UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

Síntese de potencial inibidor de acetilcolinesterase para tratamento da Doença de Alzheimer

Talita Perez Cantuaria Chierrito

Ribeirão Preto

2016

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

Síntese de potencial inibidor de acetilcolinesterase para tratamento da Doença de Alzheimer

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas para obtenção do Título de Doutor em Ciências

Área de Concentração: Produtos Naturais e Sintéticos.

Orientada: Talita Perez Cantuaria Chierrito

Orientadora: Profa. Dra. Ivone Carvalho

Versão corrigida da Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas no dia 09/03/2016. A versão original encontra-se disponível na Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP.

Ribeirão Preto

2016

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Chierrito, Talita Perez Cantuaria

Síntese de potencial inibidor de acetilcolinesterase para tratamento da Doença de Alzheimer, 2016. 191 p.; 30cm.

Tese de Doutorado, apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP – Área de concentração: Produtos Naturais e Sintéticos.

Orientador: Carvalho, Ivone.

1. acetilcolinesterase. 2. inibidor duplo. 3. peptídeo β-amiloide. 4. Doença de Alzheimer.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Talita Perez Cantuaria Chierrito

Síntese de potencial inibidor de acetilcolinesterase para tratamento da Doença de Alzheimer

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas para obtenção do Título de Doutor em Ciências

Área de Concentração: Produtos Naturais e Sintéticos.

Orientador(a): Profa. Dra. Ivone Carvalho

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura:_____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura:_____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura:_____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura:_____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura:_____

Dedico esse trabalho a aqueles que não mediram

esforços para me darem o suporte necessário,

Mãe Orminda, Pai Domingos (*in memorian*)

e irmãs Ana e Klebsielle.

Agradecimentos

Primeiramente agradeço a Deus, que tornou tudo possível mesmo quando no início eu achava que não seria.

Agradeço também a minha família mãe Orminda, pai Domingos, irmãs Klebsielle e Ana Luiza, ao meu cunhado Fábio e meu sobrinho Gabriel, por todos os momentos de união e amor que nos fortalece, sem vocês não teriamos alcançado!

A Professora Ivone Carvalho por ter acreditado e me dado à oportunidade sem me conhecer ou ter algum tipo de indicação, e muito mais por ser um exemplo de profissional dedicada, e que nos desafia a encontrar o nosso melhor, obrigada Professora por todos os ensinamentos e incentivos, te agradecer ainda é pouco!!!

Aos funcionários e professores da Universidade de São Paulo e da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, por propiciar condições para o desenvolvimento do trabalho.

A Fapesp pelo suporte Financeiro ao laboratório no projeto auxílio, as bolsas, prorrogações e reservas técnicas de doutorado no Brasil (Processo: 2012/04054-5) e BEPE (Processo: 2014/10414-0) na Espanha.

Aos Técnicos do laboratório Marcelo e Luís Otávio por toda ajuda no laboratório, e companhia diária.

Aos colegas de laboratório Peterson, Valquíria, Vanessa, Getúlio, Milena, Paulo, Galo, Andreza, Ana Hart, Maris e Ana, que tornaram a caminhada mais branda, pelas ajudas mútuas e todas as brincadeiras e companheirismo, obrigada! Aos colegas do laboratório vizinho Claudia, João, Jhonatan e Leonardo !! obrigada pela amizade e companhia !

A Susimaire Pedersoli Mantoani, pelas parcerias nos relatórios do projeto auxílio Alzheimer, por ajudar com meus relatórios Fapesp, o RMN e agora com a tese. ¡Não poderia esquecer também Susi do que vivemos em CIB-CSIC España! ¡Muchas gracias!

Aos Técnicos de análise de RMN, Vinícios, e de ESI-MS, Thomas e Jaqueline.

Aos amigos de coração que mesmo longe estiveram muito presentes nessa jornada e fizeram diferença, Liana obrigada pelos primeiros dias em Ribeirão! Janine, Raphaela, Edna e Liliane.

"...Aprender a volar significa amar el viento..." **(SPIRIT EL CORCEL INDOMABLE)**

Al Consejo Superior de Investigaciones Científicas-CSIC (Madrid-España) por haberme aceptado y dado las condiciones para poder desarrollar una parte de nuestro trabajo.

Me gustaría muchísimo dar las gracias a la siempre amable Profesora Ana Martínez, un ejemplo como jefa y como persona, jamás olvidaré por todo que hiciste por nosotros. ¡Eres un sol!

Doy las gracias también a las Profesoras Carmen Gil, Nuria Campillo y a Ruth Pérez, por toda su ayuda en los meses que estuve en el CIB. ¡Gracias jefas queridas! A Concepción Pérez por los ensayos in vitro. ¡Gracias Concha!

Al Prof. Javier Cañada por su paciencia y por los ensayos de STD-NMR de nuestros compuestos. ¡Muchas gracias!

A mis queridos compañeros de lab en España, Los #Chemfinders: Daniel Pérez, por la ayuda con los ensayos de Pampa y por la persona genial que eres; Anna García, Josefa Zaldívar, Loreto Martínez, Sara Redenti (pampa team), Elisa Rojas, Carlos Roca, Víctor Sebastián, Carmen Fernández, Noélia García, Anna Espasa y Cristina Risueño, no hay palabras para explicar lo maravilloso que fue estar con vosotros. Os quiero muchísimo y ojalá nos veamos pronto. ¡Os echo de menos!

Doy las gracias también a Evita, mi querida, por haberme recibido tan bien en su casa ¡Mis días en Madrid no habrían sido los mismos sin ti!

“Os Teus sonhos são maiores do que os meus
Os Teus caminhos bem mais altos do que os meus”

(Fernandinho, Teus sonhos)

RESUMO

CHIERRITO, T.P.C. **Síntese de potencial inibidor de acetilcolinesterase para tratamento da Doença de Alzheimer**. 2016. 191f. Tese (Doutorado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2016.

A doença de Alzheimer (DA) é a forma mais comum de demência, representando cerca de 80% dos casos. A DA é caracterizada por um processo de declínio progressivo e irreversível das funções cognitivas e da memória, que se estende para a desorganização do comportamento. Atualmente, 46,8 milhões de pessoas em todo o mundo foram diagnosticadas com demência. Embora vários fatores tenham sido implicados na DA, sua etiologia ainda não é completamente conhecida. Do ponto de vista neuropatológico, é observado no cérebro de indivíduos com DA atrofia cortical difusa, presença de grande número de placas senis, emaranhados neurofibrilares, processo inflamatório e perda neuronal. A progressão dos sintomas está associada a mudanças estruturais nas sinapses colinérgicas em certas regiões do cérebro, que consequentemente, apresentam neurotransmissão colinérgica reduzida. Os vários eventos patológicos interligados contribuem para o avanço da doença e direcionam diversas pesquisas na busca por tratamentos multialvos com base no processo multifatorial de DA. Assim o presente trabalho descreve a síntese de derivados híbridos *dual binding site* de donepezila-tacrina (fármacos inibidores de acetilcolinesterase), com potencial para agir em dois alvos terapêuticos pela (i) inibição da acetilcolinesterase em ambos os sítios ativo e periférico, como demonstrado pelos estudos de modelagem molecular, e (ii) na agregação do peptídeo Aβ neurotóxico induzido pela acetilcolinesterase, na tentativa de interromper a progressão da doença. A estratégia sintética envolveu a condensação da 5,6-dimetóxi-indanona com a unidade 4-piperidinil carbaldeído, a qual forneceu o intermediário 5,6-dimetóxindan-1-ona-4-piperidinil-metileno-1-[(4-cloroquinolin-2-il)metil], seguido de redução da dupla ligação, gerada na reação de condensação anterior, e substituição do átomo de cloro-quinolina por amino para obtenção do produto final, ou manutenção da função olefina, seguido de substituição do átomo de cloro-quinolina por azido ou amino, gerando cinco híbridos estruturalmente correlacionados. Os híbridos foram testados em ensaio de inibição de acetilcolinesterase e butirilcolinesterase pelo método de Ellman, e o híbrido insaturado, contendo a função amino-quinolina foi o mais ativo da série com IC_{50} na faixa de nanomolar (0,014 μM). Futuramente, os intermediários da reação e produto final serão submetidos ao ensaio de inibição da agregação do peptídeo Aβ neurotóxico pelo método da tioflavina T. Neste trabalho, também são descritos os testes de predição *in vitro* para permeação pela barreira hematoencefálica, bem como sua absorção intestinal, pelo método PAMPA.

Palavras-chave: acetilcolinesterase, inibidor duplo, peptídeo beta-amiloide, Doença de Alzheimer.

ABSTRACT

CHIERRITO, T.P.C. **Synthesis of potencial acetylcholinesterase inhibitor to Alzheimer disease treatment**. 2016. 191f. Thesis (Doctoral). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2016.

Alzheimer's disease (AD) is the most commom form of dementia in almost 80% of the cases. AD is a process that causes a progressive and irreversible decline of cognitive functions, memory and includes disorganized behavior. Currently, 46.8 million people live with dementia around the world. Although several factors have been implicated in AD, its etiology is not fully understood. In the point of neuropathologic view, diffuse cortical atrophy, presence of senile plaques, neurofibrillary tangles, inflammatory process and neuronal loss are observed in the brain of the patients with AD. The progression of the disease symptoms is associated with structural changes in cholinergic synapses in certain brain regions and consequent impairment of cholinergic neurotransmission. The various interconnected pathological events contribute for the progression of the disease and drive several studies in the search for multitarget treatments based on the multifactorial process of AD. Therefore, this work describes the synthesis of *dual binding site* tacrine-donepezil hybrids, with the potential to act in two therapeutics targets by: (i) inhibition of the acetylcholinesterase in both peripheral and active sites, as demonstrated in molecular modeling studies, and (ii) the peptide Aβ neurotoxic aggregation induced by acetylcholinesterase, in an attempt to stop the progression of the disease. The synthetic strategy was based on the condensation between 5,6-dimethoxy-indanone and the 4-piperidinyl carbaldehyde core, which afforded the 5,6-dimethoxy-indanone-4-piperidinyl-methylene-1-[(4-chloroquinolin-2-yl)methyl] intermediate, followed by the reduction of the olefinic bond, formed in the previous condensation, and substitution of the chloro-quinoline atom by amine group to give the final product, or keeping the olefin function, followed by replacement of the chloro-quinoline atom by azide or amine to produce five structural related hybrids. The hybrids were tested in acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase inhibition assays using Ellman method, and the unsaturated hybrid containing the amino-quinoline function was the most active of the series with IC_{50} in a nanomolar range (0,014 μM). The ability of the hybrids to inhibit protein Aβ neurotoxic aggregation will be assessed by thioflavin T method. In addition, the blood brain and intestinal barrier permeation by PAMPA methodology were also predicted.

Key words: acetylcholinesterase, dual binding site, amyloid peptide, Alzheimer disease.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estruturas dos fármacos donepezila, tacrina, rivastigmina, galantamina, e memantina. 03

Figura 2. A PPA é alternativamente clivada por ambas, (A) α secretase, resultando em fragmentos não amiloidogênicos ou (B) pela β-secretase, liberando o fragmento neurotóxico Aβ pela adicional clivagem por γ secretase. 05

Figura 3. Clivagem da proteína integral de membrana PPA pelas secretases, formação do peptídeo Aβ, oligômeros, fibrilas e a placa amiloide no espaço interneural. 06

Figura 4. Processo de formação dos emaranhados neurofibrilares, a partir da hiperfosforilação da proteína Tau, desligamento e despolimerização do microtúbulo. 07

Figura 5. Inibidor de BACE-1 MK 8931 em fase clínica II/III. 11

Figura 6. Estrutura do azul de metileno (Rember®), inibidor de agregação da Tau, e do tideglusib (NP12), inibidor de GSK-3β. 14

Figura 7. Formação do complexo Aβ-AChE, induzida via sítio periférico da enzima atuando como um ponto de nucleação e elongação das fibrilas. 17

Figura 8. Estrutura do propídio, capaz de bloquear a interação entre peptídeo Aβ e a AChE. 18

Figura 9. Inibidores do sítio periférico de AChE. 19

Figura 10. Inibidores de AChE *dual binding site* (**V-XI**). 21

Figura 11. Estratégia de hibridação molecular, envolvendo os fármacos donepezila (**1**) e tacrina (**2**) para obtenção do híbrido **3**, capaz de interagir nos sítios ativo e periférico da AChE como *dual binding site.* 24

Figura 12. **A-** Sobreposição de tacrina (**1**), em rosa e híbrido **3**, em verde; **B-** Sobreposição de donepezila (**2**), em amarelo, e híbrido **3**, em verde, nos sítios ativo e periférico da enzima AChE, relacionados aos complexos PDB 1ACJ para tacrina e 1EVE para donepezila, obtidos a partir de estudos de docking. 25

Figura 13. Formação de metabólitos reativos da tacrina. Fonte adaptado PATOCKA et al., 2008. 26

Figura 14. Representação da simetria dos hidrogênios axiais e equatoriais do anel piperidínico. 36

Figura 15. Estrutura numerada do composto **4**. 41

Figura 16. Estrutura numerada do composto **13** 45

Figura 17. Estrutura numerada do composto **20**. 49

Figura 18. Estrutura numerada do composto **25**. 54

Figura 19: Compostos submetidos ao ensaio de Ellman. 59

Figure 20. PAMPA-BBB teste mostrando as placas doadora e aceptora como um "sanduíche". 69

Figura 21: Híbridos donepezila-tacrina **13**, **20, 21** e **25.** 69

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Atividade biológica das substâncias *dual binding site* (**V-X e XI**). 22

Tabela 2. Resultados obtidos no estudo das condições reacionais para obtenção do composto **8.** 34

Tabela 3. Tentativas de oxidação de Swern exploradas sem sucesso. 39

Tabela 4. Tentativas de condensação entre a indanona **12** e o aldeído **18** para obtenção do composto **19**. 43

Tabela 5. Resultados dos ensaios de Ellman por microplaca, realizado para os precursores, intermediários e os fármacos de referência tacrina e donepezila, em porcentagem de inibição na concentração de 10 μmol.L^{-1}, bem como os IC_{50}, envolvendo as enzimas AChE e BuChE. 60

Tabela 6. Resultados de IC_{50} para AChE e BuChE dos híbridos do tipo tacrina-donepezila descritos na literatura (**V-VII, XII** e **XIII**), donepezila (**1**), tacrina (**2**) e dos compostos **21** e **25**. 65

Tabela 7. Permeabilidade (*Pe* 10^{-6} cm s^{-1}) no ensaio PAMPA-BBB de 10 fármacos comerciais (utilizados na validação do experimento) e dos híbridos **13**, **20, 21** e **25** com sua predição de permeação pelo SNC.[a] 71

Tabela 8. Permeabilidade (*Pe* 10^{-6} cm s^{-1}) no ensaio PAMPA e fração absorvida de 11 fármacos comercias e os compostos **25**, **21** e donepezila (**1**). 74

LISTA DE ESQUEMAS

Esquema 1. Proposta sintética para obtenção do aldeído **8**. 29

Esquema 2. Proposta sintética para obtenção do aldeído **4**. 29

Esquema 3: Estratégia sintética para obtenção do híbrido **3** 30

Esquema 4. a) Reação de ciclização realizada para obtenção do composto **6**; b) Reação de ciclização realizada por Engen e colaboradores (2010). 31

Esquema 5. Reação de substituição do cloro do composto 2-metil-4-cloroquinolina (**6**) pelo grupo azido e obtenção do composto 2-metil-4-azidoquinolina (**7**). 32

Esquema 6. Tentativa de oxidação da metila utilizando dióxido de selênio. 33

Esquema 7. Oxidação da metila utilizando dióxido de selênio e TBHP. 33

Esquema 8. Mecanismo envolvendo TBHP na formação de um complexo possibilitando a oxidação de metila em sistema *N*-heteroaromático, sugerido por Tagawa e colaboradores (2003). 33

Esquema 9. Reação de oxidação da metila alfa a nitrogênio quinolínico do composto **6**, com SeO_2 e reagente auxiliar hidroperóxido de *terc*-butila (TBHP) para obtenção de **16**. 35

Esquema 10. Esquema de obtenção do intermediário 4-piperidinil-álcool-1-[(4-azidoquinolin-2-il)metil] (**11**). 36

Esquema 11. Reação de aminação redutiva entre o álcool **10** e o aldeído **16** com o agente redutor $NaBH(OAc)_3$ em DCE. 37

Esquema 12. Reação de substituição de cloro do composto **17** por azido para obtenção do composto **11**. 37

Esquema 13. Tentativa de obtenção do aldeído **4**, via oxidação de Swern do intermediário álcool **11**. 38

Esquema 14. Tentativa de oxidação do álcool **17** ao correspondente aldeído **18**. 39

Esquema 15. Reação de oxidação do álcool **17** ao aldeído **18**, empregando como reagente oxidante DMP 39

Esquema 16. Mecanismo geral da reação de oxidação utilizando a periodinana de Dess- Martin 40

Esquema 17. Obtenção do intermediário aldeído com azido na posição C-4 de quinolina. 41

Esquema 18. Tentativa de síntese do intermediário **19**. 42

Esquema 19. Reação de condensação entre a indanona **12** e o aldeído **18**. 43

Esquema 20. Reação de condensação tipo aldol entre o aldeído **4** e o enolato de indanona **12** formado na presença de etóxido de sódio. 44

Esquema 21. Reação de substituição do átomo de cloro por azido do composto **19** para obtenção de **13**. 46

Esquema 22. Redução catalítica do intermediário **21** para síntese do fármaco donepezila (**1**) descrita por Sugimoto e colaboradores (1992). 47

Esquema 23. Tentativa de redução da dupla alfa carbonila do composto **19** via hidrogenação catalítica paládio carbono (10%). 47

Esquema 24. Mecanismo proposto para redução de carbonilas por $NaBH_4$, evidenciando a etapa inicial de complexação com o Na^+. 48

Esquema 25. Redução da dupla alfa carbonila do composto **19** com o auxílo de $NaBH_4$ em piridina. 48

Esquema 26. Reação de substituição do átomo de cloro do intermediário **20** pelo grupo azido para obtenção do composto **22**. 50

Esquema 27. Reação de aminação catalisada por cobre, realizada por Xu e Wolf (2009). 50

Esquema 28: Tentativa de aminação do intermediário **17** para obtenção de **23**, e padronização do método. 51

Esquema 29. Reação de aminação direta utilizando fenol e amônia gasosa realizada por Perez e colaboradores (2012). 51

Esquema 30. Reação de aminação do intermediário **17** para padronização do método. 51

Esquema 31. Tentativa de aminação direta do intermediário **20** para obtenção do híbrido **3**. 52

Esquema 32. Mecanismo reacional da aminação de Buchwald-Hartwing. 53

Esquema 33. Reação teste de aminação para conversão de cloro-quinolina **6** a amino-quinolina **24**. 53

Esquema 34. Reação de obtenção do intermediário amino **25**. 54

Esquema 35. Reação de aminação do composto **20** para obtenção do híbrido **3**. 56

Esquema 36. Síntese do intermediário **21**, primeiro produto da síntese de donepezila (**1**). 57

Esquema 37. Redução da dupla exocíclica do intermediário **21** para obtenção de donepezila (**1**). 57

Esquema 38. Hidrólise da acetiltiocolina e reação de Ellman. 58

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Aβ – peptídeo beta-amiloide

ACh – acetilcolina

AChE – acetilcolinesterase

AChEI – inibidor de acetilcolinesterase

AChT– acetiltransferase

ApoE – apolipoproteína E

PPA – proteína precursora do amiloide

BACE1 – enzima 1 de clivagem do sítio-β da PPA

BuChE – butirilcolinesterase

CAS – Catalytic Anionic Site

CCD – cromatografia em camada delgada

CCDP – cromatografia em camada delgada preparativa

CLAE – cromatografia líquida de alta eficiência

CNS – central nervous system

COSY – Correlation spectroscopy

DA – doença de Alzheimer

DMP – Dess-Martin periodinane

DTNB – ácido 5,5'-ditiobis-(2-nitrobenzóico)

FHP– Filamentos Helicoidais Pareados

HMBC – Heteronuclear multiple-bond correlation spectroscopy

HRMS (ESI) – high resolution mass spectroscopy (eletron spray ionization)

HSQC – Heteronuclear single-quantum correlation spectroscopy

MAP– Microtubule Associated Proteins

NMDAR –N- methyl-D-aspartate receptor

NMP – N-Metilpirrolidona

PAMPA-BBB – parallel artificial membrane permeability assay-blood brain barrier

PAS – Peripheral Anionic Site

PDB – Protein Data Bank

PS-1 – presenilina 1

PS-2 – presenilina 2

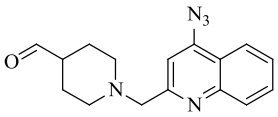
STD-NMR – saturation transfer difference- Nuclear magnetic resonace

TBHP – hidroperóxido de terc-butila

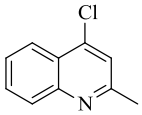
TcAChE – acetilcolinesterase *Torpedo californica*

trNOESY – two-dimensional transferred nuclear Overhauser effect spectroscopy

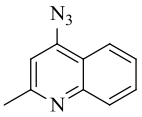
LISTA DE SUBSTÂNCIAS SINTETIZADAS DURANTE O DESENVOLVIMENTO DO TRABALHO



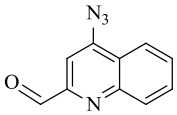
4



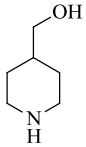
6



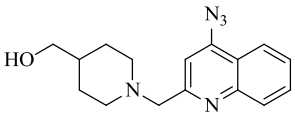
7



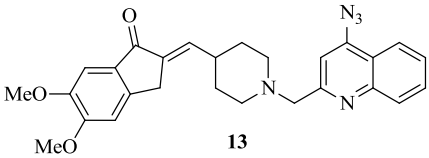
8



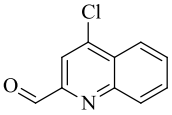
10



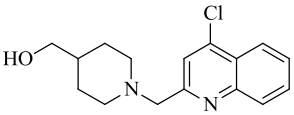
11



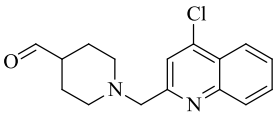
13



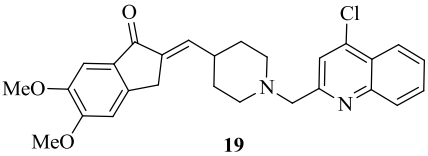
16



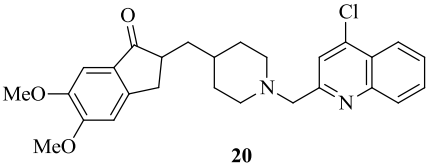
17



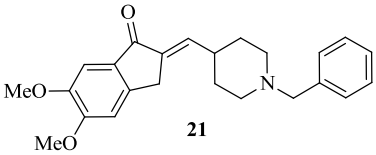
18



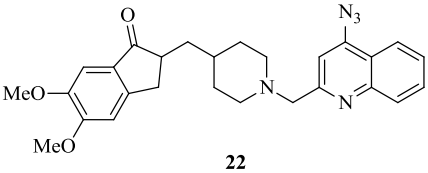
19



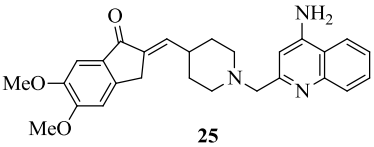
20



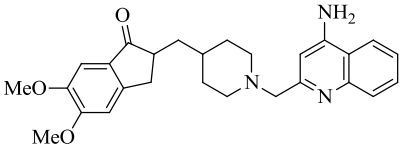
21



22



25



híbrido **3**

SUMÁRIO

Resumo i
Abstract ii
Lista de figuras iii
Lista de tabelas v
Lista de esquemas vi
Lista de abreviaturas e siglas ix
Lista de substâncias sintetizadas durante o desenvolvimeto do trabalho xi

1. INTRODUÇÃO 1
1.1 Doença de Alzheimer 1
1.2 Principais processos patológicos envolvidos na doença de Alzheimer 4
1.2.1 Placas amiloides 4
1.2.2 Emaranhados neurofibrilares 6
1.2.3 Déficit colinérgico 8
1.2.4 Processo neuroinflamatório 8
1.2.5 Genética 9
1.3 Alvos terapêuticos explorados para tratamento da doença de Alzheimer 10
1.3.1 Peptídeo Aβ 10
1.3.2 Proteína Tau 12
1.3.3 Neuroinflamação 14
1.3.4 Colinesterases 15
1.4. Justificativa para síntese do novo híbrido tacrina-donepezila 23
2. OBJETIVOS 28
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO 29
3.1 Planejamento de síntese 29
3.2 Síntese do híbrido 3 30
3.2.1 – Síntese do 4-azido-2-quinolinacarboxaldeído (8) 30
3.2.2 Síntese do intermediário 4-piperidinilálcool-1-[(4-azidoquinolin-2-il)metil] (11) 35
3.2.3 Síntese do intermediário 4-piperidinilaldeído-1-[(4-azidoquinolin-2-il)metil] (4) 38
3.2.4 Síntese do intermediário 5,6-dimetóxinda-1-ona-4-piperidinil-metileno-1-[(4-azidoquinolin-2-il)metil] (13) 42
3.2.5 Tentativa de síntese do 5,6-dimetóxindan-1-ona-4-piperidinil-metil-1-[(4-azidoquinolin-2-il)metil] (22) 46
3.2.6 Síntese do 5,6-dimetoxindan-1-ona-4-piperidinil-metileno-1-[(4-aminoquinolin-2-il)metil] (25) 50

3.2.7 Síntese do 5,6-dimetóxindan-1-ona-4-piperidinil-metil-1-[(4-aminoquinolin-2-il)metil] (híbrido 3) 55
3.2.8. Síntese de donepezila (1) 56
3.3. Ensaios Biológicos 58
3.3.1 Ensaio de inibição de colinesterases (Ensaio de Ellman) 58
3.3.2 Ensaio de competitivade AChE e BuChE - Mecanismo de ação 61
3.3.3 Estudos de relação estrutura x atividade de híbridos tacrina-donepezila e o composto 2564
3.3.4 Testes in vitro de permeção- Parallel artificial membrane permeability assay 68
4. MATERIAL 75
4.1 Aparelhagem analítica 75
4.2 Aparelhagem laboratorial 75
4.3 Solventes, reagentes e outros materiais 75
5. MÉTODOS 76
5.1 Síntese 76
5.2 Ensaios Biológicos 93
5.2.1 Ensaio de Ellman 93
5.2.2 Teste in vitro de permeação para o sistema nervoso central (SNC)- Parallel artificial membrane permeability assay (PAMPA) barreira hematoencefálica 93
5.2.3 Teste in vitro de permeação intestinal- Parallel artificial membrane permeability assay (PAMPA) absorção oral 94
6. CONCLUSÃO 96
7. REFERÊNCIAS 98
8. APÊNDICES 109

1. INTRODUÇÃO

1.1 DOENÇA DE ALZHEIMER

Descrita primeiramente pelo neuropatologista alemão Alois Alzheimer em 1906, como "Eine eigenartige Erkrankung der Hirnrinde"- **"**Uma doença peculiar dos neurônios do córtex cerebral", a doença de Alzheimer (DA) é a forma mais comum de demência, representando cerca de 80% dos casos. Caracterizada como um processo de declínio progressivo e irreversível das funções cognitivas que se estende para desorganização do comportamento e sintomas psicóticos. Em geral, a DA de acometimento tardio, de incidência ao redor dos 60 anos de idade, ocorre de forma esporádica, enquanto a DA de acometimento precoce, de incidência ao redor de 40 anos, mostra recorrência familiar. O quadro é insidioso e, frequentemente, antecipado por comprometimento cognitivo leve, uma condição considerada, por vários autores, como pré-demência (SMITH, 1999; COELHO et al., 2009; ALZHEIMER´S ASSOCIATION, 2015).

Inicialmente, o paciente apresenta maior comprometimento da memória recente e, com a evolução do quadro clínico, ocorrem distúrbios de memória semântica, dificuldade de nomeação e de elaboração da linguagem, déficits de atenção, prejuízos nas habilidades visuoespaciais e nas funções executivas. Estes déficits cognitivos prejudicam o paciente em suas atividades diárias, na convivência familiar, bem como no desempenho social e ocupacional, dependendo completamente de cuidadores com o avanço da doença (COELHO et al., 2009).

Segundo o World Alzheimer Report (2015), foi estimado 9,9 milhões de novos casos de demência em todo o mundo, ou seja, um novo caso a cada três segundos. Atualmente 46,8 milhões de pessoas vivem com a doença, e de acordo com as projeções esse número dobrará a cada 20 anos, e em 2050 serão 131,5 milhões de acometidos. O custo mundial gerado pela demência em 2015 foi de cerca de 818 bilhões de dólares.

No Brasil, há cerca de 1,2 milhão de casos e a prevalência de demência entre 60 e 65 anos de idade é de 7%, sendo que, mais da metade desses casos apresentam a DA. A Organização Mundial da Saúde estima que daqui a 20 anos, as doenças mentais e neurológicas constituirão a segunda causa de morte no mundo, principalmente pelo aumento da expectativa de vida (PERRONI, 2007; ABRAZ, 2015).

Embora vários fatores tenham sido implicados na DA, sua etiologia não é completamente conhecida. Do ponto de vista neuropatológico, é observado no cérebro de

indivíduos com DA atrofia cortical difusa, a presença de grande número de placas senis e emaranhados neurofibrilares.

As placas senis são encontradas nos espaços extracelulares, na região de sinapse e são formadas devido à agregação do peptídeo β-amiloide (Aβ). Os emaranhados neurofibrilares estão presentes intracelularmente e se formam devido à agregação da proteína Tau, envolvida com a estabilização do citoesqueleto do neurônio. Esses dois fatores culminam com degenerações grânulo-vacuolares e perda neuronal (SILVA et al., 2014).

Transtornos da transmissão da acetilcolina (ACh) e acetiltransferases ocorrem nos indivíduos afetados por DA, a ACh é um neurotransmissor envolvido no aprendizado e memória. A progressão dos sintomas da doença está associada a mudanças estruturais nas sinapses colinérgicas em certas regiões do cérebro, como o córtex e o hipocampo, os quais apresentam neurotransmissão colinérgica reduzida (SMITH, 1999; SILVA et al., 2006).

Adicionalmente, outros fatores etiológicos para a DA vem sendo estudados como o processo inflamatório, estresse oxidativo, herança genética, e a apolipoproteína E (ApoE) como fator de risco no desenvolvimento da doença (SILVA et al., 2014).

Com vários eventos patológicos interligados que contribuem para o avanço da doença, durante as últimas décadas, ficou estabelecido por diversas pesquisas que a doença de Alzheimer é um processo multifatorial (TELL & HILGEROTH, 2013).

Os tratamentos atuais da DA aprovados pelo FDA (Food and Drug Administration) são focados no aumento da transmissão colinérgica no cérebro pela inibição das colinesterases, empregando os fármacos tacrina, donepezila, rivastigmina e galantamina (**Figura 1)**.

Tacrina (Cognex®) foi um dos primeiros fármacos introduzidos na terapêutica como inibidor reversível e não seletivo de acetilcolinesterase (AChE), uma vez que apresentou capacidade de também inibir a enzima butirilcolinesterase (BuChE). Mas, o uso de tacrina no tratamento da doença foi prejudicado devido a alta dose diária (120-160 mg) e ao aparecimento de efeitos hepatotóxicos.

Por outro lado, donepezila (Aricept®) atua como inibidor reversível e, ao contrário de tacrina, é seletivo junto à inibição de AChE e requer a utilização diária de 5-10 mg. Os seus efeitos adversos são de natureza, principalmente, gastrointestinal (REICHMAN et al., 2003).

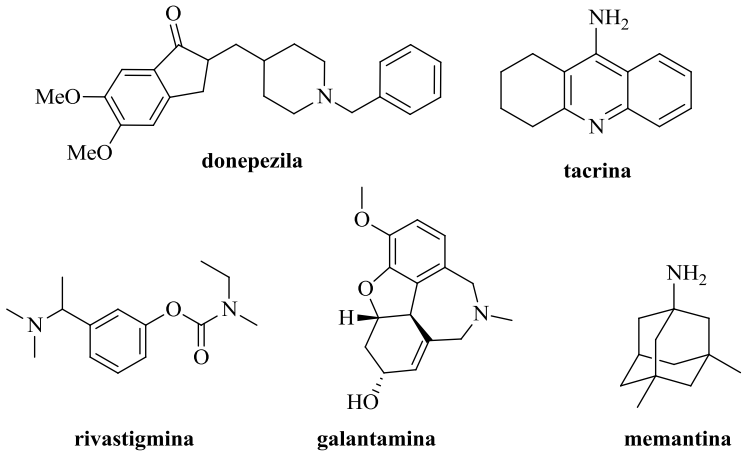


Figura 1. Estruturas dos fármacos donepezila, tacrina, rivastigmina, galantamina, e memantina.

A galantamina (Razadyne®) alcalóide isolado da espécie *Galanthus nivalis* (Amaryllidaceae), apresenta um mecanismo de inibição duplo no sistema colinérgico, inibindo a AChE e modulando alostéricamente a atividade do receptor nicotínico (nAChR), como agonista. A galantamina apresenta 53 vezes mais seletividade pela AChE humana quando comparada a BuChE. A relação estrutura atividade revela que o grupo hidroxil da galantamina contribui para sua interação na AChE (NG et al., 2015). Efeitos adversos incluem náusea, vômito, perda de apetite e aumento na frequência dos movimentos peristálticos intestinais (ALZHEIMER´S ASSOCIATION, 2015).

A Rivastigmina (Exelon®) quimicamente classificado como fenilcarbamato, é outro fármaco utilizado na terapêutica e tem ação inibitória para ambas as colinesterases AChE e BuChE. Apresenta efeitos adversos como os de galantamina.

Outra classe de fármaco aprovada pelo FDA atua bloqueando o receptor de *N*- metil-D-aspartato (NMDAR). Na DA, o excesso de glutamato (um importante neurotransmissor relacionado ao aprendizado e memória) liberado em células danificadas, causa um alto influxo de cálcio para dentro dos neurônios via ativação NMDAR, o que resulta em excitotoxicidade, levando a morte neuronal. Memantina (Nameda®) (**Figura 1**), um agente neuroprotetor que bloqueia NMDAR, foi aprovado em 2003 para o tratamento de Alzheimer de leve a moderada. Memantina pode ser administrada sozinha ou em combinação com inibidores de AChE como o fármaco donepezila (NG et al., 2015). Os principais efeitos colaterais são dor de cabeça, constipação, confusão mental e tontura (ALZHEIMER´S ASSOCIATION, 2015).

No entanto, a experiência clínica tem revelado que esses inibidores podem ser apenas paliativos, pois não abordam a etiologia complexa da DA.

1.2 PRINCIPAIS PROCESSOS PATOLÓGICOS ENVOLVIDOS NA DOENÇA DE ALZHEIMER

1.2.1 Placas amiloides

Um dos processos patológicos mais descritos que está envolvido na DA é o da "hipótese da cascata amiloide", relacionado ao peptídeo Aβ. Muitos pesquisadores acreditam que a produção defeituosa, degradação, e *clearance* do peptídeo Aβ são as causas primárias da DA.

Os eventos da cascata amiloide incluem a superprodução da proteína precursora do amiloide (PPA), além do mau funcionamento das proteases de degradação-Aβ. PPA é uma glicoproteína integral tipo 1 de membrana, com domínio *N*-terminal extracelular, um simples domínio transmembrana e uma cauda citoplasmática curta, encontrada preferencialmente nas terminações nervosas. O desequilíbrio entre a produção e *clearance* no processamento da PPA, resulta em excesso de peptídeo Aβ, o qual está relacionado com o desencadeamento patológico, como a redução de sinapses, perda de neurônios, prejuízo no uso da glicose e danos oxidativos (PERNECZKY et al., 2014).

As três enzimas que afetam o processamento da PPA são chamadas secretases (α-, β- e γ-secretases). A PPA pode ser clivada inicialmente em dois sítios, pela α-secretase (via não amiloidogênica) ou β-secretase (via amiloidogênica).

β-Secretase, também conhecida por BACE-1, é uma aspartil protease transmembrana, enzima de clivagem do sítio-β da PPA, localizada nos terminais sinápticos. Estudos indicam que esta β-clivagem é o passo limitante de processamento da PPA e produção do peptídeo Aβ, e sua relevância na DA é evidenciada pelo aumento na expressão e atividade no tecido cerebral de indivíduos com Alzheimer. A γ-secretase é um atípico complexo aspartil protease composto por proteínas individuais (presenilina nicastrina, APH-1, PEN-2, PS-1 e PS-2). Há um consenso de que PS-1 e PS-2 estão intrinsecamente relacionadas com o processamento amiloidogênico de PPA, ao formar a subunidade catalítica da enzima (PERNECZKY et al., 2014; SILVA et al., 2014).

Na via não amiloidogênica, a α-secretase cliva a PPA gerando o fragmento C-terminal (C83) e o fragmento sPPAα, posteriormente o fragmento C83 é clivado pela γ-secretase liberando os fragmentos não tóxicos p3 e C59. No processamento amiloidogênico, a β-secretase após clivar a PPA libera o fragmento sPPAβ, e há formação do fragmento C-terminal (C99) o qual é clivado pela γ-secretase resultando no peptído $A\beta_{40/42}$ e um fragmento

intracelular C59. O fragmento Aβ40 é o mais frequente, no entanto, o Aβ42 é o que apresenta maior propensão de agregação, sendo o mais encontrado nas placas amiloides (**Figura 2**).

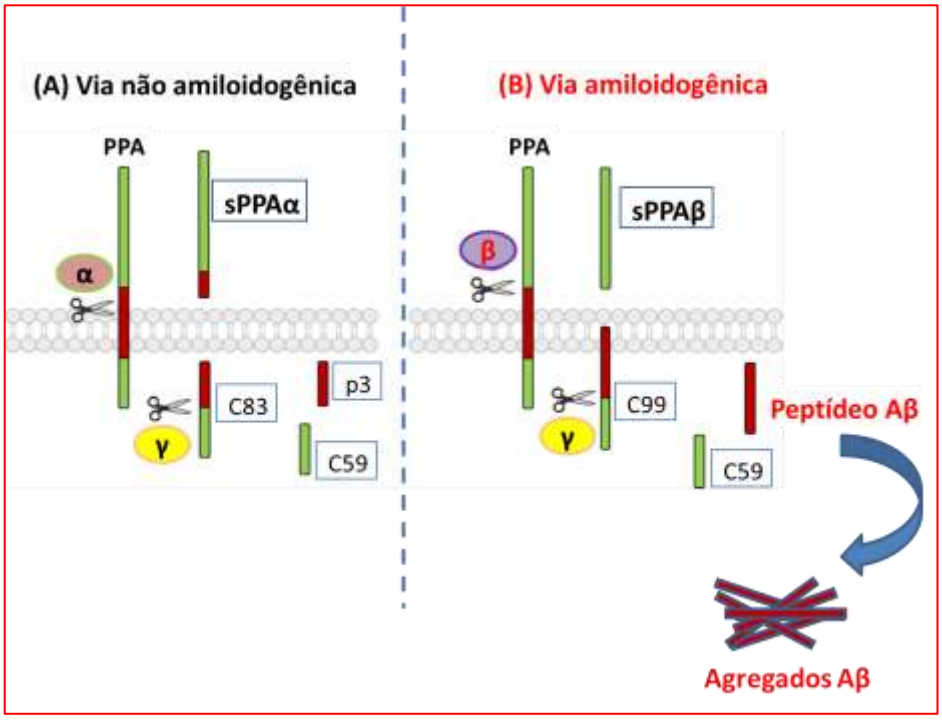


Figura 2. A PPA é alternativamente clivada por ambas, (A) α secretase, resultando em fragmentos não amiloidogênicos ou (B) pela β-secretase, liberando o fragmento neurotóxico Aβ pela adicional clivagem por γ secretase.
Fonte Adaptado de: SILVA et al., Alzheimer's disease, enzyme targets and drug Discovery struggles: From natural products to drug prototypes, Ageing Research Reviews, p.116-145, copyright (2014), com a permissão de Elsevier.

Uma vez formado os peptídeos Aβ, em um processo patológico inicia-se o processo de agregação, dando origem aos agregados chamados oligômeros. Em continuidade a esses agregados são formadas as fibrilas, que consequentemente levam aos entrelaçados de fibrilas formando as chamadas folhas-beta. No estágio final, as folhas-beta se agregam dando origem às placas amiloides (**Figura 3**) (ALZHEIMER´S ASSOCIATION, 2015).

Atualmente, os oligômeros são considerados a forma mais prejudicial e tóxica do peptídeo Aβ, ao invés das placas amiloides. Os pequenos agregados bloqueiam a sinalização entre as células nas sinapses, e ainda podem ativar as células do sistema imune que ativam o processo inflamatório local. A toxicidade celular associada com a agregação de fibrilas provê uma explicação para a perda neuronal encontrada nos pacientes (LUO et al., 2011;).

As razões para a toxicidade diferencial entre oligômeros de Aβ e as fibrilas podem ser explicadas pelo arranjo estrutural. Nos oligômeros a superfície hidrofóbica está exposta em folhas β enquanto nas fibrilas estão encobertas internamente nas pilhas de fibrilas. Os oligômeros são menores em tamanho e, por esta razão, podem difundir-se facilmente nos

tecidos quando comparados às longas fibrilas, além disso, os oligômeros são altamente instáveis e desordenados ao contrário das fibrilas (VERMA et al., 2015).

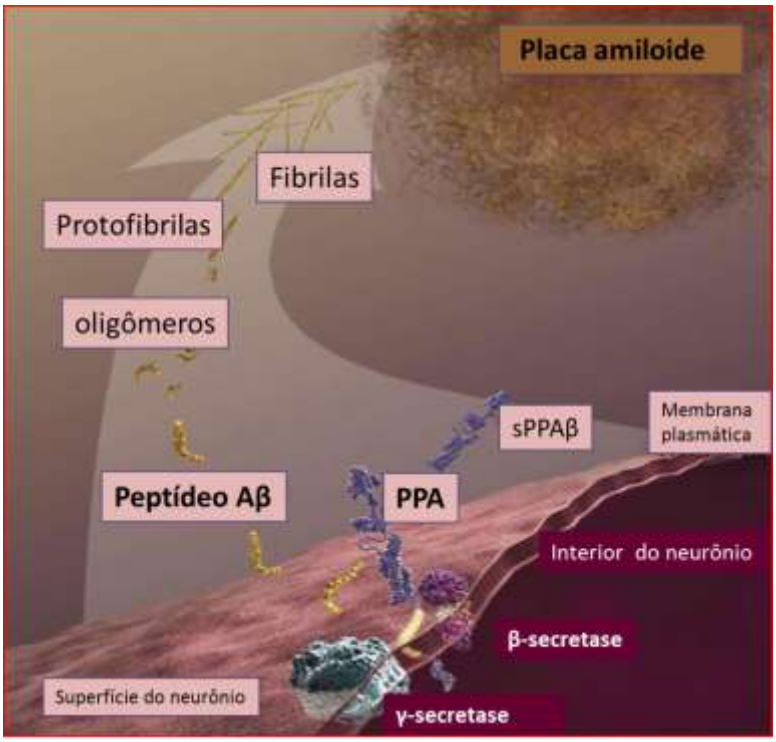


Figura 3. Clivagem da proteína integral de membrana PPA pelas secretases, formação do peptídeo Aβ, oligômeros, fibrilas e a placa amiloide no espaço interneural.
Adaptado Fonte: www.nia.nih.gov/alzheimer

1.2.2 Emaranhados neurofibrilares

A proteína Tau pertence à família de proteínas associadas aos microtúbulos (MAP, do inglês *microtubule-associated proteins*), cuja associação é fundamental na polimerização, estabilização e modulação dos microtúbulos (NAINI & SOUSSI-YANICOSTAS, 2015).

Os microtúbulos, formados pela proteína tubulina (α e β tubulina), juntamente com os neurofilamentos e microfilamentos, são os maiores constituintes do citoesqueleto neural, os quais fazem parte da sustentação estrutural celular e ainda realizam o transporte axonal de organelas, de nutrientes, de vesículas com neurotransmissores, e outros sinalizadores celulares, para manutenção da viabilidade celular (NAINI & SOUSSI-YANICOSTAS, 2015).
A proteína Tau pode se encontrada na forma solúvel ou insolúvel, sendo que a forma insolúvel ocorre quando a proteína está hiperfosforilada e se agrega formando filamentos helicoidais pareados (FHP), principal constituinte encontrado nos emaranhados neurofibrilares (**Figura 4**). A degeneração neurofibrilar associada à hiperfosforilação anormal

da proteína Tau não ocorre apenas em cérebros com a DA, mas é também observado em outras doenças neurodegenerativas, denominadas taupatias, como a demência fronto-temporal com Parkinson, degeneração corticobasal, demência pugilística, dentre outras (PAULA et al., 2009; IQBAL et al., 2010).

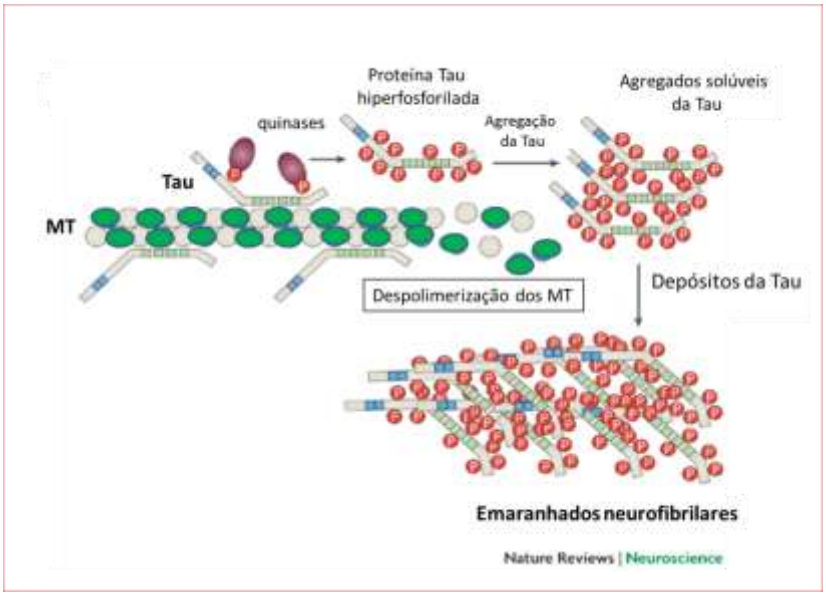


Figura 4. Processo de formação dos emaranhados neurofibrilares, a partir da hiperfosforilação da proteína Tau, desligamento e despolimerização do microtúbulo.
Fonte: Adaptado com a permissão de Macmillan Publishers LTd: Nat. Rev. Neurosci. GOTZ & ITTNER, Animal models of Alzheimer's disease and frontotemporal dementia, v.9, p.532-544, copyright (2008).

Quando a proteína Tau encontra-se no estado de hiperfosforilação, há impedimento da ligação com a tubulina, culminando na instabilização da estrutura dos microtúbulos e, consequentemente, do citoesqueleto celular. A hiperfosforilação da proteína Tau pode ser o resultado ou a combinação do aumento da atividade das tauquinases ou da subsensibilização das suas fosfatases, de modo que a hiperfosforilação da Tau é considerada o ponto de partida para a perda funcional e o colapso da estrutura microtubular (PAULA et al., 2009).

Consequentemente os emaranhados neurofibrilares destroem o transporte vital na célula neural realizado pelo citoesqueleto, além de destruir também a arquitetura celular, uma vez que os microtúbulos não conseguem se manter ordenados e se desintegram. Desta forma, como os nutrientes e outros suplementos essenciais não podem mais se mover através das células, ocorre morte neuronal (ALZHEIMER´S ASSOCIATION, 2015).

1.2.3 Déficit colinérgico

O sistema colinérgico é o primeiro sistema de neurotransmissores responsáveis pela disfunção cognitiva e da memória no envelhecimento normal e na DA. Assim a estratégia de aumentar os níveis de acetilcolina na fenda sináptica, a chamada hipótese hipocolinérgica, levou ao desenvolvimento de farmácos capazes de inibir a hidrólise da acetilcolina (MARTORANA et al., 2010; WEINREB et al., 2015). Atualmente a hipótese hipocolinérgica é reforçada pelo uso desses inibidores aprovados pelo FDA (donepezila, rivastigmina e galantamina), que demonstram melhorar os aspectos de cognição e memória dos pacientes com DA.

Os principais componentes envolvidos na transmissão colinérgica são: (1) o neurotransmissor acetilcolina (ACh); (2) acetilcolinesterase (AChE); (3); acetiltransferase (AChT), enzima que sintetiza a ACh e (4) receptores de ACh, especificadamente o receptor nicotínico (nAChR) e receptor muscarínico (mAChR). Pesquisas anteriores sobre envelhecimento e DA, baseados na administração de fármacos anticolinérgicos e pró-colinérgicos, e indução de lesões em certas regiões do cérebro de modelos animais, evidenciaram o grande envolvimento do sistema colinérgico no declínio cognitivo relacionado à idade. A partir desses estudos, novas pesquisas vêm estabelecendo uma forte relação entre prejuízo cognitivo e o sistema colinérgico do prosencéfalo basal (BAXTER & CHIBA, 1999; PAUL et al., 2015).

Outros estudos mostraram que camundongos transgênicos que superexpressam os genes da proteína presenilina (PS) (relacionada com a porção catalítica da γ-secretase) e PPA, apresentam distrofia colinérgica e redução na atividade da enzima AChT no córtex e no hipocampo, implicando na diminuição da função colinérgica. No entanto, não houveram mudanças significativas nos neurônios colinérgicos do prosencéfalo basal dos animais transgênicos (PEREZ et al., 2007; ZABORSZKYY et al., 2012).

1.2.4 Processo neuroinflamatório

Além dos mecanismos fisiopatológicos mencionados acima como, déficit colinérgico, depósito de peptídeo Aβ e hiperfosforilação da Tau, atualmente há também evidências do desencadeamento de processo inflamatório no tecido neuronal dos pacientes com DA. A

neuroinflamação em vários estágios da doença, bem como a ativação do sistema imune e de algumas células na estimulação da via inflamatória no sistema nervoso central (SNC), já foi reportada (AKIYAMA et al., 2000; HENEKA & O'BANION, 2007; GIUNTA et al., 2008; ROCHA-GONZÁLEZ et al., 2008).

O processo inflamatório na patogênese da DA é caracterizado pela produção anormal pelas células da glia, de citocinas pró-inflamatórias, quimiocinas, ativação do sistema complemento, bem como a formação de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio, que podem interromper a sinapse, levando a perda de memória, culminando com a morte neuronal associada aos últimos estágios da DA. Além disso, evidências de análise *post-mortem* confirmam a presença de microglia ativada e astrócitos reativos em torno dos depósitos de amiloide. Assim, também é interessante o uso de estratégias terapêuticas que possam direcionar o controle da ativação da micróglia, astrócitos e do excesso na produção de fatores pró-inflamatórios e pró-oxidantes no controle do processo de neurodegeneração (AGOSTINHO et al., 2010; CHOI et al., 2013).

1.2.5 Genética

Os genes relacionados à DA estão classificados em duas categorias, os genes determinantes e os de risco.

Indivíduos precocemente acometidos pela DA, antes dos 60 anos por exemplo, aos 30 ou 40 anos, mostraram recorrência familiar caracterizada por mutações nos genes da *PPA*, *presenilina-1* e *2* (*PS-1* e *PS-2*), esses casos são chamados de "doença de Alzheimer autossômica dominate (ADAD)" ou "doença de Alzheimer familiar". Variações de Alzheimer determinantes foram encontradas somente em poucas centenas de famílias no mundo todo. Os casos de Alzheimer familiar correspondem a menos de 5 % dos casos (ALZHEIMER´S ASSOCIATION, 2015).

Mutações nos genes (*PPA*, *PS-1* e *PS-2*), são relevantes na DA porque todos eles afetam o processamento da PPA e a produção de Aβ. Mutações do gene da *PPA* no cromossomo 21 também aumentam os níveis totais de produção de Aβ. Mutações do gene *PS-1* (no cromossomo 14) e em menor proporção no gene *PS-2* (no cromossomo 1) resultam em aumento na produção de Aβ42. Um aspecto importante sobre o peptídeo Aβ na etiologia da doença é que na Síndrome de Down (SD, trissomia do cromossomo 21) a cópia extra do cromossomo 21 provoca um aumento da expressão de PPA e, por conseguinte aumento nos níveis de Aβ, o que acarreta uma elevação no depósito de placas amiloides em alguns indivíduos com SD (FINDEIS, 2007).

A apolipoproteína E (apoE) participa do transporte e metabolismo de lipídios, particularmente do colesterol e está presente em vários órgãos como fígado e cérebro. No sistema nervoso é produzido pelas células da glia, astrócitos e macrófagos. Estudos recentes demonstraram como fator de risco a presença do alelo *ε4* do gene *apoE*, o qual apresentou relação com a DA em vários estudos independentes, correspondendo entre 20 a 25% dos casos de Alzheimer. O gene da apoE existe em três alelos polifórmicos *ε2*, *ε3* e *ε4*, e apresentam uma frequência de 8,4%, 77,9% e 13,7%, respectivamente, entretanto, em pacientes com DA a frequência do alelo *ε4* está aumentada consideravelmente para cerca de 40% (LIU et al., 2013; NG et al., 2015).

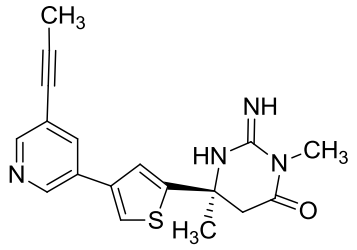
1.3 ALVOS TERAPÊUTICOS EXPLORADOS PARA TRATAMENTO DA DOENÇA DE ALZHEIMER

Nos últimos anos os avanços nas pesquisas levaram ao reconhecimento de vários alvos e vias relacionadas à DA, sendo os principais descritos nesta seção.

1.3.1 Peptídeo Aβ

Como a β-secretase (BACE-1) é uma enzima que inicia a produção de Aβ, ela passou a ser um alvo terapêutico chave para DA. A deleção genética de BACE-1 em camundongos promoveu a redução da produção de Aβ em consequência da redução do processamento de PPA, indicando que a inibição de BACE-1 deva ser eficaz no tratamento da DA. Entretanto, camundongos nulos para BACE-1, exibiram múltiplos fenótipos neurológicos, sugerindo que fármacos inibidores de BACE-1 devam ocasionar efeitos colaterais relacionados a hipomielização, defeitos de orientação dos axônios, déficits de memória, anormalidades na neurogenesis e neurodegeneração (VASSAR, 2014).

Apesar dos desafios no descobrimento de fármacos inibidores de BACE-1, desde sua descoberta há 15 anos, a introdução recente de vários desses inibidores em triagens clínicas tem redirecionado a atenção para essa abordagem terapêutica na DA. Atualmente, o composto da Merck MK-8931 (**Figura 5**) está descrito como o inibidor que está em estágio mais avançado, em fase 2/3, enquanto os inibidores desenvolvidos pela AstraZeneca, Eisai e Pfizer, por exemplo, estão em fase 1 e 2. Estes compostos demonstraram ser potentes uma vez que promovem a redução de aproximadamente 90% de Aβ no fluido cérebro-espinhal. Adicionalmente, essas substâncias foram bem toleradas em sua maioria (VASSAR, 2014).



MK 8931

Figura 5. Inibidor de BACE-1 MK 8931 em fase clínica II/III.

O maior desafio para o desenvolvimento de inibidores da BACE-1 na clínica é a relação nível de inibição suficiente desta enzima *versus* estágio da doença, visando otimizar a eficácia do tratamento. Argumentos hipotéticos baseados na mutação do tipo BACE1+/− em camundongos sugeriram que a inibição de aproximadamente 50% da BACE-1 alcançaria uma redução de cerca de 20% de Aβ, que poderia prevenir a DA, caso comece antes dos depósitos significativos de placas amiloides. É esperado que a janela terapêutica para a dose adequada de inibidor BACE-1 seja estabelecida para que haja a redução nos níveis cerebrais de Aβ, e ainda mantenha a atividade de BACE-1 para controlar o surgimento dos efeitos colaterais (VASSAR, 2014).

Dentre as estratégias anti-amiloide, a imunoterapia vem sendo estudada e considerada como a mais promissora para o tratamento da DA. Em particular, a imunoterapia contra Aβ possibilita o desenvolvimento de anticorpos cujo alvo são porções altamente específicas do peptídeo. Recentes avanços na engenharia de proteínas, bem como a produção de proteínas recombinates, tornaram viáveis as produções de anticorpos específicos para uso terapêutico (LANNFELT et al., 2014).

Apesar da modulação imunológica afetar o processamento de Aβ secundariamente, o foco da maior parte das pesquisas atualmente está baseado na estratégia para imunidade ativa e passiva direcionada para a toxicidade e *clearance* de Aβ. O tempo para o aparecimento e distribuição dos oligômeros e até mesmo das placas amiloides no cérebro não correspondem aos dos sintomas clínicos da DA, sendo que o processo de agregação do peptídeo Aβ pode começar até 20 anos antes da perda cognitiva. Por isso, a remoção das placas pode não ser um alvo adequado para o tratamento dos sintomas da DA, embora ainda pudesse ser um alvo viável para a prevenção. Como dito anteriormente, os agregados solúveis de Aβ, como os oligômeros e protofibrilas, são altamente tóxicos para o cérebro e são os alvos lógicos para a imunoterapia Aβ. Entretanto, estes agregados Aβ solúveis tendem a ter curta duração e baixa abundância sendo, portanto, mais difíceis de caracterizar e direcionar como alvo quando

comparados aos monômeros e fibrilas. Um melhor entendimento sobre esses agregados intermediários Aβ solúveis que contribuem para a patogênese da DA pode ajudar no desenvolvimento de imunoterapias anti-amiloide (LANNFELT et al., 2014).

Várias estratégias de imunoterapias estão atualmente sendo testadas em triagens clínicas, como é o caso do Aducanumab e Gantenerumab (CLINICAL TRIALS; ALZFORUM, 2015; ALZHEIMER ASSOCIATION (Clinical trials), 2015).

Os resultados mais promissores foram do Aducanumab, antigo BIIB037, desenvolvido pela empresa Biogen em Cambridge, Massachusetts. Um anticorpo monoclonal recombinante humano, de alta afinidade contra Aβ, capaz de reconhecer os aminoácidos (3 ao 6) *N*-terminal do peptídeo Aβ, o qual entrou em fase clínica em agosto de 2015. Este anticorpo mostrou benefícios dose dependente em remover Aβ e melhorar a cognição. Os estudos revelam que foi possível reduzir as formas de agregação de Aβ, incluindo oligômeros solúveis e fibrilas insolúveis depositadas na placa amiloide em seis regiões do cérebro: frontal, parietal, temporo lateral, sensorimotor e cingulado anterior e posterior. Acredita-se que o mecanismo pelo qual os anticorpos removam o peptídeo Aβ do cérebro seja via mediação celular por fagocitose ou dissolução direta do peptídeo. Os estudos estão previstos para serem executados até 2022, em 150 centros na América do Norte, Europa, Austrália e Ásia (ALZFORUM, 2015; CLINICAL TRIALS).

1.3.2 Proteína Tau

As pesquisas para tratamento dos emaranhados neurofibrilares focam principalmente o desenvolvimento de agentes capazes de inibirem e/ou reverterem à formação dos FHP e também o desenvolvimento de inibidores de quinases, responsáveis pela hiperfosforilação da Tau.

Um dos mais avançados estudos relacionados à inibição da agregação da Tau, está sendo realizado pela TauRx®. Esta empresa, dirigida pelo Prof. Dr. Claude Wischik (Professor da Universidade de Aberdeen, e o pioneiro na pesquisa sobre a proteína Tau) vem estudando o azul de metileno (Rember®) (**Figura 6**) e tem demonstrado em ensaios clínicos de fase II que este fármaco atua na prevenção e na dissolução dos emaranhados. Novos estudos para melhorar a absorção, biodisponibilidade e tolerabilidade do Rember® deu origem a um novo protótipo, o TRx0237, o qual se encontra em ensaios de fase III. (LANSDALL, 2014).

Outra abordagem terapêutica relevante a fim de evitar a formação dos agregados FHP é o desenvolvimentos de inibidores das tauquinases, responsáveis pelo processo de fosforilação da proteína Tau. As principais quinases responsáveis pelo processo de fosforilação da Tau são: glicogênio sintase quinase 3-beta (glycogen synthase kinase 3 beta, GSK-3β), caseína quinase 1 (casein kinase 1, CK-1) e quinase dependente de ciclina 5 (Cdk5), sendo a primeira amplamente estudada (LANSDALL, 2014).

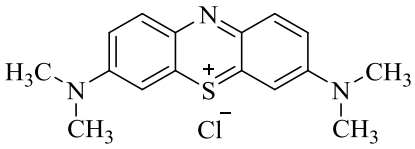
A GSK-3β é uma das isoformas mais abundantes da GSK-3, possui 47 kDa (WOODGETT, 1990) e é composta por 420 aminoácidos. Esta enzima é uma proteína serina-treonina quinase que, em resposta a eventos de sinalização celular, modifica as funções de uma variedade de proteínas por fosforilação de serinas ou treoninas.

Estudos recentes demonstram que o aumento da atividade da GSK-3 promove vários eventos, como a fosforilação da proteína Tau em sítios específicos, e também facilita a transformação da PPA, resultando no aumento da produção de Aβ e, consequentemente, favorecendo a formação das placas amiloides (PHIEL et al., 2003; LATHER et al., 2008).

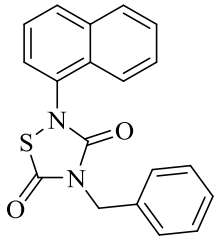
A caseína quinase 1 (CK1), faz parte de uma grande família de proteínas monoméricas de serina/treonina, encontradas em diversas partes da célula, incluindo núcleo, citoplasma, citoesqueleto, vesículas e membrana plasmática (VIELHABER & VIRSHUP, 2001). De forma semelhante à GSK-3, CK1 desempenha um importante fator na hiperfosforilação da Tau, e sua inibição evita a formação dos emaranhados neurofibrilares e também diminui a formação das placas senis, pela redução da formação de Aβ (KURET et al., 1997). Dados recentes indicam que várias isoformas de CK1 (α, β, ε) foram encontradas em filamentos e em lesões grânulo vacuolares em cérebros com DA (VIELHABER & VIRSHUP, 2001; KURET et al., 1997)

A vantagem desta abordagem envolvendo GSK-3β e CK1, como um novo alvo terapêutico frente às demais, é que os compostos usuais utilizados para diminuir a produção de Aβ também bloqueiam a quebra de outras proteínas, causando graves efeitos colaterais. Contudo, estudos conduzidos por Flajolet e colaboradores (2007) identificaram que as enzimas-chave envolvidas na produção de Aβ (BACE-1 e γ-secretase) são alvos dessas duas quinases, GSK-3β e CK1, e sua inibição diminui a formação de Aβ sem interferir nos demais processos enzimáticos.

Tideglusib (NP-12), desenvolvido pela Noscira, é um derivado de tiadiazolidinas e atua como inibidor irreversível ATP-não competitivo de GSK-3β (**Figura 6**).



azul de metileno



tideglusib (NP-12)

Figura 6. Estrutura do azul de metileno (Rember®), inibidor de agregação da Tau, e do tideglusib (NP12), inibidor de GSK-3β.

Tideglusib apresentou, nos ensaios pré-clínicos, uma significante neuroproteção envolvendo neurônios do hipocampo, depois de dano excitotóxico. A administração de tideglusib em camundongos *PPAsw* transgênicos reduziu os níveis de Tau hiperfosforilada e depósitos de Aβ. Esses ensaios encorajaram a entrada em fase clínica de tideglusib, alcançando a fase IIb para o tratamento da DA e também de uma rara taupatia conhecida como paralisia supranuclear progressiva (PSP). Nessa fase, tideglusib foi bem tolerado pelos pacientes que apresentavam a DA em grau leve a moderado, conduzindo a alterações positivas na cognição, mas sem significância estatística devido ao pequeno grupo amostral. A eficácia clínica de tideglusib em pacientes com DA deve ser assistida em um número maior de pacientes para que os resultados sejam estatisticamente significativos (LANSDALL, 2014; SILVA et al., 2014).

1.3.3 Neuroinflamação

Atualmente, células do sistema imune nato, e também micróglias são os primeiros alvos para modulação da neuroinflamação. As triagens clínicas prospectivas falharam em demonstrar efeitos positivos do uso dos tradicionais anti-inflamatórios não esteróidais (NSAIDS) e também dos inibidores seletivos de ciclo-oxigenase 2 (COX 2) no tratamento ou prevenção da DA. Entretanto, em uma grande triagem de prevenção, os participantes demonstraram melhora na cognição por um período de tempo prolongado após terminar o tratamento com NSAIDS. Assim a eficácia dos anti-inflamatórios no tratamento pré-sintomático de indivíduos é atualmente inconclusiva. Isto demonstra a importância da avaliação rigorosa em relação ao momento do uso, antes ou após o início dos sintomas e alterações dos biomarcadores, além da duração do tratamento com anti-inflamatório na DA (HEPPNER et al., 2015).

1.3.4 Colinesterases

Acetilcolinesterase (AChE) e butirilcolinesterase (BuChE) são glicoproteínas homólogas, que apresentam mais de 50% de homologia. AChE é principalmente expressa pelos neurônios, enquanto a BuChE está associada as células gliais. No córtex de pacientes com DA, a atividade da AChE reduz progressivamente dos estágios moderado a severo da doença e passa a ter apenas de 10 a 15% do valores normais, enquanto a atividade da BuChE está inalterada ou as vezes aumentada atingindo até 120%. Alguns estudos demonstram que a BuChE desenvolve um papel de suporte compensatório nesse processo, como nos estudos em camundongos nulizigotos para AChE que demonstraram que a BuChE recupera a função colinesterásica na ausência de AChE (GIACOBINI, 2004; BRUS et al., 2014).

A enzima acetilcolinesterase no sistema nervoso periférico é responsável pelo controle nos impulsos nervosos, dos batimentos cardíacos, pela contração de músculos lisos, dilatação de vasos sanguíneos, e no sistema nervoso central modula o controle motor, a memória e cognição. Nas sinapses colinérgicas de vertebrados regula a neurotransmissão através da rápida e eficiente hidrólise da ACh em colina e acetato, com capacidade em catalisar até $6x10^5$ moléculas de ACh por molécula de enzima a cada minuto (PETRONILHO et al., 2011).

A AChE é uma molécula de aproximadamente 320.000 Da, consistindo em duas cadeias polipeptídicas, na qual cada uma se apresenta em dobro (α2, β2). Apresenta três regiões importantes na extensão catalítica: o sítio catalítico (CAS, do inglês *catalytic anionic site*), o sítio periférico (PAS, do inglês *peripheral anionic site*) e uma fenda hidrofóbica que une o PAS ao CAS. O CAS é dividido em dois subsítios, um esterásico, responsável pela hidrólise do grupo éster do substrato ACh, envolvendo os resíduos da tríade catalítica (Ser 200 (203), His (440) 447 e Glu (327) 334) [número referente a *Torpeto californica* é dado primeiro, seguido pelo referente da espécie *humana*], e outro relacionado à interação com a região de colina, rico em aminoácidos hidrofóbicos, como o Trp 84 (86) (JOHNSON & MOORE 2006; DVIR et al., 2010).

O PAS, localizado na entrada da fenda catalítica, distante cerca de 14Å do CAS, contém o Trp 279 (286) como o resíduo responsável pela função de adesão na AChE. Este sítio está envolvido com a modulação alostérica da catálise no CAS e é alvo de vários agentes anticolinesterásicos. Está também implicado em várias funções não clássicas da enzima, como, em particular, o depósito de peptídeo Aβ, adesão celular, e crescimento em expansão dos dendrímeros (MUÑOZ- TORRERO & CAMPS, 2006; SILVA et al., 2006; JHONSON & MOORE, 2006; CHEUNG et al., 2012).

BuChE, também conhecida como pseudocolinesterase, é sintetizada no fígado, encontrada no plasma sanguíneo e catalisa a hidrólise de ésteres de colina, incluindo a butirilcolina, succinilcolina e acetilcolina. É estruturalmente e funcionalmente relacionada com a AChE, ambas apresentam um resíduo de serina essencial para a atividade catalítica. AChE e BuChE pertencem a família de proteínas de enovelamento-α/β uma vez que contém a folha-β central circundada por α-hélice. Esta enzima demonstrou catalisar a hidrólise de outros ésteres como a cocaína, o ácido acetilsalicílico e heroína. Além disso, a BuChE é importante na proteção do organismo diante de anticolinesterásicos, como fisostigmina e organofosforados (DARVESH et al., 2003).

A butirilcolinesterase humana (*h*BuChE) contém uma tríade catalítica, composta pela Ser226, histidina 466 e ácido glutâmico 353, e assim como na AChE é também encontrada na extremidade de um cavidade de 20 Å de profundidade, a qual está alinhada por seis resíduos de aminoácidos. Além da tríade catalítica, o sítio ativo contém o chamado "sítio aniônico", que pode se ligar ao nitrogênio quaternário do substrato. O sítio aniônico compreende o aminoácido triptofano 82 (DARVESH et al., 2003).

Consequentemente, é esperado que a inibição da BuChE possa beneficiar pacientes com DA da mesma forma que os inibidores de AChE (DARVESH et al., 2003; ZAWADZKA et al., 2013; BRUS et al., 2014).

1.3.4.1 Relação entre AChE e proteína Aβ

Recentemente, algumas evidências indicam que a formação, agregação e neurotoxicidade do peptídeo Aβ pode estar sob controle colinérgico e que os clássicos efeitos dos inibidores de AChE podem interferir no processo de geração dos componentes não-amiloidogênicos dos precursores de proteína amiloide. Ativação de receptores muscarínicos M_1, em decorrência da inibição da AChE e subsequente ativação da via da proteína quinase C (PKC) podem estimular a secreção da proteína amiloide solúvel neurotrófica e neuroprotetora (αPPAs), com consequente redução na liberação de Aβ. Este fato sugere que inibidores de AChE podem prevenir a formação das placas amiloides e promover o processamento normal da PPA (MUÑOZ-TORRERO & CAMPS, 2006).

Outros estudos revelam que a enzima AChE também apresenta funções não colinérgicas, a AChE foi encontrada associada aos depósitos de Aβ no início da formação das placas. De fato, ambos os depósitos pré-amiloides difusos, bem como placas senis compactas contém a enzima. Além disso, a AChE forma complexos *in vitro* enzima-Aβ muito estáveis e permanecem fortemente ligados mesmo após lavagens com soluções salinas concentradas e

detergentes. Estes resultados indicam que a AChE pode participar do processo de formação de placas, fornecendo um núcleo heterogêneo durante a formação e crescimento das fibrilas amiloides (INESTROSA & MUÑOZ, 1999).

Assim, a AChE pode se ligar a um confôrmero não amiloidogênico de Aβ, induzir uma transição conformacional para uma forma amiloidogênica e, consequentemente, para fibrilas amiloides, formando complexos estáveis de Aβ-AChE. Estes complexos estáveis de Aβ-AChE são capazes de modificar as propriedades bioquímicas da enzima e causar aumento na neurotoxicidade das fibrilas de Aβ (**Figura 7**). O local de ligação na AChE é o PAS, o responsável pela função de adesão na enzima. Como consequência, os inibidores de AChE (AChEIs) capazes de interagir com esse sítio periférico da enzima poderiam exibir um interessante efeito neuroprotetor resultante da sua habilidade de bloquear a interação entre AChE com Aβ, o que pode representar uma nova forma para retardar o processo degenerativo na doença de Alzheimer (ALONSO et al., 2005; MUÑOZ-TORRERO & CAMPS, 2006; CAMPS et al., 2010).

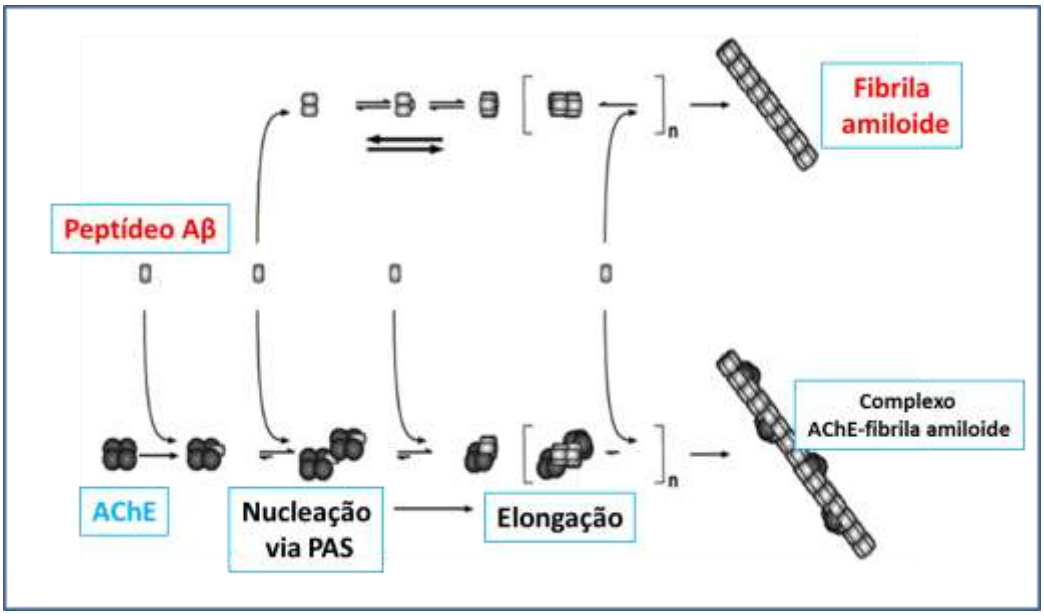


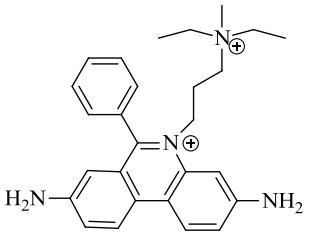
Figura 7. Formação do complexo Aβ-AChE, induzida via sítio periférico da enzima atuando como um ponto de nucleação e elongação das fibrilas.
Adaptado Fonte: CARVAJAL & INESTROSA, 2011.

1.3.4.2 Inibidores do sítio periférico

Considerando os aspectos não colinérgicos da AChE, sua relação com as principais evidências da doença e o envolvimento do sítio periférico da enzima em todas essas funções,

o mesmo foi considerado um alvo atrativo para o desenho de novos fármacos anti-Alzheimer. Inibidores do sítio periférico ou dos dois sítios de AChE (através de modulação alostérica via sítio periférico, ou bloqueio ao sítio ativo) podem simultaneamente aliviar o déficit de memória nos pacientes com Alzheimer, e o mais importante, evitar a agregação do peptídeo Aβ. O desenvolvimento desses inibidores representa um novo caminho para retardar o processo neurodegenerativo (CASTRO & MARTÍNEZ, 2001).

O primeiro composto descrito com alta capacidade de bloquear a interação entre o peptídeo Aβ e a AChE foi o propídio (**Figura 8**), um inibidor descrito como capaz de interagir exclusivamente com o sítio periférico. Sua baixa capacidade em inibir a AChE, e sua natureza dicatiônica fez descartar seu uso na farmacoterapia anti-Alzheimer (CANTADOR, 2012).



propídio

Figura 8. Estrutura do propídio, capaz de bloquear a interação entre peptídeo Aβ e a AChE.

Além do propídio, alguns compostos heterocíclicos foram desenhados como inibidores de AChE capazes de interagir com o PAS. Como é o caso da 4,4'- bipiridina (**I**), fenilcarbamato dissubstituído (**II**) e indenoquinolilamina (**III**). O mecanismo de inibição nos três casos foi determinado por estudos cinéticos. Assim, os compostos foram caracterizados como inibidores dirigidos ao sítio periférico aniônico (**Figura 9**). Huprina x (**IV**), um híbrido que combina a subestrutura carbocíclica da huperzina A com 4-aminoquinolina, subestrutura da tacrina, tem uma das mais altas afinidades pela AChE já descritas. O seu modo de ligação na enzima foi verificado em estudos de competição com o inibidor de sítio periférico propídio, e o edrophonium que promove inibição no sítio ativo. Resultados indicaram que a huprina x (**IV**) interage no sítio de acilação no sítio ativo da enzima, mas interfere levemente com a ligação dos ligantes do sítio periférico (SIMEON-RUDOLF et al., 1999; LIN et al., 1999; RAMPA et al., 2000; CAMPS et al., 2000; CASTRO & MARTÍNEZ, 2001).

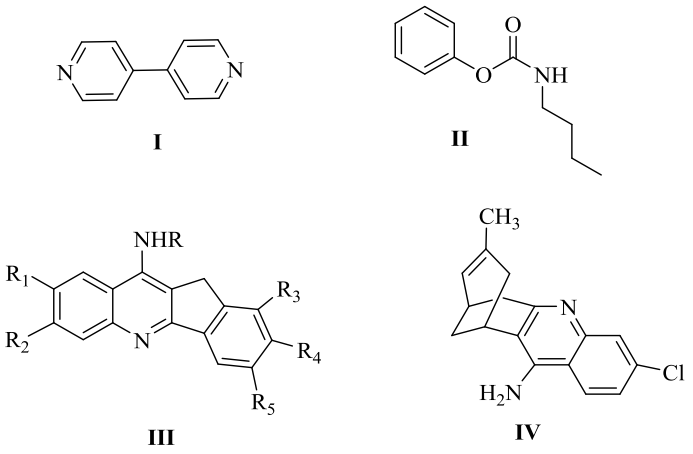


Figura 9. Inibidores do sítio periférico de AChE.

1.3.4.3 Inibidores duplos de AChE (dual binding site)

Várias classes de inibidores duplos de AChE, denominados *dual binding site,* têm sido desenvolvidos pela hibridação adequada de duas unidades que interagem com a enzima, que em geral, são derivados dos inibidores clássicos da AChE (donepezila e/ou tacrina) e tem sido relacionados ao bloqueio dos sítios periférico e catalítico da AChE. O sucesso da estratégia envolvendo *dual binding site* é evidente pelo grande aumento na inibição da AChE em relação aos compostos de origem (CAMPS et al., 2008; MEHTA et al., 2012). Adicionalmente, o desenvolvimento de fármacos *dual binding site* tem sido particularmente interessante por apresentarem propriedade de inibição da agregação do peptídeo Aβ induzida pela AChE, via interação pelo sítio periférico, o que faz desses compostos promissores candidatos para o tratamento da doença de Alzheimer (CAMPS et al., 2008).

A **Figura 10,** mostra alguns exemplos de inibidores híbridos de AChE do tipo *dual binding site* **V-XI**, em seguida na **Tabela 1** estão apresentadas as correspondentes atividades biológicas (**V-VIII** e **X-XI**).

Dentre as substâncias *dual binding site* apresentadas na **Figura 10**, a que apresentou melhor inibição da AChE foi **XI-A** e **B** com IC_{50} de 0,070 e 0,060 nM, respectivamente, além da inibição de 98 e 96% na agregação da proteína Aβ amiloide induzida pela AChE respectivamente, conforme **Tabela 1**.

Alonso e colaboradores (2005) sintetizaram os híbridos de donepezila-tacrina **V** e **VI** (considerando o núcleo ftalimida como bioisóstero da indanona), os quais apresentaram atividade inibidora da AChE 8 e 70 vezes mais potentes que donepezila e tacrina, respectivamente. Neste mesmo estudo, foi realizado ensaio de competição pelo propídio

(ligante seletivo do sítio periférico da enzima), para confirmar a interação das substâncias neste sítio de ligação, e prever indiretamente o potencial de inibição da agregação Aβ amiloide. Como resultado, os compostos **V** e V**I** foram capazes de deslocar o propídio nos ensaios de competição, mostrando IC_{50} de 10 e 1 μM, respectivamente, sendo a unidade ftalimida destes compostos apontada como a responsável pela ligação ao sítio periférico.

Os compostos **VII** e **VIII** também apresentaram resultados positivos de inibição em AChE 0,27 e 7,98 nM respectivamente, e ainda foram capazes de inibir a agregação do peptídeo Aβ induzido por AChE em 46 e 65%. O composto **VII** conservou as porções de acridina da tacrina e indanona de donepezila unidas por um linker de piperidina, demonstrando ser interessante essa combinação frente à inibição de AChE (CAMPS et al., 2010), quando comparada, por exemplo, ao composto **VIII** que manteve apenas a porção acridina de tacrina (LUO et al., 2011).

Camps García e colaboradores (2007) sintetizaram o composto **IX** (**Figura 10**), além de vários derivados e seus sais, incluindo estereoisômeros ou misturas de estereoisômeros, no qual *R1*, *R2*, *R3* e *R4* são radicais relacionados ao H, Cl, F, Br, CF3, (C1-C4) alquil, (C1-C4) alcoxil e nitro; *R5*, *R6*, *R7* e *R8* relacionado ao H e (C1-C6) alcoxil; *n* é um número de carbonos de 3 a 5; *r* é um número de carbono de 2 a 5; *s* é um número de 1 a 5 e *X* é CO ou CH_2.

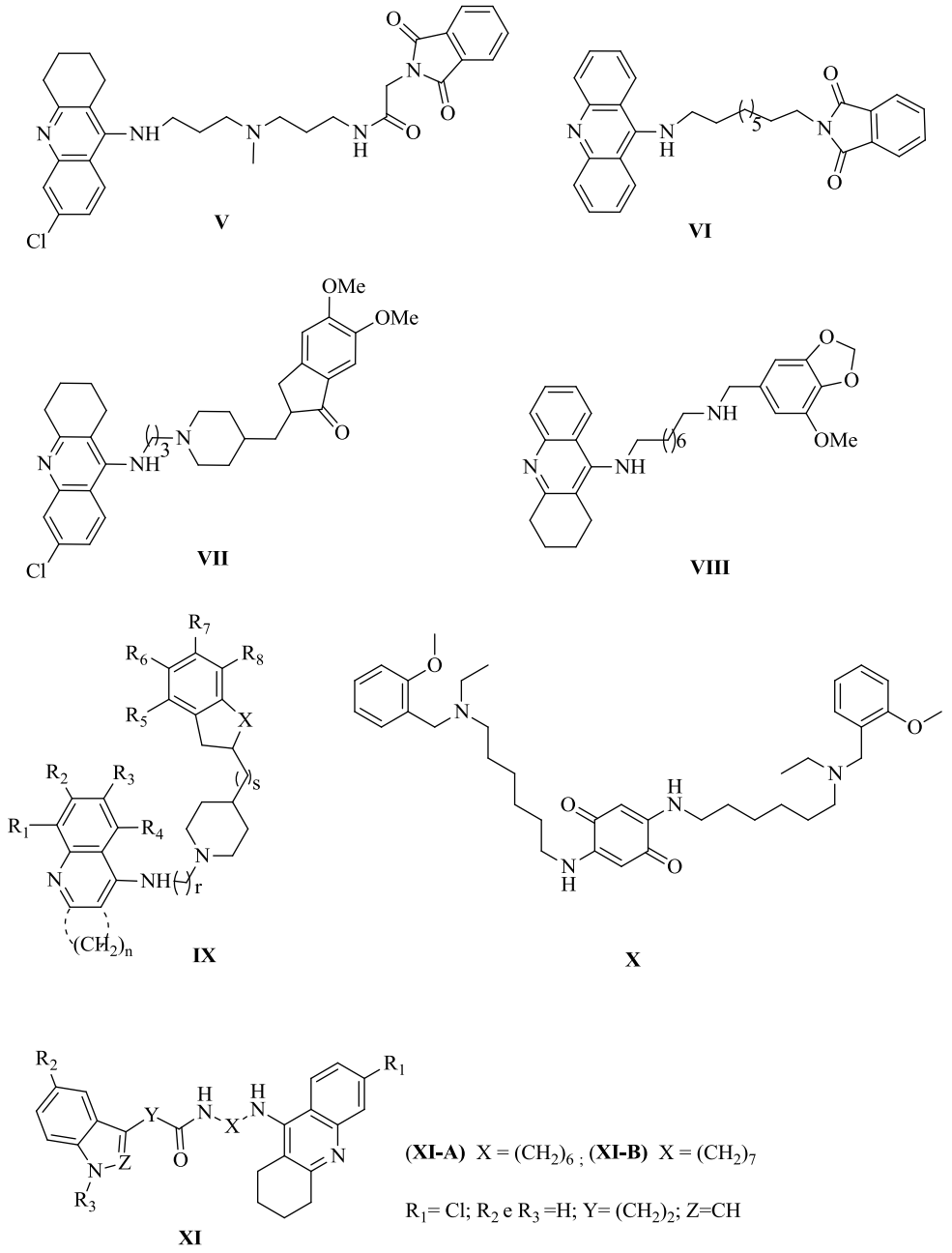


Figura 10. Inibidores de AChE *dual binding site* (**V-XI**).

Estas estruturas (**IX**) foram patenteadas uma vez que se comportam como inibidores da AChE nos dois sítios de ligação e são úteis como protótipo contra a doença de Alzheimer, apesar dos ensaios biológicos não terem sido descritos.

Tabela 1. Atividade biológica das substâncias *dual binding site* (**V-X e XI**).

Dual binding site	IC_{50} AChE (nM)	IC_{50} BuChE (nM)	Ensaio propídio (μM)	Ensaio de inibição da agregação Aβ amiloide induzida pela AChE (%)
V	2,80	7,50	10,0	--
VI	2,40	90,0	1,0	--
[a]VII	0,27	66,3	--	46
[b]VIII	7,98	7,94	--	65
[a]X	1,55	1440,0	--	87
[a]XI -A	0,070	0,014	--	98
[a]XI -B	0,060	0,10	--	96

[a]Ensaio de inibição, método Tioflavina –T, na presença de 100 μM de inibidor.

[b]Ensaio de inibição, método Tioflavina –T, na presença de 20 μM de inibidor.

De acordo com esses exemplos, é possível visualizar a potencialidade dos inibidores de AChE *dual binding site*, não só em inibir a AChE e, consequentemente, aumentar a transmissão colinérgica, melhorando a cognição, bem como em inibir a agregação do peptídeo Aβ induzida pela AChE, o qual é neurotóxico e culmina na perda neuronal.

Os resultados dos ensaios *in vitro* de inibição da agregação do peptídeo Aβ pelos AChEIs *dual binding site* têm apresentado correlação direta com os ensaios *in vivo.* Assim, a memoquina (**X**), *um dual binding site* que *in vitro* bloqueou 87% da indução da agregação do peptídeo Aβ amiloide pela AChE a 100 μM, tem demonstrado reduzir depósitos de peptídeo Aβ amiloide e resgatar o déficit comportamental ligado a atenção em camundongos que apresentam o conjunto completo de características da DA (CAMPS et al., 2008; BOLOGNESI et al., 2007).

Além da memoquina (**X**), a subtância da Neuropharma NP-61 (antigamente chamado de NP-0361), um AChEI *dual binding site*, inibiu *in vitro* a agregação do peptídeo Aβ amiloide induzida pela AChE, com IC_{50} uma ordem de magnitude menor que o propídio, e também reduziu o número, a área de superfície e tamanho das placas amiloides no córtex e hipocampo em camundongos transgênicos (Swedish e London). A redução da carga proteica amiloide resultou em significante aumento na cognição (aprendizado espacial e memória no teste de Morris *water maze*), destacando a relação direta entre o ensaio *in vitro* e *in vivo*. Na primeira metade de 2007, NP-61 entrou em ensaio clínico de fase I para tratamento da doença

de Alzheimer na Inglaterra, o que constitui uma evidência clara do promissor papel dessas substâncias contra a DA (CAMPS et. al, 2008).

NP-61 faz parte dos heterodímeros indol-tacrina sintetizadas por Muñoz-Ruiz e colaboradores (2005) representado por **XI** (**Figura 10**), em uma série de inibidores *dual binding site* obtidos pelo grupo. De acordo com os resultados mostrados, duas moléculas (**A** e **B**) foram mais promissoras, ambas apresentam R_1= Cl; R_2 e R_3=H; Y= $(CH_2)_2$; Z=CH; diferem apenas pelo fato de que na molécula (**A)** X = $(CH_2)_6$ e em (**B)** X = $(CH_2)_7$, os dados das atividades biológicas estão na **Tabela 1** (GARCÍA-PALOMERO et al., 2008).

Estudos de *docking* utilizando AChE, isolada de *Torpedo californica* (*Tc*AChE), foram realizados para o heterodímero **XI-A**, no qual a porção tacrina interage com o sítio ativo com os resíduos de aminoácidos Trp84 e Tyr330, o nitrogênio aromático da tacrina faz ligação de hidrogênio com o carbono carbonílico da cadeia principal da His440. Adicionalmente, uma ligação de hidrogênio também é formada entre o grupo amino da tacrina e o carbono carbonílico de Trp84, além do átomo de cloro que ocupa uma cavidade hidrofóbica, formado por Trp432, Met436 e Ile439. A cadeia ligante é alinhada ao longo da fenda e as principais interações são realizadas pelo grupo amida. No sítio periférico é possível notar interações entre o anel indol junto ao anel aromático do Trp279 (MUÑOZ-RUIZ et al., 2005).

1.4 JUSTIFICATIVA PARA SÍNTESE DO NOVO HÍBRIDO TACRINA-DONEPEZILA

Analisando todo processo multifatorial envolvido na DA, torna-se evidente a necessidade de uma abordagem mais ampla na pesquisa a fim de se obter um fármaco capaz de bloquear a evolução da doença em distintas vias patológicas. Assim, uma das estratégias atuais é o desenvolvimento de novos agentes anti-Alzheimer com múltiplas potências. Dentre os principais processos multialvos envolvidos na DA, o desenvolvimento de substâncias com atividade inibidora de colinesterases e de agregação do peptídeo Aβ, vem sendo estudadas e tem se mostrado serem bastante promissoras (DVIR et al., 2002; LUO et al., 2011; RIZZO et al., 2008; RIZZO et al., 2010; YAN et al., 2012). Inibidores de colinesterase e formação/agregação do peptídeo Aβ são extensivamente explorados ao longo de décadas e o grande número de informações já descritas facilita o desenvolvimento racional de novos inibidores multialvos do tipo inibidores duplos de AChE.

Com base na estrutura tridimensional de *Tc*AChE, e análise das interações moleculares entre os resíduos da enzima e os fármacos donepezila (**1**), capaz de interagir no sítio periférico, e tacrina (**2**), capaz de interagir na região de colina no sítio ativo, foi possível planejar compostos híbridos com potencial afinidade pelos dois sítios enzimáticos (**Figura 11**).

Neste caso, o processo de hibridação molecular, representado pela conjugação das principais características estruturais dos dois fármacos em uma única substância bioativa, pode ser aplicado para melhorar as propriedades farmacodinâmicas desta classe de compostos inibidores de AChE. De fato, estudos anteriores de modelagem molecular e *docking*, realizados pelo grupo de pesquisa, mostraram que a combinação dos fármacos donepezila (**1**) e tacrina (**2**) pode dar origem a moléculas híbridas, como mostrado na **Figura 11**, com grande complementaridade estrutural para preencher ambas as cavidades da enzima, sítio ativo (CAS) e periférico (PAS) (SILVA et al., 2006).

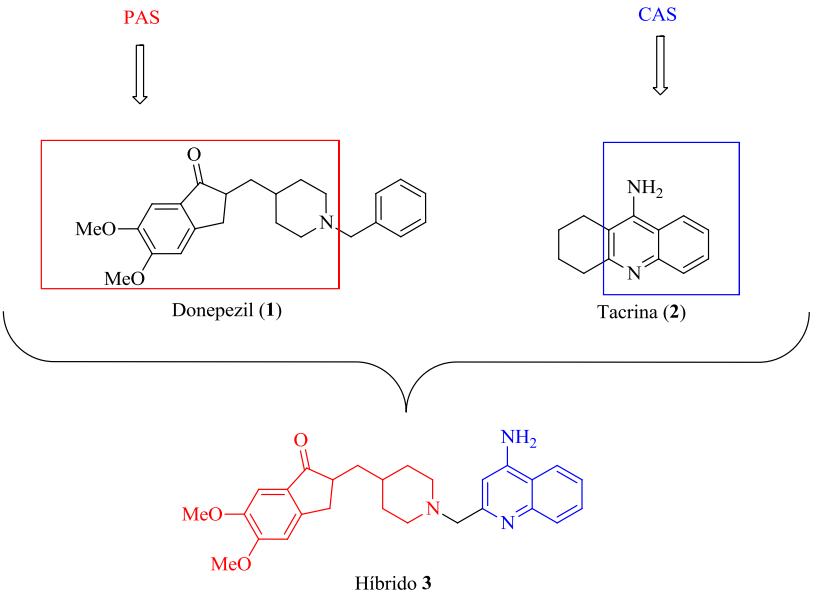


Figura 11. Estratégia de hibridação molecular, envolvendo os fármacos donepezila (**1**) e tacrina (**2**) para obtenção do híbrido **3**, capaz de interagir nos sítios ativo e periférico da AChE como *dual binding site.*

Adicionalmente, estudos de predição de toxicidade e metabolismo, realizados pelos programas DEREK1[1] e METEOR, indicaram que estes derivados poderiam apresentar propriedades farmacocinéticas adequadas. Entre os derivados propostos, o **híbrido 3** apresentou o melhor resultado de docking, com score 88. A molécula foi mantida orientada

[1] Derek é uma base de dados que faz a predição qualitativa de toxicidade envolvendo uma série de regras que relacionam a estrutura química ou o toxicóforo á toxicidade da molécula associada, e também a carcinogênicidade, mutagênicidade, sensibilização da pele, irritação, teratogenicidade e neurotoxicidade (GUPTA et al., 2011).

permitindo interação π-stacking envolvendo o grupo indanona do híbrido, bem como as interações π-stacking com Trp 84 e ligações de hidrogênio com o resíduo His440 da AChE, além de uma interação adicional por ligação de hidrogênio entre o grupo amino livre do composto proposto e a cadeia lateral do Glu199 (SILVA et al., 2006).

Apesar de derivados híbridos de tacrina-donepezila já terem sido descritos na literatura, nenhum possui a combinação estrutural entre os dois fármacos, como proposto para o híbrido **3**.

Na **Figura 12 a-b** está representado o resultado de docking realizado com o híbrido **3**, mostrando a complementariedade deste composto em ambos os sítios e interação de maneira semelhante aos fármacos de origem. Devido a possível isomerização no carbono α-carbonila, a estereoquímica específica do híbrido **3** não está sendo representada.

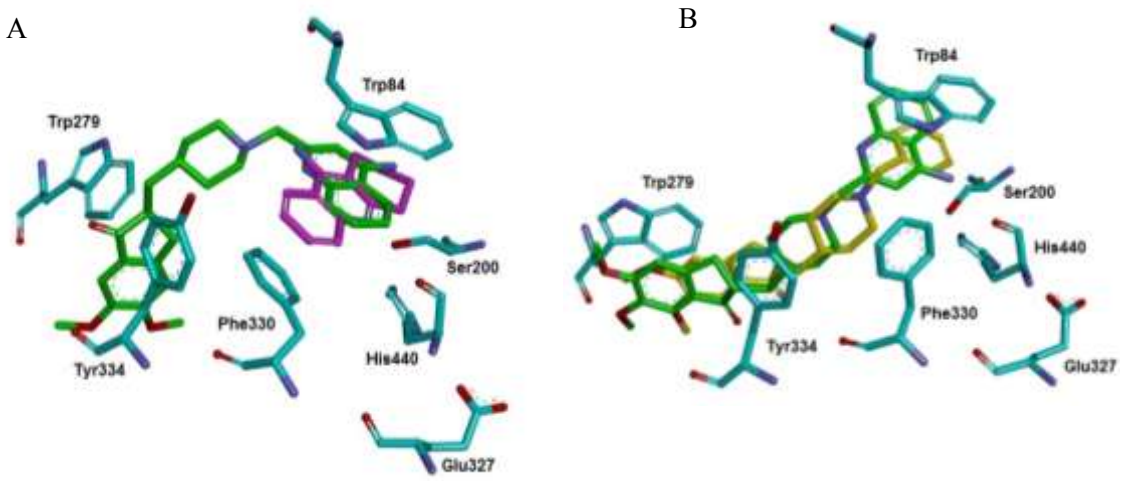


Figura 12. **A-** Sobreposição de tacrina (**1**), em rosa e híbrido **3**, em verde; **B-** Sobreposição de donepezila (**2**), em amarelo, e híbrido **3**, em verde, nos sítios ativo e periférico da enzima AChE, relacionados aos complexos PDB 1ACJ para tacrina e 1EVE para donepezila, obtidos a partir de estudos de docking.

Com relação aos compostos dual binding site descritos anteriormente (**Figura 10**), o híbrido **3** difere dos compostos V**II e IX** pela presença de anel quinolínico, em substituição ao sistema anelar de acridina, pelo local de ligação do nitrogênio metil-piperidínico ao anel heterocíclico quinolínico, o qual ocorre na posição C-2 no híbrido **3**, conforme sugerido pelos estudos de *docking*, enquanto nas estruturas V**II** e **IX** ocorrem no grupo amino presente em C-4 do núcleo de acridina.

Como pode ser observado, embora haja semelhança nas estruturas citadas de *dual binding site* com o híbrido **3**, é possível notar uma diferença característica importante no aspecto de toxicidade. Enquanto os exemplos citados apresentam a unidade acridina da tacrina

(**2**), o híbrido **3** apresenta o anel simplificado quinolínico, capaz de manter as mesmas interações de tacrina. Está bem estabelecida que a estrutura planar de anéis tricíclicos confere aos compostos a habilidade de interferir em uma variedade de processos metabólicos tanto em células procarióticas como eucarióticas (DI GIORGIO et al., 2011). Os agentes intercalantes de DNA mais extensivamente estudados são acridina e seus derivados, os quais são ligados não covalentemente ao DNA e são altamente mutagênicos (LYNNETTE et al., 2007).

Os efeitos genéticos de compostos de acridina têm sido estudados em microrganismos, insetos, plantas e células de mamíferos. O efeito mutagênico mais notável são as mutações *frameshift* (inserção ou deleção de bases) culminando com a leitura incorreta do DNA (HOFFMANN et al., 1996).

O metabolismo da tacrina é realizado no sistema oxidativo microsomal hepático juntamente com as enzimas do citocromo P450 família 1A. Dentre os metabólitos da tacrina estão os derivados mono e diidroxilados. Dentre esses a 7-hidróxitacrina, após oxidações adicionais, conduz a formação do derivado reativo quinona metide que pode formar conjugados com proteínas pela reação do grupo tiol e/ou com a glutationa reduzida (**figura** 13). Os danos celulares podem resultar da interação da quinona metide com macromoléculas essenciais ou por induções de diferentes ciclos de redox, provocado pela indução da peroxidação lipídica e aumento dos níveis de radicais livres, o que leva a crer que a 7-hidróxitacrina seja um composto potencialmente perigoso (PATOCKA et al., 2008).

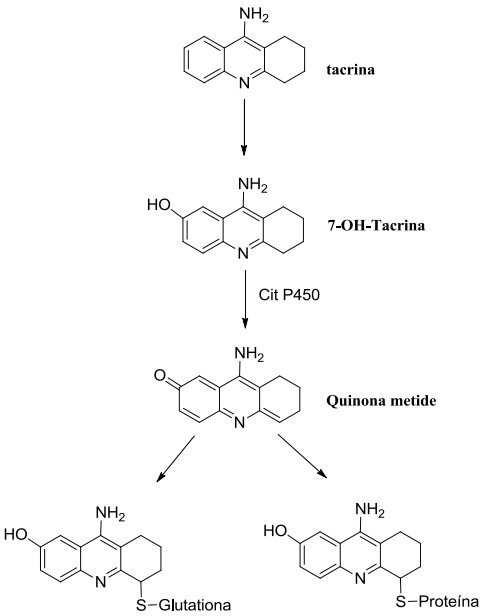


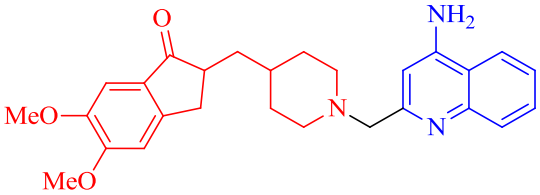
Figura 13. Formação de metabólitos reativos da tacrina.
Fonte adaptado PATOCKA et al., 2008.

Por outro lado, quinolina é uma base terciária fraca e não tóxica para humanos em absorção oral e inalação. O núcleo quinolina ocorre em vários compostos naturais (alcalóides da Cinchona) e substâncias farmacologicamente ativas, como antimalárico (cloroquina, primaquina, quinina, mefloquina), antifúngico (tetahidroquinolinas), antihelmíntico (2,4-arilquinolinas), com atividade cardiovascular (amida quinolínica; quinolina-4-ácido carboxílico; tetraidroquinolinas), no sistema nervoso central (quinolina base antagonista de receptor NK3), anti-inflamatório (2-(furan-2-il)-4-fenoxi-quinolina derivado), analgésico (4-Substituído-7-trifluorometilquinolinas), antiglicêmico (quinolina carboxiguanidas) (MARELLA et al., 2013).

De fato, estudos realizados por nosso grupo de pesquisa utilizando o programa DEREK prediz que são prováveis os danos ao cromossomo ao se verificar o anel de acridina, enquanto ao anel de quinolina são apresentadas apenas advertências plausíveis (chances remotas de ocorrer).

2. OBJETIVOS

O objetivo do trabalho é sintetizar um derivado híbrido de donepezila-tacrina, o híbrido **3**, que seja capaz de se ligar simultânea e seletivamente nos sítios ativo e periférico da enzima acetilcolinesterase. O composto híbrido proposto deverá conduzir à identificação de um novo protótipo para descoberta de novas alternativas para o tratamento da Doença de Alzheimer. Adicionalmente, o projeto prevê a realização de ensaios de atividade enzimática, envolvendo a enzima acetilcolinesterase, para determinação da constante de inibição, mecanismo de ação e também ensaio de inibição da agregação do peptídeo Aβ induzido pela AChE.



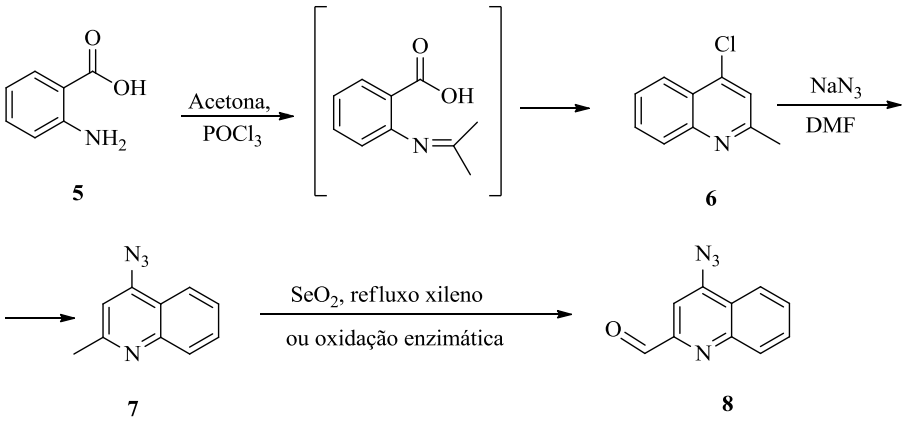
Híbrido **3**

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 PLANEJAMENTO DE SÍNTESE

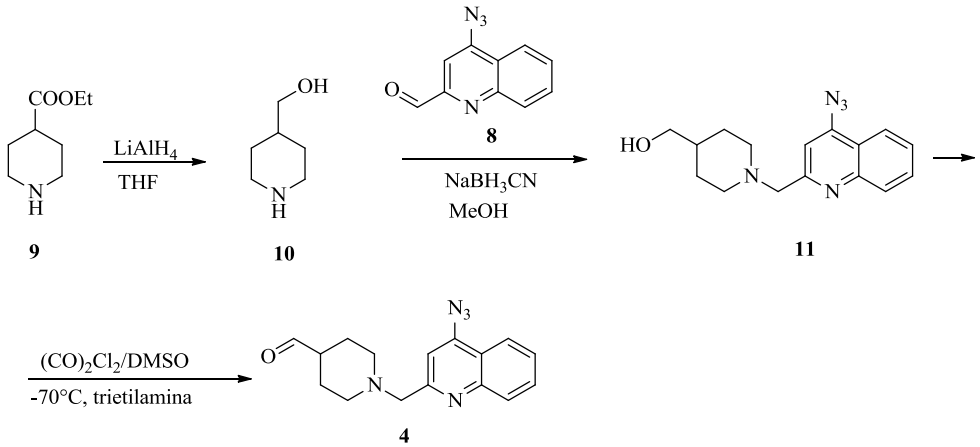
A síntese do híbrido **3** foi planejada conforme sequência mostrada nos **esquemas 1-3**.

A preparação do aldeído **4** (**Esquema 1 e 2**) inicialmente foi proposta a partir da reação de condensação entre acetona e o ácido *o*-aminobenzóico (**5**), com consequente formação do anel de quinolina e obtenção do composto **6**. Posteriormente, o átomo de cloro de **6** seria substituído pelo grupo azido para síntese do derivado azido **7**, o qual em seguida sofreria uma reação de oxidação da metila do anel de quinolina para síntese do aldeído **8** **(Esquema 1)** (POTTHAST et al., 1995; PÉREZ-MELERO et al., 2004; ENGEN et al., 2010).



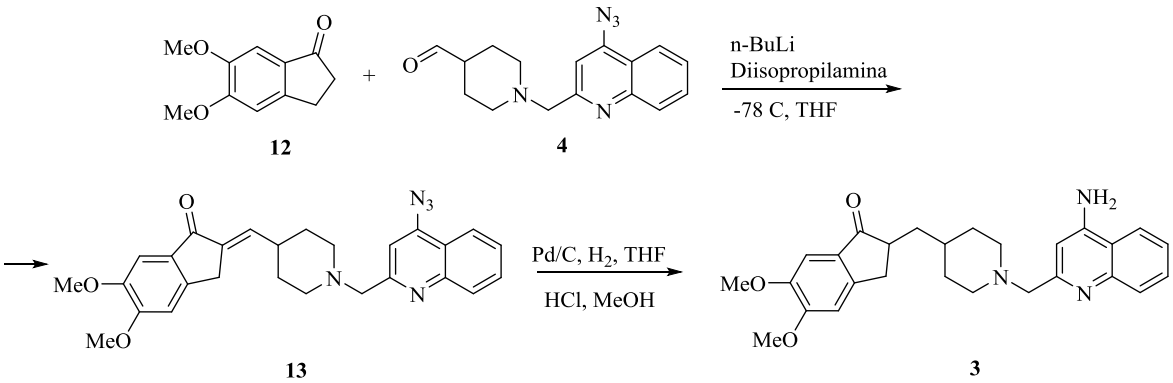
Esquema 1. Proposta sintética para obtenção do aldeído **8**.

A reação de redução do isonepecotato de etila (**9**) forneceria o composto **10** que uma vez submetido à reação de aminação redutiva com o aldeído **8**, daria origem ao composto **11**. Este após reação de oxidação forneceria o composto **4** desejado **(Esquema 2)** (NIPHADE et al., 2008).



Esquema 2. Proposta sintética para obtenção do aldeído **4**.

As últimas etapas para a síntese do hídrido **3** envolveria a reação de condensação entre o aldeído **4** e a indanona **12** (disponível comercialmente) para obtenção de **13,** que seria realizada de acordo com o método descrito para preparação de donepezila (**1**) (SUGIMOTO et al., 1995; EISAI, 1996; ELATI et al., 2006). Em seguida, o composto **13** seria submetido a uma reação de hidrogenção catalítica a fim de reduzir concomitantemente a dupla ligação e o grupo azido em amina (**Esquema 3**).

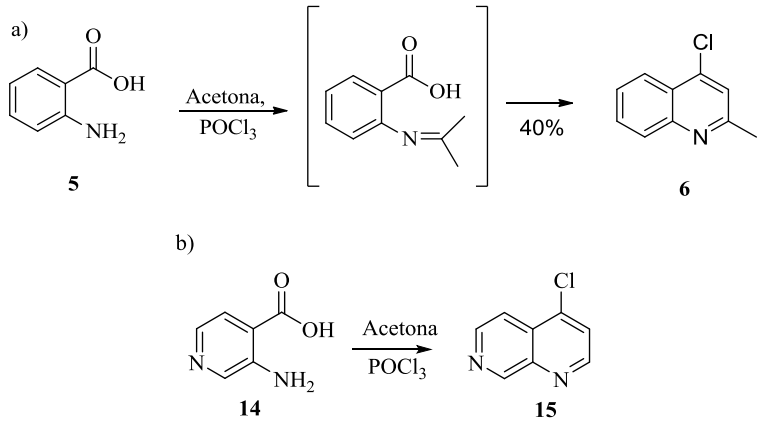


Esquema 3: Estratégia sintética para obtenção do híbrido **3**.

3.2 SÍNTESE DO HÍBRIDO 3

3.2.1 – Síntese do 4-azido-2-quinolinacarboxaldeído (8)

Com o intuito de preparar o composto **8,** foi sintetizado inicialmente 2-metil-4-cloroquinolina (**6)** a partir da reação de ciclização entre o ácido *o*-aminobenzóico (**5**), acetona e $POCl_3$ (**Esquema 4a**), conforme método descrito por Engen e colaboradores (2010) o qual obteve o composto **15**, uma 4-cloro-1,7-nafitiridina, tendo como material de partida o ácido 3-aminoisonicotínico (**14**) (**Esquema 4b**).



Esquema 4. a) Reação de ciclização realizada para obtenção do composto **6**; b) Reação de ciclização realizada por Engen e colaboradores (2010).

A síntese do material de partida **6**, envolve a formação de imina entre o ácido *o*-aminobenzóico (**5**) e acetona, com subsequente ataque do carbono α-imínico ao carbono carbonílico, ativado na presença de $POCl_3$, seguida da substituição da hidroxila formada por cloro. A reação de ciclização conduz à formação de quinolina contendo cloro em C-4 e metila em C-2 (**Esquema 4a**).

Para obtenção de **6**, foi necessário tratar a mistura reacional com solução aquosa de NaOH 5 $mol.L^{-1}$, até atingir pH 14. A dificuldade desta reação ocorreu no momento da alcalinização da solução, na qual resultou em grande volume final. Uma alternativa foi utilizar uma solução mais concentrada da base (8 $mol.L^{-1}$), resultando em volume final bem menor, ou realizar a concentração da fase aquosa antes da extração. No entanto, em ambos os casos o rendimento foi mantido na faixa de 40 %.

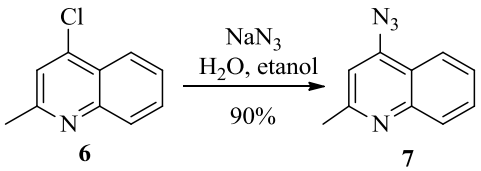
A formação do produto foi confirmada por dados espectroscópicos. No espectro de RMN de ^{1}H foi observada a presença dos hidrogênios aromáticos do anel de quinolina em 8,10; 7,96; 7,66; 7,51 e 7,33 ppm e também da metila em 2,65 ppm. No espectro de RMN de ^{13}C foram observados os carbonos quaternários da junção dos anéis em 142,6 ppm e 148,7 ppm, bem como o carbono metílico em 25,1 ppm. A atribuição completa dos sinais dos hidrogênios e carbonos foi realizada com o auxílio dos espectros bidimensionais de correlação heteronuclerar (HMBC e HSQC). A análise por HRESI-MS mostrou o pico referente para o valor calculado, 178,0418, encontrado *m/z* $[M+H]^+$ 178,0418 (**Apêndice A**).

Embora o rendimento da reação tenha sido satisfatório, o ácido *o*-aminobenzóico não está mais disponível comercialmente, e considerando a necessidade de maiores quantidades do composto **6**, este foi obtido comercialmente.

A próxima etapa para a síntese do composto **8** consistiu em substituir o átomo de cloro do composto **6** pelo grupo azido, dando origem ao composto **7** (**Esquema 5**). Esta reação foi

realizada conforme método descrito por Kamiya e colaboradores (1979), o qual sintetizou o 4-azido-7-cloro-quinolina.

A reação para obtenção de **7** foi realizada com azida de sódio em água e etanol absoluto, e após 2 horas sob agitação em refluxo, o composto desejado foi obtido, sem purificação, com rendimento de 90%.

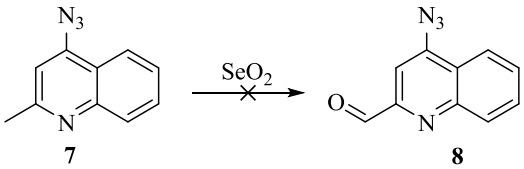


Esquema 5. Reação de substituição do cloro do composto 2-metil-4-cloroquinolina (**6**) pelo grupo azido e obtenção do composto 2-metil-4-azidoquinolina (**7**).

A obtenção do produto **7** foi confirmada por espectrometria de massas (ESI-MS calculado para $C_{10}H_8N_4$ 184,0749, encontrado 157,0762 $[M - N_2]^+$). Adicionalmente, a análise desse composto por espectro na região do infravermelho apresentou uma banda em 2127 cm^{-1}, característico de grupo azido. No espectro de RMN de ^1H foi observada uma variação de deslocamento químico do sinal do hidrogênio em posição alfa ao grupo azido, o qual variou de 7,33 ppm no composto **6** clorado para 7,03 ppm no composto **7**. Os demais sinais de hidrogênio não apresentaram nenhuma alteração significativa nos valores de deslocamento químico. No espectro de RMN de ^{13}C foi observado efeito semelhante, ou seja, o sinal do carbono ligado ao grupo azido está mais blindado, em 120,0 ppm para **7** e 124,7 ppm para **6** devido ao efeito elétron doador do grupo azido.

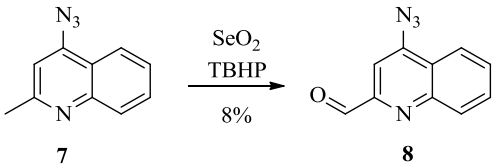
A oxidação do grupo metila do composto **7**, e formação do aldeído **8** (**Esquema 6**), foi inicialmente realizada sem solvente, na presença de dióxido de selênio (SeO_2), a alta temperatura (160^oC) para fusão dos reagentes. A reação permaneceu sob agitação por 12 horas, conforme descrito por Plobeck e colaboradores (2000). Após este período foi observado a formação de uma mistura complexa onde nenhum produto pôde ser isolado e identificado. Contudo, analisando o método descrito na literatura foi observado que o material de partida utilizado, a 6-metilquinolina, era líquido, enquanto o composto **7** é sólido. Assim, a reação foi repetida usando xileno como solvente, conforme descrito por Pérez-Melero e colaboradores (2004). Novamente, no final do período de 12 horas foi observada a formação de uma mistura complexa. Na tentativa de reduzir o tempo reacional e evitar degradação e/ou reações indesejadas do produto formado, a reação foi repetida nas mesmas condições anteriores, mas agora utilizando irradiação por micro-ondas. A temperatura foi mantida a 160 ^oC (150W) por um período de 1 hora e 20 minutos, e novamente não foi observado a

formação do produto desejado, mas apenas mistura complexa, sem recuperação de material de partida.



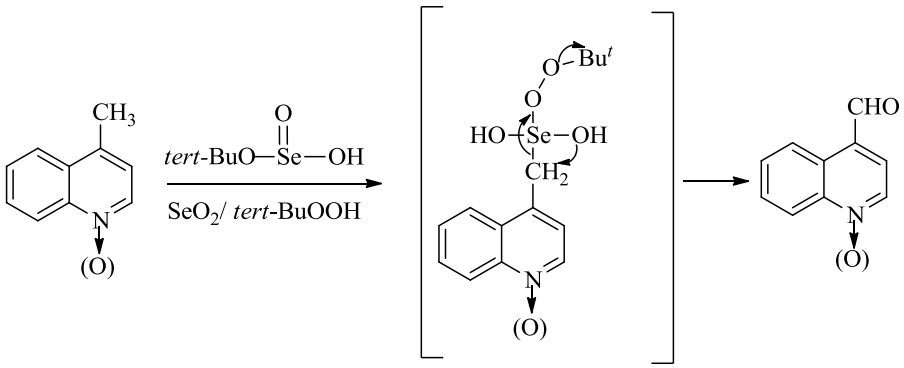
Esquema 6. Tentativa de oxidação da metila utilizando dióxido de selênio.

Em vista destes resultados infrutíferos, um novo método para síntese do composto **8** desejado foi testado. Tagawa e colaboradores (2003) descreveram um protocolo muito semelhante ao utilizado anteriormente, contudo com a adição de um reagente auxiliar o hidroperóxido de *terc*-butila (TBHP) (**Esquema 7**).



Esquema 7. Oxidação da metila utilizando dióxido de selênio e TBHP.

Segundo Tagawa e colaboradores (2003), a oxidação de grupos metílicos de sistema aromático e *N*-heteroaromático por SeO_2 se dá com a formação do aldeído correspondente, além de ácidos carboxílicos e produtos indesejados, como pôde ser observado nas reações anteriores. O auxiliar TBHP proporciona condições reacionais mais brandas (temperatura ~ 50°C) e redução de tempo reacional. No **Esquema 8**, está descrito o mecanismo sugerido por Tagawa e colaboradores (2003).



Esquema 8. Mecanismo envolvendo TBHP na formação de um complexo possibilitando a oxidação de metila em sistema *N*-heteroaromático, sugerido por Tagawa e colaboradores (2003).

A reação de oxidação da metila do composto **7** foi repetida usando o auxiliar TBHP, conforme condições reacionais descritas na **Tabela 2** (experimentos 1, 2, 3 e 4).

Inicialmente, a reação foi realizada nas condições descritas na literatura (TAGAWA et al., 2003) (**Tabela 2**, experimento 1), e após purificação por cromatografia em coluna o produto **8** foi obtido com 8% de rendimento. Nas demais condições reacionais estudadas foram realizadas algumas modificações quanto ao solvente, a temperatura e o tempo reacional, contudo em nenhum caso houve aumento do rendimento.

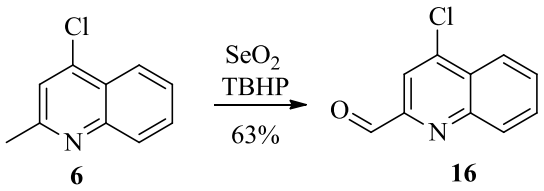
Tabela 2. Resultados obtidos no estudo das condições reacionais para obtenção do composto **8.**

	Material de partida (eq)	**SeO_2 (eq)**	**solvente**	**T(°C)**	**Tempo reacional**	**TBHP (eq) /tempo para complexar**	**Rendimento (%)**
1	1	2,3	dioxano	50	1h	1 /30 min	8
2	1	2,3	THF	50	2h	1 /30 min	5
3	1	2,3	dioxano	50	5h	1 /1h	5
4	1	2,3	dioxano	30*	73h	1/1h	8

*Temperatura ambiente aproximada.

O produto foi analisado por RMN de ^{1}H onde foi observado o desaparecimento do sinal da metila e a presença de hidrogênio de aldeído em 10,19 ppm, bem como a variação dos deslocamentos químicos para campo de maior desblindagem dos sinais dos hidrogênios aromáticos vizinhos ao grupo carbonila. No espectro de RMN de ^{13}C foi observado o sinal da carbonila em 193,3 ppm. O espectro na região de infravermelho apresentou uma banda em 2122 cm^{-1} correspondente ao grupo azido e outra banda em 1701 cm^{-1} referente ao grupo carbonila. A análise por ESI-MS calculado para $[M+H]^{+}$ 199,0614, revelaram picos para $[M+H-N]^{+}$ 185,0693 e $[M+H-N_2]^{+}$ 171,0538.

Na tentativa de explicar o baixo rendimento do produto **8** obtido, foi investigado a influência do grupo azido na ativação da metila. A fim de verificar essa possibilidade, foi realizada a reação de oxidação com o composto **6**, o qual apresenta o átomo de cloro ao invés do grupo azido (**Esquema 9**).



Esquema 9. Reação de oxidação da metila alfa a nitrogênio quinolínico do composto **6**, com SeO_2 e reagente auxiliar hidroperóxido de *terc*-butila (TBHP) para obtenção de **16**.

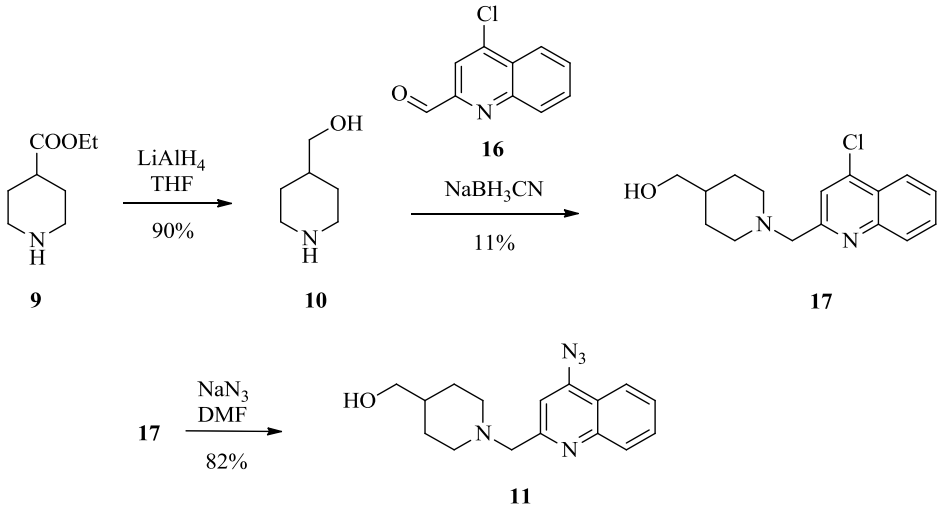
A reação foi realizada nas mesmas condições descrita na **Tabela 2**, experimento 1, de acordo com o método descrito por Tagawa e colaboradores (2003). Após purificação da mistura reacional bruta por cromatografia flash automatizada (Biotage®), o composto **16** foi obtido com rendimento de 63%.

Os dados de RMN de ^{1}H de **16** mostraram o sinal do hidrogênio do aldeído em 10,18 ppm e todos os hidrogênios aromáticos em região de maior desblindagem quando comparados ao material de partida **6**. No espectro de RMN de ^{13}C foi observado o sinal do carbono carbonílico em 192,6 ppm e o sinal do carbono ligado ao cloro em 128,0 ppm, sendo que sua posição está mais desblindada que a do material de partida **6** (124,7 ppm). Por espectroscopia de massas de alta resolução HRMS (ESI): $C_{10}H_6ClNO$ *m/z* $[M+H]^+$ foi calculado 192,0211, e encontrado *m/z* $[M+H]^+$ 192,0211 (**Apêndice B**).

O resultado satisfatório obtido com a oxidação do grupo metílico do intermediário **6**, permitiu que a síntese fosse continuada a partir do aldeído **16**. Contudo, para a síntese do híbrido **3** será necessário, em alguma etapa da rota sintética, realizar a reação de substituição do átomo de cloro pelo grupo azido, para que este seja reduzido a amina, conforme proposta inicial. No entanto, esta reação de substituição tem demonstrado ser de fácil execução em grande diversidade de estruturas moleculares (KAMIYA et al., 1979; DIAS et al., 2006; ENGEN et al., 2010). Por esse motivo, foi considerado que não haveria problema em realizar essa reação em etapas subsequentes.

3.2.2 Síntese do intermediário 4-piperidinilálcool-1-[(4-azidoquinolin-2-il)metil] (11)

Para obtenção do intermediário **11**, foi realizada inicialmente a síntese do reagente 4-hidroximetil-piperidina (**10**) pelo emprego da reação de redução do isonepecotato de etila comercial (**9**), na presença de hidreto de lítio e alumínio em tetraidrofurano (THF) (**Esquema 10**), conforme descrito por Boyer e colaboradores (2008). Após purificação em cromatografia em coluna, o álcool **10** foi obtido com 90% de rendimento.



Esquema 10. Esquema de obtenção do intermediário 4-piperidinil-álcool-1-[(4-azidoquinolin-2-il)metil] (**11**).

Após análise do espectro de RMN de ^{1}H do composto **10**, foi possível constatar um alto grau de simetria do anel piperidínico, sendo possível observar dois pares de hidrogênios equatoriais (3,11 ppm e 1,74 ppm) e dois pares de hidrogênios axiais (2,61 ppm e 1,16 ppm) (**Figura 14**). Essa simetria foi verificada também no espectro de RMN de ^{13}C, o qual apresentou apenas quatro sinais de carbono. Dados de correlação homonuclear H-H (COSY) e correlação heteronuclear C-H (HSQC) foram indispensáveis na atribuição completa. A análise de espectrometria de massas por ESI-MS mostrou sinal referente para $C_6H_{13}NO$ *m/z* $[M+H]^+$ 116,1065, calculado *m/z* $[M+H]^+$ 116,1070 (**Apêndice C**).

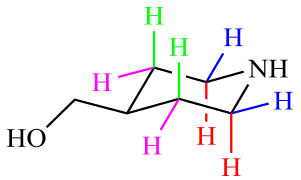
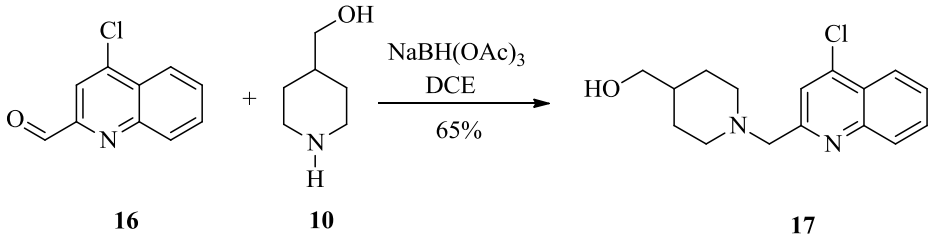


Figura 14. Representção da simetria dos hidrogênios axiais e equatoriais do anel piperidínico.

Para dar sequência às reações mostradas no **Esquema 10**, foi realizada a reação de aminação redutiva entre o álcool **10** e o aldeído **16** a fim de obter o intermediário **17**. Inicialmente esta reação foi realizada utilizando como agente redutor o $NaBH_3CN$ em metanol a temperatura ambiente (MATOS et al., 1999). Contudo, mesmo após várias tentativas, variando tempo reacional e o número de equivalentes do agente redutor, o produto desejado **17** foi obtido com rendimento máximo de 11,0 % (**Esquema 10**). Nesta reação observamos a redução de boa parte do aldeído **16** ao seu respectivo álcool, o que proporcionaria o baixo rendimento reacional.

Uma alternativa seria o uso de um agente redutor mais brando e seletivo, como por exemplo, o triacetóxiboroidreto de sódio [$NaBH(OAc)_3$]. Assim, a reação foi repetida utilizando o $NaBH(OAc)_3$ em dicloroetano (DCE), a temperatura ambiente, e após purificação da mistura reacional bruta, realizada em gradiente ($CHCl_3$: tolueno: MeOH) por cromatografia flash automatizada (Biotage®) o produto **17** foi obtido com 65 % de rendimento (**Esquema 11**).

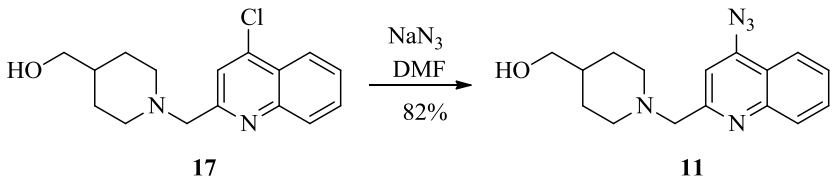


Esquema 11. Reação de aminação redutiva entre o álcool **10** e o aldeído **16** com o agente redutor $NaBH(OAc)_3$ em DCE.

O efeito estéreo e eletroretirador dos três grupos acetóxi estabilizam a ligação B-H e são responsáveis por sua redução branda. Outra vantagem desse agente redutor frente ao $NaBH_3CN$, é o fato de que não há a formação de resíduos de cianeto, altamente tóxicos.

De acordo com o espectro de RMN de ^1H foi possível observar os sinais dos hidrogênios do anel quinolínico entre 7,61 ppm e 8,21 ppm, um simpleto referente aos hidrogênios metilênicos, da ligação formada entre o anel quinolínico e piperidínico, em 3,79 ppm e os sinais dos hidrogênios do anel piperidínico na região entre 2,94 ppm a 1,36 ppm. A análise de espectrometria de massas ESI-MS mostrou sinal referente para $C_{16}H_{19}ClN_2O$ encontrado *m/z* $[M+H]^+$ 291,1288, calculado *m/z* $[M+H]^+$ 291,1259 (**Apêndice D**).

A próxima reação envolveu a substituição do átomo de cloro do composto **17** pelo grupo azido, realizada em dimetilformamida (DMF) e azida de sódio, a temperatura de 65 ^oC, permanecendo sob agitação por 24 horas, conforme descrito por Dias e colaboradores (2006) (**Esquema 12**).



Esquema 12. Reação de substituição de cloro do composto **17** por azido para obtenção do composto **11**.

Após extração, a mistura reacional bruta foi analisada por CLAE, a qual demonstrou alto grau de pureza do produto formado, não necessitando de prévia purificação. Assim, no

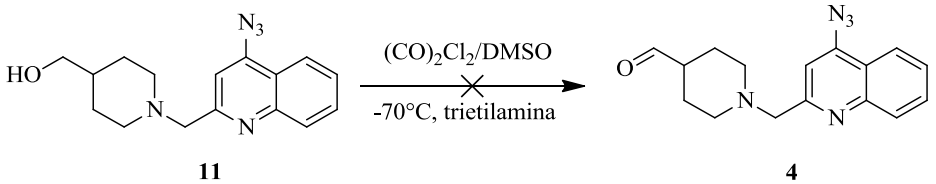
espectro na região do infravermelho foi possível verificar uma banda em 2109 cm^{-1} característico do grupo azido, além da banda em 3389 cm^{-1} do grupo hidroxila, confirmando a formação do composto **11** com rendimento de 82 %.

Nos espectros de RMN de ^{1}H do composto **11** foram observados os hidrogênios aromáticos mais blindados em relação aos mesmos hidrogênios do composto **17**, sendo observado o efeito de blindagem mais pronunciado no hidrogênio alfa ao carbono ligado ao grupo azido, ou seja, de 7,78 ppm em **17** para 7,46 ppm em **11**.

3.2.3 Síntese do intermediário 4-piperidinilaldeído-1-[(4-azidoquinolin-2-il)metil] (4)

A partir da preparação do intermediário **11,** a reação de oxidação do álcool ao aldeído correspondente **4** foi investigada (**Esquema 13**). De acordo com a proposta inicial do projeto (**Esquema 2**), o método escolhido inicialmente para realização desta reação foi a oxidação de Swern, envolvendo condições de oxidação branda, no qual o agente oxidante DMSO é ativado por cloreto de oxalila ou anidrido trifluoracético (HAINES, 1988; NIPHADE et al., 2008, MATOS et al., 1999).

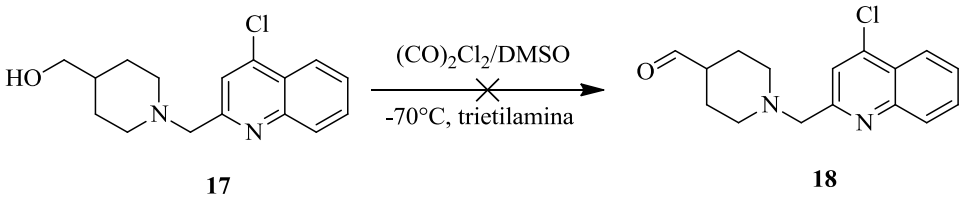
Primeiramente o método descrito por Niphade e colaboradores (2008) foi estudado, extrapolando os dados obtidos com (1-benzilpiperidin-4-il) metanol de estrutura muito semelhante a porção piperidínica de **11**. No entanto, a partir deste método não houve a formação do produto desejado **4.**



Esquema 13. Tentativa de obtenção do aldeído **4**, via oxidação de Swern do intermediário álcool **11**.

Outro método de oxidação de Swern descrito por Matos e colaboradores (1999), o qual utiliza como agente ativante do DMSO, anidrido trifluoracético a -78°C, também foi estudado, mas sem sucesso.

Em ambos os casos, a reação de oxidação foi realizada com o composto **11** a fim de se obter o composto **4**, de acordo com o **Esquema 13**. Contudo, em vista dos resultados negativos, a reação de oxidação foi realizada com o derivado clorado **17** (**Esquema 14**), uma vez que a presença do grupo azido em **11** poderia estar dificultando a reação (assim como nas etapas anteriores).



Esquema 14. Tentativa de oxidação do álcool **17** ao correspondente aldeído **18**.

No entanto, mesmo após várias tentativas o aldeído **18** desejado não foi isolado, havendo formação de mistura complexa (**Tabela 3**).

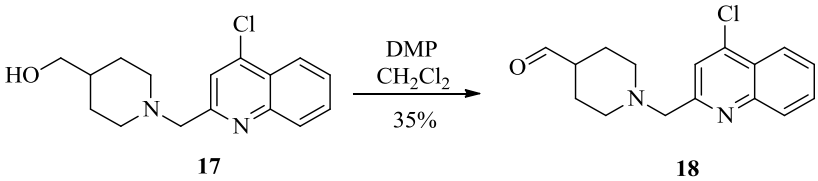
Tabela 3. Tentativas de oxidação de Swern exploradas sem sucesso.

Material de partida	Agente ativante	Temperatura (°C)
11[1]	Cloreto de oxalila	- 65
17[1]	Cloreto de oxalila	- 65
11[2]	Anidrido trifluoracético	-78
17[2]	Anidrido trifluoracético	-78

[1]NIPHADE et al.,2008; [2]MATOS et al.,1999

Outro agente oxidante que utiliza condições brandas é a periodinana de Dess-Martin (DMP), a qual pode ser preparada em duas etapas a partir da reação entre $KBrO_3$ e ácido-2-iodobenzóico, seguida da reação com ácido acético e anidrido acético (DESS & MARTIN, 1983).

Desta forma, o agente oxidante DMP foi sintetizado e em seguida a reação com o álcool **17** foi realizada em diclorometano anidro, a temperatura ambiente, permanecendo sob agitação, por 1,15 h. Após purificação por cromatografia em coluna, o aldeído **18** foi obtido em 35 % de rendimento (**Esquema 15**).

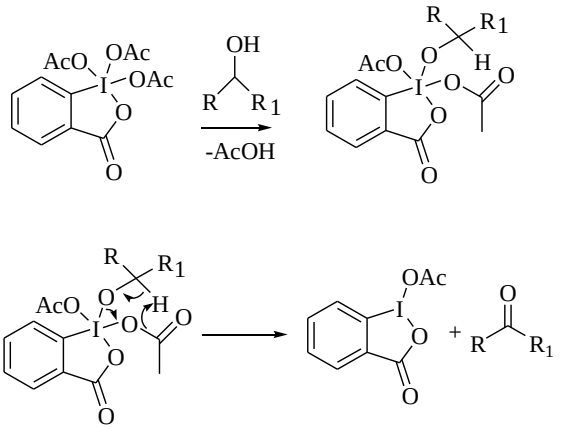


Esquema 15. Reação de oxidação do álcool **17** ao aldeído **18**, empregando como reagente oxidante a periodinana de Dess-Martin.

A análise do espectro de RMN de ^1H de **18** permitiu identificar um dubleto em 9,60 ppm, referente ao hidrogênio do aldeído (acoplamento com o CH do anel piperidina) e,

consequentemente a ausência do dubleto referente aos hidrogênios metilênicos ligado ao OH do material de partida **17**. Os sinais dos hidrogênios piperidínicos estão de forma geral mais desblindados em relação ao composto **17,** em especial o hidrogênio ligado ao carbono alfa carbonílico, o qual apresentou deslocamento químico na faixa de 1,49-1,61 ppm no material de partida, e no composto oxidado **18** em região de maior desblindagem (2,17-2,30 ppm). No espectro de RMN de ^{13}C foram observados os carbonos piperidínicos entre 25,3 ppm e 52,8 ppm, e em especial o carbono alfa carbonila mais desblindado (47,6 ppm) para o composto **18**, enquanto no intermediário **17** foi identificado em 38,4 ppm. Os carbonos aromáticos apresentaram deslocamento químico na faixa de 121,0 a 159,4 ppm, bem como a carbonila do aldeído em 203,7 ppm. O espectro de ESI-MS confirmou a massa molecular, calculado para *m/z* $[M+H]^+$ 289,1102, encontrado *m/z* $[M+H]^+$ 289,1117 (**Apêndice E**).

No **Esquema 16** está representado o mecanismo geral da reação de oxidação com DMP. O primeiro passo é a troca do grupo acetato pelo álcool na periodinana, o próton alfa ao álcool é subsequentemente removido pelo acetato para formar o composto carbonílico desejado, além de iodo ou iodeto(III) e ácido acético como subproduto (JUNIOR, 2012).



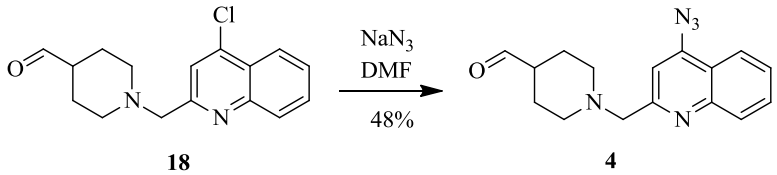
Esquema 16. Mecanismo geral da reação de oxidação utilizando DMP
Fonte: http://www.organic-chemistry.org

Considerando o rendimento moderado com DMP (36 %), outras oxidações foram estudadas. Dentre os métodos descritos para condições brandas de oxidação, alguns aldeídos são obtidos utilizando o percursor do DMP, o qual é denominado ácido 2-iodoxibenzóico ou IBX. Assim o álcool **17** foi testado frente ao agente oxidante IBX (acetato de etila; 80ºC; 3,5 horas). De fato, IBX tem a vantagem de ser estável em relação ao DMP, embora apresente pouca solubilidade em solventes orgânicos comuns. As tentativas envolvendo este reagente conduziu a formação de uma mistura complexa sem observação do produto **18** esperado (MORE & FINNEY, 1999).

Outro método alternativo de oxidação com clorocromato de piridínio (PCC) em diclorometano também foi explorado para realizar a oxidação do álcool **17.** A utilização de PCC via refluxo convencional conduziu a formação de **18** com 13 % de rendimento (COREY & SUGGS, 1975), enquanto por micro-ondas (200 W, 40 ºC, 5 min) foi obtido um rendimento máximo de 17% (CHAKRABORTY et al., 1999).

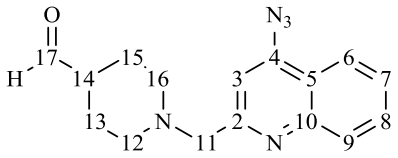
Assim, apesar do rendimento utilizando o reagente de Dess-Martin (DMP) ter sido moderado (36%), este pode ser considerado satisfatório em decorrência da alta funcionalização de **18**.

A síntese de **4** foi realizada em DMF e azida de sódio, sob irradiações de micro-ondas, 150 W, 70°C, 2,5 horas (CARVALHO et al., 2010). A purificação foi realizada por cromatografia flash automatizada (Biotage®) isocrática (acetato de etila 100%), com rendimento de 48% (**esquema 17**).



Esquema 17. Obtenção do intermediário aldeído com azido na posição C-4 de quinolina.

Por RMN de ^{1}H foi possível observar os sinais de H-9 (8,06-8,00 ppm) e H-3 (7,43 ppm) mais blindados quando comparados com a molécula que apresenta o átomo de cloro na posição C-4, assim como os sinais dos carbonos C-3 (108,1 ppm) e C-4 (120,9 ppm) (**Figura 15**). Duas bandas características, uma em 2117 cm^{-1} para grupamento azido e outra em 1719 cm^{-1} de carbonila, foram observadas nas análises por infravermelho. O composto **4** foi confirmado por espectroscopia de massas de alta resolução com os fragmentos HRMS (ESI): $C_{16}H_{17}N_5O$ *m/z* $[M+H]^+$ calculado 296,1506; *m/z* $[M+H + MeOH]^+$ 328,1768; $[M+H - N_2]^+$ 268,1444; sendo encontrado *m/z* $[M+H + MeOH]^+$ 328,1592, $[M+H - N_2]^+$ 268,1282 (**Apêndice F**).



4

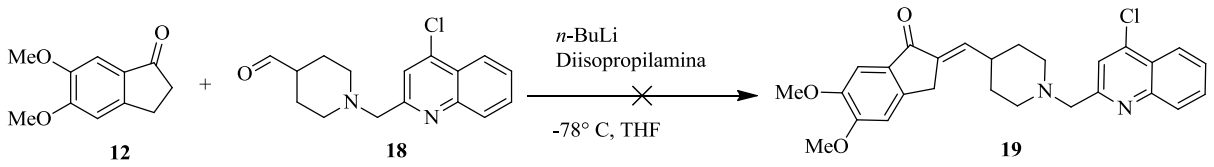
Figura 15. Estrutura numerada do composto **4**.

É importante destacar que apesar da introdução inicial do grupo azido no anel quinolínico, para obtenção do intermediário **4**, as reações foram realizadas de forma satisfatória a partir de intermediários cloro-quinolínicos. Assim, a substituição do átomo de cloro por azido pode ser conduzida em etapas posteriores para preparação do produto final **3**, o que possibilita, inclusive, a geração de uma maior diversidade molecular (Cl; N_3; NH_2) na posição C-4 de quinolina para realização do teste de inibição da AChE devido à similaridade estrutural ao híbrido **3**.

3.2.4 Síntese do intermediário 5,6-dimetóxinda-1-ona-4-piperidinil-metileno-1-[(4-azidoquinolin-2-il)metil] (13)

A síntese do intermediário **13** foi proposta inicialmente a partir da reação de condensação entre o aldeído **4** e a 5,6-dimetóxi indanona (**12**) (**Esquema 3**). Contudo, devido à dificuldade de síntese deste aldeído contendo o grupo azido e também pelos resultados insatisfatórios obtidos anteriormente com os derivados de azido, a otimização das condições reacionais da reação de condensação foi realizada utilizando o aldeído **18** que contém o átomo de cloro.

Para a reação de condensação entre o aldeído **18** e a indanona **12**, foi inicialmente proposto a formação do enolato de indanona **12**, pelo tratamento com *n*-BuLi e diisopropilamina para formação de LDA *in situ* (**Esquema 18**). Esse método foi testado variando algumas condições (reagentes e concentrações dos mesmos), mas não houve formação do intermediário **19** desejado (**Tabela 4**).



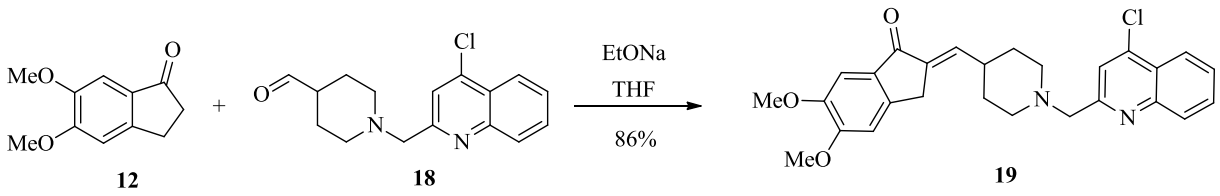
Esquema 18. Tentativa de síntese do intermediário **19**.

Tabela 4. Tentativas de condensação entre a indanona **12** e o aldeído **18** para obtenção do composto **19**.

Reagentes	Tentativa I (mmol)	Tentativa II (mmol)	Tentativa III (mmol)
Aldeído 18	1,0	1,0	1,0
Indanona 12	1,0	1,0	1,0
***n*-BuLi**	1,2	1,2	4,0
Diisopropilamina	1,2	1,2	4,0
HMPA	-	1,0	-

TROST & LATIMER, 1977; SUGIMOTO et al., 1992.

Outra metodologia descrita por Camps e colaboradores (2006) utiliza como base EtONa para este tipo de reação. Nestas condições, a indanona **12** apresentou uma mudança na coloração, de levemente amarelado para salmão, sugerindo a formação do enolato (**Esquema 19**). A formação do composto **19** pode ser observada por CCD como uma mancha azul fluorescente em 254 nm, devido à carbonila α,β insaturada formada. Após purificação em coluna clássica em gradiente diclorometano:acetato de etila, o produto de condensação **19** desejado foi obtido com 86% de rendimento e sua estrutura foi confirmada por métodos espectroscópicos de RMN de ^{1}H, RMN de ^{13}C, ESI/MS e IV (**Apêndice G**).



Esquema 19. Reação de condensação entre a indanona **12** e o aldeído **18**.

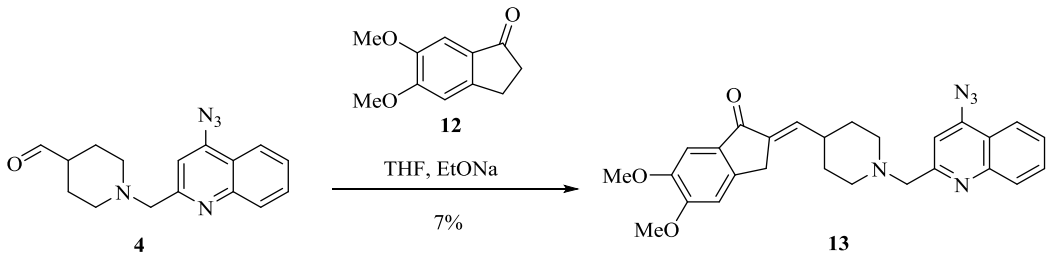
A partir do espectro de RMN de ^{1}H de **19,** na faixa de 8,22-7,62 ppm foram observados os sinais dos hidrogênios do anel quinolínico, bem como os simpletos dos hidrogênios aromáticos do núcleo da indanona 7,30 ppm e em 6,91 ppm e as metoxilas em 3,93 ppm e 3,97 ppm. No anel ciclopentanona da indanona foi encontrado o dubleto referente aos hidrogênios metilênicos em 3,61 ppm que acoplam (^{4}J=1,3 Hz) com o hidrogênio olefínico com deslocamento químico em 6,69 ppm. Pode ser observado também os sinais dos hidrogênios piperidínicos na faixa de 2,94 a 1,78 ppm, bem como o simpleto correspondente aos hidrogênios metilênicos em 3,83 ppm entre o núcleo quinolínico e o piperídinico.

O espectro de RMN ^{13}C de **19** apresentou os sinais característicos da indanona, os carbonos das metoxilas do anel aromático em 56,3 ppm e 56,2 ppm, no anel ciclopentanona o carbono carbonílico em 192,6 ppm e os carbonos olefínicos em 135,8 ppm e 139,6 ppm. O núcleo piperidínico apresentou carbonos vizinhos ao nitrogênio em 53,5 ppm, bem como os outros dois vizinhos a esses em 31,2 ppm, além do sinal do carbono entre o anel piperidínico ao quinolínico em 65,2 ppm.

Pelo espectro de ESI-MS foi confirmado o valor calculado para *m/z* $[M+H]^+$ 463,1783, sendo encontrado *m/z* $[M+H]^+$ 463,1782, e na espectroscopia de infravermelho foram observadas bandas características de carbonila α,β insaturada em 1688 cm^{-1} e banda de estiramento C=C em 1656 cm^{-1} .

Outras bases (NaOH e KOH) também foram estudadas para a formação do enolato de **12**. A utilização de NaOH 10% e brometo de tetra-*n*-butilamônio (TBAB) levou a formação do produto esperado, porém a reação não foi completa, uma vez que foi observado uma grande quantidade de **12** e **18** na mistura reacional (NIPHADE et al., 2008). O uso de KOH 4%, em etanol, conduziu a formação do produto **19**, embora a conversão também não tenha sido completa, além da formação de um subproduto de menor Rf em relação ao produto desejado **19** (HUANG et al., 2012). Frente a estes resultados, o método envolvendo etóxido de sódio foi selecionado para preparação de **19**.

Uma vez otimizada as condições reacionais da reação de condensação utilizando o aldeído **18**, a próxima etapa foi repetir a reação com o aldeído **4**. A reação foi realizada com a 5,6 dimetóxi-indanona (**12**) utilizando etóxido de sódio como base para formação do enolato de indanona (**Esquema 20**).



Esquema 20. Reação de condensação tipo aldol entre o aldeído **4** e o enolato de indanona **12** formado na presença de etóxido de sódio.

O protocolo utilizado foi igual ao anterior quando havia o átomo de cloro na quinolina (86% de rendimento), no entanto, foram observados a formação de alguns subprodutos, e a coloração da reação mudou drasticamente de salmão para preto após a adição do aldeído **4.** A purificação foi realizada por cromatografia flash automatizada (Biotage®), gradiente acetato

de etila: hexano, o rendimento do intermediário **13** foi baixíssimo, em torno de 7%. Uma alíquota foi enviada ao teste de inibição em AChE e BuChE.

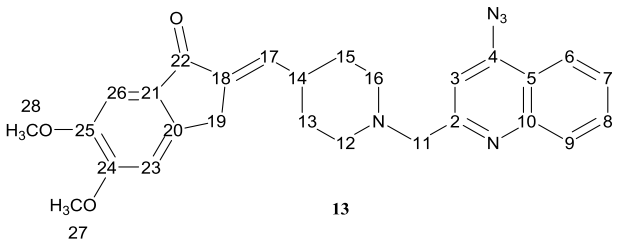


Figura 16. Estrutura numerada do composto **13**.

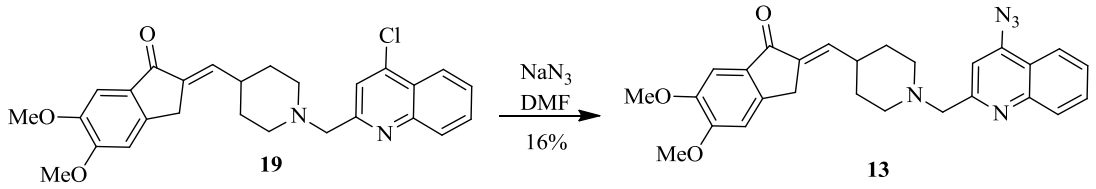
Os deslocamentos químicos de RMN de ^{1}H do produto de condensação **13** foram semelhantes ao intermediário **19**, com algumas diferenças características no deslocamento de dois hidrogênios do anel quinolínico. Ambos os sinais estão em região de maior blindagem, o sinal do H-3 identificado em 7,48 ppm no precursor azido e na molécula **19** em 7,80 ppm, o outro hidrogênio que se encontra mais blindado é o H-9 que em **19** foi encontrado em 8,22 ppm, e na molécula **13** entre 8,07-7,99 ppm como um multipleto, o qual coincide com o sinal de H-6. Por RMN de ^{13}C a maior diferença foi observada no carbono C-3 do anel quinolínico vizinho ao carbono ligado ao grupo azido, pois no produto de condensação **19** foi atribuído em 121,0 ppm e em **13** em região de maior blindagem, 108,3 ppm (**Figura 16**) (**Apêndice H**).

Algumas modificações foram realizadas para aumentar o rendimento (7%), como reduzir a temperatura (0°C) e utilizar outra base para formação do enolato, como solução etanólica de KOH 4% (HUANG et al., 2012), mas o rendimento foi mantido em torno de 7%.

Assim, novamente, foi observado que a presença do grupo azido influencia drasticamente no sucesso desta reação. Contudo, como proposto inicialmente, uma vez obtido o composto **13**, restaria apenas a etapa de redução da dupla e concomitantemente do grupo azido para obtenção do híbrido **3** desejado.

Desta forma, uma alternativa para a síntese do composto **13** foi realizar a reação de substituição do átomo de cloro para azido a partir do composto **19**. A reação foi realizada nas condições inicialmente propostas, azida de sódio sob aquecimento em DMF, contudo foi obtido o composto **13** com rendimento reduzido de 16%. Algumas tentativas foram realizadas para melhorar esse rendimento, como: duplicação da quantidade de azida de sódio; alteração da temperatura (70º e 100ºC), bem como o uso de irradiação por micro-ondas (5-20 min, 70 e 100ºC, 100 W). Como o material de partida e produto apresentavam Rfs muito próximos, bem como havia a presença de muitos subprodutos, foi empregada sílica flash em gradiente de diclorometano:acetato de etila, mas a separação não foi eficiente. Foi utilizado também CLAE

(fase estacionária reversa C18 variando a fase móvel acetonitrila/água, água/metanol), porém, não foi observada uma boa separação cromatográfica nas condições empregadas (**Esquema 21).**



Esquema 21. Reação de substituição do átomo de cloro por azido do composto **19** para obtenção de **13**.

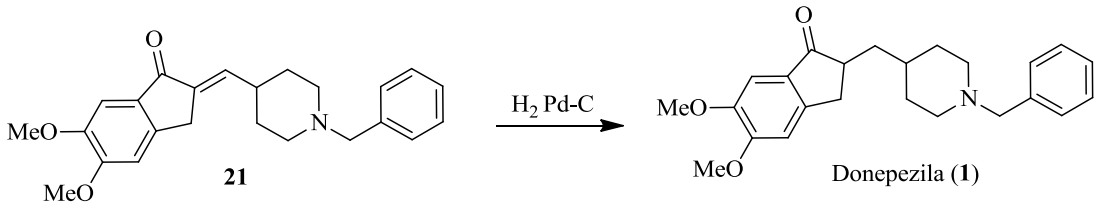
Pelo espectro de ESI-MS foi possível confirmar o valor calculado para *m/z* $[M+H]^+$ 470,2187, encontrado *m/z* $[M+H]^+$ 470,2186. Nas análises de IV constatou-se as bandas características de carbonila α,β insaturada em 1693 cm^{-1} , de estiramento C=C em 1647 cm^{-1} e a banda referente ao grupamento azida em 2117 cm^{-1}, confirmando a substituição do átomo de cloro pelo grupo azido.

Um dos problemas relacionados ao baixo rendimento da substituição do átomo de cloro por azido pode estar relacionado à reação de adição de Michael de azida de sódio como um nucleófilo ao carbono β olefínico com menor densidade eletrônica do sistema de carbonila α,β insaturada, reduzindo assim o rendimento da reação desejada para formação de **13**. Desta forma, a estratégia para evitar essa reação paralela, consistiu em reduzir a dupla ligação do composto **19**, antes da substituição do átomo de cloro pelo grupo azido no anel de quinolina.

Contudo apesar da inviabilidade de prosseguir a síntese do híbrido **3** a partir do composto **13**, este intermediário foi submetido à avaliação biológica.

3.2.5 Tentativa de síntese do 5,6-dimetóxindan-1-ona-4-piperidinil-metil-1-[(4-azidoquinolin-2-il)metil] (22)

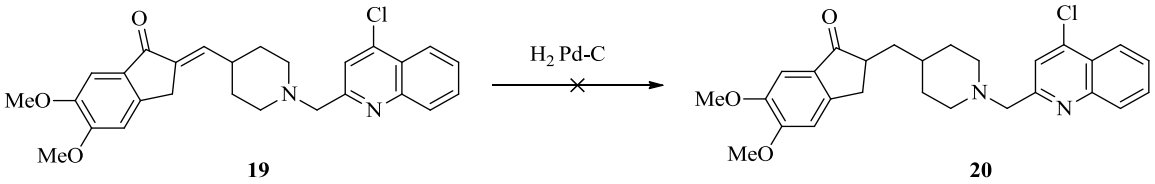
No intuito de obter o composto derivado de **19** com a dupla reduzida, foi observado na literatura que, de acordo com a síntese de donepezila, apresentado por Sugimoto e colaboradores (1992), o mesmo reduz a ligação insaturada α,β-carbonílica do intermediário **21**, via hidrogenação catalítica em paládio carbono 10%, a temperatura ambiente e pressão atmosférica (**Esquema 22**).



Esquema 22. Redução catalítica do intermediário **21** para síntese do fármaco donepezila (**1**) descrita por Sugimoto e colaboradores (1992).

Assim, explorando a literatura que descreve essa reação de redução catalisada por paládio carbono (10%) com compostos semelhantes a **19** (MARTÍNEZ et al., 2004; GANT et al., 2010), foi realizado um estudo das condições dessa reação a fim de encontrar a melhor condição para obtenção do produto **20** desejado.

Inicialmente foram empregados diferentes solventes: metanol, metanol-ácido acético 1% e acetato de etila, bem como a variação da pressão exercida (14 e 50 psi) e o tempo reacional (2, 5 e 24 horas). Em todos os casos foram observados a presença de material de partida **19** e subprodutos, mas não houve a formação do produto com a dupla exocíclica reduzida **20** (**Esquema 23**).

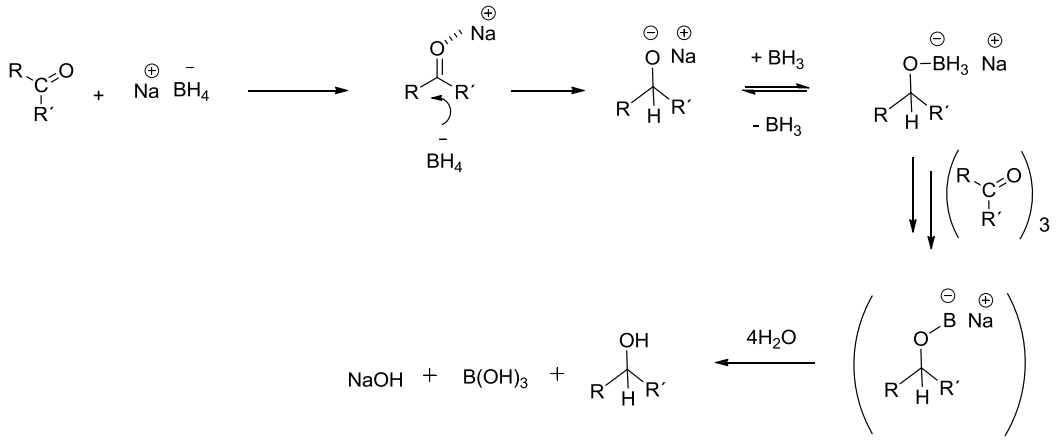


Esquema 23. Tentativa de redução da dupla alfa carbonílica do composto **19** via hidrogenação catalítica paládio carbono (10%).

Neste caso, provavelmente o grupo quinolínico presente na molécula **19**, diferentemente do intermediário **21** precursor de donepezila, estaria envenenando o catalisador, e reduzindo assim sua eficiência. De fato, o uso de quinolina e piridina estão descritos como envenenadores de paládio em reações seletivas de hidrogenação de alcino a alceno, inibindo sua redução total até alcano, como é o caso do catalisador de Lindlar que utiliza uma combinação de dois envenenadores: acetato de chumbo e quinolina (NISHIMURA, 2001; CLAYDEN et al., 2001).

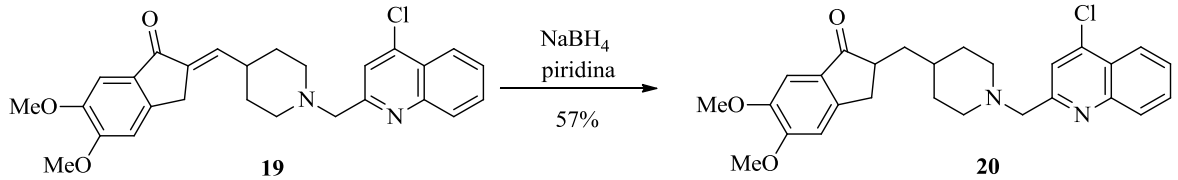
Outro agente redutor foi estudado, o $NaBH_4$ em piridina, que embora em condições suaves atue como redutor específico de aldeídos e cetonas aos respectivos álcoois, na presença de piridina demonstrou reduzir preferencialmente a dupla ligação em sistemas α,β

insaturados em detrimento da carbonila (HARIG & KUCK, 2006). De acordo com o mecanismo reacional proposto para redução de carbonilas por $NaBH_4$ (**Esquema 24**), é necessário que ocorra inicialmente a complexação com o cátion sódio (catálise por ácido de Lewis), tornando a carbonila mais susceptível ao ataque nucleofílico do hidreto (etapa lenta), assim o $NaBH_4$ irá reduzir preferencialmente a carbonila na presença de solventes próticos (etanol, metanol, H_2O), o qual não solvatam efetivamente cátions (Na^+) (SEYDEN- PENNE, 1997). No caso da estratégia explorada na síntese de **20**, de usar piridina como solvente, um solvente aprótico, ocorre uma melhor solvatação dos cátions (sódio), deixando-os menos disponíveis para a etapa de complexação inicial na carbonila, ocorrendo assim preferencialmente a adição de hidreto na dupla ligação.



Esquema 24. Mecanismo proposto para redução de carbonilas por $NaBH_4$,evidenciando a etapa inicial de complexação com o Na^+.
Fonte: Adaptado de DANTAS, 2010.

Utilizando essa estratégia de redução de **19**, empregando $NaBH_4$ em piridina, foi possível obter o intermediário **20**, com 57 % de rendimento (**Esquema 25**). O mesmo apresenta em CCD uma mancha de mesmo Rf que o intermediário **19** embora com outra coloração ao ser revelado em UV 254 nm. Os sinais de RMN de ^1H , RMN de ^{13}C e ESI/MS de **20** confirmaram a estrutura desejada (**Apêndice I**).



Esquema 25. Redução da dupla alfa carbonílica do composto **19** com o auxílo de $NaBH_4$ em piridina.

No espectro de RMN de ^{1}H foi possível observar os hidrogênios aromáticos do anel de quinolina na faixa de 8,21-7,61 ppm, os simpletos do núcleo indanona em 7,18 ppm e 6,86 ppm, bem como os simpletos das metoxilas em 3,96 ppm e 3,91 ppm.

A redução da dupla ligação conduziu a formação de um carbono quiral o qual, faz com que os quatro hidrogênios dos dois carbonos vizinhos sejam diasterotópicos, portanto os mesmos apresentam deslocamentos químicos em regiões diferentes do espectro. Assim foi observado em 2,78-2,67 ppm o multipleto com integral de dois hidrogênios, correspondente a um dos hidrogênio metilênicos da indanona (H-19b) e ao hidrogênio ligado ao carbono quiral (H-18) e em 3,25 ppm é observado um duplo dubleto correspondente ao outro hidrogênio metilênico da indanona(H-19-a), com integral para um hidrogênio (**Figura 17**).

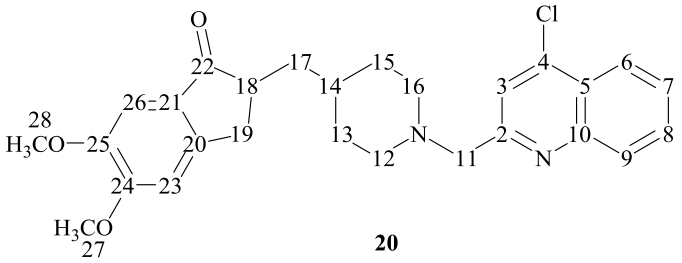


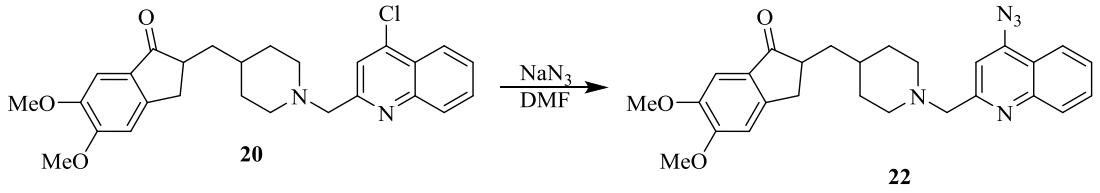
Figura 17. Estrutura numerada do composto **20**.

No espectro de RMN de ^{13}C foram observados os carbonos das metoxilas do anel aromático em 56,1 ppm e 56,2 ppm, carbono carbonílico em 207,8 ppm, não mais relacionado a um sistema α,β insaturado, portando mais desblindado. Os carbonos saturados C-18 e C-17 apresentaram deslocamentos químicos em 45,5 ppm e 38,7 ppm, respectivamente, ambos mais blindados devido a redução da dupla ligação. Com relação ao núcleo piperidínico os C-12 e C-16 coincidiram em 54,3 ppm e C-13 e C-15 foram observados e 31,8 e 33,1 ppm respectivamente, enquanto, C-14 foi identificado em 34,3 ppm. Em adição, o sinal C-11, unindo o anel piperidínico ao quinolínico foi observado em 65,2 ppm, enquanto C-2 quinolínico e C20 em 155,5 ppm. O carbono C-6 do anel quinolínico e C-21 do núcleo indanona foram sobrepostos em 129,3 ppm. Análise de espectrometria de massas confirmou a obtenção de **20**, calculado para $C_{27}H_{29}ClN_2O_3$ *m/z* $[M+H]^+$ 465,1939, encontrado *m/z* $[M+H]^+$ 465,1931 (**Figura 17**) (**Apêndice I**).

Após a obtenção do intermediário **20**, a próxima etapa consistiu em substituir o átomo de cloro por azido para obtenção do composto **22**, o qual em etapa subsequente fosse reduzido a amino para síntese do híbrido **3**.

Na tentativa de síntese do intermediário azido **22** foi utilizado azida de sódio em DMF, sob aquecimento a 100°C, por 24 horas (**Esquema 26**). No entanto, nesta reação foi

observada a formação de uma mistura complexa, a qual foi purificada por cromatografia em coluna clássica em gradiente diclorometano:acetato de etila. Algumas frações foram isoladas, sendo uma delas provavelmente o produto **22** desejado, mas obtido em quantidade insuficiente para todas as demais análises e sua identificação inequívoca por RMN. No entanto foi observado o íon por ESI-MS *m/z* encontrado $[M+H]^+$ 472,2341 *m/z* calculado $[M+H]^+$ 472,2343.

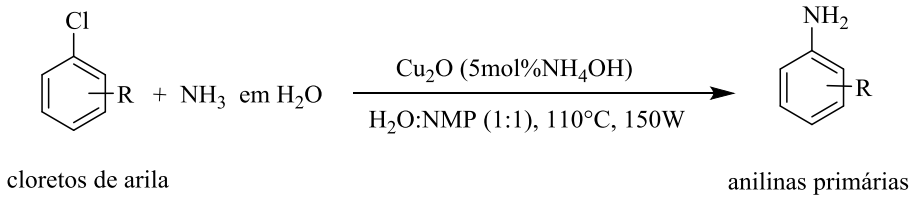


Esquema 26. Reação de substituição do átomo de cloro, intermediário **20** pelo grupo azido para obtenção do composto **22**.

3.2.6 Síntese do 5,6-dimetoxindan-1-ona-4-piperidinil-metileno-1-[(4-aminoquinolin-2-il)metil] (25)

Como o rendimento para obtenção dos derivados azido **13** e **22** não foram satisfatórios, a proposta de reduzir a função azido ao grupo amino da posição 4 da quinolina foi inviável. Desta forma, uma alternativa encontrada foi a aminação direta da posição 4 do anel de quinolina através da reação de substituição do átomo de cloro pelo grupamento amino.

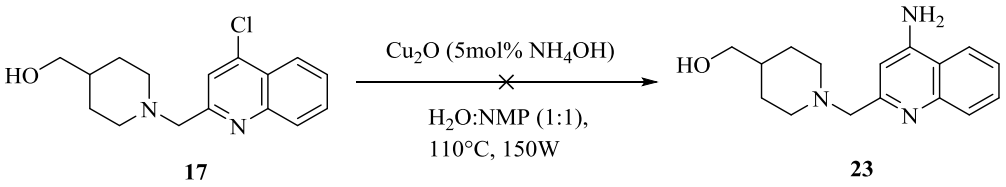
Xu e Wolf (2009) descreveram esse tipo reação de substituição com cloretos de arila em solução de amônia, catalisadas por cobre, sob irradiação em micro-ondas, para obtenção de anilinas primárias, com ótimos rendimentos (**Esquema 27**).



Esquema 27. Reação de aminação catalisada por cobre, realizada por Xu e Wolf (2009).

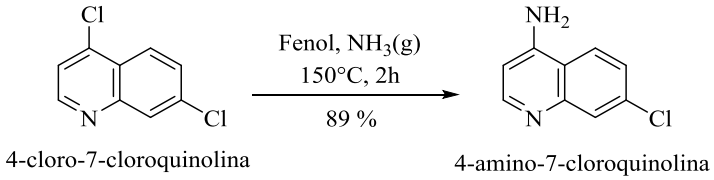
Assim, uma reação teste de aminação direta foi realizado primeiramente com um intermediário da rota sintética, o composto **17**, para padronização do método. No entanto, após algumas tentativas mantendo as mesmas condições reacionais descritas por Xu eWolf

(2009) e variando o tempo de irradiação, foi observada a recuperação de parte do material de partida **17** e a formação de uma mistura complexa. Após purificação do resíduo bruto não foi possível isolar o produto desejado (**Esquema 28**).



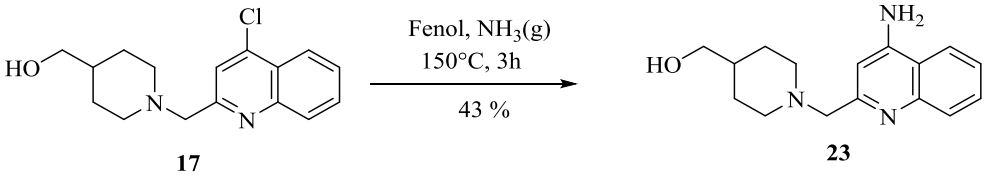
Esquema 28. Tentativa de aminação do intermediário **17** para obtenção de **23**, e padronização do método.

Outro método foi descrito por Perez e colaboradores (2012) utilizando fenol e amônia gasosa, a qual é borbulhada no balão reacional sob aquecimento (150°C) por 2 horas. De acordo com a referência o produto 4-amino-7-cloroquinolina foi obtido com 89% de rendimento a partir do derivado cloro correspondente (**Esquema 29**).



Esquema 29. Reação de aminação direta utilizando fenol e amônia gasosa realizada por Perez e colaboradores (2012).

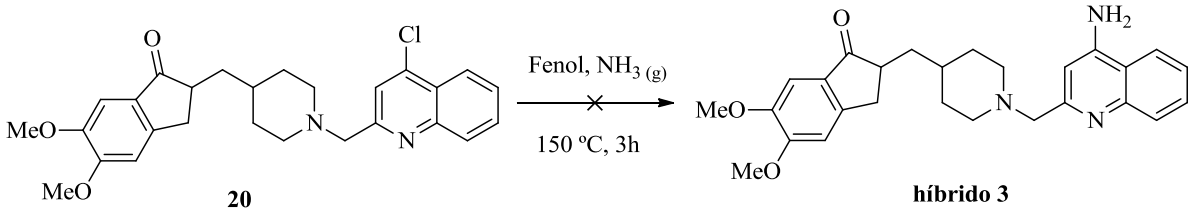
Assim, para padronização dessa reação, foi utilizado o mesmo intermediário **17** como material de partida (**Esquema 30**). Após alguns testes variando a temperatura (150 e 180 °C) e o tempo reacional (2 e 3 horas) foi estabelecida a melhor condição reacional, ou seja, temperatura de 180 °C e tempo reacional de 3h. O produto **23** desta reação foi obtido com 43% de rendimento, sendo confirmada a sua obtenção por RMN de ^{1}H, RMN de ^{13}C e ESI-MS *m/z* encontrado $[M+H]^+$ 272,1766 *m/z* calculado $[M+H]^+$ 272,1757.



Esquema 30. Reação de aminação do intermediário **17** para padronização do método.

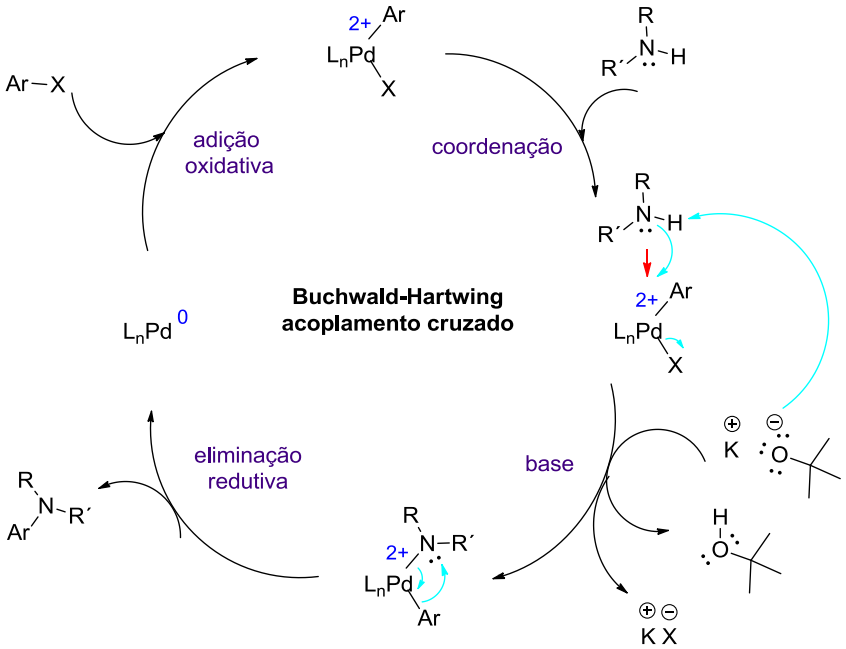
Após a reação de aminação ter sido bem sucedida com o composto **17**, foram iniciados os estudos com o composto **20** nas mesmas condições reacionais anteriores (**Esquema 31**).

Após purificação da amostra, tanto por cromatografia em camada delgada preparativa (CCDP) (acetato de etila:metanol 9:1 + $NH_4OH_{(v)}$) ou por CLAE (coluna C18, fase móvel H_2O+TFA (0,1%):MeOH 70:30) o produto principal isolado apresentava alguns sinais característicos no RMN de ^1H, como os sinais da quinolina e metoxilas, mas devido a pequena quantidade obtida, a análise por RMN de ^1H ficou comprometida. Análise por ESI-MS foi realizada com a amostra bruta, onde puderam ser observados dois fragmentos de maior intensidade, um com *m/z* 459,2321 e outro com *m/z* 462,2235, sendo que o produto final **3** tem *m/z* calculado para 445,2365. Após purificação, nova análise por ESI-MS foi realizada, sendo observado apenas o fragmento de *m/z* 459,2321, sugerindo que houve a adição de mais um átomo de nitrogênio na molécula, já que a diferença de *m/z* entre o híbrido **3** e do fragmento é de aproximadamente 14.



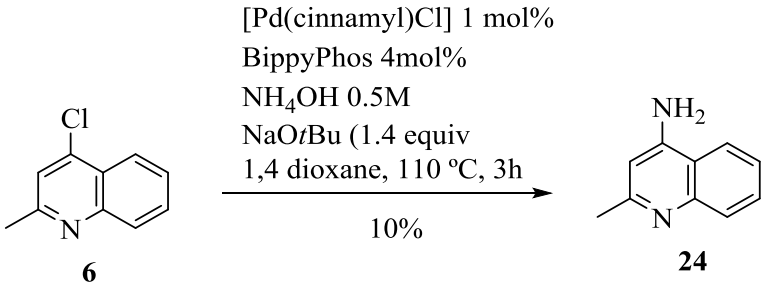
Esquema 31. Tentativa de aminação direta do intermediário **20** para obtenção do híbrido **3**.

Devido ao baixo rendimento da reação anterior foi estudada uma alternativa para reação de aminação, conhecida como Buchwald-Hartwig, a qual promove o acoplamento de um haleto de arila com uma amina utilizando paládio como catalisador e base forte. A reação é iniciada pela adição oxidativa do haleto de arila ao paládio que é seguido pela coordenação da amina ao mesmo. A base forte abstrai um próton da amina, formando um amideto, que por sua vez ataca o paládio e favorece a saída do haleto como grupo abandonador. Uma eliminação redutiva produz a aril amina final e regenera o catalisador (**Esquema 32**). O sistema catalítico BippyPhos/$[Pd(cinnamyl)Cl]_2$, promove a aminação de uma variedade de cloretos, brometos e tosilatos de (hetero)arila, com quantidades baixas a moderadas de catalisador (CRAWFORD et al., 2013; 2014).



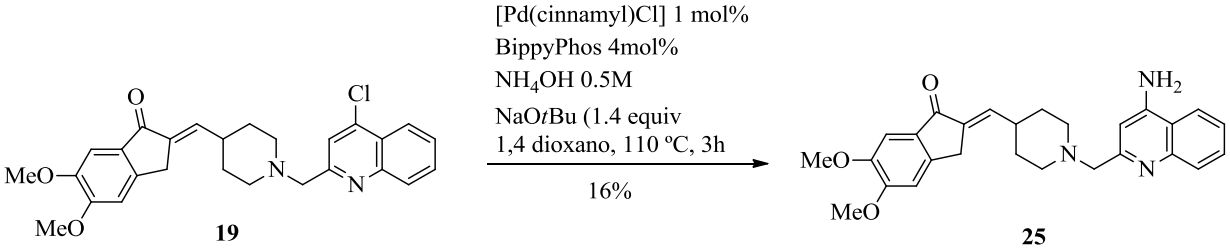
Esquema 32. Mecanismo reacional da aminação de Buchwald-Hartwing.
Fonte: Adaptado de Buchwald hartwig amination- http://www.name-reaction.com/buchwald-hartwig-amination.

Essa reação foi inicialmente testada com o reagente comercial 2-metil-4-cloroquinolina (**6**), como um modelo, nas mesmas condições reacionais descritas por Crawford e colaboradores (2013, 2014) e após 3 horas de reação foi possível visualizar por CCD um produto com Rf muito pequeno, praticamente na origem (**Esquema 33**). O material foi purificado em cromatógrafo flash automatizado em fase estacionária reversa (C18) utilizando como eluente acetonitrila:água (20:80 v/v). Por RMN de ^{1}H em DMSO-d_6 foi possível observar os sinais dos dois hidrogênios da amina aromática em 6,73 ppm, bem como o deslocamento do singleto vizinho ao grupo amina para região de maior blindagem, podendo concluir que a amina **24** havia sido formada, embora com rendimento de apenas 10%.



Esquema 33. Reação de aminação teste para conversão de cloro-quinolina **6** a amino-quinolina **24**.

Após o teste com o reagente comercial, foi realizada a reação para obtenção do produto **25**, a partir do intermediário **19**, utilizando o sistema catalítico BippyPhos/[Pd(cinnamyl)Cl]$_2$ (**Esquema 34**) nas mesmas condições utilizadas para síntese do composto **24**. O material foi purificado por cromatografia em coluna de sílica flash, em gradiente de diclorometano:metanol (0-15%), com rendimento de 16%.



Esquema 34. Reação de obtenção do intermediário amino **25**.

Por RMN de ^{1}H foi possível observar de maneira geral um deslocamento de vários sinais para a região de maior blindagem. A maior variação ocorreu principalmente com o simpleto H-3 vizinho ao grupo amino de 7,80 ppm no composto clorado **19** para 6,93 ppm, devido ao efeito *orto* do grupo NH_2 que aumenta a densidade eletrônica nessa posição do anel de quinolina. Houve também o deslocamento do hidrogênio aromático quinolínico H-7 de 7,62 ppm para 7,40 ppm. (**Figura 18**).

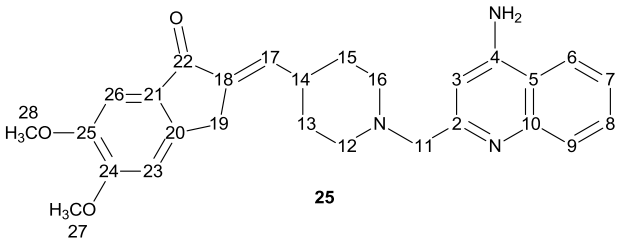


Figura 18. Estrutura numerada do composto **25**.

Outros hidrogênios que tiveram seus deslocamentos químicos alterados foram os hidrogênios aromáticos da porção indanônica, H-23 em 7,30 ppm e H-26 em 6,91 ppm para composto **19** e no produto **25** variou para 6,85 ppm e 7,19 ppm, respectivamente.

Com relação aos hidrogênios piperidínicos a diferença maior ocorreu com relação ao H-14, identificado anteriormente como multipleto entre 2,33-2,42 ppm com integral 1 no composto clorado **19**, e no derivado amino atribuído na mesma região dos H-12ax e H-16ax, resultando em um multipleto entre 2,10-2,30 ppm com integral 3.

Pelo espectro de RMN de ^{13}C, embora obtido com alta relação sinal/ruído, foi possível visualizar o carbono carbonílico em 191,6 ppm, os carbonos metínicos do grupo indanona (C23 e C26) em 106,3 ppm e 103,9 ppm, respectivamente, as metoxilas em aproximadamente 55,0 ppm, o carbono olefínico em 138,2 ppm, os piperidínicos próximos ao nitrogênio em 52,3 ppm, bem como os mais distantes em 30,1 ppm e o C14 em 35,6 ppm. O carbono (C11) que une o anel piperidínico ao quinolínico foi identificado em região de maior blindagem em 61,4 ppm, quando comparado ao composto **19** em 65,2 ppm. C3 também foi observado em região de maior blindagem devido ao efeito do grupo amino, em 101,4 ppm (antes 121,0 ppm), além dos carbonos metínicos quinolínicos 130,6 (C8), 124,6 (C7), e os demais 121,4(C9) e 122,1 (C6), um pouco mais blindados que o composto clorado. Como foi dito anteriormente, os sinais foram observados em baixa intensidade e os carbonos quaternários C2, C4, C5 e C10 não foram visualizados adequadamente por RMN de ^{13}C e nem com o auxilio de técnicas bidimensionais como HMQC e QMBC (**Figura 18**) (**Apêndice I**).

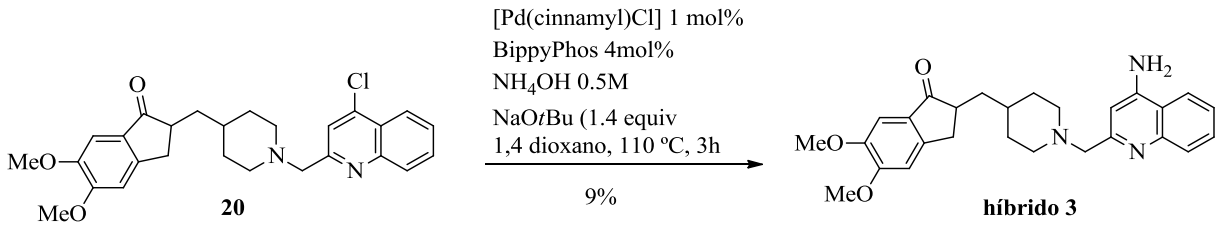
O material foi analisado por ESI-MS, confirmando a massa molecular da molécula **25**, ($C_{27}H_{29}N_3O_3$) *m/z* calculado $[M+H]^+$ 444,2282 e encontrado *m/z* $[M+H]^+$ 444,2297.

Algumas variações, como tempo reacional e quantidade de base, foram estudadas a fim de melhorar o rendimento desta etapa, contudo, em nenhum caso foi obtido rendimento superior a 16%.

No entanto, como o composto **25** é o penúltimo composto da rota sintética, faltando apenas a redução da dupla ligação α,β- insaturada, pela mesma metodologia já descrita anteriormente, para a síntese do híbrido **3** final, este resultado foi considerado satisfatório para conclusão do projeto.

3.2.7 Síntese do 5,6-dimetóxindan-1-ona-4-piperidinil-metil-1-[(4-aminoquinolin-2-il)metil] (híbrido 3)

Diante dos resultados mostrados anteriormente referentes aos rendimentos das reações de redução e aminação, optou-se por realizar a reação de aminação diretamente do composto **20** reduzido a fim de obter o híbrido **3** desejado (**Esquema 35**).



Esquema 35. Reação de aminação do composto **20** para obtenção do híbrido **3**.

Apesar do rendimento moderado (57%) da reação de redução, seguido por outro reduzido de 16% (de acordo com a reação anterior para obtenção de **25)**, o híbrido final foi sintetizado com 9,0 % de rendimento, embora levemente impuro e em quantidades insuficientes para análises e atribuições inequívocas por RMN de ^{13}C e correlações, devido ao emprego e consumo elevado dos diversos intermediários reacionais para padronização das diversas condições reacionais.

Na análise por RMN de ^{1}H do híbrido **3** foi possível observar o mesmo padrão de sinais obtidos para o composto clorado **20**, havendo um deslocamento químico para região de maior blindagem de todos os hidrogênios quinolínicos, com destaque maior para o H-3 singleto vizinho ao grupamento amino, o qual sofreu um deslocamento de 7,79 ppm do composto clorado **20** para 7,03 ppm no composto híbrido **3**. Os demais sinais da piperidina e indanona não sofreram mudanças pronunciadas.

A análise por ESI-MS ($C_{27}H_{31}N_3O_3$) com *m/z* $[M+H]^+$ calculado para 446,2438 e encontrado *m/z* $[M+H]^+$ 446,2414, também confirma a obtenção do híbrido **3** (**APÊNDICE K**).

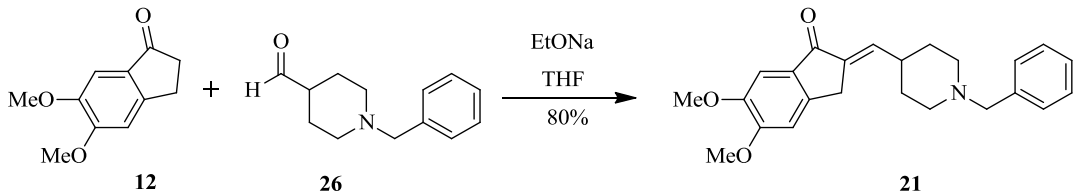
No momento, a rota sintética para síntese de uma maior quantidade de híbrido **3** está sendo retomada para que possa ser realizada uma completa atribuição dos dados de RMN e também para os realização dos ensaios biológicos.

3.2.8. Síntese de donepezila (1)

Donepezila (**1**) é um fármaco utilizado como padrão nos ensaios biológicos e, no momento dos ensaios preliminares, este não estava disponível para aquisição. Por esse motivo, foi realizada a síntese deste fármaco e também do intermediário olefínico **21** devido à disponibilidade do precursor *N*-benzilpiperidina-4-carboxaldeído (**26**) (**Esquema 36**).

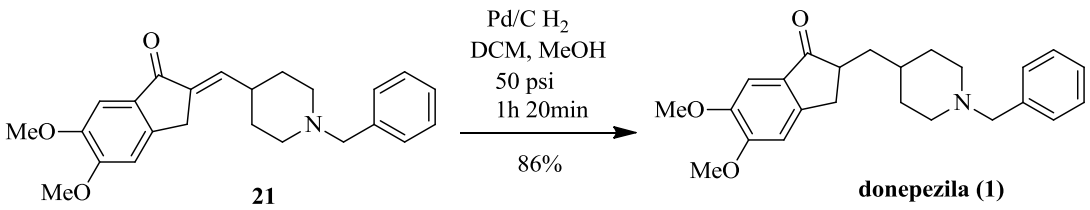
Desta forma, a síntese de donepezila consistiu em duas etapas, a primeira com a condensação entre o enolato de indanona **12** e o aldeído **26**, seguida de redução catalítica da dupla exocíclica para obtenção do composto **1**.

A síntese do intermediário **21** foi realizada seguindo o mesmo método para obtenção do composto **19,** ou seja, foi utilizado etóxido de sódio (em THF) como base para formação do enolato de **12**. A mistura reacional foi purificada por cromatografia clássica em sílica flash, em gradiente diclorometano:acetato de etila, o qual conduziu a um rendimento de 80%. A estrutura do intermediário **21** foi confirmada por RMN de ^{1}H. Os hidrogênios aromáticos do anel benzílico foram identificados na faixa de 7,40 a 7,12 ppm, bem como um dos simpletos do núcleo indanônico, enquanto o outro simpleto foi observado em região mais blindada, 6,9 ppm. Os demais hidrogênios foram adequadamente atribuídos, como o dubleto referente ao hidrogênio da dupla ligação em 6,66 ppm, metoxilas em 3,90 ppm e 3,98 ppm, hidrogênios metilênicos do carbono que une o anel piperidínico ao quinolínico em 3,59 ppm, hidrogênios metilênicos do núcleo ciclopentanona em 3,54 ppm, bem como os hidrogênios do núcleo piperidínico caindo em região de maior blindagem (2,93 a 1,57 ppm) (**Esquema 36**).



Esquema 36. Síntese do intermediário **21**, primeiro produto da síntese de donepezila (**1**).

Na segunda etapa como foi dito, foi realizada a redução clássica da dupla ligação exoxíclica do intermediário **21**, para obtenção do produto desejado donepezila (**1**) com 86% de rendimento (**Esquema 37**).



Esquema 37. Redução da dupla exocíclica do intermediário **21** para obtenção de donepezila (**1**).

A purificação foi realizada por coluna cromatográfica clássica em sílica flash, em gradiente diclorometano:acetato. Os dados de RMN ^{1}H confirmam a estrutura de donepezila

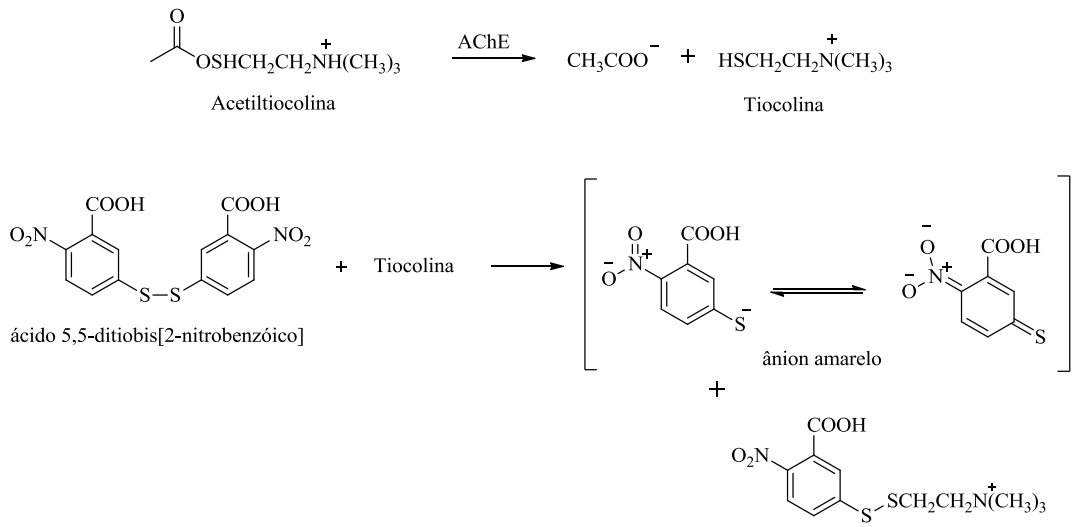
(**1**), com os mesmos sinais citados acima, mas a ausência do sinal do hidrogênio da dupla ligação em 6,65 ppm. Em contrapartida, foram identificados os sinais mais blindados em 2,08-1,85 ppm e outro em 1,49 ppm referentes aos hidrogênios resultantes da redução. Adicionalmente, foram observados os sinais em 3,23 ppm (dd, *J*=17,5; 8,1 Hz) e 2,70 ppm (multipleto) referentes aos hidrogênios metilênicos do anel ciclopentanona, coincidentes com o sinal do hidrogênio de carbono metínico quiral do mesmo anel.

3.3. ENSAIOS BIOLÓGICOS

3.3.1 Ensaio de inibição de colinesterases (Ensaio de Ellman)

O método descrito por Ellman é baseado na medida da velocidade de formação da tiocolina a partir da hidrólise de acetiltiocolina (substrato análogo da acetilcolina) pela acetilcolinesterase. O produto da hidrólise (tiocolina) reage com o ácido 5,5-ditiobis [2-nitrobenzóico] (DTNB, reagente de Ellman), resultando em uma mistura de dissulfeto e um ânion com coloração amarela, e absorção em 412 nm (ELLMAN et al., 1961) (**Esquema 38**).

Na presença de inibidor de acetilcolinesterase, a acetiltiocolina não é hidrolisada, não havendo a formação de tiocolina, que por sua vez não há formação do ânion amarelo, reduzindo o valor da absorbância.



Esquema 38. Hidrólise da acetiltiocolina e reação de Ellman.

Os compostos mostrados na **Figura 19** foram submetidos aos ensaios de inibição de colinesterases, com as enzimas *h*AChE e *h*BuChE, e realizados no grupo da Prof. Ana Martinez no Instituto de Química Médica – CSIC, Madrid, Espanha, durante estágio BEPE da bolsita (Proc. Fapesp 2014/10414-0). Com relação aos compostos **4**, **11**, **17**, **18** e **23**, precursores contendo apenas o grupo quinolil-piperidina, também foram avaliados nos ensaios de inibição para fins comparativos. A disponibilidade do intermediário olefínico (**21**), usado na última etapa de redução para obtenção de donepezila (**1**), permitiu a realização dos ensaios enzimáticos de forma comparativa, uma vez que a maioria dos intermediários obtidos, **13**, **19**, **20,** e **25**, similares ao híbrido **3**, apresenta grupo olefínico semelhante a **21**.

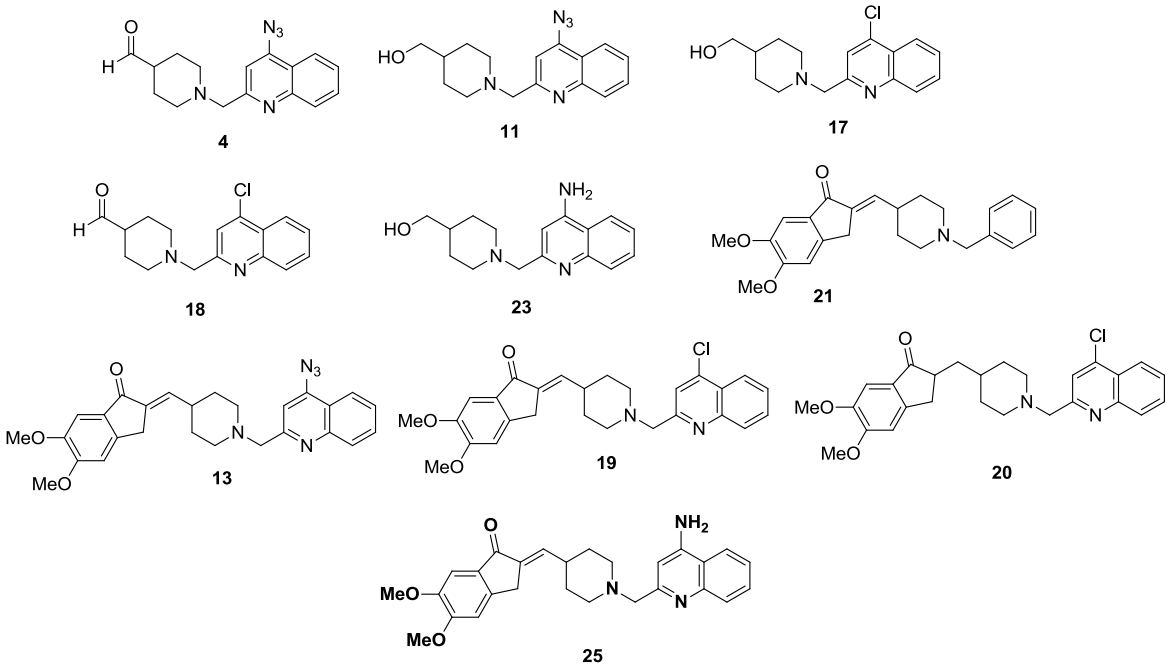


Figura 19. Compostos submetidos ao ensaio de Ellman.

Os resultados obtidos nos ensaios de inibição da *h*AChE e *h*BuChE são mostrados na **Tabela 5**, descritos em porcentagem de inibição na concentração de 10 μmol.L^{-1}, bem como os IC_{50} calculados em comparação com os fármacos de referência tacrina e donepezila.

Tabela 5. Resultados dos ensaios de Ellman por microplaca, realizado para os precursores, intermediários e os fármacos de referência tacrina e donepezila, em porcentagem de inibição na concentração de 10 μmol.L^{-1}, bem como os IC_{50}, envolvendo as enzimas AChE e BuChE.

Compostos	% inibição *h*AChE (10μM)	IC_{50} *h*AChE (μM)	% inibição *h*BuChE (10μM)	IC_{50} *h*BuChE (μM)
Donepezila (1)	98	0,0057±0,0005	--	9,14±0,56
Tacrina (2)	--	0,23±0,069	--	0,040±0,002
4	5,1	>10	--	--
11	3,6	>10	36	>10
13	84	4,88±0,45	42	>10
17	10	>10	24	>10
18	6,7	>10	--	--
19	14	>10	--	>10
20	21	>10	--	5,99±0,64
21	96	0,13±0,069	24	>10
23	3,6	>10	35	>10
25	--	0,014±0,009	--	3,69±0,84

De acordo com os resultados mostrados na **Tabela 5**, podemos observar que os precursores da rota sintética para preparação do híbrido **3**, compostos **4, 11, 17, 18 e 23**, apresentam baixa atividade inibitória em *h*AChE e *h*BuChE, provando que o tamanho e a funcionalização da molécula são fundamentais para a atividade biológica.

Por outro lado, alguns compostos, produtos da condensação entre a 5,6-dimetóxi-indanona (**12**) com alguns destes precursores, apresentaram atividade anticolinesterase bastante interessante. Por exemplo, o derivado amino **25** foi o mais potente de toda a série, com inibição bastante expressiva da AChE e IC_{50} na ordem nanomolar, 0,014 μmol.L^{-1}, além do correspondente azido **13** com IC_{50} de 4,88 μmol.L^{-1}. Adicionalmente, o composto amino **25** também foi um inibidor moderado de BuChE (IC_{50} 3,69 μmo.L^{-1}). Em termos comparativos, os compostos **13** e **25** apresentam os grupos 5,6-dimetóxi indanona, anel quinolínico, *linker* piperidina e a dupla ligação oriunda da condensação tipo aldol. O que os diferenciam é apenas o substituinte na posição 4 do anel de quinolina, em **13** o grupo azido e

em **25** o grupo amino, sugerindo que o grupo amino seja responsável por interações adicionais na AChE de forma a aumentar sua afinidade e, consequentemente, sua atividade inibitória.

O composto **21**, precursor de donepezila, exibiu um IC_{50} de 0,13 μmol.L^{-1}, 23 vezes menos ativo do que donepezila (0,0057 μmol.L^{-1}), o que demonstra que a redução da dupla ligação aumenta a atividade, provavelmente por aumentar a flexibilidade da molécula e facilitar as interações entre ligante e proteína. Assim, é possível inferir que o híbrido **3**, obtido pela redução do composto **25**, poderá apresentar atividade inibitória ainda mais pronunciada que seu precursor.

Vale ressaltar que o composto clorado **20** também apresentou atividade anti-BuChE, com IC_{50} 5,99 μmol.L^{-1}.

3.3.2 Ensaio de competitivade AChE e BuChE - Mecanismo de ação

Muitas enzimas obedecem à cinética de Michaeles-Menten, para a qual:

$$v = \frac{Vmax\ [S]}{Km\ + [S]}$$

Pode ser reescrita na forma de Lineweaver-Burk como:

$$\frac{1}{v} = \left(\frac{Km}{Vmax} \cdot \frac{1}{[S]}\right) + \frac{1}{Vmax}$$

Esta forma de descrever a equação de Michaeles-Menten enfatiza a relação linear de *1/[S]* com 1/*v*. Com relação ao mecanismo de ação, quatro tipos de inibições podem ocorrer, a inibição competitiva, não competitiva, incompetitiva e inibição mista.

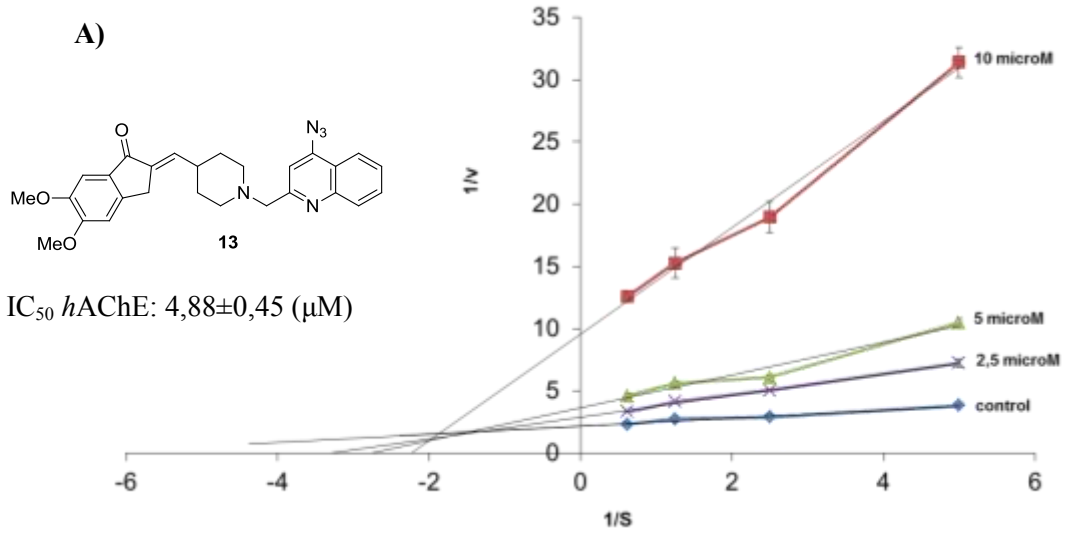
De acordo com os gráficos de Lineweaver-Burk, inibidores competitivos possuem a mesma interceptação em *y*, mas há diferentes inclinações e interceptações em *x*. Uma vez que o substrato está ligado na enzima, o inibidor não influencia a velocidade que a enzima transforma o substrato em produtos. O que significa que o inibidor competitivo afeta a ligação do substrato (K*m*), mas não a velocidade da reação.

Na inibição não competitiva há curvas com a mesma intercepção em *x* (K*m* não é afetado), mas diferentes inclinações e interceptações em *y*. Esse tipo de inibidor não tem influência na interação do substrato com o sítio ativo e não afeta *Km*, entretanto, tem uma profunda influencia inibitória na velocidade da reação.

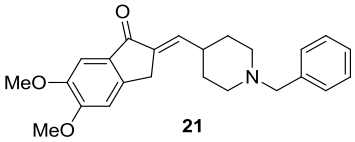
Inibição incompetitiva causa diferentes intercepções em ambos os eixos *y* e *x* (as curvas com inibidor são paralelas à curva sem inibidor). Essa inibição reduz o *Vmax* e *Km* ao mesmo tempo e na mesma proporção.

Inibidores mistos causam intersecções acima ou abaixo do eixo *x*. O inibidor misto é aquele que interfere com a ligação no sítio ativo enzimático e reduz a velocidade de transformação do substrato pela enzima. Este mecanismo pode ser observado quando o inibidor interage com a enzima em região distante do sítio ativo, podendo interferir com a ligação do substrato e a catálise. Esse tipo de inibidor reduz *Vmax* e aumenta *Km* (COX & NELSON, 2013).

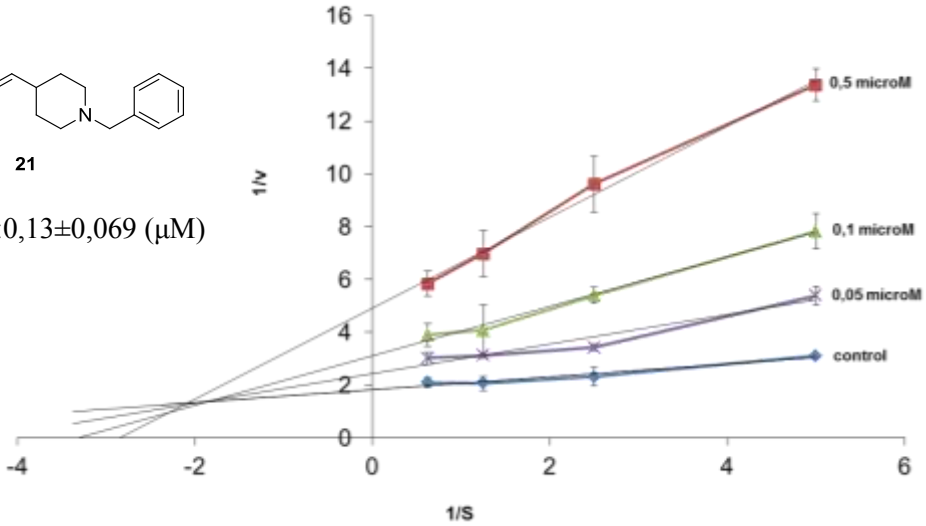
Assim para avaliar o mecanismo de ação dos compostos em acetilcolinesterase ou butirilcolinesterase, os experimentos foram realizados utilizando uma combinação de quatro concentrações de substratos e três concentrações de inibidores. Uma curva Lineweaver-Burk dos dados foi construída, na qual cada ponto representa a média de três experimentos diferentes (**Gráfico 1**).



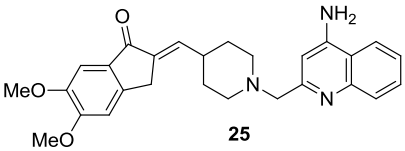
B)



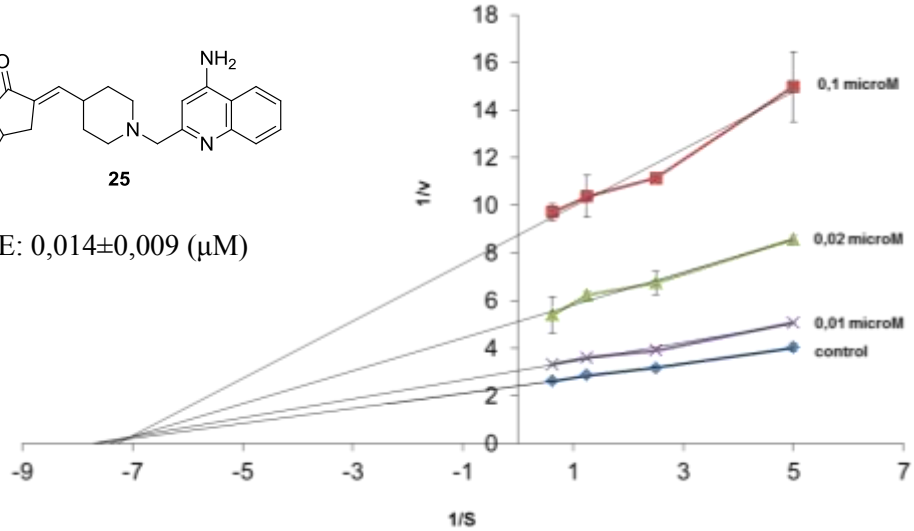
IC_{50} *h*AChE:0,13±0,069 (μM)



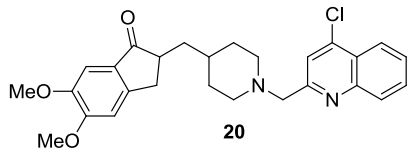
C)



IC_{50} *h*AChE: 0,014±0,009 (μM)



D)



IC_{50} *h*BuChE: 5,99±0,64 (μM)

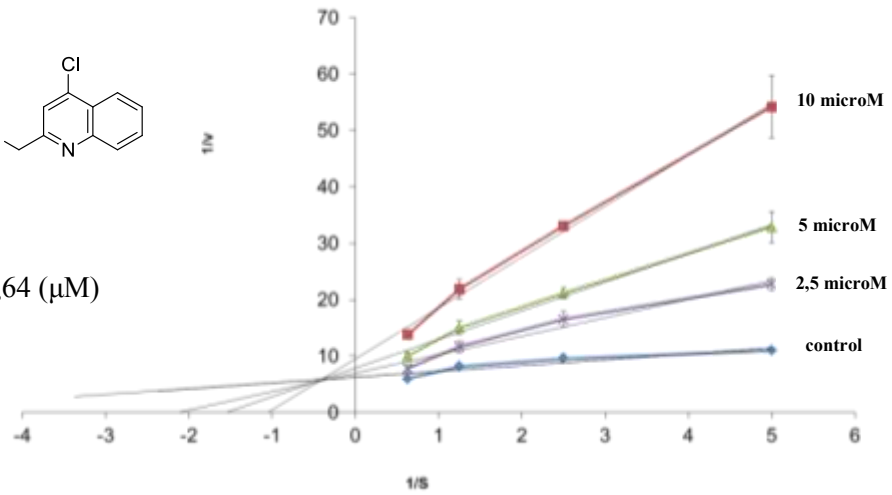


Gráfico 1. Ensaios de competitividade do composto **13** em *h*AChE (**A**), do composto **21** em *h*AChE (**B**), do composto **25** em *h*AChE (**C**) e do composto **20** em *h*BuChE (**D**).

Após análise dos dados mostrados no **Gráfico 1**, é possível verificar que os derivados azido **13** e o precursor do donepezila **21** apresentam modo de inibição de AChE misto, ou seja, podem estar interagindo no sítio ativo e periférico, como um inibidor *dual binding site*, como proposto nos estudos de Modelagem Molecular. O composto clorado **20**, também atuou como inibidor misto em BuChE, podendo estar atuando em um possível sítio alostérico, e os ensaios envolvendo AChE não foram realizados devido a baixa atividade em relação a esta enzima.

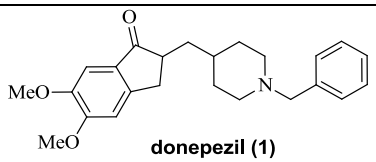
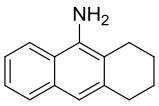
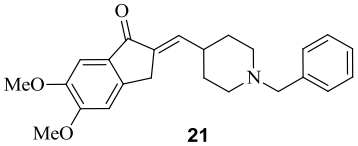
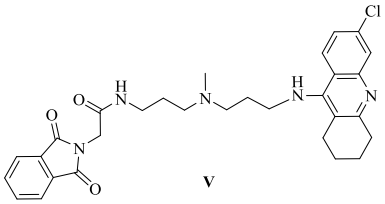
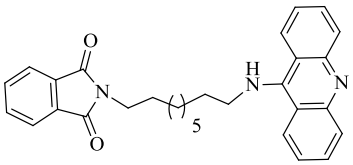
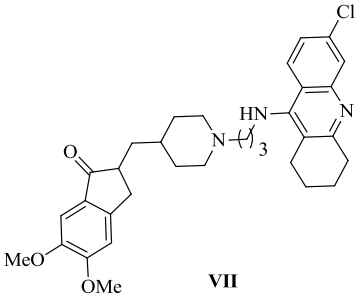
Diferentemente dos resultados anteriores, o composto amino **25** mostra uma curva de inibição junto a AChE não competitiva, tendendo a misto. Neste caso, o composto pode estar interagindo apenas com o sítio periférico ou em sítio diferente do substrato natural. Estudos mais aprofundados de modelagem molecular e de ressonância magnética nuclear (STD-NMR) e *tr*NOESY estão sendo realizados a fim de estudar tal possibilidade.

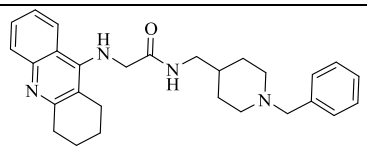
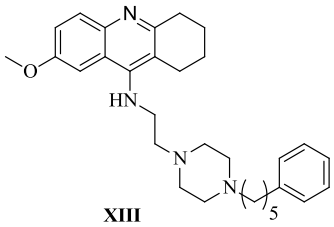
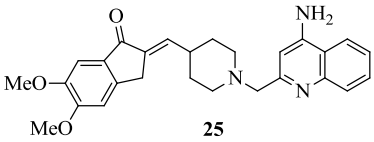
3.3.3 Estudos de relação estrutura x atividade de híbridos tacrina-donepezila e o composto 25

A hibridação é uma estratégia de modificação molecular explorada no desenvolvimento de fármacos ao realizar a combinação entre grupos farmacofóricos de diferentes moléculas bioativas, com a finalidade de obter compostos híbridos com maior afinidade, eficácia e menos efeitos colaterais, quando comparados aos fármacos de origem. Na **Tabela 6** são mostrados os dados de IC_{50} em AChE e BuChE de alguns híbridos tacrina-

donepezila descritos na literatura bem como o composto **25** que apresentou maior atividade anticolinesterásica, além do composto **21**.

Tabela 6. Resultados de IC_{50} para AChE e BuChE dos híbridos do tipo tacrina-donepezila descritos na literatura (**V-VII, XII** e **XIII**), donepezila (**1**), tacrina (**2**) e dos compostos **21** e **25**.

Entrada	Compostos	IC_{50} AChE µM	IC_{50} BuChE µM	Referência
1	 donepezil (1)	0,0057±0,0005	9,14±0,56	Presente trabalho
2	 tacrina (2)	0,23±0,069	0,040±0,002	Presente trabalho
3	 21	0,13±0,069	>10	Presente trabalho
4	 V	0,0028	0,075	Alonso et al., 2005
5	 VI	0,0024	0,090	Alonso et al., 2005
***6**	 VII	0,00027± 0,00003	0,0663±0,0040	Camps et al., 2010

7	 **XII**	0,0102 ± 0,0011	0,0124 ±0,0013	Shao et al., 2004
8	 **XIII**	0,00277±0,00034	0,00225 ±0,0040	Korabecny et al.,2014
9	 **25**	0,014±0,009	3,69±0,84	Presente trabalho

*Dados de porcentagem de inibição de agregação de peptídeo Aβ induzido pela AChE: 46,1±9,0.

Como podem ser observados esses compostos conservam a unidade indanona (**VII** e **25**), ou seu bioisóstero ftalimida (**V** e **VI**), ou o grupo benzilpiperidina/benzilpiperazina (**XII/XIII**), relacionada a donepezila, e também, o núcleo de acridina da tacrina (**V**,**VI**, **VII**, **XII** e **XIII**). Por outro lado, o composto **25** apresenta a unidade de acridina simplificada, a quinolina, e o sistema piperidinil-indanona. Todos demonstraram maior atividade inibitória para AChE do que para a BuChE.

Os compostos **XII e XIII** (entradas 7 e 8) possuem a mesma unidade de acridina, mas com diferentes grupos espaçantes, em **XII** há o grupamento amida ligado ao esqueleto de piperidina e em **XIII** *N*-alquil piperazínico, sendo as distâncias entre as extremidades do núcleo acridina e o anel fenil de 10 e 12 átomos, respectivamente. Neste caso, o composto **XIII** foi mais potente, com maior atividade inibitória sobre AChE (0,00277 μM), considerando que ainda possui adicionalmene uma função metoxila no núcleo de acridina.

A manutenção do núcleo de acridina e a unidade indanona (**VII**), ou seu bioisóstero ftalimida (**V** e **VI)**, conduziu a moléculas altamente potentes, embora a atividade anti-AChE tenha sido 10 vezes maior no derivado contendo o núcleo indanônico **VII (**0,00027 μM), o qual apresenta grupo espaçante contendo anel piperidínico com 9 átomos de distância entre os núceos da extremidade da molécula, enquanto os compostos **V** e **VI** apresentam 11 e 10 átomos, contendo espaçante relacionado a cadeia diaminoalquílica e aminoalquílica, respectivamente.

O híbrido **25** com maior inibição contra AChE (0,014 μM), sintetizado nesse trabalho, apresenta grupo espaçante com o mesmo núcleo piperidínico de donepezila (**1**) e compostos **VII** e **XII** e possui distância de 6 átomos entre os dois principais núcleos da extremidade, quinolina e indanona, como observado no fármaco **1** (fenil e indanona). Estes dados mostram que os híbridos com espaçantes mais longos (9 a 12 átomos) que preservam o núcleo acridina (**V-VII**, **XII** e **XIII**) são mais ativos do que o produto **25**. No entanto, a comparação do híbrido **25** com **21**, relacionado ao fármaco donepezila, o qual também apresenta dupla ligação exocíclica e espaçante piperidínico de mesmo comprimento (6 átomos), mostra que a unidade quinolínica do produto **25** é mais vantajosa do que o esqueleto benzilpiperidina **21** (0,130 μM), pois o produto **25** foi 10 vezes mais potente contra AChE do que **21**. Como mencionado anteriormente, o fármaco **1** (0,0057 μM) foi 23 vezes mais ativo que seu precursor rígido olefínico, composto **21** nos ensaios envolvendo AChE, além do intermediário clorado-quinolínico **20** (IC_{50} 5,99 μM) mais potente que seu precursor clorado-quinolínico olefínico **19** (IC_{50} > 10 μM) nos ensaios com *h*BuChE. Por esta razão, pode ser inferido que a menor atividade mostrada pelo intermediário **25**, em relação aos híbridos já descritos e donepezila, pode estar relacionada com a rigidez imposta pelo espaçante contendo a dupla ligação e, não necessariamente ao seu comprimento e presença do grupo quinolina. Portanto, o híbrido **3** final, resultante da redução da função olefina de 25 com grupo espaçante mais flexível, deverá promover maior interação com AChE, podendo apresentar atividade similar ou superior aos híbridos descritos. Em adição, a presença da unidade quinolina também demonstrou atividade anti-butirilcolinesterase (3,69 μM).

3.3.4 Testes in vitro de permeção- Parallel artificial membrane permeability assay

3.3.4.1 Teste in vitro de permeação para o sistema nervoso central (SNC)- Parallel artificial membrane permeability assay-blood brain barrier (PAMPA-BBB)

Nos estágios iniciais de descoberta de fármacos, a avaliação de ADME (absorção, distribuição, metabolismo, excreção) são propriedades de crucial importância para evitar futuros problemas no desenvolvimento dos mesmos.

Um dos maiores obstáculos para o tratamento das doenças do sistema nervoso central (SNC) é a penetração de fármacos pela barreira hematoencefálica (BHE) em concentrações terapêuticas. A BHE é uma interface complexa entre o SNC, a qual controla rigorosamente as trocas de substâncias entre o sangue e o cérebro (CARDOSO et al., 2010). Esta barreira é composta por células endoteliais com junções oclusivas que protegem o cérebro de xenobióticos (VAN ASPEREN et al., 1997). A maior parte dos fármacos entra no cérebro por difusão transcelular passiva, devido a forte adesão entre as células e limitadas vias de transporte.

Para verificar a capacidade de vários compostos de penetrar no SNC, foi realizado o método PAMPA-BBB descrito por Di e colaboradores (2003), o qual emprega uma membrana lipídica de cérebro de porco. A membrana lipídica de cérebro de porco (Avanti Polar Lipids, Inc.) é composta por fosfatidiletanolamina (33,1 % peso), fosfatidilserina (18,5 % peso), fosfatidilcolina (12,6 % peso), ácido fosfatídico (0,8 % peso), fosfatidilinositol (4,1 % peso), outros (cerebrosídeos, sulfatos, pigmentos) (30,9 % peso).

Tecidos do cérebro humano e de porco apresentam conteúdos similares de lipídios e água, confirmados nos espectros de Raman e massas (KÖHLER et al., 2009). A complexidade da composição lipídica endotelial, a variação entre espécies, idade e outros fatores, tornam difícil a mimetização exata da BHE. A membrana lipídica de cérebro de porco, apesar de não relacionada a uma bicamada lipídica, mantém parte dos componentes fosfolipídicos em proporções aproximadas como *in vivo*. Desta forma, o ensaio de PAMPA é um teste reprodutível, útil, e fornece predições confiáveis de permeabilidade (*Pe*), apesar de não mimetizar completamente as células endoteliais cerebrais (DI et al., 2003).

O método foi realizado em placas de 96 poços, envolvendo placa aceptora e doadora. A placa doadora apresenta uma membrana filtrante como material de suporte, a qual foi revestida com solução lipídica e, sobre esta camada, o poço foi preenchido com a solução do composto teste. A placa aceptora foi preenchida com tampão/etanol 70:30. A placa doadora foi colocada sobre a placa aceptora como um “sanduíche” (consistindo na solução com

compostos teste na parte superior, a membrana lipídica ao meio, e a solução aceptora na parte inferior) (**Figura 20**).

O experimento foi conduzido para que as moléculas teste difundissem ou não da placa doadora através da camada lipídica até a placa aceptora. As concentrações das amostras na placa doadora (antes) e na placa aceptora (após) foram medidas em um equipamento com detecção ultravioleta.

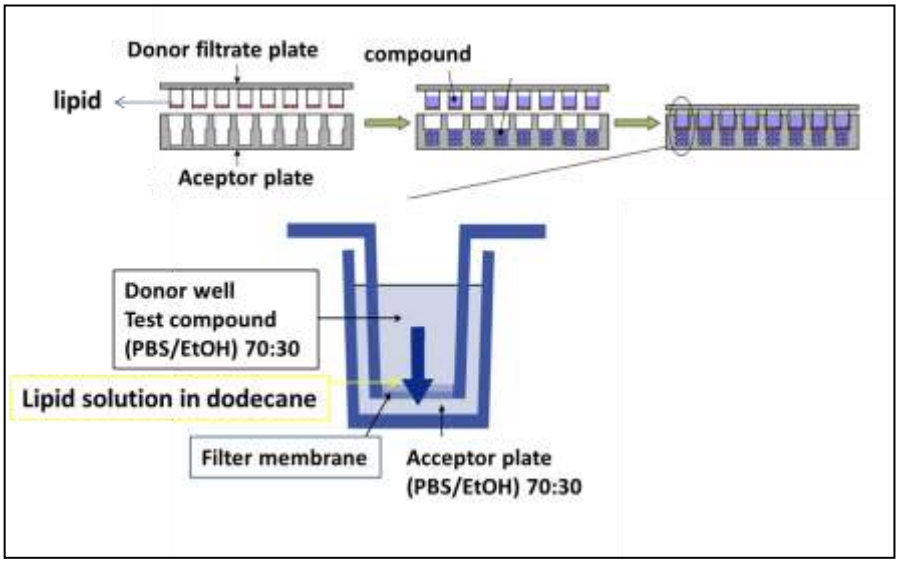


Figura 20. PAMPA-BBB teste mostrando as placas doadora e aceptora como um "sanduíche".

Assim, para predizer a permeabilidade passiva dos derivados ativos **13, 20, 21, e 25** (**Figura 21**) pela barreira hematoencefálica (BHE) foi realizado o ensaio de PAMPA-BBB, e os resultados são mostrados na **tabela 7**.

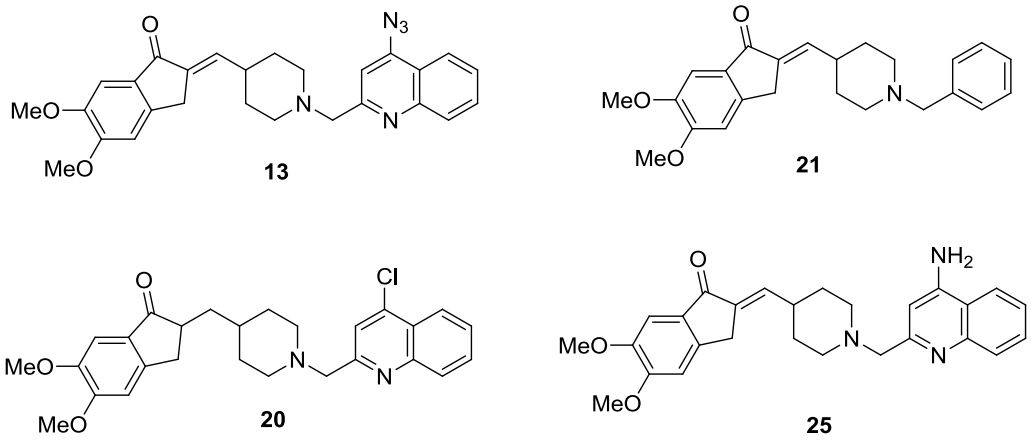


Figura 21. Híbridos donepezila-tacrina **13**, **20, 21** e **25.**

Um ensaio de validação foi realizado, comparando os valores de permeabilidades de fármacos comerciais com os dados experimentais obtidos para padronização adequada do método. Uma boa correlação entre os valores experimentais e descritos de permeabilidade foi obtida *Pe* (exptl)= 1,2128 (lit) – 0,8493 (R^2= 0,9496) (**Gráfico 2)**.

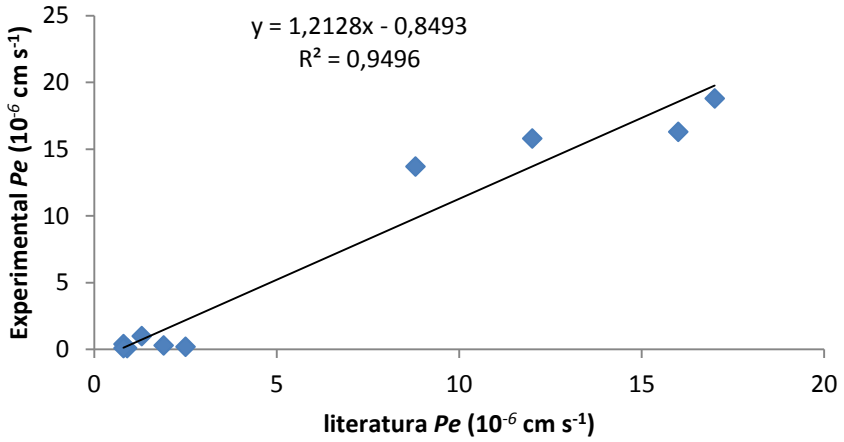


Gráfico 2. Correlação linear entre os dados experimentais e os descritos na literatura de fármacos comerciais utilizando o ensaio PAMPA-BBB.

A partir desta equação, e seguindo os padrões estabelecidos na literatura para predição de permeação em BHE (CRIVORI et al., 2000), foi possível classificar os compostos como CNS+, quando apresentavam uma permeabilidade > 4,0 x 10^{-6} cm s^{-1}. Baseado nesses resultados é possível considerar que os compostos **13**, **20, 21** e donepezila são capazes de atravessar a BHE por permeação passiva (**Tabela 7**).

Um ensaio em separado foi realizado para o composto **25**, já que o mesmo foi obtido posteriormente, e como para cada ensaio existe uma equação e R^2, a seguinte equação foi obtida para o composto **25**: y =1,2156x -0,8366 (R^2=0,9679). Portanto, a permeabilidade de **25** foi de 1,335 x 10^{-6} cm s^{-1}, sendo classificado em CNS- uma vez que não foi capaz de atravessar a BHE por permeação passiva e sua permeabilidade não foi superior a 4,02 x 10^{-6} cm s^{-1} para ser considerado CNS+ (**Tabela 7**).

É importante destacar que a membrana artificial do teste PAMPA-BBB é uma camada físico-química e não reproduz todas as situações que ocorrem *in vivo*. Os compostos que são transportados ativamente podem ser classificados erroneamente, por exemplo, o falso negativo obtido para cafeína, conhecida por atravessar a BHE por transporte passivo e ativo. PAMPA-BBB subestima a permeabilidade *in vivo* da cafeína, devido ao mecanismo de influxo ativo, no entanto, para difusão passiva, o ensaio prediz a permeabilidade adequadamente.

Tabela 7. Permeabilidade (*Pe* 10^{-6} cm s^{-1}) no ensaio PAMPA-BBB de 10 fármacos comerciais (utilizados na validação do experimento) e dos híbridos **13**, **20, 21** e **25** com sua predição de permeação pelo SNC [a].

Compostos	Literatura[b]	*Pe* (10^{-6} cm s^{1})[c]	Predição
Atenolol	0,8	0,4±0,1	[b]CNS -
Cafeína	1,3	1,0±0,4	[b]CNS -
Desipramina	12,0	15,8±0,4	[b]CNS +
Enoxacino	0,9	0,1±0,2	[b]CNS -
Hydrocortisona	1,9	0,3±0,6	[b]CNS -
Ofloxacina	0,8	0,8±0,6	[b]CNS -
Piroxicam	2,5	0,2±0,4	[b]CNS +/-
Promazina	8,8	13,7±0,8	[b]CNS +
Testosterona	17,0	18,8±6,89	[b]CNS +
Verapamil	16,0	16,3±5,0	[b]CNS +
13		7,3±0,1	CNS +
20		5,6±1,1	CNS +
21		18,8±0,7	CNS +
25		*1,3±0,23	CNS -
Donepezila		19,2±4,6	CNS +

[a]PBS:EtOH (70:30) foi utilizado como solvente. [b] DI et al., 2003. [c]Dados são as médias ± SD de 2 experimentos independentes. *y =1,2156x -0,8366 (R^2=0,9679).

A glicoproteína P (Pgp) de efluxo *in vivo* impede a penetração pela BHE, pois a mesma bombeia moléculas para fora do cérebro. Alguns compostos são substratos para Pgp ou são metabolizados rapidamente no sangue antes alcançar a BHE. Os resultados para os compostos que não são capazes de atravessar a BHE pelo método PAMPA são provavelmente afetados pelo transporte ativo (DI et al., 2003).

3.3.4.2 PAMPA- Oral ensaio de predição de absorção intestinal

Para validar o teste de predição de absorção intestinal, o estudo correlacionou o experimento de PAMPA–BBB estabelecido no laboratório (CIB-CSIC), experimentos da

literatura (ZHU et al., 2002) e também a fração absorvida pela membrana intestinal (Fa) de fármacos comerciais conhecidos.

A membrana intestinal apresenta distintas vias de permeação, passiva por via transcelular, passiva paracelular pelas junções oclusivas, transporte ativo auxiliada por transportadores, bem como o efluxo induzido pela Pgp. Assim, a correlação entre a permeabilidade pela membrana intestinal e artificial pode não ser completa. Entretanto, como a grande maioria dos fármacos são absorvidos passivamente (ou parcialmente passivo) por transporte transcelular, é possível obter determinadas predições nestes testes *in vitro*. Alguns experimentos sugerem que o transporte passivo transcelular seja um mecanismo essencial na absorção da maioria dos fármacos, assim, validar a permeabilidade por uma membrana artificial é um modelo simples e efetivo para esse tipo de predição (ZHU et al., 2002).

O ensaio foi realizado praticamente da mesma forma que o PAMPA-BBB (**Figura 20**), também com placas de 96 poços, a placa doadora com membrana filtrante e placa aceptora. As principais diferenças estão relacionadas ao tipo de lipídio e gradiente de pH, mimetizando o ambiente intestinal.

Dois tipos de lipídios foram testados (lecitina de ovo e soja), embora grandes variações na composição dos fosfolipídios em membranas de mamíferos são conhecidas, a lecitina de ovo mimetiza adequadamente a composição das membranas de mamíferos (KANSY et al., 1998). A lecitina de ovo contém fosfatidilcolina (PC) e fosfatidietanolamina (PE), com PC como componente majoritário e a concentração de ácidos graxos insaturados é muito maior na lecitina de soja do que na lecitina de ovo. Por outro lado, a lecitina de soja consiste em três tipos de fosfolipídios (PL): PC, PE e fosfotidilinositol (PI), com quantidades similares de PL (ZHANG et al., 2006).

Assim, para realizar o teste, diferentes tentativas foram realizadas com distintas membranas artificias e concentrações (L-α-fosfatidilcolina de gema de ovo e de soja, 2-3% (w/v), 4-6 μL), variando pH dos compartimentos (6,5 ou 7,4 em ambos compartimentos, ou utilizando um gradiente de pH de 6,5 da placa doadora para 7,4 na aceptora) e tempo de incubação (2, 4, 6, 8, 16 horas). Estes estudos foram necessários para selecionar as melhores condições experimentais em termos de alto coeficiente de correlação com os valores descritos na literatura (ZHU et al., 2002) e os compostos referência. O conjunto de fármacos comerciais selecionados incluíram substâncias com alta fração de absorção humana (Fa) (Fa > 70%; carbamazepina, cumarina, diclofenaco, hidrocortisona, verapamil), absorções intermediárias (Fa 30-70%; atenolol) e de baixa absorção ((Fa < 30%; aciclovir, ceftriaxona, norfloxacina, ranitidina, sulfasalazina) (AMIDON et al., 1988).

A melhor correlação entre valores experimentais e descritos foi obtido [*Pe* (exptl)= 0,9908 (lit) – 0,0149 (R^2= 0,9018)] e Fa% = $(1-e^{(-a \cdot Pe)}) \cdot 100$ a = $10,75 \cdot 10^5$ (**Gráficos 3 e 4**), com a membrana de L-α-fosfatidilcolina de gema de ovo (2% w/v, 5 µL), em pH 6,5 e 7,4, respectivamente, do compartimento doador para a placa aceptora, em tempo de incubação de 8 horas.

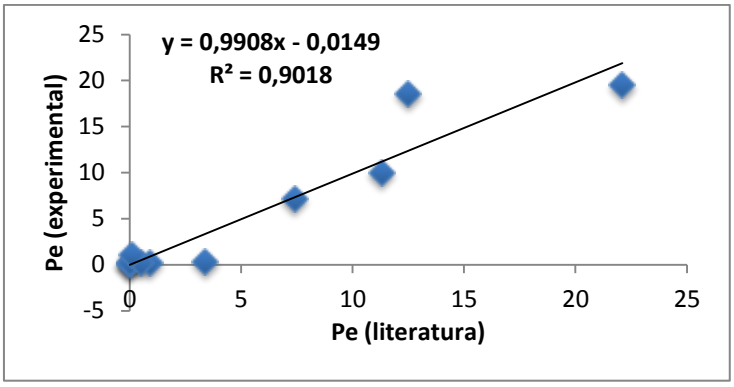


Gráfico 3. Correlação linear entre a permeabilidade experimental e descrita para fármacos comerciais utilizando o ensaio PAMPA.

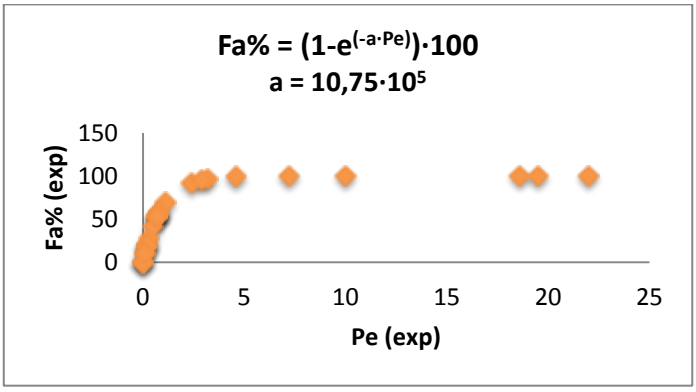


Gráfico 4. Correlação entre a Permeabilidade (Pe) experimental e a fração absorbida (Fa)%.

As permeabilidades in vitro (*Pe*) e fração absorbida (Fa) dos fármacos pela membrana lipídica, juntamente com os compostos testes, foram determinadas e descritas na **Tabela 8**.

Tabela 8. Permeabilidade (*Pe* 10^{-6} cm s^{-1}) no ensaio PAMPA e fração absorvida de 11 fármacos comercias e os compostos **25**, **21** e donepezila (**1**).

Compostos	Pe (Lit.)[c] (10^{-6}cm/s)	Pe (exp.)[a] (10^{-6}cm/s)	Fa (%)[c] Lit.	Fa (%) Exp.	Classificação[b]
Aciclovir	0	0,2 ± 0,35	21	19	baixa
Atenolol	0	0,1 ± 0,2	52	10	média (exp. baixa)
Carbamazepina	11,3	10,0 ± 2,1	100	100	alta
Ceftriaxona	0	0,2 ± 0,1	1	19	baixa
Cumarina	22,1	19,5 ± 5,1	100	100	alta
Diclofenaco	12,5	18,6 ± 1,1	100	100	alta
Hidrocortisona	3,4	0,3 ± 0,1	91	28	alta (exp. baixa)
Norfloxacina	0,9	0,2 ± 0,3	35	19	baixa
Ranitidina	0,5	0,2 ± 0,3	55	19	média (exp. baixa)
Sulfasalazina	0,1	1,1 ± 1,2	12	69	baixa (exp. Média)
Verapamil	7,4	7,2 ± 1,8	98	100	alta
25		0,7 ± 0,7		53	média
21*		3,5 ± 1,0		97	alta
Donepezila (1)*		7,5 ± 1,9		100	alta

Dados são a média ± SD de dois experimentos independentes; [b]AMIDON et al.,1988; [c]ZHU et al., 2002; *Dias diferentes de experimento [*Pe* (exptl)=0,8724 (lit) – 0,4610 (R^2= 0,9616)], Fa correlação $Fa\% = (1-e^{(-a \cdot Pe)}) \cdot 100$ $a = 9{,}75 \cdot 10^5$.
Lit.= literatura; Exp.= Experimental.

Seguindo os padrões estabelecidos na literatura para predição de absorção oral (AMIDON et al., 1988), e baseados nos resultados obtidos, os compostos **21** e donepezila (**1**) apresentaram alta absorção por permeação passiva através da membrana intestinal, enquanto o composto **25** apresentou absorção média.

4. MATERIAL

4.1 APARELHAGEM ANALÍTICA

- Espectrômetros Bruker Advance DPX-300, DRX-400 e DRX-500 da Universidade de São Paulo foram empregados na obtenção de espectros de Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio (RMN de ^{1}H) e Carbono (RMN de ^{13}C). Os deslocamentos químicos (δ) estão descritos em parte por milhão (ppm) em relação ao tetrametilsilano (TMS) e o número de hidrogênios deduzidos da integral relativa.
- Os espectros de massas foram obtidos em aparelho Bruker Daltonics ULTRO-Q-TOF, empregando ionização por electrospray (ESI) e analisadores de quadrupolo (Q) e tempo de voô (TOF).
- Espectrômetro de Infravermelho IVFT Nicollet Modelo protege 460.
- Cromatógrafo Shimadzu SCL-10AVP e o software Class-VP 5.0.

4.2 APARELHAGEM LABORATORIAL

- Agitador magnético: IKA RCT Basic e Corning PC-320
- Balanças: Mettler PE 400/ Sartorius BP 121S
- Bomba de alto vácuo: Precision Model D 150
- Cromatógrafo Biotage HorizonTM
- Evaporador rotatório: Büchi RE-121
- Evaporador rotatório com controlador de vácuo: Büchi R-215
- Luz ultravioleta: Spectroline CM-10
- Reator para irradiação de microondas CEM® Discover

4.3 SOLVENTES, REAGENTES E OUTROS MATERIAIS

- Os solventes e reagentes comerciais, quando necessário, foram convenientemente purificados, conforme métodos padronizados na literatura (PERRIN, 1980).
- As cromatografias em camada delgada (CCD) foram realizadas utilizando placas de sílica-gel 60 GF254 da MERCK®, as cromatografias em coluna (CC) foram realizadas utilizando sílica comum gel 60 (20-63 μm) da MERCK® e as cromatografias flash

automatizada foram realizadas em aparelho Biotage HorizonTM, utilizando coluna compactada com sílica flash 60 (40-63 μm).

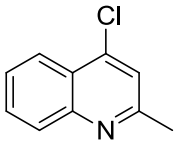
- Coluna analítica de fase reversa C18 CLC-ODS (M) (150 mm x 4.6 mm) e coluna semi-preparativa de fase reversa Phenomenex Luna C18 (250 x 10 mm) foram utilizadas durante a análise e purificação por CLAE.

5. MÉTODOS

5.1 SÍNTESE

2-metil-4-cloro quinolina (6)

(ENGEN et al., 2010)



6

Em um balão de 2 bocas de fundo redondo foram adicionados ácido *o*-aminobenzóico (**5**) (0,0505 g; 0,365 mmol) e acetona (0,134 ml; 1,82 mmol). A solução permaneceu sob agitação por 5 minutos a temperatura ambiente para completa dissolução do sólido. A essa mistura foi adicionado $POCl_3$ (12 ml) gota a gota e a solução resultante foi mantida sob refluxo durante 1 hora. Após este período, a mistura reacional foi vertida em um becker contendo gelo, e basificada até pH 14 com solução aquosa de NaOH (5 mol/L). Posteriormente, a solução resultante foi extraída com diclorometano (3 x 50 ml), a fase orgânica lavada com solução saturada de NaCl, secada em Na_2SO_4 e concentrado em evaporador rotatório. O produto bruto (sólido marrom) foi obtido com alto grau de pureza, sendo utilizado na etapa seguinte sem purificação. Rendimento: 41,2 % (0,0266 g) Rf= 0,46 (tolueno:acetato de etila 7:3 (v/v)).

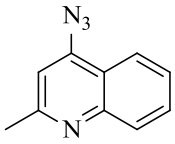
RMN ^{1}H (400 MHz, $CDCl_3$) de **6**: δ: 8,10 (1H, dd, *J* = 8,4; 1,0 Hz, H-9), 7,96 (1H, d, *J* = 8,4 Hz, H-6), 7,66 (1H, ddd, *J* = 8,4; 7,0; 1,4 Hz, H-8), 7,51 (1H, ddd, 8,4; 7,0; 1,0 Hz, H-7), 7,33 (1H, s, H-3), 2,65 (3H, s, H-11).

RMN ^{13}C (400 MHz, $CDCl_3$) de **6**: δ: 25,2 (C11); 122,0 (C3); 123,9 (C9); 124,7 (C4); 126,7 (C7); 128,9 (C8); 130,4 (C6); 142,6 (C5); 148,7(C10); 158,9 (C2).

HRMS (ESI): $C_{10}H_8ClN$ *m/z* $[M+H]^+$ calculado 178,0418, encontrado *m/z* $[M+H]^+$ 178,0418.

2-metil-4-azido quinolina (7)

(KAMIYA et al., 1979)



7

Em um balão de fundo redondo foram adicionados 2-metil-4-cloroquinolina (**6**) (0,40 g; 2,2 mmol), azida de sódio (0,83 g; 4,51 mmol), 8 mL de água, e 8 mL de álcool etílico absoluto e a solução resultante foi mantida sob refluxo por 2 horas. Em seguida, a solução resultante foi extraída com diclorometano (3 x 50 ml), a fase orgânica lavada com solução saturada de NaCl, secada em Na_2SO_4 e concentrado em evaporador rotativo. O produto bruto (sólido amarelo) foi obtido com alto grau de pureza, sendo utilizado na etapa seguinte sem purificação. Rendimento: 90 % (0,373 g), Rf: 0,28 (tolueno:acetato de etila 7:3 (v/v)).

RMN ^{1}H (400 MHz, $CDCl_3$) de **7**: δ: 7,99 (2H, td, *J* = 8,3, 1,3 Hz, H-6 e H-9), 7,71 (1H, ddd, *J* = 8,4, 6,9, 1,5 Hz, H-8), 7,47 (1H, ddd, *J* = 8,2; 6,9; 1,2 Hz, H-7), 7,03 (1H s, H-3), 2,74 (3H, s, H-11).

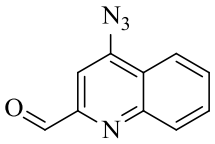
RMN ^{13}C (400 MHz, $CDCl_3$) de **7**: δ: 25,5 (C11); 109,2 (C3); 120,0 (C4); 122,1 (C9); 125,7 (C7); 128,4 (C8); 130,5 (C6); 146,2 (C5); 148,8 (C10); 159,1 (C2).

HRMS (ESI) $C_{10}H_8N_4$: *m/z* $[M+H]^+$ calculado 185,0822, encontrado *m/z* $[M+H - N_2]^+$ 157,0762.

IV: banda característica de azido em 2127 cm^{-1}.

4-azido-2-quinolinacarboxaldeído (8)

(TAGAWA et al., 2003)



8

Em um balão de fundo redondo foi adicionado SeO_2 (0,0693 g; 0,6250 mmol) em 0,55 mL de dioxano, e gota a gota uma solução aquosa (70%) de hidroperóxido de *terc*-butila (TBHP) no volume de 26 µL. A mistura reacional permaneceu sob agitação por 30 minutos a temperatura ambiente. Após esse período foi adicionado o composto **7** (0,050 g; 0,2717 mmol) e a mistura resultante foi mantida em refluxo por 1 hora. Em seguida o sólido foi filtrado em funil sinterizado em celite, lavado com diclorometano, e particionado com solução saturada de NaCl, secado em Na_2SO_4 e concentrado em evaporador rotativo. O resíduo foi purificado por cromatografia em coluna de sílica, eluindo com hexano: acetato de etila (8:2 v/v). Rendimento 8% (0,005 g).

RMN ^{1}H (400 MHz, $CDCl_3$) de **8 :** δ: 10,19 (1H, s, H-11), 8,22 (1H, ddd, *J* = 8,5; 1,7; 0,5 Hz, H-6), 8,14 (1H, ddd, *J* = 8,4; 1,8; 0,5 Hz, H-9), 7,86 (1H, ddd, *J* = 8,4; 6,9; 1,4 Hz, H-8), 7,79 (1H, s, H-3), 7,69 (1H, ddd, *J* = 8,3; 6,9; 1,2 Hz, H-7).

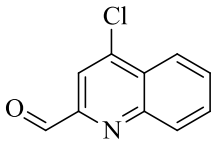
RMN ^{13}C (400 MHz, $CDCl_3$) de **8**: δ: 104,7 (C3), 122,6 (C9), 123,0 (C4), 129,1 (C7), 130,2 (C8), 131,4 (C6), 147,9 (C5), 148,8 (C10), 152,8 (C2), 193,2 (C11).

HRMS (ESI): $C_{10}H_6N_4O$ *m/z* $[M+H]^+$ calculado 199,0614 encontrados *m/z* $[M+H - N]^+$ 185,0693 e $[M+H - N_2]^+$ 171,0538,

IV: banda característica de azido em: 2122, e carbonila em 1701 cm^{-1}.

4-cloro-2-quinolinacarboxaldeído (16)

(TAGAWA et al., 2003)



16

Em um balão de fundo redondo foi adicionado SeO_2 (1,44 g; 13,0 mmol) em 11,2 mL de dioxano e 540 µL de hidroperóxido de *terc*-butila (TBHP) 70% solução aquosa, gota a gota. A mistura reacional permaneceu sob agitação por 30 minutos a temperatura ambiente. Após esse período foi adicionado o composto **6** (1,0 g; 5,65 mmol) e a mistura resultante foi mantida em refluxo por 1 hora. Em seguida o sólido foi filtrado em funil sinterizado em celite, lavado com diclorometano, e particionado com solução saturada de NaCl, secada em Na_2SO_4 e concentrado em evaporador rotativo. O resíduo foi purificado por cromatografia flash automatizada (Biotage®), eluindo com hexano: acetato de etila (8:2 v/v). Rendimento: 63% (0,6767 g)**.**

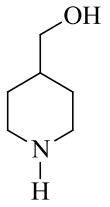
RMN ^{1}H (400 MHz, $CDCl_3$) de **16**: δ: 10,18 (1H, s, H-11), 8,31 (1H, dd, *J*= 8,4; 1,4 Hz, H-9), 8,27 (1H, dd, *J*= 8,3; 0,8 Hz, H-6), 8,09 (1H, s, H-3), 7,89 (1H, ddd, *J*= 8,4; 6,9; 1,4 Hz, H-8), 7,80 (1H, ddd, *J*= 8,31; 7,0; 1,3 Hz, H-7).

RMN ^{13}C (400 MHz, $CDCl_3$) de **16**: δ: 117,6 (C3), 124,4 (C9), 128,0 (C4), 130,2 (C7), 130,8 (C8), 131,3 (C6), 144,2 (C5), 148,6 (C10), 152,3 (C2), 192,6 (C11).

HRMS (ESI): $C_{10}H_6ClNO$ *m/z* $[M+H]^+$ calculado 192,0211, encontrado *m/z* $[M+H]^+$ 192,0211.

4-hidróxi-metilpiperidina (10)

(BOYER et al., 2008)



10

Em um balão de fundo redondo foi adicionado, sob atmosfera de argônio, $LiAlH_4$ (0,307 g; 8,0 mmol) em THF anidro (22,0 mL). A mistura foi resfriada com banho de gelo (0 ^oC) e em seguida, foi adicionado vagarosamente isonepecotato de etila (**9**) (1,0 mL; 1,0 g; 6,3 mmol) em THF anidro (7,0 mL). A mistura permaneceu sob agitação nesta temperatura por 30 minutos. Em seguida a temperatura foi elevada até temperatura ambiente e mantida sob agitação por 48 horas. Após esse período foram adicionados 1,0 mL de solução aquosa de NaOH (1,0 mol/L), 1,0 mL de água e éter dietílico (60 ml) permanecendo sob agitação por mais 30 minutos. A mistura reacional foi filtrada em funil sinterizado com Celite®, lavado com éter dietílico e concentrado em evaporador rotativo. O resíduo foi purificado em cromatografia em coluna, eluindo com clorofórmio: metanol (9:1 (v/v)). Rendimento: 90% (0,652 g).

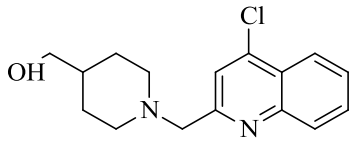
RMN ^1H (400 MHz, $CDCl_3$) de **10**: δ: 3,47 (2H, d, *J* = 6,4 Hz, H-7), 3,11 (2H, dt, *J* = 11,9, 3,0 Hz, H-2eq, H-6eq), 2,61 (2H, dt, *J* = 12.3, 2.6 Hz, H-2ax, H-6ax), 2,24 (br s, 2H, NH/OH), 1,74 (2H, d, *J* = 13,6 Hz, H-5eq, H-3 eq), 1,68 – 1,56 (1H, m, H-4), 1,16 (2H, dq, *J* = 12,1; 4,1 Hz, H-5ax, H-3ax).

RMN ^{13}C (400 MHz, $CDCl_3$) de **10**: δ: 29,7 (C3 e C5); 38,9 (C4); 46,2 (C2 e C6); 68,0 (C7).

HRMS (ESI): $C_6H_{13}NO$ *m/z* $[M+H]^+$ calculado 116,1070, encontrado *m/z* $[M+H]^+$ 116,1065.

4-piperidinilmetanol-1-[(4-cloroquinolin-2-il)metil] (17)

(ABDEL-MAGID et al., 1990)



17

Em um balão de duas bocas foram adicionados 4-hidróximetil-piperidina (**10**) (0,160 g; 1,39 mmol), 4-cloro-2-quinolinacarboxaldeído (**16)** (0,202 g; 1,05 mmol), peneira molecular em pó 4 Å (0,101 g), e dicloroetano (1,10 mL) sob atmosfera de N_2. A mistura reacional permaneceu sob agitação por 1,5 hora a temperatura ambiente. Após esse período foi adicionado o agente redutor $NaBH(OAc)_3$ (0,328 g), permanecendo sob agitação por um período adicional de 1,5 horas. Após esse período foi adicionado 3,0 mL de solução saturada de $NaHCO_3$, e mantido sob agitação por 20 minutos. Em seguida o sólido foi filtrado em funil sinterizado em Celite®, a solução foi concentrada, extraída com diclorometano, lavado com solução saturada de NaCl, secada em Mg_2SO_4 e concentrado em evaporador rotativo. O resíduo foi purificado por cromatografia flash em gradiente de diclorometano: acetato de etila, 1:1. Rendimento: 64,8% (0,197 g) cristais levemente amarelados, Pf: 107-108ºC.

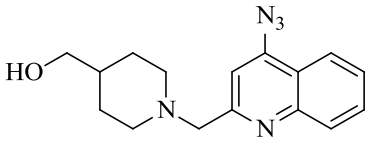
RMN ^{1}H (400 MHz, $CDCl_3$) de **17**: δ: 8,21 (1H, dd, *J* = 8,4; 1,0 Hz, H-9), 8,08 (1H, d, *J* = 8,4 Hz, H-6), 7,78 (1H, s, H-3), 7,75 (1H, ddd, *J* = 8,4; 6,9; 1,4 Hz, H-8), 7,61 (1H, ddd, *J* = 8,2; 6,9; 1,2 Hz, H-7), 3,79 (2H, s, H-11), 3,53 (2H, d, *J* = 6,4 Hz, H-17), 2,94 (2H, d, *J* = 11,6 Hz; H-12 eq; H-16 eq), 2,16 (2H, dt, *J* = 11,7; 2,4 Hz, H-12ax; H-16 ax), 1,74 (2H, d, *J* = 12,5 Hz, H-15eq; H-13eq), 1,61 – 1,49 (1H, m, H-14), 1,36 (2H, dq, *J*= 12,2; 3,8 Hz, H-15ax; H-13ax).

RMN ^{13}C (400 MHz, $CDCl_3$) de **17**: δ: 28,8 (C15, C13), 38,4 (C14), 53,8 (C16, C12), 65,2 (C11), 67,9 (C17), 121,0 (C3), 125,6 (C4), 124,0 (C9), 127,1 (C7), 129,3 (C8), 130,3 (C6), 143,0 (C5), 148,4 (C10), 160,3 (C2).

HRMS (ESI): $C_{16}H_{19}ClN_2O$ *m/z* $[M+H]^+$ calculado 291,1259, encontrado *m/z* $[M+H]^+$ 291,1288.

4-piperidinilmetanol, 1-[(4-azidoquinolin-2-il)metil] (11)

(DIAS et al., 2006)



11

Em um balão de fundo redondo foram adicionados o composto **17** (0,18 g; 0,62 mmol), azida de sódio (0,245 g; 3,76 mmol) e 3,40 mL de DMF anidro. A mistura reacional foi mantida a temperatura de 65 °C e sob agitação por 24 horas. Após esse período o solvente foi removido em evaporador rotativo sob alto vácuo e o resíduo foi extraído com diclorometano, lavado com solução saturada de NaCl, secada em Mg_2SO_4 e concentrado em evaporador rotativo. O produto bruto (sólido marrom) foi obtido com alto grau de pureza, sendo utilizado na etapa seguinte sem purificação. Rendimento: 82,3 % (0,152 g).

RMN ^{1}H (400 MHz, $CDCl_3$) de **11**: δ 8,05 – 7,99 (2H, m, H-9 e H-6), 7,71 (1H, ddd, *J* = 8,5; 6,9; 1,4 Hz, H-8), 7,50 (1-H, ddd, *J* = 8,1; 6,9; 1,2 Hz, H-7), 7,46 (1H, s, H-3), 3,79 (2H, s, H-11), 3,53 (2H, d, *J* = 6,4 Hz, H-17), 2,95 (2H, d, *J* = 11,6 Hz; H-12eq; H-16eq), 2,16 (2H, dt, *J* = 11,7; 2,4 Hz, H-12ax, H-16ax), 1,83 (2H, br s), 1,75 (2H, d, *J* = 12,7 Hz, H-15eq; H-13eq), 1,61 – 1,50 (1H, m, H-14), 1,36 (2H, dq, *J* =12,1; 3,9 Hz, H-15ax; H-13ax).

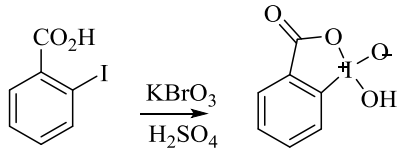
RMN ^{13}C (400 MHz, $CDCl_3$) de **11**: δ: 28,8 (C15, C13), 38,4 (C14), 53,9 (C16, C12), 65,5 (C11), 67,9 (C17), 108,3 (C3), 120,9 (C4), 122,2 (C9), 126,1 (C7), 128,7 (C8), 130,4 (C6), 146,5 (C5), 148,5 (C10), 160,5 (C2).

HRMS (ESI): $C_{16}H_{19}N_5O$ *m/z* $[M+H]^+$ calculado 298,1662 encontrados *m/z* $[M+H]^+$ 298,1684; $[M+H - N_2]^+$ 270,1616; $[M - N_3]^+$ 257,1633.

IV: banda característica de azido 2109 cm^{-1} e hidroxila em 3389 cm^{-1}.

Periodinana de Dess-Martin (DMP)

Primeira etapa:

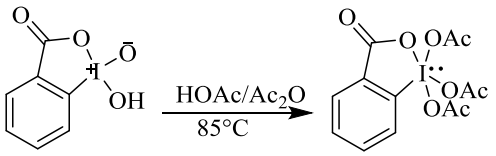


ácido-2-iodobenzóico **IBX**

Em um balão de 250 mL foram adicionados 34,3 mL de ácido sulfúrico (0,73 mol/L) e ácido-2-iodobenzóico (4,04g; 16,3 mmol). Em seguida, sob forte agitação, foi adicionado lentamente $KBrO_3$ (3,57g; 21,4 mmol). Durante a adição, a temperatura da mistura reacional foi mantida abaixo de 55°C. Em seguida, a temperatura foi elevada a 65°C e agitada por mais 3,5 horas. Após esse período, a mistura reacional foi resfriada a 0°C e filtrada sob vácuo em funil de placa sinterizado. O sólido foi lavado com 47 mL de H_2O e 50 mL de etanol, o produto foi armazenado em dessecador contendo sílica por 12h, obtendo-se um sólido branco. Rendimento 64,5 % (3,85 g).

Ponto de fusão: 233-236 °C.

Segunda etapa:



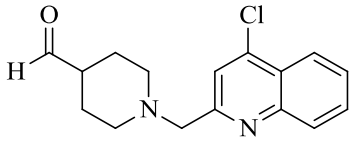
IBX **DMP**

Em um balão de duas bocas foram adicionados IBX (4,01 g, 14,3 mmol), anidrido acético (12,5 mL) e ácido acético (10,6 mL) sob atmosfera de N_2. A mistura reacional foi aquecida a 85°C por 2,5 horas sob agitação (a mistura adquire aspecto límpido após 1 hora). Em seguida a mesma foi resfriada a temperatura ambiente, sob atmosfera de N_2. O balão foi devidamente fechado, embrulhado em papel alumínio e deixado cristalizar em geladeira por 2 dias. A solução sobrenadante foi removida através de seringa, sob atmosfera de N_2, e os cristais foram lavados com éter dietílico anidro (5 vezes). Os cristais brancos foram guardados sob atmosfera de N_2 em freezer a -20 ^oC.

RMN ^1H (400 MHz, $CDCl_3$): δ 8,39 (2H, dd, *J*= 8,5; 1,4 Hz), 8,16 (1H, td, *J*= 8,5; 1,4 Hz) 7,99 (1H, td, *J*=7,5; 0,7 Hz), 2,41 (3H, s, $COCH_3$), 2,09 (6H, s, $COCH_3$).

4-piperidinilaldeído-1-[(4-cloroquinolin-2-il)metil] (18)

(MEYER et al., 1994; DESS et al., 1984)



18

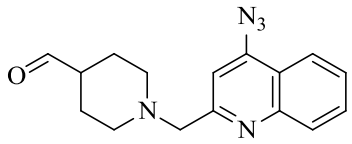
A uma solução de DMP (0,1095 g; 0,2584 mmol) em diclorometano anidro (1,0 ml), sob atmosfera de N_2 foi adicionada gota a gota uma solução de **17** (0,0505 g; 0,1723 mmol) em (0,9 mL) de diclorometano anidro sob atmosfera de N_2 e mantida sob agitação por 1,3 horas. Após este período foi adicionado 5,5 mL de éter dietílico (solução turva), 3,3 mL de solução saturada de $NaHCO_3$ e 12 mL de solução $Na_2S_2O_3$ (1,57 mol.L^{-1}), permanecendo sob agitação por 20 minutos, até completa dissolução do sólido e separação das fases. A fase aquosa foi extraída com éter etílico (3x de 10 mL), e em seguida a fase etérea foi lavada com solução saturada de $NaHCO_3$ (3x 10 mL), secada em Mg_2SO_4 e concentrado em evaporador rotativo. O resíduo foi purificado em cromatografia em coluna de sílica flash, em gradiente diclorometano: acetato de etila, óleo amarelo. Rendimento: 35,6 % (0,017 g).

RMN ^{1}H (400 MHz, $CDCl_3$) de **18** : δ: 9,60 (1H, d, *J*= 1,0 Hz, H-17), 8,14 (1H, dd, *J* = 8,4; 0,9 Hz, H-9), 8,00 (1H, dd, *J* = 8,4; 0,4 Hz, H-6), 7,69 (1H, s, H-3), 7,68 (1H, ddd, *J* = 8,4; 7,0; 1,4 Hz, H-8), 7,55 (1H, ddd, *J* = 8,2; 7,0; 1,2 Hz, H-7), 3,75 (2H, s, H-11), 2,83 (2H, dt, *J* = 11,1; 3,6 Hz, H-12 eq; H-16 eq), 2,30-2,17 (3H, m, H-14; H-12ax; H-16 ax), 1,84-1,91 (2H, m, H-15eq, H-13eq;), 1,69 (2H, dq, *J* =10,7, 3,7 Hz, H-15ax; H-13ax).

RMN ^{13}C (400 MHz, $CDCl_3$) de **18** : δ: 25,3 (C13 e C15), 47,6 (C14), 52,8 (C12 e C16), 64,7 (C11), 121,0 (C3), 124,0 (C9), 125,7 (C4), 127,3 (C7), 129,3 (C6), 130,4 (C8), 143,2 (C5), 148,4 (C10), 159,4 (C2), 203,7 (C17).

HRMS (ESI): $C_{16}H_{17}ClN_2O$ *m/z* $[M+H]^+$ calculado 289,1102 encontrados *m/z* $[M+H]^+$ 289,1117; $[M+H + H_2O]^+$ 307,1214.

4-piperidinilaldeído-1-[(4-azidoquinolin-2-il)metil] (4)



4

Em um tubo previamente seco em estufa (100°C por 6h), foram adicionados 0,100 g (0,347 mmol) do aldeído **18**, 1,00 ml de DMF anidro e 0,132 g de azida de sódio (2,03 mmol) e deixado agitar sob fluxo de argônio por 10 min. Após, foi submetido a radiação em micro-ondas por 2, 5 horas, a 70°C, 150 W. A purificação foi realizada por cromatografia flash automatizada (Biotage®), isocrática acetato de etila 100%, rendimento 48% (0,005 g).

RMN ^{1}H (300 MHz, $CDCl_3$) de **4**: δ 9,68 (1H, d, *J* = 0,9 Hz, H-17), 8,06 – 8,00 (2H, m, H-9 e H-6), 7,72 (1H, ddd, *J* = 8,4, 6,9, 1,4 Hz, H-8), 7,51 (1H, ddd, *J* = 8,1, 6,9, 1,1 Hz, H-7), 7,43 (1H, s, H-3), 3,80 (2H, s, H-11), 2,90 (2H, dt, *J*= 11,5, 3,7, H-12eq e H-16eq), 2,29 (3H, ddd, *J*=14,0, 8,2, 2,7 H-12ax, H-16ax e H-14), 1,96 (2H, m, H15eq, H-13eq), 1,83 – 1,65 (2H, m, H-13ax e H-15ax).

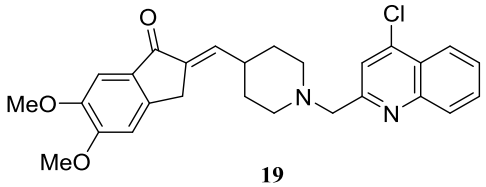
RMN ^{13}C (75 MHz, $CDCl_3$) de **4**: δ 203,7 (C17), 160,1 (C2), 148,6 (C10), 146,6 (C5), 130,4 (C8), 128,8 (C6), 126,1 (C7), 122,2 (C9), 120,9 (C4), 108,1 (C3), 65,3 (C11), 52,9 (C12 e C16), 47,8 (C14), 25,5 (C13 e C15).

HRMS (ESI): $C_{16}H_{17}N_5O$ *m/z* $[M+H]^+$ calculado 296,1506, calculado *m/z* $[M+H + MeOH]^+$, 328,1768 e calculado$[M+H - N_2]^+$ 268,1444. Encontrado os fragmentos *m/z* $[M+H + MeOH]^+$ 328,1592, $[M+H - N_2]^+$ 268,1282.

IV: Banda referente ao grupo azido em 2117 cm^{-1} e banda de carbonila em 1719 cm^{-1}.

5,6-dimetóxinda-1-ona-4-piperidinil-metileno-1-[(4-cloroquinolin-2-il)metil] (19)

(CAMPS et al., 2006)



19

Em um balão de três bocas (previamente seco em estufa a 100°C por 5 horas), sob fluxo de argônio, foram adicionados (0,0445 g; 0,2316 mmol) de indanona **12**, peneira molecular em pó 4 Å (0,010 g) (previamente seca em mufla a 300°C por 6 horas), THF anidro (1,5 mL) e EtONa 95% (0,0266 g; 0,3910 mmol), a mistura permaneceu sob agitação por 30 min para formação do enolato. Em seguida foram adicionados gota a gota (0,080 g; 0,277 mmol) o aldeído **18** em 1,5 mL de THF, permanecendo sob agitação por 20 horas, a temperatura ambiente. Após esse período foi realizada partição com diclorometano e NaCl saturada e secagem sob $MgSO_4$. O material foi purificado por cromatografia em coluna flash, utilizando sílica flash em gradiente de diclorometano: acetato de etila 10:0; 8:2; 6:4 e 4:6 (v/v). Rf: 0,85 ($CHCl_3$:MeOH 9:1 v/v). Rendimento: 86 % (0,092 g). Sólido amarelo.

Ponto de fusão: 190 ºC.

RMN ^{1}H (400 MHz, $CDCl_3$) de **19**: δ 8,22 (1H, d, *J* = 9,3Hz, H-9), 8,08 (1H, d, *J* = 8,4 Hz, H-6), 7,80 (1H, s, H-3), 7,75 (1H, ddd, *J* = 8,4; 7,0; 1,4 Hz, H-8), 7,62 (1H, ddd, *J* = 8,2; 7,0; 1,0 H-7), 7,30 (1H, s, H-23), 6,91 (1H, s, H-26), 6,69 (1H, dd, *J* = 8,0; 1,7 Hz, H-17), 3,97 (3H, s, H-27), 3,93 (3H, s, H-28), 3,83 (2H, s, H-11), 3,61 (2H, d, *J* = 1,3 Hz, H-19), 2,94-3,02 (2H, m, H-16eq, H-12eq), 2,32-2,42 (2H, m, H-13eq, H-14), 2,25 (2H,td, *J* = 11,2; 3,4 Hz, H-12ax, H-16ax), 1,67-1,78 (3H, m, H-13ax, H-15ax, H-15eq).

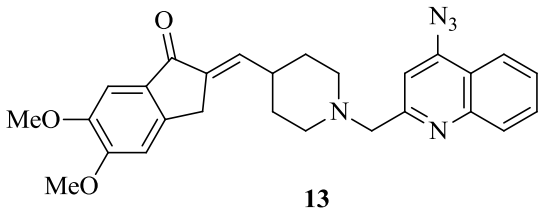
RMN ^{13}C (400 MHz, $CDCl_3$) de **19**: δ 29,5 (C19), 31,2 (C13 e C15), 37,1 (C14), 53,5 (C12 e C16), 56,2 (C27), 56,3 (C28), 65,2 (C11), 105,0 (C23), 107,2 (C26), 121,0 (C3), 124,0 (C9), 125,6 (C4), 127,1 (C7), 129,3 (C6), 130,3 (C8), 131,8 (C21), 135,8 (C18), 139,6 (C17), 143,1 (C5), 144,5 (C20), 148,4 (C10), 149,5 (C25), 155,3 (C24), 160,0 (C2), 192,6 (C22).

HRMS (ESI): $C_{27}H_{27}ClN_2O_3$ *m/z* $[M+H]^+$ calculado 463,1783, encontrado *m/z* $[M+H]^+$ 463,1782.

IV: banda característica de carbonila α,β insaturada em 1688 cm^{-1} e banda característica de estiramento C=C em 1656 cm^{-1}.

5,6-dimetóxinda-1-ona-4-piperidinil-metileno-1-[(4-azidoquinolin-2-il)metil] (13)

(CAMPS et al., 2006)



Em um balão de três bocas (previamente seco), sob fluxo de argônio, foram adicionados (0,0206 g; 0,107 mmol) de indanona **12**, peneira molecular em pó 4 Å (0,030 g) (previamente seca em mufla a 300°C por 6 horas), THF anidro (1,5 mL) e EtONa (0,0102 g; 0,146 mmol), a mistura permaneceu sob agitação por 30 min para formação do enolato. Em seguida foram adicionados gota a gota (0,0371 g; 0,128 mmol) o aldeído **4** em 1,5 mL de THF, permanecendo sob agitação por 24 horas, a temperatura ambiente. Após esse período foi realizada partição com diclorometano e NaCl saturada e secagem sob $MgSO_4$. O material foi purificado por cromatografia flash automatizada (Biotage®), gradiente acetato de etila: hexano. Rendimento 7% (0,003g).

RMN ^{1}H (400 MHz, $CDCl_3$) de **13**: δ 8,07 – 7,99 (m, 2H, H-9 e H-6), 7,72 (ddd, *J* = 8,5, 6,9, 1,4 Hz, 1H; H-8), 7,51 (ddd, *J* = 8,7, 4,9, 1,3 Hz, 1H, H-7), 7,48 (s, 1H, H-3), 7,30 (s, 1H, H-23), 6,91 (s, 1H, H-26), 6,69 (dt, *J* = 9,7, 1,7 Hz, 1H, H-17), 3,93 (s, 3H, H-28), 3,98 (s, 3H, H-27), 3,83 (s, 2H, H-11), 3,62 (d, *J* = 1,5 Hz, 2H, H-19), 2,99 (d, *J* = 11,5 Hz, 2H, H-12eq e H-16eq), 2,33-2,45 (m, 2H, H-13eq e H-14), 2,26 (dt, *J* = 11,4, 3,4 Hz, 2H, 12-ax, 16-ax), 1,79 – 1,65 (m, 3H, 13-ax,15-ax,15-eq).

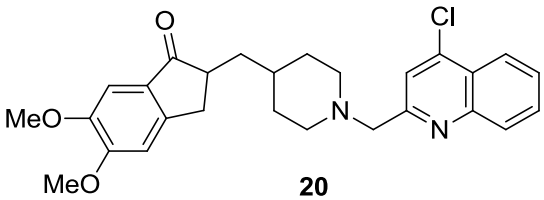
RMN ^{13}C (101 MHz, $CDCl_3$) de **13**: δ 192,6 (C22), 160,3 (C2), 155,3 (C24), 149,5 (C25), 148,6(C10),146,6 (C5), 144,6 (C20), 139,7 (C17), 135,8 (C18), 130,4(C8, C21), 128,7(C6), 126,1(C7), 122,2(C4, C9), 108,3(C3), 107,3 (C26), 105,1(C23), 65,6 (C11), 56,3 (C28), 56,2(C27), 53,6(C12 e C16), 37,1(C14), 31,3(C19), 29,7(C13), 29,5(C15).

HRMS (ESI): $C_{27}H_{27}N_5O_3$ *m/z* $[M+H]^+$ calculado 470,2187 encontrado *m/z* $[M+H]^+$ 470,2186.

IV: banda característica de carbonila α,β insaturada em 1693 cm-1 , de estiramento C=C em 1647 cm^{-1} , e banda referente ao grupamento azida em 2117 cm^{-1}.

5,6-dimetóxinda-1-ona-4-piperidinil-metil-1-[(4-cloroquinolin-2-il)metil] (20)

(HARIG & KUCK, 2006)



Em um balão de duas bocas sob atmosfera inerte foram adicionados (0,060 g; 12,9 mmol) do composto **19** em 1,00 mL de piridina anidra, a mistura foi agitada por 10 min logo após foi adicionado $NaBH_4$ (0,010 g; 0,264 mmol) em pequenas porções, deixou-se agitando por mais 5 min à temperatura ambiente. Em seguida aqueceu-se a mistura (60 ºC) por 20 min. Após esse tempo, resfriou-se a mesma à 0 ºC e adicionou-se solução de HCl (5 %), a mistura foi agitada por 20 min, e em seguida realizou-se a partição com diclorometano e filtração sob $MgSO_4$. O filtrado foi concentrado adicionalmente com tolueno para completa evaporação da piridina. O resíduo obtido foi purificado por cromatografia em coluna, sílica flash em gradiente diclorometano: acetato de etila, rendimento: 57,4% (0,0346 g), Rf: 0,32 em acetato 100%.

Ponto de fusão: 159-160 ºC.

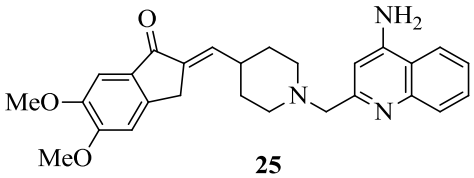
RMN ^{1}H (400 MHz, $CDCl_3$) de **20**: δ 8,21 (1H, dd, *J* = 8,4, 0,9 Hz, H-9), 8,07 (1H, d, *J* = 8,5 Hz, H-6), 7,78 (1H, s, H-3), 7,74 (1H, ddd, *J* = 8,4, 6,9, 1,4 Hz, H-8), 7,61 (1H, ddd, *J* = 8,2, 6,9, 1,2 Hz, H-7), 7,17 (1H, s, H-23), 6,86 (1H, s, H-26), 3,96 (3H, s, H-28), 3,90 (3H, s, H-27), 3,79 (2H, s,H-11), 3,25 (1H, dd, *J* = 17,6, 8,1 Hz, H-19a), 2,93 (2H, t, *J* = 10,0 Hz,H-12eq, H-16eq), 2,78 – 2,67 (2H, m, H-19b), 2,16 (2H, t, *J* = 11,4 Hz, H-12ax, H-16ax), 2,00 – 1,89 (1H, m, H-17a,), 1,83 – 1,3 (6H, m, H-17b, H-14, H-13ax, H-15ax, H-13eq, H-15eq)

RMN ^{13}C (101 MHz, $CDCl_3$) de **20**: δ 207,8 (C22), 155,5 (C2 e C20), 149,5 (24), 148,8 (25), 148,4 (C10), 143,0 (C5), 130,3 (C8), 129,3 (C21 e C6), 127,1 (C7), 125,6 (C4), 124,0 (C9), 121,1 (C3), 107,4 (C26), 104,4 (C23), 65,2 (C11), 56,2 (C27), 56,1 (C28), 54,3 (C12 e C16), 45,5 (C18), 38,7 (C17), 34,3 (C14), 33,3 (C19), 33,1 (C15), 31,8 (C13).

HRMS (ESI): $C_{27}H_{29}ClN_2O_3$ *m/z* $[M+H]^+$ calculado 465,1939 encontrado *m/z* $[M+H]^+$ 465,1931.

5,6-dimetóxinda-1-ona-4-piperidinil-metileno-1-[(4-aminoquinolin-2-il)metil] (25)

(CRAWFORD et al., 2013)



Em um balão de três bocas (previamente seco), sob fluxo de argônio, foram adicionados (0,0083 g; 0,0160 mmol) de $[Pd(cinnamyl)Cl]_2$, BippyPhos (0,0273 g; 0,054 mol) e 1,5 ml de dioxano anidro, e foi deixado agitar por 5min. Em seguida foram adicionados (0,104 g; 1,08 mmol) de NaO*t*Bu, deixado agitar vagarosamente seguido pela adição do intermediário clorado **19** (0,080 g; 0,173 mmol). A mistura reacional foi agitada até solubilização de **19**, e adicionado 3 ml da solução de dioxano-NH_4OH (0,5 $mol.L^{-1}$) gota a gota. Após isso, o balão foi aquecido a 110ºC por 3 horas. A amostra foi previamente seca em rotaevaporador rotativo, resuspendida em diclorometano-metanol e filtrada em filtro PVDF 30mm 0,45µ e posteriormente purificado cromatografia em coluna em sílica flash, em gradiente diclorometano:metanol (0-15%). Rendimento: 16% (0,007 g).

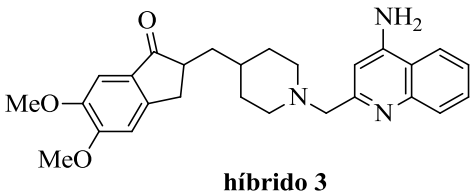
^{1}H NMR (300 MHz, CDCl3) de **25**: δ 8,21 (1H, d, *J* = 6,4 Hz, H-9), 7,99 (1H, d, *J* = 8,3 Hz, H-6), 7,58 (1H, t, *J* = 7,4 Hz, H-8), 7,4 (1H, t, *J* = 7,6 Hz, H-7), 7,19 (1H, s, H-26), 6,93 (1H, s, H-3), 6,85 (1H, s, H-23), 6,50 (1H, d, *J* = 9,4 Hz, H-17), 3,91 (3H, s, H-27), 3,85 (3H, s, H-28), 3,69 (2H, s, H-11), 3,50 (2H, s, H-19), 2,86 – 2,75 (2H, m, H-12 eq e H-16eq), 2,10- 2,30 (3H, m, H-12ax, H-16ax, H-14), 1,66 – 1,46 (4H, m, H-13ax, H-13 ax, H-15eq, H-15ax).

^{13}C NMR (75 MHz, $CDCl_3$) de **25**: δ 191,6 (C22), 154,4 (C24), 148,5(C25), 143,7 (C20), 138,2 (C17), 134,9 (C18), 132,2 (C21), 130,6 (C8), 124,6 (C7),121,4 (C9), 122,1 (C6), 106,3 (C23), 103,9 (C26), 101,4 (C3), 61,4 (C11), 55,3 (C27), 55,1 (C28), 52,3 (C12 e C16), 35,6 (C14), 30,1 (C13 e C15), 28,7 (C19), C2 ?, C4?, C5?, C10?

HRMS (ESI): $C_{27}H_{29}N_3O_3$ *m/z* $[M+H]^+$ calculado 444,2282, encontrado *m/z* $[M+H^+]$ 444, 2297.

5,6-dimetóxinda-1-ona-4-piperidinil-metil-1-[(4-aminoquinolin-2-il)metil]

(CRAWFORD et al., 2013)



híbrido 3

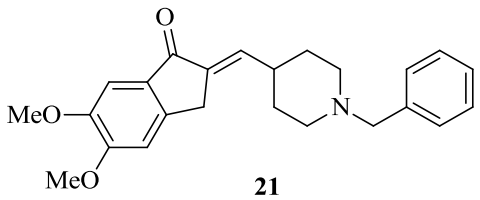
Em um balão de três bocas (previamente seco), sob fluxo de argônio, foram adicionados (0,008 g; 0,0160 mmol) de $[Pd(cinnamyl)Cl]_2$, BippyPhos (0,0272 g; 0,054 mol) e 1,5 ml de dioxano anidro, e deixados em agitação por 5min. Em seguida foram adicionados (0,1045 g; 1,08 mmol) de NaO*t*Bu, permanecendo sob agitação vagarosamente seguido pela adição do intermediário clorado **20** (0,022 g; 0,049 mmol). A mistura reacional foi agitada até solubilização de **20**, e adicionado 3 ml da solução de dioxano-NH_4OH (0,5 M) gota a gota. Após isso, o balão foi aquecido a 110ºC por 5 horas. A amostra foi previamente seca em rotaevaporador rotativo, resuspendida em diclorometano-metanol e filtrada em filtro PVDF 30mm 0,45µ e posteriormente purificado cromatografia em coluna em sílica flash, em gradiente diclorometano:metanol (0-20%). Rendimento 9,0 % (0,002 g).

^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) de **híbrido 3**: δ 8,09 (1H, d, *J* = 8,2 Hz, H-9), 7,96 (1H, d, *J* = 8,5 Hz, H-6), 7,67 (1H, d, *J* = 7,7 Hz, H-8), 7,48 (1H, t, *J* = 5,9 Hz, H-7), 7,16 (1H, s, H-23), 7,03 (1H, s, H-3), 6,86 (1H, s, H-26), 3,96 (3H, s, H-28), 3,90 (3H, s, H-27), 3,86 (1H, s, H-11), 3,24 (1H, dd, *J* = 17,6; 8,1 Hz, H-19a), 2,69 (1H, dt, *J* = 8,0; 3,4 Hz, H-19b e H-18), 1,95 – 1,83 (1H, m, H-17a), 1,75 (1H, dd, *J* = 12,0; 9,6 Hz, H-15eq e H-13eq), 1,60-1,30 (4H, m, H-13ax,H-15ax, H-14, H-17b).

HRMS (ESI): $C_{27}H_{31}N_3O_3$ *m/z* $[M+H]^+$ calculado 446,2438, encontrado *m/z* $[M+H]^+$ 446,2414.

5,6-dimetóxinda-1-ona-4-piperidinil-metileno-1-benzil (21)

(CAMPS et al., 2006)



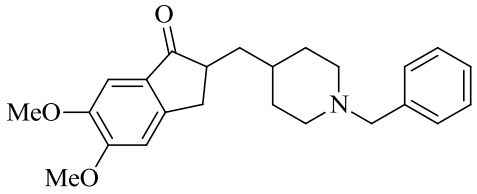
21

Em um balão de três bocas (previamente seco em estufa), sob fluxo de argônio, foram adicionados (0,0393 g; 0,205 mmol) de indanona **12**, peneira molecular em pó 4 Å (0,010 g) (previamente seca em mufla a 300°C por 6 horas), THF anidro (1,5 mL) e EtONa 95% (0,012 g; 0,1763 mmol), a mistura permaneceu sob agitação por 30 min para formação do enolato. Em seguida foram adicionados gota a gota (0,050 g; 0,246 mmol) do aldeído **26** em 1,5 mL de THF, permanecendo sob agitação por 20 horas, a temperatura ambiente. Após esse período foi realizada partição com diclorometano e NaCl saturada e secagem sob $MgSO_4$. O material foi purificado por cromatografia em coluna flash, utilizando sílica flash em gradiente de diclorometano: acetato de etila 10:0; 8:2; 6:4 e 4:6 (v/v). Rf: 0,55 (diclorometno:MeOH 9:1 v/v). Rendimento: 80 % (0,040 g). Sólido amarelo.

^{1}H RMN (400 MHz, $CDCl_3$) de **21**: δ 7,45 – 7,12 (m, 6H, H-Bz e H-23), 6,90 (s, 1H, H-26), 6,66 (d, *J* = 9,7 Hz, 1H, H-17), 3,98 (s, 3H, MeO), 3,93 (s, 3H, MeO), 3,59 (d, *J* = 1.4 Hz, 2H, H-11), 3,54 (s, 2H, H-19), 2,93 (d, *J* = 11,6 Hz, 2H, H-12eq e H-16eq), 2,39 – 2,27 (m, 1H, H-14), 2,07 (td, *J* = 11,4; 2,6 Hz, 2H, H-12ax e H-16ax), 1,75 – 1,57 (m, 4H, H-15ax, H-15eq, H-13ax e H-13eq).

HRMS (ESI) ($C_{24}H_{27}NO_3$) com *m/z* $[M+H]^+$ calculado para 378,2064, encontrado *m/z* $[M+H]^+$ 378,2066.

5,6-dimetóxinda-1-ona-4-piperidinil-metil-1-benzil (donepezila) (1)



donepezila (**1**)

Em um frasco próprio para hidrogenação catalítica, foram adicionados (0,090 g; 0,239mmol) do intermediário **21**, 2mL de metanol e 0,5 mL de diclorometano para solubilização de **21**, e 10 mg de Pd/C 5%. Foi submetida no hidrogenador uma pressão de 50 psi por 1h e 20 min. Após esse período foi observado por CCD a formação do produto com Rf um pouco menor que o material de partida. O material bruto foi filtrado em celite e lavado com metanol e diclorometano. O material foi purificado em coluna cromatográfica com sílica flash, gradiente diclorometano: acetato de etila, rendimento 86% (0,077 g).

^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) de **1**: δ 7,38 – 7,23 (m, 5H, H-Bz), 7,17 (s, 1H, H-23,), 6,85 (s, 1H, H-26), 3,96 (s, 3H, MeO), 3,91 (s, 3H, MeO), 3,49 (d, *J* = 19,9 Hz, 2H, H-11), 3,23 (dd, *J* = 17,5; 8,1 Hz, 1H, H-19a), 3,01 – 2,82 (m, 2H, H-12eq, H-16eq), 2,70 (dt, *J* = 12,6; 3,5 Hz, 2H, H-18, H-19b), 2,08 – 1,85 (m, 3H, H-17a, H-12ax e H-16ax), 1,85 – 1,62 (m, 2H, H-13eq e H-15eq), 1,49 (dd, *J* = 23,6; 15,4 Hz, 1H, H-17b), 1,43 – 1,23 (m, 3H, H-14, H-13ax e H-15ax).

5.2 ENSAIOS BIOLÓGICOS

5.2.1 Ensaio de Ellman

O ensaio foi realizado em microplaca de 96 poços utilizando um espectrofotômetro UV/Vis, Multiskan Spectrum, Thermo electron Corporation.

As amostras foram submetidas a ensaios de inibição de acetilcolinesterase e butirilcolinesterase (AChE e BuChE), com as enzimas acetilcolinesterase humana recombinante (500 unidades/mg proteína; pó liofilizado) e a butirilcolinesterase de soro humano (3 unidades/mg proteína, pó liofilizado) adquiridos de Sigma Aldrich® (*h*AChE), (*h*BuChE).

A solução do ensaio consiste de 0,1 mol.L^{-1} de tampão fosfato pH 8, 400 µmol.L^{-1} 5,5´-dithiobis (ácido 2-nitrobenzóico) (DTNB, reagente de Ellman), 0,05 unidades/mL de AChE ou 0,024 unidades/mL de BuChE, e 800 µmol.L^{-1} de iodeto acetiltiocolina ou 500 µmol.L^{-1} de butiriltiocolina como substrato de AChE e BuChE, respectivamente. Os compostos testes foram adicionados na solução ensaio e pré-incubados com a enzima por 5 min a 30ºC. Depois desse período, o substrato foi adicionado. A absorbância observada em 412 nm foi obtida por 5 min com um espectrofotômetro UV/Vis, Multiskan Spectrum, Thermo electron corporation. As velocidades da reação foram comparadas, e a porcentagem de inibição na presença dos compostos testes foi calculada. O IC_{50} foi definido como a concentração de cada composto capaz de reduzir a atividade enzimática em 50%, calculados com auxílio do programa Excel (ELLMAN et al., 1961).

5.2.2 Teste in vitro de permeação para o sistema nervoso central (SNC)- Parallel artificial membrane permeability assay (PAMPA) barreira hematoencefálica

A predição da permeação das moléculas sintetizadas para o cérebro foi avaliada através do ensaio *parallel artificial membrane permeability assay* (PAMPA) (DI et al., 2003). Dez fármacos comerciais, solução tampão fosfato a pH 7,4 (PBS), etanol e dodecano foram comprados da Sigma, Acros organics, Merck, Aldrich e Fluka. A membrana lipídica polar de cérebro de porco (catalog no. 141101) foi adquirida da Avanti Polar Lipids. A placa doadora utilizada foi de 96 poços com placa filtrante (Multiscreen® IP Sterile Plate PDVF membrane, tamanho do poro 0,45 µM, catalogo n^{o} MAIPS4510) e a placa aceptora de 96 poços (Multiscreen®, catalog n^{o} MAMCS9610) ambas da Millipore. Filtros de membrana PDVF

(diâmetro 30 mm, tamanho do poro 0,45 μm) da Symta foram utilizados para filtrar as amostras. Um leitor de UV de placa de 96 poços (Thermoscientific, Multiskan spectrum) foi utilizado para as leituras. Os compostos testes [(2-6 mg de cafeína, Enoxacino, Hidrocortisona, Desipramina, Ofloxacino, Piroxicam, Testosterona), (12-15 mg de Promazina e Verapamil) e (23 mg de Atenolol)] foram dissolvidos em etanol (1000 μL). 100 μL desta solução estoque foi retirada e 1400 μL de etanol e 3500 μL de tampão fosfato (PBS) pH 7,4 foram adicionados para alcançar a concentração de 30% de etanol no experimento. Estas soluções foram filtradas. A microplaca aceptora de 96 poços foi preenchida com 180 μL de PBS/etanol (70/30). A placa doadora de 96 poços foi revestida com 4 μL de lipídio de cérebro de porco em dodecano (20 $mg.mL^{-1}$) e depois de 5 min, 180 μL de cada solução de composto foi adicionada à ela. 1-2 mg de cada composto para determinar sua capacidade de atravessar a membrana foram dissolvidos em 1500 μL de etanol e 3500 μL de PBS pH 7,4, filtrados e então adicionados a placa doadora de 96 poços.

A placa doadora foi cuidadosamente colocada na placa aceptora formando um sanduíche, o qual foi deixado em repouso por 2,5 horas a 25 °C. Durante este tempo os compostos difundiram da placa doadora através da membrana de lipídio de cérebro de porco para dentro da placa aceptora. Após a incubação, a placa doadora foi removida. O leitor de UV determinou a concentração de cada um dos compostos e das fármacos comerciais nas placas aceptoras e doadoras. Cada amostra foi analisada de três a cinco comprimentos de onda, em 3 poços e em duas corridas independentes. Os resultados são dados como a média (desvio padrão (SD)) e a média entre duas corridas. Dez compostos para o controle de qualidade (previamente mencionados) de conhecida permeabilidade em barreira hematoencefálica foram incluídos em cada experimento para validar o conjunto de análises.

5.2.3 Teste in vitro de permeação intestinal- Parallel artificial membrane permeability assay (PAMPA) absorção oral

A predição da absorção intestinal foi avaliada utilizando o ensaio de permeabilidade paralela em membrana artificial (PAMPA) (DI et al., 2003). Aciclovir, atenolol, carbamazepina, ceftriaxona, sulfasalazina e (±) hidrocloreto de verapamil, foram comprados da Acros Organics, Alfa Aesar, Fluorochem e Sigma Aldrich, e utilizados como compostos referências para o desenvolvimento e validação do método. Sal de tampão fosfato no pH 7,4 (PBS), dimetilsulfóxido (DMSO) e dodecano foram comprados da Sigma Aldrich. A L-α-

fosfatidilcolina da gema do ovo, utilizada na preparação da membrana lipídica, foi adquirida da Sigma Aldrich.

A placa doadora utilizada apresentava 96 poços com membrana filtrante na base (Multiscreen® IP Sterile Plate PDVF membrana, tamanho do poro 0.45 μM, catalogo nº MAIPS4510) e a placa aceptora também apresentava 96 poços, embora sem membrana filtrante (Multiscreen®, catalog nº MAMCS9610) ambas da Millipore. Unidades de Filtros de membranas de PDVF (diâmetro 30 mm, tamanho do poro 0,45 μm) adquiridos da Symta foram utilizadas para filtrar as amostras.

Um leitor de placa de 96 poços (Thermoscientific, Multiskan spectrum) foi utilizado para as medidas de ultravioleta. Soluções estoques das fármacos referência e dos compostos a serem analisados foram preparadas em DMSO a 10mM e então diluídas para alcançarem a concentração de 500μM em um volume final de 5 mL com PBS pH=6,5, assim a concentração de DMSO não passou de 5% do volume total. Estas soluções foram filtradas.

A placa aceptora de 96 poços foi preenchida com 180 μL de solução de tampão fosfato contendo até 5% de DMSO. A placa doadora de 96 poços foi revestida com 5 μL de L-α-fosfatidilcolina de gema de ovo em dodecano (20 $mg.mL^{-1}$) e depois de 5 min, 180 μL de cada solução teste foi adicionada. Assim, a placa doadora foi cuidadosamente colocada na placa aceptora formando um "sanduíche", a qual foi deixada por 8 horas a 25°C sob leve agitação (50 rpm). Durante este tempo os compostos difundiram da placa doadora através da membrana lipídica até a placa aceptora. Depois do tempo de incubação, a placa doadora foi removida. O leitor de placas determinou a absorbância das soluções testes na placa doadora e aceptora. Cada amostra foi analisada de um a cinco comprimentos de onda, em 3 poços em duas corridas independentes. Os resultados estão descritos como a média (desvio padrão) e a média de duas corridas. Onze compostos para o controle (previamente mencionados) de conhecida permeabilidade intestinal foram incluídos em cada experimento para validar o conjunto de dados.

O coeficiente de permeabilidade (*Pe*) de cada fármaco, em centímetro por segundo, foi calculado aplicando a seguinte formula (AVDEEF, 2003):

$$Pe = \frac{\mathrm{Vd} \cdot \mathrm{Vr}}{(\mathrm{Vd} + \mathrm{Vr}) \cdot \mathrm{S} \cdot \mathrm{t}} \ln \frac{100 \cdot \mathrm{Vd}}{100 \cdot \mathrm{Vd} - \%\mathrm{T}(\mathrm{Vd} + \mathrm{Vr})}$$

$$\%\mathrm{T} = \frac{\mathrm{Vr} \cdot \mathrm{Ar}}{\mathrm{Ad}_0 \cdot \mathrm{Vd}} 100$$

No qual Vd e Vr são os volumes das soluções na placa doadora e receptora (0,18 cm^3), S é a área da membrana(0,266 cm^2), t é o tempo de incubação (28800 s), Ar é a absorbância da placa receptora após o experimento e Ad_0 é a absorbância inicial no compartimento doador. A

relação teórica entre a fração absorção intestinal (Fa) e a permeabilidade foi descrita por Amidon e colaboradores (1988) como uma função não-linear, expressa pela seguinte equação:

$$\text{Fa\%} = (1 - e^{-a \cdot P_e}) \cdot 100$$

A Fa% pode ser calculada utilizando o software estatístico SPSS ou JMP (ZHU et al., 2002).

6. CONCLUSÃO

O trabalho foi realizado de forma satisfatória e diversos resultados foram obtidos. Entre os resultados mais relevantes, vale destacar:

- A síntese total do híbrido **3**, como produto final proposto no projeto, foi realizada após sete etapas de síntese e envolvendo diversas reações que, apesar de clássicas, foram investigadas para padronização das melhores condições reacionais; apesar de algumas etapas terem apresentado baixo rendimento, como por exemplo a etapa final, é possível variar as condições reacionais para obtenção de maiores quantidades, caso o produto **3** apresente, de fato, elevada atividade junto a AChE, como inibidor *dual binding site*;

- Além do híbrido **3**, quatro novos derivados foram obtidos (**13**, **19**, **20** e **25**), como intermediários da sequência sintética, contendo aspectos estruturais importantes e relacionados ao produto final para estudos de relação estrutura-atividade;

- Os ensaios enzimáticos empregando o método de Ellman, envolvendo *h*AChE e *h*BuChE foram realizados com sucesso e, apesar do híbrido **3** ainda não ter sido testado, foi possível avaliar a atividade dos intermediários relacionados estruturalmente ao híbrido **3**, como o composto **25**, com atividade inibidora junto a *h*AChE na ordem de nanomolar (IC_{50} 0,014 μM) e **13** (IC_{50} 4,88 μM), além dos derivados **20** e **25** com atividade inibidora junto a *h*BuChE (IC_{50} 5,99 e 3,69 μM, respectivamente).

- A partir dos ensaios de inibição enzimática, foram explorados os estudos de cinética enzimática para determinação do mecanismo de inibição dos derivados mais ativos. Os derivados azido **13** e clorado **20** apresentaram mecanismos mistos de ação em *h*AChE e *h*BuChE, respectivamente, podendo atuar portanto como inibidores *dual binding site.* Em contrapartida, o derivado **25**, o qual difere do híbrido **3** apenas pela presença de uma função olefina, apresentou mecanismo não competitivo. De acordo com os estudos de modelagem molecular, este dado de cinética enzimática pode demonstrar a grande afinidade do composto **25** pelo sítio periférico;

- Estudos de relação estrutura-atividade preliminares mostram a potencialidade do composto híbrido amino-quinolínico **3** em inibir *h*AChE em maior proporção que o seu correspondente intermediário olefínico **25**, principalmente, quando são comparados as atividades de donepezila (IC_{50} 0,0057 μM) com o seu precursor insaturado **21** (IC_{50} 0,13 μM).

- Os compostos híbridos intermediáridos (**13**, **20** e **25**, além de donepezila (**1**) e seu precursor **21**) também foram avaliados adequadamente na predição de permeabilidade pela barreira

hematoencefálica e intestinal pelo método PAMPA, realizado no centro de pesquisa CIB-CSIC (Espanha), durante o estágio (BEPE); os compostos **13**, **20**, **21** e donepezila foram capazes de atravessar a BHE.

Embora não tenha sido realizado o ensaio biológico de agregação do peptídeo beta-amiloide induzido pela AChE, como proposto, devido a baixa quantidade de híbrido **3** obtido, o mesmo será realizado após nova obtenção de **3** pela reprodução de algumas reações finais da sequência sintética.

7. REFERÊNCIAS

ABDEL-MAGID A. F.; MARYANOFF C. A.; CARSON K. G. Reductive amination of aldehydes and ketones by using sodium triacetoxyborohydride. **Tetrahedron Lett.,** v. 31(39), p. 5595-5598, 1996.

ABRAZ- Associação Brasileira de Alzheimer. Disponível em: <http://www.abraz.org.br/>. Acesso em: 10 dezembro 2015.

AKIYAMA, H.; BARGER, S.; BARNUM, S.; BRADT, B.; BAUER, J.; COLE, G. M.; COOPER, N. R.; EIKELENBOOM, P.; EMMERLING, M.; FIEBICH, L. B.; FINCH, C.; FRAUTSCHY, S.; GRIFFIN, W. S. T.; HAMPEL, H.; HULL, M.; LANDRETH, G.; LUE, L. -F.; MRAK, R.; MACKENZIE, R. I.; MCGEER, L. P.; O'BANION, K. M.; PACHTER, J.; PASINETTI, G.; PLATA-SALAMAN, C.; ROGERS, J.; RYDEL, R.; SHEN, Y.; STREIT, W.; STROHMEYER, R.; TOOYOMA, I.; MUISWINKEL, V. L. F.; VEERHUIS, R.; WALKER, D.; WEBSTER, S.; WEGRZYNIAK, B.; WENK, G.; WYSS-CORAY, T.; Inflammation and Alzheimer's disease. **Neurobiol. Aging**, v.21, p.383, 2000.

ALONSO, D; DORRONSORO, I; RUBIO, L; MUÑOZ, P; GARCÍA-PALOMERO, E M. DEL MONTE, A. BIDON-CHANAL, M. OROZCO, F.J. LUQUE, A. CASTRO, M. MEDINA, A. MARTÍNEZ. Donepezila–tacrine hybrid related derivatives as new dual binding site inhibitors of AChE. **Bioorg. Med. Chem.**, v.13 (24), p. 6588-6597, 2005.

ALZHEIMER´S ASSOCIATION, **Alzheimer's Disease Facts and Figures.** Disponível em: <http://www.alz.org/downloads/Facts_Figures_2011.pdf>. Acesso em: 12 novembro de 2011. Disponível em: <http://www.alz.org/facts/overview.asp>. Acesso em: 5 janeiro de 2016.

ALZHEIMER ASSOCIATION. Clinical trials results and new data analyses in amyloid-related therapies from the Alzheimer's association international conference 2015.Disponível em: www.alz.org/aaic. Acesso em: 20 janeiro 2016.

ALZFORUM. International Conference on Alzheimer's & Parkinson's Diseases 2015. Disponível em: www.alzforum.org/print-series/413246. Acesso em: 20 janeiro 2016.

AGOSTINHO P.; CUNHA R.A.; OLIVEIRA C. Neuroinflammation, Oxidative Stress and the Pathogenesis of Alzheimer's Disease. **Curr. Pharm. Design.**, v.16, p. 2766-2778, 2010.

AMIDON G.L., SINKO P.J., FLEISHER D. Estimating human oral fraction dose absorbed: a correlation using rat intestinal membrane permeability for passive and carrier-mediated compounds. **Pharm. Res.**, v.10, p.651-654, 1988.

AUSPEX PHARMACEUTICALS, INC. GANT T. G.; SARSHAR S.; SHAHBAZ M.M .Indanone Inhibitors of acetylcholinesterase. **U.S. Pat. PPAl 2010/0143505A1**, 10 junho 2010.

AVDEEF, A. Permeability-Thin membrane model without retention. In absorption and drug development: solubility, permeability and charge state. Ed. Hoboken: John Wiley & Sons, Inc., 2003.

BAXTER M. G. & CHIBA A. A. Cognitive functions of the basal forebrain. **Curr. Opin. Neurobiol.**, v.9, p.178–183, 1999.

BOLOGNESI L. M.; BANZI R., BARTOLINI M.; CAVALLI A.; TAROZZI A.; ANDRISANO V.; MINARINI A.; ROSINI M.; TUMIATTI V.; BERGAMINI C.; FATO R.; LENAZ G.; HRELIA P.; CATTANEO A.; RECANATINI M.; MELCHIORRE C. Novel Class of Quinone-Bearing Polyamines as Multi-Target-Directed Ligands To Combat Alzheimer's Disease. **J. Med. Chem.,** v. 50*,* p. 4882-4897, 2007.

BOYER, N.; GLOANEC, P.; DE NANTEUIL, G.; JUBAULT, P.; QUIRION, J.C. Synthesis of α,α-Difluoro-β-amino Esters org*em*-Difluoro-β-lactams as Potential Metallocarboxypeptidase Inhibitors. **Eur. J. Org. Chem**., p.4277–4295, 2008.

BRUS B.; KOŠAK U.; TURK S.; PIŠLAR A.; COQUELLE N.; KOS J.; STOJAN J.; COLLETIER J.; GOBEC S. Discovery, Biological Evaluation, and Crystal Structure of a Novel Nanomolar Selective Butyrylcholinesterase Inhibitor. **J. Med. Chem**., v.57, p.8167−8179, 2014.

BUCHWALD HARTWIG AMINATION. Disponível em: <http://www.name-reaction.com /buchwald-hartwig-amination>. Acesso em: 21 janeiro 2015.

CAMPS, P.; ELACHAB, R.; MORRAL, J.; MUÕZ-TORRERO, D.; BADIA, A.; BAÑOS, J.E.; VIVAS, N.M.; BARRIL, X.; OROZCO, M.; LUQUE, F.J. New Tacrine−Huperzine A Hybrids (Huprines): Highly Potent Tight-Binding Acetylcholinesterase Inhibitors of Interest for the Treatment of Alzheimer's Disease. **J. Med. Chem**., v.43, p.4657-4666, 2000.

CAMPS P.; DOMINGO L.R.; FORMOSA X.; GALDEANO C.; GONZÁLEZ D., MUÑOZ-TORRERO D.; SEGALÉS S.; FONT-BARDIA M.; SOLANS X. Highly Diastereoselective One-Pot Synthesis of Spiro{cyclopenta[*a*]indene-2,2'-indene}diones from 1-Indanones and Aromatic Aldehydes. **J. Org. Chem.,** v.71(9), p. 3464–3471, 2006.

CAMPS, GARCÍA P.; MUÑOZ T.; LÓPEZ I. D.; FORMOSA X.; MÁRQUEZ X.; SCARPELLINI, M. Acetylcholinesterase-inhibiting compounds for treating Alzheimer desease, Barcelona, Universidad de Barcelona, **Pat.** WO 2007/122274 A1, 2007.

CAMPS P.; FORMOSA X.; GALDEANO C.; GÓMEZ T.; MUÑOZ-TORRERO D.; SCARPELLINI M.; VIAYNA E.; BADIA A.; CLOS M.V.; CAMINS A.; PALLÀS M.; BARTOLINI M.; MANCINI F.; ANDRISANO V.; ESTELRICH J.; LIZONDO M.; BIDON-CHANAL A.; LUQUE F.J. Novel Donepezila-Based Inhibitors of Acetyl- and Butyrylcholinesterase and Acetylcholinesterase-Induced -Amyloid Aggregation. **J. Med. Chem.**, v. 51, p. 3588-3598, 2008.

CAMPS P.; FORMOSA X.; GALDEANO C.; GÓMEZ T.; MUÑOZ-TORRERO D.; RAMÍREZ L.; VIAYNA E.; GÓMEZ E.; ISAMBERT N.; LAVILLA R.; BADIA A.; CLOS M. V.; BARTOLINI M.; MANCINI F.; ANDRISANO V.; BIDON-CHANAL A.; HUERTAS Ó.; DAFNI T.; LUQUE F. J. Tacrine-based dual binding site acetylcholinesterase inhibitors as potential disease-modifying anti-Alzheimer drug candidates. **Chem. Biol. Interact.,** v.187, p. 411-415, 2010.

CANTADOR C. G., **Disseny, síntesi, avaluació farmacológica i modelatge molecular de nousinhibitors de I' acetilcolinesterasa de lloc d'unió dual**. TESE, Universitat de Barcelona, Departament de Farmacologia I Química Terapèutica, Facultat de Farmàcia, 297 f., 2012.

CARDOSO, F. L.; BRITES, D.; BRITO, M. A. Looking at the blood–brain barrier: Molecular anatomy and possible investigation PPAroaches. **Brain Res. Dev**., v.64, p. 328-363, 2010.

CASTRO A. & MARTINEZ A. Peripheral and Dual Binding Site Acetylcholinesterase Inhibitors: Implications in treatment of Alzheimer's Disease. **Mini Rev. Med. Chem.**, v.1, p.267-272, 2001.

CHAKRABORTY**, V.;** BORDOLOI, M**.;** Microwave-assisted Oxidation of Alcohols by Pyridinium Chlorochromate. **J. Chem. Res. (S)**, p. 118-119, 1999.

COELHO, F. G. M.; GALDUROZ-SANTOS, R. F.; GOBBI, S.; STELLA, F. Atividade física sistematizada e desempenho cognitivo com demência de Alzheimer: uma revisão sistemática. **Rev. Bras. Psiquiatr.**, São Paulo, v. 31, p. 163-170, 2009.

COREY E.J. & SUGGS J.W. Pyridinium chlorochromate. An efficient reagente for oxidation of primary and secondary alcohols to carbonyl compounds. **Tetrahedron lett.**, n.31, p.2647-2650, 1975.

CARVALHO I.; ANDRADE P.; CAMPO V. L.; GUEDES P. M.M.; SESTI-COSTA R; SILVA J. S.; SCHENKMAN S.; DEDOLA S.; HILL L.; REJZEK M.; NEPOGODIEV S. A.; FIELD R. A. 'Click chemistry' synthesis of a library of 1,2,3-triazole-substituted galactose derivatives and their evaluation against Trypanosoma cruzi and its cell surface trans-sialidase. **Bioorg. Med. Chem.**, v.18, p.2412–2427, 2010.

CARVAJAL F.J. & INESTROSA N.C. Interactions of AChE with Aβ Aggregates in Alzheimer's Brain: Therapeutic Relevance of IDN 5706. **Front. Mol. Neurosci**., v.4(19), 2011.

CHEUNG J.; RUDOLPH M.J.; BURSHTEYN F.; CASSIDY M. S.; GARY E. N.; LOVE J.; FRANKLIN M.C.; HEIGHT J.J. Structures of Human Acetylcholinesterase in Complex with Pharmacologically Important Ligands. **J. Med. Chem**. v.*55* (22), p.10282-10286**, 2012.**

CHOI, S.; AID, S.; CARACCIOLO, L.; MINAMI, S.; NIIKURA, T.; MATSUOKA, Y.; TURNER, R. R.; MATTSON, M. P.; BOSETTI, F. Cyclooxygenase-1 inhibition reduces amyloid pathology and improves memory deficits in a mouse model of Alzheimer's disease. **J. Neurochem**.,v.124, p.59–68, 2013.

CLAYDEN J.; GREEVES N.; WAREN S.; WOTHERS P. **Organic Chemistry**, 1st ed. Oxford University Press, 2001.

CLINICAL TRIALS. Disponível em: www.clinicaltrials.gov. Acesso em: 20 janeiro 2016.

COX, M.M. & NELSON, D.L. Lehninger Principles of Biochemistry, 6th edn. WH FREEMAN, UK, 2013.

CRAWFORD S. M.; LAVERY, C. B.; STRADIOTTO, M., BippyPhos: A Single Ligand With Unprecedented Scope in the Buchwald–Hartwig Amination of (Hetero) aryl Chlorides. **Chem. Eur. J**., v. 19, p. 16760–16771, 2013.

CRAWFORD, S. M., LAVERY, C. B.; STRADIOTTO, M. ChemInform Abstract: BippyPhos: A Single Ligand with Unprecedented Scope in the Buchwald—Hartwig Amination of (Hetero)aryl Chlorides. **Chem. Inform.**, v.45, 2014.

CRIVORI, P.; CRUCIANI, G.; TESTA, B. Predicting Blood-Brain Barrier Permeation from Three-Dimensional Molecular Structure. **J. Med. Chem**.,v. 43, p. 2204-2216, 2000.

DANTAS H. J., **Síntese diastereosseletiva e estudo espectroscópico da (1r, 3r, 3'r, 4r)-3-[(3-piridinil)-hidroximetil]-1,7,7- trimetil biciclo[2.2.1]heptan-2-ona, do regioisômero (4-piridinil) e seus produtos de redução assimétrica**, 2010. Tese de doutorado Universidade da Paraíba, Departamento de Química, 2010. Disponível em :< http://www.quimica.ufpb.br/posgrad/teses/>. Acesso em 20 outubro 2014.

DARVESH S.; HOPKINS D. A.; GEULA C. Neurobiology of butyrylcholinesterase. **Nat. Rev. Neurosci.**, v.4, p.131-138, 2003.

DESS, D.B. & MARTIN, J.C. Readily accessible 12-I-5 oxidant for the conversion of primary and secondary alcohols to aldehydes and ketones. **J. Org. Chem**.,v.48, p. 4156, 1983.

DI L.; KERNS E.H.; FAN K.; MCCONNELL O.J.; CARTER G.T. High throughput artificial membrane permeability assay for blood-brain barrier. **Eur. J. Med. Chem.** v.38, p.223-32, 2003.

DI GIORGIO C.; BENCHABANE Y.; BOYER G.; PICCERELLE P.; DE MÉO M. Evaluation of the mutagenic/clastogenic potential of 3,6-di-substituted acridines targeted for anticancer chemotherapy. **Food. Chem. Toxicol.**, v. 49, p. 2773–2779, 2011.

DIAS D. F.; PRADO F. M. A.; PINTO G. D.L; ALVES R. J.; ALVES R. B.; SOUZA F. J. D. D. Síntese de aliloxi-*orto*-iodobenzamida derivada de d-glicose e reação de ciclização radicalar mediada por hidreto de tri-*n*-butilestanho. **Quím. Nova**, v.29 (3), p. 444-451, 2006.

DVIR H.; JIANG H.L.; WONG D.M.; HAREL M.; CHETRIT M.; HE X.C.; JIN G.Y.; YU G.L.; TANG X.C.; SILMAN I.; BAI D.L.; SUSSMAN J.L. X-ray structures of *Torpedo californica* acetylcholinesterase complexed with (+)-huperzine A and (-)-huperzine B: structural evidence for an active site rearrangement. **Biochemistry,** v.41, p.10810-10818, 2002.

DVIR H.; SILMAN I.; HAREL M.; ROSENBERRY T. L.; SUSSMAN J. L.; Acetylcholinesterase: From 3D structure to function. **Chem. Biol. Interact**, v. 187, p.10-22, 2010.

ELATI C. R.; KOLLA N.; RAO CHALAMALA S.; VANKAWALA P. J.; SUNDARA V.; VURIMIDI H.; MATHAD V. T. New Synthesis of Donepezila Through Palladium-Catalyzed Hydrogenation PPAroach. **Synth. Commun.**, v. 36 (2), p. 169-174, 2006.

ELLMAN, G. L., A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. **Biochem. Pharmacol.**, v.7, p. 88-95, 1961.

ENGEN, W.; O'BRIEN, T.E.; KELLY, B.; DO, J.; RILLERA, L.; STAPLETON, L.K.; YOUNGREN, J.F.; ANDERSON, M. O. Synthesis of aryl-heteroaryl ureas (AHUs) based on 4-aminoquinoline and their evaluation against the insulin-like growth factor receptor (IGF-1R). **Bioorg. Med. Chem.**, v.18 (16), p.5995-6005, 2010.

FINDEIS, M. A. The role of amyloid β peptide 42 in Alzheimer's disease. **Pharmacol. Ther.**, v.116, p.266–286, 2007.

FLAJOLET, M.; HE, G.; HEIMAN, M.; LIN, A.; NAIRN, A. C.; GREENGARD, P.; Regulation of Alzheimer's disease amyloid-β formation by casein kinase I. **Proc. Natl. Acad. Sci USA**, v.104(10), p.4159-4164, 2007.

GANT T. G., SARSHAR S., SHAHBAZ M.M .Indanone Inhibitors of acetylcholinesterase. **U.S. Pat. Appl 2010/0143505A1**.

GARCÍA-PALOMERO, E.; MUÑOZ, P.; USAN, P.; GARCIA, P.; DE AUSTRIA, C.; VALENZUELA, R.; RUBIO, L.; MEDINA, M.; MARTÍNEZ, A. Potent β-AmyloidModulators. **Neurodegener. Dis.**, v.5, p. 153–156, 2008.

GIACOBINI E. Cholinesterase inhibitors: new roles and therapeutic alternatives. **Pharmacol. Res.**, v.50, p.433–440, 2004.

GIUNTA, B.; FERNANDEZ, F.; NIKOLIC, W. V.; OBREGON, D.; RRAPO, E.; TOWN, T.; TAN, J. Inflammaging as a prodrome to Alzheimer's disease. **J. Inflammation**, v. 5, p.51, 2008.

GOTZ, J. & ITTNER, L. M. Animal models of Alzheimer's disease and frontotemporal dementia. **Nat. Rev. Neurosci.,** v.9, p.532-544, 2008.

GUPTA S.; MOHAN C. G. 3D-pharmacophore model based virtual screening to identify dual-binding site and selective acetylcholinesterase inhibitors, **Med. Chem. Res.**, v.20, p.1422–1430, 2011.

HAINES ALAN H., Methods for the oxidation of organic compounds, Alcohols, Alcohol Derivatives, Alkyl Halides, Nitroalkanes, Alkyl Azides, Carbonyl compounds, Hydroxyarenes and Aminoarenes. **Best Synthetic Methods**. Academic Press, 1988.

HARIG M.; KUCK D. The first Centro hexaindane bearing twelve functional groups at its outer molecular periphery and related lower veratrole-derived centropolyindanes. **Eur. J. Org. Chem.**, p. 1647-1655, 2006.

HENEKA, M.T.; O'BANION, M.K. Inflammatory processes in Alzheimer's disease. **J. Neuroimmunol.**, v.184, p. 69, 2007.

HEPPNER, F. L.; RANSOHOFF, R. M.; BECHER, B. Immune attack: the role of inflammation in Alzheimer disease. **Nat. Rev. Neurosci.**, v.16, p.358-372, 2015.

HOFFMANN G. R.; DESCHÊNES S.M.; MANYIN T.; FUCHS R. P.P. Mutagenicity of acridines in a reversion assay based on tetracycline resistance in plasmid pBR322 in *Escherichia coli*. **Mutation. Research.** v. 351, p. 33-43, 1996.

HUANG L.; LU C.; SUN Y.; MAO F.; LUO Z. SU T.; JIANG H.; SHAN W.; LI X. Multitarget-directed benzylideneindanone derivatives: anti-β-amyloid (Aβ) aggregation, antioxidant, metal chelation, and monoamine oxidase B (MAO-B) inhibition properties against Alzheimer's disease. **J. Med. Chem.** v. 55(19), p. 8483-92, 2012.

INESTROSA N.C.; MUÑOZ J. F. Neurotoxicity of acetylcholinesterase amyloid L-peptide aggregates is dependent on the type of AL peptide and the AChE concentration present in the complexes. **FEBS Letters**, v. 450, p.205-209, 1999.

IQBAL K.; LIU F.; GONG C.; GRUNDKE-IQBAL I.Tau in Alzheimer Disease and Related Tauopathies. **Curr. Alzheimer Res.**, v.7(8), p. 656–664, 2010.

JOHNSON G. & MOORE S.W. The Peripheral Anionic Site of Acetylcholinesterase: Structure, Functions and Potential Role in Rational Drug Design. **Curr. Pharm. Design.**, v. 12, p.217-225, 2006.

JUNIOR L.F.S. Oxidações- IQ-USP, 2012. Dísponível em: http://www.iq.usp.br/luizfsjr/QFL5928_2012_04_Oxidacao.pdf. Acessado em: 21 junho 2014.

KAMIYA S.; SUEYOSHI S.; MIYAHARA M.; YANAGIMACHI K.; NAKASHIMA T.; Synthesis of 4- azidoquinoline 1 oxides and related compounds. **Chem. Pharm. Bull.**, v.28 (5), 1485-1490, 1979.

KANSY M., SENNER F, GUBERNATOR K. Physicochemical High Throughput Screening: Parallel Artificial Membrane Permeation Assay in the Description of Passive Absorption Processes. **J. Med. Chem.**, v. 41, n.7, 1998

KÖHLER M., MACHILL S., SALZER R., KRAFFT C. Characterization of lipid extracts from brain tissue and tumors using Raman spectroscopy and mass spectrometry. **Anal. Bioanal. Chem.** v.393 (5), p.1513-1520, 2009.

KORABECNY J.; DOLEZAL R.; CABELOVA P.; HOROVA A.; HRUBA E.; RICNY J.; SEDLACEK L.; NEPOVIMOVA E.; SPILOVSKA K.; ANDRS M.; MUSILEK K., OPLETALOVA V., SEPSOVA V., RIPOVA D., KUCA K.. 7-MEOTA–donepezila like compounds as cholinesterase inhibitors: Synthesis, pharmacological evaluation, molecular modeling and QSAR studies. **Eur. J. Med. Chem.**, v. 82, p. 426-438, 2014.

KURET, J.; JOHNSON, G. S.; CHA, D.; CHRISTENSON, E. R.; DEMAGGIO, A. J.; HOEKSTRA, M. F.; J. Casein kinase 1 is tightly associated with paired-helical filaments isolated from Alzheimer's disease brain. **Neurochem.**,v. 69(6), p. 2506-15, 1997.

LANNFELT L.; RELKIN N. R.; SIEMERS E. R. Amyloid-ß-directed immunotherapy for Alzheimer’s disease. **J. Intern. Med.,** v. 275, p.284–295, 2014.

LANSDALL C. J. An effective treatment for Alzheimer's disease must consider both amyloid and tau. **Biosci. Horiz.,** v.7, p.1-11, 2014.

LATHER, V.; KRISTAM, R.; SAINI, J. S.; KRISTAM, R.; KARTHIKEYAN, N.A.; BALAJI, V.N.; QSAR Models for Prediction of Glycogen Synthase Kinase-3β Inhibitory Activity of Indirubin Derivatives. **QSAR Comb. Sci**.,v. 27(6), p.718-728, 2008.

LIN G.L.; LAI C.Y.; LIAO W.C. Molecular recognition by acetylcholinesterase at the peripheral anionic site: Structureactivity relationships for inhibitions by aryl carbamates. **Bioorg. Med. Chem.,** v.7, p.2683-2689, 1999.

LIU C.; KANEKIYO T.; XU H.; BU G. Apolipoprotein E and Alzheimer disease: risk, mechanisms, and therapy. **Nat. Rev. Neurol.**, v.9 (2), p.106-118, 2013.

LUO W. Design, synthesis and evaluation of novel tacrine-multialkoxybenzene hybrids as dual inhibitors for cholinesterases and amyloid beta aggregation. **Bioorg. Med. Chem.**, v. 19, (2), p. 763-770, 2011.

LYNNETTE R. F.; WILLIAM A. D. Genotoxicity of non-covalent interactions: DNA intercalators (Review). **Mutat. Res.,** v.623, p.14–23, 2007.

MARELLA A.; TANWAR O. P.; SAHA R.; ALI M. R.; SRIVASTAVA S.; AKHTER M.; SHAQUIQUZZAMAN M.; ALAM M. M. Quinoline: A versatile heterocyclic. **Saudi Pharm. J.,** v. 21 (1), p. 1–12, 2013.

MARTÍNEZ A.; FERNÁNDEZ M.; ESTÉVEZ J.C.; ESTÉVEZ R.J.; CASTEDO L. Studies on the chemistry of 2-(2-oxo-3-phenylpropyl)-benzaldehydes: novel total synthesis of 3-phenylnaphthaleno-2-ols and 2-hydroxy-3-phenyl-1,4-naphthoquinones. **Tetrahedron,** v.61, p. 485-492, 2004.

MARTORANA A.; ESPOSITO Z.; KOCH G. Beyond the Cholinergic Hypothesis: Do Current Drugs Work in Alzheimer's Disease? **CNS Neurosci. Ther.,** v.16, p.235–245, 2010.

MATOS C.R.R.; LOPES R. S.C; LOPES C.C.; Synthesis of 1-deoxinofirimycin and n-butyl-1-deoxynojirimycin. **Synthesis**, v.4, p. 571-573, 1999.

MEHTA M.; ADEM A.; SABBAGH M. New Acetylcholinesterase Inhibitors for Alzheimer's Disease. **Int. J. Alzheimers Dis**., v. 2012, Article ID 728983, 8 pages, 2012.

MEYER, S.D. & SCHREIBER, S.L**. J.Org. Chem**. v.59, p. 7549, 1994.

MORE J.D & FINNEY N.S. A simple and advantageous protocol for the oxidation of alcohols with o- iodoxybenzoic acid (IBX). **Org. Lett.**, v.4(17), p.3001-3003, 1999.

MUÑOZ-RUIZ, P.; RUBIO, L.; GARCÍA-PALOMERO, E.; DORRONSORO, I.; DEL MONTE-MIL , M.; VALENZUELA, R.; US AN, P.; DE AUSTRIA, C.; BARTOLINI, M.; ANDRISANO, V.; BIDON-CHANAL, A.; OROZCO, M.; LUQUE, F. J.; MEDINA, M.; MARTÍNEZ, A. Design, Synthesis, and Biological Evaluation of Dual Binding Site Acetylcholinesterase Inhibitors: New Disease-Modifying Agents for Alzheimer's Disease. **J. Med. Chem**., v. 48, p. 7223–7233, 2005.

MUÑOZ-TORRERO & CAMPS. Dimeric and hybrid anti-Alzheimer drug candidates. **Curr. Med. Chem.,** v. 13, p. 399-422, 2006.

NAINI S. A. & SOUSSI-YANICOSTAS N. Tau Hyperphosphorylation and Oxidative Stress, a Critical Vicious Circle in Neurodegenerative Tauopathies? **Oxid. Med. Cell. Longev.,** v.2015, Article ID 151979, p.1-17, 2015.

NIPHADE N.; MALI A.; JAGTAP K.; OJHA R. C.; VANKAWALA P. J.; MATHAD V. T. AN improved and efficient process for the production of donezepil hidrochloride: substitution of sodium hidroxide for *n*-butyl lithium via phase transfer catalysis. **Org. Process. Res. Dev.**, v. 12, p. 731-735, 2008.

NG Y. P.; OR T. C. T.; IP N. Y. Plant alkaloids as drug leads for Alzheimer's disease. **Neurochem. Int.** v.89, p.260-270, 2015.

PAUL S.; JEON W. K.; BIZON J. L. Han J. Interaction of basal forebrain cholinergic neurons with the glucocorticoid system in stress regulation and cognitive impairment. **Front. Aging. Neurosci .**, v.7 (43), 2015.

PAULA V. J. R. DE; GUIMARÃES F. M.; FORLENZA O. V. The role of TAU protein in the pathophysiology of frontotemporal dementia. **Rev. Psiq. Clín.,** v. 36(5), p.197-202, 2009.

PATOCKA J., JUN D., KUCA K. Possible role of hydroxylated metabolites of tacrine in drug toxicity and therapy of Alzheimer's disease. **Curr. Drug. Metab**., v.9(4), p.332-5, 2008.

PEREZ S.E.; DAR S.; IKONOMOVIC M.D.; DEKOSKY S.T.; MUFSON E.J. Cholinergic Forebrain Degeneration in the PPAswe/PS1ΔE9 Transgenic Mouse. **Neurobiol. Dis**., v.28(1), p.3-15, 2007.

PÉREZ B. C., TEIXEIRA C., FIGUEIRAS M. , GUT J. , ROSENTHAL P. J., GOMES J. R. B., GOMES P. Novel cinnamic acid/4-aminoquinoline conjugates bearing non-proteinogenic amino acids: towards the development of potential dual action antimalarials. **Eur. J. Med. Chem.** v.54, p.887-899, 2012.

PÉREZ-MELERO C.; MAYA A.B.S; DEL REY B.; PELÁEZ R.; CABALLERO E.; MEDARDE M.L. A new family of quinoline and quinoxaline analogues of combretastatins. **Bioorg. Med. Chem. Lett.,** v.1, p.3771–3774, 2004.

PERNECZKY R.; ALEXOPOULS P.; KURZA. Soluble amyloid precursor proteins and secretases as Alzheimer's disease biomarkers. **Trends. Mol. Med.**, v. 20(1), p.8-15, 2014.

PERRONI, G.G.G., **Capacidade functional de indivíduos idosos portadores da doença de Alzheimer.** Dissertação, Programa de Pós-graduação do Departamento de Medicina Social da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2007. Disponível em <http://www.teses.usp.br> Acesso em: 14 janeiro 2016.

PETRONILHO DA C. E.; PINTO, A. C.; VILLAR, J. D. F. Acetilcolinesterase: Alzheimer e GUERRA QUÍMICA. **Ciência e Tecnologia**, v.3, 2011.

PLOBECK N.; DELORME D.; WEI ZHONG-YONG; YANG H.; ZHOU F.; SCHWARZ P.; GAWELL L.; GAGNON H.; PELCMAN B.; SCHMIDT R.; YUE S. Y.; WALPOLE C.; BROWN W.; ZHOU E.; LABARRE M.; PAYZA K.; ST-ONGE S.; KAMASSAH A.; PIERRE-EMMANUEL M.; PROJEAN D.; DUCHARME J.; ROBERTS E. New Diarylmethylpiperazines as Potent and Selective Nonpeptidic δ Opioid Receptor Agonists with Increased In Vitro Metabolic Stability. **J. Med. Chem.**, v.43, p.3878-3894, 2000.

PHIEL, C. J.; WILSON, C. A.; LEE, V. M.; KLEIN, P. S.; GSK-3alpha regulates production of Alzheimer's disease amyloid-beta peptides. **Nature**, v.423, p.435- 439, 2003.

POTTHAST A.; ROSENAU T.; CHEN C.L.; GRATZL J. S. Selective Enzymic Oxidation of Aromatic Methyl Groups to Aldehydes. **J. Org. Chem.**, v.60 (14), p. 4320–4321, 1995.

RAMPA, A.; BISI, A.; BELLUTI, F.; GOBBI, S.; VALENTI, P.; ANDRISANO, V.; CAVRINI, V.; CAVALLI, A.; RECANATINI, M. Acetylcholinesterase inhibitors for potential use in Alzheimer's disease: molecular modeling, synthesis and kinetic evaluation of 11H-indeno-[1,2-b]-quinolin-10-ylamine derivatives. **Bioorg. Med. Chem.**, v. 8, p.497-506, 2000.

REICHMAN W.E. Current pharmacologic options for patients with Alzheimer's disease. **Ann. Gen. Hosp. Psychiatry,** v. 2, p.1–14, 2003.

RIZZO S.; RIVIÈRE C.; PIAZZI L.; BISI A. S.; BARTOLINI M.; ANDRISANO V.; MORRONI F.; TAROZZI A.; MONTI JEAN-PIERRE; RAMPA A. Benzofuran-Based Hybrid Compounds for the Inhibition of Cholinesterase Activity, *β* Amyloid Aggregation, and A*β* Neurotoxicity**. J. Med. Chem.,** v.51, p.2883–2886, 2008.

RIZZO S.; BARTOLINI M.; CECCARINI L.; PIAZZI L.; GOBBI S.; CAVALLI A.; RECANATINI M.; ANDRISANO V.; RAMPA A.Targeting Alzheimer's disease: Novel indanone hybrids bearing a pharmacophoric fragment of AP2238. **Bioorg. Med. Chem.**, v.18, p. 1749–1760, 2010.

ROCHA-GONZÁLEZ, H.I.; AMBRIZ-TUTUTI, M.; GRANADOS-SOTO, V.; Resveratrol: a natural compound with pharmacological potential in neurodegenerative diseases. **CNS Neurosci. Ther**, v.14, p.234, 2008.

SEYDEN-PENNE J. Reductions by the Alumino- and Borohydrides in Organic Synthesis Second Edition, Wiley-VCH, 1997.

SHAO D.;ZOU C.;LUO C.; TANG X.; LI Y.; Synthesis and evaluation of tacrine–E2020 hybrids as acetylcholinesterase inhibitors for the treatment of Alzheimer's disease. **Bioorg. Med. Chem. Lett**., v.14, (18),p.4639-4642, 2004.

NISHIMURA S. Handbook of heterogeneous catalytic hydrogenation for organic synthesis, ISBN 0-471-39698-2, 2001.

SILVA C.H.; CAMPO V.L.; CARVALHO I.; TAFT C.A. Molecular modeling, docking and ADMET studies PPAlied to designed of a novel hybrid for treatment of Alzheimer´s disease. **J. Mol. Graph. Model.**, v. 25, p.169-175, 2006.

SILVA T.; REIS J.; TEIXEIRA J.; BORGES F. Alzheimer's disease, enzyme targets and drug discovery struggles: From natural products to drug prototypes. **Aging Res. Rev.,** v.15, p.116–145, 2014.

SIMEON-RUDOLF R.; KOVARIK Z.; RADIC Z.; REINER E. Reversible inhibition of acetylcholinesterase by 4,4′-bipyridine and by a coumarin derivative. **Chem. Biol. Interact.**, p.119-120, 1999.

SMITH, M.A.C, Doença de Alzheimer. **Rev. Bras. Psiquiatr**., v.21, s.2, 1999.

EISAI CO., Ltd.(Japan) SUGIMOTO H.; TSUCHIYA Y.; HIGURASHI K.; KARIBE N.; LIMURA Y.; SASAKI A.; YAMANASHI Y.; OGURA H.; ARAKI S.K. M.; KOSASA T.; KUSOTA A.; KOZASA M.; YAMATSU K. 1,4-Substituted piperidines as acetylcholinesterase inhibitors and their use for the treatment of Alzheimer's disease, **Pat. EP0296560**, 1996.

SUGIMOTO H.; IIMURA Y.; YAMANISHI Y.; YAMATSU K. Synthesis and anti-acetylcholinesterase activity of 1-benzyl-4-[(5,6-dimethoxy-1-indanon-2-yl)methyl]piperidine hydrochloride (E2020) and related compounds, **Bioorg. Med. Chem. Let.**, v.2 (8), p. 871-876, 1992.

SUGIMOTO H.; IIMURA YO.; YAMANISH Y.; YAMATSU. Synthesis and structure-activity relationships of acetylcholinesterase inhibitors: 1-Benzyl-4-[(5,6-dimethoxy-1-oxoindan-2-yl)methyl] piperidine hydrochloride and related compounds, **J. Med. Chem.,** v. 38 (24), p. 4821-4829, 1995.

TAGAWA Y.; YAMASHITA K.; HIGUCHI Y.; GOTO Y. Improved oxidation of active methyl group of N-heteroaromatic compouns by selenium dioxide in the presence of tert-butyl hidroperoxide. **Heterocycles**, v. 60(4), p. 953-957, 2003.

TELL V. & HIGEROTH A. AD-relevant protein kinase inhibitors. **Front. Cell. Neurosci.**, v.7 (Article 189), p.28-33, 2013.

TROST, B.M; LATIMER, L.H. Generation and alkylation of dianion (homoenolate) of a 1-indanone. **J. Org. Chem.**, v. 42, p.3213, 1977.

VAN ASPEREN, J.; MAYER, U.; VAN TELLINGEN, O.; BEIJNEN, J. H. The Functional Role of P-Glycoprotein in the Blood-Brain Barrier. **J. Pharm. Sciences**, v. 86 (8), p.881-884, 1997.

VASSAR, R. BACE-1 inhibitor drugs in clinical trials for Alzheimer's disease. **Alzheimers Res. Ther.**, v.6, p.1-14, 2014.

VERMA M, VATS A, TANEJA V. Toxic species in amyloid disorders: Oligomers or mature fibrils. **Ann. Indian. Acad. Neurol**. v.18(2), p.138-145, 2015.

VIELHABER, E.; VIRSHUP, D.M.; Casein kinase I: From obscurity to center stage. **IUBMB Life**, v.51(2), p.73-78, 2001.

YAN J.W. Design, synthesis and evaluation of isaindigotone derivatives as dual inhibitors for acetylcholinesterase and amyloid beta aggregation. **Bioorg. Med. Chem.,** v. 20 (8), p. 2527–2534, 2012.

ZABORSZKYY L.; POL A. VAN DEN; GYENGESI E. The Basal Forebrain Cholinergic Projection System in Mice. **The Mouse Nervous System**, chapter 28, p.684-709, 2012.

ZHANG S.; WANG T., BEITZ D., Soy Lecithin but Not Egg Lecithin Decreased the Plasma Cholesterol Concentration in Golden Syrian Hamsters. **A.S. Leaflet R2080**, http://www.ans.iastate.edu/report/air/2006pdf/R2080.pdf

ZAWADZKA A.; LOZIN´SKA I.; MOLE DA Z.; PANASIEWICZ M.; CZARNOCKI Z. Highly selective inhibition of butyrylcholinesterase by a novel melatonin–tacrine heterodimers. **J. Pineal Res.**, v.54, p.435–441, 2013.

ZHU C. JIANG L.,CHEN T.-M., HWANG K.-K., A comparative study of artificial membrane permeability assay for high throughput profiling of drug absorption potential. **Eur. J. Med. Chem.** v.37 (5), p. 399-407, 2002.

XU H., WOLF C., Efficient copper-catalyzed coupling of aryl chlorides, bromides and iodides with aqueous ammonia. **Chem. Commun**., p.3035-3037, 2009.

WEINREB O.; AMIT T.; BAR-AM O.; YOUDIM M. B. H. REVIEW Neuroprotective effects of multifaceted hybrid agents targeting MAO, cholinesterase, iron and β-amyloid in ageing and Alzheimer's disease. **Br. J. Pharmacol.**, 2015.

WORLD ALZHEIMER REPORT, 2015. Disponível em:< http://www.alz.co.uk/research/world-report-2015>. Acesso em: 20 dezembro 2015.

WOODGETT, J. R., Molecular cloning and expression of glycogen synthase kinase-3/factor A. **Embo J.,**v. 9(8), p.2431-2438, 1990.

www.nia.nih.gov/alzheimer. Acesso em 20 janeiro 2016.

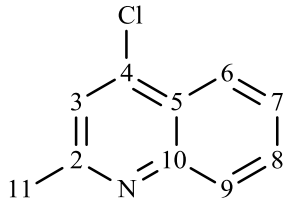
www.organic-chemistry.org. Acesso em 17 novembro 2015.

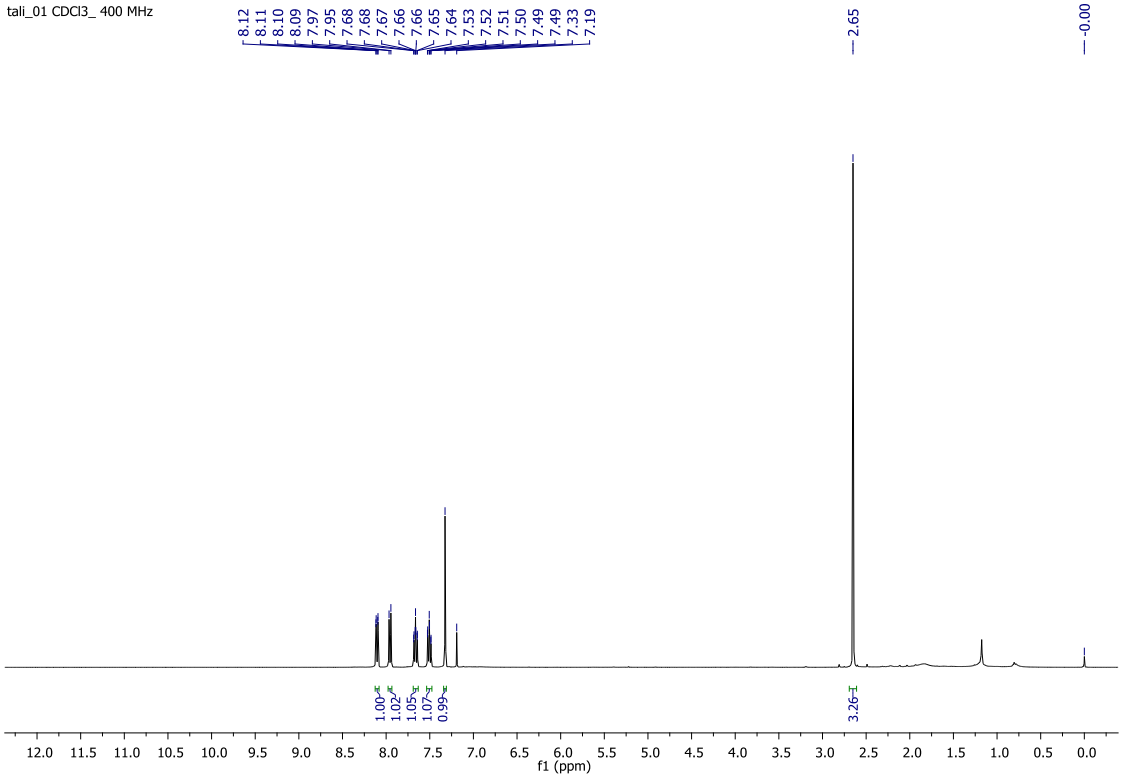
8. APÊNDICES

A seguir estão alguns espectros selecionados dos compostos sintetizados neste trabalho. A numeração dos átomos foi apenas para facilitar a atribuição.

APÊNDICE A

Espectro de RMN de ^{1}H ($CDCl_3$, 400 MHz) do composto **6**.





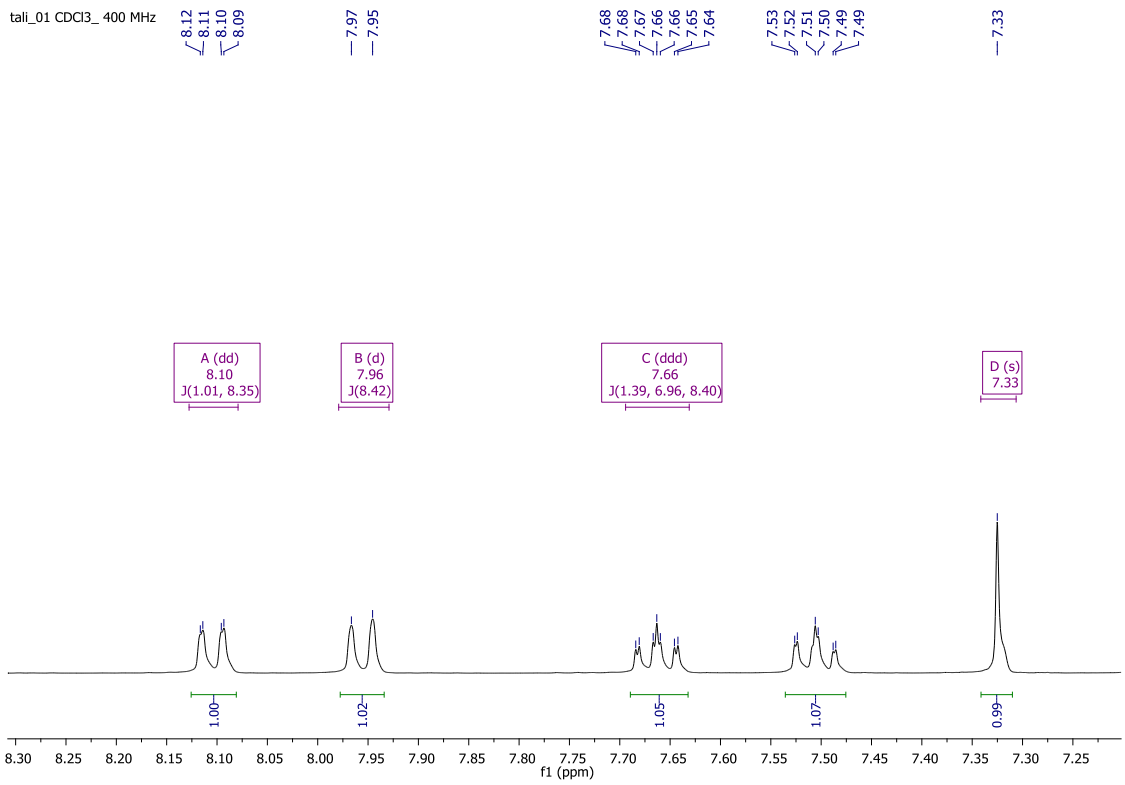


Tabela de RMN de ^{1}H (400MHz, CCl_3D) da 2-metil-4-cloroquinolina (**6**).

Posição	δ_H **(ppm)**	**integral**	**multiplicidade**	***J*(Hz)**
3	7,33	1	s	--
6	7,96	1	d	8,4
7	7,51	1	ddd	8,4; 7,0; 1,0
8	7,66	1	ddd	8,4; 7,0; 1,4
9	8,10	1	dd	8,4; 1,0
11	2,65	3	s	--

Espectro de RMN de C^{13} ($CDCl_3$, 400 MHz) do composto **6**.

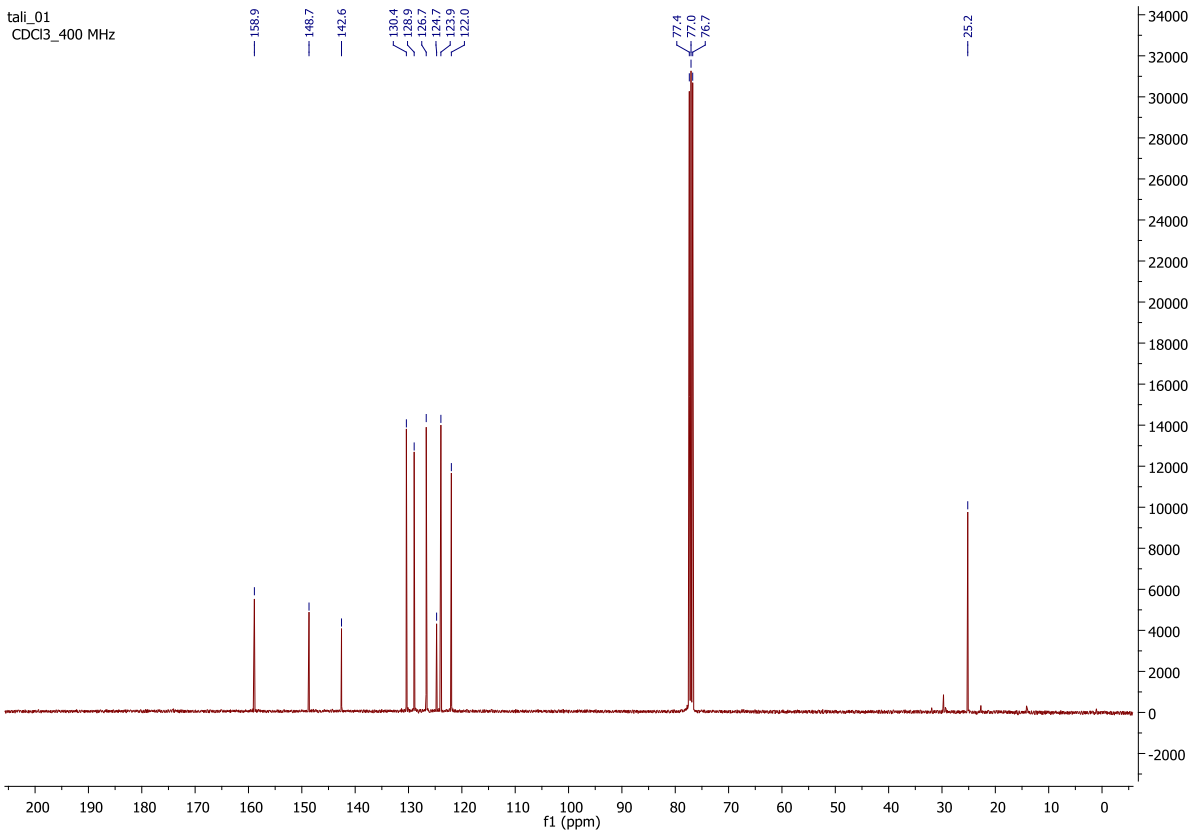
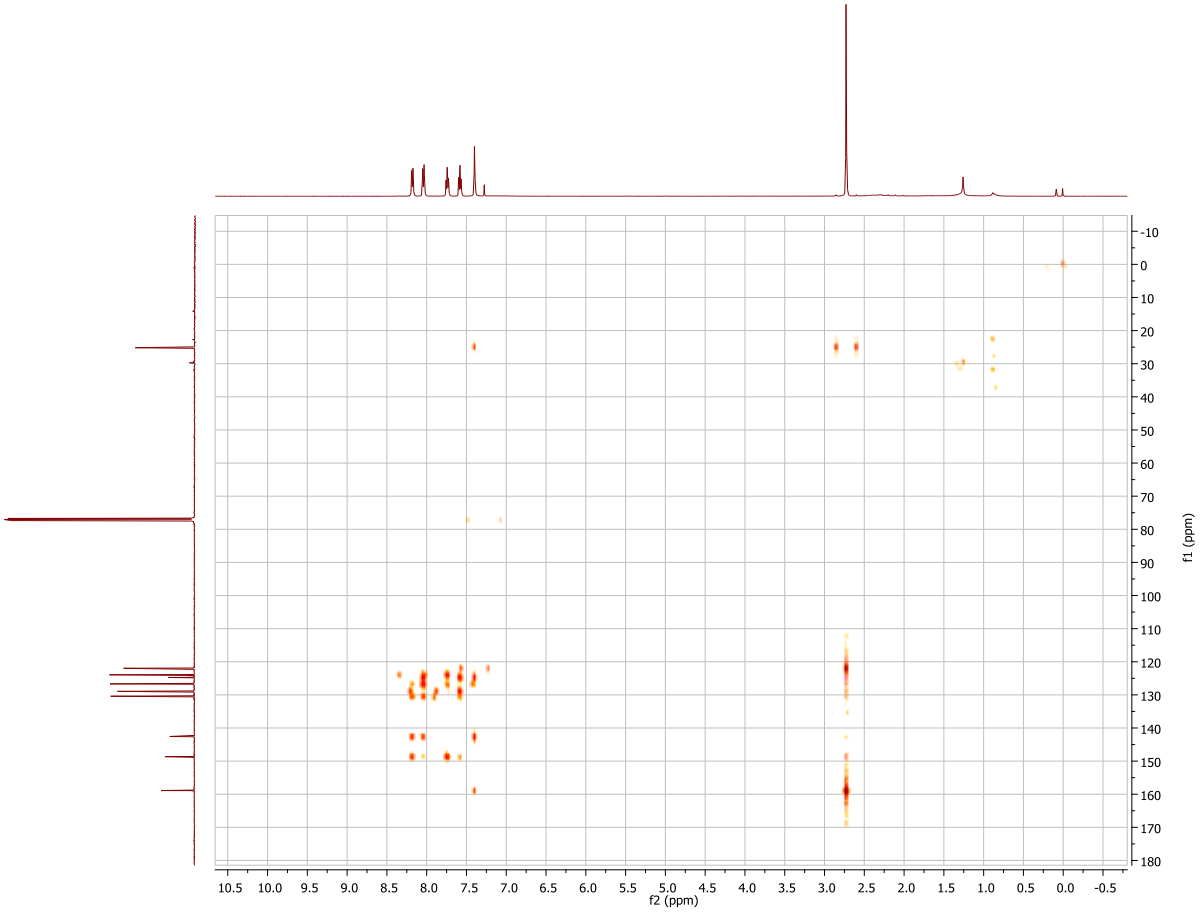


Tabela de RMN de ^{13}C (400MHz, $CDCl_3$) da 2-metil-4-cloroquinolina (**6**).

Posição	δ_c (ppm)
2	158,9
3	122,0
4	124,7
5	142,6
6	130,4
7	126,7
8	128,9
9	123,9
10	148,7
11	25,2

Espectro bidimensional de correlação C-H HMBC ($CDCl_3$, 400 MHz) do composto **6.**

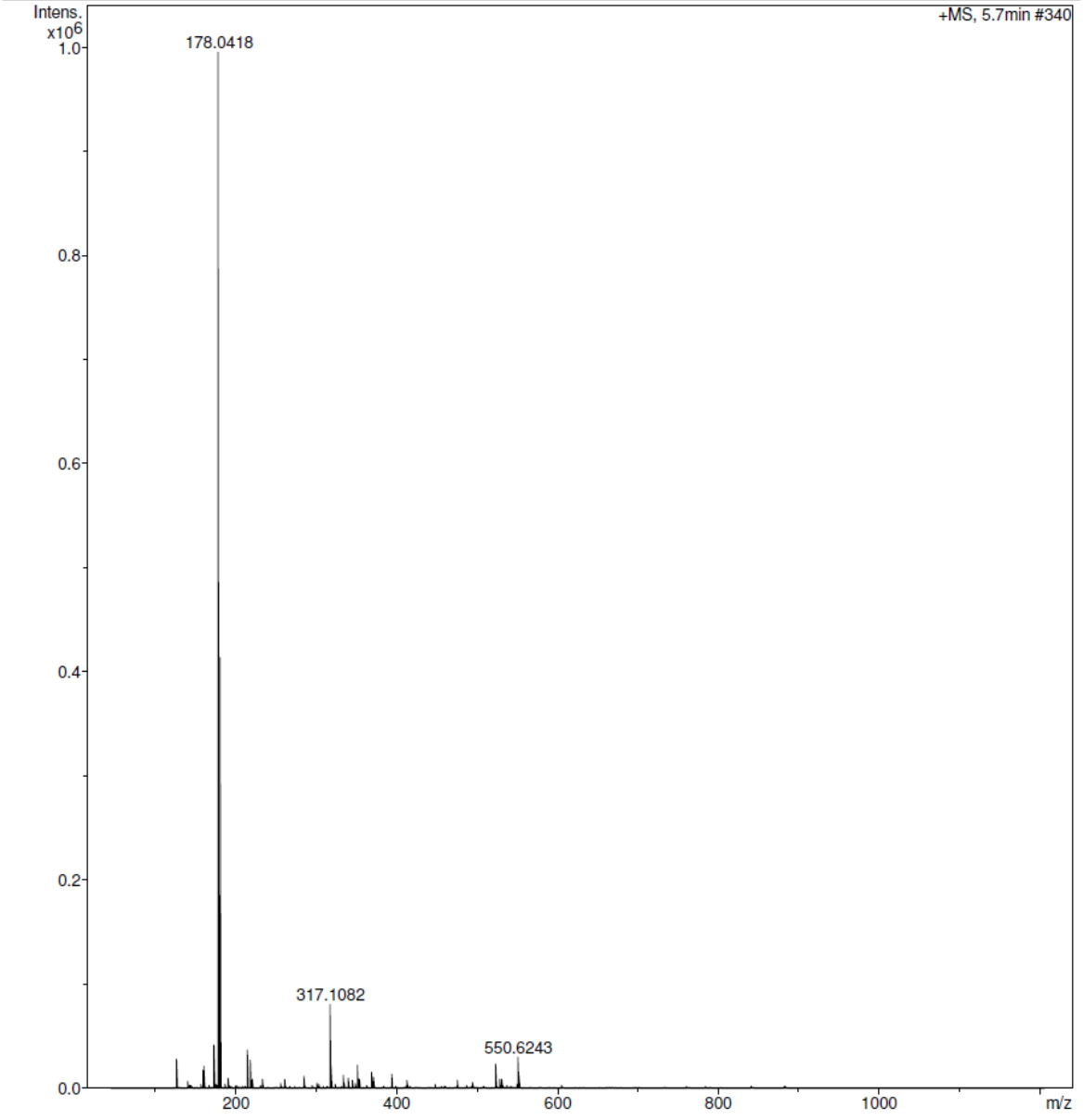


Generic Display Report

Faculdade de Ciencias Farmaceuticas de Ribeirao Preto-USP

Analysis Info

Analysis Name	D:\Data\Profa IVONE_QF\TALI_01.d	Acquisition Date	6/21/2012 1:52:12 PM
Method	tune_low_Tomaz1200_POS_HPLC.m	Operator	BDAL@DE
Sample Name	TALI_01	Instrument	micrOTOF-Q II
Comment			

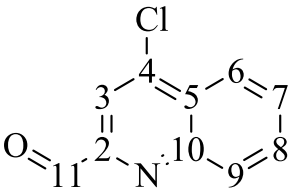


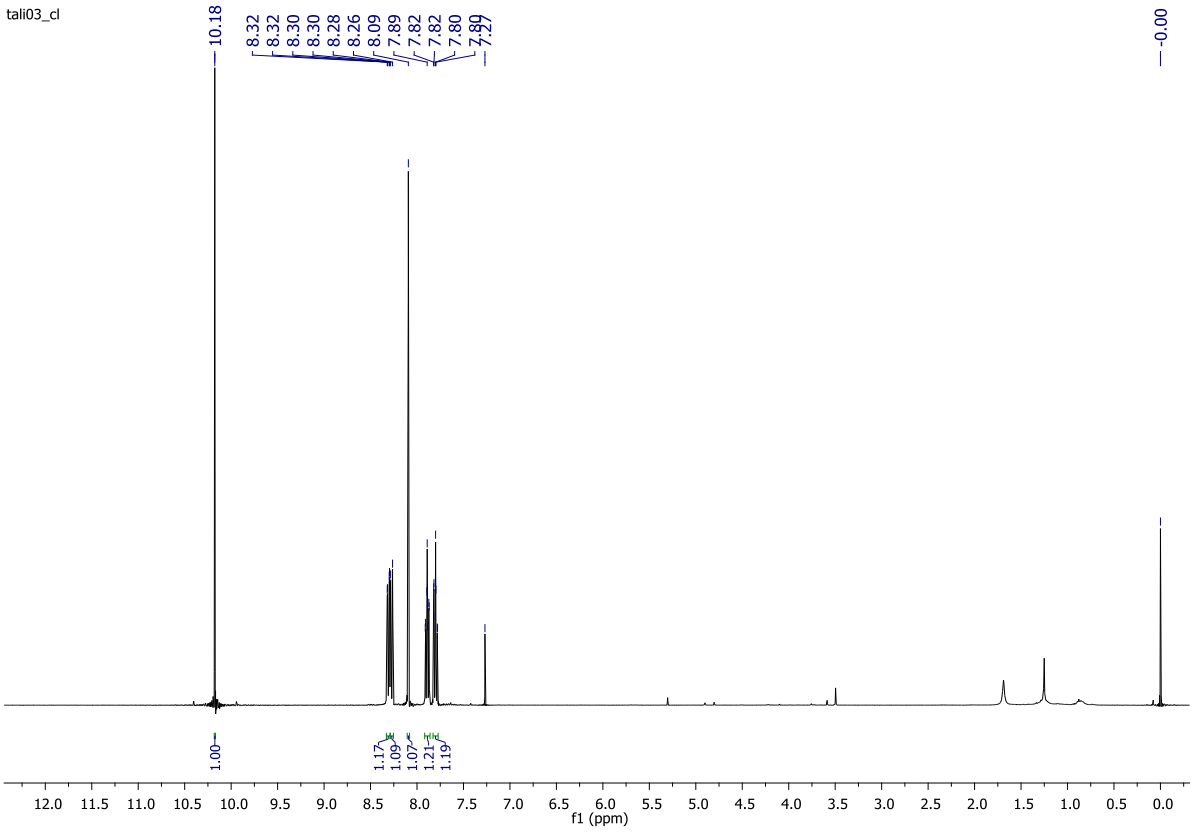
Bruker Compass DataAnalysis 4.0 printed: 6/21/2012 2:25:38 PM Page 1 of 1

HRMS (ESI): $C_{10}H_8ClN$ *m/z* $[M+H]^+$ calculado, 178,0418 encontrado *m/z* $[M+H]^+$ 178,0418.

APÊNDICE B

Espectro de RMN de H^1 (400MHz, $CDCl_3$) do composto **16**.





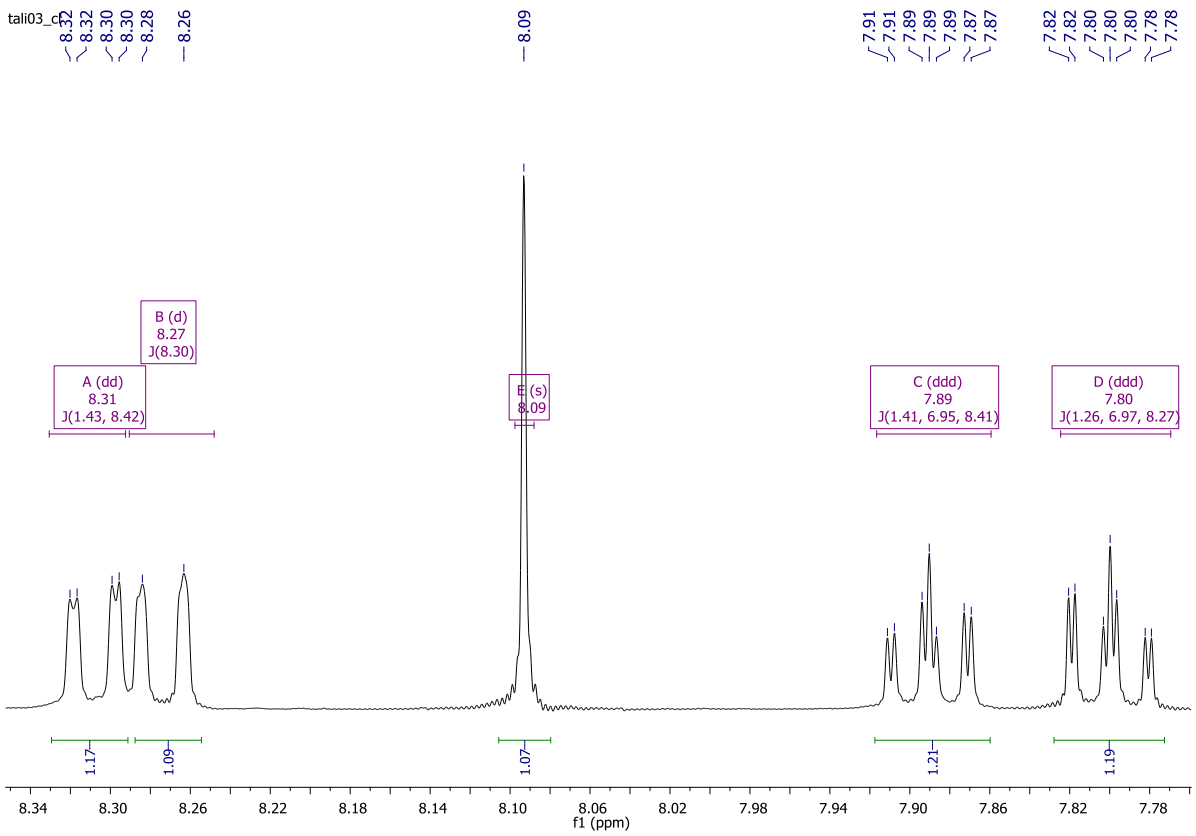


Tabela de RMN de ^{1}H (400MHz, $CDCl_3$) do 4-cloro-2-quinolinacarboxaldeído (**16**).

Posição	δ_H (ppm)	integral	multiplicidade	*J*(Hz)
3	8,09	1	s	--
6	8,27	1	dd	8,3; 0,82
7	7,80	1	ddd	8,3; 7,0; 1,3
8	7,89	1	ddd	8,4; 6,9; 1,4
9	8,31	1	dd	8,4; 1,4
11	10,18	1	s	--

Espectro de RMN de C^{13} ($CDCl_3$, 400 MHz) do composto **16**.

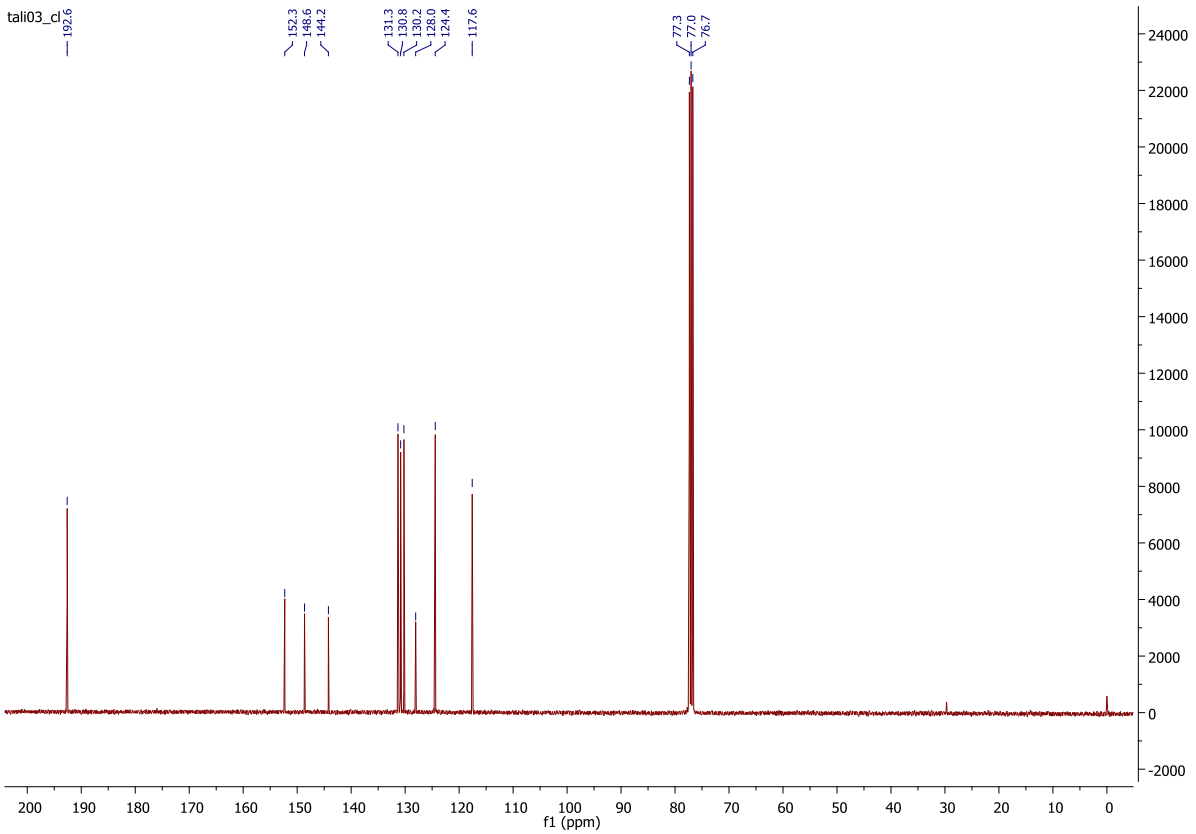


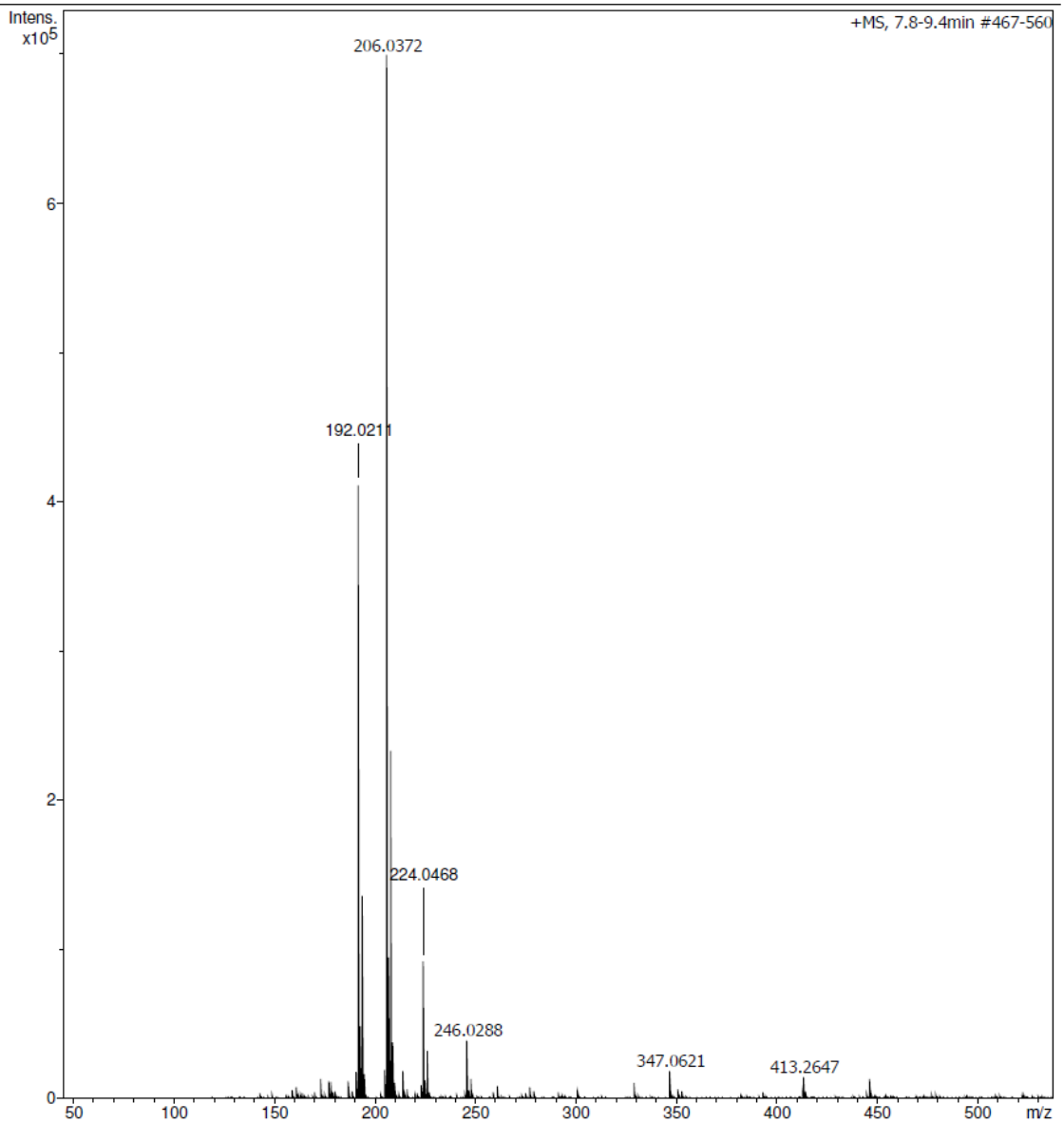
Tabela de RMN de C^{13} ($CDCl_3$, 400 MHz) do composto **16**.

Posição	δ_c (ppm)
2	152,3
3	117,6
4	128,0
5	144,2
6	131,3
7	130,2
8	130,8
9	124,4
10	148,6
11	192,6

Generic Display Report

Faculdade de Ciencias Farmaceuticas de Ribeirao Preto-USP

Analysis Info			
Analysis Name	D:\Data\Profa IVONE_QF\TALI 03 - CL_POS.d	Acquisition Date	5/29/2013 9:49:29 AM
Method	Tune_Low_Tomaz_Pos_1300u_NOVO.m	Operator	BDAL@DE
Sample Name	TALI 03 - CL_POS	Instrument	micrOTOF-Q II
Comment			

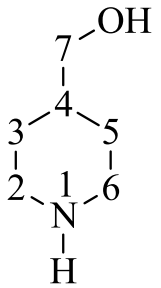


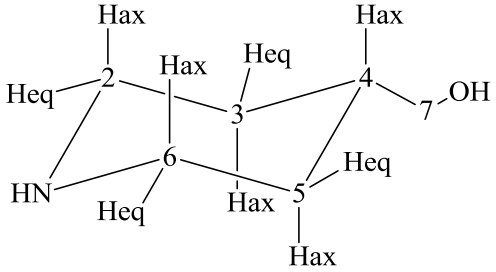
Bruker Compass DataAnalysis 4.1 printed: 5/29/2013 10:07:54 AM Page 1 of 1

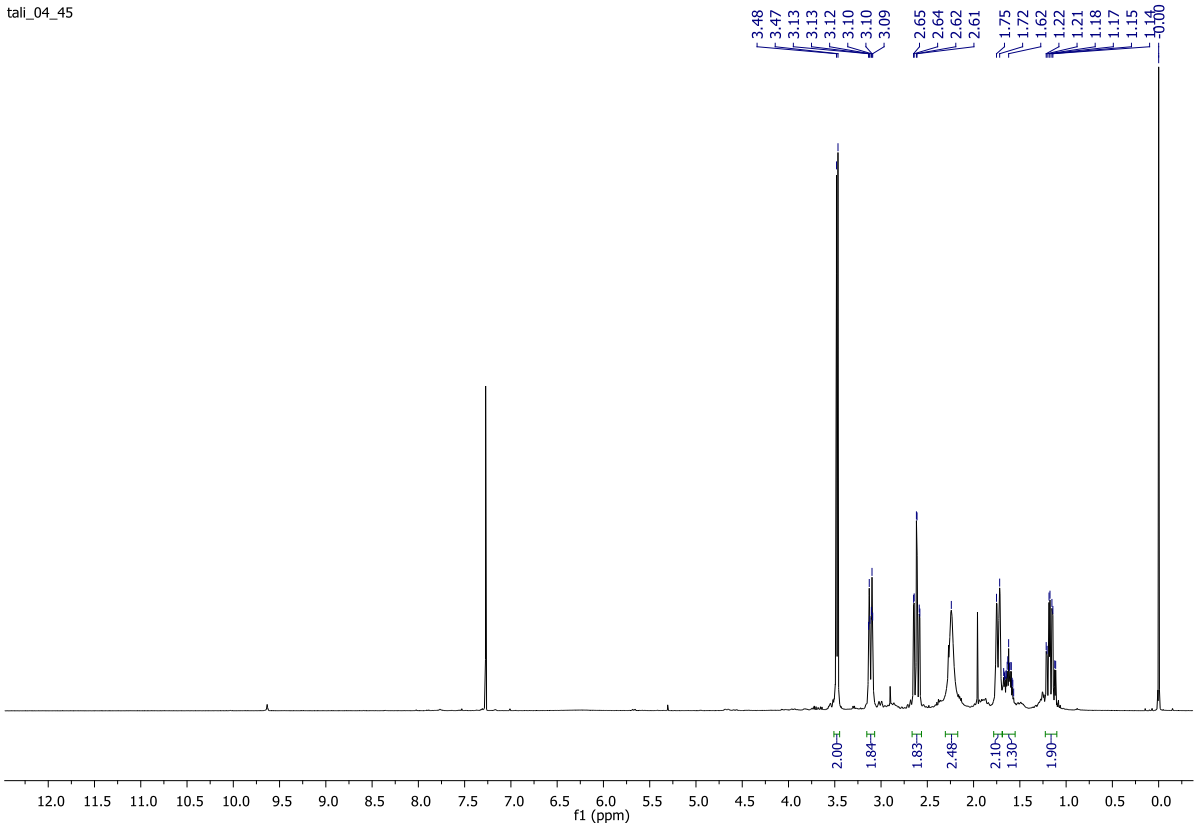
HRMS (ESI): $C_{10}H_6ClNO$ *m/z* $[M+H]^+$ calculado 192,0211, encontrado *m/z* $[M+H^+]$ 192,0211.

APÊNDICE C

Espectro de RMN de H^1 (400MHz, $CDCl_3$) do composto **10.**







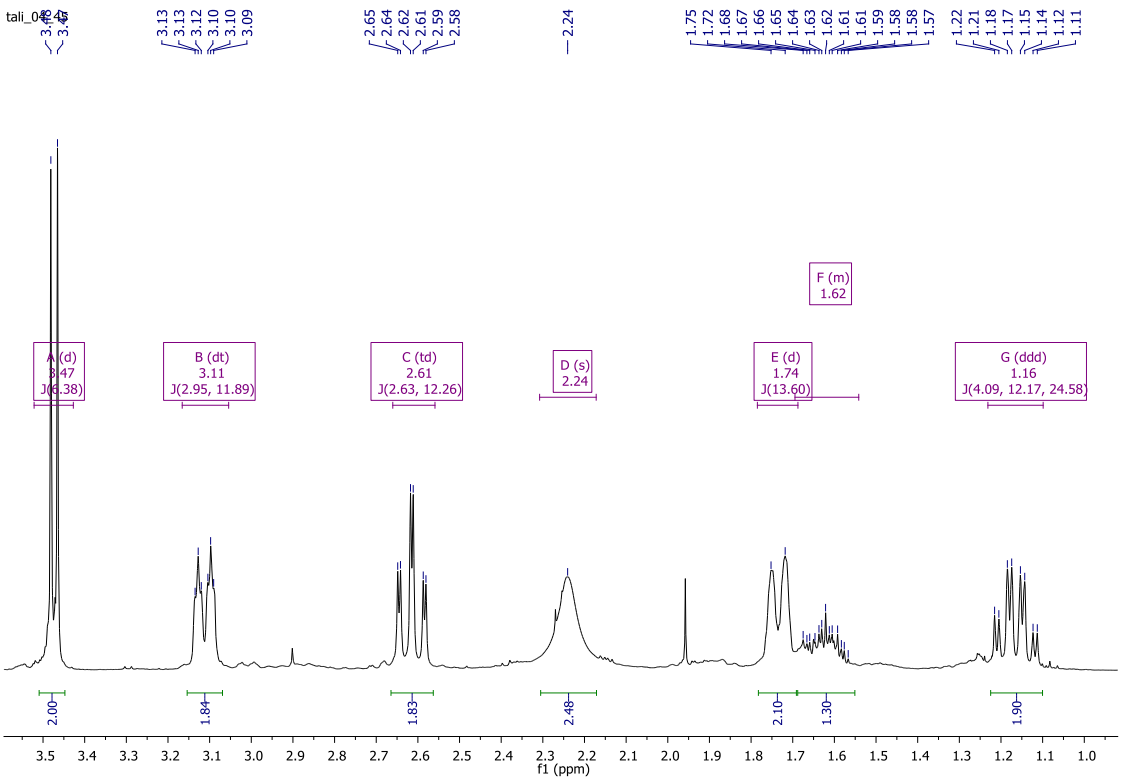
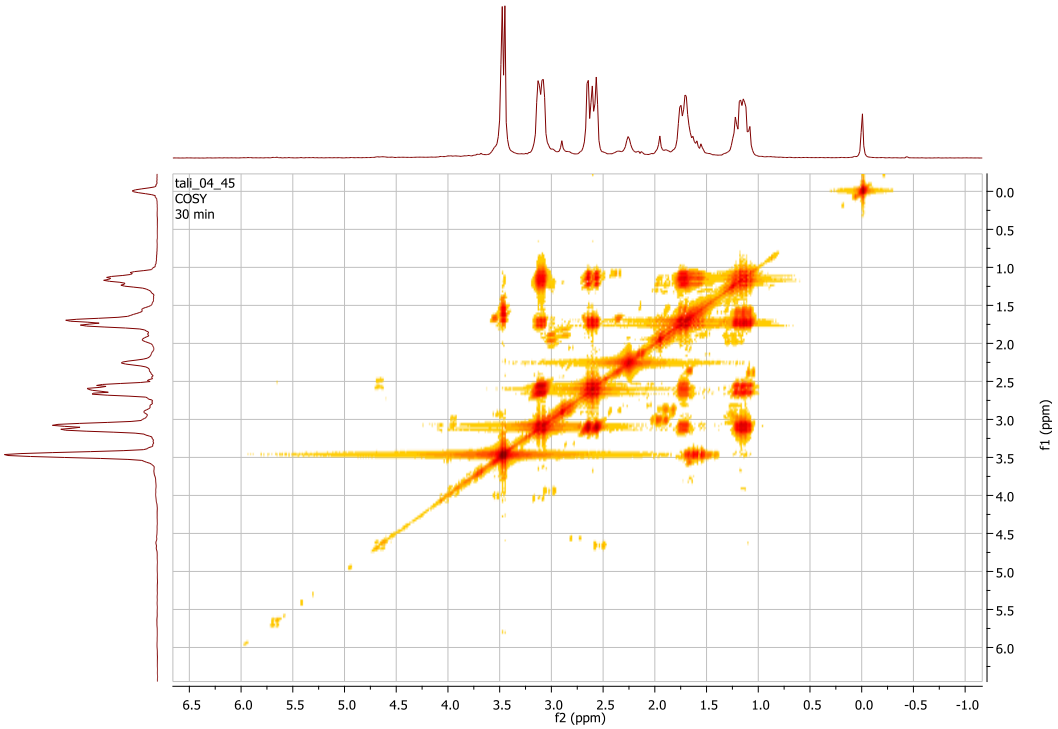


Tabela de RMN de ^{1}H (400MHz, $CDCl_3$) do 4-piperidinil metanol (**10**).

Posição	δ_H (ppm)	integral	multiplicidade	*J*(Hz)
NH/OH	2,24	2	br s	--
2ax	2,61	1	dt	12,3; 2,6
2eq	3,11	1	dt	11,9; 3,0
3ax	1,16	1	dq	12,1; 4,1
3eq	1,74	1	d	13,6
4	1,62	1	m	--
5ax	1,16	1	dq	12,1; 4,1
5eq	1,74	1	d	13,6
6ax	2,61	1	dt	12,3; 2,6
6eq	3,11	1	dt	11,9; 3,0
7	3,47	2	d	6,4

Espectro bidimensional de correlação H-H (COSY) (300MHz, $CDCl_3$) do composto **10.**



Espectro de RMN de ^{13}C (400MHz, $CDCl_3$) do composto **10.**

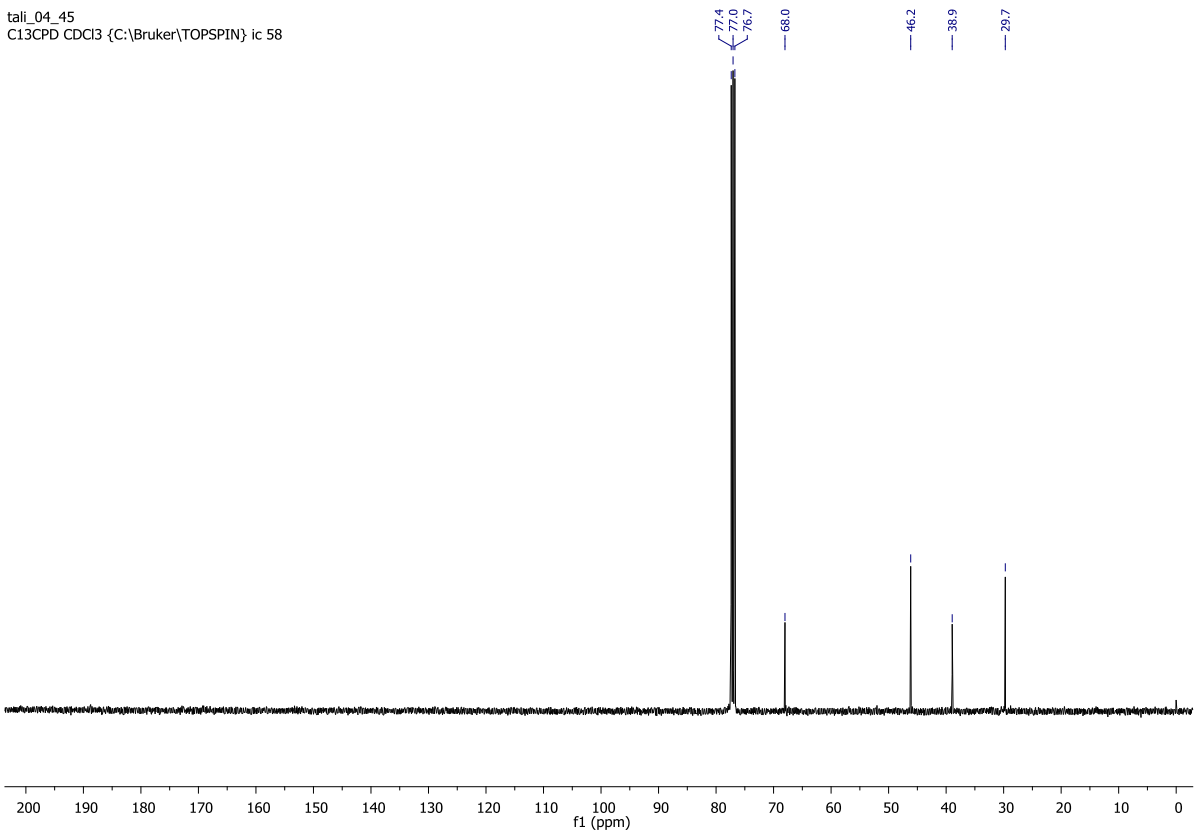
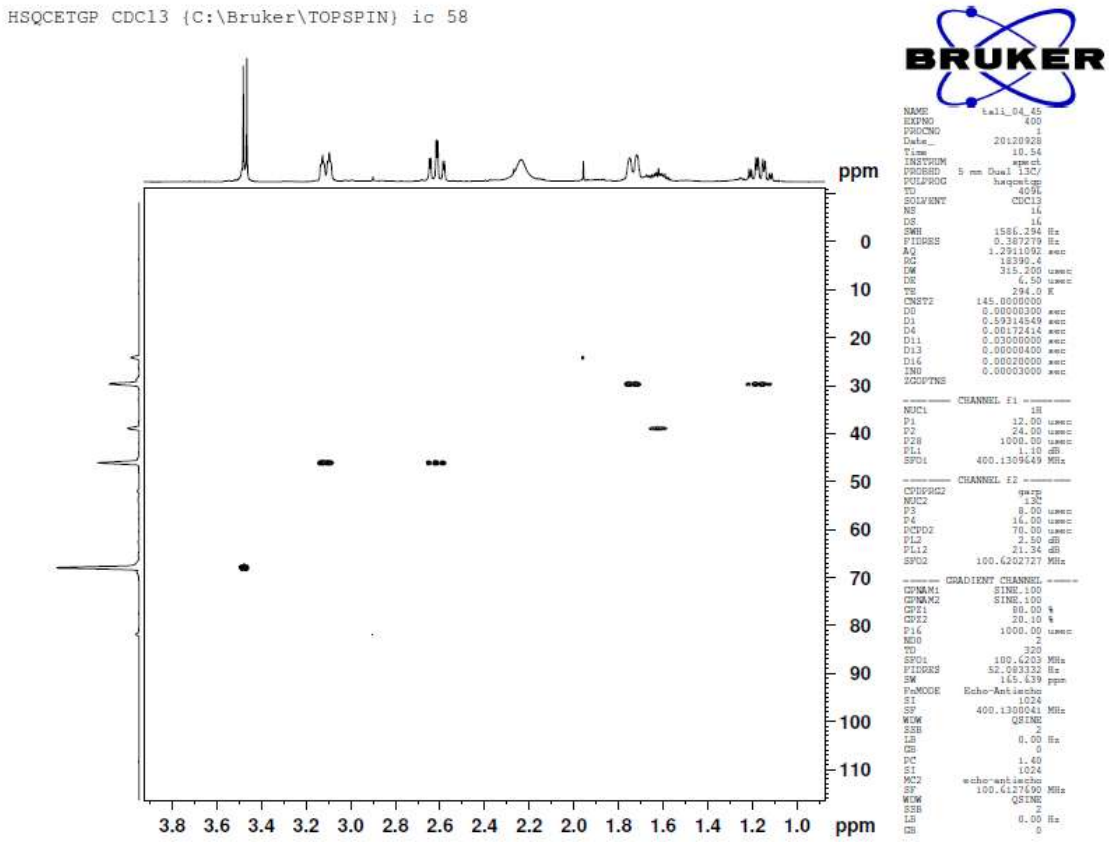


Tabela de RMN de C^{13} ($CDCl_3$, 400 MHz) do composto **10**.

Posição	δ_c (ppm)
2	46,2
3	29,7
4	38,9
5	29,7
6	46,2
7	68,0

Espectro bidimensional de correlação C-H (HSQC) do composto **10.**

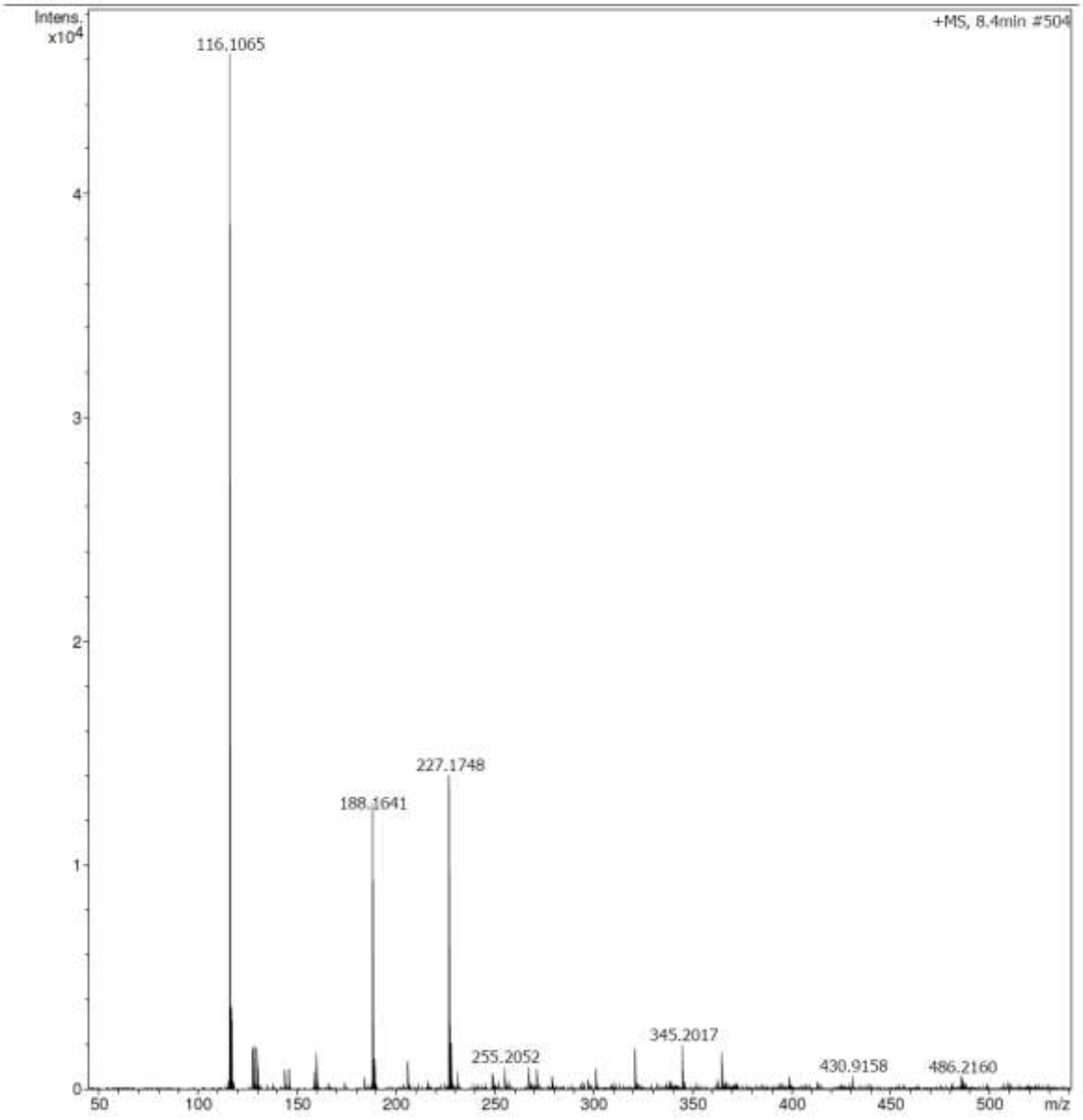


Generic Display Report

Faculdade de Ciencias Farmaceuticas de Ribeirao Preto-USP

Analysis Info

Analysis Name	D:\Data\Profa IVONE_QF\TALI 04-45 PADRÃO_POS.d	Acquisition Date	5/3/2013 11:10:51 AM
Method	Tune_Low_Tomaz_Pos_1300u_NOVO.m	Operator	BDAL@DE
Sample Name	TALI 04-45 PADRÃO_POS	Instrument	micrOTOF-Q II
Comment			

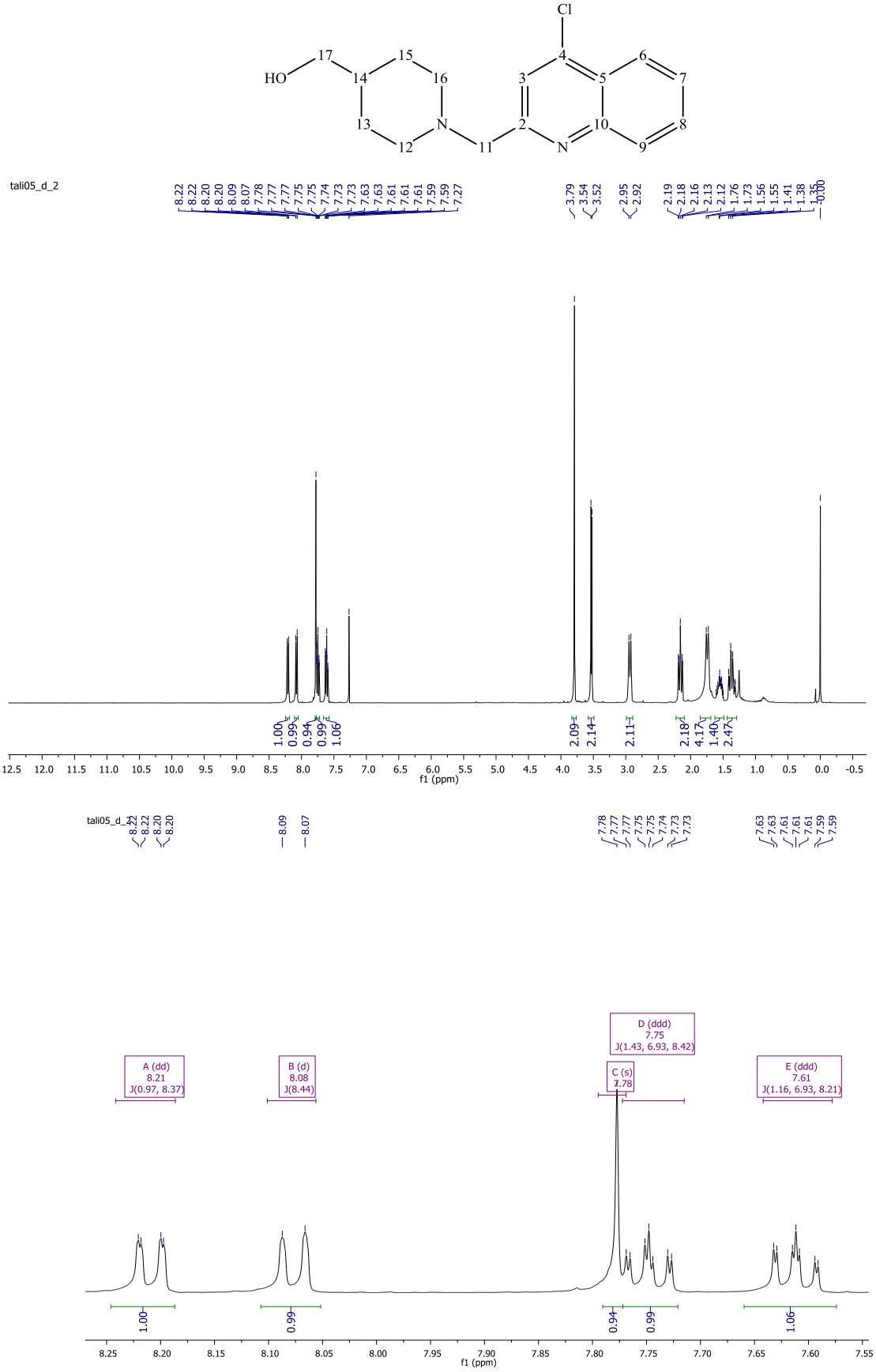


Bruker Compass DataAnalysis 4.1 printed: 5/3/2013 11:48:03 AM Page 1 of 1

HRMS (ESI): $C_6H_{13}NO$ *m/z* $[M+H]^+$ calculado 116,1070, encontrado *m/z* $[M+H]^+$ 116,1065.

APÊNDICE D

Espectro de RMN de H^1 (400MHz, $CDCl_3$) do composto **17.**



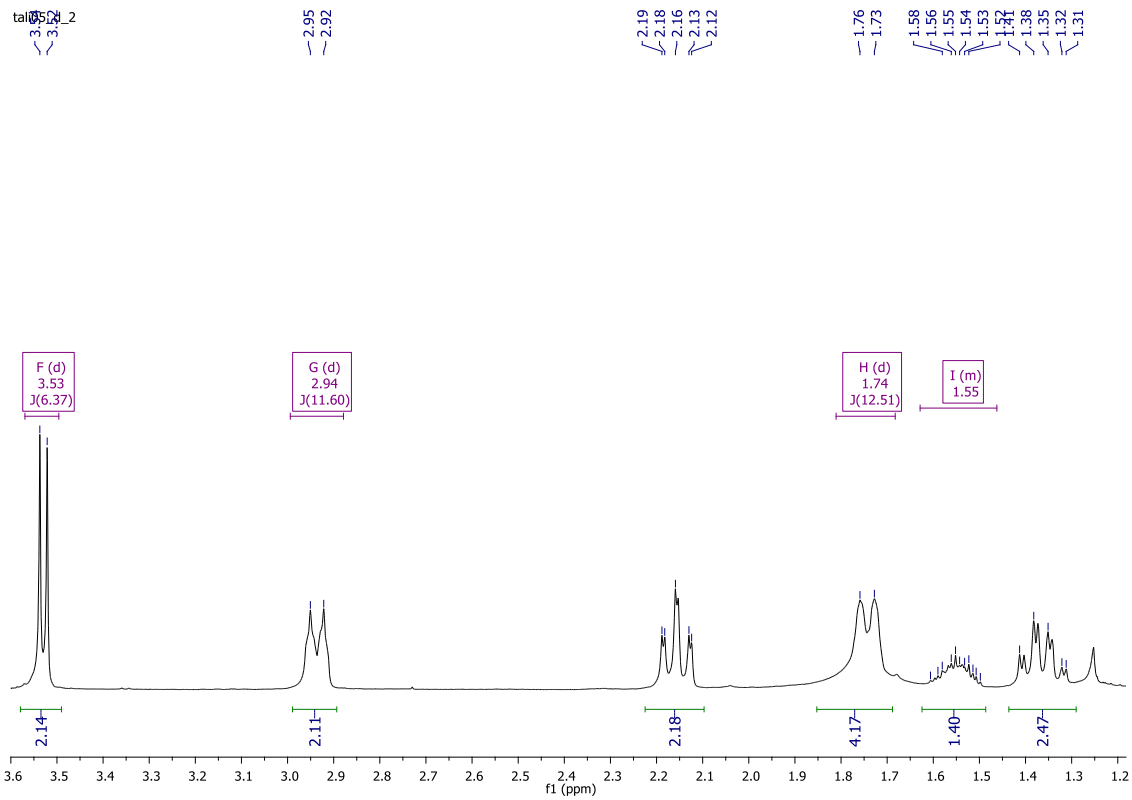

F (d)
3.53
J(6.37)
G (d)
2.94
J(11.60)
H (d)
1.74
J(12.51)
I (m)
1.55
2.14
2.11
2.18
4.17
1.40
2.47
f1 (ppm)

Tabela de RMN de H^1 (400MHz, $CDCl_3$) do composto **17.**

Posição	δ_H (ppm)	integral	multiplicidade	*J*(Hz)
3	7,78	1	s	--
6	8,08	1	d	8,4
7	7,61	1	ddd	8,2; 6,9; 1,2
8	7,75	1	ddd	8,4; 6,9; 1,4
9	8,21	1	dd	8,4; 1,0
OH	1,74		br d	--
11	3,79	2	s	--
12ax	2,16	1	dt	11,7; 2,4;
12eq	2,94	1	d	11,6
13ax	1,36	1	dq	12,1; 4,0
13eq	1,74	1	d	12,5
14	1,61-1,49	1	m	--
15ax	1,36	1	dq	12,1; 4,0
15eq	1,74	1	d	12,5
16ax	2,16	1	dt	11,7; 2,4
16eq	2,94	1	d	11,6
17	3,53	2	d	6,4

Espectro de RMN de ^{13}C (400MHz, $CDCl_3$) do composto **17.**

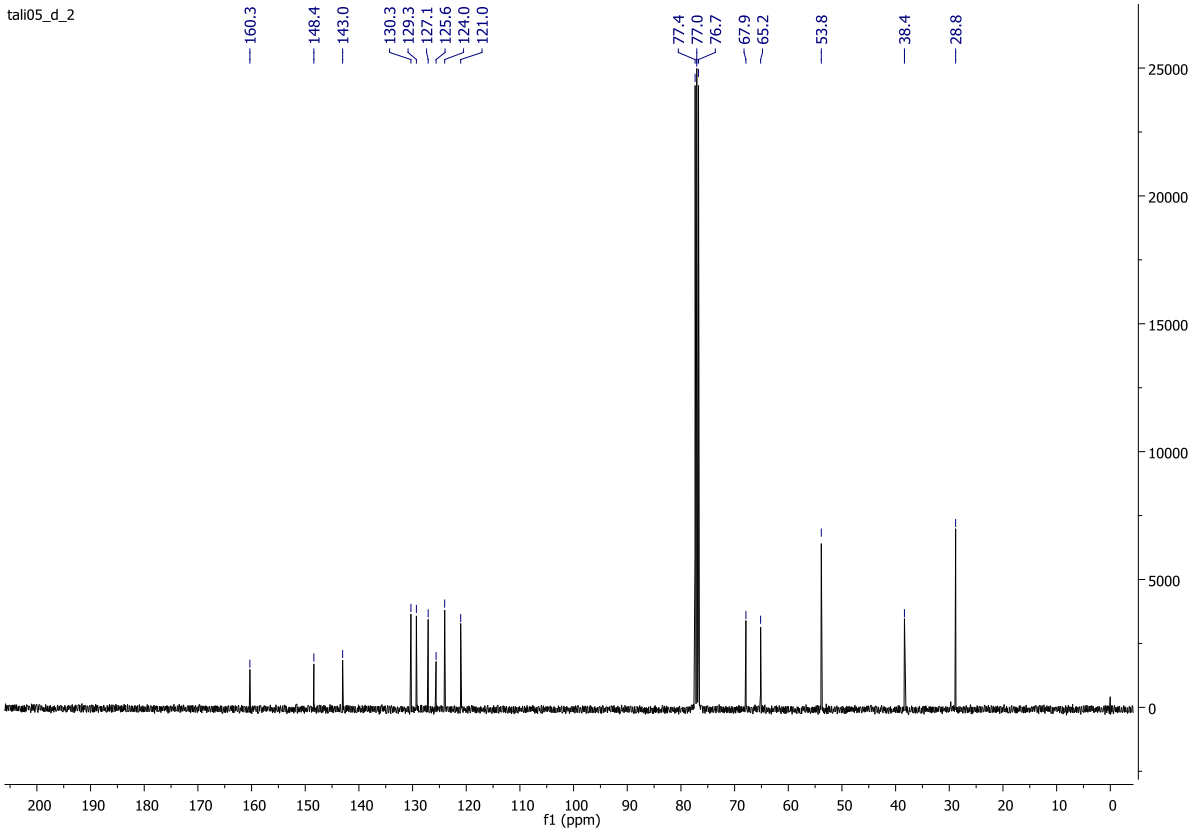
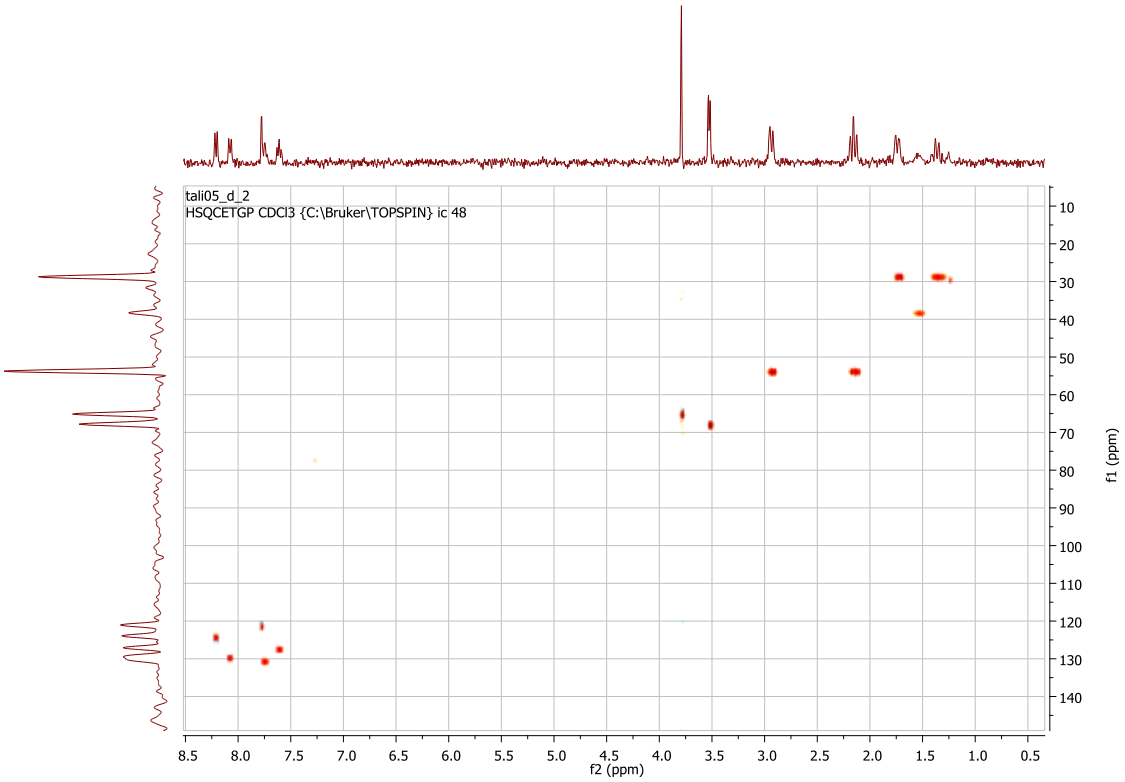


Tabela de RMN de C^{13} ($CDCl_3$, 400 MHz) do composto **17**.

Posição	δ_c (ppm)
2	160,3
3	121,0
4	125,6
5	143,0
6	130,3
7	127,1
8	129,3
9	124,0
10	148,4
11	65,2
12	53,8
13	28,8
14	38,4
15	28,8
16	53,8
17	67,9

Espectro bidimensional de correlação C-H (HSQC) (400MHz, $CDCl_3$) do composto **17.**

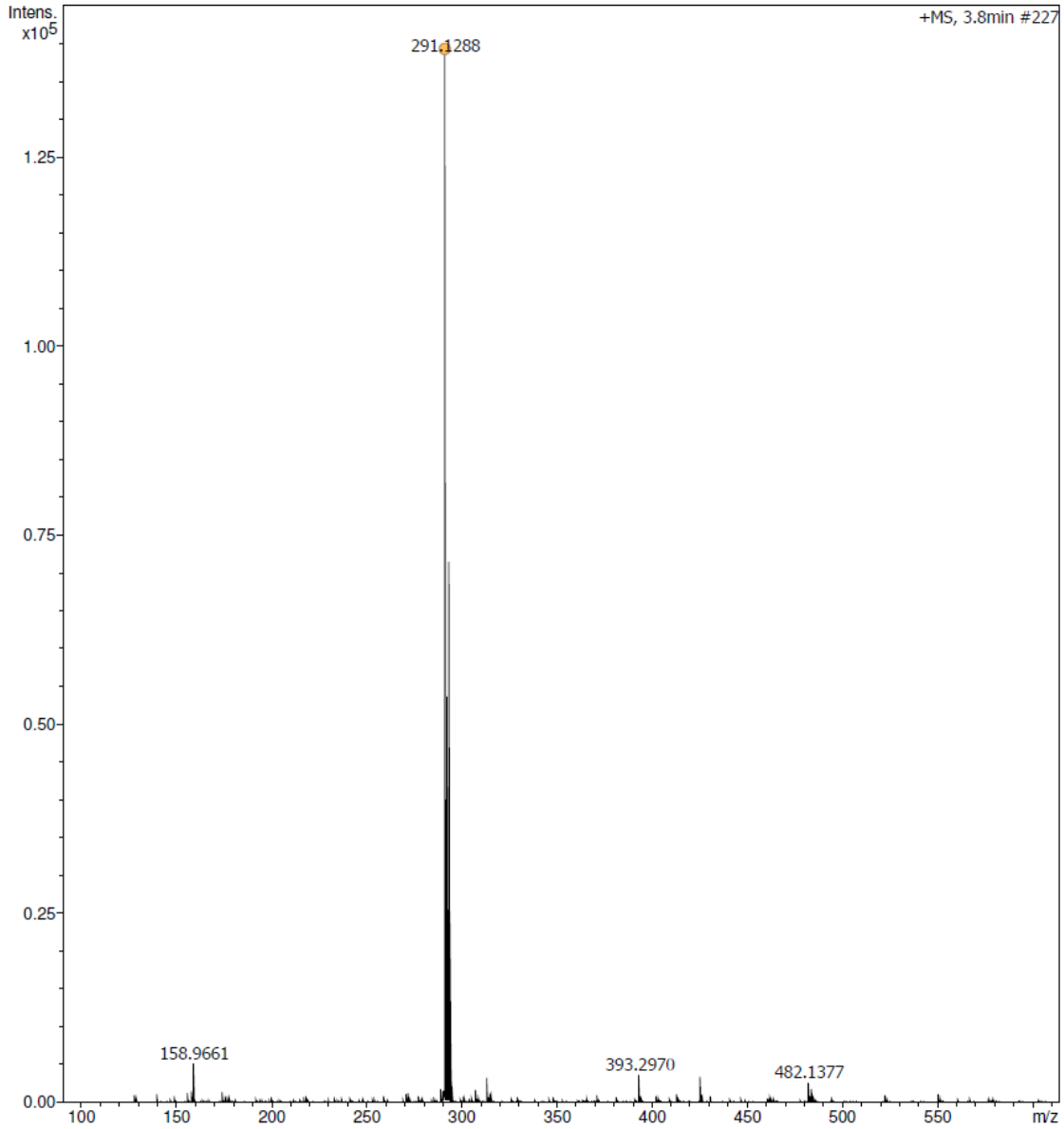


Generic Display Report

Faculdade de Ciencias Farmaceuticas de Ribeirao Preto-USP

Analysis Info

Analysis Name	D:\Data\Profa IVONE_QF\TALI05_CI_2.d	Acquisition Date	2/20/2013 2:37:21 PM
Method	Tune_Low_Tomaz_Pos_1300u_NOVO.m	Operator	BDAL@DE
Sample Name	TALI05_CI_2	Instrument	micrOTOF-Q II
Comment			

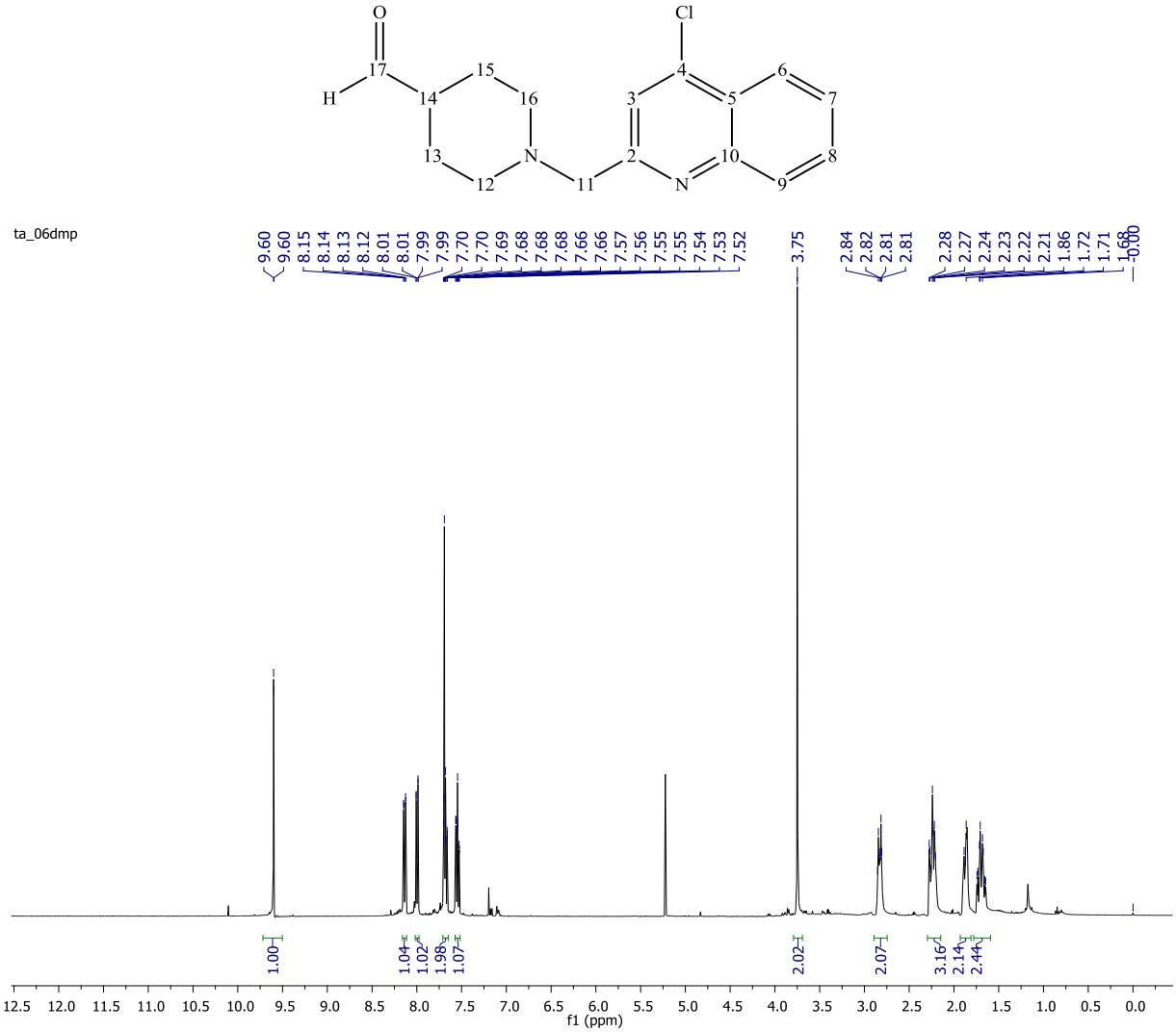


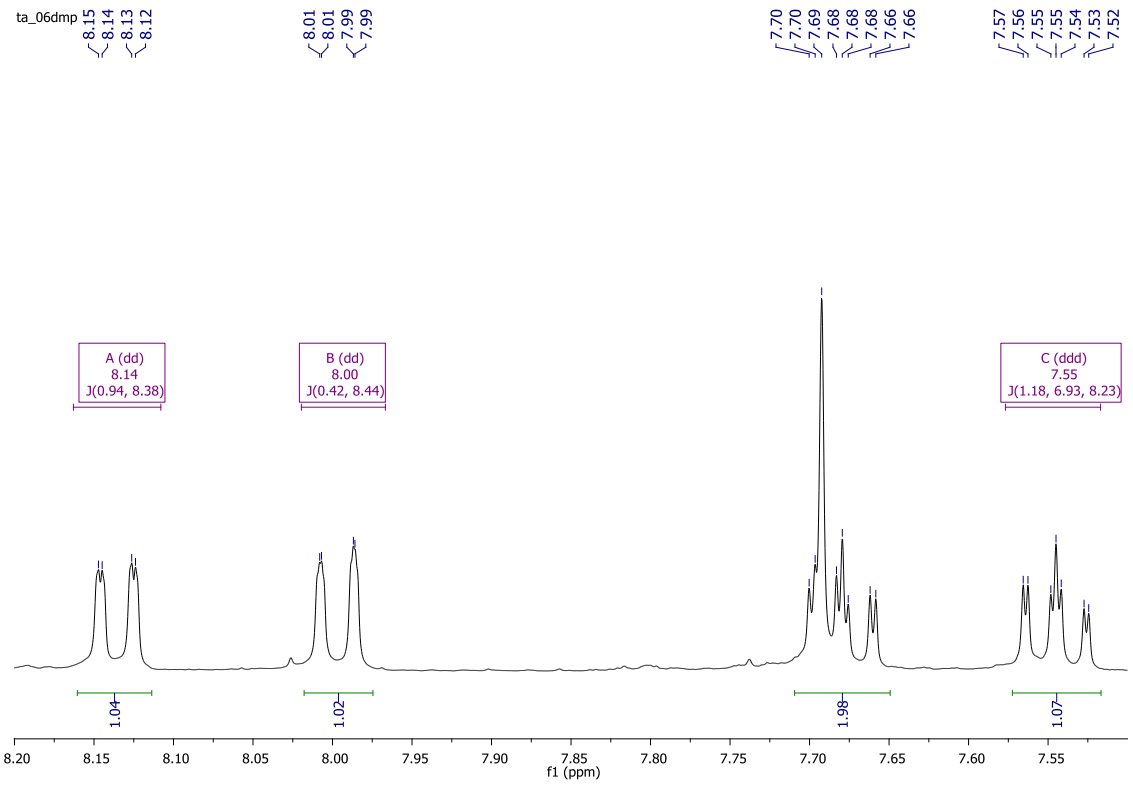
Bruker Compass DataAnalysis 4.1 printed: 2/20/2013 3:07:45 PM Page 1 of 1

HRMS (ESI): $C_{16}H_{19}ClN_2O$ *m/z* $[M+H]^+$ calculado 291,1259, encontrado *m/z* $[M+H]^+$ 291,1288.

APÊNDICE E

Espectro de RMN de H^1 (400MHz, $CDCl_3$) do composto **18.**




ta_06dmp
8.15
8.14
8.13
8.12
8.01
8.01
7.99
7.99
7.70
7.70
7.69
7.68
7.68
7.68
7.66
7.66
7.57
7.56
7.55
7.55
7.54
7.53
7.52
A (dd)
8.14
J(0.94, 8.38)
B (dd)
8.00
J(0.42, 8.44)
C (ddd)
7.55
J(1.18, 6.93, 8.23)
1.04
1.02
1.98
1.07
8.20
8.15
8.10
8.05
8.00
7.95
7.90
7.85
7.80
7.75
7.70
7.65
7.60
7.55
f1 (ppm)

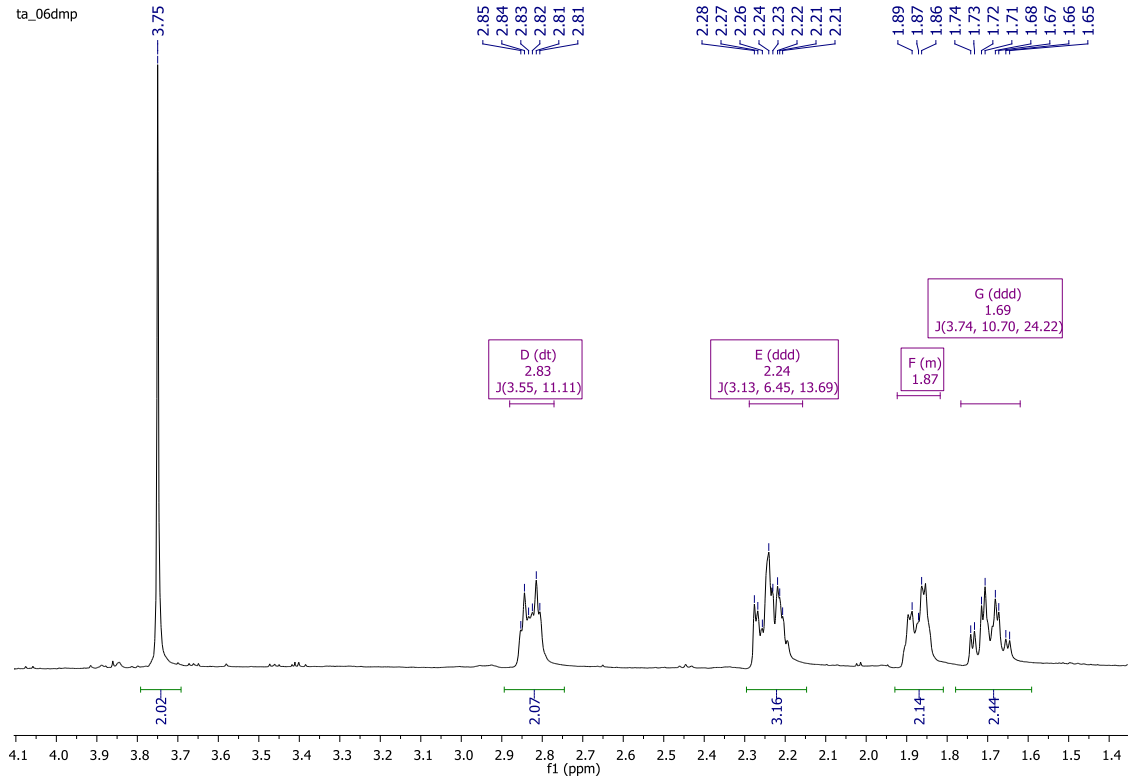

ta_06dmp
3.75
2.85
2.84
2.83
2.82
2.81
2.81
2.28
2.27
2.26
2.24
2.23
2.22
2.21
2.21
1.89
1.87
1.86
1.74
1.73
1.72
1.71
1.68
1.67
1.66
1.65
G (ddd)
1.69
J(3.74, 10.70, 24.22)
D (dt)
2.83
J(3.55, 11.11)
E (ddd)
2.24
J(3.13, 6.45, 13.69)
F (m)
1.87
2.02
2.07
3.16
2.14
2.44
4.1
4.0
3.9
3.8
3.7
3.6
3.5
3.4
3.3
3.2
3.1
3.0
2.9
2.8
2.7
2.6
2.5
2.4
2.3
2.2
2.1
2.0
1.9
1.8
1.7
1.6
1.5
1.4
f1 (ppm)

Tabela de RMN de H^1 (400MHz, $CDCl_3$) do composto **18.**

Posição	δ_H (ppm)	integral	multiplicidade	*J*(Hz)
3	7,69	1	s	--
6	8,00	1	dd	8,4; 0,4
7	7,55	1	ddd	8,2; 7,0; 1,2
8	7,68	1	ddd	8,4; 7,0; 1,4
9	8,14	1	dd	8,4; 0.9
11	3,75	2	s	--
12ax	2,30-2,17	1	m	--
12eq	2,83	1	dt	11,1; 3,6
13ax	1,69	1	dq	12,0; 10,7; 3,7
13eq	1,84-1,91	1	m	13,3; 3,9
14	2,30-2,17	1	m	--
15ax	1,69	1	dq	12,0; 10,7; 3,7
15eq	1,84-1,91	1	m	--
16ax	2,30-2,17	1	m	--
16eq	2,83	1	dt	11,1; 3,6
17	9,60	1	d	1,0

Espectro de RMN de C^{13} ($CDCl_3$, 400 MHz) do composto **18**.

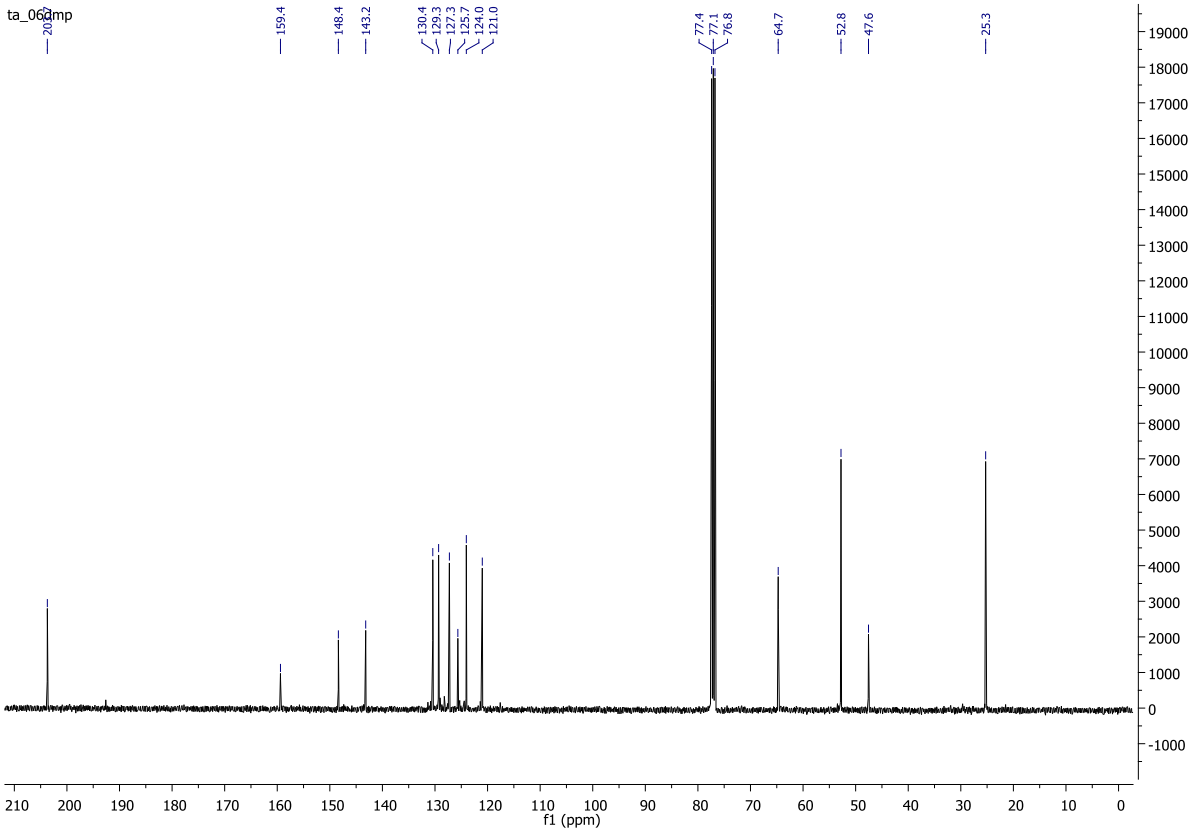
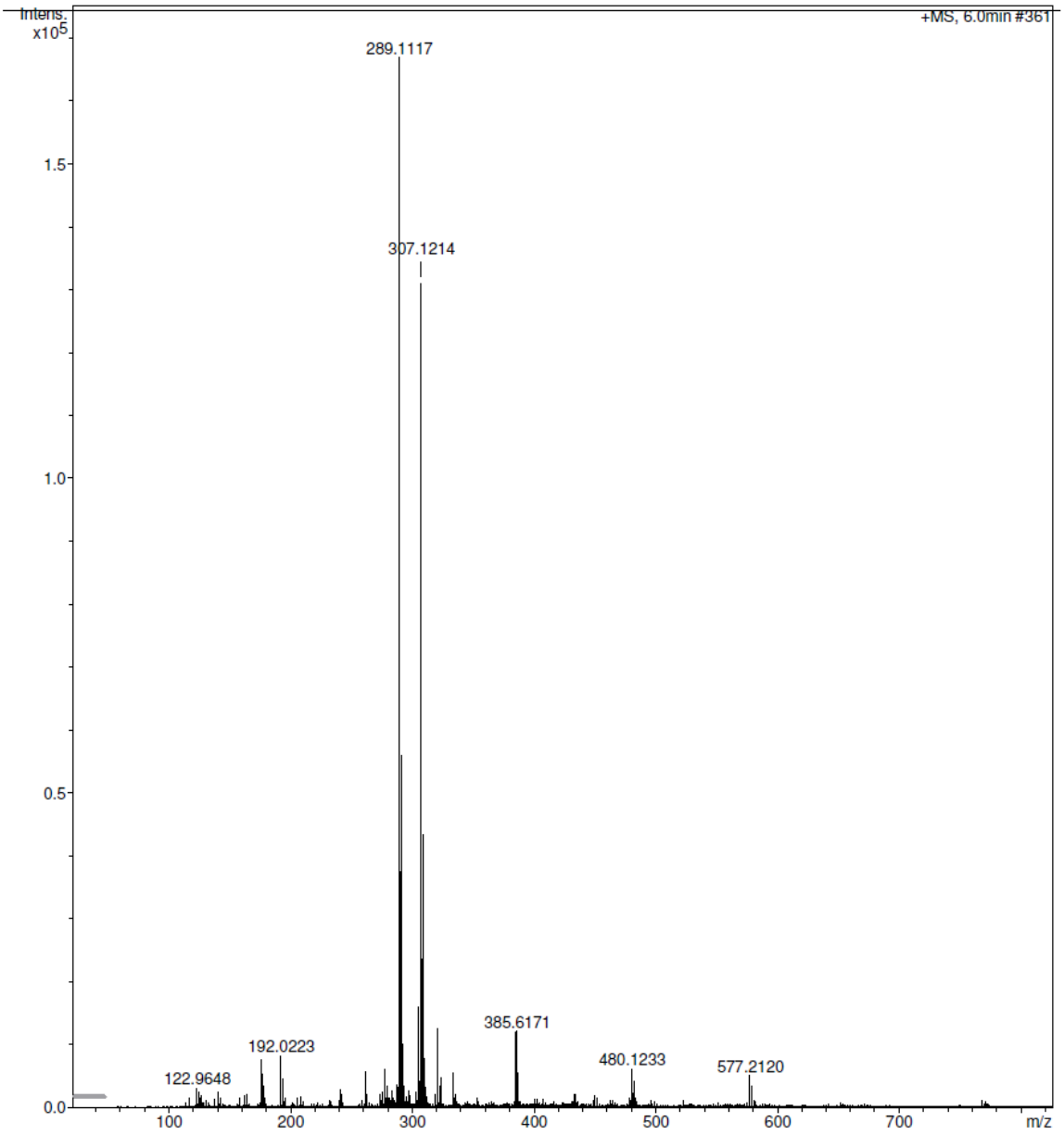


Tabela de RMN de C^{13} ($CDCl_3$, 400 MHz) do composto **18**.

Posição	δ_c (ppm)
2	159,4
3	121,0
4	125,7
5	143,2
6	129,3
7	127,3
8	130,4
9	124,0
10	148,4
11	64,7
12	52,8
13	25,3
14	47,6
15	25,3
16	52,8
17	203,7

Analysis Info

Analysis Name	D:\Data\IVONE_QF\TA 06-DMP - ACN_POS.d	Acquisition Date	7/3/2013 5:04:41 PM
Method	tune_low_tomaz1000_pos.m	Operador	Jose Carlos Tomaz
Sample Name	TA 06-DMP - ACN_POS	Instrument	micrOTOF
Comment			

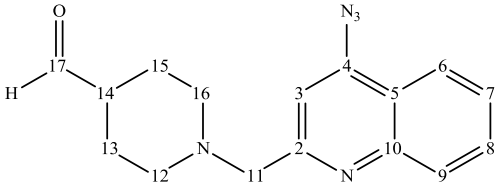


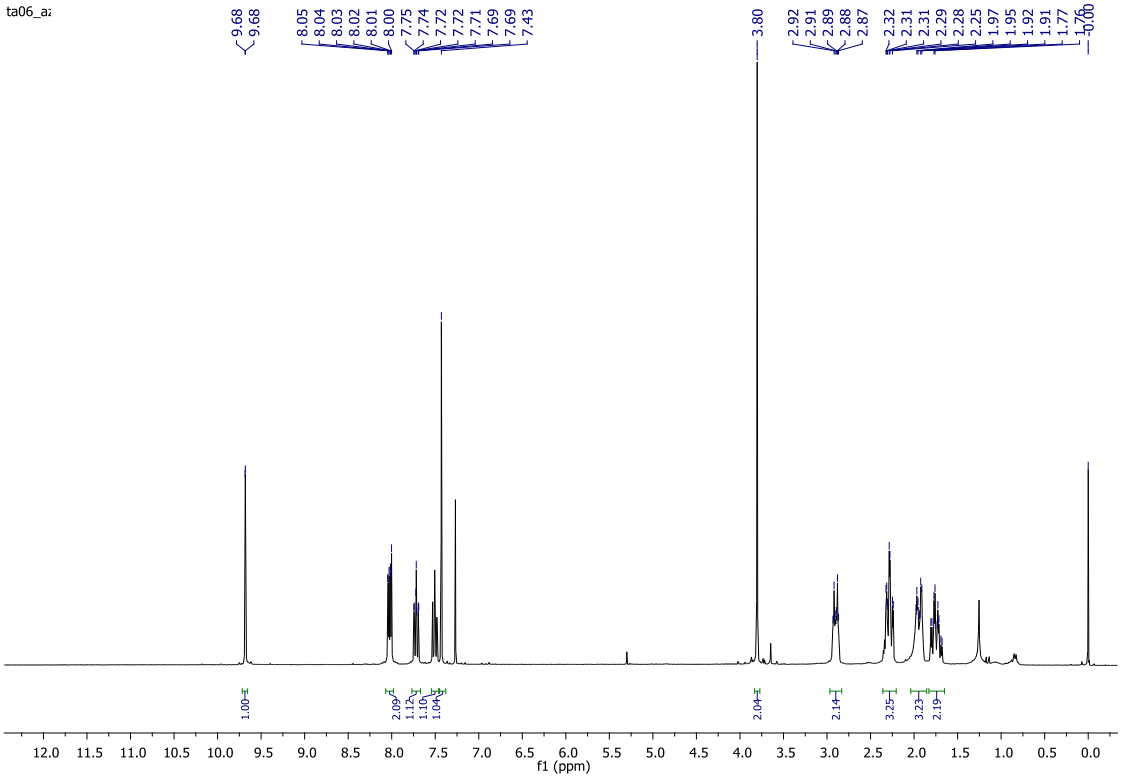
Bruker Compass DataAnalysis 4.0 printed: 7/4/2013 2:23:53 PM Page 1 of 1

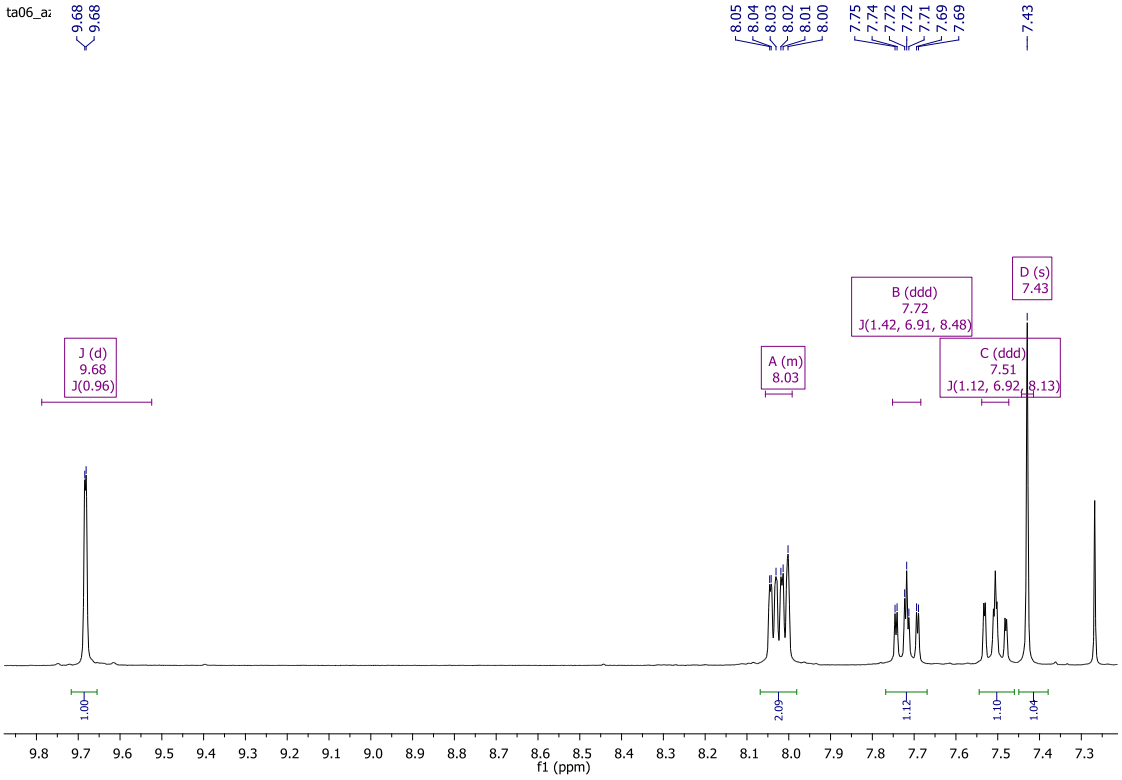
HRMS (ESI): $C_{16}H_{17}ClN_2O$ *m/z* $[M+H]^+$ calculado 289,1102, encontrados *m/z* $[M+H]^+$ 289,1117; $[M+H + H_2O]^+$ 307,1214.

APÊNDICE F

Espectro de RMN de ^{1}H (400MHz, $CDCl_3$) do composto **4**






ta06_a
9.68
9.68
8.05
8.04
8.03
8.02
8.01
8.00
7.75
7.74
7.72
7.72
7.71
7.69
7.69
7.43
J (d)
9.68
J(0.96)
A (m)
8.03
B (ddd)
7.72
J(1.42, 6.91, 8.48)
C (ddd)
7.51
J(1.12, 6.92, 8.13)
D (s)
7.43
1.00
2.09
1.12
1.10
1.04
f1 (ppm)

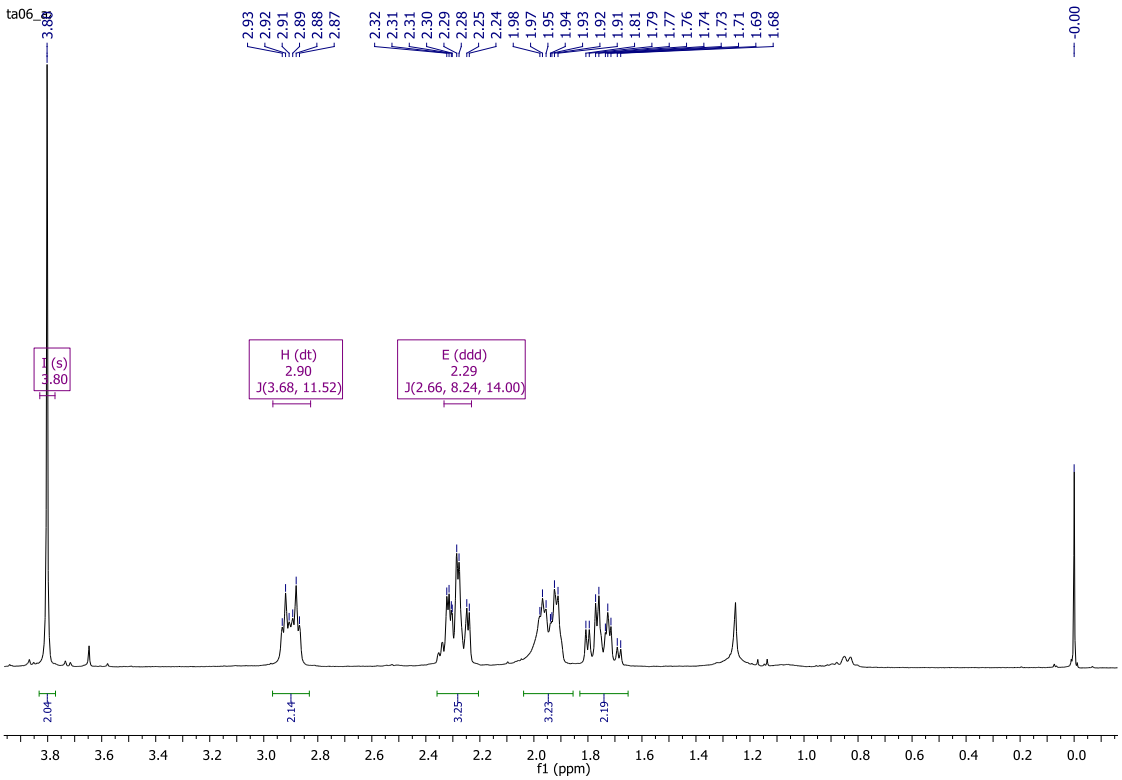

ta06_
3.80
2.93
2.92
2.91
2.89
2.88
2.87
2.32
2.31
2.31
2.30
2.29
2.28
2.25
2.24
1.98
1.97
1.95
1.94
1.93
1.92
1.91
1.81
1.79
1.77
1.76
1.74
1.73
1.71
1.69
1.68
0.00
I (s)
3.80
H (dt)
2.90
J(3.68, 11.52)
E (ddd)
2.29
J(2.66, 8.24, 14.00)
2.04
2.14
3.25
3.23
2.19
f1 (ppm)

Tabela de RMN de ^{1}H (300MHz, $CDCl_3$) do composto **4.**

Posição	**δ_H (ppm)**	**integral**	**multiplicidade**	***J*(Hz)**
3	7,43	1	s	--
6	8,06-8,00	1	m	--
7	7,51	1	ddd	8,1; 6,9; 1,1
8	7,72	1	ddd	8,4; 6,9; 1,4
9	8,06-8,00	1	m	--
11	3,8	2	s	--
12ax	2,29	1	ddd	14,0; 8,2; 2,7
12eq	2,90	1	dt	11,5; 3,7
13ax	1,83-1,65	1	m	--
13eq	1,96	1	m	--
14	2,29	1	ddd	14,0; 8,2; 2,7
15ax	1,83-1,65	1	m	--
15eq	1,96	1	m	--
16ax	2,29	1	ddd	14,0; 8,2; 2,7
16eq	2,90	1	dt	11,5; 3,7
17	9,68	1	d	0,9

Espectro de RMN de ^{13}C ($CDCl_3$, 300 MHz) do composto **4**.

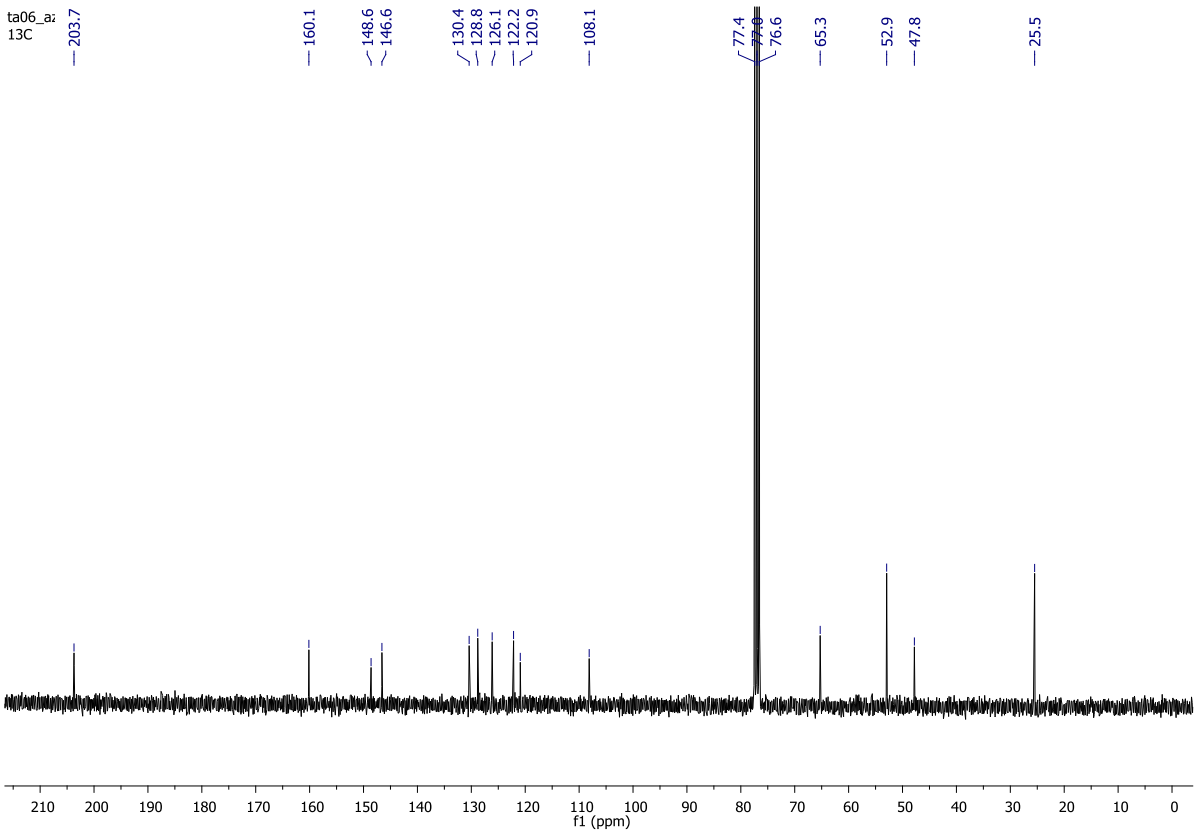


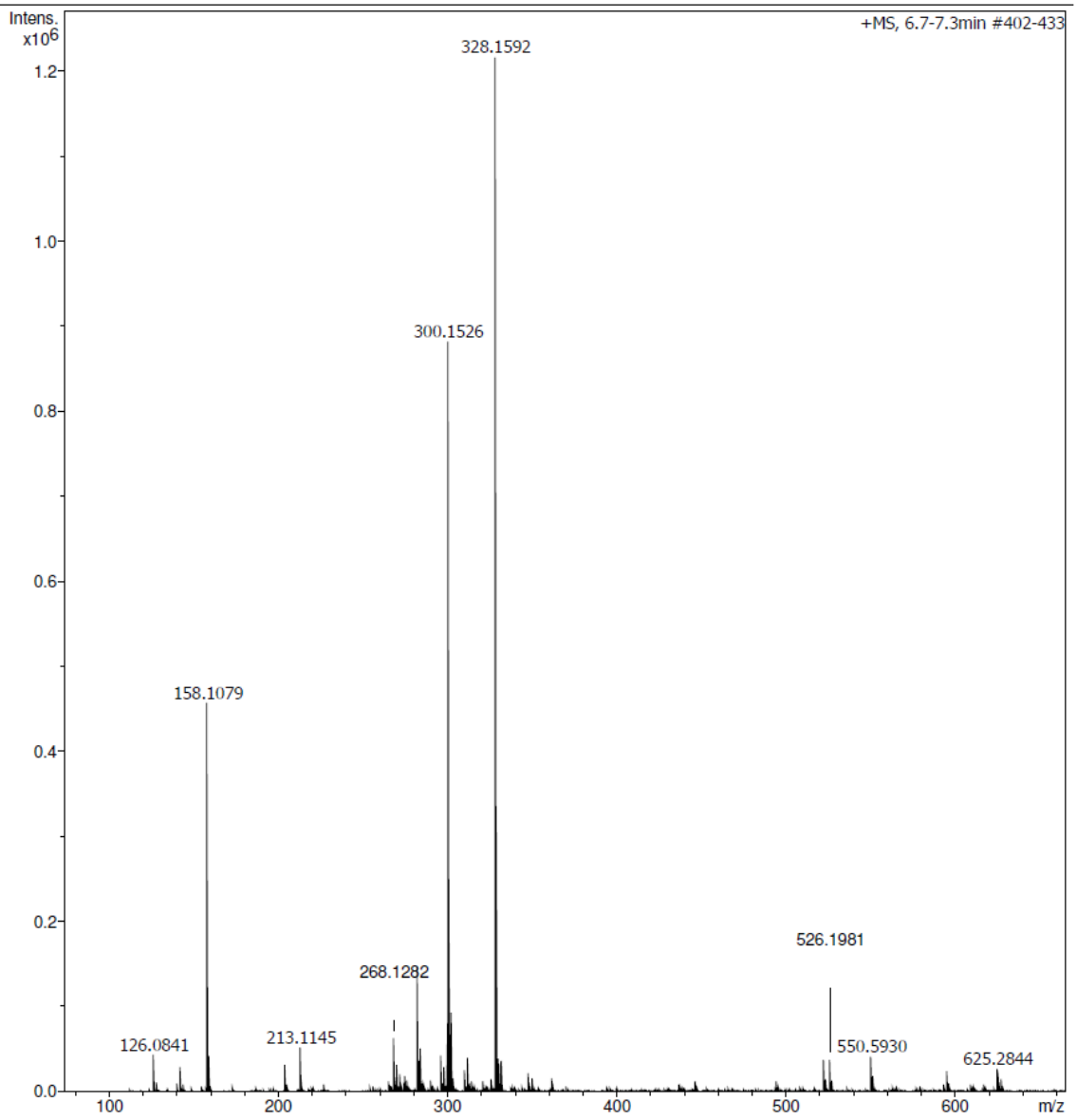
Tabela de RMN de ^{13}C ($CDCl_3$, 400 MHz) do composto **4**.

Posição	δ_c (ppm)
2	160,1
3	108,1
4	120,9
5	146,6
6	128,8
7	126,1
8	130,4
9	122,2
10	148,6
11	65,3
12	52,9
13	25,5
14	47,8
15	25,5
16	52,9
17	203,7

Generic Display Report

Faculdade de Ciencias Farmaceuticas de Ribeirao Preto-USP

Analysis Info		Acquisition Date	11/3/2014 3:48:46 PM
Analysis Name	D:\Data\Profa IVONE_QF\TA 06 - AZ_POS.d		
Method	Tune_Low_Tomaz_Pos_1300u_NOVO.m	Operator	BDAL@DE
Sample Name	TA 06 - AZ_POS	Instrument	micrOTOF-Q II
Comment			

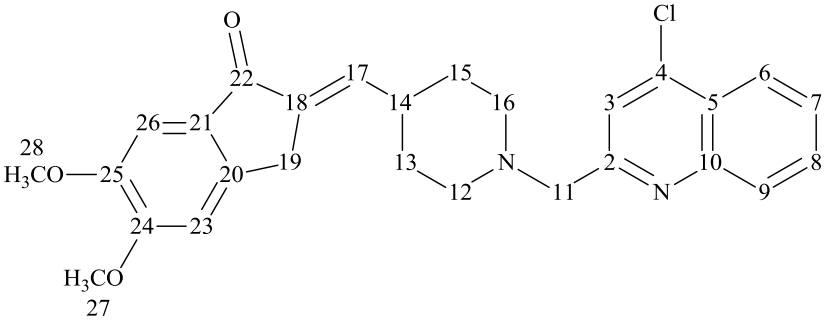


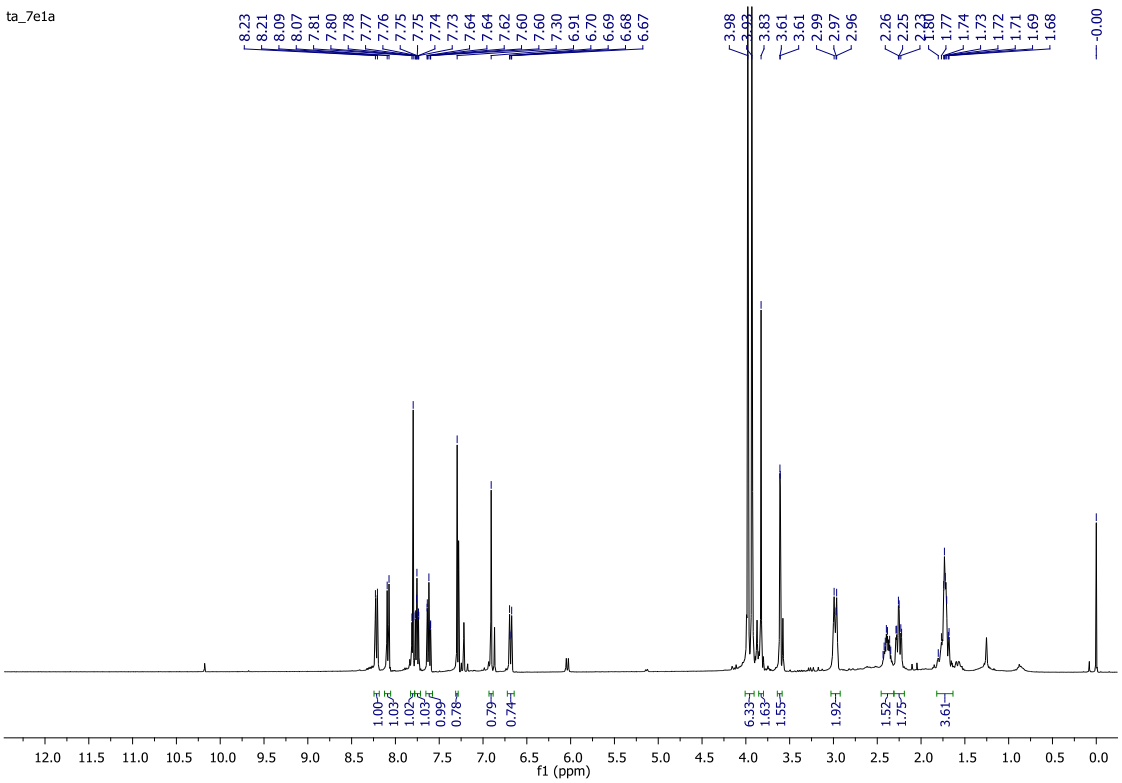
Bruker Compass DataAnalysis 4.1 printed: 11/3/2014 4:03:38 PM Page 1 of 1

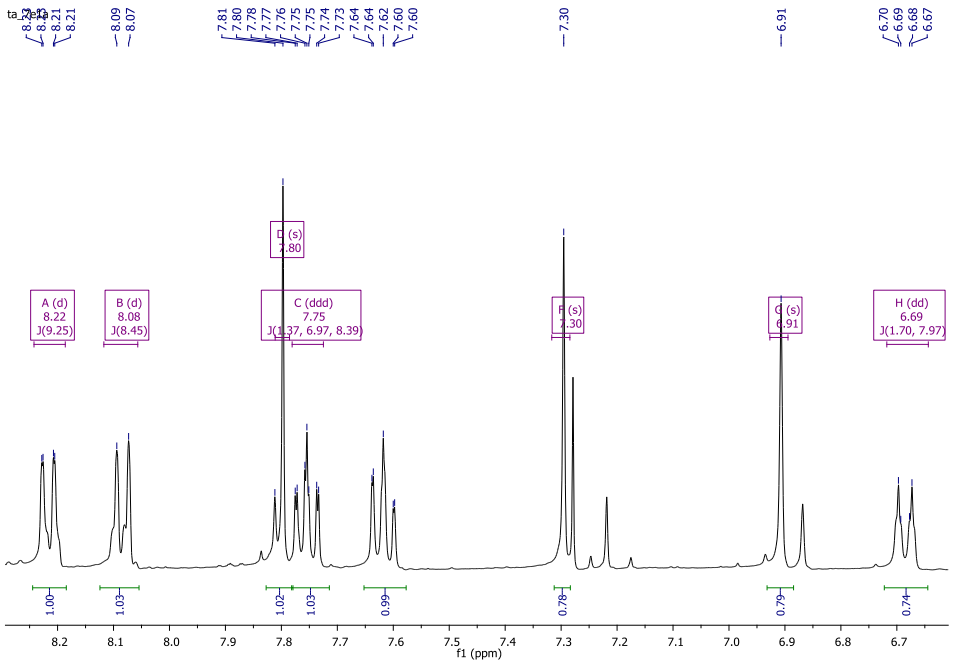
HRMS (ESI): $C_{16}H_{17}N_5O$ *m/z* $[M+H]^+$ calculado 296,1506; *m/z* $[M+H + MeOH]^+$ 328,1768; $[M+H - N_2]^+$ 268,1444 e encontrado *m/z* $[M+H + MeOH]^+$ 328,1592, $[M+H - N_2]^+$ 268,1282.

APÊNDICE G

Espectro de RMN de H^1 (400MHz, $CDCl_3$) do composto **19.**






ta_7e1a
A (d)
8.22
J(9.25)
B (d)
8.08
J(8.45)
C (ddd)
7.75
J(1.37, 6.97, 8.39)
D (s)
7.80
F (s)
7.30
G (s)
6.91
H (dd)
6.69
J(1.70, 7.97)
f1 (ppm)

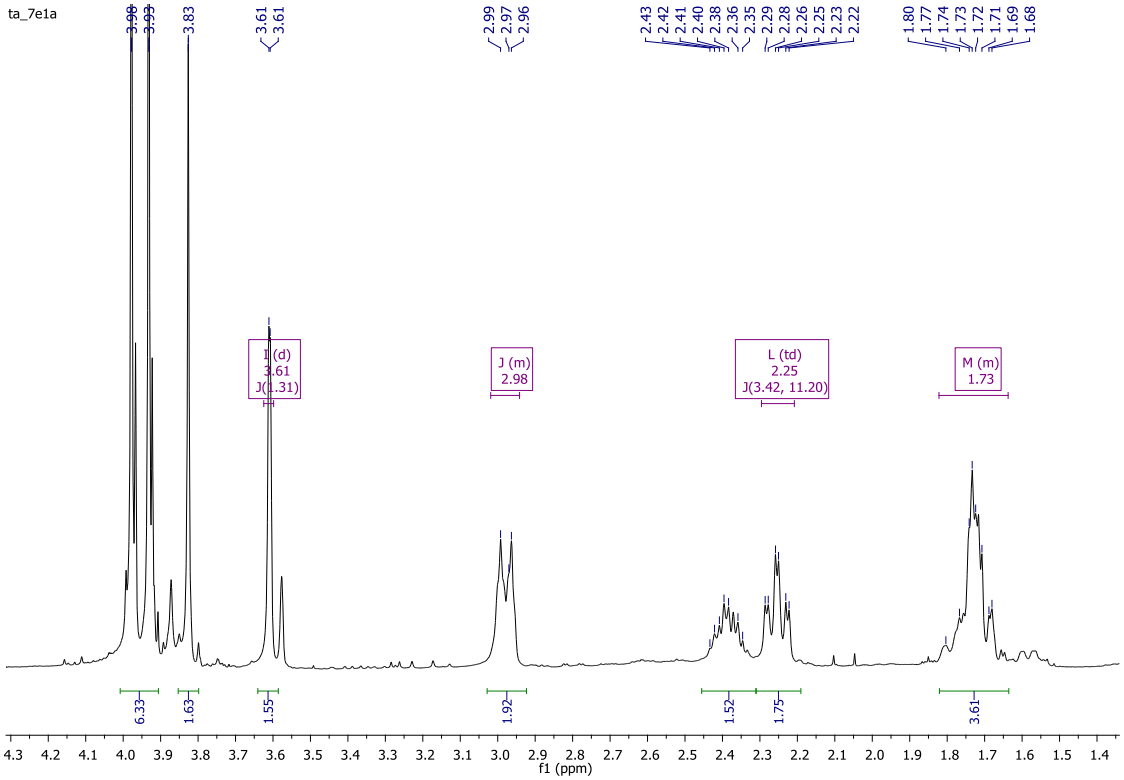

ta_7e1a
I (d)
3.61
J(1.31)
J (m)
2.98
L (td)
2.25
J(3.42, 11.20)
M (m)
1.73
f1 (ppm)

Tabela de RMN de H^1 (400MHz, $CDCl_3$) do composto **19.**

Posição	δ_H (ppm)	integral	multiplicidade	*J*(Hz)
3	7,80	1	s	--
6	8,08	1	d	8,4
7	7,62	1	ddd	8,2; 7,0; 1,2
8	7,75	1	ddd	8,4; 7,0; 1,4
9	8,22	1	d	9,25
11	3,83	2	s	--
12ax	2,25	1	dt	11,2; 3,4
12eq	2,94-3,02	1	m	--
13ax	1,67-1,78	1	m	--
13eq	2,32-2,42	1	m	--
14	2,32-2,42	1	m	--
15ax	1,67-1,78	1	m	--
15eq	1,67-1,78	1	m	--
16ax	2,25	1	dt	11,2; 3,4
16eq	2,94-3,02	1	m	--
17	6,69	1	dd	8,0; 1,7
19	3,61	2	d	1,3
23	7,30	1	s	--
26	6,91	1	s	--
27	3,97	3	s	--
28	3,93	3	s	--

Espectro de RMN de C^{13} ($CDCl_3$, 400 MHz) do composto **19**.

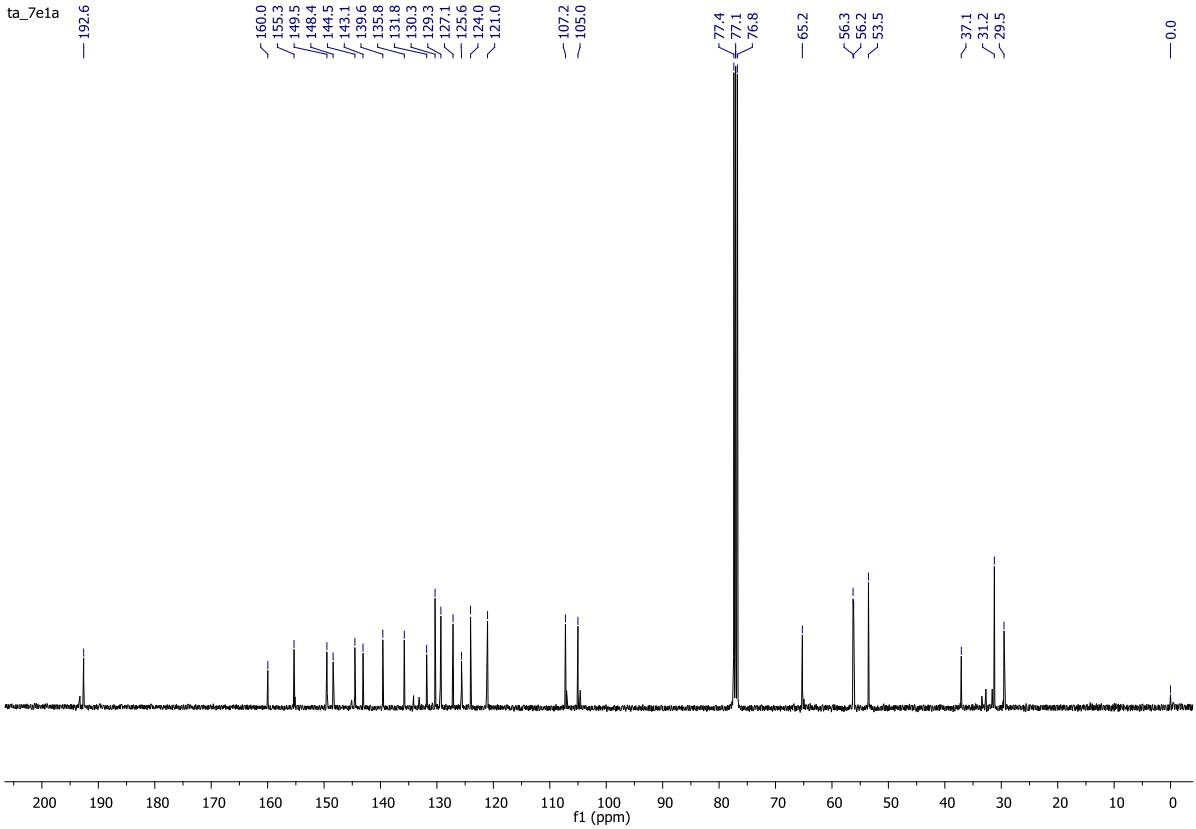
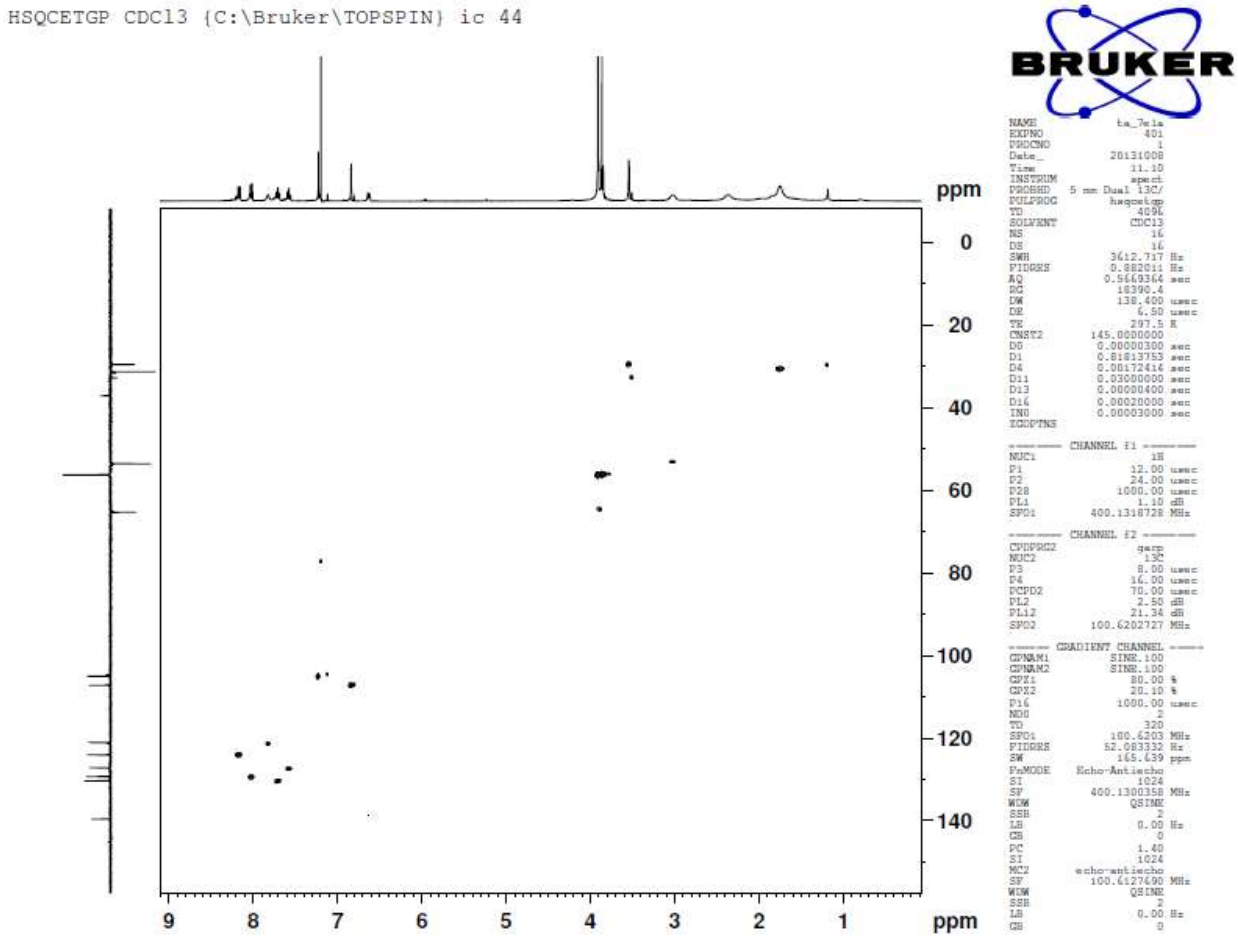


Tabela de RMN de C^{13} ($CDCl_3$, 400 MHz) do composto **19**.

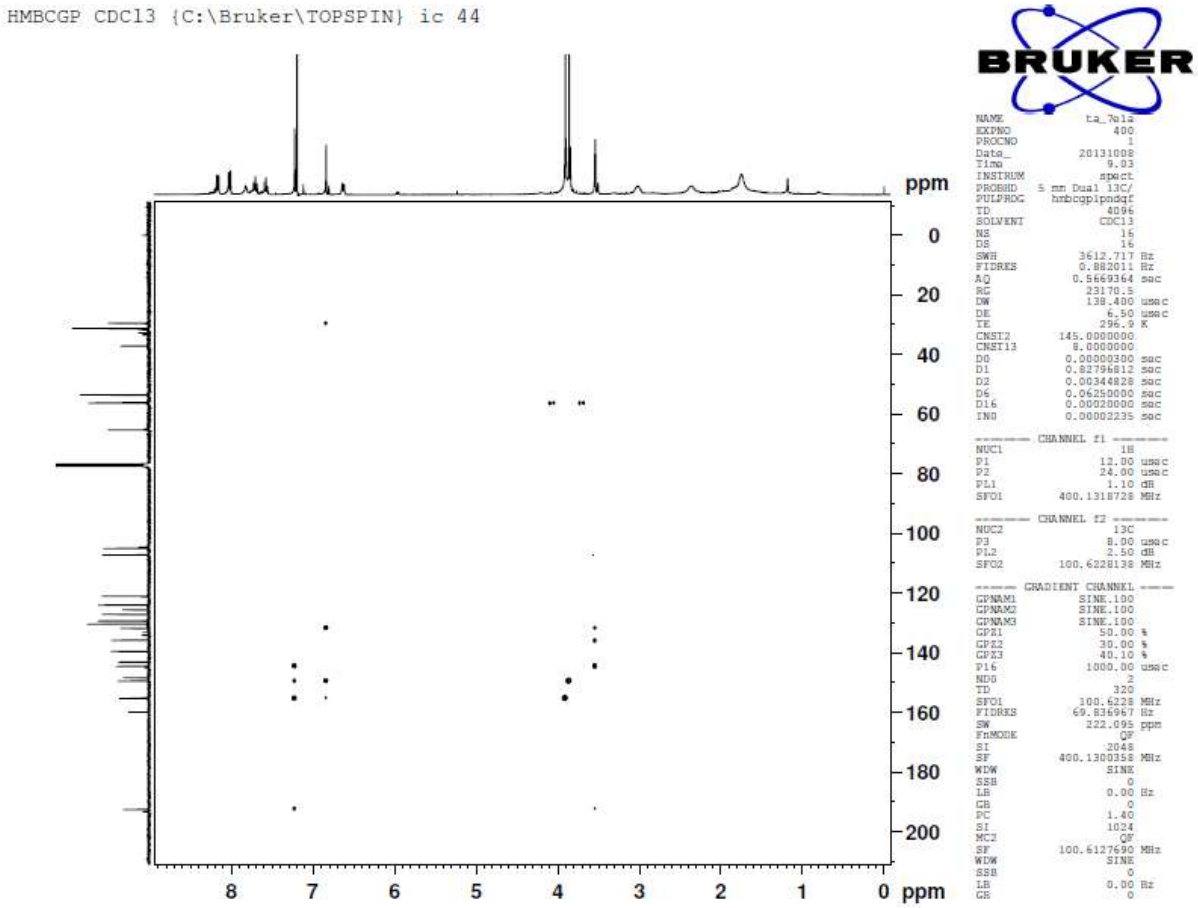
Posição	δ_c (ppm)
2	160,0
3	121,0
4	125,6
5	143,1
6	129,3
7	127,1
8	130,3
9	124,0
10	148,4
11	65,2
12	53,5
13	31,2
14	37,1
15	31,2

Posição	δ_c (ppm)
16	53,5
17	139,6
18	135,8
19	29,5
20	144,5
21	131,8
22	192,6
23	105,0
24	155,3
25	149,5
26	107,2
27	56,2
28	56,3

Espectro bidimensional de correlação C-H (HSQC) (400MHz, $CDCl_3$) do composto **19.**



Espectro bidimensional de correlação C-H (HMBC) (400MHz, $CDCl_3$) do composto **19.**

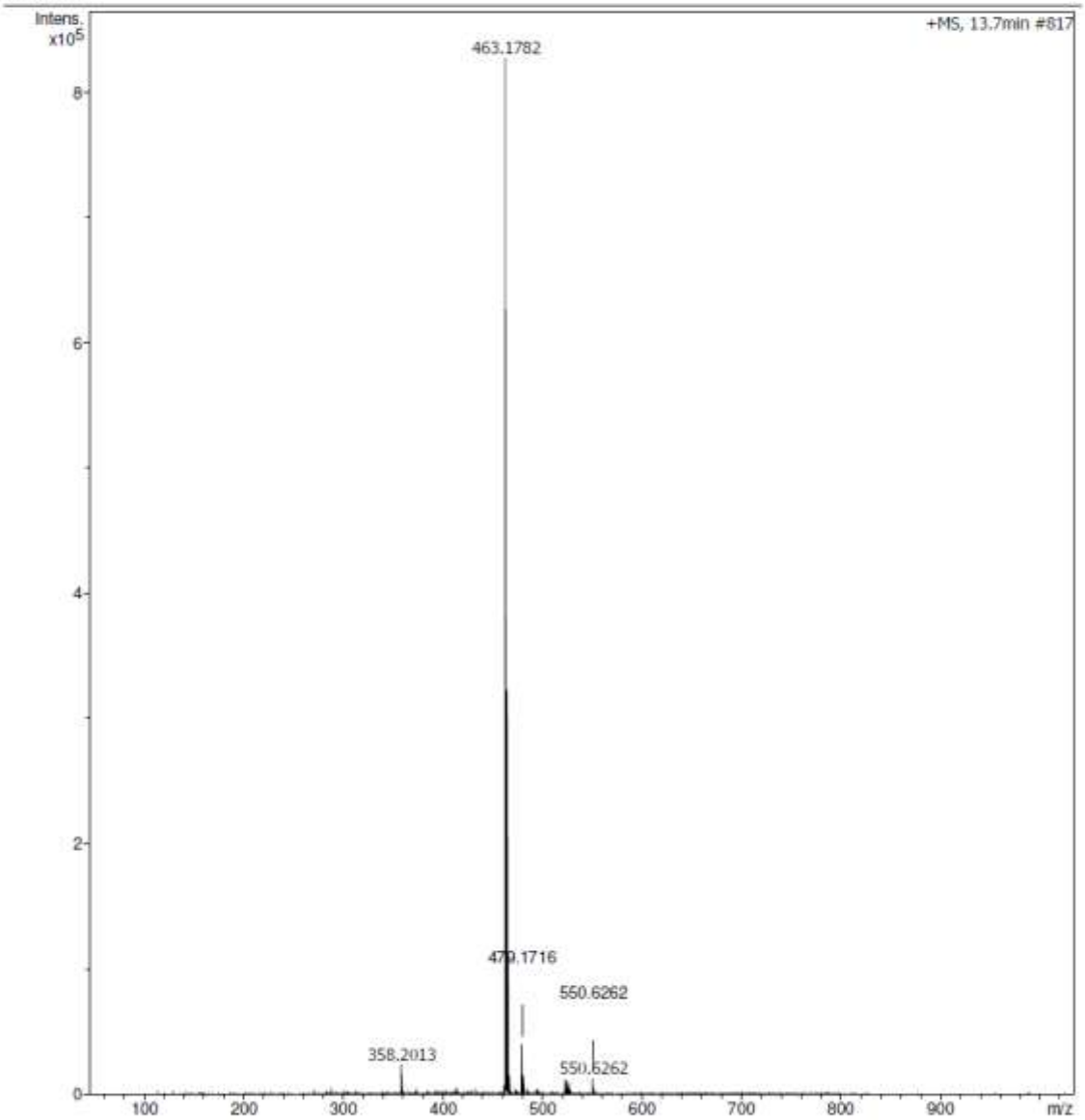


Generic Display Report

Faculdade de Ciencias Farmaceuticas de Ribeirao Preto-USP

Analysis Info

Analysis Name	D:\Data\Profa IVONE_QF\TA-7 E1-A_POS.d	Acquisition Date	8/19/2013 4:32:18 PM
Method	Tune_Low_Tomaz_Pos_1300u_NOVO.m	Operator	BDAL@DE
Sample Name	TA-7 E1-A_POS	Instrument	micrOTOF-Q II
Comment			

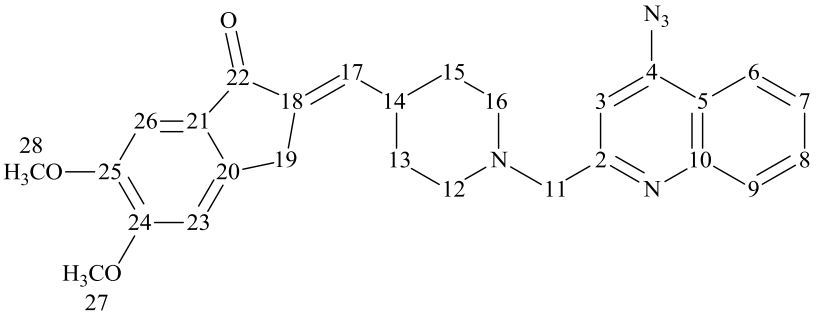


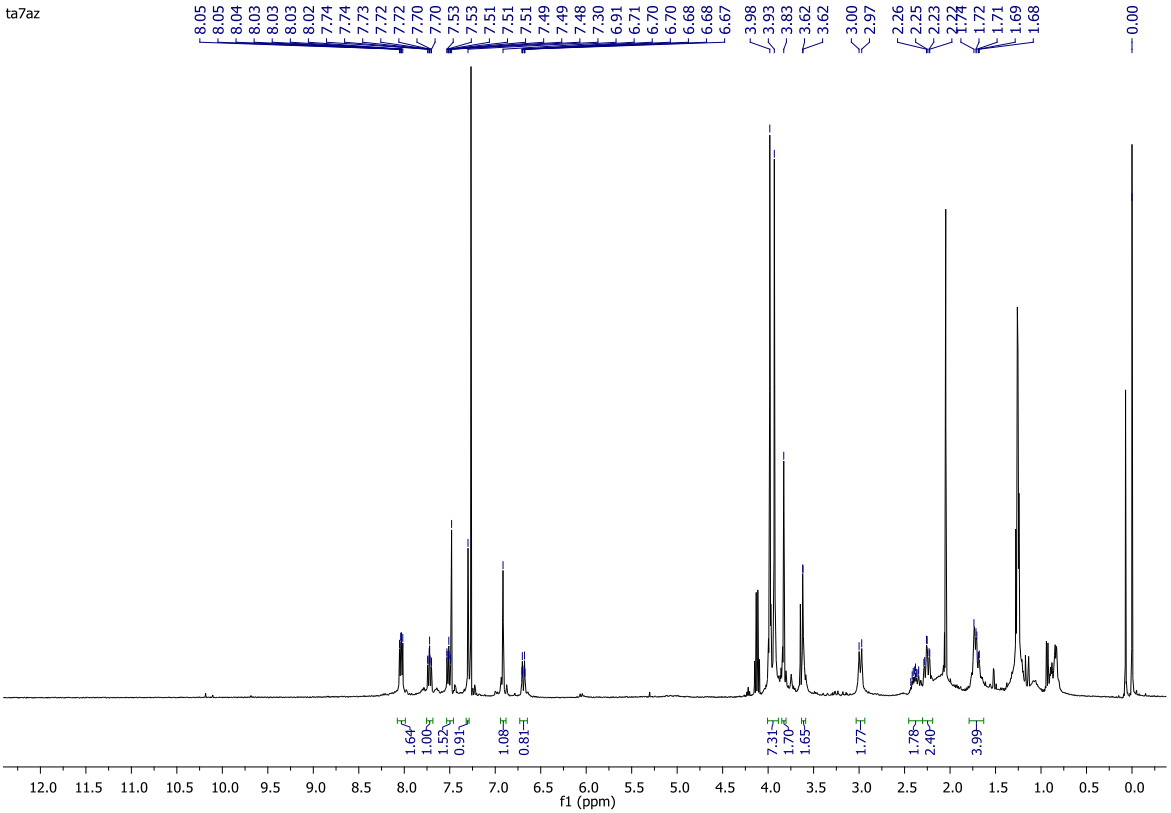
Bruker Compass DataAnalysis 4.1 printed: 8/19/2013 5:00:39 PM Page 1 of 1

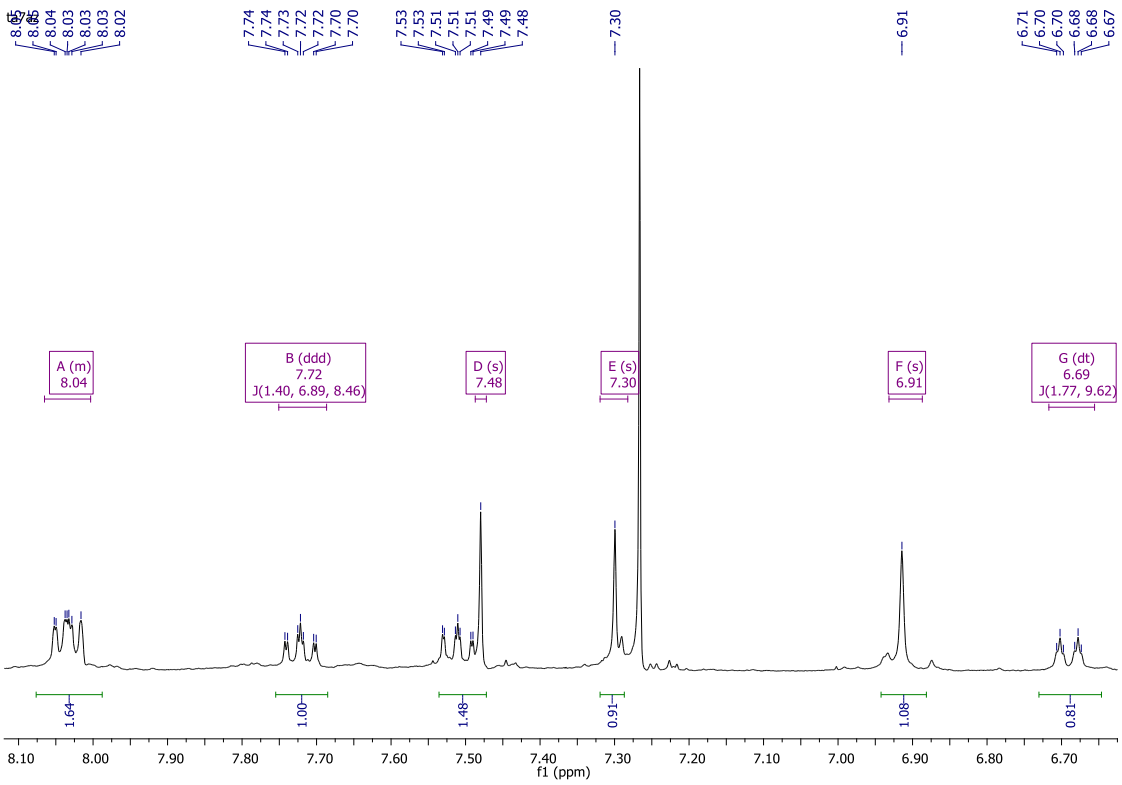
HRMS (ESI): $C_{27}H_{27}ClN_2O_3$ *m/z* $[M+H]^+$ calculado 463,1783, encontrado *m/z* $[M+H]^+$ 463,1782.

APÊNDICE H

Espectro de RMN de ^{1}H (400MHz, $CDCl_3$) do composto **13**






A (m)
8.04
B (ddd)
7.72
J(1.40, 6.89, 8.46)
D (s)
7.48
E (s)
7.30
F (s)
6.91
G (dt)
6.69
J(1.77, 9.62)
1.64
1.00
1.48
0.91
1.08
0.81
f1 (ppm)

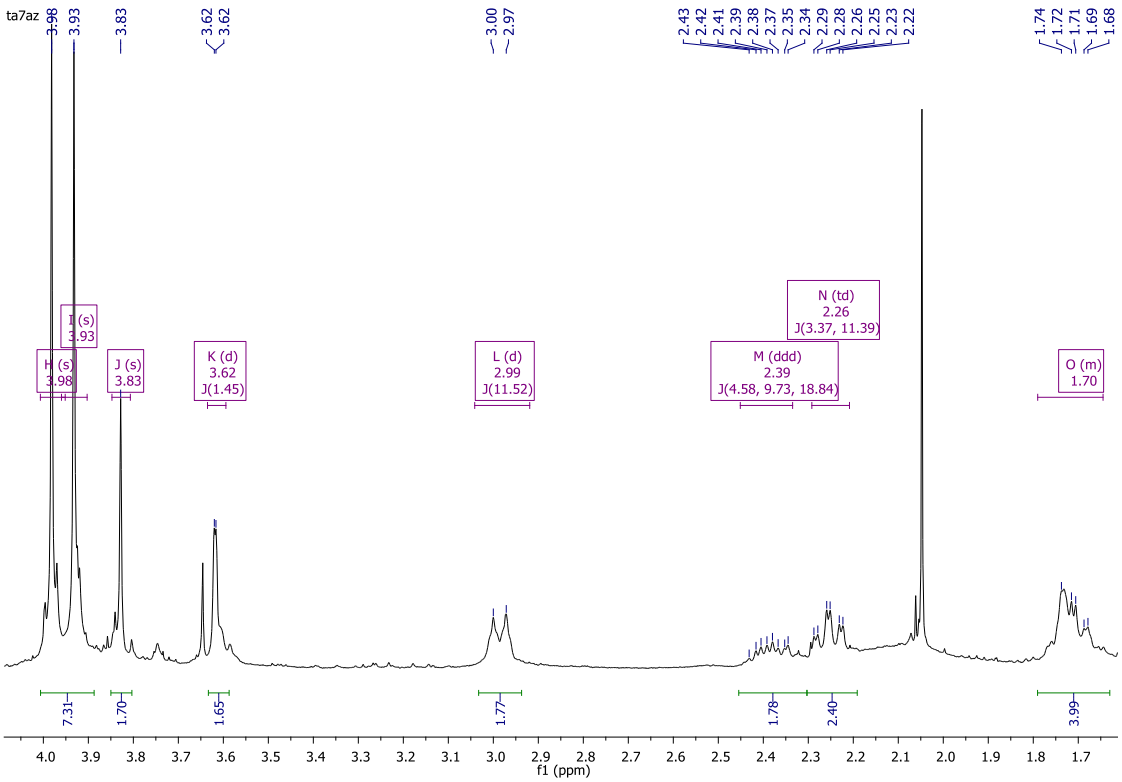

ta7az
I (s)
3.93
H (s)
3.98
J (s)
3.83
K (d)
3.62
J(1.45)
L (d)
2.99
J(11.52)
N (td)
2.26
J(3.37, 11.39)
M (ddd)
2.39
J(4.58, 9.73, 18.84)
O (m)
1.70
7.31
1.70
1.65
1.77
1.78
2.40
3.99
f1 (ppm)

Tabela de RMN de ^{1}H (400MHz, $CDCl_3$) do composto **13**.

Posição	δ_H (ppm)	integral	multiplicidade	*J*(Hz)
3	7,48	1	s	--
6	8,07-7,99	1	m	--
7	7,51	1	ddd	8,7; 4,9; 1,3
8	7,72	1	ddd	8,5; 6,9; 1,4
9	8,07-7,99	1	m	--
11	3,83	2	s	--
12ax	2,26	1	dt	11,4; 3,4
12eq	2,99	1	d	11,5
13ax	1,79- 1,65	1	m	--
13eq	2,39	1	ddd	18,8; 9,73; 4,6
14	2,39	1	ddd	18,8; 9,73; 4,6
15ax	1,79- 1,65	1	m	--
15eq	1,79- 1,65	1	m	--
16ax	2,26	1	dt	11,4; 3,4
16eq	2,99	1	d	11,5
17	6,69	1	dt	9,7; 1,7
19	3,62	2	d	1,5
23	7,30	1	s	--
26	6,91	1	s	--
27	3,98	3	s	--
28	3,93	3	s	--

Espectro de RMN de ^{13}C ($CDCl_3$, 400 MHz) do composto **13**.

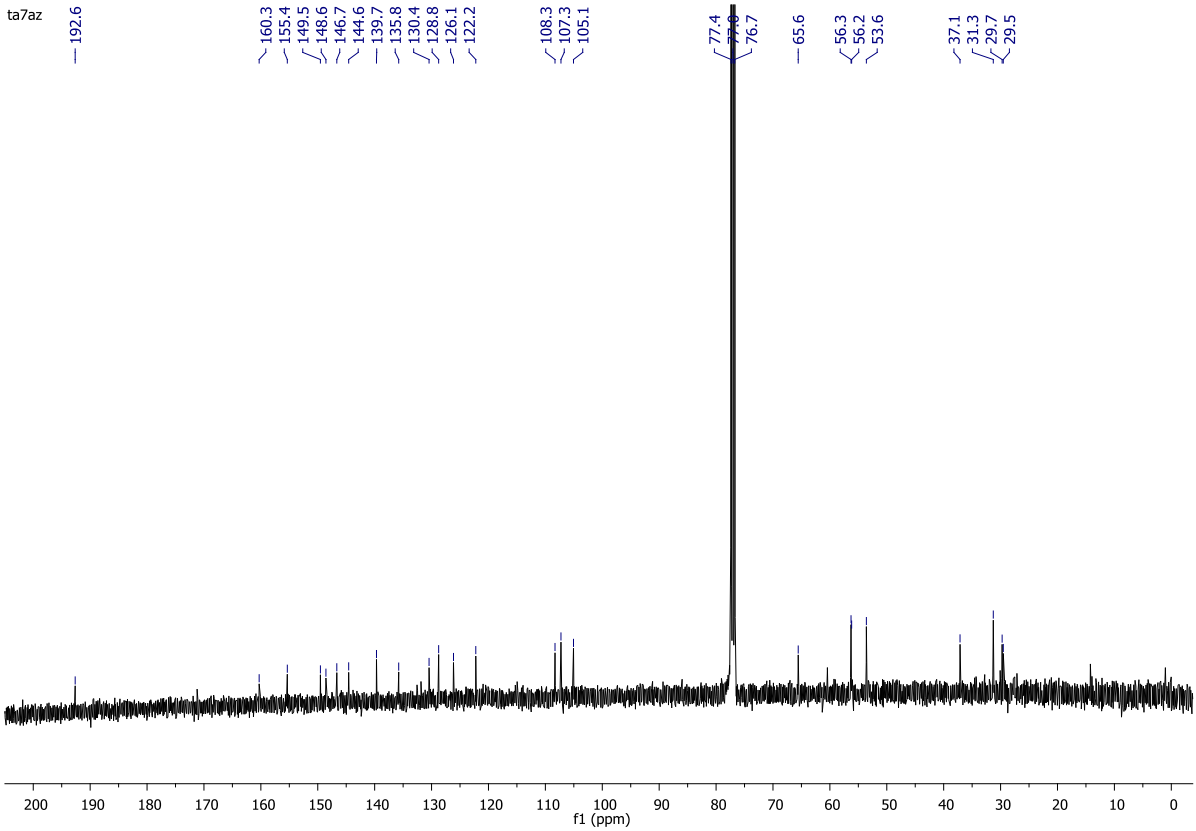


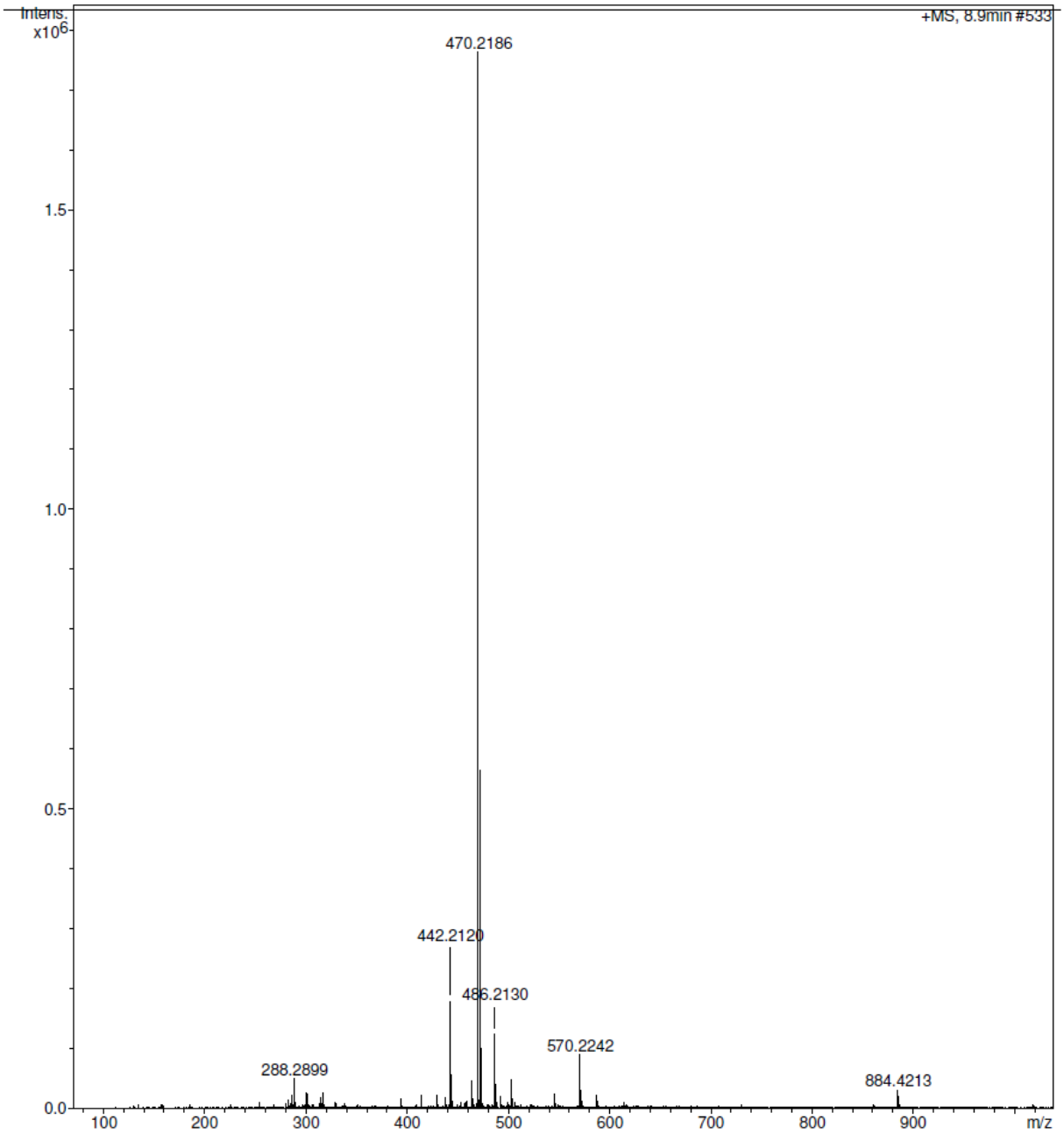
Tabela de RMN ^{13}C (CCl_3D, 400 MHz) do composto **13**.

Posição	δ_c (ppm)
2	160,3
3	108,3
4	122,2
5	146,7
6	128,8
7	126,1
8	130,4
9	122,2
10	148,6
11	65,6
12	53,6
13	29,7
14	37,1
15	29,5

Posição	δ_c (ppm)
16	53,6
17	139,7
18	135,8
19	31,3
20	144,6
21	130,4
22	192,6
23	105,1
24	155,4
25	149,5
26	107,3
27	56,2
28	56,3

Analysis Info

Analysis Name	D:\Data\Profa IVONE_QF\TA - 8 AZ_POS.d	Acquisition Date	9/25/2013 10:01:39 AM
Method	tune_low_tomaz1000_pos.m	Operador	Jose Carlos Tomaz
Sample Name	TA - 8 AZ_POS	Instrument	micrOTOF
Comment			

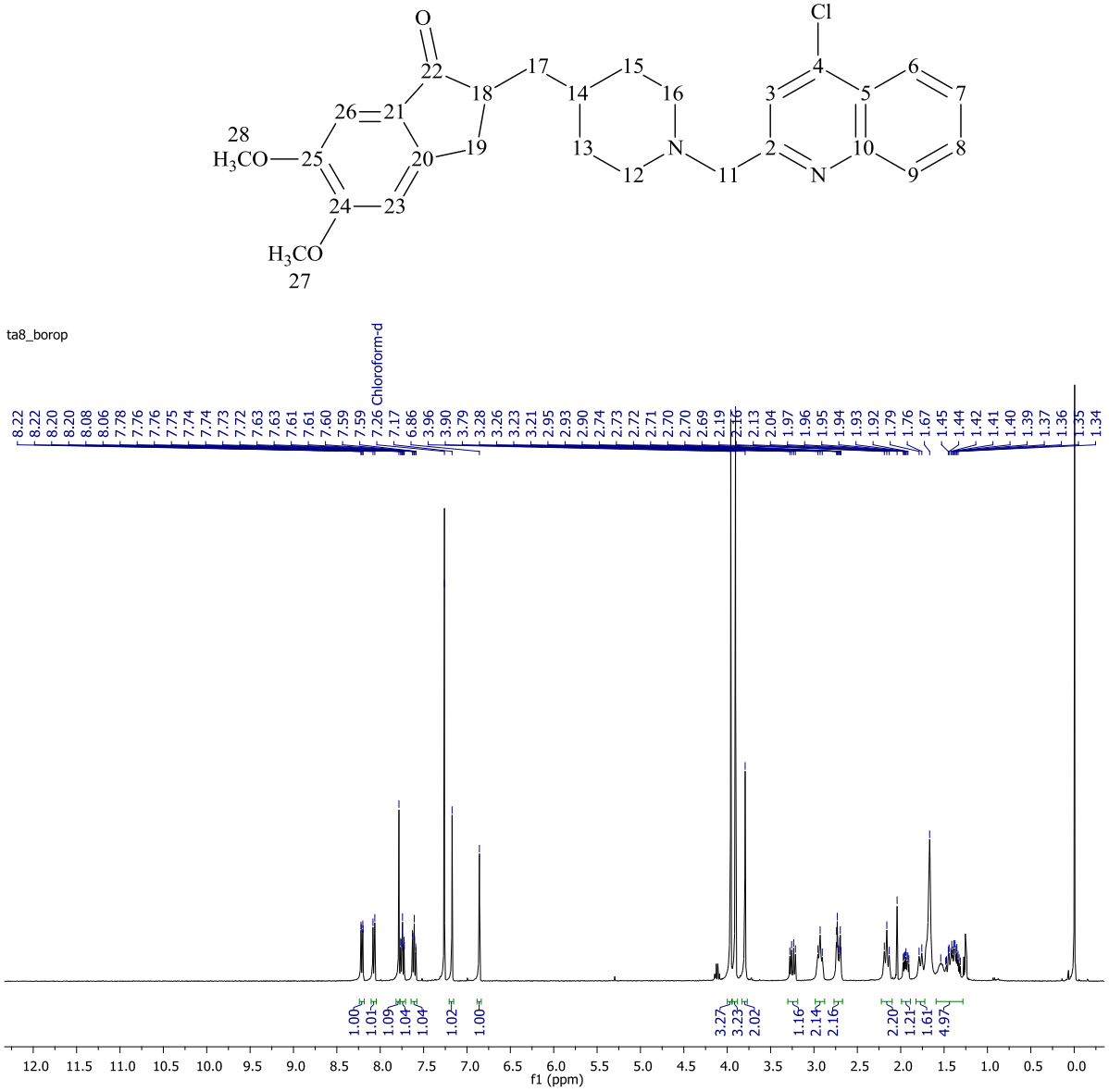


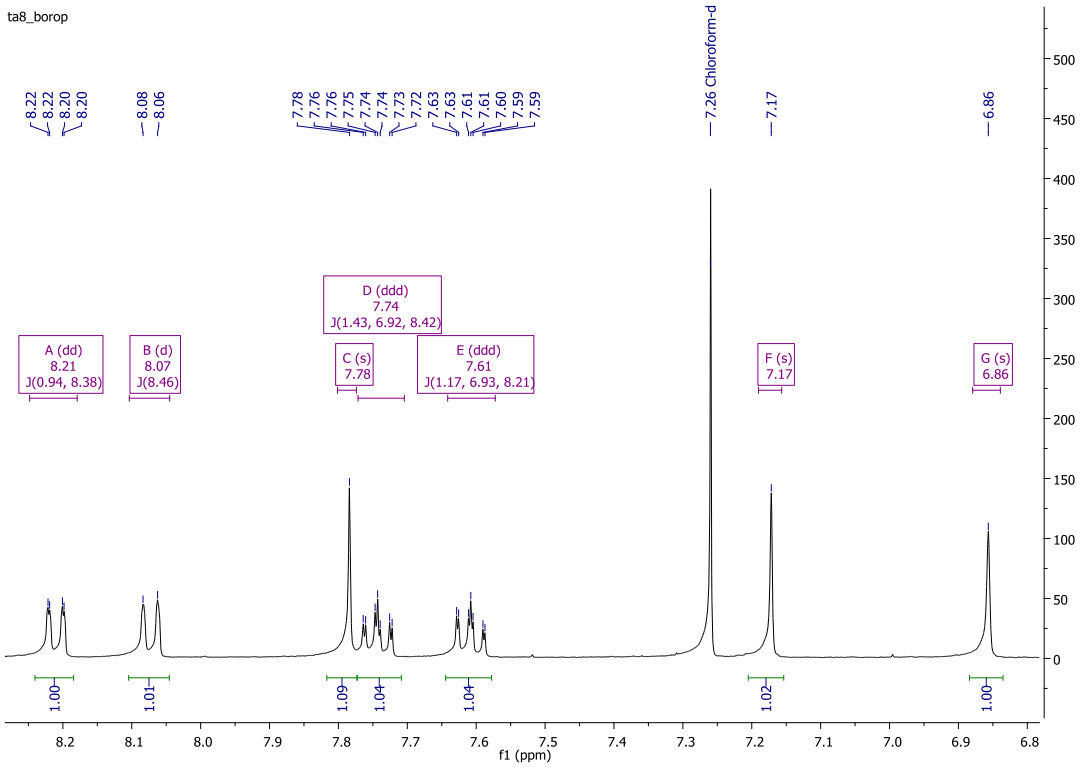
Bruker Compass DataAnalysis 4.0 printed: 9/25/2013 10:17:48 AM Page 1 of 1

HRMS (ESI): $C_{27}H_{27}N_5O_3$ *m/z* $[M+H]^+$ calculado 470,2187, encontrado *m/z* $[M+H]^+$ 470,2186.

APÊNDICE I

Espectro de RMN de H^1 (400MHz, $CDCl_3$) do composto **20.**




ta8_borop
8.22
8.22
8.20
8.20
8.08
8.06
7.78
7.76
7.76
7.75
7.74
7.74
7.73
7.72
7.63
7.63
7.61
7.61
7.60
7.59
7.59
7.26 Chloroform-d
7.17
6.86
A (dd)
8.21
J(0.94, 8.38)
B (d)
8.07
J(8.46)
D (ddd)
7.74
J(1.43, 6.92, 8.42)
C (s)
7.78
E (ddd)
7.61
J(1.17, 6.93, 8.21)
F (s)
7.17
G (s)
6.86
1.00
1.01
1.09
1.04
1.04
1.02
1.00
f1 (ppm)

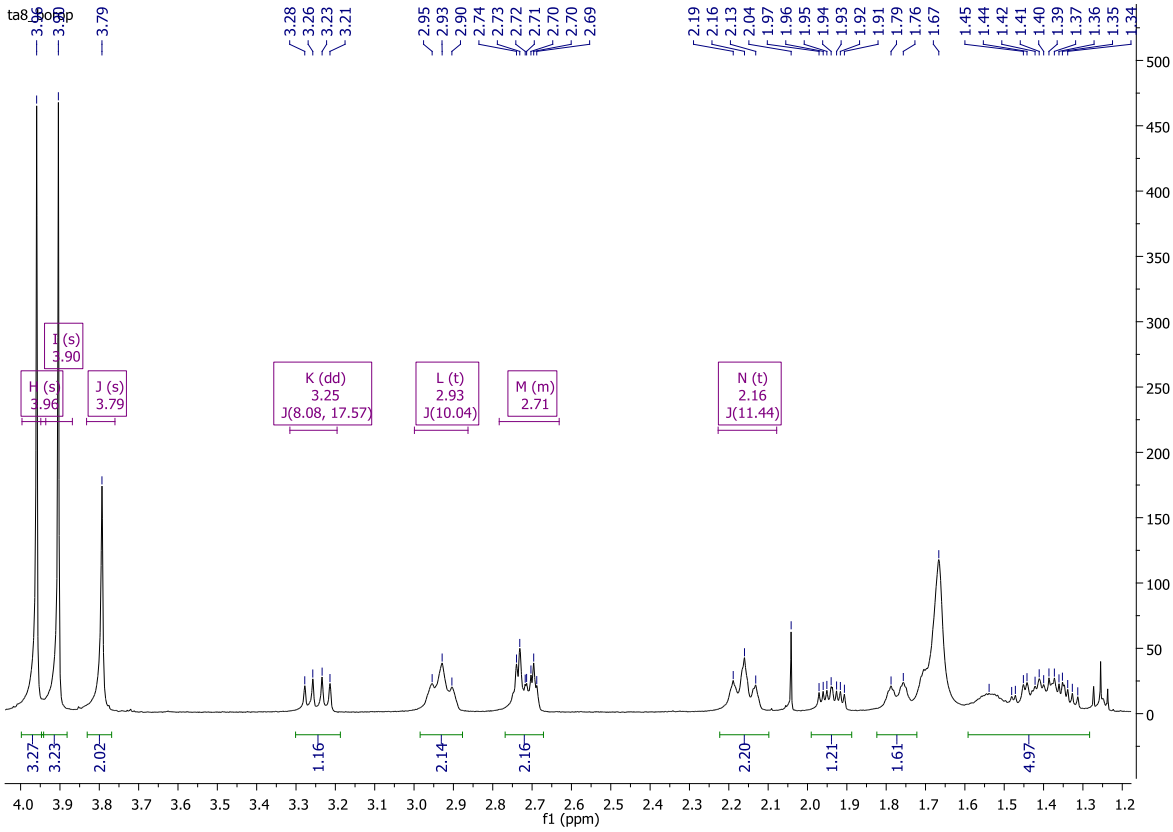

ta8_borop
3.96
3.90
3.79
3.28
3.26
3.23
3.21
2.95
2.93
2.90
2.74
2.73
2.72
2.71
2.70
2.70
2.69
2.19
2.16
2.13
2.04
1.97
1.96
1.95
1.94
1.93
1.92
1.91
1.79
1.76
1.67
1.45
1.44
1.42
1.41
1.40
1.39
1.37
1.36
1.35
1.34
I (s)
3.90
H (s)
3.96
J (s)
3.79
K (dd)
3.25
J(8.08, 17.57)
L (t)
2.93
J(10.04)
M (m)
2.71
N (t)
2.16
J(11.44)
3.27
3.23
2.02
1.16
2.14
2.16
2.20
1.21
1.61
4.97
f1 (ppm)

Tabela de RMN de H^1 (400MHz, $CDCl_3$) do composto **20.**

Posição	δ_H (ppm)	integral	multiplicidade	*J*(Hz)
3	7,78	1	s	--
6	8,07	1	d	8,5
7	7,61	1	ddd	8,2; 6,9; 1,2
8	7,74	1	ddd	8,4; 6,9; 1,4
9	8,21	1	dd	8,4; 0.9
11	3,79	2	s	--
12ax	2,16	1	t	11,4
12eq	2,93	1	t	10,0
13ax	1,83-1,3	1	m	--
13eq	1,83-1,3	1	m	--
14	1,83-1,3	1	m	--
15ax	1,83-1,3	1	m	--
15eq	1,83-1,3	1	m	--
16ax	2,16	1	t	11,4
16eq	2,93	1	t	10,0
17a	2,00-1,89	1	m	--
17b	1,83-1,3	1	m	--
18	2,78-2,67	1	m	--
19a	3,25	1	dd	17,6; 8,1
19b	2,78-2,67	1	m	--
23	7,17	1	s	--
26	6,86	1	s	--
27	3,90	3	s	--
28	3,96	3	s	--

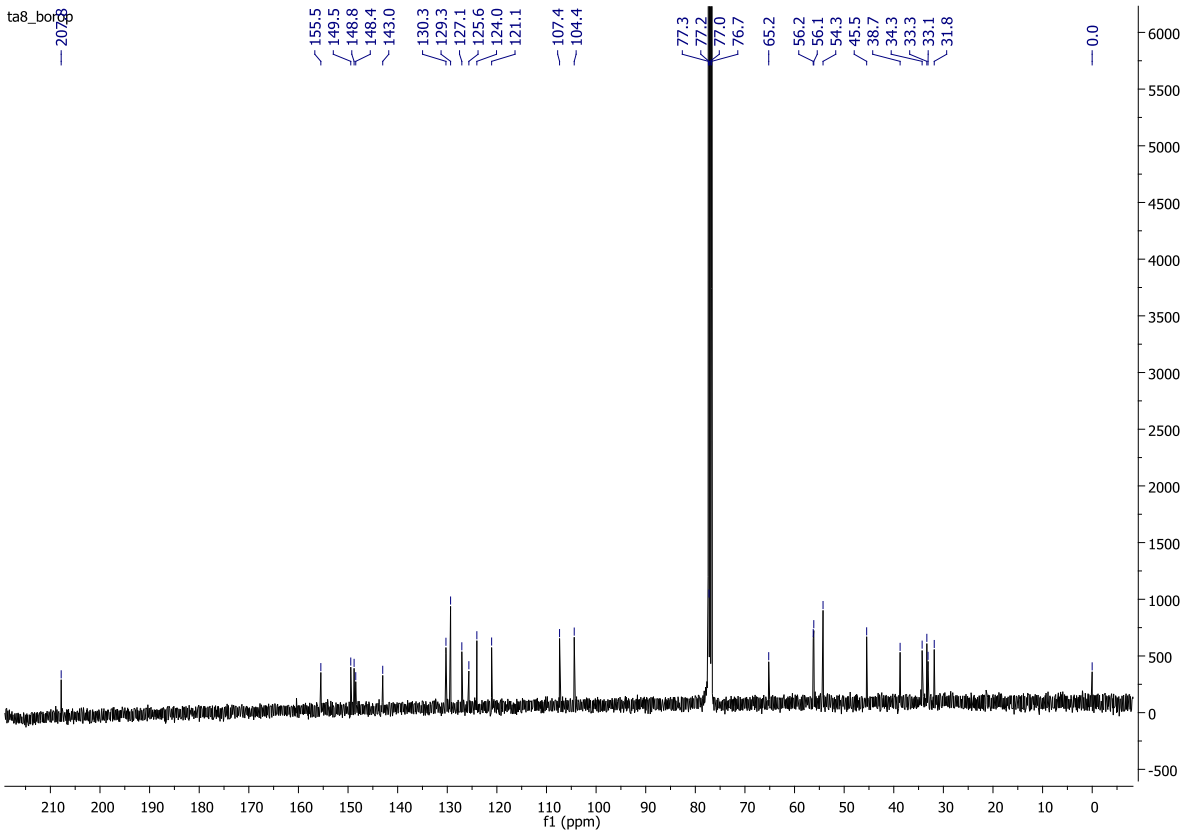
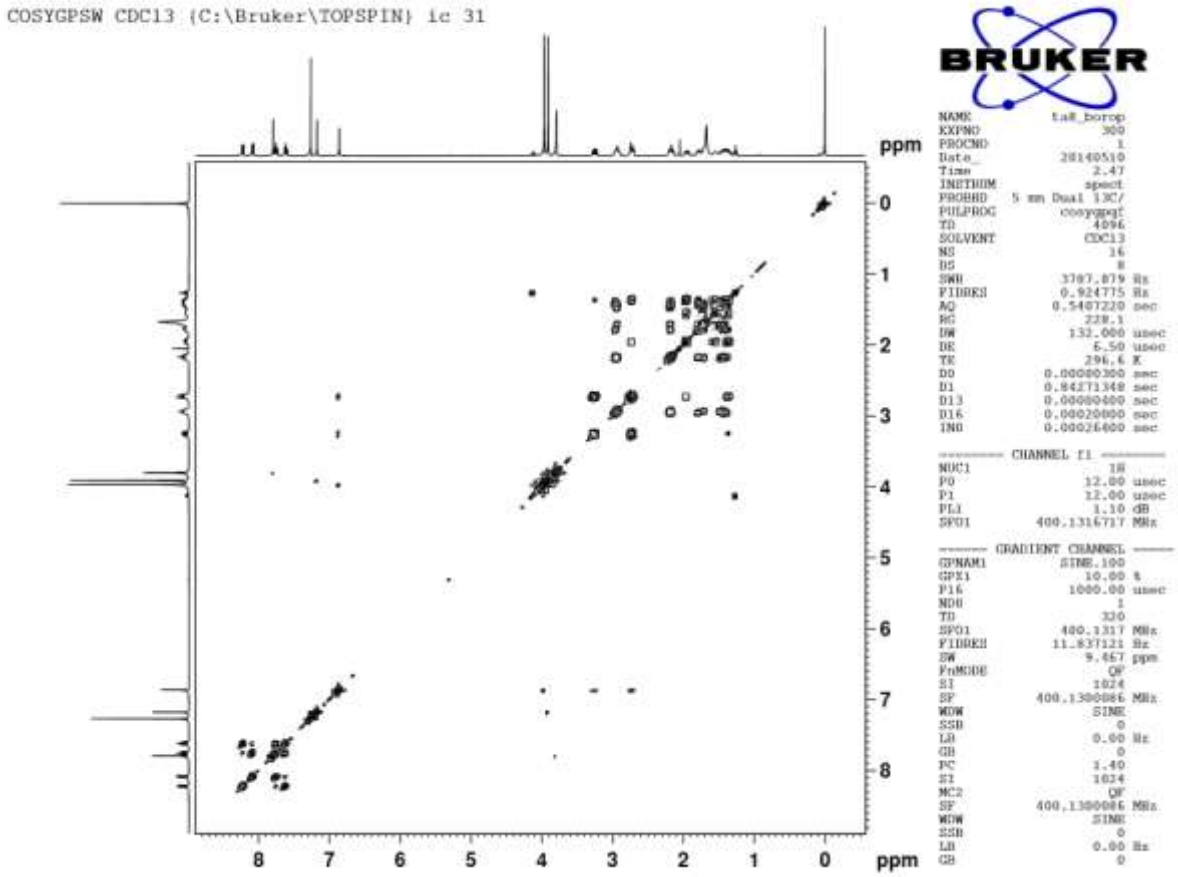


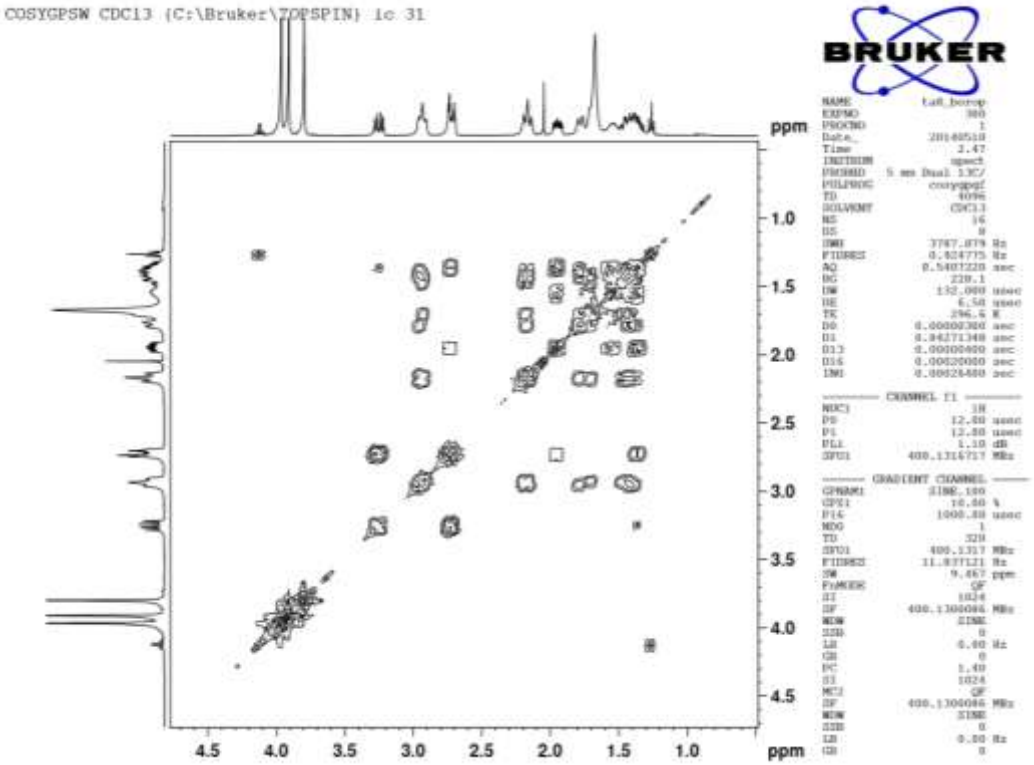
Tabela de RMN C^{13} (CCl_3D, 400 MHz) do composto **20**.

Posição	δ_c (ppm)
2	155,5
3	121,1
4	125,6
5	143,0
6	129,3
7	127,1
8	130,3
9	124,0
10	148,4
11	65,2
12	54,3
13	31,8
14	34,3
15	33,1

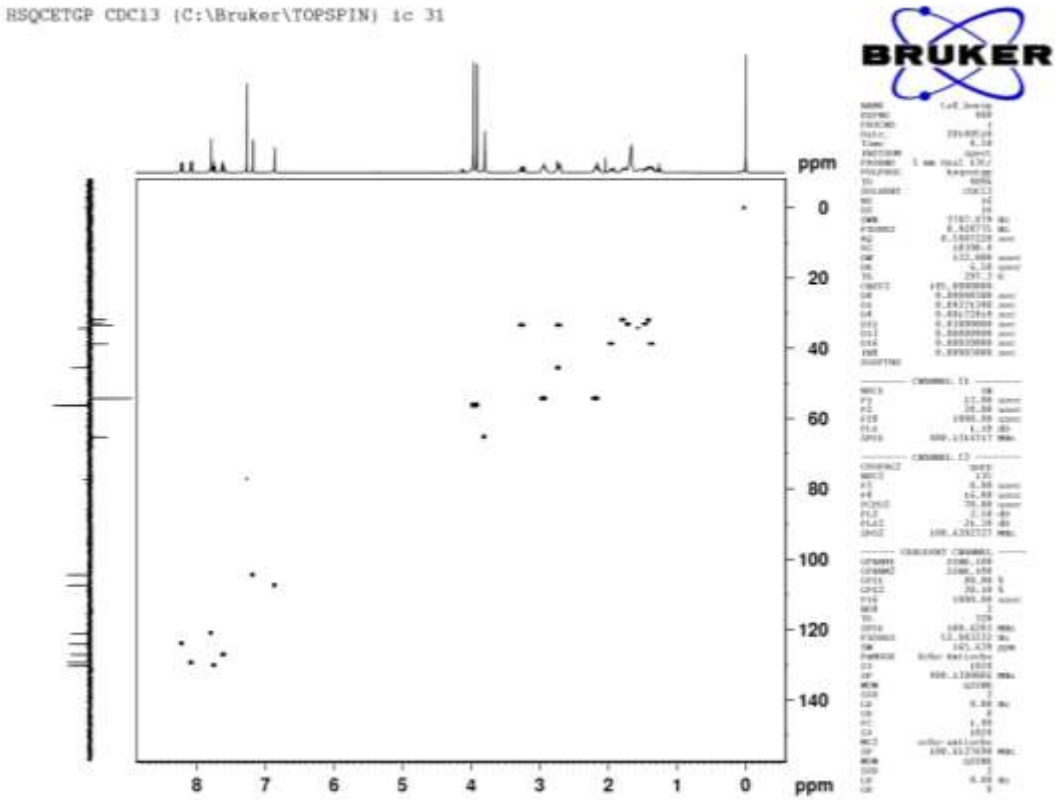
Posição	δ_c (ppm)
16	54,3
17	38,7
18	45,5
19	33,3
20	155,5
21	129,3
22	207,8
23	104,4
24	149,5
25	148,8
26	107,4
27	56,2
28	56,1

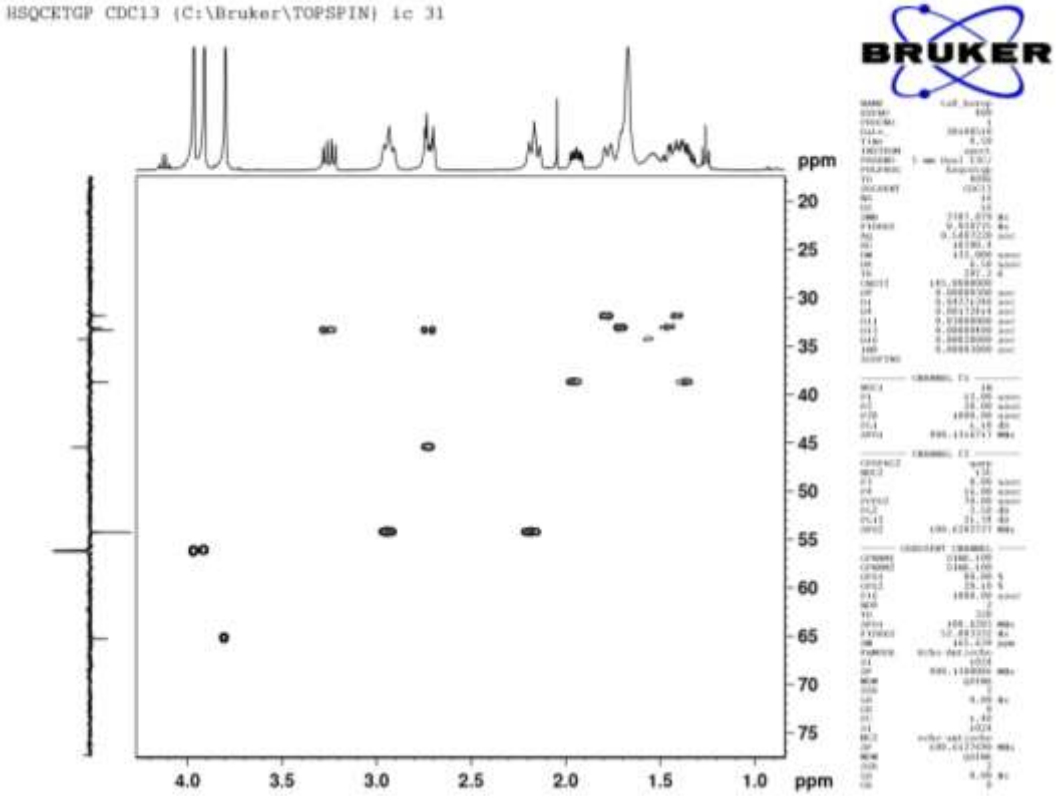
Espectro bidimensional de correlação H-H (COSY) (400MHz, $CDCl_3$) do composto **20.**



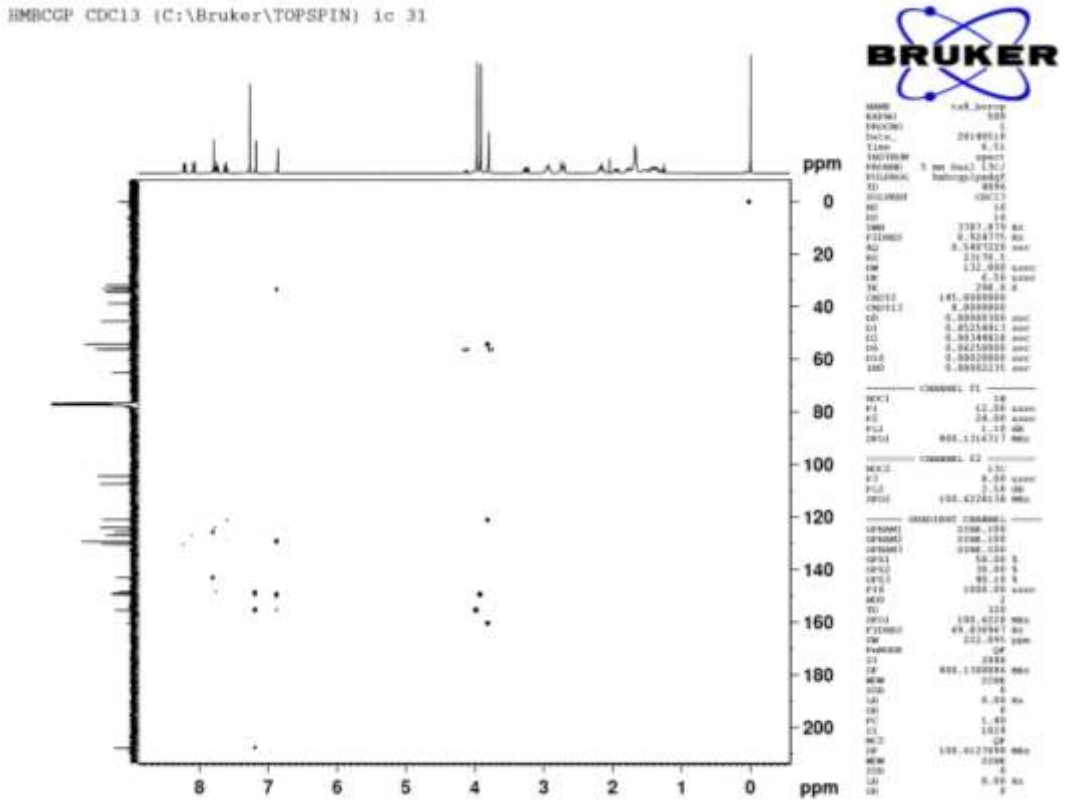


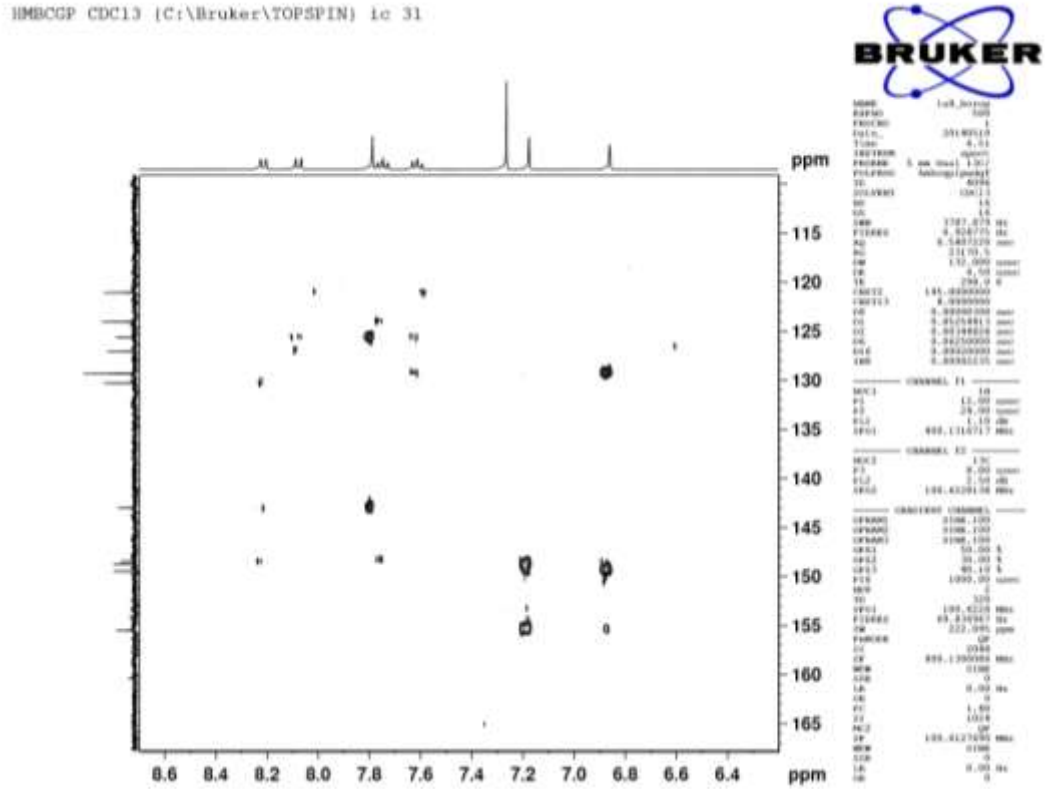
Espectro bidimensional de correlação C-H (HSQC) (400MHz, $CDCl_3$) do composto **20.**





Espectro bidimensional de correlação C-H (HMBC) (400MHz, $CDCl_3$) do composto **20.**

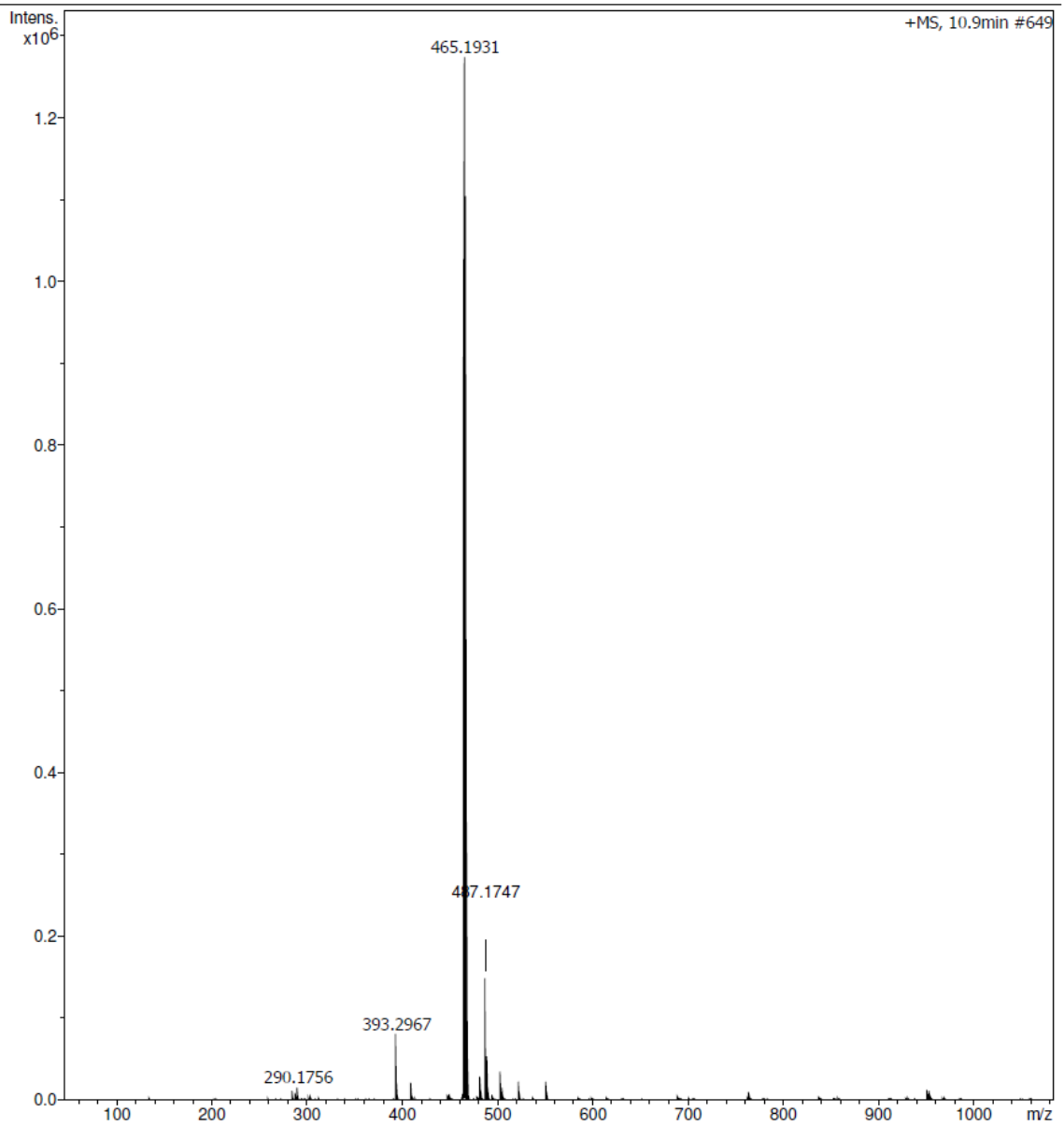




Generic Display Report

Faculdade de Ciencias Farmaceuticas de Ribeirao Preto-USP

Analysis Info		Acquisition Date	5/9/2014 9:55:14 AM
Analysis Name	D:\Data\Profa IVONE_QF\TA-8 BORO-P_POS.d		
Method	Tune_Low_Tomaz_Pos_1300u_NOVO.m	Operator	BDAL@DE
Sample Name	TA-8 BORO-P_POS	Instrument	micrOTOF-Q II
Comment			

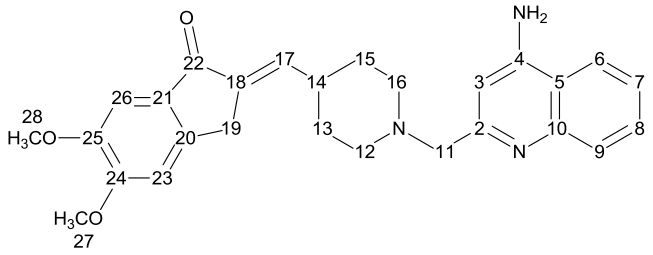


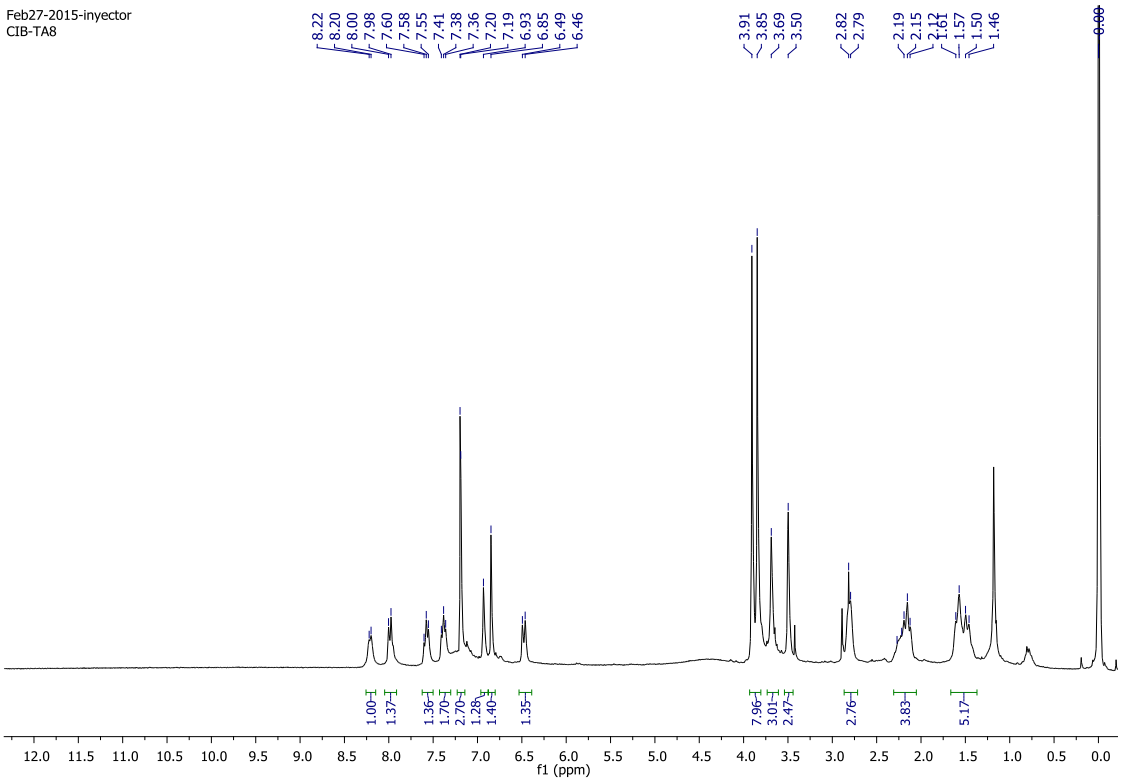
Bruker Compass DataAnalysis 4.1 printed: 5/9/2014 10:19:33 AM Page 1 of 1

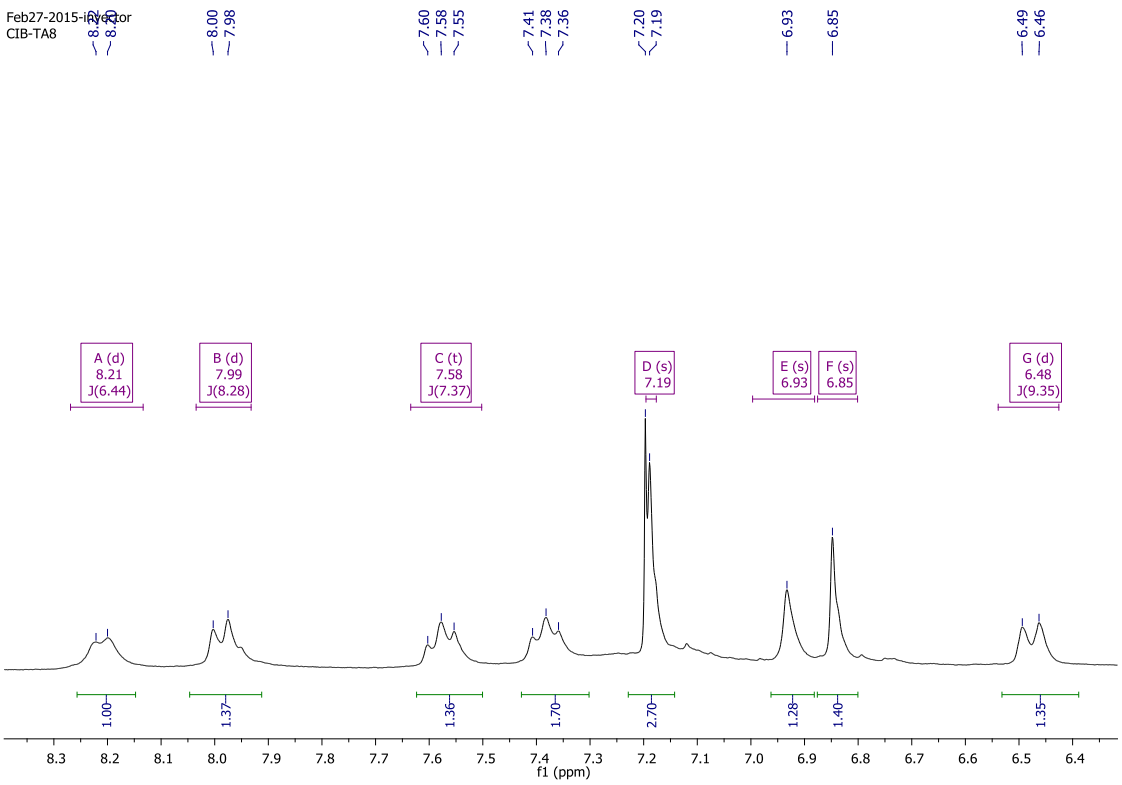
HRMS (ESI): $C_{27}H_{29}ClN_2O_3$ *m/z* $[M+H]^+$ calculado 465,1939, encontrado *m/z* $[M+H]^+$ 465,1931.

APÊNDICE J

Espectro de RMN de ^{1}H (300MHz, $CDCl_3$) do composto **25.**






Feb27-2015-injector
CIB-TA8
8.21
8.20
8.00
7.98
7.60
7.58
7.55
7.41
7.38
7.36
7.20
7.19
6.93
6.85
6.49
6.46
A (d)
8.21
J(6.44)
B (d)
7.99
J(8.28)
C (t)
7.58
J(7.37)
D (s)
7.19
E (s)
6.93
F (s)
6.85
G (d)
6.48
J(9.35)
1.00
1.37
1.36
1.70
2.70
1.28
1.40
1.35
f1 (ppm)

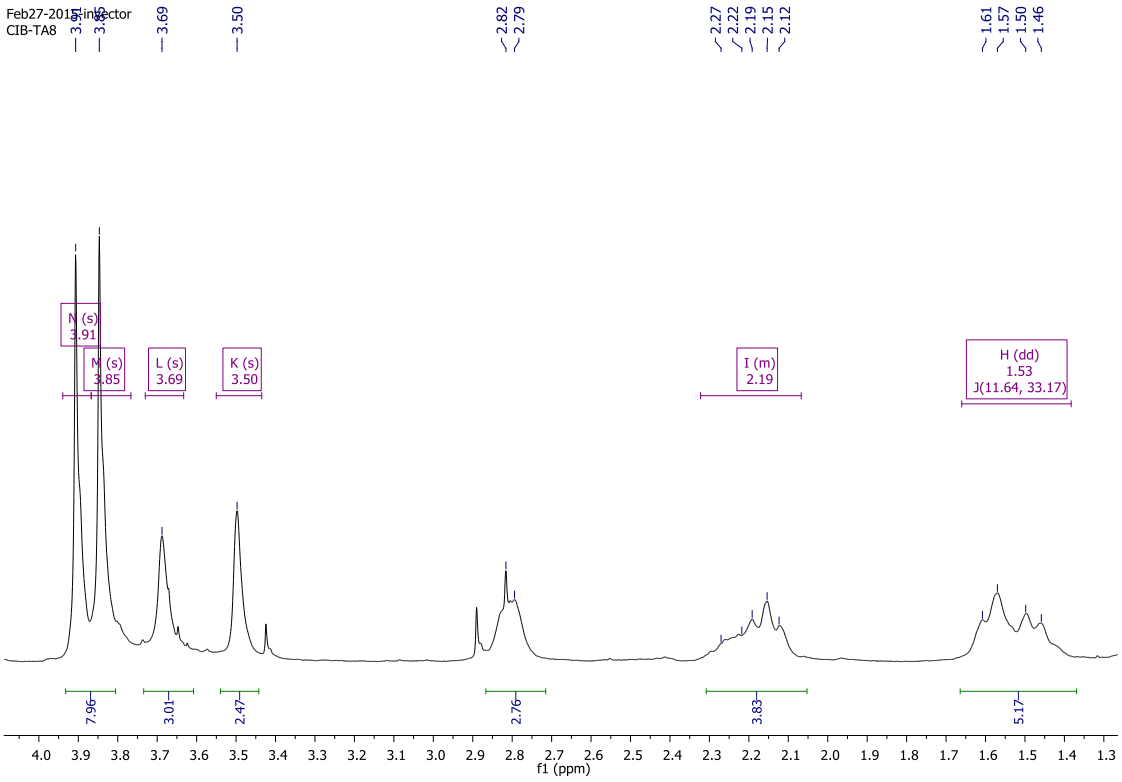

Feb27-2015-injector
CIB-TA8
3.91
3.85
3.69
3.50
2.82
2.79
2.27
2.22
2.19
2.15
2.12
1.61
1.57
1.50
1.46
N (s)
3.91
M (s)
3.85
L (s)
3.69
K (s)
3.50
I (m)
2.19
H (dd)
1.53
J(11.64, 33.17)
7.96
3.01
2.47
2.76
3.83
5.17
f1 (ppm)

Tabela de RMN de ^{1}H (CCl_3D, 300 MHz) do composto **25**.

Posição	δ_H (ppm)	integral	multiplicidade	*J*(Hz)
3	6,93	1	s	--
6	7,99	1	d	8,3
7	7,40	1	t	7,6
8	7,58	1	t	7,4
9	8,21	1	d	6,4
11	3,69	2	s	--
12ax	2,10-2,30	1	m	--
12eq	2,86- 2,75	1	m	--
13ax	1,66-1,46	1	m	--
13eq	1,66-1,46	1	m	--
14	2,10-2,30	1	m	--
15ax	1,66-1,46	1	m	--
15eq	1,66-1,46	1	m	--
16ax	2,10-2,30	1	m	--
16eq	2,86- 2,75	1	m	--
17	6,50	1	d	9,4
19	3,50	2	s	--
23	6,85	1	s	--
26	7,19	1	s	--
27	3,91	3	s	--
28	3,85	3	s	--

Espectro de RMN de ^{13}C (300MHz, $CDCl_3$) do composto **25.**

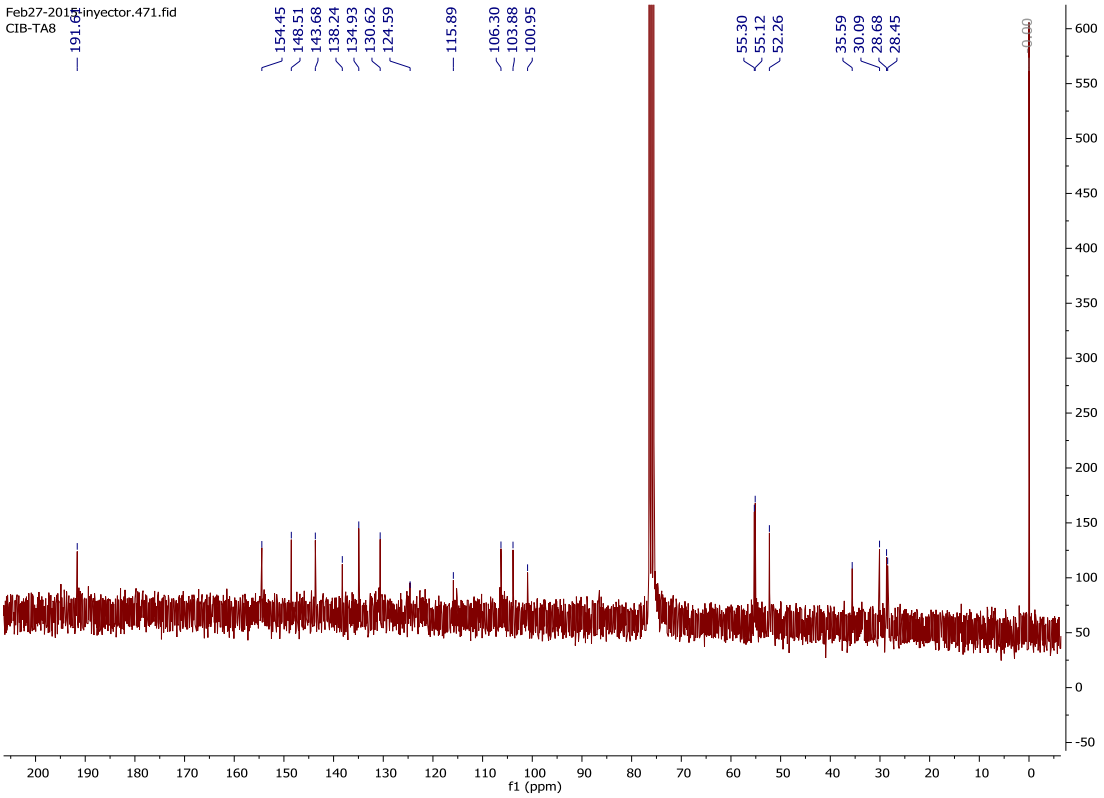
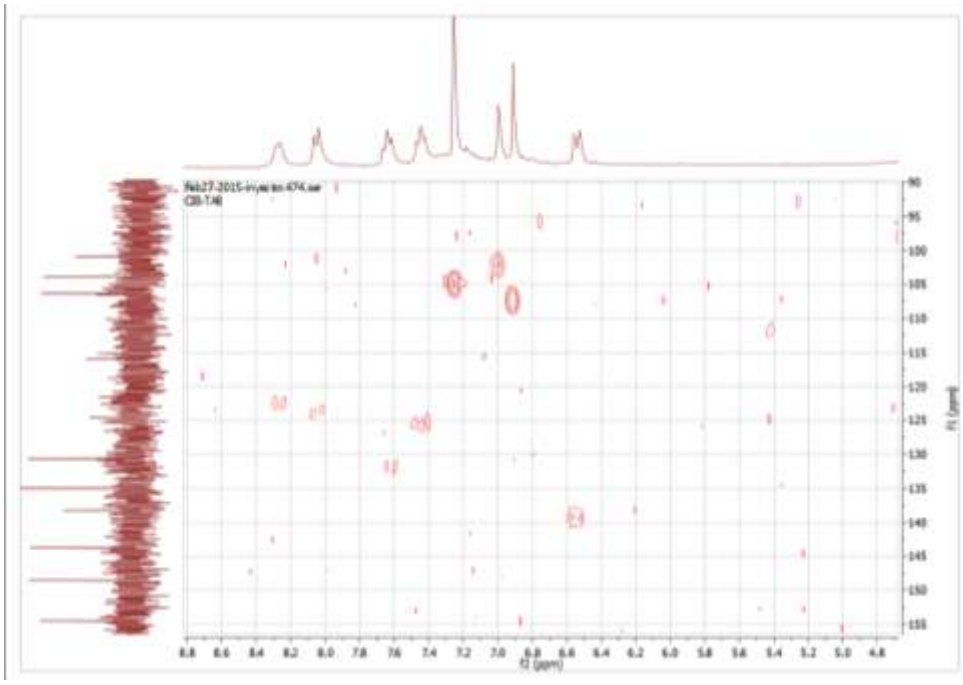


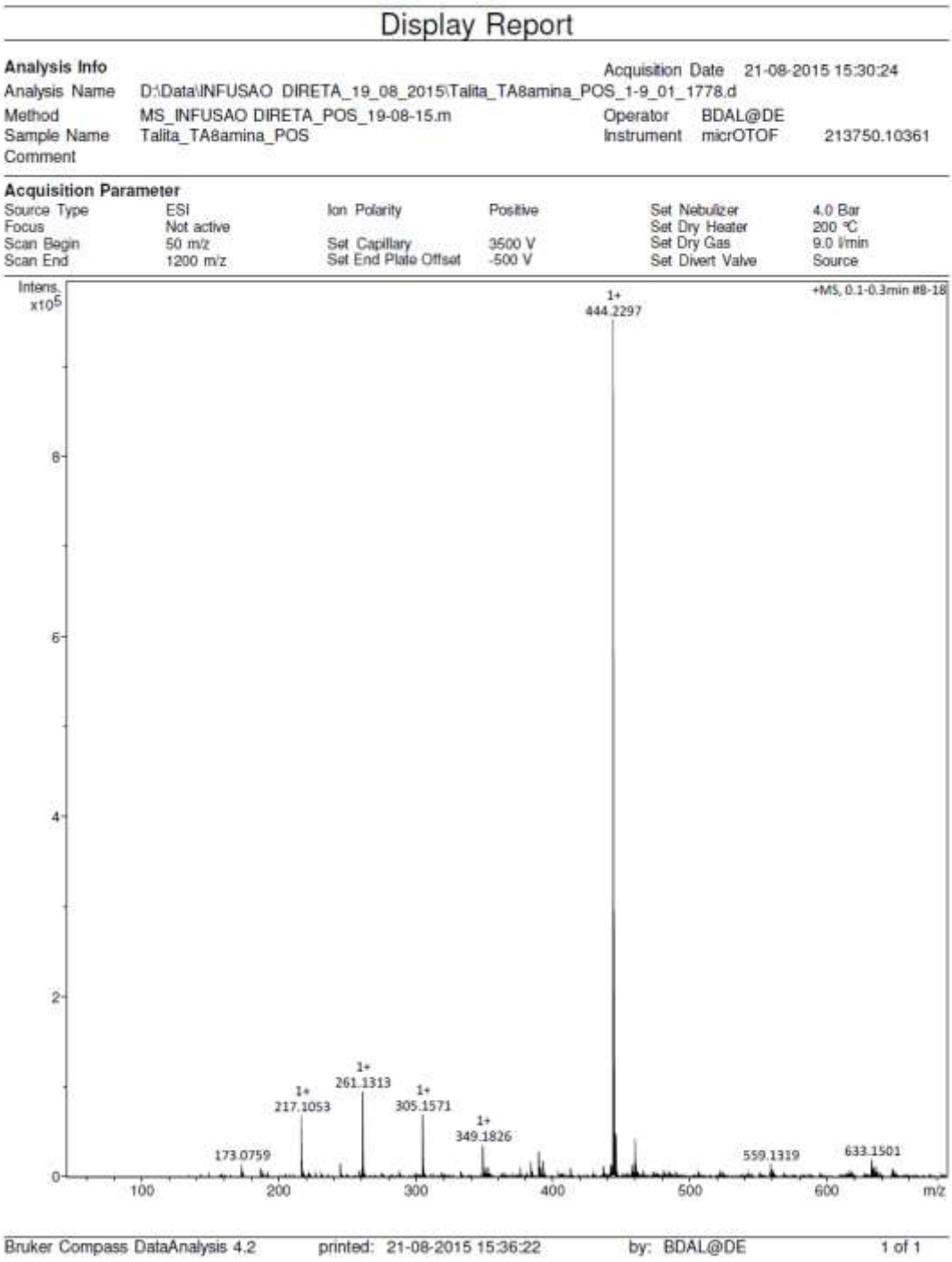
Tabela de RMN de C^{13} ($CDCl_3$, 300 MHz) do composto **25**.

Posição	δ_c (ppm)
2	?
3	101,4
4	?
5	?
6	122,1
7	124,6
8	130,6
9	121,4
10	?
11	61,4
12	52,3
13	30,1
14	35,6
15	30,1

Posição	δ_c (ppm)
16	52,3
17	138,2
18	134,9
19	28,7
20	143,7
21	132,2
22	191,6
23	106,3
24	154,4
25	148,5
26	103,9
27	55,3
28	55,1

Espectro bidimensional de correlação C-H (HSQC) (400MHz, $CDCl_3$) do composto **25.**

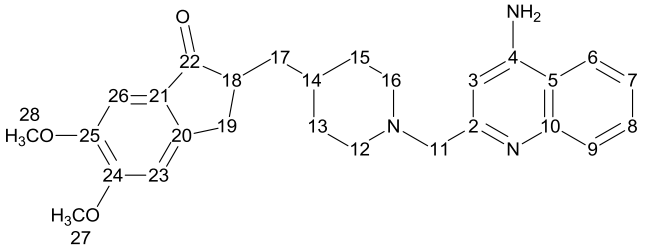


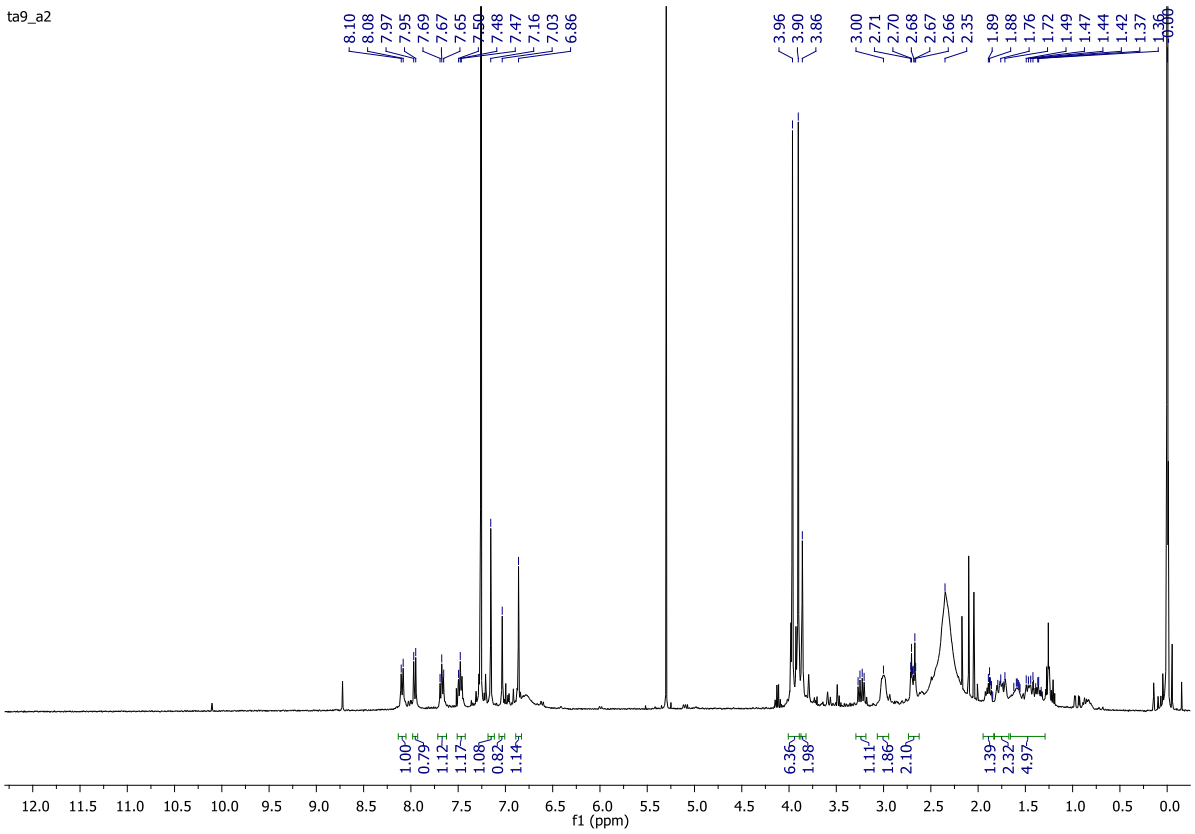


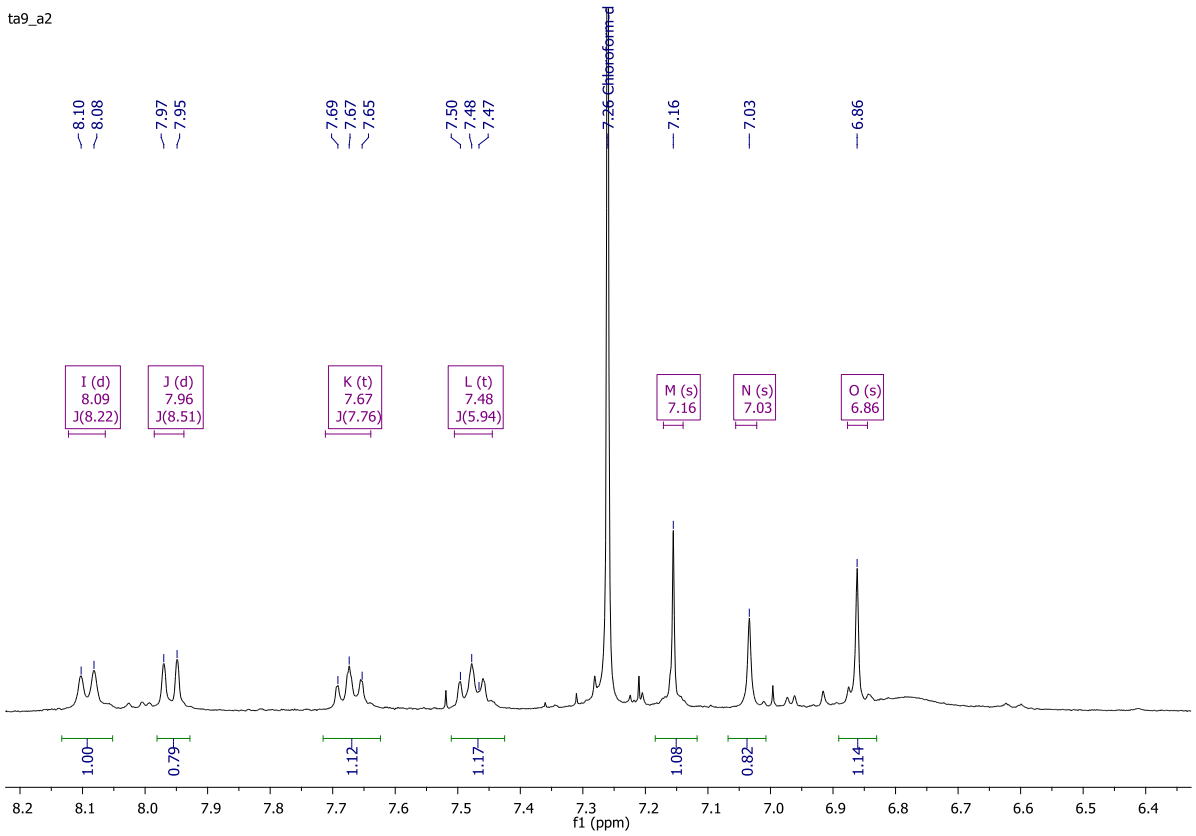
HRMS (ESI): $C_{27}H_{29}N_3O_3$ *m/z* $[M+H]^+$ calculado 444,2282, encontrado *m/z* $[M+H]^+$ 444,2297.

APÊNDICE K

Espectro de RMN de ^{1}H (400MHz, $CDCl_3$) do híbrido **3.**






ta9_a2
8.10
8.08
7.97
7.95
7.69
7.67
7.65
7.50
7.48
7.47
7.26 Chloroform-d
7.16
7.03
6.86
I (d)
8.09
J(8.22)
J (d)
7.96
J(8.51)
K (t)
7.67
J(7.76)
L (t)
7.48
J(5.94)
M (s)
7.16
N (s)
7.03
O (s)
6.86
1.00
0.79
1.12
1.17
1.08
0.82
1.14
f1 (ppm)

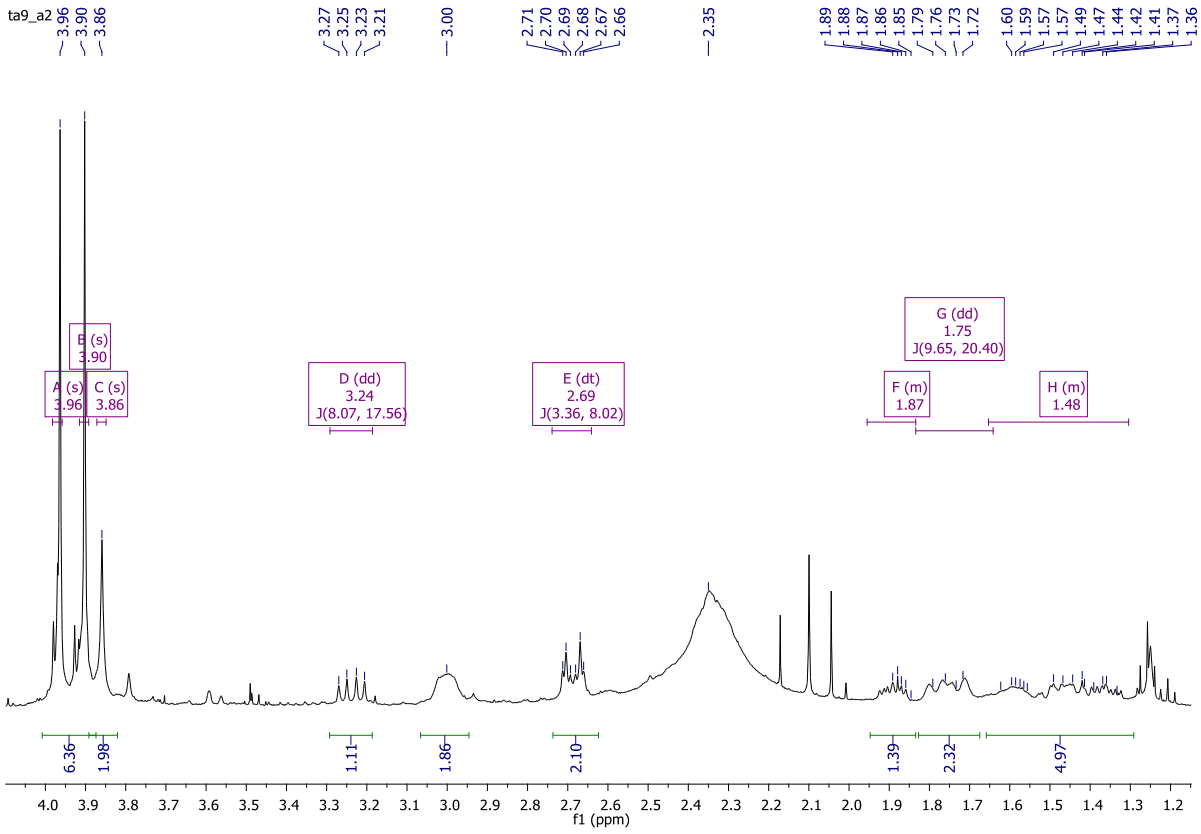
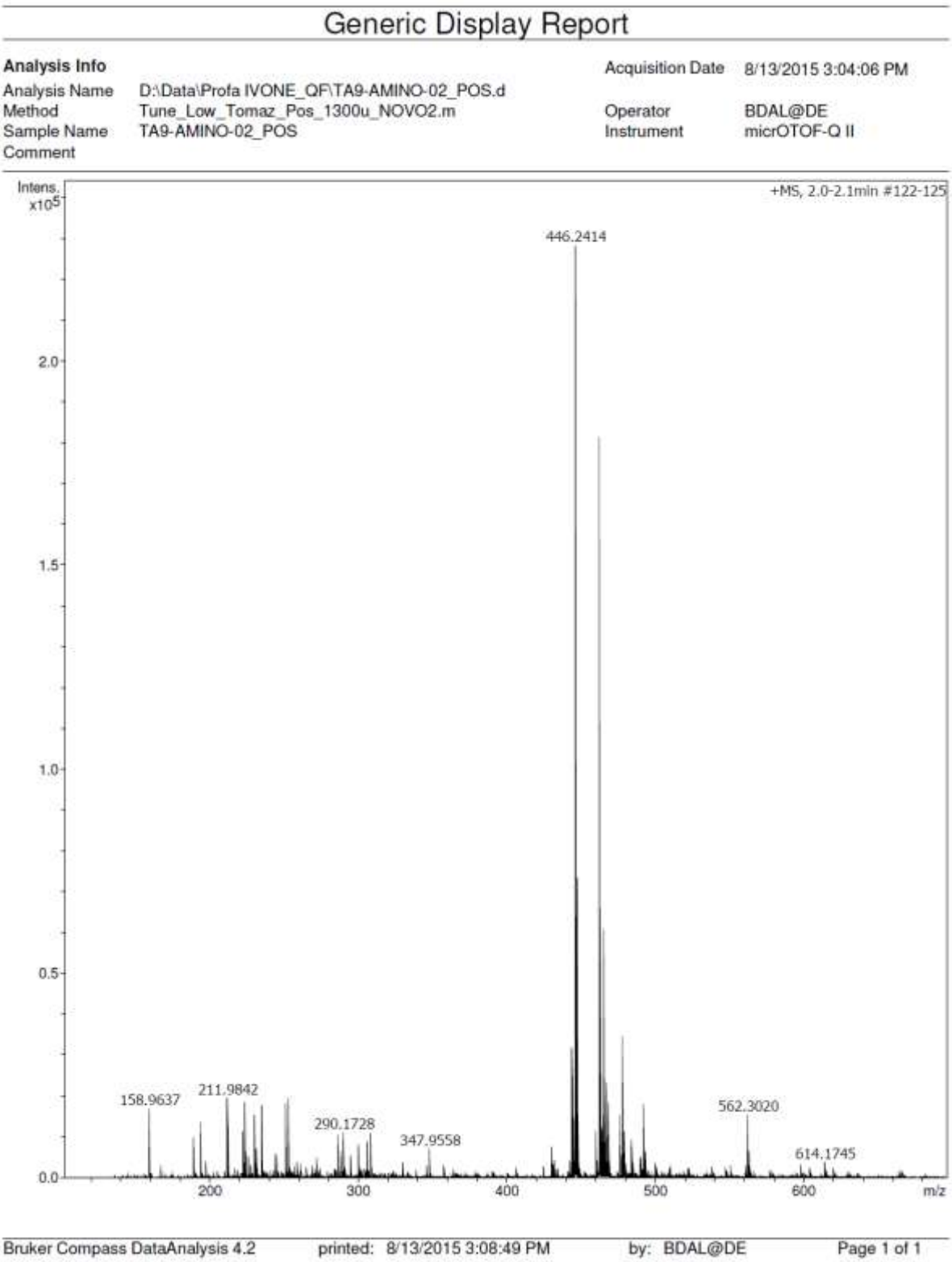

ta9_a2
3.96
3.90
3.86
3.27
3.25
3.23
3.21
3.00
2.71
2.70
2.69
2.68
2.67
2.66
2.35
1.89
1.88
1.87
1.86
1.85
1.79
1.76
1.73
1.72
1.60
1.59
1.57
1.57
1.49
1.47
1.44
1.42
1.41
1.37
1.36
B (s)
3.90
A (s)
3.96
C (s)
3.86
D (dd)
3.24
J(8.07, 17.56)
E (dt)
2.69
J(3.36, 8.02)
G (dd)
1.75
J(9.65, 20.40)
F (m)
1.87
H (m)
1.48
6.36
1.98
1.11
1.86
2.10
1.39
2.32
4.97
f1 (ppm)

Tabela de RMN ^{1}H (CCl_3D, 400 MHz) do híbrido **3**.

Posição	δ_H (ppm)	integral	multiplicidade	*J*(Hz)
3	7,03	1	s	--
6	7,96	1	d	8,5
7	7,48	1	t	5,9
8	7,67	1	d	7,7
9	8,09	1	d	8,2
11	3,86	2	s	--
12ax	2,50-2,20	1	m	--
12eq	2,90-3,10	1	m	--
13ax	1,60-1,30	1	m	--
13eq	1,75	1	dd	9,6; 13,0
14	1,60-1,30	1	m	--
15ax	1,60-1,30	1	m	--
15eq	1,75	1	dd	9,6; 13,0
16ax	2,50-2,20	1	m	--
16eq	2,90 - 3,10	1	m	--
17a	1,95-1,83	1	m	--
17b	1,60-1,30	1	m	--
18	2,69	1	dt	3,4; 8,02
19a	3,24	1	dd	17,6; 8,1
19b	2,69	1	dt	3,4; 8,02
23	7,16	1	s	--
26	6,86	1	s	--
27	3,90	3	s	--
28	3,96	3	s	--



HRMS (ESI): $C_{27}H_{31}N_3O_3$ *m/z* $[M+H]^+$ calculado 446,2438, encontrado *m/z* $[M+H]^+$ 446,2414.