

AMANDA COELHO DANUELLO

**Estudos computacionais e sintéticos visando o planejamento racional de
novos agentes anticolinesterásicos**

Tese apresentada ao Instituto de Química,
Universidade Estadual Paulista, como parte
dos requisitos para obtenção do título de
Doutor em Química.

Orientadora: Profa. Dra. Vanderlan da Silva
Bolzani
Co-orientador: Prof. Dr. Carlos Alberto
Manssour Fraga

Araraquara
2010

FICHA CATALOGRÁFICA

D195e Danuello, Amanda Coelho
Estudos computacionais e sintéticos visando o planejamento racional de novos agentes anticolinesterásicos / Amanda Coelho Danuello. – Araraquara : [s.n], 2010
165 f. : il.

Tese (doutorado) – Universidade Estadual Paulista, Instituto de Química
Orientador: Vanderlan da Silva Bolzani
Co-orientador: Carlos Alberto Manssour Fraga

1. Química medicinal. 2. Docking molecular.
3. Hibridação molecular. 4. Inibidores de acetilcolinesterase.
I. Título.

DADOS CURRICULARES

Nome: Amanda Coelho Danuello

Data de Nascimento: 05/11/1981

e-mail: danuello@yahoo.com.br

Formação:

- Doutorado em Química, área de concentração Química Orgânica / Instituto de Química – UNESP Araraquara.
Título: Estudos computacionais e sintéticos visando o planejamento racional de novos agentes anticolinesterásicos.
Orientadora: Vanderlan da Silva Bolzani.
Co-orientador: Carlos Alberto Manssour Fraga.
Bolsista CAPES. Início: março 2006 / Término previsto: agosto de 2010.
- Mestrado em Química, área de concentração Química Orgânica / Instituto de Química – UNESP Araraquara.
Título: Estudos visando a síntese de novos intermediários-chave na preparação de candidatos a inibidores de acetilcolinesterase.
Orientadora: Vanderlan da Silva Bolzani.
Co-orientador: Cláudio Viegas Júnior.
Bolsista CAPES. Conclusão em dezembro de 2005.
- Bacharelado em Química Tecnológica / Instituto de Química – UNESP Araraquara. Conclusão em dezembro de 2002.

Experiência Profissional:

- Professora (bolsista didático) na disciplina “Química Orgânica Experimental I” para os cursos de Licenciatura em Química (1º semestre de 2009) e Bacharelado em Química (2º semestre de 2009) – UNESP/Araraquara.

- Professora (bolsista didático) na disciplina “Química Orgânica I” para o curso de Farmácia/Noturno (2º semestre de 2009) – UNESP/Araraquara.
- Professora (bolsista didático) na disciplina “Química Orgânica Experimental” para o curso de Farmácia/Noturno (1º semestre de 2009) – UNESP/Araraquara.
- Supervisão científica da aluna Marília Valli (Mestrado em Química, área de concentração Química Orgânica). Início: março 2008 / Conclusão em fevereiro de 2010.
- Supervisão científica da aluna Caroline Lima de Oliveira (Iniciação científica em Química Orgânica). Apresentação da monografia em dezembro de 2008.
- Supervisão científica da aluna Marília Valli (Iniciação científica em Química Orgânica). Apresentação da monografia em dezembro de 2007.
- Conferencista na “V Jornada Científica” – Faculdade Santa Giúlia/Taquaritinga (24/10/2007) – Produtos Naturais: da Etnofarmacologia a Química Medicinal.
- Estágio em docência na disciplina “Química Orgânica III” / curso de Bacharelado em Química e Química Tecnológica (1º semestre de 2007) – UNESP/Araraquara.
- Supervisão do laboratório de pesquisa NuBBE III (Núcleo de Bioensaios, Biossíntese e Ecofisiologia de Produtos Naturais – Departamento de Orgânica – Instituto de Química – Unesp/Araraquara) de julho de 2006 a junho de 2007.
- Conferencista na “XXXI SECITAP” (Semana de Ciência e Tecnologia Agropecuária) – UNESP/Jaboticabal (02/06/2006) – Produção de fármacos através do uso da biotecnologia.
- Participante da Comissão Organizadora do “V Simpósio e V Reunião de Avaliação do Programa Biota/Fapesp”, realizado no período de 15 a 20 de novembro de 2005 – Águas de Lindóia.

- Estágio supervisionado no controle de qualidade da empresa Yoki Alimentos S/A – Marília/SP (2º semestre de 2002).

Publicações em periódicos de artigos completos:

- SERRANO, M. A. R.; PIVATTO, M.; FRANCISCO, W.; DANUELLO, A.; REGASINI, L. O.; LOPES, E. M. C.; LOPES, M. N.; YOUNG, M. C. M.; BOLZANI, V. S. Acetylcholinesterase inhibitory pyridine alkaloids of the leaves of *Senna multijuga*. *Journal of Natural Products*, v. 73, p. 482-484, 2010.
- CASTRO, N. G., COSTA, R. S., PIMENTEL, L. S. B., DANUELLO, A., ROMEIRO, N.C., VIEGAS JR., C., BARREIRO, E. J., FRAGA, C.A. M., BOLZANI, V. S., ROCHA, M. S. CNS-selective noncompetitive cholinesterase inhibitors derived from the natural piperidine alkaloid (-)-spectaline. *European Journal of Pharmacology*, v.580, p.339 - 349, 2008.
- VIEGAS JR., C., DANUELLO, A., BOLZANI, V. S., BARREIRO, E. J., FRAGA, C.A. M. Molecular Hybridization: A Useful Tool in the Design of New Drug Prototypes. *Current Medicinal Chemistry (Hilversum)*. , v.14, p.1829 - 1852, 2007.

Principais trabalhos apresentados em congresso:

- “New bioactive pyridine alkaloids from the leaves of *Senna multijuga*”. Marcos Pivatto, Welington Francisco, Maria A. R. Serrano, Amanda Danuello, Luís O. Regasini, Elaine M. C. Lopes, Maria Cláudia M. Young, Márcia N. Lopes, Vanderlan da Silva Bolzani. 7th International Congress of Pharmaceutical Sciences – CIFARP (apresentação na forma de painel).
- “Molecular modeling studies of semi-synthetic piperidine anti-Alzheimer prototypes”. The 4th Brazilian Symposium on Medicinal Chemistry (BrazMedChem 2008) – trabalho selecionado para apresentação oral.
- “Molecular modeling studies of semi-synthetic piperidine anti-Alzheimer prototypes”. Amanda Danuello, Nelilma C. Romeiro, Marcos Pivatto,

Guilherme Giesel, Hugo Verli, Newton G. Castro, Cláudio Viegas Jr., Eliezer J. Barreiro, Carlos A. M. Fraga, Vanderlan da Silva Bolzani. The 4th Brazilian Symposium on Medicinal Chemistry – BrazMedChem 2008 (apresentação na forma de painel).

- “Acetylcholinesterase inhibitors alkaloids (–)-cassine and (–)-spectaline from *Senna spectabilis* (Fabaceae)”. Marcos Pivatto, Amanda Danuello, Welington Francisco, Ian Castro-Gamboa, Cláudio Viegas Jr., Maria Cláudia M. Young, Maysa Furlan, Vanderlan da Silva Bolzani, Elaine M. C. Lopes. The 4th Brazilian Symposium on Medicinal Chemistry – BrazMedChem 2008 (apresentação na forma de painel).
- “Purificação e caracterização dos alcalóides homólogos (–)-cassina e (–)-espectralina de *Senna spectabilis* (Fabaceae)”. Marcos Pivatto, Amanda Danuello, Welington Francisco, Norberto P. Lopes, Maysa Furlan, Vanderlan da Silva Bolzani. 31^a Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química – SBQ 2008 (apresentação na forma de painel).
- “Híbridos moleculares oxipiridínicos candidatos a inibidores de acetilcolinesterase” Caroline Lima de Oliveira, Amanda Danuello, Marília Valli, Marcos Pivatto, Nelilma Romeiro, Cláudio Viegas Jr., Carlos A. M. Fraga, Vanderlan da Silva Bolzani. 31^a Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química – SBQ 2008 (apresentação na forma de painel).
- “Thiopyridine hybrids candidates to acetylcholinesterase inhibitors” Marília Valli, Amanda Danuello, Marcos Pivatto, Caroline Lima de Oliveira, Cláudio Viegas Jr., Nelilma Romeiro, Carlos A. M. Fraga, Vanderlan da Silva Bolzani. 6^o International Congress of Pharmaceutical Sciences – CIFARP 2007 (apresentação na forma de painel).
- “Screening for alkaloids and biological evaluation of *Senna* and *Cassia* species” Marcos Pivatto, Frenanda Garcia, Amanda Danuello, Maria Amélia R. Serrano, Norberto P. Lopes, Maria Cláudia M. Young, Maysa Furlan, Vanderlan da Silva Bolzani. 1st Brazilian Conference on Natural Products – BCNP 2007 (apresentação na forma de painel).

- “Docking studies of new semi-synthetic piperidine anti-alzheimer prototypes with acetylcholinesterase”. Amanda Danuello, Nelilma C. Romeiro, Cláudio Viegas Jr., Eliezer J. Barreiro, Carlos A. M. Fraga, Vanderlan da Silva Bolzani. The 3th Brazilian Symposium on Medicinal Chemistry – BrazMedChem 2006 (apresentação na forma de painel).
- “Síntese de novos intermediários-chave para a preparação de candidatos a inibidores de acetilcolinesterase”. Amanda Danuello, Cláudio Viegas Jr., Elaine M. C. Lopes, Luce B. Torres, Maria C. M. Young, Newton G. Castro, Carlos A. M. Fraga, Vanderlan da Silva Bolzani. 29^a Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química – SBQ 2006 (apresentação na forma de painel).

Outras informações:

- Classificada no concurso para docente em Química do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Estado de São Paulo (IFSP), vaga para Catanduva (junho de 2010).
- Citações em bases bibliográficas:

Web of Science Número total de citações: 25; Número de trabalhos: 3
Data: 31/07/2010; Fator H: 2

SCOPUS Número total de citações: 26; Número de trabalhos: 3
Data: 31/07/2010.


- Idioma: Inglês intermediário

AMANDA COELHO DANUELLO

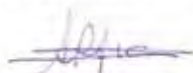
Tese apresentada ao Instituto de Química,
Universidade Estadual Paulista, como parte
dos requisitos para obtenção do título de
Doutor em Química.

Araraquara, 13 de agosto de 2010.

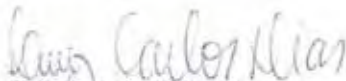
BANCA EXAMINADORA



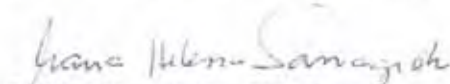
Profª Drª Vanderlan da Silva Bolzani (Orientadora)
Instituto de Química – UNESP, Araraquara



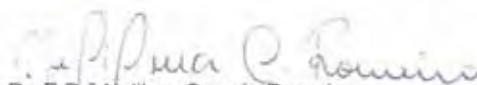
Profª Drª Angela Regina Araujo
Instituto de Química – UNESP, Araraquara



Prof. Dr. Luiz Carlos Dias
Instituto de Química – UNICAMP, Campinas



Profª Drª Maria Helena Sarragiotto
Universidade Estadual de Maringá – UEM – Maringá



Profª Drª Neilma Correia Romeiro
Núcleo de Pesquisas em Ecologia e Desenvolvimento Social de Macaé – NUPEM/UFRJ –
Macaé

*Dedico este trabalho às três pessoas que me ensinaram o que há de mais valioso na vida:
Amar plenamente.*

À minha mãe, Jane:

*“Você sempre esteve lá para mim, o vento carinhoso que me levava, uma luz no escuro
brilhando seu amor na minha vida. Você tem sido minha inspiração, em meio a mentiras
você foi a verdade. Meu mundo é um lugar melhor por sua causa... Você foi minha força
quando estive fraca, você foi minha voz quando eu não podia falar, você foi meus olhos
quando eu não podia ver, você enxergou o que há de melhor em mim, me ergueu quando eu
não conseguia alcançar, você me deu fé porque você acreditou, eu sou tudo o que sou porque
você me amou.” (trecho da música Because you loved me, composição: Diane Warren)*

Ao meu marido, Marcos:

*“No passo da estrada só faço andar, tenho meu amor pra me acompanhar... E jamais
termina meu caminhar, só o amor me ensina onde vou chegar, por onde for quero ser seu
par” (trecho da música Andança, composição: Danilo Caymmi, Edmundo Souto, Paulinho
Tabajós)*

Ao meu filho, Felipe:

*“Nem mesmo o céu, nem as estrelas, nem mesmo o mar e o infinito não é maior que meu
amor, nem mais bonito. Me desespero a procurar alguma forma de lhe falar como é grande o
meu amor por você...” (trecho da música Como é grande o meu amor por você, composição:
Roberto Carlos)*

AGRADECIMENTOS

O desenvolvimento deste trabalho envolveu momentos intensos de determinação, decepção, doação, perseverança e superação. Várias pessoas participaram destas fases me estimulando, apoiando ou servindo de modelo para minha evolução.

✓ Agradeço à minha mãe, Jane, por tudo que sou, por sempre ser o exemplo sólido de caráter, retidão e ética, mesmo nos momentos em que a maioria das pessoas se corromperia. Você é minha inspiração para tudo que ainda quero ser e ensinar para meu filho.

✓ Ao Marcos, por ser muito mais que meu marido e pai do meu filho... Por ser meu grande companheiro de trabalho e meu melhor amigo.

✓ Ao meu filho, Felipe, por me transformar em mulher de verdade. Ser mãe me deu maior responsabilidade e comprometimento com meu trabalho. Não seria uma boa profissional se não fosse mãe e não seria boa mãe se não tivesse minha profissão.

✓ À minha orientadora, Vanderlan Bolzani, pela confiança no meu trabalho, por todo suporte oferecido e principalmente pelo exemplo de profissionalismo. Tenho muito carinho, respeito e admiração por esta nordestina arretada. A você, Vanda, dedico este poema: *“Quem você pensa que é? Perguntou pra mim de queixo em pé... Sou forte, fraca, generosa, egoísta, angustiada, perigosa, infantil, astuta, aflita, serena, indecorosa, inconstante, persistente, sensata e corajosa, como é toda mulher. Poderia ter respondido, mas não lhe dei essa colher.” Martha Medeiros.*

✓ À minha família por todo amor e carinho, em especial ao meu irmão, Lucas, minhas tias Denise, Ivone e Rita e meu tio Charles.

✓ Ao meu pai, Luiz, por me mostrar minha capacidade de superação.

✓ Ao professor Carlos A. Manssour Fraga, pela co-orientação e carinho.

✓ Ao professor Eliezer J. Barreiro, que junto com o professor Manssour me receberam tão bem no LASSBio para os estudos de modelagem molecular.

✓ À professora Nelilma C. Romeiro, por ser meu “anjo” nos estudos computacionais. Sua paciência, dedicação e carinho foram essenciais para o trabalho.

- ✓ Aos professores do departamento de Química Orgânica da Unesp pelos ensinamentos. Em especial à professora Ângela pelas discussões de síntese orgânica, ao professor Ian pela amizade e exemplo de profissional dinâmico e otimista e ao professor José Eduardo Oliveira (Zelão) por despertar em mim a paixão pela docência e disponibilizar o equipamento de CG/EM.
- ✓ Ao professor Luiz Carlos Dias por me receber em seu laboratório e me auxiliar nos estudos de síntese tanto na Unicamp quanto por e-mail. Este tempo em Campinas foi fundamental para o desenvolvimento do meu trabalho. Aos doutorandos Carla Cristina Perez e Dimas José da Paz Lima por me cederem suas bancadas, vidrarias e tempo enquanto estive na Unicamp.
- ✓ Ao professor Hugo Verli e ao doutorando Guilherme M. Giesel pelos estudos de Dinâmica Molecular.
- ✓ À professora Maria Cláudia M. Young e à Maura Casari pelos ensaios anticolinesterásicos.
- ✓ Às minhas ex-alunas de iniciação científica, Marília e Carol, por me ensinarem tanto quanto eu as ensinei e à Luciene que considero um pouco minha aluna e tenho um carinho muito grande.
- ✓ Aos colegas do NuBBE pela convivência e colaborações dentro e fora do laboratório.
- ✓ Ao Alberto Alécio, Nivaldo, Marquinhos e Jorge por fazerem mais do que suas profissões os obrigam. Sem o trabalho e ajuda de vocês este trabalho não se concretizaria.
- ✓ Aos funcionários do Instituto de Química, especialmente ao pessoal da pós-graduação e da biblioteca pelo profissionalismo e agilidade.
- ✓ Aos meus amigos Adriana, Adriano, Aleks, Aline, Breno, Dani, Fer, Gra, Jana, Juliana, Luís Octávio, Marília, Marina (minha irmã), Massaro, Néia, Nina e Vlad por tudo que fizeram por mim. Eu precisaria de uma tese só para agradecer individualmente a todos vocês, por isto dedico um poema:
*“Escolho meus amigos não pela pele ou outro arquétipo qualquer, mas pela pupila. Tem que ter brilho questionador e tonalidade inquietante.
A mim não interessam os bons de espírito nem os maus de hábitos.
Fico com aqueles que fazem de mim louco e santo.
Deles não quero resposta, quero meu avesso.
Que me tragam dúvidas e angústias e agüentem o que há de pior em mim.*

Para isso, só sendo louco.

Quero os santos, para que não duvidem das diferenças e peçam perdão pelas injustiças.

Escolho meus amigos pela alma lavada e pela cara exposta.

Não quero só o ombro e o colo, quero também sua maior alegria.

Amigo que não ri junto, não sabe sofrer junto.

Meus amigos são todos assim: metade bobeira, metade seriedade.

Não quero risos previsíveis, nem choros piedosos.

Quero amigos sérios, daqueles que fazem da realidade sua fonte de aprendizagem, mas lutam para que a fantasia não desapareça.

Não quero amigos adultos nem chatos.

Quero-os metade infância e outra metade velhice!

Crianças, para que não esqueçam o valor do vento no rosto; e velhos, para que nunca tenham pressa.

Tenho amigos para saber quem eu sou.

Pois os vendo loucos e santos, bobos e sérios, crianças e velhos, nunca me esquecerei de que "normalidade" é uma ilusão imbecil e estéril."

Oscar Wilde.

✓ A Deus pela oportunidade da vida e por colocar pessoas tão incríveis no meu caminho.

✓ À FAPESP pelo apoio financeiro e a CAPES pela bolsa concedida.

“E como nasci? Por um quase. Podia ser outra. Podia ser um homem. Felizmente nasci mulher... Tenho várias caras, uma é quase bonita, outra é quase feia. Sou um o quê? Um quase tudo.”

Clarisse Lispector

RESUMO

O presente trabalho teve como objetivo o planejamento e síntese de novas substâncias inibidoras da acetilcolinesterase, enzima cuja modulação está associada ao tratamento de diversas patologias, entre elas a doença de Alzheimer. Para isto foi utilizada a técnica de *docking* molecular visando o reconhecimento dos sítios de interação da enzima que possibilitaram a modelagem de novos compostos híbridos. O modelo de *docking* foi criado utilizando a enzima de *Torpedo californica*, muito semelhante à acetilcolinesterase humana, complexada com a tacrina, donepezil e (-)-huperzina A que foi validado por *cross-docking*. Em seguida, a (-)-3-O-acetil-espectalina (**32**), (-)-3-O-acetil-cassina (**36**) e derivados virtualmente planejados foram ancorados na enzima e a partir de sobreposições destes alcalóides com os inibidores de acetilcolinesterase comerciais foram planejados diversos híbridos que apresentaram interações mais efetivas com a proteína que os modelos originais. Além disto, foram realizados estudos sobre o modo de inibição de **32**, que corroboraram os resultados obtidos *in vivo*, apresentando inibição não-competitiva. A análise por *docking* e dinâmica molecular sugeriu que **32** e **36** apresentam diferentes interações com a enzima, sendo **36** potencialmente mais ativo que **32**. O híbrido planejado por *docking* que apresentou melhor interação com a AChE, além de maior viabilidade sintética foi selecionado e por análise retrossintética foram escolhidas a 3-hidroxi-2-hidrometil-piridina (**38**) e a 4-bromoquinolina (**42**) como materiais de partida para uma rota convergente. Os estudos sintéticos levaram a obtenção de intermediários piridínicos sendo que numa das etapas da rota proposta, onde o objetivo era a proteção seletiva da hidroxila piridínica de **38**, foi observada a proteção da hidroxila metil-piridínica o que sugere a migração dos grupos acetil e benzoíl avaliados. Foram utilizadas diversas metodologias de acoplamento dos núcleos piridínico e quinolínico e na reação com o reagente de Grignard foi possível detectar o produto acoplado. Os compostos obtidos foram avaliados quanto à atividade anticolinesterásica e todos foram ativos, sendo que a 2-carbaldeído-3-hidroxibenzil-piridina (**48**) foi a que apresentou melhor perfil de inibição.

Palavras chave: Inibidor da acetilcolinesterase. *Docking* molecular. Hibridação molecular.

ABSTRACT

The goal of this research deals with the design and synthesis of new acetylcholinesterase inhibitor molecules. This enzyme is associated to the treatment of several pathologies including Alzheimer's disease and thus the importance of studying molecules that may interact with it. To fulfill this task we used molecular docking aiming to recognize the enzyme's interaction sites allowing us to design new hybrid compounds. The docking model was created using *Torpedo californica*'s enzyme, very similar to human acetylcholinesterase, complexed with tacrine, donepezil and (-)-huperzine A, all validated by *cross-docking*. Furthermore, (-)-3-O-acetyl-espectaline (**32**), (-)-3-O-acetyl-cassine (**36**) and virtually designed derivatives, were docked into the enzyme through geometric comparisons of known commercially available acetylcholinesterase inhibitors, allowing us to produce a series of enzyme effective molecular hybrids when compared to the original ones. Additionally, we studied the inhibition mode of action of **32** that confirmed the *in vivo* results showing a non-competitive inhibition. Docking and molecular dynamics of **32** and **36** revealed that they showed different enzyme interactions and that the latter compound was potentially more active than **32**. The hybrid molecule planned by docking that showed a better interaction with AChE and, with the best synthetic viability was selected showing 3-hydroxy-2-hydroxymethyl-pyridine (**38**) and 4-bromoquinoline (**42**) as the starting materials of a convergent route. The synthesis studies lead us to the production of pyridine intermediaries and, in one of the stages where the main goal was the selective protection of a pyridine hydroxyl group; we observed instead, the protection of the methyl pyridine hydroxyl moiety suggesting the migration of the acetyl and benzoyl groups. We used several coupling methods for the pyridine and quinoline nuclei and, using Grignard's reagent, we were able to detect the final coupled product. All obtained compounds were evaluated against anti-cholinesterase activity and all were active especially 2-carbaldehyde-3-hydroxybenzyl-pyridine (**48**) that showed the best inhibition profile.

Keywords: Acetylcholinesterase inhibitors. Molecular docking. Molecular hybridization.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Composto 1 no sítio ativo da enzima ECA 2. (adaptado de: HUENTELMAN et al., 2004).	31
Figura 2 - Inibidores representativos da IN.	32
Figura 3 - Modelo da IN do HIV para elvitegravir (A) e para raltegravir (B). (Fonte: TANG et al., 2010).	33
Figura 4 - Inibidores da FAS.	34
Figura 5 - Inibidores de FAS 4–8 no sítio ativo da KS (5A) e compostos 4 (verde) e 5 (azul) no sítio ativo da KS (5B). (Fonte: WANG et al., 2009).	34
Figura 6 - Quinonas selecionadas para estudos de dinâmica molecular.	35
Figura 7 - Complexos TR-9 (a) e TR-10 (b) submetidos a dinâmica molecular. (Fonte: MOLFETTA et al., 2009).	36
Figura 8 - Mecanismo de hidrólise da acetilcolina. (Adaptado de: PATRICK, 2005).	38
Figura 9 - Inibidores da acetilcolinesterase.	40
Figura 10 - Semelhança estrutural da acetilcolina com a (–)-3-O-acetil-espectalina.	40
Figura 11 - Esquema de hibridação de 11 com 15 .	41
Figura 12 - (A) Detalhe da estrutura 3D do complexo <i>TcAChE</i> -(–)-huprina X; (B) sobreposição da (–)-huprina X (azul), tacrina (branco) e (–)-huperzina A (vermelho). (Fonte: BARRIL; OROZCO; LUQUE, 2001).	42
Figura 13 - Huprina X (azul), 17c (amarelo) e 17d (rosa) no sítio ativo da <i>hAChE</i> . (Adaptado de: RONCO et al., 2009).	43
Figura 14 - Híbridos <i>IACHe</i> .	43
Figura 15 - Compostos 18a (laranja) e 18b (verde) no sítio ativo da <i>TcAChE</i> . (Fonte: ALONSO et al., 2005).	44
Figura 16 - Híbridos planejados para análise de <i>docking</i> .	44
Figura 17 - Sobreposição das estruturas da tacrina (rosa), donepezil (azul) e 8c (laranja) no sítio ativo da <i>TcAChE</i> . (Fonte: SILVA et al., 2006).	45

Figura 18 - Híbridos de 11 e 20 no sítio ativo da <i>hAChE</i> . (Adaptado de: BACHILLER et al., 2009).	46
Figura 19 - Reações químicas envolvidas no ensaio por bioautografia.	61
Figura 20 - Orientações da Phe330 (roxo) no sítio ativo da AChE para 1ACJ (A), 1EVE (B) e 1VOT (C).	64
Figura 21 - <i>TcAChE</i> complexada com tacrina (A), donepezil (B) e (-)-huperzina A.	65
Figura 22 - Substâncias inicialmente selecionadas para estudos de <i>docking</i> .	65
Figura 23 - Moléculas selecionadas como modelos para hibridação molecular, 24 (A), 23 (B) e 16a (C) no sítio ativo da <i>TcAChE</i> .	67
Figura 24 - Sobreposições do donepezil com 24 (A), 16a (B) e 23 (C).	68
Figura 25 - Híbridos do donepezil com os compostos 16a , 23 e 24 .	68
Figura 26 - Sobreposições da (-)-huperzina A com 24 (A), 16a (B) e 23 (C).	69
Figura 27 - Híbridos da (-)-huperzina A com 16a , 23 e 24 .	69
Figura 28 - Sobreposição de 11 com 24 e o híbrido desenhado 30 .	69
Figura 29 - Híbridos 29 (A) e 30 (B) no sítio ativo da <i>TcAChE</i> .	70
Figura 30 - Análogos planejados a partir dos híbridos 29 e 30 .	71
Figura 31 - Híbrido 31a no sítio ativo da AChE selecionado como alvo sintético.	72
Figura 32 - IACHes em fase pré-clínica.	73
Figura 33 - Resultados <i>in silico</i> para 32 (A) e 33 (B) e comparação com a ACh (C e D).	75
Figura 34 - Alcalóides de <i>S. spectabilis</i> e derivados semi-sintéticos.	75
Figura 35 - Compostos 36 (A) e 32 (B) no sítio ativo da <i>TcAChE</i> .	77
Figura 36 - Sobreposições dos complexos AChE- 32 e AChE- 36 .	78
Figura 37 - Gráficos de RMSF para 32 e 36 nas formas complexadas (vermelho) e descomplexadas (preto).	80
Figura 38 - Análise retrossintética do híbrido 31a .	81
Figura 39 - Rota sintética proposta para obtenção do híbrido 31a .	82

Figura 40 - CCD de 38 e produto formado na reação de oxidação (FE: sílica, FM: Hex:AcOEt (1:9), sob luz UV 365 nm).	85
Figura 41 - Proteção seletiva da hidroxila piridínica e oxidação com MnO ₂ .	90
Figura 42 - Reações de acetilação do álcool 38a .	91
Figura 43 - Correlações H–C observadas no mapa de contorno <i>g</i> HMBC de 43 .	99
Figura 44 - Correlações H–C observadas no mapa de contorno <i>g</i> HMBC de 44 .	105
Figura 45 - Derivados acetilados de 38 .	105
Figura 46 - Correlações H–C observadas no mapa de contorno <i>g</i> HMBC de 46 .	110
Figura 47 - Formação do derivado benzilado 47 .	110
Figura 48 - Correlações H–C observadas no mapa de contorno <i>g</i> HMBC de 47 .	115
Figura 49 - Reação de Swern para o álcool 47 .	115
Figura 50 - Oxidação do álcool 47 com MnO ₂ .	116
Figura 51 - Rearranjo proposto para obtenção dos produtos 44 e 46 .	119
Figura 52 - Proposta para formação de 51 .	120
Figura 53 - Reação de benzoilação do álcool 38 .	123
Figura 54 - Correlações H–C observadas no mapa de contorno <i>g</i> HMBC de 52 .	128
Figura 55 - Nova abordagem sintética.	130
Figura 56 - Reação de acoplamento da 3-bromo-quinolina com benzaldeído.	130
Figura 57 - Proposta para a formação do produto 61 .	131
Figura 58 - Cromatograma de íons totais do produto da reação com <i>t</i> -BuLi (–78 °C).	135
Figura 59 - Produtos identificados na reação com <i>t</i> -BuLi (–78 °C).	135
Figura 60 - Formação do tri-quinolil-magnesato de lítio.	137
Figura 61 - Cromatograma de íons totais do produto da reação entre 57 e 48 .	138
Figura 62 - Reações de Grignard para obtenção de 58 e 66 .	139

Figura 63 - Cromatograma de íons totais de F6–8b.	144
Figura 64 - Mapa de fragmentação de 66 .	144
Figura 65 - Acoplamento cruzado de Suzuki-Miyaura.	148
Figura 66 - Correlações H–C observadas no mapa de contorno gHMBC de 68 .	153
Figura 67 - Substâncias avaliadas no ensaio anticolinesterásico.	154
Figura 68 - Ensaio anticolinesterásico.	155

LISTA DE ESPECTROS

Espectro 1 - Espectro de RMN de ^1H do produto obtido na reação de oxidação com MnO_2 (500 MHz, CDCl_3).	83
Espectro 2 - Espectro de RMN de ^1H do produto obtido na reação de oxidação com MnO_2 após um dia (500 MHz, CDCl_3).	84
Espectro 3 - Espectro de RMN de ^1H de 41 (500 MHz, CDCl_3).	86
Espectro 4 - Ampliação do espectro de RMN de ^1H de 41 (δ 7,2–8,3).	86
Espectro 5 - Espectro de RMN de ^{13}C de 41 (125 MHz, CDCl_3).	87
Espectro 6 - Espectro de RMN de DEPT 90 de 41 (125 MHz, CDCl_3).	87
Espectro 7 - Espectro de RMN de ^1H de 37 (500 MHz, CDCl_3).	89
Espectro 8 - Espectro de RMN de ^1H do produto obtido na reação de acetilação do aldeído 41 (500 MHz, CDCl_3).	89
Espectro 9 - Espectro de RMN de ^1H de 43 (500 MHz, CDCl_3).	92
Espectro 10 - Ampliação do espectro de RMN de ^1H de 43 (δ 1,8–2,6).	93
Espectro 11 - Espectro de RMN de ^{13}C de 43 (125 MHz, CDCl_3).	93
Espectro 12 - Ampliação do espectro de RMN de ^{13}C de 43 (δ 20,0–24,0).	94
Espectro 13 - Mapa de contorno gHMQC de 43 (500 MHz; CDCl_3).	94
Espectro 14 - Mapa de contorno gHMQC de 43 (δ 19–26; 500 MHz; CDCl_3).	95
Espectro 15 - Mapa de contorno gHMQC de 43 (δ 61–64; 500 MHz; CDCl_3).	95
Espectro 16 - Mapa de contorno gHMQC de 43 (δ 123–132; 500 MHz; CDCl_3).	96
Espectro 17 - Mapa de contorno gHMBC de 43 (500 MHz; CDCl_3).	96
Espectro 18 - Mapa de contorno gHMBC de 43 (δ 142–157; 500 MHz; CDCl_3).	97
Espectro 19 - Mapa de contorno gHMBC de 43 (δ 124–171; 500 MHz; CDCl_3).	97

Espectro 20 - Mapa de contorno gHMBC de 43 (δ 131–158; 500 MHz; CDCl ₃).	98
Espectro 21 - Mapa de contorno gHMBC de 43 (δ 143–172; 500 MHz; CDCl ₃).	98
Espectro 22 - Espectro de RMN de ¹ H de 44 (500 MHz, CDCl ₃).	100
Espectro 23 - Espectro de RMN de ¹³ C de 44 (125 MHz, CDCl ₃).	101
Espectro 24 - Mapa de contorno gHMQC de 44 (500 MHz; CDCl ₃).	101
Espectro 25 - Mapa de contorno gHMQC de 44 (δ 122–132; 500 MHz; CDCl ₃).	102
Espectro 26 - Mapa de contorno gHMQC de 44 (δ 17–27; 500 MHz; CDCl ₃).	102
Espectro 27 - Mapa de contorno gHMBC de 44 (500 MHz; CDCl ₃).	103
Espectro 28 - Mapa de contorno gHMBC de 44 (δ 124–180; 500 MHz; CDCl ₃).	103
Espectro 29 - Mapa de contorno gHMBC de 44 (δ 139–180; 500 MHz; CDCl ₃).	104
Espectro 30 - Espectro de RMN de ¹ H de 45 (500 MHz, CDCl ₃).	106
Espectro 31 - Espectro de RMN de ¹ H de 46 (500 MHz, CDCl ₃).	107
Espectro 32 - Ampliação do espectro de RMN de ¹ H de 46 (δ 7,14–8,16).	107
Espectro 33 - Espectro de RMN de ¹³ C de 46 (125 MHz, CDCl ₃).	108
Espectro 34 - Mapa de contorno gHMBC de 46 (500 MHz; CDCl ₃).	108
Espectro 35 - Mapa de contorno gHMBC de 46 (δ 124–155; 500 MHz; CDCl ₃).	109
Espectro 36 - Espectro de RMN de ¹ H de 47 (500 MHz, CDCl ₃).	111
Espectro 37 - Espectro de RMN de ¹³ C de 47 (125 MHz, CDCl ₃).	111
Espectro 38 - Mapa de contorno gHMQC de 47 (500 MHz; CDCl ₃).	112
Espectro 39 - Mapa de contorno gHMQC de 47 (δ 116–142; 500 MHz; CDCl ₃).	112
Espectro 40 - Mapa de contorno gHMBC de 47 (500 MHz; CDCl ₃).	113

Espectro 41 - Mapa de contorno gHMBC de 47 (δ 119–155; 500 MHz; CDCl ₃).	113
Espectro 42 - Mapa de contorno gHMBC de 47 (δ 65–75; 500 MHz; CDCl ₃).	114
Espectro 43 - Espectro de RMN de ¹ H de 48 (500 MHz, CDCl ₃).	116
Espectro 44 - Espectro de RMN de ¹³ C de 48 (125 MHz, CDCl ₃).	117
Espectro 45 - Espectro de RMN de DEPT 135 de 48 (125 MHz, CDCl ₃).	117
Espectro 46 - Espectro de RMN de ¹ H de 50 (500 MHz, CDCl ₃).	121
Espectro 47 - Espectro de RMN de ¹³ C de 50 (125 MHz, CDCl ₃).	122
Espectro 48 - Ampliação do espectro de RMN de ¹³ C de 50 (δ 129-180, 125 MHz, CDCl ₃).	122
Espectro 49 - Espectro de RMN de ¹ H de 52 (500 MHz, CDCl ₃).	124
Espectro 50 - Ampliação do espectro de RMN de ¹ H de 52 (δ 7,1–8,2; 500 MHz, CDCl ₃).	124
Espectro 51 - Espectro de RMN de ¹³ C de 52 (125 MHz, CDCl ₃).	125
Espectro 52 - Ampliação do espectro de RMN de ¹³ C de 52 (δ 125–170, 125 MHz, CDCl ₃).	125
Espectro 53 - Mapa de contorno gHMBC de 52 (500 MHz; CDCl ₃).	126
Espectro 54 - Mapa de contorno gHMBC de 52 (δ 130–175; 500 MHz; CDCl ₃).	126
Espectro 55 - Mapa de contorno gHMBC de 52 (δ 120–170; 500 MHz; CDCl ₃).	127
Espectro 56 - Espectro de RMN de ¹ H da mistura dos dois derivados benzoilados (500 MHz, CDCl ₃).	129
Espectro 57 - Espectro de RMN de ¹ H da mistura dos dois derivados benzoilados (δ 5,4–8,6; integrais comparativas, 500 MHz, CDCl ₃).	129
Espectro 58 - Espectro de RMN de ¹ H de 61 (500 MHz, CDCl ₃).	131

Espectro 59 - Ampliação do espectro de RMN de ^1H de 61 (δ 0–2,1; 500 MHz, CDCl_3).	132
Espectro 60 - Ampliação do espectro de RMN de ^1H de 61 (δ 7,1–8,0; 500 MHz, CDCl_3).	132
Espectro 61 - Espectro de RMN de ^{13}C de 61 (125 MHz, CDCl_3).	133
Espectro 62 - Espectro de RMN de DEPT 135 de 61 (125 MHz, CDCl_3).	133
Espectro 63 - Espectro de RMN de DEPT 90 de 61 (125 MHz, CDCl_3).	134
Espectro 64 - EM da banda com tr 10,65 min.	135
Espectro 65 - EM da banda com tr 16,08 min.	136
Espectro 66 - EM da banda com tr 16,34 min.	136
Espectro 67 - EM da banda com tr 21,56 min.	136
Espectro 68 - EM da banda com tr 35,51 min.	136
Espectro 69 - EM da banda com tr 15,89 min.	138
Espectro 70 - EM da banda com tr 23,63 min.	138
Espectro 71 - Espectro de RMN de ^1H de 60 (500 MHz, CDCl_3).	140
Espectro 72 - Ampliação do espectro de RMN de ^1H de 60 (δ 7,3–8,9; 500 MHz, CDCl_3).	140
Espectro 73 - Espectro de RMN de ^1H de F6–8 (500 MHz, CDCl_3).	142
Espectro 74 - Espectro de RMN de DEPT 135 de F6–8 (125 MHz, CDCl_3).	142
Espectro 75 - Espectro de RMN de ^1H de F6–8b (500 MHz, CDCl_3).	143
Espectro 76 - EM da banda com tr 40,28 min.	144
Espectro 77 - Mapa de contorno gHSQC de F6–8b (δ 66–80; 500 MHz; CDCl_3).	145
Espectro 78 - Mapa de contorno gHSQC no modo positivo de F6–8b (δ 66–80; 500 MHz; CDCl_3).	146
Espectro 79 - Mapa de contorno gHSQC no modo negativo de F6–8b (δ 66–80; 500 MHz; CDCl_3).	146
Espectro 80 - Mapa de contorno gHMBC de F6–8b (δ 65–74; 500 MHz; CDCl_3).	147
Espectro 81 - Espectro de RMN de ^1H de 68 (500 MHz, CD_3OD).	149

Espectro 82 - Espectro de RMN de ^{13}C de 68 (125 MHz, CD_3OD).	149
Espectro 83 - Ampliação do espectro de RMN de ^{13}C de 68 (δ 129–157, 125 MHz, CD_3OD).	150
Espectro 84 - Espectro de DEPT 135 de 68 (125 MHz, CD_3OD).	150
Espectro 85 - Mapa de contorno gHMBC de 68 (500 MHz; CD_3OD).	151
Espectro 86 - Mapa de contorno gHMBC de 68 (δ 124–160; 500 MHz; CD_3OD).	151
Espectro 87 - Mapa de contorno gHMBC de 68 (δ 70–76; 500 MHz; CD_3OD).	152
Espectro 88 - Mapa de contorno gHMBC de 68 (δ 125–160; 500 MHz; CD_3OD).	152

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Experimentos realizados de <i>self</i> e <i>cross-docking</i>	63
Tabela 2 - Valores de $\Delta G_{\text{ligação}}$ (kJ/mol) para 16 e análogos planejados	66
Tabela 3 - Valores de $\Delta G_{\text{ligação}}$ (kJ/mol) para os híbridos planejados	70
Tabela 4 - Valores de $\Delta G_{\text{ligação}}$ (kJ/mol) para os análogos dos híbridos 29 e 30	71
Tabela 5 - Energia de interação entre os compostos 32, 36 e AChE em kJ/mol	79
Tabela 6 - Dados de RMN ^1H e ^{13}C de 41 (CDCl_3)	88
Tabela 7 - Dados de RMN de 43 (CDCl_3)	99
Tabela 8 - Dados de RMN de 44 (CDCl_3)	104
Tabela 9 - Dados de RMN de 46 (CDCl_3)	109
Tabela 10 - Dados de RMN de 47 (CDCl_3)	114
Tabela 11 - Dados de RMN ^1H e ^{13}C de 48 (CDCl_3)	118
Tabela 12 - Reações de proteção com benzil e acetato	120
Tabela 13 - Dados de RMN de 52 (CDCl_3)	127
Tabela 14 - Dados de RMN ^1H e ^{13}C de 61 (CDCl_3)	134
Tabela 15 - Dados de RMN ^1H de 60 (CDCl_3)	141
Tabela 16 - Dados de RMN de 68 (CDCl_3)	153
Tabela 17 - Valores de R_f para os halos de inibição da AChE	155

LISTA DE ABREVIATURAS

AcBr – brometo de acetila
AcCl – cloreto de acetila
Ac₂O – anidrido acético
ACh – acetilcolina
AChE – acetilcolinesterase
AcOEt – acetato de etila
BH₃-THF – complexo borano-tetraidrofurano
BnBr – brometo de benzila
BnCl – cloreto de benzila
BzBr – brometo de benzoíla
BOC – *tert*-butoxicarbonil
CC – Cromatografia em Coluna
CCD – Cromatografia em Camada Delgada
CG/EM – Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrômetro de Massas
d – dubleto
DA – Doença de Alzheimer
dd – duplo dubleto
ddd – duplo duplo dubleto
DEPT – Distortionless enhancement by polarization transfer
DM – Dinâmica Molecular
DMSO – dimetilsulfóxido
ECA2 – enzima conversora da angiotensina 2
EM – Espectro de Massas
FAS – ácido graxo sintase
FB – Fragmento Base
FDA – Food and drug administration
FE – Fase Estacionária
FM – Fase Móvel
gHMBC – Gradient Heteronuclear Multiple Bond Correlation
gHMQC – Gradient Heteronuclear Multiple Quantum Correlation
gHSQC – Gradient Heteronuclear Single Quantum Correlation
GR – glutationa redutase

GSH – tiol glutationa
hAChE – acetilcolinesterase humana
Hex – hexano
HM – hibridação molecular
IAChE – inibidores de acetilcolinesterase
IN – enzima integrase
J – constante de acoplamento (em Hertz)
KS – cetoacil sintase
LASSBio – Laboratório de Avaliação e Síntese de Substâncias Bioativas
M – metal
m – multiplete
MeOH – metanol
m/z – relação massa–carga
n-BuLi – *n*-butil-lítio
n-BuMgCl – cloreto de *n*-butil-magnésio
NuBBE – Núcleo de Bioensaios, Biossíntese e Ecofisiologia de Produtos Naturais
PdCl₂ (dppf) – 1,1'-bis(difenilfosfino)ferroceno-dicloro-paládio II
PDB – Protein Data Bank
PFV – prototype foamy vírus
R_f – fator de retenção
RMN de ¹³C – Ressonância Magnética Nuclear de Carbono 13
RMN de ¹H – Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio
RMSD – Root Mean Squared Deviation
RMSF – Root Mean Squared Fluctuation
s – singleto
sex – sexteto
sl – singleto largo
t – tripleto
t.a. – temperatura ambiente
TBAH – hidrogenossulfato de tetrabutilamônio
TBDPSCI – cloreto de terc-butil-difenil-silano
TcAChE – acetilcolinesterase de *Torpedo californica*
t-BuLi – *terc*-butil-lítio

TMS – tetrametilsilano

tr – tempo de retenção

TR – tripanotona redutase

δ – deslocamento químico em relação ao TMS (expresso em ppm)

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	30
1.1	Modelagem Molecular aplicada ao planejamento de novos inibidores de acetilcolinesterase	37
2	OBJETIVOS	47
3	MATERIAIS E MÉTODOS	47
3.1	Estudos Computacionais para o planejamento do alvo sintético	47
3.2	Estudos Computacionais dos IChE descobertos no NuBBE	49
3.3	Reagentes, solventes e instrumentação	50
3.4	Reações	52
3.4.1	Oxidação da 3-hidroxi-2-hidroximetil-piridina (38)	52
3.4.1.1	Metodologia proposta por Wang et al. (1990)	52
3.4.1.2	Metodologia proposta por Heinert e Martell (1959)	52
3.4.2	Acetilação da 2-carbaldeído-3-hidroxi-piridina (41)	53
3.4.3	Reações de proteção da hidroxila piridínica da 3-hidroxi-2-hidroximetil-piridina (38)	53
3.4.3.1	Grupos protetores acetil e TBDPS	53
3.4.3.2	Reação de proteção com benzil	55
3.4.4	Oxidação da 2-hidroximetil-3-oxibenzil-piridina (47)	55
3.4.4.1	Reação de Swern	55
3.4.4.2	Reação com dióxido de manganês	56
3.4.5	Acetilação do ácido 3-hidroxi-picolínico (49)	56
3.4.6	Redução do ácido 3-oxiacetil-picolínico (50) com BH ₃ .THF	57
3.4.7	Acoplamentos com organolítio e organomagnésio	57
3.4.7.1	Reação com <i>n</i> -butil-lítio	57
3.4.7.2	Reação com <i>terc</i> -butil-lítio	58
3.4.7.3	Reação com tributilmagnesato de lítio	58
3.4.7.4	Reação de Grignard	58
3.4.7.5	Titulações dos organolítios e organomagnésio comerciais	59
3.4.8	Halogenação da 2-hidroximetil-3-oxibenzil-piridina (47)	59
3.4.9	Preparação do 3-quinolinil-trifluorborato de potássio (67)	60

3.5 Avaliação da atividade anticolinesterásica	60
3.5.1 Preparo das soluções	61
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	62
4.1 Planejamento do alvo sintético através dos estudos de modelagem molecular	62
4.2 Estudos Computacionais dos IChE descobertos no NuBBE	73
4.2.1 Análise do modo de inibição dos derivados semi-sintéticos	73
4.2.2 Avaliação da inibição da AChE pela (-)-3-O-acetil-espectalina e (-)-3-O-acetil-cassina	75
4.2.2.1 Estudos de <i>docking</i> molecular para os derivados 32 e 36	76
4.2.2.2 Estudos de Dinâmica Molecular	77
4.3 Síntese	81
4.4 Avaliação da atividade anticolinesterásica	154
5 CONCLUSÕES	156
REFERÊNCIAS	158

1 INTRODUÇÃO

O uso da química combinatória e das técnicas de *screening* em larga escala para a descoberta de novas substâncias protótipos busca sintetizar milhares de substâncias e avaliá-las farmacologicamente (YUNES; CALIXTO, 2001), enquanto que o paradigma atual das indústrias farmacêuticas visa reduzir tempo e custos no desenvolvimento de novos fármacos. Dentro deste universo, as pesquisas farmacêuticas caminham para processos mais racionais que levem a novas entidades químicas (NEQs) com perfis biológicos desejáveis. Neste contexto, estratégias racionais baseadas na compreensão das interações ligante-proteína são empregadas no desenvolvimento de protótipos de fármacos (GUIDO; OLIVA; ANDRICOPULO, 2008).

A aplicação da modelagem molecular no planejamento de novos fármacos vem crescendo continuamente nos últimos anos. No entanto, é importante destacar que a utilização de programas computacionais é apenas uma parte do complexo processo para se chegar a uma substância protótipo. A modelagem de compostos bioativos envolve o trabalho de uma equipe multidisciplinar que emprega um grande conjunto de métodos computacionais sistematizado de forma a facilitar e otimizar o processo de desenvolvimento destes compostos, em conjunção com a síntese orgânica e avaliação farmacológica e toxicológica (SANT'ANNA, 2009).

Metodologias computacionais que ancoram moléculas de baixo peso molecular em alvos macromoleculares e medem a complementaridade nos sítios de ligação (*docking* molecular) são amplamente utilizadas na identificação e otimização de substâncias bioativas. Existe um considerável número de fármacos que tiveram suporte nos estudos computacionais em alguma etapa de seu desenvolvimento, como planejamento baseado na estrutura da enzima ou estratégias de *screening*, como inibidores de protease (KITCHEN et al., 2004).

Estas técnicas apresentam algumas limitações, como por exemplo a contribuição dos efeitos hidrofóbicos decorrentes da dessolvatação dos ligantes e interações eletrostáticas, que não são consideradas adequadamente nas medidas de *docking* e podem ser significativamente relevantes para interação ligante-receptor. Além disto, a técnica de *docking* não considera todas as

moléculas de água, que muitas vezes estão diretamente envolvidas nas interações micro-macromolécula e podem influenciar significativamente na posição dos ligantes no sítio ativo da enzima. Portanto, para seleção eficiente de um protótipo, não se deve confiar somente nos dados computacionais, a experiência e a intuição do profissional qualificado ainda são as chaves do sucesso. (KITCHEN et al., 2004).

Um exemplo da aplicação da técnica *docking* molecular no *screening* de milhares de moléculas foi descrito por Huentelman et al, 2004, onde o objetivo era identificar possíveis inibidores da enzima conversora da angiotensina 2 (ECA 2). Esta enzima apresenta grande impacto no sistema cardiovascular, já que catalisa a produção de peptídeos vasodilatadores e é responsável por contrabalancear os potentes efeitos vasoconstritores da angiotensina II. Portanto, a modulação da ECA 2 é um dos alvos para desenvolvimento de novos fármacos anti-hipertensivos. Para este estudo, aproximadamente 140.000 compostos com peso molecular menor que 500 g/mol retiradas da base *The National Cancer Institute/Development Therapeutics Program* (NCI/DTP) foram ancorados na enzima ECA 2. Cada composto foi posicionado no sítio ativo da enzima em 100 orientações sendo a energia de interação entre a substância e a enzima calculada para cada orientação (HUENTELMAN et al., 2004).

O composto com melhor energia ($\Delta G_{\text{ligação}} = -23,7$ Kcal/mol) foi a *N*-(2-aminoetil)-1-aziridina-etanamina (**1**, Figura 1) e foi identificado como um potencial inibidor desta enzima, sendo uma molécula atrativa para os estudos posteriores sobre a modulação da hipertensão (HUENTELMAN et al., 2004).

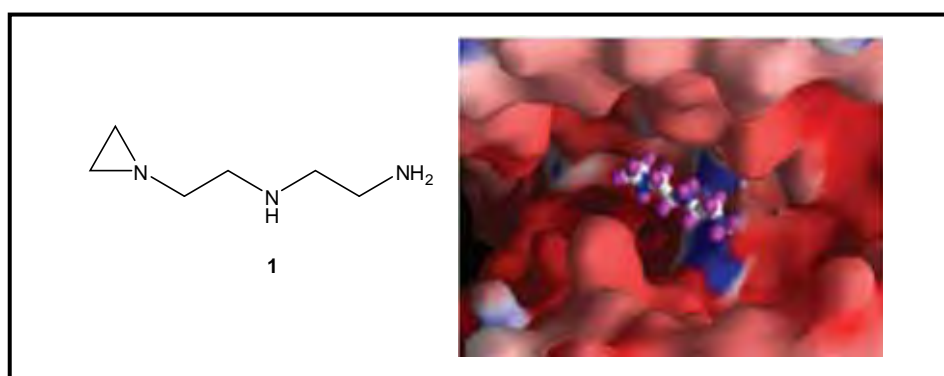


Figura 1 - Composto 1 no sítio ativo da enzima ECA 2. (adaptado de: HUENTELMAN et al., 2004).

Uma das patologias de maior impacto sócio-econômico e que necessita de novas alternativas terapêuticas é a síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS) e um dos alvos para a modulação desta doença é a enzima integrase (IN). A integração do DNA viral dentro do genoma é um passo definitivo durante a replicação do vírus da imunodeficiência humana (HIV) e este processo é catalisado pela IN. Dois inibidores da IN são o elvitegravir (**2**) e o raltegravir (**3**, Figura 2), sendo o segundo o único inibidor da IN aprovado pelo FDA (Food and Drug Administration) (TANG et al., 2010).

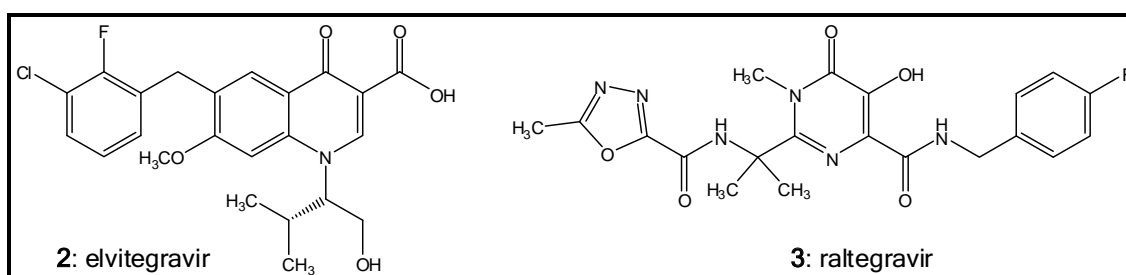


Figura 2 - Inibidores representativos da IN.

Recentemente, foi publicada a primeira estrutura cristalina da IN do DNA-ligante retroviral (HARE et al., 2010), o que levou Tang et al., 2010, a construir novos modelos de *docking* para IN do HIV. Como as estruturas de **2** e **3** sugerem diferentes mecanismos de inibição, dois modelos foram construídos baseados nas estruturas cristalográficas originais da IN do retrovírus *prototype foamy virus* (PFV), semelhante ao HIV (TANG et al., 2010).

Os modelos para HIV foram construídos por homologia ao PFV. A sequência de aminoácidos foi alinhada por modelos de homologia baseados nas estruturas secundárias da IN do PFV e HIV. Estes modelos podem ser úteis no desenvolvimento de novos inibidores da IN do HIV. A Figura 3 ilustra **2** e **3** nos modelos obtidos (TANG et al., 2010).

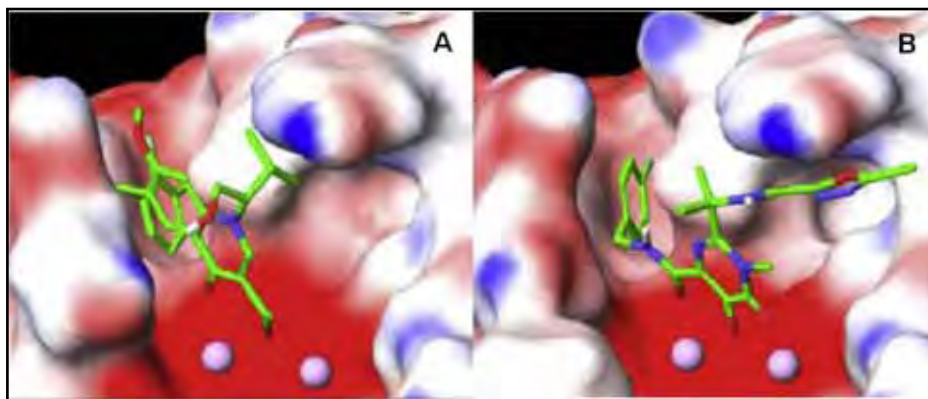


Figura 3 - Modelo da IN do HIV para elvitegravir (A) e para raltegravir (B). (Fonte: TANG et al., 2010).

Outra enzima interessante para os estudos de modelagem molecular é a ácido graxo sintase (FAS), que é um complexo multi-enzimático formado por sete proteínas, sendo um alvo atrativo no tratamento da obesidade e câncer (WANG et al., 2009). Entre estas sete proteínas, está a cetoacil sintase (KS) que é considerada o alvo do C75 (**4**, Figura 4), um inibidor de FAS. Neste contexto, Wang et al., 2009, planejaram e sintetizaram uma série de análogos de **4** (Figura 4) que foram analisados por *docking* molecular.

Os estudos de *docking* revelaram que a cadeia carbônica saturada destes compostos está ajustada na região da proteína representada pelos resíduos Ala162, Tyr224, Val263, Phe202, Phe258 e Glu335 e o grupo lactona interage com a região formada pelos resíduos Ser114, Cys163, Pro336 e Phe397 (WANG et al., 2009).

As estruturas **6** e **7** (Figura 4) apresentam grupos metílicos em C-5, que são desfavoráveis para a atividade, pois eles diminuem a hidrofiliabilidade das lactonas e enfraquecem as interações $\pi-\pi$. Além disto, os grupos metílicos conferem um bloqueio estérico que impede as ligações de hidrogênio entre o grupo carboxílico e a proteína (WANG et al., 2009).

Na estrutura **8**, as interações $\pi-\pi$ não foram afetadas, devido às características planares da molécula, mas a atividade inibitória da FAS diminuiu, provavelmente, pela adição do grupo aromático que diminuiu a hidrofiliabilidade da lactona (WANG et al., 2009).

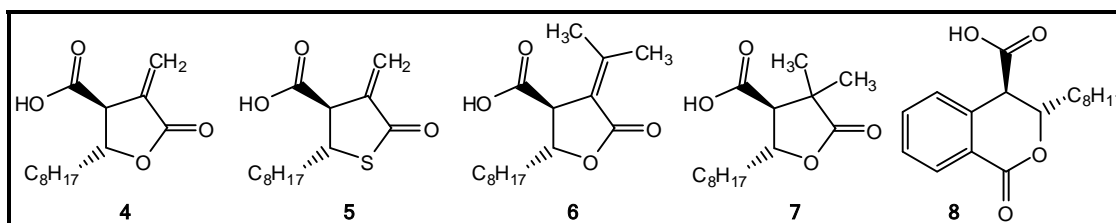


Figura 4 - Inibidores da FAS.

A Figura 5A ilustra os compostos **4–8** no sítio ativo da KS e a Figura 5B representa o composto **5** (azul), que foi o mais ativo da série, e C75 (**4**, verde) no sítio ativo da proteína. As ligações de hidrogênio estão representadas por linhas vermelhas e os comprimentos destas ligações por números vermelhos (Figura 5B) (WANG et al., 2009).

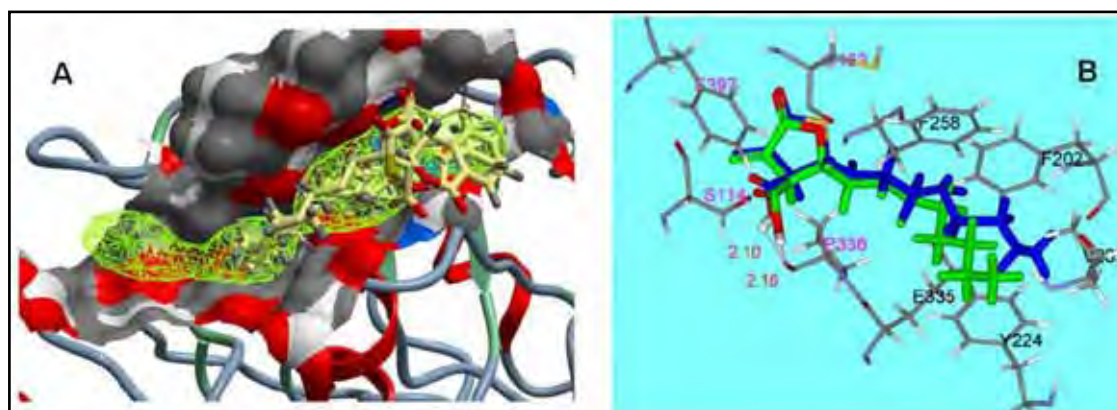


Figura 5 - Inibidores de FAS **4–8** no sítio ativo da KS (5A) e compostos **4** (verde) e **5** (azul) no sítio ativo da KS (5B). (Fonte: WANG et al., 2009).

Estudos de *docking* molecular também podem ser aplicados ao desenvolvimento de novas substâncias úteis no tratamento de doenças negligenciadas como a Doença de Chagas. Esta patologia é causada pelo *Trypanosoma cruzi* sendo uma das doenças parasitárias mais letais nos trópicos e subtropicais da América do Sul, causando em torno de 50.000 mortes por ano. Atualmente, existem entre 16 e 18 milhões de indivíduos infectados pela doença de Chagas (MOLFETTA et al., 2009).

A quimioterapia desta patologia se limita somente a dois fármacos (nifurtimox e benznidazol), que apresentam sérios efeitos colaterais e são ativos somente na fase aguda da doença. Portanto, existe uma necessidade

urgente de novas alternativas terapêuticas mais eficazes (MOLFETTA et al., 2009).

Na maioria dos organismos, a tiol glutationa (GSH) é utilizada para proteger as células das espécies reativas de oxigênio, que surgem como resultado da respiração aeróbica e resposta auto-imune a infecções. Os níveis de GSH são mantidos pela ação da enzima glutationa redutase (GR) e na doença de Chagas, o sistema GR/GSH é substituído pelo sistema análogo tripanotona/ tripanotona redutase (TR) (DIXON, 2005). Estas duas enzimas, GR e TR, são muito semelhantes, porém apresentam substratos naturais específicos para cada uma delas. Consequentemente TR representa um alvo promissor no desenvolvimento de fármacos tripanocidas (LUCA, 2003).

Molfetta et al. (2009) utilizaram dois programas de docking (AutoDock e FlexX) para analisar a inibição da TR e GR por uma série de quinonas. Os compostos estudados mostraram maior afinidade pela TR que pela GR nos dois programas.

Como a técnica de *docking* molecular não considera todas as interações com a água, experimentos de dinâmica molecular foram realizados com os complexos que apresentaram maior e menor energia livre pelo programa AutoDock. A Figura 6 ilustra as duas quinonas, **9** e **10**, selecionadas para os estudos de dinâmica, bem como as energias livres obtidas por docking (MOLFETTA et al., 2009).

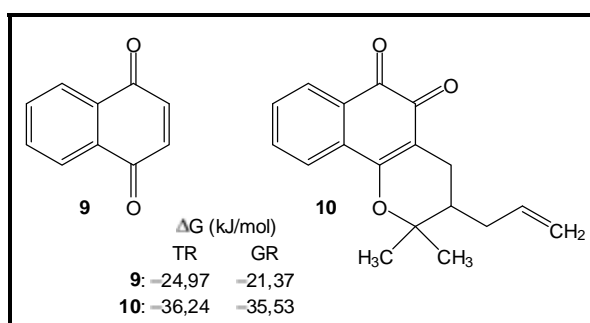


Figura 6 - Quinonas selecionadas para estudos de dinâmica molecular.

Os complexos analisados por dinâmica molecular foram TR-9 e TR-10 e a Figura 7 representa estes complexos antes (em azul) e depois (em amarelo) da simulação. O RMSD entre o complexo inicial e final foi pequeno para as duas quinonas: 1,344 Å para **9** e 1,259 Å para **10**.

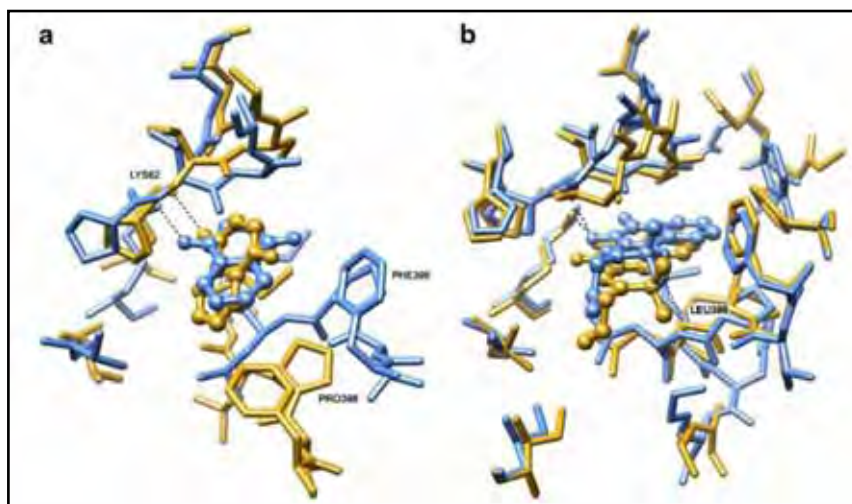


Figura 7 - Complexos TR-9 (a) e TR-10 (b) submetidos a dinâmica molecular. (Fonte: MOLFETTA et al., 2009).

Os estudos de dinâmica molecular são muito interessantes, já que em sistemas reais, a energia cinética dos átomos permite que colisões intermoleculares e que mudanças conformacionais aconteçam a todo o momento. Um modelo de trabalho que considera apenas a melhor conformação encontrada em um processo de minimização de energia de uma molécula bioativa tem sérias limitações, visto que na temperatura da biofase a energia cinética disponível permite que muitas outras conformações sejam facilmente alcançadas (SANT'ANNA, 2009).

A resolução das equações de movimento da dinâmica molecular representa a evolução no tempo dos movimentos moleculares, que pode ser usada para o estudo de propriedades como a difusão, o dobramento de cadeias moleculares (como acontece no enovelamento de proteínas) e a distribuição de moléculas de solvente ao redor de um soluto. Num cálculo de dinâmica molecular, as moléculas, que tem uma determinada energia cinética, podem superar barreiras de energia potencial, o que permite a exploração da superfície de energia potencial na busca de outras conformações (SANT'ANNA, 2009).

1.1 Modelagem Molecular aplicada ao planejamento de novos inibidores de acetilcolinesterase

A utilização de ferramentas computacionais para o planejamento de novos protótipos de fármacos para patologias com grande impacto sócio-econômico que possuem poucas alternativas terapêuticas é muito interessante. Neste contexto encontra-se a Doença de Alzheimer (DA), que é uma patologia neurodegenerativa progressiva, com perda de memória e cognição, sendo a forma de demência mais comum entre os idosos (SHEN; LIU; TANG, 2007).

A acetilcolinesterase (AChE), uma das enzimas mais importantes da família das serina hidrolases, catalisa a hidrólise do neurotransmissor acetilcolina (ACh), que exerce um papel fundamental na memória e cognição. Quando deseja-se memorizar algo, a ACh é biossintetizada no neurônio pré-sináptico, liberada na fenda sináptica e transmite o impulso nervoso para o neurônio pós-sináptico pelos receptores nicotínicos e muscarínicos. Está claro que a DA está associada a deficiência de ACh, sendo assim, este neurotransmissor é hidrolizado pela AChE antes de enviar a mensagem para o neurônio pós-sináptico. Portanto, uma das estratégias terapêuticas para o tratamento da DA é inibir a atividade biológica da AChE que causa o aumento da ACh no cérebro e gera um estado homeostático temporário (SHEN; LIU; TANG, 2007).

Os inibidores de acetilcolinesterase (IAChE) também são utilizados na terapia de outras patologias como doença de Parkinson, demências vasculares, esclerose múltipla e no tratamento de dependentes em morfina e cocaína (LANGE et al., 2010).

O mecanismo de hidrólise da ACh envolve os resíduos de serina, histidina e aspartato (tríade catalítica) (Figura 8). A serina atua como nucleófilo, atacando a carbonila da função éster da ACh (Figura 8a). O resíduo de histidina atua como base capturando o próton (Figura 8b e 8c) e numa etapa subsequente age como ácido doando o próton à subunidade O-R (Figura 8d), tornando-o melhor grupo abandonador. Posteriormente, o par eletrônico sobre o oxigênio restabelece a ligação dupla liberando a colina (Figura 8e). Em seguida a água age como nucleófilo atacando o grupo acila (Figura 8f e 8g) e, novamente, a histidina age primeiro como base removendo um próton

(Figura 8h) e depois como ácido doando este próton ao intermediário (Figura 8i). Finalmente, a carbonila é restabelecida e o resíduo de histidina é liberado quando o par de elétrons sobre o oxigênio forma novamente a ligação dupla (Figura 8j e 8k). O resíduo de aspartato, aparentemente sem importância, interage com o resíduo de histidina orientando e ativando o anel para atuar como ácido-base (PATRICK, 2005).

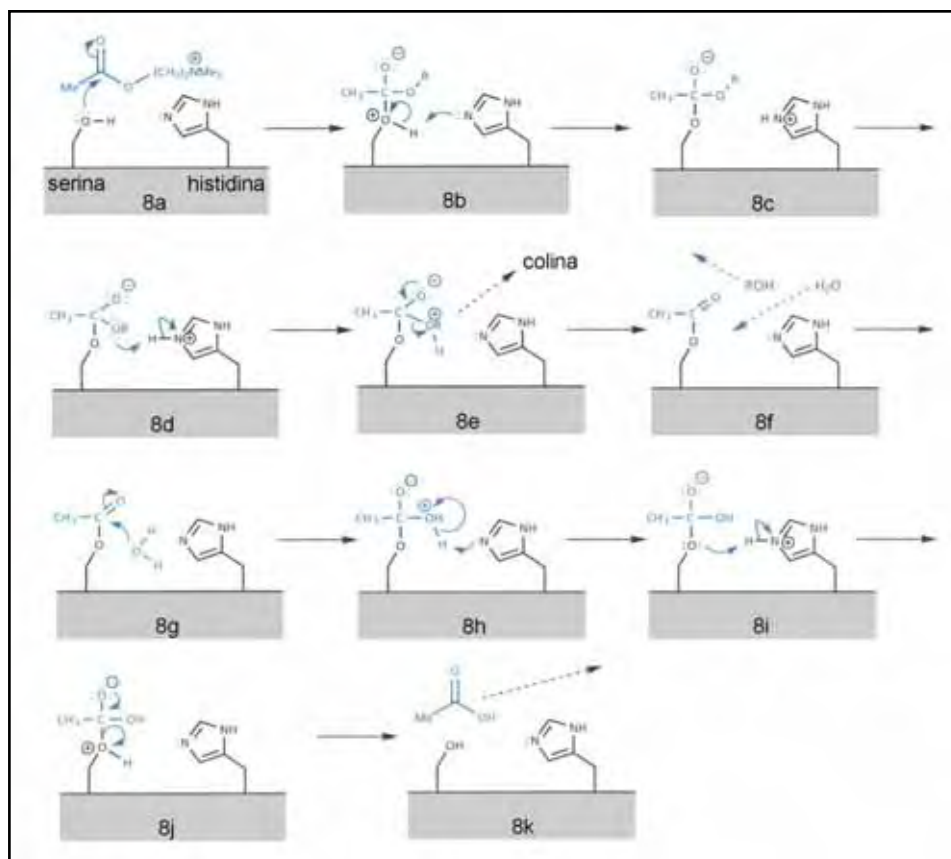


Figura 8 - Mecanismo de hidrólise da acetilcolina. (Adaptado de: PATRICK, 2005).

Além da tríade catalítica, o sítio catalítico da AChE é composto pelos resíduos de aminoácidos Glu199, que estabiliza os intermediários formados na hidrólise da ACh e Trp84, que é responsável pela atração do substrato e repulsão dos produtos de hidrólise, colina e acetato. Existe outra região para modulação da enzima que é o sítio periférico aniônico, caracterizado pelo Trp279, Asp72 e pelos resíduos pertencentes a cavidade aromática Tyr121, Phe290, Phe330, Phe331 e Tyr334. Estes aminoácidos são responsáveis pela orientação do substrato (BARRIL; OROZCO; LUQUE, 2001).

Os inibidores de acetilcolinesterase (AChE) aprovados pelo FDA para tratamento da DA são a tacrina (**11**), donepezil (**12**), rivastigmina (**13**) e galantamina (**14**, Figura 9), porém estes inibidores têm o uso restrito devido aos efeitos colaterais. Estes fármacos atuam como inibidores reversíveis da AChE, com exceção de **13** que é considerado um inibidor pseudo-irreversível, já que apresenta um grupo carbamato que forma um complexo carbamoilado com o resíduo da serina da tríade catalítica que é lentamente hidrolisado (VIEGAS JR. et al., 2004).

A galantamina (**14**) é um produto natural, isolado de várias espécies da família Amaryllidaceae sendo um inibidor da AChE de ação longa, seletivo, reversível e competitivo, além de ser um modulador alostérico dos receptores nicotínicos. De acordo com a Agência Nacional de Vigilância Sanitária, 2005, a administração da galantamina pode estar associada a sérios efeitos cardiovasculares, o que levou a prescrição cautelosa deste fármaco (LÓPEZ, 2002; JANSSEN-ORTHO, 2005).

Outra substância natural com potente atividade anticolinesterásica é o alcalóide (-)-huperzina A (**15**, Figura 9), isolado da erva chinesa *Huperzia serrata*, que é comercializado na China e aprovado pelo FDA como suplemento alimentar (SHEN; LIU; TANG, 2007; WEN et al., 2008).

O crescente impacto da DA, aliado aos poucos agentes terapêuticos seguros disponíveis, vêm determinando um grande esforço para a descoberta de novos fármacos inibidores de AChE. Os produtos naturais têm recebido atenção especial, já que inúmeros metabólitos secundários vegetais e de microorganismos vem sendo identificados como IChE.

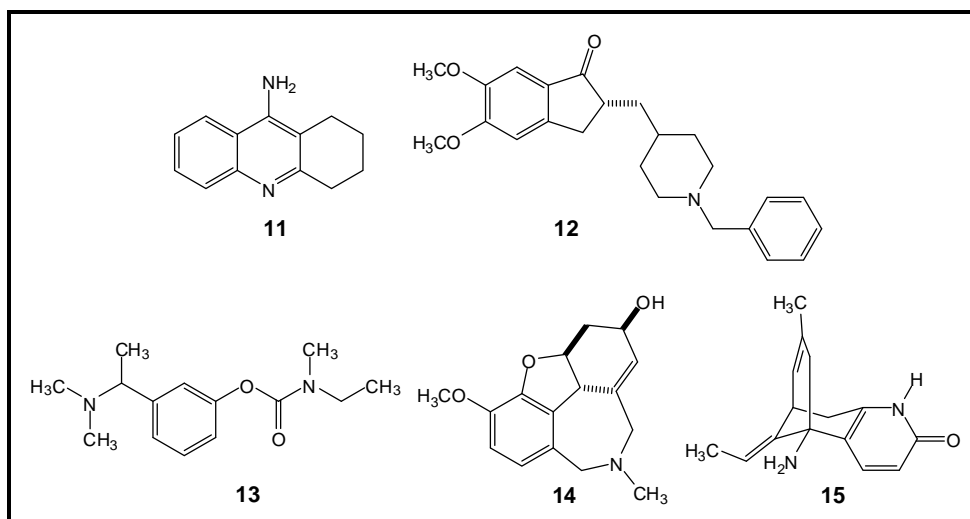


Figura 9 - Inibidores da acetilcolinesterase.

Em 2004, Viegas Jr. et al. isolaram o alcalóide piperidínico (–)-3-*O*-acetil-espectalina (**16**, Figura 10) das flores e frutos de *Senna spectabilis*, sendo que o cloridrato correspondente demonstrou atividade inibitória da AChE comparável à galantamina (padrão positivo) com baixa toxicidade (VIEGAS JR. et al., 2004b; VIEGAS JR. et al., 2005). Uma análise minuciosa da estrutura molecular de **16** permitiu a identificação de uma subunidade acetilcolina internalizada no anel piperidínico, que poderia representar o grupo farmacofórico deste alcalóide (Figura 10).

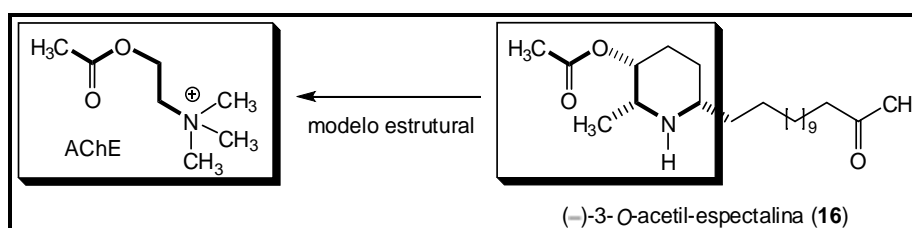


Figura 10 - Semelhança estrutural da acetilcolina com a (–)-3-*O*-acetil-espectalina.

Apesar do grande número de substâncias com atividade anticolinesterásica isoladas, poucas têm vencido as etapas de ensaios pré-clínicos e clínicos. Não obstante, os produtos naturais continuam sendo uma fonte potencial de novos compostos bioativos ou modelos para a síntese de novos candidatos a fármacos mais seletivos e menos tóxicos.

Uma ferramenta muito útil no planejamento de protótipos inibidores de acetilcolinesterase é a hibridação molecular (HM), que é uma estratégia de

planejamento racional fundamentada no reconhecimento das subunidades farmacofóricas nas estruturas moleculares de duas ou mais substâncias ativas conhecidas que são fundidas gerando novas arquiteturas moleculares que mantenham as características pré-selecionadas dos modelos originais. Por outro lado, a eliminação das subunidades moleculares não-farmacofóricas, torna possível a diminuição das propriedades químicas e farmacológicas indesejadas e das dificuldades inerentes à síntese orgânica (VIEGAS JR et al., 2007).

Dentre as várias abordagens sintéticas descritas na literatura, a síntese de compostos inspirados na estrutura molecular da tacrina (**11**) merece destaque. Muito embora apresente alta toxicidade, **11** vem sendo utilizada como uma importante referência para a síntese e pesquisa farmacológica de novos protótipos mais seguros e potentes (MARCO et al., 2004).

Um exemplo relevante de IChE planejados por HM de um produto natural [(-)-huperzina A] com a tacrina são as huprinas (**17**, Figura 11). Estes híbridos foram desenhados pela combinação da estrutura carbobocíclica de **11** com a subestrutura 4-aminoquinolínica de **15** (Figura 11) (CAMPS et al., 2000; BARRIL; OROZCO; LUQUE, 2001; MUÑOZ-TORRERO, CAMPS, 2006).

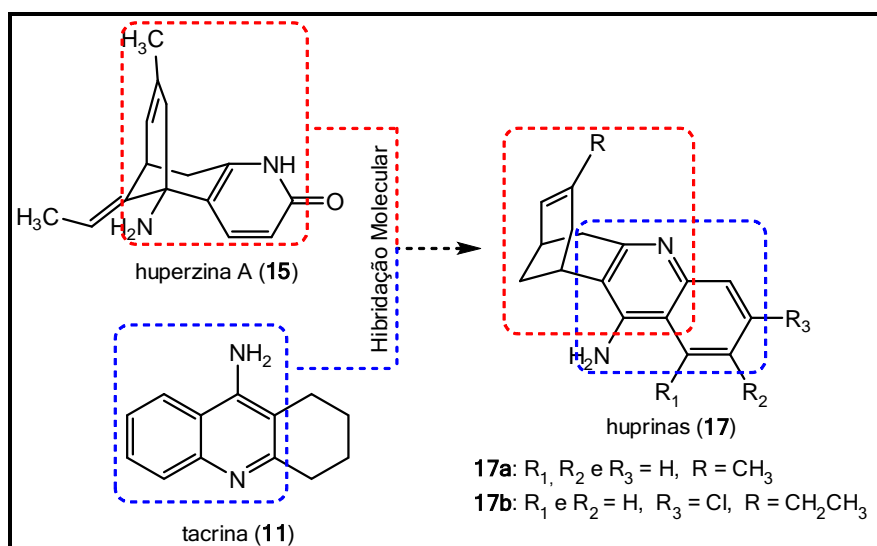


Figura 11 - Esquema de hibridação de **11** com **15**.

A primeira huprina sintetizada **17a** (Figura 11) é mais potente que a tacrina (IC₅₀ = 130 nM) e huperzina A (IC₅₀ = 74 nM) apresentando um IC₅₀ = 47 nM. Estudos subsequentes levaram à síntese da huprina X (**17b**), um

inibidor reversível da AChE, que apresenta um alto potencial de inibição ($IC_{50} = 1,3 \text{ nM}$) (CAMPS et al., 2000; BARRIL; OROZCO; LUQUE, 2001; MUÑOZ-TORRERO, CAMPS, 2006).

Estudos computacionais indicaram que os anéis heterocíclicos da tacrina e da huperzina A devem ocupar regiões próximas ao sítio ativo da AChE e, conseqüentemente, o híbrido deve apresentar um aumento significativo na atividade inibitória. As interações da AChE de *Torpedo californica* (TcAChE) com a huprina X são mostradas na Figura 12A, onde as esferas vermelhas representam os átomos de oxigênio das moléculas de água e as ligações de hidrogênio são as linhas tracejadas (BARRIL; OROZCO; LUQUE, 2001). O grupo amina da huprina X ocupa uma posição similar ao grupo amina da tacrina e da huperzina A, fazendo uma ligação de hidrogênio com uma molécula de água que se liga ao resíduo de aspartato (D72), já o nitrogênio do anel piridínico faz uma ligação de hidrogênio com o resíduo de histidina (H440) (BARRIL; OROZCO; LUQUE, 2001).

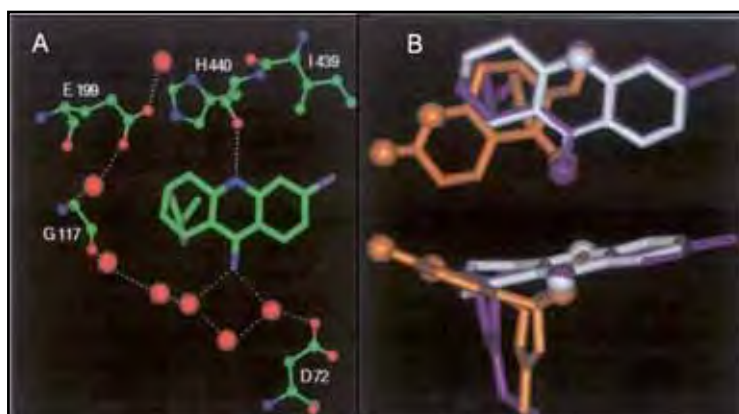


Figura 12 - (A) Detalhe da estrutura 3D do complexo TcAChE-(-)-huprina X; (B) sobreposição da (-)-huprina X, tacrina e (-)-huperzina A. (Fonte: BARRIL; OROZCO; LUQUE, 2001).

A Figura 12B ilustra a sobreposição da (-)-huprina X (azul), tacrina (branco) e (-)-huperzina A (vermelho) da maneira que elas se ligam ao sítio ativo da enzima. Desta análise observa-se que a unidade 4-aminoquinolínica da huprina ocupa a mesma posição da unidade correspondente da tacrina. O mesmo ocorre com as respectivas unidades carbocíclicas da huprina e huperzina (BARRIL; OROZCO; LUQUE, 2001).

Recentemente, Ronco et al. (2009) sintetizaram uma série de huprinas análogas a huprina X, porém nenhuma foi mais potente que o modelo original. A Figura 13 ilustra as duas huprinas mais ativas da série (**17c** e **17d**) e a huprina X no sítio ativo da AChE humana (*hAChE*).

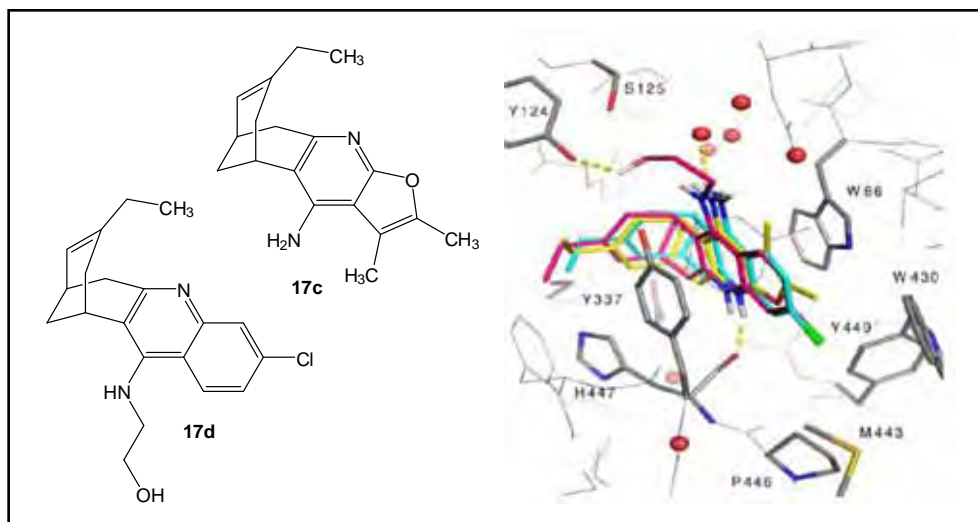


Figura 13 - Huprina X (azul), **17c** (amarelo) e **17d** (rosa) no sítio ativo da *hAChE*. (Adaptado de: RONCO et al., 2009).

Alonso et al. (2005) sintetizaram uma série de híbridos de **11** e **12** desejando obter compostos capazes de interagir simultaneamente no sítio periférico aniônico e sítio catalítico da AChE. Estas substâncias combinam a unidade acridina de **11** e indanona de **12** conectadas por diferentes espaçadores. Duas das 22 substâncias sintetizadas apresentaram potência e seletividade na inibição da AChE, com mecanismo de ação competitivo (**18a** e **18b**, Figura 14). A Figura 15 ilustra estas duas substâncias no sítio ativo da enzima e as linhas tracejadas são referentes às ligações de hidrogênio. Estudos de *docking* molecular deste híbrido confirmaram as interações nos diferentes sítios de ligação da enzima.

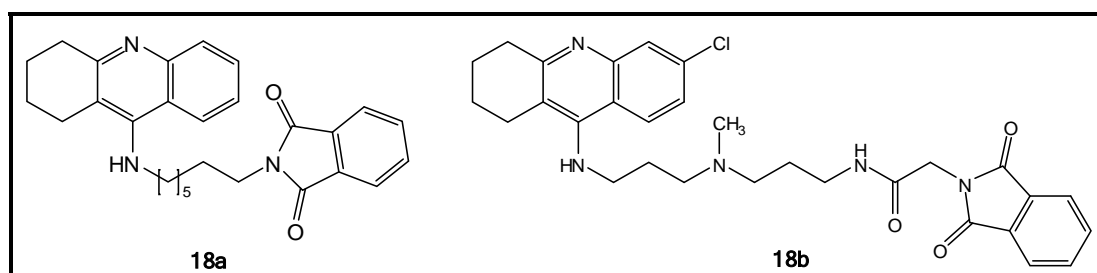


Figura 14 - Híbridos IACHe.

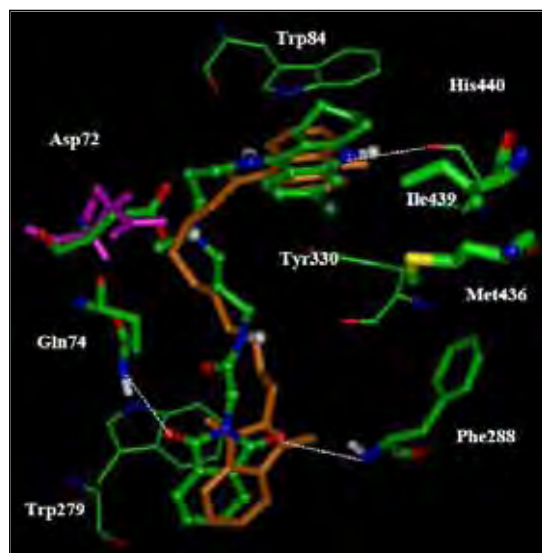


Figura 15 - Compostos **18a** (laranja) e **18b** (verde) no sítio ativo da TcAChE. (Fonte: ALONSO et al., 2005).

Na busca por novos IACHEs, Silva et al. (2006) planejaram três híbridos da tacrina e donepezil (**19a**, **19b** e **19c**, Figura 16) que foram avaliados por *docking*. Todos apresentaram atividade *in silico*, sendo o composto **19c** aquele que interagiu mais com a enzima e sua sobreposição com a tacrina e o donepezil indica um modo de inibição semelhante aos modelos da hibridação (Figura 17).

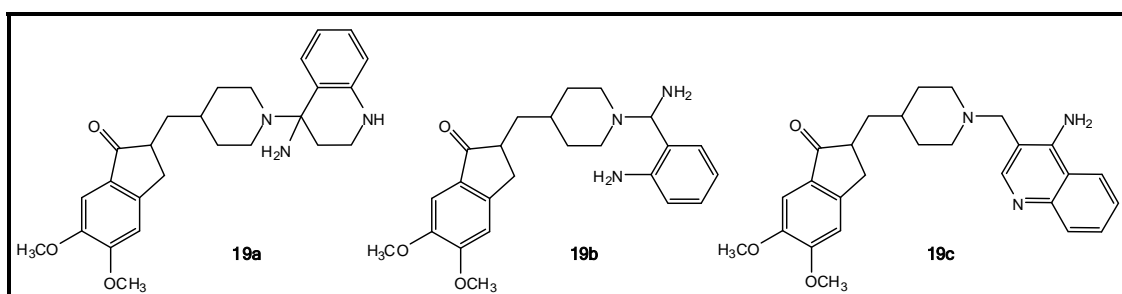


Figura 16 - Híbridos planejados para análise de *docking*.

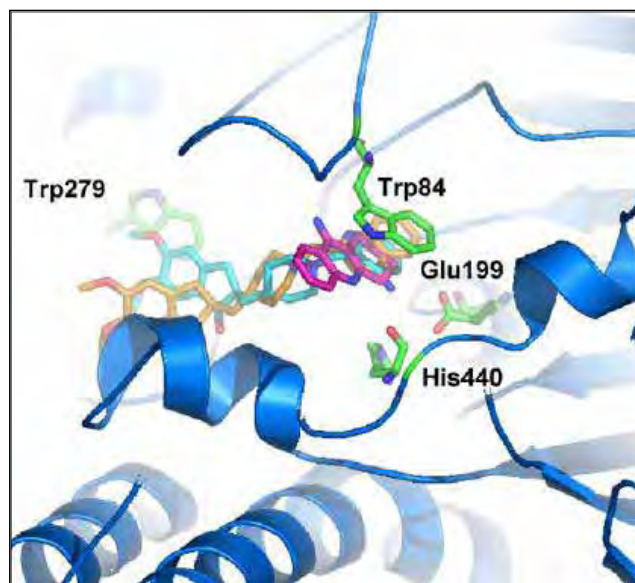


Figura 17 - Sobreposição das estruturas da tacrina (rosa), donepezil (azul) e **8c** (laranja) no sítio ativo da TcAChE. (Fonte: SILVA et al., 2006).

Devido à complexidade da Doença de Alzheimer, vários esforços vêm sendo realizados nos últimos anos a fim de estabelecer terapias combinadas para a manipulação de vários neurotransmissores como a noradrenalina, dopamina, serotonina e glutamato, além da acetilcolina que estão em baixa concentração nos pacientes com DA. Estes déficits estão envolvidos nos declínios neuropsiquiátricos, funcionais e cognitivos característicos dessa doença (MUÑOZ-TORRERO, CAMPS, 2006).

Alguns estudos apontam que a combinação de agentes terapêuticos que agem em diferentes alvos, numa mesma molécula, pode ser mais potente que os tratamentos separados, possibilitando menores doses e atenuando os efeitos colaterais (MUÑOZ-TORRERO, CAMPS, 2006; LANGE et al., 2010). Neste contexto, Bachiller et al. (2009) planejaram e sintetizaram 23 híbridos de **11** com a melatonina (**20**, Figura 18), um neuro-hormônio, com potente ação antioxidante e efeito protetor da deposição extracelular do peptídeo β -amilóide, que sofre declínio em pacientes com DA.

Os compostos sintetizados apresentaram propriedades colinérgicas e antioxidantes, inibindo a AChE mais efetivamente que **11** e capturando os radicais livres melhor que **20**, além de inibir a agregação do peptídeo β -amilóide. Estes híbridos exibiram baixa toxicidade e são capazes de penetrar

no sistema nervoso central de acordo com testes realizados *in vitro* (BACHILLER et al., 2009).

Estudos de *docking* revelaram que estes híbridos interagem no sítio catalítico (Ser203 e His447) e sítio periférico aniônico da enzima (Trp86, Phe295, Phe297, Gly120, Gly121, Ala204, Tyr72 e Trp286). A Figura 18 ilustra dois híbridos **20a** (verde) e **20b** (vermelho) no sítio ativo da *hAChE* (BACHILLER et al., 2009).

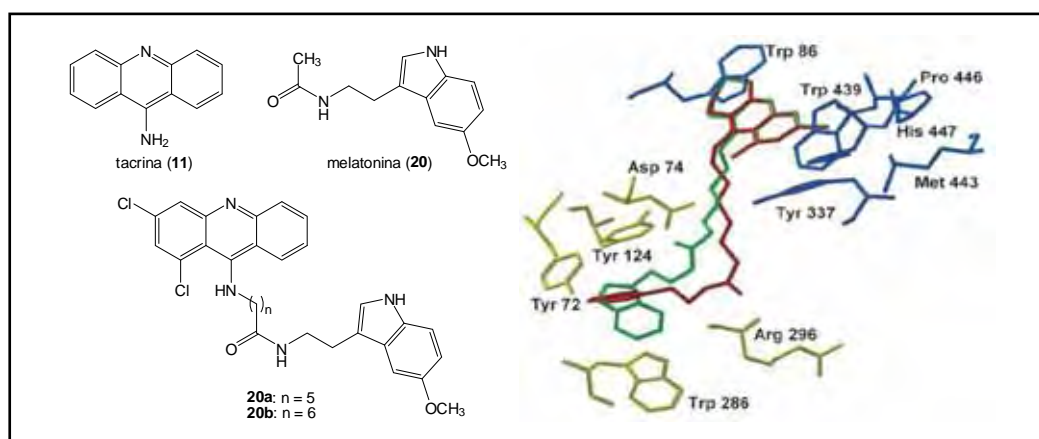


Figura 18 - Híbridos de **11** e **20** no sítio ativo da *hAChE*. (Adaptado de: BACHILLER et al., 2009).

O *docking* molecular é amplamente utilizado para compreensão do modo de interação de determinada substância que já foi sintetizada e, muitas vezes, avaliada *in vitro* ou *in vivo*, numa proteína. Existem também vários trabalhos publicados utilizando esta técnica para o *screening* de várias substâncias depositadas em bibliotecas virtuais ou planejadas a partir de estudos de relação estrutura-atividade. Uma alternativa interessante seria aplicar os estudos de *docking* para o planejamento de híbridos, visando o reconhecimento dos sítios de ligação/interação dos modelos originais e realizando sobreposições destes modelos, a fim de se obter estruturas com o máximo de regiões passíveis de interagir com a enzima. No presente trabalho a ferramenta de *docking* foi utilizada para avaliação de derivados de um alcalóide isolado no NuBBE (**16**, Figura 10) com potencial para estudos adicionais visando um protótipo de fármaco inibidor de acetilcolinesterase. Foi obviamente, um excelente aprendizado para um grupo com tradição em química de Produtos Naturais.

2 OBJETIVOS

- ✓ Realizar estudos de “docking molecular” da (–)-3-O-acetil-espectalina e alguns análogos racionalmente planejados na estrutura cristalina da acetilcolinesterase, visando o reconhecimento dos sítios de ligação/interação que possibilitam a modelagem molecular de novos compostos híbridos.
- ✓ Selecionar o híbrido que apresente melhor viabilidade sintética e melhor interação com a AChE.
- ✓ Realizar análise retrossintética do alvo selecionado.
- ✓ Sintetizar o híbrido selecionado.
- ✓ Avaliar os compostos sintetizados quanto a atividade anticolinesterásica.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Estudos Computacionais para o planejamento do alvo sintético

Os estudos de *docking* molecular foram realizados utilizando o programa FlexX no ambiente gráfico do software SYBYL versão 7.1 na estação de trabalho *silicon graphics* modelo Onyx 3 VPro e processador MIPS R 14010 FPU no Laboratório de Avaliação e Síntese de Substâncias Bioativas (LASSBio), sob a supervisão e valiosa colaboração do Prof. Dr. Carlos Alberto Manssour Fraga da Universidade Federal do Rio de Janeiro.

Este programa inicia o “docking” selecionando um “fragmento base” (FB) que corresponde a parte mais rígida da molécula, contendo o maior número de grupos funcionais passíveis de realizarem interações específicas com os resíduos de aminoácidos no sítio receptor. Assim, o FB da molécula é posicionado no sítio ativo do receptor várias vezes e a cada posicionamento a energia de interação associada é calculada. A molécula é então “reconstruída” com a adição dos fragmentos de maior liberdade conformacional restantes ao FB selecionado em várias conformações que se encontram armazenadas em um banco de dados sendo as energias de interação recalculadas. Os fragmentos que contêm grupos que podem formar ligações de hidrogênio são

colocados primeiro, já que estas ligações irão definir a geometria do ligante com o sítio receptor (RAREY et al., 1996).

Os principais termos de energia (variação da energia livre de ligação, $\Delta G_{\text{ligação}}$) avaliados pelo programa FlexX, estão descritos na equação abaixo:

$$\Delta G_{\text{ligação}} = \Delta G_{\text{match}} + \Delta G_{\text{lipo}} + \Delta G_{\text{ambig}} + \Delta G_{\text{clash}} + \Delta G_{\text{rot}}$$

O $\Delta G_{\text{ligação}}$ é a energia de ligação representada pelo termo *Total Score*. ΔG_{match} corresponde à soma de pontos para interações direcionadas entre a proteína e o ligante, e consiste em contribuições de energia individuais, como interações por ligações de hidrogênio, interações aromáticas, etc. O termo ΔG_{lipo} , por sua vez, é uma medida dos “contatos” da superfície hidrofóbica em função dos pares de átomos apolares do ligante e da proteína. Adicionalmente, o termo ΔG_{ambig} corresponde à mesma medida, porém envolvendo pares em que um átomo é polar e o outro apolar. O termo ΔG_{clash} corresponde a uma função de perda energética para as sobreposições entre o ligante e a proteína (interações estéricas), que é baseada em valores do raio de Van der Waals. Finalmente, o termo ΔG_{rot} é uma medida do custo entrópico do congelamento dos graus internos de liberdade, implícito em complexos ligante-receptor devido a fatores limitantes da flexibilidade conformacional do ligante pelo “ambiente” do sítio ativo (RAREY et al., 1996).

As estruturas tridimensionais da acetilcolinesterase de *Torpedo californica* complexadas com a tacrina, donepezil e huperzina A foram retiradas da base virtual *Protein Data Bank*, PDB (BERMAN et al., 2000) com os códigos 1ACJ (HAREL et al., 1993), 1EVE (KRYGER; SILMAN; SUSSMAN, 1999) e 1VOT (RAVES et al., 1997), respectivamente.

As proteínas foram preparadas pela remoção dos heteroátomos e moléculas de água e adição de todos os átomos de hidrogênio e cargas AMBER. O sítio ativo da enzima foi definido pelos resíduos de aminoácidos num raio de 12 Å a partir do ligante. Os ligantes receberam cargas Gasteiger-Hückel.

As estruturas dos ligantes foram construídas e tiveram suas energias minimizadas utilizando o programa PC Spartan Pro 1.0 para Windows (Wavefunction). Após cada experimento de *docking*, 30 complexos enzima-

ligante foram salvos em arquivos com a extensão .mol2 para futuras análises e os valores teóricos de energia livre foram calculados.

3.2 Estudos Computacionais dos AChE descobertos no NuBBE

Os experimentos de *docking* foram realizados utilizando o programa FlexE, no ambiente gráfico do software SYBYL versão 7.1 na estação de trabalho *silicon graphics* modelo Onyx 3 VPro e processador MIPS R 14010 FPU no LASSBio. Neste programa, uma proteína é gerada pela sobreposição de várias estruturas protéicas selecionadas (*ensemble*). Partes semelhantes das estruturas são fundidas, enquanto partes diferentes são tratadas separadamente, consideradas simultaneamente e combinadas para formar novas estruturas globais (CLAUBEN et al., 2001).

O FlexE é derivado do FlexX, portanto utiliza todos os conceitos substanciais como esquema de interações, algoritmos de construção e funções. Estes conceitos são adaptados ao método do conjunto (CLAUBEN et al., 2001).

As proteínas e ligantes foram preparados da mesma forma descrita no item 3.1, porém o sítio ativo foi definido pelos resíduos de aminoácidos num raio de 15 Å a partir do ligante da estrutura referência (1ACJ). O sítio ativo do conjunto foi definido pela união de todos os ligantes.

Também foram realizados estudos de dinâmica molecular. As estruturas de cada ligante foram submetidas ao programa PRODRG e as geometrias e topologias iniciais foram obtidas por *docking*. A manipulação das estruturas foi realizada no programa MOLDEN, utilizando o campo de força GROMOS96 e todos os cálculos de dinâmica molecular foram realizados e analisados utilizando o pacote de simulação GROMACS.

Os sistemas AChE livre e AChE complexada com os ligantes foram simulados por 5 ns cada e os ligantes sozinhos em solução foram simulados por 100 ns, sendo a água utilizada como solvente.

3.3 Reagentes, solventes e instrumentação

- ✓ 3-hidroxi-2-hidroximetil-6-metil-piridina, 99%, 10 g, código Aldrich: 14442-8.
- ✓ 3-bromo-quinolina, 98%, 25 g, código Aldrich: 12413-3.
- ✓ 4-bromo-quinolina, 95%, 1 g, código Aldrich: 69394-4.
- ✓ 1,2-dibromo-etano, 98%, 250 g, código Aldrich: D4075-2.
- ✓ ácido bromídrico, 48%, 1 L, código Vetec: TC0295.
- ✓ ácido 3-hidroxi-picolínico, 98%, 5 g, código Aldrich: 15230-7
- ✓ anidrido acético, 100%, 1 L, código Synth: 00A1096.05.BJ.
- ✓ benzaldeído, 99,5%, 100 mL, código Aldrich: 41809-9.
- ✓ brometo de benzila, 98%, 100 g, código Aldrich: B1790-5.
- ✓ brometo de benzoíla, 97%, 50 g, código Aldrich: 13972-6.
- ✓ carbonato de manganês ($\text{MnCO}_3 \cdot \text{XH}_2\text{O}$), mínimo 44%, 250 g, código Vetec: 1676.
- ✓ ciclohexanona, 99%, 500 mL, código Aldrich: 39824-1.
- ✓ cloreto de acetila, 99%, 50 g, código Aldrich: 23957-7.
- ✓ cloreto de benzila, 99%, 50 g, código Aldrich: 18555-8.
- ✓ cloreto de *n*-butil-magnésio, 1,45 M em butil-glicima, 100 mL, código Aldrich: 52992-3.
- ✓ cloreto de *tert*-butil-difenil-silano, 98%, 10 g, código Aldrich: 19553-7.
- ✓ cloreto de tionila, 99%, 100 mL, código Aldrich: 23046-4.
- ✓ cloridrato de 3-hidroxi-2-hidroximetil-piridina, 85%, 25 g, código Aldrich: H31530.
- ✓ complexo borano-tetraidrofurano, 1M em THF, 100 mL, código Aldrich: 17619-2.
- ✓ hidreto de sódio, 95% (seco), 10 g, código Aldrich: 22344-1.
- ✓ hidrogeno difluoreto de potássio, 99%, 500 g, código Acros: 219235000.
- ✓ hidrogenossulfato de tetrabutylamônio, 97%, 25 g, código Aldrich: 15583-7.
- ✓ hidróxido de potássio, 95%, 1 Kg, código Quemis: QHH022.
- ✓ hidróxido de sódio, 97%, 1 Kg, código Quemis: QHH023.
- ✓ magnésio em grânulos (20-230 mesh), 98%, 500 g, código Aldrich: 25412-6.

- ✓ óxido de manganês IV (dióxido de manganês), 99%, 100 mesh, 100g, código Acros: AC222581000.
- ✓ *n*-butil-lítio, 1,6 M em hexano, 100 mL, código Aldrich: 18617-1.
- ✓ *terc*-butil-lítio, 1,7 M em pentano, 100 mL, código Aldrich: 18619-8.
- ✓ triisopropil-borato, 97%, 100 mL, código Fluka: 92085

Os solventes utilizados foram de grau PA ou HPLC. Também foram utilizados solventes grau técnico, purificados em destilador semi-industrial com coluna de fracionamento (4 m de altura): hexano, acetato de etila, etanol, metanol, acetona. Para todas as reações os solventes foram tratados e destilados segundo a literatura específica (PERRIN, 1988)

Para as separações cromatográficas em coluna foi utilizada Sílica gel (SiO₂) para cromatografia flash (0,035 – 0,070 mm, diâmetro de poro ca 6 nm) ACROS Organics. Para cromatografia em camada delgada preparativa foram utilizadas placas de vidro 20 x 20 cm impregnadas com sílica gel 500 microns, Uniplate™ Analtech.

O método utilizado para o acompanhamento das reações foi cromatografia em camada delgada comparativa, utilizando placas de alumínio impregnadas com sílica gel 60 F₂₅₄ (Merck).

Para as análises espectroscópicas e espectrométricas foram utilizados os seguintes equipamentos:

- ✓ Espectrômetro de RMN Varian INOVA 500 (11,7 Tesla), operando em frequência de 500 MHz para os núcleos de hidrogênio e 125 MHz para o carbono.
- ✓ Cromatógrafo a gás acoplado a espectrômetro de massas da marca Shimadzu® modelo QP 5050A. Coluna capilar de sílica fundida (30 m x 0,25 mm) com fase ligada DB-1MS (0,10 µm de espessura de filme); O equipamento foi operado nas seguintes condições: temperatura do injetor de 280 °C; temperatura da interface de 300 °C; programação da coluna com temperatura inicial de 50 °C, permanecendo por 3 min, sendo acrescidos 6 °C/min até atingir 295 °C, permanecendo por 10 min; tempo total da análise: 53 min; gás carreador hélio (1 mL min⁻¹); pressão inicial na coluna: 56,0 kPa; taxa de *split* 1:20 e volume injetado de 1 µL. Para o

espectrômetro de massas (EM), foram utilizadas as seguintes condições: energia de impacto: 70 eV; *scan speed* (velocidade de aquisição dos dados) foi de 769 u.m.a./s; e fragmentos de *m/z* 40 a 500 Da em *full scan*, medidos a intervalos de 0,5 s.

3.4 Reações

3.4.1 Oxidação da 3-hidroxi-2-hidroximetil-piridina (**38**)

3.4.1.1 Metodologia proposta por Wang et al. (1990)

O cloridrato da 3-hidroxi-2-hidroximetil-piridina (300 mg, 1,6 mmol) foi neutralizado com 90 mg (1,6 mmol) de KOH em 15 mL de metanol em banho de gelo por 1h sendo que o KCl formado foi removido por filtração simples. A fase metanólica foi concentrada no evaporador rotatório fornecendo 190 mg da base livre (**38**) que foi suspensa em CHCl₃ anidro e adicionados três equivalentes (420 mg) de dióxido de manganês (MnO₂). A mistura foi mantida em refluxo por 3 h, resfriada, filtrada e o resíduo de MnO₂ lavado três vezes com CHCl₃. A fase orgânica foi concentrada em evaporador rotatório. Nenhum produto foi obtido.

3.4.1.2 Metodologia proposta por Heinert e Martell (1959)

O cloridrato da 3-hidroxi-2-hidroximetil-piridina (**38**, 300 mg, 1,6 mmol) foi solubilizado em 25 mL de água e em seguida 30 mL de CHCl₃ foi adicionado. Esta solução bifásica foi aquecida a 50 °C sendo em seguida adicionados três equivalentes de MnO₂ (420 mg) e duas gotas de H₂SO₄ concentrado. A mistura foi mantida sob refluxo e forte agitação por 45 min. As fases foram separadas, sendo a fase aquosa particionada três vezes com CHCl₃. As fases orgânicas foram reunidas e o solvente evaporado. Foi obtido um produto puro (sólido amarelo) identificado como a 2-carbaldeído-3-hidroxi-piridina (**41**) em 45% de rendimento. Dados de RMN de ¹H (CDCl₃, 500 MHz): δ 7,29 (dd, 1H, *J* = 8,5; 1,5 Hz), 7,36 (dd, 1H, *J* = 8,5; 4,5 Hz), 8,28 (dd, 1H, *J* = 4,5; 1,5 Hz), 10,00 (s, 1H), 10,64 (sl, 1H). Dados de RMN de ¹³C (CDCl₃, 125 MHz): δ 125,9 (CH),

129,9 (CH), 136,8 (C), 142,4 (CH), 156,6 (C), 198,6 (CH). CCD: R_f 0,65 (CHCl₃:MeOH 9:1).

3.4.2 Acetilação da 2-carbaldeído-3-hidroxi-piridina (41)

Uma solução da 2-carbaldeído-3-hidroxi-piridina (180 mg, 1,46 mmol) em 2 mL de piridina anidra foi preparada sob atmosfera de N₂ e adicionado 0,10 mL de AcCl (1,46 mmol) ou 0,13 mL de Ac₂O (1,46 mmol) previamente destilados. Após 2 h de agitação (t.a.) foram adicionados 3 mL de água. A fase aquosa foi extraída três vezes com 5 mL de AcOEt. As fases orgânicas foram reunidas e em seguida particionada com 5 mL de solução saturada de NaCl, seca com MgSO₄ e filtrada. O solvente foi evaporado e o produto seco em linha de alto vácuo (BRIARD et al., 2008). Foram obtidas a 2-carbaldeído-3-oxiacetil-piridina (**37**, metodologia utilizando Ac₂O) e o ácido 3-oxiacetil-picolínico (**50**, metodologia utilizando AcCl) em mistura e devido aos baixos rendimentos brutos (30% e 40%, respectivamente) estes compostos não foram purificados.

3.4.3 Reações de proteção da hidroxila piridínica da 3-hidroxi-2-hidroximetil-piridina (38)

3.4.3.1 Grupos protetores acetil e TBDPS

Para a avaliação das metodologias foi utilizado o álcool 3-hidroxi-2-hidroximetil-6-metil-piridina (**38a**) como modelo, sendo as reações realizadas sob atmosfera de N₂. Nenhuma das reações utilizando TBDPSCI foi eficiente nas condições avaliadas não levando a formação de produtos.

✓ Metodologia 1

Uma solução do álcool (**38a**, 20 mg, 0,14 mmol) em 1 mL de DMF anidro foi preparada e adicionados 3,36 mg de NaH (0,14 mmol) sendo a mistura mantida em agitação. Após 10 min foi adicionado um equivalente de anidrido acético (Ac₂O) previamente destilado (0,013 mL) ou cloreto de *tert*-butil-difenil-silano (TBDPSCI, 0,04 mL). Depois de 15 min da adição de Ac₂O ou TBDPSCI

foi adicionada uma solução aquosa saturada e gelada de NH_4Cl (3 mL). A fase aquosa foi extraída três vezes com 5 mL de AcOEt. As fases orgânicas foram reunidas e o solvente evaporado (RITTER; ZAROTTI; CARREIRA, 2004). Foi obtida uma mistura de dois produtos com R_f 0,55 e 0,68 utilizando Hex:AcOEt 1:9 como fase móvel (FM) identificados como os derivados acetilados **44** e **43**, respectivamente.

✓ Metodologia 2

Uma solução do álcool (**38a**, 20 mg, 0,14 mmol) em isopropanol (1 mL) foi preparada e adicionado um equivalente de NaOH (5,6 mg, 0,14 mmol) dissolvido no mínimo de H_2O . Em seguida foi adicionado um equivalente de Ac_2O destilado (0,013 mL) ou TBDPSCI (0,04 mL). Após 10 min o isopropanol foi removido em linha de alto vácuo e os produtos foram solubilizados em AcOEt, secos com MgSO_4 , filtrados e o solvente evaporado em evaporador rotatório (SRIVASTAVA; TANDON; RAY, 1992). Foi obtido o produto **43** (óleo amarelo) puro em 49% de rendimento. Dados de RMN de ^1H (CDCl_3 , 500 MHz): δ 1,99 (s, 3H), 2,24 (s, 3H), 2,47 (s, 3H), 5,09 (s, 2H), 7,08 (d, 1H, $J = 8,5$ Hz), 7,27 (d, 1H, $J = 8,5$ Hz). Dados de RMN de ^{13}C (CDCl_3 , 125 MHz): δ 20,6 (2 CH_3), 23,6 (CH_3), 62,6 (CH_2), 123,9 (CH), 130,8 (CH), 143,7 (C), 146,3 (C), 155,7 (C), 168,8 (C), 170,3 (C). CCD: R_f 0,68 (Hex:AcOEt 1:9).

✓ Metodologia 3

À solução do álcool (**38a**, 20 mg, 0,14 mmol) em THF anidro (1 mL) foram adicionadas quantidades catalíticas de TBAH, um equivalente de NaOH (5,6 mg, 0,14 mmol) e um equivalente de cloreto de acetila (AcCl) previamente destilado (0,01 mL) ou TBDPSCI (0,04 mL). Após 1h o meio reacional foi filtrado e o precipitado lavado com THF. A fase orgânica foi evaporada em evaporador rotatório (ILLI, 1979). Foi obtido o produto **44** (sólido amarelo) puro em 85% de rendimento. Dados de RMN de ^1H (CDCl_3 , 500 MHz): δ 2,06 (s, 3H), 2,42 (s, 3H), 5,16 (s, 2H), 7,01 (d, 1H, $J = 8,5$ Hz), 7,14 (d, 1H, $J = 8,5$ Hz). Dados de RMN de ^{13}C (CDCl_3 , 125 MHz): δ 20,7 (CH_3), 23,2 (CH_3),

64,6 (CH₂), 125,6 (CH), 126,7 (CH), 140,1 (C), 150,1 (C), 150,3 (C), 174,2 (C).
CCD: R_f 0,55 (Hex:AcOEt 1:9).

3.4.3.2 Reação de proteção com benzil

O cloridrato da 3-hidroxi-2-hidroximetil-piridina (**38**, 300 mg, 1,6 mmol) foi suspenso em 15 mL de EtOH anidro, sendo depois adicionados dois equivalentes de KOH (179 mg, 3,2 mmol) e um equivalente de brometo de benzila (BnBr, 0,19 mL, 1,6 mmol). A mistura foi submetida ao refluxo por 24 h, sendo em seguida diluída com 30 mL de H₂O e extraída três vezes com 20 mL de AcOEt. A fase orgânica foi seca com MgSO₄, filtrada e o solvente evaporado em evaporador rotatório (TAKEDA et al., 2003). O produto foi purificado por CC utilizando sílica como FE e AcOEt:Hex (7:3) como FM levando ao derivado benzilado **47** (sólido amarelo) em 70% de rendimento. Dados de RMN de ¹H (CDCl₃, 500 MHz): δ 4,75 (s, 2H), 5,05 (s, 2H), 7,10 (m, 2H), 7,29 (m, 3H), 7,33 (m, 2H), 8,10 (dd, 1H, *J* = 2,0; 4,0 Hz). Dados de RMN de ¹³C (CDCl₃, 125 MHz): δ 60,1 (CH₂), 69,9 (CH₂), 118,0 (CH), 122,5 (CH), 127,1 (CH), 128,2 (CH), 128,7 (CH), 135,9(C), 139,7 (CH), 148,8 (C), 151,4 (C). CCD: R_f 0,69 (CHCl₃:MeOH 9:1).

3.4.4 Oxidação da 2-hidroximetil-3-oxibenzil-piridina (**47**)

3.4.4.1 Reação de Swern

Uma solução de cloreto de oxalila destilado (0,146 mL, 1,6 mmol) em CH₂Cl₂ anidro sob atmosfera de N₂ foi resfriada a -78°C e foi adicionado 0,163 mL de DMSO (2,3 mmol) tratado e destilado sendo a mistura submetida a agitação por 30 min. Em seguida, 170 mg (0,8 mmol) da 2-hidroximetil-3-oxibenzil-piridina (**47**) dissolvida em 2 mL de CH₂Cl₂ e 5 gotas de DMSO foi adicionada à mistura. Depois de 30 min, foram adicionados 0,57 mL (4,2 mmol) de trietilamina destilada e a mistura foi mantida sob agitação por uma hora e então a temperatura foi elevada a 0°C. Foram adicionados 5 mL de solução saturada de NH₄Cl, as fases foram separadas e a fase aquosa foi particionada três vezes com 10 mL de éter etílico. As fases orgânicas foram reunidas e o

solvente evaporado (OMURA; SWERN, 1978). O aldeído **48** não foi obtido nesta metodologia.

3.4.4.2 Reação com dióxido de manganês

Uma solução da 2-hidroxi-3-oxibenzil-piridina (**47**, 150 mg, 0,7 mmol) em CHCl_3 anidro foi preparada sob atmosfera de N_2 e adicionados 600 mg de MnO_2 . A mistura foi mantida sob agitação e refluxo por 80 min, filtrada e o solvente evaporado (TAKEDA et al., 2003). Foi obtido um produto puro (óleo amarelo) identificado como a 2-carbaldeído-3-oxibenzil-piridina (**48**) em 75% de rendimento. Dados de RMN de ^1H (CDCl_3 , 500 MHz): δ 5,17 (s, 2H), 7,35 (m, 7H), 8,32 (dd, 1H, $J = 4,5; 1,5$ Hz), 10,35 (s, 1H). Dados de RMN de ^{13}C (CDCl_3 , 125 MHz): δ 70,6 (CH_2), 121,7 (CH), 127,0 (CH), 128,4 (CH), 128,5 (CH), 128,8 (CH), 135,3 (C), 141,5 (C), 142,4 (CH), 157,0 (C), 189,9 (CH). CCD: R_f 0,71 (CHCl_3 :MeOH 9:1).

3.4.5 Acetilação do ácido 3-hidroxi-picolínico (**49**)

A uma suspensão do ácido 3-hidroxi-picolínico (**49**, 200 mg) em 10 mL de CHCl_3 anidro foram adicionados 2 mL de Ac_2O previamente destilado sendo o sistema mantido sob refluxo por 12 h. Em seguida o solvente foi evaporado e ao sólido foram adicionados 10 mL de água. A água foi evaporada em evaporador rotatório e o produto seco em linha de alto vácuo (MOON et al., 2002). Foi obtido o ácido 3-oxiacetil-picolínico (**50**, sólido amarelo) puro em 95% de rendimento. Dados de RMN de ^1H (CDCl_3 , 500 MHz): δ 2,39 (s, 3H), 7,58 (dd, 1H, $J = 8,0; 1,5$ Hz), 7,63 (dd, 1H, $J = 8,0; 4,5$ Hz), 8,48 (dd, 1H, $J = 4,5; 1,5$ Hz). Dados de RMN de ^{13}C (CDCl_3 , 125 MHz): δ 20,9 (CH_3), 129,4 (CH), 133,9 (CH), 138,1 (C), 145,1 (CH), 148,6 (C), 161,3 (C), 169,0 (C). CCD: R_f 0,38 (AcOEt:MeOH 9:1).

3.4.6 Redução do ácido 3-oxiacetil-picolínico (**50**) com BH₃.THF

A solução do ácido acetilado **50** (50 mg, 0,3 mmol), obtido de acordo com a reação descrita no item 3.4.5, em 2 mL de THF anidro foi resfriada a –10 °C sob atmosfera de N₂. Em seguida o BH₃.THF (0,4 mL, 0,4 mmol) foi adicionado e a temperatura elevada a t.a. sendo o sistema mantido sob agitação por 16 h. Posteriormente, foram adicionados 2 mL de H₂O a 0 °C e a fase aquosa tratada com 70 mg de carbonato de potássio e extraída três vezes com 5 mL de AcOEt. As fases orgânicas foram reunidas e o solvente evaporado (YOON et al., 1973; MOON et al., 2002). O produto reduzido **51** não foi obtido.

3.4.7 Acoplamentos com organolítio e organomagnésio

Todas as vidrarias utilizadas nestas reações foram secas em estufa a 110 °C por 5 h e mantidas em dessecador conectado a linha de alto vácuo até o uso. Os balões e as barras magnéticas foram flambados sob atmosfera de N₂, sendo as reações também processadas sob atmosfera inerte. Quando necessário, os produtos brutos foram submetidos a CC utilizando como FE sílica (h = 15 cm, ø = 2 cm). A eluição foi realizada em gradiente de Hex:AcOEt (9:1) até 100% de AcOEt.

3.4.7.1 Reação com *n*-butil-lítio

Uma solução da 4-bromo-quinolina (**42**, 50 mg, 0,24 mmol) em 3 mL de THF anidro foi resfriada a –78 °C. Em seguida, gotejou-se o *n*-BuLi (0,27 mL, 0,9 mol/L) e a mistura mantida sob agitação por 20 min. Posteriormente, uma solução do aldeído (**48**, 0,24 mmol) em THF (1 mL) foi transferida via cânula para a mistura reacional. Após 2,5 h a temperatura foi elevada a 0 °C e adicionados 5 mL de solução saturada de NH₄Cl. A fase aquosa foi particionada três vezes com 5 mL AcOEt sendo as fases orgânicas reunidas e o solvente evaporado (LIMA et al., 2002). O produto bruto da reação foi purificado em CC e obteve-se majoritariamente (47% de rendimento) a 2-*n*-butil-quinolina (**61**). Dados de RMN de ¹H (CDCl₃, 500 MHz): δ 0,89 (t, 3H,

$J = 7,5$ Hz), 1,37 (sex, 2H, $J = 7,5$ Hz), 1,72 (m, 2H), 2,90 (t, 2H, $J = 8,0$ Hz), 7,21 (d, 1H, $J = 8,0$ Hz), 7,39 (ddd, 1H, $J = 7,0; 7,0; 1,0$ Hz), 7,59 (ddd, 1H, $J = 7,0; 7,0; 1,0$ Hz), 7,68 (dd, 1H, $J = 7,0; 1,0$ Hz), 7,97 (d; 2H, 8,0 Hz). Dados de RMN de ^{13}C (CDCl_3 , 125 MHz): δ 13,9 (CH_3), 22,6 (CH_2), 32,1 (CH_2), 39,0 (CH_2), 121,3 (CH), 125,6 (CH), 126,6 (C), 127,4 (CH), 128,7 (CH), 129,2 (CH), 136,1 (CH), 147,8 (C), 163,0 (C).

3.4.7.2 Reação com *terc*-butil-lítio

Esta reação foi realizada da mesma maneira descrita no item 3.4.7.1, porém foram utilizados dois equivalentes de *t*-BuLi (0,28 mL, 1,7 mol/L) (JEN; CAVA, 1983). Foi obtida uma mistura complexa de produtos que foi analisada por CG/MS.

3.4.7.3 Reação com tributilmagnesato de lítio

Uma solução (-10°C) de *n*-BuMgCl (0,45 mL, 1,45 mol/L) em 3 mL de THF anidro foi preparada sob agitação e adicionado o *n*-BuLi (1,45 mL, 0,9 mol/L). Após 1 h o sistema foi resfriado a -30°C e a 3-bromo-quinolina (**57**, 0,23 mL, 1,7 mmol) adicionada. Em seguida a temperatura foi mantida em -10°C por 2,5 h e o benzaldeído previamente destilado (0,17 mL, 1,7 mmol) adicionado. Após 1 h foi adicionado 0,5 mL de água e a temperatura elevada a t.a.. O solvente foi evaporado em rota-evaporador e o produto seco em linha de alto vácuo (DUMOUCHEL et al., 2003). Nenhum produto foi obtido nesta metodologia.

3.4.7.4 Reação de Grignard

O magnésio (30 mg, 1,25 mmol) foi lavado com solução aquosa diluída de HCl (0,1 mol/L), com acetona e depois seco em linha de alto vácuo. Após este procedimento adicionou-se 3 mL de THF anidro e o sistema foi submetido a agitação e refluxo. A solução de 3-bromo-quinolina (**57**, 0,16 mL, 1,25 mmol), em 1 mL de THF foi adicionada lentamente. Para catalisar a formação do brometo de 3-quinolinil-magnésio (**65**) foram adicionadas duas gotas de

1,2-dibromo-etano. Quando todo magnésio foi consumido, o benzaldeído previamente destilado (0,13 mL, 1,25 mmol) dissolvido em 0,5 mL de THF foi gotejado no meio reacional. Após 2 h foram adicionados 2 mL de água sendo a fase aquosa extraída três vezes com 5 mL de AcOEt, as fases orgânicas foram reunidas e o solvente evaporado (SABERI; SHAH; SIMONS, 2005). O produto bruto da reação foi purificado em CC e obteve-se majoritariamente (78% de rendimento) a quinolina (**60**). Dados de RMN de ^1H (CDCl_3 , 500 MHz): δ 7,33 (dd, 1H, $J = 8,5; 4,0$ Hz), 7,48 (ddd, 1H, $J = 8,5; 8,5; 1,5$ Hz), 7,65 (ddd, 1H, $J = 8,5; 8,5; 1,5$ Hz), 7,75 (dd, 1H, $J = 8,5; 1,5$ Hz), 8,08 (dd, 2H, $J = 8,5; 1,5$ Hz), 8,85 (dd, 1H, $J = 4,0; 1,5$ Hz).

3.4.7.5 Titulações dos organolítios e organomagnésio comerciais

Uma solução padrão de mentol em THF anidro (1 mL, 1 mol/L) foi preparada num balão de 10 mL e adicionado uma ponta de espátula de *o*-fenantrolina (indicador) sob agitação. A solução comercial do reagente (seringa graduada) foi adicionada lentamente até o ponto de viragem (incolor–violeta para organomagnésio e incolor–vermelho para organolítios). Em seguida toda solução restante na seringa foi adicionada no balão e a mistura reacional foi re-titulada com a solução padrão de mentol (WATSON; EASTHAM, 1967).

3.4.8 Halogenação da 2-hidroximetil-3-oxibenzil-piridina (**47**)

Uma solução do álcool (**47**, 100 mg, 0,47 mmol) em 3 mL de CHCl_3 anidro foi preparada e a temperatura reduzida a 0 °C. Em seguida 0,1 mL de SOCl_2 foi gotejado e o sistema mantido sob agitação por 3 h à t.a.. O excesso de SOCl_2 e solvente foram evaporados com N_2 (BONFANTI et al., 2007). Foi obtido um produto puro (sólido branco) identificado como o cloridrato da 2-clorometil-3-oxibenzil-piridina (**68**) em 85% de rendimento. Dados de RMN de ^1H (CD_3OD , 500 MHz): δ 4,97 (s, 2H), 5,45 (s, 2H), 7,38 (m, 1H), 7,43 (m, 2H), 7,52 (m, 2H), 7,96 (dd, 1H, $J = 8,5; 5,5$ Hz), 8,32 (dd, 1H, $J = 8,5; 1,5$ Hz), 8,39 (dd, 1H, $J = 5,5; 1,5$ Hz). Dados de RMN de ^{13}C (CD_3OD , 125 MHz):

δ 37,3 (CH₂), 73,1 (CH₂), 128,9 (CH), 129,1 (CH), 129,9 (2 CH), 130,3 (CH), 135,1 (CH), 136,1 (C), 143,0 (C), 156,3 (C). CCD: R_f 0,58 (Hex:AcOEt 1:1).

3.4.9 Preparação do 3-quinolinil-trifluorborato de potássio (67)

O brometo de 3-quinolinil-magnésio (**65**, 2,8 mmol) foi preparado como descrito no item 3.4.7.4 e após todo magnésio ser consumido, a temperatura foi reduzida a -15 °C e 0,7 mL de triisopropil-borato (2,8 mmol) solubilizado em 5 mL de THF foi adicionado lentamente. Após 1 h a temperatura foi elevada a 0 °C e 30 min depois uma solução aquosa saturada de hidrogeno fluoreto de potássio (KHF₂, 733 mg, 9,4 mmol) foi adicionada. Em seguida o solvente foi evaporado e o sólido obtido foi extraído duas vezes com acetona a t.a. e duas vezes com acetona quente. As fases orgânicas foram reunidas e o solvente evaporado. O sólido foi re-dissolvido no mínimo de acetona quente, a solução foi filtrada e deixada resfriar a temperatura ambiente. Para completar a precipitação foi adicionado 1 mL de éter etílico. Foi obtido um sólido vermelho em 5% de rendimento por filtração à pressão reduzida. (DARSES; MICHAUD; GENÊT, 1999).

3.5 Avaliação da atividade anticolinesterásica

O ensaio qualitativo por bioautografia (Cromatografia em Camada Delgada – CCD), consiste no desenvolvimento de uma cromatoplaça com a substância em análise, juntamente com um controle positivo (fisostigmina ou galantamina) inibidor da enzima acetilcolinesterase (AChE) (Figura 19). Após o desenvolvimento da cromatografia, a cromatoplaça foi borrifada com a solução da enzima (Solução A) e incubada em câmara úmida fechada a 37 °C por 20 minutos. Em seguida borrifada com a solução do revelador (Solução D). A coloração roxa aparece em aproximadamente 2 minutos. O aparecimento de halo branco sobre um fundo de coloração roxa indica que houve inibição da atividade enzimática. A Figura 19 ilustra um esquema das reações que se sucedem até o aparecimento da coloração na cromatoplaça. A AChE hidroliza o acetato de 1-naftila levando ao α -naftol que reage com o sal fast blue B (substituição eletrofílica aromática) formando o corante azóico (roxo). Quando a

amostra é capaz de inibir a enzima o α -naftol não é formado e é possível observar um halo branco na cromatoplaça (MARSTON; KISSLING; HOSTETTMANN, 2002).

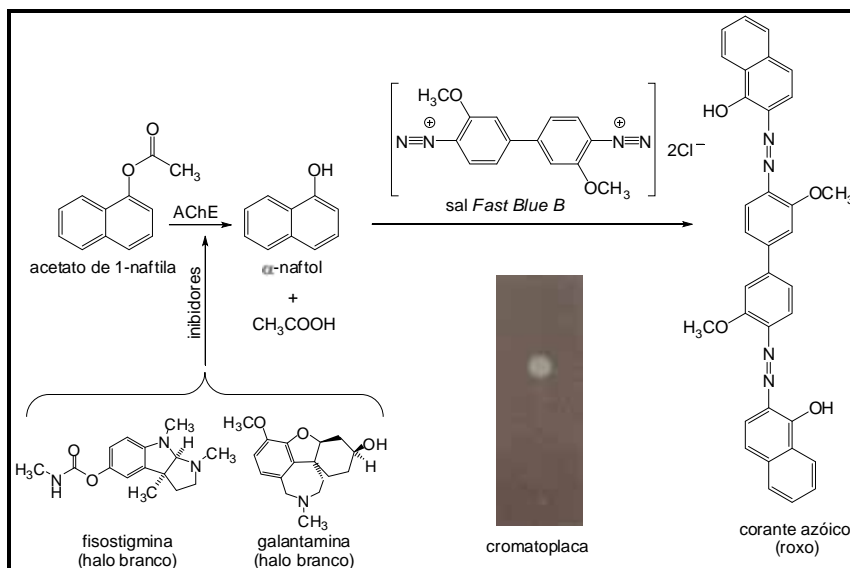


Figura 19 - Reações químicas envolvidas no ensaio por bioautografia.

Os resultados foram observados e fotografados em câmera fotográfica Epson e os valores de R_f calculados para os halos onde houve inibição da enzima.

3.5.1 Preparo das soluções

Preparo do tampão: 0,313 g Tris/HCl em 40 mL de H_2O deionizada (ajustar pH ~7,8)

Solução A: A enzima acetilcolinesterase (1000 U, Sigma, produto n° C2880) é previamente dissolvida em 1 mL da solução tampão Tris/HCl, pH ~ 7,8. Dessa solução, 200 μ L são diluídos em 30 mL do tampão e adicionado 30 mg de albumina bovina;

Solução B: 12,5 mg de acetato de 1-naftila em 5 mL de etanol;

Solução C: 50 mg do sal *Fast Blue B* em 20 mL de água destilada;

Solução D: juntar as **solução B e C**.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Planejamento do alvo sintético através dos estudos de modelagem molecular

Para os estudos de *docking* molecular, foi selecionada a estrutura cristalina da *TcAChE*, que é muito semelhante à *AChE* humana (*hAChE*), sendo uma das principais diferenças o resíduo de aspartato da tríade catalítica para a *hAChE* que é substituído pelo glutamato na *TcAChE*. Esta enzima é composta por 537 aminoácidos e caracterizada por uma cavidade profunda e estreita que leva até o sítio ativo (BARRIL; OROZCO; LUQUE, 2001; CASTRO; MARTINEZ, 2001). Existem complexos *hAChE*-ligantes depositados no PDB (BERMAN et al., 2000), porém foram observadas deformações estruturais em várias regiões da enzima o que levou à escolha da *TcAChE*.

As diferenças estruturais entre os *IACHEs* conhecidos ilustram a diversidade e complexidade das interações entre os inibidores e a enzima. Por este motivo foram analisados diversos complexos *TcAChE*-ligante, para observar as deformações estruturais que cada um dos inibidores poderia conferir à enzima. Estas características devem ser analisadas, pois a escolha da enzima é fundamental na criação de um modelo de *docking* confiável e reprodutível.

O complexo *TcAChE*-rivastigmina foi descartado deste estudo, já que este inibidor apresenta um modo de inibição pseudo-reversível, formando uma ligação covalente com a enzima (VIEGAS JR. et al., 2004), que gera uma deformação nesta proteína.

Foi observado que o resíduo de fenilalanina (Phe330) pode assumir três diferentes conformações dependendo da natureza do inibidor e esta diferença não pode ser ignorada, pois este resíduo faz parte da cavidade aromática, que é fundamental na orientação do ligante para atingir o sítio ativo da enzima (BARRIL; OROZCO; LUQUE, 2001).

As três possíveis conformações da Phe330 estão descritas na literatura, sendo o complexo *TcAChE*-donepezil caracterizado pela conformação aberta, *TcAChE*-tacrina pela conformação fechada e *TcAChE*-huperzina A pela conformação meio-aberta (XIE et al., 2006).

Por este motivo foram escolhidas para os estudos de *docking* as estruturas cristalinas de AChE complexadas com a tacrina (**11**), donepezil (**12**) e (-)-huperzina A (**15**), com os códigos PDB 1ACJ, 1EVE e 1VOT, respectivamente. Num primeiro momento desejava-se selecionar uma destas três estruturas protéicas para dar continuidade ao trabalho. Para isto, as enzimas foram tratadas como descrito na metodologia e foram realizados experimentos de *self-docking* e *cross-docking* nas três proteínas com os ligantes **11**, **12**, **15** e galantamina (**14**).

O *self-docking* consiste em atracar o ligante no próprio receptor em que foi cristalizado e *cross-docking* em atracar o ligante nas outras proteínas estudadas (NABUURS; WAGENER; VLIEG, 2007). Em seguida, a estrutura do ligante obtida por *docking* é sobreposta com a estrutura original obtida da enzima em que foi cristalizado. Quanto maior o grau de similaridade obtido entre as duas estruturas, melhor o modelo de *docking*. A Tabela 1 ilustra como foram realizadas as análises de *self* e *cross-docking*.

Tabela 1 - Experimentos realizados de *self* e *cross-docking*

	1ACJ	1EVE	1VOT
tacrina	<i>self-docking</i> ^b	<i>cross-docking</i>	<i>cross-docking</i>
donepezil	<i>cross-docking</i> ^c	<i>self-docking</i>	<i>cross-docking</i>
(-)-huperzina A	<i>cross-docking</i>	<i>cross-docking</i>	<i>self-docking</i>
galantamina ^a	<i>cross-docking</i>	<i>cross-docking</i>	<i>cross-docking</i>

^a retirada do complexo TcAChE-galantamina com código PDB 1DX6

^b auto-*docking*

^c *docking* cruzado

A comparação estrutural nestas técnicas é realizada pela medida de RMSD (*Root Mean Squared Deviation*). Este valor é obtido pela soma das distâncias entre os átomos correspondentes nas duas estruturas dividida pelo número de átomos. A unidade de RMSD é angstrom (Å) e quanto mais próximo o valor obtido de zero, mais similares são as estruturas e melhor o modelo de *docking* analisado (SOTRIFFER; DRAMBURG, 2005).

As sobreposições obtidas para o *self-docking* das três enzimas foram satisfatórias, porém as sobreposições do *cross-docking* revelaram diferenças grandes entre as estruturas dos ligantes. Estes resultados comprovam a

importância da conformação do resíduo de Phe330 no mecanismo de inibição da enzima. Como na técnica de docking o receptor não apresenta mobilidade, optou-se por seguir os estudos computacionais utilizando as três enzimas (1ACJ, 1EVE e 1VOT).

Dados da literatura descrevem que a galantamina confere conformação aberta ao resíduo de Phe330 (PILGER et al., 2001) sendo que a melhor sobreposição obtida por *cross-docking* para este ligante foi para a enzima 1EVE, que também tem a Phe330 na mesma conformação. Este resultado confirma que as estruturas protéicas estão otimizadas e que a avaliação das variações na conformação da Phe330 é importante e pode influenciar na complementaridade das interações enzima-ligante. Isto demonstra a relevância da análise nas três enzimas para gerar um modelo de *docking* mais eficiente e confiável a ser utilizado nos estudos com novos ligantes.

A Figura 20 ilustra as três possíveis conformações da Phe 330 sem os respectivos ligantes. A Figura 21 representa a tacrina, o donepezil e a (-)-huperzina A no sítio ativo da *TcAChE*.

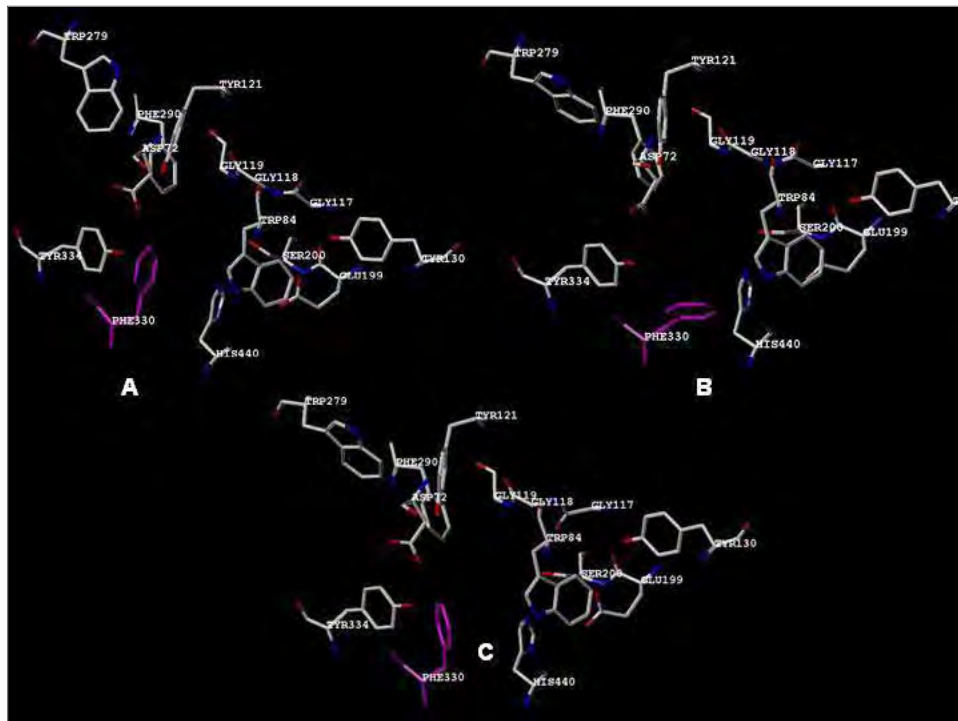


Figura 20 - Orientações da Phe330 (roxo) no sítio ativo da AChE para 1ACJ (A), 1EVE (B) e 1VOT (C).

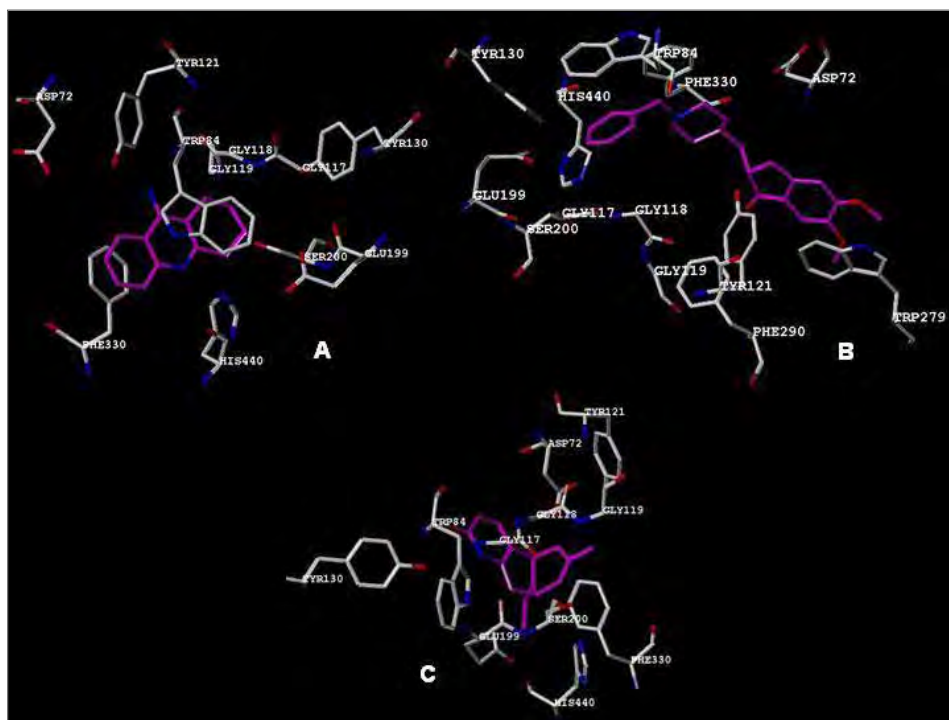


Figura 21 - TcAChE complexada com tacrina (A), donepezil (B) e (-)-huperzina A.

Com o modelo de *docking* determinado, os estudos foram direcionados à avaliação do potencial inibitório da (-)-3-O-acetil-espectalina (**16**, Figura 22) e, já pensando na viabilidade sintética dos híbridos moleculares a serem planejados, optou-se por verificar virtualmente a importância do tamanho da cadeia lateral de **16**, bem como a necessidade de quiralidade nesta molécula para a atividade anticolinesterásica. Assim, foram planejados alguns análogos deste alcalóide variando a estereoquímica dos centros estereogênicos (**21** e **22**), aromaticidade do anel (**23**) e tamanho da cadeia lateral (**24**, Figura 22).

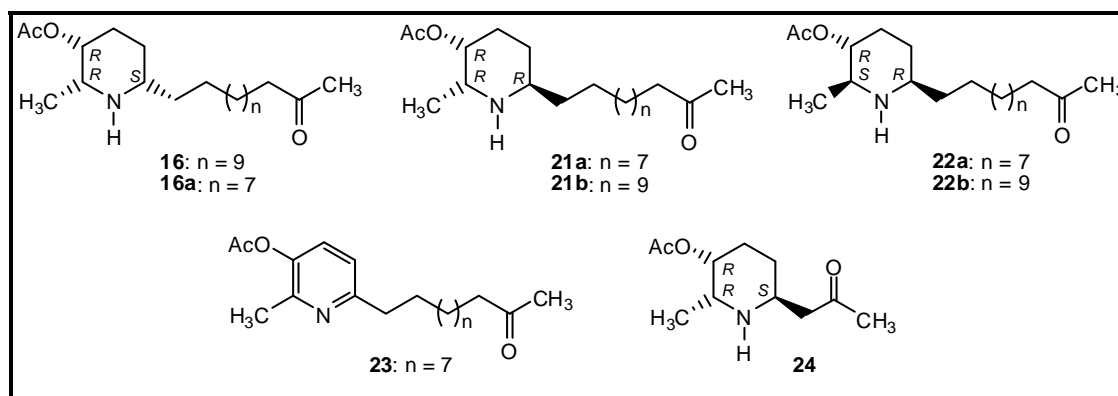


Figura 22 - Substâncias inicialmente selecionadas para estudos de *docking*.

Os análogos **16**, **21** e **22**, que apresentam variações de duas unidades metilênicas no tamanho da cadeia lateral, foram planejadas a partir da observação dos alcalóides homólogos (-)-cassina e (-)-espectralina que ocorrem em *Senna spectabilis* (PIVATTO et al., 2005).

Foram realizadas as análises de *docking* de todas as estruturas (Figura 22) nas três estruturas cristalinas de TcAChE (1ACJ, 1EVE e 1VOT). Os valores de $\Delta G_{\text{ligação}}$ para estas substâncias, bem como para a tacrina, (-)-huperzina A, donepezil e galantamina estão apresentados na Tabela 2.

Tabela 2 - Valores de $\Delta G_{\text{ligação}}$ (kJ/mol) para **16** e análogos planejados

	1ACJ	1EVE	1VOT
tacrina	-15,140	-14,080	-11,660
(-)-huperzina A	-19,850	-11,860	-15,700
donepezil	-11,760	-18,980	-14,330
galantamina	-16,770	-19,550	-10,050
16	- 11,220	- 7,617	- 1,656
16a	- 7,242	- 8,572	- 3,921
21a	- 7,202	- 11,141	- 3,159
21b	- 5,800	- 9,246	- 0,288
22a	- 7,247	- 10,449	- 4,422
22b	- 6,291	- 7,904	- 1,497
23	- 10,147	- 21,689	- 10,739
24	- 19,388	- 13,983	- 8,319

Os compostos **23** e **24** apresentaram melhores valores para $\Delta G_{\text{ligação}}$ e por isto foram selecionados como modelos para a hibridação molecular. Cabe ressaltar que **23** não apresenta centros estereogênicos e **24** tem cadeia lateral pequena, fatores que contribuem à viabilidade sintética. Também era de interesse selecionar uma substância estudada no NuBBE para servir como modelo na hibridação molecular, sendo que dentre os metabólitos avaliados, **16a** foi o que apresentou os melhores valores de $\Delta G_{\text{ligação}}$, além da melhor geometria no interior da enzima.

A Figura 23 ilustra os compostos **16a**, **23** e **24** no sítio ativo de *TcAChE*, relativos aos melhores valores de $\Delta G_{\text{ligação}}$ para cada (1EVE, 1EVE e 1ACJ, respectivamente).

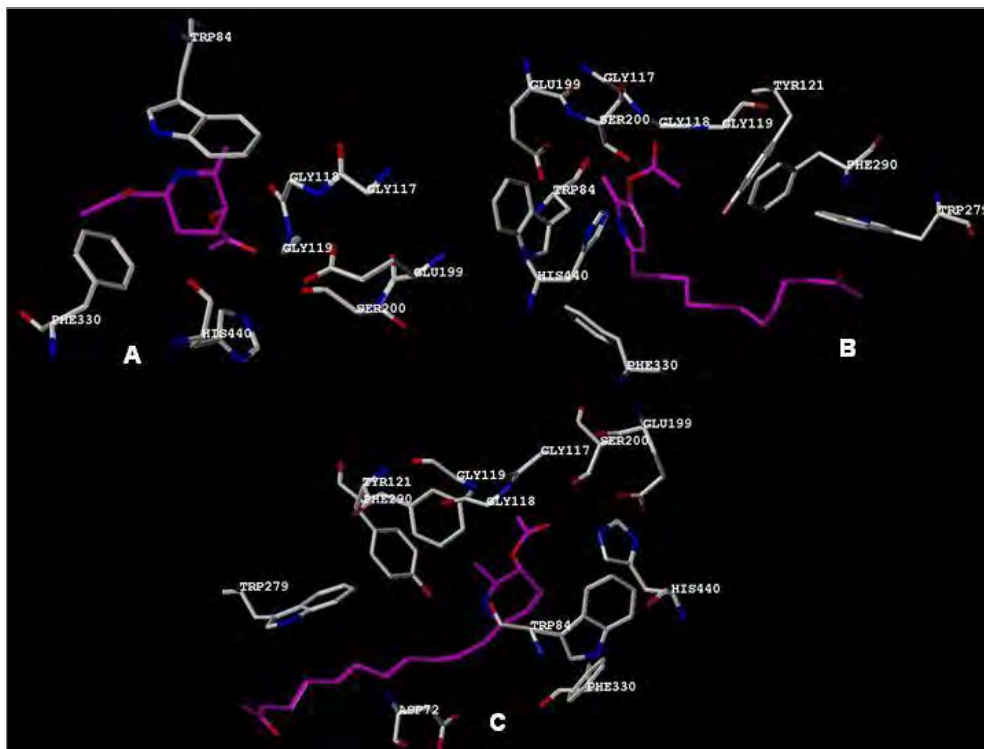


Figura 23 - Moléculas selecionadas como modelos para hibridação molecular (roxo), **24** (A), **23** (B) e **16a** (C) no sítio ativo da *TcAChE*.

As sobreposições dos IACHe clássicos com a (-)-3-O-acetil-espectalina (**16**) e análogos podem auxiliar no desenho de híbridos moleculares capazes de interagir em diferentes pontos da enzima.

Inibidores que atuam no sítio catalítico e periférico aniônico mutuamente são muito atrativos, já que a AChE também está presente em tecidos que não estão diretamente relacionados aos nervos colinérgicos. Estudos recentes descrevem que o peptídeo β -amilóide se liga ao sítio periférico aniônico da AChE formando um complexo muito estável, que é capaz de alterar as propriedades bioquímicas e farmacológicas da enzima, além de aumentar a neurotoxicidade das fibrilas β -amilóides. Portanto, a modulação da enzima AChE pode melhorar o déficit colinérgico e diminuir a deposição do peptídeo β -amilóide, que representa um alvo promissor no tratamento da Doença de Alzheimer (CASTRO; MARTINEZ, 2001).

Os compostos **16a**, **23** e **24** foram sobrepostos com o donepezil, a (-)-huperzina A, a tacrina e a galantamina para o planejamento racional dos híbridos a serem avaliados por *docking* e as melhores sobreposições foram escolhidas tendo como critério de seleção o maior número de interações do ligante com a enzima.

As sobreposições do donepezil com **16a**, **23** e **24** estão ilustradas na Figura 24 e a partir delas foram desenhados os híbridos **19**, **20** e **21** (Figura 25).



Figura 24 - Sobreposições do donepezil (verde) com **24** (A), **16a** (B) e **23** (C).

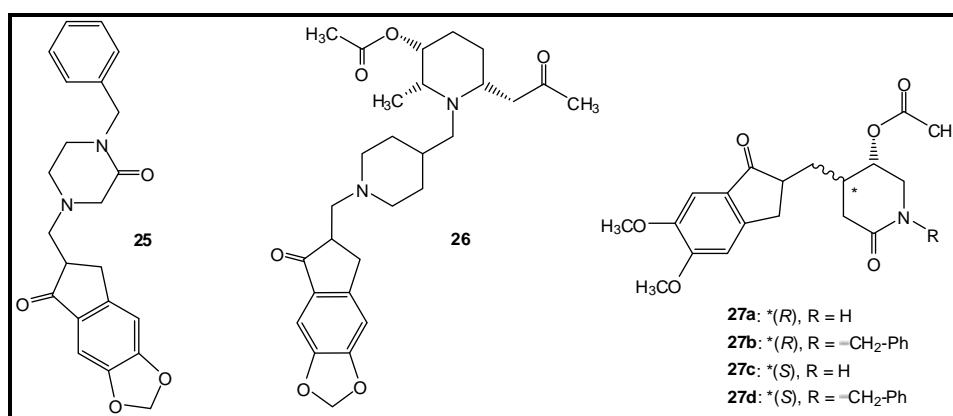


Figura 25 - Híbridos do donepezil com os compostos **16a**, **23** e **24**.

A (-)-huperzina A foi sobreposta com as substâncias **16a**, **23** e **24** (Figura 26) e a partir das sobreposições foram desenhados os híbridos **28** e **29** (Figura 27).

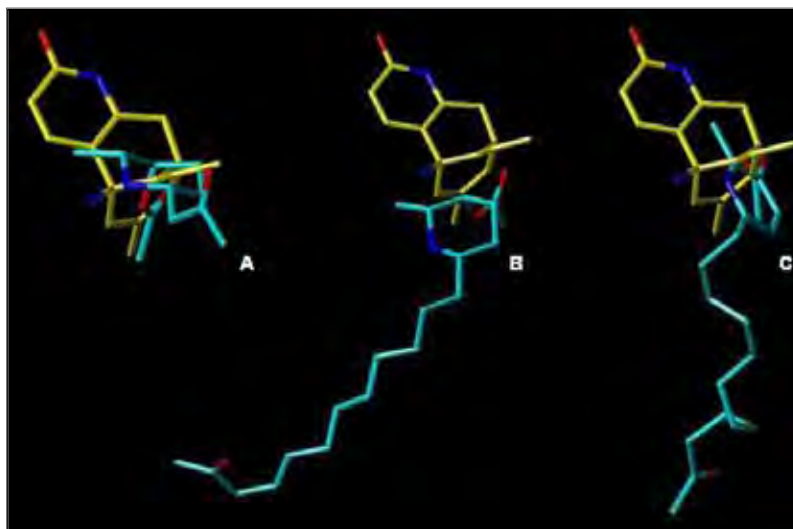


Figura 26 - Sobreposições da (-)-huperzina A (amarelo) com **24** (A), **16a** (B) e **23** (C).

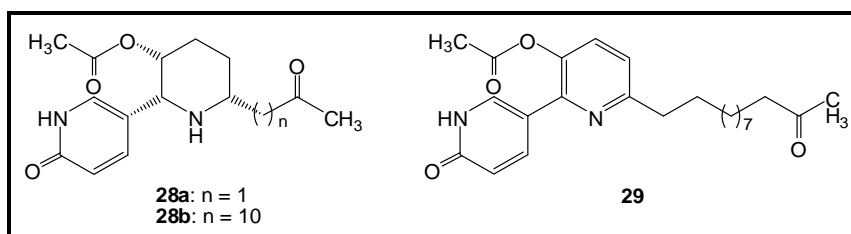


Figura 27 - Híbridos da (-)-huperzina A com **16a**, **23** e **24**.

A sobreposição da tacrina (**11**) com o composto **24** gerou o híbrido **30** (Figura 28).

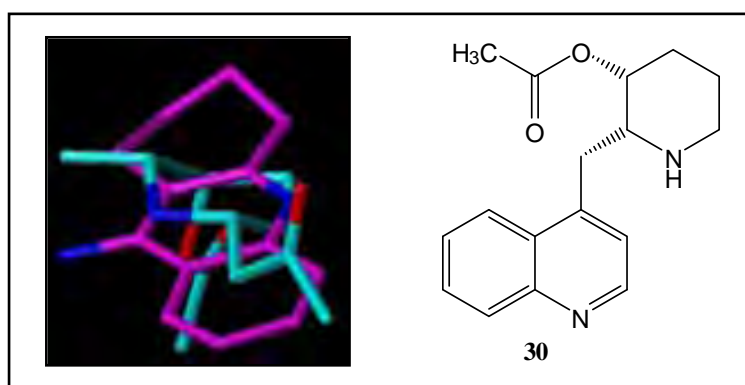


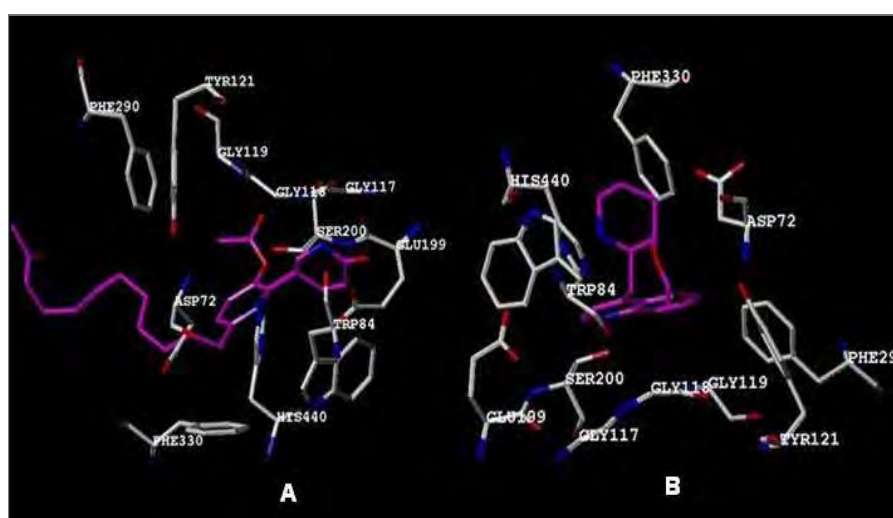
Figura 28 - Sobreposição de **11** (roxo) com **24** e o híbrido desenhado **30**.

Foi realizado *docking* molecular destes híbridos nas três estruturas de TcAChE. Os valores de $\Delta G_{\text{ligação}}$ para estes compostos estão descritos na Tabela 3.

Tabela 3 - Valores de $\Delta G_{\text{ligação}}$ (kJ/mol) para os híbridos planejados

	1ACJ	1EVE	1VOT
tacrina	-15,140	-14,080	-11,660
(-)-huperzina A	-19,850	-11,860	-15,700
donepezil	-11,760	-18,980	-14,330
galantamina	-16,770	-19,550	-10,050
25	-7,548	-17,156	-11,153
26	-6,557	-15,721	-12,156
27a	-13,883	-15,916	-10,817
27c	-12,528	-18,047	-9,554
27b	-7,700	-15,000	-9,233
27d	-6,972	-12,102	-10,617
28a	-12,790	-16,366	-14,879
28b	-11,590	-14,604	-5,693
29	-17,165	-26,389	-20,661
30	-25,851	-21,964	-19,696

A maioria dos híbridos apresentou valores de $\Delta G_{\text{ligação}}$ mais satisfatórios que os ligantes utilizados como modelo (tacrina, (-)-huperzina A, donepezil e galantamina), justificando o planejamento racional realizado. As substâncias **29** e **30** apresentaram os melhores valores de $\Delta G_{\text{ligação}}$ nos sítios ativos de 1EVE e 1ACJ, respectivamente (Figura 29).

**Figura 29** - Híbridos (roxo) **29** (A) e **30** (B) no sítio ativo da TcAChE.

Analisando a viabilidade sintética destes híbridos, foram construídos vários análogos (Figura 30). Estes compostos foram submetidos ao *docking* e os valores de $\Delta G_{\text{ligação}}$ estão descritos na Tabela 4.

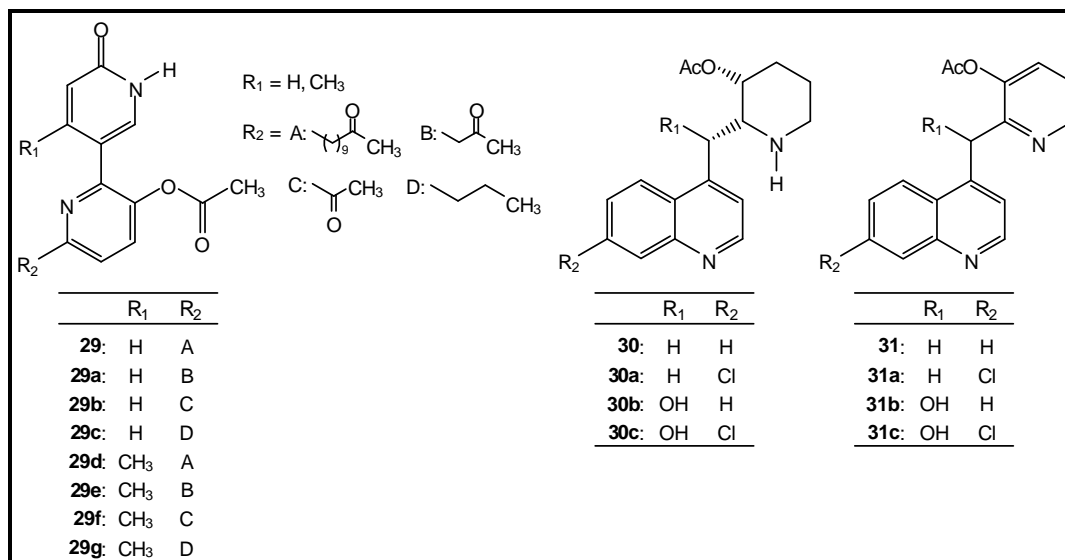


Figura 30 - Análogos planejados a partir dos híbridos 29 e 30.

Tabela 4 - Valores de $\Delta G_{\text{ligação}}$ (kJ/mol) para os análogos dos híbridos 29 e 30

	1ACJ	1EVE	1VOT
29	-17,165	-26,389	-20,661
29a	-25,156	-29,239	-26,110
29b	-25,459	-30,710	-25,237
29c	-20,533	-29,177	-13,327
29d	-16,131	-29,212	-15,863
29e	-21,045	-29,128	-18,978
29f	-22,603	-22,277	-21,955
29g	-19,991	-31,276	-17,920
30	-25,851	-21,964	-19,696
30a	-20,554	-17,711	-17,315
30b	-23,691	-22,021	-19,588
30c	-17,030	-20,243	-18,433
31a	-28,583	-27,340	-22,132
31b	-24,848	-26,254	-19,386
31c	-26,500	-27,690	-21,020
31d	-22,187	-26,898	-20,850

Os análogos piridínicos **31** gerados a partir de **30** apresentaram interações mais efetivas com a enzima que os análogos piperidínicos, o que pode ser explicado pelas interações $\pi-\pi$ que os compostos **31a-d** podem realizar com os resíduos de aminoácidos da cavidade aromática. A análise deste resultado é bastante interessante tendo em conta a viabilidade sintética destes híbridos, uma vez que a preparação dos análogos **30a-d** necessitaria de síntese enantiosseletiva.

Analisando os dados da Tabela 4 foi possível observar que os híbridos **29g** e **31a** apresentaram os melhores valores de $\Delta G_{\text{ligação}}$ nas enzimas 1EVE e 1ACJ, respectivamente, sendo que o segundo foi selecionado para síntese devido a sua maior viabilidade (Figura 31). Além disto, o híbrido **31c** também apresentou bom valor de $\Delta G_{\text{ligação}}$ na enzima 1EVE sendo um intermediário sintético na preparação de **31a**.

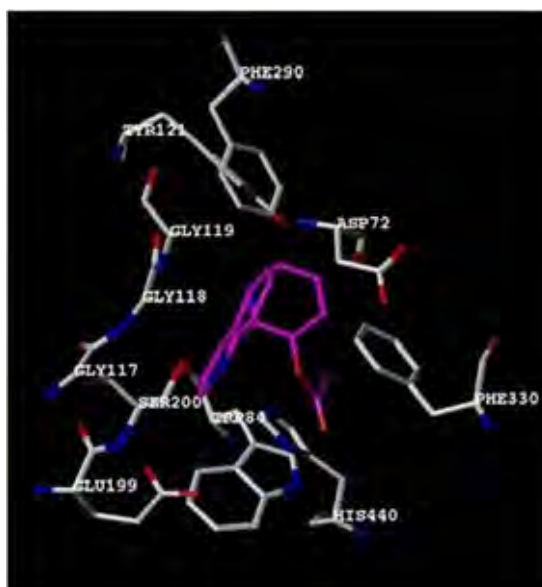


Figura 31 - Híbrido **31a** no sítio ativo da AChE selecionado como alvo sintético.

4.2 Estudos Computacionais dos IChE descobertos no NuBBE

4.2.1 Análise do modo de inibição dos derivados semi-sintéticos

Os derivados semi-sintéticos **32** e **33** (Figura 32) descobertos no NuBBE, foram patenteados devido a suas potentes atividades inibidoras da AChE *in vivo*, além de baixa toxicidade. Estas substâncias despertaram o interesse de uma indústria farmacêutica e estão em fase pré-clínica.

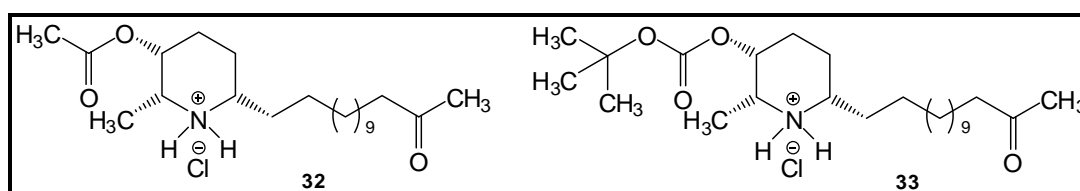


Figura 32 - IChEs em fase pré-clínica.

Estudos farmacológicos sobre o modo de inibição destes alcalóides indicaram que eles são IChE não-competitivos (CASTRO et al., 2008). Analisando os resultados computacionais relativos à inibição da TcAChE pela (-)-3-O-acetil-espectralina, foi possível observar que o modo de inibição *in silico* também era não-competitivo. Este fato motivou estudos computacionais mais elaborados para verificar se o modo de inibição obtido *in silico* seria coerente com os resultados *in vivo*.

Os experimentos de *docking* foram realizados utilizando o programa FlexE, que fornece dados mais sofisticados que o FlexX, já que confere uma certa flexibilidade a proteína através do método *ensemble* (item 3.2).

O FlexE gera uma proteína global considerando todas as características das enzimas selecionadas (1ACJ, 1EVE e 1VOT), não sendo necessário realizar o *docking* nas três proteínas separadamente. Como explicado no item 4.1, foi realizado o *cross-docking* na proteína gerada pelo programa com os IChEs tacrina, donepezil, (-)-huperzina A e galantamina.

A análise computacional revelou que nenhum destes derivados foi capaz de penetrar profundamente no sítio ativo da enzima, o que pode estar associado à longa cadeia lateral em C-6 (Figura 33). Além disto, estes compostos não interagiram com nenhum dos resíduos da tríade catalítica (Ser200, Glu327 e His440), indicando um modo de inibição não-competitivo.

O donepezil apresenta uma inibição não-competitiva e interage com o resíduo de Phe330 através do anel piperidínico, sendo esta uma das principais características no seu modo de inibição (KRYGER; SILMAN; SUSSMAN, 1999). Por este motivo, foram analisadas as possíveis interações entre os análogos semi-sintéticos e a Phe330. O composto **32** não interage com este resíduo (Figura 33A), já a função *terc*-butil de **33** realiza interações de van der Waals com a Phe330 (Figura 33B).

A entrada da cavidade, também chamada de sítio periférico aniônico, está representada pelos resíduos de aminoácidos Tyr70, Tyr121 e Trp279 (verde na Figura 33A e B e rosa na Figura 33C e D).

Foram observadas ligações de hidrogênio entre **32** e o resíduo de Tyr121 através do átomo de H pertencente ao grupo amino protonado da parte piperidínica e também através do oxigênio do grupo éster (Figura 33A). A substância **33** também apresentou ligações de hidrogênio com Tyr121, envolvendo os dois oxigênios do grupo BOC, e com Glu73 através do oxigênio do grupo carbonila terminal (Figura 33B).

Adicionalmente, estudos de docking com a acetilcolina, agonista da AChE, confirmaram o mecanismo de inibição não-competitivo destas duas substâncias, já que elas interagem em regiões diferentes da enzima (Figura 33C e D) (CASTRO et al., 2008).

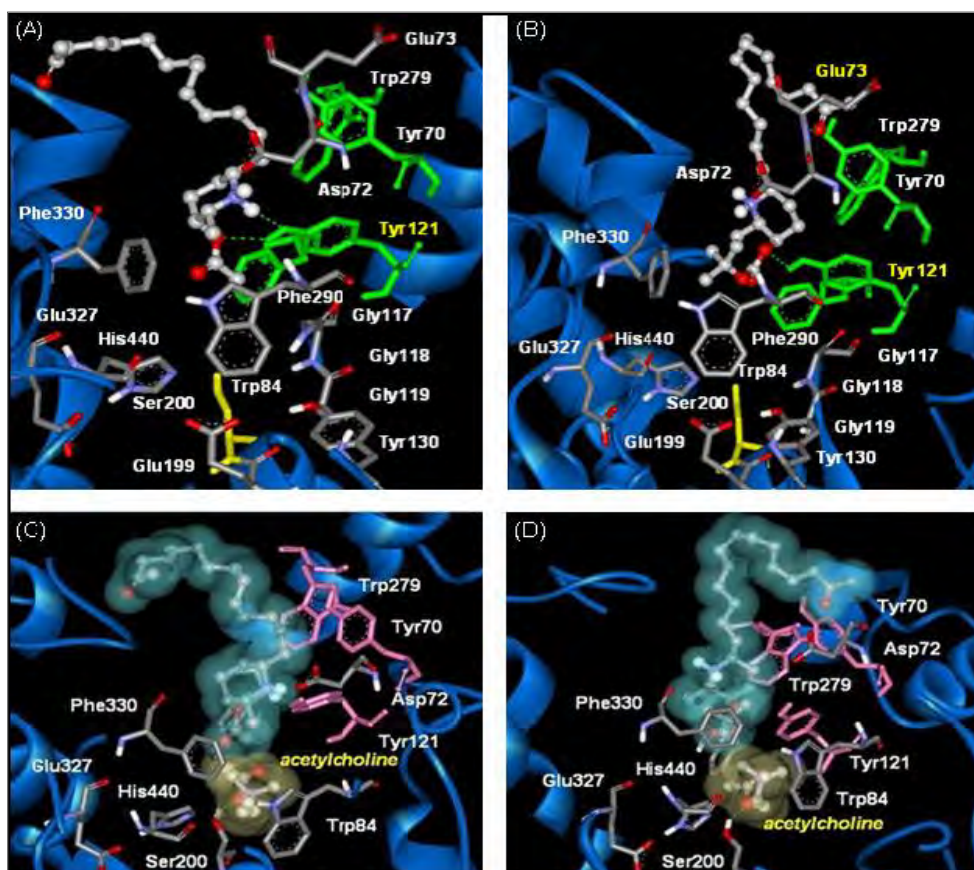


Figura 33 - Resultados *in silico* para **32** (A) e **33** (B) e comparação com a ACh (C e D).

4.2.2 Avaliação da inibição da AChE pela (-)-3-O-acetil-espectalina e (-)-3-O-acetil-cassina

O estudo realizado por Pivatto et al., 2005, revelou que os alcalóides piperidínicos de *S. spectabilis* estão em mistura de pares homólogos [(–)-cassina (**34**) e (–)-espectalina (**35**), Figura 34], portanto a reação de acetilação desta mistura para a preparação do cloridrato da (–)-3-O-acetil-espectalina (**32**), na realidade gera uma mistura de **32** e do cloridrato da (–)-3-O-acetil-cassina (**36**, Figura 34).

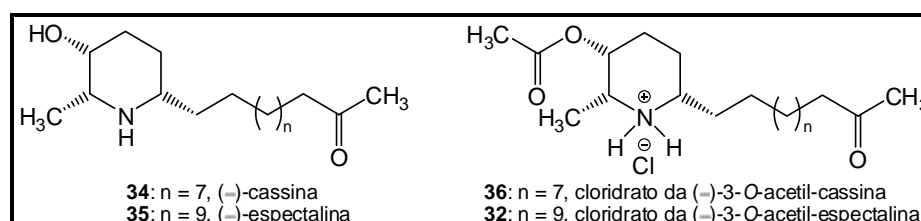


Figura 34 - Alcalóides de *S. spectabilis* e derivados semi-sintéticos.

Duas unidades metilênicas podem parecer pouco para influenciar na atividade biológica, porém o reconhecimento molecular de uma substância (micromolécula) pela biomacromolécula (enzima) é dependente da estrutura do ligante, incluindo o arranjo espacial dos seus grupamentos funcionais, que devem ser complementares ao sítio de ligação. As interações entre proteína e micromolécula apresentam características tridimensionais dinâmicas, assim, o volume molecular do ligante, as distâncias interatômicas e o arranjo espacial entre os grupamentos farmacofóricos são fundamentais na inibição de uma enzima (BARREIRO; FRAGA, 2001).

Com base nestes dados e nos resultados preliminares de *docking* descritos no item 4.1, que sugerem uma diferença no potencial de inibição da AChE entre a (-)-3-O-acetil-espectalina e (-)-3-O-acetil-cassina, foram realizados estudos computacionais mais detalhados para verificar a magnitude desta diferença.

4.2.2.1 Estudos de *docking* molecular para os derivados **32** e **36**

As análises de *docking* molecular foram realizadas utilizando o programa FlexE. O melhor valor de $\Delta G_{\text{ligação}}$ para **36** foi $-11,602$ kJ/mol, sendo que a análise do complexo enzima-ligante revelou interações de van der Waals entre o anel piperidínico e os anéis aromáticos dos resíduos Phe288 e Phe290 (Figura 35A). Além disto, **36** apresentou ligações de hidrogênio com o grupo $-NH$ da Phe288 através do grupo acetila em C-3 do anel piperidínico, com a Gly118, Gly119 e Ala201, através do oxigênio da carbonila no final da cadeia lateral e com a Tyr121 através do átomo de hidrogênio pertencente ao grupo amina protonada do anel piperidínico (Figura 35A). Este composto ainda realiza uma ligação de hidrogênio com um dos resíduos de aminoácidos da tríade catalítica (Ser200) através do oxigênio pertencente ao grupo acetila terminal (Figura 35A).

O melhor valor de $\Delta G_{\text{ligação}}$ para **32** foi $-2,236$ kJ/mol, quando comparado com o $\Delta G_{\text{ligação}}$ obtido para **36**, sugere que **32** seja menos potente na inibição da AChE que **36**. O composto **32** realiza ligações de hidrogênio com a Lys341 através do grupo acetila em C-3 do anel piperidínico, com a Pro76 através do átomo de hidrogênio pertencente ao grupo amina protonada do anel

piperidínico e com Asn85 através do grupo acetila terminal (Figura 35B). Este composto apresentou um número menor de interações com a AChE justificando os maiores valores de $\Delta G_{\text{ligação}}$.

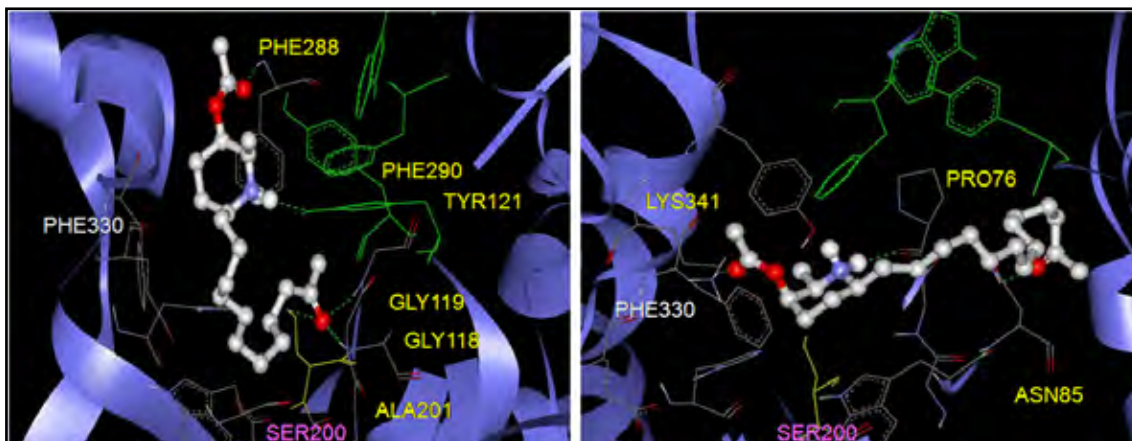


Figura 35 - Compostos **36** (A) e **32** (B) no sítio ativo da TcAChE.

4.2.2.2 Estudos de Dinâmica Molecular

Com os estudos de *docking* realizados, a dinâmica molecular (DM) foi uma ferramenta utilizada para validação dos dados obtidos, bem como na avaliação do comportamento conformacional das moléculas complexadas com a AChE em solução. Os experimentos de DM são importantes para identificar possíveis alterações conformacionais, seja na proteína ou no ligante, e ligações/interações que podem ser relevantes para a complementaridade da molécula com a enzima.

Para obter informações adicionais considerando a dinâmica dos compostos na inibição da AChE, os complexos enzima-**32** e enzima-**36** foram submetidos às simulações de DM utilizando água como solvente.

Os complexos finais, em relação aos obtidos por *docking*, estão representados na Figura 36, sendo os ligantes representados por esferas. A Figura 36A ilustra o ligante **36** na orientação obtida por *docking* (rosa) sobreposta com a orientação obtida após 5 ns de DM (azul). A Figura 36B representa **32** na orientação obtida por *docking* (rosa) sobreposta com a orientação obtida após 5 ns de DM (verde). Finalmente, a Figura 36C ilustra as orientações obtidas após 5 ns de DM para **32** (verde) e **36** (azul).

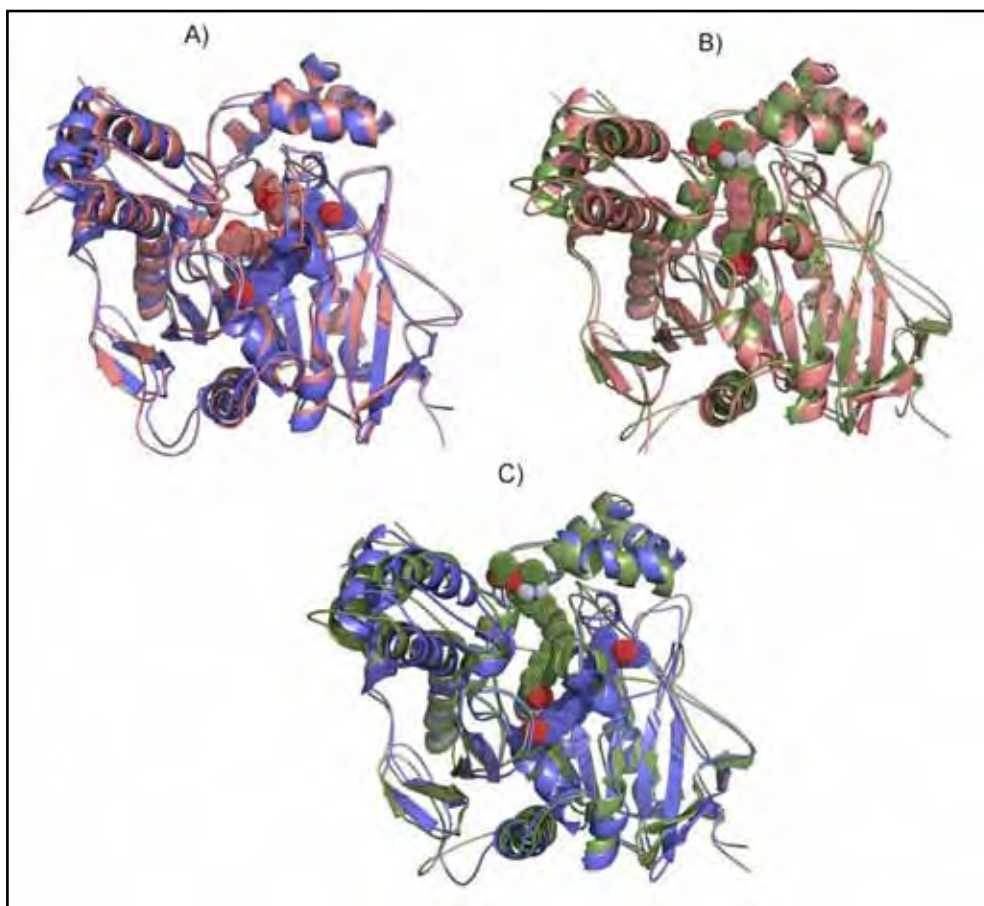


Figura 36 - Sobreposições dos complexos AChE-**32** e AChE-**36**.

Ambos os compostos apresentaram variações nas orientações dos ligantes, indicando que o solvente tem um papel relevante na flexibilidade e estabilização do complexo. Entretanto, a acomodação conformacional não parece induzir modificações nos elementos da estrutura secundária da proteína.

Foram observadas interações no fundo da cavidade da enzima para os dois compostos envolvendo o resíduo de aminoácido Trp84, porém **36** apresentou melhor energia de interação com a AChE ($-7,7 \pm 6,5$ kJ/mol) quando comparado com **32** ($-1,9 \pm 2,6$ kJ/mol) (Tabela 5). Na região média da cavidade tanto **32** quanto **36** interagem com o Trp432, que está próximo ao resíduo de Phe330 (Tabela 5).

Tabela 5 - Energia de interação entre os compostos **32**, **36** e AChE em kJ/mol

	32	36
Tyr70	0.0±0.0	-1.8±1.5
Asp72	0.0±0.0	-13.7±10.0
Gln74	-3.6±6.4	0.0±0.0
Trp84	-1.9±2.6	-7.7±6.5
Gly118	0.0±0.0	0.0±0.0
Tyr121	0.0±0.0	-5.0±7.8
Ser122	0.0±0.0	-2.1±4.0
Asp285	-9.4±8.1	0.0±0.0
Ser286	-2.6±2.5	0.0±0.0
Arg289	-1.6±2.5	0.0±0.0
Tyr334	-4.0±5.8	0.0±0.0
Gly335	-2.0±1.8	0.0±0.0
Trp432	-1.3±1.9	-1.4±2.9
ΔH_{AChE}	-30.9±17.7	-34.0±15.1
$\Delta H_{\text{solvente}}^a$	-92.6±16.5	-77.7±15.4

^a energia de interação entre os compostos descomplexados com o solvente.

No topo da cavidade, **36** faz interações com os resíduos Tyr70 e Asp72. Já no sítio catalítico da enzima, **36** interage com a Tyr121 e Ser122, sendo que estas interações não são observadas para **32**, porém este composto interage com os resíduos Gln74, Asp285, Ser286, Arg289, Tyr334 e Gly335 (Tabela 5).

Considerando a grande flexibilidade de **32** e **36**, foi realizada a simulação destes compostos na presença do solvente, sem a proteína, sendo que o gráfico de RMSF (*Root Mean Square Fluctuation*) para os dois ligantes mede a flutuação dos átomos do sistema (Figura 37). Esta é uma propriedade média de todo o tempo de simulação. Analisando este gráfico é possível observar que a flutuação do composto **32** no seu estado complexado (linha vermelha) diminui quando comparado com seu estado livre em solução (linha preta). Além disto, a flutuação no estado complexado de **32** é menor que a flutuação no estado complexado de **36**, já no estado livre em solução ocorre o inverso. Esta análise revelou que **32** tornou-se mais “organizado” que **36** quando complexado com a enzima, ou seja, o custo entrópico foi maior para **32**

que para **36**. Isto significa que a complexação e o desencadeamento do efeito terapêutico pelo composto **32** tende a ser menos favorável que para **36**.

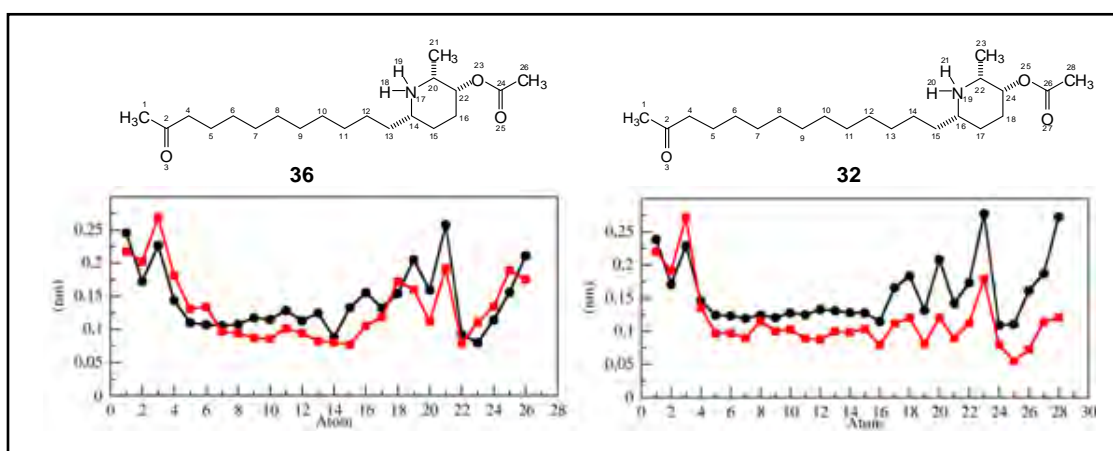


Figura 37 - Gráficos de RMSF para **32** e **36** nas formas complexadas (vermelho) e descomplexadas (preto).

A simulação destes dois diferentes complexos obtidos por *docking* levou a obtenção de energias de interação de $-34,0 \pm 15,1$ kJ/mol e $-30,9 \pm 17,7$ kJ/mol para os complexos *TcAChE-36* e *TcAChE-32*, respectivamente (Tabela 5). A diferença entre as energias de interações entre estes dois compostos e o solvente (descomplexados) e as energias quando complexados deve ser associada ao custo entálpico relacionado com a inibição da AChE por estes ligantes.

O composto **36** apresentou interações mais favoráveis com a enzima que com o solvente, já com **32** ocorreu o inverso. Assim, **36** necessita de um menor custo entálpico para a complexação com a proteína, sendo um inibidor da AChE mais potente que **32**, conclusão também obtida pelos resultados de *docking*.

4.3 Síntese

O híbrido **31a** escolhido como alvo sintético teve como critério de seleção o melhor valor de $\Delta G_{\text{ligação}}$ ($-28,583$ kJ/mol), obtido para as interações TcAChE-**31a**. Além disto, o híbrido **31c** é um dos intermediários para a preparação de **31a** (Figura 38) e também apresentou $\Delta G_{\text{ligação}}$ satisfatório ($-27,690$ kJ/mol). Portanto, ao final da via sintética de **31a** seriam obtidos dois híbridos potenciais IChE. Analisando a estrutura de **31c** é possível reconhecer dois padrões estruturais: uma quinolina substituída na posição 4 e uma piridina di-substituída nas posições 2 e 3. O acoplamento destas subunidades poderia ser realizado através da reação entre a 4-lítio-quinolina (**39**), que seria obtida a partir da 4-bromo/cloro-quinolina (**40**, comerciais), e o aldeído **37**. Como **37** não é comercial, ele pode ser obtido pela oxidação seguida de acetilação do álcool **38** (Figura 38).

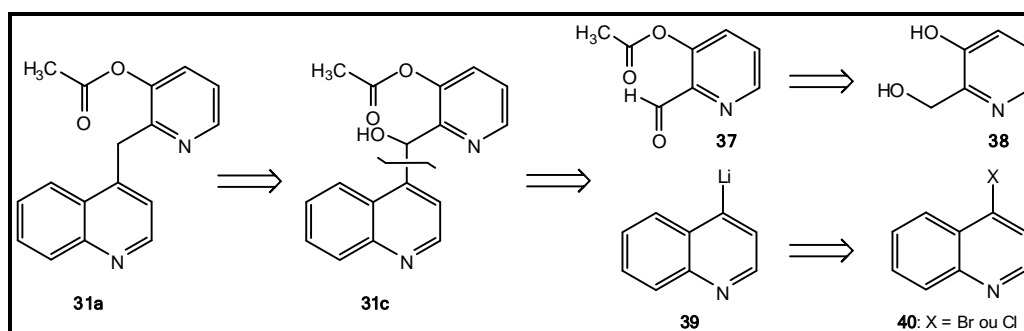


Figura 38 - Análise retrossintética do híbrido **31a**.

A metodologia sintética proposta inicialmente para a obtenção de **31a** consiste numa rota sintética convergente (Figura 39). A primeira etapa seria a obtenção do aldeído **41** a partir da reação de oxidação do álcool comercial 3-hidroxi-2-metil-hidroxi-piridina (**38**) utilizando dióxido de manganês. Em seguida, a reação entre **41** e anidrido acético levaria ao produto acetilado **37**.

Após a obtenção e caracterização de **37**, a reação entre a 4-bromoquinolina (**42**, Figura 39) e *n*-BuLi em THF a -50 °C sob atmosfera inerte levaria a 4-lítioquinolina (**39**) correspondente (GILMAN; SODDY, 1958). Devido à alta reatividade dos organolítios, que reagem com a umidade do ar e por isto não podem ser manipulados e caracterizados, o composto **37** seria adicionado no mesmo balão contendo **39** que levaria ao híbrido **31c**.

Finalmente, a redução de **31c** com borohidreto de sódio em ácido trifluoroacético a 0 °C levaria a obtenção do híbrido **31a** (Figura 39) (LAGES et al., 1998).

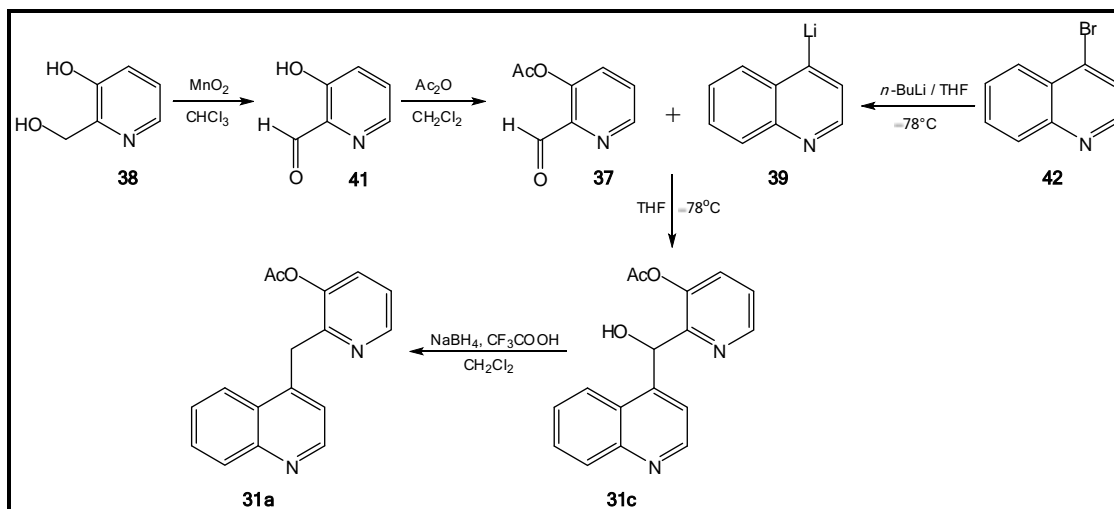


Figura 39 - Rota sintética proposta para obtenção do híbrido **31a**.

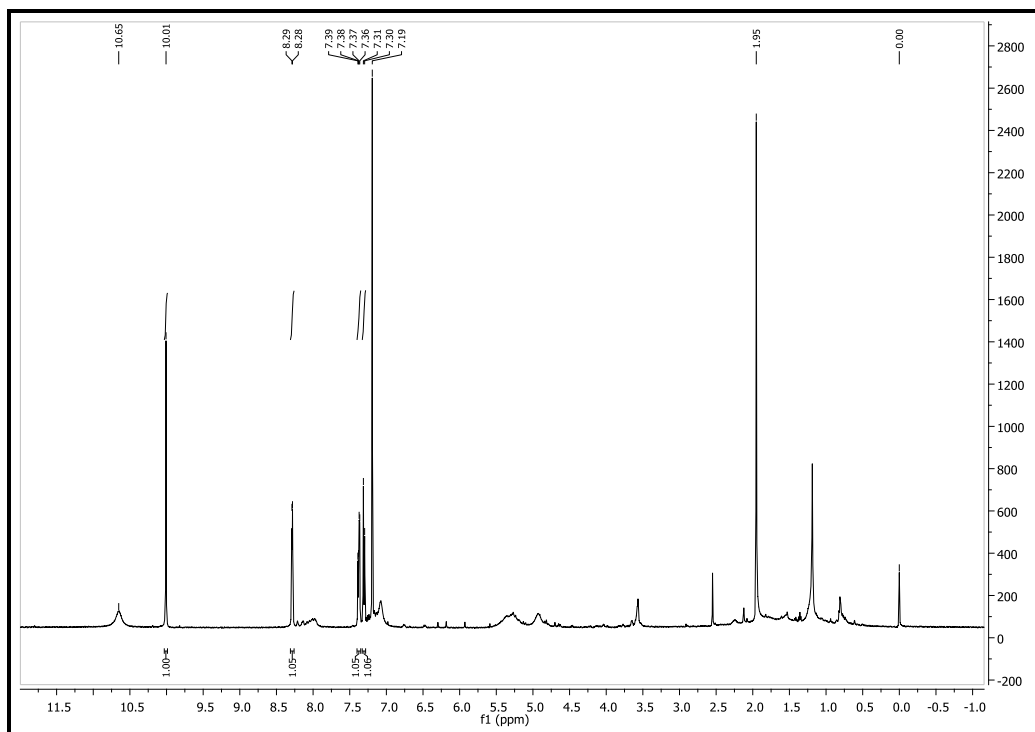
O trabalho sintético foi iniciado pela reação entre **38** e o dióxido de manganês, que é um agente oxidante clássico para oxidações de alcoóis benzílicos e alílicos a aldeídos ou cetonas. Para isto foi utilizada a metodologia descrita por Wang et al., 1990, em que os autores sintetizaram exatamente o aldeído **41**. O cloridrato de **38** foi neutralizado com hidróxido de potássio e foram adicionados três equivalentes de MnO_2 ao álcool livre suspenso em CHCl_3 . No final da reação somente uma pequena quantidade do álcool de partida foi recuperada (5%), pois a maior parte de **38** ficou adsorvida no MnO_2 e o aldeído não foi formado.

Como o álcool **38** não é solúvel em CHCl_3 , optou-se por testar a reação em diferentes solventes, já que esta oxidação se processa por adsorção entre o substrato (**38**) e o reagente (MnO_2) através do solvente, que pode influenciar na taxa de adsorção do álcool no MnO_2 (SMITH, 1994). Assim, a reação foi testada em CHCl_2 , THF, acetona, acetonitrila (ACN), dimetilformamida (DMF) e piridina, nas mesmas condições e, em nenhum dos casos, o aldeído foi obtido.

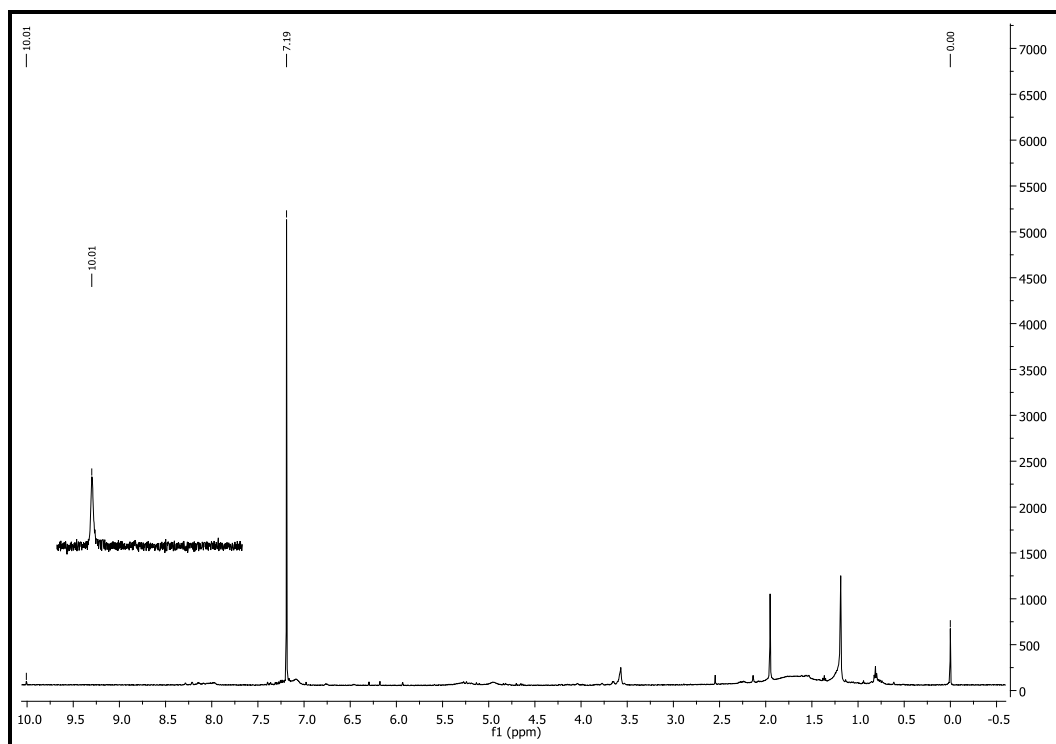
A ativação do MnO_2 em estufa/mufla é muito importante na sua eficiência oxidante. Porém, o tempo e a temperatura utilizada neste processo podem variar dependendo da procedência do reagente. Além disto, muitas vezes o

MnO₂ deve ser utilizado em grande excesso (HARFENIST; BAVLEY; LAZIER, 1954). Portanto, foram testadas inúmeras reações variando o tempo de ativação do MnO₂ (2h, 6h, 12h, 24h e 48h), quantidade de equivalentes deste reagente (3, 10, 15 e 20 equivalentes) e todos solventes citados anteriormente.

A partir da análise de cromatografia em camada delgada (CCD) da reação utilizando ACN, com 20 equivalentes de MnO₂ e 24h de ativação foi possível observar uma mancha mais apolar que o material de partida com forte absorção em $\lambda = 365$ nm, indicando a formação do aldeído. A quantidade de produto bruto obtido nesta oxidação foi muito baixa (7% de rendimento) e a análise imediata de RMN ¹H apresentou um sinal característico do H ligado à carbonila em 10,65 ppm (1H), além dos sinais referentes aos hidrogênios aromáticos em δ 8,28 (1H), 7,30 (1H) e 7,38 (1H) (Espectro 1). Foi observado ainda um sinal em 1,95 ppm que é referente a ACN utilizada na reação. Após um dia, a análise de RMN ¹H foi repetida e a intensidade do sinal referente ao hidrogênio ligado a carbonila diminuiu consideravelmente (Espectro 2) indicando a degradação do aldeído.



Espectro 1 - Espectro de RMN de ¹H do produto obtido na reação de oxidação com MnO₂ (500 MHz, CDCl₃).



Espectro 2 - Espectro de RMN de ^1H do produto obtido na reação de oxidação com MnO_2 após um dia (500 MHz, CDCl_3).

Como a quantidade de aldeído obtido foi muito baixa e sua degradação, aparentemente, muito fácil, foi necessário encontrar outra metodologia para obtenção do aldeído em melhores rendimentos.

Muitas oxidações clássicas de álcoois a aldeídos não poderiam ser utilizadas para este tipo de substrato, pois levariam ao derivado N-óxido ou alguns reagentes se complexariam com o nitrogênio piridínico (como dicromato piridínico, PDC). A melhor metodologia descrita na literatura para oxidação de alcoóis piridínicos, realmente são as reações com MnO_2 .

Algumas metodologias descritas na literatura sintetizam o MnO_2 e não utilizam este reagente comercial (HEINERT; MARTELL, 1959; LOU; XU, 2002), pois existem relatos que a capacidade oxidante do MnO_2 depende da sua preparação (HARFENIST; BAVLEY; LAZIER, 1954). Com base nestes dados, foi realizada a reação de oxidação com este reagente preparado pelo aquecimento do MnCO_3 a $300\text{ }^\circ\text{C}$ por 12h (HEINERT; MARTELL, 1959).

Esta reação levou a um produto (sólido amarelo) mais apolar que o substrato [R_f 0,65; CHCl_3 :MeOH (9:1)], com forte absorção em $\lambda = 365\text{ nm}$ (Figura 40) e em 45% de rendimento, que é muito próximo aos rendimentos

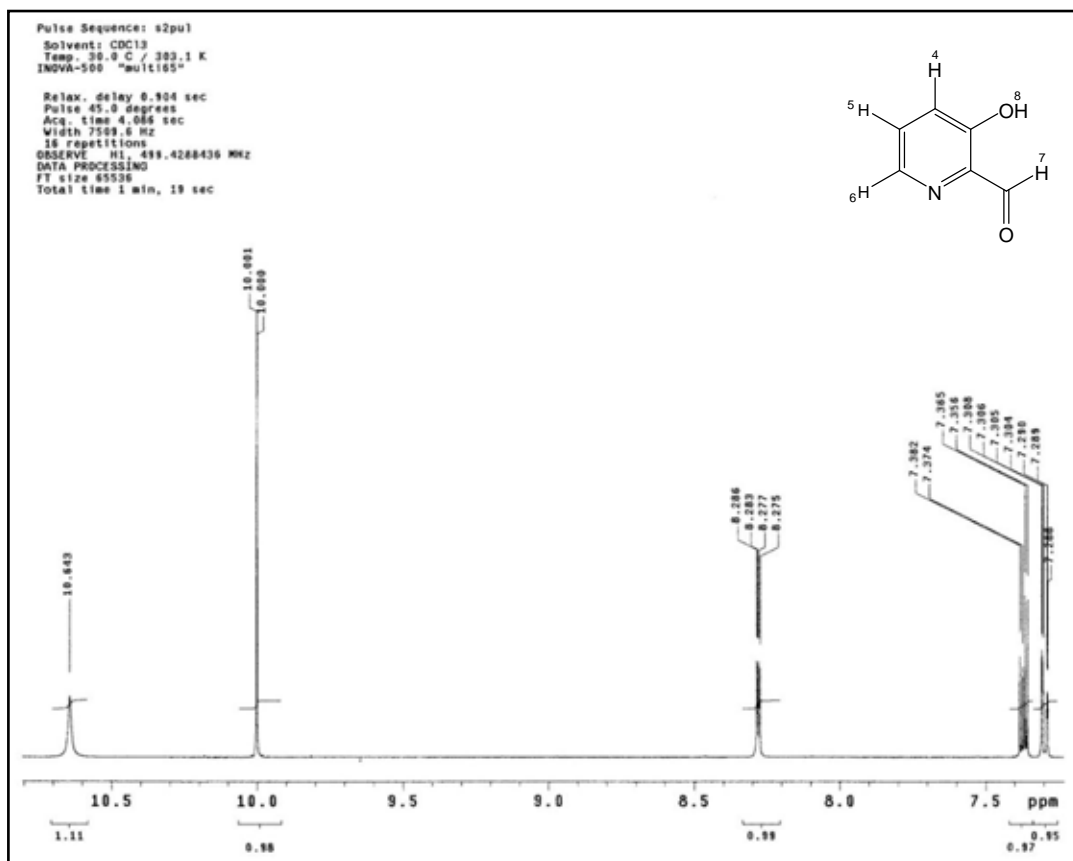
descritos na literatura para formação da 2-carbaldeído-3-hidroxi-piridina (**41**) (HEINERT; MARTELL, 1959).

A análise do espectro de RMN ^1H (Espectros 3 e 4) apresentou um sinal característico de aldeído em 10,00 ppm (1H) e três duplos dubletos em δ 8,28 (1H, $J_{6-5} = 4,5$ Hz e $J_{6-4} = 1,5$ Hz), em δ 7,36 (1H, $J_{5-6} = 4,5$ Hz e $J_{5-4} = 8,5$ Hz) e em δ 7,29 (1H, $J_{4-5} = 8,5$ Hz e $J_{4-6} = 1,5$ Hz) referentes aos hidrogênios 6, 5 e 4, respectivamente. O sinal em δ 10,64 é referente ao hidrogênio da hidroxila.

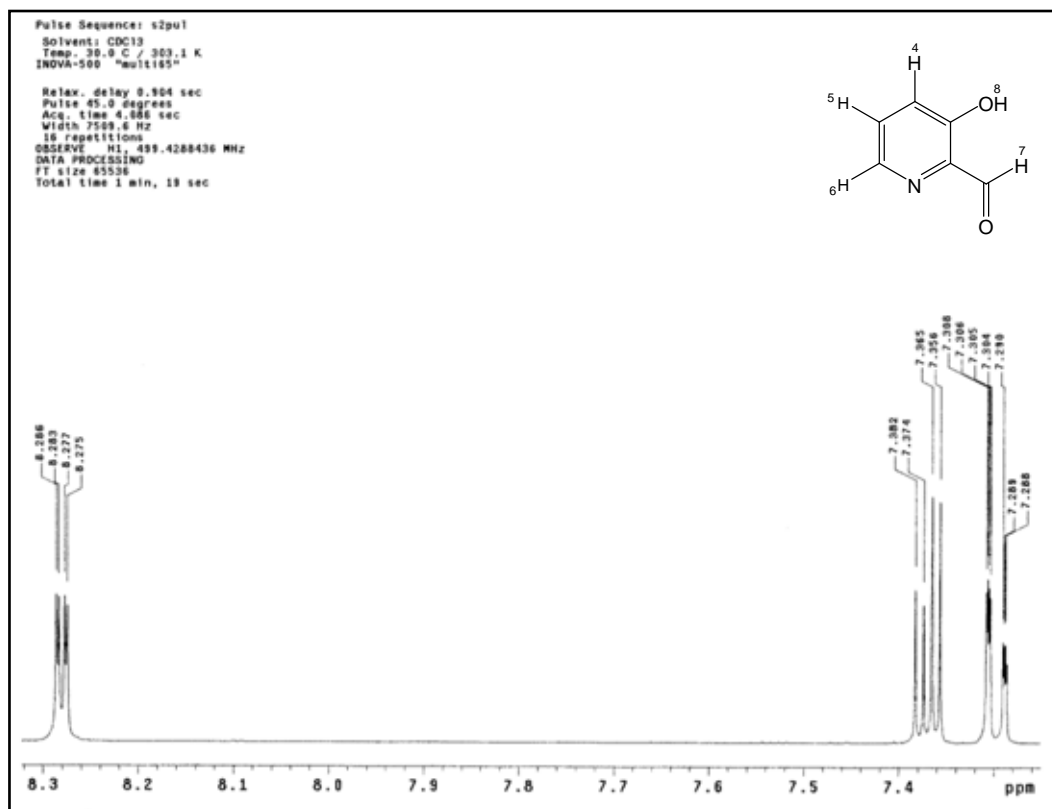
No espectro de ^{13}C e DEPT 90 (Espectros 5 e 6) foi possível observar seis sinais: cinco característicos do núcleo piridínico, dos quais dois são quaternários e um sinal característico de carbonila de aldeído (δ 198,6). As atribuições aos carbonos estão descritas na Tabela 6 e foram baseadas em dados da literatura (LOUISE-LERICHE et al., 2010).



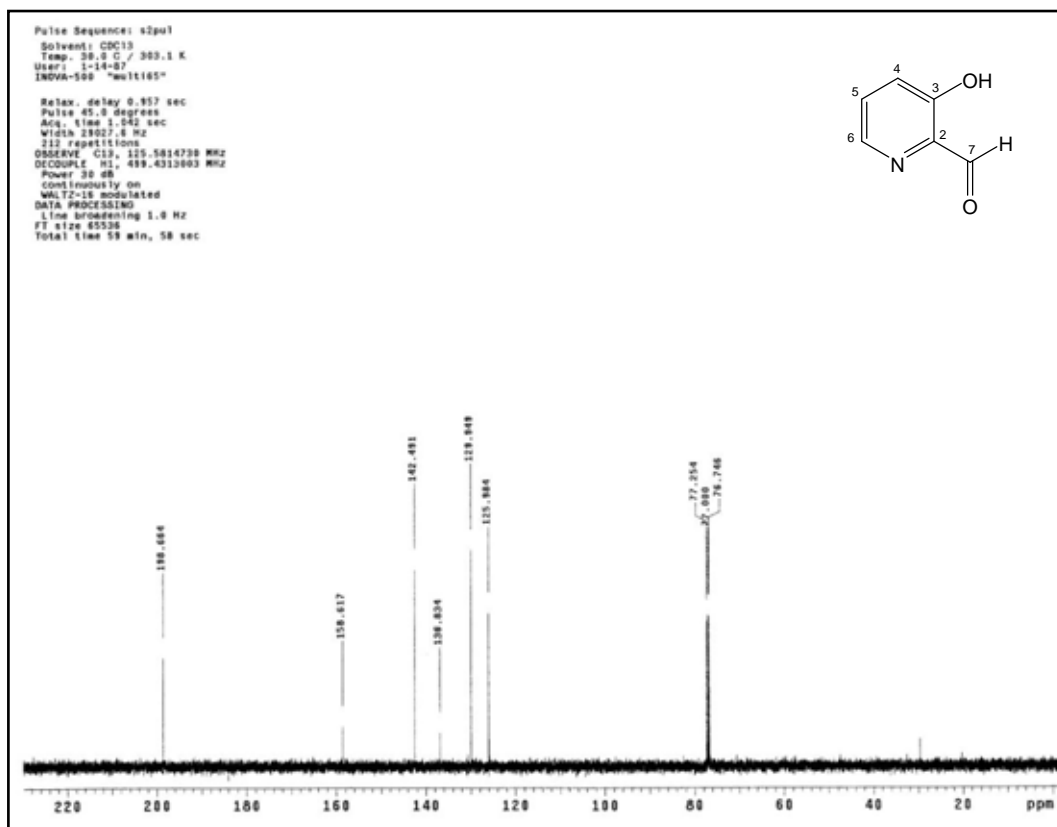
Figura 40 - CCD de **38** e produto formado na reação de oxidação (FE: sílica, FM: Hex:AcOEt (1:9), sob luz UV 365 nm).



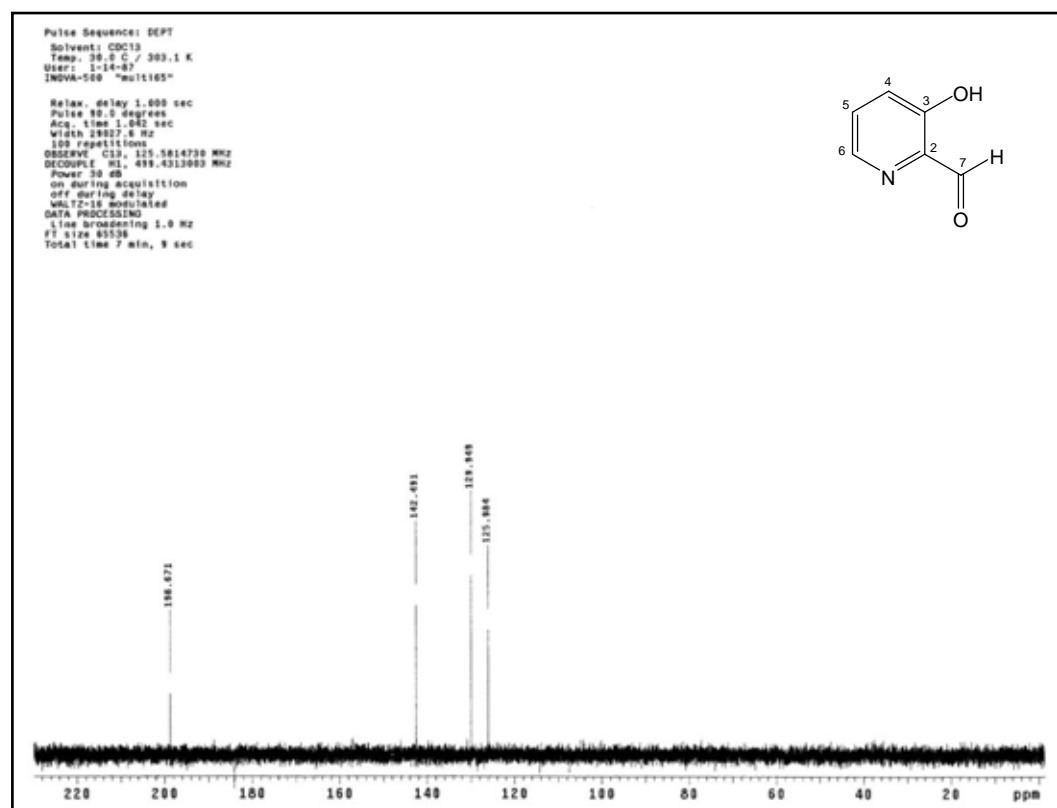
Espectro 3 - Espectro de RMN de ^1H de **41** (500 MHz, CDCl_3).



Espectro 4 - Ampliação do espectro de RMN de ^1H de **41** (δ 7,2–8,3).



Espectro 5 - Espectro de RMN de ¹³C de **41** (125 MHz, CDCl₃).



Espectro 6 - Espectro de RMN de DEPT 90 de **41** (125 MHz, CDCl₃).

Tabela 6 - Dados de RMN ^1H e ^{13}C de **41** (CDCl_3)

posição	δ_{H}^a (m^b , J^c)	δ_{C}^a (m^b)
2	–	136,8 (C)
3	–	156,6 (C)
4	7,29 (dd, 8,5; 1,5)	129,9 (CH)
5	7,36 (dd, 8,5; 4,5)	125,9 (CH)
6	8,28 (dd, 4,5; 1,5)	142,4 (CH)
7	10,00 (s)	198,6 (CH)
8	10,64 (sl)	–

^a deslocamentos químicos em ppm, em relação ao TMS como padrão interno

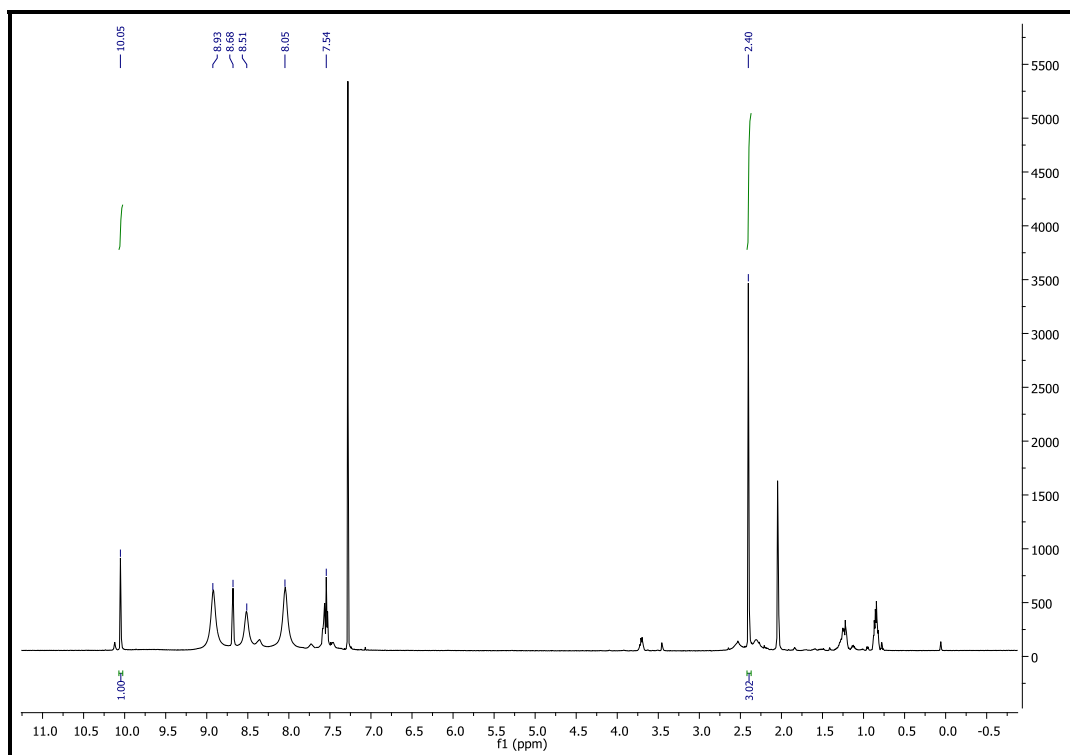
^b multiplicidade

^c constantes de acoplamento em Hz

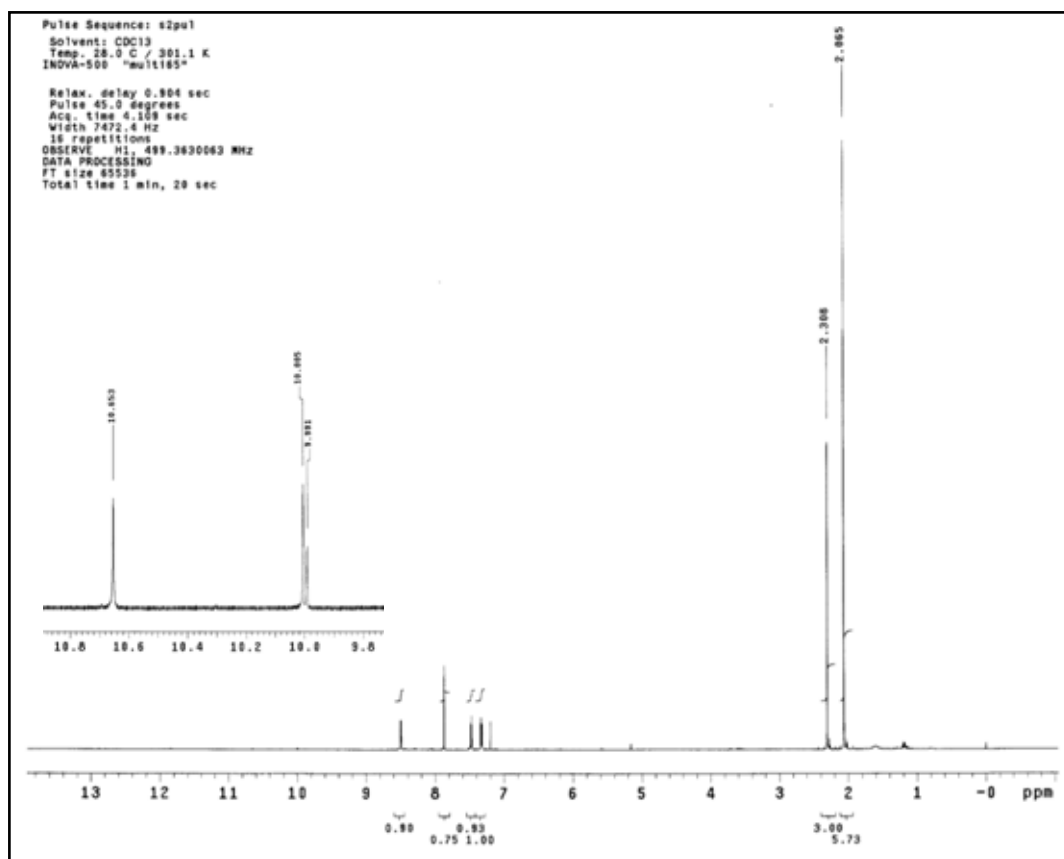
O aldeído **41** não é estável, pois mesmo armazenado sob atmosfera de N_2 e baixas temperaturas, ele resiste por poucos dias. Assim, a próxima etapa da rota sintética proposta (Figura 39) deveria ser realizada logo em seguida a preparação de **41**.

Foram testadas duas metodologias de acetilação. A primeira com Ac_2O , aparentemente levou ao produto acetilado, pois o espectro de RMN de ^1H apresentou um singlete em 10,05 ppm e um singlete em 2,40 ppm integrando para três hidrogênios (Espectro 7), porém o produto estava em mistura com a piridina (solvente da reação) e o rendimento foi baixo (30%).

A análise do RMN de ^1H da segunda metodologia utilizando AcCl (Espectro 8) permitiu observar o sinal característico de aldeído somente com ampliação da região entre 9,8 e 10,8 ppm. O produto principal desta reação possivelmente foi o ácido carboxílico acetilado (ácido 3-oxiacetil-picolínico, sólido amarelo, 40% de rendimento), sendo o sinal em δ 7,87 referente ao hidrogênio da hidroxila.



Espectro 7 - Espectro de RMN de ^1H de **37** (500 MHz, CDCl_3).



Espectro 8 - Espectro de RMN de ^1H do produto obtido na reação de acilação do aldeído **41** (500 MHz, CDCl_3).

Considerando a instabilidade de **41** e os rendimentos das reações de oxidação e acetilação, seria complicado proteger a hidroxila piridínica e depois realizar a reação de acoplamento com a 4-lítio-quinolina (Figura 39). Esta reação é delicada e exige uma série de cuidados, como condições anidras e atmosfera de N_2 , portanto é interessante eliminar quaisquer reações secundárias. Por este motivo, o acoplamento entre a 4-lítio-quinolina (**39**) e o aldeído **41** seria a alternativa menos viável, já que o hidrogênio da hidroxila diretamente ligada ao núcleo piridínico tem caráter ácido e os organolítios são básicos. Desta forma, seriam necessários dois equivalentes de **39**, um para captura do próton e outro para reagir com a carbonila do aldeído. Além disto, esta carbonila se tornaria menos reativa com a formação do alcóxido, diminuindo o rendimento da reação que por natureza não é muito alto.

Uma alternativa seria proteger seletivamente a hidroxila ligada ao grupo piridínico de **38** e em seguida sintetizar o aldeído. As duas primeiras etapas desta nova abordagem sintética estão ilustradas na Figura 41.

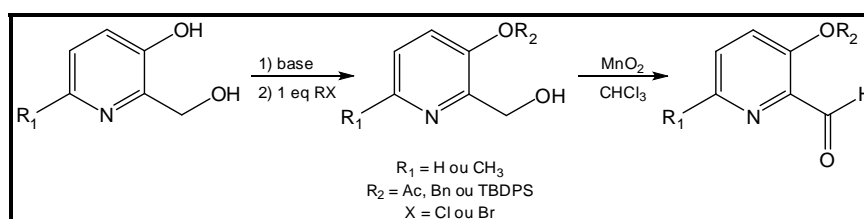


Figura 41 - Proteção seletiva da hidroxila piridínica e oxidação com MnO_2 .

A proteção com acetato (Ac) seria a de maior interesse já que o híbrido **31a** deve conter este grupo, porém considerando que Ac poderia interferir na reação de acoplamento, outros dois grupos protetores foram selecionados: o *tert*-butil-difenil-silano (TBDPS) e benzil (Bn), que são grupos menos lábeis.

Dois fatores devem ser considerados nestas reações de proteção, i) a nucleofilicidade do oxigênio ligado ao grupo metil-piridínico de **38** é maior que do oxigênio ligado diretamente ao núcleo piridínico, porém com a adição de uma base há a formação do alcóxido na posição 3 que o torna melhor nucleófilo; ii) a quantidade de eletrófilo adicionado deve ser equivalente ao substrato para uma proteção seletiva na posição 3 do álcool.

Nas reações de acetilação foi utilizado o álcool 3-hidroxi-2-hidroxi-6-metil-piridina (**38a**, Figura 42) como modelo. Pela análise por CCD foi possível

observar, para a primeira metodologia empregada, a formação de dois produtos mais apolares que o material de partida [R_f 0,15; Hex:AcOEt (1:9)] sendo que o mais polar [R_f 0,55; Hex:AcOEt (1:9)] destes produtos poderia ser o protegido seletivamente na posição 3 (**44a**) ou no oxigênio ligado ao grupo metil-piridínico (**44**), pois a hidroxila livre destes compostos pode interagir com a sílica. O produto mais apolar [R_f 0,68; Hex:AcOEt (1:9)] seria o derivado protegido nas duas hidroxilas (**43**). A reação descrita na Metodologia 2 levou a um produto que, por comparação com a primeira reação, poderia ser o produto di-protegido (**43**). Finalmente, a reação descrita na Metodologia 3 formou o produto mais polar que seria o derivado **44a** ou **44** (Figura 42).

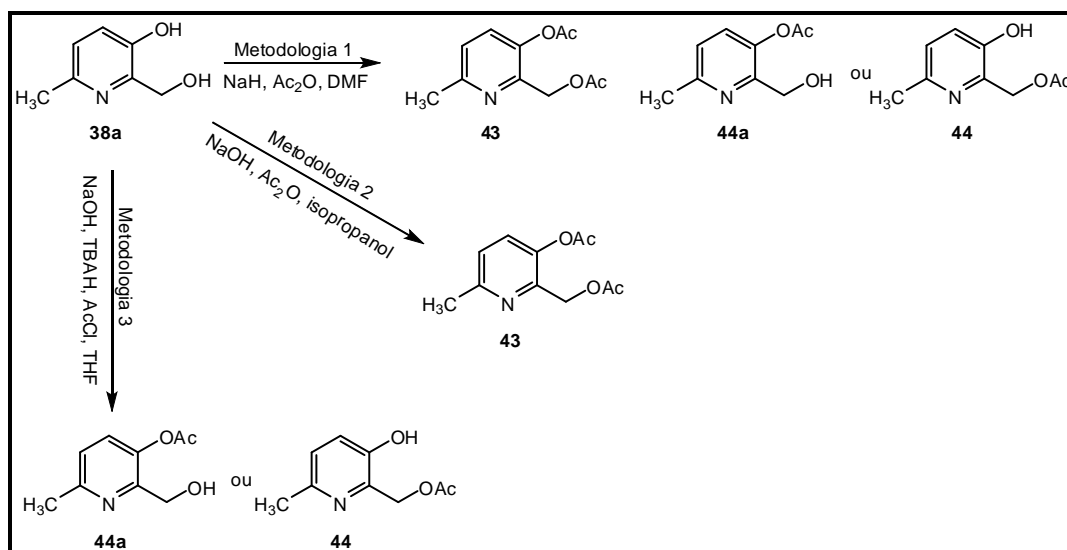
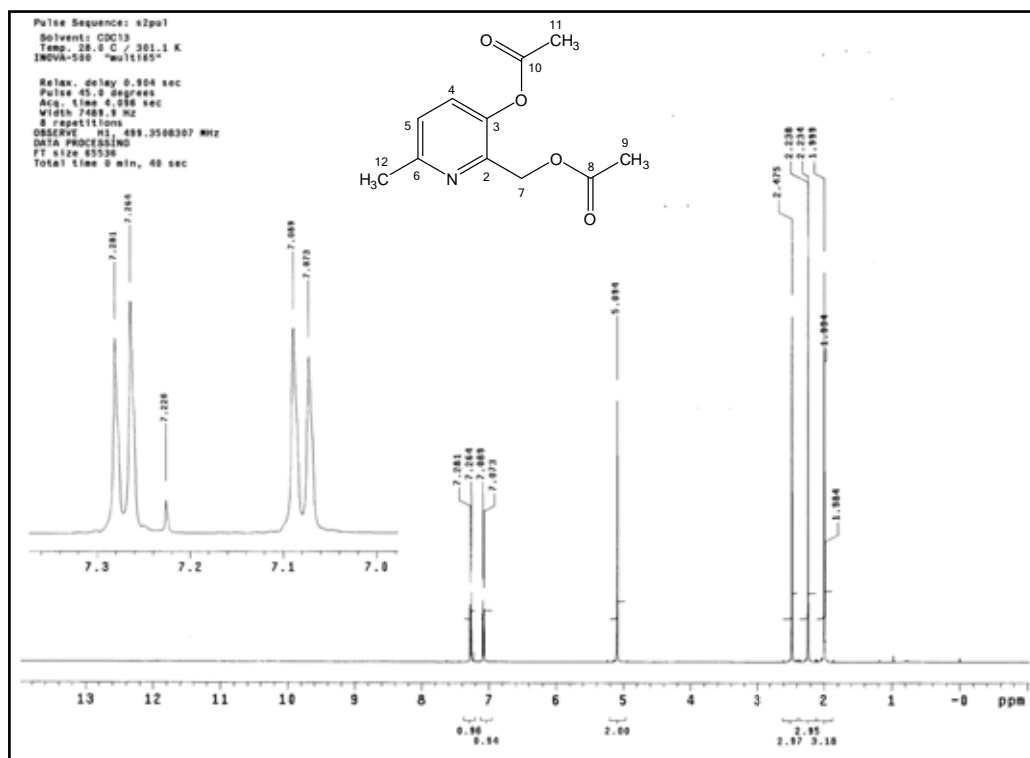


Figura 42 - Reações de acetilação do álcool **38a**.

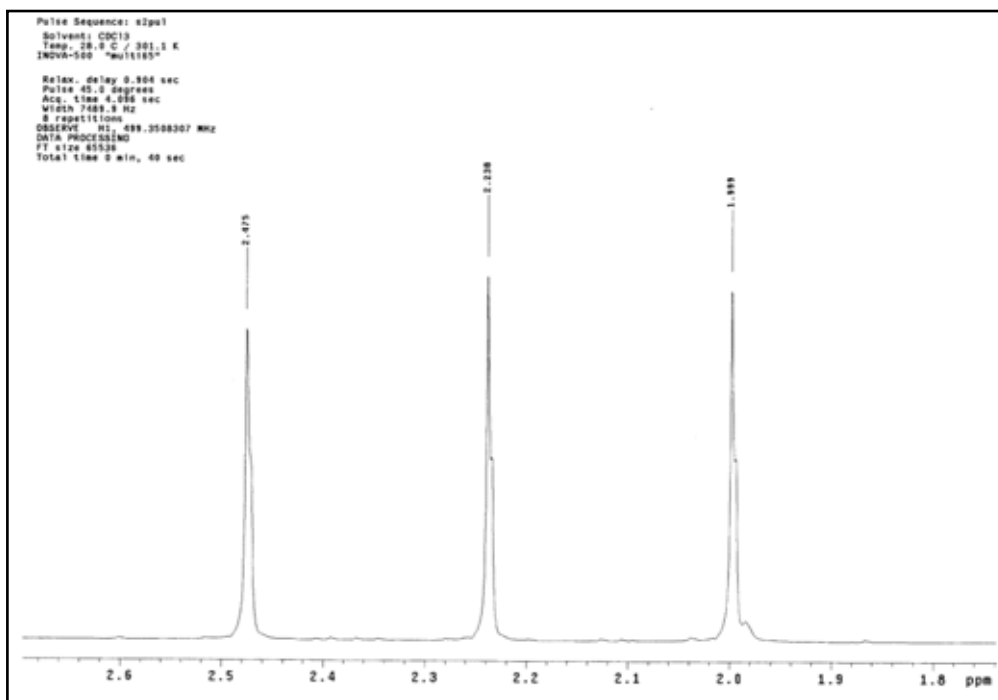
As análises de RMN ¹H e ¹³C confirmaram que o produto da reação (óleo amarelo) descrita na Metodologia 2 correspondia ao derivado inédito di-substituído (**43**, Figura 42). No espectro de RMN de ¹H (Espectros 9 e 10) foi possível observar três singletos em δ 1,99, 2,24 e 2,47 referentes às metilas, um singlete em δ 5,09 referente ao metileno e dois dubletos em δ 7,08 e 7,27 ($J = 8,5$ Hz), característicos de hidrogênios orto nas posições 4 e 5 do anel piridínico.

A análise do espectro de RMN de ¹³C (Espectros 11 e 12) apresentou cinco sinais para carbonos quaternários sendo dois característicos de carbonilas de éster (δ 168,8 e 170,3) e três do anel piridínico (δ 143,7; 146,3 e

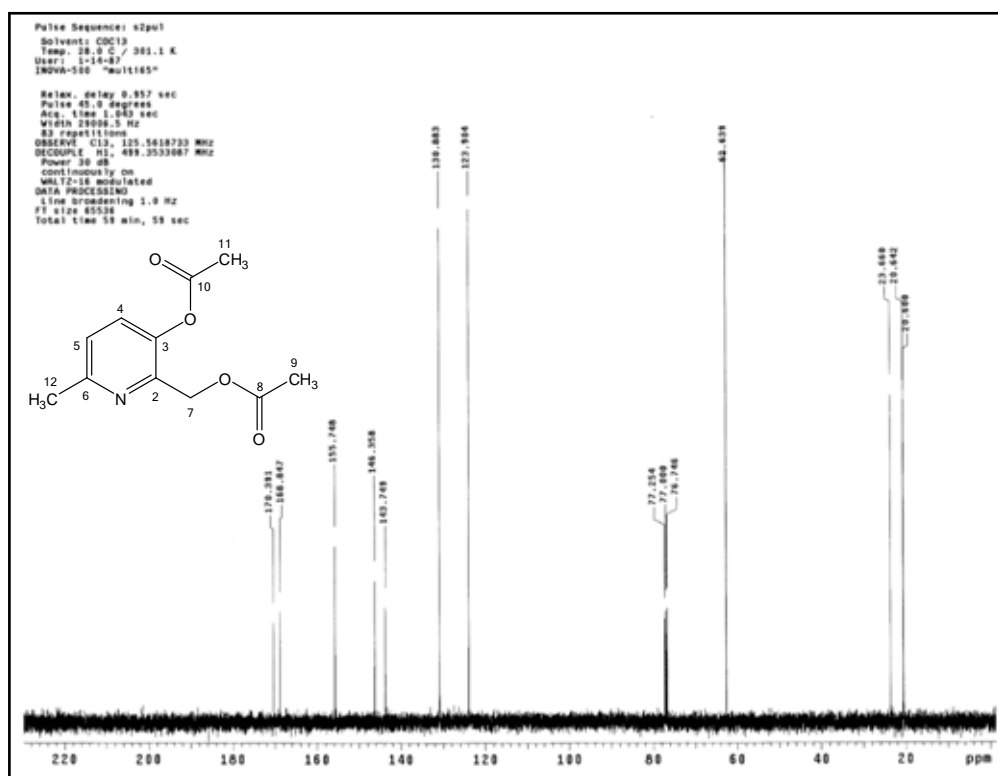
155,7). Ainda foi possível observar três sinais correspondentes aos carbonos metílicos (δ 20,60; 20,64 e 23,6), um carbono metilênico (δ 62,6) e dois carbonos (CH) característicos do núcleo piridínico (δ 123,9 e 130,8). As atribuições dos carbonos estão descritas na Tabela 7 e foram baseadas nas correlações observadas nos mapas de contorno de gHMQC (Espectros 13–16) e gHMBC (Espectros 17–21 e Figura 43).



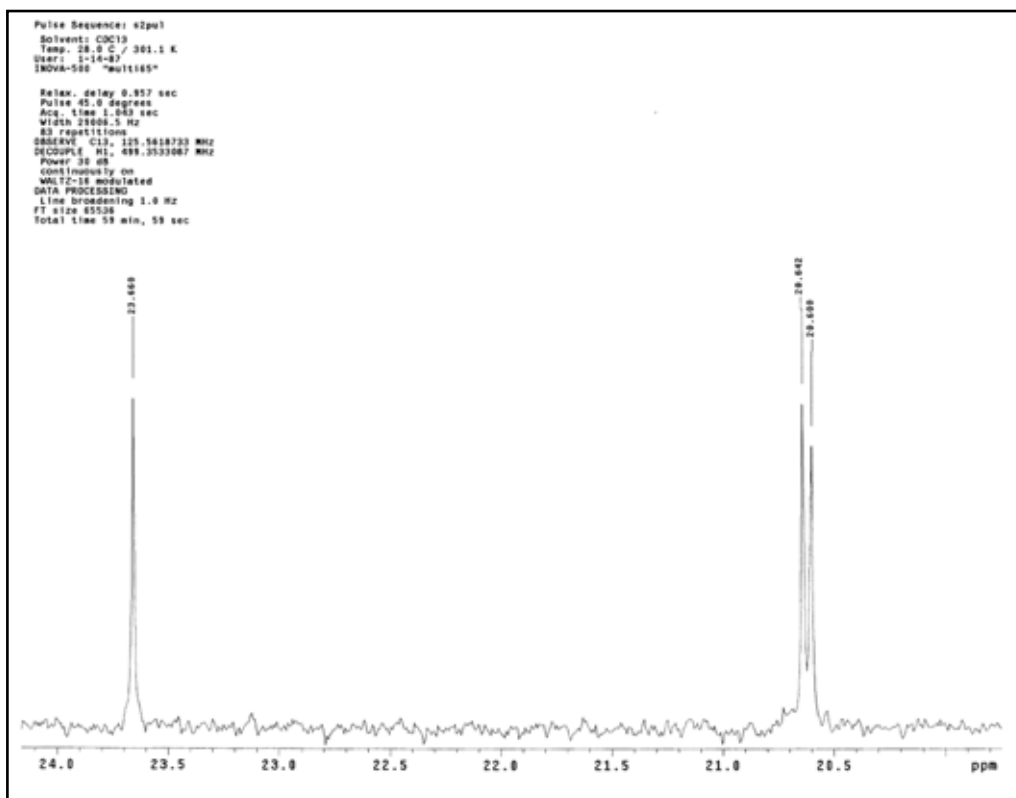
Espectro 9 - Espectro de RMN de ^1H de **43** (500 MHz, CDCl_3).



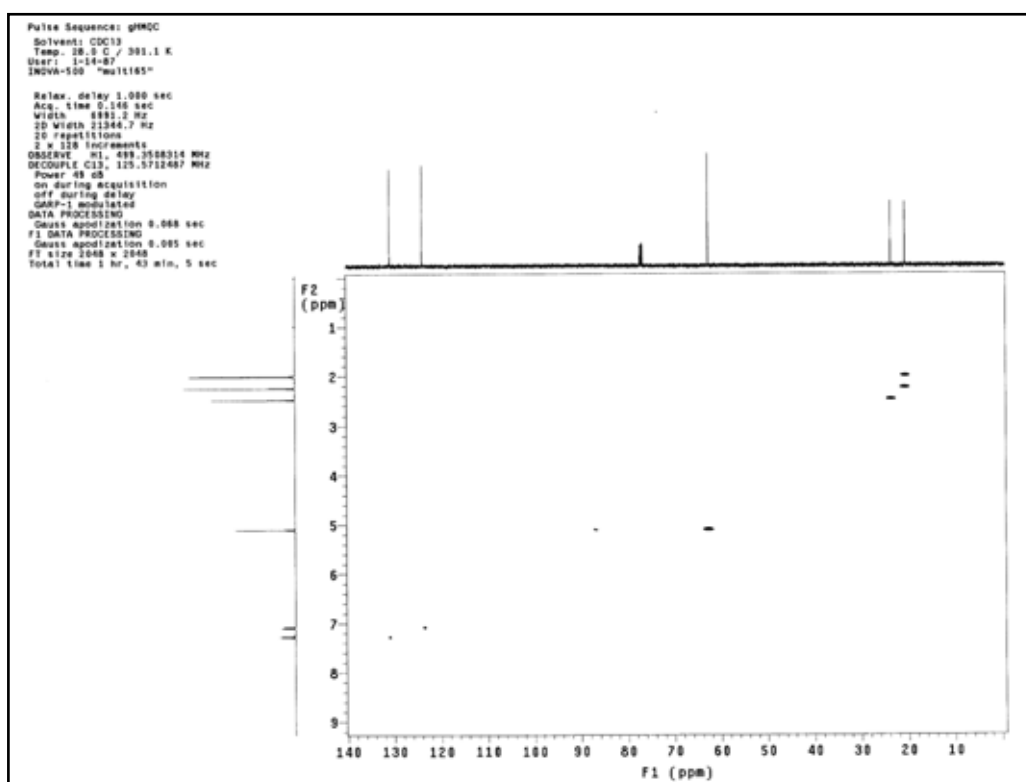
Espectro 10 - Ampliação do espectro de RMN de ^1H de **43** (δ 1,8–2,6).



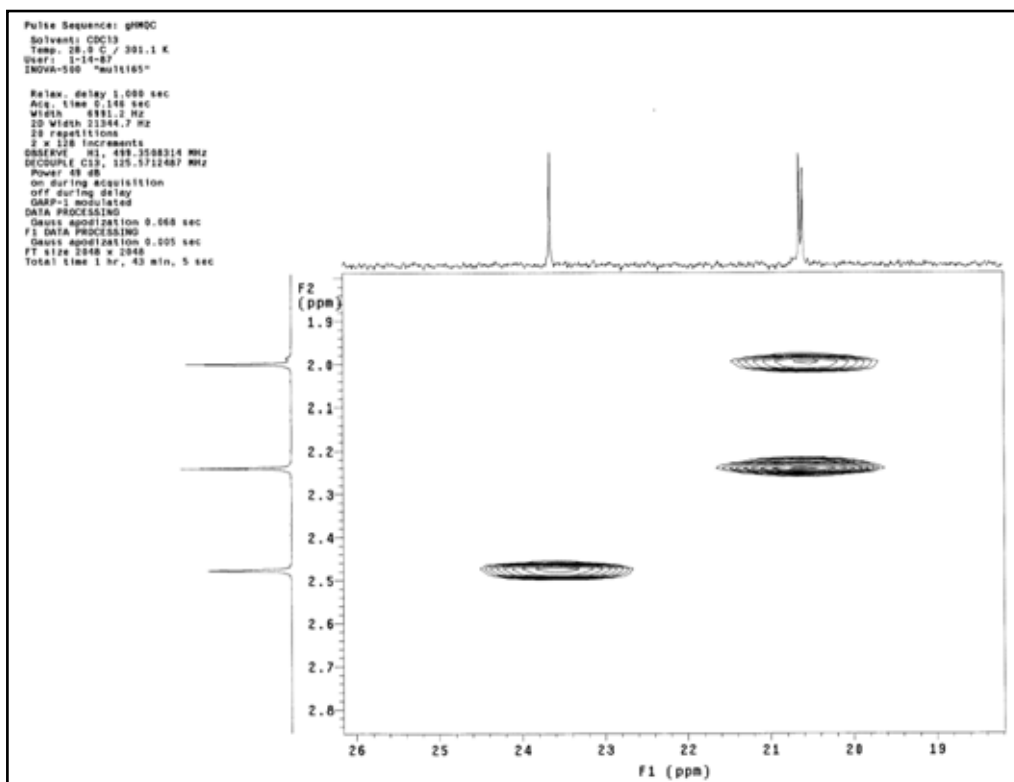
Espectro 11 - Espectro de RMN de ^{13}C de **43** (125 MHz, CDCl_3).



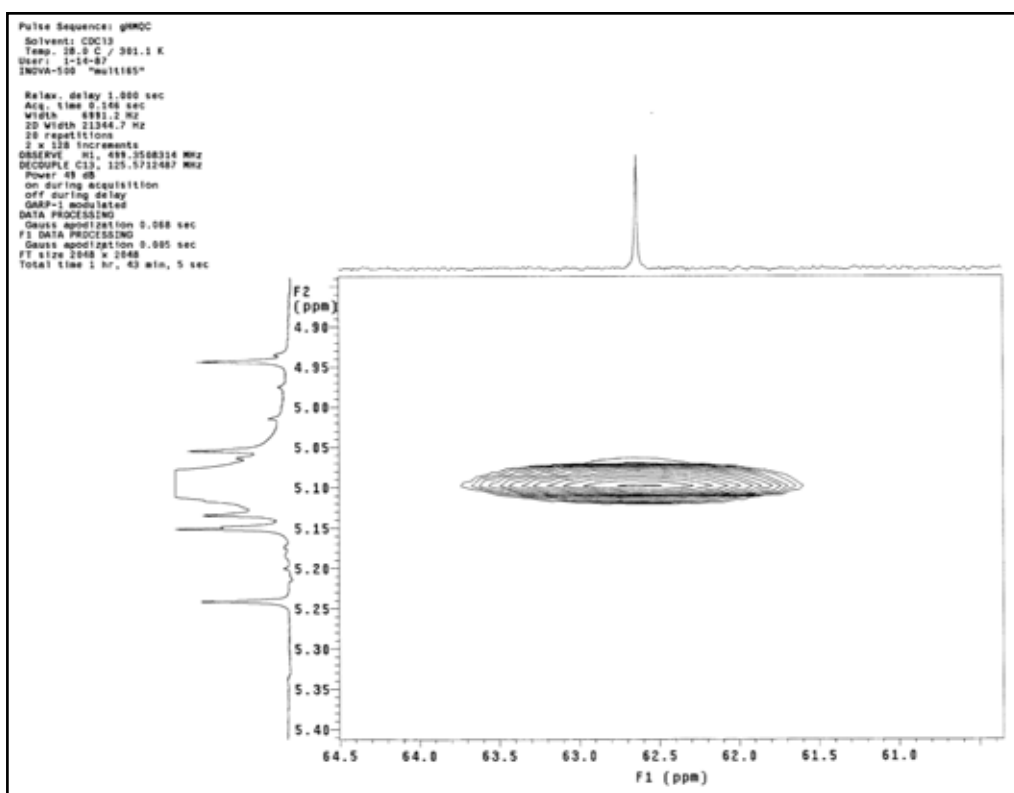
Espectro 12 - Ampliação do espectro de RMN de ^{13}C de **43** (δ 20,0–24,0).



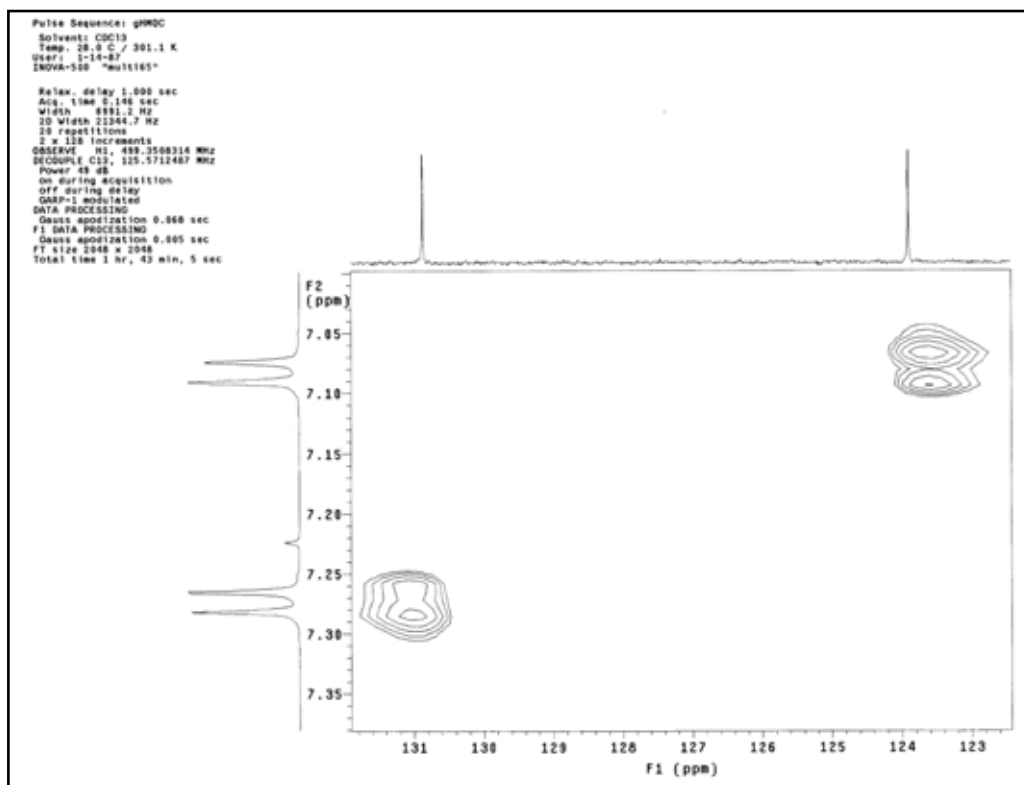
Espectro 13 - Mapa de contorno gHMOC de **43** (500 MHz; CDCl_3).



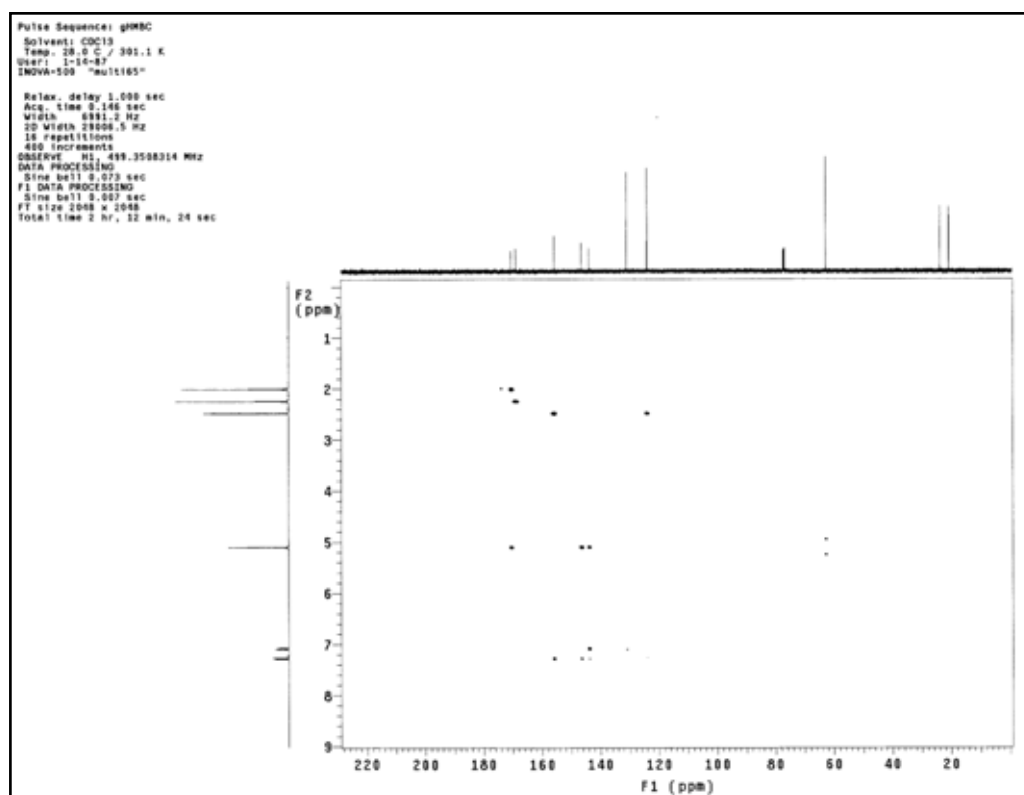
Espectro 14 - Mapa de contorno gHMOC de **43** (δ 19–26; 500 MHz; CDCl₃).



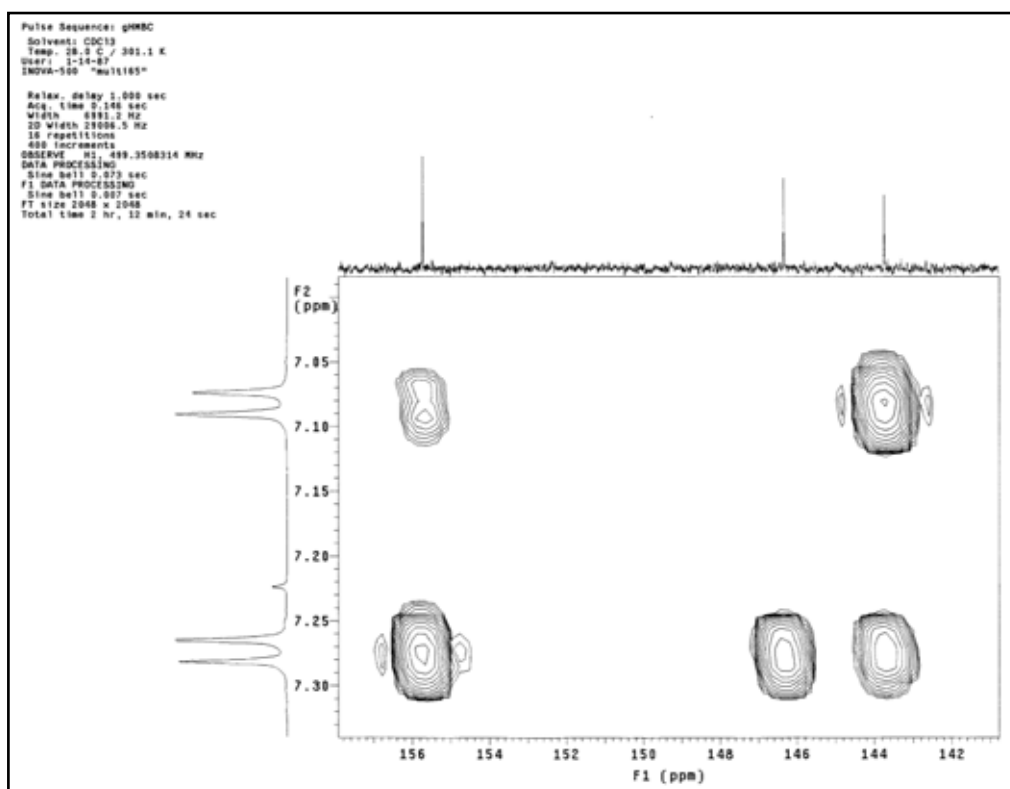
Espectro 15 - Mapa de contorno gHMOC de **43** (δ 61–64; 500 MHz; CDCl₃).



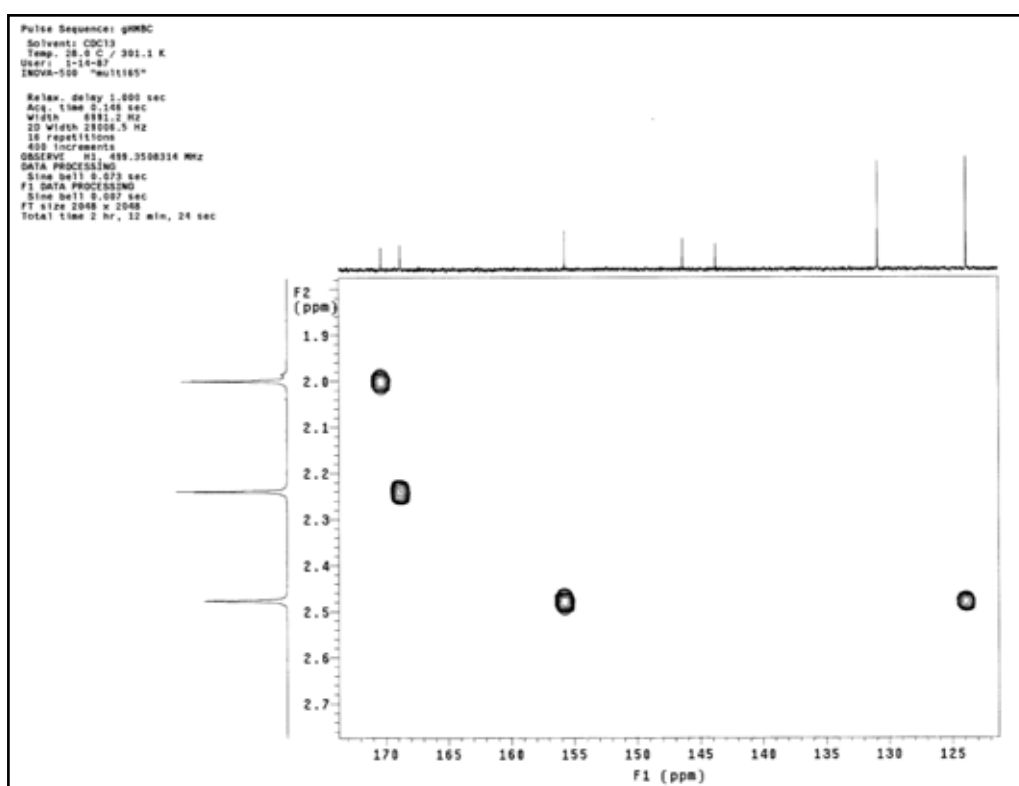
Espectro 16 - Mapa de contorno gHMBC de **43** (δ 123–132; 500 MHz; CDCl₃).



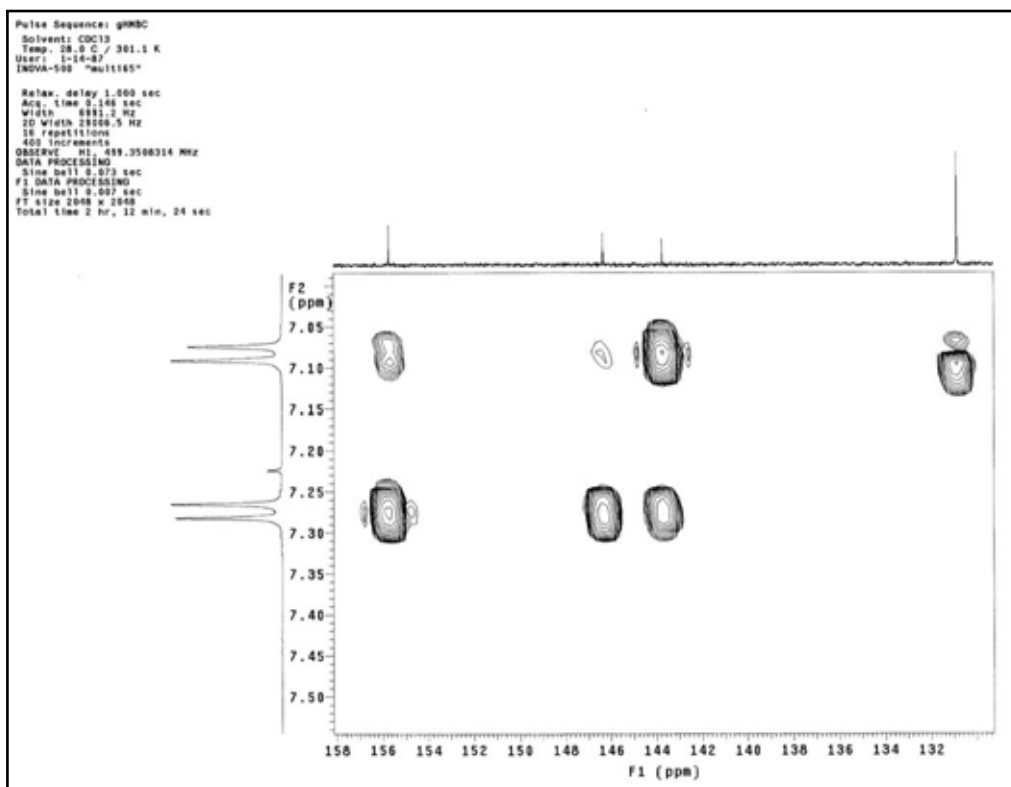
Espectro 17 - Mapa de contorno gHMBC de **43** (500 MHz; CDCl₃).



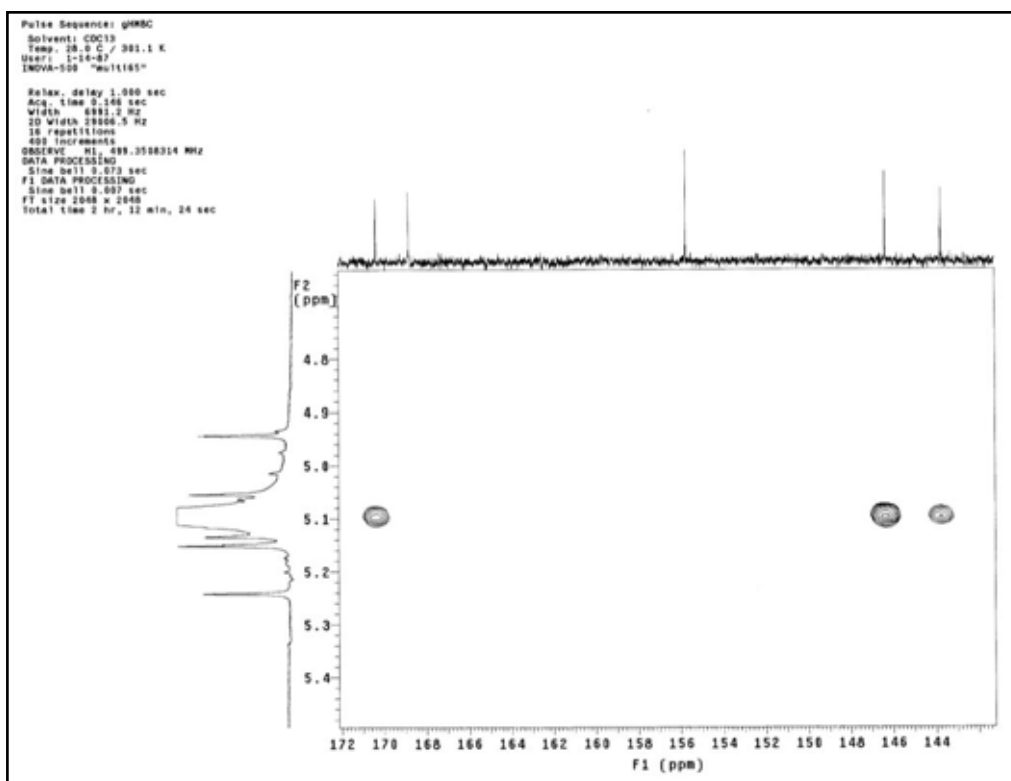
Espectro 18 - Mapa de contorno gHMBC de **43** (δ 142–157; 500 MHz; CDCl_3).



Espectro 19 - Mapa de contorno gHMBC de **43** (δ 124–171; 500 MHz; CDCl_3).



Espectro 20 - Mapa de contorno gHMBC de **43** (δ 131–158; 500 MHz; CDCl₃).



Espectro 21 - Mapa de contorno gHMBC de **43** (δ 143–172; 500 MHz; CDCl₃).

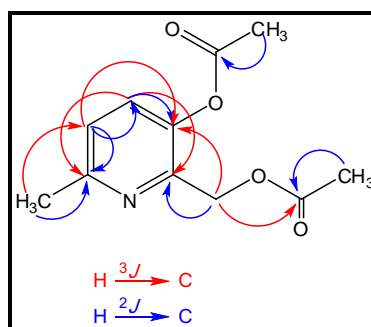
Tabela 7 - Dados de RMN de **43** (CDCl₃)

posição	δ_C^a	gHMBC δ_H^a (m^b , J^c)	gHMBC
2	146,3	–	H-4; H-7
3	143,7	–	H-4; H-7; H-5
4	130,8	7,27 (d, 8,5)	H-5
5	123,9	7,08 (d, 8,5)	H-12
6	155,7	–	H-12; H-5; H-4
7	62,6	5,09 (s)	–
8	170,3	–	H-9; H-7
9	20,6	1,99 (s)	–
10	168,8	–	H-11
11	20,6	2,24 (s)	–
12	23,6	2,47 (s)	–

^a deslocamentos químicos em ppm, em relação ao TMS como padrão interno

^b multiplicidade

^c constantes de acoplamento em Hz

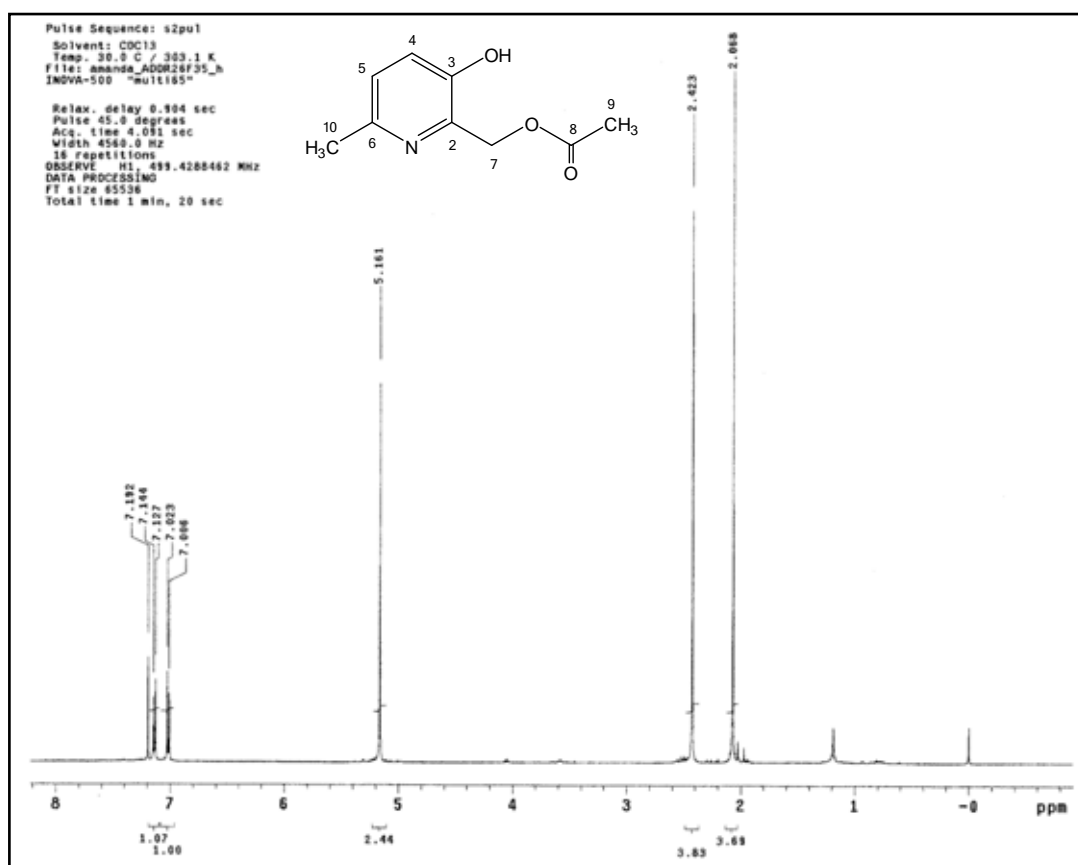
**Figura 43** - Correlações H-C observadas no mapa de contorno gHMBC de **43**.

O produto obtido na terceira metodologia (sólido amarelo) corresponde a um derivado mono-acetilado obtido em 85% rendimento, pois o espectro de RMN de ¹H (Espectro 22) apresentou sinais correspondentes a um grupo metílico em δ 2,06 característico do grupo acetato, uma metila ligada ao anel piridínico em δ 2,42, um metileno em δ 5,16 e dois hidrogênios aromáticos em δ 7,01 e δ 7,14.

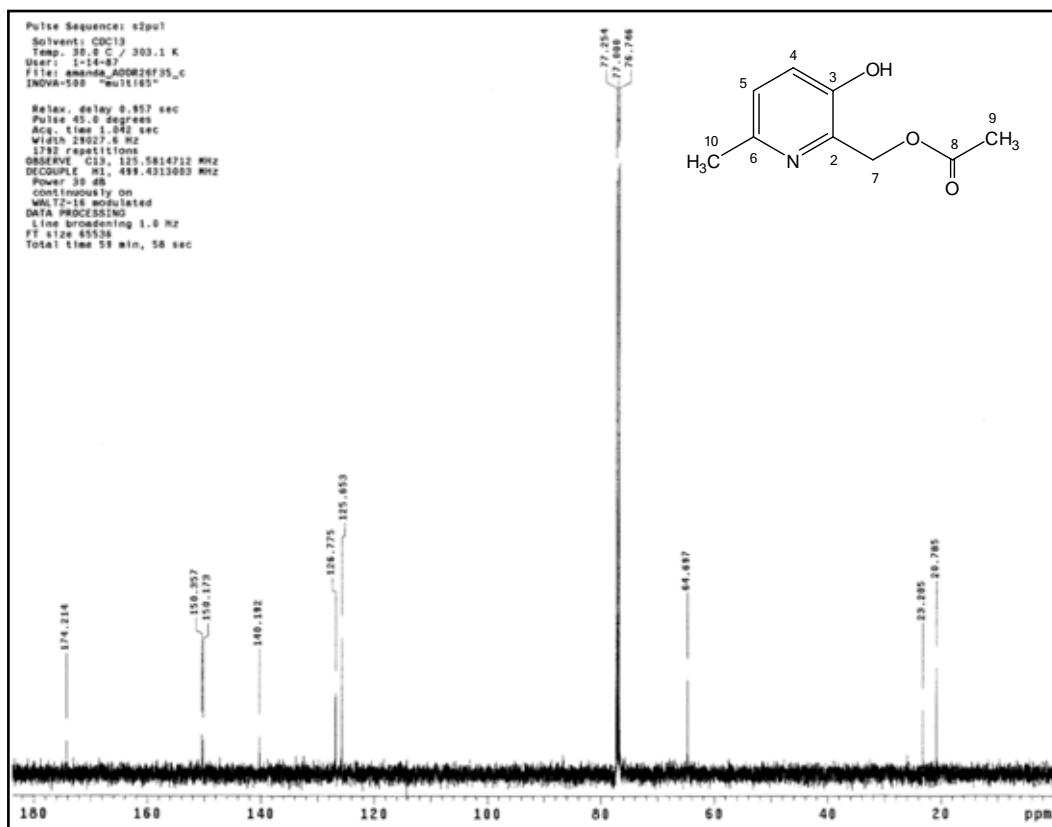
A análise do espectro de RMN de ¹³C (Espectros 23) apresentou sinais para um carbono metílico em δ 20,7 referente ao grupo acetato e outro em δ 23,2 ligado ao anel piridínico. Foi possível observar também um sinal para carbono metilênico (δ 64,6), dois carbonos (CH) característicos do núcleo

piridínico (δ 125,6 e 126,7) e quatro carbonos quaternários, sendo um característico de carbonila de éster (δ 174,2) e três do anel piridínico (δ 140,1; 150,1 e 150,3).

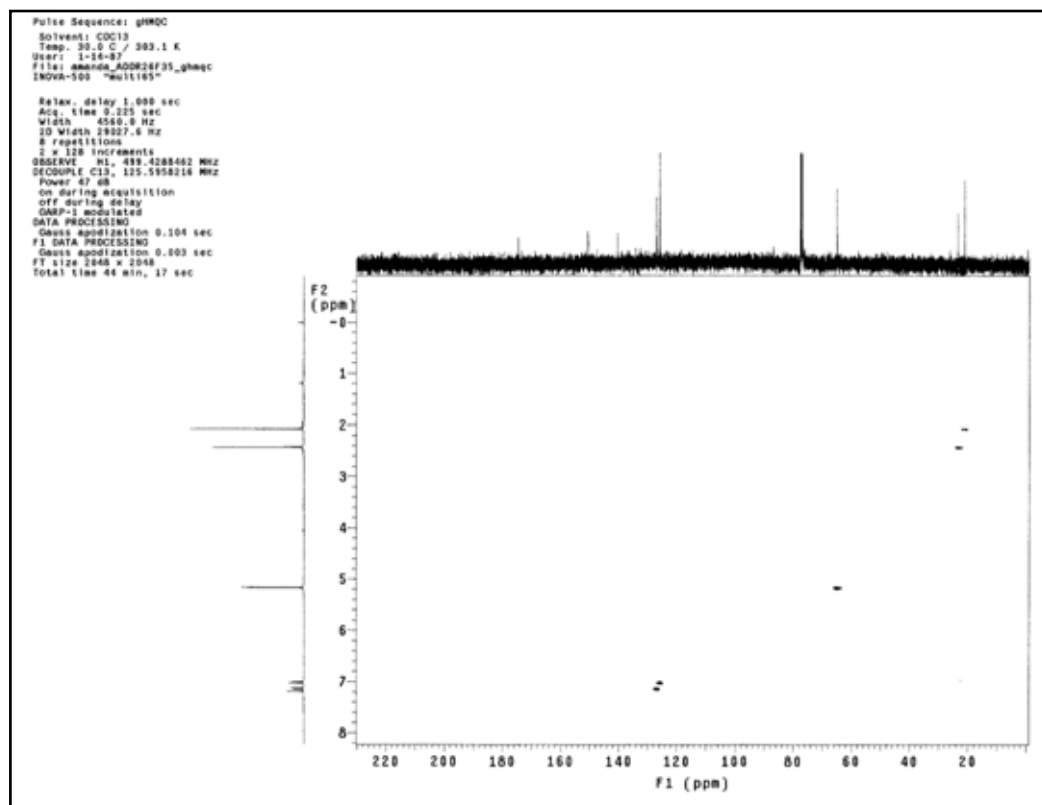
Restava confirmar se o grupo acetato estava ligado ao oxigênio da posição 3 ou ao oxigênio ligado ao grupo metil-piridínico. Para isto, foi realizado o experimento de *g*HMBC (Espectros 27–29) e foi observado a correlação entre os hidrogênios do CH₂ metil-piridínico (δ _H 5,16, s) com a carbonila do acetato (δ _C 174,2), portanto a proteção ocorreu no oxigênio ligado ao grupo metil-piridínico e não no oxigênio ligado diretamente ao grupo aromático como esperado (**44**, Figura 41). As atribuições dos carbonos estão descritas na Tabela 8 e foram baseadas nas correlações observadas nos mapas de contorno de *g*HMQC (Espectros 24–26) e *g*HMBC (Espectros 27–29 e Figura 44).



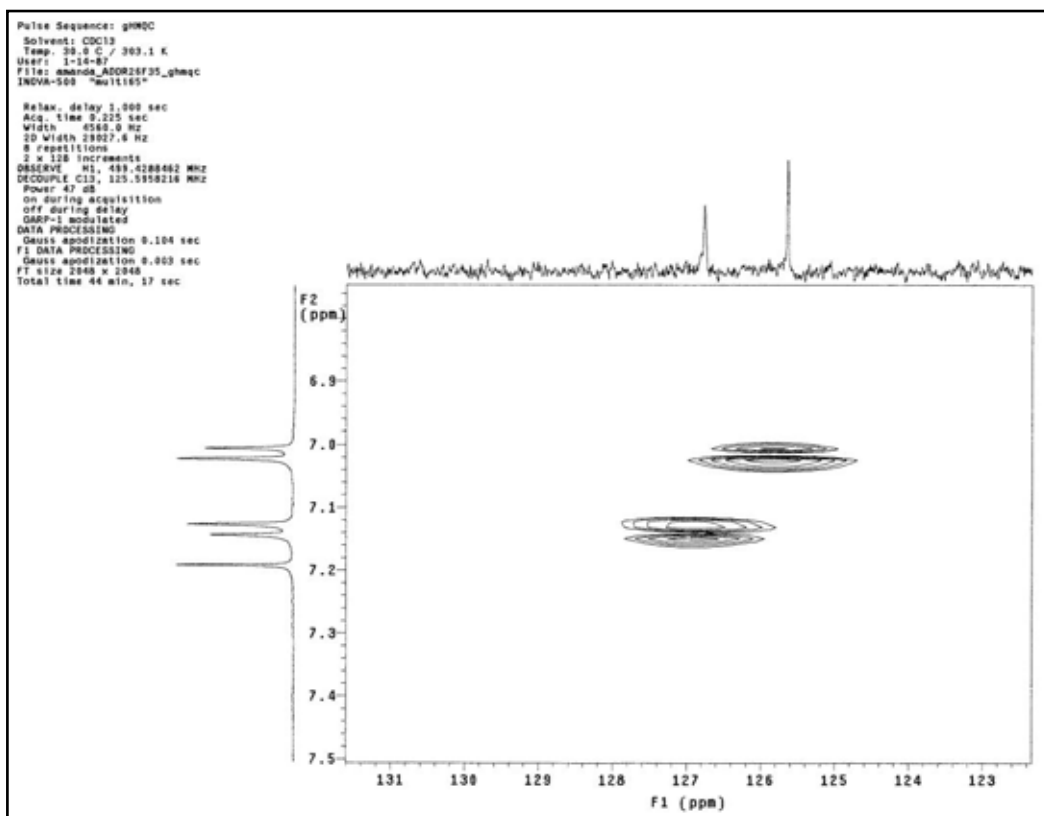
Espectro 22 - Espectro de RMN de ¹H de **44** (500 MHz, CDCl₃).



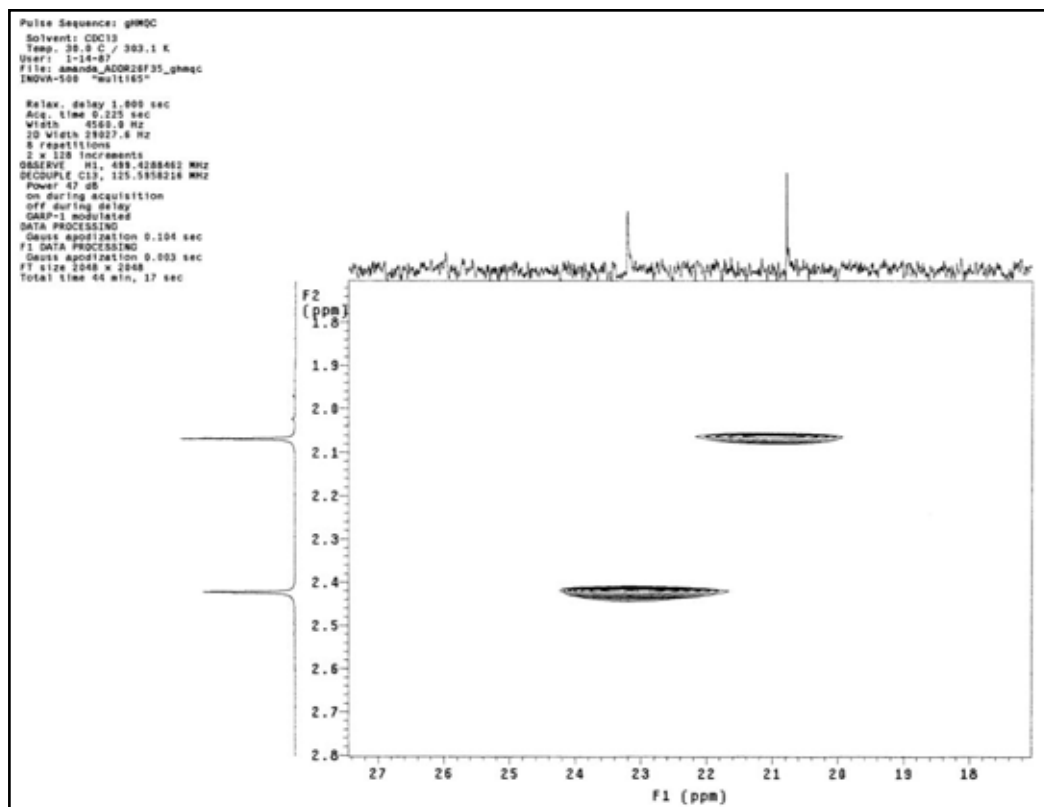
Espectro 23 - Espectro de RMN de ^{13}C de **44** (125 MHz, CDCl_3).



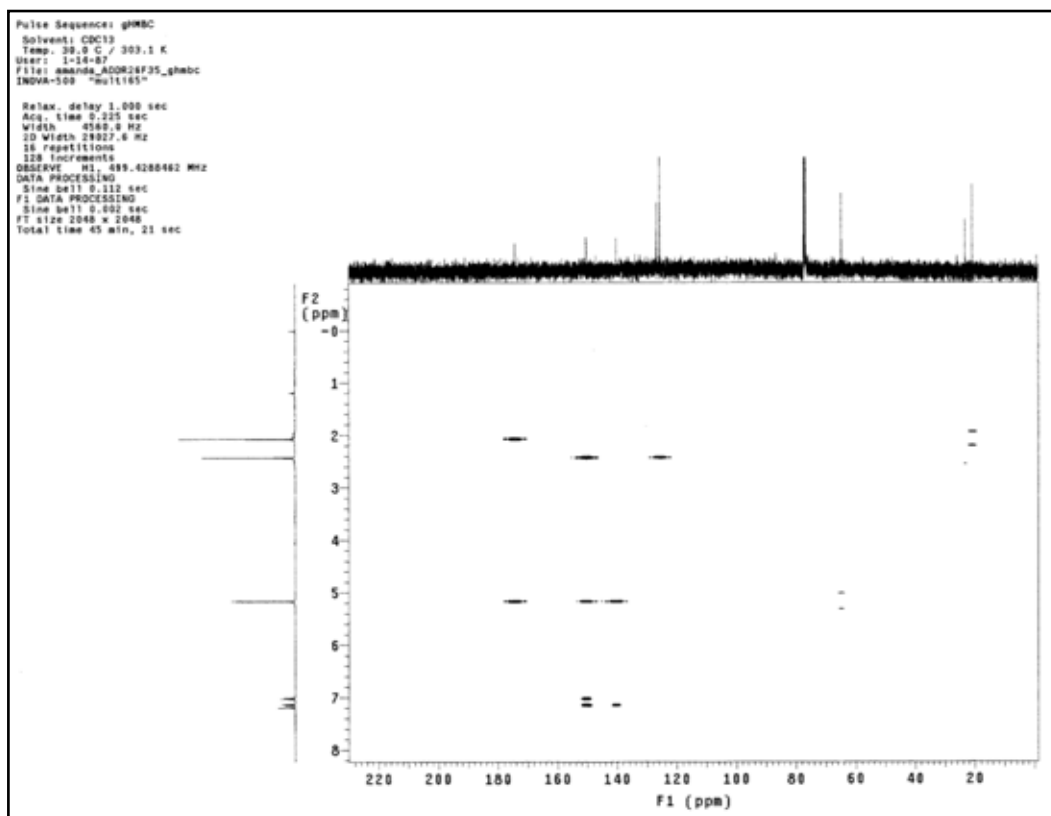
Espectro 24 - Mapa de contorno gHMOC de **44** (500 MHz; CDCl_3).



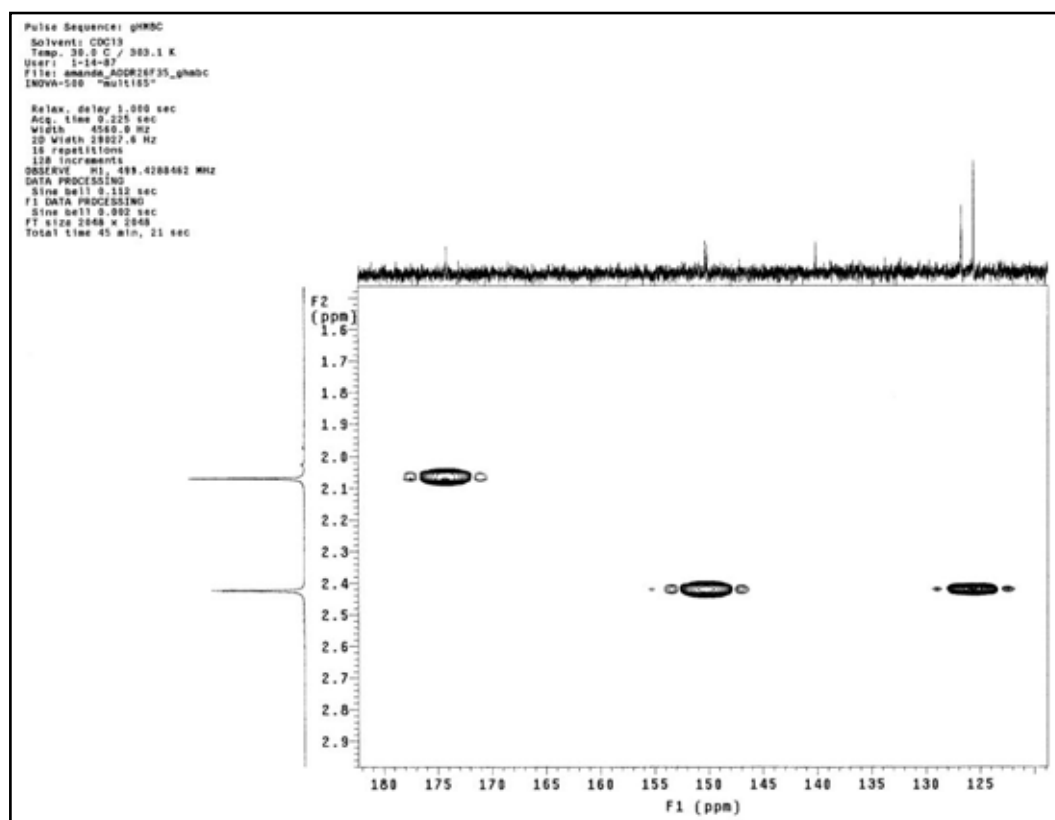
Espectro 25 - Mapa de contorno gHMQC de **44** (δ 122–132; 500 MHz; CDCl₃).



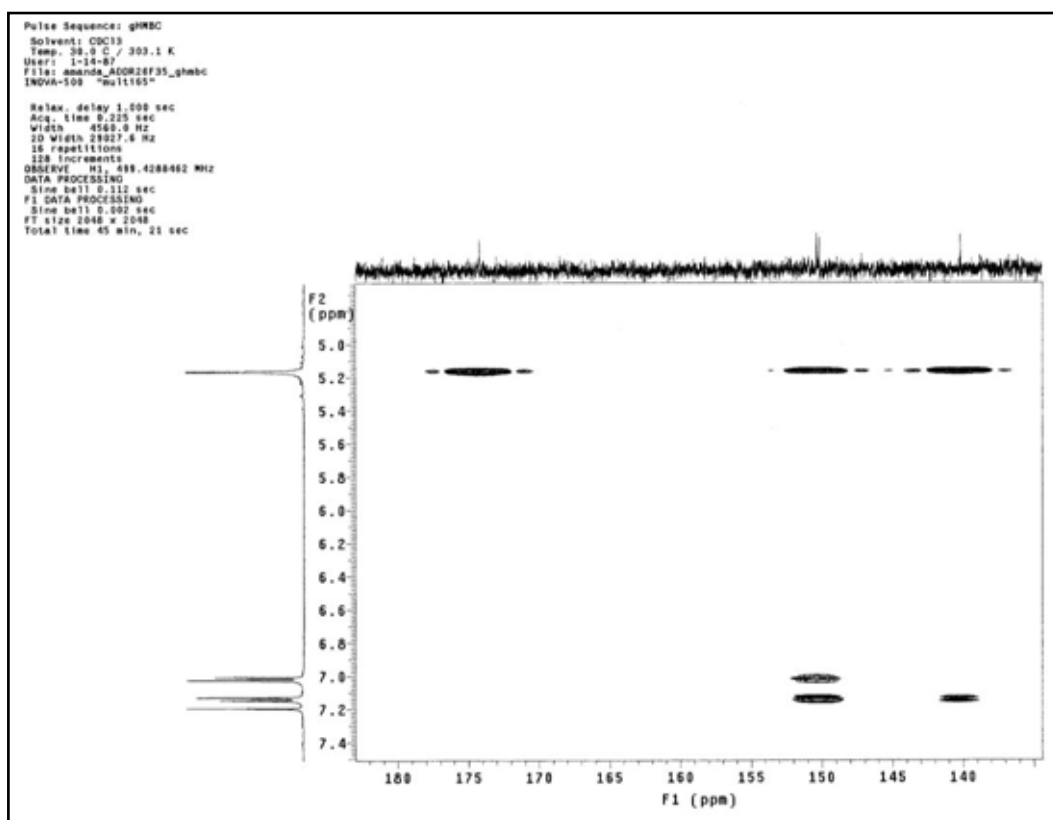
Espectro 26 - Mapa de contorno gHMQC de **44** (δ 17–27; 500 MHz; CDCl₃).



Espectro 27 - Mapa de contorno gHMBC de **44** (500 MHz; CDCl₃).



Espectro 28 - Mapa de contorno gHMBC de **44** (δ 124–180; 500 MHz; CDCl₃).



Espectro 29 - Mapa de contorno gHMBC de **44** (δ 139–180; 500 MHz; CDCl₃).

Tabela 8 - Dados de RMN de **44** (CDCl₃)

posição	δ_C^a	gHMQC δ_H^a (m^b , J^c)	gHMBC
2	140,1	–	H-4; H-7
3	150,1 ^d	–	H-4; H-7; H-5
4	126,7	7,14 (d, 8,5)	–
5	125,6	7,01 (d, 8,5)	H-10
6	150,3 ^d	–	H-4; H-5; H-10
7	64,6	5,16 (s)	–
8	174,2	–	H-7; H-9
9	20,7	2,06 (s)	–
10	23,2	2,42 (s)	–

^a deslocamentos químicos em ppm, em relação ao TMS como padrão interno

^b multiplicidade

^c constantes de acoplamento em Hz

^d podem estar trocados

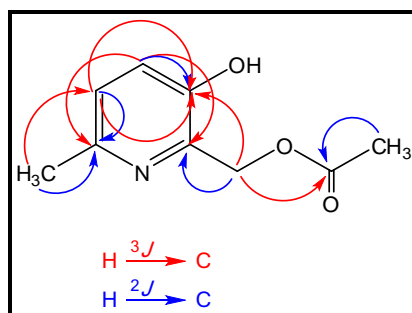


Figura 44 - Correlações H–C observadas no mapa de contorno gHMBC de **44**.

As reações de acetilação foram repetidas para o álcool 3-hidroxi-2-hidroximetil-piridina (**38**) e foram obtidos dois produtos: o derivado di-acetilado [R_f 0,51; Hex:AcOEt (1:9)], óleo amarelo, **45**, Figura 45), já descrito por Stempel e Buzzi (1949) e o derivado mono-acetilado na hidroxila metil-piridínica (R_f 0,44; Hex:AcOEt 1:9, sólido amarelo, **46**, Figura 45), inédito na literatura.

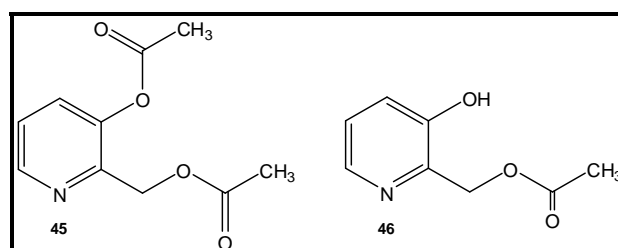
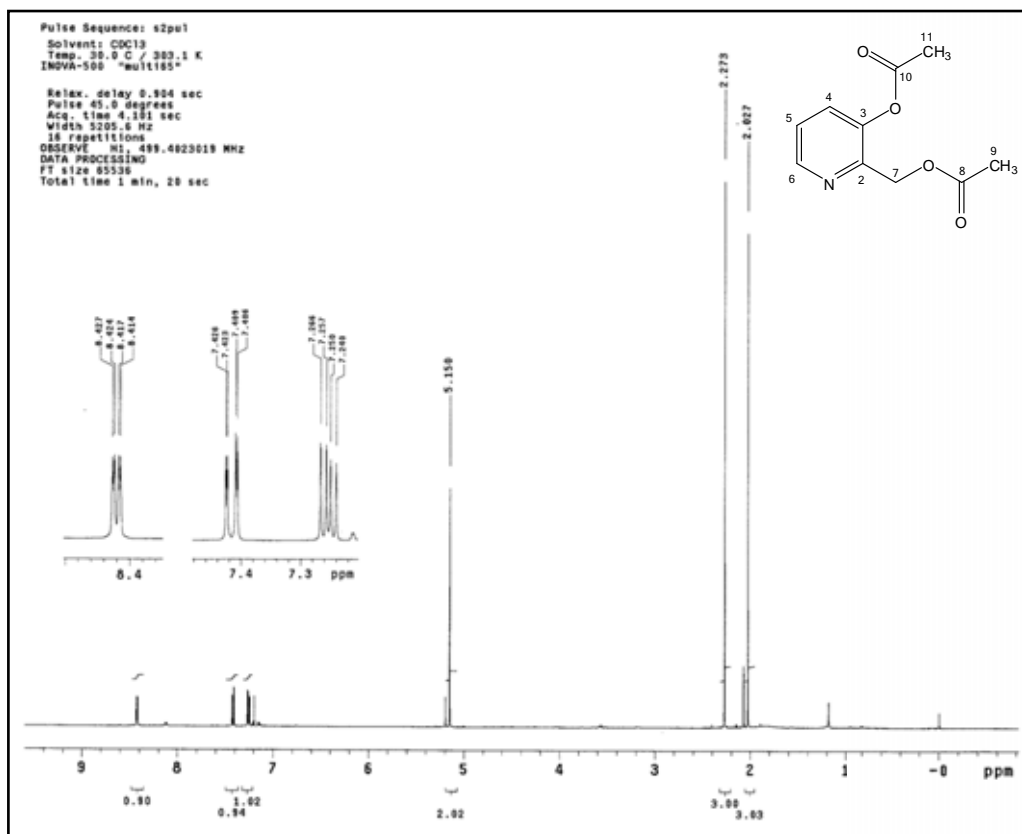


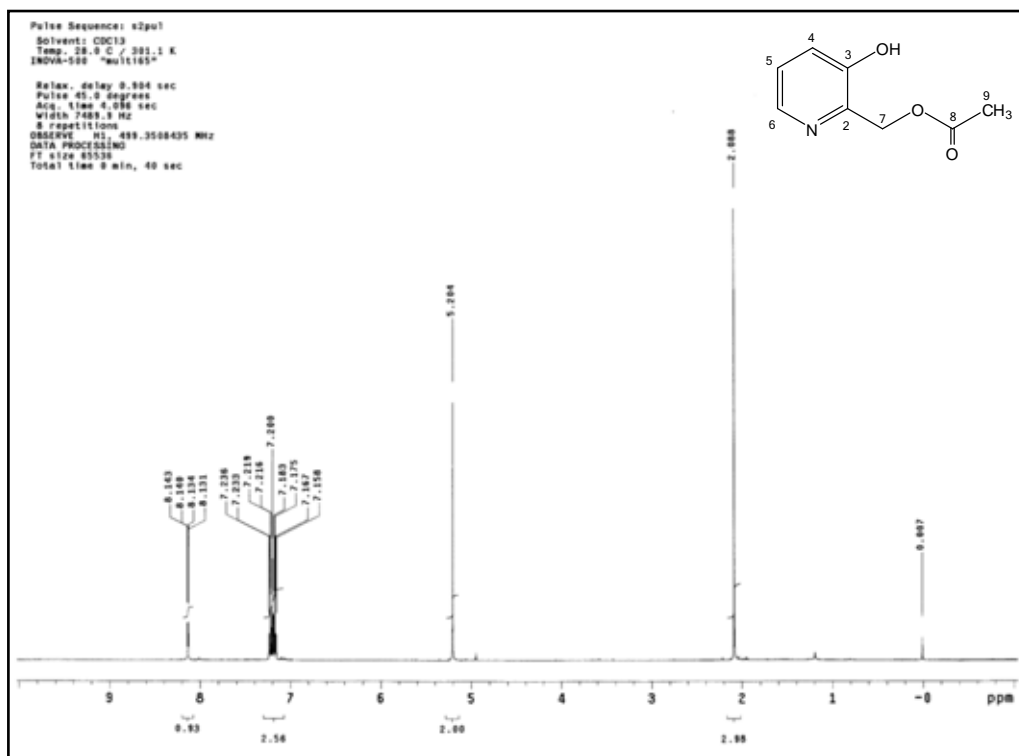
Figura 45 - Derivados acetilados de **38**.

O espectro de RMN de ^1H para **45** (Espectro 30) apresentou três duplos dubletos em δ 8,42 (1H, $J_{6-5} = 5$ Hz e $J_{6-4} = 1,5$ Hz), δ 7,42 (1H, $J_{4-5} = 8,5$ Hz e $J_{4-6} = 1,5$ Hz) e δ 7,25 (1H, $J_{5-4} = 8,5$ Hz e $J_{5-6} = 5$ Hz) referentes aos hidrogênios 6, 4 e 5, respectivamente. Também foi observado um singleto em δ 5,15 (2H) referente aos hidrogênios metilênicos e dois singletos característicos dos hidrogênios metílicos em δ 2,27 (3H, H-11) e δ 2,02 (3H, H-9).

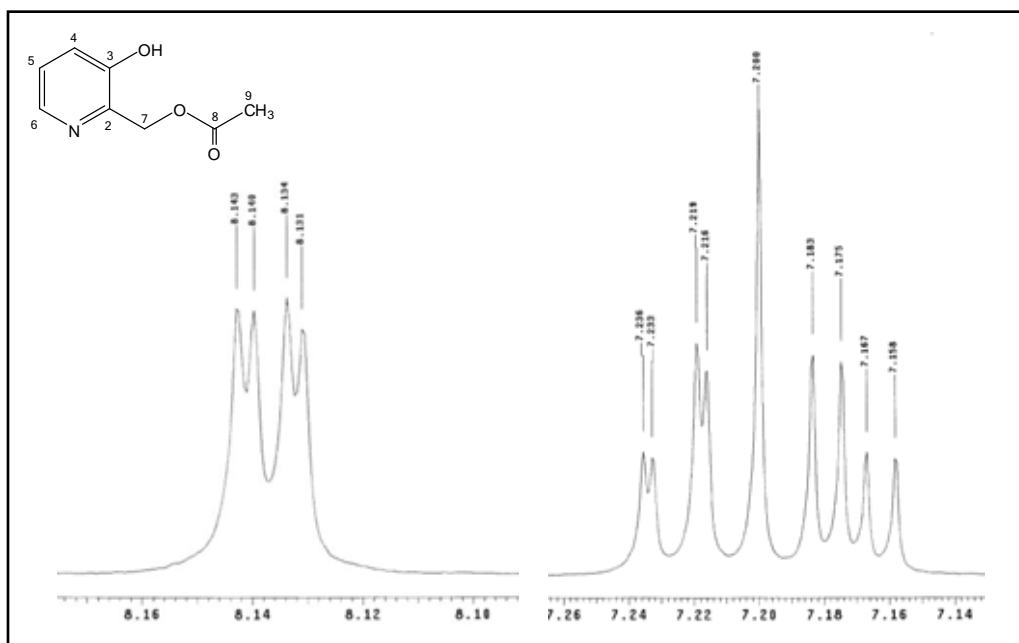


Espectro 30 - Espectro de RMN de ^1H de **45** (500 MHz, CDCl_3).

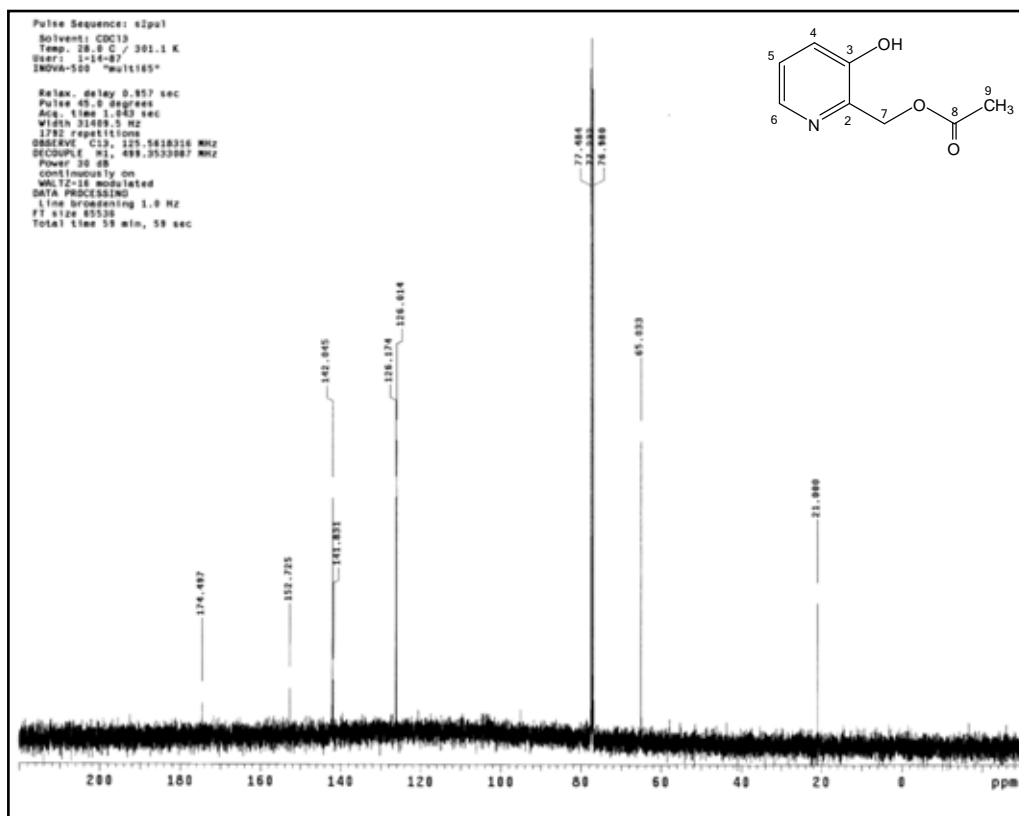
A análise dos espectros de RMN de ^1H (Espectros 31 e 32) e ^{13}C (Espectro 33) para **46** foi muito semelhante àquela realizada para **44**. As principais diferenças são as multiplicidades dos hidrogênios 4 e 5 (dd) e o surgimento do sinal em δ 8,13 referente ao H-6. As atribuições dos carbonos estão descritas na Tabela 9 e foram baseadas nas correlações observadas no mapa de contorno gHMBC (Espectros 34 e 35 e Figura 46).



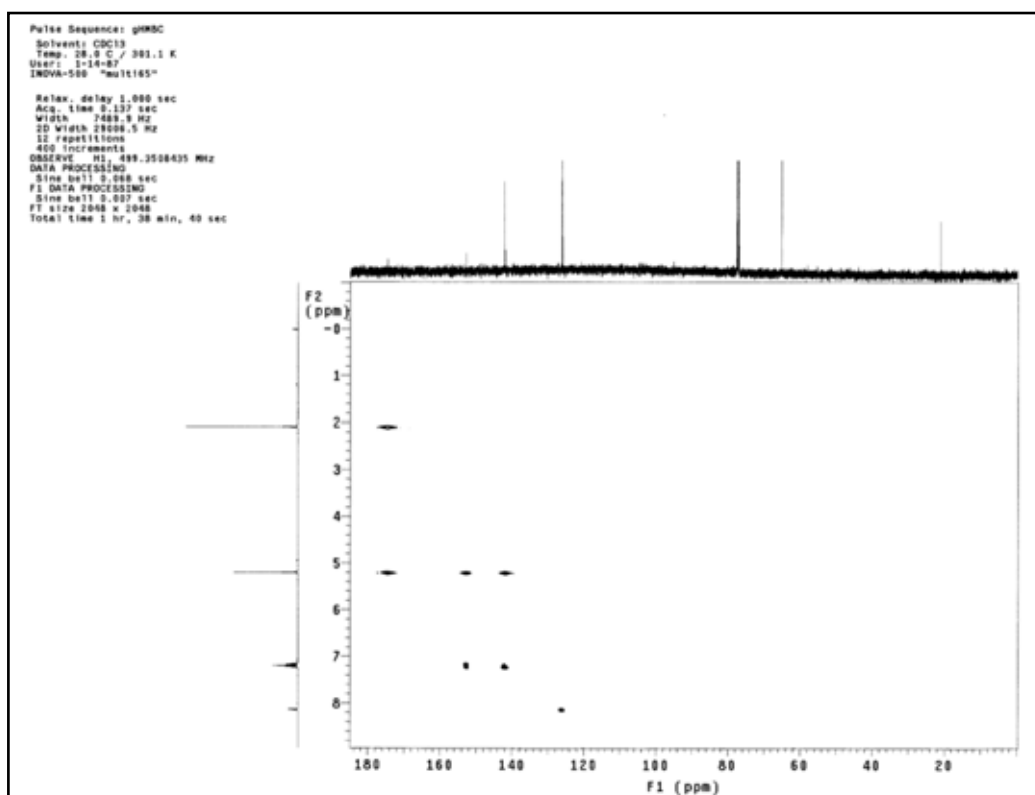
Espectro 31 - Espectro de RMN de ^1H de **46** (500 MHz, CDCl_3).



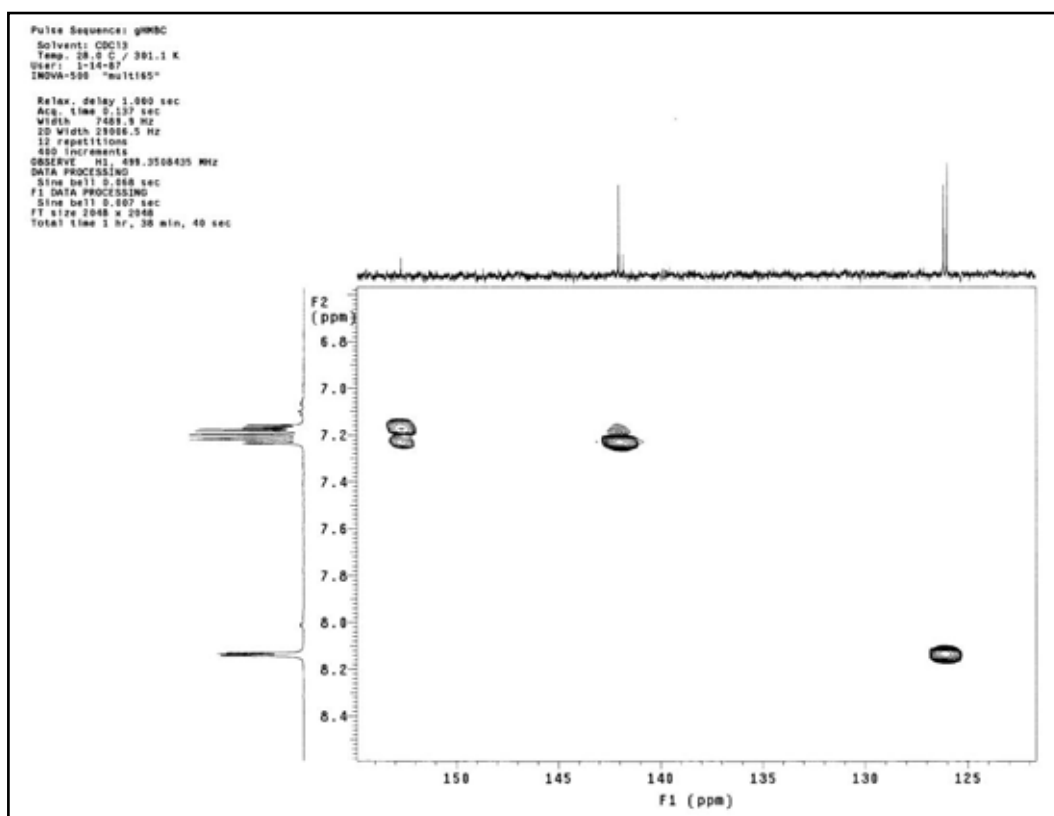
Espectro 32 - Ampliação do espectro de RMN de ^1H de **46** (δ 7,14–8,16).



Espectro 33 - Espectro de RMN de ^{13}C de **46** (125 MHz, CDCl_3).



Espectro 34 - Mapa de contorno gHMBC de **46** (500 MHz; CDCl_3).



Espectro 35 - Mapa de contorno gHMBC de **46** (δ 124–155; 500 MHz; CDCl₃).

Tabela 9 - Dados de RMN de **46** (CDCl₃)

posição	δ_C^a	gHMQC δ_H^a (m^b , J^c)	gHMBC
2	141,8	–	H-4; H-7
3	152,7	–	H-4; H-5; H-7
4	126,1 ^d	7,22 (dd; 8,5; 1,5)	H-6
5	126,0 ^d	7,17 (dd; 8,5; 4,5)	H-6
6	142,0	8,13 (dd; 4,5; 1,5)	H-4; H-5
7	65,0	5,20 (s)	–
8	174,4	–	H-7; H-9
9	21,0	2,08 (s)	–

^a deslocamentos químicos em ppm, em relação ao TMS como padrão interno

^b multiplicidade

^c constantes de acoplamento em Hz

^d podem estar trocados

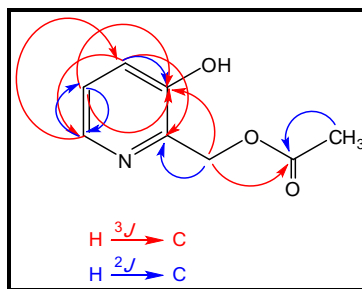


Figura 46 - Correlações H–C observadas no mapa de contorno *g*HMBC de **46**.

As reações com TBDPSCI não foram eficientes nas condições avaliadas, pois em nenhum dos casos o produto mono ou di-protegido foi formado, já a reação de proteção com BnBr (Figura 47) levou a um sólido amarelo claro [R_f 0,69; CHCl_3 :MeOH (9:1)] em 70% de rendimento.

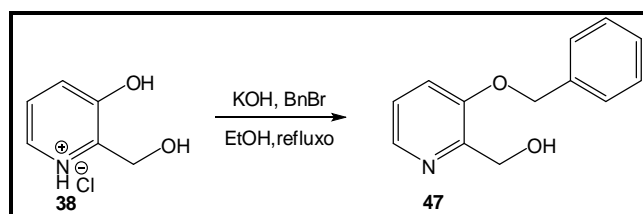
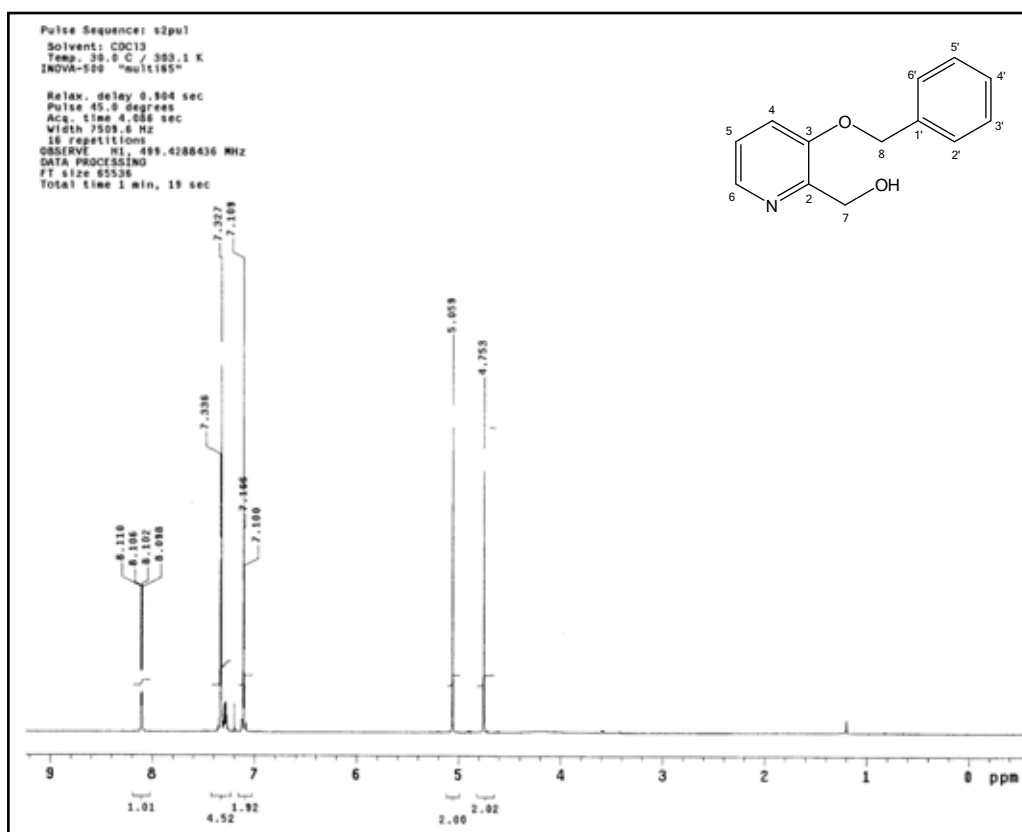


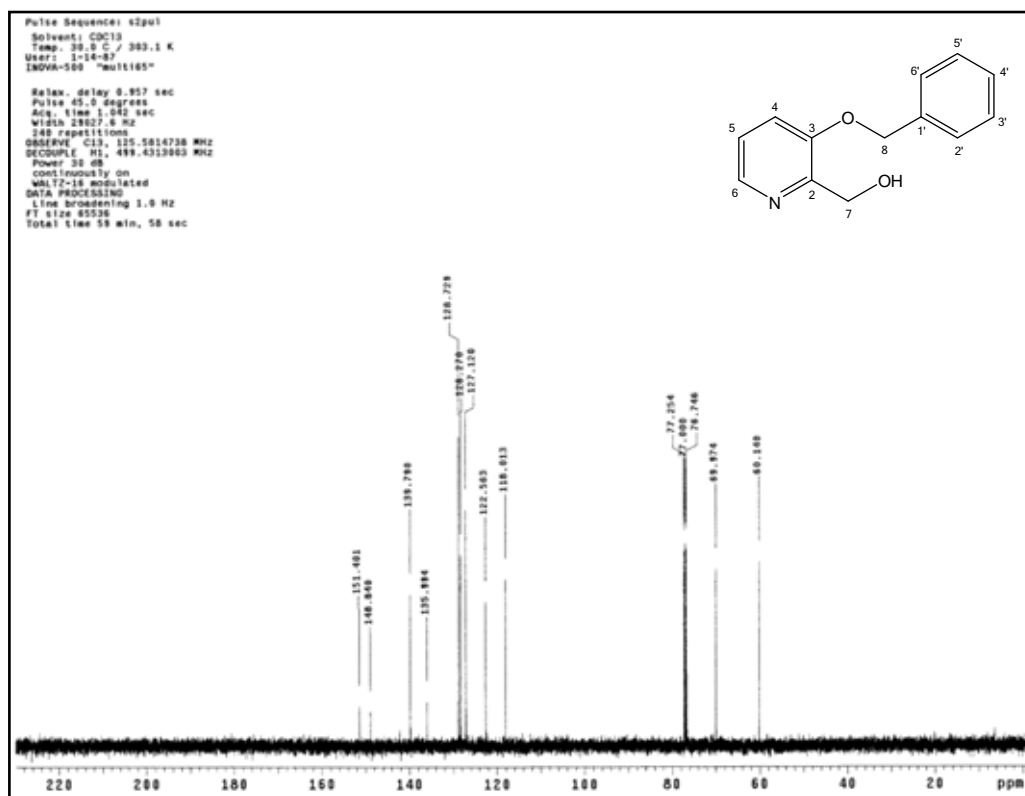
Figura 47 - Formação do derivado benzilado **47**.

O produto obtido corresponde a um derivado mono-protegido (**47**, Figura 47), pois foi possível observar no espectro de RMN de ^1H (Espectro 36) dois sinais em δ 5,05 e 4,75 referentes a hidrogênios metilênicos, além de um duplo dubleto integrando para um hidrogênio em δ 8,10 referente ao H-6 e três multipletos integrando para sete hidrogênios em δ 7,10; 7,29 e 7,33.

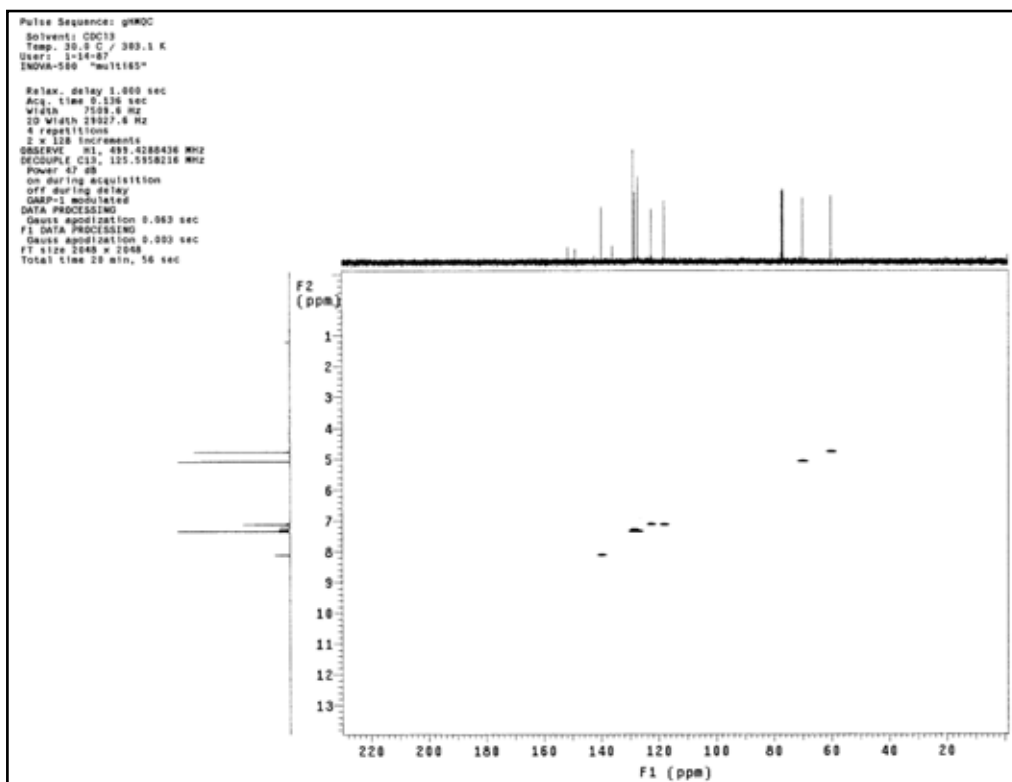
A análise do espectro de RMN de ^{13}C (Espectro 37) apresentou dois sinais para carbonos metilênicos em δ 60,1 e 69,9 e nove sinais característicos de aromáticos, sendo dois deles característicos do núcleo piridínico (δ 148,8 e 151,4) e dois de maior intensidade (δ 127,1 e 128,7) que correspondem aos carbonos equivalentes 2'-6' e 3'-5'. As atribuições dos carbonos estão descritas na Tabela 10 e foram baseadas nas correlações observadas nos mapas de contorno de *g*HMQC (Espectros 38 e 39) e *g*HMBC (Espectros 40–42 e Figura 48). A correlação entre os hidrogênios metilênicos do grupo protetor com C-3 confirma que a proteção ocorreu no oxigênio ligado diretamente ao núcleo piridínico (Figura 48).



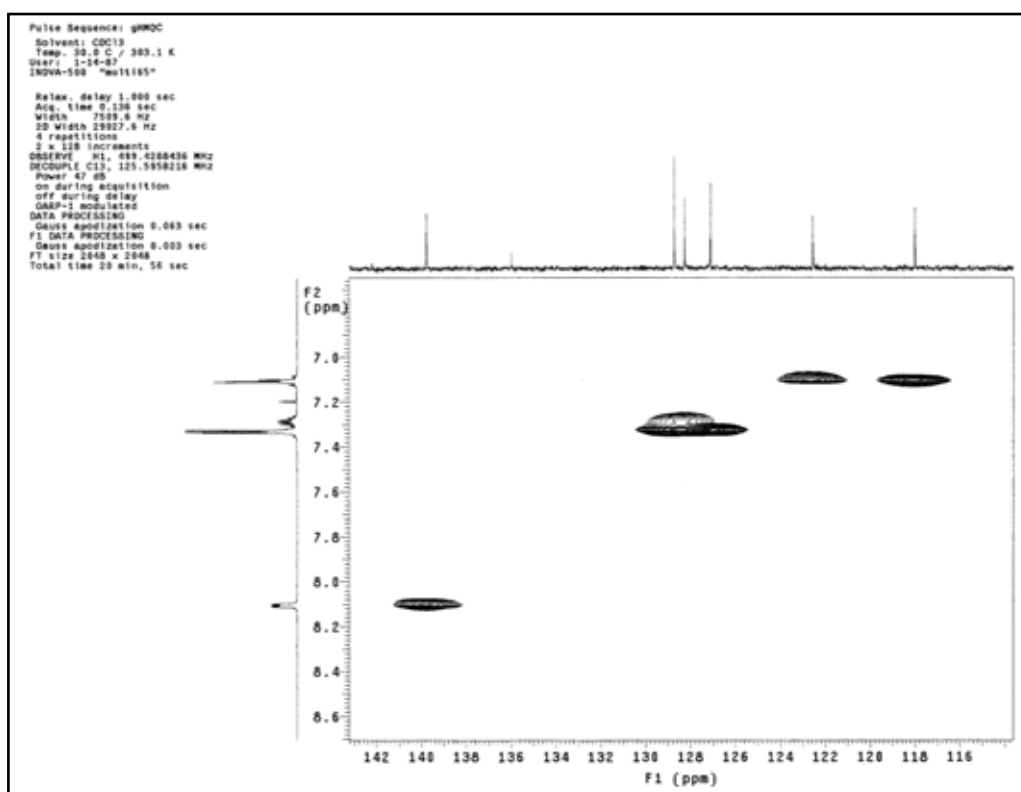
Espectro 36 - Espectro de RMN de ^1H de **47** (500 MHz, CDCl_3).



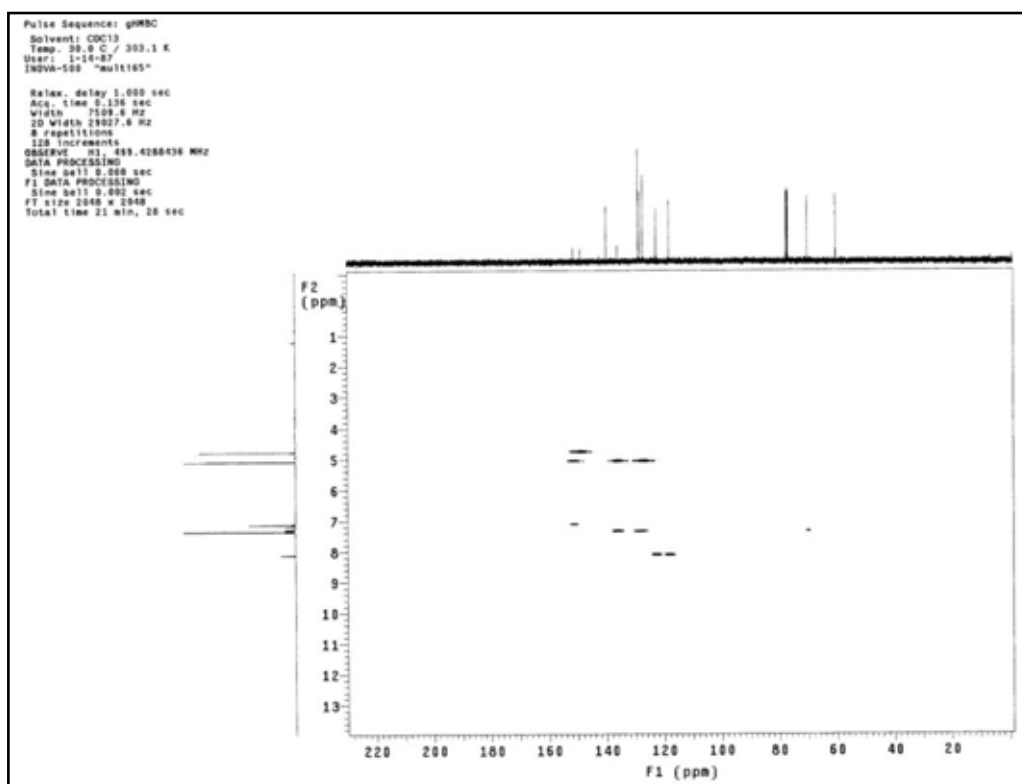
Espectro 37 - Espectro de RMN de ^{13}C de **47** (125 MHz, CDCl_3).



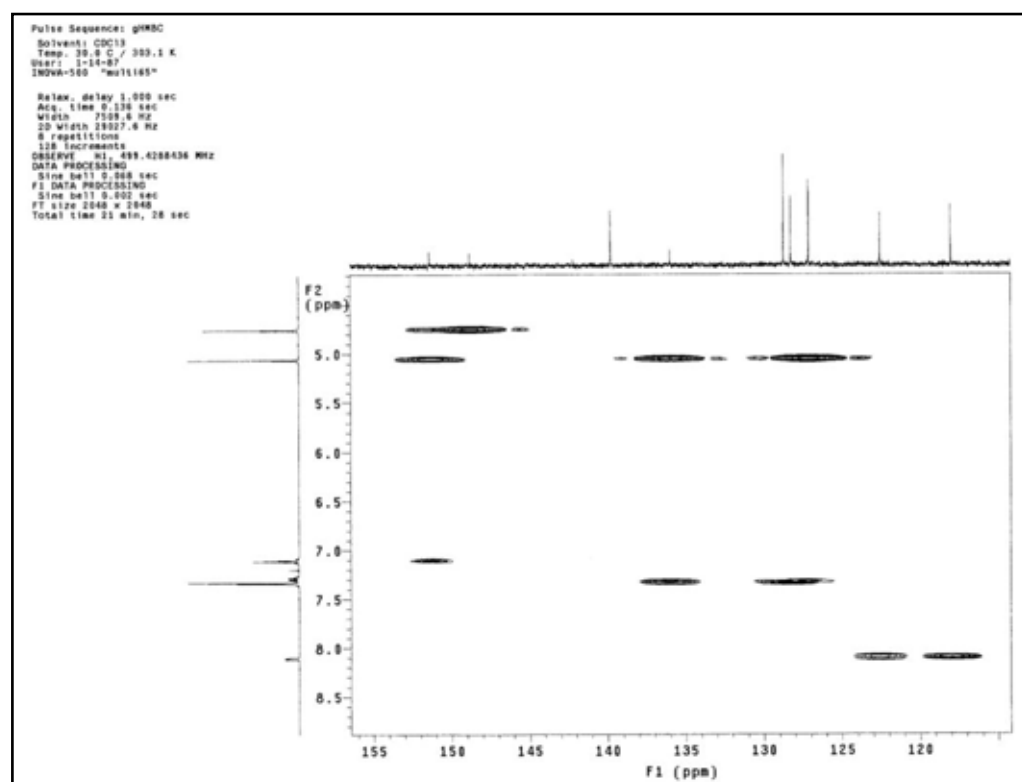
Espectro 38 - Mapa de contorno gHMOC de **47** (500 MHz; CDCl₃).



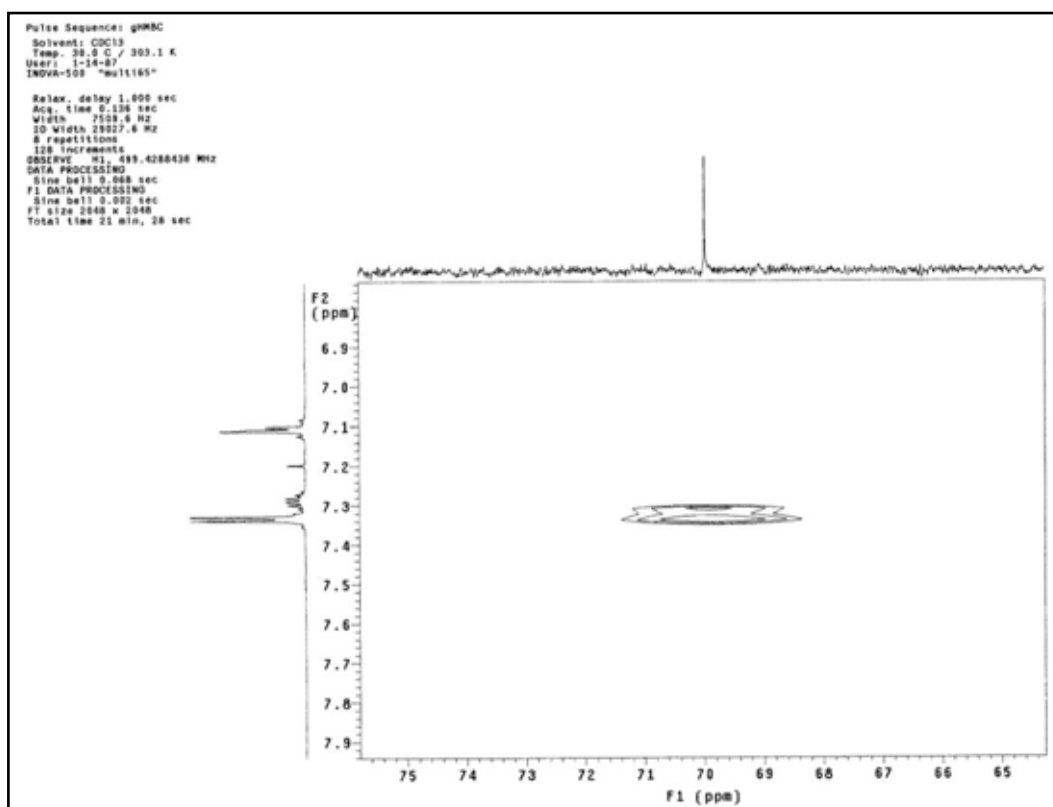
Espectro 39 - Mapa de contorno gHMOC de **47** (δ 116–142; 500 MHz; CDCl₃).



Espectro 40 - Mapa de contorno gHMBC de **47** (500 MHz; CDCl₃).



Espectro 41 - Mapa de contorno gHMBC de **47** (δ 119–155; 500 MHz; CDCl₃).



Espectro 42 - Mapa de contorno gHMBC de **47** (δ 65–75; 500 MHz; CDCl_3).

Tabela 10 - Dados de RMN de **47** (CDCl_3)

posição	δ_{C}^a	gHMBC δ_{H}^a (m^b , \mathcal{J}^c)	gHMBC
2	148,8	–	H-7
3	151,4	–	H-7, H-8
4	122,5 ^d	7,10 (m)	H-6
5	118,0 ^d	7,10 (m)	H-6
6	139,7	8,10 (dd, 2, 4)	–
7	60,1	4,75 (s)	–
8	69,9	5,05 (s)	H-2', H-6'
1'	135,9	–	H-8, H-2', H-6'
2' e 6'	127,1	7,33 (m)	H-8
3' e 5'	128,7	7,29 (m)	H-2', H-6'
4'	128,2	7,29 (m)	H-2', H-6'

^a deslocamentos químicos em ppm, em relação ao TMS como padrão interno

^b multiplicidade

^c constantes de acoplamento em Hz

^d podem estar trocados

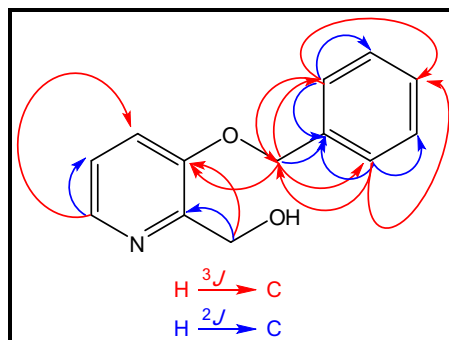


Figura 48 - Correlações H–C observadas no mapa de contorno gHMBC de **47**.

Após a obtenção de **47**, foram realizadas duas reações de oxidação (Figuras 49 e 50) esperando-se obter melhores rendimentos para o aldeído formado (**48**) do que aquele obtido para o aldeído **41**. A primeira foi a reação de Swern (Figura 49), que é uma metodologia mais delicada que as reações com MnO_2 , porém geralmente é eficiente nas oxidações de alcoóis primários a aldeídos. O cloreto de oxalila reage com o DMSO levando ao sal clorossulfônico que é o agente oxidante e instável acima de $-60\text{ }^\circ\text{C}$. Em seguida o álcool é adicionado e, finalmente, a adição da trietilamina facilita a decomposição do sal alcoxissulfônico (Figura 49, KÜRTI; CZAKÓ, 2005). Um dos indícios da formação do aldeído é o odor característico do dimetilsulfeto formado como subproduto, porém o aldeído não foi formado. A segunda reação realizada foi com MnO_2 (Figura 50) que levou a um óleo amarelo ligeiramente mais apolar que o material de partida [$R_f = 0,71$; $\text{CHCl}_3:\text{MeOH}$ (9:1)] em 75% de rendimento.

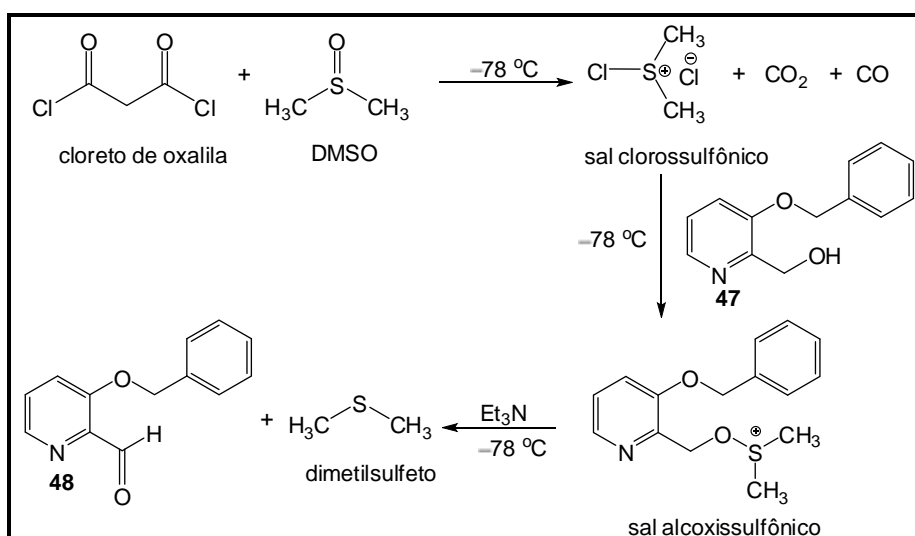


Figura 49 - Reação de Swern para o álcool **47**.

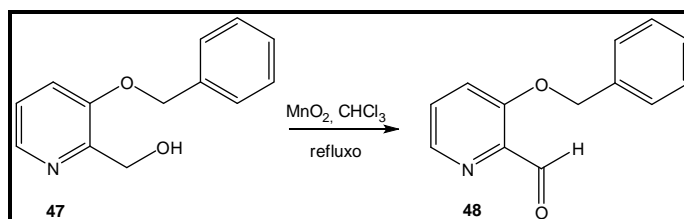
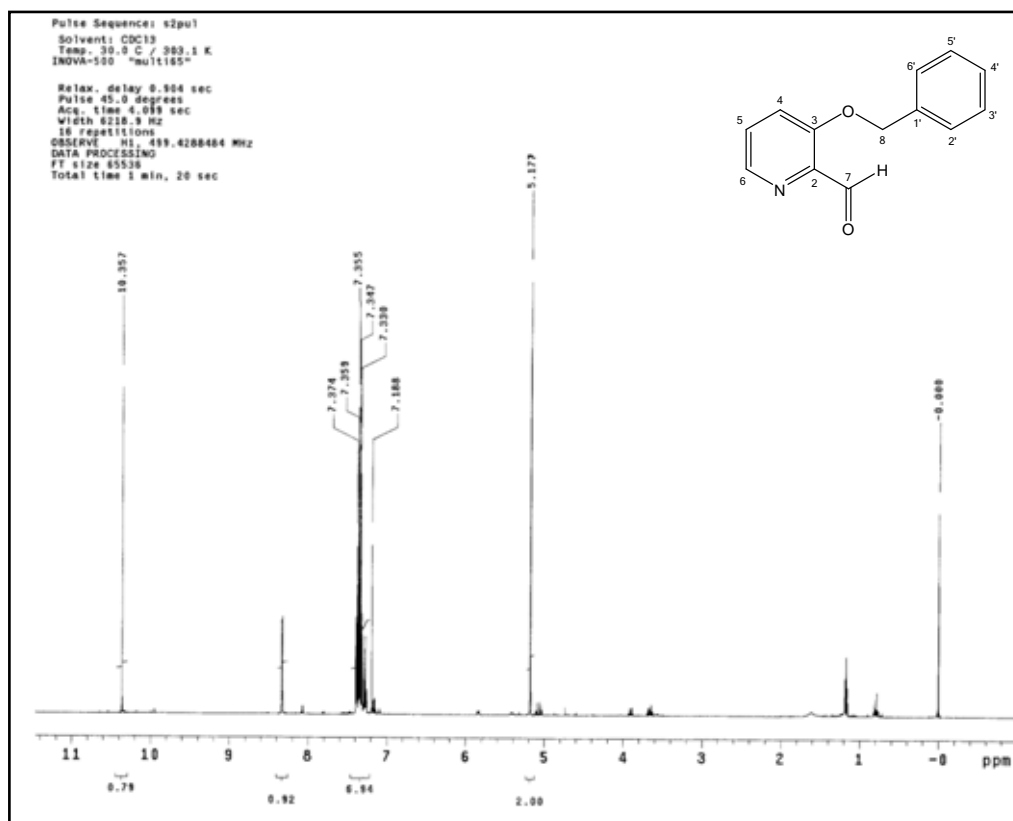


Figura 50 - Oxidação do álcool **47** com MnO_2 .

A análise de RMN de ^1H e ^{13}C confirmou a obtenção de **48** (Figura 50), pois este produto apresentou um sinal característico de hidrogênio ligado a carbonila em δ 10,35 (Espectro 43) e um sinal característico de carbonila de aldeído em δ 189,9 (Espectro 44 e 45). As atribuições foram baseadas em dados da literatura (Tabela 11, TAKEDA et al., 2003).



Espectro 43 - Espectro de RMN de ^1H de **48** (500 MHz, CDCl_3).

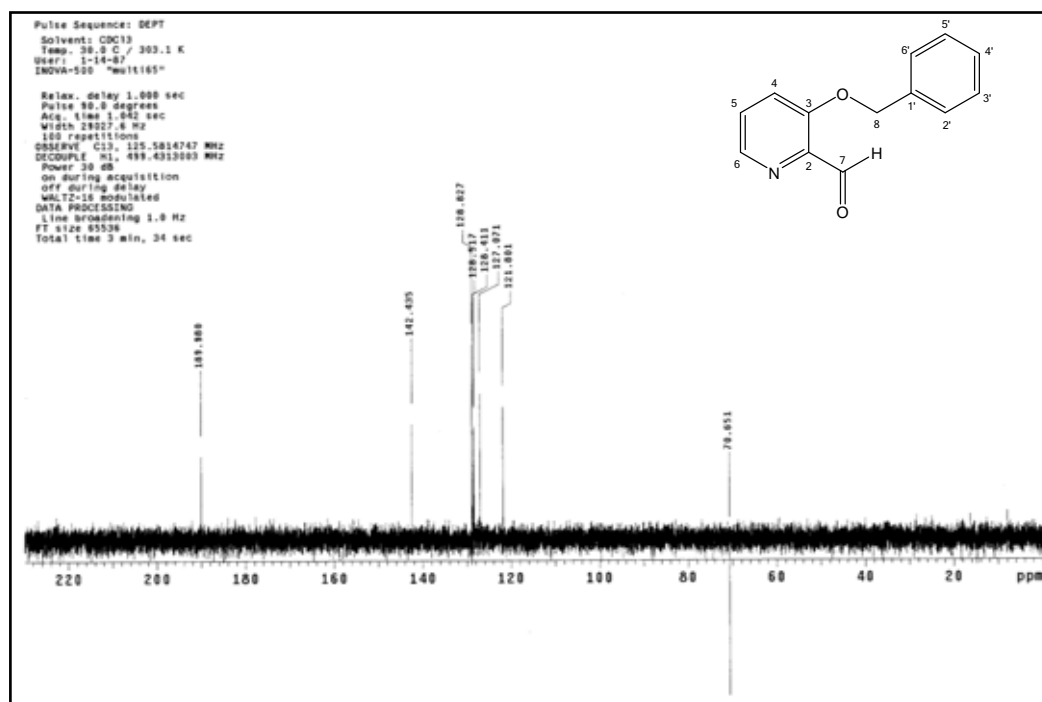
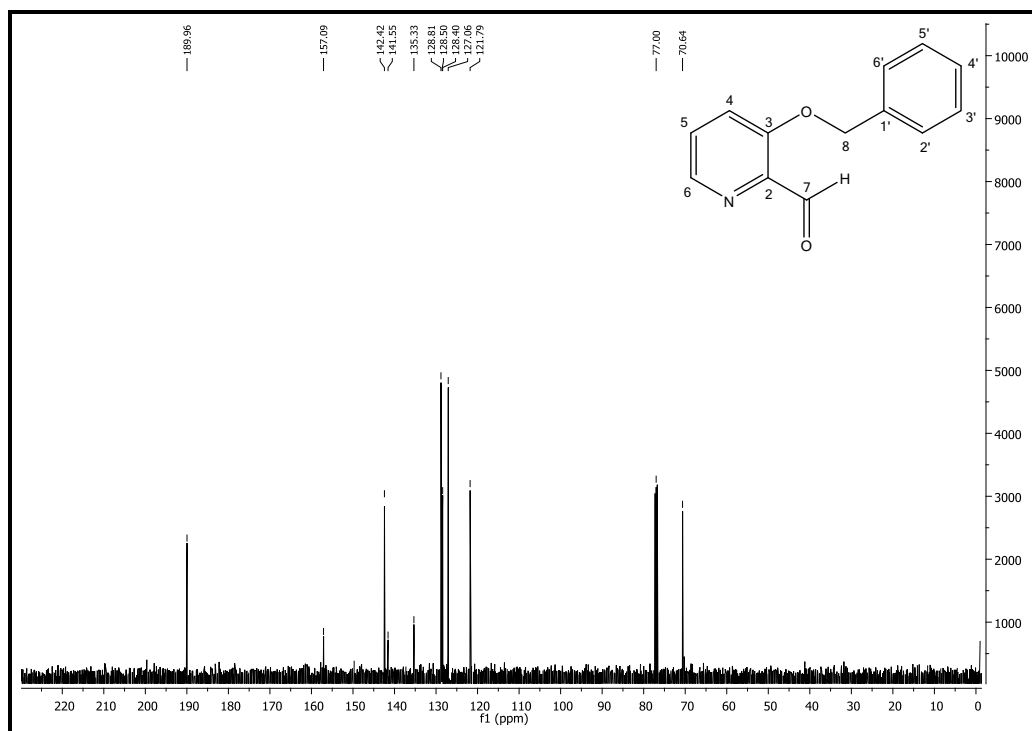


Tabela 11 - Dados de RMN ^1H e ^{13}C de **48** (CDCl_3)

posição	δ_{H}^a (m^b , J^c)	δ_{C}^a (m^b)
2	–	141,5 (C)
3	–	157,0 (C)
4	7,35 (m)	121,7 (CH)
5	7,35 (m)	128,5 ^d (CH)
6	8,32 (dd, 4,5; 1,5)	142,4 (CH)
7	10,35 (s)	189,9 (CH)
8	5,17 (s)	70,6 (CH_2)
1'	–	135,3 (C)
2' e 6'	7,35 (m)	127,0 (CH)
3' e 5'	7,35 (m)	128,8 (CH)
4'	7,35 (m)	128,4 ^d (CH)

^a deslocamentos químicos em ppm, em relação ao TMS como padrão interno

^b multiplicidade

^c constantes de acoplamento em Hz

^d podem estar trocados

A diferença entre os rendimentos de **41** e **48** (45% e 70%, respectivamente) pode ser atribuída à hidroxila livre de **41**, que deve interagir com o MnO_2 , adsorvendo **41** no agente oxidante e, conseqüentemente, diminuir o rendimento da reação. Já no caso do álcool protegido seletivamente (**47**), o MnO_2 interage somente com a hidroxila ligada ao grupo metil-piridínico levando ao aldeído desejado (**48**) em melhores rendimentos.

Os resultados obtidos nas reações de proteção seletiva com Ac e Bn são aparentemente contraditórios. Em ambos os casos ocorre um ataque nucleofílico do oxigênio ao carbono eletrofílico de um halogeneto ou cloreto de ácido e, mesmo o segundo sendo mais reativo que o primeiro, se esperaria que a hidroxila protegida fosse a mesma, já que o alcóxido formado na posição 3 do anel piridínico é mais nucleofílico que a hidroxila 2-metil-piridínica. No entanto, na reação com AcCl a proteção ocorreu no oxigênio metil-piridínico. Assim, uma proposta apresentada para este fato fundamenta-se numa reação na hidroxila piridínica seguida de uma migração do grupo protetor para a hidroxila metil-piridínica. Esta migração ocorre pela proximidade desta hidroxila com a carbonila do acetato, o que proporciona um ataque nucleofílico deste álcool

metílico e a transferência do grupo protetor, formando o produto **44** ou **46** (Figura 51).

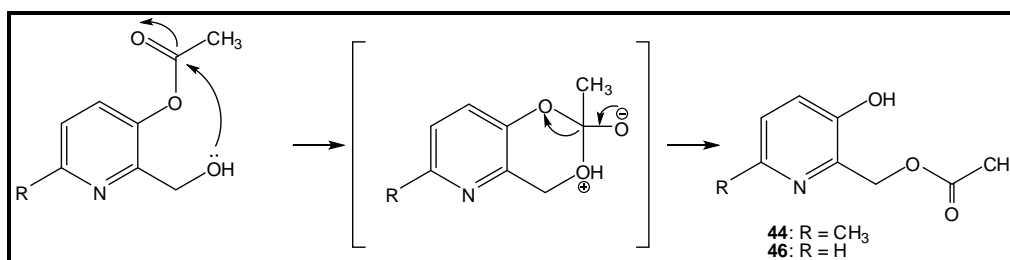


Figura 51 - Rearranjo proposto para obtenção dos produtos **44** e **46**.

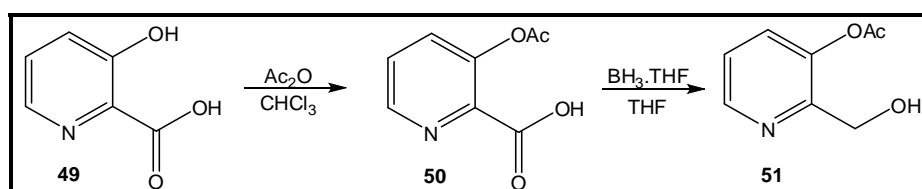
Para validar esta proposta foram realizadas 10 reações (Tabela 12) sendo testados os reagentes BnCl e AcBr, para avaliar a reatividade dos halogenetos (cloreto ou brometo), já que a metodologia para obtenção de **46** (Metodologia 3, Figura 42) utilizava AcCl e para obtenção de **47** (Figura 47) utilizava BnBr. A redução na temperatura em 6 e 8 para $-15\text{ }^{\circ}\text{C}$ teve como objetivo tentar identificar o produto de acetilação protegido no oxigênio ligado diretamente a piridina. Finalmente, foram avaliadas duas reações de benzilação utilizando a metodologia que levou ao produto di-acetilado (Metodologia 2, Figura 42) para verificar se o produto di-benzilado também seria formado.

Nenhuma das reações levou ao produto acetilado na hidroxila ligada a piridina, ao derivado di-benzilado ou ao produto protegido com benzil na hidroxila ligada ao grupo metil-piridínico, o que justifica a proposta de migração do grupo acetato. Foi observado que as reações com BnBr apresentaram melhores rendimentos, sendo a metodologia ilustrada na figura 47 a mais eficaz. As reações com AcBr levaram ao produto **46** em menores rendimentos.

Tabela 12 - Reações de proteção com benzil e acetato

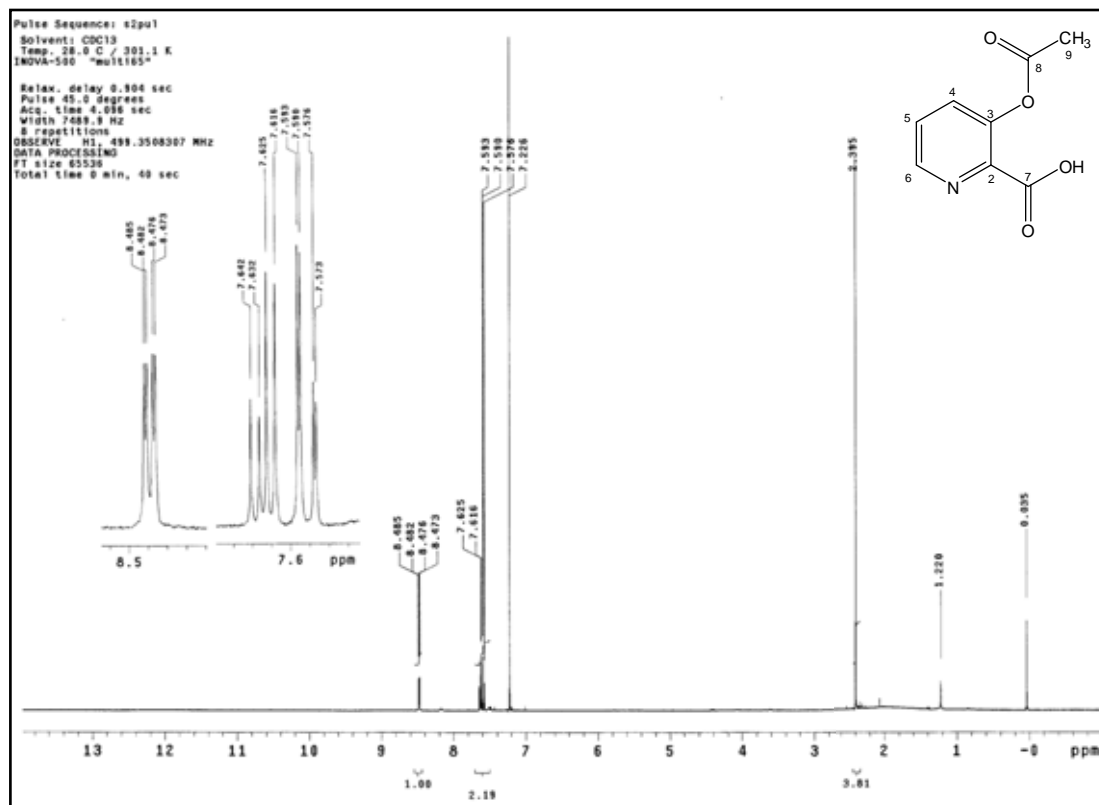
Reação	Reagente	Metodologia	Temperatura	Produto (rendimento)
1	BnCl	3.4.3.2	refluxo	47 (50%)
2	AcCl	3.4.3.2	refluxo	46 (25%)
3	AcBr	3.4.3.2	refluxo	46 (14%)
4	BnCl	3.4.3.1 (metodologia 3)	t.a.	não reagiu
5	BnBr	3.4.3.1 (metodologia 3)	t.a.	47 (25%)
6	AcCl	3.4.3.1 (metodologia 3)	-15 °C	46 (55%)
7	AcBr	3.4.3.1 (metodologia 3)	t.a.	46 (37%)
8	AcBr	3.4.3.1 (metodologia 3)	-15 °C	não reagiu
9	BnCl	3.4.3.1 (metodologia 2)	t.a.	não reagiu
10	BnBr	3.4.3.1 (metodologia 2)	t.a.	47 (17%)

Outra alternativa para verificar este rearranjo seria proteger a hidroxila ligada ao núcleo piridínico do ácido 3-hidroxi-picolínico e em seguida reduzir seletivamente o ácido carboxílico a álcool (Figura 52). Desta maneira, se **46** fosse formado a migração seria comprovada.

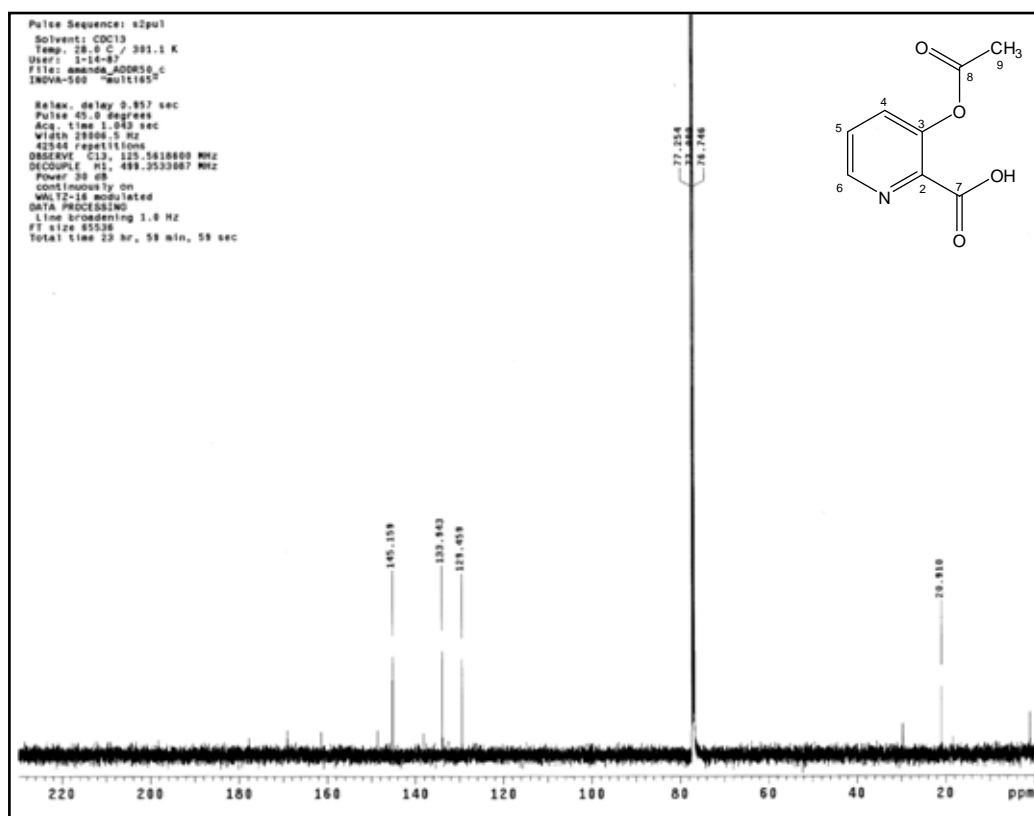
**Figura 52** - Proposta para formação de **51**.

A reação de acetilação de **49** (Figura 52) levou ao produto **50** [sólido amarelo, R_f = 0,38; AcOEt:MeOH (9:1)] em 95% de rendimento. A análise do espectro de RMN de ¹H (Espectro 46) apresentou três duplos dubletos em δ 8,48 (1H, J₆₋₅ = 4,5 Hz e J₆₋₄ = 1,5 Hz), δ 7,63 (1H, J₅₋₄ = 8 Hz e J₅₋₆ = 4,5 Hz) e δ 7,58 (1H, J₄₋₅ = 8 Hz e J₄₋₆ = 1,5 Hz) referentes aos hidrogênios 6, 5 e 4, respectivamente. Além destes sinais foi observado um singlete em δ 2,39 referente aos hidrogênios metílicos. O espectro de RMN de ¹³C (Espectros 47 e 48) apresentou cinco sinais característicos do núcleo piridínico em δ 129,4

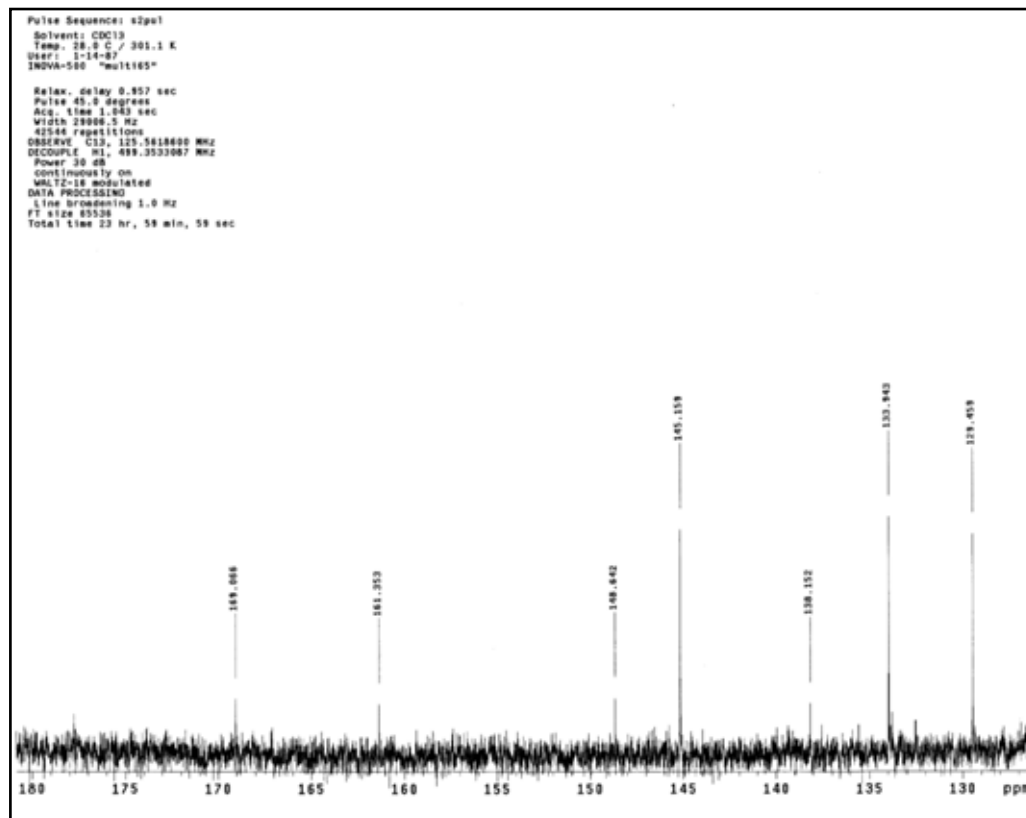
(C-5), 133,9 (C-4), 138,1 (C-2), 145,1 (C-6) e 148,6 (C-3); dois sinais referentes aos carbonos carbonílicos C-7 (δ 161,3) e C-8 (δ 169,0) e um sinal característico do carbono metílico em δ 20,9 (C-9).



Espectro 46 - Espectro de RMN de ¹H de **50** (500 MHz, CDCl₃).



Espectro 47 - Espectro de RMN de ^{13}C de **50** (125 MHz, CDCl_3).



Espectro 48 - Ampliação do espectro de RMN de ^{13}C de **50** (δ 129-180, 125 MHz, CDCl_3).

A reação de redução seletiva do ácido carboxílico não foi eficaz, pois quando utilizado um equivalente em mol do $\text{BH}_3:\text{THF}$ nenhum produto foi formado e quando adicionados dois equivalentes deste reagente, somente o álcool **38** foi obtido. Isto pode ser explicado pelos grupos funcionais presentes em **50** (ácido carboxílico, éster e amina), já que quando se deseja reduzir um ácido carboxílico na presença de ésteres, somente um equivalente de $\text{BH}_3:\text{THF}$ deve ser utilizado e quando se tem um aminoácido deve ser utilizado três equivalentes do redutor (YOON et al., 1973).

Para finalizar o estudo da proposta de migração, foi realizada a reação de proteção com benzoil (Bz), pois este grupo apresenta uma carbonila como o grupo Ac e um anel benzênico como Bn. Foi utilizada a mesma metodologia empregada para formação de **47** que levou a formação de dois produtos (Figura 53) com R_f muito próximos [0,68 e 0,70; Hex:AcOEt (1:9)]. A purificação por CC forneceu duas frações, uma delas referente ao composto com menor R_f e outra com a mistura dos dois produtos.

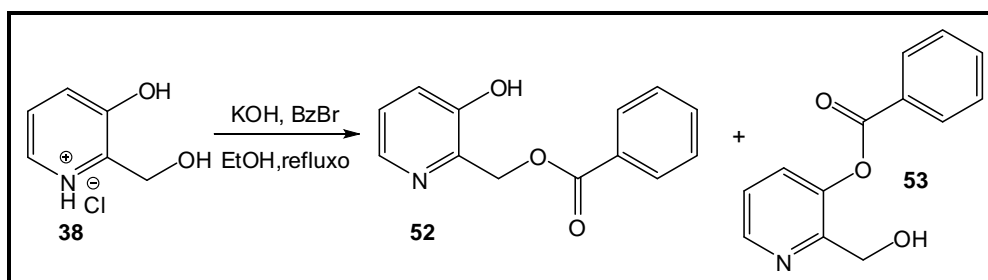
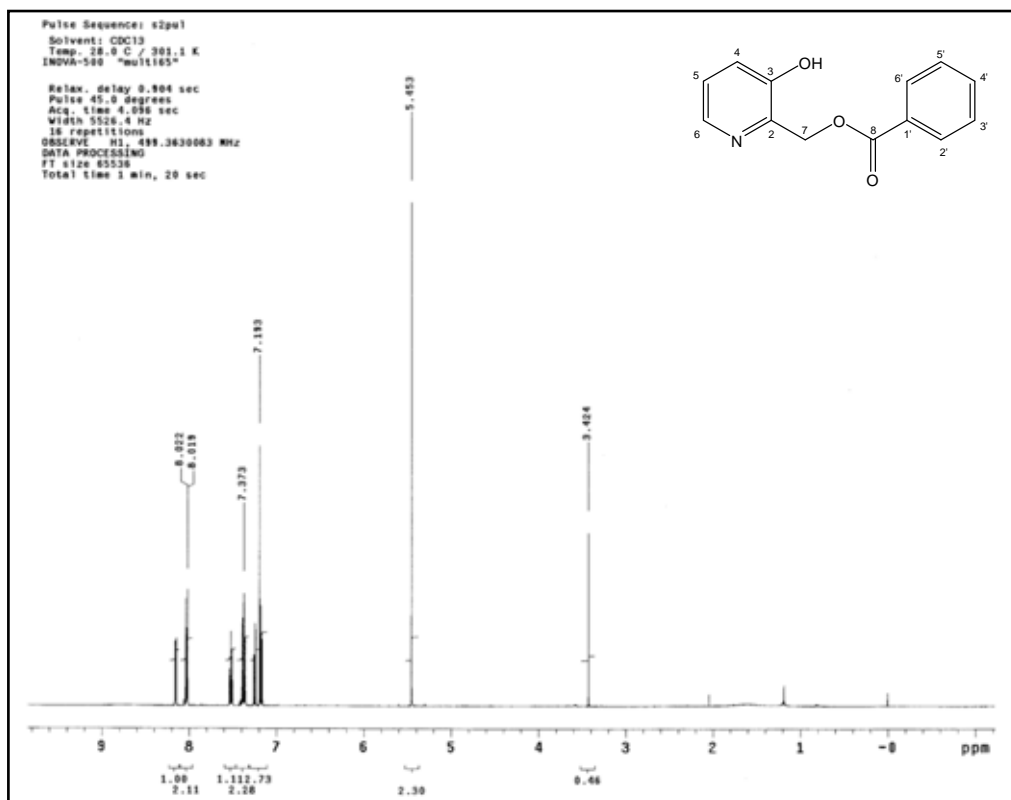
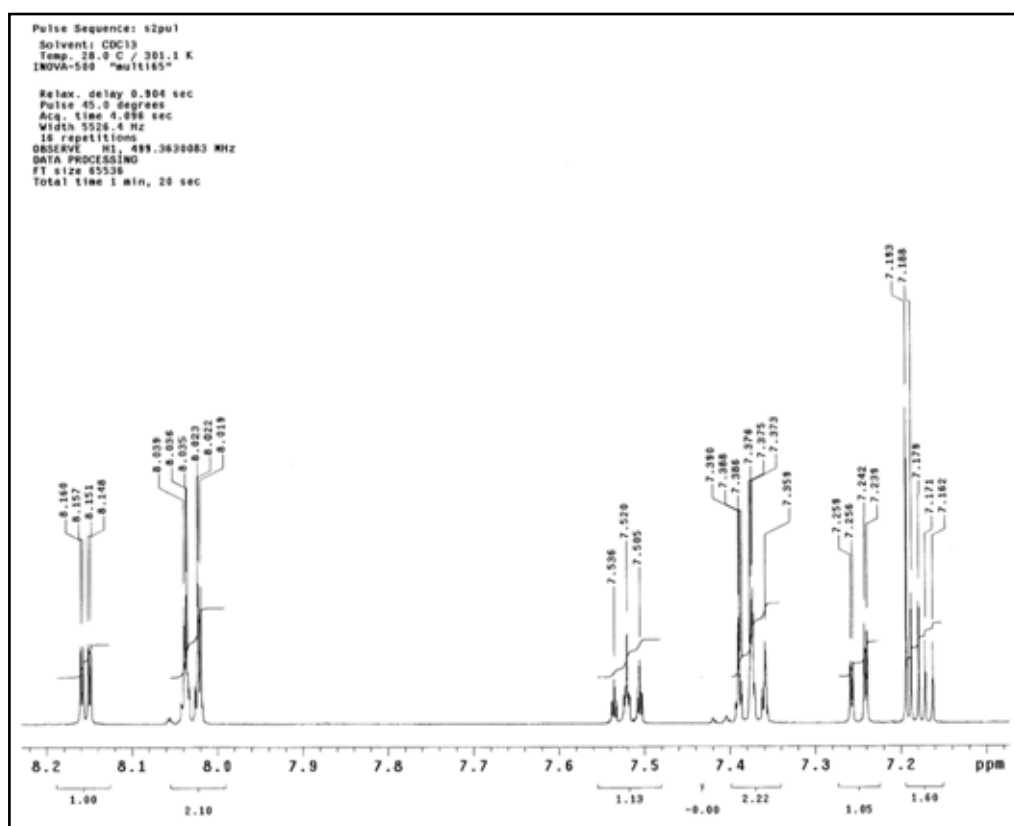


Figura 53 - Reação de benzoilação do álcool **38**.

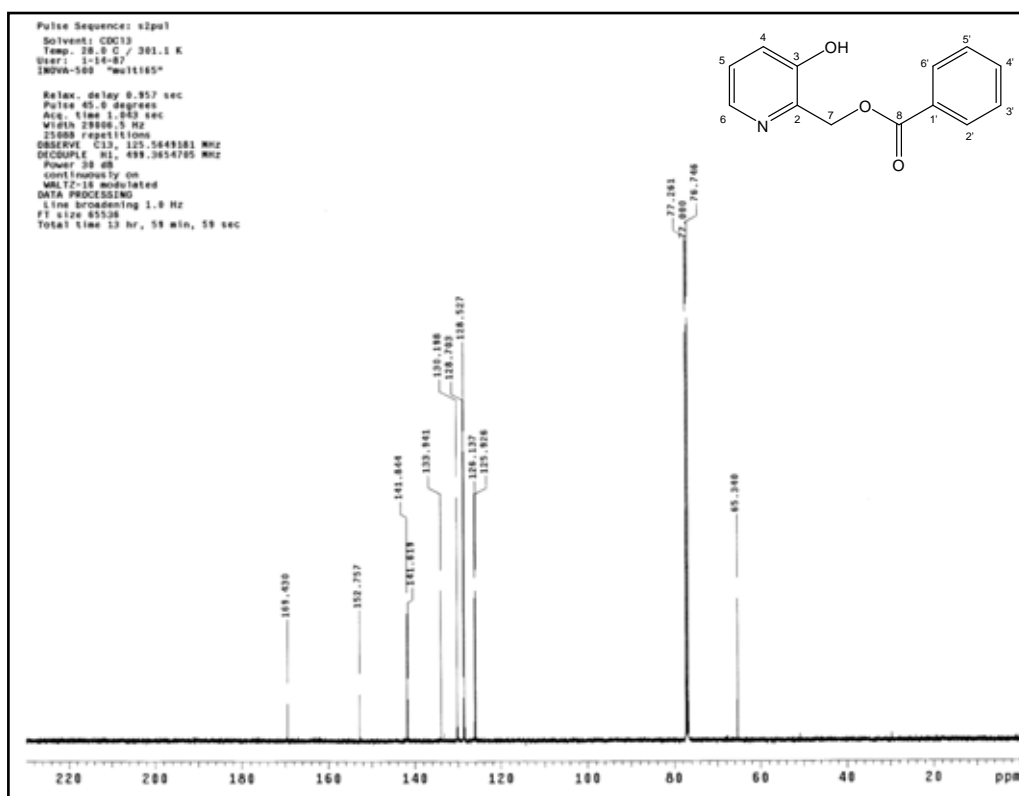
A análise dos espectros de RMN de ^1H e ^{13}C (Espectros 49-52) do produto puro (**52**, Figura 53) foi semelhante àquela realizada para **47** sendo a principal diferença o sinal em δ 169,4 (Espectros 51 e 52) referente ao carbono carbonílico do grupo Bz. As atribuições dos carbonos foram baseadas nas correlações observadas no mapa de contorno $g\text{HMBC}$ (Tabela 13, Espectros 53–55 e Figura 54). Foi observada a correlação entre os hidrogênios metilênicos (δ 5,45; H-7) com a carbonila (δ 169,4; C-8) do grupo protetor (Figura 54) indicando a proteção na hidroxila do álcool primário, sugerindo a migração do grupo Bz como proposto para o Ac (Figura 51).



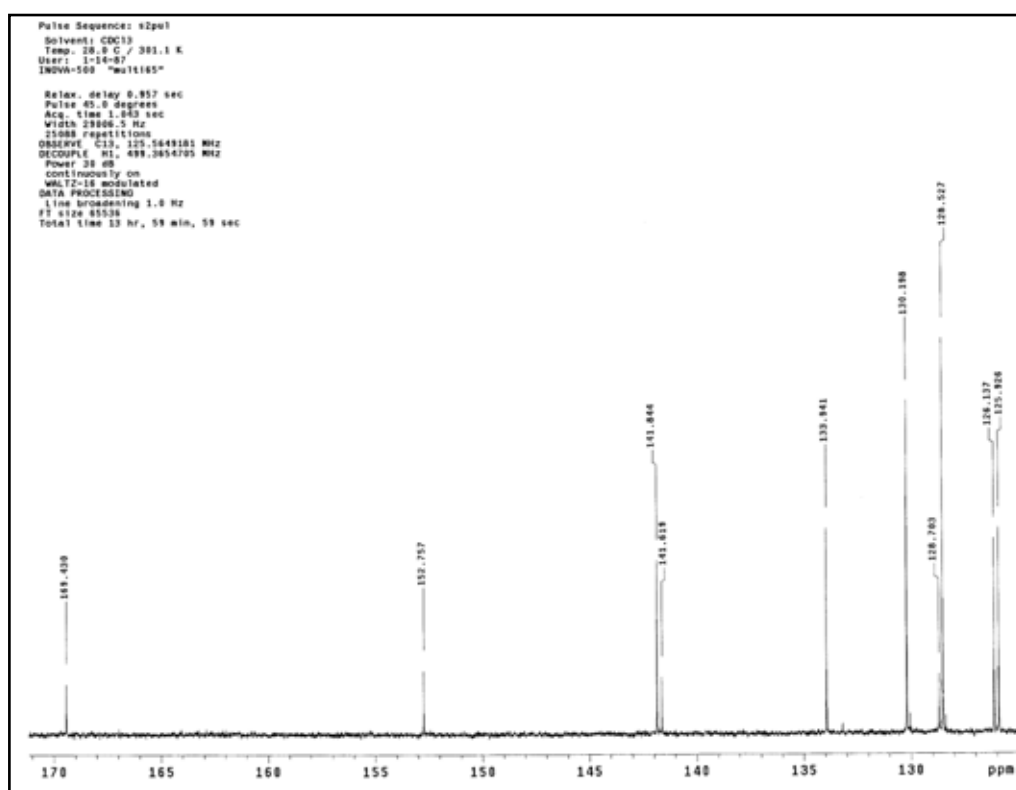
Espectro 49 - Espectro de RMN de ^1H de **52** (500 MHz, CDCl_3).



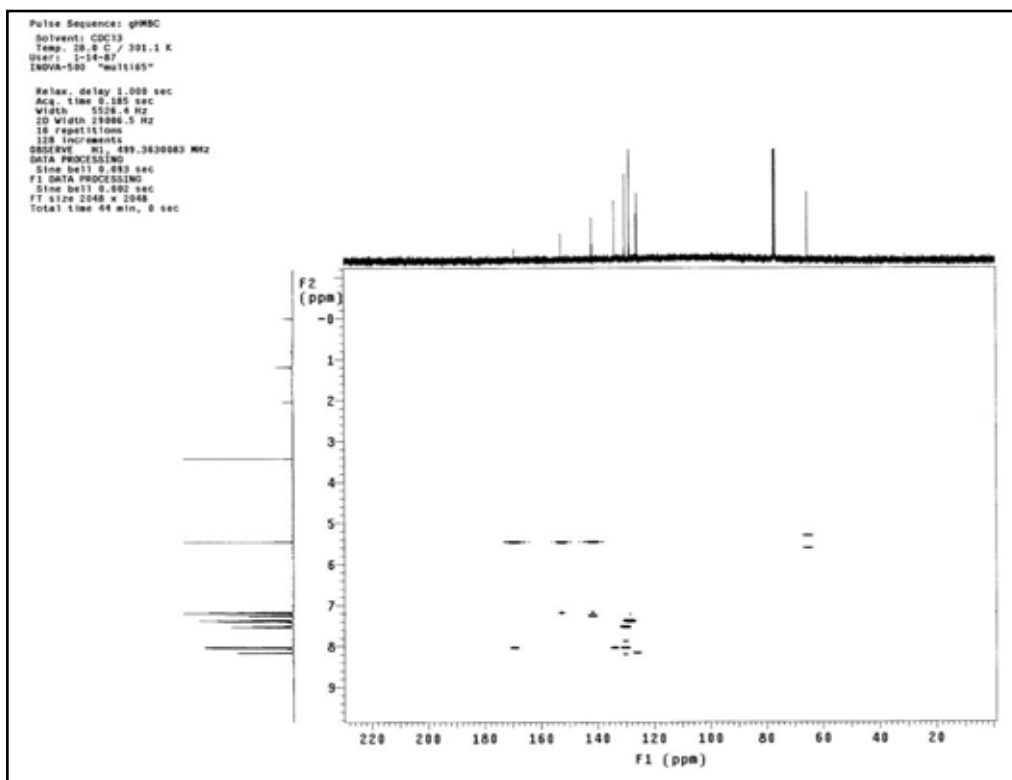
Espectro 50 - Ampliação do espectro de RMN de ^1H de **52** (δ 7,1–8,2; 500 MHz, CDCl_3).



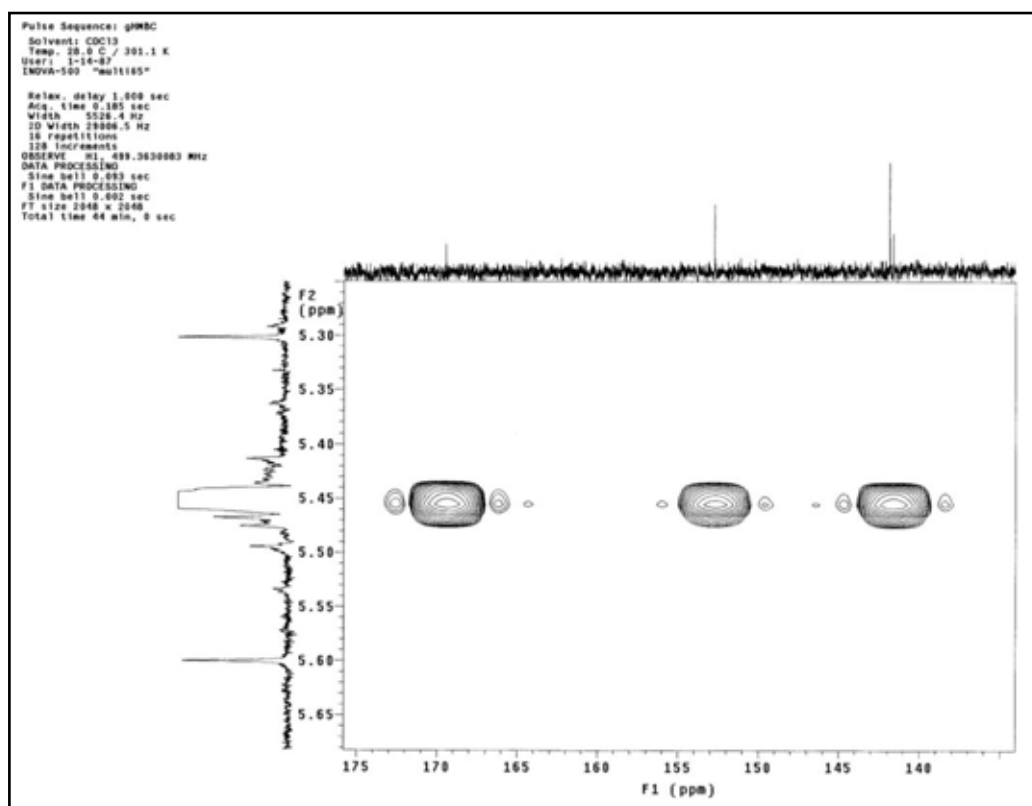
Espectro 51 - Espectro de RMN de ¹³C de **52** (125 MHz, CDCl₃).



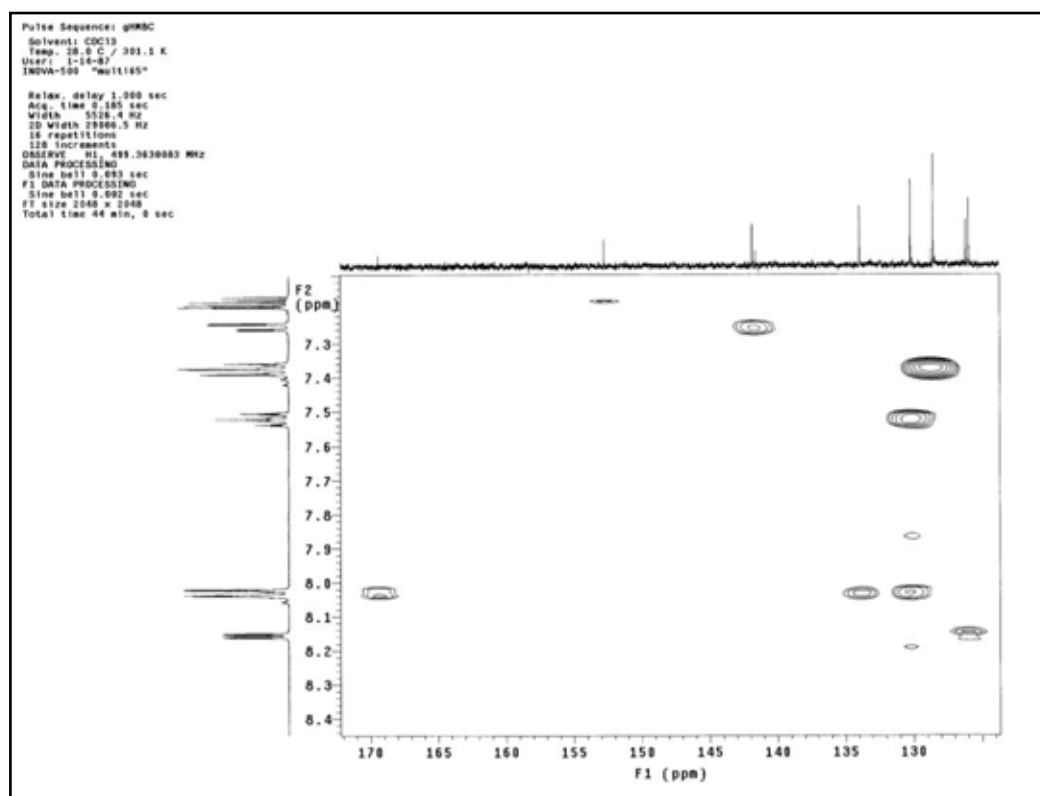
Espectro 52 - Ampliação do espectro de RMN de ¹³C de **52** (δ 125–170, 125 MHz, CDCl₃).



Espectro 53 - Mapa de contorno gHMBC de **52** (500 MHz; CDCl_3).



Espectro 54 - Mapa de contorno gHMBC de **52** (δ 130–175; 500 MHz; CDCl_3).



Espectro 55 - Mapa de contorno gHMBC de **52** (δ 120–170; 500 MHz; CDCl_3).

Tabela 13 - Dados de RMN de **52** (CDCl_3)

posição	δ_{C}^a	gHMQC δ_{H}^a (m^b , J^c)	gHMBC
2	141,6 ^d	–	H-4, H-7
3	152,7	–	H-7, H-5'
4	126,1 ^d	7,25 (dd; 1,5; 8,5)	H-6
5	125,9 ^d	7,18 (dd; 4,5; 8,5)	H-6
6	141,8 ^d	8,15 (dd; 1,5; 4,5)	H-4
7	65,3	5,45 (s)	–
8	169,4	–	H-7, H-2', H-6'
1'	128,7	–	H-3', H-5'
2' e 6'	128,5	8,03 (m)	H-3', H-5'
3' e 5'	130,1	7,37 (m)	H-4', H-2', H-6'
4'	133,9	7,52 (m)	H-2', H-6'

^a deslocamentos químicos em ppm, em relação ao TMS como padrão interno

^b multiplicidade

^c constantes de acoplamento em Hz

^d podem estar trocados

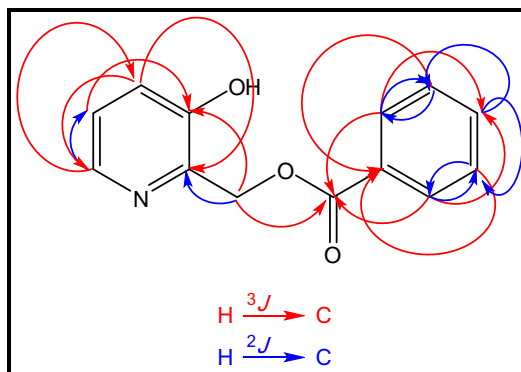
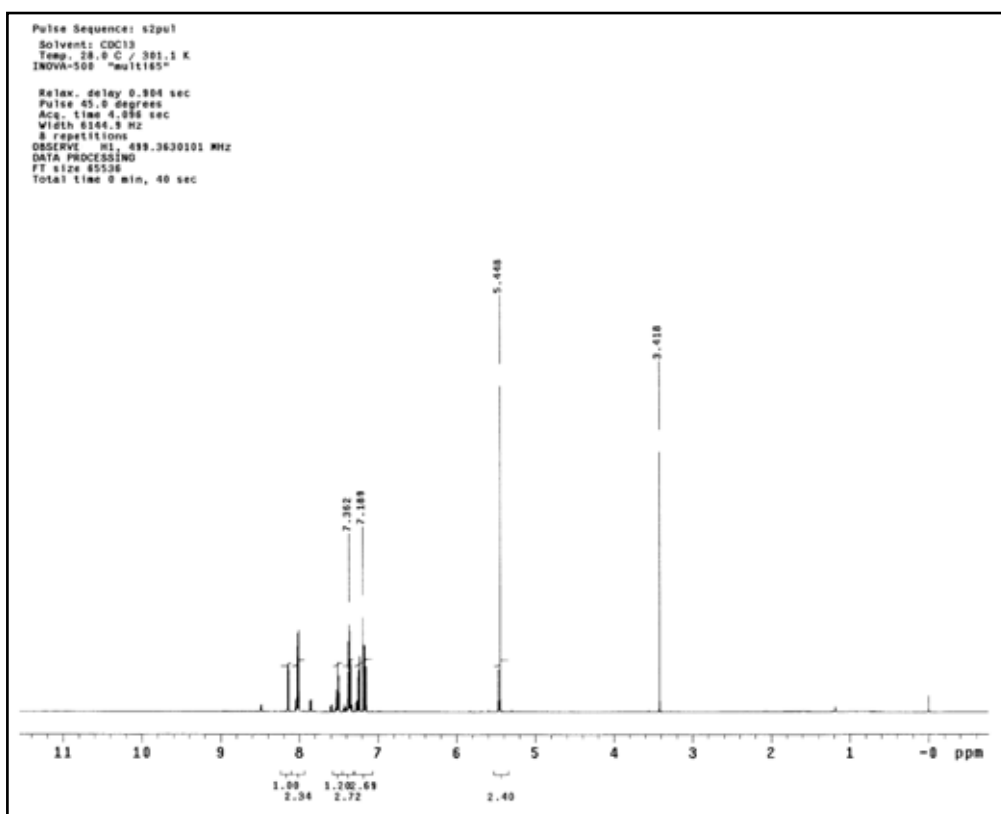


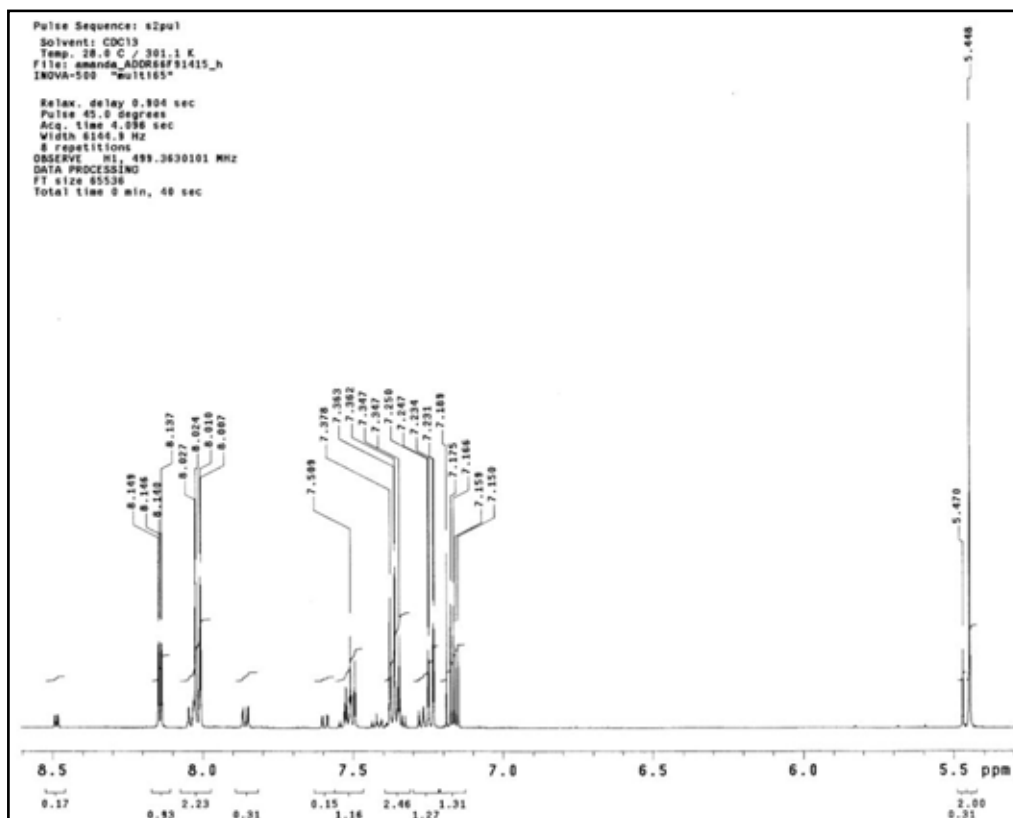
Figura 54 - Correlações H–C observadas no mapa de contorno gHMBC de **52**.

O espectro de RMN de ^1H da mistura (Espectros 56 e 57) revelou que **52** era o produto majoritário, sendo os sinais em δ 8,5 (1H) e δ 5,47 (2H) (Espectro 57) referentes ao composto minoritário **53** (Figura 53). A comparação entre as integrais dos sinais em δ 5,44 e 5,47, referentes aos hidrogênios metilênicos (H-7) de **52** e **53**, respectivamente, permitiu estimar que a proporção entre eles era 6,5:1.

Foi realizada a separação dos compostos **52** e **53** por cromatografia em camada delgada preparativa utilizando Hex:AcOEt (1:9) como FM. A extração foi feita utilizando AcOEt. As frações foram secas e novamente avaliadas por CCD comparativa, onde foi possível observar que as duas frações, referentes às duas bandas cromatográficas purificadas, apresentavam o mesmo R_f (0,68). Foram realizadas as análises por RMN onde foi possível confirmar que as duas frações tratavam-se do produto **52**, sugerindo a migração do grupo benzoílico.



Espectro 56 - Espectro de RMN de ^1H da mistura dos dois derivados benzilados (500 MHz, CDCl_3).



Espectro 57 - Espectro de RMN de ^1H da mistura dos dois derivados benzilados (δ 5,4–8,6; integrais comparativas, 500 MHz, CDCl_3).

Com o estudo das migrações dos grupos Ac e Bz concluído, a próxima etapa do trabalho consistiu na reação de acoplamento entre a 4-lítio-quinolina (**39**) e o aldeído protegido na hidroxila piridínica **48**. O intermediário **54** obtido nesta reação seria submetido à redução com NaBH_4 e CF_3COOH que poderia levar direto ao composto **56** ou ao derivado **55**. Neste segundo caso, a desproteção da hidroxila poderia ser realizada com Pd/C 10% fornecendo o composto **56**. Finalmente, uma reação de acetilação levaria ao híbrido **31a** (Figura 55).

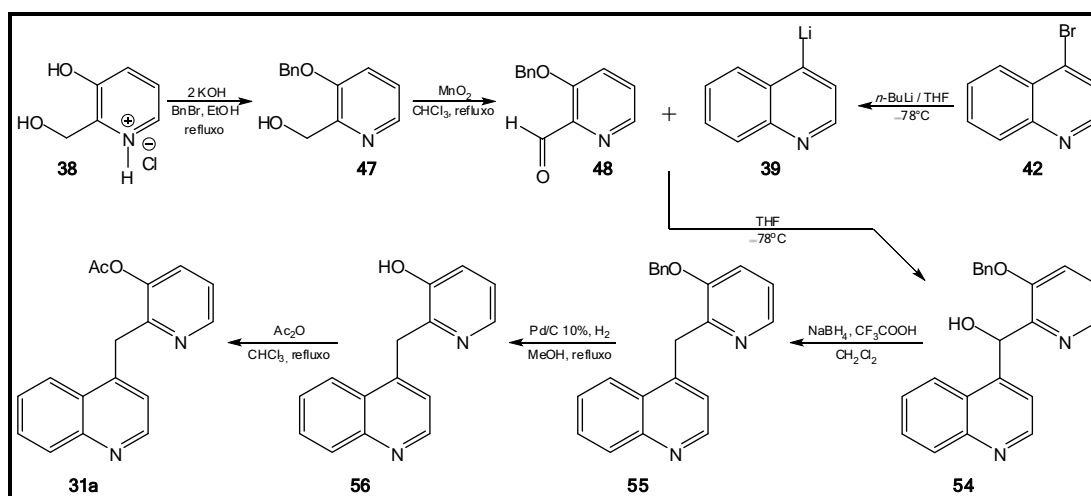


Figura 55 - Nova abordagem sintética.

A etapa chave na obtenção do híbrido **31a** seria a reação de acoplamento do núcleo quinolínico com o piridínico e para isto a troca Br-Li deveria ser efetiva. Para avaliar esta reação foram utilizados como modelo a 3-bromo-quinolina e o benzaldeído.

Foram realizadas reações com $n\text{-BuLi}$ e $t\text{-BuLi}$ a $-78\text{ }^\circ\text{C}$ (Figura 56, LIMA et al., 2002) e a $-50\text{ }^\circ\text{C}$ (Figura 56, GILMAN; SODDY, 1959) e todas levaram a uma complexa mistura.

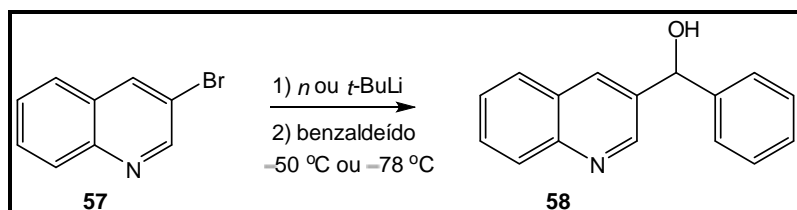


Figura 56 - Reação de acoplamento da 3-bromo-quinolina com benzaldeído.

O composto majoritário obtido após purificação por CC do produto da reação com *n*-BuLi a $-50\text{ }^{\circ}\text{C}$ foi identificado através das análises dos espectros de RMN de ^1H e ^{13}C e DEPT (Espectros 58–63, Tabela 14) como a 2-*n*-butilquinolina (**61**, Figura 57). A formação deste produto indica que a troca Br-Li foi efetuada e como os organolítios podem atuar como bases fortes, a 3-lítioquinolina (**59**) formaria a quinolina (**60**) pela captura de um próton do meio reacional. Em seguida o ataque nucleofílico do *n*-BuLi ao C-2 de **60** leva ao derivado **61** (Figura 57) (GIAM; STOUT, 1969; CRAWFORTH; METH-COHN; RUSSELL, 1973).

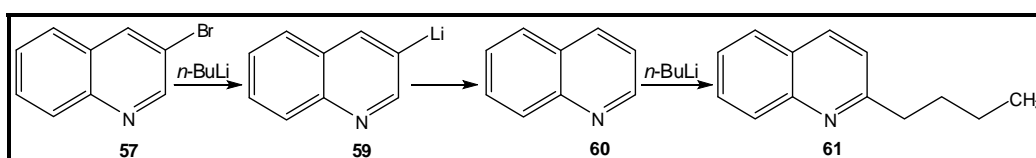
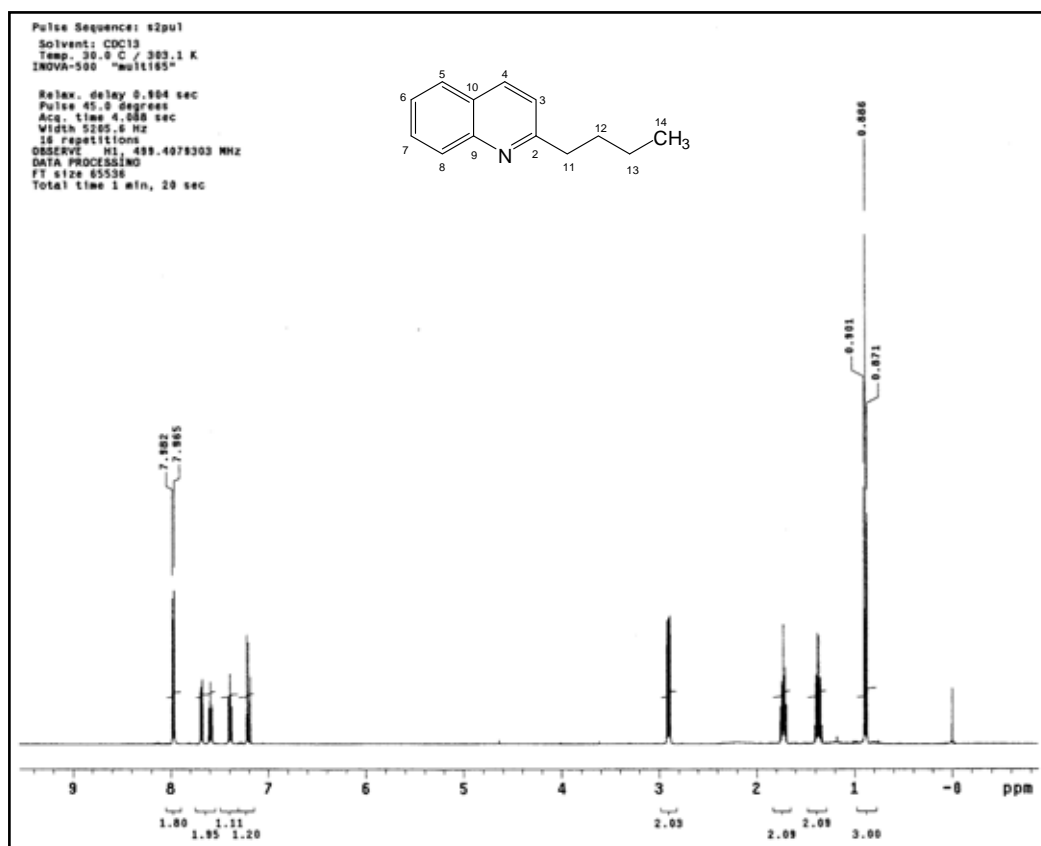
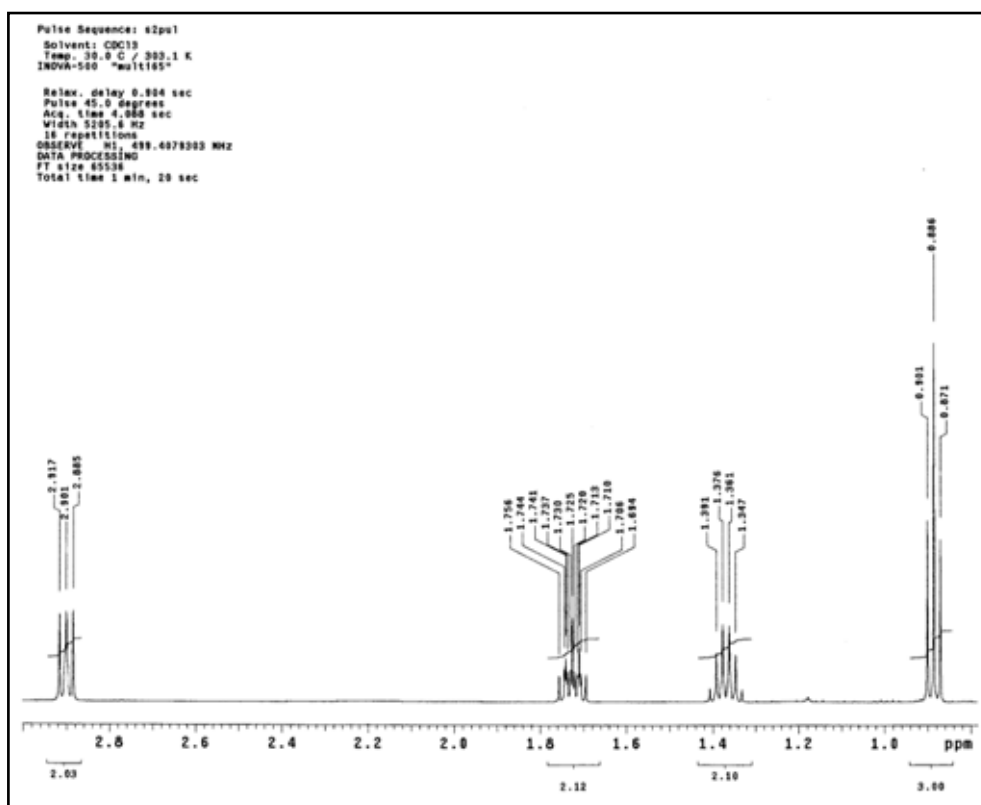


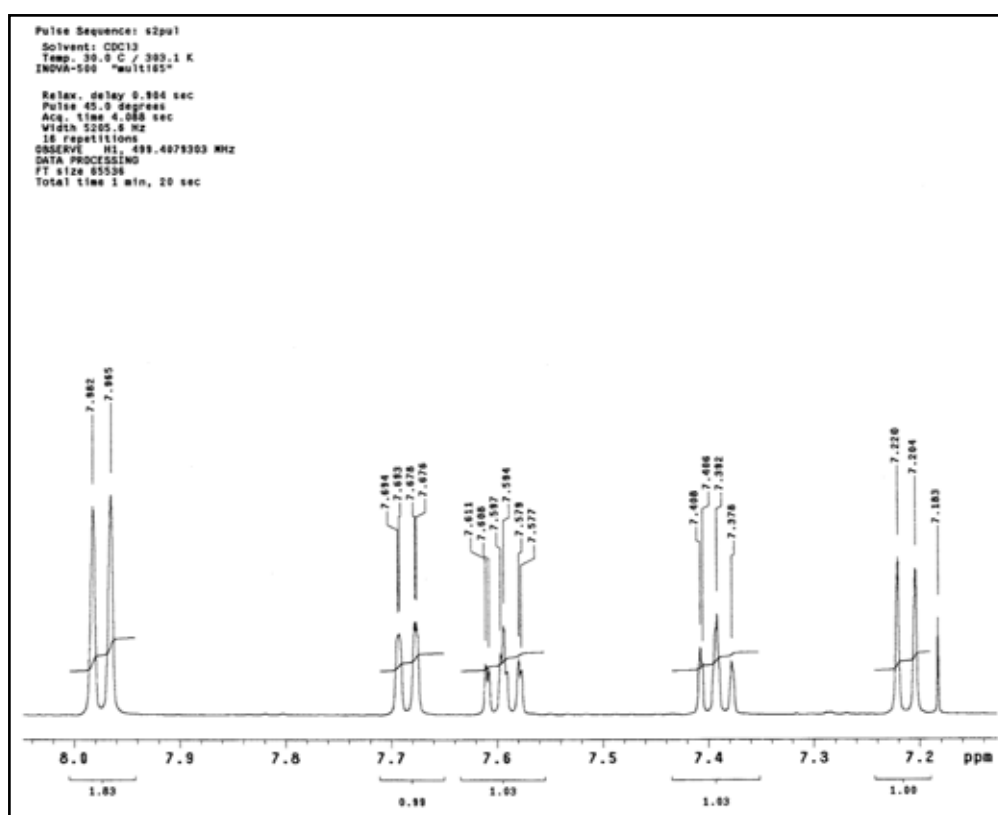
Figura 57 - Proposta para a formação do produto **61**.



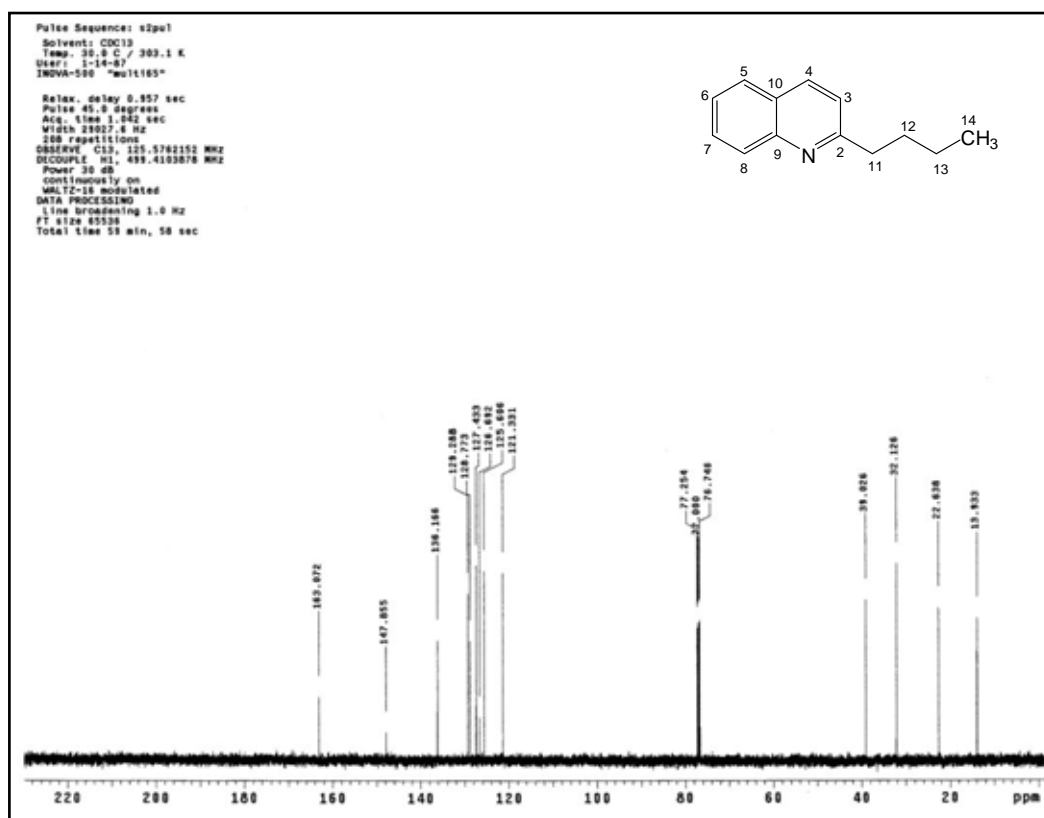
Espectro 58 - Espectro de RMN de ^1H de **61** (500 MHz, CDCl_3).



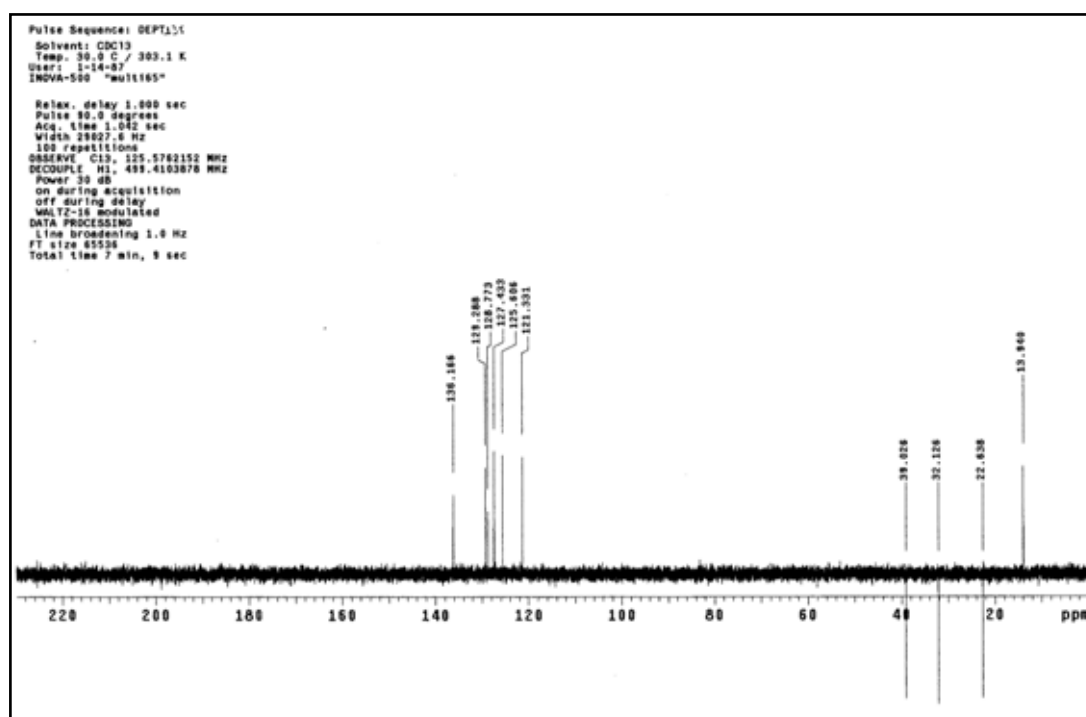
Espectro 59 - Ampliação do espectro de RMN de ¹H de **61** (δ 0–2,1; 500 MHz, CDCl₃).



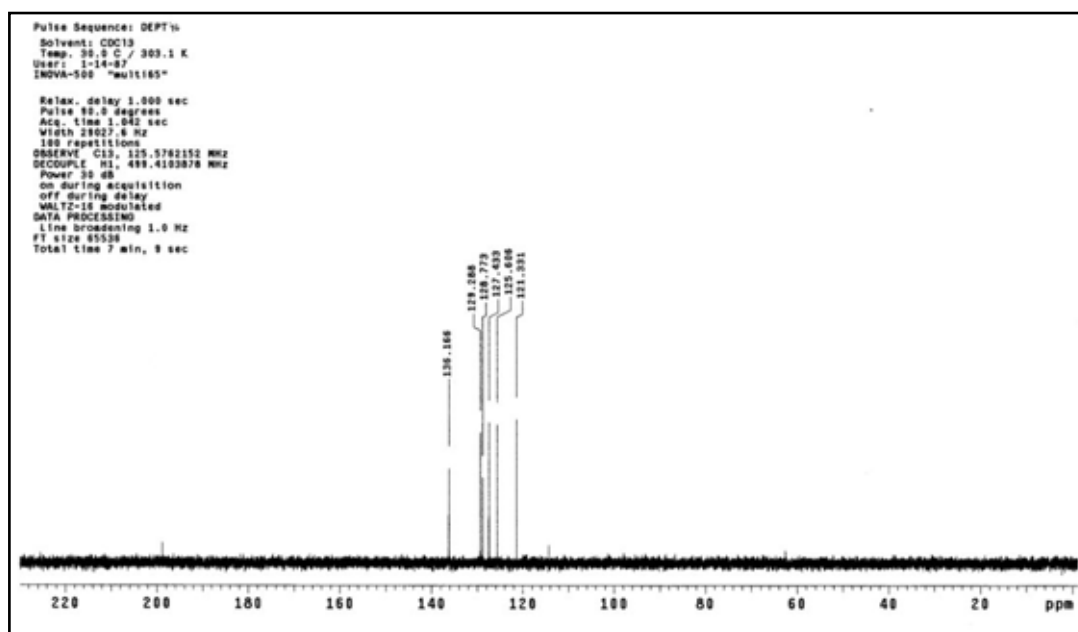
Espectro 60 - Ampliação do espectro de RMN de ¹H de **61** (δ 7,1–8,0; 500 MHz, CDCl₃).



Espectro 61 - Espectro de RMN de ^{13}C de **61** (125 MHz, CDCl_3).



Espectro 62 - Espectro de RMN de DEPT 135 de **61** (125 MHz, CDCl_3).



Espectro 63 - Espectro de RMN de DEPT 90 de **61** (125 MHz, CDCl_3).

Tabela 14 - Dados de RMN ^1H e ^{13}C de **61** (CDCl_3)

posição	δ_{H}^a calculado ^b	δ_{H}^a (m^c , J^d)	δ_{C}^a calculado ^b	δ_{C}^a (m^c)
2	—	—	160,0	163,0 (C)
3	7,25	7,21 (d; 8,0)	121,5	121,3 (CH)
4	7,93	7,97 (d; 8,0)	136,9	136,1 (CH)
5	7,63	7,68 (dd; 7,0; 1,0)	127,3	127,4 (CH)
6	7,37	7,39 (ddd; 7,0; 7,0; 1,0)	125,5	125,6 (CH)
7	7,50	7,59 (ddd; 7,0; 7,0; 1,0)	130,2	129,2 (CH)
8	7,95	7,97 (dd; 7,0; 1,0)	129,2	128,7 (CH)
9	—	—	146,3	147,8 (C)
10	—	—	126,9	126,6 (C)
11	2,76	2,90 (t; 8,0)	38,5	39,0 (CH_2)
12	1,66	1,72 (m)	31,4	32,1 (CH_2)
13	1,42	1,37 (sex; 7,5)	21,5	22,6 (CH_2)
14	1,00	0,89 (t; 7,5)	14,0	13,9 (CH_3)

^a deslocamentos químicos em ppm, em relação ao TMS como padrão interno

^b valores calculados pelo programa MestReNova

^c multiplicidade

^d constantes de acoplamento em Hz

Devido à complexidade dos produtos obtidos nas reações com organolítios, optou-se por avaliar estes compostos por CG/EM. A análise do cromatograma de íons totais do produto não purificado da reação com *t*-BuLi ($-78\text{ }^{\circ}\text{C}$) permitiu observar cinco bandas principais com tempos de retenção 10,65; 16,08; 16,34; 21,56 e 35,51 min (Figura 58), cujos espectros de massas (Espectros 64, 65, 66, 67 e 68) sugerem que sejam os produtos **60**, **57**, **61a** ou **61b**; **62** e **63** (Figura 59), respectivamente.

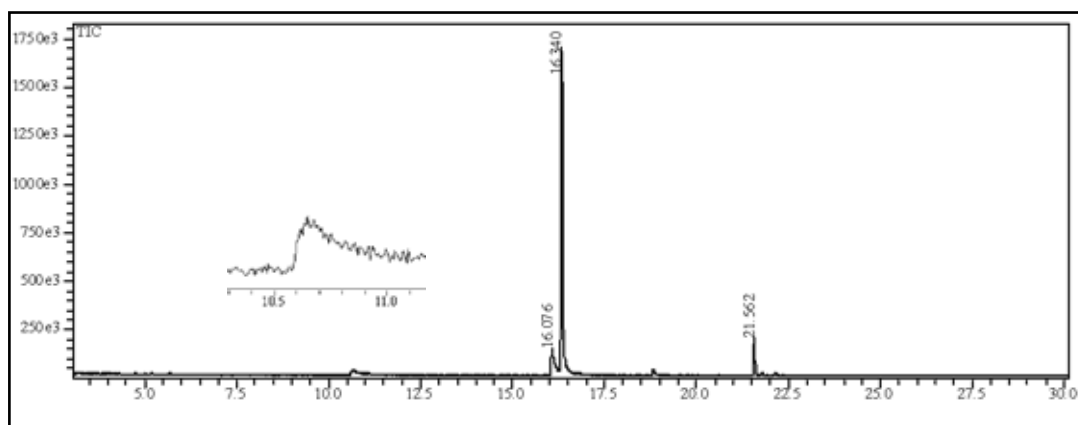


Figura 58 - Cromatograma de íons totais do produto da reação com *t*-BuLi ($-78\text{ }^{\circ}\text{C}$).

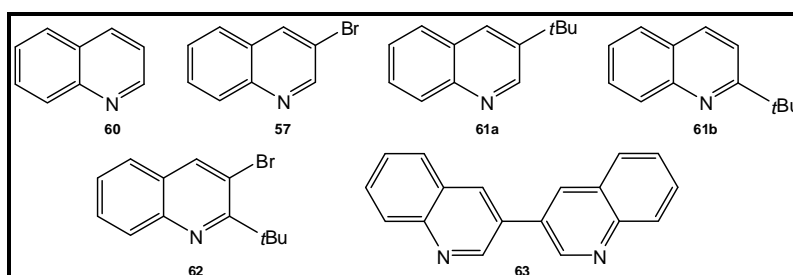
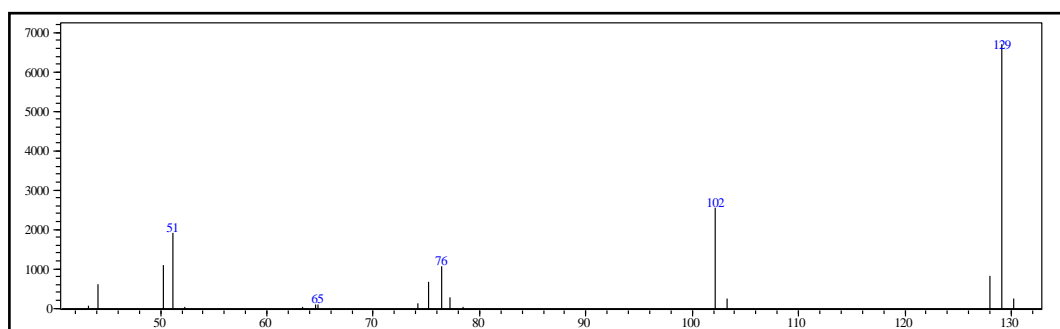
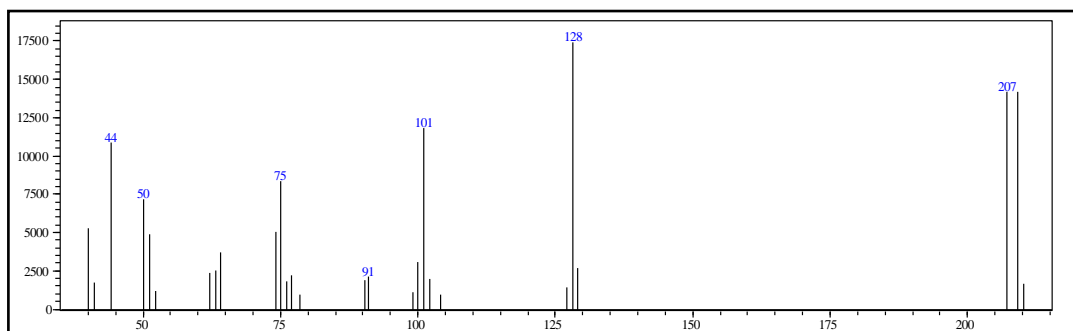


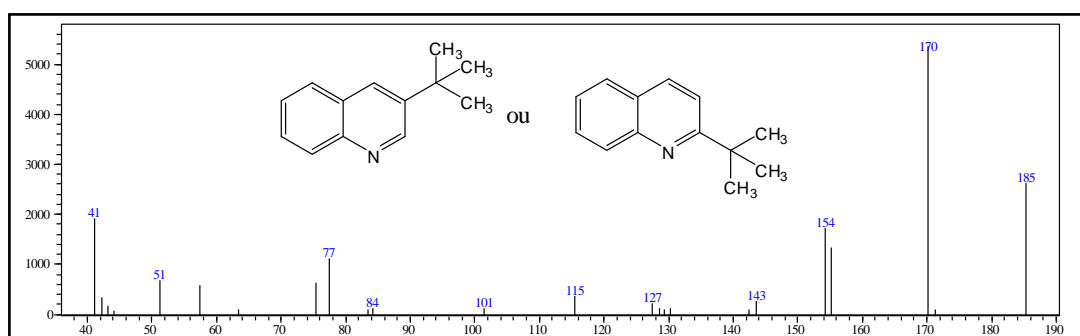
Figura 59 - Produtos identificados na reação com *t*-BuLi ($-78\text{ }^{\circ}\text{C}$).



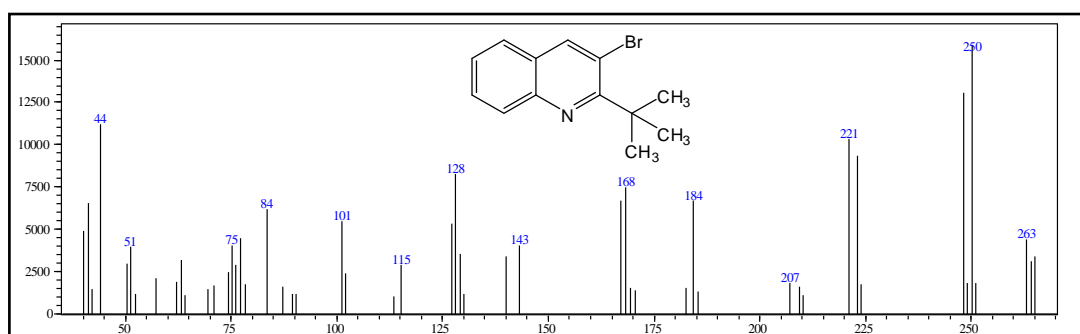
Espectro 64 - EM da banda com tr 10,65 min.



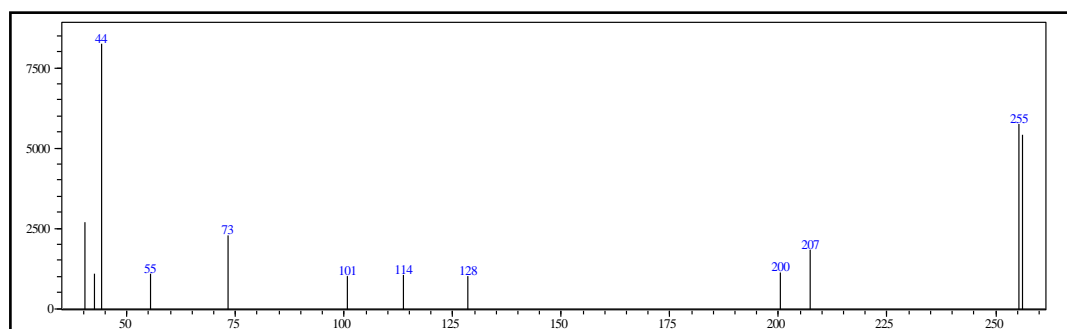
Spectro 65 - EM da banda com tr 16,08 min.



Spectro 66 - EM da banda com tr 16,34 min.



Spectro 67 - EM da banda com tr 21,56 min.



Spectro 68 - EM da banda com tr 35,51 min.

A análise por CG/EM do produto da reação entre **57** e *n*-BuLi (−78 °C) foi muito semelhante à reação com *t*-BuLi na mesma temperatura, porém não foi possível detectar os produtos **60** e **63**. A reação com *t*-BuLi a −50 °C levou somente ao produto **61a** ou **61b**.

Com base nestes resultados, a reação de acoplamento com organólítios foi descartada, pois apresenta baixa seletividade química e em nenhuma das condições o produto desejado foi detectado.

Outra alternativa seria a formação do tri-quinolil-magnesato de lítio (**64**) a partir do tributilmagnesato de lítio (Figura 60), que apresenta menor basicidade que os organólítios e poderia promover a troca Br-M com maior eficácia, além desta reação exigir condições mais brandas como temperatura a −15 °C (DUMOUCHEL et al., 2003; WAKEFIELD, 1995). A adição do benzaldeído *in situ* levaria ao produto acoplado **58** (Figura 60).

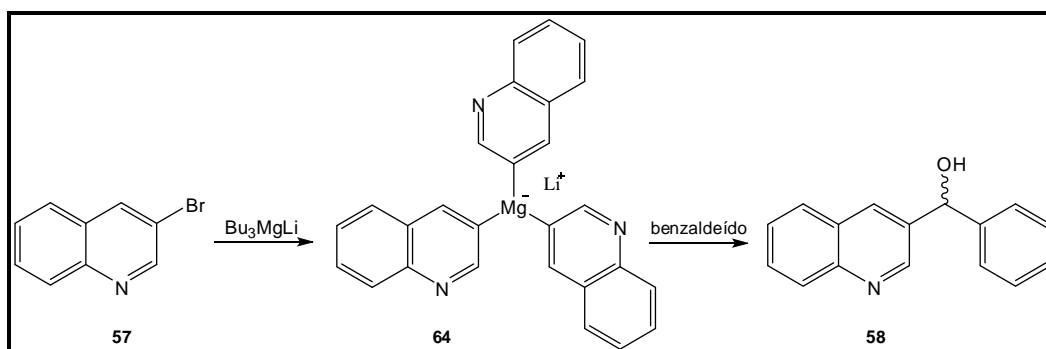


Figura 60 - Formação do tri-quinolil-magnesato de lítio.

Esta reação também foi realizada com o aldeído **48**, porém, como na reação com benzaldeído, o produto acoplado não foi formado. O cromatograma de íons totais da reação com **48** (Figura 61) apresentou duas bandas com tempos de retenção de 15,89 e 23,63 min. Os respectivos espectros de massas (Espectros 69 e 70) indicam que a troca Br-M não ocorreu e que os picos observados são referentes a **57** e **48**.

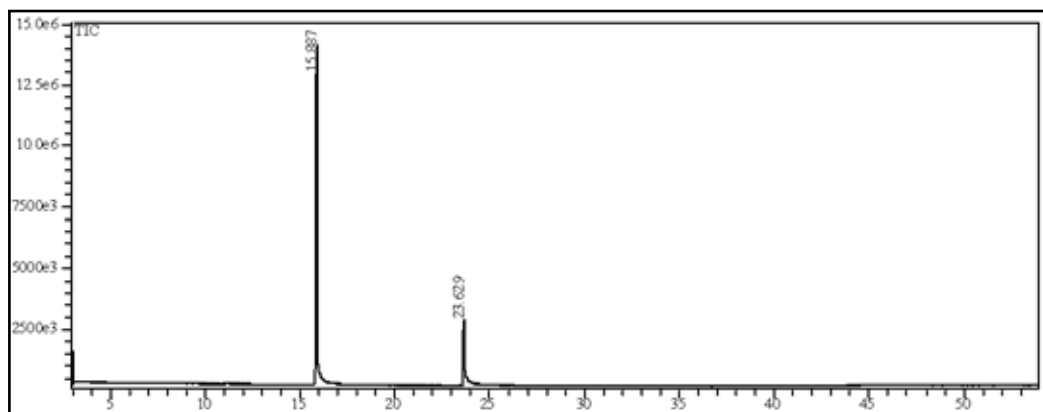
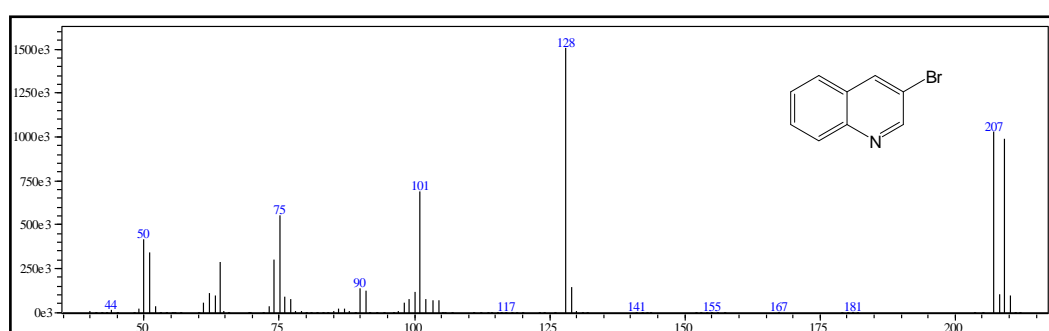
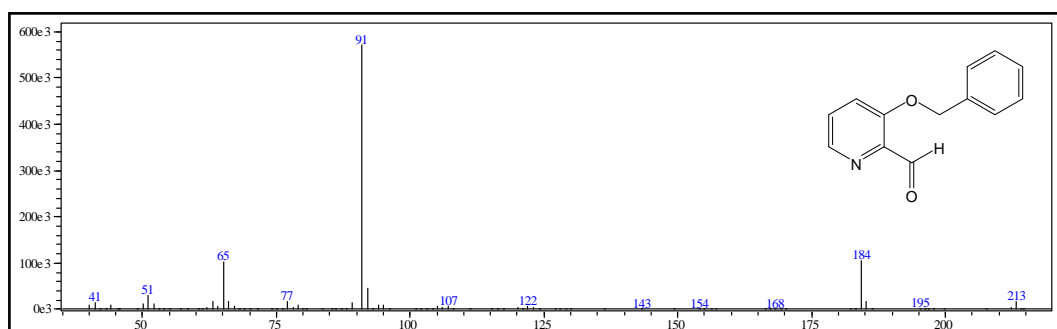


Figura 61 - Cromatograma de íons totais do produto da reação entre **57** e **48**.



Espectro 69 - EM da banda com tr 15,89 min.



Espectro 70 - EM da banda com tr 23,63 min.

Como as reações com *t*-BuLi, *n*-BuLi e *n*-BuMgCl (utilizado para formação do $n\text{Bu}_3\text{MgLi}$) não foram eficazes, uma opção seria reagir a 3-bromoquinolina (**57**) com magnésio metálico para formação do reagente de Grignard (**65**, Figura 62, SABERI; SHAH; SIMONS, 2005; WAKEFIELD, 1995) e adicionar *in situ* o eletrófilo (benzaldeído ou **48**, Figura 62).

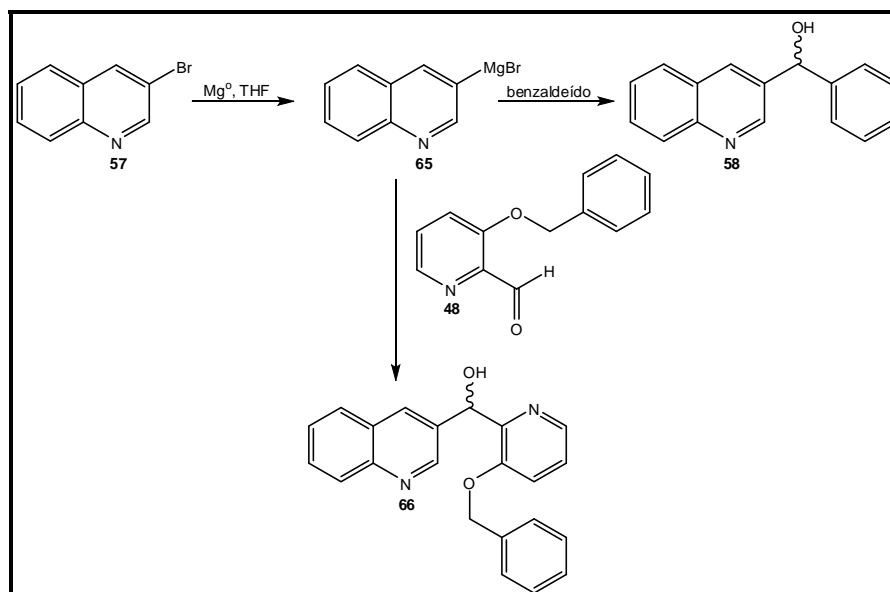
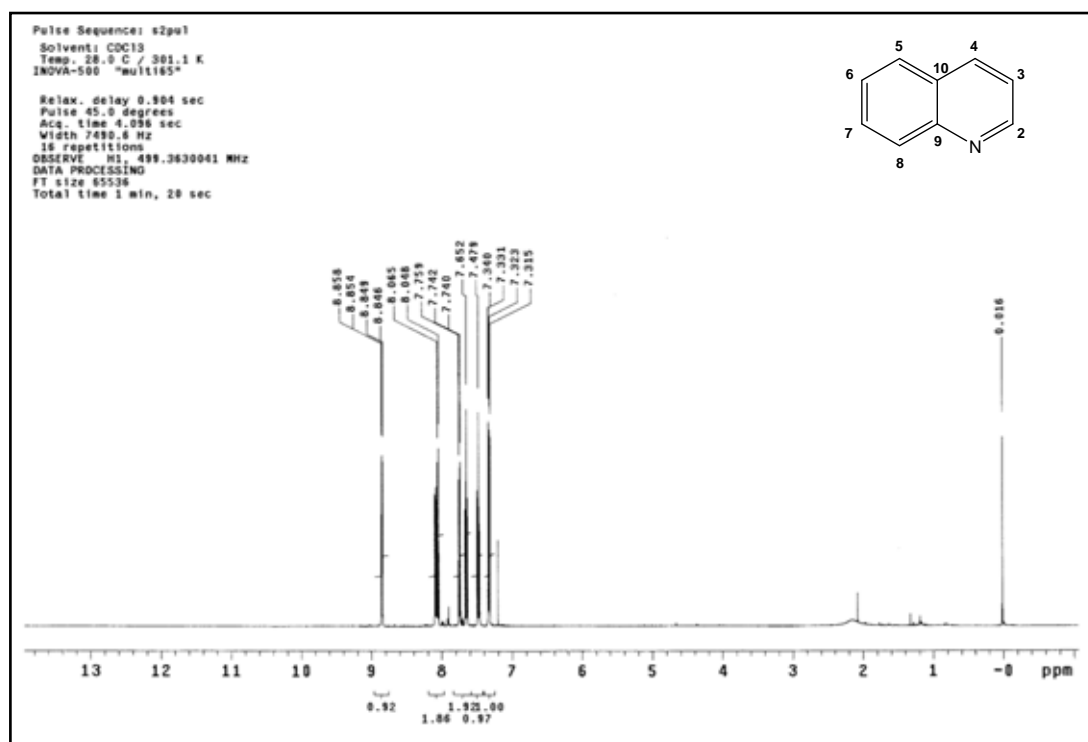


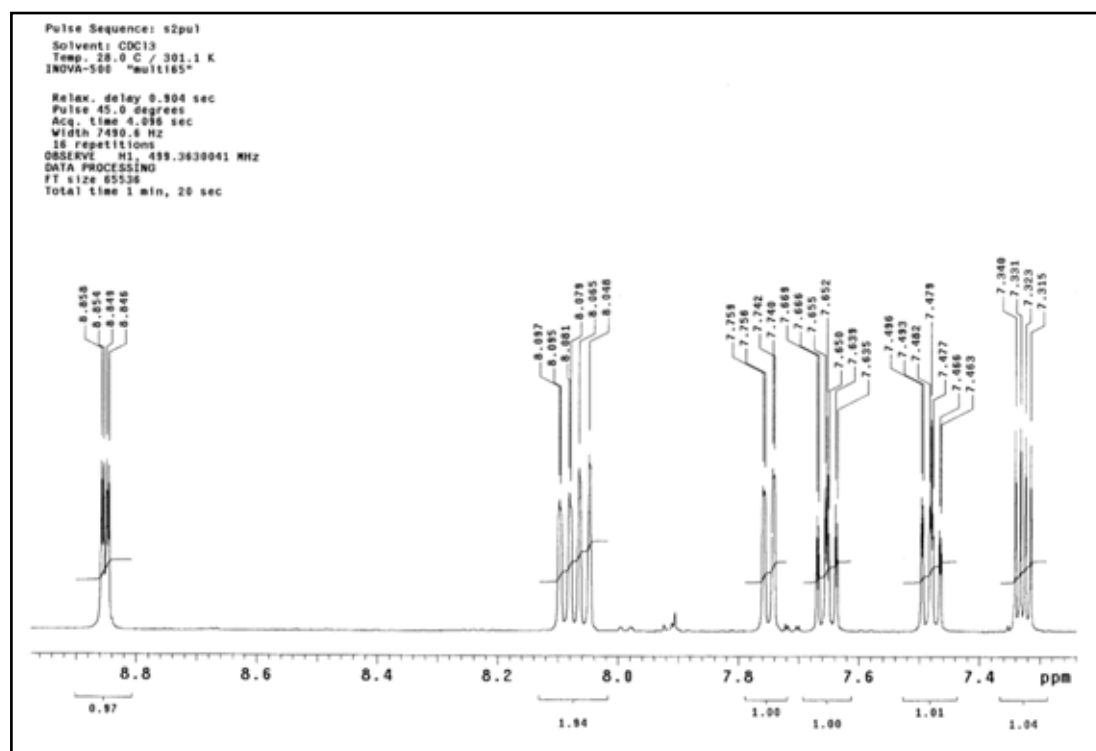
Figura 62 - Reações de Grignard para obtenção de **58** e **66**.

A formação do reagente de Grignard é um processo exotérmico, porém o início da reação pode ser lento devido à camada de óxido de magnésio formado na superfície do metal. Para remover esta camada, o magnésio deve ser tratado com solução diluída de ácido clorídrico e a reação pode ser iniciada com o auxílio de ultrassom, elevação da temperatura, forte agitação e adição catalítica de 1,2-dibromo-etano que reage com o metal formando gás eteno e brometo de magnésio que não interferem na reação de Grignard (WAKEFIELD, 1995).

Esta metodologia foi eficiente para a troca Br-M, pois pela análise do espectro de RMN de ^1H (Espectros 71 e 72) do produto majoritário obtido na reação entre **57** e benzaldeído foi possível caracterizá-lo como a quinolina (**60**, Tabela 15), porém o produto acoplado não foi formado. Uma possível explicação para este fato seria a temperatura do meio reacional ($65\text{ }^\circ\text{C}$, Figura 62). Nesta condição o reagente de Grignard pode atuar preferencialmente como base capturando um próton do meio reacional ao invés de atuar como nucleófilo atacando a carbonila do aldeído (WAKEFIELD, 1995).



Espectro 71 - Espectro de RMN de ¹H de **60** (500 MHz, CDCl₃).



Espectro 72 - Ampliação do espectro de RMN de ¹H de **60** (δ 7,3–8,9; 500 MHz, CDCl₃).

Tabela 15 - Dados de RMN ^1H de **60** (CDCl_3)

posição	δ_{H}^a calculado ^b	δ_{H}^a (m^c , J^d)
2	8,62	8,85 (dd; 4,0; 1,5)
3	7,28	7,33 (dd; 8,5; 4,0)
4	8,02	8,08 (dd; 8,5; 1,5)
5	7,69	7,75 (dd; 8,5; 1,5)
6	7,42	7,48 (ddd; 8,5; 8,5; 1,5)
7	7,56	7,65 (ddd; 8,5; 8,5; 1,5)
8	8,00	8,08 (dd; 8,5; 1,5)

^a deslocamentos químicos em ppm, em relação ao TMS como padrão interno

^b valores calculados pelo programa MestReNova

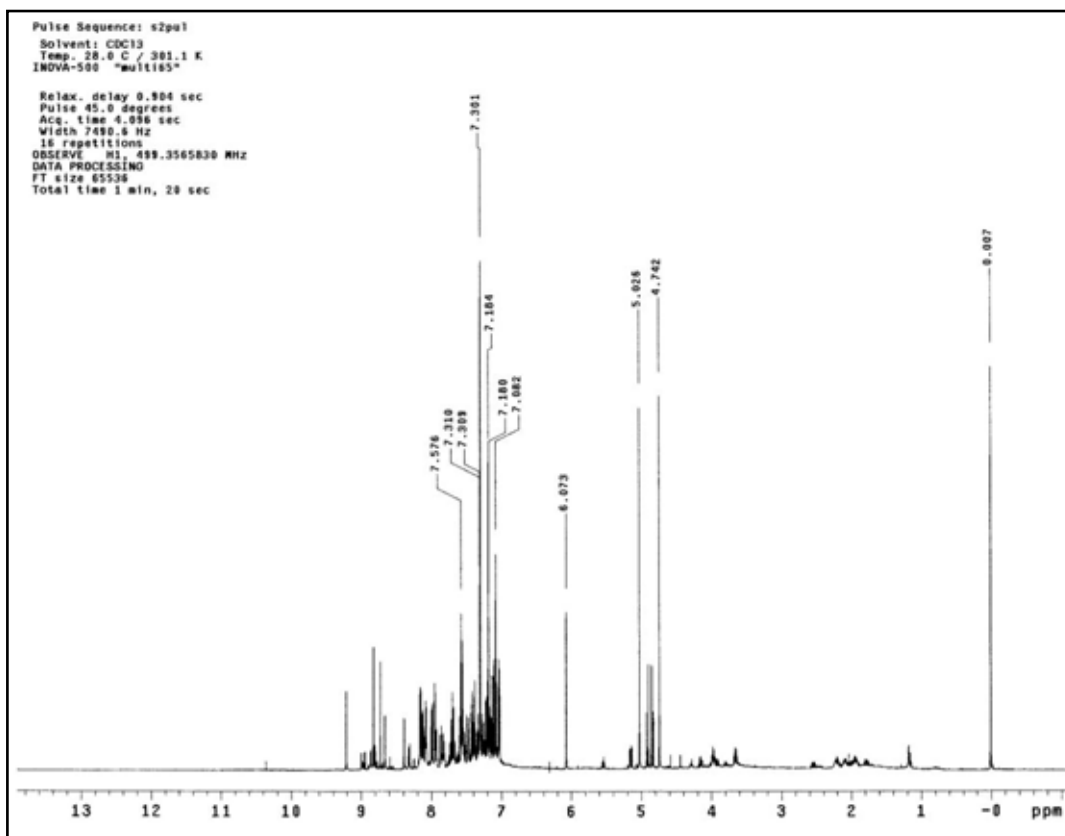
^c multiplicidade

^d constantes de acoplamento em Hz

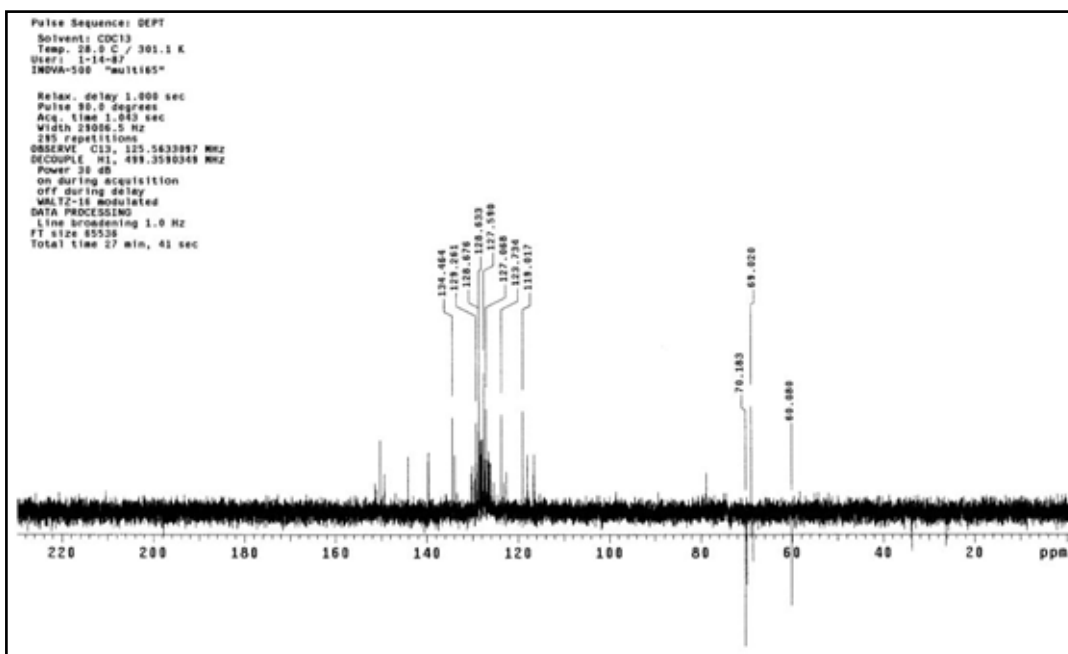
Foram testadas duas reações utilizando a mesma metodologia para a formação do brometo de 3-quinolil-magnésio (**65**, Figura 62) e após todo magnésio metálico ser consumido a temperatura foi reduzida a $-15\text{ }^\circ\text{C}$ e o aldeído (**48** ou benzaldeído) adicionado. Novamente o produto majoritário foi **60**.

A reação com **48** (150 mg, 0,7 mmol) e 2 equivalentes de **57**, sob refluxo por 6h foi analisada por CCD [Hex:AcOEt (1:1)] e apresentou uma substância mais polar (R_f 0,38) que a 3-bromo-quinolina (R_f 0,60) e quinolina (R_f 0,48) com forte absorção em $\lambda = 365\text{ nm}$, porém com R_f muito próximo àquele observado para **48** (R_f 0,36). A partir da purificação por CC foram obtidas 25 frações, sendo a fração 6–8 (F6–8, 12 mg) submetida à análise de RMN de ^1H e DEPT 135 (Espectros 73 e 74).

A análise do espectro de RMN de ^1H confirma que F6–8 estava em mistura, porém foi possível observar um singlete característico de hidrogênio carbinólico ligado a dois sistemas aromáticos (DUMOUCHEL et al., 2003) em δ 6,07 ($\delta_{\text{teórico}}$ 6,16). A análise por DEPT 135 também indicou a formação do produto acoplado **66** (Figura 61), devido ao carbono hidroximetínico em δ 69,0 ($\delta_{\text{teórico}}$ 68,3).



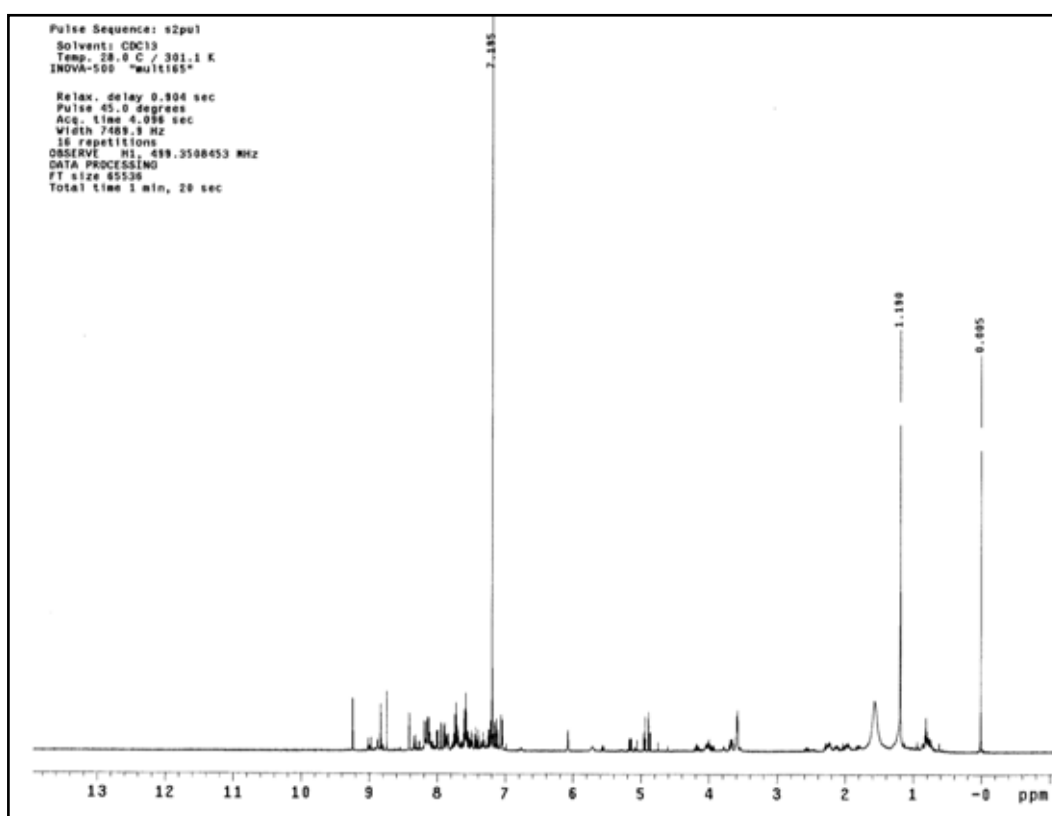
Espectro 73 - Espectro de RMN de ¹H de F6-8 (500 MHz, CDCl₃).



Espectro 74 - Espectro de RMN de DEPT 135 de F6-8 (125 MHz, CDCl₃).

A fração F6–8 foi submetida à CCD preparativa utilizando Hex:CHCl₃:MeOH (1,5:8,0:0,5) como FM. Foram observadas três bandas cromatográficas sob luz UV 254 nm com R_f muito próximos (0,64; 0,69; 0,73), sendo que a substância com R_f 0,69 (F6–8b) foi a única que apresentou absorção sob luz UV 365 nm. A extração foi realizada utilizando AcOEt e em seguida MeOH e foram obtidos 3 mg de F6–8b.

O espectro de RMN de ¹H de F6–8b (Espectro 75) indicou sinais correspondentes ao possível produto acoplado **66** (Figura 62), obviamente analisado em mistura, indicando a complexidade desta fração que, devido a pouca massa, foi submetida à análise por CG/EM para interpretação deste resultado.



Espectro 75 - Espectro de RMN de ¹H de F6–8b (500 MHz, CDCl₃).

O cromatograma de íons totais de F6–8b possibilitou observar uma banda pouco intensa com tempo de retenção 40,28 min (Figura 63), cujo espectro de massas (Espectro 76) sugere que seja o produto **66**. No EM foi possível observar o íon molecular (*m/z* 342), o íon *m/z* 91 que é o pico base sendo atribuído ao íon tropílio, os íons *m/z* 77, 65, 51 e 39 característicos da

fragmentação do íon tropílio e o íon m/z 128 atribuído ao íon quinolíneo (Figura 64). A presença desses íons indica que os núcleos quinolíneo e piridínico (que contém o grupo benzílico) fazem parte de um mesmo sistema.

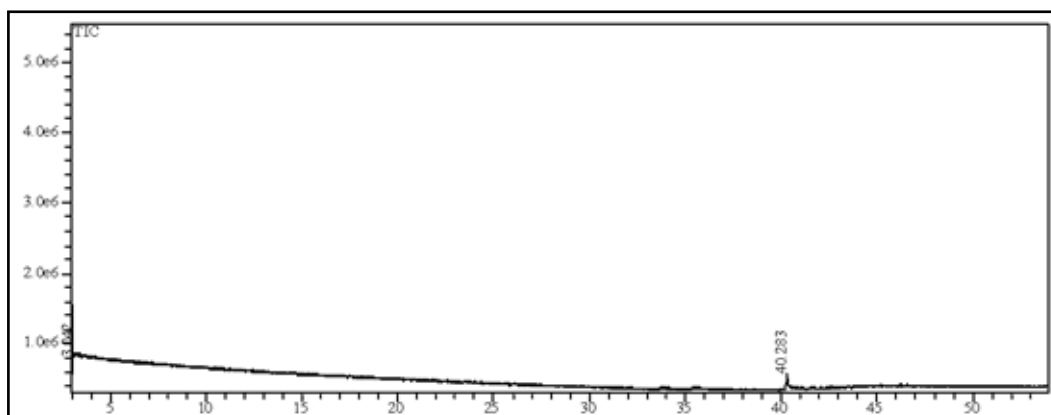
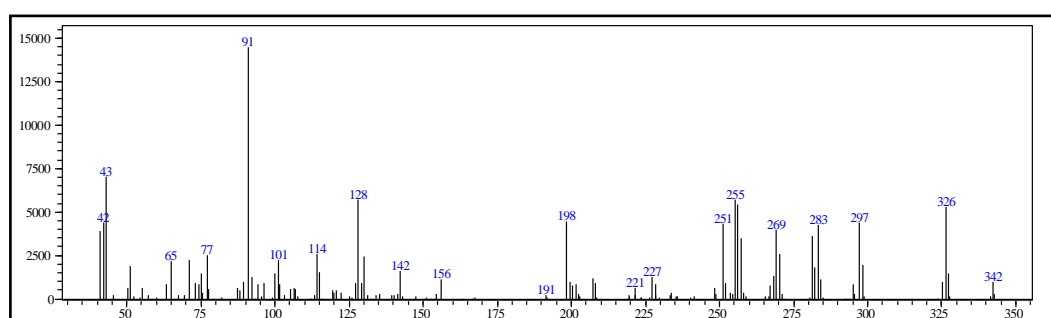


Figura 63 - Cromatograma de íons totais de F6-8b.



Espectro 76 - EM da banda com tr 40,28 min.

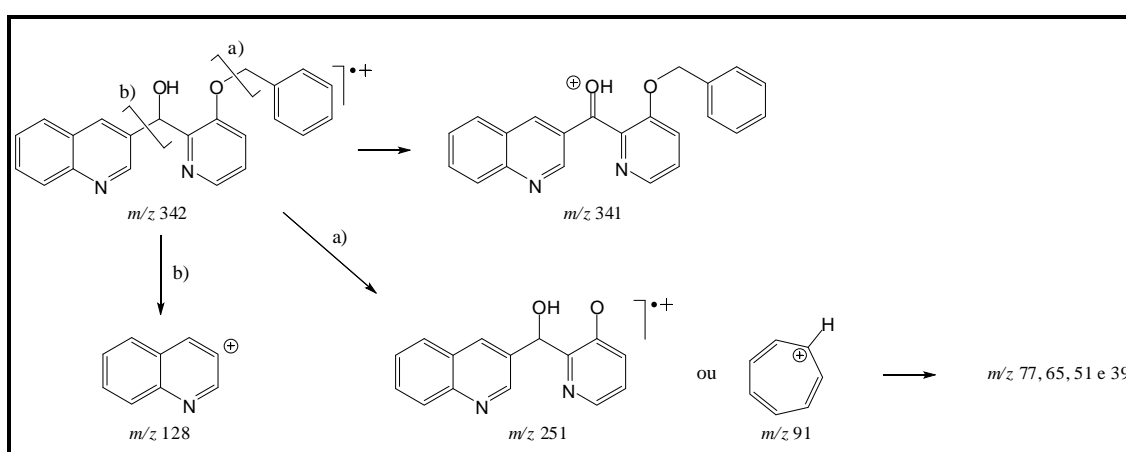
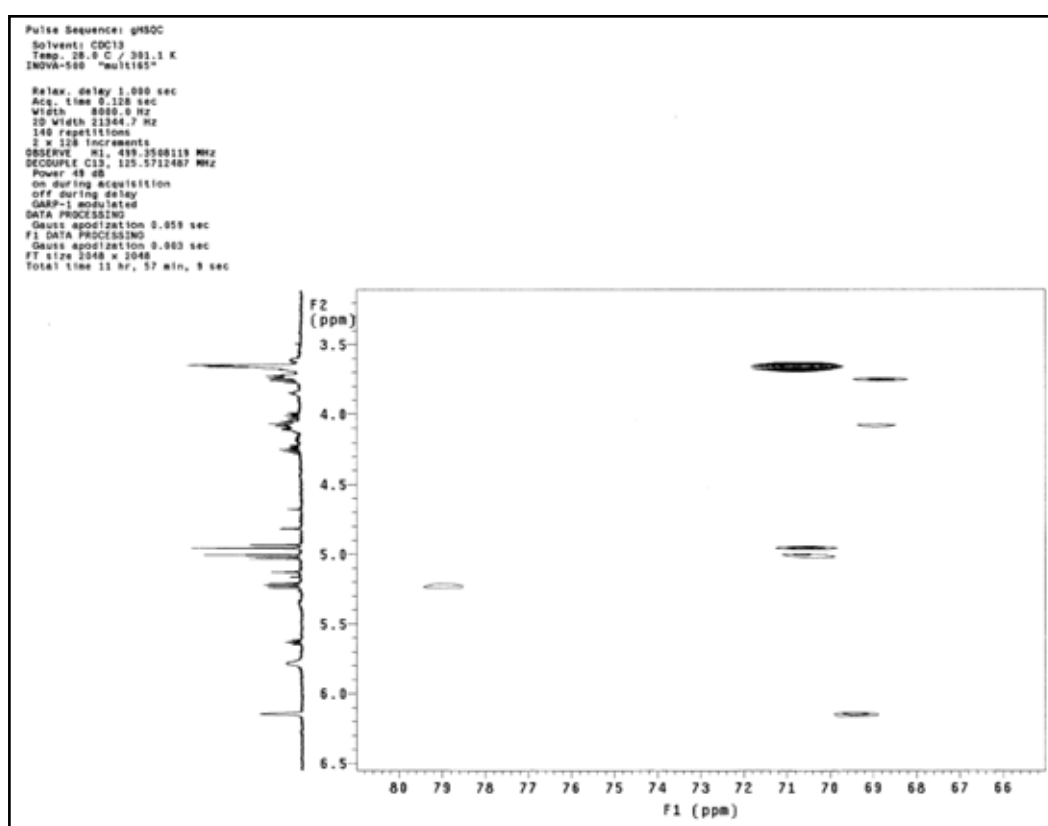
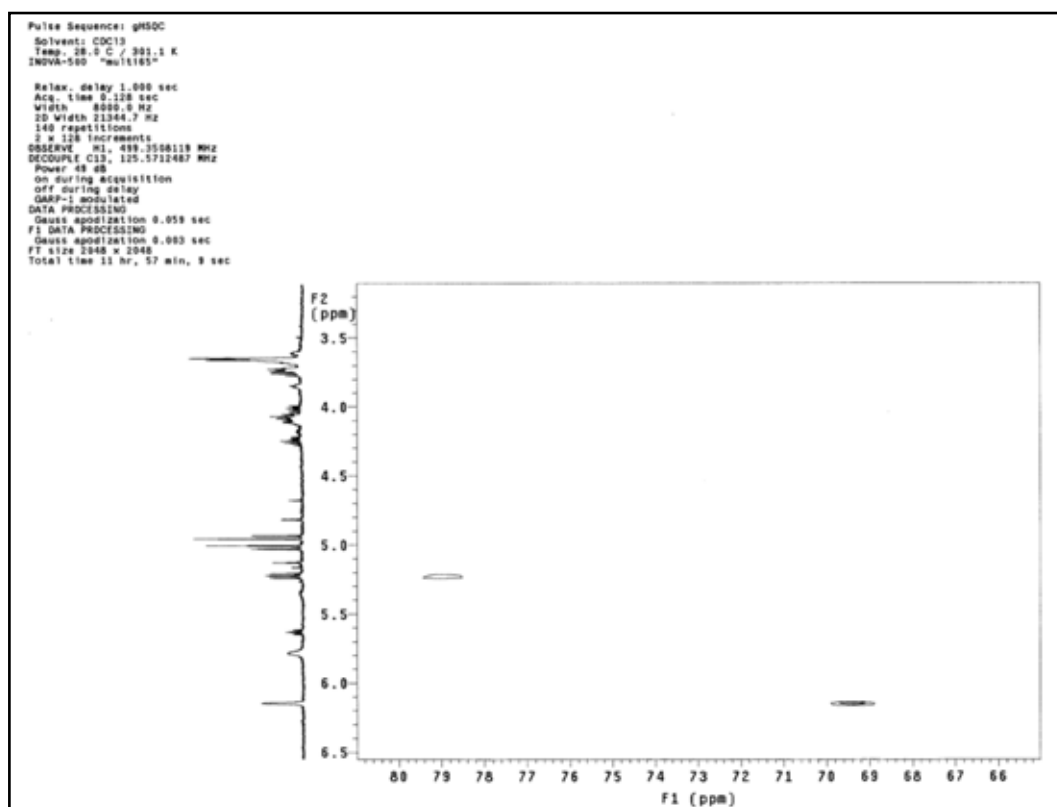


Figura 64 - Mapa de fragmentação de 66.

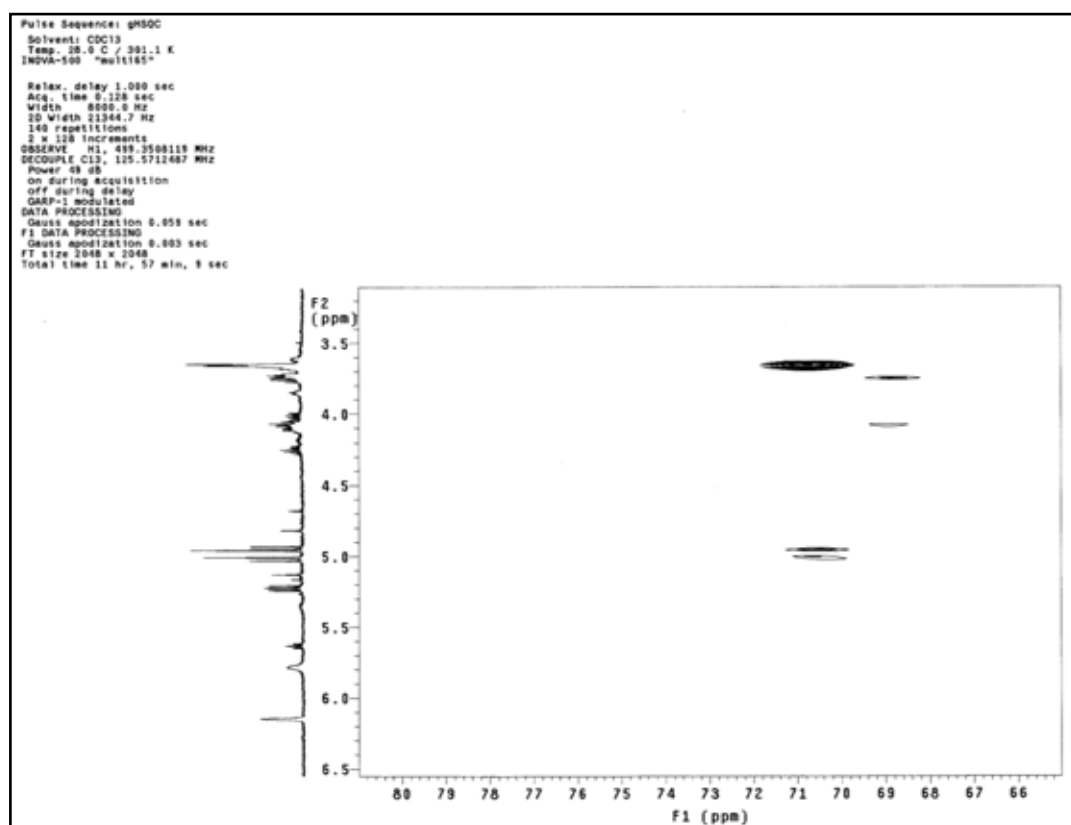
Adicionalmente, foram realizados experimentos de *g*HSQC e *g*HMBC com a fração F6–8b sendo possível observar que o hidrogênio em δ 6,15 está ligado ao carbono C-11 (**66**, Figura 62) em δ 69,4 (Espectro 77) e os mapas de contorno *g*HSQC nos modos positivo e negativo (Espectros 78 e 79) permitiram atribuir a multiplicidade deste carbono (CH). A análise do mapa de contorno *g*HMBC (Espectro 80) permitiu observar a correlação entre o hidrogênio em δ 8,02, possivelmente referente ao H-2 do núcleo quinolínico com o carbono em δ 69,4. Estes dados aliados aos resultados de CG/EM indicam a formação do produto **66** mesmo que em baixo rendimento.



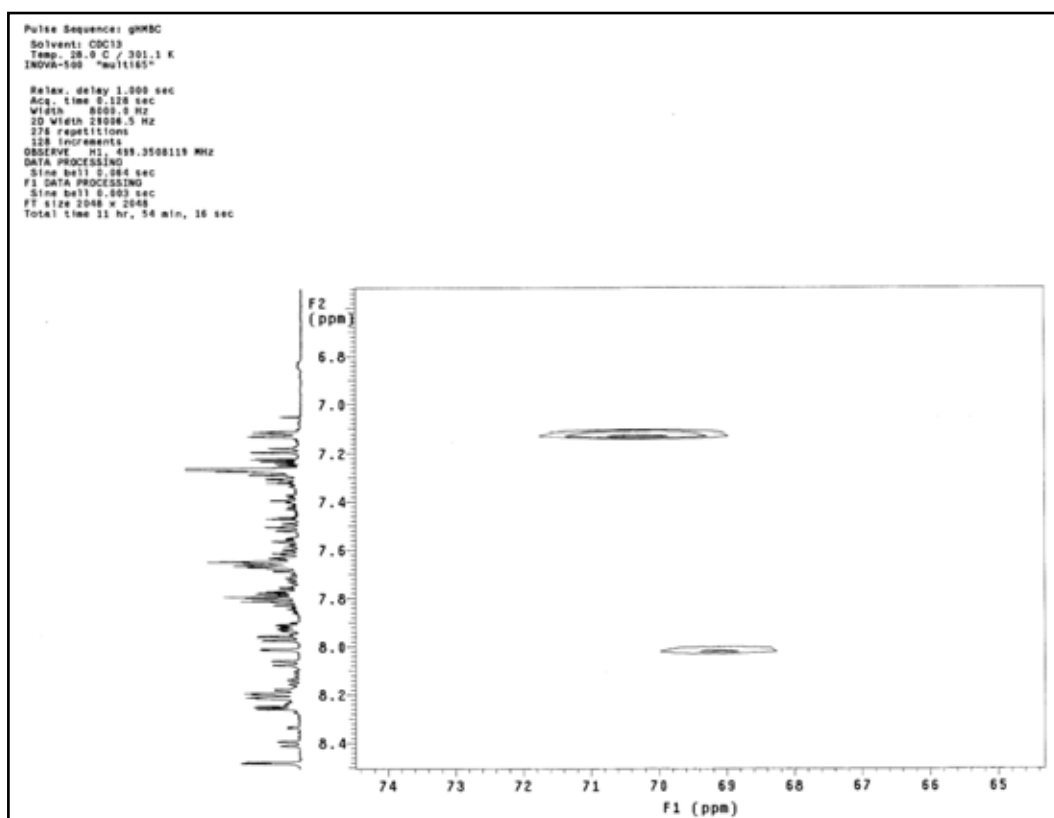
Espectro 77 - Mapa de contorno *g*HSQC de F6–8b (δ 66–80; 500 MHz; CDCl₃).



Espectro 78 - Mapa de contorno gHSQC no modo positivo de F6-8b (δ 66-80; 500 MHz; CDCl₃).



Espectro 79 - Mapa de contorno gHSQC no modo negativo de F6-8b (δ 66-80; 500 MHz; CDCl₃).



Espectro 80 - Mapa de contorno gHMBC de F6–8b (δ 65–74; 500 MHz; CDCl₃).

Como as reações de acoplamento com organolítios e organomagnésio não foram eficientes, uma alternativa seria testar uma reação de acoplamento cruzado catalisada por metal de transição, que corresponde a um dos métodos mais eficientes para a construção de ligações carbono-carbono. Este tipo de reação, entre um composto organometálico R¹–M e um halogeneto R²–X catalisada por um metal de transição (Cu, Ni, Fe ou Pd), origina um composto orgânico R¹–R². Os compostos de paládio são os catalisadores mais comumente empregados (TEIXEIRA; BARBOSA; PILÓ-VELOSO, 2007).

Neste contexto, o acoplamento de Suzuki-Miyaura é uma das opções mais promissoras, pois apresenta alta estereo- e regioselectividade, além de exigir condições experimentais amenas (DOUCET, 2008; MOLANDER; ELIA, 2006). Neste tipo de reação são utilizados compostos organoborados, geralmente sais de organotrifluorboratos que são estáveis à t.a. e oxigênio ao contrário dos ácidos e ésteres borônicos (STEFANI; CELLA; VIEIRA, 2007).

A abordagem sintética para obtenção do híbrido **31a** utilizando a metodologia de Suzuki-Miyaura consiste na formação do 4-quinolinil-trifluorborato de potássio (**67**) e do cloreto **68**. A reação entre estes dois

compostos catalisada por PdCl₂ (dppf) poderia formar o intermediário **55** que após uma hidrogenação seguida de acetilação levaria a **31a** (Figura 65).

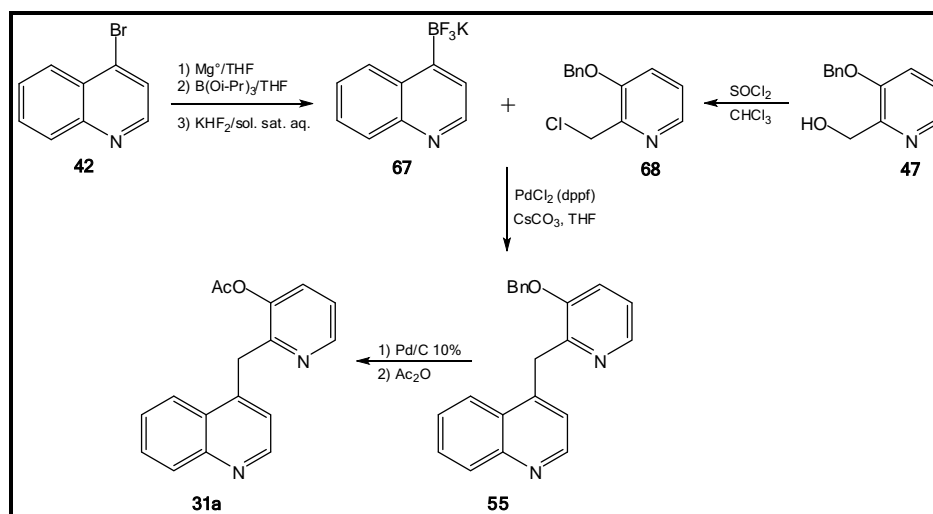
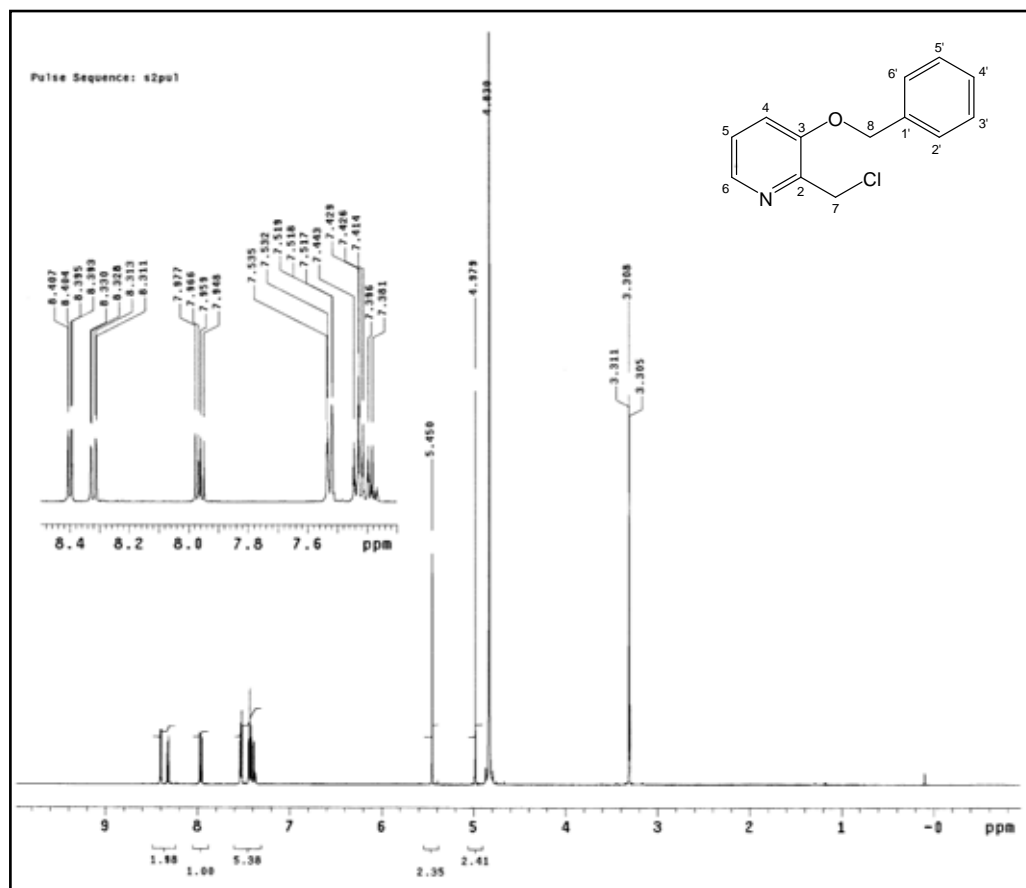
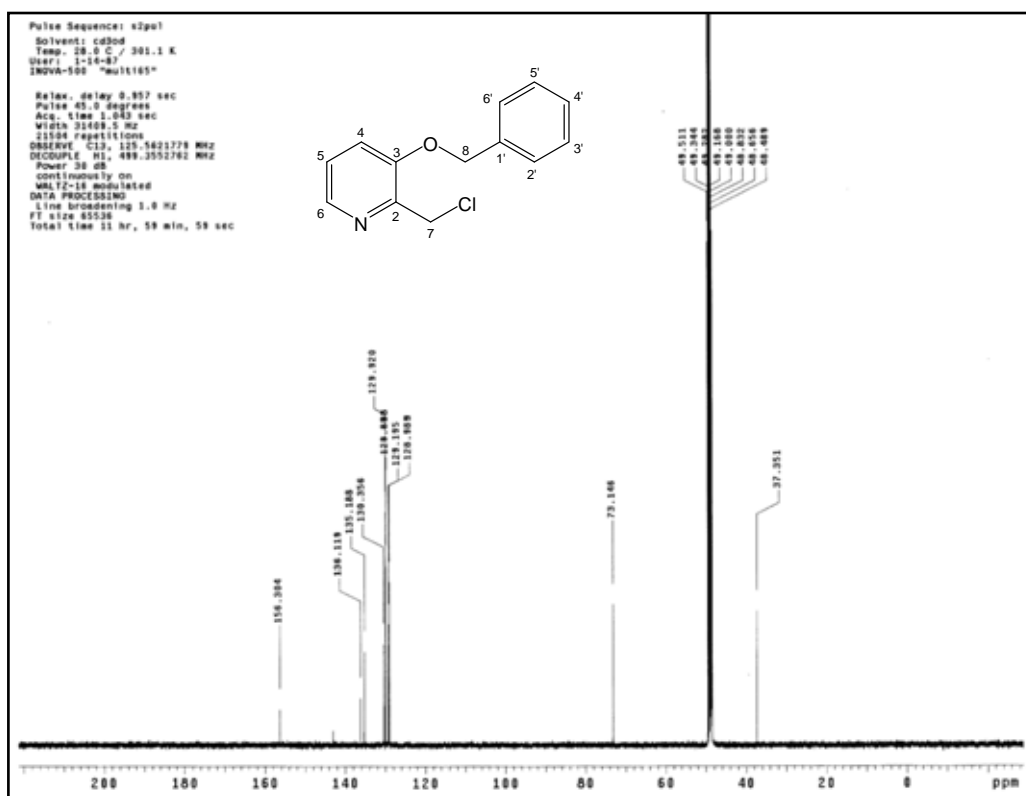


Figura 65 - Acoplamento cruzado de Suzuki-Miyaura.

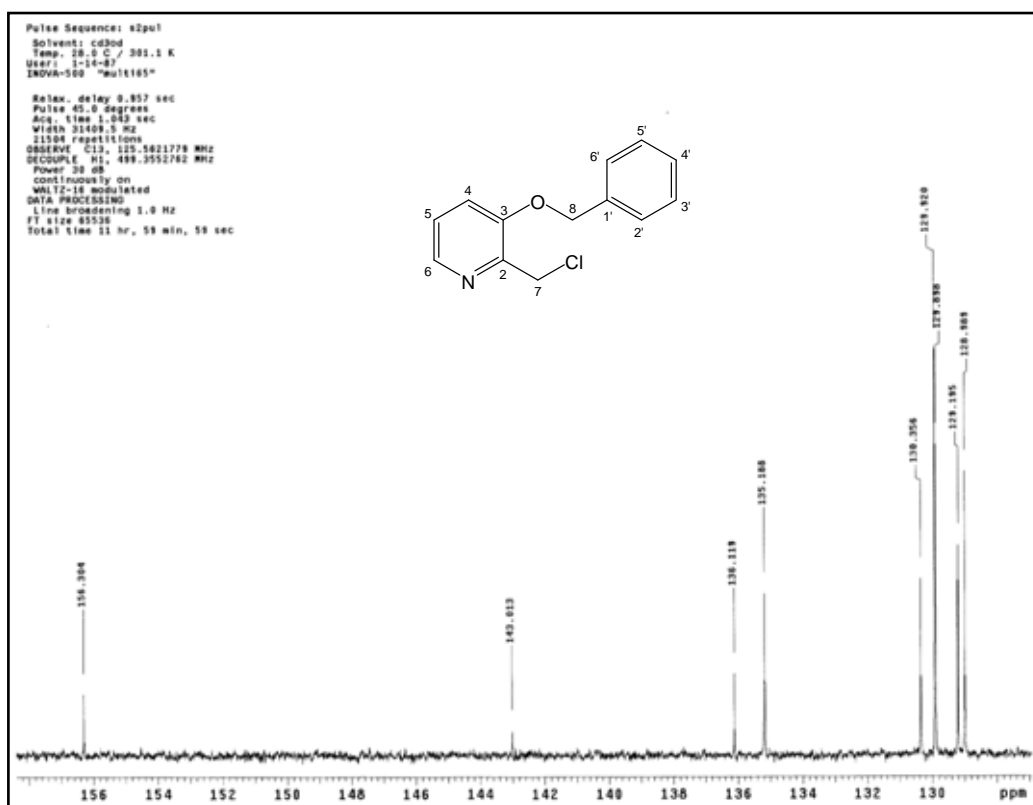
A halogenação de **47** utilizando SOCl₂ (Figura 65) levou a um sólido branco com R_f 0,58 [Hex:AcOEt (1:1)] em 85% de rendimento. A análise dos espectros de RMN de ¹H, ¹³C e DEPT (Espectros 81–84) deste composto confirmou a obtenção do cloridrato de **68**. As atribuições dos carbonos foram realizadas baseadas no mapa de contorno gHMBC (Tabela 16, Espectros 85–88 e Figura 66) e foram muito semelhantes às aquelas realizadas para **47**. Os sinais correspondentes aos hidrogênios e carbonos 4 e 5 foram deslocados devido a formação do cloridrato. O sinal em δ 37,3 (Espectro 82) quando comparado ao sinal correspondente em **47** (δ 60,1) confirma a halogenação em C-7.



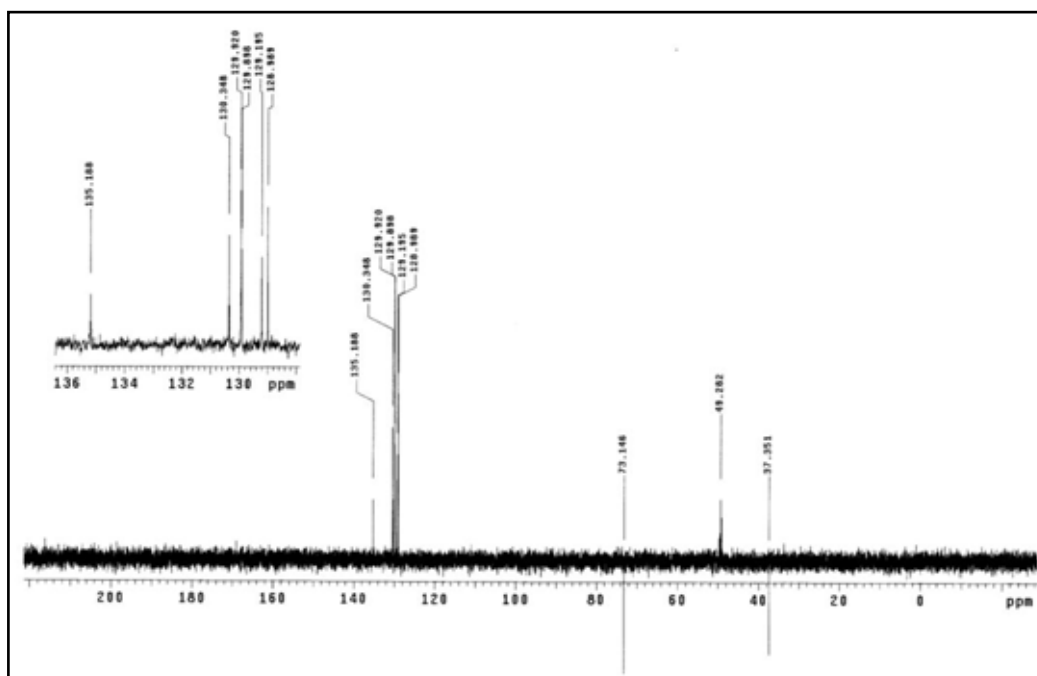
Espectro 81 - Espectro de RMN de ^1H de **68** (500 MHz, CD_3OD).



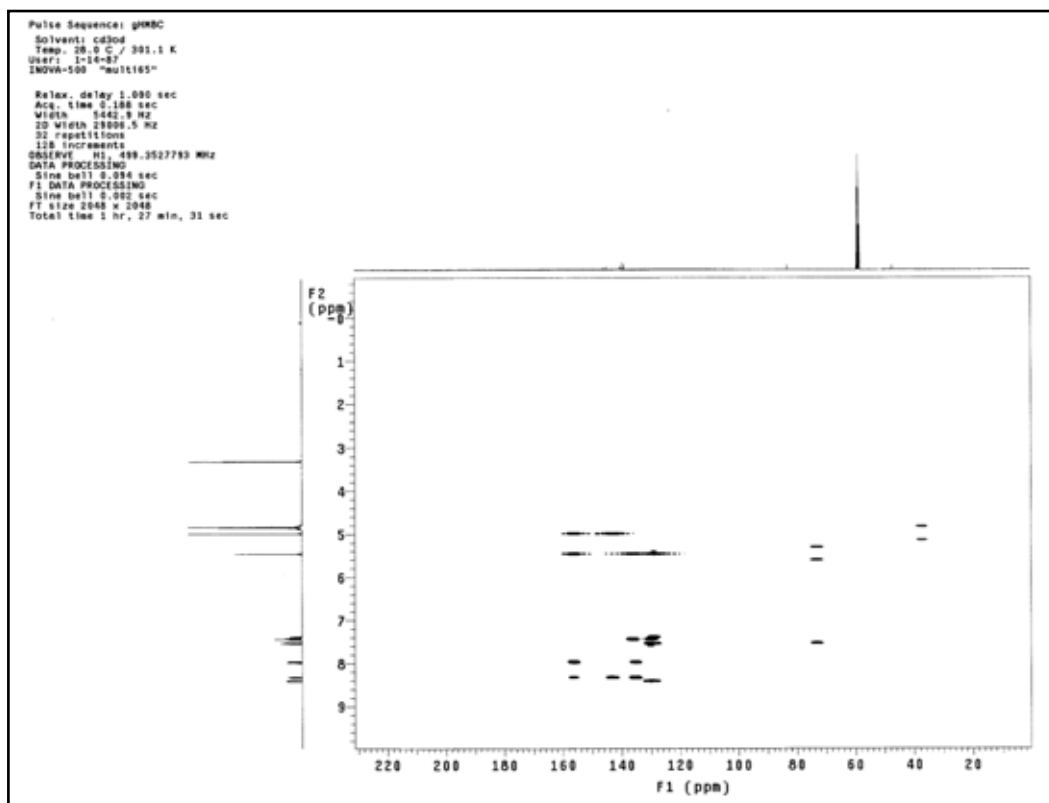
Espectro 82 - Espectro de RMN de ^{13}C de **68** (125 MHz, CD_3OD).



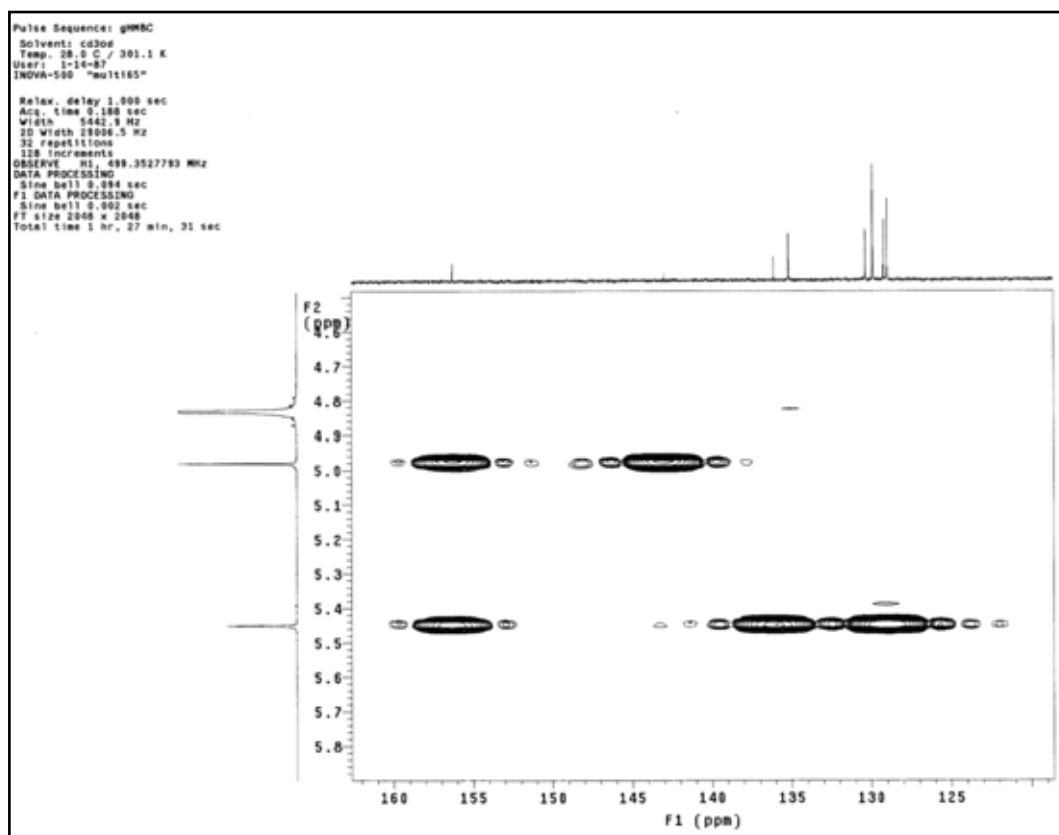
Espectro 83 - Ampliação do espectro de RMN de ^{13}C de **68** (δ 129–157, 125 MHz, CD_3OD).



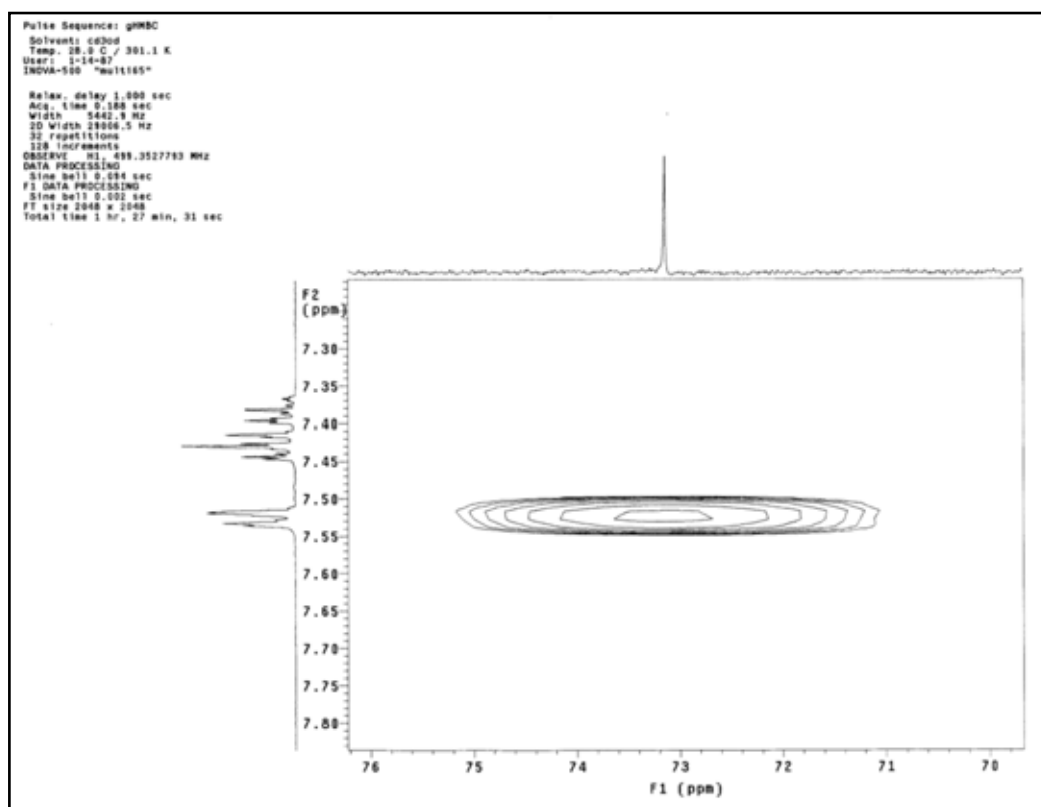
Espectro 84 - Espectro de DEPT 135 de **68** (125 MHz, CD_3OD).



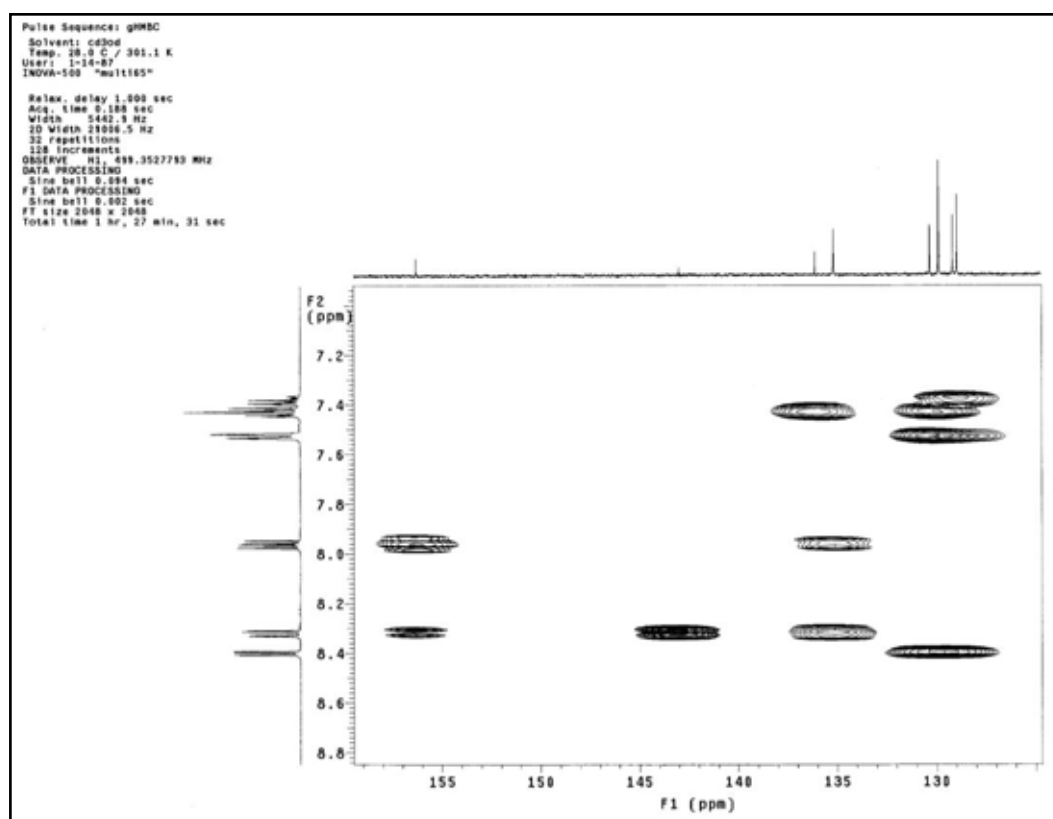
Espectro 85 - Mapa de contorno gHMBC de **68** (500 MHz; CD₃OD).



Espectro 86 - Mapa de contorno gHMBC de **68** (δ 124–160; 500 MHz; CD₃OD).



Espectro 87 - Mapa de contorno gHMBC de **68** (δ 70–76; 500 MHz; CD₃OD).



Espectro 88 - Mapa de contorno gHMBC de **68** (δ 125–160; 500 MHz; CD₃OD).

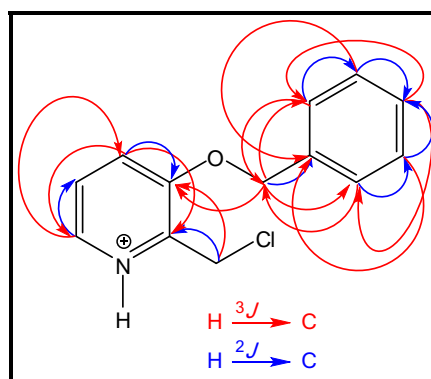
Tabela 16 - Dados de RMN de **68** (CD₃OD)

posição	δ_C^a (m ^b)	<i>g</i> HMQC δ_H^a (m ^b , <i>J</i> ^c)	<i>g</i> HMBC
2	143,0 (C)	–	H-4, H-7
3	156,3 (C)	–	H-4, H-7, H-8
4	130,3 (CH)	8,32 (dd, 8,5; 1,5)	H-6
5	129,9 (CH)	7,96 (dd, 8,5; 5,5)	H-6
6	135,1 (CH)	8,39 (dd, 5,5, 1,5)	H-4
7	37,3 (CH ₂)	4,97 (s)	–
8	73,1 (CH ₂)	5,45 (s)	H-2', H-6'
1'	136,1 (C)	–	H-8, H-3', H-5'
2' e 6'	128,9 (CH)	7,52 (m)	H-8, H-4'
3' e 5'	129,9 (CH)	7,43 (m)	H-2', H-6'
4'	129,1 (CH)	7,38 (m)	H-2', H-3', H-5', H-6'

^a deslocamentos químicos em ppm, em relação ao TMS como padrão interno

^b multiplicidade

^c constantes de acoplamento em Hz

**Figura 66** - Correlações H–C observadas no mapa de contorno *g*HMBC de **68**.

A reação para a preparação do 3-quinolinil-trifluorborato de potássio (Figura 65) a partir de **57** levou a um sólido avermelhado em baixo rendimento (5%) que contrasta com o rendimento obtido por Molander; Canturk e Kennedy (2008) de 84% para este sal. Uma explicação para este fato seria a instabilidade dos ésteres borônicos (intermediário na formação do sal trifluorborato) acima de -60 °C (Li et al., 2002) e como esta etapa da reação foi realizada a -15 °C, o rendimento foi baixo.

Devido à baixa quantidade obtida deste sal não foi possível realizar o acoplamento entre **67** e **68** (Figura 65), porém esta metodologia merece

estudos adicionais para formação dos derivados borônicos a temperaturas mais baixas ($-78\text{ }^{\circ}\text{C}$) e gerar o sal **67** em melhores rendimentos, sendo que a reação de Suzuki-Miyaura seria uma alternativa promissora para obtenção do híbrido **31a**, uma vez que o reagente **68**, necessário para esta reação, foi obtido em bom rendimento (85%).

4.4 Avaliação da atividade anticolinesterásica

Os derivados piridínicos (**43–48**, **50** e **52**) e a fração F6–8 (possivelmente contendo **66**, Figura 67) foram submetidos ao ensaio qualitativo por bioautografia, utilizando como padrão positivo a fisostigmina (P, Figura 68) e Hex:AcOEt (1:1) como FM. Foram aplicados $50\text{ }\mu\text{g}$ de cada amostra e $0,05\text{ }\mu\text{g}$ do padrão. Os valores de R_f foram calculados para os halos onde houve inibição da AChE (Tabela 17).

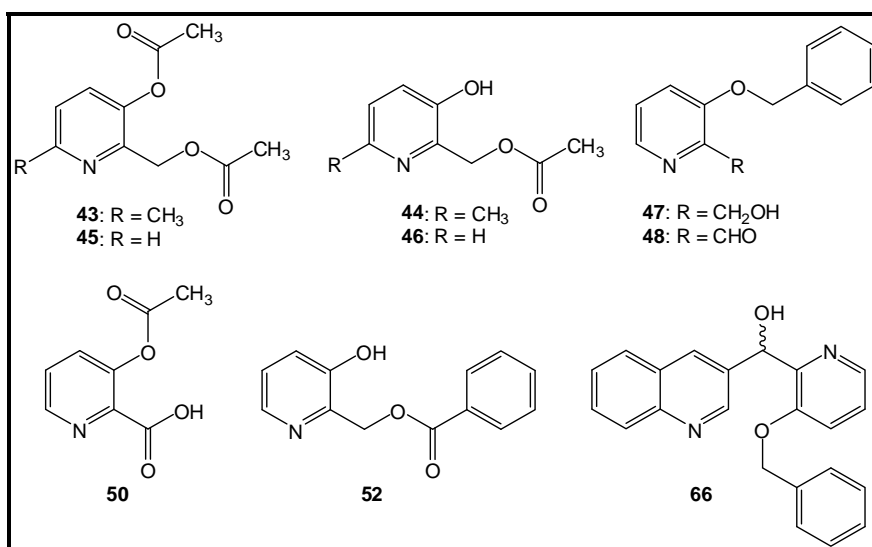


Figura 67 - Substâncias avaliadas no ensaio anticolinesterásico.

Todos os compostos apresentaram inibição da AChE sendo o aldeído **48** àquele que apresentou o melhor perfil inibitório neste *screening* (Figura 68). A fração F6–8 teve uma inibição satisfatória e considerando que **66** é um dos possíveis constituintes desta fração, este derivado poderia ser o responsável pela atividade. Estes resultados validam todo o planejamento realizado, tendo em conta que o foco deste trabalho era a busca por novos inibidores de acetilcolinesterase.

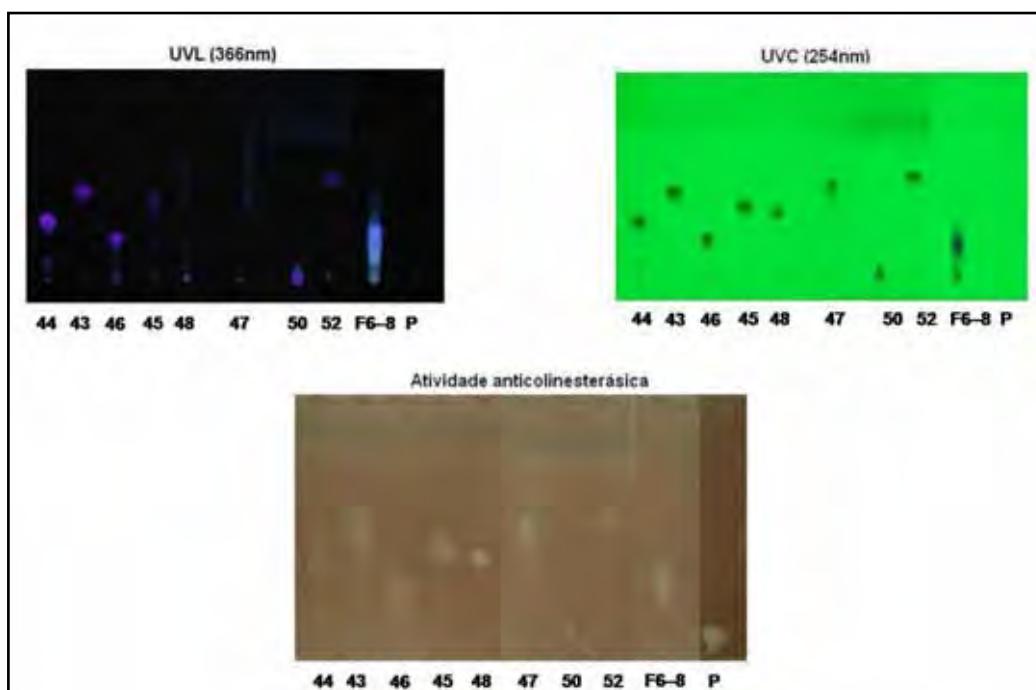


Figura 68 - Ensaio anticolinesterásico.

Tabela 17 - Valores de R_f para os halos de inibição da AChE

Amostras	R_f
44	0,27
43	0,43
46	0,18
45	0,34
48	0,31
47	0,45
50	Base
52	0,46
66	0,24/0,14
padrão	base

5 CONCLUSÕES

Os estudos computacionais permitiram a criação de dois modelos de *docking* para a acetilcolinesterase, um utilizando o programa FlexX e outro o FlexE. O primeiro foi utilizado no planejamento de 24 híbridos que apresentaram valores de $\Delta G_{\text{ligação}}$ mais satisfatórios que os inibidores de acetilcolinesterase comerciais e os derivados de (-)-3-O-acetil-espectralina (**32**), um alcalóide piperidínico de *S. spectabilis* em estudos de fase pré-clínica, constituindo-se o primeiro protótipo de metabólitos secundários do NuBBE. O segundo foi empregado nos estudos do modo de interação de **32** que corroboraram os dados obtidos *in vivo*, onde foi proposto um modo de inibição não-competitivo (CASTRO et al., 2008) evidenciando a necessidade de maior investimento neste estudo, dado a importância deste mecanismo de ação para inibidores de acetilcolinesterase. Além disto, o segundo modelo utilizando o programa FlexE e estudos de dinâmica molecular foram utilizados para prever uma possível diferença da atividade entre **32** e (-)-3-O-acetil-cassina (**36**) em fase pré-clínica e o resultado sugere diferenças no modo de interação destes alcalóides, sendo **36** potencialmente mais ativo que **32**.

O híbrido planejado por *docking* (**31a**) que apresentou melhores interações com a enzima e maior viabilidade sintética foi selecionado como segundo objetivo deste projeto e, por análise retrossintética, foram escolhidas a 3-hidroxi-2-hidrometil-piridina (**38**) e a 4-bromoquinolina (**42**) como materiais de partida de uma rota sintética convergente para obtenção de **31a**.

A rota sintética planejada inicialmente foi bastante modificada devido às dificuldades inerentes ao desenvolvimento da síntese orgânica num laboratório tradicionalmente dedicado à fitoquímica. As primeiras etapas da rota – formação do aldeído **41** e acetilação subsequente (Figura **38**) – devido ao baixo rendimento foram alteradas. Na nova abordagem sintética a obtenção do derivado benzoílico **52** nos levou a propor um rearranjo para explicar a migração dos grupos Ac e Bz no modelo aplicado (Figura 50), ainda sem dados na literatura.

Várias metodologias de acoplamento dos núcleos piridínico (**38**) e quinolínicos (**42**) foram avaliadas, porém o intermediário acoplado (**66**) só pôde ser detectado por CG/MS na reação utilizando o reagente de Grignard brometo

de 3-quinolinil-magnésio. Devido ao baixo rendimento de **66**, não foi possível isolá-lo da mistura reacional e, portanto, sua identidade, provando a viabilidade sintética do método, não foi possível até o presente momento.

Uma alternativa metodológica para a obtenção de **31a** seria o acoplamento cruzado de Suzuki-Miyaura. Este método é considerado um dos mais eficientes para a construção de ligações carbono-carbono descritos na literatura. A obtenção de um dos reagentes (**68**) para este tipo de acoplamento (Figura 64) teve sucesso. No entanto, o sal **67** necessário para finalizar a síntese proposta foi obtido, porém com rendimentos baixos, o que inviabilizou a conclusão do procedimento. Concluindo, após várias análises sobre a obtenção de **67**, acredita-se que a temperatura utilizada não foi ideal, levando em conta a instabilidade do intermediário a ser formado antes do sal. Esta etapa final do projeto está no momento sendo concluída.

A parte de *docking* molecular foi muito útil para a seleção do composto (**31a**) escolhido para a síntese, pois mesmo ainda em fase de obtenção, nove intermediários sintetizados foram avaliados quanto à atividade anticolinesterásica e todos foram ativos sendo **48** o derivado que apresentou melhor inibição no ensaio enzimático. Concluímos que os objetivos principais deste trabalho foram alcançados, já que uma das finalidades da química medicinal é a obtenção de substâncias bioativas.

REFERÊNCIAS

- AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Farmacovigilância**. Brasília, DF, 2005. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/farmacovigilancia/alerta/federal/2005/federal_1_05.htm>. Acesso em: 07 jul. 2010.
- BACHILLER, M. I. F.; PÉREZ, C.; CAMPILLO, N. E.; PÁEZ, J. A.; GONZÁLEZ-MUÑOZ, G. C.; USÁN, P.; GARCÍA-PALOMERO, E.; LÓPEZ, M. G.; VILLARROYA, M.; GARCÍA, A. G.; MARTÍNEZ, A.; RODRÍGUES-FRANCO, M. I. Tacrine-melatonin hybrids as multifunctional agents for Alzheimer's disease, with cholinergic, antioxidant, and neuroprotective properties. **ChemMedChem**, v. 4, p. 828-841, 2009.
- BARREIRO, E. J.; FRAGA, C. A. M. **Química medicinal**: as bases moleculares da ação dos fármacos. Porto Alegre: Artmed, 2001. Cap. 1, p. 15-24.
- BARRIL, X.; OROZCO, M.; LUQUE, F. J. Towards improved acetylcholinesterase inhibitors: a structural and computational approach. **Mini Reviews in Medicinal Chemistry**, v. 1, n. 3, p. 255-266, 2001.
- BERMAN, H. M.; WESTBROOK, J.; FENG, Z.; GILLILAND, G.; BHAT, T. N.; WEISSIG, H.; SHINDYALOV, I. N.; BOURNE, P. E. The protein data bank. **Nucleic Acids Research**, v. 28, p. 235-242, 2000.
- BONFANTI, J.; DOUBLET, F.; FORTIN, J.; LACRAMPE, J.; GUILLEMONT, J.; MULLER, P.; QUEGUINER, L.; ARNOULT, E.; GEVERS, T.; JANSSENS, P.; SZEL, H.; WILLEBRORDS, R.; TIMMERMAN, P.; WUYTS, K.; JANSSENS, F.; SOMMEN, C.; WIGERINCK, P.; ANDRIES, K. Selection of a respiratory syncytial virus fusion inhibitors clinical candidate, part 1: improving the pharmacokinetic profile using the structure-property relationship. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 50, p. 4572-4584, 2007.
- BRIARD, E.; ZOGHBI, S. S.; IMAIZUMI, M.; GOURLEY, J. P.; SHETTY, H. U.; HONG, J.; CROPLEY, V.; FUJITA, M.; INNIS, R. B.; PIKE, V. W. Synthesis and evaluation in monkey of two sensitive ¹¹C-labeled aryloxyanilide ligands for imaging brain peripheral benzodiazepine receptors *in vivo*. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 51, p. 17-30, 2008.
- CAMPS, P.; EL ACHAB, R.; MORRAL, J.; MUÑOZ-TORRERO, D.; BADÍA, 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. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 43, p. 4657-4666, 2000.

CASTRO, A.; MARTINEZ, A. Peripheral and dual binding site acetylcholinesterase inhibitors: implications in treatment of Alzheimer's disease. **Mini Reviews in Medicinal Chemistry**, v. 1, p. 267-272, 2001.

CASTRO, N. G.; COSTA, R. S.; PIMENTEL, L. S. B.; DANUELLO, A.; ROMEIRO, N. C.; VIEGAS JUNIOR C.; BARREIRO, E. J.; FRAGA, C. A. M.; BOLZANI, V. S.; ROCHA, M. S. CNS-selective noncompetitive cholinesterase inhibitors derived from the natural piperidine alkaloid (-)-spectaline. **European Journal of Pharmacology**, v. 580, p. 339-349, 2008.

CLAUBEN, H.; BUNING, C.; RAREY, M.; LENGAUER, T. FlexE: efficient molecular docking considering protein structure variations. **Journal of Molecular Biology**, v. 308, p. 377-395, 2001.

CRAWFORTH, C. E.; METH-COHN, O.; RUSSELL, C. A. The question of 1,2- or 1,4-addition of organolithium compounds to quinolines. **Journal of Chemical Society Perkin I**, n. 22, p. 2807-2810, 1972.

DARSES, S.; MICHAUD, G.; GENËT, J. Potassium organotrifluoroborates: new partners in palladium-catalysed cross-coupling reactions. **European Journal of Organic Chemistry**, n. 8, p. 1875-1883, 1999.

DIXON, M. J.; MAURER, R. I.; BIGGI, C.; OYARZABAL, J.; ESSEX, J. W.; BRADLEY, M. Mechanism and structure-activity relationships of norspermidine-based peptidic inhibitors of trypanothione reductase. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 13, p. 4513-4526, 2005.

DOUCET, H. Suzuki-Miyaura cross-coupling reactions of alkylboronic acid derivatives or alkyltrifluoroborates with aryl, alkenyl or alkyl halides and triflates. **European Journal of Organic Chemistry**, n. 12, p. 2013-2030, 2008.

DUMOUCHEL, S.; MONGIN, F.; TRÉCOURT, F.; QUÉGUINER, G. Synthesis and reactivity of lithium tri(quinolinyl)magnesates. **Tetrahedron**, v. 59, p. 8629-8640, 2003a.

DUMOUCHEL, S.; MONGIN, F.; TRÉCOURT, F.; QUÉGUINER, G. Tributylmagnesium ate complex-mediated bromine-magnesium exchange of bromoquinolines: a convenient access to functionalized quinolines. **Tetrahedron Letters**, v. 44, p. 2033-2035, 2003b.

GIAM, C. S.; STOUT, J. L. Isolation and characterization of crystalline o-complexes from organolithium compounds and pyridine derivatives. **Chemical Communications**, n. 4, p. 142, 1969.

GILMAN, H.; SODDY, T. S. Some organolithium compounds of quinoline and 2-phenylquinoline. **Journal of Organic Chemistry**, v. 23, p. 1584-1585, 1958.

- GUIDO, R. V. C.; OLIVA, G.; ANDRICOPULO, A. D. Virtual screening and its integration with modern drug design technologies. **Current Medicinal Chemistry**, v. 15, p. 37-46, 2008.
- HARE, S.; GUPTA, S. S.; VALKOV, E.; ENGELMAN, A.; CHEREPANOV, P. Retroviral intasome assembly and inhibition of DNA strand transfer. **Nature**, v. 464, p. 232-237, 2010.
- HAREL, M.; SCHALK, I.; EHRET-SABATIER, L.; BOUET, F.; GOELDNER, M.; HIRTH, C.; AXELSEN, P. H.; SILMAN, I.; SUSSMAN, J. L. Quaternary ligand binding to aromatic residues in the active-site gorge of acetylcholinesterase. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 90, p. 9031-9035, 1993.
- HARFENIST, M.; BAVLEY, A.; LAZIER, W. A. The oxidation of allyl and benzyl alcohols to the aldehydes. **Journal of Organic Chemistry**, v. 19, p. 1608-1616, 1954.
- HEINERT, D.; MARTELL, A. A pyridoxine and pyridoxal analogs. II. Infrared spectra and hydrogen bonding. **Journal of American Chemical Society**, v. 81, p. 3933-3943, 1959.
- HUENTELMAN, M. J.; ZUBCEVIC, J.; PRADA, J. A. H.; XIAO, X.; DIMITROV, D. S.; RAIZADA, M. K.; OSTROV, D. A. Structure-based discovery of a novel angiotensin-converting enzyme 2 inhibitor. **Hypertension: Journal of the American Heart Association**, v. 44, p. 903-906, 2004.
- ILLI, V. O. Phase transfer catalysed acylation. **Tetrahedron Letters**, v. 26, p. 2431-2432, 1979.
- JANSSEN-ORTHO. **Public advisory**: health Canada endorsed important preliminary safety information regarding Reminyl[®] (galantamine). Toronto, 2005. Disponível em: <http://www.janssen-ortho.com/joi/pdf_files/publicadvisory_en_reminyl.pdf>. Acesso em: 07 jul. 2010.
- JEN, K.; CAVA, M. P. Improved synthesis of aromatic diselenides. **Journal of Organic Chemistry**, v. 48, p. 1449-1451, 1983.
- KITCHEN, D. B.; DECORNEZ, H.; FURR, J. R.; BAJORATH, J. Docking and scoring in virtual screening for drug discovery: methods and applications. **Nature: Reviews Drug Discovery**, v. 3, p. 935-949, 2004.
- KRYGER, G.; SILMAN, I.; SUSSMAN, J. L. Structure of acetylcholinesterase complexed with E2020 (Aricept[®]): implications for the design of new anti-Alzheimer drugs. **Structure**, v. 7, p. 297-307, 1999.

- KÜRTI, L.; CZAKÓ, B. **Strategic applications of named reactions in organic synthesis**. San Diego: Elsevier Academic Press, 2005. p. 450-451.
- LAGES, A. S.; SILVA, K. C. M.; MIRANDA, A. L. P.; FRAGA, C. A. M.; BARREIRO, E. J. Synthesis and pharmacological evaluation of new flosulide analogues synthesized from natural safrole. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 8, p. 183-188, 1998.
- LANGE, J. H. M.; COOLEN, H. K. A. C.; VAN DER NEUT, M. A. W.; BORST, A. J. M.; STORK, B.; VERVEER, P. C.; KRUSE, C. G. Design, synthesis, biological properties and molecular modeling investigations of novel tacrine derivatives with a combination of acetylcholinesterase inhibition and cannabinoid CB₁ receptor antagonism. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 53, p. 1338-1346, 2010.
- LI, W.; NELSON, D. P.; JENSEN, M. S.; HOERRNER, R. S.; CAI, D.; LARSEN, R. D.; REIDER, P. J. An improved protocol for the preparation of 3-pyridyl- and some arylboronic acids. **Journal of Organic Chemistry**, v. 67, p. 5394-5397, 2002.
- LIMA, P. C.; AVERY, M. A.; TEKWANI, B. L.; ALVES, H. M.; BARREIRO, E. J.; FRAGA, C. A. M. Synthesis and biological evaluation of new imidazo[1,2-*a*]pyridine derivatives designed as mefloquine analogues. **Il Farmaco**, v. 57, p. 825-832, 2002.
- LÓPEZ, S.; BASTIDA, J.; VILADOMAT, F.; CODINA, C. Acetylcholinesterase inhibitory activity of some Amaryllidaceae alkaloids and narcissus extracts. **Life Sciences**, v. 71, p. 2521-2529, 2002.
- LOU, J.; XU, Z. Solvent free oxidation of alcohols with manganese dioxide. **Tetrahedron Letters**, v. 43, p. 6149-6150, 2002.
- LOUISE-LERICHE, L.; PAUNESCU, E.; SAINT-ANDRÉ, G.; BAATI, R.; ROMIEU, A.; WAGNER, A.; RENARD, P. A HTS assay for the detection of organophosphorus nerve agent scavengers. **Chemistry: A European Journal**, v. 16, n. 11, p. 3510-3523, 2010.
- LUCA, S.; ULHAQ, S.; DIXON, M. J.; ESSEX, J.; BRADLEY, M. Solid-phase synthesis of a focused library of trypanothione reductase inhibitors. **Tetrahedron Letters**, v. 44, p. 3195-3197, 2003.
- MARCO, J. L.; RÍOS, C.; GARCÍA, A. G.; VILLARROYA, M.; CARREIRAS, M. C.; MARTINS, C.; ELEUTÉRIO, A.; MORREALE, A.; OROZCO, M.; LUQUE, F. J. Synthesis, biological evaluation and molecular modelling of diversely functionalized heterocyclic derivatives as inhibitors of acetylcholinesterase/butylcholinesterase and modulators of Ca²⁺ channels and nicotinic receptors. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 12, p. 2199-2218, 2004.

MARSTON, A.; KISSLING, J.; HOSTETTMANN, K. A rapid TLC bioautographic method for the detection of acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase inhibitors in plants. **Phytochemical Analysis**, v. 13, p. 51-54, 2002.

MOLANDER, G. A.; CANTURK, B.; KENNEDY, L. E. Scope of the Suzuki-Miyaura cross-coupling reactions of potassium heteroaryltrifluoroborates. **Journal of Organic Chemistry**, v. 74, p. 973-980, 2009.

MOLANDER, G. A.; ELIA, M. D. Suzuki-Miyaura cross-coupling reactions of benzyl halides with potassium aryltrifluoroborates. **Journal of Organic Chemistry**, v. 71, p. 9198-9202, 2006.

MOLFETTA, F. A.; FREITAS, R. F.; SILVA, A. B. F.; MONTANARI, C. A. Docking and molecular dynamics simulation of quinone compounds with trypanocidal activity. **Journal of Molecular Modeling**, v. 15, p. 1175-1184, 2009.

MOON, H.; NAM, S.; KIM, S.; KIM, D.; GWAG, B. J.; LEE, Y.; YOON, S. Structural requirements for the neuroprotective effects of aspirin analogues against *N*-methyl-D-aspartate and zinc ion neurotoxicity. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 54, n. 7, p. 935-944, 2002.

MUÑOZ-TORRERO, D.; CAMPS, P. Dimeric and hybrid anti-alzheimer drug candidates. **Current Medicinal Chemistry**, v. 13, p. 399-422, 2006.

OMURA, K.; SWERN, D. Oxidation of alcohols by "activated" dimethyl sulfoxide. A preparative steric and mechanistic study. **Tetrahedron**, v. 34, p. 1651-1660, 1978.

PATRICK, G. L. **A introduction to medicinal chemistry**. 3rd ed. Oxford: Oxford University Press, 2005. Cap. 19, p. 559-592.

PERRIN, D. D.; ARMAREGO, W. L. F. **Purification of laboratory chemicals**. 3rd ed. Oxford: Pergamon Press, 1988. 391 p.

PILGER, C.; BARTOLUCCI, C.; LAMBA, D.; TROPSHA, A.; FELS, G. Accurate prediction of galanthamine in the active site of *Torpedo californica* acetylcholinesterase using molecular docking. **Journal of Molecular Graphics and Modelling**, v. 19, p. 288-296, 2001.

PIVATTO, M.; CROTTI, A. E. M.; LOPES, N. P.; CASTRO-GAMBOA, I.; REZENDE, A.; VIEGAS JUNIOR, C.; YOUNG, M. C. M.; FURLAN, M.; BOLZANI, V. S. Electrospray Ionization mass spectrometry screening of piperidine alkaloids from *Senna spectabilis* (Fabaceae) extracts: fast identification of new constituents and co-metabolites. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 16, n. 6B, p. 1431-1438, 2005.

- RAREY, M.; KRAMER, B.; LENGAUER, T.; KLEBE, G. A fast flexible docking method using an incremental construction algorithm. **Journal of Molecular Biology**, v. 261, p. 470-489, 1996.
- RAVES, M. L.; HAREL, M.; PANG, Y. P.; SILMAN, I.; KOZIKOWSKI, A. P.; SUSSMAN, J. L. Structure of acetylcholinesterase complexed with the nootropic alkaloid (-)-huperzine A. **Nature Structural Biology**, v. 4, p. 57-63, 1997.
- RITTER, T.; ZAROTTI, P.; CARREIRA, E. M. Diastereoselective phenol para-alkylation: access to a cross-conjugated cyclohexadienone en route to resiniferatoxin. **Organic Letters**, v. 6, p. 4371-4374, 2004.
- RONCO, C.; SORIN, G.; NACHON, F.; FOUCAULT, R.; JEAN, L.; ROMIEU, A.; RENARD, P. Synthesis and structure-activity relationship of huprine derivatives as human acetylcholinesterase inhibitors. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 17, p. 4523-4536, 2009.
- SABERI, M. R.; SHAH, K.; SIMONS, C. Benzofuran- and furan-2-yl-(phenyl)-3-pyridylmethanols: synthesis and inhibition of P450 aromatase. **Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry**, v. 20, n. 2, p. 135-141, 2005.
- SANT'ANNA, C. M. R. Métodos de modelagem molecular para estudo e planejamento de compostos bioativos: uma introdução. **Revista Virtual de Química**, v. 1, n. 1, p. 49-57, 2009.
- SHEN, L.; LIU, G.; TANG, Y. Molecular docking and 3D-QSAR studies of 2-substituted 1-indanone derivatives as acetylcholinesterase inhibitors. **Acta Pharmacologica Sinica**, v. 28, n. 12, p. 2053-2063, 2007.
- SILVA, C. H. T. P.; CAMPO, V. L.; CARVALHO, I.; TAFT, C. A. Molecular modeling, docking and ADMET studies applied to design of a novel hybrid for treatment of Alzheimer's disease. **Journal of Molecular Graphics and Modelling**, v. 25, p. 169-175, 2006.
- SMITH, M. B. **Organic synthesis**. New York: McGraw-Hill, 1994. Chapt 3, p. 245-246.
- SOTRIFFER, C. A.; DRAMBURG, I. *In situ* cross-docking to simultaneously address multiple targets. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 48, p. 3122-3125, 2005.
- SRIVASTAVA, V.; TANDON, A.; RAY, S. Convenient and selective acetylations of phenols, amines and alcohols. **Synthetic Communications**, v. 22, p. 2703-2710, 1992.
- STEFANI, H. A.; CELLA, R.; VIEIRA, A. S. Recent advances in organotrifluoroborates chemistry. **Tetrahedron**, v. 63, p. 3623-3658, 2007.

STEMPEL, A.; BUZZI, E. C. 3-pyridols in the Mannich reaction. **Journal of the American Chemical Society**, v. 71, n. 9, p. 2969-2972, 1949.

TAKEDA, Y.; UOTO, K.; CHIBA, J.; HORIUCHI, T.; IWAHANA, M.; ATSUMI, R.; ONO, C.; TERASAWA, H.; SOGA, T. New highly active taxoids from 9 β -dihydrobaccatin-9,10-acetals. Part 4. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 11, p. 4431-4447, 2003.

TANG, J.; MADDALI, K.; POMMIER, Y.; SHAM, Y. Y.; WANG, Z. Scaffold rearrangement of dihydroxypyrimidine inhibitors of HIV integrase: docking model revisited. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 20, p. 3275-3279, 2010.

TEIXEIRA, R. R.; BARBOSA, L. C. A.; PILÓ-VELOSO, D. Reações de acoplamento cruzado de organossilanos catalisadas por paládio: aspectos históricos, sintéticos e mecanísticos. **Química Nova**, v. 30, n. 7, p. 1704-1720, 2007.

VIEGAS JUNIOR, C.; BOLZANI, V. S.; FURLAN, M.; FRAGA, C. A. M.; BARREIRO, E. J. Produtos naturais como candidatos a fármacos úteis no tratamento do mal de Alzheimer. **Química Nova**, v. 27, n. 4, p. 655-660, 2004a.

VIEGAS JUNIOR, C.; BOLZANI, V. S.; FURLAN, M.; BARREIRO, E. J.; YOUNG, M. C. M.; TOMAZELA, D.; EBERLIN, M. N. Further bioactive piperidine alkaloids from the flowers and green fruits of *Cassia spectabilis*. **Journal of Natural Products**, v. 67, n. 5, p. 908-910, 2004b.

VIEGAS JUNIOR, C.; BOLZANI, V. S.; PIMENTEL, L. S. B., CASTRO, N. G.; CABRAL, R. F.; COSTA, R. S.; FLOYD, C.; ROCHA, M. S.; YOUNG, M. C. M.; BARREIRO, E. J.; FRAGA, C. A. M. New selective acetylcholinesterase inhibitors designed from natural piperidine alkaloids. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 13, p. 4184-4190, 2005.

VIEGAS JUNIOR, C.; DANUELLO, A.; BOLZANI, V. S.; BARREIRO, E. J.; FRAGA, C. A. M. Molecular hybridization: a useful tool in the design of new drug prototypes. **Current Medicinal Chemistry**, v. 14, p. 1829-1852, 2007.

WAKEFIELD, B. J. **Organomagnesium methods in organic chemistry**. London: Academic Press, 1995. p. 1-71; 111-146.

WANG, P.; KECK, J. G.; LIEN, E. J.; LAI, M. M. C. Design, synthesis, testing, and quantitative structure-activity relationship analysis of substituted salicylaldehyde Schiff bases of 1-amino-3-hydroxyguanidine tosylate as new antiviral agent against coronavirus. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 33, p. 608-614, 1990.

WANG, X.; LIN, J.; CHEN, Y.; ZHONG, W.; ZHAO, G.; LIU, H.; LI, S.; WANG, L.; LI, S. Novel fatty acid synthase (FAS) inhibitors: design, synthesis, biological evaluation and molecular docking studies. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 17, p. 1898-1904, 2009.

WATSON, S. C.; EASTHAM, J. F. Colored indicators for simple direct titration of magnesium and lithium reagents. **Journal of Organometallic Chemistry**, v. 9, p. 165-168, 1967.

WEN, H.; LIN, C.; QUE, L.; GE, H.; MA, L.; CAO, R.; WAN, Y.; PENG, W.; WANG, Z.; SONG, H. Synthesis and biological evaluation of helicid analogues as acetylcholinesterase inhibitors. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 43, p. 166-173, 2008.

XIE, Q.; TANG, Y.; LI, W.; WANG, X. H.; QIU, Z. B. Investigation of the binding mode of (-)-meptazinol and bis-meptazinol derivatives on acetylcholinesterase using a molecular docking method. **Journal of Molecular Modeling**, v. 12, p. 390-397, 2006.

YOON, N. M.; PAK, C. S.; BROWN, H. C.; KRISHNAMURTHY, S.; STOCKY, T. P. Selective reductions. XIX. The rapid reaction of carboxylic acids with borane-tetrahydrofuran. A remarkably convenient procedure for the selective conversion of carboxylic acids to the corresponding alcohols in the presence of other functional groups. **Journal of Organic Chemistry**, v. 38, n. 16, p. 2786-2792, 1973.

YUNES, R. A.; CALIXTO, J. B. (Ed.). **Plantas medicinais: sob a ótica da química medicinal moderna**. Chapecó: Argos, 2001. 523 p.