

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

**SÍNTESE DE NOVOS HÍBRIDOS DERIVADOS DE TACRINA, LOFINA,
PIRIMIDINA E CARBOIDRATOS, COMPOSTOS COM POTENCIAL
APLICAÇÃO NO TRATAMENTO DA DOENÇA DE ALZHEIMER**

Tese de Doutorado

JOÃO PAULO BIZARRO LOPES

Orientador: Prof. Dr. Marco Antonio Ceschi

Porto Alegre, Abril de 2018

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

JOÃO PAULO BIZARRO LOPES

**SÍNTESE DE NOVOS HÍBRIDOS DERIVADOS DE TACRINA, LOFINA,
PIRIMIDINA E CARBOIDRATOS, COMPOSTOS COM POTENCIAL
APLICAÇÃO NO TRATAMENTO DA DOENÇA DE ALZHEIMER**

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

Prof. Dr. Marco Antonio Ceschi
Orientador

Porto Alegre, Abril de 2018

Declaro que a presente tese foi realizada inteiramente por mim, João Paulo Bizarro Lopes, exceto as colaborações devidamente referenciadas, no período entre abril de 2014 e abril de 2018 no Instituto de Química da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, sob Orientação do Professor Doutor Marco Antonio Ceschi. A tese foi julgada adequada para a obtenção do título de Doutor em Química pela seguinte banca examinadora:

Comissão Examinadora:



Prof. Dr. Ronaldo Aloise Pilli



Prof. Dr. Nilo Zanatta



Prof. Dr. Paulo Henrique Schneider



Prof. Dr. Angélica Venturini Moro



Prof. Dr. Marco Antonio Ceschi
(Orientador)



João Paulo Bizarro Lopes

"O heroísmo não consiste em não ter medo, mas sim em superá-lo!"
(Roberto Gómez Bolaños - criador e intérprete do Chapolin Colorado)

Dedico este trabalho aos meus pais, José Marcio Pereira Lopes (*in memoriam*)
e Denise Bizarro Lopes.

AGRADECIMENTOS

À minha mãe, professora Denise Bizarro Lopes, pela minha educação, pelo carinho, por me guiar sempre pelo caminho da honestidade e por me ensinar a respeitar. Por ter compreendido e apoiado a minha escolha de seguir numa carreira que exige muito estudo e dedicação, mas que ainda é pouco valorizada em nosso país. Por ser um exemplo de profissional. Por ser a minha mãe.

Aos meus irmãos João Marcos e Maria Laura, pelo amor e companheirismo que a distância não diminui. Pelos momentos que compartilhamos e fazemos questão de estar juntos. Pela compreensão da minha ausência.

À minha avó, Ceneida Bizarro, pelo carinho e amor incondicionais aos seus netos. Pela compreensão da minha ausência. Pela festa que sempre faz quando vou lhe visitar.

Ao meu orientador, professor doutor Marco Antonio Ceschi, pela excelente orientação. Pela convivência muito próxima que tivemos nesses anos com a qual pude aprender mais do que química, mas como ser um bom e sério cientista. Pela liberdade a mim conferida de tomar decisões com relação ao trabalho, tanto no experimental quanto na escrita, o que creio ser fundamental no processo de formação de um cientista.

Aos professores Diogo Seibert Lüdtke, Leandra Franciscato Campo, Dennis Russowsky e Fabiano Severo Rodembusch, pelo apoio a mim prestados em variadas situações em diversos momentos do meu doutorado.

Ao doutor Laurent Emmanuel Dardenne e à doutora Isabella Alvim Guedes, pelo esforço para realizar os estudos de modelagem molecular e a discussão dos resultados a tempo de incluí-los nas patentes, no artigo e nesta tese de doutorado. Por terem sido atenciosos e prestativos em diversos momentos do meu doutorado e pelo conhecimento transmitido.

Aos professores e ex-colegas de laboratório Jessie Sobieski da Costa e Douglas Gamba, pelo companheirismo e pelo apoio prestados em diversos momentos.

Ao meu colega, doutorando Viktor Saraiva Câmara, pela divertida e produtiva convivência no laboratório. Pela troca de experiências, pela paciência e pelo exemplo de profissional. Pela amizade adquirida.

Aos colegas Gabriela, Brunella, Franciela, Ana Júlia, Renan, Patrick e Rafael, com os quais tive o prazer de trabalhar junto durante o meu doutorado.

Aos demais colegas, atuais e ex-integrantes do laboratório K-215, pelos divertidos momentos que tornaram o ambiente de trabalho agradável.

Aos meus amigos da Parsa, pela amizade que se mantém desde a graduação. Pelos momentos de descontração e diversão sem os quais é impossível manter uma mente sadia.

Aos meus sogros, Edite e José Gonzaga, por todo carinho e apoio que recebo. Pela compreensão nos momentos de ausência.

À minha companheira canina, Lola, que é um exemplo de amor incondicional e companheirismo.

À minha melhor companheira, melhor amiga, meu amor, minha namorada, Luana Silva. Por todo o amor que sei que sente por mim e que me permite sentir o mesmo. Por me tornar uma pessoa melhor. Por me fazer me sentir mais completo. Por todo carinho que me transmite. Por me permitir contemplar a experiência única que é ver o brilho do seus olhos (os quais não há mais bonitos) e sentir que sou amado. Por toda a paciência e compreensão que sei que foi muito necessária nessa reta final do meu doutorado. Por fazer parte dessa conquista junto comigo. Pela ajuda na tese. Pelo fornecimento dos tosilatos dos carboidratos (a colaboração foi estabelecida pelos orientadores antes do namoro, a colaboração com a namorada foi uma mera e feliz coincidência).

A todos, muito obrigado!

João Paulo

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	2
2. OBJETIVOS	7
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	9
3.1. A Doença de Alzheimer	9
3.1.1. Aspectos Gerais	9
3.1.2. Características Patológicas e Hipóteses	11
3.2. Hipótese Colinérgica e Enzimas Colinesterases	14
3.2.1. Mecanismo de transmissão colinérgica	14
3.2.2. Acetilcolinesterase	16
3.2.3. Butirilcolinesterase	25
3.3. Inibidores de Colinesterases	30
3.3.1. Híbridos multialvo baseados em tacrina	32
3.4. Núcleo Lofina e Derivados Imidazólicos	41
3.5. Núcleo Pirimidina Derivado da Reação de Biginelli	44
3.6. Carboidratos e Derivados	49
3.5.1. Interações CH/ π entre carboidratos e anéis aromáticos	50
3.5.2. Derivados de carboidratos com atividade anti-beta amilóide (anti-A β)	52
3.5.3. Derivados de carboidratos com atividade anticolinesterase	53
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	59
4.1. Metodologia	59
4.2. Síntese dos Derivados da Tacrina	60
4.2.1. Síntese da 9-cloro-1,2,3,4-tetraidroacridina (5)	60
4.2.2. Obtenção das 9-aminoalquil-1,2,3,4-tetraidroacridinas (1a-e)	62
4.3. Síntese dos Derivados da Lofina	65
4.4. Síntese da Pirimidina Derivada da Reação de Biginelli	71
4.4.1. Reação de Biginelli para obtenção da 6-metil-2-oxo-4-fenil-1,2,3,4-tetraidropirimidina-5-carboxilato de etila (7)	71
4.4.2. Oxidação seletiva da DHPM 7	75
4.4.3. Cloração com POCl ₃	79
4.5. Híbridos Tacrina-pirimidina e Lofina-pirimidina	81
4.5.1. Síntese dos Híbridos Tacrina-Pirimidina e Lofina-Pirimidina	81
4.5.2. Caracterização Espectroscópica dos híbridos tacrina-pirimidina e lofina-pirimidina	83
4.6. Síntese dos Tosilatos Derivados de Carboidratos	92

4.6.1. Tosilato da D-xilose	93
4.6.2. Tosilato da D-ribose	94
4.6.3. Tosilato da D-galactose	95
4.7. Híbridos Derivados de Carboidratos	95
4.7.1. Síntese dos Híbridos Tacrina-carboidratos e Lofina-carboidratos	95
4.7.2. Caracterização espectroscópica dos híbridos derivados de carboidratos	104
4.7.3. Tentativa de desproteção dos carboidratos	114
4.8. Atividade Anticolinesterase dos Compostos Sintetizados	115
4.8.1. Híbridos tacrina-pirimidina e lofina-pirimidina	115
4.8.2. Híbridos derivados de carboidratos	117
4.9. Estudos de Modelagem Molecular	123
4.9.1. Híbridos tacrina-carboidratos	124
4.9.2. Híbridos lofina-carboidratos	130
4.9.3. Predição do perfil farmacocinético dos híbridos tacrina-carboidratos	132
5. CONCLUSÕES	135
6. PARTE EXPERIMENTAL	137
6.1. Materiais e Métodos	137
6.2. Procedimentos de Síntese	138
6.2.1. Procedimento para a síntese da 9-cloro-1,2,3,4-tetraidroacridina (5)	138
6.2.2. Procedimento geral para a síntese das 9-aminoalquil-1,2,3,4-tetraidroacridinas (1a-e)	138
6.2.3. Procedimento geral para a proteção seletiva das 1,n-alcanodiaminas e obtenção das aminas protegidas 20a-e	141
6.2.4. Procedimento geral para a síntese tetracomponente das (n-(2,4,5-trifenil-1 <i>H</i> -imidazol-1- il)alquil)carbamato de <i>tert</i> -butila (21a-e)	143
6.2.5. Procedimento geral para a desproteção de 21a-e e obtenção das n-(2,4,5-trifenil-1 <i>H</i> - imidazol-1-il)alcanaminas 9a-e	146
6.2.6. Procedimento para a síntese da 6-metil-2-oxo-4-fenil-1,2,3,4-tetraidropirimidina-5- carboxilato de etila (7) (Reação de Biginelli)	150
6.2.7. Procedimento para a obtenção da 2-cloro-4-metil-6-fenil-pirimidina-5-carboxilato de etila (6)	151
6.2.8. Procedimento geral para a síntese dos híbridos tacrina(n)-pirimidinas (43a-c) e lofina(n)- pirimidinas (44a-c)	152
6.2.9. Síntese dos tosilatos derivados de carboidratos	156
6.2.10. Procedimento geral para a síntese dos híbridos tacrina(n)-carboidratos e lofina(n)- carboidratos	159
6.3. Análise de Inibição das Colinesterases	172

6.4. Estudos de Modelagem Molecular	173
APÊNDICE	175
Apêndice A: Estruturas dos Aminoácidos	175
Apêndice B: Modelagem Molecular	176
Apêndice C: Espectros de RMN dos Compostos Sintetizados	180
Apêndice D: Espectros de IV dos Compostos Inéditos	257
REFERÊNCIAS	274

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Fármacos aprovados para o tratamento da doença de Alzheimer.	3
Figura 2. Ação do bis-tacrina nos dois sítios da enzima acetilcolinesterase.	4
Figura 3. Compostos sintetizados pelo nosso grupo com atividade anticolinesterase.	5
Figura 4. a) clivagem da proteína APP gerando o peptídeo A β ; b) comparação da proteína tau associada aos microtúbulos (acima) e hiperfosforilada (abaixo). Créditos da imagem: Shutterstock®	12
Figura 5. Estrutura do neurotransmissor acetilcolina (à esquerda) e representação esquemática da sinapse química entre dois neurônios (à direita). Figura extraída do livro <i>Princípios de Bioquímica de Lehninger</i> , 6ª ed., pg. 466.	15
Figura 6. a) Estrutura do monômero da <i>Mm</i> AChE com destaque para o sítio ativo (azul claro) e o domínio WAT em hélice α ; b) Vista de cima da estrutura tetramérica da <i>Mm</i> AChE, com cada monômero representado por uma cor, o sítio ativo em azul claro, a Ser203 da tríade catalítica em verde e os domínios WAT ao centro, circundando o PRAD; c) e d) Representação esquemática da ancoragem da AChE em células neuronais via PRiMA (c) e em lâmina basal via ColQ (d).	18
Figura 7. a) Cavidade do sítio ativo da AChE, onde a linha pontilhada representa o espaço disponível, mais estreito na entrada; b) Representação do complexo ES antes de reagir: interação cátion- π com Trp84 e LH com Gly118-119.	20
Figura 8. a) Visão geral do sítio ativo da AChE destacando as portas alternativas com os caminhos de saída indicados por flecha, indicando a saída de tiocolina. Figura obtida a partir de fotos instantâneas da tiocolina obtidas na dinâmica molecular do trabalho de Xu <i>et al.</i> ; b) Posições do Trp84, Trp432, Tyr442 e da TCh obtidas a partir da conformação nativa (verde) e a instantâneos obtidos a partir da dinâmica molecular em 4,2 ns (azul) e 17,1 ns (violeta)	24
Figura 9. Ésteres hidrolisados pela enzima butirilcolinesterase (BuChE).....	26
Figura 10. Superposição das estruturas da <i>Tc</i> AChE (PDB ID 2CKM, azul claro) e <i>h</i> BuChE (PDB ID 4BDS, verde) com o substrato acetilcolina, obtidas do <i>docking</i> pela equipe colaboradora do LNCC.....	27
Figura 11. Derivados da tacrina (a) e da 7-metóxi-tacrina, 7-MEOTA (b).....	32
Figura 12. Comparação da conformação nativa (azul claro), com a da enzima inibida (violeta) pelo bis(7)-tacrina (verde, à esquerda) e o bis(5)-tacrina (verde, à direita).....	33

Figura 13. a) Híbridos tacrina-tianeptina; b) Representação da estrutura inibidor-enzima (acima) e os modos de ligação do enantiômero híbrido ($n = 3$, $X = Cl$) com os aminoácidos (abaixo), obtidos <i>in silico</i>	40
Figura 14. Derivados imidazólicos: a) lofina e fármacos comercializados; b) testados como inibidores de colinesterase.	42
Figura 15. a) derivados de Hantzsch; b) derivados de Biginelli.	46
Figura 16. Interações do composto AAP1 na <i>TcAChE</i> : a) representação 2D; b) adaptada da figura do <i>docking</i> do trabalho de Ahmad <i>et al.</i>	47
Figura 17. Interações do composto AAP2 na <i>TcAChE</i> : a) representação 2D; b) adaptada da figura do <i>docking</i> do trabalho de Ahmad <i>et al.</i>	48
Figura 18. Representação esquemática das interações CH/ π da β -D-galactose (esquerda) e α -D-galactose (direita) com o anel indólico. As ligações C-H axiais estão destacadas em azul. 51	
Figura 19. Relação entre a superfície de potencial eletrostático (ESP) da D-galactose e a formação de interações CH/ π : A) estrutura tridimensional; B) ESP, onde as regiões em azul são as áreas com menor densidade eletrônica; C) representação das interações com anéis aromáticos.	51
Figura 20. Produtos naturais derivados de carboidratos com atividade anti-A β	53
Figura 21. Produtos naturais derivados de carboidratos com atividade anticolinesterase.....	54
Figura 22. Derivados de carboidratos contendo selênio: a) selenoureidoiminoaçúcares inibidores da AChE; b) selenocarbohidratos sintetizados pelo grupo de Lüdtke.	56
Figura 23. Iminoaçúcares de Decrooq <i>et al.</i> a) inibidores da AChE e da BuChE; b) inibidores seletivos da BuChE.....	57
Figura 24. Espectro de RMN de 1H ($CDCl_3$, 300 MHz) da 9-cloro-1,2,3,4-tetraidroacridina (5), com ampliação entre 7,40 e 8,15 ppm (acima e à esquerda).....	62
Figura 25. Espectro de RMN de 1H ($CDCl_3$, 300 MHz) da amina 1a , com ampliação entre 7,3 e 8,0 ppm (acima e à esquerda) e entre 1,4 e 1,8 ppm (acima e à direita).	64
Figura 26. Espectro de RMN de 1H ($DMSO-d_6$, 300 MHz) do composto 21c , com ampliação entre 6,6 e 8,2 ppm (acima e à esquerda).....	70
Figura 27. Espectro de RMN de 1H ($CDCl_3$, 300 MHz) do composto 9c , com ampliação entre 7,0 e 7,8 ppm (acima e à esquerda).	70
Figura 28. Espectro de RMN de 1H ($DMSO-d_6$, 300 MHz) da DHPM 7	73
Figura 29. Rotas possíveis para o mecanismo da reação de Biginelli: a) rota do íon imínio; b) rota da enamina; c) rota Knoevenagel.	74

Figura 30. Comparação dos espectros de RMN de ^1H da DHPM 7 , acima em verde (DMSO- <i>d</i> ₆ , 300 MHz), com o do produto de oxidação 26 , abaixo em vermelho (CDCl ₃ , 300 MHz).	.79
Figura 31. Comparação dos espectros de RMN de ^1H da DHPM 7 , acima em verde (DMSO- <i>d</i> ₆ , 300 MHz), com o do produto de oxidação 26 , no meio em vermelho (CDCl ₃ , 300 MHz) e do produto de cloração, a pirimidina 6 , abaixo em azul (CDCl ₃ , 300 MHz).....	80
Figura 32. Comparação dos espectros de RMN de ^{13}C (APT) da DHPM 7 , acima em verde (DMSO- <i>d</i> ₆ , 75 MHz), com a da pirimidina 6 , abaixo em azul (CDCl ₃ , 75 MHz).	81
Figura 33. a) Estrutura do híbrido 43a com carbonos numerados; b) ampliação do espectro de RMN de ^1H (CDCl ₃ , 300 MHz) de 43a entre 7,2 e 8,0 ppm e c) entre 1,0 e 5,4 ppm.	84
Figura 34. a) Estrutura do híbrido 43a com carbonos numerados; b) Espectro de RMN de ^{13}C (APT, CDCl ₃ , 75 MHz) do híbrido 43a , ampliação entre 115 e 170 ppm e c) 10 e 70 ppm. ...	86
Figura 35. a) Ampliação do RMN bidimensional ^1H - ^{13}C HSQC do híbrido 43a na região dos aromáticos e comparação com o APT da amina 1a (à direita) para identificação dos carbonos; b) Ampliação do HSQC do híbrido 43a na região dos alifáticos.....	87
Figura 36. Espectro de RMN de ^1H (CDCl ₃ , 300 MHz) do híbrido 43a (acima) e 44a (abaixo). Em negrito estão destacados os hidrogênios do núcleo pirimidina.	88
Figura 37. Espectro de RMN de ^{13}C (APT, CDCl ₃ , 75 MHz) do híbrido 43a (acima) e 44a (abaixo). Em negrito estão destacados os carbonos do núcleo pirimidina.	89
Figura 38. Espectro HMQC do híbrido lofina(6)-pirimidina 44a , ampliação na região dos a) aromáticos e b) alifáticos. Em negrito estão destacados os C e H do núcleo pirimidina.	90
Figura 39. Espectros de IV (pastilha de KBr) dos híbridos tacrina(6)-pirimidina (43a , acima) e lofina(6)-pirimidina (44a , abaixo).....	91
Figura 40. Carboidratos naturais precursores dos tosيلات utilizados neste trabalho.	92
Figura 41. Panorama geral dos rendimentos obtidos para os híbridos sintetizados.	100
Figura 42. Proposta de formação de uma ligação de hidrogênio no estado de transição da S _N 2 no anel da a) D-galactose e b) D-xilose. Essa interação é observada no produto (à direita)...	103
Figura 43. a) Estrutura do híbrido tacrina(6)-D-xilose (54c); b) Espectro de RMN de ^1H (CDCl ₃ , 300 MHz) de 54c , destacando ampliações; e c) Ampliação entre 2,3 e 4,6 ppm.	106
Figura 44. Espectro de RMN bidimensional homonuclear ^1H - ^1H -COSY (CDCl ₃ , 300 MHz) do híbrido tacrina(6)-D-xilose (54c), ampliação entre 1,0 e 6,0 ppm.....	107
Figura 45. Comparação dos espectros de RMN de ^1H (CDCl ₃ , 300 MHz) dos híbridos tacrina-(n = 6)carboidratos, D-xilose (54c , acima), D-ribose (55a , meio) e D-galactose (56a , abaixo). Ampliações entre 1,2 e 6,4 ppm.	109

Figura 46. Comparação dos espectros de RMN de ^{13}C (CDCl_3 , 75 MHz) dos híbridos tacrina-(n = 6)carboidratos, D-xilose (54c , acima), D-ribose (55a , meio) e D-galactose (56a , abaixo). Ampliações entre 60 e 165 ppm.	110
Figura 47. Ampliações na região dos alifáticos dos espectros bidimensionais ^1H - ^{13}C -HMQC dos híbridos de tacrina e a) xilose (54c); b) ribose (55a); e c) galactose (56a).	111
Figura 48. Espectro de RMN de ^1H (CDCl_3 , 300 MHz) do híbrido tacrina(6)-D-xilose (54c , acima) e lofina(6)-D-xilose (57c , abaixo).	112
Figura 49. Espectros de IV (pastilha de KBr) dos híbridos tacrina(6)-xilose (54c), tacrina(6)-ribose (55a), lofina(6)-xilose (57c) e tacrina(6)-galactose (56a).	113
Figura 50. Estrutura do híbrido tacrina(6)-pirimidina (43a) nas formas a) bidimensional e b) tridimensional. Os átomos de H não são mostrados na Figura 3D.	116
Figura 51. Comparação das estruturas 2D (à esquerda) e 3D (à direita) do núcleo pirimidina (a) e di-hidropirimidinona (DHPM, b). Os átomos de H não são mostrados na Figura 3D. ...	117
Figura 52. Sobreposição dos resultados de <i>docking</i> dos híbridos tacrina(6)-D-xilose (54c , rosa), tacrina(6)-D-ribose (55a , amarelo) e tacrina(6)-D-galactose (56a , verde) na TcAChE: A) Modos de ligação previstos na cavidade do sítio ativo da AChE; B) Interação do núcleo carboidrato no PAS; C) Sobreposição dos híbridos 55a e 56a com o inibidor co-cristalizado com a TcAChE (PDB ID 1ZGC).	126
Figura 53. Representação das ligações CH/ π previstas, em linhas tracejadas em rosa, para os núcleos carboidratos dos híbridos com espaçador hexametilênico (54c , 55a e 56a).	127
Figura 54. Resultados de <i>docking</i> dos híbridos tacrina(n)-D-xilose (54a , n = 4, roxo), (54b , n = 5, azul-claro), (54c , n = 6, rosa), (54d , n = 7, verde-escuro) e (54e , n = 8, cinza) na TcAChE.	128
Figura 55. Resultado de <i>docking</i> do híbrido tacrina(6)-D-galactose (56a) na TcAChE (A) e na hBuChE (B).	129
Figura 56. Resultado de <i>docking</i> do composto lofina(5)-D-xilose (57b) na TcAChE (A) e na hBuChE (B).	130
Figura 57. Interação entre o núcleo lofina do inibidor 57b com o Trp231 (no CAS) e a ponte salina entre o NH protonado ligado ao núcleo D-xilose e o Asp70 na enzima hBuChE.	131
Figura 58. Resultado de <i>docking</i> do composto lofina(6)-D-galactose (59a) na enzima hBuChE: (A) visão de cima da cavidade do sítio ativo; (B) interação do inibidor 59a com resíduos de aminoácidos na entrada da cavidade da hBuChE.	132

ÍNDICE DE ESQUEMAS

Esquema 1. Síntese dos dímeros bis(n)-tacrina por Pang e colaboradores.	4
Esquema 2. Mecanismo de hidrólise da ACh pela enzima <i>TcAChE</i> : a) acilação e b) desacilação.	22
Esquema 3. Mecanismo de hidrólise da heroína pela enzima <i>hBuChE</i>	28
Esquema 4. Hidrólise da cocaína pela enzima <i>BuChE</i>	29
Esquema 5. Síntese da tacrina via reação de Friedländer.	30
Esquema 6. Destino metabólico da tacrina na mitocôndria das células hepáticas.	31
Esquema 7. a) Reação de Radziszewski para a síntese da lofina; b) Síntese dos híbridos tacrina-lofina pelo nosso grupo de pesquisa.	43
Esquema 8. Síntese dos dímeros bis(n)-lofina.	44
Esquema 9. Esquema genérico da reação de Biginelli.	44
Esquema 10. Síntese dos organosselênios derivados de Biginelli com atividade anti-AChE, obtidos pelo grupo de A. L. Braga.	49
Esquema 11. Nucleosídeos de purina sintetizados por Schwarz e colaboradores.	55
Esquema 12. Análise retrossintética para a obtenção dos híbridos baseados em tacrina.	59
Esquema 13. Análise retrossintética para a obtenção dos híbridos baseados em lofina.	60
Esquema 14. Reação de Niementowski para obtenção da 9-cloro-1,2,3,4-tetraidroacridina (5).	60
Esquema 15. Proposta de mecanismo para a síntese da 9-cloro-1,2,3,4-tetraidroacridina (5).	61
Esquema 16. Síntese dos intermediários 9-aminoalquil-1,2,3,4-tetraidroacridinas (1a-e).	63
Esquema 17. Mecanismo de formação das 9-aminoalquil-1,2,3,4-tetraidroacridinas (1a-e).	63
Esquema 18. Tentativa de obtenção das aminas de interesse via <i>one-pot</i>	65
Esquema 19. Proteção seletiva das 1,n-alcanodiaminas.	66
Esquema 20. Reação tetracomponente para síntese das aminas 21a-e	66
Esquema 21. Proposta de mecanismo da reação tetracomponente.	67
Esquema 22. Remoção do grupo Boc e obtenção das aminas 9a-e	68
Esquema 23. Rota sintética para obtenção de 2-aminopirimidinas proposta por Singh <i>et al.</i> ..	71
Esquema 24. Reação de Biginelli para obtenção da DHPM 7	72
Esquema 25. Proposta de mecanismo da reação de Biginelli para obtenção da DHPM 7	75
Esquema 26. Oxidação da DHPM 7	76

Esquema 27. Proposta de mecanismo da oxidação da DHPM via radicalar, de acordo com Memarian e Farhadi.....	78
Esquema 28. Síntese da 2-cloro-6-metil-4-fenilpirimidina-5-carboxilato de etila (6).....	79
Esquema 29. Proposta de mecanismo via S _N Ar para a formação de 2-aminopirimidinas 27 .	82
Esquema 30. Síntese dos híbridos de interesse contendo a) tacrina (43a-c) e b) lofina (44a-c).	82
Esquema 31. Proteção das hidroxilas da D-xilose.....	93
Esquema 32. Proposta mecanística para formação do bis-acetonídeo 51 a partir da D-xilose.	94
Esquema 33. Hidrólise do bis-acetonídeo 49 seguida da tosilção da hidroxila primária e obtenção do tosilato da D-xilose (45).	94
Esquema 34. Obtenção do tosilato da D-ribose (46).	95
Esquema 35. Obtenção do tosilato da D-galactose (47).	95
Esquema 36. Primeira tentativa de síntese do híbrido tacrina(6)-xilose (54c).	96
Esquema 37. Síntese dos híbridos derivados de carboidratos: a) tacrina-(n)-D-xilose (54a-e); b) tacrina(n)-D-ribose (55a e 55b); e c) tacrina(n)-D-galactose (56a e 56b).	98
Esquema 38. Síntese dos híbridos derivados de carboidratos: a) lofina-(n)-D-xilose (57a-e); b) lofina(n)-D-ribose (58a e 58b); e c) lofina(n)-D-galactose (59a e 59b).	99
Esquema 39. Mecanismo via S _N 2 para a substituição da amina no tosilato da D-galactose (47) e a representação do efeito estereoeletrônico no ET.	101
Esquema 40. Mecanismo via S _N 2 para o tosilato da a) D-ribose (46) e b) D-xilose (45).	102
Esquema 41. Tentativas de desproteção das hidroxilas do híbrido a) tacrina(6)-xilose (54c) e b) lofina(7)-ribose (58b).	115

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1. Principais aminoácidos da enzima acetilcolinesterase, suas funções na catálise e as principais interações descritas com o núcleo tacrina.	35
Tabela 2. Híbridos baseados em tacrina descritos na literatura.	36
Tabela 3. Condições testadas para a síntese dos híbridos tacrina-lofina	43
Tabela 4. Condições de desproteção testadas de acordo com o Esquema 22.	68
Tabela 5. Condições testadas de acordo com o Esquema 26.	76
Tabela 6. Otimização do tempo de reação dos híbridos tacrina-carboidratos.	97
Tabela 7. Testes com KI para obtenção dos híbridos derivados de carboidratos.....	104
Tabela 8. Atividade anticolinesterase dos híbridos tacrina-carboidratos.	118
Tabela 9. Atividade anticolinesterase dos híbridos lofina-carboidratos.....	121
Tabela 10. Perfil farmacocinético obtido <i>in silico</i> para os híbridos tacrina-carboidratos.	133

LISTA DE ABREVIATURAS

LH - Ligação de Hidrogênio

DA - Doença de Alzheimer

ChE - Enzimas Colinesterases

ChEI - Inibidore(s) de Colinesterase(s)

AChE - Acetilcolinesterase

BuChE - Butirilcolinesterase

ACh - Acetilcolina

CAS - Sítio Catalítico Ativo

PAS - Sítio Aniônico Periférico

A β - beta-amilóide

IC₅₀ - Concentração necessária para inibir 50% da atividade enzimática

BASE-1 - Enzima β -secretase

APP - Proteína Precursora Amilóide

ApoE - Alipoproteína E; ApoE4 (gene)

PSEN - Proteína Presenilina; *PSENI* e *PSEN2* (genes)

ES - Complexo Enzima-Substrato

RMN - Ressonância Magnética Nuclear

IV - Infravermelho

TMS - Tetrametilsilano

Nota: A lista com a estrutura e as respectivas abreviaturas dos aminoácidos encontra-se disponível no Apêndice A (pág. 175).

RESUMO

A melhora da capacidade cognitiva através da utilização de um inibidor reversível das enzimas colinesterases (ChEI) consiste atualmente na principal estratégia terapêutica para o tratamento sintomático da doença de Alzheimer (DA), para a qual ainda não existe cura. No contexto da busca por novos fármacos mais eficientes e com menos efeitos colaterais que os disponíveis no mercado, protótipos análogos aos fármacos anti-Alzheimer têm sido estudados na literatura, contendo principalmente derivados da tacrina. Compostos híbridos combinando dois núcleos bioativos conectados por uma cadeia alquílica espaçadora permitem uma dupla ação no sítio ativo das colinesterases, interagindo no sítio catalítico (CAS) e no periférico (PAS) da acetilcolinesterase (AChE) e da butirilcolinesterase (BuChE).

Neste trabalho, a síntese dos compostos de interesse envolveu a preparação prévia dos núcleos separados na forma de derivados nucleofílicos e eletrofílicos. O núcleo tacrina foi obtido através de protocolos existentes na literatura, sintetizado na forma de 9-alquilaminotacrinas. O núcleo lofina foi preparado na forma de 9-alquilaminolofinas inéditas, cuja etapa chave foi a obtenção do núcleo imidazólico através de uma reação tetracomponente. Na sequência foram obtidos os híbridos tacrina-pirimidina e lofina-pirimidina, contendo o núcleo pirimidina derivado da reação de Biginelli. Esses compostos não apresentaram a atividade esperada, provavelmente devido a uma repulsão estereoeletrônica na molécula que dificultou a interação com as enzimas AChE e BuChE. Duas séries de híbridos derivados de carboidratos foram obtidas em poucas etapas a partir dos precursores naturais D-xilose, D-ribose e D-galactose, contendo as hidroxilas protegidas pelo grupo acetonídeo. Os híbridos tacrina-carboidratos inibiram ambas as enzimas AChE e BuChE na escala nanomolar de concentração, com maior afinidade pela AChE. Já os híbridos lofina-carboidratos foram amplamente seletivos para a BuChE. Os estudos de modelagem molecular mostraram que o uso da cadeia espaçadora adequada permitiu a dupla interação enzimática, com posicionamento ótimo dos núcleos no CAS e no PAS da AChE e da BuChE. Os núcleos glicosídicos atuam no PAS da AChE via interações CH/ π , ligações de hidrogênio e interações hidrofóbicas com as metilas do grupo acetonídeo. Considerando o baixo número de etapas para a síntese, a alta potência inibitória e a biocompatibilidade, os derivados de carboidratos sintetizados neste trabalho são potenciais candidatos à aplicação no tratamento paliativo da doença de Alzheimer.

ABSTRACT

Cholinesterases inhibitors (ChEI) remain the most effective therapeutic approach for the symptomatic treatment of Alzheimer's disease (AD) for which there is still no cure. In the quest of search for new drugs with improved efficacy and less side effects, several Alzheimer's drug analogues, especially tacrine derivatives, have been synthesized and studied in the recent years. Alkylene-linked hybrids containing two bioactive moieties provide a double interaction with both catalytic site (CAS) and peripheral site (PAS) of acetylcholinesterase (AChE) and butyrylcholinesterase (BuChE).

In this work, the synthesis of desired hybrids required previous preparation of all nuclei as nucleophilic and electrophilic derivatives. Tacrine nucleus was obtained as 9-aminoalkyl-tacrines, according to previous literature protocols. The key step for synthesis of lophine derivatives was the four-component reaction to obtain the imidazole ring in the 9-aminoalkyl-lophines. With this in hand, the lophine-pyrimidine and tacrine-pyrimidine were synthesized, containing pyrimidine nucleus derived from Biginelli reaction. Two series of natural-based carbohydrate hybrids from D-xylose, D-ribose and D-galactose were obtained, with sugar moiety protected by acetonide group. Tacrine-carbohydrates hybrids were found to be potent inhibitors of both AChE and BuChE in the nanomolar concentration scale, with more affinity for AChE. The lophine-carbohydrate hybrids were strongly selective for BuChE. Molecular modeling studies predict that the alkylene linker enables the correct positioning of the two moieties with CAS and PAS to allow optimal interactions with the binding cavity. Moreover, the glycosyl moieties interact with PAS via CH/ π , hydrogen bonds and hydrophobic interactions through their methyl groups of acetonide. Considering the short synthesis, the high inhibitory potency and the biocompatibility, the carbohydrate-based hybrids synthesized in this work are potential candidates for the treatment of Alzheimer's disease.

Capítulo 1

Introdução

1. INTRODUÇÃO

O mal de Alzheimer ou doença de Alzheimer (DA) é uma patologia neurodegenerativa que causa perda progressiva e irreversível das funções cognitivas, sendo a forma mais comum de demência entre idosos. Segundo estimativas da organização internacional para a DA (ADI - *Alzheimer Disease International*), em 2015 cerca de 46 milhões de pessoas possuíam a doença no mundo e os casos devem ultrapassar 140 milhões até 2050.¹ A DA ainda não possui cura nem um medicamento eficaz, possuindo apenas tratamentos sintomáticos e paliativos. Ainda sem causa conhecida, o principal fator de risco associado é a idade avançada. Entretanto, outros fatores como hipertensão, depressão, diabetes e pouca atividade física e cognitiva também podem contribuir para o desenvolvimento da doença.² A importância socioeconômica do desenvolvimento de novos agentes terapêuticos para a DA supera os possíveis riscos e os custos de desenvolvimento. Somente nos Estados Unidos, entre 2010 e 2011, os prejuízos econômicos causados pela DA superaram os 215 bilhões de dólares. De acordo com relatórios recentes, a venda de drogas para o tratamento da doença de Alzheimer pode ter chegado a 8,3 bilhões de dólares em 2017.³

A melhora da capacidade cognitiva através da utilização de inibidores reversíveis das enzimas colinesterases (ChEI) consiste atualmente na principal estratégia terapêutica para o tratamento sintomático da DA. As enzimas colinesterases, acetilcolinesterase (AChE) e butirilcolinesterase (BuChE), são responsáveis por catalisar a hidrólise do neurotransmissor acetilcolina (ACh) nas sinapses colinérgicas do sistema nervoso central e nas junções neuromusculares. A utilização de ChEI permite a estimulação dos receptores de ACh prolongando a disponibilidade do neurotransmissor na fenda sináptica e melhorando os sintomas associados a DA.⁴ Atualmente, três dos quatro fármacos disponíveis no mercado para o tratamento da doença de Alzheimer são do tipo ChEI: Donepezil (Aricept®), (*S*)-Rivastigmina (Exelon®) e Galantamina (Razadyne®), Figura 1.⁵ Outro fármaco, a Memantina (Namenda XR®), é do tipo antagonista dos receptores de *N*-metil-D-aspartato (NMDA), que impede a ativação desses receptores pelo glutamato, evitando o influxo livre de Ca^{+2} e a consequente excitotoxicidade.^{6, 7} Entretanto, esse fármacos apresentam efeitos colaterais, tais como náusea, diarreia, perda de peso, tontura, dor de cabeça e cansaço.⁵

A tacrina (9-amino-1,2,3,4-tetraidroacridina, Figura 1) foi o primeiro fármaco aprovado nos Estados Unidos pela *Food and Drug Administration* (FDA) para o tratamento

sintomático da DA, em 1993. Apesar de ser um potente inibidor de ambas as enzimas AChE e BuChE, seu uso foi descontinuado devido aos efeitos colaterais, principalmente a hepatotoxicidade.

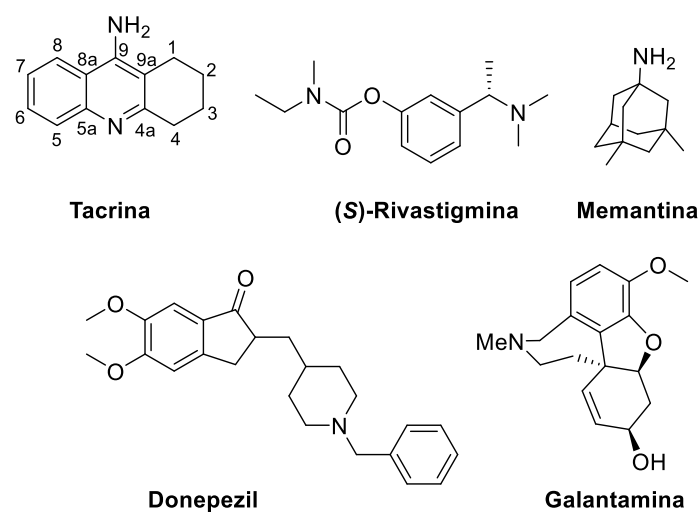
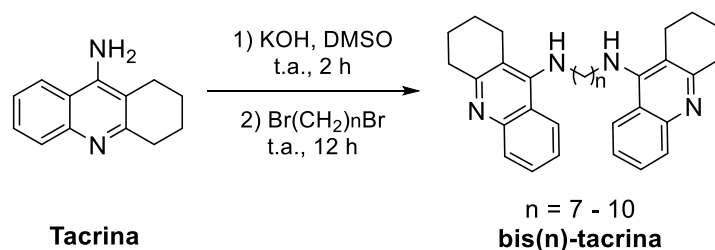


Figura 1. Fármacos aprovados para o tratamento da doença de Alzheimer.

No contexto da busca por novos fármacos mais eficientes e com menos efeitos colaterais que os disponíveis no mercado atualmente, protótipos análogos aos fármacos anti-Alzheimer têm sido sintetizados na literatura, contendo principalmente derivados da tacrina.⁸ Por sua facilidade de síntese e sua elevada afinidade com o sítio ativo da AChE, a tacrina é uma estrutura de referência, ainda amplamente empregada como núcleo na construção de novas moléculas com o objetivo de encontrar fármacos mais potentes e mais seguros.⁹ Após a obtenção da estrutura de raios-X da enzima AChE em 1991, confirmou-se que o sítio ativo consiste em uma profunda cavidade, incluindo dois sítios de ligação: o sítio catalítico ativo (CAS), no fundo da cavidade, e o sítio aniônico periférico (PAS), na entrada.¹⁰ Com base nisso, em 1996 Pang e colaboradores realizaram a síntese de compostos do tipo bis(n)-tacrina, moléculas com duas unidades do núcleo tacrina ligadas por uma cadeia espaçadora de carbonos metilênicos (Esquema 1). Eles propuseram que esses compostos seriam capazes de interagir em ambos os sítios da AChE e conseqüentemente seriam inibidores mais eficientes (Figura 2). De fato, as análises *in vitro* mostraram que os dímeros de tacrina são potentes inibidores da AChE, sendo que o bis(7)-tacrina foi mil vezes mais ativo que a tacrina.¹¹ Estudos conformacionais dos dímeros bis-tacrina indicaram que o espaçamento de sete carbonos metilênicos permite uma distância de 18 Å entre os átomos de nitrogênio de cada molécula de tacrina, bem próximo do valor de 16 Å entre o CAS e o PAS, determinado em

estudos computacionais.¹² O estudo feito por Pang com os dímeros bis(n)-tacrina também mostrou que o aumento da cadeia provoca diminuição da atividade biológica de inibição da AChE, observação que também foi feita com heterodímeros tacrina(n)-quinolina e tacrina(n)-piridina.¹³



Esquema 1. Síntese dos dímeros bis(n)-tacrina por Pang e colaboradores.

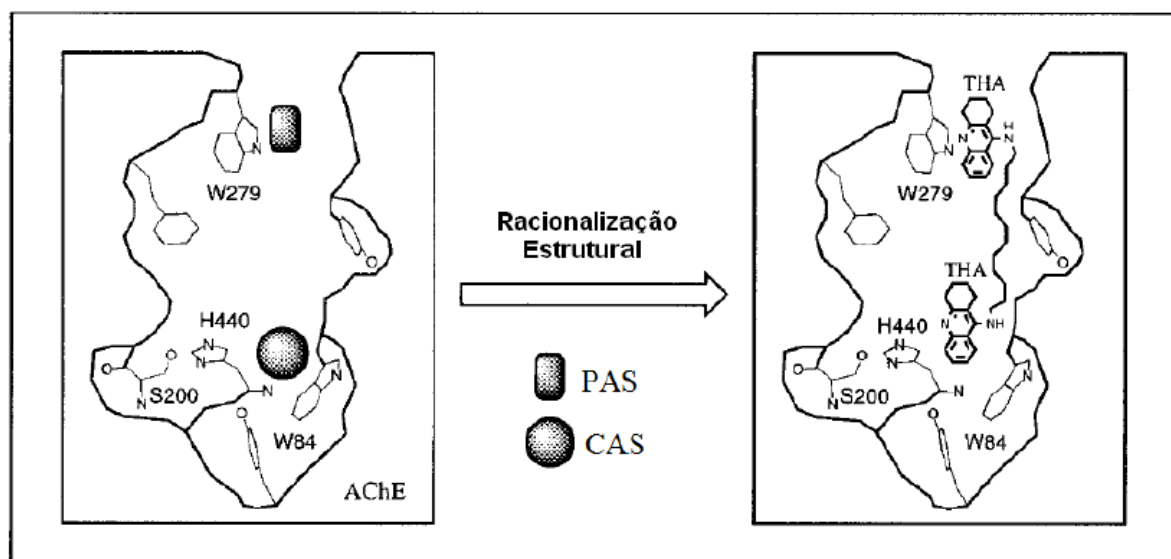


Figura 2. Ação do bis-tacrina nos dois sítios da enzima acetilcolinesterase. Adaptado do trabalho de Pang *et al.*¹¹

Devido à complexidade da doença de Alzheimer, por seu caráter multifatorial, há grande interesse da comunidade científica no *design* de moléculas multialvo, que possam interagir simultaneamente com diferentes fatores da doença, de maneira a impedir o seu progresso mais do que apenas mitigar seus sintomas.¹⁴ Híbridos contendo o núcleo tacrina conectado por uma cadeia metilênica a um outro núcleo bioativo têm sido estudados e têm se mostrado promissores como moléculas multialvo para o tratamento sintomático da DA.¹⁵ Recentemente nosso grupo de pesquisa obteve novos híbridos tacrina-tianeptina e tacrina-lofina, além de dímeros quirais do tipo bis-tacrina (Figura 3). Esses compostos mostraram-se potentes inibidores das enzimas AChE e BuChE, com IC₅₀ na escala nanomolar.^{16, 17, 18}

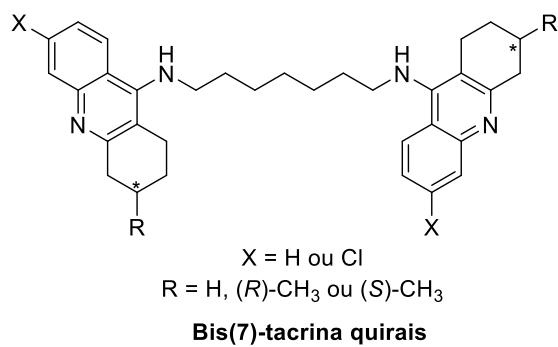
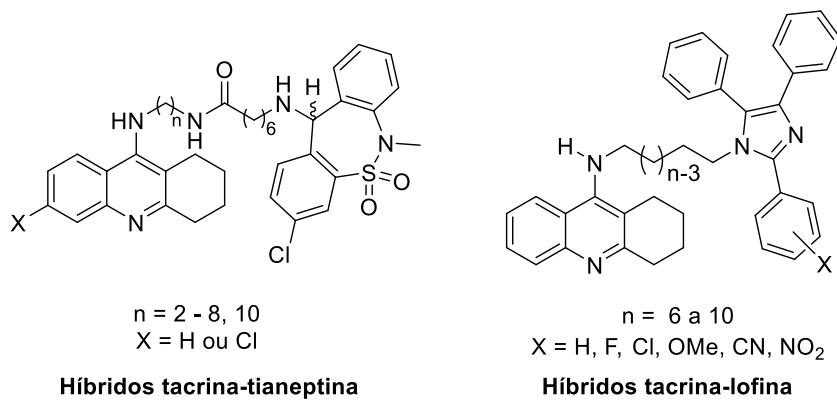


Figura 3. Compostos sintetizados pelo nosso grupo com atividade anticolinesterase.

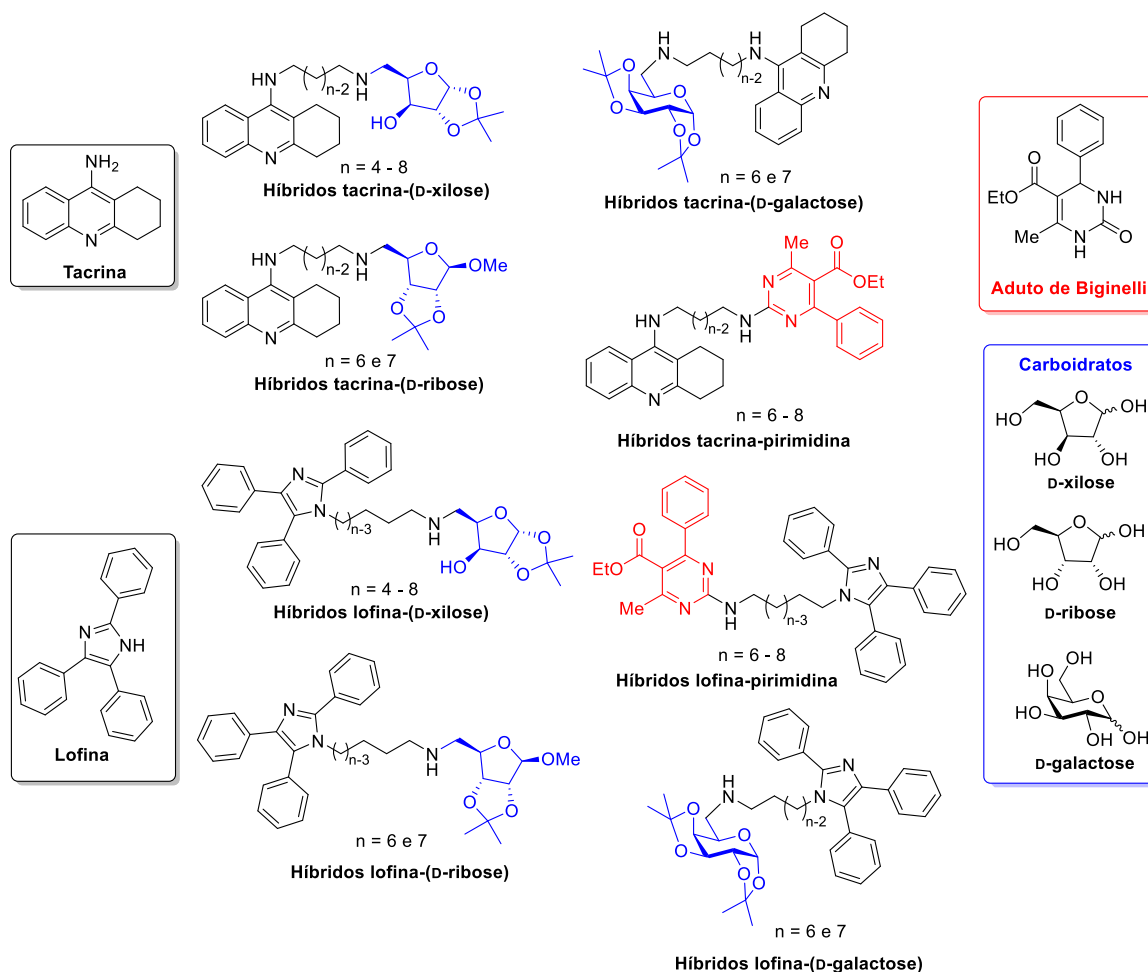
Capítulo 2

Objetivos

2. OBJETIVOS

Considerando a crescente busca por novos fármacos multialvo para o tratamento da doença de Alzheimer, este trabalho teve como objetivo principal a obtenção de novos híbridos inibidores de colinesterases. Pretendeu-se realizar a síntese de compostos baseados em tacrina e lofina, conectados por uma cadeia metilênica espaçadora aos núcleos: pirimidina, obtidos a partir da reação de Biginelli; e derivados dos carboidratos D-xilose, D-ribose e D-galactose.

Os objetivos específicos foram: (i) a utilização de uma metodologia tetracomponente, previamente desenvolvida no grupo para a obtenção dos intermediários contendo o núcleo lofina; (ii) o emprego da reação multicomponente de Biginelli para a síntese dos intermediários pirimidínicos; (iii) a preparação de intermediários contendo os núcleos tacrina e carboidratos, através de protocolos existentes na literatura; (iv) a síntese e a caracterização dos híbridos de interesse; (v) o envio das amostras dos produtos finais para a realização dos ensaios de inibição das enzimas AChE e BuChE; (vi) o envio das estruturas para estudos de modelagem molecular.



Capítulo 3

Revisão Bibliográfica

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1. A DOENÇA DE ALZHEIMER

3.1.1. Aspectos Gerais

A doença de Alzheimer (DA) foi descrita pela primeira vez em 1907 pelo médico psiquiatra e neuropatologista alemão Alois Alzheimer (1864-1915), que definiu em sua publicação como "uma desordem peculiar do córtex cerebral." Em 1901 a alemã Auguste Deter foi internada aos 51 anos em uma clínica psiquiátrica, apresentando os sintomas que hoje são associados a DA, tais como prejuízos crescentes de memória, alterações repentinas de humor, agressividade e perda das funções cognitivas. Auguste foi atendida por Alzheimer, que acompanhou a regressão mental da paciente até o óbito após quatro anos e meio. Após a morte da paciente, Alzheimer examinou amostras de seu encéfalo sob o microscópio e observou alterações nas neurofibrilas que servem de sustentação ao citoesqueleto celular e, em muitos lugares onde deveriam haver neurônios, haviam apenas feixes de fibrilas. Ele observou também o acúmulo entre as células de um produto patológico do metabolismo dos neurônios, o qual chamou de placa senil. Atualmente sabe-se que essas fibrilas observadas por Alzheimer são emaranhados neurofibrilares de uma proteína chamada tau, hiperfosforilada no interior das células, enquanto que as placas senis são agregados insolúveis de um peptídeo chamado beta-amilóide (A β).

Atualmente, existem dois tipos reconhecidos para a DA: a familiar ou de início precoce (FAD - *Familial Alzheimer's Disease*) e a de início tardio ou esporádica (LOAD - *Late Onset Alzheimer's Disease*), sendo a primeira mais rara e representante dentre 1% e 6% dos casos.⁵ Na FAD os sintomas manifestam-se antes dos 60 anos e a doença possui um forte componente genético, associado a mutações e polimorfismos nos genes *APP*, *PSEN1* e *PSEN2*, localizados nos cromossomos 21, 14 e 1, respectivamente, transmitidos de forma autossômica dominante.^{19, 20} Embora controverso na literatura, em 2013 um estudo envolvendo a extração do DNA do tecido cerebral de Auguste apontou para uma mutação no gene *PSEN1*, o que caracterizaria a DA familiar correspondente com idade na qual a paciente apresentou os sintomas.^{21, 22} A DA esporádica é a forma mais comum da doença, tendo como principal fator de risco a idade avançada. Nos últimos anos tem se fortalecido a teoria de que o gene ApoE4 seja o principal fator genético de risco ao desenvolvimento da DA, tanto a

familiar quanto a esporádica. A alipoproteína E (ApoE) é uma proteína plasmática produzida pelos astrócitos e é capaz de se ligar a lipídeos, sendo responsável pelo transporte de triglicerídeos, colesterol e fosfolipídios, os quais possuem vital importância para as sinapses.⁵

²³ Em seres humanos há três isoformas da ApoE: ApoE2, ApoE3, e ApoE4, que afetam de forma diferente a agregação do peptídeo beta-amilóide (A β).²⁴ Experimentos mostraram que a ApoE4 promove a fibrilogênese *in vivo* e *in vitro* do peptídeo A β .²⁵ De fato, tem sido observado que indivíduos com a variante ApoE4 tem predisposição para o acúmulo de placas, sendo que a posse de uma cópia do gene triplica o risco de desenvolver a DA, já um indivíduo que herdou duas cópias do gene tem 90% de risco de desenvolver a doença. A proeminência do gene ApoE4 na população varia entre 15 e 20%, sendo o ApoE3 o mais comum.²³ Entretanto, a herança do gene ApoE4 não é necessária nem suficiente para causar DA, ela apenas aumenta o risco, que é maior se associado a doença vascular periférica e diabetes tipo 2.²⁶

A dificuldade atual em se obter um diagnóstico preciso de Alzheimer em sua fase inicial, onde os sintomas ainda são inconclusivos e facilmente confundidos com sintomas naturais do envelhecimento, faz com que os tratamentos comecem sempre quando a doença já está em estágio de moderado a avançado. Além disso, o início da manifestação dos sintomas varia muito de pessoa para pessoa. Em pacientes que já manifestam os sintomas, principalmente problemas de memória, o diagnóstico diferencial é bastante amplo, podendo ser confundido com tipos de demência senil, disfunção vascular cognitiva, infecções, neuroinflamação e alterações metabólicas.²⁷ Atualmente, uma técnica utilizada para o diagnóstico da DA é a PET (Tomografia Computadorizada por Emissão de Pósitrons), onde um composto marcado com radioisótopo se liga às placas de A β , marcando-as e tornando possível identificar a quantidade e a área de deposição.²⁸ Três radioisótopos de flúor-18 (¹⁸F) foram aprovados pela FDA para uso no diagnóstico de Alzheimer com a PET: florbetapir, flutemetamol e florbetaben. Outro exame bastante utilizado é análise do líquido cefalorraquidiano, cuja composição na DA é diferente de outros tipos de demência, contendo altos níveis da proteína tau hiperfosforilada e baixos níveis da forma A β ₁₋₄₂ (discutido mais adiante), o que também pode indicar que o paciente é propenso a desenvolver a DA.²⁷ Um estudo de um grupo de pesquisa da Suécia, envolvendo um grupo de 146 pessoas saudáveis e 46 pessoas com comprometimento cognitivo leve (MIC - *mild cognitive impairment*) devido à doença de Alzheimer, mostrou que as duas técnicas podem detectar a DA em fase leve com alta precisão e que não há diferenças significativas nos resultados.²⁹

3.1.2. Características Patológicas e Hipóteses

Com base nas características patológicas observadas em cérebros de pacientes afetados pela doença de Alzheimer, as quais são comuns nos dois tipos da doença (familiar e tardia), diferentes hipóteses têm sido propostas com objetivo de direcionar a busca por um tratamento terapêutico eficaz. A presença de agregados do peptídeo A β e de emaranhados fibrilares da proteína tau são as principais características observadas, sendo que os níveis totais de A β observados aumentam em seis vezes no cérebro de pacientes comparado com o de pessoas saudáveis.^{30, 31} Os peptídeos A β são sintetizados nas células a partir da clivagem da proteína precursora amilóide (APP) em duas reações sequenciais, catalisadas pelas enzimas β -secretase (BASE-1) e γ -secretase (Figura 4a).³² Os agregados A β são formados por dois tipos de fragmentos: com 40 e 42 resíduos de aminoácidos, A β_{1-40} e A β_{1-42} respectivamente. Apesar do fragmento A β_{1-40} ser o mais comum, o A β_{1-42} é mais hidrofóbico e possui um maior potencial amiloidogênico, embora ambos sejam capazes de se agregar em oligômeros solúveis e em placas senis insolúveis.⁵ **A hipótese da cascata amilóide** originalmente descreve que a disfunção observada na DA é causada pelo acúmulo das placas senis A β . Contudo, pesquisas mais recentes têm confirmado que os oligômeros solúveis A β são os principais responsáveis em conduzir à interrupção das sinapses, com consequente morte dos neurônios e perda de memória.³³ Apesar dos efeitos nocivos da A β , estudos têm mostrado que tanto os peptídeos A β quanto a APP parecem possuir uma função fisiológica importante para a neuroplasticidade, promovendo a proliferação, a diferenciação e a transmissão sináptica de várias células.^{5, 33} A outra característica patogênica observada por Alois Alzheimer foi a presença de emaranhados neurofibrilares no lugar de onde deveriam haver neurônios, o que hoje se sabe serem da proteína tau, dando origem à **hipótese da proteína tau**. A tau é uma proteína responsável por promover a montagem e a estabilidade dos microtúbulos, essenciais para a manutenção do citoesqueleto celular (Figura 4b). Porém, em cérebros acometidos pela DA essa proteína sofre hiperfosforilação e consequente mudança de sua conformação nativa, o que leva ao seu desenrolamento dos microtúbulos e à morte do neurônio.^{33, 34}

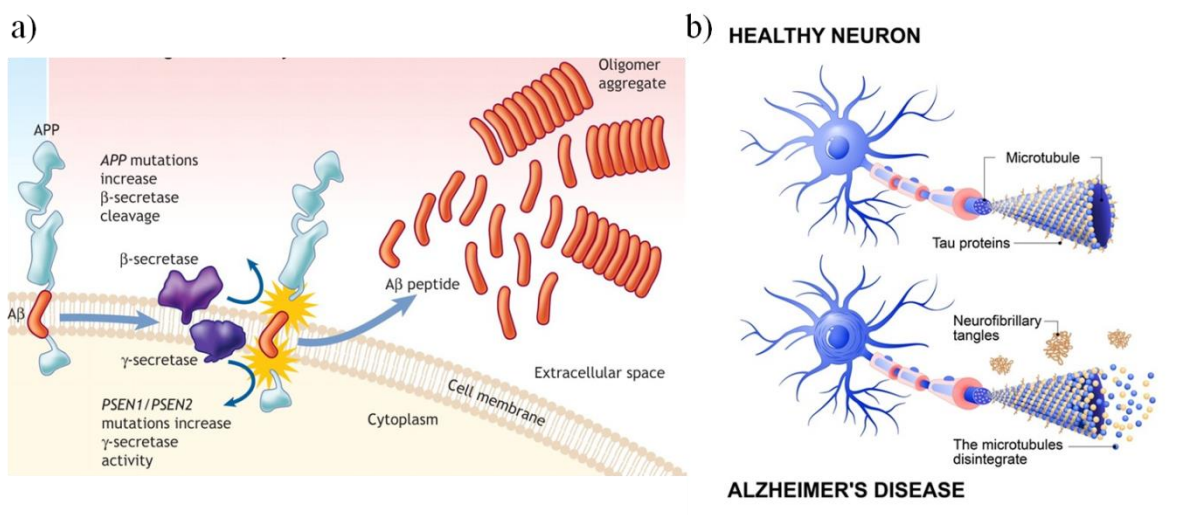


Figura 4. a) clivagem da proteína APP gerando o peptídeo Aβ. Adaptado do trabalho de Patterson *et al.*³²; b) comparação da proteína tau associada aos microtúbulos (acima) e hiperfosforilada (abaixo). Créditos da imagem: Shutterstock®.

Nos últimos anos, a imunoterapia com base nas hipóteses da proteína tau e da cascata amilóide tem despertado a atenção da comunidade científica devido aos bons resultados *in vitro*. Anticorpos, tais como o bapineuzumab e o solanezumab foram capazes de atravessar a barreira hematoencefálica e promover a limpeza das placas amilóides pelos astrócitos.³⁵ Entretanto, o solanezumab não apresentou melhora nos sintomas em pacientes e falhou na fase 3 dos testes clínicos.³⁶ O bapineuzumab é um anticorpo monoclonal que se liga a peptídeos amilóides tóxicos no cérebro, contribuindo para a sua remoção. Além disso, foi capaz de reduzir a concentração da proteína tau no líquido cefalorraquidiano, porém, essa ação não se traduziu em melhora clínica nos pacientes.³⁷ Além do mais, outras dificuldades têm afetado a busca por um protótipo promissor que atue diretamente na tau ou na Aβ, tais como a heterogeneidade dos agregados Aβ, a existência de outras proteínas envolvidas na patogênese da DA e a indisponibilidade de estruturas de alta resolução dos oligômeros de Aβ ou tau e suas interações na célula.³⁸ Compostos que inibem a enzima β-secretase (BASE-1), responsável por catalisar a clivagem da APP, apresentaram bons resultados em fases pré-clínicas, porém foram abandonados em fases clínicas II ou III.^{39, 40}

A hipótese dos metais propõe que o desequilíbrio dos mecanismos homeostáticos que compartimentalizam e regulam metais endógenos, como Cu^{+2} e Zn^{+2} , pode favorecer a formação de agregados Aβ através da atração e interação com resíduos de histidina dos mesmos, contribuindo para o desenvolvimento e o avanço da DA.⁴¹ Diversos estudos tem

revelado que o Cu^{+2} e Zn^{+2} competem pelos mesmos resíduos na $\text{A}\beta$, sendo que o Zn^{+2} possui uma contribuição maior para a agregação, enquanto que o Cu^{+2} promove mudanças conformacionais no peptídeo.⁵ Além disso, esses biometais possuem a capacidade de produzir espécies reativas de oxigênio (ERO) e de nitrogênio (ERN), contribuindo para o estresse oxidativo. Além do mais, é descrito na literatura o aumento na concentração de cobre, zinco e ferro em cérebros de pacientes com DA.⁴²

Além dos metais fisiológicos, a exposição prolongada a metais tóxicos tais como alumínio e mercúrio também contribui na patogênese da DA. O mercúrio é um metal tóxico bioacumulativo, que provoca danos ao sistema nervoso central. Há vários relatos na literatura associando a exposição ao mercúrio ao desenvolvimento de doenças neurodegenerativas, tais como Parkinson e Alzheimer.^{43, 44} Por exemplo, observou-se que ratos expostos a mercúrio tiveram dificuldades na formação dos microtúbulos do citoesqueleto neuronal. O mercúrio promoveu nos cérebros das cobaias a inibição do trifosfato de guanosina (GTP), impedindo a polimerização da tubulina, proteína que forma os microtúbulos.⁴⁵ Alguns estudos apontam para a exposição prolongada ao amálgama usado em próteses dentárias, que contém mercúrio na composição, o que poderia acelerar o processo de desenvolvimento da DA.^{44, 46} Vários estudos tem evidenciado que o alumínio induz o acúmulo de placas $\text{A}\beta$, além de promover disfunção mitocondrial, levando à apoptose neuronal, observada tanto em testes *in vitro* quanto em testes *in vivo*.⁴⁷ De uma forma geral, os metais exibem efeito tóxico no organismo pela ligação a proteínas transportadoras de Ca^{+2} , principal sinalizador bioquímico, impedindo e interferindo nos processos celulares.⁴⁴

A principal estratégia terapêutica baseada na hipótese dos metais é o sequestro desses metais através da utilização de agentes quelantes. O clioquinol, um derivado da 8-hidroxiquinolina que possui propriedades quelantes para metais como zinco, ferro e cobre, mostrou-se efetivo na inibição da formação de oligômeros $\text{A}\beta$ em ratos após tratamento oral por nove semanas. Contudo, além de alguns efeitos colaterais, complicações na produção em grande escala tem desmotivado pesquisas adicionais para seu uso no tratamento da DA.⁴¹ A maioria dos estudos envolvendo a hipótese dos metais é fundamentada em compostos cujo alvo é a hipótese colinérgica, isto é, inibidores de colinesterase cuja estrutura foi desenhada ou modificada para agir como quelante.

A **hipótese colinérgica** foi a primeira teoria proposta para a terapia da DA e postula que a perda das funções colinérgicas associada a morte neuronal contribui significativamente para o declínio cognitivo associado a idade avançada e aos sintomas da doença.^{48, 49}

Atualmente, três dos quatro fármacos disponíveis no mercado para o tratamento da doença de Alzheimer baseiam-se nessa hipótese, ou seja, são inibidores das enzimas colinesterase (Figura 1, pág. 3). Além disso, os melhores resultados obtidos até o momento envolvem compostos cuja estratégia inicial baseia-se na síntese de uma série de inibidores de colinesterases, seguida por modificações na estrutura dos compostos mais potentes com vias de atingir as características das outras hipóteses. Como tratou-se da base para o desenvolvimento deste trabalho, a hipótese colinérgica e será abordada em mais detalhes nas seções seguintes.

Existem ainda outras várias características observadas que não serão abordadas neste texto, tais como disfunções mitocondriais associadas ao **estresse oxidativo**, problemas no metabolismo do **colesterol**, associação entre a DA e o **diabetes**, entre outras.^{5, 33} A memantina, único fármaco aprovado até o momento que não age via inibição das colinesterases, atua como antagonista dos receptores NMDA (*N*-metil-D-aspartato), baseada na **hipótese glutamatérgica**. Ao se ligar aos receptores NMDA (NMDAr), a memantina impede a ligação do glutamato, seu agonista natural, o qual promove superestimulação dos NMDAr provocando a excitotoxicidade devido ao influxo excessivo de Ca^{+2} no meio intracelular.^{6, 7}

3.2. HIPÓTESE COLINÉRGICA E ENZIMAS COLINESTERASES

3.2.1. Mecanismo de transmissão colinérgica

A sinapse ocorre na região chamada fenda sináptica, um pequeno espaço entre o axônio de um neurônio pré-sináptico e um neurônio ou miócito pós-sináptico (Figura 5). Um potencial de ação gera uma despolarização na membrana celular, que se propaga através de abertura e fechamento de canais iônicos de sódio e potássio ao longo da membrana do axônio. Esse processo é conhecido como impulso nervoso, que ao atingir a região próxima à fenda sináptica promove a abertura de canais de cálcio, permitindo o influxo de íons Ca^{+2} . O aumento da concentração de Ca^{+2} na zona ativa induz a liberação da ACh na fenda sináptica. Uma vez liberada, a ACh liga-se a receptores específicos localizados na membrana da célula pós-sináptica, permitindo a passagem de íons Na^{+} e K^{+} , gerando um novo potencial de ação e propagando a transmissão da mensagem intercelular.⁵⁰

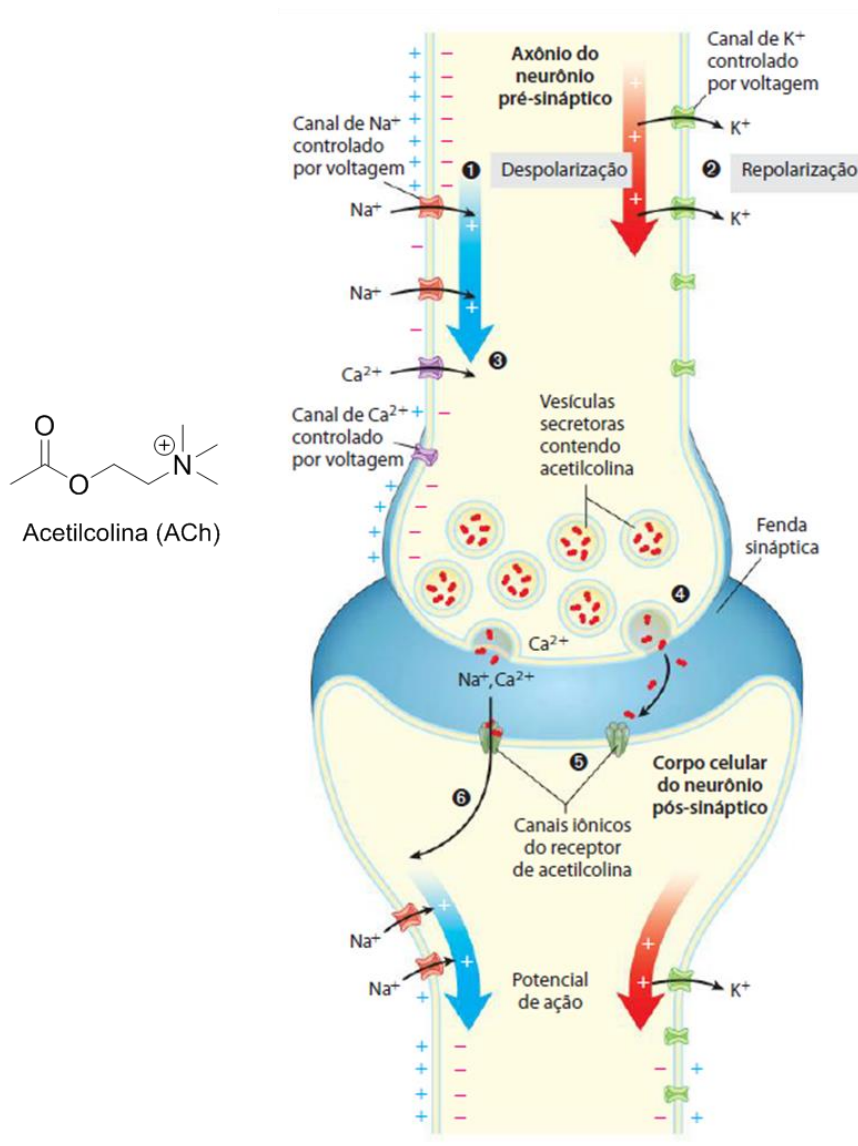


Figura 5. Estrutura do neurotransmissor acetilcolina (à esquerda) e representação esquemática da sinapse química entre dois neurônios (à direita). Figura extraída do livro *Princípios de Bioquímica de Lehninger*, 6ª ed., pg. 466.⁵⁰

As enzimas acetilcolinesterase (AChE, E.C.* 3.1.1.7) e butirilcolinesterase (BuChE, E.C. 3.1.1.8) são serino hidrolases que catalisam a reação de hidrólise de ésteres derivados de colina ou similares. A AChE atua seletivamente em acetilésteres e sua função fisiológica é a hidrólise do neurotransmissor acetilcolina (ACh) nas sinapses colinérgicas. Esse é um processo natural importante para evitar a dessensibilização, onde a superestimulação do receptor de ACh mantém o canal fechado apesar da contínua presença de ACh e esse estado

* O Número EC (*Enzyme Commission*) é uma classificação das enzimas de acordo com a reação catalisada, determinada pela União Internacional de Bioquímica e Biologia Molecular (IUBMB), podendo ser conferida no site: <http://www.sbc.sqmul.ac.uk/iubmb/enzyme/>.

pode persistir por muitos segundos mesmo após a remoção da ACh, podendo levar a falhas fatais nos processos cognitivos e paralisia cerebral.⁵¹ A intoxicação por inibidores irreversíveis da AChE, tais como os agentes de guerra organofosforados, promove esse processo ao impedir a hidrólise e a reciclagem da ACh.⁵² Entretanto, a utilização de inibidores reversíveis da AChE tem se demonstrado a estratégia terapêutica mais eficaz para o tratamento paliativo da doença de Alzheimer.⁴⁰

3.2.2. Acetilcolinesterase

A AChE é encontrada principalmente em junções neuromusculares, sistemas nervosos central e periférico, fibras colinérgicas e não colinérgicas e hemácias, sendo que sua atividade é maior nos neurônios motores e sensoriais.⁵³ Nas sinapses, encontra-se principalmente na forma tetramérica ancorada na membrana celular. A estrutura monomérica da AChE humana constitui-se em 543 aminoácidos arranjados em 12 folhas β centrais envolvidas por 14 hélices α , sendo classificada como um sanduíche α/β .^{54, 55} A estrutura da AChE tende a ser bem conservada entre as diferentes espécies, por exemplo a humana (*Homo sapiens*, *hAChE*) e a do camundongo (*Mus musculus*, *MmAChE*), possuem 88% de identidade e 97% de homologia na sequência de aminoácidos.^{55, 56} Em 1991, Sussman e colaboradores publicaram a primeira elucidação da estrutura tridimensional da AChE, através da cristalização do homodímero da enzima obtida da arraia elétrica do pacífico (*Torpedo californica*, *TcAChE*), utilizando análise de raios-X.¹⁰ A partir deste trabalho, aliados a novas estruturas cristalinas da AChE de várias espécies cristalizadas com inibidores, inúmeros estudos computacionais foram desenvolvidos e têm auxiliado o entendimento da estrutura detalhada da enzima, especialmente no sítio ativo, o que é fundamental para o planejamento racional de novos fármacos.^{57, 58} A *TcAChE* e a *hAChE* são as espécies mais estudadas da enzima do ponto de vista computacional e suas sequências de aminoácidos possuem 86% de homologia, com as posições de aminoácidos no sítio ativo quase idênticas. As diferenças entre as AChE de diferentes espécies são mostradas na Tabela 1, página 35.

A AChE tem sido purificada e isolada nas suas formas monomérica, dimérica e tetramérica, entretanto a forma tetramérica é a mais importante para a atividade catalítica em condições fisiológicas, sendo predominante em cérebros de mamíferos.^{59, 60} A estrutura

tetramérica da AChE é mantida por um domínio do monômero rico em triptofano,[†] chamado domínio de tetramerização anfifílico (WAT - *tryptophan amphiphilic tetramerization*), composto por 40 resíduos de aminoácidos e a extremidade C-terminal da proteína (Figura 6a). A interação entre cada domínio WAT de cada monômero estabiliza a estrutura quaternária (Figura 6b).⁶¹ Por sua vez, o tetrâmero da AChE é ancorado na membrana celular através de duas estruturas essenciais: o domínio de ligação rico em prolina (PRAD - *proline-rich attachment domain*) e a proteína de ancoramento à membrana (PRiMA - *proline-rich membrane-anchoring protein*) (Figura 6b e Figura 6c). A PRiMA é a proteína de ancoramento nas sinapses neuronais, enquanto que na sinapses onde há lâmina basal, como nas junções neuromusculares, a enzima é ancorada pela subunidade Q tipo colágeno (ColQ- *collagen-like Q subunit*) (Figura 6d).⁶² Estudos de cristalografia e cálculos computacionais mostraram que interações hidrofóbicas do tipo *stacking* entre o WAT e o PRAD, formando um complexo [(WAT)₄PRAD], estabilizam o ancoramento na membrana do tetrâmero da AChE do camundongo (Figura 6c-d).^{62, 63}

[†] As estruturas dos 20 aminoácidos mais comuns em proteínas estão disponíveis, junto com seus respectivos nomes e códigos, no Apêndice A (pág. 175).

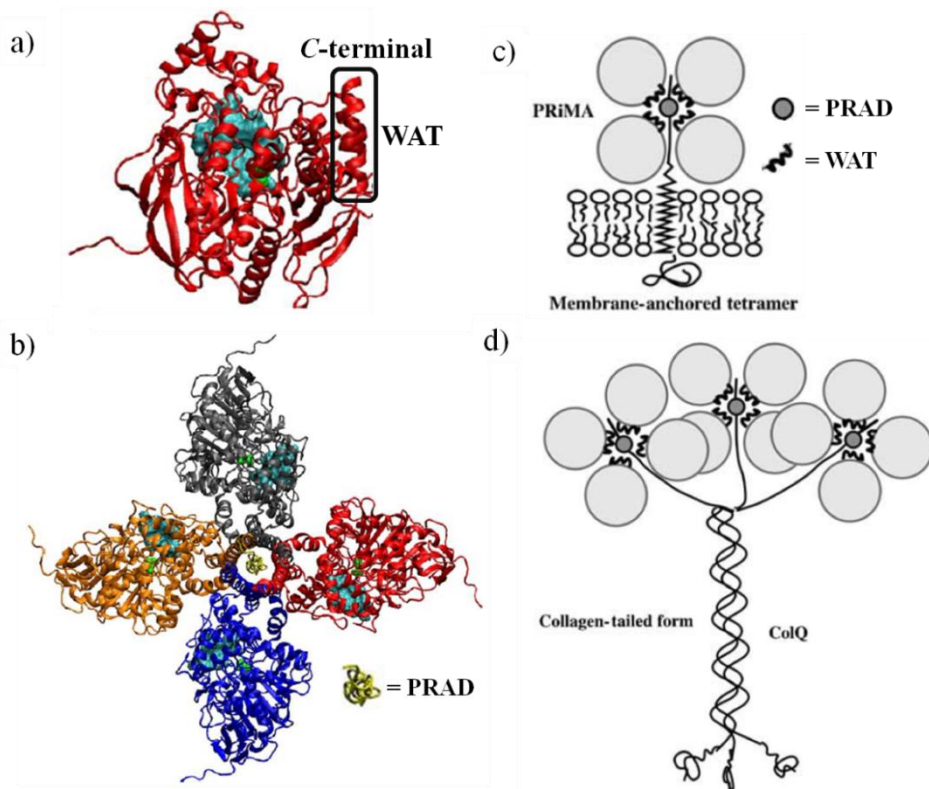


Figura 6. a) Estrutura do monômero da *MmAChE* com destaque para o sítio ativo (azul claro) e o domínio WAT em hélice α ; b) Vista de cima da estrutura tetramérica da *MmAChE*, com cada monômero representado por uma cor, o sítio ativo em azul claro, a Ser203 da tríade catalítica em verde e os domínios WAT ao centro, circundando o PRAD;⁶² c) e d) Representação esquemática da ancoragem da AChE em células neuronais via PRiMA (c) e em lâmina basal via ColQ (d).⁶³ Figuras adaptadas das referências citadas.

3.2.2.1. Mecanismo Catalítico da Acetilcolinesterase

O sítio ativo de cada unidade monomérica de AChE consiste em uma estreita e profunda cavidade de cerca de 20 Å de profundidade e possui dois sítios de ligação: sítio ativo catalítico (CAS - *catalytic active site*), no fundo da cavidade, e sítio aniônico periférico (PAS - *peripheral anionic site*), na entrada (Figura 7a).^{55, 64, 65} O mecanismo de hidrólise da acetilcolina pela AChE tem sido estudado antes mesmo da primeira cristalização e elucidação da estrutura tridimensional. Com base em evidências experimentais, em 1987 Daniel M. Quinn propôs que o mecanismo de hidrólise pode ser dividido em duas partes: **acilação** (ligação da acetilcolina na enzima e liberação da colina) e **desacilação** (liberação do de ácido acético e restabelecimento do sítio ativo).⁶⁶ A elucidação da estrutura tridimensional da *TcAChE* confirmou que a tríade catalítica é composta por Ser200, His440 e Glu327, similar à tríade de várias outras serino hidrolases, onde a serina é o nucleófilo.^{10, 67} Com a ampliação da

biblioteca[‡] de estruturas de AChE de diferentes espécies, cristalizadas com diferentes substratos e inibidores, aliado ao avanço da química computacional, diversos estudos de mecânica quântica e mecânica molecular têm possibilitado a melhor compreensão do mecanismo catalítico e da estrutura detalhada do sítio ativo.⁶⁸ Além dos três aminoácidos responsáveis diretamente pela atividade catalítica, o CAS possui aminoácidos estritamente posicionados para conferir alta seletividade para acetilésteres, restringindo o espaço para a hidrólise de ésteres volumosos no chamado **bolso acila**, composto por três fenilalaninas (Phe288, Phe290 e Phe331). A **cavidade do oxianion**, composta por duas glicinas (Gly118 e Gly119) e uma alanina (Ala201), todas posicionadas próximas ao nucleófilo (Ser200), doam ligação de hidrogênio (LH) a partir do NH da cadeia peptídica para os oxigênios do grupo acetil, tornando o carbono carboxílico mais suscetível ao ataque nucleofílico, como mostrado esquematicamente na Figura 7b.⁵⁵ Além disso, essas LH são fundamentais para manter a estabilidade dos intermediários tetraédricos formados em ambas as etapas, como mostrado mais adiante no Esquema 2. A acetilcolina é atraída para dentro da cavidade do sítio ativo através de atração eletrostática do grupo colina positivamente carregado pelo Asp72, um aminoácido negativamente carregado (Figura 7a, D72).⁶⁹ Vários resíduos de aminoácidos aromáticos, tais como Trp279, Tyr70, Tyr334, Tyr121 e Phe330 ajudam a "empurrar" a ACh para o fundo da cavidade, onde está o CAS. Um resíduo fundamental para concluir esse processo é o Trp84, localizado adjacente à tríade catalítica e responsável por atrair e acomodar o grupo colina via interação cátion- π , enquanto a tríade catalítica se encarrega de iniciar a reação. Essa região é conhecida como **subsítio aniônico**, pois o nome foi dado quando se acreditava que era um aminoácido negativamente carregado o responsável por essa função.^{55, 64}

A enzima AChE segue a cinética de Michaelis-Menten e seu mecanismo pode ser descrito dessa forma, onde inicialmente ocorre a formação do complexo enzima-substrato (ES), como mostrado a seguir na Figura 7b.

[‡] Todas as enzimas cristalizadas com ou sem substrato ou inibidor estão catalogadas no banco de dados PDB (*Protein Data Bank*), com um determinado código específico. Para mais detalhes: <http://www.rcsb.org/pdb>.

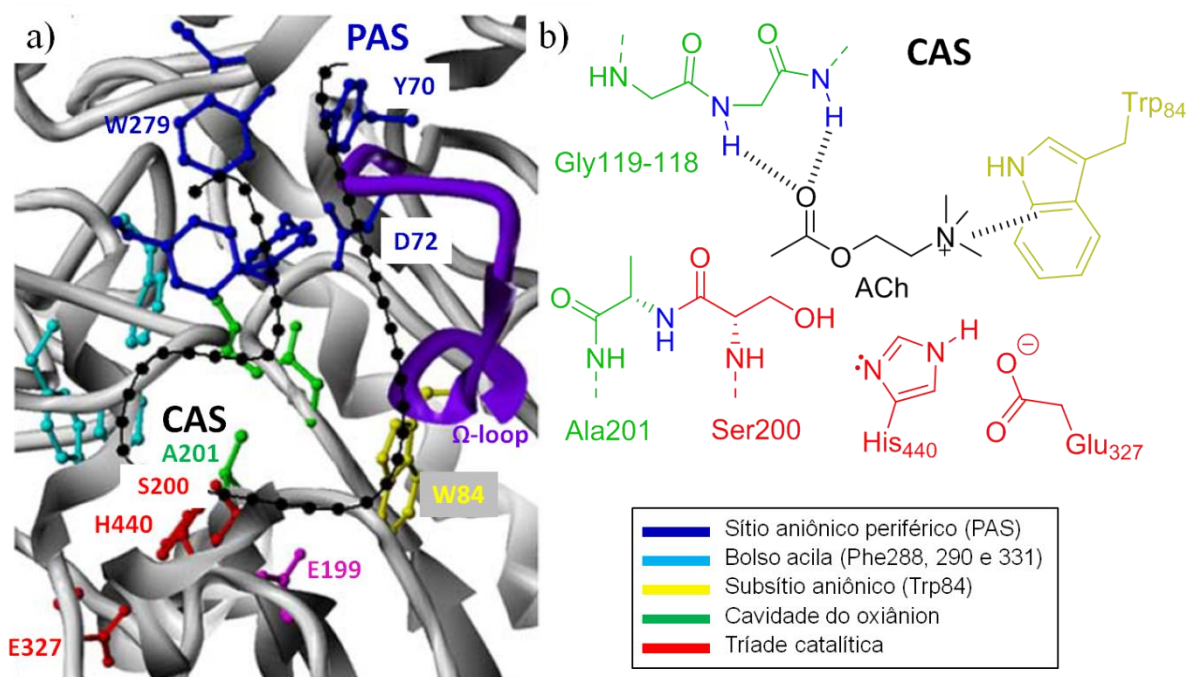
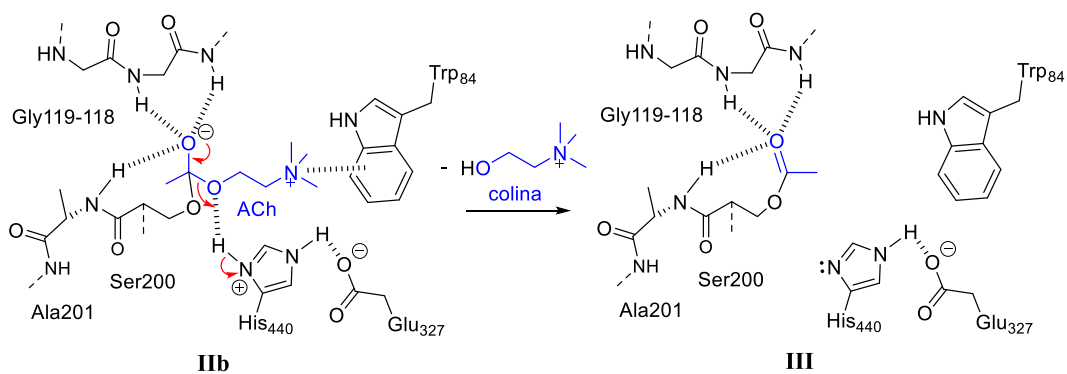
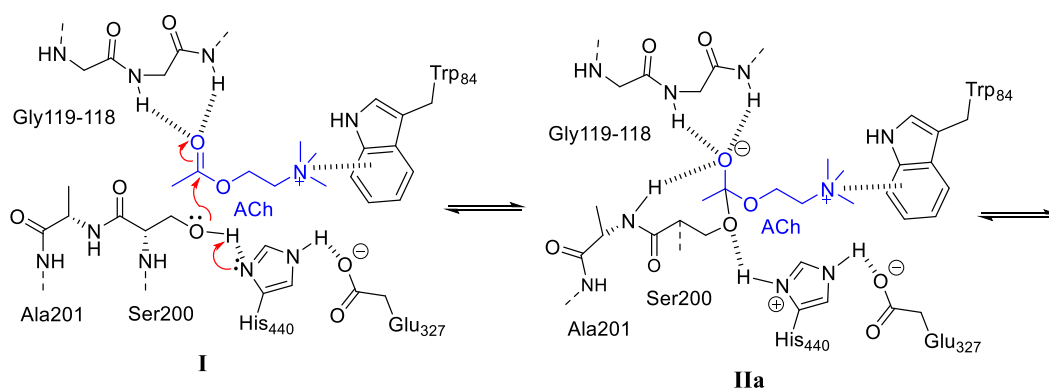


Figura 7. a) Cavidade do sítio ativo da AChE, onde a linha pontilhada representa o espaço disponível, mais estreito na entrada. Adaptado do trabalho de Lushington *et al.*⁵⁵; b) Representação do complexo ES antes de reagir: interação cátion- π com Trp84 e LH com Gly118-119.

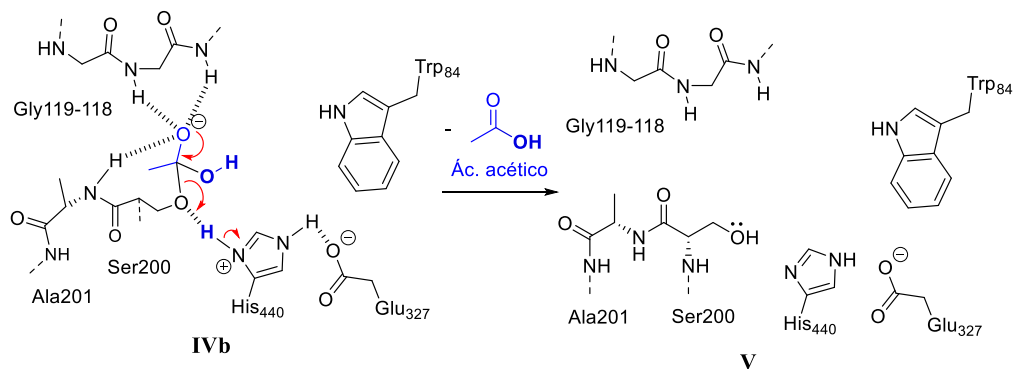
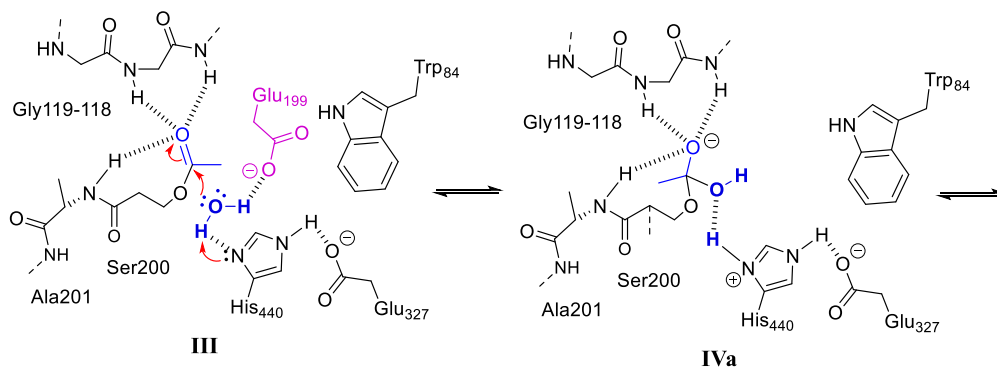
No Esquema 2 é mostrada a proposta mais consistente para mecanismo da AChE. Após a formação do complexo ES (**I**), o ataque nucleofílico da Ser200 leva a formação do intermediário tetraédrico representado por **IIa** e **IIb**. A teoria do estado de transição prevê que uma enzima tende a estabelecer interações favoráveis com o estado de transição da reação de modo a estabilizá-lo e baixar a energia de ativação da reação, atuando assim como um catalisador.⁵⁰ De fato, vários estudos têm mostrado que a energia do estado de transição na AChE, representado pelas estruturas **IIa** e **IIb**, possuem energia menor quando comparado com o complexo enzima-substrato (**I**).^{70, 71} Além disso, uma terceira LH, entre o H da ligação peptídica da Ala201 e o oxianion do substrato surge em **II** que não é observada no complexo ES, aumentando o componente estabilizador. Por fim, cálculos prevêem a formação de LH do H da His440 tanto com o O da Ser200 (**IIa**) quanto o O do éster de colina (**IIb**) no estado de transição. Posteriormente, ocorre a desprotonação da His440 pelo oxigênio da ACh, levando ao rompimento da ligação C-O na ACh. Esse rompimento é favorecido pela neutralização do sistema (representado pelo estado **III**) e a liberação de colina, que é recapturada pela célula para nova síntese de ACh.

Na etapa de desacilação, mostrada no Esquema 2b, uma molécula de água, altamente conservada e posicionada pela enzima (discutido mais adiante) é desprotonada pela His440, promovendo a substituição nucleofílica na acetil-Ser200 (enzima acetilada, **III**), formando o segundo intermediário tetraédrico, representado por **IV**, que conduz à liberação de ácido acético e à regeneração do sítio ativo enzima (**V**).⁷²

a)



b)



Esquema 2. Mecanismo de hidrólise da ACh pela enzima *TcAChE*: a) acilação e b) desacilação.

Várias informações experimentais baseadas em estudos computacionais têm evidenciado alguns detalhes do mecanismo da AChE. Por exemplo, assim como observado em várias outras enzimas, na AChE a histidina (His440) age via catálise geral ácido-básica, sendo observado experimentalmente um aumento do caráter básico do seu anel imidazólico no intermediário tetraédrico em relação à estrutura **I**.⁶⁷ Vários estudos têm demonstrado a importância do terceiro resíduo da tríade catalítica (Glu327) na estabilização dos estados de transição **II** e **IV**. Experimentos com a enzima *hAChE* mutante trocando o glutamato por aspartato e glutamina na posição 334 (327 na *TcAChE*) mostraram inatividade da enzima sem o glutamato na tríade catalítica.^{67, 73} Alguns estudos apontam para uma interação eletrostática do Glu327 com o anel imidazólico protonado da His440.⁷⁴ Por outro lado, a maior parte dos cálculos tem indicado que a formação de LH entre um oxigênio do carboxilato do Glu327 e o NH da His447 é a principal forma de contribuição do Glu327 para a estabilização do anel imidazólico protonado.^{68, 75, 76} Outro aminoácido importante para a atividade catalítica é o Glu199, que atua através de ligações de hidrogênio principalmente posicionando a molécula de H₂O conservada no CAS na orientação correta para promover o ataque nucleofílico na acetil-Ser200 em **III** (Esquema 2b).⁷⁶ Além disso, estudos envolvendo a AChE de inseto (*DmAChE*) e a humana (*hAChE*) apontaram que na formação do complexo ES o Glu199 (237-*DmAChE* e 202-*hAChE*) atua estabilizando o grupo colina no subsítio aniônico através de uma LH com um dos grupos metila do grupo amônio, dando suporte ao Trp84.^{75, 77} Todas as enzimas possuem aminoácidos posicionados para estabilizar o estado de transição e promover a catálise, porém essa grande versatilidade de interações e a quantidade de resíduos de aminoácidos envolvidos no sítio ativo da AChE não é tão comum, o que ajuda a explicar a sua alta eficiência catalítica ($k_{cat}/K_M \sim 10^8 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$).⁵⁰

Outra propriedade observada na AChE é a existência de portas alternativas, tais como a porta dos fundos (*backdoor*), localizada na região do subsítio aniônico no CAS, e a porta lateral (*side-door*), aproximadamente perpendicular ao PAS (Figura 8a). As evidências experimentais da existência dessas portas cresceram fortemente na década de 90, após a obtenção do raio-X da *TcAChE* e com o avanço dos estudos de dinâmica molecular.^{55, 78, 79} Constatou-se que a ACh e outros ligantes com amônio quaternário são largos demais para entrar e sair simultaneamente através da longa cavidade do sítio ativo, único caminho possível observado na estrutura de raios-X.⁸⁰ Além disso, a evidência da existência de um Ω -loop (ver Figura 7a) através de quebra e formação de uma ponte dissulfeto entre os resíduos Cys67 e Cys94 (Cys69 e Cys96 na *hAChE*), tornou fácil relacioná-lo com o controle de abertura e

fechamento dessas portas.⁸¹ Atualmente sabe-se que o loop Cys67-Cys94 facilita a abertura e o alargamento da porta dos fundos, cuja finalidade é facilitar a saída dos produtos, bem como a captura de água ou substrato em casos de oclusão do PAS ou excesso de ACh.^{57, 82} Estudos comparando a enzima livre com a enzima inibida pela fasciculina, um inibidor que age no PAS, mostraram que quando o acesso pelo PAS é bloqueado, são observadas maiores flutuações complexas na estrutura e maior flexibilidade do Ω -loop, resultando em rotas alternativas de acesso.^{83, 84}

Utilizando estudos de dinâmica molecular, Xu e colaboradores analisaram uma estrutura da *TcAChE* cristalizada com duas moléculas de tiocolina[§] (TCh), uma ligada no CAS e a outra no PAS (PDB 2C5G). Em uma simulação de 2,8 μ s verificou-se que o caminho mais frequente para a saída da TCh foi a porta dos fundos. Analisando a trajetória da TCh, observou-se uma mudança conformacional no resíduo Trp84, concomitante com o rompimento da ligação de hidrogênio entre o O da hidroxila da Tyr442 e o NH do Trp84 (Figura 8b).^{82, 85} Um estudo de dinâmica molecular da AChE complexada com a tacrina mostrou que a porta dos fundos não se abriu em nenhum momento durante a simulação, provavelmente devido à presença do inibidor no sítio ativo da AChE.⁷⁹

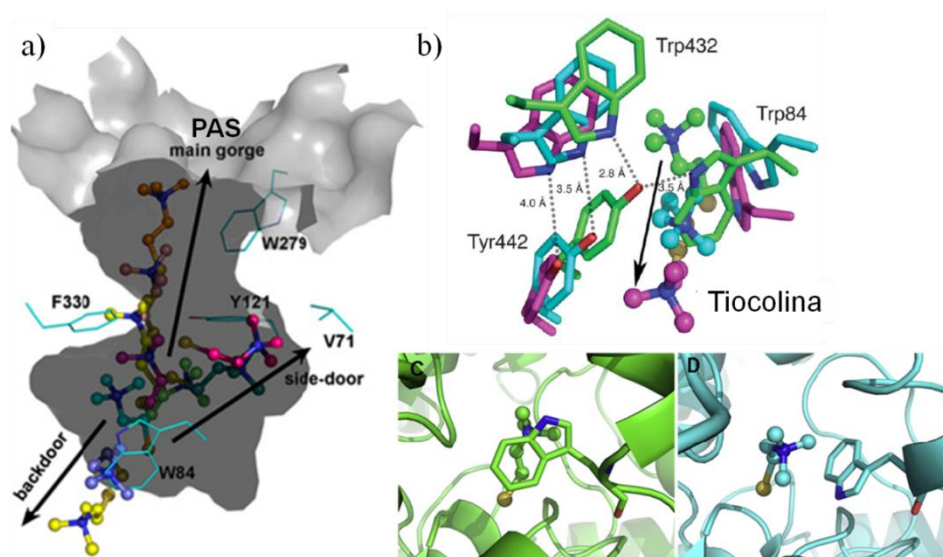


Figura 8. a) Visão geral do sítio ativo da AChE destacando as portas alternativas com os caminhos de saída indicados por flecha, indicando a saída de tiocolina. Figura obtida a partir de fotos instantâneas da tiocolina obtidas na dinâmica molecular do trabalho de Xu *et al.*⁸⁵; b) Posições do Trp84, Trp432, Tyr442 e da TCh obtidas a partir da conformação nativa (verde) e a instantâneos obtidos a partir da dinâmica molecular em 4,2 ns (azul) e 17,1 ns (violeta).^{82, 85}

[§] Produto de hidrólise da acetiltiocolina pela enzima AChE, com mecanismo análogo ao da hidrólise da ACh.

3.2.3. Butirilcolinesterase

A BuChE é encontrada principalmente no plasma e no fígado, mas é muito mais abundante do que a AChE em todo o organismo, sendo que um ser humano adulto saudável possui cerca de dez vezes mais BuChE que AChE no corpo.⁸⁶ Após a descoberta de que indivíduos sem BuChE são capazes de viver normalmente e com saúde, acreditou-se na ideia de que a BuChE não possuía nenhuma função importante no organismo. Embora ainda não seja completamente esclarecida sua função fisiológica, vários papéis importantes são atribuídos à BuChE. Dentre eles, a capacidade de hidrolisar vários ésteres carboxílicos e fosfóricos, permitindo que a BuChE atue como uma enzima de desintoxicação no organismo, sendo por exemplo a principal enzima envolvida no metabolismo da cocaína no corpo humano.^{87, 88} Organofosforados neurotóxicos (OP), que inibem irreversivelmente a AChE e matam por paralisia, são sequestrados e hidrolisados pela BuChE muito rapidamente, mesmo a concentrações mais baixas que a dose de intoxicação, tornando-a um excelente biomarcador para a exposição a OP.^{86, 89} A BuChE também é responsável pela hidrólise de anestésicos como a succinilcolina e a mivacurina, que agem como antagonistas dos receptores nicotínicos de acetilcolina (nAChR) (Figura 9).⁹⁰ A deficiência de BuChE é uma doença genética que causa alergia a esses anestésicos, sendo comum pacientes demorem até seis horas para recuperar a consciência após a anestesia.⁹¹ Outras drogas contendo a função éster, como a aspirina e a heroína também são hidrolisadas pela BuChE, sendo convertidas em ácido salicílico e morfina, respectivamente.⁸⁶

Vários estudos têm evidenciado o papel da BuChE na hidrólise da acetilcolina (ACh), confirmando que ela pode atuar em substituição a AChE quando esta está em deficiência ou inibida. Estudos *in vivo* mostraram que camundongos mutantes com pouca ou sem atividade da AChE, mas com níveis normais da BuChE, não sofreram efeitos tóxicos quando administrados com inibidores seletivos de AChE.⁹² Porém, animais completamente deficientes em BuChE morreram com a injeção dos mesmos compostos.⁹³ A BuChE não possui todos os mecanismos discutidos anteriormente que a AChE dispõe para a eficácia da hidrólise da ACh, sendo que sua atividade é cerca de 10% da AChE em cérebros saudáveis.⁹⁴ Entretanto, a utilização da BuChE como alvo terapêutico da doença de Alzheimer tem crescido nos últimos anos. Em vários estudos foi observado um aumento de mais de 50 vezes na razão de atividade BuChE/AChE em cérebros afetados pela DA em comparação com cérebros saudáveis.^{94, 95} Em estágios avançados da DA a AChE encontra-se

predominantemente na forma monomérica e a sua atividade cai mais de 60% em relação ao valor normal. Portanto, a utilização de inibidores seletivos para a BuChE é a estratégia mais promissora para estados de moderados a avançados da DA.⁹⁶

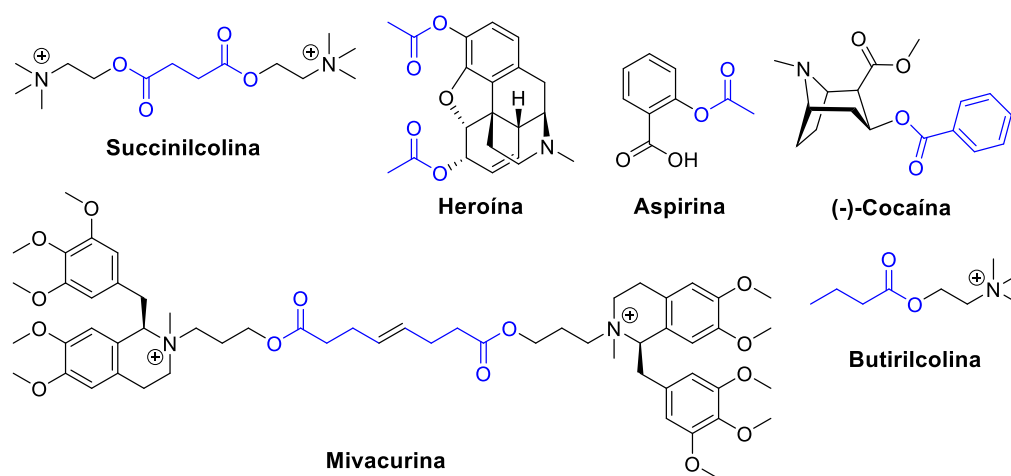


Figura 9. Ésteres hidrolisados pela enzima butirilcolinesterase (BuChE).

Devido à fácil obtenção a partir do sangue, a BuChE da espécie humana (*h*BuChE ou *Hs*BuChE) tem sido amplamente a mais estudada. A primeira estrutura cristalina da BuChE foi obtida por Nicolet *et al.* em 2003 e mostrou uma estrutura tridimensional muito similar a da AChE, sendo que a principal diferença se encontra na região do bolso acila, que na BuChE é muito menos impedido e permite o acomodamento de ésteres maiores (PDB 1P0I).⁹⁷ Onde na *Tc*AChE há a Phe288 e Phe290, na *h*BuChE há a Leu286 e Val288, respectivamente, isto é, resíduos pequenos e hidrofóbicos que permitem maior espaço para um éster butílico, ou maiores como os mostrados na Figura 9. Outra diferença é observada no sítio periférico da BuChE, que não contém resíduos aromáticos volumosos como Trp279, Tyr70 e Tyr121 da *Tc*AChE, permitindo um espaço maior na cavidade, preenchida por resíduos pequenos como Ala277, Asn68 e Gln119 (Figura 10).^{96,98} Por outro lado, o CAS da BuChE é bem conservado em relação ao da AChE. A tríade catalítica é composta pelos mesmos tipos de resíduos de aminoácidos (Ser198, His438 e Glu325), assim como o subsítio aniônico (Trp82) e a cavidade oxianion (Gly116, Gly117 e Ala119), responsável pela estabilização do estado de transição.⁹⁹ Assim como a AChE, a BuChE é encontrada tanto nas formas monoméricas e diméricas como na forma de tetrâmero ancorado em membrana celular ou solúvel, sendo esta a última a mais comum no plasma de mamíferos.^{87, 100} Os domínios de tetramerização e ancoramento na membrana também são muito similares nas duas enzimas, seguindo o mesmo padrão onde a

PriMA é a proteína de ancoramento no cérebro e a ColQ na lâmina basal e nas junções neuromusculares.¹⁰¹

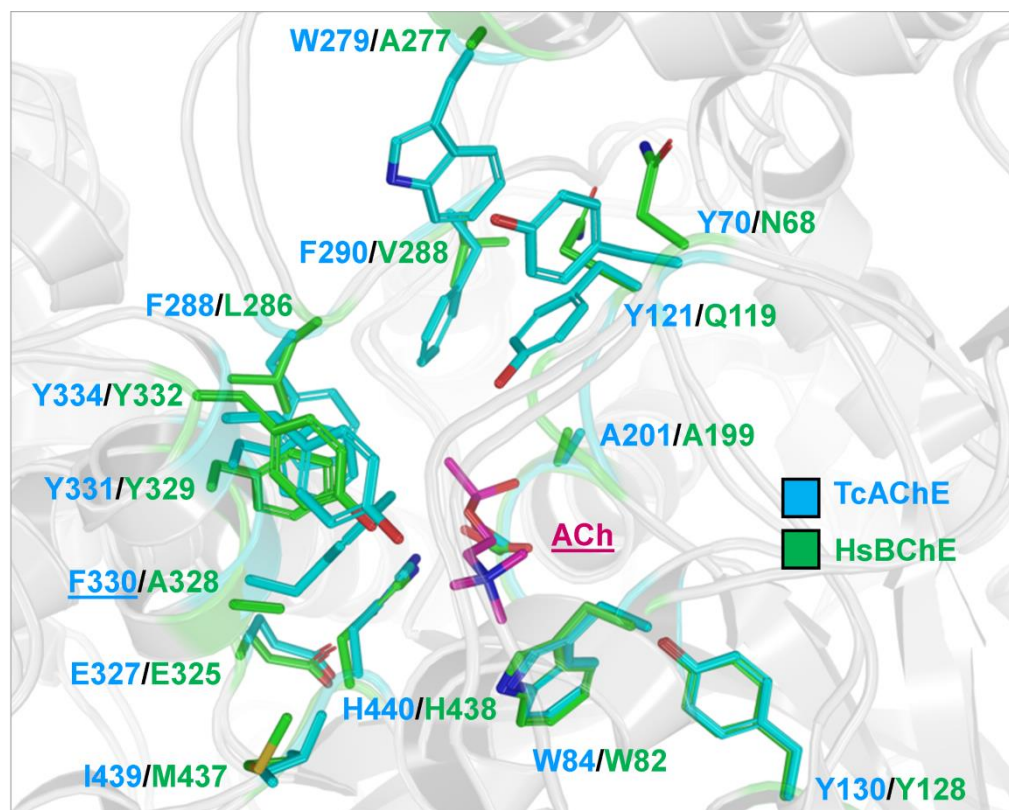
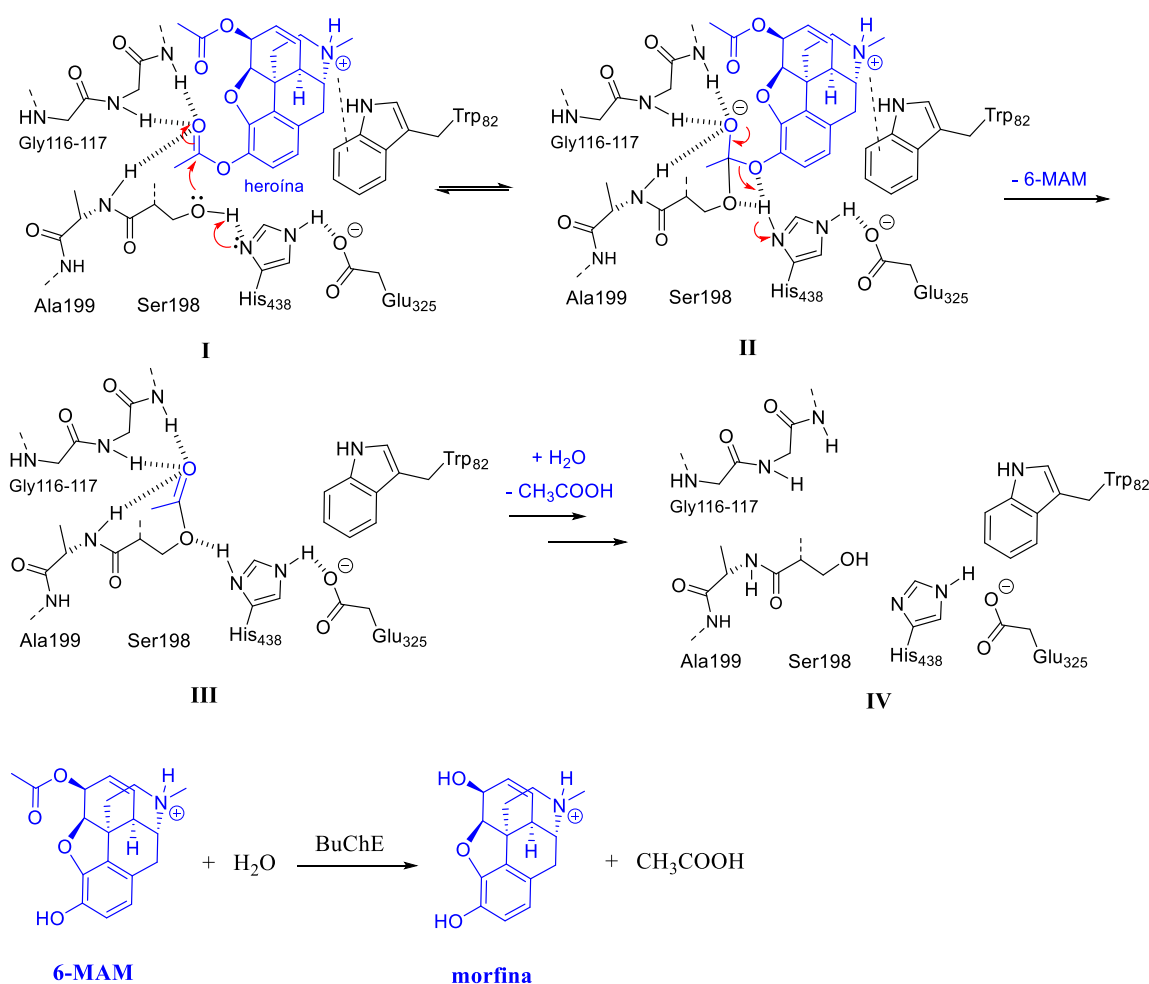


Figura 10. Superposição das estruturas da *TcAChE* (PDB ID 2CKM, azul claro) e *hBuChE* (PDB ID 4BDS, verde) com o substrato acetilcolina, obtidas do *docking* pela equipe colaboradora do LNCC.

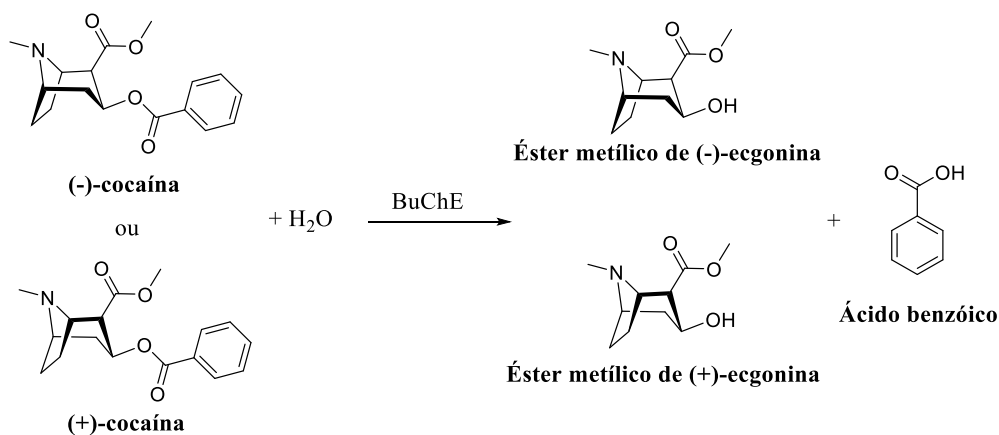
A respeito das similaridades estruturais no CAS da BuChE com a AChE não é surpreendente que o mecanismo catalítico de hidrólise da acetilcolina seja similar. De fato, pode-se representar as etapas de hidrólise da ACh pela BuChE de forma análoga ao mecanismo do Esquema 2. Através de estudos computacionais Chen *et al.* apresentaram uma proposta de mecanismo análoga ao da AChE, contudo com uma grande diferença na qual a etapa limitante da reação é a acilação, enquanto que na AChE é a desacilação.¹⁰² A heroína (Figura 9) é um éster metílico, assim como a ACh, e portanto pode ser hidrolisada tanto pela AChE quanto pela BuChE, uma vez que a função éster se acomoda no bolso acila, posicionando o carbono carboxílico próximo à serina para o ataque nucleofílico (Esquema 3).¹⁰³ Assim que entra no organismo a heroína (3,6-diacetilmorfina) é rapidamente convertida em 6-monoacetilmorfina (6-MAM) pela BuChE em uma reação em 4 etapas, seguida pela hidrólise da 6-MAM em morfina de forma bem mais lenta.¹⁰⁴ A 6-MAM é a principal forma

tóxica e ativa da heroína e cruza rapidamente a barreira hematoencefálica, acumula-se no cérebro e possui muito mais afinidade pelos receptores opióides que a heroína e a morfina.¹⁰³ No Esquema 3 é representado de forma simplificada o mecanismo de hidrólise da heroína e da 6-MAM pela BuChE. De acordo com a simulação por dinâmica molecular, os três aminoácidos da cavidade do oxianion (Gly116, Gly117 e Ala119) estabilizam o complexo enzima-substrato (**I**), bem como é observada interação entre o Trp82 e o nitrogênio protonado da heroína. O ataque nucleofílico da Ser198 leva a formação do intermediário tetraédrico no estado de transição **II**. O rompimento da ligação éster leva a liberação da 6-MAM e a formação da enzima acetilada **III**, a qual sofre hidrólise de forma similar ao mecanismo da acetilcolina, regenerando o sítio ativo (**IV**). Por sua vez, a 6-MAM pode entrar no sítio catalítico da BuChE e, de forma mais lenta que a heroína, sofrer hidrólise através do mesmo mecanismo liberando a morfina.^{103, 104}



Esquema 3. Mecanismo de hidrólise da heroína pela enzima *h*BuChE.

A butirilcolinesterase é a principal enzima envolvida na rota metabólica da cocaína, cuja via hidrolítica é o principal caminho do seu catabolismo no corpo humano. O mecanismo de hidrólise dos dois enantiômeros da cocaína pela BuChE ocorre de forma similar ao da ACh e da heroína, levando a formação do éster metílico de ecgonina e de ácido benzóico, Esquema 4.^{105, 106} Entretanto a eficiência catalítica da BuChE para a hidrólise do enantiômero natural e ativo (-)-cocaína é mais de 800 vezes menor ($k_{cat}/K_M = 0,9 \mu\text{M}^{-1}\text{min}^{-1}$) comparado a do não natural e inativo (+)-cocaína ($k_{cat}/K_M = 760 \mu\text{M}^{-1}\text{min}^{-1}$), ocorrendo de forma lenta o suficiente para que a (-)-cocaína atinja o sistema nervoso central.^{88, 107} O conhecimento da estrutura da BuChE tem possibilitado o estudo do mecanismo da reação de hidrólise da cocaína, diferenciando os dois enantiômeros, o que tem permitido o desenvolvimento de BuChE mutantes com melhor eficiência para a hidrólise da (-)-cocaína e a aplicação na terapia de desintoxicação.^{86, 88} Observou-se que um impedimento estérico causado pela Tyr332 no PAS dificulta a aproximação do grupo éster de metila e a formação do complexo enzima-substrato na ligação da (-)-cocaína, o que não afeta a (+)-cocaína, onde o mesmo grupo encontra-se voltado para frente.¹⁰⁸ Estudos cinéticos mostraram que a mutação por resíduos de aminoácidos menores nessa posição, especialmente a glicina, melhoram a atividade catalítica.^{86, 88, 107}

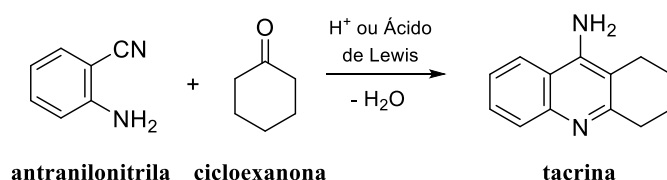


Esquema 4. Hidrólise da cocaína pela enzima BuChE.

3.3. INIBIDORES DE COLINESTERASES

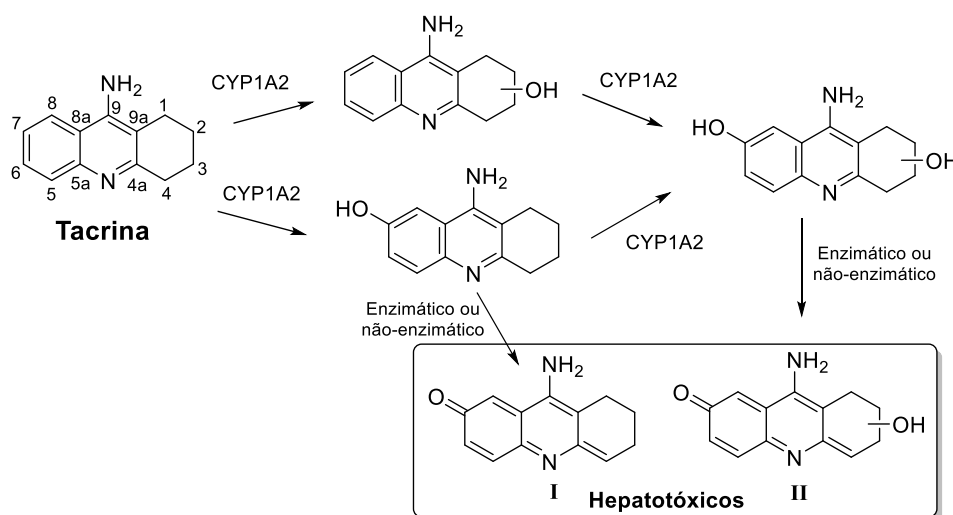
Os inibidores de colinesterases (ChEI) retardam a degradação metabólica da acetilcolina, potencializam as sinapses nas células sobreviventes e melhoram os sintomas decorrentes da disfunção cognitiva.^{4,5}

Apesar dos efeitos hepatotóxicos que levaram a sua retirada do mercado, a tacrina ainda é um referencial importante para o desenvolvimento de ChEI, devido a sua alta afinidade com o sítio catalítico da AChE e sua facilidade de síntese. A tacrina é preparada através da reação de Friedländer, que originalmente envolve a condensação de um *o*-aminoaldeído, *o*-aminocetona ou *o*-aminonitrila aromática com aldeídos ou cetonas que contenham um grupo metileno em posição α -carbonila. Utilizando-se a *o*-aminobenzonitrila (antranilonitrila) e a cicloexanona via catálise ácida (ácido prótico ou ácido de Lewis), a tacrina é obtida em altos rendimentos (Esquema 5).¹⁰⁹



Esquema 5. Síntese da tacrina via reação de Friedländer.

O metabolismo da tacrina no corpo humano ocorre no retículo endoplasmático das células hepáticas, envolvendo primeiramente a hidroxilação oxidativa pela enzima 1A2 do complexo citocromo P450 (CYP1A2), Esquema 6. Na tacrina, a introdução enzimática de um ou mais grupos hidroxila pode ocorrer nas posições C1, C2, C3 e C4 do anel alifático ou C7 do anel aromático, com subsequente rearranjo formando os intermediários derivados de 7-quinona-metidas **I** e **II**, que causam necrose nas células do fígado.¹¹⁰



Esquema 6. Destino metabólico da tacrina na mitocôndria das células hepáticas.

Várias modificações na estrutura da tacrina tem sido feitas com fins de melhorar a atividade anticolinesterase e reduzir os efeitos colaterais. Vários compostos baseados em tacrina com átomo de cloro em C6 tem sido estudados como ChEI, uma vez que é conhecido na literatura que a substituição na posição C6 é a mais eficaz em termos de atividade como ChEI, sendo que a 6-clorotacrina mostrou-se 25 vezes mais potente que a tacrina.¹¹¹ A 7-metóxi-tacrina (7-MEOTA) apesar de menor atividade inibitória de ambas as enzimas ChE, tem se mostrado bem menos tóxica para as células hepáticas em estudos *in vivo*, além de apresentar propriedades antioxidantes e interação com os receptores NMDA.¹¹² Vários análogos da 7-MEOTA tem sido sintetizados e estudados como ChEI, incluindo dímeros do tipo bis(7)-MEOTA e híbridos derivados da amantadina, um fármaco anti-Parkinson com estrutura similar à memantina (Figura 11b).^{113, 114} Análogos quirais da tacrina foram sintetizados pelo nosso grupo de pesquisa e o resultados dos testes de inibição da AChE mostraram que a diminuição do volume do substituinte no anel alifático levou a uma melhora na atividade. Em contrapartida, o aumento do tamanho do substituinte reduziu a afinidade pela enzima AChE (Figura 11a).¹¹⁵

Os dímeros do tipo bis-tacrina sintetizados por Pang em 1996, como comentado na Introdução (página 2), além de apresentarem afinidade muito maior pela AChE devido à dupla ação enzimática (CAS e PAS), também mostraram menor potencial tóxico em estudos *in vivo*, especialmente o bis(7)-tacrina.¹¹⁶ Além disso, o bis(7)-tacrina possui ação multifatorial, como por exemplo sendo capaz de inibir a enzima BASE-1, que catalisa a clivagem da proteína precursora amilóide (APP), e é capaz de agir como antagonista dos

receptores NMDA.¹¹⁷ Recentemente análogos do bis-tacrina demonstraram atividade contra o protozoário *Plasmodium falciparum*, causador da malária, evidenciando a versatilidade desses compostos.¹¹⁸ Testes de inibição *in vivo* do bis(7)-tacrina mostraram que o dímero atingiu o efeito máximo de inibição após quinze minutos da administração e atravessou facilmente a barreira hematoencefálica.¹² Recentemente, nosso grupo de pesquisa publicou a síntese de análogos quirais do bis(7)-tacrina avaliando as duas séries enantioméricas, a partir da (*R*)-(+)- e da (*S*)-(-)-pulegona (Figura 11a). Ambas as séries foram ativas na escala nanomolar, sendo alguns mais ativos que o bis(7)-tacrina, evidenciando alta afinidade e seletividade para a AChE, o que foi mostrado também pelos estudos de modelagem molecular.¹⁸

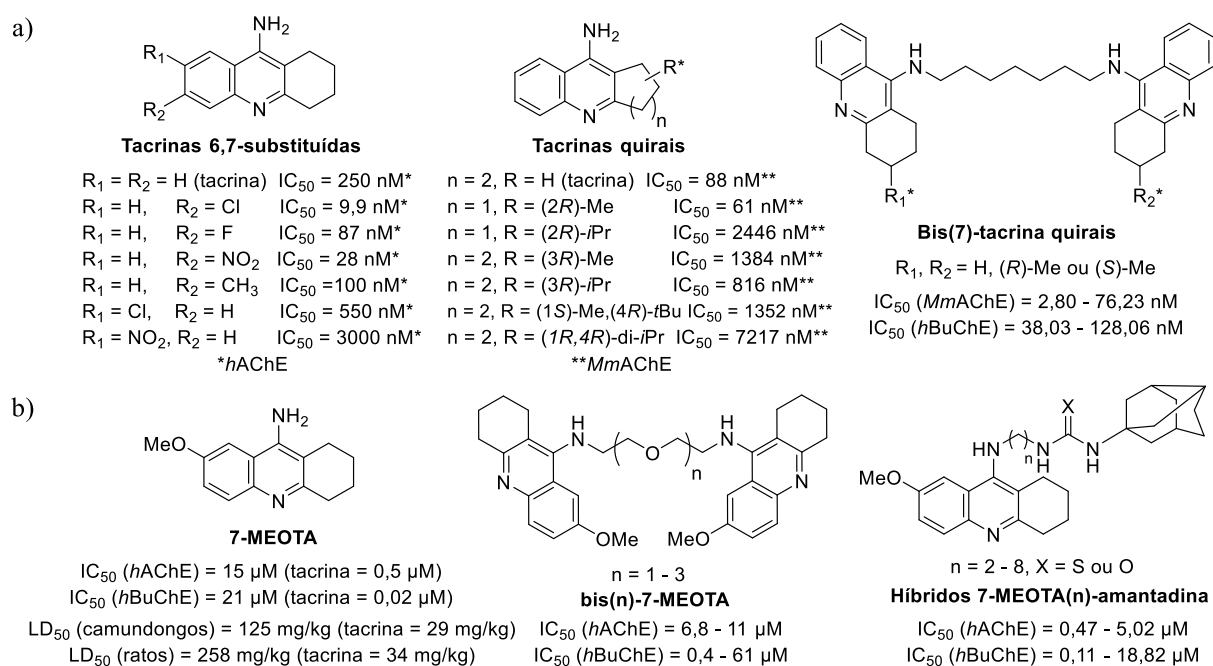


Figura 11. Derivados da tacrina (a) e da 7-metóxi-tacrina, 7-MEOTA (b).

3.3.1. Híbridos multialvo baseados em tacrina

A hibridização molecular é uma estratégia de planejamento racional de novos compostos baseada na combinação de dois ou mais núcleos farmacofóricos, com fim de obter um nova molécula com melhor afinidade e eficácia.¹¹⁹ O núcleo tacrina é o mais comumente incorporado nestes compostos devido à alta afinidade com o CAS da AChE. A tacrina e os bis(n)-tacrina são até hoje referenciais na literatura para o desenvolvimento de inibidores de colinesterases. Híbridos contendo o núcleo tacrina conectados por um espaçador a outro

núcleo farmacofórico são geralmente otimizados para uma distância equivalente a cerca de sete carbonos metilênicos, que corresponde a distância ideal entre o CAS e o PAS (ver páginas 2 e 3). Em 2006, Rydberg e colaboradores obtiveram a estrutura de raios-X através da cristalização dos complexos *TcAChE*-bis(7)-tacrina e *TcAChE*-bis(5)-tacrina e compararam as estruturas utilizando cálculos computacionais. Observou-se que ambos os inibidores promovem modificações na estrutura da enzima, porém uma maior modificação foi observada na ligação do bis(5)-tacrina, indicando que a AChE necessita de mais mudanças conformacionais para se adaptar ao dímero de cadeia mais curta, o que ajuda a explicar a maior afinidade pelo bis(7)-tacrina (Figura 12).¹²⁰

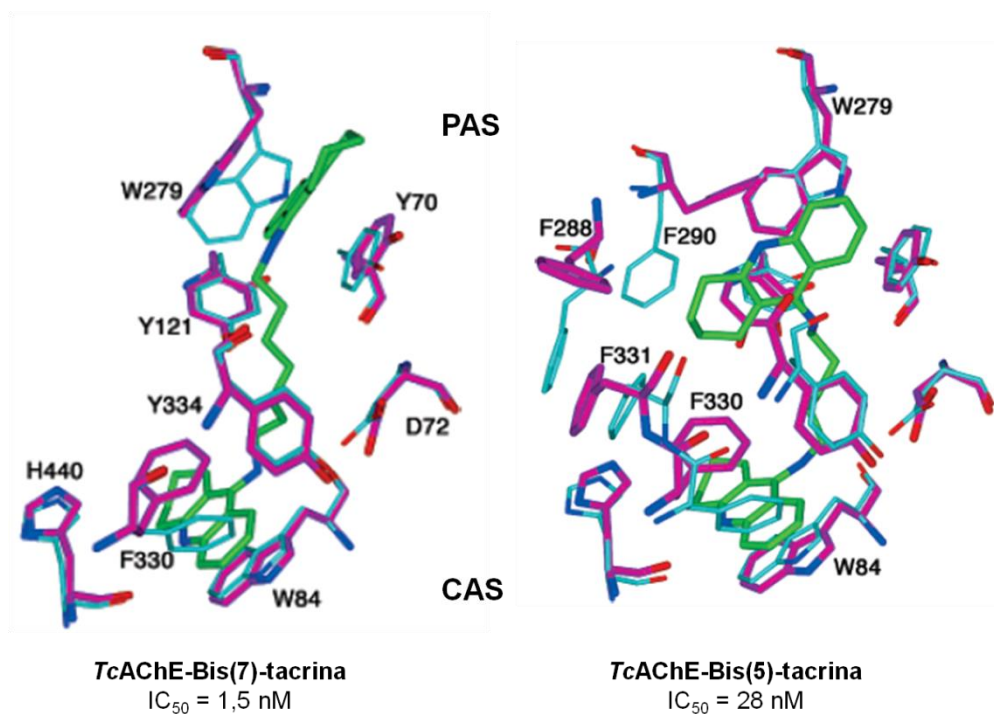


Figura 12. Comparação da conformação nativa (azul claro), com a da enzima inibida (violeta) pelo bis(7)-tacrina (verde, à esquerda) e o bis(5)-tacrina (verde, à direita). Adaptado de Rydberg *et al.*¹²⁰

O interesse pelo desenvolvimento de híbridos multialvo foi impulsionado não somente pela excelente atuação de compostos com dupla interação simultânea ao CAS e ao PAS da AChE, bem como frente a vários estudos *in vitro* que têm indicado que a AChE aumenta a produção das placas $A\beta$, interagindo com as fibrilas que estão em fase de formação.¹²¹⁻¹²³ De acordo com estudos computacionais, o PAS atua como uma chaperona no enovelamento da cadeia do peptídeo $A\beta$, o que é evidenciado pelo fato da extremidade *C*-terminal da *hAChE* possuir um razoável grau de homologia com a extremidade *N*-terminal dos peptídeos $A\beta$.^{94, 124}

O avanço da química computacional tem possibilitado um melhor entendimento sobre a estrutura e a dinâmica das enzimas AChE e BuChE, aliado ao aumento da biblioteca de compostos sintetizados e avaliados, atualmente é possível prever o modo de ligação e a afinidade de um candidato a fármaco dentro do sítio ativo. Nesse sentido, várias interações que têm sido descritas na literatura para o núcleo tacrina com a AChE são encontradas em comum entre vários híbridos derivados da tacrina: i) o núcleo tacrina geralmente interage no CAS, direcionando o outro núcleo farmacofórico para o PAS; ii) a tacrina interage fortemente formando o recheio de um sanduíche entre a Phe330 e o Trp84 através de interações π - π *stacking*, entre os orbitais π dos anéis aromáticos, e interações cátion- π entre o nitrogênio piridínico protonado e os anéis aromáticos dos aminoácidos; iii) o nitrogênio piridínico também é capaz de atuar como doador de ligações de hidrogênio (LH) para o oxigênio carbonílico da cadeia principal da His440, o que foi encontrado em vários casos; iv) o grupo amino secundário da tacrina é capaz de estabelecer LH com moléculas de água e vários resíduos de aminoácidos diferentes, tanto na sua forma protonada quanto na sua forma neutra. A tacrina também é capaz de formar interações no PAS, como no caso dos dímeros bis-tacrina, formando um sanduíche entre Trp279 e Tyr70 (Figura 12). As principais interações descritas para a tacrina com a AChE são mostradas na Tabela 1, que também relaciona a função catalítica dos aminoácidos.^{16, 18, 55, 65, 125-127}

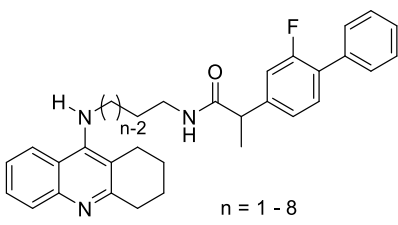
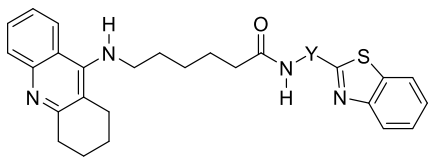
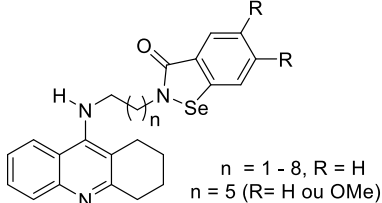
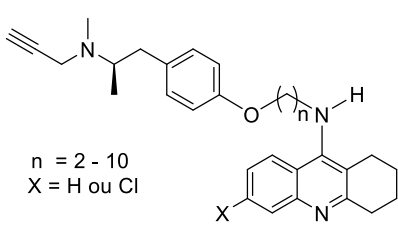
Tabela 1. Principais aminoácidos da enzima acetilcolinesterase, suas funções na catálise e as principais interações descritas com o nucleotacrina.

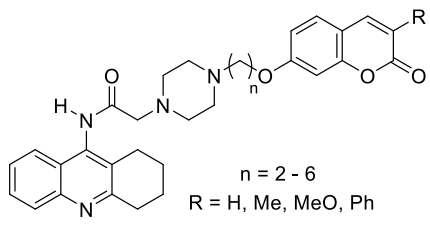
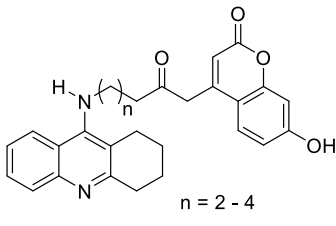
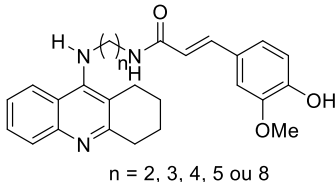
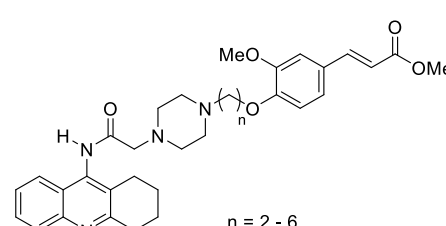
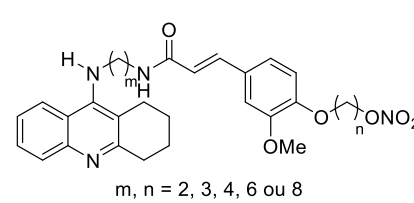
Região	<i>hAChE</i>	<i>TcAChE</i>	<i>DmAChE</i>	Funções	Interações com Tacrina
PAS	Asp74	Asp72	Tyr71	Atração eletrostática do grupo colina	-
	Trp286	Trp279	Trp321	Atração cátion- π	π - π stacking, cátion- π
	Tyr72	Tyr70	Glu69	Atração cátion- π	π - π stacking
Meio da cavidade	Tyr341	Tyr334	Tyr374	Atração cátion- π	π - π stacking
	Tyr124	Tyr121	Met153	Atração cátion- π	π - π stacking; LH com o grupo NH
	Gly329	Gly322	Gly362	Doador/Aceptor LH	LH com o grupo NH
CAS (cav.do oxianion)	Gly121	Gly118	Gly150	Doador LH; estabilização do grupo acetil e do int. tetraédrico	-
	Gly122	Gly119	Gly151		
	Ala204	Ala201	Ala239		
CAS (subsítio aniônico)	Trp86	Trp84	Trp83	Atração/Estabilização do grupo colina; <i>backdoor</i>	π - π stacking, cátion- π
	Tyr337	Phe330	Tyr370	Estabilização do grupo colina	π - π stacking, cátion- π , LH com o grupo NH
	Glu202	Glu199	Glu237	Estabilização do grupo colina; orientação da H ₂ O nucleofílica	LH com o grupo NH
CAS (tríade catalítica)	His447	His440	His480	Aceptor de próton	LH com o grupo NH
	Ser203	Ser200	Ser238	Nucleófilo	-
	Glu334	Glu327	Glu367	Aceptor de LH	-

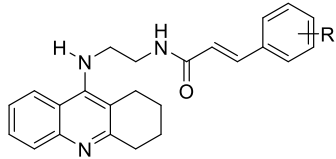
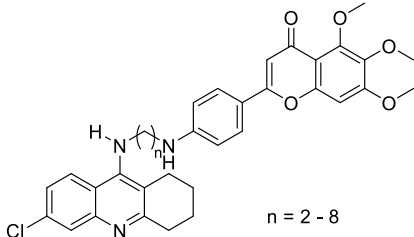
Diante da enorme biblioteca de compostos híbridos baseados em tacrina descritos na literatura, foram selecionados alguns exemplos que estão mostrados a seguir na Tabela 2. Nas colunas à direita estão listadas as atividades anticolinesterase dos principais compostos das séries, na forma de IC₅₀^{**}. Os compostos mais ativos estão destacados em negrito.

** IC₅₀ é a concentração necessária para inibir 50% da atividade enzimática.

Tabela 2. Híbridos baseados em tacrina descritos na literatura.

Entrada	Híbrido	Variações	IC ₅₀ (AChE) ^a	IC ₅₀ (BuChE) ^a
1	 <p>Tacrina-flurbiprofen ¹²⁹Chen, Y. <i>et al.</i>; <i>Arch. Pharm. Chem. Life Sci.</i> 2013, 346, 865.</p>	n = 2 n = 3 n = 4 n = 6 n = 8 Tacrina ^b	714,9 nM 344,8 nM 193,1 nM 19,3 nM 34,5 nM 61,7 nM	58,7 nM 13,9 nM 11,0 nM 3,7 nM 2,1 nM 9,0 nM
2	 <p>Tacrina-benzotiazol ¹³⁰Keri, R. S. <i>et al.</i>; <i>Bioorg. Med. Chem.</i> 2013, 21, 4559.</p>	Y = Ph Y = PhCH ₂ Y = CH ₂ Ph Y = (CH ₂) ₃ Y = (CH ₂) ₅ Tacrina ^b	0,34 μM 0,57 μM 1,84 μM 0,96 μM 0,76 μM 0,19 μM	Não testado
3	 <p>Tacrina-ebselele ¹³¹Mao, F. <i>et al.</i>; <i>Bioorg. Med. Chem. Lett.</i> 2013, 23, 6737.</p>	n = 1 n = 4 n = 5 n = 5 (R = OMe) n = 6 n = 8 Tacrina ^b	657 nM 70,7 nM 6,32 nM 2,55 nM 26,49 nM 31,98 nM 109 nM	38,88 nM 4,52 nM 4,37 nM 2,80 nM 13,97 nM 25,77 nM 15,8 nM
4	 <p>Tacrina-selegilina ¹²⁶Lu, C. <i>et al.</i>; <i>Eur. J. Med. Chem.</i> 2013, 62, 745.</p>	n = 2 (X = H) n = 4 (X = H) n = 8 (X = H) n = 10 (X = H) n = 3 (X = Cl) n = 8 (X = Cl) Tacrina ^b	83,1 nM 53,0 nM 147 nM 23,2 nM 14,2 nM 55,4 nM 110,2 nM	50,6 nM 39,6 nM 35,5 nM 2,03 nM 66,0 nM 17,6 nM 21,6 nM

Entrada	Híbrido	Variações	IC ₅₀ (AChE) ^a	IC ₅₀ (BuChE) ^a
5	 <p>n = 2 - 6 R = H, Me, MeO, Ph</p> <p>Tacrina-cumarina I</p> <p>¹³²Xie, S.-S. <i>et al.</i>; <i>Eur. J. Med. Chem.</i> 2013, 64, 540.</p>	n = 2 (R = H) n = 4 (R = H) n = 2 (R = Me) n = 6 (R = Me) n = 2 (R = MeO) n = 2 (R = Ph) Tacrina ^b	0,150 μM 0,169 μM 0,092 μM 0,398 μM 0,150 μM 0,373 μM 0,269 μM	0,493 μM 0,309 μM 0,234 μM 0,099 μM 5,14 μM 1,51 μM 0,042 μM
6	 <p>n = 2 - 4</p> <p>Tacrina-cumarina II</p> <p>¹³³Hamulakova, S. <i>et al.</i>; <i>J. Med. Chem.</i> 2014, 57, 7073.</p>	n = 2 n = 3 n = 4 Tacrina ^b	2,91 μM 0,277 μM 0,0154 μM (15,4 nM) 0,5 μM	12,6 μM 0,827 μM 0,328 μM 0,023 μM
7	 <p>n = 2, 3, 4, 5 ou 8</p> <p>Tacrina-ácido ferúlico I</p> <p>¹³⁴Fang, L. <i>et al.</i>; <i>Bioorg. Med. Chem. Lett.</i> 2008, 18, 2905.</p>	n = 2 n = 3 n = 4 n = 5 n = 8 Tacrina ^b	38,6 nM 33,0 nM 7,6 nM 4,4 nM 9,6 nM 45,1 nM	34,1 nM 27,0 nM 5,9 nM 6,7 nM 12,7 nM 5,1 nM
8	 <p>n = 2 - 6</p> <p>Tacrina-ácido ferúlico II</p> <p>¹³⁵Fu, Y. <i>et al.</i>; <i>Molecules</i> 2016, 21, 1338.</p>	n = 2 n = 3 n = 4 n = 5 n = 6 Tacrina ^b	306,5 nM 90,3 nM 52,7 nM 61,7 nM 184,1 nM 151,1 nM	202,9 nM 119,7 nM 215,4 nM 106,9 nM 195,7 nM 27,6 nM
9	 <p>m, n = 2, 3, 4, 6 ou 8</p> <p>Tri-híbrido tacrina-ácido ferúlico-</p>	m = 2, n = 2 m = 3, n = 4 m = 6, n = 3 m = 8, n = 3 m = 8, n = 6	17,2 nM 3,6 nM 4,4 nM 10,1 nM 10,8 nM	10,5 nM 6,2 nM 5,6 nM 1,0 nM 1,9 nM

Entrada	Híbrido	Variações	IC ₅₀ (AChE) ^a	IC ₅₀ (BuChE) ^a
	óxido nítrico	Tacrina ^b	69,8 nM	10,6 nM
	¹³⁶ Chen, Y. <i>et al.</i> ; <i>J. Med. Chem.</i> 2012 , 55, 4309.			
10	 Tacrina-ácido cinâmico	R = H R = 3-NO₂ R = 4-NO ₂ R = 2-OBn R = 4-NH ₂	92,5 nM 3,8 nM 6,8 nM 103,2 nM 173,3 nM	23,3 nM 34,7 nM 154,3 nM 13,6 nM 68,5 nM
	⁶⁵ Chen, Y. <i>et al.</i> ; <i>RSC Adv.</i> 2017 , 7, 33851.	Tacrina ^b	69,8 nM	10,6 nM
11	 Tacrina-escutelarina	n = 2 n = 4 n = 6 n = 8 6-Cl-tacrina ^c	1,63 nM 5,15 nM 24,1 nM 22,3 nM 20 nM	1210 nM 8690 nM 2810 nM 2210 nM 1780 nM
	¹²⁷ Spilovska, K. <i>et al.</i> ; <i>Molecules</i> 2017 , 22, 1006.			

^aOs diferentes trabalhos usaram diferentes espécies das enzimas nos ensaios biológicos; ^bA tacrina é usada como referência na maioria dos trabalhos; ^c6-cloro-9-amino-1,2,3,4-tetraidroacridina usada como referência neste caso.

De uma forma geral, as séries de híbridos mostradas nas Entradas 6, 8 e 11 da Tabela 2 apresentaram seletividade para a AChE, enquanto que a série da Entrada 1 (tacrina-flurbiprofen) mostrou seletividade para a BuChE. Com relação as demais séries de compostos, não é possível afirmar uma tendência geral de seletividade, que variou conforme o tamanho da cadeia ou o substituinte, sendo necessário analisar cada composto. Os estudos de modelagem molecular com a AChE mostraram as interações conservadas da tacrina no CAS para os híbridos das Entradas 1 a 10, em todos os casos direcionando o outro núcleo para o PAS, geralmente com interações π - π *stacking* entre Trp279 e Tyr70. No caso dos híbridos tacrina-benzotiazol (Entrada 2), apenas em um híbrido (Y = PhCH₂) esses aminoácidos acomodaram o núcleo benzílico espaçador, expondo o anel benzotiazol para a entrada da cavidade do sítio ativo da AChE.¹³⁰ Recentemente, Spilovska e colaboradores sintetizaram uma série de híbridos tacrina-escutelarina (Entrada 11), que foram fortemente seletivos para a AChE (nanomolar) em relação a BuChE (micromolar). Um dos compostos (n = 4) apontou

como menor energia de *docking* o núcleo tacrina no PAS, entre Tyr72 e Trp286 (*hAChE*, Trp279 e Tyr70 na *TcAChE*), sendo um exemplar único deste trabalho e raro na literatura.¹²⁷

Recentemente nosso grupo sintetizou uma série de híbridos conectando a tacrina com o fármaco tianeptina (Stablon®), utilizado como anti-depressivo. Esses compostos foram chamados de híbridos tacrina-tianeptina e inibiram as enzimas AChE e BuChE com IC₅₀ na escala nanomolar.¹⁶ Verificou-se também que os compostos obtidos não afetaram a integridade celular e, além disso, foram capazes de reduzir a secreção basal da proteína S100B, cujo alto nível de secreção está associado a neuropatologias. Na Figura 13a é mostrada a estrutura geral dos híbridos tacrina-tianeptina sintetizados pelo nosso grupo. Na Figura 13b é mostrada interação inibidor-enzima e seus modos de ligação obtidos *in silico*, para o enantiômero *R* do híbrido mais ativo anti-AChE da série (n = 3, X = Cl). Os modos de ligação obtidos no estudo de *docking* foram similares para todos os híbridos tacrina-tianeptina testados na AChE. Em todos os casos, o núcleo tacrina realiza as interações no CAS descritas na literatura. A maior variabilidade dos modos de ligação foi observada na região da tianeptina, que interage no PAS. O melhor modo de ligação no complexo PDB 2CKM da *TcAChE* mostrou que o anel fenila clorado da tianeptina interage via π - π stacking com Trp279 e Tyr70. A amina próxima à tacrina faz ligação de hidrogênio (LH) com uma água. Por outro lado, no enantiômero *S* e em outros compostos (não mostrados) a amida da cadeia espaçadora faz LH com Tyr121 e Tyr334. Neste trabalho, os estudos de modelagem molecular mostraram que a atividade anticolinesterase diminuiu com o aumento da cadeia espaçadora, o que também foi verificado nos testes *in vitro*. Isso pode ser explicado porque as interações por LH do grupo amida com os resíduos de aminoácidos Tyr121 e/ou Tyr334 só estão presentes nos inibidores com cadeia espaçadora com até quatro metilenos entre o núcleo tacrina e a função amida.¹⁶

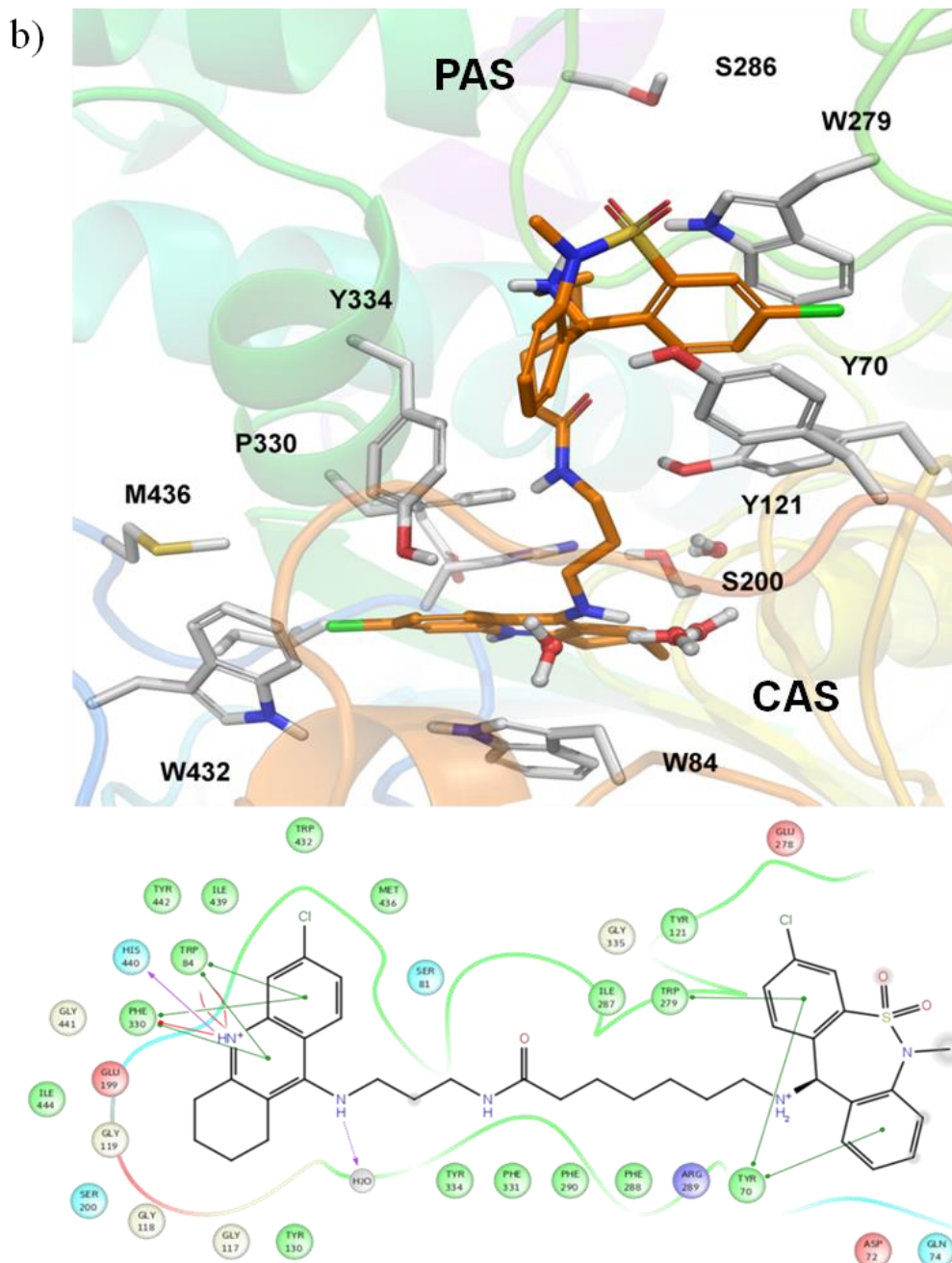
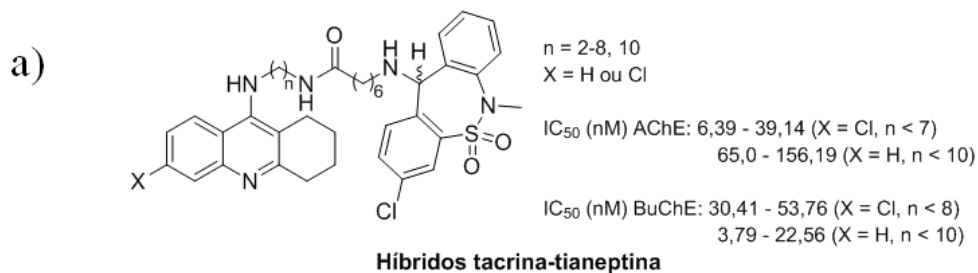


Figura 13. a) Híbridos tacrina-tianeptina; b) Representação da estrutura inibidor-enzima (acima) e os modos de ligação do enantiômero híbrido ($n = 3$, $X = \text{Cl}$) com os aminoácidos (abaixo), obtidos *in silico*.¹⁶

3.4. NÚCLEO LOFINA E DERIVADOS IMIDAZÓLICOS

A lofina (2,4,5-trifenil-1*H*-imidazol, Figura 14a) é um derivado imidazólico que têm sido amplamente estudado desde que Radziszewski observou emissão de luz a partir de uma solução de lofina e hidróxido de sódio na presença de oxigênio.¹³⁷ O imidazol é um composto heterocíclico aromático de cinco membros que possui caráter doador e aceptor de ligações de hidrogênio e está presente em vários produtos naturais, tais como histidina, histamina, purina e ácidos nucleicos. Vários compostos contendo o anel imidazólico possuem atividades farmacológicas, tais como o fármaco SB 203580, um derivado da lofina que atua na redução da expressão de citocinas pela inibição de um tipo de quinase, agindo como anti-inflamatório. Outros exemplos são compostos de uso tópico, como o clotrimazol e o flotrimazol, que possuem um anel imidazólico monossubstituído e atuam como antifúngos; e inibidores de bombas de prótons, como o omeprazol e o pantoprazol, que possuem em comum o anel benzimidazólico e são comercializados para redução da azia e prevenção de úlcera gástrica (Figura 14a).¹³⁸

Compostos contendo o anel imidazólico têm sido explorados na literatura como inibidores de colinesterases na forma de benzimidazóis e fenantroimidazóis, fundidos com anéis benzênicos com fim de melhorar as interações π - π *stacking* com os aminoácidos-alvo no sítio ativo. Em 2014, Alpan e colaboradores sintetizaram uma série de benzimidazóis que inibiram as enzimas AChE e BuChE na escala micromolar. Os estudos de modelagem molecular mostraram que o anel benzimidazol interage no PAS através de interações π - π *stacking* com Trp279 e Tyr334.¹³⁹ Compostos do tipo fenantroimidazóis, contendo o anel imidazólico fundido com anel fenantreno, mostraram-se efetivos na inibição da agregação do peptídeo A β em concentrações na ordem micromolar, bem como na inibição das colinesterases na mesma escala de concentração (Figura 14b).¹⁴⁰

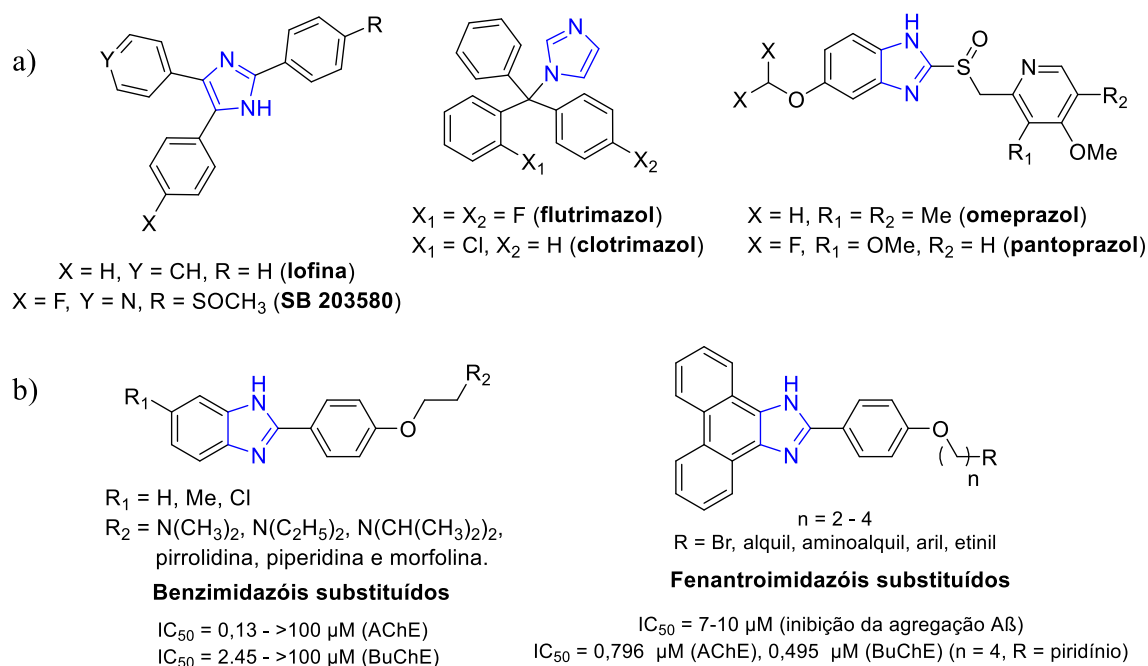
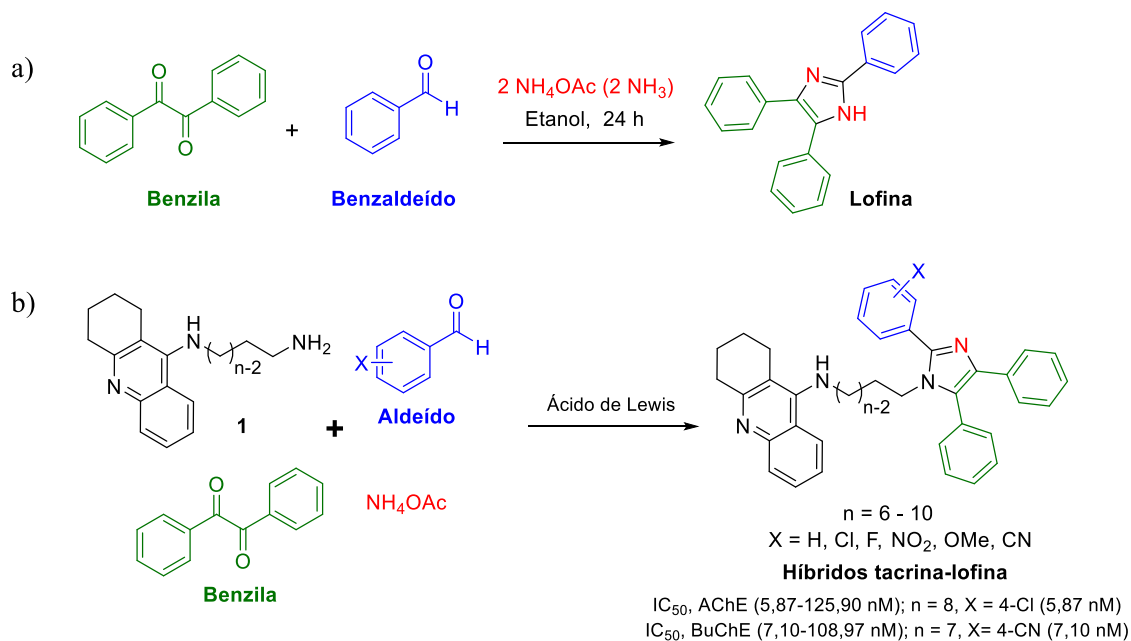


Figura 14. Derivados imidazólicos: a) lofina e fármacos comercializados; b) testados como inibidores de colinesterase.

A estratégia sintética mais empregada para a obtenção de imidazóis trissubstituídos e tetrassubstituídos é a reação multicomponente desenvolvida por Radziszewski para a síntese da lofina e derivados. A clássica reação de Radziszewski envolve a condensação entre a benzila, o benzaldeído e dois equivalentes de amônia, ou um equivalente de uma amina e um de amônia, utilizando etanol como solvente (Esquema 7a). Entretanto, os rendimentos costumam ser baixos devido à reversibilidade da condensação aldólica e à formação de oxazóis como subprodutos.¹³⁸ Várias modificações têm sido testadas e a utilização de ácidos de Lewis como catalisadores tem se mostrado a estratégia mais eficiente. Altos rendimentos em curtos tempos de reação têm sido obtidos com a utilização de catalisadores como FeCl₃.6H₂O, Yb(OTf)₃, UO₂(NO₃)₂.6H₂O e InCl₃.3H₂O.¹⁴¹⁻¹⁴⁴ Em 2013 nosso grupo de pesquisa utilizou essa estratégia para a síntese de híbridos tacrina-lofina, utilizando as 9-alkilamino-1,2,3,4-tetraidroacridinas (**1**) como nucleófilos, juntamente com benzila, benzaldeído e acetato de amônio (Esquema 7b). Dentre os catalisadores investigados, o melhor rendimento foi obtido com InCl₃ (Tabela 3). Os híbridos tacrina-lofina foram avaliados quanto a sua atividade anticolinesterase e mostraram-se potentes inibidores das enzimas AChE e BuChE com IC₅₀ na escala nanomolar, sendo a maioria seletivos para a BuChE.¹⁷



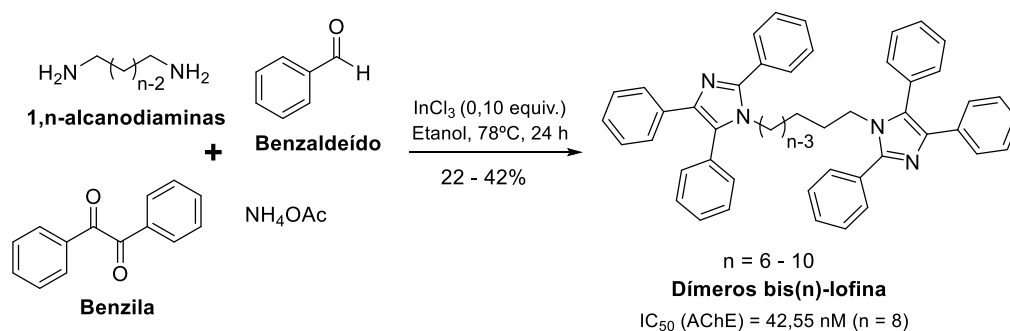
Esquema 7. a) Reação de Radziszewski para a síntese da lofina; b) Síntese dos híbridos tacrina-lofina pelo nosso grupo de pesquisa.¹⁷

Tabela 3. Condições testadas para a síntese dos híbridos tacrina-lofina^{a, 17}

Ácido de Lewis	Solvente	Temperatura (°C)	Tempo (h)	Rendimento ^b (%)
InCl ₃	Etanol	78	96	55 ^c
FeCl ₃	Etanol	78	96	45 ^c
SnCl ₂ .2H ₂ O	Etanol	78	96	41 ^c
AlCl ₃	Etanol	78	96	44 ^c
BF ₃ .Et ₂ O	Etanol	78	96	33 ^c
InCl ₃	-	120	19	3
InCl ₃	<i>n</i> -pentanol	120	48	11 ^c
InCl ₃	Etanol	78	180	12
InCl ₃	Etanol	78	48	31 ^c
InCl ₃	Etanol	78	96	35

^a Condições testadas com $n = 8, X = H$; ^b Rendimentos referem-se aos produtos purificados; ^c Houve adição extra de 1,0 equiv. de benzil, benzaldeído e NH_4OAc após metade do tempo.

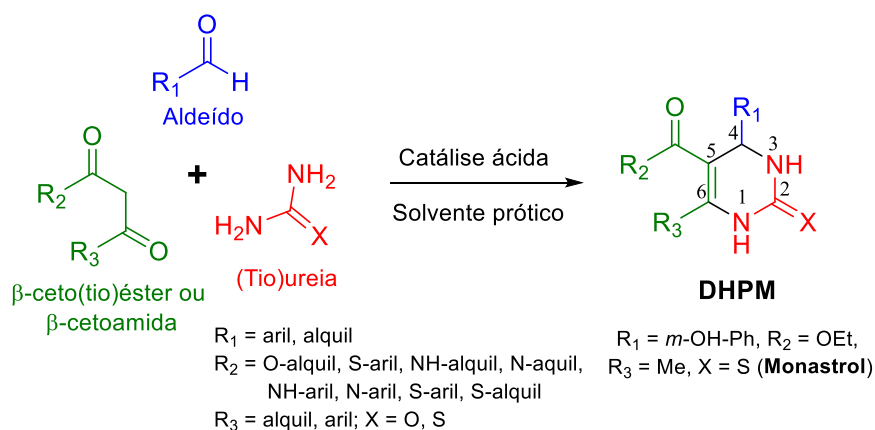
Utilizando-se a mesma estratégia sintética com 1,*n*-alcanodiaminas, foram isolados dímeros do tipo bis-lofina, cujo análogo bis(8)-lofina mostrou-se um potente inibidor da AChE na escala nanomolar (Esquema 8). Juntamente com os híbridos tacrina-lofina, este trabalho revelou o núcleo lofina como uma nova plataforma promissora no desenvolvimento de inibidores de colinesterases.¹⁷



Esquema 8. Síntese dos dímeros bis(n)-lofina.

3.5. NÚCLEO PIRIMIDINA DERIVADO DA REAÇÃO DE BIGINELLI

Os compostos de Biginelli, como são conhecidas as 3,4-di-hidropirimidin-2(1H)-(ti)onas (DHPM, Esquema 9) possuem várias propriedades farmacológicas, tais como antibiótica, antiviral, antitumoral, antioxidante e anti-inflamatória.¹⁴⁵ A reação de Biginelli consiste na síntese tricomponente envolvendo um β -ceto(tio)éster ou β -cetoamida, um aldeído e ureia ou tioureia, utilizando catálise ácida e solvente prótico (Esquema 9).¹⁴⁶



Esquema 9. Esquema genérico da reação de Biginelli.

Nos últimos anos a reação de Biginelli tem sido amplamente estudada na literatura em modificações do protocolo tradicional visando melhores rendimentos, bem como mostrando a versatilidade desta reação, podendo ser empregada na síntese de vários derivados diferentes. Experimentos utilizando ácidos de Lewis como catalisadores tem sido relatados, tais como BF_3 , $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, SnCl_2 suportado em nanopartículas de sílica, triflato, cloreto e brometo de índio(III), entre outros.¹⁴⁷⁻¹⁵² A utilização de biocatalisadores e líquidos iônicos também levou à formação dos produtos de Biginelli em ótimos rendimentos.^{153, 154} Recentemente, protocolos

na ausência de solvente também foram relatados para a síntese de Biginelli.^{155, 156} Um importante derivado sulfurado de Biginelli conhecido como monastrol (Esquema 9) possui atividade antimitótica, através da inibição da proteína cinesina Eg5, causando um bloqueio específico no ciclo de células tumorais e tem sido usado como modelo para o desenvolvimento de novos compostos anticâncer.¹⁴⁵

As 1,4-di-hidropiridinas (DHP) são obtidas a partir da Reação de Hantzsch, similar a de Biginelli porém utilizando uma fonte de amônia ao invés de uma ureia, e dois equivalentes ou dois análogos do β -cetoéster. Os derivados de Hantzsch têm sido extensivamente estudados devido à potente ação bloqueadora dos canais de Ca^{+2} do tipo L, o que confere ação vasodilatadora, podendo ser utilizados como antiarrítmicos, como os fármacos nitrendipina e nifedipina (Figura 15a).¹⁴⁵ Derivados DHPM de Biginelli também mostraram essa propriedade antagonista dos canais de Ca^{+2} .¹⁵⁷ Sabe-se da literatura que a desregulação da concentração intracelular de Ca^{+2} está relacionada na patogênese da doença de Alzheimer, aumentando a formação da proteína A β e a hiperfosforilação da tau.¹⁵⁸ Além do mais, a sobrecarga de Ca^{+2} devido à entrada desregulada através dos canais de Ca^{+2} do tipo L causa rompimento da mitocôndria e desencadeia o processo de morte celular.¹⁵⁹ Baseado nisso, o desenvolvimento de compostos contendo os núcleos piridina ou pirimidina têm sido uma abordagem recorrente no avanço das pesquisas para o tratamento da DA. O fármaco nimodipina, uma DHP bloqueadora de canais de cálcio utilizada no tratamento da enxaqueca e da hipertensão arterial, também é usada como anti-ischêmico no tratamento da DA.¹⁶⁰ Em 2009 Marco-Contelles e colaboradores sintetizaram híbridos tacrina-(di-hidropiridinas), chamados tacripirinas, que são análogos estruturais da tacrina e da nimodipina (Figura 15a). Esses compostos mostraram alta seletividade para a AChE em relação a BuChE, com IC_{50} variando de 45 a 600 nM (AChE) e acima de 100 μM (BuChE). Além disso, as tacripirinas exibiram atividades moderadas de inibição da agregação de A β e bloqueio dos canais de Ca^{+2} , além de cruzarem a barreira hematoencefálica. Estudos de modelagem molecular apontaram que as tacripirinas interagem no sítio periférico (PAS) da AChE, principalmente através de interações π - π *stacking* com o Trp279 e LH do grupo NH do anel com o grupo OH da Tyr70.¹⁵⁸

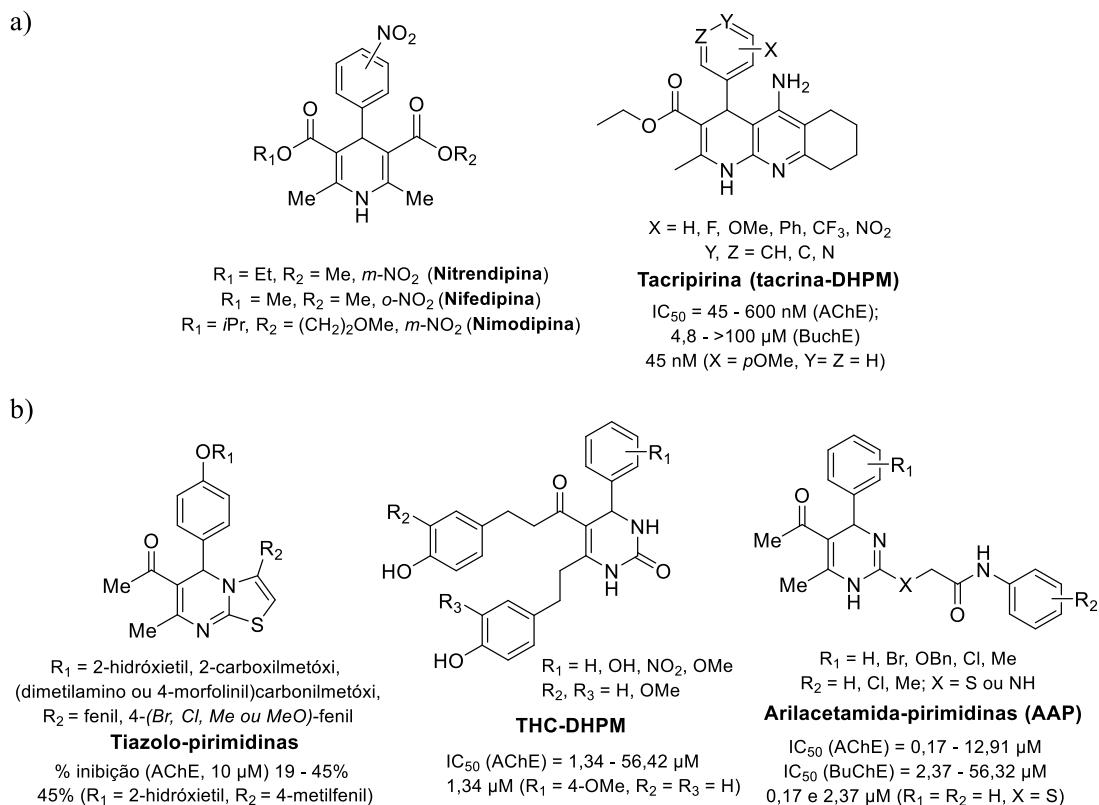


Figura 15. a) derivados de Hantzsch; b) derivados de Biginelli.

Os derivados de Biginelli também tem mostrado atividade anticolinesterase. Como por exemplo, Zhi e colaboradores sintetizaram uma série de tiazolo-pirimidinas a partir de tio-DHPM, que mostraram capacidade de inibir até 45% da atividade da AChE numa concentração de 10 μM . Estudos de *docking* apontaram para a interação no CAS através de interações $\pi\text{-}\pi$ *stacking* entre o grupo fenila e o Trp84, interações iônicas entre o sistema bicíclico tiazolo-pirimidina e os resíduos ácidos Aps72 e Tyr334 e ligações de hidrogênio com Glu199 e His440.¹⁶¹ No trabalho de Arunkhamkaew *et al.* a reação de Biginelli foi conduzida na presença de tetra-hidrocurcuminas (THC), compostos 1,3-dicarbonílicos, ao invés de um β -cetoéster. Os produtos formados foram chamados pelos autores de análogos THC-DHPM e inibiram a AChE na escala micromolar, sendo mais potentes que o fármaco galantamina (Figura 15b).¹⁶² Recentemente, Ahmad e colaboradores sintetizaram uma série de pirimidinas a partir da reação de Biginelli com substituição na posição C2 do anel por um grupo arilacetamida, a partir da reação de um análogo sulfurado ou aminado nesta posição com uma aril-cloroacetamida.¹⁶³ Os compostos obtidos inibiram ambas AChE e BuChE na escala micromolar (Figura 15b). Estudos de modelagem molecular de várias arilacetamida-pirimidinas (AAP) com a *TcAChE* mostraram que os vários anéis aromáticos são capazes de

interagir através de interações π - π *stacking* tanto no CAS quanto no PAS, conforme o tipo de substituinte. Na maioria dos compostos estudados o núcleo 4-arilpirimidina foi direcionado ao CAS, como mostrado para a **AAP1** ($R_1 = H$, $R_2 = Cl$, $X = NH$) na Figura 16, com o anel fenil interagindo com o Trp84 e o anel cloro-fenilacetamida com o Trp279 no PAS. Além disso, foram encontradas três ligações de hidrogênio: (i) do grupo carboxila na posição C5 do anel de Biginelli com um dos hidrogênios imidazólicos da His440; (ii) de um dos hidrogênios α -carbonila do grupo acetamida com a carboxila do Asp72; e (iii) do hidrogênio da amida com o OH da Tyr70. Na Figura 17, é mostrado o docking de um dos poucos compostos da série de Ahmad e colaboradores que direcionaram o núcleo pirimidina para o PAS. No composto **AAP2** ($R_1 = OBn$, $R_2 = H$, $X = NH$) o anel benzilóxi ligado ao anel fenila promove interações com o Trp279, bloqueando a entrada do sítio ativo no PAS. As duas carboxilas de **AAP2** estão envolvidas em ligações de hidrogênio com a His440 e a Phe288, esta última com a carboxila em C5 do núcleo de Biginelli.¹⁶³

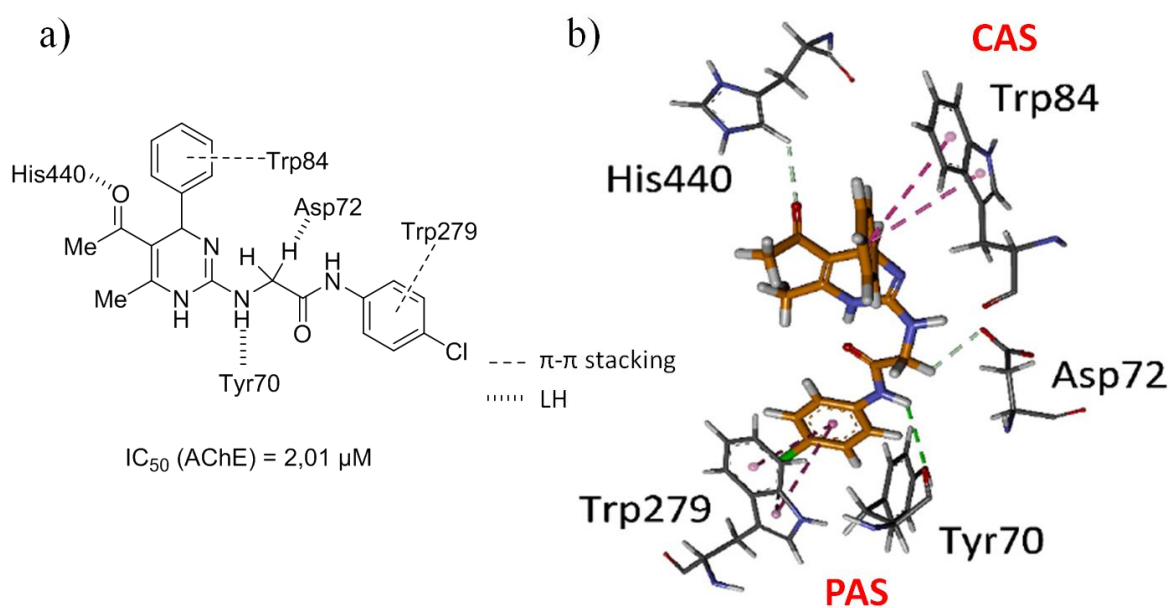


Figura 16. Interações do composto **AAP1** na *TcAChE*: a) representação 2D; b) adaptada da figura do *docking* do trabalho de Ahmad *et al.*¹⁶³

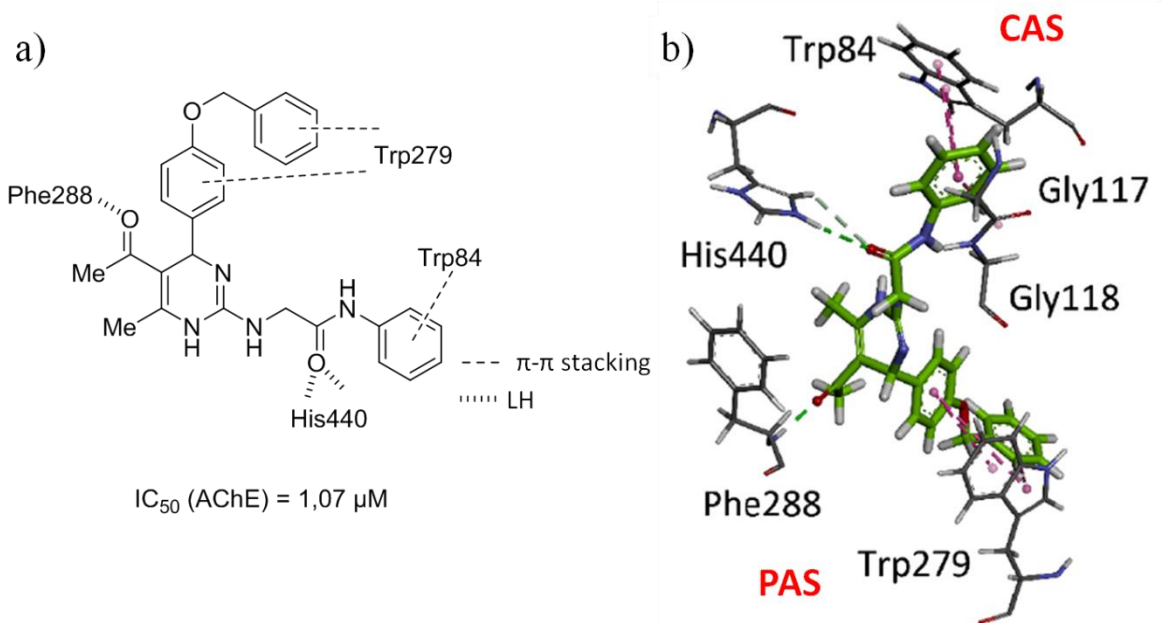
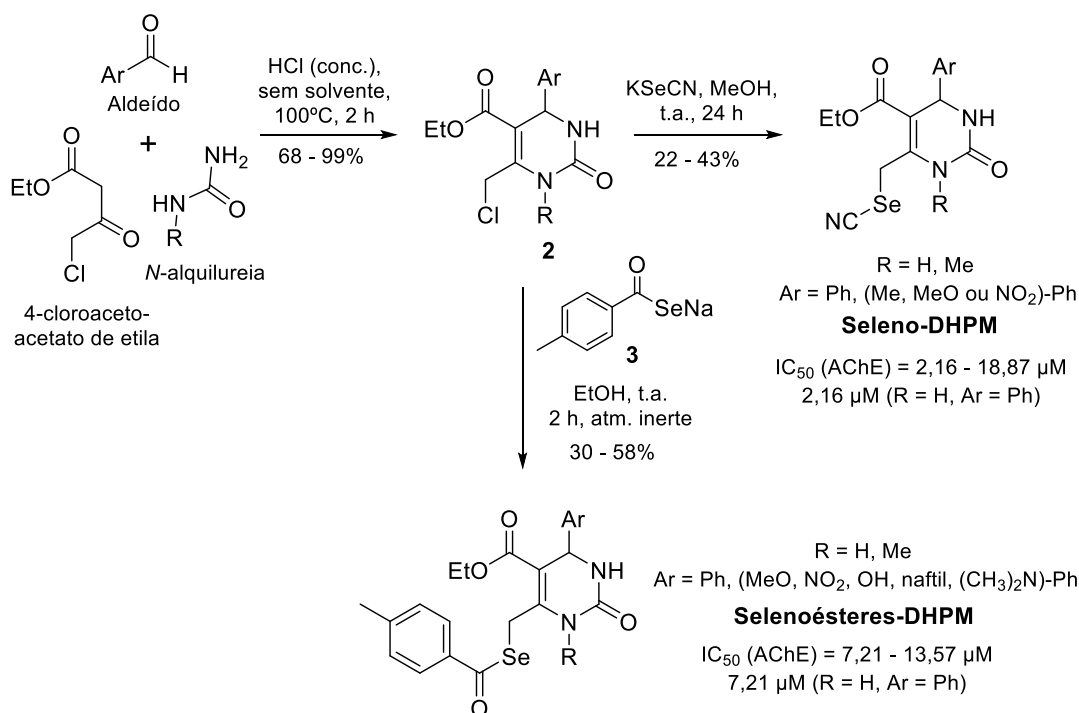


Figura 17. Interações do composto **AAP2** na *TcAChE*: a) representação 2D; b) adaptada da figura do *docking* do trabalho de Ahmad *et al.*¹⁶³

Derivados do tipo organosselênio das DHPM foram sintetizados pelo grupo de pesquisa de Antônio L. Braga, a partir da preparação de 6-clorometil-DHPM (**2**) via reação de Biginelli catalisada por HCl na ausência de solvente. A substituição nucleofílica em **2** por selenocianeto de potássio (KSeCN) e pelo selenocarboxilato **3** levou à formação de seleno-DHPM e selenoésteres de DHPM, respectivamente (Esquema 10). Ambas as séries de compostos mostraram atividade de inibição da AChE na escala micromolar, além de exibir propriedades antioxidantes e um perfil farmacocinético favorável *in silico*.^{164, 165}



Esquema 10. Síntese dos organoselênios derivados de Biginelli com atividade anti-AChE, obtidos pelo grupo de A. L. Braga.^{164, 165}

3.5. CARBOIDRATOS E DERIVADOS

Os carboidratos são as biomoléculas mais abundantes na natureza, sendo alguns os principais elementos da dieta em várias partes do mundo e, sua oxidação, a principal via de produção de energia nas células fotossintéticas.⁵⁰ A atividade biológica desta classe de moléculas é tão inerente a sua classificação (biomolécula) quanto notória pelas inúmeras atividades essenciais à vida, como componentes estruturais básicos dos seres vivos desde o DNA. A relevante importância dos carboidratos na química medicinal não reside somente no fato de sua importância biológica e biocompatibilidade, mas também por serem estruturas ricas em centros assimétricos e moléculas polifuncionais, sendo facilmente conectadas a outras moléculas com diferentes tipos de ligação.¹⁶⁶ Além disso, os carboidratos são capazes de interagir com resíduos de aminoácidos aromáticos através de interações CH/π, sendo um valioso núcleo para interações com alvos proteicos.¹⁶⁷ Além do mais, o cérebro necessita de grandes quantidades de glicose, por isso apesar do caráter hidrofóbico da barreira hematoencefálica, a existência de vários transportadores de hexoses facilitam a passagem de carboidratos e seus derivados, favorecendo o desenho de drogas para o SNC baseadas em carboidratos.¹⁶⁸

3.5.1. Interações CH/ π entre carboidratos e anéis aromáticos

As interações de grupos CH com sistemas de elétrons π podem ser evidenciadas por espectroscopia de IV ou RMN. A dissolução do CHCl_3 em solventes aromáticos no RMN de ^1H leva a um menor deslocamento químico para o sinal do ^1H do CHCl_3 , por exemplo, em benzeno deuterado ($\delta = 6,15$ ppm), em comparação com outros solventes polares ($\delta > 7,5$ ppm).^{169, 170} Pode-se considerar a interação CH/ π como o tipo mais fraco de ligação de hidrogênio, ocorrendo entre um ácido fraco (CH) e uma base fraca (elétrons π). A entalpia de ligação de uma LH típica (entre H e F, O ou N) é cerca de 3-7 kcalmol⁻¹, já para interações do tipo OH/ π , NH/ π e CH/ n é cerca de 2-4 kcalmol⁻¹, enquanto que para interações CH/ π é cerca de 1 kcalmol⁻¹.¹⁷¹ A grande particularidade deste tipo de ligação em compostos orgânicos é o número de grupos CH que podem participar simultaneamente na interação com um sistema π . A entalpia total do sistema cresce à medida que os grupos são capazes de se organizar maximizando o número de interações CH/ π favoráveis. Outra característica importante é que as interações CH/ π são observadas tanto em meios aquosos quanto apolares.¹⁷¹

A natureza da interação CH/ π depende do quão deficiente de elétrons é a ligação C-H, ou seja, quanto mais grupos retiradores de elétrons estiverem ligados ao carbono da ligação C-H, maior será o caráter doador de LH do grupo CH. Nesse sentido, carboidratos são anéis ricos em oxigênio que tornam os grupos C-H mais deficientes de elétrons do que um anel alifático comum. Várias proteínas de ligação a carboidratos, envolvidas em processos de reconhecimento celular, contém muitos resíduos de aminoácidos aromáticos no sítio de ligação, especialmente o triptofano. Esses resíduos interagem com carboidratos através de uma geometria do tipo *stacking*, formando um sanduíche entre os anéis aromático e glicosídico.^{167, 172} Evidências teóricas e experimentais têm comprovado que as interações CH/ π são mais favorecidas na face com mais ligações C-H em axial ao plano do anel, pois essa geometria favorece a sobreposição dos orbitais σCH e π do anel.^{173, 174} Por exemplo, a face α da β -D-galactose é uma face excelente para a formação de ligações CH/ π , devido à existência de três hidrogênios axiais em C1, C3 e C5 (Figura 18). Além disso, a hidroxila axial em C4 retira densidade eletrônica de C3 e C5 devido à sobreposição antiperiplanar dos orbitais ligantes $\sigma\text{C}_3\text{-H}$ e $\sigma\text{C}_5\text{-H}$ com o antiligante $\sigma^*\text{C}_4\text{-O}$, tornando esses grupos CH ainda mais deficientes de elétrons. De fato, a β -D-galactose foi o monossacarídeo que mais permitiu ligações CH/ π com anéis aromáticos dentre os mais comuns estudados por Hudson *et al.*¹⁷² De acordo com cálculos de superfície de potencial eletrostático (ESP), a face α apresentou

menor densidade eletrônica e maior tendência a formar interações com anéis aromáticos em ambos os anômeros da D-galactose (Figura 19).

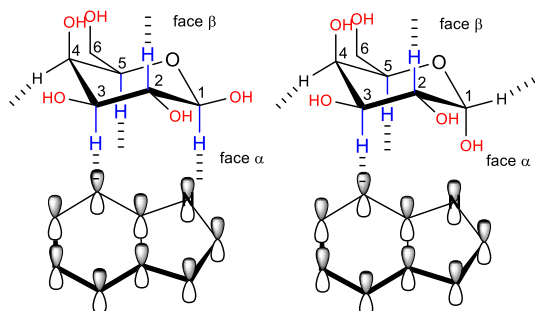


Figura 18. Representação esquemática das interações CH/π da β-D-galactose (esquerda) e α-D-galactose (direita) com o anel indólico. As ligações C-H axiais estão destacadas em azul.

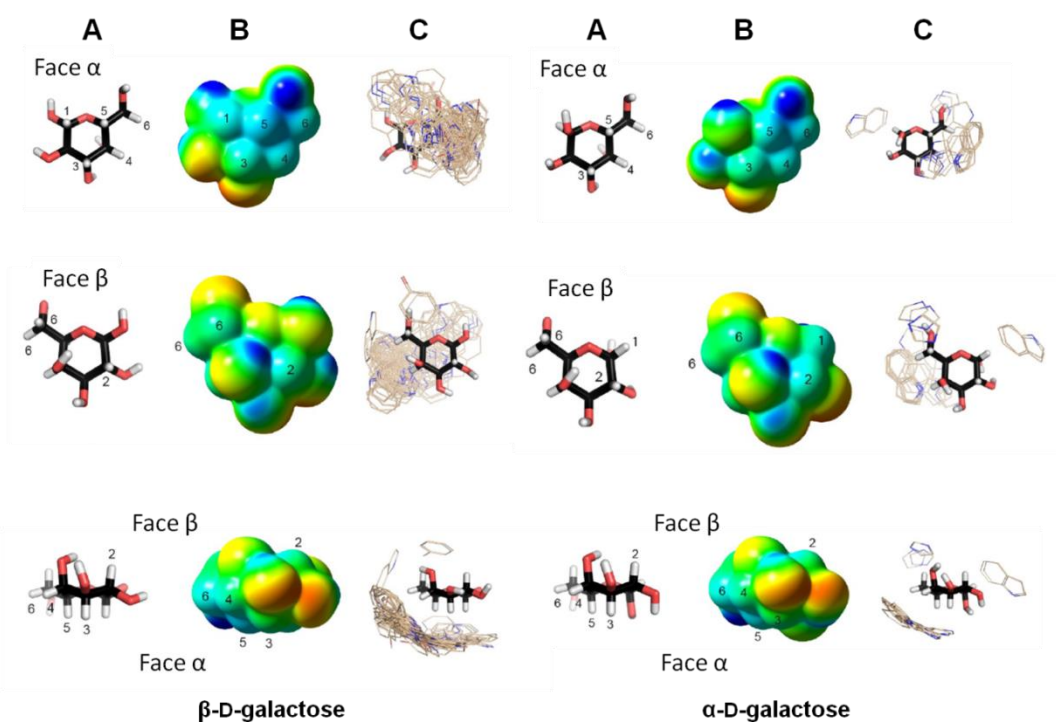


Figura 19. Relação entre a superfície de potencial eletrostático (ESP) da D-galactose e a formação de interações CH/π: A) estrutura tridimensional; B) ESP, onde as regiões em azul são as áreas com menor densidade eletrônica; C) representação das interações com anéis aromáticos. Adaptada de Hudson *et al.*¹⁷²

De fato, as interações entre carboidratos e anéis aromáticos em proteínas podem ser classificadas tanto como do tipo CH/π (LH fraca), *stacking* (devido a sua geometria), ou como interações de dispersão com contribuição de fatores eletrostáticos (do ponto de vista físico-químico).¹⁶⁷ Embora ainda pouco exploradas no âmbito da química medicinal, o

entendimento dessas interações e de quais tipos de carboidratos e/ou seus substituintes podem melhorar a interação com o alvo biológico é muito importante para o desenvolvimento de novos compostos.

3.5.2. Derivados de carboidratos com atividade anti-beta amilóide (anti-A β)

Vários derivados de carboidratos têm sido descritos na literatura devido à atividade antiagregação de beta-amilóide (A β), tais como alguns glicosídeos terpenóides. Estudos *in vivo* mostraram que o *O*-glicosídeo ginsenosídeo **Rg1** (Figura 20), princípio ativo da raiz *Panax ginseng*, foi capaz de reduzir a produção do peptídeo A β através da inibição da enzima β -secretase (BASE-1), provocando melhoras neuropatológicas e comportamentais em ratos com superexpressão da proteína precursora amilóide (APP).¹⁷⁵ Além disso, o **Rg1** também foi capaz de proteger as células da toxicidade induzida por A β através da inibição *in vitro* da BASE-1.¹⁷⁶ Outros efeitos positivos do **Rg1** na neuropatologia associada a doença de Alzheimer também tem sido descritos para o **Rg1**, tais como diminuição da disfunção mitocondrial e do estresse oxidativo.¹⁷⁵ O acteosídeo, um *O*-glicosídeo fenólico isolado da *Orobancha minor*, demonstrou forte inibição da agregação da A β ₁₋₄₂ com IC₅₀ de 8,9 μ M, além de diminuir a geração de espécies reativas de oxigênio, contribuindo para reduzir o estresse oxidativo.¹⁷⁷ Cromonas como a aloeresina D e a C-2'-decoumaroil-aloesina G, C-glicosídeos isolados da babosa *Aloe vera*, inibiram a atividade da BASE-1 com valores de IC₅₀ de 39,0 e 20,5 μ M respectivamente.¹⁷⁸

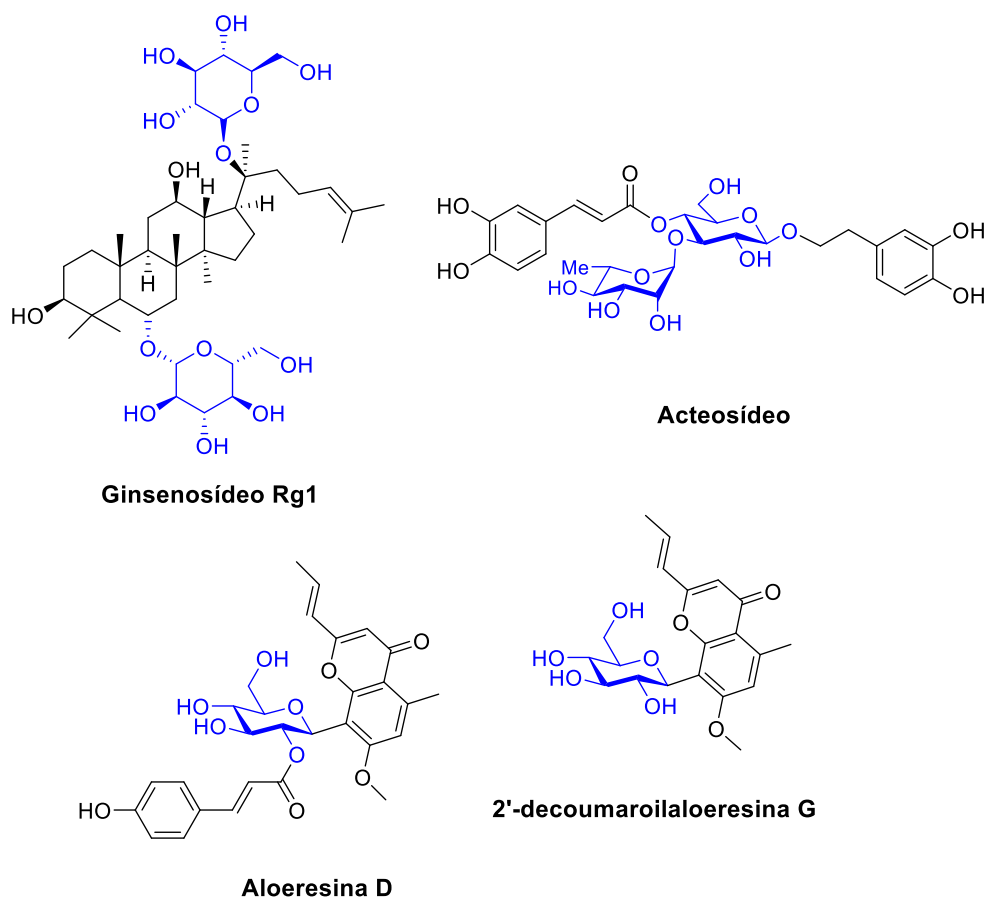


Figura 20. Produtos naturais derivados de carboidratos com atividade anti-A β .

3.5.3. Derivados de carboidratos com atividade anticolinesterase

Vários glicosídeos naturais derivados de carboidratos também exibem atividade anti-AChE, como por exemplo a timosaponina AIII ($IC_{50} = 5,4 \mu M$), extraída da *Anemarrhena asphodeloides*, a nuciferosida ($IC_{50} = 3,2 \mu M$) e a vanillosida ($IC_{50} = 4,55 \mu M$), ambas extraídas da flor-de-lótus (*Nelumbo nucifera*), entre outros.¹⁷⁵ Flavonóides glicosídicos, tais como tilirosídeo e a quercitrina, extraídos da *Agrimonia pilosa*, apresentam também valores de IC_{50} micromolar, de 25,5 e 66,9 respectivamente (Figura 21).¹⁷⁹ Polifenóis isolados da *Verbascum xanthophoeniceum* mostraram, além de propriedades antioxidantes, inibição das colinesterases, sendo que o melhor resultado foi obtido com o forsitosídeo B que foi capaz de inibir 98% da atividade da BuChE na concentração de 100 μM .¹⁸⁰ Outro exemplo, o sincososídeo, extraído da *Symplocos racemosa*, inibiu a BuChE com IC_{50} de 21,1 μM e não mostrou atividade contra a AChE (Figura 21).¹⁷⁵

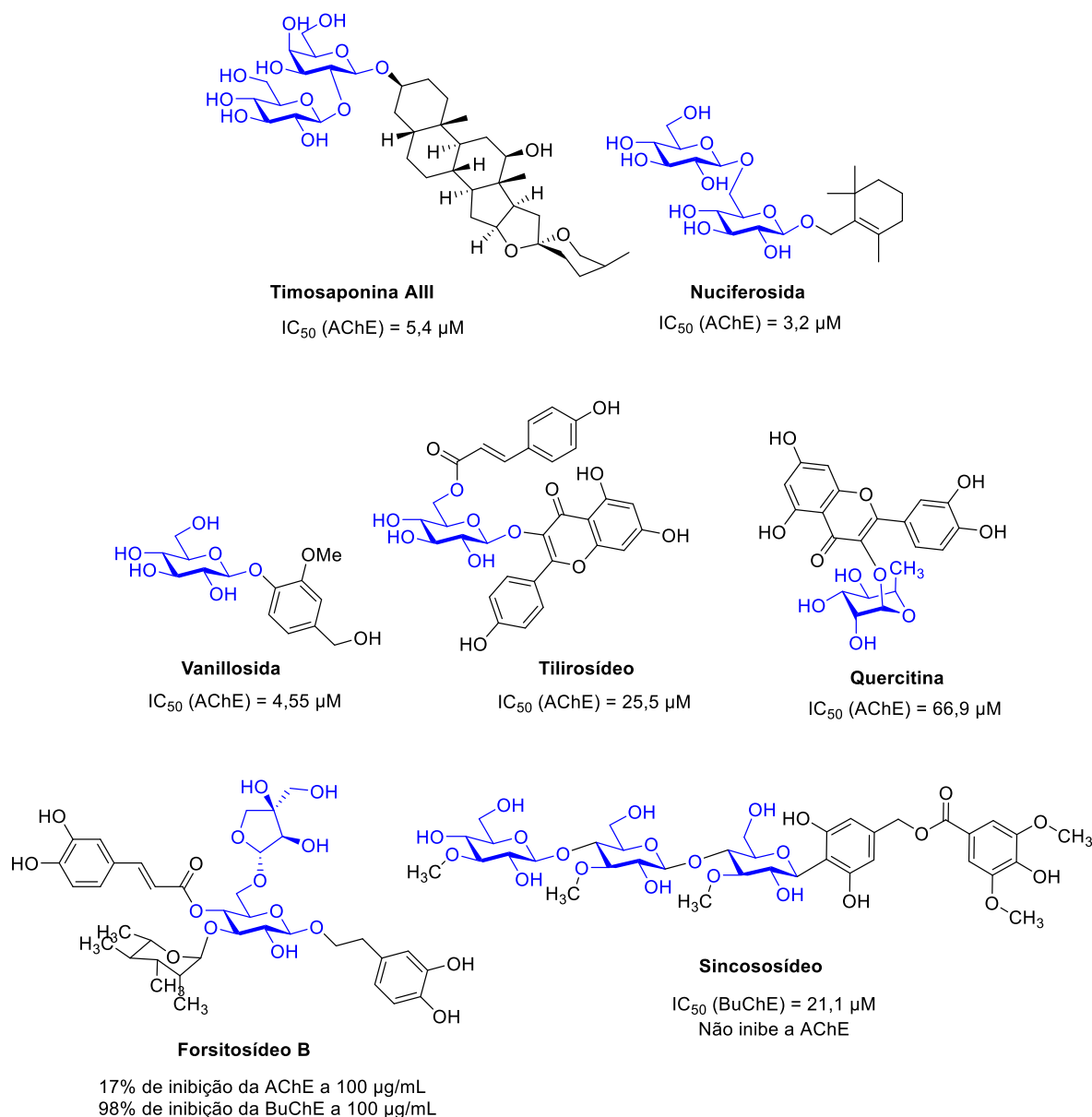
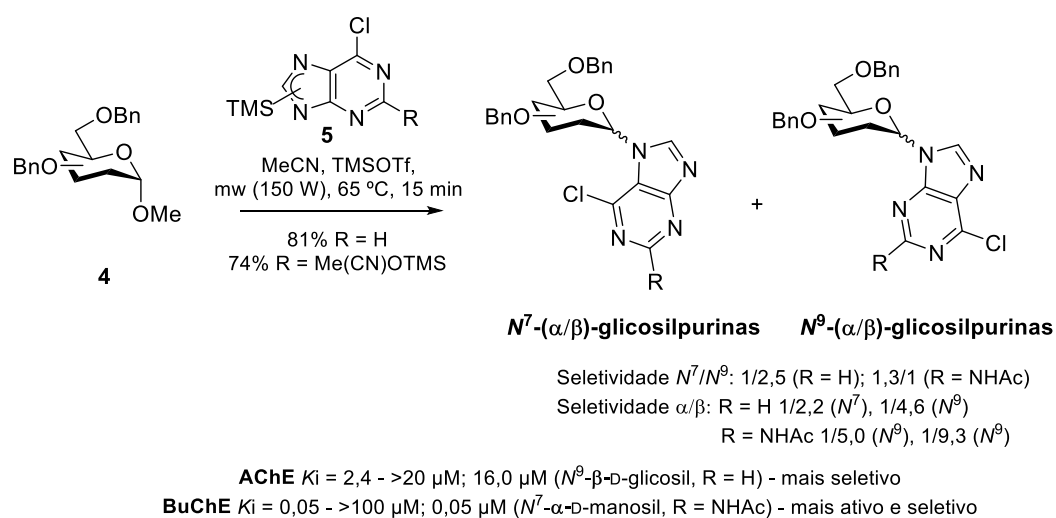


Figura 21. Produtos naturais derivados de carboidratos com atividade anticolinesterase.

Nos últimos anos, vários nucleosídeos^{††} sintéticos tem sido estudados devido à atividade anticolinesterase. Nucleosídeos de purina contendo o anéis derivados de D-glicose, D-manose e D-galactose foram sintetizados por Schwarz e colaboradores e inibiram as enzimas AChE e BuChE na escala micromolar.¹⁸¹ Os nucleosídeos foram obtidos a partir da reação em microondas entre o glicosídeo de metila protegido (4) e a 6-cloropurina sililada (5)

^{††} Nucleosídeos consistem em um anel carboidrato substituído por uma base nitrogenada, geralmente purínica ou pirimidínica, na posição anomérica. Quando um grupo fosfato é ligado em outra posição do anel glicosídico, é chamado de nucleotídeo. O prefixo *núcleo* vem do núcleo celular, onde são encontrados o DNA e o RNA, polímeros naturais de nucleotídeos.

que forneceu quatro produtos diferenciados entre a configuração anomérica e a posição de ligação na purina (Esquema 11). Os α -nucleosídeos foram, em geral, mais potentes, sendo o mais ativo da série o N^7 -(2-acetamido- α -D-manosilpurina), seletivo para a BuChE ($K_i = 0,05 \mu\text{M}$). Os autores também observaram que os derivados da D-manose apresentaram seletividade para a BuChE, enquanto que os D-glicosil^{‡‡} e D-galactosilpurinas foram fortemente seletivos para a enzima AChE.¹⁸¹ Outros nucleosídeos de purina e pirimidina contendo núcleos carboidratos, tais como ácido D-glicurônico e D-glicose, têm sido sintetizados e demonstrado atividade anticolinesterase também na ordem micromolar.^{182, 183}



Esquema 11. Nucleosídeos de purina sintetizados por Schwarz e colaboradores.¹⁸¹

Derivados de carboidratos contendo o átomo de selênio na estrutura têm sido recentemente investigados em estudos associados a possíveis terapias para a doença de Alzheimer, tais como propriedades antioxidantes, anti-inflamatórias, antidepressivas, além de anticolinesterase.¹⁸⁴⁻¹⁸⁸ Selenoureidoiminoaçúcares foram sintetizados por Olsen e colaboradores em nove etapas a partir do α -metil-D-glicosídeo, mostrando atividade anti-AChE na escala micromolar, inibindo tanto a enzima livre (EI), quanto na presença do substrato (ESI) (Figura 22a). Além disso, os compostos foram capazes de mimetizar a ação da enzima glutatona peroxidase, enzima que contém selênio no sítio ativo e é responsável pela redução do peróxido de hidrogênio.¹⁸⁴ Aril-selenoxilofuranosídeos protegidos com o grupo acetônio foram sintetizados pelo grupo de Diogo S. Lüdtkke em três etapas a partir da D-xilose em altos rendimentos.¹⁸⁵ Análises *in vivo* do fenil-selenoxilofuranosídeo (Figura 22b)

^{‡‡} Os termos *glicosil* e *glicosídico* podem se referir tanto a um anel de carboidrato qualquer quanto especificamente ao anel da glicose.

mostraram propriedades como melhoria de déficits cognitivos associados a demências tipo a DA, redução do estresse oxidativo, diminuição da atividade da AChE e anti-inflamatórias.¹⁸⁶ Recentemente um estudo mostrou que o mesmo composto melhorou déficits associados a memória de longo prazo em ratos expostos ao glutamato monossódico.¹⁸⁷ Por sua vez, alquil-selenocarboidratos mostraram propriedades antioxidantes, sendo que o octil-selenoxilofuranosídeo (derivado da D-xilose) demonstrou os melhores resultados na capacidade de sequestrar radicais livres.¹⁸⁸

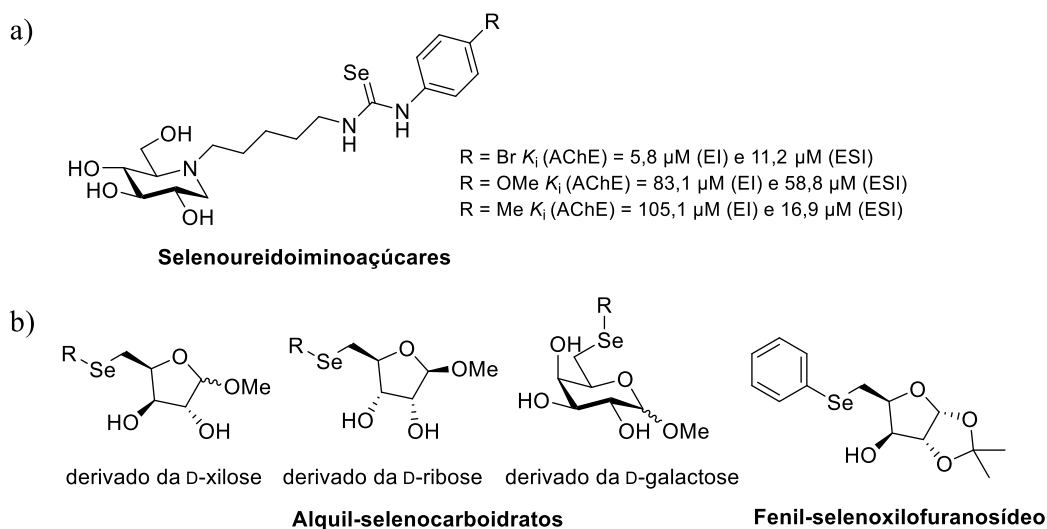


Figura 22. Derivados de carboidratos contendo selênio: a) selenoureidoiminoaçúcares inibidores da AChE; b) selenocarboidratos sintetizados pelo grupo de Lüdtke.

Uma série de iminoaçúcares foi sintetizada por Decroocq e colaboradores que avaliaram a atividade de inibição das enzimas colinesterases. Dos 23 compostos avaliados, apenas três inibiram a AChE, todos contendo anéis aromáticos provenientes do grupo protetor benzil (Figura 23a). Outros seis compostos inibiram seletivamente a BuChE, sendo três contendo o anel triazólico e apenas dois não contendo nenhum anel aromático (Figura 23b). De forma geral, os iminocarboidratos mais protegidos apresentaram atividade melhor, enquanto que a desproteção das hidroxilas levou à diminuição ou à ausência de atividade.¹⁸⁹

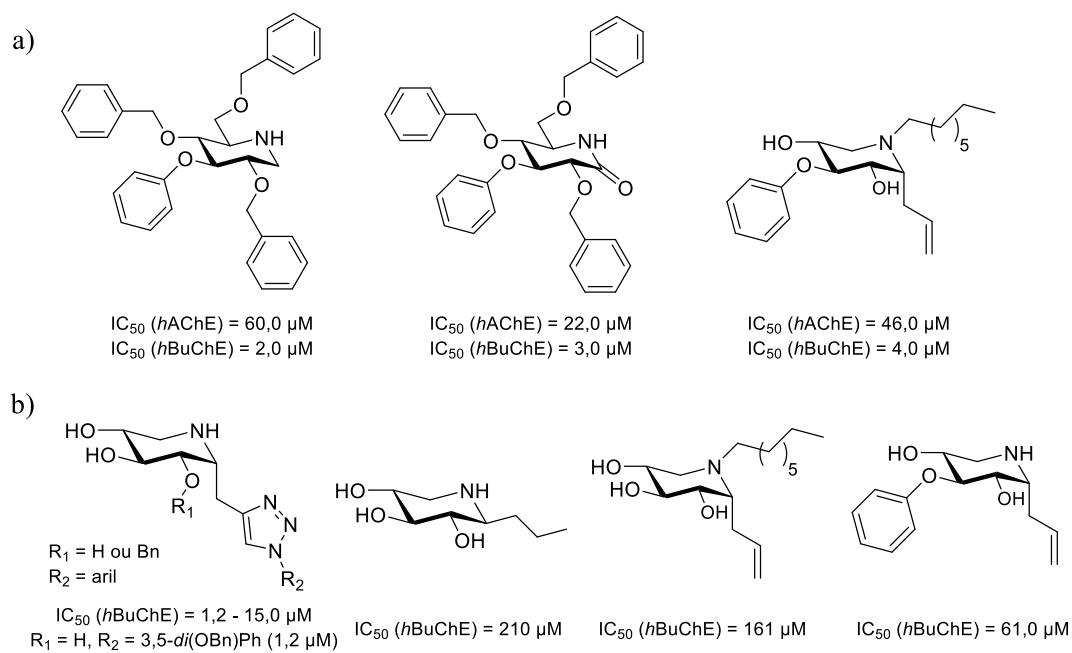


Figura 23. Iminoaçúcares de Decrooq *et al.*¹⁸⁹ a) inibidores da AChE e da BuChE; b) inibidores seletivos da BuChE.

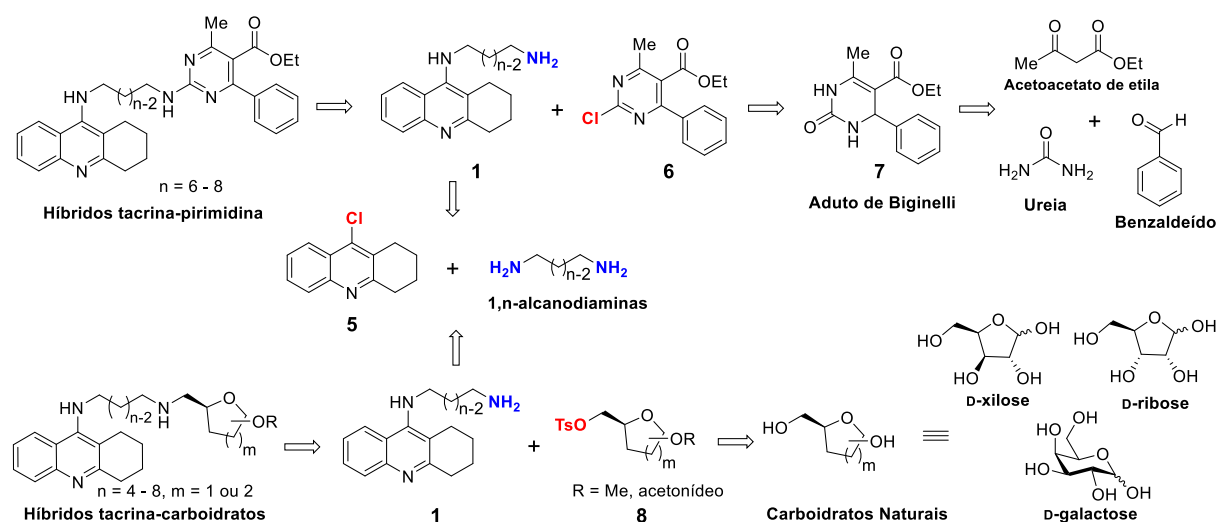
Capítulo 4

Resultados e Discussão

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

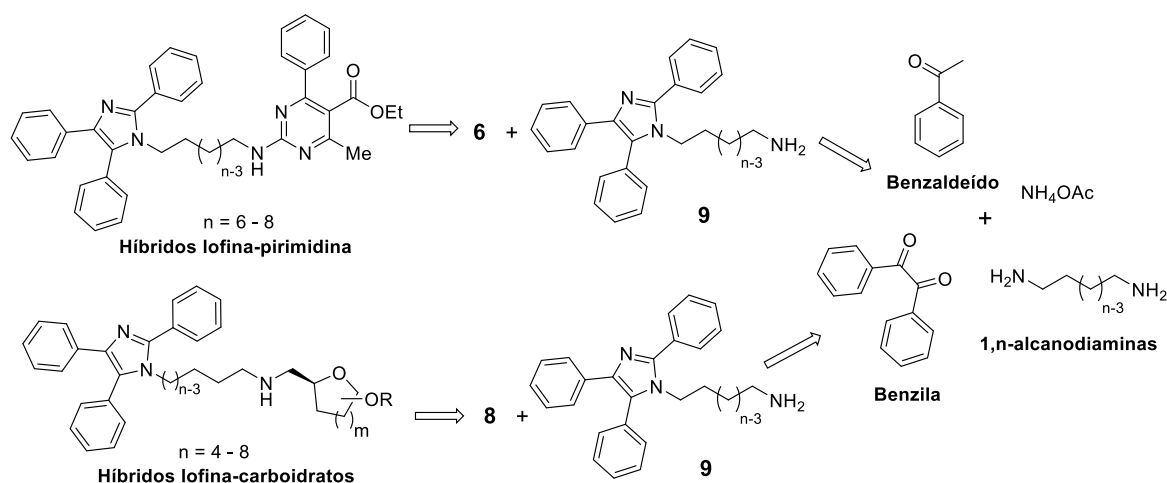
4.1. METODOLOGIA

Para obtenção dos compostos híbridos de interesse foram utilizadas metodologias de reação envolvendo substituição nucleofílica alifática (S_N) e aromática (S_NAr). Inicialmente, foi necessária a preparação dos materiais de partida como espécies eletrofílicas ou nucleofílicas, com a reatividade apropriada para a obtenção dos compostos de interesse para o desenvolvimento do presente trabalho. A etapa chave para a obtenção de híbridos baseados na tacrina é a construção do núcleo tetraidroacridínico na forma de cloreto, pela 9-cloro-1,2,3,4-tetraidroacridina (**5**). A pirimidina utilizada também foi obtida na forma de cloreto (**6**) a partir da 3,4-di-hidropirimidinona (DHPM) de Biginelli (**7**). Já os carboidratos foram protegidos e preparados na forma de tosilatos (**8**) a partir dos precursores naturais D-xilose, D-ribose e D-galactose (Esquema 12).



Esquema 12. Análise retrossintética para a obtenção dos híbridos baseados em tacrina.

O anel imidazólico dos híbridos baseados em lofina foi construído através da adaptação da estratégia multicomponente, previamente desenvolvida pelo nosso grupo de pesquisa para a síntese dos híbridos tacrina-lofina (ver Esquema 7b). Os compostos obtidos na forma de 9-aminoalquillofinas (**9**) foram então acoplados aos intermediários **6** e **8** para a obtenção dos compostos de interesse (Esquema 13).

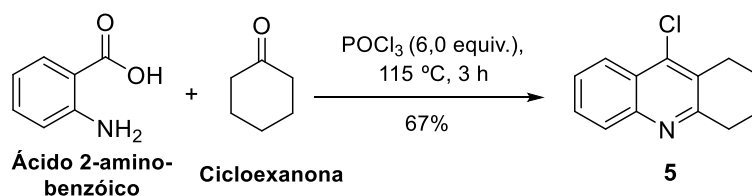


Esquema 13. Análise retróssintética para a obtenção dos híbridos baseados em lofina.

4.2. SÍNTESE DOS DERIVADOS DA TACRINA

4.2.1. Síntese da 9-cloro-1,2,3,4-tetraidroacridina (5)

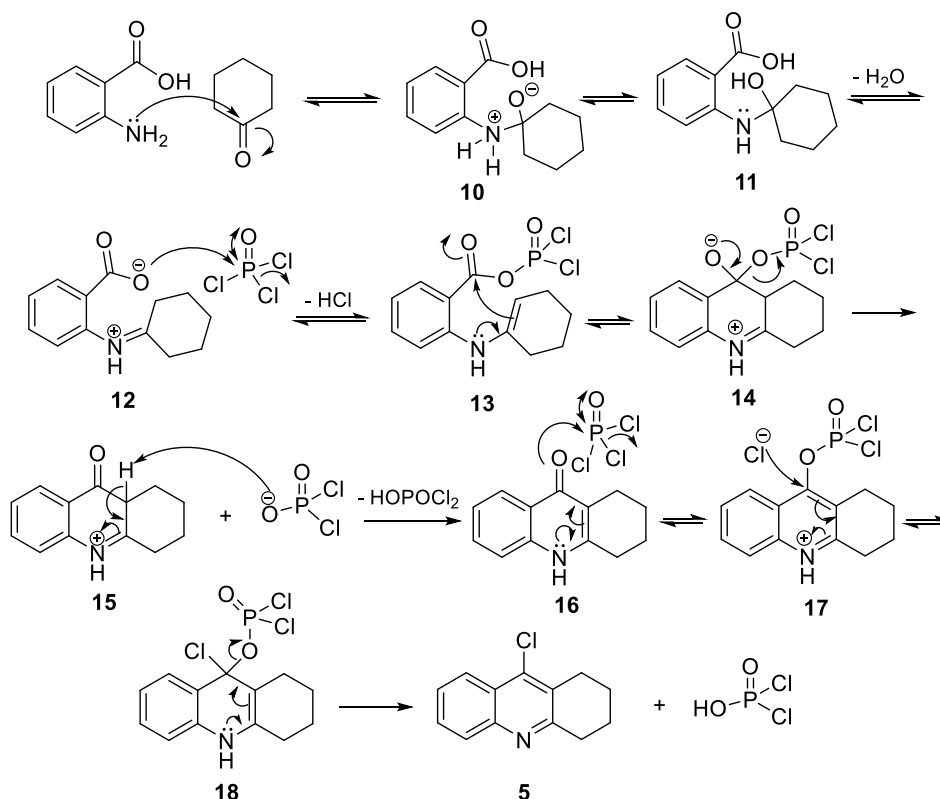
A etapa chave para obtenção de **5** é a reação de condensação de Niementowski, desenvolvida para obtenção de compostos quinolínicos, cuja diferença em relação a reação de Friedländer (ver Esquema 5, página 30) é a utilização de um ácido carboxílico ao invés de uma nitrila, aldeído ou cetona.¹⁹⁰ A reação entre o ácido 2-aminobenzóico (ácido antranílico) e a cicloexanona forneceu a 9-cloro-1,2,3,4-tetraidroacridina (**5**), empregando-se excesso de POCl_3 , sob refluxo a $115\text{ }^\circ\text{C}$ e atmosfera inerte (Esquema 14).¹⁹¹ O produto foi obtido com 67% de rendimento após purificação por cromatografia em coluna.



Esquema 14. Reação de Niementowski para obtenção da 9-cloro-1,2,3,4-tetraidroacridina (**5**).

No Esquema 15 a seguir, é apresentada uma proposta de mecanismo para esta reação. Propõe-se que, inicialmente, a adição nucleofílica do grupo amino do ácido antranílico à carbonila da cicloexanona leva à formação do intermediário **10**, que após troca protônica fornece o hemiaminal **11**. A seguir, a rápida desidratação de **11** fornece o imínio **12**. Então, o carboxilato em **12** é ativado com cloreto de fosforila (POCl_3) formando o intermediário **13**. A

ciclização ocorre através do ataque nucleofílico intramolecular em **13** da enamina sobre a carboxila ativada. A seguir, ocorre a eliminação do ânion diclorofosfato em **14**, levando à formação do imínio **15**, que tautomeriza para a enamina em **16**. A ativação da carbonila da tetraidroacridinona **16** por outra molécula de POCl₃ favorece a formação do intermediário **17**, que sofre adição nucleofílica pelo cloreto, formando o intermediário tetraédrico **18**. Após a saída do ânion diclorofosfato em **18** obtém-se a 9-cloro-1,2,3,4-tetraidroacridina (**5**) de interesse.¹⁴



Esquema 15. Proposta de mecanismo para a síntese da 9-cloro-1,2,3,4-tetraidroacridina (**5**).

A formação do núcleo tetraidroacridínico em **5** foi evidenciada por RMN de ¹H, onde é observado o padrão típico desse sistema (Figura 24): i) dubleto de dubletos em 8,1 ppm referente ao H8, com $J = 8,4$ Hz (acoplamento ³ J com H7) e 1,3 Hz (acoplamento ⁴ J com H6); ii) dubleto em 7,95 ppm referente ao H5, com $J = 8,5$ Hz (acoplamento ³ J com H6), não foi possível obter o valor de ⁴ J com H7, mas foi observado um leve desdobramento no sinal, além do acoplamento ⁴ J no sinal de H7; iii) dubleto de dubletos de dubletos em 7,62 ppm referente ao H6 com $J = 8,4$ Hz (acoplamento ³ J com H5), 6,9 Hz (acoplamento ³ J com H7) e 1,4 Hz (acoplamento ⁴ J com H8); iv) dubleto de dubletos de dubletos em 7,47 ppm referente ao H7

com $J = 8,2$ Hz (acoplamento 3J com H8), $6,9$ Hz (acoplamento 3J com H6) e $1,2$ Hz (acoplamento 4J com H5). A determinação do deslocamento químico (δ) sinais dos hidrogênios aromáticos foi baseada em derivados contendo substituintes em H5-H8.^{14, 192} Com relação ao anel alifático, são observados dois tripletos referentes a H4 (3,1 ppm) e H1 (2,9 ppm), ambos com $J = 6,2$ Hz, que corresponde ao 3J com H2 e H3, respectivamente, e um multipletto em 1,7 ppm correspondente aos H2 e H3. O espectro de RMN de ^{13}C de **5** pode ser conferido no material adicional (Figura C6, pág. 182).

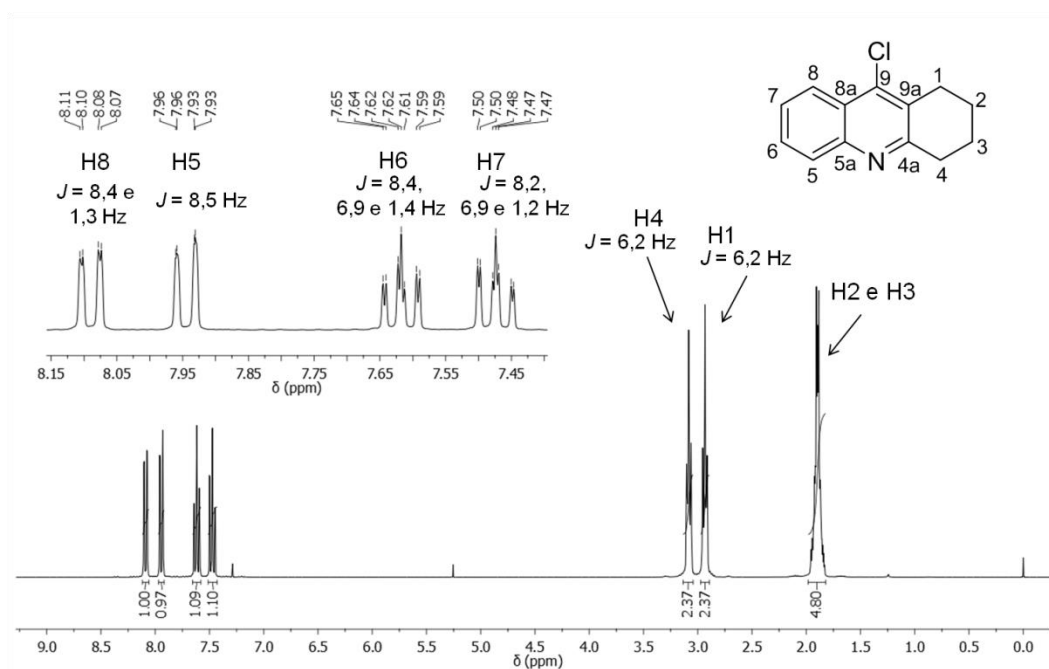
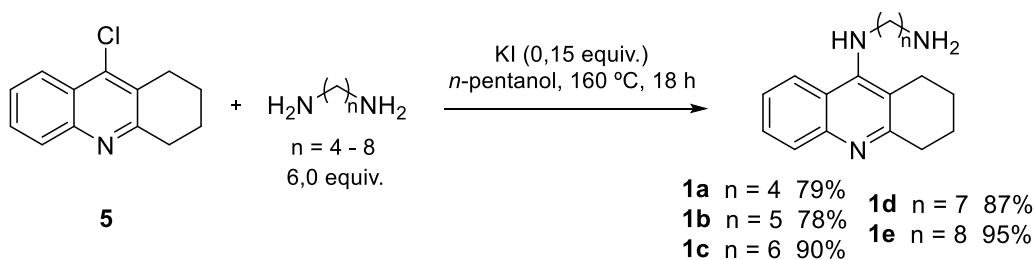


Figura 24. Espectro de RMN de ^1H (CDCl_3 , 300 MHz) da 9-cloro-1,2,3,4-tetraidroacridina (**5**), com ampliação entre 7,40 e 8,15 ppm (acima e à esquerda).

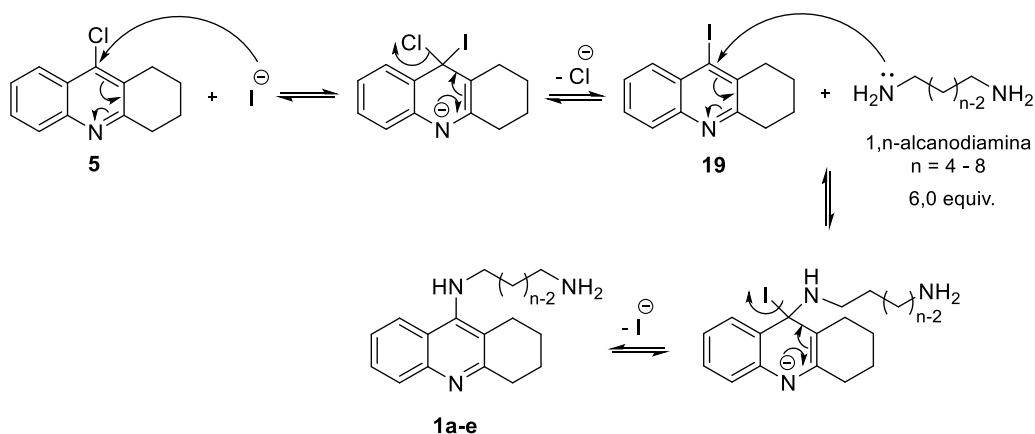
4.2.2. Obtenção das 9-aminoalquil-1,2,3,4-tetraidroacridinas (**1a-e**)

Na etapa seguinte, a 9-cloro-1,2,3,4-tetraidroacridina (**5**) foi conectada à cadeia espaçadora alquílica de interesse através da reação de substituição nucleofílica das 1, n -alcanodiaminas em **5** na presença de iodeto de potássio (KI), em n -pentanol a 160°C , levando à formação dos intermediários **1a-e** em bons rendimentos (78-95%) (Esquema 16).



Esquema 16. Síntese dos intermediários 9-aminoalquil-1,2,3,4-tetraidroacridinas (**1a-e**).

Existem outras metodologias para obtenção das aminas **1a-e** sem a utilização de catalisador ou sem excesso da diamina, entretanto a metodologia utilizada neste trabalho já havia sido previamente testada no grupo como a de melhor rendimento e com menor formação de subprodutos.¹⁴ A utilização do iodeto de potássio na síntese de **1a-e** tem o objetivo de deslocar o equilíbrio em favor da formação dos produtos, substituindo o cloreto por iodeto em **5**, formando *in situ* a 9-iodo-1,2,3,4-tetraidroacridina (**19**). Como o iodeto é melhor nucleófilo e melhor grupo de saída que o cloreto, pode ser utilizado em quantidade catalítica para facilitar a substituição nucleofílica aromática (S_NAr) da 1,n-alkanodiamina em **5** (Esquema 17). A utilização de seis equivalentes da 1,n-alkanodiamina teve como objetivo evitar a formação do bis(n)-tacrina.



Esquema 17. Mecanismo de formação das 9-aminoalquil-1,2,3,4-tetraidroacridinas (**1a-e**).

Comparando-se os espectros de RMN de ^1H da 9-cloro-1,2,3,4-tetraidroacridina (**5**, Figura 24) com a amina formada **1a** (Figura 25) observa-se que a substituição do grupo retirador de elétrons (Cl) por um doador (NH) no anel aromático, promove um menor δ para os hidrogênios aromáticos, sendo que a maior variação é observada para o H8 ($\Delta\delta = 0,17$

ppm), seguida por H7 ($\Delta\delta = 0,15$ ppm), H6 ($\Delta\delta = 0,07$ ppm) e a menor para o H5 ($\Delta\delta = 0,02$ ppm). Essa diferença faz com que os sinais de H5 e H8 se sobreponham, gerando um sinal com três valores de $J = 15,5, 8,5$ e $1,0$ Hz, extraídos do espectro. Entretanto os valores não condizem com os acoplamentos reais, logo atribui-se o sinal como um multipletto. Outro sinal observado em menor δ é o de H1 e H4 ($\Delta\delta = 0,17$ ppm para H1 e $0,34$ ppm para H4), que também são observados sobrepostos. O aparecimento do sinal largo para o NH em $4,1$ ppm contribui para evidenciar a formação do produto, além dos sinais da cadeia metilênica. O tripleto observado em $3,5$ ppm é característico de H metilênico ligado ao núcleo tacrina (H10), com $J = 7,1$ Hz, referente ao 3J com H11. Os demais sinais da cadeia são observados entre $1,4$ e $1,8$ ppm como um multipletto devido à sobreposição dos sinais referentes a H11, H12 e do NH_2 .

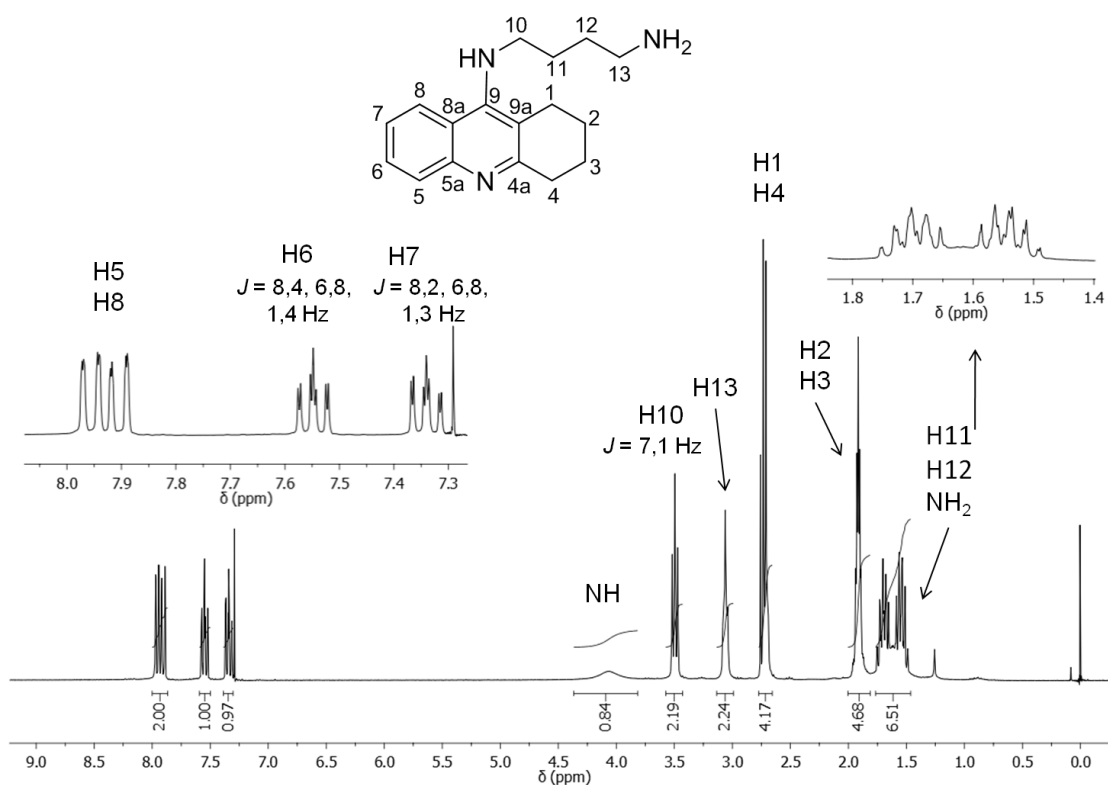
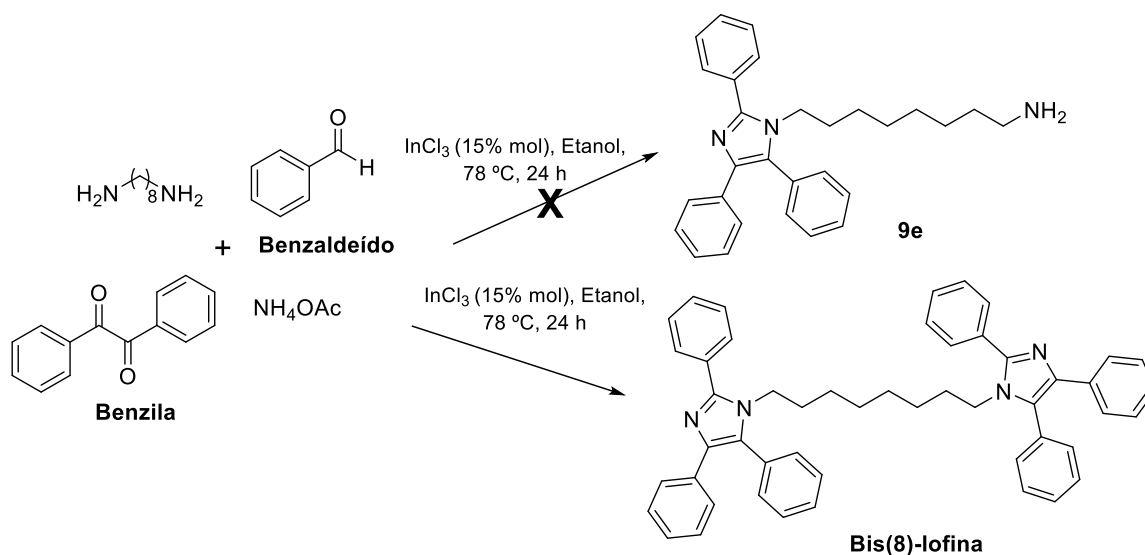


Figura 25. Espectro de RMN de ^1H (CDCl_3 , 300 MHz) da amina **1a**, com ampliação entre $7,3$ e $8,0$ ppm (acima e à esquerda) e entre $1,4$ e $1,8$ ppm (acima e à direita).

4.3. SÍNTESE DOS DERIVADOS DA LOFINA

Com o objetivo de obter o núcleo lofina conectado à cadeia alquílica espaçadora como intermediários nucleofílicos, foi desenvolvida uma metodologia para obtenção das *n*-(2,4,5-trifenil-1*H*-imidazol-1-il)alcanaminas (**9**).

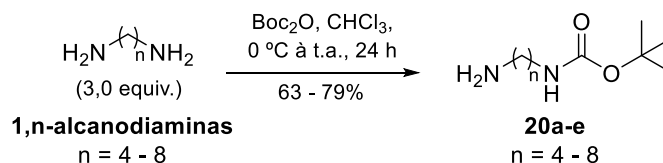
A primeira tentativa foi utilizar o procedimento *one-pot* desenvolvido previamente pelo nosso grupo de pesquisa para a síntese de híbridos tacrina-lofina e dímeros bis(*n*)-lofina.¹⁷ A reação tetracomponente envolveu benzaldeído, benzila, acetato de amônio e 1,8-octanodiamina, utilizando cloreto de índio como catalisador e refluxo em etanol (Esquema 5). A utilização de 1,0 equivalente da diamina conduziu à formação do bis(8)-lofina, não sendo observado o produto de interesse. Foram testadas também condições utilizando excesso da diamina, com 3,0 e 6,0 equivalentes, entretanto não se observou a formação do produto de interesse, sendo obtida uma mistura complexa. Uma explicação possível é que a utilização de excesso de diamina poderia permitir a incorporação de duas moléculas dessa diamina, ao invés de uma de amônia, o que não levaria à formação do anel imidazólico, como é mostrado no mecanismo proposto mais adiante no Esquema 21. Porém esta possibilidade também não foi observada.



Esquema 18. Tentativa de obtenção das aminas de interesse via *one-pot*.

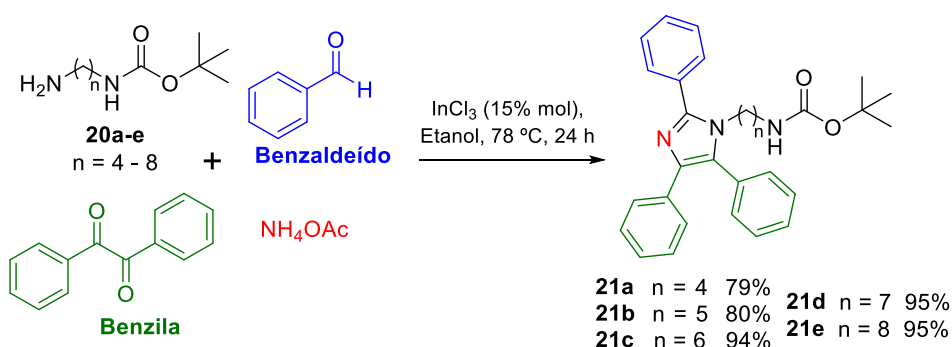
Alternativamente, utilizou-se a estratégia de proteção seletiva de um dos grupos amino das 1,*n*-alcanodiaminas com o grupo dicarbonato de *terc*-butila (Boc₂O), através de um protocolo já estabelecido na literatura.¹⁹³ Utilizando-se excesso de 3,0 equivalentes da

diamina foi possível obter as 1,n-alcanodiaminas protegidas (**20a-e**) em bons rendimentos, 63-79% (Esquema 19).



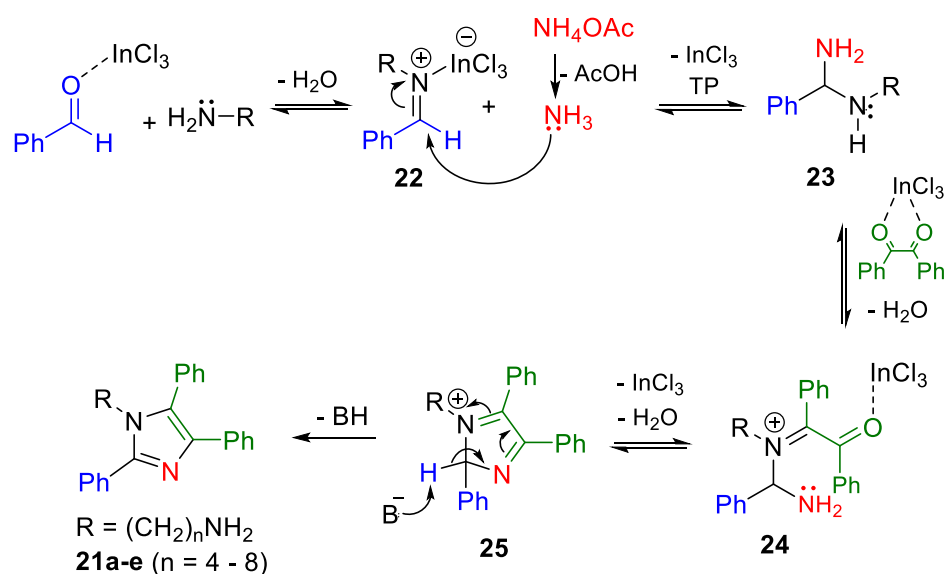
Esquema 19. Proteção seletiva das 1,n-alcanodiaminas.

Após a obtenção das 1,n-alcanodiaminas protegidas, foi conduzida a reação tetracomponente para a construção do núcleo lofina, obtendo-se os intermediários protegidos n-(2,4,5-trifenil-1*H*-imidazol-1-il)alquil)carbamato de *tert*-butila (**21a-e**) (Esquema 20). A reação foi conduzida sob refluxo de etanol por 24 horas e com 0,15 equivalentes de InCl_3 , que já havia sido estudado previamente no grupo como melhor catalisador para este tipo de reação (ver Tabela 3, página 43).



Esquema 20. Reação tetracomponente para síntese das aminas **21a-e**.

Diferentes propostas mecanísticas já foram apresentadas para a reação tricomponente entre benzila, aldeído e acetato de amônio para a formação da lofina.^{142, 194} Das Sharma e colaboradores propuseram um mecanismo para a formação de imidazóis tetrassubstituídos na presença de $\text{InCl}_3 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ como catalisador.¹⁴⁴ Baseada neste trabalho, a seguir é apresentada uma proposta mecanística para a formação dos imidazóis tetrassubstituídos sintetizados neste trabalho na presença de InCl_3 (Esquema 21).

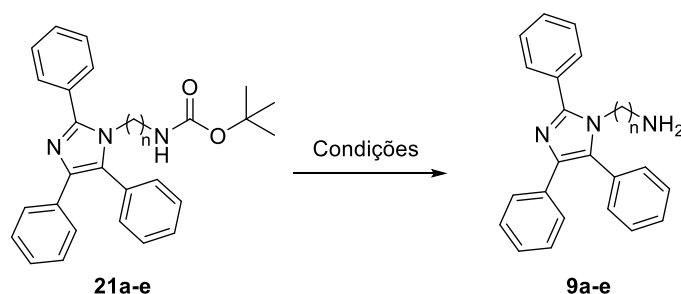


Esquema 21. Proposta de mecanismo da reação tetracomponente.

Conforme mostrado no esquema acima, o ácido de Lewis promove um aumento do caráter eletrofílico da carbonila do benzaldeído (em azul), favorecendo o ataque nucleofílico da amina primária, levando à formação do íon imínio **22**, após a eliminação de uma molécula de água. A seguir, a adição nucleofílica no íon imínio **22** pela amônia (produzida no meio reacional a partir do acetato de amônio) fornece a diamina **23**. O grupo amino secundário de **23** promove um ataque nucleofílico a uma das carbonilas da benzila (em verde), que está ativada pelo ácido de Lewis, fornecendo o imínio **24**, após a eliminação de água. Então, o ataque nucleofílico intramolecular do grupo amino em **24** sobre a carbonila ativada resulta no intermediário cíclico **25**, após a eliminação de água. A seguir, a abstração de um próton do intermediário **25** permite a aromatização do anel e fornece o imidazol tetrassubstituído como produto final (**21a-e**).¹⁴

A etapa de remoção do grupo Boc para desproteção das aminas **21a-e** foi realizada primeiramente em hidrólise ácida ($\text{HCl}_{(\text{aq.})}$ 10%) em metanol a 90 °C durante 18 horas, de acordo com protocolo da literatura.¹⁹⁵ Essa condição levou a formação das aminas desprotegidas de interesse **9a-e** em altos rendimentos (59 - 87%), como mostrado na Tabela 4, Entradas 1 - 5, tendo sido estabelecida previamente como a condição padrão para a desproteção. Visando-se encurtar o tempo de reação, testou-se a desproteção com ácido trifluoroacético (TFA), em CH_2Cl_2 à temperatura ambiente.¹⁹³ Após 30 min, observou-se conversão parcial do material de partida **21d** em cromatografia em camada delgada (CCD), o qual foi totalmente consumido após 2 h (Entrada 8). A amina desprotegida de interesse foi

obtida em bom rendimento (71%), embora inferior ao procedimento com HCl/MeOH (Entrada 4), o que também foi observado com a amina **21e** (Entrada 7). No entanto, utilizando-se amina com $n = 6$ (**21c**), obteve-se um rendimento melhor (Entrada 6).



Esquema 22. Remoção do grupo Boc e obtenção das aminas **9a-e**.

Tabela 4. Condições de desproteção testadas de acordo com o Esquema 22.

Entrada	Material de Partida	n	Condições	Rendimento (%) [*]
1	21a	4	HCl (aq.) 10%, metanol, 90 °C, 18 h	59%
2	21b	5		75%
3	21c	6		63%
4	21d	7		84%
5	21e	8		87%
6	21c	6	TFA, DCM, 2 h	96%
7	21d	7		71%
8	21e	8		51%

^{*}Após purificação por cromatografia em coluna.

A formação do núcleo lofina ligado a uma cadeia metilênica é evidenciada no espectro de RMN de ¹H pela presença de quatro sinais característicos: i) dubleto de dubletos em 7,6 ppm (2H); ii) multipeto em 7,6 - 7,4 ppm (10H); iii) multipeto em 7,3 - 7,1 ppm (3H); iv) triplete em 3,9 ppm ($J = 7,3$ Hz, 2H). Em todos os compostos derivados de lofina sintetizados neste trabalho esses sinais foram observados, com pouca variação nos valores de δ , sendo que i, ii e iii juntos, correspondem aos 15H aromáticos do núcleo lofina, enquanto que iv corresponde aos hidrogênios do carbono metilênico ligado diretamente ao anel imidazólico.

Comparando-se os espectros de RMN de ^1H da amina protegida (**21c**) com a amina livre (**9c**), o desaparecimento do singlete com integral para 9H (H21) e do sinal do NH (observados na Figura 26) e o aparecimento de um singlete com integral para 2H (Figura 27) evidenciam a remoção do grupo protetor Boc. Além disso, são observadas algumas variações de δ entre os espectros dos dois compostos. Por exemplo, o sinal que mais variou foi o que corresponde aos hidrogênios H19, do carbono ligado diretamente ao Boc (2,75 ppm, Figura 26) ou ao grupo amina (2,48 ppm, Figura 27), isto é, um $\Delta\delta = 0,27$ ppm. A maior variação nos aromáticos foi com H6 ($\Delta\delta = 0,06$ ppm). Os demais sinais não variaram muito entre os dois compostos, por exemplo H14 ($\Delta\delta = 0,02$ ppm). O pequeno dubleto observado em 8,13 ppm na amina protegida corresponde a uma impureza não identificada, que não é removida na purificação da tetracomponente, porém é facilmente removida na coluna da reação de hidrólise do Boc.

A partir do espectro de **21c** (Figura 26) é possível calcular dois valores de J para o sinal do H19 em 2,75 ppm (12,7 e 6,5 Hz). Porém, esses valores não correspondem aos acoplamentos reais pois o valor 12,7 Hz não faz sentido e o valor 6,5 Hz não corresponde ao valor calculado do tripleto do NH vizinho (5,3 Hz, 6,69 ppm). O sinal deve ser atribuído como um multiplete como resultado do acoplamento vicinal com os dois H18 e com o NH.

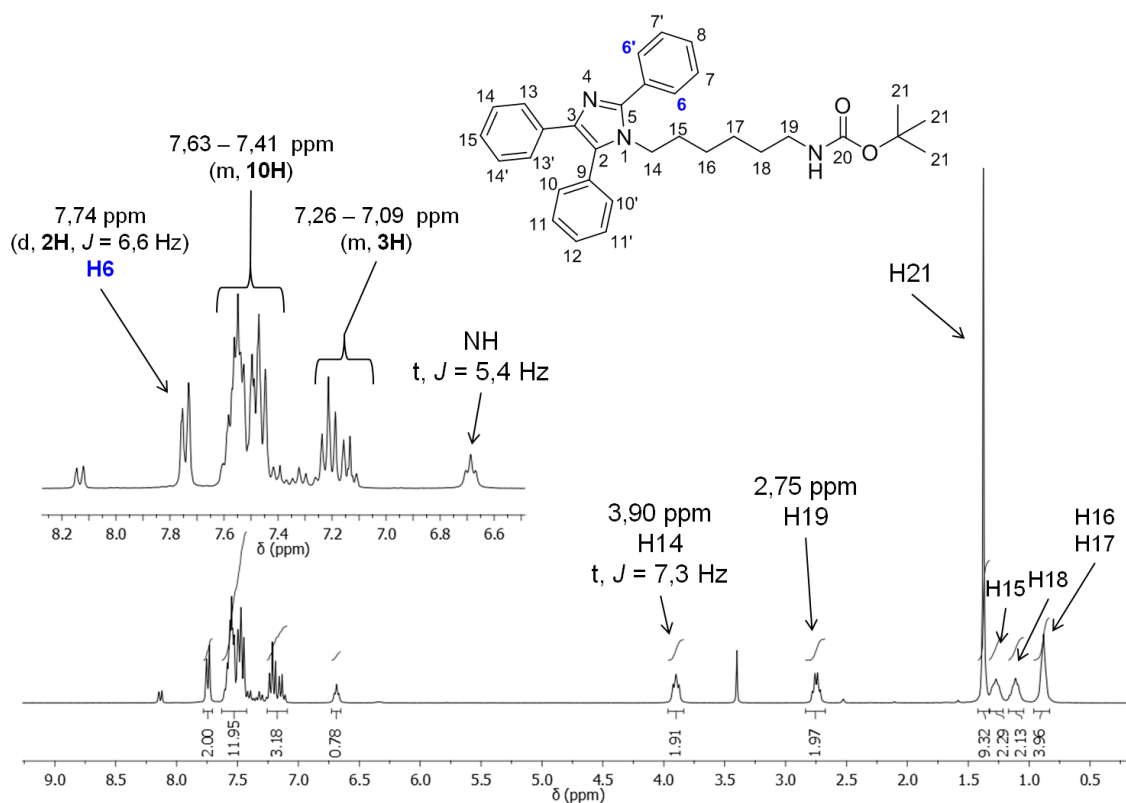


Figura 26. Espectro de RMN de ^1H (DMSO- d_6 , 300 MHz) do composto **21c**, com ampliação entre 6,6 e 8,2 ppm (acima e à esquerda).

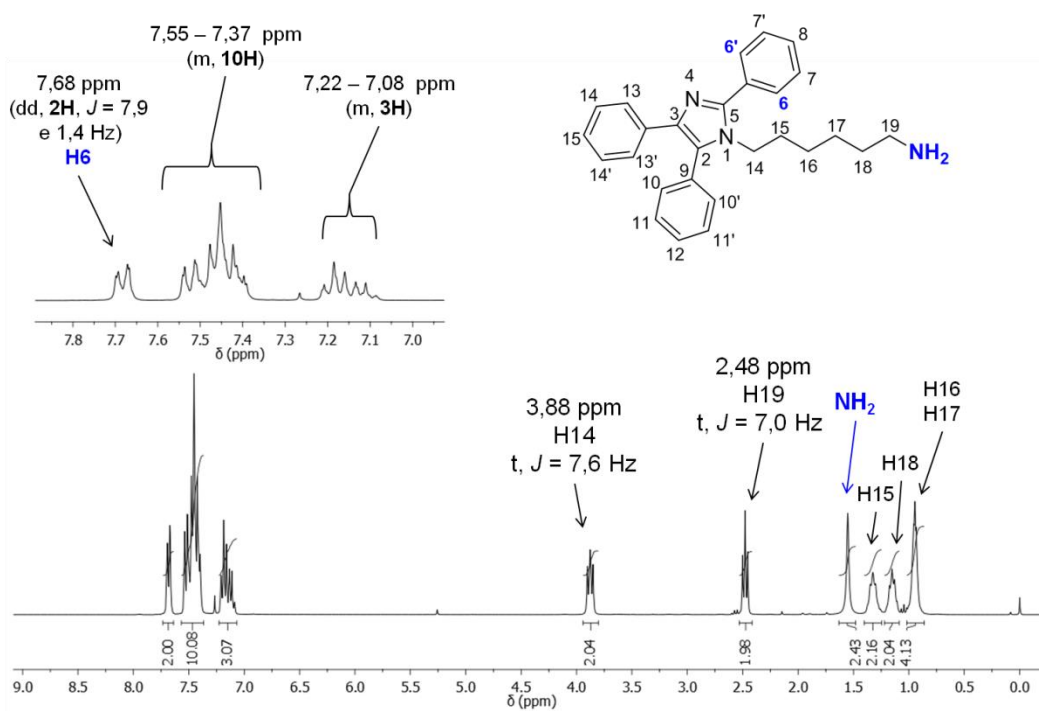
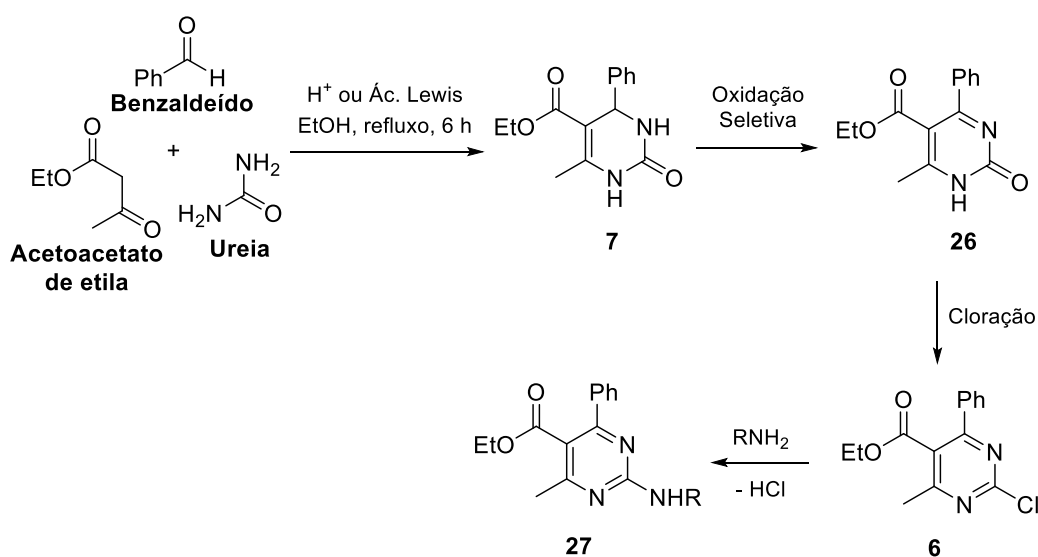


Figura 27. Espectro de RMN de ^1H (CDCl_3 , 300 MHz) do composto **9c**, com ampliação entre 7,0 e 7,8 ppm (acima e à esquerda).

4.4. SÍNTESE DA PIRIMIDINA DERIVADA DA REAÇÃO DE BIGINELLI

Em 2011 Singh *et al.* desenvolveram um método de conversão em quatro etapas de dihidropirimidinonas (DHPM), obtidas através da reação de Biginelli, em pirimidinas 2-substituídas, onde o substituinte pode ser uma amina nucleofílica (Esquema 23).¹⁹⁶ Após a obtenção da DHPM **7** via reação de Biginelli, a oxidação seletiva fornece o intermediário pirimidinona **26**, seguida de cloração com POCl₃ para obtenção do intermediário eletrofílico 2-cloro-4-metil-6-fenil-pirimidina (**6**). Na sequência, o cloro pode ser substituído por uma amina em uma reação de substituição nucleofílica aromática, levando à formação de pirimidinas 2-amino-substituídas (**27**).¹⁹⁶



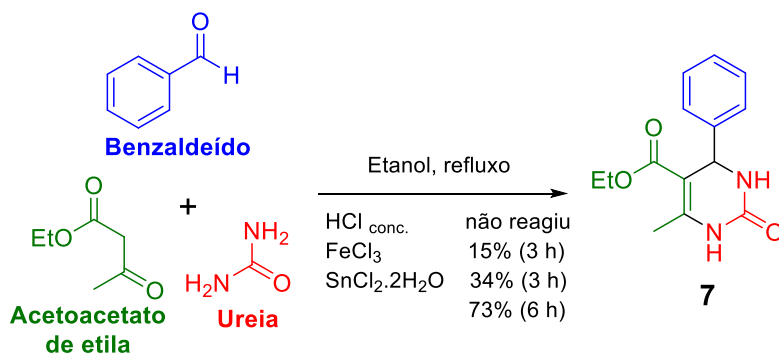
Esquema 23. Rota sintética para obtenção de 2-aminopirimidinas proposta por Singh *et al.*¹⁹⁶

Neste trabalho utilizou-se a estratégia de Singh *et al.*¹⁹⁶ para obtenção da 2-cloro-4-metil-6-fenil-pirimidina (**6**), cujas etapas serão discutidas a seguir.

4.4.1. Reação de Biginelli para obtenção da 6-metil-2-oxo-4-fenil-1,2,3,4-tetraidropirimidina-5-carboxilato de etila (**7**)

A Reação multicomponente de Biginelli envolvendo ureia, benzaldeído e acetoacetato de etila foi testada inicialmente em sua condição clássica, isto é, na presença de quantidades catalíticas de HCl.¹⁵² Entretanto, mesmo utilizando HCl concentrado não foi observada a formação do produto, somente uma mistura complexa que não foi possível isolar. Optou-se

então pela utilização de ácido de Lewis. A reação foi conduzida em refluxo de etanol por três horas, utilizando cloreto férrico (FeCl_3), levando à formação do produto desejado em 15% de rendimento, após recristalização em etanol. Nas mesmas condições, porém utilizando-se cloreto de estanho di-hidratado ($\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$),¹⁴⁸ o rendimento obtido foi de 34%. Dobrando-se o tempo obteve-se 73% de rendimento (Esquema 10).



Esquema 24. Reação de Biginelli para obtenção da DHPM 7.

A formação da DHPM de Biginelli foi evidenciada no espectro de RMN de ^1H (Figura 28) pelo sinal em 5,19 ppm correspondente ao H4, ligado ao carbono metínico que está ligado diretamente ao anel aromático, a um nitrogênio, e a um carbono sp^2 α -carbonila (C5), e pelo sinais dos NH em 7,78 e 9,23 ppm. Além disso, são observados os seguintes sinais: i) tripleto (1,13 ppm, $J = 7,1$ Hz) e quarteto (4,02 ppm, $J = 7,1$ Hz) referentes ao grupamento etila; ii) singlete da metila H7 em 2,29 ppm; iii) multipletos dos H aromáticos (H11 - H13) entre 7,46 e 7,17 ppm.

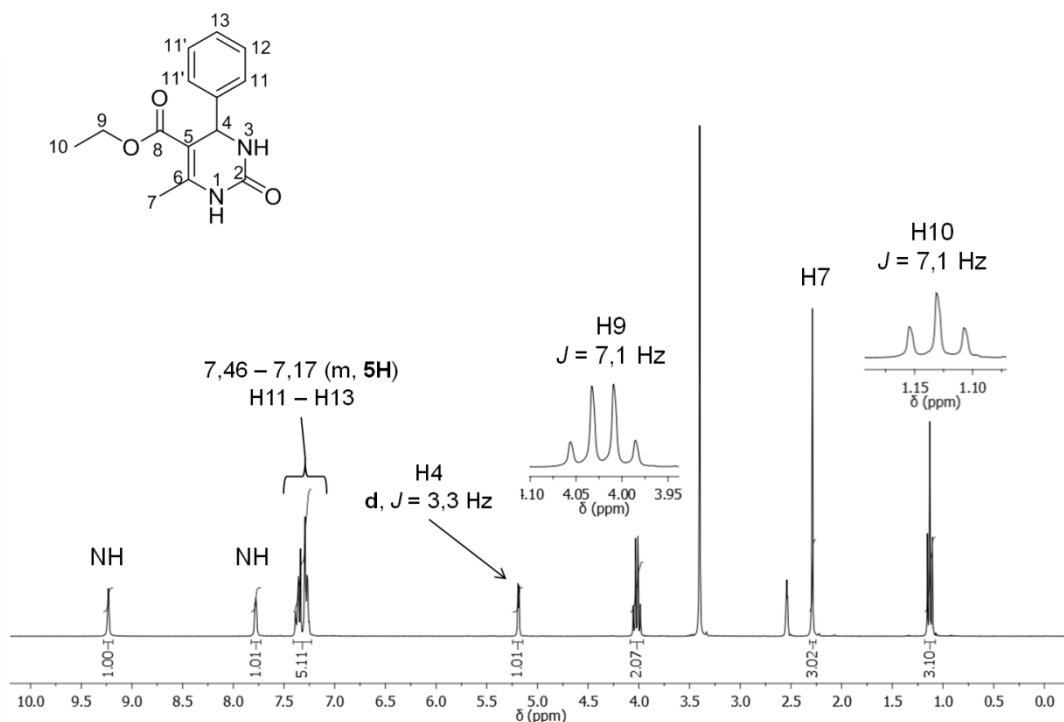


Figura 28. Espectro de RMN de ^1H (DMSO- d_6 , 300 MHz) da DHPM **7**.

O mecanismo da Reação de Biginelli tem sido discutido tanto no âmbito experimental quanto no âmbito da química teórica. Inicialmente, três rotas possíveis haviam sido propostas para a formação da DHPM **7** e estão mostradas na Figura 29.¹⁹⁷ As três propostas consistem nas diferentes combinações possíveis entre os três componentes iniciais, gerando intermediários do tipo íon imínio **28** (Figura 29a), enamina **29** (Figura 29b) e Knoevenagel **30** (Figura 29c). Em 1933, Folkers e Johnson sugeriram que a etapa determinante consistia na chamada rota do íon imínio, envolvendo a condensação entre a ureia e o benzaldeído, levando à formação do intermediário *N*-acilimínio **28** e posterior adição nucleofílica do acetoacetato de etila, conduzindo à formação da DHPM **7** (Figura 29a).¹⁹⁸ Quarenta anos mais tarde, Sweet e Fissekis propuseram que a reação ocorria primeiro entre o benzaldeído e o acetoacetato de etila, conduzindo à formação do intermediário tipo Knoevenagel **30**, promovendo a adição nucleofílica na ureia e levando à formação da DHPM (Figura 29c).¹⁹⁹ Em 1997, Kappe utilizou espectroscopia de RMN de ^1H e ^{13}C para investigar o mecanismo da reação.²⁰⁰ Quando a reação entre o benzaldeído e o acetoacetato de etila em $\text{CD}_3\text{OH}/\text{HCl}$ em temperatura ambiente foi monitorada, nenhuma evidência de formação do intermediário **30** ou qualquer reação entre os dois compostos foi observada. Além disso, a reação entre benzaldeído e ureia levou à formação de um intermediário do tipo bisureido, evidenciando a participação do íon *N*-acilimínio **28**, como intermediário na reação. Finalmente, quando os

três componentes foram misturados juntos somente a DHPM **7** foi observada.^{197, 200} Assim como o estudo de Kappe, cálculos teóricos mostraram que a rota do íon imínio é a mais favorável energeticamente e, aliados a outros resultados experimentais, têm se fortalecido como o mais provável mecanismo da reação de Biginelli.¹⁹⁷

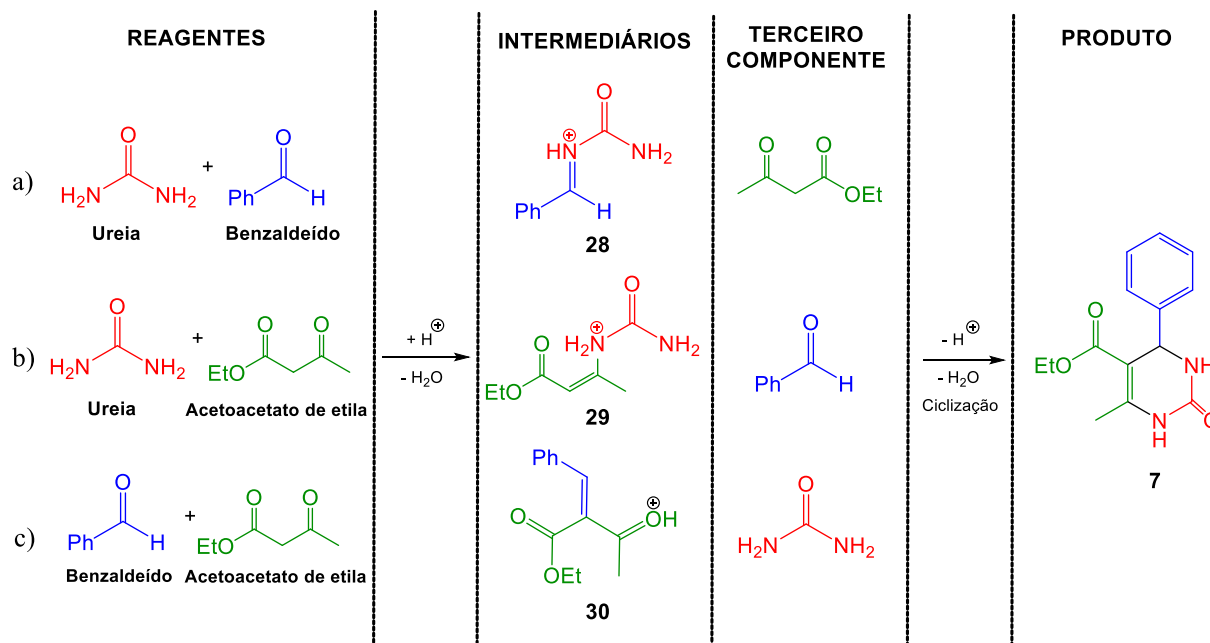
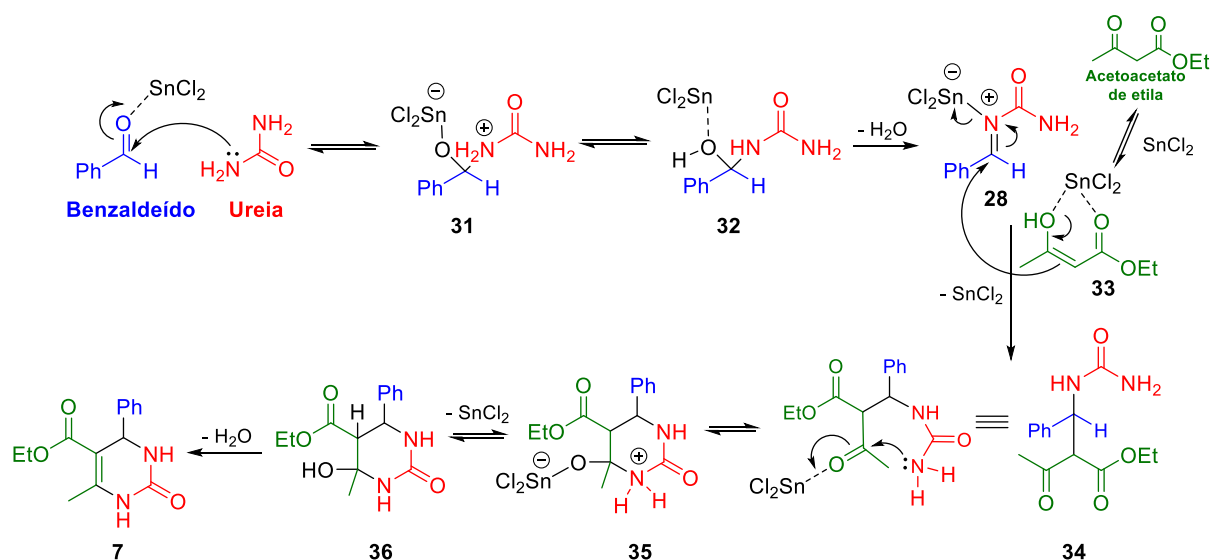


Figura 29. Rotas possíveis para o mecanismo da reação de Biginelli: a) rota do íon imínio; b) rota da enamina; c) rota Knoevenagel. Figura adaptada do trabalho de Puripat *et al.*²⁰¹

Considerando que neste trabalho foram utilizados ácido de Lewis como catalisadores da reação de Biginelli (Esquema 24, pág. 72) e a rota do íon imínio apontada em vários estudos na literatura como a mais provável, no Esquema 25 a seguir é mostrada uma proposta mecanística para obtenção da DHPM **7**. A proposta baseia-se nos artigos de Zhang *et al.*²⁰², que empregaram FeCl₃ como catalisador para obtenção de 6-arylvinil-3,4-dihidropirimidinonas, e de Russowsky *et al.*¹⁴⁸ que utilizaram SnCl₂.2H₂O para obtenção de uma série de di-hidropirimidinonas.



Esquema 25. Proposta de mecanismo da reação de Biginelli para obtenção da DHPM 7.

O ácido de Lewis coordena-se ao átomo de oxigênio do benzaldeído, tornando o carbono mais eletrofílico e suscetível ao ataque nucleofílico do nitrogênio da ureia, formando o intermediário **31**, em equilíbrio protônico com o intermediário **32**, que rapidamente perde água e conduz à formação do íon *N*-acilimínio **28**. A coordenação do acetoacetato de etila com o SnCl₂ desloca o equilíbrio para a forma enol, como mostrado em **33**, promovendo o ataque nucleofílico no carbono do íon imínio em **28**, que resulta no intermediário tetraédrico **34**. A estrutura **34** cicliza através do ataque nucleofílico intramolecular à carbonila ativada pelo SnCl₂, levando à formação de **35**, em equilíbrio protônico com o intermediário **36**, seguido de desidratação e formação da di-hidropirimidinona de interesse **7**.

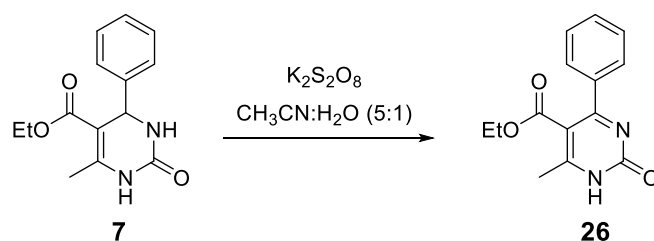
4.4.2. Oxidação seletiva da DHPM 7

Uma vez obtida a DHPM **7**, a etapa seguinte consistiu na oxidação seletiva das posições C3 e C4 do anel di-hidropirimidinona. Considerando-se que existem vários métodos disponíveis na literatura descritos para a oxidação de **7** em pirimidinona **26**, evitou-se neste trabalho a metodologia envolvendo a oxidação por PCC, utilizada por Singh *et al.*¹⁹⁶, devido à alta toxicidade do cromo-VI. A oxidação das DHPM é difícil devido principalmente à susceptibilidade do grupo metila na posição C6 ao ataque de agentes oxidantes.²⁰³

Karade e colaboradores desenvolveram uma metodologia combinando iodo hipervalente e hidroperóxido de *tert*-butila no processo de oxidação das DHPM, obtendo o

produto **26** em 84% de rendimento.²⁰⁴ Em 2009, Liang *et al.* utilizaram uma molécula com nitrosônio (NO^+BF_4^-), onde o cátion é o agente oxidante, atuando como eletrófilo.²⁰⁵ Outros oxidantes tais como, nitrato de amônio cérico (CAN) combinado com HCl,²⁰³ e dióxido de titânio,²⁰⁶ também têm sido testados para desidrogenação de di-hidropirimidinonas em C3 e C4.

A metodologia escolhida para este trabalho foi a descrita em 2009 por Memarian e Farhadi.²⁰⁷ Os autores obtiveram o composto **26** com um rendimento de 85% através da oxidação da DHPM **7** com persulfato de potássio ($\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$), utilizando uma mistura 10: 2 de acetonitrila: água como solvente e refluxo por 80 minutos, Esquema 26. Entretanto, foi verificada a necessidade de algumas adaptações. Na Tabela 5 estão resumidas as condições testadas neste trabalho.



Esquema 26. Oxidação da DHPM **7**.

Tabela 5. Condições testadas de acordo com o Esquema 26.

Entrada	Temperatura	Tempo	Atmosfera	Rendimento
1	80 °C	90 min	ambiente	36% ^a
2	73 °C	90 min	ambiente	31% ^b
3	73 °C	120 min	ambiente	47% ^b
4	73 °C	240 min	ambiente	45% ^a
5	73 °C	80 min	ambiente	36% ^b
6	73 °C	80 min	N ₂ (g)	64% ^b , 69% ^a

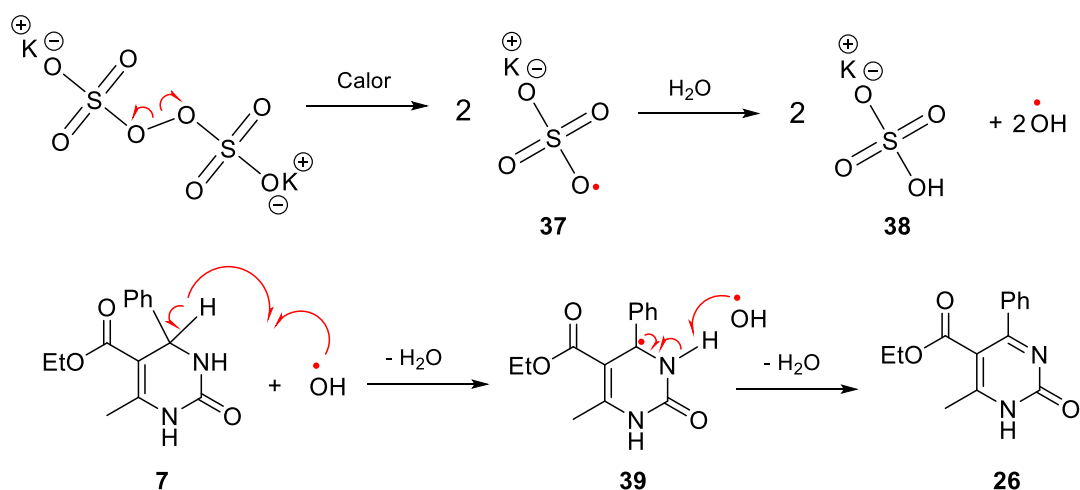
^aEstimado a partir do rendimento das duas etapas (oxidação + cloração); ^bApós purificação por cromatografia em coluna.

A primeira tentativa de oxidação da DHPM **7** seguindo o protocolo observado por Memarian e Farhadi levou à formação do produto em rendimento bem inferior ao relatado pelos autores (Entrada 1). Esse mesmo protocolo foi estudado por Joel M. G. Galvão em seu

trabalho de conclusão de curso (TCC), onde também foram relatados problemas em se reproduzirem os rendimentos obtidos por Memarian e Farhadi. Em seu TCC, Galvão não observou nenhuma reação em temperaturas menores que 70 °C, contudo encontrou como temperatura ideal cerca de 73 °C, abaixo da temperatura de refluxo indicada pelos autores (cerca de 80 °C).²⁰⁸ Tanto no artigo, como no TCC de Galvão, observou-se que tempos maiores de reação, mesmo a 73 °C, geram o produto em menores rendimentos.

Neste trabalho, o maior rendimento foi observado após 120 min (Entrada 3, Tabela 5), no entanto neste caso a reação demorou mais para começar a ocorrer. O início da reação pode ser detectado tanto em CCD como visivelmente, através da mudança de cor branca para amarela. A reação é bastante sensível à temperatura e ocorre de forma ideal na mínima temperatura necessária, isto é, cerca de 73 °C. Não foi detectado (ou não foi descrito) pelos autores a necessidade de se utilizar atmosfera livre de oxigênio. Porém, neste trabalho foi verificado que essa condição (Entrada 6, Tabela 5) melhorou consideravelmente o rendimento.

Memarian e Farhadi propuseram um mecanismo via formação de radicais para a oxidação da DHPM com persulfato de potássio, mostrado no Esquema 27. A etapa inicial consiste na cisão homolítica da ligação O-O do ânion persulfato a partir do aquecimento em solução, gerando ânions radicais sulfatos (**37**). A água é capaz de reagir com o ânion radical sulfato, formando ânions bissulfato (**38**) e radicais hidroxila.²⁰⁹ Os autores propuseram que o radical hidroxila é a espécie que reage com a DHPM, hipótese reforçada pelo fato de que eles não observaram reação em meio anidro. O radical hidroxila é mais reativo que o radical **37**, sendo mais efetivo na abstração de espécies de hidrogênios radicais. A etapa lenta da oxidação de **7** consiste na abstração radicalar do hidrogênio na posição C4 do anel da DHPM, formando água e o radical **39**. Por fim, a abstração do segundo hidrogênio de **39** conduz à formação da pirimidinona **26**.²⁰⁷



Esquema 27. Proposta de mecanismo da oxidação da DHPM via radicalar, de acordo com Memarian e Farhadi.²⁰⁷

Os autores destacaram as seguintes observações para reforçar a proposta mecanística:

- a presença de uma quantidade mínima de água é necessária, uma vez que não ocorreu reação em condições anidras e o rendimento foi muito baixo utilizando 10: 1 (acetonitrila: água);
- a reação com a condição etanol: água (5: 1) teve rendimentos muito baixos, provavelmente devido à competição entre os radicais hidroxila e etoxila para remover o H4 em **7**, ou devido à solvatação do ânion radical sulfato pelo solvente prótico, dificultando a formação dos radicais hidroxila;
- a presença de grupos doadores de elétrons no anel benzênico que estabilizam o radical na posição benzílica em **39** provocou aumento no rendimento e diminuição do tempo, enquanto que grupos retiradores diminuíram o rendimento, reforçando a participação da espécie **39**.²⁰⁷ Em um trabalho publicado recentemente, Memarian e Kalantari reforçaram a hipótese do mecanismo mostrado no Esquema 27 através de estudos computacionais, evidenciando que a formação do radical **39** é a etapa determinante.²⁰⁹

Comparando-se o RMN de ¹H da DHPM **7** com o da pirimidinona **26** evidencia-se a oxidação pelo desaparecimento do sinal correspondente ao hidrogênio benzílico H4, além da observação de somente um sinal NH. Além disso, é possível distinguir os H aromáticos entre H11 e H12-13, devido a um aumento no δ dos H11, mais próximos do centro oxidado (Figura 30).

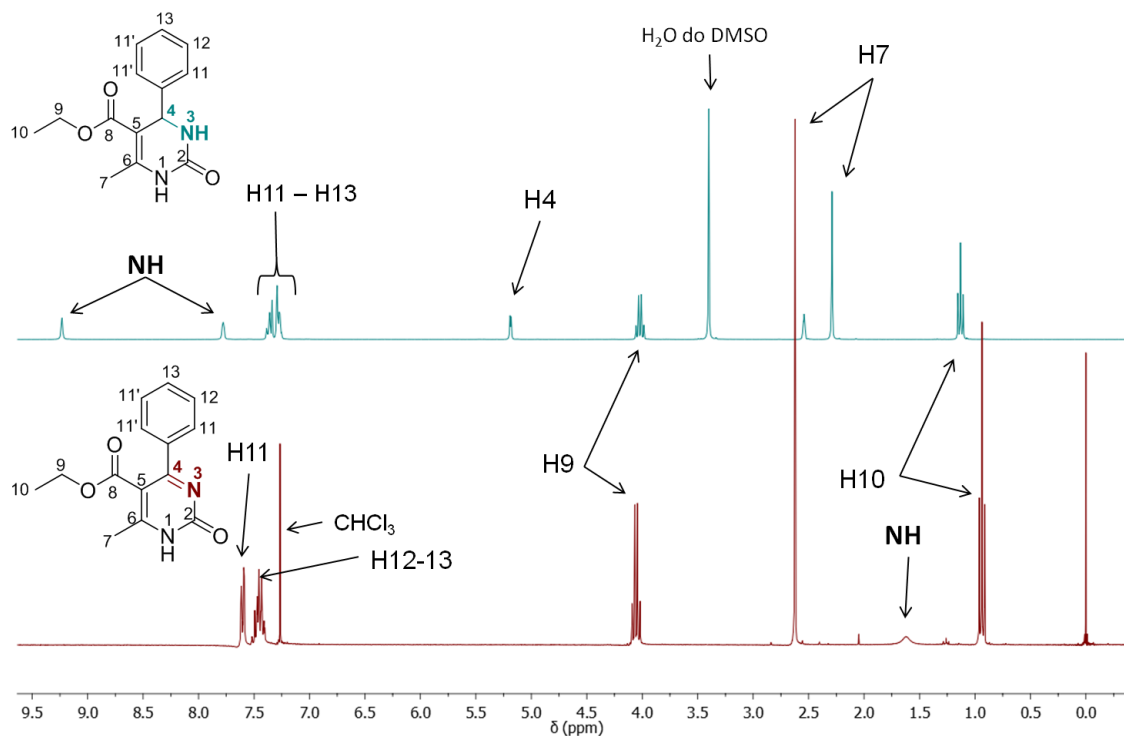
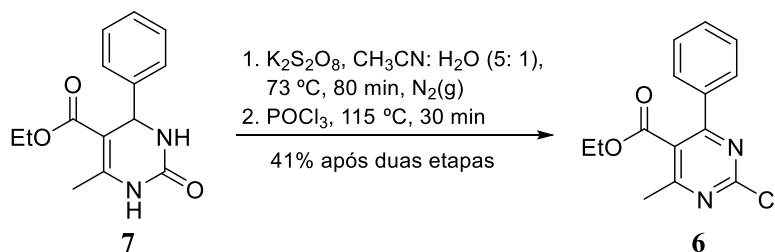


Figura 30. Comparação dos espectros de RMN de ^1H da DHPM **7**, acima em verde (DMSO- d_6 , 300 MHz), com o do produto de oxidação **26**, abaixo em vermelho (CDCl_3 , 300 MHz).

4.4.3. Cloração com POCl_3

A última etapa para obtenção do cloreto **6** consistiu na cloração de **26** utilizando POCl_3 em excesso, como descrito por Singh *et al.*¹⁹⁶ Foram testadas duas condições: purificando o composto **26** previamente por cromatografia em coluna e utilizando o bruto, dissolvendo-o no POCl_3 . Não houve diferença significativa em termos de rendimento ou pureza do produto de interesse **6**, portanto o segundo procedimento foi adotado como padrão (Esquema 28).



Esquema 28. Síntese da 2-cloro-6-metil-4-fenilpirimidina-5-carboxilato de etila (**6**).

Comparando-se o espectro de RMN de ^1H dos três produtos obtidos a partir da reação de Biginelli (DHPM **7**), seguida de oxidação (**26**) e cloração (pirimidina **7**), observa-se o

desaparecimento dos sinais do H4, dos NH e a conservação dos demais sinais, indicando que não houve degradação do material (Figura 31). Além disso, são observadas pequenas variações de deslocamento químico (δ), sendo que para os hidrogênios da metila H10 (1,12 ppm em **7**, 0,93 ppm em **26** e 1,07 ppm em **6**); para os H7 (2,28, 2,60 e 2,62 ppm), para H9 (4,01, 4,03 e 4,20 ppm) e para os aromáticos H11-H13 (7,41-7,17, 7,67-7,33 e 7,72-7,38 ppm). Observa-se também uma separação maior dos H aromáticos H11 (2H) de H12-13 (3H), devido ao aumento do δ dos H11, mais próximos ao anel pirimidínico. De uma forma geral, o valor de δ aumentou em cada etapa, sendo maior na 2-cloro-pirimidina (**6**), o que era esperado devido a maior quantidade de elétrons π . A única exceção foi observada para os H10, mais afastados do sistema π do anel e mais expostos ao solvente. Da mesma forma, no RMN de ^{13}C (Figura 32) os carbonos C5, C6 e principalmente C4, aumentam de δ significativamente, sendo que C4 apresenta uma variação maior que 100 ppm.

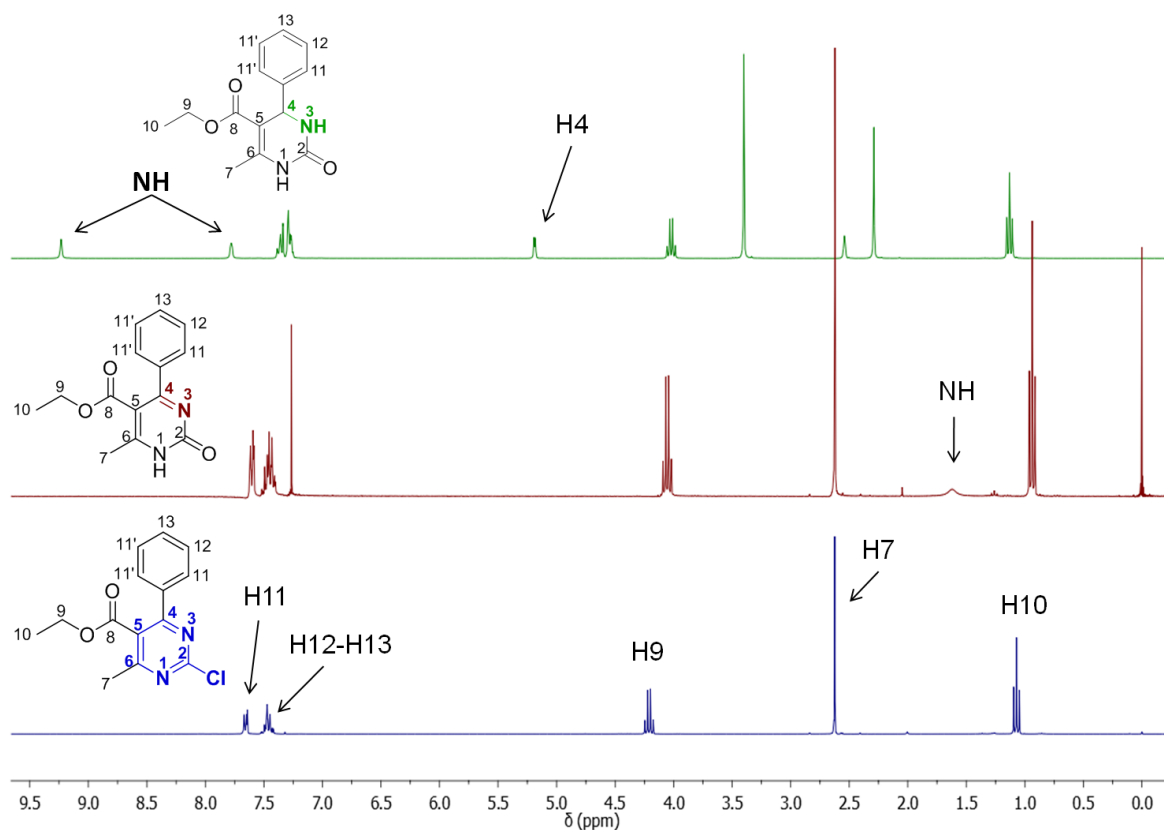


Figura 31. Comparação dos espectros de RMN de ^1H da DHPM **7**, acima em verde ($\text{DMSO-}d_6$, 300 MHz), com o do produto de oxidação **26**, no meio em vermelho (CDCl_3 , 300 MHz) e do produto de cloração, a pirimidina **6**, abaixo em azul (CDCl_3 , 300 MHz).

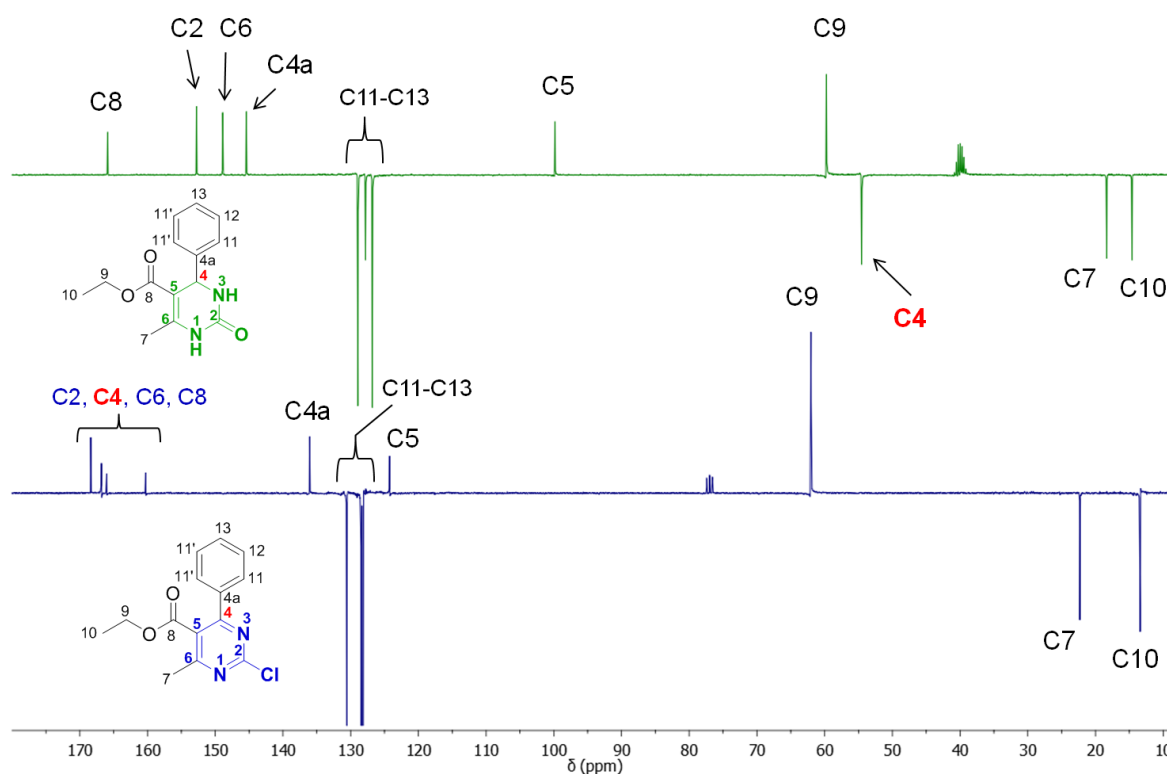
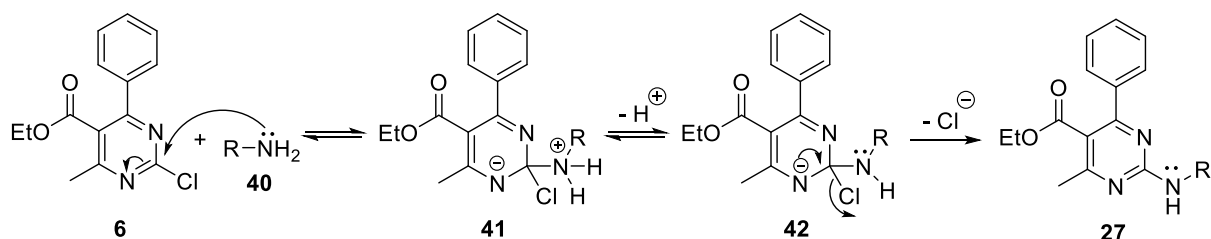


Figura 32. Comparação dos espectros de RMN de ^{13}C (APT) da DHPM **7**, acima em verde (DMSO- d_6 , 75 MHz), com a da pirimidina **6**, abaixo em azul (CDCl_3 , 75 MHz).

4.5. HÍBRIDOS TACRINA-PIRIMIDINA E LOFINA-PIRIMIDINA

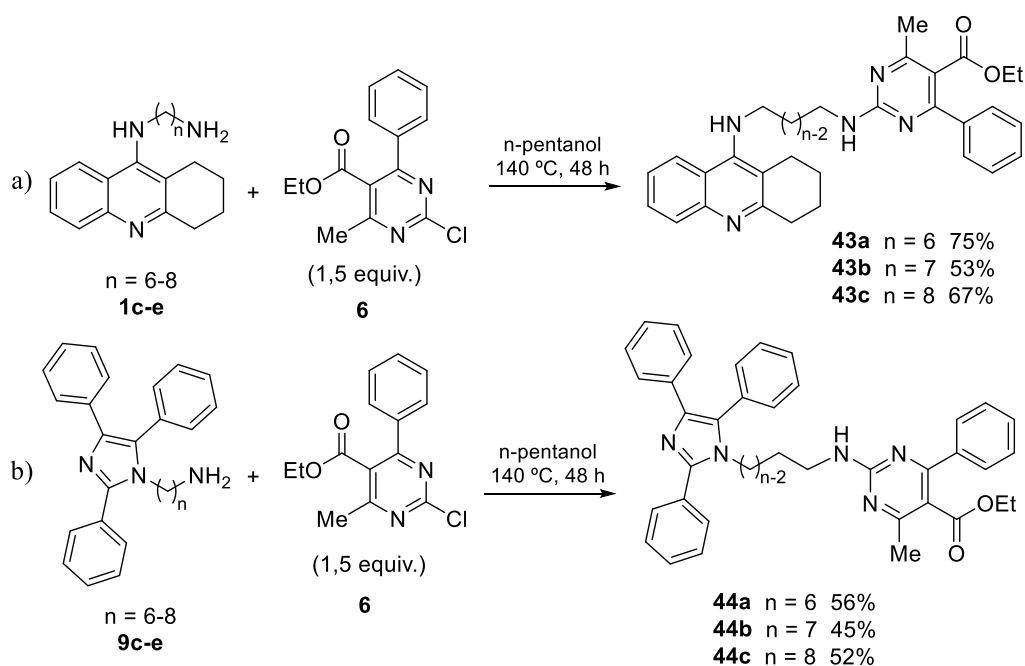
4.5.1. Síntese dos Híbridos Tacrina-Pirimidina e Lofina-Pirimidina

Para a síntese dos híbridos contendo os núcleos tacrina, lofina e pirimidina, foi utilizado um procedimento através de reações de substituição nucleofílica aromática ($\text{S}_{\text{N}}\text{Ar}$), conforme representado no Esquema 29.^{18, 192} O intermediário eletrofílico **6**, que possui um átomo de cloro ligado a um anel pirimidínico, é um sítio suscetível ao ataque nucleofílico de uma amina (**40**), deslocando um par de elétrons para o nitrogênio em posição *orto*, formando um intermediário tetraédrico **41**, em equilíbrio protônico com **42**. O par de elétrons do N em *orto* retorna ao orbital π , restabelecendo a aromaticidade do anel com a expulsão de cloreto, formando uma 2-aminopirimidina **27**.



Esquema 29. Proposta de mecanismo via S_NAr para a formação de 2-aminopirimidinas **27**.

Para as reações de obtenção dos híbridos tacrina(n)-pirimidina (**43a-c**) e lofina(n)-pirimidina (**44a-c**), as aminas **1a-e** e **9a-e** agem como nucleófilos de acordo com o esquema anterior. As reações foram conduzidas sob *n*-pentanol em refluxo e foram acompanhadas por CCD. Observou-se que as aminas **1a-e** e **9a-e**, reagentes limitantes, foram consumidas somente após 48 horas (Esquema 17).



Esquema 30. Síntese dos híbridos de interesse contendo a) tacrina (**43a-c**) e b) lofina (**44a-c**).

4.5.2. Caracterização espectroscópica dos híbridos tacrina-pirimidina e lofina-pirimidina

Na Figura 33a é mostrada a estrutura do híbrido tacrina(6)-pirimidina (**43a**) com os carbonos numerados, iniciando-se a partir da numeração padrão IUPAC dos carbonos da tacrina (ver Figura 1, pág. 3). É mostrada na Figura 33b a ampliação do espectro de RMN de ^1H do híbrido **43a** na região dos hidrogênios aromáticos, onde são observados os sinais típicos do núcleo tacrina referentes a H5, H6, H7 e H8 (ver Figura 24 e Figura 25, págs. 62 e 64). Os hidrogênios do núcleo pirimidina H21 são observados em 7,55 ppm e coincidem com H6, enquanto que H22 e H23 são observados em 7,40 ppm como um multipletto. Observa-se também um efeito telhado nos sinais de H6/H21 e H22/H23, devido ao acoplamento 3J H21-H22.

Na Figura 33c é mostrada a ampliação entre 1,0 e 5,4 ppm, destacando-se em 5,31 ppm um dos hidrogênios ligados ao nitrogênio (NH), que é observado como um tripleto (5,7 Hz), referente ao acoplamento com os hidrogênios metilênicos vizinhos, da extremidade da cadeia (H15). Como o sinal de NH próximo ao núcleo tacrina é geralmente observado como um singletto largo em torno de 3,5-4,0 ppm (ver Figura 25) e, além disso, este sinal largo foi observado em outros híbridos baseados em tacrina sintetizados pelo nosso grupo, portanto pode-se inferir que o sinal em 5,4 ppm corresponde ao NH vizinho ao C15 e ao anel pirimidínico. Destacam-se também os hidrogênios do grupamento etila do éster em 4,05 ppm (H26, quarteto) e 0,9 ppm (H27, tripleto), ambos com $J = 7,1$ Hz, além dos os hidrogênios H24 em 2,49 ppm da metila ligada ao anel pirimidínico. Os H10 e H15 (extremidades da cadeia) coincidem em $\delta = 3,45$ ppm, mesmo δ observado para o H10 próximo ao núcleo tacrina nas 9-aminoalquil-tacrinas **1a-e**.

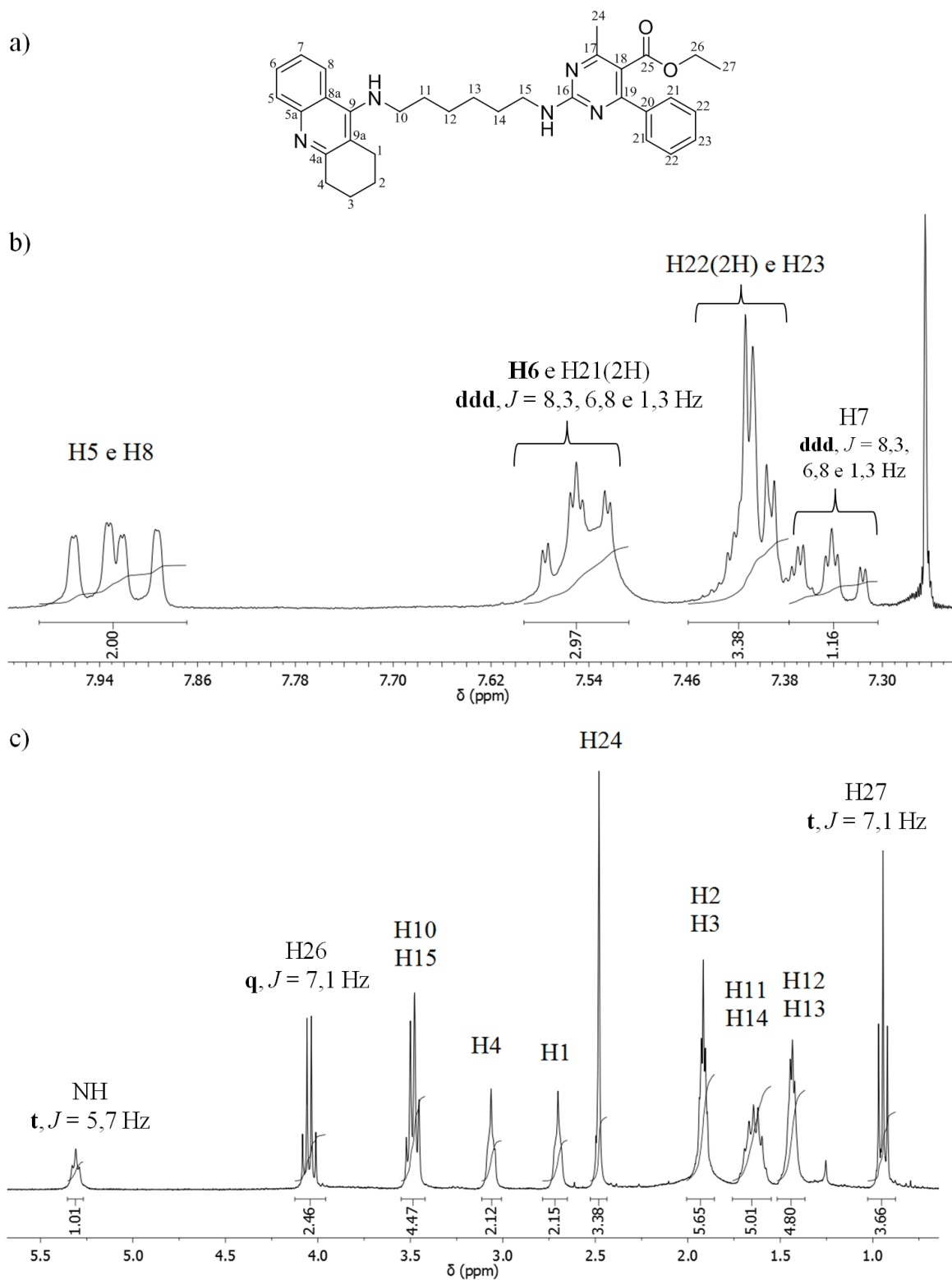


Figura 33. a) Estrutura do híbrido **43a** com carbonos numerados; b) ampliação do espectro de RMN de ^1H (CDCl_3 , 300 MHz) de **43a** entre 7,2 e 8,0 ppm e c) entre 1,0 e 5,4 ppm.

As ampliações do espectro de RMN de ^{13}C (APT) do híbrido **43a** são mostradas na Figura 34. Na Figura 34b, entre 114 e 172 ppm, os sinais mais desblindados (maior δ) são o do carbono C16 do anel pirimidínico, ligado aos três nitrogênios (169 ppm) e o da carbonila do grupo éster (C25, 166 ppm). Os carbonos do tipo C_0 do núcleo tacrina: C4a (158 ppm), C5a (151 ppm), C8a (120 ppm) e C9a (115 ppm), são observados nos mesmos valores de δ que nas aminas **1a-e** e no bis(7)-tacrina (Figura C4, pág. 181), sendo estes valores típicos para estes carbonos. Os carbonos C17 e C19 são observados provavelmente sobrepostos em 166 ppm, embora somente um sinal seja observado neste δ no espectro. Os carbonos do tipo CH aromáticos são observados entre 122 e 130 ppm, em fase para baixo, sendo que foi possível atribuir somente C7 e C8 do núcleo tacrina, a partir do espectro bidimensional HSQC (Figura 35a). Na Figura 34c, entre 10 e 70 ppm, são observados os sinais de C26 (CH_2) e C27 (CH_3) do grupo etila da função éster, os metilenos das extremidades da cadeia C15 (41 ppm) e C10 (49 ppm) e os carbonos metilenos do anel alifático da tacrina C4 (33,9 ppm), C1 (24,8 ppm) e C2-C3 (22-23 ppm). O carbono C10 é observado no mesmo δ (49 ppm) nos espectros das aminas **1a-e** e do bis(7)-tacrina. O carbono da metila C24 não foi observado na análise de APT, entretanto foi observado na análise de HSQC (Figura 35b).

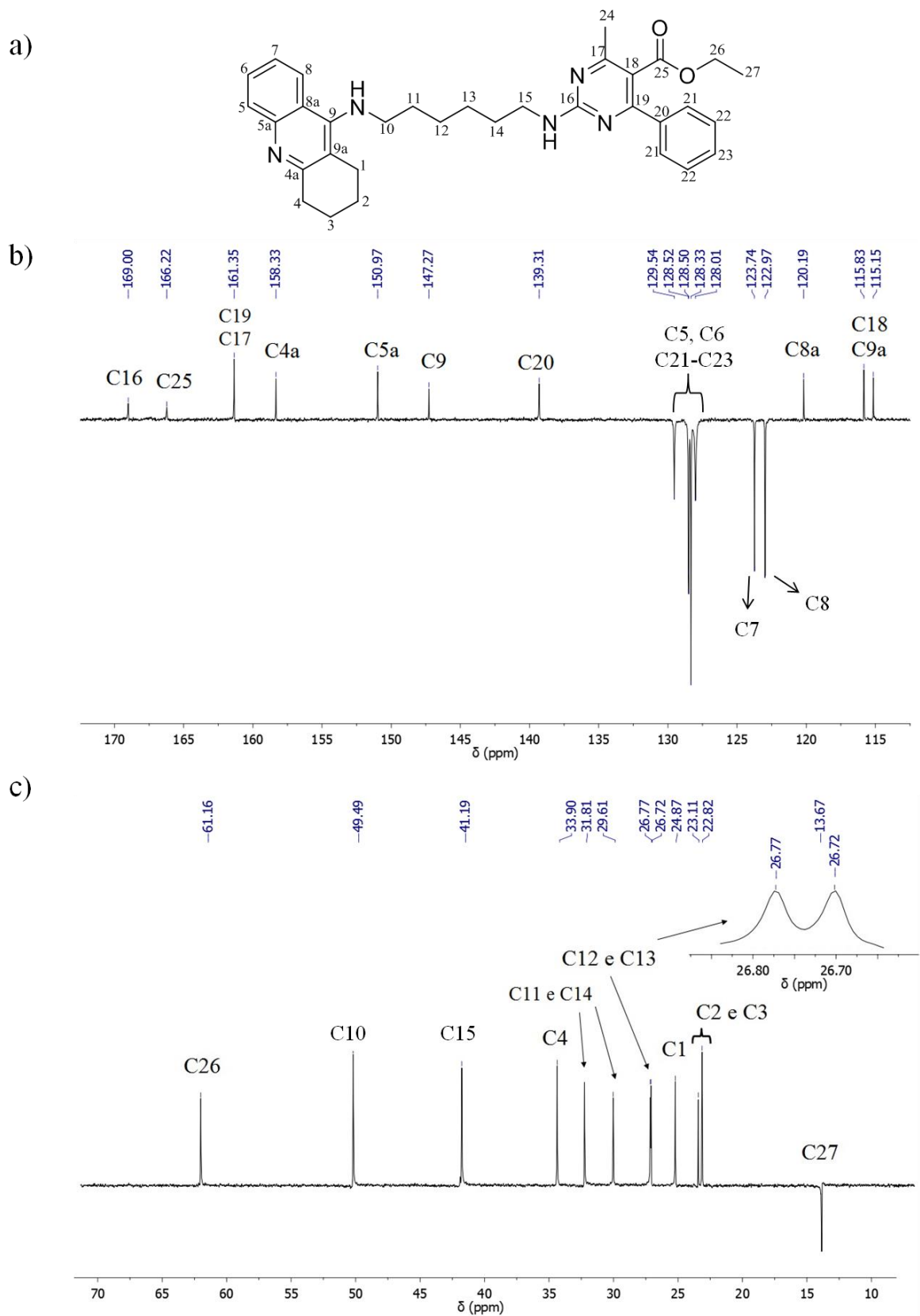


Figura 34. a) Estrutura do híbrido **43a** com carbonos numerados; b) Espectro de RMN de ^{13}C (APT, CDCl_3 , 75 MHz) do híbrido **43a**, ampliação entre 115 e 170 ppm e c) 10 e 70 ppm.

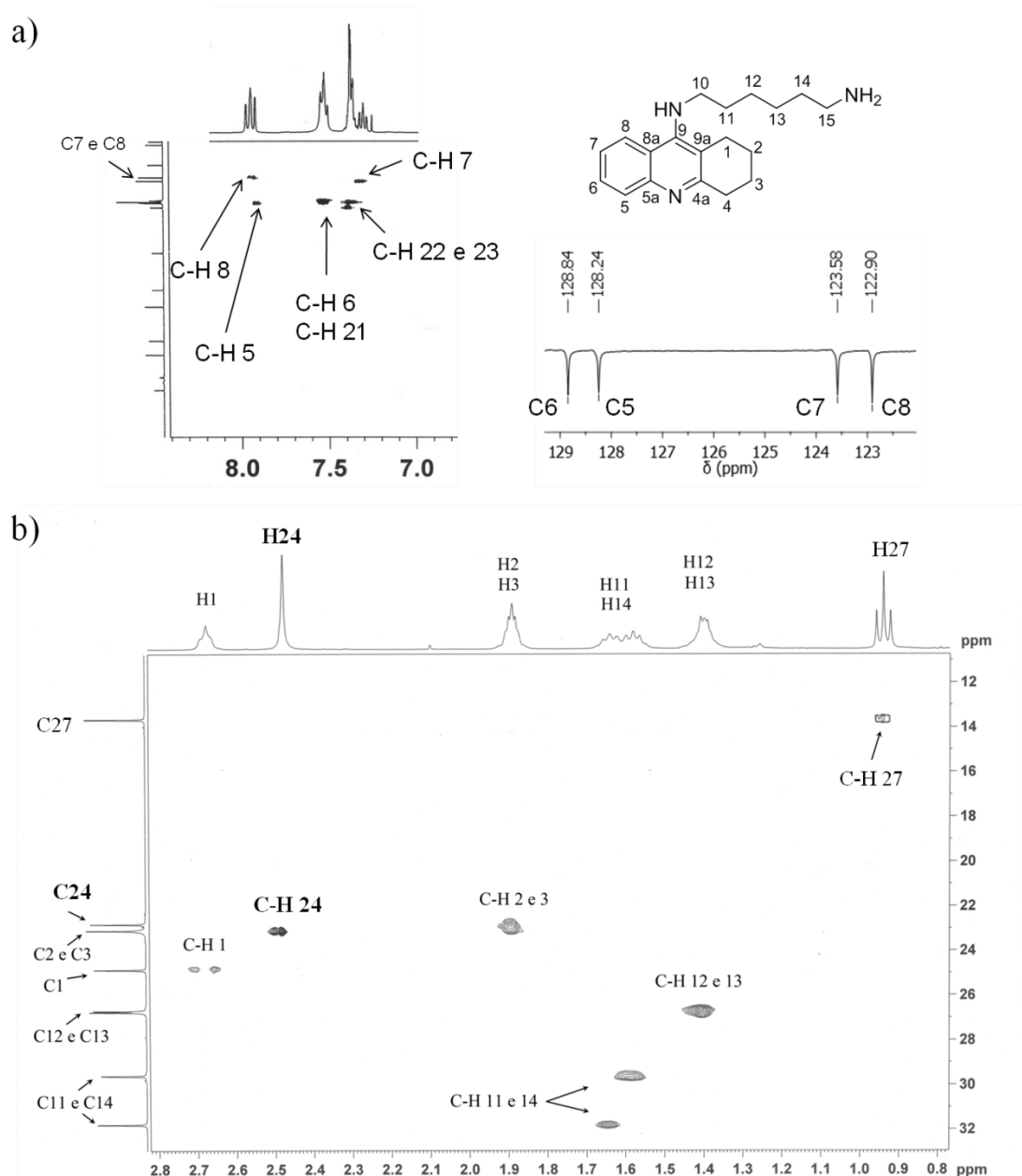


Figura 35. a) Ampliação do RMN bidimensional ^1H - ^{13}C HSQC do híbrido **43a** na região dos aromáticos e comparação com o APT da amina **1a** (à direita) para identificação dos carbonos; b) Ampliação do HSQC do híbrido **43a** na região dos alifáticos.

Comparando-se os espectros de RMN de ^1H do híbrido tacrina(6)-pirimidina (**43a**) e lofina(6)-pirimidina (**44a**) observam-se os sinais do núcleo pirimidina de Biginelli praticamente no mesmo δ (Figura 36). Uma variação significativa é observada para os H10 metilênicos ligados ao núcleo tacrina (**43a**, 3,49 ppm) ou lofina (**44a**, 3,88 ppm), sendo observado em maior δ no híbrido de lofina. Por outro lado, os demais H da cadeia metilênica aparecem em menor δ no derivado da lofina, sendo que a diferença aumenta em direção ao meio da cadeia: H15 ($\Delta\delta = 0,18$ ppm), H11 e H14 ($\Delta\delta = 0,3$ ppm) e H12 e H13 ($\Delta\delta = 0,43$

ppm). Já no RMN de ^{13}C não se observa uma diferença significativa para os carbonos metilênicos C11-C15 entre os híbridos **43a** e **44a** (Figura 37). Porém, o metileno C10 é observado em um δ de 44,6 ppm no derivado da lofina (**44a**), mais blindado que no C10 do derivado da tacrina (49,5 ppm), comportamento inverso ao observado para os hidrogênios H10, devido ao efeito γ -gauche^{§§}. O sinal do hidrogênio do NH observado em ambos espectros de **43a** (5,31 ppm) e **44a** (5,19 ppm) (Figura 36), corresponde ao NH diretamente ligado ao núcleo pirimidina, o que pode ser comprovado pela análise do RMN 2D COSY de **44a**, onde é observado o acoplamento entre H15 e NH (Figura C58, pág. 209).

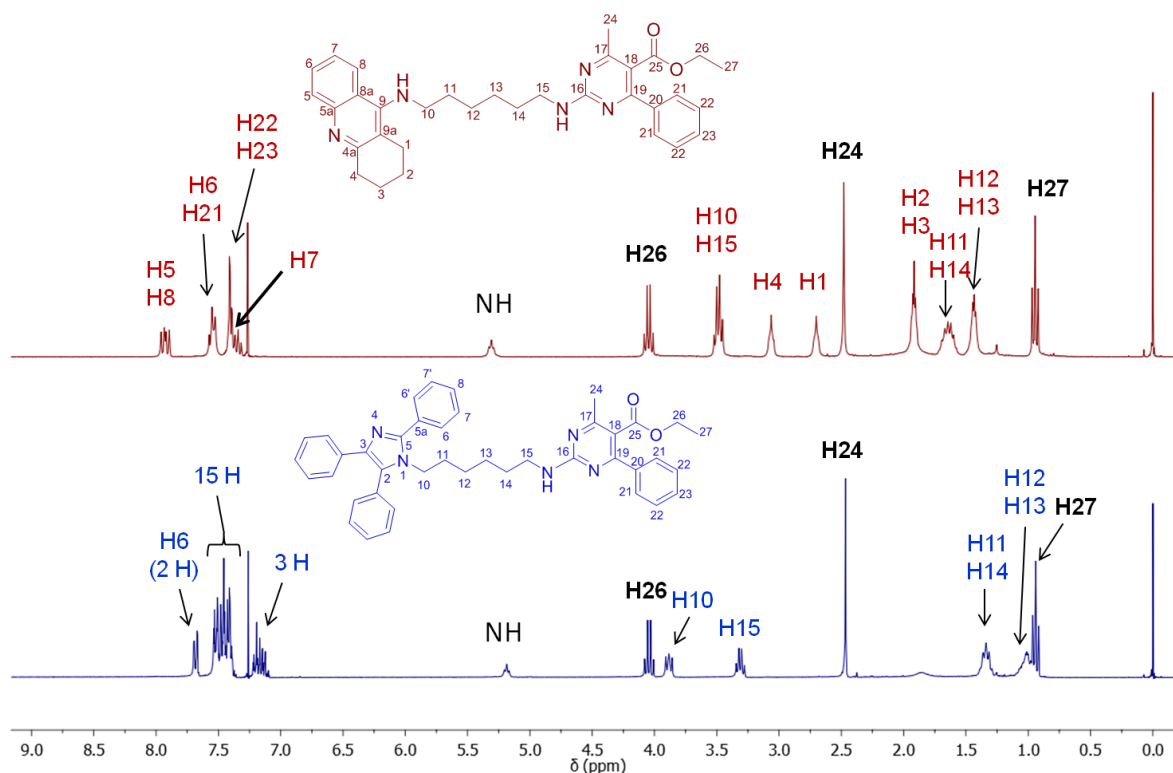


Figura 36. Espectro de RMN de ^1H (CDCl_3 , 300 MHz) do híbrido **43a** (acima) e **44a** (abaixo). Em negrito estão destacados os hidrogênios do núcleo pirimidina.

^{§§} Efeito γ -gauche: a hiperconjugação entre o orbital $\sigma_{\text{C-H}}$ (C11-H11) com o $\sigma^*_{\text{C-N}}$ (C10-N) permite a doação de elétrons para a ligação C-N, mais deficiente no derivado da lofina que no da tacrina. Essa hiperconjugação torna o C10 mais blindado contra ação do campo, mas não afeta o hidrogênio. Essa sobreposição σ/σ^* só é possível na formação gauche e a favorece.

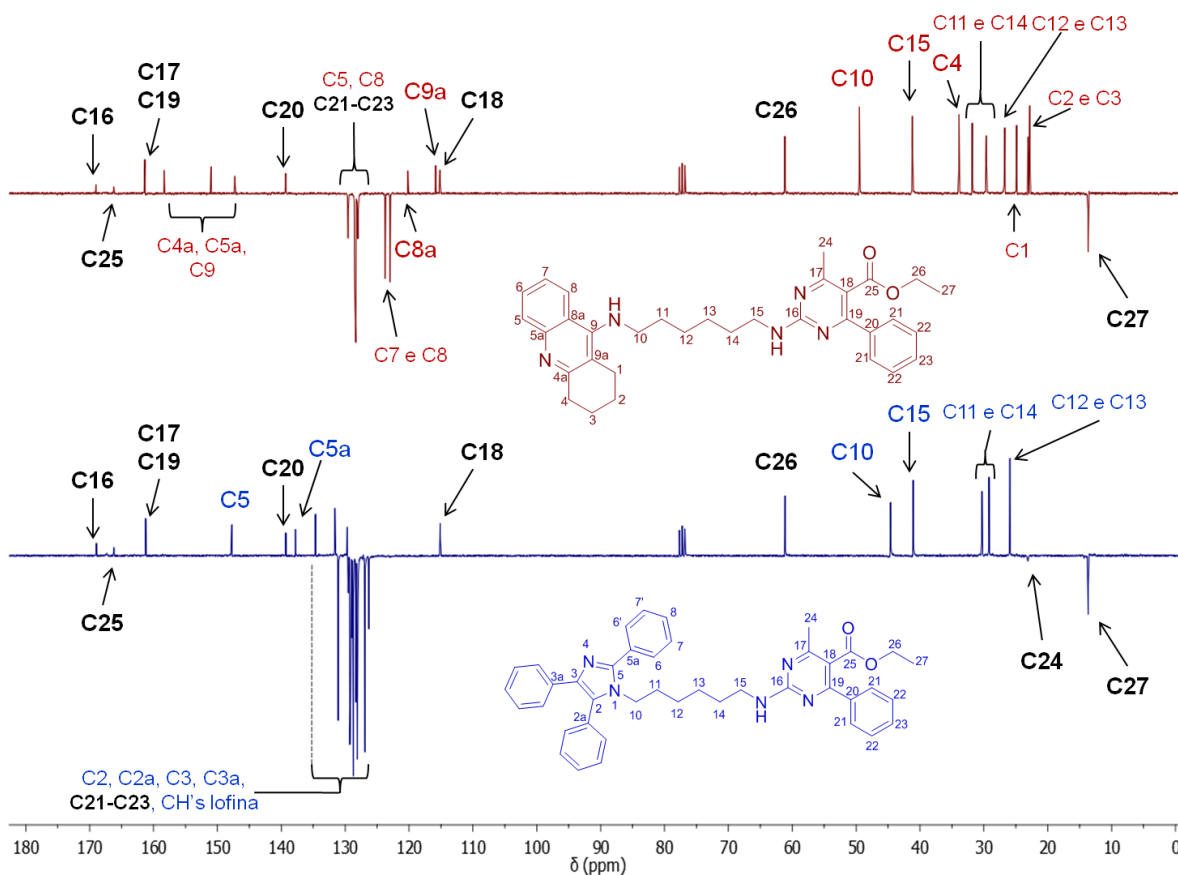


Figura 37. Espectro de RMN de ^{13}C (APT, CDCl_3 , 75 MHz) do híbrido **43a** (acima) e **44a** (abaixo). Em negrito estão destacados os carbonos do núcleo pirimidina.

Assim como no espectro de **43a**, a identificação do carbono da metila **C24** em **44a** só foi possível com auxílio do HMQC (Figura 38b). O espectro bidimensional auxiliou também na identificação de **C6** entre o grande aglomerado de sinais de carbonos aromáticos do núcleo lofina, devido à separação de **H6** observada no RMN de ^1H (Figura 38a). Os acoplamentos C-H referentes à cadeia alifática e ao núcleo Biginelli estão mostrados na Figura 38b.

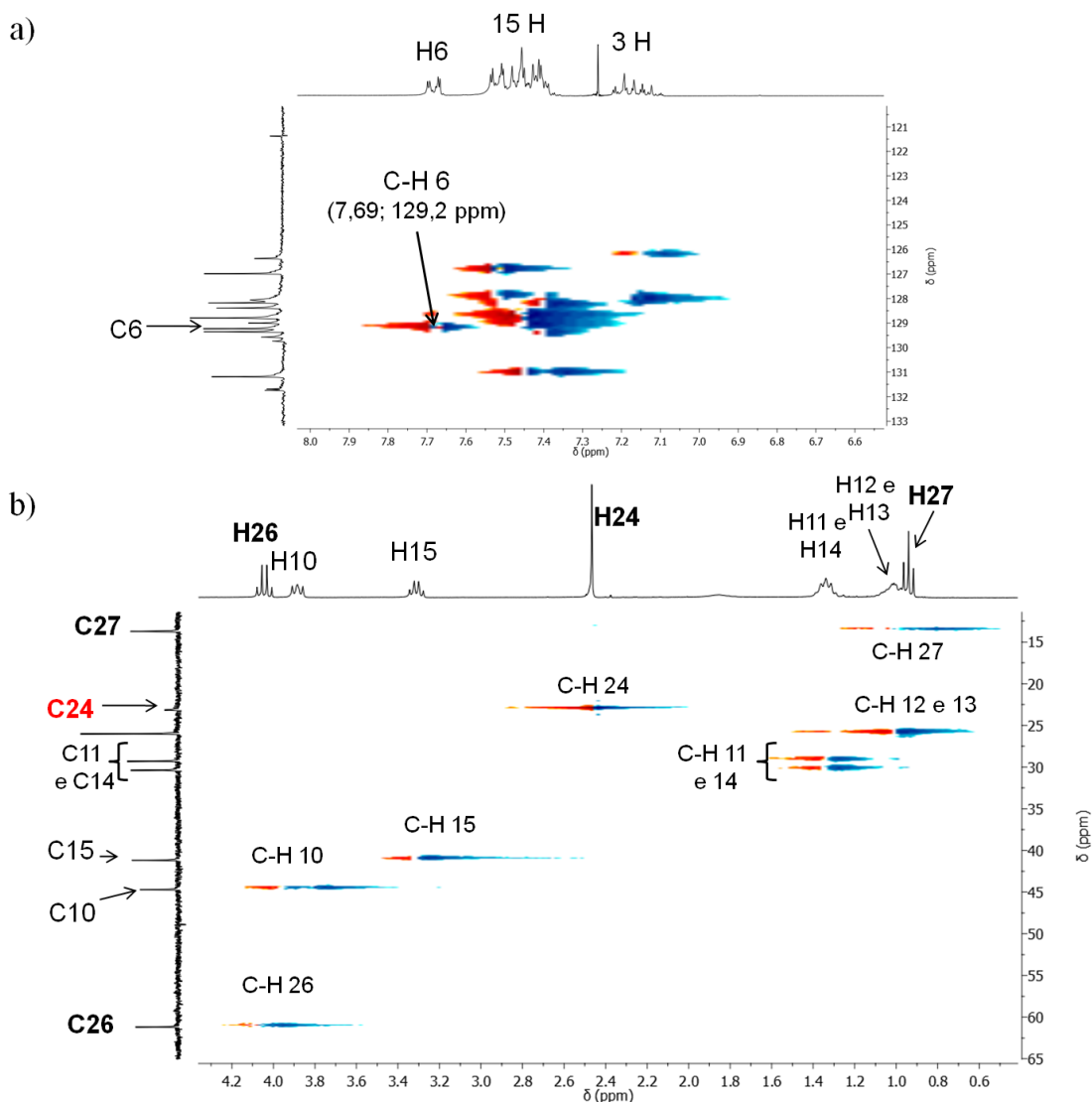


Figura 38. Espectro HMQC do híbrido lofina(6)-pirimidina **44a**, ampliação na região dos a) aromáticos e b) alifáticos. Em negrito estão destacados os C e H do núcleo pirimidina.

Na Figura 39 são mostrados os espectros de infravermelho (IV) dos híbridos tacrina(6)-pirimidina (**43a**) e lofina(6)-pirimidina (**44a**). Observa-se que os dois espectros são muito similares, destacando-se as bandas dos estiramentos C=C e C=N dos anéis aromáticos ($\approx 1550 \text{ cm}^{-1}$) e o C=O do éster (1710 cm^{-1}), observada menor número de onda (ν) que um éster alifático (1750-1730) devido à conjugação da carbonila com o anel pirimidínico. Acima de 3200 cm^{-1} observa-se uma banda larga que se refere ao estiramento da ligação N-H. Essa banda típica geralmente não se desdobra em aminas secundárias, ao contrário do observado em ambos espectros da Figura 39, o que pode ser atribuído a uma eventual umidade na pastilha de KBr.

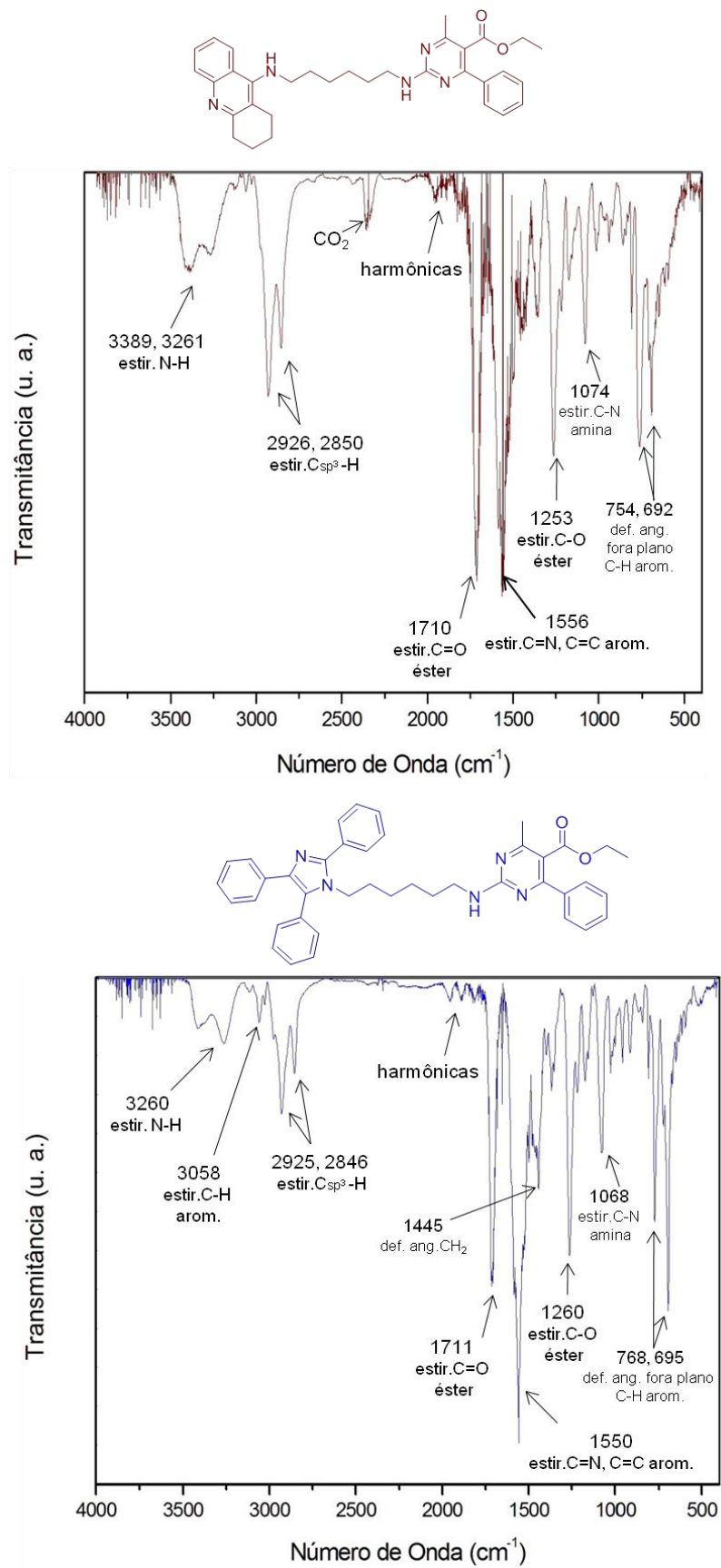


Figura 39. Espectros de IV (pastilha de KBr) dos híbridos tacrina(6)-pirimidina (**43a**, acima) e lofina(6)-pirimidina (**44a**, abaixo).

4.6. SÍNTESE DOS TOSILATOS DERIVADOS DE CARBOIDRATOS

Monossacarídeos comercialmente disponíveis podem ser transformados em derivados eletrofílicos na forma de tosilatos, bons grupos de saída para reações do tipo substituição nucleofílica (S_N). Os tosilatos da D-xilose (**45**), D-ribose (**46**) e D-galactose (**47**) (Figura 40) utilizados neste trabalho foram obtidos em parceria com o grupo de pesquisa do prof. Dr. Diogo Seibert Lüdtke, sintetizados pela doutoranda Luana Silva, de acordo com protocolos já estabelecidos na literatura.^{166, 210, 211}

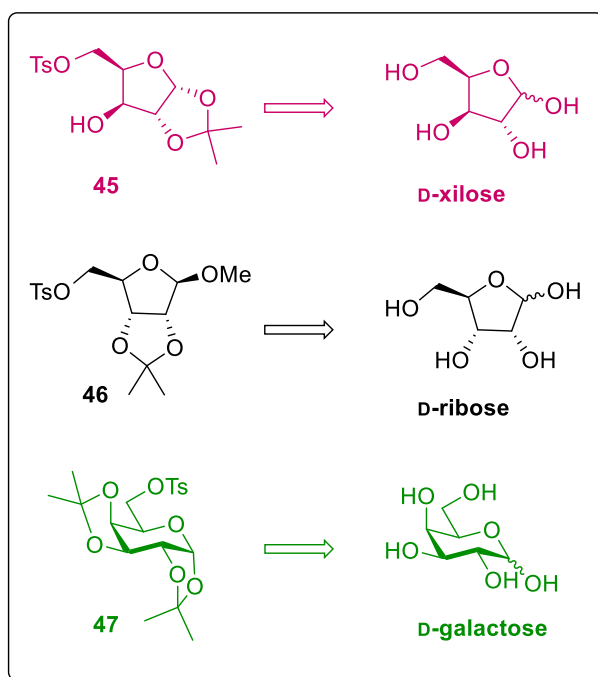


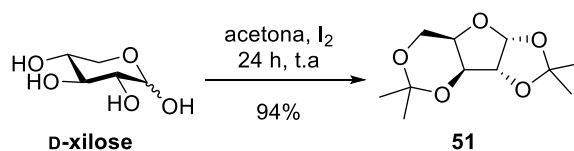
Figura 40. Carboidratos naturais precursores dos tosilatos utilizados neste trabalho.

A maior parte das estruturas derivadas de carboidratos (naturais ou sintéticas) encontra-se funcionalizada na posição anomérica, como pode ser visto nos exemplos apresentados na Seção 3.5. Neste trabalho, optou-se pela funcionalização (isto é, a introdução da cadeia metilênica contendo o núcleo tacrina, ou lofina) na posição primária do açúcar, mantendo a posição anomérica protegida com o grupo acetônio. Uma das vantagens é o controle da estereoquímica do produto formado, uma vez que a substituição na posição anomérica pode gerar uma mistura de anômeros α - e β -glicosídicos. Além disso, após o estudo dos compostos protegidos pode-se estudar a desproteção das hidroxilas, incluindo a anomérica, visando avaliar o impacto na atividade biológica, bem como ainda permite realizar reações de oxidação do núcleo carboidrato, sem afetar o restante da molécula. Quanto à

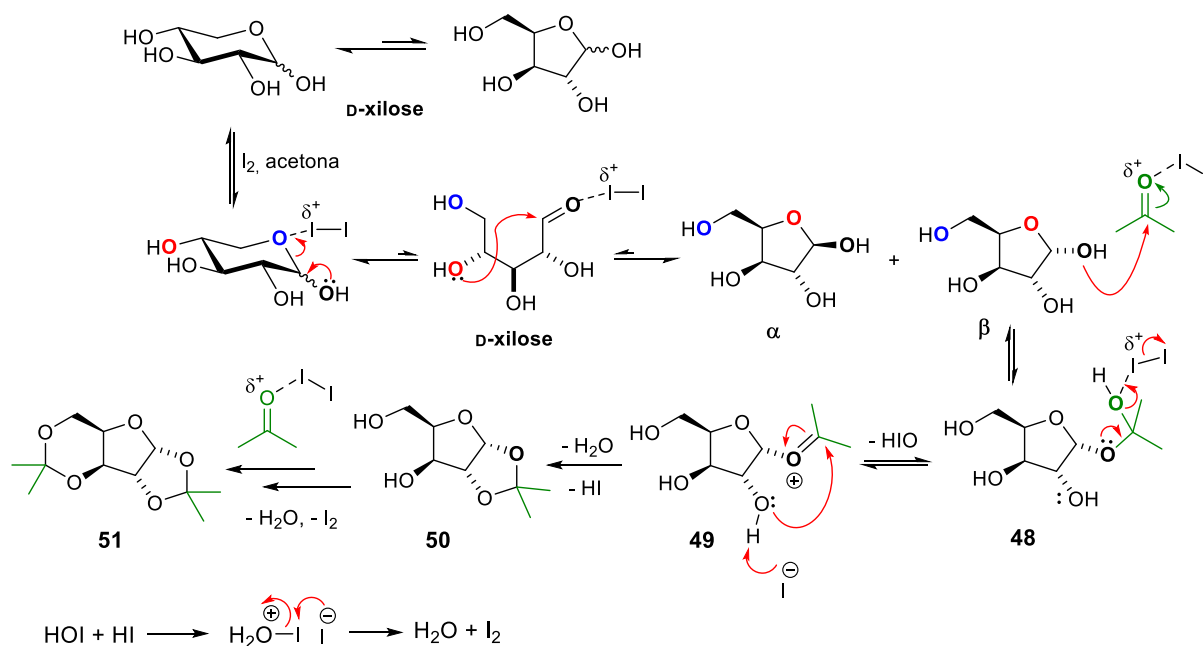
escolha do grupo acetonídeo como protetor das hidroxilas, deve-se especialmente ao seu pequeno tamanho se comparado a outros grupos protetores clássicos de carboidratos, tais como benzil e acetil. Supõe-se que a substituição por grupos muito volumosos poderia dificultar a interação no sítio ativo das enzimas colinesterases, especialmente a AChE, que possui maior restrição espacial (Seção 3.2).

4.6.1. Tosilato da D-xilose

A D-xilose existe naturalmente nas formas piranosídica (anel de 6) e furanosídica (anel de 5), como mostrado no Esquema 31, sendo que a primeira é preferencial. A etapa inicial da conversão da D-xilose no intermediário de interesse consiste na proteção das hidroxilas através da reação com acetona utilizando iodo molecular como catalisador (Esquema 31). O iodo atua como ácido de Lewis deslocando o equilíbrio para a forma furanosídica, mais favorecida para a formação do acetonídeo devido à formação de dois anéis de cinco membros fundidos (Esquema 32). A hidroxila anomérica promove o ataque nucleofílico na acetona, formando o acetal **48**, que após a eliminação de ácido hipoiódoso (HIO) forma o oxônio **49**. Um iodeto auxilia a desprotonação da hidroxila vizinha ao centro anomérico, possibilitando o ataque intramolecular em **49**, levando a formação do monoacetonídeo **50**. Dentre os dois anômeros possíveis (α e β), a formação do acetonídeo só é possível na forma β , logo somente o ataque nucleofílico com a hidroxila nesta conformação conduz à formação de **50**. Simultaneamente, ocorre a formação do segundo acetonídeo pela reação das hidroxilas remanescentes com outra molécula de acetona, obtendo o bis-acetonídeo **51**, que na etapa seguinte é desprotegido seletivamente em meio ácido, retornando a estrutura **50** (Esquema 33).¹⁶⁶

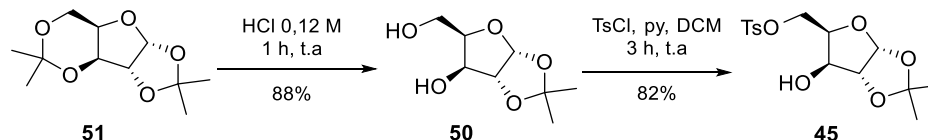


Esquema 31. Proteção das hidroxilas da D-xilose.



Esquema 32. Proposta mecânica para formação do bis-acetonídeo **51** a partir da D-xilose.

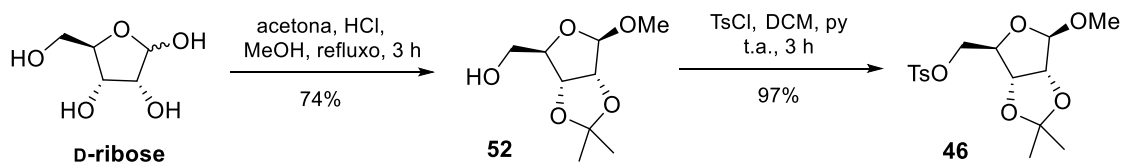
A hidrólise do bis-acetonídeo **51** ocorre de forma seletiva em meio ácido (HCl 0,12 M), isolando-se o monoacetonídeo **50**. Na sequência, a reação com cloreto de *p*-toluenossulfonila (cloreto de tosila, TsCl) conduz à formação do intermediário de interesse, o tosilato da D-xilose (**45**) (Esquema 33).



Esquema 33. Hidrólise do bis-acetonídeo **49** seguida da tosilação da hidroxila primária e obtenção do tosilato da D-xilose (**45**).

4.6.2. Tosilato da D-ribose

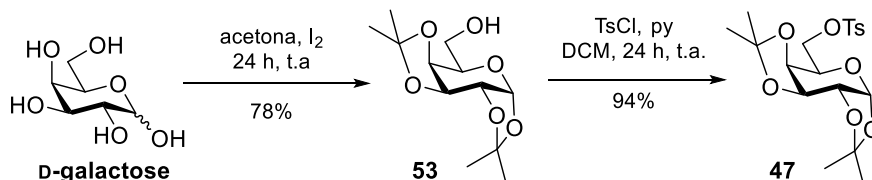
Para o derivado da D-ribose as hidroxilas *cis* foram protegidas com grupo acetonídeo, através da reação com acetona e metanol em meio ácido (Esquema 34). Simultaneamente, a proteção da hidroxila anomérica ocorre via formação do íon oxônio, que sofre ataque nucleofílico do metanol, formando o álcool **52** em apenas 3 h de reação. Em seguida, a reação de **52** com cloreto de tosila forneceu o tosilato **46**.¹⁶⁶



Esquema 34. Obtenção do tosilato da D-ribose (**46**).

4.6.3. Tosilato da D-galactose

As hidroxilas secundárias da D-galactose foram protegidas através da mesma estratégia utilizada para a D-xilose, formando o bis-acetonídeo **53** pela reação com acetona utilizando iodo molecular como catalisador (Esquema 35). A hidroxila primária em **53** foi funcionalizada com um grupo tosila pela reação com cloreto de tosila em meio básico, obtendo-se o tosilato da D-galactose (**47**).¹⁶⁶

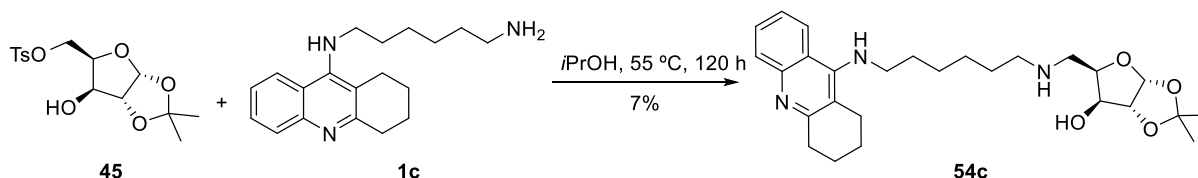


Esquema 35. Obtenção do tosilato da D-galactose (**47**).

4.7. HÍBRIDOS DERIVADOS DE CARBOIDRATOS

4.7.1. Síntese dos Híbridos Tacrina-carboidratos e Lofina-carboidratos

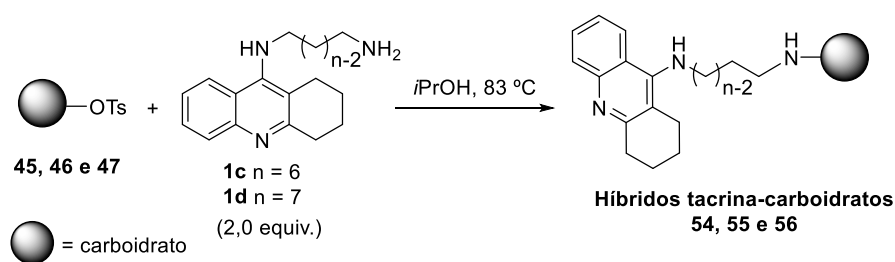
Em 2001, Lu e Just promoveram a reação do tosilato da D-xilose (**45**) com a isopropilamina, utilizando-a também como solvente da reação, e aqueceram a 55 °C por 36 horas, obtendo o produto de interesse em 79% de rendimento.²¹⁰ Adaptou-se esse procedimento na reação entre **45** e a amina derivada da tacrina **1c**, utilizando como solvente o isopropanol. Devido ao número de etapas para a síntese e à alta massa molecular das aminas derivadas da tacrina (**1a-e**) e da lofina (**9a-e**), optou-se por utilizar somente dois equivalentes em excesso. A reação foi monitorada por CCD e após 36 horas ainda havia material de partida, sendo mantido o aquecimento por até 120 horas. Decorrido esse tempo ainda havia o tosilato **45**, porém optou-se por encerrar a reação. O híbrido tacrina(6)-D-xilose (**54c**), foi obtido com 7% de rendimento após purificação por cromatografia em coluna (Esquema 36).



Esquema 36. Primeira tentativa de síntese do híbrido tacrina(6)-xilose (**54c**).

Devido ao baixo rendimento obtido procurou-se uma alternativa para melhorá-lo. Em 2010 Wouters *et al.* desenvolveram uma metodologia para síntese de aminoálcoois derivados da D-xilose e da D-glicosamina, aplicados como catalisadores quirais para arilações enantiosseletivas.²¹² Eles promoveram a reação do tosilato da D-xilose **45** com pirrolidina, piperidina e morfolina, todas em excesso de oito equivalentes, sob refluxo de isopropanol durante 24 horas e obtiveram os produtos de interesse em bons rendimentos (65%-86%). Ajustou-se esse procedimento para a utilização de somente dois equivalentes da amina **1c**, mantendo-se a reação em refluxo por 24 h. Após esse tempo, ainda havia tosilato **45**, porém optou-se por encerrar a reação. O produto **54c** foi obtido com 61% de rendimento após purificação por cromatografia em coluna (Tabela 6, Entrada 1). Variando-se o açúcar de partida, o mesmo procedimento foi adotado para a obtenção dos híbridos **55a** e **56a**, derivados da D-ribose e D-galactose, respectivamente, e os produtos foram obtidos puros com rendimentos de 33% (**55a**, Entrada 3) e 37% (**56a**, Entrada 8). Estudou-se o aumento do tempo da reação para até 72 horas, resultando em melhora significativa nos rendimentos, principalmente para os híbridos de D-xilose (86%) e D-galactose (58%) (Entradas 2 e 9). Os derivados da D-ribose não foram obtidos em rendimentos muito altos, mesmo após 72 horas de reação (Entradas 3 a 7). Visando-se a economia da amina de partida, também foi testada a utilização de 1,0 equivalente de **1c** para obtenção de **54c**, porém o produto foi obtido com rendimento mais baixo (45%, após 72 h).

Tabela 6. Otimização do tempo de reação dos híbridos tacrina-carboidratos.

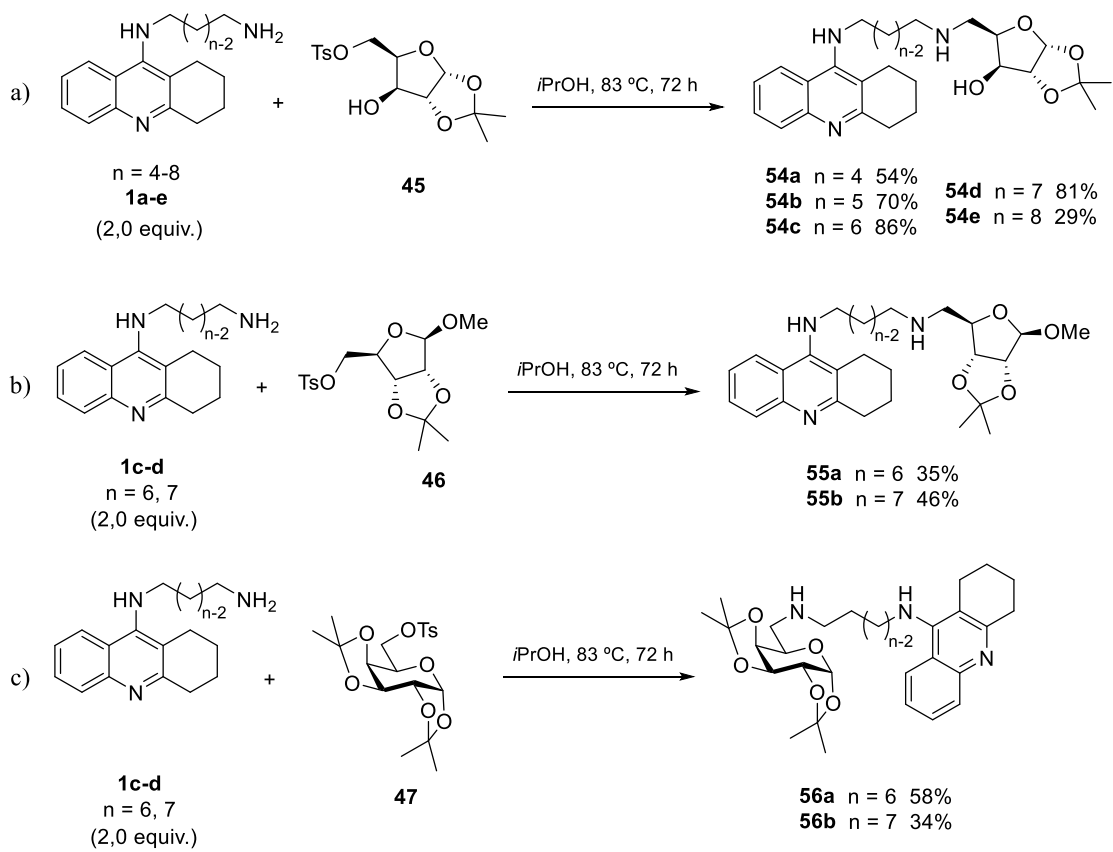


Entrada	Carboidrato ^a	Híbrido	Tempo (h)	Rend. ^b (%)
1	D-xilose	54c (n = 6)	24	61
2	D-xilose	54c (n = 6)	72	86
3	D-ribose	55a (n = 6)	24	33
4	D-ribose	55a (n = 6)	48	34
5	D-ribose	55a (n = 6)	72	35
6	D-ribose	55b (n = 7)	24	17
7	D-ribose	55b (n = 7)	72	46
8	D-galactose	56a (n = 6)	24	37
9	D-galactose	56a (n = 6)	72	58

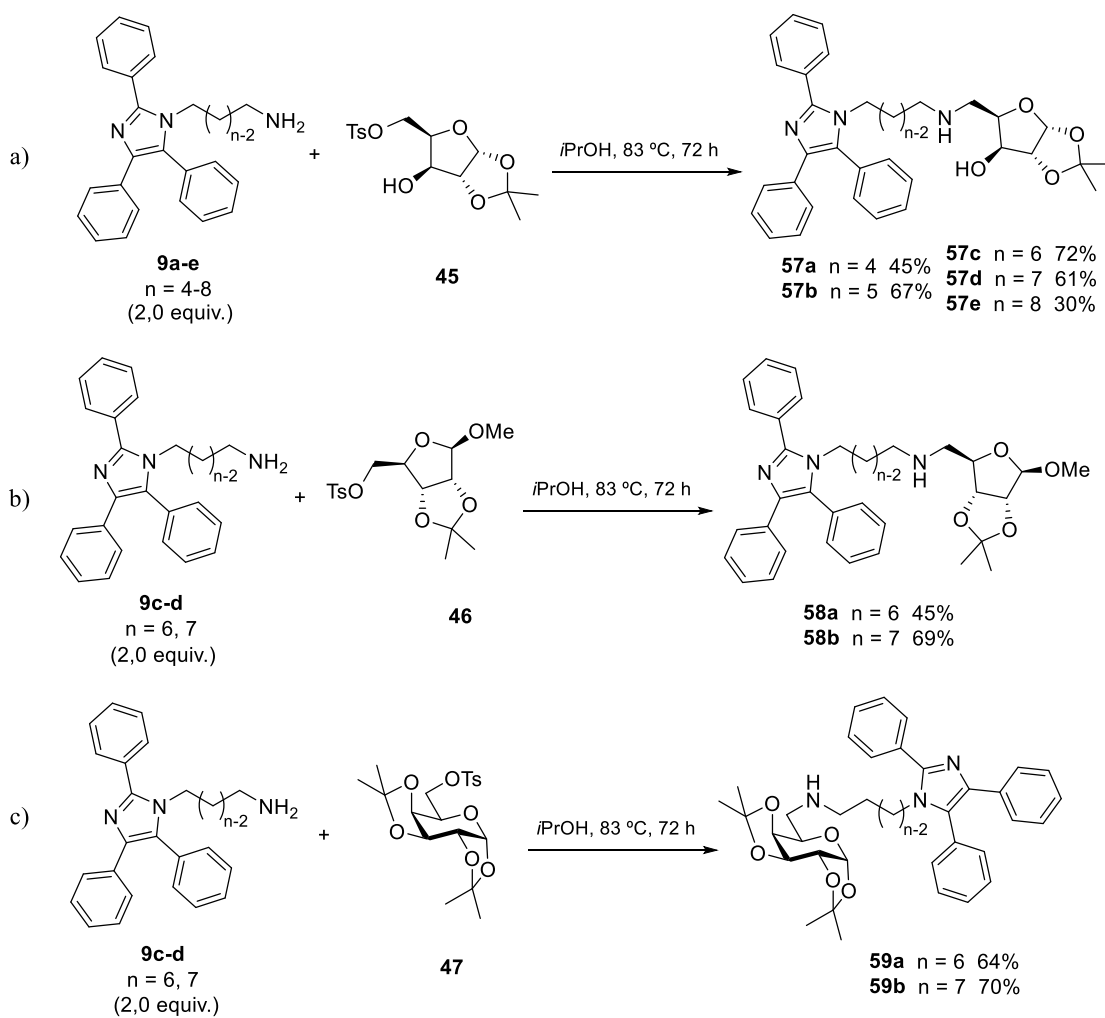
^aProtegido com grupo acetônio; ^bApós purificação por cromatografia em coluna.

Outra tentativa foi a utilização de um solvente aprótico, mais adequado para S_N2 . Dissolveu-se o tosilato da D-xilose (**45**) e a amina **1c** em DMF anidra e aqueceu-se a 83 °C sob agitação e atmosfera inerte. No entanto, após 24 h não se observou a formação de produto em CCD. A análise de RMN de ^1H do bruto da reação mostrou traços de produto, tentou-se então o isolamento por cromatografia em coluna, porém foram recuperados somente o material de partida puro e uma mistura complexa contendo traços de produto.

Tendo em vista os bons rendimentos obtidos para os derivados da D-xilose e D-galactose com o tempo de reação de 72 horas (Tabela 6, Entradas 2 e 9) e a necessidade do aumento da biblioteca de compostos para o envio para análise de inibição das colinesterases, adotou-se esse procedimento para a obtenção dos demais híbridos tacrina(n)-carboidratos (Esquema 37) e lofina(n)-carboidratos (Esquema 38).



Esquema 37. Síntese dos híbridos derivados de carboidratos: a) tacrina-(n)-D-xilose (**54a-e**); b) tacrina(n)-D-ribose (**55a e 55b**); e c) tacrina(n)-D-galactose (**56a e 56b**).



Esquema 38. Síntese dos híbridos derivados de carboidratos: a) lofina-(n)-D-xilose (**57a-e**); b) lofina(n)-D-ribose (**58a e 58b**); e c) lofina(n)-D-galactose (**59a e 59b**).

Observou-se que, de uma forma geral, os rendimentos foram melhores para os derivados da D-xilose, mostrando que há uma evidente diferença de reatividade entre os tosilatos dos açúcares de partida frente ao ataque nucleofílico da amina (Figura 41).

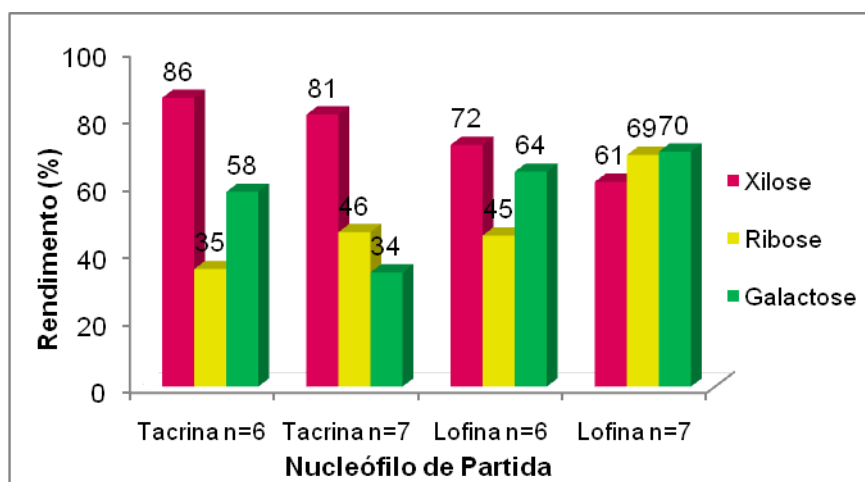
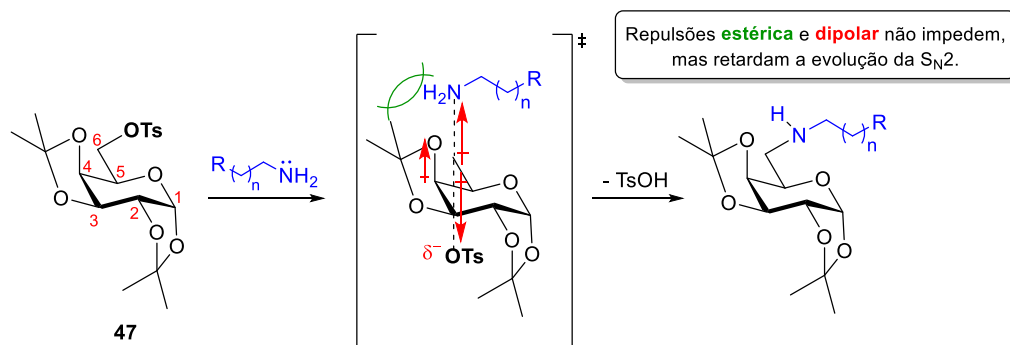


Figura 41. Panorama geral dos rendimentos obtidos para os híbridos sintetizados.

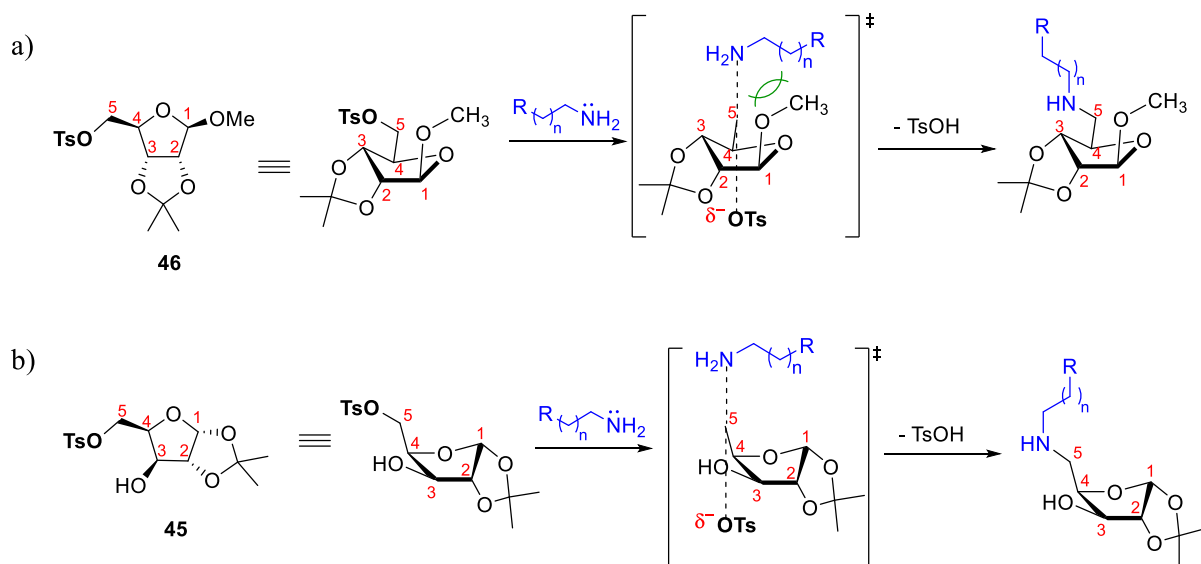
Uma vez que o procedimento originalmente fora desenvolvido para o tosilato da D-xilose, não é surpreendente que o rendimento tenha sido maior na obtenção dos híbridos contendo seus derivados. Entretanto, aspectos do mecanismo da reação também podem ajudar a explicar a diferença observada nos rendimentos. As diferenças estruturais entre os diferentes carboidratos e a influência na reatividade têm sido bastante exploradas na literatura. Na década de 60, Richardson e Hough publicaram uma teoria baseada em efeitos estereoeletrônicos para explicar a reatividade de sulfonatos de carboidratos frente a reações de S_N2 .^{213, 214} Essa teoria, conhecida como Regras de Richardson-Hough, tem sido ratificada e atualizada recentemente na literatura.^{215, 216} A teoria baseia-se no fato de que no estado de transição (ET) pentacoordenado da S_N2 , o alinhamento entre dipolos adjacentes, isto é, um dipolo fixo de uma ligação C-O e o dipolo da ligação parcial entre o nucleófilo, o substrato e o grupo de saída, causa uma forte repulsão estereoeletrônica e torna o ET menos estável.²¹⁵ Uma das regras diz respeito a reatividade de hexopiranosos com sulfonatos na posição C6 (caso do tosilato da D-galactose, **47**). Neste caso, a teoria prevê que a reação pode ocorrer, mas é dificultada quando o substituinte em C4 é axial (caso de **47**) e muito volumoso, sendo necessários tempos longos de reação. No Esquema 39 abaixo é mostrado como o efeito pode afetar a reatividade do tosilato da D-galactose (**47**).



Esquema 39. Mecanismo via S_N2 para a substituição da amina no tosilato da D-galactose (**47**) e a representação do efeito estereoeletrônico no ET. Esquema adaptado de Hale *et al.*²¹⁵

O fato da ligação em C4 ser em axial favorece o alinhamento do dipolo da ligação C4-O com o dipolo da ligação parcial entre o nucleófilo e o centro eletrofílico (C6), gerando uma repulsão estereoeletrônica, chamada nesse caso também de repulsão dipolar. Além disso, o grupo acetonídeo pode causar impedimento estérico para a aproximação do nucleófilo.

Com relação a reatividade de furanoses (casos da D-xilose e da D-ribose), a teoria prevê que a reação seja fácil e rápida quando o substrato for primário, ou seja, com o grupo de saída na posição C5 do anel, que é exatamente o caso dos tosilatos utilizados neste trabalho.²¹⁶ Além disso, é descrito na literatura que em reações com azida de sódio e organosselenetos, os melhores rendimentos são obtidos com as furanoses enquanto que a substituição no tosilato da D-galactose apresenta os rendimentos mais baixos.^{166, 188} Esses argumentos ajudam a explicar porque as reações com a D-xilose deram rendimentos melhores que com a D-galactose. Contudo, não explica porque os rendimentos com a D-ribose foram baixos, pois seriam esperados rendimentos maiores do que a reação com a D-galactose. Uma possível explicação para os baixos rendimentos obtidos com o tosilato da D-ribose neste trabalho é uma repulsão estérica causada pelo grupo metoxila na posição C1, voltado para a mesma face que o sítio eletrofílico (C5), o que poderia dificultar a aproximação de um nucleófilo volumoso como as aminas derivadas da tacrina (**1a-e**) e da lofina (**9a-e**). Mesmo assim, essa repulsão é menor do que a observada no anel galactosídico, pois a distância entre ligação C1-O e C5 é de três ligações (Esquema 40a) (na galactose a distância entre C4-O e C6 é de duas ligações, Esquema 39). Essa possível repulsão estérica não pode ocorrer no anel da D-xilose, uma vez que não há nenhum grupo volumoso voltado para a mesma face que C5 (Esquema 40b).



Esquema 40. Mecanismo via S_N2 para o tosilato da a) D-ribose (**46**) e b) D-xilose (**45**).

Outra explicação possível para o melhor rendimento observado para os derivados da D-xilose e D-galactose é a formação de uma ligação de hidrogênio no ET entre um H da amina com o oxigênio ligado ao C4 (galactose) ou C3 (xilose) (Figura 42). Essa LH pode ter uma contribuição importante na estabilização do estado de transição pentacoordenado. Além disso, uma LH intramolecular entre o NH e o O adjacente é muito provável nos híbridos derivados de xilose e galactose, devido à formação de um anel seis membros e foi detectada no espectro de RMN dos produtos, como será discutido mais adiante (ver Figura 43). Devido à geometria do substrato, essa LH com o NH é improvável de se formar no anel da D-ribose.

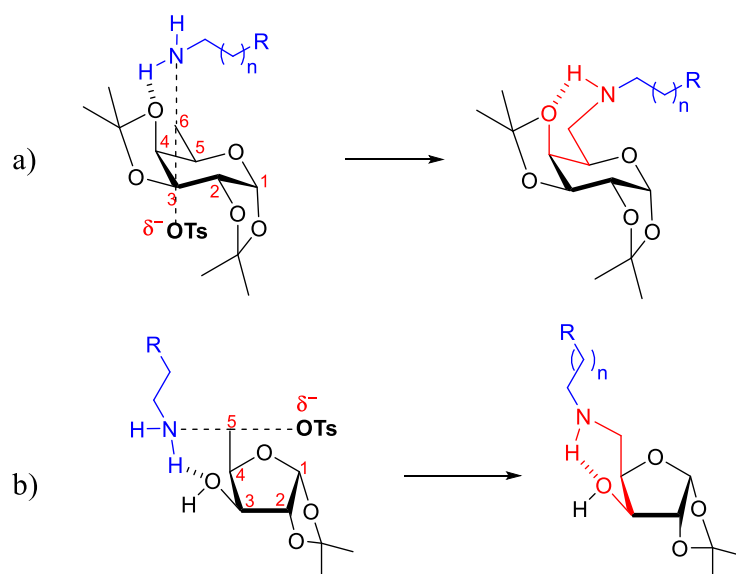
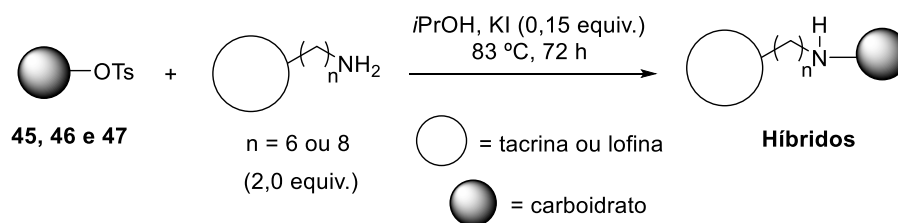


Figura 42. Proposta de formação de uma LH no estado de transição da $\text{S}_{\text{N}}2$ no anel da a) D-galactose e b) D-xilose. Essa interação é observada no produto (à direita).

Com objetivo de melhorar os rendimentos obtidos, testou-se a utilização de iodeto de potássio como catalisador nas mesmas condições dos Esquema 37 e Esquema 38. O iodeto é um melhor nucleófilo que a amina e muito menos volumoso que as aminas **1** e **9** utilizadas neste trabalho, além de ser um melhor grupo de saída que o tosilato. Sendo assim, sua utilização em quantidade catalítica pode proporcionar melhor rendimento para o ataque nucleofílico, como já estudado em outra reação neste trabalho (ver Esquema 17, pág. 63). Testou-se a reação com iodeto de potássio em diferentes substratos e os rendimentos foram melhores em todos os quatro exemplares testados (Tabela 7). Observou-se na placa de CCD uma maior formação de subprodutos para a reação com o derivado da D-ribose, os quais não foi possível isolar. No entanto, a reação teve um rendimento bem melhor do que sem o uso do KI (Entrada 1). Ainda assim, em todas as reações houve sobra de tosilato observada por CCD.

Tabela 7. Testes com KI para obtenção dos híbridos derivados de carboidratos.



Entrada	Produto	Rendimento sem KI ^a	Rendimento com KI ^a
1	tacrina(6)-ribose (55a)	35%	58% ^b
2	tacrina(8)-xilose (54e)	29%	85%
3	tacrina(6)-galactose (56a)	58%	70%
4	lofina(8)-xilose (57e)	30%	63%

^aApós purificação por cromatografia em coluna; ^bHouve formação de mais subprodutos.

4.7.2. Caracterização espectroscópica dos híbridos derivados de carboidratos

4.7.2.1. Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

A formação do híbrido tacrina-carboidrato é evidenciada no RMN de ¹H pelos sinais do núcleo tacrina, do núcleo carboidrato e pelo desaparecimento dos sinais do tosilato. Na Figura 43 é mostrado o espectro de RMN de ¹H do híbrido tacrina(6)-D-xilose (**54c**). Os H do núcleo da tacrina são observados nos mesmos δ das 9-alkilamino-tacrininas (**1a-e**) de partida (ver Figura 25, pág. 64), com destaque para os H10 metilênicos mais próximos à tacrina, um tripleto com $J = 7,1$ Hz em 3,5 ppm, mesmos J e δ que nas 9-alkilamino-tacrininas. O hidrogênio da posição anomérica é observado em 5,95 ppm, um $\Delta\delta = 0,07$ ppm em relação ao mesmo H no tosilato **45** (5,88 ppm) (Figura C64, pág. 212). Esse sinal é um dubleto com $^3J = 3,6$ Hz devido ao acoplamento *cis* com H19, cujo sinal é observado em 4,49 ppm, também como um dubleto com $^3J = 3,5$ Hz. Não é observado acoplamento entre H19 e H18, onde o ângulo entre essas ligações em *trans* é aproximadamente 90°, logo $J \approx 0$ de acordo com equação de Karplus^{***, 217}. Essa situação é característica em anéis furanosídicos. A diferença na magnitude dos acoplamentos *cis* e *trans* entre H16 e H17 permitiu diferenciar entre os dois H16, que são diastereotópicos (Figura 43c), sendo $^3J = 3,4$ Hz o acoplamento *cis* e 1,1 Hz o

*** A eq. de Karplus descreve a magnitude do acoplamento 3J , no caso H-C-C-H, dependente do ângulo diedro α , onde $^3J = A + B\cos\alpha + C\cos2\alpha$. Quando as ligações são perpendiculares ($\alpha = 90^\circ$), a sobreposição orbital é mínima, com quase nenhuma interação de *spins* e $^3J = 0$. Quanto mais próximo de 90° for o ângulo α , menor será o J . Quando as ligações são paralelas ($\alpha = 0^\circ$) ou antiparalelas ($\alpha = 180^\circ$), a constante de acoplamento 3J deve ter sua maior magnitude.

acoplamento *trans*, cujo ângulo é próximo de 90°. Os sinais dos dois hidrogênios H15 quase coincidem em δ , o que dificultou a determinação dos 2J geminal (H15-H15) e 3J vicinal (H15-H14), no entanto ambos acoplamentos podem ser vistos no RMN bidimensional COSY (Figura 44). Os demais hidrogênios da cadeia metilênica, apesar de também serem diastereotópicos, não desdobram o sinal e são observados nos mesmos δ que nas 9-alkilamino-tacrinas, sendo que H12 e H13 se sobrepõem com os singletos das metilas do acetônio (H22 e H23), formando um único multipletto entre 1,53 e 1,28 ppm com integração para 12H (Figura 43b). O hidrogênio do NH mais próximo ao núcleo D-xilose não é observado em nenhum híbrido da série, provavelmente devido à ligação de hidrogênio intramolecular formada com o O da hidroxila, mesma explicação proposta para a duplicação de alguns sinais observados tanto no ^1H quanto no ^{13}C . O hidrogênio da hidroxila também nunca foi observado em nenhum composto da série.

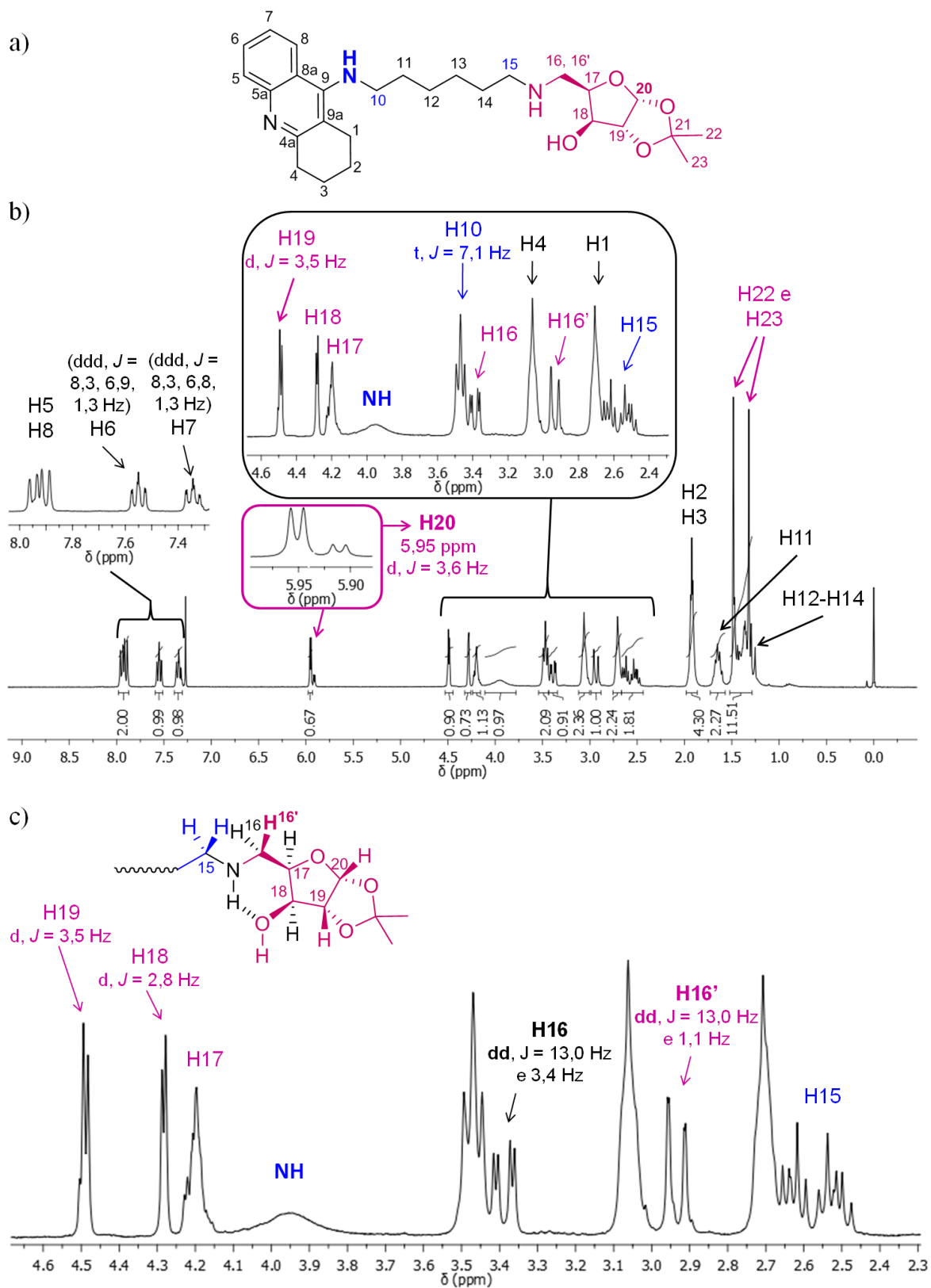


Figura 43. a) Estrutura do híbrido tacrina(6)-D-xilose (**54c**); b) Espectro de RMN de ^1H (CDCl_3 , 300 MHz) de **54c**, destacando ampliações; e c) Ampliação entre 2,3 e 4,6 ppm.

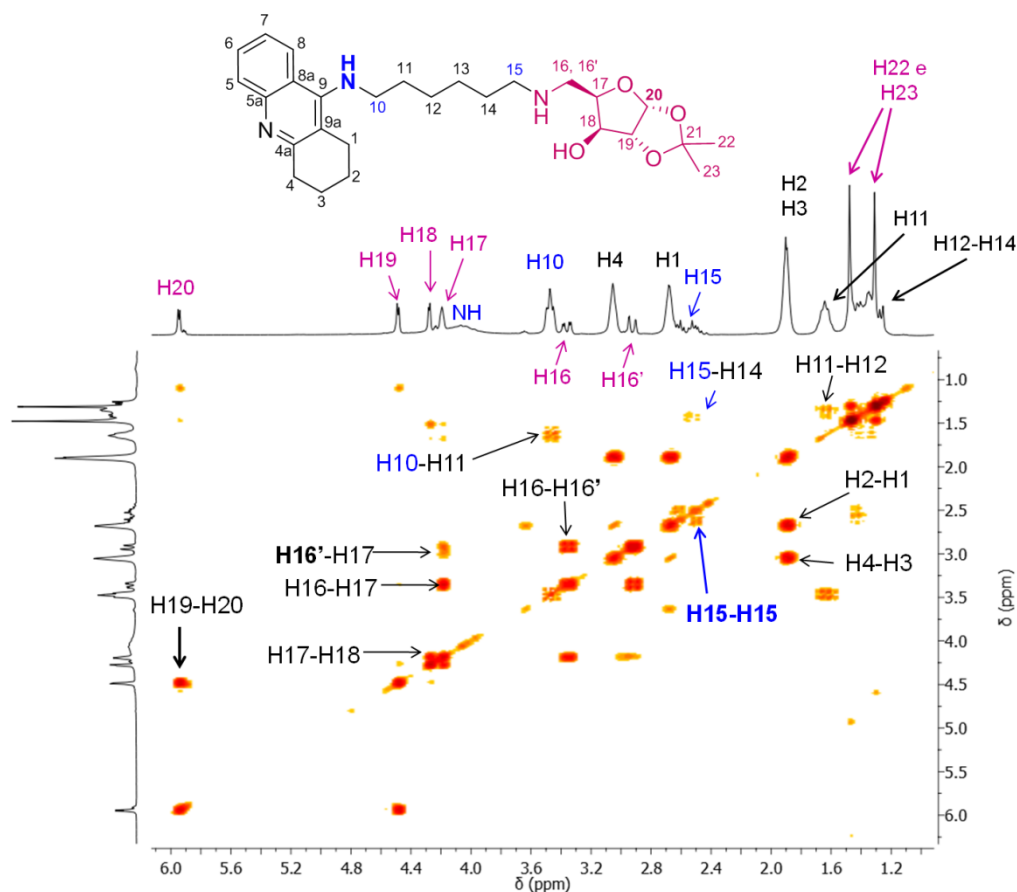


Figura 44. Espectro de RMN bidimensional homonuclear ^1H - ^1H -COSY (CDCl_3 , 300 MHz) do híbrido tacrina(6)-D-xilose (**54c**), ampliação entre 1,0 e 6,0 ppm.

Comparando-se os espectros de RMN de ^1H dos híbridos tacrina-carboidratos, observa-se a principal diferença no δ do H anomérico: 5,94 ppm (xilose), 5,54 ppm (galactose) e 4,96 ppm (ribose), sendo que a diferença entre o tacrina-xilose e o tacrina-ribose é de praticamente 1,0 ppm (Figura 45). De forma contrária, no espectro de ^{13}C (Figura 46) o carbono anomérico da ribose é o mais desblindado dentre os três híbridos, mesmo comportamento observado nos tosilatos de partida (Apêndice C, págs. 212-214).

No derivado da ribose, o H anomérico (H20) é um singlete devido ao ângulo de 90° com o H vizinho (H19), que resulta em $J \approx 0$, como já discutido anteriormente. Os hidrogênios vizinhos H18 e H19 acoplam entre si com $^3J = 6,0$ Hz e são observados muito próximos no espectro, 4,57 e 4,62, respectivamente. Olhando-se somente o espectro de ^1H do tacrina-ribose, os H16 coincidem em 2,69 ppm em um dubleto com $J = 6,7$ Hz, mesmo valor encontrado no tripleto em 4,30 ppm, que corresponde ao H17 (3J H16-H17). Entretanto, uma pequena separação devido ao efeito diastereotópico pode ser notada no espectro 2D HMQC, onde se observam dois sinais desdobrados e bem próximos para o acoplamento 1J

heteronuclear C-H16 (Figura 47b). Através da observação dos acoplamentos 3J homonucleares H1-H2 e H16-H17 no espectro bidimensional COSY (Figura C100, pág. 230), foi possível mostrar que os H1 (da tacrina) coincidem com H16 em 2,69 ppm.

No derivado da galactose o H17 é observado em menor δ (3,93 ppm) que nos híbridos de ribose (4,30 ppm) e xilose (4,21 ppm), sendo esta a principal diferença em termos de δ , além do H anomérico. A atribuição dos sinais do anel da galactose foi baseada nas constantes de acoplamento J e no espectro bidimensional COSY, onde são observados os dois acoplamentos do H17 com os H16 em (3,93; 2,89 ppm) e (3,93; 2,60 ppm), distinguindo-o dos demais H do anel (Figura C110, pág. 235). O sinal do H anomérico (H21) é observado em 5,54 ppm como um dubleto com $J = 5,1$ Hz devido ao acoplamento $^3J_{cis}$ com H20. Os demais H do anel galactose são: (i) H19 em 4,60 ppm como um dd com $J = 7,9$ Hz ($^3J_{cis}$ com H18) e 2,3 Hz ($^3J_{trans}$ com H20); (ii) H20 em 4,32 ppm como um dd com $J = 5,1$ Hz ($^3J_{cis}$ com H21) e 2,3 Hz ($^3J_{trans}$ com H19); e (iii) H18 em 4,18 ppm como um dd com $J = 7,9$ Hz ($^3J_{cis}$ com H19) e 1,8 Hz ($^3J_{cis}$ com H17) (Figura 45).

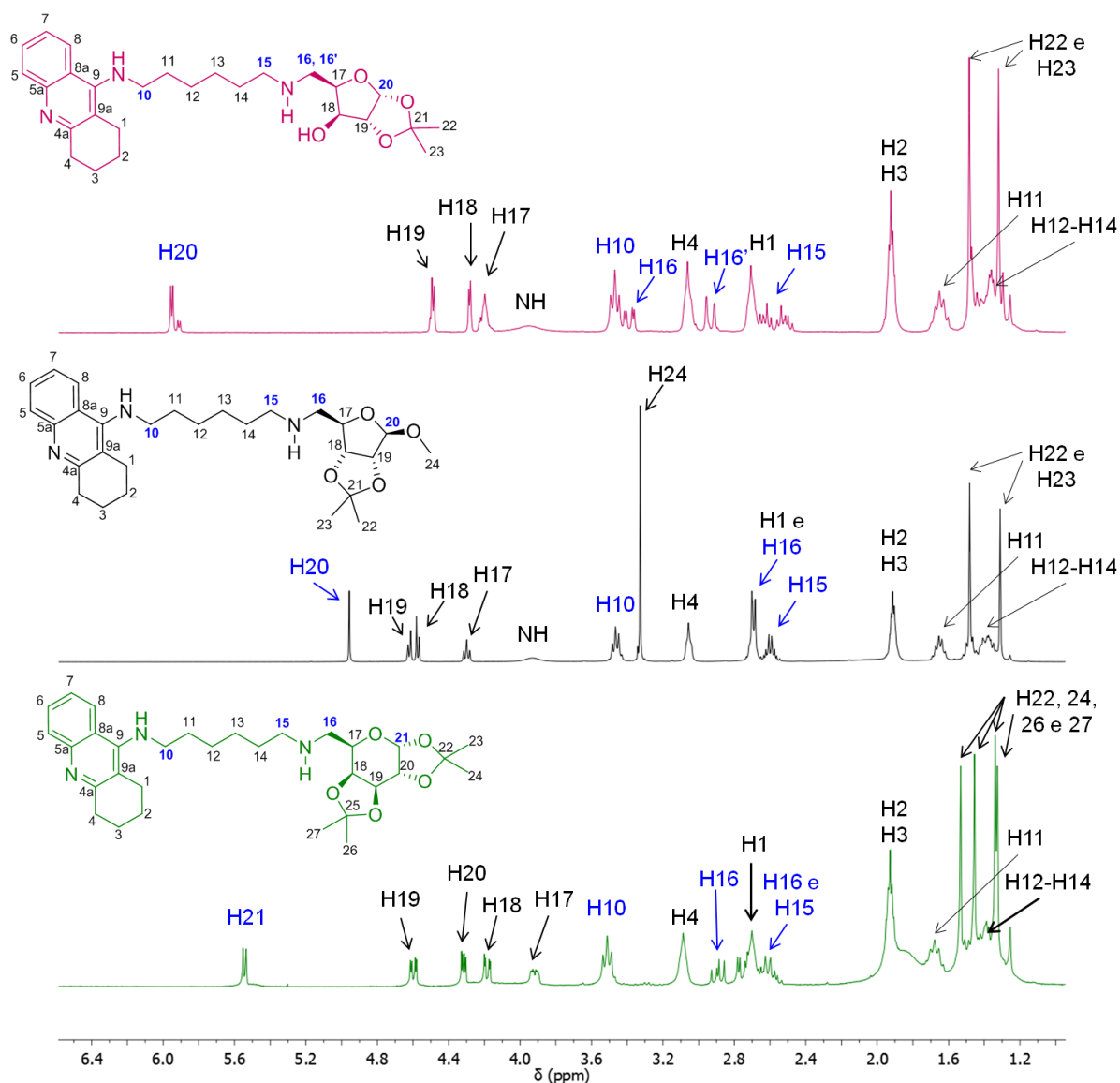


Figura 45. Comparação dos espectros de RMN de ^1H (CDCl_3 , 300 MHz) dos híbridos tacrina-carboidratos, D-xilose (**54c**, acima), D-ribose (**55a**, meio) e D-galactose (**56a**, abaixo). Ampliações entre 1,2 e 6,4 ppm.

Comparando-se os espectros de RMN de ^{13}C dos mesmos três híbridos, nota-se que as diferenças entre os carbonos do anel carboidrato, além do anomérico, são mais significativas do que os hidrogênios no RMN de ^1H discutido acima. Os C anoméricos nos híbridos tacrina-carboidratos aparecem na seguinte ordem: ribose (109 ppm) > xilose (106 ppm) > galactose (96 ppm), destacados em azul na Figura 46. Os carbonos do anel da galactose são observados em menor δ , sendo que seus quatro carbonos CH do anel são observados entre 65 e 72 ppm, mais blindados que os sinais do CDCl_3 . Dois carbonos do núcleo xilose (C17 e C18) aparecem na mesma região do CDCl_3 e puderam ser identificados com auxílio das análises de RMN HMQC (Figura 47a) e APT (Figura C80, pág. 220).

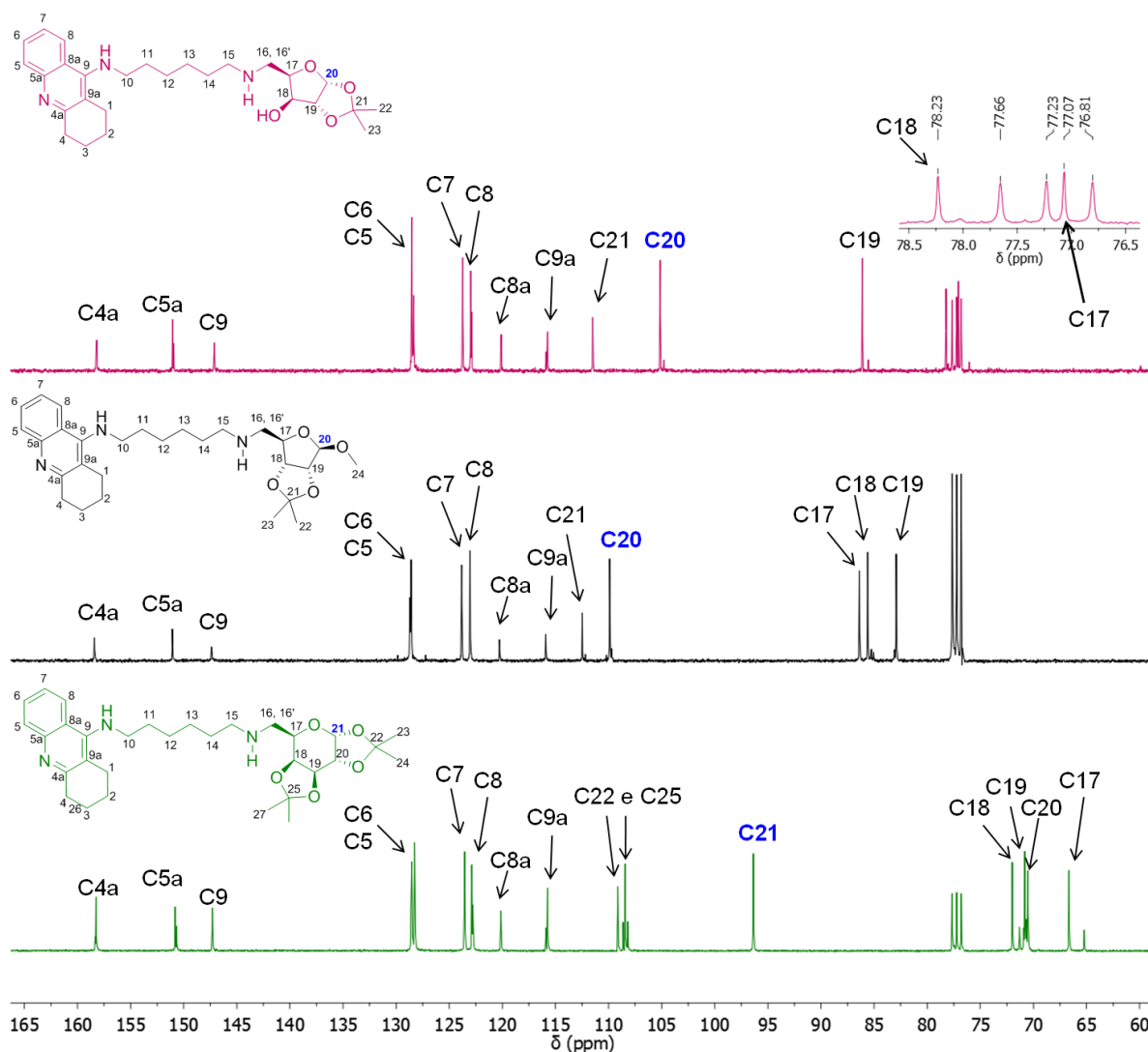


Figura 46. Comparação dos espectros de RMN de ^{13}C (CDCl_3 , 75 MHz) dos híbridos tacrina-($n = 6$)carboidratos, D-xilose (**54c**, acima), D-ribose (**55a**, meio) e D-galactose (**56a**, abaixo). Ampliações entre 60 e 165 ppm.

A análise de RMN bidimensional ^1H - ^{13}C -HMQC (Figura 47) foi utilizada para auxiliar na identificação dos carbonos dos híbridos discutidos acima, principalmente os do núcleo carboidrato. Observou-se que enquanto que os carbonos do anel diferem bastante em termos de δ , o carbono metilênico C16 não varia muito entre os três compostos, sendo observado em 49 ppm nos três casos. Nessa mesma região também são observados os carbonos das extremidades da cadeia C10 e C15, sendo que C10 aparece no mesmo deslocamento típico observado nos demais derivados da tacrina.

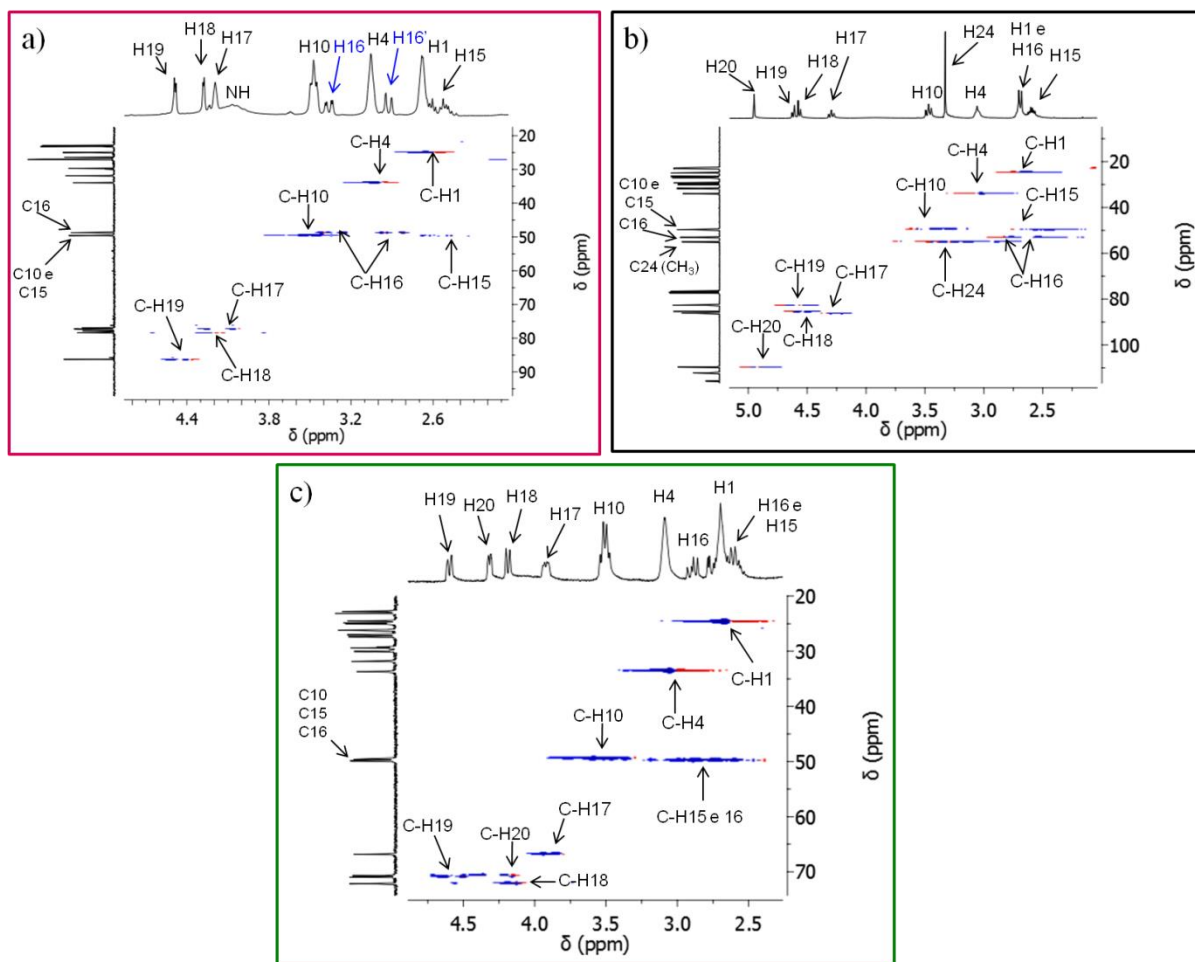


Figura 47. Ampliações na região dos alifáticos dos espectros bidimensionais heteronucleares ^1H - ^{13}C -HMQC dos híbridos de tacrina e a) xilose (**54c**); b) ribose (**55a**); e c) galactose (**56a**).

Comparando-se os espectros de RMN de ^1H dos híbridos tacrina-(6)-D-xilose (**54c**) e lofina(6)-D-xilose (**57c**) observam-se os sinais do núcleo carboidrato sem diferenças significativas em termos de δ (indicados em cor preta na Figura 48, e o anomérico em vermelho). Os hidrogênios H15, do grupo metileno mais próximo ao açúcar, são observados mais blindados no derivado da lofina (2,39 ppm) que no da tacrina (2,57 ppm), $\Delta\delta = 0,18$ ppm. Além disso, foi observada uma variação para o H16' (*trans* com H17, $\Delta\delta = 0,07$ ppm) maior que para o H16 (*cis* com H17, $\Delta\delta = 0,03$ ppm), sendo ambos mais blindados e com uma maior separação no derivado da lofina. Assim como observado nos híbridos derivados de Biginelli (ver Figura 37, pág. 89), os H da cadeia metilênica (exceto H10) estão em menor δ (mais blindados) no híbrido de lofina. A maior diferença foi encontrada para o H11 ($\Delta\delta = 0,48$ ppm, sendo 1,64 ppm em **54c** e 1,16 ppm em **57c**), maior que a observada entre os híbridos tacrina-pirimidina e lofina-pirimidina (Figura 36, pág. 88).

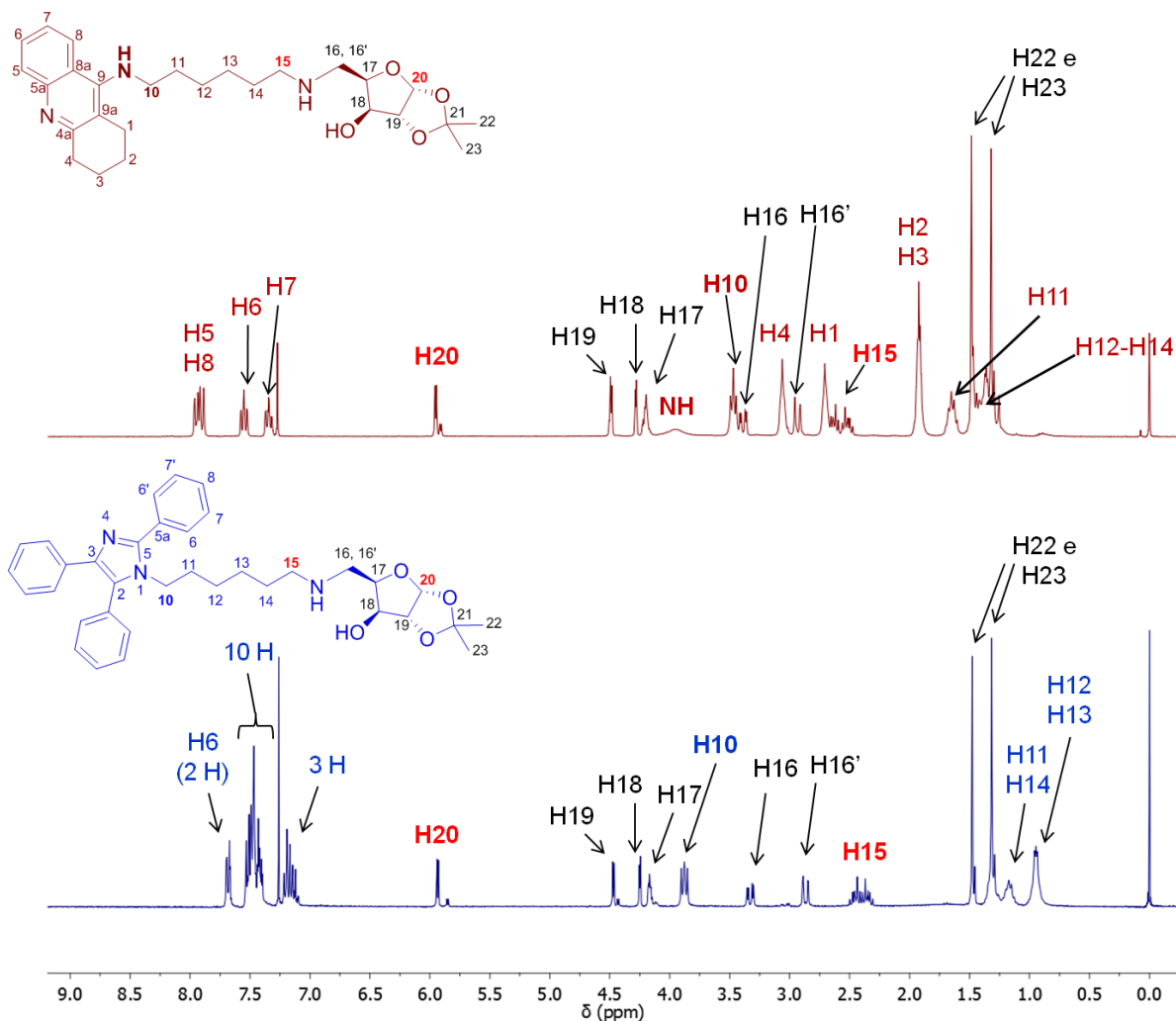


Figura 48. Espectro de RMN de ¹H (CDCl₃, 300 MHz) do híbrido tacrina(6)-D-xilose (**54c**, acima) e lofina(6)-D-xilose (**57c**, abaixo).

Está disponível no Apêndice C a comparação entre os RMN de ¹H e ¹³C dos híbridos lofina-carboidratos sintetizados neste trabalho (Figura C150 e Figura C151, págs. 255 e 256).

4.7.1.2. Espectroscopia no infravermelho (IV)

Na Figura 49 são mostrados os espectros de IV de alguns híbridos sintetizados. As bandas referentes aos estiramentos das ligações C-H dos metilenos (entre 2800 e 3000 cm⁻¹), das C-H aromáticas (entre 3000 e 3100 cm⁻¹) e do N-H (entre 3300 e 3400 cm⁻¹) são comuns em todos os compostos, e não diferem muito do perfil observado nos híbridos tacrina-pirimidina e lofina-pirimidina (Figura 39, página 91). É importante destacar nesses espectros as bandas correspondentes aos estiramentos C-O-C dos carboidratos, geralmente duas, na

região entre 1200 e 1050 cm^{-1} .¹⁶⁶ A banda do estiramento O-H não foi observada em todos os derivados da D-xilose, possivelmente devido à formação de LH entre o O da hidroxila e o H do NH (Figura 42, pág. 103), dificultando a formação de LH do tipo O-H-O, responsáveis por aumentar e alargar a intensidade da banda de absorção no IV na região entre 3300 e 3500 cm^{-1} .

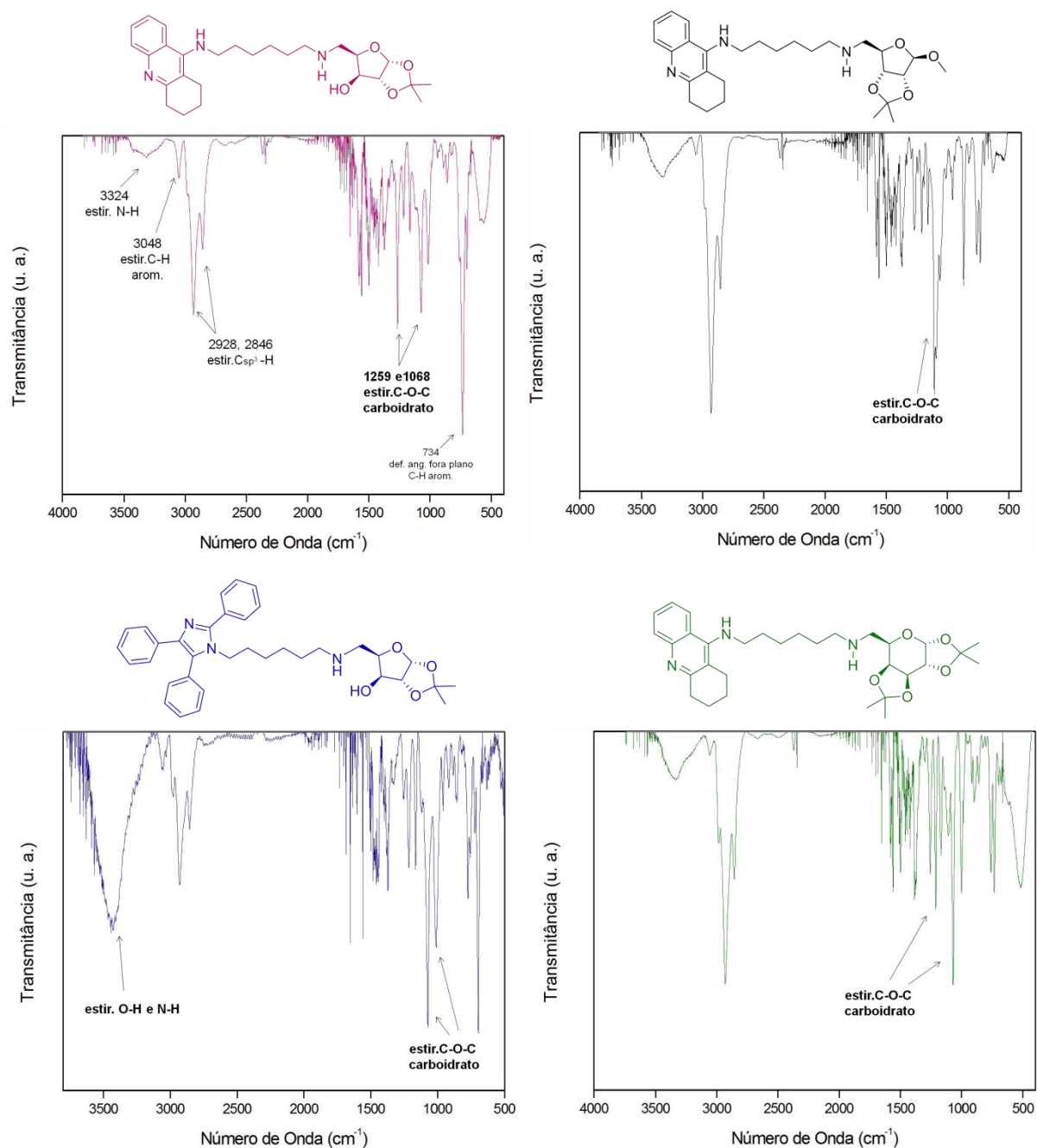


Figura 49. Espectros de IV (pastilha de KBr) dos híbridos tacrina(6)-xilose (**54c**, rosa), tacrina(6)-ribose (**55a**, preto), lofina(6)-xilose (**57c**, azul) e tacrina(6)-galactose (**56a**, verde).

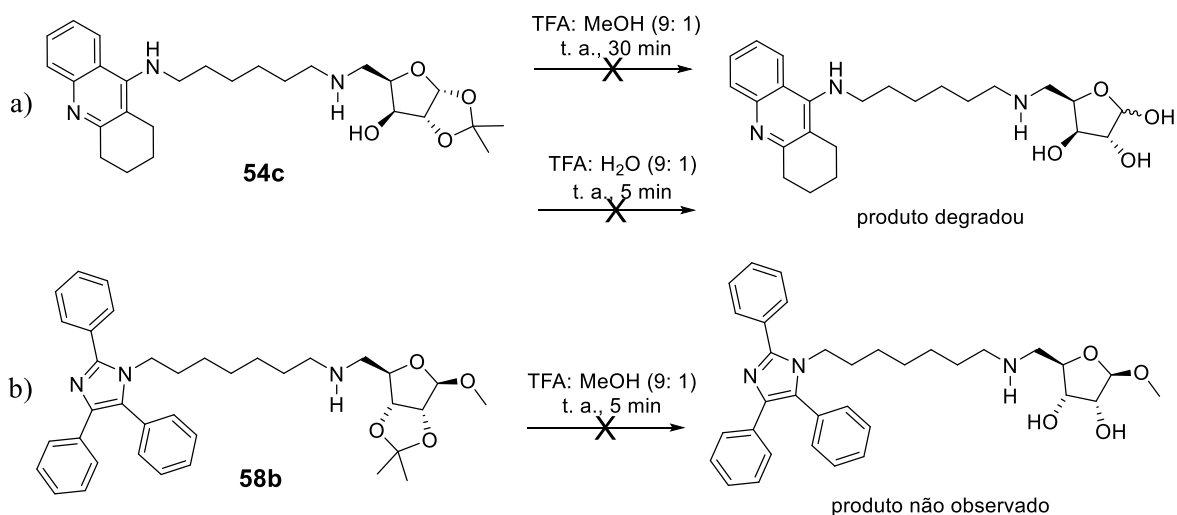
4.7.2. Tentativa de desproteção dos carboidratos

Levando em conta o objetivo de se avaliar a atividade anticolinesterase dos híbridos tacrina-carboidratos e lofina-carboidratos com as hidroxilas livres, foi testada a reação de remoção do grupo acetonídeo. Os procedimentos mais utilizados na literatura para remover o grupo acetonídeo de carboidratos envolvem a reação com ácido trifluoroacético (TFA) em metanol ou água, em curtos tempos de reação.¹⁸⁸

O híbrido tacrina(6)-xilose (**54c**) foi dissolvido numa mistura TFA: metanol 9: 1 (Esquema 41a) e a solução foi mantida sob agitação a temperatura ambiente e a evolução foi acompanhada por cromatografia em camada delgada (CCD). Observaram-se duas manchas na placa após 5 minutos de reação, sendo uma delas correspondente ao híbrido **54c** de partida. Não se observou consumo total do reagente de partida mesmo após 30 minutos, tempo mais longo que o descrito na literatura, mesmo assim optou-se por encerrar a reação. Não foram observados sinais de carboidrato nos RMN de ¹H e ¹³C, sendo vistos somente sinais de aromáticos e de cadeia metilênica similares aos do núcleo tacrina, concluindo-se que a amostra degradou. Tentou-se desproteger o híbrido **54c** com TFA: H₂O 9: 1, deixando-se apenas 5 minutos sob agitação, onde se observou consumo parcial de **54c** em CCD. A degradação do núcleo carboidrato foi observada por RMN (¹H e APT), onde no primeiro dia ainda haviam sinais correspondentes ao carboidrato e, após uma semana, não se observou mais.

Uma explicação proposta é que a desproteção da hidroxila da posição anomérica (C1) tenha proporcionado o ataque intramolecular do NH no carbono carbonílico C1 da forma aberta do açúcar, formando um iminoaçúcar, uma reação que é descrita na literatura para a formação de iminoaçúcares bicíclicos, com a função amina cíclica.²¹⁸ Entretanto, iminoaçúcares com a função hemiaminal não são encontrados na literatura, provavelmente devido à instabilidade. Iminoaçúcares com um grupo metilênico em C2 são amplamente encontrados na literatura, inclusive com atividade anticolinesterase (Figura 23, pág. 57).

Para se evitar a conversão do anel glicosídico para a forma aberta e o ataque intramolecular do NH, testou-se a desproteção de um derivado da D-ribose (**58b**), onde a posição anomérica está protegida com um grupo metóxi, cujo TFA não é forte suficiente para remover. No entanto, não se observou formação de produto (Esquema 41b).



Esquema 41. Tentativas de desproteção das hidroxilas do híbrido a) tacrina(6)-xilose (**54c**) e b) lofina(7)-ribose (**58b**).

4.8. ATIVIDADE ANTICOLINESTERASE DOS COMPOSTOS SINTETIZADOS

Os compostos finais sintetizados neste trabalho, híbridos contendo os núcleos tacrina, lofina, pirimidina e carboidratos, foram avaliados quanto à capacidade de inibição das enzimas colinesterases (ChE): acetilcolinesterase (AChE) e butirilcolinesterase (BuChE). As análises ocorreram em parceria com a equipe do Dr. Mário Roberto Senger no Laboratório de Bioquímica de Proteínas e Peptídeos, da Fundação Oswaldo Cruz - IOC (FioCruz), na cidade do Rio de Janeiro.

4.8.1. Híbridos tacrina-pirimidina e lofina-pirimidina

Nenhum dos híbridos tacrina-pirimidina (**43a-c**) ou lofina-pirimidina (**44a-c**) apresentou atividade anti-AChE ou anti-BuChE. Considerando que vários derivados de Biginelli inibem as enzimas AChE e BuChE, como discutido na Seção 3.5 (páginas 46 a 49), o resultado é considerado surpreendente, especialmente para os híbridos tacrina-pirimidina. Esperava-se que a interação da tacrina no sítio catalítico (CAS) pudesse direcionar o núcleo pirimidina para o sítio periférico, com a utilização de um espaçador adequado (6 a 8 carbonos metilênicos).

Uma explicação proposta para a ausência de atividade anti-ChE dos híbridos **43a-c** e **44a-c** é o ângulo existente entre os planos do anel fenila e do anel pirimidina, devido à repulsão causada pela nuvem de elétrons do sistema π da carbonila do éster (Figura 50b). Esse

ângulo entre os dois anéis aromáticos pode ter dificultado a formação de interações π - π *stacking* com os anéis aromáticos do triptofano (Trp) e da tirosina (Tyr) no sítio ativo das colinesterases. Em compostos onde o anel pirimidínico não é aromático, tais como nas di-hidropirimidinonas (DHPM) e na arilacetamida-pirimidina discutida na Figura 16 (pág. 47), a ausência de conjugação π entre os dois anéis permite um ângulo maior, quase perpendicular (Figura 51). Nesse sistema onde somente há um anel aromático, existe menos impedimento para uma sobreposição entre o sistema π da fenila e o de um resíduo aromático da enzima, como o triptofano. Levando em conta esse resultado, tentou-se remover a carbonila dos híbridos sintetizados através da redução do grupo éster a um álcool primário, utilizando hidreto de alumínio e lítio (LiAlH_4) a 0 °C em THF anidro, no entanto não se observou formação de produto.

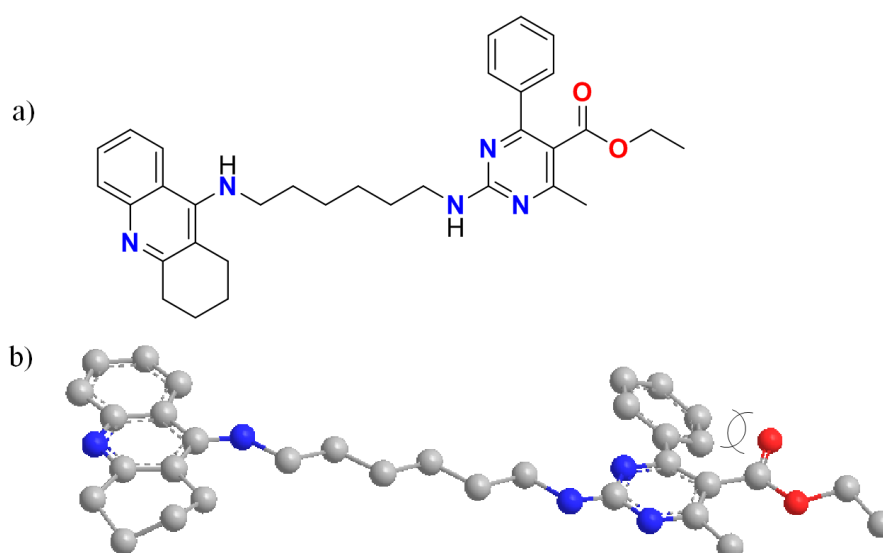


Figura 50. Estrutura do híbrido tacrina(6)-pirimidina (**43a**) nas formas a) bidimensional e b) tridimensional.^{†††} Os átomos de H não são mostrados na Figura 3D.

^{†††} As figuras tridimensionais foram obtidas no programa ChemBio 3D Ultra, a partir da estrutura 2D e aplicando a função de minimização de energia MM2.

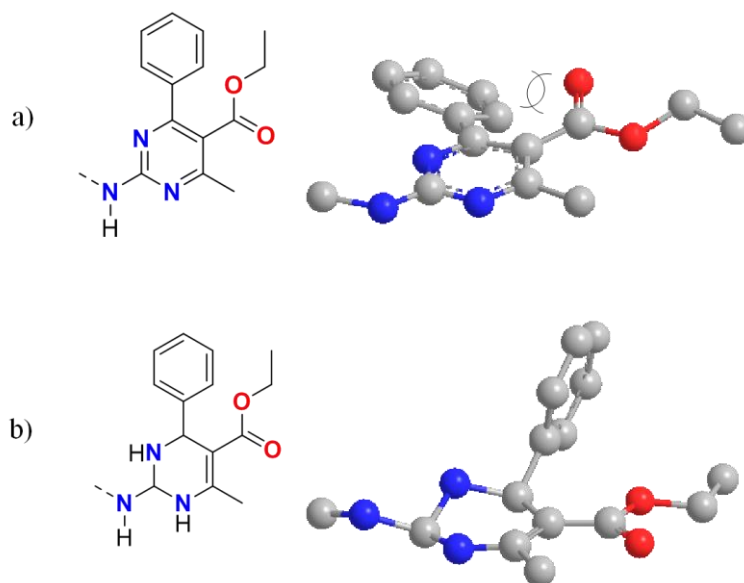


Figura 51. Comparação das estruturas 2D (à esquerda) e 3D (à direita) do núcleo pirimidina (a) e di-hidropirimidinona (DHPM, b). Os átomos de H não são mostrados na Figura 3D.

4.8.2. Híbridos derivados de carboidratos

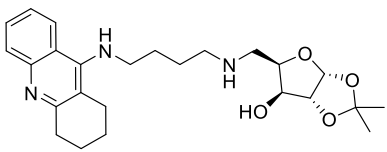
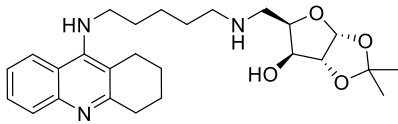
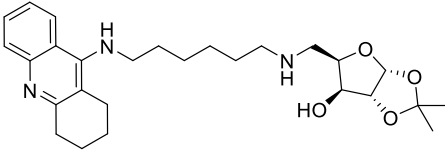
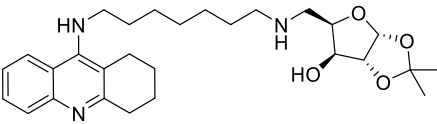
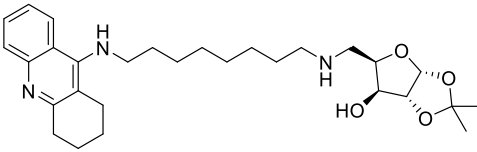
Os híbridos tacrina-carboidratos e lofina-carboidratos mostraram-se ativos para inibição das enzimas colinesterases, sendo observadas duas grandes diferenças entre as duas séries sintetizadas: (i) os derivados da tacrina foram ativos na escala nanomolar de concentração enquanto que os de lofina inibiram em escala micromolar; (ii) os derivados de tacrina exibiram tendência geral de seletividade para a AChE, por sua vez os híbridos lofina-carboidratos foram todos amplamente seletivos para a enzima BuChE, sendo que alguns não inibiram a AChE. Tendo em vista essas diferenças os resultados serão discutidos separadamente.

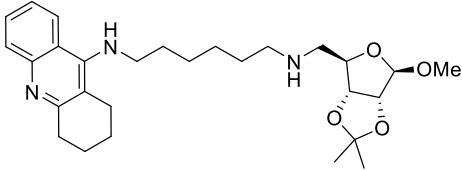
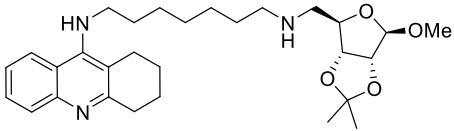
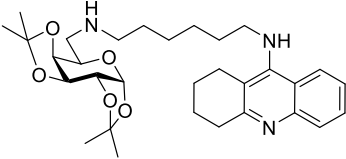
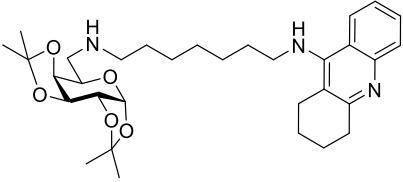
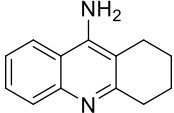
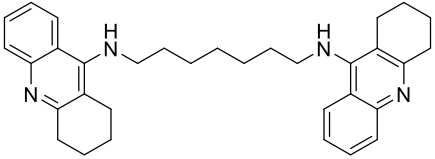
4.8.2.1. Híbridos tacrina-carboidratos

Na Tabela 8 estão mostradas as atividades de inibição das colinesterases dos híbridos tacrina-carboidratos sintetizados neste trabalho, os quais mostraram ser inibidores muito potentes de ambas as enzimas AChE e BuChE, inibindo-as na escala nanomolar de concentração (IC_{50}). Os híbridos derivados da xilose e da galactose com cadeia espaçadora entre 6 e 8 carbonos metilênicos foram os mais potentes contra a AChE, sendo que os compostos **54e** (tacrina(8)-xilose, $IC_{50} = 2,2$ nM) e **56a** (tacrina(6)-galactose, $IC_{50} = 4,8$ nM) foram os dois compostos mais ativos. Com exceção dos derivados da ribose (**55a** e **55b**,

Entradas 6 e 7) e o tacrina(5)-xilose (**54b**, Entrada 2), os híbridos tacrina-carboidratos foram seletivos para a AChE e mais ativos que o fármaco tacrina. O híbrido **54e** (Entrada 5) também foi o mais ativo contra a BuChE, sendo o mais potente para as duas enzimas, mas o menos seletivo. O híbrido **54b** (Entrada 2) foi o mais seletivo inibidor da BuChE, com $IC_{50} = 11,7$ nM. Os derivados da ribose também apresentaram seletividade para a BuChE, mas pela sua menor atividade para AChE, pois também foram menos ativos que os demais compostos contra a BuChE.

Tabela 8. Atividade anticolinesterase dos híbridos tacrina-carboidratos.

Entrada	Composto	IC_{50} (nM)		Razão IC_{50} BuChE/AChE
		AChE	BuChE	
1	 Híbrido tacrina(4)-D-xilose (54a)	8,72	27,6	3,2
2	 Híbrido tacrina(5)-D-xilose (54b)	84,4	11,7	0,14
3	 Híbrido tacrina(6)-D-xilose (54c)	5,1	25,8	5,0
4	 Híbrido tacrina(7)-D-xilose (54d)	10,2	30,8	3,0
5	 Híbrido tacrina(8)-D-xilose (54e)	2,2	4,93	2,2

6		89,9	36,9	0,41
	Híbrido tacrina(6)-D-ribose (55a)			
7		65,5	64,3	0,98
	Híbrido tacrina(7)-D-ribose (55b)			
8		4,8	36,7	7,6
	Híbrido tacrina(6)-D-galactose (56a)			
9		7,6	26,2	3,4
	Híbrido tacrina(7)-D-galactose (56b)			
10		34,3	62,5	1,8
	Tacrina			
11		1,9	9,1	4,8
	Bis(7)-tacrina			

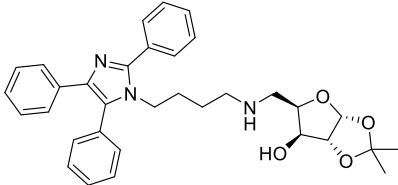
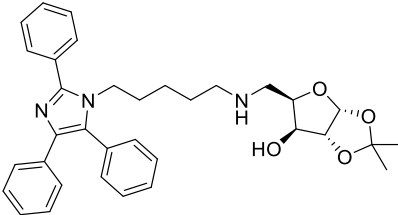
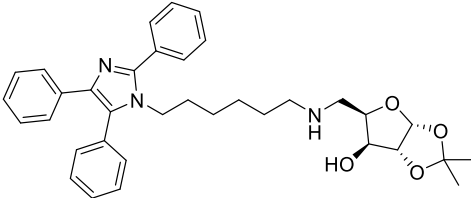
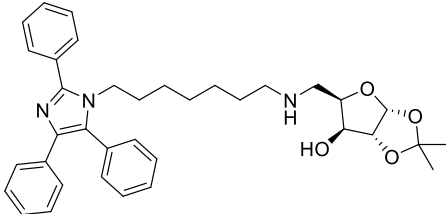
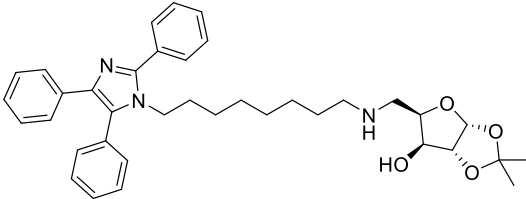
4.8.2.2. Híbridos lofina-carboidratos

Devido ao fato de que a enzima BuChE possui aminoácidos menos volumosos no sítio ativo, tanto no PAS, quanto no CAS (bolso acila), como discutido na Seção 3.2.2. (ver Figura 10, pág. 27), já era esperado que a série de híbridos derivados da lofina apresentasse tendência de seletividade para a enzima BuChE. Por ser um núcleo mais volumoso que a tacrina, a AChE dispõe de menos espaço disponível no sítio ativo para acomodar o núcleo lofina. No entanto, estudos de modelagem molecular mostraram que o núcleo lofina, acoplado aos derivados de carboidratos, foi capaz de interagir no CAS da AChE, o que será discutido na seção 4.9.2.

Na Tabela 9 são mostrados os resultados da atividade dos híbridos lofina-carboidratos. Não foi observada nenhuma tendência de melhor atividade entre os três núcleos glicosídicos estudados, para a BuChE. O híbrido lofina(6)-D-galactose (**59a**, $IC_{50} = 0,174 \mu M$, Entrada 8) foi o mais ativo da série contra a BuChE, seguido pelos dois derivados da xilose de cadeia mais curta (Entradas 1 e 2). O composto de cadeia mais longa estudado, lofina(8)-D-xilose (**57e**, Entrada 5), foi o que apresentou o pior resultado ($1,30 \mu M$), tendo sido o único com $IC_{50} > 1 \mu M$ para a enzima BuChE. Isso pode indicar que o aumento da cadeia espaçadora tende a diminuir a atividade com a enzima, como também observado para os derivados da ribose e da galactose, onde os compostos separados por sete metilenos apresentaram atividade inferior aos separados por seis (Entradas 6 a 9).

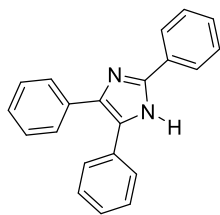
Nenhum dos híbridos lofina-galactose (Entradas 8 e 9), os mais volumosos da série, inibiu a enzima AChE. Os únicos compostos que inibiram a AChE foram os derivados da xilose de cadeia mais curta (Entradas 1 e 2), além do híbrido lofina(7)-D-ribose (**58b**, Entrada 7), que foi um ponto fora da curva.

Tabela 9. Atividade anticolinesterase dos híbridos lofina-carboidratos.

Entrada	Composto	IC ₅₀ (μM)		Razão IC ₅₀ BuChE/AChE
		AChE	BuChE	
1	 <p>Híbrido lofina(4)-D-xilose (57a)</p>	1,23	0,295	0,24
2	 <p>Híbrido lofina(5)-D-xilose (57b)</p>	3,79	0,277	0,07
3	 <p>Híbrido lofina(6)-D-xilose (57c)</p>	n.a.	0,708	-
4	 <p>Híbrido lofina(7)-D-xilose (57d)</p>	n.a.	0,399	-
5	 <p>Híbrido lofina(8)-D-xilose (57e)</p>	1,89	1,30	0,69

6		n.a.	0,396	-
	Híbrido lofina(6)-D-ribose (58a)			
7		6,34	0,499	0,08
	Híbrido lofina(7)-D-ribose (58b)			
8		n.a.	0,174	-
	Híbrido lofina(6)-D-galactose (59a)			
9		n.a.	0,619	-
	Híbrido lofina(7)-D-galactose (59b)			
10		0,0343	0,0625	1,8
	Tacrina			
11		0,0019	0,0091	4,8
	Bis(7)-tacrina			

12



Lofina

n.a.

n.a.

-

Os resultados obtidos para os híbridos lofina-carboidratos podem ser considerados muito bons, levando em conta a ausência do núcleo tacrina e os valores em escala micromolar baixa ($IC_{50} < 1 \mu M$ para BuChE e entre 1 e 7 μM para AChE). Inibidores de colinesterase do tipo híbridos com dupla ação enzimática não baseados em tacrina ou em núcleos similares são uma abordagem rara na literatura. Além disso, a ampla seletividade para a BuChE encontrada para os híbridos lofina-carboidratos é extremamente interessante visto que a utilização de inibidores seletivos para a BuChE consiste na estratégia mais adequada para estágios avançados da doença de Alzheimer, como abordado na Seção 3.2.2 (pág. 26).

4.9. ESTUDOS DE MODELAGEM MOLECULAR

Os estudos de modelagem molecular dos híbridos contendo derivados de carboidratos foram conduzidos pelo prof. Dr. Laurent Emmanuel Dardenne e pela Dra. Isabela Alvim Guedes, no Laboratório Nacional de Computação Científica (LNCC), em Petrópolis-RJ.

Apesar do alto grau de conservação e homologia entre as diferentes espécies de AChE no que diz respeito à natureza dos aminoácidos (Tabela 1, pág. 35), existem algumas variações conformacionais observadas em regiões específicas da cavidade de ligação da acetilcolina (ACh). Por isso, utilizou-se neste trabalho a estratégia de *ensemble docking* para a enzima AChE. Essa metodologia consiste na realização do *docking* molecular em mais de uma estrutura da enzima no PDB com o objetivo de incluir implicitamente a flexibilidade proteica. As estruturas selecionadas foram PDB 1ZGC (*Torpedo Californica*, TcAChE), PDB 2CKM (TcAChE) e PDB 1Q84 (*Mus Musculus*, MmAChE), sendo todas estruturas da AChE cristalizadas e estudadas com um determinado inibidor. Não foram selecionadas estruturas de *Homo sapiens* por não haver complexos da AChE humana com inibidores de tamanho similar aos híbridos derivados de carboidratos sintetizados neste trabalho. Todos os inibidores das três estruturas catalogadas no PDB interagem no CAS, no PAS e são derivados da tacrina.

Não foram consideradas moléculas de água nos experimentos. Estudos de *redocking* dos compostos de referência foram realizados para validar a metodologia adotada neste trabalho e os resultados estão mostrados no material suplementar (Apêndice B, págs. 176-177). A melhor energia para os modos de ligação de todos os compostos estudados foi com a estrutura PDB 1ZGC (*TcAChE*), a qual foi escolhida para o estudo dos demais compostos deste trabalho. Nessa estrutura a AChE foi cristalizada com o híbrido tacrina(10)-hupiridona (Figura 52).⁵⁸ Para a enzima BuChE foi utilizada a estrutura PDB 5K5E (*Homo sapiens*, *HsBuChE* ou *hBuChE*). Entretanto, a ausência de estruturas no PDB da BuChE com inibidores do mesmo tamanho dos compostos sintetizados neste trabalho, torna mais difícil uma análise mais detalhada das interações de modo que somente algumas interações mais importantes serão discutidas.

4.9.1. Híbridos tacrina-carboidratos

Em todos os híbridos tacrina-carboidratos estudados neste trabalho os modos de ligação mais favoráveis obtidos dos estudos de *docking* apontaram o núcleo tacrina interagindo no CAS, no fundo da cavidade do sítio ativo da AChE, conservando as interações descritas na literatura, como mostrado na Tabela 1 (pág. 35). Em nenhum híbrido desta série o núcleo carboidrato interage com o CAS (Figura B3, pág. 179). De acordo com os resultados de *docking*, a cadeia metilênica espaçadora é capaz de formar interações hidrofóbicas fracas, principalmente com o resíduo Tyr334 no meio da cavidade (Figura 52B).

Para analisar a contribuição dos diferentes núcleos glicosídicos estudados, foi feita uma comparação dos três compostos com espaçador hexametilênico ($n = 6$), derivados da D-xilose (**54c**), D-ribose (**55a**) e D-galactose (**56a**) no sítio ativo da AChE (Figura 52A). De acordo com os modos de ligação previstos *in silico*, dentre os três híbridos com $n = 6$, o derivado da galactose é o inibidor mais potente contra a AChE (**56a**, $IC_{50} = 4,8$ nM, *Docking Score* = 131,93, Tabela B1, pág. 177). O híbrido **56a** é capaz de formar interações hidrofóbicas entre as metilas de um dos grupos acetônio e o bolso hidrofóbico formado pelos resíduos Ile287, Phe288 e Phe331 (Figura 52B). Essa mesma interação hidrofóbica é prevista para o derivado da ribose (**55a**), mas não para o da xilose (**54c**), onde as metilas do acetônio estão expostas ao solvente (água), assim como as metilas do segundo acetônio da galactose (**56a**). Por outro lado, uma forte LH (2,6 Å) entre o OH da xilose em **54c** e o OH da Tyr70 ajuda a estabilizar o núcleo xilose no PAS (Figura 52B), o que pode ajudar a

explicar a maior potência observada para esse derivado. O híbrido tacrina(10)-hupiridona (inibidor no complexo PDB 1ZGC) forma uma LH entre o oxigênio da carbonila e um NH da cadeia peptídica da Phe288, na mesma região hidrofóbica onde foi encontrada a interação dos acetonídeos de **55a** e **56a** (Figura 52C). No entanto, nos grupos acetonídeo de **55a** e **56a** o oxigênio mais próximo do NH da Phe288 encontra-se a 4,0 e 5,0 Å, respectivamente, maior que o limite mínimo para se caracterizar uma LH (3,0 - 3,5 Å).

Embora o programa utilizado não tenha sido capaz de computar as contribuições específicas das interações CH/ π , os modos de ligação dos estudos de *docking* sugerem fortemente que há interações entre o anel carboidrato e o Trp279 nos três casos estudados (Figura 53). Além disso, o modo de ligação mais estável prevê que o nitrogênio do NH mais próximo ao açúcar seja protonado, tornando o anel glicosídico ainda mais deficiente de elétrons, aumentando a força das interações CH/ π com o anel indólico do Trp279. Dentre os três compostos, o derivado da D-galactose (**56a**) é capaz de formar quatro interações CH/ π entre sua face β e o Trp279, sendo duas do anel e duas do metileno vizinho ao anel (Figura 53).

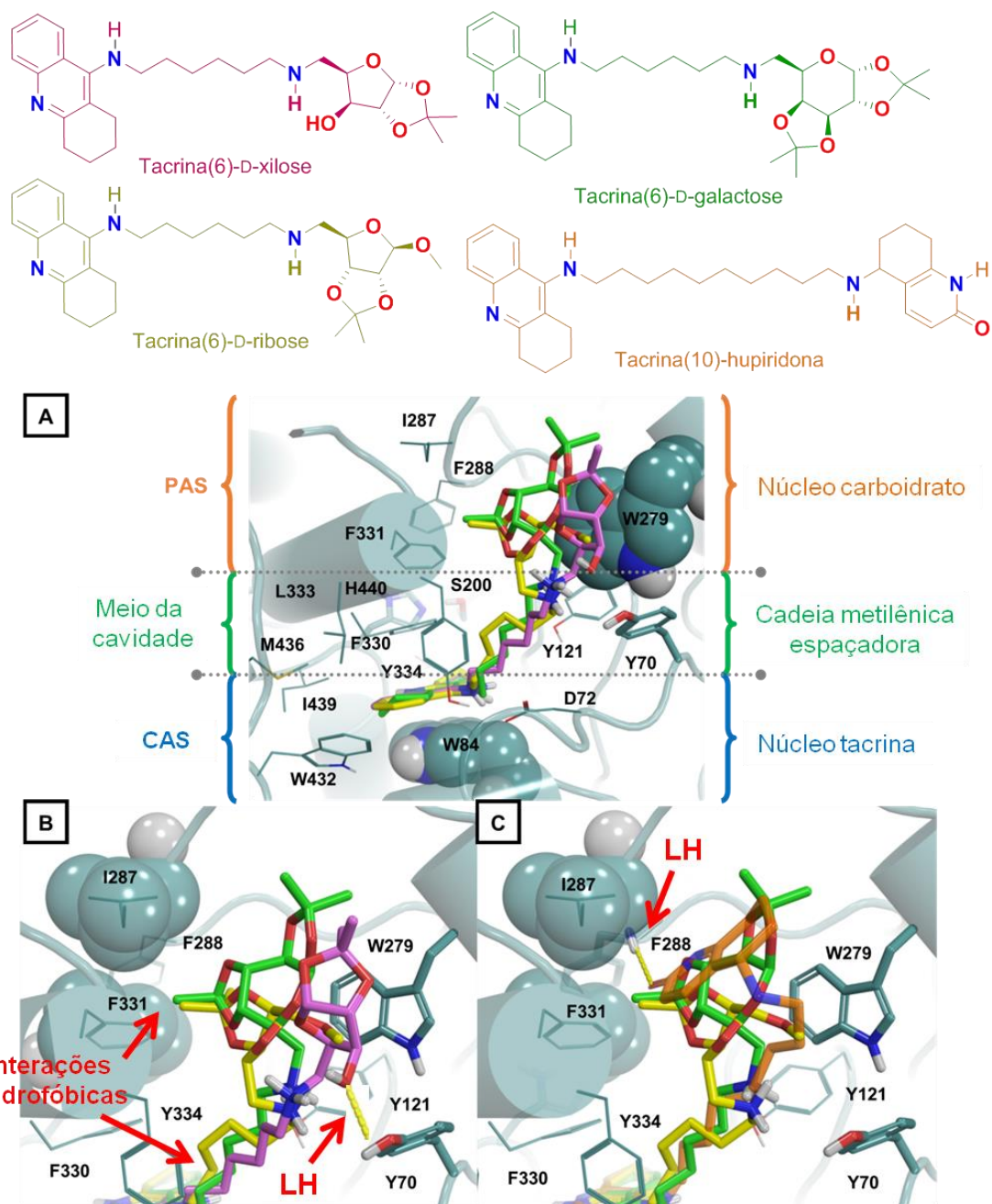


Figura 52. Sobreposição dos resultados de *docking* dos híbridos tacrina(6)-D-xilose (**54c**, rosa), tacrina(6)-D-ribose (**55a**, amarelo) e tacrina(6)-D-galactose (**56a**, verde) na *TcAChE*: A) Modos de ligação previstos na cavidade do sítio ativo da AChE; B) Interação do núcleo carboidrato no PAS; C) Sobreposição dos híbridos **55a** e **56a** com o inibidor co-cristalizado com a *TcAChE* (PDB ID 1ZGC). LH são representadas por linha tracejada amarela, átomos de O na cor vermelha e de N na cor azul.

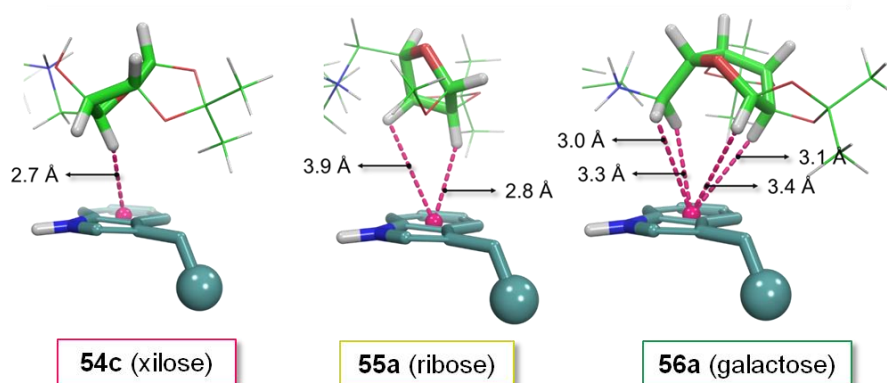


Figura 53. Representação das ligações CH/ π previstas, em linhas tracejadas em rosa, para os núcleos carboidratos dos híbridos com espaçador hexametilênico (**54c**, **55a** e **56a**).

Nesse trabalho, também foi avaliada a influência do tamanho da cadeia espaçadora metilênica nas interações do núcleo D-xilose com a AChE. De acordo com os modos de ligação previstos no *docking*, no composto de cadeia mais curta (**54a**, $n = 4$, $IC_{50} = 8,7$ nM) o núcleo xilose interage no bolso hidrofóbico da Ile287 e Phe331, enquanto que o átomo de NH protonado forma uma forte LH (2,8 Å) com o OH fenólico da Tyr121 no meio da cavidade (Figura 54A). No híbrido tacrina(5)-xilose (**54b**), a LH entre o NH e a Tyr121 também foi observada, um pouco menos forte (3,1 Å), porém o anel da xilose é orientado para o PAS, formando uma LH (3,0 Å) com o OH da Tyr70 (Figura 54A e B). A atividade bem menor observada para **54b** ($n = 5$, $IC_{50} = 84,4$ nM) em relação aos demais tacrina-xilose ($IC_{50} < 11$ nM) não é explicada nem prevista pelo *docking*, cujo resultado prevê mesma ordem de afinidade com a enzima (Tabela B1, pág. 177). O híbrido tacrina(6)-xilose (**54c**, $IC_{50} = 5,1$ nM) é o único composto dessa série cuja formação de uma interação CH/ π com o Trp279 é prevista, sendo inviável em nos demais compostos. Além disso, a hidroxila de **54c** também forma LH com a Tyr70, como já comentado no final da pág. 124. Os dois derivados de cadeia mais longa, **54d** ($n = 7$, $IC_{50} = 10,2$ nM) e **54e** ($n = 8$, $IC_{50} = 2,2$ nM), foram capazes de interagir tanto no bolso da Ile287 e Phe331 quanto no Trp279 (Figura 54C). A maior cadeia espaçadora permitiu um ajuste melhor do núcleo xilose, posicionando-o de forma a direcionar as metilas do acetônio para formar interações hidrofóbicas com a Ile287 e a Phe331 e o NH protonado para cátion- π com o Trp279, ocupando um espaço maior e bloqueando ao acesso à cavidade do sítio ativo da AChE (Figura 54D).

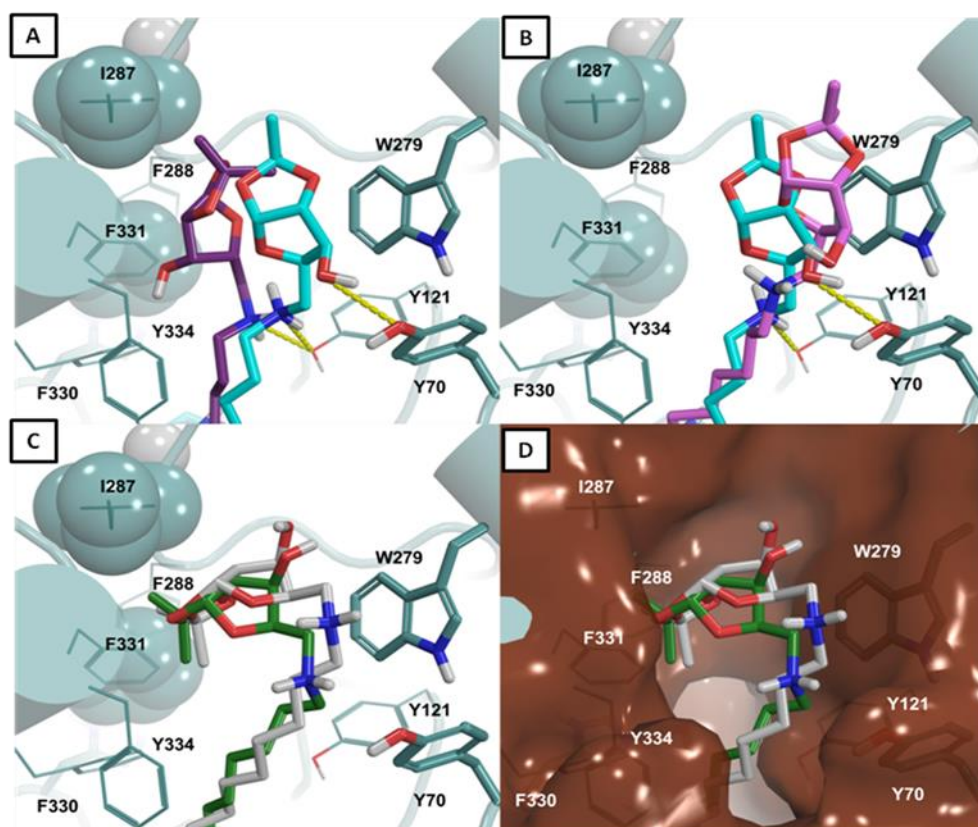
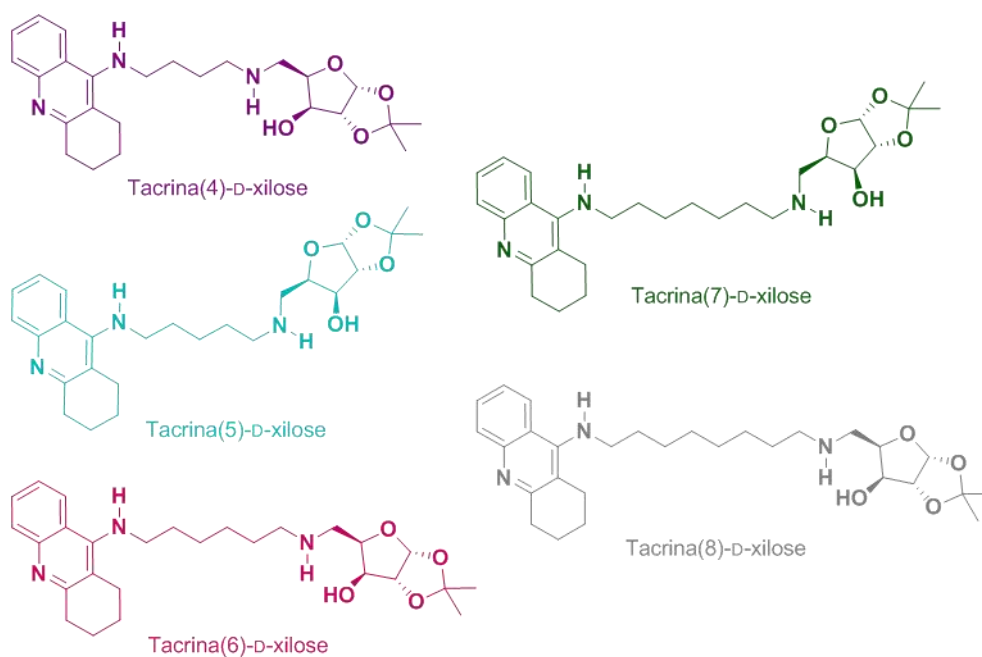


Figura 54. Resultados de *docking* dos híbridos tacrina(n)-D-xilose (**54a**, $n = 4$, roxo), (**54b**, $n = 5$, azul-claro), (**54c**, $n = 6$, rosa), (**54d**, $n = 7$, verde-escuro) e (**54e**, $n = 8$, cinza) na TcAChE.

O híbrido tacrina(6)-D-galactose (**56a**) foi estudado na enzima BuChE e o resultado de docking está mostrado na Figura 55B. O melhor modo de ligação de **56a** para a interação com a BuChE encontrado é caracterizado pelas interações conservadas do núcleo tacrina no fundo do sítio ativo (ou seja, no CAS da BuChE), enquanto que a parte do açúcar encontra-se altamente exposta ao solvente. O fato da enzima BuChE não possuir aminoácidos aromáticos e volumosos no PAS pode ter dificultado o ancoramento e a estabilização do núcleo galactose. Mesmo assim, o composto apresentou alta inibição da BuChE ($IC_{50} = 36,7$ nM, Tabela 8, Entrada 8). Uma estabilização para o núcleo galactose pode ser proveniente de ligações de hidrogênio com o OH da Ser72 (S72) e o NH da Gln71 (Q71) (Figura 55B).

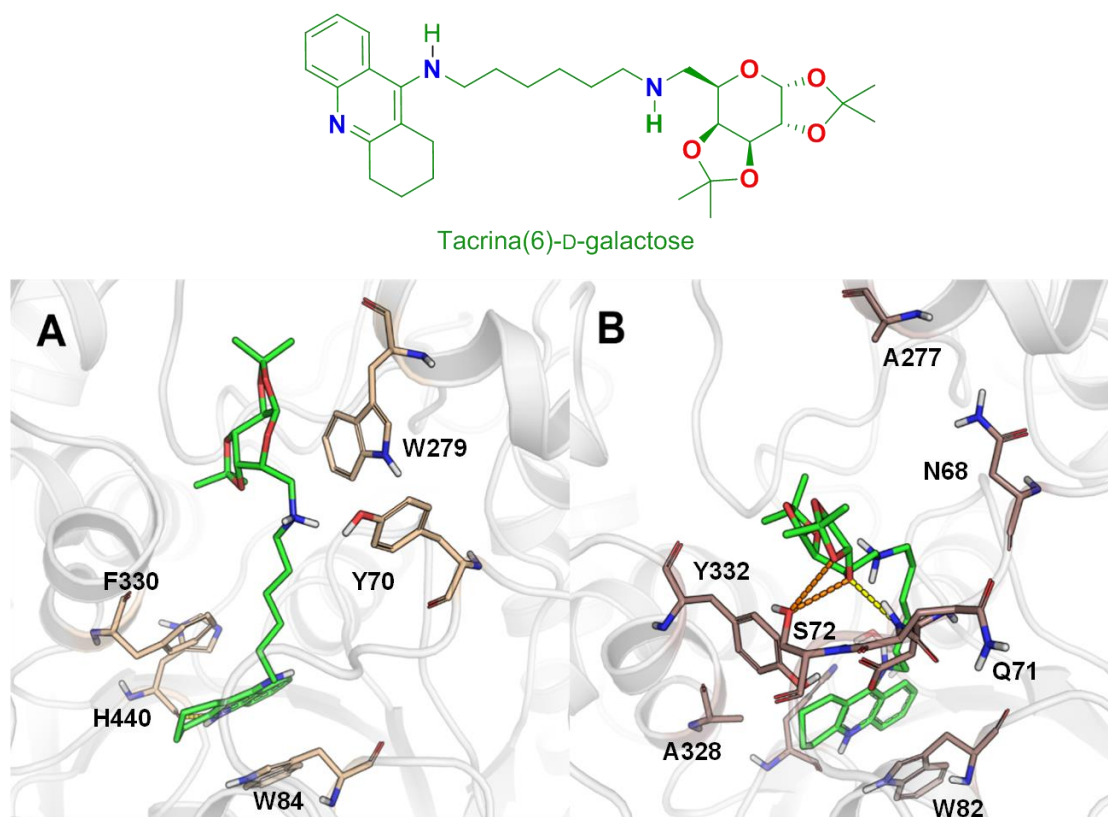


Figura 55. Resultado de *docking* do híbrido tacrina(6)-D-galactose (**56a**) na *TcAChE* (A) e na *hBuChE* (B). As linhas tracejadas representam as ligações de hidrogênio (amarelo) e os possíveis contatos favoráveis (laranja).

4.9.2. Híbridos lofina-carboidratos

Como já discutido na Seção 4.8.2, os híbridos lofina-carboidratos foram amplamente seletivos para a enzima BuChE. O híbrido lofina(5)-D-xilose (**57b**) foi um dos poucos exemplos da série ativos contra a AChE ($IC_{50} = 3,79 \mu M$) e o segundo mais potente contra a BuChE ($IC_{50} = 0,277 \mu M$). Na Figura 56 são mostradas as interações do composto **57b** com as enzimas AChE (Figura 56A) e BuChE (Figura 56B), obtidas a partir do *docking*. As principais interações encontradas para **57b** com a enzima AChE são do tipo *stacking* (π e T) com resíduos aromáticos no CAS (Trp84 e Phe330) e uma LH entre o grupo hidroxila da xilose com a cadeia principal da Phe288 no PAS (Figura 56A).

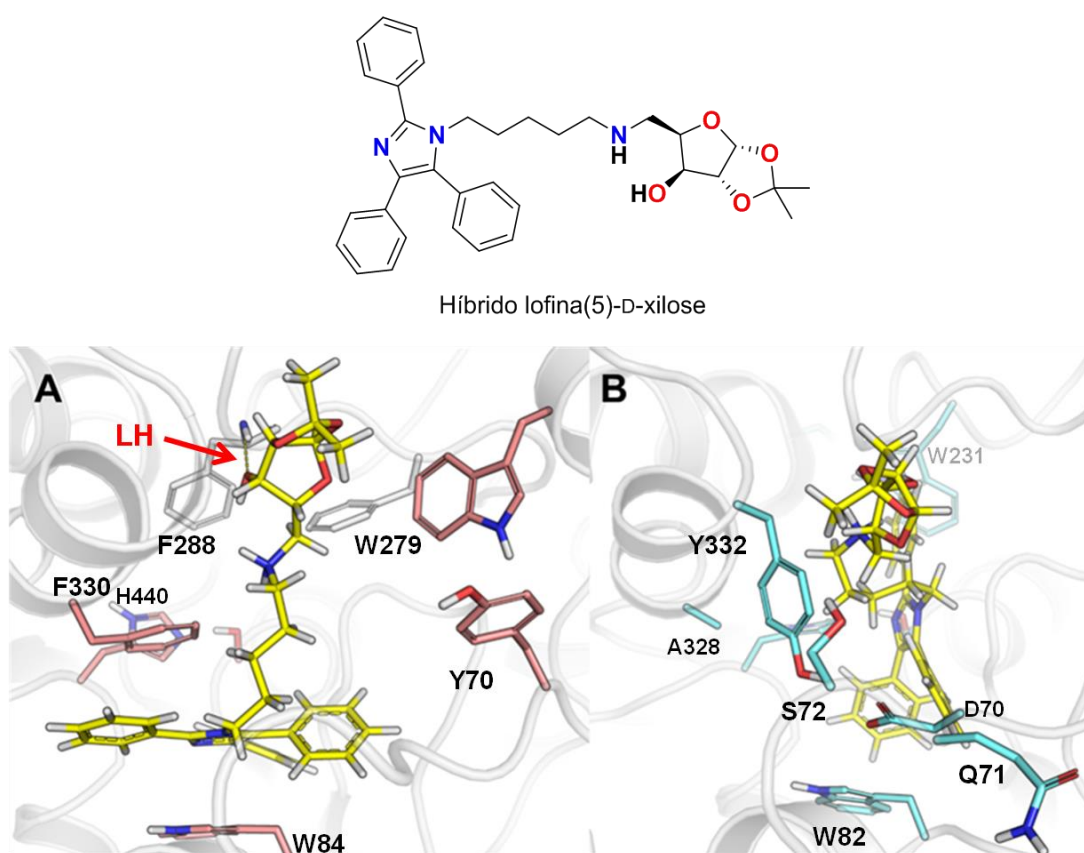


Figura 56. Resultado de *docking* do composto lofina(5)-D-xilose (**57b**) na TcAChE (A) e na hBuChE (B).

De acordo com o *docking*, o composto **57b** interage com a enzima BuChE principalmente através de uma interação do tipo T-*stacking* com o resíduo Trp231 e de uma ponte salina (PS) entre o grupo amino, positivamente carregado, com a cadeia lateral do Asp70 (Figura 57). O núcleo D-xilose encontra-se em sua maior parte exposto ao solvente (Figura 56B).

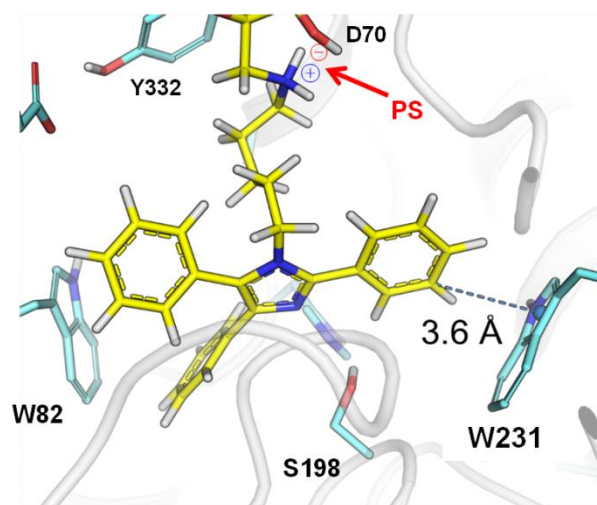


Figura 57. Interação entre o núcleo lofina do inibidor **57b** com o Trp231 (no CAS) e a ponte salina entre o NH protonado ligado ao núcleo D-xilose e o Asp70 na enzima *hBuChE*.

É importante destacar que interações do tipo *stacking* com o resíduo Trp231 da BuChE têm sido consideradas como estratégicas para o desenvolvimento de inibidores seletivos para BuChE, uma vez que o acesso resíduo aromático homólogo na AChE (Trp233 na *TcAChE*) é estericamente impossibilitada pela presença dos resíduos volumosos do bolso acila, Phe288 e Phe290. Nestas mesmas posições na BuChE, existem os resíduos hidrofóbicos menos volumosos Leu286 e Val288 (não mostrados na Figura 57), permitindo o acesso ao Trp231.

O inibidor mais potente da série, lofina(6)-D-galactose (**59a**, $IC_{50} = 0,174 \mu M$) foi extremamente seletivo, uma vez que não inibiu a AChE. O modo de ligação de **59a** na cavidade da BuChE se caracteriza por possíveis interações do tipo *stacking* com resíduos aromáticos no fundo do sítio de ligação, principalmente Trp82, Phe329 e Trp231 (*T-stacking* com Trp231) (Figura 58A). Além disso, o grupo amino positivamente carregado da cadeia espaçadora realiza uma ponte salina (PS) com a cadeia lateral do Asp70 (Figura 58B). Devido à proximidade deste grupo carregado com a Tyr332, é possível que ocorra uma interação do tipo *cation- π* . A região do carboidrato encontra-se exposta ao solvente, interagindo entre o meio e a entrada da cavidade por interações fracas de van der Waals e uma possível ligação de hidrogênio entre o oxigênio de um dos grupos acetônio com a cadeia lateral da Ser72 (Figura 58B).

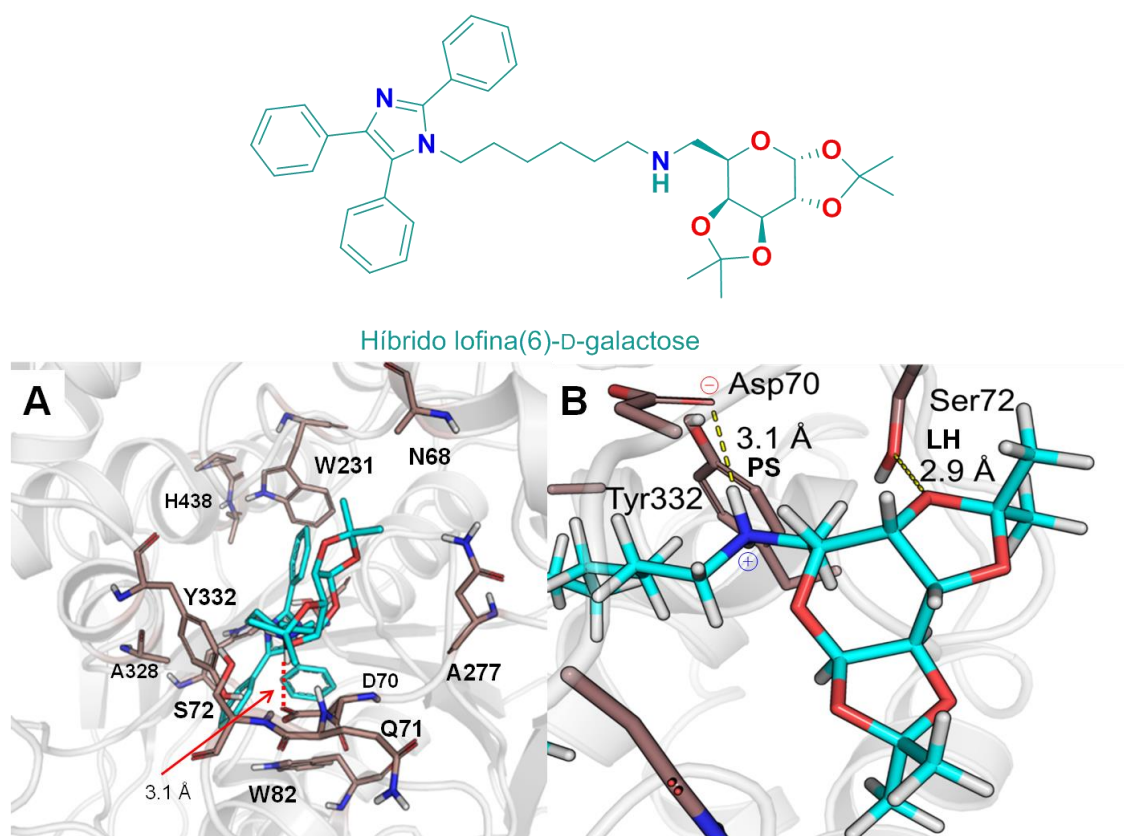


Figura 58. Resultado de *docking* do composto lofina(6)-D-galactose (**59a**) na enzima *hBuChE*: (A) visão de cima da cavidade do sítio ativo; (B) interação do inibidor **59a** com resíduos de aminoácidos na entrada da cavidade da *hBuChE*.

Apesar do estudo de *docking* prever interações do composto **59a** com a enzima AChE, os resultados *in vitro* não mostraram atividade anticolinesterase. Provavelmente o modo de ligação predito não é viável experimentalmente devido ao impedimento estérico associado a presença de resíduos volumosos no meio da cavidade, impedindo ou dificultando a passagem do grupo lofina até o fundo da cavidade da AChE como predito pelos estudos de *docking*. O resultado do *docking* de **59a** com a AChE está disponível no material suplementar (Figura B2, pág. 178).

4.9.3. Predição do perfil farmacocinético dos híbridos tacrina-carboidratos

Através de cálculos computacionais realizados pela equipe do LNCC, os híbridos tacrina-carboidratos sintetizados neste trabalho foram avaliados quanto às suas propriedades de absorção, distribuição, metabolismo e excreção (ADME) para obter o perfil farmacocinético *in silico*. De acordo com os cálculos, cinco compostos não violaram nenhuma

das regras de Lipinski (**54a-d** e **55a**, Tabela 10) e quatro compostos (**54e**, **55b**, **56a** e **56b**) violaram somente a regra da massa molecular (deve ser menor que 500 g.mol⁻¹), excedendo um pouco (Entradas 5, 7-9). Todos os compostos respeitam as regras do número máximo de sítios doadores de ligação de hidrogênio (DLH, máximo 5) e aceptores de LH (ALH, máximo 10). Além disso, todos os compostos possuem o valor calculado do logP^{†††} (ClogP) inferior a 5, de acordo com a regra. Sendo assim, a previsão é que os híbridos tacrina-carboidratos possuam um equilíbrio entre o caráter hidrofílico e o caráter lipofílico, isto é, tenham uma boa absorção oral, possam atravessar a membrana do trato gastrointestinal e possam atingir em tempos curtos o nível ideal de concentração plasmática

Tabela 10. Perfil farmacocinético obtido *in silico* para os híbridos tacrina-carboidratos.

Entrada	Composto	M (g.mol ⁻¹)	DLH	ALH	ClogP	Nº de Violações a Regra de Lipinski
1	54a	447,61	4	7	2,96	0
2	54b	461,64	4	7	3,32	0
3	54c	475,66	4	7	3,68	0
4	54d	489,69	4	7	4,22	0
5	54e	503,72	4	7	4,76	1
6	55a	489,69	3	7	3,66	0
7	55b	503,72	3	7	4,20	1
8	56a	545,75	3	8	4,07	1
9	56b	559,78	3	8	4,61	1

††† O logP é definido como o logaritmo decimal do coeficiente de partição de um composto na mistura *n*-octanol/água, onde P é a razão da concentração em octanol pela concentração em água, determinado experimentalmente. ClogP é o valor de logP estimado por cálculos computacionais. Quanto maior for o logP de um composto, maior seu grau de hidrofobicidade.

Capítulo 5

Conclusões

5. CONCLUSÕES

Os híbridos tacrina-pirimidina e lofina-pirimidina, obtidos após três etapas a partir da reação de Biginelli, não apresentaram atividade de inibição das enzimas colinesterases, provavelmente devido a uma repulsão estereoeletrônica que impede a planaridade do sistema π do núcleo pirimidínico.

Os híbridos tacrina-carboidratos foram encontrados como inibidores muito potentes de ambas as enzimas AChE e BuChE, inibindo-as na escala nanomolar de concentração, sendo que a maioria mostrou seletividade para a AChE. Esses compostos, com a tacrina conectada a um núcleo carboidrato através de um espaçador metilênico, consistem em um abordagem inédita na literatura. Os híbridos tacrina(6)-galactose (**56a**) e tacrina(6)-xilose (**54c**) exibiram respectivamente um IC_{50} de 4,8 e 5,1 nM, além de altas seletividades para a AChE, melhores que a do bis(7)-tacrina, sendo protótipos promissores para o desenvolvimentos de fármacos para o tratamento de estágios iniciais e moderados da doença de Alzheimer.

Já os híbridos lofina-carboidratos foram fortemente seletivos para a enzima BuChE. Esses compostos representam uma abordagem pouco comum, pela ausência do núcleo tacrina na estrutura, o que pode indicar um menor potencial tóxico. O híbrido lofina(6)-galactose (**59a**) inibiu exclusivamente a BuChE com $IC_{50} = 174$ nM, sendo o protótipo mais promissor dessa série e um potencial candidato ao desenvolvimento de fármacos para estágios moderados e avançados da DA.

Os estudos de modelagem molecular mostraram que o uso da cadeia espaçadora adequada permitiu a dupla interação enzimática, com posicionamento ótimo dos núcleos no CAS e no PAS da AChE e da BuChE. Os núcleos tacrina e lofina interagem no CAS, no fundo da cavidade do sítio ativo, enquanto que os núcleos glicosídicos realizam interações CH/ π com o Trp279 no PAS, além de interações hidrofóbicas com as metilas do grupo acetônio e ligações de hidrogênio com aminoácidos do meio da cavidade e do PAS.

De uma forma geral, os compostos sintetizados neste trabalho contribuíram para o aumento da biblioteca disponível para o avanço dos estudos na química de inibidores de colinesterases. Considerando o baixo número de etapas para a síntese, a biodisponibilidade dos reagentes de partida, a alta potência inibitória dos híbridos obtidos e a biocompatibilidade de carboidratos, os derivados sintetizados neste trabalho são potenciais candidatos à aplicação no tratamento paliativo da doença de Alzheimer (DA).

Capítulo 6

Parte Experimental

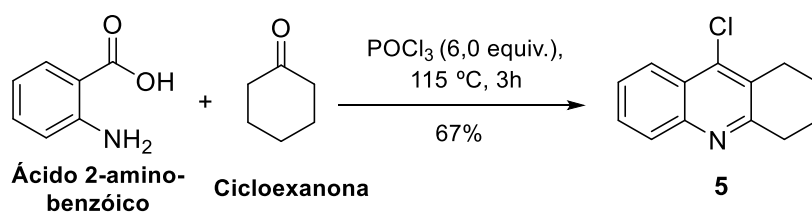
6. PARTE EXPERIMENTAL

6.1. MATERIAIS E MÉTODOS

Os pontos de fusão foram determinados em tubos capilares de vidro abertos em um equipamento Büchi M-565. Os espectros no infravermelho (IV) foram obtidos em um espectrômetro Varian 640-IR em pastilhas de KBr ou no composto puro. Os espectros de RMN de ^1H e ^{13}C foram obtidos em uma solução em solvente deuterado apropriado em um espectrômetro Varian VNMRS 300 MHz. Os deslocamentos químicos (δ) são dados em partes por milhão (ppm) a partir do sinal do tetrametilsilano ($\delta = 0,00$ ppm) como padrão interno para o RMN de ^1H ou a partir do sinal do solvente, CDCl_3 ($\delta = 77,23$ ppm), $\text{DMSO-}d_6$ (39,51 ppm) para o RMN de ^{13}C ; as multiplicidades são dadas como s (singlete), d (dubleto), dd (dubleto de dubletos), ddd (dubleto de dubletos de dubletos), t (triplete), q (quarteto), m (multiplete) ou sl (singlete largo); as constantes de acoplamento (J) são dadas em Hz. Os dados de Espectrometria de Massas de Alta Resolução com Ionização *Eletrospray* (*High Resolution Mass Spectrometry with Eletrospray Ionization* - HRMS-ESI), em modo positivo, foram obtidos em um equipamento UHPLC-QTOF/MS Bruker Impact II. As medidas de rotação específica foram obtidas em um polarímetro Jasco P-2000, onde as soluções foram diluídas em diclorometano, medidas em uma célula de 1,0 mL, à temperatura de 20 °C e utilizando a linha D do sódio como comprimento de onda da radiação utilizada (589 nm). As purificações por cromatografia em coluna foram realizadas empregando como fase estacionária sílica gel 60Å (70 – 230 mesh). As análises de cromatografia em camada delgada foram realizadas em placas de alumínio com camada de 0,2 mm de sílica gel 60F-254 (Macherey-Nagel). Os reagentes foram obtidos da Sigma Aldrich, Acros Organics e TCI. Os solventes utilizados, de grau P.A., foram obtidos da Nuclear e o isopropanol, de grau HPLC, da Tedia. A nomenclatura dos compostos foi escrita baseando-se no programa ChemDraw Ultra 14.0 (ChemBioOffice 2014), considerada a tradução do inglês. A nomenclatura da parte glicosídica dos derivados de carboidratos foi extraída de núcleos glicosídicos iguais na literatura.²¹⁹

6.2. PROCEDIMENTOS DE SÍNTESE

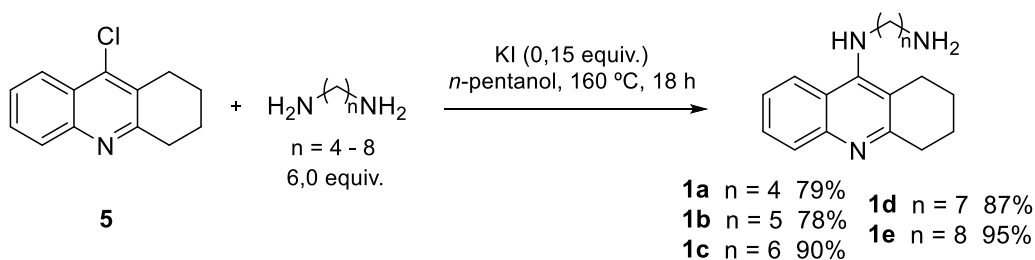
6.2.1. Procedimento para a síntese da 9-cloro-1,2,3,4-tetraidroacridina (5)



A uma mistura de ácido 2-aminobenzóico (37,8 mmol, 5,2 g) e cicloexanona (36,0 mmol, 3,5 g) foi adicionado, a 0 °C e sob atmosfera inerte, POCl_3 (227,0 mmol, 21 mL). A seguir, a mistura foi aquecida a 115 °C durante três horas. Após este período o excesso de POCl_3 foi removido sob alto vácuo a 60 °C até a formação de uma pasta escura. A mistura obtida foi diluída em diclorometano (80 mL) e a solução resultante foi neutralizada com solução aquosa 30% de Na_2CO_3 até atingir pH 11, então as fases foram separadas. A fase orgânica foi lavada com solução saturada de NaCl (50 mL), seca com Na_2SO_4 anidro e filtrada. O solvente foi removido em rotaevaporador e o produto bruto foi purificado por cromatografia em coluna em sílica gel, empregando como eluente diclorometano com eluição isocrática, obtendo-se o produto puro com 67% de rendimento.

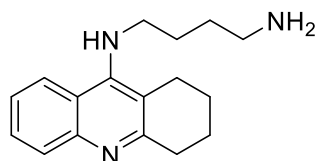
Número CAS: 5396-30-5; Sólido amarelo; ponto de fusão 68-69 °C; RMN de ^1H (CDCl_3) δ 8,09 (dd, 1H, $J = 8,4$ e 1,3 Hz), 7,95 (d, 1H, $J = 8,5$ Hz), 7,61 (ddd, $J = 8,4$, 6,9 e 1,4 Hz, 1H), 7,48 (ddd, $J = 8,2$, 6,9 e 1,2 Hz, 1H), 3,08 (t, $J = 6,2$ Hz, 2H), 2,93 (t, $J = 6,2$ Hz, 2H), 1,96-1,82 (m, 4H); RMN de ^{13}C (CDCl_3) δ 159,5; 146,7; 141,4; 129,2; 128,8; 128,7; 126,5; 125,4; 123,7; 34,3; 27,5; 22,7 (2C).

6.2.2. Procedimento geral para a síntese das 9-alkilamino-1,2,3,4-tetraidroacridinas (1a-e)



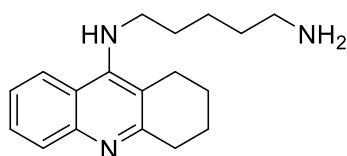
Uma mistura de 9-cloro-1,2,3,4-tetraidroacridina (**5**, 4,0 mmol), 1,n-alcanodiamina (24,0 mmol), iodeto de potássio (0,60 mmol) e *n*-pentanol (10 mL), em um balão conectado a um condensador com tubo secante, foi aquecida a 160 °C por 18 h. A conversão completa da 9-cloro-1,2,3,4-tetraidroacridina foi verificada em CCD em sílica empregando como mistura eluente CH₂Cl₂ : MeOH (9 : 1). O solvente foi evaporado sob alto vácuo a 100 °C até a obtenção de um óleo marrom. Após resfriamento à temperatura ambiente a mistura foi diluída em CH₂Cl₂ (80 mL) e lavada com solução aquosa de NaOH 10 % (80 mL) e água (2 x 70 mL). A fase orgânica foi seca em Na₂SO₄ anidro e filtrada. O solvente foi removido em rotaevaporador e sob alto vácuo a 130 °C para remoção do *n*-pentanol residual, por no máximo uma hora. O produto bruto foi purificado por cromatografia em coluna em sílica gel, empregando como mistura eluente CHCl₃ : CH₃OH : NH₄OH (93 : 6,5 : 0,5; pH 10), com eluição isocrática.

6.2.2.1. *N*¹-(1,2,3,4-tetraidroacridin-9-il)butano-1,4-diamina (**1a**)



Número CAS: 249290-07-1; Óleo amarelo; rendimento: 79%; RMN de ¹H (CDCl₃, 300 MHz) δ 7,98 - 7,88 (m, 2H); 7,55 (ddd, *J* = 8,4, 6,8, 1,4 Hz, 1H); 7,34 (ddd, *J* = 8,2, 6,8, 1,3 Hz, 1H); 4,07 (sl, 1H); 3,50 (t, *J* = 7,1 Hz, 2H); 3,06 (s, 2H); 2,78 – 2,62 (m, 4H); 2,00 – 1,83 (m, 4H); 1,78 – 1,44 (m, 6H); RMN de ¹³C (CDCl₃, 75 MHz) δ 158,6; 150,8; 147,6; 128,9; 128,4; 123,7; 122,9; 120,4; 116,1; 49,5; 42,0; 34,2; 31,1; 29,3; 25,0; 23,2; 22,9.

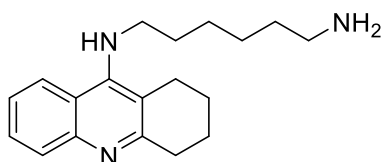
6.2.2.2. *N*¹-(1,2,3,4-tetraidroacridin-9-il)pentano-1,5-diamina (**1b**)



Número CAS: 249290-16-2; Óleo amarelo; rendimento: 78%; RMN de ¹H (CDCl₃, 300 MHz) δ 7,95 - 7,85 (m, 2H); 7,50 (ddd, *J* = 8,3, 6,8, 1,3 Hz, 1H); 7,29 (ddd, *J* = 8,2, 6,0, 1,2 Hz, 1H); 3,93 (sl, 1H); 3,43 (t, *J* = 7,0 Hz, 2H); 3,02 (s, 2H); 2,75 – 2,56 (m, 4H); 1,95 –

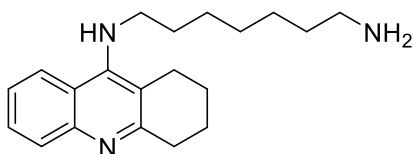
1,77 (m, 4H); 1,76 – 1,54 (m, 4H); 1,50 – 1,22 (m, 4H); RMN de ^{13}C (CDCl_3 , 75 MHz) δ 158,5; 150,7; 147,5; 128,8; 128,2; 123,6; 122,8; 120,3; 116,0; 49,4; 42,0; 34,1; 33,4; 31,7; 24,8; 24,3; 23,1; 22,8.

6.2.2.3. *N*^l-(1,2,3,4-tetraidroacridin-9-il)hexano-1,6-diamina (**1c**)



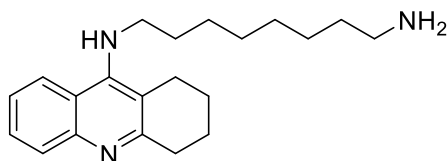
Número CAS: 249290-17-3; Óleo amarelo; rendimento: 90%; RMN de ^1H (CDCl_3 , 300 MHz) δ 7,96 - 7,86 (m, 2H); 7,54 (t, $J = 7,6$ Hz, 1H); 7,33 (t, $J = 7,5$ Hz, 1H); 3,94 (s, 1H); 3,46 (t, $J = 7,0$ Hz, 2H); 3,05 (s, 2H); 2,75 – 2,59 (m, 4H); 1,91 (s, 4H); 1,75 – 1,57 (m, 2H); 1,54 – 1,25 (m, 8H); RMN de ^{13}C (CDCl_3 , 75 MHz) δ 158,5; 150,7; 147,6; 128,8; 128,2; 123,6; 122,9; 120,3; 116,0; 49,5; 42,1; 34,2; 33,7; 31,8; 26,9; 26,7; 24,8; 23,1; 22,9.

6.2.2.4. *N*^l-(1,2,3,4-tetraidroacridin-9-il)heptano-1,7-diamina (**1d**)



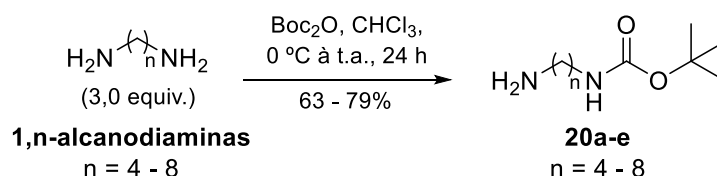
Número CAS: 24290-18-4; Óleo amarelo; rendimento: 87%; RMN de ^1H (CDCl_3 , 300 MHz) δ 7,96 - 7,86 (m, 2H), 7,53 (t, $J = 7,5$ Hz, 1H), 7,39 - 7,28 (m, 1H), 3,98 (sl, 1H), 3,51-3,40 (m, 2H), 3,05 (s, 2H), 2,77-2,59 (m, 4H), 2,20 (s, 2H), 2,00-1,80 (m, 4H), 1,70-1,55 (m, 2H), 1,48-1,20 (m, 8H); RMN de ^{13}C (CDCl_3 , 75 MHz) δ 158,3; 150,7; 147,4; 128,6; 128,2; 123,4; 122,8; 120,1; 115,7; 49,4; 41,9; 34,0; 33,3; 31,6; 29,1; 26,8; 26,7; 24,7; 23,0; 22,7.

6.2.2.5. *N*^l-(1,2,3,4-tetraidroacridin-9-il)octano-1,8-diamina (**1e**)



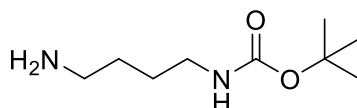
Número CAS: 249290-19-5; Óleo amarelo; rendimento: 95%; RMN de ¹H (CDCl₃, 300 MHz) δ 7,96 - 7,86 (m, 2H); 7,53 (ddd, *J* = 8,3, 6,8, 1,3 Hz, 1H); 7,32 (ddd, *J* = 8,3, 6,8, 1,3 Hz, 1H); 3,97 (sl, 1H); 3,55 - 3,36 (m, 2H); 3,05 (s, 2H); 2,76 - 2,57 (m, 4H); 2,02 - 1,83 (m, 6H); 1,70 - 1,53 (m, 2H); 1,51 - 1,17 (m, 10H); RMN de ¹³C (CDCl₃, 75 MHz) δ 158,3; 150,8; 147,4; 128,6; 128,2; 123,5; 122,9; 120,2; 115,7; 49,4; 41,99; 34,0; 33,3; 31,7; 29,3; 29,3; 26,8; 26,7; 24,8; 23,0; 22,8.

6.2.3. Procedimento geral para a proteção seletiva das 1,n-alcanodiaminas e obtenção das aminas protegidas **20a-e**



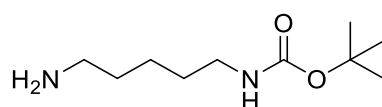
A uma solução de 1,n-alcanodiamina (39,0 mmol) em 240 mL de clorofórmio, foi adicionada gota a gota a 0 °C uma solução de dicarbonato de *tert*-butila (Boc₂O, 13,0 mmol, 6,5 mL CHCl₃), durante duas horas com auxílio de um funil de adição. A reação permaneceu sob agitação à temperatura ambiente por 24 h. Decorrido este tempo, a mistura foi filtrada para remoção do sólido branco formado e o solvente foi evaporado em rotaevaporador. O óleo resultante foi diluído em acetato de etila e a solução foi lavada com NaCl saturada (3 x 35 mL). A fase aquosa foi extraída com 25 mL de acetato de etila, os extratos orgânicos foram combinados, secos com Na₂SO₄ anidro, filtrados e o solvente removido à pressão reduzida. O produto bruto foi purificado por cromatografia em coluna em sílica gel, empregando como mistura eluente CHCl₃ : CH₃OH : Et₃N (93 : 6 : 1), com eluição isocrática.

6.2.3.1. (4-aminobutil)carbamato de *tert*-butila (**20a**)



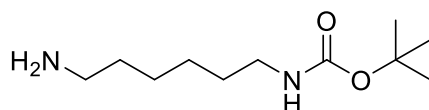
Número CAS: 68076-36-8; Óleo incolor; rendimento: 79%; RMN de ^1H (CDCl_3 , 400 MHz) δ 4,68 (sl, 1H); 3,22 – 3,08 (m, 2H); 2,74 (t, $J = 6,7$ Hz, 2H); 1,62 (s, 4H); 1,58 – 1,42 (m, 11H); RMN de ^{13}C (CDCl_3 , 75 MHz) δ 156,2; 79,1; 41,8; 40,5; 30,8; 28,5; 27,6.

6.2.3.2. (5-aminopentil)carbamato de *tert*-butila (**20b**)



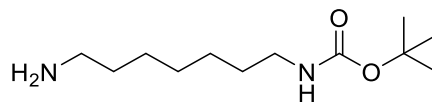
Número CAS: 51644-96-3; Óleo incolor; rendimento: 69%; RMN de ^1H (CDCl_3 , 400 MHz) δ 4,97 (sl, 1H); 3,20 – 3,01 (m, 2H); 2,69 (t, $J = 6,9$ Hz, 2H); 1,83 (s, 2H); 1,60 – 1,21 (m, 15H); RMN de ^{13}C (CDCl_3 , 75 MHz) δ 156,1; 78,8; 41,9; 40,4; 33,1; 29,9; 28,4; 24,0.

6.2.3.3. (6-aminoexil)carbamato de *tert*-butila (**20c**)



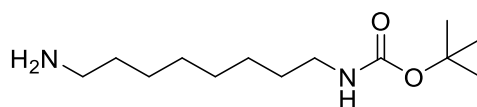
Número CAS: 51857-17-1; Óleo incolor; rendimento: 63%; RMN de ^1H (CDCl_3 , 300 MHz) δ 4,94 (sl, 1H); 3,20 – 2,98 (m, 2H); 2,68 (t, $J = 6,8$ Hz, 2H); 1,56 – 1,27 (m, 19H); RMN de ^{13}C (CDCl_3 , 75 MHz) δ 156,0; 78,8; 42,0; 40,4; 33,6; 30,0; 28,4; 26,6; 26,5.

6.2.3.4. (7-aminoeptil)carbamato de *tert*-butila (**20d**)



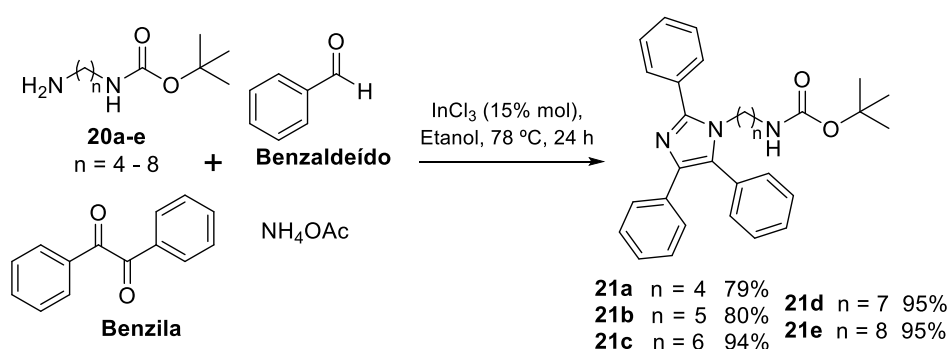
Número CAS: 99733-18-3; Óleo incolor; rendimento: 75%; RMN de ^1H (CDCl_3 , 300 MHz) δ 5,09 (sl, 1H); 3,17 – 2,98 (m, 2H); 2,67 (t, $J = 6,9$ Hz, 2H); 1,44 (s, 13H); 1,35 – 1,29 (m, 8H); RMN de ^{13}C (CDCl_3 , 75 MHz) δ 156,0; 78,6; 42,0; 40,4; 33,5; 29,9; 29,0; 28,3; 26,7.

6.2.3.5. (8-aminooctil)carbamato de *terc*-butila (**20e**)



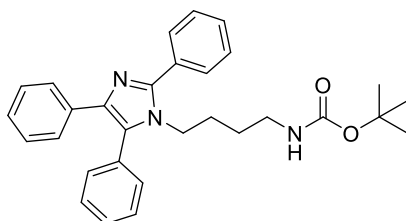
Número CAS:88829-82-7; Óleo incolor; rendimento: 67%; RMN de ^1H (CDCl_3 , 300 MHz) δ 4,67 (sl, 1H); 3,07 (s, 2H); 2,69 – 2,57 (m, 2H); 1,41 (m, 13H); 1,26 (s, 10H); RMN de ^{13}C (CDCl_3 , 75 MHz) δ 156,1; 78,9; 42,2; 40,6; 33,8; 30,1; 29,4; 29,3; 28,7; 28,5; 26,8; 26,8.

6.2.4. Procedimento geral para a síntese tetracomponente das (n-(2,4,5-trifenil-1H-imidazol-1-il)alquil)carbamato de *terc*-butila (**21a-e**)



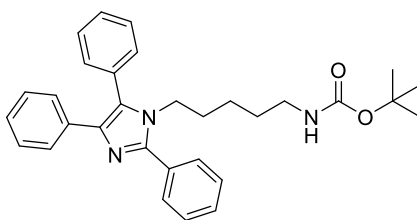
Benzaldeído (2,0 mmol), benzila (2,0 mmol) e acetato de amônio (2,0 mmol; pré-seco sob alto vácuo) foram misturados com 2,0 mmol das 1,n-alcanodiaminas protegidas **20a-e** e cloreto de índio (0,30 mmol) e diluídos em 2,0 mL de etanol absoluto. A mistura permaneceu sob refluxo durante 12 h. Após este tempo, foram acrescentados mais 2,0 mmol dos três primeiros reagentes, permanecendo a mistura em refluxo por mais 12 h. Posteriormente, o etanol foi removido sob alto vácuo a 80 °C e a mistura purificada por cromatografia em coluna em sílica gel, empregando como mistura eluente hexano: AcOEt: Et_3N , com eluição por gradiente (90: 9: 1; 80: 19: 1, 70: 29:1, 60: 39: 1, 50: 49: 1, 0: 99: 1).

6.2.4.1. (4-(2,4,5-trifenil-1*H*-imidazol-1-il)butil)carbamato de *terc*-butila (**21a**)



A 1,4-butanodiamina protegida (**20a**) foi submetida à reação acordo com o procedimento geral, obtendo-se o produto desejado **21a**. Sólido branco; rendimento: 79%; p.f. 102-103 °C; IV (*KBr*) ν_{max}/cm^{-1} : 3352, 3222, 3050, 2968, 2928, 2860, 1691, 1527, 1171, 774, 692; RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3) δ 7,70 (dd, $J = 8,0, 1,4$ Hz, 2H); 7,57 – 7,41 (m, 10H); 7,26 – 7,11 (m, 3H); 4,21 (sl, 1H); 3,93 (t, $J = 6,0$ Hz, 2H); 2,88 – 2,70 (m, 2H); 1,69 (s, 2H); 1,42 (s, 9H); 1,19 – 1,08 (m, 2H); RMN de ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) δ 155,7; 147,7; 137,8; 134,4; 131,4; 131,3; 131,0; 129,5; 129,2; 129,0; 128,8; 128,7; 128,6; 128,5; 128,1; 127,9; 126,8; 126,3; 125,5; 44,2; 39,5; 28,4; 27,6; 26,7; HRMS-ESI: calculado $[\text{M-H}]^+$ 468,2646; encontrado 468,2659.

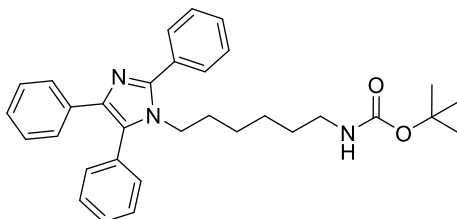
6.2.4.2. (5-(2,4,5-trifenil-1*H*-imidazol-1-il)pentil)carbamato de *terc*-butila (**21b**)



A 1,5-pentanodiamina protegida (**20b**) foi submetida à reação acordo com o procedimento geral, obtendo-se o produto desejado **21b**. Sólido branco; rendimento: 80%; p.f. 59-60 °C; IV (*KBr*) ν_{max}/cm^{-1} : 3344, 3050, 2976, 2852, 1697, 1499, 1163, 768, 700; RMN de ^1H (300 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 7,72 (d, $J = 6,6$ Hz, 2H); 7,59 – 7,37 (m, 10H); 7,24 – 7,04 (m, 3H); 6,62 (s, 1H); 3,87 (t, $J = 7,3$ Hz, 2H); 2,74 – 2,57 (m, 2H); 1,33 (s, 9H); 1,29 – 1,19 (m, 2H); 1,09 – 0,93 (m, 2H); 0,86 (d, $J = 7,0$ Hz, 2H); RMN de ^{13}C (75 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 155,9; 147,1; 137,0; 135,1; 131,7; 131,5; 131,3; 130,2; 129,6; 129,3; 129,2; 129,1; 128,9;

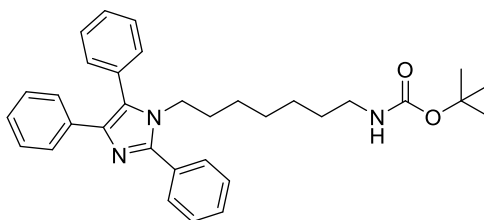
128,6; 128,5; 127,5; 126,5; 125,6; 77,8; 44,7; 29,8; 29,0; 28,7; 23,4; HRMS-ESI: calculado $[M-H]^+$ 482,2802; encontrado 482,2805.

6.2.4.3. (6-(2,4,5-trifenil-1*H*-imidazol-1-il)hexil)carbamato de *terc*-butila (**21c**)



A 1,6-hexanodiamina protegida (**20c**) foi submetida à reação acordo com o procedimento geral, obtendo-se o produto desejado **21c**. Óleo branco; rendimento: 94%; IV (*KBr*) ν_{max}/cm^{-1} : 3344, 3058, 2968, 2928, 2846, 1703, 1499, 1355, 1246, 1172, 774, 692; RMN de 1H (300 MHz, DMSO-*d6*) δ 7,74 (d, $J = 6,6$ Hz, 2H); 7,63 – 7,41 (m, 10H); 7,26 – 7,09 (m, 3H); 6,69 (t, $J = 5,4$ Hz, 1H); 3,90 (t, $J = 7,3$ Hz, 2H); 2,84 - 2,66 (m, 2H); 1,38 (s, 9H); 1,27 (s, 2H); 1,11 (s, 2H); 0,88 (s, 4H); RMN de ^{13}C (75 MHz, DMSO-*d6*) δ 156,0; 147,2; 137,0; 135,2; 131,7; 131,6; 131,3; 130,2; 129,6; 129,3; 129,2; 129,1; 128,9; 128,6; 128,5; 128,2; 127,5; 127,0; 126,5; 125,7; 77,7; 44,6; 30,0; 29,5; 28,7; 25,6; 25,7; HRMS-ESI: calculado $[M-H]^+$ 496,2959; encontrado 496,2965.

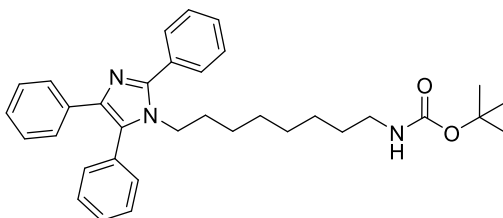
6.2.4.4. (7-(2,4,5-trifenil-1*H*-imidazol-1-il)heptil)carbamato de *terc*-butila (**21d**)



A 1,7-heptanodiamina protegida (**20d**) foi submetida à reação acordo com o procedimento geral, obtendo-se o produto desejado **21d**. Óleo branco; rendimento: 96%; IV (*KBr*) ν_{max}/cm^{-1} : 3344, 3064, 2928, 2852, 1697, 1171, 692, 570; RMN de 1H (300 MHz, DMSO-*d6*) δ 7,72 (d, $J = 6,9$ Hz, 2H); 7,60 – 7,41 (m, 10H); 7,26 – 7,04 (m, 3H); 6,71 (t, $J = 5,4$ Hz, 1H); 3,88 (t, $J = 7,4$ Hz, 2H); 2,88 - 2,67 (m, 2H); 1,37 (s, 9H); 1,29 – 1,07 (m, 4H); 1,03 – 0,81 (m, 6H); RMN de ^{13}C (75 MHz, DMSO-*d6*) δ 156,0; 147,2; 137,0; 135,2; 131,8;

131,6; 131,3; 130,2; 129,6; 129,3; 129,2; 129,1; 129,1; 128,7; 128,5; 126,5; 125,7; 77,7; 44,5; 29,8; 29,7; 28,7; 28,0; 26,2; 25,9; HRMS-ESI: calculado $[M-H]^+$ 510,3115; encontrado 510,3117.

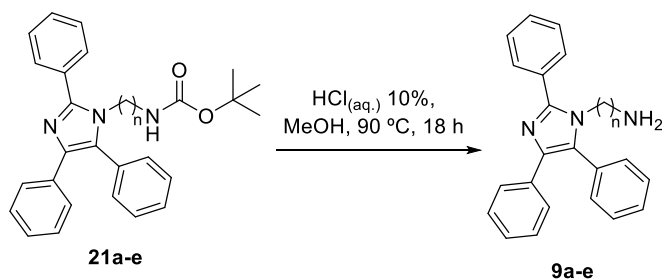
6.2.4.5. (8-(2,4,5-trifenil-1*H*-imidazol-1-il)octil)carbamato de *tert*-butila (**21e**)



A 1,8-octanodiamina protegida (**20e**) foi submetida à reação acordo com o procedimento geral, obtendo-se o produto desejado **21e**. Óleo branco; rendimento: 95%; IV (*KBr*) ν_{max}/cm^{-1} : 3344, 3050, 2921, 2860, 1697, 1505, 1465, 1164, 760, 686; RMN de 1H (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ 7,71 (d, $J = 7,6$ Hz, 2H); 7,61 – 7,36 (m, 10H); 7,28 – 7,06 (m, 3H); 6,74 (t, $J = 5,4$ Hz, 1H); 3,87 (t, $J = 7,3$ Hz, 2H); 2,90 - 2,73 (m, 2H); 1,36 (s, 9H); 1,27 – 1,16 (m, 4H); 1,05 – 0,75 (m, 8H); RMN de ^{13}C (75 MHz, DMSO-*d*₆) δ 156,0; 147,2; 137,0; 135,2; 131,8; 131,6; 131,3; 130,2; 129,6; 129,3; 129,2; 129,1; 128,5; 126,6; 125,7; 77,8; 44,6; 29,9; 29,8; 28,8; 28,6; 28,3; 26,6; 25,8; HRMS-ESI: calculado $[M-H]^+$ 524,3272; encontrado 524,3273.

6.2.5. Procedimento geral para a desproteção de 21a-e e obtenção das n-(2,4,5-trifenil-1*H*-imidazol-1-il)alcanaminas 9a-e

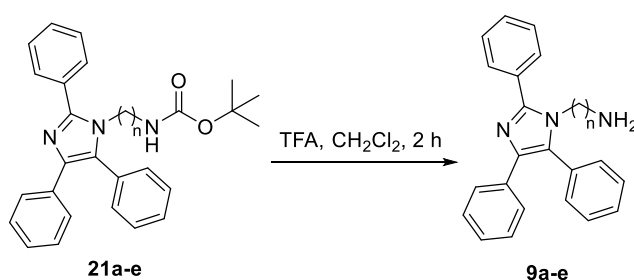
6.2.5.1. Desproteção com HCl e Metanol (PG1)



A amina protegida contendo o núcleo lofina (**21a-e**; 1,0 g) foi diluída em 100 mL de metanol e foram acrescentados 10 mL de uma solução aquosa 10% de HCl. A reação foi

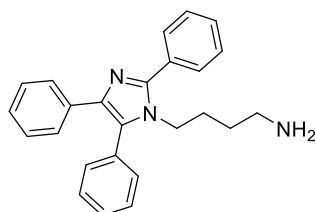
mantida a 90 °C durante 18 horas, seguida de remoção do solvente em rotaevaporador e posterior neutralização com solução aquosa 10% de Na₂CO₃, até observar a turvação e pH 11. O produto foi extraído duas vezes com diclorometano, nas mesmas quantidades utilizadas da solução de neutralização. Após secagem com Na₂SO₄ anidro o solvente foi removido à pressão reduzida e o produto bruto purificado por cromatografia em coluna em sílica gel, empregando como mistura eluente CHCl₃: CH₃OH: NH₄OH (93: 6,5: 0,5; pH 10), com eluição isocrática.

6.2.5.2. Desproteção com TFA e DCM (PG2)



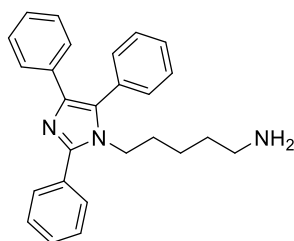
A uma solução de amina protegida (**21a-e**) (3,0 mmol) em diclorometano (6,0 mL) foi adicionado ácido trifluoroacético (3,0 mL) e a mistura foi mantida sob agitação a temperatura ambiente durante duas horas. A conversão completa do carbamato em amina foi observada em placa de CCD (eluição com AcOEt: Et₃N, 60: 39: 1). Depois disso, o ácido foi removido no rotaevaporador por arraste a vapor com tolueno (10 mL) e diclorometano (3 x 10 mL). O óleo residual foi dissolvido em metanol e neutralizado com Na₂CO₃, filtrado e o solvente removido à pressão reduzida. O produto bruto purificado por cromatografia em coluna em sílica gel, empregando como mistura eluente CHCl₃: CH₃OH: NH₄OH (93: 6,5: 0,5; pH 10), com eluição isocrática.

6.2.5.3. 4-(2,4,5-triphenyl-1H-imidazol-1-yl)butan-1-amine (**9a**)



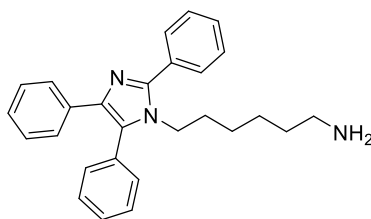
O composto **21a** foi submetido à reação de acordo com o procedimento geral PG1, obtendo-se o produto desejado **9a**. Sólido branco; rendimento: 59%; p.f. 119-120 °C; IV (*KBr*) ν_{max}/cm^{-1} : 3044, 2920, 2846, 1595, 1438, 768, 692; RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3) δ 7,69 (dd, $J = 8,0, 1,6$ Hz, 2H); 7,56 – 7,38 (m, 10H); 7,23 – 7,08 (m, 3H); 3,91 (t, $J = 7,5$ Hz, 2H); 2,34 (t, $J = 7,0$ Hz, 2H); 1,44 – 1,28 (m, 2H); 1,23 (s, 2H); 1,14 – 0,99 (m, 2H); RMN de ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) δ 147,6; 137,8; 134,5; 131,5; 131,5; 131,0; 129,5; 129,2; 129,1; 128,8; 128,7; 128,6; 128,0; 126,8; 126,2; 44,5; 41,1; 30,1; 27,7; HRMS-ESI: calculado $[\text{M-H}]^+$ 468,2646, encontrado 468,2659.

6.2.5.4. 5-(2,4,5-triphenyl-1*H*-imidazol-1-yl)pentan-1-amine (**9b**)



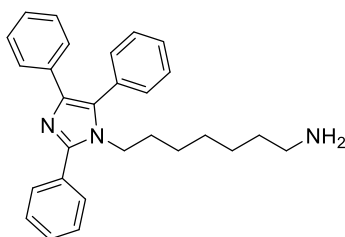
O composto **21b** foi submetido à reação de acordo com o procedimento geral PG1, obtendo-se o produto desejado **9b**. Óleo incolor; rendimento: 75%; IV (*KBr*) ν_{max}/cm^{-1} : 3433, 3058, 2922, 2851, 1595, 1503, 1437, 768, 692; RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3) δ 7,67 (dd, $J = 8,0, 1,6$ Hz, 2H); 7,56 – 7,38 (m, 10H); 7,22 – 7,06 (m, 3H); 3,88 (t, $J = 7,5$ Hz, 2H); 2,39 (t, $J = 6,0$ Hz, H); 1,48 (sl, 2H); 1,32 (dt, $J = 15,0, 7,5$ Hz, 2H); 1,14 – 0,86 (m, 4H); RMN de ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) δ 147,7; 137,8; 134,6; 131,6; 131,5; 131,0; 129,6; 129,2; 129,1; 128,9; 128,7; 128,6; 128,4; 128,1; 126,9; 126,3; 125,7; 44,6; 41,7; 32,6; 30,2; 23,5; HRMS-ESI: calculado $[\text{M-H}]^+$ 382,2278, encontrado 382,2278.

6.2.5.5. 6-(2,4,5-triphenyl-1*H*-imidazol-1-yl)hexan-1-amine (**9c**)



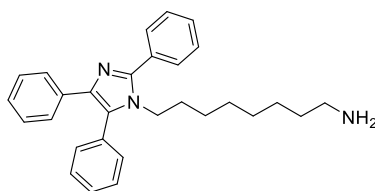
O composto **21c** foi submetido à reação de acordo com o procedimento geral PG1 ou PG2, obtendo-se o produto desejado **9c**. Óleo incolor; rendimento: 63% (PG1), 96% (PG2); IV (*KBr*) ν_{max}/cm^{-1} : 3058, 2968, 2920, 2846, 1697, 1260, 1163, 734, 500; RMN de 1H (300 MHz, $CDCl_3$) δ 7,68 (dd, $J = 7,9, 1,4$ Hz, 2H); 7,58 – 7,37 (m, 10H); 7,22 – 7,07 (m, 3H); 3,95 – 3,80 (t, $J = 7,5$ Hz, 2H); 2,48 (t, $J = 7,0$ Hz, 2H); 1,55 (s, 2H); 1,38 – 1,26 (m, 2H); 1,24 – 1,08 (m, 2H); 1,01 – 0,86 (m, 4H); RMN de ^{13}C (75 MHz, $CDCl_3$) δ 147,5; 137,5; 134,4; 131,4; 131,4; 130,8; 129,4; 129,0; 128,9; 128,7; 128,5; 127,9; 126,6; 126,0; 44,4; 41,7; 33,0; 30,1; 25,8; 25,7; HRMS-ESI: calculado $[M-H]^+$ 396,2434, encontrado 396,2431.

6.2.5.6. 7-(2,4,5-triphenyl-1*H*-imidazol-1-yl)heptan-1-amine (**9d**)



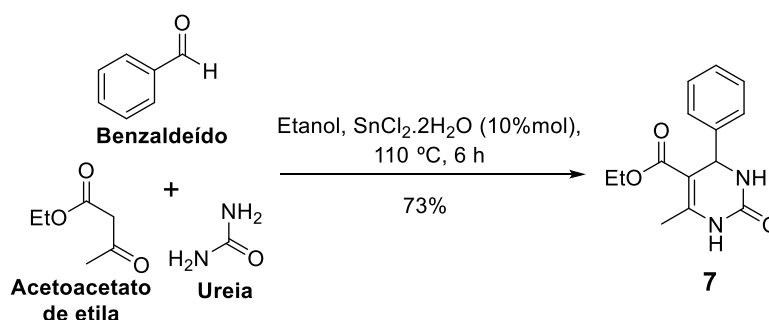
O composto **21d** foi submetido à reação de acordo com o procedimento geral PG1 ou PG2, obtendo-se o produto desejado **9d**. Óleo incolor; rendimento: 84% (PG1), 71% (PG2); IV (*KBr*) ν_{max}/cm^{-1} : 3427, 3064, 2928, 2852, 1595, 1444, 774, 692; RMN de 1H (300 MHz, $CDCl_3$) δ 7,67 (dd, $J = 8,0, 1,4$ Hz, 2H); 7,58 – 7,35 (m, 10H); 7,21 – 7,04 (m, 3H); 3,85 (t, $J = 7,5$ Hz, 2H); 2,48 (t, $J = 7,1$ Hz, 2H); 2,30 (s, 2H); 1,41 – 1,14 (m, 4H); 0,95 (m, 6H); RMN de ^{13}C (75 MHz, $CDCl_3$) δ 147,4; 137,4; 134,4; 131,2; 130,8; 129,5; 128,9; 128,8; 128,6; 128,4; 127,8; 126,6; 126,0; 44,4; 41,5; 32,8; 30,0; 28,1; 26,1; 25,8; HRMS-ESI: calculado $[M-H]^+$ 410,2591, encontrado 410,2591.

6.2.5.7. 8-(2,4,5-triphenyl-1*H*-imidazol-1-yl)octan-1-amine (**9e**)



O composto **21e** foi submetido à reação de acordo com o procedimento geral PG1 ou PG2, obtendo-se o produto desejado **9e**. Óleo incolor; rendimento: 87% (PG1), 51% (PG2); IV (*KBr*) ν_{max}/cm^{-1} : 3434, 3064, 2920, 2852, 1561, 768, 692; RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3) δ 7,69 (dd, $J = 8,0, 1,6$ Hz, 2H); 7,57 – 7,38 (m, 10H); 7,23 – 7,07 (m, 3H); 3,87 (t, $J = 7,5$ Hz, 2H); 2,60 (t, $J = 7,1$ Hz, 2H); 1,63 (s, 2H); 1,40 – 1,27 (m, 4H); 1,19 – 0,86 (m, 8H); RMN de ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) δ 147,5; 137,5; 134,5; 131,4; 131,4; 130,9; 129,5; 129,0; 128,9; 128,7; 128,5; 127,9; 126,7; 126,1; 44,6; 41,9; 33,3; 30,1; 28,8; 28,4; 26,5; 25,9; HRMS-ESI: calculado $[\text{M-H}]^+$ 424,2747, encontrado 424,2746.

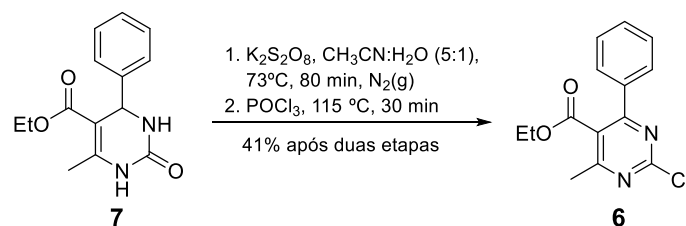
6.2.6. Procedimento para a síntese da 6-metil-2-oxo-4-fenil-1,2,3,4-tetraidropirimidina-5-carboxilato de etila (**7**) (Reação de Biginelli)



Benzaldeído (30,0 mmol, 3,0 mL), acetoacetato de etila (30,0 mmol, 3,8 mL) e ureia (45,0 mmol, 2,7 g) foram misturados com cloreto de estanho di-hidratado ($\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$; 3,0 mmol, 677 mg) e diluídos em 40 mL de etanol absoluto. A mistura foi mantida a $110\text{ }^\circ\text{C}$ por seis horas. Decorrido este tempo o solvente foi evaporado em rotaevaporador seguido de alto vácuo a $80\text{ }^\circ\text{C}$. Uma vez seco, o sólido amarelo resultante foi lavado com água gelada e gelo e filtrado sob vácuo utilizando um funil de Büchner. O produto foi purificado por recristalização em etanol e o sólido branco obtido foi seco na estufa a $100\text{ }^\circ\text{C}$ por oito horas; o rendimento foi de 73%.

6-Metil-2-oxo-4-fenil-1,2,3,4-tetraidropirimidina-5-carboxilato de etila; Número CAS: 5395-36-8; RMN de ^1H ($\text{DMSO}-d_6$, 300 MHz) δ 9,23 (s, 1H); 7,78 (s, 1H); 7,46 – 7,17 (m, 5H); 5,19 (d, $J = 3,3$ Hz, 1H); 4,02 (q, $J = 7,1$ Hz, 2H); 2,29 (s, 3H); 1,13 (t, $J = 7,1$ Hz, 3H); RMN de ^{13}C ($\text{DMSO}-d_6$, 75 MHz) 165,9; 152,8; 148,9; 145,4; 128,9; 127,8; 126,8; 99,8; 59,7; 54,5; 18,3; 14,6.

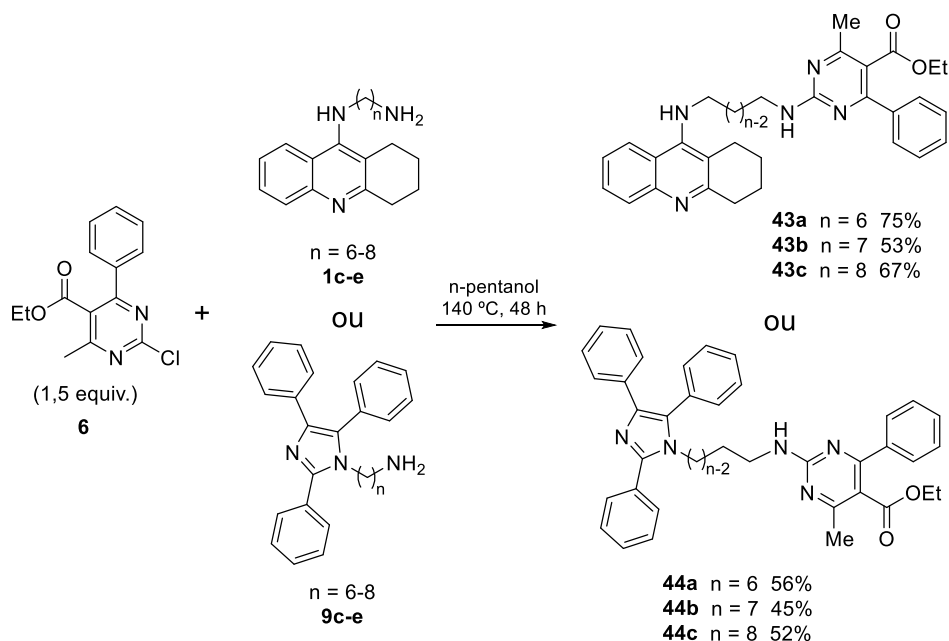
6.2.7. Procedimento para a obtenção da 2-cloro-4-metil-6-fenil-pirimidina-5-carboxilato de etila (6)



A di-hidropirimidinona **7** (7,7 mmol, 2,0 g) foi diluída em 167 mL de acetonitrila e foram adicionados persulfato de potássio ($K_2S_2O_8$; 7,7 mmol, 2,1 g) e 34 mL de água. A mistura foi mantida a 73 °C sob atmosfera inerte por 80 minutos. Decorrido este tempo, o solvente foi imediatamente removido em rotaevaporador e a mistura resultante diluída em 80 mL de diclorometano. A fase orgânica foi lavada com 80 mL de água e seca com Na_2SO_4 anidro. Na sequência, o sólido foi filtrado e o solvente foi removido à pressão reduzida, obtendo-se o produto **26**. Ao produto bruto **26** foram adicionados 2,0 mL de $POCl_3$ e a mistura mantida a 115 °C por 30 minutos. Após este tempo, o $POCl_3$ removido sob alto vácuo a 60 °C até a formação de uma pasta escura. A mistura foi diluída com 20 mL de diclorometano, a solução resultante foi neutralizada com solução aquosa 30% de Na_2CO_3 , até atingir pH 11 e as fases foram separadas. A fase orgânica foi lavada com solução saturada de $NaCl$ (20 mL), seca com Na_2SO_4 anidro e filtrada. O solvente foi removido em rotaevaporador e o produto bruto foi purificado por cromatografia em coluna em sílica gel, empregando como mistura eluente hexano : $AcOEt$ (9 : 1), com eluição isocrática.

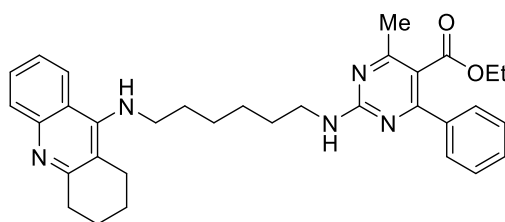
Obteve-se o produto 2-Cloro-4-metil-6-fenilpirimidina-5-carboxilato de etila (**6**), um sólido esverdeado, rendimento: 41% (após as duas etapas de oxidação e cloração). Número CAS: 36746-07-3; RMN de 1H ($CDCl_3$, 300 MHz) δ 7,69 – 7,63 (m, 2H); 7,53 – 7,41 (m, 3H); 4,21 (q, $J = 7,1$ Hz, 2H); 2,62 (s, 3H); 1,07 (t, $J = 7,1$ Hz, 3H); RMN de ^{13}C ($CDCl_3$, 75 MHz) δ 168,6; 167,0; 166,3; 160,5; 136,3; 130,8; 128,7; 128,4; 124,5; 62,2; 22,6; 13,6.

6.2.8. Procedimento geral para a síntese dos híbridos tacrina(n)-pirimidinas (43a-c) e lofina(n)-pirimidinas (44a-c)



Uma mistura contendo 0,60 mmol da 2-cloropirimidina **6** e 0,40 mmol da amina contendo o núcleo tacrina (**1c-e**) ou lofina (**9c-e**) foi diluída em 2,0 mL de *n*-pentanol em um balão conectado a um condensador com tubo secante e foi mantida em refluxo por 48 h. Decorrido este tempo o solvente foi evaporado sob alto vácuo a 120 °C por uma hora e a mistura foi diluída em 10 mL de diclorometano. A fase orgânica foi lavada com 10 mL de soluções aquosas de NaOH (10%) e NaCl saturado, seguida de secagem com Na₂SO₄ anidro. O solvente foi removido no rotaevaporador e sob alto vácuo a 120 °C por duas horas para remoção do *n*-pentanol residual. O produto puro foi purificado por cromatografia em coluna com eluição por gradiente utilizando hexano : acetato de etila : trietilamina (95 : 4 : 1, 90 : 9 : 1, 85 : 14 : 1, 80 : 19 : 1), obtendo-se o produto desejado puro.

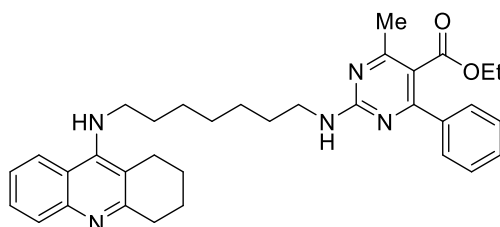
6.2.8.1. Híbrido tacrina(6)-pirimidina (**43a**)



6-metil-4-fenil-2-((6-((1,2,3,4-tetraidroacridin-9-il)amino)hexil)amino)pirimidina-5-carboxilato de etila

A partir do composto **6** e da amina **1c**, de acordo com o procedimento geral, obteve-se o produto desejado **43a**. Óleo amarelo; rendimento: 75%; IV (*KBr*) ν_{max}/cm^{-1} : 3389, 3261, 2926, 2850, 1710, 1556, 1253, 1074, 754, 692; RMN de 1H ($CDCl_3$, 300 MHz) δ 7,99 – 7,87 (m, 2H); 7,55 (ddd, $J = 8,3, 6,8$ e $1,3$ Hz, 3H); 7,44 – 7,36 (m, 3H); 7,34 (ddd, $J = 8,3, 6,8$ e $1,3$ Hz, 1H); 5,31 (t, $J = 5,7$ Hz, 1H); 4,05 (q, $J = 7,1$ Hz, 2H); 3,54 – 3,36 (m, 4H); 3,12 – 2,98 (m, 2H); 2,75 – 2,61 (m, 2H); 2,49 (s, 3H); 1,97 – 1,83 (m, 4H); 1,72 – 1,51 (m, 4H); 1,49 – 1,33 (m, 4H); 0,94 (t, $J = 7,1$ Hz, 3H); RMN de ^{13}C ($CDCl_3$, 75 MHz) δ 169,0; 166,2; 161,3; 158,3; 151,0; 147,3; 139,3; 129,5; 128,5; 128,5; 128,3; 128,0; 123,7; 123,0; 120,2; 115,8; 115,2; 61,2; 49,5; 41,2; 33,9; 31,8; 29,6; 26,8; 26,7; 24,9; 23,1; 22,8; 13,7; HRMS-ESI: calculado $[M-H]^+$ 538,3177; encontrado 538,3186.

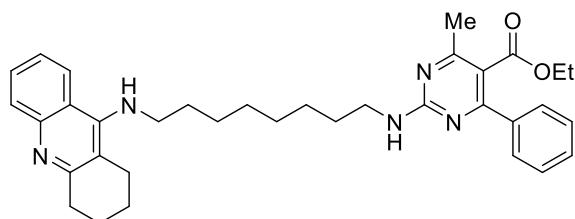
6.2.8.2. Híbrido tacrina(7)-pirimidina (**43b**)



6-metil-4-fenil-2-(((7-((1,2,3,4-tetraidroacridin-9-il)amino)heptil)amino)pirimidina-5-carboxilato de etila

A partir do composto **6** e da amina **1d**, de acordo com o procedimento geral, obteve-se o produto desejado **43b**. Óleo amarelo; rendimento: 53%; RMN de 1H ($CDCl_3$, 300 MHz) δ 7,93 (t, $J = 9,1$ Hz, 2H); 7,62 – 7,47 (m, 3H); 7,44 – 7,27 (m, 4H); 5,72 (sl, 1H); 4,04 (q, $J = 7,1$ Hz, 2H); 3,94 (sl, 1H); 3,53 – 3,33 (m, 4H); 3,05 (s, 2H); 2,67 (s, 2H); 2,49 (s, 3H); 1,97 – 1,81 (m, 4H); 1,70 – 1,46 (m, 4H); 1,29 (s, 6H); 0,93 (t, $J = 7,1$ Hz, 3H); RMN de ^{13}C ($CDCl_3$, 75 MHz) δ 168,9; 166,1; 161,3; 158,3; 150,8; 147,4; 139,3; 129,4; 128,6; 128,3; 128,2; 127,9; 123,6; 122,9; 120,2; 115,8; 115,0; 61,0; 49,5; 41,2; 34,0; 31,8; 29,5; 29,1; 26,9; 26,8; 24,8; 23,1; 22,8; 13,6.

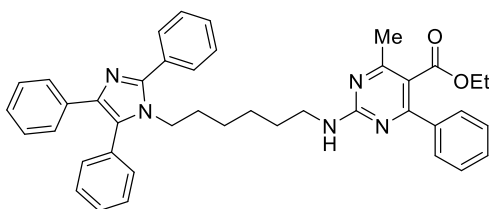
6.2.8.3. Híbrido tacrina(8)-pirimidina (**43c**)



6-metil-4-fenil-2-((8-((1,2,3,4-tetraidroacridin-9-il)amino)octil)amino)pirimidina-5-carboxilato de etila

A partir do composto **6** e da amina **1e**, de acordo com o procedimento geral, obteve-se o produto desejado **43c**. Óleo amarelo; rendimento: 67%; IV (*KBr*) ν_{max}/cm^{-1} : 3389, 3262, 2922, 2850, 1712, 1562, 1255, 1074, 756, 692; RMN de ^1H (CDCl_3 , 300 MHz) δ 7,93 (dd, $J = 15,2, 8,5$ Hz, 2H); 7,59 – 7,49 (m, 3H); 7,43 – 7,36 (m, 3H); 7,36 – 7,30 (m, 1H); 5,47 (s, 1H); 4,12 – 3,97 (m, 2H); 3,54 – 3,37 (m, 4H); 3,05 (s, 2H); 2,69 (s, 2H); 2,48 (s, 3H); 1,90 (d, $J = 2,9$ Hz, 4H); 1,70 – 1,50 (m, 4H); 1,32 (s, 8H); 0,94 (t, $J = 7,1$ Hz, 3H); RMN de ^{13}C (CDCl_3 , 75 MHz) δ 169,0; 166,3; 161,4; 158,3; 151,1; 147,3; 139,4; 129,5; 128,5; 128,3; 128,1; 123,8; 123,0; 120,2; 115,8; 115,2; 61,1; 49,6; 41,4; 33,9; 31,9; 29,7; 29,4; 29,3; 27,0; 26,9; 24,9; 23,1; 22,8; 13,7; HRMS-ESI: calculado $[\text{M-H}]^+$ 566,3490; encontrado 566,3491.

6.2.8.4. Híbrido lofina(6)-pirimidina (**44a**)

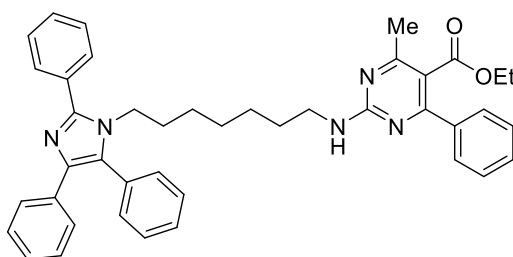


6-metil-4-fenil-2-((7-(2,4,5-trifenil-1H-imidazol-1-il)hexil)amino)pirimidina-5-carboxilato de etila

A partir do composto **6** e da amina **9c**, de acordo com o procedimento geral, obteve-se o produto desejado **44a**. Sólido amarelo; rendimento: 56% ; ponto de fusão: 53-55 °C; IV (*KBr*) ν_{max}/cm^{-1} : 3407, 3260, 2925, 1705, 1550, 1260, 1068, 768, 695; RMN de ^1H (CDCl_3 , 300 MHz) δ 7,68 (dd, $J = 8,0, 1,6$ Hz, 2H); 7,57 – 7,38 (m, 15H); 7,23 – 7,08 (m, 3H); 5,19 (t, $J = 5,6$ Hz, 1H); 4,04 (q, $J = 7,1$ Hz, 2H); 3,88 (t, $J = 7,5$ Hz, 2H); 3,31 (dd, $J = 12,9, 6,0$ Hz,

2H); 2,47 (s, 3H); 1,41 – 1,27 (m, 4H); 1,12 – 0,97 (m, 4H); 0,94 (t, $J = 7,1$ Hz, 3H); RMN de ^{13}C (CDCl_3 , 75 MHz) δ 168,7; 165,9; 161,0; 147,5; 139,0; 137,5; 134,4; 131,4; 131,3; 130,8; 129,4; 129,3; 129,0; 128,9; 128,7; 128,5; 128,1; 127,9; 127,7; 126,7; 126,0; 114,9; 60,9; 44,4; 40,8; 30,1; 29,0; 25,7; 22,8; 13,4; HRMS-ESI: calculado $[\text{M-H}]^+$ 636,3333; encontrado 636,3329.

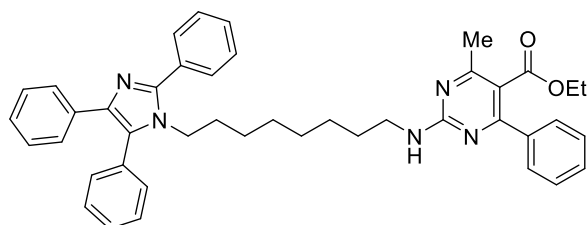
6.2.8.5. Híbrido lofina(7)-pirimidina (**44b**)



6-metil-4-fenil-2-((7-(2,4,5-trifenil-1*H*-imidazol-1-il)heptil)amino)pirimidina-5-carboxilato de etila

A partir do composto **6** e da amina **9d** de acordo com o procedimento geral obteve-se o produto desejado **44b**. Sólido amarelo; rendimento: 45% ; ponto de fusão: 51-53 °C; RMN de ^1H (CDCl_3 , 300 MHz) δ 7,68 (d, $J = 7,5$ Hz, 2H); 7,55 – 7,34 (m, 15H); 7,22 – 7,07 (m, 3H); 5,24 (s, 1H); 4,04 (q, $J = 7,1$ Hz, 2H); 3,91 - 3,82 (m, 2H); 3,42 - 3,30 (m, 2H); 2,47 (s, 3H); 1,50 – 1,20 (m, 4H); 1,11 (s, 4H); 0,97 – 0,90 (m, 3H); RMN de ^{13}C (CDCl_3 , 75 MHz) δ 168,8; 161,1; 147,6; 139,2; 137,7; 134,6; 131,5; 131,0; 129,5; 129,4; 129,2; 129,0; 128,8; 128,6; 128,2; 128,0; 127,9; 126,8; 126,1; 115,1; 61,0; 59,5; 44,6; 41,1; 38,1; 31,2; 30,2; 29,7; 29,3; 28,2; 26,3; 26,0; 23,0; 13,5.

6.2.8.6. Híbrido lofina(8)-pirimidina (**44c**)

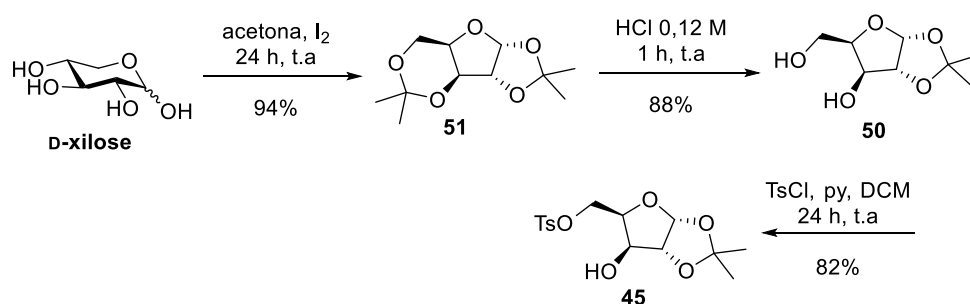


6-metil-4-fenil-2-((7-(2,4,5-trifenil-1*H*-imidazol-1-il)octil)amino)pirimidina-5-carboxilato de etila

A partir do composto **6** e da amina **9e** de acordo com o procedimento geral obteve-se o produto desejado **44c**. Óleo amarelo; rendimento: 52%; IV (*KBr*) ν_{max}/cm^{-1} : 3413, 3262, 2919, 1711, 1550, 1255, 694; RMN de ^1H (CDCl_3 , 300 MHz) δ 7,68 (dd, $J = 8,0, 1,6$ Hz, 2H); 7,56 – 7,36 (m, 15H); 7,23 – 7,08 (m, 3H); 5,33 (t, $J = 5,7$ Hz, 1H); 4,04 (q, $J = 7,1$ Hz, 2H); 3,91 – 3,83 (m, 2H); 3,41 (q, 7,0 Hz, 2H); 2,48 (s, 3H); 1,52 – 1,45 (m, 2H); 1,36 – 1,28 (m, 4H); 1,23 – 1,13 (m, 2H); 1,12 – 0,99 (m, 4H); 0,94 (t, $J = 7,1$ Hz, 3H); RMN de ^{13}C (CDCl_3 , 75 MHz) δ 169,1; 161,4; 147,8; 139,4; 137,8; 134,7; 131,7; 131,7; 131,2; 129,8; 129,6; 129,4; 129,2; 129,0; 128,8; 128,4; 128,2; 127,0; 126,4; 115,1; 61,2; 44,8; 41,4; 30,4; 29,6; 29,0; 28,7; 26,8; 26,2; 13,7; HRMS-ESI: calculado $[\text{M-H}]^+$ 664,3646; encontrado 664,3643.

6.2.9. Síntese dos tosilatos derivados de carboidratos

6.2.9.1. Tosilato da D-xilose (**45**)



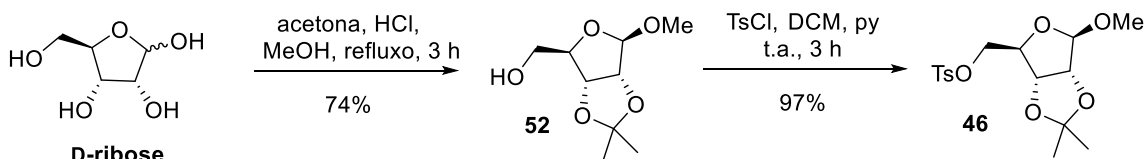
Em um balão de 500 mL foram adicionados a D-xilose (20,0 mmol, 3,00 g), acetona (200 mL) e I_2 (3,5 mmol, 0,90 g). A mistura reacional ficou sob agitação por 24 h ou até que não se observasse carboidrato depositado no fundo do recipiente. Após evaporação de cerca de 2/3 do solvente reacional, foi adicionado $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ (1 x 100 mL) para que o iodo remanescente fosse consumido até que a mistura apresentasse aspecto incolor. Então, o produto foi extraído com diclorometano (3 x 100 mL), a fase orgânica foi seca com MgSO_4 e os solventes evaporados em rotaevaporador. O produto (bis-acetonídeo **51**) bruto foi utilizado diretamente na etapa seguinte, sem a necessidade de purificação.

Uma solução de 25 mL de HCl 0,12 M (3,0 mmol, 25 mL) foi adicionada ao bis-acetonídeo **51** (18,8 mmol, 4,32 g), e a mistura foi mantida sob agitação a temperatura ambiente por 1 h. Em seguida, foi feita a neutralização da mistura reacional com solução saturada de bicarbonato de sódio (NaHCO_3) até pH neutro. A fase orgânica foi lavada com água destilada (50 mL), extraída com acetato de etila (AcOEt) (3 x 100 mL), e seca com MgSO_4 e o solvente foi evaporado no rotaevaporador e sob alto vácuo. O produto (diol **50**) bruto foi utilizado diretamente na etapa seguinte, sem a necessidade de purificação.

A uma solução do diol **50** (16,5 mmol, 3,14 g) em diclorometano seco (20 mL) e piridina seca (18,2 mmol, 1,45 mL) foi adicionada uma solução de cloreto de tosila (24,8 mmol, 4,71 g), sob atmosfera inerte. A reação foi mantida sob agitação por 3 h a temperatura ambiente. Após esse período, foi adicionada solução saturada de CuSO₄ seguido de filtração. Lavou-se a fase orgânica com solução de NaCl saturada (1 x 100 mL), extraiu-se o produto com diclorometano (3 x 100 mL), a fase orgânica foi seca com MgSO₄ e o solvente removido no rotaevaporador. O produto bruto foi purificado por cromatografia em coluna com sílica *flash* (200-400 mesh), utilizando hexano: AcOEt (70: 30) como eluente em modo isocrático.

1,2-*O*-isopropilideno-5-*p*-toluenosulfonato- α -D-xilofuranose. Número CAS: 20513-95-5; sólido branco; rendimento: 82%; RMN de ¹H (CDCl₃, 300 MHz) δ 7,80 (d, *J* = 8,0 Hz, 2H); 7,35 (d, *J* = 8,0 Hz, 2H); 5,87 (d, *J* = 3,5 Hz, 1H); 4,50 (d, *J* = 3,5 Hz, 1H); 4,37 - 4,26 (m, 3H); 4,20 - 4,10 (m, 1H); 2,62 (sl, 1H); 2,44 (s, 3H); 1,45 (s, 3H); 1,29 (s, 3H); RMN de ¹³C (CDCl₃, 75 MHz) δ 145,3; 132,3; 130,0; 128,0; 112,1; 105,0; 85,1; 66,6; 28,2; 26,8; 21,7.

6.2.9.2. Tosilato da D-ribose (**46**)



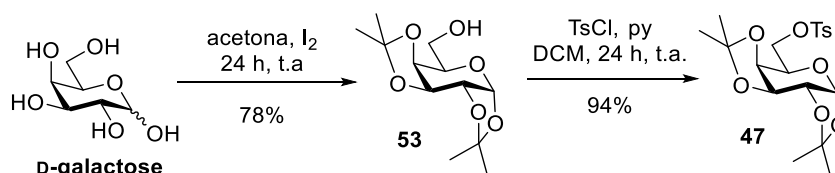
Em balão de 200mL, a uma solução de D-ribose (20 mmol, 3,00 g), em metanol (60 mL) e acetona (60 mL), foi feita a adição de HCl concentrado (20,0 mmol, 1,5 mL). O sistema foi mantido em refluxo sob agitação por 3 horas. Após este período resfriou-se o sistema e neutralizou-se com solução saturada de NaHCO₃ até pH 7. A fase orgânica foi lavada com água destilada e o produto foi extraído com AcOEt (3 x 100 mL). A fase orgânica foi seca com MgSO₄ e os solventes foram evaporados em rotaevaporador. O produto obtido (**52**) foi utilizado diretamente na etapa seguinte, sem necessidade de purificação.

A uma solução de **52** (14,8 mmol, 3,02 g) em diclorometano seco (20 mL) e piridina seca (16,3mmol, 1,3 mL) foi adicionado cloreto de tosila (22,2 mmol, 4,22 g) a 0 °C sob atmosfera inerte. Então, o banho de gelo foi retirado e a mistura reacional permaneceu sob agitação por 3 h a temperatura ambiente. Após esse período, foi adicionado solução saturada de CuSO₄ (1 x 50 mL) seguido de filtração. Lavou-se o bruto com solução de NaCl saturada (1 x 50 mL), extraiu-se o produto com diclorometano (3 x 100 mL), a fase orgânica foi seca

com MgSO_4 e o solvente removido no rotaevaporador. O produto bruto foi purificado por cromatografia em coluna com sílica *flash* (200-400 mesh), utilizando hexano: AcOEt (70: 30) como eluente em modo isocrático.

1-Metil-2,3-*O*-isopropilideno-5-*p*-toluenosulfonato- β -D-ribofuranose. Número CAS: 4137-56-8; sólido branco; rendimento: 97%; RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ 7,80 (d, $J = 8,0$ Hz, 2H); 7,36 (d, $J = 8,0$ Hz, 2H); 4,93 (s, 1H); 4,60 (d, $J = 6,0$ Hz, 1H); 4,53 (d, $J = 6,0$ Hz, 1H); 4,31 (t, $J = 7,2$ Hz, 1H); 4,03 – 4,00 (m, 2H); 3,23 (s, 3H); 2,45 (s, 3H); 1,44 (s, 3H); 1,28 (s, 3H); RMN de ^{13}C (CDCl_3 , 100 MHz) δ 144,9; 132,6; 129,8; 127,8; 112,5; 109,3; 84,7; 83,4; 81,2; 69,1; 54,8; 26,2; 24,73; 21,5.

6.2.9.3. Tosilato da D-galactose (**47**)

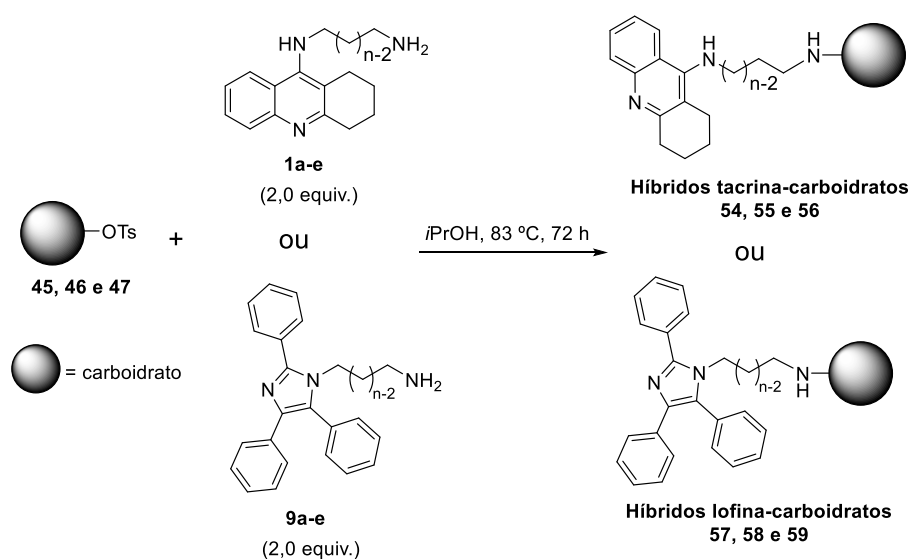


Em um balão de 500 mL foram adicionados a D-galactose (20,0 mmol, 3,60 g), acetona (200 mL) e I_2 (3,5 mmol, 0,90 g). A mistura reacional ficou sob agitação por 24 h ou até que não se observasse carboidrato depositado no fundo do recipiente. Após evaporação de cerca de 2/3 do solvente reacional, foi adicionada solução saturada de tiosulfato de sódio (1 x 100 mL, $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$) para que o iodo remanescente fosse consumido até que a mistura apresentasse aspecto incolor. Então, o produto foi extraído com diclorometano (3 x 100 mL), a fase orgânica foi seca com sulfato de magnésio (MgSO_4) e os solventes evaporados em rotaevaporador. O produto bruto (**53**) foi utilizado diretamente na etapa seguinte, sem a necessidade de purificação.

Em um balão de duas bocas, sob atmosfera inerte, adicionou-se piridina (17,1 mmol, 1,37 mL) ao bis-acetonídeo **53** (15,5 mmol, 4,05 g) em diclorometano seco (20 mL). Em seguida foi adicionado à mistura cloreto de tosila (23,3 mmol, 5,59 g), de uma única vez a 0°C . A mistura reacional foi agitada por 24 h a temperatura ambiente. O bruto é lavado com solução saturada de sulfato de cobre (1 x 50 mL, CuSO_4), extraído com diclorometano (3 x 100 mL), a fase orgânica seca com sulfato de magnésio, e o solvente evaporado em rotaevaporador. O produto bruto foi purificado por cromatografia em coluna com sílica *flash* (200-400 mesh), utilizando hexano: AcOEt (80: 20) como eluente em modo isocrático.

1,2:3,4-di-*O*-isopropilideno-*p*-toluenosulfonato- α -D-galactopiranosose. Número CAS: 4478-43-7; sólido branco; rendimento 94%; RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ 7,80 (d, $J = 8,0$ Hz, 2H); 7,33 (d, $J = 8,0$ Hz, 2H); 5,45 (d, $J = 5,0$ Hz, 1H); 4,59 (dd, $J = 7,9$ Hz; 2,5 Hz, 1H); 4,29 (dd, $J = 5,0$ Hz, 2,5 Hz, 1H); 4,24 – 4,15 (m, 2H); 4,12 - 4,04 (m, 2H); 2,44 (s, 3H); 1,50 (s, 3H); 1,34 (s, 3H); 1,31 (s, 3H); 1,28 (s, 3H); RMN ^{13}C (CDCl_3 , 100 MHz) δ 144,8; 132,9; 129,8; 128,2; 109,6; 109,0; 96,2; 70,6; 70,5; 70,4; 68,2; 65,9; 26,0; 25,9; 25,0; 24,4; 21,7.

6.2.10. Procedimento geral para a síntese dos híbridos tacrina(n)-carboidratos e lofina(n)-carboidratos

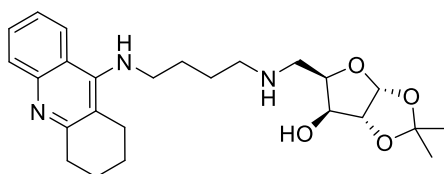


Uma mistura contendo 0,3 mmol do tosilato da D-xilose, D-ribose ou D-galactose (**45**, **46** ou **47**) e 0,6 mmol das aminas contendo o núcleo tacrina (**1a-e**) ou lofina (**9a-e**) foi diluída em 1,0 mL de isopropanol, previamente armazenado em peneira molecular para remoção do excesso de água. A mistura foi ambientada em atmosfera inerte e mantida sob aquecimento a 83 °C em um frasco vedado e sob agitação durante 72 horas. O acompanhamento da reação foi feito com CCD em hexano: AcOEt 1: 1 revelada em solução de vanilina, onde a formação do produto é evidenciada pelo surgimento de uma mancha laranja em $R_f = 0$. Além disso, sempre foi observada a sobra do tosilato de partida: da xilose ($R_f \approx 0,6$), ribose ($R_f \approx 0,7$) ou galactose ($R_f \approx 0,9$). Decorrido o tempo reacional, a reação foi diluída em 20 mL de diclorometano e tratada com soluções aquosas saturadas de NaHCO_3 (20 mL), seguido de NaCl (20 mL) e lavada com 20 mL de água. A fase orgânica foi seca com Na_2SO_4 anidro, o solvente evaporado em rotaevaporador e o produto bruto obtido foi purificado por

cromatografia em coluna utilizando como mistura eluente hexano : AcOEt (1 : 1) até a remoção do tosilato de partida e CHCl₃ : CH₃OH (98 : 2) até a remoção do produto puro da fase estacionária.

Para os testes utilizando iodeto de potássio como catalisador, adotou-se exatamente o mesmo procedimento acima, apenas com a adição de 0,045 mmol (15% mol) do KI no início da reação.

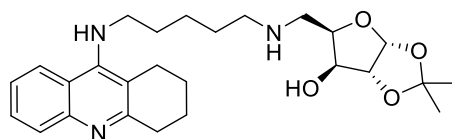
6.2.10.1. Híbrido tacrina(4)-xilose (**54a**)



*N*¹-(5-Desoxi-1,2-*O*-isopropilideno- α -D-xilofuranose)-5-(*N*⁴-(1,2,3,4-tetraidroacridin-9-il)butano-1,4-diamina)

A partir do tosilato da D-xilose **45** e da amina **1a**, de acordo com o procedimento geral, obteve-se o produto desejado **54a**. Óleo amarelo; rendimento: 54%; $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = +63,6^{\circ}$ (*c* 0,154, CH₂Cl₂); IV (*KBr*) $\nu_{\text{max}}/\text{cm}^{-1}$: 3397, 2920, 2853, 1562, 1499, 1372, 1072, 1009, 752; RMN de ¹H (CDCl₃, 300 MHz) δ 7,97 – 7,87 (m, 2H); 7,55 (ddd, *J* = 8,4, 6,9, 1,2 Hz, 1H); 7,39 – 7,31 (m, 1H); 5,95 (d, *J* = 3,7 Hz, 1H); 4,49 (d, *J* = 3,6 Hz, 1H); 4,28 (d, *J* = 2,8 Hz, 1H); 4,21 (d, *J* = 2,2 Hz, 1H); 3,98 (sl, 2H); 3,56 – 3,45 (m, 2H); 3,38 (dd, *J* = 12,9, 3,5 Hz, 1H); 3,11 – 3,02 (m, 2H); 2,95 (dd, *J* = 13,0, 1,3 Hz, 1H); 2,75 – 2,65 (m, 2H); 2,65 – 2,51 (m, 1H); 1,98 – 1,86 (m, 4H); 1,77 – 1,53 (m, 4H); 1,50 – 1,46 (s, 3H); 1,34 – 1,24 (m, 4H); RMN de ¹³C (CDCl₃, 75 MHz) δ 158,5; 150,9; 147,3; 128,6; 123,9; 122,9; 122,6; 120,3; 116,2; 111,6; 105,2; 86,2; 78,4; 77,1; 49,2; 49,3; 48,7; 34,0; 29,5; 27,2; 27,0; 26,3; 24,9; 23,1; 22,9; HRMS-ESI: calculado [M-H]⁺ 442,2700; encontrado 442,2695.

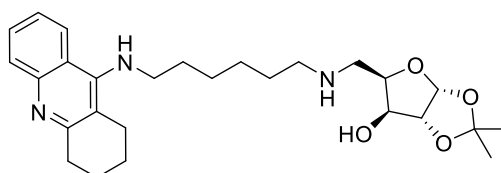
6.2.10.2. Híbrido tacrina(5)-xilose (**54b**)



*N*¹-(5-Desoxi-1,2-*O*-isopropilideno- α -D-xilofuranose)-5-(*N*⁵-(1,2,3,4-tetraidroacridin-9-il)pentano-1,5-diamina)

A partir do tosilato da D-xilose **45** e da amina **1b**, de acordo com o procedimento geral, obteve-se o produto desejado **54b**. Óleo amarelo; rendimento: 70%; $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = +60,9^{\circ}$ (*c* 0,328, CH₂Cl₂); IV (*KBr*) $\nu_{\text{max}}/\text{cm}^{-1}$: 3381, 2940, 2843, 1572, 1487, 1072, 998, 757; RMN de ¹H (CDCl₃, 300 MHz) δ 7,92 (dd, *J* = 13,7, 8,1 Hz, 2H); 7,61 – 7,50 (m, 1H); 7,34 (ddd, *J* = 8,3, 6,8, 1,3 Hz, 1H); 5,95 (d, *J* = 3,6 Hz, 1H); 4,49 (d, *J* = 3,5 Hz, 1H); 4,28 (d, *J* = 2,8 Hz, 1H); 4,25 – 4,15 (m, 1H); 3,96 (sl, 1H); 3,47 (t, *J* = 7,1 Hz, 2H); 3,39 (dd, *J* = 13,0, 3,4 Hz, 1H); 3,11 – 3,01 (m, 2H); 2,93 (dd, *J* = 13,0, 1,1 Hz, 1H); 2,71 (s, 2H); 2,68 – 2,44 (m, 2H); 1,98 – 1,87 (m, 4H); 1,65 (m, 2H), 1,53 – 1,28 (m, 13H); RMN de ¹³C (CDCl₃, 75 MHz) δ 157,9; 150,9; 146,7; 128,4; 128,0; 123,6; 122,9; 119,9; 115,6; 111,3; 105,0; 85,9; 77,9; 77,0; 49,2; 49,1; 48,4; 33,6; 31,4; 29,2; 26,8; 26,1; 24,7; 24,4; 22,7; 22,6; HRMS-ESI: calculado [M-H]⁺ 456,2857; encontrado 456,2855.

6.2.10.3. Híbrido tacrina(6)-xilose (**54c**)

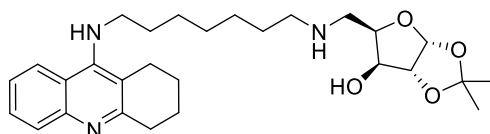


*N*¹-(5-Desoxi-1,2-*O*-isopropilideno- α -D-xilofuranose)-5-(*N*⁶-(1,2,3,4-tetraidroacridin-9-il)hexano-1,6-diamina)

A partir do tosilato da D-xilose **45** e da amina **1c**, de acordo com o procedimento geral, obteve-se o produto desejado **54c**. Óleo amarelo; rendimento: 86%; $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = -65,0^{\circ}$ (*c* 0,303, CH₂Cl₂); IV (*KBr*) $\nu_{\text{max}}/\text{cm}^{-1}$: 3369, 3928, 2847, 2345, 1502, 1081, 1001, 760, 659; RMN de ¹H (CDCl₃, 300 MHz) δ 7,98 – 7,86 (m, 2H); 7,54 (ddd, *J* = 8,3, 6,9 e 1,3 Hz, 1H); 7,35 (ddd, *J* = 8,3, 6,8 e 1,3 Hz, 1H); 5,95 (d, *J* = 3,6 Hz, 1H); 4,49 (d, *J* = 3,5 Hz, 1H); 4,28 (d, *J* = 2,6

Hz, 1H); 4,19 (m, 1H); 3,95 (sl, 1H); 3,54 – 3,42 (m, 2H); 3,36 (dd, $J = 13,0, 3,3$ Hz, 1H); 3,06 (s, 2H); 2,93 (d, $J = 11,7$ Hz, 1H); 2,68 (s, 2H); 2,64 – 2,40 (m, 2H); 1,97 – 1,84 (m, 4H); 1,72 – 1,58 (m, 2H); 1,53 – 1,22 (m, 12H); RMN de ^{13}C (CDCl_3 , 75 MHz) δ 158,4; 150,8; 147,4; 128,6; 128,3; 123,6; 122,9; 120,2; 115,8; 111,4; 105,1; 85,8; 78,1; 77,0; 49,4; 48,5; 34,0; 31,7; 29,5; 26,8; 26,9; 26,7; 26,2; 24,8; 23,1; 22,8; HRMS-ESI: calculado $[\text{M-H}]^+$ 470,3013; encontrado 470,3014.

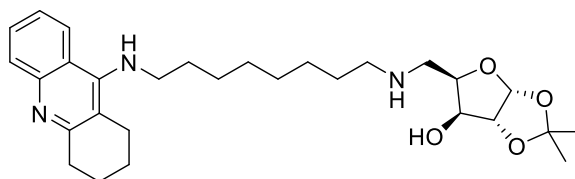
6.2.10.4. Híbrido tacrina(7)-xilose (**54d**)



N^1 -(5-Desoxi-1,2-*O*-isopropilideno- α -D-xilofuranose)-5-(N^7 -(1,2,3,4-tetraidroacridin-9-il)heptano-1,7-diamina)

A partir do tosilato da D-xilose **45** e da amina **1d**, de acordo com o procedimento geral, obteve-se o produto desejado **54d**. Óleo amarelo; rendimento: 81%; $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = +87,7^\circ$ (c 0,106, CH_2Cl_2); IV (KBr) $\nu_{\text{max}}/\text{cm}^{-1}$: 3423, 2920, 2840, 1621, 1066, 604; RMN de ^1H (CDCl_3 , 300 MHz) δ 8,02 – 7,85 (m, 2H); 7,61 – 7,48 (m, 1H); 7,41 – 7,30 (m, 1H); 5,95 (d, $J = 3,6$ Hz, 1H); 4,49 (d, $J = 3,6$ Hz, 1H); 4,28 (d, $J = 2,7$ Hz, 1H); 4,20 (s, 1H); 4,00 (sl, 1H); 3,56 – 3,44 (m, 2H); 3,39 (dd, $J = 12,9, 3,3$ Hz, 1H); 3,07 (s, 2H); 2,94 (d, $J = 13,1$ Hz, 1H); 2,79 – 2,45 (m, 4H); 1,92 (s, 4H); 1,65 (s, 2H); 1,57 – 1,23 (m, 14H); RMN de ^{13}C (CDCl_3 , 75 MHz) δ 158,1; 150,8; 147,2; 128,3; 128,3; 123,5; 122,9; 120,1; 115,6; 111,3; 105,0; 86,0; 77,9; 77,0; 49,4; 49,3; 48,5; 33,8; 31,6; 29,4; 29,0; 26,9; 26,7; 26,1; 24,7; 23,0; 22,7; HRMS-ESI: calculado $[\text{M-H}]^+$ 484,3170; encontrado 484,3164.

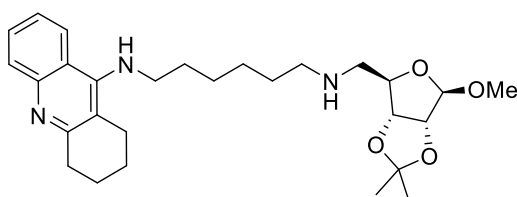
6.2.10.5. Híbrido tacrina(8)-xilose (**54e**)



N^1 -(5-Desoxi-1,2-*O*-isopropilideno- α -D-xilofuranose)-5-(N^8 -(1,2,3,4-tetraidroacridin-9-il)octano-1,8-diamina)

A partir do tosilato da D-xilose **45** e da amina **1e**, de acordo com o procedimento geral, obteve-se o produto desejado **54e**. Óleo amarelo; rendimento: 29% (85% com KI); $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = -12,5^{\circ}$ (*c* 0,990, CH₂Cl₂); IV (*KBr*) $\nu_{\text{max}}/\text{cm}^{-1}$: 3324, 2914, 2846, 1573, 1561, 1492, 1370, 1068, 1000, 754, 726; RMN de ¹H (CDCl₃, 300 MHz) δ 8,01 – 7,89 (m, 2H); 7,59 – 7,51 (m, 1H); 7,40 – 7,30 (m, 1H); 5,95 (d, *J* = 3,7 Hz, 1H); 4,48 (d, *J* = 3,7 Hz, 1H); 4,28 (d, *J* = 2,9 Hz, 1H); 4,20 (d, *J* = 2,9 Hz, 1H); 4,04 (sl, 1H); 3,53 – 3,43 (m, 2H); 3,39 (dd, *J* = 13,0, 3,5 Hz, 1H); 3,11 – 3,00 (m, 2H); 2,94 (dd, *J* = 13,0, 1,3 Hz, 1H); 2,78 – 2,45 (m, 4H); 1,96 – 1,82 (m, 4H); 1,70 – 1,55 (m, 2H); 1,52 – 1,10 (m, 16H); RMN de ¹³C (CDCl₃, 75 MHz) δ 158,3; 151,2; 147,2; 128,7; 128,6; 123,9; 123,1; 120,2; 115,7; 111,6; 105,3; 86,2; 78,4; 77,1; 49,7; 49,7; 49,6; 48,7; 33,9; 31,9; 29,9; 29,7; 29,5; 29,4; 27,2; 27,1; 27,0; 26,3; 24,9; 23,2; 22,9; HRMS-ESI: calculado [M-H]⁺ 498,3326; encontrado 498,3329.

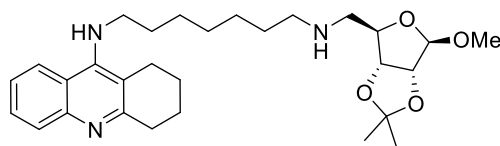
6.2.10.6. Híbrido tacrina(6)-ribose (**55a**)



*N*¹-(1-Metil-5-desoxi-2,3-*O*-isopropilideno-β-D-ribofuranosídeo)-5-(*N*⁶-(1,2,3,4-tetraidroacridin-9-il)hexano-1,6-diamina)

A partir do tosilato da D-ribose **46** e da amina **1c**, de acordo com o procedimento geral, obteve-se o produto desejado **55a**. Óleo amarelo; rendimento: 35% (58% com KI); $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = -54,7^{\circ}$ (*c* 1,10, CH₂Cl₂); IV (*KBr*) $\nu_{\text{max}}/\text{cm}^{-1}$: 3386, 2926, 2851, 1566, 1089, 867, 760; RMN de ¹H (CDCl₃, 300 MHz) δ 8,03 – 7,88 (m, 2H); 7,62 – 7,48 (m, 1H); 7,43 – 7,30 (m, 1H); 4,96 (s, 1H); 4,70 – 4,53 (m, 2H); 4,40 – 4,24 (m, 1H); 4,00 (sl, 1H); 3,58 – 3,43 (m, 2H); 3,33 (s, 3H); 3,07 (s, 2H); 2,81 – 2,51 (m, 6H); 2,18 (sl, 1H); 1,92 (m, 4H); 1,78 – 1,60 (m, 2H); 1,60 – 1,19 (m, 12H); RMN de ¹³C (CDCl₃, 75 MHz) δ 158,4; 151,1; 147,4; 128,7; 128,6; 123,8; 123,0; 120,3; 115,9; 112,5; 109,9; 86,4; 85,6; 82,9; 55,2; 53,3; 49,9; 49,6; 34,1; 31,9; 30,2; 27,2; 27,1; 26,7; 25,2; 24,9; 23,2; 22,9; HRMS-ESI: calculado [M-H]⁺ 484,3170; encontrado 484,3170.

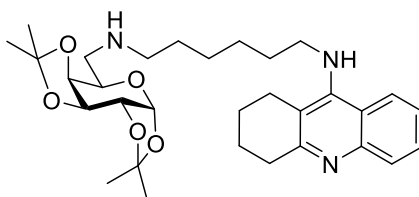
6.2.10.7. Híbrido tacrina(7)-ribose (**55b**)



*N*¹-(1-Metil-5-desoxi-2,3-*O*-isopropilideno-β-D-ribofuranosídeo)-5-(*N*⁷-(1,2,3,4-tetraidroacridin-9-il)heptano-1,7-diamina)

A partir do tosilato da D-ribose **46** e da amina **1d**, de acordo com o procedimento geral, obteve-se o produto desejado **55b**. Óleo amarelo; rendimento: 29%; $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = -37,9^\circ$ (*c* 0,287, CH₂Cl₂); IV (*KBr*) $\nu_{\text{max}}/\text{cm}^{-1}$: 3370, 2921, 2846, 1554, 1493, 1371, 1098, 863, 750; RMN de ¹H (CDCl₃, 300 MHz) δ 7,98 – 7,86 (m, 2H); 7,59 – 7,49 (m, 1H); 7,33 (t, *J* = 7,2 Hz, 1H); 4,95 (s, 1H); 4,62 (d, *J* = 6,0 Hz, 1H); 4,57 (d, *J* = 6,0 Hz, 1H); 4,30 (t, *J* = 6,9 Hz, 1H); 3,93 (sl, 2H); 3,47 (t, *J* = 7,2 Hz, 2H); 3,31 (s, 3H); 3,10 – 2,97 (m, 2H); 2,73 – 2,64 (m, 4H); 2,64 – 2,52 (m, 2H); 1,98 – 1,84 (m, 4H); 1,76 – 1,58 (m, 4H); 1,56 – 1,19 (m, 12H); RMN de ¹³C (CDCl₃, 75 MHz) δ 158,6; 158,7; 150,9; 151,0; 147,6; 128,9; 128,4; 123,8; 123,0; 120,4; 116,0; 112,5; 109,9; 86,4; 85,6; 82,9; 55,2; 53,3; 50,0; 49,7; 34,2; 31,9; 30,2; 29,5; 27,4; 27,1; 26,7; 25,2; 25,0; 23,3; 23,0; HRMS-ESI: calculado $[\text{M}-\text{H}]^+$ 498,3326; encontrado 498,3327.

6.2.10.8. Híbrido tacrina(6)-galactose (**56a**)

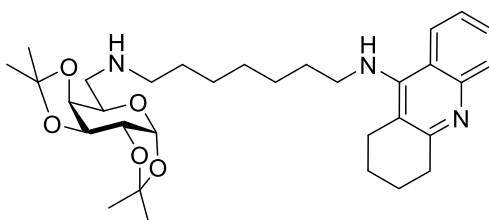


*N*¹-(6-Desoxi-1,2:3,4-di-*O*-isopropilideno-α-D-galactopirranose)-5-(*N*⁶-(1,2,3,4-tetraidroacridin-9-il)hexano-1,6-diamina)

A partir do tosilato da D-galactose **47** e a amina **1c**, de acordo com o procedimento geral, obteve-se o produto desejado **56a**. Óleo amarelo; rendimento 58% (70% com KI); $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = -26,0^\circ$ (*c* 1,09, CH₂Cl₂); IV (*KBr*) $\nu_{\text{max}}/\text{cm}^{-1}$: 3338, 2982, 2928, 2852, 1561, 1383, 1205, 1068, 993, 768, 734, 522; RMN de ¹H (CDCl₃, 300 MHz) δ 7,98 – 7,85 (m, 2H); 7,57 – 7,48 (m, 1H); 7,36 – 7,27 (m, 1H); 5,54 (d, *J* = 5,1 Hz, 1H); 4,59 (dd, *J* = 7,9, 2,3 Hz, 1H);

4,31 (dd, $J = 5,1, 2,3$ Hz, 1H); 4,17 (dd, $J = 7,9, 1,8$ Hz, 1H); 3,98 (sl, 1H); 3,96 – 3,85 (m, 1H); 3,52 – 3,37 (m, 2H); 3,05 (s, 2H); 2,95 – 2,44 (m, 6H); 1,97 – 1,81 (m, 4H); 1,71 – 1,56 (m, 2H); 1,55 – 1,21 (m, 18H); RMN de ^{13}C (CDCl_3 , 75 MHz) δ 158,2; 150,8; 147,3; 128,5; 128,3; 123,5; 122,9; 120,1; 115,7; 109,1; 108,4; 96,4; 72,0; 70,8; 70,5; 66,7; 49,6; 49,4; 49,2; 33,9; 31,7; 29,9; 27,1; 26,8; 26,1; 26,0; 24,9; 24,8; 24,3; 23,0; 22,7; HRMS-ESI: calculado $[\text{M-H}]^+$ 540,3432; encontrado 540,3435.

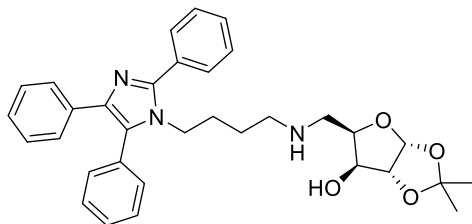
6.2.10.9. Híbrido tacrina(7)-galactose (**56b**)



N^1 -(6-Desoxi-1,2:3,4-di-*O*-isopropilideno- α -D-galactopiranoose)-5-(N^7 -(1,2,3,4-tetraidroacridin-9-il)heptano-1,7-diamina)

A partir do tosilato da D-galactose **47** e a amina **1d**, de acordo com o procedimento geral, obteve-se o produto desejado **56b**. Óleo amarelo; rendimento 34%; $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = -19,8^\circ$ (c 0,136, CH_2Cl_2); IV (KBr) $\nu_{\text{max}}/\text{cm}^{-1}$: 3355, 2928, 2848, 1555, 1499, 1361, 1201, 1064, 991, 758; RMN de ^1H (CDCl_3 , 300 MHz) δ 7,96 (t, $J = 6,0$ Hz, 2H); 7,57 (t, $J = 7,7$ Hz, 1H); 7,40 – 7,30 (m, 1H); 5,54 (d, $J = 5,0$ Hz, 1H); 4,60 (d, $J = 7,7$ Hz, 1H); 4,31 (d, $J = 5,0$ Hz, 1H); 4,19 (d, $J = 8,0$ Hz, 1H); 3,92 (d, $J = 4,6$ Hz, 1H); 3,51 (dd, $J = 12,9, 6,3$ Hz, 2H); 3,09 (s, 2H); 2,89 (dd, $J = 12,9, 8,7$ Hz, 1H); 2,81 – 2,51 (m, 5H); 2,08 – 1,83 (m, 5H); 1,75 – 1,57 (m, 2H); 1,59 – 1,22 (m, 20H); RMN de ^{13}C (CDCl_3 , 75 MHz) δ 158,0; 151,4; 146,9; 128,8; 128,2; 123,9; 123,1; 120,0; 115,5; 109,4; 108,7; 96,6; 72,2; 71,0; 70,7; 66,9; 49,8; 49,9; 49,6; 33,7; 31,9; 30,0; 29,4; 27,4; 27,0; 26,3; 26,2; 25,1; 24,8; 24,5; 23,1; 22,8; HRMS-ESI: calculado $[\text{M-H}]^+$ 554,3588; encontrado 554,3587.

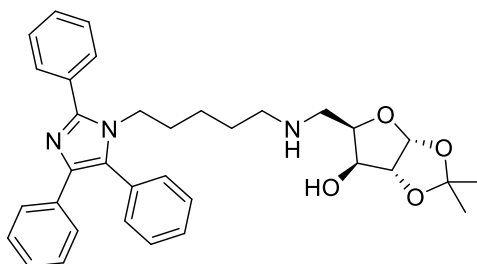
6.2.10.10. Híbrido lofina(4)-xilose (**57a**)



*N*¹-(5-Desoxi-1,2-*O*-isopropilideno- α -D-xilofuranose)-5-(*N*⁴-(2,4,5-trifenil-1*H*-imidazol-1-il)butan-1-amina)

A partir do tosilato da D-xilose **45** e a amina **9a**, de acordo com o procedimento geral, obteve-se o produto desejado **57a**. Sólido amarelo; rendimento: 45%; ponto de fusão: 67-68 °C; $[\alpha]_D^{20} = +19,0^\circ$ (*c* 0,237, CH₂Cl₂); IV (*KBr*) ν_{max}/cm^{-1} : 3059, 2983, 2937, 2853, 1434, 1372, 1213, 1161, 1069, 1001, 781, 697; RMN de ¹H (CDCl₃, 300 MHz) δ 7,70 (dd, *J* = 7,9, 1,3 Hz, 2H); 7,56 – 7,41 (m, 10H); 7,24 – 7,11 (m, 3H); 5,91 (d, *J* = 3,7 Hz, 1H); 4,46 (d, *J* = 3,6 Hz, 1H); 4,22 (d, *J* = 2,8 Hz, 1H); 4,14 (s, 1H); 3,93 (t, *J* = 7,4 Hz, 3H); 3,21 (dd, *J* = 13,0, 3,5 Hz, 1H); 2,76 (d, *J* = 12,9 Hz, 1H); 2,39 – 2,11 (m, 2H); 1,49 (s, 3H); 1,39 – 1,27 (m, 5H); 1,16 – 1,02 (m, 2H); RMN de ¹³C (CDCl₃, 75 MHz) δ 147,8; 137,9; 134,6; 131,5; 131,1; 129,6; 129,3; 129,0; 128,8; 128,1; 127,0; 126,4; 111,5; 105,1; 86,0; 78,1; 76,9; 48,6; 48,4; 44,4; 28,1; 26,9; 26,3; HRMS-ESI: calculado $[M-H]^+$ 540,2857; encontrado 540,2851.

6.2.10.11. Híbrido lofina(5)-xilose (**57b**)

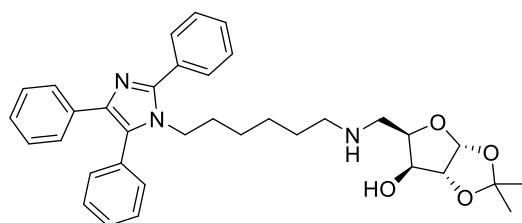


*N*¹-(5-Desoxi-1,2-*O*-isopropilideno- α -D-xilofuranose)-5-(*N*⁵-(2,4,5-trifenil-1*H*-imidazol-1-il)pentan-1-amina)

A partir do tosilato da D-xilose **45** e a amina **9b**, de acordo com o procedimento geral, obteve-se o produto desejado **57b**. Sólido amarelo; rendimento: 67%; ponto de fusão: 53-54

°C; $[\alpha]_D^{20} = -107,6^\circ$ (*c* 0,196, CH₂Cl₂); IV (*KBr*) ν_{max}/cm^{-1} : 3053, 2982, 1419, 1260, 1068, 890, 734; RMN de ¹H (CDCl₃, 300 MHz) δ 7,72 – 7,63 (m, 2H); 7,57 – 7,36 (m, 10H); 7,24 – 7,09 (m, 3H); 5,91 (d, *J* = 3,6 Hz, 1H); 4,45 (d, *J* = 3,7 Hz, 1H); 4,23 (d, *J* = 2,8 Hz, 1H); 4,15 (s, 1H); 4,06 (s, 1H); 3,88 (t, *J* = 7,5 Hz, 2H); 3,27 (dd, *J* = 12,9, 3,4 Hz, 1H); 2,81 (d, *J* = 11,9 Hz, 1H); 2,48 – 2,11 (m, 2H); 1,47 (s, 3H); 1,31 (s, 5H); 1,08 (s, 2H); 0,96 (d, *J* = 6,4 Hz, 2H); RMN de ¹³C (CDCl₃, 75 MHz) δ 147,8; 138,0; 134,7; 131,7; 131,6; 131,2; 129,7; 129,4; 129,3; 129,1; 128,9; 128,2; 127,0; 126,4; 111,6; 105,2; 86,2; 78,4; 77,0; 49,2; 48,6; 44,6; 30,2; 28,7; 27,0; 26,3; 23,8; HRMS-ESI: calculado [M-H]⁺ 554,3013; calculado 554,3012.

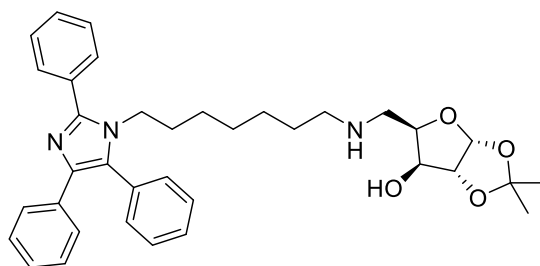
6.2.10.12. Híbrido lofina(6)-xilose (**57c**)



*N*¹-(5-Desoxi-1,2-*O*-isopropilideno- α -D-xilofuranose)-5-(*N*⁶-(2,4,5-trifenil-1*H*-imidazol-1-il)hexan-1-amina)

A partir do tosilato da D-xilose **45** e a amina **9c**, de acordo com o procedimento geral, obteve-se o produto desejado **57c**. Sólido amarelo; rendimento: 72%; ponto de fusão: 55-56 °C; $[\alpha]_D^{20} = -7,1^\circ$ (*c* 0,210, CH₂Cl₂); IV (*KBr*) ν_{max}/cm^{-1} : 3434, 2923, 2838, 1649, 1555, 1064, 998, 686; RMN de ¹H (CDCl₃, 300 MHz) δ 7,67 (d, *J* = 6,5 Hz, 2H); 7,57 – 7,35 (m, 10H); 7,14 (m, 3H); 5,92 (d, *J* = 3,5 Hz, 1H); 4,45 (d, *J* = 3,5 Hz, 1H); 4,23 (d, *J* = 2,6 Hz, 1H); 4,16 (s, 1H); 4,00 (s, 1H); 3,88 (t, *J* = 7,5 Hz, 2H); 3,28 (dd, *J* = 12,9, 3,3 Hz, 1H); 2,85 (d, *J* = 12,8 Hz, 1H); 2,81 – 2,65 (m, 1H); 2,38 (m, 2H); 1,47 (s, 3H); 1,30 (s, 5H); 1,15 (s, 2H); 0,93 (s, 4H); RMN de ¹³C (CDCl₃, 75 MHz) δ 147,7; 137,8; 134,6; 131,6; 131,5; 131,1; 129,7; 129,3; 129,1; 128,9; 128,71; 128,09; 126,91; 126,30; 111,45; 105,11; 86,08; 78,16; 77,01; 49,37; 48,54; 44,59; 30,1; 29,1; 26,9; 26,2; 26,1; 25,9; HRMS-ESI: calculado [M-H]⁺ 568,3170; encontrado 568,3164.

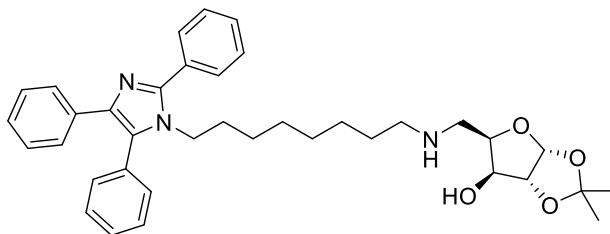
6.2.10.13. Híbrido lofina(7)-xilose (**57d**)



*N*¹-(5-Desoxi-1,2-*O*-isopropilideno- α -D-xilofuranose)-5-(*N*⁷-(2,4,5-trifenil-1*H*-imidazol-1-il)heptan-1-amina)

A partir do tosilato da D-xilose **45** e a amina **9d**, de acordo com o procedimento geral, obteve-se o produto desejado **57d**. Sólido amarelo; rendimento: 61%; ponto de fusão: 54-55 °C; $[\alpha]_D^{20} = -46,7^\circ$ (*c* 0,120, CH₂Cl₂); IV (*KBr*) ν_{max}/cm^{-1} : 3393, 3050, 2928, 2843, 1609, 1450, 1364, 1072, 1010, 981; RMN de ¹H (CDCl₃, 300 MHz) δ 7,78 – 7,64 (m, 2H); 7,64 – 7,38 (m, 10H); 7,25 – 7,08 (m, 3H); 5,94 (d, *J* = 3,7 Hz, 1H); 4,48 (d, *J* = 3,6 Hz, 1H); 4,27 (d, *J* = 2,6 Hz, 1H); 4,18 (s, 1H); 3,88 (t, 2H); 3,48 (s, 1H); 3,36 (dd, *J* = 12,8, 3,4 Hz, 1H); 2,91 (d, *J* = 12,8 Hz, 1H); 2,65 – 2,33 (m, 1H); 1,48 (s, 3H); 1,40 – 1,20 (m, 7H); 1,12 – 0,88 (m, 8H); RMN de ¹³C (CDCl₃, 75 MHz) δ 147,8; 137,8; 134,7; 131,6; 131,6; 131,1; 129,7; 129,3; 129,2; 129,0; 128,8; 128,2; 127,0; 126,4; 111,6; 105,2; 86,1; 78,3; 77,0; 49,6; 48,6; 44,7; 30,4; 29,4; 28,5; 27,0; 26,8; 26,3; 26,1; HRMS-ESI: calculado [M-H]⁺ 582,3326; encontrado 582,3329.

6.2.10.14. Híbrido lofina(8)-xilose (**57e**)

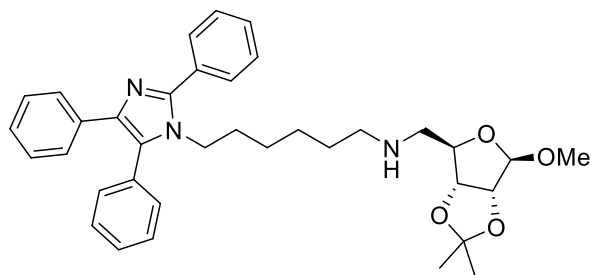


*N*¹-(5-Desoxi-1,2-*O*-isopropilideno- α -D-xilofuranose)-5-(*N*⁸-(2,4,5-trifenil-1*H*-imidazol-1-il)octan-1-amina)

A partir do tosilato da D-xilose **45** e a amina **9e**, de acordo com o procedimento geral, obteve-se o produto desejado **57e**. Óleo amarelo; rendimento: 30% (63% com KI); $[\alpha]_D^{20} =$

+38,7° (c 0,281, CH₂Cl₂); IV (KBr) ν_{max}/cm^{-1} : 3420, 3055, 2928, 2852, 1471, 1068, 1007, 768, 690; RMN de ¹H (CDCl₃, 300 MHz) δ 7,68 (dd, *J* = 8,0, 1,6 Hz, 2H); 7,55 – 7,37 (m, 10H); 7,23 – 7,07 (m, 3H); 5,94 (d, *J* = 3,7 Hz, 1H); 4,48 (d, *J* = 3,7 Hz, 1H); 4,27 (d, *J* = 2,8 Hz, 1H); 4,23 – 4,10 (m, 2H); 3,90 – 3,81 (m, 2H); 3,36 (dd, *J* = 13,0, 3,5 Hz, 1H); 2,93 (d, *J* = 11,8 Hz, 1H); 2,65 – 2,38 (m, 2H); 1,54 – 0,79 (m, 15H); RMN de ¹³C (CDCl₃, 75 MHz) δ 147,6; 137,7; 134,5; 131,5; 131,6; 131,0; 129,6; 129,2; 129,0; 128,8; 128,6; 128,0; 126,8; 126,2; 111,4; 105,0; 86,0; 78,1; 76,9; 49,5; 48,4; 44,6; 30,2; 29,7; 29,3; 28,9; 28,4; 26,8; 26,1; 26,0; HRMS-ESI: calculado [M-H]⁺ 596,3483; calculado 596,3481.

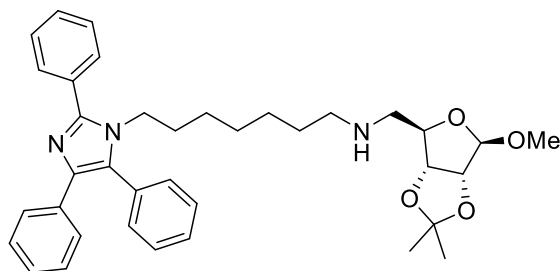
6.2.10.15. Híbrido lofina(6)-ribose (**58a**)



*N*¹-(1-Metil-5-desoxi-2,3-*O*-isopropilideno- β -D-ribofuranosídeo)-5-(*N*⁶-(2,4,5-trifenil-1*H*-imidazol-1-il)hexan-1-amina)

A partir do tosilato da D-ribose **46** e a amina **9c**, de acordo com o procedimento geral, obteve-se o produto desejado **58a**. Óleo amarelo; rendimento: 45%; [α]_D²⁰ = -88,4° (c 0,301, CH₂Cl₂); IV (KBr) ν_{max}/cm^{-1} : 3417, 2928, 2843, 1561, 1108, 693; RMN de ¹H (CDCl₃, 300 MHz) δ 7,69 (dd, *J* = 7,9, 1,6 Hz, 2H); 7,56 – 7,39 (m, 10H); 7,24 – 7,10 (m, 3H); 4,95 (s, 1H); 4,58 (dd, *J* = 11,8, 6,1 Hz, 2H); 4,27 (t, *J* = 6,9 Hz, 1H); 3,95 – 3,82 (m, 2H); 3,31 (s, 3H); 2,66 (dd, *J* = 10,9, 9,0 Hz, 2H); 2,50 – 2,38 (m, 2H); 1,62 (sl, 3H); 1,48 (s, 3H); 1,40 – 1,18 (m, 5H); 1,05 – 0,90 (m, 4H); RMN de ¹³C (CDCl₃, 75 MHz) δ 147,8; 137,9; 134,7; 131,7; 131,8; 131,2; 129,7; 129,3; 129,2; 129,0; 128,8; 128,2; 127,0; 126,3; 112,4; 109,8; 86,3; 85,5; 82,9; 55,2; 53,1; 49,6; 44,8; 30,5; 29,8; 26,6; 26,5; 26,2; 25,1; HRMS-ESI: calculado [M-H]⁺ 582,3326; encontrado 582,3327.

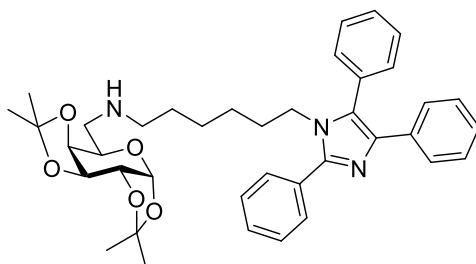
6.2.10.16. Híbrido lofina(7)-ribose (**58b**)



*N*¹-(1-Metil-5-desoxi-2,3-*O*-isopropilideno-β-D-ribofuranosídeo)-5-(*N*⁷-(2,4,5-trifenil-1*H*-imidazol-1-il)heptan-1-amina)

A partir do tosilato da D-ribose **46** e a amina **9d**, de acordo com o procedimento geral, obteve-se o produto desejado **58b**. Óleo amarelo; rendimento: 69%; $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = -10,3^{\circ}$ (*c* 0,340, CH₂Cl₂); IV (*KBr*) $\nu_{\text{max}}/\text{cm}^{-1}$: 3417, 2928, 2843, 1561, 1108, 693; RMN de ¹H (CDCl₃, 300 MHz) δ 7,69 (dd, *J* = 8,0, 1,5 Hz, 2H); 7,56 – 7,38 (m, 10H); 7,23 – 7,07 (m, 3H); 4,95 (s, 1H); 4,65 – 4,53 (m, 2H); 4,28 (t, *J* = 6,9 Hz, 1H); 3,88 (t, 2H); 3,32 (s, 3H); 2,66 (d, *J* = 7,4 Hz, 2H); 2,56 – 2,44 (m, 2H); 1,55 (s, 3H); 1,48 (s, 3H); 1,31 (m, 5H); 1,01 (m, 6H); RMN de ¹³C (CDCl₃, 75 MHz) δ 147,7; 137,8; 134,7; 131,7; 131,6; 131,1; 129,7; 129,3; 129,1; 128,9; 128,7; 128,7; 128,1; 126,9; 126,3; 112,4; 109,8; 86,3; 85,5; 82,8; 55,2; 53,1; 49,8; 44,7; 30,4; 29,9; 28,6; 26,9; 26,6; 26,2; 25,1; HRMS-ESI: calculado [M-H]⁺ 596,3483; encontrado 596,3481.

6.2.10.17. Híbrido lofina(6)-galactose (**59a**)

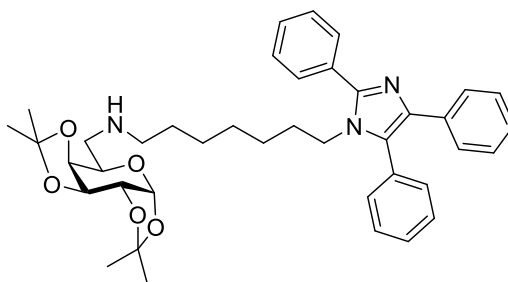


*N*¹-(6-Desoxi-1,2:3,4-di-*O*-isopropilideno-α-D-galactopiranosose)-5-(*N*⁶-(2,4,5-trifenil-1*H*-imidazol-1-il)hexan-1-amina)

A partir do tosilato da D-galactose **47** e a amina **9c**, de acordo com o procedimento geral, obteve-se o produto desejado **59a**. Óleo amarelo; rendimento: 64%; $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = -6,33^{\circ}$ (*c*

0,300, CH₂Cl₂); IV (*KBr*) ν_{max}/cm^{-1} : 3427, 2980, 2923, 2855, 1377, 1202, 1066, 687; RMN de ¹H (CDCl₃, 300 MHz) δ 7,68 (d, *J* = 6,6 Hz, 2H); 7,47 (m, 10H); 7,23 – 7,06 (m, 3H); 5,53 (d, *J* = 5,0 Hz, 1H); 4,58 (dd, *J* = 7,9, 1,9 Hz, 1H); 4,30 (dd, *J* = 4,9, 2,1 Hz, 1H); 4,16 (d, *J* = 7,9 Hz, 1H); 3,95 – 3,80 (m, 3H); 2,90 – 2,76 (m, 1H); 2,69 (dd, *J* = 12,5, 3,9 Hz, 1H); 2,56 – 2,30 (m, 2H); 1,93 (sl, 1H); 1,51 (s, 3H); 1,44 (s, 3H); 1,42 – 1,15 (m, 10H); 0,96 (m, 4H); RMN de ¹³C (CDCl₃, 75 MHz) δ 147,7; 137,7; 134,7; 131,6; 131,6; 131,1; 129,7; 129,3; 129,1; 128,9; 128,8; 128,7; 128,1; 126,9; 126,3; 109,2; 108,5; 96,4; 72,1; 70,9; 70,6; 66,8; 49,8; 49,7; 44,7; 30,3; 29,6; 26,4; 26,3; 26,2; 26,1; 25,0; 24,4; HRMS-ESI: calculado [M-H]⁺ 638,3588; encontrado 638,3585.

6.2.10.18. Híbrido lofina(7)-galactose (**59b**)



*N*¹-(6-Desoxi-1,2:3,4-di-*O*-isopropilideno- α -D-galactopiranoze)-5-(*N*⁷-(2,4,5-trifenil-1*H*-imidazol-1-il)heptan-1-amina)

A partir do tosilato da D-galactose **47** e a amina **9d**, de acordo com o procedimento geral, obteve-se o produto desejado **59b**. Óleo amarelo; rendimento: 70%; [α]_D²⁰ = +17,0° (*c* 0,206, CH₂Cl₂); IV (*KBr*) ν_{max}/cm^{-1} : 3429, 2917, 2843, 1646, 1060, 694; RMN de ¹H (CDCl₃, 300 MHz) δ 7,73 – 7,65 (m, 2H); 7,59 – 7,38 (m, 10H); 7,24 – 7,07 (m, 3H); 5,54 (d, *J* = 5,0 Hz, 1H); 4,59 (dd, *J* = 7,9, 2,1 Hz, 1H); 4,31 (dd, *J* = 5,0, 2,2 Hz, 1H); 4,18 (d, *J* = 7,9 Hz, 1H); 4,00 – 3,79 (m, 3H); 2,95 – 2,67 (m, 2H); 2,64 – 2,38 (m, 2H); 1,97 (sl, 1H); 1,63 – 1,24 (m, 18H); 1,18 – 0,87 (d, *J* = 30,3 Hz, 4H); RMN de ¹³C (CDCl₃, 75 MHz) δ 147,8; 137,8; 134,8; 131,7; 131,6; 131,2; 129,8; 129,3; 129,2; 129,0; 128,8; 128,2; 127,0; 126,3; 109,3; 108,7; 96,5; 72,2; 71,0; 70,7; 66,8; 49,9; 44,8; 30,4; 29,9; 28,7; 27,0; 26,3; 26,2; 25,1; 24,5; HRMS-ESI: calculado [M-H]⁺ 652,3745; encontrado 652,3737.

6.3. ANÁLISE DE INIBIÇÃO DAS COLINESTERASES

A determinação da atividade anti-AChE no cérebro e anti-BuChE em soro, ambos de camundongo, foi determinada utilizando o método de Ellman (1961) modificado.²²⁰ Para os estudos *in vitro*, camundongos *Swiss Webster* foram tratados e os experimentos conduzidos de acordo com Comissão de Ética no Uso de Animais do Instituto Oswaldo Cruz (CEUA-IOC), licença nº L-044/15 e licença aditiva nº LA-010/2016. Os extratos cerebrais foram homogeneizados em 5 mL de água destilada e o homogeneizado foi centrifugado a 20000g por 60 minutos a 4 °C. Após a centrifugação, as pastilhas resultantes foram resuspendidas em 2 mL de solução do surfactante Triton X-100 1% e homogeneizados e mantidos sob agitação por 30 minutos. Então, a fração foi novamente centrifugada a 20000g por 90 minutos. Os sobrenadantes foram reunidos e foi adicionado 0,02% de NaN₃ para conservação. As amostras do soro foram preparadas a partir de amostras do sangue dos camundongos, coletados e centrifugados em tubos de plástico a 2000g por 10 minutos a 20 °C. O sobrenadante contendo o soro foi mantido em gelo durante os experimentos.

O extrato cerebral e o soro sanguíneo foram adicionados em uma placa de 96 poços contendo tampão fosfato de sódio (0,1 M e pH 7,5) e o composto sintético a ser analisado, exceto para os grupos controles. Os compostos foram solubilizados inicialmente em DMSO e posteriormente diluídos em água Milli-Q®. Os testes de inibição da atividade enzimática foram realizados num intervalo de concentração entre 0,01 e 10000 nM. Posteriormente foi adicionado DTNB (ácido 5,5'-ditio-bis-(2-nitrobenzóico)) na concentração de 0,32 mM. Os meios reacionais permaneceram incubando a 25°C por 10 minutos. Os ensaios foram iniciados pela adição dos substratos, iodeto de acetiltiocolina ou iodeto de butiriltiocolina na concentração de 1,5 mM, sendo realizada uma nova incubação por 10 minutos a 25°C. Terminado o tempo de incubação, a densidade ótica dos meios reacionais foi medida a 412 nm, em um espectrofotômetro compatível com microplacas. Os poços referentes aos brancos (sem atividade enzimática) não tiveram adição das frações biológicas. Os dados foram tratados utilizando o programa GraphPad Prism versão 6.0 (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA).

6.4. ESTUDOS DE MODELAGEM MOLECULAR

Os estudos de *ensemble docking* foram realizados com o programas de *docking* molecular GOLD, utilizando a função de avaliação padrão ChemPLP e eficiência do algoritmo genético de 200% - configuração mais indicada para compostos altamente flexíveis. A seleção do melhor modo de ligação para cada inibidor foi feita de acordo com o valor *ChemPLP Fitness*. O centro do sítio de ligação teve como coordenadas X = 98,06; Y = 53,14 e Z = 22,06, com raio de 14 Å. A afinidade de ligação reportada para o melhor modo de ligação de cada composto foi predita com a função de avaliação DockTScore, recentemente desenvolvida pelo grupo de pesquisa GMMSB/LNCC. Estudos de *redocking* dos compostos de referência foram realizados para validar a metodologia adotada neste trabalho.

As estruturas tridimensionais dos compostos foram desenhadas utilizando o programa ChemBio3D Ultra 14 Suite (PerkinElmer, Waltham, MA, USA, 2014) e os isômeros e estados de protonação foram definidos manualmente no programa Maestro (Maestro, Schrödinger, LLC, New York, NY, 2014). As estruturas da AChE e da BuChE foram obtidas a partir de um trabalho publicado pelo nosso grupo de pesquisa em 2016,¹⁶ os quais foram preparados com a ferramenta de preparação de proteínas Protein Preparation Wizard (Schrödinger Suite 2014-1 Protein Preparation Wizard; Impact version 6.2, Schrödinger, LLC, New York, NY, USA, 2014). Os estados de protonação dos resíduos de aminoácidos foram preditos utilizando PROPKA com pH = 7, respeitando os estados de protonação dos resíduos do sítio ativo já descritos a literatura: Glu202 e Glu327 carregados negativamente e His440 neutra. O nitrogênio pirimidínico da tacrina foi predito protonado de acordo com a previsão Epik.²²¹ Essa protonação é essencial uma vez que atua como DLH para o oxigênio carbonílico da cadeia peptídica da His440. A otimização da rede de LH entre a enzima e o inibidor foi realizada de forma a ajustar a orientação dos átomos de hidrogênio, seguida por minimização de energia.

Apêndice

APÊNDICE A - Estrutura dos Aminoácidos

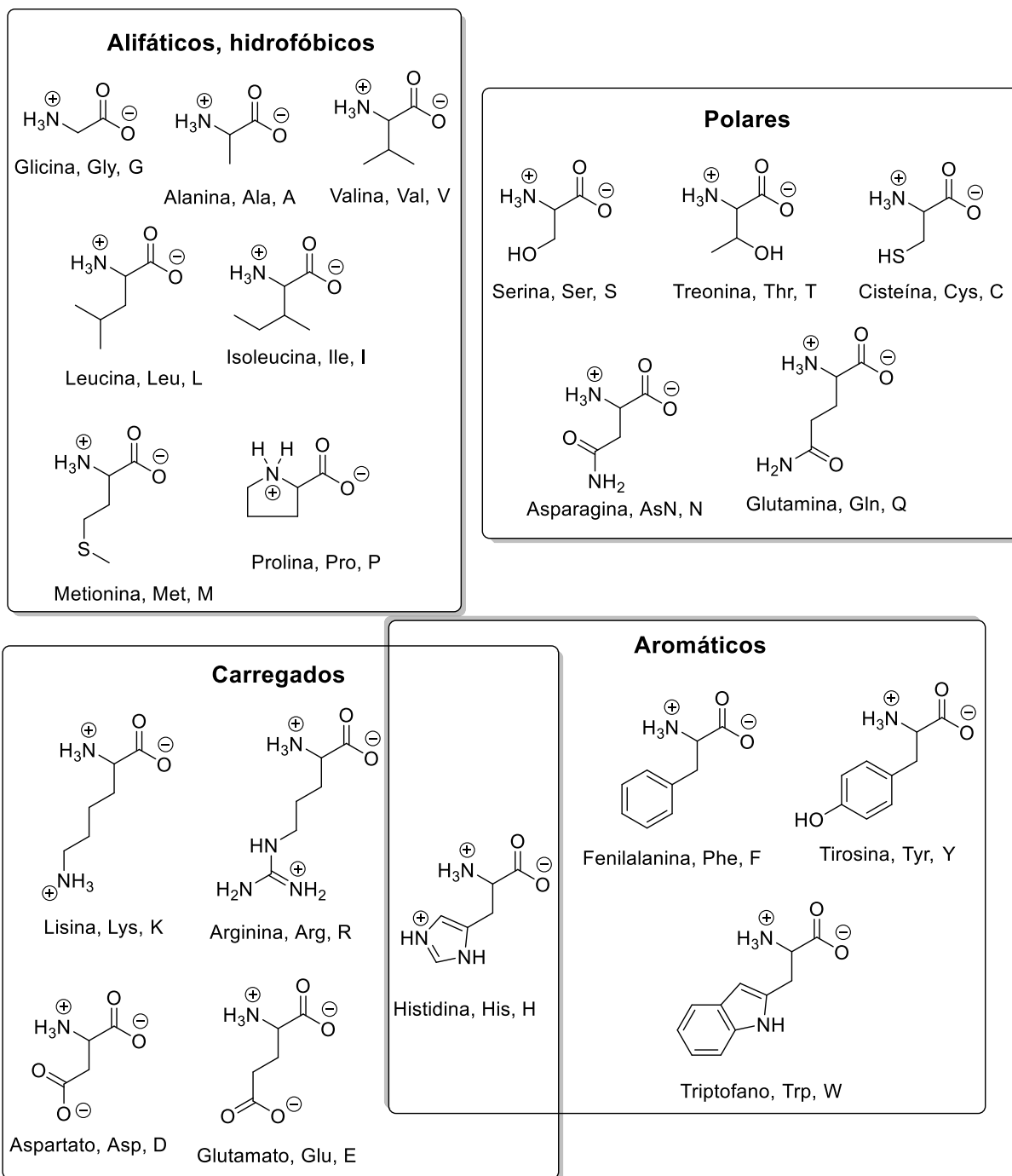


Figura A1. Estrutura dos aminoácidos mais comuns em proteínas e enzimas, agrupados de acordo com a característica da cadeia lateral. Estados de protonação em pH = 7,0.

APÊNDICE B - Modelagem Molecular

Experimentos de *redocking* foram realizados para as enzimas AChE e BuChE em diferentes estruturas do PDB para validar o protocolo de docking utilizado neste trabalho, isto é, o programa GOLD com a função de escore ChemPLP. Em todos os quatro complexos (três da AChE e uma da BuChE), a metodologia de *docking* utilizada nesse trabalho foi capaz de prever a posição de menor energia próxima à conformação experimental observada para o inibidor de referência, presente em cada estrutura cristalográfica (Figura B1), mesmo para os compostos altamente flexíveis. Em geral, os estudos de docking são considerados como bem sucedidos quanto o desvio quadrático médio (*Root-mean-square deviation*, RMSD) entre o composto analisado e a sua conformação de referência é menor que 2 Å.

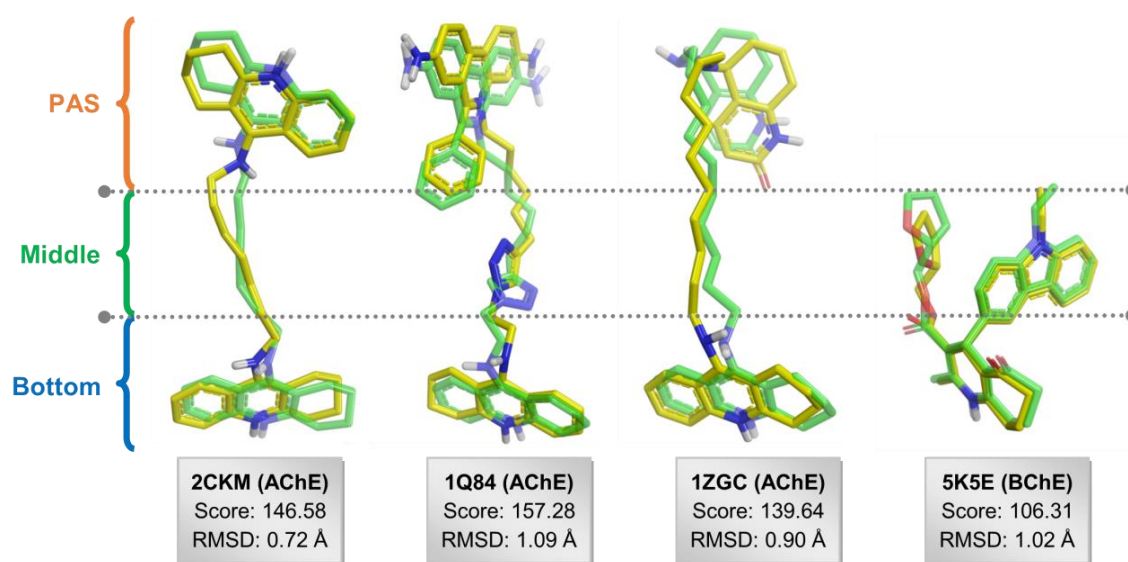


Figura B1. Posição de menor energia prevista pelo GOLD:ChemPLP para cada estrutura do PDB estudada. O modo de ligação previsto está representado em amarelo e o experimental catalogado no PDB, em verde.

Na Tabela B1 a seguir são mostrados, juntamente com os valores de IC_{50} , os escores *docking* previstos pela função ChemPLP do programa GOLD para os híbridos tacrina-carboidratos.

Tabela B1. Atividade anticolinesterase e modos de ligação previstos para os híbridos tacrina-carboidratos para as estruturas de AChE.

Entrada	Composto	IC ₅₀ (nM) [intervalo de confiança]		Docking Score		
		AChE	BuChE	1ZGC	2CKM	1Q84
1	54a	8,70 [7,30 – 10,5]	27,6 [19,3 - 39,7]	118,31	114,10	112,40
2	54b	84,4 [63,6 – 113,3]	11,7 [8,70 - 15,9]	121,77	121,06	119,96
3	54c	5,10 [3,60 – 7,60]	25,8 [18,5 - 36,0]	120,60	119,56	118,00
4	54d	10,2 [7,20 – 14,5]	30,8 [20,4 - 46,6]	125,38	119,43	121,96
5	54e	2,20 [1,80 – 2,70]	4,93 [40,0 - 60,8]	131,44	120,27	121,87
6	55a	89,9 [62,4 – 131]	36,9 [21,8 - 62,5]	125,11	120,24	118,47
7	55b	65,5 [45,2 – 93,7]	64,3 [50,2 - 82,5]	129,19	121,77	119,57
8	56a	4,80 [3,20 – 7,40]	36,7 [22,9 - 58,7]	131,93	119,24	115,38
9	56b	7,60 [5,60 - 10,3]	26,2 [19,1 - 36,1]	131,17	119,57	119,97
10	Tacrina	34,3 [14,9 – 108]	62,5 [44,0 - 89,0]	-	-	
11	Bis(7)tacrina	1,90 [1,50 – 2,40]	9,07 [6,58 - 12,5]	-	-	

O híbrido lofina(6)-D-galactose (**59a**) não apresentou atividade *in vitro* contra a enzima acetilcolinesterase (AChE), entretanto o resultado de docking previu a interação de **59a** no sítio ativo da AChE. De acordo com o modo de ligação mais favorável, o núcleo lofina interagiria no CAS, através de interações *stacking*, enquanto que o núcleo D-galactose ficaria exposto ao solvente (Figura B2). Provavelmente o modo de ligação predito não é viável experimentalmente devido à dificuldade estérica associada a presença de resíduos volumosos no meio da cavidade, impedindo ou dificultando a passagem do grupo lofina até o fundo da cavidade da AChE como predito pelos estudos de *docking*.

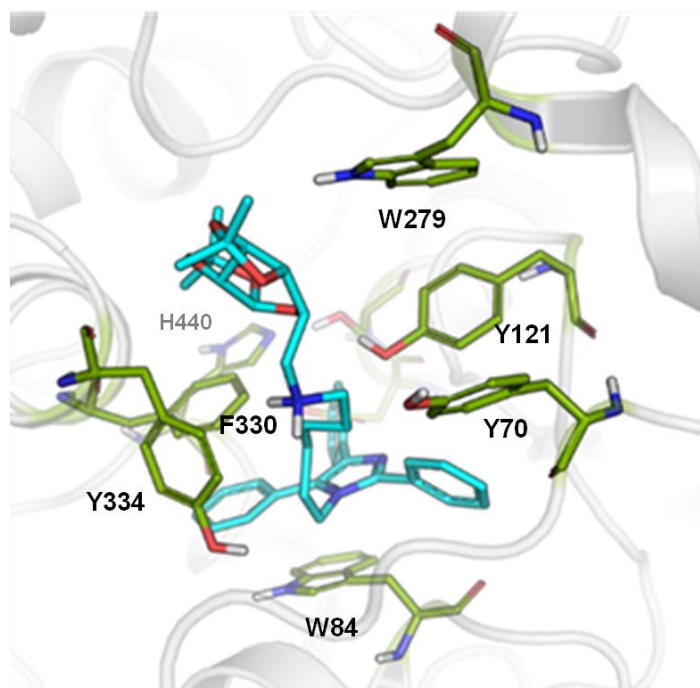
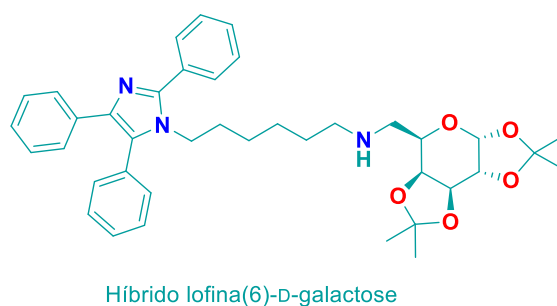


Figura B2. Resultado de docking do híbrido lofina(6)-D-galactose (**59a**) na *TcAChE*, composto que não apresentou atividade *in vitro* contra essa enzima.

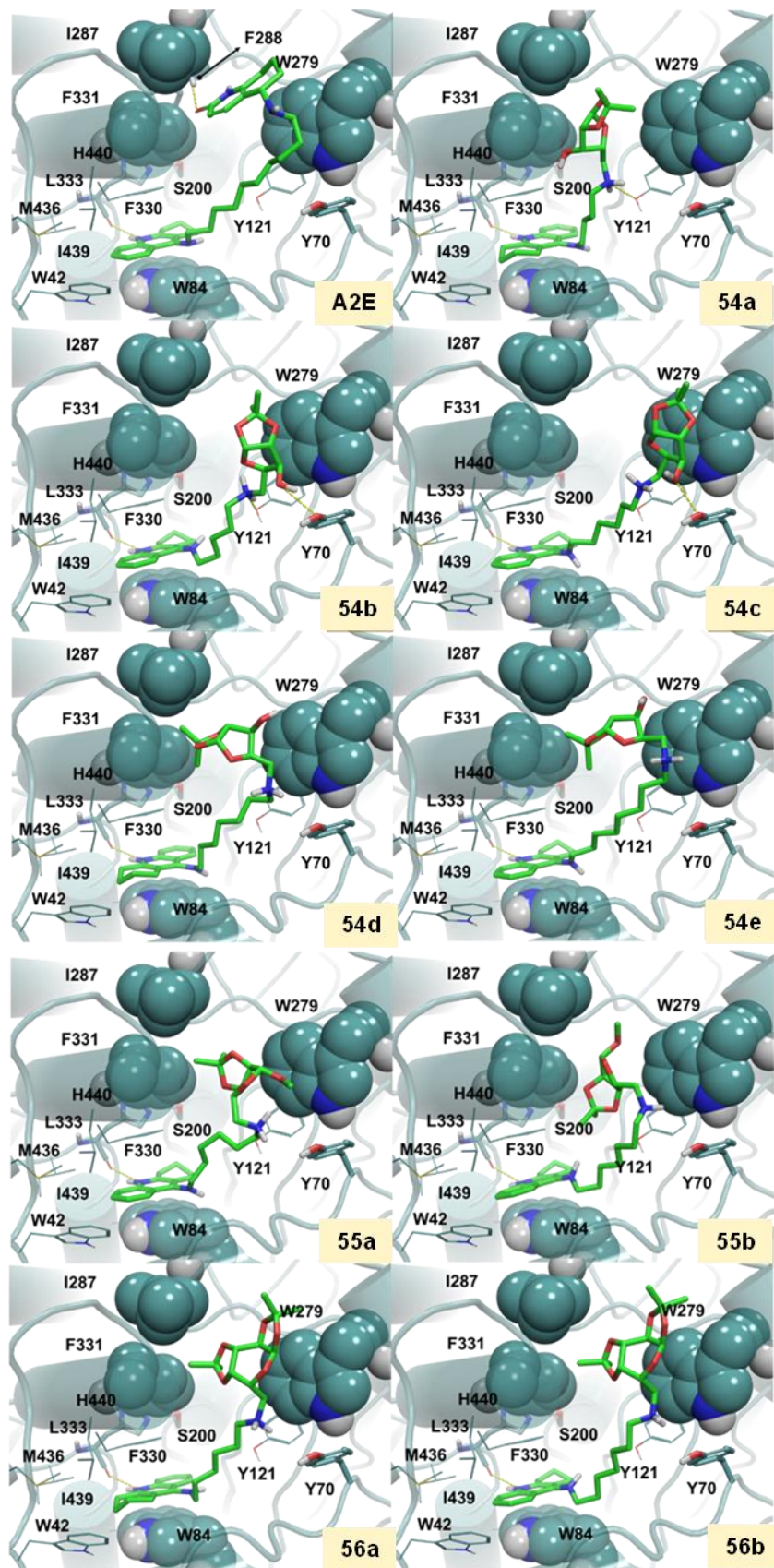


Figura B3. Resultados de *docking* do composto de referência (híbrido tacrina(10)-hupiridona, A2E) e dos híbridos tacrina-carboidratos sintetizados neste trabalho. LH possíveis estão representadas por linhas pontilhadas amarelas.

APÊNDICE C - Espectros de RMN dos Compostos Sintetizados

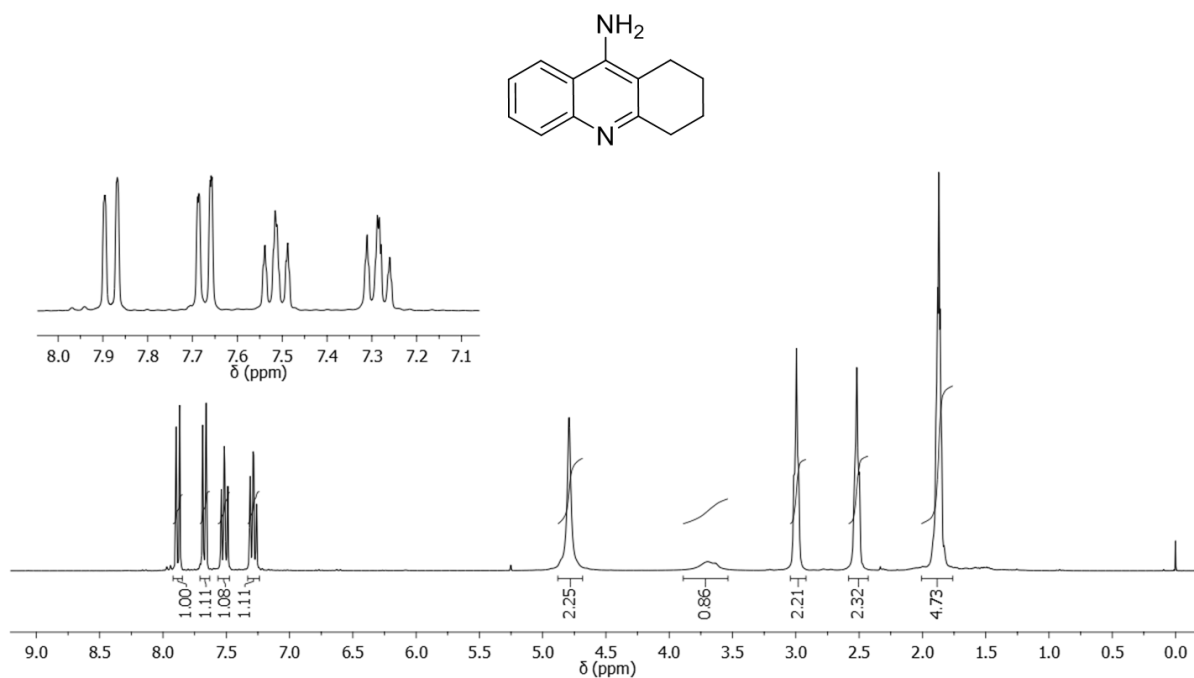


Figura C1. Espectro de RMN de ¹H (CDCl₃, 300 MHz) da **tacrina**.

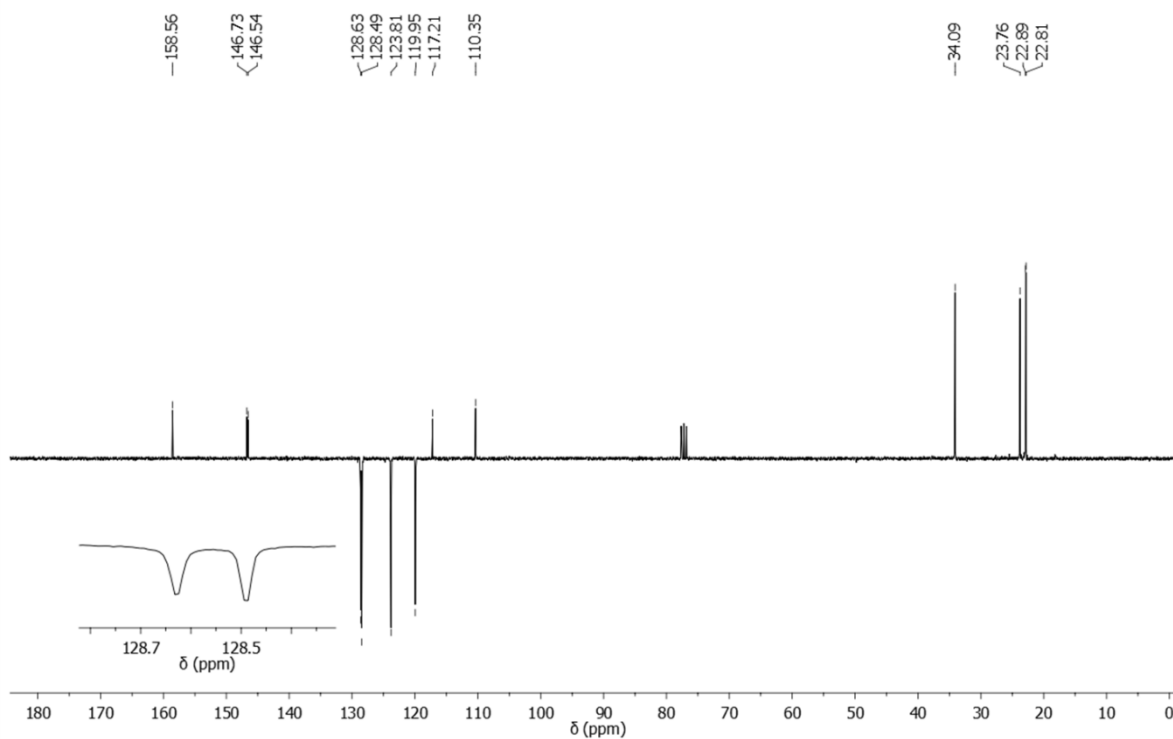


Figura C2. Espectro de RMN de ¹³C (APT, CDCl₃, 75 MHz) da **tacrina**.

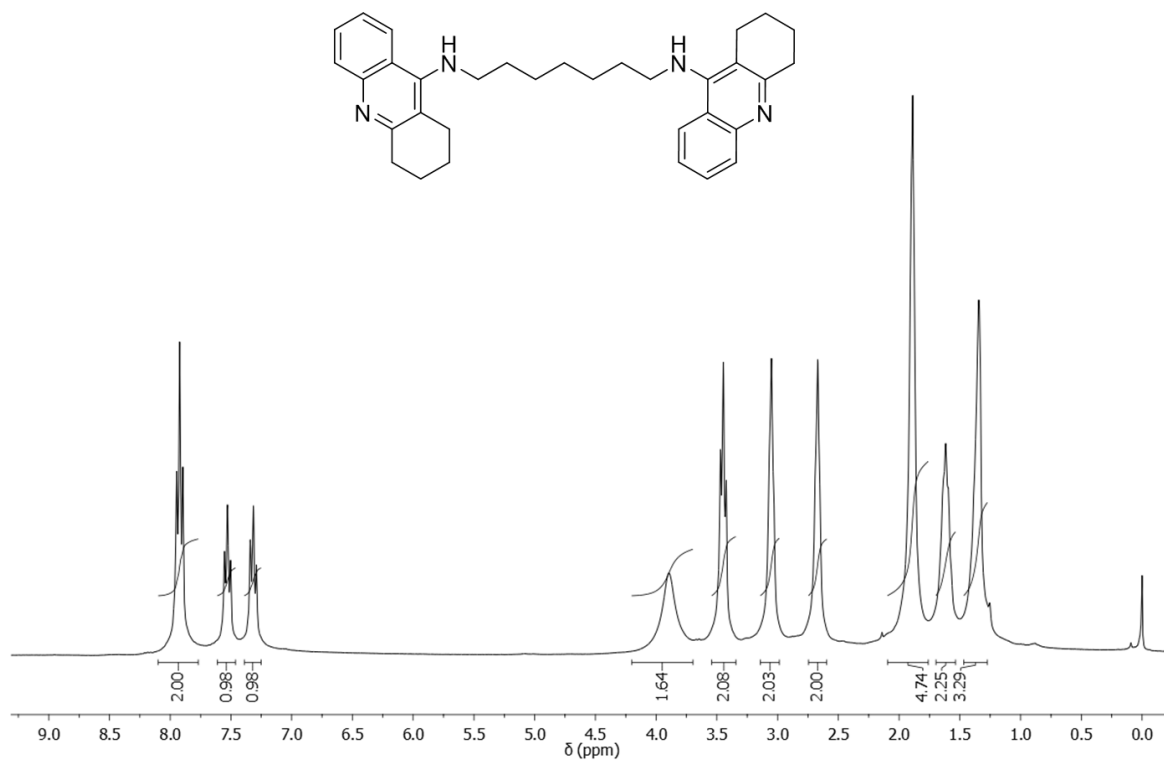


Figura C3. Espectro de RMN de ¹H (CDCl₃, 300 MHz) do bis(7)-tacrina.

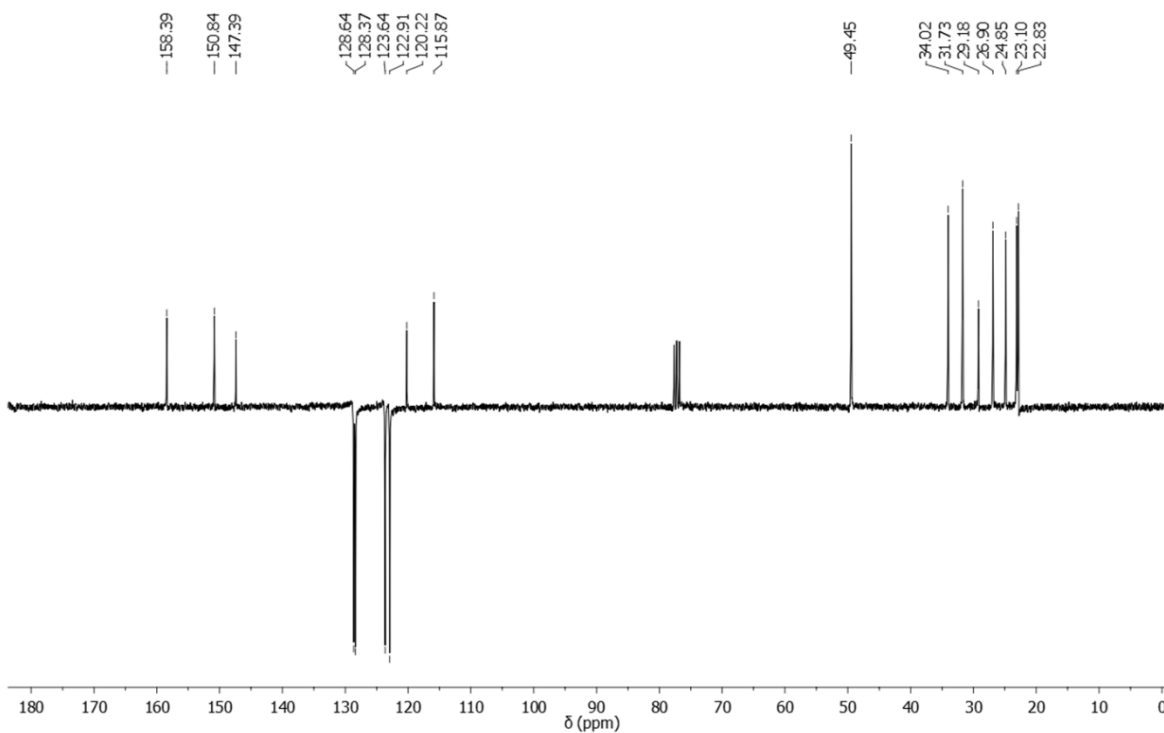


Figura C4. Espectro de RMN de ¹³C (APT, CDCl₃, 75 MHz) do bis(7)-tacrina.

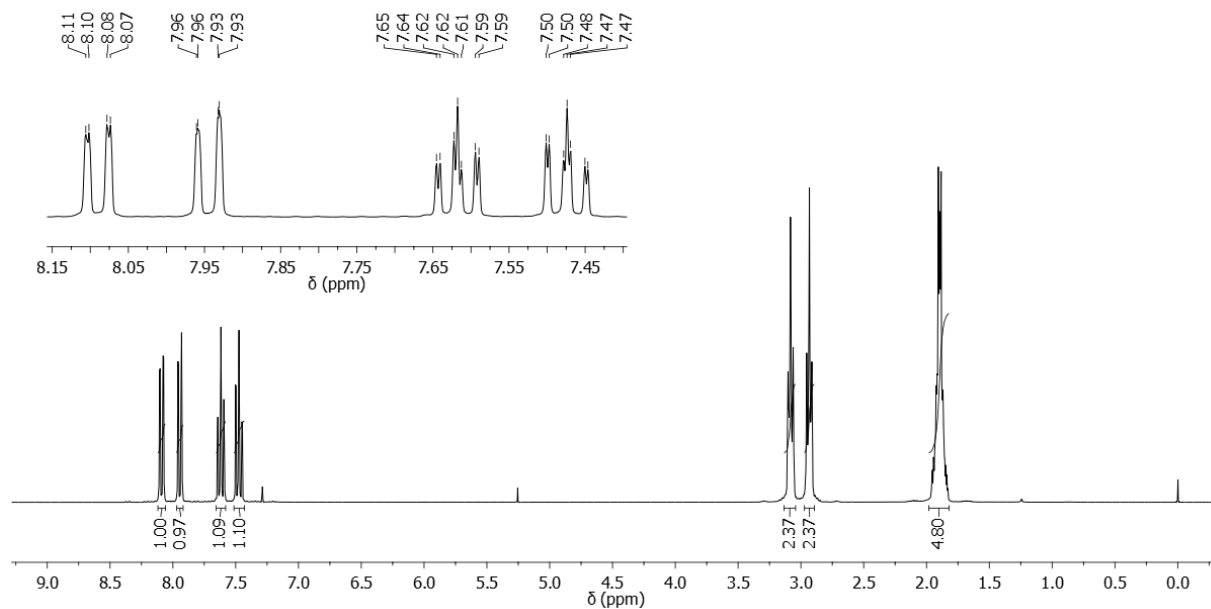
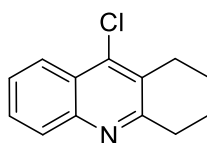


Figura C5. Espectro de RMN de ^1H (CDCl_3 , 300 MHz) da 9-cloro-1,2,3,4-tetraidroacridina (**5**).

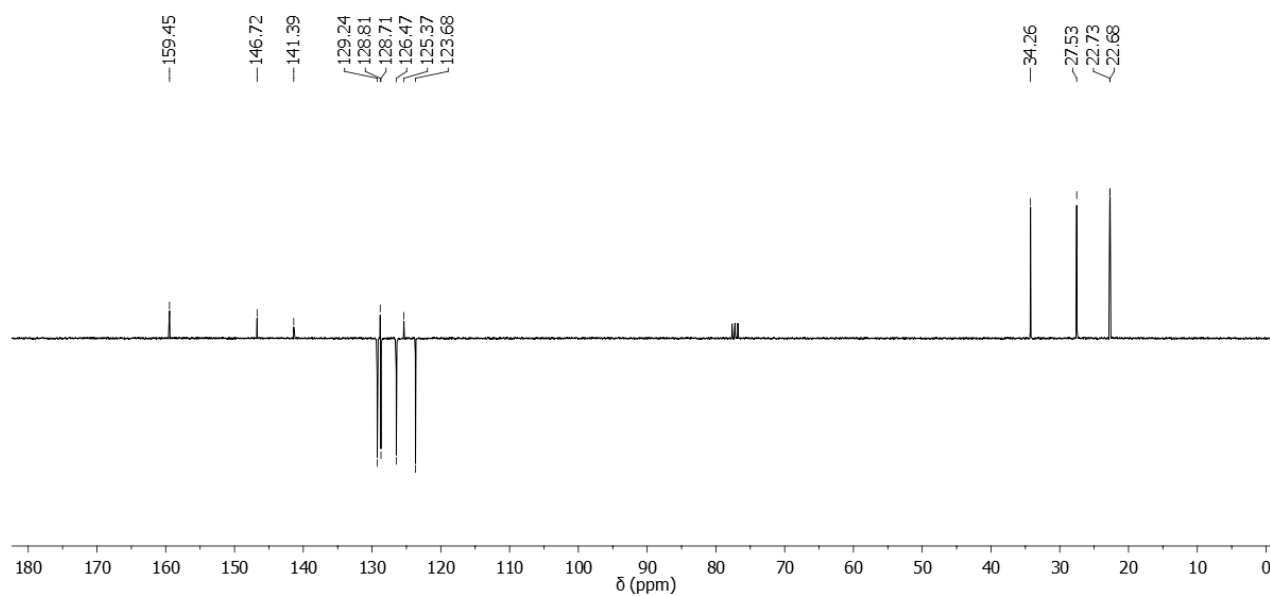


Figura C6. Espectro de RMN de ^{13}C (APT, CDCl_3 , 75 MHz) da 9-cloro-1,2,3,4-tetraidroacridina (**5**).

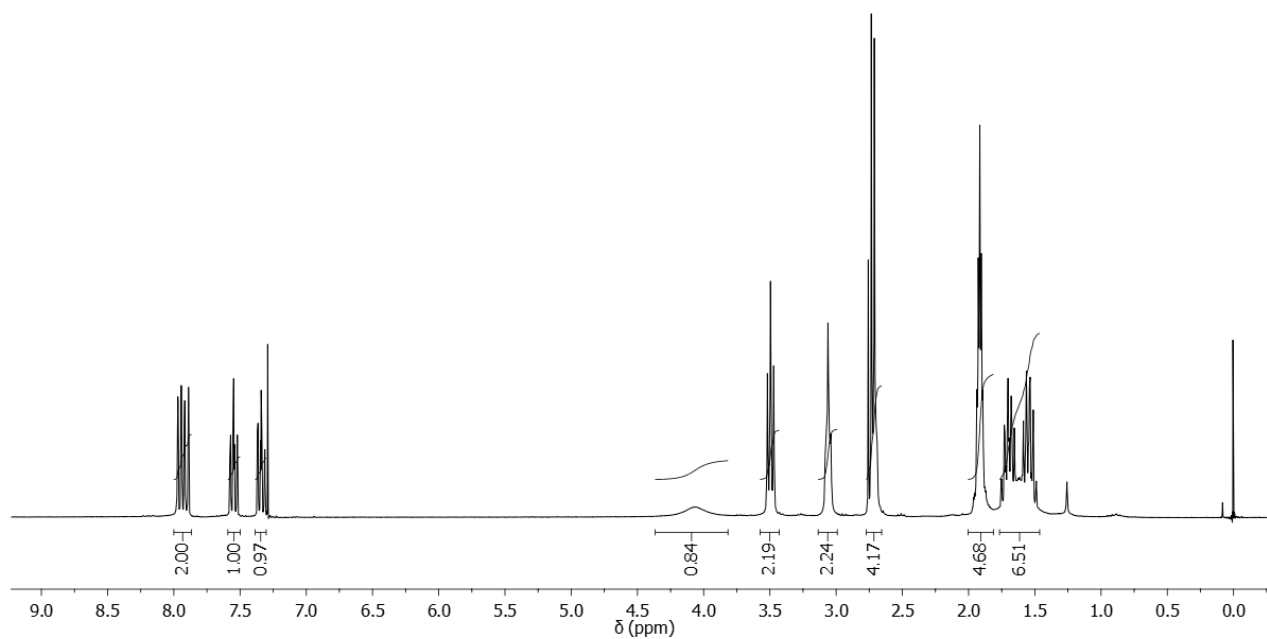
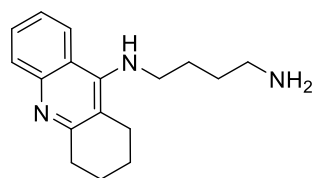


Figura C7. Espectro de RMN de ^1H (CDCl_3 , 300 MHz) da amina **1a**.

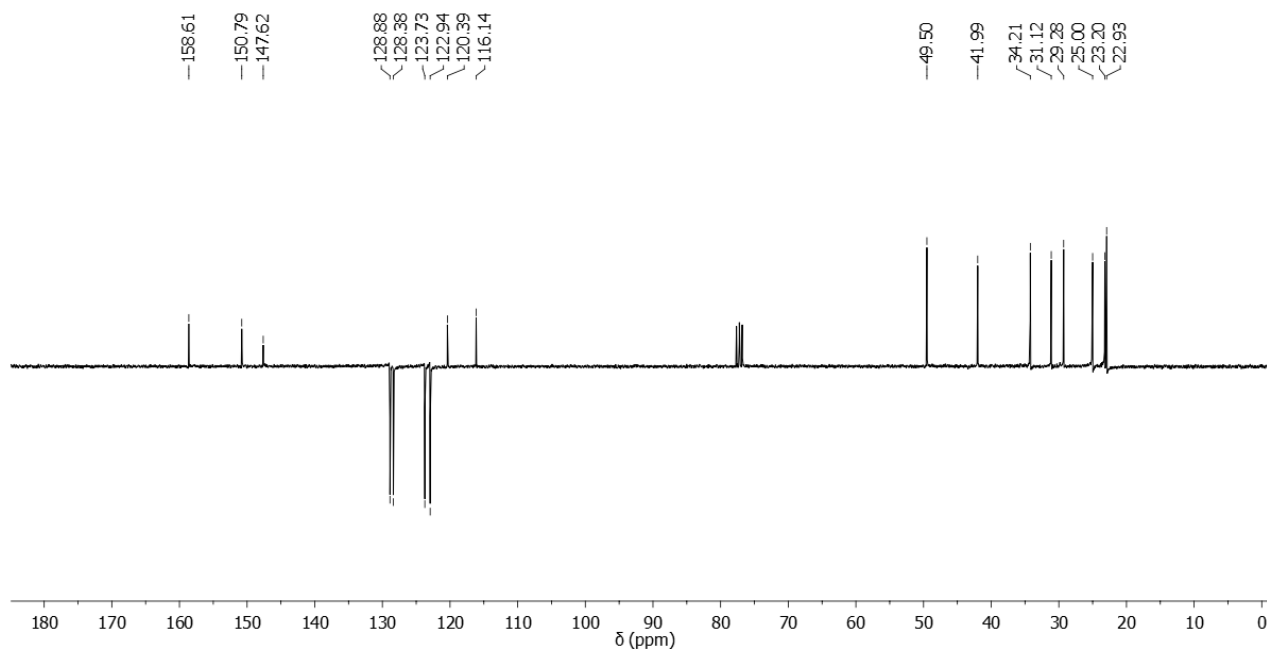


Figura C8. Espectro de RMN de ^{13}C (APT, CDCl_3 , 75 MHz) da amina **1a**.

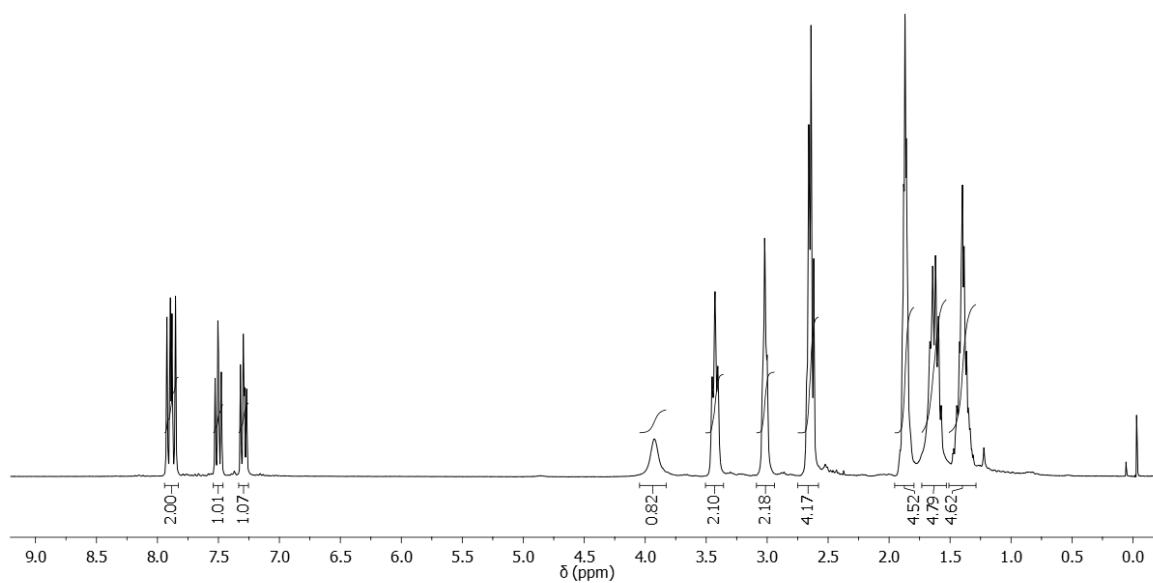
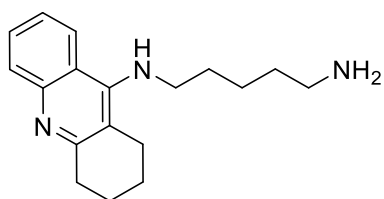


Figura C9. Espectro de RMN de ^1H (CDCl_3 , 300 MHz) da amina **1b**.

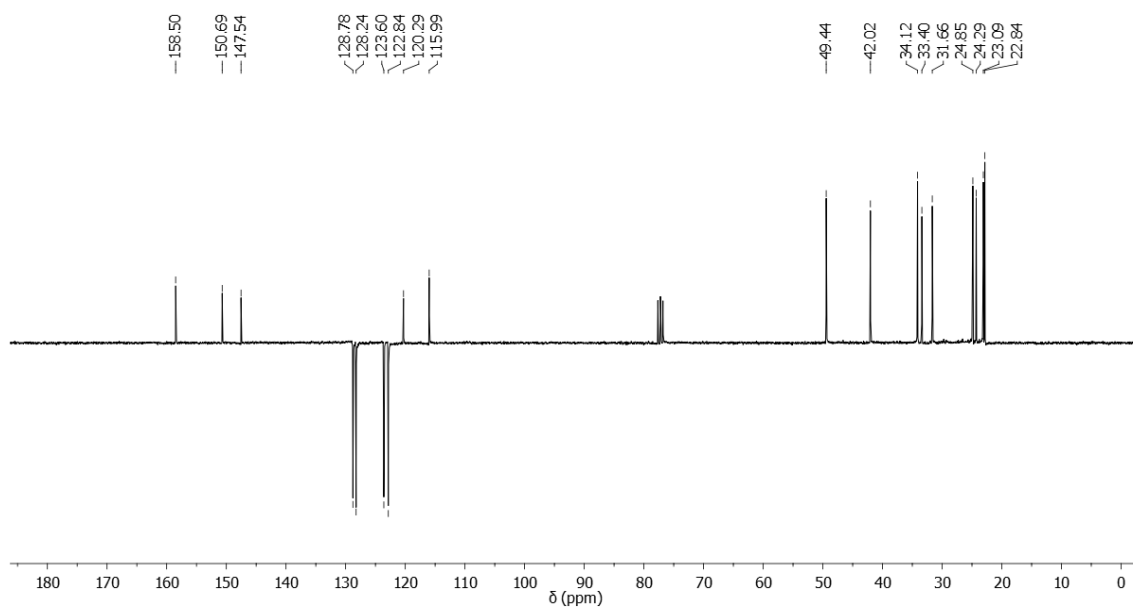


Figura C10. Espectro de RMN de ^{13}C (APT, CDCl_3 , 75 MHz) da amina **1b**.

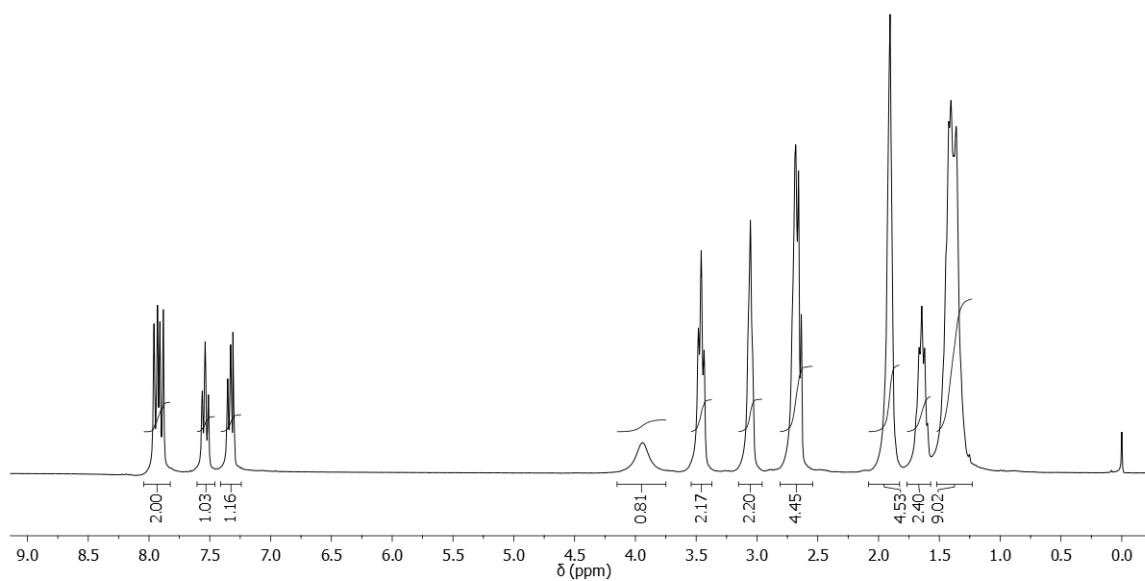
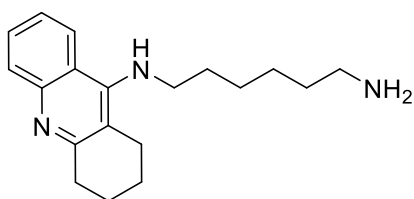


Figura C11. Espectro de RMN de ^1H (CDCl_3 , 300 MHz) da amina **1c**.

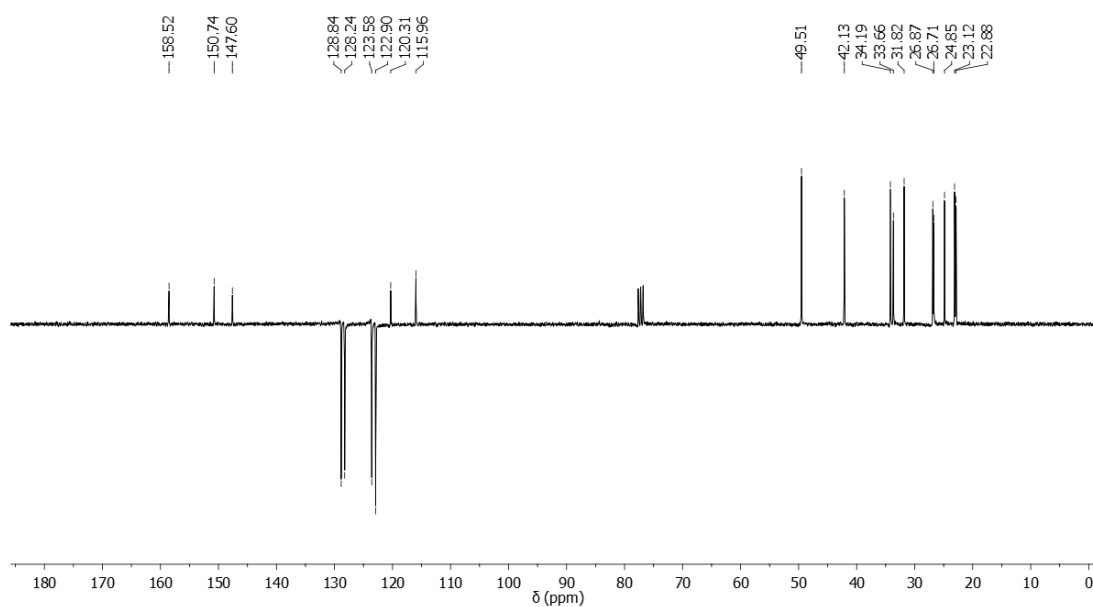


Figura C12. Espectro de RMN de ^{13}C (APT, CDCl_3 , 75 MHz) da amina **1c**.

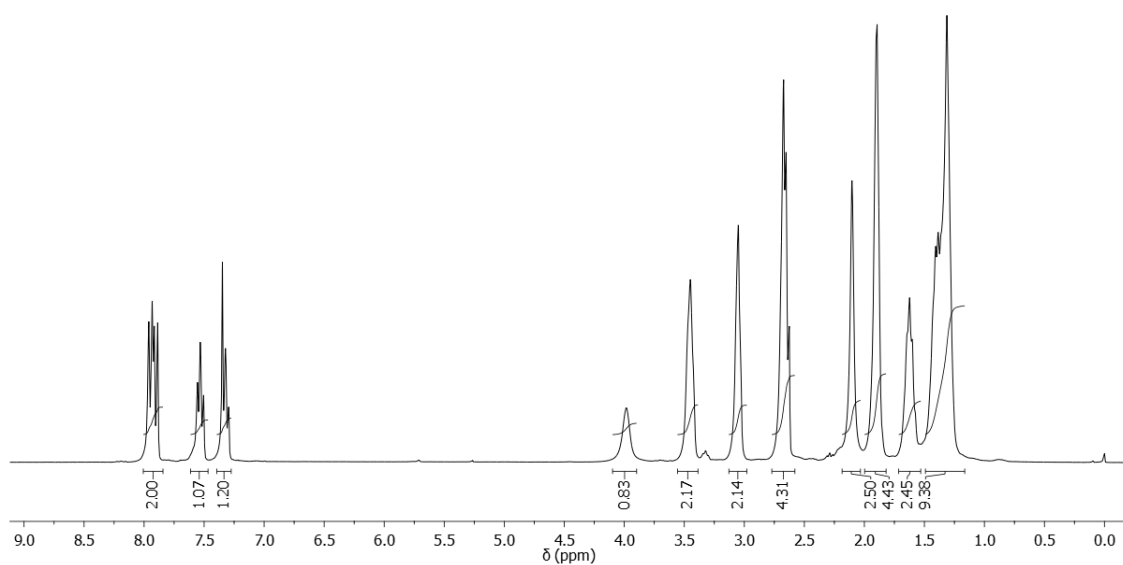
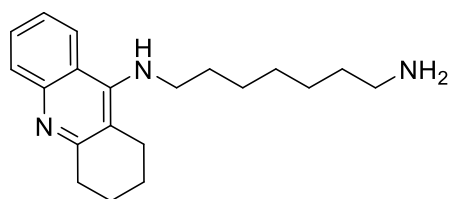


Figura C13. Espectro de RMN de ^1H (CDCl_3 , 300 MHz) da amina **1d**.

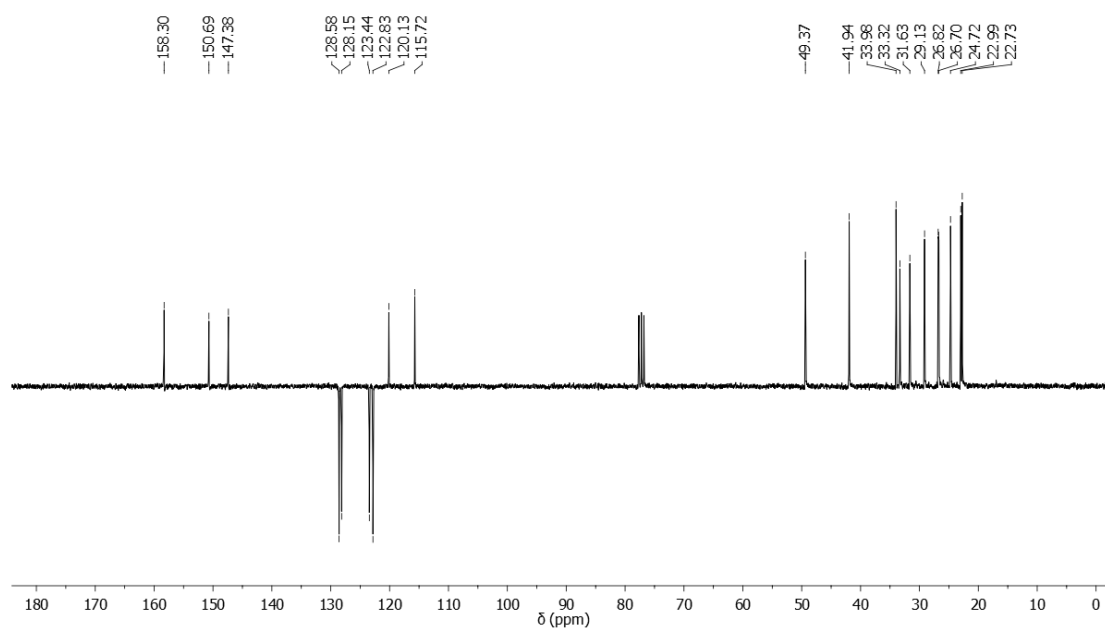


Figura C14. Espectro de RMN de ^{13}C (APT, CDCl_3 , 75 MHz) da amina **1d**.

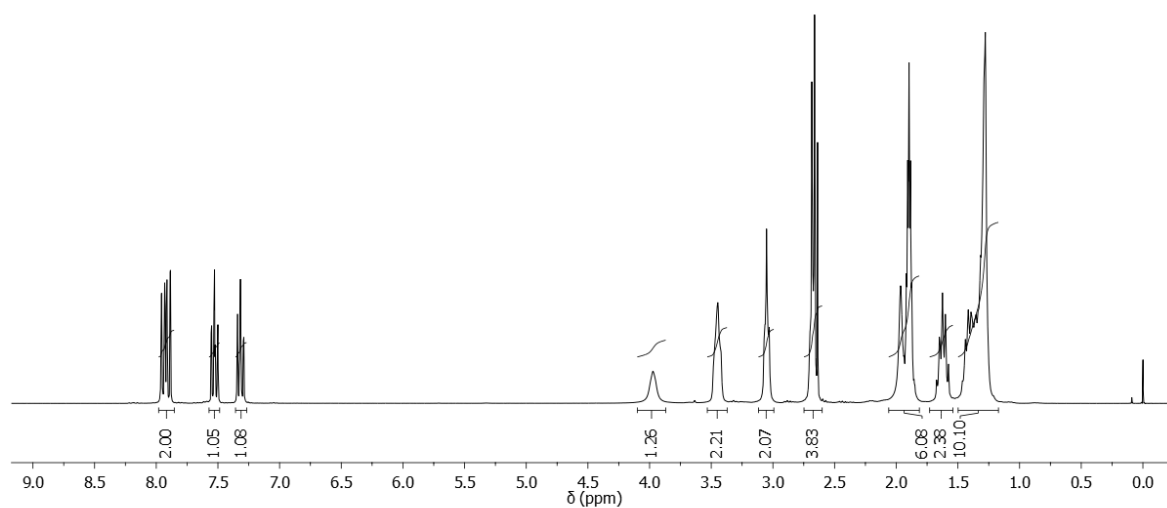
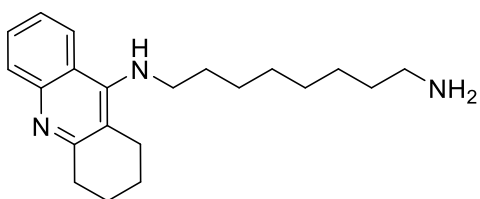


Figura C15. Espectro de RMN de ^1H (CDCl_3 , 300 MHz) da amina **1e**.

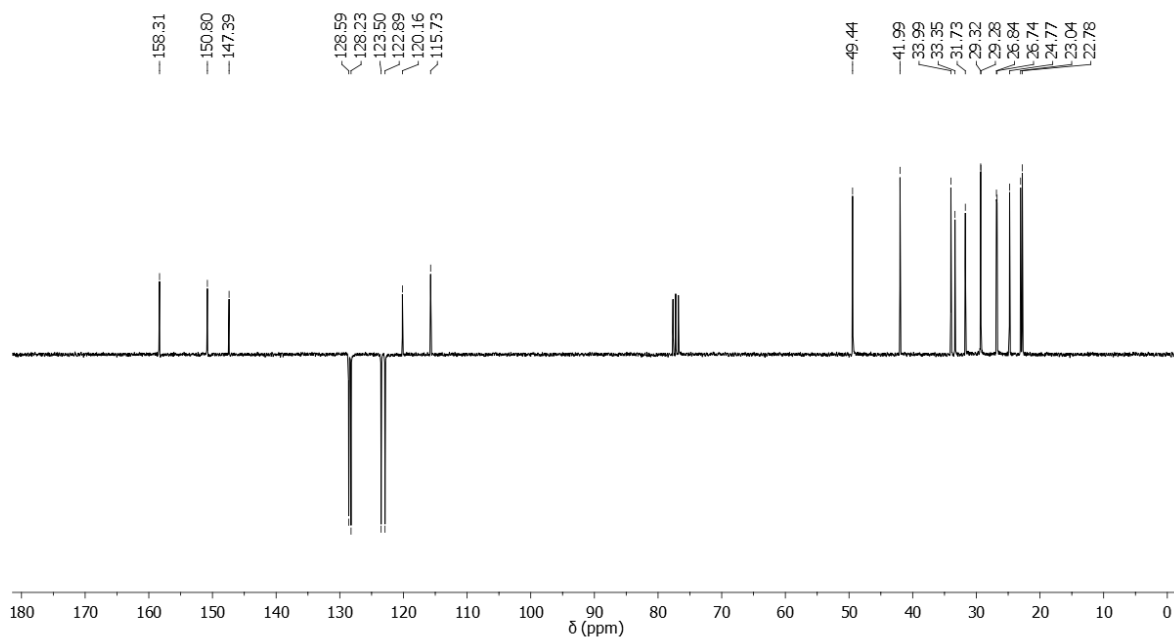


Figura C16. Espectro de RMN de ^{13}C (APT, CDCl_3 , 75 MHz) da amina **1e**.

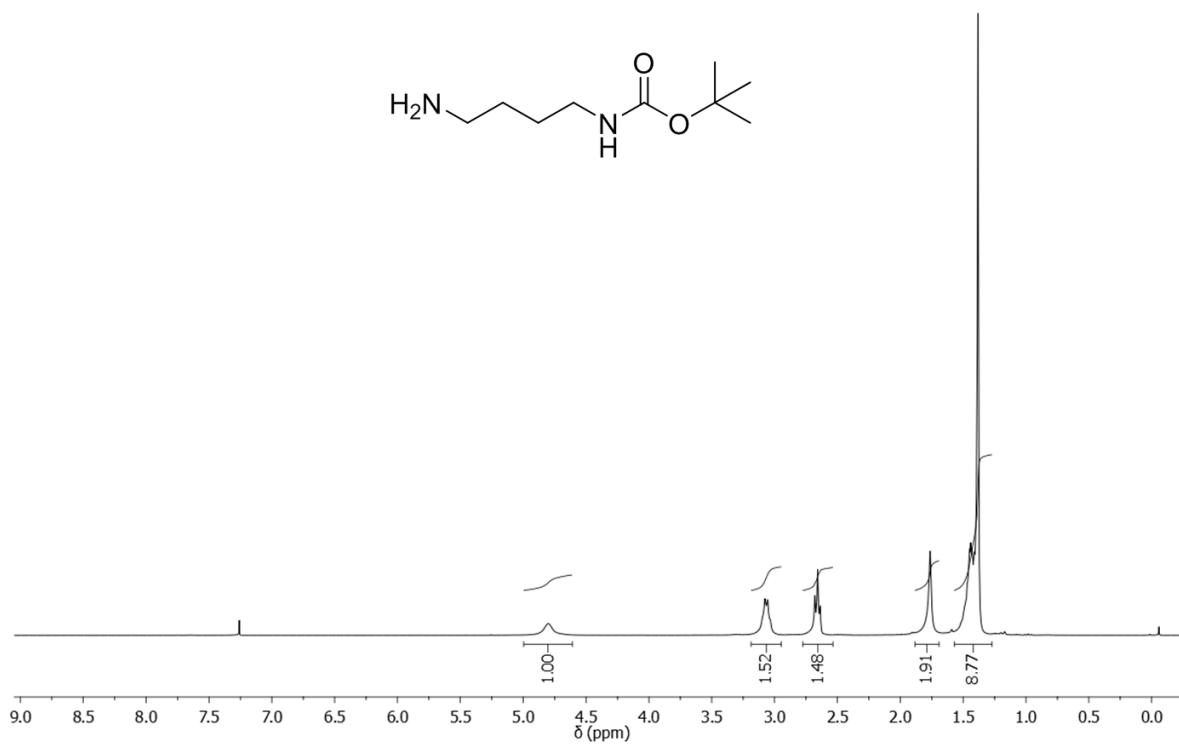


Figura C17. Espectro de RMN de ^1H (CDCl₃, 300 MHz) da amina **20a**.

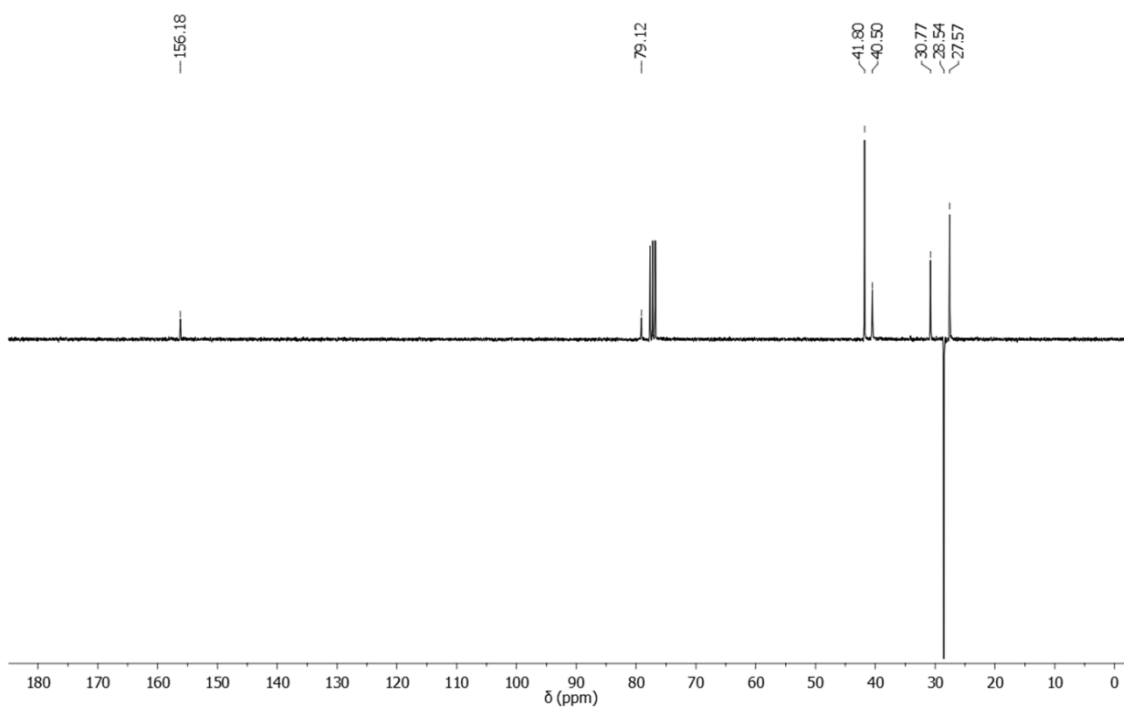


Figura C18. Espectro de RMN de ^{13}C (APT, CDCl₃, 75 MHz) da amina **20a**.

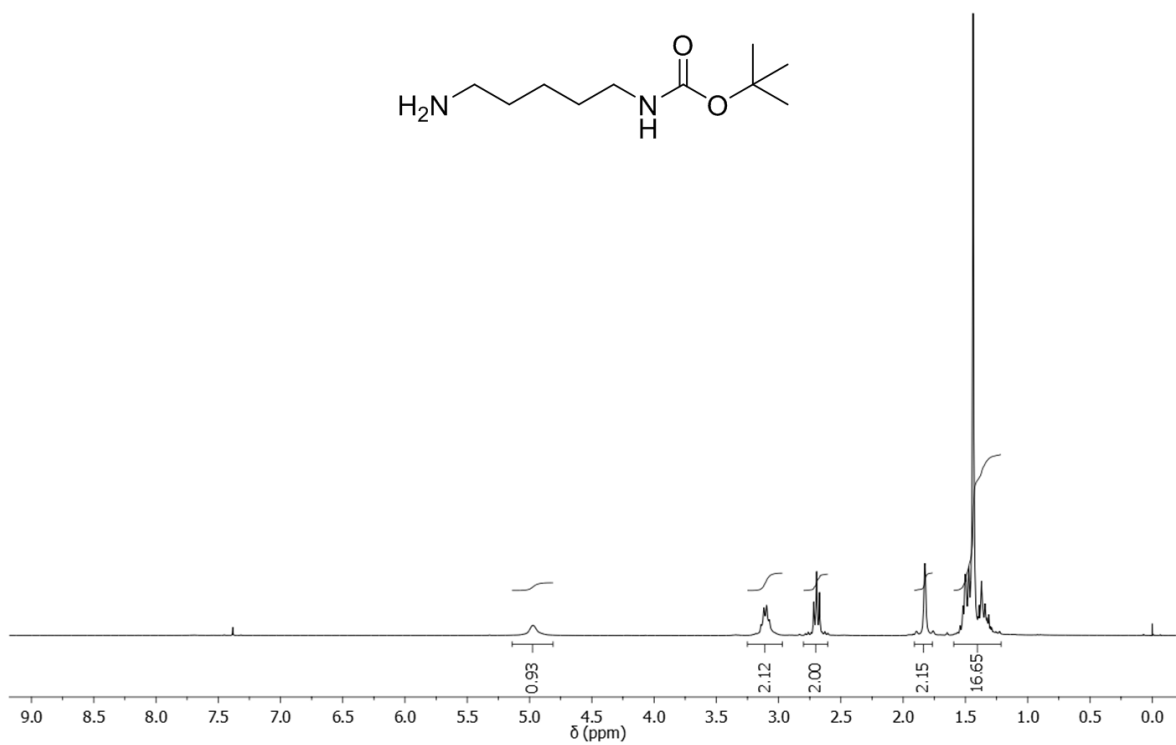


Figura C19. Espectro de RMN de ^1H (CDCl₃, 300 MHz) da amina **20b**.

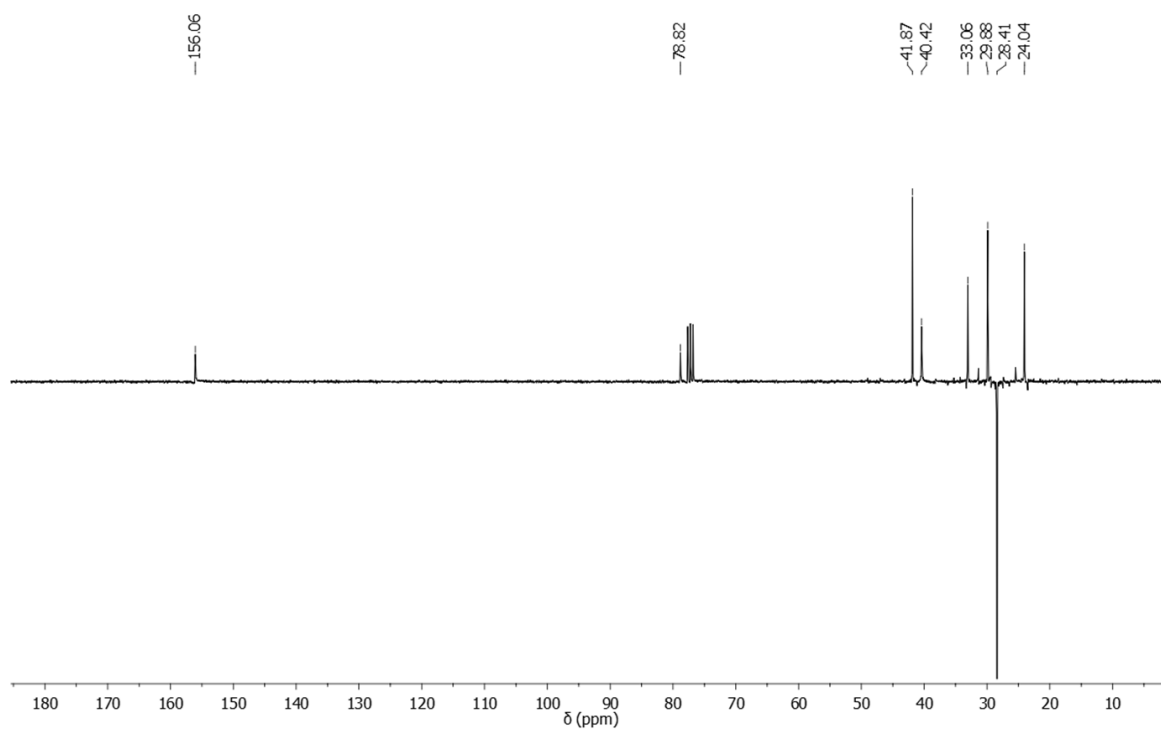


Figura C20. Espectro de RMN de ^{13}C (APT, CDCl₃, 75 MHz) da amina **20b**.

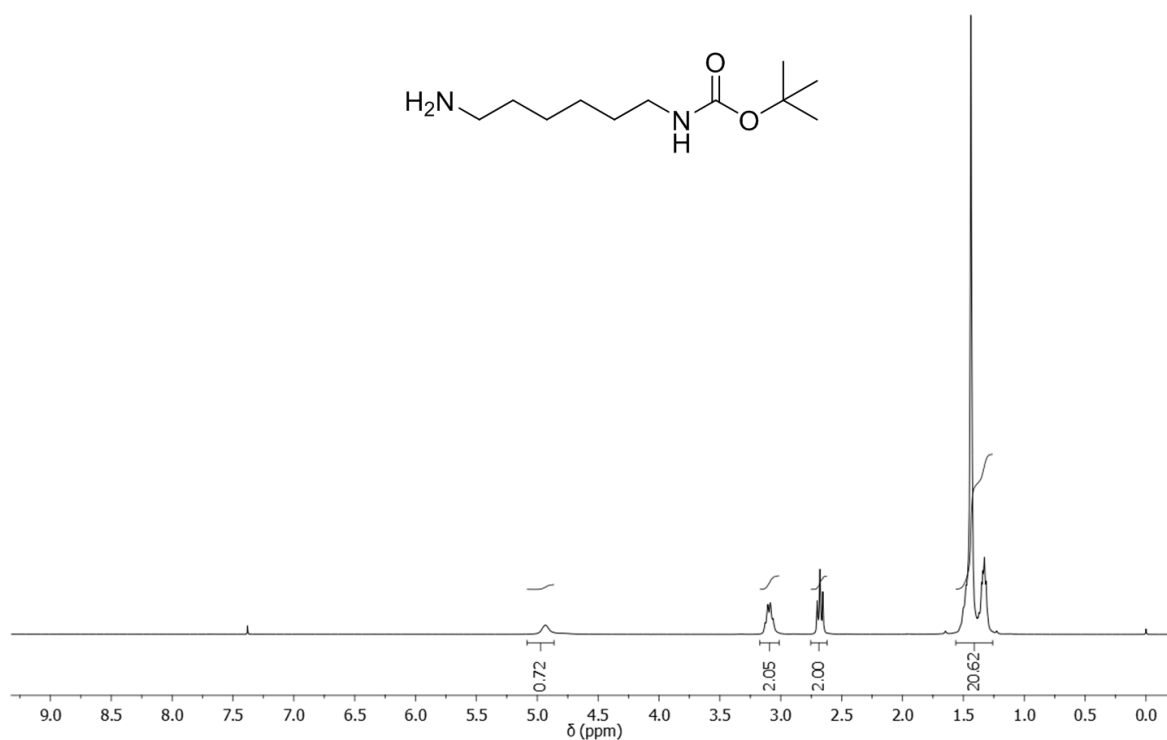


Figura C21. Espectro de RMN de ^1H (CDCl₃, 300 MHz) da amina **20c**.

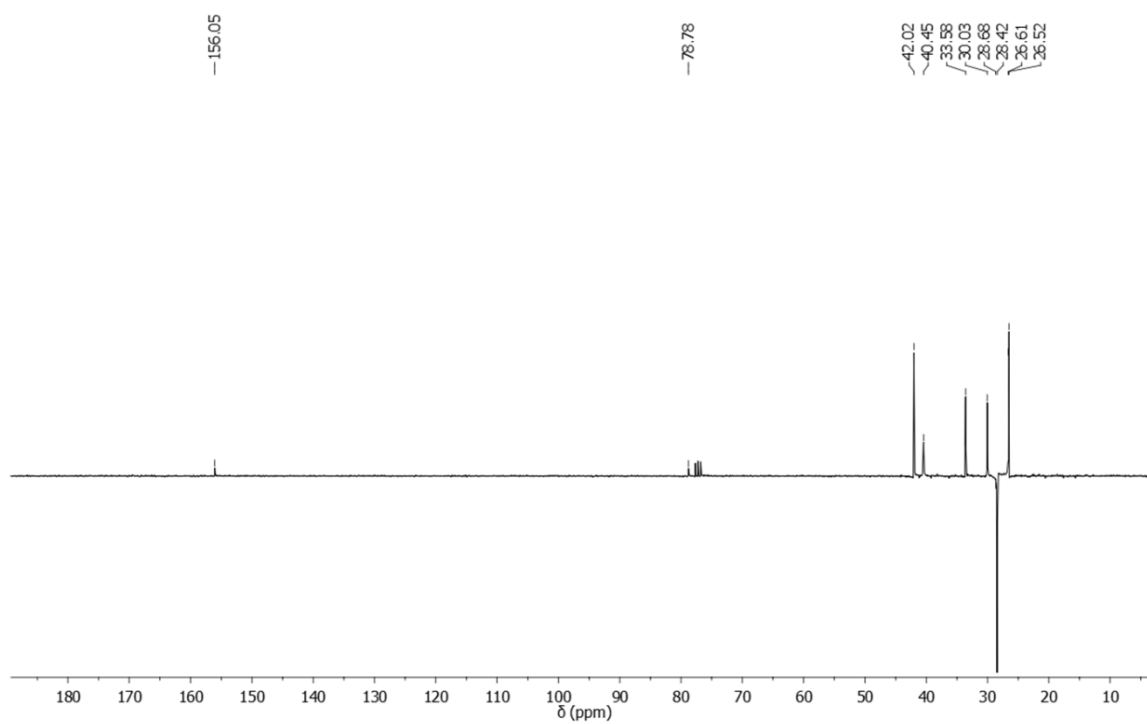


Figura C22. Espectro de RMN de ^{13}C (APT, CDCl₃, 75 MHz) da amina **20c**.

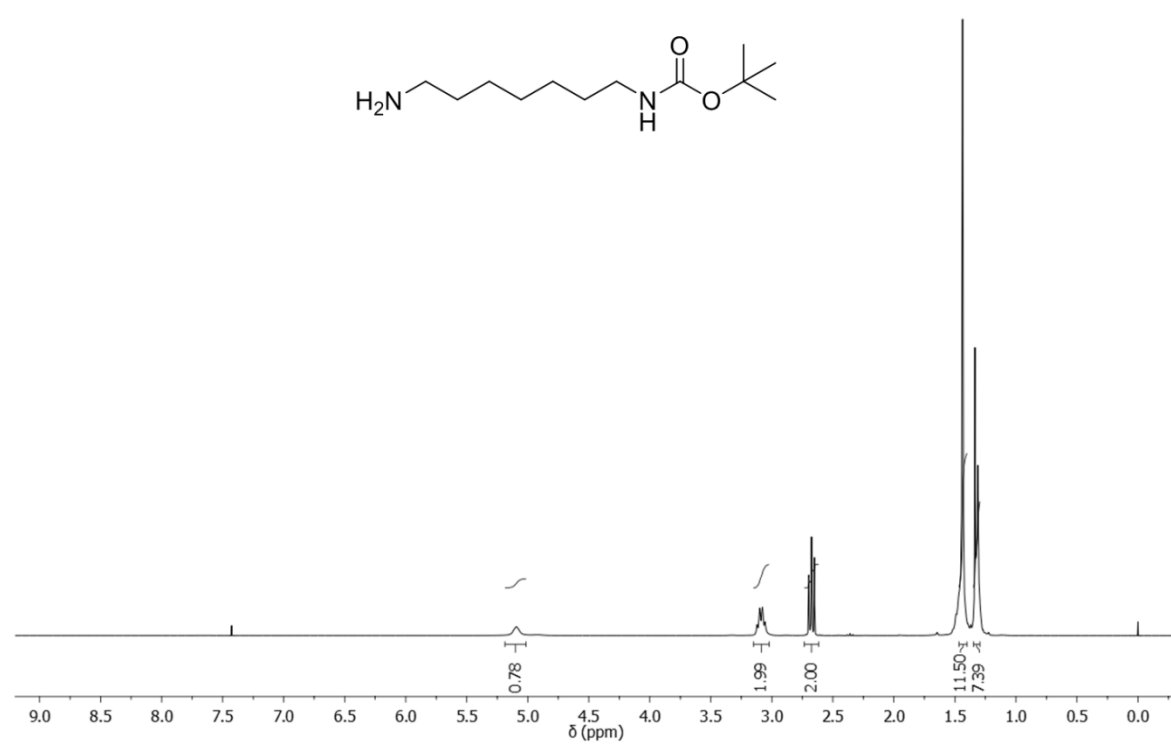


Figura C23. Espectro de RMN de ^1H (CDCl₃, 300 MHz) da amina **20d**.

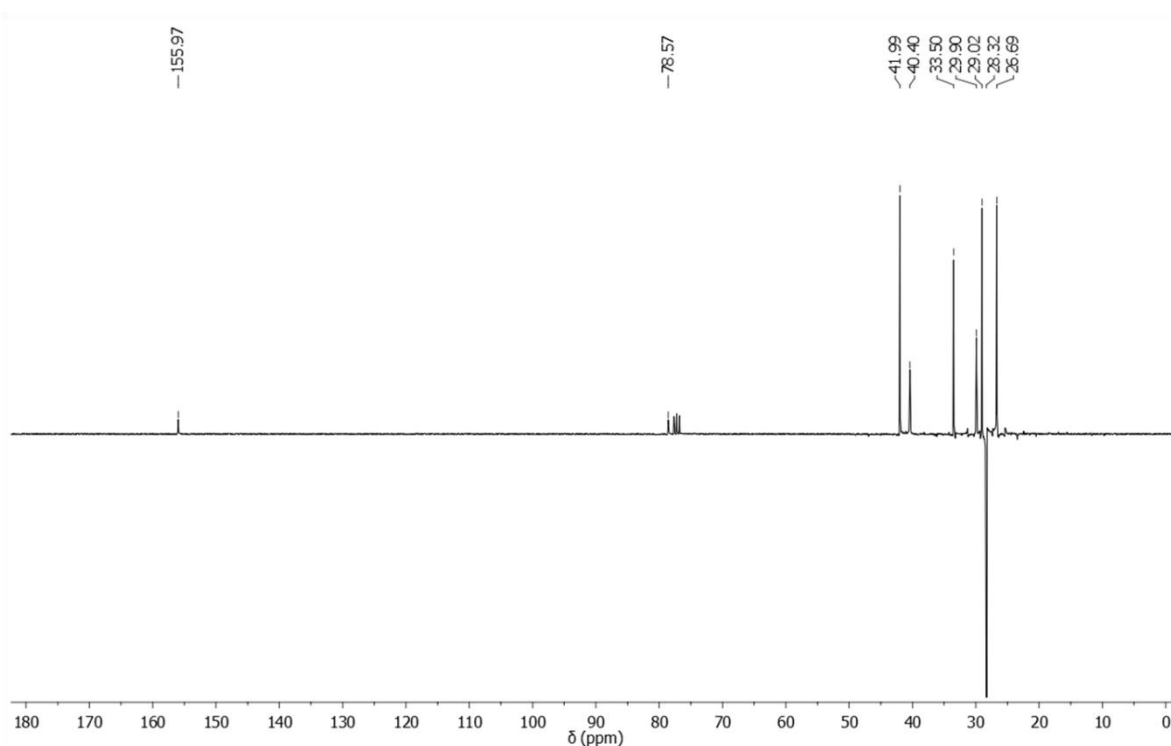


Figura C24. Espectro de RMN de ^{13}C (APT, CDCl₃, 75 MHz) da amina **20d**.



Figura C25. Espectro de RMN de ^1H (CDCl₃, 300 MHz) da amina **20e**.

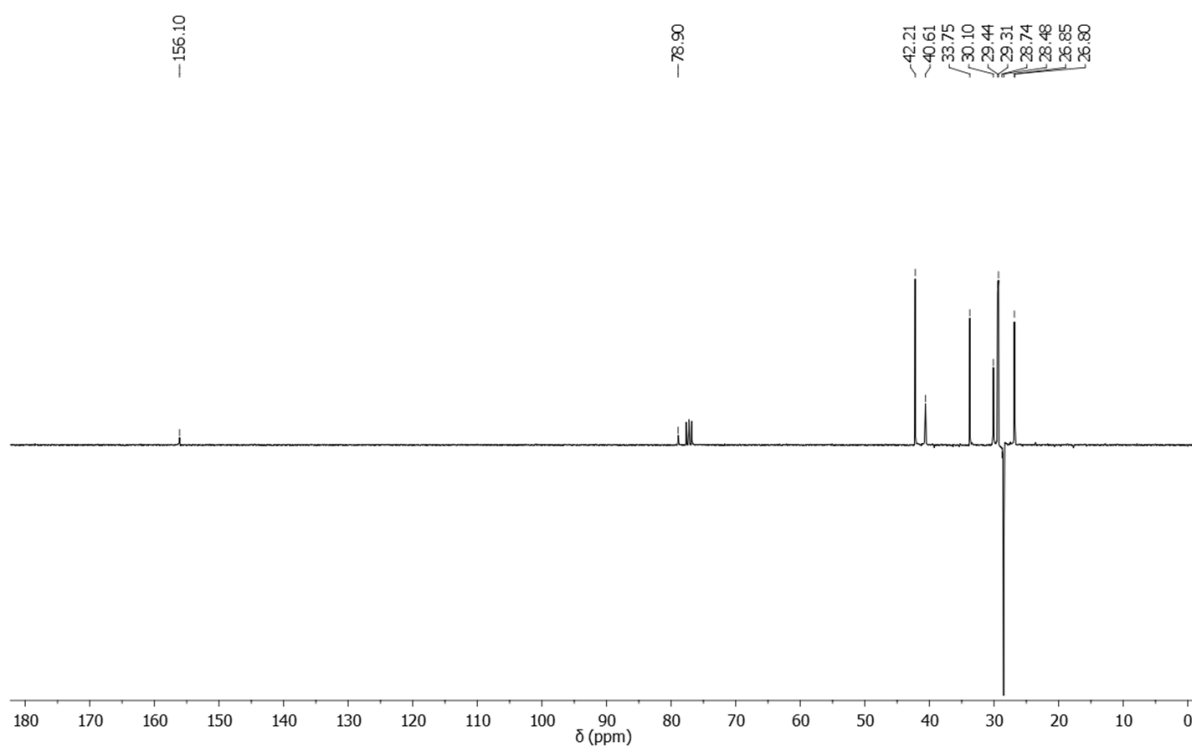


Figura C26. Espectro de RMN de ^{13}C (APT, CDCl₃, 75 MHz) da amina **20e**.

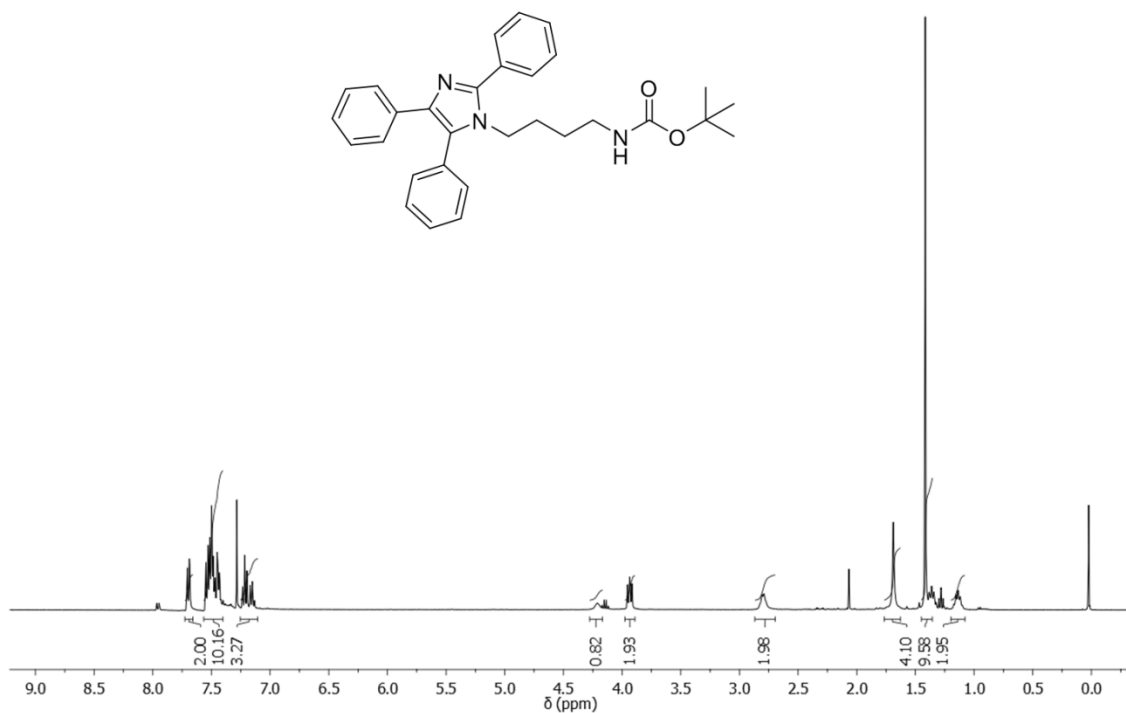


Figura C27. Espectro de RMN de ^1H (CDCl₃, 300 MHz) do carbamato **21a**.

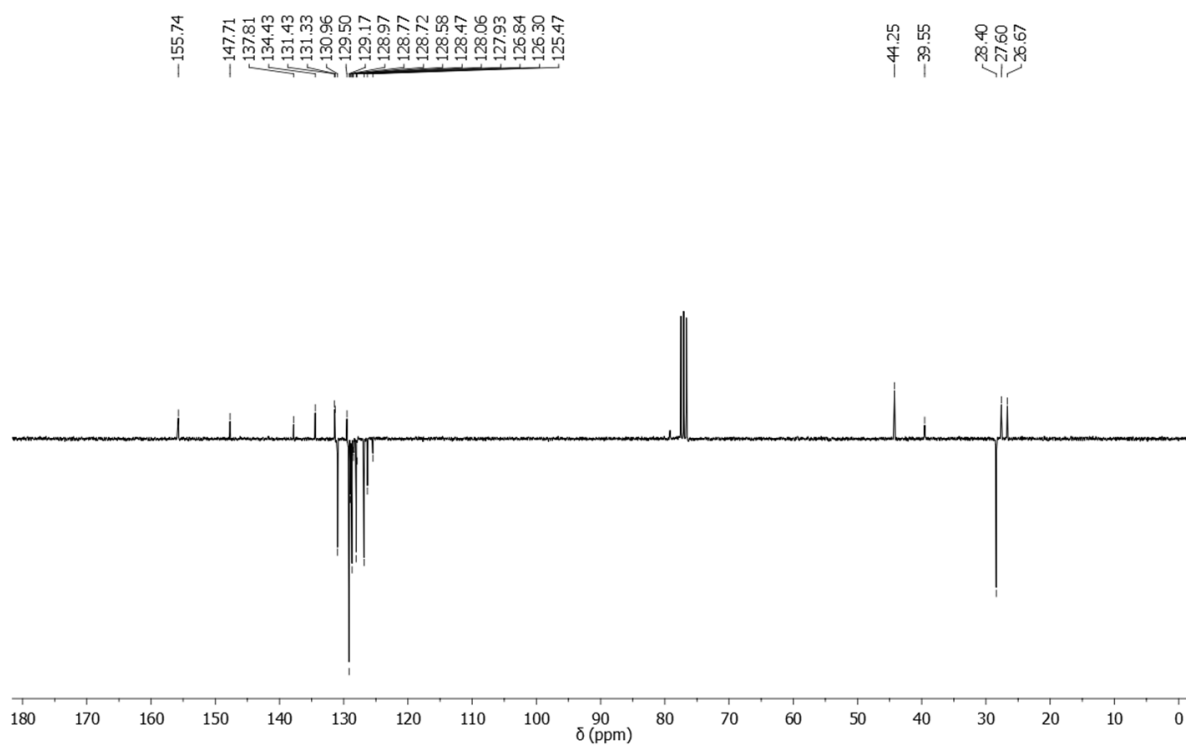


Figura C28. Espectro de RMN de ^{13}C (APT, CDCl₃, 75 MHz) do carbamato **21a**.

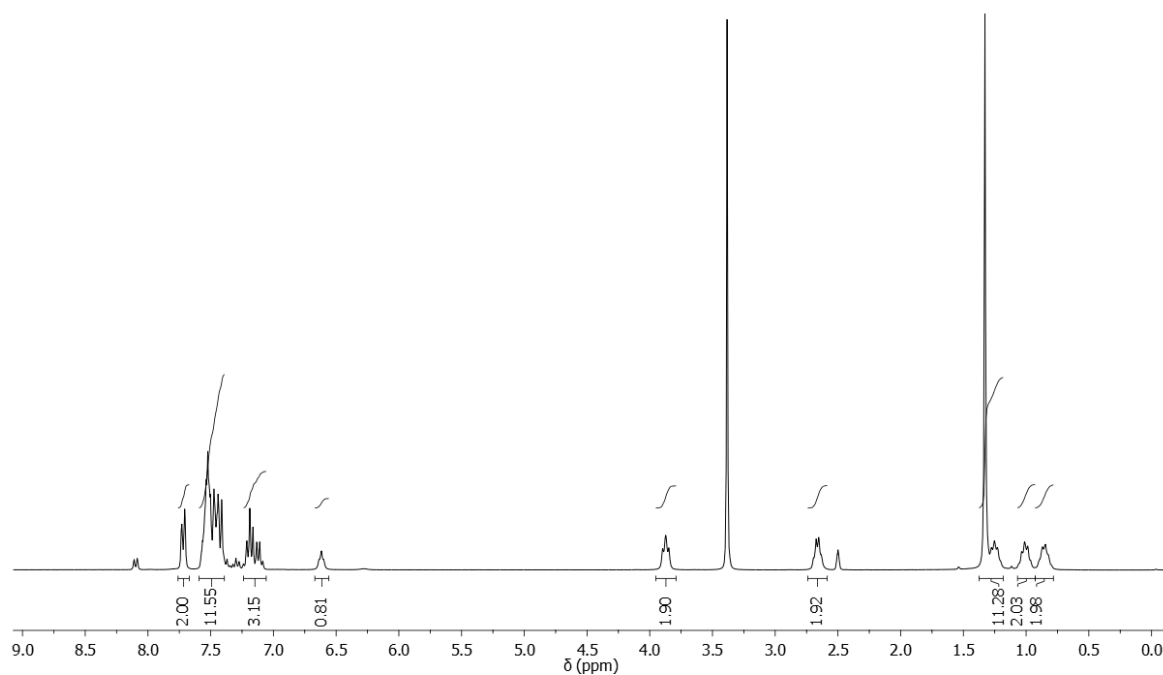
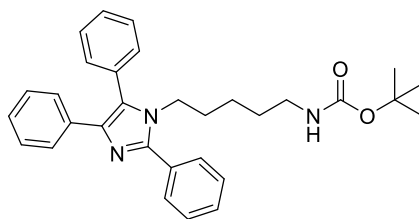


Figura AX. Espectro de RMN de ^1H (DMSO- d_6 , 300 MHz) do carbamato **21b**.

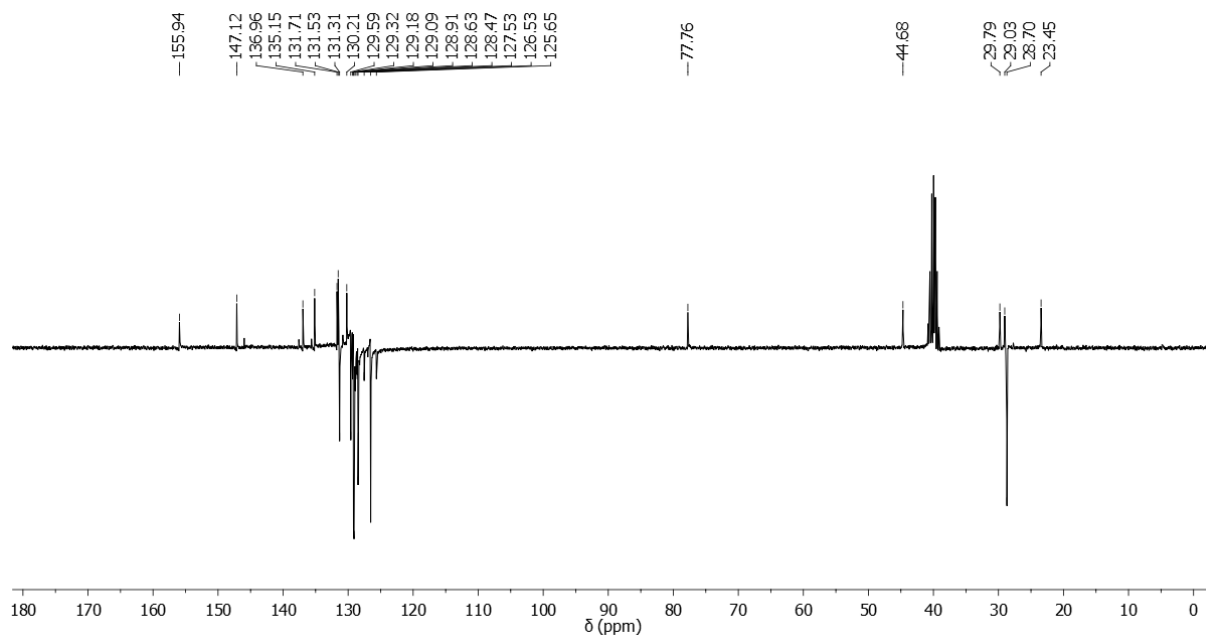


Figura C29. Espectro de RMN de ^{13}C , APT (DMSO- d_6 , 75 MHz) do carbamato **21d**.

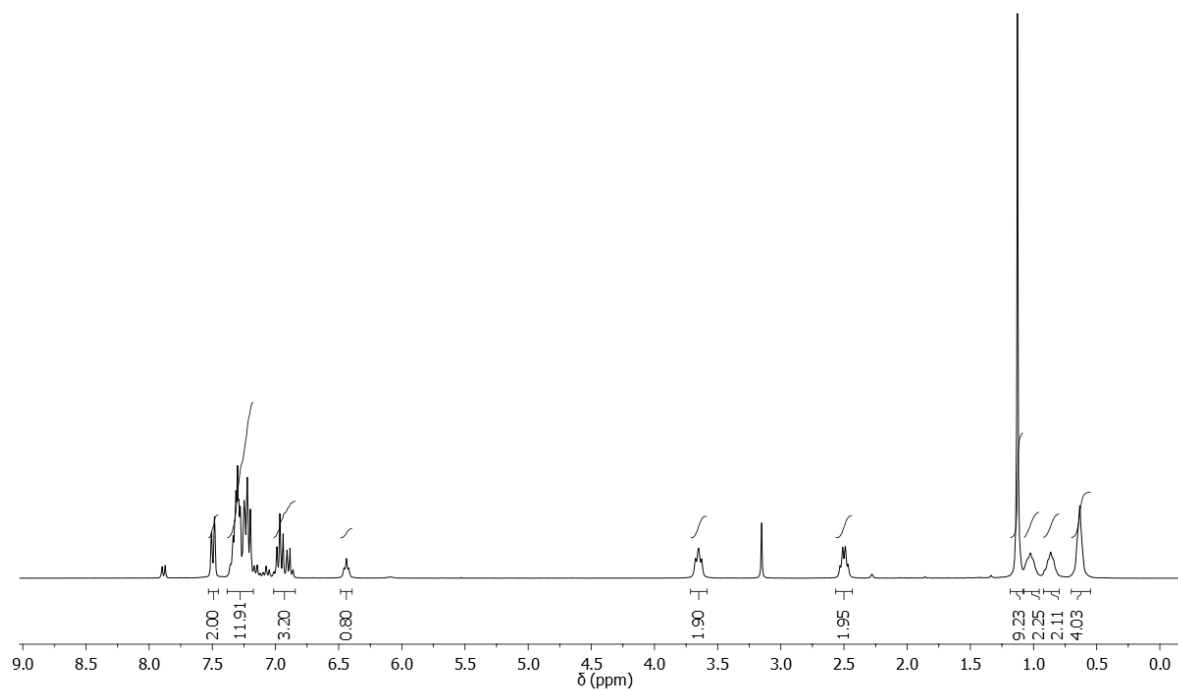
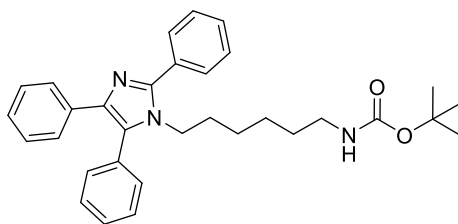


Figura C30. Espectro de RMN de ^1H (DMSO- d_6 , 300 MHz) do carbamato **21c**.

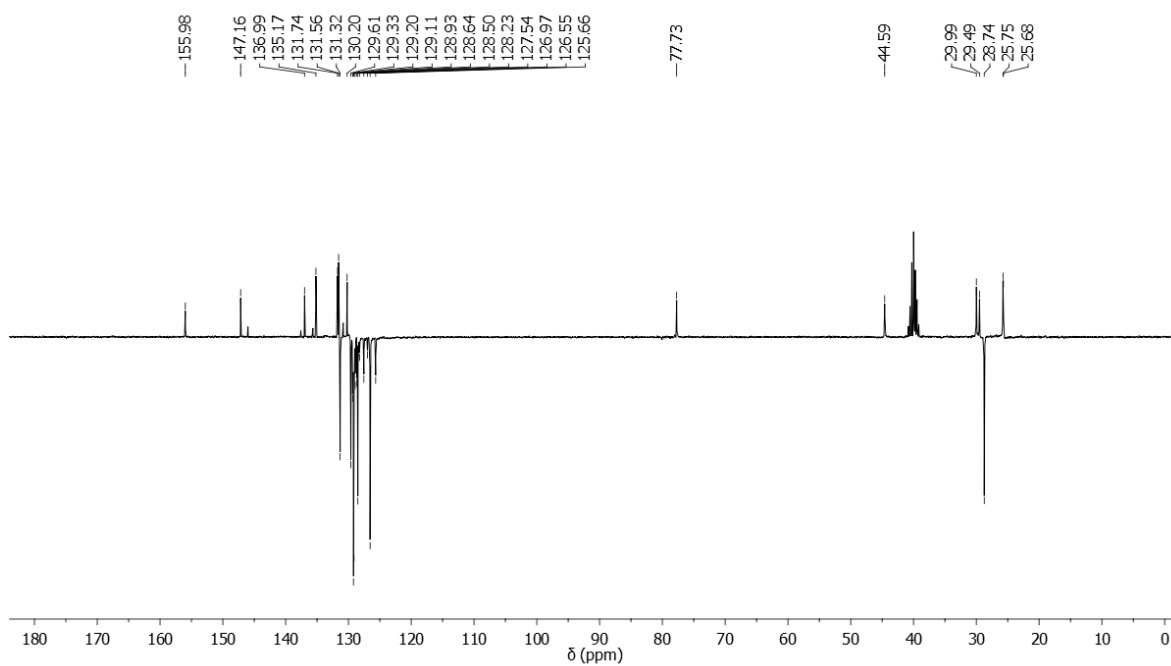


Figura C31. Espectro de RMN de ^{13}C , APT (DMSO- d_6 , 75 MHz) do carbamato **21c**.

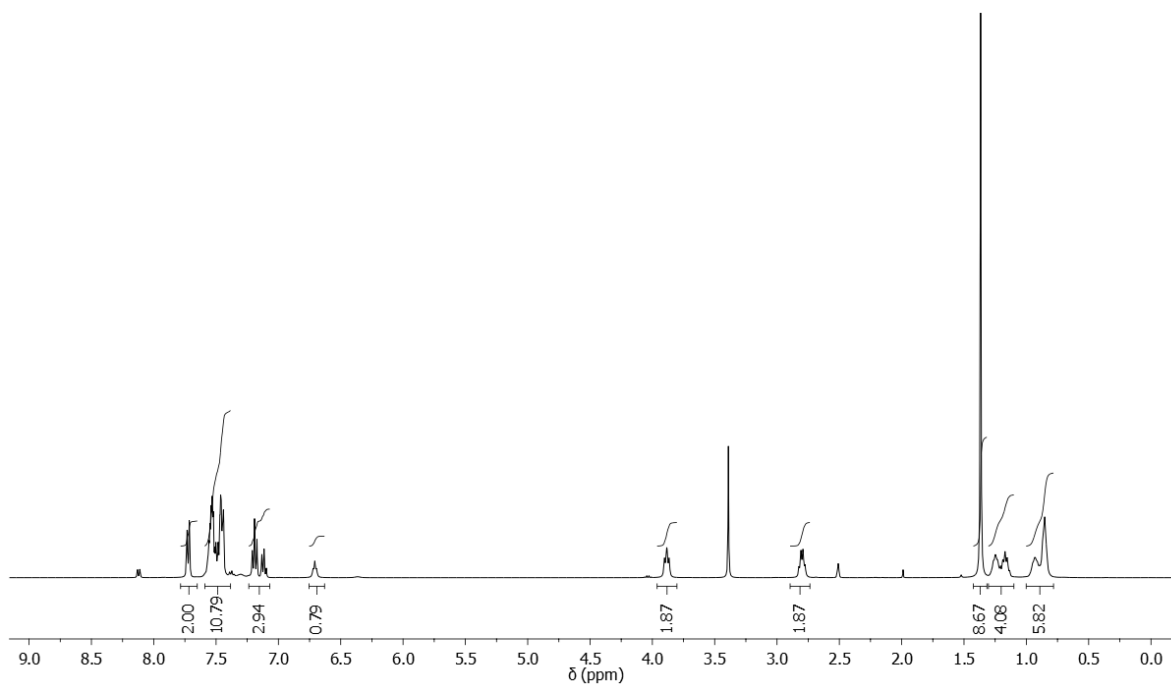
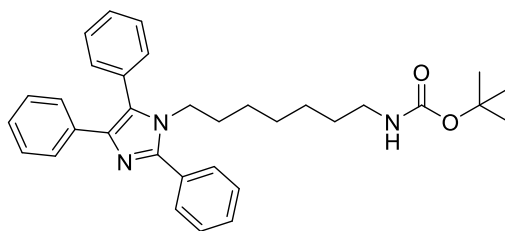


Figura C32. Espectro de RMN de ^1H (DMSO- d_6 , 300 MHz) do carbamato **21d**.

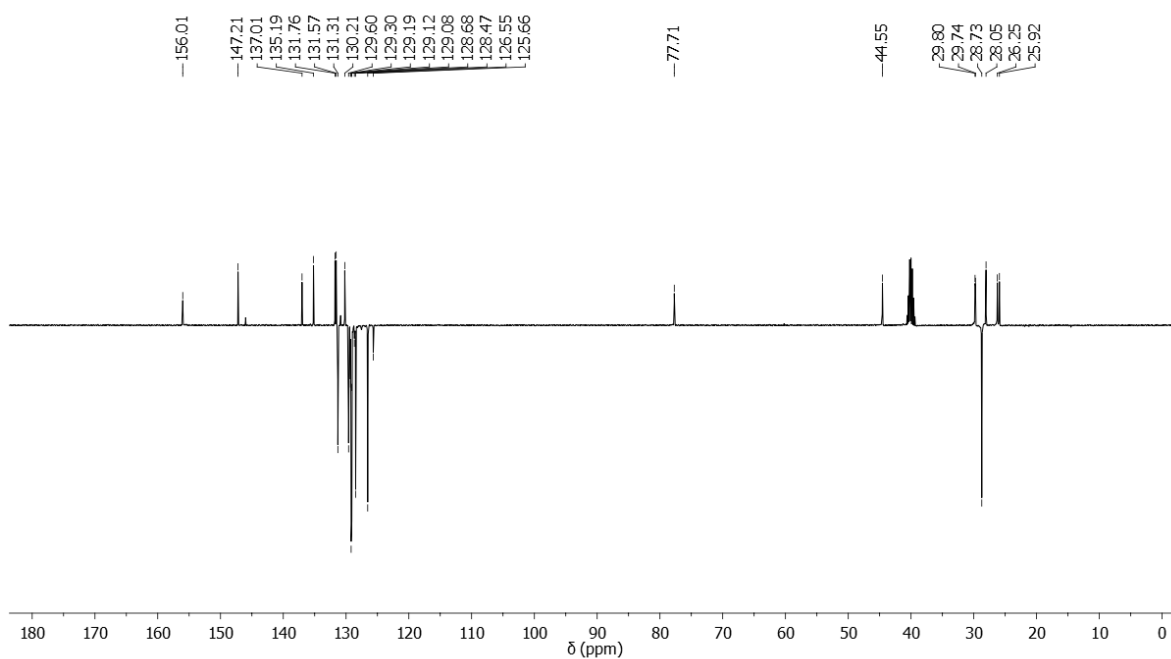


Figura C33. Espectro de RMN de ^{13}C , APT (DMSO- d_6 , 75 MHz) do carbamato **21d**.

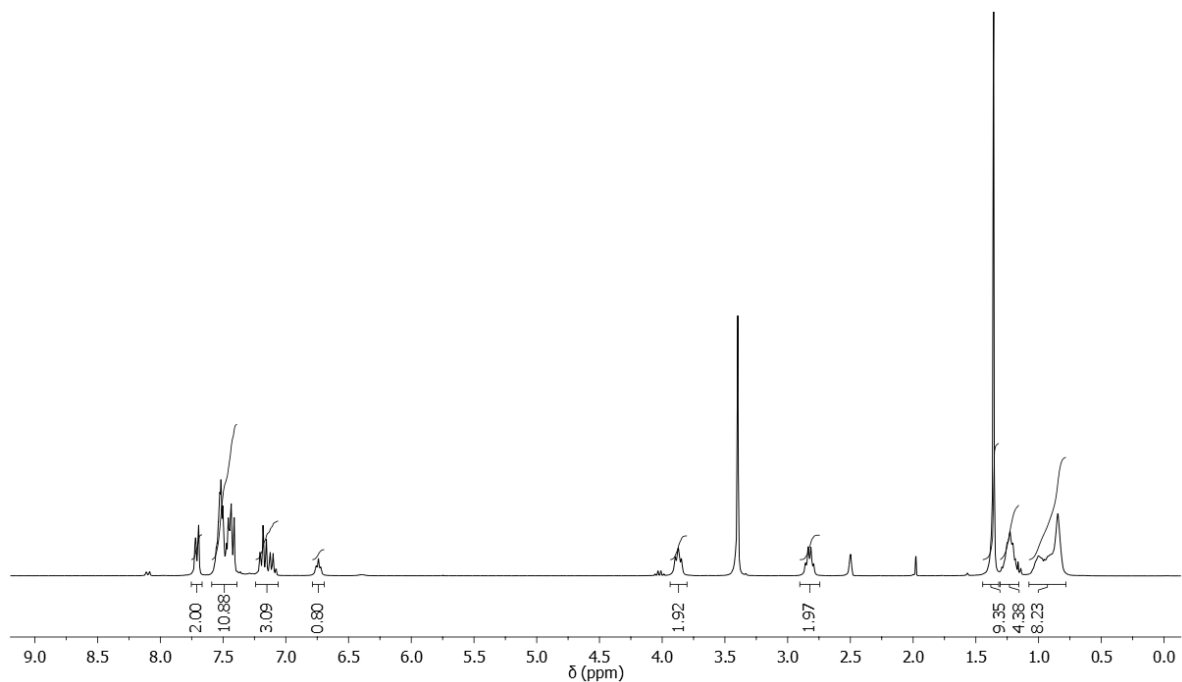
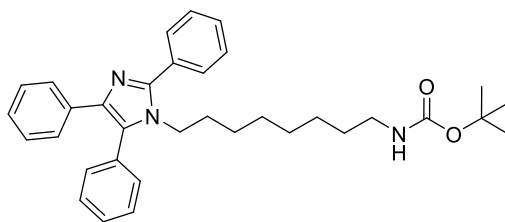


Figura C34. Espectro de RMN de ^1H (DMSO-*d*6, 300 MHz) do carbamato **21e**.

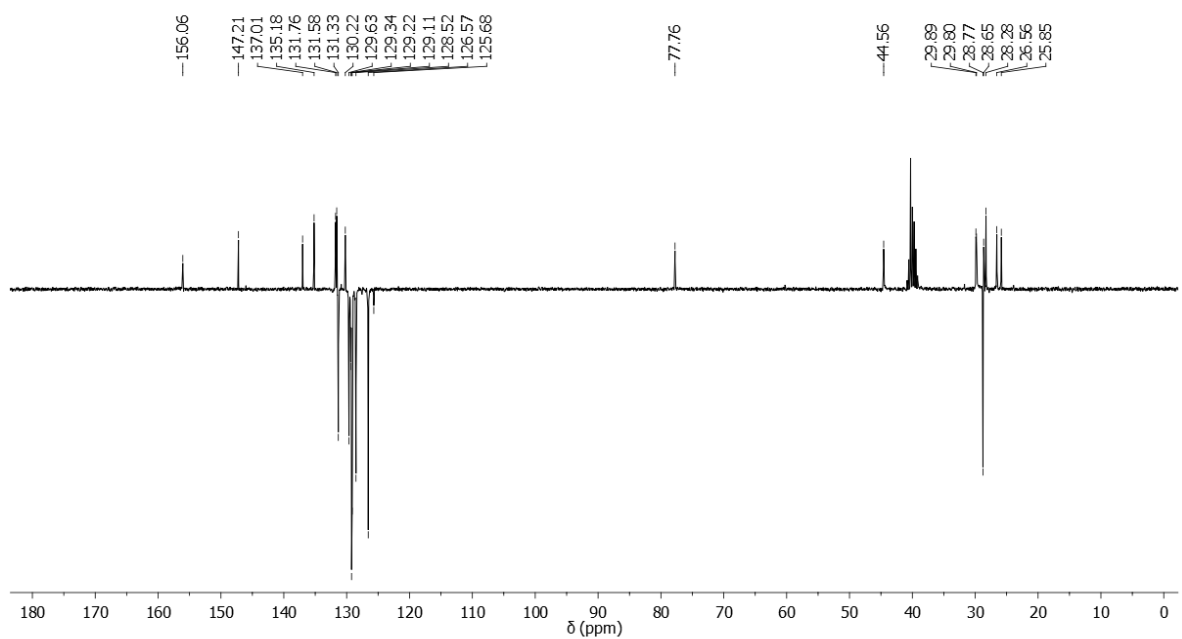


Figura C35. Espectro de RMN de ^{13}C , APT (DMSO-*d*6, 75 MHz) do carbamato **21e**.

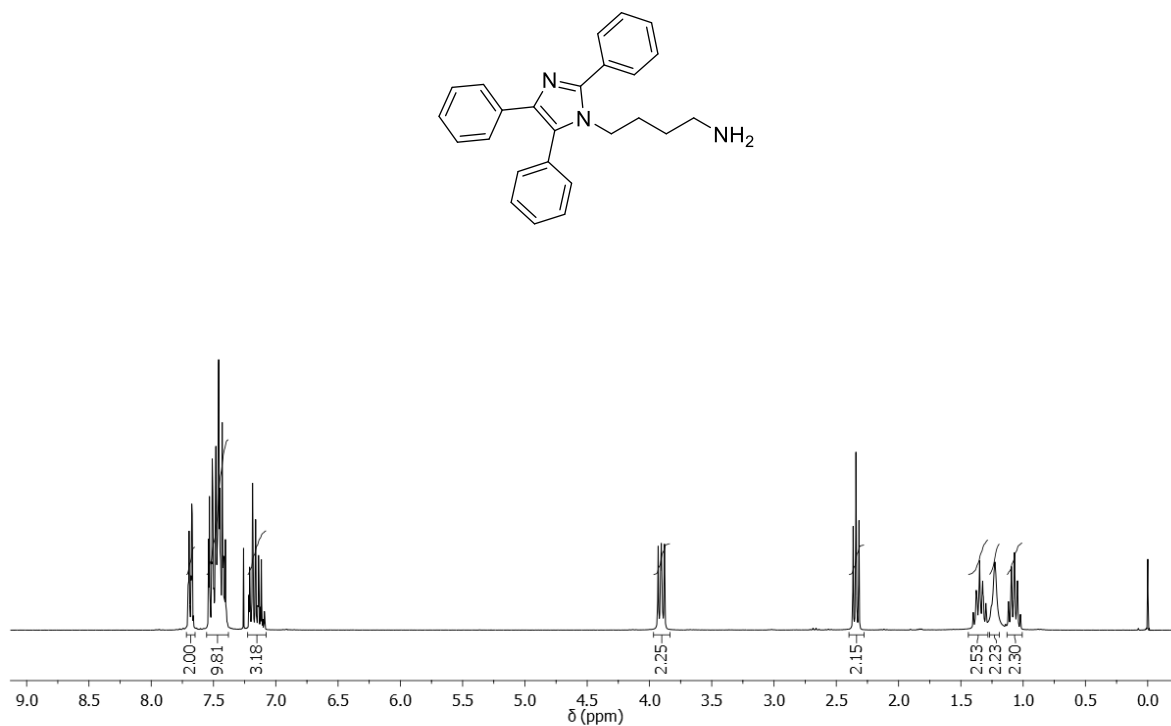


Figura C36. Espectro de RMN de ¹H (CDCl₃, 300 MHz) da amina **9a**.

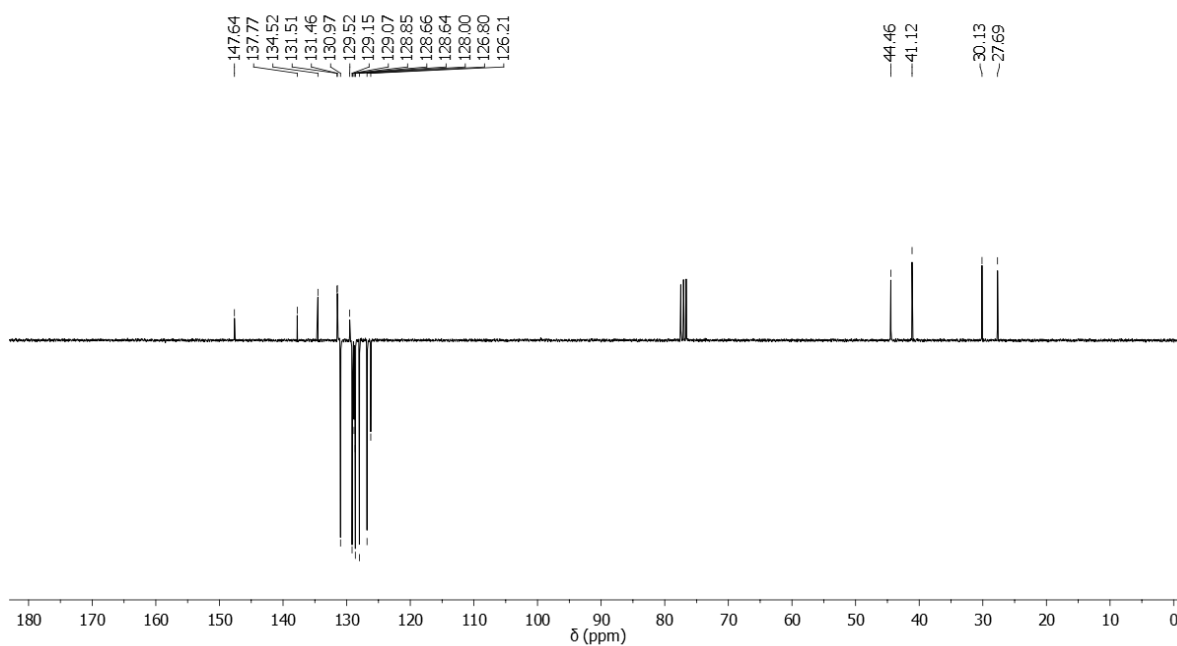


Figura C37. Espectro de RMN de ¹³C, APT (CDCl₃, 75 MHz) da amina **9a**.

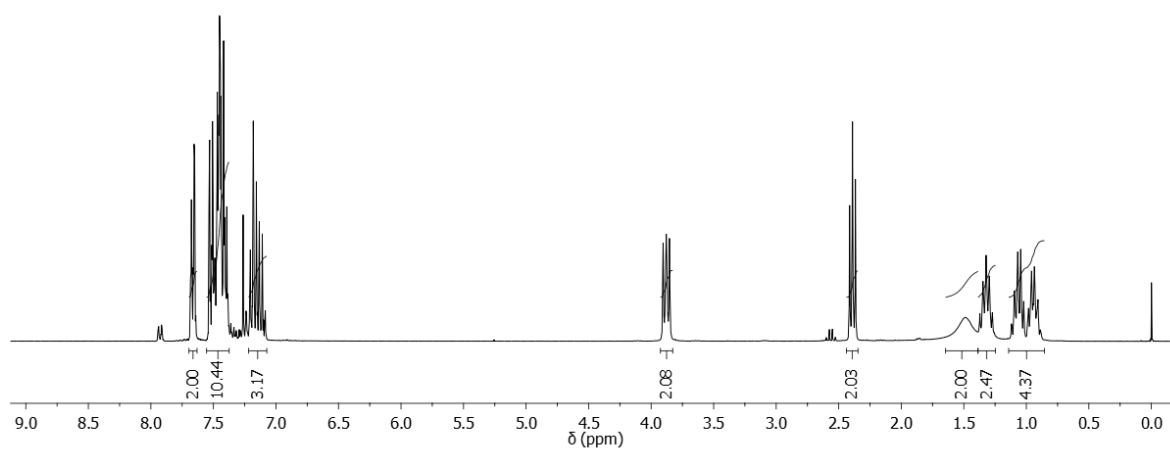
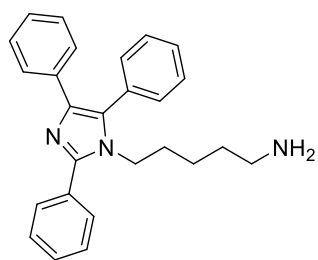


Figura C38. Espectro de RMN de ^1H (CDCl_3 , 300 MHz) da amina **9b**.

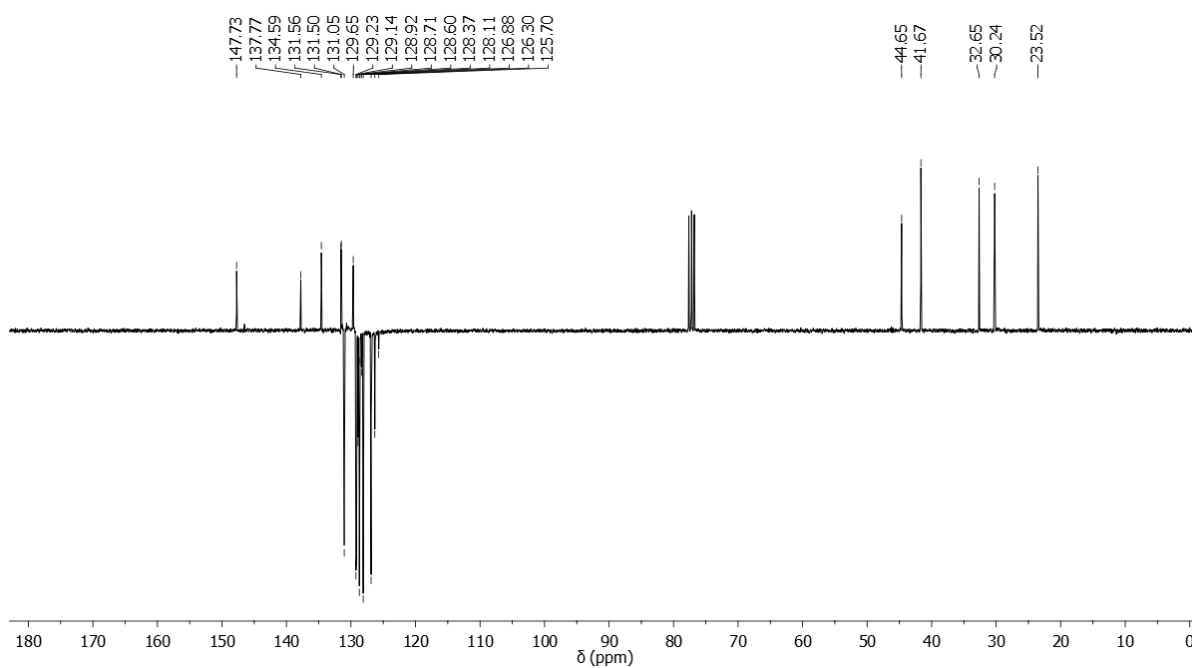


Figura C39. Espectro de RMN de ^{13}C , APT (CDCl_3 , 75 MHz) da amina **9b**.

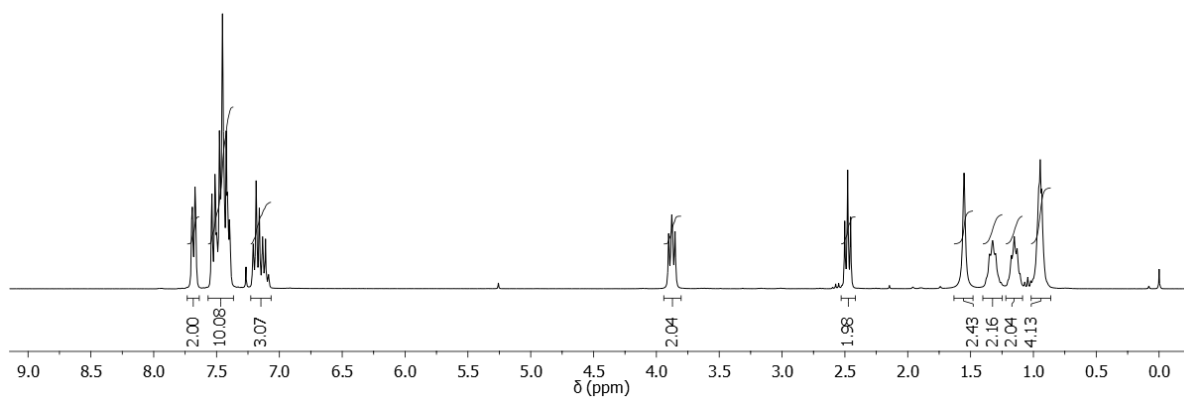
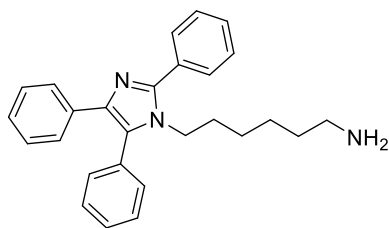


Figura C40. Espectro de RMN de ^1H (CDCl_3 , 300 MHz) da amina **9c**.

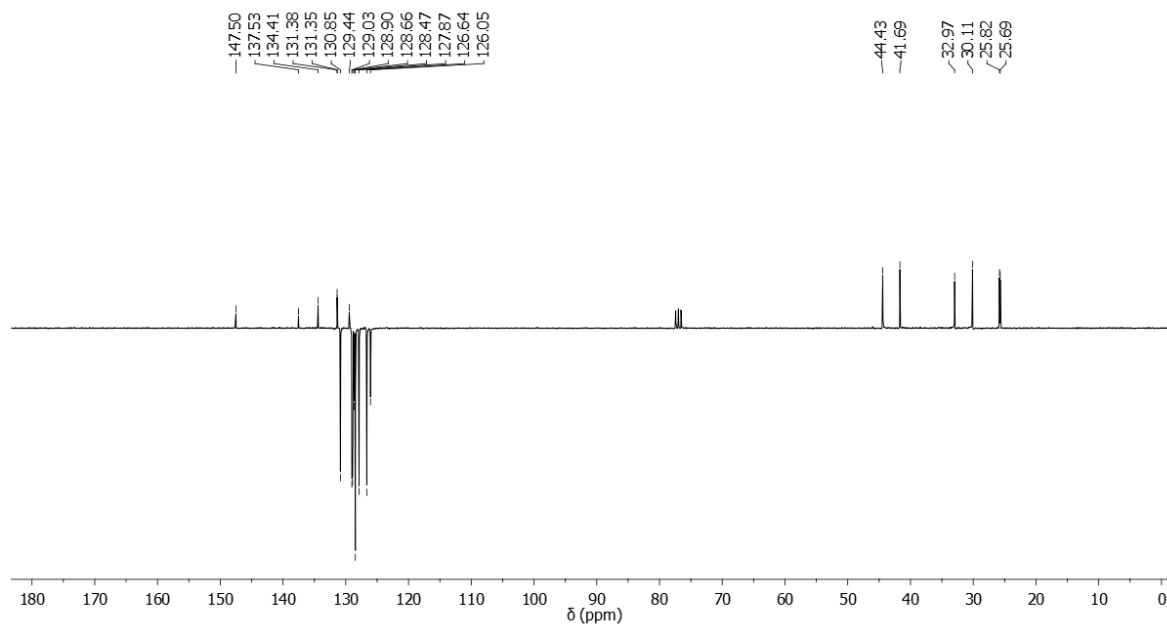


Figura C41. Espectro de RMN de ^{13}C , APT (CDCl_3 , 75 MHz) da amina **9c**.

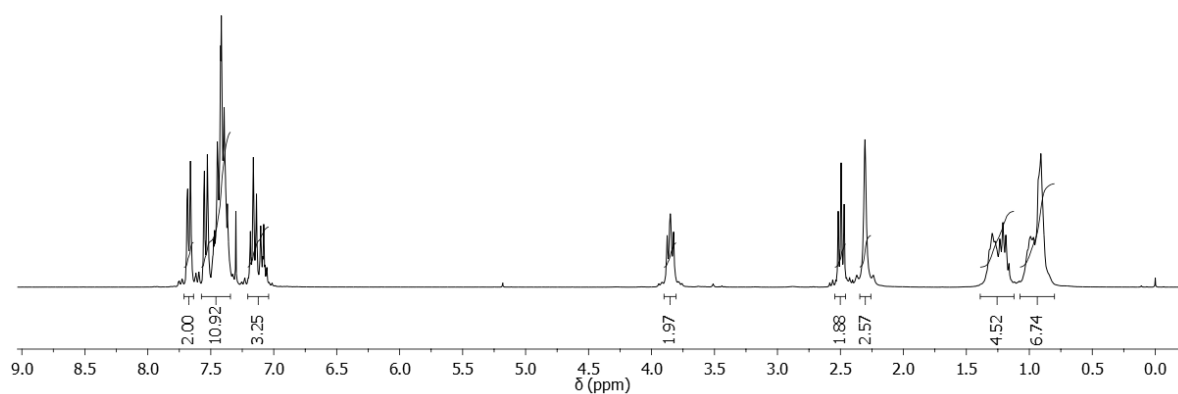
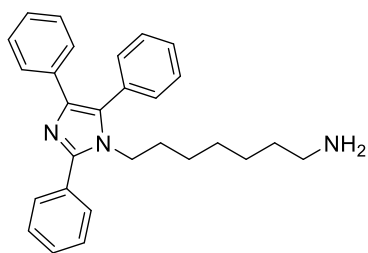


Figura C42. Espectro de RMN de ^1H (CDCl_3 , 300 MHz) da amina **9d**.

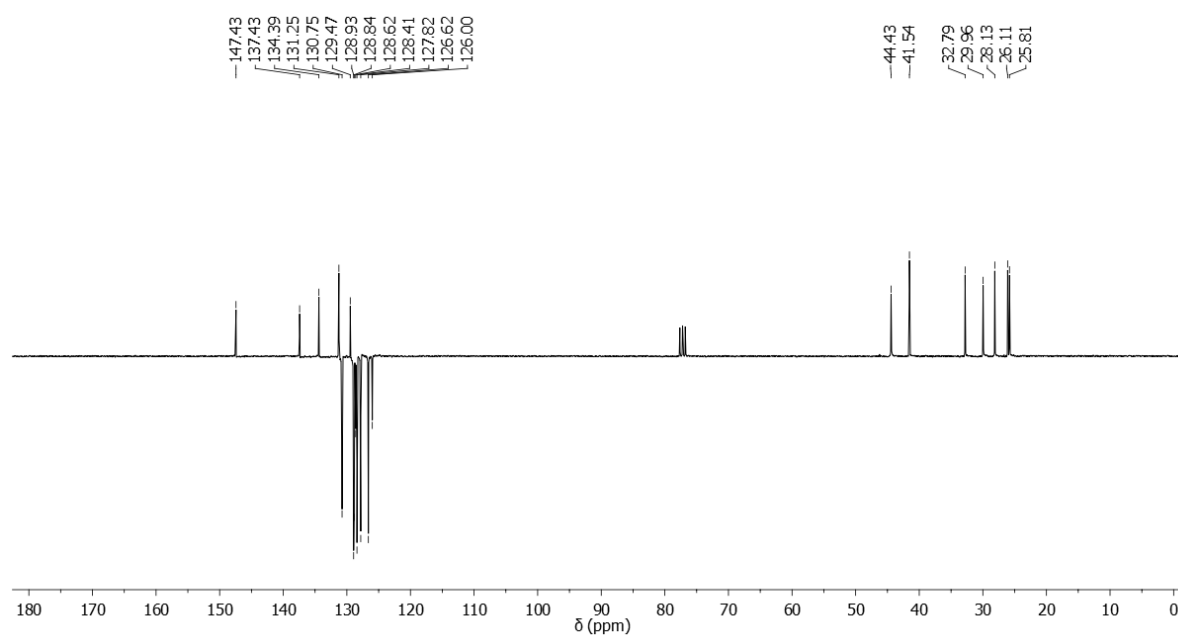


Figura C43. Espectro de RMN de ^{13}C , APT (CDCl_3 , 75 MHz) da amina **9d**.

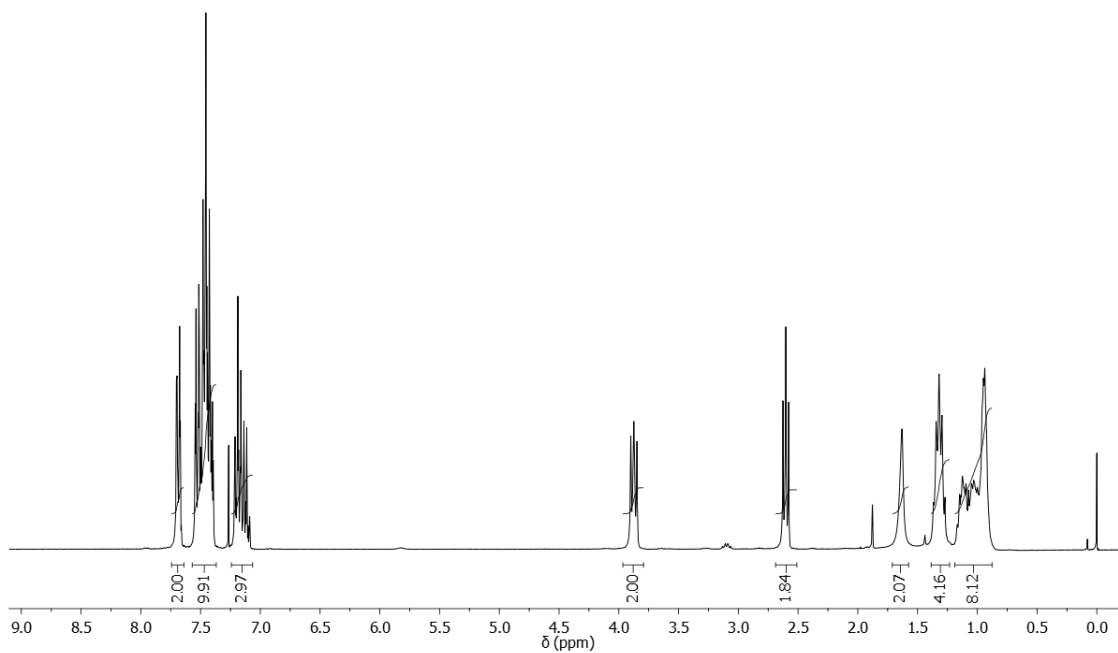
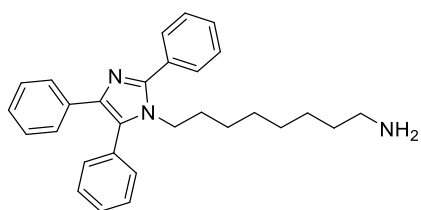


Figura C44. Espectro de RMN de ^1H (CDCl_3 , 300 MHz) da amina **9e**.

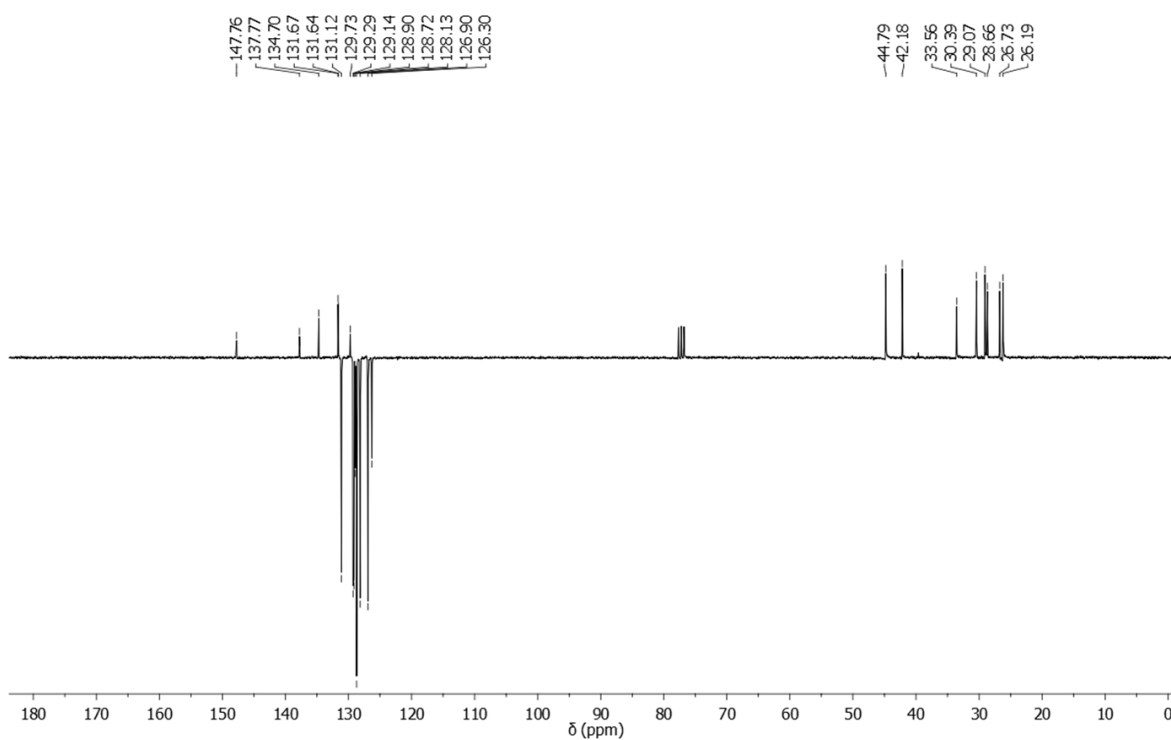


Figura C45. Espectro de RMN de ^{13}C , APT (CDCl_3 , 75 MHz) da amina **9e**.

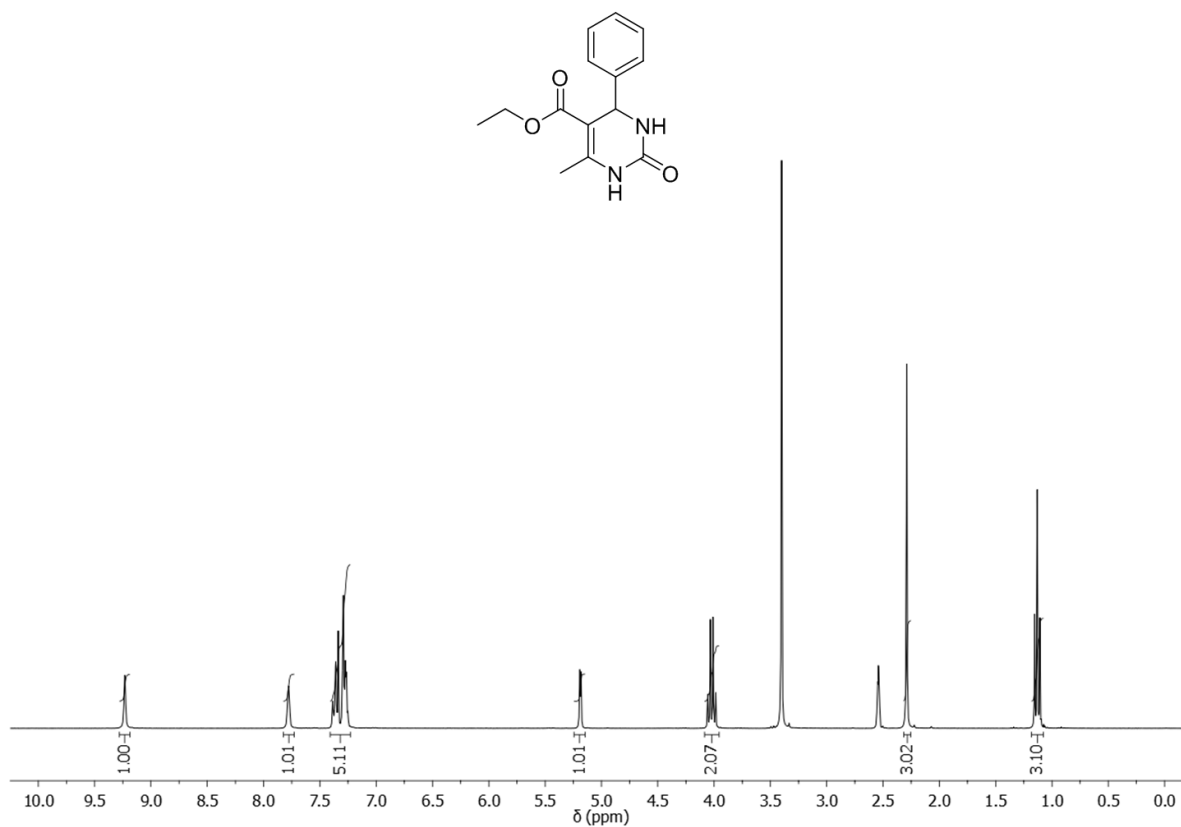


Figura C46. Espectro de RMN de ^1H (DMSO- d_6 , 300 MHz) da DHPM 7.

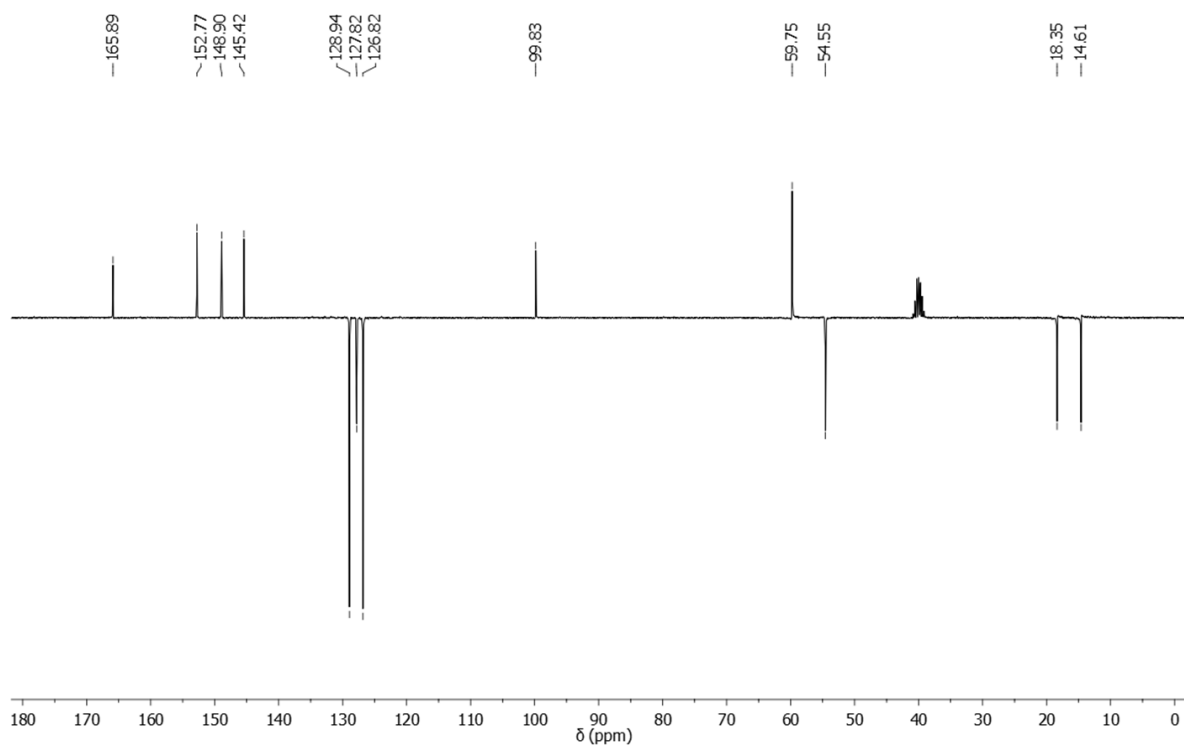


Figura C47. Espectro de RMN de ^{13}C , APT (DMSO- d_6 , 75 MHz) da DHPM 7.

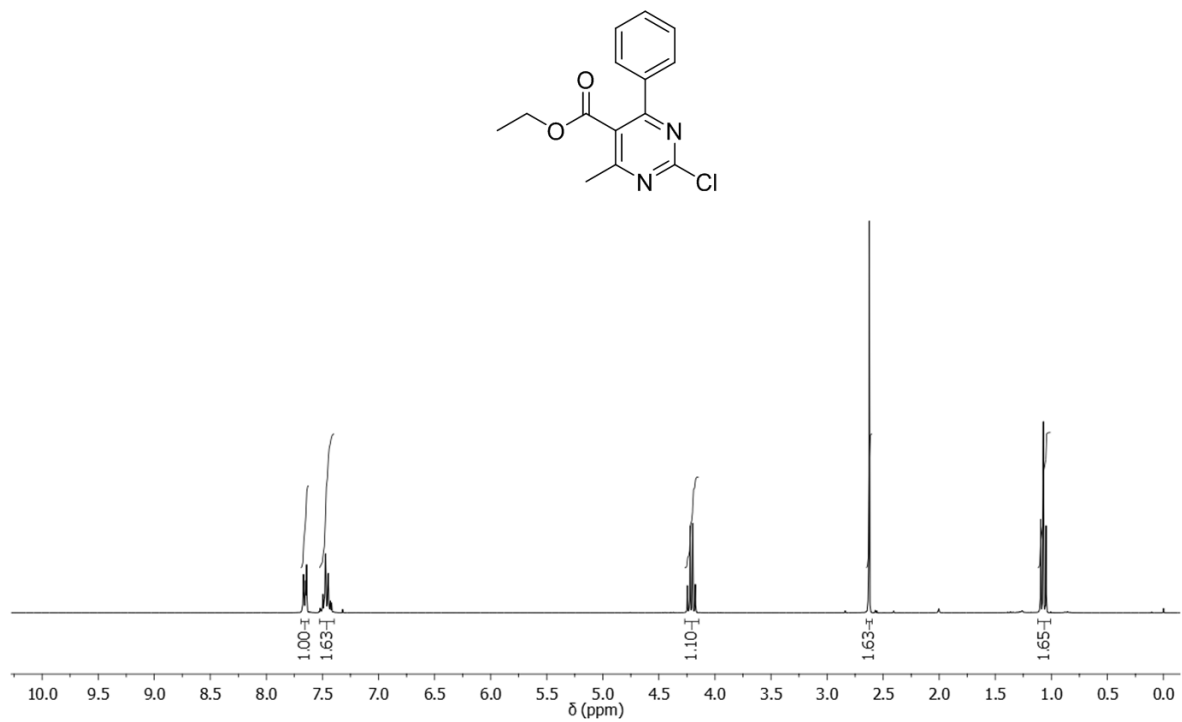


Figura C48. Espectro de RMN de ¹H (CDCl₃, 300 MHz) da pirimidina 6.

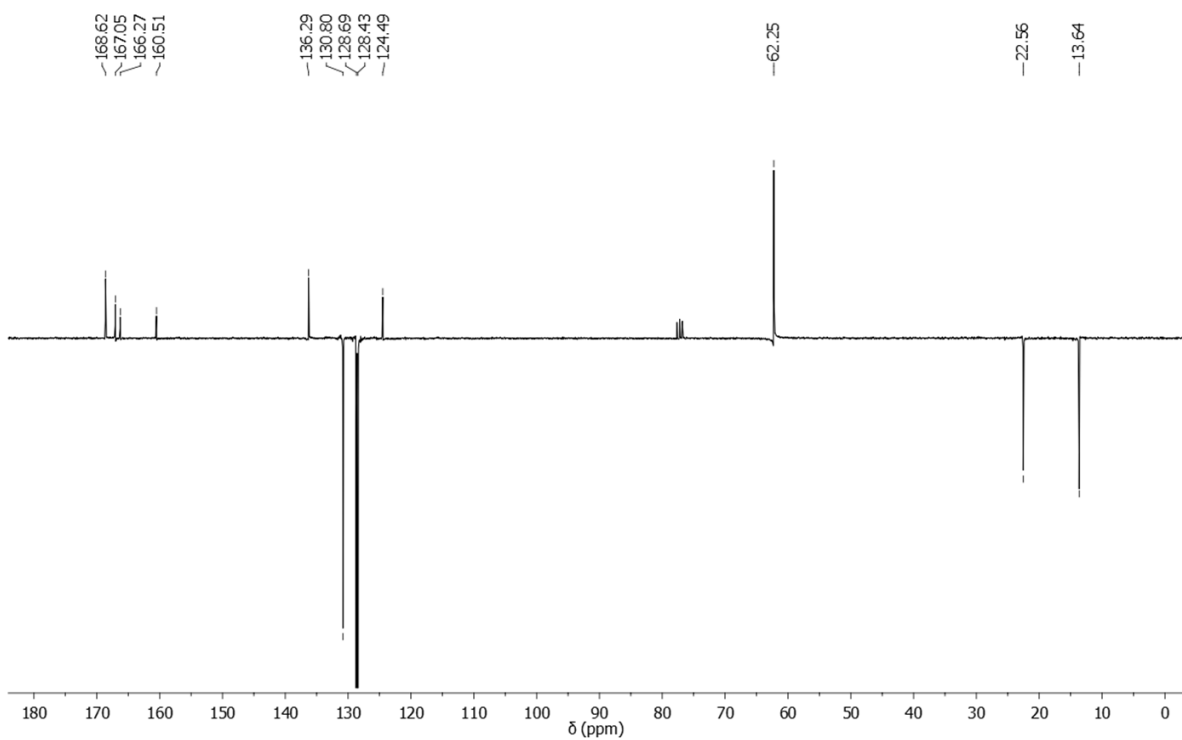


Figura C49. Espectro de RMN de ¹³C, APT (CDCl₃, 75 MHz) da pirimidina 6.

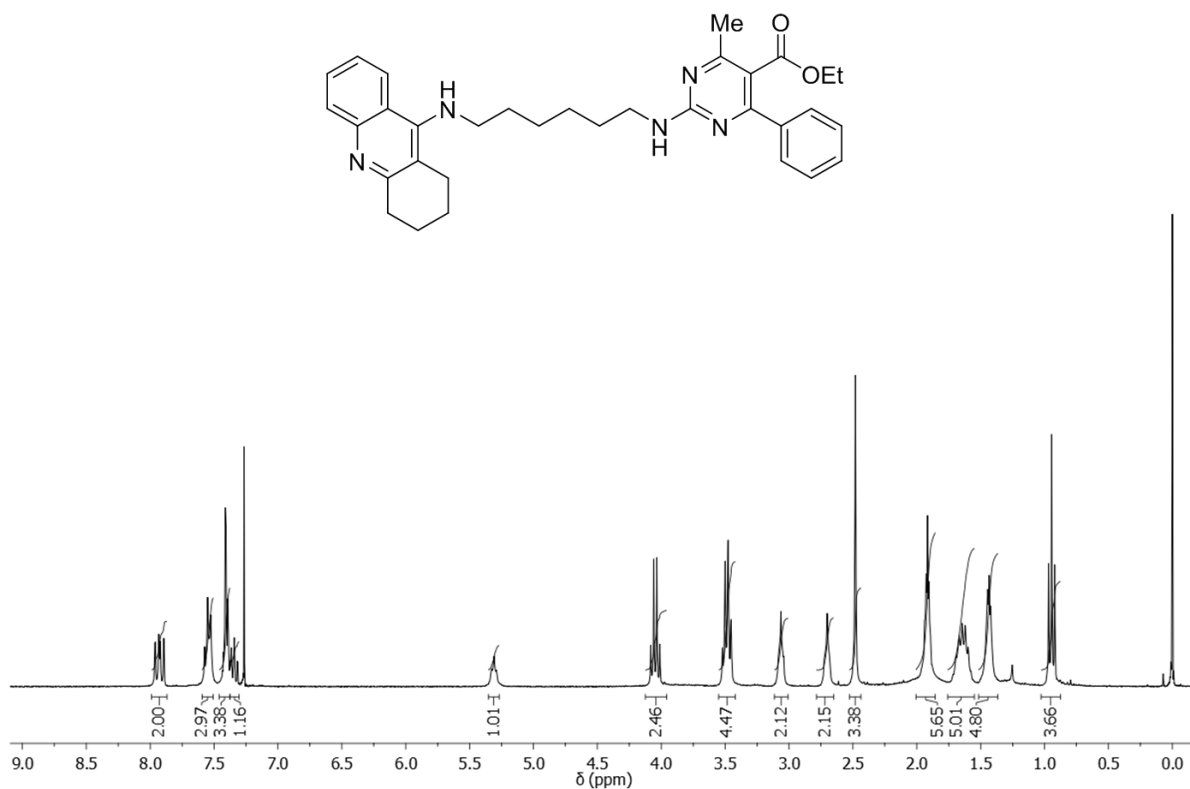


Figura C50. Espectro de RMN de ^1H (CDCl₃, 300 MHz) do híbrido tacrina(6)-pirimidina (**43a**).

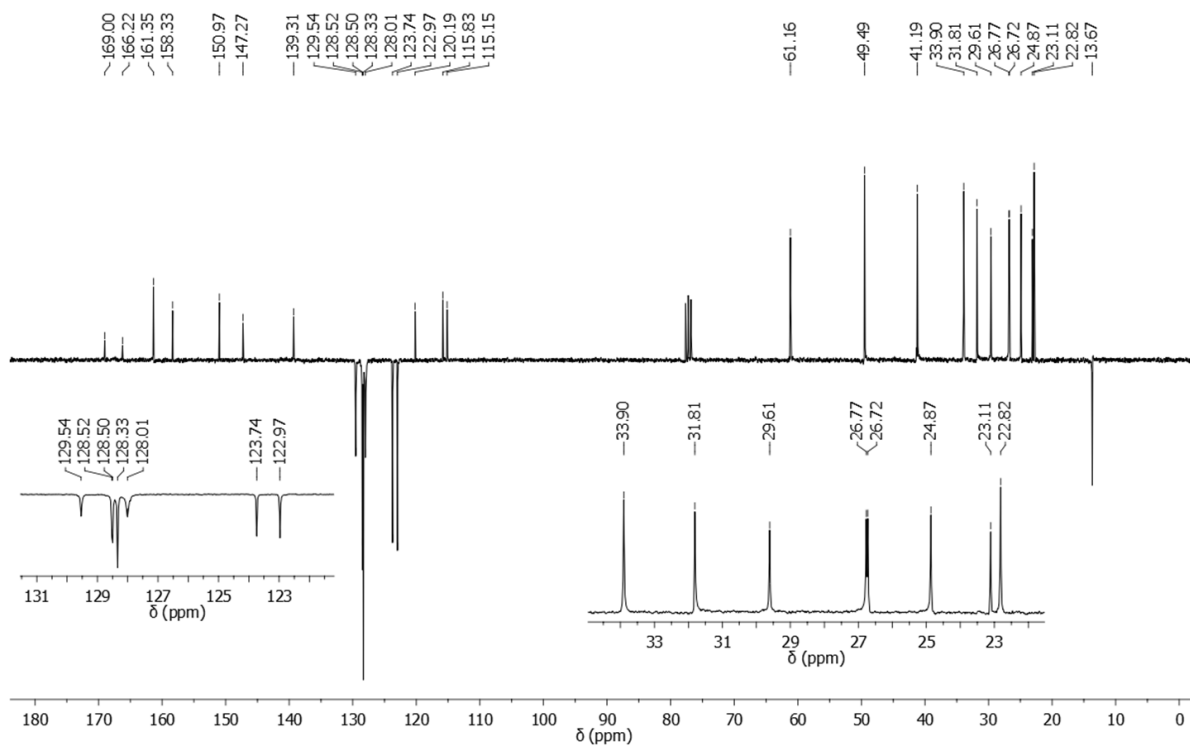


Figura C51. Espectro de RMN de ^{13}C , APT (CDCl₃, 75 MHz) do híbrido **43a**.

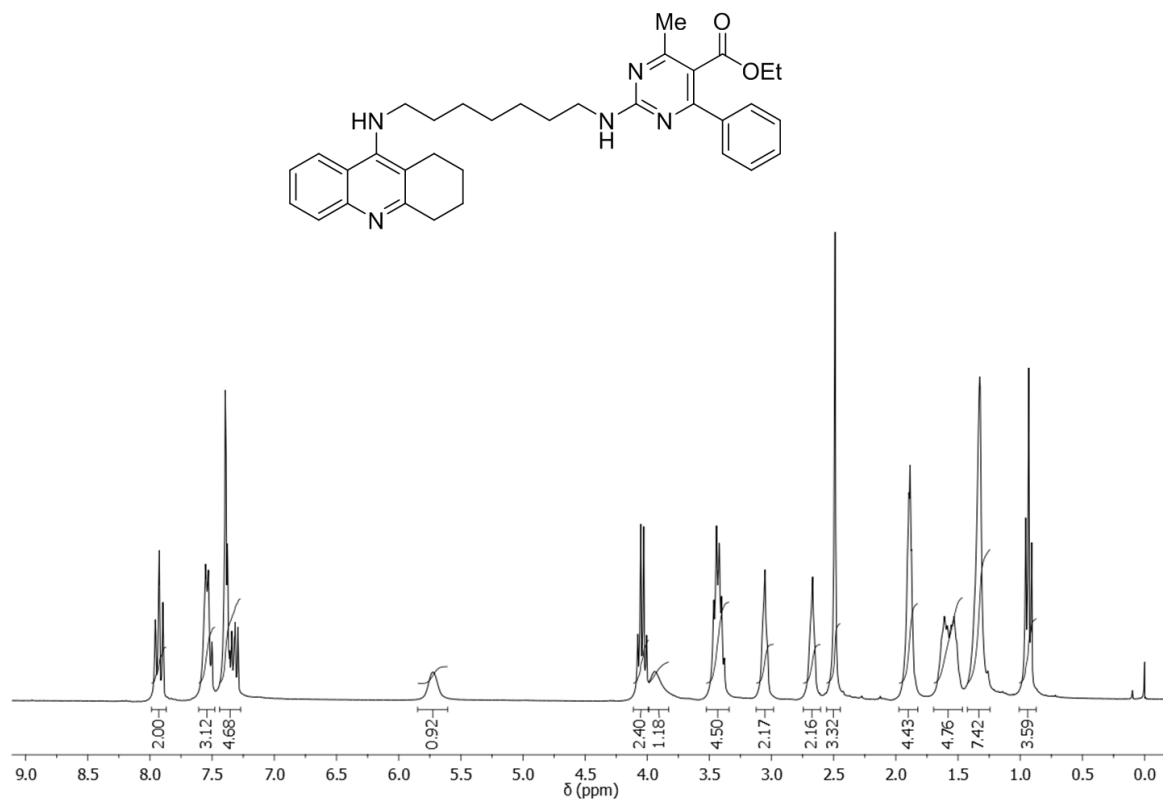


Figura C52. Espectro de RMN de ¹H (CDCl₃, 300 MHz) do híbrido tacrina(7)-pirimidina (**43b**).

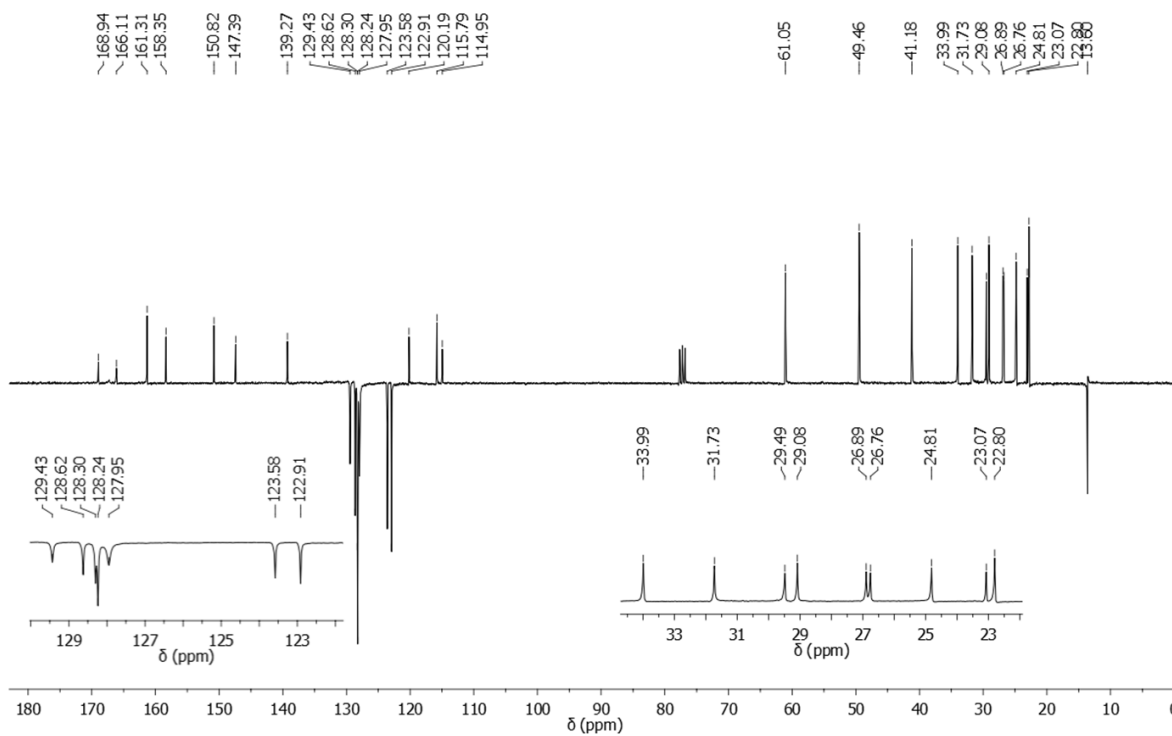


Figura C53. Espectro de RMN de ¹³C, APT (CDCl₃, 75 MHz) do híbrido **43b**.

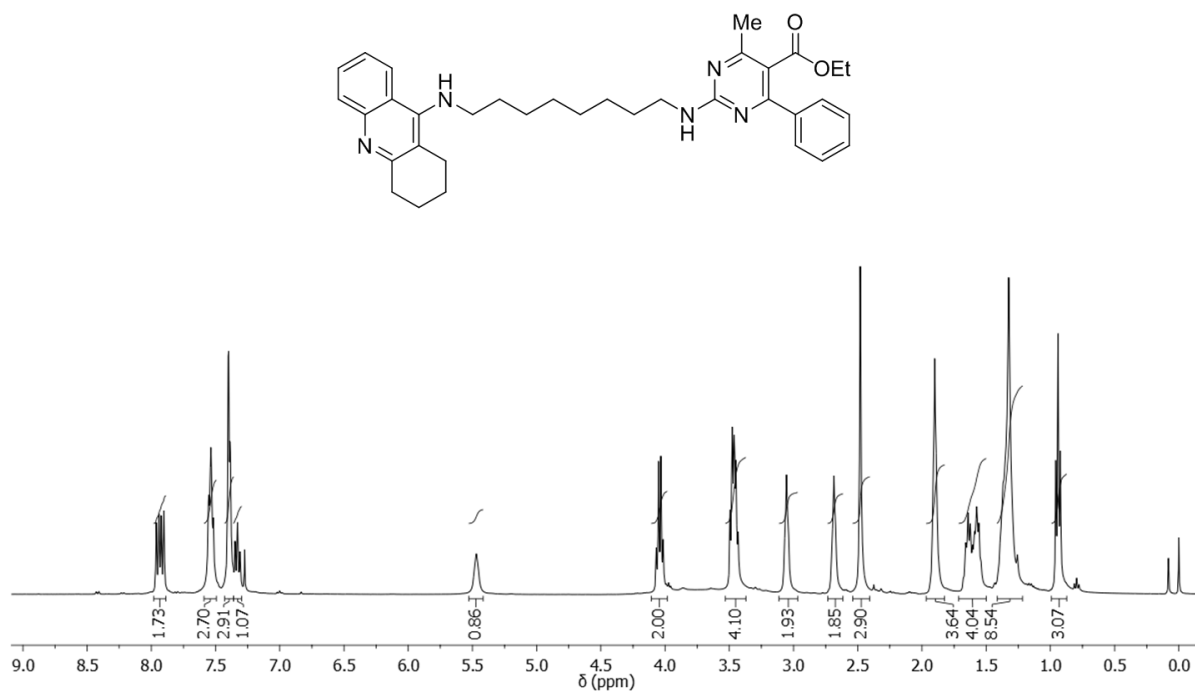


Figura C54. Espectro de RMN de ¹H (CDCl₃, 300 MHz) do híbrido tacrina(8)-pirimidina (**43c**).

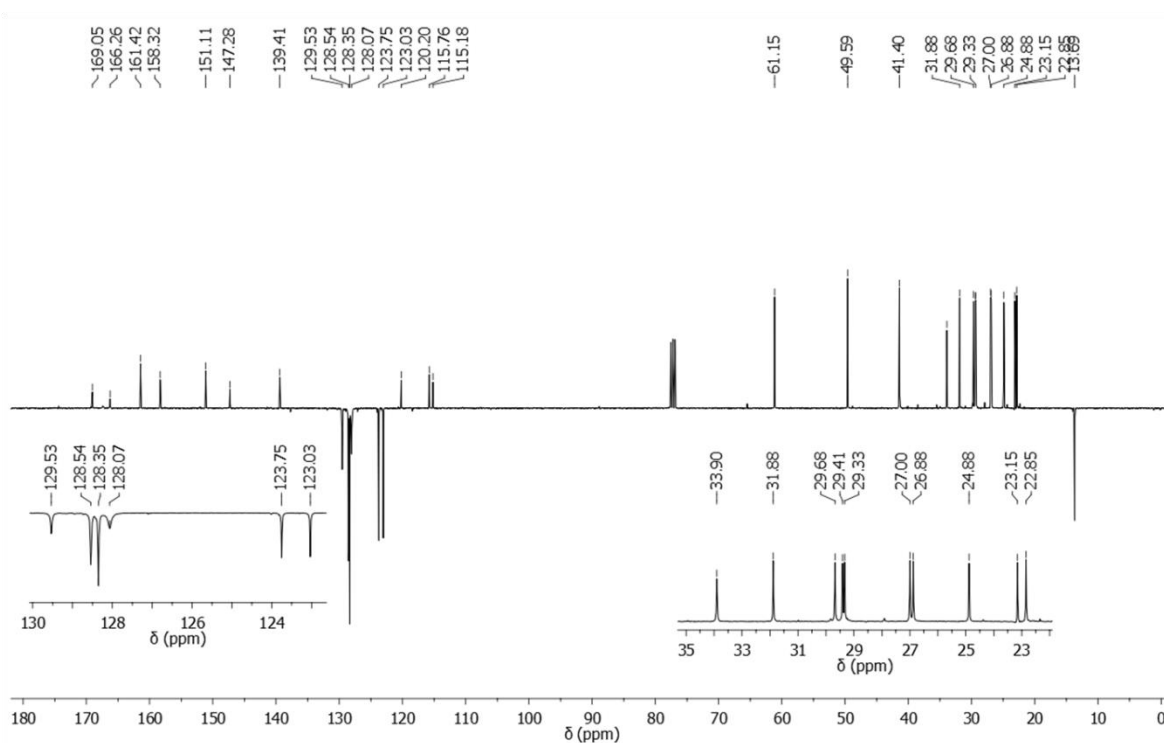


Figura C55. Espectro de RMN de ¹³C, APT (CDCl₃, 75 MHz) do híbrido **43c**.

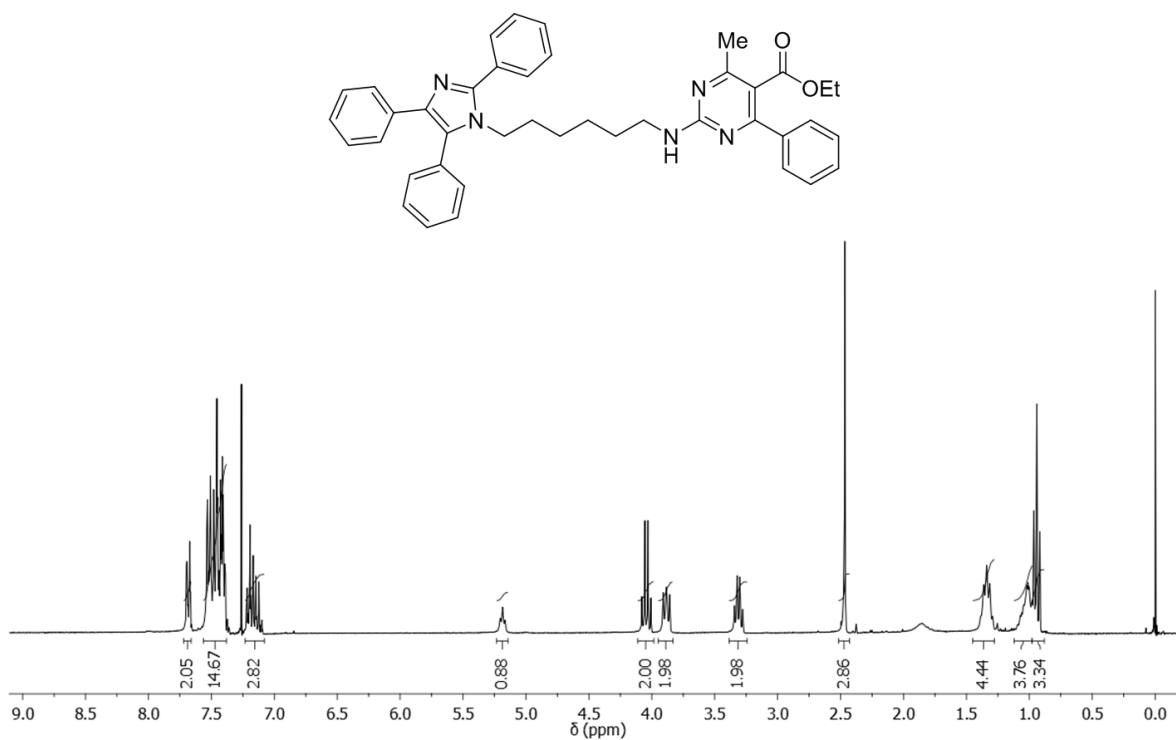


Figura C56. Espectro de RMN de ^1H (CDCl₃, 300 MHz) do híbrido lofina(6)-pirimidina (**44a**).

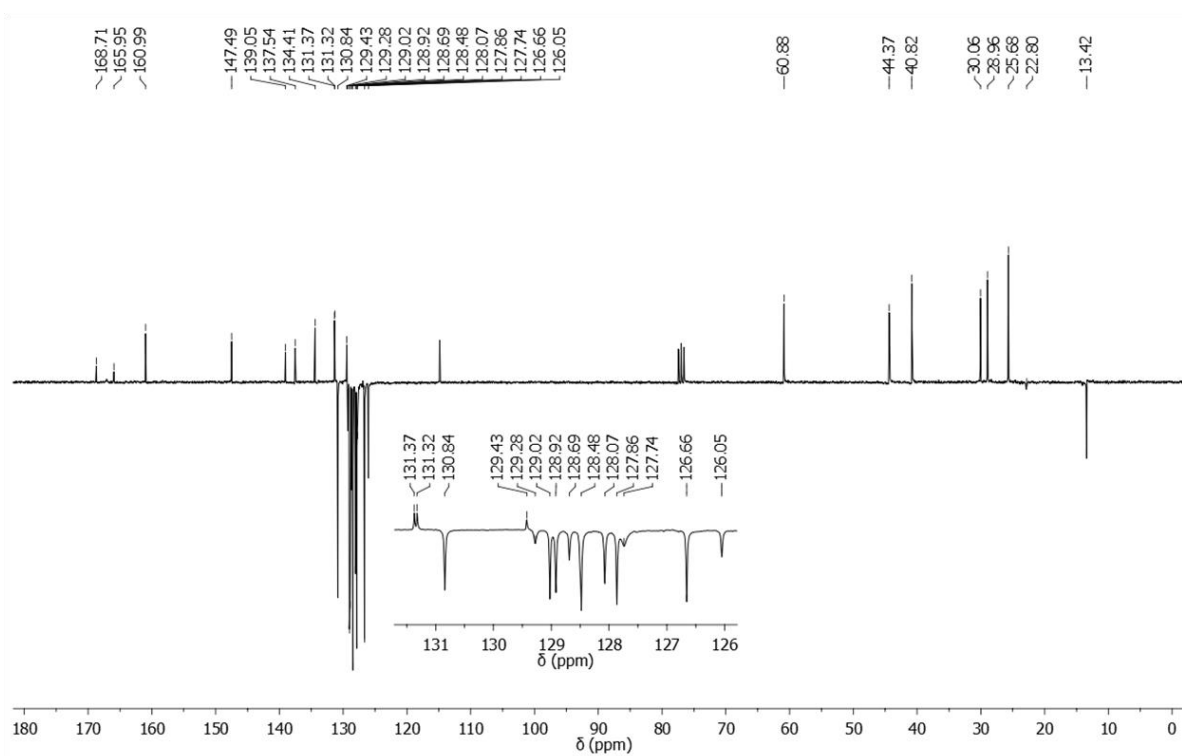


Figura C57. Espectro de RMN de ^{13}C , APT (CDCl₃, 75 MHz) do híbrido **44a**.

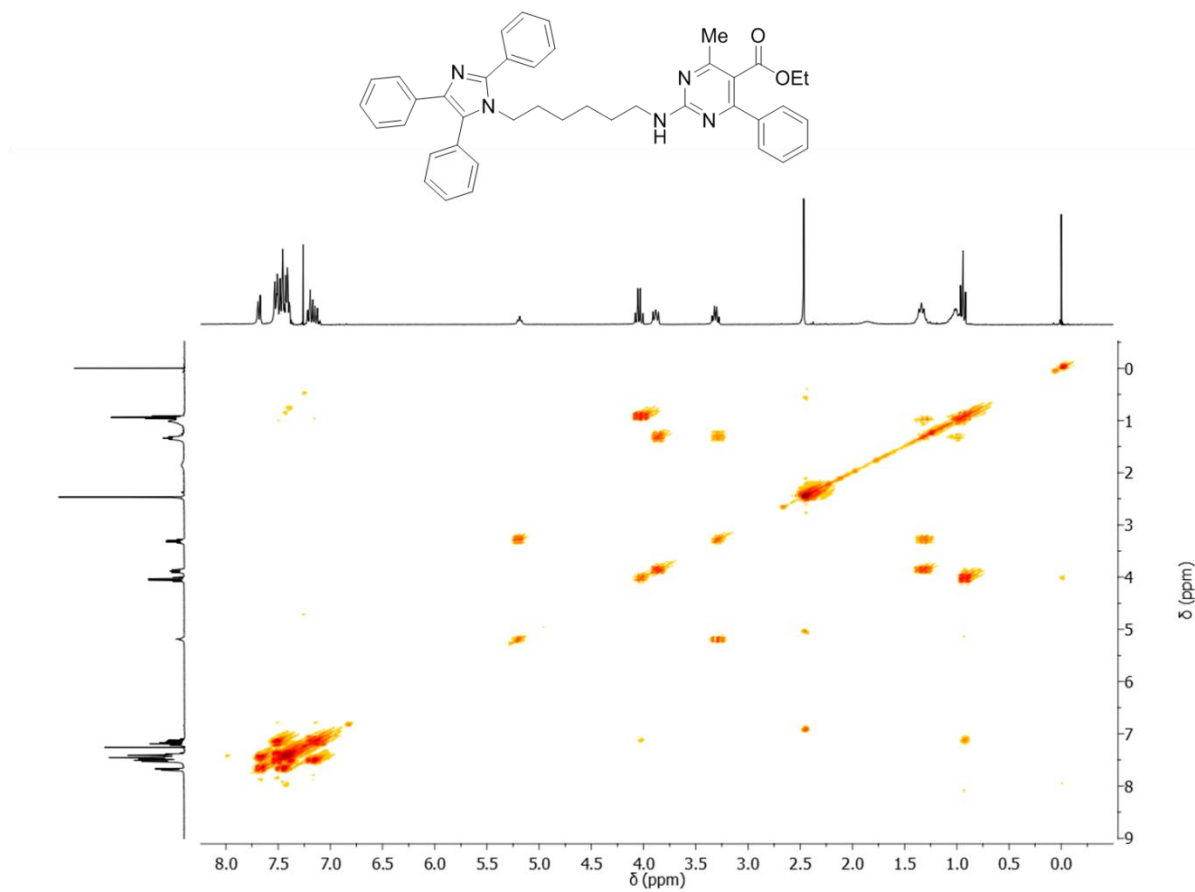


Figura C58. Espectro de RMN bidimensional ^1H - ^1H -COSY (CDCl_3 , 300 MHz) do híbrido **44a**.

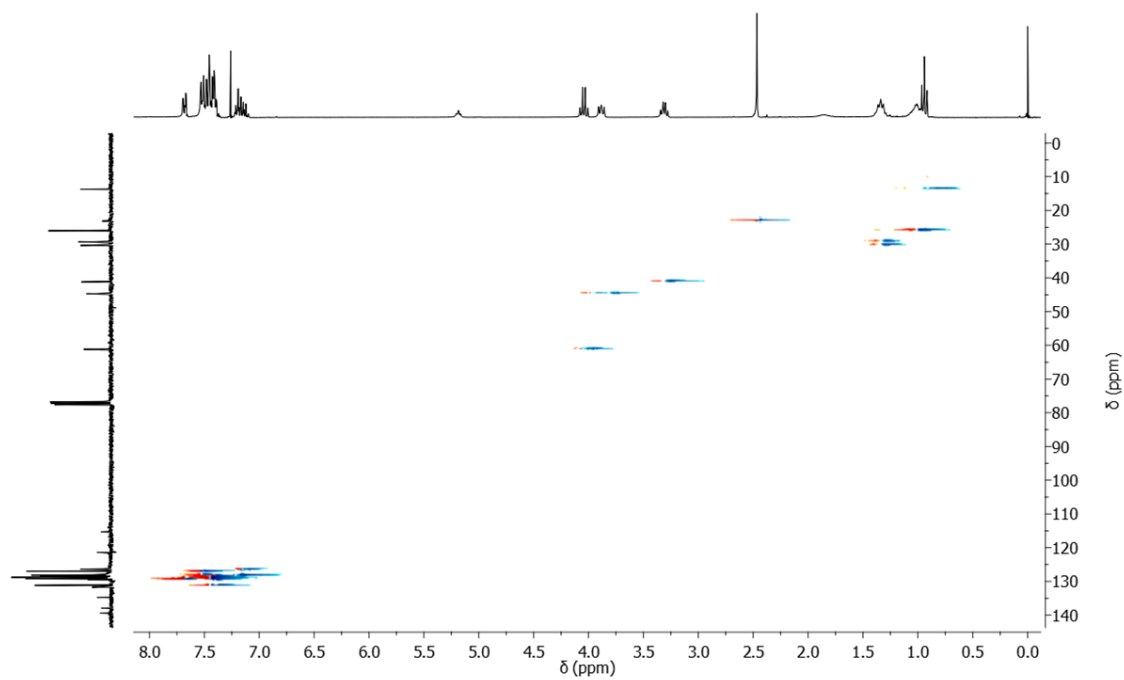


Figura C59. Espectro de RMN bidimensional ^1H - ^{13}C -HMQC (CDCl_3) do híbrido **44a**.

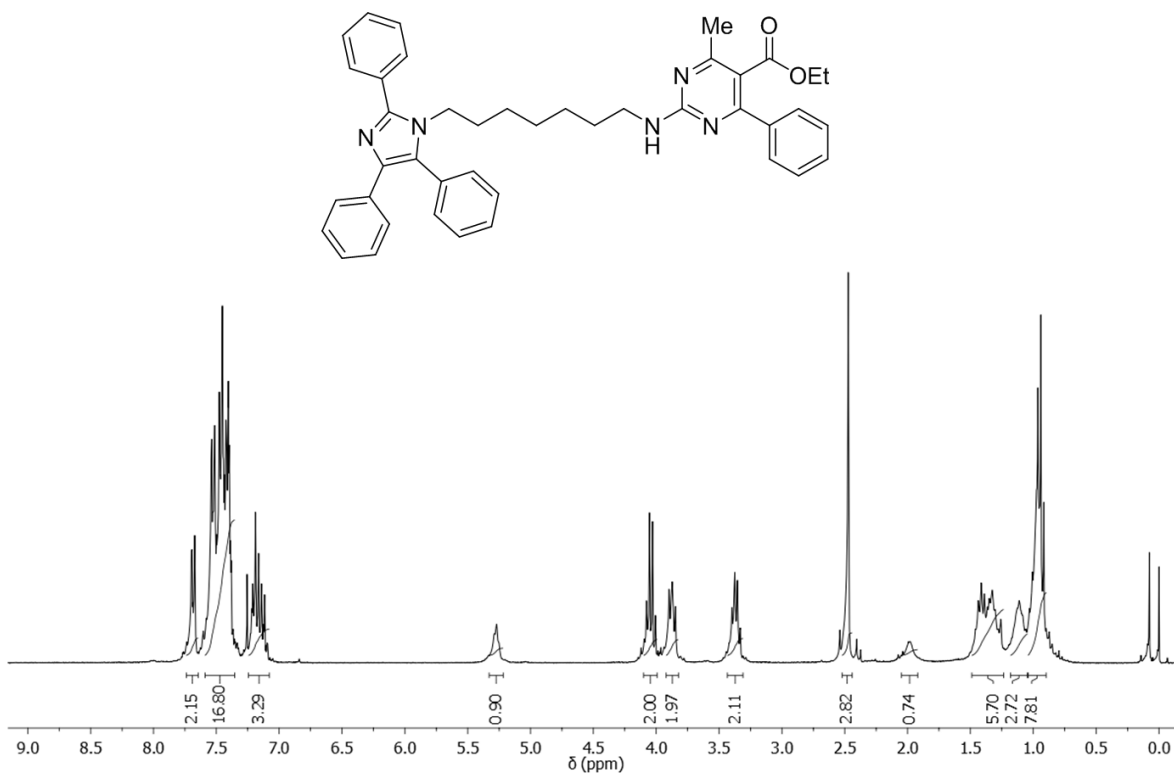


Figura C60. Espectro de RMN de ¹H (CDCl₃, 300 MHz) do híbrido lofina(7)-pirimidina (**44b**).

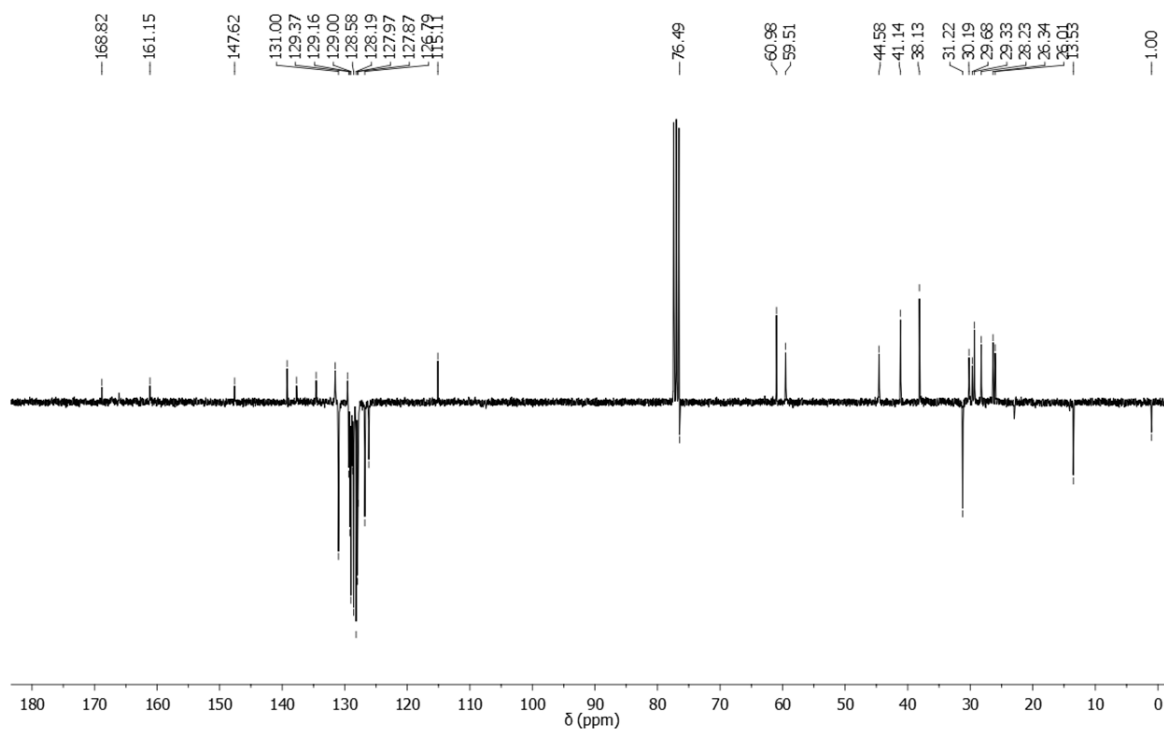


Figura C61. Espectro de RMN de ¹³C, APT (CDCl₃, 75 MHz) do híbrido **44b**.

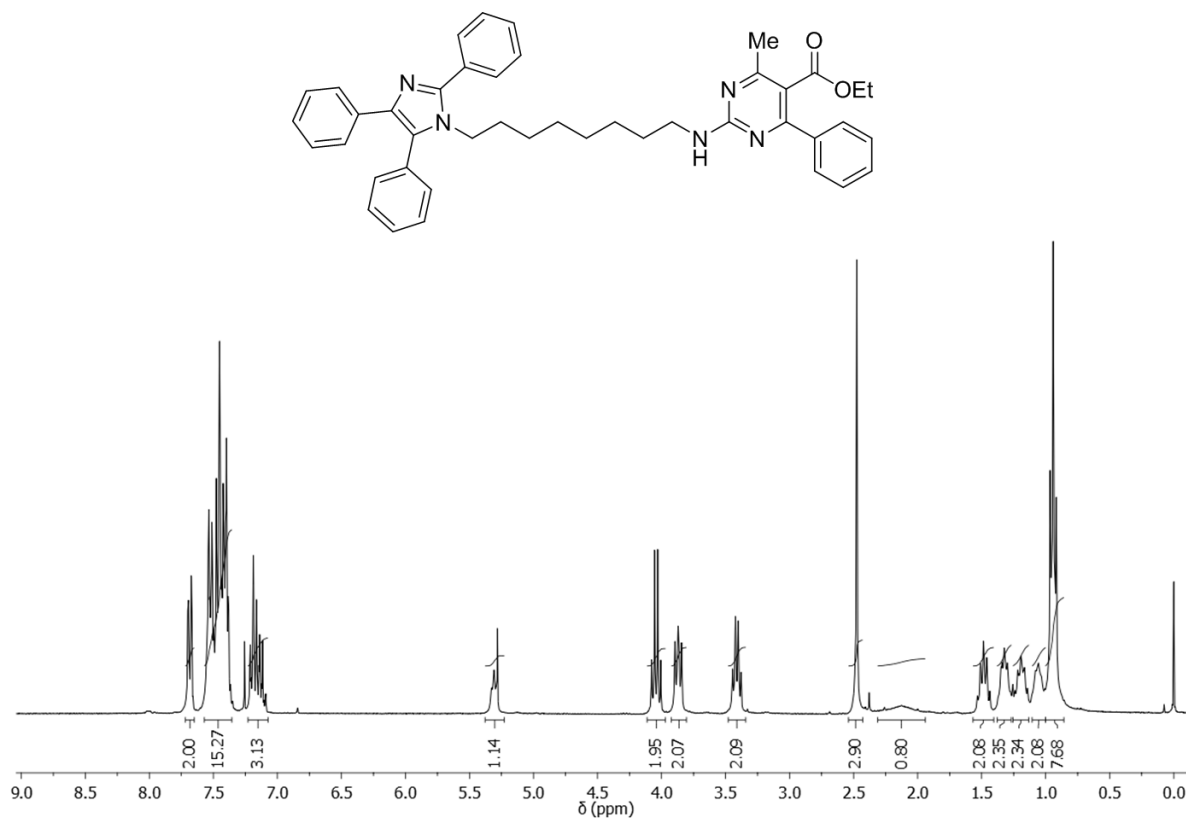


Figura C62. Espectro de RMN de ^1H (CDCl_3 , 300 MHz) do híbrido lofina(8)-pirimidina (**44c**).

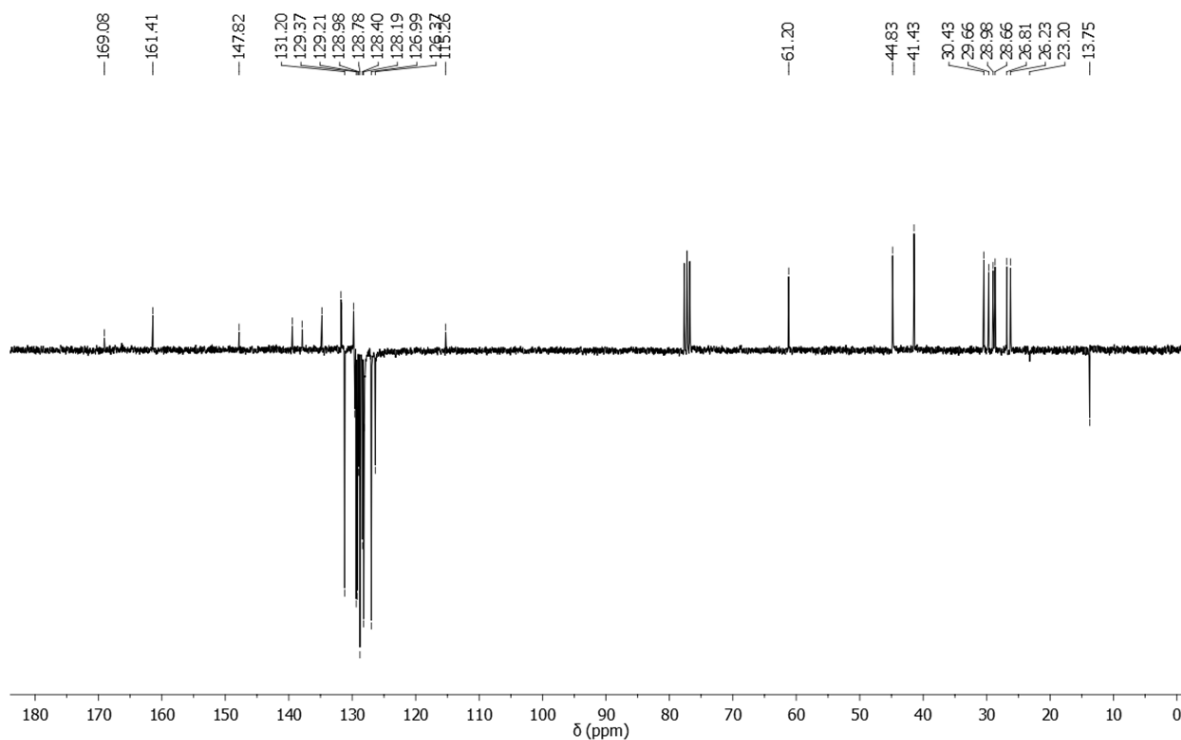


Figura C63. Espectro de RMN de ^{13}C , APT (CDCl_3 , 75 MHz) do híbrido **44c**.

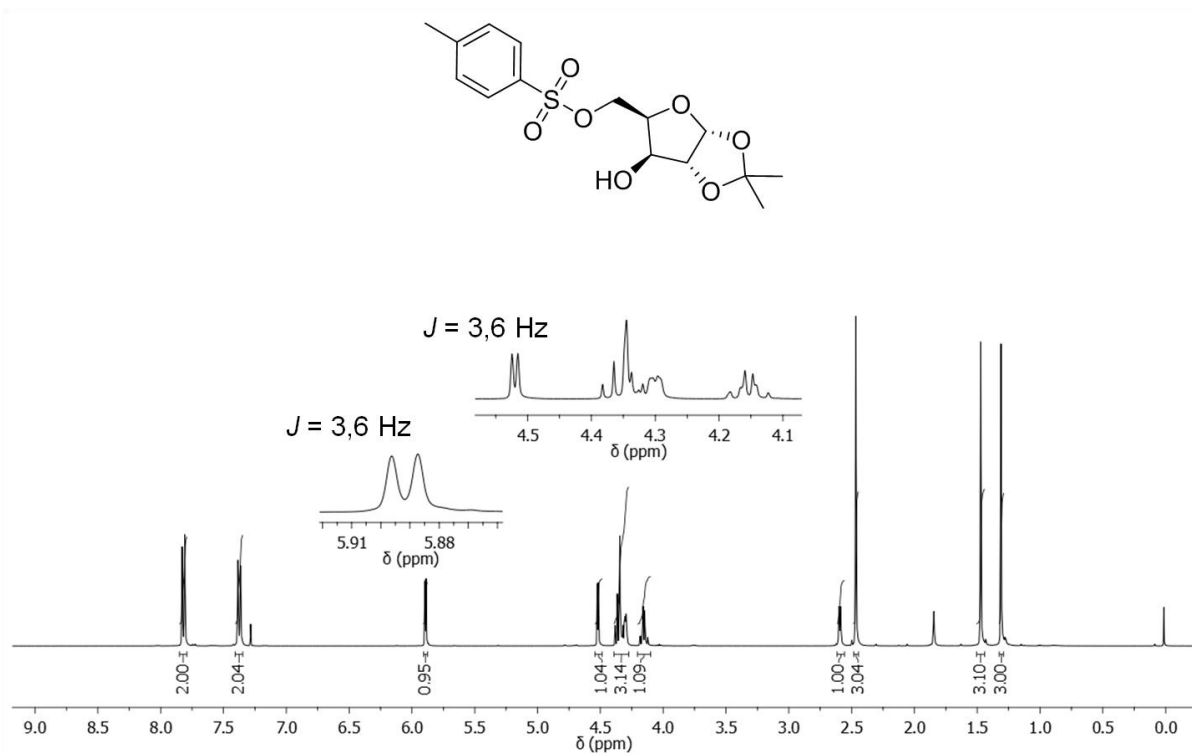


Figura C64. Espectro de RMN de ^1H (CDCl₃, 400 MHz) do tosilato da D-xilose (**45**).

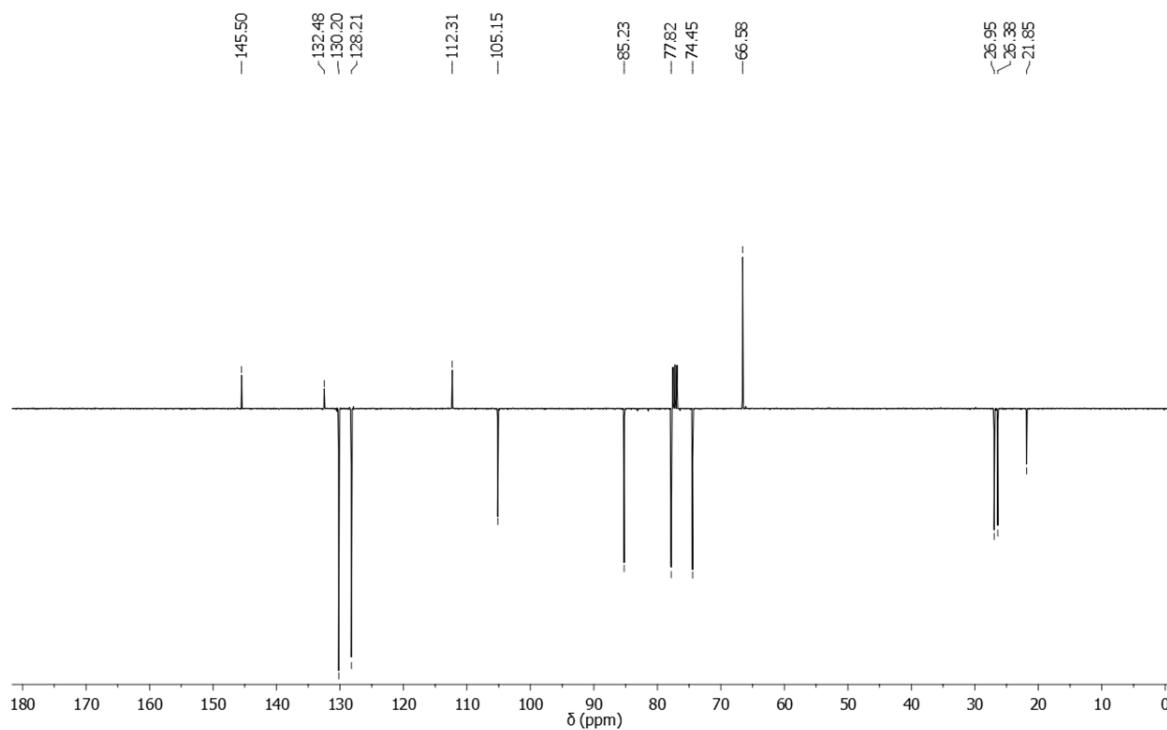


Figura C65. Espectro de RMN de ^{13}C , APT (CDCl₃, 100 MHz) do tosilato da D-xilose (**45**).

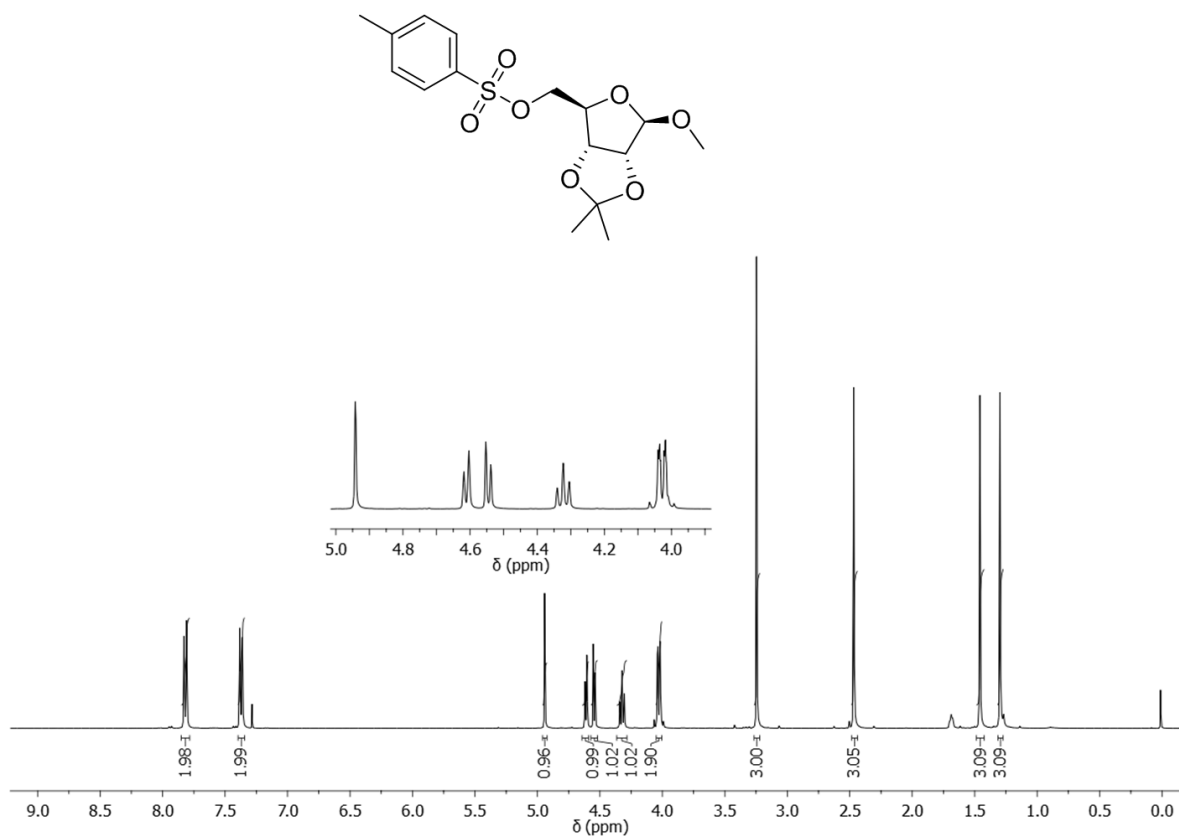


Figura C66. Espectro de RMN de ^1H (CDCl₃, 400 MHz) do tosilato da D-ribose (**46**).

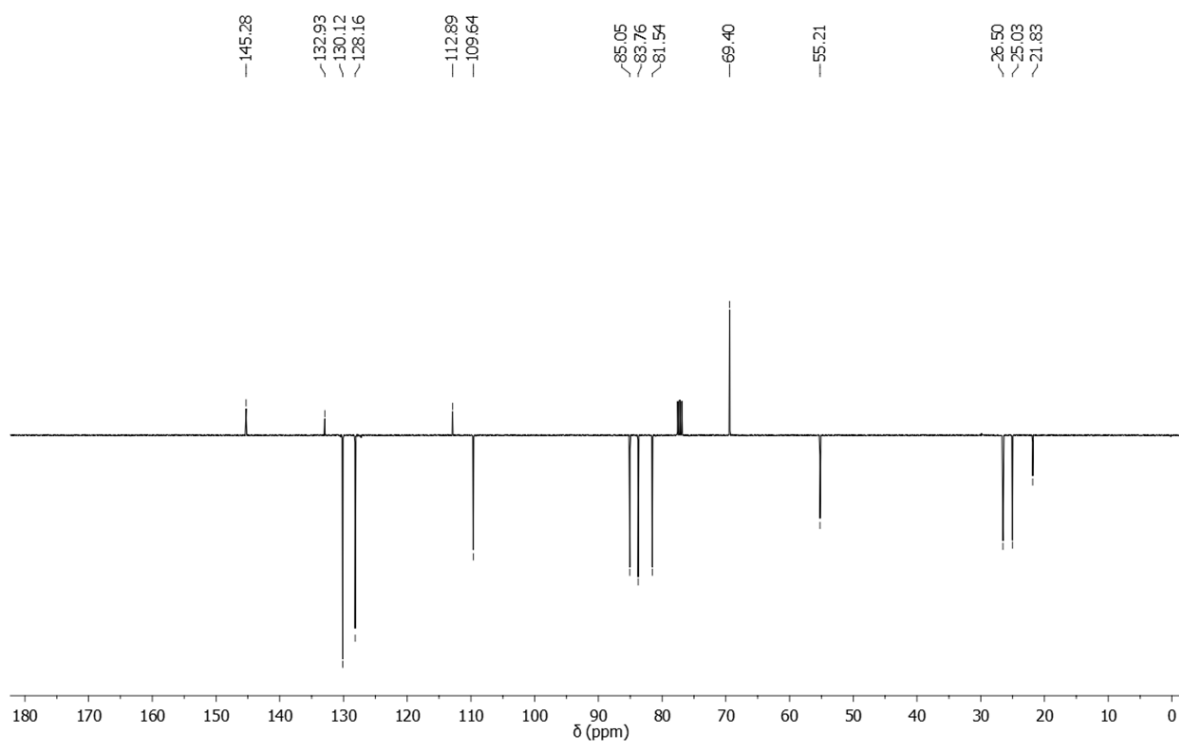


Figura C67. Espectro de RMN de ^{13}C , APT (CDCl₃, 100 MHz) do tosilato da D-ribose (**46**).

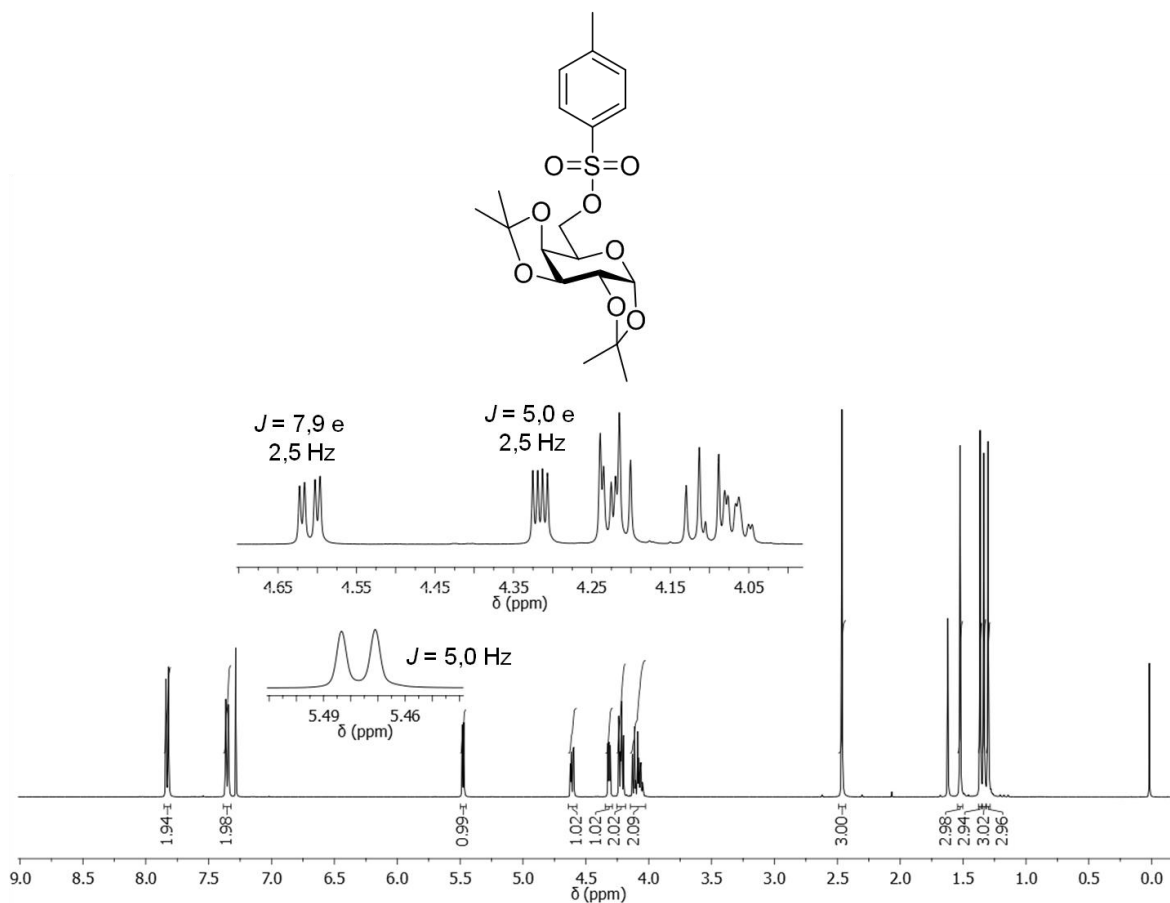


Figura C68. Espectro de RMN de ^1H (CDCl₃, 400 MHz) do tosilato da D-galactose (47).

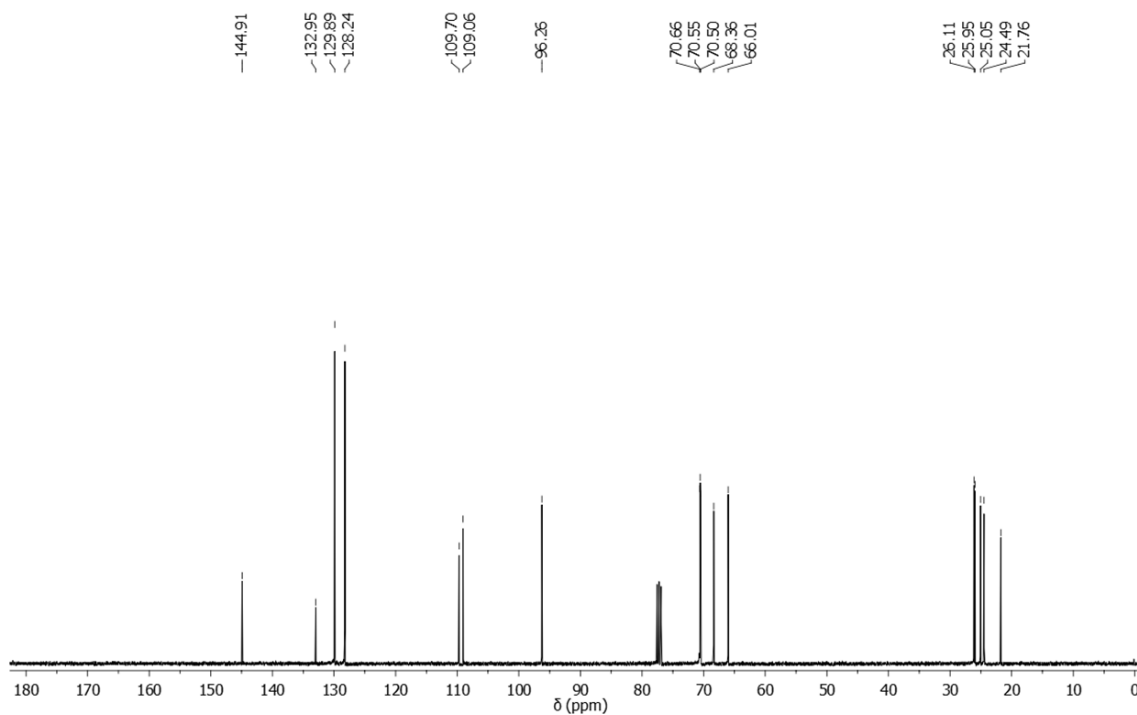


Figura C69. Espectro de RMN de ^{13}C (CDCl₃, 100 MHz) do tosilato da D-galactose (47).

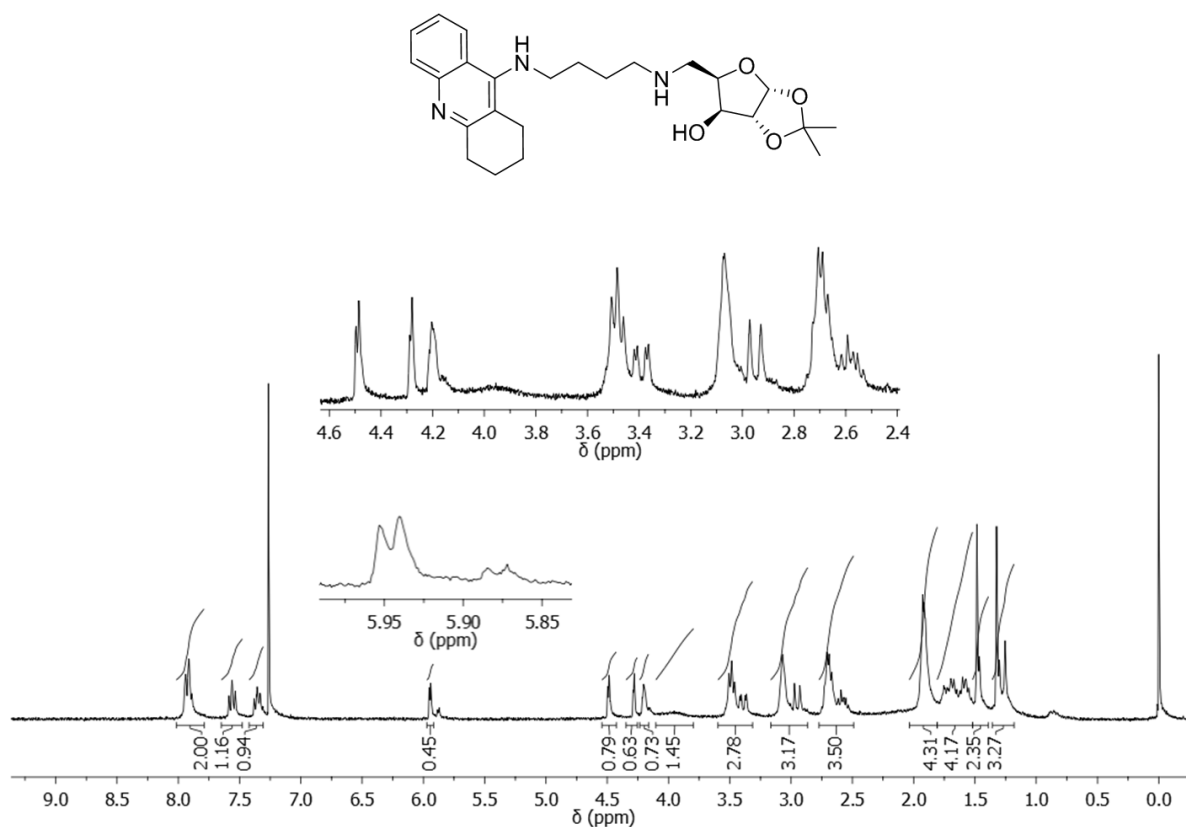


Figura C70. Espectro de RMN de ¹H (CDCl₃, 300 MHz) do híbrido tacrina(4)-xilose (**54a**).

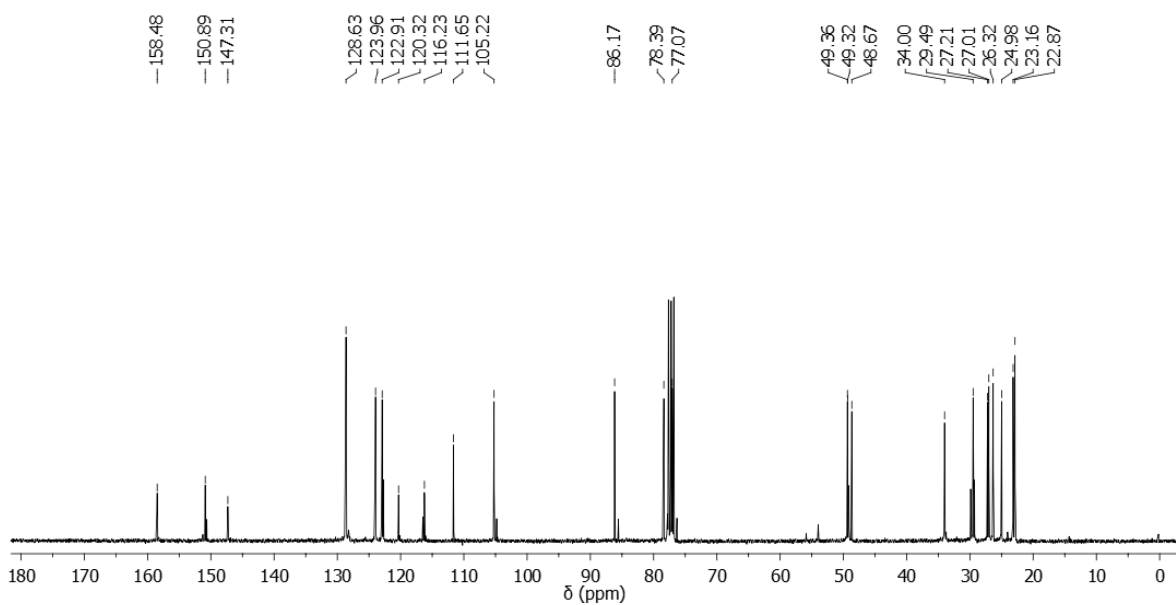


Figura C71. Espectro de RMN de ¹³C (CDCl₃, 75 MHz) do híbrido **54a**.

(Ampliações na página seguinte)

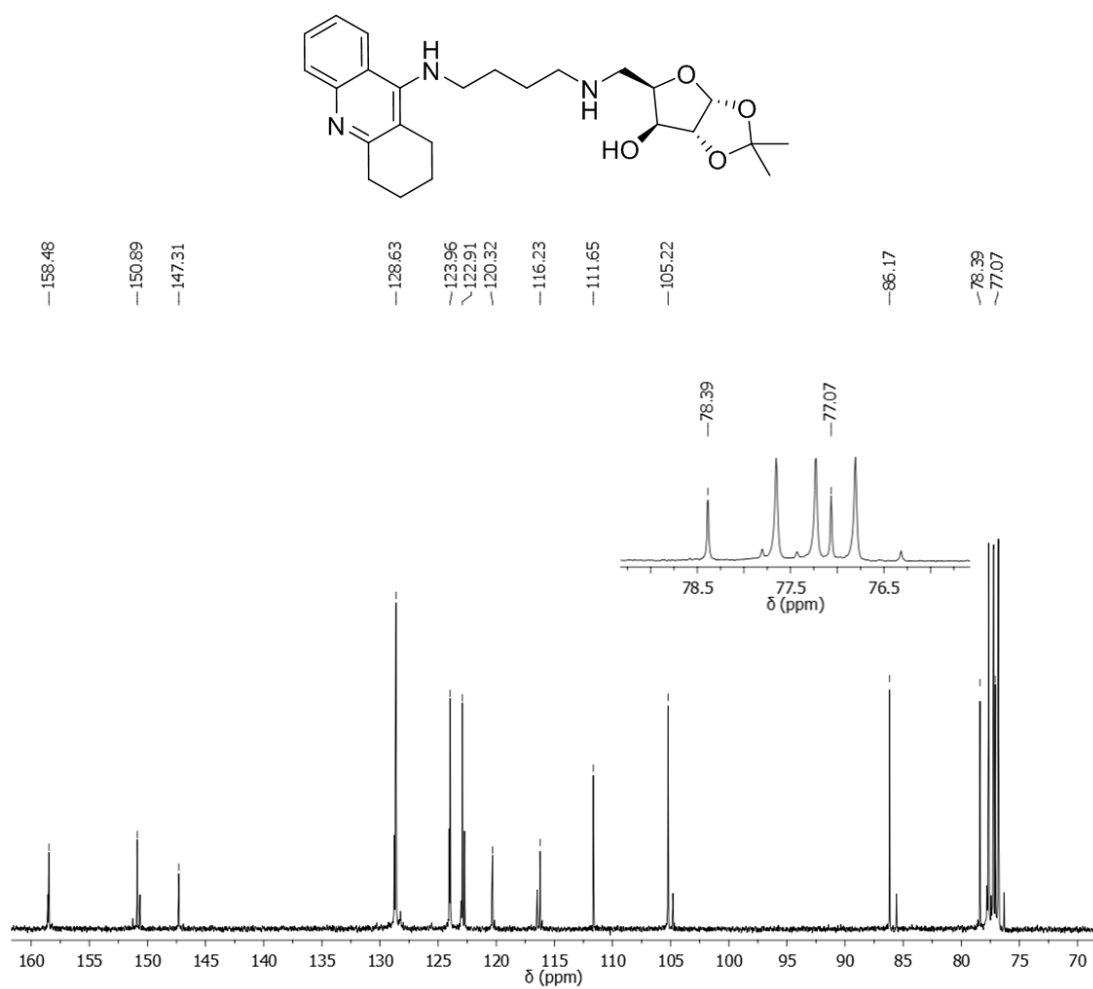


Figura C72. Ampliação do espectro de RMN de ^{13}C do híbrido **54a** entre 70 e 160 ppm.

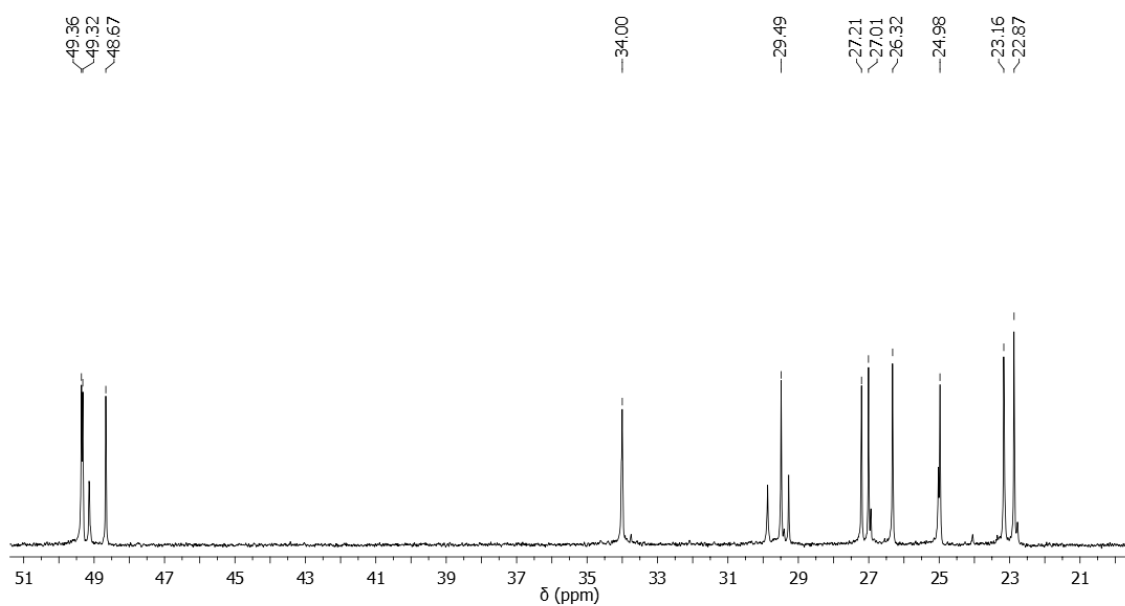


Figura C73. Ampliação do espectro de RMN de ^{13}C do híbrido **54a** entre 21 e 51 ppm.

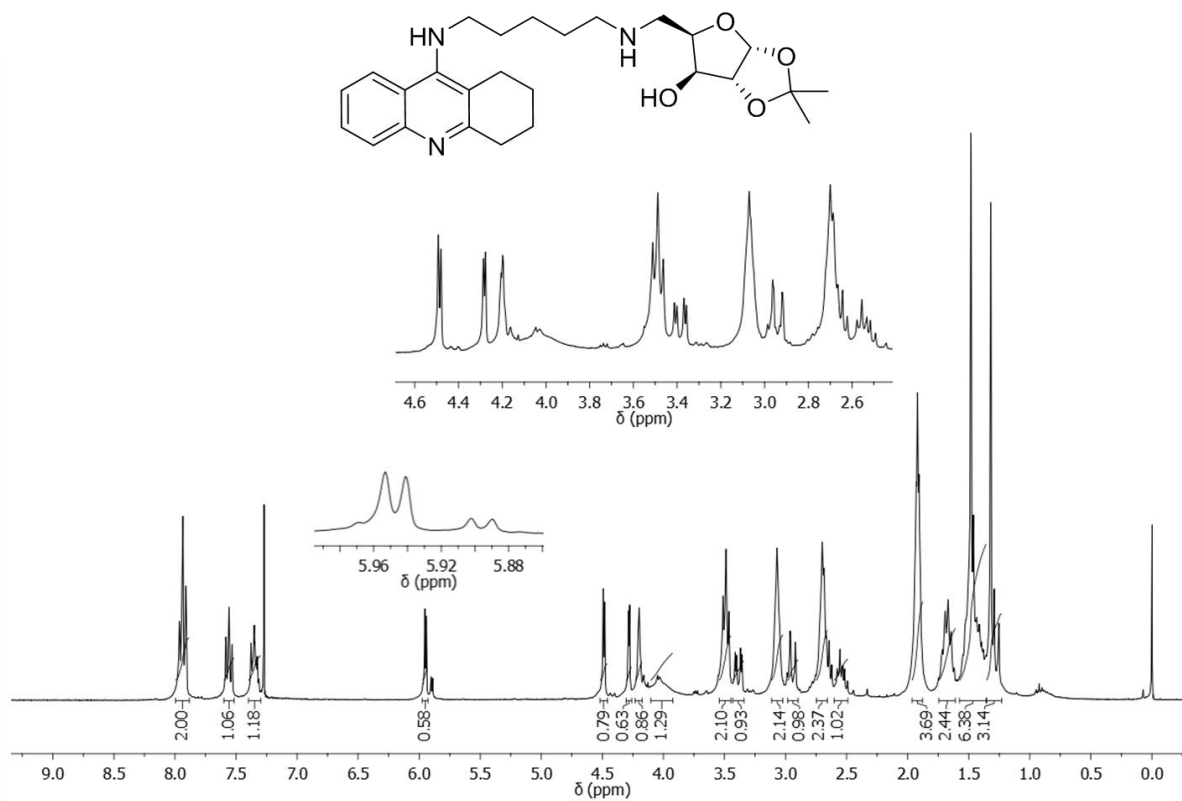


Figura C74. Espectro de RMN de ^1H (CDCl_3 , 300 MHz) do híbrido tacrina(5)-xilose (**54b**).

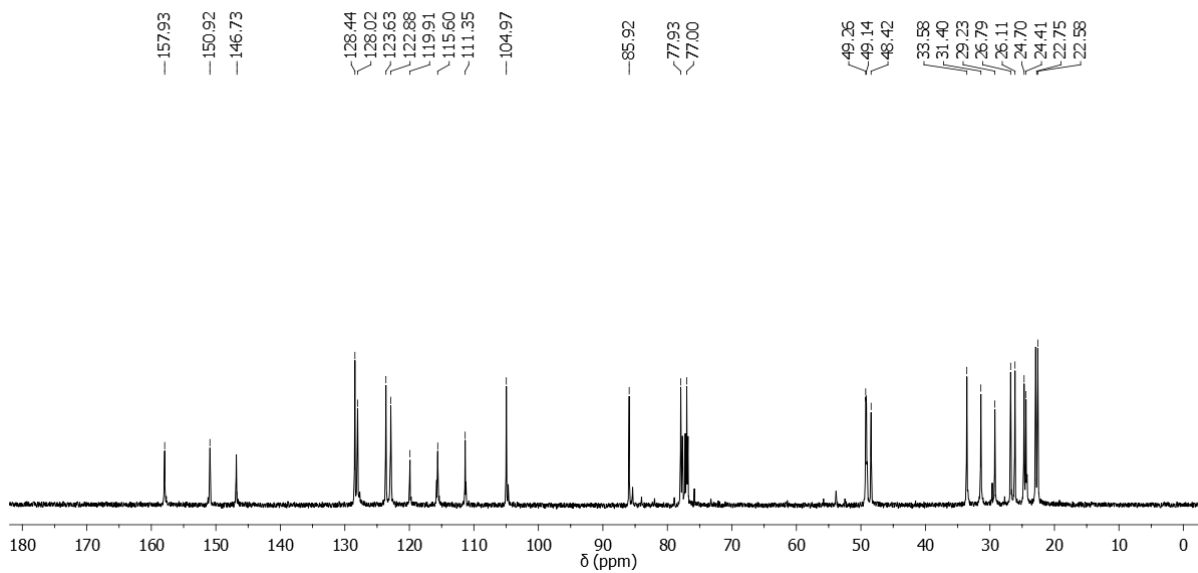


Figura C75. Espectro de RMN de ^{13}C (CDCl_3 , 75 MHz) do híbrido **54b**.

(Ampliações na página seguinte)

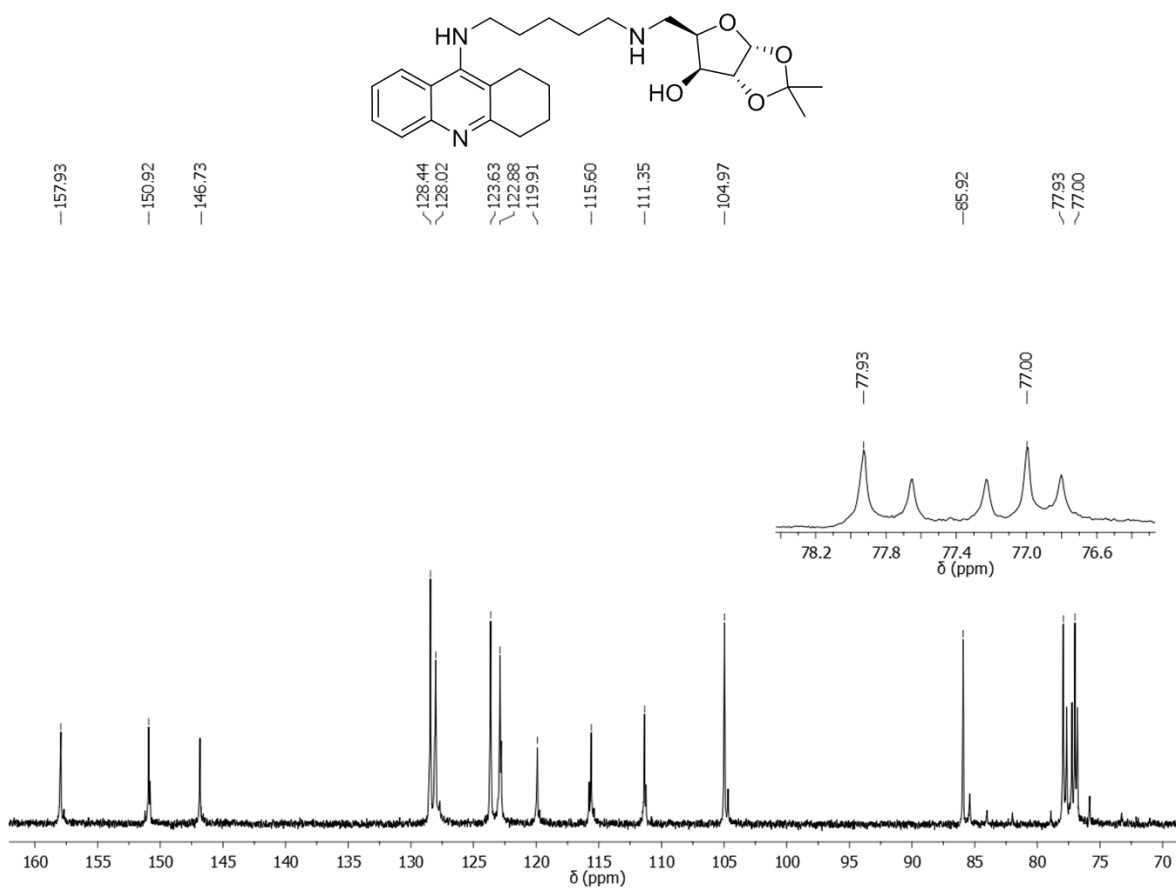


Figura C76. Ampliação do espectro de RMN de ^{13}C do híbrido **54b** entre 70 e 160 ppm.

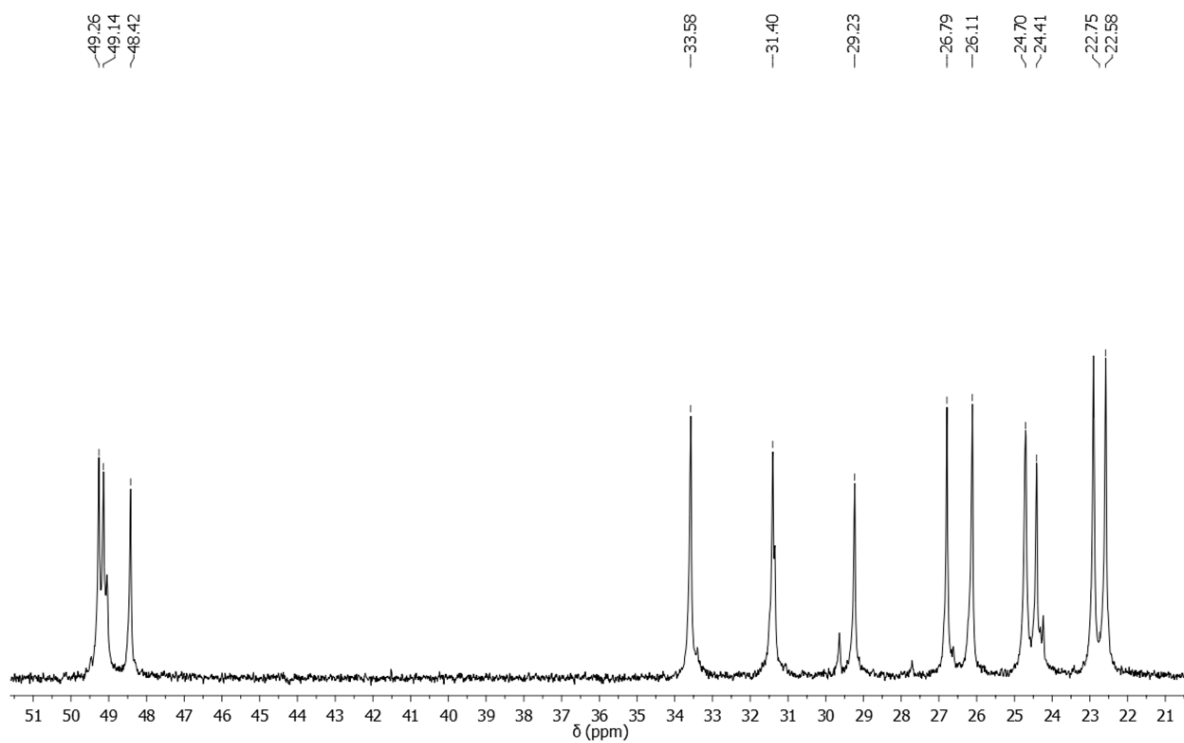


Figura C77. Ampliação do espectro de RMN de ^{13}C do híbrido **54b** entre 21 e 51 ppm.

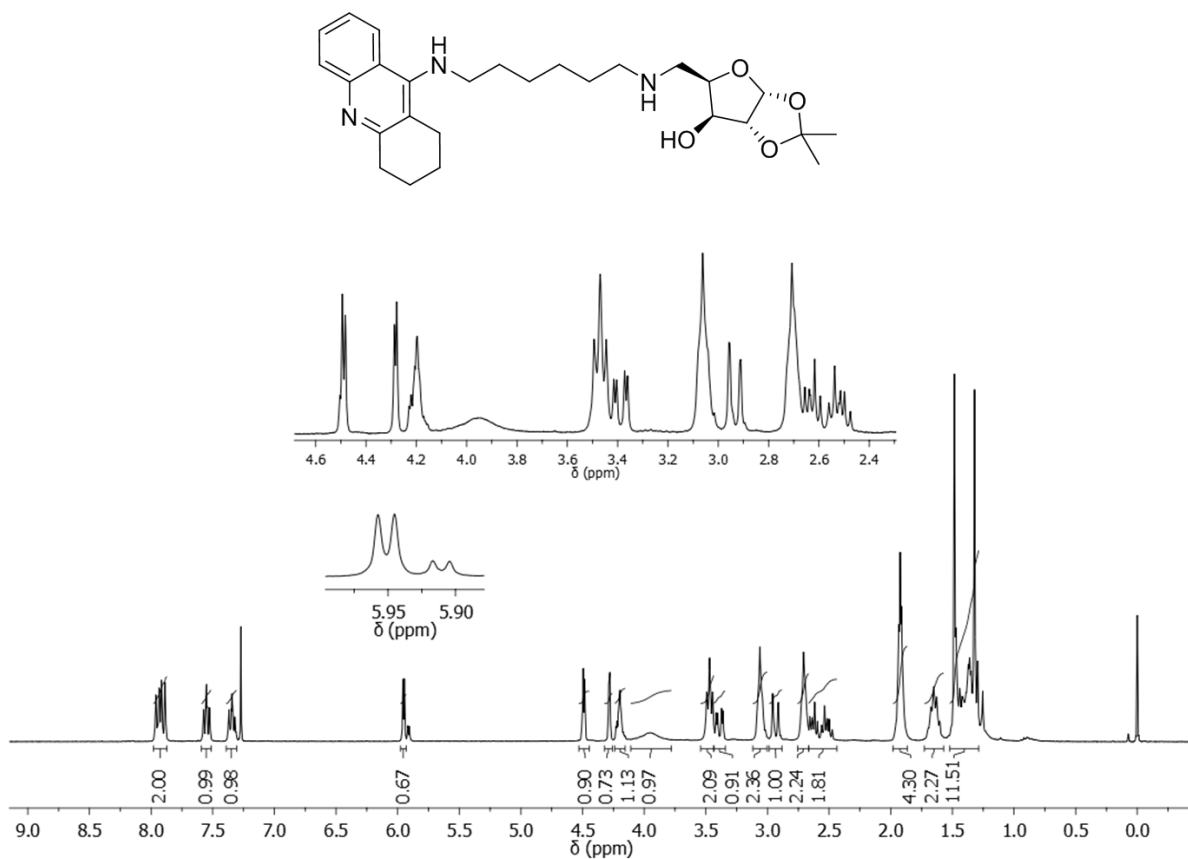


Figura C78. Espectro de RMN de ¹H (CDCl₃, 300 MHz) do híbrido tacrina(6)-xilose (**54c**).

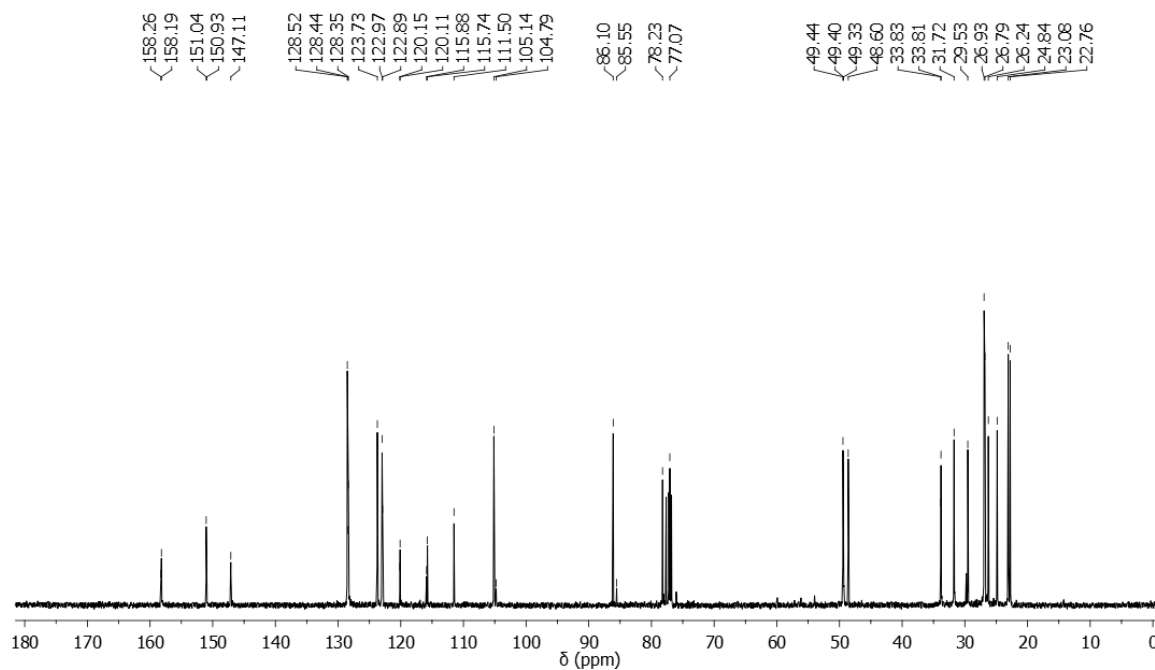


Figura C79. Espectro de RMN de ¹³C (CDCl₃, 75 MHz) do híbrido **54c**.

(APT e Ampliações na página seguinte)

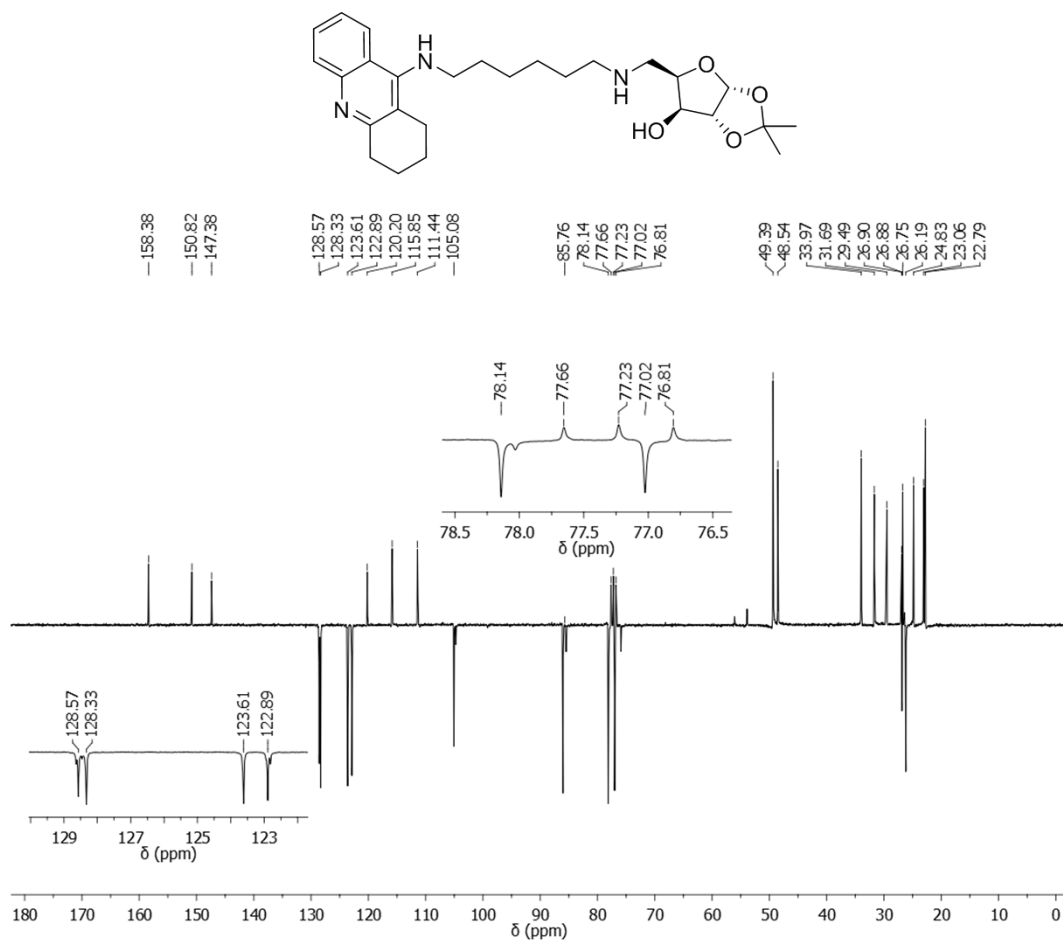


Figura C80. Espectro de RMN de ^{13}C , APT (CDCl_3 , 75 MHz) do híbrido **54c**.

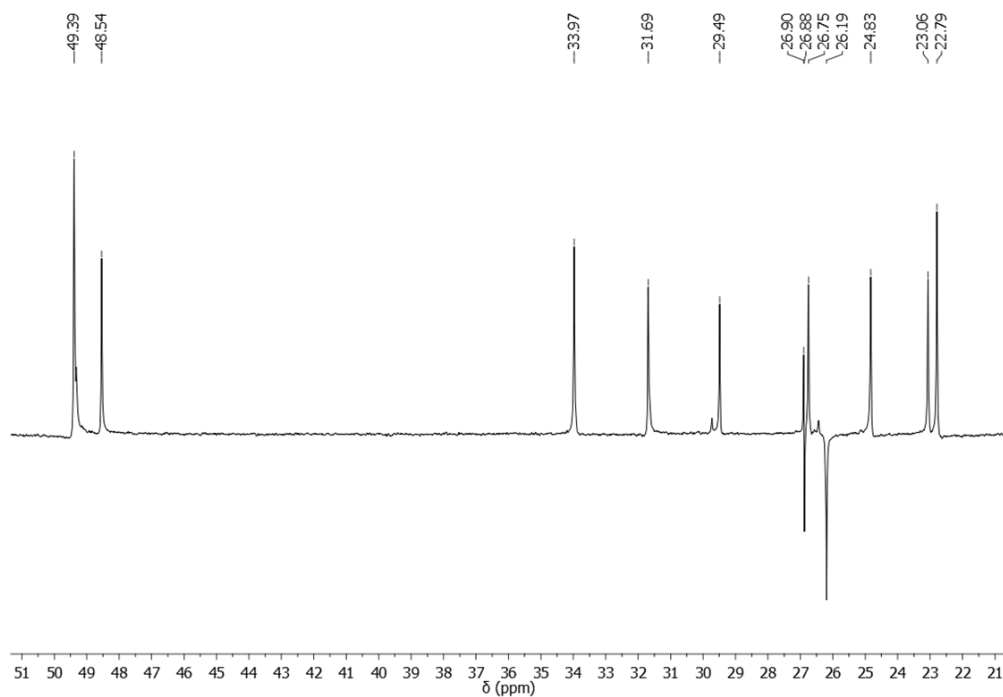


Figura C81. Ampliação do espectro de RMN de ^{13}C (APT) do híbrido **54c** entre 21 e 51 ppm.

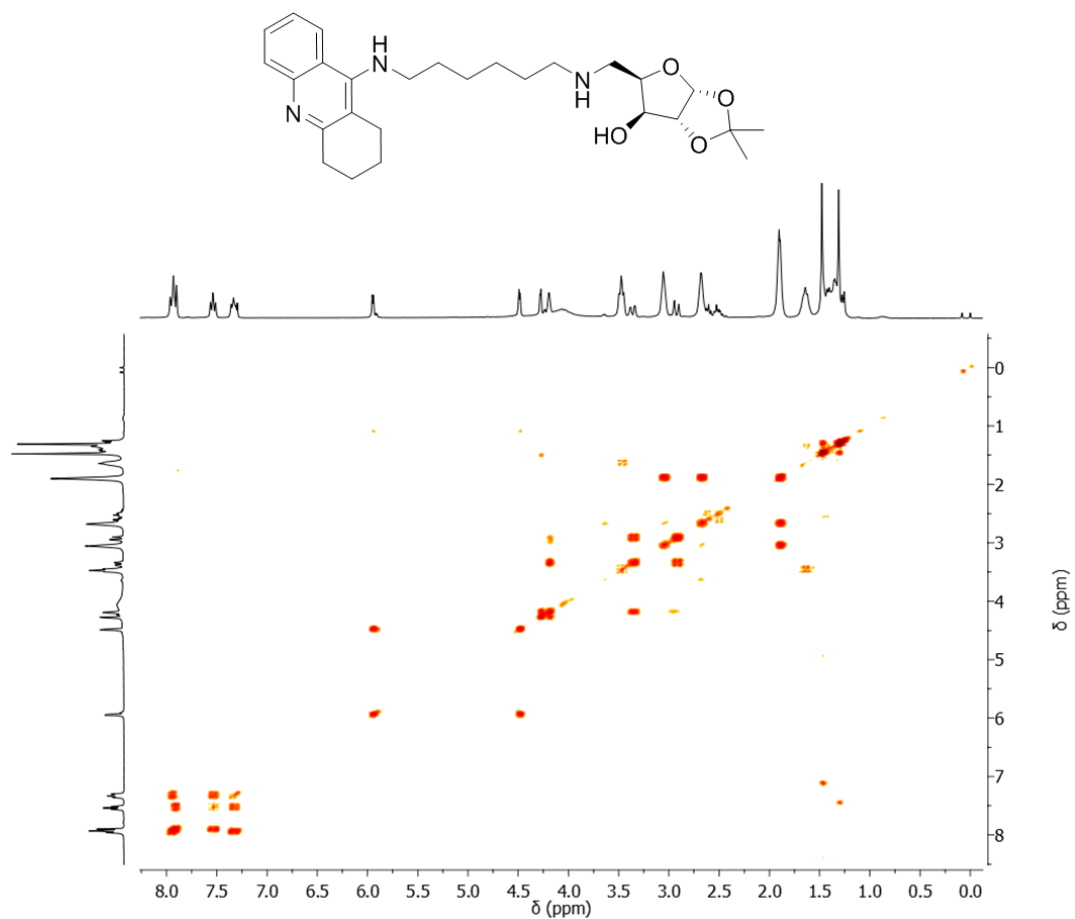


Figura C82. Espectro de RMN bidimensional ^1H - ^1H -COSY (CDCl_3 , 300 MHz) do híbrido **54c**.

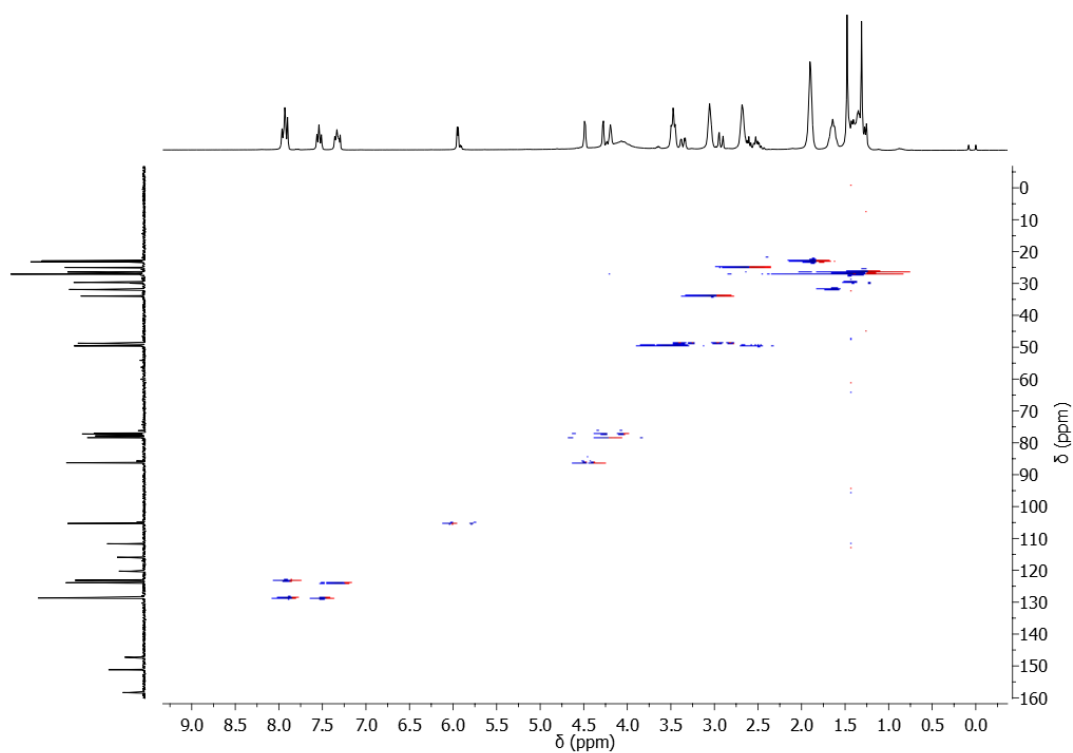


Figura C83. Espectro de RMN bidimensional ^1H - ^{13}C HMQC (CDCl_3) do híbrido **54c**.

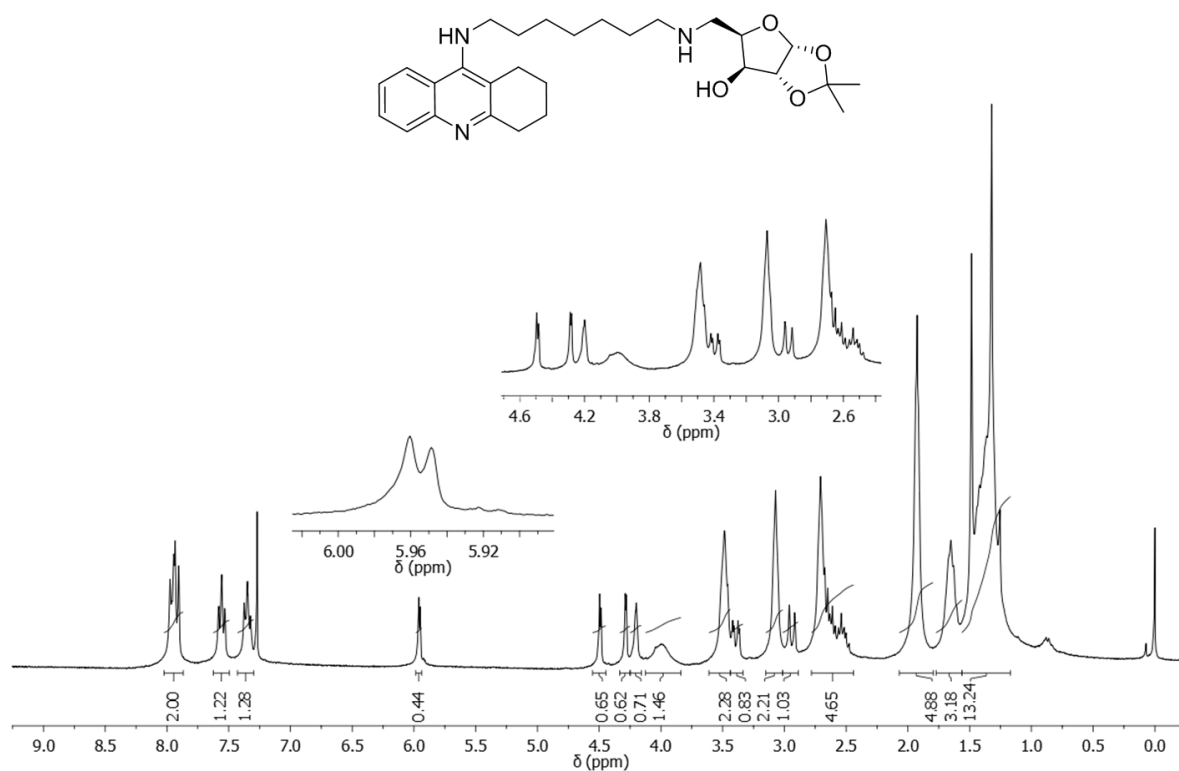


Figura C84. Espectro de RMN de ¹H (CDCl₃, 300 MHz) do híbrido tacrina(7)-xilose (**54d**).

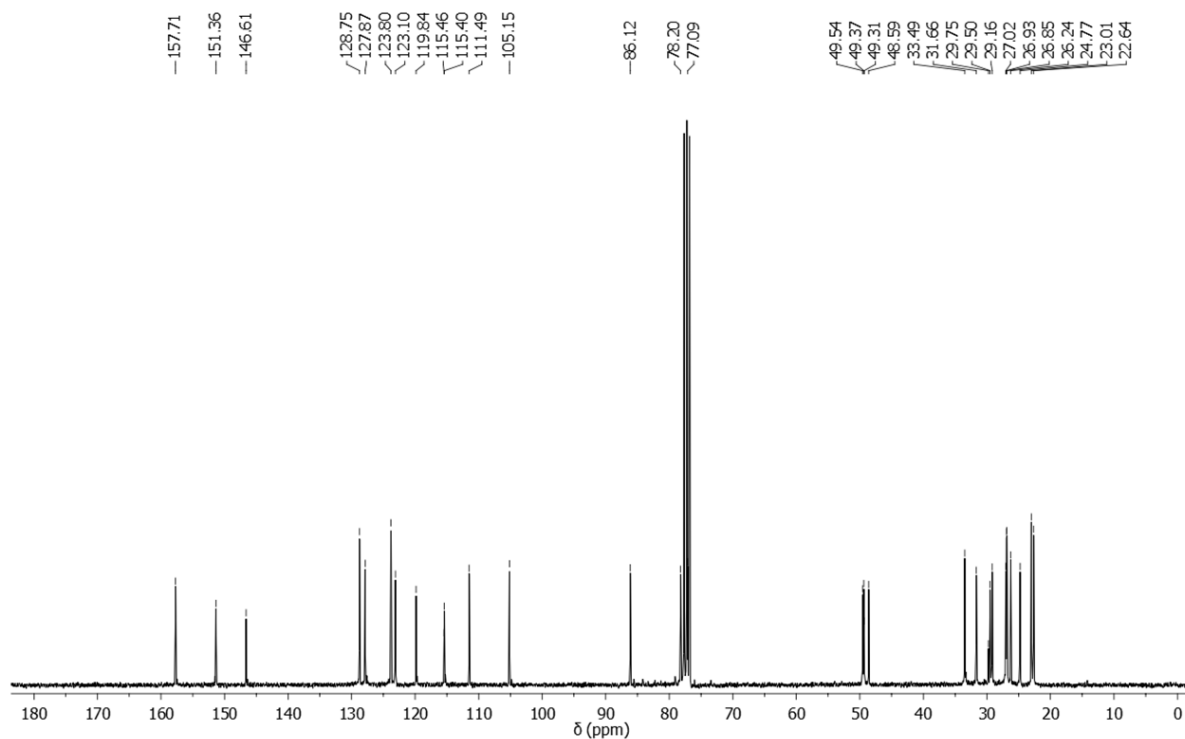


Figura C85. Espectro de RMN de ¹³C (CDCl₃, 75 MHz) do híbrido **54d**.

(Ampliações na página seguinte)

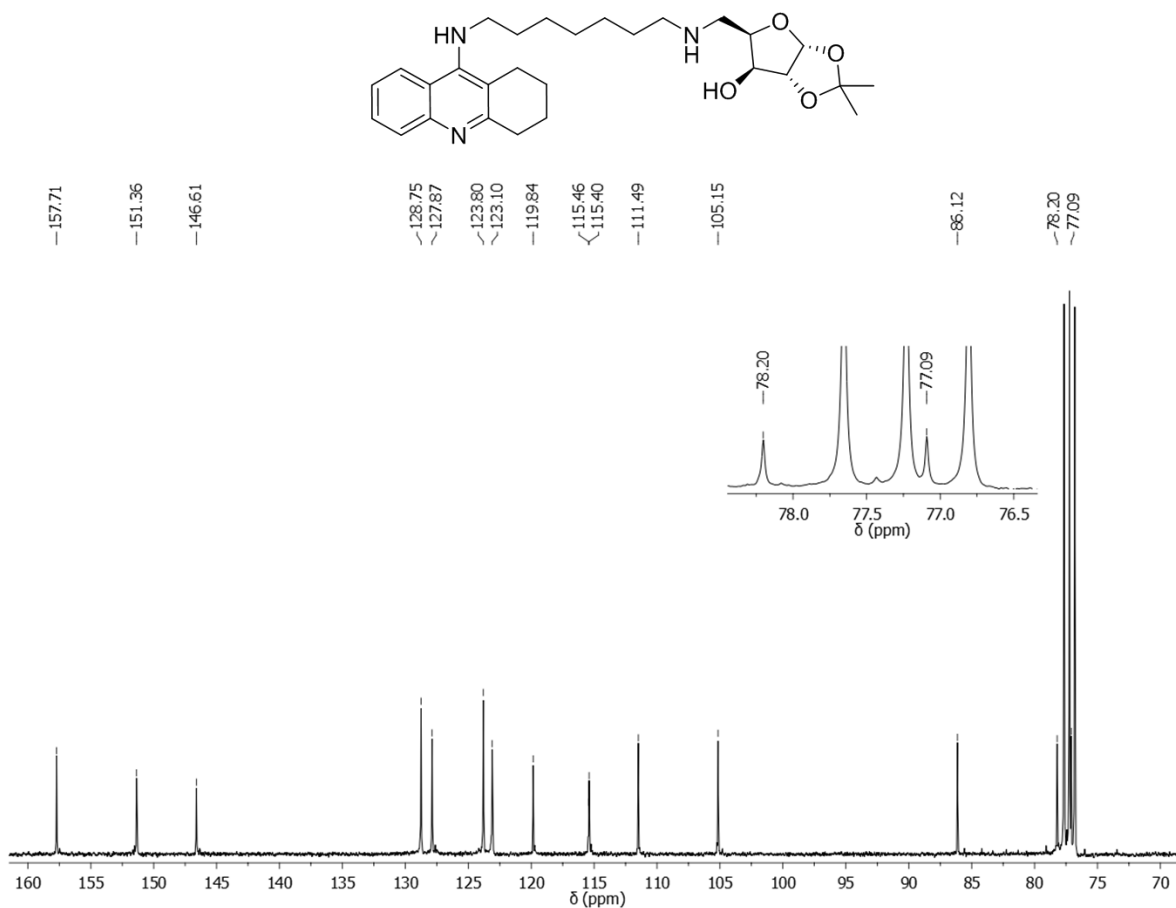


Figura C86. Ampliação do espectro de RMN de ^{13}C do híbrido **54d** entre 70 e 160 ppm.

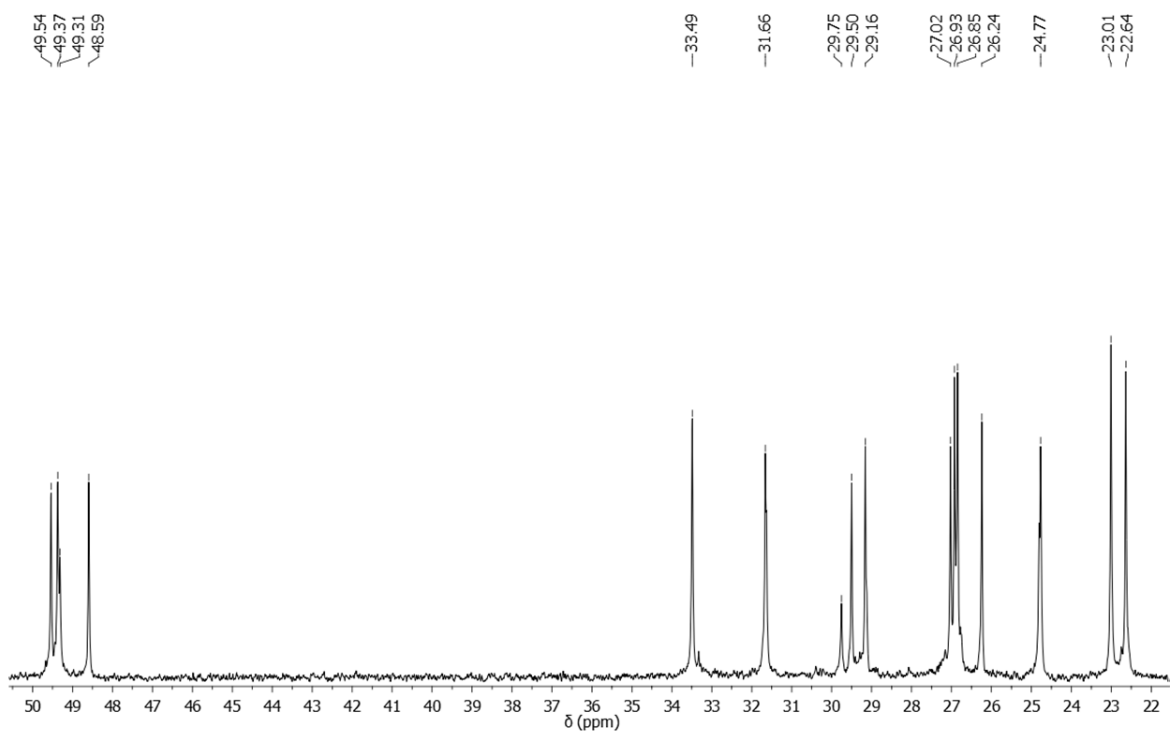


Figura C87. Ampliação do espectro de RMN de ^{13}C do híbrido **54d** entre 22 e 50 ppm.

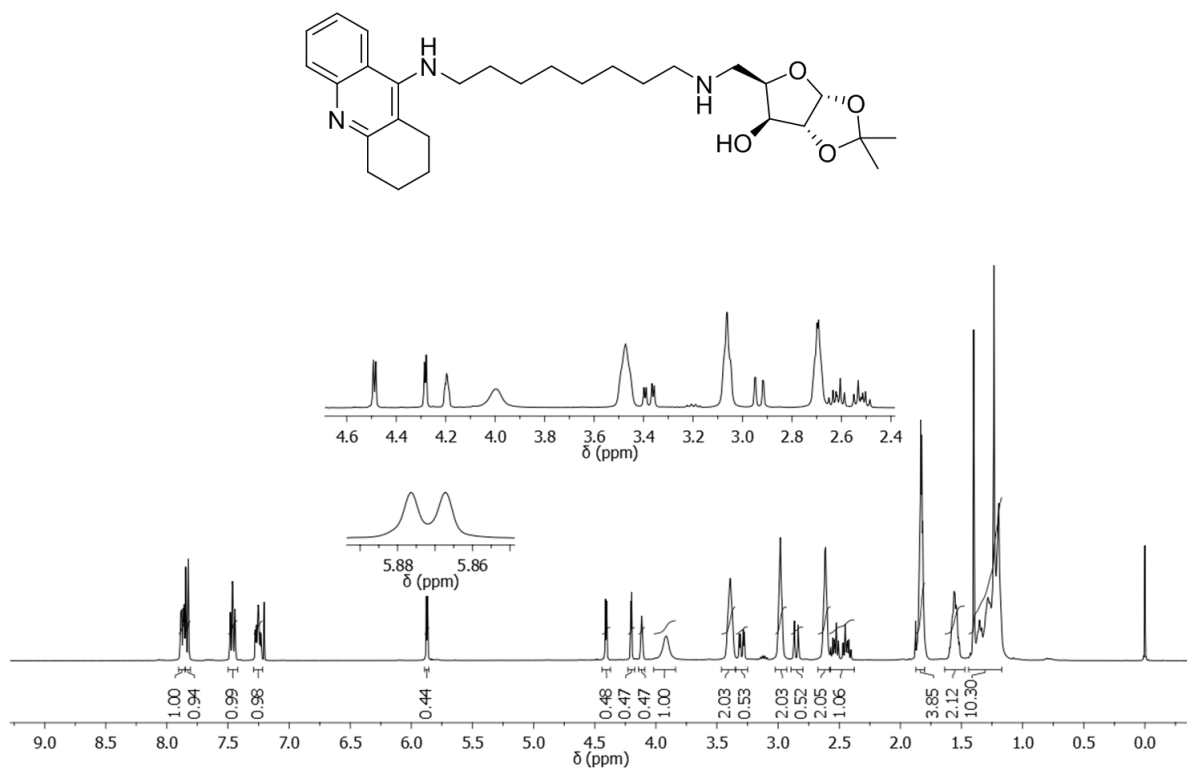


Figura C88. Espectro de RMN de ^1H (CDCl_3 , 400 MHz) do híbrido tacrina(8)-xilose (**54e**).

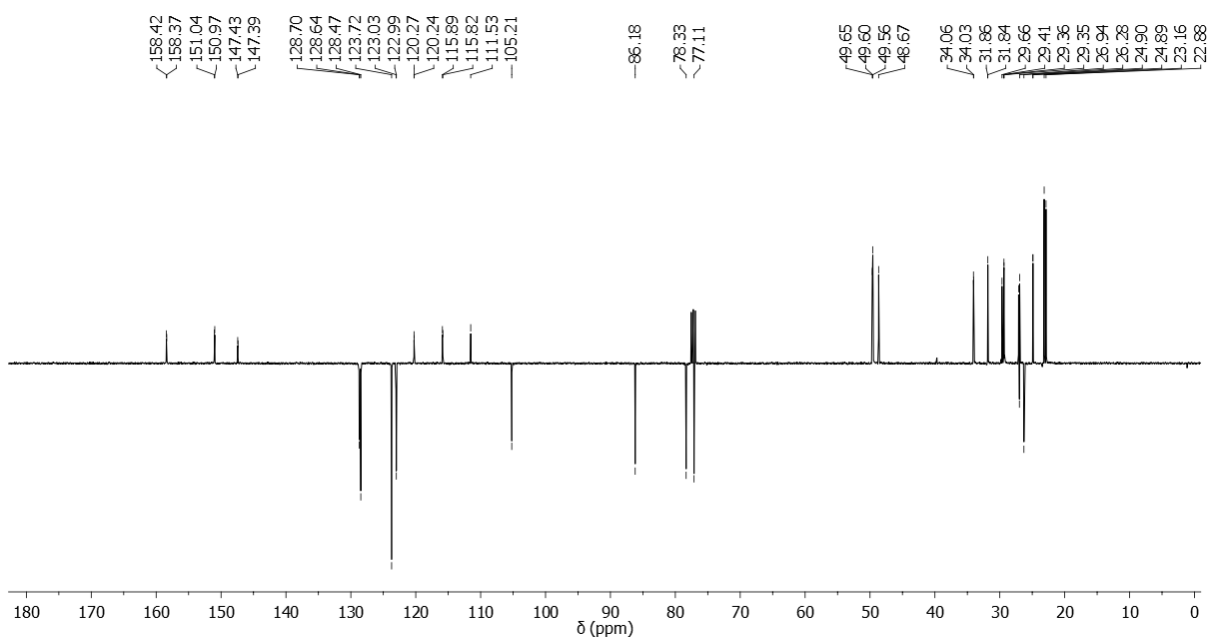


Figura C89. Espectro de RMN de ^{13}C (APT, CDCl_3 , 100 MHz) do híbrido **54e**.

(Ampliações na página seguinte)

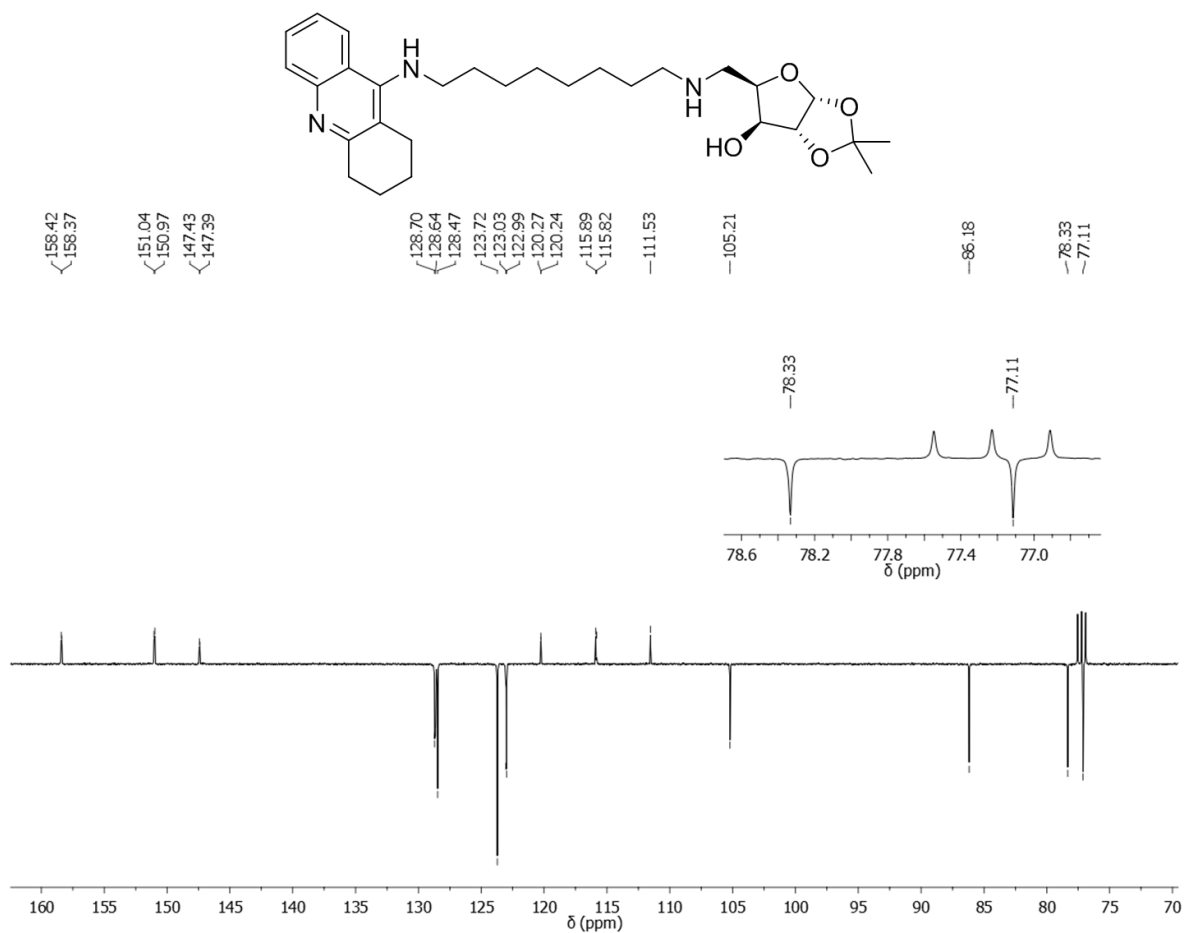


Figura C90. Ampliação do espectro de RMN de ^{13}C (APT) do híbrido **54e** entre 70 e 160 ppm.

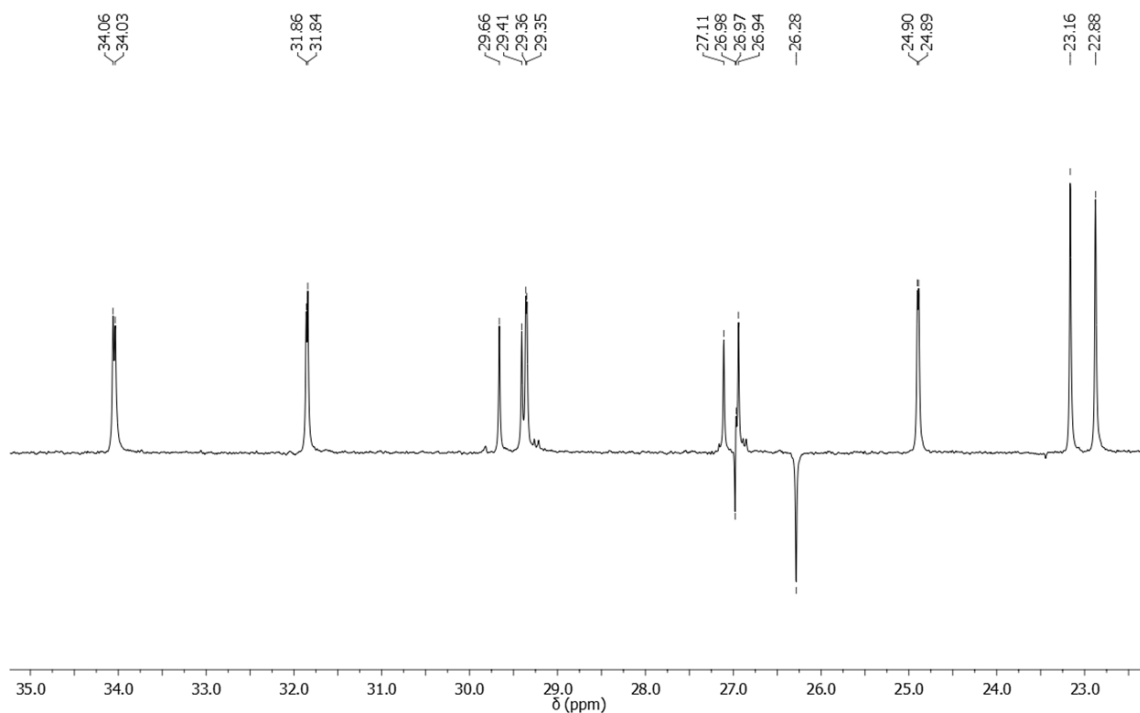


Figura C91. Ampliação do espectro de RMN de ^{13}C (APT) do híbrido **54e** entre 23 e 35 ppm.

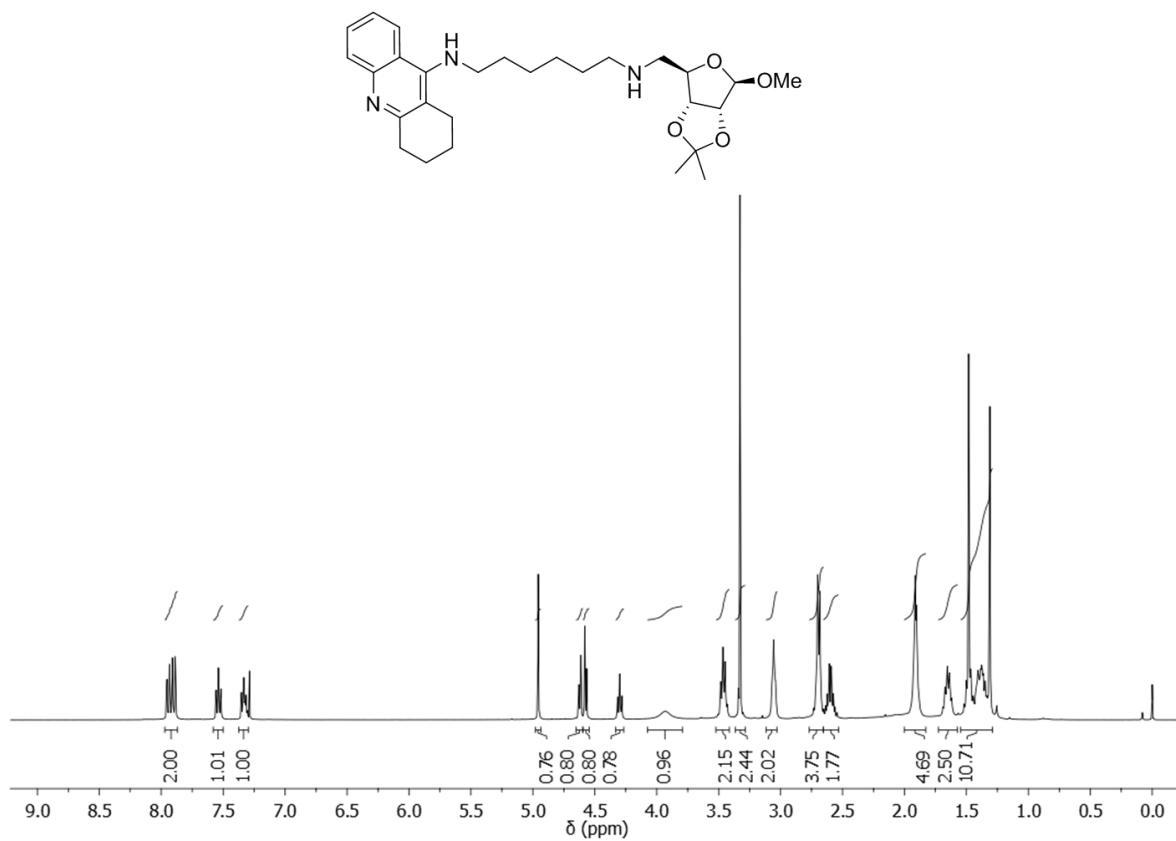


Figura C92. Espectro de RMN de ^1H (CDCl₃, 300 MHz) do híbrido tacrina(6)-ribose (**55a**).

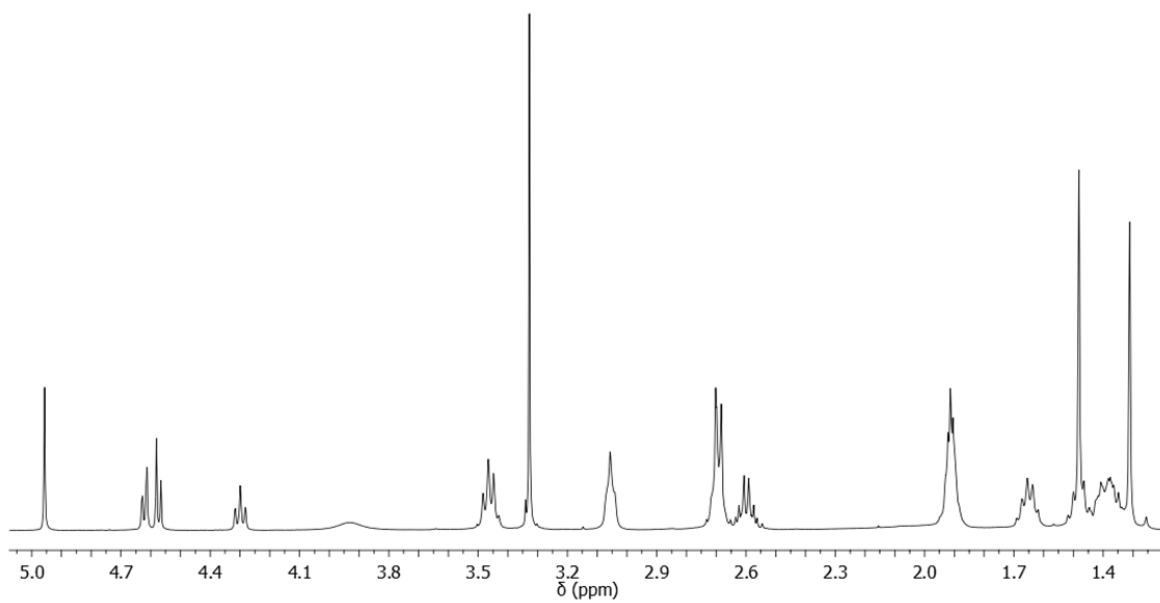


Figura C93. Ampliação do espectro de RMN de ^1H do híbrido **55a** entre 1,3 e 5,0 ppm.

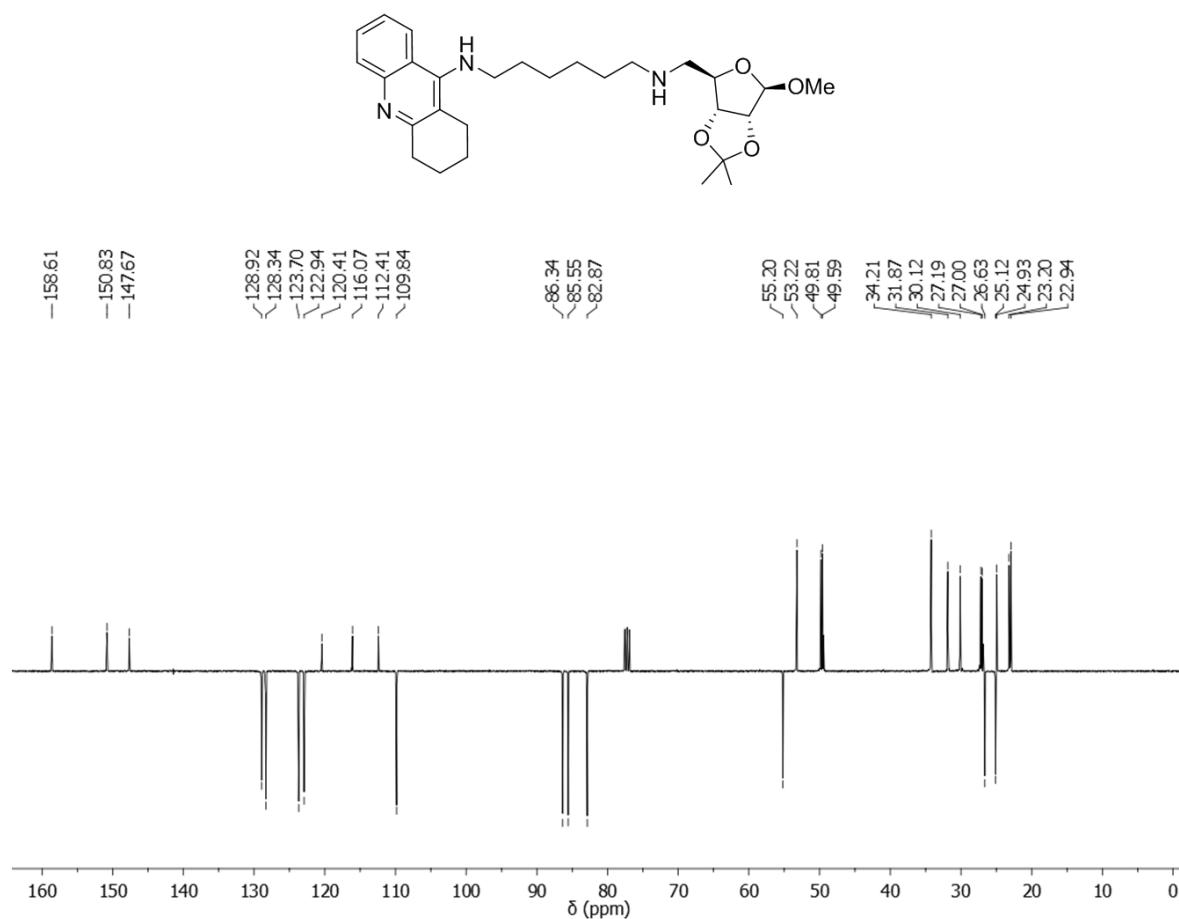


Figura C94. Espectro de RMN de ^{13}C , APT (CDCl_3 , 75 MHz) do híbrido **55a**.

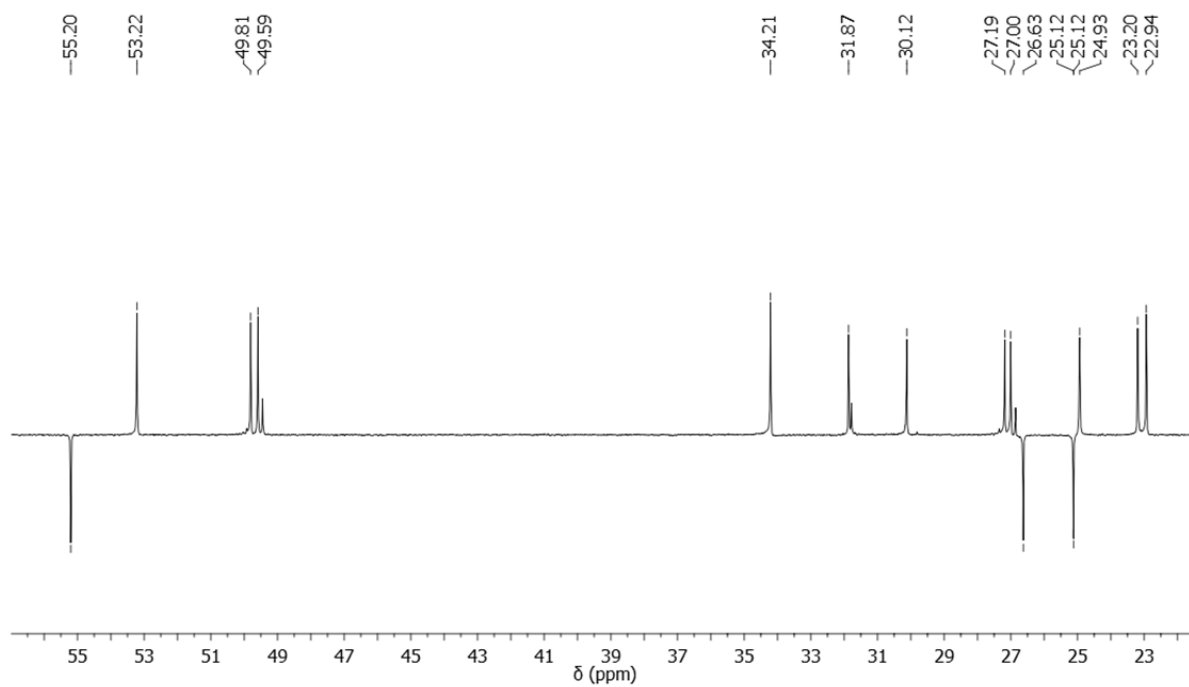


Figura C95. Ampliação do espectro de RMN de ^{13}C (APT) do híbrido **55a** entre 22 e 56 ppm.

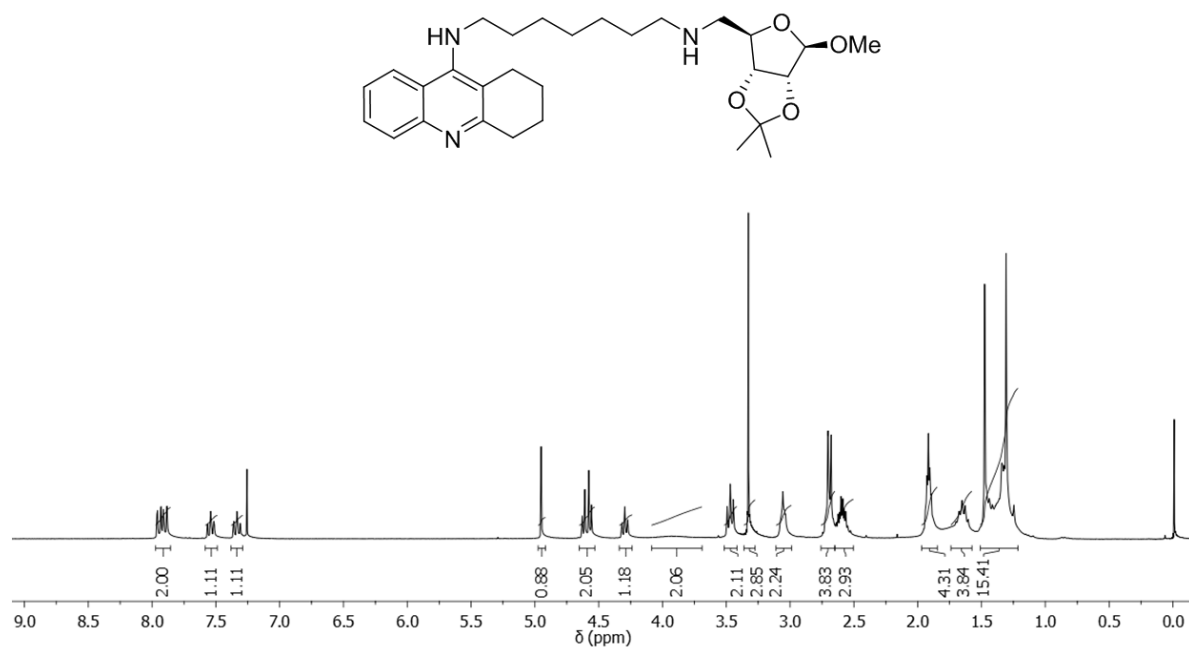


Figura C96. Espectro de RMN de ^1H (CDCl₃, 300 MHz) do híbrido tacrina(7)-ribose (**55b**).

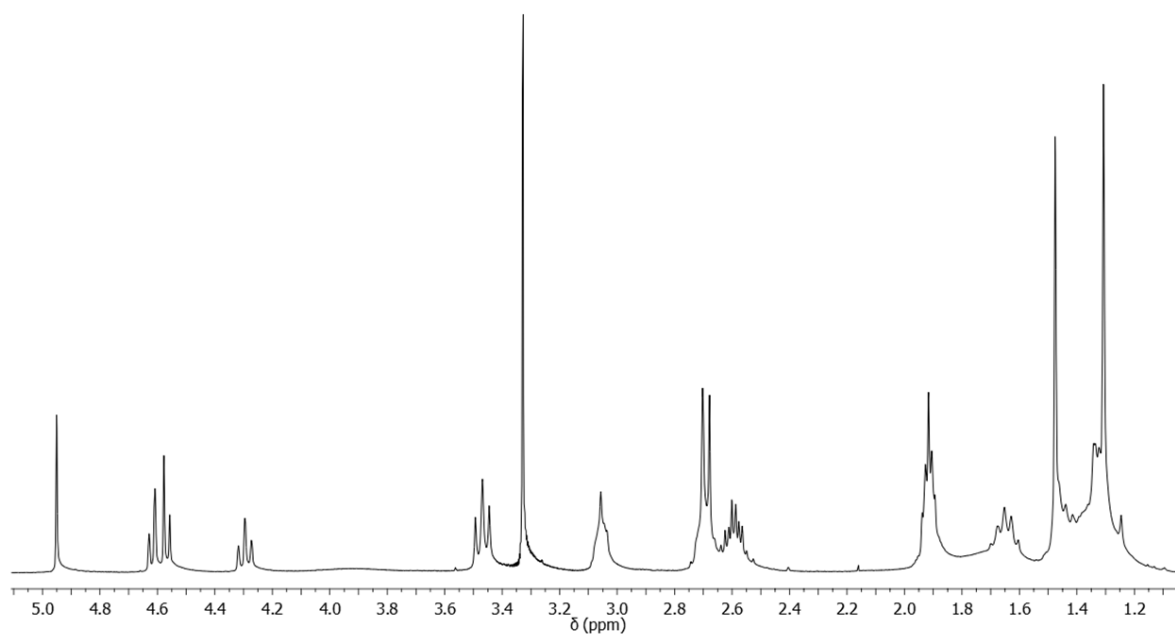


Figura C97. Ampliação do espectro de RMN de ^1H do híbrido **55b** entre 1,2 e 5,0 ppm.

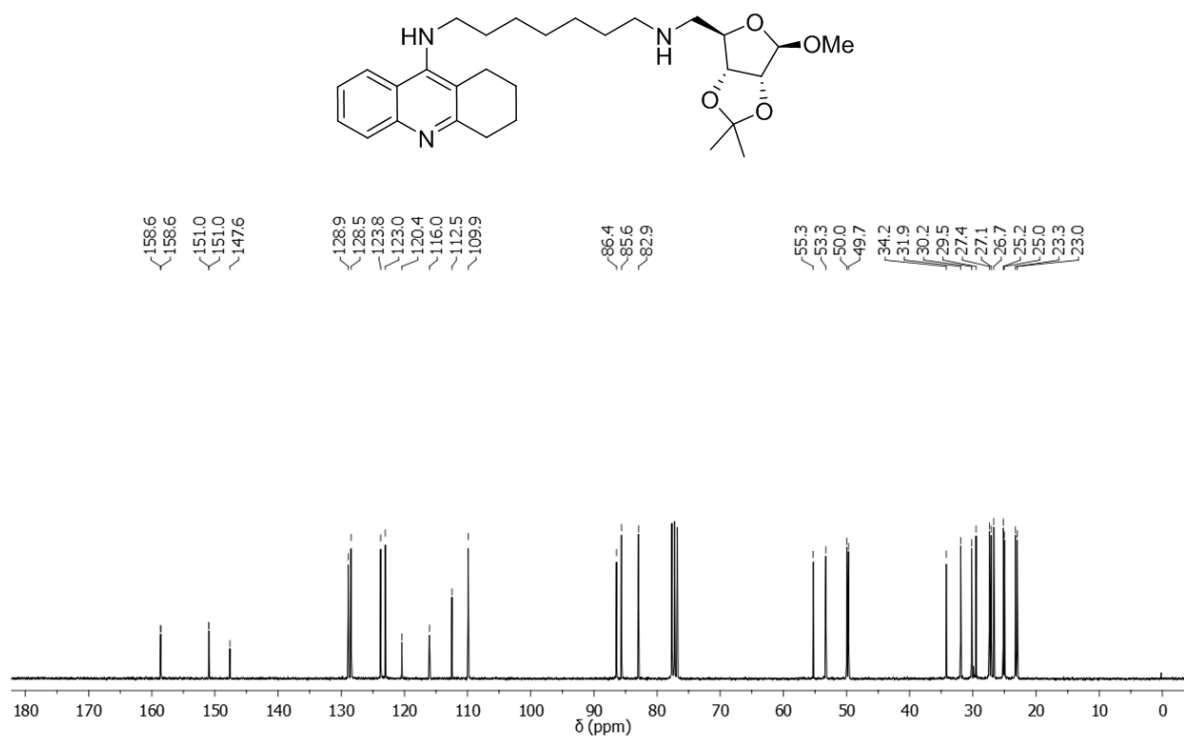


Figura C98. Espectro de RMN de ^{13}C (CDCl_3 , 75 MHz) do híbrido **55b**.

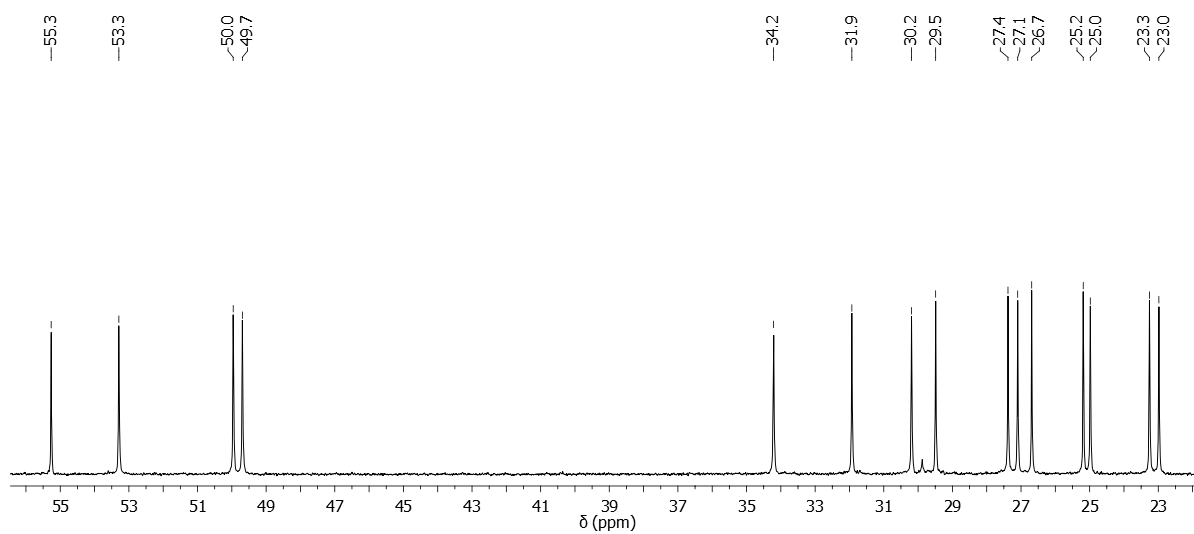


Figura C99. Ampliação do espectro de RMN de ^{13}C do híbrido **55b** entre 22 e 56 ppm.

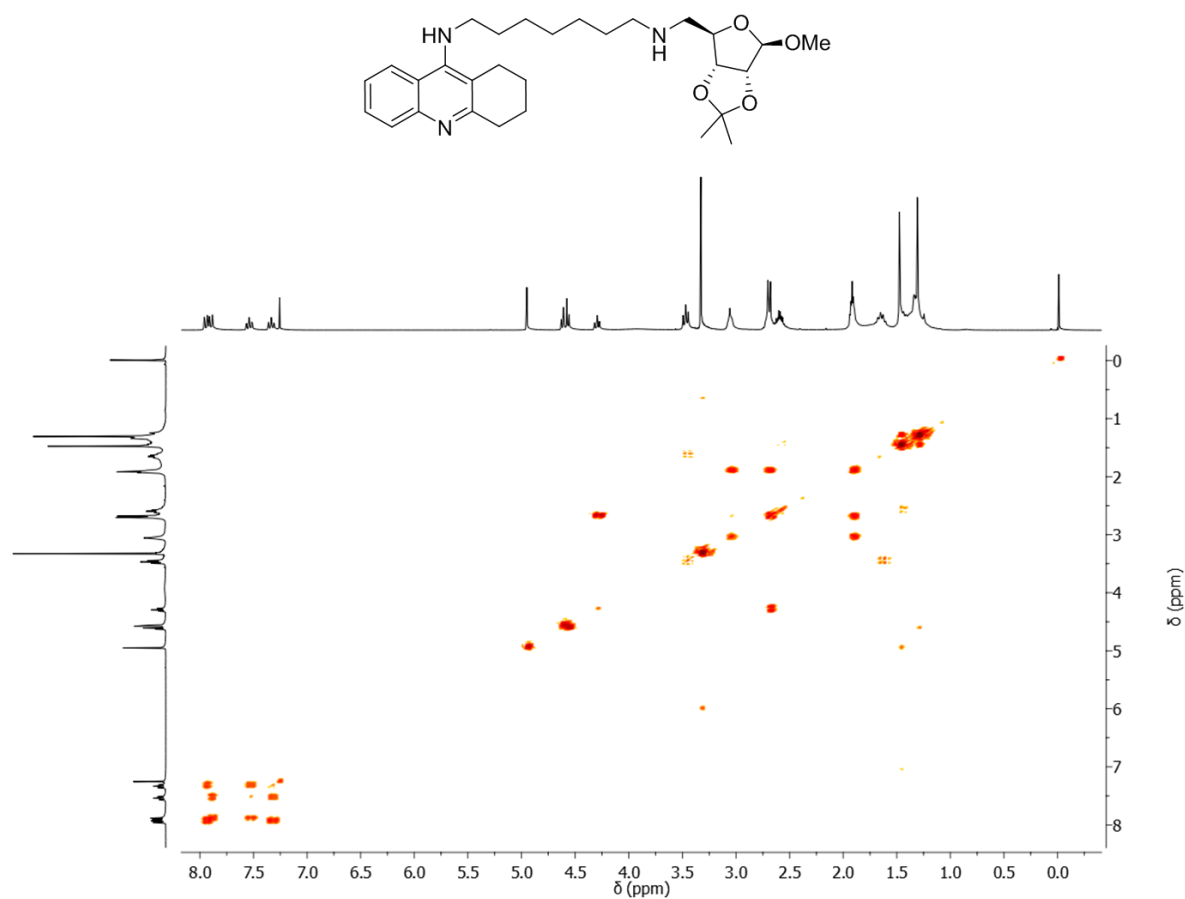


Figura C100. Espectro de RMN bidimensional ^1H - ^1H -COSY (CDCl_3 , 300 MHz) do híbrido **55b**.

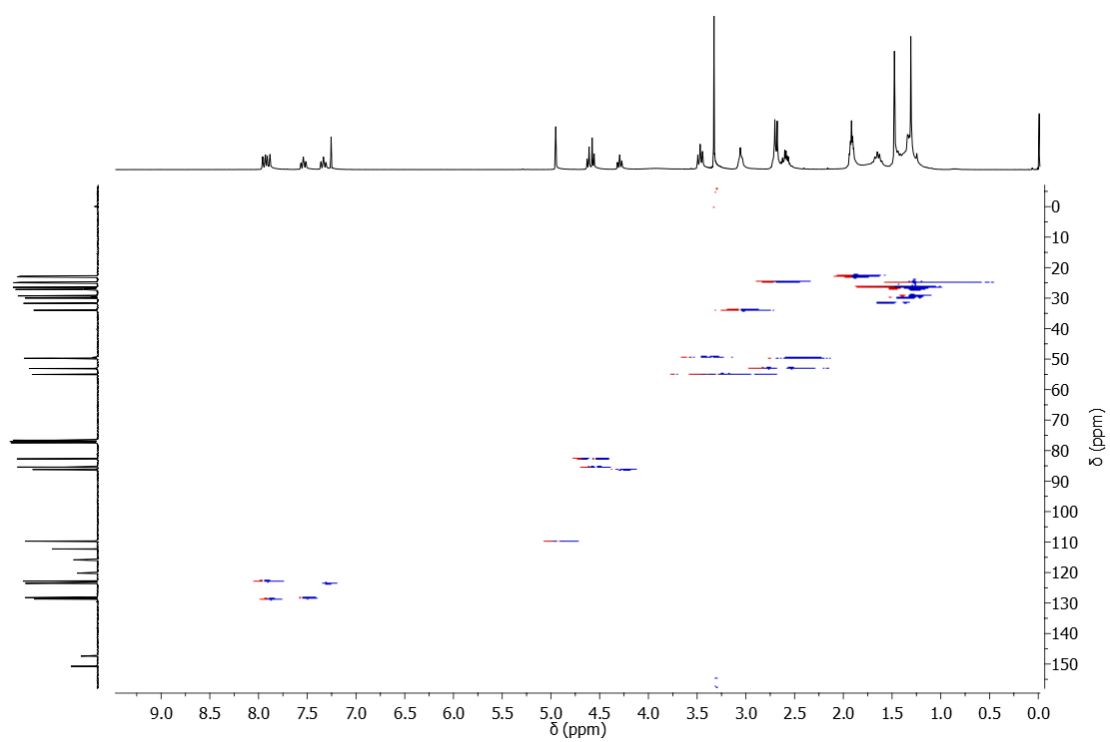


Figura C101. Espectro de RMN bidimensional ^1H - ^{13}C -HMQC (CDCl_3) do híbrido **55b**.

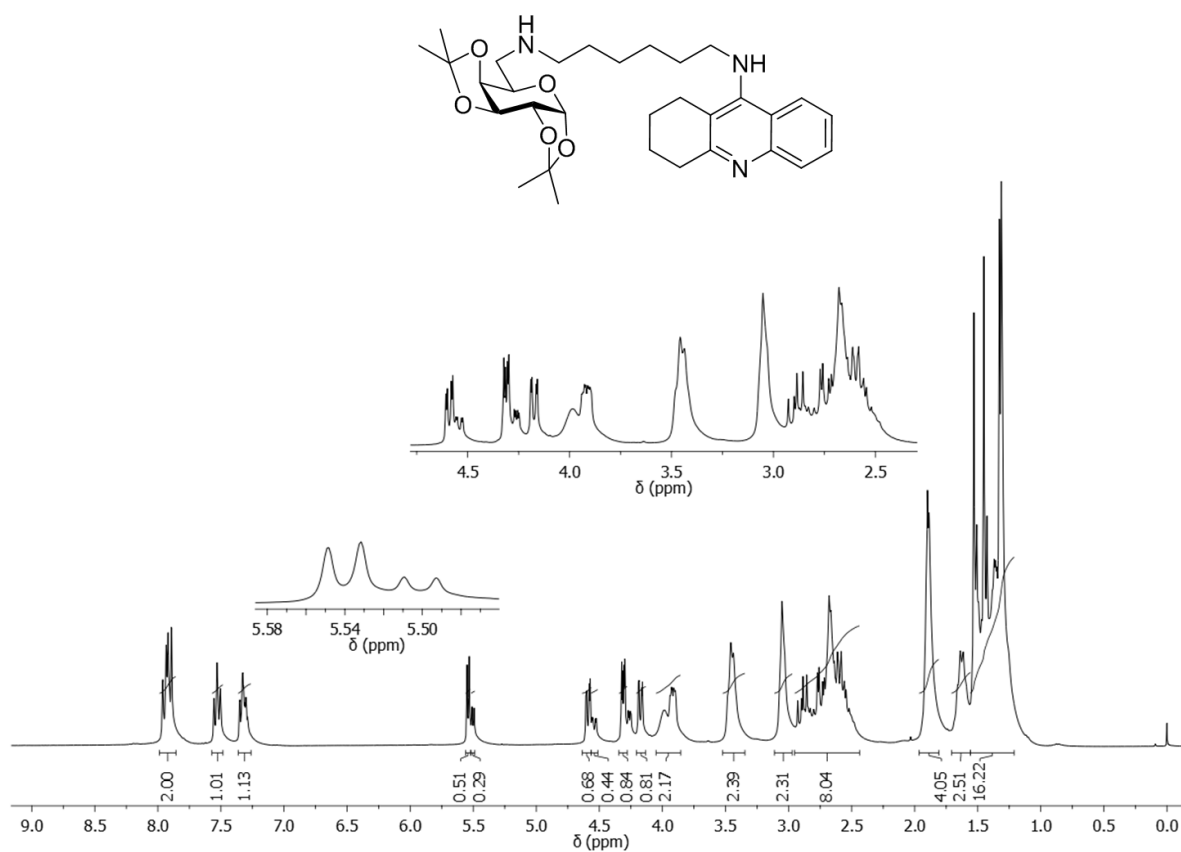


Figura C102. Espectro de RMN de ^1H (CDCl_3 , 300 MHz) do híbrido tacrina(6)-galactose (**56a**).

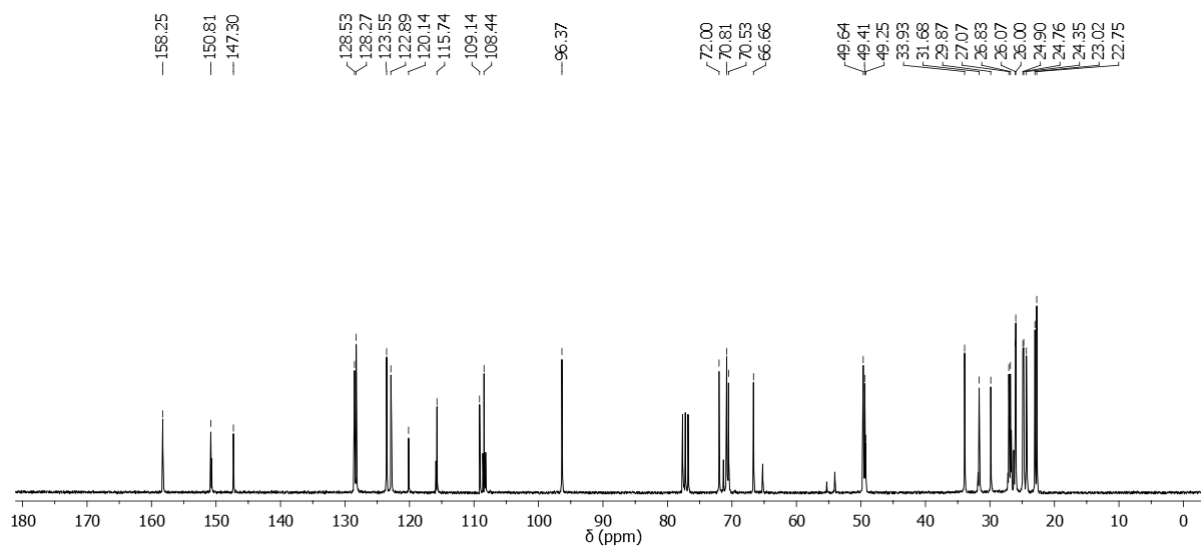


Figura C103. Espectro de RMN de ^{13}C (CDCl_3 , 75 MHz) do híbrido **56a**.

(Ampliações na página seguinte)

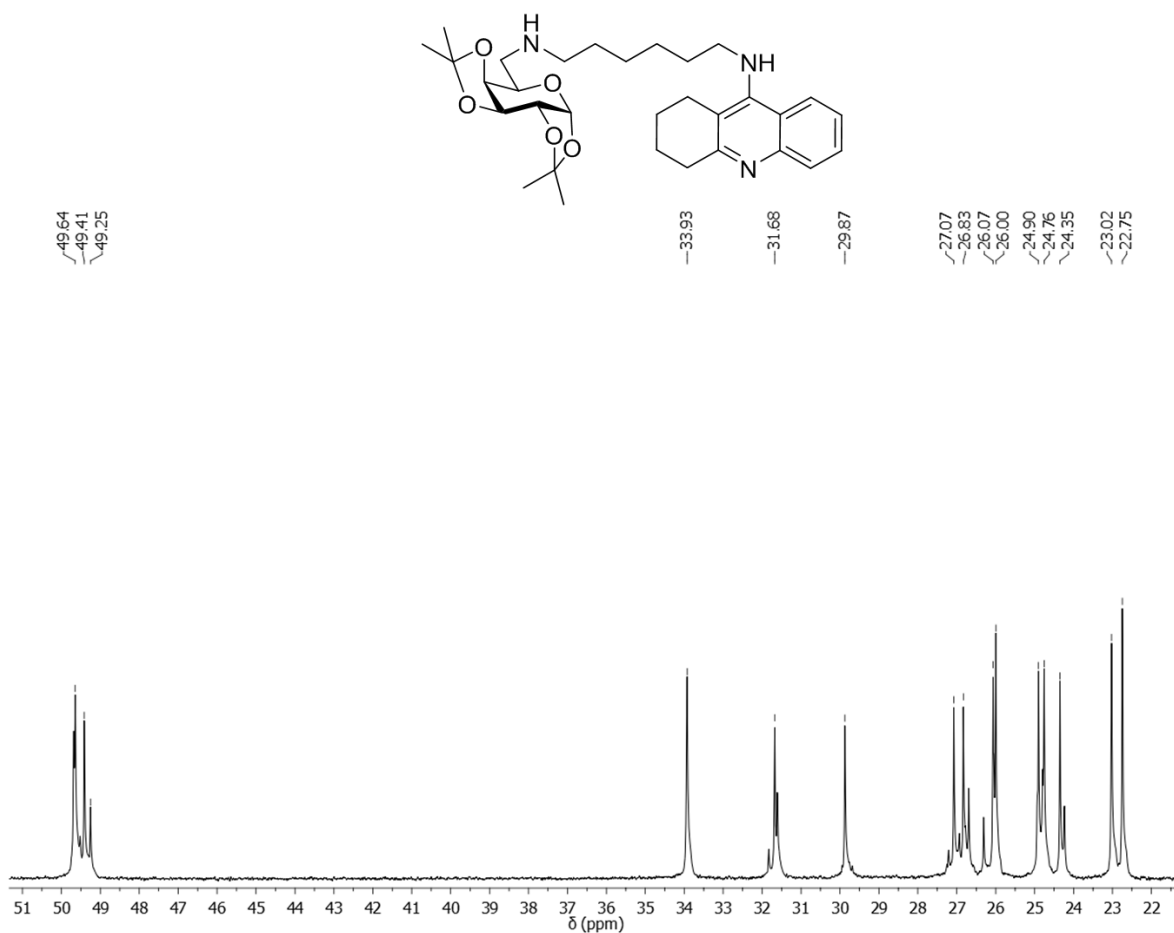


Figura C104. Ampliação do espectro de RMN de ^{13}C do híbrido **56a** entre 22 e 51 ppm.

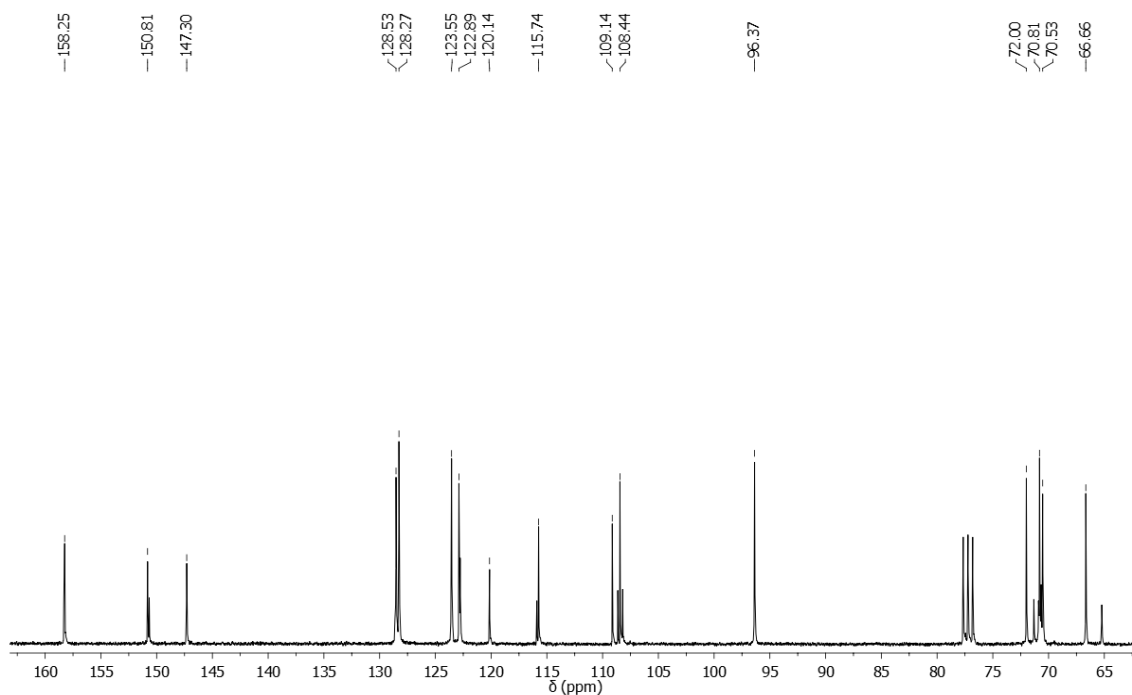


Figura C105. Ampliação do espectro de RMN de ^{13}C do híbrido **56a** entre 65 e 160 ppm.

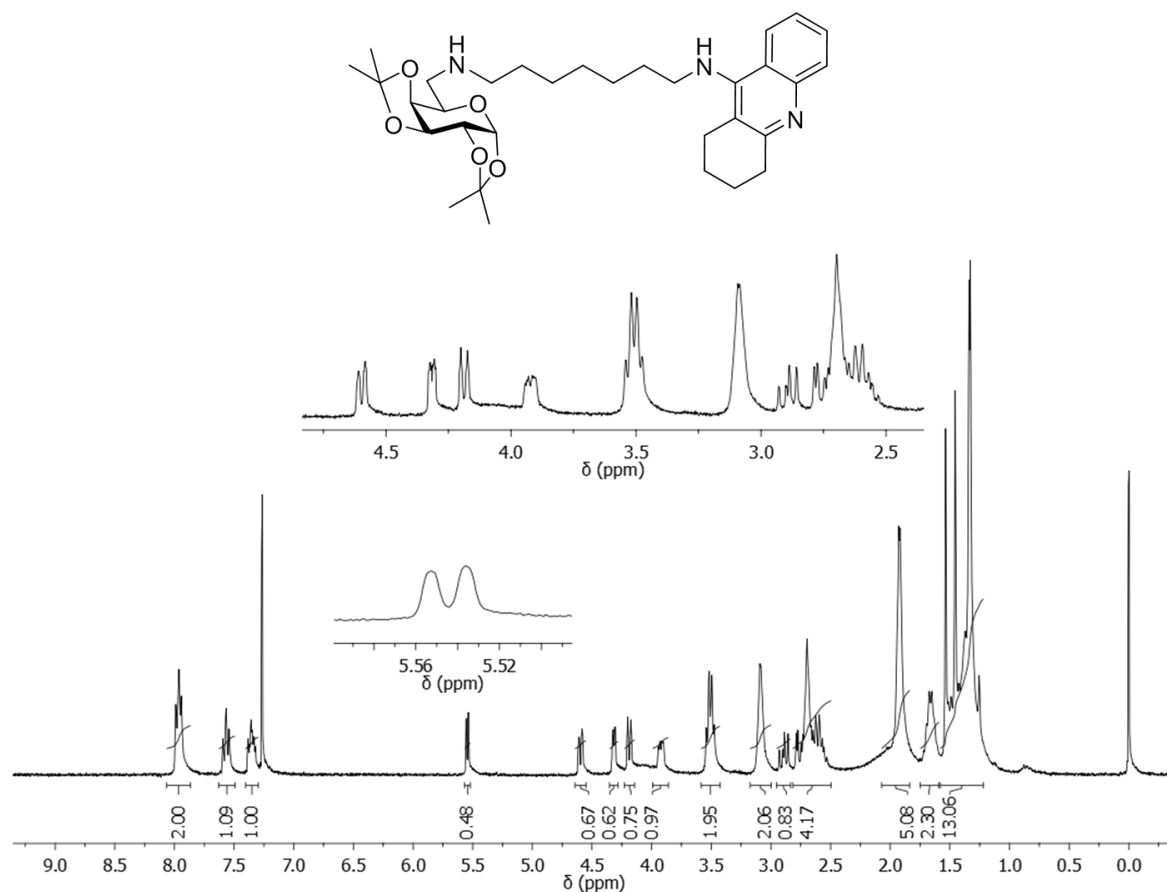


Figura C106. Espectro de RMN de ^1H (CDCl_3 , 300 MHz) do híbrido tacrina(7)-galactose (**56b**).

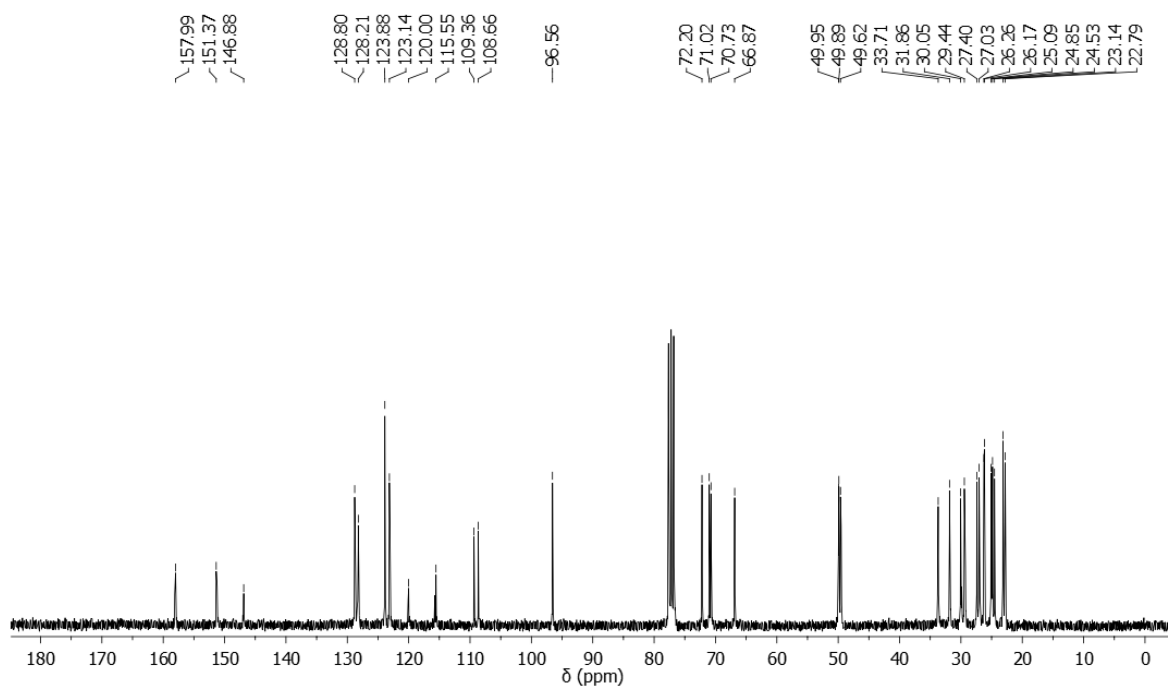


Figura C107. Espectro de RMN de ^{13}C (CDCl_3 , 75 MHz) do híbrido **56b**.

(Ampliações na página seguinte)

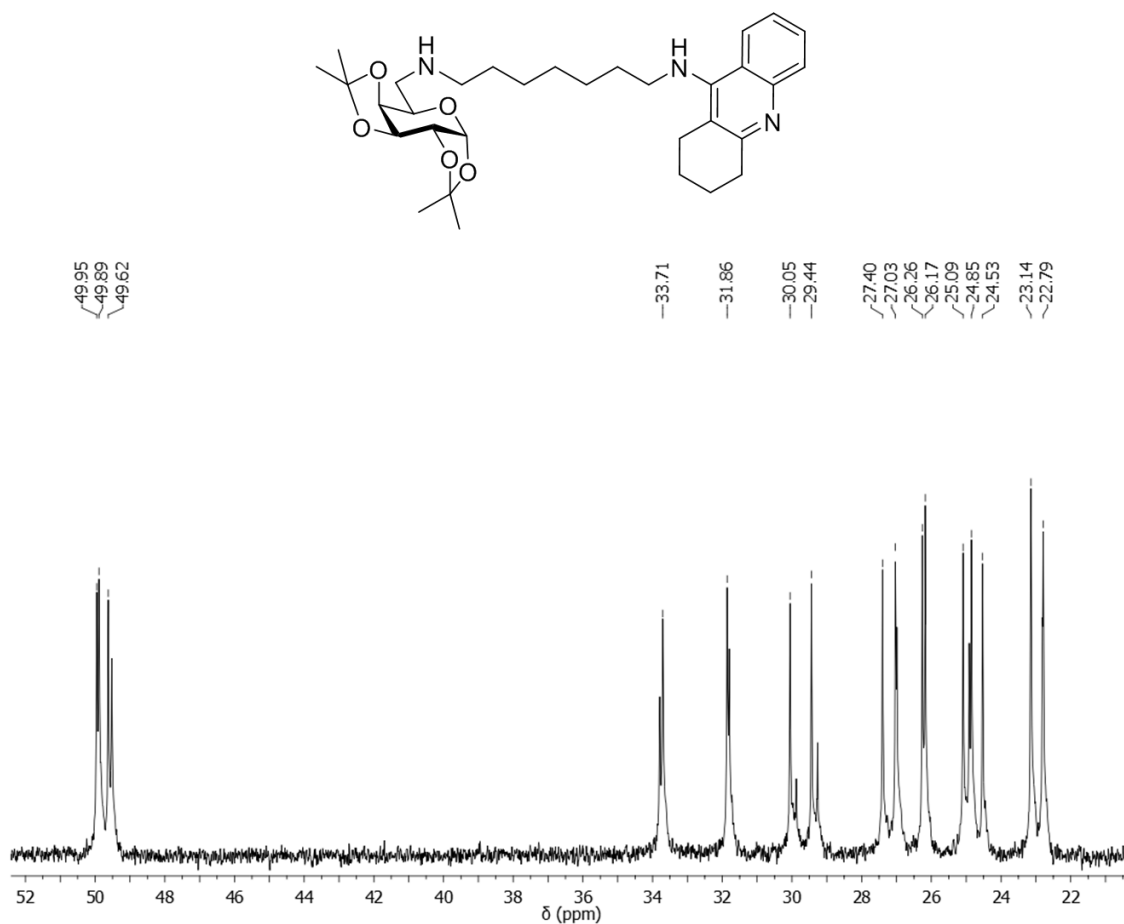


Figura C108. Ampliação do espectro de RMN de ^{13}C do híbrido **56b** entre 22 e 52 ppm.

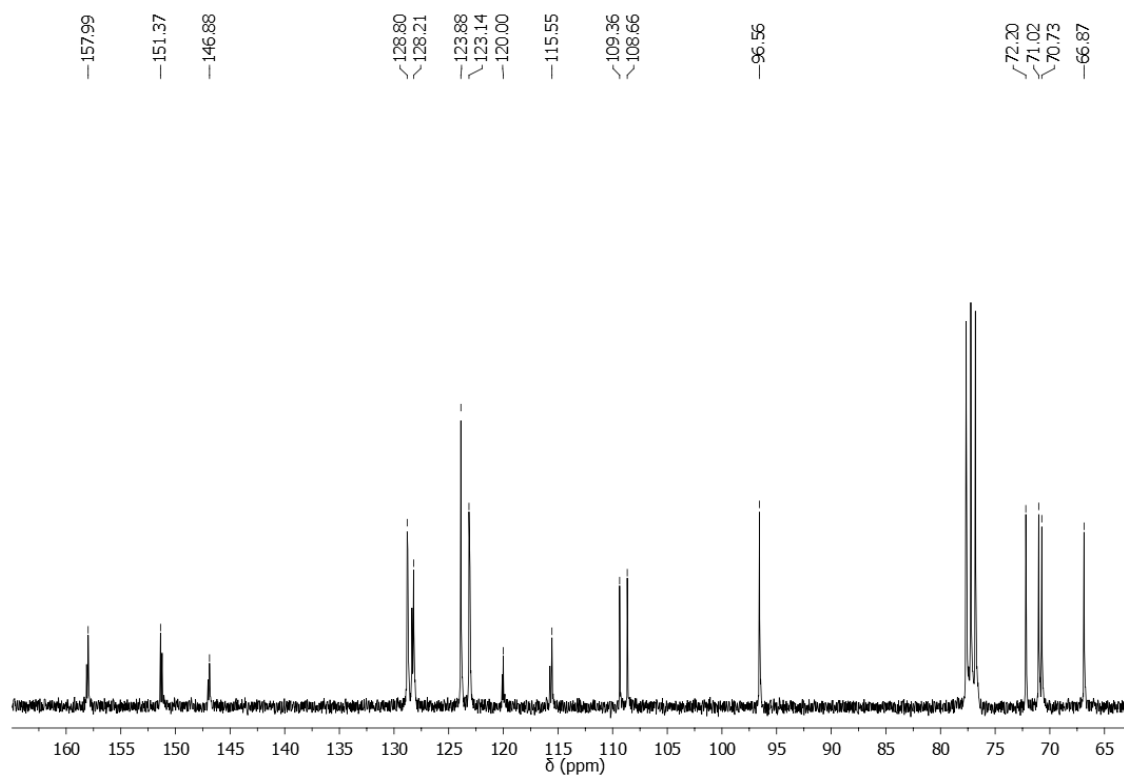


Figura C109. Ampliação do espectro de RMN de ^{13}C do híbrido **56b** entre 65 e 160 ppm.

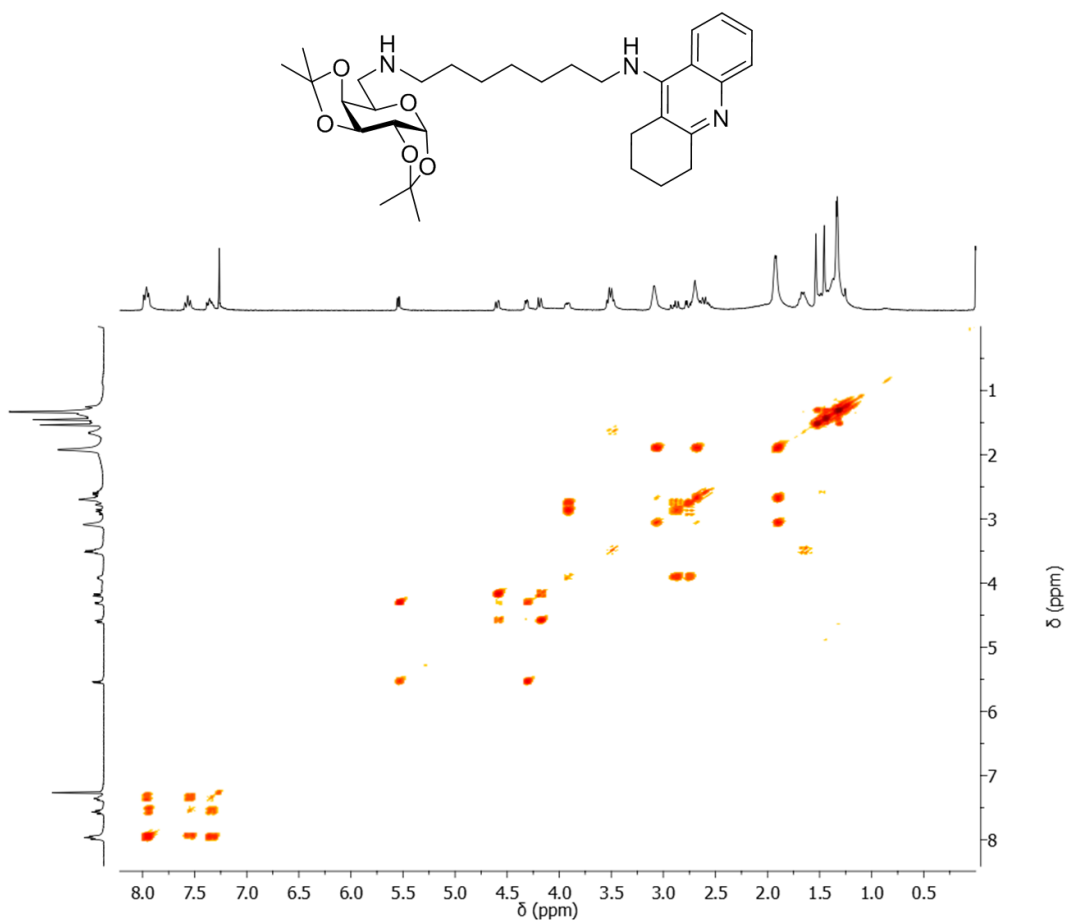


Figura C110. Espectro de RMN bidimensional ^1H - ^1H -COSY (CDCl_3 , 300 MHz) do híbrido **56b**.

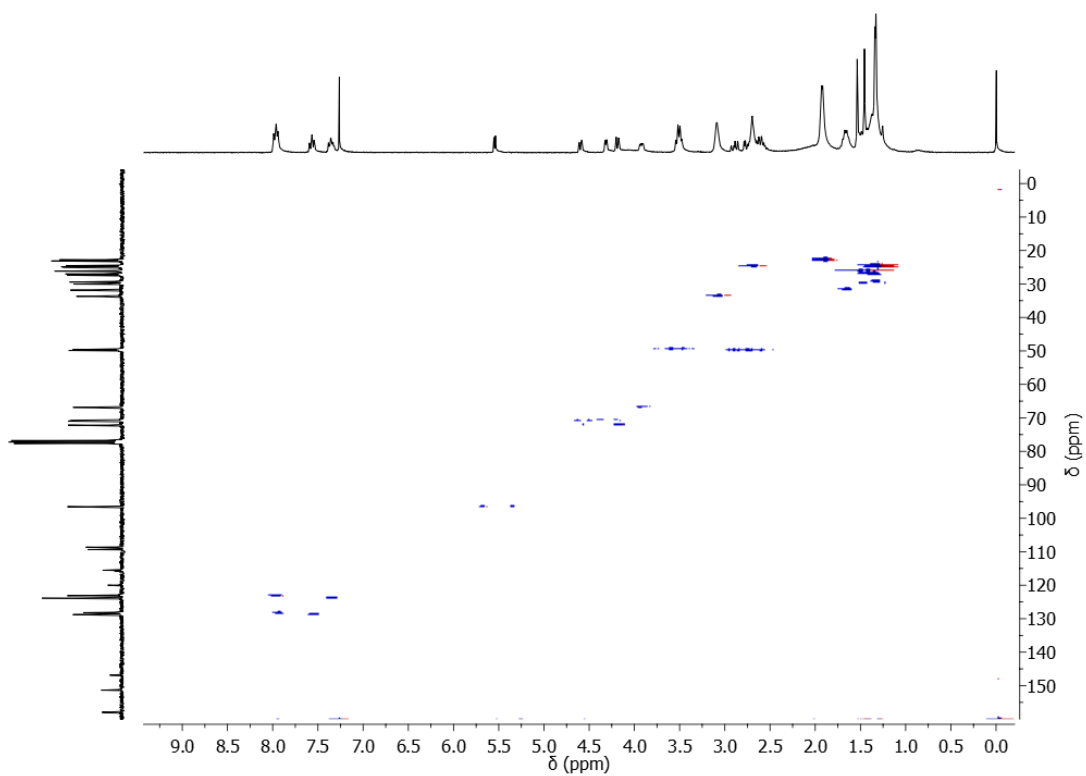


Figura C111. Espectro de RMN bidimensional ^1H - ^{13}C -HMQC (CDCl_3) do híbrido **56b**.

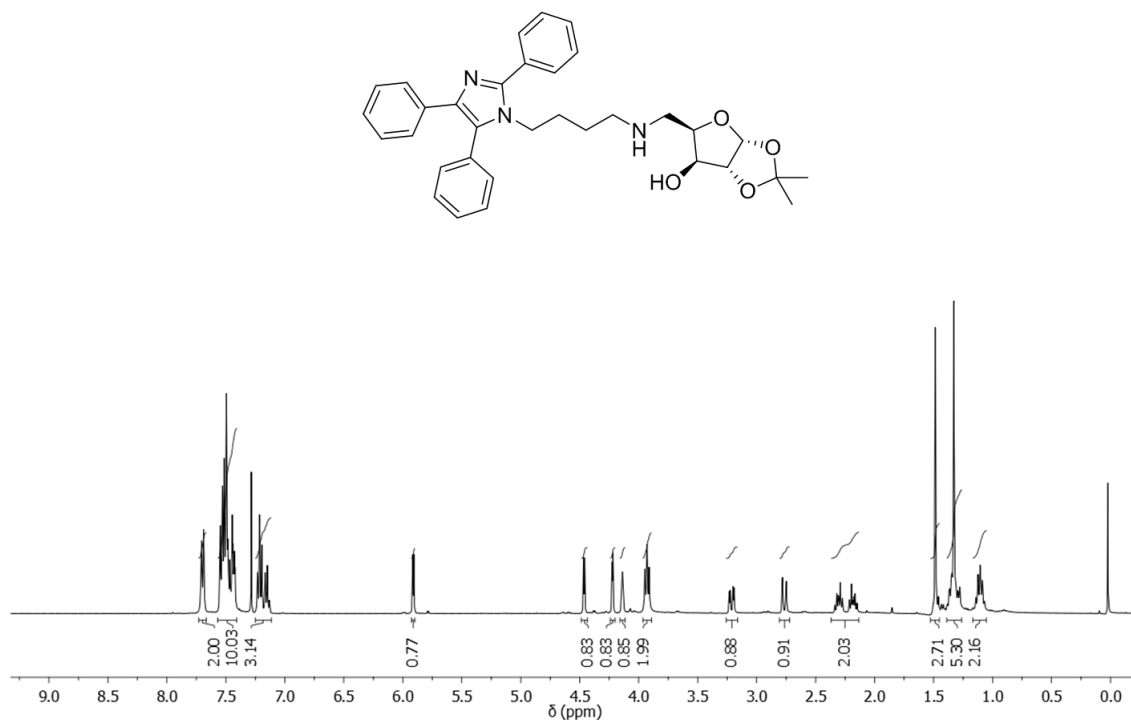


Figura C112. Espectro de RMN de ^1H (CDCl_3 , 300 MHz) do híbrido lofina(4)-xilose (**57a**).

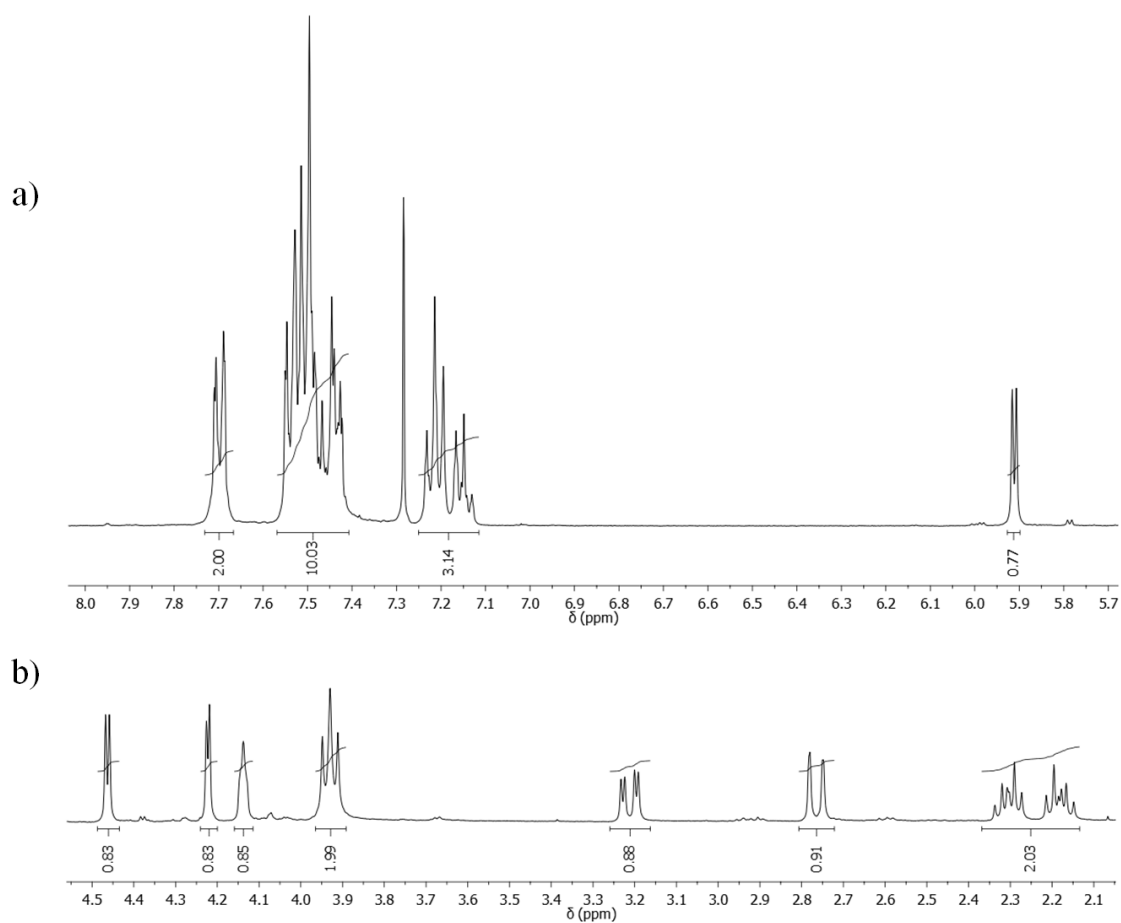


Figura C113. Ampliações do espectro de RMN de ^1H do híbrido **57a**: a) entre 5,1 e 8,0 ppm e b) entre 2,1 e 4,5 ppm.

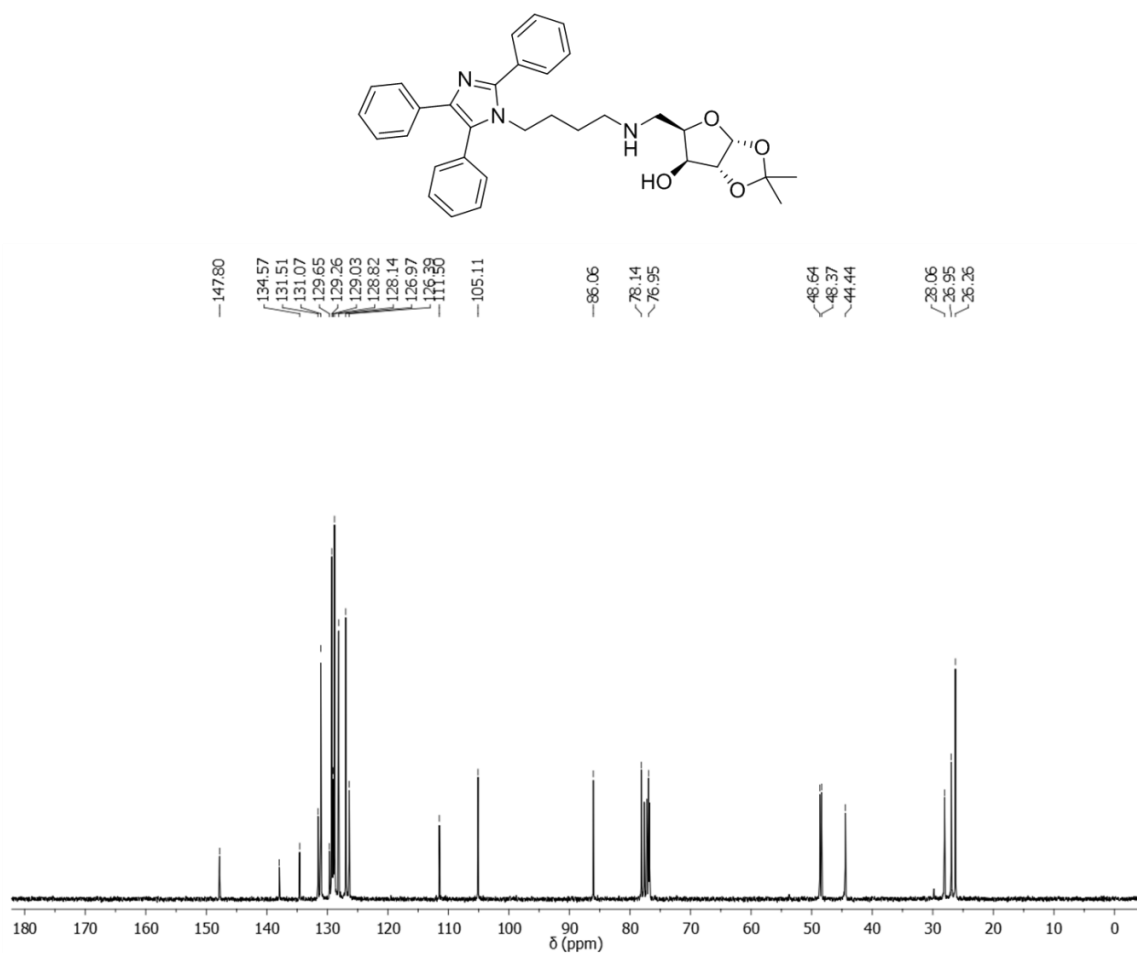


Figura C114. Espectro de RMN de ^{13}C (CDCl_3 , 75 MHz) do híbrido **57a**.

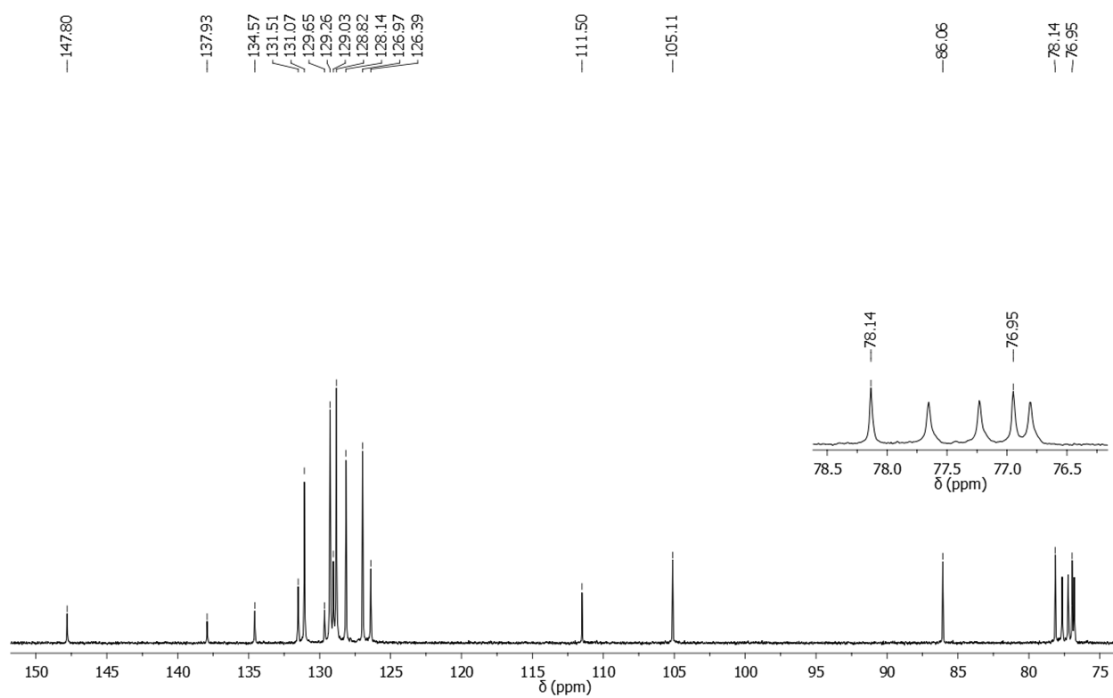


Figura C115. Ampliação do espectro de RMN de ^{13}C do híbrido **57a** entre 75 e 150 ppm.

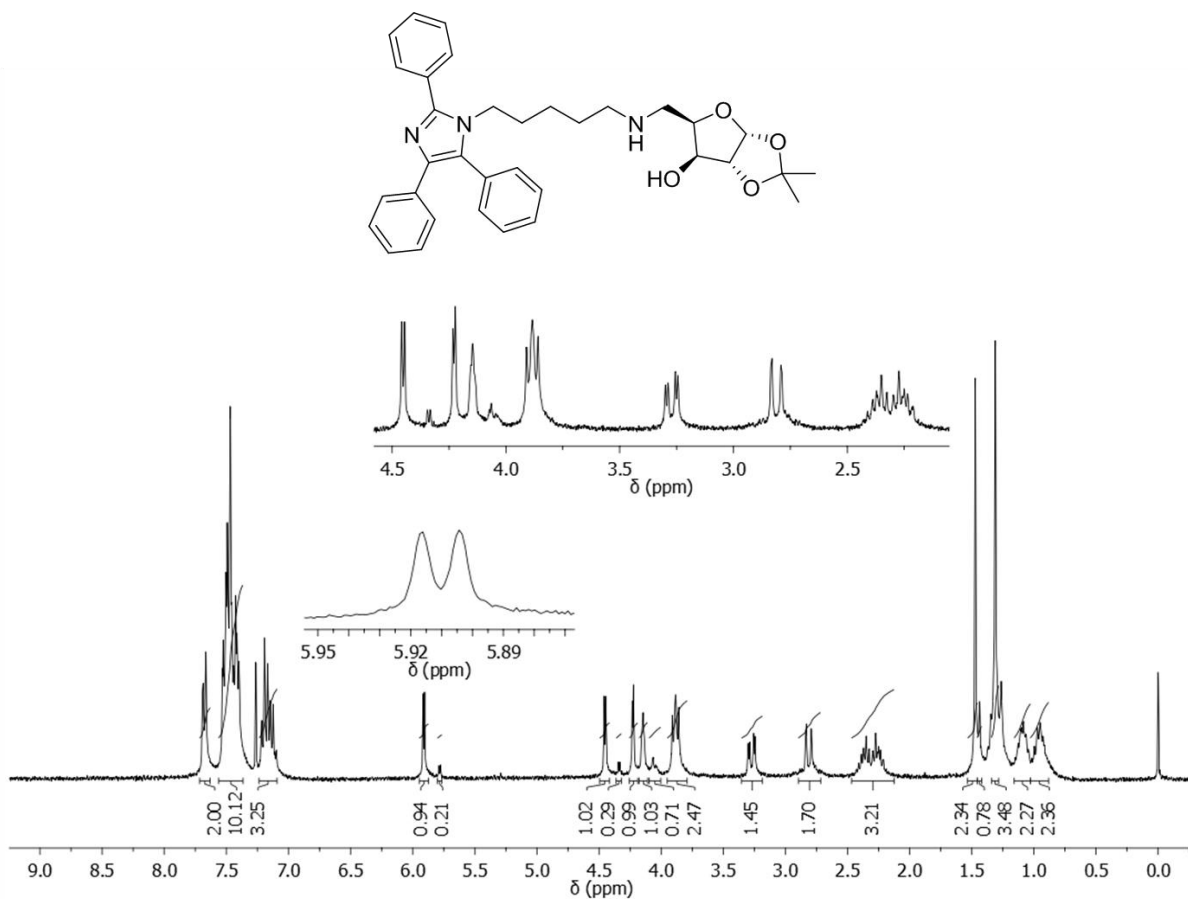


Figura C116. Espectro de RMN de ¹H (CDCl₃, 300 MHz) do híbrido lofina(5)-xilose (**57b**).

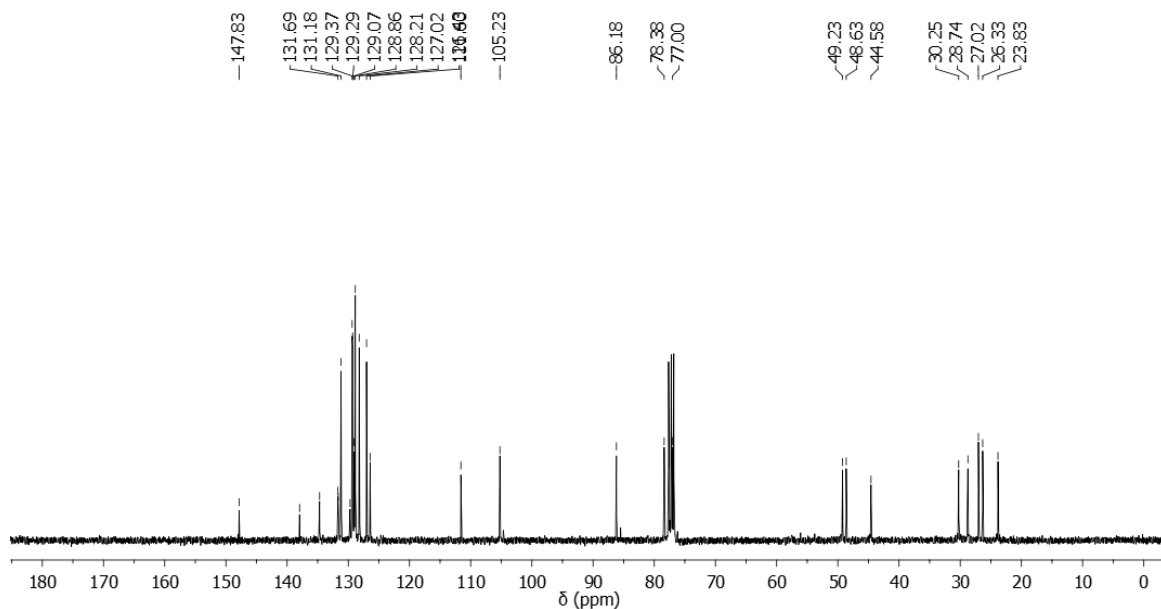


Figura C117. Espectro de RMN de ¹³C (CDCl₃, 75 MHz) do híbrido **57b**.

(Ampliações na página seguinte)

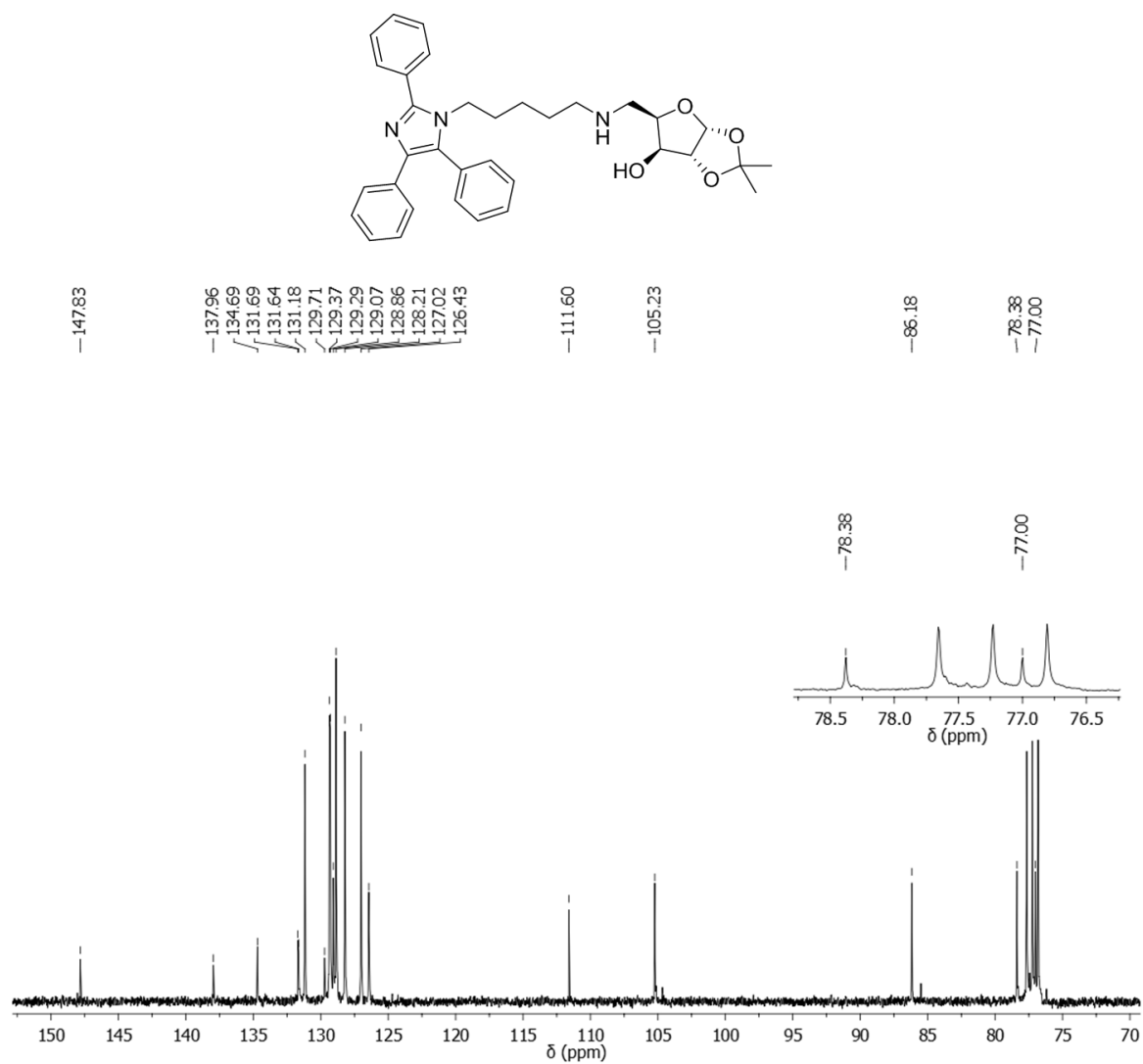


Figura C118. Ampliação do espectro de RMN de ^{13}C do híbrido **57b** entre 70 e 150 ppm.

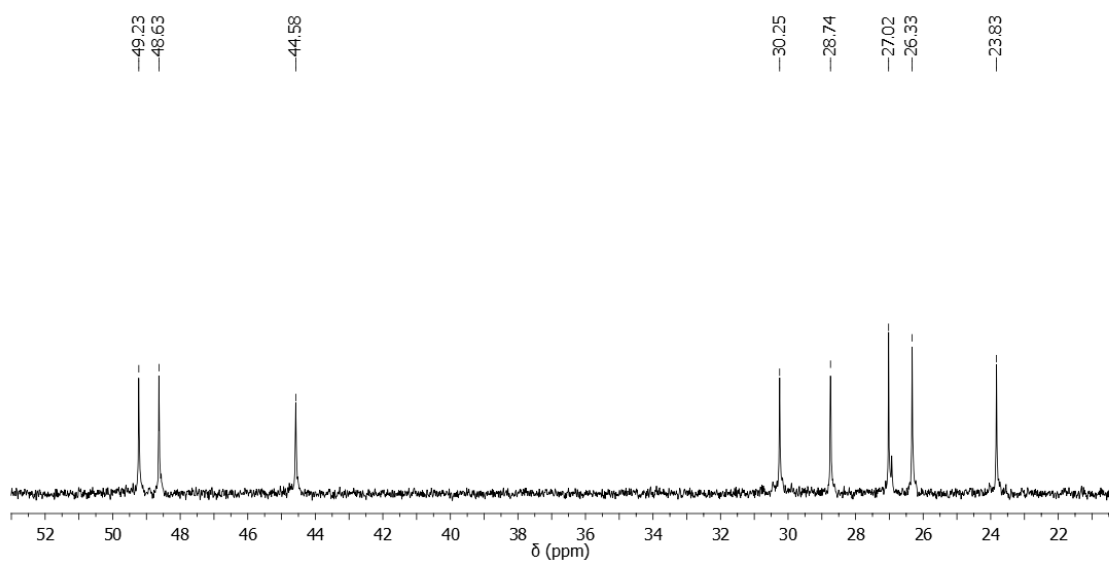


Figura C119. Ampliação do espectro de RMN de ^{13}C do híbrido **57b** entre 22 e 52 ppm.

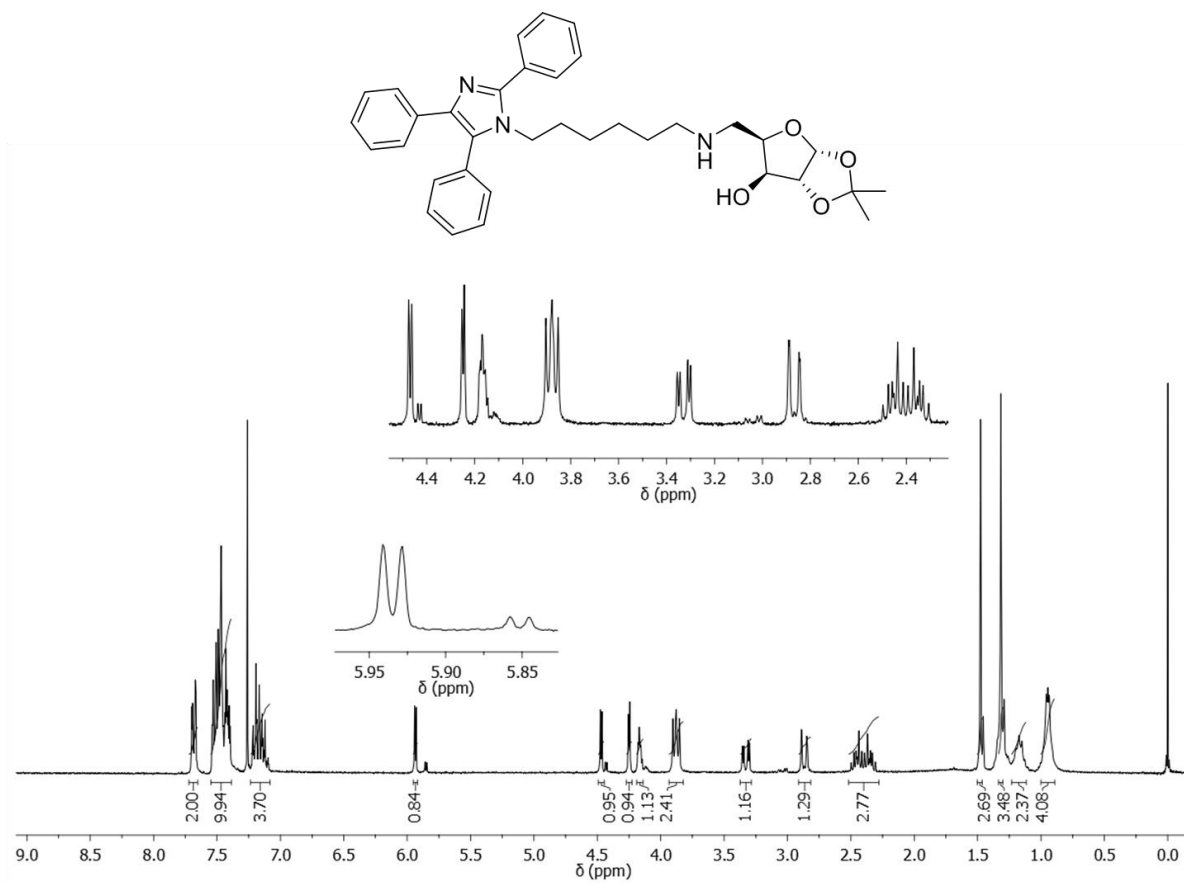


Figura C120. Espectro de RMN de ^1H (CDCl_3 , 300 MHz) do híbrido lofina(6)-xilose (**57c**).

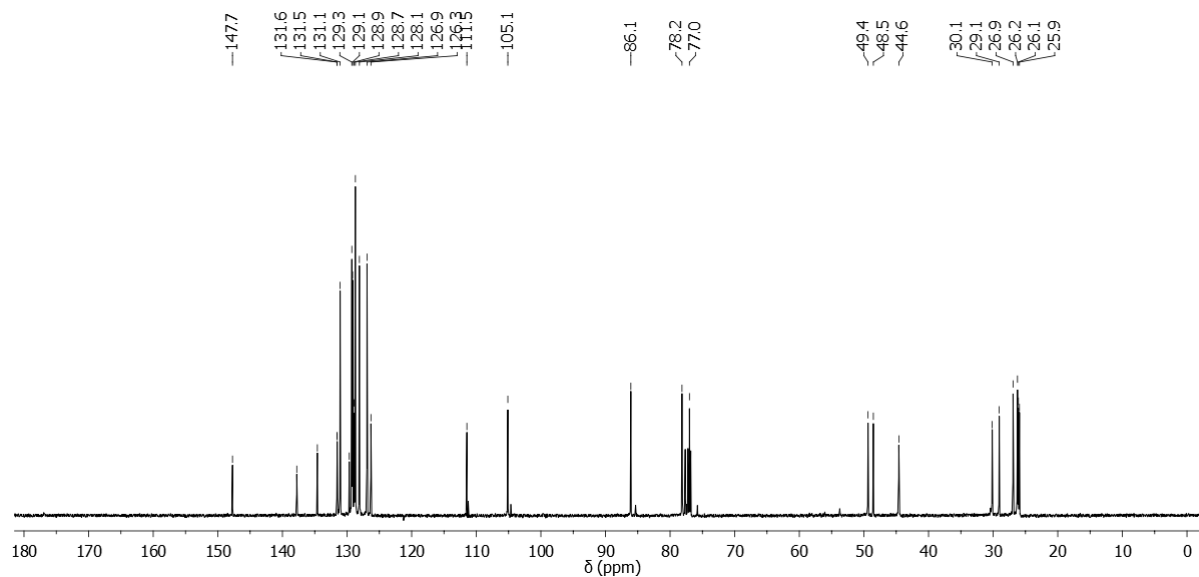


Figura C121. Espectro de RMN de ^{13}C (CDCl_3 , 75 MHz) do híbrido **57c**.

(Ampliações na página seguinte)

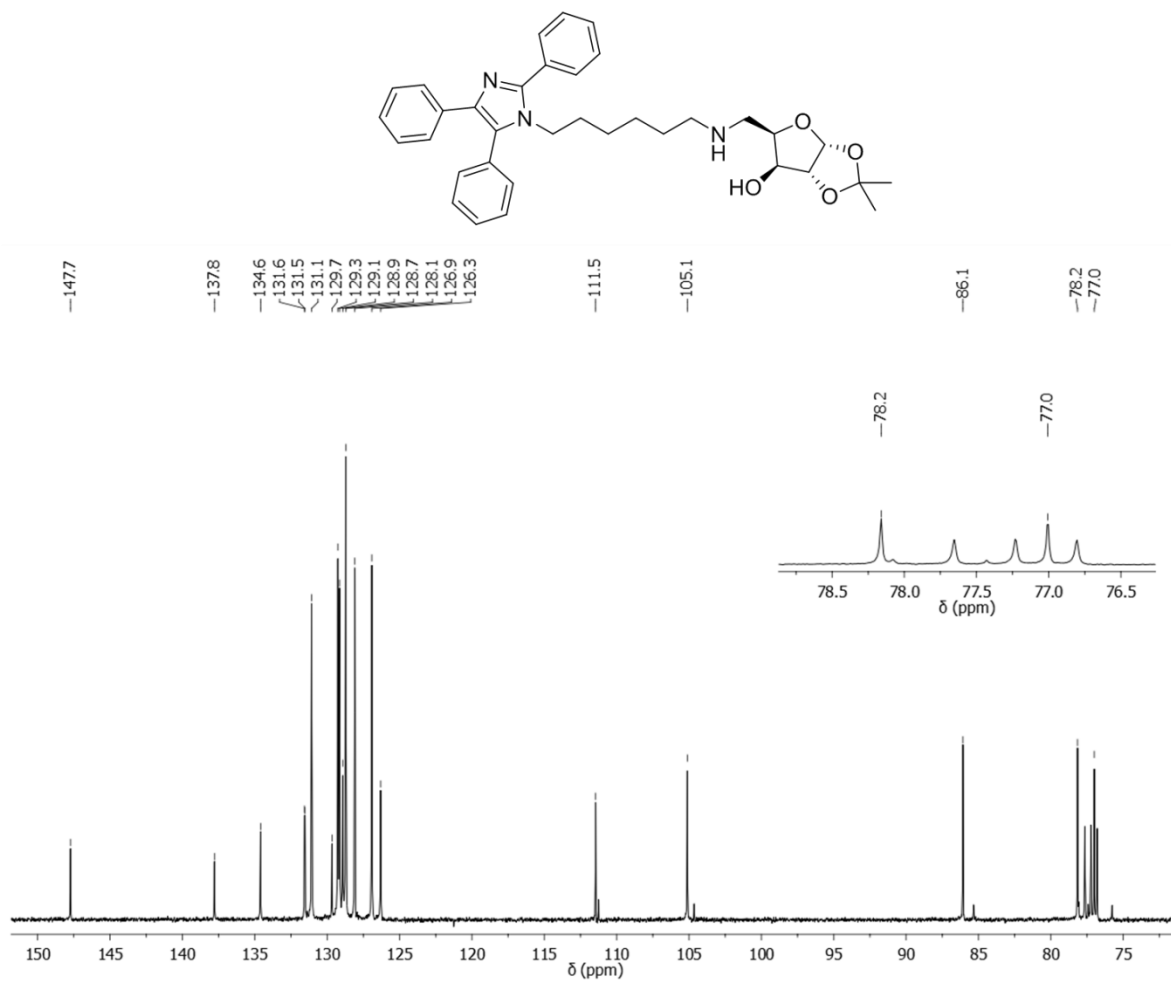


Figura C122. Ampliação do espectro de RMN de ¹³C do híbrido **57c** entre 75 e 150 ppm.

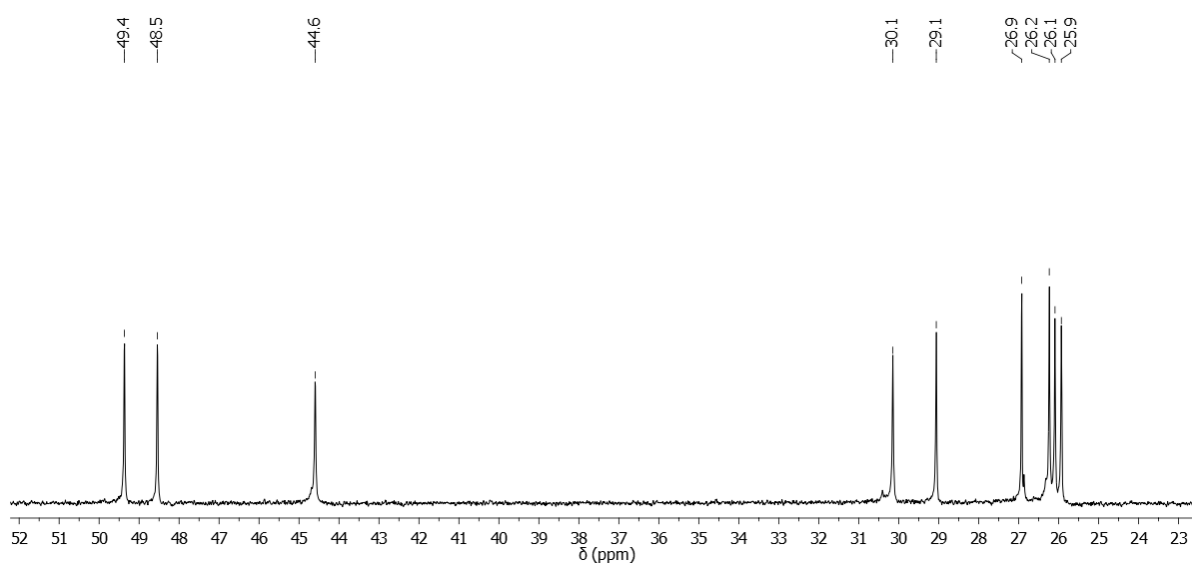


Figura C123. Ampliação do espectro de RMN de ¹³C do híbrido **57c** entre 23 e 52 ppm.

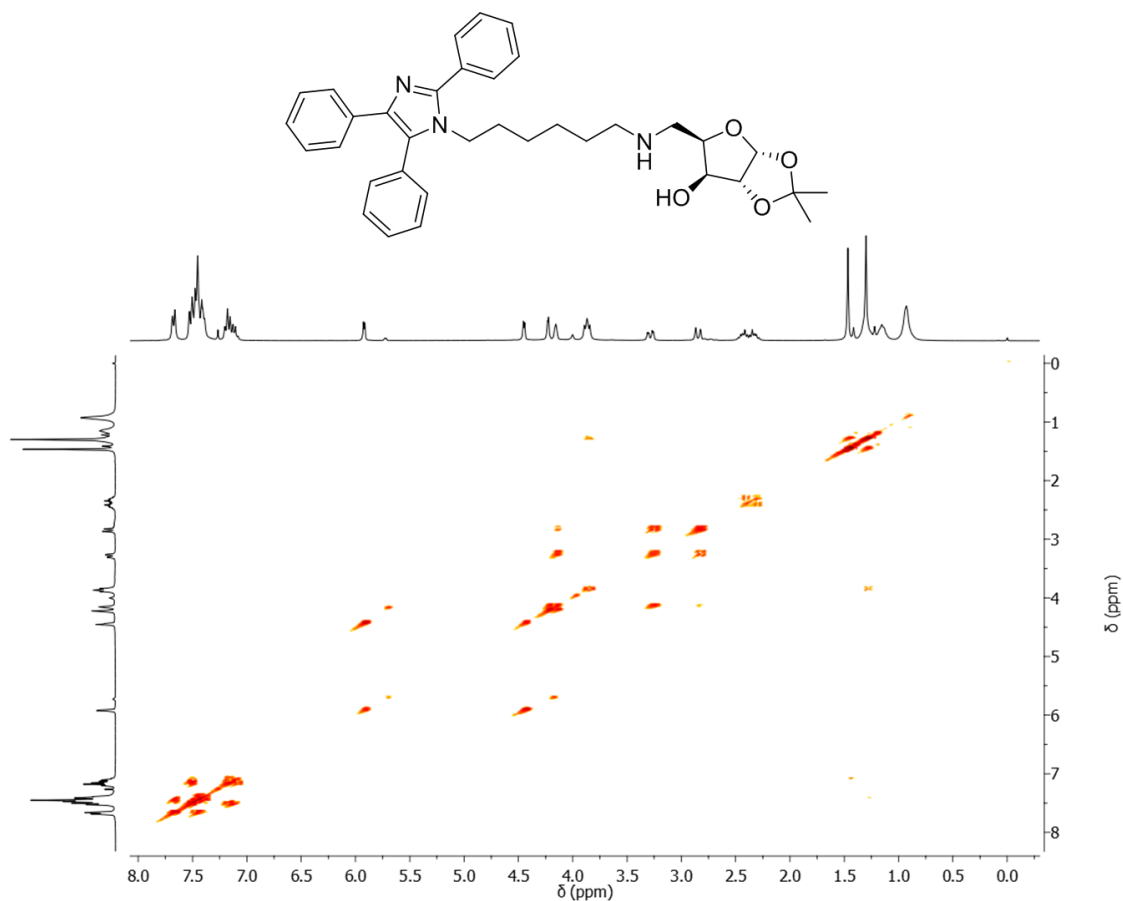


Figura C124. Espectro de RMN bidimensional ^1H - ^1H -COSY (CDCl_3 , 300 MHz) do híbrido **57c**.

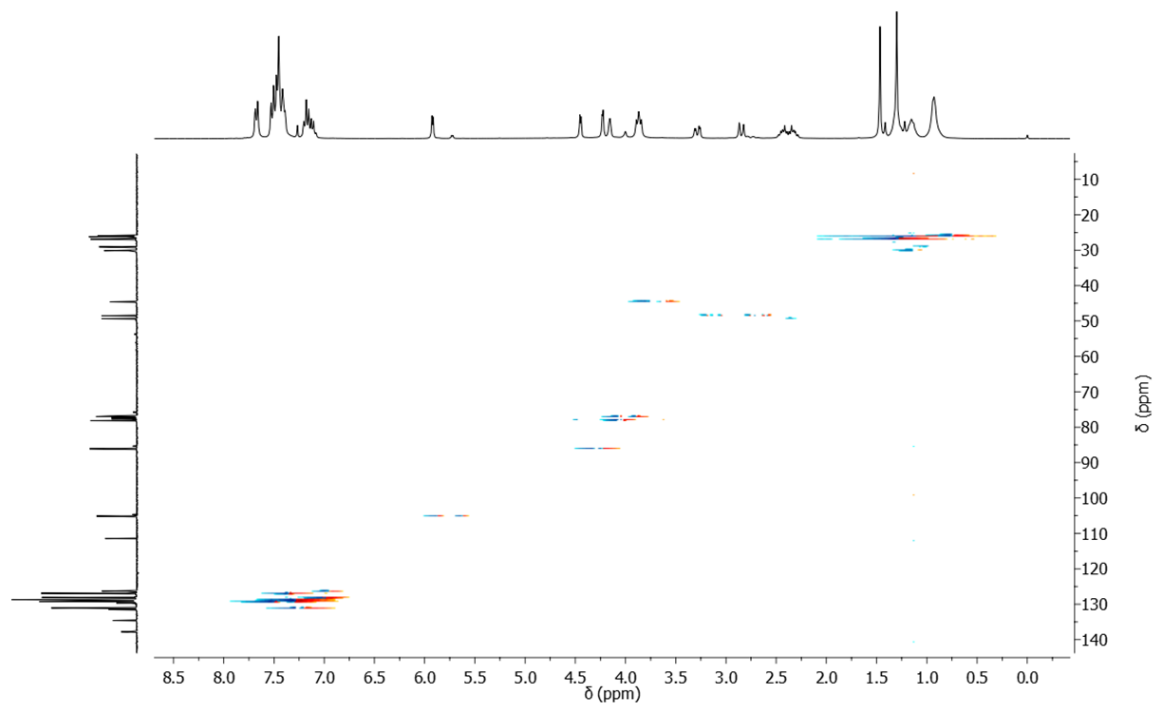


Figura C125. Espectro de RMN bidimensional ^1H - ^{13}C -HMQC (CDCl_3) do híbrido **57c**.

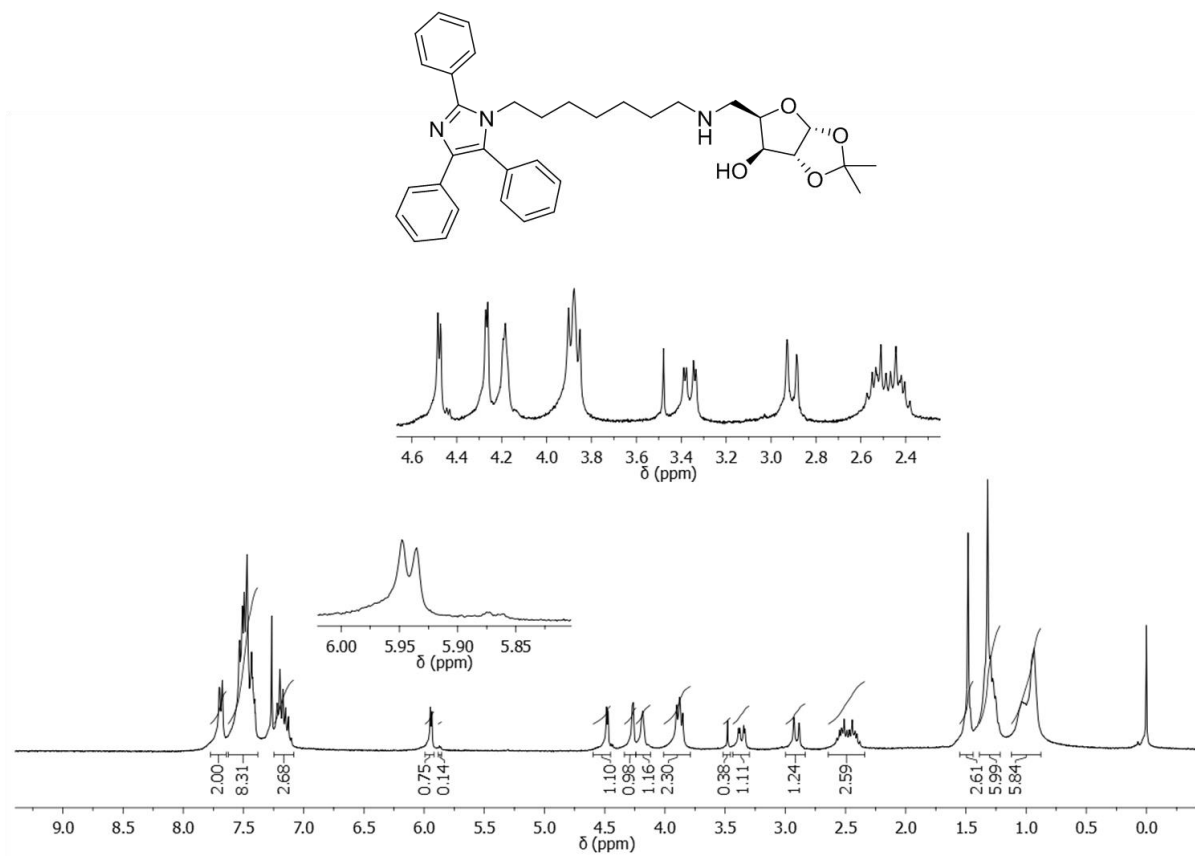


Figura C126. Espectro de RMN de ¹H (CDCl₃, 300 MHz) do híbrido lofina(7)-xilose (**57d**).

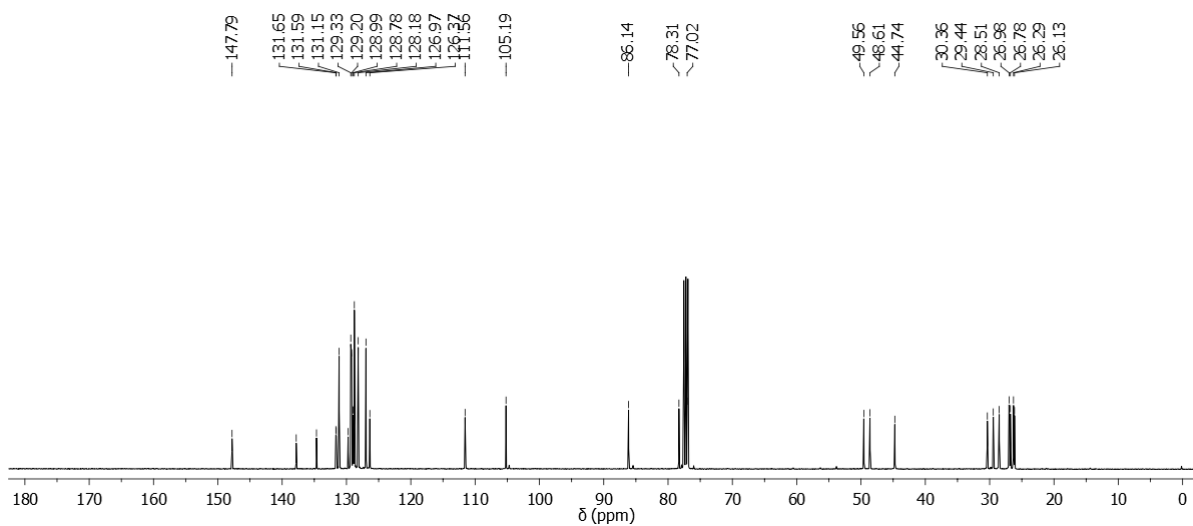


Figura C127. Espectro de RMN de ¹³C (CDCl₃, 75 MHz) do híbrido **57d**.

(Ampliações na página seguinte)

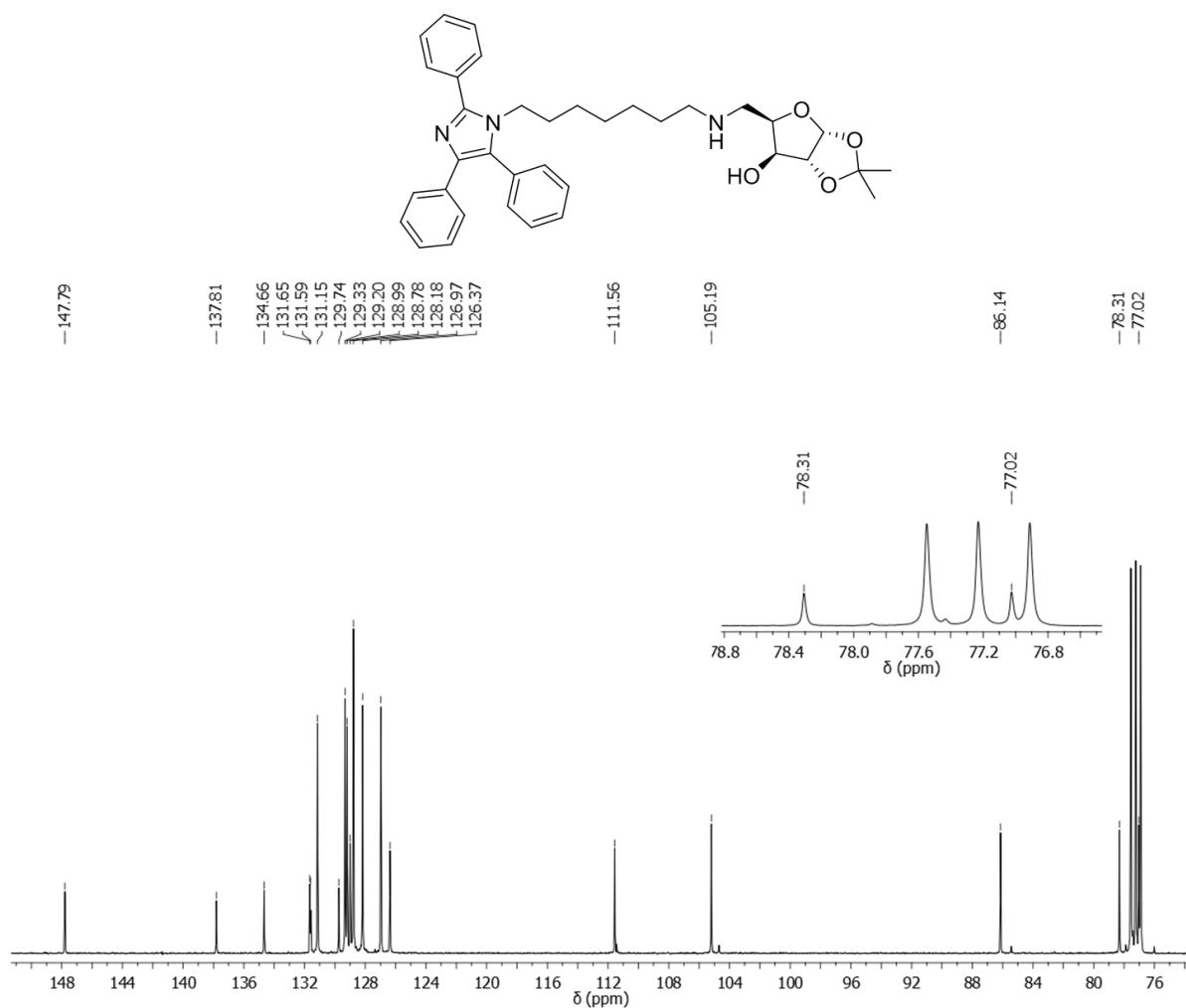


Figura C128. Ampliação do espectro de RMN de ^{13}C do híbrido **57d** entre 75 e 150 ppm.

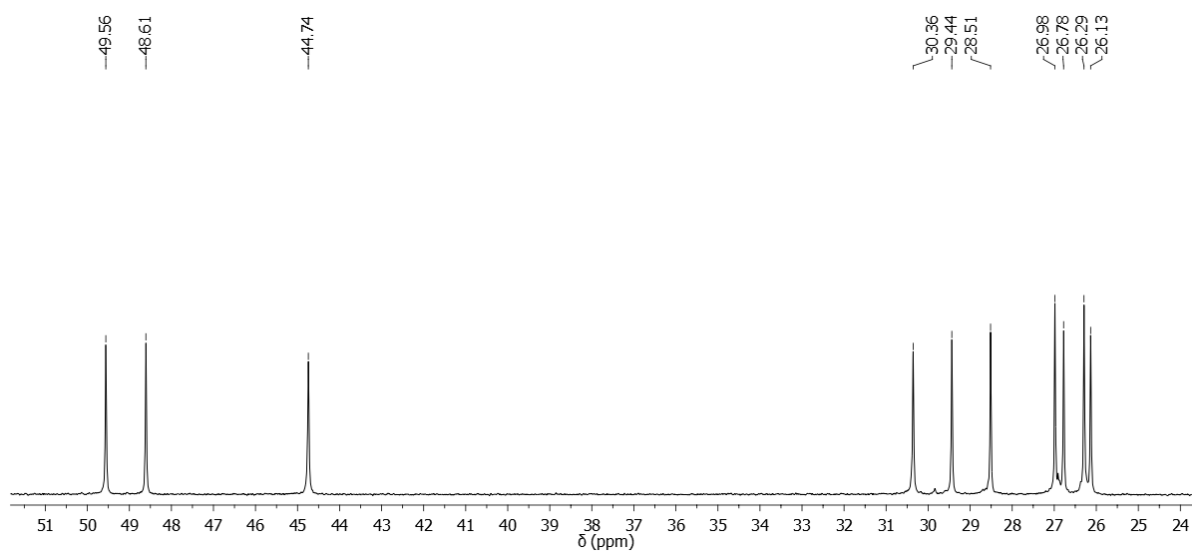


Figura C129. Ampliação do espectro de RMN de ^{13}C do híbrido **57d** entre 24 e 51 ppm.

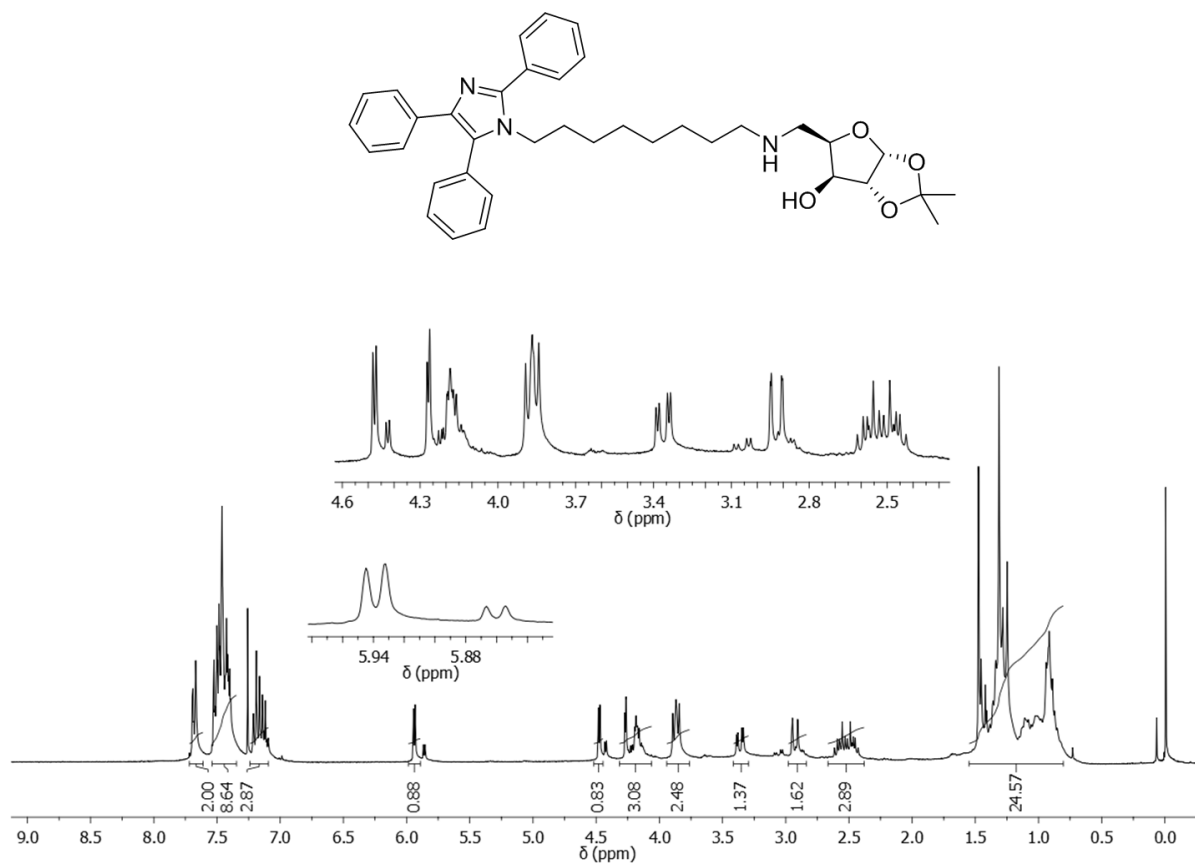


Figura C130. Espectro de RMN de ^1H (CDCl₃, 300 MHz) do híbrido lofina(8)-xilose (**57e**).

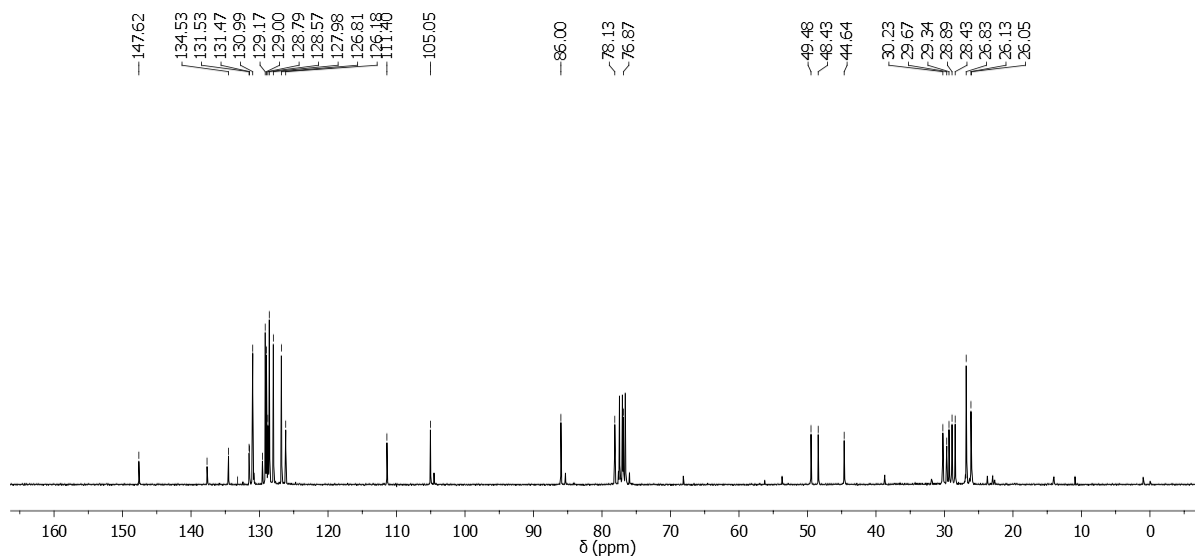


Figura C131. Espectro de RMN de ^{13}C (CDCl₃, 75 MHz) do híbrido **57e**.

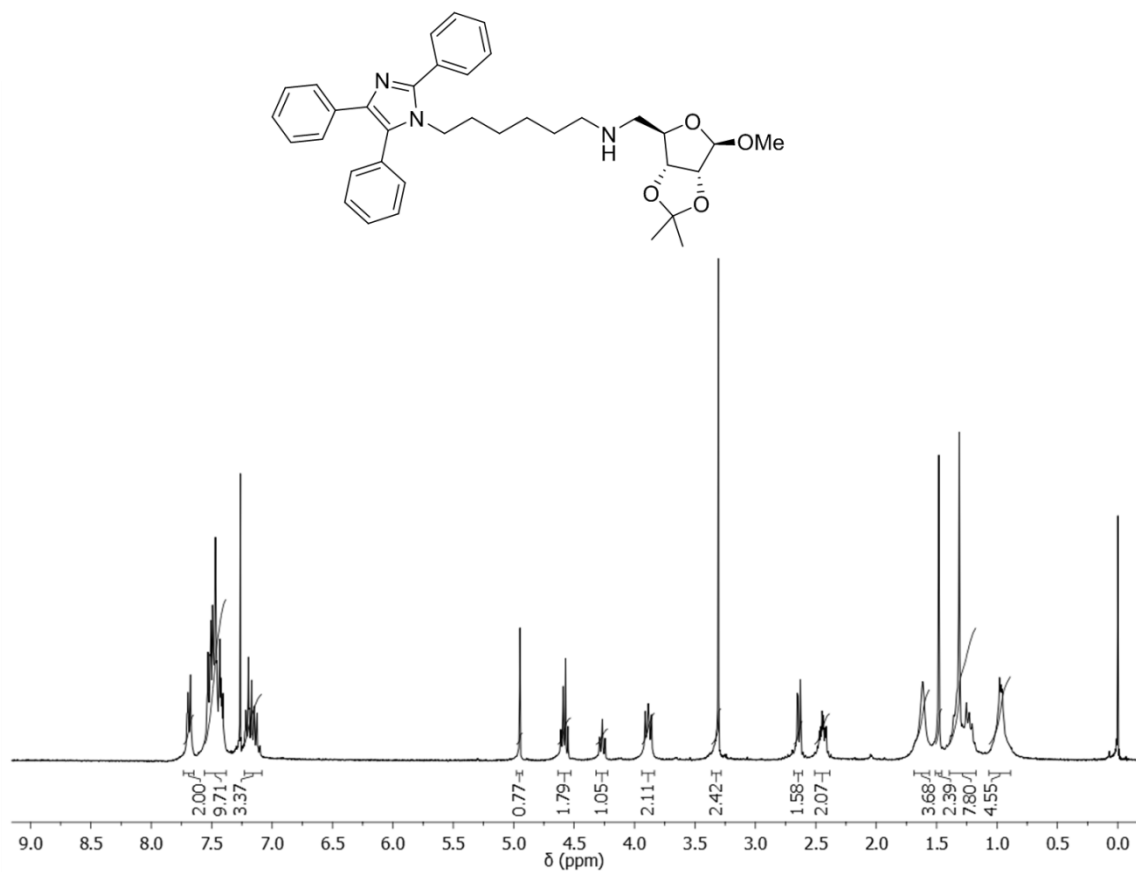


Figura C132. Espectro de RMN de ^1H (CDCl₃, 300 MHz) do híbrido lofina(6)-ribose (**58a**).

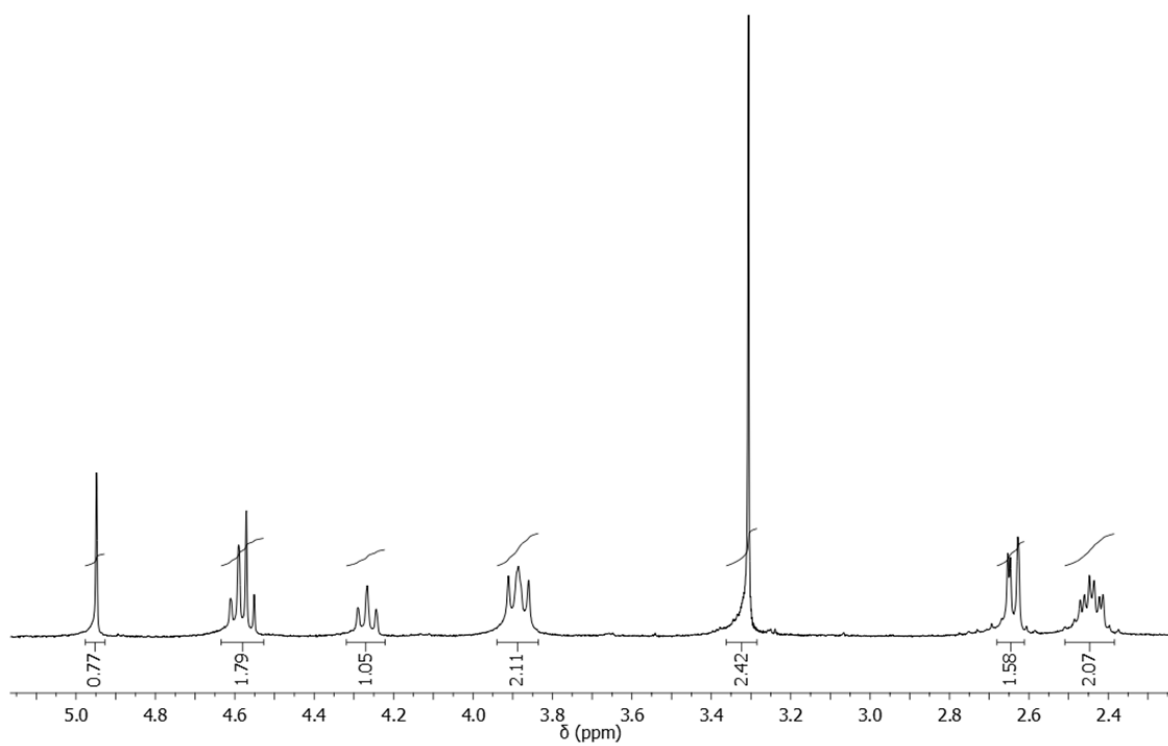


Figura C133. Ampliação do espectro de RMN de ^1H do híbrido **58a** entre 2,4 e 5,0 ppm.

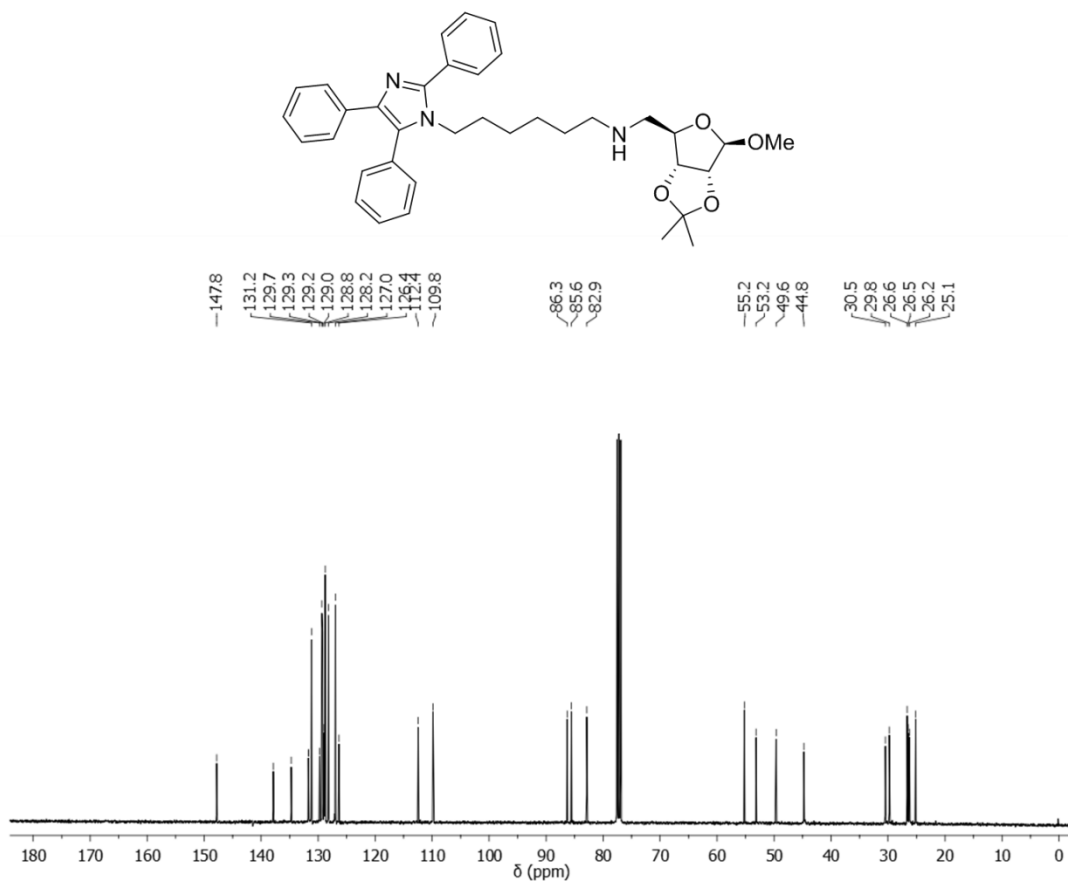


Figura C134. Espectro de RMN de ^{13}C (CDCl_3 , 75 MHz) do híbrido **58a**.

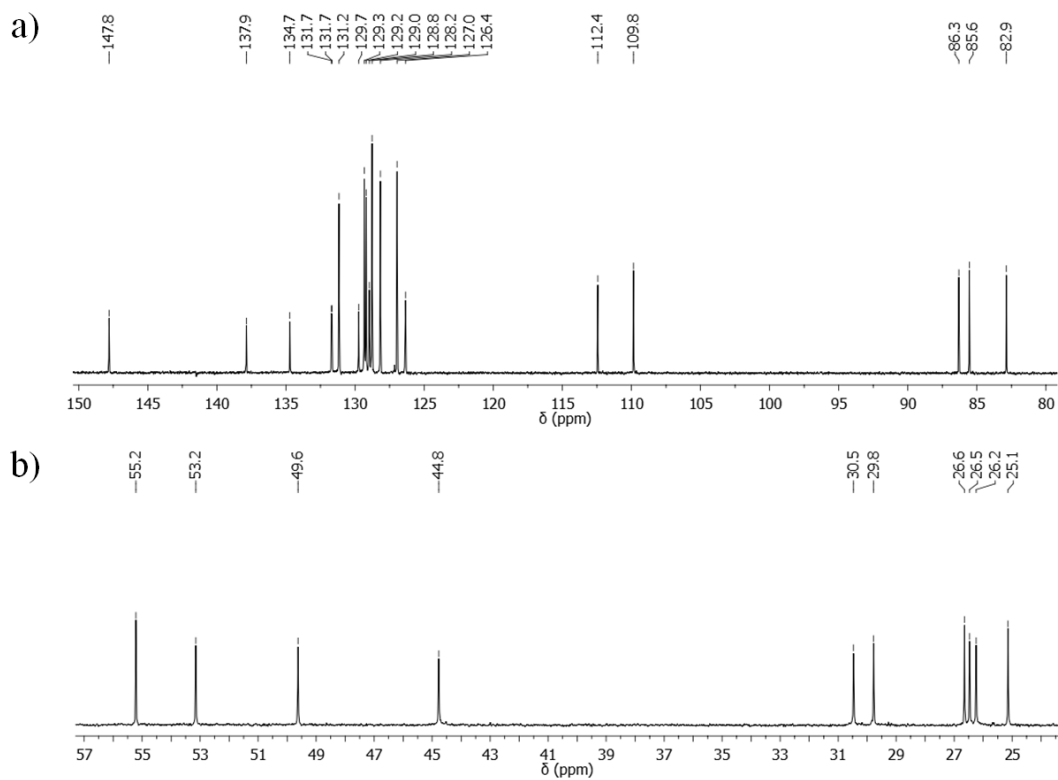


Figura C135. Ampliações do espectro de RMN de ^{13}C do híbrido **58a**: a) entre 80 e 150 ppm e b) entre 25 e 57 ppm.

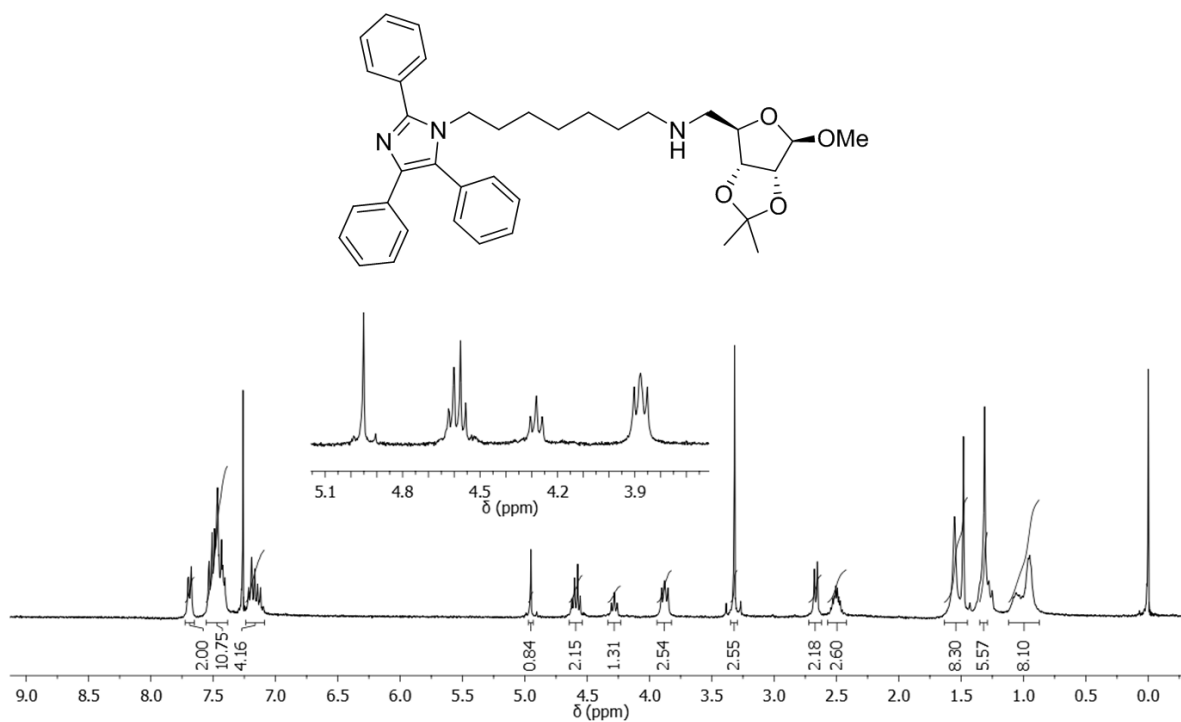


Figura C136. Espectro de RMN de ^1H (CDCl_3 , 300 MHz) do híbrido lofina(7)-ribose (**58b**).

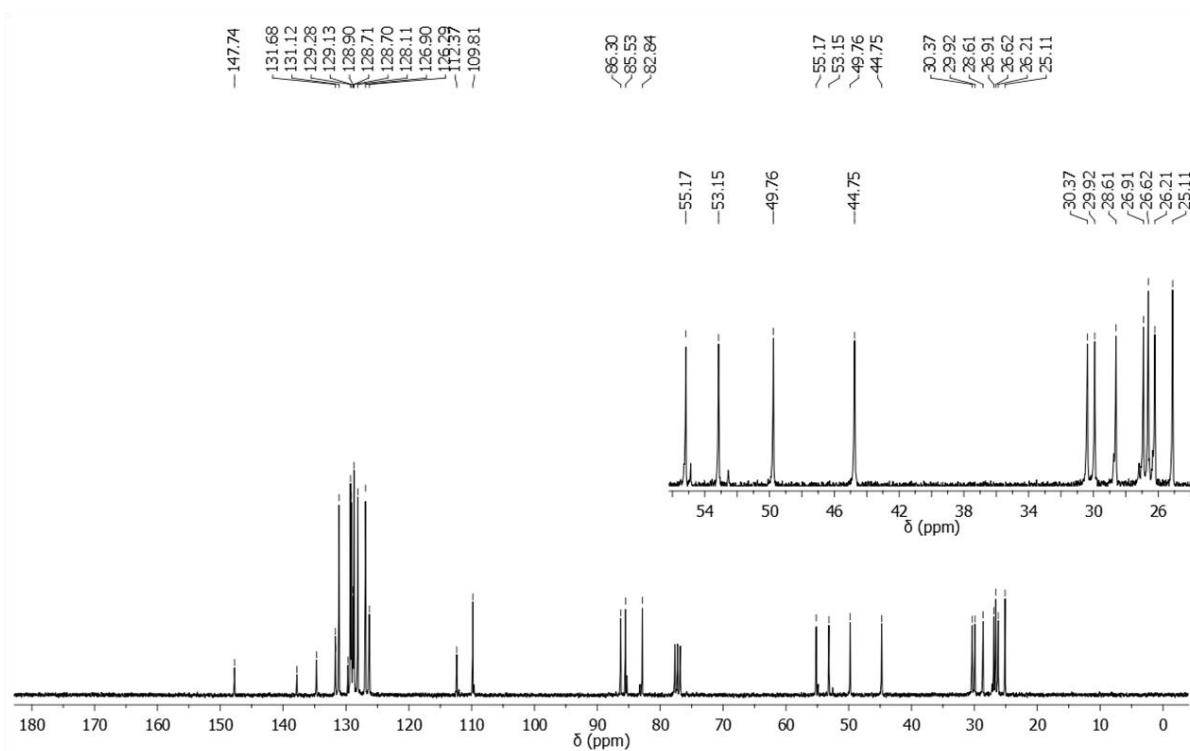


Figura C137. Espectro de RMN de ^{13}C (CDCl_3 , 75 MHz) do híbrido **58b**.

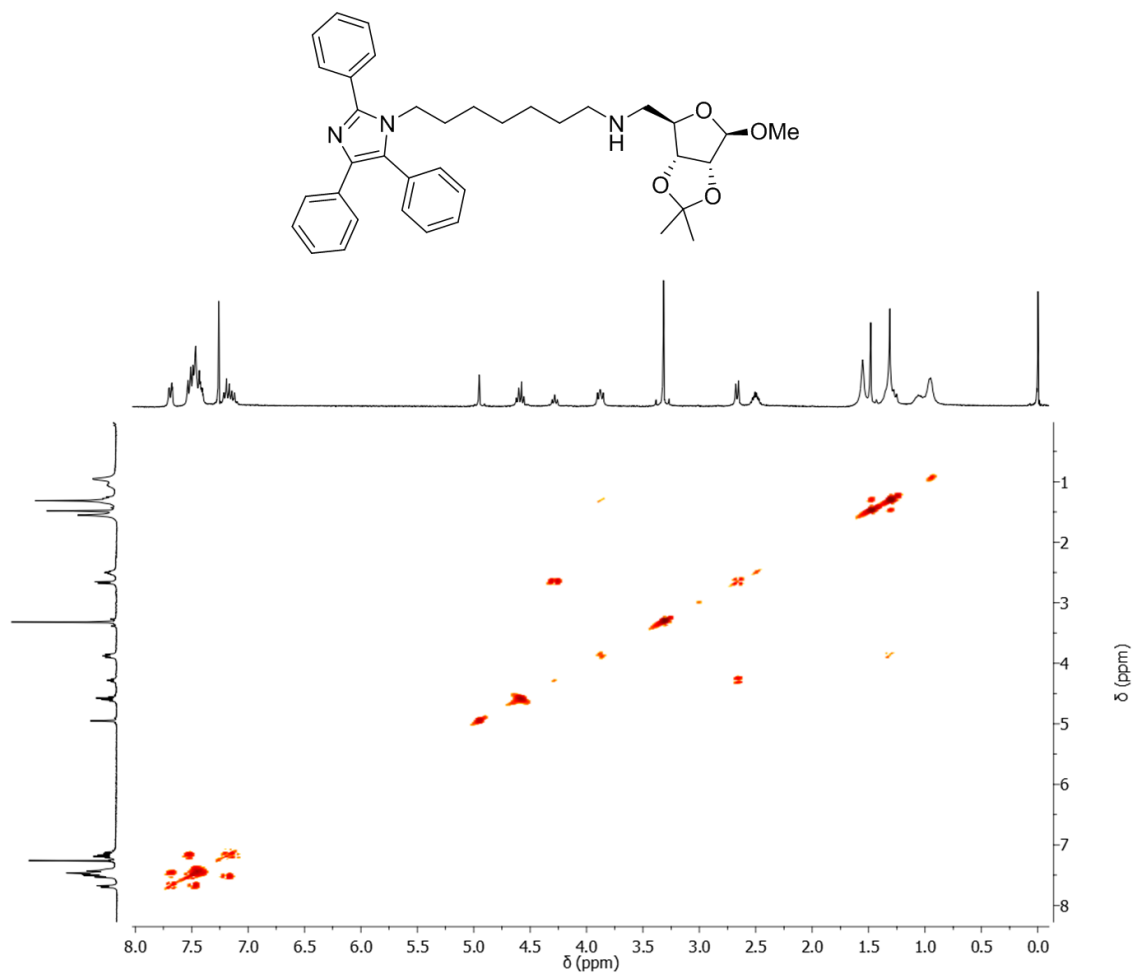


Figura C138. Espectro de RMN bidimensional ^1H - ^1H -COSY (CDCl_3 , 300 MHz) do híbrido **58b**.

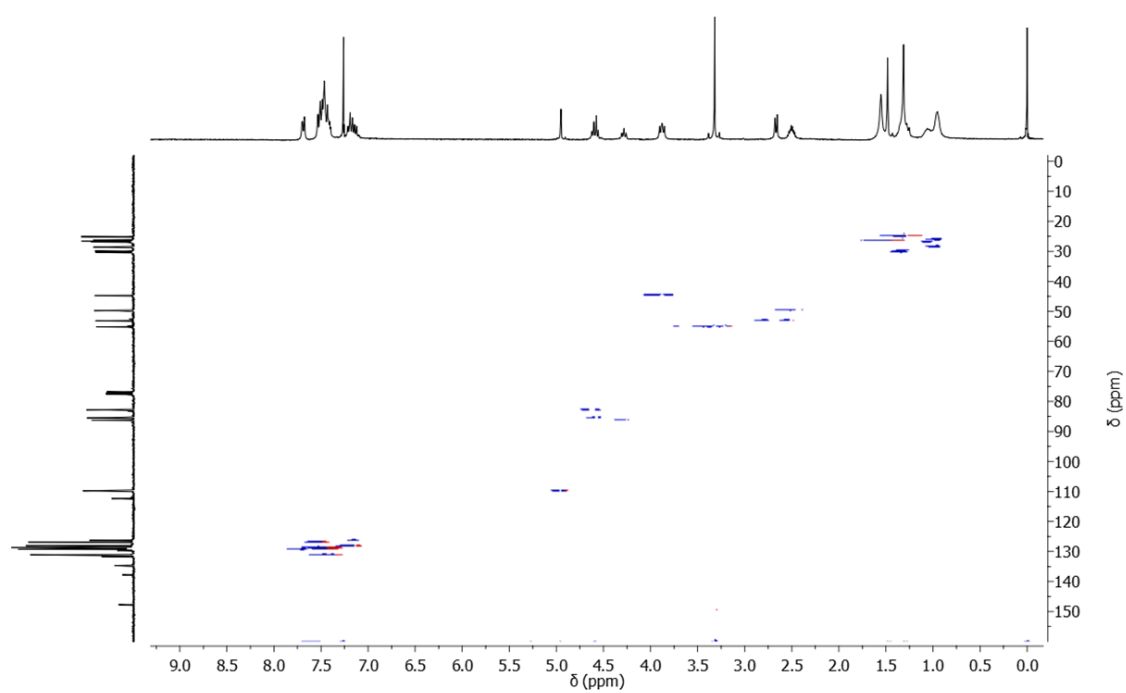


Figura C139. Espectro de RMN bidimensional ^1H - ^{13}C -HMQC (CDCl_3) do híbrido **58b**.

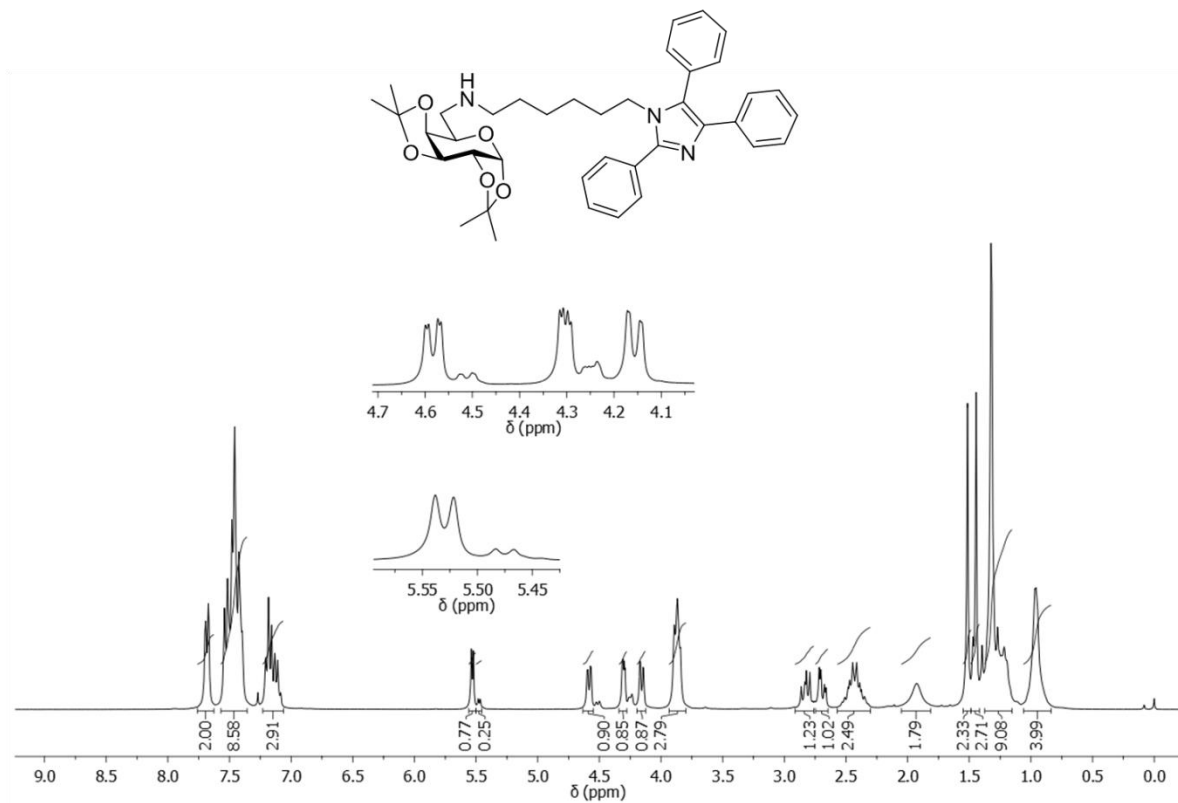


Figura C140. Espectro de RMN de ^1H (CDCl₃, 300 MHz) do híbrido lofina(6)-galactose (**59a**).

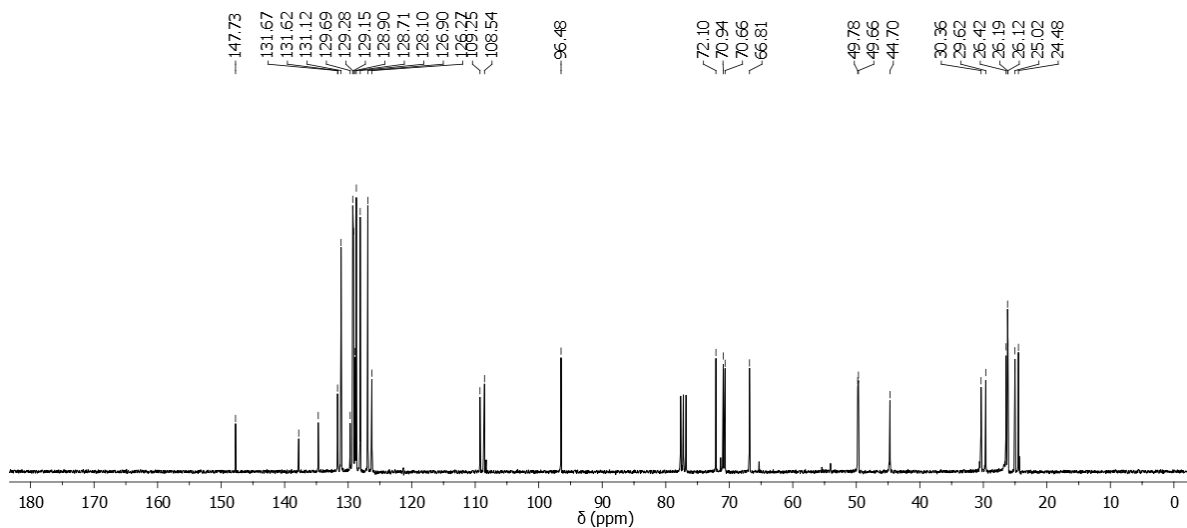


Figura C141. Espectro de RMN de ^{13}C (CDCl₃, 75 MHz) do híbrido **59a**.

(APT e ampliações na página seguinte)

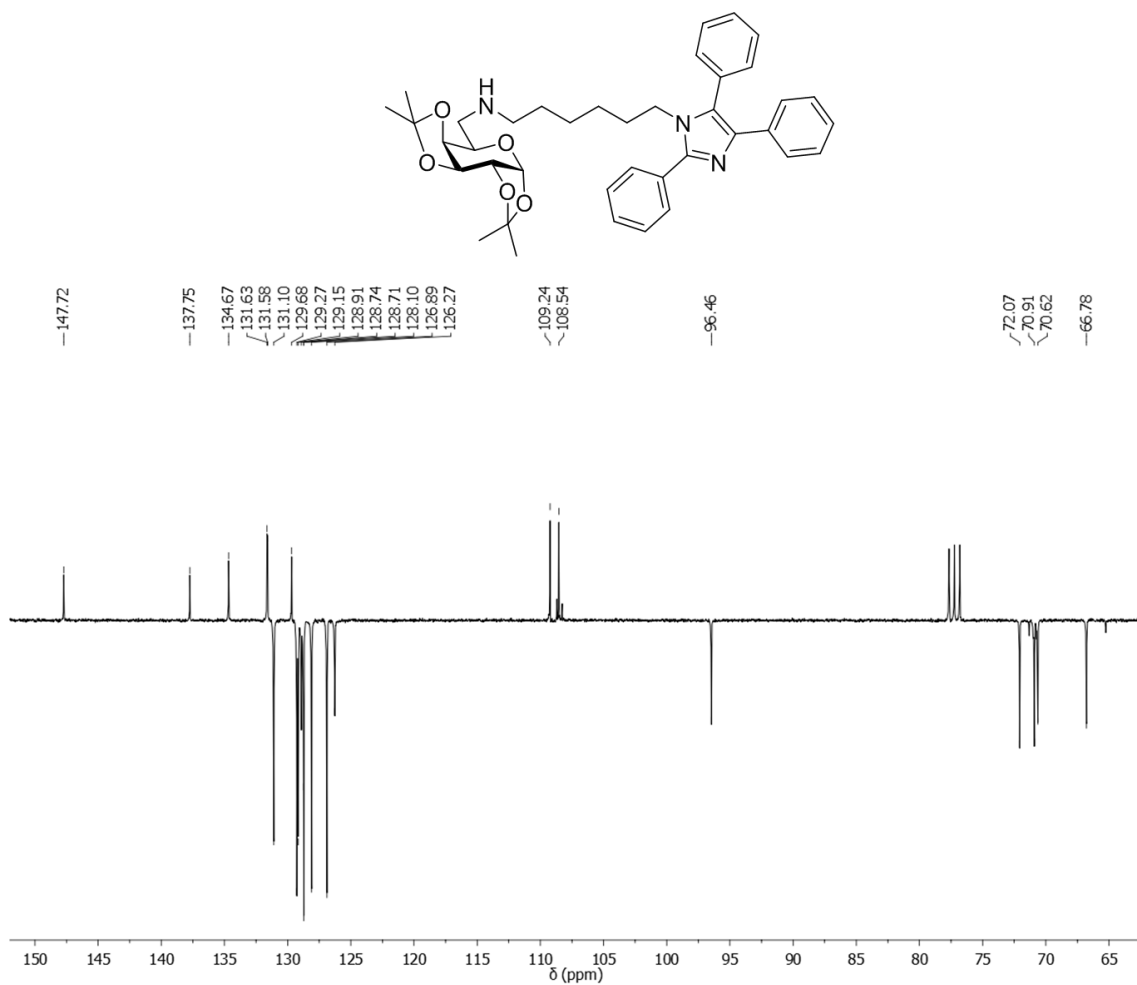


Figura C142. Ampliação do espectro de RMN de ^{13}C , APT (CDCl_3 , 75 MHz) do híbrido **59a** entre 65 e 150 ppm.

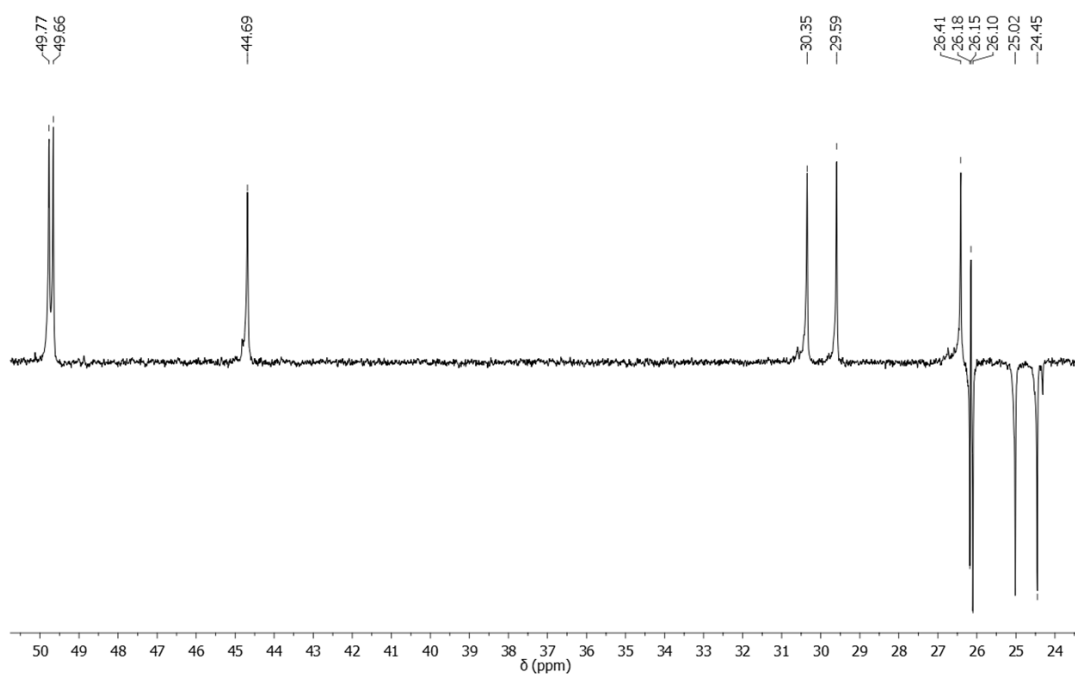


Figura C143. Ampliação do espectro de RMN de ^{13}C (APT) do híbrido **59a** entre 24 e 50 ppm.

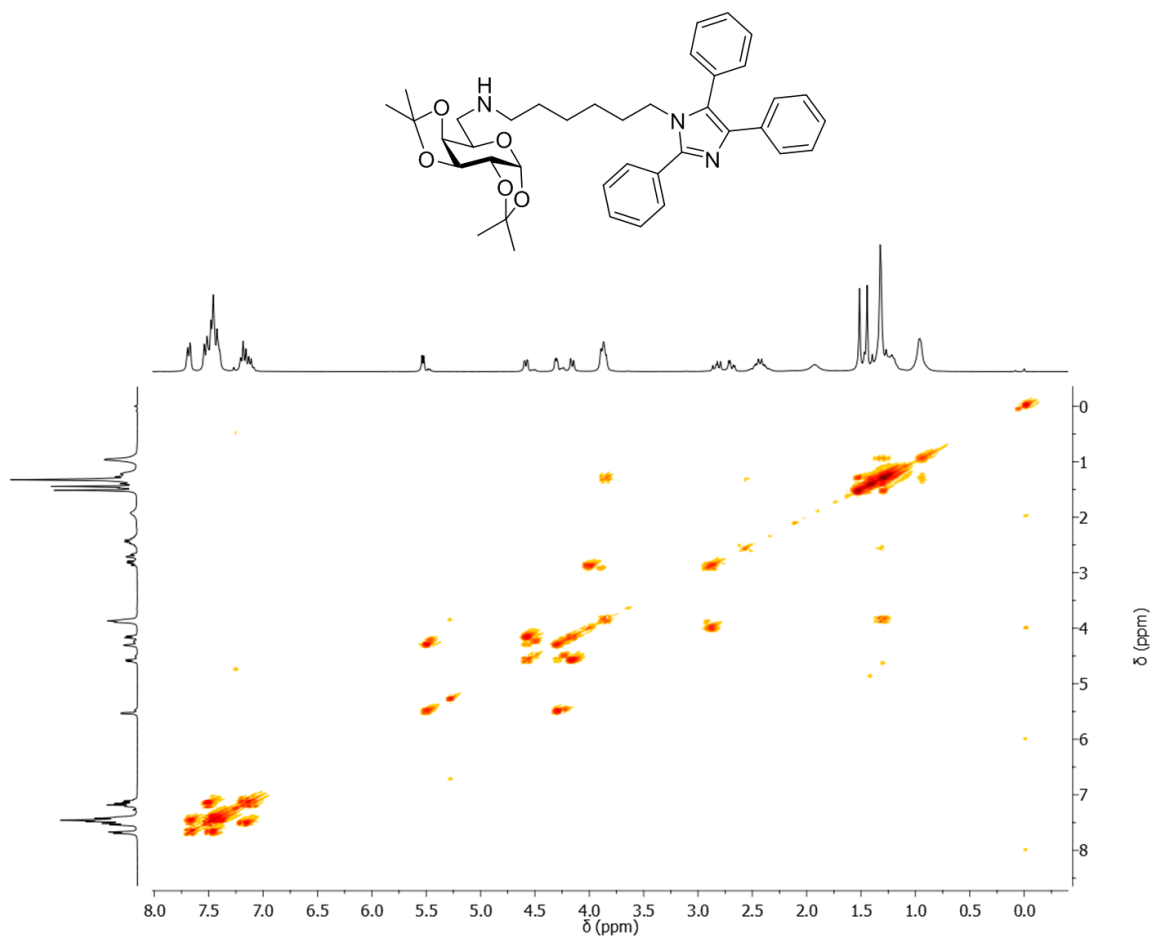


Figura C144. Espectro de RMN bidimensional ^1H - ^1H -COSY (CDCl_3 , 300 MHz) do híbrido **59a**.

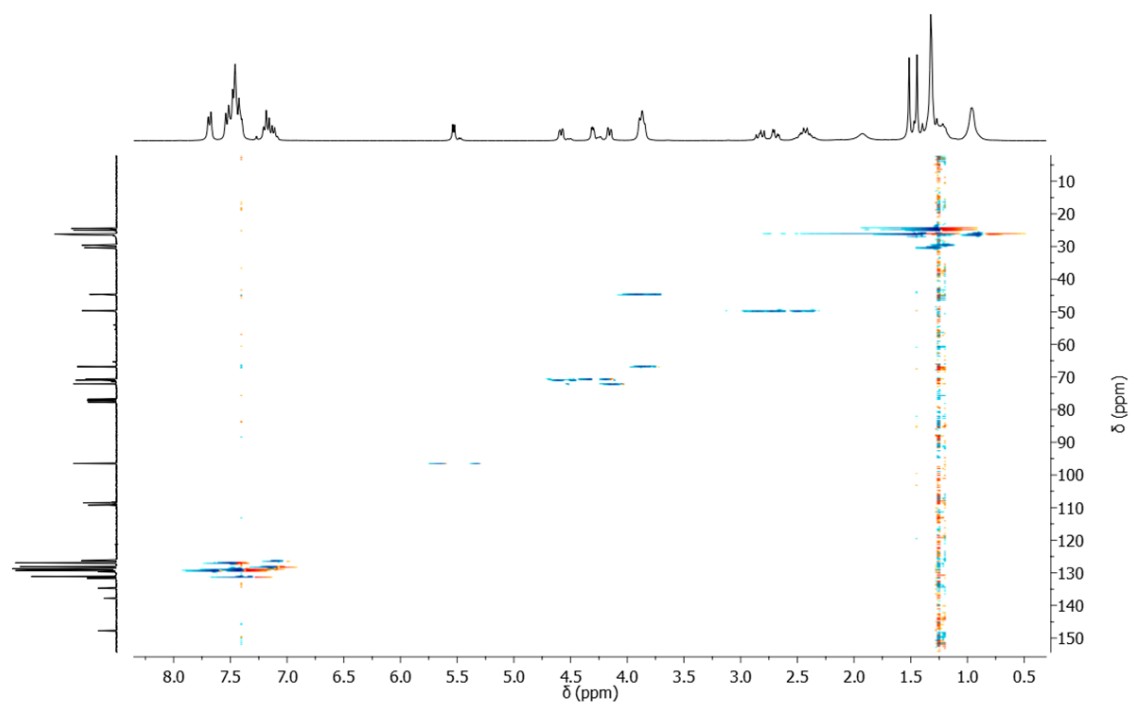


Figura C145. Espectro de RMN bidimensional ^1H - ^{13}C -HMQC (CDCl_3) do híbrido **59a**.

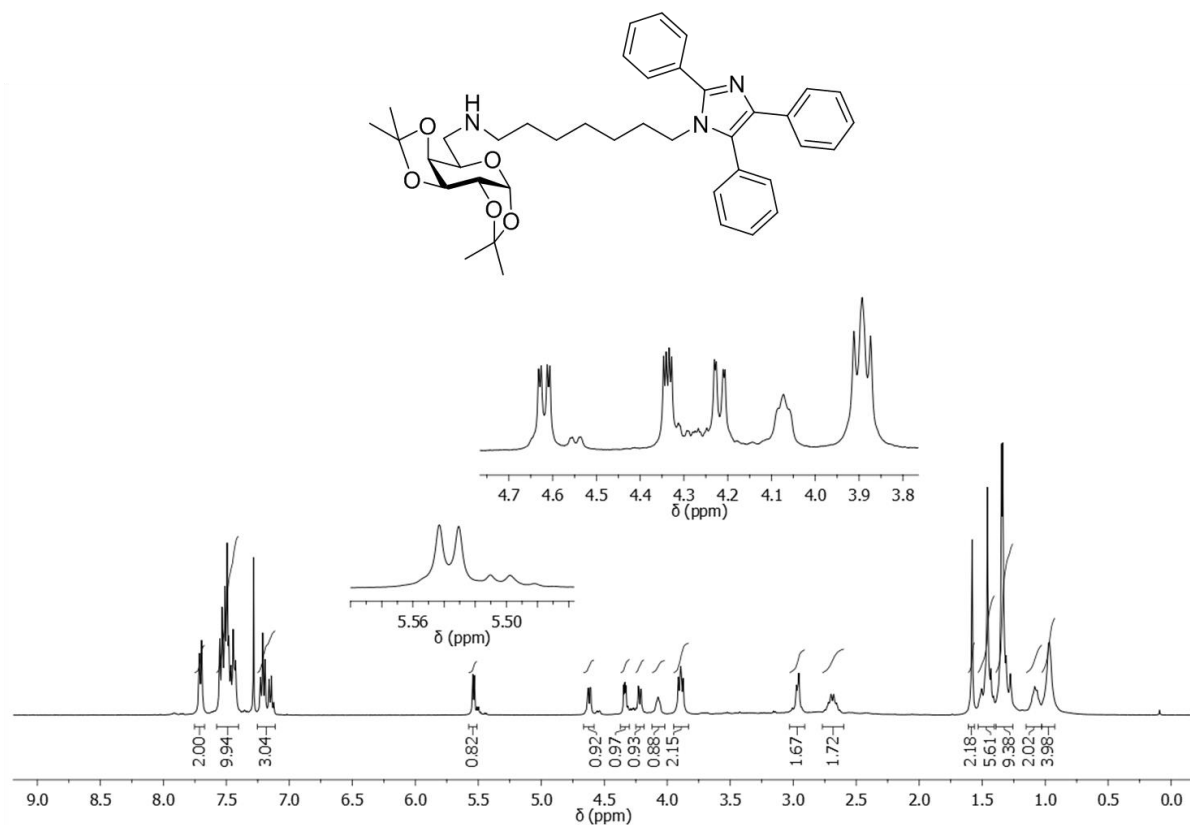


Figura C146. Espectro de RMN de ¹H (CDCl₃, 300 MHz) do híbrido lofina(7)-galactose (**59b**).

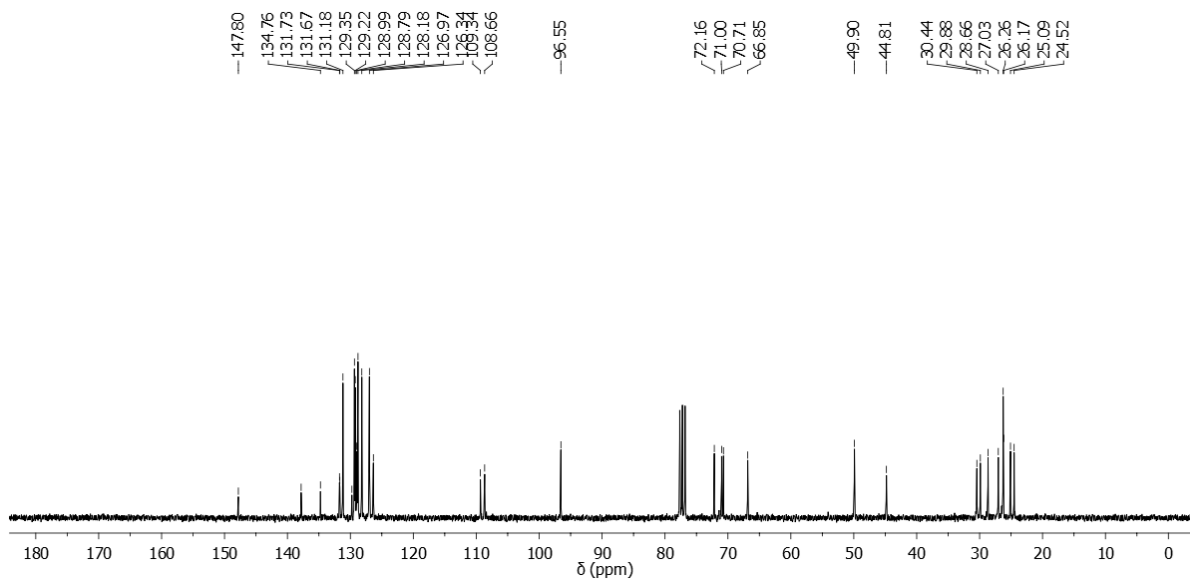


Figura C147. Espectro de RMN de ¹³C (CDCl₃, 75 MHz) do híbrido **59b**.

(Ampliações na página seguinte)

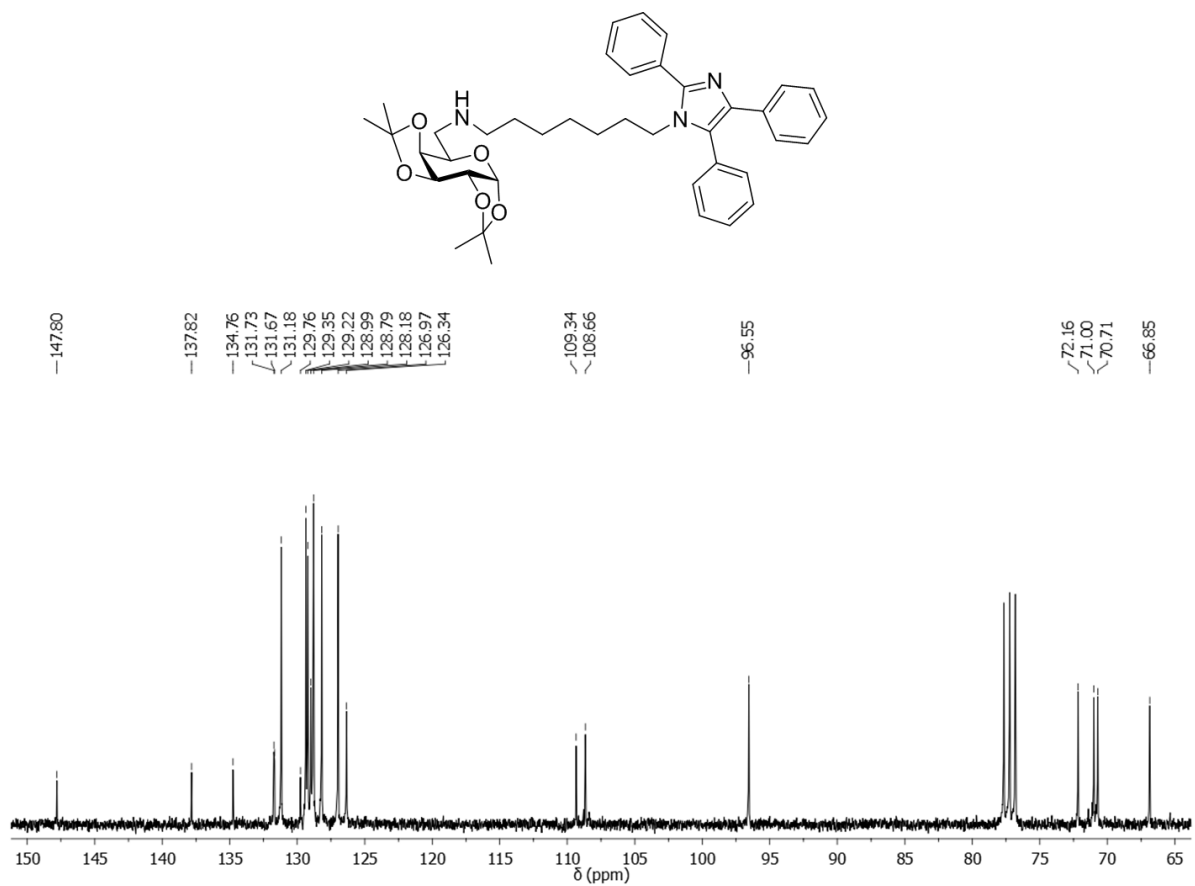


Figura C148. Ampliação do espectro de RMN de ^{13}C do híbrido **59b** entre 65 e 150 ppm.

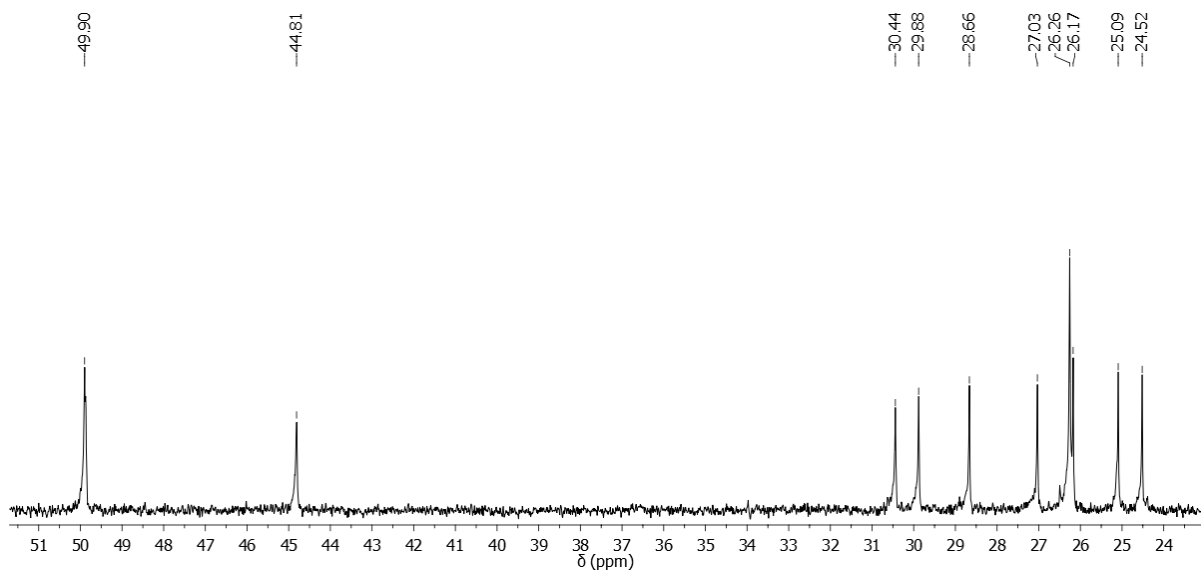


Figura C149. Ampliação do espectro de RMN de ^{13}C do híbrido **59b** entre 24 e 51 ppm.

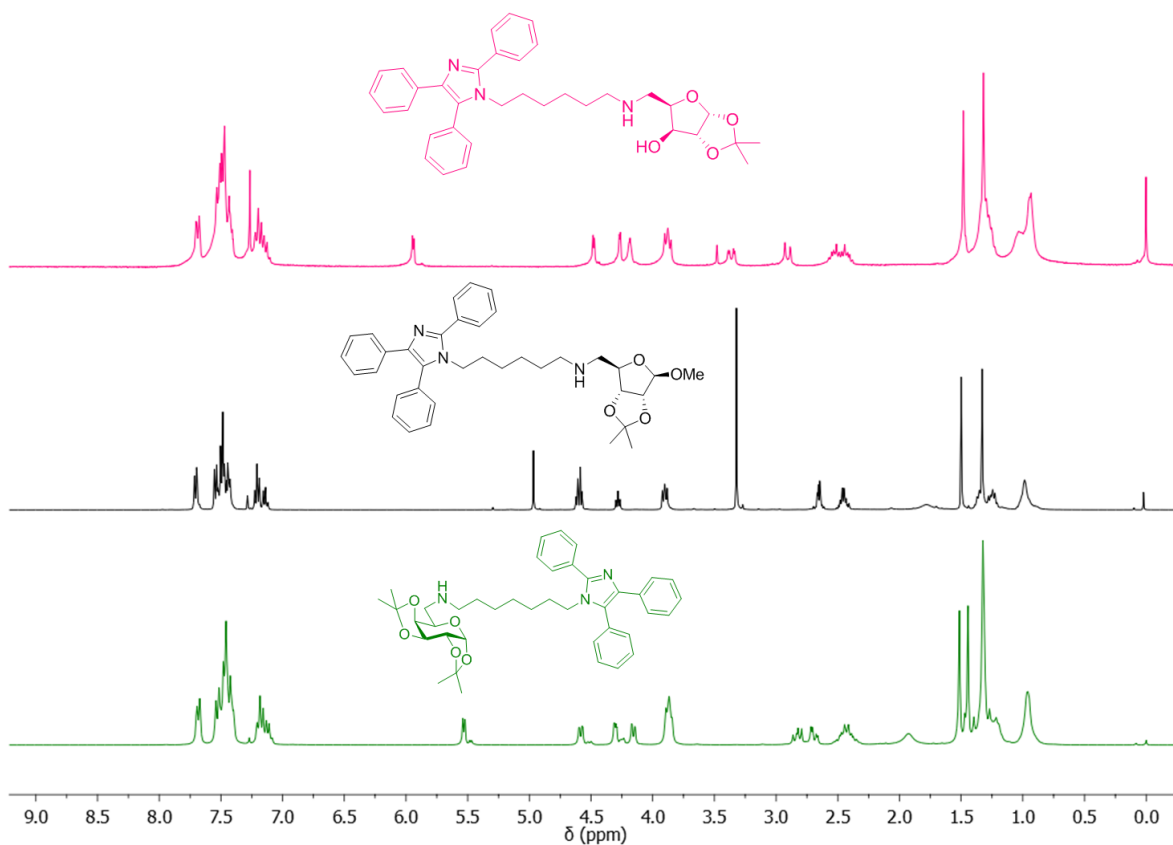


Figura C150. Comparação dos espectros de RMN de ¹H (CDCl₃, 300 MHz) dos híbridos lofina-(n = 6)carboidratos, D-xilose (**57c**, acima), D-ribose (**58a**, meio) e D-galactose (**59a**, abaixo).

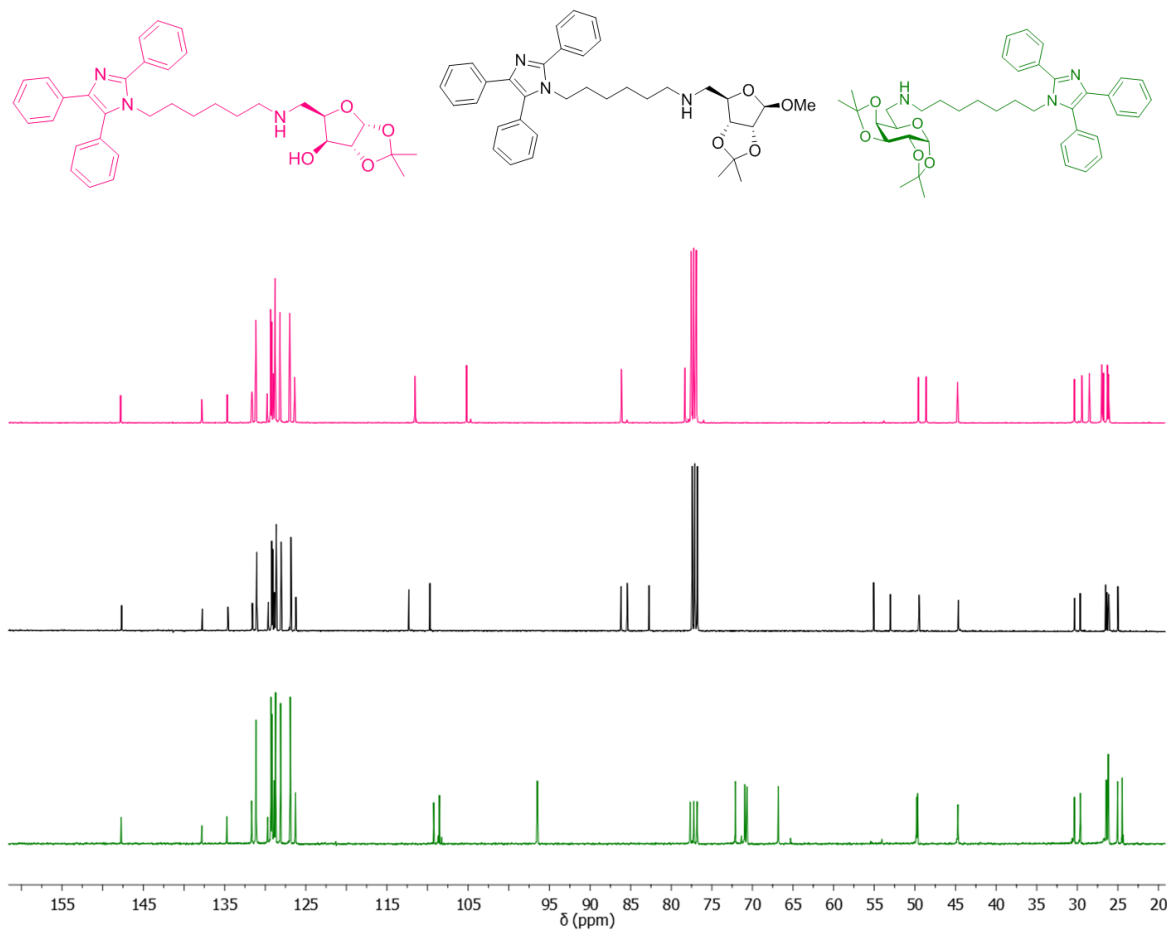


Figura C151. Comparação dos espectros de RMN de ¹³C (CDCl₃, 75 MHz) dos híbridos lofina-(n = 6)carboidratos, D-xilose (**57c**, acima), D-ribose (**58a**, meio) e D-galactose (**59a**, abaixo). Ampliação entre 20 e 150 ppm.

APÊNDICE D - Espectros de IV dos Compostos Inéditos

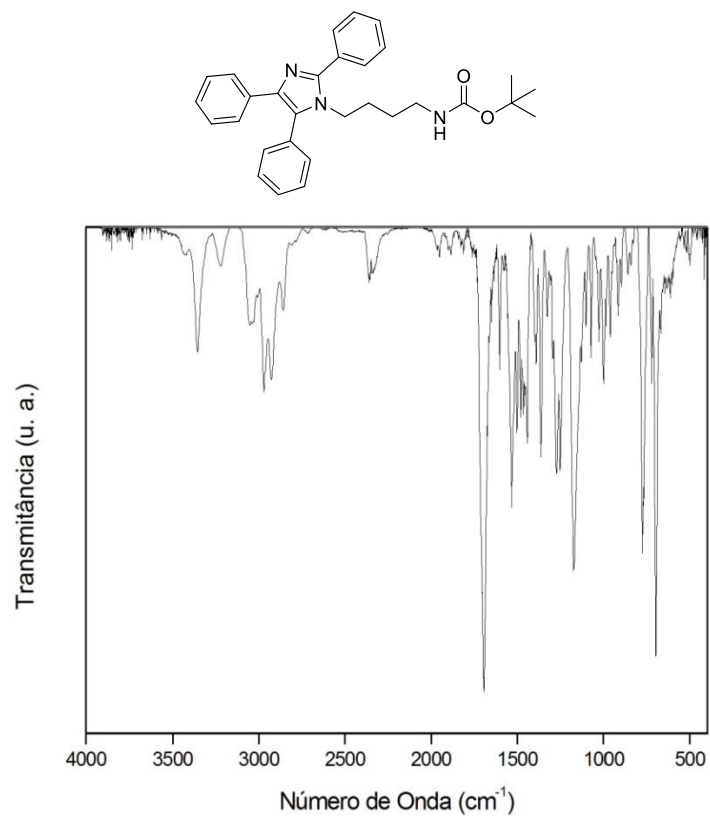


Figura D1. Espectro de IV (pastilha de KBr) do carbamato **21a**.

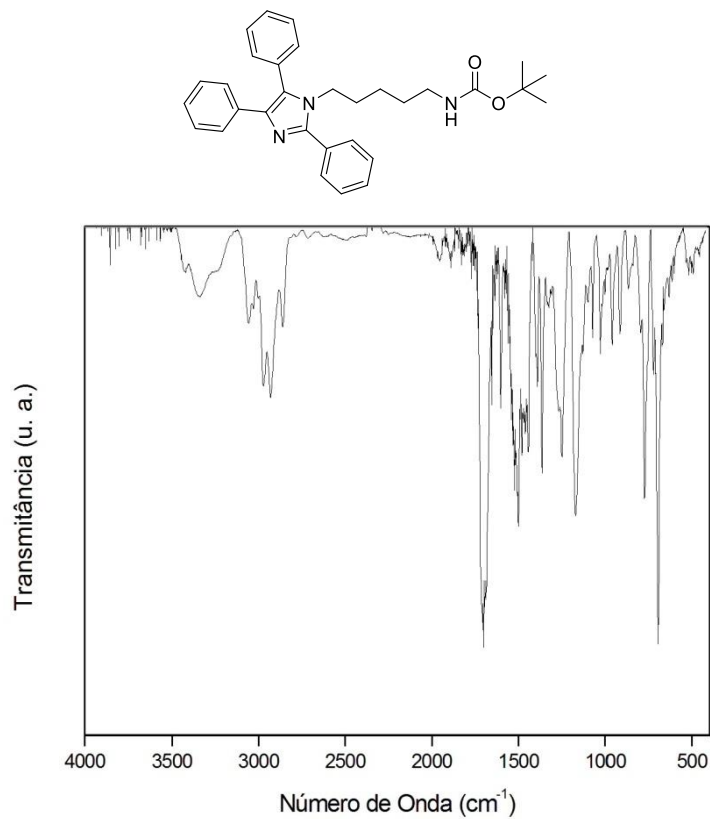


Figura D2. Espectro de IV (pastilha de KBr) do carbamato **21b**.

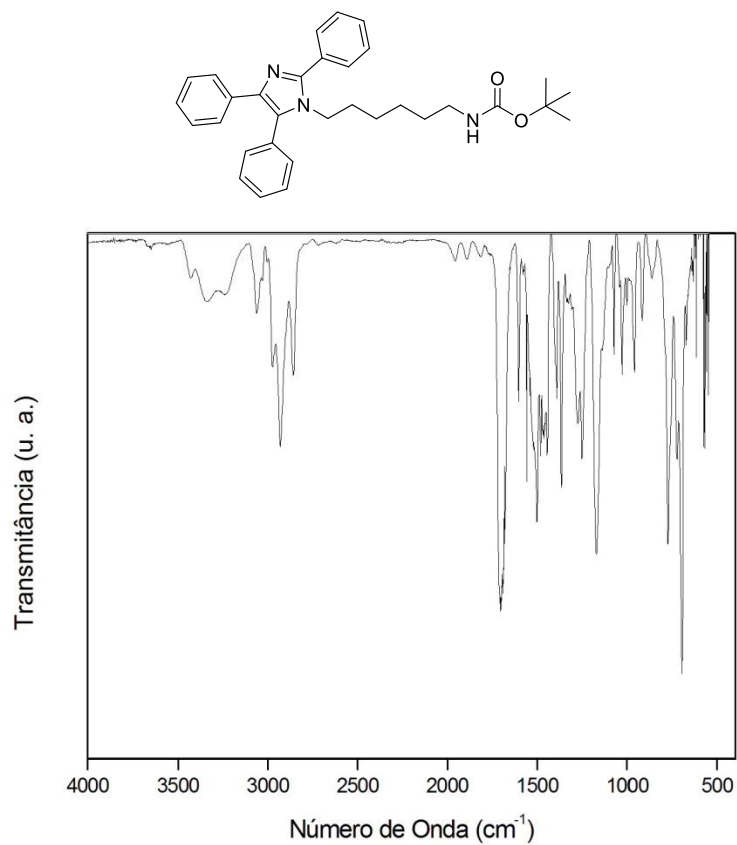


Figura D3. Espectro de IV (pastilha de KBr) do carbamato **21c**.

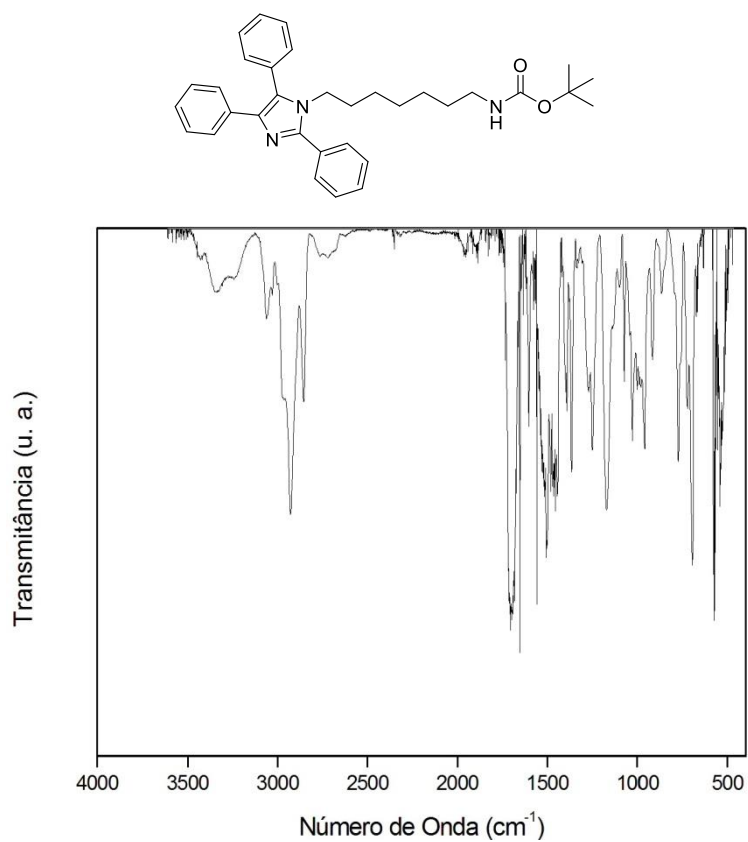


Figura D4. Espectro de IV (pastilha de KBr) do carbamato **21d**.

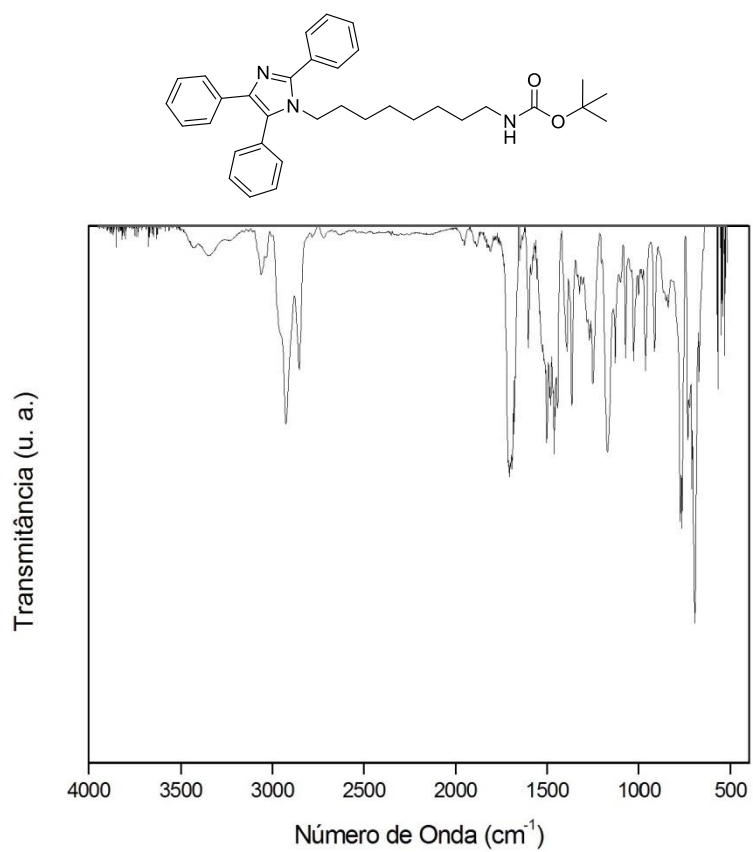


Figura D5. Espectro de IV (pastilha de KBr) do carbamato **21e**.

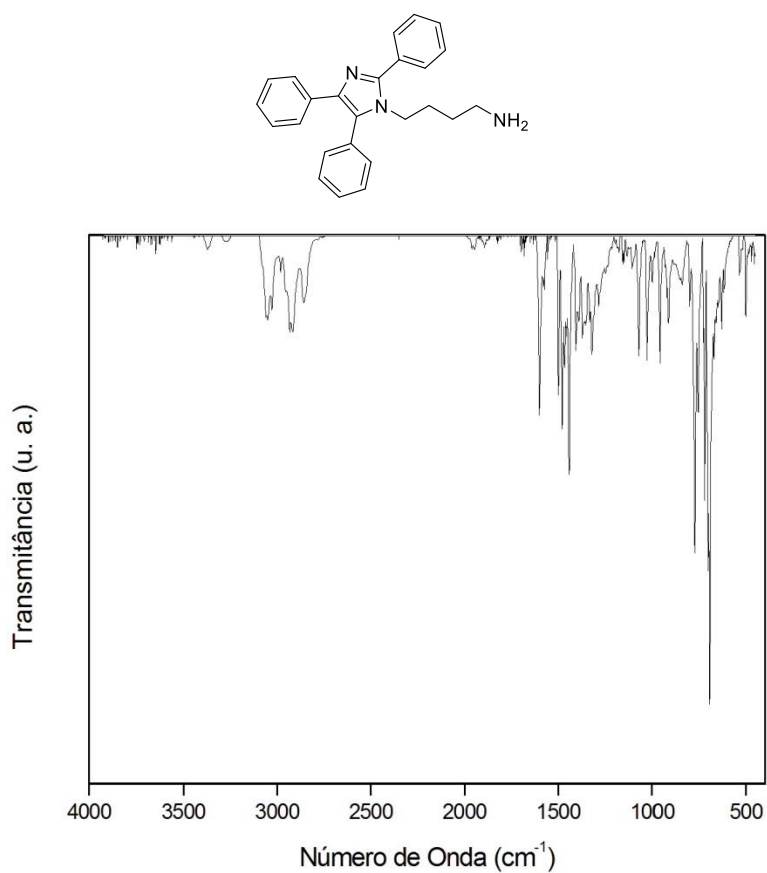


Figura D6. Espectro de IV (pastilha de KBr) da amina **9a**.

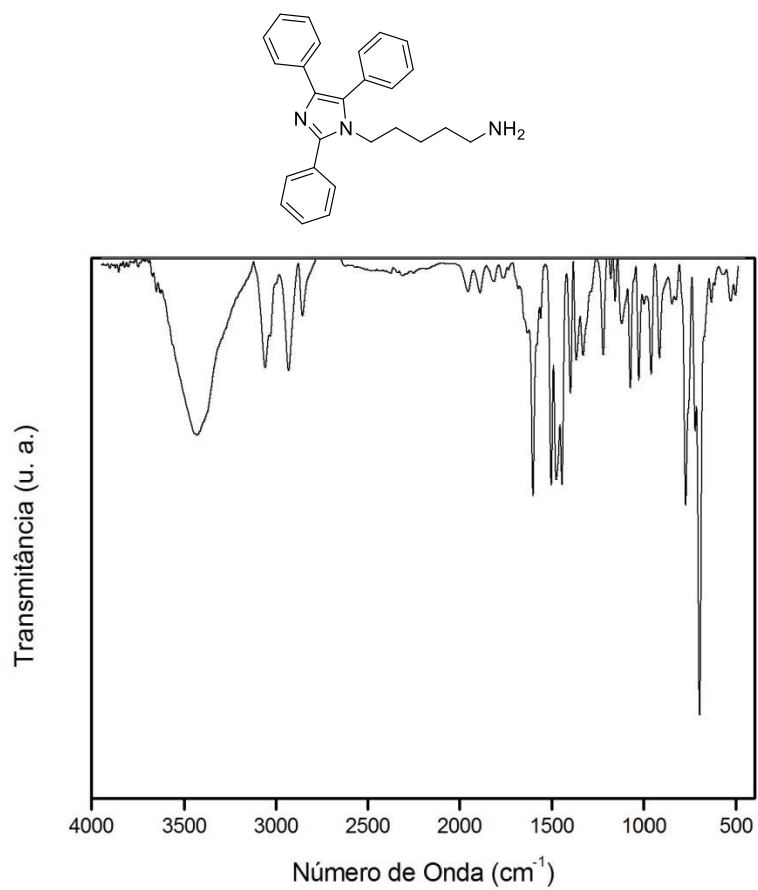


Figura D7. Espectro de IV (pastilha de KBr) da amina **9b**.

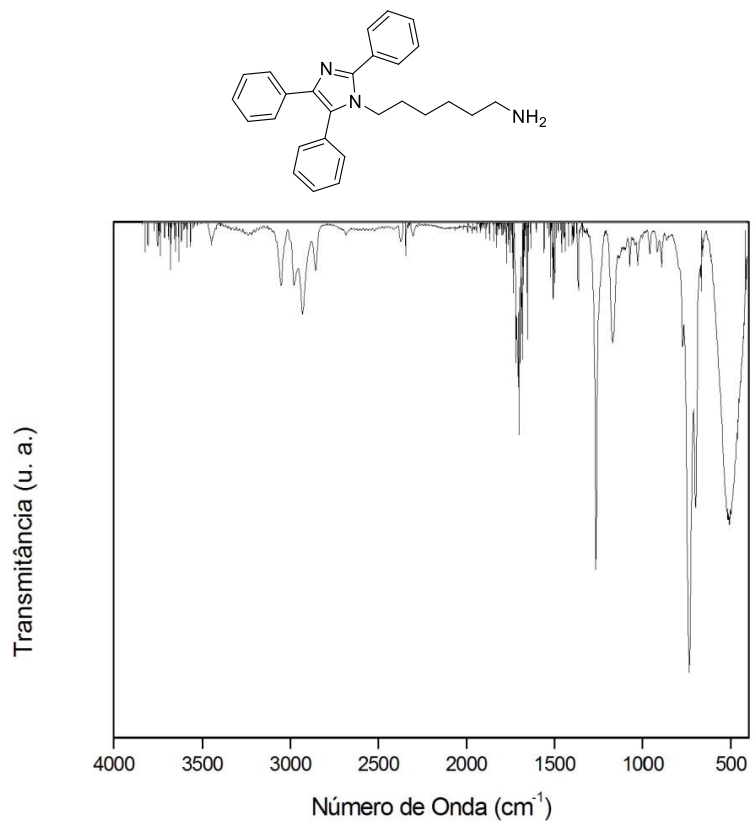


Figura D8. Espectro de IV (pastilha de KBr) da amina **9c**.

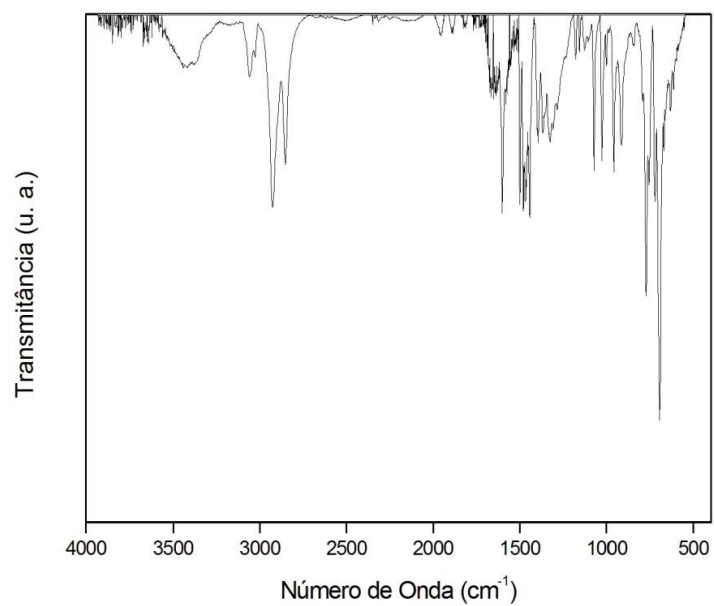
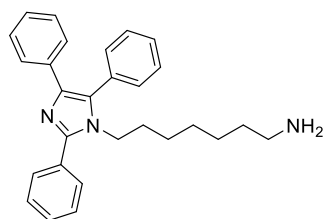


Figura D9. Espectro de IV (pastilha de KBr) da amina **9d**.

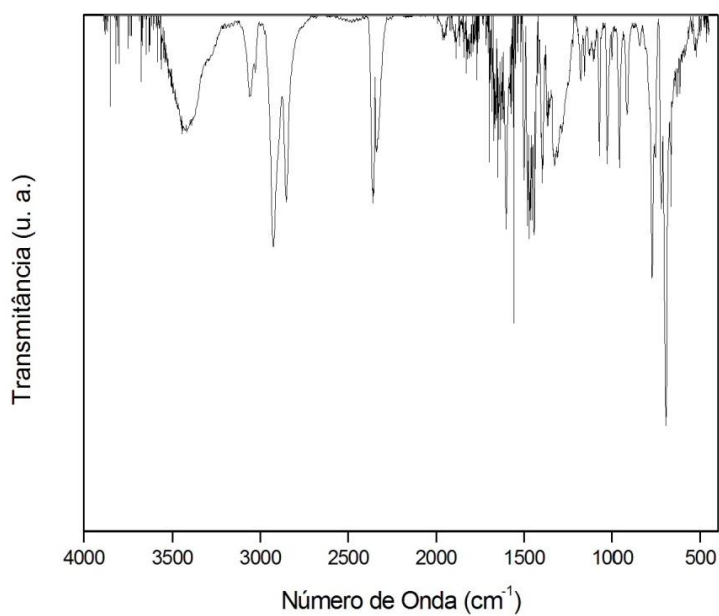
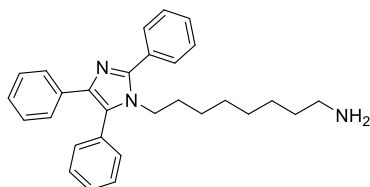


Figura D10. Espectro de IV (pastilha de KBr) da amina **9e**.

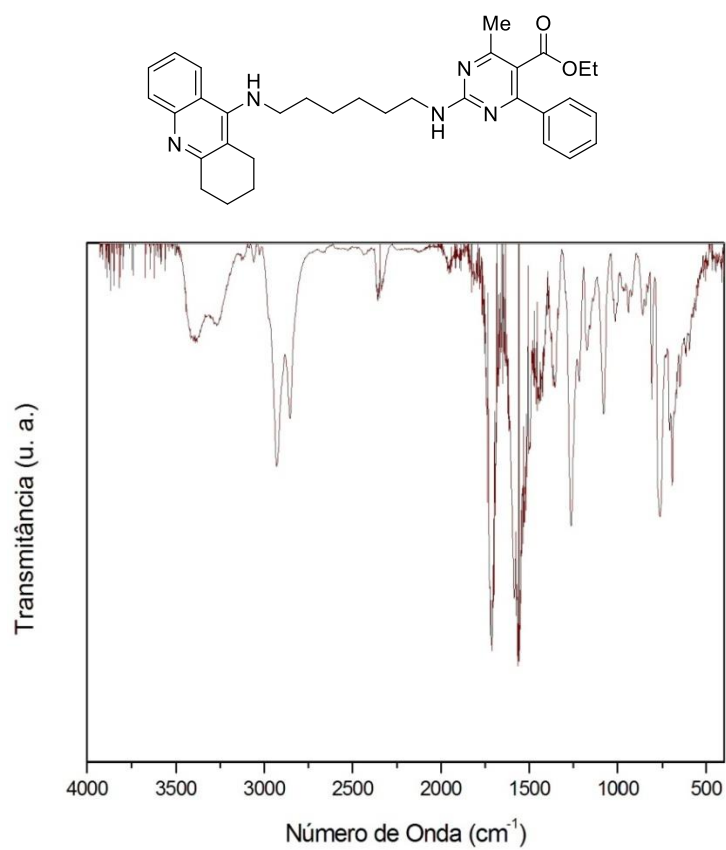


Figura D11. Espectro de IV (pastilha de KBr) do híbrido tacrina(6)-pirimidina (**43a**).

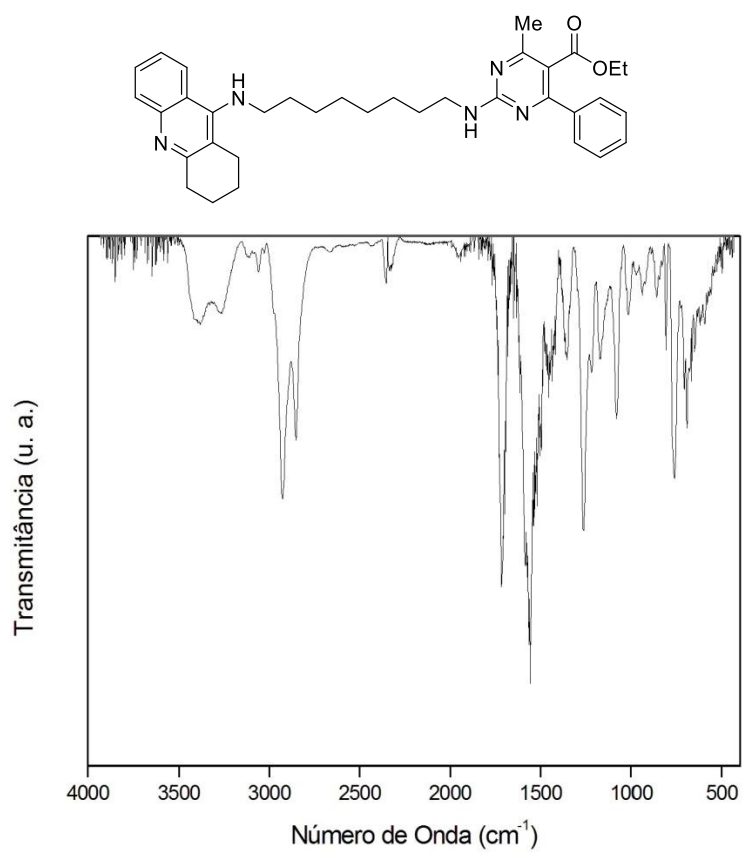


Figura D12. Espectro de IV (pastilha de KBr) do híbrido tacrina(8)-pirimidina (**43c**).

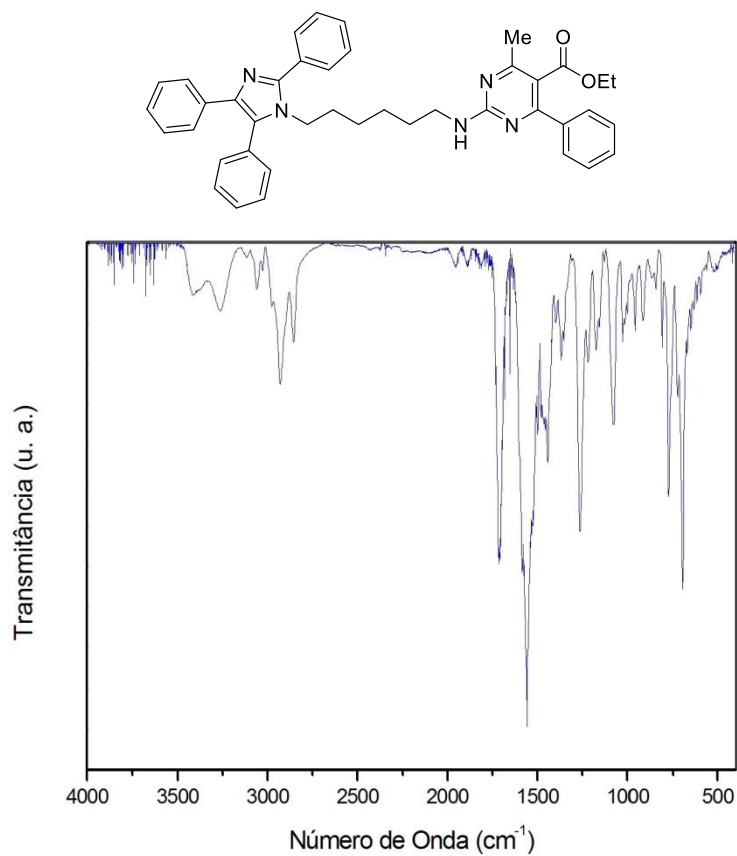


Figura D13. Espectro de IV (pastilha de KBr) do híbrido lofina(6)-pirimidina (**44a**).

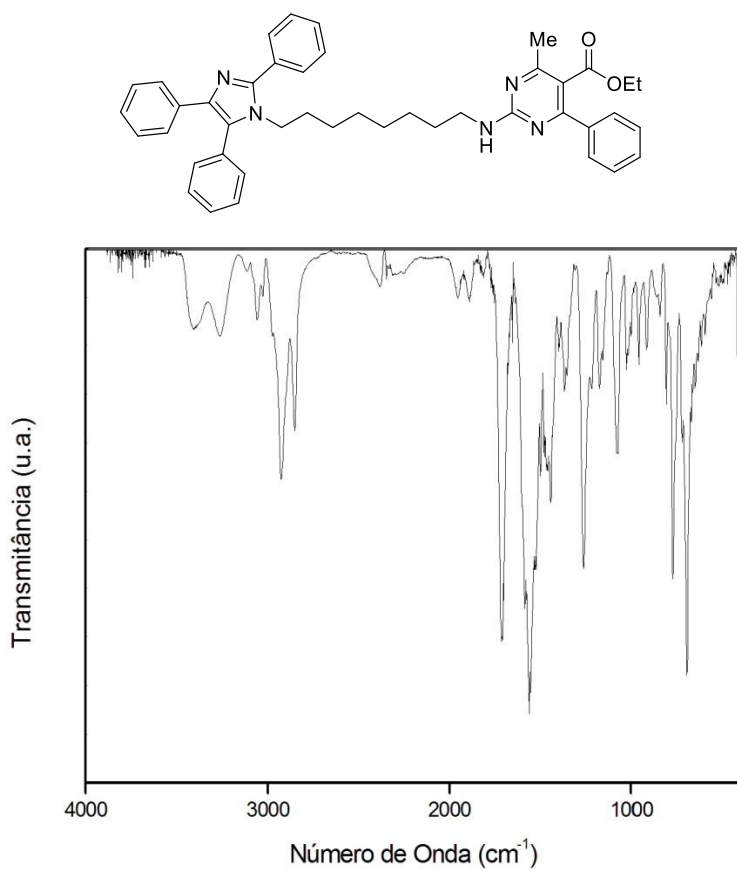


Figura D14. Espectro de IV (pastilha de KBr) do híbrido lofina(8)-pirimidina (**44c**).

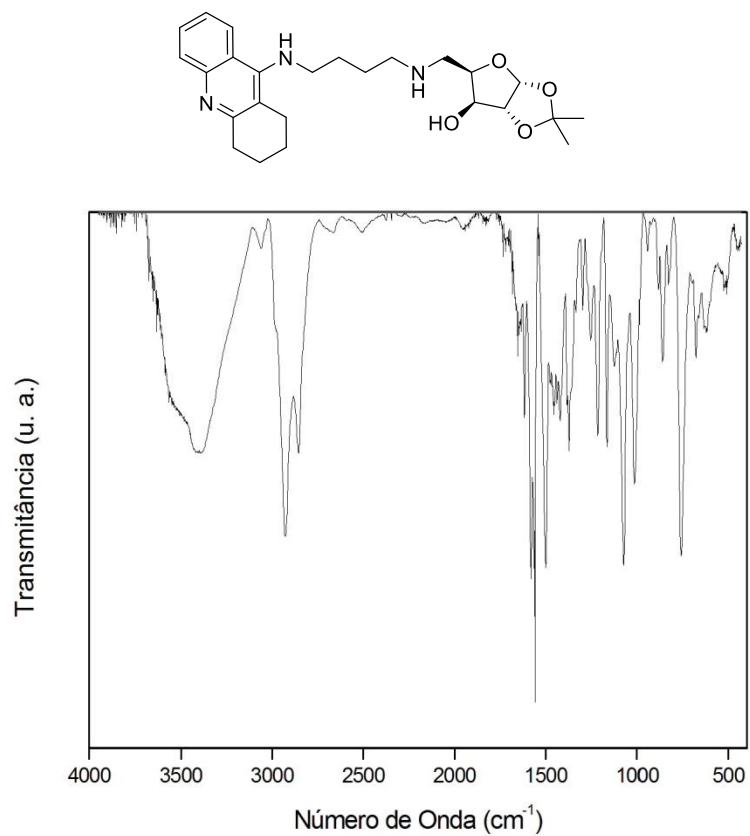


Figura D15. Espectro de IV (pastilha de KBr) do híbrido tacrina(4)-xilose (**54a**).

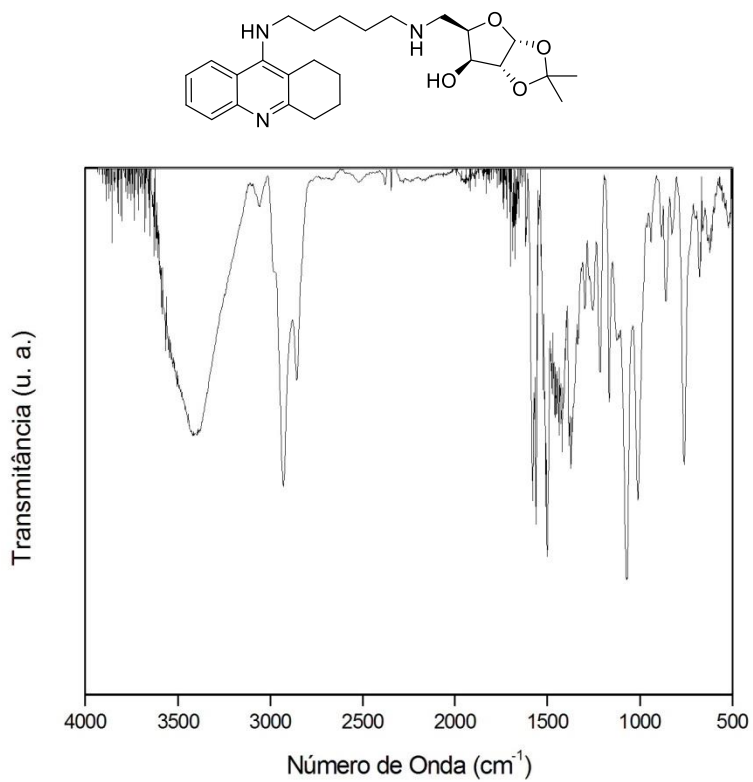


Figura D16. Espectro de IV (pastilha de KBr) do híbrido tacrina(5)-xilose (**54b**).

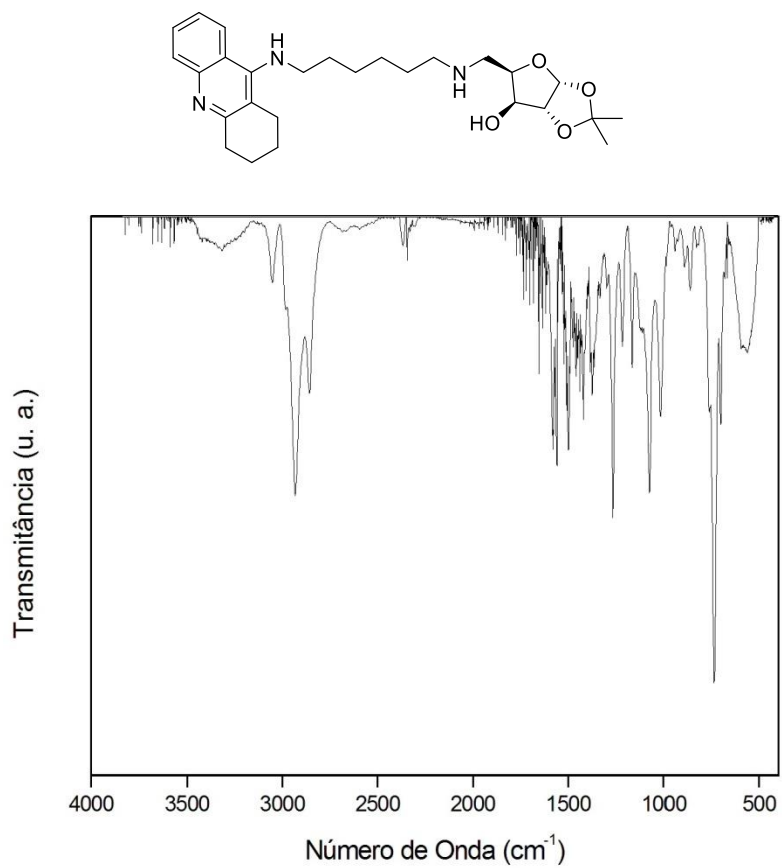


Figura D17. Espectro de IV (pastilha de KBr) do híbrido tacrina(6)-xilose (**54c**).

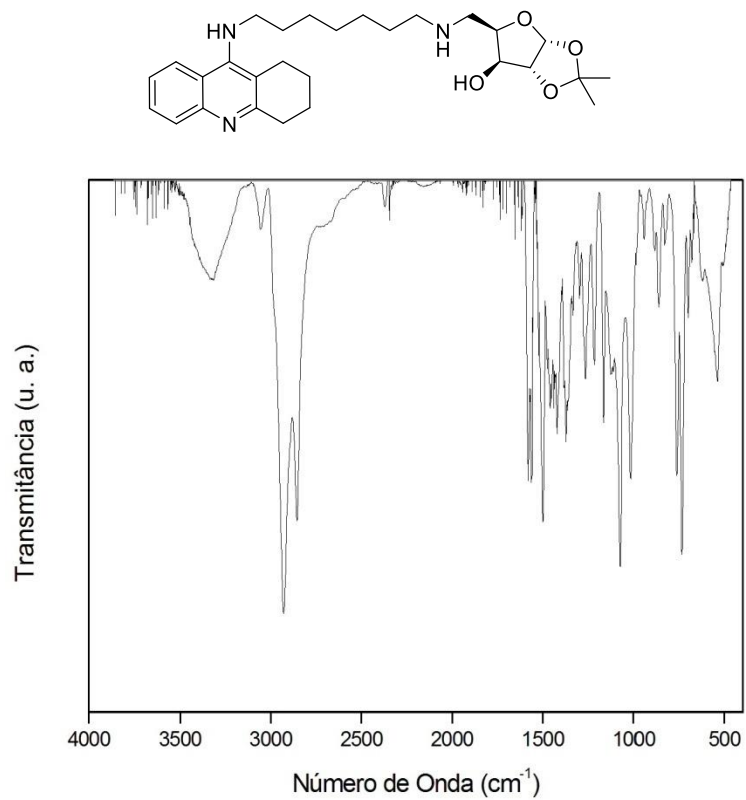


Figura D18. Espectro de IV (pastilha de KBr) do híbrido tacrina(7)-xilose (**54d**).

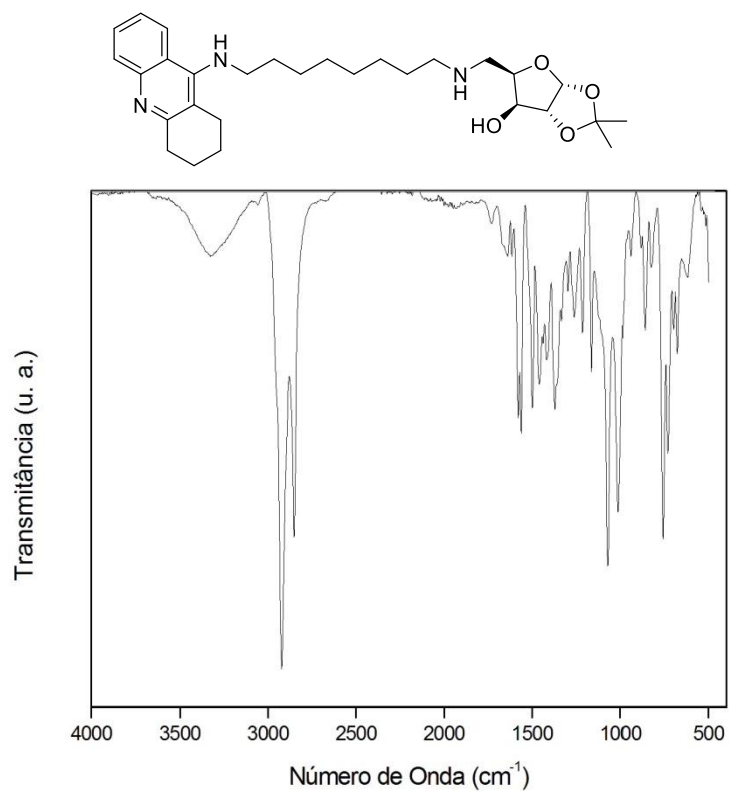


Figura D19. Espectro de IV (pastilha de KBr) do híbrido tacrina(8)-xilose (**54e**).

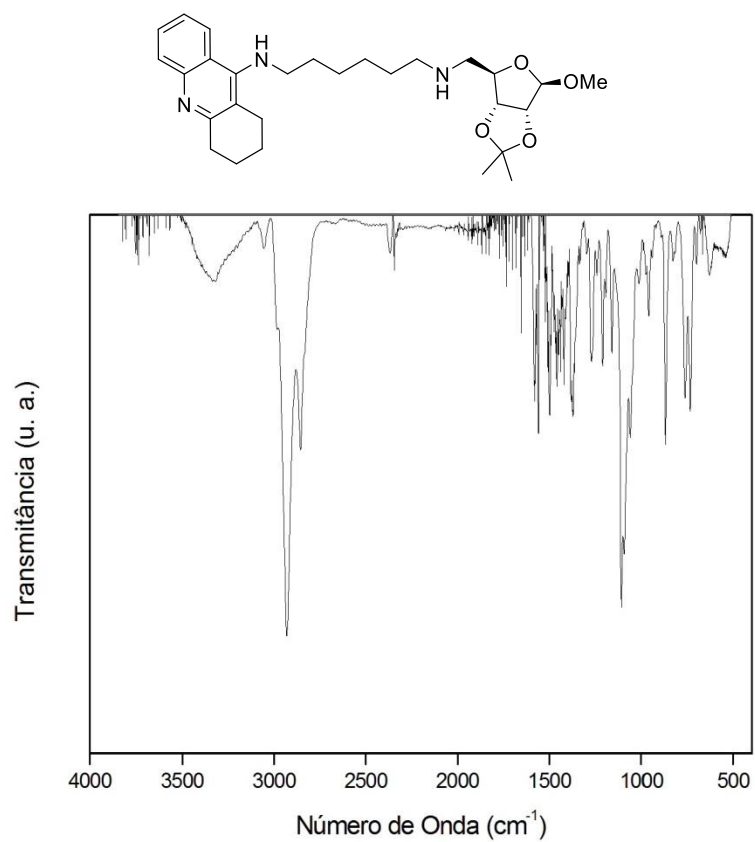


Figura D20. Espectro de IV (pastilha de KBr) do híbrido tacrina(6)-ribose (**55a**).

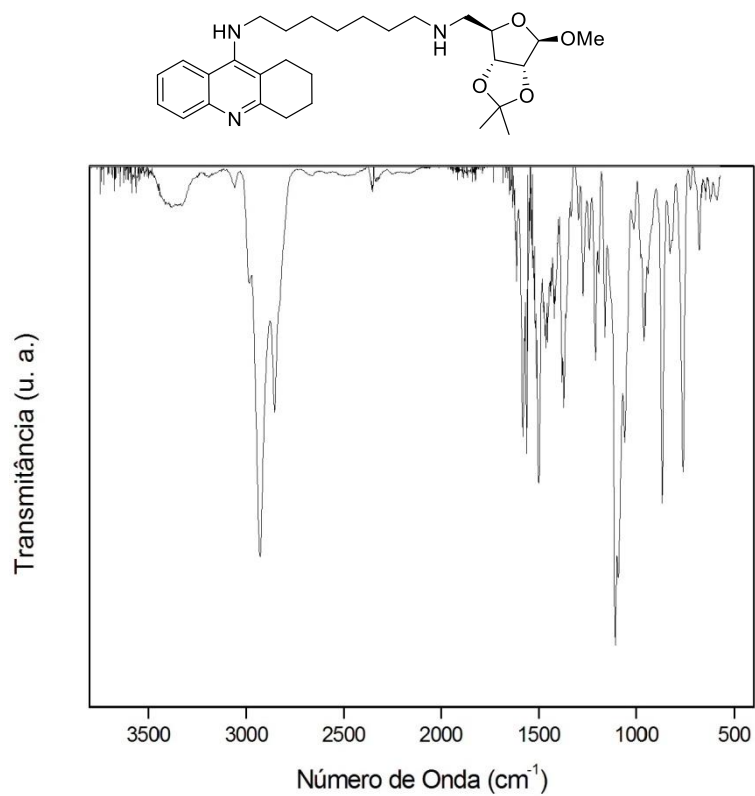


Figura D21. Espectro de IV (pastilha de KBr) do híbrido tacrina(7)-ribose (**55b**).

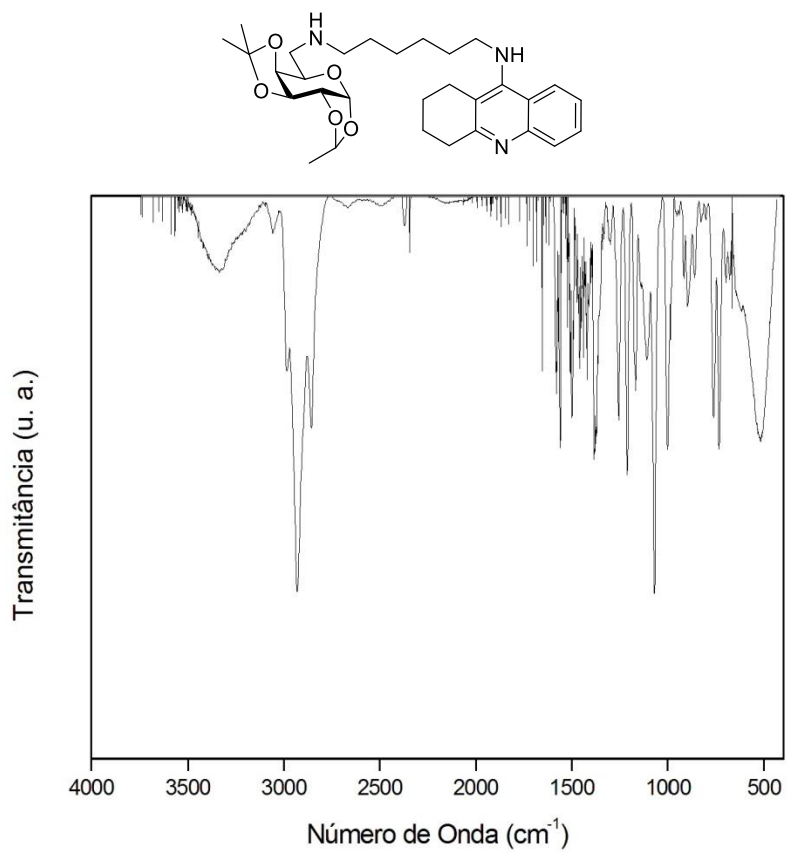


Figura D22. Espectro de IV (pastilha de KBr) do híbrido tacrina(6)-galactose (**56a**).

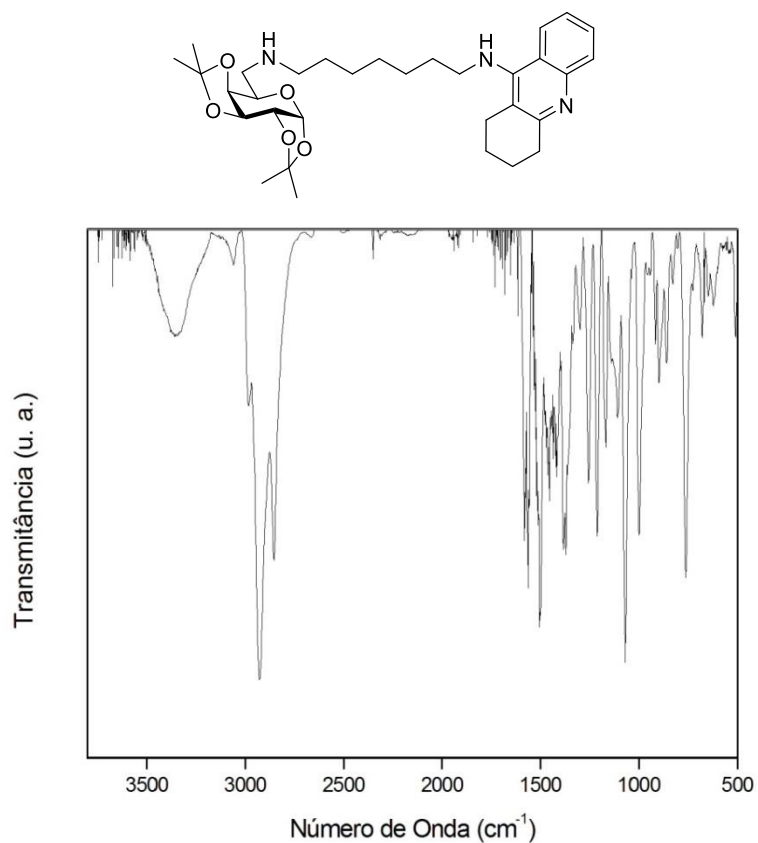


Figura D23. Espectro de IV (pastilha de KBr) do híbrido tacrina(7)-galactose (**56b**).

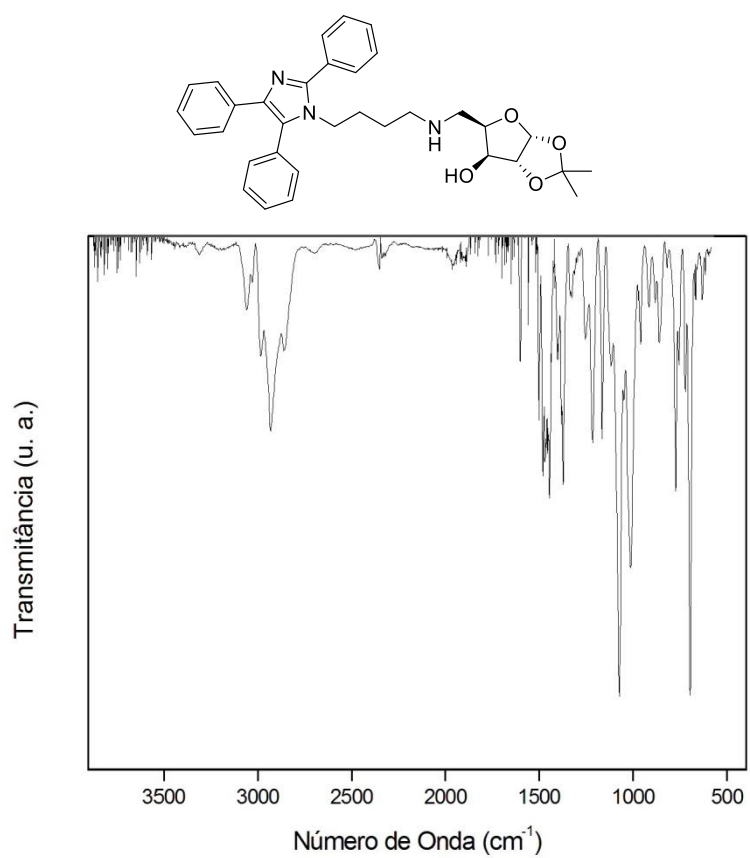


Figura D24. Espectro de IV (pastilha de KBr) do híbrido lofina(4)-xilose (**57a**).

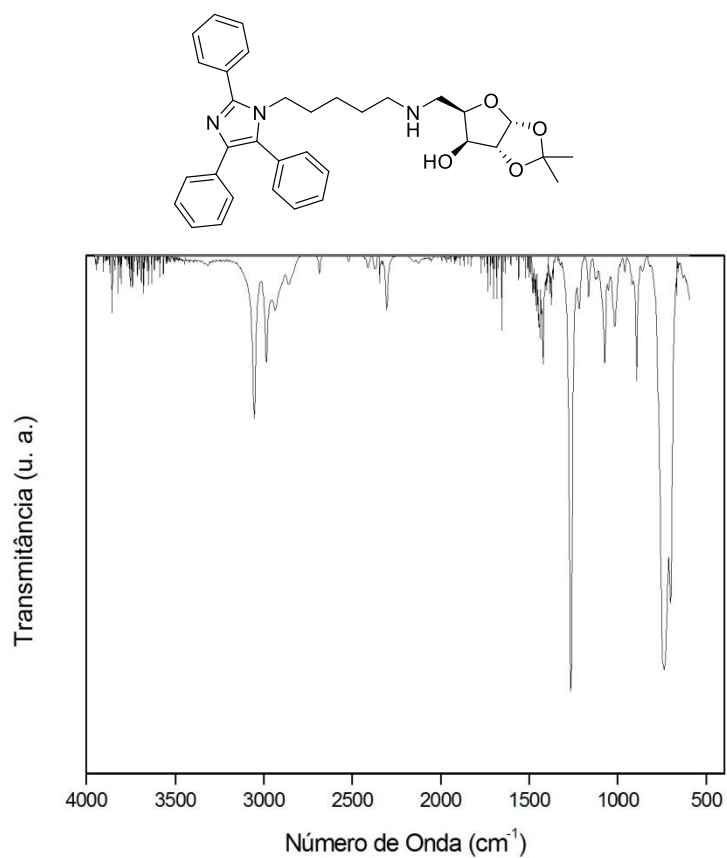


Figura D25. Espectro de IV (pastilha de KBr) do híbrido lofina(5)-xilose (**57b**).

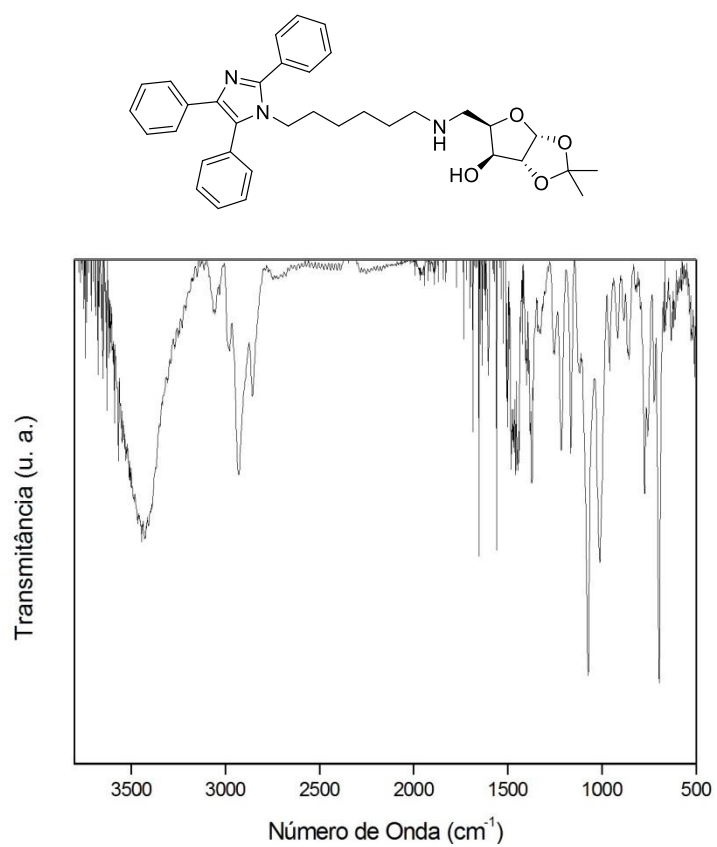


Figura D26. Espectro de IV (pastilha de KBr) do híbrido lofina(6)-xilose (**57c**).

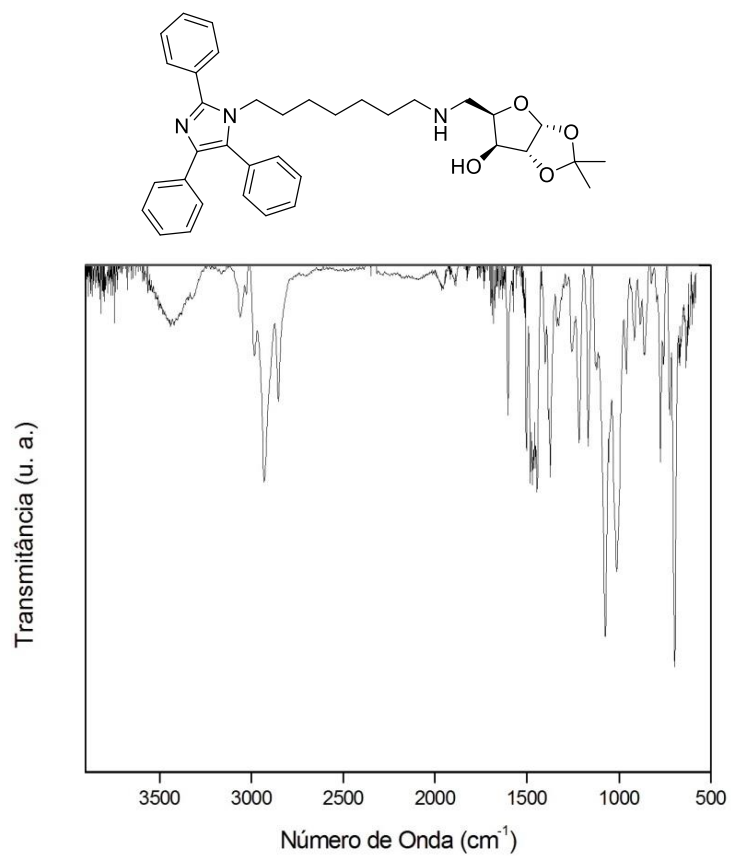


Figura D27. Espectro de IV (pastilha de KBr) do híbrido lofina(7)-xilose (**57d**).

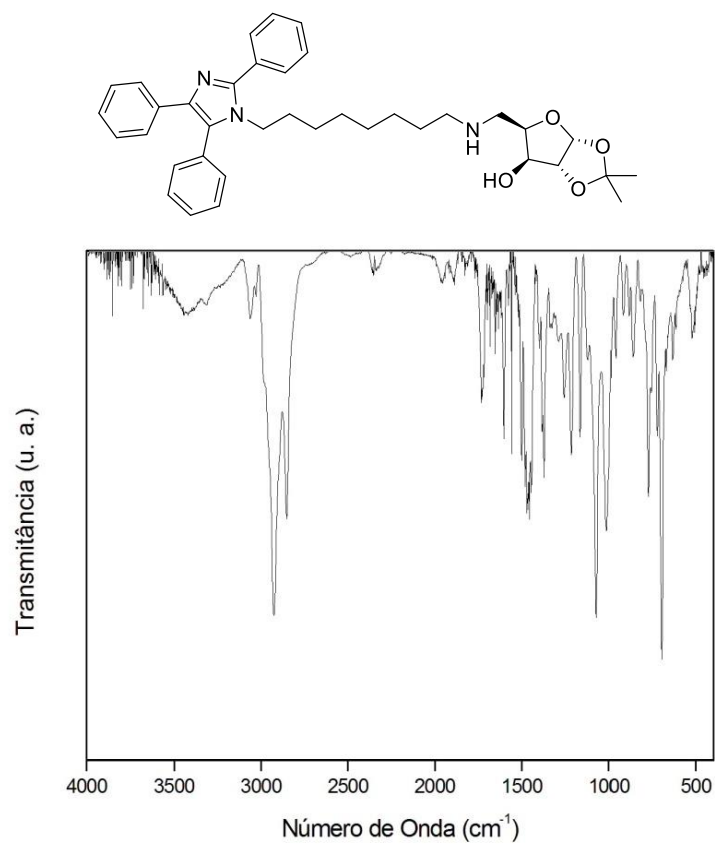


Figura D28. Espectro de IV (pastilha de KBr) do híbrido lofina(8)-xilose (**57e**).

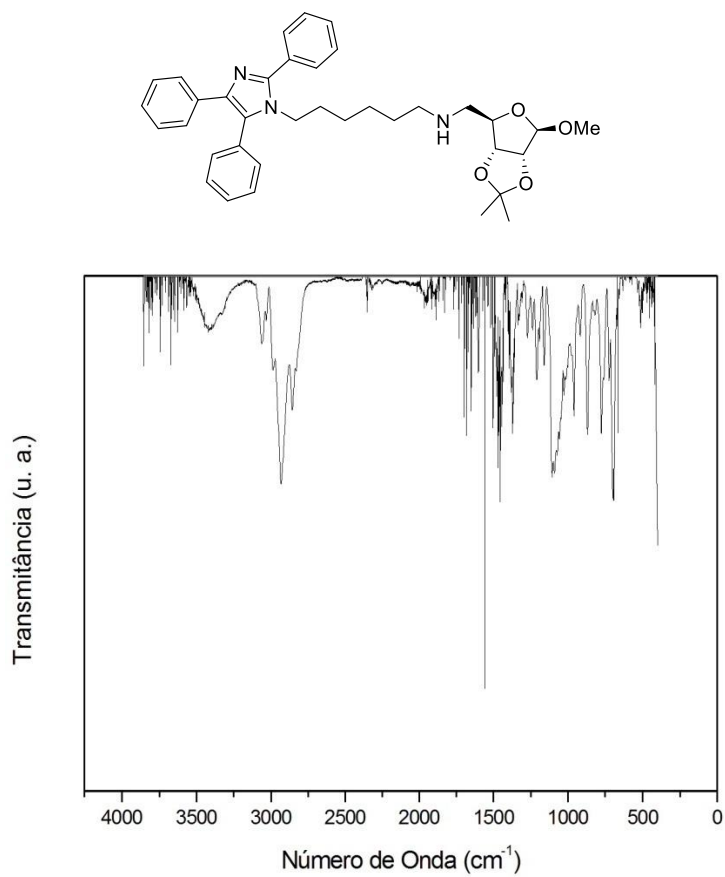


Figura D29. Espectro de IV (pastilha de KBr) do híbrido lofina(6)-ribose (**58a**).

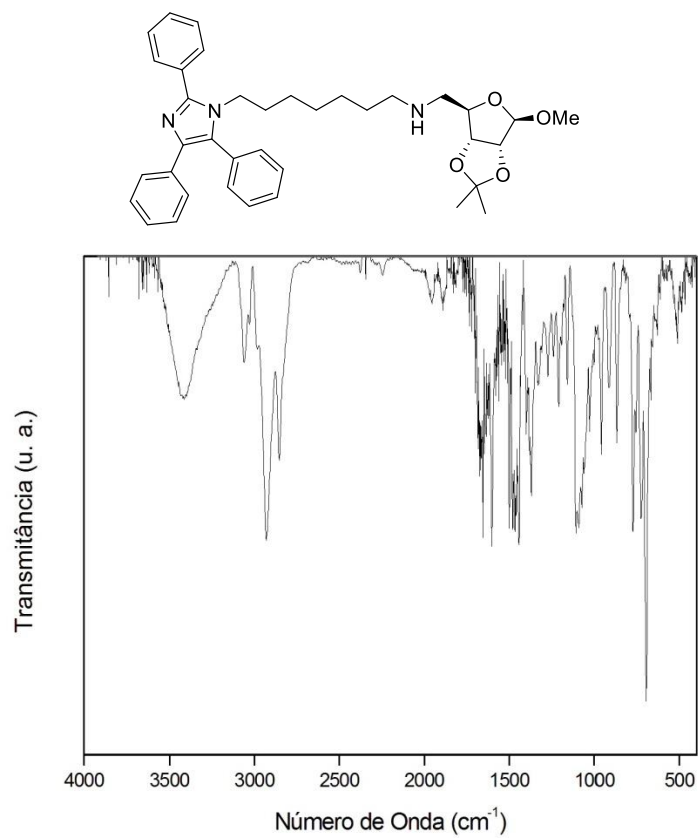


Figura D30. Espectro de IV (pastilha de KBr) do híbrido lofina(7)-ribose (**58b**).

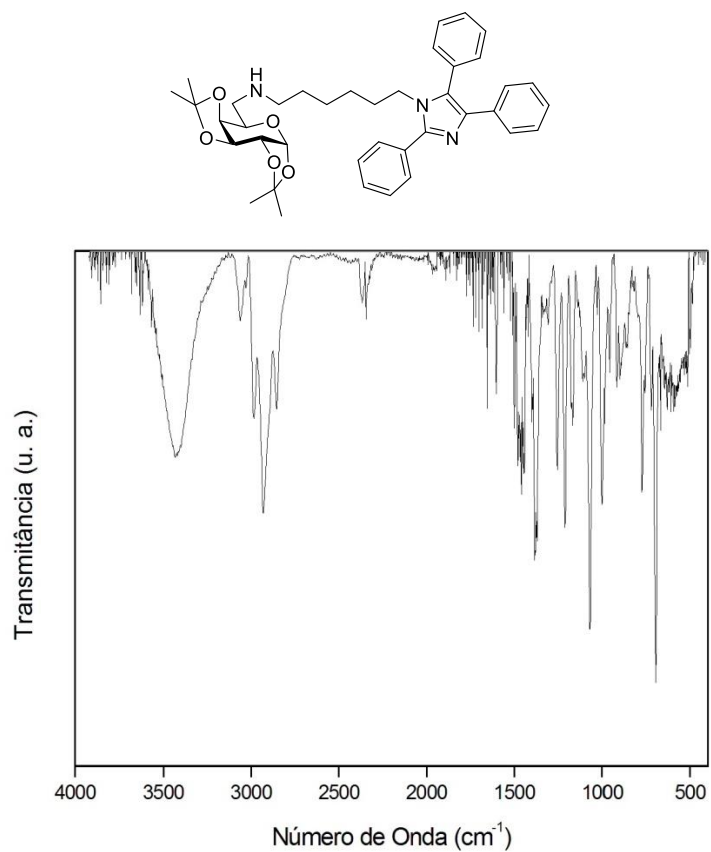


Figura D31. Espectro de IV (pastilha de KBr) do híbrido lofina(6)-galactose (**59a**).

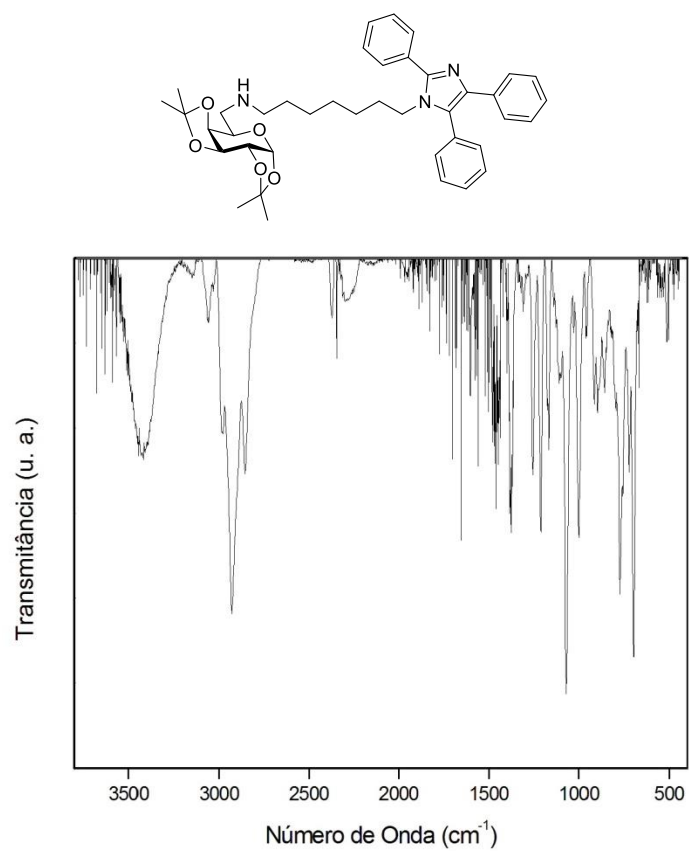


Figura D32. Espectro de IV (pastilha de KBr) do híbrido lofina(7)-galactose (**59b**).

Referências

REFERÊNCIAS

1. Jameel, E.; Meena, P.; Maqbool, M.; Kumar, J.; Ahmed, W.; Mumtazuddin, S.; Tiwari, M.; Hoda, N.; Jayaram, B., Rational design, synthesis and biological screening of triazine-triazolopyrimidine hybrids as multitarget anti-Alzheimer agents. *Eur. J. Med. Chem.* **2017**, *136*, 36-51.
2. Tumiatti, V.; Minarini, A.; Bolognesi, M. L.; Milelli, A.; Rosini, M.; Melchiorre, C., Tacrine derivatives and Alzheimer's disease. *Curr. Med. Chem.* **2010**, *17*, 1825-1838.
3. Bachurin, S. O.; Bovina, E. V.; Ustyugov, A. A., Drugs in clinical trials for Alzheimer's disease: the major trends. *Med. Res. Rev.* **2017**, *37*, 1186-1225.
4. Shah, A. A.; Dar, T. A.; Dar, P. A.; Ganie, S. A.; Kamal, M. A., A current perspective on the inhibition of cholinesterase by natural and synthetic inhibitors. *Curr. Drug Metab.* **2017**, *18*, 96-111.
5. De Falco, A.; Cukierman, D. S.; Hauser-Davis, R. A.; Rey, N. A., Doença de Alzheimer: hipóteses etiológicas e perspectivas de tratamento. *Quim. Nova* **2016**, *39*, 63-80.
6. Parsons, C. G.; Stoffler, A.; Danysz, W., Memantine: a NMDA receptor antagonist that improves memory by restoration of homeostasis in the glutamatergic system - too little activation is bad, too much is even worse. *Neuropharmacology* **2007**, *53*, 699-723.
7. Alam, S.; Lingenfelter, K. S.; Bender, A. M.; Lindsley, C. W., Classics in chemical neuroscience: memantine. *ACS Chem. Neurosci.* **2017**, *8*, 1823-1829.
8. Matias, M.; Silvestre, S.; Falcao, A.; Alves, G., Recent highlights on molecular hybrids potentially useful in central nervous system disorders. *Mini-Rev. Med. Chem.* **2017**, *17*, 486-517.
9. Sameem, B.; Saeedi, M.; Mahdavi, M.; Shafiee, A., A review on tacrine-based scaffolds as multi-target drugs (MTDLs) for Alzheimer's disease. *Eur. J. Med. Chem.* **2017**, *128*, 332-345.
10. Sussman, J. L.; Harel, M.; Frolow, F.; Oefner, C.; Goldman, A.; Toker, L.; Silman, I., Atomic-structure of acetylcholinesterase from *Torpedo californica* - A prototypic acetylcholine-binding protein. *Science* **1991**, *253*, 872-879.

11. Pang, Y. P.; Quiram, P.; Jelacic, T.; Hong, F.; Brimijoin, S., Highly potent, selective, and low cost bis-tetrahydroaminacrine inhibitors of acetylcholinesterase - Steps toward novel drugs for treating Alzheimer's disease. *J. Biol. Chem.* **1996**, *271*, 23646-23649.
12. Yu, H.; Li, W. M.; Kan, K. K. W.; Ho, J. M. K.; Carlier, P. R.; Pang, Y. P.; Gu, Z. M.; Zhong, Z.; Chan, K.; Wang, Y. T.; Han, Y. F., The physicochemical properties and the *in vivo* AChE inhibition of two potential anti-Alzheimer agents, bis(12)-hupyridone and bis(7)-tacrine. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2008**, *46*, 75-81.
13. Carlier, P. R.; Chow, E. S. H.; Han, Y. F.; Liu, J.; El Yazal, J.; Pang, Y. P., Heterodimeric tacrine-based acetylcholinesterase inhibitors: Investigating ligand-peripheral site interactions. *J. Med. Chem.* **1999**, *42*, 4225-4231.
14. Da Costa, J. S., Síntese de compostos híbridos tacrina-Lofina, tacrina-Tianeptina e dímeros bis(n)-Lofinas com potencial aplicação no tratamento da doença de Alzheimer. Tese de doutorado, Instituto de Química, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2014.
15. Spilovska, K.; Korabecny, J.; Nepovimova, E.; Dolezal, R.; Mezeiova, E.; Soukup, O.; Kuca, K., Multitarget tacrine hybrids with neuroprotective properties to confront Alzheimer's disease. *Curr. Top. Med. Chem.* **2017**, *17*, 1006-1026.
16. Ceschi, M. A.; da Costa, J. S.; Lopes, J. P. B.; Camara, V. S.; Campo, L. F.; Borges, A. C. D.; Goncalves, C. A. S.; de Souza, D. F.; Konrath, E. L.; Karl, A. L. M.; Guedes, I. A.; Dardenne, L. E., Novel series of tacrine-tianeptine hybrids: Synthesis, cholinesterase inhibitory activity, S100B secretion and a molecular modeling approach. *Eur. J. Med. Chem.* **2016**, *121*, 758-772.
17. Da Costa, J. S.; Lopes, J. P. B.; Russowsky, D.; Petzhold, C. L.; Borges, A. C. D.; Ceschi, M. A.; Konrath, E.; Batassini, C.; Lunardi, P. S.; Goncalves, C. A. S., Synthesis of tacrine-lophine hybrids via one-pot four component reaction and biological evaluation as acetyl- and butyrylcholinesterase inhibitors. *Eur. J. Med. Chem.* **2013**, *62*, 556-563.
18. Lopes, J. P. B.; da Costa, J. S.; Ceschi, M. A.; Goncalves, C. A. S.; Konrath, E. L.; Karl, A. L. M.; Guedes, I. A.; Dardenne, L. E., Chiral bistacrine analogues: synthesis, cholinesterase inhibitory activity and a molecular modeling approach. *J. Braz. Chem. Soc.* **2017**, *28*, 2218-2228.
19. Moustafa, A. A.; Hassan, M.; Hewedi, D. H.; Hewedi, I.; Garami, J. K.; Al Ashwal, H.; Zaki, N.; Seo, S. Y.; Cutsuridis, V.; Angulo, S. L.; Natesh, J. Y.; Herzallah, M. M.; Frydecka,

- D.; Misiak, B.; Salama, M.; Mohamed, W.; El Haj, M.; Hornberger, M., Genetic underpinnings in Alzheimer's disease - a review. *Rev. Neurosci.* **2018**, *29*, 21-38.
20. Schindler, S. E.; Fagan, A. M., Autosomal dominant Alzheimer disease: a unique resource to study CSF biomarker changes in preclinical AD. *Front. Neurol.* **2015**, *6*, 1-7.
21. Muller, U.; Winter, P.; Graeber, M. B., A presenilin 1 mutation in the first case of Alzheimer's disease. *Lancet Neurol.* **2013**, *12*, 129-130.
22. Rupp, C.; Beyreuther, K.; Maurer, K.; Kins, S., A presenilin 1 mutation in the first case of Alzheimer's disease: Revisited. *Alzheimers Dement.* **2014**, *10*, 869-872.
23. Lane-Donovan, C.; Herz, J., ApoE, ApoE Receptors, and the synapse in Alzheimer's disease. *Trend. Endocrinol. Metab.* **2017**, *28*, 273-284.
24. Liao, F.; Yoon, H.; Kim, J., Apolipoprotein E metabolism and functions in brain and its role in Alzheimer's disease. *Curr. Opin. Lipidol.* **2017**, *28*, 60-67.
25. Ojopi, E. P. B.; Beroncini, A. B.; Neto, E. D., Apolipoproteína E e a doença de Alzheimer. *Rev. Psiq. Clín.* **2004**, *31*, 26-33.
26. Liu, C. C.; Kanekiyo, T.; Xu, H. X.; Bu, G. J., Apolipoprotein E and Alzheimer disease: risk, mechanisms and therapy. *Nature Rev. Neurology.* **2013**, *9*, 106-118.
27. Lane, C. A.; Hardy, J.; Schott, J. M., Alzheimer's disease. *Eur. J. Neurol.* **2018**, *25*, 59-70.
28. Doraiswamy, P. M.; Sperling, R. A.; Coleman, R. E.; Johnson, K. A.; Reiman, E. M.; Davis, M. D.; Grundman, M.; Sabbagh, M. N.; Sadowsky, C. H.; Fleisher, A. S.; Carpenter, A.; Clark, C. M.; Joshi, A. D.; Mintun, M. A.; Skovronsky, D. M.; Pontecorvo, M. J.; Grp, A. A. S., Amyloid-beta assessed by florbetapir F 18 PET and 18-month cognitive decline A multicenter study. *Neurology* **2012**, *79*, 1636-1644.
29. Palmqvist, S.; Zetterberg, H.; Mattsson, N.; Johansson, P.; Minthon, L.; Blennow, K.; Olsson, M.; Hansson, O.; Alzheimer's Dis, N.; Swedish Bio, F. S. G., Detailed comparison of amyloid PET and CSF biomarkers for identifying early Alzheimer disease. *Neurology* **2015**, *85*, 1240-1249.
30. Wang, J.; Gu, B. J.; Masters, C. L.; Wang, Y. J., A systemic view of Alzheimer disease - insights from amyloid-beta metabolism beyond the brain. *Nature Rev. Neurology.* **2017**, *13*, 612-623.

31. Roher, A. E.; Esh, C. L.; Kokjohn, T. A.; Castano, E. M.; Van Vickle, G. D.; Kalback, W. M.; Patton, R. L.; Luehrs, D. C.; Dausgs, I. D.; Kuo, Y. M.; Emmerling, M. R.; Soares, H.; Quinn, J. F.; Kaye, J.; Connor, D. J.; Silverberg, N. B.; Adler, C. H.; Seward, J. D.; Beach, T. G.; Sabbagh, M. N., Amyloid beta peptides in human plasma and tissues and their significance for Alzheimer's disease. *Alzheimers Dement.* **2009**, *5*, 18-29.
32. Patterson, C.; Feightner, J. W.; Garcia, A.; Hsiung, G. Y. R.; MacKnight, C.; Sadovnick, A. D., Diagnosis and treatment of dementia: 1. Risk assessment and primary prevention of Alzheimer disease. *Can. Med. Assoc. J.* **2008**, *178*, 548-556.
33. Lv, Z. Y.; Tan, C. C.; Yu, J. T.; Tan, L., Spreading of pathology in Alzheimer's disease. *Neurotox. Res.* **2017**, *32*, 707-722.
34. Mukrasch, M. D.; Bibow, S.; Korukottu, J.; Jeganathan, S.; Biernat, J.; Griesinger, C.; Mandelkow, E.; Zweckstetter, M., Structural polymorphism of 441-residue tau at single residue resolution. *Plos Biology* **2009**, *7*, 399-414.
35. Penninkilampi, R.; Brothers, H. M.; Eslick, G. D., Safety and efficacy of anti-amyloid-beta immunotherapy in Alzheimer's disease: A systematic review and meta-analysis. *J. Neuroim. Pharmacol.* **2017**, *12*, 194-203.
36. Sacks, C. A.; Avorn, J.; Kesselheim, A. S., The failure of solanezumab - how the FDA saved taxpayers billions. *New Eng. J. Med.* **2017**, *376*, 1706-1708.
37. Abushouk, A. I.; Elmaraezy, A.; Aglan, A.; Salama, R.; Fouda, S.; Fouda, R.; AlSafadi, A. M., Bapineuzumab for mild to moderate Alzheimer's disease: a meta-analysis of randomized controlled trials. *BMC Neurology* **2017**, *17*, 1-13.
38. Doig, A. J.; del Castillo-Frias, M. P.; Berthoumieu, O.; Tarus, B.; Nasica-Labouze, J.; Sterpone, F.; Nguyen, P. H.; Hooper, N. M.; Faller, P.; Derreumaux, P., Why is research on Amyloid-beta failing to give new drugs for Alzheimer's disease? *ACS Chem. Neurosci.* **2017**, *8*, 1435-1437.
39. McGeer, P. L.; McGeer, E. G., The amyloid cascade-inflammatory hypothesis of Alzheimer disease: implications for therapy. *Acta Neuropathologica* **2013**, *126*, 479-497.
40. Panek, D.; Wichur, T.; Godyn, J.; Pasiaka, A.; Malawska, B., Advances toward multifunctional cholinesterase and beta-amyloid aggregation inhibitors. *Fut. Med. Chem.* **2017**, *9*, 1835-1854.

41. Ayton, S.; Lei, P.; Bush, A. I., Metallostasis in Alzheimer's disease. *Free Rad. Biol. Med.* **2013**, *62*, 76-89.
42. Bush, A. I.; Tanzi, R. E., Therapeutics for Alzheimer's disease based on the metal hypothesis. *Neurotherapeutics* **2008**, *5*, 421-432.
43. Chin-Chan, M.; Navarro-Yepes, J.; Quintanilla-Vega, B., Environmental pollutants as risk factors for neurodegenerative disorders: Alzheimer and Parkinson diseases. *Front. Cell. Neurosci.* **2015**, *9*, 1-22.
44. Bjorklund, G.; Dadar, M.; Mutter, J.; Aaseth, J., The toxicology of mercury: current research and emerging trends. *Environ. Res.* **2017**, *159*, 545-554.
45. Pendergrass, A. C.; Haley, B. E.; Vimy, M. J.; Winfield, S. A.; Lorscheider, F. L., Mercury vapor inhalation inhibits binding of GTP to tubulin in rat brain: similarity to a molecular lesion in Alzheimer diseased brain. *Neurotoxicology* **1997**, *18*, 315-324.
46. Sun, Y. H.; Nfor, O. N.; Huang, J. Y.; Liaw, Y. P., Association between dental amalgam fillings and Alzheimer's disease: a population-based cross-sectional study in Taiwan. *Alzheimers Res. Ther.* **2015**, *7*, 1-6.
47. Kandimalla, R.; Vallamkondu, J.; Corgiat, E. B.; Gill, K. D., Understanding aspects of aluminum exposure in Alzheimer's disease development. *Brain Pathol.* **2016**, *26*, 139-154.
48. Bartus, R. T.; Dean, R. L.; Beer, B.; Lippa, A. S., The cholinergic hypothesis of geriatric memory dysfunction. *Science* **1982**, *217*, 408-417.
49. Bartus, R. T., On neurodegenerative diseases, models, and treatment strategies: lessons learned and lessons forgotten a generation following the cholinergic hypothesis. *Exp. Neurol.* **2000**, *163*, 495-529.
50. Nelson, D. L.; Cox, M. M., *Princípios de Bioquímica de Lehninger*. 6ª edição, Artmed: Porto Alegre, 2014.
51. Bear, M. F.; Connors, B. W.; Paradiso, M. A., *Neurociências: Desvendando o Sistema Nervoso*. 3ª edição, Artmed: Porto Alegre, 2010.
52. Sharma, R.; Gupta, B.; Singh, N.; Acharya, J. R.; Musilek, K.; Kuca, K.; Ghosh, K. K., Development and structural modifications of cholinesterase reactivators against chemical warfare agents in last decade: a review. *Mini-Rev. Med. Chem.* **2015**, *15*, 58-72.

53. Colovic, M. B.; Krstic, D. Z.; Lazarevic-Pasti, T. D.; Bondzic, A. M.; Vasic, V. M., Acetylcholinesterase inhibitors: pharmacology and toxicology. *Curr. Neuropharmacol.* **2013**, *11*, 315-335.
54. Kryger, G.; Harel, M.; Giles, K.; Toker, L.; Velan, B.; Lazar, A.; Kronman, C.; Barak, D.; Ariel, N.; Shafferman, A.; Silman, I.; Sussman, J. L., Structures of recombinant native and E202Q mutant human acetylcholinesterase complexed with the snake-venom toxin fasciculin-II. *Acta Crystallogr. D.* **2000**, *56*, 1385-1394.
55. Lushington, G. H.; Guo, J. X.; Hurley, M. M., Acetylcholinesterase: molecular modeling with the whole toolkit. *Curr. Top. Med. Chem.* **2006**, *6*, 57-73.
56. Wiesner, J.; Kriz, Z.; Kuca, K.; Jun, D.; Koca, J., Acetylcholinesterases - the structural similarities and differences. *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.* **2007**, *22*, 417-424.
57. Xu, Y. C.; Cheng, S. M.; Sussman, J. L.; Silman, I.; Jiang, H. L., Computational studies on acetylcholinesterases. *Molecules* **2017**, *22*, 1-20.
58. Haviv, H.; Wong, D. M.; Greenblatt, H. M.; Carlier, P. R.; Pang, Y. P.; Silman, I.; Sussman, J. L., Crystal packing mediates enantioselective ligand recognition at the peripheral site of acetylcholinesterase. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 11029-11036.
59. Gorfe, A. A.; Chang, C. E. A.; Ivanov, I.; McCammon, J. A., Dynamics of the acetylcholinesterase tetramer. *Biophys. J.* **2008**, *94*, 1144-1154.
60. Bourne, Y.; Taylor, P.; Bougis, P. E.; Marchot, P., Crystal structure of mouse acetylcholinesterase - A peripheral site-occluding loop in a tetrameric assembly. *J. Biol. Chem.* **1999**, *274*, 2963-2970.
61. Simon, S.; Krejci, E.; Massoulie, J., A four-to-one association between peptide motifs: four C-terminal domains from cholinesterase assemble with one proline-rich attachment domain (PRAD) in the secretory pathway. *Embo J.* **1998**, *17*, 6178-6187.
62. Zhang, D. Q.; McCammon, J. A., The association of tetrameric acetylcholinesterase with CoIQ tail: A block normal mode analysis. *PLOS Comput. Biol.* **2005**, *1*, 484-491.
63. Dvir, H.; Harel, M.; Bon, S.; Liu, W. Q.; Vidal, M.; Garbay, C.; Sussman, J. L.; Massoulie, J.; Silman, I., The synaptic acetylcholinesterase tetramer assembles around a polyproline II helix. *Embo J.* **2004**, *23*, 4394-4405.

64. Dvir, H.; Silman, I.; Harel, M.; Rosenberry, T. L.; Sussman, J. L., Acetylcholinesterase: from 3D structure to function. *Chem.-Biol. Interact.* **2010**, *187*, 10-22.
65. Chen, Y.; Lin, H. Z.; Zhu, J.; Gu, K.; Li, Q.; He, S. Y.; Lu, X.; Tan, R. X.; Pei, Y. Q.; Wu, L.; Bian, Y. Y.; Sun, H. P., Design, synthesis, *in vitro* and *in vivo* evaluation of tacrine-cinnamic acid hybrids as multi-target acetyl-and butyrylcholinesterase inhibitors against Alzheimer's disease. *RSC Adv.* **2017**, *7*, 33851-33867.
66. Quinn, D. M., Acetylcholinesterase - enzyme structure, reaction dynamics, and virtual transition-states. *Chem. Rev.* **1987**, *87*, 955-979.
67. Harel, M.; Quinn, D. M.; Nair, H. K.; Silman, I.; Sussman, J. L., The X-ray structure of a transition state analog complex reveals the molecular origins of the catalytic power and substrate specificity of acetylcholinesterase. *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 2340-2346.
68. Reilly, P. J.; Rovira, C., Computational studies of glycoside, carboxylic ester, and thioester hydrolase mechanisms: A Review. *Ind. Eng. Chem. Res.* **2015**, *54*, 10138-10161.
69. Mallender, W. D.; Szegletes, T.; Rosenberry, T. L., Acetylthiocholine binds to Asp74 at the peripheral site of human acetylcholinesterase as the first step in the catalytic pathway. *Biochemistry* **2000**, *39*, 7753-7763.
70. Nemukhin, A. V.; Grigorenko, B. L.; Morozov, D. I.; Kochetov, M. S.; Lushchekina, S. V.; Varfolomeev, S. D., On quantum mechanical - molecular mechanical (QM/MM) approaches to model hydrolysis of acetylcholine by acetylcholinesterase. *Chem.-Biol. Interact.* **2013**, *203*, 51-56.
71. Tormos, J. R.; Wiley, K. L.; Wang, Y.; Fournier, D.; Masson, P.; Nachon, F.; Quinn, D. M., Accumulation of tetrahedral intermediates in cholinesterase catalysis: a secondary isotope effect study. *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 17751-17759.
72. Delfino, R. T.; Ribeiro, T. S.; Figueroa-Villar, J. D., Organophosphorus compounds as chemical warfare agents: a review. *J. Braz. Chem. Soc.* **2009**, *20*, 407-428.
73. Shafferman, A.; Kronman, C.; Flashner, Y.; Leitner, M.; Grosfeld, H.; Ordentlich, A.; Gozes, Y.; Cohen, S.; Ariel, N.; Barak, D.; Harel, M.; Silman, I.; Sussman, J. L.; Velan, B., Mutagenesis of human acetylcholinesterase - identification of residues involved in catalytic activity and in polypeptide folding. *J. Biol. Chem.* **1992**, *267*, 17640-17648.

74. Zhang, Y. K.; Kua, J.; McCammon, J. A., Role of the catalytic triad and oxyanion hole in acetylcholinesterase catalysis: an ab initio QM/MM study. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 10572-10577.
75. Sant'Anna, C. M. R.; Viana, A. D.; do Nascimento, N. M., A semiempirical study of acetylcholine hydrolysis catalyzed by *Drosophila melanogaster* acetylcholinesterase. *Bioorg. Chem.* **2006**, *34*, 77-89.
76. Nemukhin, A. V.; Lushchekina, S. V.; Bochenkova, A. V.; Golubeva, A. A.; Varfolomeev, S. D., Characterization of a complete cycle of acetylcholinesterase catalysis by ab initio QM/MM modeling. *J. Mol. Model.* **2008**, *14*, 409-416.
77. Kua, J.; Zhang, Y. K.; McCammon, J. A., Studying enzyme binding specificity in acetylcholinesterase using a combined molecular dynamics and multiple docking approach. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 8260-8267.
78. Gilson, M. K.; Straatsma, T. P.; McCammon, J. A.; Ripoll, D. R.; Faerman, C. H.; Axelsen, P. H.; Silman, I.; Sussman, J. L., Open backdoor in a molecular-dynamics simulation of acetylcholinesterase. *Science* **1994**, *263*, 1276-1278.
79. Wlodek, S. T.; Clark, T. W.; Scott, L. R.; McCammon, J. A., Molecular dynamics of acetylcholinesterase dimer complexed with tacrine. *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 9513-9522.
80. Axelsen, P. H.; Harel, M.; Silman, I.; Sussman, J. L., Structure and dynamics of the active-site gorge of acetylcholinesterase - synergistic use of molecular-dynamics simulation and X-ray crystallography. *Prot. Sci.* **1994**, *3*, 188-197.
81. Kovach, I. M.; Qian, N. F.; Bencsura, A., Efficient product clearance through exit channels in substrate hydrolysis by acetylcholinesterase. *Febs Letters* **1994**, *349*, 60-64.
82. Sanson, B.; Colletier, J. P.; Xu, Y. C.; Lang, P. T.; Jiang, H. L.; Silman, I.; Sussman, J. L.; Weik, M., Backdoor opening mechanism in acetylcholinesterase based on X-ray crystallography and molecular dynamics simulations. *Prot. Sci.* **2011**, *20*, 1114-1118.
83. Tai, K.; Shen, T. Y.; Henchman, R. H.; Bourne, Y.; Marchot, P.; McCammon, J. A., Mechanism of acetylcholinesterase inhibition by fasciculin: A 5-ns molecular dynamics simulation. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 6153-6161.
84. Bui, J. M.; Tai, K.; McCammon, J. A., Acetylcholinesterase: Enhanced fluctuations and alternative routes to the active site in the complex with fasciculin-2. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 7198-7205.

85. Xu, Y. C.; Colletier, J. P.; Weik, M.; Qin, G. R.; Jiang, H. L.; Silman, I.; Sussman, J. L., Long Route or Shortcut? A molecular dynamics study of traffic of thiocholine within the active-site gorge of acetylcholinesterase. *Biophys. J.* **2010**, *99*, 4003-4011.
86. Lockridge, O., Review of human butyrylcholinesterase structure, function, genetic variants, history of use in the clinic, and potential therapeutic uses. *Pharmacol. Ther.* **2015**, *148*, 34-46.
87. Çokuğraş, A. N., Butyrylcholinesterase: Structure and physiological importance. *Turk. J. Biochem.* **2003**, *28*, 54-61.
88. Chen, X. B.; Zheng, X. R.; Zhou, Z. Y.; Zhan, C. G.; Zheng, F., Effects of a cocaine hydrolase engineered from human butyrylcholinesterase on metabolic profile of cocaine in rats. *Chem-Biol. Interact.* **2016**, *259*, 104-109.
89. Brazzolotto, X.; Igert, A.; Guillon, V.; Santoni, G.; Nachon, F., Bacterial expression of human butyrylcholinesterase as a tool for nerve agent bioscavengers development. *Molecules* **2017**, *22*, 1-16.
90. Duysen, E. G.; Li, B.; Lockridge, O., The butyrylcholinesterase knockout mouse a research tool in the study of drug sensitivity, bio-distribution, obesity and Alzheimer's disease. *Exp. Opin. Drug Metab. Toxicol.* **2009**, *5*, 523-528.
91. Zhou, W. Q.; Lv, S., Delayed recovery from paralysis associated with plasma cholinesterase deficiency. *Springerplus* **2016**, *5*, 1-4.
92. Boudinot, E.; Taysse, L.; Daulon, S.; Chatonnet, A.; Champagnat, J.; Foutz, A. S., Effects of acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase inhibition on breathing in mice adapted or not to reduced acetylcholinesterase. *Pharmacol. Biochem. Behav.* **2005**, *80*, 53-61.
93. Duysen, E. G.; Li, B.; Darvesh, S.; Lockridge, O., Sensitivity of butyrylcholinesterase knockout mice to (-)-huperzine A and donepezil suggests humans with butyrylcholinesterase deficiency may not tolerate these Alzheimer's disease drugs and indicates butyrylcholinesterase function in neurotransmission. *Toxicology* **2007**, *233*, 60-69.
94. Mushtaq, G.; Greig, N. H.; Khan, J. A.; Kamal, M. A., Status of acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase in Alzheimer's disease and type 2 diabetes mellitus. *CNS Neurol. Disord. Drug Targets* **2014**, *13*, 1432-1439.

95. Greig, N. H.; Utsuki, T.; Yu, Q. S.; Zhu, X. X.; Holloway, H. W.; Perry, T.; Lee, B.; Ingram, D. K.; Lahiri, D. K., A new therapeutic target in Alzheimer's disease treatment: Attention to butyrylcholinesterase. *Curr. Med. Res. Opin.* **2001**, *17*, 159-165.
96. Li, Q.; Yang, H. Y.; Chen, Y.; Sun, H. P., Recent progress in the identification of selective butyrylcholinesterase inhibitors for Alzheimer's disease. *Eur. J. Med. Chem.* **2017**, *132*, 294-309.
97. Nicolet, Y.; Lockridge, O.; Masson, P.; Fontecilla-Camps, J. C.; Nachon, F., Crystal structure of human butyrylcholinesterase and of its complexes with substrate and products. *J. Biol. Chem.* **2003**, *278*, 41141-41147.
98. Macdonald, I. R.; Martin, E.; Rosenberry, T. L.; Darvesh, S., Probing the peripheral site of human butyrylcholinesterase. *Biochemistry* **2012**, *51*, 7046-7053.
99. Bajda, M.; Wieckowska, A.; Hebda, M.; Guzior, N.; Sotriffer, C. A.; Malawska, B., Structure-based search for new inhibitors of cholinesterases. *Int. J. Mol. Sci.* **2013**, *14*, 5608-5632.
100. Darvesh, S.; Hopkins, D. A.; Geula, C., Neurobiology of butyrylcholinesterase. *Nat. Rev. Neurosci.* **2003**, *4*, 131-138.
101. Schopfer, L. M.; Lockridge, O., Tetramer-organizing polyproline-rich peptides differ in CHO cell-expressed and plasma-derived human butyrylcholinesterase tetramers. *Biochim. Biophys. Acta -Proteins and Proteomics* **2016**, *1864*, 706-714.
102. Chen, X.; Fang, L.; Liu, J. J.; Zhan, C. G., Reaction pathway and free energy profile for butyrylcholinesterase-catalyzed hydrolysis of acetylcholine. *J. Phys. Chem. B* **2011**, *115*, 1315-1322.
103. Qiao, Y.; Han, K. L.; Zhan, C. G., Reaction pathways and free energy profiles for cholinesterase-catalyzed hydrolysis of 6-monoacetylmorphine. *Org. Biomol. Chem.* **2014**, *12*, 2214-2227.
104. Qiao, Y.; Han, K. L.; Zhan, C. G., Fundamental reaction pathway and free energy profile for butyrylcholinesterase-catalyzed hydrolysis of heroin. *Biochemistry* **2013**, *52*, 6467-6479.
105. Zhan, C. G.; Zheng, F.; Landry, D. W., Fundamental reaction mechanism for cocaine hydrolysis in human butyrylcholinesterase. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 2462-2474.

106. Zhan, C. G.; Gao, D. Q., Catalytic mechanism and energy barriers for butyrylcholinesterase-catalyzed hydrolysis of cocaine. *Biophys. J.* **2005**, *89*, 3863-3872.
107. Sun, H.; Pang, Y. P.; Lockridge, O.; Brimijoin, S., Re-engineering butyrylcholinesterase as a cocaine hydrolase. *Mol. Pharmacol.* **2002**, *62*, 220-224.
108. Huang, X. Q.; Pan, Y. M.; Zheng, F.; Zhan, C. G., Reaction pathway and free energy profile for prechemical reaction step of human butyrylcholinesterase-catalyzed hydrolysis of (-)-cocaine by combined targeted molecular dynamics and potential of mean force simulations. *J. Phys. Chem. B* **2010**, *114*, 13545-13554.
109. Da Costa, J. S.; Pisoni, D. S.; da Silva, C. B.; Petzhold, C. L.; Russowsky, D.; Ceschi, M. A., Lewis Acid Promoted Friedlander Condensation Reactions between Anthranilonitrile and Ketones for the Synthesis of Tacrine and its Analogues. *J. Braz. Chem. Soc.* **2009**, *20*, 1448-1454.
110. McEneny-King, A.; Osman, W.; Edginton, A. N.; Rao, P. P. N., Cytochrome P450 binding studies of novel tacrine derivatives: predicting the risk of hepatotoxicity. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2017**, *27*, 2443-2449.
111. Recanatini, M.; Cavalli, A.; Belluti, F.; Piazzini, L.; Rampa, A.; Bisi, A.; Gobbi, S.; Valenti, P.; Andrisano, V.; Bartolini, M.; Cavrini, V., SAR of 9-amino-1,2,3,4-tetrahydroacridine-based acetylcholinesterase inhibitors: synthesis, enzyme inhibitory activity, QSAR, and structure-based CoMFA of tacrine analogues. *J. Med. Chem.* **2000**, *43*, 2007-2018.
112. Soukup, O.; Jun, D.; Zdarova-Karasova, J.; Patocka, J.; Musilek, K.; Korabecny, J.; Krusek, J.; Kaniakova, M.; Sepsova, V.; Mandikova, J.; Trejtnar, F.; Pohanka, M.; Drtinova, L.; Pavlik, M.; Tobin, G.; Kuca, K., A Resurrection of 7-MEOTA: A comparison with tacrine. *Curr. Alzheimer Res.* **2013**, *10*, 893-906.
113. Lee, S. K.; Park, M. K.; Jhang, H. E.; Yi, J. J.; Nahm, K.; Cho, D. W.; Ra, C. S.; Musilek, K.; Horova, A.; Korabecny, J.; Dolezal, R.; Jun, D.; Kuca, K., Preparation of 7-methoxy tacrine dimer analogs and their *in vitro/in silico* evaluation as potential cholinesterase inhibitors. *Bull. Korean Chem. Soc.* **2015**, *36*, 1654-1660.
114. Spilovska, K.; Korabecny, J.; Horova, A.; Musilek, K.; Nepovimova, E.; Drtinova, L.; Gazova, Z.; Siposova, K.; Dolezal, R.; Jun, D.; Kuca, K., Design, synthesis and *in vitro*

testing of 7-methoxytacrine-amantadine analogues: a novel cholinesterase inhibitors for the treatment of Alzheimer's disease. *Med. Chem. Res.* **2015**, *24*, 2645-2655.

115. Pisoni, D. D.; da Costa, J. S.; Gamba, D.; Petzhold, C. L.; Borges, A. C. D.; Ceschi, M. A.; Lunardi, P.; Goncalves, C. A. S., Synthesis and AChE inhibitory activity of new chiral tetrahydroacridine analogues from terpenic cyclanones. *Eur. J. Med. Chem.* **2010**, *45*, 526-535.

116. Wang, H.; Carlier, P. R.; Ho, W. L.; Wu, D. C.; Lee, N. T. K.; Li, C. P. L.; Pang, Y. P.; Han, Y. F., Effects of bis(7)-tacrine, a novel anti-Alzheimer's agent, on rat brain AChE. *Neuroreport* **1999**, *10*, 789-793.

117. Hu, S. Q.; Wang, R.; Cui, W.; Mak, S. H.; Li, G.; Hu, Y. J.; Lee, M. Y.; Pang, Y. P.; Han, Y. F., Dimeric bis (heptyl)-cognitin blocks Alzheimer's beta-amyloid neurotoxicity via the inhibition of a beta fibrils formation and disaggregation of preformed fibrils. *CNS Neurosci. Ther.* **2015**, *21*, 953-961.

118. Schmidt, I.; Pradel, G.; Sologub, L.; Golzmann, A.; Ngwa, C. J.; Kucharski, A.; Schirmeister, T.; Holzgrabe, U., Bistacrine derivatives as new potent antimalarials. *Bioorg. Med. Chem.* **2016**, *24*, 3636-3642.

119. Viegas-Junior, C.; Danuello, A.; Bolzani, V. D.; Barreir, E. J.; Fraga, C. A. M., Molecular hybridization: a useful tool in the design of new drug prototypes. *Curr. Med. Chem.* **2007**, *14*, 1829-1852.

120. Rydberg, E. H.; Brumshtein, B.; Greenblatt, H. M.; Wong, D. M.; Shaya, D.; Williams, L. D.; Carlier, P. R.; Pang, Y. P.; Silman, I.; Sussman, J. L., Complexes of alkylene-linked tacrine dimers with *Torpedo californica* acetylcholinesterase: binding of bis(5)-tacrine produces a dramatic rearrangement in the active-site gorge. *J. Med. Chem.* **2006**, *49*, 5491-5500.

121. Inestrosa, N. C.; Alvarez, A.; Perez, C. A.; Moreno, R. D.; Vicente, M.; Linker, C.; Casanueva, O. I.; Soto, C.; Garrido, J., Acetylcholinesterase accelerates assembly of amyloid-beta-peptides into Alzheimer's fibrils: possible role of the peripheral site of the enzyme. *Neuron* **1996**, *16*, 881-891.

122. De Ferrari, G. V.; Canales, M. A.; Shin, I.; Weiner, L. M.; Silman, I.; Inestrosa, N. C., A structural motif of acetylcholinesterase that promotes amyloid beta-peptide fibril formation. *Biochemistry* **2001**, *40*, 10447-10457.

123. Carvajal, F. J.; Inestrosa, N. C., Interactions of AChE with A β aggregates in Alzheimer's brain: therapeutic relevance of IDN 5706. *Front. Mol. Neurosci.* **2011**, *4*, 1-10.
124. Cottingham, M. G.; Hollinshead, M. S.; Vaux, D. J. T., Amyloid fibril formation by a synthetic peptide from a region of human acetylcholinesterase that is homologous to the Alzheimer's amyloid-beta peptide. *Biochemistry* **2002**, *41*, 13539-13547.
125. De Aquino, R. A. N.; Modolo, L. V.; Alves, R. B.; de Fatima, A., Synthesis, kinetic studies and molecular modeling of novel tacrine dimers as cholinesterase inhibitors. *Org. Biomol. Chem.* **2013**, *11*, 8395-8409.
126. Lu, C. J.; Zhou, Q.; Yan, J.; Du, Z. Y.; Huang, L.; Li, X. S., 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.
127. Spilovska, K.; Korabecny, J.; Sepsova, V.; Jun, D.; Hrabnova, M.; Jost, P.; Muckova, L.; Soukup, O.; Janockova, J.; Kucera, T.; Dolezal, R.; Mezeiova, E.; Kaping, D.; Kuca, K., Novel tacrine-scutellarin hybrids as multipotent anti-Alzheimer's agents: design, synthesis and biological evaluation. *Molecules* **2017**, *22*, 1-22.
128. Harel, M.; Kryger, G.; Rosenberry, T. L.; Mallender, W. D.; Lewis, T.; Fletcher, R. J.; Guss, J. M.; Silman, I.; Sussman, J. L., Three-dimensional structures of *Drosophila melanogaster* acetylcholinesterase and of its complexes with two potent inhibitors. *Prot. Sci.* **2000**, *9*, 1063-1072.
129. Chen, Y.; Sun, J. F.; Peng, S. X.; Liao, H.; Zhang, Y. H.; Lehmann, J., Tacrine-flurbiprofen hybrids as multifunctional drug candidates for the treatment of Alzheimer's disease. *Archiv Der Pharm.* **2013**, *346*, 865-871.
130. Keri, R. S.; Quintanova, C.; Marques, S. M.; Esteves, A. R.; Cardoso, S. M.; Santos, M. A., Design, synthesis and neuroprotective evaluation of novel tacrine-benzothiazole hybrids as multi-targeted compounds against Alzheimer's disease. *Bioorg. Med. Chem.* **2013**, *21*, 4559-4569.
131. Mao, F.; Chen, J. W.; Zhou, Q.; Luo, Z. H.; Huang, L.; Li, X. S., Novel tacrine-ebsele hybrids with improved cholinesterase inhibitory, hydrogen peroxide and peroxynitrite scavenging activity. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2013**, *23*, 6737-6742.

132. Xie, S. S.; Wang, X. B.; Li, J. Y.; Yang, L.; Kong, L. Y., Design, synthesis and evaluation of novel tacrine coumarin hybrids as multifunctional cholinesterase inhibitors against Alzheimer's disease. *Eur. J. Med. Chem.* **2013**, *64*, 540-553.
133. Hamulakova, S.; Janovec, L.; Hrabínova, M.; Spilovska, K.; Korabecny, J.; Kristian, P.; Kuca, K.; Imrich, J., Synthesis and Biological Evaluation of Novel Tacrine Derivatives and Tacrine-Coumarin Hybrids as Cholinesterase Inhibitors. *J. Med. Chem.* **2014**, *57*, 7073-7084.
134. Fang, L.; Kraus, B.; Lehmann, J.; Heilmann, J.; Zhang, Y. H.; Decker, M., Design and synthesis of tacrine-ferulic acid hybrids as multi-potent anti-Alzheimer drug candidates. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2008**, *18*, 2905-2909.
135. Fu, Y. B.; Mu, Y.; Lei, H.; Wang, P.; Li, X.; Leng, Q.; Han, L.; Qu, X. D.; Wang, Z. Y.; Huang, X. S., Design, synthesis and evaluation of novel tacrine-ferulic acid hybrids as multifunctional drug candidates against Alzheimer's disease. *Molecules* **2016**, *21*, 1-10.
136. Chen, Y.; Sun, J. F.; Fang, L.; Liu, M.; Peng, S. X.; Liao, H.; Lehmann, J.; Zhang, Y. H., Tacrine-ferulic acid-nitric oxide (NO) donor trihybrids as potent, multifunctional acetyl- and butyrylcholinesterase inhibitors. *J. Med. Chem.* **2012**, *55*, 4309-4321.
137. Hamada, T.; Le, T.; Voegtle, M. J.; Doyle, B.; Rimby, J.; Isovitsch, R., Synthesis, photophysical and computational studies of two lophine derivatives with electron-rich substituents in the 2-position. *J. Mol. Struct.* **2017**, *1130*, 284-290.
138. Muñoz, J. A. H.; Junior, J. J.; da Silva, F. M., Radziszewski Reaction: An Elegant, easy, simple and efficient method to synthesise imidazoles. *Curr. Org. Synt.* **2014**, *11*, 824-834.
139. Alpan, A. S.; Parlar, S.; Carlino, L.; Tarikogullari, A. H.; Alptuzun, V.; Gunes, H. S., Synthesis, biological activity and molecular modeling studies on 1*H*-benzimidazole derivatives as acetylcholinesterase inhibitors. *Bioorg. Med. Chem.* **2013**, *21*, 4928-4937.
140. Liu, J. G.; Qiu, J.; Wang, M. X.; Wang, L.; Su, L. J.; Gao, J. B.; Gu, Q.; Xu, J.; Huang, S. L.; Gu, L. Q.; Huang, Z. S.; Li, D., Synthesis and characterization of 1*H*-phenanthro 9,10-d imidazole derivatives as multifunctional agents for treatment of Alzheimer's disease. *Biochim. Biophys. Acta-General Subjects* **2014**, *1840*, 2886-2903.
141. Heravi, M. M.; Derikvand, F.; Haghighi, M., Highly efficient, four component, one-pot synthesis of tetrasubstituted imidazoles using a catalytic amount of FeCl₃.6H₂O. *Monats. Chem.* **2008**, *139*, 31-33.

142. Wang, L. M.; Wang, Y. H.; Tian, H.; Yao, Y. F.; Shao, J. H.; Liu, B., Ytterbium triflate as an efficient catalyst for one-pot synthesis of substituted imidazoles through three-component condensation of benzil, aldehydes and ammonium acetate. *J. Fluor. Chem.* **2006**, *127*, 1570-1573.
143. Satyanarayana, V. S. V.; Sivakumar, A., An efficient and novel one-pot synthesis of 2,4,5-triaryl-1*H*-imidazoles catalyzed by $\text{UO}_2(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ under heterogeneous conditions. *Chem. Pap.* **2011**, *65*, 519-526.
144. Das Sharma, S.; Hazarika, P.; Konwar, D., An efficient and one-pot synthesis of 2,4,5-trisubstituted and 1,2,4,5-tetrasubstituted imidazoles catalyzed by $\text{InCl}_3 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$. *Tetrahedron Lett.* **2008**, *49*, 2216-2220.
145. De Fátima, A.; Braga, T. C.; Neto, L. D.; Terra, B. S.; Oliveira, B. G. F.; da Silva, D. L.; Modolo, L. V., A mini-review on Biginelli adducts with notable pharmacological properties. *J. Adv. Res.* **2015**, *6*, 363-373.
146. Boukis, A. C.; Monney, B.; Meier, M. A. R., Synthesis of structurally diverse 3,4-dihydropyrimidin-2(1*H*)-ones via sequential Biginelli and Passerini reactions. *Beilstein J. Org. Chem.* **2017**, *13*, 54-62.
147. Hu, E. H.; Sidler, D. R.; Dolling, U. H., Unprecedented catalytic three component one-pot condensation reaction: An efficient synthesis of 5-alkoxycarbonyl-4-aryl-3,4-dihydropyrimidin-2(1*H*)-ones. *J. Org. Chem.* **1998**, *63*, 3454-3457.
148. Russowsky, D.; Lopes, F. A.; da Silva, V. S. S.; Canto, K. F. S.; D'Oca, M. G. M.; Godoi, M. N., Multicomponent Biginelli's synthesis of 3,4-dihydropyrimidin-2(1*H*)-ones promoted by $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$. *J. Braz. Chem. Soc.* **2004**, *15*, 165-169.
149. Ghomi, J. S.; Teymuri, R.; Ziarati, A., A green synthesis of 3,4-dihydropyrimidine-2(1*H*)-one/thione derivatives using nanosilica-supported tin(II) chloride as a heterogeneous nanocatalyst. *Monats. Fur Chem.* **2013**, *144*, 1865-1870.
150. Ranu, B. C.; Hajra, A.; Jana, U., Indium(III) chloride-catalyzed one-pot synthesis of dihydropyrimidinones by a three-component coupling of 1,3-dicarbonyl compounds, aldehydes, and urea: An improved procedure for the Biginelli reaction. *J. Org. Chem.* **2000**, *65*, 6270-6272.

151. Fu, N. Y.; Yuan, Y. F.; Cao, Z.; Wang, S. W.; Wang, J. T.; Peppe, C., Indium(III) bromide-catalyzed preparation of dihydropyrimidinones: improved protocol conditions for the Biginelli reaction. *Tetrahedron* **2002**, *58*, 4801-4807.
152. Godoi, M. N.; Costenaro, H. S.; Kramer, E.; Machado, P. S.; Montes D'Oca, M. G.; Russowsky, D., Synthesis of monastrol and of new Biginelli compounds promoted by In (OTf)₃. *Quim. Nova* **2005**, *28*, 1010-1013.
153. Sharma, U. K.; Sharma, N.; Kumar, R.; Sinha, A. K., Biocatalysts for multicomponent Biginelli reaction: bovine serum albumin triggered waste-free synthesis of 3,4-dihydropyrimidin-2-(1H)-ones. *Amino Acids* **2013**, *44*, 1031-1037.
154. Peng, J. J.; Deng, Y. Q., Ionic liquids catalyzed Biginelli reaction under solvent-free conditions. *Tetrahedron Lett.* **2001**, *42*, 5917-5919.
155. M'Hamed, M. O.; Alshammari, A. G.; Lemine, O. M., Green high-yielding one-pot approach to Biginelli reaction under catalyst-free and solvent-free ball milling conditions. *Appl. Sciences-Basel* **2016**, *6*, 431-436.
156. Khatri, C. K.; Rekunge, D. S.; Chaturbhuj, G. U., Sulfated polyborate: a new and eco-friendly catalyst for one-pot multi-component synthesis of 3,4-dihydropyrimidin-2(1H)-ones/thiones via Biginelli reaction. *New J. Chem.* **2016**, *40*, 10412-10417.
157. Atwal, K. S.; Rovnyak, G. C.; Kimball, S. D.; Floyd, D. M.; Moreland, S.; Swanson, B. N.; Gougoutas, J. Z.; Schwartz, J.; Smillie, K. M.; Malley, M. F., Dihydropyrimidine calcium-channel blockers 2,3-substituted-4-aryl-1,4-dihydro-6-methyl-5-pyrimidinecarboxylic acid-esters as potent mimics of dihydropyridines. *J. Med. Chem.* **1990**, *33*, 2629-2635.
158. Marco-Contelles, J.; Leon, R.; de los Rios, C.; Samadi, A.; Bartolini, M.; Andrisano, V.; Huertas, O.; Barril, X.; Luque, F. J.; Rodriguez-Franco, M. I.; Lopez, B.; Lopez, M. G.; Garcia, A. G.; Carreiras, M. D.; Villarroya, M., Tacripyrines, the first tacrine-dihydropyridine hybrids, as multitarget-directed ligands for the treatment of Alzheimer's disease. *J. Med. Chem.* **2009**, *52*, 2724-2732.
159. Cano-Abad, M. F.; Villarroya, M.; Garcia, A. G.; Gabilan, N. H.; Lopez, M. G., Calcium entry through L-type calcium channels causes mitochondrial disruption and chromaffin cell death. *J. Biol. Chem.* **2001**, *276*, 39695-39704.
160. Safak, C.; Simsek, R., Fused 1,4-dihydropyridines as potential calcium modulatory compounds. *Mini-Rev. Med. Chem.* **2006**, *6*, 747-755.

161. Zhi, H.; Zhang, C.; Cheng, Z. X.; Jin, Z.; Huang, E. F.; Li, S.; Lin, H. Q.; Wan, D. C. C.; Hu, C., 6-Acetyl-5*H*-thiazolo 3,2-pyrimidine derivatives as the novel acetylcholinesterase inhibitors: design, synthesis, and biological activity. *Med. Chem.* **2013**, *9*, 703-709.
162. Arunkhamkaew, S.; Athipornchai, A.; Apiratikul, N.; Suksamrarn, A.; Ajavakom, V., Novel racemic tetrahydrocurcuminoid dihydropyrimidinone analogues as potent acetylcholinesterase inhibitors. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2013**, *23*, 2880-2882.
163. Ahmad, S.; Iftikhar, F.; Ullah, F.; Sadiq, A.; Rashid, U., Rational design and synthesis of dihydropyrimidine based dual binding site acetylcholinesterase inhibitors. *Bioorg. Chem.* **2016**, *69*, 91-101.
164. Canto, R. F. S.; Barbosa, F. A. R.; Nascimento, V.; de Oliveira, A. S.; Brighente, I. M. C.; Braga, A. L., Design, synthesis and evaluation of seleno-dihydropyrimidinones as potential multi-targeted therapeutics for Alzheimer's disease. *Org. Biomol. Chem.* **2014**, *12*, 3470-3477.
165. Barbosa, F. A. R.; Canto, R. F. S.; Saba, S.; Rafique, J.; Braga, A. L., Synthesis and evaluation of dihydropyrimidinone-derived selenoesters as multi-targeted directed compounds against Alzheimer's disease. *Bioorg. Med. Chem.* **2016**, *24*, 5762-5770.
166. Silva, L., Síntese de glicosil amidas e glicoconjugação via utilização de selenocarboxilatos como reagentes traceless. Dissertação de mestrado, Instituto de Química, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2016.
167. Spiwok, V., CH/ π interactions in carbohydrate recognition. *Molecules* **2017**, *22*, 1038-1049.
168. Qutub, A. A.; Hunt, C. A., Glucose transport to the brain: a systems model. *Brain Res. Rev.* **2005**, *49*, 595-617.
169. Reeves, L. W.; Schneider, W. G., Nuclear magnetic resonance measurements of chloroform with aromatic molecules and olefins. *Can. J. Chem.-Revue Canad. Chimie* **1957**, *35*, 251-261.
170. Gottlieb, H. E.; Kotlyar, V.; Nudelman, A., NMR chemical shifts of common laboratory solvents as trace impurities. *J. Org. Chem.* **1997**, *62*, 7512-7515.
171. Nishio, M.; Hirota, M.; Umezawa, Y., *The CH/ π interaction: evidence, nature and consequences*. John Wiley & Sons, Inc.: New York, USA, 1998.

172. Hudson, K. L.; Bartlett, G. J.; Diehl, R. C.; Agirre, J.; Gallagher, T.; Kiessling, L. L.; Woolfson, D. N., Carbohydrate-aromatic interactions in proteins. *J. Am. Chem. Soc.* **2015**, *137*, 15152-15160.
173. Fernandez, M. D.; Canada, F. J.; Jimenez-Barbero, J.; Cuevas, G., Molecular recognition of saccharides by proteins. Insights on the origin of the carbohydrate-aromatic interactions. *J. Am. Chem. Soci.* **2005**, *127*, 7379-7386.
174. Asensio, J. L.; Arda, A.; Canada, F. J.; Jimenez-Barbero, J., Carbohydrate-aromatic interactions. *Acc. Chem. Res.* **2013**, *46*, 946-954.
175. Dias, C.; Rauter, A. P., Carbohydrates and glycomimetics in Alzheimer's disease therapeutics and diagnosis in *Carbohydrates in drug design and discovery*. The Royal Society of Chemistry, Cambridge, UK, 2015, pages 180-208.
176. Kim, H. J.; Kim, P.; Shin, C. Y., A comprehensive review of the therapeutic and pharmacological effects of ginseng and ginsenosides in central nervous system. *J. Gins. Res.* **2013**, *37*, 8-29.
177. Kurisu, M.; Miyamae, Y.; Murakami, K.; Han, J.; Isoda, H.; Irie, K.; Shigemori, H., Inhibition of amyloid beta aggregation by acteoside, a phenylethanoid glycoside. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **2013**, *77*, 1329-1332.
178. Lv, L.; Yang, Q. Y.; Zhao, Y.; Yao, C. S.; Sun, Y.; Yang, E. J.; Song, K. S.; Mook-Jung, I.; Fang, W. S., BACE-1 (β -secretase) inhibitory chromone glycosides from *Aloe vera* and *Aloe nobilis*. *Planta Medica* **2008**, *74*, 540-545.
179. Jung, M.; Park, M., Acetylcholinesterase inhibition by flavonoids from *Agrimonia pilosa*. *Molecules* **2007**, *12*, 2130-2139.
180. Georgiev, M.; Alipieva, K.; Orhan, I.; Abrashev, R.; Denev, P.; Angelova, M., Antioxidant and cholinesterases inhibitory activities of *Verbascum xanthophoeniceum* Griseb. and its phenylethanoid glycosides. *Food Chem.* **2011**, *128*, 100-105.
181. Schwarz, S.; Csuk, R.; Rauter, A. P., Microwave-assisted synthesis of novel purine nucleosides as selective cholinesterase inhibitors. *Org. Biomol. Chem.* **2014**, *12*, 2446-2456.
182. Xavier, N. M.; Schwarz, S.; Vaz, P. D.; Csuk, R.; Rauter, A. P., Synthesis of Purine Nucleosides from D- Glucuronic Acid Derivatives and Evaluation of Their Cholinesterase-Inhibitory Activities. *Eur. J. Org. Chem.* **2014**, 2770-2779.

183. Batista, D.; Schwarz, S.; Loesche, A.; Csuk, R.; Costa, P. J.; Oliveira, M. C.; Xavier, N. M., Synthesis of glucopyranos-6'-yl purine and pyrimidine isonucleosides as potential cholinesterase inhibitors. Access to pyrimidine-linked pseudodisaccharides through Mitsunobu reaction. *Pure Appl. Chem.* **2016**, *88*, 363-379.
184. Olsen, J. I.; Plata, G. B.; Padron, J. M.; Lopez, O.; Bols, M.; Fernandez-Bolaños, J. G., Selenoureido-iminosugars: A new family of multitarget drugs. *Eur. J. Med. Chem.* **2016**, *123*, 155-160.
185. Braga, H. C.; Stefani, H. A.; Paixão, M. W.; Santos, F. W.; Lüdtke, D. S., Synthesis of 5'-seleno-xylofuranosides. *Tetrahedron* **2010**, *66*, 3441-3446.
186. Spiazzi, C. C.; Soares, M. B.; Izaguirry, A. P.; Vargas, L. M.; Zanchi, M. M.; Pavin, N. F.; Affeldt, R. F.; Lüdtke, D. S.; Prigol, M.; Santos, F. W., Selenofuranoside ameliorates memory loss in Alzheimer-like sporadic dementia: AChE activity, oxidative stress, and inflammation involvement. *Oxid. Med. Cell. Long.* **2015**, 1-9.
187. Ramalho, J. B.; Izaguirry, A. P.; Soares, M. B.; Spiazzi, C. C.; Pavin, N. F.; Affeldt, R. A.; Lüdtke, D. S.; Pinton, S.; Santos, F. W.; Prigol, M., Selenofuranoside improves long-term memory deficits in rats after exposure to monosodium glutamate: Involvement of Na⁺, K⁺-ATPase activity. *Phys. Behav.* **2018**, *184*, 27-33.
188. Vargas, J. P.; Pinto, L. M.; Savegnago, L.; Lüdtke, D. S., Synthesis of alkylseleno-carbohydrates and evaluation of their antioxidant properties. *J. Braz. Chem. Soc.* **2015**, *26*, 810-815.
189. Decroocq, C.; Stauffert, F.; Pamard, O.; Oulaidi, F.; Gallienne, E.; Martin, O. R.; Guillou, C.; Compain, P., Iminosugars as a new class of cholinesterase inhibitors. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2015**, *25*, 830-833.
190. Wiklund, P.; Bergman, J., The chemistry of anthranilic acid. *Curr. Org. Synt.* **2006**, *3*, 379-402.
191. Hu, M. K.; Wu, L. J.; Hsiao, G.; Yen, M. H., Homodimeric tacrine congeners as acetylcholinesterase inhibitors. *J. Med. Chem.* **2002**, *45*, 2277-2282.
192. Lopes, J. P. B., Síntese de dímeros quirais do tipo bis-tacrina com potencial aplicação no tratamento da doença de Alzheimer. Dissertação de Mestrado, Instituto de Química, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2014.

193. Dardonville, C.; Fernandez-Fernandez, C.; Gibbons, S. L.; Ryan, G. J.; Jagerovic, N.; Gabilondo, A. M.; Meana, J. J.; Callado, L. F., Synthesis and pharmacological studies of new hybrid derivatives of fentanyl active at the mu-opioid receptor and I-2-imidazoline binding sites. *Bioorg. Med. Chem.* **2006**, *14*, 6570-6580.
194. Marques, M. V.; Ruthner, M. M.; Fontoura, L. A. M.; Russowsky, D., Metal chloride hydrates as Lewis acid catalysts in multicomponent synthesis of 2,4,5-triarylimidazoles or 2,4,5-triaryloxazoles. *J. Braz. Chem. Soc.* **2012**, *23*, 171-179.
195. Csuk, R.; Barthel, A.; Brezesinski, T.; Raschke, C., Synthesis of pathogen inactivating nucleic acid intercalators. *Eur. J. Med. Chem.* **2004**, *39*, 975-988.
196. Singh, K.; Wan, B. J.; Franzblau, S.; Chibale, K.; Balzarini, J., Facile transformation of Biginelli pyrimidin-2(1*H*)-ones to pyrimidines. *In vitro* evaluation as inhibitors of mycobacterium tuberculosis and modulators of cytostatic activity. *Eur. J. Med. Chem.* **2011**, *46*, 2290-2294.
197. Nagarajaiah, H.; Mukhopadhyay, A.; Moorthy, J. N., Biginelli reaction: an overview. *Tetrahedron Lett.* **2016**, *57*, 5135-5149.
198. Folkers, K.; Johnson, T. B., Researches on pyrimidines. CXXXVI. The mechanism of formation of tetrahydropyrimidines by the Biginelli reaction. *J. Am. Chem. Soc.* **1933**, *55*, 3784-3791.
199. Sweet, F.; Fissekis, J., On the Synthesis of 3,4-dihydro-2(1*H*)-pyrimidinones and the mechanism of the Biginelli reaction. *J. Am. Chem. Soc.* **1973**, *95*, 8741-8749.
200. Kappe, C. O., A reexamination of the mechanism of the Biginelli dihydropyrimidine synthesis. Support for an *N*-acyliminium ion intermediate. *J. Org. Chem.* **1997**, *62*, 7201-7204.
201. Puripat, M.; Ramozzi, R.; Hatanaka, M.; Parasuk, W.; Parasuk, V.; Morokuma, K., The Biginelli reaction is a urea-catalyzed organocatalytic multicomponent reaction. *J. Org. Chem.* **2015**, *80*, 6959-6967.
202. Zhang, Z. G.; Zhang, L. Q.; Duan, X. Y.; Yan, X. Q.; Yan, Y.; Liu, Q. F.; Liu, T. X.; Zhang, G. S., Iron-catalyzed four-member multicomponent reaction for assembly of (*E*)-6-arylviny1-3,4-dihydropyrimidin-2(1*H*)-ones. *Tetrahedron* **2015**, *71*, 7745-7751.

203. Karade, H. N.; Acharya, J.; Kaushik, M. P., An efficient and rapid dehydrogenation of 4-aryl-3,4-dihydropyrimidin-2(1*H*)-ones (DHPMs) using CAN/HCl. *Tetrahedron Lett.* **2012**, *53*, 5541-5543.
204. Karade, N. N.; Gampawar, S. V.; Kondre, J. M.; Tiwari, G. B., A novel combination of (diacetoxyiodo)benzene and tert-butylhydroperoxide for the facile oxidative dehydrogenation of 3,4-dihydropyrimidin-2(1*H*)-ones. *Tetrahedron Lett.* **2008**, *49*, 6698-6700.
205. Liang, R. R.; Wu, G. L.; Wu, W. T.; Wu, L. M., Oxidation of 3,4-dihydropyrimidin-2(1*H*)-ones with nitrosonium (NO⁺). *Chin. Chem. Lett.* **2009**, *20*, 1183-1186.
206. Memarain, H. R.; Ranjbar, M., Substituent effect in photocatalytic oxidation of 2-oxo-1,2,3,4-tetrahydropyrimidines using TiO₂ nanoparticles. *J. Mol. Catal. Chem.* **2012**, *356*, 46-52.
207. Memarian, H. R.; Farhadi, A., Potassium peroxydisulfate as an Efficient Oxidizing Agent for Conversion of Ethyl 3,4-Dihydropyrimidin-2(1*H*)-one-5-carboxylates to their Corresponding Ethyl Pyrimidin-2(1*H*)-one-5-carboxylates. *J. Iran. Chem. Soc.* **2009**, *6*, 638-646.
208. Galvão, J. M. G., Síntese de pirimidinas graxas derivadas de compostos de Biginelli. Trabalho de conclusão de curso, Instituto de Química, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2013.
209. Memarian, H. R.; Kalantari, M., Steric and electronic substitution effects on the thermal oxidation of 5-carboethoxy-2-oxo-1,2,3,4-tetrahydropyridines. *J. Iran. Chem. Soc.* **2017**, *14*, 143-155.
210. Lu, Y. X.; Just, G., Stereoselective synthesis of dithymidine phosphorothioates using D-xylose derived chiral auxiliaries. *Tetrahedron* **2001**, *57*, 1677-1687.
211. Ginisty, M.; Gravier-Pelletier, C.; Le Merrer, Y., Chemical investigations in the synthesis of *O*-serinyl aminoribosides. *Tetrahedron-Asymm.* **2006**, *17*, 142-150.
212. Wouters, A. D.; Trossini, G. H. G.; Stefani, H. A.; Lüdtkke, D. S., Enantioselective arylations catalyzed by carbohydrate-based chiral amino alcohols. *Eur. J. Org. Chem.* **2010**, 2351-2356.
213. Richardson, A. C., Nucleophilic replacement reactions of sulphonates 6. A summary on steric and polar factors. *Carbohydr. Res.* **1969**, *10*, 395-402.

214. Hough, L.; Richardson, A. C., *Biological compounds* vol. 5, 1st edition, Oxford: New York, 1979.
215. Hale, K. J.; Hough, L.; Manaviazar, S.; Calabrese, A., An update of the rules for pyranoside sulfonate displacement. *Org. Lett.* **2014**, *16*, 4838-4841.
216. Hale, K. J.; Hough, L.; Manaviazar, S.; Calabrese, A., Rules and stereoelectronic guidelines for the anionic nucleophilic displacement of furanoside and furanose *O*-Sulfonates. *Org. Lett.* **2015**, *17*, 1738-1741.
217. Pavia, D. L.; Lampman, G. M.; Kriz, G. S.; Vyvyan, J. R., *Introdução à espectroscopia*. 5ª edição, Cengage Learning: São Paulo, 2015.
218. Berges, D. A.; Fan, J. M.; Devinck, S.; Liu, N. N.; Dalley, N. K., Bicyclic azasugars containing a glycosidic heteroatom: D-xylose analogues. *Tetrahedron* **1999**, *55*, 6759-6770.
219. Silva, L.; Affeldt, R. F.; Ludtke, D. S., Synthesis of glycosyl amides using selenocarboxylates as traceless reagents for amide bond formation. *J. Org. Chem.* **2016**, *81*, 5464-5473.
220. Ellman, G. L.; Courtney, K. D.; Andres, V.; Featherstone, R. M., A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem. Pharmacol.* **1961**, *7*, 88-95.
221. Shelley, J. C.; Cholleti, A.; Frye, L. L.; Greenwood, J. R.; Timlin, M. R.; Uchimaya, M., Epik: a software program for pKa prediction and protonation state generation for drug-like molecules. *J. Comput.-Aided Mol. Design* **2007**, *21*, 681-691.