

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

**SÍNTESE DE DÍMEROS QUIRAIS DO TIPO BIS-TACRINA
COM POTENCIAL APLICAÇÃO NO TRATAMENTO DA
DOENÇA DE ALZHEIMER**

Dissertação de Mestrado

JOÃO PAULO BIZARRO LOPES

Orientador: Prof. Dr. Marco Antonio Ceschi

Porto Alegre, Fevereiro de 2014

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

JOÃO PAULO BIZARRO LOPES

**SÍNTESE DE DÍMEROS QUIRAIS DO TIPO BIS-TACRINA
COM POTENCIAL APLICAÇÃO NO TRATAMENTO DA
DOENÇA DE ALZHEIMER**

Dissertação apresentada como requisito parcial para a
obtenção do grau de mestre em Química

Prof. Dr. Marco Antonio Ceschi
Orientador

Porto Alegre, Fevereiro de 2014

DECLARAÇÃO

A presente dissertação foi desenvolvida no Instituto de Química da Universidade Federal do Rio Grande do Sul entre março de 2012 e fevereiro de 2014, inteiramente por mim, João Paulo Bizarro Lopes, salvo eventuais colaborações devidamente referenciadas, sob a orientação do professor Marco Antonio Ceschi. A dissertação foi julgada adequada para a obtenção do título de Mestre em Química pela seguinte banca examinadora:

Comissão Examinadora:

Profa. Dra. Vânia Rodrigues de Lima

Prof. Dr. Marco Antonio Ceschi

Prof. Dr. Diogo Seibert Lüdtke

João Paulo Bizarro Lopes

Prof. Dr. Dennis Russowsky

“Quando fizeres algo nobre e belo e ninguém notar, não fique triste. Pois o sol toda manhã faz um lindo espetáculo e, no entanto, a maioria da plateia ainda dorme...”

(John Lennon)

Dedico este trabalho ao meu pai, José Marcio Pereira Lopes (*in memoriam*). Exemplo de homem e de pai, carinhoso e correto, sempre foi minha fonte de inspiração e que em seu último conselho dirigido a mim em vida, orientou-me realizar um mestrado.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus pela minha existência e por ter saúde e permitindo assim que pudesse realizar meus objetivos iniciais nesta longa caminhada que é a vida.

Agradeço, de forma incomparável, minha mãe, Denise, mãe forte, que sempre me deu confiança, coragem e apoio e que mesmo distante sempre me oferece seu afeto e carinho. Aos meus irmãos, João Marcos e Maria Laura, pelo amor enorme que me permitem sentir por eles.

Aos meus avós e todos os meus parentes pela ajuda que sei que sempre posso contar quando preciso, e que toleram as ausências pelos diversos motivos.

Ao professor Marco Antonio pelo tempo e paciência a mim dedicados, pela excelente orientação e pelo espírito crítico o qual espero, pelo menos em parte, ter adquirido.

Aos colegas de trabalho do laboratório K-215 pelos divertidos momentos que tornam o ambiente de trabalho agradável e propício para o desenvolvimento da pesquisa. Agradeço em especial o doutorando Jessé Sobieski, pela ajuda, colaboração no trabalho e experiência transmitida.

Um grande agradecimento aos meus amigos e amigas, pelo companheirismo, pela tolerância e pelos momentos de diversão e descontração, sem os quais seria impossível uma mente saudável.

A todos, muito obrigado!

João Paulo

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	VIII
LISTA DE ESQUEMAS.....	X
LISTA DE TABELAS.....	XI
LISTA DE ABREVIATURAS.....	XII
RESUMO.....	XIII
ABSTRACT.....	XIV
1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1. A DOENÇA DE ALZHEIMER.....	2
1.1.1. Características e Sintomas.....	2
1.1.2. Hipótese Colinérgica.....	3
1.1.3. Enzimas Colinesterase.....	5
1.1.4. Inibidores das Enzimas Colinesterase.....	9
1.2. QUIRALIDADE E ATIVIDADE BIOLÓGICA.....	11
1.3. DÍMEROS DO TIPO BIS-TACRINA.....	14
1.4. ESTRATÉGIA SINTÉTICA: A REAÇÃO DE FRIEDLÄNDER.....	19
2. OBJETIVOS.....	22
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	24
3.1. SÍNTESE DAS CETONAS QUIRAIS.....	25
3.1.1. Obtenção da (<i>R</i>)-3-metilcicloexanona e da (<i>S</i>)-3-metilcicloexanona.....	25
3.1.2. Obtenção da (<i>R</i>)-2,2,5-trimetilcicloheptan-1,3-diona.....	27
3.2. SÍNTESE DOS INTERMEDIÁRIOS 9-CLORO-1,2,3,4-TETRAIDROACRIDINA.....	29
3.2.1. Obtenção das 9-cloro-1,2,3,4-tetraidroacridinas quirais.....	29
3.2.2. Obtenção da 9-cloroacridina a partir da (<i>R</i>)-2,2,5-trimetilciclohepta-1,3-diona.....	37
3.3. SÍNTESE DOS HOMODÍMEROS QUIRAIS TIPO BIS-TACRINA.....	38
3.4. SÍNTESE DOS HETERODÍMEROS QUIRAIS TIPO BIS-TACRINA.....	45
3.4.1. Obtenção dos intermediários 9-(1,7-diaminoheptil)-1,2,3,4-tetraidroacridina.....	45
3.4.2. Obtenção dos heterodímeros quirais.....	47
3.5. ANÁLISE BIOLÓGICA.....	54
3.5.1. Metodologia.....	54
3.5.2. Resultados e Discussão da Análise Biológica.....	55
4. CONCLUSÕES.....	58
5. PARTE EXPERIMENTAL.....	60

5.1 MATERIAIS E MÉTODOS.....	61
5.2. PROCEDIMENTOS.....	62
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	74
ANEXOS.....	79

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Neurotransmissor acetilcolina, ACh.	3
Figura 2. Representação esquemática da sinapse colinérgica no sistema nervoso central.	5
Figura 3. a) Representação esquemática da enzima AChE de <i>T. californica</i> e à direita os aminoácidos presentes no CAS e no PAS; b) Detalhe do sítio ativo da enzima AChE obtido a partir das enzimas de <i>H. sapiens</i> , <i>M. musculus</i> e <i>T. californica</i>	7
Figura 4. Inibidores de colinesterase.	10
Figura 5. Ação do bis-tacrina nos dois sítios da enzima acetilcolinesterase.	15
Figura 6. Dímeros do tipo bis-tacrina testados como ChEI.	16
Figura 7. a) Exemplos de híbridos da tacrina testados como ChEI; b) Híbridos tacrina-lofina sintetizados por nosso grupo de pesquisa e testados como ChEI.	18
Figura 8. Compostos acridínicos.	19
Figura 9. Espectro de RMN de ^{13}C (APT, CDCl_3 , 75 MHz) de (R)- 12 , bruto da reação.	27
Figura 10. Espectro de RMN de ^1H (CDCl_3 , 300 MHz) da (<i>R</i>)-9-cloro-3-metil-1,2,3,4-tetraidroacridina, (R)- 22b	33
Figura 11. Espectro de RMN de ^{13}C (APT, CDCl_3 , 75 MHz) da (<i>R</i>)-9-cloro-3-metil-1,2,3,4-tetraidroacridina, (R)- 22b	34
Figura 12. Espectro de RMN de ^1H (CDCl_3 , 300 MHz) da (<i>R</i>)-9-cloro-1-metil-1,2,3,4-tetraidroacridina, (R)- 22d	34
Figura 13. Espectro de RMN de ^1H (CDCl_3 , 300 MHz) da (<i>R</i>)-6,9-dicloro-3-metil-1,2,3,4-tetraidroacridina, (R)- 22c	35
Figura 14. Espectro de RMN de ^{13}C (APT, CDCl_3 , 75 MHz) da (<i>R</i>)-6,9-dicloro-3-metil-1,2,3,4-tetraidroacridina, (R)- 22c	36
Figura 15. Espectro de RMN bidimensional HMQC da (<i>R</i>)-6,9-dicloro-3-metil-1,2,3,4-tetraidroacridina, (R)- 22c	37

Figura 16. a) Homodímero quiral (R)- 33b ; b) Ampliação do espectro de RMN de ^1H (CDCl_3 , 300 MHz) do homodímero (R)- 33b entre 1,0 e 4,3 ppm e, acima e à esquerda, entre 7,0 e 8,2 ppm.	41
Figura 17. Espectro de RMN de ^{13}C (APT, CDCl_3 , 75 MHz) do homodímero (R)- 33b	42
Figura 18. a) Homodímero quiral (R)- 33b ; b) Espectro de RMN bidimensional COSY do homodímero quiral (R)- 33b	43
Figura 19. Ampliação do espectro de RMN bidimensional HMQC do homodímero (R)- 33b , ampliação entre 1,0 e 4,0 ppm (^1H) e entre 20,0 e 55,0 ppm (^{13}C).	44
Figura 20. Espectro de RMN de ^1H (CDCl_3 , 300 MHz) da amina 39a	46
Figura 21. Espectro de RMN de ^{13}C (APT) (CDCl_3 , 75 MHz) da amina 39a	46
Figura 22. a) Heterodímero quiral (R)- 40b ; b) Ampliação do espectro de RMN de ^1H (CDCl_3 , 300 MHz) do heterodímero (R)- 40b entre 1,0 e 4,4 ppm e, acima e à esquerda, entre 7,0 e 8,5 ppm.	49
Figura 23. Ampliação do espectro de RMN de ^{13}C (APT) (CDCl_3 , 75 MHz) do heterodímero (R)- 40b : a) entre 20,0 e 51,0 ppm; b) entre 110,0 e 164,0 ppm.	50
Figura 24. a) Heterodímero quiral (R)- 40b ; b) Espectro de RMN bidimensional COSY do heterodímero quiral (R)- 40b	51
Figura 25. Ampliação do espectro de RMN bidimensional HMQC do heterodímero quiral (R)- 40b entre 0 e 4,0 ppm (^1H) e 10,0 e 55,0 ppm (^{13}C).	52
Figura 26. Ampliação do espectro de RMN de ^{13}C (APT), entre 110,0 e 164,0 ppm, do a) heterodímero quiral (R)- 40b , b) homodímero quiral (R)- 33b	53

LISTA DE ESQUEMAS

Esquema 1. Biossíntese do neurotransmissor acetilcolina.	4
Esquema 2. Mecanismo da hidrólise da acetilcolina pela enzima AChE.	8
Esquema 3. Síntese dos dímeros bis(n)-tacrina por Pang.	14
Esquema 4. Esquema geral da reação de Friedländer.	19
Esquema 5. Mecanismo proposto para a reação de Friedländer.	20
Esquema 6. Reação de Friedländer para síntese da tacrina e análogos.	21
Esquema 7. Mecanismo para obtenção da tacrina e análogos com ácido de Lewis.....	21
Esquema 8. Retro-aldol da pulegona, obtenção da 3-metilcicloexanona quiral (12).	25
Esquema 9. Mecanismo de retro-aldol da pulegona.	26
Esquema 10. Epoxidação, seguida de expansão da (<i>R</i>)-(+)-pulegona.	27
Esquema 11. Mecanismo para obtenção da (<i>R</i>)-2,2,5-trimetilcicloheptan-1,3-diona, (R)- 17 . .	28
Esquema 12. Obtenção das 9-cloroacridinas 22	29
Esquema 13. Proposta de mecanismo para a reação de Friedländer para a síntese da (<i>R</i>)-9-cloro-3-metil-1,2,3,4-tetraidroacridina, (R)- 22b	30, 31
Esquema 14. Tentativa de síntese da 9-cloroacridina quiral 32	37
Esquema 15. Síntese dos homodímeros quirais tipo do bis-tacrina (33).	38
Esquema 16. Mecanismo para obtenção dos homodímeros quirais do tipo bis-tacrina (33). .	40
Esquema 17. Síntese da amina 39 com iodeto de potássio.	45
Esquema 18. Síntese dos heterodímeros quirais do tipo bis-tacrina (40).	47
Esquema 19. Reação do Método de Ellman.	55

LISTA DE TABELAS

Tabela I. Atividade de inibição da AChE de análogos quirais da tacrina.	12
Tabela II. Intermediários 9-cloroacridinas quirais.	32
Tabela III. Homodímeros quirais do tipo bis-tacrina.	39
Tabela IV. Heterodímeros quirais do tipo bis-tacrina.	48
Tabela V. Análise biológica dos dímeros bis-tacrina.	57

LISTA DE ABREVIATURAS

DA = doença de Alzheimer

A β = beta-amilóide (proteína)

ACh = acetilcolina (neurotransmissor)

SNC = Sistema Nervoso Central

SNP = Sistema Nervoso Periférico

CoA = coenzima A

ChAT = colina acetiltransferase (enzima)

ChE = colinesterase (enzimas)

ChEI = inibidor de colinesterase

AChE = acetilcolinesterase (enzima)

BuChE = butirilcolinesterase (enzima)

CAS = *catalytic active site* ou sítio ativo catalítico

PAS = *peripheral anionic site* ou sítio aniônico periférico

THA = tacrina

S_NAc = substituição nucleofílica acílica

E1_CB = eliminação unimolecular de base conjugada

S_NAr = substituição nucleofílica aromática

IC₅₀ = concentração de substância necessária para inibir 50% da quantidade de enzima presente no ensaio biológico.

RESUMO

A doença de Alzheimer (DA) é uma doença neurodegenerativa que causa perda progressiva e irreversível das funções cerebrais, atualmente não tem cura e não existe um tratamento específico eficaz. Uma estratégia para o tratamento paliativo é restaurar o neurotransmissor acetilcolina utilizando fármacos inibidores das enzimas colinesterase (ChEI), nesse contexto a tacrina foi o primeiro fármaco aprovado para o tratamento da DA. Há mais de uma década os análogos dímeros da tacrina, conhecidos como bis-tacrina, mostraram maior eficiência na inibição da enzima acetilcolinesterase (AChE) comparativamente ao fármaco tacrina e seus análogos, devido à ação simultânea em dois sítios da enzima, catalítico e periférico. Desde então, vários compostos dímeros e híbridos contendo o núcleo tacrina tem sido sintetizados e testados como ChEI.

Neste trabalho realizou-se a síntese de dímeros quirais do tipo bis-tacrina, onde dois núcleos da tacrina com substituintes quirais estão conectados por uma cadeia espaçadora de carbonos metilênicos. A reação de condensação de Friedlander foi a estratégia adotada para a obtenção do núcleo tacrina, onde uma ciclocetona quiral de origem terpênica foi condensada com um ácido *o*-aminobenzóico na presença de POCl₃, formando os intermediários do tipo 9-cloroacridinas quirais. As ciclocetonas quirais foram sintetizadas a partir da reação de retroaldol do monoterpeneo natural pulegona, comercialmente disponível nas formas (*R*)-(+)- e (*S*)-(-). A preparação dos homodímeros envolveu a reação de substituição nucleofílica aromática (S_NAr) entre as 9-cloroacridinas e a 1,7-heptanodiamina, que contém a cadeia alquílica espaçadora. A síntese dos heterodímeros necessitou a preparação dos precursores 9-(1,7-diaminoetil)-1,2,3,4-tetraidroacridina, contendo o núcleo tacrina e o grupo amino separados pela cadeia espaçadora, para posterior reação de S_NAr com as 9-cloroacridinas. Os produtos obtidos neste trabalho foram purificados por cromatografia em coluna e caracterizados por espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN) de ¹H e ¹³C, no infravermelho (IV), atividade óptica e medidas de ponto de fusão. As análises de atividade óptica mostraram que a quiralidade foi mantida nos intermediários e nos produtos finais sintetizados. Foram realizados ensaios biológicos de inibição das enzimas AChE e BuChE com os compostos quirais disponíveis, e os dímeros da série (*R*) mostraram ser ativos como inibidores das enzimas.

Palavras-chave: bis-tacrina; análogos quirais; síntese.

ABSTRACT

Alzheimer's disease (AD) is a progressive neurodegenerative disorder which causes progressive and irreversible loss of brain functions and currently has no cure and no effective specific treatment. A strategy for palliative treatment of AD is the restoration of neurotransmitter acetylcholine using drugs cholinesterase inhibitors (ChEI) and tacrine was the first drug approved for the treatment of AD. About fifteen years ago, bis(n)-tacrine analogues linked by an alkylene chain were prepared, and it was proved that these dimeric molecules of tacrine offered a much stronger potency and selectivity toward AChE. Bis(7)-tacrine simultaneously binds at both the CAS and the PAS sites and provides a higher selectivity towards AChE over BuChE.. Since then, several dimmers and hybrid compounds containing the nucleus tacrine, have been synthesized and tested as cholinesterase inhibitors.

In this work were carried out the syntheses of chiral homodimers and heterodimers of bis-tacrine type, where two nucleus of tacrine with chiral substituents were connected by an alkyl chain as spacer. The Friedländer condensation reaction was performed to obtain the tacrine nucleus, the cycloketone from a chiral terpene source was condensed with an *o*-aminobenzoic acid in the presence of POCl₃, forming 9-chloroacridine intermediates. The chiral cycloketone were obtained from natural monoterpene pulegone, commercially available in (*R*)-(+)- and (*S*)-(-) enantiomers. The preparation of homodimers involved the nucleophilic aromatic substitution (S_NAr) reaction between 9-chloroacridines and 1,7-diaminoheptane, which contains the spacer alkyl chain. The synthesis of heterodimers required the preparation of precursor 9-(1,7-diaminoheptyl)-1,2,3,4-tetrahydroacridine, containing tacrine nucleus and the amino group separated by spacer chain, for subsequent S_NAr reaction with the 9-chloroacridines. The products obtained in this work were purified by column chromatography and characterized by nuclear magnetic resonance (NMR) spectroscopy of ¹H and ¹³C, infrared spectroscopy (IR), optical activity and melting point measurements. The analysis of optical activity showed that the chirality was maintained in the intermediate and final products synthesized. Biological assays of inhibition of AChE and BuChE enzymes were performed with chiral compounds. The dimers of (*R*)-series were active as cholinesterase inhibitors.

Keywords: bis-tacrine; chiral analogues; synthesis.

1. INTRODUÇÃO

1.1. A DOENÇA DE ALZHEIMER

1.1.1. Características e Sintomas

O mal de Alzheimer, ou doença de Alzheimer (DA), é uma desordem neurodegenerativa que resulta na perda progressiva e irreversível das funções cognitivas, sendo a forma mais comum de demência, levando à morte entre três a nove anos após o diagnóstico.¹ De acordo com dados da Organização Mundial de Saúde (OMS), trinta e seis milhões de pessoas no mundo eram afetadas pela doença em 2010, e a estimativa é que os casos dobrem a cada vinte anos.²

A doença foi descoberta e descrita em 1907 pelo médico psiquiatra e neuropatologista alemão Alois Alzheimer (1864-1915). Alzheimer tinha uma paciente que aos 51 anos de idade começou a apresentar os sintomas que hoje são associados à DA, tais como prejuízos crescentes de memória, alterações repentinas de humor, como agressividade repentinamente sucedida por medo e perda das funções cognitivas. A regressão mental da paciente avançou constantemente até levar a óbito após quatro anos e meio de doença.³ Após a morte da paciente, Alzheimer examinou amostras de seu encéfalo sob o microscópio e observou alterações nas neurofibrilas que servem de sustentação ao citoesqueleto celular e, em muitos lugares onde deveriam haver neurônios, haviam apenas feixes de fibrilas. Ele observou também o acúmulo entre as células de um produto patológico do metabolismo dos neurônios.

Atualmente sabe-se que essas fibrilas observadas por Alzheimer são emaranhados neurofibrilares da proteína tau hiperfosforilada no interior das células.¹ A proteína tau é abundante no axônio, auxilia na montagem e sustentação dos microtúbulos, estruturas que servem de sustentação ao citoesqueleto.⁴ Há evidências que a proteína tau também auxilia na transmissão sináptica.⁵ Os emaranhados neurofibrilares são compostos por filamentos helicoidais emparelhados, contendo em sua maior parte uma forma anormal da proteína tau, hiperfosforilada que, associada ao microtúbulo, promove o seu desdobramento, diminuição do tamanho e leva ao seu rompimento, contribuindo para a morte celular.⁶ O produto patológico acumulado que Alzheimer observou entre os neurônios do encéfalo de sua paciente, são placas senis contendo a proteína β -amilóide ($A\beta$) depositada.⁷ A proteína $A\beta$ é sintetizada dentro do neurônio e sua função normal ainda não é bem conhecida. Embora alguns estudos em animais tenham demonstrado que a ausência de $A\beta$ não conduz a nenhuma perda de funções fisiológicas, várias atividades potenciais foram descobertas para a $A\beta$, como antioxidante,⁸ ativador de enzimas cinase,⁹ regulador de transporte de colesterol¹⁰ e atividade

antimicrobiana.¹¹ Na DA, a exposição à proteína A β inibe enzimas na mitocôndria, consequentemente, a produção de energia, o transporte de elétrons e o consumo de oxigênio são prejudicados, causando o estresse oxidativo, que é o excesso de espécies oxidantes no cérebro.^{12,13}

A causa da doença de Alzheimer ainda não é conhecida, o principal fator de risco associado à DA é a idade avançada. Entretanto, outros fatores como histórico familiar, hipertensão, depressão, diabetes, altos níveis de colesterol e pouca atividade física e cognitiva também podem contribuir para o desenvolvimento da DA.⁶ Os sintomas da doença, entre eles o mais pronunciado, a perda progressiva da memória, estão associados aos déficits na transmissão colinérgica, isto é, uma transmissão sináptica deficiente entre os neurônios colinérgicos (neurônios que utilizam a acetilcolina (ACh, Figura 1) como neurotransmissor) no sistema nervoso central (SNC), principalmente no lobo temporal e no hipocampo.¹⁴

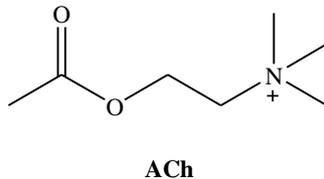
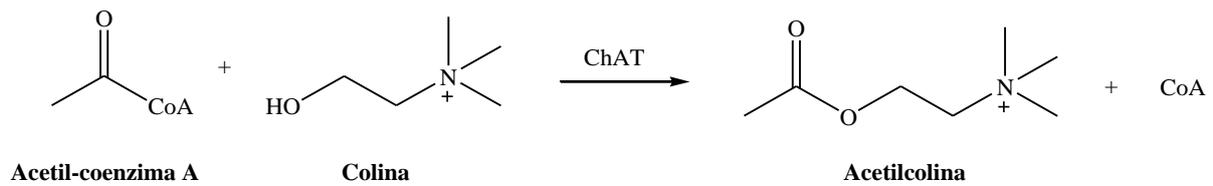


Figura 1. Neurotransmissor acetilcolina, ACh.

1.1.2. Hipótese Colinérgica

A sinapse ocorre na região chamada fenda sináptica, um pequeno espaço entre o axônio de um neurônio pré-sináptico e um neurônio pós-sináptico, mais comumente no dendrito, mas também ocorre com corpo celular ou o axônio (Figura 2, página 4). A acetilcolina é o neurotransmissor mais utilizado para sinapses excitatórias no sistema nervoso (SN), tanto no central (SNC) quanto no periférico (SNP).³ A ACh é sintetizada na zona ativa do neurônio pré-sináptico, que é a região do axônio mais próxima à fenda sináptica. A síntese ocorre a partir da acetil-coenzima A (acetil-CoA), oriunda da mitocôndria, e colina, presente no citoplasma, a reação é catalisada pela enzima colina acetiltransferase (ChAT), Esquema 1.



Esquema 1. Biossíntese do neurotransmissor acetilcolina.

Uma ilustração detalhada da transmissão colinérgica é mostrada na Figura 2. Após ser sintetizada a ACh é armazenada em vesículas, onde será liberada na fenda sináptica através de exocitose. A indução da exocitose da ACh ocorre com o aumento da concentração de íons cálcio Ca^{+2} na zona ativa, e esta concentração aumenta devido a abertura de canais iônicos (estruturas proteicas) seletivos que permitem a entrada de Ca^{+2} na célula. Os canais iônicos são abertos quando o impulso nervoso (ou potencial de ação), gerado pela despolarização da membrana celular, chega à zona ativa.¹⁵ Após liberada na fenda sináptica, a ACh se liga aos receptores específicos, que são outros tipos de canais iônicos, na membrana do neurônio pós-sináptico, promovendo a abertura desses canais e a entrada de íons sódio e potássio, Na^+ e K^+ , na célula. A entrada dos íons Na^+ e K^+ promove despolarização da membrana e, conseqüentemente um novo impulso nervoso gerado na célula pós-sináptica.^{3,15} Há evidências que a proteína $A\beta$ se liga aos receptores da ACh, bloqueando-os e contribuindo para os déficits colinérgicos.¹ Nos últimos anos, as estratégias de tratamento da DA têm focado no restabelecimento da neurotransmissão colinérgica no cérebro. A “hipótese colinérgica” afirma que a perda das funções colinérgicas no sistema nervoso central contribui significativamente para o declínio cognitivo associado com a idade avançada e a DA.¹⁶ Opções terapêuticas atuais para o tratamento da DA consistem no uso de fármacos inibidores de enzimas colinesterase (ChEI), que aumentam a neurotransmissão em sinapses colinérgicas no cérebro e reduzem temporariamente os déficits cognitivos.

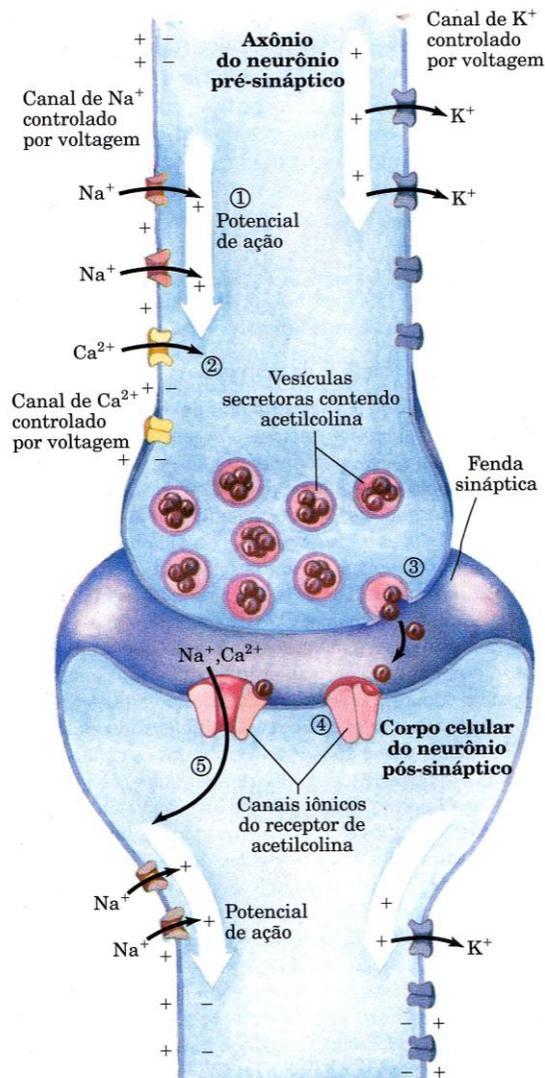


Figura 2. Representação esquemática da sinapse colinérgica no sistema nervoso central: ① Potencial de ação gerado pela despolarização da membrana celular; ② Entrada de Ca^{+2} no meio celular; ③ Exocitose da acetilcolina; ④ Ligação da acetilcolina ao receptor; ⑤ Entrada de Ca^{+2} e Na^{+} no neurônio pós-sináptico e geração de um novo potencial de ação.¹⁵

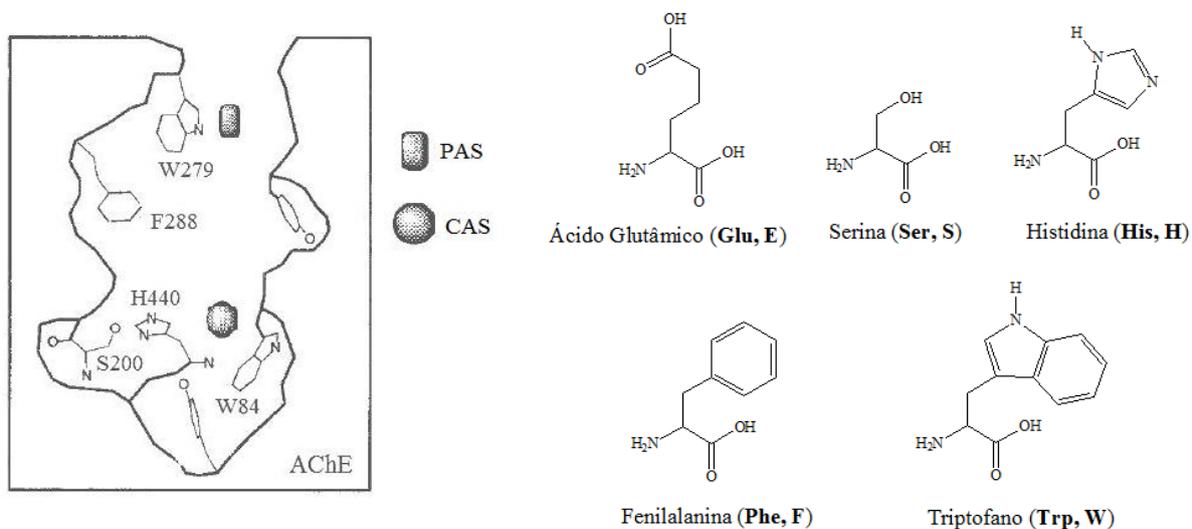
1.1.3. Enzimas Colinesterase

A acetilcolinesterase (AChE) e a butirilcolinesterase (BuChE) são enzimas que constituem o grupo das colinesterases. A acetilcolinesterase, entre outras funções fisiológicas, age em células pós-sinápticas, realizando a hidrólise da acetilcolina e encerrando a transmissão do impulso nervoso.¹⁷ Esse processo é importante para que o neurônio retorne ao seu estado de repouso e não ocorra fadiga celular, que pode levar a lesões cerebrais, ou para que não ocorra um processo chamado dessensibilização. Nesse processo, os canais receptores

ativados pelo neurotransmissor fecham-se, apesar da contínua presença de ACh, e esse estado pode persistir por muitos segundos mesmo após a remoção da ACh, podendo levar a uma falha de memória ou falhas em junções neuromusculares.³ A função fisiológica da BuChE ainda não é bem conhecida, mas é sugerida sua participação no mecanismo regulatório dos níveis da AChE na sinapse colinérgica.¹⁸ Além disso, a observação de que a razão BuChE/AChE eleva com o progresso da DA, com o aumento significativo da BuChE no hipocampo e córtex temporal, deve favorecer o uso de inibidores seletivos de BuChE em tratamentos de formas moderadas a avançadas de DA.^{19,20}

A enzima AChE é uma estrutura proteica cujo arranjo tridimensional foi determinado a partir de análise de raios-X de amostra extraída do peixe elétrico *Torpedo californica*²¹ (Figura 3a). O estudo mostrou que o sítio ativo da enzima (*catalytic active site* – CAS) se encontra ao fundo de uma estreita e longa cavidade de aproximadamente 20Å, onde estão localizados os aminoácidos serina (Ser200), histidina (His440) e ácido glutâmico (Glu327), que formam a tríade catalítica da enzima.²² Os números ao lado da representação do aminoácido correspondem a posição na cadeia proteica da AChE no peixe elétrico, podendo haver uma pequena variação conforme a espécie. Em seres humanos (*Homo sapiens*) a tríade provavelmente posiciona-se como Ser203, His447 e Glu334, Figura 3b.²³ Porém, essa variação não altera as propriedades enzimáticas e, portanto, os estudos feitos com a AChE do *T. Californica* são seguramente aplicados para a AChE de seres humanos. Além do CAS, a enzima também possui um sítio aniônico periférico (*peripheral anionic site* – PAS), próximo à entrada da cavidade.²⁴ A AChE é encontrada predominantemente no cérebro, onde é cerca de dez vezes mais abundante que a BuChE, e também no músculo estriado e no eritrócito. A BuChE é encontrada principalmente no músculo cardíaco e liso, pele e plasma.²⁵

a)



b)

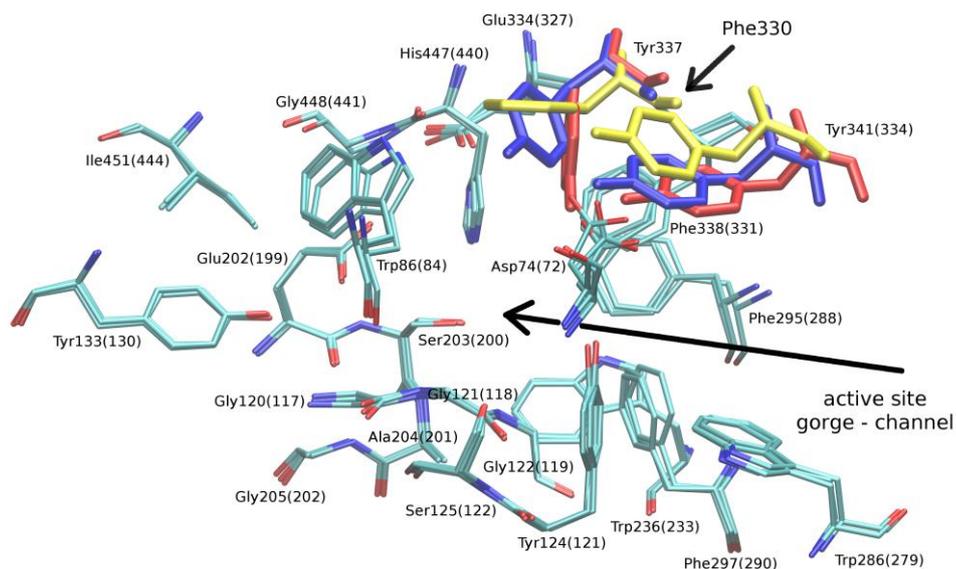
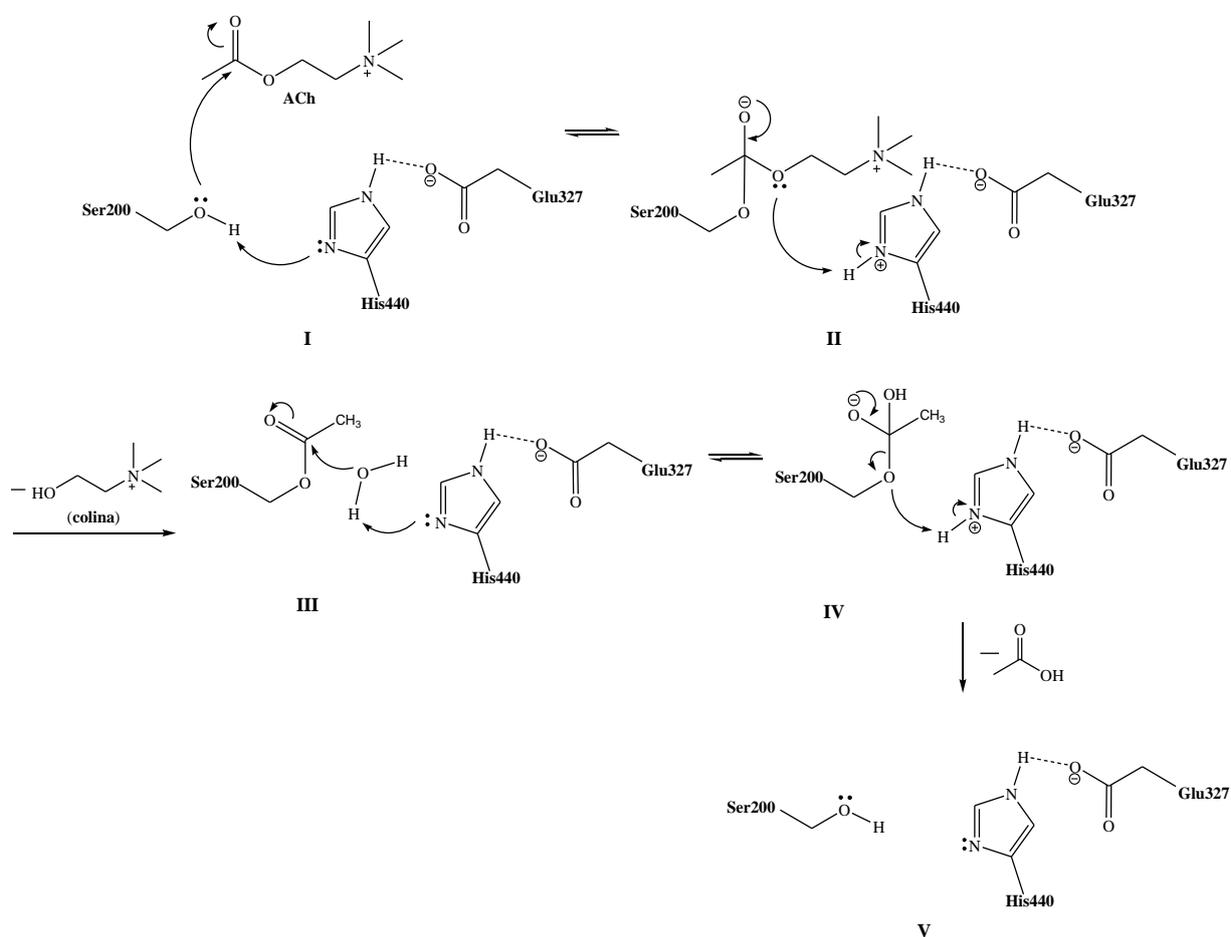


Figura 3. a) Representação esquemática da enzima AChE de *T. californica* e à direita os aminoácidos presentes no CAS e no PAS; b) Detalhe do sítio ativo da enzima AChE obtido a partir das enzimas de *H. sapiens*, *M. musculus* e *T. californica*.

O mecanismo de hidrólise da acetilcolina envolve diretamente os três aminoácidos da tríade catalítica, Ser200, His440 e Glu327. Porém outros aminoácidos, como Glu199, Phe330 e Trp84 estão envolvidos na estabilização dos estados intermediários.²² Como mostrado no Esquema 2, inicialmente, em um estado **I**, o hidrogênio da hidroxila da **Ser200** é capturado

pelo nitrogênio do anel imidazólico da **His440**, ativando o oxigênio nucleofílico da **Ser200**. Com o oxigênio ativado, ocorre o ataque nucleofílico da **Ser200** no carbono da carboxila da acetilcolina (**ACh**), levando ao estado intermediário tetraédrico representado por **II**. Estudos mostram que o glutamato **Glu327** (forma aniônica do ácido glutâmico) atua como sítio aniônico estabilizando a forma protonada da **His440**.¹⁸ Posteriormente, ocorre a desprotonação da **His440** pelo oxigênio da **ACh**, levando ao rompimento da ligação C-O na **ACh**. Esse rompimento é favorecido pela neutralização do sistema (representado pelo estado **III**) e a liberação de **colina**, que será recapturada pela célula para nova síntese de **ACh**. Uma molécula de água (H_2O), presente no meio celular, é desprotonada pela **His440**, e promove substituição nucleofílica acílica (S_NAc) na **acetil-Ser200**, levando a formação de ácido acético (CH_3COOH) e regenerando o aminoácido **Ser200**.^{26,27,28}



Esquema 2. Mecanismo da hidrólise da acetilcolina pela enzima AChE.

1.1.4. Inibidores das Enzimas Colinesterase

Os inibidores de acetilcolinesterase (ChEI) atuam sobre o sítio ativo da enzima impedindo a interação de uma molécula de substrato ou sua hidrólise. A maioria dos inibidores atua de forma reversível, através de interações intermoleculares com os aminoácidos da cavidade enzimática, do tipo dipolo-dipolo, ligações de hidrogênio e, principalmente, interações do tipo π - π *stacking* entre os anéis aromáticos.²⁹ Os inibidores que atuam de forma irreversível formam complexos covalentes com a enzima, como o metrifonato, que era originalmente utilizado no tratamento da esquistossomose. Apesar de sua alta eficácia como ChEI, os testes para utilização no tratamento da DA foram interrompidos na fase clínica III devido a problemas graves para a saúde humana.³⁰

A tacrina ou 9-amino-1,2,3,4-tetraidroacridina (THA, Figura 4), um inibidor reversível, foi o primeiro fármaco aprovado pela FDA (*Food and Drug Administration*) dos EUA, em 1993, para o tratamento sintomático da doença de Alzheimer, comercializada como Tacrinal® e Cognex®.¹⁶ Entretanto esta droga apresenta efeitos colaterais, como distúrbios gastrointestinais e hepatotoxicidade. Neste contexto, várias pesquisas evidenciam a importância da preparação de novos análogos estruturais da tacrina, com o objetivo de aumentar a eficiência do fármaco e minimizar os efeitos colaterais. Outros fármacos ChEI reversíveis foram aprovados para o tratamento sintomático da DA, como o donepezil, a (S)-rivastigmina, galantamina e a (-)-huperzina A, porém assim como a tacrina, possuem benefícios limitados quanto ao uso terapêutico, como a perda de eficácia ao longo do tempo³¹ (Figura 4). As (-)-huprinas, que combinam as estruturas da tacrina e da huperzina, também são fortes inibidores de ChE e estão em fase de testes clínicos.

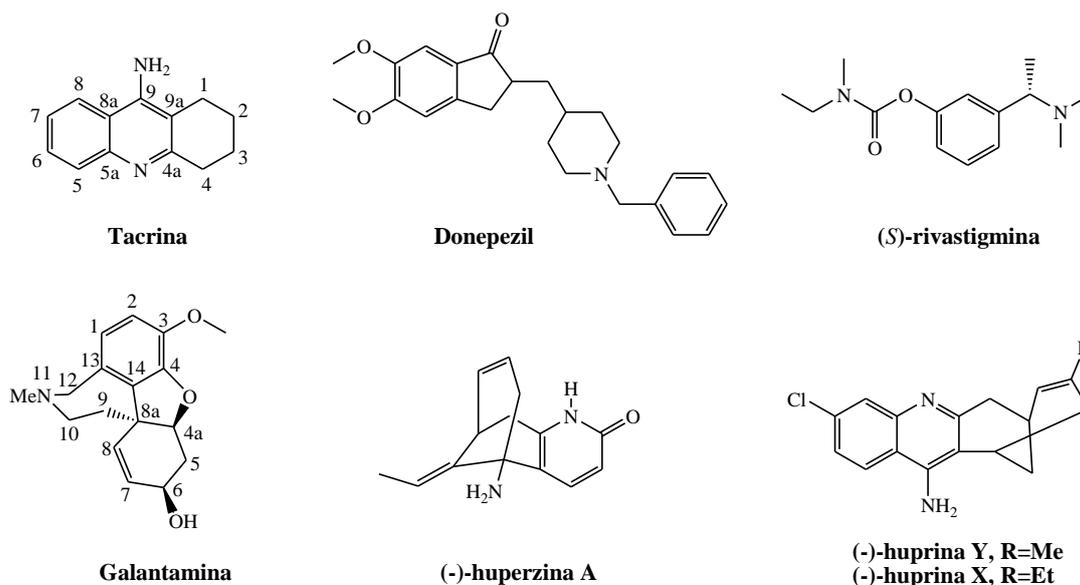


Figura 4. Inibidores de colinesterase.

O donepezil foi o segundo fármaco aprovado para o tratamento da DA, em 1996 e é comercializado na forma racêmica como Aricept®. O centro quiral do donepezil é localizado em posição α -carbonila, portanto no pH fisiológico há grande possibilidade de tautomerização para a forma enol, levando a racemização.³² Em 2000 foi aprovado um terceiro fármaco para o tratamento paliativo da DA, a (S)-rivastigmina (Exelon®), que em 2006 foi o primeiro fármaco aprovado para o tratamento da doença de Parkinson, e somente o enantiômero (S) é biologicamente ativo.³³ A galantamina (Reminyl®) foi aprovada em 2001 e somente um enantiômero (4a*S*,6*R*,8a*S*) é ativo na enzima (Figura 4). Satcharoen e colaboradores obtiveram uma síntese enantiosseletiva em apenas oito etapas da (4a*S*,6*R*,8a*S*)-(-)-galantamina.³⁴ A (-)-huperzina A é um alcaloide extraído da planta *Huperzia serrata*, é tradicionalmente usada na medicina chinesa para o tratamento de problemas de memória e demonstrou ser um potente e seletivo inibidor de AChE.³⁵ A huperzina A já foi sintetizada na forma racêmica, porém a atividade inibitória foi muito mais baixa comparado ao produto natural.³² A (-)-huprina X apresenta uma das mais fortes interações com o sítio ativo da AChE.³⁶ Formas racêmicas sintetizadas das huprinas também mostraram ser ativas como ChEI, embora menos que a forma (-), a (±)-huprina Y foi mais eficiente com maior interação com a AChE, enquanto a (±)-huprina X foi mais específica para manter a concentração extracelular de acetilcolina.^{37,38}

1.2. QUIRALIDADE E ATIVIDADE BIOLÓGICA

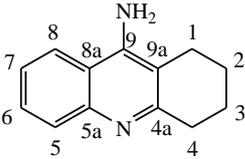
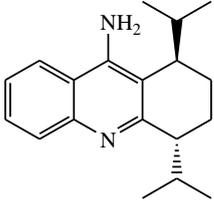
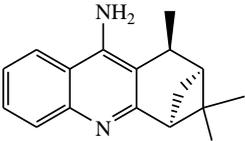
Para que um fármaco seja útil como instrumento terapêutico ou científico, ele precisa agir de modo seletivo sobre células e tecidos específicos. Em outras palavras, ele precisa exibir um alto grau de especificidade pelo sítio de ligação. Do mesmo modo, as proteínas ou enzimas que funcionam como alvo geralmente mostram um alto grau de especificidade pelo ligante, ligando-se apenas às moléculas de um tipo específico.³⁹ O conhecimento da topografia tridimensional do receptor, especialmente do sítio de interação, permite o desenho de inibidores enzimáticos ou de antagonistas e agonistas de receptores por processos de complementaridade molecular desejada, que podem, por sua vez, discriminar entre diferentes interações intermoleculares ou ligações covalentes.⁴⁰ As interações intermoleculares de um fármaco com a enzima dependem não apenas de sua estrutura, mas também da forma como os ligantes estão conectados na molécula. A existência de enzimas e receptores estereoespecíficos no organismo conduz às características biológicas diferentes para as estruturas quirais. Essa ação estereosseletiva é devido à quiralidade dos aminoácidos constituintes das estruturas proteicas e resulta, na maioria das vezes, em uma ocupação preferencial de um sítio receptor por um dos enantiômeros.⁴¹

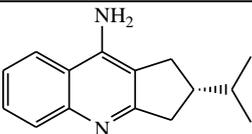
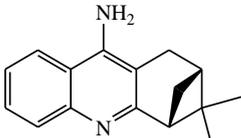
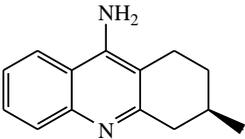
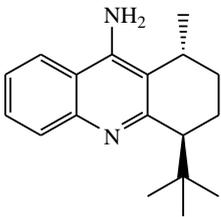
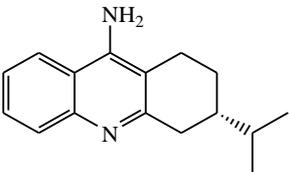
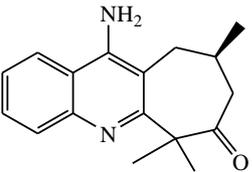
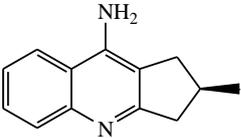
Um dos primeiros relatos da literatura que indicava a relevância da estereoquímica e da configuração absoluta na atividade biológica foi feito por Arnaldo Piutti, em 1886, descrevendo o isolamento e as diferentes propriedades gustativas dos enantiômeros do aminoácido asparagina.⁴² Essas diferenças de propriedades organolépticas expressavam diferentes modos de reconhecimento molecular do ligante pelo sítio receptor localizado nas papilas gustativas, traduzindo sensações distintas. Entretanto, a importância da configuração absoluta na atividade biológica permaneceu adormecida até a década de 60, quando o uso da forma racêmica do sedativo talidomida, por gestantes, resultou no nascimento de cerca de doze mil crianças com má formação.²⁹ O estudo do metabolismo permitiu evidenciar que o enantiômero (*R*)-talidomida é o responsável pelas atividades sedativa e analgésicas. Recentemente, um estudo mostrou que o enantiômero (*S*) liga-se à proteína cereblon, muito importante nos dois primeiros meses do feto para o desenvolvimento dos membros. A ligação torna inativa a proteína, o que provoca a má formação fetal.⁴³ Entretanto, o mesmo enantiômeros (*S*)-talidomida está associado a inibição do fator de necrose tumoral (TNF- α) e

ao excesso na produção de citocina, que está associado ao desenvolvimento de câncer e doenças neurodegenerativas, entre elas a doença de Alzheimer.⁴⁴

A estereoespecificidade da acetilcolinesterase na interação com inibidores é evidente, uma vez que a enzima não reconhece o enantiômeros (*R*)-rivastigmina e também os outros estereoisômeros da galantamina. A enzima AChE provavelmente também não reconhece, ou interage muito pouco com a (+)-huperzina, uma vez que a utilização da forma racêmica sintetizada obteve uma resposta biológica inferior ao enantiômeros natural (-)-huperzina.³² Entretanto, não há na literatura atual um estudo do reconhecimento enzimático da AChE frente a antípodos óticos de análogos quirais, dímeros e híbridos da tacrina. Nosso grupo de pesquisa mostrou que análogos quirais (*R*) da tacrina são reconhecidos pela AChE.⁴⁵ Na Tabela I são mostrados os resultados obtidos de IC₅₀, que é a concentração mínima necessária do composto para inibir metade da população de enzimas. Observa-se que o análogo quiral na Entrada 10 apresentou atividade inibitória maior que a própria tacrina. Os compostos das Entradas 5, 6, 7, 8 e 9 também mostraram grande atividade inibitória da AChE. Nota-se também que substituintes volumosos nas posições 1 e 4 no anel alifático da tacrina conferiram menor interação com a enzima, enquanto substituintes na posição 3 possibilitaram a melhor interação, resultando em melhor atividade inibitória.⁴⁵

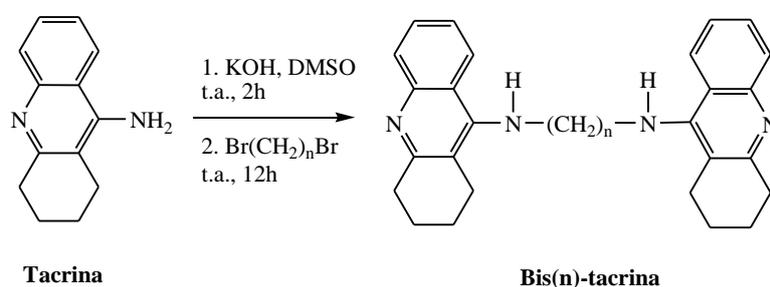
Tabela I. Atividade de inibição da AChE de análogos quirais da tacrina.

Entrada	Composto	IC ₅₀ (μM)
1	 <p style="text-align: center;">Tacrina</p>	0,088
2		7,127
3		2,616

Entrada	Composto	IC ₅₀ (μM)
4		2,446
5		1,931
6		1,384
7		1,352
8		0,816
9		0,288
10		0,061

1.3. DÍMEROS DO TIPO BIS-TACRINA

Após a aprovação da tacrina como fármaco para o tratamento da DA e considerando a sua facilidade de síntese, fortaleceu-se a busca por compostos análogos que possam aumentar o potencial inibidor de AChE e, ao mesmo tempo, provocar menos efeitos colaterais. Em 1994 Pang e colaboradores realizaram a síntese de compostos do tipo bis(n)-tacrina, que são moléculas com duas unidades do núcleo tacrina ligadas por uma cadeia espaçadora de carbonos metilênicos, Esquema 3.⁴⁶



Esquema 3. Síntese dos dímeros bis(n)-tacrina por Pang.

Os dímeros da tacrina são potenciais fármacos para o tratamento da DA devido ao aumento do potencial inibidor e a especificidade do alvo, que foi resultado da ligação de duas unidades, permitindo a ação simultânea nos CAS e PAS da AChE, Figura 5.^{47,48} O dímero bis(7)-tacrina mostrou ser mil vezes mais potente na inibição da acetilcolinesterase do que a tacrina e possui maior seletividade na inibição da AChE em relação à BuChE⁴⁹ (Figura 6). Estudos conformacionais dos dímeros bis-tacrina indicaram que o espaçamento de sete carbonos metilênicos permite uma distância de 18Å entre os átomos de nitrogênio de cada molécula de THA, bem próximo do valor de 16Å entre os dois sítios ativos catalítico e periférico, CAS e PAS, da AChE, determinado em estudos computacionais.⁴⁸ O estudo feito por Pang com os dímeros bis(n)-tacrina também mostrou que o aumento da cadeia provoca diminuição da atividade biológica de inibição da AChE, observação que também foi feita com heterodímeros tacrina(n)-quinolina e tacrina(n)-piridina.⁵⁰ A síntese de diferentes compostos do tipo bis-tacrina é descrita na literatura, tanto do tipo homodímeros (núcleos tacrina iguais conectados por um espaçador) quanto do tipo heterodímeros (quando os núcleos possuem substituintes diferentes), Figura 6.⁵¹ O homodímero tacrina-cistamina foi menos efetivo que a

tacrina na inibição da AChE, porém foi mais ativo na inibição da BuChE.⁵² O homodímero bis(7,4-*N*-metil)-tacrina também apresentou atividade de inibição de AChE muito maior do que a tacrina, cerca de seiscentas vezes mais ativo.^{53,54} O heterodímero tacrina(8)-huprina, que apresentou ótima atividade biológica, embora possua dos núcleos farmacofóricos diferentes, pode ser considerado um dímero uma vez que a estrutura da huprina é derivada da tacrina.⁵⁵

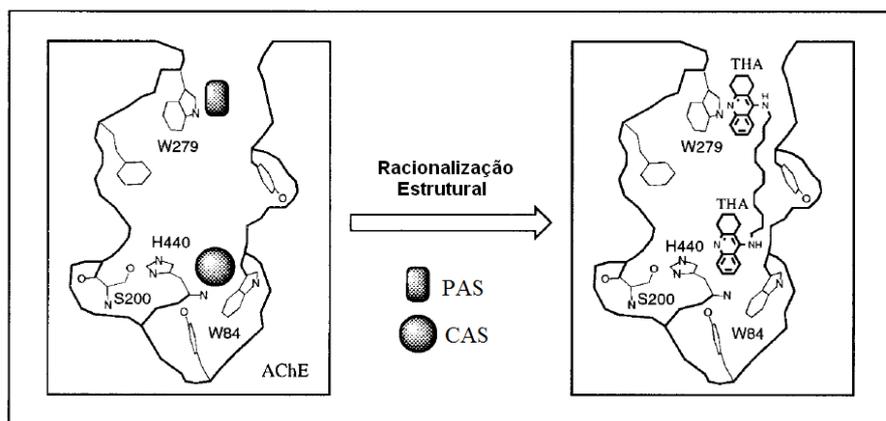


Figura 5. Ação do bis-tacrina nos dois sítios da enzima acetilcolinesterase.

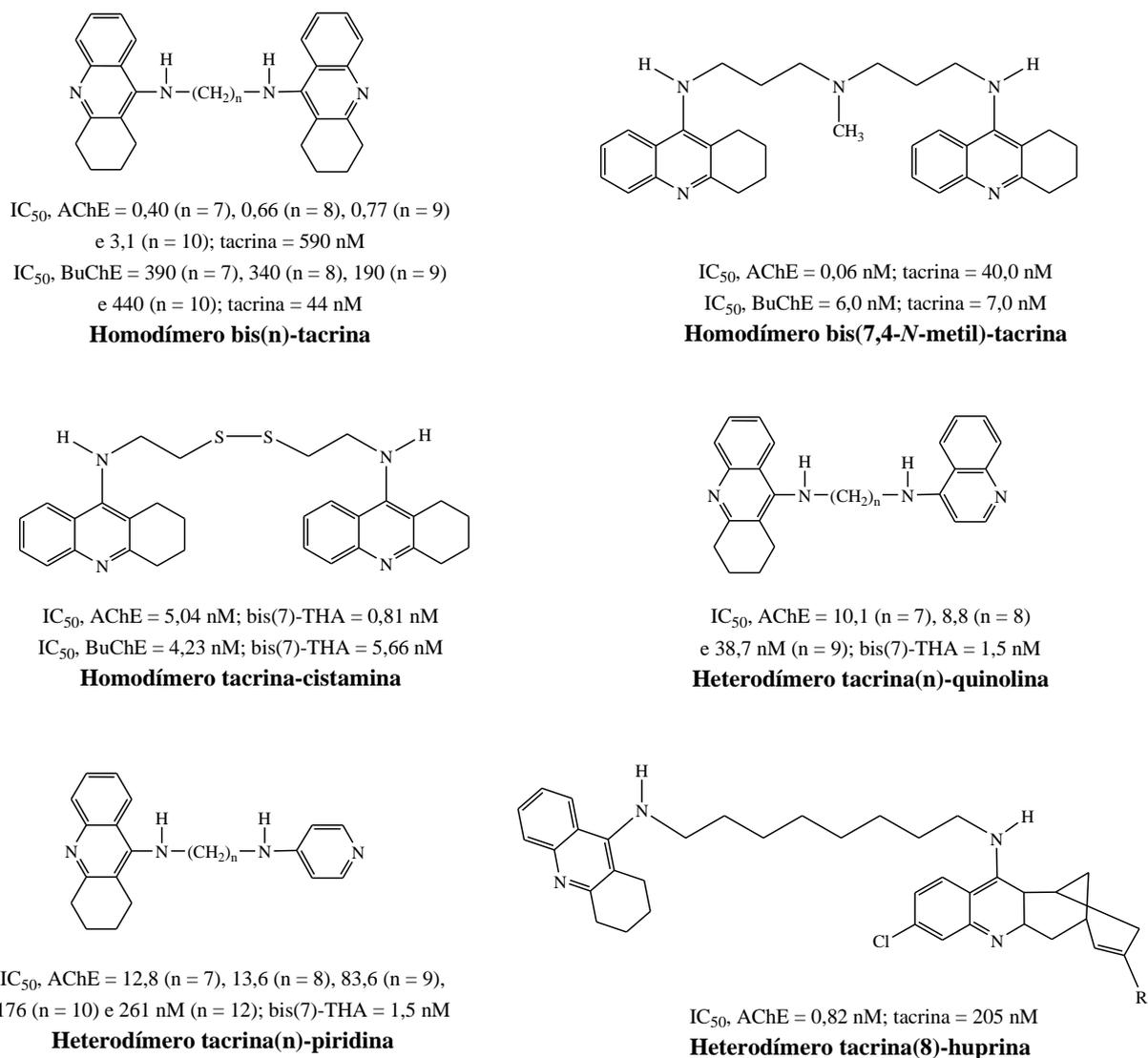


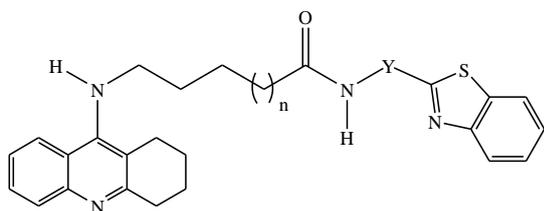
Figura 6. Dímeros do tipo bis-tacrina testados como ChEI.

Testes de inibição *in vivo* do bis(7)-tacrina mostraram que o dímero atingiu o efeito máximo de inibição após quinze minutos da administração e atravessou facilmente a barreira hematoencefálica.^{6,48} O bis(7)-tacrina também apresentou atividade neuroprotetora, que foi relacionada com sua capacidade de agir em múltiplos alvos da doença de Alzheimer.⁵⁰ Entre as capacidades multi-alvo do bis(7)-tacrina destaca-se a inibição da enzima β -secretase (BASE-1), que é responsável por catalisar a síntese da proteína β -amilóide (A β).⁵⁶

Embora a tacrina hoje em dia seja utilizada de forma limitada no tratamento da DA, sua estrutura constitui-se em uma importante referência para a construção da arquitetura molecular de novos fármacos para o tratamento da DA, assim como permanece sendo um referencial para avaliação de atividade inibitória de enzimas colinesterase. Compostos híbridos da tacrina com outros núcleos farmacofóricos também mostraram ser ativos na inibição da enzima acetilcolinesterase, como por exemplo, híbridos tacrina-benzotiazol,⁵⁷ tacrina-ebesen,⁵⁸ tacrina-selegilina,⁵⁹ tacrina-cromeno⁶⁰ e tacrina-ácido ferúlico⁶¹ (Figura 7a).

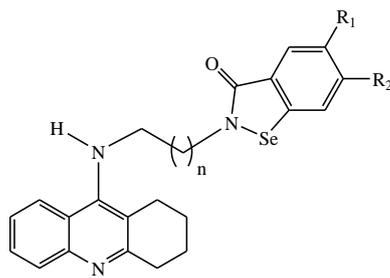
Compostos híbridos tacrina-lofina (Figura 7b), trabalho publicado pelo nosso grupo recentemente, também mostraram ser potentes inibidores das enzimas AChE e BuChE.⁶² Neste trabalho verificou-se que os híbridos tacrina-lofina com seis carbonos metilênicos na cadeia alquílica espaçadora ($n = 6$, Figura 7b) foram seletivos para BuChE, com valores de IC_{50} entre 12,4 e 58,0 nM, não apresentando interação com a AChE. Nenhum composto ativo para AChE foi inativo para BuChE, porém o híbrido com oito carbonos espaçadores e com cloro na posição 4 (*para*) do anel lofínico ($n = 8$, $X = 4\text{-Cl}$, Figura 7b) apresentou a melhor atividade biológica para inibição da AChE, com $IC_{50} = 5,87$ nM, e para BuChE o $IC_{50} = 108,97$ nM, mostrando uma certa seletividade para AChE. Híbridos com cadeia espaçadora mais longa, com nove e dez carbonos metilênicos, não apresentaram atividade de inibição em nenhuma das enzimas. O bis(7)-tacrina, sintetizado e purificado por cromatografia em coluna em nosso laboratório, foi utilizado como composto de referência e seus valores de IC_{50} foram 4,12 nM e 9,03 nM, para AChE e BuChE, respectivamente.⁶²

a)



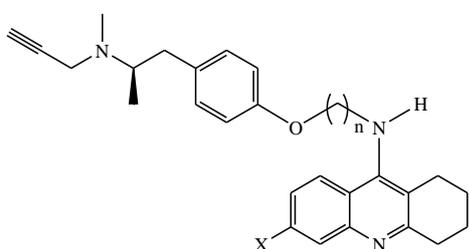
n = 2
 Y = anel aromático
 ou cadeia alifática
IC₅₀, AChE (340-1840 nM)
 Y = Ph (340 nM)
 THA (190 nM)

Híbrido tacrina-benzotiazol



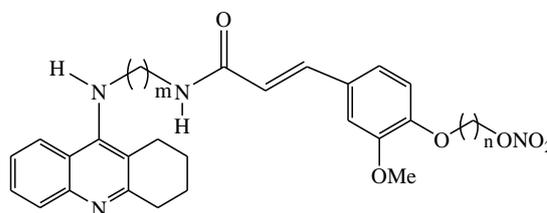
n = 1 a 8
 R₁, R₂ = H ou OMe
IC₅₀, AChE (2,55-657 nM)
 n = 5, R₁ = R₂ = OMe (2,55 nM)
 THA (109 nM)

Híbrido tacrina-ebesen



n = 2 a 10
 X = H ou Cl
IC₅₀, AChE (14,2-456 nM)
 n = 3, X = Cl (2,55 nM)
 THA (110 nM)

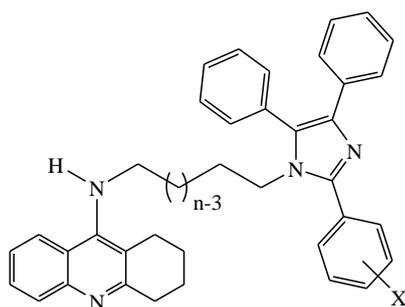
Híbrido tacrina-seligilina



m = 2 a 8
 n = 2 a 6
IC₅₀, AChE (3,6-69,8 nM)
 m = 4, n = 3 (3,6 nM)
 THA (69,8 nM)

Híbrido tacrina-ácido ferúlico

b)



n = 6 a 10
 X = H, F, Cl, OMe, CN, NO₂
IC₅₀, AChE (5,87-125,90 nM); bis(7)-THA (4,12 nM)
 n = 8, X = 4-Cl (5,87 nM)
IC₅₀, BuChE (7,10-108,97 nM); bis(7)-THA (9,03 nM)
 n = 7, X = 4-CN (7,10 nM)

Híbrido tacrina-lofina

Figura 7. a) Exemplos de híbridos da tacrina testados como ChEI; b) Híbridos tacrina-lofina sintetizados por nosso grupo de pesquisa e testados como ChEI.

1.4. ESTRATÉGIA SINTÉTICA: A REAÇÃO DE FRIEDLÄNDER

A tacrina (THA) é um composto acridínico. Os compostos acridínicos são estruturas derivadas da acridina, um substância aromática contendo três ciclos aromáticos cuja estrutura se baseia na fusão de um núcleo quinolínico com um anel benzênico. Dentre as aplicações descritas para esta classe de substâncias destacam-se as atividades antissépticas e antibacterianas, exibidas particularmente pelos derivados 9-aminoacridinas.⁶³ A ordem de numeração do núcleo acridina é convencionada pela IUPAC (*International Union of Pure and Applied Chemistry* – União Internacional de Química Pura e Aplicada) (Figura 8).

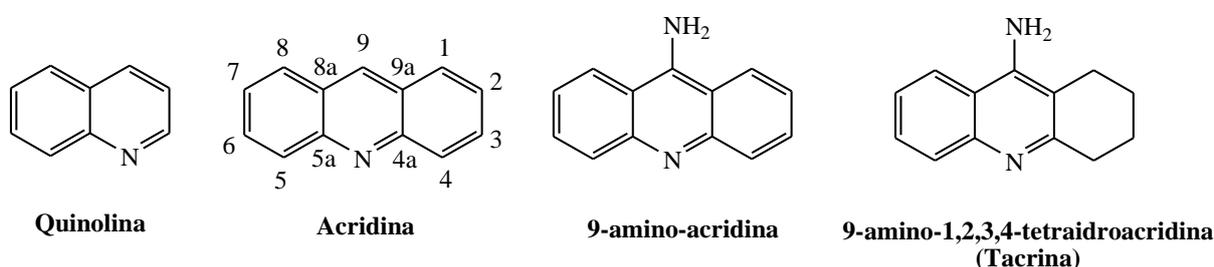
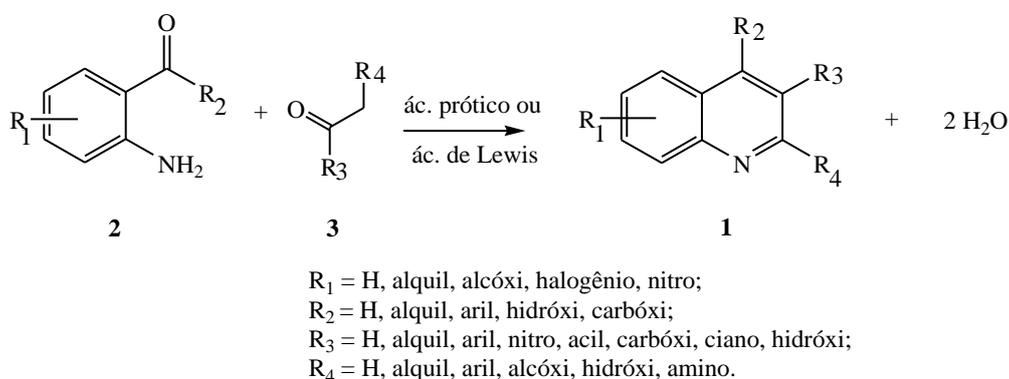


Figura 8. Compostos acridínicos.

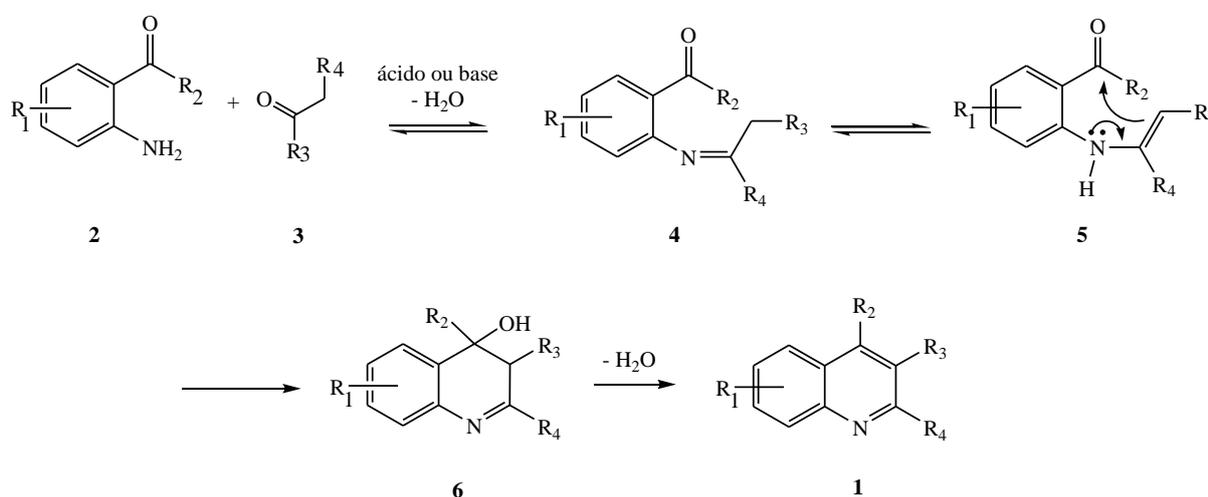
A reação de Friedländer é uma das estratégias para a construção de compostos quinolínicos **1** e seus derivados, sendo a mais utilizada para a obtenção de compostos acridínicos. Originalmente, a condensação de Friedländer é a reação de um *o*-aminoaldeído ou *o*-aminocetona **2** aromática com aldeídos ou cetonas **3** que contenham um grupo metileno ativo em posição α -carbonila, Esquema 4.^{64,65}



Esquema 4. Esquema geral da reação de Friedländer.

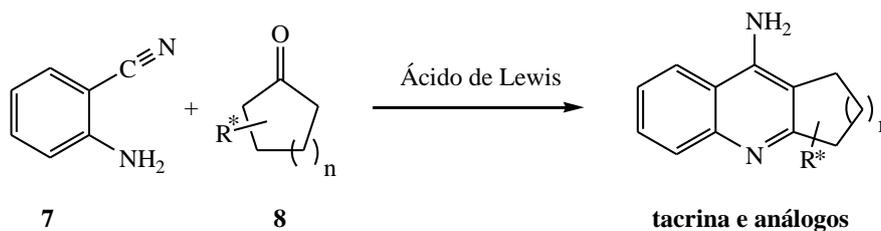
A reação de Friedländer pode ser realizada via catálise ácida ou básica, ou até mesmo na ausência de catalisador, sendo exigido neste caso elevadas temperaturas, entre 150-220°C.⁶⁶ Devido à variedade de substituintes (R_1 , R_2) no composto *o*-aminocarbonílico **2** e dos grupos R_3 e R_4 no composto carbonílico **3** contendo o metileno ativo, a reação de Friedländer é uma importante estratégia para a obtenção de compostos quinolínicos **1** contendo uma ampla variedade de substituintes.

Embora as características gerais desta transformação sejam bem conhecidas, os detalhes mecanísticos não são completamente determinados. Dentre as propostas descritas, a mais evidente envolve inicialmente a formação da imina **4**, em equilíbrio com a enamina **5**. A seguir, a condensação intramolecular em **5** formando o composto **6** e a subsequente perda de H_2O levam à formação dos derivados quinolínicos **1**⁶⁵ (Esquema 5).



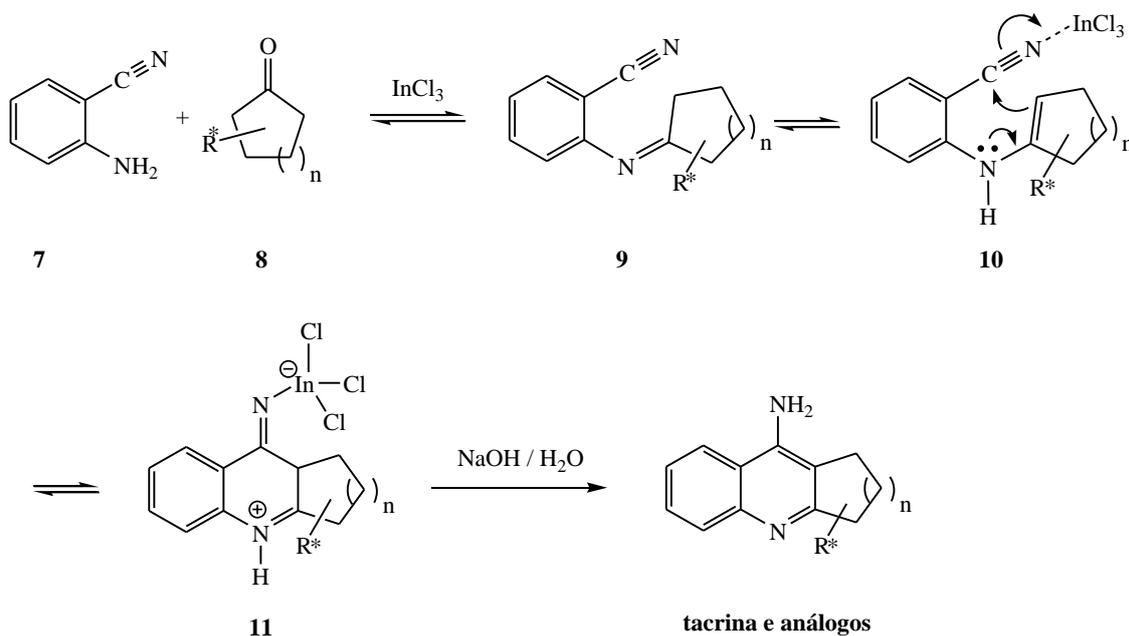
Esquema 5. Mecanismo proposto para a reação de Friedländer.

A reação de Friedländer foi utilizada por nosso grupo de pesquisa para obtenção dos análogos quirais da tacrina.⁴⁵ A reação foi feita utilizando-se a *o*-aminonitrila (**7**) e uma cicloetona **8**, levando a formação dos análogos da tacrina. O estudo das condições reacionais utilizando a ciclohexanona como cetona, para a síntese da tacrina, mostrou que o cloreto de índio ($InCl_3$) foi o melhor catalisador ácido de Lewis para esta reação⁶⁷ (Esquema 6).



Esquema 6. Reação de Friedländer para síntese da tacrina e análogos.

O mecanismo proposto para obtenção da tacrina e seus análogos, utilizando ácido de Lewis como catalisador, é mostrado a seguir no Esquema 7. O ácido de Lewis (por exemplo, InCl_3) coordena-se com o oxigênio em **8**, ativando a carbonila para a adição nucleofílica da amina **7**, levando a formação da imina **9** em equilíbrio com a enamina **10**. O carbono olefínico da enamina **10** ataca o carbono da nitrila, ativada pela coordenação com o InCl_3 , conduzindo à ciclização para a formação do complexo **11**. O intermediário **11** é convertido na tacrina ou seus análogos por hidrólise em meio básico.⁶⁷

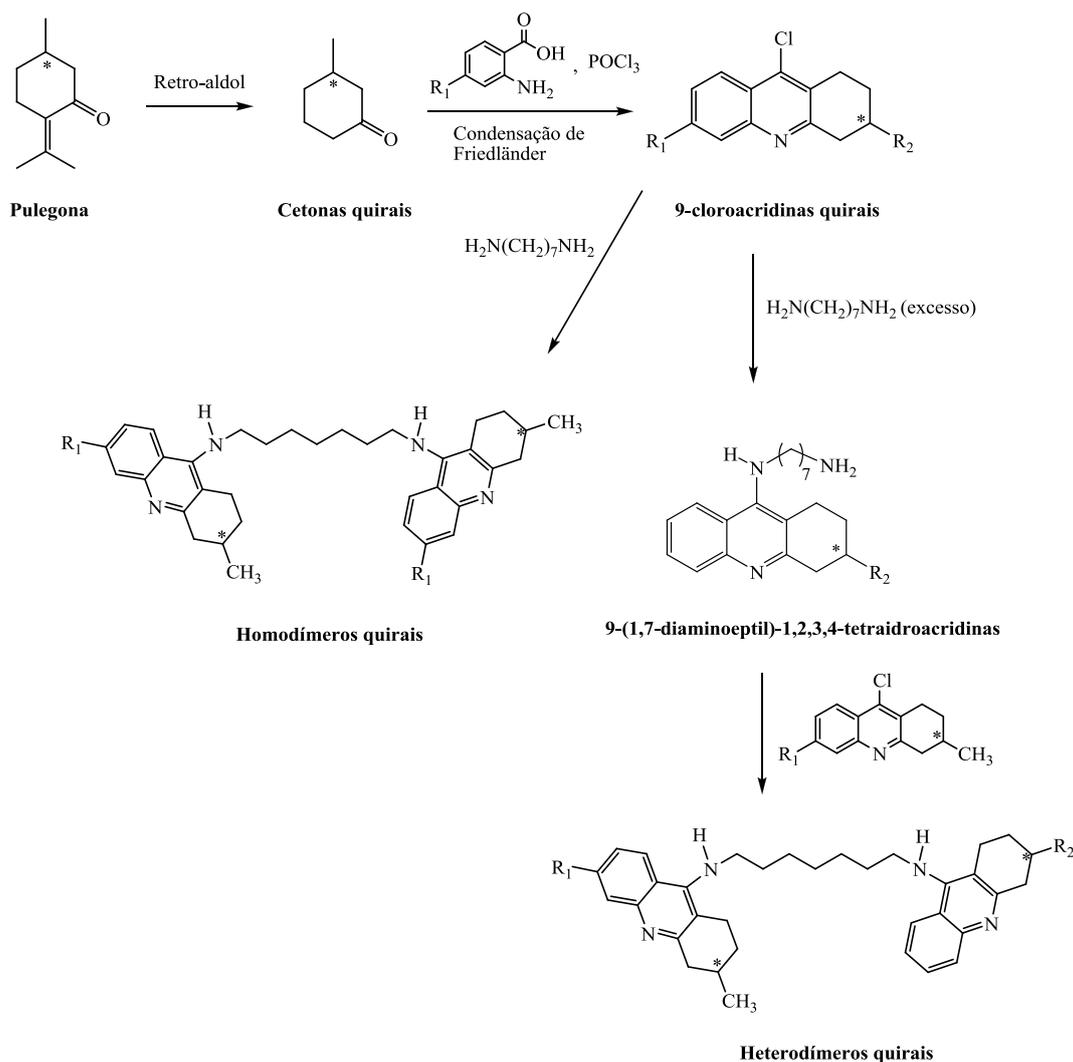


Esquema 7. Mecanismo para obtenção da tacrina e análogos com ácido de Lewis.

2. OBJETIVOS

Evidenciando a crescente busca por novos fármacos inibidores de enzimas colinesterase para o tratamento da doença de Alzheimer, e o interesse do grupo em desenvolver novas moléculas capazes de interagir com as enzimas colinesterase, este projeto de pesquisa teve como objetivo principal a preparação, caracterização e avaliação da atividade biológica de inibição das enzimas acetilcolinesterase e butirilcolinesterase de novos dímeros quirais do tipo bis-tacrina, a partir do monoterpreno natural pulegona, disponível comercialmente nas formas (*R*)-(+ e (*S*)-(-).

Os objetivos específicos foram: (i) síntese de cetonas quirais a partir de monoterprenos naturais; (ii) síntese de 9-cloroacridinas quirais como intermediários para a obtenção de análogos quirais da tacrina; (iii) síntese de intermediários 9-(1,7-diaminoeptil)-1,2,3,4-tetraidroacridinas; (iv) sínteses dos homodímeros e heterodímeros quirais do tipo bis-tacrina e ensaios de inibição de AChE e BuChE; (v) comparação dos resultados obtidos para compostos enantiômeros ópticos.

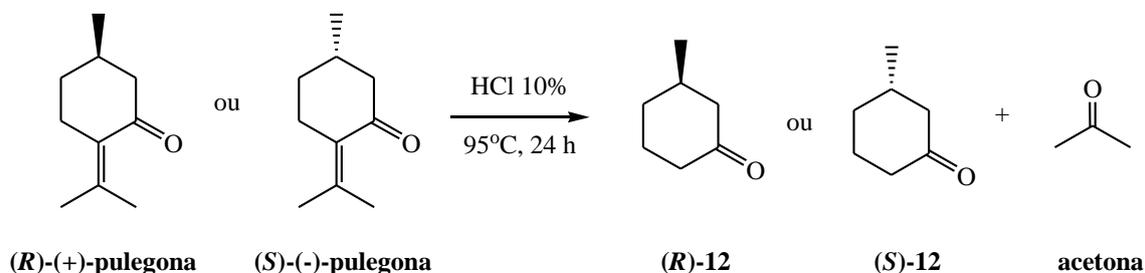


3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. SÍNTESE DAS CETONAS QUIRAIS

3.1.1. Obtenção da (R)-3-metilcicloexanona e da (S)-3-metilcicloexanona

A ciclocetona quiral **12**, necessária para a construção do núcleo tetraidroacridina quiral, é obtida a partir da reação de retro-aldol da pulegona. A pulegona é um óleo terpênico natural, sua forma mais abundante é a (R)-(+), com odor mentolado, extraída a partir do poejo (*Mentha pulegium*) e da erva-de-gato (*Nepeta cataria*). A (S)-(-)-pulegona possui odor similar à forma (R)-(+), é muito rara na natureza e com custo elevado, R\$ 872,00 / mL, enquanto o valor da (R)-(+) é de R\$ 70,00 / mL.⁶⁸ A (R)-(+)-3-metilcicloexanona, (**R**)-**12**, foi obtida a partir da (R)-(+)-pulegona e, analogamente, a (S)-(-)-3-metilcicloexanona, (**S**)-**12**, a partir da (S)-(-)-pulegona (Esquema 8).

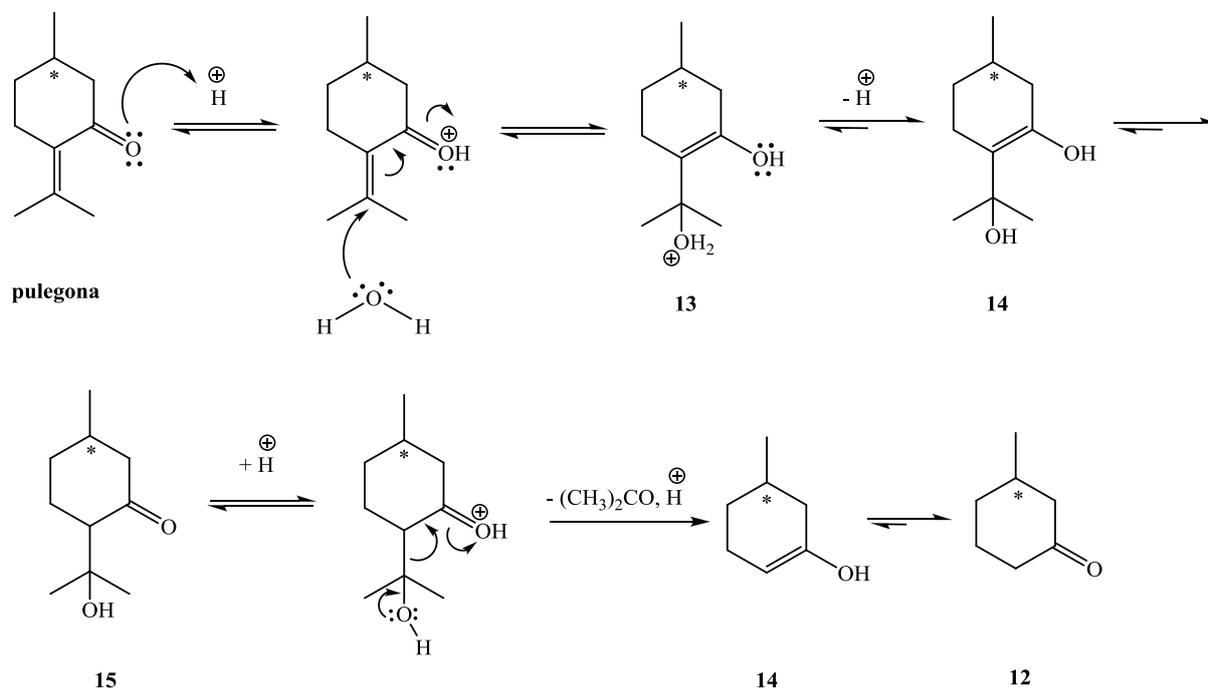


Esquema 8. Retro-aldol da pulegona, obtenção da 3-metilcicloexanona quiral (**12**).

A acetona formada na reação foi eliminada por arraste a vapor na própria reação, que ocorre em sistema aberto, e na evaporação do éter etílico, solvente utilizado no tratamento da reação.⁶⁹ Os produtos brutos foram isolados e os rendimentos obtidos foram de 92% para a cetona (**R**)-**12** e 94% para a (**S**)-**12**.

O mecanismo da reação de retro-aldol para obtenção das 3-metilcicloexanonas consiste inicialmente na protonação do oxigênio da carbonila da pulegona, ativando-a para uma adição nucleofílica do tipo adição-1,4 da água, levando a formação do intermediário **13**. O intermediário **13** é rapidamente desprotonado formando o β-hidróxi-enol **14** em equilíbrio com a β-hidróxi-cetona **15**. A protonação de **15** leva ao rompimento da ligação Cα-Cβ e à liberação de acetona na forma protonada e da 3-metilcicloexanona **12**, em equilíbrio com a forma enólica **16**, Esquema 9. O produto formado é termodinamicamente favorecido e a

liberação de uma molécula estável, a acetona, e a alta temperatura, permitem o deslocamento dos equilíbrios no sentido de formação dos produtos.⁶⁹



Esquema 9. Mecanismo de retro-aldol da pulegona.

Devido ao alto custo e disponibilidade limitada da (*S*)-(-)-pulegona, as reações para obtenção das cetonas quirais foram feitas em pequena escala (ver procedimento experimental, página 53). O isolamento dos produtos em pequena escala se mostrou difícil e exigiu adaptação dos procedimentos experimentais. Inicialmente os testes, incluindo as tentativas de purificação, foram conduzidos utilizando-se a (*R*)-(+)-pulegona, com maior disponibilidade, e após otimizados, aplicados para a (*S*)-(-)-pulegona. Com objetivo de eliminar as impurezas contidas no bruto da reação, conforme observado nos sinais pouco intensos entre 15,0 e 60,0 ppm do espectro de RMN da Figura 9, foram feitas tentativas de purificação do produto obtido, a 3-metilcicloexanona. A destilação mostrou-se difícil, mesmo utilizando um sistema de micro-destilação, houve dificuldade no controle do processo, ocorrendo perda de material. Devido à volatilidade da 3-metilcicloexanona, a purificação por cromatografia em coluna, utilizando hexano como eluente, acarretou perda de material na evaporação do solvente, e (*R*)-12 foi obtido puro com 57% de rendimento. O uso de pentano, um solvente mais volátil, como eluente não resultou em melhor rendimento. Uma vez que as impurezas não comprometeram a purificação do produto da etapa seguinte, o produto bruto foi utilizado na síntese das cloro-acridinas quirais, via reação de Friedländer (ver página 24).

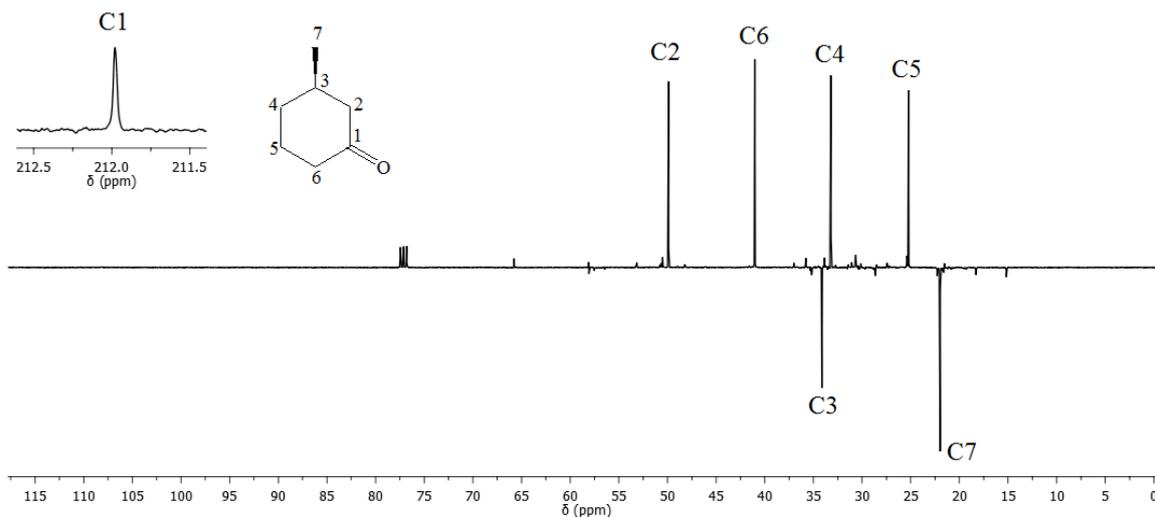
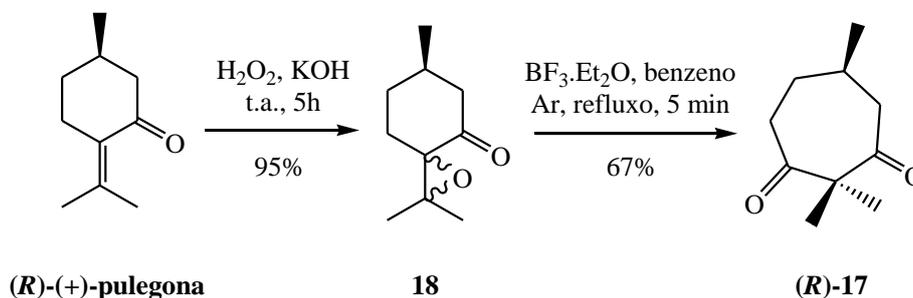


Figura 9. Espectro de RMN de ^{13}C (APT, CDCl_3 , 75 MHz) de **(R)-12**, bruto da reação.

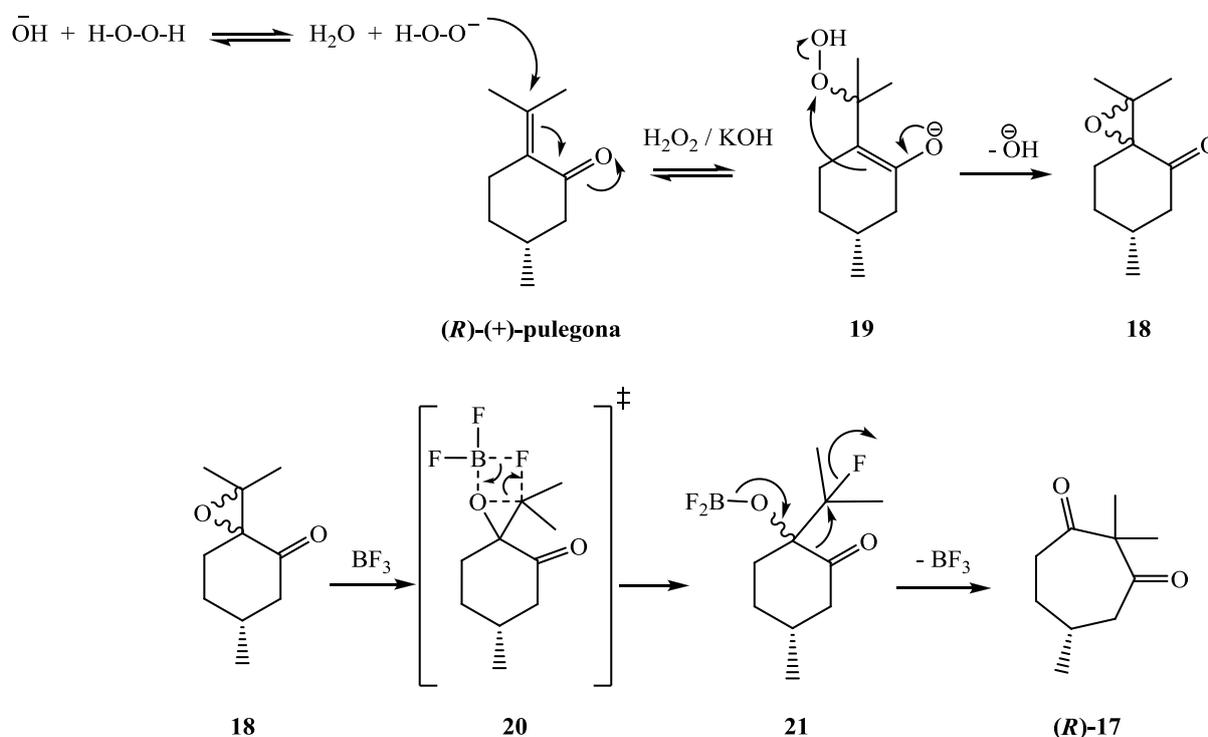
3.1.2. Obtenção da **(R)-2,2,5-trimetilcicloheptan-1,3-diona**

A **(R)-2,2,5-trimetilcicloheptan-1,3-diona**, **(R)-17**, consiste em um valioso bloco de construção quiral ainda não aplicado na literatura corrente para a elaboração de dímeros, híbridos e moléculas mais complexas. Nosso grupo de pesquisa obteve um análogo quiral da tacrina, utilizando esta dicetona **(R)-17**, e o composto apresentou significativa atividade de inibição de AChE (Tabela I, Entrada 9).⁴⁵ A conversão da **(R)-(+)-pulegona** para a epoxipulegona **18** seguido expansão de anel com ácido de Lewis, forneceu **(R)-17** em elevado rendimento (Esquema 10).⁷⁰



Esquema 10. Epoxidação, seguida de expansão da **(R)-(+)-pulegona**.

O mecanismo para obtenção da (*R*)-2,2,5-trimetilcicloheptan-1,3-diona, (**R**)-**17**, é mostrado a seguir no Esquema 11. A primeira etapa consiste em uma adição nucleofílica do ânion hidroperóxido (HOO^-), do tipo adição-1,4, na (*R*)-(+)-pulegona, formando o intermediário **19**. A eliminação unimolecular de base conjugada (E1_{CB}) em **19** conduz à formação da epoxipulegona **18**, que é isolada. A presença do ácido de Lewis trifluoreto de boro eterado ($\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$), sob aquecimento, promove o rompimento das ligações B-F e C-O no epóxido **18** e a formação das ligações B-O e C-F, como mostrado no estado de transição representado por **20**, levando a formação do intermediário tetraédrico **21**. O rearranjo de expansão do anel em **21** e a consequente liberação de BF_3 favorecem a formação de (**R**)-**17**.^{70,71}

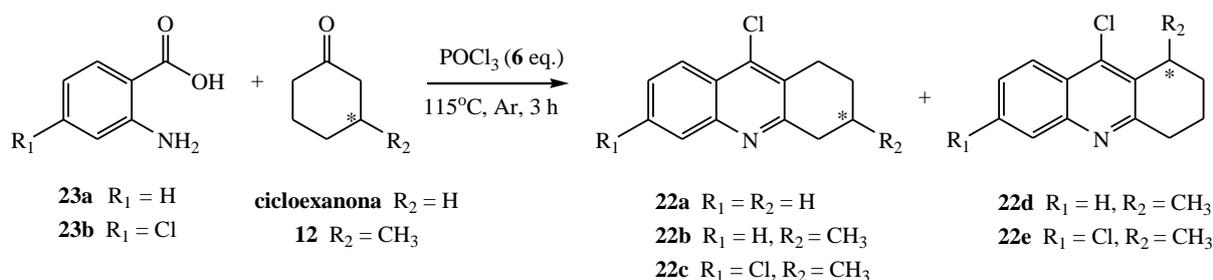


Esquema 11. Mecanismo para obtenção da (*R*)-2,2,5-trimetilcicloheptan-1,3-diona, (**R**)-**17**.

3.2. SÍNTESE DOS INTERMEDIÁRIOS 9-CLORO-1,2,3,4-TETRAIDROACRIDINA

3.2.1. Obtenção das 9-cloro-1,2,3,4-tetraidroacridinas quirais

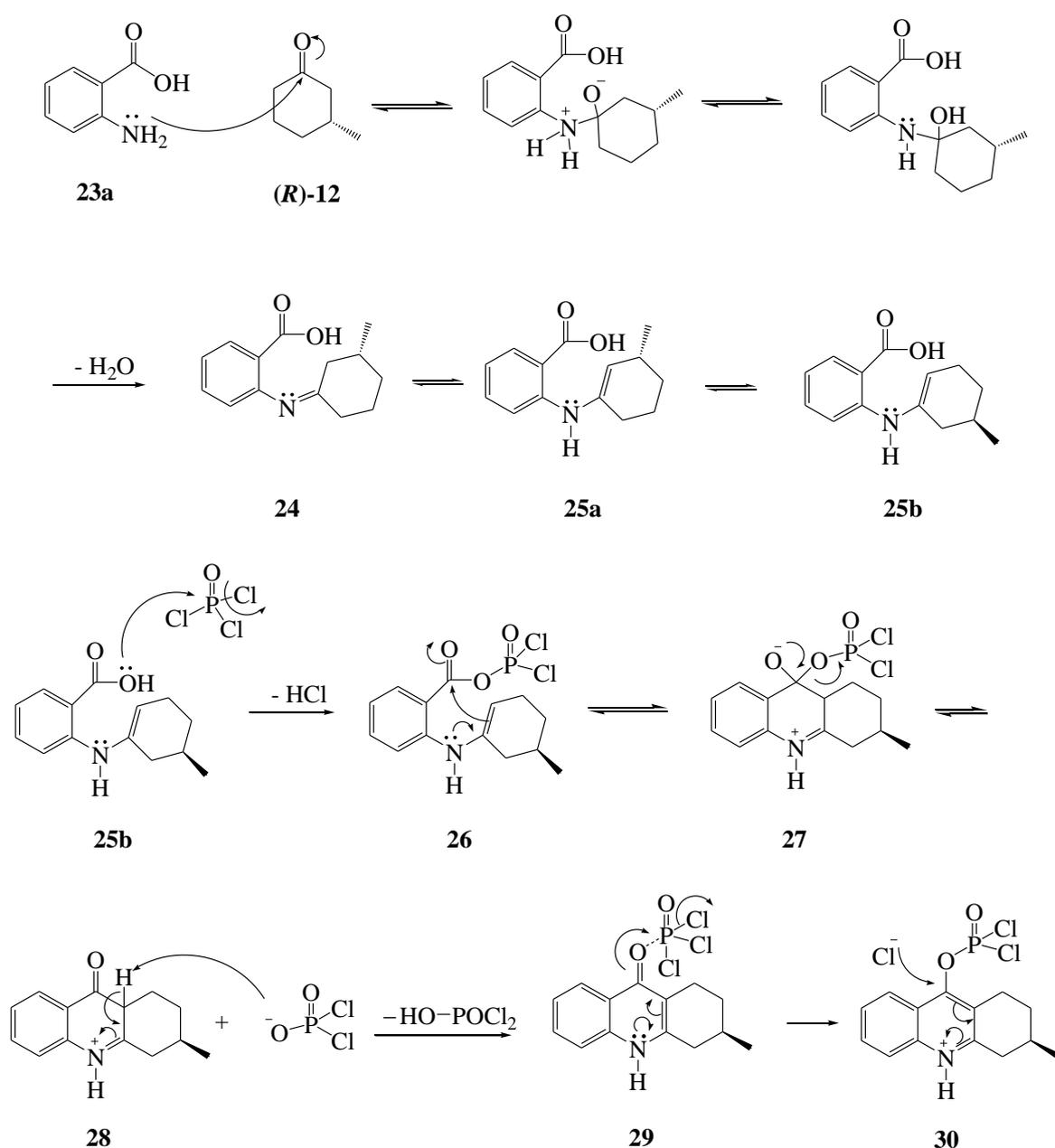
A reação de condensação de Friedländer é a principal estratégia utilizada para a síntese de compostos contendo o núcleo quinolínico, como as tetraidroacridinas, a tacrina e análogos da tacrina (Página 19).⁶⁴ Neste trabalho, utilizou-se esta estratégia para a síntese de 9-cloro-1,2,3,4-tetraidroacridinas ou simplificada, 9-cloroacridinas (**22**), que são precursores-chaves na síntese de dímeros do tipo bis-tacrina. A reação de síntese das 9-cloroacridinas foi realizada com o ácido 2-aminobenzóico (**23a**) ou 3-cloro-2-aminobenzóico (**23b**), a cicloexanona ou a 3-metilcicloexanona (**12**) e oxatriloreto de fósforo (POCl₃), Esquema 12. A escolha de **23b** se deveu ao fato de que é conhecido da literatura que 6-clorotacrininas e derivados, possuem maior atividade biológica de inibição de enzimas colinesterase.^{72,59}

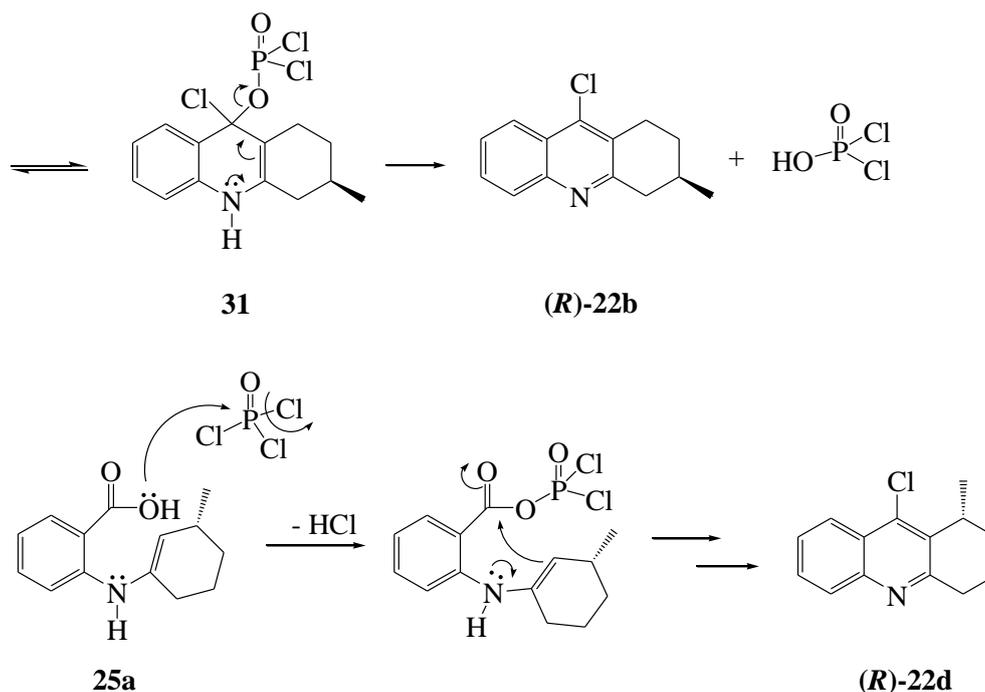


Esquema 12. Obtenção das 9-cloroacridinas **22**.

Com base na proposta descrita por nosso grupo discutida na página 19, mostra-se no Esquema 13 uma proposta de mecanismo para a obtenção das 9-cloroacridinas quirais.⁶⁷ Inicialmente, ocorre a adição nucleofílica do grupo amino do ácido antranílico (**23a**) no carbono carbonílico da (*R*)-3-metilcicloexanona, (**R**)-**12**, conduzindo a formação da imina **24**, em equilíbrio com as enaminas **25a** e **25b**. O grupo carboxila de **25b** é ativado com o oxatriloreto de fósforo (POCl₃), formando o intermediário **26**. A seguir, a condensação intramolecular em **26** leva a formação de um intermediário tetraédrico **27** e a posterior expulsão do grupo de saída, o ânion diclorofosfato, formando a cetona **28**. Este ânion presente no meio captura o hidrogênio α -carbonila em **28** formando ácido diclorofosfórico (HO-POCl₂) e a cetona α,β -insaturada **29**. A cetona **29** age como um nucleófilo quando ativado por outra molécula de POCl₃ presente no meio, levando a formação da estrutura **30**, que possui

um anel aromático deficiente de elétrons. O íon cloreto presente no meio promove a substituição nucleofílica aromática (S_NAr) em **30**, formando o intermediário tetraédrico neutro **31**, que rearranja eliminando o grupo de saída diclorofosfato, estabelecendo a aromaticidade no anel, levando a formação do produto final, a (*R*)-9-cloro-3-metil-1,2,3,4-tetraidroacridina, (**R**)-**22b**.⁶⁵ Analogamente, o grupo carboxila de **25a** é ativado com o $POCl_3$, seguindo-se a mesma sequência de etapas, e obtém-se a (*R*)-9-cloro-1-metil-1,2,3,4-tetraidroacridina, (**R**)-**22d**, que é produto minoritário, atribuindo-se ao impedimento espacial causado pelo grupo metila em **25a**.^{65,67}

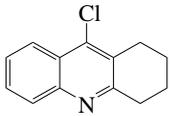
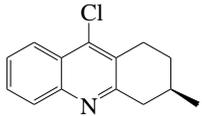
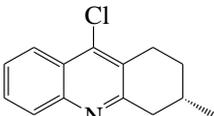
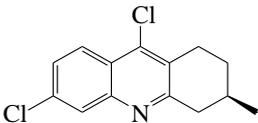
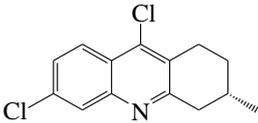




Esquema 13. Proposta de mecanismo para a reação de Friedländer para a síntese das 9-cloroacridinas quirais.

Na Tabela II mostram-se os resultados obtidos na síntese dos intermediários 9-cloroacridinas. Um grande desafio consistiu na separação dos dois régio-isômeros formados, que é atribuído à possibilidade de formação de duas enaminas **25a** e **25b**, como mostrado no mecanismo proposto acima. Devido a melhor atividade biológica observada nos análogos quirais da tacrina com substituintes na posição 3 (ver Tabela I, página 11), as 9-cloroacridinas de interesse para este trabalho são **(R)-22b**, **(S)-22b**, **(R)-22c** e **(S)-22c**, majoritários que foram separados de seus respectivos isômeros minoritários **(R)-22d**, **(S)-22d**, **(R)-22e** e **(S)-22e**, por cromatografia em coluna. A separação cromatográfica destes compostos se mostrou difícil, devido à pequena diferença dos fatores de retenção, mas foi conseguida após a aplicação de um extenso gradiente de composição da fase móvel (ver Procedimento Experimental, página 54). Em todos os casos, foi possível isolar o composto majoritário, possibilitando a sua utilização na síntese dos dímeros da tacrina. Para fins de caracterização, os compostos minoritários **(R)-22d** e **(R)-22e** foram separados e isolados após nova purificação. Devido a disponibilidade limitada e a pequena escala de trabalho da *(S)-(-)-pulegona*, já discutidas anteriormente, os compostos **(S)-22d** e **(S)-22e** não foram isolados.

Tabela II. Intermediários 9-cloroacridinas quirais.

Entrada	Produto	$[\alpha_D]^{20}$	Rendimento* (%)
1	 22a	-	67
2	 (R)-22b	+64° (c = 0,44, CHCl ₃)	60
3	 (S)-22b	-62° (c = 0,45, CHCl ₃)	58
4	 (R)-22c	+60° (c = 1,03, CH ₂ Cl ₂)	76
5	 (S)-22c	-59° (c = 0,99, CH ₂ Cl ₂)	54

*Após purificação por cromatografia em coluna.

É mostrado na Figura 10 as ampliações do espectro de RMN de ¹H do composto **(R)-22b**, onde se observa em destaque, com ampliação, em 1,14 ppm, o duplete típico referente aos hidrogênios H10 da metila (CH₃) ligada ao anel alifático, com constante de acoplamento $J = 6,6$ Hz e integração para três hidrogênios. O hidrogênio H3 ligado à metila é observado no multiplete em 1,95-2,06 ppm, com integração para dois hidrogênios, onde o outro corresponde a um H2. Os hidrogênios H1, H2, e H4 são diastereotópicos e são observados em deslocamentos químicos diferentes os hidrogênios ligados ao mesmo carbono. Ao longo do eixo da ligação sigma (σ) C-C os elétrons promovem maior desblindagem nos hidrogênios

equatoriais. Pode-se propor, portanto, que o sinal multipletto em 1,45 ppm corresponde ao H2 em axial, e o multipletto em 3,17 ppm corresponde aos H1 e H4 equatoriais. Na região dos hidrogênios ligados ao anel aromático, em 7,51 ppm é observado um duplo duplo dupletto que se refere ao H7 e em 7,64 ppm é observado outro duplo duplo dupletto que se refere ao H6, que quando substituído por um Cl não é observado, como mostrado no espectro de (**R**)-**22b** da Figura 13. Também na região dos aromáticos, em 7,96 e em 8,14 são observados dois dupletos com $J = 8,4$ Hz, que correspondem respectivamente a H5 e H8.

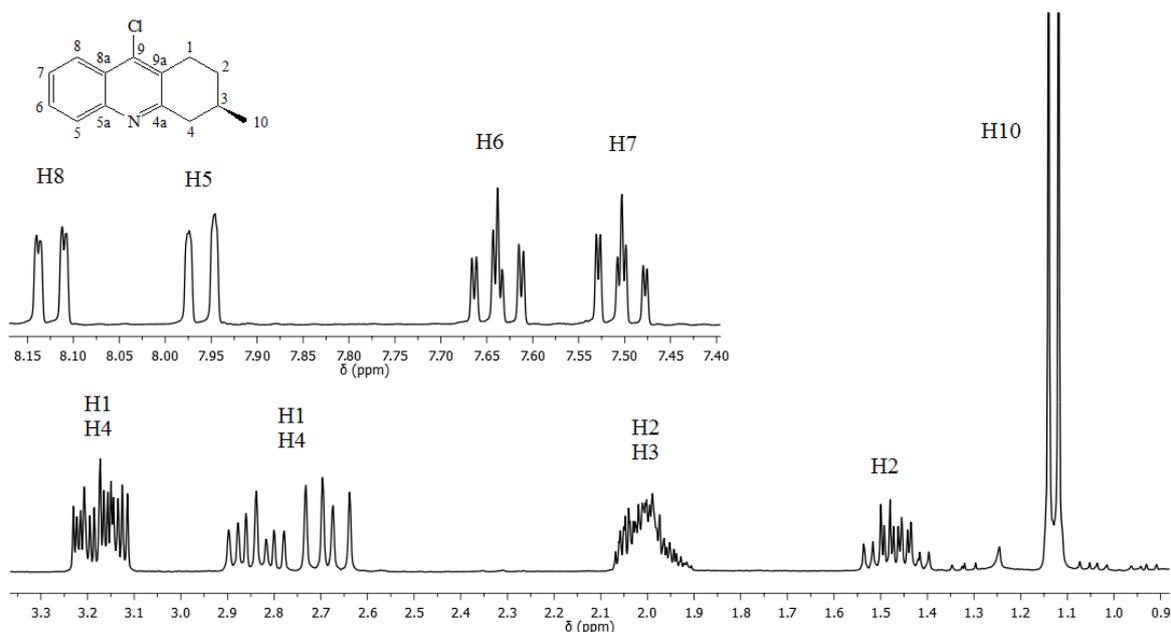


Figura 10. Ampliação do espectro de RMN de ^1H (CDCl_3 , 300 MHz) do composto (**R**)-**22b** entre 1,0 e 3,3 ppm e, acima e à esquerda, entre 7,4 e 8,2 ppm.

Na Figura 11 é mostrado o espectro de RMN de ^{13}C , do tipo APT, do composto (**R**)-**22b**. Neste tipo de experimento os carbonos do tipo CH_3 e CH são observados em fase para baixo e os carbonos do tipo metilenos (CH_2) e carbonos não ligados a hidrogênio (C_0) são observados em fase para cima. No espectro da Figura 11 observam-se os seguintes sinais, em ppm: 21,5 (C_{10}); 27,1 (C_1); 28,9 (C_3); 30,6 (C_2); 42,5 (C_4); 123,6 (C_8); 125,4 (C_{8a}); 128,3 (C_7); 128,7 (C_{9a}); 128,5 (C_5); 129,2 (C_6); 141,3 (C_9); 146,8 (C_{5a}); 159,3 (C_{4a}).

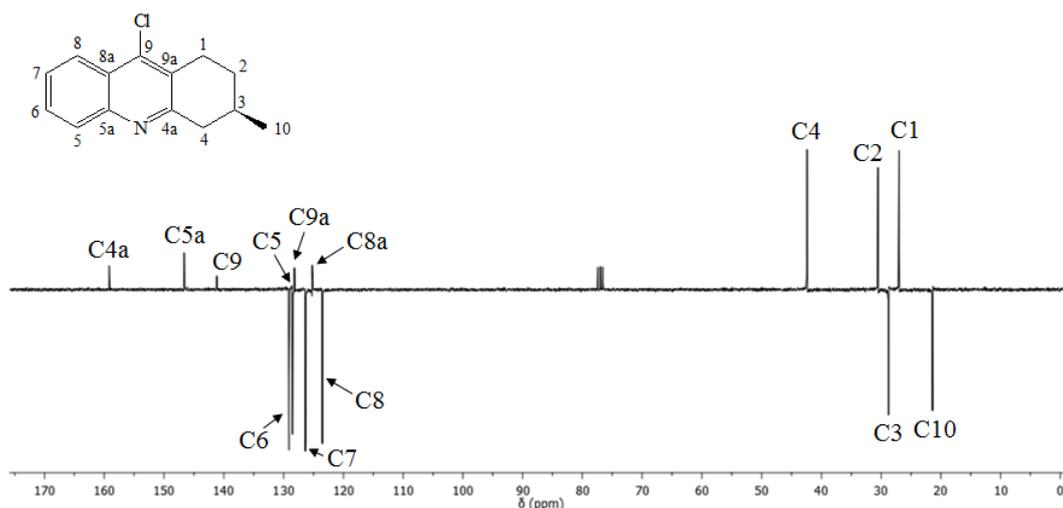


Figura 11. Espectro de RMN de ^{13}C (APT, CDCl_3 , 75 MHz) da (*R*)-9-cloro-3-metil-1,2,3,4-tetraidroacridina, (*R*)-**22b**.

É mostrado na Figura 12 as ampliações do espectro de RMN de ^1H do composto (*R*)-**22d**, isômero minoritário separado de (*R*)-**22b**, como discutido na página 26. Destaca-se na ampliação, em 1,30 ppm, o duplete típico referente aos hidrogênios H10 da metila (CH_3) ligada ao anel alifático, com constante de acoplamento $J = 7,2$ Hz e integração para três hidrogênios. O hidrogênio H1 ligado à metila é observado no multiplete em 1,84-2,16 ppm, com integração para quatro hidrogênios, onde os outros correspondem a um H2 os dois H3. Os hidrogênios H2, H3, e H4 são diastereotópicos. Na região dos hidrogênios ligados ao anel aromático a configuração dos sinais similar ao observado no espectro da Figura 10.

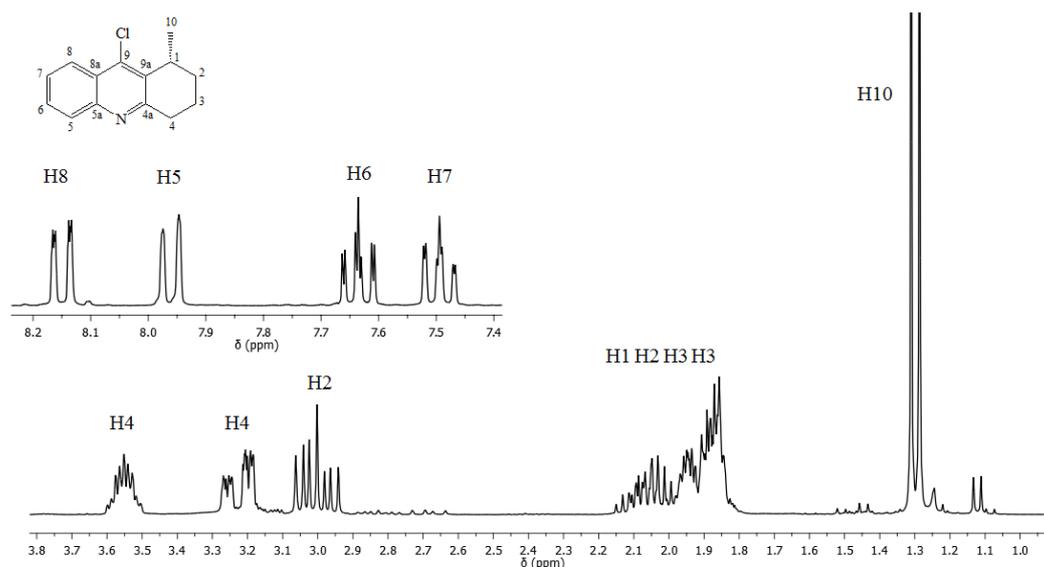


Figura 12. Ampliação do espectro de RMN de ^1H (CDCl_3 , 300 MHz) do composto (*R*)-**22d** entre 1,0 e 3,8 ppm e, acima e à esquerda, entre 7,4 e 8,2 ppm.

É mostrado na Figura 13 as ampliações do espectro de RMN de ^1H do composto (**R**)-**22c**, onde se observa uma similaridade com o espectro de (**R**)-**22b** na Figura 10 na região dos hidrogênios alifáticos, entre 1,0 e 4,0 ppm. Na região dos hidrogênios ligados ao anel aromático, em 7,45 ppm é observado um duplo duplete que se refere ao H7 e nota-se a ausência do hidrogênio H6, pois nesta posição está o cloro originário do ácido 3-cloro-antranílico. Também na região dos aromáticos, em 7,96 e em 8,06 são observados dois dupletos com constantes de acoplamento $J = 3,0$ e $9,0$ Hz, respectivamente, que correspondem a H5 e H8.

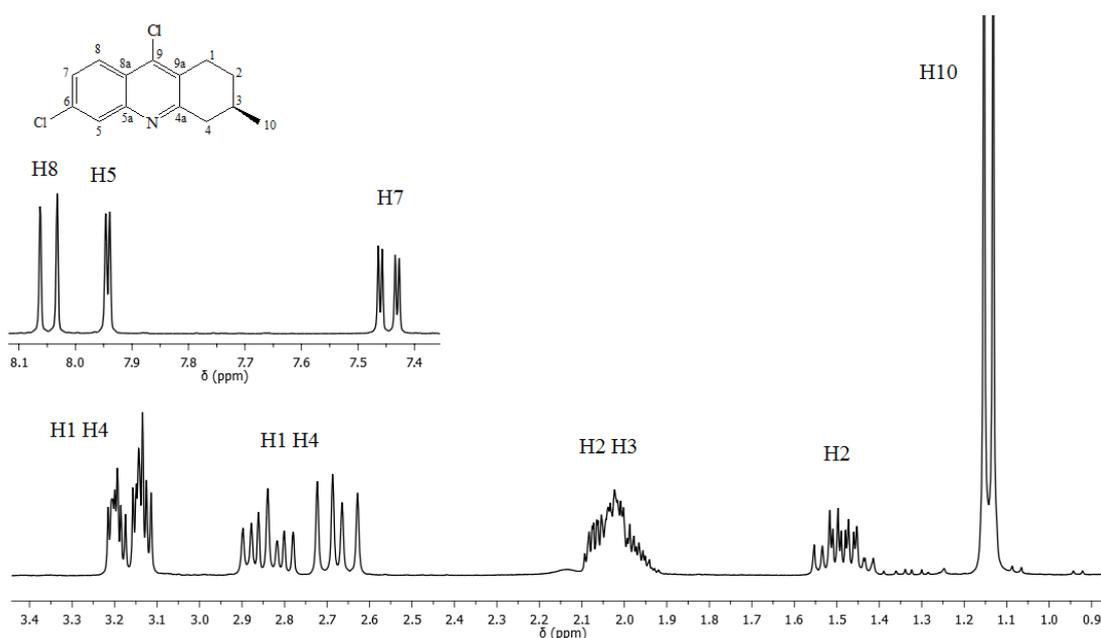


Figura 13. Ampliação do espectro de RMN de ^1H (CDCl_3 , 300 MHz) do composto (**R**)-**22c** entre 1,0 e 3,4 ppm e, acima e à esquerda, entre 7,4 e 8,1 ppm.

No espectro de RMN de ^{13}C (APT) do composto (**R**)-**22c**, mostrado na Figura 14, observam-se os seguintes sinais, em ppm: 21,4 (C10); 27,0 (C1); 28,8 (C3); 30,5 (C2); 42,3 (C4); 123,8 (C8a); 125,1 (C8); 127,3 (C7); 127,6 (C5); 128,6 (C9a); 135,1 (C6); 141,2 (C9); 147,0 (C5a); 160,7 (C4a). Nota-se que o carbono C6 ligado ao cloro é observado em 135 ppm, enquanto o C6 do composto (**R**)-**22b** (Figura 11), ligado ao hidrogênio, é observado em 129 ppm. O cloro por ser mais eletronegativo, diminui a densidade eletrônica sobre o carbono, tornando-o menos afetado pelo campo magnético, conseqüentemente sendo observado em maior deslocamento químico.

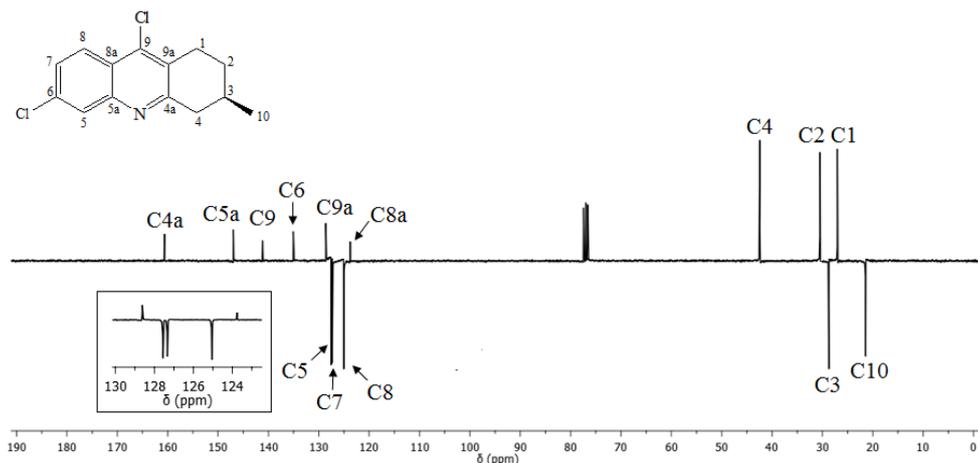


Figura 14. Espectro de RMN de ^{13}C (APT, CDCl_3 , 75 MHz) da (*R*)-6,9-dicloro-3-metil-1,2,3,4-tetraidroacridina, (**R**)-**22c**.

Para auxiliar na atribuição os sinais dos hidrogênios diastereotópicos H1, H2 e H4 das 9-cloroacridinas quirais foi realizada a técnica de RMN bidimensional HMQC do composto (**R**)-**22c**, onde o espectro de ^1H é mostrado no eixo horizontal acima, e o de ^{13}C no eixo vertical à esquerda, Figura 15. No espectro estão indicados no eixo horizontal os hidrogênios aos quais correspondem os sinais (ver Figura 13), no eixo vertical os carbonos (ver Figura 14) e no plano os acoplamentos aos quais corresponde cada sinal (mancha) observado, por exemplo: C1-H1 (acoplamento entre o hidrogênio H1 e o carbono C1), C2-H2 (acoplamento entre o hidrogênio H2 e o carbono C2). Todos os acoplamentos referidos são do tipo heteronucleares carbono-hidrogênio (^{13}C - ^1H).

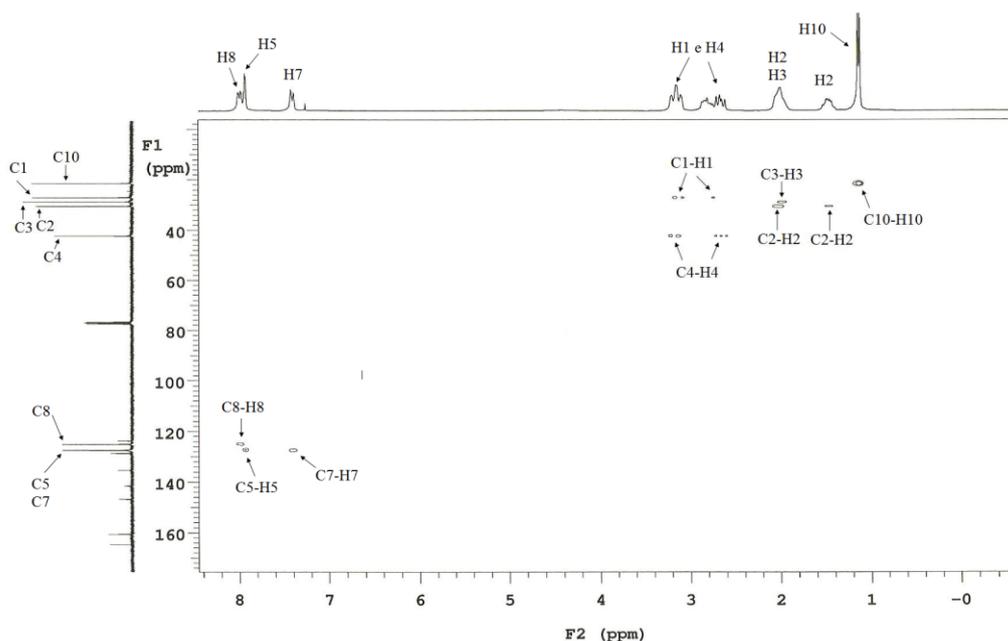
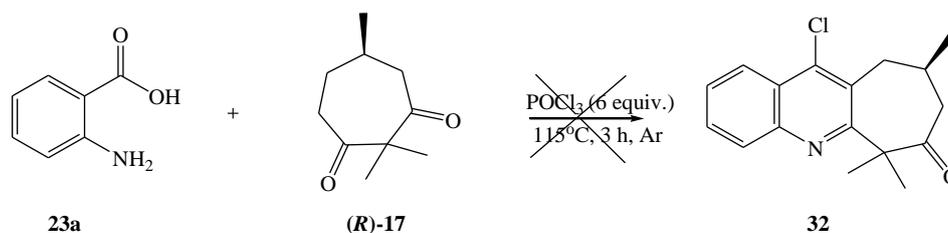


Figura 15. Espectro de RMN bidimensional HMQC da (*R*)-6,9-dicloro-3-metil-1,2,3,4-tetraidroacridina, (**R**)-**22c**.

3.2.2. Obtenção da 9-cloroacridina a partir da (*R*)-2,2,5-trimetilciclohepta-1,3-diona

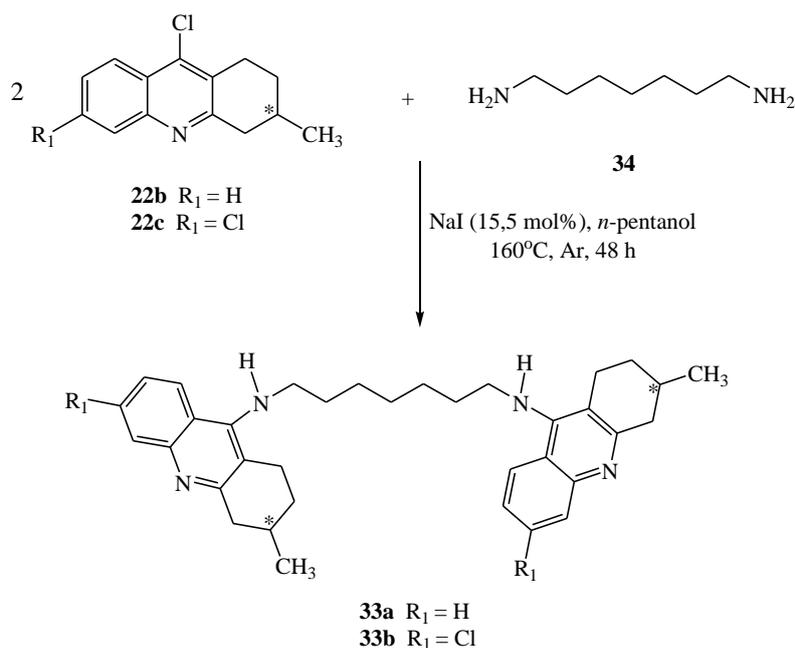
Utilizando-se a mesma estratégia, a reação de Friedländer, tentou-se obter a 9-cloroacridina quiral derivada da (*R*)-2,2,5-trimetilciclohepta-1,3-diona, (**R**)-**17**, reagindo-a com o ácido 2-aminobenzóico (**23a**), Esquema 14. Porém, não se observaram sinais do produto **32** nos espectros de RMN de ^1H e ^{13}C (APT) da mistura bruta da reação ou das frações da cromatografia em coluna, sendo observada uma mistura complexa somente em uma das frações, nas demais não se observou produto orgânico (Figura 16). Entretanto, não foram feitos outros testes para tentar se obter o composto **32**, portanto não é possível afirmar que o produto não possa ser obtido otimizando essas condições reacionais ou modificando a estratégia de síntese.



Esquema 14. Tentativa de síntese da 9-cloroacridina quiral **32**.

3.3. SÍNTESE DOS HOMODÍMEROS QUIRAIS TIPO BIS-TACRINA

É mostrada no Esquema 15 a reação para a obtenção dos homodímeros **33**, que consiste na reação de dois equivalentes de 9-cloroacridina **22** com um equivalente da 1,7-heptanodiamina (**34**), que contém a cadeia alquílica com sete carbonos metilênicos que se deseja como espaçador no dímero, uma vez que o bis(7)-tacrina é o mais ativo entre os homodímeros bis(*n*)-tacrina (ver Figura 6, página 14).



Esquema 15. Síntese dos homodímeros quirais tipo do bis-tacrina (**33**).

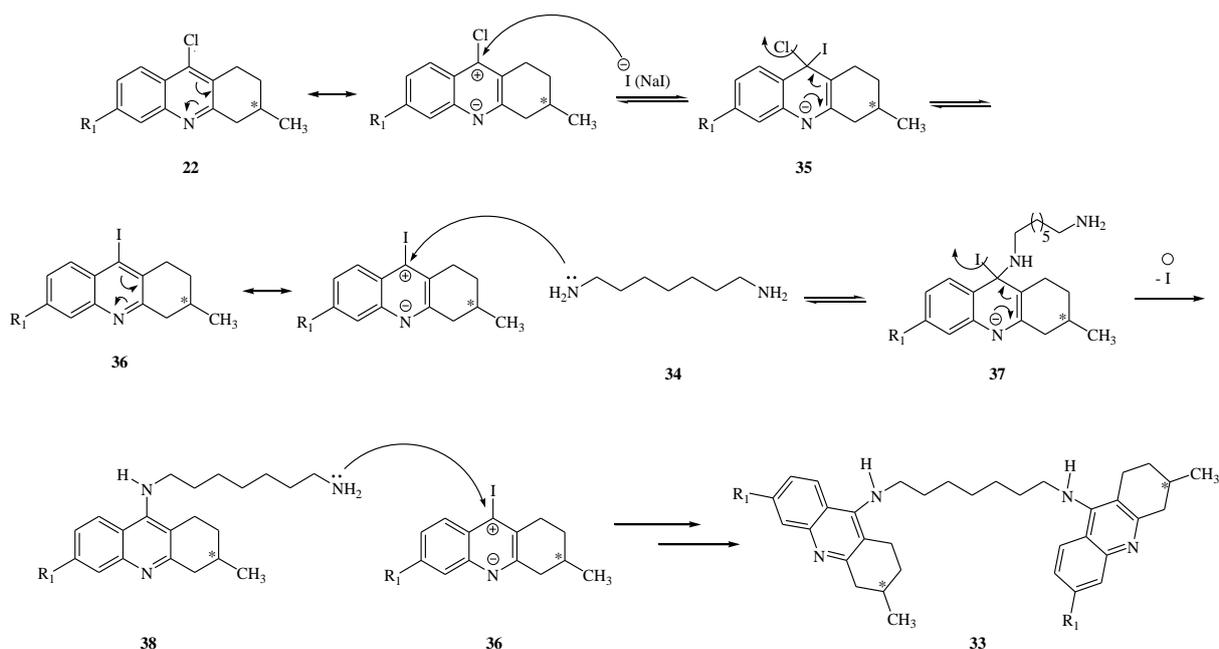
Conforme mostrado na Tabela III, os homodímeros foram obtidos em rendimentos satisfatórios quando comparados com o rendimento de 38% encontrado na literatura para o bis(7)-tacrina,⁷³ que corresponde ao referencial mais importante para a nova geração de dímeros e híbridos da tacrina. O reação da Entrada 1 para obtenção do homodímero (**R**)-**33a** foi realizada duas vezes a fim de se verificar a reprodutibilidade, o produto foi obtido puro com rendimentos de 54% e 73%. Os rendimentos um pouco mais baixos obtidos para a série enantiomérica (**S**) podem ser explicados porque se trabalhou com escala menor comparado com a série (**R**) e cada reação foi realizada uma única vez.

Tabela III. Homodímeros quirais do tipo *bis*-tacrina.

Entrada	Produto	R ₁	[α _D] ^{20 a}	Rendimento ^b (%)
1	(R)-33a	H	+18° (c = 1,50)	73
2	(S)-33a	H	-17° (c = 1,54)	63
3	(R)-33b	Cl	+14° (c = 0,57)	81
4	(S)-33b	Cl	-12° (c = 0,59)	69

^aSolvente: CH₂Cl₂. ^bApós purificação por cromatografia em coluna.

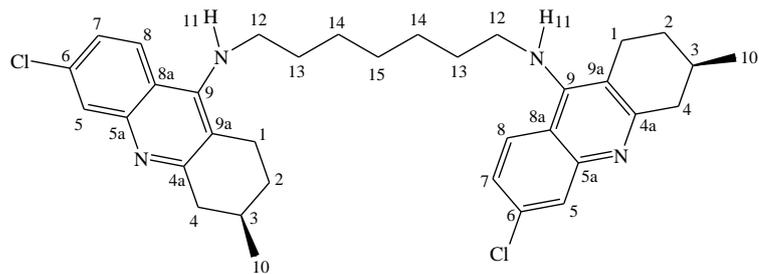
O mecanismo da reação de obtenção dos homodímeros envolve substituições nucleofílicas aromáticas (S_NAr) no anel piridínico, onde a presença do átomo de nitrogênio torna possível a entrada de um nucleófilo em posição *para* (Esquema 16). O papel do iodeto consiste em substituir o cloro da 9-cloroacridina **22**, passando rapidamente por um estado tetraédrico **35** e formando uma 9-iodoacridina **36**, mais reativa que **22**. Porém tanto o clorado **22** quanto o iodado **36** são substratos para o ataque nucleofílico da 1,7-heptanodiamina (**34**), portanto a reação ocorre mesmo na ausência de iodeto. A reação de S_NAr entre **36** e **34** leva à formação do intermediário tetraédrico **37**, que com a eliminação de iodo forma a 9-diaminoeptilacridina (**38**). A substituição de **38** no outro equivalente de **22** ou **36** conduz, através da mesma sequência de etapas, a formação do produto termodinamicamente favorecido **33**, os homodímeros quirais.⁷⁴



Esquema 16. Mecanismo para obtenção dos homodímeros quirais do tipo bis-tacrina (**33**).

É mostrada na Figura 16b a ampliação do espectro de RMN de ^1H do composto (**R**)-**33b** (Figura 16a), onde se observa em destaque, em 1,11 ppm, o duplete típico referente aos hidrogênios H10 da metila (CH_3) ligada ao anel alifático do núcleo tetraidroacridina, com constante de acoplamento $J = 6,6$ Hz e integração para seis hidrogênios. Destaca-se também o tripleto ($J = 7,2$ Hz) em 3,47 ppm, referente aos quatro hidrogênios H12, ligados aos dois carbonos C12 mais próximos do núcleo tacrina, e o singlete largo em 3,94 ppm, referente aos dois hidrogênios H11 ligados aos nitrogênios. Os hidrogênios H1, H2 e H4 são diastereotópicos. Na região dos hidrogênios ligados aos carbonos do anel aromático entre 7,21 e 7,30 é observado o multiplete com integração para um hidrogênio que se refere aos H7, e entre 7,81 e 7,97 o multiplete referente aos hidrogênios H5 e H8.

a)



b)

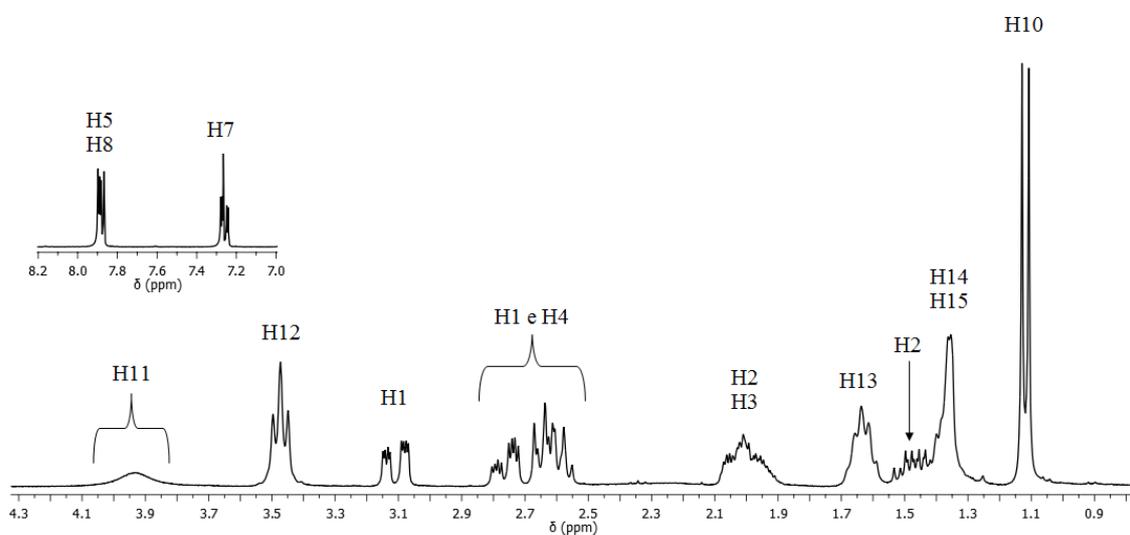


Figura 16. a) Homodímero quiral (**R**)-**33b**; b) Ampliação do espectro de RMN de ^1H (CDCl_3 , 300 MHz) do homodímero (**R**)-**33b** entre 1,0 e 4,3 ppm e, acima e à esquerda, entre 7,0 e 8,2 ppm.

No espectro de RMN de ^{13}C (APT) do composto (**R**)-**33b**, Figura 17, observam-se os seguintes sinais, em ppm: 21,4 (C10); 24,1 (C1); 26,7 (C14); 28,7 (C3); 29,0 (C15); 30,8 (C2); 31,6 (C13); 42,2 (C4); 49,4 (C12); 115,0 (C9a); 118,2 (C8a); 124,1 (C7); 124,6 (C8); 127,4 (C5); 133,9 (C4a); 148,0 (C9); 150,6 (C5a); 159,2 (C6).

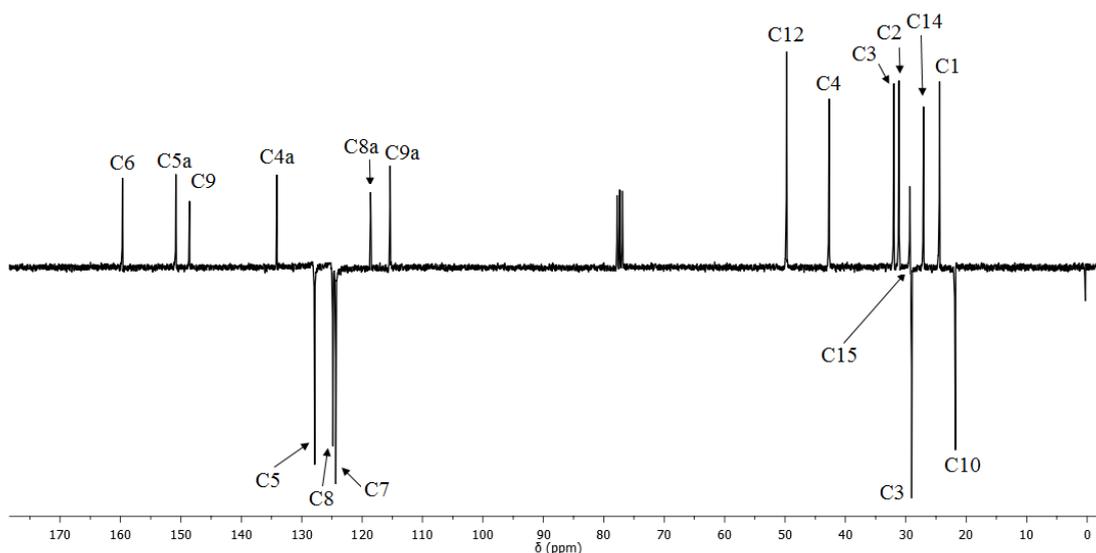


Figura 17. Espectro de RMN de ^{13}C (APT, CDCl_3 , 75 MHz) do homodímero (**R**)-**33b**.

Para auxiliar na atribuição os sinais dos hidrogênios e dos carbonos, especialmente os alifáticos, foi realizada a técnica de RMN bidimensional COSY do composto (**R**)-**33b**, onde dois espectros de ^1H iguais são mostrados, um no eixo horizontal e outro no eixo vertical à esquerda, Figura 18b. No espectro da Figura 18b observa-se uma linha diagonal formada pelos sinais (manchas) referente aos próprios picos, uma vez que o mesmo espectro é colocado nos dois eixos, e por essa mesma razão há simetria com as mesmas manchas acima e abaixo da linha. No espectro estão indicados no eixo horizontal acima os hidrogênios aos quais correspondem os sinais (ver Figura 16b) e no plano os acoplamentos aos quais corresponde cada mancha observada, por exemplo: H10-H3 (acoplamento entre o hidrogênio H3 e os hidrogênios H10); H2-H1 (acoplamento entre um hidrogênio H1 e um hidrogênio H2); H2-H2 (acoplamento entre os dois hidrogênios H2, que acoplam entre si pois são diastereotópicos); e assim sucessivamente. Todos os acoplamentos referidos são do tipo homonucleares a três ligações (H-C-H , 3J).

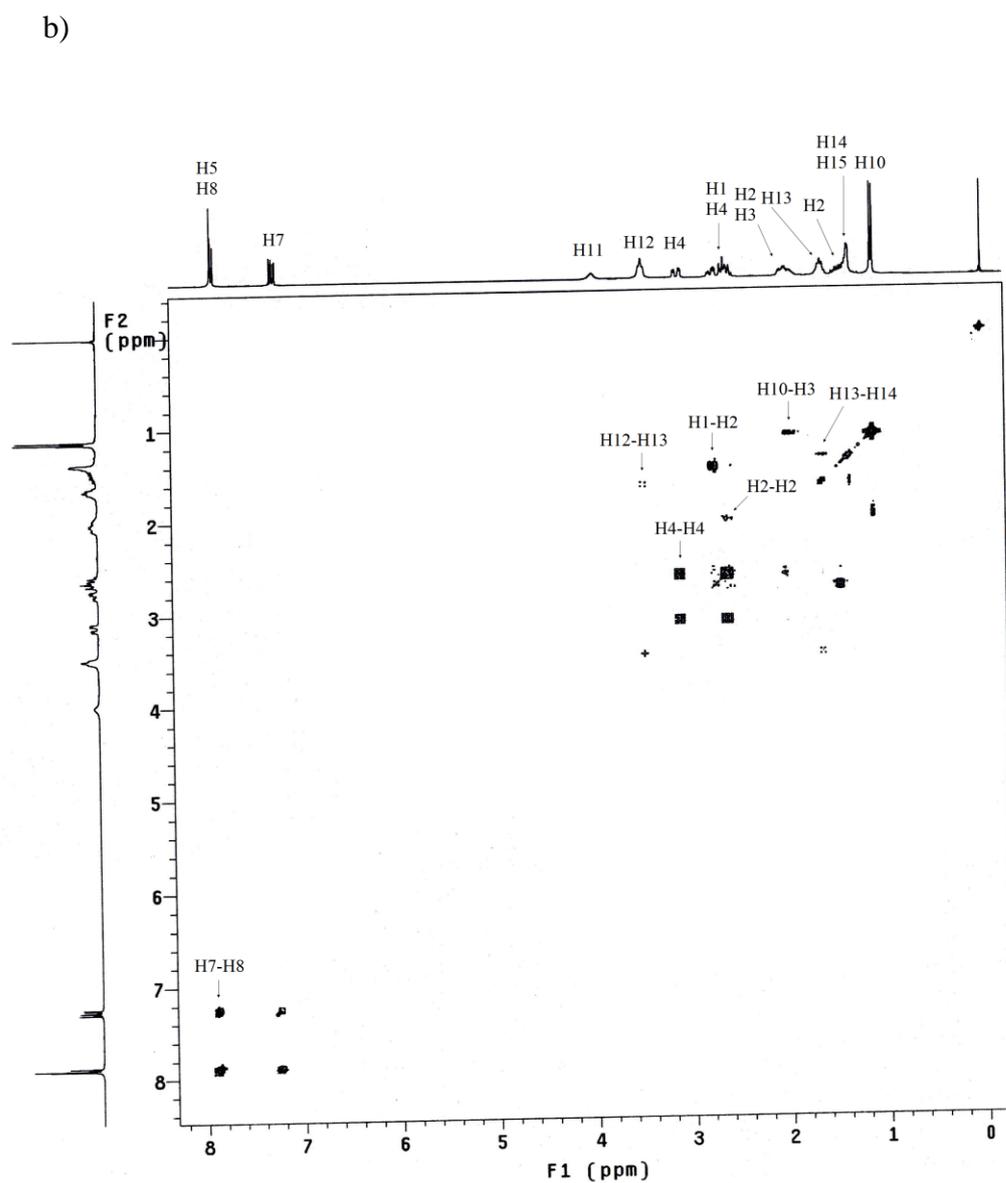
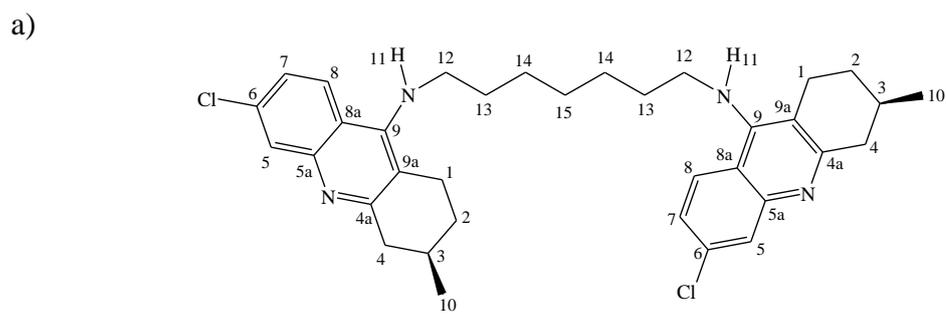


Figura 18. a) Homodímero quiral (*R*)-**33b**; b) Espectro de RMN bidimensional COSY do homodímero quiral (*R*)-**33b**.

A técnica de RMN bidimensional HMQC também foi utilizada na interpretação do homodímero (**R**)-**33b**, onde o espectro de ^{13}C é mostrado no eixo horizontal acima e o de ^1H no eixo vertical à esquerda, Figura 19.

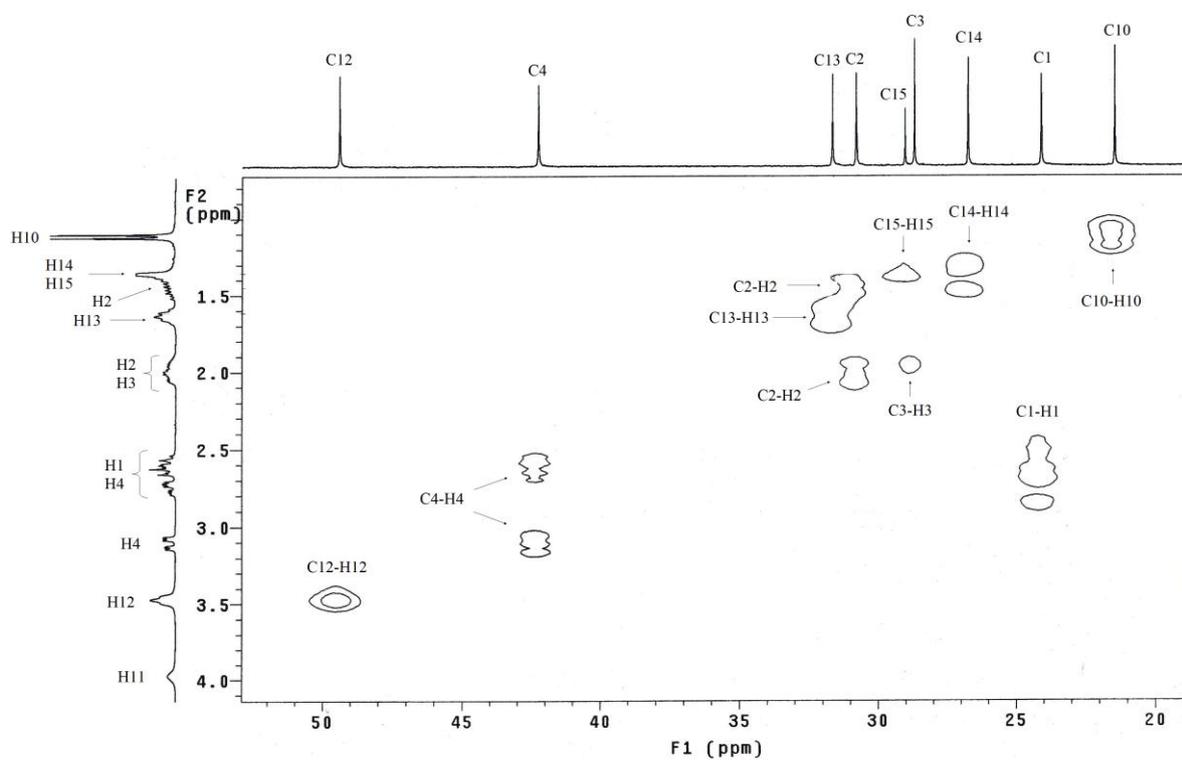
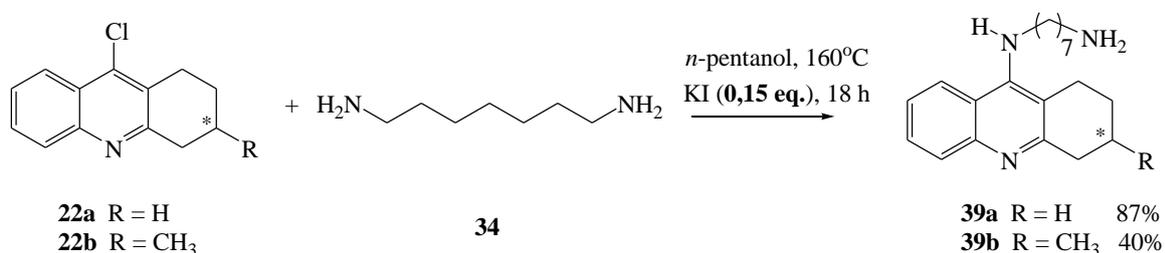


Figura 19. Ampliação do espectro de RMN bidimensional HMQC do homodímero (**R**)-**33b**, ampliação entre 1,0 e 4,0 ppm (^1H) e entre 20,0 e 55,0 ppm (^{13}C).

3.4. SÍNTESE DOS HETERODÍMEROS QUIRAIS TIPO BIS-TACRINA

3.4.1. Obtenção dos intermediários 9-(1,7-diaminoeptil)-1,2,3,4-tetraidroacridina

A síntese dos heterodímeros quirais tipos bis-tacrina consiste na preparação inicial dos precursores 9-(1,7-diaminoeptil)-1,2,3,4-tetraidroacridina (**39**), que contém o núcleo tacrina e o grupo amino separados por uma cadeia alquílica. A reação foi conduzida usando-se **1,0** equivalente de **22a** ou (**R**)-**22b**, **6,0** equivalentes da 1,7-heptanodiamina (**34**), iodeto de potássio como catalisador e *n*-pentanol como solvente (Esquema 17).⁷⁴ A reação ocorre com um mecanismo de S_NAr análogo ao da obtenção dos homodímeros quirais mostrado no Esquema 16 na página 35.



Esquema 17. Síntese da amina **39** com iodeto de potássio.

É mostrado na Figura 20 o espectro de RMN de ¹H da amina **39a**, onde se observa em destaque em 3,05 ppm um singlete com integração para dois hidrogênios referentes aos H19 ligados ao nitrogênio (NH₂) e um singlete largo em 3,96 ppm com integração para um hidrogênio e que se refere ao H11 (N-H). Um multiplete com integral para quatro hidrogênios é observado entre 2,59-2,73 ppm e se refere aos H1e H4 do anel alifático. Em 3,46 ppm observa-se o tripleto referente aos hidrogênios H12, com a constante de acoplamento *J* = 7,1 Hz. Os demais hidrogênios alifáticos da molécula são observados abaixo de 2,0 ppm. Na região dos hidrogênios ligados ao anel aromático entre 7,27-7,36 e 7,47-7,58 ppm são observados dois multipletos que correspondem a H7 e H6, respectivamente. Um multiplete com integral para dois hidrogênios é observado entre 7,85-7,98 e corresponde a H5 e H8.

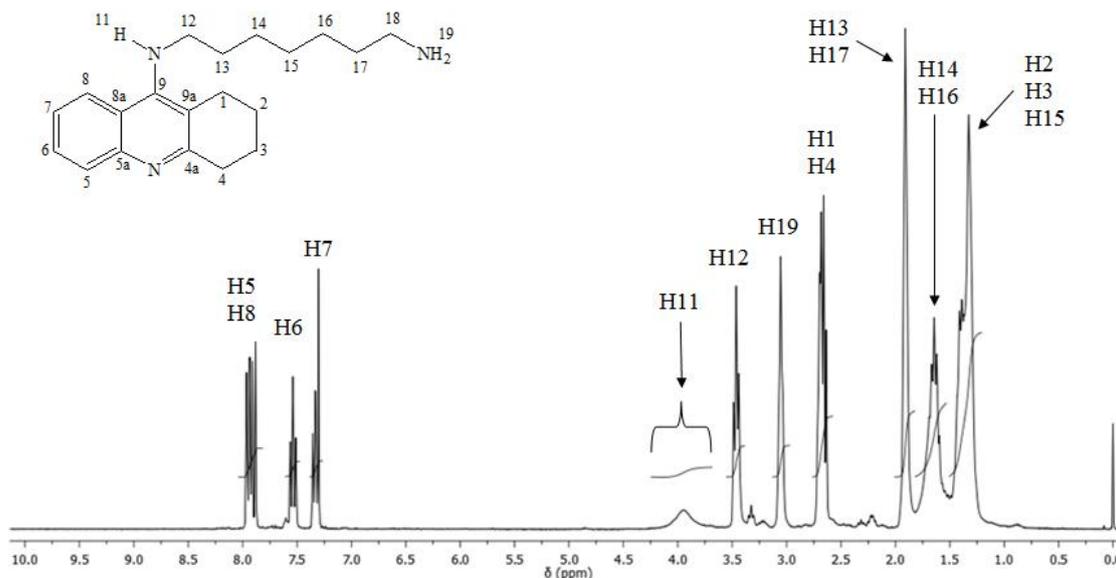


Figura 20. Espectro de RMN de ^1H (CDCl_3 , 300 MHz) da amina **39a**.

No espectro de RMN de ^{13}C (APT) da Figura 21, observam-se os seguintes sinais referentes aos carbonos da amina **39a**: 22,5 (C2); 22,8 (C3); 24,5 (C15); 26,5 (C14); 26,6 (C16); 28,9 (C13); 31,4 (C17); 33,3 (C1); 33,8 (C4); 41,8 (C18); 49,2 (C12); 115,4 (C9a); 120,0 (C8a); 122,6 (C8); 123,2 (C7); 127,9 (C5); 128,4 (C6); 147,2 (C4a); 150,4 (C5a); 158,1 (C9).

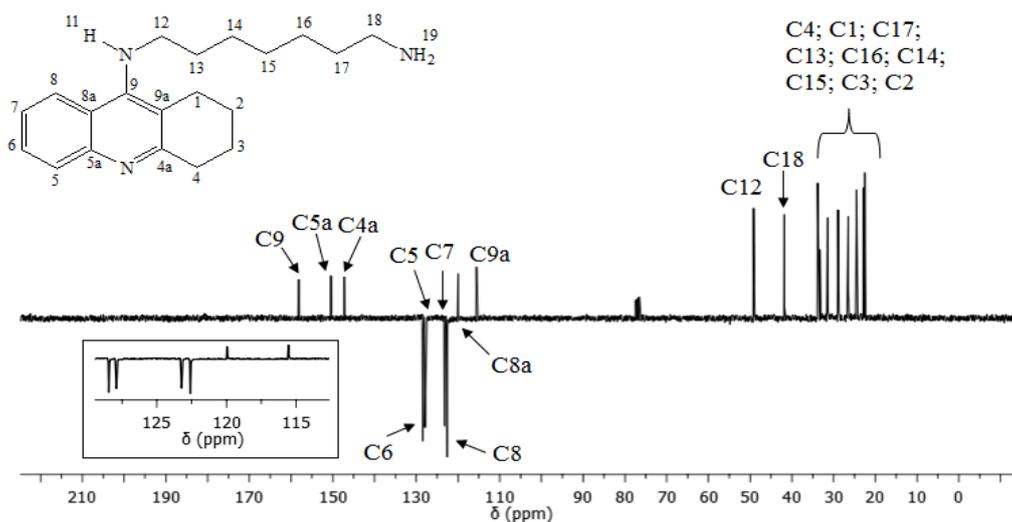
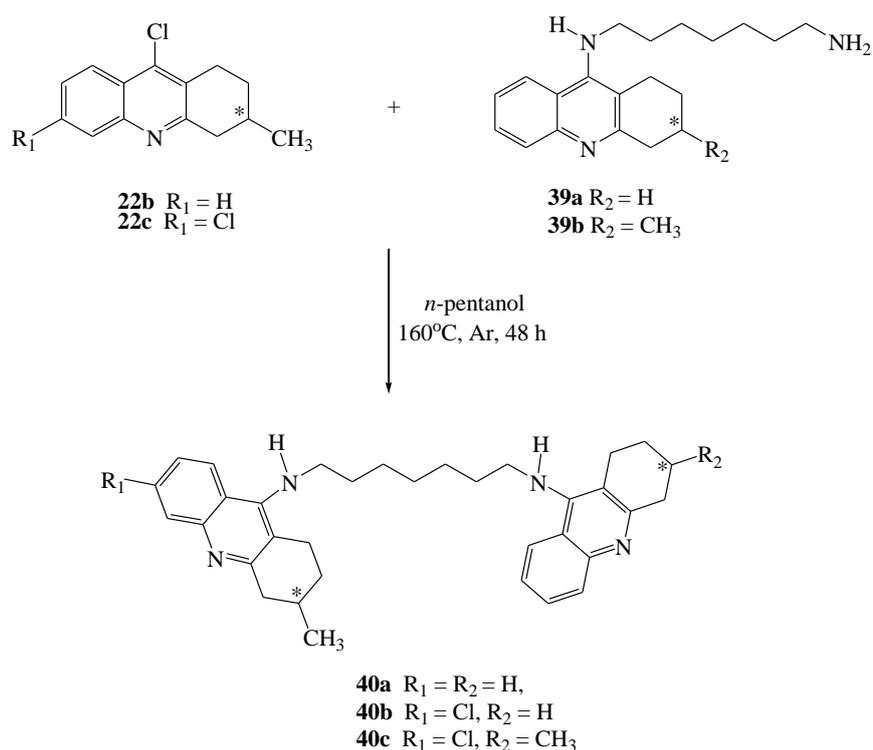


Figura 21. Espectro de RMN de ^{13}C (APT) (CDCl_3 , 75 MHz) da amina **39a**.

3.4.2. Obtenção dos heterodímeros quirais

A reação das 9-cloroacridinas **22** (1,5 equiv.) com as aminas **39** (com substituinte diferente de **22**) levou a formação dos heterodímeros **40**, conforme o Esquema 18. A reação para obtenção dos heterodímeros quirais ocorre com um mecanismo de S_NAr análogo ao da obtenção dos homodímeros quirais mostrado no Esquema 16 na página 35.



Esquema 18. Síntese dos heterodímeros quirais do tipo bis-tacrina (**40**).

Na Tabela IV são mostrados os heterodímeros sintetizados. Encontrou-se dificuldade na purificação dos heterodímeros. O composto (**R**)-**40a** (Entrada 1) foi purificado após duas cromatografias em coluna para a realização dos ensaios de atividade biológica, o rendimento foi de 71% após a primeira purificação. A reação foi repetida a fim de se avaliar a reprodutibilidade e o produto foi obtido puro com rendimento de 80%. Na síntese do heterodímero (**R**)-**40c** (Entrada 5), após a primeira cromatografia em coluna da mistura bruta da reação obteve-se 38% de rendimento, porém foi necessário realizar três vezes a cromatografia para se obter o produto puro para a análise biológica (Anexos 47 e 48, páginas

116 e 117). Devido à disponibilidade já discutida da (S)-(-)-pulegona as reações foram realizadas uma única vez.

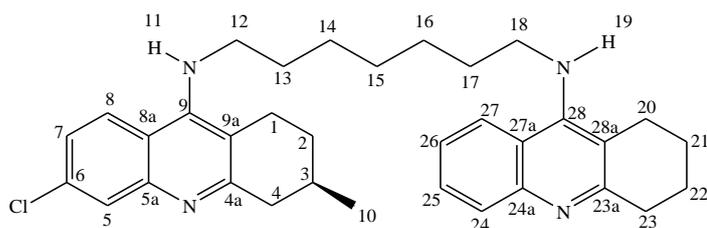
Tabela IV. Heterodímeros quirais do tipo bis-tacrina.

Entrada	Produto	R ₁	R ₂	[α _D] ^{20 a}	Rendimento ^b (%)
1	(R)-40a	H	H	+5° (c = 0,74)	80
2	(S)-40a	H	H	-4° (c = 0,73)	68
3	(R)-40b	Cl	H	+10° (c = 1,12)	44
4	(S)-40b	Cl	H	-4° (c = 0,85)	46
5	(R)-40c	Cl	CH ₃	-6° (c = 0,50)	38

^aSolvente: CH₂Cl₂. ^bApós purificação por cromatografia em coluna.

É mostrada na Figura 22b a ampliação do espectro de RMN de ¹H do composto **(R)-40b** (Figura 22a), onde observa-se em destaque, em 1,10 ppm, o duplete típico referente aos hidrogênios H10 da metila (CH₃) ligada ao anel alifático do núcleo tetraidroacridina, com constante de acoplamento $J = 6,6$ Hz e integração para três hidrogênios. Destaca-se também o sinal largo em 3,9 ppm, referente aos hidrogênios H11 e H19, ligados ao nitrogênio e o multiplete entre 3,37 e 3,57 ppm, referente aos hidrogênios H12 e H18. Os hidrogênios H1, H2 e H4 são diastereotópicos. Na região dos hidrogênios ligados ao anel aromático, entre 7,18 e 7,38 é observado o multiplete com integração para dois hidrogênios, que se refere aos H7 e H26, entre 7,43 e 7,58 é observado o multiplete com integração para um hidrogênio que se refere ao H25, e entre 7,78 e 8,01 o multiplete referente aos hidrogênios H5, H8, H24 e H27.

a)



b)

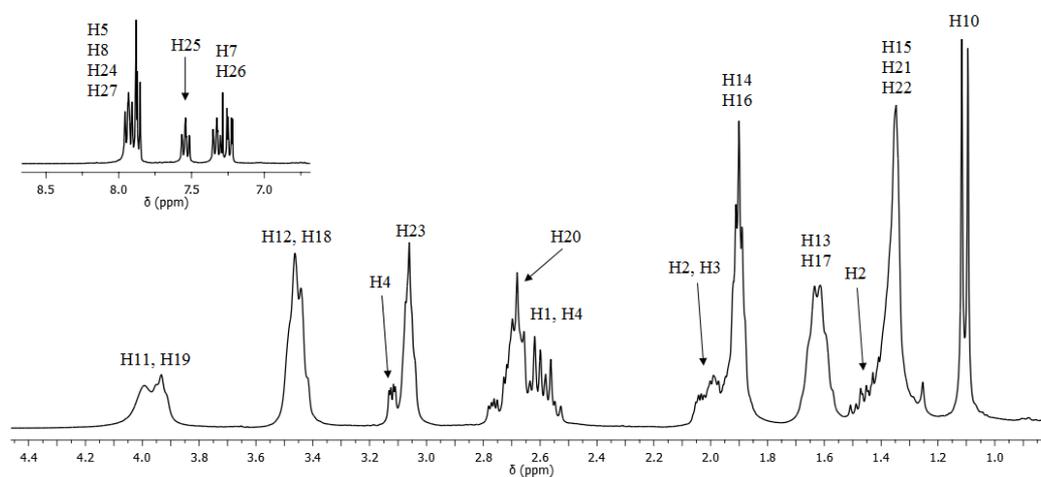
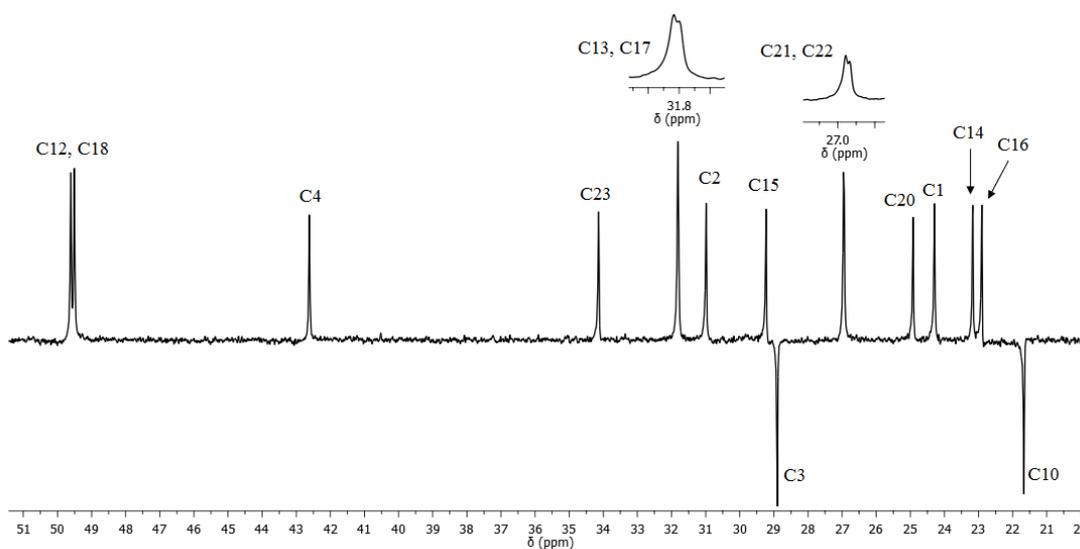


Figura 22. a) Heterodímero quiral (**R**)-**40b**; b) Ampliação do espectro de RMN de ^1H (CDCl_3 , 300 MHz) do heterodímero (**R**)-**40b** entre 1,0 e 4,4 ppm e, acima e à esquerda, entre 7,0 e 8,5 ppm.

No espectro de RMN de ^{13}C (APT) do composto (**R**)-**40b** observam-se os seguintes sinais, em ppm: 21,6 (C10); 22,9 (C16); 23,2 (C14); 24,3 (C1); 24,9 (C20); 26,9 (C21 e C22); 28,9 (C3); 29,2 (C15); 31,0 (C2); 31,8 (C13 e C17); 34,1 (C23); 42,6 (C4); 49,5 (C18); 49,6 (C12); 115,2 (C28a); 116,0 (C9a); 118,5 (C27a); 120,3 (C8a); 122,9 (C27); 123,7 (C26); 124,2 (C7); 124,7 (C24); 127,8 (C8); 128,4 (C25); 128,8 (C5); 134,0 (C4a); 147,5 (C23a); 148,5 (C24a); 150,7 (C28); 150,8 (C9); 158,5 (C5a); 159,5 (C6); (Figura 23).

a)



b)

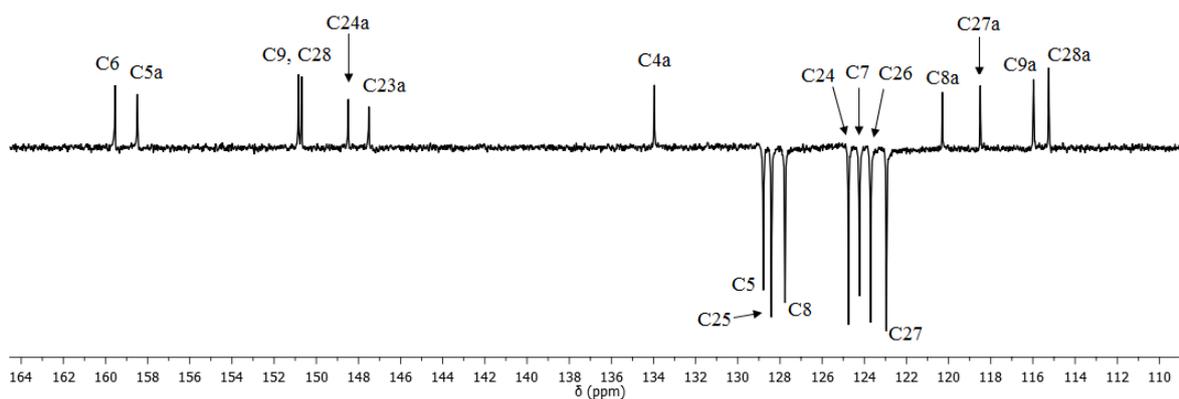
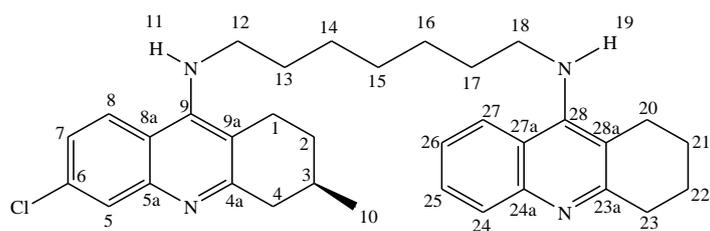


Figura 23. Ampliação do espectro de RMN de ¹³C (APT) (CDCl₃, 75 MHz) do heterodímero **(R)-40b**: a) entre 20,0 e 51,0 ppm; b) entre 110,0 e 164,0 ppm.

Para auxiliar na atribuição os sinais dos hidrogênios e dos carbonos, especialmente os alifáticos, foi realizada a técnica de RMN bidimensional COSY do composto **(R)-40b**, Figura 24b.

a)



b)

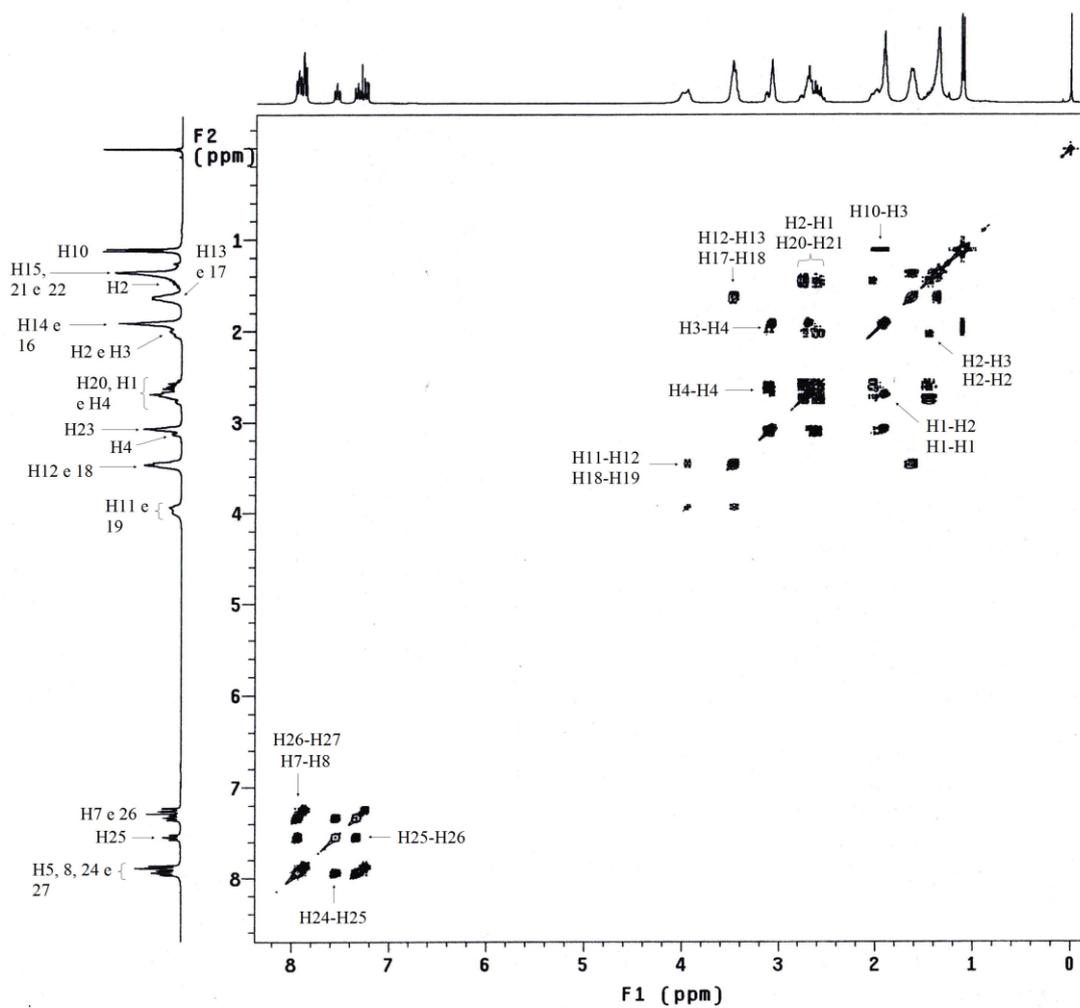


Figura 24. a) Heterodímero quiral (**R**)-**40b**; b) Espectro de RMN bidimensional COSY do heterodímero quiral (**R**)-**40b**.

A técnica de RMN bidimensional HMQC também foi utilizada na interpretação do heterodímero (*R*)-**40b**, onde o espectro de ^{13}C é mostrado no eixo horizontal acima e o de ^1H no eixo vertical à esquerda, Figura 25.

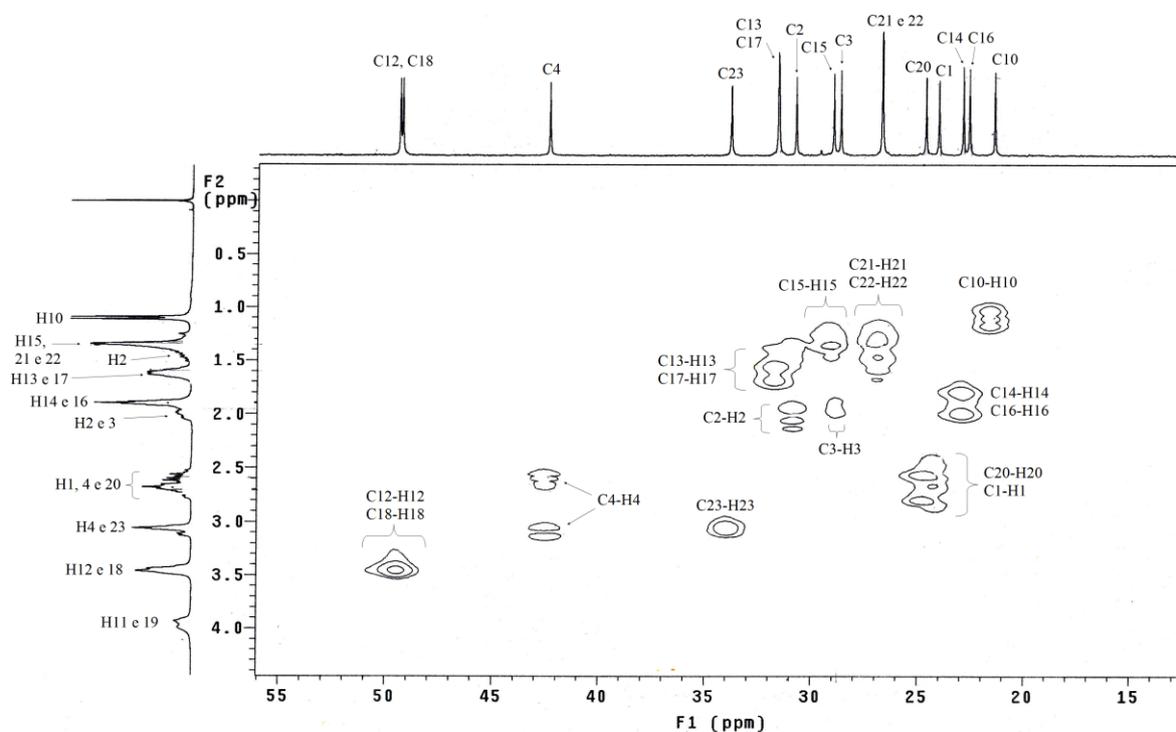
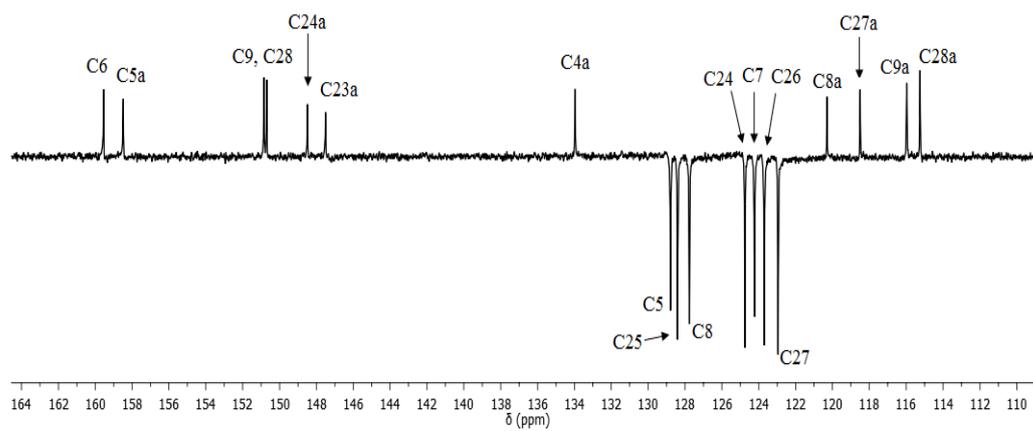


Figura 25. Ampliação do espectro de RMN bidimensional HMQC do heterodímero quiral (*R*)-**40b** entre 0 e 4,0 ppm (^1H) e 10,0 e 55,0 ppm (^{13}C).

Devido aos diferentes substituintes nos dois núcleos tacrina, as moléculas dos heterodímeros quirais possuem menos simetria do que as dos homodímeros quirais. A comparação dos espectros de RMN permite facilmente observar a diferença. Na Figura 26, observam-se nos espectros de APT todos os carbonos do heterodímero (*R*)-**40b**, enquanto somente a metade dos carbonos correspondente à molécula do homodímero (*R*)-**33b** são observados. Isso ocorre porque devido à simetria da molécula os carbonos nos dois núcleos possuem o mesmo ambiente químico, e o mesmo é válido para os hidrogênios.

a)



b)

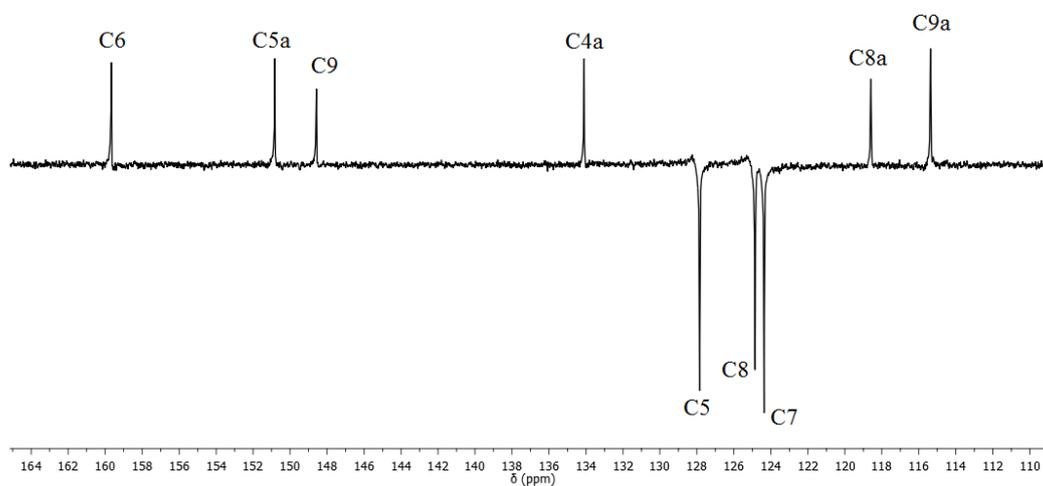


Figura 26. Ampliação do espectro de RMN de ^{13}C (APT), entre 110,0 e 164,0 ppm, do
a) heterodímero quiral **(R)-40b**, b) homodímero quiral **(R)-33b**.

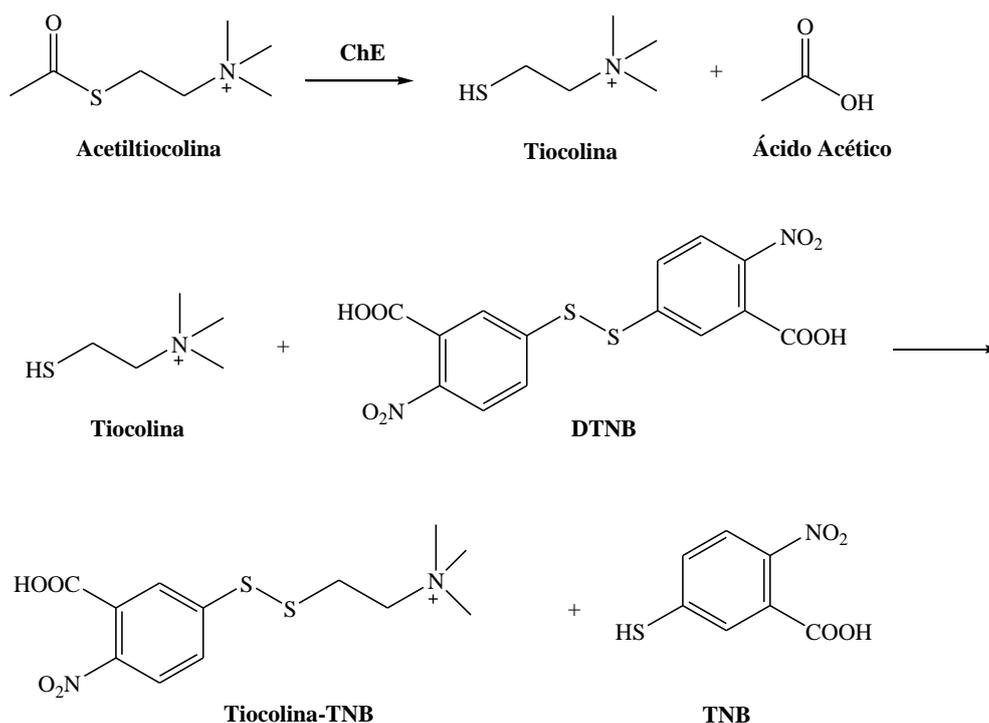
3.5. ANÁLISE BIOLÓGICA

3.5.1. Metodologia

Os testes biológicos realizados com os homodímeros e heterodímeros quirais preparados neste trabalho visaram avaliar a atividade inibitória destes compostos frente às enzimas colinesterase (ChE): acetilcolinesterase (AChE) e butirilcolinesterase (BuChE), através do método de Ellman.⁷⁵

Ellman e colaboradores desenvolveram uma metodologia de medição da atividade catalítica da acetilcolinesterase a partir da variação de absorbância do produto formado na reação de hidrólise catalítica da acetilcolina. A medida espectrofotométrica permite quantificar a variação da atividade da acetilcolinesterase e possíveis sinais de inibição. As enzimas AChE utilizadas nos testes foram extraídas a partir de cérebros de rato e as enzimas BuChE a partir do plasma humano.

O princípio do método de Ellman consiste na medição da velocidade de produção de tiocolina quando a acetiltiocolina é hidrolisada pela enzima AChE. Esta é acompanhada pela reação contínua da tiocolina formada com o Reagente de Ellman (ácido 5,5-ditiobis-2-nitrobenzóico, DTNB) para produzir o ácido 5-tiol-2-nitrobenzoato (TNB), cuja forma aniônica (existente em equilíbrio) possui coloração amarelada (Esquema 19). A medida espectrofotométrica desse produto permite avaliar a quantidade de enzima colinesterase que realizou a hidrólise da tiocolina de partida. A reação com o grupo tiol tem se mostrado suficientemente rápida para não ser limitante da medição da velocidade da atividade da enzima e a concentração usada não inibe a hidrólise enzimática.



Esquema 19. Reação do Método de Ellman.

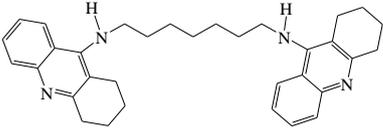
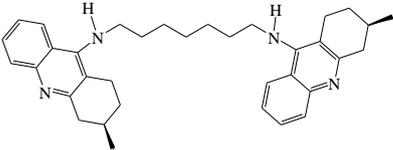
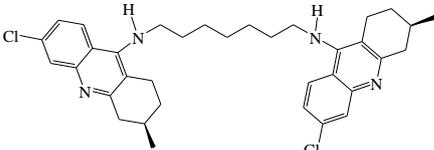
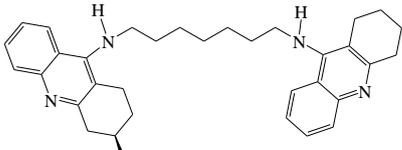
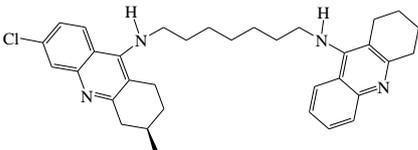
3.5.2. Resultados e Discussão dos Testes Biológicos

Na Tabela V (página 57) são mostrados alguns resultados disponíveis de inibição das enzimas AChE e BuChE dos dímeros bis-tacrina quirais, juntamente com a do dímero bis(7)-tacrina como composto de referência e são expressos em IC_{50} , isto é, da concentração do inibidor (medida em $nmol.L^{-1}$) necessária para inibir 50% da quantidade de enzima presente no ensaio.

Na Entrada 3 observa-se que o homodímero (**R**)-**33b** apresentou significativa atividade inibitória na AChE, e foi seletivo para esta enzima, não apresentando atividade na BuChE. Na Entrada 5 observa-se que o heterodímero (**R**)-**40b** apresentou uma atividade inibitória da AChE melhor que o composto bis(7)-tacrina, que corresponde ao referencial mais importante da literatura para a nova geração de dímeros e híbridos da tacrina. Essa melhor atividade de (**R**)-**40b**, bem como de (**R**)-**33b** quando comparado com (**R**)-**33a**, pode ser atribuída a maior interação com o sítio ativo da enzima, pois a presença do átomo de cloro na posição 6 do núcleo acridínico confere a molécula um sítio a mais de interação do tipo dipolo-dipolo. Em contrapartida, o átomo de cloro, por efeito indutivo, torna o anel aromático mais deficiente de

elétrons, o que enfraquece as interações tipo π - π *stacking*, que são as principais interações entre a enzima e o inibidor, especialmente no sítio ativo (CAS), onde a quantidade de resíduos de aminoácidos aromáticos é maior. Isso pode explicar a maior interação do heterodímero, quando comparado ao homodímero, uma vez que um dos núcleos do heterodímero não possui substituintes no anel aromático. A avaliação da atividade de inibição de AChE do heterodímero **(R)-40c** (estrutura na página 67), que possui quiralidade nos dois núcleos, porém somente um dos núcleos com cloro no anel aromático, será de fundamental importância para aprofundar a discussão da relação da estrutura e a atividade biológica dos dímeros quirais do tipo bis-tacrina. As amostras da série **(S)-** e do dímero **(R)-40c** foram encaminhadas para análise biológica. É importante ressaltar que o bis(7)-tacrina utilizado como padrão para os testes biológicos, foi sintetizado e purificado por cromatografia em coluna no nosso laboratório.

Tabela V. Análise biológica dos dímeros bis-tacrina.

Entrada	Produto	$[\alpha_D]^{20}$ *	IC_{50} (nmol.L ⁻¹)	
			AChE	BuChE
1	 Bis(7)-tacrina	-	4.12 ± 0.70	9.03 ± 1.67
2	 (R)-33a	+18° (c = 1,50)	11.21 ± 3.41	80.03 ± 8.46
3	 (R)-33b	+14° (c = 0,57)	4.73 ± 0.67	inativo
4	 (R)-40a	+5° (c = 0,74)	76.23 ± 15.16	inativo
5	 (R)-40b	+10° (c = 1,12)	2.80 ± 0.92	44.82 ± 3.06

*Solvente: CH₂Cl₂.

4. CONCLUSÕES

Neste trabalho foram sintetizados nove dímeros quirais da tacrina, sendo os quatro do tipo homodímeros, **(R)-33a**, **(S)-33a**, **(R)-33b**, **(S)-33b** e cinco do tipo heterodímeros, **(R)-40a**, **(S)-40a**, **(R)-40b**, **(S)-40b** e **(R)-40c**. O monoterpeneo natural pulegona, comercialmente disponível nas formas **(R)-(+)-** e **(S)-(-)-**, foi utilizado na preparação das 3-metilcicloexanonas, empregadas nas reações de ciclocondensação com ácidos antranílicos substituídos. Devido à disponibilidade limitada da **(S)-(-)-pulegona**, não foi feito um estudo esquematizado para avaliar os diferentes rendimentos obtidos para os homodímeros e heterodímeros quirais, pois a maior parte das reações foi realizada uma única vez. Foram realizados ensaios de inibição das enzimas AChE e BuChE com os compostos quirais disponíveis **(R)-33a**, **(R)-33b**, **(R)-40a** e **(R)-40b**, sendo que o heterodímero **(R)-40b** foi mais ativo que o bis(7)-tacrina. As análises de atividade óptica mostraram que a quiralidade foi mantida nos intermediários e nos produtos finais sintetizados.

As amostras da série enantiomérica **(S)** (**(S)-33a**, **(S)-33b**, **(S)-40a** e **(S)-40b**) foram encaminhadas para a análise de atividade de inibição de AChE e BuChE, e quaisquer seja o resultado dos testes pode ser considerado positivo, uma vez que a ausência de atividade biológica nesta série estaria de acordo com a maioria dos fármacos existentes, onde a enzima-alvo tende a reconhecer somente um enantiômeros óptico. (ver tópico 1.2, página 9). A amostra do heterodímero **(R)-40c** também foi encaminhada para a medida de atividade biológica.

5. PARTE EXPERIMENTAL

5.1 MATERIAIS E MÉTODOS

5.1.1. Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear

Os espectros de RMN de ^1H e de ^{13}C foram obtidos em um espectrômetro *Varian VNMRS* modelo INOVA, 300 MHz e 75,5 MHz, respectivamente (Instituto de Química – UFRGS). O tempo de relaxação em ambas as análises foi de 1,0 segundo. Os sinais são descritos em ordem crescente de deslocamento químico. Os deslocamentos químicos (δ) estão relacionados em partes por milhão (ppm), em relação ao tetrametilsilano (TMS), utilizado como padrão interno para os espectros, colocando-se entre parênteses a multiplicidade (s = singleto, sl = singleto largo, d = duplete, t = tripleto, q = quarteto, dd = duplo duplete, m = multiplete), o número de hidrogênios deduzido da integral relativa e a constante de acoplamento (J) em Hertz (Hz).

5.1.2. Espectroscopia no Infravermelho

Os espectros no infravermelho (IV) foram obtidos em um espectrômetro *Varian 640-IR* (Instituto de Química – UFRGS) em pastilhas de KBr.

5.1.3. Análise Óptica

O desvio ótico foi medido em um polarímetro *Perkin Elmer 341* à temperatura de 20°C. As amostras foram pesadas e dissolvidas em um balão volumétrico de um mililitro de solvente P.A. (clorofórmio ou diclorometano), produzidos pela *Nuclear*.

5.1.4. Ponto de Fusão

O valor de ponto de fusão das substâncias foi determinado em aparelho *Buchi Melting Point M-565* (Instituto de Química – UFRGS).

5.1.5. Solventes e Reagentes

A purificação por cromatografia em coluna foi realizada utilizando como fase estacionária sílica gel 60 Å (70-230 mesh), produzida pela *Acros*. Cromatografia por camada delgada (CCD) foi conduzida utilizando-se placas de alumínio com 0,2 mm de sílica gel produzidas pela *Macherey-Nagel*. A trietilamina P.A. utilizada na fase móvel para cromatografia foi produzida pela *Aldrich* e os demais solventes P.A., utilizados nas reações e nas purificações, foram produzidos pela *Nuclear*.

5.1.6. Análise Biológica

Os testes biológicos de inibição das enzimas AChE e BuChE foram realizadas no Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Departamento de Bioquímica, nesta universidade, em forma de parceria.

5.2. PROCEDIMENTOS

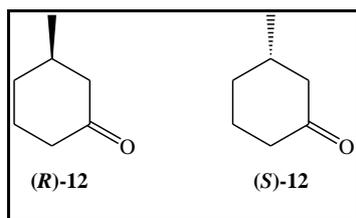
5.2.1. Retro-aldol da pulegona

5.2.1.1. Procedimento Geral

Uma solução de 3,0 mL (18,45 mmol) de (*R*)-(+)-pulegona em 15 mL de solução aquosa de ácido clorídrico (HCl) 10 % foi agitada sob refluxo durante 24 h. Após este período, adicionou-se 21 mL de éter etílico (Et₂O). A fase orgânica foi separada e lavada com solução saturada de cloreto de sódio (NaCl, 21 mL) e água (H₂O, 21 mL) e seca com sulfato de sódio (Na₂SO₄) anidro. O solvente foi removido em evaporador rotatório, lentamente e à temperatura ambiente, devido ao baixo ponto de ebulição do produto. A evaporação foi controlada pela pesagem do produto bruto. A (*R*)-3-metilcicloexanona, (**R**)-12, foi purificada por destilação à pressão normal, e foi obtida pura com 70% de rendimento.

5.2.1.2. Procedimento Otimizado para a Escala Pequena

Um mililitro (6,15 mmol) da (*R*)-(+)-pulegona, ou da (*S*)-(-)-pulegona, foi colocado em um balão de 25 mL, onde foram adicionados 5 mL de uma solução aquosa de ácido clorídrico (HCl) 10%. A mistura foi deixada sob aquecimento em refluxo entre 90 e 95°C durante 24 horas. Decorrido esse período, não havia mais material de partida conforme CCD, foi feita a diluição em éter etílico (Et₂O, 7 mL) e a fase orgânica foi separada e lavada com solução saturada de cloreto de sódio (NaCl, 7 mL) e água (H₂O, 7 mL) e seca com sulfato de sódio (Na₂SO₄) anidro. O solvente foi evaporado no rota-evaporador lentamente e à temperatura ambiente, devido ao baixo ponto de ebulição do produto. A evaporação foi controlada pela pesagem do produto bruto.



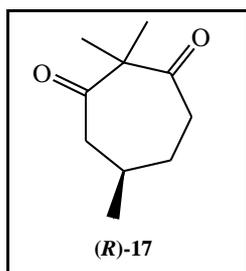
RMN de ¹H (CDCl₃, 300 MHz) δ (ppm): 1,02 (d, 3H, *J* = 3,0 Hz); 1,18-1,25 (m, 1H); 1,30-1,38 (m, 1H); 1,61-1,71 (m, 1H); 1,83-1,94 (m, 2H); 2,01-2,08 (m, 1H); 2,20-2,28 (m, 1H); 2,31-2,40 (m, 2H).

RMN de ¹³C (CDCl₃, 75MHz) δ (ppm): 22,0; 25,2; 33,2; 34,1; 41,0; 49,9; 212,0.

(*R*)-12 [α_D]²⁰ = +13° (c = 1,00; 20°C, CH₂Cl₂)

(*S*)-12 [α_D]²⁰ = -15° (c = 0,75; 20°C, CH₂Cl₂)

5.2.2. Síntese da (R)-2,2,5-trimetilcicloheptan-1,3-diona



A uma solução de 3,0 g (19,7 mmol) de (R)-(+)-pulegona em 20 mL de metanol (MeOH), foram adicionados, à temperatura de 0°C, 6,6 mL de solução peróxido de hidrogênio (H₂O₂) 30 % e 1,5 mL de solução 6,6 mol/L de hidróxido de potássio (KOH). A seguir, a solução resultante foi agitada a 0°C durante 2 h e à temperatura ambiente durante 3 h. Após este período, a solução resultante foi colocada em 100 mL de H₂O e as fases foram separadas. A fase aquosa foi extraída com Et₂O (4 x 40 mL), os extratos orgânicos foram transferidos para um erlenmeyer e os traços de H₂O removidos com sulfato de sódio anidro (Na₂SO₄). O solvente foi removido em evaporador rotatório, obtendo-se 2,95 g (17,5 mmol, 89 %) de óxido de pulegona (**18**), que foi utilizado sem purificação na etapa seguinte.

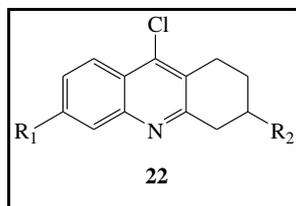
A uma solução de 2,0 g (11,9 mmol) de óxido de pulegona (**18**) em 40 mL de benzeno anidro, foram adicionados 3,0 mL de trifluoreto de boro eterado (BF₃.Et₂O). A mistura resultante foi refluxada por 5 min. Após a adição de 40 mL de benzeno, a solução foi lavada com H₂O (2 x 40 mL) e com solução saturada de NaCl (2 x 40 mL). A fase orgânica foi seca com Na₂SO₄ anidro, o solvente foi removido em evaporador rotatório e bomba de alto vácuo. Após cromatografia em coluna, tendo-se como mistura eluente hexano e acetato de etila, em uma proporção volumétrica de 98% e 2%, respectivamente, obteve-se 1,90 g (11,3 mmol, 95%) da (R)-2,2,5-trimetilcicloheptan-1,3-diona, (**R**)-**17**.

RMN de ¹H (300 MHz, CDCl₃/TMS), δ (ppm): 2,53 (td, *J* = 12,0, 2,9 Hz, 1H); 2,44 – 2,32 (m, 3H); 2,10 – 1,94 (m, 2H); 1,56 – 1,45 (m, 1H); 1,23 (s, 6H); 1,03 (d, *J* = 6,6 Hz, 3H).

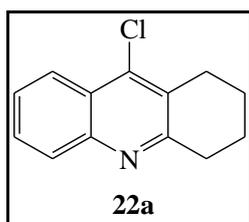
RMN de ¹³C (APT) (75 MHz, CDCl₃/TMS), δ (ppm): 212,5; 211,5; 61,4; 48,3; 39,7; 35,7; 35,0; 22,9; 20,5; 20,4.

[α]_D: -99° (*c* = 1,5; 20°C, CHCl₃); **P.F.** = 53-55°C

5.2.3. Síntese das 9-cloroacridinas



A uma mistura de ácido 2-aminobenzóico (**23a**) ou ácido 3-cloro-2-aminobenzóico (**23b**) (1,05 equiv.) e da ciclocetona **12** (1,0 equiv.), foi adicionado, a 0°C e sob atmosfera inerte, oxatricloreto de fósforo V, POCl₃, (6 equiv.). A seguir, a mistura foi mantida sob refluxo durante três horas, em atmosfera inerte. Após este período, o excesso de POCl₃ foi removido em alto vácuo e o resíduo foi diluído com acetato de etila. A solução resultante foi neutralizada com solução aquosa 10% de carbonato de sódio (Na₂CO₃) até pH 8 e as fases foram separadas. A fase orgânica foi lavada com solução saturada de cloreto de sódio (NaCl). Os extratos orgânicos foram transferidos para um erlenmeyer e os traços de H₂O removidos com sulfato de sódio anidro (Na₂SO₄). O solvente foi removido em evaporador rotatório e em bomba de alto vácuo a 50°C por duas horas. A purificação foi feita por cromatografia em coluna utilizando como fase móvel: diclorometano com eluição isocrática para o composto **22a** e para separar as misturas de isômeros (*R*)-**22b**, (*S*)-**22b**, (*R*)-**22c** e (*S*)-**22c**, respectivamente, (*R*)-**22d**, (*S*)-**22d**, (*R*)-**22e** e (*S*)-**22e**, hexano e acetato de etila com eluição por gradiente, sendo as porcentagens volumétricas, respectivamente 98% e 2%, 97% e 3%, 96% e 4%, 95% e 5%, 93% e 7%, 90% e 10% e 85% e 15%. O acompanhamento foi feito por CCD com hexano e acetato de etila, 90% e 10%, respectivamente.

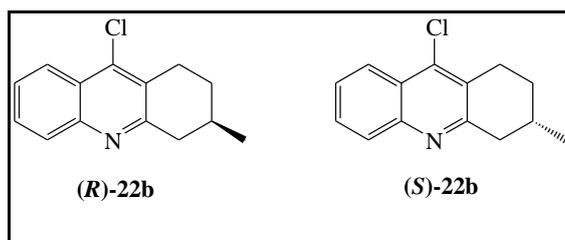


9-cloro-1,2,3,4-tetraidroacridina (22a)

RMN de ^1H (CDCl_3 , 300 MHz) δ (ppm): 1,85-1,95 (m, 4H); 2,94 (t, 2H, $J = 6,0$ Hz); 3,09 (t, 2H, $J = 6,0$ Hz); 7,48 (ddd, 1H, $J = 8,4, 7,5$ e $3,0$ Hz); 7,62 (ddd, 1H, $J = 8,4, 7,5$ e $3,0$ Hz); 7,95 (d, 1H, $J = 9,0$ Hz); 8,10 (d, 1H, $J = 9,0$ Hz).

RMN de ^{13}C (CDCl_3 , 75MHz) δ (ppm): 22,5; 27,3; 34,0; 123,5; 125,1; 126,2; 128,5; 128,6; 129,0; 141,2; 146,5; 159,2.

P.F. = 68-70°C



(R)-9-cloro-3-metil-1,2,3,4-tetraidroacridina ((R)-22b) e

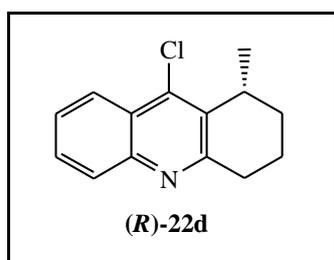
(S)-9-cloro-3-metil-1,2,3,4-tetraidroacridina ((S)-22b)

RMN de ^1H (CDCl_3 , 300 MHz) δ (ppm): 1,14 (d, 3H, $J = 6,6$ Hz); 1,44-1,53 (m, 1H); 1,95-2,06 (m, 2H); 2,66-2,73 (m, 1H); 2,82-2,90 (m, 1H); 3,15-3,23 (m, 2H); 7,51 (ddd, 1H, $J = 8,4, 6,8$ e $1,2$ Hz); 7,64 (ddd, 1H, $J = 8,4, 6,8$ e $1,5$ Hz); 7,96 (d, 1H, $J = 8,4$ Hz); 8,16 (d, 1H, $J = 8,4$ Hz).

RMN de ^{13}C (CDCl_3 , 75MHz) δ (ppm): 21,5; 27,1; 28,9; 30,6; 42,5; 123,6; 125,4; 128,3; 128,7; 129,2; 141,3; 146,8; 159,3.

(R)-22b $[\alpha_D]^{20} = +64^\circ$ (c = 0,44; 20°C, CHCl_3); **P.F.** = 57-59°C

(S)-22b $[\alpha_D]^{20} = -62^\circ$ (c = 0,45; 20°C, CHCl_3) **P.F.** = 56-59°C

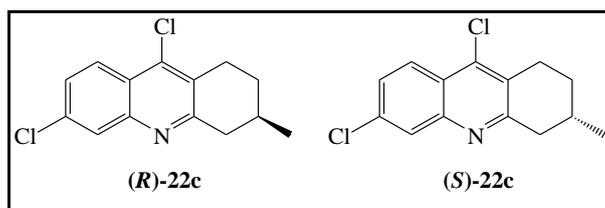


(R)-9-cloro-1-metil-1,2,3,4-tetraidroacridina ((R)-22d)

RMN de ^1H (CDCl_3 , 300 MHz) δ (ppm): 1,30 (d, 3H, $J = 7,2$ Hz); 1,84-2,16 (m, 4H); 2,94-3,07 (m, 1H); 3,17-3,27 (m, 1H); 3,51-3,50 (m, 1H); 7,49 (ddd, 1H, $J = 7,7, 7,5$ e $1,2$ Hz); 7,64 (ddd, 1H, $J = 8,7, 6,8$ e $1,4$ Hz); 7,96 (d, 1H, $J = 8,4$ Hz); 8,15 (d, 1H, $J = 8,4$ Hz).

RMN de ^{13}C (CDCl_3 , 75MHz) δ (ppm): 17,6; 20,1; 29,4; 30,4; 33,6; 123,7; 125,4; 126,3; 128,4; 129,2; 133,5; 141,1; 146,6; 158,9.

(R)-22d $[\alpha_D]^{20} = +37^\circ$ (c = 8,29; 20°C , CH_2Cl_2) **P.F.** = líquido à t.a.



(R)-6,9-dicloro-3-metil-1,2,3,4-tetraidroacridina ((R)-22c) e

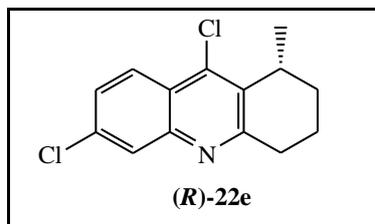
(S)-6,9-dicloro-3-metil-1,2,3,4-tetraidroacridina ((S)-22c)

RMN de ^1H (CDCl_3 , 300 MHz) δ (ppm): 1,14 (d, 3H, $J = 6,0$ Hz); 1,45-1,56 (m, 1H); 1,95-2,09 (m, 2H); 2,63-2,72 (m, 1H); 2,79-2,90 (m, 1H); 3,12-3,22 (m, 2H); 7,45 (dd, 1H, $J = 9,0$ e $3,0$ Hz); 7,96 (d, 1H, $J = 3,0$ Hz); 8,06 (d, 1H, $J = 9,0$ Hz).

RMN de ^{13}C (CDCl_3 , 75MHz) δ (ppm): 21,4; 27,0; 28,8; 30,5; 42,3; 123,8; 125,1; 127,3; 127,6; 128,6; 135,1; 141,2; 147,0; 160,7.

(R)-22c $[\alpha_D]^{20} = +60^\circ$ (c = 1,03; 20°C , CH_2Cl_2); **P.F.** = $86-89^\circ\text{C}$

(S)-22c $[\alpha_D]^{20} = -59^\circ$ (c = 0,99; 20°C , CH_2Cl_2); **P.F.** = $86-89^\circ\text{C}$



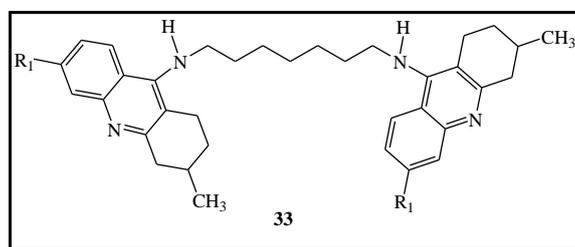
(R)-6,9-dicloro-1-metil-1,2,3,4-tetraidroacridina ((R)-22e)

RMN de ^1H (CDCl_3 , 300 MHz) δ (ppm): 1,30 (d, 3H, $J = 6,9$ Hz); 1,84-2,15 (m, 4H); 2,90-3,07 (m, 1H); 3,13-3,26 (m, 1H); 3,47-3,60 (m, 1H); 7,42 (dd, 1H, $J = 9,0$ e 2,1 Hz); 7,93 (d, 1H, $J = 1,8$ Hz); 8,05 (d, 1H, $J = 9,0$ Hz).

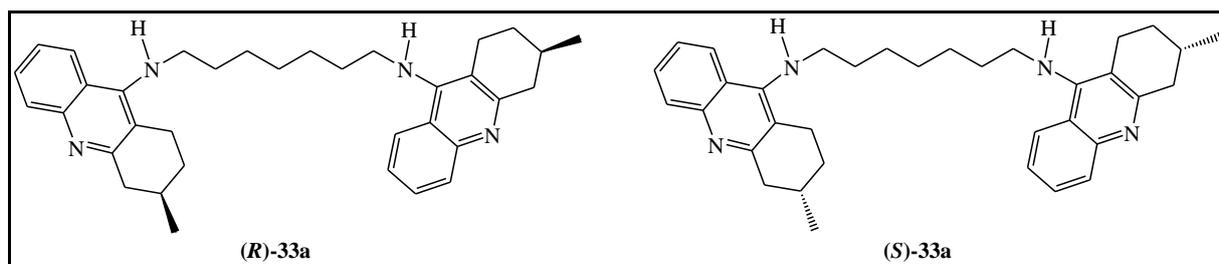
RMN de ^{13}C (CDCl_3 , 75MHz) δ (ppm): 17,4; 20,0; 29,3; 30,4; 33,7; 123,9; 125,2; 127,2; 127,4; 133,8; 135,1; 141,1; 146,9; 160,3.

(R)-22e $[\alpha_D]^{20} = +38^\circ$ ($c = 7,28$; 20°C , CH_2Cl_2) **P.F.** = líquido à t.a.

5.2.4. Síntese dos homodímeros quirais



Em um balão de 10 mL foi pesada a 1,7-heptanodiamina (**34**, 1,0 equiv.). A 9-cloroacridina (**7**) correspondente (**2,0 equiv.**) foi adicionada ao balão juntamente com *n*-pentanol (1,0 mL para 0,15 mmol da diamina **34**). Por último foi adicionado o iodeto de sódio, NaI, (0,155 equiv.). A mistura ficou em refluxo a 160°C por 48 horas sob argônio, sendo que na metade do tempo foi repostado 1,0 mL de *n*-pentanol. Após o término do período reacional o *n*-pentanol residual foi evaporado sob alto vácuo a 120°C por uma hora. A mistura foi diluída com 10 mL de diclorometano e a fase orgânica foi lavada com soluções aquosas 10 mL de hidróxido de sódio (NaOH) 10% e 10 mL de cloreto de sódio (NaCl) saturado. Os extratos orgânicos foram transferidos para um erlenmeyer e os traços de H_2O removidos com sulfato de sódio anidro (Na_2SO_4). O solvente foi removido em evaporador rotatório e em bomba de alto vácuo a 120°C por cinco horas. A purificação foi feita por cromatografia em coluna, utilizando como fase móvel: hexano, acetato de etila e trietilamina, com eluição por gradiente sendo as porcentagens volumétricas, respectivamente 90%, 9% e 1%; 80%; 19% e 1%; 70%, 29% e 1%; 60%, 39% e 1%, 50%, 49% e 1% e 0%, 99% e 1%. O acompanhamento foi realizado por CCD utilizando hexano, acetato de etila e trietilamina na proporção volumétrica 70%, 29% e 1%, respectivamente.



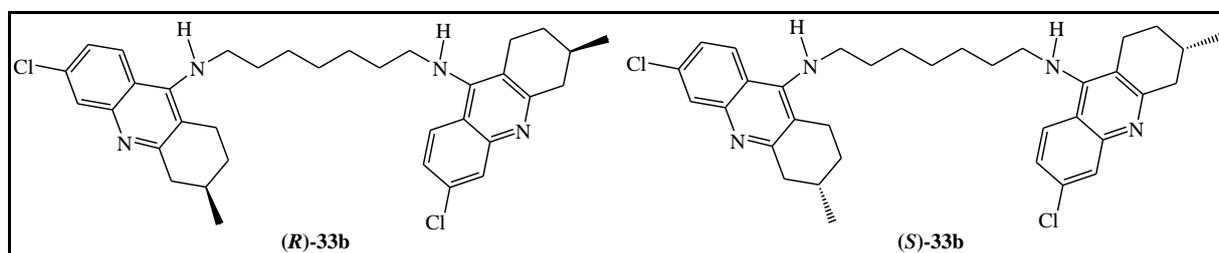
RMN de ^1H (CDCl_3 , 300 MHz) δ (ppm): 1,12 (d, 6H, $J = 6,0$ Hz); 1,32-1,42 (m, 6H); 1,43-1,55 (m, 2H); 1,58-1,70 (m, 4H); 1,92-2,09 (m, 4H); 2,58-2,72 (m, 4H); 2,75-2,86 (m, 2H); 3,09-3,20 (m, 2H); 3,40-3,55 (m, 4H); 3,92 (s, 2H); 7,33 (ddd, 1H, $J = 8,4, 7,7$ e $1,2$ Hz); 7,54 (ddd, 1H, $J = 8,4, 7,5$ e $1,2$ Hz), 7,87-7,98 (m, 4H).

RMN de ^{13}C (CDCl_3 , 75MHz) δ (ppm): 21,5; 24,3; 26,8; 28,8; 29,0; 30,9; 31,6; 42,4; 49,3; 115,2; 120,1; 122,8; 123,5; 128,1; 128,7; 147,6; 150,5; 158,3.

(R)-33a $[\alpha_D]^{20} = +18^\circ$ ($c = 1,50$ g/100 mL, CH_2Cl_2); **P.F.** = 78-80°C

(S)-33a $[\alpha_D]^{20} = -17^\circ$ ($c = 1,54$ g/100 mL, CH_2Cl_2); **P.F.** = 78-80°C

IV (KBr) $\nu_{\text{max}}/\text{cm}^{-1}$: 3410; 2922; 2856; 1615; 1581; 1561; 1499; 1418; 1357; 760.



RMN de ^1H (CDCl_3 , 300 MHz) δ (ppm): 1,11 (d, 6H, $J = 6,6$ Hz); 1,33-1,52 (m, 10H); 1,58-1,70 (m, 4H); 1,85-2,08 (m, 4H); 2,50-2,82 (m, 6H); 3,03-3,17 (m, 2H); 3,47 (t, 4H, $J = 7,2$ Hz); 3,89-4,04 (sl, 2H); 7,21-7,30 (m, 2H); 7,81-7,97 (m, 4H).

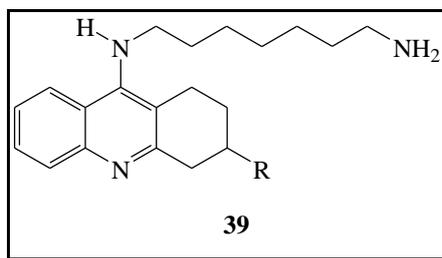
RMN de ^{13}C (CDCl_3 , 75MHz) δ (ppm): 21,4; 24,1; 26,7; 28,7; 29,0; 30,8; 31,6; 42,2; 49,4; 115,0; 118,2; 124,1; 124,6; 127,4; 133,9; 148,0; 150,6; 159,2.

(R)-33b $[\alpha_D]^{20} = +14^\circ$ ($c = 0,57$; 20°C, CH_2Cl_2); **P.F.** = 52-55°C

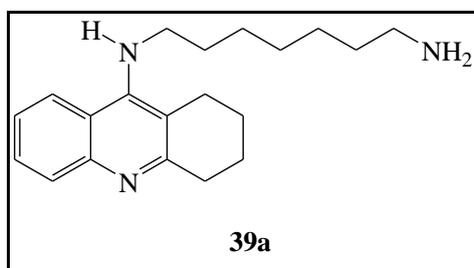
(S)-33b $[\alpha_D]^{20} = -12^\circ$ ($c = 0,59$; 20°C, CH_2Cl_2); **P.F.** = 54-56°C

IV (KBr) $\nu_{\text{max}}/\text{cm}^{-1}$: 3411; 2924; 2854; 1607; 1489; 1419.

5.2.5. Síntese da 9-(1,7-diaminoeptil)-1,2,3,4-tetraidroacridina



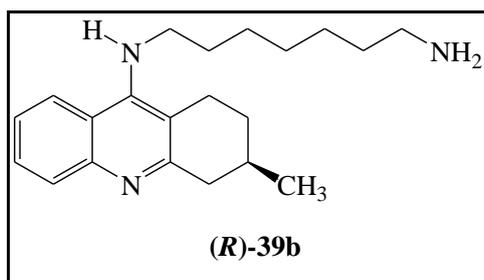
Em um balão de 25 mL foram misturados 9-cloro-1,2,3,4-tetraidroacridina (**7a**) ou (*R*)-9-cloro-3-metil-1,2,3,4-tetraidroacridina ((**R**)-**7b**) (1,0 eq.), 1,7-heptanodiamina (**15**) (6,0 equiv.), iodeto de potássio (KI) (0,15 eq.) e *n*-pentanol (2,5 mL para 5 mmol da diamina **15**). Um tubo secante foi adaptado no sistema para retenção de água. A mistura foi colocada em refluxo a 160°C por 18 h. Decorrido o tempo em refluxo a mistura reacional foi tratada com 25 mL de diclorometano, 25 mL de solução aquosa de hidróxido de sódio (NaOH) 10% e água (2 x 18 mL), quantidades partindo-se de 5 mmol da diamina **15**. A fase aquosa foi extraída com 40 mL (2 x 20 mL) de CH₂Cl₂, os extratos orgânicos foram transferidos para um erlenmeyer e os traços de H₂O removidos com sulfato de sódio anidro. O diclorometano foi evaporado em evaporador rotatório e sob alto vácuo a 130°C por uma hora. A purificação foi feita por cromatografia em coluna, utilizando como fase móvel: clorofórmio (93% v), metanol (6,5% v) e solução aquosa saturada de hidróxido de amônio (NH₄OH, 0,5% v). A eluição ocorreu de modo isocrático. O acompanhamento foi feito por CCD utilizando a mesma composição de fase móvel. Após a purificação o solvente foi evaporado em evaporador rotatório e sob alto vácuo a 60°C por uma hora.



9-(1,7-diaminoeptil)-1,2,3,4-tetraidroacridina (39a)

RMN de ^1H (CDCl_3 , 300 MHz) δ (ppm): 1,22-1,47 (m, 8H); 1,54-1,75 (m, 4H); 1,83-1,96 (m, 4H); 2,59-2,73 (m, 4H); 3,05 (s, 2H); 3,39-3,51 (m, 2H); 3,96 (sl, 1H); 7,27-7,36 (m, 1H); 7,47-7,58 (m, 1H); 7,85-7,98 (m, 2H).

RMN de ^{13}C (CDCl_3 , 75MHz) δ (ppm): 22,5; 22,8; 24,5; 26,5; 26,6; 28,9; 31,4; 33,3; 33,8; 41,8; 49,2; 115,4; 120,0; 122,6; 123,2; 127,9; 128,4; 147,2; 150,4; 158,1.



(R)-9-(1,7-diaminoheptil)-3-metil-1,2,3,4-tetraidroacridina ((R)-39b)

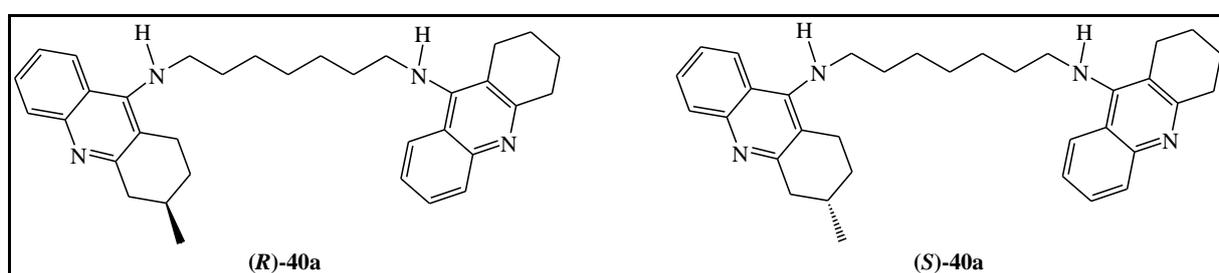
RMN de ^1H (CDCl_3 , 300 MHz) δ (ppm): 1,11 (d, 3H, $J = 6,0$ Hz); 1,22-1,43 (m, 10H); 1,57-1,60 (m, 2H); 1,88-2,18 (m, 4H); 2,57-2,72 (m, 3H); 2,75-2,85 (m, 1H); 3,10-3,19 (m, 1H); 3,43-3,57 (m, 2H); 3,95 (sl, 1H); 7,27-7,37 (m, 1H); 7,50-7,58 (m, 1H); 7,88-8,03 (m, 2H).

RMN de ^{13}C (CDCl_3 , 75MHz) δ (ppm): 21,6; 24,4; 26,8; 26,9; 28,9; 29,2; 31,0; 31,8; 33,4; 42,1; 42,5; 49,5; 115,2; 120,2; 123,0; 123,6; 128,7; 147,6; 150,7; 158,3.

5.2.6. Síntese dos heterodímeros quirais

Em um balão de 10 mL foram adicionados a 9-(1,7-diaminoheptil)-1,2,3,4-tetraidroacridina (**17**, 1,0 equiv.), a 9-cloroacridina (**7**) correspondente (**1,5 equiv.**), que foi adicionada ao balão juntamente com *n*-pentanol (1,0 mL para 0,5 mmol da 9-cloroacridina **7**). A mistura ficou em refluxo a 160°C por 48 horas sob argônio, sendo que na metade do tempo foi repostado 1,0 mL de *n*-pentanol. Após o término do período reacional o *n*-pentanol residual foi evaporado no alto vácuo a 120°C por uma hora. A mistura foi diluída com 10 mL de diclorometano e a fase orgânica foi lavada com soluções aquosas 10 mL de hidróxido de sódio (NaOH) 10% e 10 mL de cloreto de sódio (NaCl) saturado. Os extratos orgânicos foram

transferidos para um erlenmeyer e os traços de H₂O removidos com sulfato de sódio anidro (Na₂SO₄). O solvente foi removido em evaporador rotatório e em bomba de alto vácuo a 120°C por cinco horas. A purificação foi feita por cromatografia em coluna, utilizando como fase móvel: hexano, acetato de etila e trietilamina, com eluição por gradiente sendo as porcentagens volumétricas, respectivamente 90%, 9% e 1%; 80%; 19% e 1%; 70%, 29% e 1%; 60%, 39% e 1%, 50%, 49% e 1% e 0%, 99% e 1%. O acompanhamento foi realizado por CCD utilizando hexano, acetato de etila e trietilamina na proporção volumétrica 70%, 29% e 1%, respectivamente.



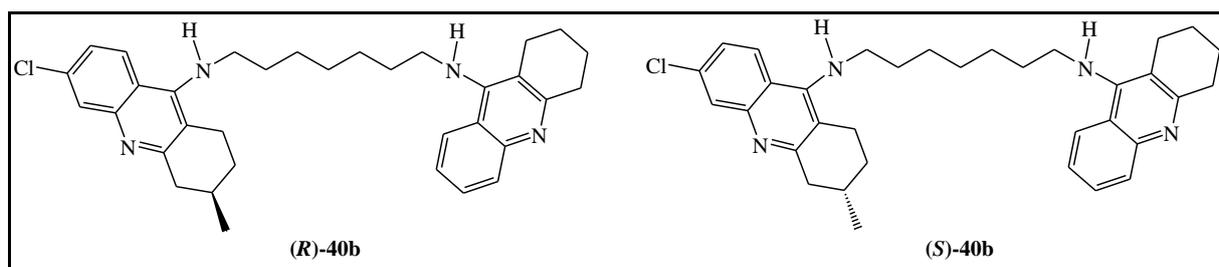
RMN de ¹H (CDCl₃, 300 MHz) δ (ppm): 1,11 (d, 3H, *J* = 6,3 Hz); 1,23-1,76 (m, 10H); 1,82-2,17 (m, 6H); 2,52-2,90 (m, 5H); 3,03-3,23 (m, 4H); 3,43-3,62 (s, 4H); 4,02-4,18 (sl, 2H); 7,30-7,42 (m, 2H); 7,48-7,63 (m, 2H); 7,88-8,17 (m, 4H).

RMN de ¹³C (CDCl₃, 75MHz) δ (ppm): 21,4; 21,5; 22,5; 22,9; 23,1; 24,2; 24,6; 26,8; 28,5; 28,7; 29,0; 29,6; 30,4; 30,8; 31,6; 33,5; 41,8; 49,3; 114,8; 115,4; 119,7; 122,8; 122,9; 123,7; 124,2; 128,0; 128,6; 129,3; 146,7; 146,8; 151,0; 151,1; 157,6; 157,8.

(R)-40a [α_D]²⁰ = +5° (c = 0,74; 20°C, CH₂Cl₂); **P.F.** = 50-52°C

(S)-40a [α_D]²⁰ = -4° (c = 0,73; 20°C, CH₂Cl₂); **P.F.** = 50-52°C

IV (KBr) ν_{max}/cm^{-1} : 3411; 2391; 2853; 1615; 1580; 1561; 1498; 760.



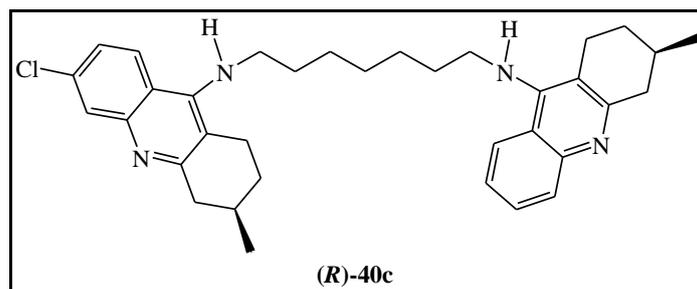
RMN de ^1H (CDCl_3 , 300 MHz) δ (ppm): 1,10 (d, 3H, $J = 6,6$ Hz), 1,27-1,47 (m, (R)-7e); 1,49-1,67 (m, 4H); 1,81-2,04 (m, 6H); 2,49-2,78 (m, 5H); 3,01-3,17 (m, 3H); 3,37-3,57 (m, 4H); 3,81-4,07 (sl, 2H); 7,18-7,38 (m, 2H); 7,43-7,58 (m, 1H); 7,78-8,01 (m, 4H).

RMN de ^{13}C (CDCl_3 , 75MHz) δ (ppm): 21,6; 22,9; 23,2; 24,3; 24,9; 26,9; 28,9; 29,2; 31,0; 34,1; 42,6; 49,5; 49,6; 115,2; 116,0; 118,5; 120,3; 122,9; 123,7; 124,2; 124,7; 127,8; 128,4; 128,8; 134,0; 147,5; 148,5; 150,7; 150,8; 158,5; 159,5.

(R)-40b $[\alpha_D]^{20} = +10^\circ$ ($c = 1,12$; 20°C , CH_2Cl_2); **P.F.** = $58-59^\circ\text{C}$

(S)-40b $[\alpha_D]^{20} = -4^\circ$ ($c = 0,85$; 20°C , CH_2Cl_2); **P.F.** = $58-59^\circ\text{C}$

IV (KBr) $\nu_{\text{max}}/\text{cm}^{-1}$: 3412; 2449; 2854; 1657; 1495; 1419; 1353; 760.



RMN de ^1H (CDCl_3 , 300 MHz) δ (ppm): 1,12 (d, 6H, $J = 4,8$ Hz); 1,32-1,53 (m, 6H); 1,58-1,70 (m, 4H); 1,92-2,09 (m, 6H); 2,58-2,86 (m, 6H); 3,05-3,18 (m, 2H); 3,43-3,53 (m, 4H); 3,89 (sl, 2H); 7,24-7,28 (m, 2H); 7,52-7,57 (m, 1H); 7,86-7,97 (m, 4H).

RMN de ^{13}C (CDCl_3 , 75MHz) δ (ppm): 21,5; 24,1; 24,3; 26,8; 28,7; 29,0; 29,7; 30,8; 30,9; 31,7; 42,0; 42,3; 49,3; 49,5; 114,9; 115,0; 118,2; 119,8; 122,8; 123,6; 124,2; 124,5; 127,4; 128,2; 128,4; 133,9; 137,5; 147,0; 148,2; 150,6; 150,8; 157,9; 159,3.

(R)-40c $[\alpha_D]^{20} = -6^\circ$ ($c = 0,50$; 20°C , CH_2Cl_2); **P.F.** = $66-68^\circ\text{C}$

IV (KBr) $\nu_{\text{max}}/\text{cm}^{-1}$: 3411; 2924; 2854; 1727; 1609; 760.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Querfurth, H. W.; LaFerla, F. M.; *N. Engl. J. Med.* **2010**, *362*, 329.
2. Lu, C.; Zhou, Q.; Yan, J.; Du, Z.; Huang, L.; Li, X.; *Eur. J. Med. Chem.* **2013**, *62*, 745.
3. Bear, M. F.; Connors, B. W.; Paradiso, M. A.; *Neurociências: Desvendando o Sistema Nervoso*, 3ª edição, Artmed: Porto Alegre, 2010.
4. Mao, F.; Huang, L.; Luo, Z.; Liu, A.; Lu, C.; Xie, Z.; Li, X.; *Bioorg. Med. Chem.* **2012**, *20*, 5884.
5. Pooler, A. M.; Noble, W.; Hanger, D. P.; *Neuropharmacology* **2014**, *76*, 1.
6. Tumiatti, V.; Minarini, A.; Bolognesi, M. L.; Milelli, A.; Rosini, M.; Melchiorre, C.; *Curr. Med. Chem.* **2010**, *17*, 1825.
7. Huang, L.; Su, T.; Shan, W.; Luo, Z.; Sun, Y.; He, F.; Li, X.; *Bioorg. Med. Chem.* **2012**, *20*, 3038.
8. Baruch-Suchodolsky, R.; Fischer, B.; *Biochemistry* **2009**, *48*, 4354.
9. Tabaton, M.; Zhu, X.; Perry, G.; Smith, M.; Giliberto, L.; *Exp. Neurol.* **2010**, *221*, 18.
10. Igbavboa, U.; Sun, G. Y.; Weisman, G. A.; He, Y.; Wood, W. G.; *Neuroscience* **2009**, *162*, 328.
11. Soscia, S. J.; Kirby, J. E.; Washicosky, K. J.; Tucker, S. M.; Ingelsson, M.; Hyman, B.; Burton, M. A.; Goldstein, L. E.; Duong, S.; Tanzi, R. E.; Moir, R. D.; *Plos One* **2010**, *5*, 9505.
12. Wang, X.; Wang, W.; Li, L.; Perry, G.; Lee, H.; Zhu, X.; *Biochim. Biophys. Acta.* **2013**, no prelo.
13. Schrag, M.; Mueller, C.; Zabel, M.; Crofton, A.; Kirsch, W. M.; Ghribi, O.; Squitti, R.; Perry, G.; *Neurobiol. Dis.* **2013**, *59*, 100.
14. McGleenon, B. M.; Dynan, K. B.; Passmore, A. P.; *J. Clin. Pharmacol.* **1999**, *48*, 471–480.
15. Nelson, D. L.; Cox, M. M.; *Princípios de Bioquímica de Lehninger*, 5ª edição, Artmed: Porto Alegre, 2011.
16. Bartus, R. T.; *Exp. Neurol.* **2000**, *163*, 495

17. Hu, M. K.; Wu, L. J.; Hsiao, G.; Yen, M. H.; *J. Med. Chem.* **2002**, *45*, 2277.
18. Delfino, R. T.; Ribeiro, T. S.; Figueroa-Villar, J. D.; *J. Braz. Chem. Soc.* **2009**, *20*, 407.
19. 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.; *Eur. J. Med. Chem.* **2012**, *52*, 251.
20. Fernández-Bachiller, M. I.; Pérez, C.; Monjas, L.; Rademann, J.; Rodríguez-Franco, M. I.; *J. Med. Chem.* **2012**, *55*, 1303.
21. Sussman, J. L.; Harel, M.; Frolow, F.; Oefner, C.; Goldman, A.; Toker, L.; Silman, I., *Science* **1991**, *253*, 872.
22. Pohanka, M.; *Biomed. Pap.* **2011**, *155*, 219.
23. <http://www.ncbr.muni.cz/group/lcc/acetylcholinesterase.html> - acessado em 12/01/2014
24. Millard, C. B.; Koellner, G.; Ordentlich, A.; Shafferman, A.; Silman, I.; Sussman, J. L., *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 9883.
25. Dvir, H.; Silman, I.; Harel, M.; Rosenberry, T. L.; Sussman, J. L.; *Chem.-Biol. Interact.* **2010**, *187*, 10.
26. Fuxreiter, M.; Warshel, A.; *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 183.
27. Sant'anna, C. M. R.; Viana, A. S.; Junior, N. M. N.; *Bioorg. Chem.* **2006**, *34*, 77.
28. Nemukhin, A. V.; Lushchekina, S. V.; Bochenkova, A. V.; Golubeva, A. A.; Varfolomeev, S. D.; *J. Mol. Model.* **2008**, *14*, 409.
29. Fraga, C. A. M.; *Cadernos Temáticos de Química Nova na Escola* **2001**, *3*, 33.
30. Singh, M.; Kaur, M.; Kukreja, H.; Chugh, R.; Silakari, O.; Singh, D.; *Eur. J. Med. Chem.* **2013**, *70*, 165.
31. Kozurkova, M.; Hamulakova, S.; Gazova, Z.; Paulikova, H.; Kristian, P.; *Pharmaceuticals* **2011**, *4*, 382.
32. Mehta, M.; Adem, A.; Sabbagh, M.; *Int. J. Alzheimer's Dis.* **2012**, *1*.
33. Fuchs, M.; Koszelewski, D.; Tauber, K.; Sattler, J.; Banko, W.; Holzer, A. K.; Pickl, M.; Kroutil, W.; Faber, K.; *Tetrahedron* **2012**, 7691.

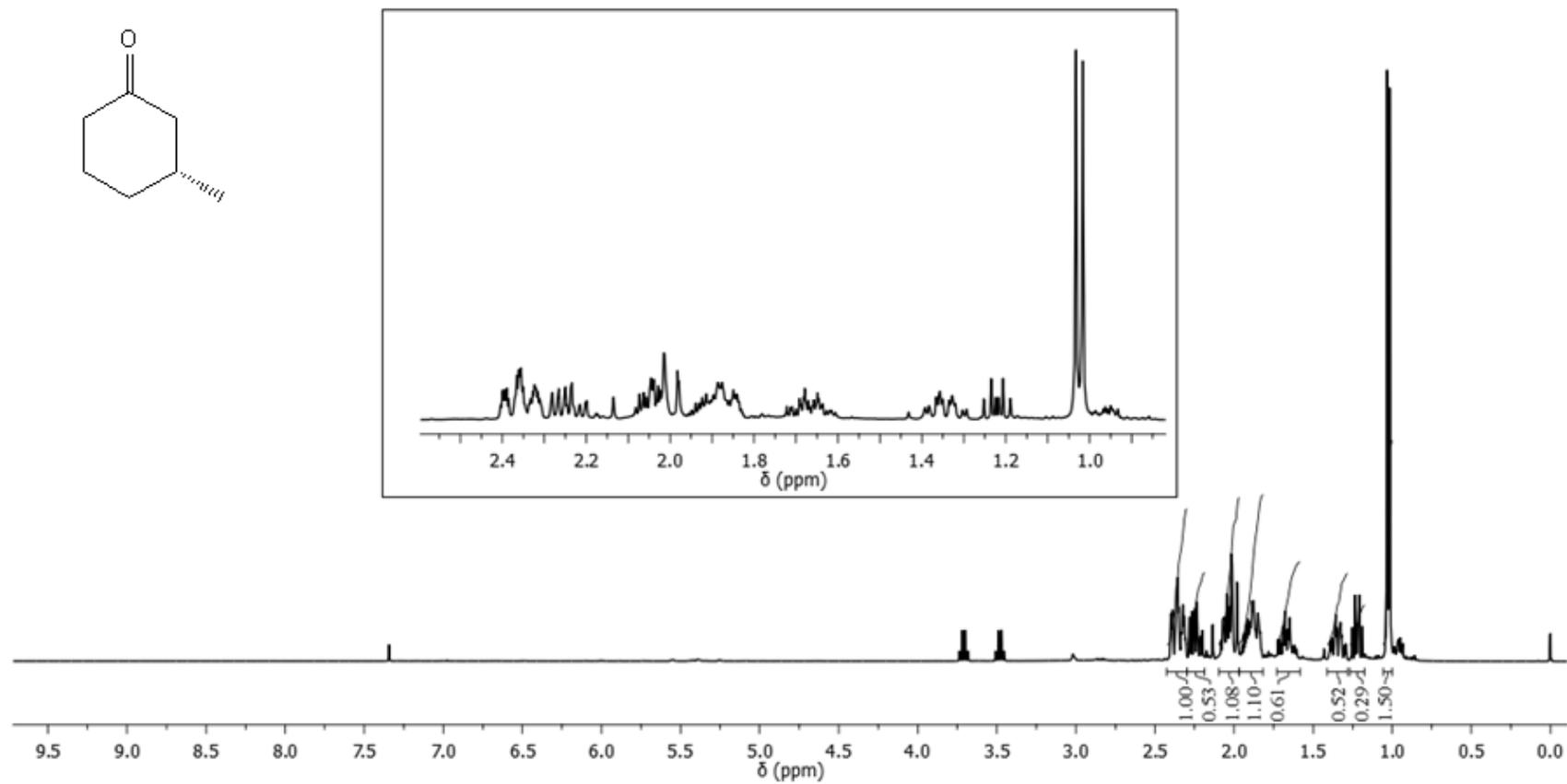
34. Satcharoen, V.; McLean, N. J.; Kemp, S. C.; Camp, N. P.; Brown, R. C. D.; *Org. Lett.* **2007**, *9*, 1867.
35. Wang, B. S.; Wang, H.; Wei, Z. H.; Song, Y. Y.; Zhang, L.; Chen, H. Z.; *J. Neural Transm.* **2009**, *116*, 457.
36. Camps, P.; Cusak, B.; Mallender, W. D.; Achab, R.; Morral, J.; Muñoz-Torrero, D.; Rosenberry, T.; *Mol. Pharm.* **2000**, *57*, 409.
37. Roman, S.; Badia, A.; Camps, P.; Clos, M. V.; *Neuropharmacology* **2004**, *46*, 95.
38. Ros, E.; Aleu, J.; Aranda, I. G.; Muñoz-Torrero, D.; Camps, P.; Badia, A.; Marsal, J.; Solsona, C.; *Eur. J. Pharmacol.* **2001**, *421*, 77.
39. Rang, H. P.; Dale, M. M.; Ritter, J. M.; Flower, R. J.; Henderson, G.; *Farmacologia*, 7^a edição, Elsevier: Rio de Janeiro, 2011, p. 7.
40. Barreiro, E. J.; Fraga, C. A. M.; Miranda, A. L. P.; Rodrigues, A. R.; *Quím. Nova* **2002**, *25*, 129.
41. Lima, V. L. E.; *Quím. Nova* **1997**, *20*, 657.
42. Gal, J.; *Chirality* **2012**, *24*, 959.
43. Ito, T.; Ando, H.; Suzuki, T.; Ogura, T.; Hotta, K.; Imamura, Y.; Yamaguchi, Y.; Handa, H.; *Science* **2010**, *327*, 1345.
44. Greig, N. H.; Giordano, T.; Zhu, X.; Yu, Q.; Perry, T. A.; Holloway, H. W.; Brossi, A.; Rogers, J. T.; Sambamurti, K.; Lahiri, D. K.; *Acta. Neurobiol. Exp.* **2004**, *64*, 1.
45. Pisoni, D. S., da Costa, J. S.; Gamba, D.; Petzhold, C. L.; Borges, A. C. A.; Ceschi, M. A.; Lunardi, P.; Gonçalves, C. A. S.; *Eur. J. Med. Chem.* **2010**, *45*, 526.
46. Pang, Y.-P.; Kozikowski, A. P., *J. Comput. Aided Mol. Des.* **1994**, *8*, 669.
47. Li, W.; Mak, M.; Jiang, H.; Wang, Q.; Pang, Y.; Chen, K.; Han, Y., *Neurotherapeutics* **2009**, *6*, 187.
48. Yu, H.; Li, W.; Kan, K. K. W.; Ho, J. M. K.; Carlier, P. R.; Pang, Y.; Gue, Z.; Zhong, Z.; Chang, K.; Wang, Y.; Hanb, Y.; *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2008**, *46*, 75.
49. Pang, Y.-P.; Quiram, P.; Jelacic, T.; Hong, F.; Brimijoin, S., *J. Biol. Chem.* **1996**, *271*, 23646

50. Carlier, P. R.; Chow, E. S.; Han, Y.; Liu, J.; Yazal, J.; Pang, Y.; *J. Med. Chem.* **1999**, *42*, 4225.
51. Romero, A.; Cacabelos, R.; Oset-Gasque, M. J.; Samadi, A.; Marco-Contelles, J.; *Bioorg. Med. Chem.* **2013**, *23*, 1916.
52. Minarini, A.; Milelli, A.; Tumiatti, V.; Rosini, M.; Simoni, E.; Bolognesi, M. L.; Andrisano, V.; Bartolini, M.; Motori, E.; Angeloni, C.; Hrelia, S.; *Neuropharmacology* **2012**, *62*, 997.
53. Campiani, G.; Fattorusso, C.; Butini, S.; Gaeta, A.; Agnusdei, M.; Gemma, S.; Persico, M.; Catalanotti, B.; Savini, L.; Nacci, V.; Novellino, E.; Holloway, H. W.; Greig, N. H.; Belinskaya, T.; Fedorko, J. M.; Saxena, A.; *J. Med. Chem.* **2005**, *48*, 1919.
54. Savini, L.; Gaeta, A.; Fattorusso, C.; Catalanotti, B.; Campiani, G.; Chiasserini, L.; Pellerano, C.; Novellino, E.; McKissic, D.; Saxena, A.; *J. Med. Chem.* **2003**, *46*, 1.
55. Camps, P.; Formosa, X.; Muñoz-Torrero, D.; Petriguet, J.; Badia, A.; Clos, M. V.; *J. Med. Chem.* **2005**, *48*, 1701.
56. Fu, H.; Li, W.; Luo, J.; Lee, N. T. K.; Li, M.; Tsim, K. W. K.; Pang, Y.; Youdim, M. B. H.; Han, Y.; *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2008**, *366*, 631.
57. Keri, R. S.; Quintanova, C.; Marques, S. M.; Esteves, A., R.; Cardoso, S. M.; Santos, M. A.; *Bioorg. Med. Chem.* **2013**, *21*, 4559.
58. Mao, F.; Chen, J.; Zhou, Q.; Luo, Z.; Huang, L.; Li, X.; *Bioorg. Med. Chem.* **2013**, *23*, 6737.
59. Lu, C.; Zhou, Q.; Yan, J.; Du, Z.; Huang, L.; Li, X.; *Eur. J. Med. Chem.* **2013**, *62*, 745.
60. Fernández-Bachiller, M. I.; Pérez, C.; Monjas, L.; Rademann, J.; Rodríguez-Franco, M. I.; *J. Med. Chem.* **2012**, *55*, 1303.
61. Chen, Y.; Sun, J.; Fang, L.; Liu, M.; Peng, S.; Liao, H.; Lehmann, J.; Zhang, Y.; *J. Med. Chem.* **2012**, *55*, 4309.
62. da Costa, J. S.; Lopes, J. P. B.; Russowsky, D.; Petzhold, C. L.; Borges, A. C. A.; Ceschi, M. A.; Konrath, E.; Batassini, C.; Lunardi, P. S.; Gonçalves, C. A. S.; *Eur. J. Med. Chem.* **2013**, *62*, 556.
63. Gilchrist, T. L., *Heterocyclic Chemistry*; 2nd Edition, John Wiley & Sons: New York, **1992**, 168.

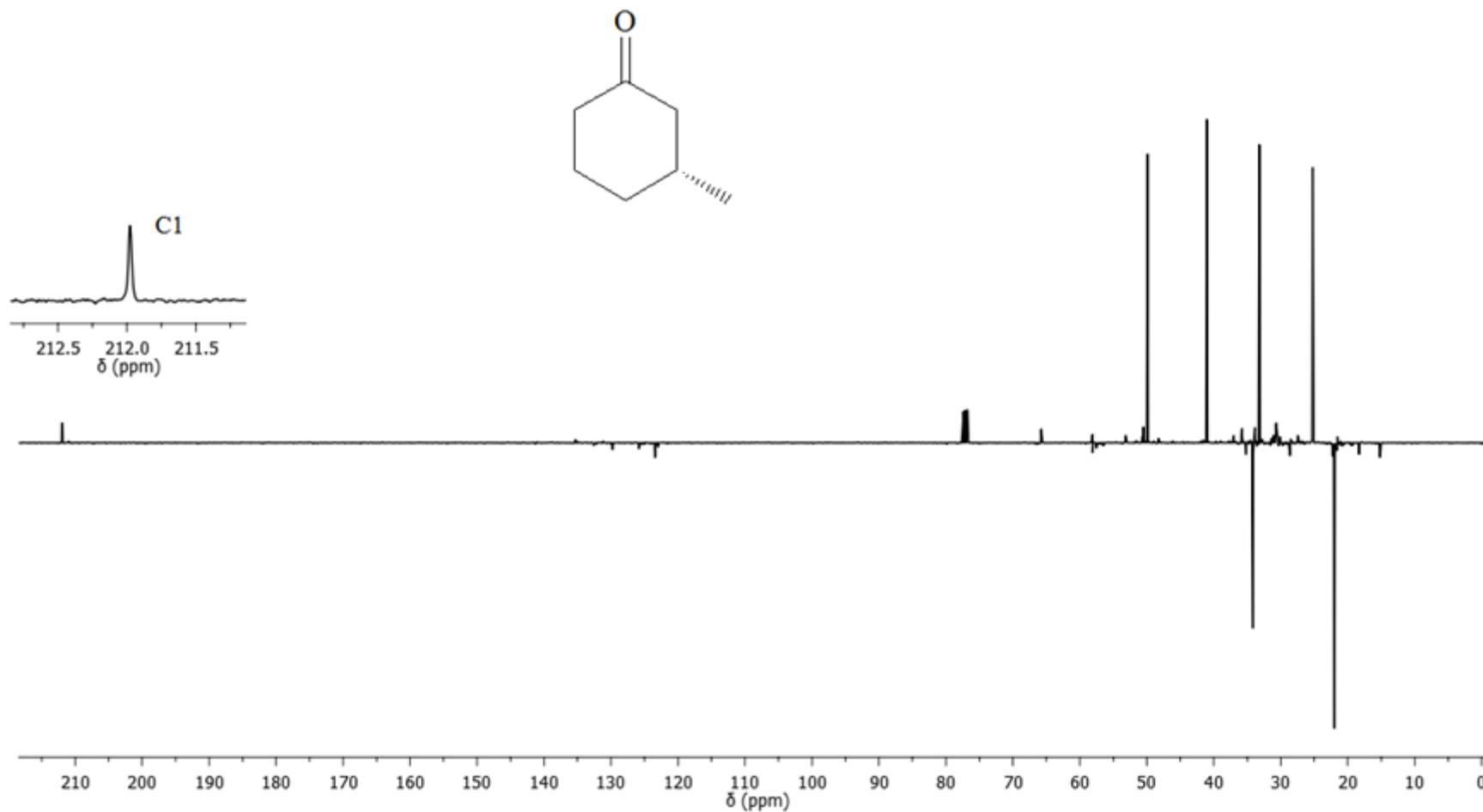
64. Friedländer, P., *Ber.* **1882**, *15*, 2572.
65. Muchowski, J. M.; Maddox, M. L., *Can. J. Chem.* **2004**, *82*, 461.
66. Marco-Contelles, J.; Pérez-Mayoral, E.; Samadi, A.; Carreiras, M. C.; Soriano, E., *Chem. Rev.* **2009**, *109*, 2652.
67. da Costa, J. S.; Pisoni, D. S.; da Silva, C. B.; Petzhold, C. L.; Russowsky, D.; Ceschi, M. A.; *J. Braz. Chem. Soc.* **2009**, *20*, 8, 1448.
68. <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/search?interface> (Search: (S)-pulegone) – acessado em 12/01/2014
69. Djerassi, C.; Krakower, G. W., *J. Am. Chem. Soc.* **1959**, *81*, 237.
70. Ellings, J. A.; Lempers, H. E. B.; Sheldon, R., *A. Eur. J. Org. Chem.* **2000**, 1905.
71. Pogrebnoi, S.; Sarabèr, F. C. E.; Jansen, B. J. M.; Groot, A., *Tetrahedron* **2006**, *62*, 1743.
72. Recanatini, M.; Cavalli, A.; Belluti, F.; Piazzini, L.; Rampa, A.; Bisi, A.; Gobbi, S.; Valenti, P.; Andrisano, V.; Bartolini, M.; Cavrini, V.; *J. Med. Chem.* **2000**, *43*, 2007.
73. Pang, Y.-P.; Hong, F.; Quiram, P.; Jelacic, T.; Brimijoin, S., *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1* **1997**, 171.
74. Huang, Z.; Luo, W.; Li Y.; Huang, S.; Tan, J.; Ou, T.; Li, D.; Gu, L., *Bioorg. Med. Chem.* **2011**, *19*, 763.
75. Ellman, G. L.; Courtney, K. D.; Andres, V. J.; Featherstone, R. M., *Biochem. Pharmacol.* **1961**, *7*, 88.

ANEXOS

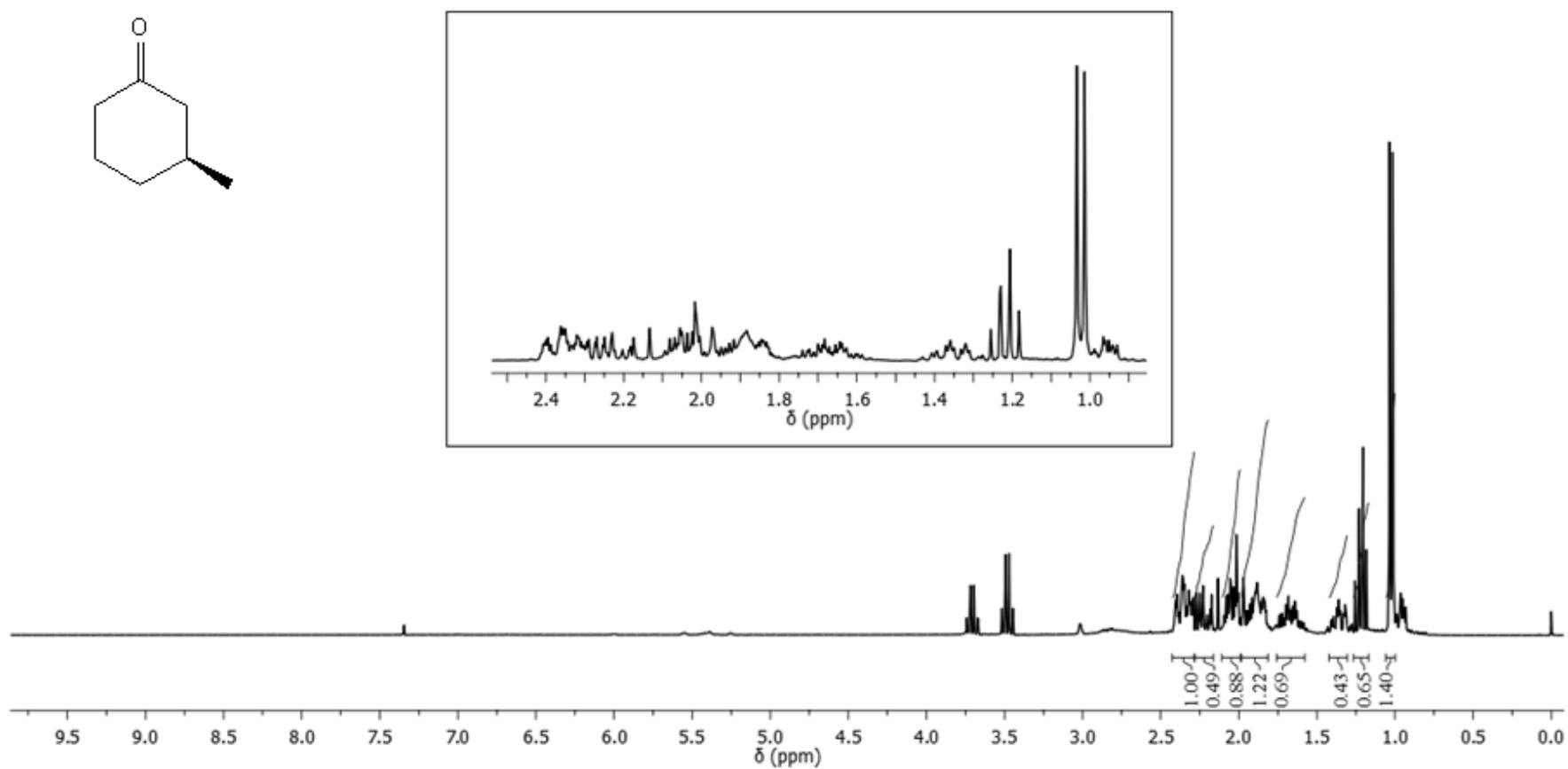
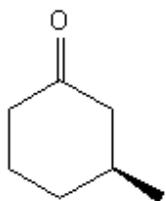
Espectros de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) de ^1H e ^{13}C



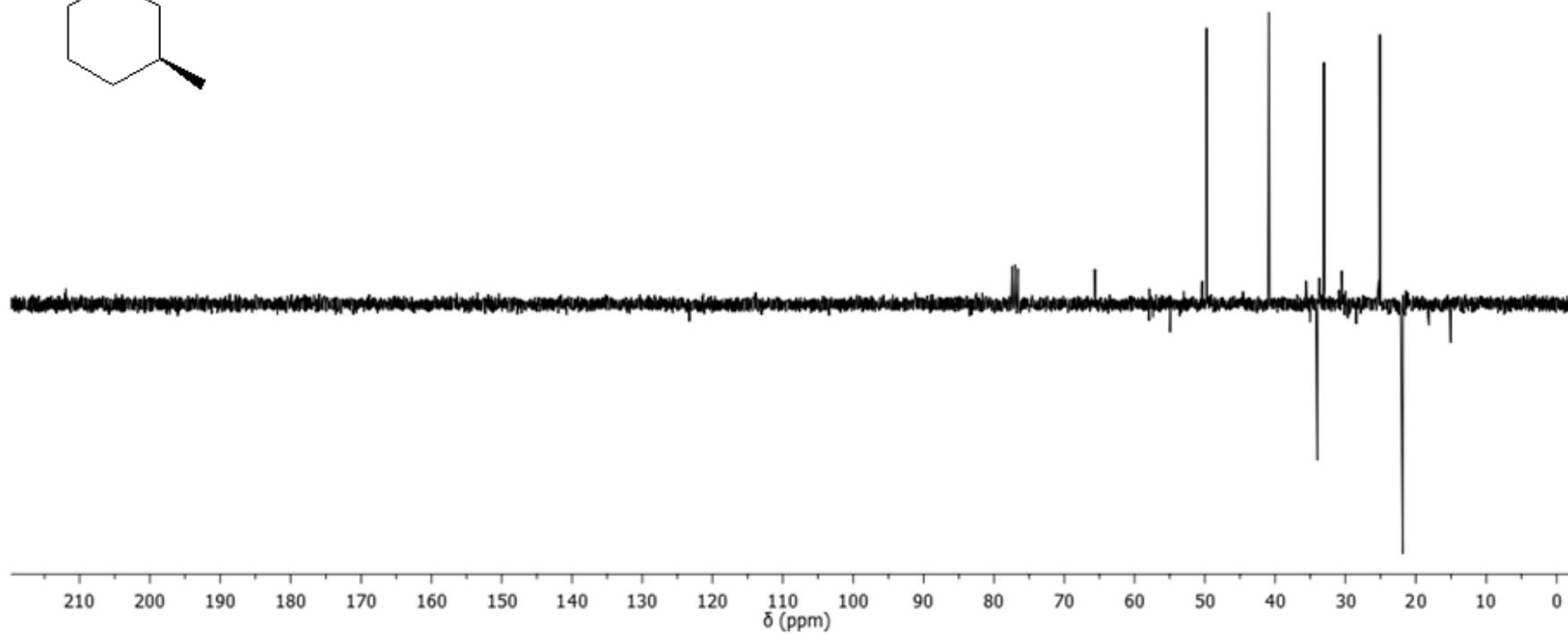
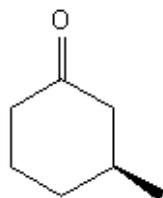
Anexo 1. Espectro de RMN de ^1H (CDCl_3 , 300 MHz) da *(R)*-3-metilciclohexanona, **(R)-12**.



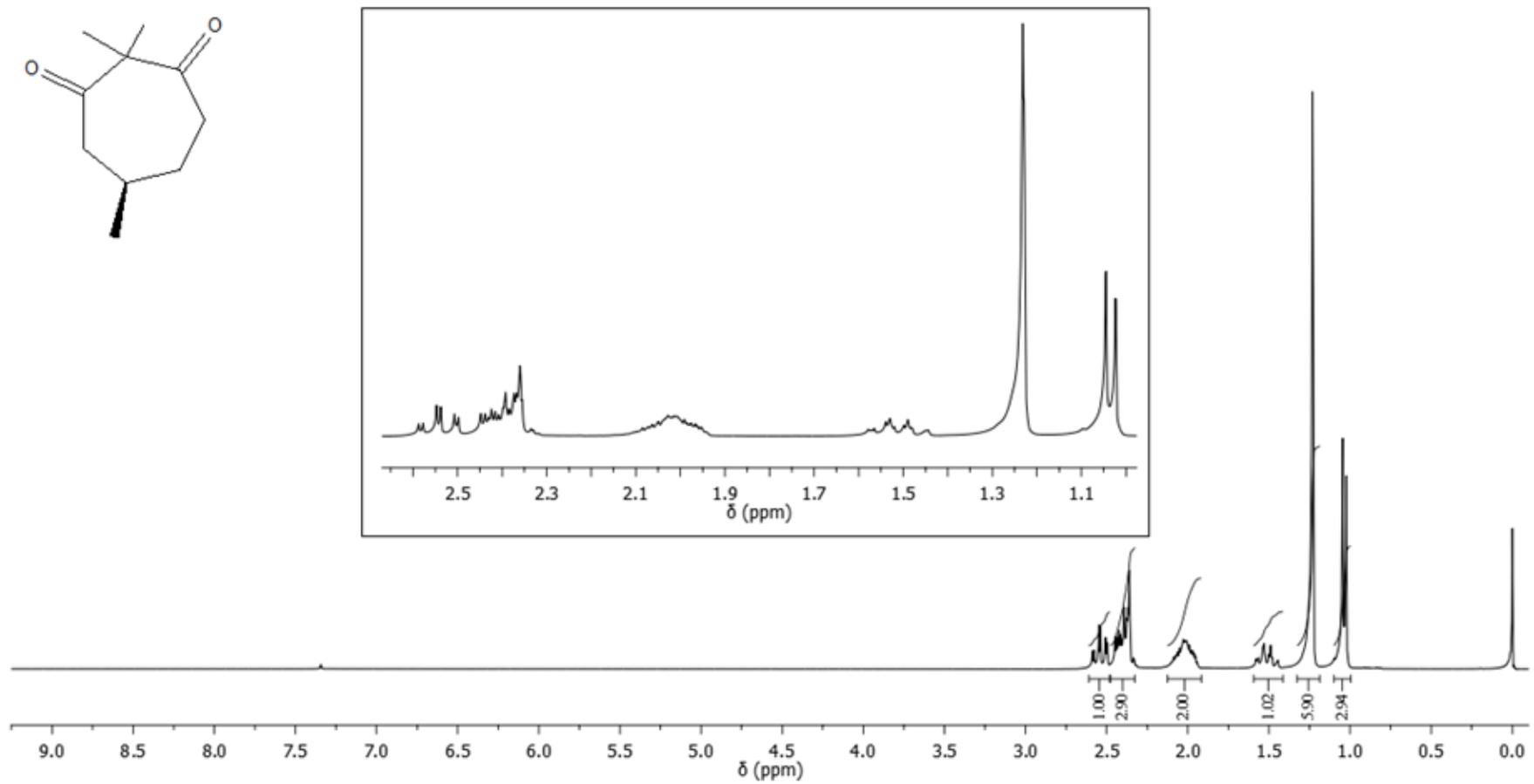
Anexo 2. Espectro de RMN de ^{13}C (APT, CDCl_3 , 75 MHz) da (R)-3-metilcicloexanona, (R)-12.



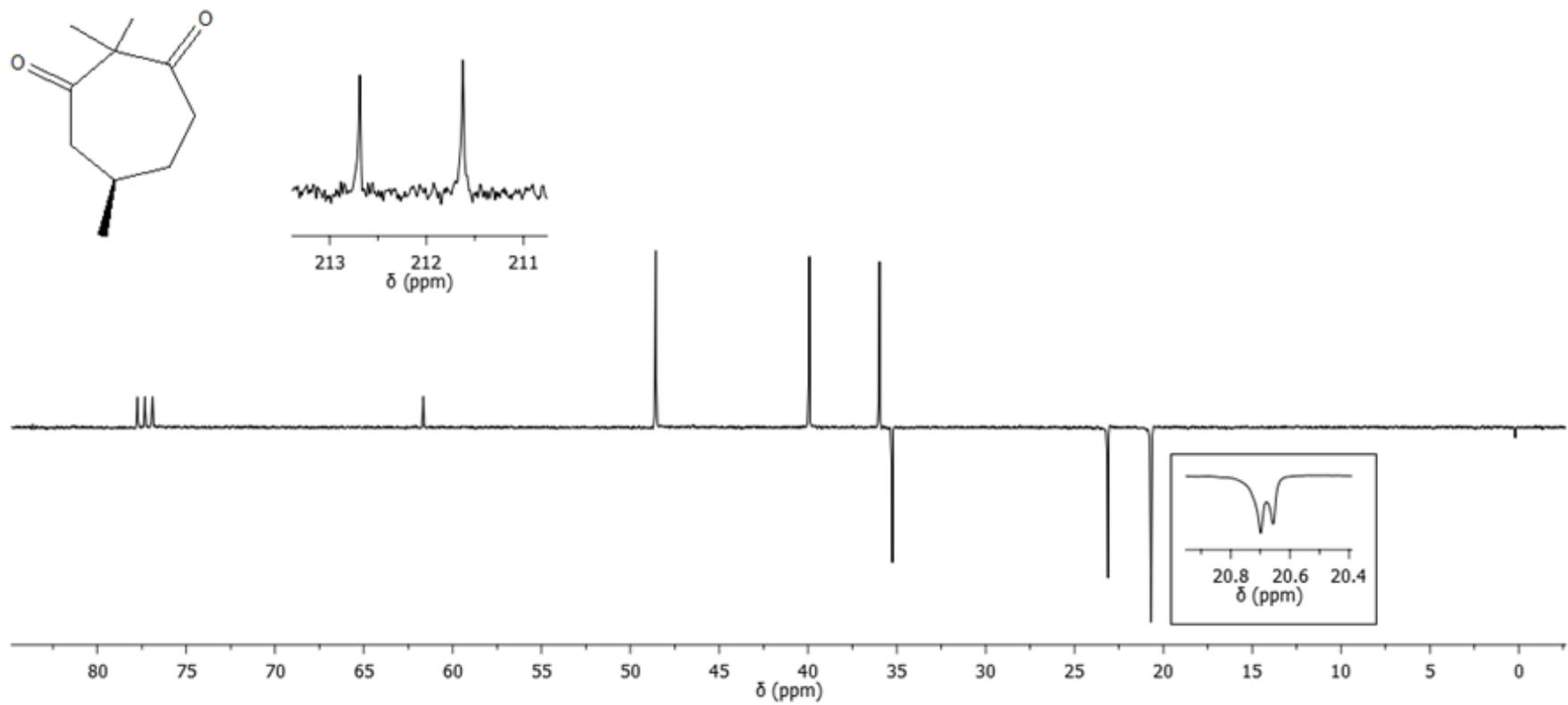
Anexo 3. Espectro de RMN de ^1H (CDCl_3 , 300 MHz) da (S)-3-metilcicloexanona, (S)-12.



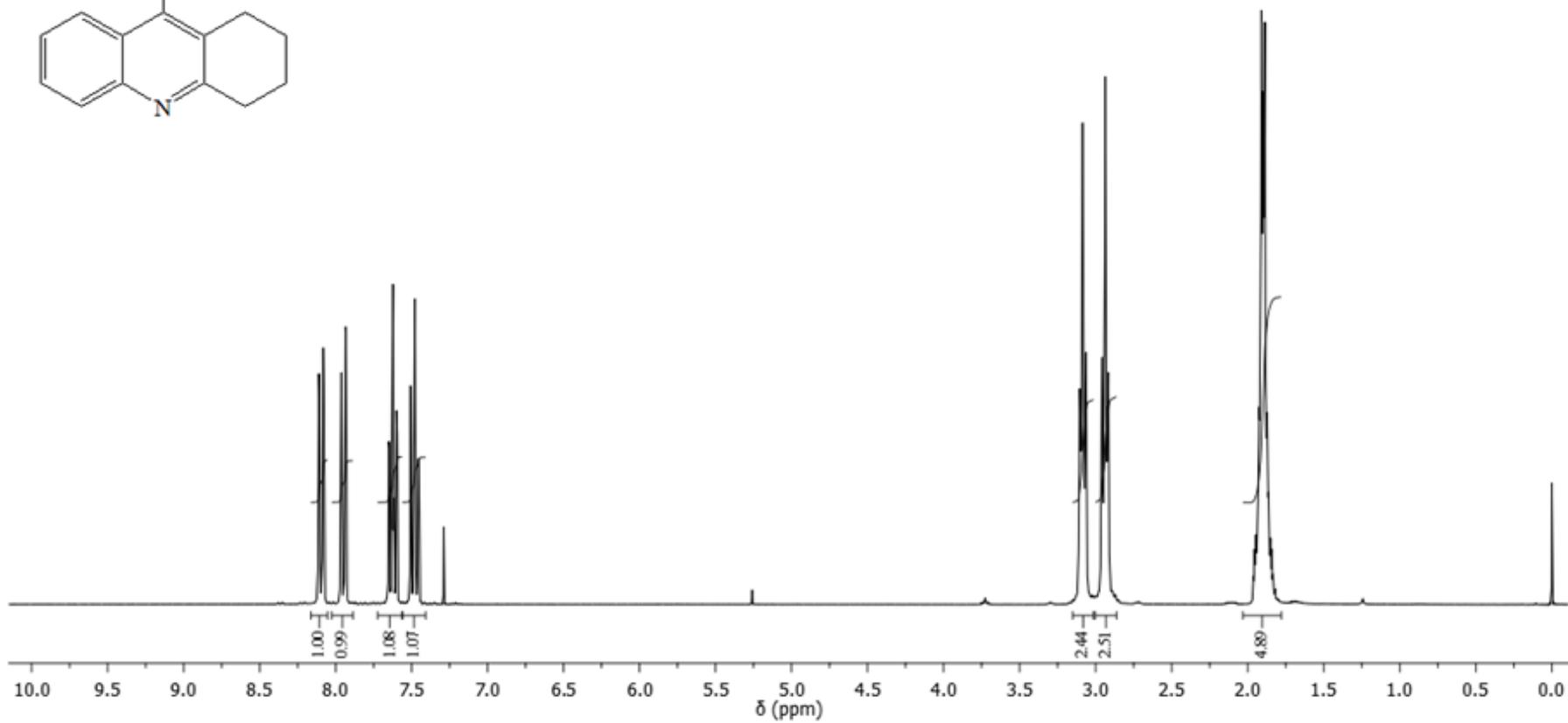
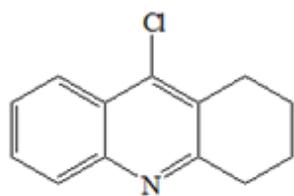
Anexo 4. Espectro de RMN de ^{13}C (APT, CDCl_3 , 75 MHz) da (S)-3-metilcicloexanona, (S)-12.



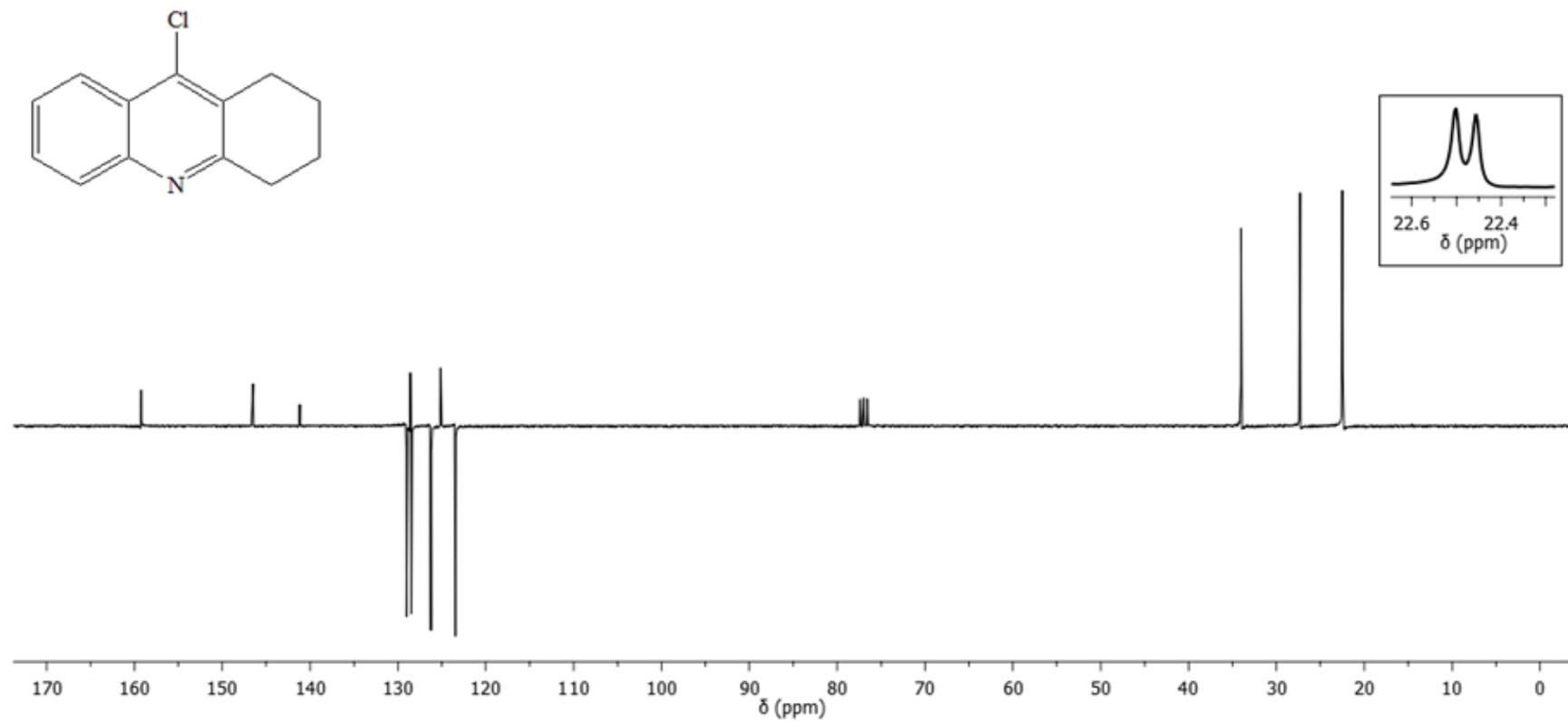
Anexo 5. Espectro de RMN de ¹H (CDCl₃, 300 MHz) da (*R*)-2,2,5-trimetilcicloheptan-1,3-diona, (**R**)-17.



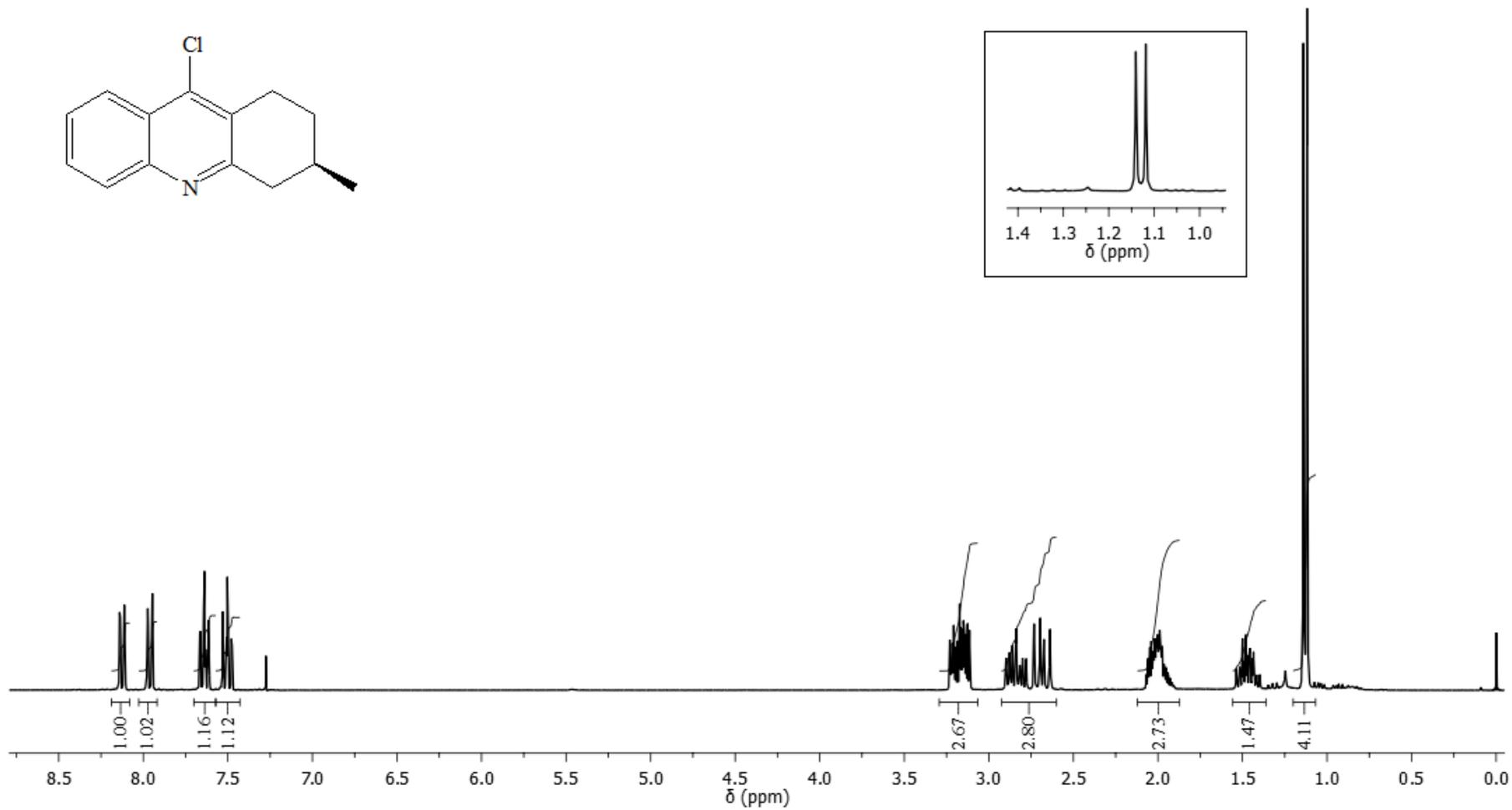
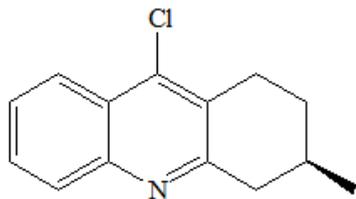
Anexo 6. Espectro de RMN de ^{13}C (APT, CDCl_3 , 75 MHz) da (*R*)-2,2,5-trimetilcicloheptan-1,3-diona, (**R**)-17.



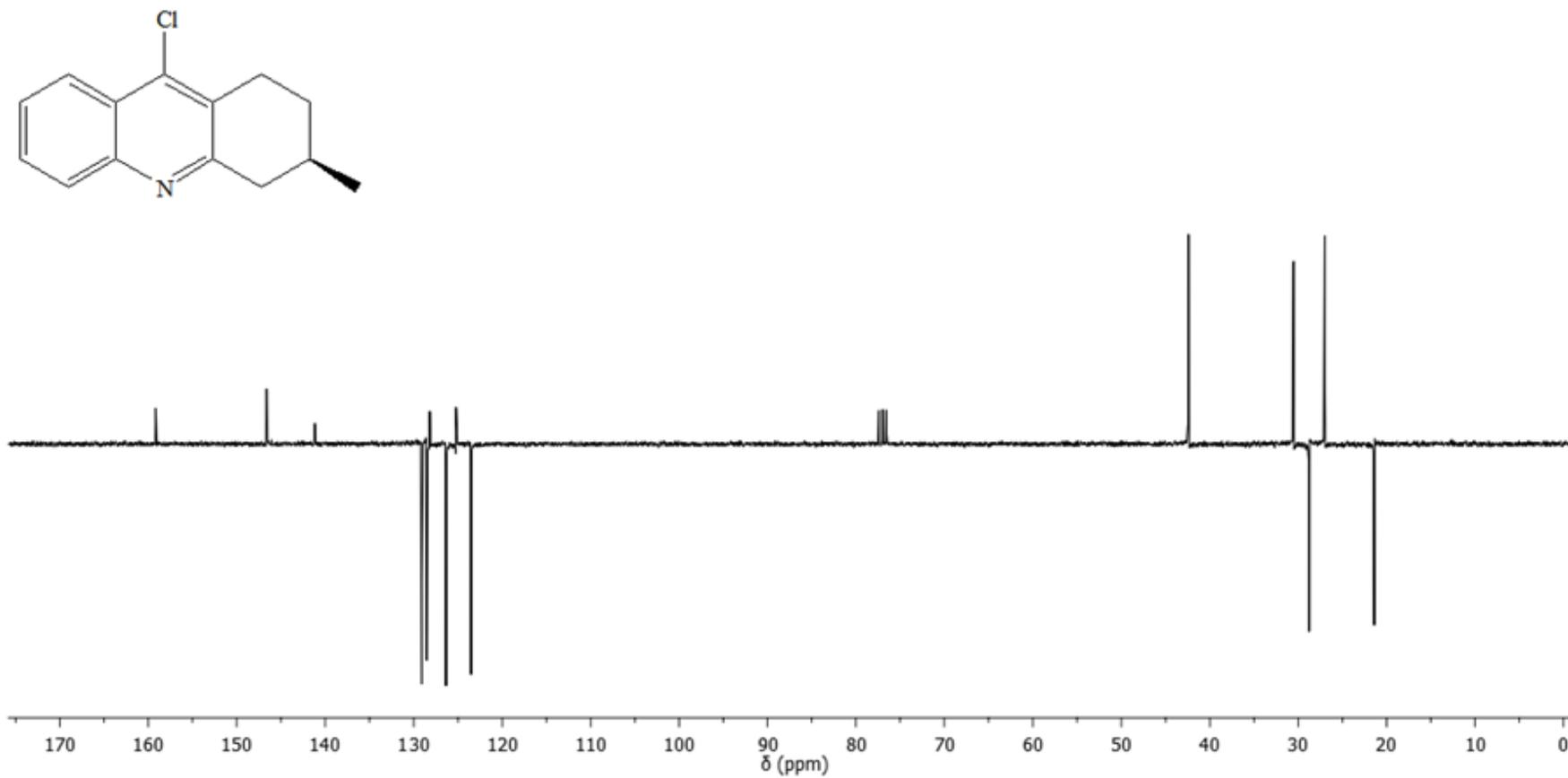
Anexo 7. Espectro de RMN de ^1H (CDCl_3 , 300 MHz) da 9-cloro-1,2,3,4-tetraidroacridina, **22a**.



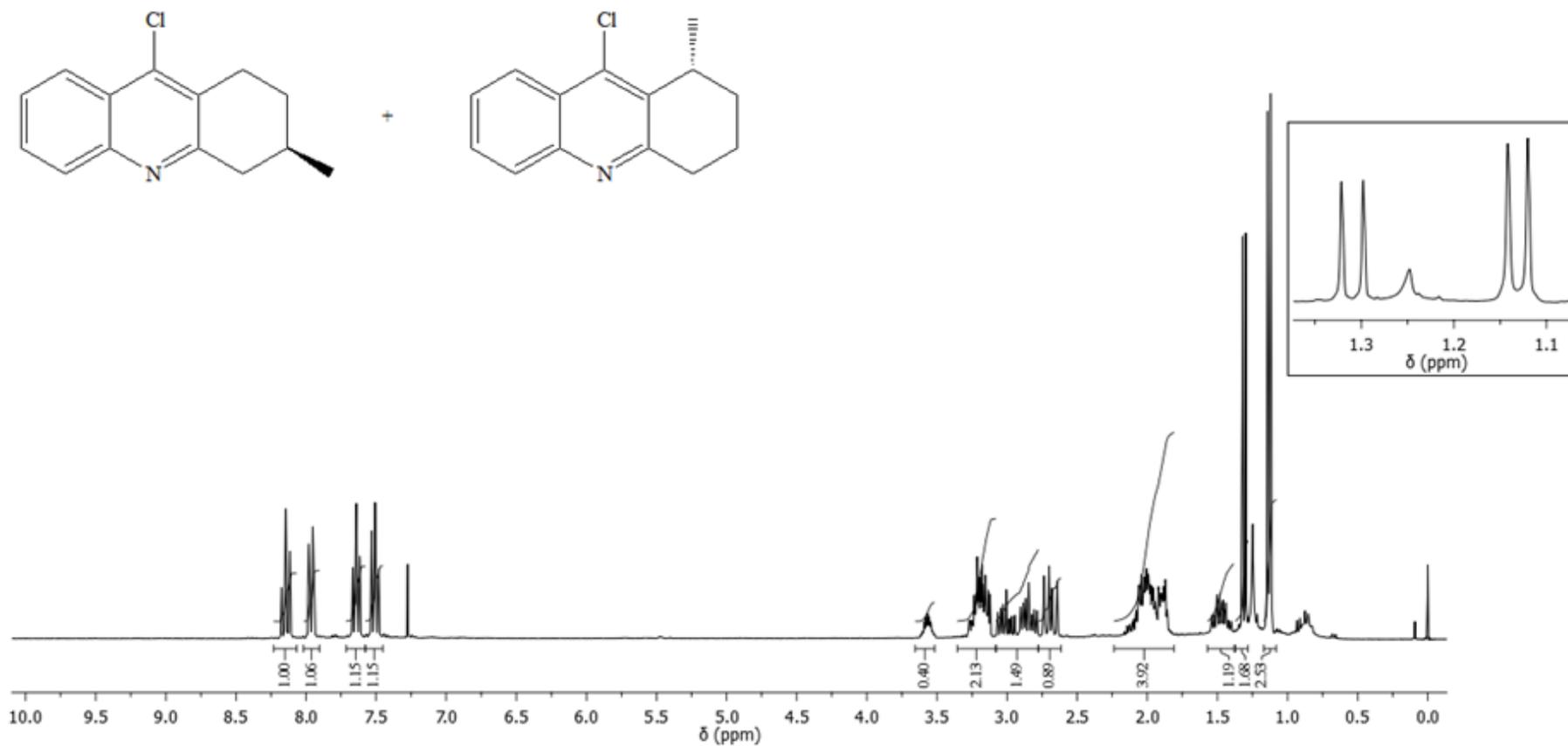
Anexo 8. Espectro de RMN de ^{13}C (APT, CDCl_3 , 75 MHz) da 9-cloro-1,2,3,4-tetraidroacridina, **22a**.



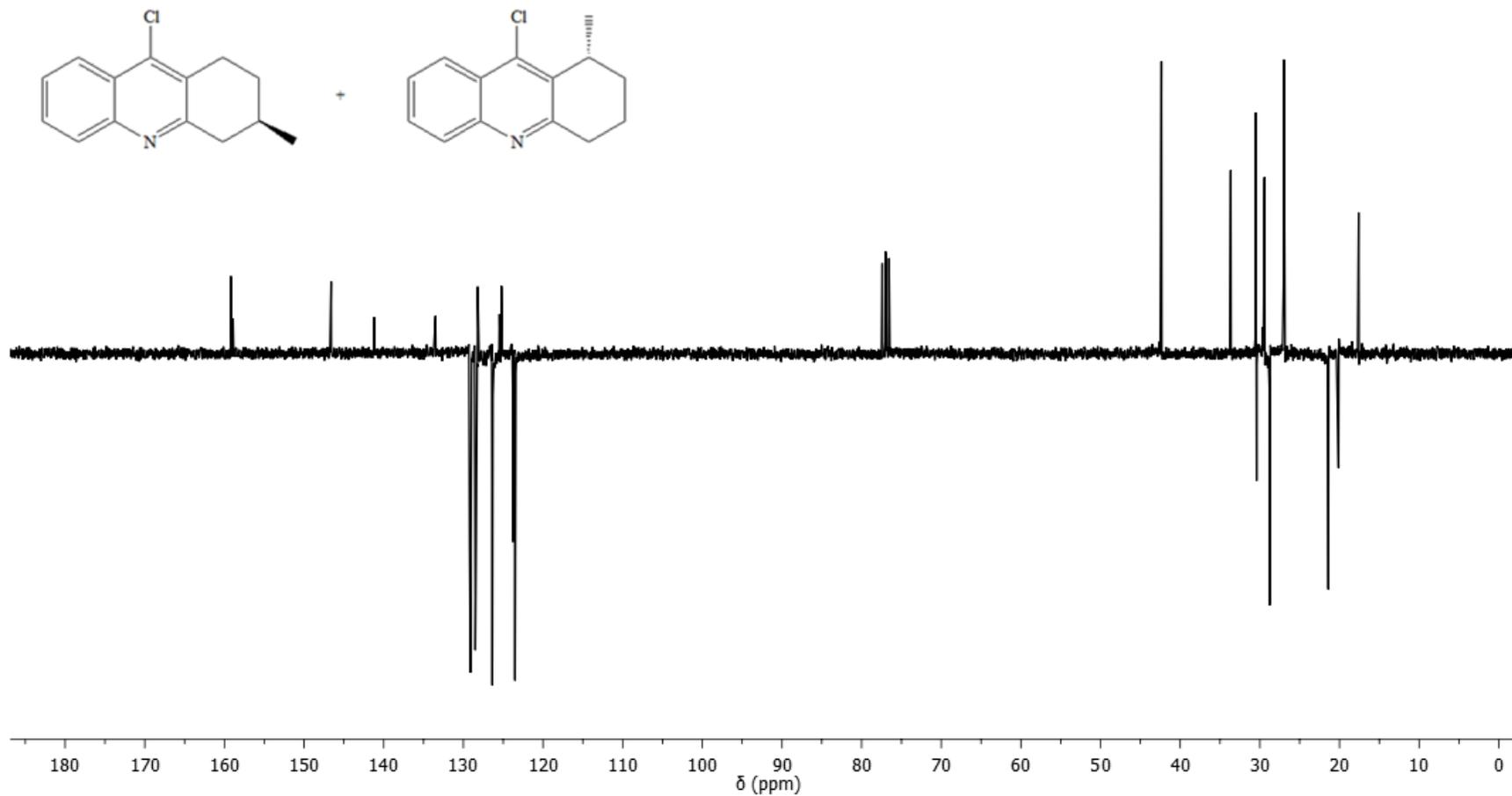
Anexo 9. Espectro de RMN de ^1H (CDCl₃, 300 MHz) da (R)-9-cloro-3-metil-1,2,3,4-tetraidroacridina, (R)-22b.



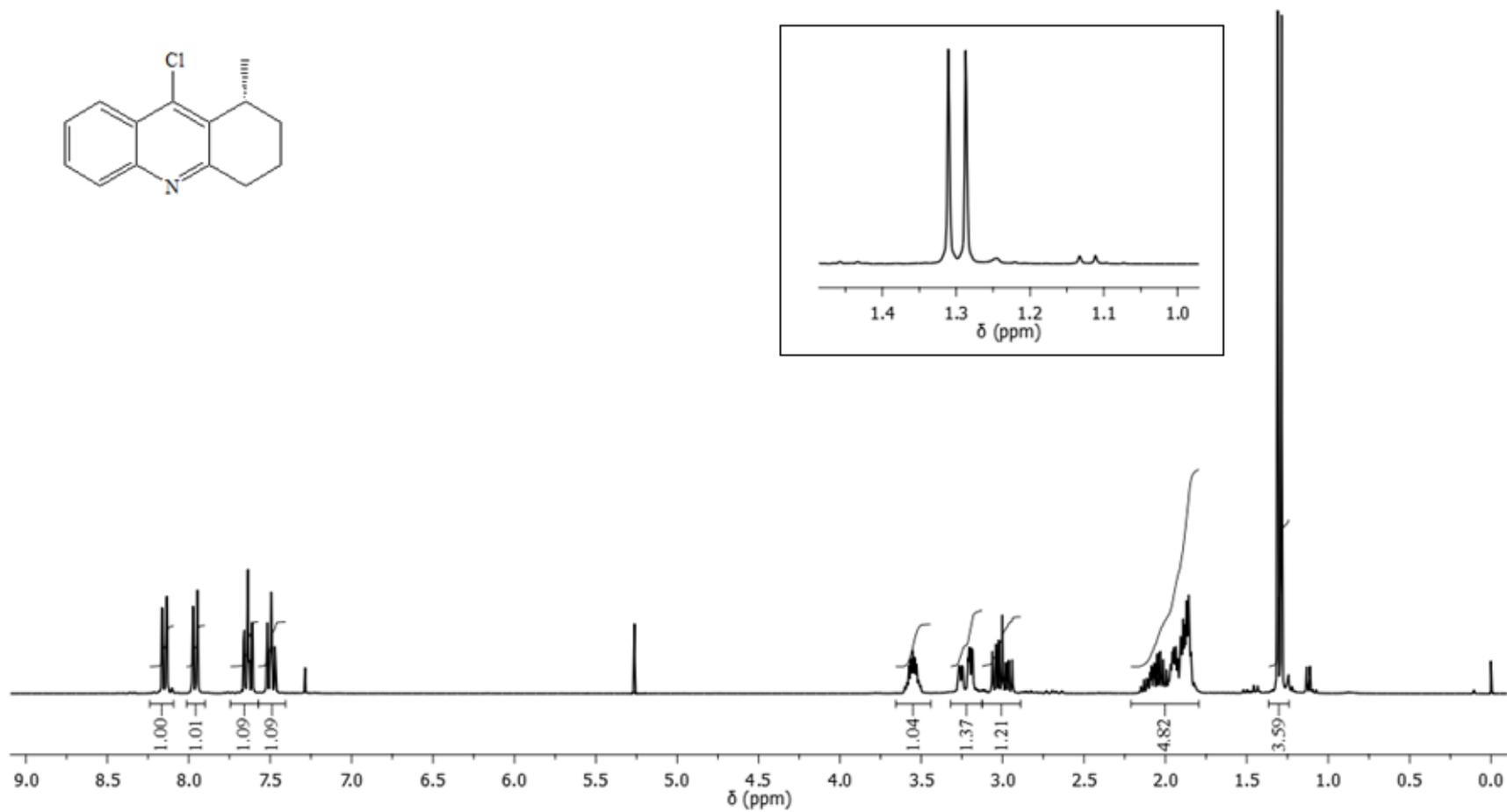
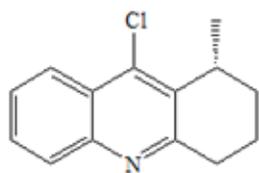
Anexo 10. Espectro de RMN de ¹³C (APT, CDCl₃, 75 MHz) da (R)-9-cloro-3-metil-1,2,3,4-tetraidroacridina, (**R**)-**22b**.



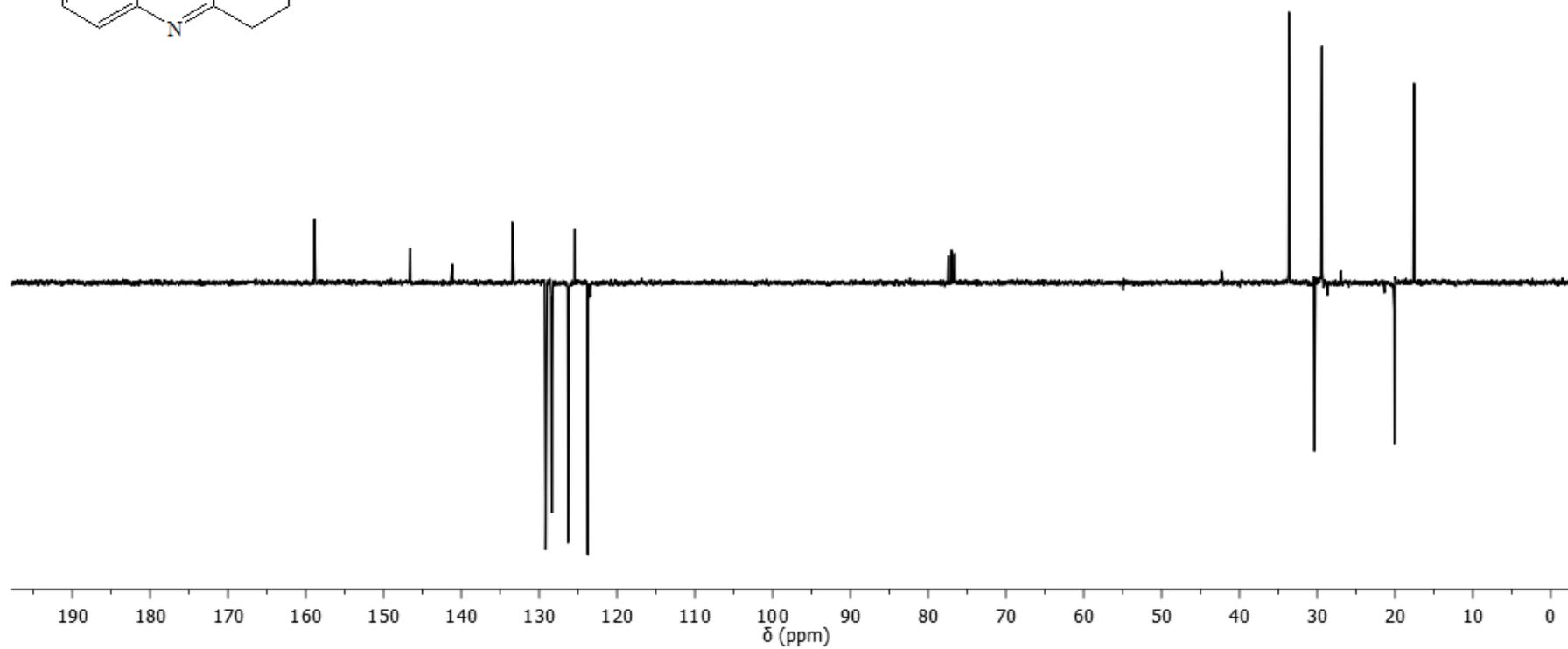
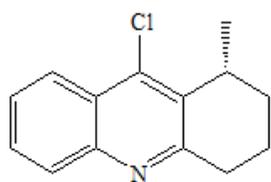
Anexo 11. Espectro de RMN de ¹H (CDCl₃, 300 MHz) da mistura dos isômeros (*R*)-9-cloro-3-metil-1,2,3,4-tetraidroacridina, (**R**)-22b e (*R*)-9-cloro-1-metil-1,2,3,4-tetraidroacridina, (**R**)-22d, destacando-se a ampliação entre 1,1 e 1,4 ppm.



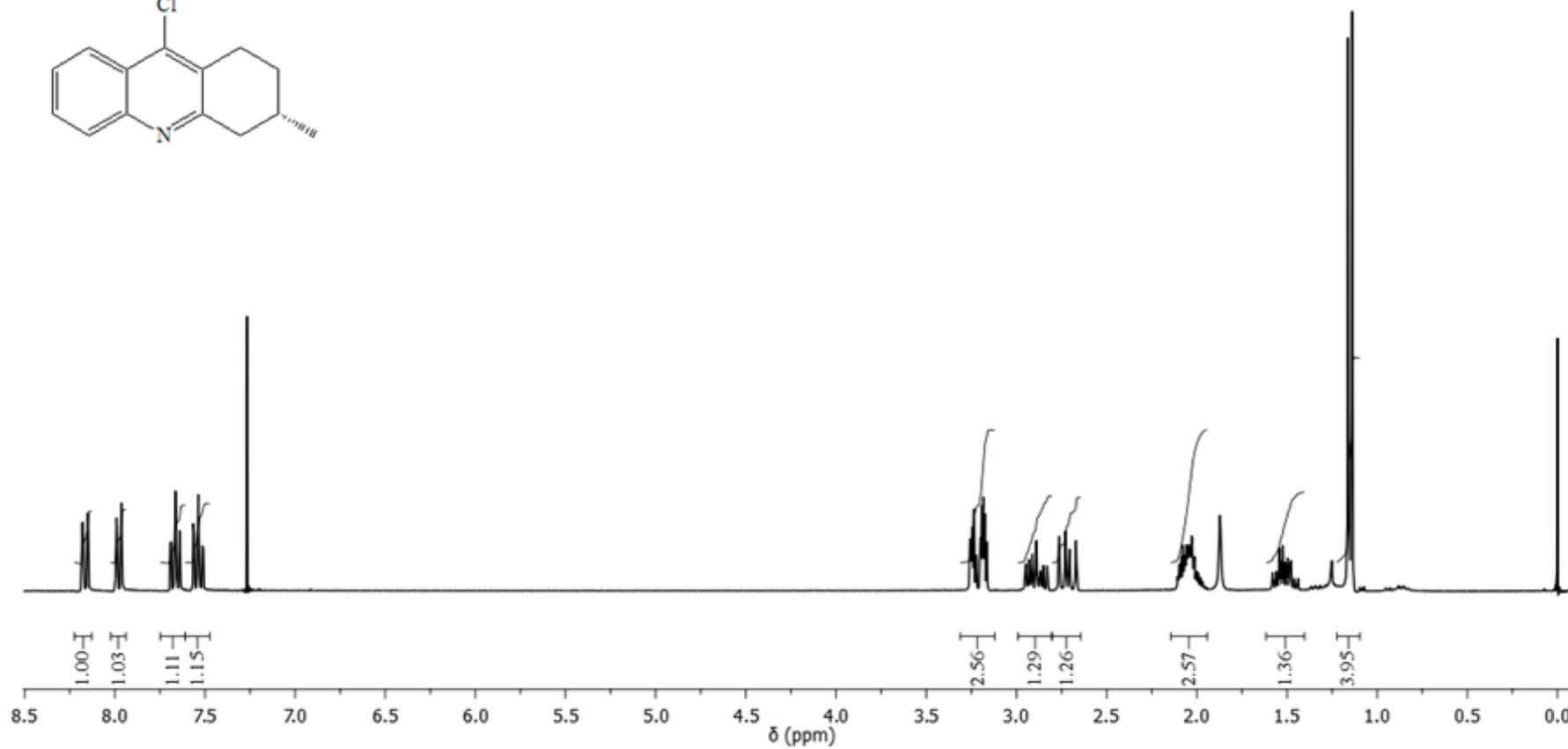
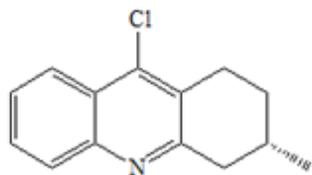
Anexo 12. Espectro de RMN de ¹³C (APT, CDCl₃, 75 MHz) da mistura dos isômeros (*R*)-9-cloro-3-metil-1,2,3,4-tetraidroacridina, (**R**)-22b e (*R*)-9-cloro-1-metil-1,2,3,4-tetraidroacridina, (**R**)-22d, destacando-se dois carbonos CH e dois CH₃.



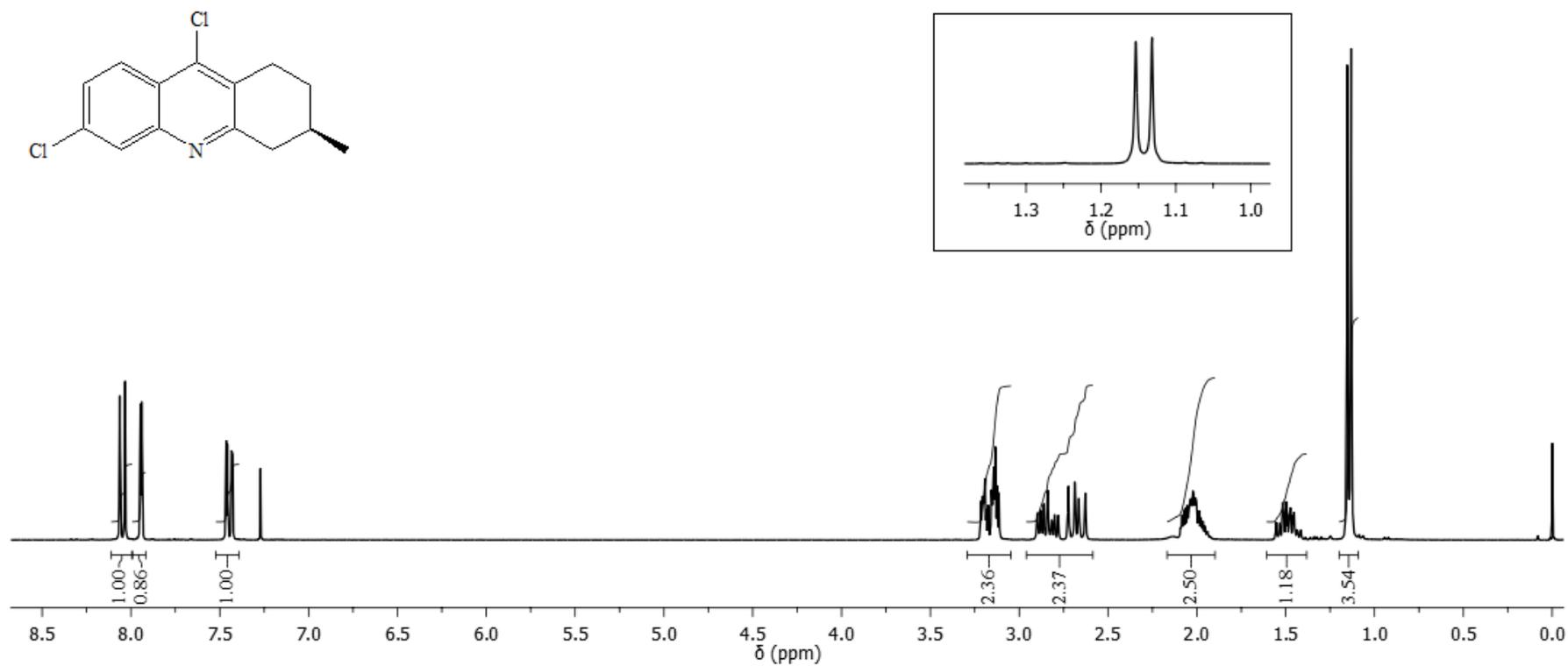
Anexo 13. Espectro de RMN de ¹H (CDCl₃, 300 MHz) da (R)-9-cloro-1-metil-1,2,3,4-tetraidroacridina, (R)-22d.



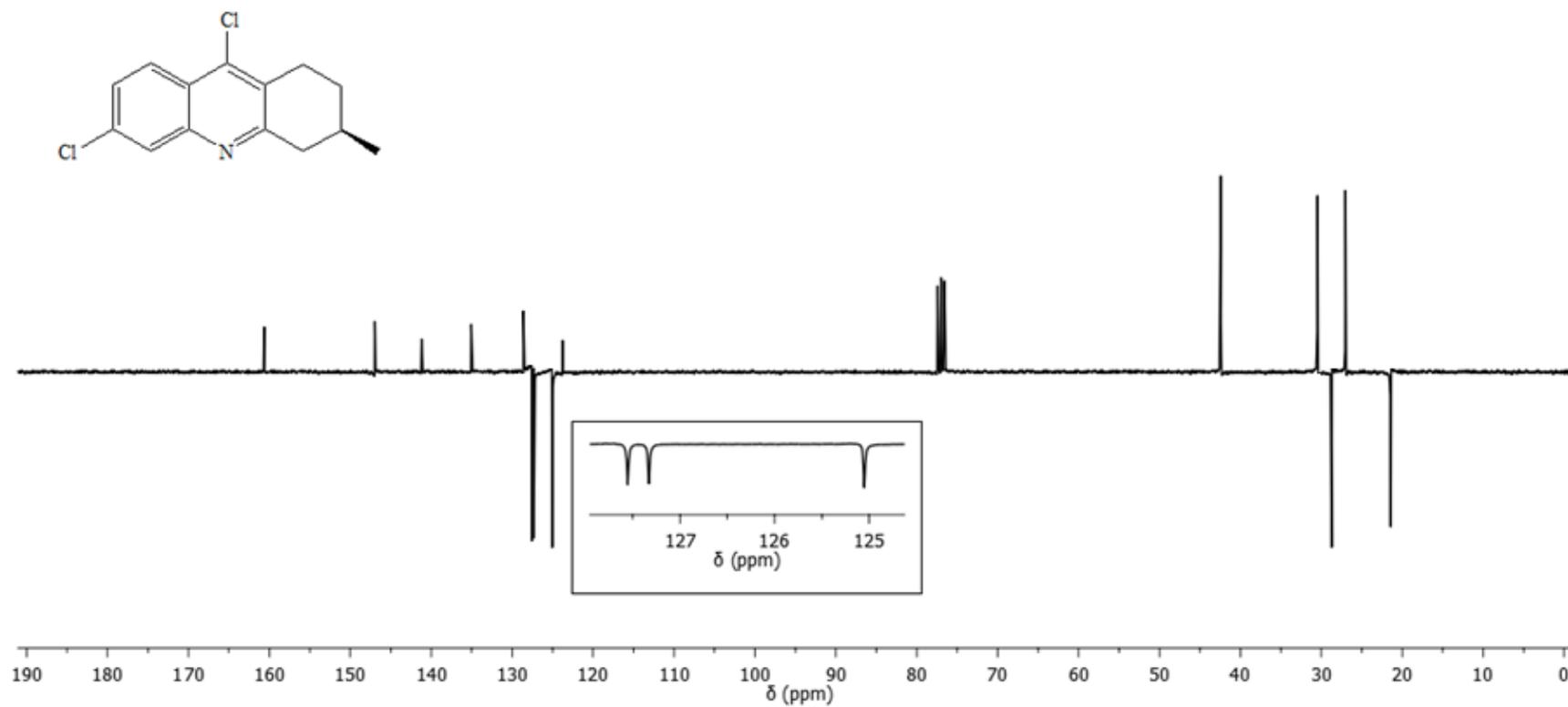
Anexo 14. Espectro de RMN de ^{13}C (APT, CDCl_3 , 75 MHz) da (R)-9-cloro-1-metil-1,2,3,4-tetraidroacridina, (R)-22d.



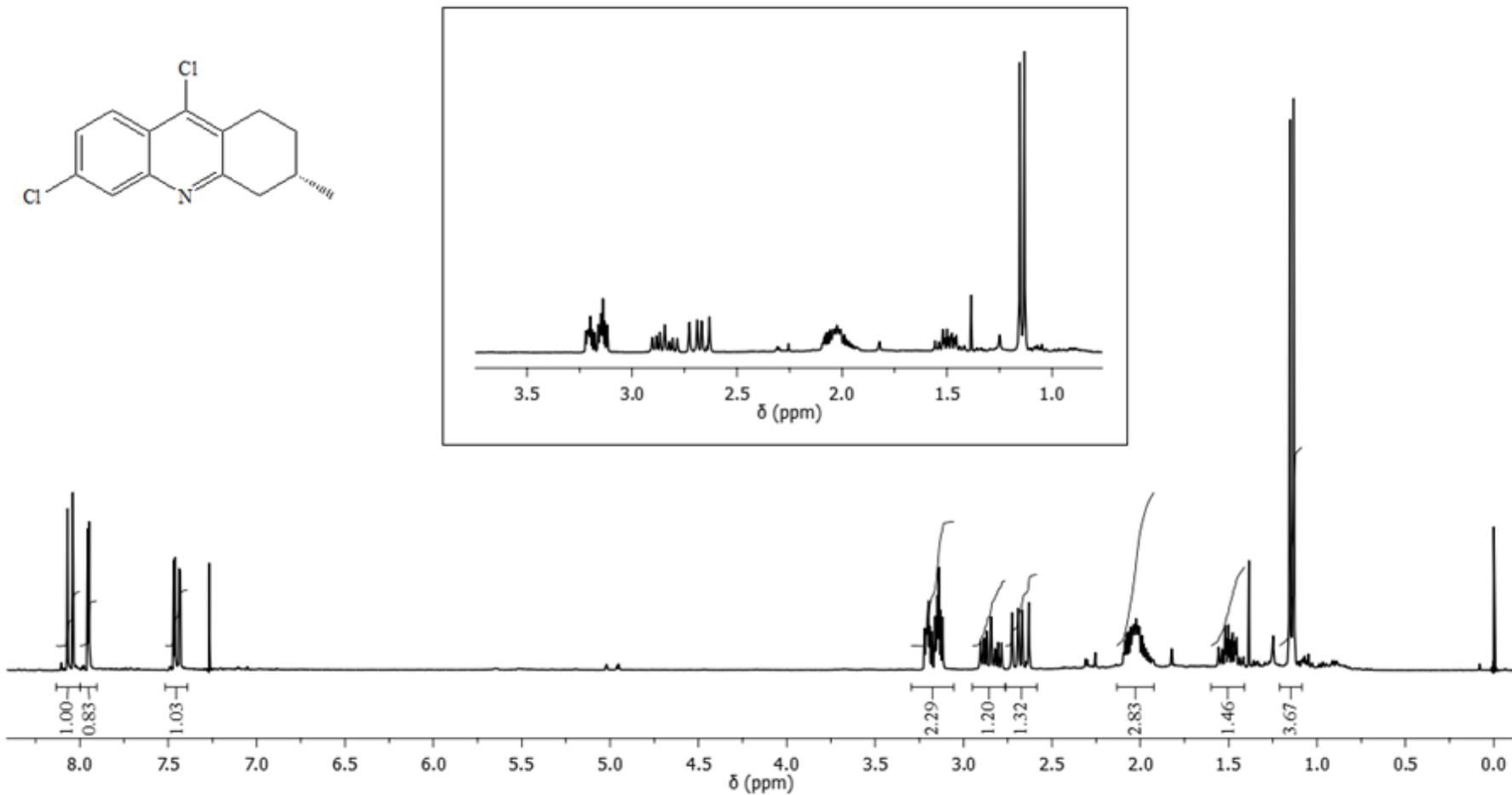
Anexo 15. Espectro de RMN de ¹H (CDCl₃, 300 MHz) da (S)-9-cloro-3-metil-1,2,3,4-tetraidroacridina, (S)-22b.



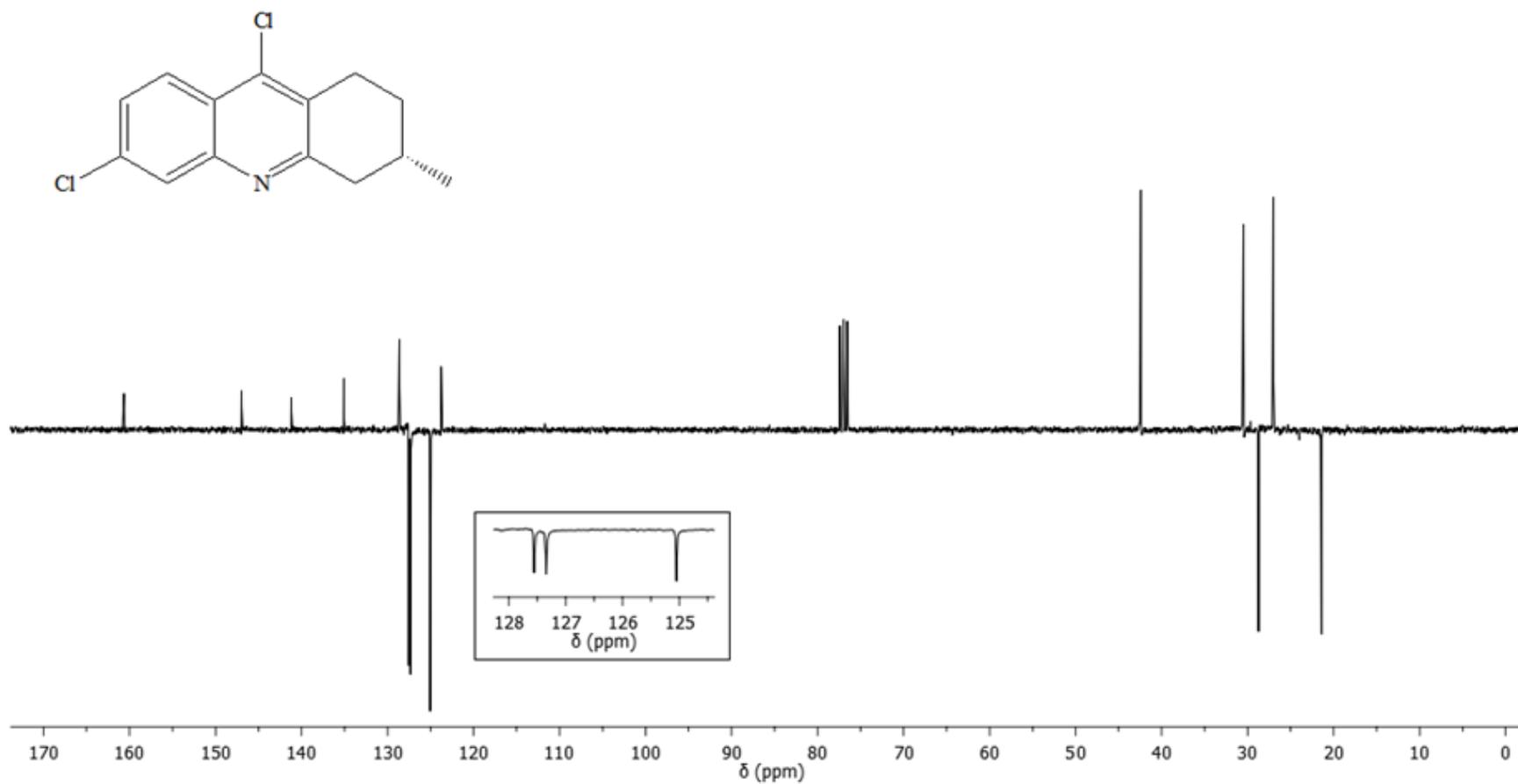
Anexo 16. Espectro de RMN de ¹H (CDCl₃, 300 MHz) da (*R*)-6,9-dicloro-3-metil-1,2,3,4-tetraidroacridina, (**R**)-**22c**.



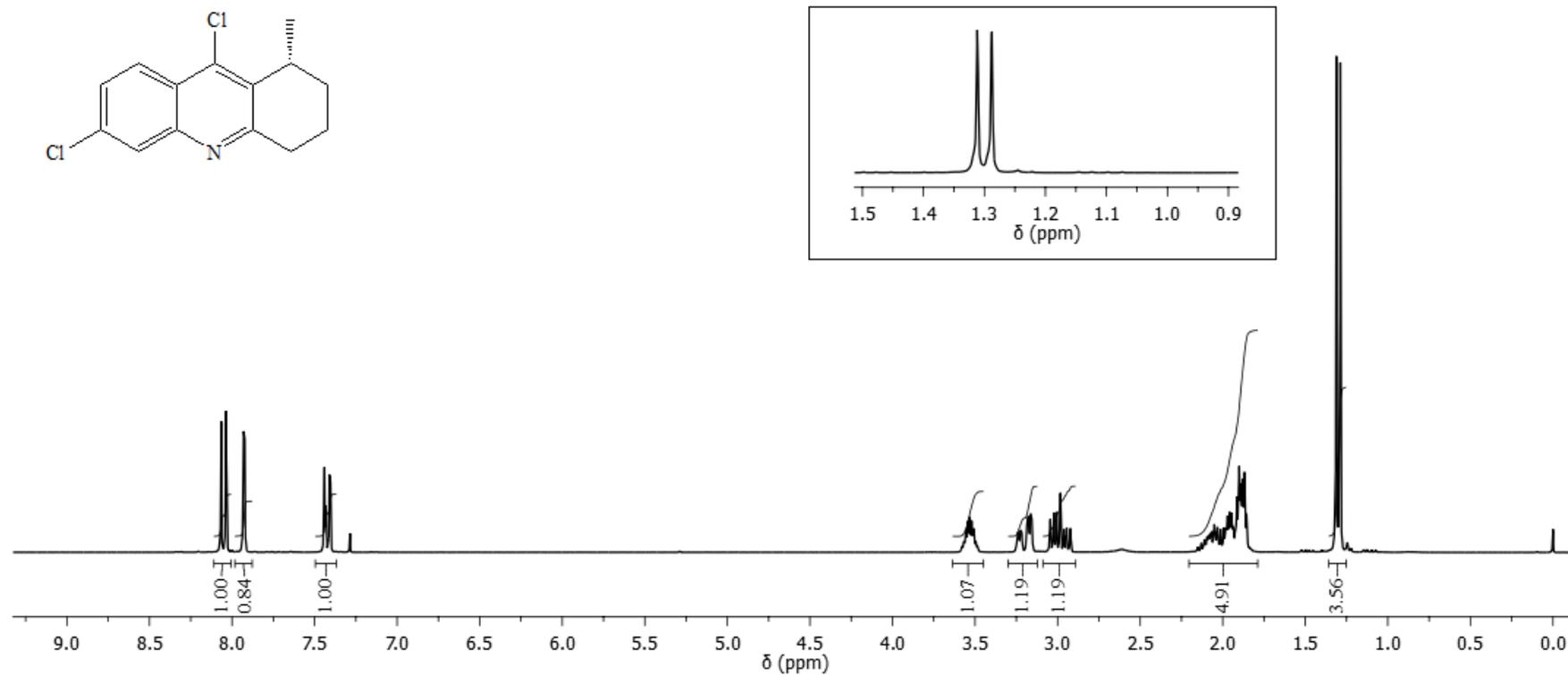
Anexo 17. Espectro de RMN de ¹³C (APT, CDCl₃, 75 MHz) da (*R*)-6,9-dicloro-3-metil-1,2,3,4-tetraidroacridina, (*R*)-**22c**.



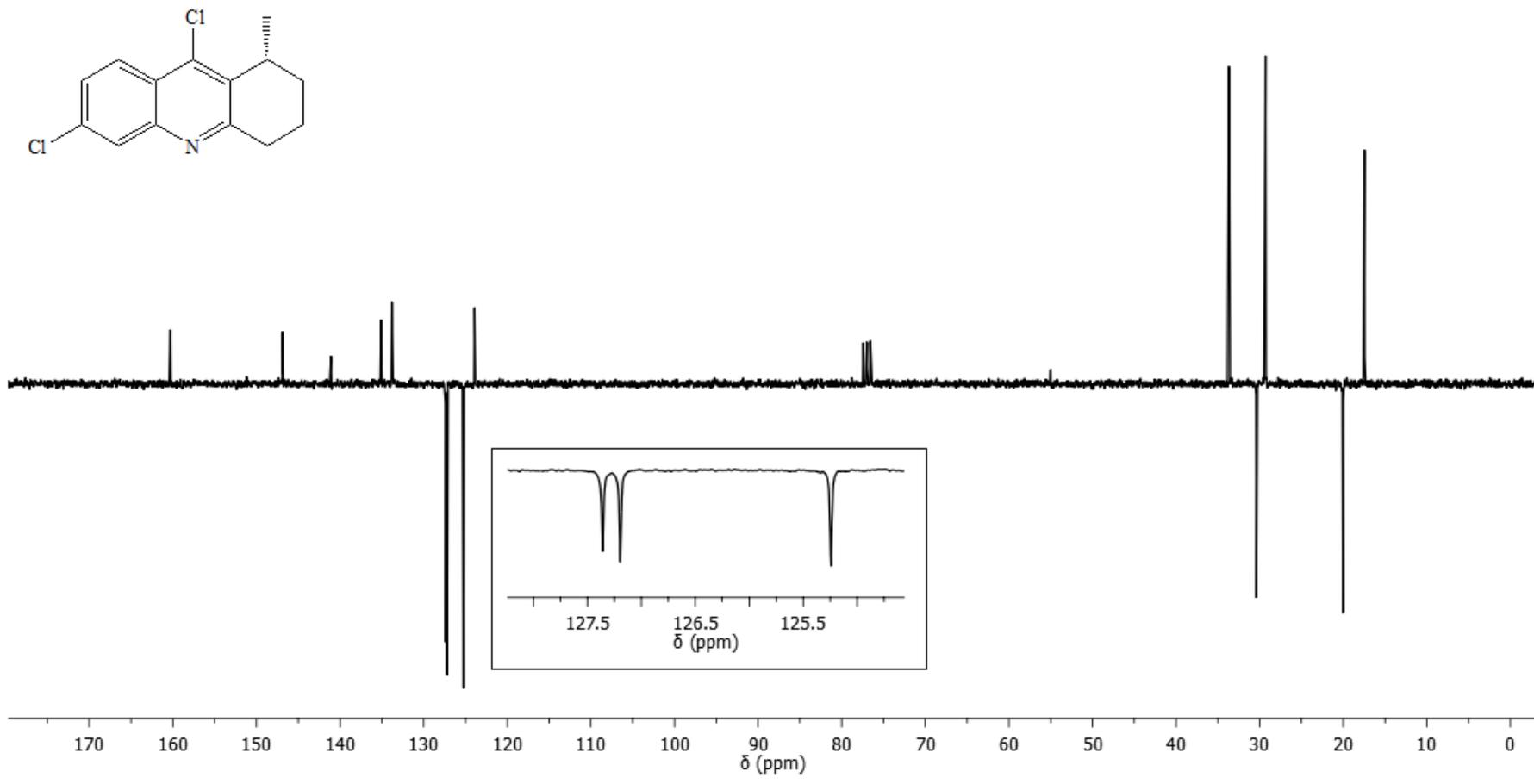
Anexo 18. Espectro de RMN de ¹H (CDCl₃, 300 MHz) da *(S)*-6,9-dicloro-3-metil-1,2,3,4-tetraidroacridina, *(S)*-**22c**.



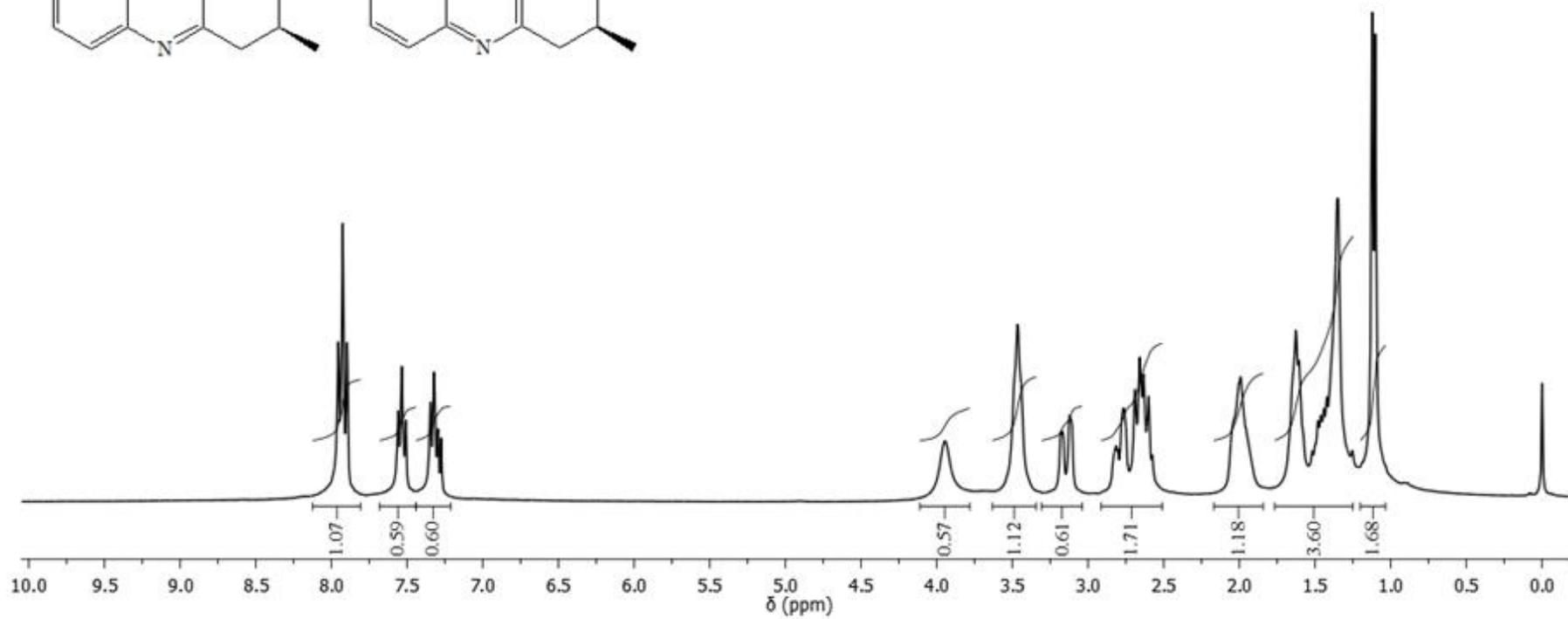
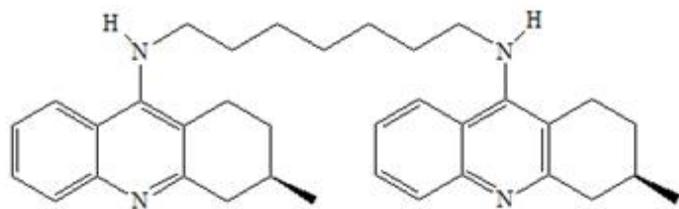
Anexo 19. Espectro de RMN de ^{13}C (APT, CDCl_3 , 75 MHz) da (S)-6,9-dicloro-3-metil-1,2,3,4-tetraidroacridina, (S)-**22c**.



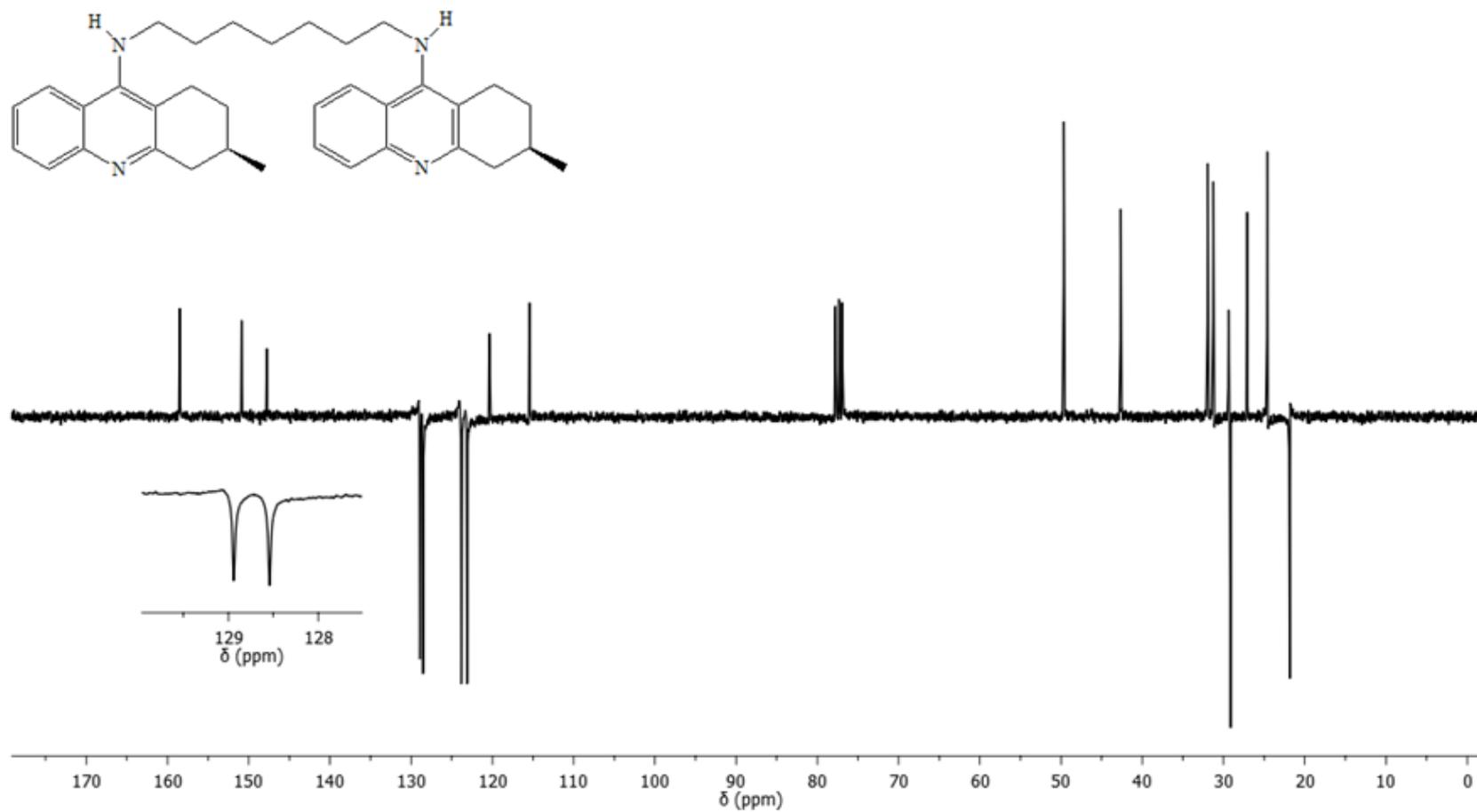
Anexo 20. Espectro de RMN de ¹H (CDCl₃, 300 MHz) da (*R*)-6,9-dicloro-1-metil-1,2,3,4-tetraidroacridina, (**R**)-22e.



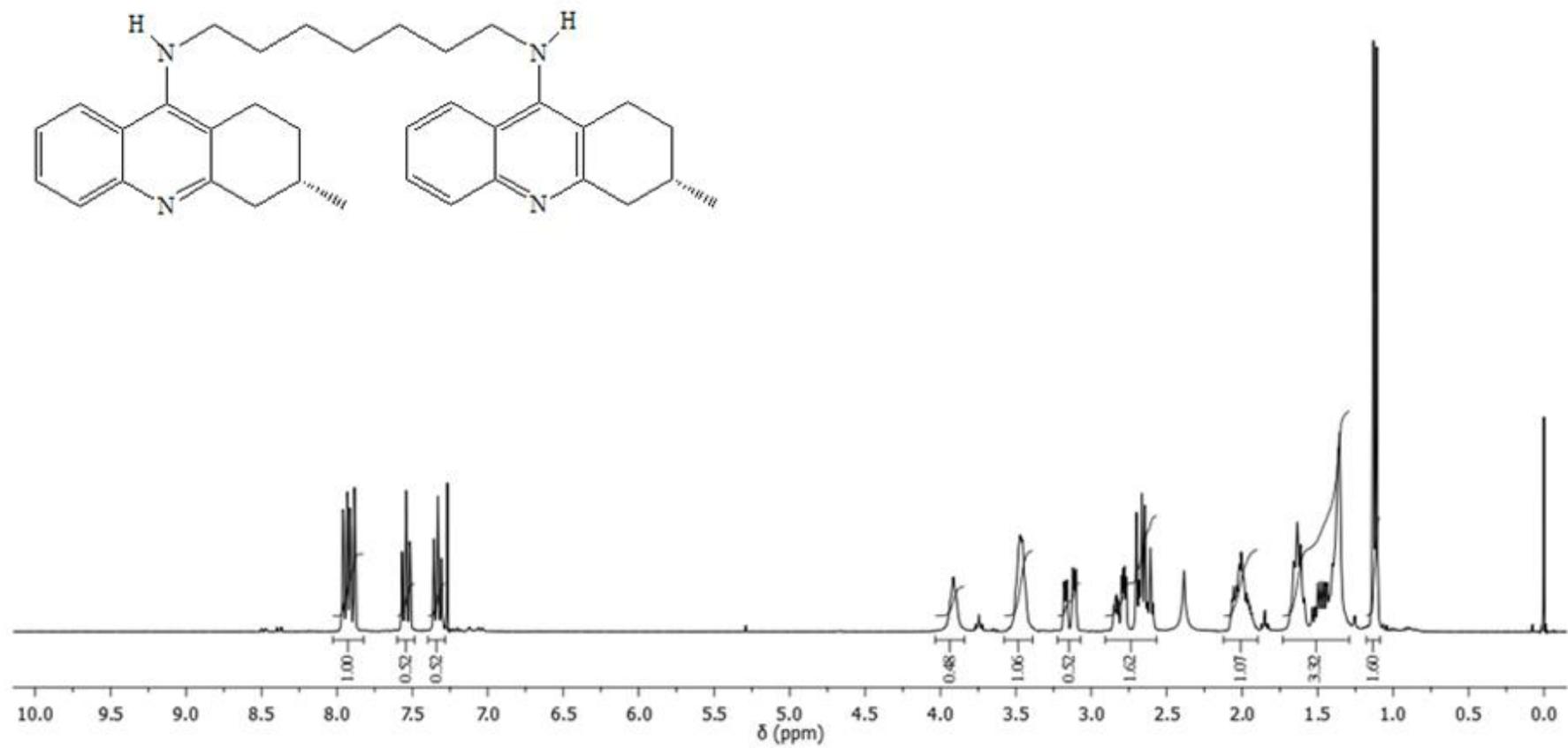
Anexo 21. Espectro de RMN de ¹³C (APT, CDCl₃, 75 MHz) da (R)-6,9-dicloro-1-metil-1,2,3,4-tetraidroacridina, (**R**)-22e.



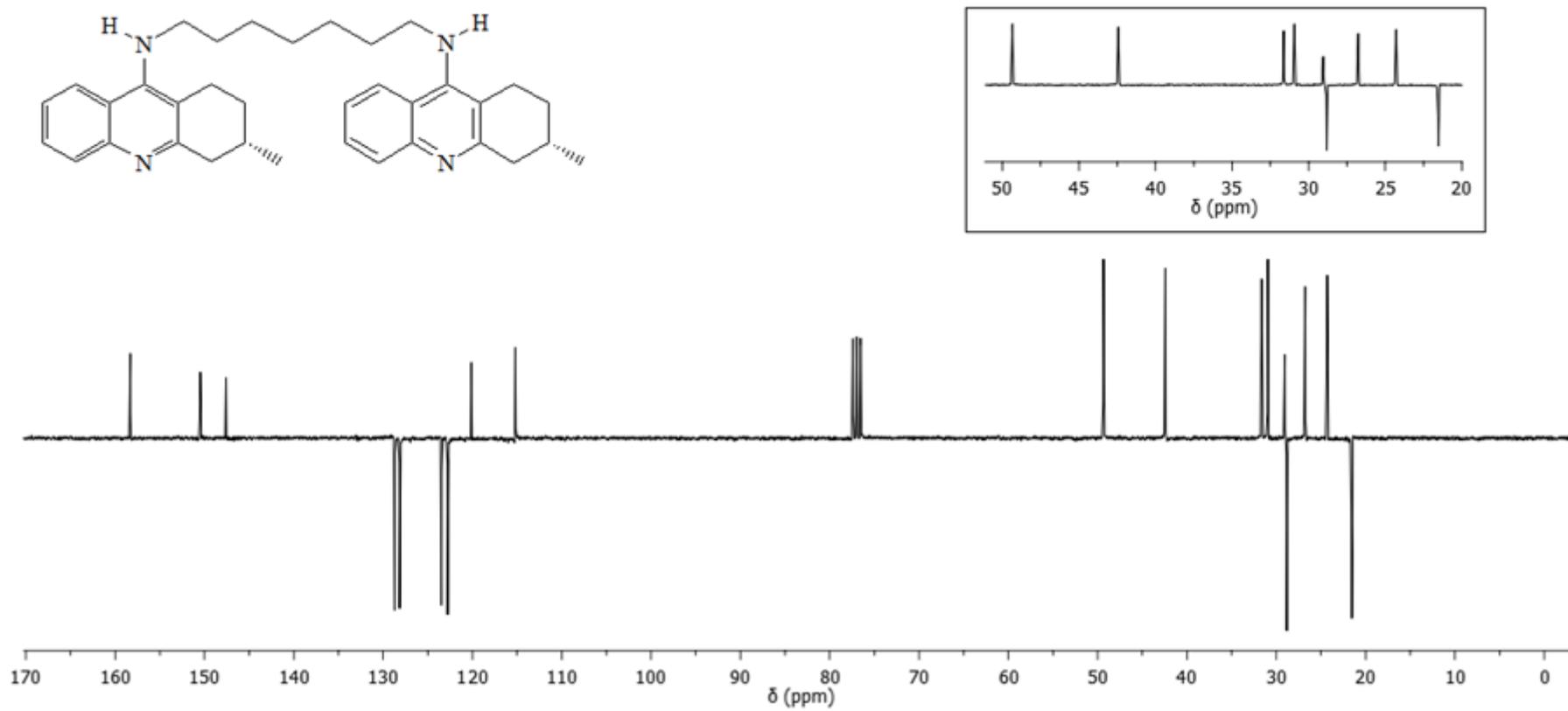
Anexo 22. Espectro de RMN de ^1H (CDCl_3 , 300 MHz) do homodímero (*R*)-**33a**.



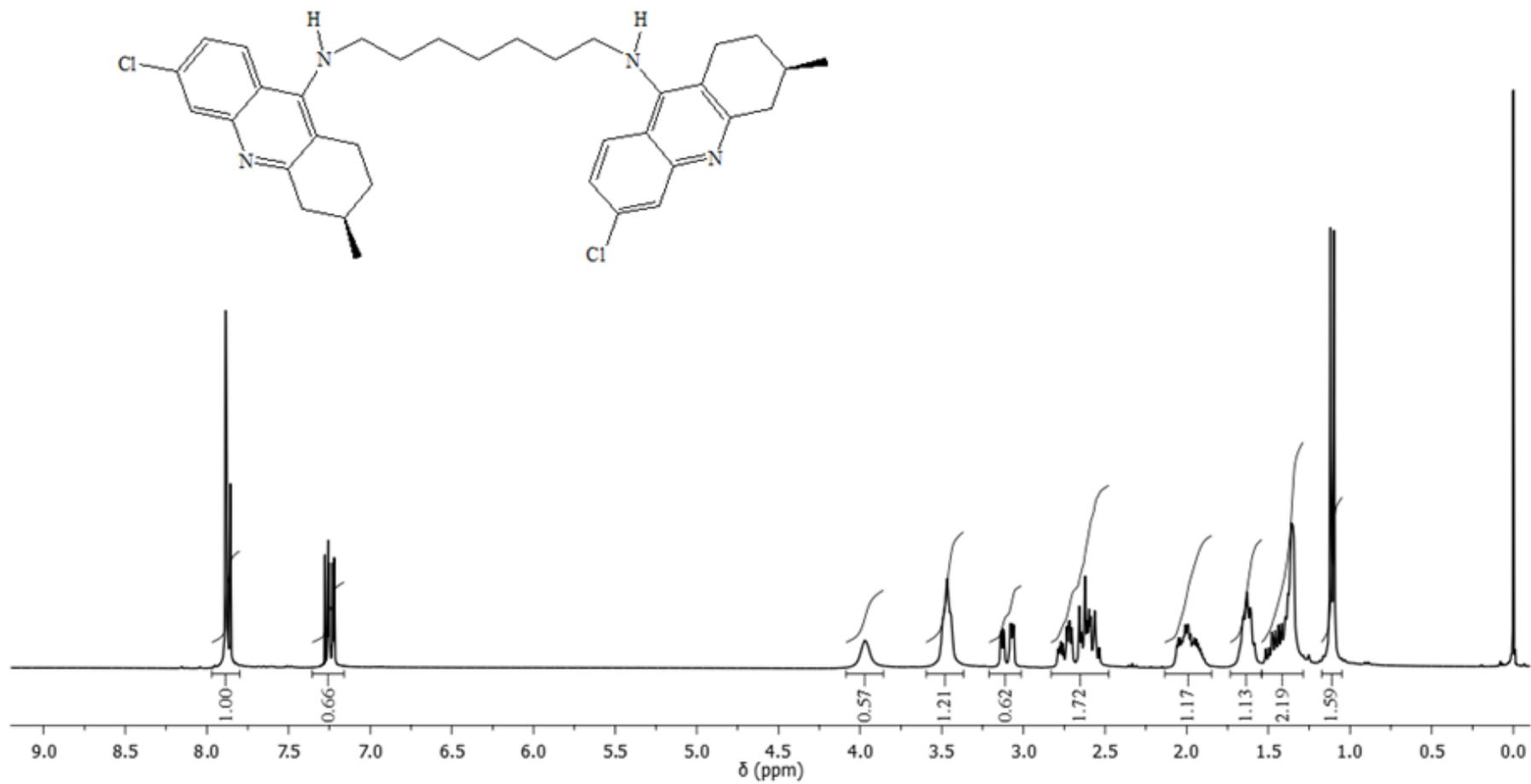
Anexo 23. Espectro de RMN de ¹³C (APT, CDCl₃, 75 MHz) do homodímero **(R)-33a**.



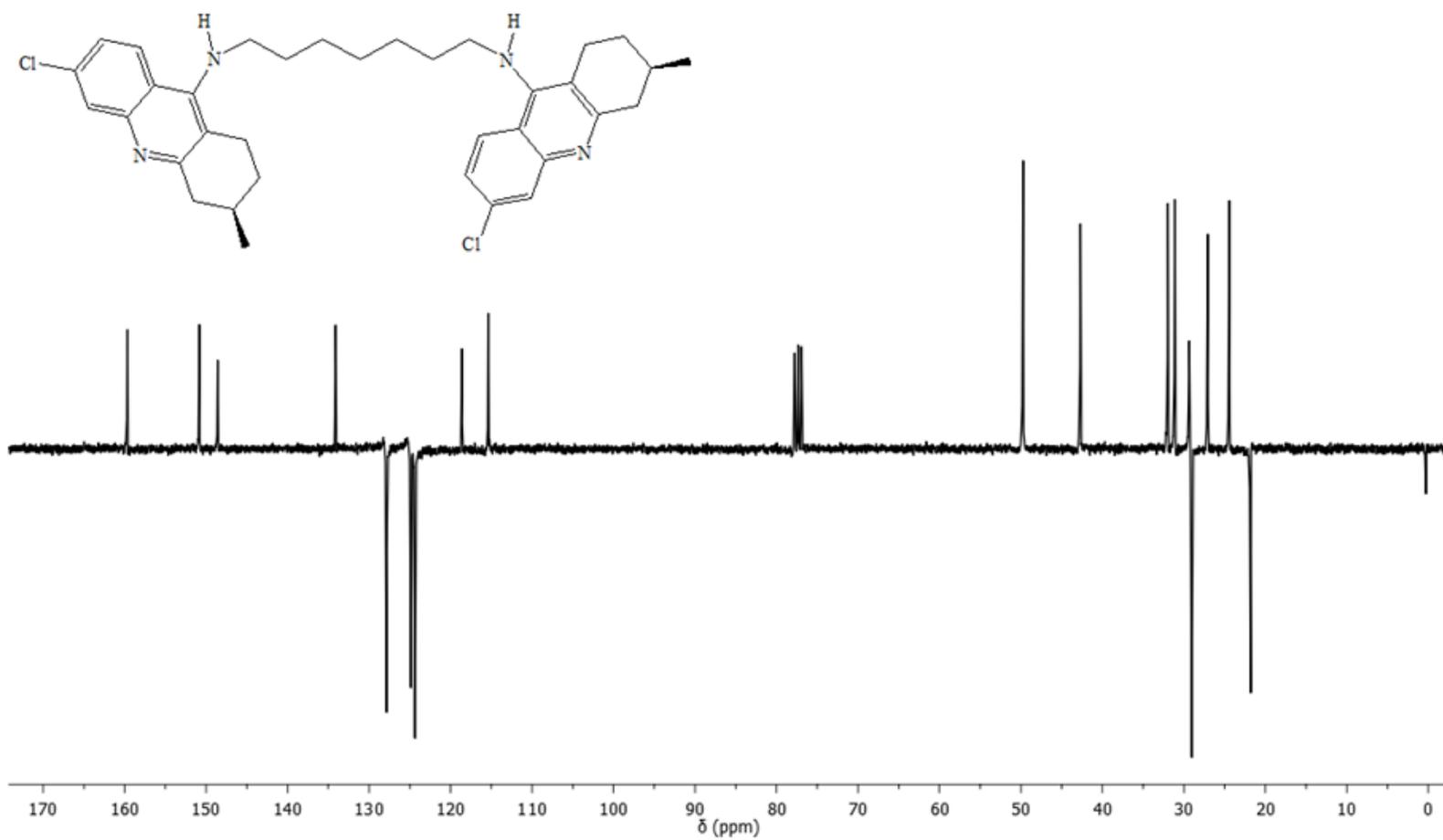
Anexo 24. Espectro de RMN de ¹H (CDCl₃, 300 MHz) do homodímero (S)-33a.



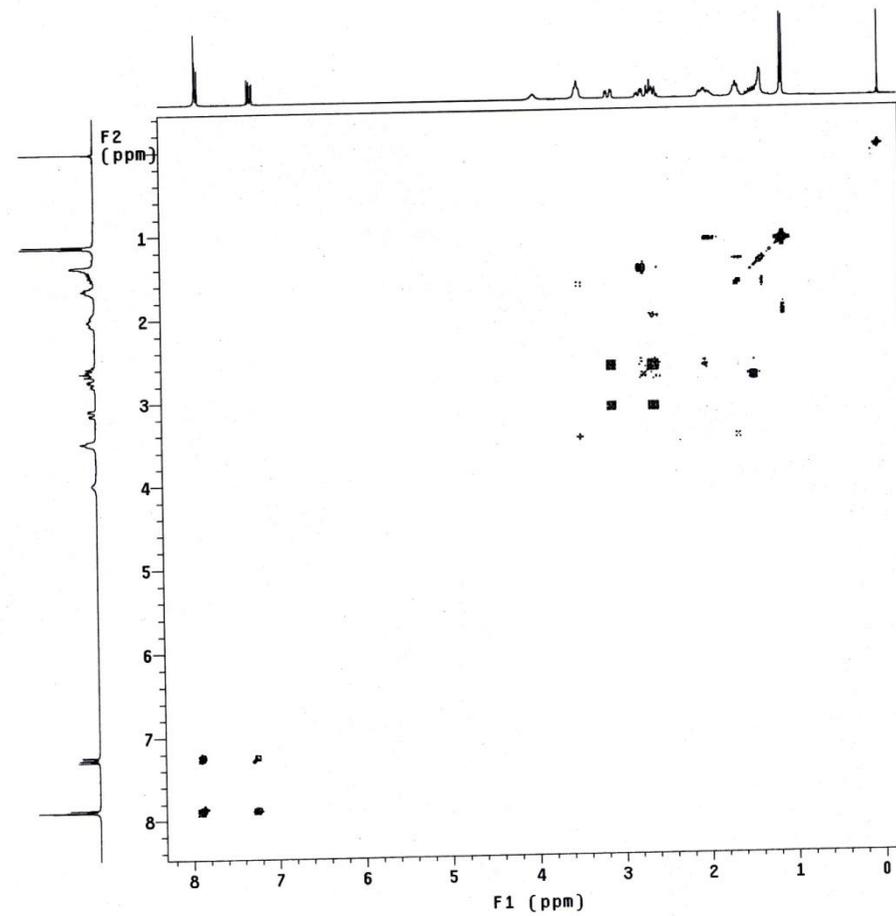
Anexo 25. Espectro de RMN de ¹³C (APT, CDCl₃, 75 MHz) do homodímero (S)-33a.



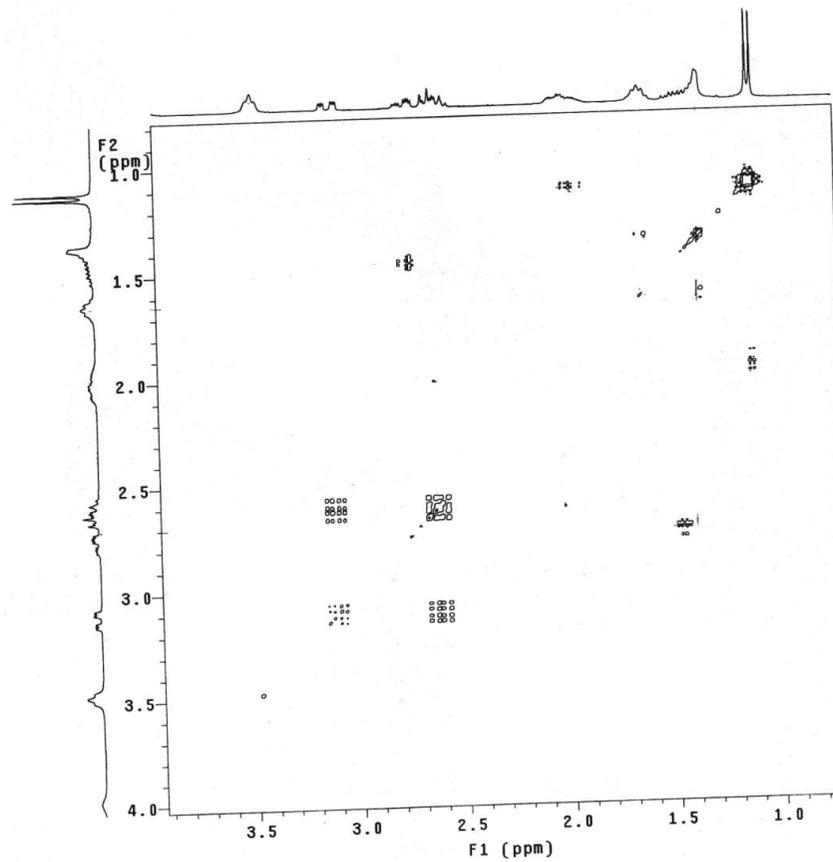
Anexo 26. Espectro de RMN de ^1H (CDCl_3 , 300 MHz) do homodímero **(R)-33b**.



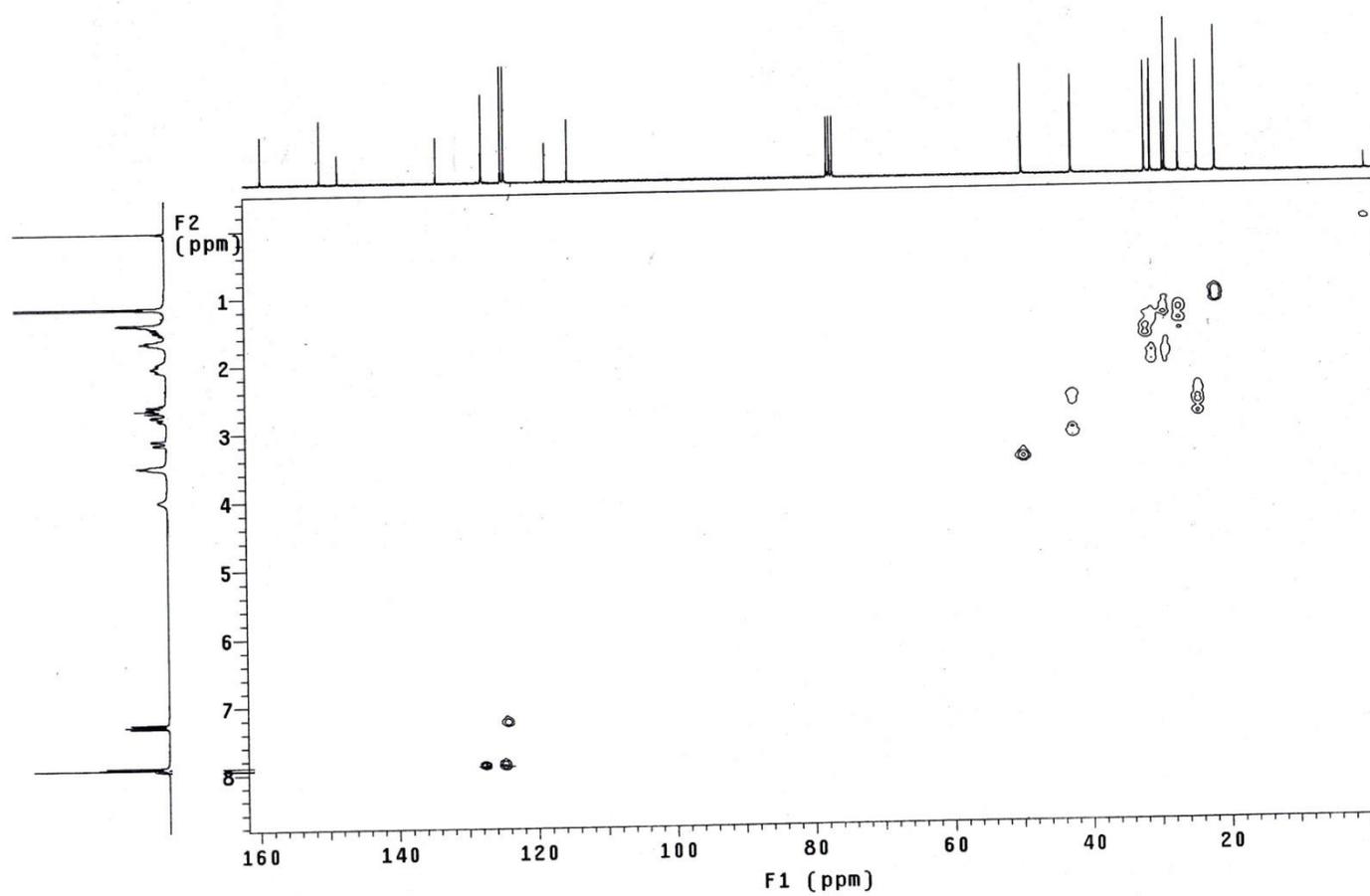
Anexo 27. Espectro de RMN de ¹³C (APT, CDCl₃, 75 MHz) do homodímero **(R)-33b**.



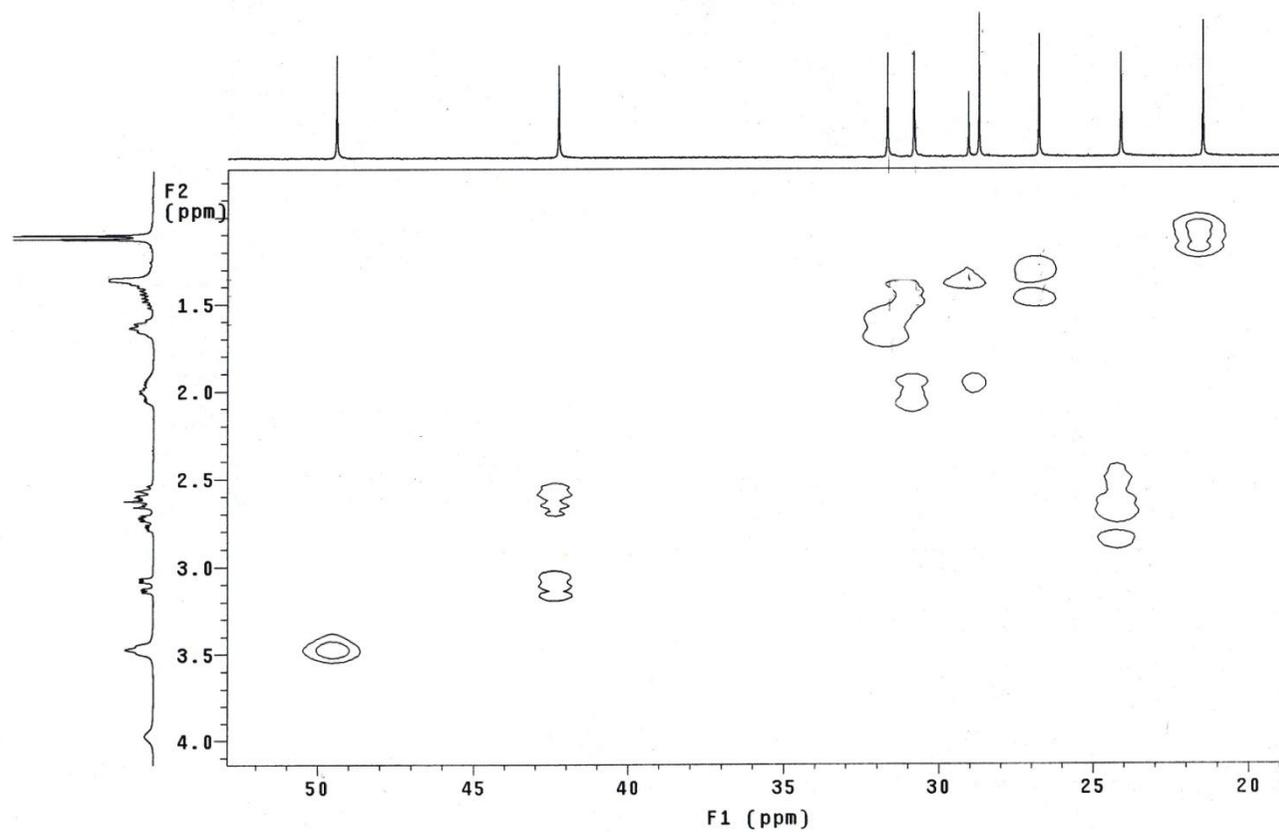
Anexo 28. Espectro de RMN bidimensional COSY do homodímero (*R*)-**33b**.



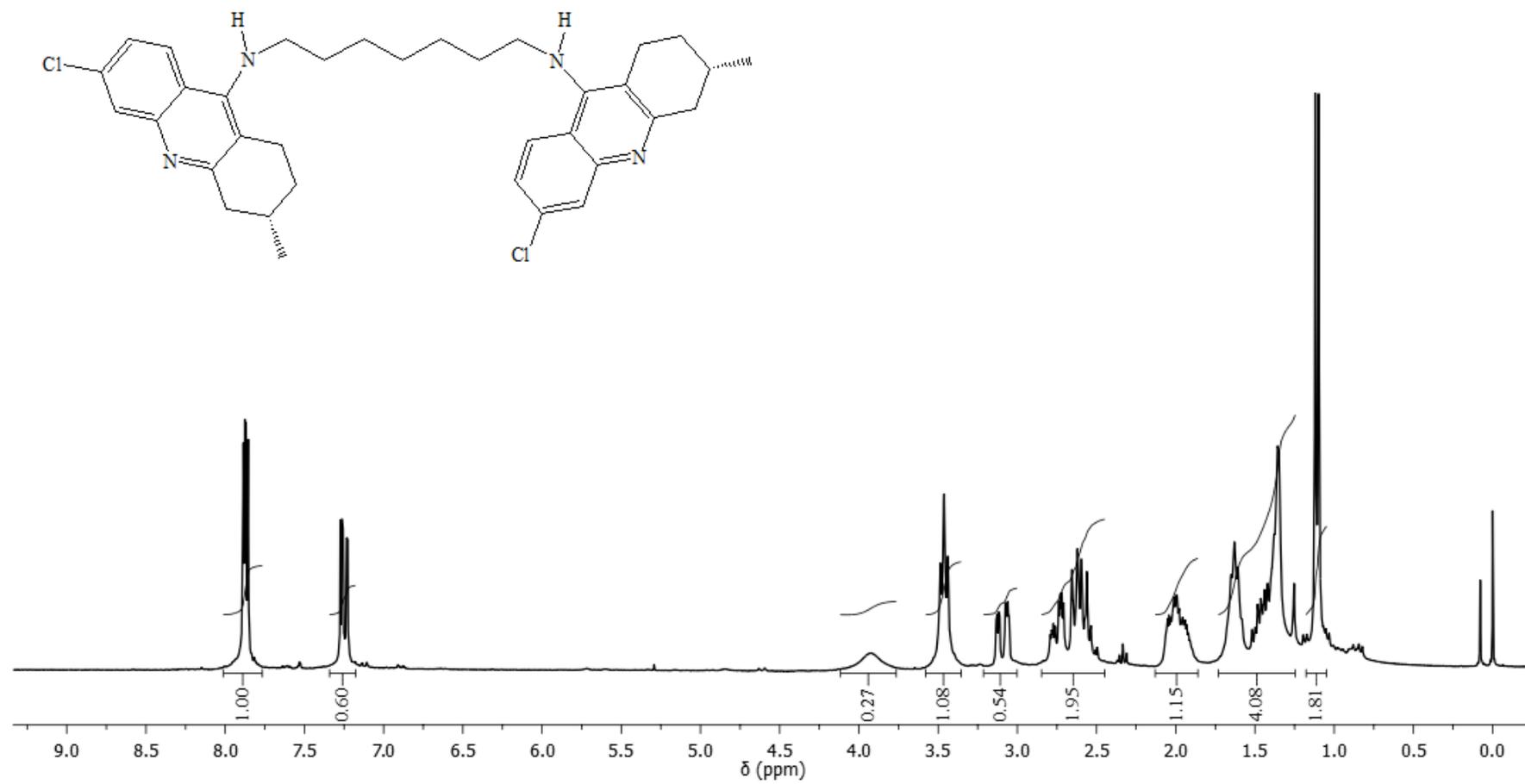
Anexo 29. Espectro de RMN bidimensional COSY do homodímero (*R*)-**33b**, ampliação entre 1,0 e 4,0 ppm.



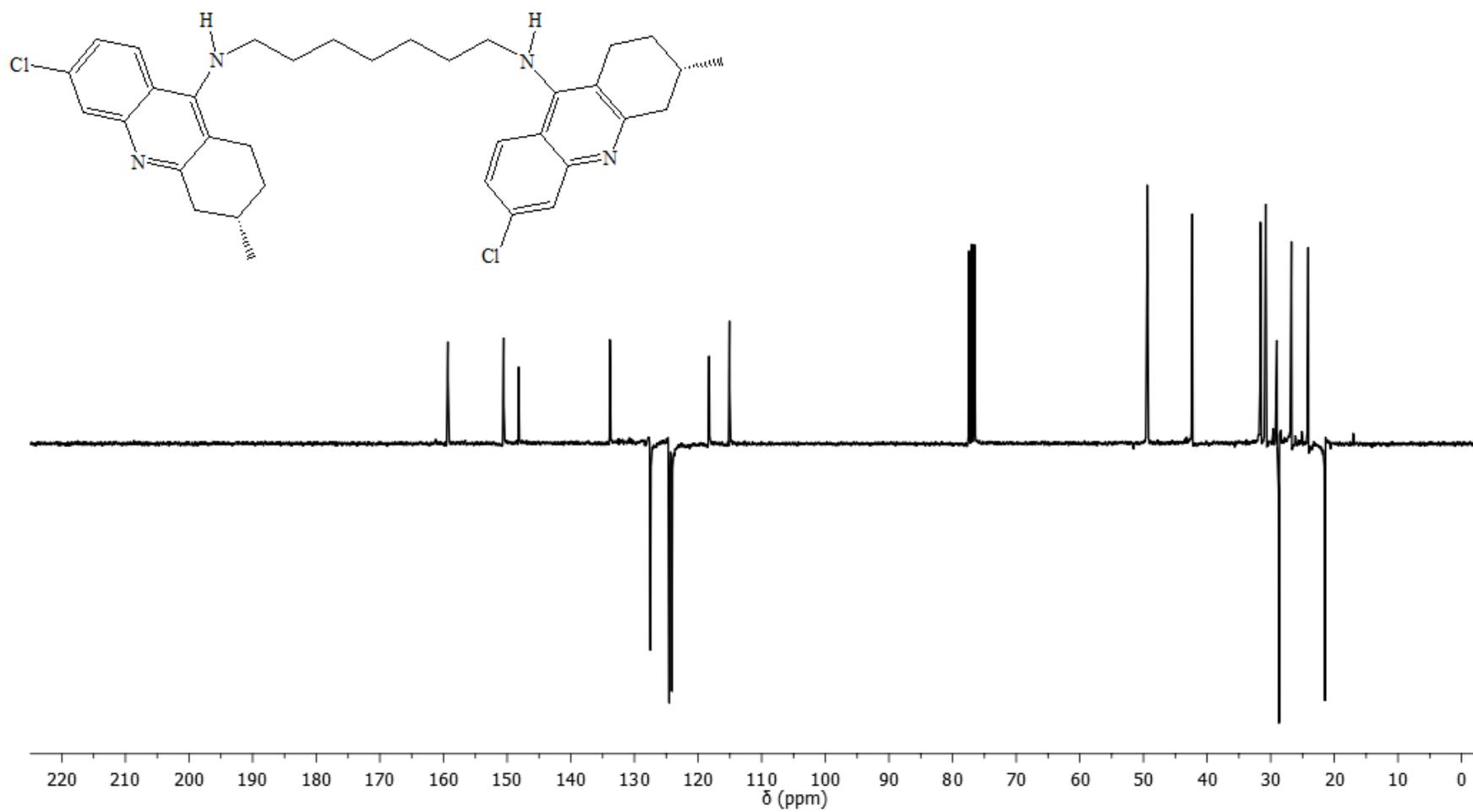
Anexo 30. Espectro de RMN bidimensional HMQC do homodímero (*R*)-33b.



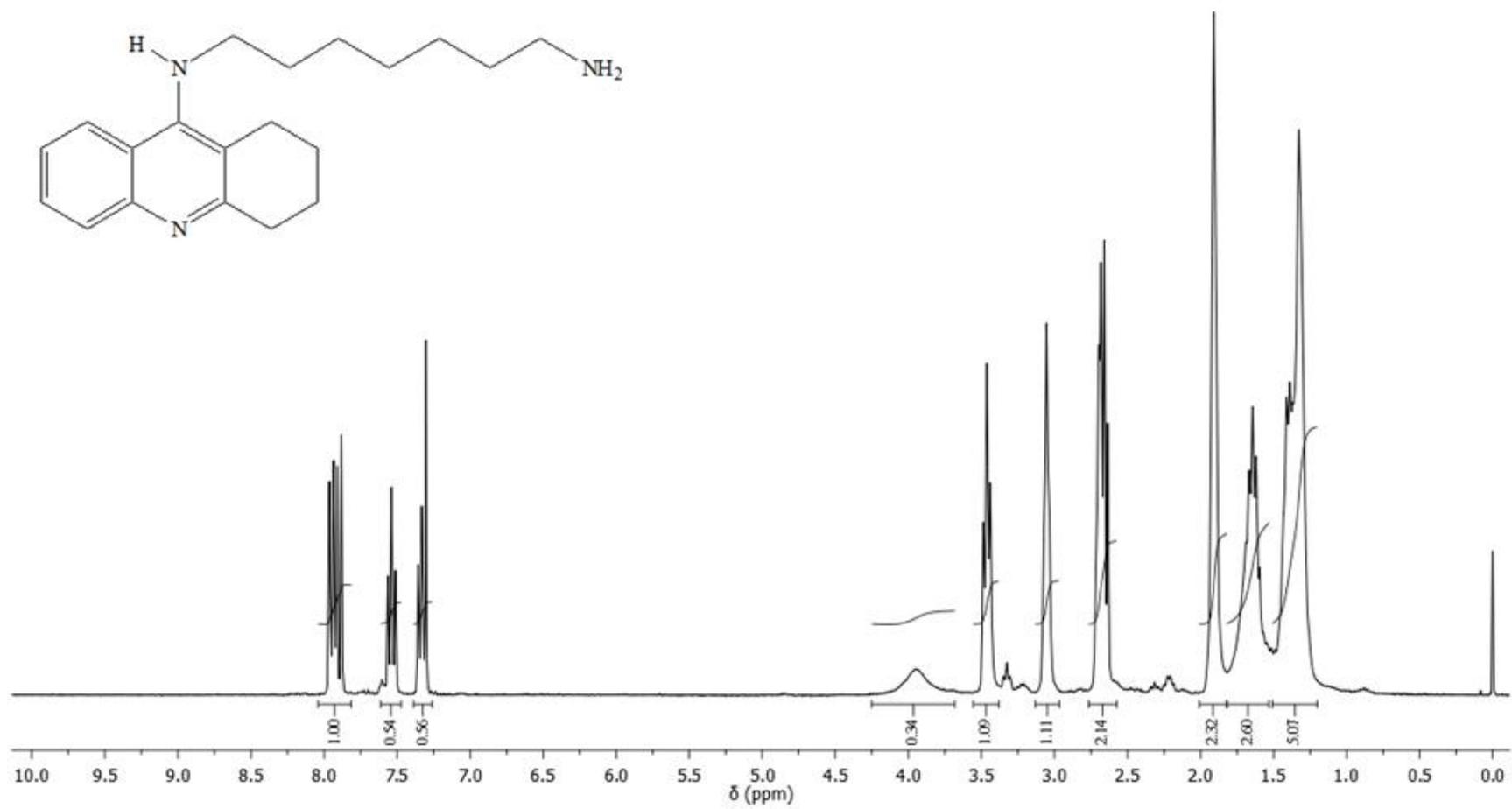
Anexo 31. Espectro de RMN bidimensional HMQC do homodímero (*R*)-**33b**, ampliação entre 1,0 e 4,0 ppm (^1H) e entre 20,0 e 50,0 ppm (^{13}C).



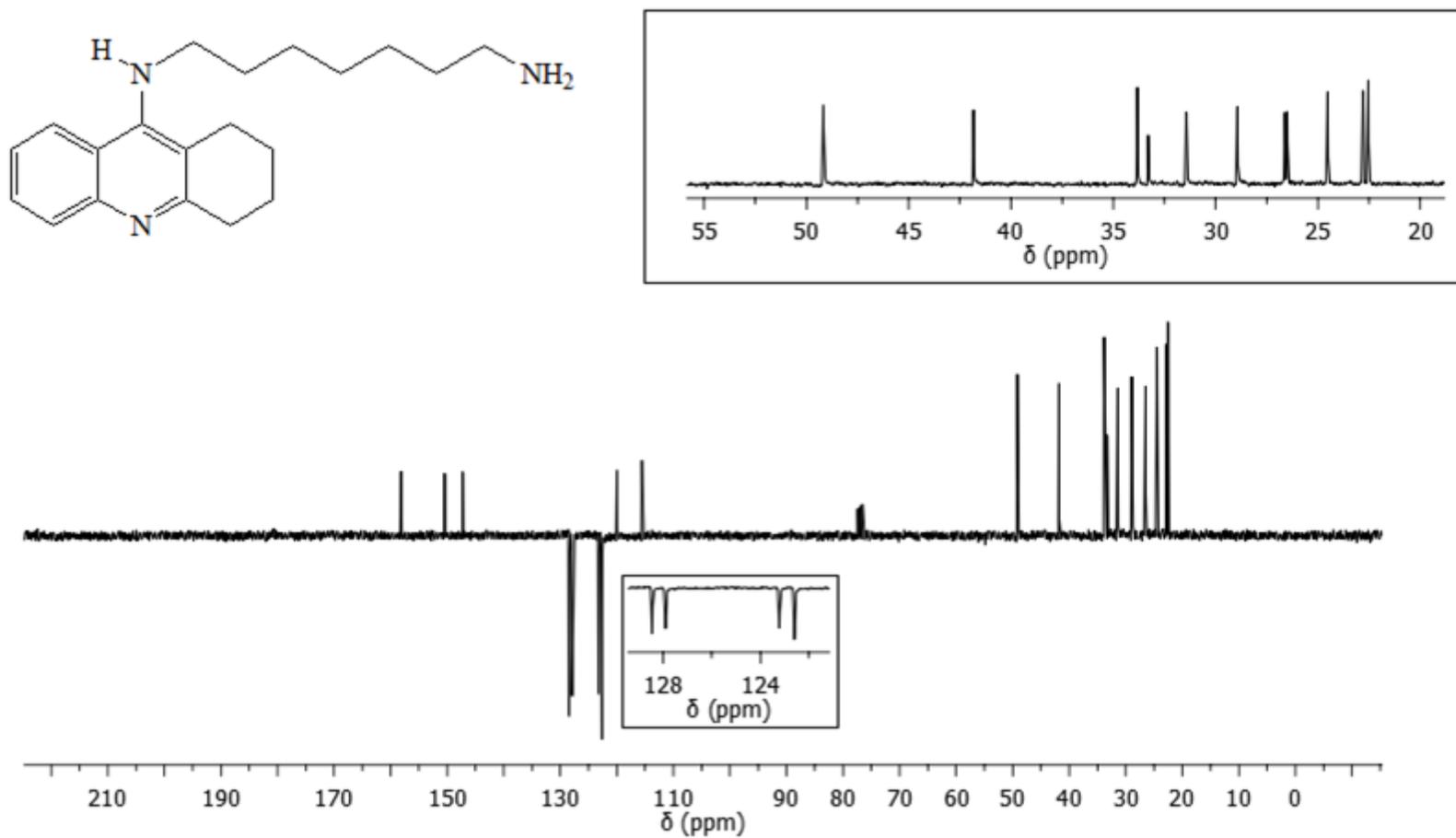
Anexo 32. Espectro de RMN de ¹H (CDCl₃, 300 MHz) do homodímero (S)-33b.



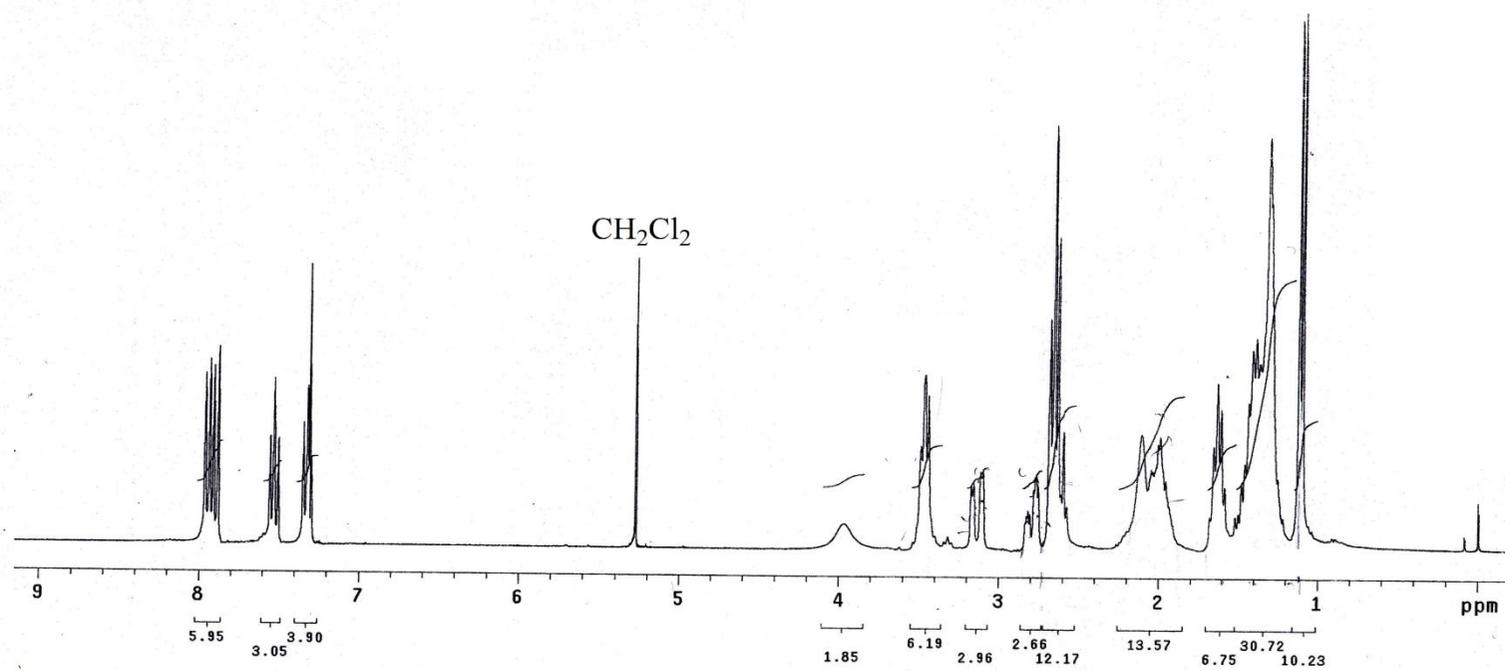
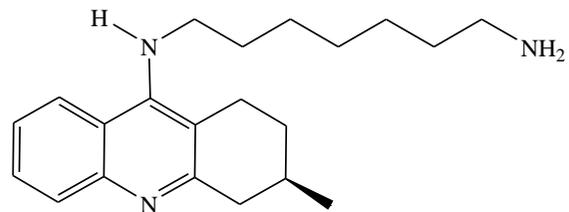
Anexo 33. Espectro de RMN de ¹³C (APT, CDCl₃, 75 MHz) do homodímero (S)-33b.



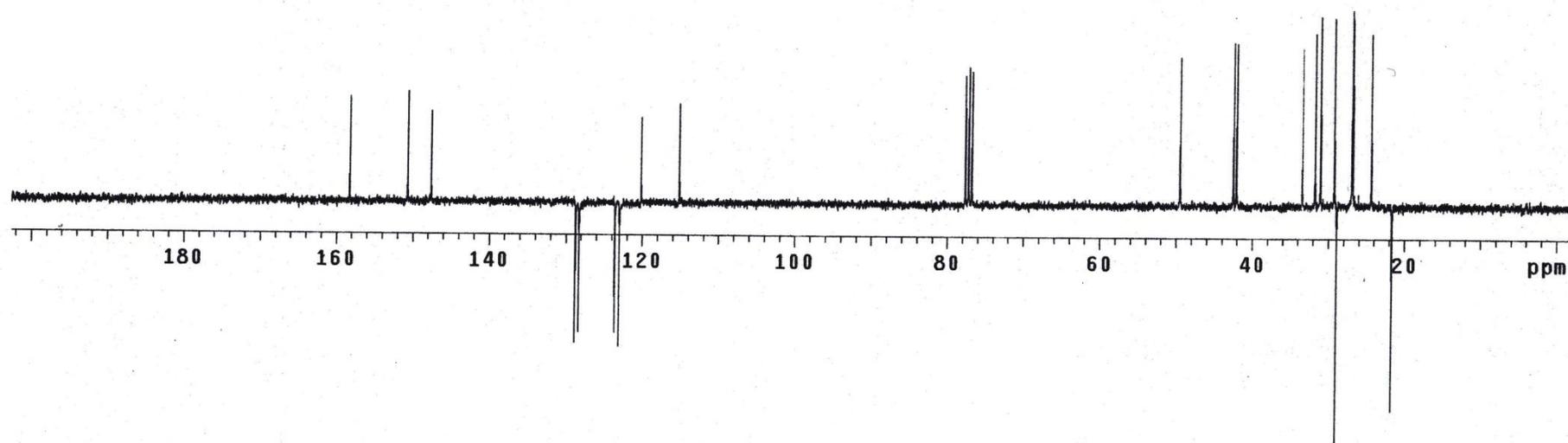
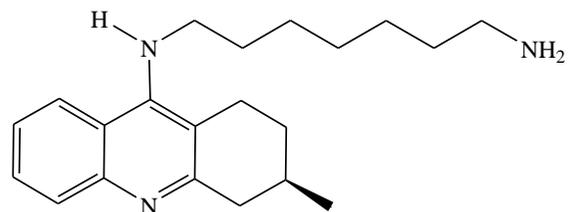
Anexo 34. Espectro de RMN de ¹H (CDCl₃, 300 MHz) da 9-(1,7-diaminoheptil)-1,2,3,4-tetraidroacridina, **39a**.



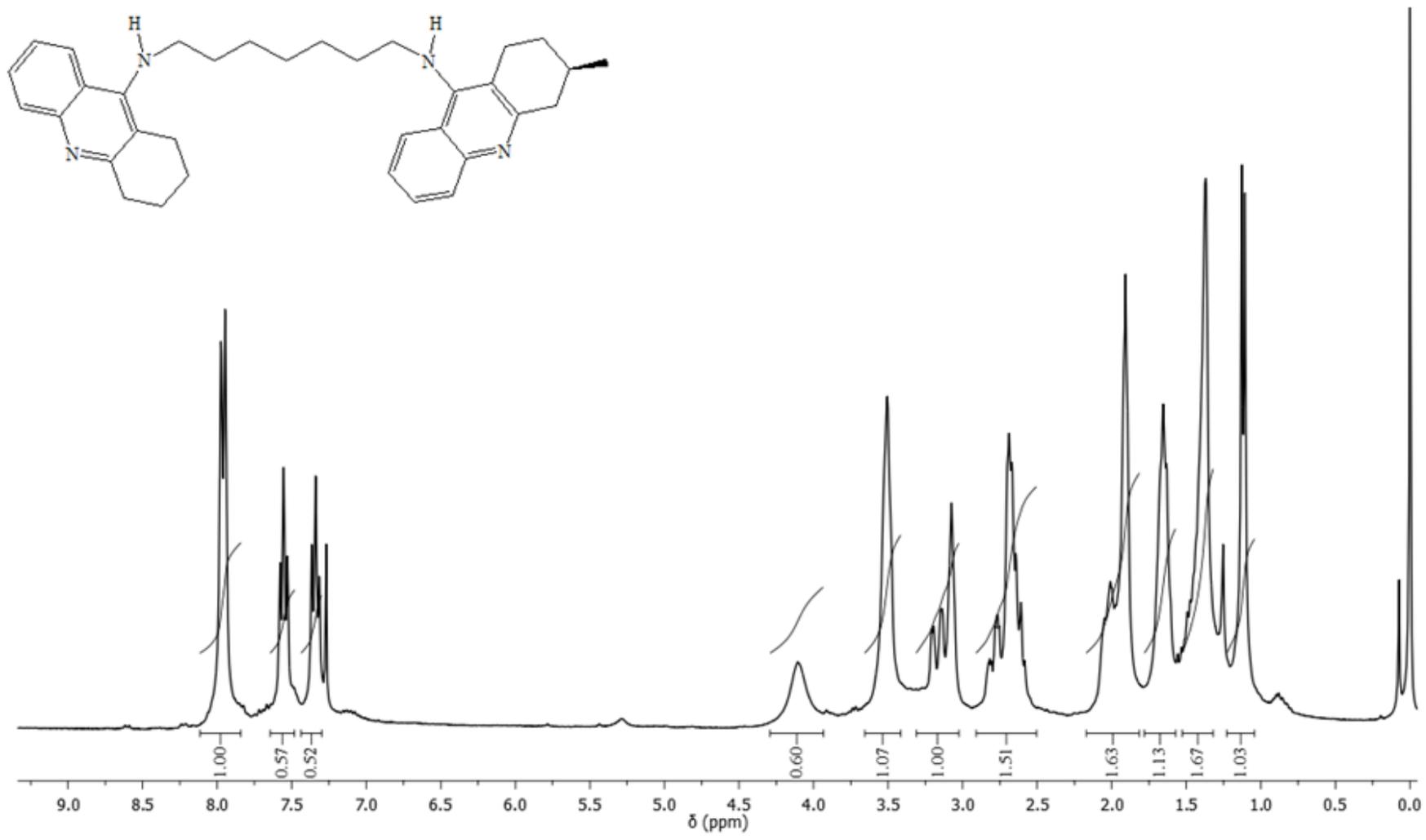
Anexo 35. Espectro de RMN de ¹³C (APT, CDCl₃, 75 MHz) da 9-(1,7-diaminoheptil)-1,2,3,4-tetraidroacridina, **39a**.



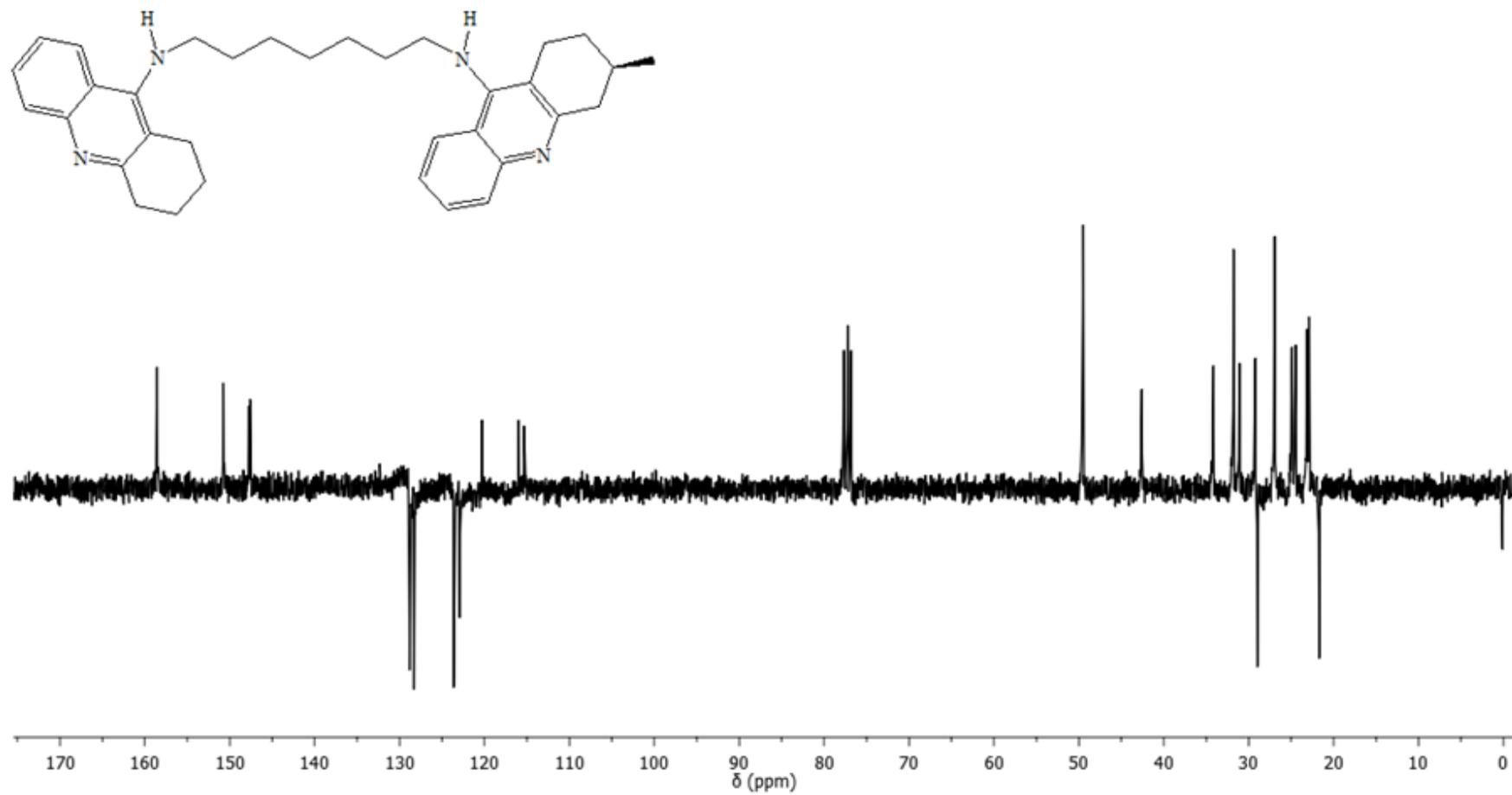
Anexo 36. Espectro de RMN de ¹H (CDCl₃, 300 MHz) da (R)-9-(1,7-diaminoheptil)-3-metil-1,2,3,4-tetraidroacridina, (R)-39b.



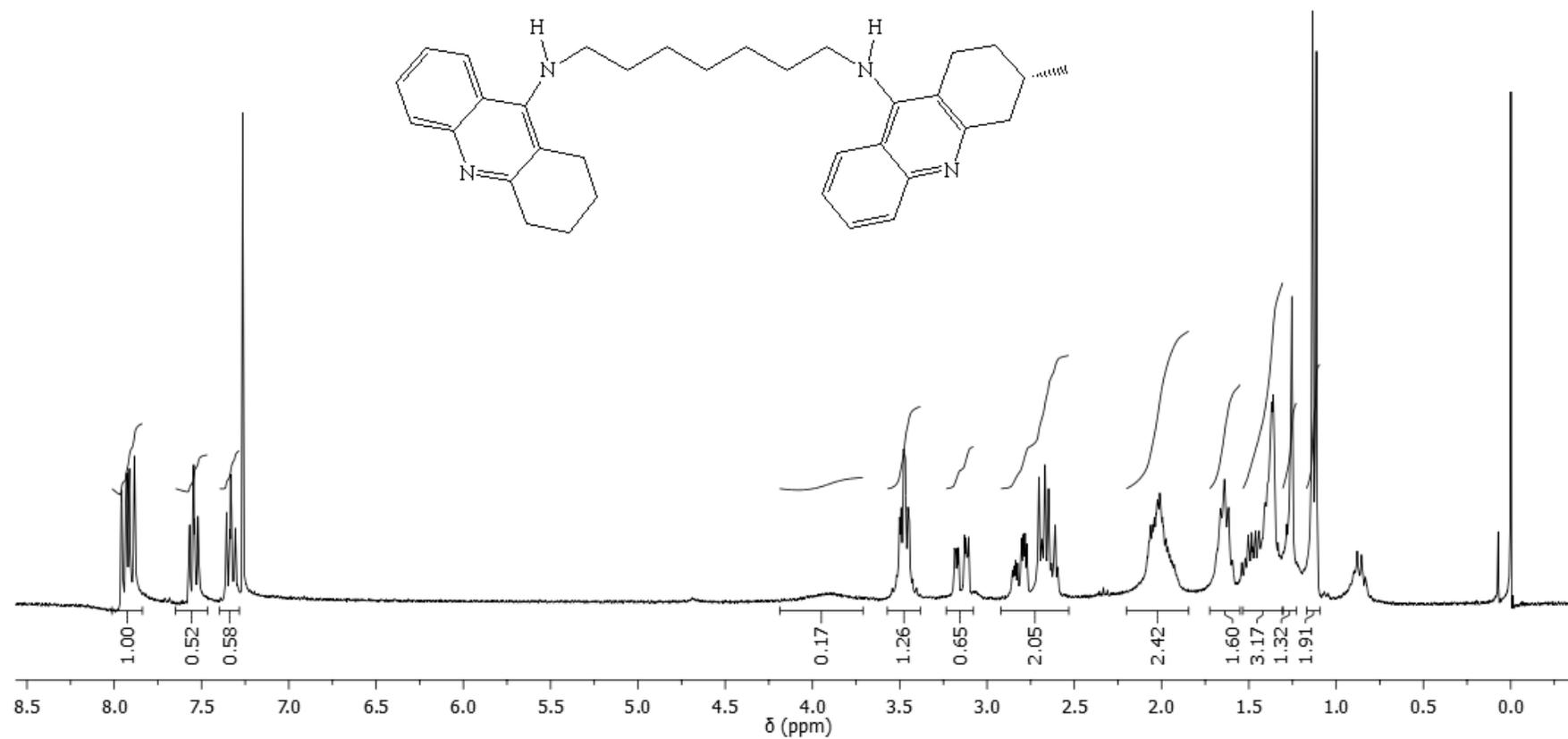
Anexo 37. Espectro de RMN de ^{13}C (APT, CDCl_3 , 75 MHz) da (R)-9-(1,7-diaminoheptil)-3-metil-1,2,3,4-tetraidroacridina, (R)-39b.



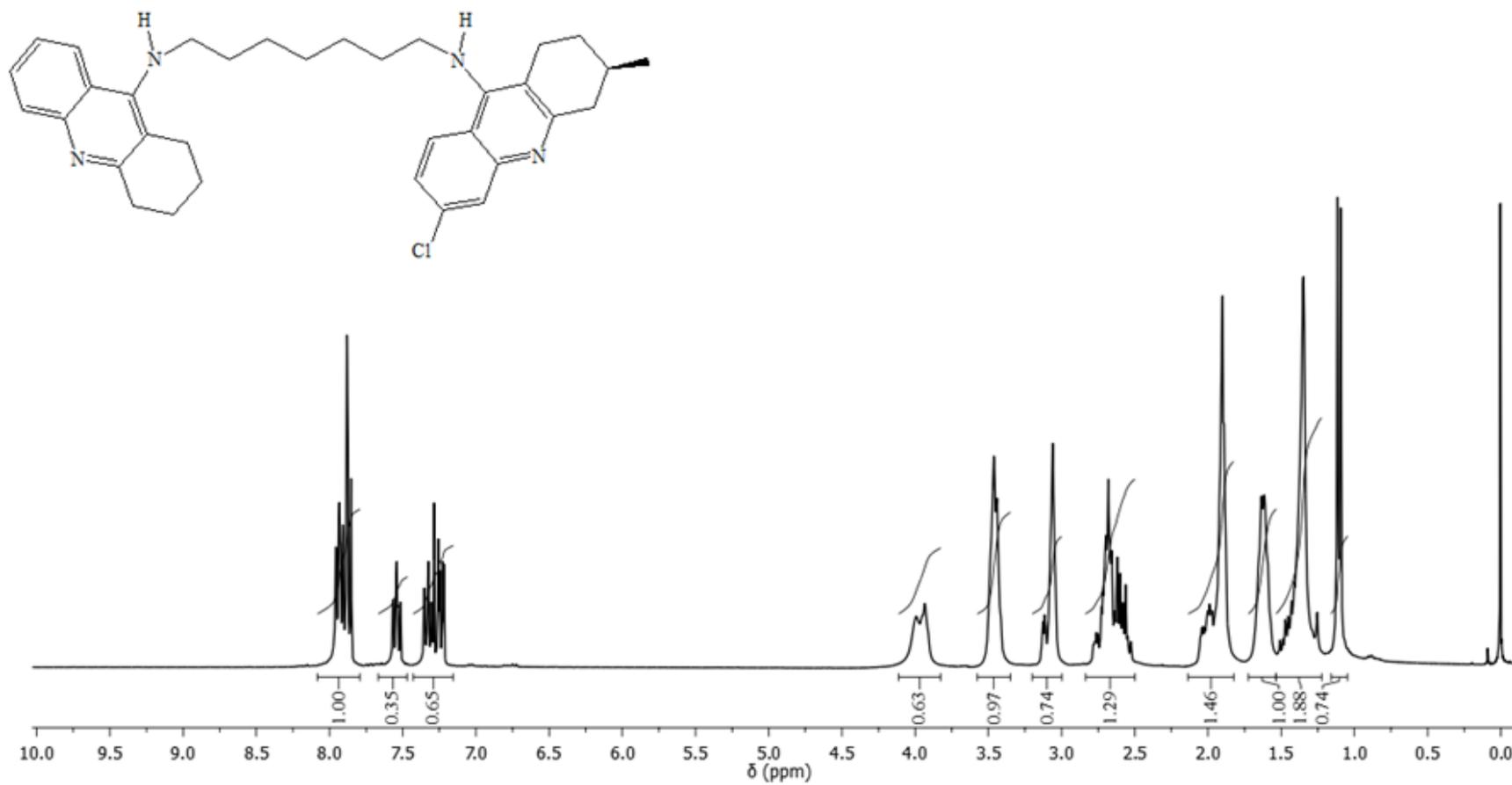
Anexo 38. Espectro de RMN de ¹H (CDCl₃, 300 MHz) do heterodímero (**R**)-40a.



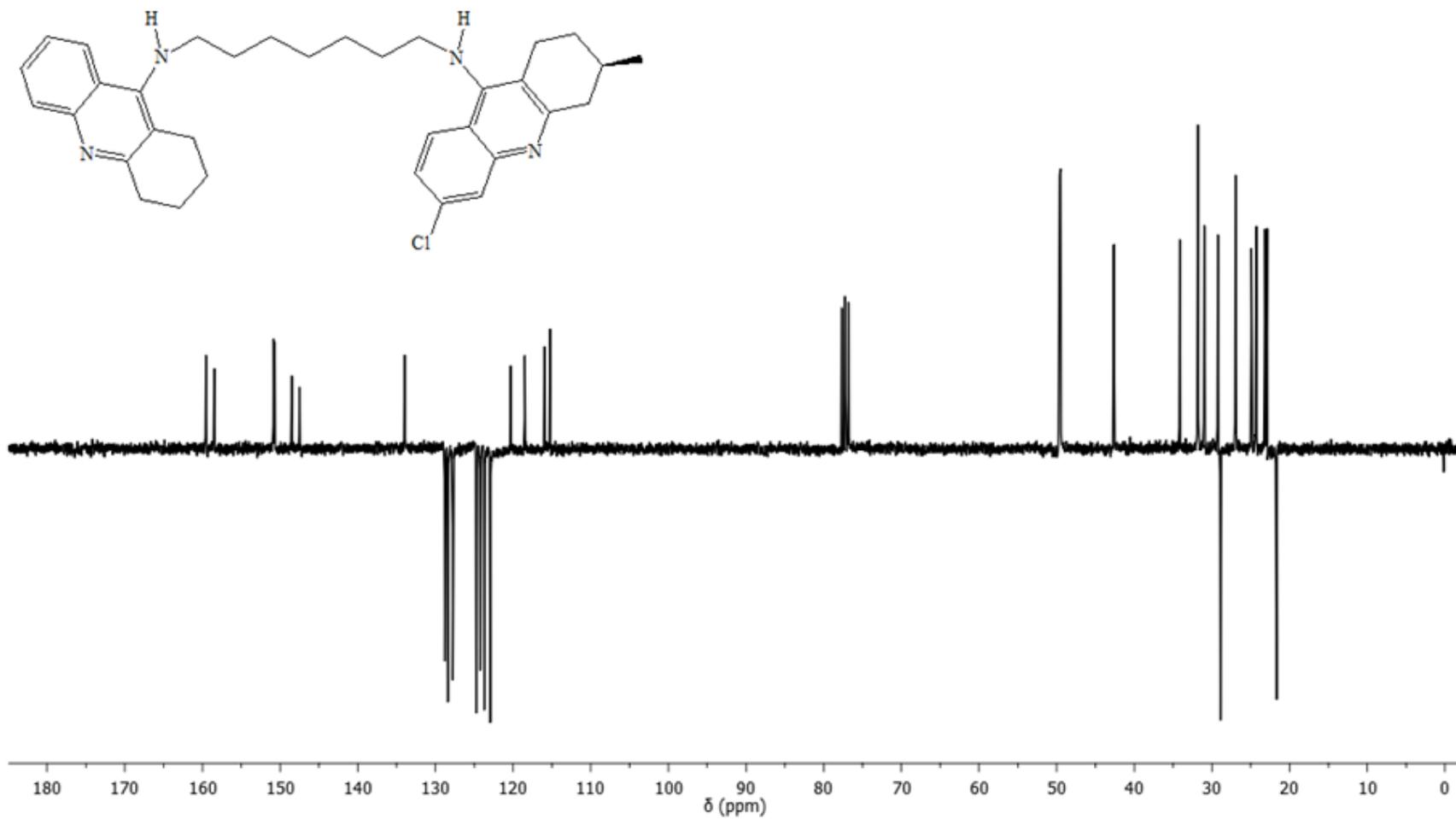
Anexo 39. Espectro de RMN de ^{13}C (APT, CDCl₃, 75 MHz) do heterodímero **(R)-40a**.



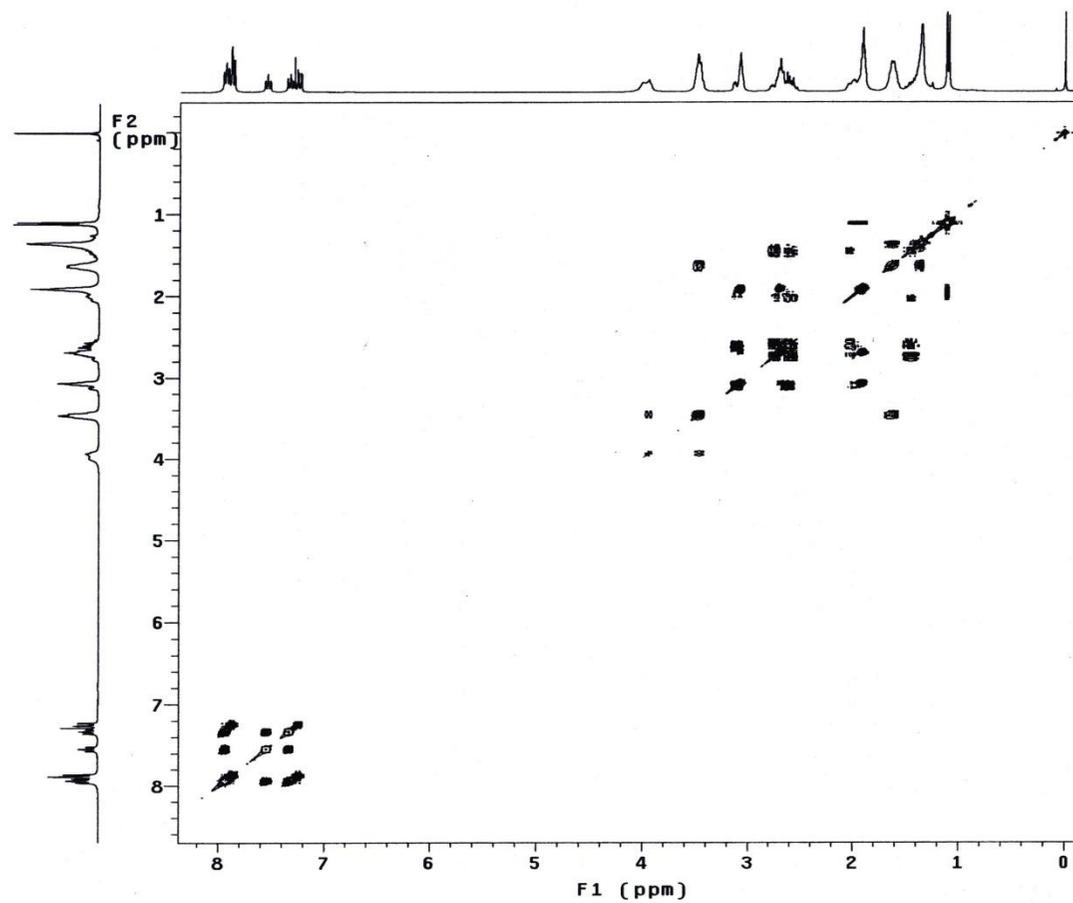
Anexo 40. Espectro de RMN de ^1H (CDCl_3 , 300 MHz) do heterodímero (S)-40a.



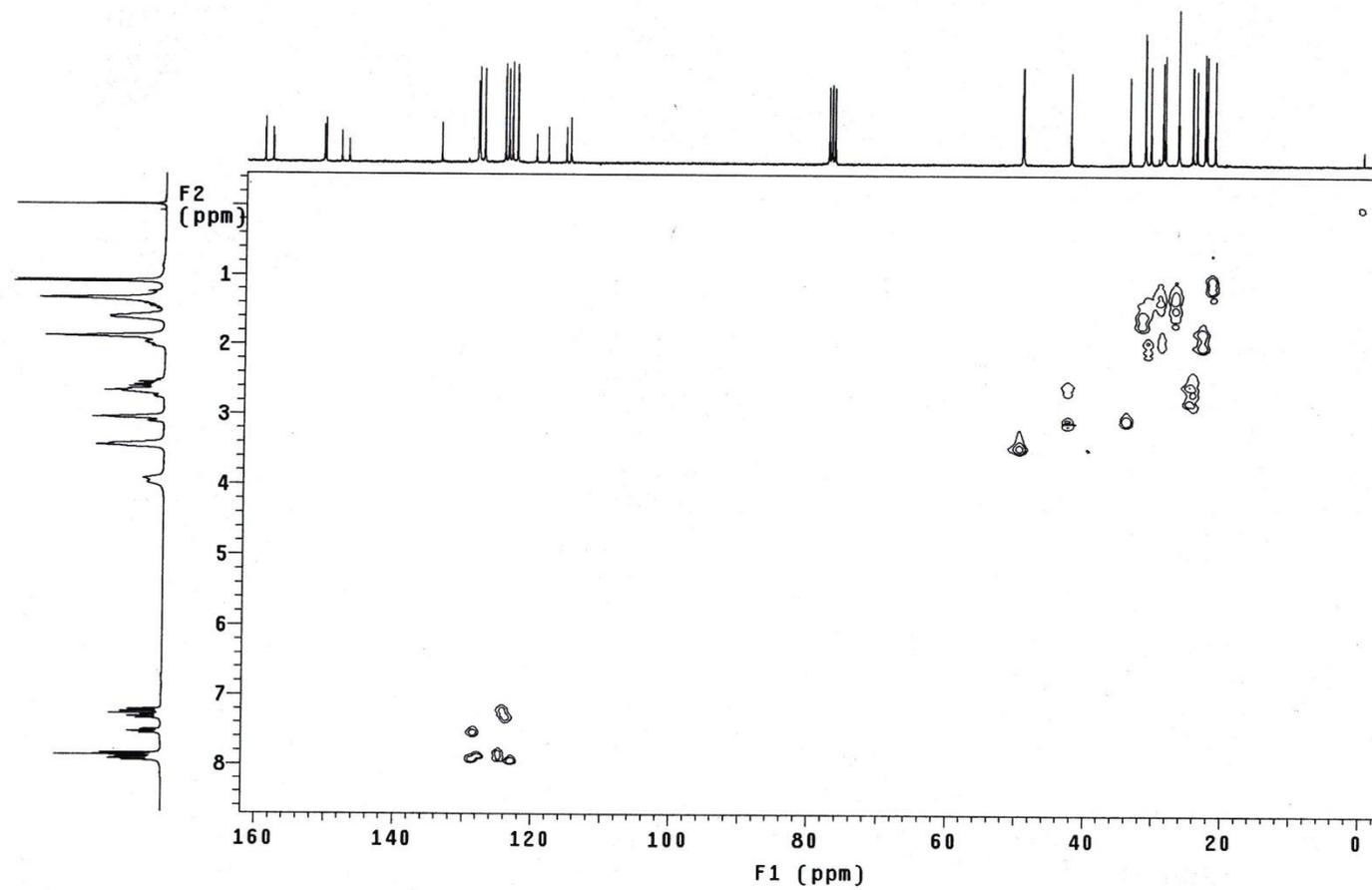
Anexo 41. Espectro de RMN de ^1H (CDCl_3 , 300 MHz) do heterodímero **(R)-40b**.



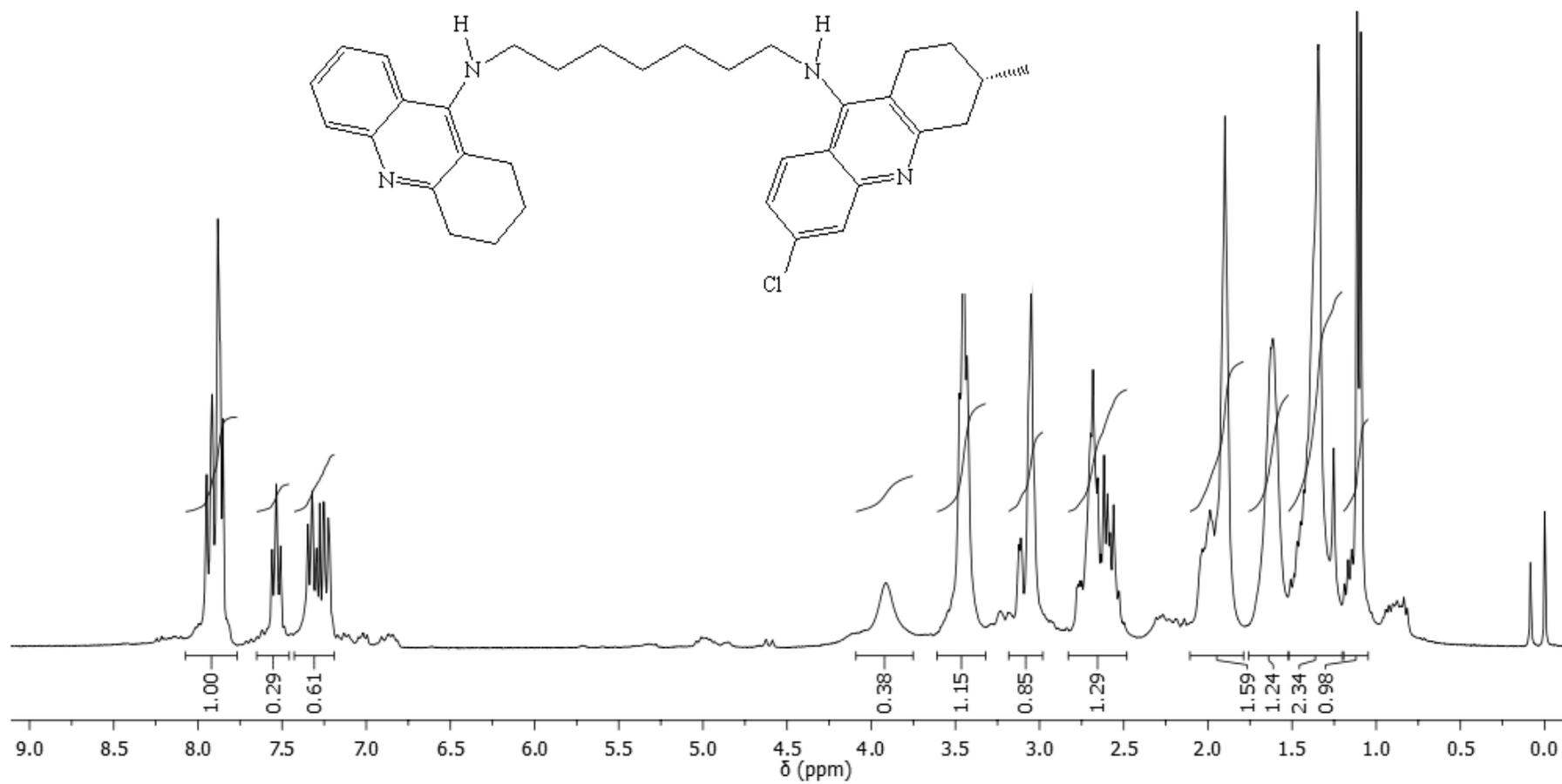
Anexo 42. Espectro de RMN de ^{13}C (APT, CDCl_3 , 75 MHz) do heterodímero **(R)-40b**.



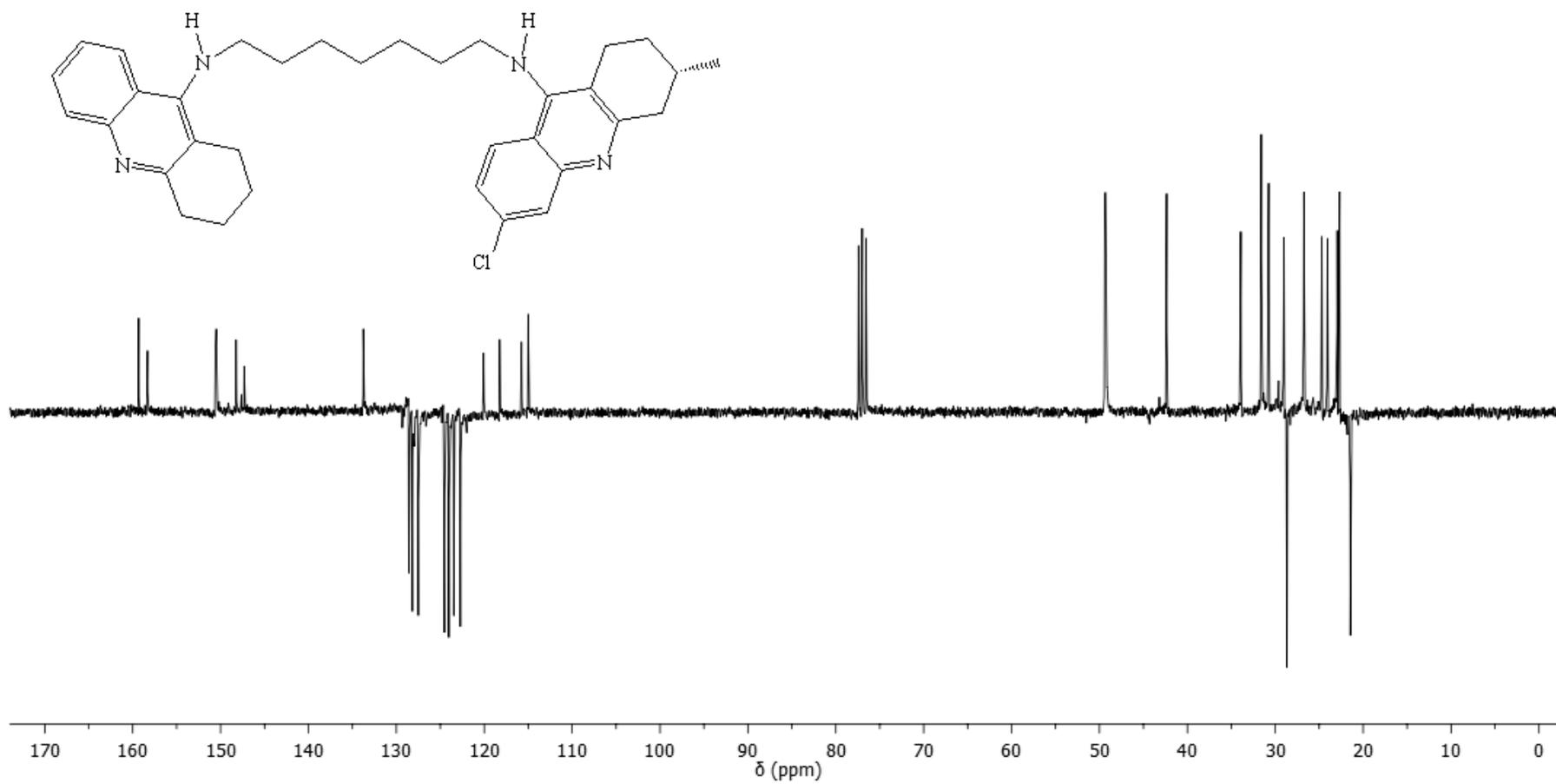
Anexo 43. Espectro de RMN bidimensional COSY do heterodímero (*R*)-40b.



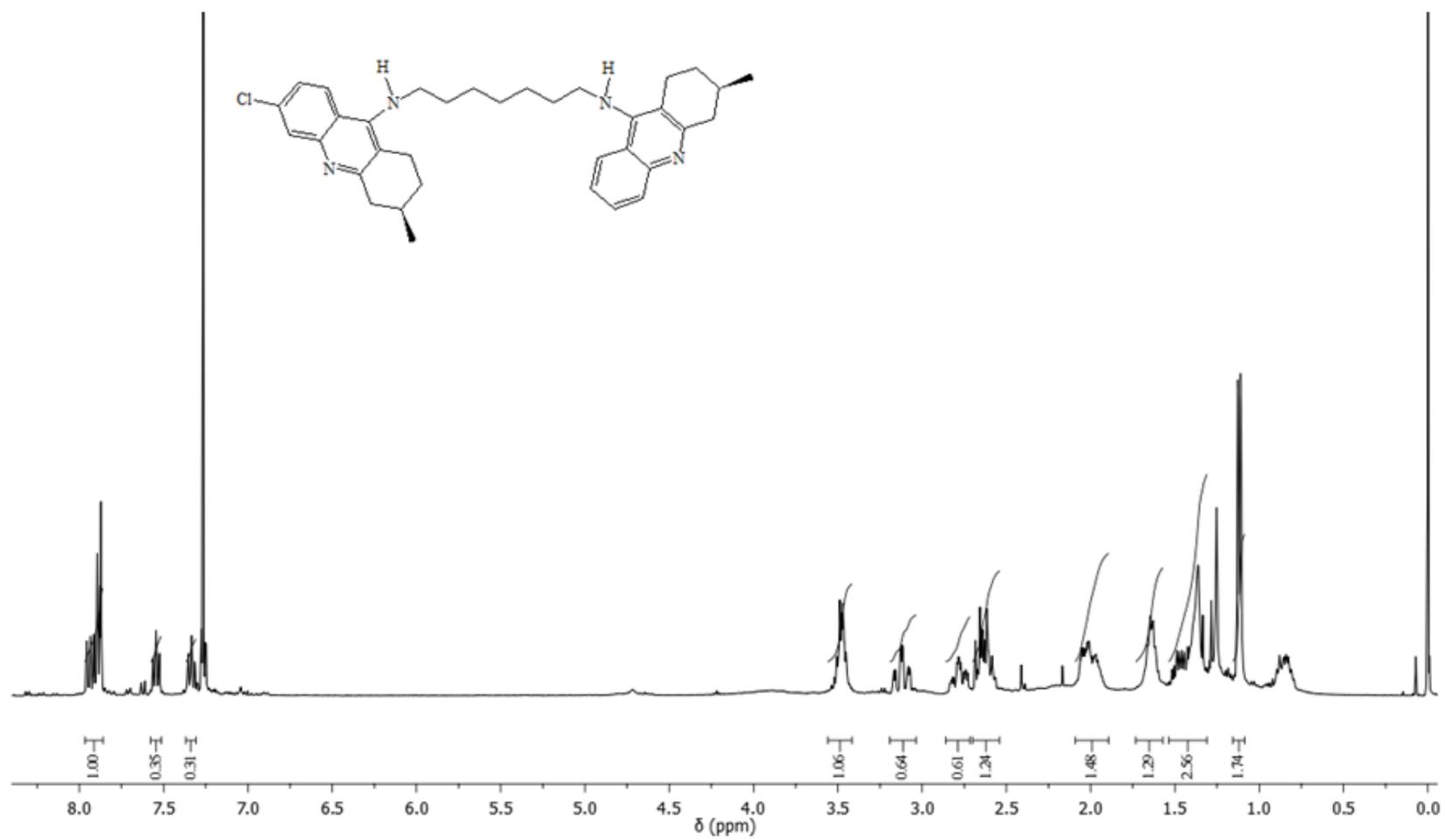
Anexo 44. Espectro de RMN bidimensional HMQC do heterodímero (*R*)-40b.



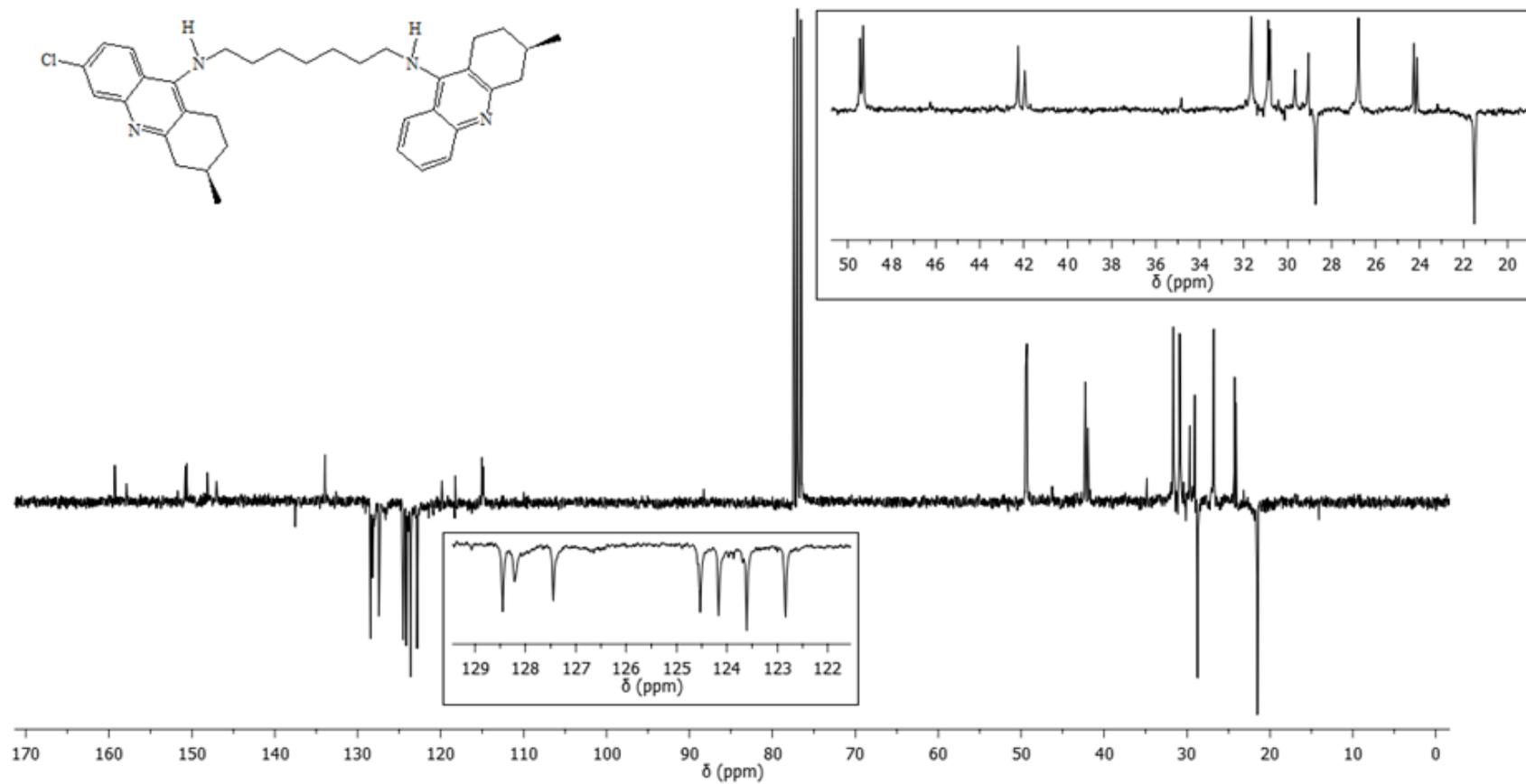
Anexo 45. Espectro de RMN de ¹H (CDCl₃, 300 MHz) do heterodímero (S)-40b.



Anexo 46. Espectro de RMN de ^{13}C (APT, CDCl_3 , 75 MHz) do heterodímero *(S)*-40b.



Anexo 47. Espectro de RMN de ¹H (CDCl₃, 300 MHz) do heterodímero **(R)-40c**.



Anexo 48. Espectro de RMN de ^{13}C (APT, CDCl_3 , 75 MHz) do heterodímero **(R)-40c**.