

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE QUIMICA

RENAN MICHAEL PILOTTI

**SÍNTESE DE HÍBRIDOS INIBIDORES DE COLINESTERASES CONTENDO OS
NÚCLEOS TACRINA E 4-ETINILBENZENOCINAMAMIDA**

Porto Alegre

2018

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE QUIMICA

RENAN MICHAEL PILOTTI

**SÍNTESE DE HÍBRIDOS INIBIDORES DE COLINESTERASES CONTENDO OS
NÚCLEOS TACRINA E 4-ETINILBENZENOCINAMAMIDA**

Trabalho de conclusão apresentado junto à atividade de ensino “Trabalho de Conclusão de Curso – QUI” do Curso de Química, como requisito parcial para a obtenção do grau de Bacharel em Química.

Prof. Dr. Marco Antonio Ceschi
Orientador

Profa. Dra. Leandra Franciscato Campo
Coorientadora

Porto Alegre
2018

AGRADECIMENTOS

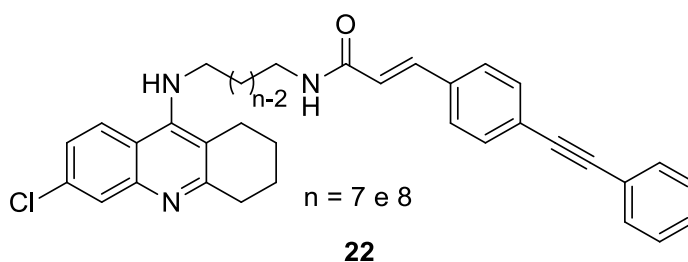
Agradeço aos meus pais, por todo amor, incentivo e apoio incondicional. Sem eles não seria possível me dedicar integralmente à graduação e à pesquisa; ao Dionatan Monteiro, por todo amor e companheirismo.

Ao Prof. Dr. Marco Antonio Ceschi, pela excelente orientação, dedicação e confiança dedicada a mim; à Profa. Dra. Leandra Franciscato, por se mostrar sempre acessível para momentos de dúvidas; à doutoranda Franciela Arenhart, que além de uma amiga, me ensinou muito sobre técnicas em síntese orgânica; aos colegas do laboratório K215 e K208B, por tornarem o ambiente de trabalho leve e descontraído.

Por fim, agradeço à UFRGS e aos professores do Instituto de Química pelo excelente ensino.

RESUMO

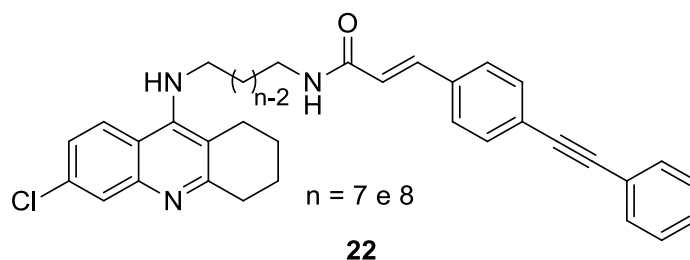
Neste trabalho, foram sintetizados dois híbridos inéditos contendo núcleos tacrina e 4-etinilbenzenocinamamida, unidos por uma cadeia espaçadora alquílica. Para a obtenção do núcleo tacrina, foi empregada a reação de Niementowsky e para a construção do derivado 4-etinilbenzenocinamamida foi empregada a reação de Sonogashira, seguida de uma condensação de Knoevenagel com modificação de Doebner. Os híbridos obtidos foram purificados por cromatografia em coluna e caracterizados por espectroscopia de ressonância magnética nuclear de hidrogênio e de carbono (RMN¹H e RMN¹³C) e espectroscopia no infravermelho (IV). As moléculas foram encaminhadas à Fundação Oswaldo Cruz para ensaios biológicos.



Palavras Chave: Doença de Alzheimer, Síntese, Híbridos, 4-etinilbenzenocinamamida, inibidores, colinesterases.

ABSTRACT

In this work, two unprecedented hybrids were synthesized containing nuclei tacrine and 4-ethynylbenzenecinnamamide, united by an alkyl spacer chain. In order to obtain the nucleus tacrine, the Niementowsky reaction was used. On the other hand, for the construction of the cinnamic acid derivatives, Sonogashira reaction followed by a condensation of Knoevenagel with Doebner modification were applied. The obtained hybrids were purified by column chromatography and characterized by nuclear magnetic resonance spectroscopy of hydrogen and carbon (^1H NMR and ^{13}C NMR) and infrared spectroscopy (IR). The molecules were sent to the Oswaldo Cruz Foundation for biological assays.



Keywords: Alzheimer's Disease, Synthesis, Hybrids, 4-ethynylbenzenecinnamamide, inhibitors, cholinesterases.

LISTA DE ESQUEMAS

Esquema 1. Biossíntese da acetilcolina (ACh).....	13
Esquema 2. Reação de hidrólise da acetilcolina.....	13
Esquema 3. Mecanismo de hidrólise da ACh catalisada pela AChE (adaptado de Patrick). ¹⁶	15
Esquema 4. Reação de obtenção da 6,9-dicloro-1,2,3,4-tetraidroacridina.....	24
Esquema 5. Mecanismo proposto para a formação da 6,9-dicloro-1,2,3,4-tetraidroacridina.....	24
Esquema 6. Preparação dos intermediários 6-cloro-9-alquilamino-1,2,3,4-tetraidroacridinas.....	25
Esquema 7. Mecanismo proposto para a formação das 6-cloro-9-alquilamino-1,2,3,4-tetraidroacridinas.....	26
Esquema 8. Reação de acoplamento cruzado de Sonogashira.....	27
Esquema 9. Reação para obtenção do derivado do ácido cinâmico.....	27
Esquema 10. Reação de obtenção dos híbridos contendo os núcleos tacrina e 4-etinilbenzenocinamamida.....	27
Esquema 11. Mecanismo para a reação de acoplamento entre o ácido carboxílico e a amina intermediária.....	28

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Representação de um neurônio multipolar piramidal encontrado principalmente no hipocampo e no córtex cerebral.	12
Figura 2. Representação da sinapse colinérgica (adaptada de Bear et al)	13
Figura 3. Representação esquemática dos quatro subsítios presentes no CAS da AChE e estrutura de alguns aminoácidos (adaptada de Houghton et al)	16
Figura 4. Representação esquemática das enzimas AChE e BuChE (adaptada de Bajda et al)	17
Figura 5. Estrutura molecular de fármacos aprovados para o tratamento da DA.....	18
Figura 6. Estrutura do composto bis(n)-tacrina	19
Figura 7. Representação de um dímero bis(n)-tacrina interagindo com o CAS e com o PAS da AChE (adaptada de Pang et al)	19
Figura 8. Exemplo de moléculas híbridas multialvo contendo diferentes núcleos.	21
Figura 9. Estrutura do ácido cinâmico e seus derivados.	21
Figura 10. Estrutura química de cinamamidas bioativas.	22
Figura 11. Retrossíntese proposta neste trabalho.....	23
Figura 12. Espectro de RMN ¹ H (CDCl ₃ , 400MHz) do composto 22b	29
Figura 13. Ampliação do espectro de RMN ¹ H (CDCl ₃ , 400MHz) do composto 22b ..	29
Figura 14. Espectro de RMN de ¹³ C-APT (CDCl ₃ , 75 MHz) do composto (22b). a) ampliação entre 84 e 170 ppm; b) ampliação entre 17 e 55 ppm.....	31
Figura 15. Espectro de infravermelho do composto 22b em filme.	32

ABREVIATURAS

δ	Deslocamento Químico
Ach	Acetilcolina
AchE	Acetilcolinesterase
AF	Ácido Ferúlico
Aβ	β -amiloide
BuChE	Butirilcolinesterase
CAS	Sítio Catalítico
CCD	Cromatografia em Camada Delgada
ChAT	Colina Acetiltransferase
DA	Doença de Alzheimer
EDC	1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida
HOBt	1-hidroxibenzotriazol
IV	Espectroscopia no Infravermelho
J	Constante de Acoplamento
PAS	Sítio Periférico
RMN¹H	Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio
RMN¹³C	Ressonância Magnética Nuclear de Carbono
TMS	Tetrametilsilano

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	9
2 OBJETIVOS	10
2.1 OBJETIVO GERAL	10
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	10
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	11
3.1 DOENÇA DE ALZHEIMER	11
3.2 HIPÓTESE COLINÉRGICA	12
3.3 ENZIMAS COLINESTERASES	14
3.4 ESTRATÉGIA DE TRATAMENTO	17
3.4.1 Compostos do tipo bis-tacrina	19
3.5 HÍBRIDOS CONTENDO DIFERENTES NÚCLEOS	20
3.5.1 Derivados do Ácido Cinâmico e Cinamamida	21
4 RESULTADOS E DISCUSSÕES	23
4.1 SÍNTESE DA 6,9-DICLORO-1,2,3,4-TETRAIDROACRIDINA	23
4.2 SÍNTESE DOS INTERMEDIÁRIOS 6-CLORO-9-ALQUILAMINO-1,2,3,4-TETRAIDROACRIDINAS	25
4.3 SÍNTESE DO ÁCIDO (<i>E</i>)-3-(4-(FENILETINIL)FENIL)ACRÍLICO	26
4.4 SÍNTESE DOS HÍBRIDOS CONTENDO NÚCLEOS TACRINA E 4-ETINILBENZENOCINAMAMIDA	27
5 CONCLUSÕES	33
6 PARTE EXPERIMENTAL	33
6.1 EQUIPAMENTOS	33
6.2 MATERIAIS E MÉTODOS	34
6.2.1 Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear	34
6.2.2 Espectroscopia no Infravermelho	34
6.2.3 Solventes e Reagentes	34
6.3 PROCEDIMENTOS	35
6.3.1 Preparação da 6,9-dicloro-1,2,3,4-tetraidroacridina (3)	35
6.3.2 Procedimento Geral para a Preparação das 6-cloro-9-alkilamino-1,2,3,4-tetraidroacridinas (13a-b)	35
6.3.2.1 N ¹ -(6-cloro-1,2,3,4-tetraidroacridina-9-il)heptano-1,7-diamina (13a)	36
6.3.2.2 N ¹ -(6-cloro-1,2,3,4-tetraidroacridina-9-il)octano-1,8-diamina (13b)	36

6.3.3	Preparação do Composto Intermediário 4-(feniletinil)benzaldeído (20)	36
6.3.4	Preparação do Ácido (<i>E</i>)-3-(4-(feniletinil)fenil)acrílico (22).....	37
6.3.5	Procedimento Geral para a Preparação dos Híbridos Tacrina-4- etinilbenzenocinamamida.....	37
6.3.5.1	(<i>E</i>)-N-(7-((6-cloro-1,2,3,4-tetraidroacridina-9-il)amino)heptil)-3-(4- (feniletinil)fenil)acrilamida (22a).....	37
6.3.5.2	(<i>E</i>)-N-(8-((6-cloro-1,2,3,4-tetraidroacridina-9-il)amino)octil)-3-(4- (feniletinil)fenil)acrilamida (22b)	38
	REFERÊNCIAS	38

1 INTRODUÇÃO

A doença de Alzheimer (DA) é uma desordem neurodegenerativa progressiva que afeta mais de 35 milhões de pessoas em âmbito mundial. Além disso, a DA é a forma mais comum de demência e sua etiologia permanece ainda indefinida, embora um progresso considerável tenha sido alcançado na compreensão de seus mecanismos bioquímicos e genéticos.

Apesar de não existir cura para DA, existem tratamentos medicamentosos que aliviam seus sintomas. Para isso, a principal linha de tratamento vigente dessa doença emprega o uso de inibidores reversíveis de enzimas colinesterases, que atuam de forma a restaurar os níveis do neurotransmissor acetilcolina no cérebro. A inibição é dita reversível quando o inibidor ocupa o sítio ativo da enzima, impedindo que o substrato se ligue a ela e, à medida que a concentração de substrato aumenta, o inibidor se dissocia permitindo que a enzima reestabeleça sua atividade.

Por conta dos efeitos colaterais associados aos fármacos utilizados no tratamento da DA, há um intenso estudo de novas moléculas que podem vir a ser empregadas no seu tratamento. Essas novas moléculas visam a uma maior potência de inibição enzimática e também a alguma outra propriedade biológica que venha a interagir com algum fator da DA. Uma estratégia é a de hibridização molecular, em que dois ou mais núcleos bioativos são combinados em uma única molécula, contribuindo para uma ação multialvo.

A tacrina foi o primeiro fármaco aprovado para seu uso no tratamento da DA e, apesar de seu uso ter sido descontinuado por conta de sua hepatotoxicidade, possui importante relevância no desenvolvimento de novos híbridos, assim como os seus derivados. Da mesma forma, produtos naturais, como o ácido cinâmico e seus derivados, são de grande importância em química medicinal por conta de seus baixos efeitos colaterais e por possuírem uma gama de diferentes atividades biológicas. Assim, moléculas híbridas contendo núcleos tacrina e cinamamidas são alvos interessantes quando se visa a uma possível ação frente aos diferentes fatores que contribuem na patogênese da DA. Núcleos cinâmicos podem apresentar ligações do tipo π com os resíduos de aminoácidos aromáticos dos sítios enzimáticos das enzimas colinesterases, potencializando assim sua inibição.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Síntese, caracterização e avaliação biológica de híbridos inibidores das enzimas colinesterases contendo núcleos tacrina e 4-etinilbenzenocinamamida.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Síntese da 6,9-dicloro-1,2,3,4-tetraidroacridina empregando a reação de Niementowski como estratégia sintética;
- Síntese do ácido (*E*)-3-(4-(feniletinil)fenil)acrílico pela reação de Sonogashira, seguida de uma condensação de Knoevenagel com modificação de Doebner;
- Síntese dos compostos intermediários 6-cloro-9-alkilamino-1,2,3,4-tetraidroacridinas;
- Síntese dos híbridos contendo núcleos tacrina e 4-etinilbenzenocinamamida, separados por uma cadeia espaçadora metilênica;
- Purificação e caracterização dos compostos sintetizados;
- Encaminhamento dos produtos para avaliar a inibição das enzimas acetilcolinesterase (AChE) e butirilcolinesterase (BuChE).

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 DOENÇA DE ALZHEIMER

A doença de Alzheimer (DA) é uma desordem neurodegenerativa progressiva que afeta grandes áreas do córtex cerebral e do hipocampo.¹ Estima-se que mais de 35 milhões de pessoas são afetadas pela doença no mundo, sendo ela a forma mais comum de demência. Mais da metade dos casos em autópsias e em séries clínicas são atribuídos à DA. Também é estimado que a morte do paciente ocorre entre 3 e 9 anos após o seu diagnóstico.² Outra característica da DA é a grande perda de massa e volume cerebral nas regiões majoritariamente afetadas, sendo essas atribuídas à diminuição e à perda de processos neuronais.^{3,4}

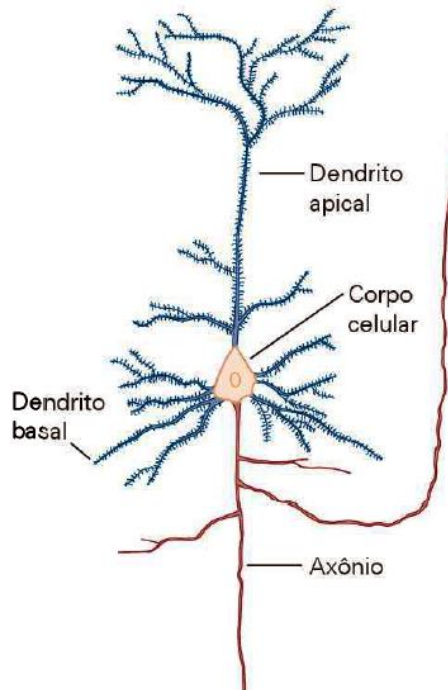
Os sintomas ocasionados pela DA variam entre os indivíduos. O sintoma inicial mais comum é a perda na capacidade de recordar novas informações, visto que os primeiros neurônios a serem danificados e destruídos geralmente estão nas regiões do cérebro envolvidas na formação de novas memórias. Conforme os neurônios de outras partes do cérebro também são danificados e destruídos, outras dificuldades são reportadas. Os sintomas mais comuns incluem dificuldades no planejamento ou na solução de problemas, dificuldades em completar tarefas domésticas ou no trabalho, confusão com o tempo ou lugar, entre outros.⁵

As características patológicas presentes no cérebro de pessoas portadoras da DA incluem a maciça perda sináptica e morte neuronal nas regiões responsáveis pelo processo cognitivo, deposição de agregados tóxicos de placas de proteínas β -amiloide ($A\beta$) no cérebro, acúmulo de emaranhados neurofibrilares de proteína tau - provenientes de sua hiperfosforilação, estresse oxidativo e inflamação.⁶⁻⁹ A partir dessas informações, diferentes hipóteses foram levantadas visando a uma melhor compreensão da DA, tais como a hipótese colinérgica,¹⁰ a hipótese da disfunção glutamatérgica,¹¹ a hipótese do cascata amiloide,¹² a hipótese oligomérica,¹³ a hipótese metálica,¹⁴ entre outras.¹⁵

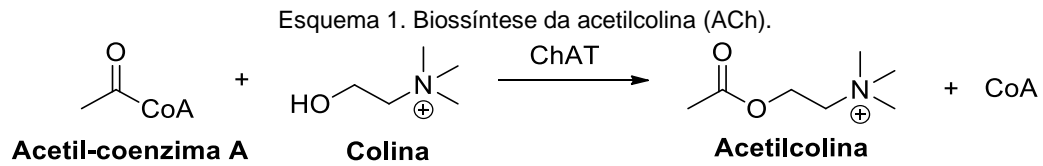
3.2 HIPÓTESE COLINÉRGICA

Uma célula nervosa individual é chamada de neurônio e, tipicamente, possui quatro regiões definidas: o corpo celular, os dendritos, o axônio e os terminais pré-sinápticos (Figura 1). Para transmissão de uma mensagem, existem espaços em zonas especializadas de comunicação chamadas de sinapses.¹⁶ A célula nervosa que transmite o sinal é chamada de célula pré-sináptica e a célula receptora do sinal é chamada pós-sináptica. Entre elas, há um espaço muito estreito chamado de fenda sináptica. Comumente, o terminal pré-sináptico, localizado nas ramificações do axônio, termina nos dendritos dos neurônios pós-sinápticos.¹⁷

Figura 1. Representação de um neurônio multipolar piramidal encontrado principalmente no hipocampo e no córtex cerebral.¹⁷



O primeiro estágio para que a sinapse ocorra envolve a biossíntese de acetilcolina (ACh), o neurotransmissor mais utilizado no sistema nervoso. A acetilcolina é biossintetizada a partir da colina e da acetil-coenzima A, catalisada pela enzima colina acetiltransferase (ChAT) (Esquema 1).



Após, a acetilcolina é incorporada a vesículas para fim de transporte à fenda sináptica. A chegada de um sinal nervoso leva a uma abertura dos canais iônicos de cálcio e a um aumento na concentração de cálcio intracelular. Isso induz as vesículas a se fundirem com a membrana celular e liberar a ACh na fenda sináptica. A ACh atravessa a fenda sináptica e liga-se ao receptor colinérgico, resultando na estimulação do neurônio pós-sináptico. Após essa interação, a ACh é hidrolisada pela enzima acetilcolinesterase (AChE), que se encontra ancorada no neurônio pós-sináptico. Os produtos resultantes da hidrólise são colina e ácido acético (Esquema 2). A colina é absorvida pelo neurônio pré-sináptico por uma proteína de transporte para continuar o ciclo.¹⁶ Uma representação desse ciclo é apresentada na Figura 2.

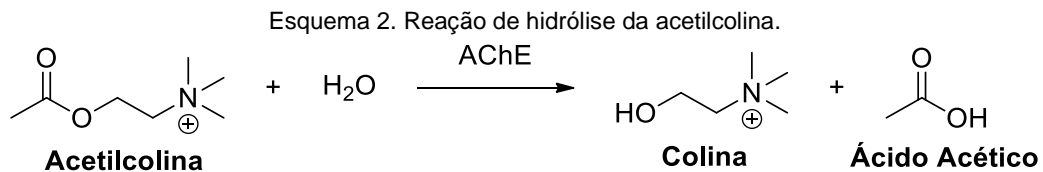
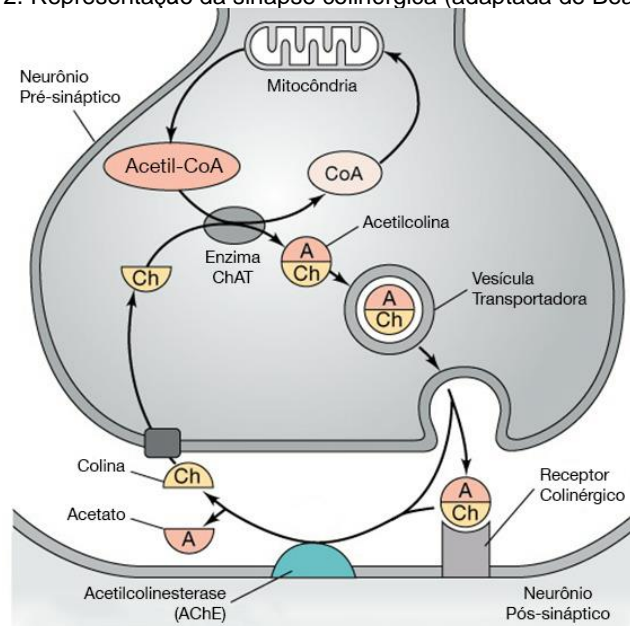


Figura 2. Representação da sinapse colinérgica (adaptada de Bear et al).¹⁸



A hipótese colinérgica foi estabelecida para explicar os déficits cognitivos e de memória em pacientes acometidos pela DA.¹⁹ Ela é sustentada pelas observações de que a DA está relacionada com a deficiência da enzima ChAT (responsável pela síntese do neurotransmissor ACh) e também com a redução de neurônios colinérgicos, o que comprometem a função colinérgica.²⁰ A neurotransmissão colinérgica possui um papel vital na função cognitiva, especificamente na codificação de atenção e memória.²¹ Atualmente, quase todos os medicamentos para o tratamento da DA baseiam-se na inibição reversível das enzimas colinesterases, com a finalidade de aumentar os níveis de acetilcolina na fenda sináptica e reduzir os déficits cognitivos.²²

3.3 ENZIMAS COLINESTERASES

As colinesterases pertencem à família de enzimas que hidrolisam ésteres de colina e estão divididas em dois subgrupos: acetilcolinesterase (AChE, EC 3.1.1.7) e butirilcolinesterase (BuChE, EC 3.1.1.8). A AChE possui um papel muito bem definido na regulação da sinalização colinérgica, enquanto que o papel da BuChE ainda não é muito bem definido.^{23,24}

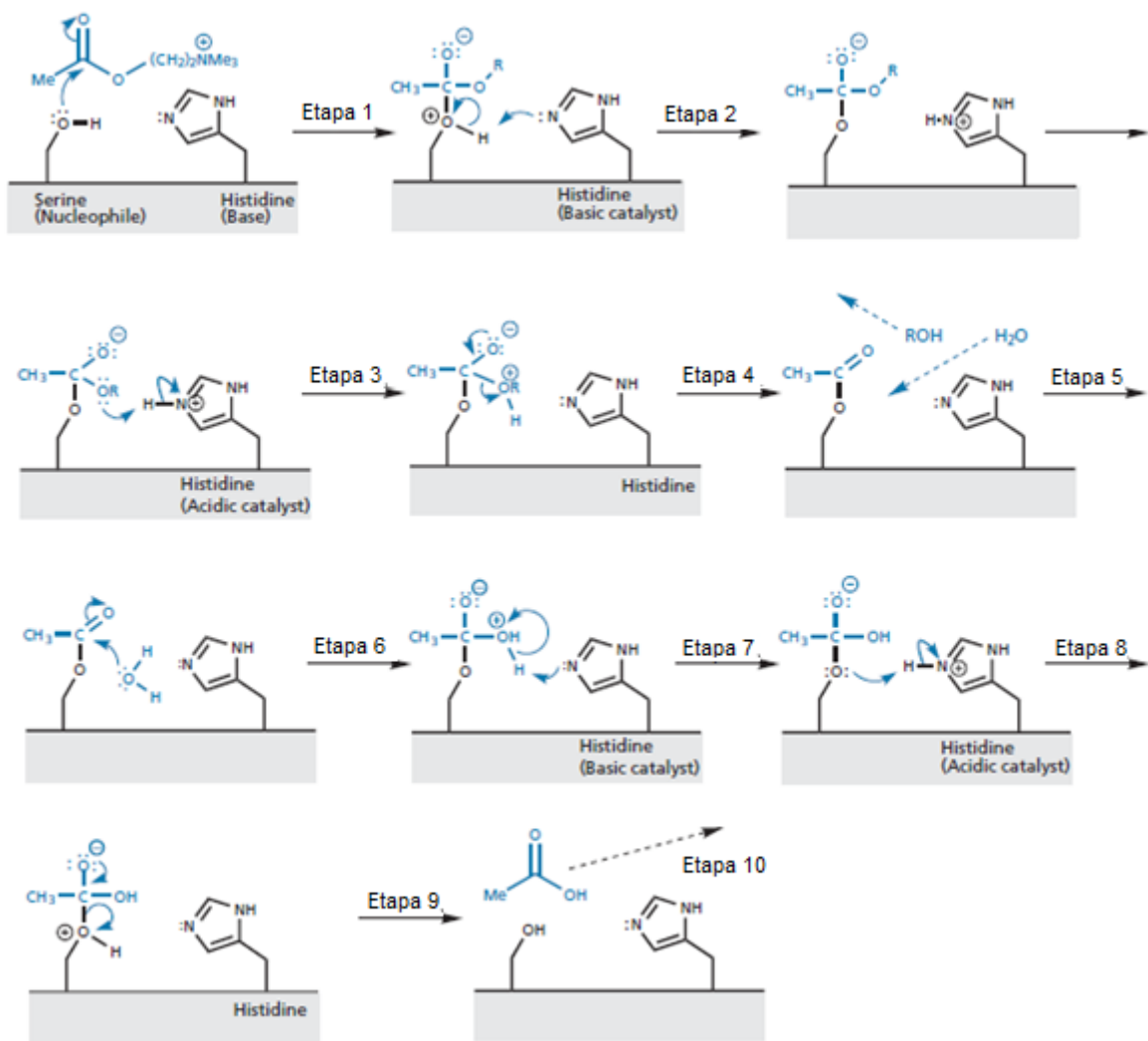
A AChE está localizada principalmente nas fendas sinápticas do sistema nervoso central e periférico e nas membranas dos glóbulos vermelhos. Ela é responsável por terminar os impulsos nervosos ao catalisar a hidrólise da ACh.²⁵ Já a BuChE é capaz de hidrolisar a butirilcolina e é relativamente abundante no plasma sanguíneo (cerca de 3 mg L⁻¹). Sabe-se que ela possui sua importância como enzima desintoxicante contra inibidores irreversíveis de colinesterases, como os organofosforados neurotóxicos.²⁴ No entanto, a AChE é 10¹³ vezes mais potente na hidrólise da ACh do que a BuChE nas mesmas condições de temperatura e pH.²⁶

Estruturalmente, ambas enzimas são semelhantes, possuindo estruturas terciárias e quaternárias muito parecidas. Seus sítios catalíticos apresentam a mesma tríade catalítica composta por três resíduos de aminoácidos (serina, glutamato e histidina), localizados no fundo de uma cavidade de aproximadamente 20 Å de profundidade.^{27,28} O mecanismo proposto para a hidrólise da ACh é apresentado no Esquema 3.¹⁶

Primeiramente, há uma aproximação da acetilcolina e a hidroxila do resíduo serina atua como nucleófilo, realizando um ataque à carbonila da ACh. Na etapa 2, o

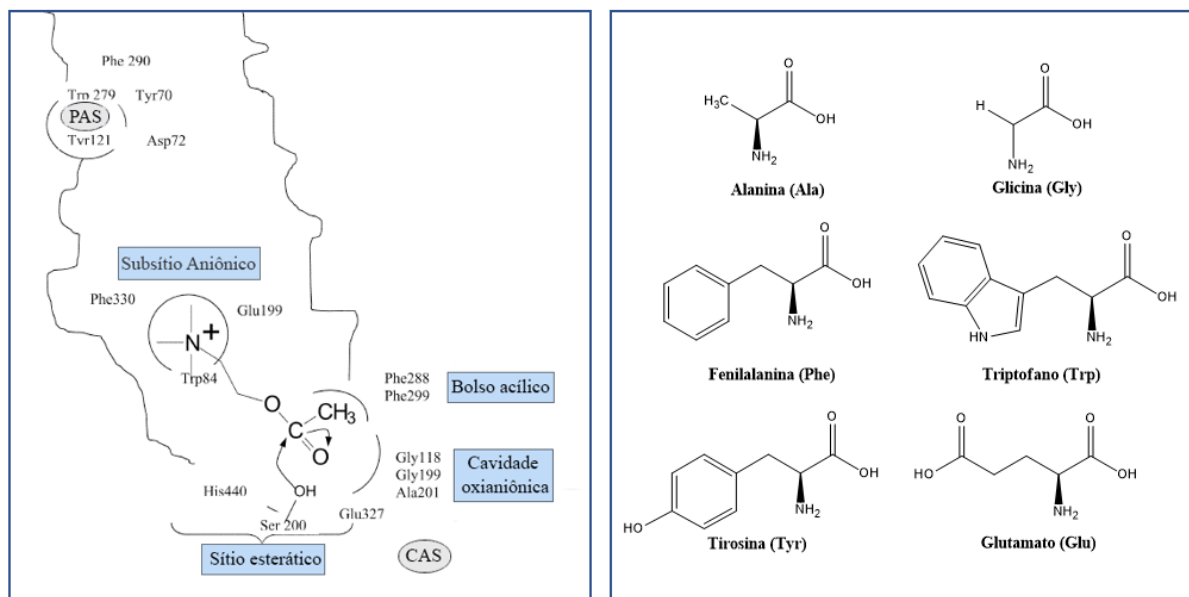
resíduo de aminoácido histidina atua como base ao desprotonar o intermediário protonado. Em seguida na etapa 3, o resíduo histidina atua como um catalisador ácido ao protonar o grupo alcóxi (OR), transformando-o em um bom grupo de saída. Na etapa 4, a carbonila é restaurada e elimina o grupo de saída colina. A colina deixa o sítio ativo da enzima e há uma aproximação de uma molécula de água. Após, na etapa 6, a água atua como um nucleófilo ao atacar a carbonila para formar um intermediário tetraédrico. Em 7, a histidina atua novamente como catalisador básico, desprotonando o intermediário protonado. A histidina atua com catalisador ácido ao protonar o oxigênio do resíduo da serina na etapa 8 e, na etapa 9, o grupo carboxila é restaurado e elimina o resíduo serina. Por fim, o ácido acético deixa o local do sítio ativo da enzima, e o ciclo pode ser repetido.¹⁶

Esquema 3. Mecanismo de hidrólise da ACh catalisada pela AChE (adaptado de Patrick).¹⁶



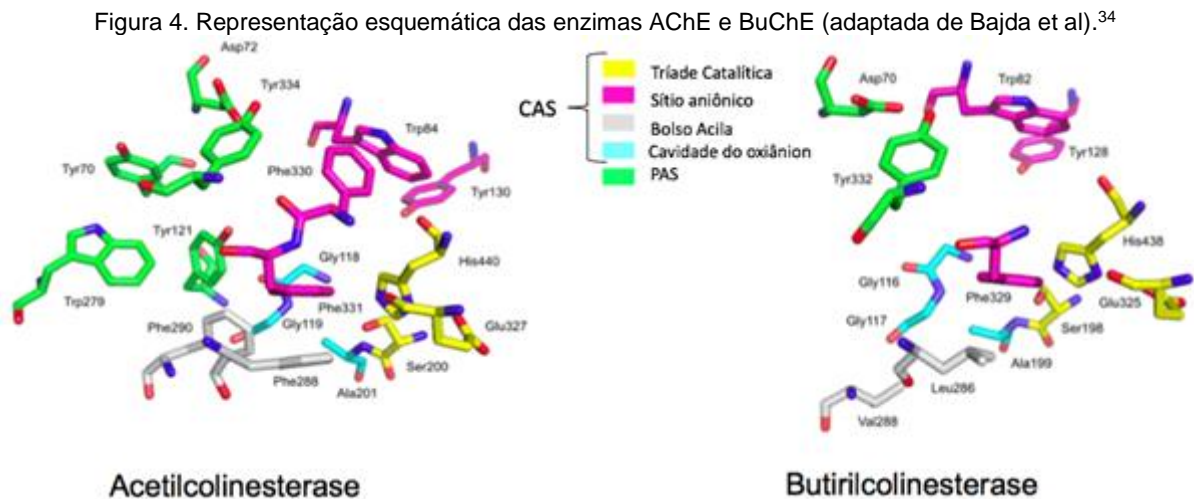
Embora o processo de hidrólise ocorra no sítio catalítico (CAS) no fundo da cavidade, acredita-se que a ligação inicial de ACh ocorra na entrada da cavidade da AChE, em uma região chamada sítio periférico (PAS). No fundo da cavidade, onde ocorre a hidrólise, existem quatro subsítios principais, sendo estes o “sítio esterático”, a “cavidade oxianiônica”, o “subsítio aniônico” e o “bolso acílico”.²⁸ Os quatro subsítios estão representados na Figura 3.

Figura 3. Representação esquemática dos quatro subsítios presentes no CAS da AChE e estrutura de alguns aminoácidos (adaptada de Houghton et al).²⁸



O sítio esterático é responsável por realizar a catálise da hidrólise, contendo a tríade catalítica Ser200, His440 e Glu327.²⁹ A “cavidade oxianiônica” possui os resíduos Gly118, Gly119 e Ala201. Esses três resíduos de aminoácidos contêm doadores de ligação de hidrogênio e estabilizam o intermediário tetraédrico da ACh que é formado durante o processo catalítico.³⁰ O “subsítio aniônico” é em grande parte composto de resíduos aromáticos (Trp84, Phe330 e Glu199) e acredita-se que estes interajam com a porção catiônica da Ach, através de interações do tipo π -cátion. A carga positiva presente no átomo de nitrogênio da Ach pode formar uma interação estável com os sistemas π ricos em elétrons dos anéis aromáticos.³¹ O “bolso acílico” apresenta os resíduos volumosos Phe288 e Phe290, responsáveis por desempenhar um papel importante na limitação da dimensão dos substratos que são capazes de entrar no sítio ativo da AChE.³²

Embora o processo de hidrólise ocorra no sítio catalítico (CAS) no fundo da cavidade, acredita-se que a ligação inicial da ACh ocorre na entrada da cavidade, em uma região chamada sítio periférico (PAS). A grande diferença entre a AChE e a BuChE está no PAS e no subsítio existente no CAS. Na BuChE, os resíduos de aminoácidos Phe288 e o Phe290 presentes no “bolso acílico” do CAS da AChE são substituídos por Leu286 e Val288. Esses resíduos alifáticos têm dimensões menores que os resíduos aromáticos e, portanto, o subsítio presente no CAS da BuChE possui um volume maior do que o da AChE. Isso permite que substratos maiores, como a butirilcolina, sejam catalisados no CAS.²⁴ Da mesma forma, no PAS da BuChE são encontrados resíduos de aminoácidos alifáticos menos volumosos do que os aromáticos Tyr70, Tyr121 e Trp279 encontrados no PAS da AChE.³³



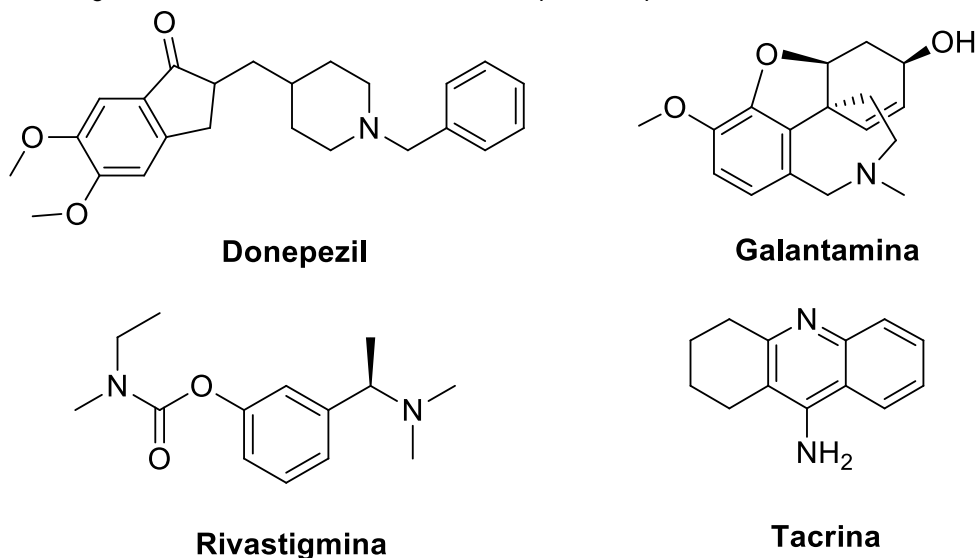
3.4 ESTRATÉGIA DE TRATAMENTO

Atualmente não existe cura para a DA, porém existem tratamentos que visam a minimizar os sintomas da doença. Dessa forma, inibidores reversíveis de colinesterases foram documentados como alvos críticos para o manejo da DA, através da restauração dos níveis do neurotransmissor ACh.²² A tacrina (9-amino-1,2,3,4-tetra-hidroacridina) ($IC_{50} = 167$ nM) foi descrita em 1961 como um inibidor reversível da AChE e da BuChE. Em 1993, foi aprovada como o primeiro medicamento para o tratamento da DA, comercializada como Tacrinal® ou Cognex®.³⁵ No entanto, seus efeitos colaterais graves, como a hepatotoxicidade, levaram à sua retirada do mercado.³⁶ Dentre os fármacos que já foram aprovados até hoje, quatro deles são

empregados como inibidores reversíveis de colinesterases para o tratamento da DA. São eles, além da tacrina, o Donepezil, a Galantamina e a Rivastigmina (Figura 5).¹¹

Donepezil, comercializado sob o nome de Aricept®, foi o segundo fármaco aprovado pela FDA em 1996, 3 anos após a aprovação da tacrina. Esse fármaco possui uma excelente absorção por via oral, atingindo picos de concentração entre 3 e 4 horas.^{37,38} Em 2000, a rivastigmina é aprovada para o tratamento da DA em estágio leve a moderado. Desde então, ela vem ganhando aprovação para seu uso em doenças relacionadas à de Parkinson. Em forma de cápsulas, a rivastigmina está associada a diferentes efeitos colaterais. Por conta disso e por possuir uma baixa dose diária, tempo de meia-vida curto e baixa massa molar, sua forma de administração foi reformulada para a transdérmica, o que foi responsável por reduzir esses efeitos colaterais associados.^{38,39} Um ano após a aprovação da rivastigmina, a galantamina é aprovada para o tratamento da DA em estágio leve a moderado. Seu enantiômero (-)-Galantamina, comercializado sob o nome Reminyl®, é um alcaloide natural isolado da planta *Galanthus woronowii* e sua síntese total por diferentes métodos é descrita na literatura.^{38,40}

Figura 5. Estrutura molecular de fármacos aprovados para o tratamento da DA.



3.4.1 Compostos do tipo bis(n)-tacrina

Com o objetivo de descobrir compostos mais potentes na inibição da AChE, Pang e colaboradores realizaram estudos computacionais para testar a estratégia de dupla interação de um inibidor com a enzima. Os autores observaram que duas unidades de tacrina espaçadas por uma cadeia metilênica permitia uma dupla interação do composto com a enzima, ligando-se simultaneamente ao seu CAS e ao seu PAS. Considerando os bons resultados obtidos pelas simulações computacionais, os autores realizaram a síntese de compostos do tipo bis(n)-tacrina (Figura 6). Dentre os compostos obtidos, o dímero bis(7)-tacrina se mostrou mil vezes mais potente na inibição da AChE e também mais de dez mil vezes mais seletivo para a AChE quando comparado à tacrina.⁴¹

Figura 6. Estrutura do composto bis(n)-tacrina

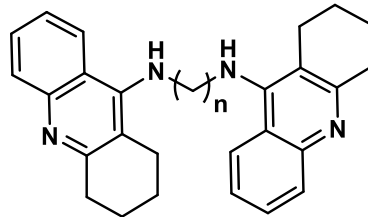
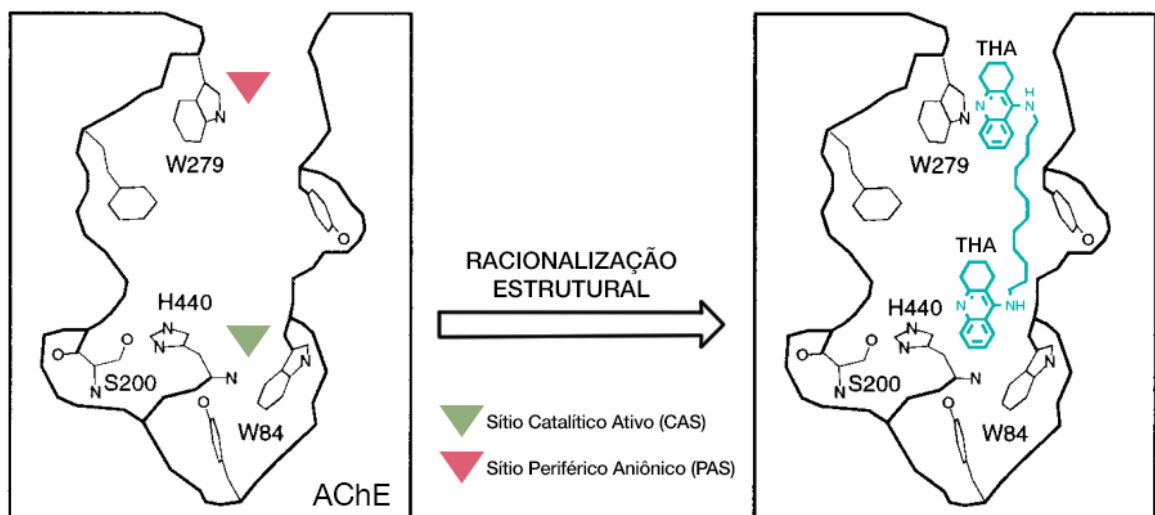


Figura 7. Representação de um dímero bis(n)-tacrina interagindo com o CAS e com o PAS da AChE (adaptada de Pang et al).³⁵

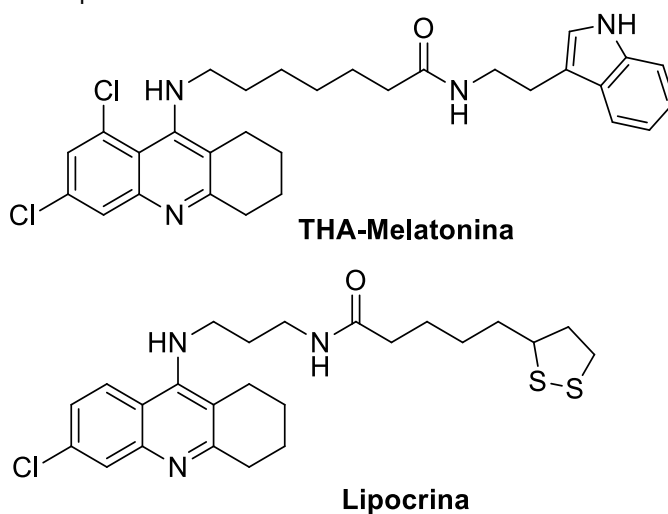


3.5 HÍBRIDOS CONTENDO DIFERENTES NÚCLEOS

A patologia da DA é complexa. Por isso, ela é considerada uma doença multifatorial, possuindo diferentes fatores que contribuem para sua ação. Dessa forma, um fármaco contendo um único alvo específico pode não ser uma estratégia de tratamento eficiente. A vantagem dos híbridos é a possível ação frente aos diferentes fatores da DA.⁴² Além disso, híbridos contendo dois núcleos separados por uma cadeia espaçadora metilênica podem vir a interagir, simultaneamente, com o CAS e o PAS das colinesterases. A tacrina é um exemplo de molécula multialvo que, além de ser uma inibidora das colinesterases, atua na diminuição da lesão oxidativa induzida pelo β -amiloide ($A\beta$)⁴³ e na redução da produção de espécies reativas de oxigênio.⁴⁴

O hormônio melatonina é produzido pela glândula pineal e também pode ser extraído dos grãos de café. Relata-se que esse composto possui propriedades antioxidantes. Um derivado da melatonina foi combinado com derivados da tacrina, separados por um grupo espaçador metilênico, para oferecer moléculas híbridas multialvo que inibem a AChE e a BuChE, assim como reduzem o estresse oxidativo. De todos os híbridos sintetizados, verificou-se que o híbrido espaçado com seis carbonos contendo o núcleo tacrina diclorado nas posições 6 e 8 (THA-Melatonina) foi capaz de inibir a AChE humana ($IC_{50} = 0,008 \pm 0,0004$ nM) com capacidade significativa na redução de radicais de oxigênio.⁴⁵ Da mesma forma, foram sintetizados por Rosini e colaboradores híbridos espaçados por uma cadeia metilênica contendo um núcleo derivado da tacrina e outro do ácido lipoico, um composto comercializado como antioxidante. O híbrido chamado de Lipocrina, contendo o núcleo tacrina clorado na posição 6 e grupo espaçador de 3 carbonos, mostrou-se como o mais ativo da série sintetizada para a inibição da AChE ($IC_{50} = 0.253 \pm 0.016$ nM). Também, mostrou-se ativo contra a agregação $A\beta$ induzida pela AChE e possui propriedades antioxidantes.⁴⁶ A estrutura molecular desses dois híbridos são apresentadas na Figura 8.

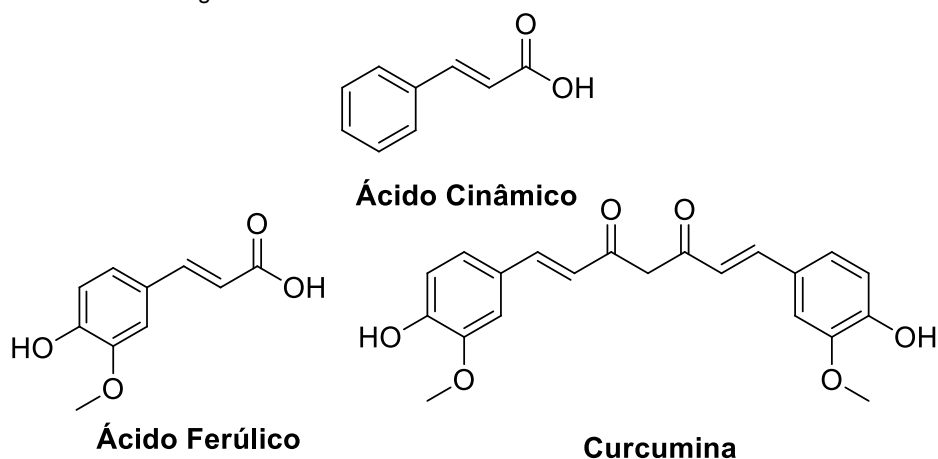
Figura 8. Exemplo de moléculas híbridas multialvo contendo diferentes núcleos.



3.5.1 Derivados do Ácido Cinâmico e Cinamamida.

O ácido cinâmico é um ácido orgânico natural que possui baixa toxicidade e um amplo espectro de atividades biológicas. Sabe-se que esse composto apresenta atividade antioxidante *in vivo*,⁴⁷ antibacteriana⁴⁸ e antifúngica⁴⁹ *in vitro*.⁵⁰ Seus derivados, de origem natural ou sintética, também possuem atividade biológica, como por exemplo o ácido ferúlico (AF) e a curcumina (Figura 9).⁵¹

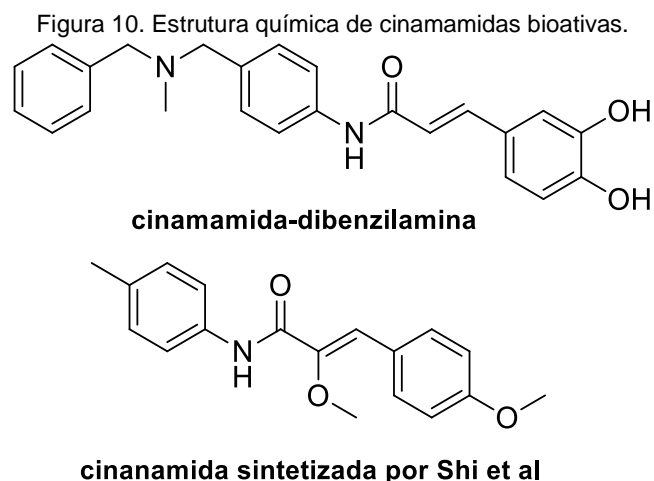
Figura 9. Estrutura do ácido cinâmico e seus derivados.



O AF apresenta propriedades antioxidantes *in vitro* quando presente em cultura celular neuronal, e pode ser um candidato promissor como agente antioxidante em doenças neurodegenerativas como a DA.⁵² A curcumina também apresenta atividade antioxidante e possui ação contra a agregação fibril de A β em testes realizados *in*

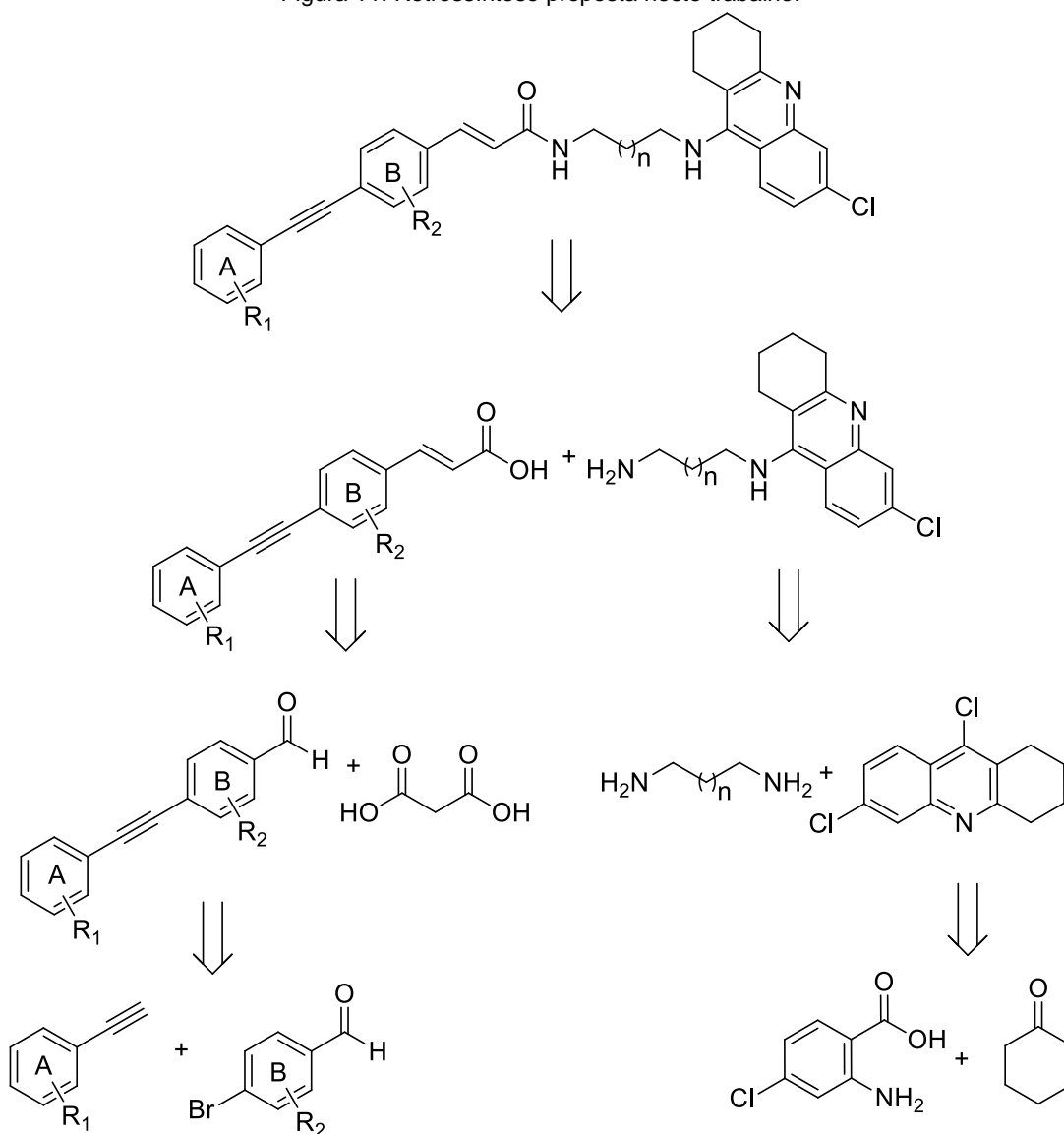
vitro.⁵³ Consequentemente, o ácido cinâmico serve como um fragmento útil no projeto de híbridos multialvo inibidores das colinesterases, tais como híbridos tacrina-AF,⁵⁴ híbridos AF-memoquina,⁵⁵ híbridos AF-carbazol⁵⁶ e híbridos donepezil-AF.⁵⁷

Outra classe de derivados do ácido cinâmico que apresenta atividade biológica são as cinamamidas. O híbrido contendo um núcleo derivado da cinamamida (cinamamida-dibenzilamina), representado na Figura 10, apresentou potência de inibição das enzimas colinesterases, sendo o mais ativo da série sintetizada ($IC_{50} = 4.64 \pm 0.23 \mu\text{M}$, AChE).⁵⁸ Shi et al sintetizaram uma série de cinamamidas que apresentaram potencial aplicação em doenças autoimunes, possuindo atividade imunossupressora sem apresentar uma significativa citotoxicidade.⁵⁹ O composto mais bioativo sintetizado por Shi et al está representado na Figura 10.



Mostra-se a seguir, a retrosíntese proposta neste trabalho, para a obtenção das cinamamidas de interesse, evidenciando os principais precursores sintéticos (Figura 11). Estas cinamamidas poderão aumentar as interações intermoleculares do híbrido com o PAS da AChE. Além disso, pode-se realizar substituições nos anéis aromáticos A e B, assim como variações no tamanho da cadeia metilênica para a obtenção de uma biblioteca de novos compostos. Os substituintes aromáticos possibilitam interações do tipo π com os resíduos de aminoácidos aromáticos do sítio enzimático PAS, além de outras interações enzima-substrato que poderão potencializar a inibição da AChE.

Figura 11. Retrossíntese proposta neste trabalho.



4 RESULTADOS E DISCUSSÕES

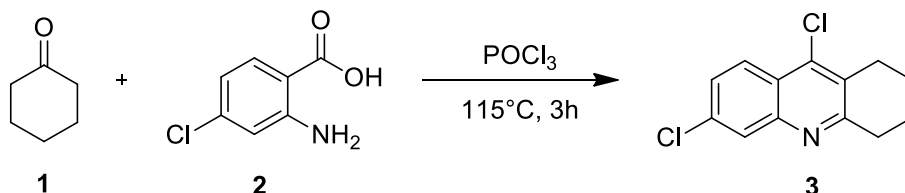
Inicialmente, visou-se à síntese dos intermediários 6-cloro-9-alkilamino-1,2,3,4-tetraidroacridinas e do ácido (*E*)-3-4-(feniletinil)fenil)acrílico. Após, a reação de acoplamento entre a amina primária e o ácido carboxílico α,β -insaturado resultou nos híbridos desejados.

4.1 SÍNTESE DA 6,9-DICLORO-1,2,3,4-TETRAIDROACRIDINA

A 6,9-dicloro-1,2,3,4-tetraidroacridina (**3**) foi obtida através da síntese de Niementowski. Partiu-se da ciclohexanona (**1**) e do ácido 4-cloro-2-aminobenzoico (**2**),

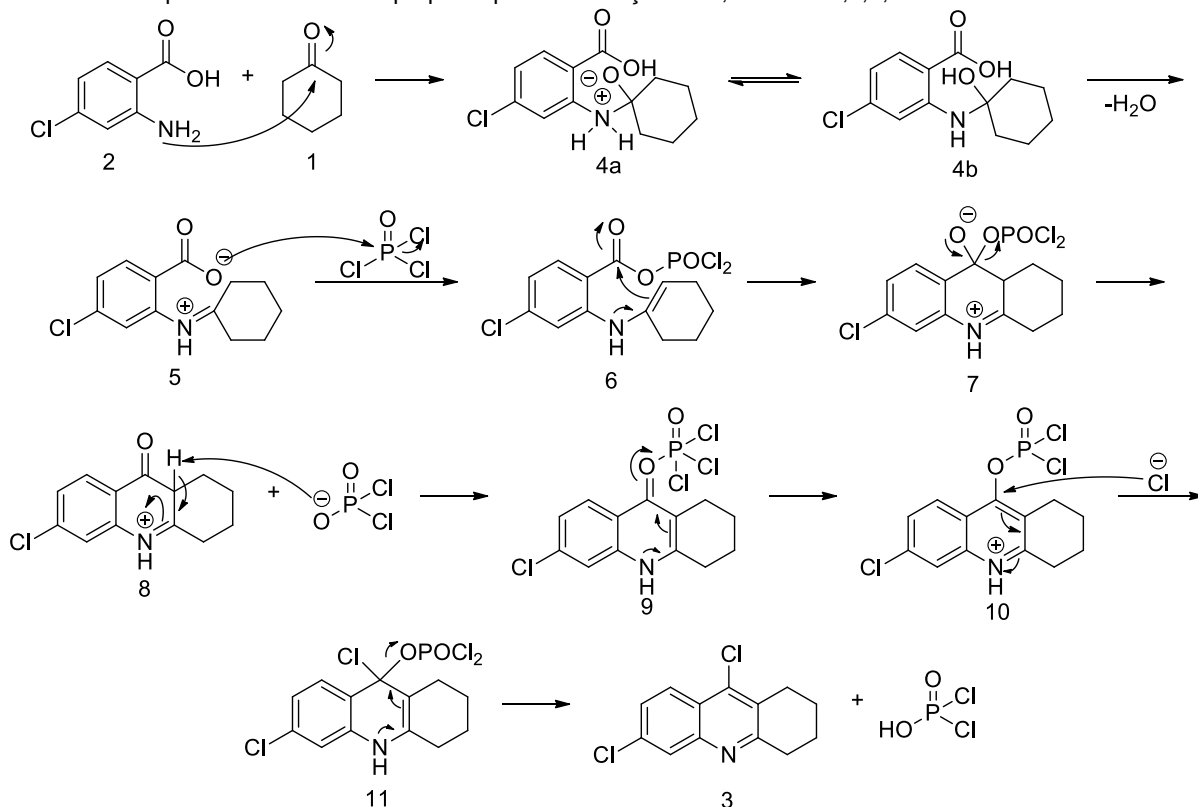
empregando-se excesso de cloreto de fosforila (POCl_3), sob refluxo a 115°C e atmosfera inerte (Esquema 4).⁶⁰

Esquema 4. Reação de obtenção da 6,9-dicloro-1,2,3,4-tetraidroacridina.



A proposta de mecanismo da reação de Niementowsky entre a ciclohexanona e o ácido 4-cloro-2-aminobenzoico na presença de excesso de POCl_3 é apresentada no Esquema 5.

Esquema 5. Mecanismo proposto para a formação da 6,9-dicloro-1,2,3,4-tetraidroacridina.

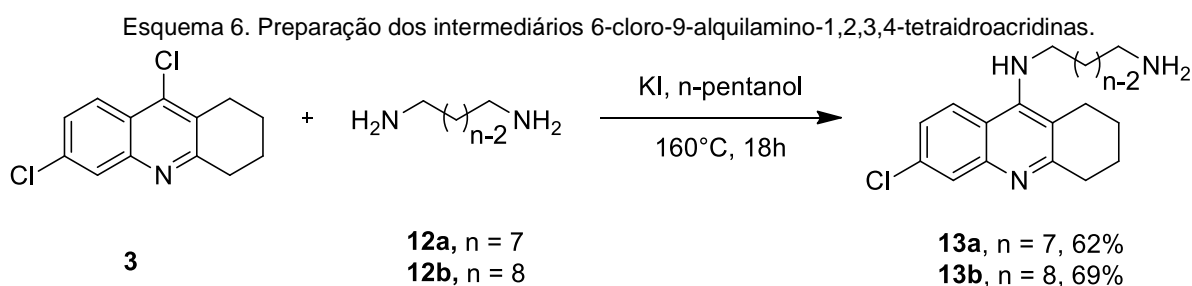


Nesta proposta mecanística, o grupo amino do ácido 4-cloro-2-aminobenzoico realiza uma adição nucleofílica à carbonila da ciclohexanona, levando à formação do intermediário **4a**, que após troca protônica fornece **4b**. Em seguida, a desidratação deste fornece o imínio **5**. O carboxilato em **5** é ativado com POCl_3 formando o

intermediário **6**. O ataque nucleofílico intramolecular em **6** da enamina sobre a carboxila, seguido de eliminação do ânion diclorofosfato em **7**, leva à formação do imínio **8**. O ânion diclorofosfato eliminado atua como uma base de Brønsted-Lowry em **8** para formar a enamina **9**. Outra molécula de POCl_3 ativa a carbonila de **9**, formando o intermediário **10**, que sofre substituição nucleofílica pelo cloreto, formando a enamina **11**. Após a saída do ânion diclorofosfato e desprotonação do nitrogênio quinolínic, obtém-se o composto **3** de interesse.

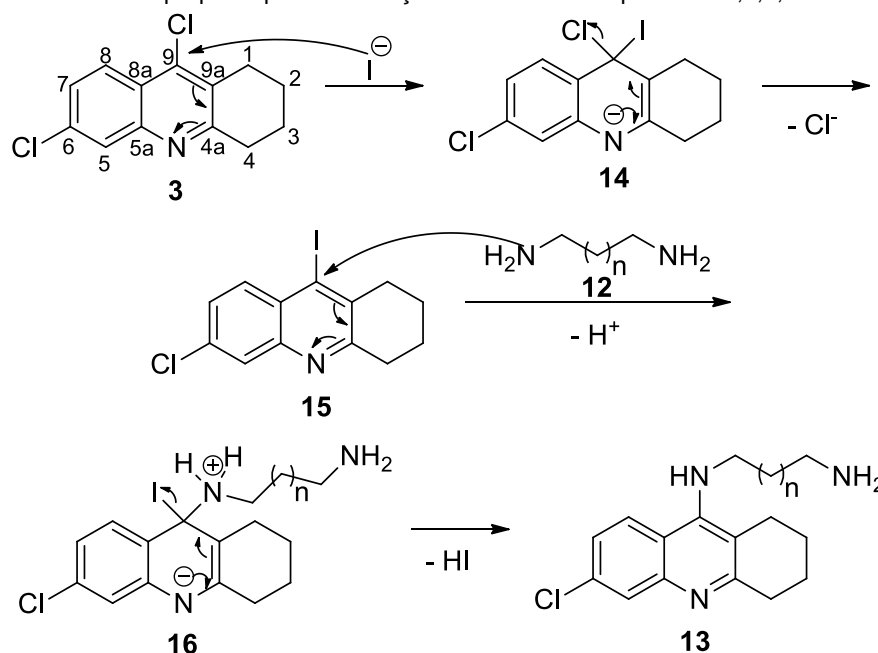
4.2 SÍNTESE DOS INTERMEDIÁRIOS 6-CLORO-9-ALQUILAMINO-1,2,3,4-TETRAIDROACRIDINAS

A reação de substituição nucleofílica aromática entre a 6,9-dicloro-1,2,3,4-tetraidroacridina (**3**) e as *n*-alcanodiaminas (**12a-b**), em *n*-pentanol a 160°C , levou à formação dos intermediários **13a-b** com rendimentos de 62-69%, após purificação por cromatografia em coluna. O excesso de seis equivalentes da alcanodiamina permite a obtenção seletiva dos compostos de interesse **13**, reduzindo a formação de dímeros do tipo bis-tacrina. Dessa forma, não é necessário realizar uma reação de proteção/desproteção seletiva das *n*-alcanodiaminas.⁶¹



O mecanismo para a reação de substituição nucleofílica aromática na presença do catalisador KI é apresentado no Esquema 7.

Esquema 7. Mecanismo proposto para a formação das 6-cloro-9-alkilamino-1,2,3,4-tetraidroacridinas.

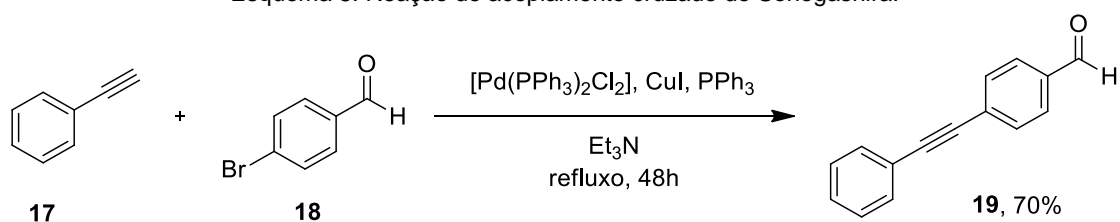


Propõe-se que, primeiramente, o iodeto proveniente do iodeto de potássio atua como nucleófilo ao realizar o ataque no carbono 9 do composto **3**, formando o intermediário **14**. A aromaticidade do composto é restaurada em **15** ao expulsar o íon cloreto. Após, a diamina **12** atua como nucleófilo com o ataque novamente no carbono 9 em **15**, e após restauração da aromaticidade com a saída do iodeto em **16**, o composto **13** desejado é formado após sua desprotonação.

4.3 SÍNTESE DO ÁCIDO (*E*)-3-(4-(FENILETINIL)FENIL)ACRÍLICO

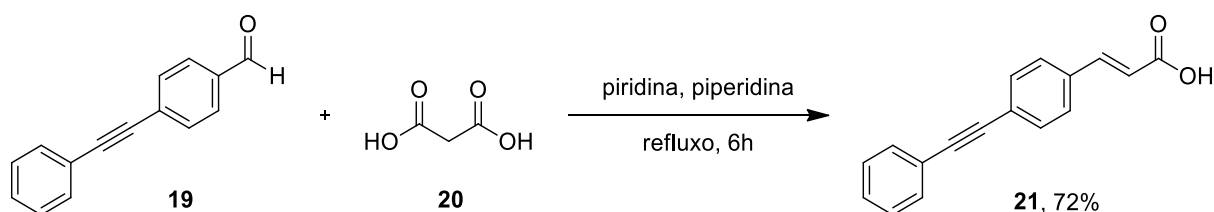
Visando à síntese do ácido (*E*)-3-(4-(feniletinil)fenil)acrílico, foi realizada uma reação de Sonogashira entre o fenilacetileno (**17**) e o 4-bromobenzaldeído (**18**), na presença do catalisador $[\text{Pd}(\text{PPh})_3\text{Cl}_2]$, co-catalisador CuI , trifetilfosfina e trietilamina como base e solvente. O intermediário **19** foi obtido com rendimento de 70% após purificação por recristalização em hexano.

Esquema 8. Reação de acoplamento cruzado de Sonogashira.



Na sequência, o ácido (*E*)-3-(4-(feniletinil)fenil)acrílico (**21**) foi obtido através de uma condensação de Knoevenagel com modificação de Doebner, na presença do aldeído **19**, ácido malônico (**20**), piridina e piperidina. O produto **21** foi obtido com 72% de rendimento após purificação por recristalização em etanol.

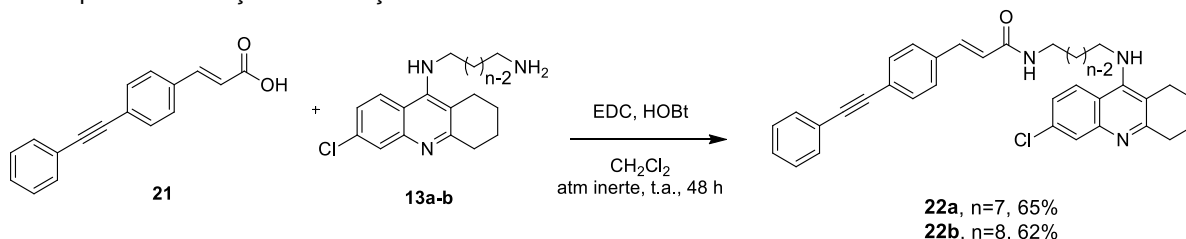
Esquema 9. Reação para obtenção do derivado do ácido cinâmico.



4.4 SÍNTESE DOS HÍBRIDOS CONTENDO NÚCLEOS TACRINA E 4-ETINILBENZENOCINAMAMIDA

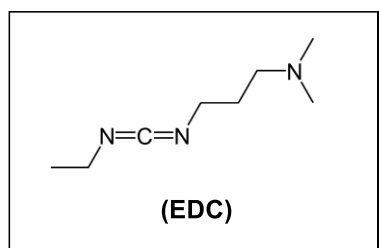
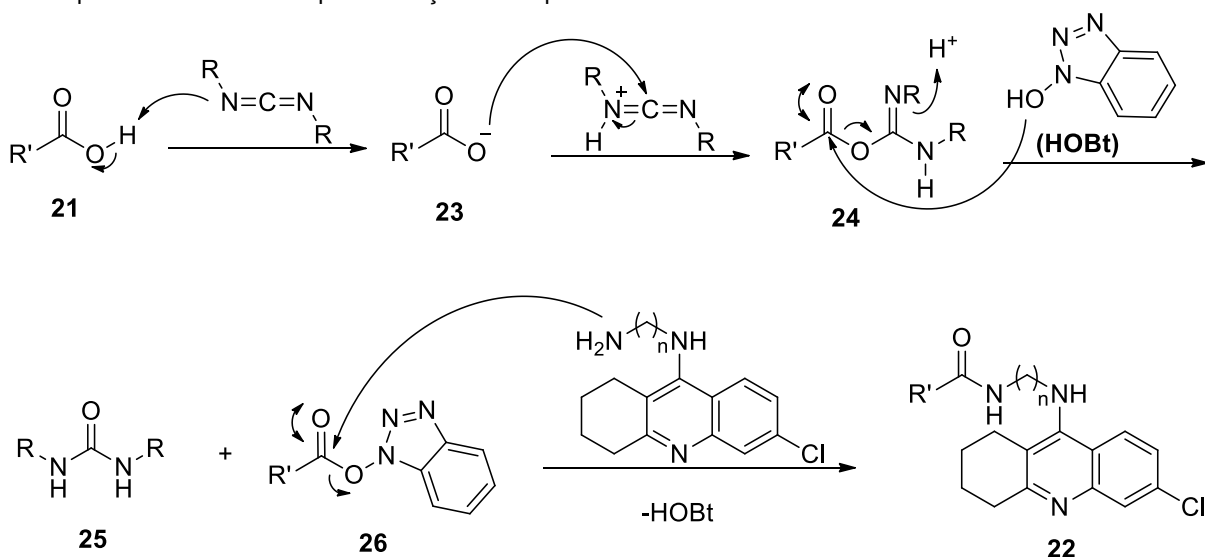
Os híbridos **22a-b** foram obtidos através da reação de substituição acílica entre as aminas **13a-b** e o derivado do ácido cinâmico **21**, empregando-se agentes de acoplamento (Esquema 10).

Esquema 10. Reação de obtenção dos híbridos contendo os núcleos tacrina e 4-etinilbenzenocinamamida.



O mecanismo proposto para o acoplamento entre o ácido carboxílico e a amina intermediária empregando-se os agentes de acoplamento EDC e HOBT é apresentado no Esquema 11.

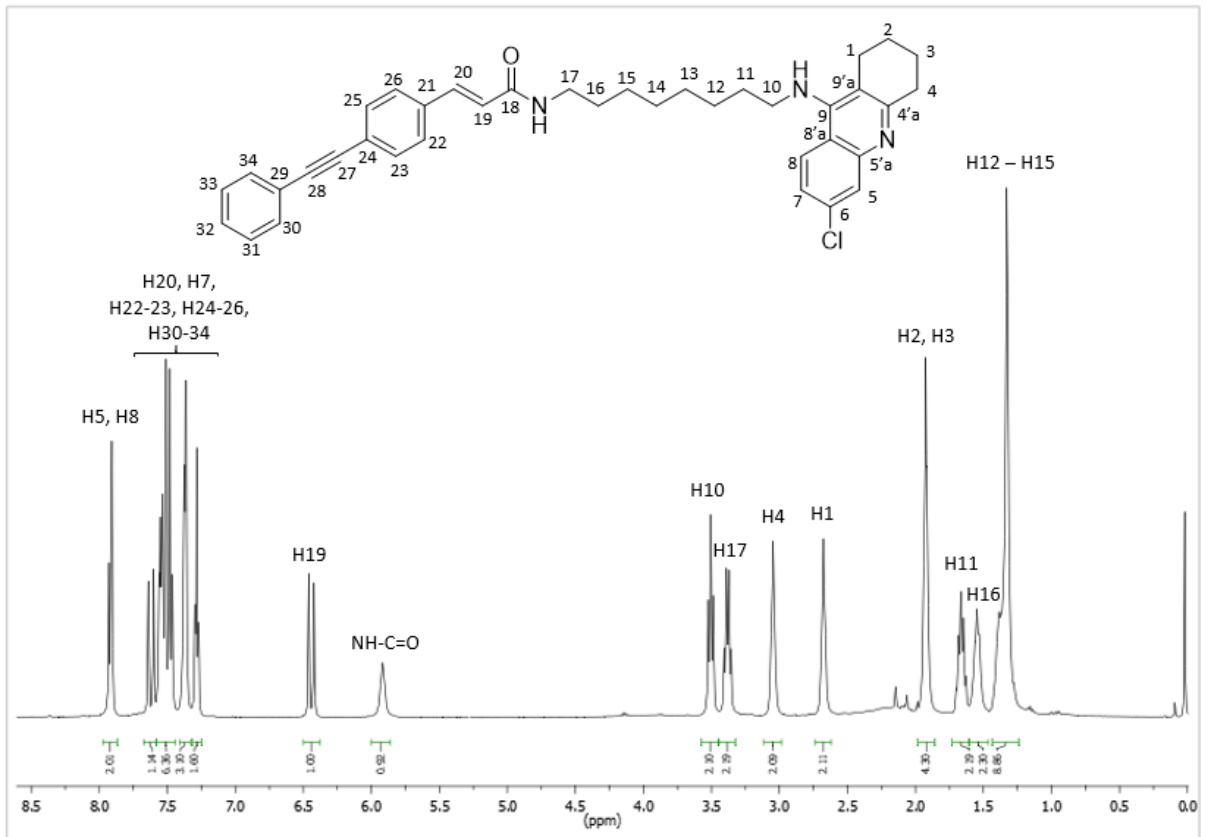
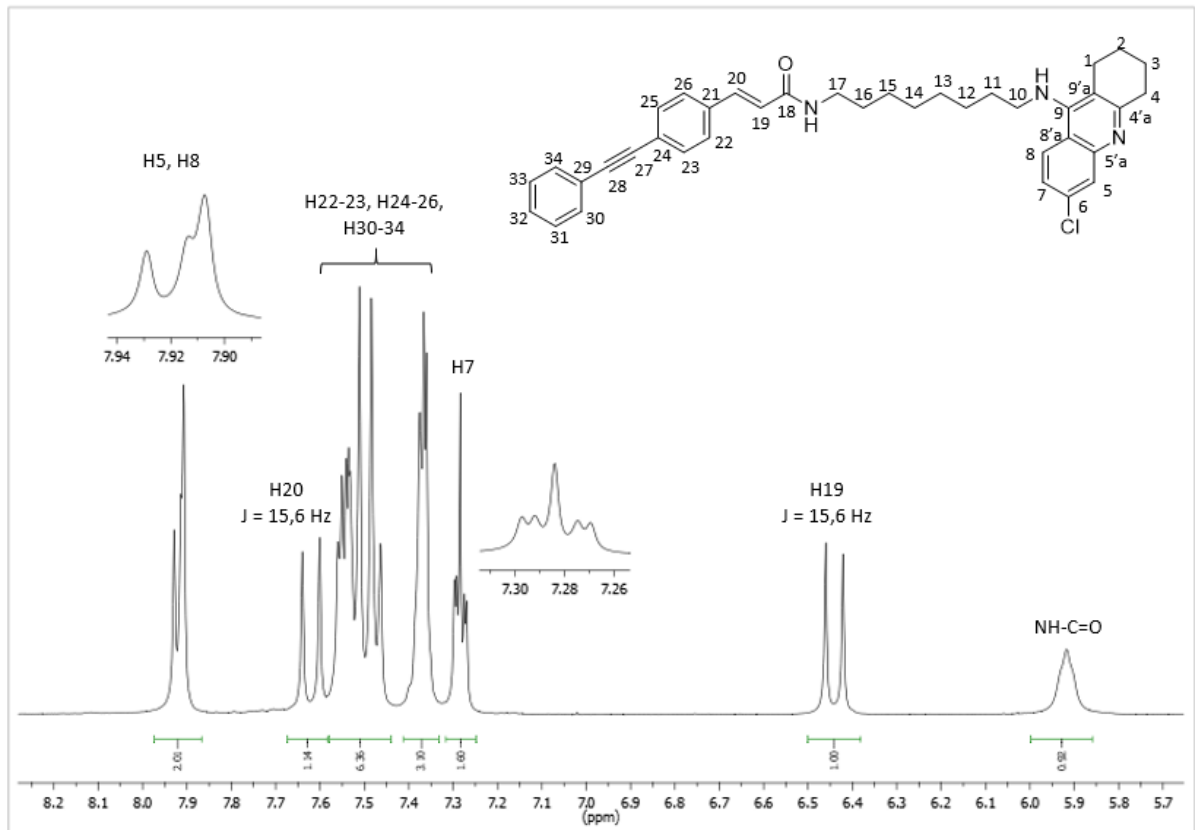
Esquema 11. Mecanismo para a reação de acoplamento entre o ácido carboxílico e a amina intermediária.



A primeira etapa desta proposta mecanística consiste na desprotonação do ácido carboxílico **21** e protonação da carbodiimida (EDC). Subsequentemente, ocorre um ataque nucleofílico do ânion carboxilato à carbodiimida, formando o composto **24**. O HOBT atua fazendo uma substituição nucleofílica acílica com o composto **24** para fornecer um éster ativado **26** e uma dialquil ureia estável (**25**). Por fim, uma reação de aminólise ocorre e, após troca protônica, a amida **22** de interesse é obtida.

A função amida desempenha um papel fundamental na química medicinal. O uso de agentes de acoplamento torna possível o acoplamento entre uma amina e um ácido carboxílico em condições brandas. Tais agentes possuem importância na área da bioquímica, sendo possível realizar o acoplamento entre dois aminoácidos para formar um dipeptídeo.⁶² O uso do HOBT forma rapidamente um éster ativado, evitando a racemização de enantiômeros e a formação de subprodutos provenientes de um rearranjo do composto **24**.⁶³

O espectro de Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio (RMN¹H) do composto **22b** é apresentado na Figura 12 e sua ampliação na região entre 9,2 ppm e 5,7 ppm na Figura 13 para melhor visualização.

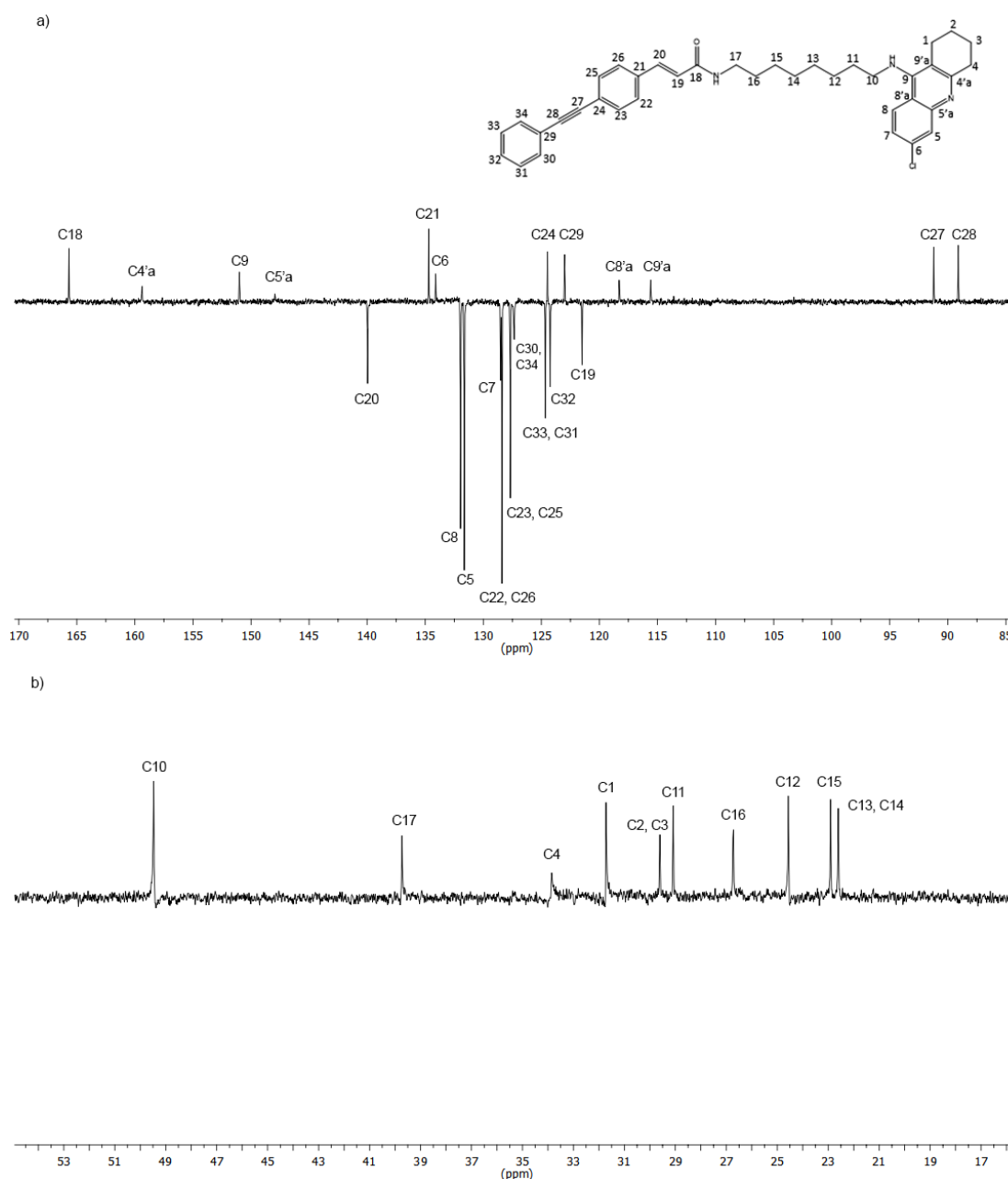
Figura 12. Espectro de RMN¹H (CDCl₃, 400MHz) do composto **22b**.Figura 13. Ampliação do espectro de RMN¹H (CDCl₃, 400MHz) do composto **22b**.

Quanto aos hidrogênios pertencentes à parte alifática da molécula, observa-se em 3,48 ppm um tripleto desblindado ($J = 7,2$ Hz) referente ao H10 vizinho ao nitrogênio do grupo amino. Em 3,38 ppm, há um quarteto ($J = 6,8$ Hz) referente ao acoplamento de H17 com o hidrogênio do grupo amida e com H16. Em relação aos sinais dos hidrogênios presentes na parte alifática do núcleo tacrina, dois multipletos em 3,05 ppm e 2,67 ppm referentes a H1 e a H4 e um multipletto em 1,92 ppm referente a H2 e a H3 são observados.

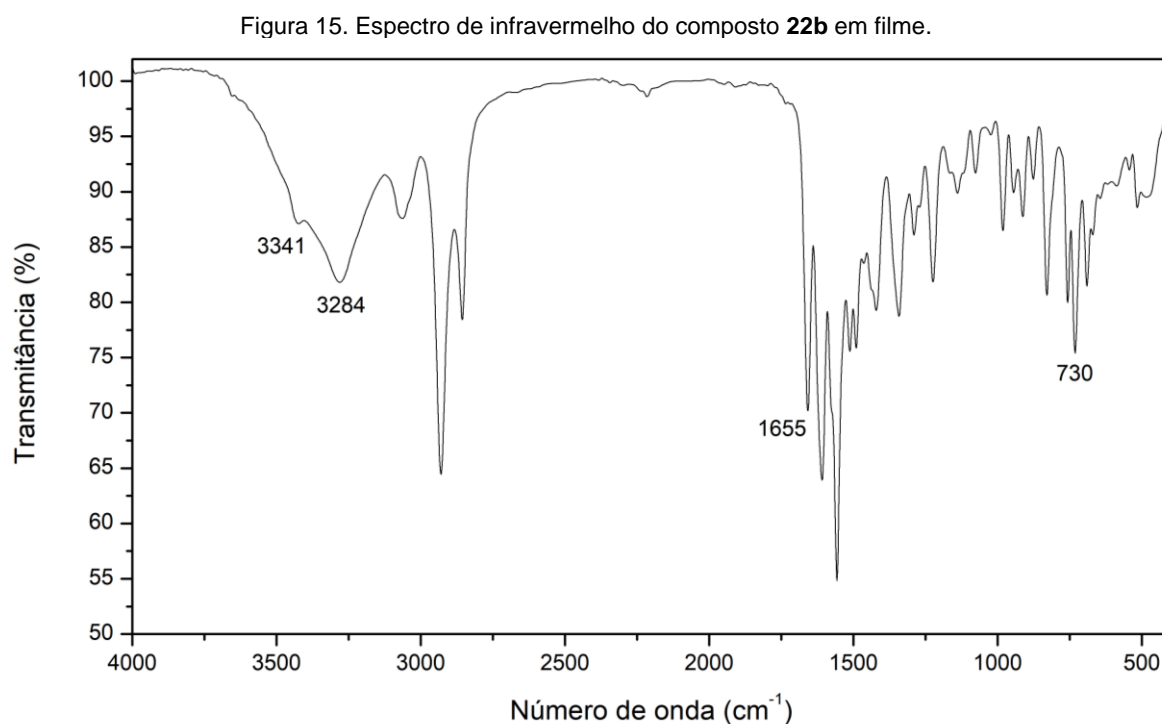
Na Figura 13, em 7,92 ppm são observados dois sinais sobrepostos, um dubleto ($J = 6,4$ Hz) referente a H8 e um singleto referente a H5. Há um dubleto em 7,62 ppm e em 6,44 ppm referente aos hidrogênios H20 e H19 do alceno conjugado. A constante de acoplamento para os dois sinais é de 15,6 Hz, o que indica a configuração *E* do composto. Entre 7,65 ppm e 7,32 ppm é observada uma sobreposição complexa de sinais referentes aos hidrogênios dos anéis aromáticos do núcleo 4-etinilbenzenocinamamida. O sinal de H7 do núcleo tacrina é observado em 7,28 ppm como um duplo dubleto ($J = 8,8$ Hz, 2,0 Hz), por conta de seu acoplamento com H8 e H5. Nesse mesmo deslocamento químico, um singleto intenso é atribuído ao hidrogênio do clorofórmio presente na amostra. O hidrogênio presente na função amida gerou um singleto largo em 5,90 ppm. O hidrogênio da amina secundária não é observado no espectro.

Na Figura 14, é apresentado o espectro de RMN¹³C (75 MHz, CDCl₃) do composto **22b**. Os seguintes sinais são observados (em ppm): 165,68 (C18); 159,38 (C4'a); 151,01 (C9); 147,90 (C5'a); 139,97 (C20); 134,69 (C21); 134,10 (C6); 131,96 (C8); 131,64 (C5); 128,51 (C7); 128,40 (C22, C26); 127,67 (C23, C25); 127,34 (C30, C34); 124,66 (C33, C31); 124,47 (C24); 124,24 (C32); 122,99 (C29); 121,49 (C19); 118,30 (C8'a); 115,59 (C9'a); 91,22 (C27); 89,09 (C28); 49,47 (C10); 39,73 (C17); 33,85 (C4); 31,72 (C1); 29,61 (C2, C3); 29,08 (C11); 26,72 (C16); 24,56 (C12); 22,91 (C15); 22,60 (C13, C14).

Figura 14. Espectro de RMN de ¹³C-APT (CDCl₃, 75 MHz) do composto (**22b**). a) ampliação entre 84 e 170 ppm; b) ampliação entre 17 e 55 ppm.



No espectro de infravermelho do composto **22b** (Figura 15) são observadas, principalmente, as bandas correspondentes às vibrações de: a) deformação axial de N-H de amida em 3341 cm^{-1} ; b) deformação axial de N-H de amina secundária em 3284 cm^{-1} ; c) deformação axial das ligações C-H de aromáticos entre 3000 e 3100 cm^{-1} ; d) deformação axial de C-H de alcanos entre 2850 e 3000 cm^{-1} ; e) deformação axial de C=O de amidas em 1655 cm^{-1} ; f) deformação axial de C-Cl em 730 cm^{-1} .



5 CONCLUSÕES

Foram sintetizados híbridos contendo núcleos tacrina e 4-etinilbenzenocinamamida, unidos por uma cadeia espaçadora metilênica. Para obtenção do núcleo tacrina, foi empregada a reação de Niementowski como estratégia sintética. As aminas intermediárias foram obtidas por uma reação de substituição nucleofílica aromática com as diaminas. Para obtenção do derivado do ácido cinâmico, foi utilizada a reação de Sonogashira, seguida de uma condensação de Knoevenagel com modificação de Doebner. Os híbridos foram então obtidos através de um acoplamento entre a amina intermediária e o derivado do ácido cinâmico com bons rendimentos. Os híbridos foram caracterizados pelas técnicas de RMN¹H, RMN¹³C e IV. Estes foram enviados ao Laboratório de Bioquímica de Proteínas e Peptídeos na Fundação Oswaldo Cruz - IOC (FioCruz), onde será averiguada sua potência frente à inibição das colinesterases.

6 PARTE EXPERIMENTAL

Todos os intermediários e híbridos sintetizados foram caracterizados por Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio (RMN¹H). O ponto de fusão dos híbridos foi medido e estes também foram caracterizado por Ressonância Magnética Nuclear de Carbono (RMN¹³C) e Espectroscopia no Infravermelho (IV).

6.1 EQUIPAMENTOS

Os pontos de fusão foram determinados em tubos capilares de vidro abertos em um equipamento Gehaka PF 1000. Os espectros de IV foram obtidos em um espectrômetro Varian 640-IR. As análises de RMN de ¹H e de ¹³C foram realizadas nos espectrômetros Varian VNMRS modelo INOVA, 300 MHz e Ascend 400 MHz.

6.2 MATERIAIS E MÉTODOS

6.2.1 Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear

As amostras foram analisadas em uma solução de clorofórmio deuterado ou dimetilsulfóxido deuterado. O tempo de relaxação em ambas as análises foi de 1,0 segundo. Os sinais são descritos em ordem decrescente de deslocamento químico. Os deslocamentos químicos (δ) são apresentados em partes por milhão (ppm), considerando o tetrametilsilano (TMS) como padrão interno. As multiplicidades são representadas da seguinte forma: s = singleto, sl = singleto largo, d = dubleto, t = tripleto, q = quarteto, dd = duplo dubleto, m = multiplete; o número de hidrogênios foi deduzido da integral relativa e a constante de acoplamento (J) é dada em Hertz (Hz).

6.2.2 Espectroscopia no Infravermelho

Os compostos foram analisados em solução de diclorometano em um suporte de ZnSe por meio da técnica de Refletância Difusa com Transformada de Fourier (DRIFT).

6.2.3 Solventes e Reagentes

Para a purificação por cromatografia em coluna foi utilizada como fase estacionária sílica gel 60 Å (70-230 mesh) fornecida pela Acros. Na cromatografia por camada delgada (CCD) utilizaram-se placas de alumínio com 0,2 mm de sílica gel 60F-254 (Macherey-Nagel). A trietilamina P.A. utilizada na fase móvel para cromatografia foi fornecida pela Aldrich e os demais solventes P.A., utilizados nas reações e nas purificações, pela Nuclear.

6.3 PROCEDIMENTOS

6.3.1 Procedimento para a Preparação da 6,9-dicloro-1,2,3,4-tetraidroacridina (**3**)

Em um balão equipado com agitador magnético, foram adicionados a cicloexanona (**1**) (0,708 g, 7,2 mmol) e o ácido 4-cloro-2-aminobenzóico (**2**) (1,300 g, 7,6 mmol). Em seguida foi adicionado o POCl₃ (4,0 mL, 43,3 mmol) sob atmosfera inerte e a 0°C. Após o sistema foi conectado a um condensador de refluxo e a reação foi aquecida a 115°C durante 3 horas sob atmosfera inerte. Ao final do tempo, o POCl₃ foi removido sob alto vácuo até que sobrasse apenas uma pasta escura. Essa pasta foi dissolvida em CH₂Cl₂ e levou-se o pH até 10 com uma solução de NaHCO₃ 10%. Em seguida, as fases foram separadas, a fase orgânica foi lavada com água destilada e seca com Na₂SO₄ anidro e o solvente foi evaporado. Purificação por cromatografia em coluna, utilizando CH₂Cl₂ como eluente.

O composto **3** foi obtido como um sólido amarelo (79% de rendimento); RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ: 8,09 (d, J = 12,0 Hz, 1H); 7,97 (d, J = 2,4 Hz, 1H); 7,47 (dd, J = 12,0, 2,8 Hz, 1H); 3,11 (t, J = 6,4 Hz, 2H); 3,00 (t, J = 6,4 Hz, 2H); 2,02 – 1,87 (m, 4H).

6.3.2 Procedimento Geral para a Preparação das 6-cloro-9-alkilamino-1,2,3,4-tetraidroacridinas (**13a-b**)

Em um balão equipado com agitador magnético e condensador de refluxo, foram adicionados o composto (**3**) (0,330 g, 1,3 mmol), a diamina (1,123 g, 7,8 mmol) (**12**) e o iodeto de potássio (0,031 g, 0,19 mmol). Em seguida, adicionou-se o n-pentanol (5 mL) e a mistura foi deixada à temperatura de 160 °C e agitação durante 18 horas. Ao fim da reação, removeu-se o solvente sob alto vácuo. O produto bruto foi dissolvido em CH₂Cl₂ e lavado uma vez com uma solução aquosa de NaOH 10% e duas vezes com água. Em seguida a fase orgânica foi seca com Na₂SO₄ e o solvente removido. A purificação foi realizada por cromatografia em coluna utilizando uma mistura de CHCl₃ : MeOH : NH₄OH (93 : 6,5 : 0,5) como eluente.

6.3.2.1 N¹-(6-cloro-1,2,3,4-tetraidroacridina-9-il)heptano-1,7-diamina (**13a**)

Óleo amarelo (62% de rendimento); RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ: 7,91 (d, 1H); 7,90 (s, 1H); 7,26 (dd, J = 9,0 Hz, 2 Hz, 1H); 3,94 (s, 1H); 3,48 (t, J = 7,1 Hz, 2H); 3,06 (m, 2H); 2,73 – 2,60 (m, 4H); 1,92 (m, J = 3,4 Hz, 4H); 1,80 – 1,60 (m, 2H); 1,48 – 1,23 (m, 8H).

6.3.2.2 N¹-(6-cloro-1,2,3,4-tetraidroacridina-9-il)octano-1,8-diamina (**13b**)

Óleo amarelo (69% de rendimento); RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ: 7,91 (d, J = 12,0 Hz, 1H); 7,90 (s, 1H); 7,26 (dd, J = 9,0 Hz, 2,0 Hz, 1H); 4,17 (s, 1H); 3,49 (t, J = 7,2 Hz, 2H); 3,04 (m, 2H); 2,74 – 2,57 (m, 4H); 1,93 (m, J = 3,6 Hz, 4H); 1,81 (s, 2H); 1,72 – 1,56 (m, 2H); 1,51 – 1,17 (m, 8H).

6.3.3 Preparação do Composto Intermediário 4-(feniletinil)benzaldeído (**19**)

Em um balão de Schlenck de 50 mL, previamente flambado e sob atmosfera inerte, foram adicionados a trietilamina seca (15 mL), o 4-bromobenzaldeído (**18**) (1,196 g, 6,46 mmol) e o alcino (**17**) (1,07 mL, 9,70 mmol). A mistura foi agitada por 20 minutos e então foram acrescentados o CuI (0,006 g, 3,2 x 10⁻² mmol), PPh₃ (0,038 g, 1,40 x 10⁻² mmol) e o catalisador [PdCl₂(PPh₃)₂] (0,020 g, 2,91 x 10⁻² mmol, 0,4 mol %). A reação permaneceu sob refluxo por 48 horas. Após o término da reação, a mistura foi resfriada à temperatura ambiente e a solução foi filtrada sob celite e lavada com CH₂Cl₂. O filtrado foi lavado com uma solução saturada de NH₄Cl (2 x 50 mL) e água (2 x 50 mL). A fase orgânica foi seca com Na₂SO₄ e o solvente foi evaporado. A purificação foi realizada por recristalização em hexano.

O produto **19** foi obtido como um sólido marrom-avermelhado (70% de rendimento); RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ: 10,04 (s, 1H); 7,94 – 7,85 (m, 2H); 7,74 – 7,66 (m, 2H); 7,62 – 7,55 (m, 2H); 7,44 – 7,36 (m, 3H).

6.3.4 Preparação do Ácido (E)-3-(4-(feniletinil)fenil)acrílico (21)

Em um balão adaptado com condensador de refluxo foram adicionados o aldeído **19** (0,450 g, 2,17 mmol), a piridina (1 mL, 12,4 mmol) e a piperidina (16 μ L, 0,16 mmol). Após a mistura solubilizar, foi adicionado o ácido malônico (**20**) (0,498 g, 4,79 mmol) e a reação permaneceu sob agitação a 85°C por 6 horas. A reação foi resfriada à temperatura ambiente e foi adicionado HCl 10% até pH neutro. O precipitado amarelado é filtrado e recristalizado em etanol.

O produto **21** foi obtido como um sólido amarelado brilhoso (72% de rendimento); RMN ^1H (400 MHz, DMSO) δ : 7,76 (d, $J = 8,3$ Hz, 2H); 7,68 – 7,55 (m, 5H); 7,50 – 7,42 (m, 3H); 6,60 (d, $J = 16,1$ Hz, 1H).

6.3.5 Procedimento Geral para a Preparação dos Híbridos Tacrina-4-etinilbenzenocinamamida (22a-b)

Em um balão contendo um agitador magnético foram adicionados o derivado do ácido cinâmico (**21**) (0,101 g, 0,407 mmol) e os agentes de acoplamento EDC (0,078 g, 0,407 mmol) e HOBt (0,055 g, 0,0407 mmol), os quais foram dissolvidos em 1,4 mL de CH_2Cl_2 anidro e deixados sob agitação durante 5 minutos sob atmosfera inerte. Após foi adicionada a amina intermediária (**13**) (0,201 g, 0,556 mmol) dissolvida em 0,5 mL de CH_2Cl_2 anidro. A reação foi deixada sob agitação em temperatura ambiente durante 48 horas. Ao final do tempo, a reação foi finalizada com 0,2 mL de água e seca com Na_2SO_4 anidro. Decorrido esse processo, o solvente foi evaporado e o produto bruto purificado por cromatografia em coluna utilizando uma mistura de hexano, acetato de etila e trietilamina na proporção de 80:19:1, aumentando a polaridade até 0:99:1.

6.3.5.1 (E)-N-(7-((6-cloro-1,2,3,4-tetraidroacridina-9-il)amino)heptil)-3-(4-(feniletinil)fenil)acrilamida (**22a**)

Sólido amarelado (65% de rendimento); ponto de fusão: 59 °C; RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ : 7,90 (d, $J = 6,6$ Hz, 1H); 7,89 (s, 1H); 7,60 (d, $J = 15,6$ Hz, 1H); 7,56 – 7,41 (m, 6H); 7,39 – 7,31 (m, 3H); 7,25 (dd, $J = 9,0, 2,4$ Hz, 1H); 6,42 (d, $J = 15,6$ Hz, 1H); 5,92 (s, 1H); 3,48 (t, $J = 7,2$ Hz, 2H); 3,36 (q, $J = 6,8$ Hz, 2H); 3,02 (m, 2H); 2,65

(m, 2H); 2,13 (s, 1H); 1,95 – 1,85 (m, 4H); 1,69 – 1,60 (m, 2H); 1,58 – 1,46 (m, 2H); 1,43 – 1,29 (m, 6H); RMN ¹³C (101 MHz, CDCl₃) δ: 165,67; 159,59; 150,87; 148,17; 140,10; 134,65; 134,01; 131,99; 131,66; 128,53; 128,41; 127,70; 127,57; 124,62; 124,53; 124,25; 122,99; 121,36; 118,44; 115,80; 91,25; 89,08; 49,50; 39,69; 34,04; 31,70; 29,57; 28,92; 26,74; 26,73; 24,59; 22,94; 22,66.

6.3.5.2 (E)-N-(8-((6-cloro-1,2,3,4-tetraidroacridina-9-il)amino)octil)-3-(4-(feniletinil)fenil)acrilamida (**22b**)

Sólido amarelado (62% de rendimento); ponto de fusão: 54 °C; ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ: 7,91 (d, *J* = 6,4 Hz, 1H); 7,90 (s, 1H); 7,60 (d, *J* = 15,6 Hz, 1H); 7,56 – 7,42 (m, 6H); 7,40 – 7,30 (m, 3H); 7,28 (dd, *J* = 8,8, 2,0 Hz, 1H); 6,42 (d, *J* = 15,6 Hz, 1H); 5,90 (s, 1H); 3,48 (t, *J* = 7,2 Hz, 2H); 3,36 (q, *J* = 6,8 Hz, 2H); 3,03 (m, 2H); 2,66 (m, 2H); 1,96 – 1,84 (m, 4H); 1,70 – 1,59 (m, 2H); 1,58 – 1,47 (m, 2H); 1,42 – 1,23 (m, 8H); RMN ¹³C (75 MHz, CDCl₃) δ 165,68; 159,38; 151,01; 139,97; 134,69; 134,10; 131,96; 131,64; 128,51; 128,40; 127,67; 127,34; 124,66; 124,47; 124,24; 122,99; 121,49; 118,30; 115,59; 91,22; 89,09; 49,47; 39,73; 33,85; 31,72; 29,61; 29,08; 26,72; 24,56; 22,91; 22,60.

REFERÊNCIAS

1. MASTERS, Colin L. et al. Alzheimer's disease. **Nature Reviews Disease Primers**, v. 1, p. 1–18, 2015
2. QUERFURTH, H. W.; LAFERLA, F. M. Alzheimer's disease. **The New England Journal of Medicine**, n. 362, p. 329–344, 2010
3. HUANG, Yadong; MUCKE, Lennart. Alzheimer mechanisms and therapeutic strategies. **Cell**, v. 148, n. 6, p. 1204-1222, 2012.
4. GÓMEZ-ISLA, Teresa et al. Profound loss of layer II entorhinal cortex neurons occurs in very mild Alzheimer's disease. **Journal of Neuroscience**, v. 16, n. 14, p. 4491-4500, 1996.
5. GAUGLER, Joseph et al. 2016 Alzheimer's disease facts and figures. **Alzheimer's and Dementia**, v. 12, n. 4, p. 459–509, 2016
6. SINGH, Manjinder et al. Hybrids: a new paradigm to treat Alzheimer's disease. **Molecular Diversity**, v. 20, n. 1, p. 271–297, 2016
7. INESTROSA, Nibaldo C. et al. Acetylcholinesterase accelerates assembly of amyloid-β-peptides into Alzheimer's fibrils: Possible role of the peripheral site of the enzyme. **Neuron**, v. 16, n. 4, p. 881–891, 1996
8. SIMONIAN, N. A.; COYLE, J. T. Oxidative Stress in Neurodegenerative Diseases. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology**, v. 36, p. 83–106, 1996.

9. MARTÍNEZ, A. et al. Advances in Alzheimer Therapy: Understanding Pharmacological Approaches to the Disease. **Current Alzheimer Research**, v.6, p. 83–85, 2009
10. BARTUS, Raymond T. et al. The cholinergic hypothesis of geriatric memory dysfunction. **Science**, v. 217, n. 4558, p. 408-414, 1982.
11. GREENAMYRE, J. Timothy et al. Glutamate transmission and toxicity in alzheimer's disease. **Progress in Neuropsychopharmacology and Biological Psychiatry**, v. 12, n. 4, 1988
12. HARDY, J.; HIGGINS, G. Alzheimer's disease: the amyloid cascade hypothesis. **Science**, v. 256, n. 5054, p. 184–185, 1992
13. LAMBERT, M. P. et al. Diffusible, nonfibrillar ligands derived from A 1-42 are potent central nervous system neurotoxins. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 95, n. 11, p. 6448–6453, 1998
14. HANE, Francis; LEONENKO, Zoya. Effect of Metals on Kinetic Pathways of Amyloid- β Aggregation. **Biomolecules**, v. 4, n. 1, p. 101–116, 2014
15. DE FALCO, Anna et al. Doença de Alzheimer: Hipóteses etiológicas e perspectivas de tratamento. **Química Nova**, v. 39, n. 1, p. 63–80, 2016
16. PATRICK, Graham L. **An introduction to medicinal chemistry**. Oxford university press, 2013.
17. SIEGELBAUM, Steven A. et al. **Principles of neural science**. New York: McGraw-hill, 2000.
18. PARADISO, M. A.; BEAR, M. F.; CONNORS, B. W., **Neuroscience: exploring the brain**. Hagerstwon, Lippincott Williams & Wilkins, 2007
19. BOHNEN, Nicolaas I. et al. Recent Advances in Cholinergic Imaging and Cognitive Decline—Revisiting the Cholinergic Hypothesis of Dementia. **Current Geriatrics Reports**, p. 1-11, 2018.
20. FRANCIS, P. T. et al. The cholinergic hypothesis of Alzheimer's disease: a review of progress. **Journal of Neurology, Neurosurgery, and Psychiatry**, v. 66, n. 2, p. 137–47, 1999
21. HASSELMO, Michael E.; SARTER, Martin. Modes and models of forebrain cholinergic neuromodulation of cognition. **Neuropsychopharmacology**, v. 36, n. 1, p. 52, 2011.
22. ANAND, Preet; SINGH, Baldev. A review on cholinesterase inhibitors for Alzheimer's disease. **Archives of Pharmacal Research**, v. 36, n. 4, p. 375–399, 2013
23. POPE, Carey N.; BRIMIJOIN, Stephen. Cholinesterases and the fine line between poison and remedy. **Biochemical Pharmacology**, 2018
24. NICOLET, Yvain et al. Crystal Structure of Human Butyrylcholinesterase and of Its Complexes with Substrate and Products. **Journal of Biological Chemistry**, v. 278, n. 42, p. 41141–41147, 2003
25. KHAN, Haroon et al. Flavonoids as acetylcholinesterase inhibitors: Current therapeutic standing and future prospects. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 101, p. 860-870, 2018.
26. PAN, Li et al. Design, synthesis and evaluation of isaindigotone derivatives as acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase inhibitors. **Bioorganic & medicinal chemistry letters**, v. 18, n. 13, p. 3790-3793, 2008.
27. CHATONNET, Arnaud; LOCKRIDGETL, Oksana. Comparison of butyrylcholinesterase and acetylcholinesterase. **Biochemical Journal**, v. 260, p. 625–634, 1989

28. HOUGHTON, Peter J.; REN, Yuhao; HOWES, Melanie-Jayne. Acetylcholinesterase inhibitors from plants and fungi. **Natural Product Reports**, v. 23, n. 2, p. 181, 2006
29. SUSSMAN, Joel L. et al. Atomic structure of acetylcholinesterase from *Torpedo californica*: A prototypic acetylcholine-binding protein. **Science**, v. 253, n. 5022, p. 872–879, 1991
30. ORDENTLICH, Arie et al. Functional characteristics of the oxyanion hole in human acetylcholinesterase. **Journal of Biological Chemistry**, v. 273, n. 31, p. 19509–19517, 1998
31. KUA, Jeremy et al. Studying the roles of W86, E202, and Y337 in binding of acetylcholine to acetylcholinesterase using a combined molecular dynamics and multiple docking approach. **Protein science : a publication of the Protein Society**, v. 12, p. 2675–2684, 2003
32. ZHANG, Yingkai; KUA, Jeremy; MCCAMMON, J. Andrew. Role of the catalytic triad and oxyanion hole in acetylcholinesterase catalysis: An ab initio QM/MM study. **Journal of the American Chemical Society**, v. 124, n. 35, p. 10572–10577, 2002
33. GIACOBINI, Ezio. Cholinesterase inhibitors: New roles and therapeutic alternatives. **Pharmacological Research**, v. 50, n. 4, p. 433–440, 2004
34. BAJDA, Marek et al. Structure-based search for new inhibitors of cholinesterases. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 14, n. 3, p. 5608–5632, 2013
35. KNAPP, M. J. et al. A 30-week randomized controlled trial of high-dose tacrine in patients with Alzheimer's disease. The Tacrine Study Group. **JAMA : The Journal of the American Medical Association**, v. 271, n. 13, p. 985–91, 1994
36. WATKINS, Paul B. et al. Hepatotoxic Effects of Tacrine Administration in Patients With Alzheimer's Disease. **JAMA: The Journal of the American Medical Association**, v. 271, n. 13, p. 992–998, 1994
37. HOMMA, Akira et al. Clinical Efficacy and Safety of Donepezil on Cognitive and Global Function in Patients with Alzheimer ' s Disease. **Dementia and Geriatrics Cognitive Disorders**, n. 11, p. 299–313, 2000
38. MEHTA, Mona; ADEM, Abdu; SABBAGH, Marwan. New Acetylcholinesterase Inhibitors for Alzheimer ' s Disease. **International Journal of Alzheimer's Disease**, v. 2012, p. 1–8, 2012
39. MALAIYA, Mayank Kumar et al. Journal of Drug Delivery Science and Technology Controlled delivery of rivastigmine using transdermal patch for effective management of alzheimer's disease. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, v. 45, p. 408–414, 2018
40. MARCO, Luis; CARREIRAS, Maria d. C. Galanthamine, a natural product for the treatment of Alzheimer's disease. **Recent patents on CNS drug discovery**, v. 1, n. 1, p. 105-111, 2006
41. PANG, Yuan Ping et al. Highly potent, selective, and low cost bis-tetrahydroaminacrine inhibitors of acetylcholinesterase. Steps toward novel drugs for treating Alzheimer's disease. **Journal of Biological Chemistry**, v. 271, n. 39, p. 23646–23649, 1996
42. CHOUDHARY, Shalki et al. Success stories of natural product-based hybrid molecules for multi-factorial diseases. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 151, p. 62–97, 2018
43. XIAO, Xiao Qiu; WANG, Rui; TANG, Xi Can. Huperzine A and tacrine attenuate β -amyloid peptide-induced oxidative injury. **Journal of Neuroscience Research**, v. 61, n. 5, p. 564–569, 2000

44. EZOULIN, M. J. M. et al. A new acetylcholinesterase inhibitor with anti-PAF activity modulates oxidative stress and pro-inflammatory mediators release in stimulated RAW 264.7 macrophage cells. Comparison with tacrine. **International Immunopharmacology**, v. 7, n. 13, p. 1685–1694, 2007
45. RODRÍGUEZ-FRANCO, María Isabel et al. Novel tacrine-melatonin hybrids as dual-acting drugs for alzheimer disease, with improved acetylcholinesterase inhibitory and antioxidant properties. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 49, n. 2, p. 459–462, 2006
46. ROSINI, Michela et al. Rational approach to discover multipotent anti-Alzheimer drugs. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 48, n. 2, p. 360–363, 2005
47. LEE, Mi Kyung et al. Hypocholesterolemic and antioxidant properties of 3-(4-hydroxyl)propanoic acid derivatives in high-cholesterol fed rats. **Chemico-Biological Interactions**, v. 170, n. 1, p. 9–19, 2007
48. NARASIMHAN, B. et al. Esters, amides and substituted derivatives of cinnamic acid: synthesis, antimicrobial activity and QSAR investigations. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 39, n. 10, p. 827–834, 2004
49. BISOGNO, Fabricio et al. Structure-antifungal activity relationship of cinnamic acid derivatives. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 55, n. 26, p. 10635–10640, 2007
50. SOVA, M. Antioxidant and Antimicrobial Activities of Cinnamic Acid Derivatives. **Mini Reviews in Medicinal Chemistry**, v. 12, n. 8, p. 749–767, 2012
51. SEZGIN, Zeynep; DINCER, Yildiz. Alzheimer's disease and epigenetic diet. **Neurochemistry International**, v. 78, p. 105–116, 2014
52. KANSKI, Jaroslaw et al. Ferulic acid antioxidant protection against hydroxyl and peroxy radical oxidation in synaptosomal and neuronal cell culture systems in vitro: structure-activity studies. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 13, n. 5, p. 273–281, 2002
53. ONO, Kenjiro et al. Curcumin Has Potent Anti-Amyloidogenic Effects for Alzheimer's β -Amyloid Fibrils In Vitro. **Journal of Neuroscience Research**, v. 75, n. 6, p. 742–750, 2004
54. BENCHEKROUN, Mohamed et al. Novel tacrine-grafted ugi adducts as multipotent anti-alzheimer drugs: A synthetic renewal in tacrine-ferulic acid hybrids. **ChemMedChem**, v. 10, n. 3, p. 523–539, 2015
55. PAN, Wanli et al. Design, synthesis and evaluation of novel ferulic acid-memoquin hybrids as potential multifunctional agents for the treatment of Alzheimer's disease. **Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters**, v. 26, n. 10, p. 2539–2543, 2016
56. FANG, Lei et al. Ferulic acid-carbazole hybrid compounds: Combination of cholinesterase inhibition, antioxidant and neuroprotection as multifunctional anti-Alzheimer agents. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, v. 24, n. 4, p. 886–893, 2016
57. XU, Wei et al. Synthesis and evaluation of donepezil–ferulic acid hybrids as multi-target-directed ligands against Alzheimer's disease. **MedChemComm**, v. 7, n. 5, p. 990–998, 2016
58. WANG, Jin et al. Novel cinnamamide-dibenzylamine hybrids: Potent neurogenic agents with antioxidant, cholinergic, and neuroprotective properties as innovative drugs for Alzheimer's disease. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 139, p. 68–83, 2017

59. SHI, Lei et al. Synthesis of novel cinnamanilides as potential immunosuppressive agents. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 47, n. 1, p. 585–593, 2012
60. HU, Ming Kuan et al. Homodimeric tacrine congeners as acetylcholinesterase inhibitors. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 45, n. 11, p. 2277–2282, 2002
61. LUO, Wen et al. Design, synthesis and evaluation of novel tacrine-multialkoxybenzene hybrids as dual inhibitors for cholinesterases and amyloid beta aggregation. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, v. 19, n. 2, p. 763–770, 2011
62. CLAYDEN, J.; GREEVES, N.; WARREN, S. **Organic Chemistry**. 2. ed. 2012. 747-748 p.
63. MONTALBETTI, Christian AGN; FALQUE, Virginie. Amide bond formation and peptide coupling. **Tetrahedron**, v. 61, n. 46, p. 10827-10852, 2005.