



**GISELE SILVESTRE DA SILVA**

**DESENVOLVIMENTO DE UM HÍBRIDO MOLECULAR COM BASE NA  
ESTRUTURA DA TACRINA CANDIDATO A INIBIDOR DE  
ACETILCOLINESTERASE**

**CAMPINAS**

**2013**





**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS  
INSTITUTO DE QUÍMICA**

**GISELE SILVESTRE DA SILVA**

**DESENVOLVIMENTO DE UM HÍBRIDO MOLECULAR COM BASE NA ESTRUTURA  
DA TACRINA CANDIDATO A INIBIDOR DE ACETILCOLINESTERASE**

**ORIENTADOR: PROFA. DRA. WANDA PEREIRA ALMEIDA**

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO APRESENTADA  
AO INSTITUTO DE QUÍMICA DA UNICAMP PARA  
OBTENÇÃO DO TÍTULO DE MESTRA EM QUÍMICA  
NA ÁREA DE QUÍMICA ORGÂNICA.**

**ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO FINAL DA DISSERTAÇÃO  
DEFENDIDA POR GISELE SILVESTRE DA SILVA, E ORIENTADA PELA PROFA.  
DRA. WANDA PEREIRA ALMEIDA.**

---

**Assinatura da Orientadora**

**CAMPINAS**

**2013**

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA POR DANIELLE DANTAS DE SOUSA -  
CRB8/6490 - BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE QUÍMICA DA UNICAMP**

Si38d	<p>Silva, Gisele Silvestre da (1981-). Desenvolvimento de um híbrido molecular com base na estrutura da tacrina candidato a inibidor de acetilcolinesterase / Gisele Silvestre da Silva. – Campinas, SP: [s.n.], 2013.</p> <p>Orientador: Wanda Pereira Almeida.</p> <p>Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Química.</p> <p>1. Alzheimer, Doença de. 2. Acetilcolinesterase. 3. Modelagem molecular. I. Almeida, Wanda Pereira. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Química. III. Título.</p>
-------	--

Informações para Biblioteca Digital

**Título em inglês:** Development of a molecular hybrid based on the structure of tacrine as a potential acetylcholinesterase inhibitor

**Palavras-chave em inglês:**

Alzheimer disease  
Acetylcholinesterase  
Molecular modelling

**Área de concentração:** Química Orgânica

**Titulação:** Mestrado em Química na área de Química Orgânica

**Banca examinadora:**

Wanda Pereira Almeida [Orientadora]  
Cláudio Francisco Tormena  
Maria Teresa Salles Trevisan

**Data de defesa:** 19/07/2013

**Programa de pós-graduação:** Química



*Dedico meu trabalho à minha mãe, Ádima Silvestre.*

*Pelo ser frágil e forte que és.*

*Por ser quem tanto me ensina e inspira.*



## **Agradecimentos**

A Deus, minha fonte inesgotável de esperança e força, que me inspira a ser firme nessa peregrinação que é viver. Tu és meu guia, meu abrigo, meu ajudador, minha fortaleza. Agradeço Tua presença em minha vida!

A minha orientadora, Wanda Pereira Almeida, pelos ensinamentos, conversas, orientação, amizade e otimismo que sempre me motivaram. Por escolher trilhar estes caminhos comigo. Pelos conselhos e apoio nas horas difíceis. E, por ser especial a ponto de conseguir semear flores em caminho de pedras.

A minha família (Ádima, Sr. Antônio, Fabim, Gezinha, Leo e Bel) por terem sido escolhidos por Deus a fazerem parte da minha vida. Compartilhando comigo todos os ensinamentos, alegrias e tristezas. Especialmente, a matriarca Silvestre que com sua força inspiradora me incentiva e me apoia. E, é em você que me espelho pra continuar nas minhas lutas.

A Lívia Paulia, por ter sido a pioneira entre os nordestinos conhecidos da UFC a trilhar este caminho e por ter me apoiado e acolhido quando vim a Campinas. Assim também, como fez com outros sonhadores da terrinha. Tendo sido, ao longo desses anos, anfitriã, incentivadora e fraterna. Você se tornou para mim mais que uma amiga, uma irmã.

Ao Fábio, meu amigo-irmão escolhido pela vida e pelo meu coração. Amo você demais, cabeça!

A “Baianada” e queridos agregados (Livinha, Michel, Tiago Baiano, Irlene, Thiaguin Zk, Flamys, Magale, Janaína, Lucas, Lair, Adriana, Paula, Ramon, Samuel, Luelc, Ricardo, Romin, Sol, Solita...) sonhadores nordestinos em terras distantes, pessoas que acreditam na educação como força motriz de mudança do mundo. Tantas histórias diferentes, por outro lado tão iguais. Vocês alegraram meus dias campineiros.

As várias formações da família “*Baixa da égua*” e aos queridos agregados (Lívia, Lair, Iolana, Pedro, Rômulo, Mayara, Rafael, Sol, Marcos, Klécia, Martins, Gabi, Claudio, Rick, Luelc, Mandinha...) pela escolha de cada um em dividir comigo tantos sonhos, som e silêncio, qualidades e defeitos, doces e travessuras. Muito obrigado pelos nossos “bons drinks” e todos os momentos de carinho, apoio e conselhos.

A Dona Salvatina, que trazia ao nosso humilde lar uma áurea de maternidade. Com sua visita trazia consigo muita paz, tranquilidade e certo “reviver” familiar deixada em nossa terra natal. Muito obrigado, que Deus lhe abençoe sempre!

Ao pessoal do laboratório, aos que foram trilhar outros caminhos, aos que chegaram e aos que voltaram: Renan, Paula, Gabi, Letícia Nishimura, Renata Sigrist, Raquel, Pedro, Suellen Moraes, Suelen Rocha, Lucas, Débora, Gustavo, Renata, Renata Parruca, Vanessa, Diogo. Muito obrigada a cada um de vocês pelos conselhos e ensinamentos compartilhados. E, principalmente por fazerem do nosso cotidiano de trabalho um lugar agradável e prazeroso. Obrigado por tudo!

Aos professores da Universidade Federal do Ceará (Geraldo, Jair, Conceição) e aos companheiros do LABFITO (Francisco, Carol, Keyline, Lair, Carlos, Célio, Roberta Rodrigues), pela minha iniciação à química orgânica. Pelos ensinamentos e conselhos compartilhados e, principalmente pela amizade. Muito obrigado!

Aos amigos da Unicamp: Ricardo, Suelen Sucena, André, Tarsila, Juliana, Dany Soares, Cristiane Schwalm, Alanzinho, Madinha, Danilo, Marília, Bruno, João Scaramal, Daniara, Fernanda Lima, Lucimara, Juliana, Edson, Carolina Sant'Ana, Lucas Martins, Adriana Godoy, Igor, Thiago, Juliana Cortez, Juliana, Benedito, Aline Guadalupe, Rodrigo Pirovani, Rose Barcelos, Lanousse Petiote, Livinha Mesquita, Ana Carolina Naime, e tantos outros rostos que me ajudaram com um sorriso aqui, outro solvente ali. Passos que deixaram os corredores do IQ um pouco mais aconchegantes. Obrigado!

Aos amigos da Fortaleza, que mesmo longe estão sempre muito presente na minha vida: Ptila, Glayd, Aierta, Ana Virginia, Flávio doido, Rejane, Dani, Adriana, Branquinha, Cleudo, Zé perecas. Quer seja numa mensagem, numa ligação, num encontro ou visita rápida, obrigado pela presença!

À Professora Maria Teresa Salles Trevisan e aos alunos da UFC Jeison e Irvila, pela realização do ensaio biológico em seu laboratório.

Aos funcionários da CPG (Bel, Miguel e Gabriela) pela ajuda e orientação.

Aos técnicos de RMN e IV (Paula, Anderson, Sônia, Gustavo e Marcia) pelos inúmeros auxílios e esclarecimentos.

Aos funcionários do Instituto de Química (Marcio, Nestor, Cristiano) da segurança, sempre muito solícitos;

Aos funcionários da BIQ (Toninho, Laurindo, Simone e Danielle Dantas) sempre simpáticos e muito prestativos;

À CAPES pelo auxílio financeiro.

# Curriculum vitae

## 1. Dados pessoais

---

**Nome:** Gisele Silvestre da Silva

**Citação:** Silva, G. S.

<http://buscatextual.cnpq.br/buscatextual/visualizacv.do?id=K4278683D4>

**e-mail:** gihchemistry@gmail.com

## 2. Formações acadêmicas

---

2006-2010: Graduação em Química- Bacharelado. Universidade Federal do Ceará

## 3. Produção científica

---

### 3.1. Trabalhos completos publicados em anais de congressos

1. SILVA, G. S.; MELLO, L. B.; NISHIMURA, L. S.; ALMEIDA, W. P., *Planejamento de híbridos moleculares baseados na estrutura da tacrina e donepezila, candidatos a inibidores da acetilcolinesterase*. **2012**. 35<sup>a</sup> Reunião Anual da SBQ.

2. ARAÚJO. P.S.; SILVA, G. S.; ARAÚJO, A.S.; *Utilização dos resíduos orgânicos na produção de biogás*, **2007**, 47<sup>o</sup> Congresso Brasileiro de Química - Recursos não renováveis.

### 3.2. Apresentações de Trabalho

1. SILVA, G. S.; MELLO, L. B.; ALMEIDA, W. P.; *Studies on the synthesis and design of acetylcholinesterase inhibitors based on the dual binding ligand approach*, **2012**, III Brazil-Spain workshop on organic chemistry.

2. SILVA, G. S.; MELLO, L. B.; NISHIMURA, L. S.; ALMEIDA, W. P.; *Planejamento de híbridos moleculares baseados na estrutura da tacrina e donepezil, candidatos a inibidores da acetilcolinesterase*, **2012**, 35ª Reunião Anual da SBQ.

3. OLIVEIRA, F. C.; BARBOSA, F. G.; MAFEZOLI, J. ; SILVA, G. S.; OLIVEIRA, M.L.S.; OLIVEIRA, M.C.F. *Investigação do potencial anticâncer de extratos obtidos da espécie venornia brasiliana*, **2010**, XXI Simpósio de plantas medicinais do Brasil.

4. SILVA, F.J.S.; SILVA, G. S.; LIMA, M.S.O.; BARBOSA, F. G.; MAFEZOLI, J. ; Andrade-Neto, M.; *Diterpenos crotofolanos de Croton jacobinensis Bill (Euphorbiaceae)*, **2010**, 30ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química.

#### **4. Atividades acadêmicas**

---

##### **4.1. Monografia de conclusão de curso de aperfeiçoamento/especialização**

1. SILVA, G. S.; *Sínteses de 2- Fenil 3- Formil 1- Azirina & 2-fenil-3-formil-3-metil-azirina*. **2010**. Monografia. Estágio supervisionado em iniciação científica – Universidade Federal do Ceará – UFC (Aperfeiçoamento/ Especialização em Químico - Bacharelado). Orientador: Prof. Dr. José Nunes da Silva Júnior.

##### **4.2. Iniciação científica**

1. SILVA, G. S. *Investigação do potencial biotecnológico de microrganismos marinhos da costa cearense*. **2010**. Universidade Federal do Ceará, PIBIC/CNPq. Orientador: Profa. Dra. Maria da Conceição da Silva Oliveira.

2- SILVA, G. S. *Estudo químico e biológico de fungos micorrizas: investigação sobre o papel dos metabolitos secundário na interação entre fungo-planta da flora nordestina*. **2009**. Universidade Federal do Ceará, PIBIC/UFCv. Orientador: Jair Mafezoli.

## Resumo

DESENVOLVIMENTO DE UM HÍBRIDO MOLECULAR BASEADO NA ESTRUTURA DA TACRINA CANDIDATO A INIBIDOR DE ACETILCOLINESTERASE. A Doença de Alzheimer (DA) é uma doença neurodegenerativa, que compromete as funções cognitivas. A acetilcolinesterase (AChE), enzima responsável pela hidrólise da acetilcolina (ACh), é um importante alvo para o desenvolvimento de candidatos a fármacos para tratar a DA. A AChE possui dois sítios ligantes: o catalítico e o periférico, envolvidos com a hidrólise da AChE e com o processo de formação de fibrilas do peptídeo  $\beta$ -amilóide, respectivamente. Neste trabalho propusemos a síntese e avaliação biológica de dois híbridos, ambos contendo porção tetraidroacridina baseado na estrutura da tacrina O híbrido I contém uma subunidade indanona baseado na donepezila e o híbrido II contém uma porção anti-inflamatória do ibuprofeno. O híbrido I e o híbrido II comportaram-se como um simples ligante e um híbrido molecular multipotente, respectivamente. Em ambos os casos foram escolhidos híbridos contendo duas unidades metilênicas. Um intermediário tetraidroacridínico contendo um grupo aminoálcool (**6**), que também se liga ao sítio catalítico da AChE, foi sintetizado a partir do ácido antranílico em uma sequência de três etapas. Todas as tentativas de acoplar este intermediário ao ibuprofeno fracassaram. Face a estes resultados, voltamos nossa atenção para as quinolonas, compostos planares que como a tacrina poderiam interagir com o sítio catalítico da AChE. Assim, nós sintetizamos quatro derivados da 4-quinolona. A síntese envolveu a ciclização catalisada por TFA do aduto de Morita-Baylis-Hillman, derivado do 2-nitrobenzaldeído, levando ao correspondente N-óxido (**32**). Em seguida, ele foi tratado com hexacarbonilmolibdato para fornecer a 3-carboetoxi-4-quinolona (**38**) em 33 % de rendimento global. O ácido carboxílico correspondente e derivados N-etilados também foram preparados. O efeito de três destes derivados quinolônicos sobre a atividade da acetilcolinesterase foi estudado. A *N*-alquil-3-carboetoxi-4-quinolona (**40**) foi o mais ativo dos derivados ( $IC_{50} \sim 84 \mu\text{mol/L}$ ). Estudo de docking molecular corroboraram nossas observações.



## Abstract

DEVELOPMENT OF A MOLECULAR HYBRID BASED ON THE STRUCTURE OF TACRINE AS A POTENTIAL ACETYLCHOLINESTERASE INHIBITOR. Alzheimer's disease (AD) is a neurodegenerative pathology, which compromises the cognitive functions. Acetylcholinesterase (AChE) is the enzyme involved in the hydrolysis of neurotransmitter acetylcholine (ACh) and has been highlighted as an important target for the design of drugs to treat AD. AChE has two binding sites: a catalytic site and the peripheral one, which are involved in the acetylcholine hydrolysis and the formation of A $\beta$ <sub>42</sub> peptide fibrils, respectively. In this work we proposed the synthesis and biological evaluation of two hybrids based on the tacrine structure, both containing portion tetrahydroacridine based on the structure of tacrine. The hybrid I has donepezil moieties and the hybrid II has anti-inflammatory portion. The hybrid I and hybrid II behave as a simple ligand and molecular hybrid, respectively. We have found that linkers with two and three methylene units generate suitable hybrids to bind to the catalytic site of the AChE. A key tetrahydroacridine bearing an amino alcohol function (**6**) also binds to the catalytic site of the AChE. It was synthesized from anthranilic acid in three steps sequence. All attempts to couple **6** and ibuprofen failed. In view of these results, we turn our attention to other planar structures which could interact with the catalytic site of the AChE. Thus, we synthesized four 4-quinolone derivatives. The synthesis involved a TFA mediated cyclization of the Morita-Baylis-Hillman adduct, derived from 2-nitrobenzaldehyde, leading to the corresponding *N*-Oxide (**32**). Then, it was treated with hexacarbonyl molibdate to afford 3-carboethoxy-4-quinolone (**38**) in 33% overall yield. We have also prepared: the corresponding carboxylic acid and the *N*-ethyl derivatives. The effect of three of them on the acetylcholinesterase activity was evaluated. The *N*-alkyl-3-carboethoxy-4-quinolone (**40**) was the most active (IC<sub>50</sub> ~84 $\mu$ mol/L). Molecular docking studies corroborated our observations.



# Sumário

Lista de Abreviaturas e convenções .....	xxiii
Lista de Figuras .....	xxvii
Lista de Tabelas.....	xxxiii
1. Introdução.....	1
1.1. Considerações gerais.....	3
1.2. Hipótese da cascata $\beta$ -amilóide.....	7
1.2.1. Formação do peptídeo amiloide ( $A\beta_{42}$ ).....	8
1.2.2. Neuroinflamação e a DA.....	11
1.3. Hipótese colinérgica.....	13
1.3.1. Anticolinesterásicos .....	16
1.3.2. Acetilcolinesterase .....	20
1.3.3. Butirilcolinesterase (BuAChE).....	22
1.4. Estratégias de desenvolvimento de fármacos e AChE.....	25
2. Objetivos .....	29
2.1. Gerais .....	31

2.2. Específicos .....	32
3. Metodologias.....	35
3.1. Seleção da estrutura da AChE para o Docking molecular.....	37
3.2. Preparo dos ligantes e Docking molecular.....	38
3.3. Metodologias sintéticas.....	41
3.3.1. Proposta sintética para os híbridos moleculares do tipo I e II .....	41
3.3.2. Estudos visando à síntese do aminoálcool 1 .....	42
3.3.2. Proposta sintética para as quinolonas.....	43
3.4. Avaliação in vitro da atividade inibidora da acetilcolinesterase.....	45
3.4.1. Análise qualitativa.....	45
3.4.2. Análise quantitativa.....	46
4. Resultados e Discussão .....	49
4.1. Estudos de Alinhamento local da sequência de proteína (BLASTp) das enzimas AChE da raia com as enzimas AChE humana.....	51
4.1.1. Obtenção e Preparo dos Ligantes.....	57
4.1.2. Estudos de docking do híbrido I .....	58
4.1.3. Estudos de docking molecular dos híbridos II.....	70

4.1.4. Estudos do docking molecular da quinolona 1 com as acetilcolinesterases humanas e <i>T. Californica</i> .....	82
4.2. Síntese química .....	87
4.2.1. Preparo dos híbridos moleculares tipo I e II .....	87
4.2.2. Tentativa de alquilação da dimetoxiindanona.....	98
4.2.3. Tentativa de preparo do híbrido tipo II .....	99
4.2.4. Síntese de quinolonas.....	105
4.3. Avaliação <i>in vitro</i> da atividade inibidora da acetilcolinesterase.....	114
4.3.1. Análise qualitativa.....	114
4.3.2. Análise quantitativa.....	116
5. Conclusão .....	119
6. Parte experimental.....	127
6.1. Geral.....	129
6.2. Preparação dos compostos .....	131
6.2.1. Espiro 2H-3,1-benzoxazina-2,10-ciclohexan]-4(1H)-ona (9) .....	131
6.2.2. 9-cloro-1,2,3,4-tetraidroacridina (7) .....	133
6.2.3. 9-aminoalcool-1,2,3,4-tetraidroacridina (6).....	134

6.2.4. Acrilato de metil-2-[(2-nitrofenil)(hidroxi)metil] (31) .....	136
6.2.5. óxido de 4-hidroxiquinolina-3-carboxilato de metila (32) .....	138
6.2.6. 4-oxo-1,4-dihidroquinolina-3-carboxilato de metila (38).....	139
6.2.7. 4-oxo-1,4-dihidroquinolina-3-carboxilato de metila (40).....	140
6.2.8. 6,8-Dimetil-4-oxo-1,4-dihidroquinolina-3-ácido carboxílico (1)	141
6.2.9. Etila-4-oxo-1,4-dihidro-quinolona-3-ácido carboxílico (32).....	142
7. Anexos.....	143

## Lista de Abreviaturas e convenções

<b>A<math>\beta</math>:</b>	peptídeo $\beta$ -amilóide
<b>A<math>\beta</math><sub>42</sub>:</b>	peptídeo $\beta$ -amilóide contendo 42 resíduos aminoácidos
<b>Acetil-CoA:</b>	acetil coenzima-A
<b>ACh:</b>	acetilcolina
<b>AChE:</b>	acetilcolinesterase
<b>ChAT:</b>	colina acetiltransferase
<b>CCD:</b>	cromatografia em camada delgada
<b>CYP1A2:</b>	enzima mediadora de metabolismo de xenobiótico
<b><math>\delta</math>:</b>	desvio químico
<b>DA:</b>	doença de Alzheimer
<b>DABCO:</b>	1,4-diazabicyclo-[2.2.2.]-octano
<b>DEPT:</b>	Distortionless Enhancement by Polarization Transfer
<b>DMAP:</b>	4-Dimetilaminopiridina
<b>DMSO:</b>	dimetilsulfóxido
<b>DNTP:</b>	ácido 5,5-ditiobis(2-nitrobenzóico)
<b>DON:</b>	donepezila
<b>ESI-MS:</b>	espectrometria de massas por electrospray
<b>HMBC:</b>	Heteronuclear Multiple Bond Correlation
<b>IACHe:</b>	inibidores da acetilcolinesterase

<b>IV:</b>	infravermelho
<b>J:</b>	constante de acoplamento
<b>IBU:</b>	ibuprofeno
<b>(M + H<sup>+</sup>):</b>	íon molecular
<b>MAO:</b>	monoamina oxidase
<b>MeOH:</b>	metanol
<b>MBH:</b>	Morita-Baylis-Hillman
<b>m/z:</b>	razão massa/carga
<b>NEQs:</b>	novas entidades químicas
<b>NMDA:</b>	<i>N</i> -metil-D-aspartato
<b>P450IA2</b>	proteína codificada em humanos pelo gene CYP1A2
<b>PPA:</b>	proteína precursora de amilóide
<b>RMN <sup>13</sup>C:</b>	ressonância Magnética Nuclear de Carbono 13
<b>RMN <sup>1</sup>H:</b>	ressonância magnética nuclear de próton
<b>SN<sub>ar</sub>:</b>	Substituição nucleofílica aromática
<b>sPPA<math>\alpha</math>:</b>	fragmentos solúveis da PPA provenientes da clivagem pela $\alpha$ -secretase
<b>sPPA<math>\beta</math>:</b>	fragmentos solúveis da PPA provenientes da clivagem pela $\beta$ -secretase
<b>TMS:</b>	Tetrametilsilano

**TFA:** ácido trifluoroacético

**THA:** tacrina

**Trp:** Triptofano



## Lista de Figuras

<b>Figura 1.</b> Marcadores histológicos da DA .....	6
<b>Figura 2.</b> Processamento da PPA por ação das enzimas $\alpha$ , BACE-1 e $\gamma$ -secretases pelas vias amiloidogênica e não amiloidogênica. ....	10
<b>Figura 3.</b> Biossíntese e degradação da acetilcolina. AChE: acetilcolinesterase; ChAT: colina acetil transferase. ....	13
<b>Figura 4.</b> Esquema de biossíntese e degradação da acetilcolina. (AChE = Acetilcolinesterase; ChAT = Colina acetiltransferase; ● = Acetilcolina; ☉ = Receptores Muscarínico; 🍷 = Receptores Nicotínico). ....	14
<b>Figura 5.</b> Fármacos aprovados pelo FDA para o tratamento de DA. ....	17
<b>Figura 6.</b> Caminho metabólico da tacrina mostrado intermediário fenólico 7-OH-THA e formação subsequente da metide quinona. ....	18
<b>Figura 7.</b> Comparação do sítio ativo das enzimas AChE humanas (Código do PDB:3LII) e BuAChE (Código do PDB: IP01) em uma área restrita do sítio ativo de 6,6 Å e 10 Å, respectivamente. ....	24
<b>Figura 8.</b> Híbridos moleculares tendo como base a estrutura da THA .....	27
<b>Figura 9.</b> (A) Híbrido proposto baseado na estrutura da tacrina e donepezila; (B) Híbrido proposto baseado na estrutura da tacrina e ibuprofeno. ....	32
<b>Figura 10.</b> Quinolona escolhida para estudo de docking .....	32

<b>Figura 11. A</b> - Interface do software BLAST com entrada das enzimas AChE.	
<b>B</b> - Parâmetros algoritmos utilizados para o BLASTp entre as enzimas AChE de códigos 1E66.pdb com as enzimas humanas 3LII.pdb e 1B41.pdb.....	37
<b>Figura 12.</b> Estruturas dos híbridos moleculares <b>I</b> e <b>II</b> .....	38
<b>Figura 13.</b> Parâmetros utilizados para os dockings dos ligantes com as AChE. ....	40
<b>Figura 14.</b> Estratégia para a síntese dos híbridos <b>I</b> e <b>II</b> .....	42
<b>Figura 15.</b> Síntese da 9-clorotetraidroacridina 7.....	43
<b>Figura 16.</b> Análise retrossintética para preparação de quinolonas. ....	43
<b>Figura 17.</b> Alinhamento local da sequência primária da AChE da raia (query) de códigos 1E66 com as humanas (sbjct) , 3LII e 1B41, respectivamente.....	55
<b>Figura 18.</b> Estrutura do híbrido <b>I</b> .....	58
<b>Figura 19.</b> A - Vista frontal da estrutura da tacrina minimizada; B - Interação $\pi$ -stacking da THA com Trp86 da AChE humana (1B41). ....	62
<b>Figura 20.</b> Interação $\pi$ -stacking do híbrido tipo <b>I</b> (n = 1) com Trp86 da AChE humana (1B41).....	69
<b>Figura 21.</b> Estrutura do híbrido <b>II</b> .....	70
<b>Figura 22.</b> Representação tridimensional do híbrido <b>II</b> ancorado na AChE humana (1B41) mostrando Interação $\pi$ -stacking com Trp86 da independente	

do número de carbonos metilênicos (n = 1 e n =5, respectivamente dois e seis carbonos metilênicos totais).....	80
<b>Figura 23.</b> A – Vista frontal da Interação $\pi$ -stacking do amino álcool acridina com Trp86 da AChE humana (1B41); B – Distância da Interação $\pi$ -stacking do amino álcool acridina com Trp86. ....	81
<b>Figura 24.</b> <i>Esquerda:</i> estrutura da quinolona 1 selecionada para estudo. <i>Centro e direita:</i> estrutura minimizada evidenciando a sua conformação planar. ....	82
<b>Figura 25.</b> A - Visão frontal da Interação da quinolona 1 com o sítio Trp84 da AChE 1E66. B - Visão perpendicular da Interação da quinolona 1 com o sítio Trp86 da AC hE humana 1B41.....	86
<b>Figura 26.</b> Rotas sintéticas para preparo dos híbridos I e II. ....	87
<b>Figura 27.</b> Síntese da 9-clorotetraidroacridina 7.....	88
<b>Figura 28.</b> Síntese do espiro aminocetal 9 e 9-clorotetraidroacridina 7. ....	89
<b>Figura 29.</b> Proposta de mecanismo para da reação de formação do espiro aminocetal 9. ....	92
<b>Figura 30.</b> Mecanismo de formação da 9-cloro-1,2,3,4-tetraidroacridina 7 a partir do espiro aminoacetal 9. ....	94
<b>Figura 31.</b> A: Conversão do amino álcool 6 ao agente alquilante 24; B: alquilação do enolato da indanona 25, levando ao híbrido do tipo I. ....	98

<b>Figura 32.</b> Tentativa de alquilação da indanona 25 com dibromoetano. ....	99
<b>Figura 33.</b> Tentativa de obtenção do híbrido I via acoplamento de Steglich, .....	100
<b>Figura 34.</b> Possíveis produtos da reação de substituição nucleofílica aromática e da reação de Steglich. ....	101
<b>Figura 35.</b> $^{15}\text{N}, ^1\text{H}$ - HMBC do aminoálcool 6 em $\text{CDCl}_3$ (400 MHz). ....	102
<b>Figura 36.</b> $^{15}\text{C}-^1\text{H}$ - HSQC do aminoálcool 6 em $\text{CDCl}_3$ (500 MHz). ....	103
<b>Figura 37.</b> Formação do aduto 30 entre ibuprofeno e diciclohexilcarbodiimida (DCC). ....	104
<b>Figura 38.</b> Estratégia de obtenção da quinolona 1 e derivados <i>N</i> - alquilados .....	105
<b>Figura 39.</b> Reação de Morita-Baylis-Hillman. ....	106
<b>Figura 40.</b> Reação para obtenção do aduto de MBH 31. ....	106
<b>Figura 41.</b> Sequência de etapas de preparação de sistemas 4-quinolônicos. Reagentes e condições: <sup>a</sup> TFA, 20h, 70–75 °C, 84%; <sup>b</sup> Mo(CO) <sub>6</sub> , EtOH, 92%; .....	108
<b>Figura 42.</b> O mecanismo proposto por Kim e colaboradores. ....	108
<b>Figura 43.</b> Reação para obtenção da quinolona 38 .....	110

<b>Figura 44.</b> Proposta mecanística para a obtenção da quinolona 38. ....	110
<b>Figura 45.</b> Hidrólise da quinolona 1. Reagentes e condições: <sup>a</sup> H <sub>2</sub> O: MeOH (1:4), K <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> , 45 min, 80 °C; <sup>b</sup> H <sub>3</sub> O <sup>+</sup> , 93%.....	111
<b>Figura 46.</b> Derivados quinolônicos selecionados para síntese e avaliação biológica.....	112
<b>Figura 47.</b> Obtenção dos derivados N-alkilados. Reagentes e condições: <sup>a</sup> CH <sub>3</sub> CH <sub>2</sub> I, K <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> , DMF, 12h, 53%; <sup>b</sup> H <sub>2</sub> O:MeOH (1:4), K <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> , 1h, 95 °C, 89 %.....	113
<b>Figura 48.</b> Gráfico de Inibição da acetilcolinesterase pela quinolona 40 avaliadas pelo ensaio em microplaca pelo método de Elmman. Desvio padrão: 84,97 +/- 1,23 μM. ....	117
<b>Figura 49.</b> Esquema representativo das etapas sintéticas para obtenção dos híbridos I e II, desenvolvidas neste trabalho.....	122
<b>Figura 50.</b> Esquema representativo das etapas sintéticas para a obtenção dos derivados quinolônicos.....	124



## Lista de Tabelas

**Tabela 1.** Estruturas cristalográficas da enzima AChE humana e *T. Californica*. .....52

**Tabela 2.** *Energias de interação dos híbridos do tipo I (kcal/mol):* melhores resultados de *moldock score, protein*, ligação de H e interações observadas nos poses do *docking* molecular na ausência de água para híbridos do tipo I (THA-DON) com as AChE humanas (3LII e 1B41) e da raia (1E66). .....65

**Tabela 3.** *Energias de interação dos híbridos do tipo I (kcal/mol):* melhores resultados de *moldock score, protein*, ligação de H e interações observadas nos poses do *docking* molecular na ausência de água para híbridos do tipo I (THA-DON) com as AChE humanas (3LII e 1B41) e da raia (1E66). .....67

**Tabela 4.** *Energias de interação do híbridos do tipo II (kcal/mol):* melhores resultados de *moldock score, protein*, ligação de H e interações observadas nos poses do *docking* molecular na ausência de água para híbridos do tipo II (THA-IBU) com as AChE humanas (3LII e 1B41) e da raia (1E66). .....73

**Tabela 5.** *Energias de interação dos híbridos do tipo II (kcal/mol):* melhores resultados de *moldock score, protein*, ligação de H e interações observadas nos poses do *docking* molecular na presença de água com as AChE humanas (3LII e 1B41) e da raia (1E66). .....77

**Tabela 6.** Energias de interação da quinolona 1 (kcal/mol): melhor resultado de *moldock score, protein*, ligação de H e interações observadas do *docking*

*molecular* na ausência de água com as AChE humanas (3LII, 1B41) e de *T. californica* (1E66). .....84

**Tabela 7.** Energias de interação da quinolona 1 (kcal/mol): resultados de moldock score, protein, ligação de H e interações observadas do *docking molecular* na presença de água com as AChE humanas (3LII, 1B41) e de *T. californica* (1E66). .....84

**Tabela 8.** Condições reacionais testadas para obtenção do aminoálcool 6.....96

**Tabela 9.** Resultado da avaliação da atividade anticolinesterásica dos derivados quinolônicos.....115

“ Aceitarás a dificuldade, não por fardo de aflição que te arrasta as energias,  
mas por ensinamento que te habilite à mais ampla aquisição de experiência.”

*Chico Xavier*

“Pensava que nós seguíamos caminhos já feitos, mas parece que não os há.  
O nosso ir faz o caminho.”

C. S. Lewis



# **1. Introdução**



## 1.1. Considerações gerais

A doença de Alzheimer (DA) é um processo neurodegenerativo, progressivo e irreversível,<sup>1</sup> além de ser o principal tipo de demência associada à idade avançada. Esse processo multipatogênico compromete as funções cognitivas, como a memória, a linguagem, o aprendizado e a concentração, bem como diminui a coordenação motora e leva o portador à morte.

Há dois tipos de DA — a precoce e a tardia, o primeiro se desenvolve em pessoas com idade inferior a 65 anos e representa apenas 5% dos casos. A segunda, mais comum, se desenvolve depois dos 60 anos. Ambas possuem um componente genético associada à DA,<sup>2</sup> embora, as causas da doença não sejam completamente entendida.

O mundo possui, nos dias de hoje, 36 milhões de habitantes com alguma forma de demência e a estimativa para 2050 é de que existam mais de 115 milhões em tal situação. A DA é a que mais afeta essas pessoas, representando cerca de 60 a 80% dos casos de demência<sup>3</sup>. Um estudo realizado nos Estados Unidos pela Associação de Alzheimer estima que há cerca de 5,4 milhões de americanos com DA.

---

<sup>1</sup> D'Addario C, Di Francesco A, Arosio B, Gussago C, Dell'osso B, Bari M, Galimberti D, Scarpini E, Altamura AC, Mari D, Maccarrone M., Epigenetic regulation of fatty acid amide hydrolase in Alzheimer disease. *PLoS One*. 2012, 7, 1-7.

<sup>2</sup> [http://www.nia.nih.gov/sites/default/files/alzheimers\\_disease\\_genetics\\_fact\\_sheet.pdf](http://www.nia.nih.gov/sites/default/files/alzheimers_disease_genetics_fact_sheet.pdf). Último acesso: 04/03/2013.

<sup>3</sup> Alzheimer's Association, Alzheimer's Disease Facts and Figures, *Alzheimer's & Dementia*, 2012, 7, 2. [http://www.alz.org/downloads/Facts\\_Figures\\_2012.pdf](http://www.alz.org/downloads/Facts_Figures_2012.pdf). Último acesso: 30/11/2012.

Devido ao envelhecimento da população, a incidência do número de pessoas afetadas pela DA e outras formas de demência deve aumentar. A expectativa é de que esses números dobrem em 2050.<sup>3</sup> Esta deve ser uma tendência em países de população jovem como o Brasil, no qual se estima que há 1,2 milhões de pessoas afetados pela DA.<sup>4</sup>

Um dos grandes desafios da medicina atual é o diagnóstico precoce da DA. Estima-se que menos de 50% de pessoas são diagnosticadas, devido dificuldade de percepção dos sintomas iniciais. O diagnóstico da DA é mais comumente feito tendo como base um histórico médico e familiar, incluindo antecedentes psiquiátricos e históricos de perdas cognitivas e alterações comportamentais. O médico também realiza testes cognitivos e exames físico e neurológico. Adicionalmente, pode ser feito um de ressonância magnética por imagem para identificar mudanças no cérebro, como a presença de um tumor ou de provas de um acidente vascular cerebral, que poderia causar o declínio cognitivo.<sup>3</sup>

A DA afeta as pessoas de diferentes maneiras, mas tendo em comum o sintoma inicial, conforme já explanado, a perda de memória recente, explicada pela ruptura inicial da função celular cerebral no hipotálamo,<sup>5</sup> região do

---

<sup>4</sup> <http://www.criasaude.com.br/N3095/doencas/alzheimer/estatisticas-alzheimer.html>. Último acesso: 06/12/2012.

<sup>5</sup> Mormino, E. C., Kluth, J. T., Madison, C. M., Rabinovici, G. D., Baker, S. L., Miller, B. L., Koeppe, R. A., Mathis, C. A.; M. W. Weiner, M. W.; Jagust, W. J. Episodic memory loss is related to hippocampal-mediated  $\beta$ -amyloid deposition in elderly subjects, *Brain* **2009**, *132*, 1310–1323.

cérebro envolvida na formação de novas memórias. Com a progressão da doença outros sintomas tendem a aparecer.

De acordo com a associação de Alzheimer,<sup>3</sup> os principais sintomas cognitivos e comportamentais, considerados sinais de alerta da referida doença são: perda de memória, desorientação espacial e temporal, incapacidade de raciocínio lógico, dificuldade para entender imagens visuais e relações espaciais, incapacidade de planejar e realizar tarefas cotidianas, alteração do humor e da personalidade, dificuldade na escrita e na fala, incapacidade de refazer caminhos, dificuldade em completar tarefas, incapacidade de julgamento, perda de discernimento, depressão, incapacidade de cuidar de si mesmo, entre outros. Com a progressão da doença estes sintomas tendem a agravar-se levando o portador da DA à morte.<sup>6</sup>

Biomarcadores são características que tem o objetivo de medir e avaliar a processo biológico normal, processo patogênico ou resposta farmacológica que podem ser utilizados para uma intervenção terapêutica.<sup>7</sup> Patologicamente, a DA é caracterizados pela formação de placas amilóides extracelulares e emaranhados intracelulares neurofibrilar no cérebro. Além de perda neuronal, perda sináptica, atrofia cerebral e inflamação<sup>8</sup> caracterizada pela ativação de

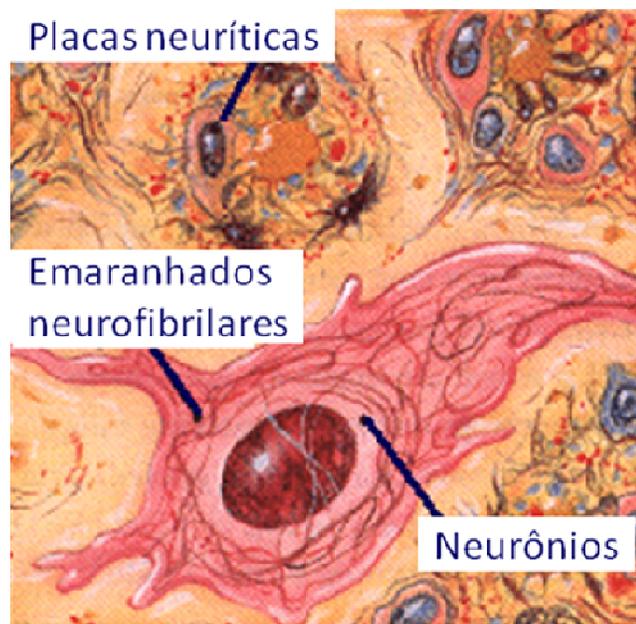
---

<sup>6</sup> Li L., Ruau D., Chen R., Weber S., Butte A.J., Systematic identification of risk factors for Alzheimer's disease through shared genetic architecture and electronic medical records, *Pac. Sym. Biocomput.* **2013**, 224-235.

<sup>7</sup> Ho, L., Fivecoat, H., Wang, J., Pasinetti, G. M., Alzheimer's disease biomarker discovery in symptomatic and asymptomatic patients: Experimental approaches and future clinical applications, *Exp. Gerontol.*, **2010**, 45(1), 15-22.

<sup>8</sup> Rapoport, S. I., Nelson, P. T. Biomarkers and evolution in Alzheimer disease, *Progr Neurobiol.*, **2011**, 95(4), 510-513.

citocinas, mastócitos e células da micróglia.<sup>9,10</sup> As placas senis extracelulares e os emaranhados neurofibrilares, constituem os dois principais marcadores histológicos e foram observados pela primeira vez por Alois Alzheimer em 1907 nos cérebros de pacientes com DA por meio de análises *post mortem*. Os emaranhados neurofibrilares são constituídos por fragmentos de proteína *tau* hiperfosforilada e comprometem a estrutura do citoesqueleto.



**Figura 1.** Marcadores histológicos da DA

---

<sup>9</sup> Jin, P., Kim, J.-A., Choi, D.-Y., Lee, Y.-J., Jung, H. S., Hong, J. T., Anti-inflammatory and anti-amyloidogenic effects of a small molecule, 2,4-bis(p-hydroxyphenyl)-2-butenal in Tg2576 Alzheimer's disease mice model, *J. Neuroinflamm.*, **2013**, 10(1), 1-13.

<sup>10</sup> Lee Y.J., Choi D.Y., Choi I.S., Kim K.H., Kim Y.H., Kim H.M., Lee K., Cho W.G., Jung J.K., Han S.B., Han J.Y., Nam S.Y., Yun Y.W., Jeong J.H., Oh K.W., Hong J.T., Inhibitory effect of 4-O-methylhonokiol on lipopolysaccharide-induced neuroinflammation, amyloidogenesis and memory impairment via inhibition of nuclear factor-kappaB in vitro and in vivo models, *J. Neuroinflamm.*, **2012**, 9, 35.

As placas neuríticas são formadas principalmente por formas agregadas e fibrilares de peptídeo derivados do processamento anormal da proteína precursora do amiloide (PPA). O principal peptídeo conhecido como  $A\beta_{42}$  possui 42 aminoácidos e possui propriedades auto-agregante.

Baseados nas principais características da DA, foram desenvolvidas algumas hipóteses na tentativa de entender e explicar um pouco mais sobre essa doença neurológica. Em seguida, vamos discutir um pouco mais sobre essas hipóteses.

## **1.2. Hipótese da cascata $\beta$ -amilóide**

A hipótese da cascata do amilóide afirma que a deposição do peptídeo  $\beta$ -amilóide ( $A\beta$ ) no cérebro é o passo crucial que inicia uma sequência de eventos que conduzem finalmente à DA. Essa hipótese é baseada em características histopatológica e genética encontrados em pacientes da DA.

Histologicamente, a identificação do peptídeo  $A\beta$  nas placas senis extracelulares em análises *post mortem* no cérebro de pacientes com Alzheimer levantou a hipótese de que este evento pudesse estar relacionado a DA. Geneticamente, a hipótese do amilóide baseia-se em estudos de pequenas populações de indivíduos com formas autossômicas dominantes de DA em que mutações nos genes da proteína precursora do amilóide (PPA), mostraram um aumento da produção e agregação da  $A\beta_{42}$  (peptídeo  $\beta$ -amilóide contendo 42 resíduos aminoácidos).

Segundo essa hipótese, a neurodegeneração na DA começa com esse processamento anormal da PPA e resultaria na produção, agregação e deposição do peptídeo A $\beta$ . Adicionalmente, a hipótese da cascata do amilóide ainda sugere que a sinaptotoxicidade e neurotoxicidade celular estão de alguma forma mediada pelas formas solúveis de espécies do peptídeo A $\beta$ . A natureza dinâmica dessas espécies e do mecanismo da toxicidade permanece desconhecida. Os mecanismos potenciais que podem levar à agregação do peptídeo  $\beta$ -amilóide, em última análise, resultam na perda neuronal e culminam na demência do paciente.<sup>11</sup>

### **1.2.1. Formação do peptídeo amiloide (A $\beta$ <sub>42</sub>)**

PPA é uma proteína precursora do amilóide. Uma glicoproteína transmembrana contendo 695-770 resíduos de aminoácido que possui um largo citocitoplasmático N-terminal que se expressa na superfície celular dos neurônios e células da glia,<sup>12</sup> cujo processamento ocorre através de enzimas proteolíticas por duas vias, uma amiloidogênica e outra dita não-amiloidogênica (Figura 2).<sup>13</sup>

---

<sup>11</sup> Karran E., Mercken M., De Strooper B., The amyloid cascade hypothesis for Alzheimer's disease: an appraisal for the development of therapeutics, *Nat. Rev. Drug. Discov.* **2011**, 10(9), 698-712.

<sup>12</sup> Mohamed A., Chaves E. P., A $\beta$  Internalization by Neurons and Glia *International Journal of Alzheimer's Disease, Int. J. Alzheimers Dis.*, **2011**, 1-17.

<sup>13</sup> Ray, B., Lahiri, D. K., Neuroinflammation in Alzheimer's disease: different molecular targets and potential therapeutic agents including curcumin, *Curr. Opin. Pharmacol.*, **2009**, 9, 434-444.

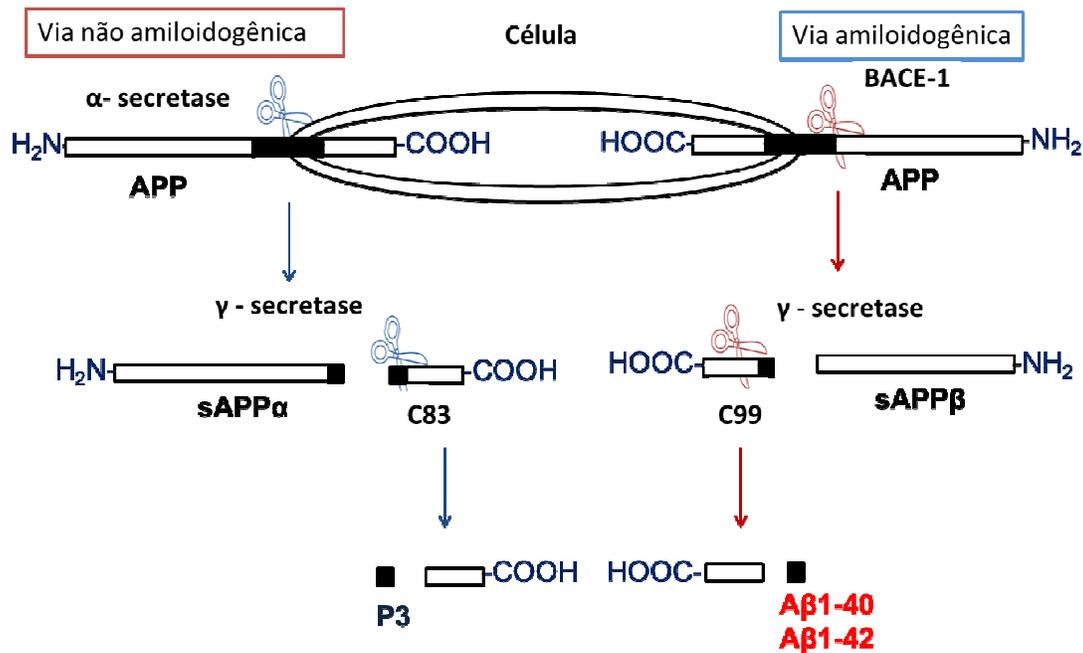
O processamento não amiloidogênico ocorre pela clivagem da PPA, pela ação das enzimas  $\alpha$ -secretases, liberando ao meio extracelular o fragmento C83 e uma estrutura solúvel (sAPP $\alpha$ ) que adicionalmente ainda possui características de neuroproteção.<sup>14</sup> O fragmento C83 pode ser processado por uma  $\gamma$ -secretase produzindo o peptídeo P3 e um derivado que não possuem o domínio do peptídeo A $\beta$ .

Na via amiloidogênica, ocorre clivagem do APP pela enzima BACE-1, anteriormente denominada de  $\beta$ -secretase, produzindo uma espécie sAPP $\beta$  e um fragmento contendo noventa e nove aminoácidos (C99). C99 é clivado pela  $\gamma$ -secretase produzindo o peptídeo amilóide de um número variável de aminoácidos (A $\beta$ <sub>1-40</sub> and A $\beta$ <sub>1-42</sub>).<sup>15</sup>

---

<sup>14</sup> i) Cochet, M., Donneger, R., Cassier, E., Gaven, F., Lichtenthaler, S. F., Marin, P., Bockaert, J., et al., 5-HT4 Receptors Constitutively Promote the Non-Amyloidogenic Pathway of APP Cleavage and Interact with ADAM10, *ACS Chemical Neuroscience*, **2012**, 4(1), 130–140; ii) Zhang H, Ma Q, Zhang YW, Xu H. Proteolytic processing of Alzheimer's  $\beta$ -amyloid precursor protein. *J Neurochem*, **2012**, 1, 9-21

<sup>15</sup> Ray, B., Lahiri, D. K., Neuroinflammation in Alzheimer's disease: different molecular targets and potential therapeutic agents including curcumin, *Curr. Opin. Pharmacol.*, **2009**, 9, 434–444.



**Figura 2.** Processamento da PPA por ação das enzimas  $\alpha$ , BACE-1 e  $\gamma$ -secretases pelas vias amiloidogênica e não amiloidogênica.<sup>15</sup>

Os peptídeos amilóide liberados pela clivagem proteolíticas na via não amiloidogênica ocorrem em duas formas diferentes,  $A\beta_{40}$  e  $A\beta_{42}$ , as quais variam no comprimento do C-terminal (40 e 42 aminoácidos, respectivamente). O  $A\beta_{42}$  é o principal componente das placas senis e possui as seguintes características: hidrofóbico, tóxico e possui propriedades agregantes.<sup>16,17</sup> As fibrilas de  $A\beta_{42}$  se agregam para formar as placas amilóides em um processo denominado fibrilogênese.

<sup>16</sup> Shankar G.M., Amyloid- $\beta$  protein dimers isolated directly from Alzheimer's brains impair synaptic plasticity and memory, *Nat. Med.*, **2008**, *14*, 837–842.

A deposição fibrilar de A $\beta$  é uma das causas da DA. Existem várias formas oligoméricas de A $\beta$  que podem agir patogênicamente se ligando as sinapses e causam toxicidade neuronal de processamento ainda não esclarecido e que está associada com a perda de sinapses excitatórias.<sup>18</sup>

### 1.2.2. Neuroinflamação e a DA

A neuroinflamação caracterizada principalmente pela ativação das células da microglia parece está envolvida com o elevado risco no desenvolvimento de DA, lesão cerebral traumática, as infecções sistêmicas, o envelhecimento normal e diversos distúrbios neurológicos.

O processo inflamatório na DA não é completamente entendido, porém há várias evidências de que as células da glia estão envolvidas em todos os tipos de processos neurodegenerativos. Os astrócitos e a micróglia são os principais tipos de células da glia encontrados no SNC.<sup>19,20</sup> Na fase inicial, a microglia está envolvida em processos de neuroproteção neuronal, entretanto, posteriormente tem-se uma resposta neuroinflamação como consequência da

---

<sup>17</sup> Koffie R.M., Meyer-Luehmann M., Hashimoto T., Adams K.W., M. L.Mielke, Garcia-Alloza M. et al. Oligomeric amyloid  $\beta$  associates with postsynaptic densities and correlates with excitatory synapse loss near senile plaques., *PNAS*, **2009**, 106 (10) , 4012-4017.

<sup>18</sup> Tang BL., Neuronal protein trafficking associated with Alzheimer disease: from APP and BACE1 to glutamate receptors., *Cell Adh. Migr.*, **2009**, 3, 118–128.

<sup>19</sup> Finnie J.W., Blumbergs P.C., Williamson M.M., Alzheimer type II astrocytes in the brains of pigs with salt poisoning (water deprivation/intoxication), *Aust.Vet. J.*, **2010**, 88, 405–407.

<sup>20</sup> Lin G.H., Lee Y.J., Choi D.Y., Han S.B., Jung J.K., Hwang B.Y., Moon D.C., Kim Y., Lee M.K., H.S., Leem J.Y., Shin H.K., Lee J.H., Hong J.T., Anti-amyloidogenic effect of thiacepromone through anti-inflammation in vitro and in vivo models, *J.Alzheimers Dis.*, **2012**, 29, 659–676.

sua ativação extensa e contínua.<sup>21</sup> Há indícios de que as fibrilas do peptídeo A $\beta$ <sub>42</sub> podem ativar a microglia, resultando na produção de mediadores tóxicos e inflamatórios como o peróxido de hidrogênio, o óxido nítrico e as citocinas. As células da micróglia também estão intimamente associadas com quase toda a deposição do peptídeo A $\beta$  encontradas em placas senis do AD.<sup>22</sup>

O estresse neuronal está associado ao risco de desenvolvimento da DA por desencadear a expressão da PPA pelos neurônios, resultando no aumento da liberação de um fragmento amilóide solúvel do PPA (sAPP) para o meio extracelular.<sup>23</sup> Este fragmento, por sua vez, aumenta a expressão de APP neuronal e induz a expressão de interleucina-23 e interleucina-12, duas outras citocinas pró-inflamatórias que estão relacionadas com o aumento da densidade das placas A $\beta$  e declínio cognitivo em um modelo do rato da DA.<sup>24</sup>

---

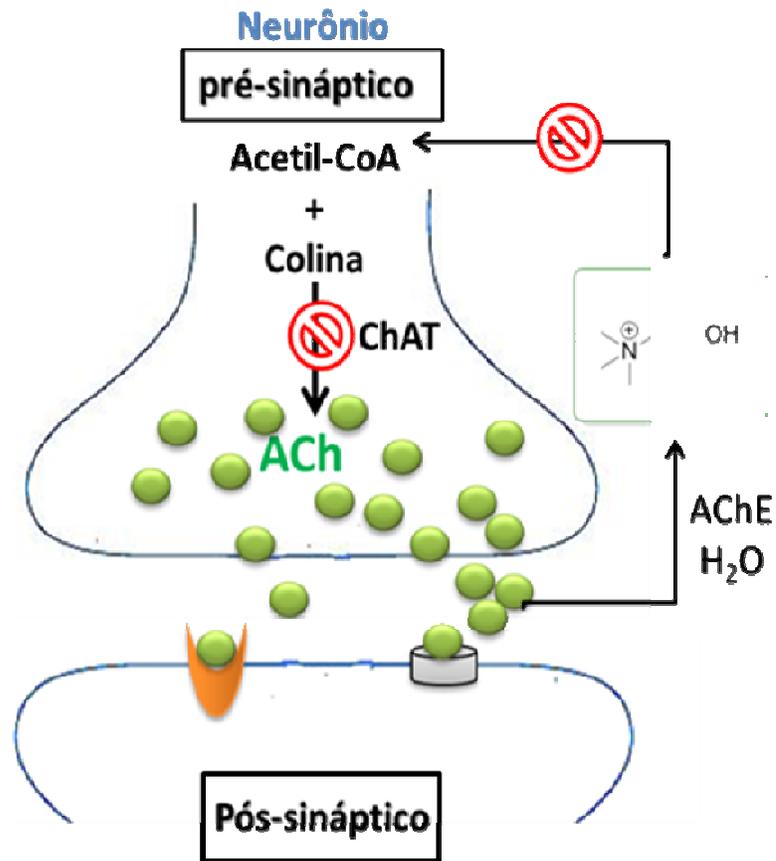
<sup>21</sup> Kakimura J., Kitamura Y., Takata K., Umeki M., Suzuki S., Shibagaki K., Taniguchi T., Nomura Y., Gebicke-Haerter P.J., Smith M.A., Perry G., Shimohama S., Microglial activation and amyloid-beta clearance induced by exogenous heat-shock proteins, *FASEB J.*, **2002**, *16*, 601–603.

<sup>22</sup> Jekabsone A., Mander P.K., Tickler A., Sharpe M., Brown G.C., Fibrillar beta-amyloid peptide Abeta1-40 activates microglial proliferation via stimulating TNF-alpha release and H2O2 derived from NADPH oxidase: a cell culture study., *J. Neuroinflamm.*, **2006**, *3*, 2.

<sup>23</sup> Griffin, W. S. T., Neuroinflammatory Cytokine Signaling and Alzheimer's disease, *New Engl. J. Med.*, **2013**, *368*(8), 770–771.

<sup>24</sup> Griffin, W. S. T., Neuroinflammatory Cytokine Signaling and Alzheimer's Disease, *N. Engl. J. Med.*, **2013**, *368*(8), 770–771.





**Figura 4.** Esquema de biossíntese e degradação da acetilcolina. (AChE = Acetilcolinesterase; ChAT = Colina acetiltransferase; ● = Acetilcolina; ☐ = Receptores Muscarínico; ☐ = Receptores Nicotínico).

No neurônio pré-sináptico, a enzima colina acetiltransferase (ChAT) sintetiza o neurotransmissor ACh, a partir de uma molécula de colina e acetil-CoA (Figura 4). Uma vez liberada na sinapse, o neurotransmissor liga-se ao receptor nicotínico e ao receptor muscarínico iniciando uma cascata de neurotransmissão. A atividade da ACh é terminada por uma reação de hidrólise, catalisada pelas enzimas acetilcolinesterase (AChE) formando

acetato e colina. Esta última pode ser recapturada e reutilizada para biossíntese de ACh no neurônio pré-sináptico.

Constatou-se que a concentração de ACh em pacientes com DA é drasticamente menor do que em indivíduos não-Alzheimer.<sup>27,28</sup> Isto pode ser explicado pela deficiência em atividade da enzima acetiltransferase (ChAT), somada a deficiência na recaptção do substrato colina, entre outros fatores.<sup>29</sup> resultando no comprometimento das funções cognitivas.<sup>30</sup> O desequilíbrio dinâmico entre o neurotransmissor colinérgico e a degradação enzimática da ACh constituem a base da hipótese colinérgica.<sup>31</sup> Tanto a acetilcolinesterase (AChE) quanto a butirilcolinesterase (BuAChE), desempenham um papel vital na patologia da DA.

---

<sup>27</sup> Dong Z., Fu A.L., Prevention of age-related memory deficit in transgenic mice by human choline acetyltransferase, *Eur. J. Pharmacol.*, **2012**, 683, 174-178.

<sup>28</sup> Fu, A.L., Huang, S.J., Sun, M.J., Complementary remedy of aged-related learning and memory deficits via exogenous choline acetyltransferase, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **2005**, 336, 268-273.

<sup>29</sup> Pákáski, M., Kálmán, J., Interactions between the amyloid and cholinergic mechanisms in Alzheimer's disease. *Neurochem. Int.*, **2008**, 53, 103-111.

<sup>30</sup> Mustafa, I. H., Elkamel, A., Chen, P., Ibrahim, G., Elnashaie, S. S. E. H., Effect of cholineacetyltransferase activity and choline recycle ratio on diffusion-reaction modeling, bifurcation and chaotic behavior of acetylcholine neurocycle and their relation to Alzheimer's and Parkinson's diseases, *Chem. Eng. Sci.*, **2012**, 68, 19-35.

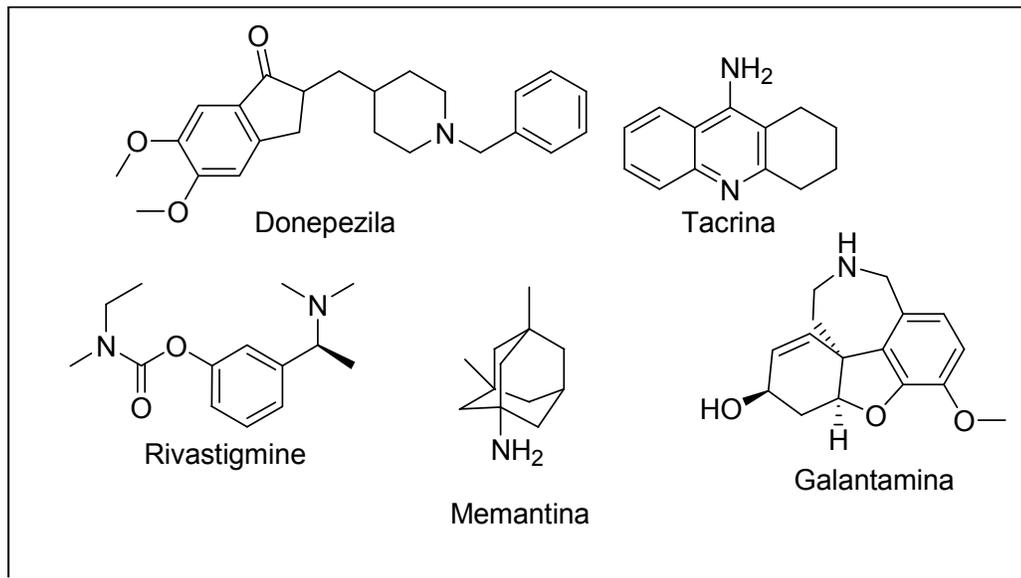
<sup>31</sup> Keowkase, R., Aboukhatwa, M., Luo, Y., Fluoxetine protects against amyloid-beta toxicity, in part via daf-16 mediated cell signaling pathway, in *Caenorhabditis elegans*. *Neuropharmacology* **2010**, 59, 358-365.

### 1.3.1. Anticolinesterásicos

Como não há cura para a DA, o tratamento medicamentoso utilizado tem por fim melhorar a qualidade de vida do paciente Alzheimer, através do retardo da falência de células cerebrais e gerenciamento dos sintomas cognitivos e comportamentais. Até hoje, apenas cinco fármacos foram aprovados pelo U.S. Food and Drug Administration (FDA) para o tratamento da DA.<sup>32</sup> Dentre estes medicamentos quatro são inibidores de acetilcolinesterase: a tacrina (Cognex®), donepezila (Aricept®), rivastigmina (Exelon®), galantamina (Razadyne®) e a Memantina (Namenda®). O quinto fármaco aprovado foi a memantina, um antagonista de glutamato no receptor NMDA (N-metil-*D*-aspartato). As estruturas destes fármacos estão representadas na Figura 5.

---

<sup>32</sup>[http://www.accessdata.fda.gov/scripts/cder/drugsatfda/index.cfm?fuseaction=Search.SearchResults\\_Browse&DrugInitial=A](http://www.accessdata.fda.gov/scripts/cder/drugsatfda/index.cfm?fuseaction=Search.SearchResults_Browse&DrugInitial=A). Acessado em 16/04/2013.



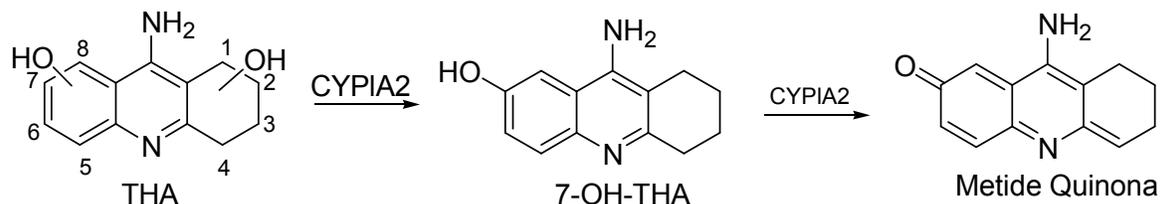
**Figura 5.** Fármacos aprovados pelo FDA para o tratamento de DA.

A tacrina, primeiro fármaco aprovado pela FDA apesar de potente foi retirada do mercado devido sua alta hepatotoxicidade derivada, principalmente da sua extensa metabolização pelo citocromo P4501A2 (CYP1A2) em uma variedade de metabólitos hidroxilados.<sup>33</sup> Dentre os metabólitos formados em humanos nós destacamos o composto 7-OH-THA que parece ser intermediário

---

<sup>33</sup> i) Pool, W. F., Reily, M. D., Bjorge, S. M.; Woolf, T. F. Metabolic disposition of the cognition activator tacrine in rats , dogs , Species Comparisons, *Xenobiotica*, **1997**, 25, 11–13; ii) ) Woolf T.F., Pool W.F., Bjorge S.M., Chang T., Goel O.P., Purchase C.F., Schroeder M.C., Kunze K.L., Trager W.F ., Bioactivation and irreversible binding of the cognition activator tacrine using human and rat liver microsomal preparations: species difference. *Drug. Metab. Dispos.*, 1993, 21(5), 874 – 882; iii) Green, V.J., Pirmohamed, M., Kitteringham, N. R., Knapp, M. J., Park, B.K., Glutathione S-transferase mu genotype (GSTM1\*0) in Alzheimer’s patients with tacrine transaminitis, *Br J Clin Pharmacol.*, **1995**, 39(4), 411–415.

de uma metide quinona, composto que parece ser responsável pela elevada toxicidade da THA (Figura 6).<sup>34</sup>



**Figura 6.** Caminho metabólico da tacrina mostrado intermediário fenólico 7-OH-THA e formação subsequente da metide quinona.

Atualmente, os dois medicamentos mais utilizados para a DA o donepezila (DON)<sup>35</sup> e a galantamina. O DON é um inibidor da colinesterase reversível e não competitiva da acetilcolinesterase que mostrou aumentar a função cognitiva de pacientes com DA do tipo leve a moderada e tem uma boa tolerabilidade, sem causar hepatotoxicidade. Devido às suas características de maior ação seletiva, boa tolerabilidade e facilidade de administração, além da eficácia terapêutica, o donepezila é considerado um tratamento de primeira linha para a doença de Alzheimer.

A memantina, conforme mencionado, é um antagonista não competitivo de receptores N-metil-D-aspartato (NMDA). Um receptor para o glutamato, principal neurotransmissor excitatório cerebral que tem sua concentração

---

<sup>34</sup> Spaldin, V., Madden, S., Pool, W. F., Woolf, T. F., Park, B. K., The effect of enzyme inhibition on the metabolism and activation of tacrine by human liver microsomes, *Br. J. Clin. Pharmacol.*, **1994**, *38*, 15–22.

<sup>35</sup> Schneider, L. S., Discontinuing Donepezil or Starting Memantine for Alzheimer's Disease, *New Engl. J. Med*, **2012**, *366* (10), 957–959.

aumentada em pacientes da DA. Quando este neurotransmissor está em excesso no cérebro, há ativação extensiva destes receptores que promovem um grande influxo de cálcio para o neurônio.

Como consequência, há um aumento na geração de espécies reativas de oxigênio que levam à morte celular. Uma vez que a memantina funciona como um antagonista não competitivo no NMDA, ela consegue reduzir a excitotoxicidade do glutamato, promovendo uma proteção para os neurônios. Assim, a memantina age impedindo que o excesso de glutamato ative estes receptores.

Existem outras abordagens terapêuticas para o tratamento farmacológico da DA que têm sua eficácia demonstrada por métodos científicos e, desse modo são prescritos aos pacientes Alzheimers pela medicina atual. Eles são os anti-inflamatórios,<sup>36</sup> os estrógenos,<sup>37</sup> os antioxidantes,<sup>38</sup> entre outros.

---

<sup>36</sup> Jin, P., Kim, J.A., Choi, D.-Y., Lee, Y.-J., Jung, H. S., Hong, J. T., Anti-inflammatory and anti-amyloidogenic effects of a small molecule, 2,4-bis(p-hydroxyphenyl)-2-butenal in Tg2576 Alzheimer's disease mice model, *J. Neuroinflamm.*, **2013**, *10*, 1-13.

<sup>37</sup> Cindy K., Barha, Lisa A.M., The hormone therapy, Premarin, impairs hippocampus-dependent spatial learning and memory and reduces activation of new granule neurons in response to memory in female rats, *Neurobiol. Aging*, **2013**, *34*, 986-1004.

<sup>38</sup> Pandi-Perumal, S., Bahammam, A., Brown, G., Spence, D. W., Bharti, V., Kaur, C., Hardeland, R., et al., Melatonin Antioxidative Defense: Therapeutical Implications for Aging and Neurodegenerative Processes. *Neurotox. Res.*, **2013**, *23*(3), 267-300.

### 1.3.2. Acetilcolinesterase

AChE é uma glicoproteína,<sup>39</sup> classificada como serina hidrolase, e a sua tríade catalítica é constituída por resíduos de serina, histidina e glutamato.<sup>40</sup> O sítio ativo da AChE é localizado no fundo de um vale, ou garganta, de 20 Å de profundidade. A entrada desse vale se assemelha a um gargalo, onde há resíduos aromáticos alinhados. Resíduos Trp84 e Phe290 (números dos resíduos na enzima *T. californica*) são importantes para estabilizar o complexo enzima-substrato.<sup>41</sup>

A enzima também possui um local de ação biológico conhecido como sítio aniônico periférico (SAP). Localiza-se próximo à entrada do vale profundo do sítio ativo citado anteriormente e composto pelos seguintes resíduos: Tyr 70, Asp 72, Tyr 121, Tyr279 e Trp 334. Tais resíduos são responsáveis por certo números de “loops” de superfície que, por sua vez, conferem um elevado grau de flexibilidade conformacional na região. O SAP está envolvido na modulação alostérica da catálise no sítio ativo e também

---

<sup>39</sup> Massoulié J., Bon S., The C-terminal T peptide of cholinesterases: structure, interactions, and influence on protein folding and secretion., *J. Mol. Neurosci.*, **2006**, 30 , 233-236.

<sup>40</sup> Lin M.-C., Lin G.-Z., Shen Y.-F., Jian S.-Y., Hsieh D.-K., Lin J., Lin G., Synthesis and Evaluation of a New Series of Tri-, Di-, and Mono-N-alkylcarbamylyphloroglucinols as Bulky Inhibitors of Acetylcholinesterase, *Chem. Res. Toxicol.*, **2012** 25 (7), 1462-1471.

<sup>41</sup> Shen, T., Tai, K., Henchman, R.H., McCammon, J.A., Molecular dynamics of acetylcholinesterase, *Acc.Chem.Res.*, **2002**, 35, 332-340.

está associado a um número de funções não clássicas, em particular, à adesão de células e à deposição de amilóide.<sup>42</sup>

Numerosos estudos indicam que o SAP, especialmente o resíduo Trp279, tem papel crucial na agregação de fibrilas  $\beta$ -amilóide.<sup>43,44</sup> A enzima AChE é encontrada predominantemente no SNC, mas também é encontrada na superfície de eritrócitos e tecido muscular. A enzima é capaz de funcionar com monômero, no entanto normalmente é encontrada como dímero ou tetrâmero.<sup>45</sup>

Existe uma hipótese de que a AChE participa do processo de agregação das fibrilas do peptídeo  $\beta$ -amilóide, através do sítio periférico, funcionando como uma chaperona molecular. Assim, o bloqueio desse sítio tem sido uma

---

<sup>42</sup> Johnson G., Moore, S.W., *Curr Pharm Des.*, The peripheral anionic site of acetylcholinesterase: structure, functions and potential role in rational drug design., **2006**, *12*, (2), 217-225.

<sup>43</sup> Dikerson, T.J.; Beuscher IV, A.E.; Rogers, C.J.; Hixon, M.S.; Yamamoto, N.; Xu, Y.; Olson, A.J.; Janda, K.D., Discovery of acetylcholinesterase peripheral anionic site ligands through computational refinement of a directed library, *Biochemistry*, **2005**, *44*, 14845-14843.

<sup>44</sup> Inestrosa, N.C., Dinamarca M.C., Alvarez A., Amyloid-cholinesterase interactions. Implications for Alzheimer's disease. *FEBS J.*, **2008**, *275*, 625-632.

<sup>45</sup> Belluti, F., Rampa, A., Piazzini L., Bisi A., Gobbi, S., Bartolini, M., Andrisano V., Cavalli A., Recanatini, M.; Valentini P., Cholinesterase inhibitors: xanthostigmine derivatives blocking the acetylcholinesterase-induced beta-amyloid aggregation, *J. Med. Chem.*, **2005**, *48*, 4444-4456.

estratégia na tentativa de diminuir a formação de fibrilas do peptídeo  $\beta$ -amilóide.<sup>46</sup>

### 1.3.3. Butirilcolinesterase (BuAChE)

Conhecida como pseudocolinesterase, a BuAChE pode hidrolisar ésteres de colinas, embora seu substrato natural seja a butirilcolina. Assim como a AChE, o BuAChE é uma serina hidrolase, cuja tríade catalítica é composta por histidina, serina e glutamato, com mecanismo de hidrólise igual ao da AChE, embora haja variações na cinética, dependendo da concentração de ACh.<sup>26</sup>

BuAChE é amplamente distribuída no organismo, comparada com AChE, podendo ser encontrada no plasma, fígado e SNC. A arquitetura da BuAChE tem aspectos comuns à AChE, entretanto é único em algumas regiões. O sítio ativo é localizado ao fundo do vale de profundidade de 20Å. No entanto, a entrada do vale possui menos resíduos aromáticos do que na entrada do vale que compõe o sítio ativo da AChE.<sup>47</sup>

---

<sup>46</sup> Yoo B.C., Kim, S. H., Cairns, N., Fountoulaks, M., Lubec, C., Deranged expression of molecular chaperones in brains of patients with Alzheimer's disease, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **2001**, 280, 249-258.

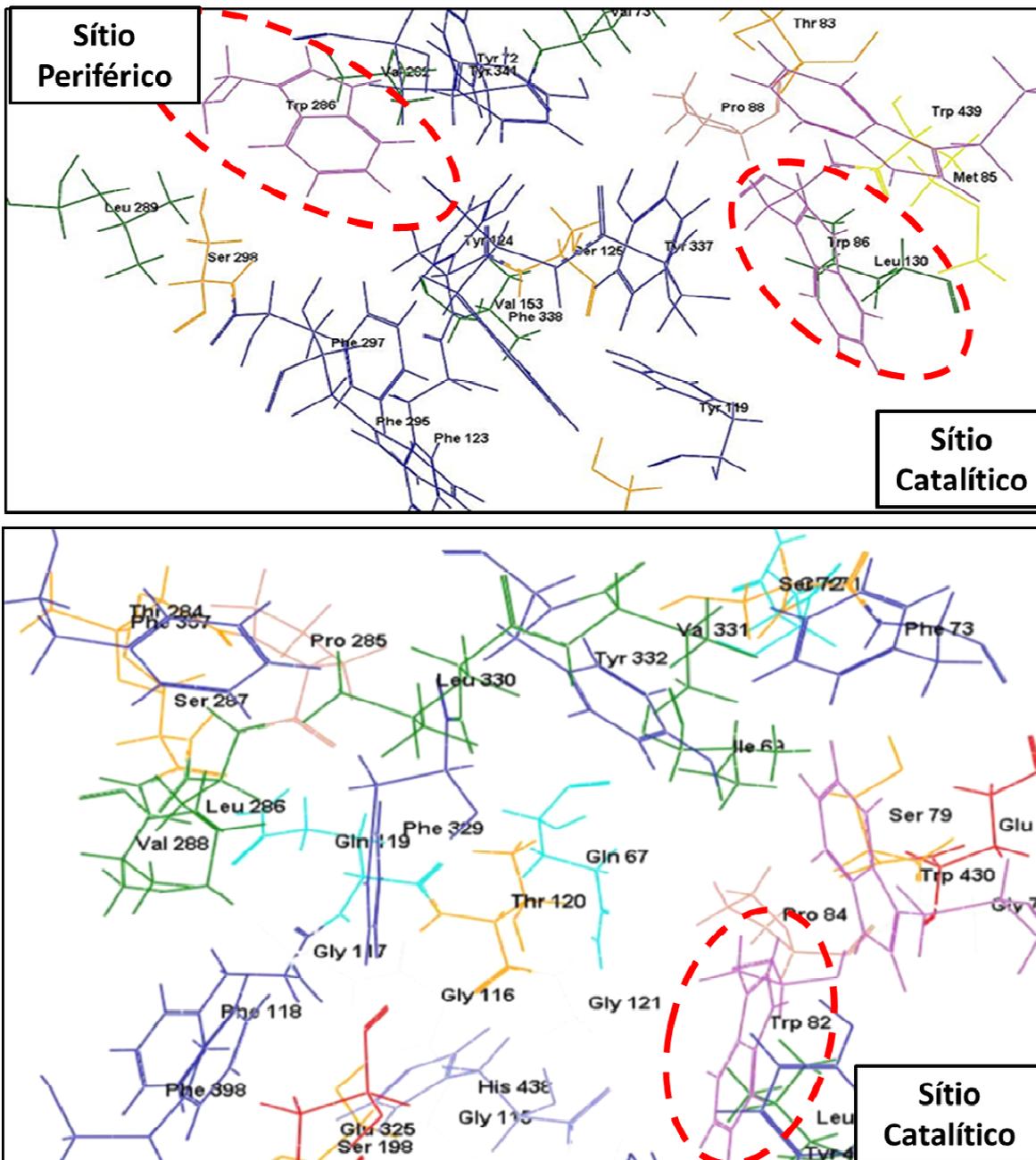
<sup>47</sup> Davesh, S., Hopkins, D.A., Geula C., Neurobiology of butyrylcholinesterase, *Nat. Rev. Neurosc.*, **2003**, 4, 131-138.

Em substituição aos resíduos aromáticos Phe 288 e 290, há resíduos de Leu286 e Val288.<sup>48</sup> Como há menos resíduos aromáticos na entrada e mesmo dentro do sítio ativo, o volume da capacidade da BuAChE é aproximadamente 200Å<sup>3</sup> maior que da AChE.<sup>49</sup> A BuAChE parece estar relacionada à formação de agregados neurotóxicos no cérebro, por mecanismo indeterminado.<sup>47</sup> Na Figura 7, os sítios ativos de AChE e BuChE, feita no programa *Molegro Virtual Docking*, a partir das estruturas depositadas no Protein Data Bank.

---

<sup>48</sup> Grei, N.H., Utsuki T., Ingram, D.K., Wang, y., Pepeu g., Scali C., Yu, Q., Mamczarz, J., Holloway H.W., Giordano, T., Chen, D., Furukawa, K., Sambarmurti, K., Brossi, A., Lahiri, D.K., Selective butyrylcholinesterase inhibition elevates brain acetylcholine, augments learning and lowers Alzheimer beta-amyloid peptide in rodent, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **2005**, *102*, 17213- 17218.

<sup>49</sup> Saxena, A., Redman A.M.G., Jiang, X., Lockridge O., Differences in active-site gorge dimensions of cholinesterases revealed by binding of inhibitors to human butyrylcholinesterase, *Chem. Bio. Interact.*, **1999**, 61-69.



**Figura 7.** Comparação do sítio ativo das enzimas AChE humanas (Código do PDB:3LII) e BuAChE (Código do PDB: IP01) em uma área restrita do sítio ativo de 6,6 Å e 10 Å, respectivamente.

## 1.4. Estratégias de desenvolvimento de fármacos e AChE

Além dos inibidores de AChE já citados e os que estão disponíveis no mercado farmacêutico, existem outras abordagens utilizando a AChE como alvo. Uma estratégia racional de Química Medicinal importante e que se insere no contexto desse trabalho é a hibridação molecular<sup>50,51</sup> que consiste no desenho de novos fármacos, baseado no reconhecimento do grupo farmacóforo derivado de dois ou mais compostos bioativo, através da adequada fusão levando a uma estrutura com características pré-selecionadas.

Os compostos híbridos moleculares podem interagir não apenas com sítios importantes da enzima AChE, como também podem exercer outras atividades biológicas, tais como antioxidante, anti-inflamatório, antagonista de  $\text{Ca}^{2+}$ , atividade inibidora da monoamina oxidase (MAO), agente complexante de metais, entre outros.

---

<sup>50</sup> Viegas-Jr., C. DanuelLo, A. Bolzani, V.S. Barreiro, E. J., Fraga, C.A.M., Molecular Hybridization: A Useful Tool in the Design of New Drug Prototypes, *Curr. Med. Chem.*, **2007**, *14*, 1848-1852.

<sup>51</sup> i) Aquino R.A., Modolo L.V., Alves R.B., Fatima A., Design of new drugs for the treatment of Alzheimer's disease based on tacrine structure, *Curr. Drug Targets*, **2013**, *14* (3), 378-397; ii) Murineddu, G., Asproni, B., Rui, S., Deligia, F., Falzoi, M., Pau, A., Thomas, B. F., Zhang, Y., Pinna, G. A., Pani, L., Lazzari, P., Using Molecular Hybridization Based on Scaffold Hopping, **2012**, *1*, 1-14; iii) Landfield, P.W., Gant, J.C., Blalock, E. M., Chen, K.-C. Methods for diagnosing and treating Alzheimer's disease using the molecules that stabilize intracellular calcium. University of Kentucky Research Foundation, USA. US201161533056P 20110909, **2013**. Acessado em: 16/06/2013.

Na Figura 8, temos alguns exemplos de candidatos a fármacos para o tratamento de DA, baseados na estrutura da THA que vem sendo investigado.

No estudo de uma nova série de híbridos tacrina-selegilina (a) sintetizado e avaliado para aplicação como inibidores da colinesterase (AChE /BuChE) e MAO,<sup>52</sup> demonstrou-se que a maior parte os compostos dessa série apresentam uma atividade inibidora elevada para todos os alvos.

Outro exemplo é o híbrido (b) contendo a porção tacrina-8-hidroxiquinolina,<sup>53</sup> que exhibe propriedades colinérgica, antioxidante, neuroproteção, além de capacidade de complexação com cobre. O composto (c) mostrou-se o mais potente de um estudo de uma série de híbridos contendo porção tacrina-flurbiprofeno-nitrato.<sup>54</sup>

Este composto apresentou significativo efeito inibitório de A $\beta$  quando comparados a THA e flurbiprofeno que, por sua vez, não exibiram qualquer atividade inibidora de A $\beta$  na mesma dose. Além disso, demonstrou-se que a hepatotoxicidade do híbrido (c) era muito mais segura que THA, sugerindo

---

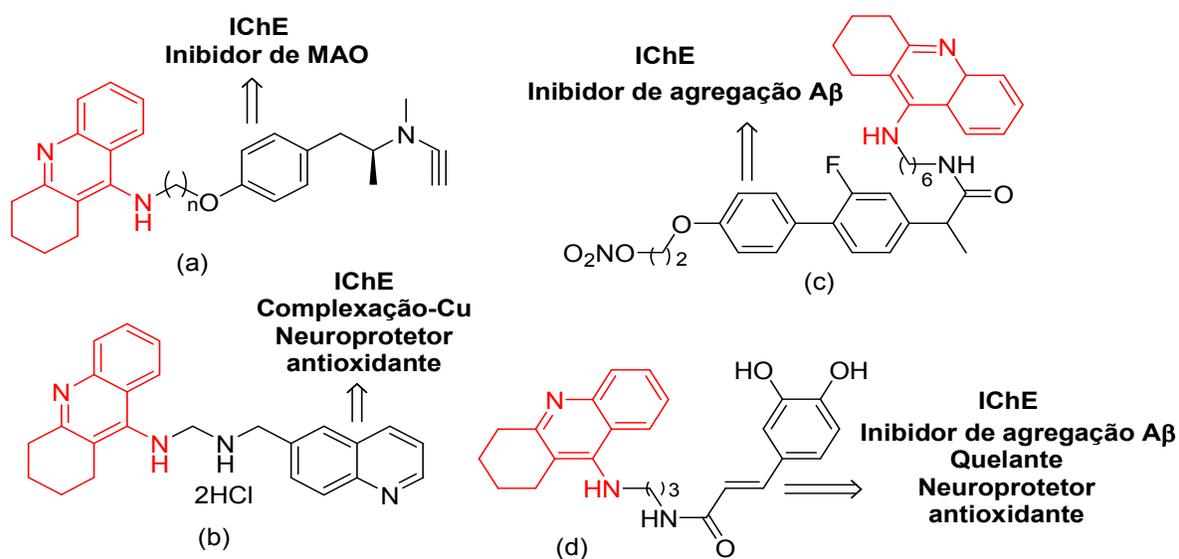
<sup>52</sup> C. Lu, Q. Zhou, J. Yan, Z. Du, L. Huang, X. Li, A., novel series of tacrine-selegiline hybrids with cholinesterase and monoamine oxidase inhibition activities for the treatment of Alzheimer's disease., *Eur. J. Med. Chem.* **2013**, *62*, 745–753.

<sup>53</sup> Antequera, D., Bolos M., Spuch C. et al., Effects of a tacrine-8-hydroxyquinoline hybrid (IQM-622) on A $\beta$  accumulation and cell death: involvement in hippocampal neuronal loss in Alzheimer's disease. *Neurobiol. Dis.*, **2012**, *46*(3), 682–691.

<sup>54</sup> Chen, Y., Sun, J., Huang, Z., Liao, H., Peng, S., Lehmann, J., Zhang, Y., Design, synthesis and evaluation of tacrine-flurbiprofen-nitrate trihybrids as novel anti-Alzheimer's disease agents., *Bioorg. Med. Chem.*, **2013**, *21*, 2462–2470.

que poderia ser um agente anti-Alzheimer promissor para uma investigação mais aprofundada.

Outro exemplo, projetado como híbrido molecular é o composto (d) contendo porção de ácido cafeíco com a THA.<sup>55</sup> Estudos revelam uma elevada seletividade na inibição AChE sobre BuChE, sugerindo que a porção THA liga-se a ambos os sítios catalítica e sítios periféricos aniônicos do AChE, além disso, o composto híbrido apresentou propriedades quelantes e de neuroproteção.



**Figura 8.** Híbridos moleculares tendo como base a estrutura da THA

<sup>55</sup> Romero, A., Cacabelos, R., Oset-Gasque, M. J., Samadi, A., Marco-Contelles, J., Novel tacrine-related drugs as potential candidates for the treatment of Alzheimer's disease., *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2013**, *23*, 1916–1922.

A síntese de uma entidade química ligante capaz de interagir com ambos os sítios da AChE é interessante, porque bloqueando-se o sítio catalítico teríamos um aumento da ação do neurotransmissor colinérgico, enquanto que um bloqueio do PAS resultaria em uma diminuição da agregação do peptídeo A $\beta$ . Se adicionalmente em um mesmo composto tivéssemos outro(s) farmacóforos(s) que pudessem interagir com outros alvos biológicos poderíamos obter um fármaco híbrido molecular que fosse capaz de controlar vários outros eventos bioquímicos relacionados a DA.

## **2. Objetivos**



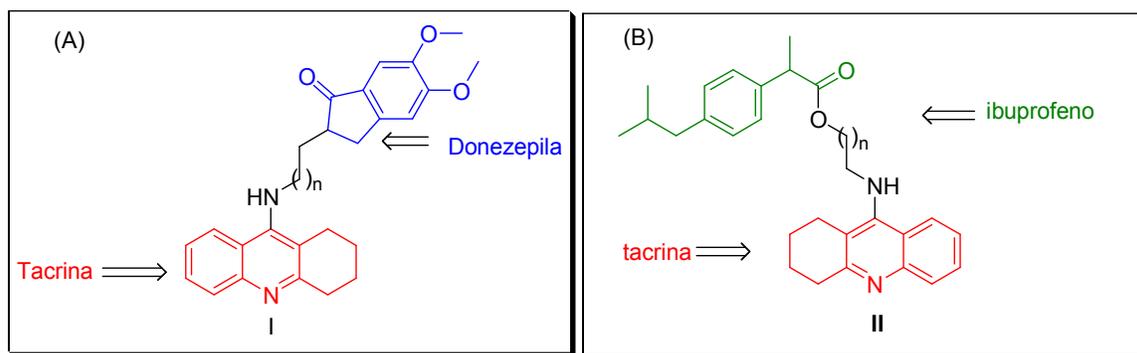
## **2.1. Gerais**

Considerando a natureza multipatogênica da doença de Alzheimer, a saber: déficit colinérgico, metabolismo anormal da proteína precursora do amilóide e reações inflamatórias da glia, este projeto teve como objetivo geral o estudo de novas entidades químicas candidatas a fármacos para o tratamento da DA, sendo que as estruturas deverão ser um híbrido molecular multipotente baseados na estrutura de inibidores da acetilcolinesterase e agentes anti-inflamatórios.

## 2.2. Específicos

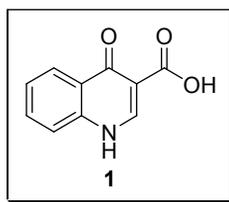
Os objetivos específicos que foram propostos para este projeto são:

- Realizar estudos de docking molecular para propor um híbrido molecular baseado nas estruturas da tacrina e donepezila (Figura 9A), e com o ibuprofeno (Figura 9B);



**Figura 9.** (A) Híbrido proposto baseado na estrutura da tacrina e donepezila; (B) Híbrido proposto baseado na estrutura da tacrina e ibuprofeno.

- Realizar estudos de docagem para inibição de AChE com a quinolona **1** (Figura 10);



**Figura 10.** Quinolona escolhida para estudo de docking

- Sintetizar os compostos híbridos **I**, **II** e a quinolona **1**;
- Avaliar quanto à atividade inibidora da acetilcolinesterase.

No caso do híbrido tipo **I** (Figura 9A) estamos explorando a estratégia do duplo ligante, no qual a subunidade tetraidroacridina proveniente da tacrina, já conhecida pelo seu potencial anticolinesterásico,<sup>56</sup> poderia interagir com o sítio catalítico, enquanto a porção dimetoxiindanona do donezepila poderia interagir com o anel indol do sítio periférico da enzima alvo.<sup>57</sup>

No caso do híbrido tipo **II** (Figura 9B), temos a proposta de um híbrido molecular multipotente, no qual temos em uma única molécula dois farmacóforos de fármacos conhecidos e que são dotados de diferentes atividades biológicas. Este híbrido molecular proposto possui uma porção proveniente do ibuprofeno, que é um conhecido anti-inflamatório não esteroide.<sup>58</sup> Propõe-se que o uso de ibuprofeno pode proteger contra o desenvolvimento da doença através da redução da formação do peptídeo A $\beta$ , retardando o seu aparecimento, através de uma modulação alostérica da atividade da enzima  $\gamma$ -secretase.<sup>59</sup> Tendo como base esta evidência, supõe-se

---

<sup>56</sup> Mao, F., Huang, L., Luo, Z., Liu, A., Lu, C., Xie, Z., Li, X., O-Hydroxyl- or o-amino benzylamine-tacrine hybrids: Multifunctional biometals chelators, antioxidants, and inhibitors of cholinesterase activity and amyloid- $\beta$  aggregation, *Bioorg. Med. Chem.*, **2012**, 20 (19), 5884–5892.

<sup>57</sup> Kryger, G., Silman, I., Sussman, J. L., Structure of acetylcholinesterase complexed with E2020 (Aricept): implications for the design of new anti-Alzheimer drugs., *Struct.* **1999**, 7, 297–307.

<sup>58</sup> Morihara, T., Teter, B., Yang, F., Lim, G. P., Boudinot, S., Boudinot, F. D., Frautschy, S. a, and Cole, G. M. Ibuprofen suppresses interleukin-1beta induction of pro-amyloidogenic alpha1-antichymotrypsin to ameliorate beta-amyloid (A $\beta$ ) pathology in Alzheimer's models., *Neuropsychopharmacol.* **2005**, 30, 1111–1120.

<sup>59</sup> i) Zara S., De Colli M., Rapino M., Pacella S., Nasuti C., Sozio P., Di Stefano A., Cataldi A., Ibuprofen and Lipoic Acid Conjugate Neuroprotective Activity Is Mediated by Ngb/Akt Intracellular Signaling Pathway

que os anti-inflamatórios possam exercer efeito de neuroproteção e, desse modo, poderiam oferecer alguma proteção contra o desenvolvimento da DA.

Além, desse efeito de proteção, o ibuprofeno também poderia interagir com o sítio periférico da AChE que, dependendo do tamanho do espaçador, poderia ser um duplo ligante para a AChE. Dessa forma, a princípio o híbrido **II** seria um pro-fármaco que sofreria uma biotransformação *in vivo*, passando a produzir os metabólitos ativos. Outra proposta, esse híbrido poderia ser um duplo ligante. A porção tetraidroacridina baseada na tacrina interagiria com o sítio catalítico e o ibuprofeno com o sítio periférico.

No caso da quinolona **1** (Figura 10) temos uma estrutura aromático planar características semelhantes aos da tetraidroacridina que poderia interagir com o sítio catalítico da AChE, comportando-se como um simples ligante, similar a tacrina.

O estudo de *docking* molecular tem como objetivo verificar possíveis interações existente entre os ligante propostos e a enzima AChE, além de escolher o melhor número de carbonos metilênicos (espaçador) necessário para favorecer uma melhor interação dos farmacóforos com os sítios catalítico e periférico da AChE dos híbridos **I** e **II**. Em seguida, iremos sintetizá-los e avaliá-los quanto à atividade inibitória da AChE.

---

in Alzheimer's Disease Rat Model, *Gerontol.*, **2013**, 1-11. ii) Miners J.S., Baig S., Palmer J., Palmer L.E., Kehoe P.G., Love S., A $\beta$ -degrading enzymes in Alzheimer's disease. *Brain. Pathol.* **2008**, *18*, 240-252.

### **3. Metodologias**



### 3.1. Seleção da estrutura da AChE para o Docking molecular

Os alinhamentos de sequências primárias das AChE de uma *T. Californica* de código 1E66 da raia com as enzima humanas 3LII e 1B41 baixadas no *Proteína Data Bank* (PDB)<sup>60</sup> foram realizadas utilizando-se o *Basic Local Alignment Search Tool*. Neste *software on-line*, fez-se a escolha da sequência no formato FASTA, em seguida fez-se o BLASTp (Figura 11).

**Figura 11.** A - Interface do software BLAST com entrada das enzimas AChE. B - Parâmetros algoritmos utilizados para o BLASTp entre as enzimas AChE de códigos 1E66.pdb com as enzimas humanas 3LII.pdb e 1B41.pdb.

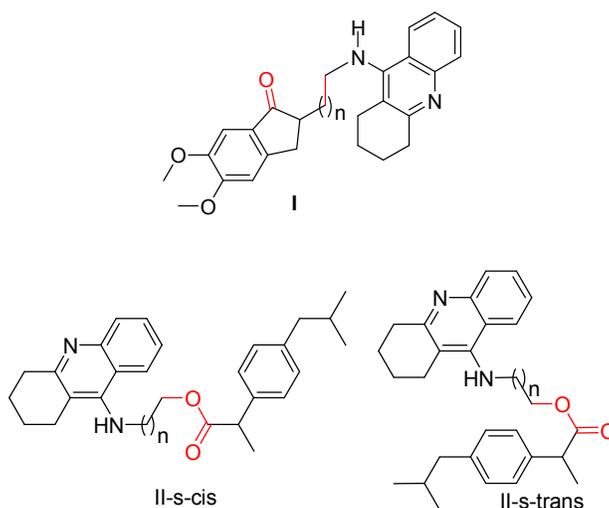
<sup>60</sup> <http://www.rcsb.org/pdb/>

### 3.2. Preparo dos ligantes e Docking molecular

Os ligantes tipo I e tipo II propostos neste trabalho foram desenhados no ChemDraw Pro 12.0 e tiveram suas estruturas minimizadas no Chem 3D do pacote ChemOffice.<sup>61</sup>

Desta forma, os híbridos moleculares **I** e **II** foram desenhados variando-se estruturalmente duas características:

- O número de carbono metilênicos que interliga os farmacóforos ( $n = 1, 2, 3, 4, 5$ );
- A orientação da cadeia espaçadora em relação ao grupo carbonila (*s*-cis ou *s*-trans) conforme representado na Figura 12.



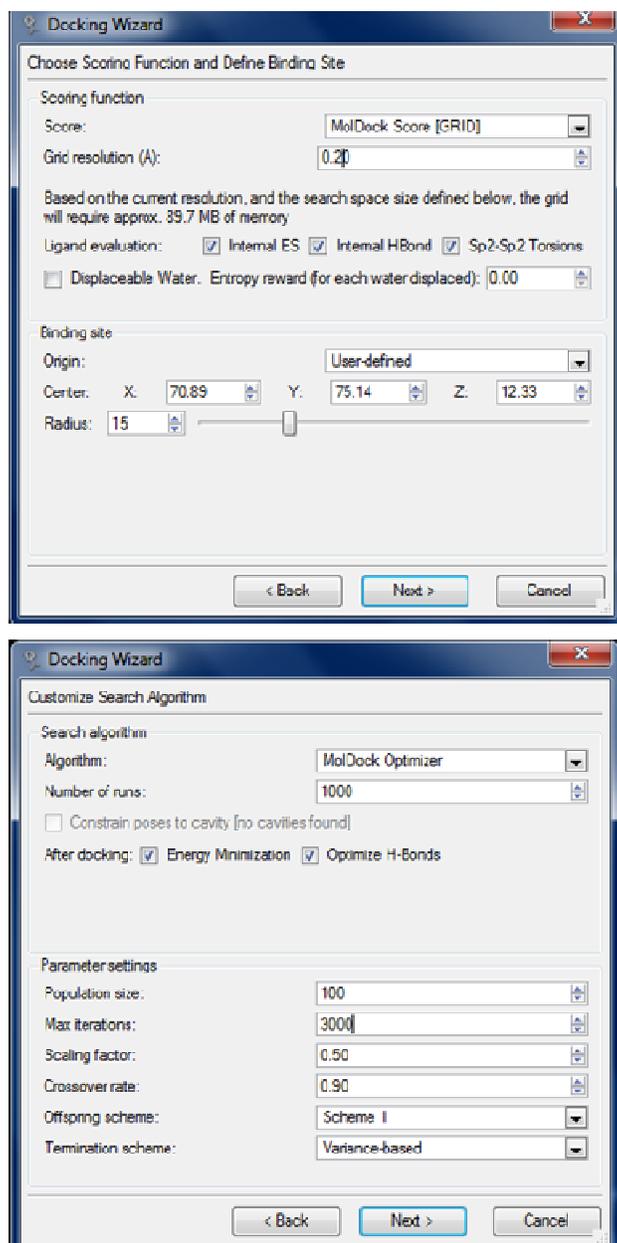
**Figura 12.** Estruturas dos híbridos moleculares **I** e **II**

---

<sup>61</sup> [http://www.cambridgesoft.com/Ensemble\\_for\\_Chemistry/ChemOffice/](http://www.cambridgesoft.com/Ensemble_for_Chemistry/ChemOffice/)

Desse modo, obtivemos cinco ligantes *s*-cis e *s*-trans (n = 1, 2, 3, 4,5). Cada ligante nos forneceu 30 poses. Gerando cento e cinquenta poses do híbrido **I** e trezentos poses do híbrido tipo **II**. De posse das estruturas minimizadas, realizou-se o *docking* molecular utilizando o programa *Molegro Virtual Docking* (MVD). Os dockings foram realizados considerando a ausência e presença de moléculas de água.

No MVD, inicialmente, importa-se o complexo cristalográfico obtido no PDB (1E66 ou 3LII ou 1B41) da proteína em 3D, em seguida retira-se o ligante do complexo e as moléculas de água caso o docking seja realizado na ausência de água. Em seguida, adiciona-se o ligante proposto com energia minimizada. Todos os *dockings* foram realizados utilizando os parâmetros do programa MVD como mostra a Figura 13.



**Figura 13.** Parâmetros utilizados para os dockings dos ligantes com as AChE.

### 3.3. Metodologias sintéticas

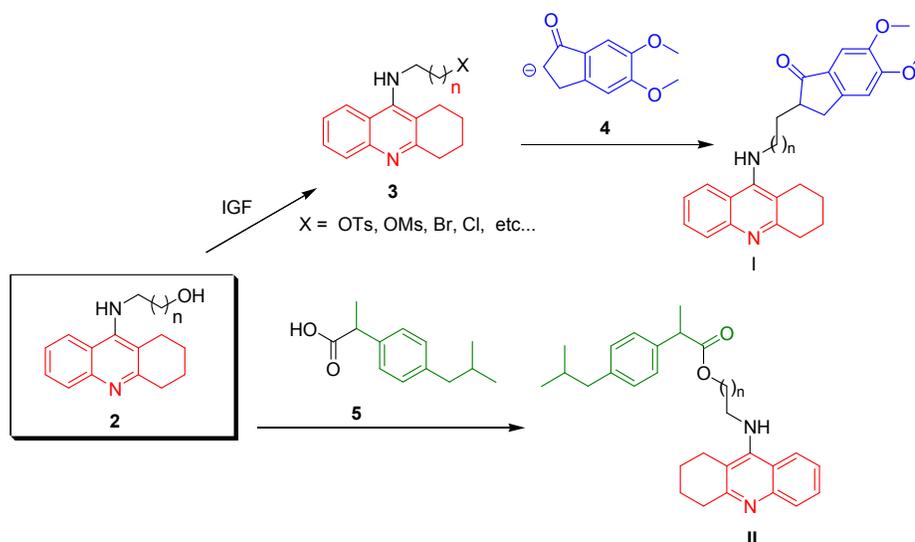
#### 3.3.1. Proposta sintética para os híbridos moleculares do tipo I e II

Na proposta sintética seja para obtenção de híbridos tacrina-donepezila **I** (THA-DON) e tacrina-ibuprofeno **II** (THA-IBU), a preparação de um intermediário contendo o farmacóforo da tacrina, funcionalizado com uma cadeia aminoálcool (**1**, Figura 14), é necessária. O aminoálcool **2** pode ser transformado em um agente alquilante **3**, através da troca da hidroxila por um bom grupo abandonador. O enolato da dimetoxiindanona **4** pode ser obtido diretamente da 3,4-dimetoxiindanona, que é disponível no comércio. Em relação à preparação de híbridos do tipo **II**, ou seja, tacrina com o ibuprofeno, o aminoálcool **1**, pode sofrer um acoplamento direto com o ibuprofeno através de uma esterificação de Steglich.<sup>62</sup>

Em relação à preparação de híbridos do tipo **II**, ou seja, tacrina com o ibuprofeno, o aminoálcool **2**, pode sofrer um acoplamento direto com o ibuprofeno através de uma esterificação de Steglich. O tamanho da cadeia carbônica do aminoálcool corresponde ao espaçador sugerido pelo *docking molecular*.

---

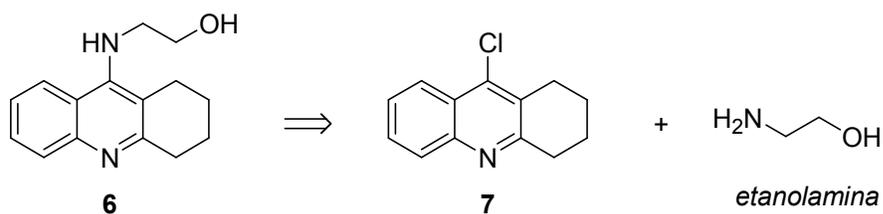
<sup>62</sup> Neises, B., Steglich W., Simple Method for the Esterification of Carboxylic Acids, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **1978**, *17*, (7), 522-524.



**Figura 14.** Estratégia para a síntese dos híbridos I e II

### 3.3.2. Estudos visando à síntese do aminoálcool 1

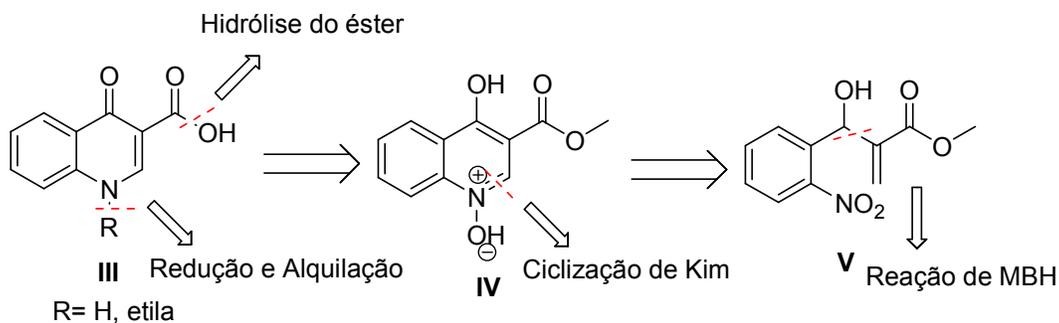
Iniciamos etapa sintética, racionalizando a preparação do amino álcool, um intermediário contendo o farmacóforo da tacrina. Esta etapa de síntese é crucial para o preparo de ambos os híbridos moleculares propostos. Na Figura 15, temos a retrosíntese de **6**, na qual o amino álcool **6** pode ser obtido por uma reação de substituição nucleofílica aromática entre a 9-cloro-tetraidroacridina **7** e a etanolamina.



**Figura 15.** Síntese da 9-clorotetraidroacridina **7**

### 3.3.2. Proposta sintética para as quinolonas

Racionalizando um possível potencial inibidor de AChE das quinolonas, baseado em resultados de docking molecular, decidimos propor uma estratégia sintética, partido-se de um aduto de MBH<sup>63</sup> e promoção de uma reação de ciclização intramolecular. Esta estratégia pode ser visualizada na análise retrossintética apresentada na Figura 16.



**Figura 16.** Análise retrossintética para preparação de quinolonas.

<sup>63</sup> Amarante, G. W., Benassi, M., Pascoal, R. N., Eberlin, M. N., Coelho, F. A. S., An approach for the enantioselective synthesis of biologically active furanones from a Morita-Baylis-Hillman adduct, *Tetrahedron*, **2010**, *66*, 6749–6753.

Pela análise retróssintética (Figura 15), o ácido quinolônico **1** pode ser obtido através de hidrólise do éster. Este, por sua vez, pode ser preparado a partir de **IV** por uma reação de redução seletiva do N-óxido.<sup>64</sup> A mesma estratégia pode ser empregada para obtenção de N-alkil derivados da quinolona. O intermediário N-óxido **IV** pode ser sintetizado a partir do aduto de MBH **V**, através de uma reação de ciclização intramolecular. O aduto de MBH **V** pode ser preparado de acordo com condições de reação desenvolvidas pelo grupo de Coelho e colaboradores, utilizando um respectivo aldeído como material de partida em excesso de acrilato de metila e um sistema de sonicação.<sup>65</sup>

---

<sup>64</sup> Kim, J. N., Lee, K. Y., Kim, H. S., Kim, T. Y., Synthesis of 3-Ethoxycarbonyl-4-hydroxyquinoline N-Oxides from the Baylis–Hillman Adducts of o-Nitrobenzaldehydes, *Org. Lett.*, **2000**, 2 (3), 343-345.

<sup>65</sup> Coelho, F.; Almeida, W. P.; Veronese, D.; Mateus, C. R.; Lopes, E. C. S.; Silveira, G. P. C.; Rossi, R. C.; Pavam, C. H., Ultrasound in Baylis-Hillman Reactions with aliphatic and aromatic aldehydes: Scope e Limitations, *Tetrahedron* **2002**, 58, 7437-7447.

## 3.4. Avaliação in vitro da atividade inibidora da acetilcolinesterase

### 3.4.1. Análise qualitativa

O método selecionado foi baseado no ensaio de Ellman *et al.*<sup>66</sup> e adaptado por Rhee e colaboradores,<sup>67</sup> para cromatografia em camada delgada. Foram utilizadas cromatoplasacas de sílica gel 60, com indicador de fluorescência em 254 nm. A enzima AChE, tipo VI-s, pó liofilizado, 292 U/mg foi adquirida da Sigma Chemical Co. Neste ensaio, a enzima é ressuspensa em tampão Tris/HCl, 50 mmol.L<sup>-1</sup>, pH 8. O iodeto de acetilcolina (ACTI), adquirido da Aldrich Chem. Co. foi empregado como substrato. O reagente de Ellman foi preparado diluindo-se o ácido 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzóico (DTNB) em tampão Tris/HCl (1 mmol.L<sup>-1</sup>). Tacrina foi utilizada como inibidor padrão da AchE.

---

<sup>66</sup> Ellman, G. L., Courtney, D., Andres, V., Featherstone, R. M., A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity, *Biochem. Pharmacol.*, **1961**, 7, 88-95.

<sup>67</sup> Rhee, I. K., Meent, M. V. D., Ingkaninan, K., Verpoorte, R., Screening for acetylcholinesterase inhibitors from Amaryllidaceae using silica gel thin-layer chromatography in combination with bioactivity staining, *J. Chromat.*, **2001**, 915, 217-223.

### **3.4.2. Análise quantitativa**

A atividade da AChE foi quantificada usando leitora de microplaca de 96 poços marca Bio-Rad modelo i-Mark, baseando-se numa modificação do método de Ellman.

#### **3.3.2.1. Solventes e reagentes utilizados**

Os reagentes e os solventes listados abaixo foram utilizados sem nenhum tratamento prévio.

- Tris-HCl marca Amresco;
- Ácido 5,5'- ditiobis [2-nitrobenzóico]marca SigmaAldrich;
- Iodeto de acetilcolinamarca Sigma Aldrich;
- Acetilcolinesterase marca Sigma Aldrich de peixe elétrico tipo VI-S;
- Albumina sérica bovina marca Sigma Aldrich;
- Fisostigmina da marca Sigma Aldrich;
- Água destilada;
- Etanol marca Merck.

#### **3.3.2.2. Ensaio enzimático**

Os ensaios para avaliação da atividade anticolinesterásica utilizando o método de Ellman foram realizados em placas de 96 poços em triplicata na ausência e na presença dos três compostos em diferentes concentrações. A densidade óptica foi medida utilizando leitor de microplaca de 96 poços Bio-Rad modelo i-Mark, em comprimento de onda 415 nm. Foram realizados no

mínimo três ensaios independentes, para desta forma ser calculado o desvio padrão, ou seja, a margem de erro do ensaio.



## **4. Resultados e Discussão**



#### **4.1. Estudos de Alinhamento local da sequência de proteína (BLASTp) das enzimas AChE da raia com as enzimas AChE humana.**

Inicialmente, foi feita uma busca no PDB<sup>60</sup> de estruturas cristalográficas de acetilcolinesterase selecionadas, pois era necessário fazer a escolha das enzimas de trabalho para obtermos melhores resultados para etapa de docagem molecular.

Para isto consideramos que em etapas futuras do trabalho seria realizada avaliação biológica *in vitro* na enzima AChE de uma *T. Californica*, por ser a AChE mais estudada e utilizada nos estudos de Docking. Como também queríamos verificar as possibilidades de interação com a enzima AChE humana com o fim de aumentar a atividade da ACh em pacientes Alzheimer, foram selecionadas algumas enzimas AChE humanas. Os resultados da busca no PDB encontram-se a seguir na Tabela 1.

**Tabela 1.** Estruturas cristalográficas da enzima AChE humana e *T. Californica*.

Código PDB	Resolução (Å)	Ligante
3LII ( <i>Homo sapiens</i> )	<b>3,20</b>	N-acetil -D-Glucosamina
1ACJ ( <i>Torpedo californica</i> )	2,80	Tacrina
1E66 ( <i>Torpedo californica</i> )	<b>2,10</b>	Huprina
1EVE ( <i>Torpedo californica</i> )	2,50	Donepezila
1B41 ( <i>Homo sapiens</i> )	<b>2,76</b>	Donepezila
2ACE ( <i>Torpedo californica</i> )	2,50	Huperzina
2CKM ( <i>Torpedo californica</i> )	2,50	Hurpezina

Para os químicos medicinais, o interesse na alta qualidade em modelagem por homologia estrutural é grande, pois, na ausência de estruturas resolvidas de alvos moleculares de interesse terapêutico, há a necessidade da criação de modelos com alto grau de confiança, constituindo-se em um primeiro passo para a identificação de novos protótipos. Partindo desta necessidade, realizou-se um estudo de homologia estrutural entre as enzimas selecionadas.

Com este fim, selecionamos para a *T. Californica* de código 1E66 como proteína-molde que apresenta boa resolução para comparar com as enzimas AChE humanas 3LII e a 1B41 que apresentam resolução, moderada e boa,

respectivamente. Além de apresentar melhor resolução, a AChE de código 1E66 da *T. Californica* será utilizada no ensaio biológico.

Realizamos um Alinhamento Local de Sequência de Proteína (BLASTp) para verificarmos identidade e o grau de similaridade entre as proteínas da raia e as AChE humanas escolhidas. A similaridade é uma medida de semelhança entre sequências de caracteres considerando a probabilidade de o alinhamento ter ocorrido por acaso.

O BLASTp entre a sequência-molde (query) selecionada na busca (*T. Californica*: 1E66) e a sequência-alvo (enzimas humanas: 3LII e 1B41) foi realizada no software *Basic Local Alignment Search Tool*. Na Figura 10, temos os parâmetros utilizados no BLASTp (Metodologia - subtítulo 3.1.). O valor de *expected threshold* = 10 indica o limite de significância estatística para relatar partidas contra sequências do banco de dados. O valor de *expected threshold* padrão é 10, o que significa que dez partidas deverão ser encontradas por mero acaso, de acordo com o modelo de Karlin e Altschul.<sup>68</sup> O *Max target sequence* indica o número máximo de sequências alinhadas que serão exibidos.

O BLASTp leva em conta os “caracteres” de alta pontuação, que são indicados pelo parâmetro *word size* = 3. Estes “caracteres” se tratam de uma

---

<sup>68</sup> Karlin S, Altschul SF. Methods for assessing the statistical significance of molecular sequence features by using general scoring schemes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, .1990, 87(6), 2264–2268.

sequência de três aminoácidos selecionados pelo programa e que estão relacionados com o valor de pontuação (*scores*) obtido pelo BLASTp. As pontuações são criadas através da comparação dos “caracteres”. Observa-se que o alinhamento significativo escolhido possui “caracteres” em comum, isto é um número de aminoácidos correspondente nas sequências de aminoácido que estão sendo comparadas. Estas pontuações podem ser reduzidas por inadequações e lacunas na melhor alinhamento.

O cálculo da pontuação depende de uma matriz substituição (BLOSUM62) para comparação entre os resíduos. Há uma pontuação entre os resíduos alinhados e proporção de gaps. Essas pontuações estão relacionadas como o número de positivos (Positives) que se refere à proporção de aminoácidos com mesmas características (carga, polaridade, hidrofobicidade) e a proporção de gaps refere-se a trechos da sequência que não são alinháveis por falta de similaridade.

O resultado do BLASTp entre as proteínas 1E66 e as enzimas humanas 3LII e 1B41 encontram-se na Figura 17. Obtivemos valores iguais de *score* e *expected* para ambos os BLASTp. O *score* fornece informação sobre o grau de homologia entre a sequência da raia e a sequência humana introduzida. Pode-se afirmar que a similaridade é um indicador de homologia. Com outras palavras é uma medida da semelhança causada por descendência de mesmo antepassado.

```

Alignments
>lcl|466|3LII:A|PDBID|CHAIN|SEQUENCE
Length=540
Score = 679 bits (1752), Expect = 0.0, Method: Compositional matrix adjust.
Identities = 311/540 (58%), Positives = 406/540 (75%), Gaps = 6/540 (1%)
Query 2 DHSELLVNTKSGKVMGTRVPLVSSHISAFGLGIPFAEPPVGNMRRFRPEPKPWVSGVWNAS 61
      + +ELLV + G++ G R+ +SAFLGIPFAEPP+G RF PEPK+PWSGV +A+
Sbjct 1 EDSELLVTVRGGRLRGIRLKTGGPVSAFLGIPFAEPPMGRFRFLPPEPKQVWVSDAT 60
      W86
Query 62 TYPNNCCQYVDEQFPFGFSGSEMNNPNREMSDCLYLNIVVPSRPFKSTT-VMVWIYGGGF 120
      + + C QYVD +PGF G+EMNNPNRE+SEDCLYLN+W P PRP S T V+VWIYGGGF
Sbjct 61 TFQSVCYQYVDTLYPGFEGTEMNNPNRELSDCCLYLNWVTPYPRPTSPTVWVWIYGGGF 120
Query 121 YSGSSTLDVYNGKYLAYTEEVVLSYRVGAFGFLALHGSQEAAPGNVGLLDQRMALQWV 180
      +S+LDVY+G++L E VLV++YRVGAFGLAL GS+EAPGNVGLLDQ+ALQW
Sbjct 121 YSGASSLDVYDGRFLVQAERTVLSMNYRVGAFGLALPGSREAPGNVGLLDQRLALQWV 180
Query 181 HDNIQFFGGDPKVTIFGESAGGASVGMHILSPGSRDLFRRAILQSGSPNCPWASVVAE 240
      +N+ FGGDP +VT+FGESAG ASVGMH+LSP SR LF RA+LQSG+PN PWA+V + E
Sbjct 181 OENVAAFGGDPTSVTLFGESAGAASVGMHLLSPPSRGLFHRRAVLQSGAPNGPWA+VGMGE 240
      W286
Query 241 GRRRAVELGRNLNC---NLNSDEELIHCLREKKPQELIDVNNVLPFDSIFRFSFVPI 296
      RRA +L + C +D EL+ CLR + Q L++ E++VLP +S+FRFSFVPI+
Sbjct 241 ARRRATQLAHLVGCPPGGTGGNDTELVACLRTRPAQVLVNHENHVLVLPQESVFRFSFVPI 300
Query 297 DGEFFPTSLSEMLNSGNFKKTQILLGVNKDEGSFFLLYGAPGFSKDESKISREDFMVSG 356
      DG+F + E+++N+G+F Q+L+GV KDEGS+FL+YGAPGFSK+ES ISR +F++GV
Sbjct 301 DGDFLSDTPEALINAGDFHGLQVLVGVVVKDEGSYFLVYGAPGFSKDNESLISRAEFLAGV 360
Query 357 KLSVPHANDLGLDAVTLQYTDWMDNNGIKNRDGLDDIVGDHNVICPLMHFVNKYTKFNG 416
      ++ VP +DL +AV L YTDW+ + + R+ L D+VGDHNV+CP+ + G
Sbjct 361 RVGVQVSDLAEEAVVLYHTDNLHPEDPARLREALSDVVGDHNVVCPVAQLAGRLAAQGA 420
Query 417 GTYLYFFNHRASNLVWPNMVGVIHCYEIEFVFGFLPLVKELNYTAEKEALSRRIMHYNAT 476
      Y Y F HRAS L WP WMGV HGYEIEF+FG+PL NYTAE+ ++R+M YNA F
Sbjct 421 RVYAVFEHRASLWPLWMMGVPHGYEIEFIFGIPLDPSRNYTAEKIFAQRLMRYWANF 480
Query 477 AKIGNEPNPHSQES-KWPLFTTKEQKFIDLNTEPMKVHQLRVQMCVFNWQFLPKLLNAT 535
      A+TG+PNEP ++ +WP +T Q+++ L+ P++V + LR Q C FWN+FLPKLL+AT
Sbjct 481 ARTGDPNEPRDPKAPQWPPYTAGAQQVVSDDLRLPVEVRRGLRAQACAFWNRFLPKLLSAT 540

```

```

Alignments
>lcl|6215|1B41:A|PDBID|CHAIN|SEQUENCE
Length=538
Score = 679 bits (1752), Expect = 0.0, Method: Compositional matrix adjust.
Identities = 311/538 (58%), Positives = 405/538 (75%), Gaps = 6/538 (1%)
Query 4 SELLVNTKSGKVMGTRVPLVSSHISAFGLGIPFAEPPVGNMRRFRPEPKPWVSGVWNAS 63
      +ELLV + G++ G R+ +SAFLGIPFAEPP+G RF PEPK+PWSGV +A+T+
Sbjct 2 AELLVTVRGGRLRGIRLKTGGPVSAFLGIPFAEPPMGRFRFLPPEPKQVWVSDATTF 61
      W86
Query 64 PNNCCQYVDEQFPFGFSGSEMNNPNREMSDCLYLNIVVPSRPFKSTT-VMVWIYGGGFYS 122
      + + C QYVD +PGF G+EMNNPNRE+SEDCLYLN+W P PRP S T V+VWIYGGGFYS
Sbjct 62 QSVCYQYVDTLYPGFEGTEMNNPNRELSDCCLYLNWVTPYPRPTSPTVWVWIYGGGFYS 121
Query 123 GSSTLDVYNGKYLAYTEEVVLSYRVGAFGFLALHGSQEAAPGNVGLLDQRMALQWV 182
      G+S+LDVY+G++L E VLV++YRVGAFGLAL GS+EAPGNVGLLDQ+ALQW +
Sbjct 122 GASSLDVYDGRFLVQAERTVLSMNYRVGAFGLALPGSREAPGNVGLLDQRLALQWVE 181
Query 183 NIQFFGGDPKVTIFGESAGGASVGMHILSPGSRDLFRRAILQSGSPNCPWASVVAEGR 242
      N+ FGGDP +VT+FGESAG ASVGMH+LSP SR LF RA+LQSG+PN PWA+V + E R
Sbjct 182 NVAAFGGDPTSVTLFGESAGAASVGMHLLSPPSRGLFHRRAVLQSGAPNGPWA+VGMGEAR 241
      W286
Query 243 RRAVELGRNLNC---NLNSDEELIHCLREKKPQELIDVNNVLPFDSIFRFSFVPI 298
      RRA +L + C +D EL+ CLR + Q L++ E++VLP +S+FRFSFVPI+DG
Sbjct 242 RRATQLAHLVGCPPGGTGGNDTELVACLRTRPAQVLVNHENHVLVLPQESVFRFSFVPI 301
Query 299 EFFPTSLSSEMLNSGNFKKTQILLGVNKDEGSFFLLYGAPGFSKDESKISREDFMVSGVKL 358
      +F + E+++N+G+F Q+L+GV KDEGS+FL+YGAPGFSK+ES ISR +F++GV++
Sbjct 302 DFLSDTPEALINAGDFHGLQVLVGVVVKDEGSYFLVYGAPGFSKDNESLISRAEFLAGVRV 361
Query 359 SVPHANDLGLDAVTLQYTDWMDNNGIKNRDGLDDIVGDHNVICPLMHFVNKYTKFNGT 418
      VP +DL +AV L YTDW+ + + R+ L D+VGDHNV+CP+ + G
Sbjct 362 QVQVSDLAEEAVVLYHTDNLHPEDPARLREALSDVVGDHNVVCPVAQLAGRLAAQGARV 421
Query 419 YLYFFNHRASNLVWPNMVGVIHCYEIEFVFGFLPLVKELNYTAEKEALSRRIMHYNATFAK 478
      Y Y F HRAS L WP WMGV HGYEIEF+FG+PL NYTAE+ ++R+M YNA FA+
Sbjct 422 YAVVFEHRASLWPLWMMGVPHGYEIEFIFGIPLDPSRNYTAEKIFAQRLMRYWANFAR 481
Query 479 TGNPNPHSQES-KWPLFTTKEQKFIDLNTEPMKVHQLRVQMCVFNWQFLPKLLNAT 535
      TG+PNEP ++ +WP +T Q+++ L+ P++V + LR Q C FWN+FLPKLL+AT
Sbjct 482 TGDPNPRDPKAPQWPPYTAGAQQVVSDDLRLPVEVRRGLRAQACAFWNRFLPKLLSAT 539

```

**Figura 17.** Alinhamento local da sequência primária da AChE da raia (query) de códigos 1E66 com as humanas (sbjct), 3LII e 1B41, respectivamente.

Quanto maior a quantidade de “caracteres” encontrados maior será a similaridade da sequência de aminoácido. O valor de *expected* (e-valor) é a medida da probabilidade do alinhamento ter ocorrido por acaso. Ele é um indicador do grau de significância do resultado da pesquisa.<sup>69</sup>

De acordo com estudo matemático desenvolvido por Altschul,<sup>70</sup> quanto menor o *e*-valor menos provável será que o alinhamento seja apenas aleatório e, portanto, mais provável que o alinhamento represente uma possível homologia. Em ambos os BLASTp da AChE da raia com as enzimas humanas obtivemos valores de *expected* = 0. A partir desse valor conclui-se uma possível homologia entre a enzimas AChE da raia (1E66) com as enzimas humanas (3LII e 1B41).

Entende-se por identidade a proporção de aminoácidos idênticos encontrados em ambas as sequências comparadas. Com respeito à faixa aceitável de identidade sequencial para a execução da modelagem molecular por homologia, é bem conhecido. A literatura<sup>71</sup> descreve como significativo um valor acima de 30 % de identidade sequencial entre a(s) proteína(s)-molde e a proteína-alvo. No nosso estudo, em ambos os BLASTp realizados encontramos uma porcentagem de identidade relativamente alta de 58%. A

---

<sup>69</sup> <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/html/blastcgihelp.html>; Acessado em 22/04/2013.

<sup>70</sup> Altschul S., Gish W., The estimation of statistical parameters for local alignment score distributions, *Nucleic Acids Research*, **2001**, 29, 351-361.

<sup>71</sup> Moulton, J., A decade of CASP: progress, bottlenecks, and prognosis in protein structure prediction. *Curr. Opin. Struct. Biol.*, **2005**, 15(3), 285-289.

partir desse estudo, conclui-se que as enzimas *T. Californica* (1E66) com ambas as proteínas humanas (3LII e 1B41), possuem um alto grau de similaridade e identidade. Adicionalmente, observamos nas regiões do sítio de ação enzimática que compreende os resíduos catalíticos e periféricos da AChEs, destacadas em verdes na Figura 17, encontram-se regiões bastante conservadas. Isso pode significar que muitas das características estudadas na enzima de raia podem-se aplicar também às enzimas humanas.

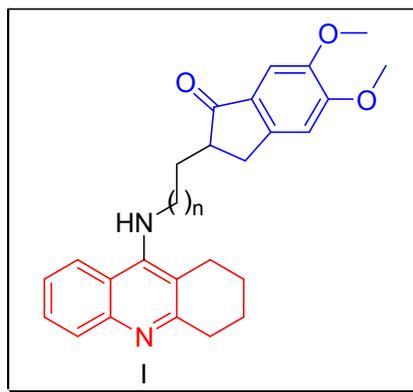
#### **4.1.1. Obtenção e Preparo dos Ligantes**

As estruturas dos ligantes proposto foram desenhadas no Chemdraw e tiveram suas energias minimizadas no ChemBio3D 12.0. Este programa realiza a otimização das estruturas dos modelos virtuais basicamente por campo de força (mecânica molecular – MM2). A estrutura molecular é submetida a um processo de relaxamento, para que o estado de energia mínima seja alcançado.

A MM2 trata as moléculas como grupo de átomos que pode ser descrita por forças newtonianas, ou seja, são tratadas como partículas mantidas unidas por forças harmônicas ou elásticas. Esta metodologia computacional possui a desvantagem de não alcançar exatamente o mínimo de energia total, algumas classes de moléculas de interesse não estão correntemente parametrizadas e a MM2 não é apropriada para a determinação de propriedades onde efeitos eletrônicos (por exemplo, interações de orbitais, quebra de ligações, etc) são predominantes.

Em contrapartida, a mecânica molecular é um dos métodos que, principalmente por razões de simplicidade computacional, tem sido utilizado para modelar as energias conformacionais na elucidação de problemas experimentais em química e bioquímica. Este método possui a vantagem de ser uma estratégia rápida e capaz de obter resultados com nível de exatidão razoável.

#### 4.1.2. Estudos de docking do híbrido I



**Figura 18.** Estrutura do híbrido I

O híbrido I (Figura 18) contém uma a porção acridina da tacrina e a porção indanona do donepezila. Atualmente, a tacrina não é muito utilizada por apresentar elevada hepatotoxicidade.<sup>72</sup> Entretanto, ainda é um dos mais potentes inibidores reversíveis conhecidos. Por isso, a sua estrutura continua sendo utilizada como protótipo para o desenvolvimento de novos ligantes.

---

<sup>72</sup> Byun E., Jeong G.S., An R.B., Min T.S., Kim Y.C., Tribuli fructus constituents protect against tacrine-induced cytotoxicity in HepG2 cells. *Arch Pharm Res.* **2010**, 33(1), 67-70.

A tacrina liga-se ao sítio catalítico da acetilcolinesterase humana, através de uma interação do tipo  $\pi$ -stacking<sup>73</sup> com um resíduo de Trp84, bloqueando desta forma, a ligação da acetilcolina e, conseqüentemente retardando a sua hidrólise. No caso da donepezila, o anel benzila interage com o resíduo Trp84, enquanto a porção dimetoxiindanona liga-se com o resíduo Trp279 através de interações do tipo  $\pi$ -stacking.<sup>74</sup> A donepezila tem a vantagem de ser mais eficaz e muito menos tóxico comparado a THA.<sup>75</sup> Os aminoácidos correspondentes na acetilcolinesterase de peixe elétrico são os resíduos Trp84 e Trp279 e os resíduos humanos são os Trp86 e Trp286.

A análise dos *dockings* levou em consideração o *MolDock score* (parâmetro que fornece a energia total de interação teórica)<sup>76</sup>, interação com a proteína (preferência para  $\pi$ - $\pi$  stacking e ligações de hidrogênio) e, principalmente, as interação com os resíduos de aminoácidos de interesse, ou seja, os resíduos catalítico e periférico da AChE.

---

<sup>73</sup> Soriano E., Samadi A., Chioua M., de los Rios C., Marco-Contelles J., Molecular modelling, synthesis and acetylcholinesterase inhibition of ethyl 5-amino-2-methyl-6,7,8,9-tetrahydrobenzo[b][1,8]naphthyridine-3-carboxylate, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2010**, 20(9), 2950-2953.

<sup>74</sup> Kryger G., Silman, I., Sussman, L., Structure of acetylcholinesterase complexed with E2020 (Aricept®) implications for the design of new anti-Alzheimer drugs, *Structure*, **1999**, 7, 297–307.

<sup>75</sup> Barreiro, E. J., Biodiversidade: fonte potencial para a descoberta de fármacos, *Quím. Nova*. **2009**, 32(3), 686-688.

<sup>76</sup> Thomsen R., Christense M.H., MolDock: a new technique for high-accuracy molecular docking, *J. Med. Chem.* **2006**, 49(11), 3315-3321.

Realizou-se um estudo de ancoragem com a tacrina com as AChE selecionadas com a finalidade de observar as interações, assim também como verificar a distância na observação espacial da interação tipo  $\pi$ - $\pi$  stacking desejada.

Haja vista que a tacrina é um potente anticolinesterásico conhecido, os dados de interações encontrados nesse docking serão utilizados para comparação do estudo de docking realizado em nosso trabalho. Nos dockings da tacrina com as enzimas humana (1B41 e 3LII) e *T. Californica* (1E66) observa-se interação  $\pi$ - $\pi$  stacking como esperado.

Na Figura 19, encontra-se a estrutura da tacrina minimizada com vista frontal (A) e a melhor interação observada com a enzima AChE humana de código 1B41, no qual obteve-se interação  $\pi$ - $\pi$  stacking uma faixa de distância entre 3,53-3,83 Å e ligações de hidrogênio com resíduos Tyr337, Ser125 (B). Vale ressaltar que o valor da distância interação  $\pi$ -stacking encontrado nesse pose está dentro da faixa comumente utilizada para empilhamento entre grupos aromáticos que ocorrem com distâncias interplanares de 3,3-3,8 Å.<sup>77</sup>

As distâncias encontradas nessa interação de empilhamento entre as faces aromáticas entre a tacrina e o resíduo Trp86 ocorreram na faixa de distância entre 3,40 - 3,98 Å. Este valor será utilizado para comparação de

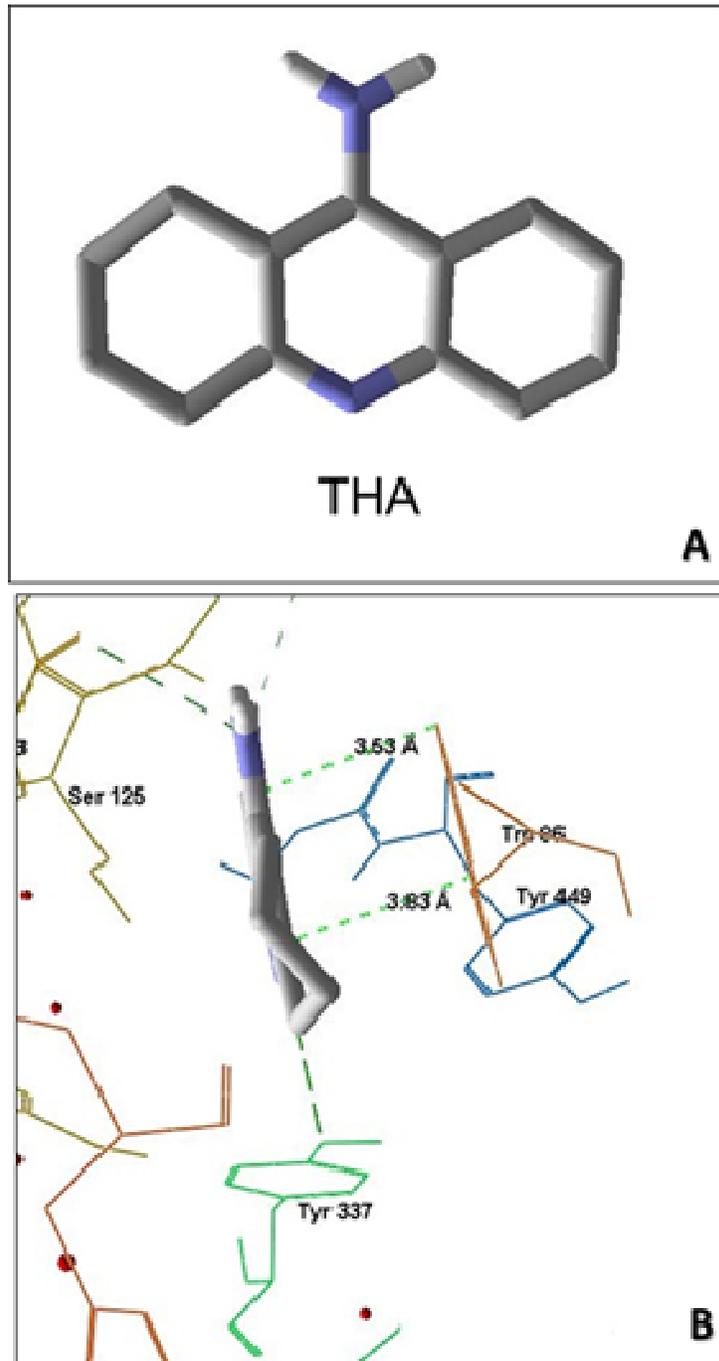
---

<sup>77</sup> Janiak, C., A critical account on  $\pi$ - $\pi$  stacking in metal complexes with aromatic nitrogen-containing ligands. *J. Chem. Soc., Dalton Trans.*, **2000**, 3885–3896.

interações tipo  $\pi$ -stacking desse trabalho. A faixa da distância observada nos dockings corrobora com distâncias entre faces aromáticas em interações  $\pi$ -stacking de inibidores de AChE encontradas na literatura.<sup>78, 79</sup>

---

<sup>78</sup> i) Kannan M., Manivel P., Geetha K., Muthukumaran J., Rao H.S.P., Krishna R., Synthesis and in silico evaluation of 1N-methyl-1S-methyl-2-nitroethylene (NMSM) derivatives against Alzheimer's disease: to understand their interacting mechanism with acetylcholinesterase. *J. Chem. Biol.*, **2012**, 5(4), 151–166; ii) Soriano E., Samadi A., Chioua M., Ríos C.D.L., Marco-contelles J., Molecular modelling, synthesis and acetylcholinesterase inhibition of ethyl 5-amino-2-methyl-6,7,8,9-tetrahydrobenzo[b][1,8]naphthyridine-3-carboxylate, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2010**, 20(9), 2950–2953; iii) Dan, C., Ya-fei, P., Chuan-jun, L., Yun-feng, X., Yu-ren J., Virtual Screening of Acetylcholinesterase Inhibitors, Virtual Screening, Prof. Mutasem Taha (Ed.), **2012**, 84-91.



**Figura 19.** **A** - Vista frontal da estrutura da tacrina minimizada; **B** - Interação  $\pi$ -stacking da THA com Trp86 da AChE humana (1B41).

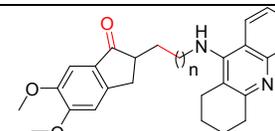
Na Tabela 2, encontram-se os estudos de docking com os ligantes híbridos tipo I com as AChEs na ausência de moléculas água. Destacamos as seguintes observações:

- As energias de interação com os resíduos de Trp do sítio catalítico (Trp84 ou Trp86) são favoráveis para qualquer dos híbridos propostos, independentemente do tamanho do espaçador (em azul, na Tabela 2)
- As energias de interação com os resíduos de Trp do sítio periférico (Trp 279 ou Trp286) são dependentes do tamanho do espaçador, conforme esperado, e da enzima (em vermelho). No caso da AChE de *T. californica* (1E66), não há interação com nenhum dos híbridos propostos, e, surpreendentemente, nem com o donepezila, que é um ligante conhecido, para ambos os sítios da AChE, e que está no mercado como agente inibidor da AChE.
- Os híbridos que apresentam interações mais favoráveis com o sítio periférico das AChEs humanas são  $n = 3 < n = 4 < n = 5$ .
- Considerando os valores de *Moldock score* (em verde), que correspondem à energia total de ancoramento molecular, observamos que os ligantes contendo espaçadores menores ( $n = 1$  e  $n = 2$ ), possuem as interações mais favoráveis com as enzimas humanas.
- *Moldock score* melhores para os híbridos contendo menores números carbonos metilênicos.

- Os valores de *Moldock score* dos híbridos propostos são em média melhores do que os inibidores conhecidos, tacrina (THA) e donepezila.(DON).
- O amino álcool **6**, apresenta interações favoráveis com os sítios catalíticos de todas as enzimas, exceto com a 3LII.

**Tabela 2.** Energias de interação dos híbridos do tipo I (kcal/mol): melhores resultados de moldock score, protein, ligação de H e interações observadas nos poses do docking molecular na ausência de água para híbridos do tipo I (THA-DON) com as AChE humanas (3LII e 1B41) e da raia (1E66).

Ligante	Energias de interação em kcal/mol do híbrido molecular I (Na ausência de água)														
	Moldock score			Protein			Ligação de H			Trp86		Trp286		Trp 84	Trp279
	3LII	1B41	1E66	3LII	1B41	1E66	3LII	1B41	1E66	3LII	1B41	3LII	1B41	1E66	1E66
n=1	<b>-109,51</b>	<b>-164,90</b>	<b>-194,34</b>	-113,74	-91,11	-207,56	-0,45	-2,12	-1,34	<b>-25,49</b>	<b>-42,14</b>	(-)	<b>-0,34</b>	<b>-53,71</b>	(-)
n=2	-74,69	<b>-166,34</b>	<b>-195,84</b>	-116,94	-184,99	-210,06	0	-1,52	-0,96	<b>-27,38</b>	<b>-34,91</b>	(-)	<b>-2,31</b>	<b>-54,68</b>	(-)
n=3	-63,43	<b>-161,11</b>	<b>-192,24</b>	-96,39	-184,05	-204,21	-3,41	-3,51	-2,00	<b>-34,92</b>	<b>-34,86</b>	<b>-5,73</b>	<b>-16,63</b>	<b>-47,19</b>	(-)
n=4	-84,64	<b>-160,56</b>	<b>-171,62</b>	-86,06	-184,00	201,12	-1,21	-1,91	-2,34	<b>-27,41</b>	<b>-32,45</b>	(-)	<b>-13,32</b>	<b>-44,08</b>	(-)
n=5	-78,07	<b>-165,90</b>	<b>-170,62</b>	-115,15	-187,14	-170,62	-0,77	-0,34	-0,03	<b>-25,94</b>	<b>-36,71</b>	<b>-2,36</b>	<b>-12,38</b>	<b>-45,81</b>	(-)
DON	-152,75	-150,29	-157,32	-168,96	-24,46	-184,45	-0,71	0	-0,17	<b>-24,18</b>	<b>-17,81</b>	<b>-10,90</b>	<b>-7,70</b>	<b>-44,15</b>	(-)
THA	-85,69	-94,23	-99,14	-102,23	-110,77	-115,69	-0,45	-3,94	-2,5	<b>-44,52</b>	<b>-40,75</b>	(-)	(-)	<b>-34,57</b>	(-)
6	-86,17	-124,86	-126,04	-74,86	-134,69	-134,63	-1,11	-2,72	-2,50	(-)	<b>-50,81</b>	(-)	(-)	<b>-35,94</b>	(-)



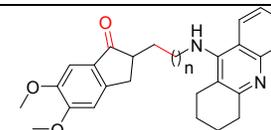
6 = amino álcool; THA = tacrina; DON = donepezila; (-) sem interação significativa.

Na Tabela 3, encontram-se os resultados relevantes do *docking molecular* considerando a presença de moléculas de água. Observou-se que:

- *Moldock score* melhores para os híbridos tipos **I** contendo menores números carbonos metilênicos.
- As energias de interação de todos os híbridos com o sítio catalítico (Trp 84 ou Trp 86) mantém as mesmas tendências observadas na ausência de água, ou seja, os valores são indicativos de uma boa interação, independentemente do número de carbonos no espaçador ou da enzima.
- Em 3LII e 1E66, todos os híbridos tipos **I** comportaram-se como simples ligantes, ou seja, interagem apenas com o sítio catalítico.
- O amino álcool **6** comportou-se como ligante simples para as enzimas 1B41 e 1E66, interagindo com os sítios Trp86 e Trp84, respectivamente.

**Tabela 3.** Energias de interação dos híbridos do tipo I (kcal/mol): melhores resultados de *moldock score*, *protein*, ligação de H e interações observadas nos poses do *docking* molecular na ausência de água para híbridos do tipo I (THA-DON) com as AChE humanas (3LII e 1B41) e da raia (1E66).

Ligante	Energias de interação em kcal/mol do híbrido molecular I (Na presença de água)														
	Moldock score			Protein			Ligação de H			Trp86		Trp286		Trp84	Trp279
	3LII	1B41	1E66	3LII	1B41	1E66	3LII	1B41	1E66	3LII	1B41	3LII	1B41	1E66	
n=1	-180,09	-57,39	-181,81	-184,12	-108,90	-195,00	-1,21	-2,02	-2,49	<b>-34,55</b>	<b>-2,33</b>	(-)	-3,44	<b>-38,89</b>	(-)
n=2	-179,12	-58,64	-180,78	-188,12	-102,61	-189,10	-0,26	-2,64	0	<b>-36,17</b>	<b>-4,09</b>	(-)	-7,50	<b>-34,67</b>	(-)
n=3	-164,99	-48,87	-178,90	-181,48	-118,47	-196,74	0	-0,76	-1,23	<b>-33,17</b>	<b>-20,27</b>	(-)	-4,59	<b>-31,21</b>	(-)
n=4	-181,35	-33,58	-176,32	-189,12	-115,73	-193,36	-0,01	-4,10	-3,33	<b>-36,12</b>	<b>-15,62</b>	(-)	-3,77	<b>-29,67</b>	(-)
n=5	-180,88	-40,75	-177,77	-187,12	-120,04	-194,50	-0,32	-1,43	-1,73	<b>-34,21</b>	<b>-12,45</b>	(-)	-6,21	<b>-28,56</b>	(-)
DON	-148,86	-52,56	-108,07	-177,46	-104,51	-121,17	-0,54	-2,89	-2,43	<b>-21,66</b>	<b>-15,11</b>	(-)	<b>-11,76</b>	<b>-49,33</b>	(-)
THA	-94,16	-94,21	-99,14	-54,96	-110,77	-115,67	-2,50	-3,94	-2,5	<b>-41,55</b>	<b>-40,75</b>	(-)	(-)	<b>-34,57</b>	(-)
6	-119,21	-124,86	-126,04	-73,16	-134,69	-134,03	0,25	-2,72	-2,5	(-)	<b>-50,81</b>	(-)	(-)	<b>-35,94</b>	(-)

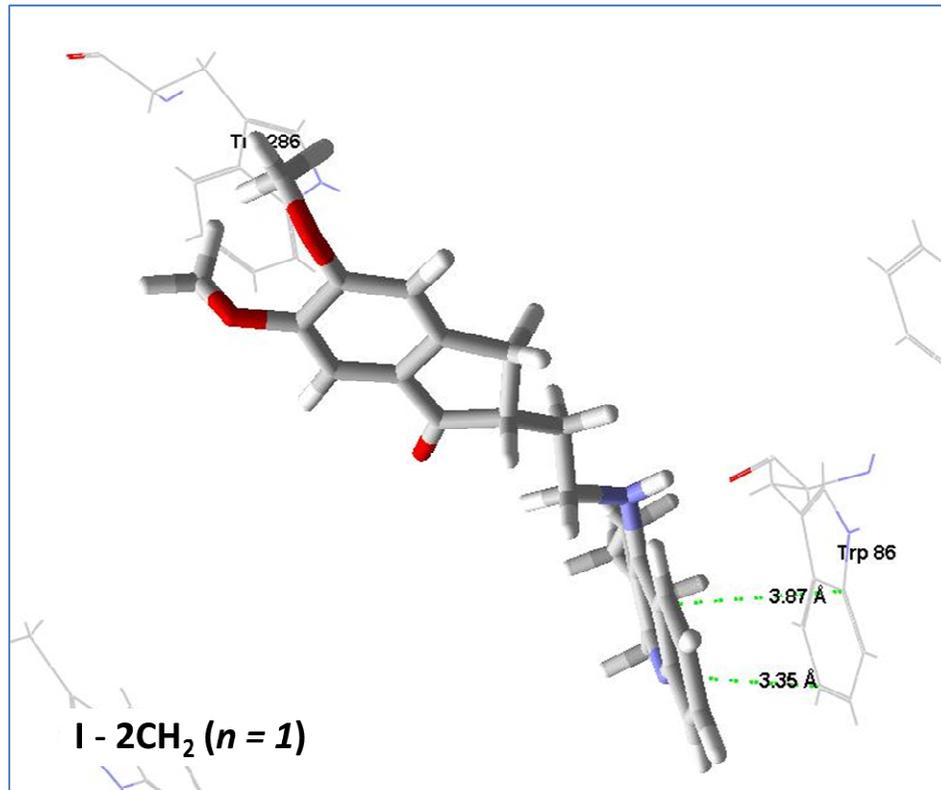


6 = amino álcool; THA = tacrina; DON = donepezila; (-) sem interação significativa.

Comparados os resultados dos dois dockings considerando a presença e ausência de água dos híbridos do tipo **I** com as AChE, observamos que as interações são semelhantes. No entanto, a magnitude das interações na ausência de água foram maiores.

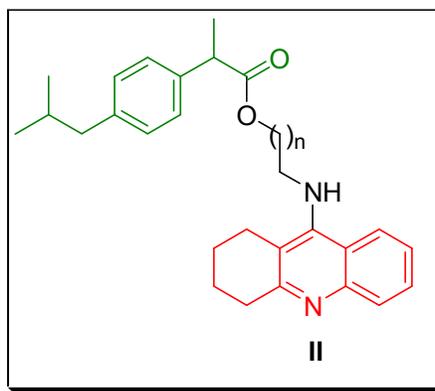
A melhor interação observada para o híbrido **I** com a enzima AChE humana de código 1B41 considerando o *molDock score* do docking ocorreu com o híbrido contendo dois carbonos metilênicos totais ( $n = 1$ ) em ambos os dockings na ausência e presença de água.

Nesta representação tridimensional do híbrido **I** contendo dois carbonos metilênicos, observa-se interação desfavorável com o sítio periférico (Trp286), enquanto que se obteve uma interação tipo  $\pi$ - $\pi$  stacking uma faixa de distância entre 3,35-3,87 Å com o sítio catalítico (Trp86). Este valor de distancia interplanar encontrada no docking com o híbrido **I** está próximo ao encontrado em empilhamento de grupos aromáticos benzenos. com a Conclusão desse estudo que este híbrido deve comporta-se como simples ligante como mostra a Figura 20, a seguir.



**Figura 20.** Interação  $\pi$ -stacking do híbrido tipo I ( $n = 1$ ) com Trp86 da AChE humana (1B41).

### 4.1.3. Estudos de docking molecular dos híbridos II



**Figura 21.** Estrutura do híbrido II

Os híbridos do tipo II (Figura 21) são como pró-fármacos que sofreriam uma biotransformação, passando a produzir os metabólitos ativos liberando as porções tetraidroacridina do amino álcool precursor e uma porção do ibuprofeno. A princípio esperamos observar uma interação da porção tetraidroacridina do amino álcool 7, o que provavelmente desencadearia uma atividade inibidora da acetilcolinesterase, e a subunidade do híbrido que corresponde ao ibuprofeno, promoveria a ação anti-inflamatória deste. Com base nesta estratégia teríamos então um candidato a fármaco para atuar contra dois processos patológicos associados à DA, que seriam a diminuição da atividade colinérgica e inflamação.

Uma vez que já estávamos realizando estudos de *docking molecular* com os híbridos do tipo I, visando a interação simultânea com ambos os sítios da AChE, pensamos na possibilidade de variar o tamanho do espaçador entre

as subunidades tetraidroacridina e ibuprofeno. Neste caso, poderíamos encontrar um híbrido que fosse não apenas um candidato a fármaco multi-alvo, mas também um duplo ligante para a AChE. Desse modo, realizamos o estudo de docking do híbrido tipo **II** variando-se o tamanho do espaçador e a conformação do éster (*s-cis* e *s-trans*). A análise do *docking* levou em consideração todos os parâmetros já comentados no tópico anterior. Os resultados se encontram na Tabela 4.

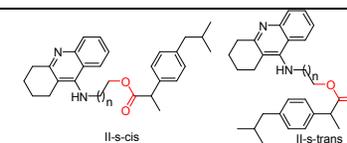
Na tabela 4, encontram-se os estudos de docking realizados com os ligantes híbridos tipo **II** com as AChE na ausência de moléculas água destacamos as seguintes observações.

- Em relação às interações dos híbridos com o sítio catalítico (Trp 86 ou Trp 84) não apresentou dependência do tamanho do espaçador, ou da conformação, na grande maioria dos casos (em azul, na tabela 4). As interações observadas são equivalentes em termos de energia, à tacrina, um inibidor conhecido.
- Não se observou interação com híbridos **II** os sítios de interesse (catalítico ou periférico) no docking com a enzima humana de código 3LII, exceto para o híbrido com  $n = 3$ .
- Com exceção do híbrido que apresenta duas unidades metilênicas no espaçador ( $n = 1$ ), a natureza da conformação não parece afetar significativamente as energias de interação com o sítio catalítico.

- Nenhum híbrido apresentou interação com o sítio periférico da enzima 1E66.
- Em relação às interações dos híbridos com o sítio periférico, apenas os híbridos com  $n = 3$  (*s-cis*) e  $n = 5$  (*s-cis* ou *s-trans*) apresentaram interações favoráveis com a enzima 1B41, assim como a donepezila (1B41 e 3LII).
- Observou-se interação do amino álcool **6** com o sítio catalítico das AChE 1B41 e 1E66 (em verde).

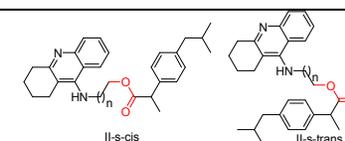
**Tabela 4.** Energias de interação do híbridos do tipo **II** (kcal/mol): melhores resultados de *moldock score*, *protein*, ligação de H e interações observadas nos poses do *docking* molecular na ausência de água para híbridos do tipo **II** (THA-IBU) com as AChE humanas (3LII e 1B41) e da raia (1E66).

Ligante	Energias de interação em kcal/mol do híbrido molecular II (Na ausência de água)															
	Moldock score			Protein			Ligação de H			Trp86		Trp286		Trp84		Trp279
	3LII	1B41	1E66	3LII	1B41	1E66	3LII	1B41	1E66	3LII	1B41	3LII	1B41	1E66	1E66	
<b>n=1(cis)</b>	-137,09	-185,05	-195,40	-129,58	-194,03	-210,51	0	-0,95	-1,33	(-)	<b>-40,07</b>	(-)	-2,12	<b>-52,48</b>	(-)	
<b>n=1(trans)</b>	-132,85	-186,20	-205,84	-133,79	-192,11	-220,23	-2,16	-1,07	-1,71	(-)	-1,07	(-)	-1,57	<b>-54,18</b>	(-)	
<b>n=2(cis)</b>	-135,41	-184,73	-191,23	-153,07	-187,13	-216,10	-2,5	-2,57	-1,88	(-)	<b>-43,39</b>	(-)	-2,87	<b>-53,33</b>	(-)	
<b>n=2(trans)</b>	-135,51	-185,87	-193,25	-141,50	-204,77	-214,01	-2,5	0	-1,36	(-)	<b>-37,45</b>	(-)	-1,22	<b>-49,25</b>	(-)	
<b>n=3 (cis)</b>	-161,78	-192,32	-204,53	-159,00	-211,44	-222,45	0	-4,03	-1,29	<b>-47,99</b>	<b>-34,54</b>	(-)	<b>-13,95</b>	<b>-54,38</b>	(-)	
<b>n=3(trans)</b>	-92,51	-185,47	-212,12	-109,87	-194,94	-232,55	-1,32	-0,19	-4,76	<b>-32,58</b>	<b>-33,13</b>	(-)	-1,06	<b>-50,60</b>	(-)	



Continuação (Tabela 4)

**Energias de interação em kcal/mol dos híbrido moleculares II  
(Na ausência de água)**



Ligante	Moldock score			Protein			Ligação de H			Trp86		Trp286		Trp84	Trp279
	3LII	1B41	1E66	3LII	1B41	1E66	3LII	1B41	1E66	3LII	1B41	3LII	1B41	1E66	1E66
<b>n=4(cis)</b>	-142,99	-191,61	-219,34	-155,58	-104,22	-227,40	0	-3,55	-1,08	(-)	<b>-45,83</b>	(-)	-2,12	<b>-51,59</b>	(-)
<b>n=4(trans)</b>	-145,99	-192,39	-212,87	-157,45	-215,86	-224,14	-4,43	-3,31	-1,71	(-)	-1,05	(-)	-1,57	<b>-45,67</b>	(-)
<b>n=5(cis)</b>	-141,67	-193,28	-210,41	-153,07	-148,18	-227,49	-2,51	-2,57	-1,88	(-)	<b>-38,05</b>	(-)	<b>-19,43</b>	<b>-34,91</b>	(-)
<b>n=5(trans)</b>	144,11	-203,94	216,11	-152,65	-212,94	-225,98	-1,44	-1,42	-2,09	(-)	<b>-43,44</b>	(-)	<b>-8,58</b>	<b>-40,99</b>	(-)
<b>DON</b>	-152,75	-150,29	-157,32	-168,96	-24,46	-184,45	-0,71	0	-0,17	-24,18	-17,81	<b>-10,90</b>	<b>-7,70</b>	<b>-44,15</b>	(-)
<b>IBU</b>	-100,46	-100,70	-105,60	-78,02	-110,22	-118,34	-2,5	-2,69	-6,60	(-)	<b>-38,68</b>	(-)	(-)	<b>-30,01</b>	(-)
<b>THA</b>	-85,69	-94,23	-99,14	-102,23	-110,77	-115,69	-0,45	-3,94	-2,5	-44,52	<b>-40,75</b>	(-)	(-)	<b>-34,57</b>	(-)
<b>6</b>	-86,17	-124,86	-126,04	-74,86	-134,69	-134,63	-1,11	-2,72	-2,50	(-)	<b>-50,81</b>	(-)	(-)	<b>-35,94</b>	(-)

THA= Tacrina; IBU= Ibuprofeno; 6 = amino álcool

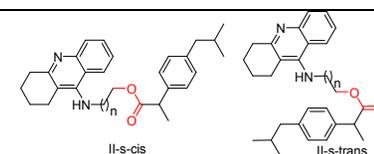
Na Tabela 5, encontram-se os resultados relevantes do docking dos híbridos **II** com as AChE humana e *T. Californica* considerando a presença de moléculas água. Destas observações destacamos as seguintes:

- A enzima 3LII apresenta, na presença de água, interações favoráveis com quase todos os ligantes em seu sítio catalítico, o que não ocorreu quando o docking foi realizado na ausência de água (em azul na Tabela 5)
- Em relação às interações com os sítios catalíticos (Trp 84 ou 86) das demais enzimas, observamos que os híbridos com conformação *s-cis* são os que apresentam energias de interação mais favoráveis, exceto, para o híbrido com  $n=1$  (duas unidades metilênicas). Neste caso, a conformação *s-trans* apresentou interação muito mais favorável do que a *s-cis*. Como isto não foi observado na ausência de água, embora não seja muito bem compreendido, atribuímos este fato à estabilização da *s-trans* pelas moléculas de água.
- Em relação às interações com o sítio periférico, apenas os ligantes com  $n = 4$  e  $n = 5$  na conformação *s-cis*, apresentaram interações com o sítio periférico (em vermelho, na tabela 5). Estas interações foram ainda mais favoráveis do que as do donezepila (DON), um inibidor conhecido.

- Interação favorável do amino álcool **6** com o sítio catalítico das AChE, 1B41 e 1E66, com valores de energia bastante significativos. As interações apresentaram as seguintes energias de interação de -50,81 Kcal/mol e -35,94 Kcal/mol, respectivamente.
- Observou-se interação do ibuprofeno com o sítio catalítico das AChE 1B41 e 1E66. As interações apresentaram as seguintes energias de interação de -38,68 Kcal/mol e -30,01 Kcal/mol, respectivamente.

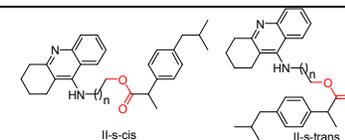
**Tabela 5.** Energias de interação dos híbridos do tipo II (kcal/mol): melhores resultados de *moldock score*, *protein*, ligação de H e interações observadas nos poses do *docking* molecular na presença de água com as AChE humanas (3LII e 1B41) e da raia (1E66).

Ligante	Energias de interação em kcal/mol do híbrido molecular II (Na presença de água)														
	Moldock score			Protein			Ligação de H			Trp86		Trp286	Trp84	Trp279	
	3LII	1B41	1E66	3LII	1B41	1E66	3LII	1B41	1E66	3LII	1B41	3LII	1B41	1E66	
n=1 (cis)	-176,21	-69,59	-162,92	-161,53	-114,01	177,22	-3,20	-0,51	-0,66	<b>-49,55</b>	-21,97	(-)	(-)	<b>-33,02</b>	(-)
n=1 (trans)	-164,04	-167,93	-163,94	-169,00	-180,25	-193,42	-1,78	-1,01	-0,58	<b>-29,57</b>	-22,75	(-)	(-)	<b>-36,16</b>	(-)
n=2 (cis)	-169,05	-55,05	-157,32	-175,86	-104,85	-188,16	-4,91	-3,85	-0,55	<b>-44,70</b>	-12,18	(-)	-7,31	<b>-35,28</b>	(-)
n=2 (trans)	-117,22	-140,67	-146,10	-135,55	-178,93	-180,68	-0,84	-1,06	-2,59	<b>-46,77</b>	(-)	(-)	(-)	<b>-38,14</b>	(-)
n=3 (cis)	-161,78	-38,16	-204,53	-159,41	-107,16	-222,45	0	-2,52	-1,29	<b>-47,99</b>	-25,32	(-)	-8,35	<b>-54,47</b>	(-)
n=3(trans)	-150,08	-38,15	-147,78	-171,58	-107,33	-183,15	0	-2,52	-2,36	<b>-29,51</b>	-8,75	(-)	(-)	<b>-32,46</b>	(-)
n=4 (cis)	-166,26	-85,20	-209,25	-192,29	-152,41	-221,69	-6,17	-2,77	-5,42	<b>-26,33</b>	-17,73	-2,32	<b>-22,84</b>	<b>-52,41</b>	(-)
4 (trans)	-157,10	-137,88	-126,01	-168,21	-188,46	-180,37	-2,99	-0,71	-0,43	<b>-36,96</b>	(-)	(-)	(-)	<b>-39,64</b>	(-)



*continua*

**Energias de interação em kcal/mol do híbrido molecular II  
(Na presença de água)**



<i>Ligante</i>	<i>Moldock score</i>			<i>Protein</i>			<i>Ligação de H</i>			<i>Trp86</i>		<i>Trp286</i>		<i>Trp84</i>	<i>Trp279</i>
	<b>3LII</b>	<b>1B41</b>	<b>1E66</b>	<b>3LII</b>	<b>1B41</b>	<b>1E66</b>	<b>3LII</b>	<b>1B41</b>	<b>1E66</b>	<b>3LII</b>	<b>1B41</b>	<b>3LII</b>	<b>1B41</b>	<b>1E66</b>	
<b>n=5 (cis)</b>	-167,06	-71,46	-195,77	-191,29	-172,33	-213,09	-4,53	0	-5,66	<b>-33,45</b>	-21,18	-4,37	<b>-23,48</b>	<b>-48,57</b>	(-)
<b>n=5 (trans)</b>	-108,36	-93,05	-93,04	-149,67	-143,12	-149,12	-2,95	-0,11	-0,10	-9,70	(-)	-4,58	(-)	<b>-12,76</b>	(-)
<b>IBU</b>	-82,52	-75,14	-117,51	-85,69	-83,68	-108,79	-5,66	-2,99	-2,50	(-)	-8,12	(-)	(-)	<b>-32,39</b>	(-)
<b>THA</b>	-94,16	-46,68	-108,07	-54,15	-82,82	-119,59	0	-2,73	0	<b>-41,55</b>	-27,91	(-)	(-)	<b>-39,33</b>	(-)
<b>DON</b>	-148,86	-52,56	-108,07	-177,46	-104,51	-121,17	-0,54	-2,89	-2,43	<b>-21,66</b>	-15,11	(-)	-11,76	<b>-49,33</b>	(-)
<b>6</b>	-119,21	-53,84	-124,75	-73,16	-93,24	-123,70	0	-5,07	0	(-)	-17,91	(-)	(-)	<b>-40,41</b>	(-)

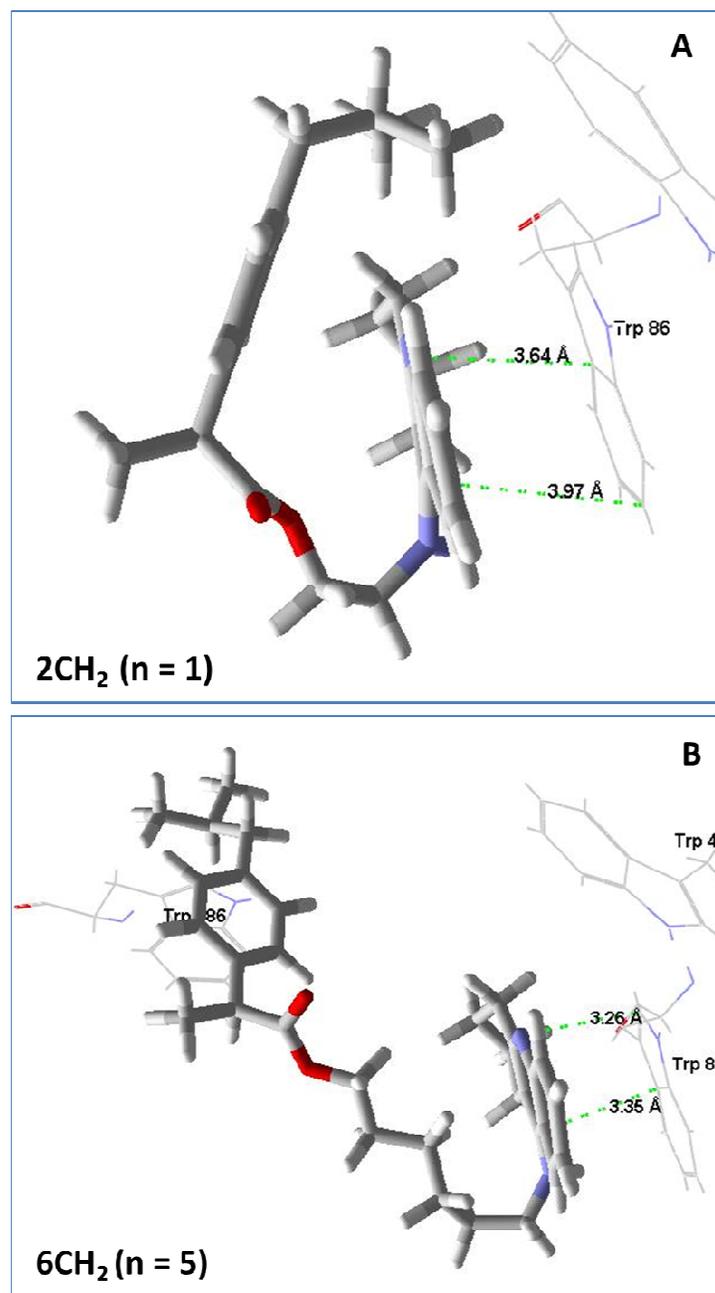
THA= Tacrina; IBU= Ibuprofeno; **6** = amino álcool.

Dos estudos de docking, considerando a presença de moléculas de água, observamos uma grande variação nas energias de interação de uma enzima para outra. Visto que a docagem feitas na presença e ausência de água não apresentaram resultados semelhantes. Não destacamos nenhum duplo ligante com energia interação muito favorável.

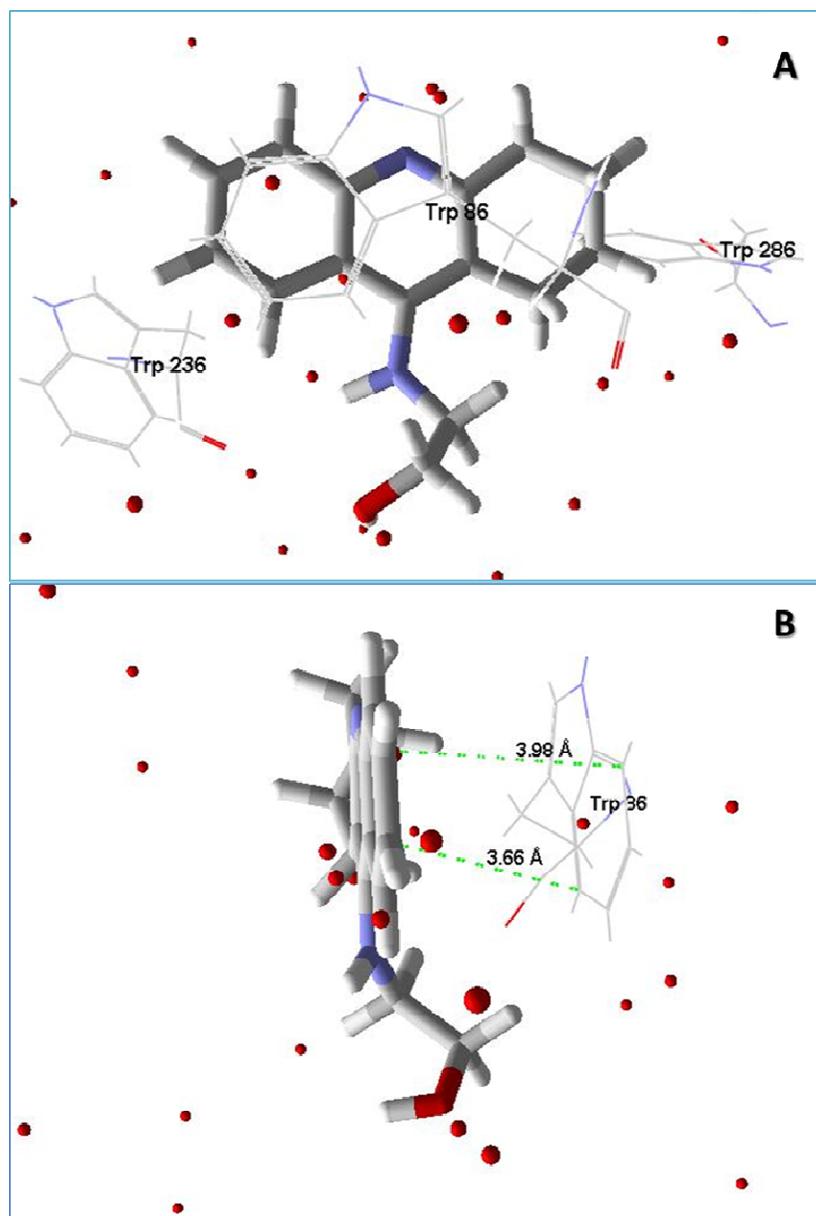
Na Figura 22, temos a representação tridimensional de dois poses dos híbridos **I** contendo dois e seis carbonos metilênicos totais ( $n=1$  e  $n = 5$ , respectivamente). No qual, observa-se interação com o sítio catalítico independente do número de carbono metilênicos em ambas as poses. Escolhemos o híbrido **II** contendo dois carbonos metilênicos ( $n = 1$ ) para a próxima etapa de síntese.

Como a proposta inicial do projeto era que o híbrido **II** fosse um fármaco multipotente, isto é, este seria um pro-fármaco. Esse ligante poderia sofrer biotransformação *in vivo* liberando o amino álcool acridina e o ibuprofeno. Desse modo, com o objetivo de verificar a interação desse metabolito amino álcool, fizemos o docking com as AChEs e constatamos que esse interage com o sítio catalítico como esperávamos (Figura 23).

Desse estudo de docking concluímos também que o amino álcool **6** pode vir a promover interação com o sítio catalítico da AChE. A atividade do híbrido estaria apenas relacionada às funções anticolinesterásica da subunidade tetraidroacridina (amino álcool **6**) e anti-inflamatória, da subunidade ibuprofeno, como planejado inicialmente.



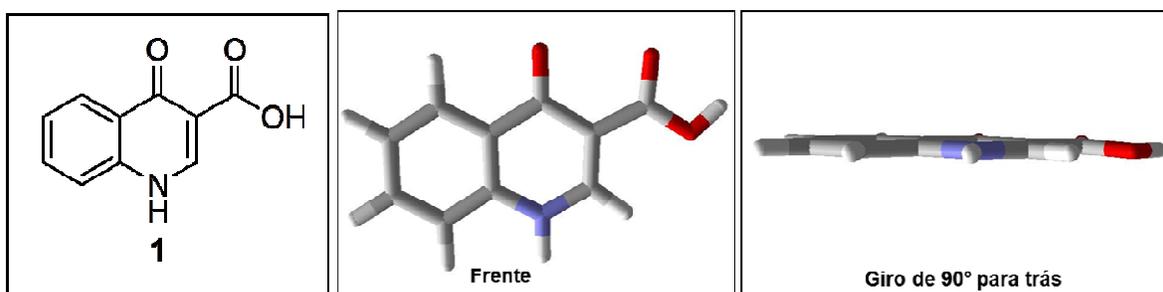
**Figura 22.** Representação tridimensional do híbrido **II** ancorado na AChE humana (1B41) mostrando Interação  $\pi$ -stacking com Trp86 da independente do número de carbonos metilênicos ( $n = 1$  e  $n = 5$ , respectivamente dois e seis carbonos metilênicos totais).



**Figura 23.** A – Vista frontal da Interação  $\pi$ -stacking do amino álcool acridina com Trp86 da AChE humana (1B41); B – Distância da Interação  $\pi$ -stacking do amino álcool acridina com Trp86.

#### 4.1.4. Estudos do docking molecular da quinolona 1 com as acetilcolinesterases humanas e *T. Californica*

Buscamos no âmbito dos projetos em desenvolvimento no laboratório, um candidato potencial para inibição da acetilcolinesterase. Seleccionamos a quinolona 1 (Figura 24), que apresenta atividade anti-amiloidogênica. Esta quinolona apresenta uma conformação planar, assim como a tacrina, além de ter grupos funcionais passíveis de interagir com o resíduo tritofano (Trp86) da acetilcolinesterase.



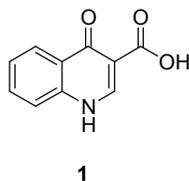
**Figura 24.** *Esquerda:* estrutura da quinolona 1 selecionada para estudo. *Centro e direita:* estrutura minimizada evidenciando a sua conformação planar.

Com o intuito de avaliar a probabilidade de interação ligante-enzima Antes de iniciar a síntese da quinolona, foi feito um estudo de docking molecular com as acetilcolinesterase humana e da raia.

Os dados obtidos de interação no *docking* molecular da quinolona 1 com as AChE humana (1B41 e 3LII) e de *T. californica* (1E66) na ausência de água (Tabela 6) e na presença de água (Tabela 7) mostram que há interação favorável do tipo  $\pi$ -stacking do ligante com o sítio catalítico (Trp86 ou Trp84)

seja na presença de água ou não, com todas as enzimas. Na presença de água, as interações são maiores, provavelmente pela maior estabilização do complexo enzima-quinolona. Os valores encontrados para as energias de interação são próximos aos valores encontrados para a tacrina.

Consideramos uma distância entre para a interação do tipo  $\pi$ -stacking de 3,40 - 3,98 Å,<sup>78</sup> tal qual fizemos com os ligantes híbridos **I** e **II**.



**Tabela 6.** Energias de interação da quinolona **1** (kcal/mol): melhor resultado de *moldock score*, protein, ligação de H e interações observadas do *docking molecular* na **ausência de água** com as AChE humanas (3LII, 1B41) e de *T. californica* (1E66).

	<i>Moldock score</i>			<i>Protein</i>			Ligação de H			Trp86		Trp84
	3LII	1B41	1E66	3LII	1B41	1E66	3LII	1B41	1E66	3LII	1B41	1E66
1	-80,51	-92,02	-94,60	-75,86	-106,38	-108,89	-1,14	-2,67	-2,88	<b>-11,09</b>	<b>-41,04</b>	<b>-35,72</b>

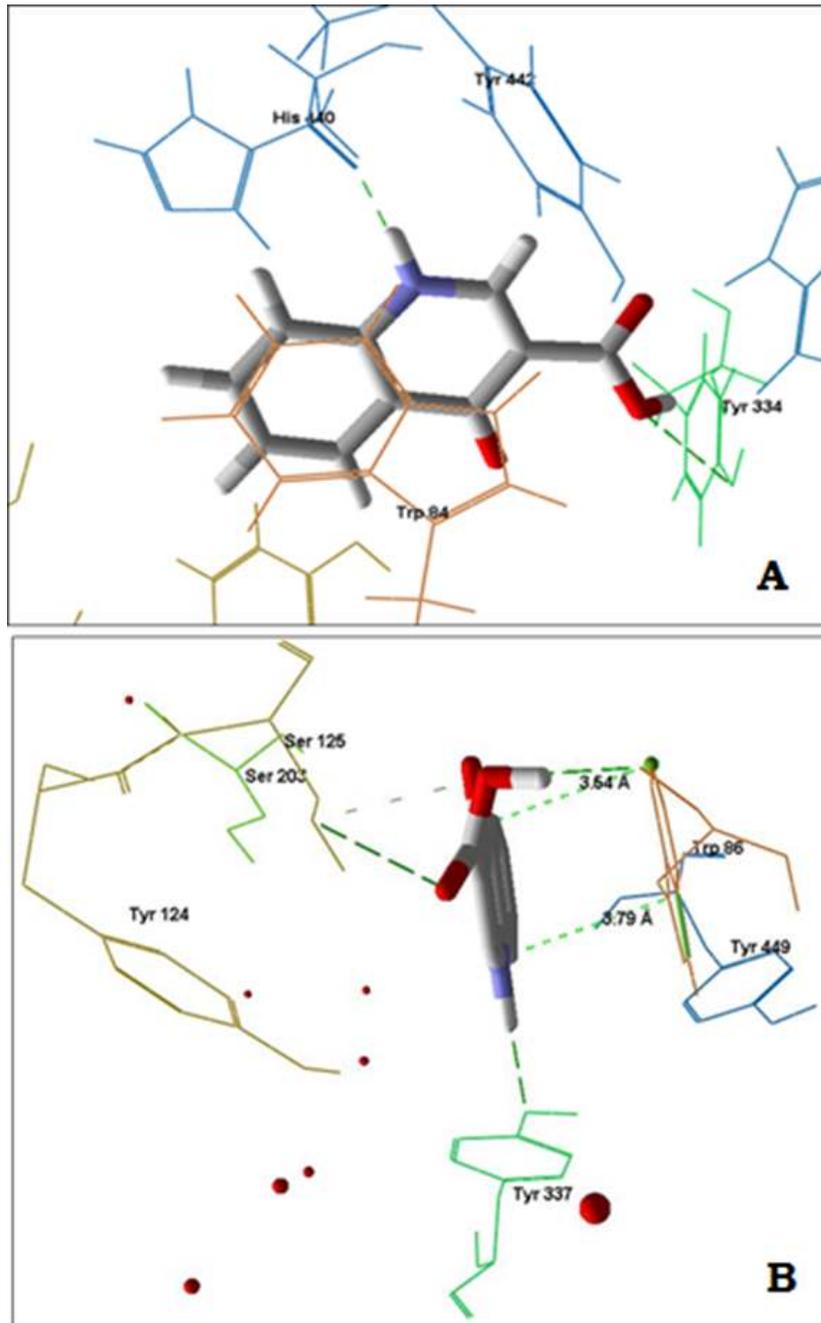
**Tabela 7.** Energias de interação da quinolona **1** (kcal/mol): resultados de moldock score, protein, ligação de H e interações observadas do *docking molecular* na **presença de água** com as AChE humanas (3LII, 1B41) e de *T. californica* (1E66).

	<i>Moldock score</i>			<i>Protein</i>			Ligação de H			Trp86		Trp84
	3LII	1B41	1E66	3LII	1B41	1E66	3LII	1B41	1E66	3LII	1B41	1E66
1	-86,40	-60,05	-104,47	-75,86	-89,86	-107,70	-2,84	-3,04	-108,89	<b>-41,15</b>	<b>-25,02</b>	<b>-37,49</b>

Comparando as interações do ligante no sítio triptofana nas enzimas humanas e *Torpedo californica*, no docking nota-se claramente que a 3LII possui menos afinidade com este sítio catalítico, no docking realizado na ausência de água haja vista que os valores de energia são muito menos negativos. Em contrapartida, nos dockings na presença de água ocorreu o oposto.

A mais importante observação dessas docagens é que em todas as enzimas testadas foi possível verificar interações do ligante quinolona do tipo  $\pi$ -stacking como o resíduo catalítico (Trp84 ou Trp86) e também interações tipo ligação de hidrogênio com resíduos do Tyr337, Ser125. Vale salientar que as interações observadas na quinolona ocorreram com os mesmo resíduos encontrados na docagem com a tacrina (ver Figura 19 - B).

Na Figura 25, podemos visualizar essas interações da quinolona com os sítios catalíticos das enzimas 1E66 e 3LII. Vale ressaltar que as interações e as distâncias (3,54 – 3,74 Å) obtidas nesse *docking* são comparáveis a ancoragem realiza com a tacrina tanto a interação tipo  $\pi$ -stacking, como também a ligação de hidrogênio do ligante com um resíduo triptofano do local de ação biológico.

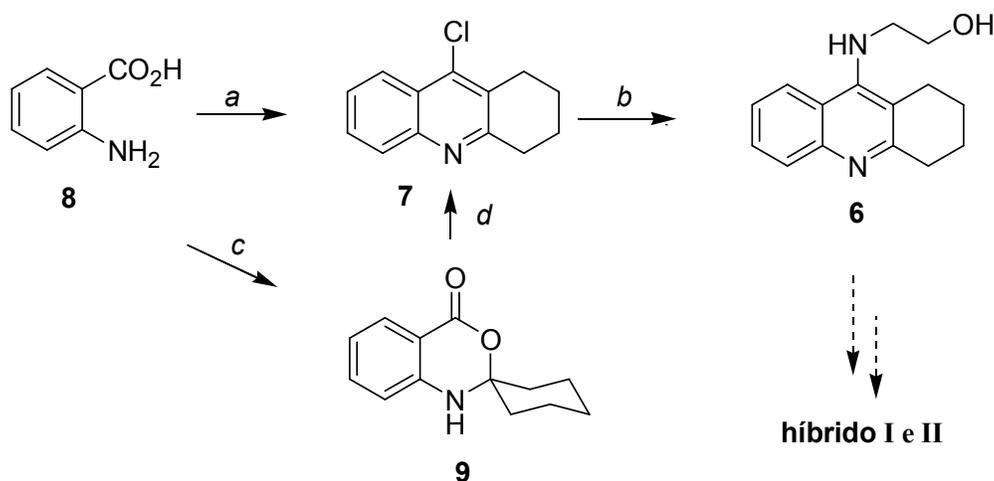


**Figura 25.** A - Visão frontal da Interação da quinolona **1** com o sítio Trp84 da AChE 1E66.  
 B - Visão perpendicular da Interação da quinolona **1** com o sítio Trp86 da AC hE humana 1B41.

## 4.2. Síntese química

### 4.2.1. Preparo dos híbridos moleculares tipo I e II

Para sintetizarmos os híbridos **I** e **II** propostos nesse trabalho, introduzimos o espaçador bifuncionalizado, por meio do qual poderíamos interligar os grupos farmacofóricos. Para a obtenção de qualquer um dos híbridos, identificamos na nossa estratégia, o aminoálcool **6**, como um precursor comum para a síntese de ambos. Este por sua vez, poderia ser preparado por uma reação de substituição nucleofílica aromática da 9-clorotetraidroacridina **7** e a etanolamina, conforme proposta apresentada na metodologia. Na Figura 26, encontram-se as rotas sintéticas estudadas em nosso laboratório para obtenção da 9-clorotetraidroacridina **7**.

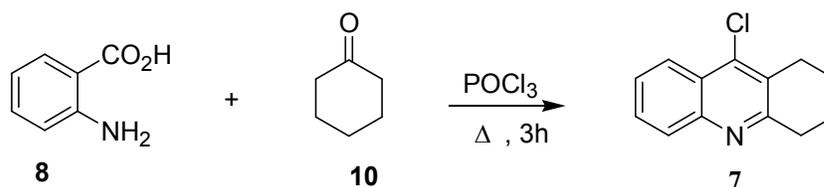


*Reagentes e condições.* **a**: POCl<sub>3</sub>, cicloexanona, Δ, 3h, 52%; **b**: H<sub>2</sub>NCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OH, fenol, Δ, 72h, 67%; **c**: 1 equiv. cicloexanona, PhCH<sub>3</sub>, Dean-Stark, 3h, **d**: 4 equiv. POCl<sub>3</sub>, Δ, 96% (**c+d**).

**Figura 26.** Rotas sintéticas para preparo dos híbridos **I** e **II**.

### 5.1.2. Preparação da 9-clorotetraidroacridina

A 9-cloro-tetraidroacridina **7** pode ser obtido por duas vias sintéticas, ambas partindo do ácido benzoico **8**. Uma primeira tentativa de preparação do núcleo tetraidroacridínico consistiu na reação entre o ácido 2-aminobenzóico **8** e a ciclohexanona **10** conforme reação descrita no Figura 27.



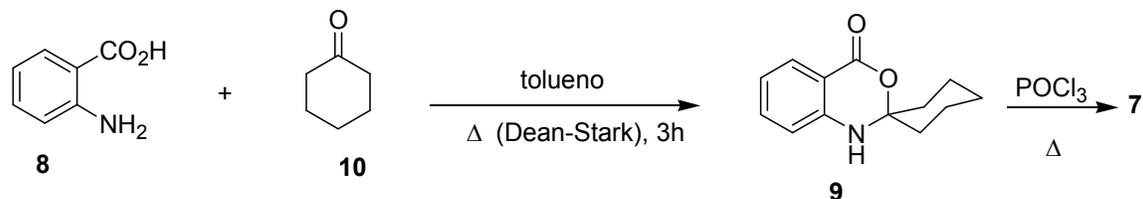
**Figura 27.** Síntese da 9-clorotetraidroacridina **7**

Assim, uma mistura do ácido antranílico **8**, ciclohexanona **10** e tricloreto de fosforila (POCl<sub>3</sub>) foi colocada sob refluxo por 3 h.<sup>80</sup> A reação foi monitorada por cromatografia camada delgada (CCD), revelando sempre um rastro sem que houvesse separação dos componentes em vários sistemas eluentes e modificando-se as proporções. Após várias tentativas de purificação por coluna cromatográfica, não foi possível obter o produto desejado de forma pura.

---

<sup>80</sup> Hu, M.-K., and Lu, C.-F. A facile synthesis of bis-tacrine isosteres, *Tetrahedron Lett.*, **2000**, *41*, 1815–1818.

Testamos então, uma rota alternativa para a obtenção de **7**, que consistiu no tratamento do ácido 2-aminobenzóico **8** com a cicloexanona em tolueno, utilizando um sistema de refluxo acoplado com um condensador Dean-Stark (Figura 28).<sup>81</sup>



**Figura 28.** Síntese do espiro aminocetal **9** e 9-clorotetraidroacridina **7**.

A análise por CCD não mais indicou a presença do ácido antranílico utilizado como material de partida e sim o aparecimento de um novo produto, e decidimos interromper a reação ao final de 3h.

No espectro de RMN <sup>1</sup>H em anexo, foram observados além dos sinais correspondentes aos prótons aromáticos na região de δ 6,71-7,93 ppm, sinais característicos dos prótons metilênicos que se apresentaram como multipletos na região de δ 1,54-2,80 ppm. A integração destes sinais na região de hidrogênio ligado a carbono alifático está um pouco acima do esperado e pensamos se tratar de resíduo de solvente. No espectro de RMN <sup>13</sup>C observamos um carbono quaternário em δ 163,99 ppm, atribuído ao carbono

<sup>81</sup> Carlier, P. R., Han, Y. F., Chow, E. S., Li, C. P., Wang, H., Lieu, T. X., Wong, H. S., Pang, Y. P. Evaluation of short-tether bis-THA AChE inhibitors. A further test of the dual binding site hypothesis, *Bioorg. Med. Chem.*, **1999**, 7, 351–357.

carbonílico, o carbono quaternário do espiro (grupo N,O-acetálico) em  $\delta$  109,78 ppm, além de cinco sinais na região entre  $\delta$  42,36-22,35 ppm que, pela análise do DEPT 135, foram caracterizados como grupos metilênicos, provenientes do ciclo de 6 membros. A comparação destes dados de RMN- $^1\text{H}$  e RMN- $^{13}\text{C}$  com a literatura, nos permite identificar o composto sintetizado como sendo o espiro aminocetal **9**.<sup>81</sup>

No espectro no IV (Anexo) deste produto **9**, não foi observado o estiramento do grupo hidroxila de ácido carboxílico na região de 3400 a 2000  $\text{cm}^{-1}$  do reagente ácido aminobenzóico **8**. Em contrapartida, observamos um sinal de média intensidade, bem fino, em  $\nu = 3472 \text{ cm}^{-1}$  atribuído à estiramento da ligação N-H. Também, visualizamos estiramento típico de ligação C-N de aminas aromáticas em  $\nu = 1265 \text{ cm}^{-1}$ . Por sua vez, uma absorção intensa em  $1670 \text{ cm}^{-1}$  que foi atribuída ao estiramento do grupo C=O característico de lactona conjugada.<sup>82,83</sup>

Na Figura 29, apresentamos uma proposta de mecanismo para a formação do espiro aminocetal **9** publicada literatura.<sup>84</sup> O grupo amino do ácido antranílico **8** faz um ataque nucleofílico no carbono carbonílico da

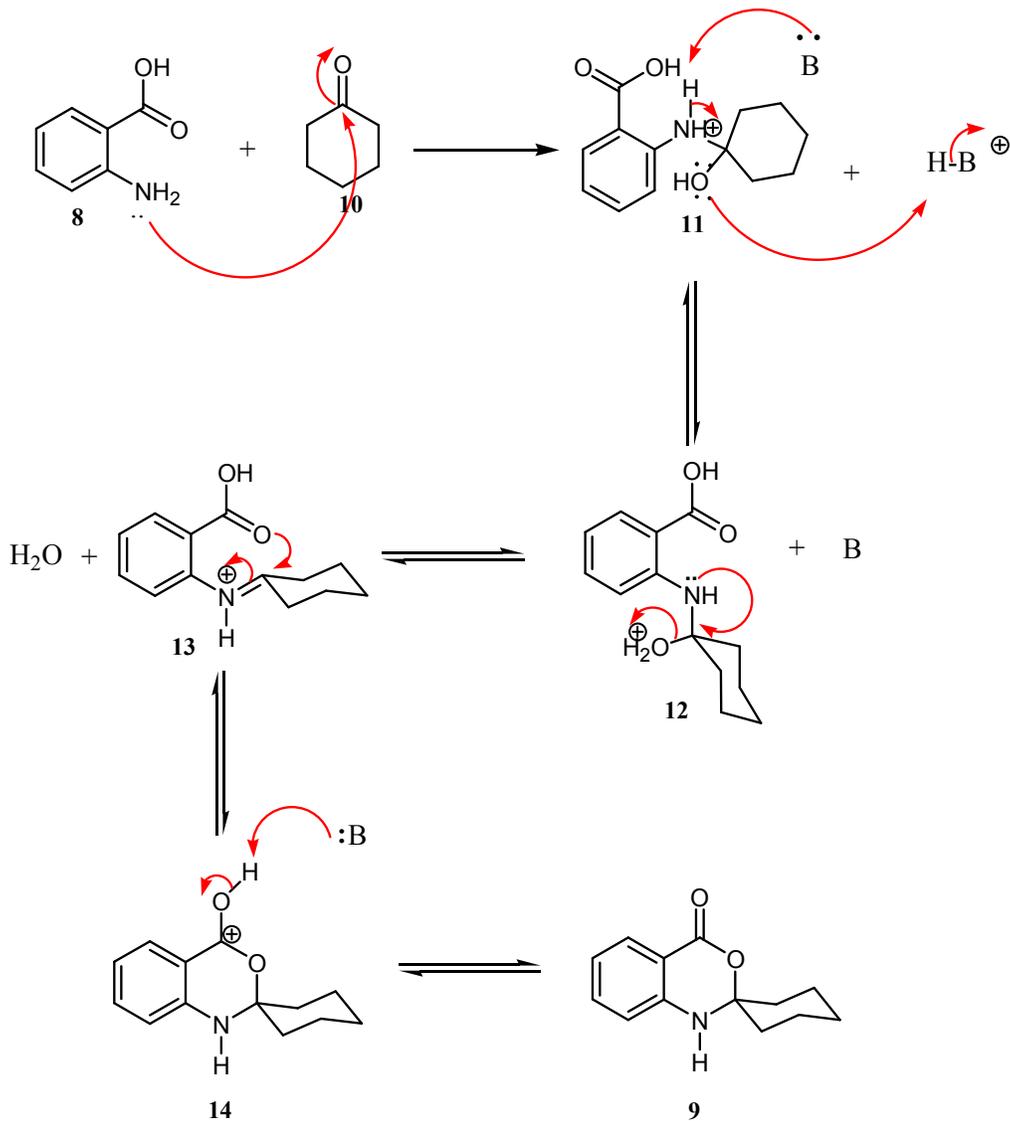
---

<sup>82</sup> Mohan J., *Organic Spectroscopy: Principles And Applications*, 2<sup>a</sup> ed. Harrow, U.K.: Alpha Science International Ltd., **2004**.

<sup>83</sup> Pavia, D. L.; Lampman, G.M.; Kriz, G.S et al. *Introdução à Espectroscopia*. 4<sup>a</sup> ed. São Paulo: Cengage Learning, **2010**.

<sup>84</sup> Chow, Suet-Hing. Syntheses and evaluation of homodimeric and heterodimeric acetylcholinesterase inhibitors. Hong Kong: Hong Kong University of Science and Technology, **1999**. *Thesis* (degree of master in philosophy in chemistry) Hong Kong University of Science and Technology.

cicloexanona **10**, levando ao intermediário **11**. Este, por transferência de próton, converte-se ao aminoálcool protonado **12**, que, após uma reação de eliminação de H<sub>2</sub>O, gera o íon imínio **13**. A ciclização de **13** levaria ao carbocátion **14**, estabilizado pelo anel aromático (cátion benzílico). A formação de uma ligação dupla carbono-oxigênio e desprotonação origina o espiro aminocetal **9**.



**Figura 29.** Proposta de mecanismo para da reação de formação do espiro aminocetal **9**.

Para a obtenção da 9-clorotetraidroacridina, o espiro aminocetal **9** obtido na etapa anterior foi tratado com POCl<sub>3</sub>, sob refluxo, por 4h e após o tratamento da reação, obtivemos um sólido amarelo, cujas características espectroscópicas foram compatíveis com a estrutura da 9-

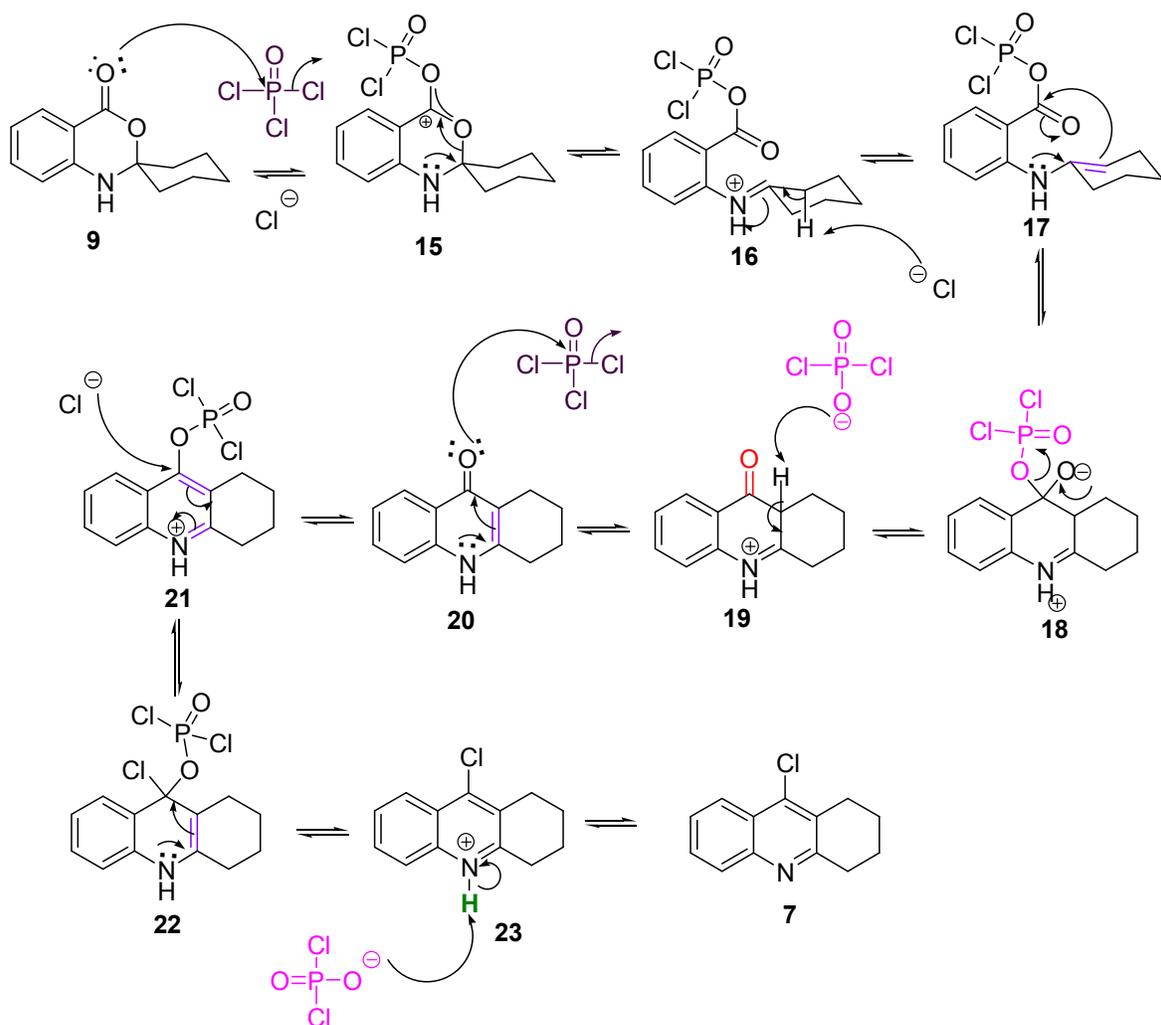
clorotetraidroacridina **7** (52 % de rendimento). O composto **7** foi caracterizada pela análise de seus espectros de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  e DEPT-135.

No espectro de RMN de  $^1\text{H}$ , observamos três grupos de sinais na região de hidrogênio ligado a carbono alifático. Um multiplete na região de  $\delta$  2,00 a 1,98 ppm, integrando para 4H, que foi atribuído a quatro dos hidrogênios metilênicos da subunidade estrutural cicloexânica. Os hidrogênios da região metilênica absorvem em  $\delta$  3,27 (2H, t,  $J = 6$  Hz) e em  $\delta$  3,07 ppm (2H, t,  $J = 4,8$  Hz), cada um destes sinais integrando para 2H. Visualizamos ainda os sinais típicos de prótons aromáticos:  $\delta$  7,62 (1H, td,  $J = 8,0$  Hz), 7,76 (1H, td,  $J = 8,4$  e 1,2 Hz), 8,19 (1H d,  $J = 8,4$  Hz), e 8,23 (1H, dd,  $J = 8,4$  e 0,8 Hz).

No espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  de **7**, observam-se treze sinais como esperávamos. Um carbono quaternário mais desprotegido em  $\delta$  159,04 ppm, atribuído ao grupo C=N, e outro e outros sete sinais de carbono na região aromática entre  $\delta$  123,88 e  $\delta$  144,62 ppm, que correspondem aos carbonos do anel aromático. A comparação dos dados obtidos com a literatura permitiu a identificação da tetraidroacridina **7**.

Deste modo, conseguimos com sucesso sintetizar a 9-clorotetraidroacridina **7**, *via* espiro aminocetal, em 93% de rendimento.

O mecanismo da reação de conversão do aminocetal **9** na 9-cloro-tetraidroacridina **7** foi proposto por Chow está apresentado no Figura 25.<sup>84</sup>



**Figura 30.** Mecanismo de formação da 9-cloro-1,2,3,4-tetraidroacridina **7** a partir do espiro aminoacetal **9**.

O oxigênio da carbonila faz um ataque nucleofílico sobre o átomo de fósforo, gerando o carbocátion **15**. Este intermediário sofre uma reação de abertura do sistema espiro, levando à imina protonada **16**. O correspondente tautômero enamina **17**, cicliza formando **18**. O intermediário carbonílico **19**, resultante da eliminação de PO<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, sofre uma desprotonação para originar a

4-quinolona **20**. O enol correspondente (não representado) faz um ataque nucleofílico ao  $\text{POCl}_3$  (usado em excesso na reação) resultando em **21**, que é o substrato para a adição do cloreto, gerando o intermediário tetraédrico **22**. Após nova eliminação de  $\text{PO}_2\text{Cl}_2$ , a tetraidrocloroacridina protonada **23** é obtida. Uma transferência de próton leva à obtenção do produto **7**.

Tendo obtido a 9-cloro-1, 2, 3, 4-tetraidroacridina **7**, passamos à preparação do aminoálcool acridina **6**. Esta etapa consistiu na substituição nucleofílica aromática ( $\text{S}_{\text{N}}_{\text{ar}}$ ) com a etanolamina.

Inicialmente, para estabelecer as condições de  $\text{S}_{\text{N}}_{\text{ar}}$ , utilizamos etanolamina em pentanol, sob refluxo. Esta reação já havia sido realizada no laboratório para obtenção de compostos análogos. Entretanto, embora tenhamos obtido o produto **6**, os rendimentos químicos não foram reproduzíveis, apresentando-se com variação muito grande. Assim, buscamos variar alguns parâmetros para otimizar a reação. Dentre as várias condições de reação testadas (Tabela 8), a que levou à formação do produto desejado de forma reproduzível foi a que incluiu fenol em pentanol no protocolo. Embora tenha sido possível obter o produto na presença de fenol, sem pentanol, o tratamento da reação foi muito mais difícil, pois o produto se apresentava contaminado com fenol. O amino álcool foi obtido em 52 % de rendimento.

**Tabela 8.** Condições reacionais testadas para obtenção do aminoálcool **6**

<b>Solvente</b>	<b>Temperatura (°C)</b>	<b>Resultado</b>	<b>Tempo (horas)</b>
<i>Pentanol*</i>	138	material de partida	14
<i>Pentanol</i>	160	mistura de produtos	72
<i>pentanol + fenol</i>	160	produto desejado	72
<i>Butanol</i>	118	material de partida	14
<i>Isopropanol</i>	82	material de partida	24
<i>Isopropanol</i>	140	mistura de produtos	72
<i>Fenol</i>	140	produto desejado	16
<i>THF</i>	65	material de partida	24

\*Foi tentada também a proporção 1:3, etanolamina/CITHA

A formação do amino álcool **6** foi comprovada por meio da análise dos espectros de absorção na região do IV, de RMN de  $^1\text{H}$  e de  $^{13}\text{C}$ .

No espectro no IV do amino álcool **6** observou-se uma banda de absorção larga a  $3353\text{ cm}^{-1}$  referente ao estiramento O-H e um sinal fino em  $3406\text{ cm}^{-1}$  atribuído ao estiramento da ligação N-H. O estiramento da ligação C=N foi detectado em  $1637\text{ cm}^{-1}$ .

No espectro de RMN de  $^1\text{H}$  observou-se absorções em  $\delta$  3,85 e 3,54 ppm, com multiplicidade de tripleto e quarteto, respectivamente. Cada um desses sinais com integração para 2H, sendo então atribuídos ao grupo etanolamina. Além destes sinais, um singleto largo em  $\delta$  4,60 ppm correspondendo a um próton ligado ao nitrogênio.

No espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  de **6**, observou-se como sinais característicos dois sinais metilênicos em  $\delta$  62,05 e  $\delta$  50,97 ppm, que foram

atribuídos aos ao grupo etanolamina. Os demais sinais são coerentes com o núcleo tetraidrocridina.

Ainda, a fim de propiciar a elucidação inequívoca do amino álcool **6**, foi obtido o espectro de massas (EM). A análise por espectrometria de massas de alta resolução (EMAR, TOF-MS-ES+) mostrou o sinal correspondente ao íon molecular protonado ( $m/z = 243,1514$ ) compatível com a fórmula molecular  $C_{15}H_{18}N_2O$  ( $M + H^+$ ) do amino álcool **6**. A massa calculada é 243,1419. O valor encontrado está dentro do erro tolerado que pode ser calculado através da seguinte expressão:

$$\frac{|Massa\ teórica - Massa\ encontrada|}{Massa\ teórica} \times 10^6 \leq 50\ ppm$$

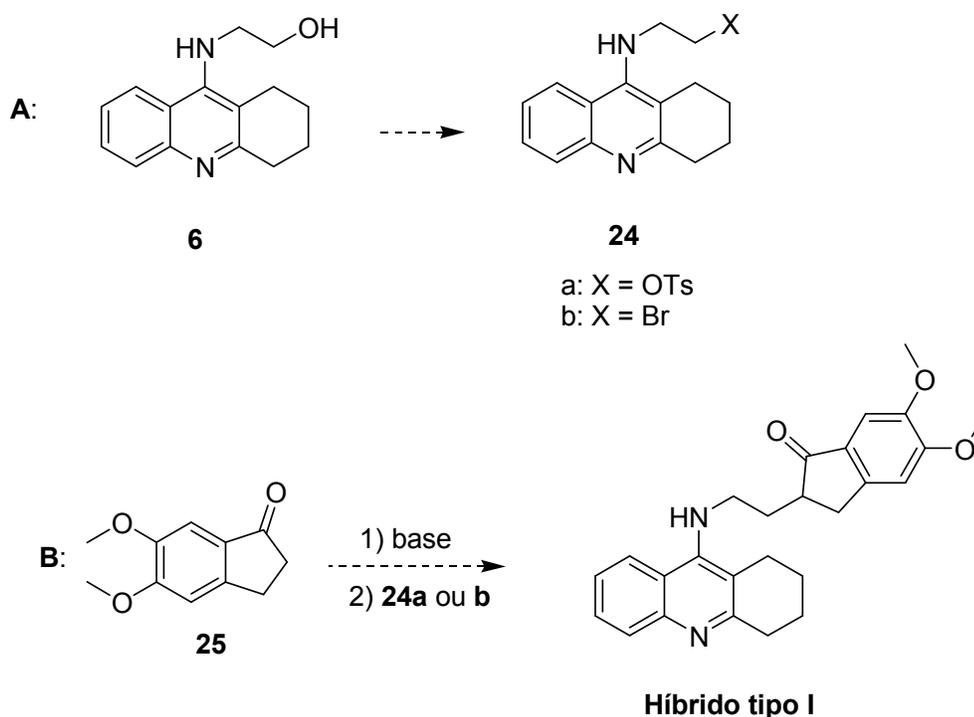
Massa teórica

Tendo em mãos todas estas evidências espectroscópicas, concluímos que conseguimos sintetizar a amino álcool **6**, utilizando estratégia sintética *via* espiro amino cetal, a partir do ácido antranílico.

De posse do composto chave da nossa estratégia sintética, seguimos com a síntese dos híbridos propostos (**I** e **II**). Embora tenhamos obtido com sucesso um dos farmacóforos (THA) ligado ao espaçador com duas unidades de carbono, funcionalizado no carbono terminal, até a sua obtenção, muito tempo havia transcorrido e tínhamos muitos resultados negativos.

#### 4.2.2. Tentativa de alquilação da dimetoxiindanona

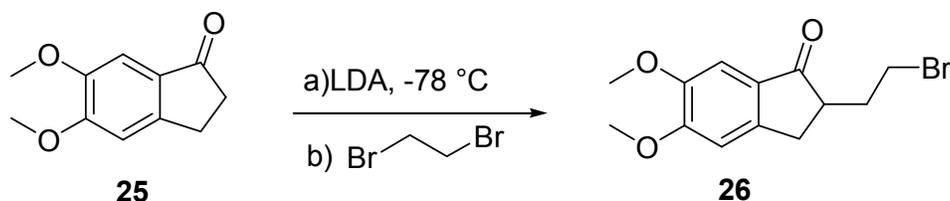
Na nossa proposta, a obtenção de híbridos do tipo **I**, envolveria a funcionalização do grupo hidroxila do amino álcool **6** de modo a transformá-lo em um bom grupo de saída (**24**, Figura 31) para a alquilação da 3,4-dimetoxiindanona (**25**), *via* seu enolato.



**Figura 31.** **A:** Conversão do amino álcool **6** ao agente alquilante **24**; **B:** alquilação do enolato da indanona **25**, levando ao híbrido do tipo **I**.

Em trabalhos anteriormente realizados no laboratório, envolvendo o sistema indanônico, foram encontradas muitas dificuldades na geração do enolato. Assim, utilizamos um sistema modelo para verificar se seria possível gerar o enolato, empregando um agente alquilante mais barato e disponível

comercialmente e selecionamos o dibromoetano como agente alquilante (Figura 32). Para isso, a desprotonação foi realizada com diisopropilamida de lítio (LDA) a  $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$ , seguida da adição de dibromoetano, para formar a ligação carbono-carbono. Infelizmente, o produto obtido após o tratamento da reação era na verdade uma mistura do produto desejado **26** (minoritário), e o material de partida (majoritário). Essa reação não foi otimizada e acabamos por abandonar esta estratégia, e demos continuidade ao estudo de preparação do híbrido do tipo **II**, ou seja, aquele que incorpora uma subunidade tacrina com o ibuprofeno.

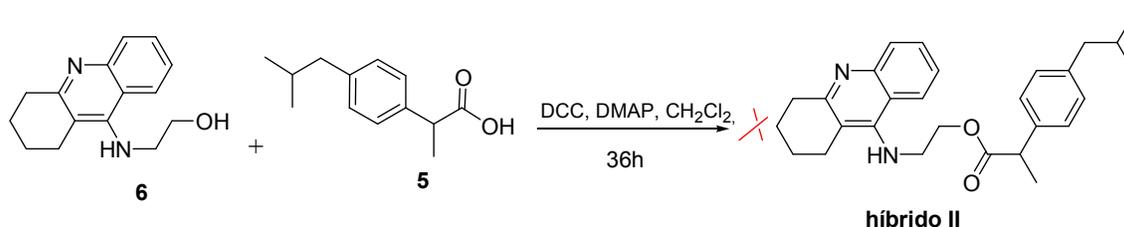


**Figura 32.** Tentativa de alquilação da indanona **25** com dibromoetano.

#### 4.2.3. Tentativa de preparo do híbrido tipo **II**

Dentre os principais métodos de preparação de ésteres, destacam-se: reação do cloreto do ácido e o álcool correspondente, reação de Steglich<sup>62</sup> entre o ácido carboxílico e o álcool, e, para ésteres metílicos a reação do ácido com diazometano. Para a obtenção do híbrido **II**, selecionamos a reação de Steglich por ser diretamente a partir do ácido, sem necessidade de uma etapa adicional. Essa reação consiste basicamente no uso de um reagente de acoplamento, que torna o grupo hidroxila da função ácida carboxílica um bom grupo abandonador.

A reação de acoplamento entre o ibuprofeno **5** com o amino álcool **6** foi realizada na presença dicicloexilcarbodiimida (DCC), como ativante do ácido carboxílico, DMAP catalítico e diclorometano como solvente (Figura 33).



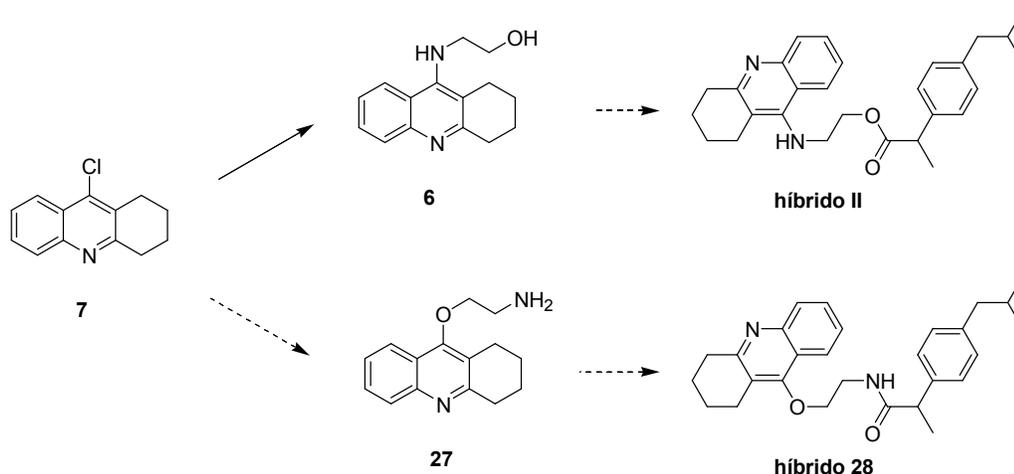
**Figura 33.** Tentativa de obtenção do híbrido **I** via acoplamento de Steglich,

A reação foi monitorada por CCD e observamos que após 3h não tínhamos mais ibuprofeno no meio reacional, e sim, aminoálcool e outro produto. Mesmo deixando a reação por mais tempo, não foi observada nenhuma evolução e decidimos isolar o produto e purificá-lo por cromatografia em coluna. Após isso, analisamos as frações por métodos espectroscópicos.

O espectro de hidrogênio não era compatível com o produto desejado, que seria o éster IBU-THA (híbrido **II**), mas tinha sinais compatíveis com a subunidade ibuprofeno, além de vários multipletos na região de carbono alifático e alguns sinais alargados. Passamos a nos questionar qual seria esse produto, uma vez que não era dicicloexiluréia no RMN de  $^1\text{H}$ .

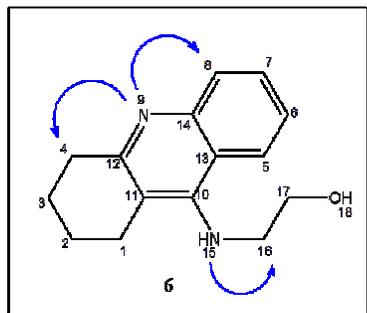
A absorção correspondente ao estiramento da carbonila no IV, em  $1655\text{ cm}^{-1}$ , era mais compatível com uma carbonila de amida, do que de éster, e, neste caso, o produto da reação de substituição nucleofílica aromática, teria

sido **27** e não o aminoálcool **6**. Isso só poderia ser explicado se o nucleófilo tivesse sido o oxigênio, um nucleófilo mais duro, e não o nitrogênio, embora o grupo amino seja mais nucleofílico (Figura 34). Assim, o produto da reação de Steglich poderia ser a amida **28**.



**Figura 34.** Possíveis produtos da reação de substituição nucleofílica aromática e da reação de Steglich.

Então, a fim de descartar esta possibilidade, foi feito um espectro de RMN de <sup>15</sup>N do aminoálcool **6** para observar a correlação entre o nitrogênio da porção amino álcool com os prótons da vizinhança em um experimento HMBC (*Heteronuclear Multiple Bond Correlation*). O espectro contendo estrutura numerada encontra-se na Figura 35. Observa-se um sinal de nitrogênio com duas correlações, uma com o próton aromático (8) e outro com um próton alifático (4), como esperado. Nesse espectro encontramos também a correlação do nitrogênio da porção amino álcool (15) que se correlaciona com os prótons (16) em  $\delta$  3,85 ppm. O que nos permite afirmar que o produto da substituição nucleofílica aromática é de fato o amino álcool **6**.



Gisele - aminoalcohol -  $\text{CDCl}_3$  - Avance 400MHz - dez05gssH1

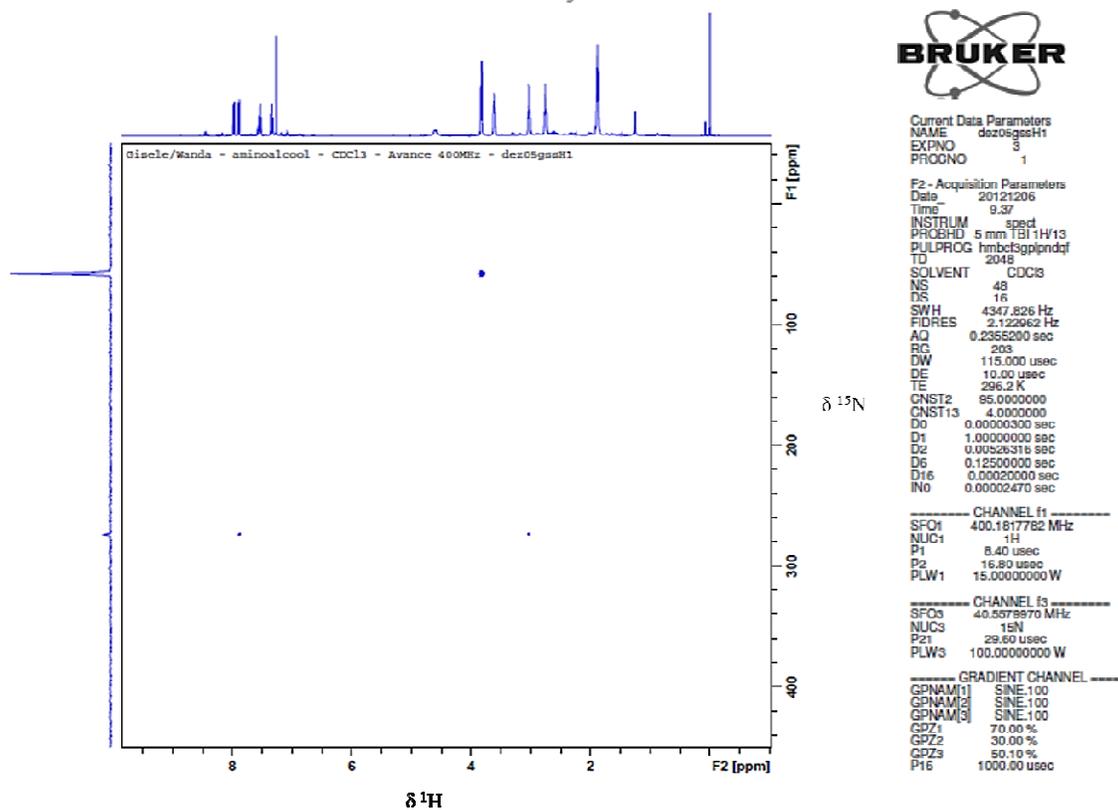


Figura 35.  $^{15}\text{N}$ ,  $^1\text{H}$  - HMBC do aminoálcool **6** em  $\text{CDCl}_3$  (400 MHz).

A fim de realizar uma análise mais completa realizou-se ainda um experimento de HSQC (*Heteronuclear Single Quantum Coherence*) para verificar a conectividade entre carbonos e hidrogênios (Figura 36).

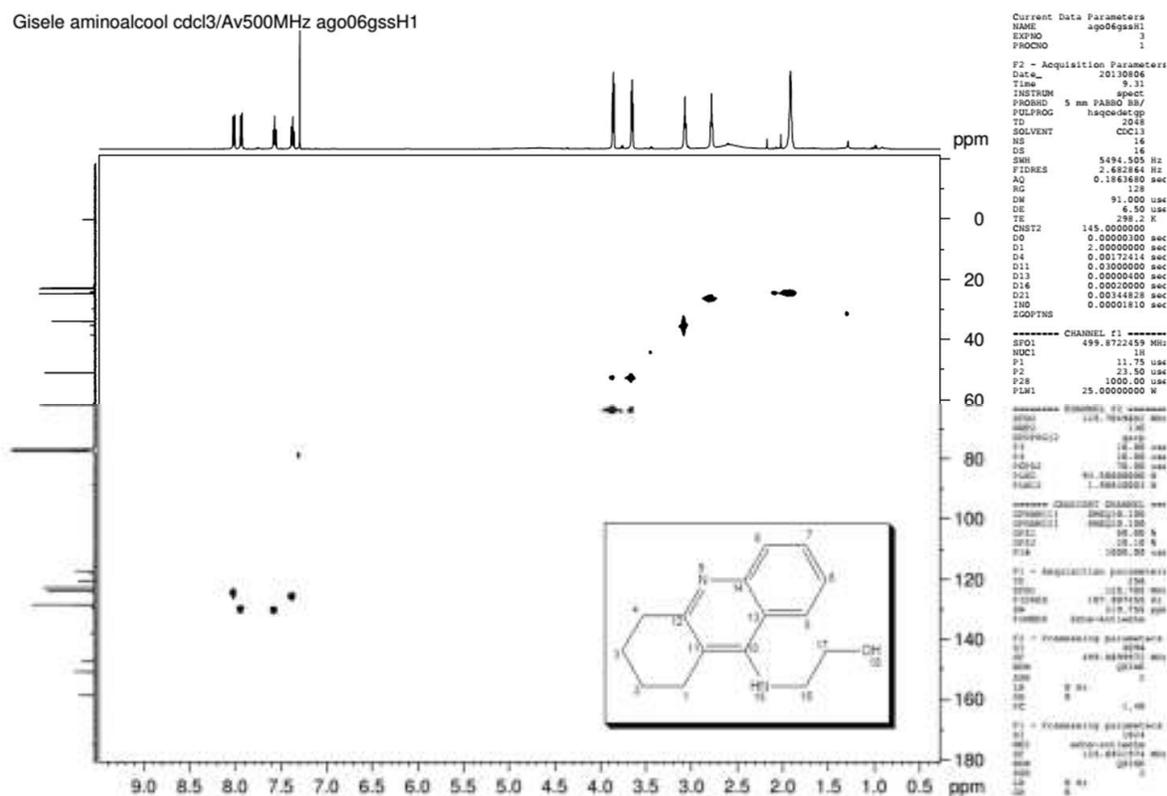
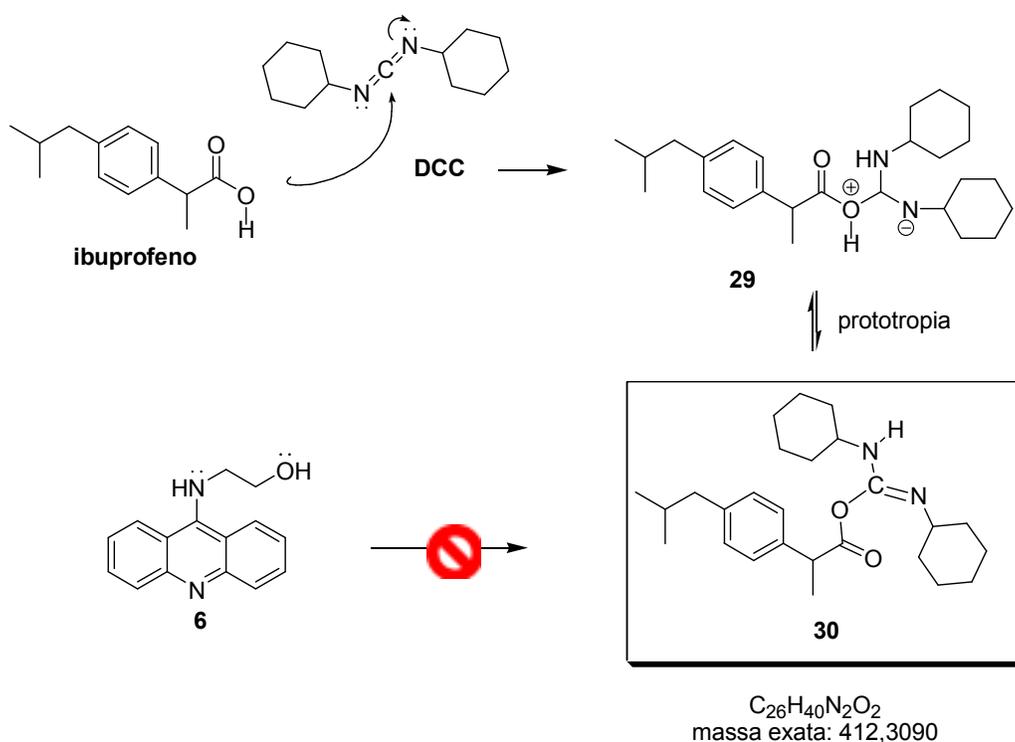


Figura 36.  $^{15}\text{C}$ - $^1\text{H}$  - HSQC do aminoálcool **6** em  $\text{CDCl}_3$  (500 MHz).

Tendo confirmado a estrutura do amino álcool **6**, demos continuidade à determinação da estrutura do produto obtido na reação de Steglich. Nesse sentido, foi feito um espectro de massas de baixa resolução, para a determinação da massa do produto obtido. No qual encontramos uma massa de  $413,6 (\text{M}+\text{H})^+$ . Revendo o mecanismo da reação de Steglich, verificamos que esta massa correspondia ao aduto formado entre o ibuprofeno e a

dicicloexilcarbodiimida (DCC), conforme representado na Figura 36. Um ataque nucleofílico do ibuprofeno sobre o DCC leva ao intermediário **29**, que, após prototropia gera o aduto **30**.



**Figura 37.** Formação do aduto **30** entre ibuprofeno e diciclohexilcarbodiimida (DCC).

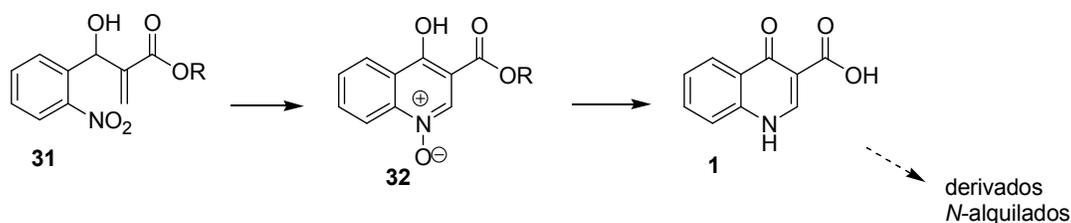
Infelizmente, mesmo variando condições reacionais, não obtivemos o híbrido **II**, que deveria se formar a partir da reação do amino álcool **6** e o aduto **30**.

Outra estratégia foi tentada para obter o híbrido **II**, e preparamos o cloreto de ácido do ibuprofeno, porém também não obtivemos o produto desejado. Uma alternativa seria ainda, tentar o acoplamento direto (Steglich)

empregando outra carbodiimida, talvez menos volumoso. Este experimento não foi realizado por nós.

#### 4.2.4. Síntese de quinolonas

De acordo com a estratégia proposta, a quinolona **1** poderia ser obtida a partir do aduto de Baylis-Hillman **31** (Figura 37). Nesta estratégia, o aduto passaria por uma reação de ciclização, levando ao N-óxido **32** que seria então posteriormente convertido à quinolona **1**, que, por sua vez, permitiria a preparação de derivados N-alquilados, conforme discussão feita a seguir.

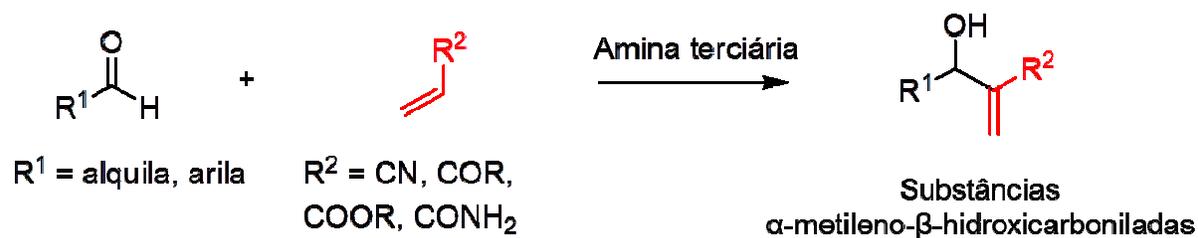


**Figura 38.** Estratégia de obtenção da quinolona **1** e derivados *N*-alquilados

##### 4.2.4.1. Preparo do aduto de MBH **31**

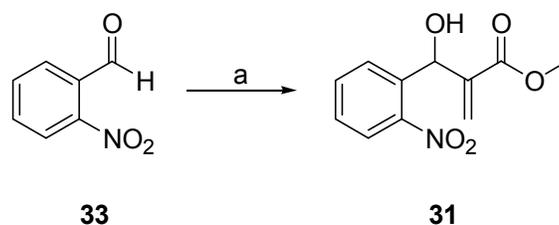
A reação de Morita-Baylis-Hillman (MBH) pode ser definida, de modo geral, como uma reação de condensação entre carbonos eletrofílicos  $sp^2$  (geralmente um aldeído) e a posição  $\alpha$  de uma olefina contendo grupos retiradores de elétrons, catalisada por uma amina terciária ou fosfina, levando

à formação de uma nova ligação  $\sigma$  C-C e produzindo moléculas polifuncionalizadas (Figura 38).<sup>85</sup>



**Figura 39.** Reação de Morita-Baylis-Hillman.

A obtenção do aduto de MBH **31** foi realizada a partir do 2-nitro benzaldeído **33** em 72% de rendimento após purificação em coluna cromatográfica (Figura 39).



*Reagentes e condições.* a) Acrilato de metila, DABCO, 8h, t.a., 72%.

**Figura 40.** Reação para obtenção do aduto de MBH **31**.

Os dados espectroscópicos estão de acordo com os publicados na literatura.<sup>86</sup> A análise do espectro no IV do aduto **31** (Anexo), observa-se as

<sup>85</sup> Basavaiah, D., Veeraghavaiah, G., Recent contributions from the Baylis-Hillman reaction to organic chemistry. *Chem. Soc. Rev.*, **2012**, *41*, 68-78.

absorções mais características que são o da ligação C=C em conjugação com a função éster ( $1630\text{ cm}^{-1}$ ) e a absorção em  $1717\text{ cm}^{-1}$  característica de C=O de ésteres  $\alpha,\beta$ -insaturados. Uma absorção em  $3439\text{ cm}^{-1}$  característica de O-H, também foi observada.

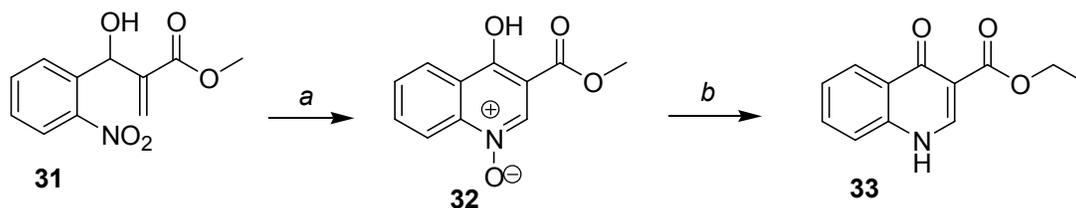
No espectro de RMN de  $^1\text{H}$  em anexo, observamos dois singletos em  $\delta$  5,73 e 6,37 ppm, integrando para 1H cada um, correspondentes aos hidrogênios vinílicos. Visualizamos um singleto em  $\delta$  3,73 ppm, integrando para 3H, correspondente ao grupo metila do éster, além dos sinais dos hidrogênios aromáticos. O espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (Anexo) mostrou sinais característicos do aduto formado, como por exemplo, as absorções em  $\delta$  67,9 ( $\text{CH-OH}$ ), 136,06 ( $\text{CH}_2=\text{C}$ ) e 166,41 ( $\text{C=O}$ ).

A sequência de reações que resultou na obtenção do sistema 4-quinolônico está representada na Figura 40. O aduto **31** foi tratado com ácido trifluoracético, fornecendo o intermediário *N*-óxido **33**, através de uma ciclização intramolecular descrita por Kim e colaboradores.<sup>87</sup>

---

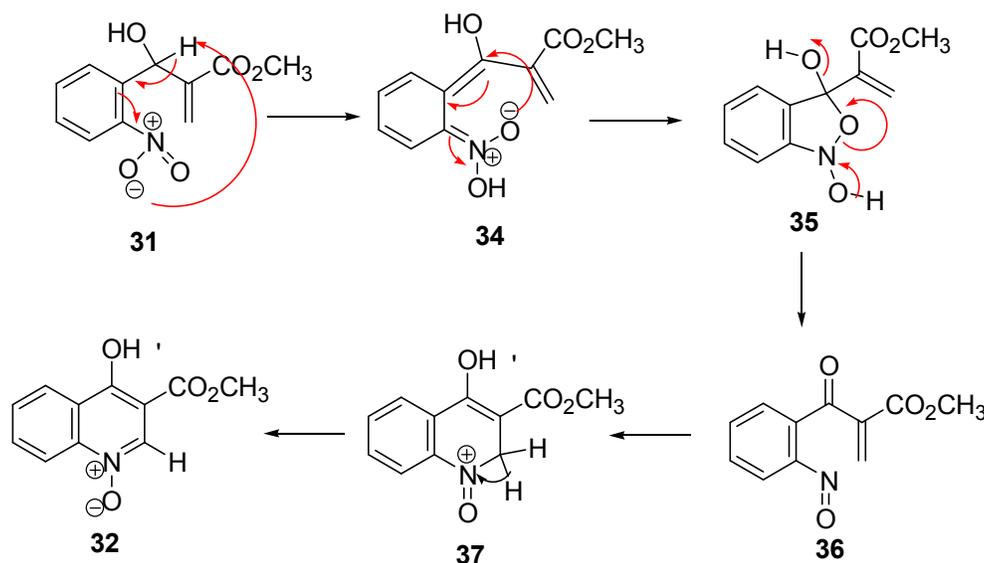
<sup>86</sup> Amarante, G. W., Benassi, M., Pascoal, R. N., Eberlin, M. N., Coelho, F. A. S., An approach for the enantioselective synthesis of biologically active furanones from a Morita-Baylis-Hillman adduct, *Tetrahedron*, **2010**, *66*, 4370- 4376.

<sup>87</sup> Kim, J. N.; Lee, K. Y.; Kim, H. S.; Kim, T. Y. *Org. Lett.* **2000**, *2*, 343-345.



**Figura 41.** Sequência de etapas de preparação de sistemas 4-quinolônicos. Reagentes e condições: <sup>a</sup>TFA, 20h, 70–75 °C, 84%; <sup>b</sup>Mo(CO)<sub>6</sub>, EtOH, 92%;

O mecanismo proposto por Kim <sup>64</sup> e colaboradores está apresentado na Figura 41.



**Figura 42.** O mecanismo proposto por Kim e colaboradores.

Nesta proposta, a primeira etapa é a de transferência intramolecular do próton para o grupo nitro levando ao intermediário **34**, que cicliza para formar o *N,O*-acetal cíclico **35**. A decomposição deste intermediário, forma o derivado nitroso **36** que adiciona à ligação dupla gerando o primeiro

intermediário cíclico, **37**, que aromatiza para formar o correspondente N-óxido **32**.

A formação do *N*-óxido **32** foi comprovada pelas análises de IV, RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$ . O espectro de infravermelho apresentou como principais absorções bandas em 3443 e 1713  $\text{cm}^{-1}$ , atribuídas ao estiramento da ligação O-H e à C=O de éster, respectivamente.

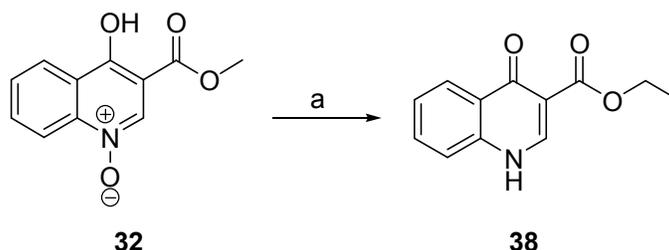
No espectro de RMN de  $^1\text{H}$  não mais se observa as absorções dos prótons vinílicos e carbinólico, presentes no material de partida. Em contrapartida, visualizamos o aparecimento do singlete em  $\delta$  8,68 ppm atribuído ao hidrogênio quinolínico em posição alfa ao grupo N-óxido. No espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$ , não foi detectado o sinal do carbono carbinólico em 67,9 ppm, do material de partida. Por outro lado, visualizamos o sinal de um CH em  $\delta$ 145,43 ppm correspondente ao carbono em posição  $\alpha$  ao grupo nitro da quinolona, bem como absorção de carbono de carbonila de éster em  $\delta$  166,41 ppm. Os dados observados estão de acordo com a literatura.<sup>64</sup>

De posse do *N*-óxido **32**, foi possível dar seguimento ao protocolo. Nesta etapa, o mesmo foi submetido a uma redução utilizando quantidades estequiométricas de hexacarbonilmolibdato (VI)<sup>88</sup> em etanol, sob refluxo. Uma reação de transesterificação com o solvente etanol levou à formação do

---

<sup>88</sup> Yoo, B. W.; Choi, J. W.; Yoon, C. M. *Tetrahedron Lett.* **2006**, 47(1), 125-126.

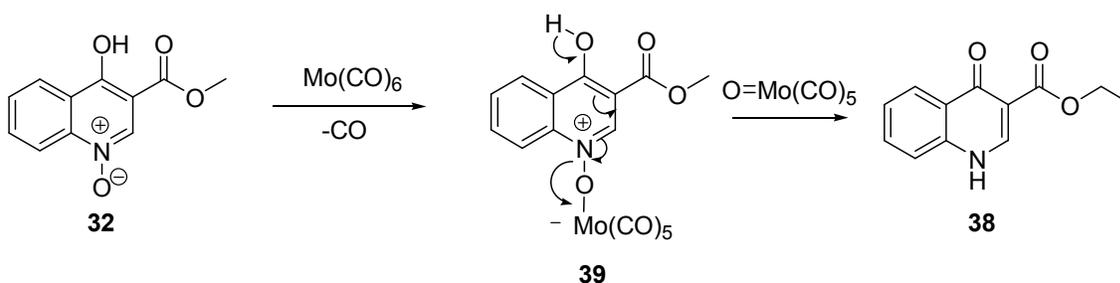
(Figura 42) éster **38** obtido em 49% de rendimento. Esta transesterificação já havia sido observada por Coelho e colaboradores.<sup>65</sup>



*Reagentes e condições.* c)  $\text{Mo}(\text{CO})_6$ , Etanol anidro, refluxo, 45 min, 92%.

**Figura 43.** Reação para obtenção da quinolona **38**

Um mecanismo plausível para a formação do éster quinolona **38** é proposto por Yoon e colaboradores<sup>43</sup> para a redução da ligação N-O do grupo *N*-óxido de **32** (Figura 43). Em um primeiro momento, ocorre a perda de um grupo CO pela molécula de  $\text{Mo}(\text{CO})_6$ , resultando no intermediário **39**, no qual o oxigênio ligado ao nitrogênio coordena ao  $\text{Mo}^-(\text{CO})_5$ , facilitando a clivagem da ligação N-O e levando à formação da amina **38**.



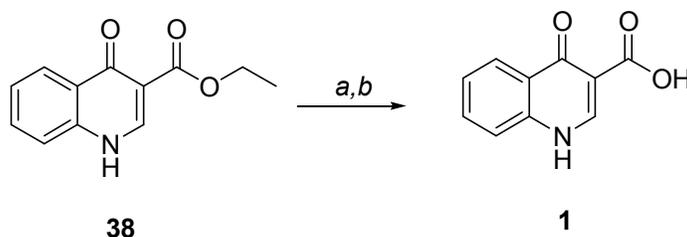
**Figura 44.** Proposta mecanística para a obtenção da quinolona **38**.

Pela análise do espectro no IV do produto de reação, verificou-se o aparecimento da absorção em  $1622\text{ cm}^{-1}$  característica de C=O da quinolona e a absorção em  $1701\text{ cm}^{-1}$  atribuída à C=O do grupo éster.

No espectro de RMN de  $^1\text{H}$  do produto de reação observamos um singlete em  $\delta\ 9,58$  ppm atribuído ao hidrogênio em posição alfa ao grupo nitrogênio quinolínico. Além dos sinais típicos de hidrogênios aromáticos, observa-se também o aparecimento de um quarteto em  $\delta\ 4,96$  ppm, integrando para 2H, e um triplete em  $\delta\ 1,81$  ppm, integrando para 3H. Estes sinais são correspondentes aos hidrogênios do grupo etila.

O espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  apresenta como sinais mais característicos da formação do produto, dois carbonos quaternários em  $\delta_{\text{C}} = 173,77$  e  $\delta = 167,68$  ppm, atribuídos respectivamente às carbonilas da cetona e do éster. Também visualizamos os sinais correspondentes aos grupos metileno ( $\text{CH}_2$ ) e metila ( $\text{CH}_3$ ) da porção etila em  $\delta\ 64,81$  e  $\delta\ 12,23$ , respectivamente.

A hidrólise do éster **38** em condições básicas (Figura 44) levou, após o tratamento da reação, ao ácido correspondente **1** em 93% de rendimento.

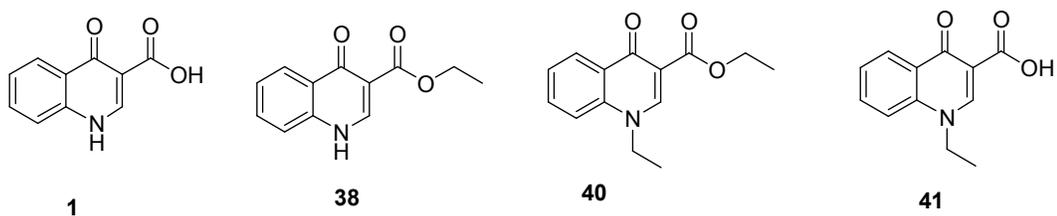


**Figura 45.** Hidrólise da quinolona **1**. Reagentes e condições: <sup>a</sup>  $\text{H}_2\text{O}$ : MeOH (1:4),  $\text{K}_2\text{CO}_3$ , 45 min,  $80\text{ }^\circ\text{C}$ ; <sup>b</sup>  $\text{H}_3\text{O}^+$ , 93%.

A hidrólise foi confirmada pela análise do espectro no infravermelho que apresentou sinais em 3440, 1670 e 1637  $\text{cm}^{-1}$ , atribuídos à deformação do grupo hidroxila do ácido, à carbonila do grupo carboxila e da carbonila quinolônica, respectivamente. No espectro de RMN de  $^1\text{H}$  de **1**, observamos o desaparecimento dos sinais do grupo etila. Em contrapartida, observa-se o aparecimento de um sinal em  $\delta$  15,32 ppm, integrando para um hidrogênio, atribuído ao hidrogênio da carboxila.

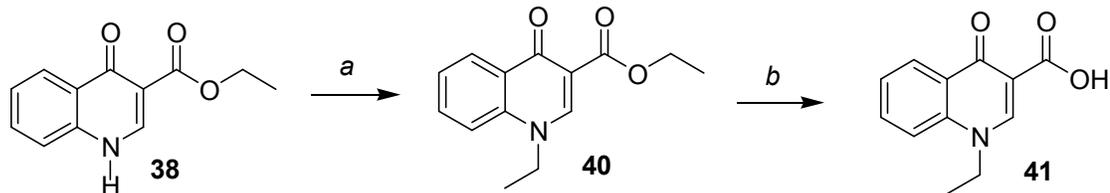
#### 4.2.4.2. Obtenção dos derivados quinolônicos N- alquilados

Visando aumentar o número de compostos para avaliação biológica, foram preparados além da quinolona **1** e do éster **38**, seu precursor, os derivados quinolônicos **40** e **41**. (Figura 45).



**Figura 46.** Derivados quinolônicos selecionados para síntese e avaliação biológica

O derivado *N*-alquilado **40** foi preparado pela reação de **38** com iodeto de etila, em meio básico (Figura 46).



**Figura 47.** Obtenção dos derivados N-alkilados. Reagentes e condições: <sup>a</sup> CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>I, K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, DMF, 12h, 53%; <sup>b</sup> H<sub>2</sub>O:MeOH (1:4), K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, 1h, 95 °C, 89 %.

O derivado **40** foi caracterizado por métodos espectroscópicos. No espectro de RMN-<sup>1</sup>H foi observado um sinal descrito por nós como um multipletto em  $\delta$  4,75-4,64 ppm, integrando para quatro hidrogênios. Este sinal que apresenta cinco linhas é na verdade dois quartetos que coalescem. Esses correspondem aos metilenos dos dois grupos etila. Além destes, aparecem um triplete em  $\delta$  1,64 ( $J = 7$  Hz, 3H) e outro em  $\delta$  1,53 ppm ( $J = 7$  Hz, 3H), correspondendo às metilas dos grupos CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>. Os demais sinais são compatíveis o núcleo aromático e o hidrogênio alfa ao nitrogênio em  $\delta$  9,47 ppm. Os dados obtidos do espectro de RMN de <sup>13</sup>C indicam que o grupo etila foi introduzido pela presença de CH<sub>3</sub> e CH<sub>2</sub>, cujas multiplicidades foram atribuídas com o auxílio do DEPT 135.

O derivado **40**, por reação de hidrólise em meio básico originou o ácido correspondente **41** em 89% de rendimento.

Observou-se no espectro de IV, uma absorção em 3418 cm<sup>-1</sup>, atribuída à hidroxila do grupo carboxila. No espectro de RMN-<sup>1</sup>H, a presença de um singletto em  $\delta$  15,27 ppm (1H), e de apenas um quarteto em  $\delta$  4,64 ( $J = 7,5$

Hz, 2H) e de um único tripleto em  $\delta_{1,44}$  ( $J = 7,5$  Hz, 3H) confirmaram que a reação de hidrólise havia ocorrido.

### **4.3. Avaliação *in vitro* da atividade inibidora da acetilcolinesterase**

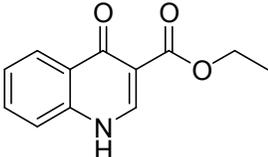
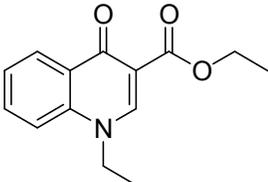
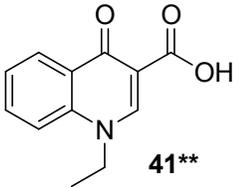
#### **4.3.1. Análise qualitativa**

Para avaliação da inibição da acetilcolinesterase, utilizamos tacrina como controle positivo e selecionamos as quinolonas **1**, **38**, **40** e **41** como substâncias-teste. Infelizmente, a quinolona **1**, não solubilizou em nenhum dos solventes testados e compatíveis com o ensaio colorimétrico qualitativo e quantitativo de Ellman.

Esta reação pode ser acompanhada pela reação da tiocolina com DNTP, produzindo o 5-tio-2-nitrobenzoato que possui coloração amarelada. A coloração amarela pode ser medida em um espectrofotômetro a 405 nm (análise quantitativa) ou apenas visualizada como halos brancos na plaquinha de CCD, indicativo de inibição da AChE (Teste positivo). Inicialmente, em uma plaquinha de CCD contendo os compostos testes aplicados, borrifam-se as soluções (DNTP) + (ATCI). Após secagem, borrifou-se a enzima 3 U/mL e, em 3 min. O teste é positivo se forem detectados halos brancos de 5-tio-2-nitrobenzoato, indicativo de inibição da hidrólise.

Todos os compostos apresentaram atividade inibitória da AChE, sendo que o éster **38** apresentou halo ligeiramente superior (Tabela 9). Acreditamos que isto seja devido ao fato de uma melhor solubilização desse composto.

**Tabela 9.** Resultado da avaliação da atividade anticolinesterásica dos derivados quinolônicos.

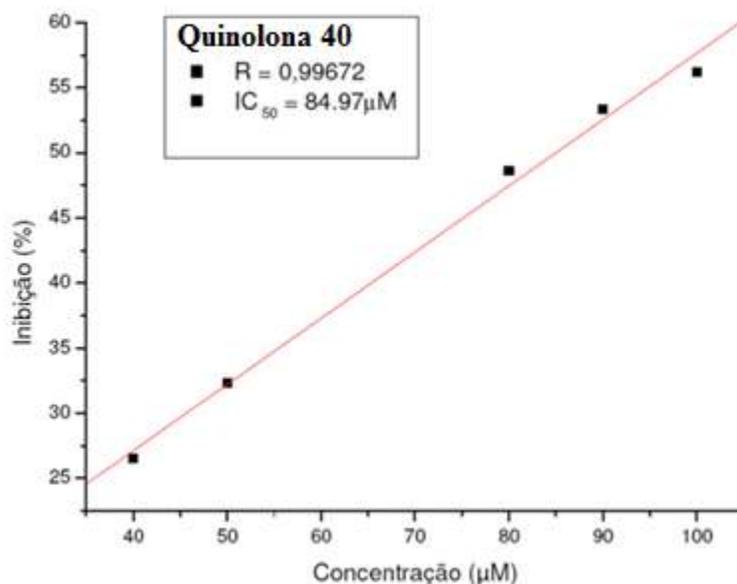
Composto (*)	Halo de inibição (mm)
 <b>38</b>	16
 <b>40</b>	14
 <b>41**</b>	14
<b>Tacrina</b>	14

(\*) Amostras aplicadas na concentração de 2 mg/mL; (\*\*) Foi colocado 1µL de acetato

### 4.3.2. Análise quantitativa

Os compostos testados nesta etapa incluíram as quinolonas **1**, **38**, **40** e **41**.

Os ensaios para a avaliação da atividade anticolinesterásica foram realizados em placas de 96 poços em triplicata (para o cálculo do desvio padrão) em diferentes concentrações. Após a adição da enzima, a placa foi levada ao aparelho de ELISA e a absorbância foi medida em um comprimento de onda de 415nm. Estas absorbâncias, por sua vez, foram utilizadas para o cálculo da porcentagem de inibição. Desse modo, foram confeccionados os gráficos e, em seguida calculados os valores de IC<sub>50</sub> (µM) e seus respectivos desvios padrões. De modo geral, esta bioanálise é realizada em metanol. No entanto, devido à baixa solubilidade destes em meio aquoso o ensaio biológico foi realizado em etanol. Todos os derivados apresentaram boa solubilidade nesse solvente. O gráfico da concentração versus porcentagem de inibição, obtido encontra-se na Figura 47, a seguir.



**Figura 48.** Gráfico de Inibição da acetilcolinesterase pela quinolona **40** avaliadas pelo ensaio em microplaca pelo método de Elman. Desvio padrão: 84,97 +/- 1,23 µM.

Dos resultados obtidos de inibição, apenas o composto quinolona **40** foi capaz de inibir a acetilcolinesterase numa concentração menor do que 100µM. O valor de IC<sub>50</sub> obtido para a quinolona **40** foi de 84,97 µM. O valor de IC<sub>50</sub> obtido para da quinolona **40** pode ser considerado extremamente significativo por caracterizar um protótipo a fármaco potente.



## **5. Conclusão**

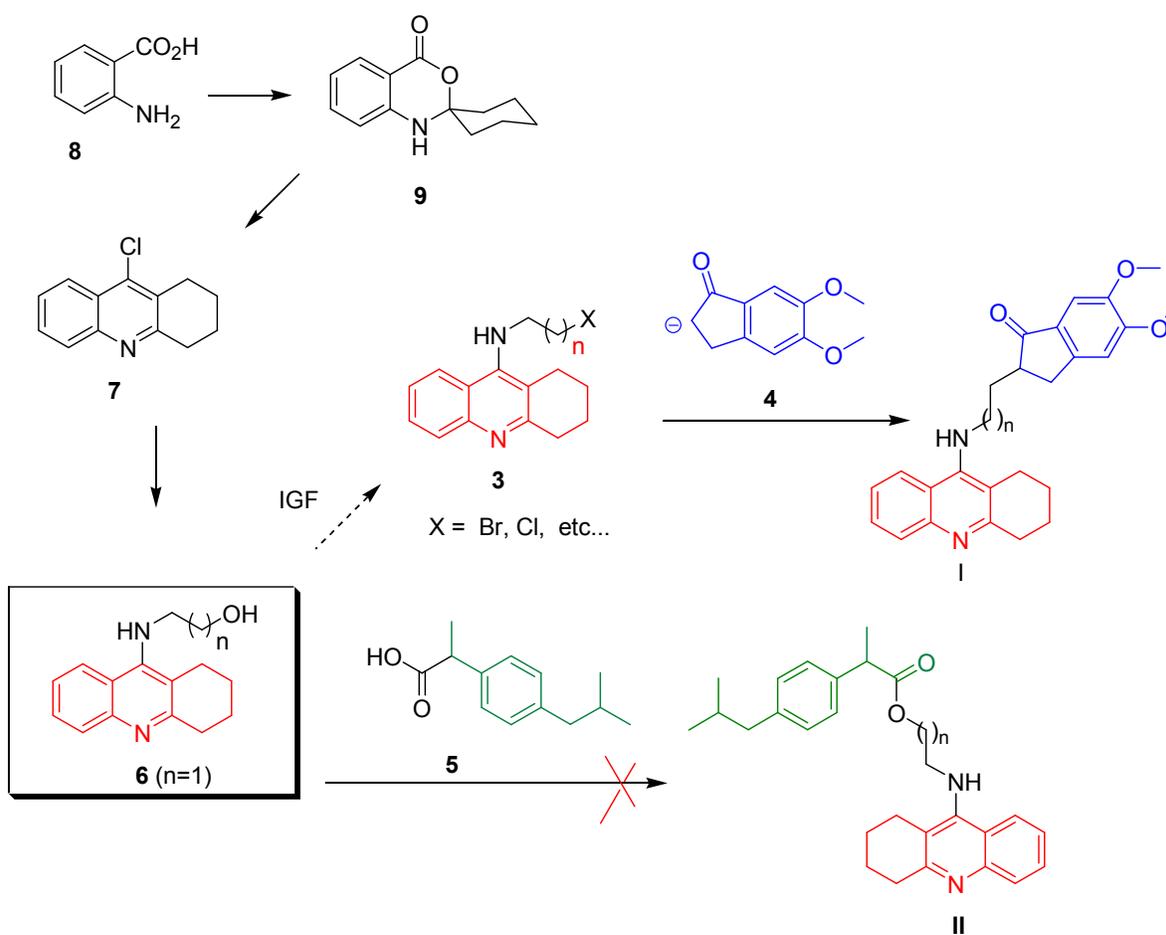


Neste trabalho foram planejados híbridos moleculares baseados na estrutura da tacrina. Em uma das estratégias, buscou-se um candidato a fármaco inibidor da acetilcolinesterase (AChE) que pudesse interagir com ambos os sítios ligantes da enzima. Para isso, selecionamos híbridos com as subunidades tetraminoacridina e donepezila (híbridos tipo I), variando-se o número de carbonos do grupo espaçador. Neste caso, os estudos de docking molecular utilizando o Programa Molegro Virtual Docking sugeriram que os ligantes contendo duas e três unidades metilênicas apresentavam interações mais favoráveis com as AChE estudadas. Todas as tentativas de alquilar o anel indanônico da subunidade estrutural donepezila, fracassaram.

Na outra estratégia, a proposta consistiu em desenvolver híbridos que apresentassem em sua estrutura, as subunidades farmacofóricas da tetraidroacridina e do ibuprofeno, buscando assim um candidato a fármaco que pudesse aumentar a atividade colinérgica e ao mesmo tempo atuar como anti-inflamatório. De acordo com os resultados de estudos de docking molecular de híbridos contendo estas subunidades ligadas por espaçadores de tamanho variável (dois a cinco C), verificamos que estes compostos não teriam interações favoráveis com ambos os sítios da AChE. Assim, só poderiam ser desenvolvidos com o propósito inicial, ou seja, atividade colinérgica (anticolinesterásica) e anti-inflamatória.

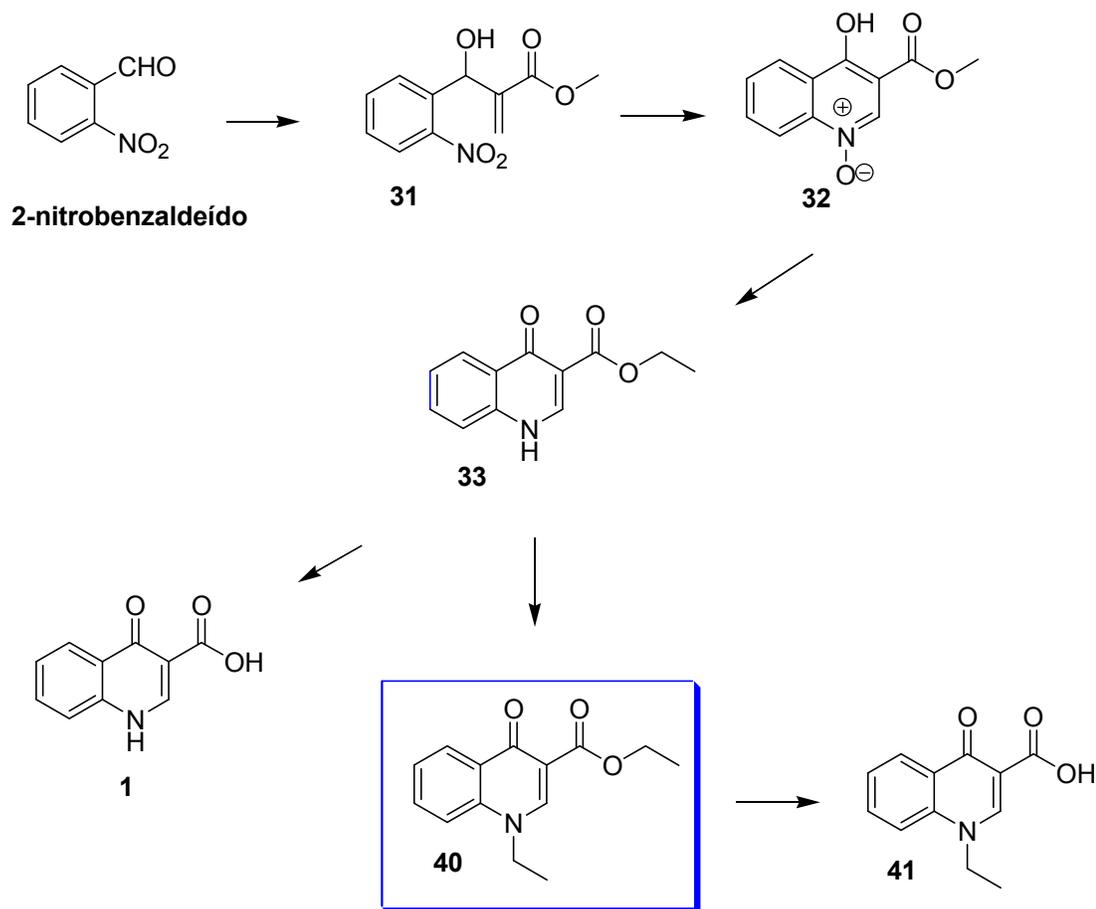
Concluimos a síntese da subunidade tetraidroacridina funcionalizada com um grupo hidroxila (amino álcool **6**) para o acoplamento com o ibuprofeno, através de uma ligação éster. A subunidade foi sintetizada a partir

do ácido antranílico **8**, que foi convertido no correspondente espiro aminocetal **9**, pela reação com a cicloexanona. Este intermediário foi tratado com  $\text{POCl}_3$  levando à 9-clorotetraidroacridina **7**, que foi submetida a uma reação de substituição nucleofílica aromática com a etanolamina, para a obtenção do amino álcool **6**. O esquema apresentado na Figura 48 resume as etapas sintéticas desenvolvidas.



**Figura 49.** Esquema representativo das etapas sintéticas para obtenção dos híbridos I e II, desenvolvidas neste trabalho.

Na tentativa de explorar outros derivados planares e funcionalizados para estudos futuros de ligantes capazes de interagir com ambos os sítios da acetilcolinesterase, sintetizamos derivados *N*-alquilados e ésteres estruturalmente relacionados à 3-carboxi-4-quinolona. A síntese, esquematizada na Figura 49, iniciou com o 2-nitrobenzaldeído, que foi convertido ao correspondente aduto de Morita-Baylis-Hillman **31**. O aduto ao ser tratado com ácido trifluoroacético sofre uma reação de ciclização resultando no N-óxido **32**, que após a reação com hexacarbonilmolibdênio, leva ao éster **33**. Este éster deu origem ao seu produto de hidrólise **1** e ao derivado *N*-alquilado **40**, que, por sua vez, originou o ácido **41**.



**Figura 50.** Esquema representativo das etapas sintéticas para a obtenção dos derivados quinolônicos.

Os compostos **33**, **40** e **41** foram submetidos à avaliação *in vitro* da atividade anticolinesterásica. De acordo com estudos de docking molecular, a quinolona **1** apresenta interação favorável com o sítio catalítico da acetilcolinesterase. Infelizmente, ela não solubilizou em nenhum dos solventes possíveis para a avaliação da atividade biológica. A quinolona **40** foi a que apresentou a melhor atividade inibitória para a AChE. Este resultado nos leva

a acreditar que a quinolona **40** ( $IC_{50} \sim 87 \mu\text{mol.L}^{-1}$ ) possa ser usada como um protótipo para investigação de novas entidades químicas inibidoras da acetilcolinesterase.



## **6. Parte experimental**



## 6.1. Geral

As reações envolvendo reagentes sensíveis à umidade foram realizadas em atmosfera inerte de nitrogênio em balão previamente flambado.

Os solventes comerciais utilizados foram previamente tratados e destilados. O tetraidrofurano foi pré-seco com hidreto de cálcio e destilado. Posteriormente foi refluxado sobre Na/benzofenona. O etanol foi seco com Mg/I<sub>2</sub> e, destilado a partir de Mg (OEt)<sub>2</sub> formado. O diclorometano foi seco com hidreto de cálcio. O tolueno permaneceu em Na/benzofenona por 8h e, em seguida armazenado em atmosfera de nitrogênio. Os demais solventes e reagentes foram obtidos da Sigma/Aldrich e não tiveram purificação prévia.

Os monitoramentos reacionais foram feitos por cromatografia em camada delgada (CCD), empregando-se UV-VIS como revelador.

As purificações e separações cromatográficas dos produtos obtidos foram efetuadas com sílica flash (230-400 mesh). A sonicação foi realizada em ultrassom de 81 W e 40 KHz.

Os espectros no infravermelho (IV) foram registrados em equipamento BOMEN modelo MBSERIES e as amostras preparadas em pastilha de KBr seco ou em filme.

Os espectros de RMN de <sup>1</sup>H e de RMN de <sup>13</sup>C foram adquiridos nos equipamentos Inova 500 operando a 500 MHz para <sup>1</sup>H e 125 MHz para <sup>13</sup>C; BRUKER 250 operando a 250 MHz para <sup>1</sup>H e 62,5 MHz para <sup>13</sup>C. Os

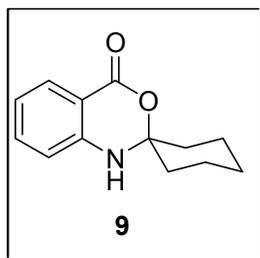
deslocamentos químicos são dados em ppm, e a multiplicidade dos carbonos determinada por DEPT 90 e 135. Os deslocamentos químicos ( $\delta$ ) foram expressos em ppm, tendo como padrão interno tetrametilsilano.

Os espectros de massas de alta resolução foram obtidos em um espectrômetro Quadrupolo Híbridos *Time-of-Flight* (Q-TOF, *Micromass*) com fonte Electrospray (ESI).

A seguir, serão detalhados somente os procedimentos experimentais que efetivamente conduziram a intermediários e aos produtos desejados.

## 6.2. Preparação dos compostos

### 6.2.1. Espiro 2H-3,1-benzoxazina-2,10-ciclohexan]-4(1H)-ona (9)



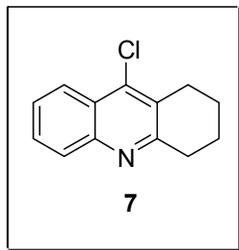
Uma mistura contendo ácido antranílico (327,6 mg, 3,70 mmol) e ciclohexanona (431,8 mg, 4,4 mmol) em 6 mL de tolueno seco foi refluxada adaptando-se um um *trap* Dean-Stark ao condensador. Após duas horas de reação obteve-se um líquido viscoso de coloração amarelada. Após resfriamento a temperatura ambiente. O resíduo foi diluído em acetato de etila e, em seguida neutralizado com solução aquosa de  $K_2CO_3$ . A fase orgânica foi lavada com solução saturada de NaCl, seca sob  $Na_2SO_4$  e evaporada sob pressão reduzida. O resíduo foi purificado em coluna cromatográfica de sílica flash gradiente (eluente hexano:acetato de etila até 30: 70 %) para fornecer 759 mg de um sólido castanho.

**IV ( KBr,  $\nu_{\max}$ ):** 3406, 1637, 1569,1502, 1421  $\text{cm}^{-1}$ .

**RMN de  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 250MHz ),  $\delta$  ppm:** 1,54-2,08 (m, 10H), 4,52 (s, 1H), 6,73 ( d, 1H,  $J = 8,25\text{Hz}$ ), 6,89 ( t, 1H,  $J = 6,75 \text{ Hz}$ ), 7,39 ( t, 1H,  $J = 7,25 \text{ Hz}$ ), 7,92 (d, 1H,  $J = 7,75 \text{ Hz}$ );

**RMN de  $^{13}\text{C}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 62,5MHz),  $\delta$  ppm:** 22,35 ( $\text{CH}_2$ ), 25,11 ( $\text{CH}_2$ ) 27,25 ( $\text{CH}_2$ ), 35,92 ( $\text{CH}_2$ ), 42,22 ( $\text{CH}_2$ ), 109,77 (C), 116,64 (C), 130,53 (CH), 132,32 (CH), 135,53 (CH), 145,38 (CH),151,33 (C), 163,99 (C=O).

### 6.2.2. 9-cloro-1,2,3,4-tetraidroacridina (7)



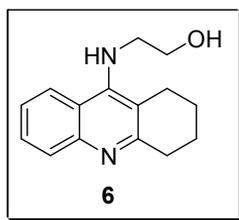
Uma mistura contendo o espiro aminocetal **9** (706,40 mg, 3,26 mmol) e cloreto de fosforila ( $\text{POCl}_3$ ) (200 mg, 13,04 mmol) foi aquecida sob refluxo ( $120^\circ\text{C}$ ) por 2h. Depois de resfriado até a temperatura ambiente obteve-se um solido pastoso que foi adicionada a um erlenmeyer contendo solução gelada de hidróxido de potássio (9,78 mmol/L). Após completa adição, houve a precipitação de um sólido amarelo escuro, separado por filtração simples da solução (pH = 10-11). A fase orgânica foi lavada com solução saturada de NaCl, extraída com diclorometano (3x20), em seguida, seca sob  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  e evaporada sob pressão reduzida fornecendo 758,16 mg de um sólido amarelo com rendimento de 96%.

**IV (KBr,  $\nu_{\text{max}}$ ):** 3470, 2936, 1637, 1578, 1485, 1261, 771  $\text{cm}^{-1}$ .

**RMN de  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 250MHz),  $\delta$  ppm:** 1,98-2,00 (m, 4H), 3,07 (t,  $J= 4,8$  Hz, 2H), 3,27 (t,  $J= 6$  Hz, 2H), 7,62 (td, 1H,  $J= 8,0$  Hz), 7,76 (td,  $J=8,4$  e 1,2 Hz, 2H), 8,19 (d, 1H,  $J= 8,4$ ), 8,23 (dd, 1H,  $J= 8,4$  e 0,8 Hz).

**RMN de  $^{13}\text{C}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 250MHz),  $\delta$  ppm:** 22,22 ( $\text{CH}_2$ ), 22,37 ( $\text{CH}_2$ ), 27,35 ( $\text{CH}_2$ ), 33,08 ( $\text{CH}_2$ ), 123,88 (CH), 125,50 (C), 127,13 (CH), 127,30 (CH), 129,32 (C), 130,40 (CH), 144,62 (C), 159,04 (C).

### 6.2.3. 9-aminoalcool-1,2,3,4-tetraidroacridina (6)



Em um balão de 25 mL uma mistura contendo 9-cloro-1,2,3,4-tetraidroacridina 7 (300 mg, 1,4 mmol) e fenol (1.540,0 mg, 16,0 mmol). foi homogeneizada a temperatura ambiente em atmosfera inerte. Em seguida, adicionou-se etanolamina (171 mg, 2,8 mmol) mantendo a mistura reacional em agitação magnética e refluxo por 12h (135 °C). O resíduo foi diluído em acetato de etila e a fase orgânica foi lavada com solução saturada de NaCl, seca sob  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  e evaporada sob pressão reduzida. O resíduo foi purificado em coluna cromatográfica de sílica flash gradiente (eluente acetato de etila: mtanol até 70: 30 %) para fornecer 758,16 mg de um sólido castanho escuro em 43% de rendimento.

**IV (KBr,  $\nu_{\max}$ ):** 3406, 3353, 2935, 1637, 1569, 1502, 1421, 1057  $\text{cm}^{-1}$ .

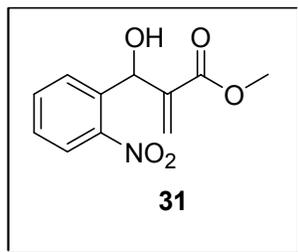
**RMN de  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 250MHz),  $\delta$  ppm:** 1,99 (m, 4H), 3,06 (t,  $J= 6,40$  Hz, 2H), 3,27 (t, 2H,  $J= 5,6$  Hz), 7,62 (td,  $J= 0,4$  e 8,00 Hz, 1H), 7,76 (td,  $J= 1,2$  e 8,4Hz, 1H), 8,18 (d,  $J=8,4$  Hz, 1H), 8,23 (dd,  $J=8,4$  Hz, 1H).

**RMN de  $^{13}\text{C}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 250MHz),  $\delta$  ppm:** 22,73( $\text{CH}_2$ ), 22,97( $\text{CH}_2$ ), 24,67 ( $\text{CH}_2$ ), 33,82 ( $\text{CH}_2$ ), 50,97 ( $\text{CH}_2$ ), 62,05 ( $\text{CH}_2$ ), 117,23 (C), 122,75 (CH), 123,93 (CH), 128,44 (CH), 129,53 (CH), 147,17 (C), 150,70 (C-N), 158,55 (C=N).

**RMN HMBC  $^{15}\text{N}$ - $^1\text{H}$ ,  $\delta$  ppm:** 48,78 (NH).

**TOF-MS-ESI+:**  $m/z = 243,1514$  ( $[\text{M}+\text{H}]^+$ ), alta resolução.

#### 6.2.4. Acrilato de metil-2-[(2-nitrofenil)(hidroxi)metil] (31)



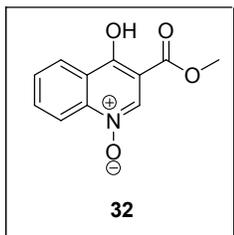
Em um balão de 50 mL, misturou-se o aldeído **33** (508 mg, 3,32 mmol) dissolvido em 5mL de acrilato de metila (em excesso – 5,0 equivalentes) e o catalisador DABCO (0,65 equivalentes). A mistura foi submetida à sonicação em um banho de ultrassom. Depois de evidenciado o término da reação por CCD o excesso de acrilato de metila foi evaporado à pressão reduzida e o bruto foi redissolvido em acetato de etila. A fase orgânica foi lavada com solução saturada de NaCl, seca sob Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> e evaporada sob pressão reduzida. Após filtração, o solvente foi evaporado sob pressão reduzida e o bruto submetido à purificação por coluna cromatográfica, utilizando-se um gradiente de eluição hexano: acetato de etila até 1:1, resultando na obtenção do aduto 797,4 mg de MBH **31** em 72 % de rendimento, como um óleo amarelado.

**IV (KBr,  $\nu_{\max}$ ):** 3439, 1717, 1630  $\text{cm}^{-1}$ ;

**RMN de  $^1\text{H}$  (250 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ),  $\delta$  ppm:** 7,96 (dd,  $J = 1,25$  e  $8,0$  Hz, 1H), 7,75 (dd,  $J = 1,5$  e  $7,75$  Hz, 1H), 7,64 (td,  $J = 1,25$ ,  $7,50$  Hz, 1H), 7,46 (td,  $J = 1,45$ ,  $7,75$  Hz, 1H), 6,37 (s, 1H), 6,20 (s, 1H), 5,73 (s, 1H), 3,73 (s, 3H), 3,08 (s, 1H).

**RMN de  $^{13}\text{C}$  (62,5 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ),  $\delta$  ppm:** 166,41(C=O), 148,32(C), 140,69 (C), 136,06 ( $\text{CH}_2 = \text{C}$ ), 133,46(CH), 128,88(CH), 128,70(CH), 126,49(CH), 124,58(CH), 67,69 (CH-OH), 52,17 ( $\text{CH}_3$ ).

### 6.2.5. óxido de 4-hidroxiquinolina-3-carboxilato de metila (32)



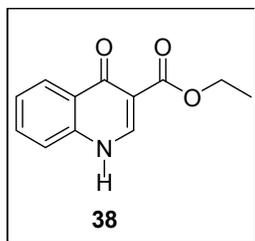
Em um balão de 50 mL foram adicionados o aduto de MBH **31** (498,1mg, 2,10 mmol) e 3 mL de ácido trifluoroacético (TFA). A mistura permaneceu em agitação magnética e foi aquecida 70 – 75 °C. A reação foi monitorada por CCD e após 24h foi evidenciado o término da reação. A solução foi colocada em água gelada e o bruto reacional foi extraído com acetato de etila fornecendo 395,2 mg de um sólido bege após purificação por coluna cromatográfica, utilizando-se como gradiente diclorometano: metanol até 90:10. O rendimento reacional foi de 84 %.

**IV (KBr,  $\nu_{\max}$ ):** 3443, 1713, 1618, 1543, 1445, 1244, 769  $\text{cm}^{-1}$ .

**RMN de  $^1\text{H}$  (250 MHz, DMSO- $d_6$ ),  $\delta$**  8,68 (s, 1H), 8,20 (d, 1H), 7,82 (d,  $J = 7,8$  Hz, 2H), 7,49 (m, 1H), 3,75 (s, 3H).

**RMN de  $^{13}\text{C}$  (62,5 MHz, DMSO- $d_6$ ):**  $\delta$  172,36(C), 165,01(C), 145,43(CH), 139,41(CH), 133,50 (CH), 127,78(C), 126,50 (CH), 125,93 (CH), 115,72 (CH), 107,78 (C), 51,77 (CH<sub>3</sub>).

### 6.2.6. 4-oxo-1,4-diidroquinolina-3-carboxilato de metila (38)



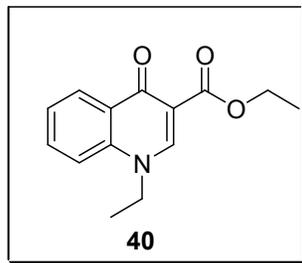
Em um balão de 25 mL contendo 194,9 mg (0,89 mol, mmol) do *N*-óxido **32** e sob atmosfera de nitrogênio foram adicionados 5 mL de etanol anidro e 242 mg de hexacarbonilmolibdato (VI). Esta mistura foi mantida em agitação e refluxo por 43 minutos, quando foi evidenciado o término da reação por CCD. A mistura foi resfriada até a temperatura ambiente, filtrada e evaporada, fornecendo o composto reduzido **38** (287 mg) como um sólido branco, em 92 % de rendimento.

**IV (KBr,  $\nu_{\max}$ ):** 3429, 3164, 3069, 2997, 1701,1622,1555,1477  $\text{cm}^{-1}$ .

**RMN de  $^1\text{H}$  (250MHz,  $\text{CF}_3\text{CO}_2\text{D}$ )  $\delta$  ppm:** 9,57 (s, 1H), 8,97 (m,  $J = 8,5$  Hz, 1H), 8,52 (m, 1H), 8,43 (m, 1H),8,28 (m, 1H), 4,76 (q,  $J = 7,14$  Hz, 2H), 1,60 (t,  $J = 7,20$  Hz, 3H).

**RMN de  $^{13}\text{C}$ (125 MHz,  $\text{CF}_3\text{CO}_2\text{D}$ ),  $\delta$  ppm:** 173,77(C=O), 167,69(C=O), 139,71(CH), 139,50(C),138,45(CH), 138,02(CH), 130,57(CH), 125,09(C), 124,93 (CH),119,95 (C), 64,81( $\text{CH}_2$ ), 12,23 ( $\text{CH}_3$ ).

### 6.2.7. 4-oxo-1,4-diidroquinolina-3-carboxilato de metila (40)



Em um balão de 50 mL contendo 211 mg (0,97mmol) da quinolona **38** adicionou-se 401,5 mg (2,91 mmol) carbonato de sódio anidro e 1,5 mL de DMF seco e 0,4 mL (4,85 mmol) de iodeto de etila. A mistura foi mantida em agitação, aquecimento (95 °C) e sob atmosfera de nitrogênio por 12h. A temperatura foi resfriada até a ambiente, à mistura foi então filtrada e o resíduo foi diluído em acetato de etila e a fase orgânica foi lavada com água destilada (4x10 mL) e solução saturada de NaCl (1x 10 mL). A fase orgânica foi seca sob Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, evaporada sob pressão reduzida. A quinolona **40** (129,0 mg) foi obtida como um sólido branco, em 53 % de rendimento.

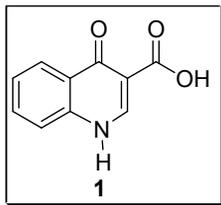
**IV (KBr,  $\nu_{\max}$ ):** 3431, 2980, 1716, 1669, 1489, 1554 cm<sup>-1</sup>.

**RMN de <sup>1</sup>H (250 MHz, CF<sub>3</sub>CO<sub>2</sub>D),  $\delta$  ppm:** 9,47 (s, 1H), 8,75 (d,  $J = 8,75$  Hz, 1H), 8,35 (m, 2H), 8,07 (m, 1H), 4,70 (m, 4H), 1,64 (t,  $J = 7,25$  Hz, 3H).

**RMN de <sup>13</sup>C (125 MHz, CF<sub>3</sub>CO<sub>2</sub>D),  $\delta$  ppm:** 174,38(C), 167,18(C), 144,60(CH), 138,63(CH), 132,60(CH), 129,33(CH), 128,17 (CH), 125,05, 115,53 (CH), 111,73 (C), 60,89(CH<sub>2</sub>), 48,87(CH<sub>2</sub>), 21,06(CH<sub>3</sub>), 14,47 (CH<sub>3</sub>).

### 6.2.8. 6,8-Dimetil-4-oxo-1,4-dihidroquinolina-3-ácido carboxílico

(1)



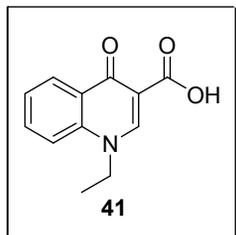
Em um balão de 50 mL contendo de 4-hidroxiquinolina-3-carboxilato de metila (338,5 mg, 1,8 2mmol) foi adicionado uma solução de hidróxido de potássio (12.00 g, 5,46 mmol) dissolvidos em uma mistura de água e metanol (1:4). Esta mistura reacional foi mantida em agitação e refluxo por 60 minutos a uma temperatura de 80 °C. Depois de ser resfriada a temperatura ambiente, a mistura obtida foi lavada com éter etílico, filtrada e evaporada. A solução aquosa foi acidificada (pH = 4) formando um precipitado que foi separado por filtração a vácuo, lavado com água destilada e seca sob vácuo fornecendo 298 mg de um sólido bege em 93% de rendimento.

**IV (Filme,  $\nu_{\max}$ ):** 3440, 1637, 1670, 1477  $\text{cm}^{-1}$ .

**RMN de  $^1\text{H}$  (500 MHz, DMSO- $d_6$ ),  $\delta$  ppm:** 15,32 (s, 1H), 8,87 (s,1H), 8,26 (d,  $J = 8,05$  Hz, 1H), 7,84 (m,2H), 7,58 (t,  $J = 7,45$  Hz, 1H), 3,31 (s,  $J = 7,45$  Hz, 1H).

**RMN de  $^{13}\text{C}$  (62.5 MHz,DMSO- $d_6$ ),  $\delta$  ppm:** 178,80(C=O), 165,2(C=O), 145,67(CH), 139,95(C), 134,40(CH), 126,67(CH), 125,52(CH), 124,87(C), 120,16(CH), 108,05(C).

### 6.2.9. Etila-4-oxo-1,4-dihidro-quinolona-3-ácido carboxílico (32)



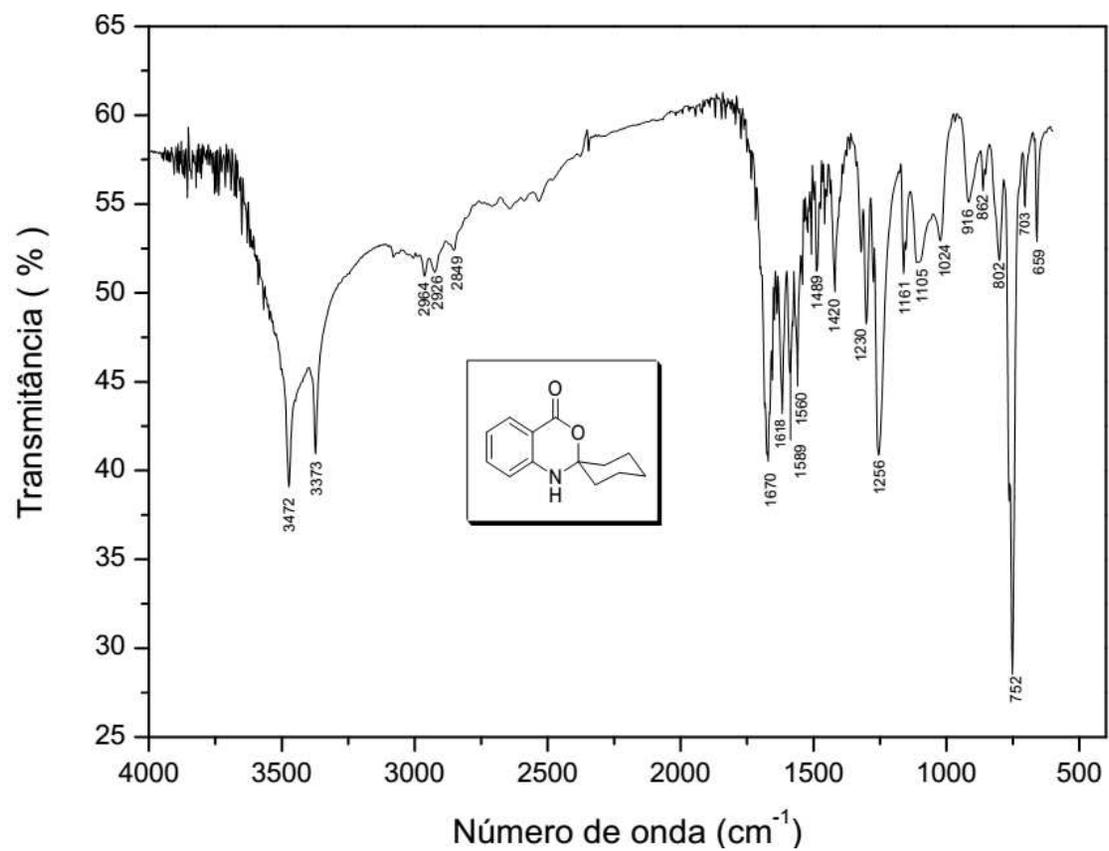
Em um balão de 50 mL contendo de 4-hidroxiquinolina-3-carboxilato de metila (338,5 mg, 1,8 2mmol) foi adicionado uma solução de hidróxido de potássio (12.00 g, 5,46 mmol) dissolvidos em uma mistura de água e metanol (1:4). Esta mistura reacional foi mantida em agitação e refluxo por 60 minutos a uma temperatura de 80 °C. Depois de ser resfriada a temperatura ambiente, a mistura obtida foi lavada com éter etílico, filtrada e evaporada. A solução aquosa foi acidificada (pH = 4) formando um precipitado que foi separado por filtração a vácuo, lavado com água destilada e seca sob vácuo fornecendo 298 mg de um sólido bege em 89% de rendimento.

**IV (Filme,  $\nu_{\max}$ ):** 3418, 1718, 1612, 1470  $\text{cm}^{-1}$ .

**RMN de  $^1\text{H}$  (500 MHz, DMSO- $d_6$ ),  $\delta$  ppm:** 15,27(s, 1H), 9,08 (s, 1H), 8,41 (dd,  $J = 1,5$  Hz e 8,00 Hz, 1H), 8,07 (d,  $J = 8,5$  Hz, 1H), 7,99 (m, 1H), 7,69 (m, 1H), 4,63 (q,  $J = 7,5$  Hz, 2H), 1,43 (t,  $J = 7,5$  Hz, 3H).

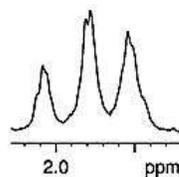
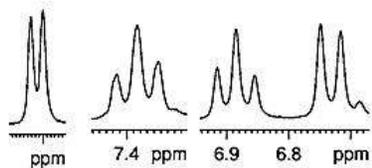
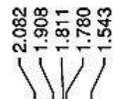
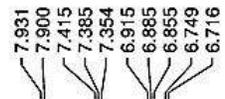
**RMN de  $^{13}\text{C}$  (62.5 MHz, DMSO- $d_6$ ),  $\delta$  ppm:** 178,19(C=O), 165,2(C=O), 149,68(CH), 139,68(CH), 134,82(C), 126,80(CH), 126,02(C), 118,60(CH), 108,15(C), 49,49(CH<sub>2</sub>), 15,04(CH<sub>2</sub>).

## **7. Anexos**



Espectro no Infravermelho (KBr,  $\nu_{\max}$ ) do espiro aminoacetal **9**.

Gisele/Wanda - GS08 - CDCL3 - Bruker250 - set14gssH1

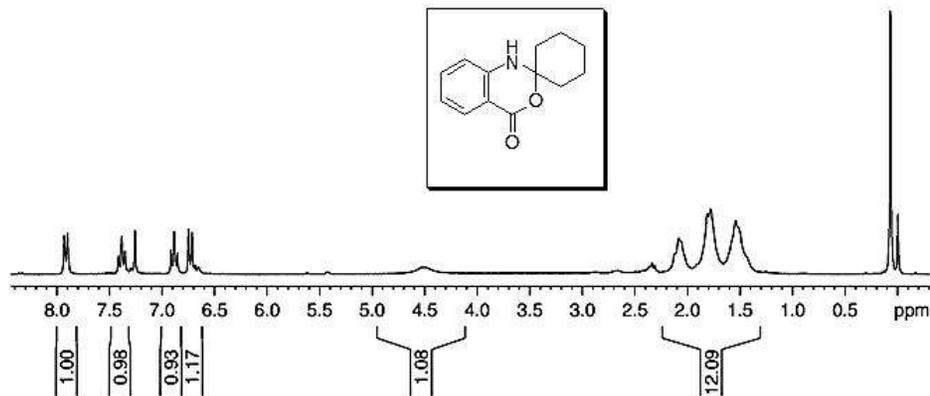
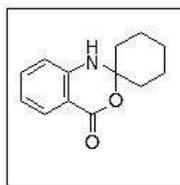


```
Current Data Parameters
NAME      set14gssH1
EXPNO     1
PROCNO    1

F2 - Acquisition Parameters
Date_     20110914
Time      15.54
INSTRUM   spect
PROBHD    5 mm QNP 1H/13
PULPROG   zg30
TD         32768
SOLVENT   CDCl3
NS         16
DS         0
SWH        5175.983 Hz
FIDRES     0.157958 Hz
AQ         3.1654389 sec
RG         3290.2
DW         96.600 usec
DE         6.00 usec
TE         298.2 K
D1         1.0000000 sec
TDO        1

----- CHANNEL f1 -----
NUC1       1H
P1         13.00 usec
PL1        -6.00 dB
SFO1       250.1315447 MHz

F2 - Processing parameters
SI         32768
SF         250.1300000 MHz
WDW        EM
SSB        0
LB         0.30 Hz
GB         0
PC         1.00
```



Espectro de RMN <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>, 250 MHz) do aminoacetal 9

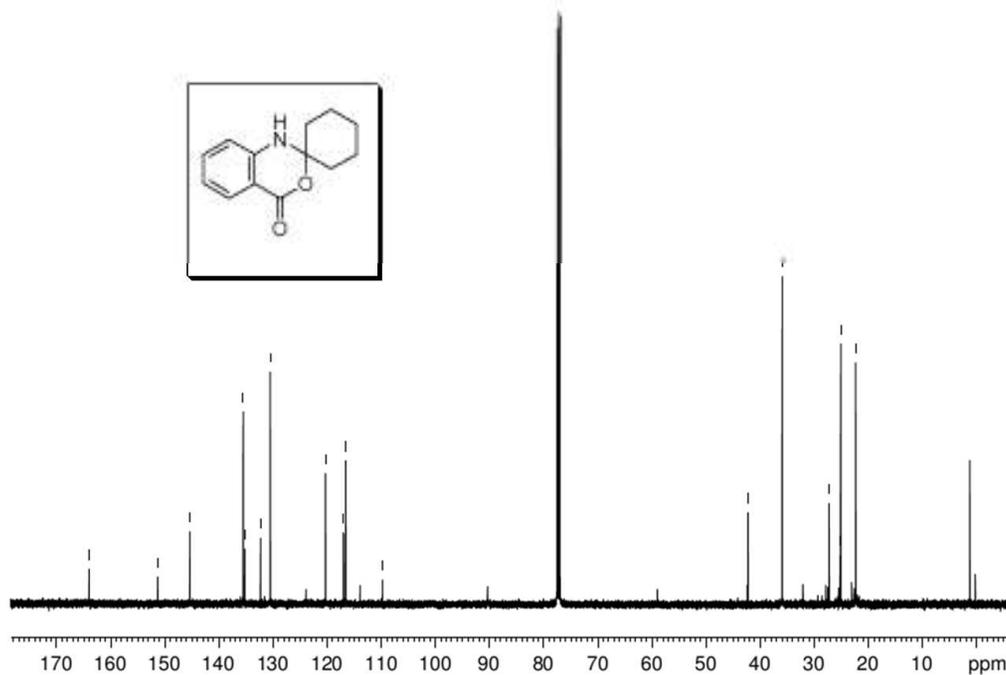
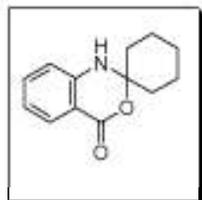
Gisele/Wanda - GS08 - CDCl<sub>3</sub>/Inova - set15gssC

163.995  
151.329  
145.392  
135.534  
135.211  
132.321  
130.538  
120.327  
116.981  
116.645  
116.577  
109.775

42.224  
35.926  
27.257  
25.232  
25.113  
22.351

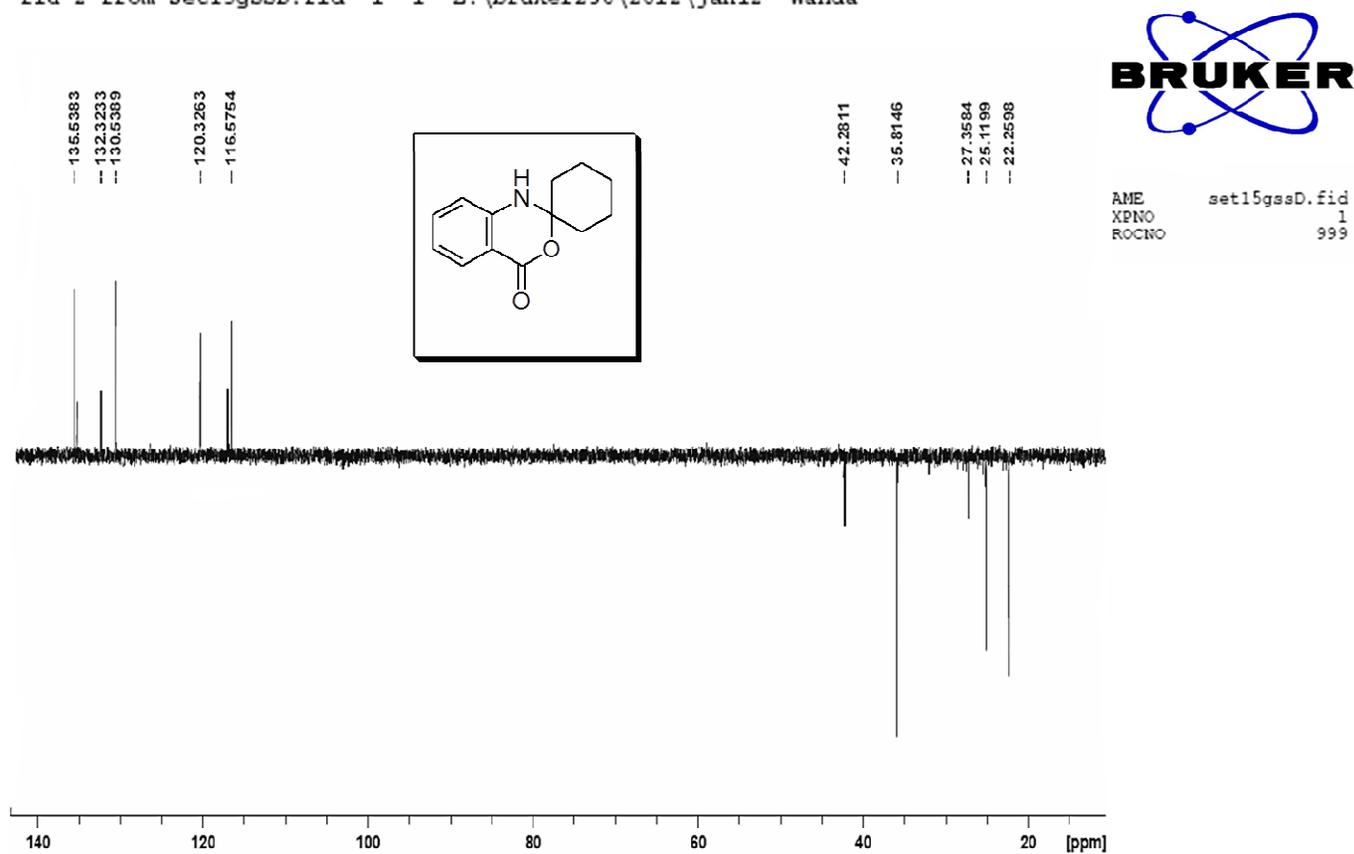


NAME set15gssC.fid  
EXPNO 2  
PROCNO 1



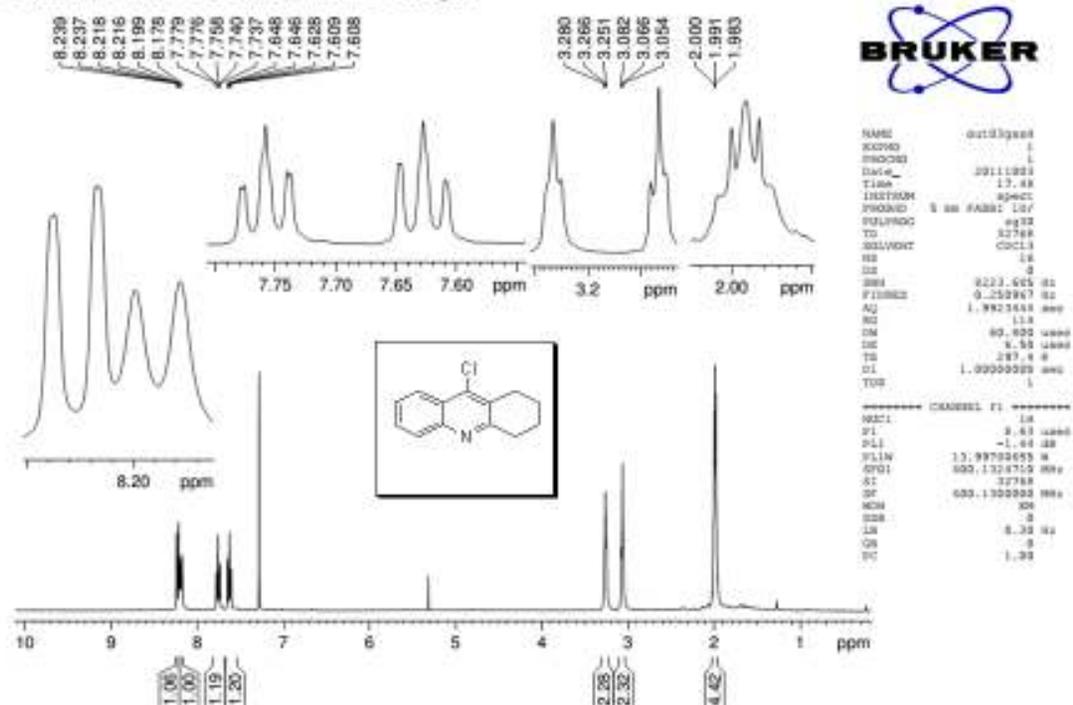
Espectro de RMN <sup>13</sup>C (CDCl<sub>3</sub>, 62,5 MHz) do aminoacetal **9**

set15gssD.fid 1 999 Z:\bruker250\2012\jan12 Wanda  
fid 2 from set15gssD.fid 1 1 Z:\bruker250\2012\jan12 Wanda



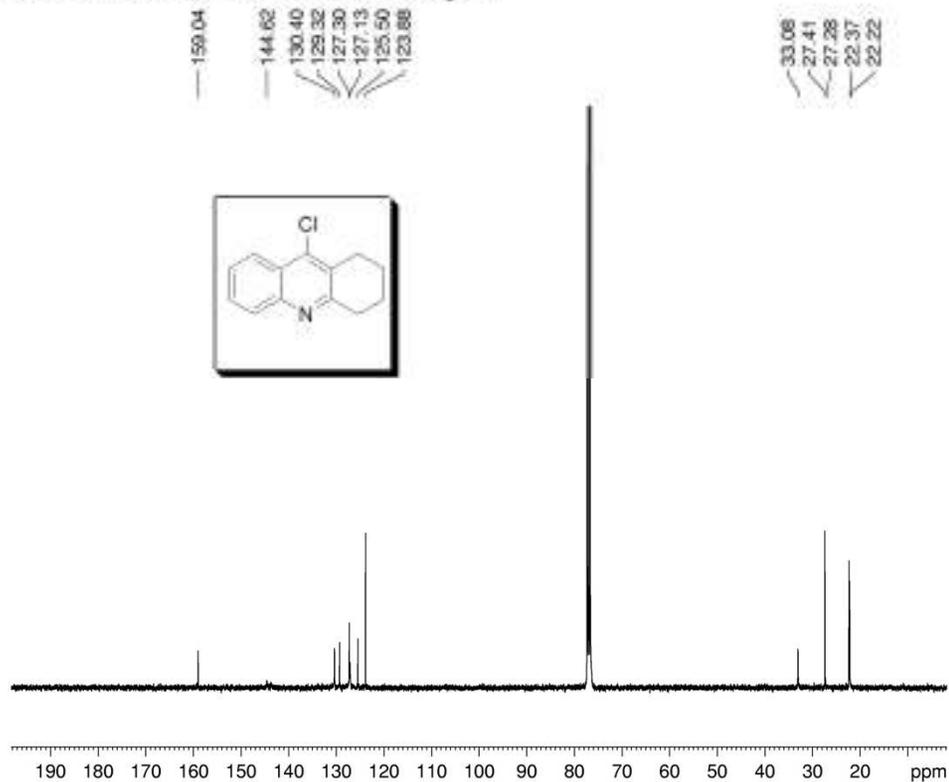
Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  (DEPT-135) ( $\text{CDCl}_3$ , 62,5 MHz) do aminoacetal 9

Gisele/Wanda - GS09 - CDCl3 /Avance 400 MHz - out03gssH



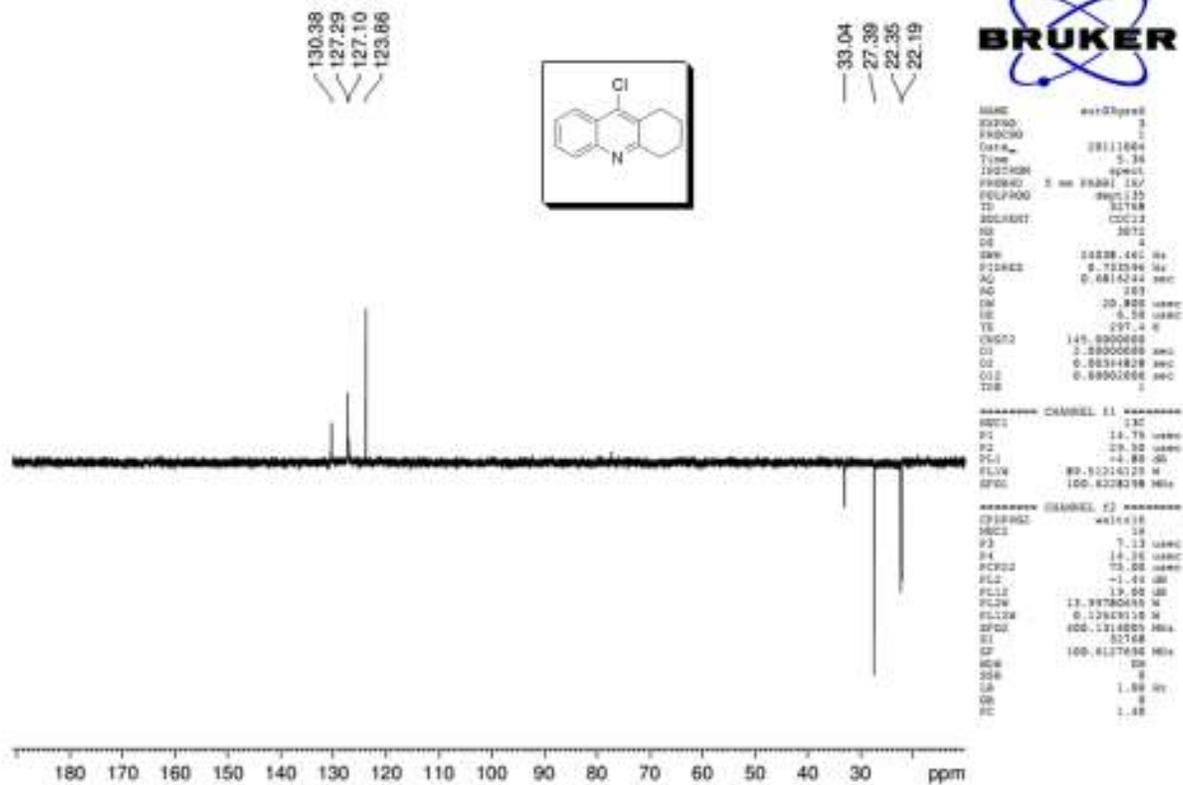
Espectro de RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz) do 9-cloro-1,2,3,4- tetraidroacridina 7

Gisela - GS09 - CDCl3 - Avance 400 MHz - out03gssC

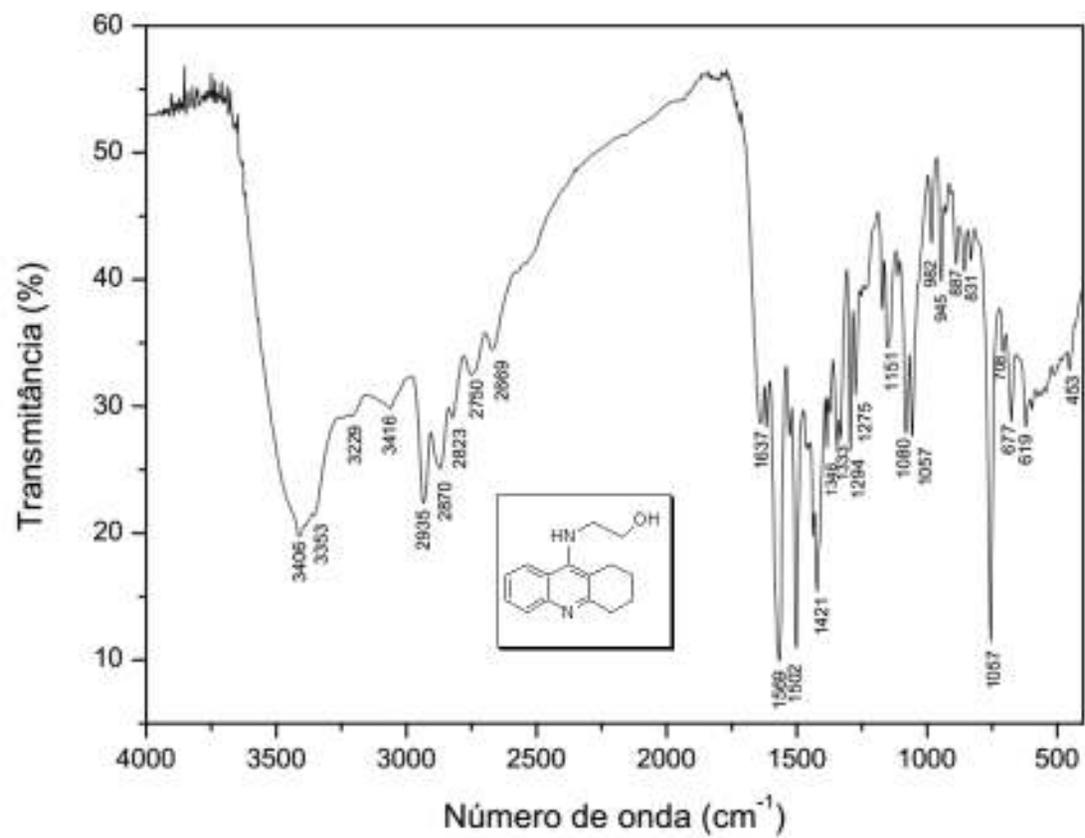


Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 100 MHz) do 9-cloro-1,2,3,4- tetraidroacridina 7

Gisele - GS09 - CDCl3 - Avance 400 MHz - out03gssC - D135

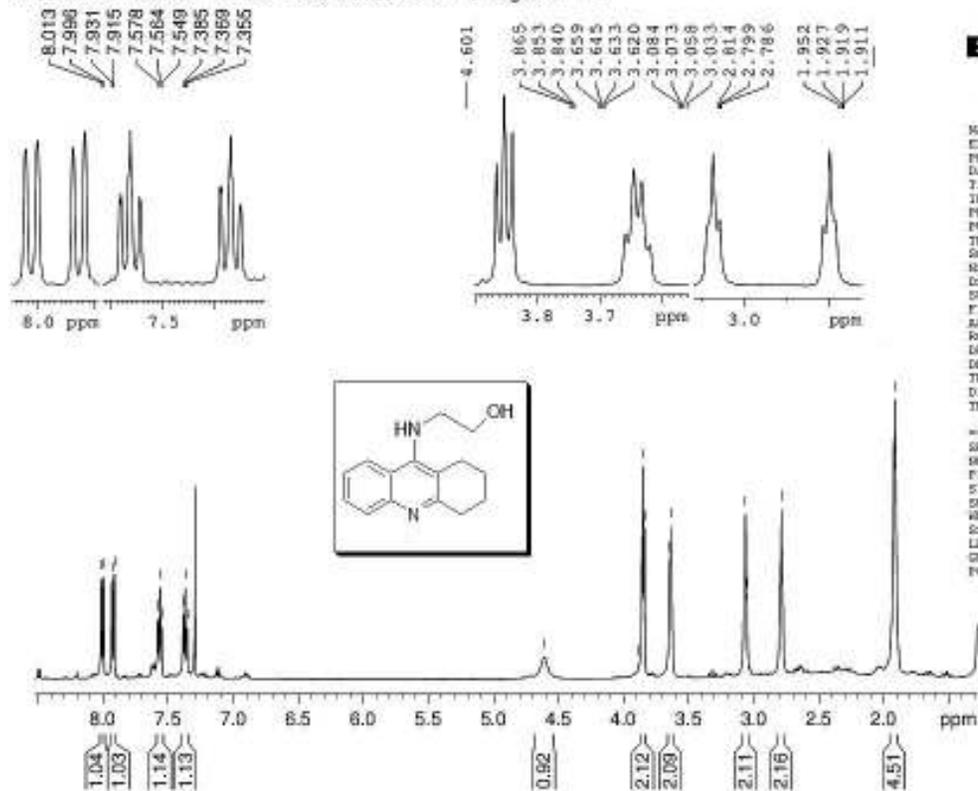


Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  (DEPT-135) ( $\text{CDCl}_3$ , 100 MHz) do 9-cloro-1,2,3,4- tetraidroacridina 7



Espectro de IV (KBr,  $\nu_{\max}$ ) do amino álcool 7

Gisele - Aminoalcoól - CDCl<sub>3</sub> - Avance 500 MHz - nov08gssH1 - 1H

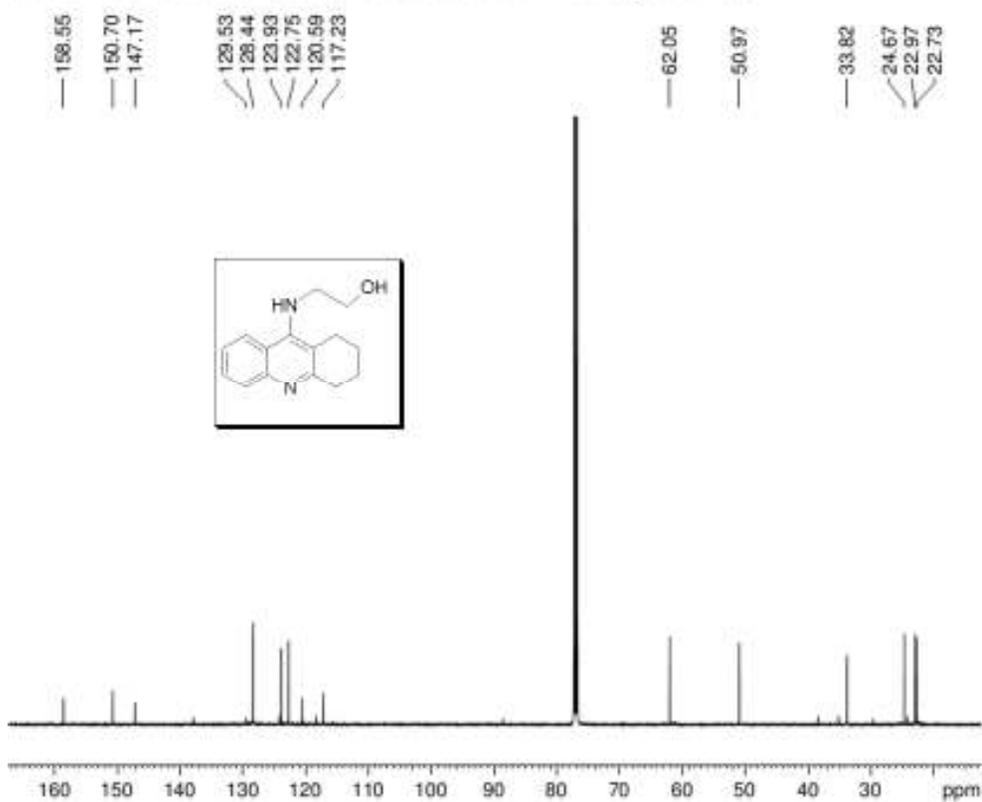


```

NAME nov08gssH1
EXPNO 1
PROCNO 1
Date_ 20121108
Time 7.43
INSTRUM spect
PROBHD 3 mm PABBO DD/
PULPROG zg30
TD 32768
SOLVENT CDCl3
NS 16
DS 2
SFR 10000.000 Hz
FIDRES 0.305176 Hz
AQ 1.6364500 sec
RG 128
SW 50.000 usec
DE 4.50 usec
TE 296.1 K
D1 1.0000000 sec
T00 1
----- CHANNEL f1 -----
SFOL 499.6730049 MHz
SOLCL 1H
P1 11.80 usec
S1 63536
SF 499.6700000 MHz
WDW EM
SSB 0
LB 0.30 Hz
GB 0
PC 1.00
    
```

Espectro de RMN <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz) do amino álcool 7

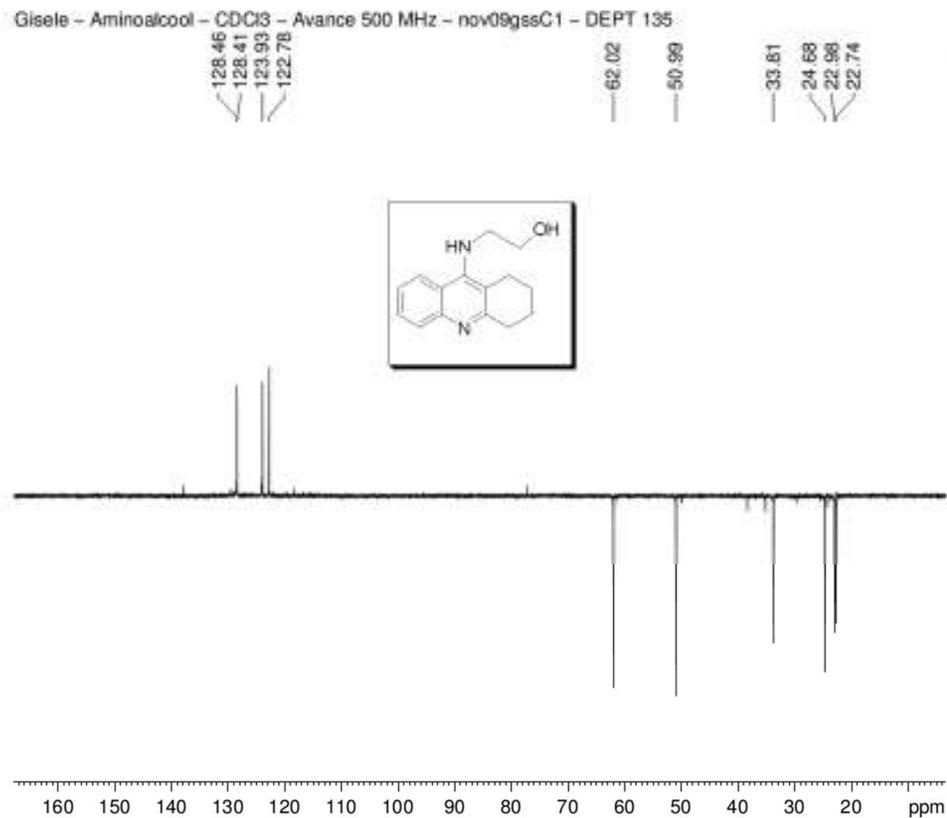
Gisele - Aminoalcohol - CDCl3 - Avance 500 MHz - nov09gsc1 - 13C



```

NAME      nov09gsc1
EXPNO     1
PROCNO    1
Date_     20111109
Time      8.58
INSTRUM   spect
PROBHD    5 mm PABBO HS/
PULPROG   zgpg30
TD         32768
SOLVENT   CDCl3
NS         5120
DS         4
SWH        29761.904 Hz
FIDRES     0.508261 Hz
AQ         0.5503524 sec
RG         2050
DH         16.800 usec
DE         4.50 usec
TE         298.2 K
D1         1.0000000 sec
D11        0.0300000 sec
TD0        1
===== CHANNEL f1 =====
SFO1      125.7649801 MHz
NUC1       13C
P1         10.00 usec
SI         32768
SF         125.6924127 MHz
RGH        EH
SGB        0
Lb         1.00 Hz
GB         0
PC         1.40
    
```

Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 125 MHz) do amino álcool 7



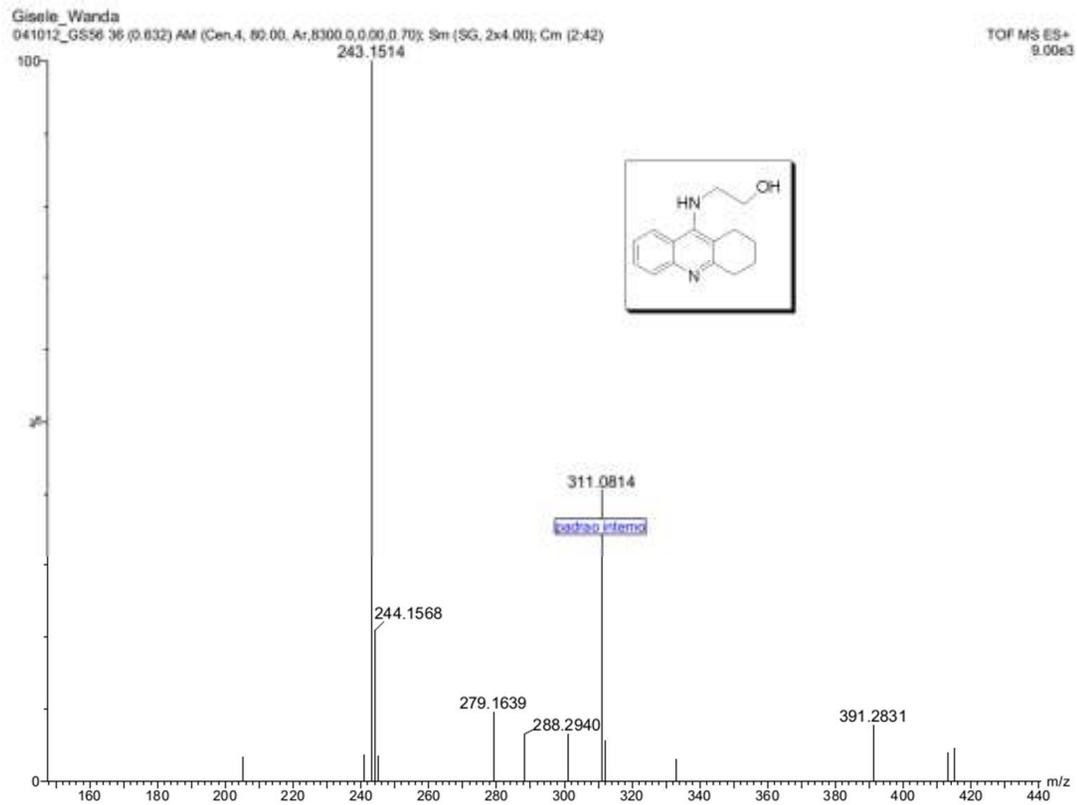
Current Data Parameters  
NAME nov09gssC1  
EXPNO 1  
PROCNO 1

F2 - Acquisition Parameters  
Date\_ 20121112  
Time 9.00  
PROBHD 5 mm PAKED BB7  
PULPROG -zgpg30  
TD 32768  
SOLVENT cdcl3  
AQ 1.889  
RG 4  
DM1 29761.304 Hz  
FIDRES 0.458261 Hz  
AQ 0.5505028 sec  
RG 3250  
DM 16.800 usec  
DQ 6.50 usec  
TE 298.15 K  
CHST2 145.000000  
D1 2.00000000 sec  
D2 0.0034828 sec  
D12 0.00000000 sec  
TDO 1

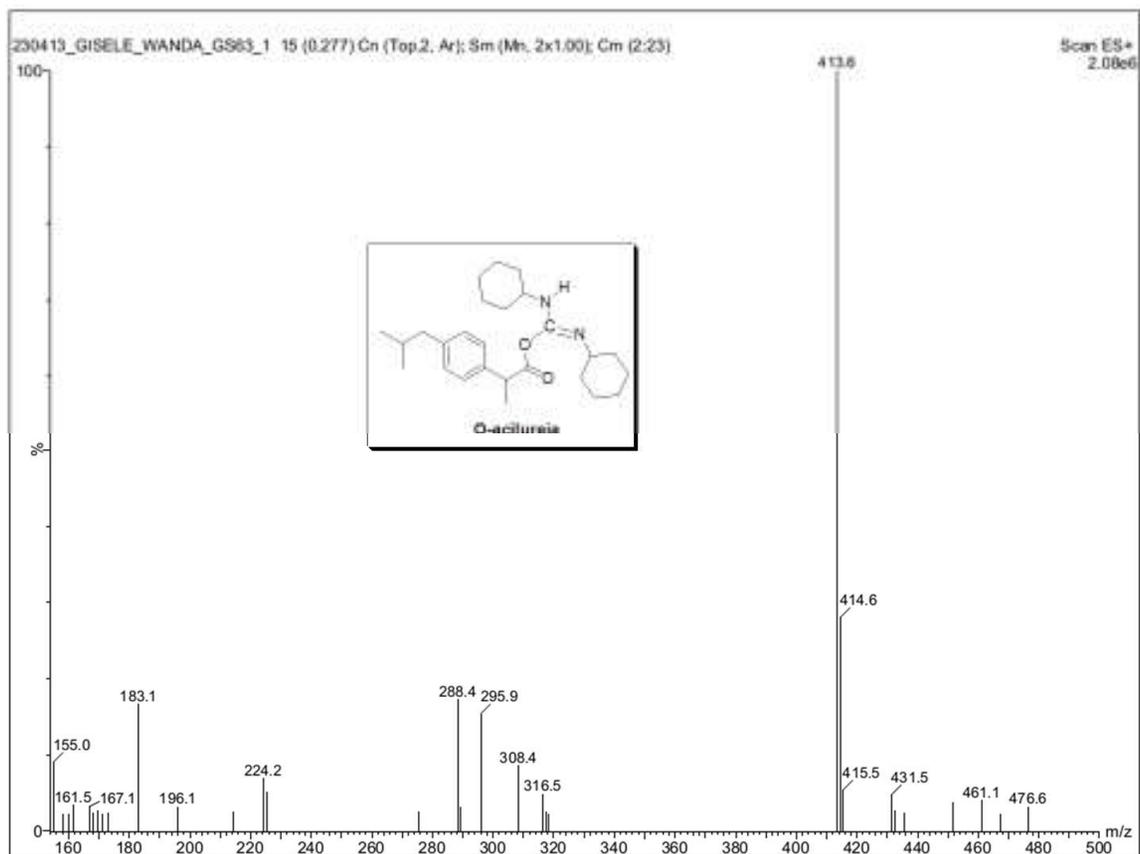
\*\*\*\*\* CHANNEL f1 \*\*\*\*\*  
SFO1 125.7049807 MHz  
NUC1 13C  
P1 10.00 usec  
P2 20.00 usec  
SFO2 499.8715986 MHz  
NUC2 1H  
CPDPRG2 waltz16  
P3 11.80 usec  
P4 23.60 usec  
PCPD2 80.00 usec  
PLW2 26.85300064 W  
PLW12 0.58421999 W

F2 - Processing parameters  
SI 32768  
SF 125.6924110 MHz  
WDW EM  
SSB 0  
LB 1.00 Hz  
GB 0  
PC 1.40

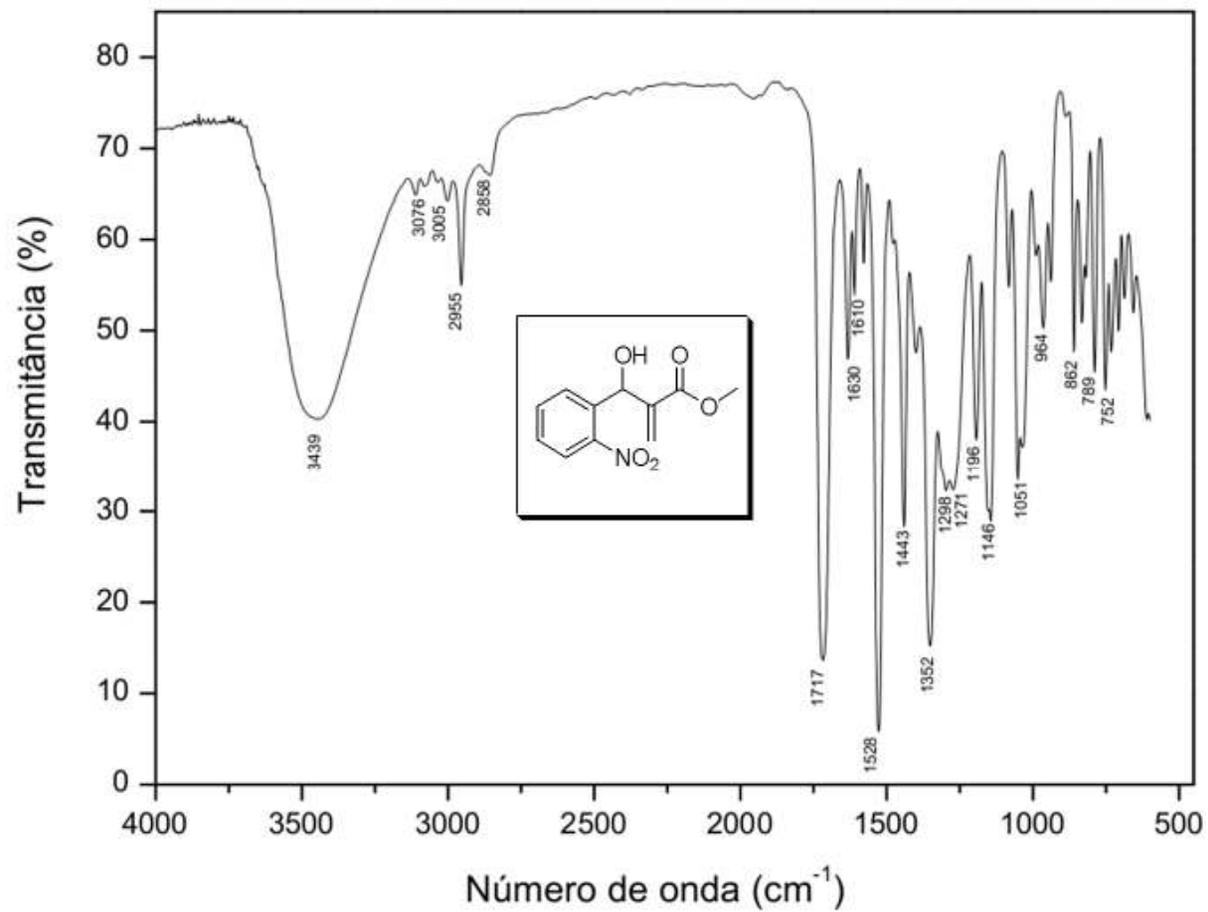
Espectro de RMN <sup>13</sup>C (DEPT-135) (CDCl<sub>3</sub>, 125 MHz) do amino álcool 7



Espectro de massas de alta resolução (TOF-MS-ES+) do amino álcool 7

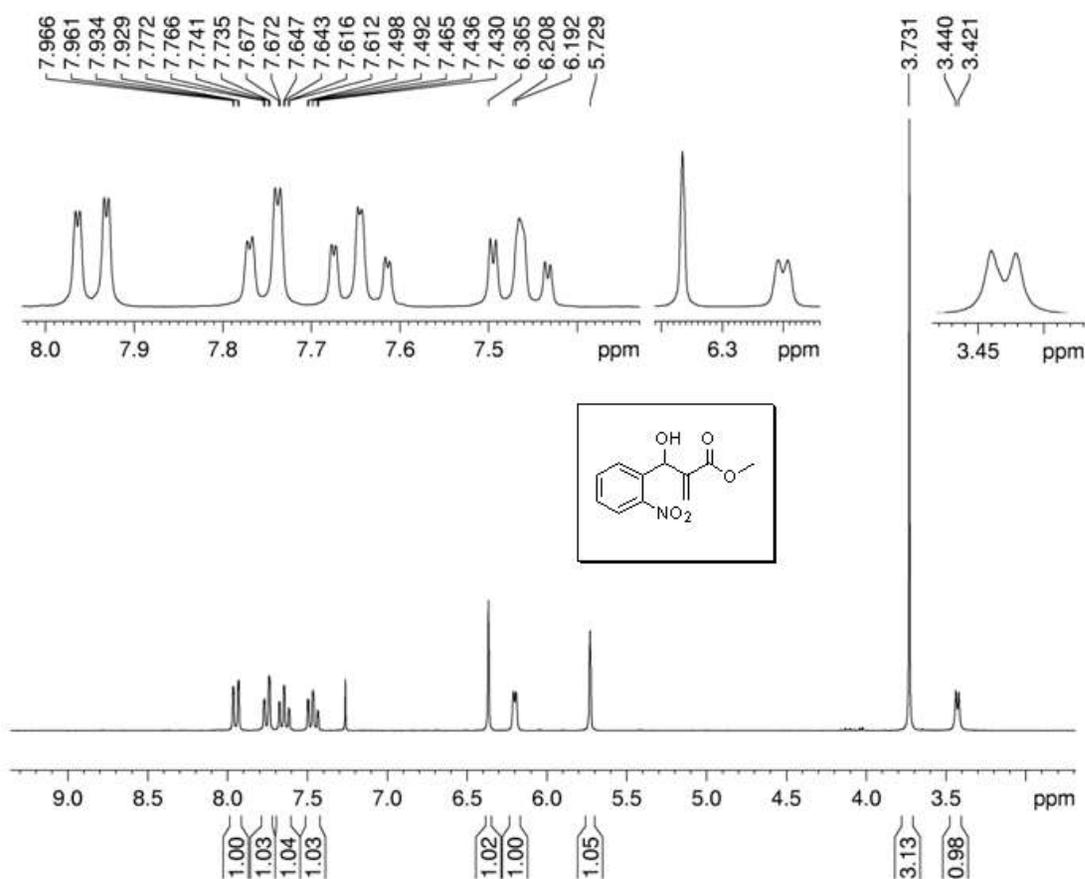


Espectro de massa de baixa resolução (Triplo quadrupolo - ES+) da *o*-acilureia



Espectro de IV (filme,  $\nu_{\max}$ ) do aduto de MBH 31

Gisele/ Wanda - CDCL3 - GS15 - bruker250 - jan19gssH1



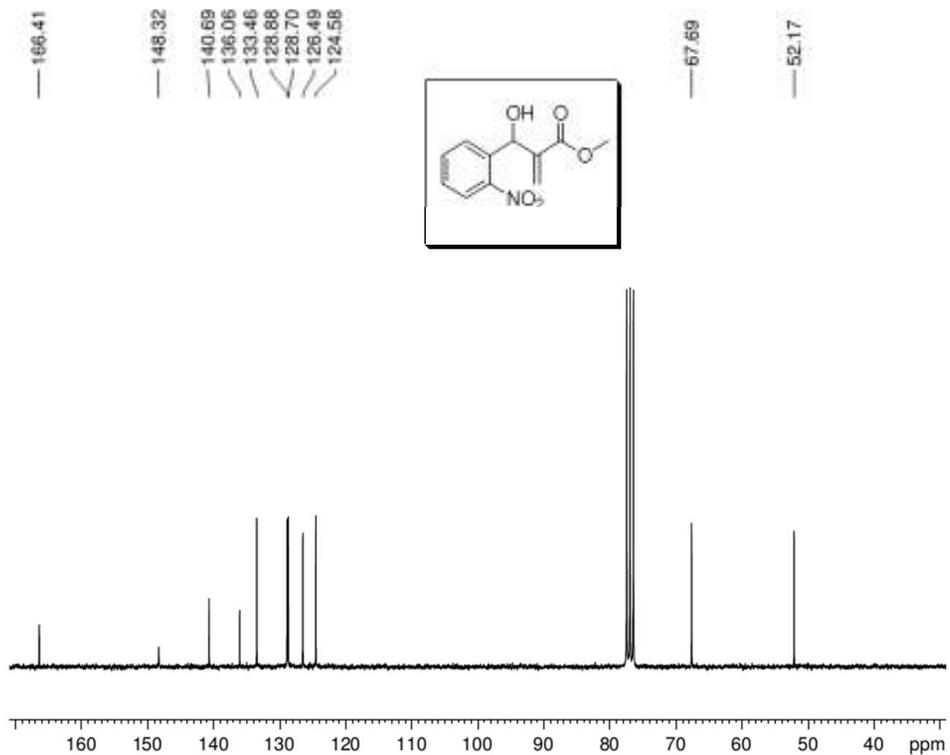
```

NAME      jan19gssH1
EXPNO     1
PROCNO    1
Date_     20120119
Time      14.35
INSTRUM   spect
PROBHD    5 mm QNP 1H/13
PULPROG   zg30
TD         32768
SOLVENT   CDCL3
NS         16
DS         0
SWH        5175.983 Hz
FIDRES     0.157958 Hz
AQ         3.1654389 sec
RG         1448.2
DW         96.600 usec
DE         6.00 usec
TE         298.2 K
D1         1.00000000 sec
TD0        1

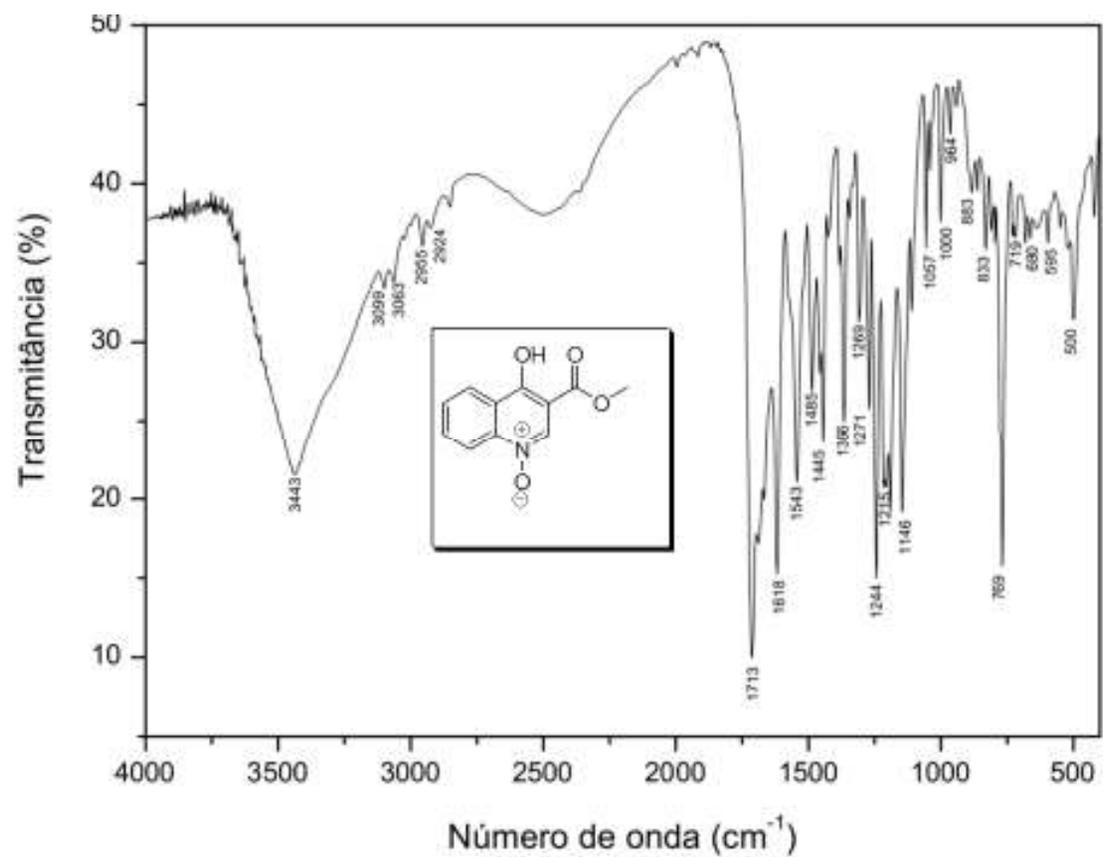
===== CHANNEL f1 =====
NUC1       1H
P1         13.25 usec
PL1        -6.00 dB
SFO1       250.1317509 MHz
SI         32768
SF         250.1300000 MHz
WDW        EM
SSB        0
LB         0.30 Hz
GB         0
PC         1.00
    
```

Espectro de RMN <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>, 250 MHz) do aduto de MBH 31

Gisele - GS15 - CDCl<sub>3</sub> - Bruker 250 MHz - dez22wanC1

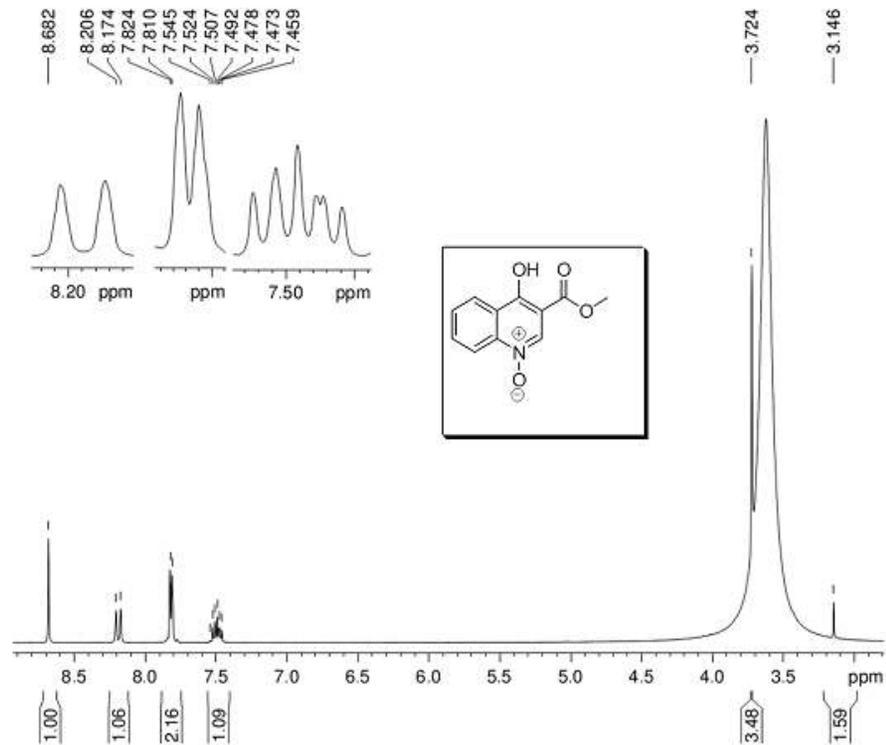


Espectro de RMN <sup>13</sup>C (CDCl<sub>3</sub>, 62,5 MHz) do aduto de MBH 31



Espectro de IV (KBr,  $\nu_{\max}$ ) do N-óxido **32**

Gisele/Wanda- GS21- DMSO-d6 - BRUKER250- mar07gssH1



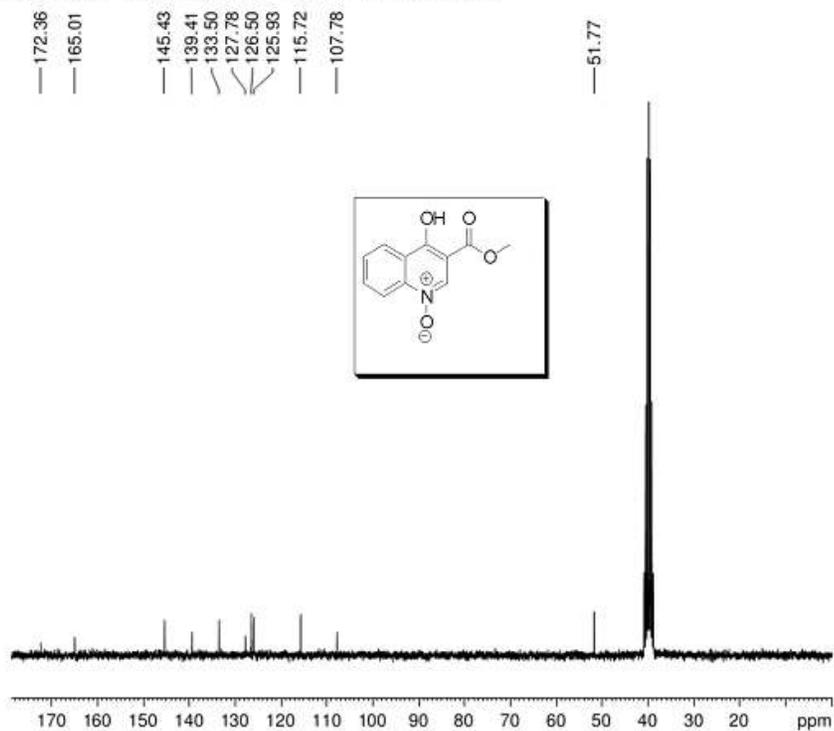
```

NAME          mar07gssH1
EXPNO         1
PROCNO        1
Date_         20120307
Time          17.07
INSTRUM       spect
PROBHD        5 mm QNP 1H/13
PULPROG       zg30
TD            32768
SOLVENT       DMSO
NS            16
DS            0
SWH           5175.983 Hz
FIDRES        0.157958 Hz
AQ            3.1654389 sec
RG            456.1
DN            96.600 usec
DE            6.00 usec
TE            298.2 K
SI            1.00000000 sec
TD0           1

***** CHANNEL f1 *****
NUC1          1H
P1            13.25 usec
PL1           -6.00 dB
SFO1         250.1317509 MHz
SI            32768
SF            250.1300000 MHz
WDW           EM
SSB           0
LB            0.30 Hz
GB            0
PC            1.00
    
```

Espectro de RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 250 MHz) do N-óxido **32**

Gisele/Wanda- GS21- DMSO-d6 - BRUKER250- mar08gssC1



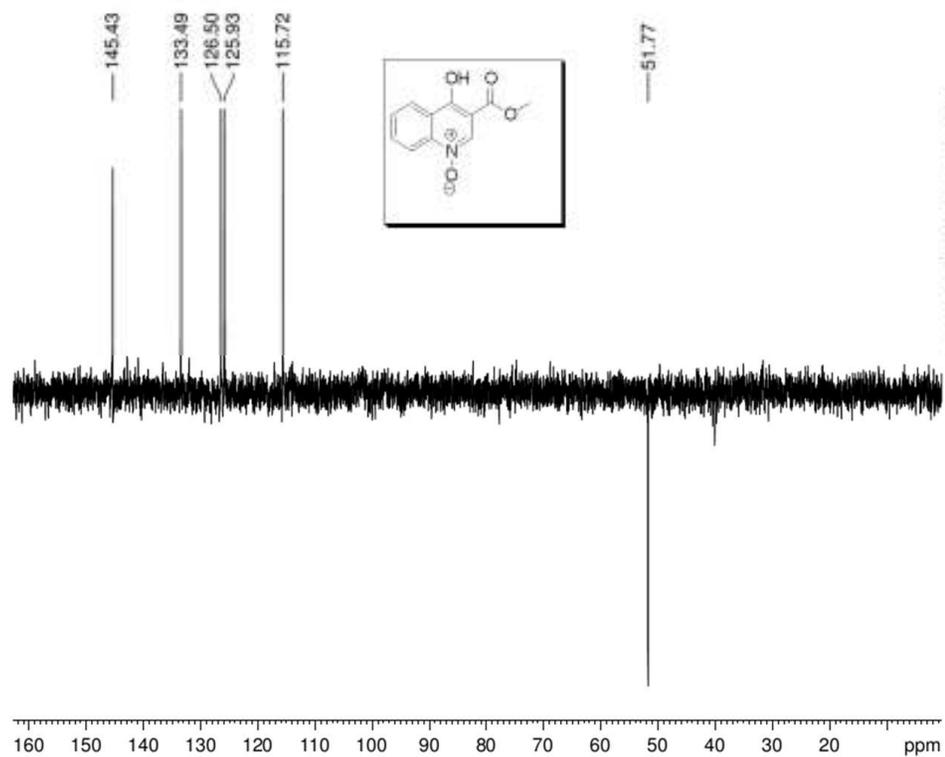
```
NAME mar08gssC1
EXPNO 1
PROCNO 1
Date_ 20120308
Time_ 10.02
INSTRUM spect
PROBHD 5 mm QNP 1H/13
PULPROG zgpg30
TD 16384
SOLVENT DMSO
NS 812
DS 0
SWH 15060.241 Hz
FIDRES 0.919204 Hz
AQ 0.5439988 sec
RG 574.7
DN 33.200 usec
DE 6.00 usec
TE 298.2 K
D1 2.0000000 sec
d11 0.0300000 sec
DELTA 1.89999998 sec
TD0 1

===== CHANNEL f1 =====
NUC1 13C
P1 10.00 usec
PL1 0.00 dB
SFO1 62.9015280 MHz

===== CHANNEL f2 =====
CPDPRG2 waltz16
NUC2 1H
PCPD2 100.00 usec
PL2 -6.00 dB
PL12 11.56 dB
PL13 18.00 dB
SFO2 250.1310005 MHz
SI 32768
SF 62.8952390 MHz
WDW EM
SSB 0
LB 1.00 Hz
GB 0
PC 1.40
```

Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 62,5 MHz) do N-óxido **32**

Glebe/Wanda-GS21- DMSO-d6 - BRUKER250- mar08gssD1 - DEPT 135

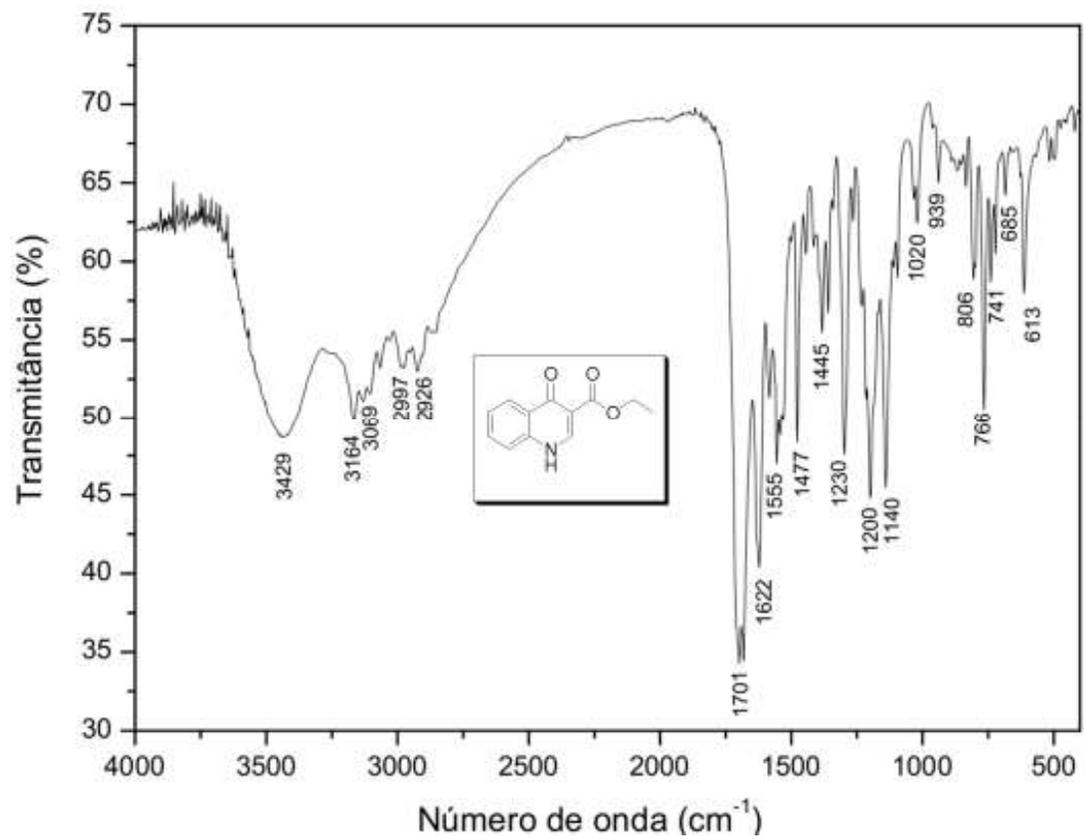


```
NAME      mar08gssD1
EXPNO     1
PROCNO    1
Date_     20120308
Time      7.43
INSTRUM   spect
PROBHD    5 mm QNP 1H/13
PULPROG   zgpg30
TD         65536
SOLVENT   DMSO
NS         1024
DS         4
SWH        15060.241 Hz
FIDRES     0.919204 Hz
AQ          0.5439988 sec
RG          1149.4
DW          33.200 usec
DE          8.00 usec
TE          300.2 K
CST3       145.000000
D1          2.0000000 sec
d2          0.0034828 sec
d12         0.0000200 sec
DELTA      0.00001273 sec
TD0         1

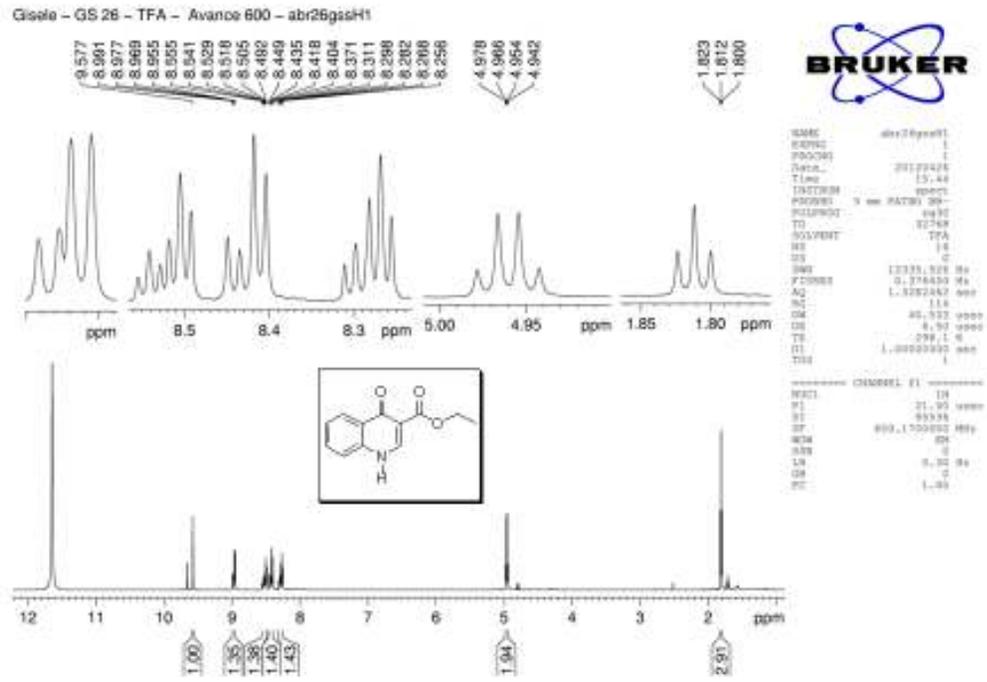
===== CHANNEL f1 =====
NUC1       13C
P1         10.00 usec
p2         20.00 usec
PL1        0.00 dB
SFO1       62.9015280 MHz

===== CHANNEL f2 =====
CPDPRG2    waltz16
NUC2       1H
P3         13.25 usec
p4         26.50 usec
PCPD2      100.00 usec
PL2        -6.00 dB
PL12       11.56 dB
SFO2       250.1310005 MHz
SI         32768
SF         62.8952390 MHz
WDW         EM
SSB         0
LB          1.00 Hz
GB          0
PC          1.40
```

Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  (DEPT-135) ( $\text{CDCl}_3$ , 62,5 MHz) do N-óxido **32**

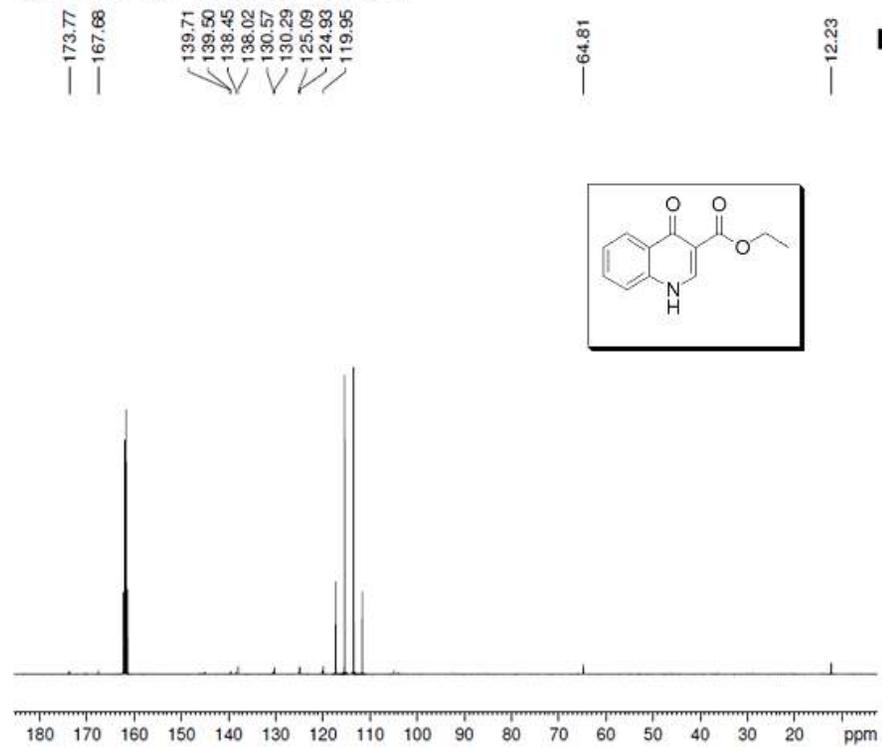


Espectro de IV (KBr,  $\nu_{\max}$ ) do 3-carboetoxi-4-quinolona **38**



Espectro de RMN <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>, 600 MHz) do 3-carboetoxi-4-quinolona **38**

Gisele - GS 26 - TFA - Avance 600 - abr26gssC1

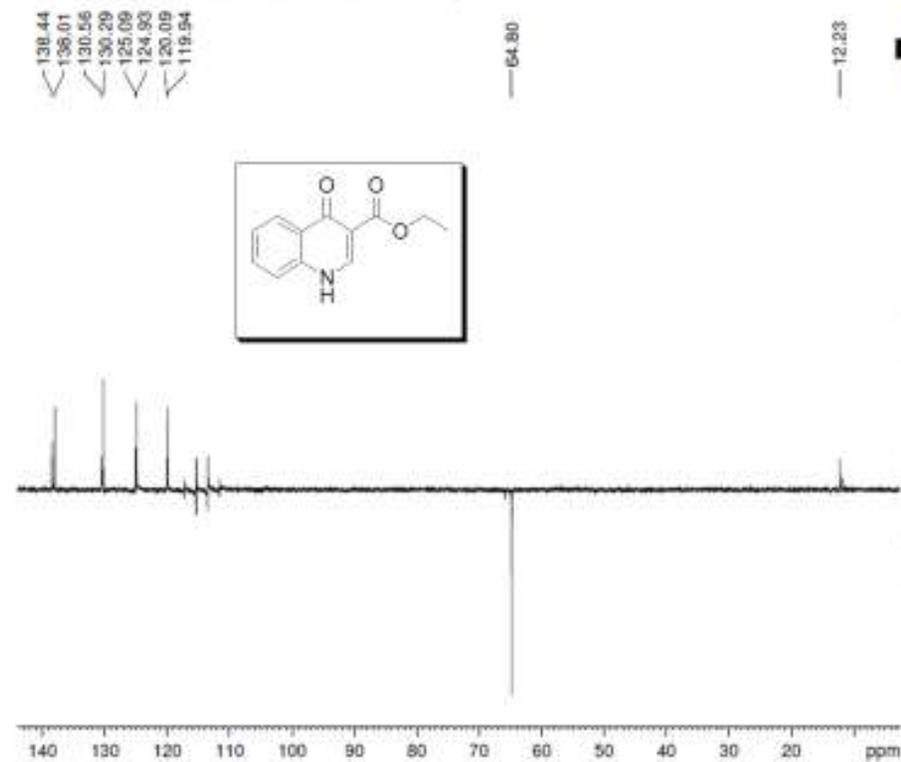


```
NAME      abr26gssC1
EXPNO     1
PROCNO    1
Date_     20120426
Time      15:48
INSTRUM   spect
PROBHD    5 mm PATEO SS-
PULPROG   zgpg30
ID        32768
SOLVENT   TFA
NS        3060
DS        0
SWH       36057.691 Hz
FIDRES    1.100393 Hz
AQ        0.4544329 sec
RG        203
SW        13.667 us
DE        6.50 us
TE        298.2 K
D1        2.00000000 sec
D11       0.03000000 sec
TDO       1
```

```
----- CHANNEL f1 -----
NUC1      13C
P1        11.50 us
SI        32768
SF        150.9128610 MHz
WDW       EM
SSB       0
LB        1.00 Hz
GB        0
PC        1.40
```

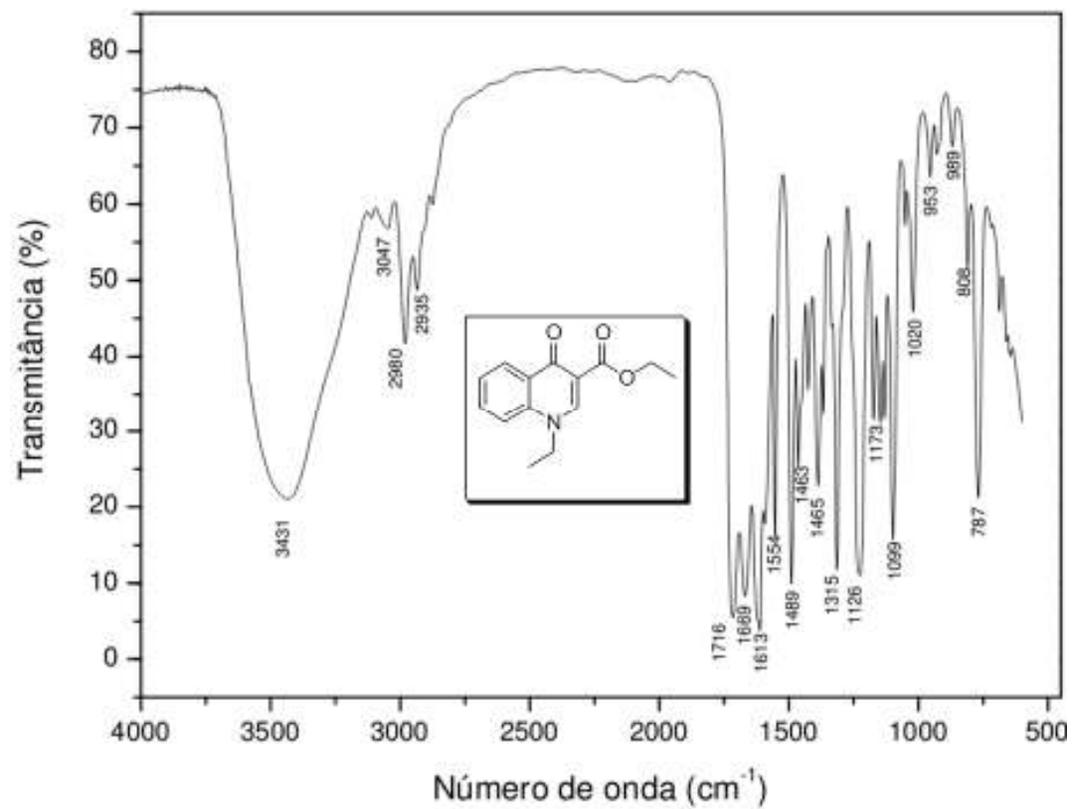
Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 600 MHz) da 3-carboetoxi-4-quinolona **38**

Cisale - GS 2E - TFA - Avance 600 - abc26qssD1



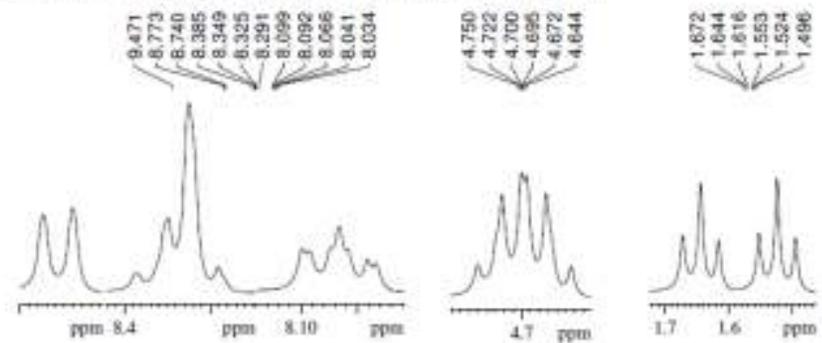
```
NAME      abc26qssD1
EXPNO     1
PROCNO    1
DATA_     20129426
Time      17.57
INSTRUM   spect
PROBHD    5 mm F4000 2B-
PULPROG   zgpg30
TD         32768
SOLVENT   TFA
NS         1024
DS         2
SWH        34037.401 Hz
FIDRES    1.195393 Hz
AQ         0.8544329 sec
RG         205
DM         13.867 um
DC         4.50 um
RG         288.2 A
CHRG1     145.0000000
SI         2.000000000 sec
S2         0.00244828 sec
S12        0.00003000 sec
SD         1
----- CHANNEL f1 -----
NUC1       13C
P1         11.50 um
PT         23.00 um
RF         400.146
RF2        150.9128470 MHz
SFO        400
SI         0
LB         3.00 Hz
GB         0
PC         1.40
```

Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  DEPT-135 ( $\text{CDCl}_3$ , 150 MHz) do 3-carboetoxi-4-quinolona **38**



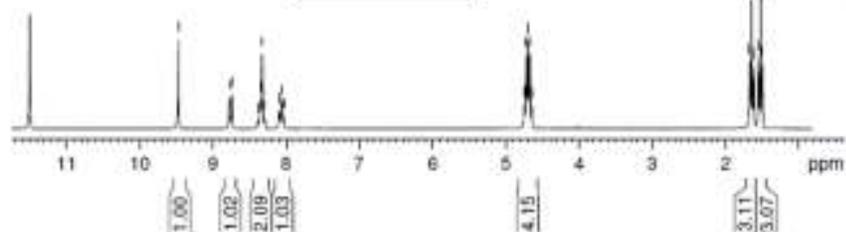
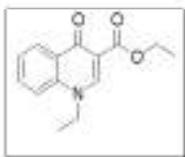
Espectro de IV (KBr,  $\nu_{\max}$ ) do N-etil-3-carboetoxi-4-quinolona **31**

Ginele/Wanda - GS34\_4 - CF3002D - BRKER250 - jun14qmsH3



```

NAME      jun14qmsH3
EXPNO     1
PROCNO    1
DATE_     20130613
TIME      14.45
INSTRUM   spect
PROBHD    5 mm QNP 1H/13
PULPROG   zgpg30
TD         65536
AQ         0.2813
RG         327.5
ADDITION  2Dac13
SI         14
DE         0
DWD        5175.383 Hz
FIDRES    0.157058 Hz
AQ         1.564388 sec
RG         1824.4
DE         96.400 usec
DE         4.00 usec
TE         300.2 K
SI         1.0000000 sec
TD         1
  
```

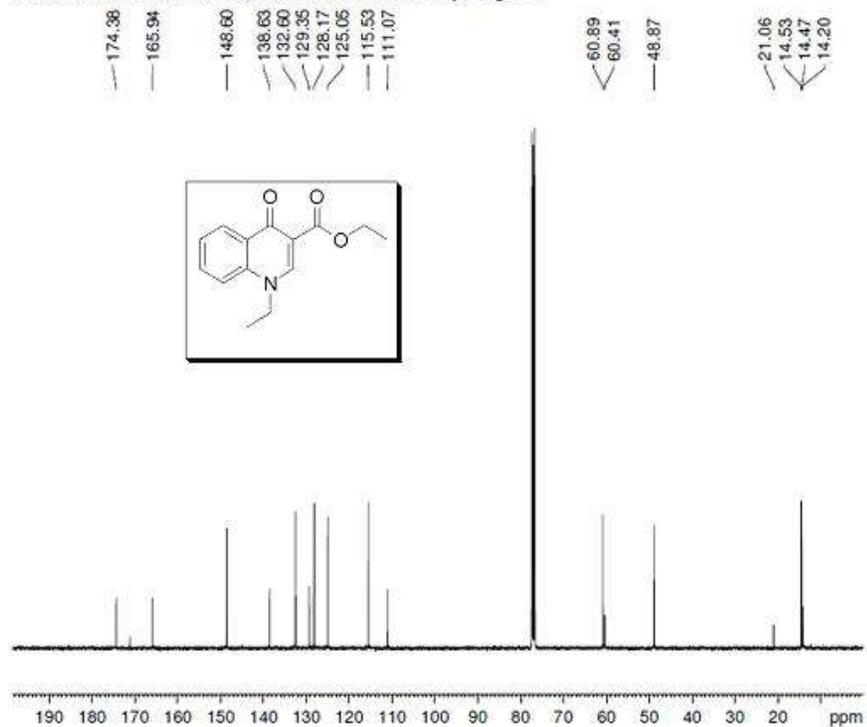


```

===== CHANNEL f1 =====
NUC1      13C
P1         14.25 usec
PL1        -4.90 dB
SFO1      125.7603 MHz
SI         32768
SF         125.76034 MHz
WDW        EM
SSB        0
LB         0.30 Hz
GB         0
PC         1.00
  
```

Espectro de RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 250 MHz) do N-etil-3-carboetoxi-4-quinolona **31**

Gisele/Wanda - GS34-4 - CDCl<sub>3</sub> - Avance 400 MHz - jun14gssC1



```

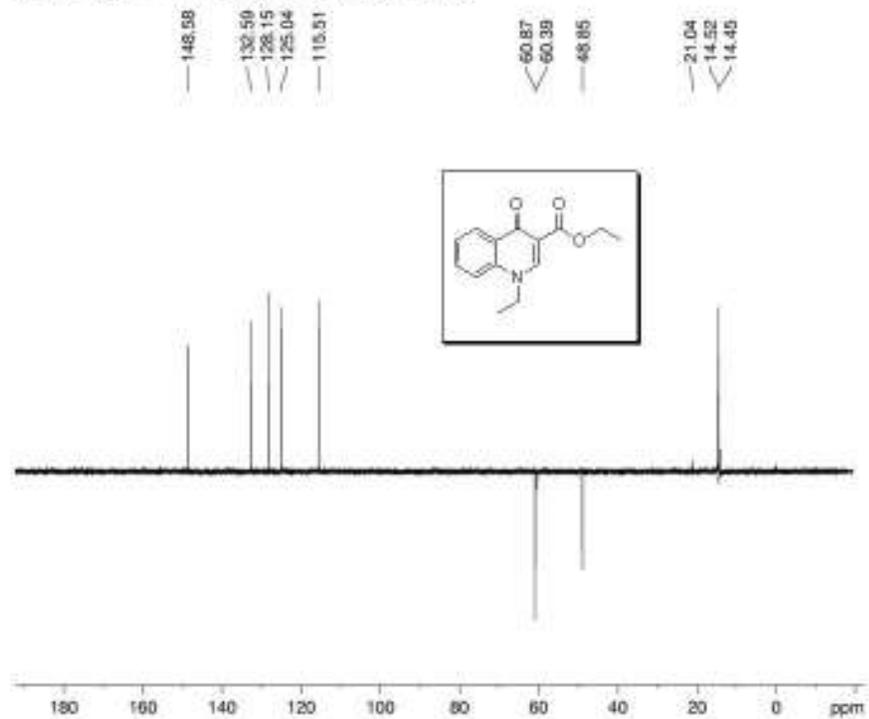
NAME      jun14gssC1
EXPNO     1
PROCNO    1
Date_     20120614
Time      17.12
INSTRUM   spect
PROBHD    5 mm TBI 1H/13
PULPROG   zgpg30
TD         32768
SOLVENT   CDCl3
NS         10240
DS         4
SWH        24038.461 Hz
FIDRES     0.733596 Hz
AQ         0.6916244 sec
RG         128
DW         20.800 usec
DE         6.50 usec
TE         298.1 K
D1         2.00000000 sec
D11        0.03000000 sec
TD0        1

----- CHANNEL f1 -----
NUC1       13C
P1         19.60 usec
PL1        1.08 dB
PL1W       84.62208557 W
SFO1       100.6278293 MHz

----- CHANNEL f2 -----
CPDPRG2   waltz16
NUC2       1H
PCPD2     70.00 usec
PL2        0.50 dB
PL12       14.70 dB
PL13       14.70 dB
PL2W       8.95488453 W
PL12W     0.21481268 W
PL13W     0.21481268 W
SFO2       400.1316005 MHz
SI         32768
SF         100.6127871 MHz
WDM        NM
SSB         0
LB         1.00 Hz
GB         0
PC         1.40
    
```

Espectro de RMN <sup>13</sup>C (CDCl<sub>3</sub>, 100 MHz) do N-etil-3-carboetoxi-4-quinolona **31**

Qsele - "GS34-4" - cdc3/ Avance 400 MHz - jun14gssD1



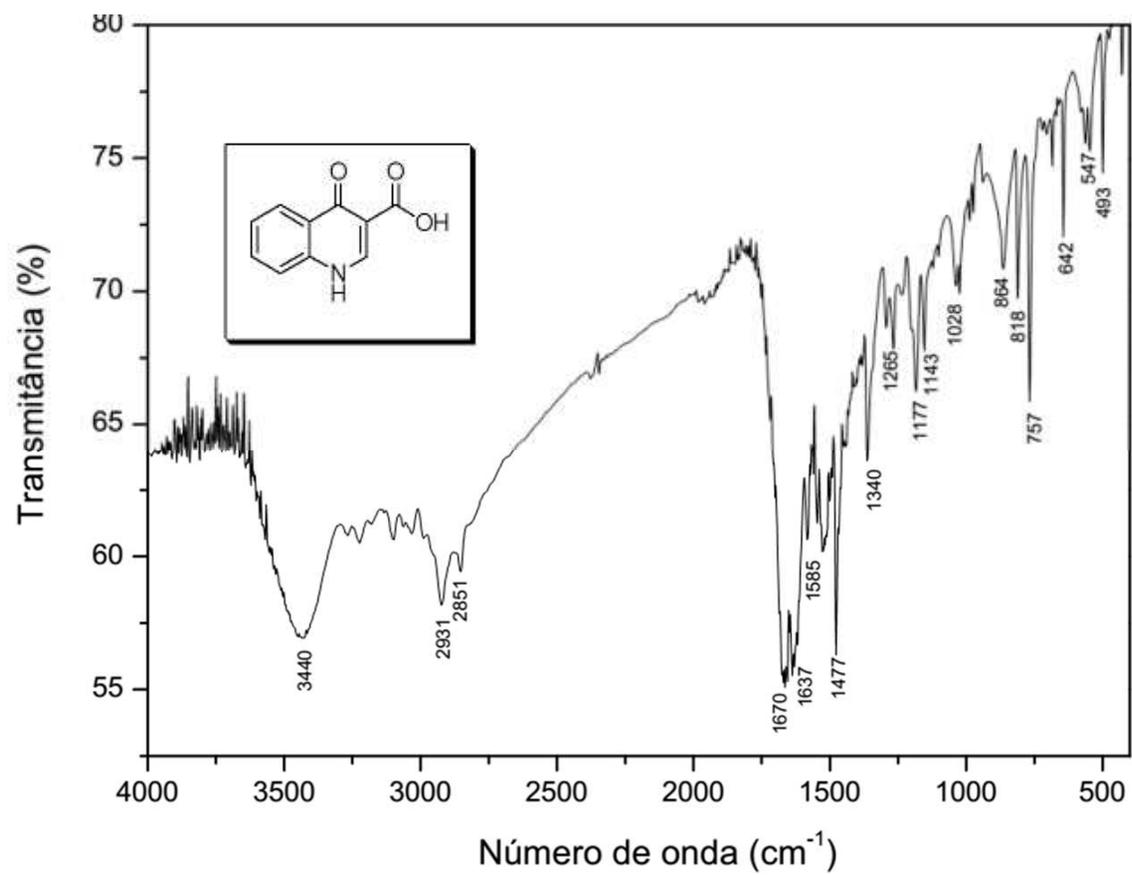
```

NAME      jun14gssD1
EXPNO    1
PROCNO    1
PROCNAME  F2F2F2F2
Date_     20120410
Time      9.48
INSTRUM   spect
PROBHD    5 mm TBI 1H/13
PULPROG   zgpg30
TD        32768
SOLVENT   CDCl3
NS        6320
DS        4
SWH       24032.481 Hz
F2F2F2    0.712000 Hz
AQ        0.0016223 sec
RG         323
DW        30.000 0000
DE        6.50 0000
TE        298.15 K
CQZG2     100.0000000
SI         2.000000000 000
OC         0.003440200 000
SC1        0.000000000 000
TC2        0

===== CHANNEL f1 =====
NUC1       13C
P1         10.00 0000
PL1        0.00 0000
PC1        -1.50 00
PL1W       00.003440210 W
SFO1       100.6282000 MHz

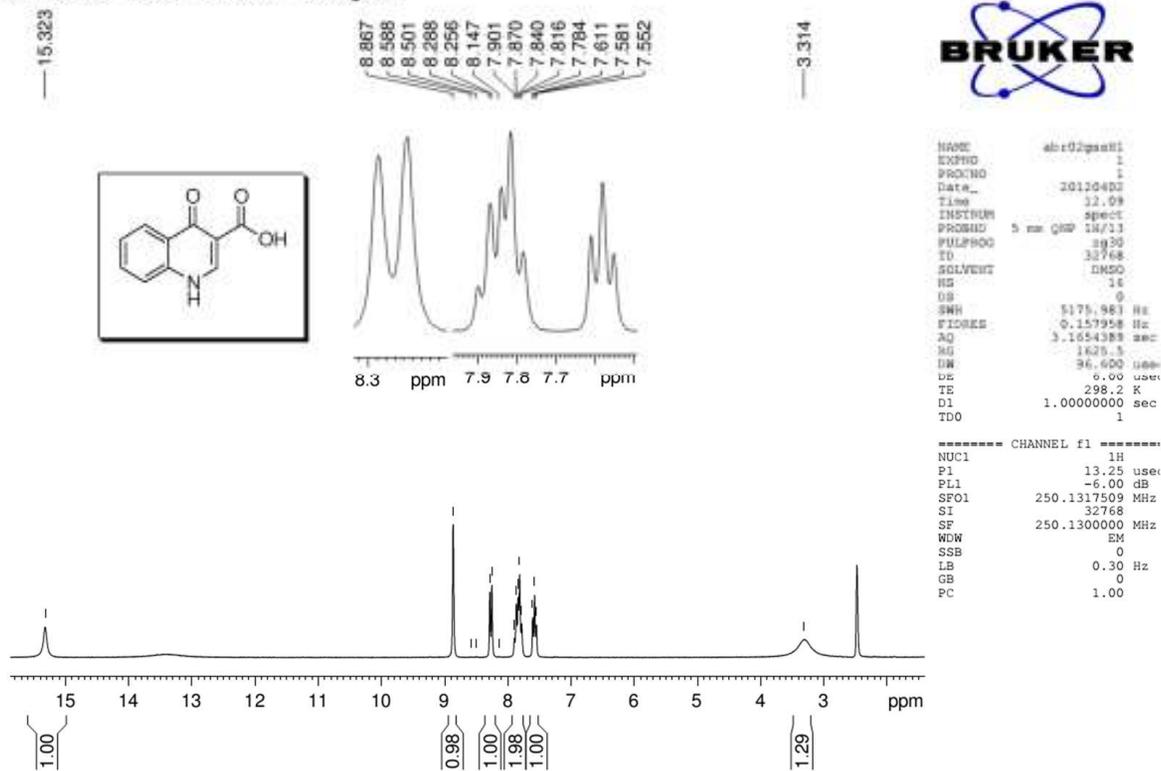
===== CHANNEL f2 =====
EXPNAME    zgpg30
NUC2       13C
P2         10.00 0000
PL2        0.00 0000
PC2        10.00 0000
PL2W       0.00 00
PL12       10.00 00
PL1W       0.003440210 W
SFO2       100.6282000 MHz
SI         20768
SF         100.6282000 MHz
SSB        0
LB         1.00 Hz
GB         0
PC         1.40
    
```

Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  DEPT-135 ( $\text{CDCl}_3$ , 100 MHz) do N-etil-3-carboetoxi-4-quinolona **31**



Espectro de IV (KBr,  $\nu_{\max}$ ) do ácido 3-carboxi-quinolona **1**

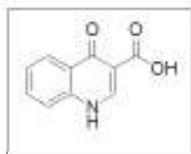
Gisele/Wanda - GS23 - Bruker250 - abr02gssH1



Espectro de RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 250 MHz) do ácido 3-carboxi-quinolona **1**

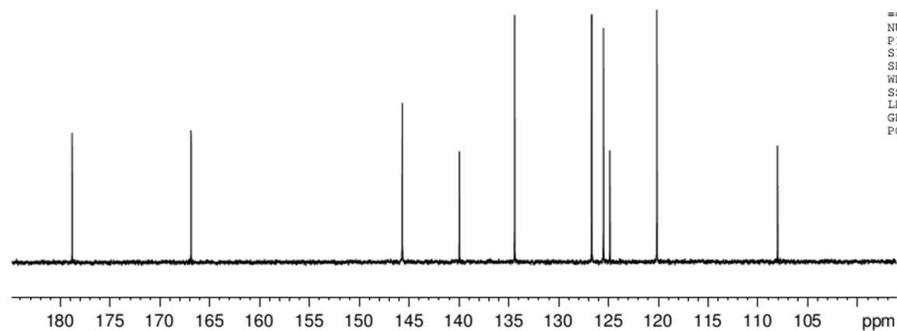
Gisele - 0823 - CDCl3 - Avanci 600 MHz - abr02qsaCl

—178.80 —166.87 —145.67 —139.95 —134.40 —126.67 —125.52 —124.87 —120.16 —108.05

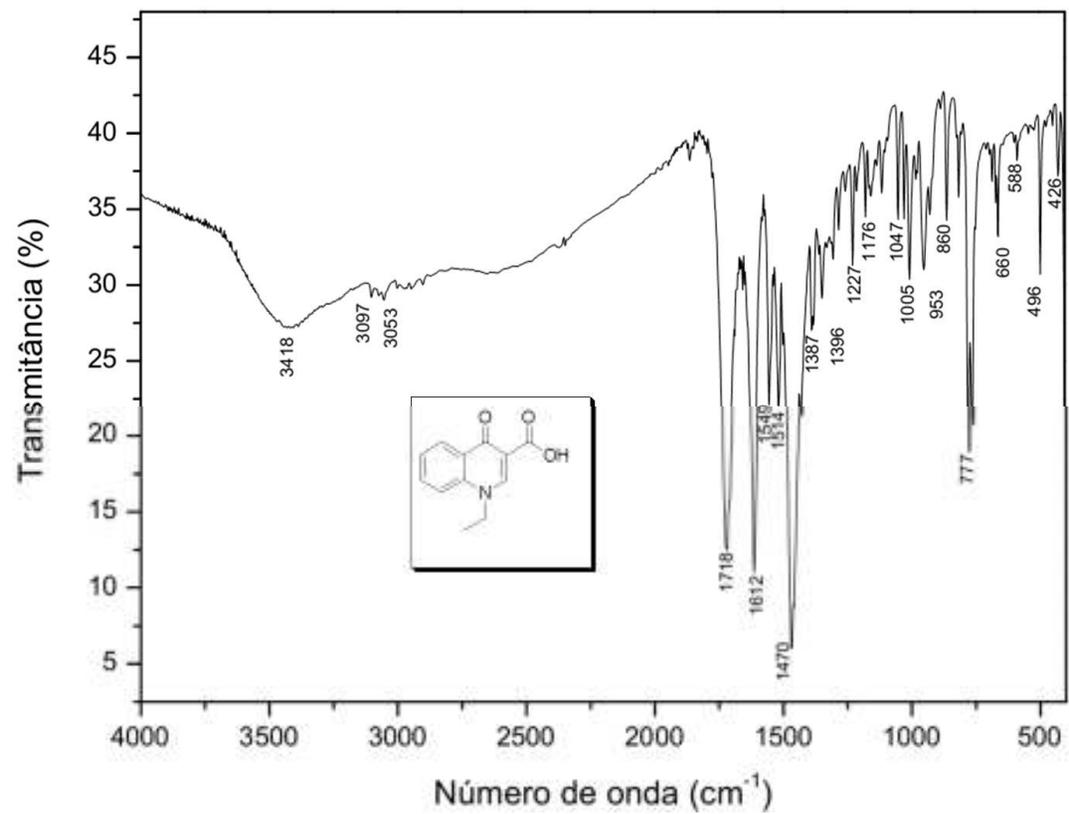


```
NAME          abr02qsaCl
EXPNO         1
PROCNO        1
Date_         20130402
Time          17.09
INSTRUM       spect
PROBHD        5 mm PABBO 15-
PULPROG       zgpg30
ID            32768
SOLVENT       DMSO
NS            1540
DS            0
SFO1          300.135 MHz
F2RES         1.200193 Hz
AQ            0.4544323 sec
RG            203
WE            203
ZG            13.467 usec
ZC            4.50 usec
TE            298.2 K
D1            2.00000000 sec
D11           0.03000000 sec
TDO           1
```

```
***** CHANNEL f1 *****
NUC1          13C
P1            11.50 usec
SI            32768
SF            150.9128670 MHz
WDW           EM
SSB           0
LB            1.00 Hz
GB            0
PC            1.40
```

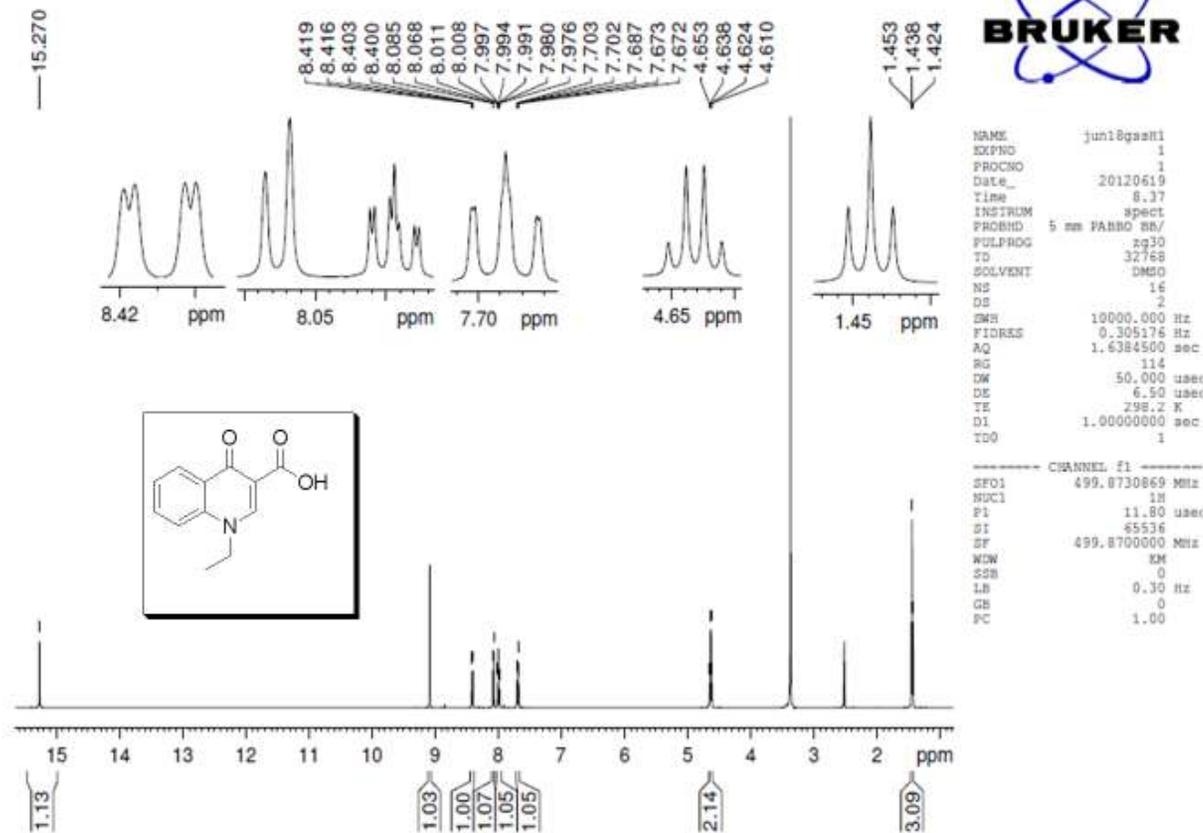


Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 150 MHz) do ácido 3-carboxi-quinolona **1**



Espectro de IV (KBr,  $\nu_{\max}$ ) do ácido N-etil-4-quinolona **41**

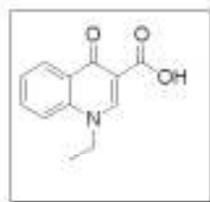
Gisele - GS36 - DMSO - Avance 500 MHz - jun18qssH1 - 1H



Espectro de RMN <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>, 500 MHz) do ácido N-etil-4-quinolona **41**

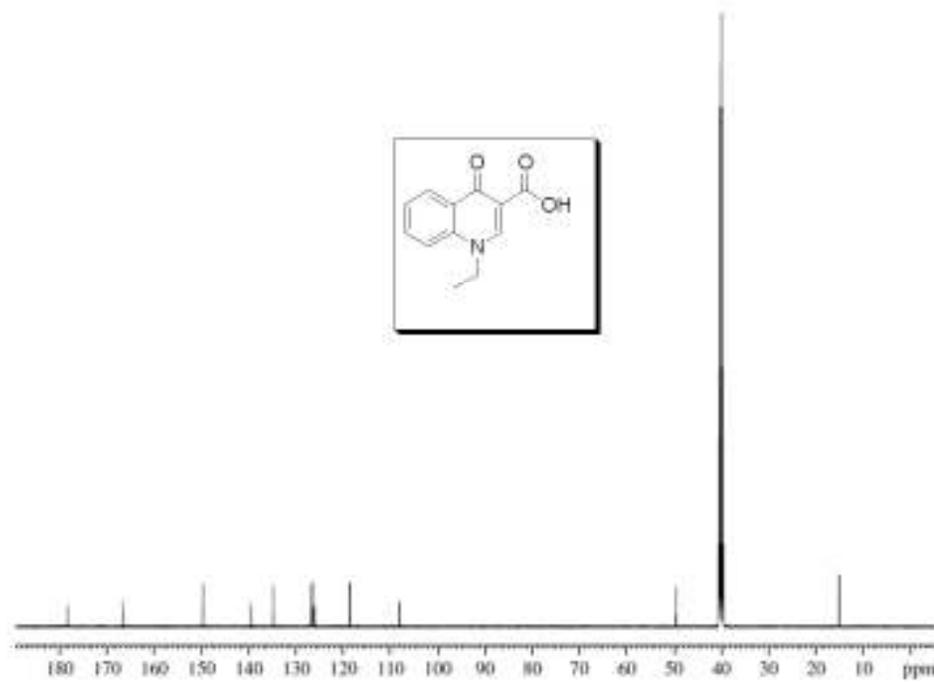
Giavle - GS36 - DMSO - Avance 500 MHz - jun18gac1 - 13C

178.19  
166.57  
149.68  
139.54  
134.82  
126.80  
126.45  
126.02  
118.60  
108.15  
49.49  
15.04



```

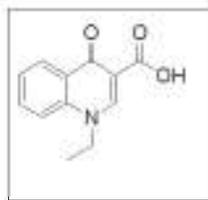
NAME      jun18gac1
EXPNO    1
PROCNO   1
Date_    20180919
Time     8.54
INSTRUM  spect
PROBHD   5 mm HAMB BBI
PULPROG  zgpg30
TD       65536
SOLVENT  DMSO
NS       1743
DS       4
SWH      20761.904 MHz
FIDRES   0.304245 Hz
AQ       0.3301572 sec
RG        380
OR       14.850 um
OX       6.50 um
CY       286.2 mm
OI       2.0000000 sec
O15      0.0300000 sec
TD0      1
----- CHANNEL f1 -----
NUC1     13C
P1       15.00 um
PL       0
PR       12143
RF       125.4821110 MHz
SFO      50
SSB      0
GB       1.00 Hz
CB       0
PC       1.40
    
```



Espectro de RMN <sup>13</sup>C (CDCl<sub>3</sub>, 125 MHz) do ácido N-etil-4-quinolona 41

Gisele - GS36 - DM90 - Avance 500 MHz - jun18qssDI - DEPT 135

149.68  
134.82  
126.80  
126.45  
118.60  
49.49  
15.04  
15.01

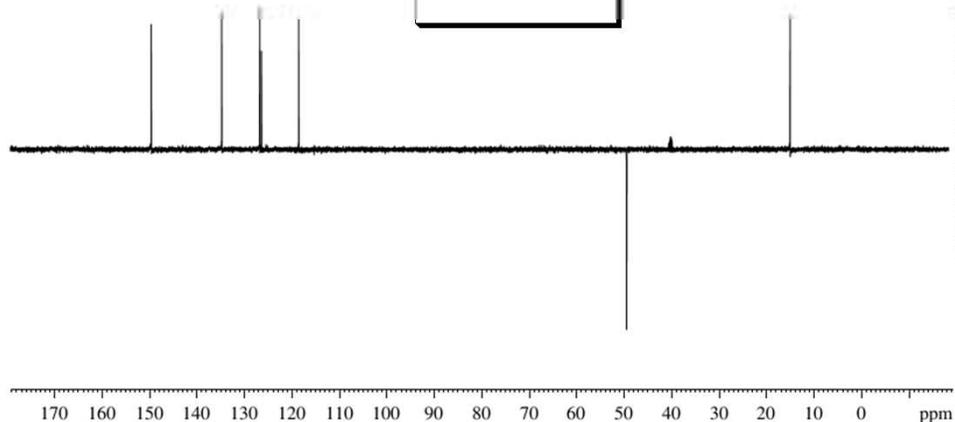


```

NAME      jun18qssDI
EXPNO     1
PROCNO    1
Date_     20110618
Time      9.58
INSTRUM   spect
PROBHD    5 mm VASCO DD/
PULPROG   zgpg30
TD         32768
SOLVENT   DM90
NS        512
DS         4
SWH        29781.900 Hz
FIDRES    0.466341 Hz
AQ         0.5865518 sec
RG         3050
SR         16.000 usec
SE         6.50 usec
TE         298.2 K
CNS1Z     145.0000000
D1         2.00000000 sec
D2         0.00344828 sec
D12        0.00002000 sec
TD0        1
    
```

```

===== CHANNEL f1 =====
SFO1     125.7049807 MHz
NUC1      13C
P1        10.00 usec
P2        20.00 usec
SI        32768
SF        125.6924110 MHz
WDW       EM
SSB       0
LB        1.00 Hz
GB         0
PC         1.40
    
```



Espectro de RMN <sup>13</sup>C DEPT-135 (CDCl<sub>3</sub>, 125 MHz) do ácido N-etil-4-quinolona **41**