regiões mais afetadas, sendo essa relacionada à diminuição das funções cognitivas e dos processos neuronais.^{22,23} Estima-se que os danos ao cérebro começam cerca de uma década antes que os primeiros sinais da DA sejam observados.²⁴ Nesse processo, ocorrem depósitos anormais de proteínas β -amiloide formando placas amiloides ($A\beta$) e acúmulo de emaranhados neurofibrilares de proteína tau, de forma que neurônios que já foram saudáveis param de funcionar, perdem conexões com outros neurônios e morrem.^{25,26}

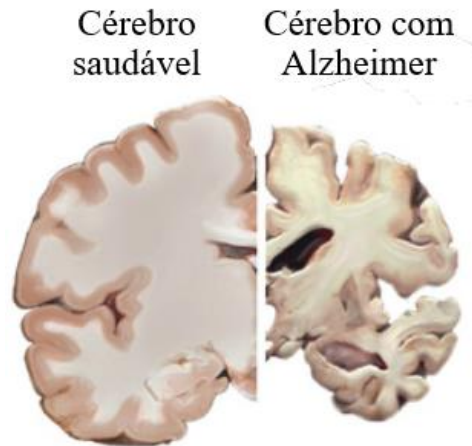


Figura 6: Ilustração da perda de massa encefálica decorrente da DA, adaptado de *National Institute of Aging*.²⁴

A DA inclui duas fases, a fase chamada pré-demência, onde aparecem os primeiros sintomas da doença, como perdas esporádicas de memória, principalmente as recentes, sem que ocorra perda da autonomia do indivíduo. Na segunda fase, conhecida como fase demente, o indivíduo tem uma piora na perda de memória, incluindo memórias antigas.²⁷ Além disso, ocorre a perda progressiva da fala, da orientação espacial e descontrole de funções fisiológicas, de modo que o indivíduo acometido necessita de cuidados constantes.⁴

A DA não tem causa conhecida, sabe-se apenas que a idade avançada e fatores como depressão, hipertensão, diabetes e pouca atividade física e cognitiva também podem contribuir para o desenvolvimento da doença.²⁸ O seu principal sintoma, a perda progressiva de memória, está relacionado a déficits no sistema colinérgico, isto é, perda de atividade neuronal envolvendo a acetilcolina como neurotransmissor.²⁹ Diversas hipóteses foram estudadas, como a hipótese colinérgica³⁰, a hipótese da cascata amiloide³¹, a hipótese metálica³², a hipótese da desregulação glutamatérgica³³, entre outras.²⁵ Estudos mais recentes têm discutido hipóteses ainda mais complexas, estando relacionadas ao sistema imune⁵, endócrino⁴ e também envolvendo a composição da microbiota intestinal.³⁴

No entanto, a hipótese colinérgica ainda tem sido utilizada como principal estratégia terapêutica da DA. Nessa estratégia são utilizados fármacos inibidores das enzimas colinesterases (ChEI), a fim de restaurar os níveis do neurotransmissor acetilcolina na fenda sináptica (Figura 7 – b).³⁵ Esta estratégia é sustentada pela

observação da redução das enzimas ChE e pela redução de neurônios colinérgicos que cumprem um papel importante nas funções cognitivas.^{4,36}

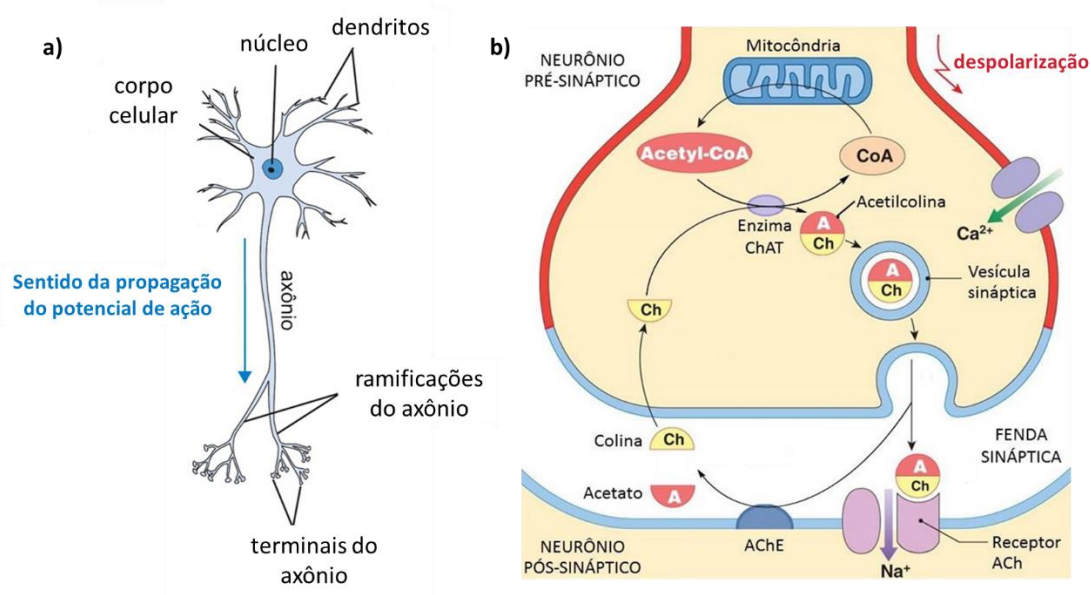


Figura 7: Representação esquemática de um neurônio (a) e mecanismo da sinapse colinérgica (b).³⁷

Para compreender melhor a hipótese colinérgica é preciso analisar como ocorre a sinapse química envolvendo a acetilcolina como neurotransmissor. A sinapse é a via de conexão por onde ocorre a comunicação entre o neurônio pré-sináptico e o neurônio pós-sináptico. O espaço entre esses dois neurônios é chamado de fenda sináptica. Nesse pequeno espaço há um conjunto imenso de proteínas sinalizadoras, enzimas, canais iônicos e outras proteínas ancoradas à membrana plasmática da célula.³⁷

A sinapse é decorrente da transmissão de um potencial de ação ao longo do corpo do axônio (Figura 7 - a), que induz a abertura de canais voltagem dependentes de Na^+ e entrada do íon na célula a favor do gradiente de concentração, causando uma despolarização. A abertura de canais de K^+ permite a saída do íon da célula, também a favor do gradiente de concentração, fazendo a repolarização. A transmissão desse potencial de ação é conhecida como impulso nervoso. Ao atingir a região da fenda sináptica ocorre a abertura de canais de Ca^{2+} voltagem dependentes, induzindo a entrada do íon na célula. O Ca^{2+} no interior da célula atua como sinalizador para a liberação de vesículas de acetilcolina, que se fundem com a membrana plasmática liberando o neurotransmissor na fenda sináptica.³⁷

Na fenda sináptica a acetilcolina interage com proteínas sinalizadoras do neurônio pós-sináptico induzindo a abertura de canais de Na^+ para que um novo potencial de ação seja gerado. Desse modo, a informação é transmitida para o neurônio seguinte. Após a transmissão da mensagem química, o neurotransmissor é degradado pela enzima acetilcolinesterase em acetato e colina. A colina é então reabsorvida pelo neurônio pré-sináptico para ser novamente transformada em acetilcolina.³⁷

2.2. Enzimas Colinesterases

As enzimas colinesterases pertencem à família das serino hidrolases e são encontradas em diversas espécies de animais. A acetilcolinesterase (AChE, EC 3.1.1.7) e a butirilcolinesterase (BuChE, EC 3.1.1.8) são as principais representantes dessa classe de enzimas e são responsáveis pela hidrólise de ésteres da colina. Embora as enzimas tenham mais de 50 % de sua estrutura similar, suas localizações e funções são bastante diferentes.³⁸ A AChE é encontrada majoritariamente no cérebro, mais especificamente na fenda sináptica e realiza hidrólise da acetilcolina, encerrando a transmissão do impulso nervoso.³⁹ A AChE é o principal alvo dos medicamentos utilizados para o tratamento da DA seguindo a hipótese colinérgica.³⁰

A BuChE, por sua vez, é sintetizada no fígado e encontrada em todo o plasma sanguíneo, onde realiza a hidrólise de diversos ésteres. No cérebro, é encontrada no hipocampo e córtex temporal associada a células gliais, porém em quantidades menores que a AChE.³⁸ Além da hidrólise de acetilcolina, a BuChE é responsável, também, pela desintoxicação do organismo, realizando a hidrólise de agentes psicotrópicos como a cocaína.^{40,41} Além disso, sabe-se que a BuChE cumpre um papel importante em estágios avançados da DA, nos quais os níveis da AChE encontram-se muito comprometidos no córtex cerebral.^{42,43} Com o progresso da doença há um aumento dos níveis gliais de BuChE e diminuição dos níveis de AChE na fenda sináptica. A razão entre BuChE/AChE em regiões corticais passa de 0,6 em condições normais, para 11 ao longo do curso da DA.³⁸

Ambas as enzimas foram elucidadas estruturalmente a partir da análise de difração de raios X, o que permitiu o desenvolvimento racional de fármacos seletivos tanto para a AChE como para a BuChE.⁴⁴ A AChE extraída da arraia elétrica do pacífico (*Torpedo californica*)⁴⁵ possui sítio catalítico (CAS, do inglês – *catalytic active site*) constituído por três resíduos de aminoácido serina, glutamato e histidina (Ser200, His440 e Glu327) e um

subsítio aniônico composto por aminoácidos triptofano, duas tirosinas e fenilalanina (Trp84, Tyr130, Tyr330, e Phe331).⁴⁶ Esse sistema encontra-se no fundo de uma cavidade hidrofóbica de cerca de 20 Å de profundidade, a qual possui, localizada em sua entrada, o sítio aniônico periférico (PAS, do inglês - *peripheral anionic site*) composto por um grupo de 5 resíduos de aminoácidos tirosina, aspartato e triptofano (Tyr70, Asp72, Tyr121, Trp279, Tyr334)⁴⁷ (Figura 8). Já a BuChE possui um conjunto de aminoácidos menos volumosos no PAS, o que permite a entrada de substratos maiores no interior do CAS, conferindo menos seletividade à enzima.⁴⁸

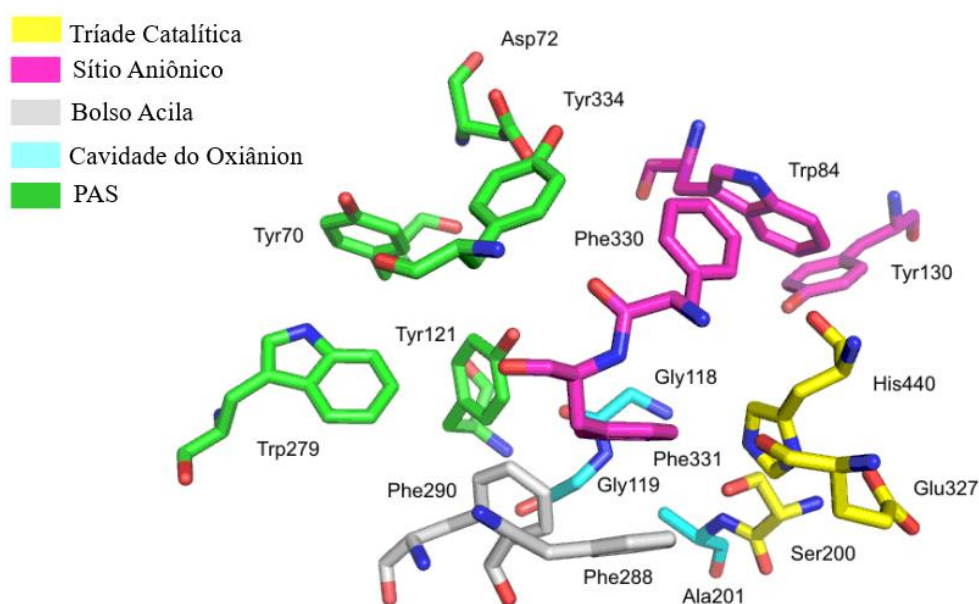
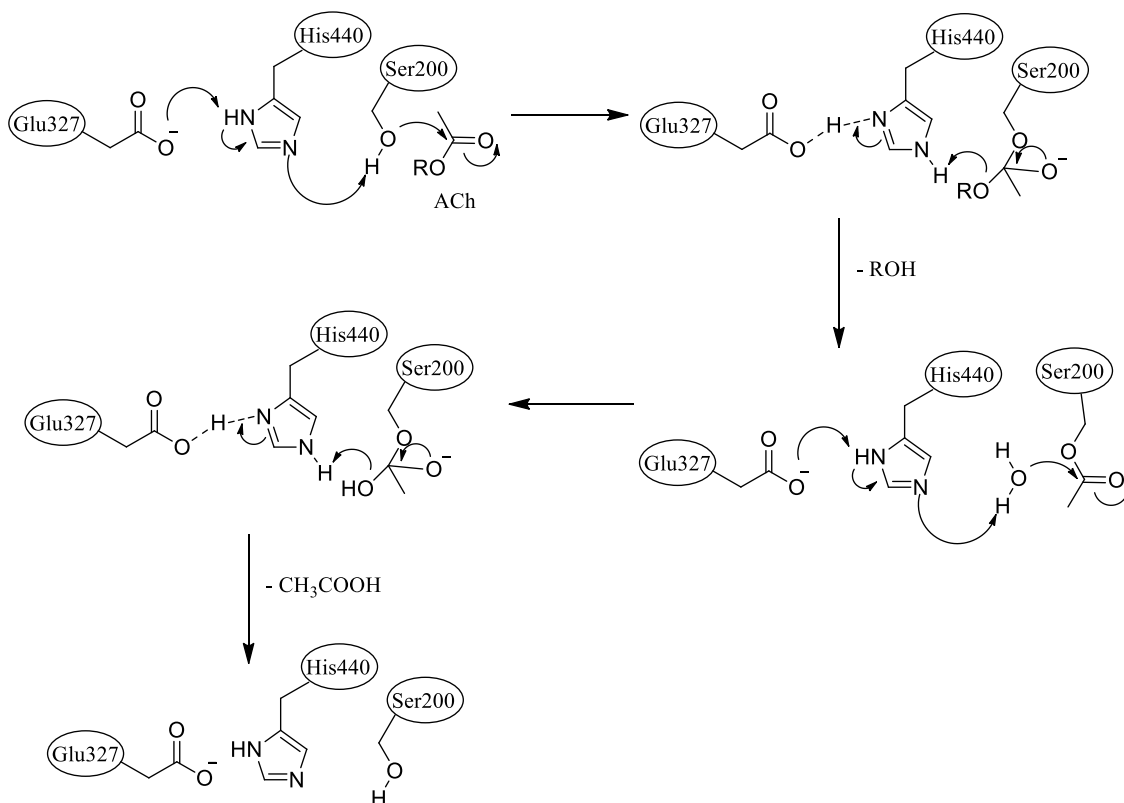


Figura 8: Representação dos aminoácidos dos sítios catalítico e periférico da AChE.
(Adaptado de Bajda e col.).⁴⁶

A tríade catalítica é essencial para que ocorra a hidrólise da acetilcolina. O mecanismo de hidrólise é apresentado no Esquema 1.⁴⁹ Inicialmente o Glu327 faz a remoção do hidrogênio do anel imidazólico da His400, que por sua vez capta o hidrogênio da Ser200 tornando-a mais nucleofílica. A Ser200 realiza o ataque nucleofílico à carbonila da acetilcolina levando à formação de um intermediário tetraédrico. O retorno do par de elétrons do oxigênio expulsa o grupo colina e há a formação de um éster com o resíduo de Ser200. A hidrólise do éster é assistida pela His400 que remove um dos hidrogênios da molécula de água. A formação de um segundo intermediário tetraédrico leva à liberação de acetato e regeneração do sítio ativo da enzima. Outros três resíduos de aminoácidos da cavidade oxianion (Figura 8), Ala201, Gly118 e Gly119, auxiliam no

processo de hidrólise estabilizando a formação dos estados de transição por meio de ligações de hidrogênio com o substrato.⁴⁹



Esquema 1: Proposta mecanística da hidrólise da acetilcolina pela tríade catalítica da AChE.⁴⁹

Além de realizar a hidrólise da acetilcolina, estudos recentes têm demonstrado o papel da AChE na deposição de placas da proteína β -amiloide ($A\beta$). O PAS da enzima atua como uma chaperona, isto é, auxilia no enovelamento dos peptídeos precursores da β -amiloide, acelerando o processo de deposição das $A\beta$.³⁸ Por outro lado, estudos reportaram que a enzima BuChE tem o efeito oposto, prevenindo a formação das fibrilas de β -amiloide e também desacelerando a deposição das placas de proteína.¹⁰ Dessa forma, a busca por moléculas seletivas para a AChE tem se tornado um critério importante no desenvolvimento de novos compostos.

Graças ao maior número de dados disponíveis a partir de difração de raios X e ressonância magnética nuclear (RMN) das ChE, os estudos de modelagem molecular têm contribuído cada vez mais para compreender as interações de fármacos e pequenas moléculas com as enzimas. Desse modo, o processo para o desenvolvimento de novos fármacos tem levado em consideração as possíveis interações com os resíduos de

aminoácido tanto do CAS, como do PAS das enzimas.⁵⁰ Além disso, os estudos de modelagem molecular ajudam a compreender as relações entre estrutura e atividade, podendo inclusive auxiliar no desenho de novas estruturas e no aprimoramento de compostos líderes.⁵¹ Para Salmaso e Moro, devido à capacidade de interpretar e prever os modos de ligação com as proteínas fornecidos pelos estudos de modelagem molecular, é que a comunidade científica tem cada vez mais utilizado essa estratégia, não só no desenvolvimento de fármacos para a DA, mas também para outras doenças.⁵²

2.3. Inibidores de Colinesterases

Desde o primeiro diagnóstico da doença de Alzheimer há mais de 110 anos, apenas cinco medicamentos foram aprovados pelo FDA para o tratamento da doença. Além disso, não há cura estabelecida para a DA e os tratamentos existentes são apenas paliativos, isto é, visam a atenuação dos sintomas.⁴ Até hoje, apenas uma classe de medicamentos provou de forma consistente melhora dos sintomas da DA.⁵³ Os fármacos inibidores das enzimas colinesterases representam a principal base de desenvolvimento de novas moléculas, segundo a hipótese colinérgica.³⁰

Dentro dessa hipótese, os ChEI atuam diminuindo a velocidade de degradação da acetilcolina, fazendo com que ela permaneça durante mais tempo na fenda sináptica.²⁹ Os ChEI constituem quatro dos cinco fármacos aprovados para o tratamento da DA, são eles: Tacrina (Cognex®), Donepezil (Aricept®), (*S*)-Rivastigmina (Exelon®) e Galantamina (Razadyne®) (Figura 9). A Memantina (Namenda XR®) não segue a hipótese colinérgica, uma vez que seu mecanismo de ação está relacionado com a interação dos receptores de *N*-metil-D-aspartato (NMDA).⁵⁴

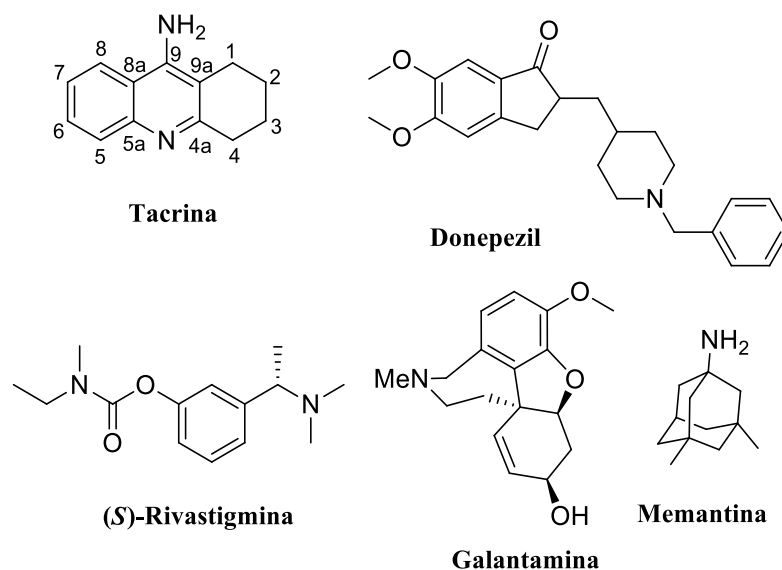


Figura 9: Estrutura molecular dos fármacos aprovados para o tratamento da DA.

A tacrina (9-cloro-1,2,3,4-tetrahydroacridina) é facilmente obtida por meio da reação de Niementowski.⁵⁵ Apesar da hepatotoxicidade, a tacrina permaneceu por vinte anos no mercado e constitui um núcleo farmacofórico importante na química medicinal. Do ponto de vista da elaboração e síntese de novas moléculas bioativas para a DA, a tacrina apresenta propriedades inibitórias a baixas concentrações e faz interações do tipo π - π *stacking* com o Trp84 do CAS da AChE, sendo muitas vezes utilizada como âncora.

A partir do trabalho realizado por Pang e colaboradores com o bis(7)tacrina, deu-se início ao estudo de uma série de compostos contendo dois núcleos farmacofóricos, principalmente devido ao aumento da potência observado com a dupla interação enzimática.^{56,60} Hu e colaboradores, de modo análogo, dedicaram-se a estudar variações estruturais nos heterociclos e nas cadeias espaçadoras dos homodímeros. Com isso, os autores observaram que a inserção de átomos de halogênios na posição 6 do núcleo tacrina resultava em um aumento da atividade inibitória da enzima AChE, de forma que o composto mais potente obtido (Figura 10) apresentava atividade inibitória cerca de 5000 vezes mais eficaz do que a tacrina.⁵⁷

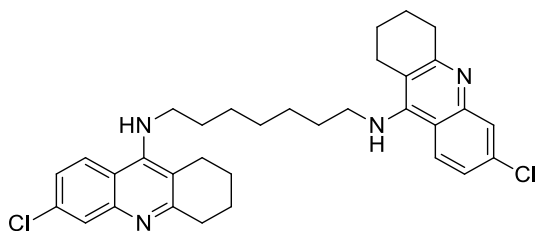


Figura 10: Homodímero mais potente na inibição da AChE obtido por Hu e col. AChE $IC_{50} = 0,07$ nM, BuChE $IC_{50} = 26$ nM.

Nosso grupo de pesquisa também se dedicou ao estudo de homodímeros do núcleo tacrina. No trabalho realizado por Lopes e colaboradores foi realizada a síntese de análogos quirais do bis(7)-tacrina contendo as duas séries enantioméricas completas.¹⁴ Apesar de todos os compostos terem se mostrado potentes, com IC_{50} na escala de nanomolar, foi possível observar diferenças na seletividade dos compostos na inibição das enzimas colinesterases (Figura 11), o que indica uma estereoseletividade do sítio catalítico da AChE frente às diferentes configurações enantioméricas dos compostos bis-tacrina. Além disso, o homodímero *R,R*-bis(7)-tacrina com cloro, e o heterodímero *R*-bis(7)-tacrina mostraram-se mais ativos que a bis(7)-tacrina e seletivos para a AChE.

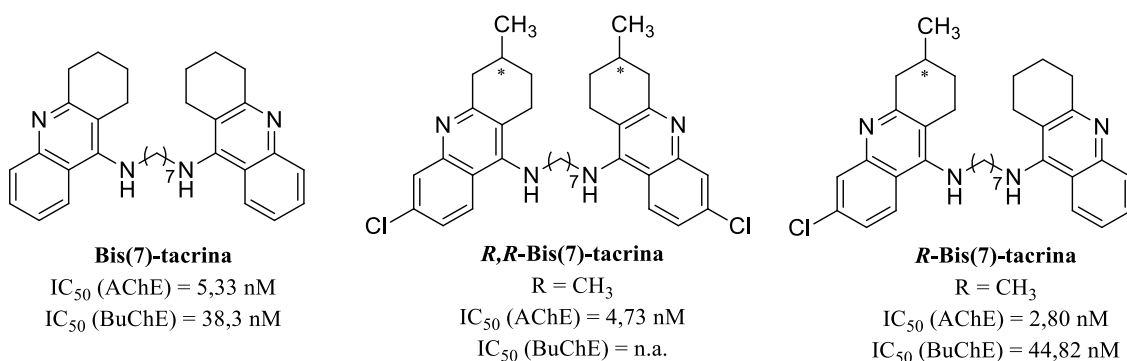


Figura 11: Homo e heterodímeros bis(7)-tacrina e suas respectivas atividades inibitórias das enzimas colinesterases.

2.4. Híbridos multifuncionais no tratamento da DA

A DA é considerada uma doença multifatorial.⁴ Devido a essa característica, várias estratégias terapêuticas foram desenvolvidas com a lógica “uma molécula, um alvo”.⁵⁸ Contudo, a falta de efetividade terapêutica das moléculas disponíveis no mercado, tem levado ao desenvolvimento racional de moléculas multialvo.³⁸ Além disso, o uso de vários medicamentos diferentes (coquetéis) ou de formulações manipuladas (combinações em dose fixa) pode gerar desconforto ao paciente devido à união de efeitos colaterais, além da alta probabilidade de interação medicamentosa. Dessa forma, pesquisas para o uso de híbridos multialvo no tratamento da DA têm se mostrado uma estratégia mais promissora do ponto de vista farmacocinético e farmacodinâmico.^{59,60}

A elaboração de moléculas multialvo, também chamadas apenas de híbridos, busca a melhora das propriedades farmacológicas, como o aumento de potência e da eficiência por interações simultâneas, além de efeitos sinérgicos. A síntese de moléculas híbridas é utilizada como estratégia terapêutica para diversas doenças como câncer⁶¹, Parkinson⁶², malária⁶³ e na elaboração de novos agentes antifúngicos.⁶⁴

Apesar do grande número de híbridos elaborados para o tratamento da DA encontrados na literatura, nenhuma das moléculas atingiu o mercado.^{1,38} Doenças multifatoriais como a DA são causadas por perturbações complexas no equilíbrio celular, de forma que a abordagem farmacológica não seja simples. A existência de mecanismo de *feedback* em sistemas biológicos tem se mostrado um desafio para os cientistas.³⁷ Por exemplo, o uso de ChEI a longo prazo não mantém baixas as taxas de hidrólise da acetilcolina, pelo contrário, é observado um aumento das taxas de atividade enzimática.³⁸ Mesmo assim, devido à capacidade dos compostos híbridos em manter as propriedades de interação com alvos específicos e assim gerar várias respostas farmacológicas distintas, a elaboração de moléculas híbridas continua sendo uma das principais estratégias para a busca de novas moléculas no tratamento da DA.¹⁰

Do ponto de vista estrutural, os híbridos podem ser classificados como ligados, fundidos ou mesclados, sendo o modo de união determinado pela natureza do alvo, pela disponibilidade das estruturas iniciais e pela viabilidade química.⁵⁸ A alta eficiência do núcleo tacrina como ligante das enzimas colinesterases torna-o um importante ponto de partida para o desenvolvimento de moléculas multialvo.⁹ Mishra e colaboradores realizaram uma revisão da literatura cobrindo vinte anos de pesquisa e desenvolvimento de híbridos tendo como alvos as ChE. Os autores identificaram mais de 40 classes de híbridos relacionadas ao núcleo tacrina.⁶⁰ Alguns exemplos de híbridos contendo o núcleo tacrina são apresentados na Figura 12.

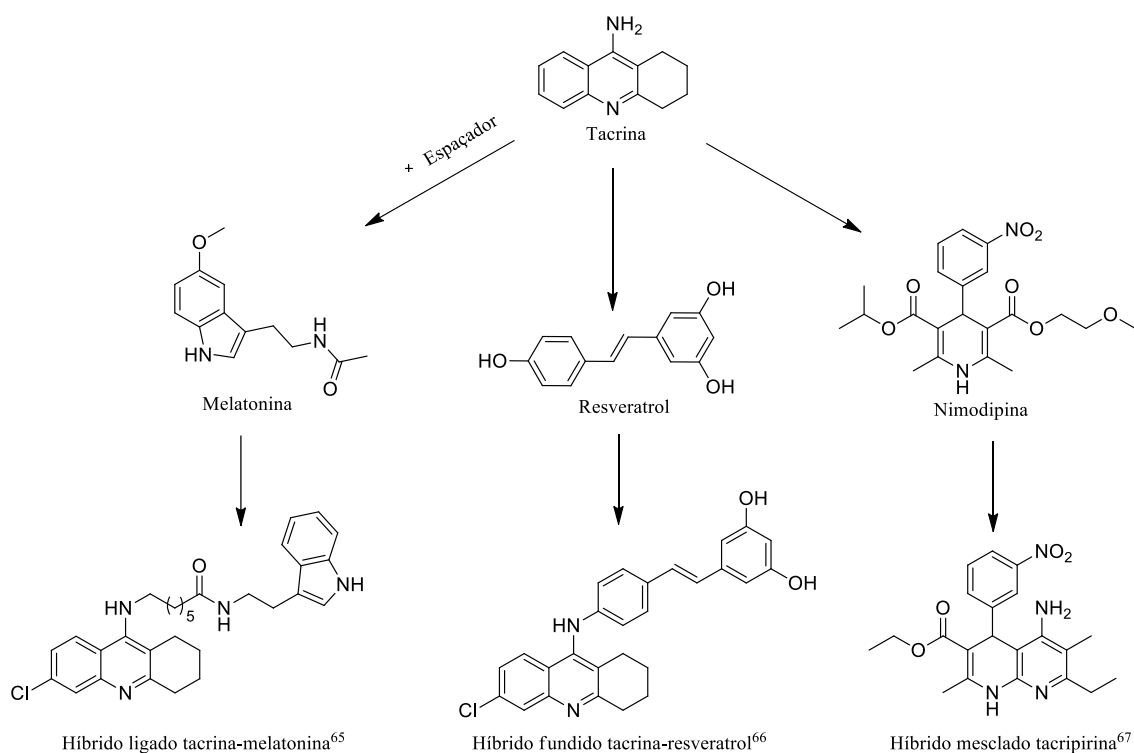
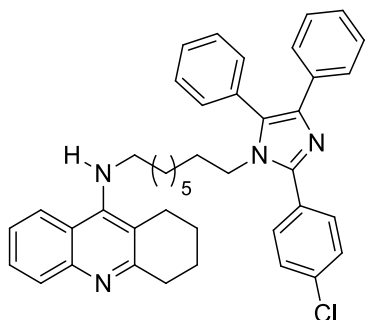


Figura 12: Diferentes tipos de híbridos contendo o núcleo tacrina.

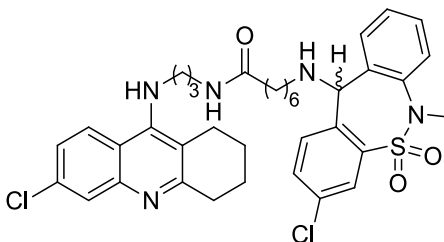
A melatonina é um hormônio natural, conhecido por regular o mecanismo do sono. Além disso, a melatonina é um potente antioxidante e neutralizador de radicais livres. Rodríguez-Franco e colaboradores reportaram uma série de híbridos ligados contendo os núcleos melatonina e tacrina. Os híbridos apresentaram alta atividade inibitória das enzimas colinesterases além de propriedades neuroprotetoras e antioxidantes.⁶⁵ O resveratrol é um produto natural sintetizado por diversas plantas com propriedades anti-inflamatórias. Bolognesi e colaboradores elaboraram um híbrido fundindo as duas moléculas que apresentou atividade inibitória da enzima colinesterase na faixa de micromolar, além de modular efetivamente a agregação de placas β -amiloides *in vitro*.⁶⁶ Já a nimodipina é um bloqueador de canais de cálcio, sendo comercializada sob o nome de Nimotop®. Marco-Contelles e colaboradores mesclaram as estruturas da tacrina e da nimodipina para a obtenção das tacripirinas. Os híbridos apresentaram bons efeitos neuroprotetivos, inibição dos canais de cálcio e da enzima AChE, além de boa permeabilidade pela barreira hematoencefálica.⁶⁷

Nosso grupo de pesquisa vem estudando uma série de híbridos contendo o núcleo tacrina como uma das porções biologicamente ativas (Figura 13). Com base na estratégia

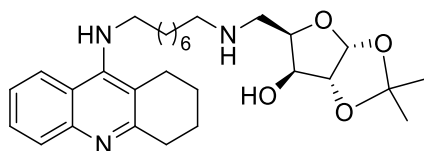
multialvo, foram elaborados híbridos ligados contendo os núcleos lofina⁶⁸, Tianeptina¹², carboidratos¹³ e pirimidinas⁶⁹ tendo como alvo as ChE.



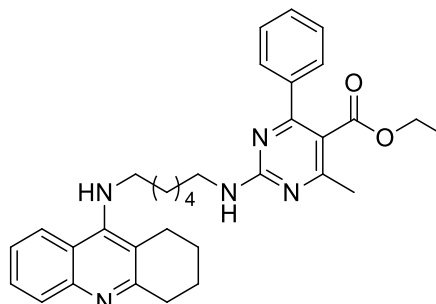
Híbrido tacrina-lofina⁶⁸
 IC_{50} (AChE) = 5,87 nM
 IC_{50} (BuChE) = 108,97 nM



Híbridos tacrina-tianeptina¹²
 IC_{50} (AChE) = 6,79 nM
 IC_{50} (BuChE) = 52,44 nM



Híbridos tacrina-D-xilose¹³
 IC_{50} (nM) AChE: 2,2 nM
 IC_{50} (nM) BuChE: 4,93 nM



Híbridos tacrina-pirimidina⁶⁹
 não ativos

Figura 13: Híbridos contendo o núcleo tacrina sintetizados por nosso grupo de pesquisa.

A lofina tem capacidade antioxidante e em híbridos com a tacrina foi observado por modelagem molecular que o núcleo interage com o sítio aniônico periférico da enzima colinesterase. O híbrido tacrina-lofina mostrou-se seletivo para a enzima AChE com atividade inibitória na escala de nanomolar.⁶⁸ A síntese de híbridos da tacrina contendo o antidepressivo tianeptina, também se mostrou bastante relevante, uma vez que apresentaram inibição das enzimas AChE e BuChE em escala nanomolar.¹² Nosso grupo de pesquisa tem utilizado a modelagem molecular para compreender as interações das moléculas sintetizadas com as enzimas ChE. Segundo os resultados obtidos, a alta atividade desses híbridos pode estar relacionada ao fato da tacrina interagir com o CAS da AChE, enquanto a tianeptina interage com o PAS. Além disso, foi demonstrado a capacidade de modulação da proteína S100B, um importante biomarcador em doenças neurodegenerativas.

Já a produção de híbridos contendo derivados de carboidratos teve como objetivo a introdução de grupos aceptores e doadores de ligação de hidrogênio. Além disso, trata-se de uma plataforma de baixa toxicidade. A série também se mostrou promissora, pois foram obtidos resultados de inibição para a AChE muito próximos da escala picomolar (2,2 nM).¹³ Um estudo detalhado de modelagem molecular revelou que o híbrido mais ativo da série tacrina-xilose foi capaz de interagir no CAS, com o núcleo tacrina, no bolso acila, por meio de interações hidrofóbicas e no PAS por meio de uma ligação de hidrogênio.⁶⁹

Já para os híbridos tacrina-pirimidina, não foi observada atividade inibitória das enzimas colinesterases.⁶⁹ Nesse caso os estudos de modelagem molecular também permitiram uma análise da ausência de atividade frente as ChE. Segundo os resultados obtidos, a falta de atividade se deu muito provavelmente ao fato que os dois anéis do núcleo pirimidina não são coplanares, o que pode ter dificultado interações do tipo π - π *stacking* com o PAS da enzima.⁶⁹

Nesse trabalho, além dos núcleos tianeptina e lofina, será explorado ainda uma terceira classe de moléculas derivadas do ácido cinâmico. Os derivados do ácido cinâmico, conforme apontado por Gonzáles e colaboradores, constituem um grupo de moléculas privilegiadas, isto é, com grande potencial para o desenvolvimento de híbridos multifuncionais.¹⁵ A seguir será apresentada a revisão da literatura contendo os núcleos lofina, tianeptina e cinâmico.

2.4.1. Tianeptina

A tianeptina é um fármaco que contém o núcleo tiazepínico utilizado para o tratamento da depressão e comercializado sob o nome de Stablon®.⁷⁰ As tiazepinas são uma classe de heterociclos de sete membros, podendo ser condensadas com um ou dois anéis benzênicos, sendo conhecidas como benzotiazepinas ou dibenzotiazepinas, respectivamente. Esse medicamento foi sintetizado pela primeira vez no Instituto Servier, na França, em 1972.⁷¹ A tianeptina é considerada um fármaco de última geração para o tratamento da depressão e outras desordens psiquiátricas.⁷²⁻⁷⁶

Seu mecanismo de ação é considerado atípico, pois a primeira hipótese para a observação do efeito antidepressivo da molécula estimava que a tianeptina se ligava aos receptores de recaptação de serotonina (SERT), induzindo a recaptação do neurotransmissor pelo neurônio pré-sináptico.⁷⁰ Em seguida, estudos demonstraram que

a tianeptina causava a modulação do sistema glutamatérgico, apresentando efeitos de neuroplasticidade no hipocampo e na amígdala.^{73, 74}

Apesar do baixo número de efeitos colaterais⁷⁷ e dos resultados antidepressivos e neuroprotetores^{73,74} da tianeptina, o fármaco não é liberado pelo FDA para comercialização nos Estados Unidos. Em um trabalho recente, Tramarin e colaboradores identificaram que a tianeptina também pode apresentar efeitos positivos em indivíduos com autismo, hipotonia e distúrbios do sono.⁷⁸ Zhao e colaboradores, ao estudarem um híbrido derivado da tianeptina, identificaram em testes *in vivo* a melhora da aprendizagem e memória, e também aumento da neuroplasticidade.⁷⁹

A estrutura da tianeptina (Figura 14) é caracterizada pelo núcleo 3-cloro-dibenzotiazepina e uma cadeia lateral aminoeptanóica, a qual é diretamente associada à atividade farmacológica. A molécula possui dois heteroátomos no sistema tricíclico, sendo o átomo de enxofre na posição 5' um doador de elétrons, além de um átomo aceptor de elétrons na posição 3' do sistema aromático. Essas características tornam a tianeptina distinta dos demais antidepressivos tricíclicos, não só do ponto de vista estrutural, mas também de suas características farmacológicas.⁷⁷ Apesar da função ácido ser facilmente funcionalizável para diversos ésteres, na literatura foi encontrado apenas o éster-etílico da tianeptina.⁷¹

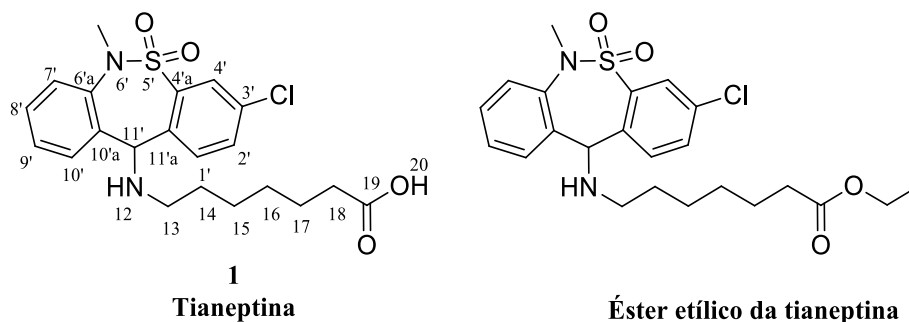


Figura 14: Estrutura molecular da tianeptina, estrutura do éster etílico da tianeptina.

Na literatura são encontrados poucos exemplos de moléculas derivadas da tianeptina. Zhao e colaboradores elaboraram uma série de híbridos da tianeptina com outras moléculas de atividade farmacológica conhecida como a Tacedinalina e o Varinostat.⁷⁹ Os híbridos apresentaram modulação da atividade de proteínas histonas, além do aumento dos níveis de BDNF, um importante biomarcador de neuroproteção.

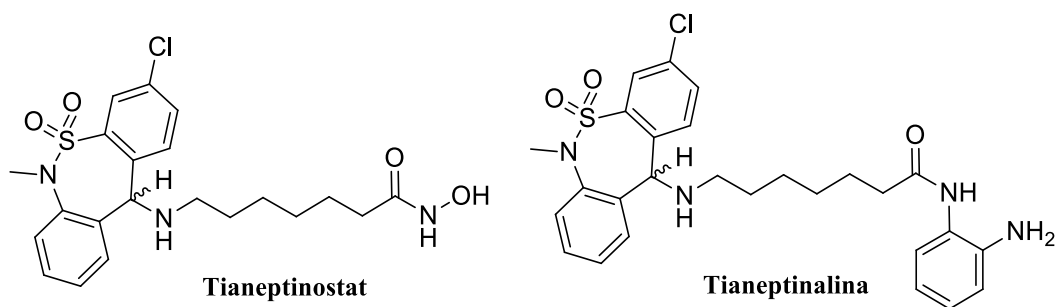


Figura 15: Híbridos da Tianeptina elaborados por Zhao e colaboradores.⁷⁹

Outra série de híbridos foi elaborada por nosso grupo de pesquisa ancorando o fármaco tacrina à porção ácida da tianeptina por meio de uma cadeia espaçadora. Esse trabalho foi realizado em 2016 sendo publicada uma importante série de híbridos que apresentaram atividade anticolinesterases com IC_{50} em escala nanomolar.¹²

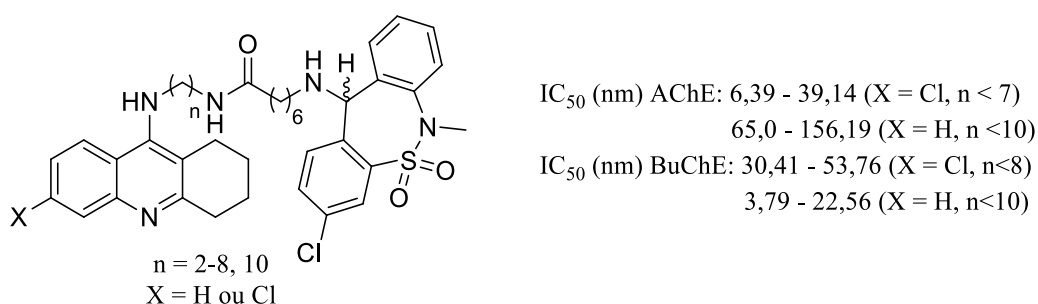


Figura 16: Híbridos tacrina-tianeptina e atividade inibitória IC_{50} frente às ChE¹²

Com base nestes resultados dos híbridos tacrina-tianeptina, Jiang e Gao utilizaram técnicas de desenho de fármacos assistidos por computador (*computer aided drug design*) para obter novas estruturas mais potentes frente à enzima AChE.⁸⁰ Porém, a estrutura obtida computacionalmente apresentou grande complexidade (Figura 17) e não foram encontrados na literatura, até a presente revisão, trabalhos apresentando a síntese da molécula ou outros compostos com estrutura similar.

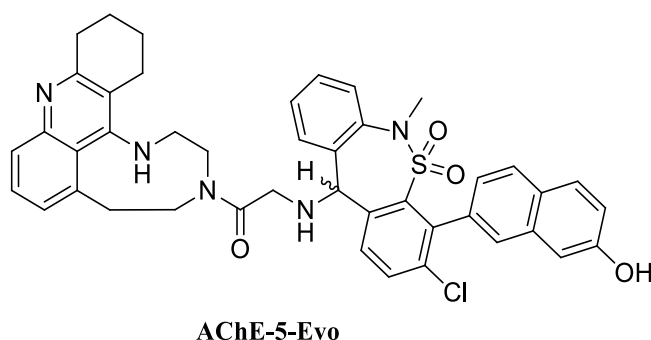


Figura 17: Modificações estruturais do híbrido tacrina-tianeptina sugeridas computacionalmente.

O único éster derivado da tianeptina encontrado na literatura é o éster etílico.⁷¹ A esterificação é muitas vezes utilizada como estratégia de obtenção de pró-fármacos, isto é, moléculas inativas que são metabolizadas à sua forma ativa dentro do organismo.⁸¹ A estratégia de esterificação permite a modulação de outras propriedades farmacocinéticas, como solubilidade, permeabilidade e biodisponibilidade.⁸²

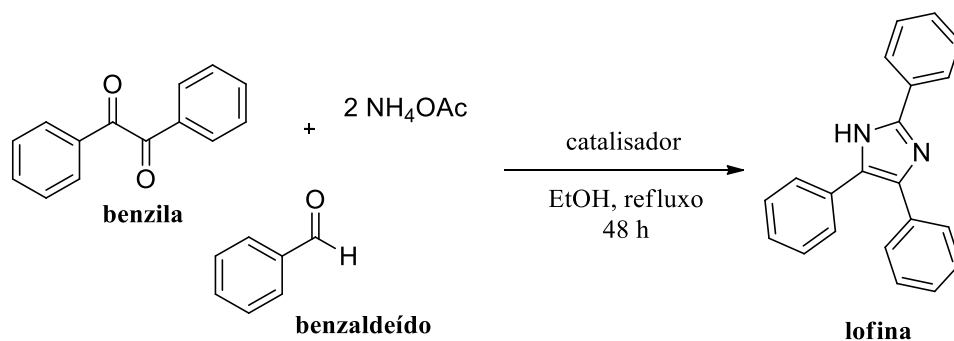
Devido à presença da porção ácida, a tianeptina interage fortemente com as proteínas plasmáticas, estando 95% ligada à proteína albumina sérica humana (HSA).^{83,84} Sendo as albuminas séricas proteínas transportadoras, vários fármacos já foram detectados no plasma conjugados a essas proteínas.^{85,86} Por este motivo, conhecer o modo como fármacos e albuminas séricas interagem representa uma etapa importante no estudo e desenvolvimento de novas moléculas bioativas.

2.4.2. Lofina

O núcleo lofina (2,4,5-trifenil-1*H*-imidazol) possui atividade antioxidante e antibacteriana.⁸⁷ Outra propriedade importante do núcleo lofina refere-se a sua capacidade de emissão de fluorescência ($\lambda = 550$ nm) quando excitado em $\lambda = 304$ nm.⁸⁸ A lofina contém o núcleo imidazólico e representa um importante bloco de construção em química medicinal devido não só a sua presença em diversas moléculas bioativas, como também devido as suas características químicas, como anel heteroaromático e acceptor e doador de ligação de hidrogênio.⁸⁹

O núcleo lofina foi obtido pela primeira vez por Radzizeswski em 1882 a partir de uma reação multicomponente entre a benzila, benzaldeído e amônia.⁹⁰ A síntese de imidazóis 2,4,5-trissubstituídos é realizada através de reações multicomponente entre 1,2-

dicetonas (ou α -hidroxicetonas), aldeídos e dois equivalentes de acetato de amônio (Esquema 2). De modo análogo, os derivados 1,2,4,5-tetrassubstituídos também podem ser obtidos, porém um equivalente de acetato de amônio é substituído por um equivalente de uma amina primária.



Esquema 2: Síntese tetracomponente para obtenção no núcleo lofina.⁹⁰

Nosso grupo de pesquisa vem estudando homodímeros e heterodímeros contendo o núcleo lofina, sendo os únicos trabalhos a utilizarem o núcleo na elaboração de híbridos para a DA. Além dos homodímeros bis-lofina⁶⁸, foram estudados os heterodímeros tacrina-lofina e, mais recentemente, lofina-carboidratos (Figura 18).⁹¹

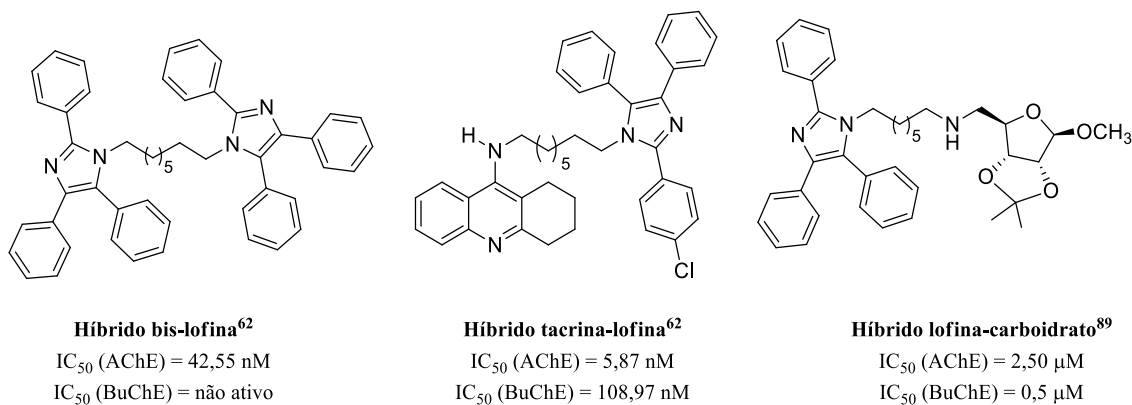


Figura 18: Homo e heterodímeros contendo o núcleo lofina sintetizados em nosso grupo de pesquisa.

O homodímero bis(8)-lofina mostrou-se inibidor seletivo da enzima AChE em escala nanomolar (IC₅₀ = 42,55 nM), enquanto para a enzima BuChE não foi observada atividade inibitória.⁶⁸ Nesse mesmo estudo também foram avaliados os híbridos tacrina-lofina que apresentaram inibição das ChE na escala de nanomolar. Além disso, foi possível observar que variações na cadeia espaçadora metilênica resultaram em

modificações na seletividade da molécula frente à enzima estudada.⁶⁸ Cadeias espaçadoras de seis carbonos resultaram em híbridos inativos frente à AChE enquanto para a BuChE foram observados valores de IC₅₀ na faixa de 12,44 - 58 nM.

Com base nos resultados obtidos a partir dos híbridos bis-lofina e tacrina-lofina, foi elaborada uma outra série de moléculas contendo carboidratos (Figura 18). Apesar da atividade inibitória (IC₅₀) frente às ChE ter se mostrado na escala de micromolar, é importante ressaltar que se tratam de dois núcleos com baixa toxicidade associada. Além disso, os estudos de modelagem molecular permitiram identificar que a porção carboidrato interage com o CAS da enzima AChE, enquanto que o núcleo lofina interage com o PAS (Figura 19). De modo interessante, na enzima BuChE o oposto é observado, com a lofina interagindo na base do gargalo e a porção carboidrato na entrada.

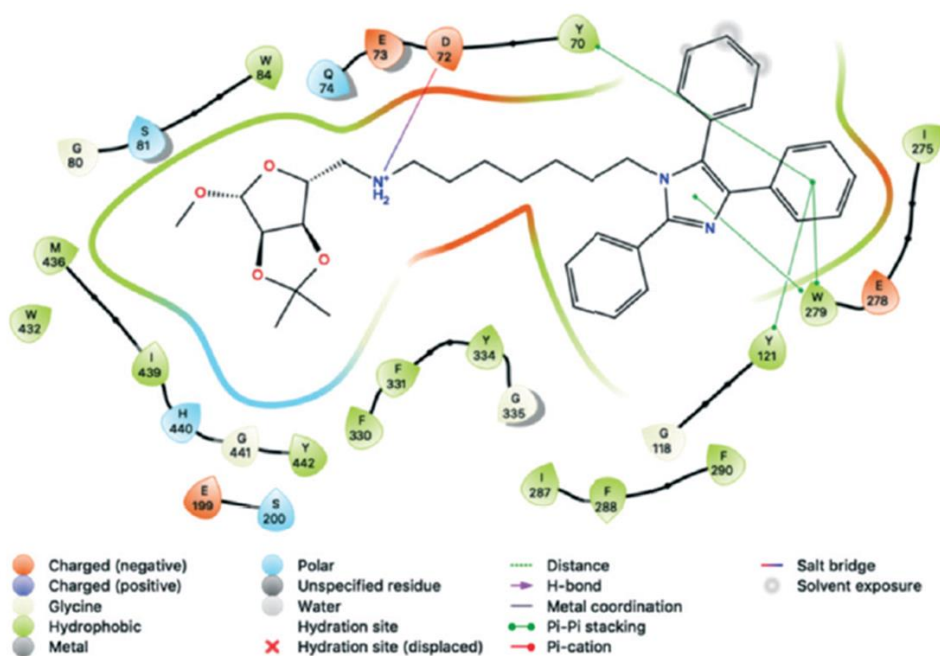


Figura 19: Resultados da análise de modelagem molecular para o híbrido lofina-carboidrato com a enzima AChE.

A partir dos resultados de modelagem molecular, foi possível identificar uma interação específica do tipo *T-stacking* do núcleo lofina com o resíduo de Trp231 do fundo da cavidade da BuChE (Figura 20). Nesse caso, foi avaliado o híbrido mais ativo para a BuChE (IC₅₀ = 0,17 μM) contendo uma cadeia espaçadora de seis átomos. Essa interação, além de explicar a seletividade dos derivados lofina-carboidratos para a enzima

BuChE, coloca o núcleo lofina como estrutura promissora para o desenvolvimento de novos híbridos.

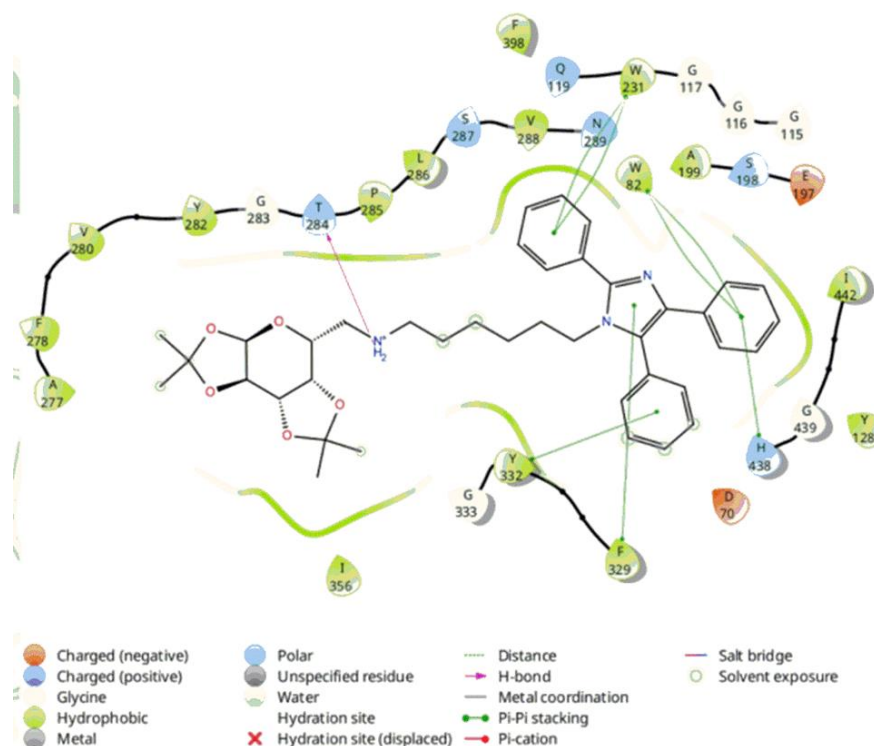


Figura 20: Resultados da análise de modelagem molecular para o híbrido lofina-carboidrato com a enzima BuChE.

2.4.3. Cinâmico

Os derivados do ácido cinâmico são ácidos carboxílicos que aparecem naturalmente em plantas, como o ácido ferúlico (AF), a curcumina e o ácido sinapínico (Figura 21). O nome cinâmico é derivado da planta do qual se extrai a canela, *Cinnamomum zeilanicum*, a qual era usada desde a antiguidade como estimulante, agente carminativo (laxante), antisséptico e inseticida.⁹² Esses compostos são facilmente extraídos de grãos de café, chá, cacau, maçãs, batatas, tomates, cereais e outros alimentos, além de estarem presentes em diversas plantas na medicina tradicional japonesa e *ayurveda*.⁹³

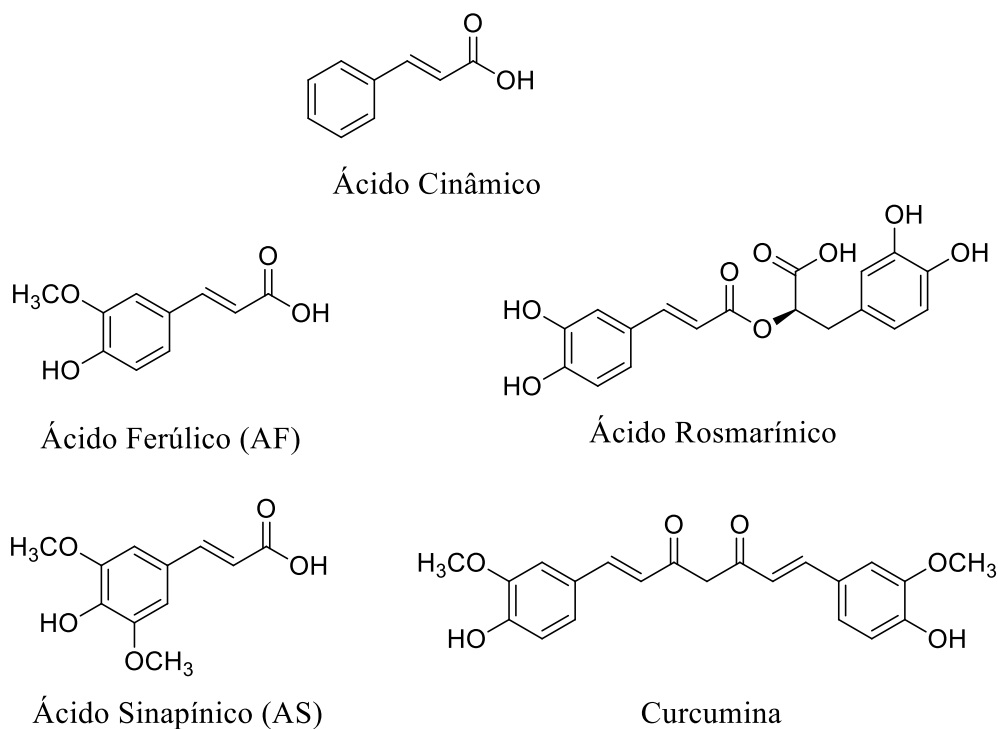


Figura 21: Estrutura molecular do ácido cinâmico e seus derivados naturais.

Devido a sua estrutura química fenólica, essas moléculas têm chamado a atenção da comunidade científica pela capacidade antioxidante frente a diversas doenças, como câncer, doenças cardiovasculares, diabetes e também frente à DA.^{94,95} O AF e a curcumina são conhecidos por inibirem a agregação de A β , diminuírem sua toxicidade promovendo o desenovelamento dos emaranhados, além de consumirem espécies reativas de oxigênio, promovendo redução dos processos inflamatórios tanto *in vitro* quanto *in vivo*.⁹⁶ Estudos também indicam que estas moléculas têm atividade neuroprotetora, apesar de suas baixas biodisponibilidades e da dificuldade em atravessar a barreira hematoencefálica.⁹⁷ Já o ácido sinapínico, extraído da raiz *P. tenuifolia* é um dos componentes da medicina japonesa tradicional, e demonstrou promover o aumento da atividade de acetilcolina em neurônios do córtex frontal de ratos.⁹³

O ácido rosmarínico é um derivado do ácido cinâmico contendo duas hidroxilas ligadas ao anel aromático (Figura 21). Assim como os demais, é um produto natural comumente obtido em plantas como a *Melissa officinalis*.⁹⁸ O ácido rosmarínico interage diretamente com os agregados β -amiloide e com a proteína tau, impedindo a formação das folhas β .⁹⁹ Além disso, o ácido rosmarínico apresentou inibição das enzimas colinesterases, sendo mais seletivo para a BuChE com $IC_{50} = 6,59 \mu M$.¹⁰⁰

Os resultados apresentados pelas moléculas apresentadas acima, levaram os cientistas a desenharem novas estruturas contendo o núcleo cinâmico. Jung e colaboradores propuseram a elaboração de um dímero do ácido ferúlico (KMS4001, Figura 22) e observaram o decréscimo de agregados β -amiloide no córtex pré-frontal de ratos.¹⁰¹ De modo análogo, He e colaboradores também propuseram a elaboração de um dímero do AF, porém com dois anéis benzênicos como espaçadores.¹⁰² O dímero mostrou inibição da formação de agregados de β -amiloide, além de propriedades antioxidantes diminuindo o stress oxidativo causado pelas espécies reativas oxidantes. Embora em ambos os casos os resultados tenham se mostrado promissores impedindo a agregação da proteína β -amiloide, os dímeros não tiveram sua atividade inibitória avaliada frente às ChE.

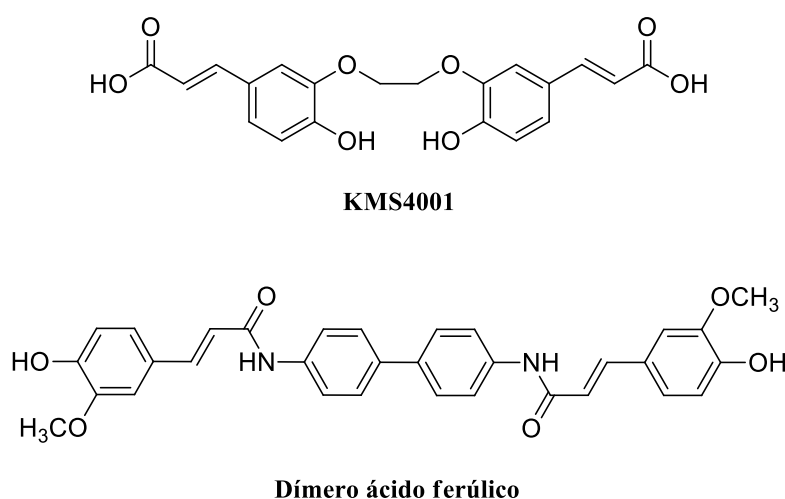
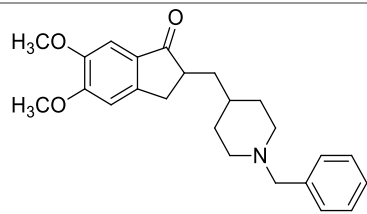
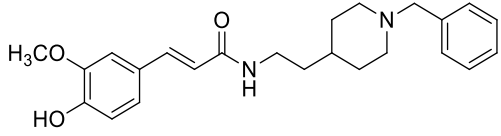
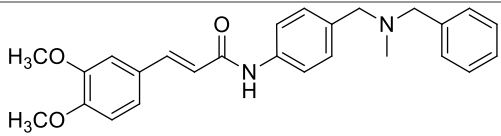
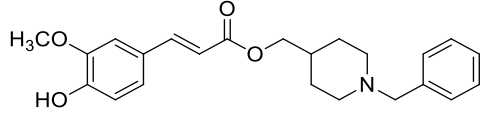
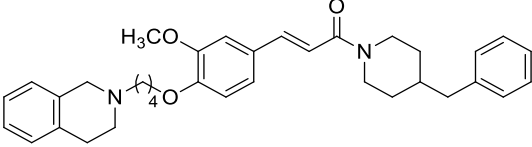
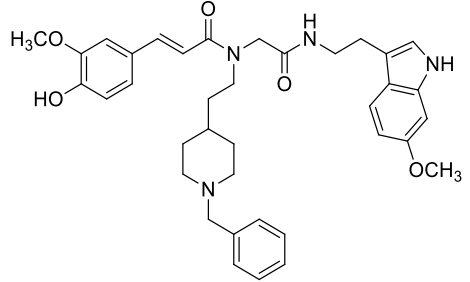


Figura 22: Dímeros derivados do ácido cinâmico.

Além dos dímeros, uma série de híbridos contendo o núcleo cinâmico pode ser encontrada na literatura.¹⁰³ Segundo um trabalho de revisão realizado por Zhang e colaboradores, os híbridos contendo o núcleo cinâmico podem ser divididos em dois grupos principais: híbridos derivado do fármaco donepezil e híbridos contendo o núcleo tacrina.⁹⁷ Tanto a tacrina como o donepezil são inibidores das enzimas colinesterases. Porém, dado o caráter multifatorial da DA, cada vez mais tem-se voltado para a elaboração de moléculas híbridas. Há ainda um terceiro grupo de híbridos derivados de outros núcleos que apresentam atividade biológica frente à DA. Na Tabela 1 são apresentados os híbridos donepezil-ácido cinâmico encontrados na literatura e suas respectivas atividades inibitórias das ChE.

Tabela 1: Híbridos derivados dos núcleos donepezil e ácido cinâmico descritos na literatura.

Entrada	Molécula	IC ₅₀ AChE ^a	IC ₅₀ BuChE ^a
1	 <p>Donepezil¹⁰⁴</p>	0,010 μM	2,50 μM
2	 <p>Cinâmico-<i>N</i>-benzilpiperidina¹⁰⁴</p>	0,26 μM	0,69 μM
3	 <p>Cinâmico-<i>N,N</i>-dibenzil(<i>N</i>-metil)amina¹⁰⁴</p>	3,98 μM	> 10 μM
4	 <p>Feruloil-donepezil¹⁰⁵</p>	0,46 μM	24,97 μM
5	 <p>Ácido Ferúlico-<i>O</i>-alquilamina¹⁰⁶</p>	2,13 μM	0,021 μM
6		n.r.	10,39 nM

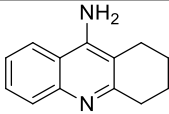
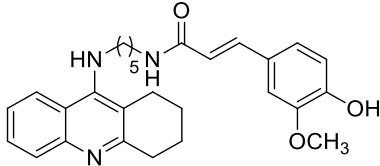
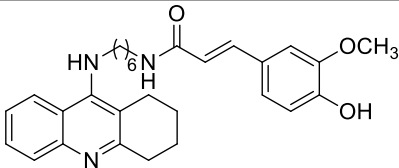
Entrada	Molécula	IC ₅₀ AChE ^a	IC ₅₀ BuChE ^a
	Donepezil-ácido ferúlico ¹⁰⁷		

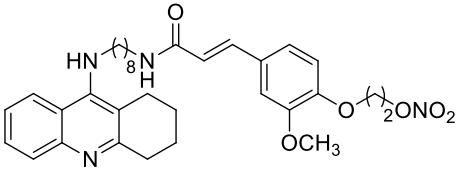
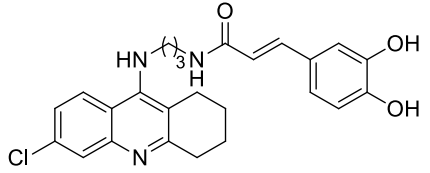
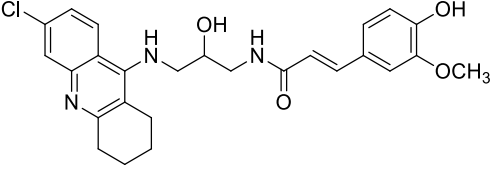
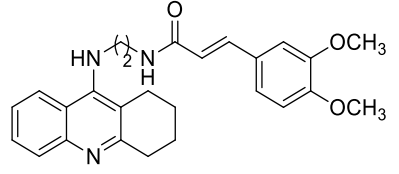
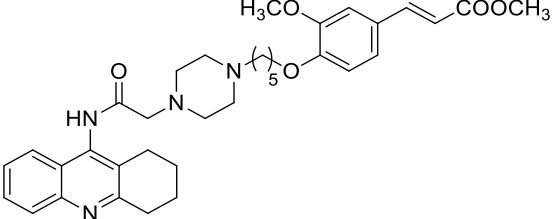
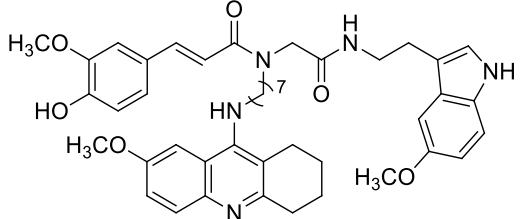
a: cada trabalho utilizou ChE de espécies diferentes nos ensaios. n.r.: não reportado

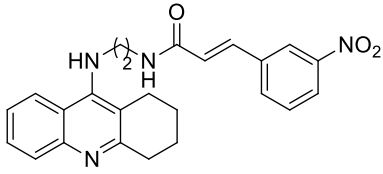
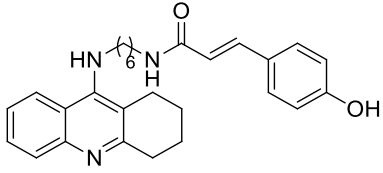
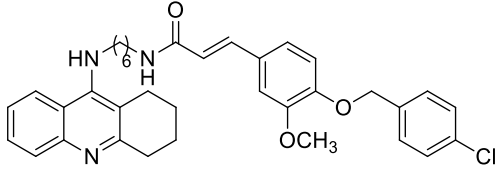
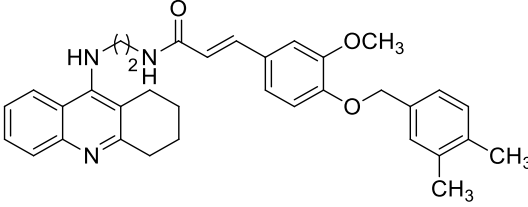
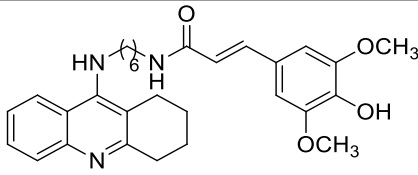
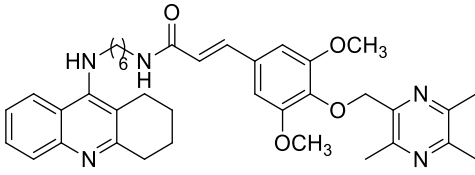
Em geral os híbridos derivados do donepezil e do ácido cinâmico apresentam inibição das ChE na concentração de μM . O híbrido mais ativo, foi o híbrido donepezil-ácido-ferúlico (entrada 6), sintetizado por Benchekroun e colaboradores, com atividade frente à enzima BuChE na escala de nanomolar.¹⁰⁷ Os compostos, em geral, se mostraram mais ativos para as enzimas AChE, exceto o híbrido ácido ferúlico-*O*-alquilamina que apresentou maior seletividade para a BuChE.¹⁰⁶

Além dos híbridos contendo o núcleo donepezil, foram encontrados na literatura um número ainda maior de moléculas contendo o núcleo tacrina. Apesar da hepatotoxicidade apresentada pela molécula, a tacrina continua sendo uma das principais plataformas para o desenvolvimento de novos compostos híbridos.⁹⁷

Tabela 2: Híbridos derivados do núcleo tacrina e ácido cinâmico descritos na literatura.

Entrada	Molécula	IC ₅₀ AChE ^a	IC ₅₀ BuChE ^a
1	 Tacrina ¹¹⁷	45,1 nM	5,1 nM
2	 Tacrina-5-ácido-ferúlico ¹¹⁷	4,4 nM	6,7 nM
3	 Tacrina-6-ácido-ferúlico ¹⁰⁸	n.r.	n.r.

Entrada	Molécula	IC ₅₀ AChE ^a	IC ₅₀ BuChE ^a
4	 <p>Tacrina-ácido-ferúlico-óxido-nítrico¹¹⁸</p>	3,7 nM	1,4 nM
5	 <p>Tacrina-ácido-cafeico¹⁰⁹</p>	0,3 μM	29,5 μM
6	 <p>Cloro-tacrina-ácido-ferúlico¹¹⁰</p>	0,02 μM	0,71 μM
7	 <p>Tacrina-cinamato¹¹¹</p>	0,09 μM	n.r.
8	 <p>Tacrina-piperazina-ácido-ferúlico¹¹²</p>	52,7 nM	215,4 nM
9	 <p>Tacrina-cinâmico-melatonina¹¹³</p>	29,6 nM	12,0 nM

Entrada	Molécula	IC ₅₀ AChE ^a	IC ₅₀ BuChE ^a
10	 <p>Tacrina-cinâmico-substituído¹¹⁹</p>	3,8 nM	34,7 nM
11	 <p>Tacrina-ácido-cinâmico¹¹⁴</p>	2,2 nM	43,5 nM
12	 <p>Tacrina-ácido-cinâmico-beziloxi¹¹⁴</p>	104,3 nM	22,6 nM
13	 <p>Tacrina-ácido-ferúlico-O-xilenoil¹¹⁵</p>	37,0 nM	101,4 nM
14	 <p>Tacrina-ácido-fenólico¹¹⁶</p>	3,9 nM	24,3 nM
15	 <p>Tacrina-ácido-fenólico-ligustrazina¹¹⁶</p>	2,6 nM	28,6 nM

a: cada trabalho utilizou ChE de espécies diferentes nos ensaios. n.r.: não reportado.

Em 2008, Fang e colaboradores desenvolveram uma série de híbridos tacrina-AF, contendo cadeias metilênicas espaçadoras de dois a oito carbonos (Tabela 2 – entrada 2). Esse trabalho foi um dos pioneiros na elaboração dos híbridos tacrina-AF. Todos os compostos sintetizados apresentaram atividade inibitória para as ChE, não havendo seletividade quanto ao tipo de enzima. Porém, os autores identificaram que o composto contendo cadeia espaçadora de cinco carbonos apresentou as melhores atividades dentre os compostos analisados.¹¹⁷

Chen e colaboradores construíram uma série de tri-híbridos, isto é, moléculas contendo uma porção tacrina, o núcleo AF e uma terminação contendo um substituinte óxido nítrico (Tabela 2 – entrada 3). Todos os compostos sintetizados apresentaram atividades inibitórias da enzima AChE superiores à tacrina na faixa de baixo nanomolar.¹¹⁸ Já os híbridos das entradas 4 a 6 apresentaram atividades inibitórias das ChE na faixa de micromolar e com seletividade para a AChE.¹⁰⁹⁻¹¹¹

Fu e colaboradores também elaboraram uma série de heterodímeros contendo o núcleo tacrina como âncora para derivados do AF, utilizando um grupo piperazina no espaçador (Tabela 2 – entrada 8). Dentre os compostos sintetizados, foi possível observar uma maior seletividade para a enzima AChE com IC₅₀ na escala nanomolar para os compostos contendo espaçadores com quatro e cinco carbonos. Além disso, os compostos sintetizados apresentaram boa capacidade de inibir o acúmulo de placas Aβ.¹¹²

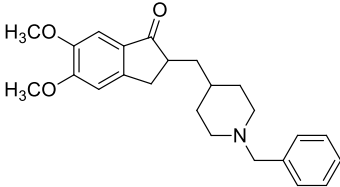
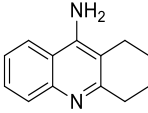
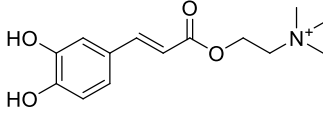
Benchekroun e colaboradores exploraram a atividade antioxidante da melatonina em um tri-híbrido contendo também os núcleos tacrina, AF e melatonina (Tabela 2 – Entrada 9). Os autores identificaram que além da boa capacidade antioxidante, o composto sintetizado apresentava boa permeabilidade, toxicidade menor do que a tacrina e boa atividade frente às ChE. Apesar do tamanho espacial elevado, o híbrido apresentou atividade na faixa de nanomolar, sendo seletivo para a enzima BuChE.¹¹³

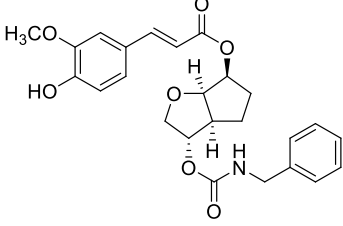
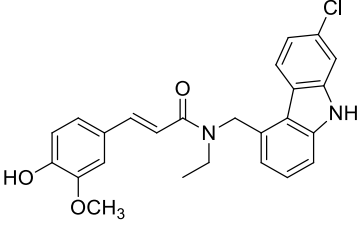
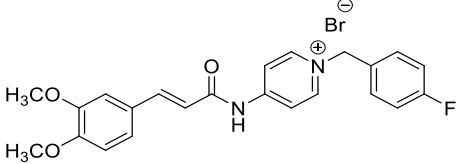
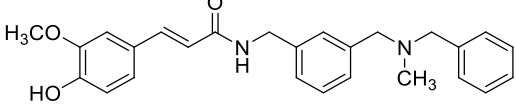
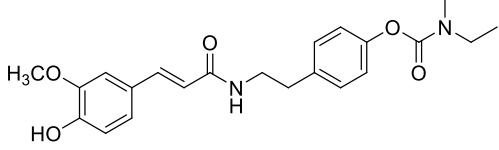
Em 2017 uma nova série de compostos contendo modificações no núcleo cinâmico foi proposta por Chen e colaboradores.¹¹⁹ Os autores mantiveram a cadeia espaçadora metilênica fixa contendo dois carbonos e propuseram uma série de substituintes no núcleo cinâmico. As cinamamidas sintetizadas contendo grupos retiradores de elétrons, como o NO₂, apresentaram os menores valores de IC₅₀ para a enzima AChE, ficando na faixa de 3,8-7,1 nM (Tabela 2 – entrada 10).

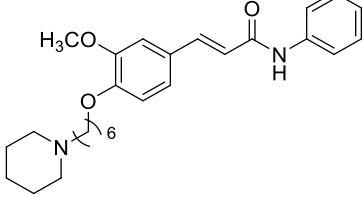
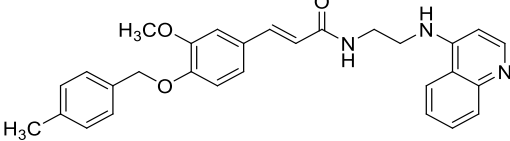
Em 2018, em dois trabalhos publicados pelo mesmo grupo de pesquisa foram introduzidas mais três séries de híbridos contendo os núcleos tacrina e ácido cinâmico.^{114,115} No primeiro trabalho, os autores exploraram, além das variações nas substituições do núcleo cinâmico, diferentes cadeias espaçadoras entre a tacrina e o ácido cinâmico. O híbrido contendo cadeia espaçadora de seis átomos e apenas uma hidroxila substituída na porção cinâmico apresentou os melhores valores de IC₅₀ da série (Tabela 2 – entrada 11), sendo seletivo para a AChE. Já o híbrido contendo um substituinte mais volumoso (entrada 12) apresentou maior seletividade para a enzima BuChE.¹¹⁴ O segundo trabalho publicado pelo grupo ampliou o escopo de moléculas contendo um anel aromático substituído ligado à porção cinâmico (entrada 13).¹¹⁵ De modo interessante, apesar do híbrido apresentar volume semelhante ao publicado no trabalho anterior, a modulação dos substituintes e do tamanho da cadeia espaçadora inverteu a seletividade entre as enzimas.

Há ainda um terceiro grupo de híbridos contendo o núcleo cinâmico ligado a outras moléculas bioativas, como rivastigmina, carbazóis, chalconas, carbamatos, entre outros. Os híbridos e suas respectivas atividades encontram-se na Tabela 3.

Tabela 3: Híbridos derivados do ácido cinâmico contendo diferentes núcleos reportados na literatura.

Entrada	Molécula	IC₅₀ AChE^a	IC₅₀ BuChE^a
1	 <p>Donepezil¹⁰⁴</p>	0,010 μM	2,50 μM
2	 <p>Tacrina¹¹⁷</p>	45,1 nM	5,1 nM
3		3,98 μM	n.r.

Entrada	Molécula	IC ₅₀ AChE ^a	IC ₅₀ BuChE ^a
	Cinâmico-colina¹²⁰		
4	 <p style="text-align: center;">Carbamato-ferulato¹²¹</p>	37,5 µM	25,8 µM
5	 <p style="text-align: center;">Ácido Ferúlico-carbazol¹²²</p>	2,1 µM	5,1 µM
6	 <p style="text-align: center;">Ácido ferúlico-benzilpiridínio⁹⁶</p>	12,1 nM	2,6 nM
7	 <p style="text-align: center;">Cinamamida-dibenzilamina¹²³</p>	1,0 µM	2,4 µM
8	 <p style="text-align: center;">Hidroxicinâmico-rivastigmina¹²⁴</p>	>5,0 µM	5,0 µM

Entrada a	Molécula	IC ₅₀ AChE ^a	IC ₅₀ BuChE ^a
9	 <p data-bbox="496 562 817 600">Cinâmico-piperidina¹²⁵</p>	0,71 μM	12,9 μM
10	 <p data-bbox="502 819 810 857">Cinâmico-quinolina¹²⁶</p>	1,1 μM	1,0 μM

a: cada trabalho utilizou ChE de espécies diferentes nos ensaios. n.r.: não reportado.

Como pode ser observado na Tabela 3 há uma variedade de híbridos contendo o núcleo cinâmico e outras moléculas bioativas. É importante destacar o trabalho realizado por Sebestík e colaboradores utilizando derivados da colina (entrada 3). Apesar da boa atividade antioxidante, os híbridos apresentaram baixa atividade frente à enzima AChE.¹²⁰ Os demais híbridos também apresentaram atividades inibitórias das ChE na faixa de micromolar, com pouca seletividade entre as enzimas. Exceto o híbrido cinâmico-piperidina (entrada 9) que apresentou maior seletividade para a enzima AChE.¹²⁵

Com base em estudos de modelagem molecular, Lan e colaboradores sintetizaram uma série de moléculas derivadas do ácido ferúlico ligando-as ao núcleo *N*-benzil-piridínio. Os híbridos apresentaram atividades inibitórias na faixa de nanomolar, com grande seletividade para a AChE com relação a BuChE. O derivado sintetizado com um substituinte flúor na posição *para* do núcleo piridínio (Tabela 3 – entrada 6) apresentou valores de IC₅₀ na faixa de 12 nM, cerca de 3,3 vezes mais eficiente do que o controle donepezil.⁹⁶

Dessa forma, com base nos dados coletados da literatura, observa-se que o núcleo cinâmico tem sido frequentemente utilizado como farmacóforo para o desenvolvimento racional de moléculas híbridas.^{97,103} Além disso, o núcleo tacrina ainda é a âncora mais

eficiente, uma vez que os híbridos contendo o núcleo tacrina apresentaram os menores valores de inibição das enzimas colinesterases (Tabela 2). Porém, na literatura há pouca informação acerca da rigidez dos substituintes na porção cinâmico, bem como sobre sua lipofilicidade. Sendo assim, o desenvolvimento de novos híbridos contendo o núcleo tacrina e cinâmico ainda constitui um campo a ser explorado.

2.5. Híbridos com ligação tripla

As ligações triplas estão presentes em diversas moléculas com atividade biológica, como em inibidores de monoaminaoxidase (MAOs)¹²⁷, agentes antifúngicos¹²⁸, antimicrobianos¹²⁹, sedativos¹³⁰ e hormônios sexuais femininos sintéticos¹³¹, entre outros.¹³² Alguns exemplos de moléculas bioativas contendo ligação tripla são mostrados na Figura 23. A presença da ligação tripla confere rigidez à estrutura, uma vez que impede a livre rotação da ligação carbono-carbono. Do ponto de vista físico-químico, as ligações triplas são apolares e realizam interações intermoleculares fracas do tipo Van der Waals.¹³³

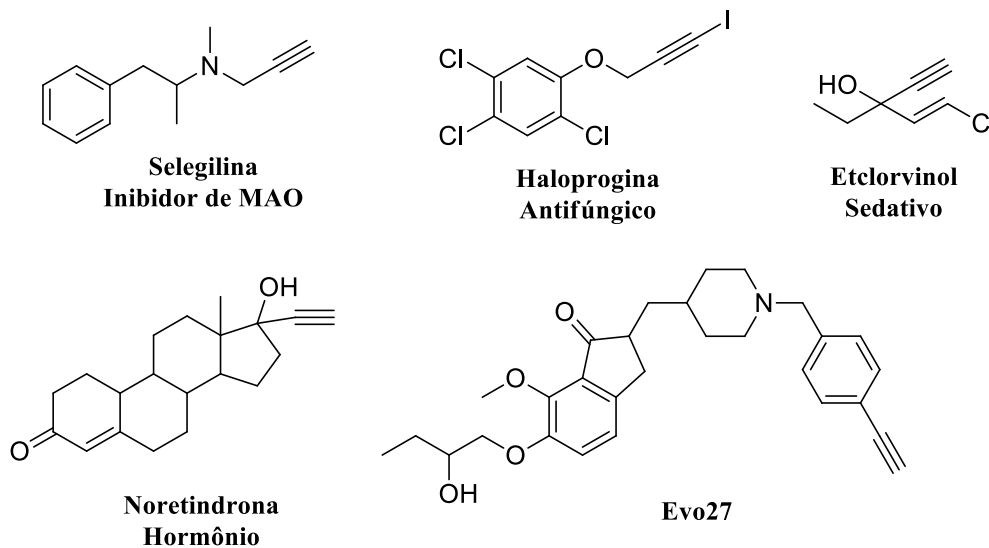


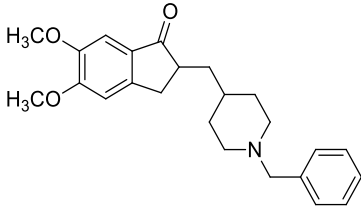
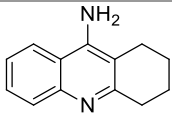
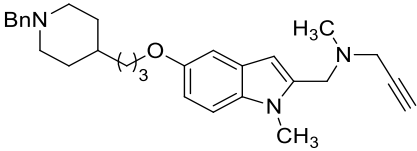
Figura 23: Exemplos de moléculas bioativas contendo ligação tripla.

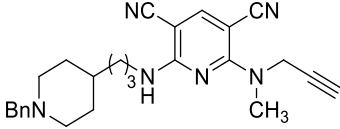
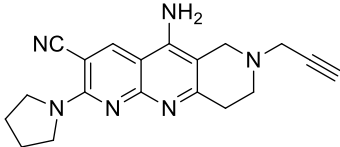
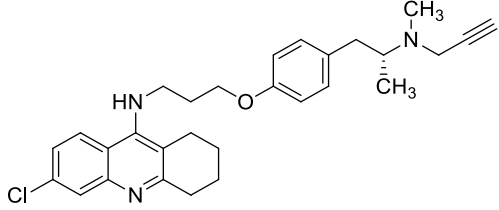
No tratamento de doenças neurodegenerativas, como a DA, também podem ser encontrados alguns exemplos de moléculas contendo ligações triplas. Chen e colaboradores ao pesquisarem híbridos para o tratamento da DA, utilizaram métodos computacionais para analisar derivados estruturais do donepezil e avaliar a sua interação

com a enzima AChE. Os autores identificaram que a presença da ligação tripla terminal no composto Evo27 (Figura 23) induz interações hidrofóbicas com o sítio ligante da proteína AChE.¹³⁴ Além do trabalho realizado por Chen e colaboradores, são encontrados outros estudos na literatura reportando híbridos contendo ligações triplas terminais como ChEI e também inibidores de MAOs.¹²⁷

As enzimas monoaminaoxidasases também constituem um alvo de interesse para o desenvolvimento de fármacos para a DA. As MAOs são responsáveis pela deaminação oxidativa de aminas com produção de peróxido de hidrogênio, podendo gerar espécies radicalares e consequentemente aumento do stress oxidativo.¹²⁷ Na literatura são encontrados exemplos de híbridos do núcleo donepezil e do núcleo tacrina com moléculas inibidoras das MAOs.¹

Tabela 4: Híbridos para o tratamento da DA contendo ligações triplas.

Entrada a	Molécula	IC₅₀ AChE^a	IC₅₀ BuChE^a
1	 <p style="text-align: center;">Donepezil¹⁰⁴</p>	0,010 μM	2,50 μM
2	 <p style="text-align: center;">Tacrina¹¹⁷</p>	45,1 nM	5,1 nM
3	 <p style="text-align: center;">ASS234¹³⁵</p>	0,35 μM	0,46

Entrada	Molécula	IC ₅₀ AChE ^a	IC ₅₀ BuChE ^a
4	 <p style="text-align: center;">MTDL-1¹³⁶</p>	1,1 nM	0,6 μM
5	 <p style="text-align: center;">Tacrina-cicloalquil-propargilamina¹³⁷</p>	0,025 μM	27 μM
6	 <p style="text-align: center;">Tacrina-seleginina¹³⁸</p>	14,2 nM	66,0 nM

a: cada trabalho utilizou ChE de espécies diferentes nos ensaios.

Bolea e colaboradores desenvolveram o híbrido ASS234, desenhado especificamente para combinar a atividade anticolinérgica do donepezil e atividade anti-MAO do grupo propargil-amina (Tabela 4 – entrada 3). O híbrido apresentou atividade anticolinesterase na faixa de micromolar, além de exibir propriedades neuroprotetoras.¹³⁵ Já Bautista-Aguilera e colaboradores desenvolveram um híbrido derivado dos núcleos donepezil e seleginina (entrada 4). O composto MTDL-1 mostrou-se 12 vezes mais potente na inibição da AChE quando comparado ao donepezil, além de apresentar maior seletividade para a AChE.¹³⁶

De modo semelhante, foram preparados híbridos contendo o núcleo tacrina. Samadi e colaboradores realizaram a síntese de híbridos fundidos tacrina-seleginina (Tabela 4 – entrada 5).¹³⁷ Os híbridos mostraram-se potentes na inibição tanto da MAO como da AChE na faixa de nanomolar. Lu e colaboradores também desenvolveram um conjunto de moléculas baseadas nos núcleos tacrina e seleginina separadas por uma cadeia espaçadora.¹³⁸ Em geral, os híbridos desenvolvidos mostraram-se mais seletivos

para a enzima BuChE com IC₅₀ na faixa de nanomolar (entrada 6). Os estudos de modelagem molecular indicaram que a tacrina interage com o CAS, enquanto que a porção derivada da seleginina fica voltada para o PAS e realiza interações do tipo π - π *stacking* com a enzima. Porém, os autores não mencionam se há interações da ligação tripla com os aminoácidos do PAS.

Como pode ser observado, são encontrados na literatura híbridos contendo ligações triplas terminais. Assim, pouco se sabe ainda sobre as interações moleculares de fármacos contendo ligações triplas duplamente substituídas e as ChE, e o modo como essa ligação tripla influencia na atividade dessas moléculas. Portanto, a síntese de novas moléculas contendo a ligação tripla encontra-se em pleno desenvolvimento. Com esta estratégia em vista, elaborou-se duas séries de híbridos contendo os núcleos tacrina e lofina unidos por meio de um espaçador à porção derivada do ácido cinâmico tendo como substituinte uma ligação tripla. Desta forma, aliam-se as propriedades farmacológicas dos núcleos individuais com a presença da ligação tripla com o objetivo de avaliar o desempenho destes híbridos frente às enzimas de importância no estudo da DA.

3. Fotofísica aplicada à farmacologia

A fotofísica é a área que estuda as interações da matéria com a luz, estando presente nas mais diversas áreas da ciência desde a química, bioquímica, medicina, biofísica, ciências dos materiais, entre outros.¹³⁹ O estudo fotofísico aborda tanto a absorção da luz por uma molécula por meio da espectroscopia de absorção no ultravioleta-visível (UV-vis), como também os processos luminescentes, isto é, a emissão de luz proveniente de uma molécula no estado excitado.¹⁴⁰ A espectroscopia de emissão de fluorescência representa uma técnica altamente sensível, tendo várias aplicações como o desenvolvimento de sondas fluorescentes para proteínas¹⁴¹, elaboração de biomarcadores^{142,143} entre outras.¹⁴⁴

A fluorescência tem sido uma das principais ferramentas para a elucidação das interações entre moléculas pequenas como os fármacos e receptores a nível celular.¹⁴⁵ Em farmacologia, é essencial obter informações como afinidade pelo ligante, eficiência e capacidade de ligação com o receptor. A sensibilidade e a precisão das técnicas

envolvendo a fluorescência têm se mostrado importantes para a obtenção dessas informações por meio de estudos de cinética, afinidade, saturação e competição, sem a necessidade da preparação de moléculas contendo radioisótopos.¹⁴⁶

As técnicas de bioimagem utilizando a espectroscopia de fluorescência têm se tornado populares ao longo dos últimos anos devido a sua segurança por não necessitarem de radiações ionizantes, pela sua sensibilidade e baixo custo.¹⁷ Zhang e colaboradores utilizaram a fluorescência para o monitoramento via imagem de modelos animais da DA para acompanhar o efeito terapêutico da molécula CRANAD-17, um derivado da curcumina que inibe a formação das placas β -amiloide.¹⁴⁷

Yoo e Han desenvolveram um biomarcador para quantificar a atividade da BuChE no plasma sanguíneo por meio de fluorescência.¹⁴¹ Os autores buscaram uma estratégia para contornar a interferência das proteínas albuminas na quantificação da BuChE. Para isso, desenvolveram uma molécula que após ser hidrolisada pela BuChE, possui alta afinidade pela proteína albumina sérica humana HSA (*Human Serum Albumin*) e intensa emissão de fluorescência, conforme mostrado na Figura 24.

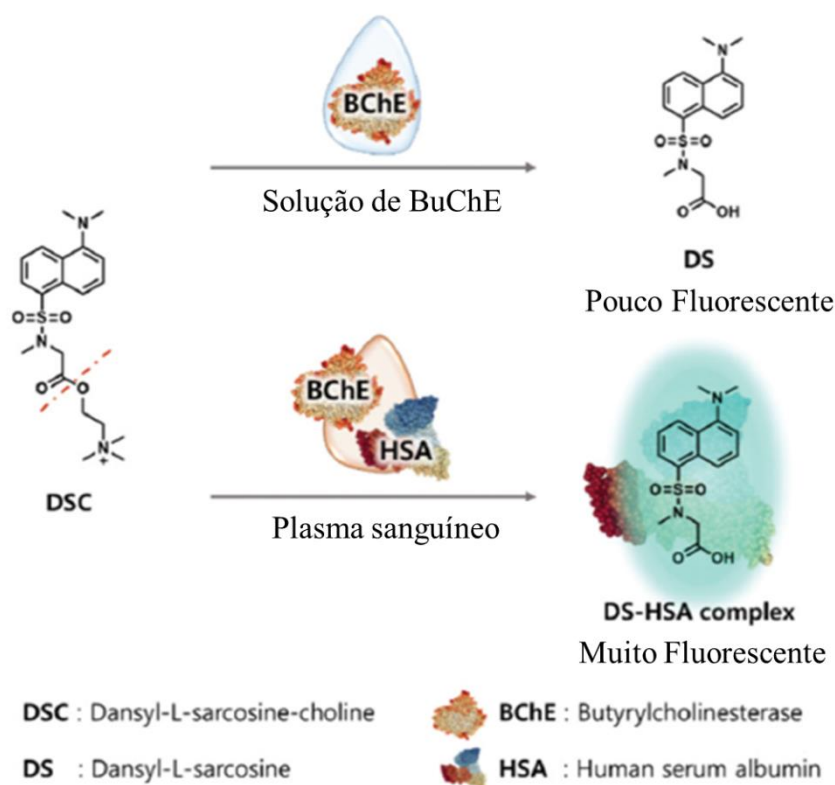


Figura 24: Biomarcador fluorescente para a BuChE presente no plasma sanguíneo desenvolvido por Yoo e Han.

As albuminas séricas são o principal grupo de proteínas constituintes do plasma sanguíneo, correspondendo a cerca de 60 % de sua composição. O nome deriva do latim *albus* devido aos precipitados esbranquiçados produzidos por essas proteínas quando isoladas. As albuminas são sintetizadas no fígado, tendo um tempo de meia vida de cerca de dezenove dias no organismo de um mamífero.¹⁴⁸ São proteínas com grande capacidade de ligarem-se reversivelmente a uma variada classe de substâncias, como ácidos graxos, compostos aromáticos, hormônios e fármacos, sendo, portanto, consideradas proteínas carreadoras.¹⁴⁹

Como apontado por Yoo e Han, o fato da HSA ser uma proteína carreadora e interagir com uma variedade de substâncias, muitas vezes acaba se tornando um desafio no desenvolvimento de biomarcadores ou sondas fluorescentes.¹⁴¹ Além de afetar a intensidade de fluorescência, a interação da sonda fluorescente pode levar a atribuições acima ou abaixo do real para um biomarcador, resultando em diagnósticos imprecisos. Desse modo, fica evidente a necessidade de conhecer as interações entre moléculas candidatas a fármacos com as proteínas plasmáticas.

A BSA (do inglês, *Bovine Serum Albumin*) é frequentemente utilizada como uma proteína modelo para o estudo das interações moleculares entre a proteína e pequenas moléculas, devido à arquitetura precisa de seus sítios ligantes, elucidada através de técnicas de ressonância magnética nuclear e cristalografia. Além disso, a BSA possui 76 % de sua estrutura homóloga a HSA que possui um custo elevado.¹⁵⁰

Além de serem proteínas transportadoras, tanto a HSA quanto a BSA também são conhecidas por serem proteínas fluorescentes, isto é, possuem fluorescência intrínseca com máximo de emissão entre 332 - 350 nm, quando excitadas em $\lambda_{ex} = 280$ nm. A fluorescência da BSA é atribuída aos resíduos dos aminoácidos triptofano (Trp) Trp-134 e Trp-213 localizados no domínio I e subdomínio IIA, respectivamente (Figura 25).¹⁵⁰ Essa característica, além do baixo custo, permite que a BSA seja utilizada como modelo para estudo de interação com fármacos.¹⁵¹⁻¹⁵³

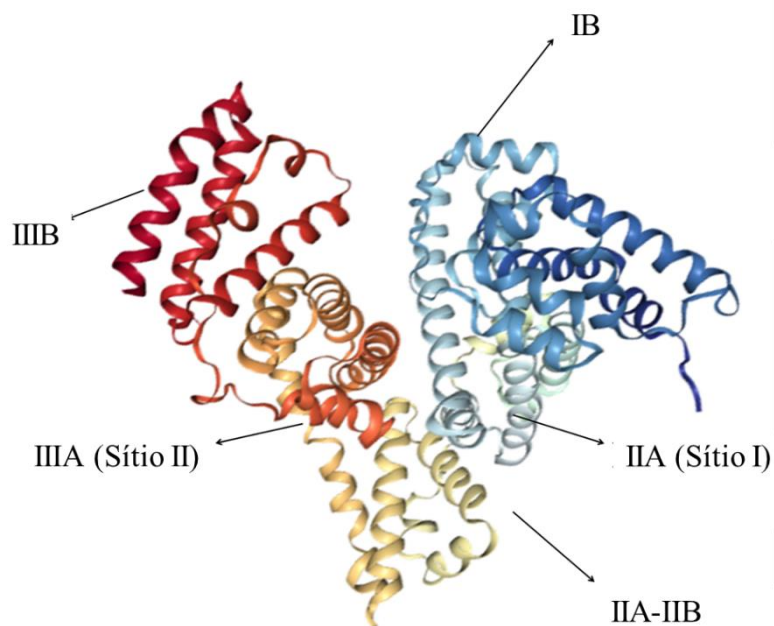


Figura 25: Estrutura da proteína BSA (PDB ID 4OR0).

Não só a emissão de fluorescência de uma molécula pode fornecer informações importantes do ponto de vista das aplicações biológicas¹⁴³, como também a supressão da fluorescência.^{140,141} Estudos de supressão de fluorescência podem fornecer informações sobre as interações entre fármacos e proteínas de relevância biológica como as albuminas^{154, 155}, actinas¹⁵⁶, proteínas do cristalino¹⁵⁷, heme-oxigenase¹⁵⁸, β -amiloide¹⁵⁹ e da AChE.^{160,161}

A supressão de fluorescência de uma proteína pode ocorrer por diversos mecanismos. A supressão de fluorescência por colisões ocorre quando o fluoróforo no estado excitado sofre uma desativação resultante de uma colisão com uma outra molécula presente em solução, chamada de supressor. Tanto a proteína quanto o supressor não são quimicamente alterados no processo. Esse modo de desativação é chamado de mecanismo dinâmico.¹⁴⁰

Outro mecanismo de supressão de fluorescência é o mecanismo estático. No mecanismo estático um complexo é formado entre o fluoróforo e o supressor, e esse complexo não fluoresce. Ambos os mecanismos necessitam que ocorra o contato entre as moléculas e podem ser explicados segundo a equação de Stern-Volmer:

$$F_0/F = 1 + K_{SV}[Q] = 1 + k_q\tau_0[Q] \quad (1)$$

onde F_0 e F são a intensidade de fluorescência na ausência e na presença do supressor, K_{SV} é a constante de Stern-Volmer, $[Q]$ é a concentração do supressor, k_q é a taxa de

supressão de fluorescência e τ_0 é o tempo de meia vida de fluorescência da proteína na ausência do supressor.¹⁶²

Além dos mecanismos de supressão de fluorescência acima citados, outros mecanismos podem estar presentes dependendo da natureza química do supressor. Um desses mecanismos é a transferência de energia ressonante de Förster (FRET – *Förster Resonant Energy Transfer*) intermolecular. A supressão de fluorescência via FRET ocorre quando o fluoróforo doador se encontra próximo ao fluoróforo receptor, de modo que ocorra a transferência de energia por meio de um processo não radiativo e acoplamento dipolo-dipolo (Figura 26). Nesse processo, o receptor absorve a energia recebida do doador e é excitado, emitindo fluorescência em um comprimento de onda maior que o do doador.¹⁶³

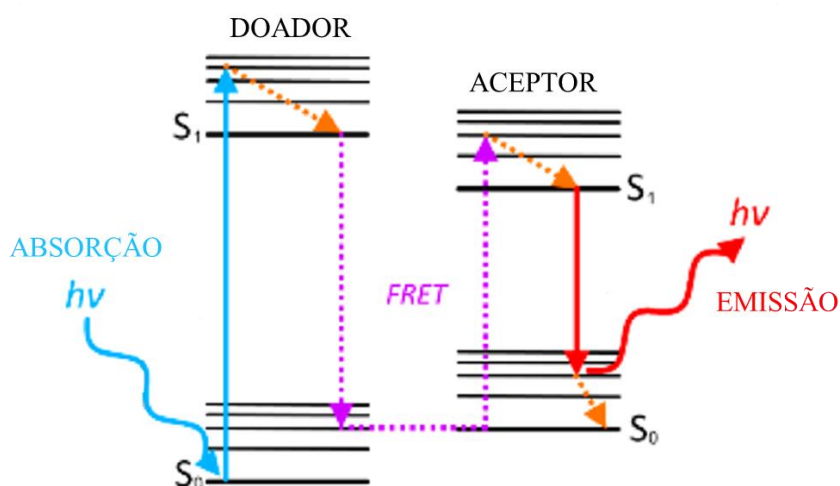


Figura 26: Representação esquemática do mecanismo de FRET. Adaptado de Lakowicz.¹⁴⁰

Segundo a teoria de Förster, para que esse processo de FRET ocorra, o espectro de emissão de fluorescência do doador deve se sobrepôr ao espectro de absorção no UV-vis do receptor. Além disso, o processo de FRET ocorre por meio de uma interação espacial. A distância de Förster de 30 Å é muito grande para interação direta das nuvens eletrônicas das moléculas envolvidas, de modo que o mecanismo de FRET não necessariamente precisa de contato entre as moléculas para ocorrer. Desse modo, o mecanismo de FRET não é sensível a fatores estéricos ou a interações eletrostáticas.¹⁴⁰

As técnicas envolvendo FRET são consideradas avançadas para a obtenção de informações acerca da proximidade entre doador e receptor. Na literatura são encontrados

diversos trabalhos mostrando a importância do mecanismo de FRET para compreender interações entre proteínas e biomoléculas.^{163,164} Como estudos envolvendo a supressão de fluorescência das proteínas albuminas HSA e BSA e a interação com agentes anticâncer¹⁵⁵, antibacterianos¹⁶⁵ e produtos naturais.^{166, 167} Jiang e colaboradores utilizaram o mecanismo de FRET para propor um novo método de estudo de interações com proteínas. Já Loura e colaboradores utilizaram o mecanismo de FRET para estudar a seletividade entre proteínas e lipídeos.¹⁶⁸

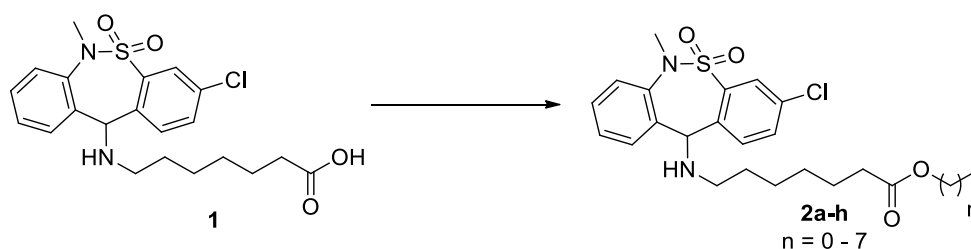
No caso da DA, é possível encontrar na literatura diversos exemplos de biomarcadores fluorescentes.¹⁶⁹ Três trabalhos de revisão recentes apontam para a necessidade de novos biomarcadores fluorescentes tanto para o diagnóstico como para o acompanhamento da DA.¹⁶⁹⁻¹⁷¹ Os principais alvos citados pelos autores são as placas β -amilóide, emaranhados neurofibrilares da proteína tau, as enzimas MAOs, o ácido γ -amino-butírico e alguns íons metálicos. Porém, pouco tem sido abordado na literatura sobre as ChE como biomarcadores, embora elas estejam associadas ao acúmulo de placas de β -amilóide.^{38,172}

4. Objetivo

Com a busca crescente por moléculas farmacologicamente ativas e de caráter multialvo no tratamento da doença de Alzheimer, este trabalho buscou o desenvolvimento de novas moléculas tendo como alvos as enzimas colinesterases bem como o estudo da interação com a proteína BSA. Dessa forma, o presente trabalho foi dividido em três partes.

4.1. Parte I – Ésteres tianeptínicos

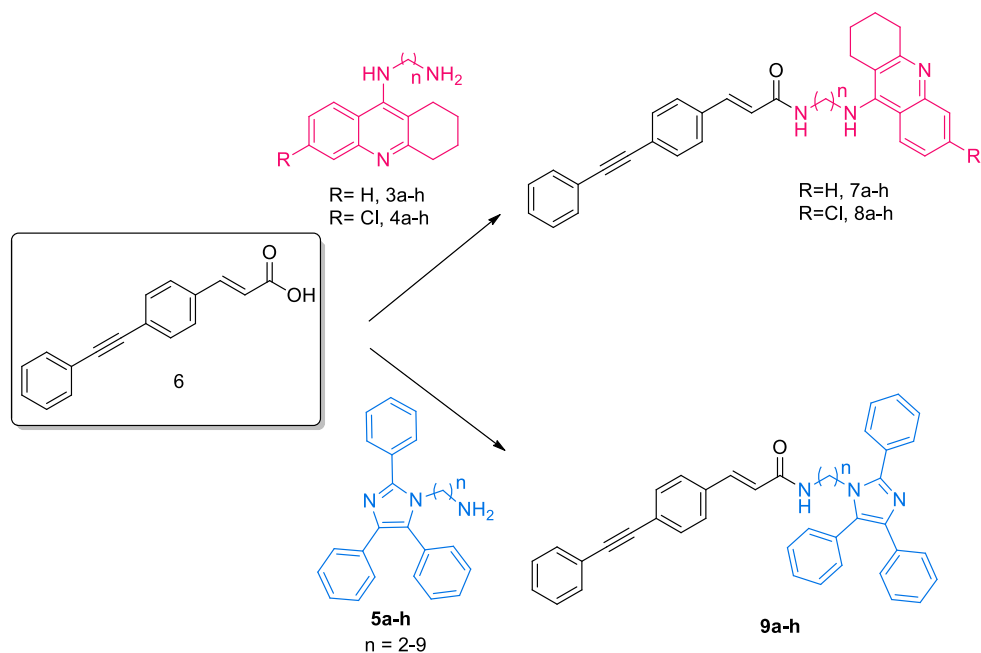
A primeira parte deste trabalho teve como objetivo a síntese de ésteres derivados da Tianeptina (Esquema 3).



Esquema 3: Ésteres tianeptínicos.

4.2. Parte II – Híbridos multifuncionais

A segunda parte deste trabalho teve por objetivo a síntese de compostos híbridos baseados nos núcleos tacrina (**3a-h** e **4a-h**), lofina (**5a-h**) e o ácido cinâmico contendo uma ligação tripla (**6**).



Esquema 4: Híbridos envolvendo os núcleos tacrina, lofina e derivados do ácido cinâmico.

4.3. Parte III – Estudo fotofísico

A terceira parte deste trabalho teve como objetivo a caracterização fotofísica das moléculas sintetizadas, visando não só o estudo de interações com o solvente, mas também de interações com proteínas, tendo como modelo para interação a proteína BSA.

4.4. Objetivos específicos

Para alcançar os objetivos, o trabalho foi dividido nas seguintes etapas:

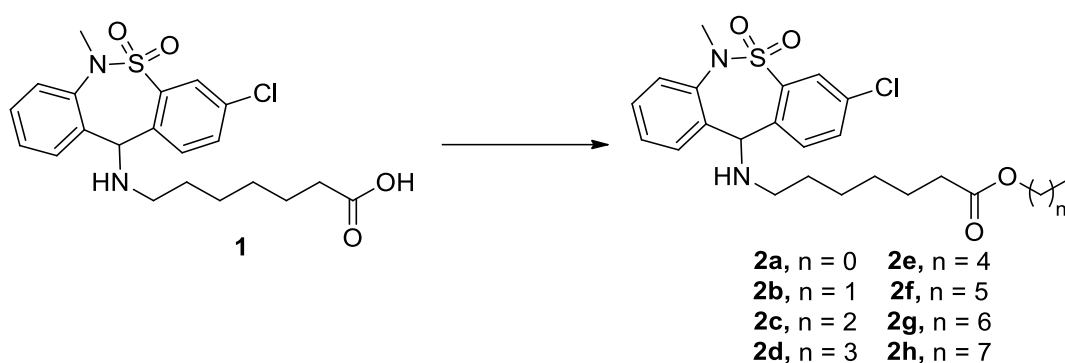
- i. Utilização da metodologia de esterificação de Fischer para a obtenção dos ésteres tianeptínicos.
- ii. Utilização da reação de acoplamento de Sonogashira para a construção do intermediário aldeído acrílico.
- iii. Utilização da reação de condensação de Knoevenagel com modificação de Doebner para a construção do núcleo derivado do ácido cinâmico.
- iv. Emprego da reação de Niementowski para construção dos núcleos 9-cloro-1,2,3,4-tetraidroacridina e 6,9-dicloro-1,2,3,4-tetraidroacridina.
- v. Utilização da metodologia tetracomponente para a síntese dos intermediários contendo o núcleo lofina.

- vi. Síntese e caracterização das cinamamidas.
- vii. Estudo fotofísico dos compostos híbridos com a proteína BSA.
- viii. Avaliação biológica com as enzimas acetilcolinesterase e butirilcolinesterase.
- ix. Aplicação da modelagem molecular para avaliar a interação dos novos híbridos com as enzimas acetilcolinesterase e butirilcolinesterase e com a proteína BSA.

5. Resultados e discussões

5.1. Parte I - Ésteres tianeptínicos

Durante o período de mestrado iniciou-se a investigação da preparação de ésteres tianeptínicos e sua interação com a proteína BSA. Durante esse período foram sintetizados ésteres contendo cadeias laterais de 4, 6 e 8 carbonos (Esquema 5). Tendo em vista os resultados de interação com a proteína BSA obtidos e os resultados de interação com as enzimas colinesterases dos híbridos tacrina-tianeptina¹², optou-se por ampliar o estudo, fazendo a síntese da série completa de ésteres com variações de 1 a 8 carbonos.



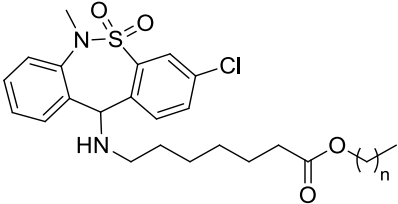
Esquema 5: Estrutura dos ésteres tianeptínicos obtidos por esterificação de Fischer da Tianeptina.

Este trabalho deu origem a uma publicação no *Journal of Brazilian Chemical Society*, envolvendo a síntese dos ésteres e estudos de interação com a proteína BSA via espectroscopia de fluorescência e modelagem molecular.¹⁷³

5.1.1. Síntese dos ésteres tianeptínicos

A Tianeptina utilizada nesse trabalho foi extraída diretamente dos comprimidos de Stablon®. A síntese dos ésteres **2a-c** seguiu o protocolo tradicional da esterificação de Fischer¹⁷⁴. Porém, para álcoois superiores a 4 carbonos (ésteres **2d-h**), a temperatura da reação foi mantida fixa em 90°C para evitar a degradação da Tianeptina, conforme mostrado na Tabela 5.

Tabela 5: Condições reacionais e rendimento dos ésteres **2a-h**.

				
Éster (n)	T _{eb.} do álcool (°C)	T da reação (°C)	Tempo de reação	Rendimento
2a (n=0)	65	65	1h	80%
2b (n=1)	78	78	1h	97%
2c (n=2)	97	97	1h	90%
2d (n=3)	118	90	3h	88%
2e (n=4)	138	90	3h	82%
2f (n=5)	157	90	3h	82%
2g (n=6)	176	90	3h	96%
2h (n=7)	195	90	3h	64%

Conforme pode ser observado na tabela acima, a diminuição da temperatura e o aumento do tempo de reação não diminuiram os rendimentos. Apenas para o éster derivado do álcool octílico observou-se um rendimento inferior a 80%. O baixo rendimento para obtenção do éster **2h** pode estar relacionado à alta temperatura de ebulição do álcool, o que dificultou sua remoção em alto vácuo. Além disso, a presença do álcool pode ter aumentado o coeficiente de solubilidade do éster na água durante o tratamento da reação.

Após o término da reação o produto bruto foi purificado por cromatografia em coluna, utilizando uma mistura de hexano e acetato de etila como eluentes. Os produtos foram caracterizados por espectroscopia de RMN de ¹H, ¹³C, infravermelho e espectrometria de massas, conforme consta no artigo.¹⁷³ A seguir a análise dos espectros de RMN de ¹H, ¹³C e infravermelho do éster **2e**, com 5 carbonos na cadeia alquílica lateral que foi sintetizado durante o período do doutorado.

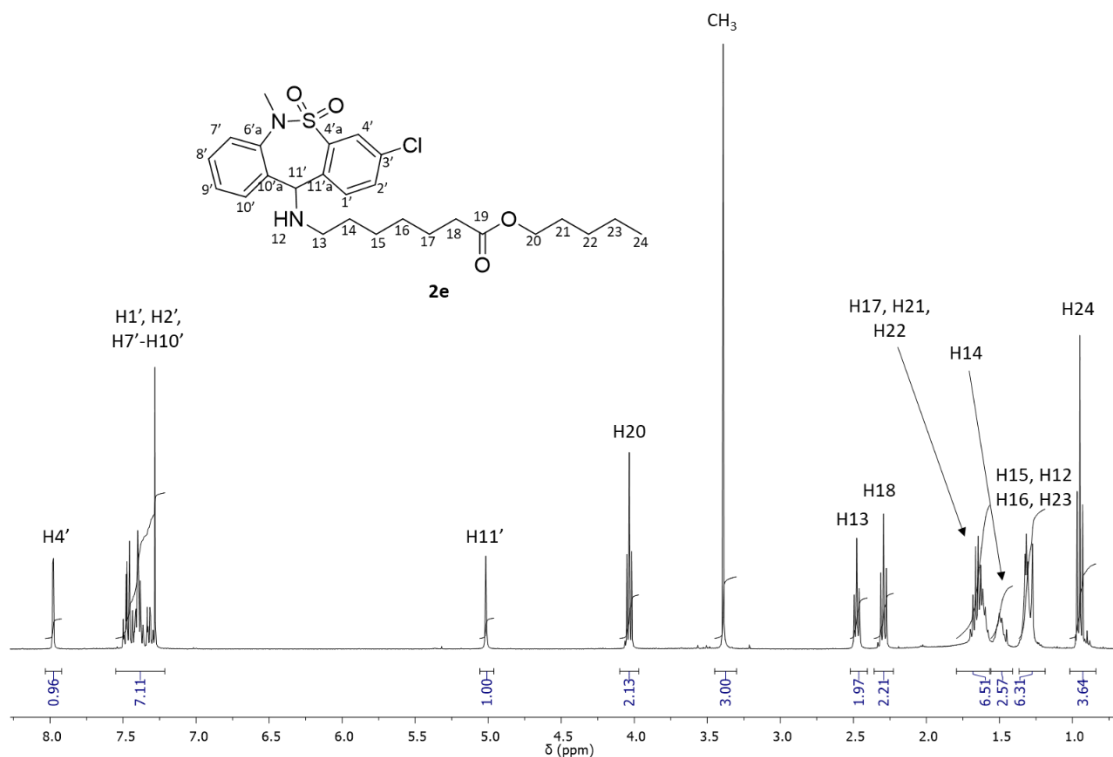


Figura 27: Espectro de RMN de ^1H (CDCl_3 , 400 MHz) do éster tianeptínico **2e**.

No espectro de RMN de ^1H do éster tianeptínico **2e** (Figura 27) podem ser observados em 0,95 ppm um tripleto ($J = 7,4$ Hz) referente aos três hidrogênios H24, em 1,37 – 1,20 ppm um multipletto referente a sobreposição dos sinais de H15, H16, H23 e possivelmente o hidrogênio ligado ao átomo de nitrogênio H12. Em 1,56 – 1,41 ppm há um multipletto referente aos hidrogênios H14 e em 1,74 – 1,56 ppm há o multipletto referente a sobreposição dos sinais de H17, H21 e H22. Em 2,29 ppm há o tripleto ($J = 7,5$ Hz) referente aos hidrogênios H18 e em 2,48 ppm há o tripleto ($J = 7,1$ Hz) referente aos hidrogênios H13. Em 3,39 aparece um singletto bastante intenso referente a metila ligada ao átomo de nitrogênio do sistema tricíclico. Em 4,03 ppm há o tripleto ($J = 6,7$ Hz) referente aos hidrogênios H20 e em 5,02 ppm há o singletto do hidrogênio do carbono quiral H11'. Na região dos aromáticos, em 7,54 – 7,30 há a sobreposição dos sinais dos hidrogênios do sistema tricíclico e em 7,98 ppm há um dubleto ($J = 2,1$ Hz) referente ao acoplamento em *meta* entre hidrogênio H4' e H2'.

Já no espectro de RMN de ^{13}C -APT (Figura 28) na região alifática, podem ser observados com fase oposta aos demais carbonos, os sinais dos carbonos C24, a metila do sistema tricíclico e C11' em 10,38, 38,89 e 66,49 ppm, respectivamente. Os demais

carbonos metilênicos tanto da tianeptina quanto da cadeia lateral encontram-se atribuídos conforme mostrado na figura. Na região aromática, podem ser observados mais blindados os sinais dos carbonos ligados a um átomo de hidrogênio (em ppm, 132,15 – C2', 131,16 – C1', 130,02 – C10', 129,32 – C8', 128,39 – C9', 128,10 – C4' e 128,00 – C7') enquanto os carbonos quaternários aparecem mais desblindados (em ppm, 140,41 – C4'a, 138,76 – C6'a, 138,55 – C10'a, 136,94 – C11'a, 134,22 – C3'). Por fim, em 174,12 ppm aparece o sinal referente ao carbono carbonílico C19.

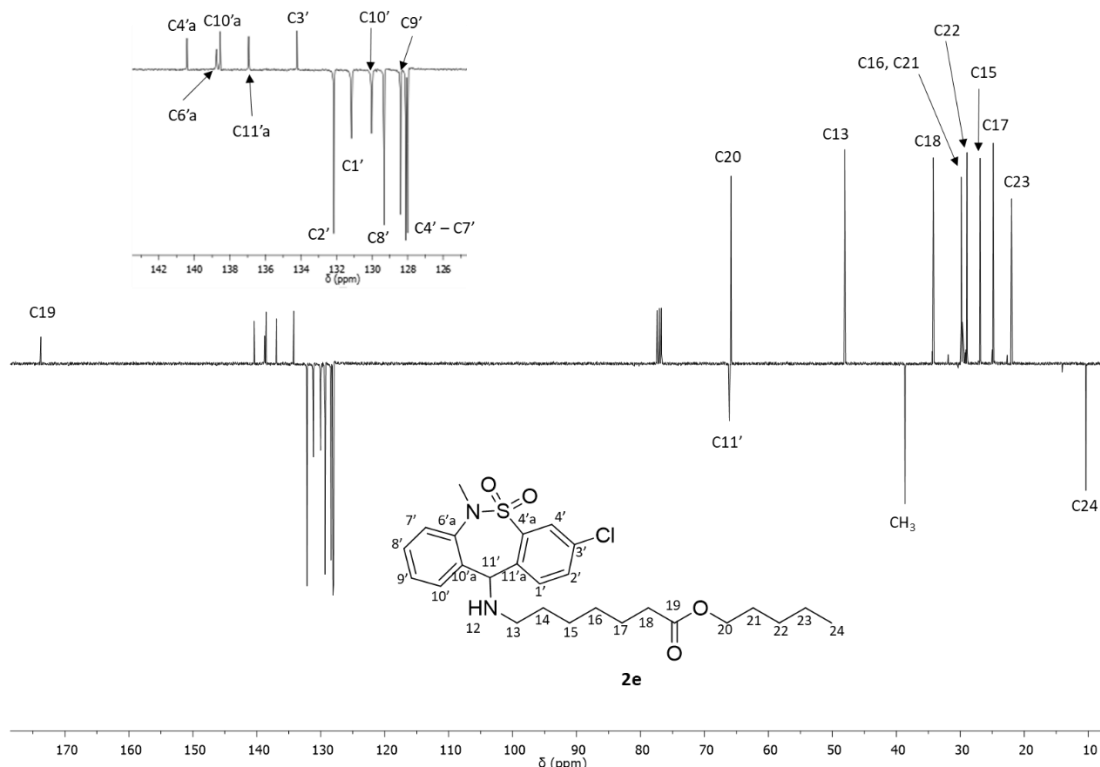


Figura 28: Espectro de RMN de ^{13}C -APT (CDCl_3 , 101 MHz) do éster tianeptínico **2e**.

No espectro de infravermelho do éster **2e** (Figura 29) podem ser observadas as bandas de estiramento da ligação N-H em 3341 cm^{-1} , em 3061 cm^{-1} a banda de estiramento da ligação C-H de hidrogênios ligados a carbonos sp^2 , em 2933 e 2857 cm^{-1} as bandas de estiramento da ligação C-H de hidrogênios ligados a carbonos sp^3 , em 1730 cm^{-1} a banda de estiramento da carbonila de éster, em 1577 cm^{-1} a banda de deformação angular da ligação N-H, em 1350 cm^{-1} a banda de estiramento da ligação S-O e em 1153 cm^{-1} a banda de estiramento da ligação C-O.

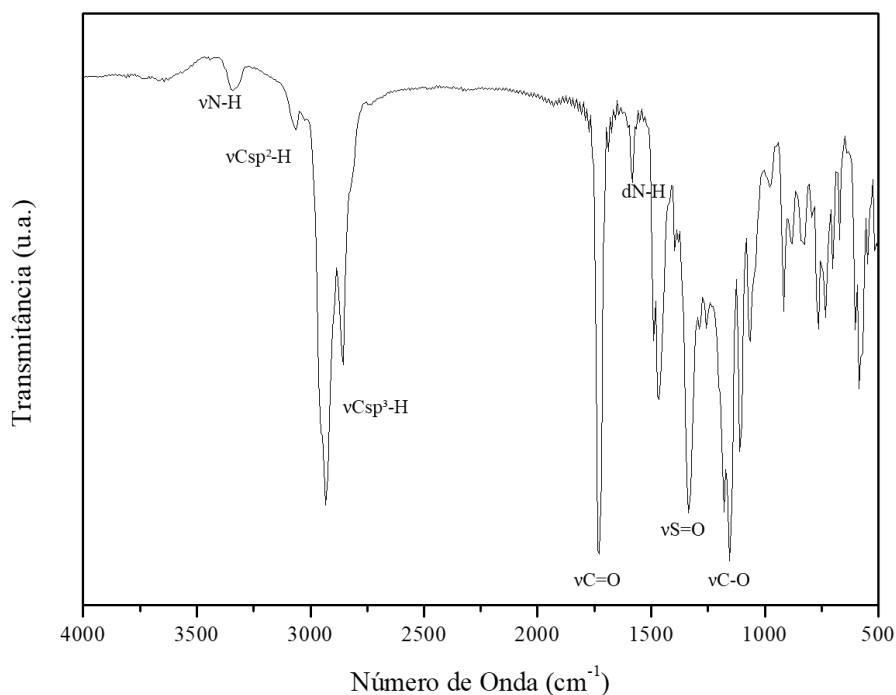


Figura 29: Espectro na região do infravermelho do éster tianeptínico **2e**.

5.1.2. Avaliação biológica

Dada a excelente atividade inibitória das ChE apresentada pelos híbridos tacrina-tianeptina¹², buscou-se avaliar se os ésteres tianeptínicos também apresentavam alguma atividade frente às enzimas. Foram avaliados os ésteres com cadeia lateral de quatro e de seis carbonos, uma vez que para estes tamanhos de cadeia espaçadora foi observado dupla interação enzimática em trabalhos anteriores do grupo.¹²⁻¹⁴ Contudo, nenhuma das moléculas avaliadas apresentou atividade inibitória frente às ChE.

5.1.3. Interações intermoleculares dos ésteres com a proteína BSA

A tianeptina interage fortemente com a proteína plasmática albumina sérica devido à presença da função ácido carboxílico, o que reflete em um baixo volume de distribuição, isto é, o fármaco encontra-se pouco livre no sangue. Em outras palavras, quanto maior a porção de fármaco ligado às proteínas plasmáticas, menos fármaco livre.^{83,84} Sendo as proteínas albuminas as mais abundantes do plasma, a interação com

essas proteínas pode resultar desde mudanças na absorção, metabolismo e excreção, até na atenuação da potência do fármaco. Dessa forma, utilizou-se a BSA como modelo para estudo da interação dos ésteres com a proteína albumina.

Os espectros de fluorescência da BSA foram obtidos na presença de quantidades maiores (aumento da concentração) dos ésteres e também da tianeptina, na faixa de 290-450 nm, nas temperaturas de 20, 30 e 40°C (293, 303 e 313K, respectivamente) em tampão fosfato PBS. O máximo de emissão de fluorescência da BSA em tampão PBS ocorre em 346 nm quando excitado em 280 nm (valor obtido do espectro de absorção no UV). Tanto a tianeptina como os ésteres não apresentam fluorescência no comprimento de excitação de 280 nm, de forma que não ocorre a excitação direta nesse comprimento de onda.

Conforme mostrado na Figura 30 a fluorescência intrínseca da BSA foi utilizada para monitorar a interação da tianeptina e dos ésteres **2a-h**. A fluorescência da BSA diminui gradativamente com o aumento da concentração da tianeptina e dos ésteres **2a-h**, enquanto o máximo de emissão e o formato dos picos permanecem inalterados. As concentrações variaram entre 0 e 25 μM . Para concentrações acima de 25 μM , era observada a precipitação dos ésteres, o que se mostrou um desafio, pois a presença de sólidos em solução pode causar espelhamentos na luz e, por consequência, erros nas medidas. A tianeptina, por outro lado, mostrou-se solúvel mesmo em concentrações superiores a 500 μM . Para poder comparar os modos de interação da tianeptina e os ésteres **2a-h** com a proteína BSA, fixou-se a concentração entre 0 e 25 μM .

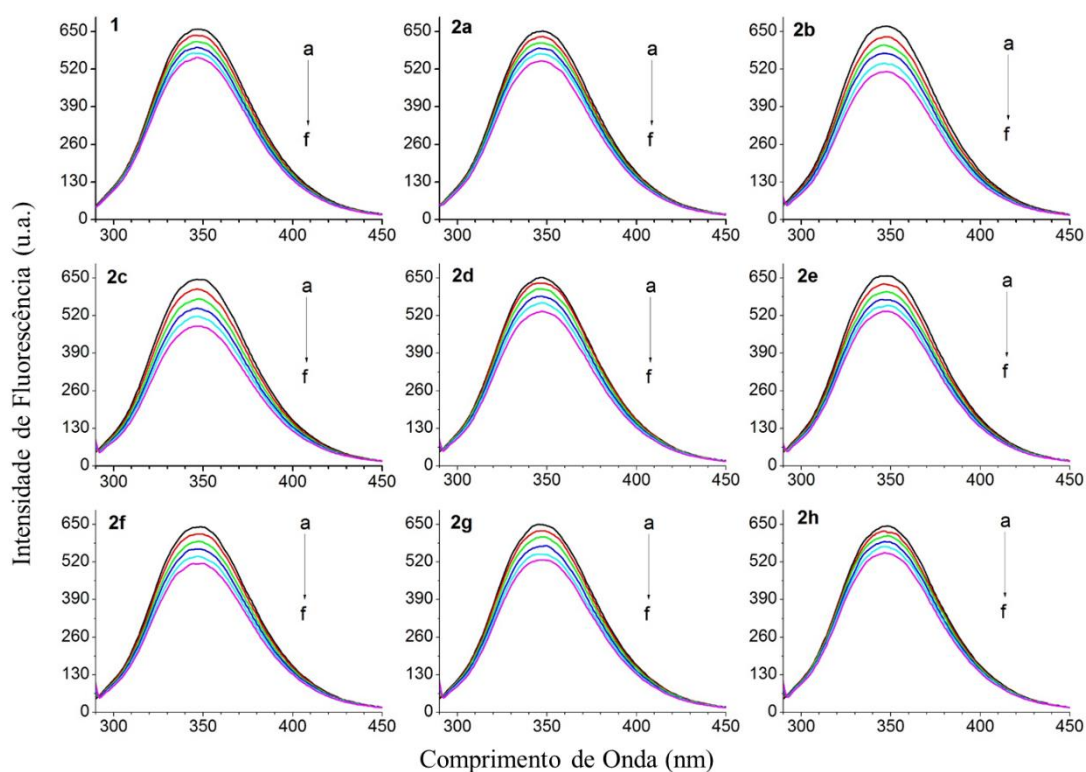


Figura 30: Efeitos da Tianeptina **1** e dos ésteres **2a-h** no espectro de fluorescência da BSA a 20°C, $\lambda_{\text{ex}} = 280 \text{ nm}$; $[\text{BSA}] = 5 \mu\text{M}$; $[\mathbf{1}, \mathbf{2a-h}] (\mu\text{M}) = 0$ (a), 5 (b), 10 (c), 15 (d), 20 (e) e 25 (f), respectivamente. (pH = 7,4 tampão PBS).

A fluorescência da BSA é atribuída principalmente aos resíduos de triptofano, sendo facilmente suprimida uma vez que o triptofano pode doar facilmente um elétron.^{175, 176} A supressão de fluorescência pode seguir o mecanismo estático, por meio de formação de complexo no estado fundamental, ou o mecanismo dinâmico, que ocorre por meio de colisões com transferência de energia.^{177,178} Ambos dependem da temperatura e podem ser descritos pela equação de Stern-Volmer (vide equação (1) – página 42). O aumento da temperatura resulta em uma maior velocidade de difusão das moléculas e, portanto, maiores taxas de colisões. Por outro lado, o aumento da temperatura desestabiliza a formação de complexos, resultando em menores taxas de supressão via mecanismo estático.¹⁴⁰

As constantes de Stern-Volmer para três diferentes temperaturas podem ser observadas na Tabela 6. Na Figura 31 podem ser observados os gráficos de $F_0/F \times [Q]$ para a tianeptina e os ésteres **2a-h**. Como pode ser observado, todos apresentaram uma

relação linear a cada temperatura, indicando que apenas um tipo de mecanismo predomina, seja ele dinâmico ou estático. Para a tianeptina observa-se uma interação considerável com a BSA o que pode ser constatado a partir dos altos valores de K_{SV} que aumentam com a temperatura ($7,1 \times 10^3 \text{ L.mol}^{-1}$ a 20°C e $13,1 \times 10^3 \text{ L.mol}^{-1}$ a 40°C), o que sugere um mecanismo dinâmico de supressão da fluorescência da BSA.

Para os ésteres tianeptínicos, a taxa de supressão de fluorescência da BSA a 20°C aumenta na seguinte ordem: **2a** ~ **2h** < **2e** < **2d** ~ **2f** < **2g** < **2b** < **2c**. De forma inesperada, os ésteres **2a** e **2h** com o menor e maior tamanho de cadeia lateral, respectivamente, apresentaram praticamente o mesmo valor de K_{SV} a 20°C . Por outro lado, a temperaturas maiores, a intensidade de fluorescência da BSA permaneceu quase inalterada na presença de quantidades crescentes dos ésteres, principalmente para os ésteres com cadeias laterais com mais de quatro carbonos. Dessa forma, o cálculo das constantes K_{SV} a 30 e 40°C foi crítico devido as limitações experimentais, como variações da temperatura da sala do equipamento, bem como variações da temperatura da cubeta de leitura das medidas. Apesar disso, é possível observar que para os ésteres a constante K_{SV} diminui com a temperatura em oposição ao observado para a tianeptina, o que pode indicar um mecanismo de supressão estático da fluorescência da BSA para os ésteres **2a-h** (Figura 31).

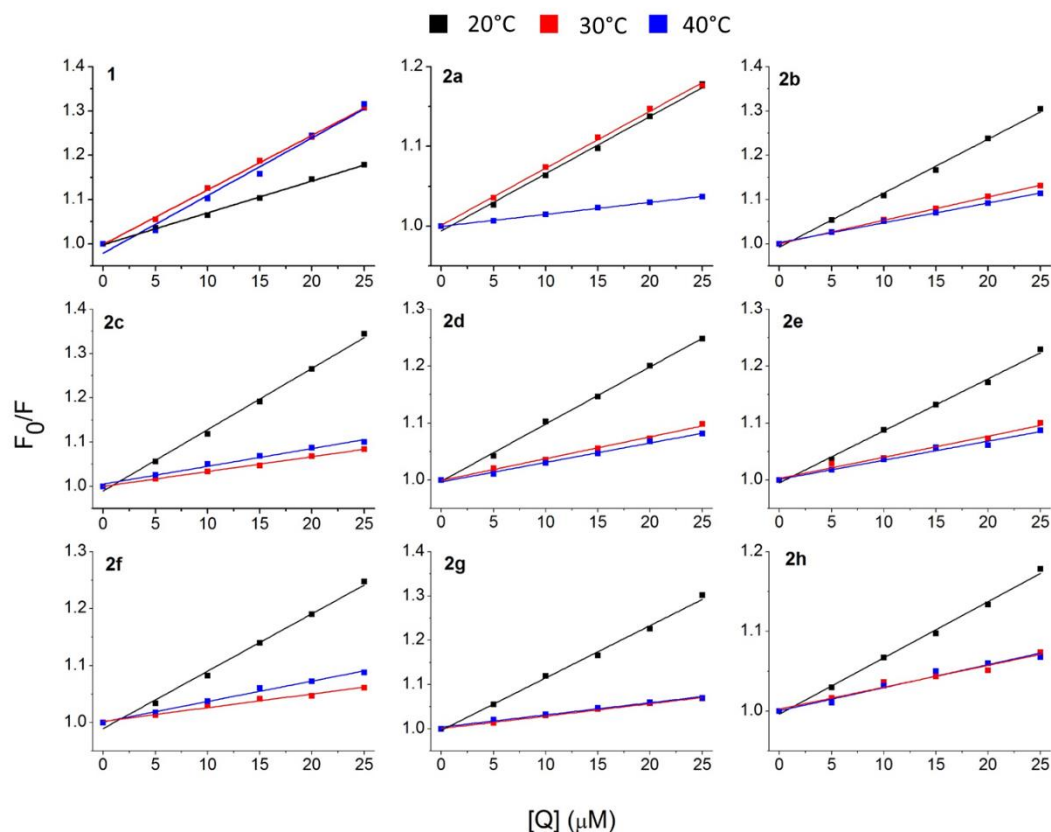


Figura 31: Gráficos de Stern-Volmer da supressão de fluorescência da BSA pela Tianeptina e pelos ésteres **2a-h**. [BSA] = 5 μM ; [1, 2a-h] (μM) = 0 (a), 5 (b), 10 (c), 15 (d), 20 (e) e 25 (f), respectivamente. (pH = 7,4 tampão PBS).

As taxas de supressão da fluorescência da BSA k_q nas temperaturas estudadas foram obtidas à partir da Equação (1), utilizando $\tau_0 = 10^{-8}\text{s}$.¹⁴⁰ Como pode ser observado na Tabela 6, para a tianeptina a taxa de supressão da fluorescência aumenta com a temperatura, o que indica que o mecanismo de supressão da BSA pela tianeptina se dê por meio de mecanismo dinâmico. Por outro lado, os valores de k_q para todas as temperaturas estudadas foram maiores que taxa de difusão limite para uma biomolécula ($2,0 \times 10^{10} \text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$)¹⁴⁰ indicando que o mecanismo estático também contribui para a supressão de fluorescência. Para os ésteres, os valores de k_q também foram superiores às taxas limite de difusão para uma biomolécula, sugerindo um mecanismo de supressão de fluorescência da BSA estático, o que está de acordo com os valores de K_{SV} obtidos.

Tabela 6: Constantes de Stern-Volmer (K_{SV} kq), constante de ligação (K_b) e número de sítios ligantes (n) para a interação entre BSA-tianeptina **1** e para BSA-ésteres **2a-h**^a

Molécula	T (°C)	$K_{sv} \times 10^3$ (M^{-1})	$k_q \times 10^{11}$ ($M^{-1} s^{-1}$)	R	$K_b \times 10^4$ (M^{-1})	n	R
1	20	7,1	7,1	0,997	0,79	1,01	0,992
	30	12,3	12,3	0,998	2,29	1,05	0,995
	40	13,0	13,0	0,981	218,7	1,48	0,998
2a	20	7,1	7,1	0,995	5,88	1,19	0,998
	30	7,2	7,2	0,997	0,74	1,00	0,998
	40	1,5	1,5	0,997	0,36	1,08	0,995
2b	20	12,1	12,1	0,995	2,81	1,08	0,998
	30	5,2	5,2	0,999	0,52	0,99	0,999
	40	4,4	4,4	0,996	0,14	0,89	0,999
2c	20	13,8	13,8	0,995	5,37	1,13	0,999
	30	3,3	3,3	0,997	0,25	0,98	0,995
	40	4,0	4,0	0,982	0,08	0,85	0,993
2d	20	10,0	10,0	0,998	2,63	1,09	0,993
	30	3,8	3,8	0,993	0,19	0,94	0,992
	40	3,4	3,4	0,992	7,24	1,28	0,989
2e	20	9,1	9,1	0,995	3,98	1,13	0,993
	30	3,7	3,7	0,977	0,28	0,76	0,933
	40	3,3	3,3	0,977	0,36	1,00	0,995
2f	20	10,0	10,0	0,992	13,18	1,24	0,998
	30	2,4	2,4	0,979	0,12	0,93	0,973
	40	3,5	3,5	0,991	0,40	1,01	0,989
2g	20	11,8	11,8	0,994	1,58	1,03	0,995
	30	2,7	2,7	0,994	0,34	1,01	0,990
	40	2,7	2,7	0,985	0,02	0,77	0,995
2h	20	7,0	7,0	0,994	1,77	1,09	0,997
	30	2,7	2,7	0,964	0,08	0,89	0,981
	40	2,8	2,8	0,967	2,04	1,17	0,943

a: R é o coeficiente de correlação.

Também foram obtidos os espectros de UV dos ésteres, da BSA e do sistema BSA-éster (Figura 32). Tanto a tianeptina quanto os ésteres absorvem em regiões semelhantes à BSA. O espectro da tianeptina apresenta duas bandas em 276 e 284 nm, sendo que para

os ésteres não houveram modificações no comprimento de onda nem no formato das bandas de absorção. O espectro de absorção do sistema BSA-éster foi medido com o éster de dois carbonos **2b**, e não apresentou mudanças no formato ou na posição do pico de absorção quando comparado à BSA sozinha. Isso indica que a interação do éster com a proteína não provoca mudanças no microambiente da BSA.¹⁷⁹

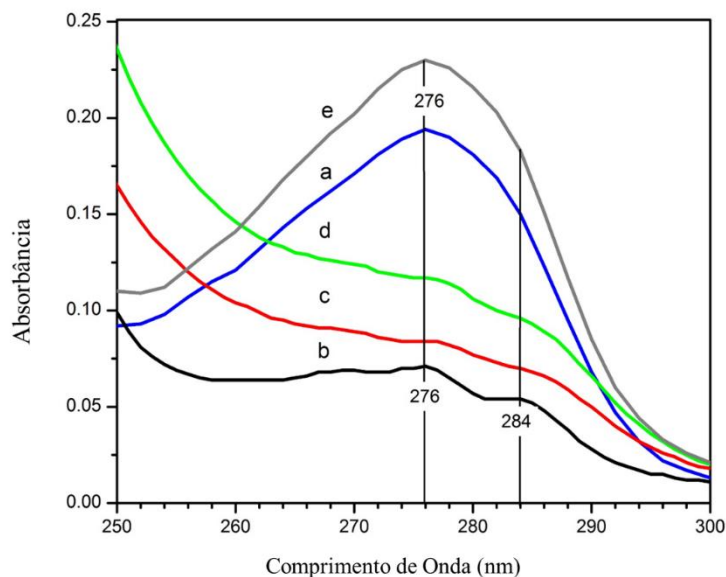


Figura 32: Espectro de absorção no UV-vis da [BSA] = 5 µM em PBS (curva a); [Tianeptina] = 20 µM em PBS/DMSO (curva b); [**2b**] = 20 µM em PBS/DMSO (curva c); [**2h**] = 20 µM em PBS/DMSO (curva d); e [complexo BSA:**2b**] = 5:20 µM em PBS/DMSO (curva e). T = 20°C, pH = 7,4.

A partir da análise do espectro de absorção no UV-vis, fica claro que a supressão da fluorescência da BSA pela tianeptina e seus ésteres não envolve um mecanismo de transferência de energia. De acordo a teoria de Föster para a transferência de energia ocorrer entre uma molécula (doador) para outra molécula (aceptor) os espectros de absorção no UV-vis e de emissão de fluorescência de ambas as moléculas precisam sobrepor-se.¹⁸⁰ Conforme pode ser observado na Figura 33 tanto o espectro de absorção da tianeptina como do éster **2b** não sobrepõem com o espectro de emissão de fluorescência da BSA, de modo que a transferência de energia entre proteína e molécula não ocorre.

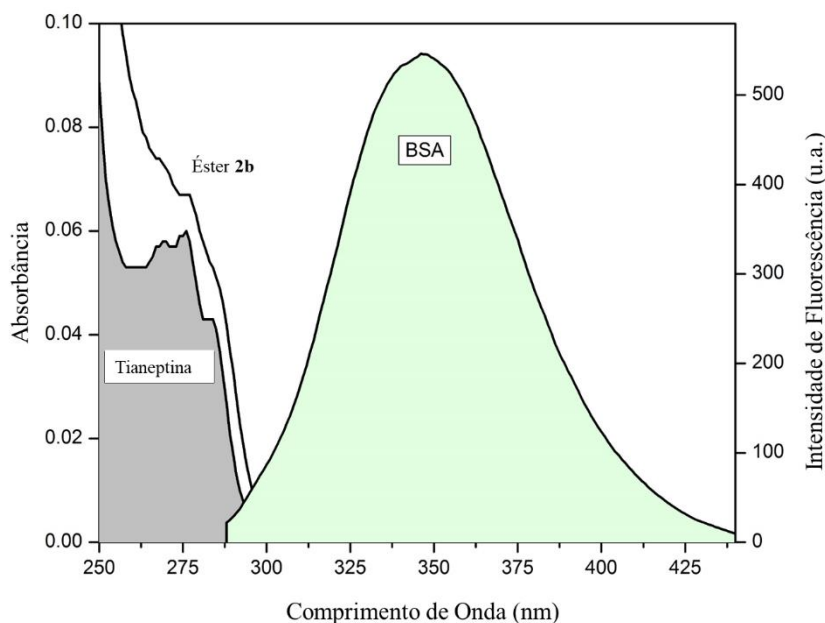


Figura 33: Sobreposição do espectro de emissão de fluorescência ($\lambda_{exc} = 280 \text{ nm}$) com os espectros de absorção no UV-vis da [tianeptina] = $20 \mu\text{M}$ e do éster [2b] = $5 \mu\text{M}$, em PBS, pH = 7,4, 25°C .

Também foi possível obter a constante de ligação (K_b) e o número de sítios ligantes (n) a partir dos dados dos espectros de fluorescência, utilizando a equação (2).¹⁴⁰

$$\log\left(\frac{F_0 - F}{F}\right) = \log K_b + n \log [Q] \quad (2)$$

Na Figura 34 podem ser observados os gráficos do duplo logaritmo e na Tabela 6 os respectivos valores calculados. O número de sítio ligantes (n) é igual a 1 em todas as temperaturas estudadas, indicando apenas um sítio de ligação entre a BSA e os ésteres **2a-h**. Para a tianeptina observou-se que $n = 1,48$ na temperatura de 40°C , indicando que um segundo sítio passou a ser ocupado pela molécula na proteína. Quanto à constante de ligação (K_b) pode-se observar que esta foi praticamente independente da temperatura. Para tianeptina percebe-se a alta afinidade a 40°C , quanto para os ésteres, na mesma temperatura, observou-se que a ligação com a proteína era muito menor. Considerando as constantes de ligação da tianeptina com a HSA na faixa de $8,9 \times 10^4 - 3,6 \times 10^6 \text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}$, percebe-se que tanto a tianeptina quanto os ésteres possuem grande afinidade pela BSA e as constantes de ligação a 20°C aumentam na seguinte ordem: $1 < 2g < 2h < 2d < 2b < 2e < 2c < 2a < 2f$. O éster **2f** com seis carbonos na cadeia lateral apresentou a maior afinidade pela proteína, enquanto a tianeptina tem a menor. Isso indica que o tamanho de

seis carbonos seja o tamanho limite para interação com a BSA. Para os ésteres com cadeias de 7 e 8 carbonos **2g** e **2h**, respectivamente, percebe-se que a interação com a proteína volta a ser semelhante à da tianeptina.

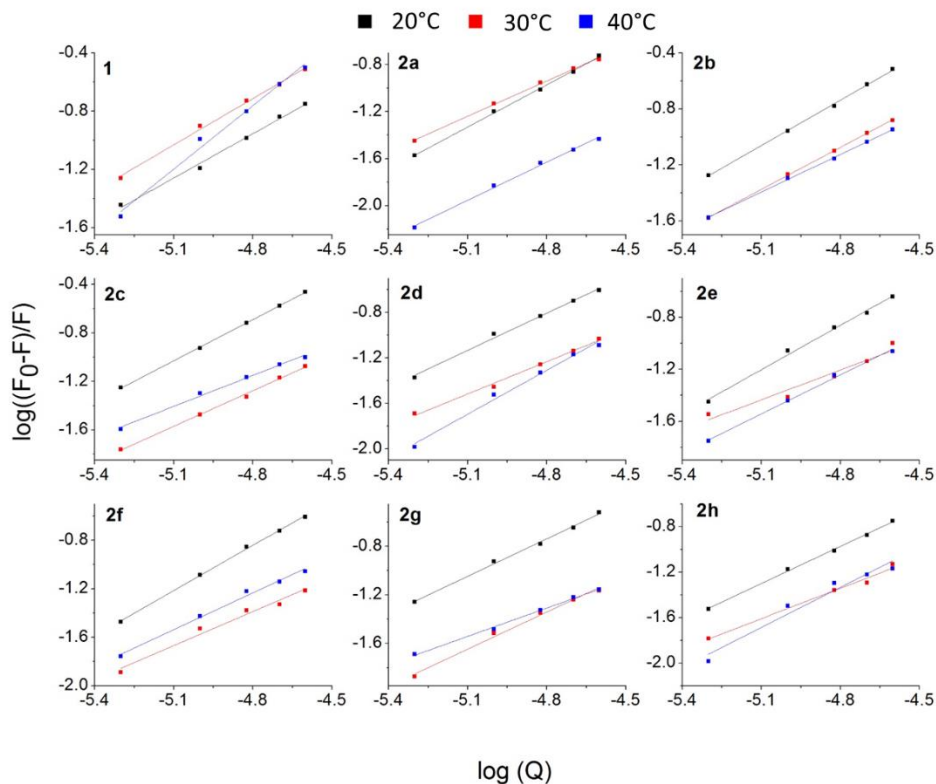


Figura 34: Gráficos de $\log((F_0-F)/F)$ vs $\log(Q)$ para tianeptina **1** e para os ésteres **2a-h**, a três diferentes temperaturas. $[BSA] = 5 \mu M$; $[1, 2a-h] (\mu M) = 0$ (a), 5 (b), 10 (c), 15 (d), 20 (e) e 25 (f), respectivamente. (pH = 7,4 tampão PBS).

5.1.4. Modelagem molecular – BSA

Segundo dados da literatura, a tianeptina interage com a HSA nos sítios ligantes do subdomínio IIA.¹⁸¹ De acordo com a classificação de Sudlow^{182,183} compostos que se ligam a este subdomínio contém tipicamente uma carga periférica negativa. A tianeptina é *zwitterion*, com dois valores de pKa, 4,4 (ácido) e 6,8 (básico).¹⁸⁴ Desse modo, em tampão PBS a tianeptina encontra-se na sua forma aniônica. Já os ésteres apresentam apenas uma constante de dissociação, uma vez que o grupo ácido carboxílico não existe mais. Essa diferença pode indicar que os ésteres estejam acomodados em um sítio diferente da tianeptina. Essa investigação foi realizada com auxílio de estudos de modelagem molecular, realizados em parceria com o Prof. Dr. Paulo Augusto Netz.

Os cálculos de modelagem molecular foram realizados utilizando o *software* AutoDockVina, conforme descrito na parte experimental. A partir dos cálculos foi possível identificar a localização dos ligantes e mapear o padrão de interações. Na Figura 35 podem ser observadas a sobreposição das posições com maior afinidade (poses com os valores mais negativos) para cada éster e também para a Tianeptina, na vizinhança de cada resíduo de triptofano.

A vizinhança do Trp134 corresponde a região IB e a vizinhança do Trp213 a região IIA, seguindo a classificação de Sudlow.¹⁸³ De acordo com os resultados de modelagem molecular, os valores obtidos para a região IIA foram mais negativos, indicando maior afinidade na proximidade do Trp213 do que em Trp134. Esses resultados foram semelhantes aos encontrados na literatura para a interação com a BSA da molécula de estazolam¹⁵³ e ramipril¹⁵², que são outros fármacos que também interagem fortemente com a BSA. Esses resultados, além de apontarem para a interação mais favorável com a região IIA, ajudam a explicar o número de sítios ligantes igual a 1 e também suportam a hipótese do mecanismo estático de supressão da fluorescência da BSA, dada a estabilidade do complexo formado.

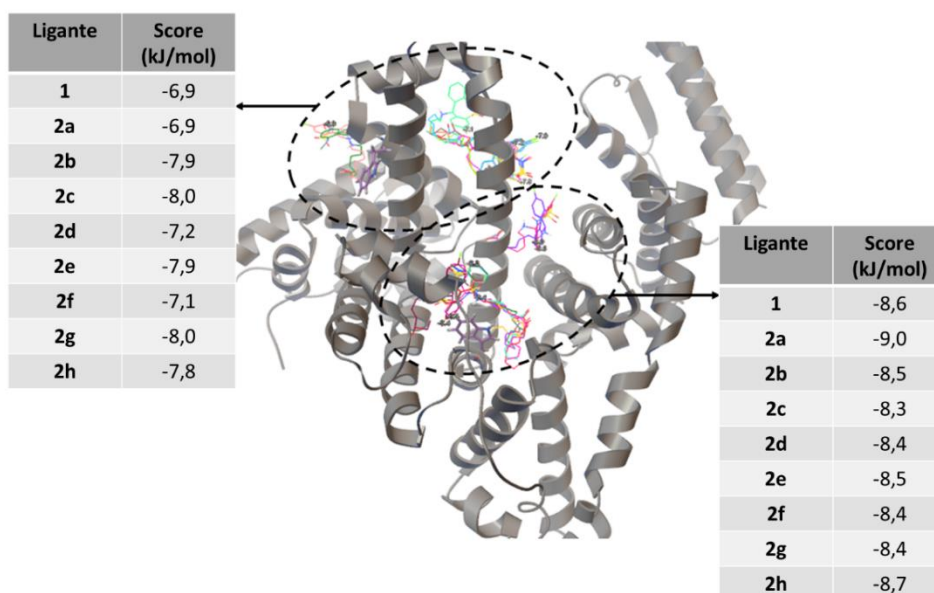


Figura 35: Melhores posições obtidas à partir da modelagem molecular para a tianeptina **1** e para os ésteres **2a-h**. Sítio IB na esquerda e IIA na direita.

Na Figura 36 podem ser observados detalhadamente a interação do éster **2f** (cadeia lateral de seis carbonos) com a BSA. O éster interage com o Trp213 por meio de

interações de van der Waals e realiza ligação de hidrogênio com o resíduo de His241. O padrão de interações encontrado é consistente com a alta afinidade de ligação obtido com os cálculos de modelagem molecular, além de corroborar para a hipótese do mecanismo estático de supressão de fluorescência da proteína.

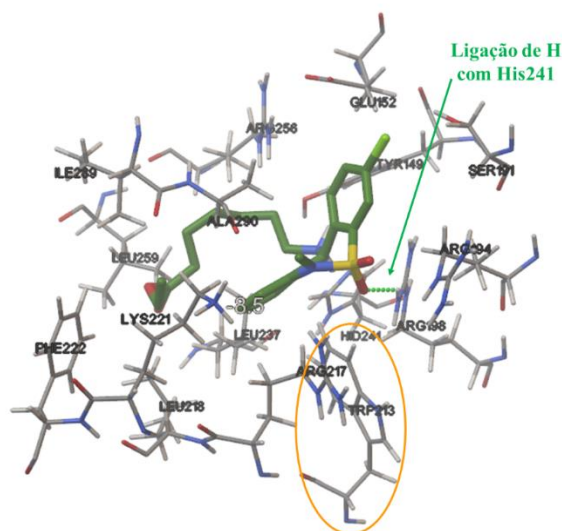


Figura 36: Resíduos de amino ácidos ao redor do éster **2f** no sítio IIA da BSA.

5.1.5. Conclusões parciais

A síntese de ésteres do fármaco tianeptina utilizando a metodologia de Fisher mostrou-se eficiente e com bons rendimentos (64-96 %). Por se tratar de uma molécula com alto valor agregado, as modificações estruturais realizadas na tianeptina com altos rendimentos podem ser úteis no desenvolvimento de pró-fármacos ou até mesmo no caso de novos híbridos envolvendo o núcleo. Além disso, a expansão da série de moléculas contendo variações de um átomo de carbono, permitiu melhores avaliações da relação estrutura e atividade frente a BSA. Os resultados experimentais mostraram que a tianeptina suprime a intensidade de fluorescência da BSA mais eficientemente que os ésteres. O aumento da K_{SV} com o aumento da temperatura indica um mecanismo de supressão dinâmico para a tianeptina, enquanto para os ésteres o mecanismo estático foi observado. Os resultados de modelagem molecular corroboram para a hipótese do mecanismo estático.

6. Considerações Finais

A química medicinal ainda é pautada na lógica “uma molécula, um alvo”. Milhares de moléculas são sintetizadas todos os anos, porém a grande maioria acaba sendo descartada nos estágios iniciais de pesquisa por não serem consideradas eficientes frente aos alvos para os quais foram construídas ou pela toxicidade. No caso da DA não tem sido diferente. Centenas de trabalhos podem ser encontrados na literatura propondo novas moléculas como potenciais candidatos para o tratamento da DA, porém sem chegar aos estágios clínicos. Mesmo no caso dos híbridos multialvo, nenhuma molécula híbrida chegou aos estágios clínicos com humanos até o momento.

Porém, a DA é uma doença multifatorial, de modo que as demais hipóteses não podem ser descartadas. A hipótese colinérgica ainda é uma das mais estudadas e busca a atenuação dos sintomas da doença pela inibição das enzimas colinesterases. Neste trabalho foram estudados uma série de núcleos com importância biológica como a Tianeptina, tacrina, lofina e cinâmico para a construção de moléculas híbridas. Todas as 38 moléculas sintetizadas nesse trabalho tiveram como alvo as enzimas colinesterases, porém apenas 17 apresentaram inibição das enzimas AChE e BuChE.

Os resultados mais promissores obtidos nesse trabalho envolvem a série de híbridos tacrina-cinamamida (**7a-h** e **8a-h**) e tacrina-alcóxi-cinamamida (**44**), que apresentaram inibição das enzimas colinesterases na escala de nanomolar. A alta atividade dos híbridos pode estar relacionada ao fato de que a tacrina se ancora no fundo do CAS da enzima AChE, enquanto a porção cinâmico interage com o PAS, segundo os estudos de modelagem molecular. Além disso, os híbridos 6-cloro-tacrina-cinamamida **8e** e **8f** com cadeias espaçadoras de seis e sete carbonos, respectivamente, apresentaram baixa toxicidade frente a três tipos celulares distintos, o que torna os compostos promissores como líderes. Isto é, compostos que ainda podem ser funcionalizados tanto na porção cinâmico, quanto no núcleo tacrina, a fim de promover aumento da atividade e melhora de propriedades farmacodinâmicas e farmacocinéticas. Quanto ao caráter multifatorial dos híbridos, mais ensaios precisam ser realizados, como capacidade antioxidante, anti β -amiloide, anti MAO, entre outros.

Conhecer as propriedades fotofísicas de uma molécula permite que diversas outras aplicações possam ser buscadas. Os estudos de interação com a proteína BSA via espectroscopia de fluorescência ainda são uma maneira rápida e barata de obter informações sobre a interação entre pequenas moléculas e proteínas e constituem uma

etapa importante no conhecimento de novos compostos com potencial aplicação biológica. Mesmo não tendo sido ativos frente às enzimas colinesterases, os ésteres tianeptínicos e os híbridos lofina-cinamamida representam moléculas com possíveis propriedades farmacológicas relevantes. A espectroscopia de fluorescência evidenciou a ocorrência da interação, enquanto os estudos de modelagem molecular permitiram identificar qual o sítio preferencial de ligação com a proteína BSA. Esses compostos, além de compor a biblioteca de estruturas do grupo, podem posteriormente apresentar atividade frente a outros alvos.

Os híbridos tacrina-alcóxi-cinamamida e lofina-alcóxi-cinamamida também tiveram suas propriedades fotofísicas estudadas neste trabalho. O híbrido **44** apresentou inibição das enzimas AChE e BuChE, de modo que se estima que os demais híbridos da série também apresentem interação com as enzimas. A interação enzimática aliada às propriedades de emissão de fluorescência dos compostos, pode indicar para o desenvolvimento de um biomarcador para as enzimas ChE. Desse modo, fica uma perspectiva para seguimento do trabalho.

Por fim, é preciso ressaltar que a elaboração dessa Tese foi fruto de um trabalho multidisciplinar, contendo tanto aspectos químicos, como bioquímicos e computacionais. Essa integração de conhecimentos de diferentes áreas é que tem permitido o desenvolvimento de trabalhos mais amplos e que, portanto, demandam uma formação mais completa e abrangente do pesquisador. Além disso, estimula a troca entre diferentes grupos de pesquisa. Ainda, este trabalho foi realizado inteiramente com financiamento público, sendo imprescindível que os resultados aqui apresentados sirvam em benefício da melhora da saúde de todos e que contribuam para o avanço da Ciência daqui para frente.

7. Parte experimental

7.1. Parte experimental – I

A tianeptina utilizada nesse trabalho foi extraída diretamente dos comprimidos de Stablon®. Os comprimidos foram triturados e dissolvidos em tetrahydrofurano (THF) e mantidos sob agitação e aquecimento (50°C) durante 30 minutos. A solução foi filtrada em funil de Büchner e concentrada no rotaevaporador. O produto bruto resultante foi purificado por cromatografia em coluna, utilizando sílica gel 60Å (70 – 230 mesh) como fase estacionária e uma mistura de CHCl₃:MeOH:NH₄OH (97:2,5:0,5 – pH = 11) como eluente. Após a purificação a tianeptina foi caracterizada por infravermelho e RMN de ¹H e ¹³C, e a atribuição dos sinais foi feita de acordo com a literatura.

A BSA (livre de ácidos graxos) foi comprada da INLAB Brazil e seu peso molecular foi considerado como 66 200 Da, para fim de cálculo das concentrações molares. As soluções de fármaco-proteína foram preparadas pela mistura da Tianeptina e seus ésteres e a BSA em tampão PBS. A fim de evitar a precipitação dos compostos orgânicos, as moléculas estudadas foram previamente dissolvidas em DMSO. A concentração de BSA foi mantida fixa em 5 µM, enquanto a concentração da tianeptina e seus ésteres foram variados de 0 a 25 µM. Os espectros de supressão de fluorescência foram obtidos nas temperaturas de 20, 30 e 40°C. Todas as medidas foram realizadas em triplicata, com soluções recém preparadas.

Os espectros de infravermelho foram obtidos no equipamento Varian 640-IR em discos de KBr. Os espectros de RMN de ¹H e ¹³C foram feitos em solução de CDCl₃ em um espectrômetro Varian VNMRS 300 MHz. Os deslocamentos químicos (δ) são dados em partes por milhão (ppm) a partir do sinal do tetrametilsilano ($\delta = 0,00$ ppm) como padrão interno para o RMN de ¹H ou a partir do sinal do solvente, CDCl₃ ($\delta = 77,23$ ppm) para o RMN de ¹³C. As multiplicidades são dadas como s (singleto), d (dubleto), dd (duplo dubleto), t (tripleto), m (multiplete) ou sl (singleto largo); as constantes de acoplamento (J) são dadas em Hz. Os dados de Espectrometria de Massas de Alta Resolução com Ionização *Eletrospray* (*High Resolution Mass Spectrometry with Eletrospray Ionization* - HRMS-ESI), em modo positivo, foram obtidos em um equipamento UHPLC-QTOF/MS Bruker Impact II. Os espectros de absorção na região do UV-visível foram obtidos em um Espectrofotômetro Shimadzu UV-2450PC. Os espectros de supressão de fluorescência foram obtidos em Espectrofluorímetro Shimadzu RF-5301PC.

7.2. Parte experimental - II

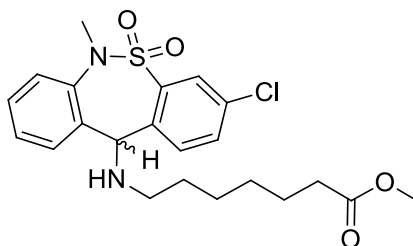
Os espectros no infravermelho (IV) foram obtidos em um espectrômetro (FTIR) Shimadzu Prestige-21 utilizando a técnica de DRIFTS sob pastilha de ZnSe. As análises de ponto de fusão foram realizadas em microscópio óptico modelo Olympus BX 41 acoplado a uma placa de aquecimento Mettler Toledo FP-90 F 982 T, utilizando-se uma taxa de aquecimento de $10\text{ }^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$. Os espectros de RMN de ^1H e ^{13}C foram obtidos em uma solução em solvente deuterado apropriado em um espectrômetro Bruker Avance 400 MHz. Os deslocamentos químicos (δ) são dados em partes por milhão (ppm) a partir do sinal do tetrametilsilano ($\delta = 0,00$ ppm) como padrão interno para o RMN de ^1H ou a partir do sinal do solvente, CDCl_3 ($\delta = 77,23$ ppm) para o RMN de ^{13}C , $\text{DMSO-}d_6$ (39,51 ppm) para o RMN de ^{13}C ; as multiplicidades são dadas como s (singleto), d (dubleto), dd (duplo dubleto), ddd (dubleto de dubleto de dubleto), t (triplete), m (multiplete) ou sl (singleto largo); as constantes de acoplamento (J) são dadas em Hz. Os dados de Espectrometria de Massas de Alta Resolução com Ionização *Eletrospray* (*High Resolution Mass Spectrometry with Eletrospray Ionization* - HRMS-ESI), em modo positivo, foram obtidos em um equipamento UHPLC-QTOF/MS Bruker Impact II. As purificações por cromatografia em coluna foram realizadas empregando como fase estacionária sílica gel 60Å (70 – 230 mesh). As análises de cromatografia em camada delgada foram realizadas em placas de alumínio com camada de 0,2 mm de sílica gel 60F-254 (Macherey-Nagel). Os reagentes foram obtidos da Sigma Aldrich, Acros Organics e TCI. A nomenclatura dos compostos foi escrita baseando-se no programa ChemDraw Ultra 14.0 (ChemBioOffice 2014), considerada a tradução do inglês.

7.3. Procedimentos sintéticos

7.3.1. Síntese dos ésteres tianeptínicos (**2a-c**)

Em um balão foi adicionado a tianeptina (100 mg, 0,22 mmol) e uma barra magnética. Então foram adicionados 2 mL do álcool e 0,05 mL de ácido sulfúrico concentrado. A mistura foi deixada sob refluxo durante 1 hora, e após resfriada a temperatura ambiente e o álcool foi removido sob vácuo. O óleo obtido foi diluído em acetato de etila (5 mL), lavado com Na_2CO_3 10 % (5 mL), extraído com água (3 x 5 mL) e seco com Na_2SO_4 . O produto bruto foi purificado por cromatografia em coluna utilizando uma mistura de hexano e acetato de etila como eluentes para resultar em um óleo amarelado.

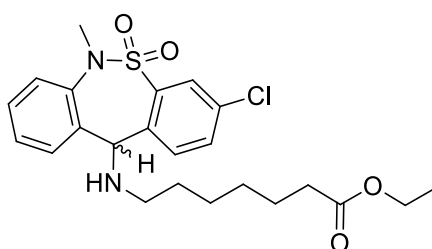
7.3.2. Éster metílico da Tianeptina (2a)



Metil 7-((3-cloro-6-metil-5,5-dioxido-6,11-di-idrodibenzo[c,f][1,2] tiazepin-11il)amino)heptanoato

Rendimento: 80 % (óleo amarelado). λ (MeOH): 210 nm. IV (KBr) ν_{max}/cm^{-1} : 3340, 3064, 2932, 2856, 1736, 1587, 1471, 1335, 1150, 581. RMN 1H (400 MHz, $CDCl_3$) δ : 1,23-1,35 (m, 4H); 1,41-1,52 (m, 2H); 1,55-1,64 (m, 2H); 1,75 (sl, NH); 2,28 (t, $J = 7,4$ Hz, 2H); 2,45 (t, $J = 7,1$ Hz, 2H); 3,37 (s, 3H); 3,65 (s, 3H); 5,00 (s, 1H); 7,28-7,32 (m, 1H); 7,33-7,41 (m, 3H); 7,41-7,49 (m, 2H); 7,96 (d, $J = 1,7$ Hz, 1H). RMN ^{13}C (100 MHz, $CDCl_3$) δ : 174,1; 140,2; 138,5; 138,4; 136,8; 134,2; 132,2; 131,2; 130,0; 129,3; 128,4; 128,1; 127,9; 66,1; 51,4; 48,0; 38,6; 33,9; 29,8; 28,9; 26,9; 24,8. HRMS (ESI) m/z , calculado: $C_{22}H_{27}ClN_2O_4S$ $[M]^+$: 451,1458, encontrado: 451,1459.

7.3.3. Éster etílico da Tianeptina (2b)

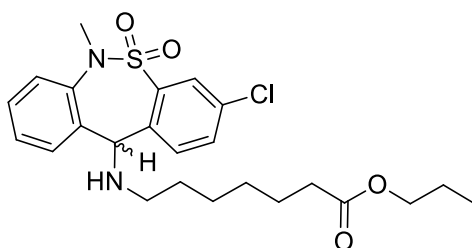


Etil 7-((3-cloro-6-metil-5,5-dioxido-6,11-di-idrodibenzo[c,f][1,2]tiazepin-11-il)amino)heptanoato

Rendimento: 97 % (óleo amarelado). λ (MeOH): 210 nm. IV (KBr) ν_{max}/cm^{-1} : 3343, 3066, 2930, 2854, 1731, 1583, 1475, 1335, 1150, 589. RMN 1H (400 MHz, $CDCl_3$) δ : 1,24 (t, $J = 7,2$ Hz, 3H); 1,27 – 1,34 (m, 4H); 1,43 – 1,53 (m, 2H); 1,55 – 1,63 (m, 2H); 2,03 (sl, NH); 2,26 (t, $J = 7,6$ Hz, 2H); 2,45 (t, $J = 7,1$ Hz, 2H); 3,36 (s, 3H), 4,11 (q, $J = 7,2$ Hz,

2H); 5,00 (s, 1H); 7,28 – 7,32 (m, 1H); 7,33 – 7,40 (m, 3H); 7,42 – 7,49 (m, 2H); 7,95 (d, $J = 2,0$ Hz, 1H). RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) δ : 173,4; 140,3; 138,7; 138,4; 136,8; 134,1; 132,1; 131,1; 130,0; 129,3; 128,3; 128,1; 127,9; 66,1; 60,1; 48,0; 38,6; 34,2; 29,8; 28,9; 26,8; 24,7; 14,2. HRMS (ESI) m/z , calculado $\text{C}_{23}\text{H}_{29}\text{ClN}_2\text{O}_4\text{S}$ $[\text{M}]^+$: 465,1614, encontrado: 465,1604.

7.3.4. Éster propílico da Tianeptina (2c)



Propil 7-((3-cloro-6-metil-5,5-dioxido-6,11-di-idrodibenzo[c,f][1,2]tiazepin-11-il)amino)heptanoato

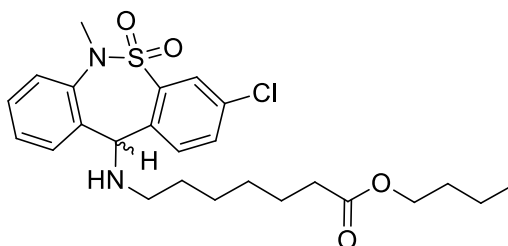
Rendimento: 90 % (óleo amarelado). λ (MeOH): 210 nm. IV (KBr) $\nu_{\text{max}}/\text{cm}^{-1}$: 3347, 3066, 2930, 2854, 1731, 1583, 1467, 1335, 1154, 584. RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ : 0,93 (t, $J = 7,4$ Hz, 3H); 1,25 (sl, NH); 1,27 – 1,35 (m, 4H); 1,43 – 1,53 (m, 2H); 1,55 – 1,69 (m, 4H); 2,27 (t, $J = 7,6$ Hz, 2H); 2,45 (t, $J = 7,2$ Hz, 2H); 3,37 (s, 3H); 4,01 (t, $J = 6,8$ Hz, 2H); 5,00 (s, 1H); 7,27 – 7,32 (m, 1H); 7,33 – 7,41 (m, 3H); 7,42 – 7,49 (m, 2H); 7,96 (d, $J = 2,0$ Hz, 1H). RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) δ : 173,7; 140,3; 138,7; 138,5; 136,9; 134,2; 132,1; 131,1; 130,0; 129,2; 128,3; 128,0; 127,9; 66,1; 65,8; 48,0; 38,6; 34,2; 29,8; 28,9; 26,8; 24,8; 21,9; 10,3. HRMS (ESI) m/z , calculado $\text{C}_{24}\text{H}_{31}\text{ClN}_2\text{O}_4\text{S}$ $[\text{M}]^+$: 479,1771, encontrado: 479,176.

7.3.5. Síntese dos ésteres tianeptínicos (2d-h)

Em um balão foi adicionado a tianeptina (100 mg, 0,22 mmol) e uma barra magnética. Então foram adicionados 2 mL do álcool e 0,05 mL de ácido sulfúrico concentrado. A mistura foi aquecida a 90°C durante 3 horas, após resfriada a temperatura

ambiente e o álcool foi removido sob vácuo. O óleo obtido foi diluído em acetato de etila (5 mL), lavado com Na₂CO₃ 10 % (5 mL), extraído com água (3 x 5 mL) e seco com Na₂SO₄. O produto bruto foi purificado por cromatografia em coluna utilizando uma mistura de hexano e acetato de etila como eluentes para resultar em um óleo amarelado.

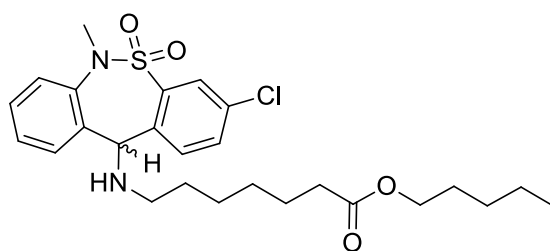
7.3.6. Éster butílico da tianeptina (2d)



Butil 7-((3-cloro-6-metil-5,5-dioxido-6,11-di-idrodibenzo[c,f][1,2]tiazepin-11-il)amino)heptanoato

Rendimento: 88 % (óleo amarelado). λ (MeOH): 210 nm. IV (KBr) ν_{max}/cm^{-1} : 3343, 3067, 2930, 2854, 1727, 1583, 1467, 1334, 1154, 585. RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ : 0,93 (t, $J = 7,3$ Hz, 3H); 1,24 – 1,32 (m, 4H); 1,32 – 1,42 (m, 2H); 1,43 – 1,52 (m, 2H); 1,55 – 1,64 (m, 4H); 1,97 (sl, NH); 2,26 (t, $J = 7,3$ Hz, 2H); 2,46 (t, $J = 7,1$ Hz, 2H); 3,37 (s, 3H); 4,06 (t, $J = 6,6$ Hz, 2H); 5,00 (s, 1H); 7,27 – 7,32 (m, 1H); 7,33 – 7,41 (m, 3H); 7,42 – 7,48 (m, 2H); 7,96 (d, $J = 2,0$ Hz, 1H). RMN ¹³C (100 MHz, CDCl₃) δ : 173,8; 140,3; 138,7; 138,5; 136,9; 134,2; 132,1; 131,1; 130,0; 129,3; 128,4; 128,1; 127,9; 66,1; 64,1; 48,0; 38,6; 34,2; 30,6; 29,8; 28,9; 26,9; 24,8; 19,1; 13,4. HRMS (ESI) m/z , calculado C₂₅H₃₃ClN₂O₄S [M]⁺: 493,1928, encontrado: 463,1929.

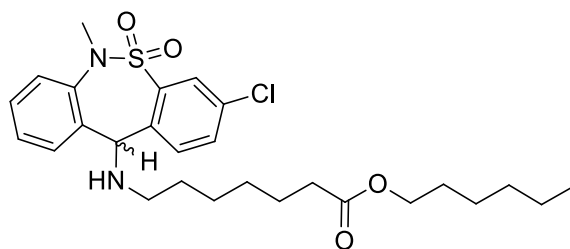
7.3.7. Éster pentílico da tianeptina (2e)



Pentil 7-((3-cloro-6-metil-5,5-dioxido-6,11-di-idrodibenzo[c,f][1,2]tiazepin-11-il)amino)heptanoato

Rendimento: 82 % (óleo amarelado). λ (MeOH): 210 nm. IV (KBr) ν_{max}/cm^{-1} : 3343, 3066, 2934, 2858, 1731, 1579, 1467, 1334, 1154, 585. RMN 1H (400 MHz, $CDCl_3$) δ : 0,90 (t, $J = 7,1$ Hz, 3H); 1,24 – 1,38 (m, 8H); 1,42 – 1,52 (m, 2H); 1,55 – 1,65 (m, 4H); 1,82 (sl, NH); 2,27 (t, $J = 7,4$ Hz, 2H); 2,46 (t, $J = 7,2$ Hz, 2H); 3,37 (s, 3H); 4,05 (t, $J = 6,8$ Hz, 2H); 5,00 (s, 1H); 7,27 – 7,32 (m, 1H); 7,33 – 7,41 (m, 3H); 7,42 – 7,48 (m, 2H); 7,9 (d, $J = 2,0$ Hz, 1H). RMN ^{13}C (100 MHz, $CDCl_3$) δ : 173,8; 140,2; 138,7; 138,4; 136,8; 134,2; 132,1; 131,1; 130,0; 129,3; 128,3; 128,1; 127,9; 66,1; 64,4; 48,0; 38,6; 34,2; 29,8; 28,9; 28,3; 28,0; 26,9; 24,8; 22,3; 13,4. HRMS (ESI) calculado $C_{26}H_{35}ClN_2O_4S$ $[M]^+$: 507,2084, encontrado: 507,2084.

7.3.8. Éster hexílico da tianeptina (2f)

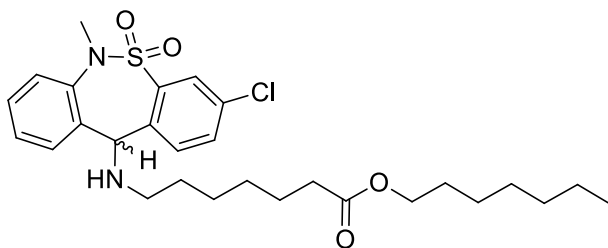


Hexil 7-((3-cloro-6-metil-5,5-dioxido-6,11-di-idrodibenzo[c,f][1,2]tiazepin-11-il)amino)heptanoato

Rendimento: 82 % (óleo amarelado). λ (MeOH): 210nm. IV (KBr) ν_{max}/cm^{-1} : 3339, 3067, 2930, 2858, 1731, 1583, 1467, 1331, 1158, 585. RMN 1H (400 MHz, $CDCl_3$) δ : 0,88 (t, $J = 6,9$ Hz, 3H); 1,23 – 1,38 (m, 10H); 1,43 – 1,52 (m, 2H); 1,55 – 1,65 (m, 4H); 2,00 (sl, NH); 2,27 (t, $J = 7,4$ Hz, 2H); 2,46 (t, $J = 7,1$ Hz, 2H); 3,37 (s, 3H); 4,05 (t, $J = 6,7$ Hz,

2H); 5,00 (s, 1H); 7,27 – 7,32 (m, 1H); 7,33 – 7,41 (m, 3H); 7,42 – 7,49 (m, 2H); 7,9 (d, $J = 2,0$ Hz, 1H). RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) δ : 173,7; 140,3; 138,6; 138,5; 136,8; 134,1; 132,1; 131,1; 130,0; 129,2; 128,3; 128,0; 127,9; 66,0; 64,3; 48,0; 38,6; 34,2; 31,3; 29,8; 28,9; 28,5; 26,8; 25,5; 24,8; 22,4; 13,9. HRMS (ESI) m/z , calculado $\text{C}_{27}\text{H}_{37}\text{ClN}_2\text{O}_4\text{S}$ $[\text{M}]^+$: 521,2241, encontrado: 521,2238.

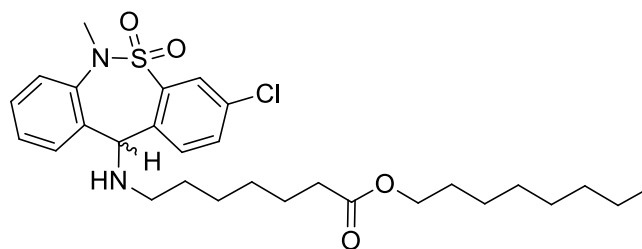
7.3.9. Éster heptílico da tianeptina (2g)



Heptil 7-((3-cloro-6-metil-5,5-dioxido-6,11-di-idrodibenzo[c,f][1,2]tiazepin-11-il)amino)heptanoato

Rendimento: 96 % (óleo amarelado). λ (MeOH): 210 nm. IV (KBr) $\nu_{\text{max}}/\text{cm}^{-1}$: 3335, 3066, 2930, 2854, 1731, 1579, 1467, 1331, 1154, 589. RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ : 0,88 (t, $J = 6,9$ Hz, 3H); 1,22 – 1,37 (m, 12H); 1,43 – 1,52 (m, 2H); 1,54 – 1,65 (m, 4H); 1,88 (sl, NH); 2,27 (t, $J = 7,6$ Hz, 2H); 2,46 (t, $J = 7,1$ Hz, 2H); 3,37 (s, 3H); 4,04 (t, $J = 6,8$ Hz, 2H); 5,00 (s, 1H); 7,27 – 7,32 (m, 1H); 7,33 – 7,41 (m, 3H); 7,42 – 7,49 (m, 2H); 7,96 (d, $J = 2,0$ Hz, 1H). RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) δ : 173,7; 140,3; 138,7; 138,5; 136,9; 134,1; 132,1; 131,1; 129,9; 129,2; 128,3; 128,0; 127,9; 66,0; 64,3; 48,0; 38,6; 34,2; 31,6; 29,8; 28,9; 28,8; 28,6; 26,8; 25,8; 24,8; 22,5; 14,0. HRMS (ESI), m/z , calculado $\text{C}_{28}\text{H}_{39}\text{ClN}_2\text{O}_4\text{S}$ $[\text{M}]^+$: 535,2397, encontrado: 535,2386.

7.3.10. Éster octílico da tianeptina (2h)



Octil 7-((3-cloro-6-metil-5,5-dioxido-6,11-di-idrodibenzo[c,f][1,2]tiazepin-11-il)amino)heptanoato (**2h**)

Rendimento: 64 % (óleo amarelado). λ (MeOH): 210 nm. IV (KBr) ν_{max}/cm^{-1} : 3339, 3062, 2926, 2854, 1731, 1583, 1463, 1334, 1155, 585. RMN 1H (400 MHz, $CDCl_3$) δ : 0,88 (t, $J = 6,9$ Hz, 3H); 1,21 – 1,37 (m, 16H); 1,42 – 1,52 (m, 2H); 1,54 – 1,64 (m, 4H); 2,24 (sl, NH); 2,27 (t, $J = 7,5$ Hz, 2H); 2,46 (t, $J = 7,1$ Hz, 2H); 3,37 (s, 3H); 4,04 (q, $J = 6,7$ Hz, 2H); 5,00 (s, 1H); 7,27 – 7,32 (m, 1H); 7,33 – 7,41 (m, 3H); 7,42 – 7,48 (m, 2H); 7,96 (d, $J = 2,0$ Hz, 1H). RMN ^{13}C (100 MHz, $CDCl_3$) δ : 173,8; 140,3; 138,6; 138,5; 136,8; 134,2; 132,1; 131,1; 130,0; 129,3; 128,3; 128,0; 127,9; 66,1; 64,4; 48,0; 38,6; 34,2; 31,7; 29,8; 29,1; 29,1; 28,9; 28,6; 26,9; 25,6; 24,8; 22,6; 14,0. HRMS (ESI), m/z , calculado $C_{28}H_{39}ClN_2O_4S$ $[H]^+$: 549,2554, encontrado: 549,2539.

8. Apêndices

APÊNDICE A – Espectros de RMN dos Compostos Sintetizados

9. Referências

-
- ¹ Wang, N.; Qiu, P.; Cui, W.; Yan, X.; Zhang, B.; He, S, Recent Advances in Multi-target Anti-Alzheimer Disease Compounds (2013 Up to the Present). *Curr. Med. Chem.*, **2019**, 26, 5684-5710.
- ² Masters, C. L.; Bateman, R.; Blennow, K.; Rowe, C. C.; Sperling, R. A.; Cummings, J. L. Alzheimer's disease. *Nat. Rev. Dis. Primers.*, **2015**, 1, 1-18.
- ³ Guarino, A.; Favieri, F.; Boncompagni, I.; Agostini, F.; Cantone, M.; Casagrande, M., Executive Functions in Alzheimer Disease: A Systematic Review. *Front. Aging Neurosci.*, **2019**, 10, 437, 1-24.
- ⁴ Du, X.; Wang, X.; Geng, M., Alzheimer's disease hypothesis and related therapies. *Translat. Neurodegen.*, **2018**, 7, 1-7.
- ⁵ Healthline: An Alzheimer's Vaccine Won't Be Approved Anytime Soon, Here's Why. Disponível em: <https://www.healthline.com/health-news/dont-bet-on-an-alzheimers-vaccine-anytime-soon>. Acesso em: 09/02/2020.
- ⁶ De Falco, A.; Cukierman, D. S.; Hauser-Davis, R. A.; Rey, N. A., Doença de Alzheimer: hipóteses etiológicas e perspectivas de tratamento. *Quim. Nova*, **2016**, 39, 63-80.
- ⁷ Watkins, Paul B.; Zimmerman, H. J.; Knapp, M. J.; Gracon, S. I.; Lewis, K. W. Hepatotoxic Effects of Tacrine Administration in Patients with Alzheimer's Disease. *JAMA* **1994**, 271, 992-998.
- ⁸ Pang, Y. P.; Quiram, P.; Jelacic, T.; Hong, F.; Brimijoin, S. Highly potent, selective, and low cost bis-tetrahydroaminacrine inhibitors of acetylcholinesterase - Steps toward novel drugs for treating Alzheimer's disease. *J. Biol. Chem.* **1996**, 271, 23646-23649.
- ⁹ Girek, M.; Szymanski, P., Tacrine hybrids as multi-target-directed ligands in Alzheimer's disease: influence of chemical structures on biological activities. *Chem. Papers.*, **2019**, 73, 269-289.
- ¹⁰ Saxena, M.; Dubey, R., Target Enzyme in Alzheimer's Disease: Acetylcholinesterase Inhibitors. *Curr. Top. Med. Chem.*, **2019**, 19, 264-275.

-
- ¹¹ Morphy, R.; Rankovic, Z., Designed multiple ligands. An emerging drug discovery paradigm. *J. Med. Chem.*, **2005**, 48, 6523-6543.
- ¹² Ceschi, M. A.; da Costa, J. S.; Lopes, J. P. B.; Câmara, V. S.; Campo, L. F.; Borges, A. C. A.; Gonçalves, C. A. S.; de Souza, D. F.; Konrath, E. L.; Karl, A. L. M.; Guedes, I. A.; Dardenne, L. E. Novel series of tacrine-tianeptine hybrids: Synthesis, cholinesterase inhibitory activity, S100B secretion and a molecular modeling approach. *Eur. J. Med. Chem.* **2016**, 4, 758-772.
- ¹³ Lopes, J. P. B.; Silva, L.; Franarin, G. C. Ceschi, M. A.; Lüdtke, D. S.; Dantas, R. F.; Martins, C. C. S.; Silva, F. P. Jr.; Senger, M. R.; Gueges, I. A.; Dardenne, L. E. Design, synthesis, cholinesterase inhibition and molecular modelling study of novel tacrine hybrids with carbohydrate derivatives. *Bioorg. Med. Chem.*, **2018**, 20, 5566-5577.
- ¹⁴ Lopes, J. P. B.; Costa, J. S. da; Ceschi, M. A. Gonçalves, C. A. S. Konrath, E. L.; Karl, A. L. M.; Guedes, I. A.; Dardenne, L. E., Chiral Bistacrine Analogues: Synthesis, Cholinesterase Inhibitory Activity and a Molecular Modeling Approach. *J. Braz. Chem. Soc.*, **2017**, 28,11, 2218-2228.
- ¹⁵ Gonzáles, J. F.; Alcántara, A. R.; Doadrio, A. L; Sánchez-Montero, J. M., Developments with multi-target drugs for Alzheimer's disease: an overview of the current discovery approaches. *Exp. Op. Drug. Discov.*, **2019**, 14, 9, 879-891.
- ¹⁶ National Institute on Aging: Symptoms and diagnosis of Alzheimer's disease. Disponível em: <https://www.nia.nih.gov/health/how-alzheimers-disease-diagnosed>. Acesso em 28/01/2020.
- ¹⁷ Arranz, A.; Ripoll, J., Advances in optical imaging for pharmacological studies. *Front. Pharmacol.*, **2015**, 6, 189, 1-7.
- ¹⁸ Klunk, W. E.; Engler, H.; Nordberg, A.; Wang, Y.; Blomqvist, G.; Holt, D. P.; Bergström, M.; Savitcheva, I.; Huang, G.-F.; Estrada, S.; Ausén, B.; Debnath, M. L.; Barletta, J.; Price, J. C.; Sandell, J.; Lopresti, B. J.; Wall, A.; Koivisto, P.; Antoni, G.; Mathis, C. A.; Långström, B., Imaging brain amyloid in Alzheimer's disease with Pittsburgh compound-B. *Ann. Neurol.*, **2004**, 55, 306-319.
- ¹⁹ Rovelet-Lecrux, A.; Hannequin, D.; Raux, G.; Meur, N. L.; Laquerrière, A.; Vital, A.; Dumanchin, C.; Feuillette, S.; Brice, A.; Vercelletto, M.; Dubas, F.; Frebourg, T.; Campion, D. APP locus duplication causes autosomal dominant early-onset Alzheimer disease with cerebral amyloid angiopathy. *Nat. Gen.* **2006**, 38, 24-26.

-
- ²⁰ James, B. D.; Leurgans, S. E.; Hebert, L. E.; Scherr, P. A.; Yaffe, K.; Bennett, D. A. Contribution of Alzheimer's disease to mortality in the United States. *Neurol.*, **2014**, *82*, 1045-1050.
- ²¹ Bachurin, S. O.; Bovina, E. V.; Ustyugov, A. A., Drugs in clinical trials for Alzheimer's disease: the major trends. *Med. Res. Rev.*, **2017**, *37*, 1186-1225.
- ²² Huang, Y.; Mucke, L., Alzheimer mechanisms and therapeutic strategies. *Cell.*, **2012**, *148*, 1204-1222.
- ²³ Gómez-Isla, T.; Price, J. L.; McKeel, D. W. Jr.; Morris, J. C.; Growdon, J. H.; Hyman, B. T., Profound loss of layer II entorhinal cortex neurons occurs in very mild Alzheimer disease. *J. Neurosci.*, **1996**, *16*, 4491-4500.
- ²⁴ National Institute on Aging: Alzheimer's Disease Fact Sheet. Disponível em <https://www.nia.nih.gov/health/alzheimers-disease-fact-sheet> Acesso em 26/01/2020.
- ²⁵ De Falco, A.; Cukierman, D. S.; Hauser-Davis, R. A.; Rey, N. A., Alzheimer's Disease: Etiological Hypotheses And Treatment Perspectives. *Quim. N.*, **2016**, *39*, 63-80.
- ²⁶ Kumar, A.; Singh, A.; Ekavali, A review on Alzheimer's disease pathophysiology and its management: an update. *Pharma. Reports.* **2015**, *67*, 195-203.
- ²⁷ Taylor, J. P.; Thomas, A., Alzheimer's disease, in *Textbook of Old Age Psychiatry*, eds. Denning, T.; Thomas, A., Oxford: Oxford University Press, **2013**, 431-455.
- ²⁸ Tumiatti, V.; Minarini, A.; Bolognesi, M. L.; Milelli, A.; Rosini, M.; Melchiorre, C., Tacrine Derivatives and Alzheimer's Disease. *Curr. Med. Chem.* **2010**, *17*, 1825-1838.
- ²⁹ McGleenon, B. M.; Dynan, K. B.; Passmore, A. P., Acetylcholinesterase inhibitors in Alzheimer's disease. *British J. Clin. Pharma.* **1999**, *48*, 471-480.
- ³⁰ Bartus, R. T., On neurodegenerative diseases, models, and treatment strategies: Lessons learned and lessons forgotten a generation following the cholinergic hypothesis. *Exp. Neurol.* **2000**, *163*, 495-529.
- ³¹ Hardy, J.; Higgins, G., Alzheimer's disease: the amyloid cascade hypothesis. *Science*, **1992**, *256*, 184-185.
- ³² Hane, F.; Leonenko, Z., Effect of Metals on Kinetic Pathways of Amyloid- β Aggregation. *Biomol.* **2014**, *4*, 101-116.
- ³³ Greenamyre, J. T.; Maragos, W. F.; Albin, R. L.; Penney, J. B.; Young, A. B., Glutamate transmission and toxicity in Alzheimer's disease. *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry*, **1988**, *12*, 421-430.

-
- ³⁴ Osorio, C.; Kanukuntla, T.; Diaz, E.; Jafri, N.; Cummings, M.; Sfera, A., The Post-Amyloid Era in Alzheimer's Disease: Trust Your Gut Feeling. *Front. Aging Neurosci.*, **2019**, 11, 143, 1-27.
- ³⁵ Anand, P.; Singh, B., A review on cholinesterase inhibitors for Alzheimer's disease. *Archiv. Pharm. Res.* **2013**, 36, 375-399.
- ³⁶ Francis, P. T.; Palmer, A. M.; Snape, M.; Wilcock, G. K., The cholinergic hypothesis of Alzheimer's disease: a review of process. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry.* **1999**, 66, 137-147.
- ³⁷ Silverthorn, D. U., *Fisiologia Humana – uma abordagem integrada*. 7.ed. Porto Alegre: Artmed, 2017, 963p.
- ³⁸ Unzeta, M.; Esteban, G.; Bolea, I.; Fogel, W.A.; Ramsay, R. R.; Youdim, M. B.H.; Tipton, K. F.; Marco-Contelles, J. Multi-Target Directed Donepezil-Like Ligands for Alzheimer's Disease. *Front. Neurosci.*, **2016**, 10, 205, 1-24.
- ³⁹ Khan, H.; Marya, Amin, S.; Kamal, M. A.; Patel, S., Flavanoids as acetylcholinesterase inhibitors: current therapeutic standing and future prospects. *Biomed. Pharmacother.* **2018**, 101, 860-870.
- ⁴⁰ Çokuğraş, A. N., Butyrylcholinesterase: Structure and physiological importance. *Turkish Jo Biochem.* **2003**, 28, 54-61.
- ⁴¹ Chen, X. B.; Zheng, X. R.; Zhou, Z. Y.; Zhan, C. G.; Zheng, F., Effects of a cocaine hydrolase engineered from human butyrylcholinesterase on metabolic profile of cocaine in rats. *Chemico-Biolog. Int.* **2016**, 259, 104-109.
- ⁴² Giacobini, E., Cholinergic function and Alzheimer's disease. *Int. J. Ger. Psychiatry.*, **2003**, 18, S1-S5.
- ⁴³ Li, Q.; Yang, H. Y.; Chen, Y.; Sun, H. P., Recent progress in the identification of selective butyrylcholinesterase inhibitors for Alzheimer's disease. *Eur. J. Med. Chem.*, **2017**, 132, 294-309.
- ⁴⁴ Sameem, B.; Saedi, M.; Mahdavi, M.; Shafiee, A., A review on tacrine-based scaffolds as multi-target drugs (MTDLs) for Alzheimer's disease. *Eur. J. Med. Chem.* **2017**, 128, 332-345.
- ⁴⁵ Sussman, J. L.; Harel, M.; Frolow, F.; Oefner, C.; Goldman, A.; Toker, L.; Silman, I., Atomic-Structure Of Acetylcholinesterase From Torpedo-Californica - A Prototypic Acetylcholine-Binding Protein. *Science.* **1991**, 253, 872-879.

-
- ⁴⁶ Bajda, M.; Wieckowska, A.; Hebda, M.; Guzior, N.; Sotriffer, C. A.; Malawska, B., Structure-Based Search for New Inhibitors of Cholinesterases. *Int. J. Mol. Sci.* **2013**, *14*, 5608-5632.
- ⁴⁷ Johnson, G.; Moore, S. W., The peripheral anionic site of acetylcholinesterase: Structure, functions and potential role in rational drug design. *Curr. Pharma. Des.* **2006**, *12*, 217-225.
- ⁴⁸ Chatonnet, A.; Lockridgetl, O., Comparison of butyrylcholinesterase and acetylcholinesterase. *Biochem. J.*, **1989**, *260*, 625-634.
- ⁴⁹ Ghosh, S.; Jana, K.; Ganguly, B., Revealing the Mechanistic Pathway of Cholinergic inhibition of Alzheimer's disease by Donepezil: A Metadynamics Simulation Study. *Phys. Chem. Chem. Phys.*, **2019**, *21*, 13578-13589.
- ⁵⁰ Hasan, A. H.; Amran, S. I.; Hussain, F. H. S.; Jaff, B. A.; Jamalis, J., Molecular Docking and Recent Advances in the Design and Development of Cholinesterase Inhibitor Scaffolds: Coumarin Hybrids. *Chem. Sel.*, **2019**, *4*, 14140 – 14156.
- ⁵¹ Pagadala, N.; Syed, N.; Tuszynsky, J., Software for Molecular Docking: a review. *Biophys. Rev.*, **2017**, *9*, 91-102.
- ⁵² Salmaso, V.; Moro, S., Bridging Molecular Docking to Molecular Dynamics in Exploring Ligand-Protein Recognition Process: An Overview. *Front. Pharmacol.*, **2018**, *9*, 923, 1-16.
- ⁵³ Liston, D. R.; Nielsen, J. A.; Villalobos, A.; Chapin, D.; Jones, S. B.; Hubbard, S. T.; Shalaby, I. A.; Ramirez, A.; Nason, D.; White, W. F., Pharmacology of selective acetylcholinesterase inhibitors: implications for use in Alzheimer's disease. *Eur. J. Med. Chem.*, **2004**, *486*, 9-17.
- ⁵⁴ Parsons, C. G.; Stoffler, A.; Danysz, W., Memantine: a NMDA receptor antagonist that improves memory by restoration of homeostasis in the glutamatergic system - too little activation is bad, too much is even worse. *Neuropharmacol.* **2007**, *53*, 699-723.
- ⁵⁵ Wiklund, P.; Bergman, J., The Chemistry of anthranilic acid. *Curr. Org. Synth.* **2006**, *3*, 379-402.
- ⁵⁶ Choudhary, S.; Singh, P. K.; Verma, H.; Singh, H.; Silakari, O., Success stories of natural product-based hybrid molecules for multi-factorial diseases. *Eur. J. Med. Chem.* **2018**, *151*, 62-97.
- ⁵⁷ Hu, M. K.; Wu, L. J.; Hsiao, G.; Yen, M. H., Homodimeric tacrine congeners as acetylcholinesterase inhibitors. *J. Med. Chem.* **2002**, *45*, 2277-2282.

-
- ⁵⁸ Uliassi, E.; Prati, F.; Bongarzone, S.; Bolognesi, M. L. Medicinal Chemistry of Hybrids for Neurodegenerative Diseases, in *Design of Hybrid Molecules for Drug Development*, Elsevier Inc., **2017**, p. 259-277.
- ⁵⁹ Torrero, D. M.; Multitarget Anti-Alzheimer Hybrid Compounds: Do They Work In Vivo? in *Design of Hybrid Molecules for Drug Development*, Elsevier Inc., **2017**, p. 167-192.
- ⁶⁰ Mishra, P.; Kumara, A.; Panda, G., Anti-cholinesterase hybrids as multi-target-directed ligands against Alzheimer's disease (1998–2018). *Bioorg. Med. Chem.* **2019**, 27, 6, 895-930.
- ⁶¹ Kucuksayan, E.; Ozben, T., Hybrid Compounds as Multitarget Directed Anticancer Agents, *Curr. Top. Med. Chem.*, **2017**, 17, 907-918.
- ⁶² Decker, M., Hybrid molecules incorporating natural products: applications in cancer therapy, neurodegenerative disorders and beyond. *Curr. Med. Chem.*, **2011**, 18, 1464-1475.
- ⁶³ Marella, A.; Verma, G.; Shaquiquzzaman, M.; Khan, M. F.; Akhtar, W.; Alam, M. M., Malaria Hybrids: A Chronological Evolution. *M. Rev. Med. Chem.*, **2019**, 19, 14, 1144-1177.
- ⁶⁴ Wang, S.-Q.; Wang, Y. F.; Xu, Z., Tetrazole hybrids and their antifungal activities. *Eur. J. Med. Chem.* **2019**, 170, 225-234.
- ⁶⁵ Rosini, M.; Andrisano, V.; Bartolini, M.; Bolognesi, M. L.; Hrelia, P.; Minarini, A.; Tarozzi, A.; Melchiorre, C., Rational approach to discover multipotent anti-Alzheimer drugs. *J. Med. Chem.* **2005**, 48, 360-363.
- ⁶⁶ Jeřábek, J.; Uliassi, E.; Guidotti, L.; Korábečný, J.; Soukup, O.; Sepsova, V.; Hrabínova, M.; Kuča, K.; Bartolini, M.; Peňa-Altamira, L. E.; Petralla, S.; Monti, B.; Roberti, M.; Bolognesi, M. L., Tacrine-resveratrol fused hybrids as multi-target-directed ligands against Alzheimer's disease. *Eur. J. Med. Chem.* **2017**, 15, 250-262.
- ⁶⁷ Marco-Contelles, J.; León, R.; de Los Ríos, C.; Guglietta, A.; Terencio, J.; López, M. G.; García, A. G.; Villarroya, M., Novel multipotent tacrine-dihydropyridine hybrids with improved acetylcholinesterase inhibitory and neuroprotective activities as potential drugs for the treatment of Alzheimer's disease. *J. Med. Chem.* **2006**, 28, 7607-7610.
- ⁶⁸ Da Costa, J. S.; Lopes, J. P. B.; Russowski, D.; Petzold, C. L.; Borges, A. C. A.; Ceschi, M. A.; Konrath, E.; Batassani, C.; Lunardi, P. S.; Gonçalves, C. A. S., Synthesis of tacrine-lopine hybrids via one-pot four component reaction and biological evaluation as acetyl- and butyrylcholinesterase inhibitors. *Eur. J. Med. Chem.* **2013**, 62, 556-563.

-
- ⁶⁹ Lopes, J. P. B. Síntese de Novos Híbridos Derivados de Tacrina, Lofina, Pirimidina e Carboidratos, Compostos com Potencial Aplicação no Tratamento da Doença de Alzheimer. Tese de doutorado – Programa de pós-graduação em Química – UFRGS. Porto Alegre, 2018.
- ⁷⁰ Labrid, C.; Moleyre, J.; Poignant, J. C.; Malen, C.; Mocaer, E.; Kamoun, A., Structure-activity relationships of tricyclic antidepressants, with special reference to tianeptine. *Clin. Neuropharmacol.* **1988**, 11, 21-31.
- ⁷¹ Malen, C.; Danrée, B.; Poignant, J. C., Science Union et Cie Societe Francaise de Recherche Medicale. Nouveaux Dérivés Tricycliques et Leur Procédé de Preparation. França, FR2104728. **1972**.
- ⁷² Bailey, S. J.; Almatroudi, A.; Kouris, A., Tianeptine: An atypical antidepressant with multimodal pharmacology. *Curr. Psychopharm.* **2017**, 6, 94-110.
- ⁷³ McEwen, B. S.; Chattarji, S.; Diamond, D. M.; Jay, T. M.; Reagan, L. P.; Svenningsson, P.; E. Fuchs, E., The neurobiological properties of tianeptine (Stablon): from monoamine hypothesis to glutamatergic modulation. *Mol. Psychiatry.* **2010**, 15, 237-249.
- ⁷⁴ Kole M. H.; Swan, L.; Fuchs, E., The antidepressant tianeptine persistently modulates glutamate receptor currents of the hippocampal CA3 commissural associational synapse in chronically stressed rats. *Eur. J. Neurosci.* **2002**, 16, 807-816.
- ⁷⁵ Gassaway, M. M.; Rives, M. L.; Kruegel, A. C.; Javitch, J. A.; Sames, D., The atypical antidepressant and neurorestorative agent Tianeptine is a μ -opioid receptor agonist *Transl. Psychiatry.* **2014**, 4, 411, 1-5.
- ⁷⁶ Springer, J.; Cubala, W. J., Tianeptine Abuse and Dependence in Psychiatric Patients: A Review of 18 Case Reports in the Literature. *J. Psychoactive. Drugs.* **2018**, 50, 275-280.
- ⁷⁷ Alamo, C.; García-García, P.; Lopez-Muñoz, F.; Zaragoza, C., Tianeptina, na atypical pharmacological approach to depression. *Rev. Psiquiatr. Salud. Ment. (Barc.).* **2019**, 12, 3, 170-186.
- ⁷⁸ Tramarin, M.; Rusconi, L.; Pizzamiglio, L.; Barbiero, I.; Peroni, D.; Scaramuzza, L.; Guilliams, T.; Cavalla, D.; Antonucci, F.; Kilstrup-Nielsen, C., The antidepressant tianeptine reverts synaptic AMPA receptor defects caused by deficiency of CDKL5. *Hum. Mol. Gen.,* **2018**, 27, 2052-2063.
- ⁷⁹ Zhao, W.-N.; Ghosh, B.; Tyler, M.; Lalonde, J.; Joseph, N. F.; Kosaric, N.; Fass, D. M.; Tsai, L.-H.; Mazitschek, R.; Haggarty, S. J., Class I Histone Deacetylase Inhibition by Tianeptinaline Modulates Neuroplasticity and Enhances Memory. *ACS Chem. Neurosci.* **2018**, 9, 2262–2273.

-
- ⁸⁰ Jiang, Y.; Gao, H., Pharmacophore-based drug design for potential AChE inhibitors from Traditional Chinese Medicine Database. *Bioorg. Chem.*, **2018**, 76, 400–414.
- ⁸¹ Barret, R., Principle of a Prodrug. *In Therapeutical Chemistry*. Elsevier Inc. **2018**, p101-118.
- ⁸² Di, L.; Kerns, E. H., Prodrugs. *In Drug-Like Properties*. Academic Press (second edition). **2016**, p471-485.
- ⁸³ Royer, R.J.; Albin, H.; Barrucand, D.; Salvadori-Failler, C.; Kamoun, A., Pharmacokinetic and metabolic parameters of tianeptine in healthy volunteers and in populations with risk factors. *Clin. Neuropharmacol.* **1988**, 11, 90-96.
- ⁸⁴ Zini, R.; Morin, D.; Salvadori, C.; Tillement, J. P., Tianeptine binding to human plasma proteins and plasma from patients with hepatic cirrhosis or renal failure. *Br. J. Clin. Pharmacol.* **1990**, 29, 9-18.
- ⁸⁵ Rimac, H.; Debeljak, Ž.; Bojić, M.; Miller L., Displacement of Drugs from Human Serum Albumin: From Molecular Interactions to Clinical Significance. *Curr. Med. Chem.* **2017**, 24, 1930-1947.
- ⁸⁶ Yang, F.; Zhang, Y.; Liang, H., Interactive association of drugs binding to human serum albumin. *Int. J. Mol. Sci.* **2014**, 15, 3580-3595.
- ⁸⁷ Fridman, N.; Kaftory, M.; Speiser, S., Structures and photophysics of lophine and double lophine derivatives. *Sens. Act. B-Chem.* **2007**, 126, 107-115.
- ⁸⁸ Maeda, K.; Ojima, H.; Hayashi, T., The chemiluminescence, Fluorescence and Absorption Spectra of 2,4,5-triphenylimidazole, *BCSJ.* **1964**, 38, 76-80.
- ⁸⁹ Cardoso, A. L.; Lemos, A.; Melo, T., Selective Synthesis of Tetrasubstituted 4-(Tetrazol-5-yl)-1H-imidazoles from 2-(Tetrazol-5-yl)-2H-azirines. *Eur. J. Org. Chem.* **2014**, 24, 5159-5165.
- ⁹⁰ Radziszewski, B., Über die Constitution des Lophins und verwandter Verbindungen. *Ber. Dtsch. Chem. Ges.*, **1882**, 15, 1493-1496.
- ⁹¹ Lopes, J. P. B.; Silva, L.; Ceschi, M. A.; Lüdtke, D. S.; Zimmer, A. R.; Ruaro, T. C.; Dantas, R. F; de Salles, C. M. C.; Silva-Jr, F. P.; Senger, M. R.; Barbosa, G.; Lima, L. M.; Guedes, I. A.; Dardenne, L. E., Synthesis of new lophine-carbohydrate hybrids as cholinesterase inhibitors: cytotoxicity evaluation and molecular modeling. *Med. Chem. Comm.*, **2019**, 10, 2089-2101.
- ⁹² Guzman, J. D., Natural cinnamic acids, synthetic derivatives and hybrids with antimicrobial activity. *Molecules* **2014**, 19, 19292-19349.

-
- ⁹³ Yabe, T.; Iizuka, S.; Komatsu, Y.; Yamada, H., Enhancements of choline acetyltransferase activity and nerve growth factor secretion by Polyage Radix-extract containing active ingredients in Kami-Utan-To. *Phytomed.* **1997**, *4*, 199-205.
- ⁹⁴ Sgarbossa, A. Giacomazza, D.; di Carlo, M., Ferulic Acid: A Hope For Alzheimer's Disease Therapy from Plants. *Nut.* **2015**, *7*, 5764-5782.
- ⁹⁵ Sultana, R. Ferulic acid ethyl ester as a potential therapy in neurodegenerative disorders. *Biochim. et Biophys. Acta*, **2012**, *1822*, 748-752.
- ⁹⁶ Lan, J. S.; Hou, J. W.; Liu, Y.; Ding, Y.; Zhang, Y.; Li, L.; Zhang, T., Design, synthesis and evaluation of novel cinnamic acid derivatives bearing N-benzylpyridinium moiety as multifunctional cholinesterase inhibitors for Alzheimer's disease, *J. Enz. Inhibit. Med. Chem.*, **2017**, *32*, 776-788.
- ⁹⁷ Zhang, X.; He, X.; Chen, Q.; Lu, J.; Rapposelli, S.; Pi, R., A review on the hybrids of hydroxycinnamic acid as multi-targeted ligands against Alzheimer's disease. *Bioorg. Med. Chem.* **2018**, *26*, 543-550.
- ⁹⁸ Habtemariam, S., Molecular Pharmacology of Rosmarinic and Salvianolic Acids: Potential Seeds for Alzheimer's and Vascular Dementia Drugs, *Int. J. Mol. Sci.* **2018**, *19*, 458-483.
- ⁹⁹ Cornejo, A.; Aguilar Sandoval, F.; Caballero, L.; Machuca, L.; Munoz, P.; Caballero, J.; Perry, G.; Ardiles, A.; Areche, C.; Melo, F., Rosmarinic acid prevents fibrillization and diminishes vibrational modes associated to beta sheet in tau protein linked to Alzheimer's disease. *J. Enzym. Inhib. Med. Chem.* **2017**, *32*, 945-953.
- ¹⁰⁰ Senol, F. S.; Slusarczyk, S.; Matkowski, A.; Perez-Garrido, A.; Giron-Rodriguez, F.; Ceron-Carrasco, J. P.; den-Haan, H.; Pena-Garcia, J.; Perez-Sanchez, H.; Domaradzki, K.; et al. Selective in vitro and in silico butyrylcholinesterase inhibitory activity of diterpenes and rosmarinic acid isolated from *Perovskia Atriplicifolia* benth. and *Salvia glutinosa*. *L. Phytochem.*, **2017**, *133*, 33-44.
- ¹⁰¹ Jung, J.-S.; Y. J.-J.; Li, H.-M.; Sultan, M. T.; Y. J.; Lee, H.-S.; Shin, K.-J.; Song, D.-K., Protective effects of a dimeric derivative of ferulic acid in animal models of Alzheimer's disease. *Eur. J. Pharmacol.*, **2016**, *782*, 30-34
- ¹⁰² He, X.-X.; Yang, X.-H.; Ou, R.-Y.; Ouyang, Y.; Wang, S.-N.; Chen, Z.-W.; Wen, S.-J.; Pi, R. Synthesis and evaluation of multifunctional ferulic and caffeic acid dimers for Alzheimer's disease. *Nat. Prod. Res.*, **2017**, *31*, 6, 734-737.
- ¹⁰³ Girek, M.; Szymański, P., Phyto-Tacrine Hybrids as Promising Drugs to Treat Alzheimer's Disease. *ChemistrySelect*, **2019**, *4*, 5776-5790.

-
- ¹⁰⁴ Estrada, M.; Herrera-Arozamena, C.; Pérez, C.; Viña, D.; Romero, A.; Morales-García, J. A.; Pérez-Castillo, A.; Rodríues-Franco, M. I., New cinnamic e N-benzylpiperidine and cinnamic e N,N-dibenzyl(Nmethyl)amine hybrids as Alzheimer-directed multitarget drugs with antioxidant, cholinergic, neuroprotective and neurogenic properties. *Eur. J. Med. Chem.*, **2016**, 121, 376-386.
- ¹⁰⁵ Dias, K. S. T.; de Paula, C. T.; dos Santos, T.; Sousa, I. N. O.; Boni, M. S.; Guimarães, M. J. R.; da Silva, F. M. R.; Castro, N. G.; Neves, G. A.; Veloso, C. C.; *et al.* Design, synthesis and evaluation of novel feruloyl-donepezil hybrids as potential multitarget drugs for the treatment of Alzheimer's disease. *Eur. J. Med. Chem.*, **2017**, 130, 440-457.
- ¹⁰⁶ Sang, Z.; Pan, W.; Wang, K.; Ma, Q.; Yu, L.; Yang, Y.; Bai, P.; Leng, C.; Xu, Q.; Li, X.; Tan, Z.; Liu, W., Design, synthesis and evaluation of novel ferulic acid-O-alkylamine derivatives as potential multifunctional agents for the treatment of Alzheimer's disease. *Eur. J. Med. Chem.*, **2017**, 130, 379-392.
- ¹⁰⁷ Benchekroun M, Ismaili L, Pudlo M, *et al.* Donepezil-ferulic acid hybrids as anti-Alzheimer drugs. *Future Med. Chem.* **2015**, 7, 15–21.
- ¹⁰⁸ Pi, R.; Mao, X.; Chao, X.; *et al.* Tacrine-6-ferulic acid, a novel multifunctional dimer, inhibits amyloid-beta-mediated Alzheimer's disease-associated pathogenesis in vitro and in vivo. *PLoS One.*, **2012**, 7, 31921-31929.
- ¹⁰⁹ Chao, X. J.; Chen, Z. W.; Liu, A. M.; *et al.* Effect of tacrine-3-caffeic acid, a novel multifunctional anti-Alzheimer's dimer, against oxidative-stress-induced cell death in HT22 hippocampal neurons: involvement of Nrf2/HO-1 pathway. *CNS Neurosci. Ther.* **2014**, 20, 840–850.
- ¹¹⁰ Digiacomio, M.; Chen, Z.; Wang, S.; Lapucci, A.; Macchia, M.; Yang, X.; Chu, J.; Han, Y.; Pi, R.; Raposelli, S., Synthesis and pharmacological evaluation of multifunctional tacrine derivatives against several disease pathways of AD. *Bioorg. Med. Chem. Let.*, **2015**, 25, 807–810.
- ¹¹¹ Quintanova, C.; Keri, R. S.; Marques, S. M.; G-Fernandes, M.; Cardoso, S. M.; Serralheiro, M. L.; Santos, M. A., Design, synthesis and bioevaluation of tacrine hybrids with cinnamate and cinnamylidene acetate derivatives as potential anti-Alzheimer drugs. *Med. Chem. Commun.*, **2015**, 6, 1969-1977.
- ¹¹² Fu, Y.; Um, Y.; Lei, H.; Wang, P.; Li, X.; Leng, Q.; Han, L.; Qu, X.; Wang, Z.; Huang, X., Design, Synthesis and Evaluation of Novel Tacrine-Ferulic Acid Hybrids as Multifunctional Drug Candidates against Alzheimer's Disease. *Molecules*, **2016**, 21, 1338, 1-10.

-
- ¹¹³ Benchekroun M, Romero A, Egea J, et al. The antioxidant additive approach for Alzheimer's disease therapy: new ferulic (lipoic) acid plus melatonin modified tacrines as cholinesterases inhibitors, direct antioxidants, and nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 2 activators. *J. Med. Chem.*, **2016**, 59, 9967-9973.
- ¹¹⁴ Chen, Y.; Zhu, J.; Mo, J.; Yang, H.; Jiang, X.; Lin, H.; Gu, K.; Pei, Y.; Wu, L.; Tan, R.; Hou, J.; Chen, J.; Lv, Y.; Bian, Y.; Sun, H., Synthesis and bioevaluation of new tacrine-cinnamic acid hybrids as cholinesterase inhibitors against Alzheimer's disease, *J. Enz. Inhib. Med. Chem.*, **2018**, 33, 1, 290-302.
- ¹¹⁵ Zhu, J.; Yang, H.; Chen, Y.; Lin, H.; Li, Q.; Mo, J.; Bian, Y.; Pei, Y.; Sun, H.; Synthesis, pharmacology and molecular docking on multifunctional tacrine-ferulic acid hybrids as cholinesterase inhibitors against Alzheimer's disease, *J. Enz. Inhib. Med. Chem.*, **2018**, 33, 1, 496-506.
- ¹¹⁶ Li, G.; Hong, G.; Li, X.; Zhang, Y.; Xu, Z.; Mao, L.; Feng, X.; Liu, T., Synthesis and activity towards Alzheimer's disease in vitro: Tacrine, phenolic acid and ligustrazine hybrids. *Bioorg. Med. Chem.*, **2018**, 148, 238-254.
- ¹¹⁷ Fang, L.; Kraus, B.; Lehmann, J.; Heilmann, J.; Zhang, Y.; Deckera, M., Design and synthesis of tacrine-ferulic acid hybrids as multi-potent anti-Alzheimer drug candidates. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2008**, 18, 2905-2909.
- ¹¹⁸ Chen, Y.; Sun, J.; Fang, L.; Liu, M.; Peng, S.; Liao, H.; Lehmann, J.; Zhang, Y., Tacrine-Ferulic Acid-Nitric Oxide (NO) Donor Trihybrids as Potent, Multifunctional Acetyl- and Butyrylcholinesterase Inhibitors. *J. Med. Chem.* **2012**, 55, 4309-4321.
- ¹¹⁹ Chen, Y.; Lin, H.; Zhu, J.; Gu, K.; Li, Q.; He, S.; Lu, X.; Tan, R.; Pei, Y.; Wu, L.; Bian, Y.; Sun, H. Design, synthesis, in vitro and in vivo evaluation of tacrine-cinnamic acid hybrids as multi-target acetyl- and butyrylcholinesterase inhibitors against Alzheimer's disease. *RSC Adv.*, **2017**, 7, 33851-33867.
- ¹²⁰ Šebestík, J.; Marques, S. M.; Falé, P. L.; Santos, S.; Arduíno, D. M.; Cardoso, S. M.; Oliveira, C. R.; Serralheiro, M. L. M.; Santos, M. A., Bifunctional phenolic-choline conjugates as anti-oxidants and acetylcholinesterase inhibitors, *J. Enz. Inhib. Med. Chem.*, **2011**, 26, 4, 485-497.
- ¹²¹ Jones, M.; Wang, J.; Harmon, S.; Kling, B.; Heilmann, J.; Gilmer, J. F., Novel Selective Butyrylcholinesterase Inhibitors Incorporating Antioxidant Functionalities as Potential Bimodal Therapeutics for Alzheimer's Disease. *Mol.*, **2016**, 21, 440-451.

-
- ¹²² Fang, L.; Chen, M.; Liu, Z.; Fang, X.; Gou, S.; Chen, L., Ferulic acid–carbazole hybrid compounds: Combination of cholinesterase inhibition, antioxidant and neuroprotection as multifunctional anti-Alzheimer agents. *Bioorg. Med. Chem.*, **2016**, 24, 886-893.
- ¹²³ Wang, J.; Cai, P.; Yang, X.-L.; Li, F.; Wu, J.-J.; Kong, L.-Y.; Wang, X.-B., Novel cinnamamide-dibenzylamine hybrids: Potent neurogenic agents with antioxidant, cholinergic, and neuroprotective properties as innovative drugs for Alzheimer's disease. *Eur. J. Med. Chem.*, **2017**, 139, 68-83.
- ¹²⁴ Chen, Z.; Digiacomio, M.; Tu, Y.; Gu, Q.; Wang, S.; Yang, X.; Chu, J.; Chen, Q.; Han, Y.; Chen, J.; Nesi, G.; Sestito, S.; Macchia, M.; Rapposelli, S.; Pi, R., Discovery of novel rivastigmine-hydroxycinnamic acid hybrids as multi-targeted agents for Alzheimer's disease. *Eur. J. Med. Chem.*, **2017**, 125, 784-792.
- ¹²⁵ Liu, H.; Liu, L.; Gao, X.; Liu, Y.; Xu, W.; He, W.; Jiang, H.; Tang, J.; Fan, H.; Xia, X., Novel ferulic amide derivatives with tertiary amine side chain as acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase inhibitors: The influence of carbon spacer length, alkylamine and aromatic group. *Eur. J. Med. Chem.*, **2017**, 126, 810-822.
- ¹²⁶ Mo, J.; Yang, H.; Chen, T.; Li, Q.; Lin, H.; Feng, F.; Liu, W.; Qu, W.; Guo, Q.; Chi, H.; Chen, Y.; Sun, H., Design, synthesis, biological evaluation, and molecular modeling studies of quinoline-ferulic acid hybrids as cholinesterase inhibitors. *Bioorg. Chem.*, **2019**, 30, 103310-103323.
- ¹²⁷ Weinreb, O.; Amit, T.; Bar-Am, O.; Youdim, M. B. H., Neuroprotective effects of multifaceted hybrid agents targeting MAO, cholinesterase, iron and β -amyloid in ageing and Alzheimer's disease. *Brit. J. Pharmacol.* **2016**, 170, 2080-2094.
- ¹²⁸ Baldrighi, M.; Bartesaghi, D.; Cavallo, G.; Chierotti, M. R.; Gobetto, R.; Metrangolo, P.; Pilati, T.; Resnati, G.; Terraneo, G., Polymorphs and co-crystals of haloprogin: an antifungal agent. *Cryst. Eng. Comm.* **2014**, 16, 5897-5904.
- ¹²⁹ Liu, X.; Kung, A.; Malinoski, B.; Prakash, G. K. S.; Zhang, C., Development of Alkyne-Containing Pyrazolopyrimidines To Overcome Drug Resistance of Bcr-Abl Kinase. *J. Med. Chem.*, **2015**, 58, 9228-9237.
- ¹³⁰ Milhorn, H. T. Sedative-Hypnotic Dependence, in Substance use disorders. Springer, p59-76, **2017**.
- ¹³¹ Scala, C.; Maggiore, U. L. R.; Barra, F.; Venturini, P. L.; Ferrero, S., Norethindrone acetate versus extended-cycle oral contraceptive (Seasonique®) in the treatment of endometriosis symptoms: A prospective open-label comparative study. *Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.* **2018**, 222, 89-94.

-
- ¹³² Thót, K.; Höfner, G.; Wanner, K. T., Synthesis and biological evaluation of novel N-substituted nipecotic acid derivatives with an alkyne spacer as GABA uptake inhibitors. *Bioorg. Med. Chem.*, **2018**, 26, 3668-3687.
- ¹³³ Lemke, T. L.; Williams, D. A.; Roche, V. F.; Zito, S. W. Foye's Principles of Medicinal Chemistry. 7th edition. Lippincott Williams & Wilkins, **2013**, 1498p.
- ¹³⁴ Chen, P. O.; Tsai, C. T.; Ou, C. Y.; Hsu, W. T.; Jhuo, M. D.; Wu, C. H.; Shih, T. C.; Cheng, T.H.; Chung, J. G., Computational analysis of novel drugs designed for use as acetylcholinesterase inhibitors and histamine H₃ receptor antagonists for Alzheimer's disease by docking, scoring and *de novo* evolution. *Mol. Med. Rep.* **2012**, 5, 1043-1048.
- ¹³⁵ Bolea, I.; Juárez-Jiménez, J.; de Los Ríos, C.; Chioua, M.; Pouplana, R.; Luque, F. J.; et al. Synthesis, biological evaluation, and molecular modeling of donepezil and N-[(5-(benzyloxy)-1-methyl-1H-indol-2-yl)methyl]-N-methylprop-2-yn-1-amine hybrids as new multipotent cholinesterase/monoamine oxidase inhibitors for the treatment of Alzheimer's disease. *J. Med. Chem.* **2011**, 54, 8251–8270.
- ¹³⁶ Bautista-Aguilera, O. M.; Esteban, G.; Chioua, M.; Nikolic, K.; Agbaba, D.; Moraleda, I.; et al. Multipotent cholinesterase/monoamine oxidase inhibitors for the treatment of Alzheimer's disease: design, synthesis, biochemical evaluation, ADMET, molecular modeling, and QSAR analysis of novel donepezil-pyridyl hybrids. *Drug Des. Devel. Ther.* **2014**, 8, 18903–18910.
- ¹³⁷ Samadi, A.; de los Ríos, C.; Bolea, I.; Chioua, M.; Iriepa, I.; Moraleda, I.; Bartolini, M.; Andrisano, V.; Gálvez, E.; Valderas, C.; Unzeta, M.; Marco-Contelles, J., Multipotent MAO and cholinesterase inhibitors for the treatment of Alzheimer's disease: synthesis, pharmacological analysis and molecular modeling of heterocyclic substituted alkyl and cycloalkyl propargyl amine. *Eur. J. Med. Chem.* **2012**, 52, 251-262.
- ¹³⁸ Lu, C.; Zhou, Q.; Yan, J.; Du, Z.; Huang, L.; Li, X., A novel series of tacrine-selegiline hybrids with cholinesterase and monoamine oxidase inhibition activities for the treatment of Alzheimer's disease. *Eur. J. Med. Chem.* **2013**, 62, 745-753.
- ¹³⁹ Klán, P.; Wirz, J. Photochemistry of Organic Compounds: From Concepts to Practice. Wiley, **2009**, 576p.
- ¹⁴⁰ Lakowicz, J. R.; Principles of Fluorescence Spectroscopy. Third edition. United States of America, Springer, **2006**, 961p.
- ¹⁴¹ Yoo, S.; Han, M. S., A fluorescent probe for butyrylcholinesterase activity in human serum based on a fluorophore with specific binding affinity for human serum albumin. *Chem. Commun.* **2019**, 55, 14574-14577.

-
- ¹⁴² Anandhan, K.; Cerón, M.; Perumal, V.; Ceballos, P.; Gordillo-Guerra, P.; Pérez-Gutiérrez, E.; Castillo, A. E.; Thamotharan, S.; Percino, M. J., Solvatochromism and pH effect on the emission of a triphenylimidazole-phenylacrylonitrile derivative: experimental and DFT studies. *RSC Adv.*, **2019**, 9, 12085-12096.
- ¹⁴³ Jun, Y. W.; Cho, S. W.; Jung, J.; Huh, Y.; Kim, Y.; Kim, D.; Ahn, K. H., Frontiers in Probing Alzheimer's Disease Biomarkers with Fluorescent Small Molecules. *ACS Cent. Sci.*, **2019**, 5, 209-217.
- ¹⁴⁴ Stelzner, J.; Roemhild, R.; Garibay-Hernández, A.; Harbaum-Piayda, B.; Mock, H. P.; Bilger, W., Hydroxycinnamic acids in sunflower leaves serve as UV-A screening pigments. *Photochem. Photobiol. Sci.*, **2019**, 18, 1649-1659.
- ¹⁴⁵ Briddon, S. J.; Hill, S. J., Pharmacology under the microscope: the use of fluorescence correlation spectroscopy to determine the properties of ligand-receptor complexes. *Trends. Pharmacol. Sci.*, **2007**, 28, 12, 637-645.
- ¹⁴⁶ Stoddart, L. A.; White, C. W.; Nguyen, K.; Hill, S. J.; Pflieger, K. D. G., Fluorescence- and bioluminescence-based approaches to study GPCR ligand binding. *Brit. J. Pharmacol.*, **2016**, 173, 3028-3037.
- ¹⁴⁷ Zhang, X.; Tian, Y.; Zhang, C.; Tian, X.; Ross, A.W.; Moir, R.D.; et al. Near-infrared fluorescence molecular imaging of amyloid beta species and monitoring therapy in animal models of Alzheimer's disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **2015**, 112, 9734-9739.
- ¹⁴⁸ Carter, D. C.; Ho, J. X., Structure of Serum Albumin. *Adv. Prot. Chem.* **1994**, 45, 153-203.
- ¹⁴⁹ He, X.M.; Carter, D.C., Atomic Structure and Chemistry of Humam Serum Albumin, *Nature*. **1992**, 358, 209-215.
- ¹⁵⁰ Bujacz, A.; Zielinski, K.; Sekula, B., Structural studies of bovine, equine, and leporine serum albumin complexes with naproxen. *Prot.* **2014**, 82, 2199-2208.
- ¹⁵¹ Seetharamappa, J.; Kamat, B. P., Spectroscopic Studies on the Mode of Interaction of an Anticancer Drug with Bovine Serum Albumin. *Chem. Pharm. Bull.* **2004**, 52, 1053-1057.
- ¹⁵² Shi, J. H.; Pan, D. Q.; Jiang, M.; Liu, T. T.; Wang, Q., Binding interaction of ramipril with bovine serum albumin (BSA): Insights from multi-spectroscopy and molecular docking methods. *J. Photochem. Photobiol. B. Biol.* **2016**, 164, 103-111.

-
- ¹⁵³ Zhang, Y. F.; Zhou, K. L.; Lou, Y. Y.; Pan, D. Q.; Shi J. H., Investigation of the binding interaction between estazolam and bovine serum albumin: multi-spectroscopic methods and molecular docking technique. *J. Biomol. Struct. Dyn.* **2017**, *35*, 3605-3614.
- ¹⁵⁴ Almutairi, F. M.; Ajmal, M. R.; Siddiqi, M. K.; Amir, M.; Khan, R. H., Multi-spectroscopic and molecular docking technique study of the azelastine interaction with human serum albumin. *J. Mol. Struct.*, **2020**, 1201, 127147-127153.
- ¹⁵⁵ Tanzadehpanah, H.; Mahaki, H.; Moghadan, N. H.; Salehzadeh, S.; Rajabi, O.; Najafi, R.; Amini, R.; Saidijam, M., Binding site identification of anticancer drug gefitinib to HSA and DNA in the presence of five different probes. *J. Biomol. Struct. Dyn.*, **2019**, *37*, 4, 823-836.
- ¹⁵⁶ Turoverov, K. K.; Kunetsova, I. M., Intrinsic Fluorescence of Actin. *J. Fluoresc.*, **2003**, *13*, 1, 41-57.
- ¹⁵⁷ Gakamsky, D.; Gakamsky, A., (2017) Intrinsic Fluorescence of Proteins as a Medical Diagnostic Tool. Disponível em: <https://www.spectroscopyeurope.com/article/intrinsic-fluorescence-proteins-medical-diagnostic-tool> Acesso em: 05/02/2020.
- ¹⁵⁸ Karasev, M. M.; Stepanenko, O. V.; Rumyantsev, K. A.; Turoverov, K. K.; Verkhusha, V. V., Near-Infrared Fluorescent Proteins and Their Applications. *Biochem. Moscow.*, **2019**, *84*, 32-50.
- ¹⁵⁹ Sirangelo, I.; Borriello, M.; Irace, G.; Iannuzzi, C., Intrinsic blue-green fluorescence in amyloid fibrils. *AIMS Biophysics.*, **2018**, *5*, 2, 155-165.
- ¹⁶⁰ Coppin, F.; Michon, J.; Garnier, C.; Frelon, S., Fluorescence Quenching Determination of Uranium (VI) Binding Properties by Two Functional Proteins: Acetylcholinesterase (AChE) and Vitellogenin (Vtg). *J. Fluoresc.*, **2015**, *25*, 3, 569-576.
- ¹⁶¹ Long, Q.; Li, H.; Zhang, Y.; Yao, S., Upconversion nanoparticle-based fluorescence resonance energy transfer assay for organophosphorus pesticides. *Biosens. Bioelect.*, **2015**, *68*, 168-174.
- ¹⁶² Stern, O.; Volmer, M., Über die Abklingzeit der Fluoreszenz. *Phys. Z.* **1919**, *20*, 183-188.
- ¹⁶³ Wang, Z.; Li, C.; Wei, Y., Application of Fluorescence in Studying Therapeutic Enzymes. In: Labrou N. (eds) Therapeutic Enzymes: Function and Clinical Implications. Advances in Experimental Medicine and Biology, vol 1148. Springer, Singapore, **2014**.
- ¹⁶⁴ Jsawal, S.; Kumar, J., Review on fluorescent donor-acceptor conjugated system as molecular probes. *Mat. Today. Proced.*, in press. <https://doi.org/10.1016/j.matpr.2019.12.161>

-
- ¹⁶⁵ Shahabadi, N.; Zendehecheshm, S., Evaluation of ct-DNA and HSA binding propensity of antibacterial drug chloroxine: Multi-spectroscopic analysis, atomic force microscopy and docking simulation. *Spec. Acta Part A: Mol. Biomol. Spec.* **2020**, *In Press*.
- ¹⁶⁶ Das, S.; Sarmah, S.; Roy, A. S., Monitoring fluorescence emission behaviors of dietary polyphenols in a serum albumin environment. *New J. Chem.*, **2020**, *44*, 299-302.
- ¹⁶⁷ Li, Y.; Guo, Q.; Yan, Y.; Chen, T.; Du, C.; Du, H., Different effects of Forsythia suspensa metabolites on bovine serum albumin (BSA). *Spec. Acta Part A: Mol. Biomol. Spec.*, **2019**, *214*, 309-319.
- ¹⁶⁸ Loura L.M.S., Prieto M., Fernandes F. Förster Resonance Energy Transfer as a Tool for Quantification of Protein–Lipid Selectivity. In: Kleinschmidt J. (eds) Lipid-Protein Interactions. Methods in Molecular Biology, vol 2003. Humana, New York, NY, **2019**.
- ¹⁶⁹ Jun, Y. W.; Cho, S. W.; Jung, J.; Huh, Y.; Kim, Y.; Kim, D.; Ahn, K. H., Frontiers in Probing Alzheimer’s Disease Biomarkers with Fluorescent Small Molecules. *ACS Cent. Sci.*, **2019**, *5*, 209–217.
- ¹⁷⁰ Lu, M.; Kaminski, C. F.; Schierle, G. S. K., Advanced fluorescence imaging of *in situ* protein aggregation. *Phys. Biol.*, **2020**, *in press* <https://doi.org/10.1088/1478-3975/ab694e>
- ¹⁷¹ Gyasi, Y. I.; Pang, Y.-P.; Li, X. -R.; Gu, J. -X.; Cheng, X. -J.; Liu, J.; Xu, T.; Liu, Y., Biological applications of near infrared fluorescence dye probes in monitoring Alzheimer’s disease. *Eur. J. Med. Chem.*, **2020**, *187*, 11982, 1-16.
- ¹⁷² Elsinghorst, P. W.; Härtig, W.; Goldhammer, S.; Grosche, J.; Gütschow, M., A gorge-spanning, high-affinity cholinesterase inhibitor to explore b-amyloid plaques. *Org. Biomol. Chem.*, **2009**, *7*, 3940–3946.
- ¹⁷³ Soares, F. A.; Ceschi, M. A.; Franceschini, D. B.; Canto, V. P. do; Netz, P. A.; Campo, L. F. Tianeptine Esters Derivatives: A Study of Protein-Drug Interaction Performed by Fluorescence Quenching and Molecular Docking. *J. Braz. Chem. Soc.*, **2019**, *30*, 10, 2125-2135.
- ¹⁷⁴ Carey, F. A.; Sundberg, R. J., *Advanced organic chemistry. Part B – Reactions and Synthesis*. Springer E-Books. New York, NY: Springer, **2007**.
- ¹⁷⁵ Suryawanshi, V. D.; Walekar, L. S.; Gore, A. H.; Anbhule, P. V.; Kolekar, G. B., Spectroscopic analysis on the binding interaction of biologically active pyrimidine derivative with bovine serum albumin. *J. Pharma. Anal.* **2016**, *6*, 56-63.

-
- ¹⁷⁶ Callis, P. R., Binding Phenomena and Fluorescence Quenching. II: Photophysics of Aromatic Residues and Dependence of Fluorescence Spectra on Protein Conformation *J. Mol. Struct.* **2014**, 1077, 22-29.
- ¹⁷⁷ Paul, B. K.; Guchhait, N.; Bhattacharya, S. C., Binding of ciprofloxacin to bovine serum albumin: Photophysical and thermodynamic aspects. *J. Photochem. Photobiol. B. Biol.* **2017**, 172, 11-19.
- ¹⁷⁸ Lou, Y. Y.; Zhou, K. L.; Pan, D. Q.; Shen, J. L.; Shi, J. H., Spectroscopic and molecular docking approaches for investigating conformation and binding characteristics of clonazepam with bovine serum albumin (BSA). *J. Photochem. Photobiol. B. Biol.* **2017**, 167, 158-167.
- ¹⁷⁹ Naik, P. N.; Chimatadar, S. A.; Nandibewoor, S. T., Interaction between a potent corticosteroid drug - dexamethasone with bovine serum albumin and human serum albumin: a fluorescence quenching and fourier transformation infrared spectroscopy study. *J. Photochem. Photobiol. B. Biol.* **2010**, 100, 147-159.
- ¹⁸⁰ Förster, T.; *Delocalized excitation and excitation transfer. Modern Quantum Chemistry*; Academic Press, New York, USA, **1996**.
- ¹⁸¹ Zisla, F., Subdomain IB is the third major drug binding region of human serum albumin: toward the three-sites model. *Mol. Pharmaceutics.* **2013**, 10, 1668-1682.
- ¹⁸² Sudlow, G.; Birkett, D. J.; Wade, D. N., The characterization of two specific drug binding sites on human serum albumin. *Mol. Pharmacol.* **1975**, 11, 824-832.
- ¹⁸³ Sudlow, G.; Birkett, D. J.; Wade, D. N., Further characterization of specific drug binding sites on human serum albumin. *Mol. Pharmacol.* **1976**, 12, 1052-1061.
- ¹⁸⁴ Zini, R.; Morin, D.; Salvadori, C.; Tillement, J. P., Tianeptine binding to human plasma proteins and plasma from patients with hepatic cirrhosis or renal failure. *Br. J. Clin. Pharmac.* **1990**, 29, 9-18.