

Universidade Federal de Minas Gerais
Instituto de Ciências Exatas
Departamento de Química

Roney Anderson Nascimento de Aquino

**Síntese, Avaliação Farmacológica e Estudos Computacionais de Dímeros
de Tacrina**

Belo Horizonte
2014

UFMG/ICEx/DQ. 1014^a

T. 462^a

Roney Anderson Nascimento de Aquino

**Síntese, Avaliação Farmacológica e Estudos Computacionais de Dímeros
de Tacrina**

Tese apresentada ao Departamento de Química do Instituto de Ciências Exatas da Universidade Federal de Minas Gerais como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor em Ciências – Química.

Belo Horizonte

2014

A656s Aquino, Roney Anderson Nascimento de
2014 Síntese, avaliação farmacológica e estudos
T computacionais de dímeros de tacrina [manuscrito] /
Roney Anderson Nascimento de Aquino. 2014.
[xii], 140 f. : il.

Orientador: Ângelo de Fátima.
Coorientadora: Rosemeire Brondi Alves.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Minas Gerais. Departamento de Química.
Inclui bibliografias.
Anexos: 105-140.

1. Química orgânica - Teses 2. Inibidores da colinesterase - Teses 3. Células cancerosas - Teses 4. Alzheimer, Doença de - Teses 5. Síntese orgânica - Teses 6. Farmacologia molecular - Simulação por computador - Teses 7. Cinética de enzimas - Teses I. Fátima, Ângelo de, Orientador II. Alves, Rosemeire Brondi, Coorientadora III. Título.

CDU 043

UFMG

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA - ICEX
31270-901 - BELO HORIZONTE - MG
TEL.: 031 - 3409-5732
FAX: 031 - 3409-5711
E-MAIL: pgquimic@.qui.ufmg.br



"Síntese, Avaliação Farmacológica e Estudos Computacionais de Dímeros de
Tacrina"

Roney Anderson Nascimento de Aquino

Tese aprovada pela banca examinadora constituída pelos Professores:

Prof. Ângelo de Fátima - Orientador
UFMG

Prof. Rosemeire Brondi Alves - Coorientadora
UFMG

Prof. Claudio Viegas Júnior
UNIFAL

Prof. Luiz Antonio Soares Romeiro
UnB

Prof. Tiago Antônio da Silva Brandão
UFMG

Prof. Willian Ricardo Rocha
UFMG

Belo Horizonte, 14 de março de 2014.

Dedicatória

Dedico esta tese ao meu caro orientador, professor Dr. Ângelo de Fátima.

Agradecimentos

Agradeço ao professor Dr. Ângelo de Fátima pela sua dedicada orientação.

Agradeço a co-orientação da professora Dra. Rosimeire B. Alves e a colaboração da professora Dra. Luzia V. Modolo (ICB-UFMG).

Agradeço a colaboração da pesquisadora Dra. Luciana M. Silva (FUNED) e de suas assessoras Flávia P. de Melo, Msc. Josiane B. Piedade, Heloisa H. M. Oliveira, Rita C. P. Mendes bem como das pesquisadoras Dra. Letícia C. Braga e Dra. Alessandra C. S. Matavel.

Agradeço à professa Dra. Dorila P. Veloso bem como aos professores Dr. Tiago A. S. Brandão e Dr. Willian R. Rocha por comporem a banca de qualificação deste trabalho.

Agradeço aos professores Dr. Eufrânio Nunes S. Júnior e Dr. Willian R. Rocha pela avaliação deste trabalho na pré-banca de tese.

Agradeço aos professores Dr. Cláudio V. Júnior, Dr. Eufrânio N. S. Júnior, Dr. Luiz A. S. Romeiro, Dr. Tiago A. S. Brandão (suplente), Dr. Wendell Guerra (suplente) e Dr. Willian R. Rocha por comporem a banca de tese.

Agradeço a FAPEMIG pelo financiamento do projeto.

Agradeço aos professores Dr. Adão A. Sabino, Dr. Ângelo de Fátima, Dr. Cláudio L. Donnici, Dra. Clésia C. Nascentes, Dra. Dorila P. Veloso, Dr. Fernando Carazza (*in memoriam*), Dr. Hélio A. Duarte, Dr. José D. S. Filho, Dr. Rodrigo L. Laval, Dra. Rosimeire B. Alves e Dr. Tiago A. S. Brandão, por compartilharem seu conhecimento nas disciplinas que ministraram.

Agradeço aos técnicos Ricardo A. Machado e Dra. Ivana S. Lula pelos espectros de RMN.

Agradeço ao técnico Marley A. P. de Assis pelas análises CHN.

Agradeço aos alunos Lucas M. Arantes e Aretha P. S. Andrade pelas análises de HRMS.

Agradeço aos professores Dr. Nelson G. Gonçalves e Dr. Nivaldo L. Speziali e ao aluno Leonardo H. L. Santos pelo auxílio na obtenção das estruturas de raios-X.

Agradeço aos alunos Stefânia N. Lavorato e Bruno L. Silva e aos professores Dr. Ricardo J. Alves e Dra. Thaís H. A. da Silva (Farmácia-UFMG) pela colaboração na determinação dos espectros IV.

Agradeço ao professor Dr. Adão A. Sabino por compartilhar sua experiência no laboratório.

Agradeço nas pessoas dos professores Dr. Antônio F. C. Alcântara, Dr. Geraldo M. de Lima, Dra. Heloisa O. Beraldo e Dra. Lucienir P. Duarte aos seus alunos e técnicos que casualmente fizeram aqueles essenciais empréstimos de material. Ressalto especialmente o Fernando, a Josane, a Karina, o Rafael e o técnico Wellerson F. Ribeiro.

Agradeço aos técnicos do DQ-UFMG Anderson P. Souza, Eurípedes G. Santos, José S. Fernandes, Lucas R. da Costa, Márcio A. de Araújo, Maria H. de Paula, Marilda C. da Silva, Renato J. dos Reis, Rogério M. F. Boa, Rubio A. Moreira, Samuel R. S. de Carvalho, Sérgio F. da Silva, Silvio T. Teixeira, Sônia M. Rodrigues, Wladmir T. da Silva e Yuri A. Pereira, pelas suas contribuições.

Agradeço ao CEFET-MG nas pessoas das técnicas administrativas Ana C. O. Santos, Elizabeth de Araújo, Luana D. L. Guerra bem como dos professores Dr. André M. de Oliveira, Dr. Ângelo M. L. Denadai, Dr. Armin F. Insemann, Dr. Eduardo Coutinho, Msc. Fabio L. Rodrigues, Dr. Fernando C. de Oliveira, Dr. Flávio A. Santos, Dr. Flávio L. C. Pádua, Dr. Gray Farias Moita, Dra. Heloisa H. J. Ferreira, Dr. James W. G. Junior, Dr. Márcio Silva Basílio, Msc. Maurílio A. M. da Costa, Dr. Rodrigo G. de Oliveira e Msc. Silvânia A. F. Souza, os quais apoiaram e tornaram possível a realização deste treinamento.

Agradeço aos colegas de laboratório *i)* no DQ-UFMG: Ana Cristina, Beatriz, Bruna, Cleiton, Daniel, Débora, Esther, Fabiano, Francinely, Gisele, Juliana, Leonardo, Lucas, Luiza, Mariana, Samira, Taniris e Yuri; *ii)* no ICB-UFMG: Advânio, Alexandre, Ana Paula, Camila, Dandara, Janaína, Livia e Raquel; e, *iii)* na FUNED: Aristeu, Camila, Fábio, Fernanda, Graziela, Julia, Juliana, Mariana, Milene, Pedro, Pollyanne, Rayanne, Tayara, Thais e Vinicius; pela presteza e por compartilharem suas experiências no laboratório.

Agradeço a Fabiana M. Barbosa, Kátia M. F. de Souza, Lilian B. Brécia, Marluce R. G. Petinelli e Paulete M. P. Gerken pelo suporte nos assuntos de secretária da pós-graduação.

Agradeço a minha família e amigos pelo apoio.

Muito obrigado a todos!

Resumo

Este trabalho apresenta os resultados de síntese, determinação de constante inibitória, valores de CI_{50} , mecanismo cinético e *docking* molecular de quinze novos dímeros de tacrina em relação à colinesterases; e os resultados de avaliação de atividade antiproliferativa das novas moléculas para dez linhagens celulares representativas bem como de *docking* molecular em relação a possíveis alvos biomoleculares.

Os dímeros de tacrina foram obtidos com bons rendimentos (78% em média), sendo o menor rendimento (43%) para o composto **24** (espaçador naftalênico) e o maior rendimento (98%) para o composto **21** (espaçador benzidínico). Os bons rendimentos podem ser entendidos em termos da ativação da reação de substituição nucleofílica aromática pelo nitrogênio piridínico. Além disso, a disponibilidade de par eletrônico não ligante da amina espaçadora associado ao quesito de orientação molecular adequada no momento de reação parecem importantes para o rendimento das reações, onde efeitos de impedimento estérico e de restrição conformacional parecem determinar a ocorrência do processo. Por outro lado a cristalização é uma técnica mais efetiva na obtenção de maiores rendimentos de reação.

Nos testes enzimáticos, os dímeros obtidos mostraram-se como inibidores colinesterásicos na ordem de nanomolar. O inibidor de AChE mais potente foi o composto **15** ($K_i_{EeAChE} = 0,61$ nM) enquanto para BChE foi o composto **16** ($K_i_{hBChE} = 3,14$ nM). Dentro os dímeros com espaçadores aromáticos, a maior potência inibitória foi alcançada pelo composto **21** ($K_i_{hAChE} = 2,67$ nM), sendo este composto aquele com melhor perfil de seletividade para hAChE (44 vezes mais seletivo). Em oposição, o melhor perfil de seletividade para hBChE foi alcançado pelo dímero **25** com espaçador naftalênico (38 vezes mais seletivo). Assim, espaçadores aromáticos constituem estratégia útil para se estabelecer interações interaromáticas com a região de meia fenda da enzima, possibilitando modular a seletividade dos ligantes. Além disso, como no caso do composto **16**, a ampliação da região hidrofóbica dos dímeros de tacrina pode ampliar sua capacidade inibitória. Como a tacrina, observou-se que seus dímeros são inibidores mistos, sendo que os dados de potência relativa obtidos pela avaliação da atividade inibitória frente às colinesterases não-humanas podem ser estendidos à potência esperada às colinesterases humanas. Por último, como se observou para o composto **15**, os parâmetros de comprimento ideal (10Å) e flexibilidade estrutural dos espaçadores são indispensáveis para a efetividade de inibidores duais de colinesterases.

A avaliação de atividade antitumorigênica mostrou que os dímeros de tacrina apresentam CI_{50} médio da ordem de micromolar, sendo mais potente o composto **16** em relação à linhagem SKMEL5 ($CI_{50} < 7,5$ nM), além de ser este composto o mais potente para as linhagens IMR32, SKOV3, SKMEL2, BT549 e U87MG. Dentre os compostos com espaçadores aromáticos, o composto **26** é o de mais amplo espectro, sendo mais potente que o composto **16** para as linhagens C6, TOV21G e COLO205. A tacrina mostrou-se inativa para todas as linhagens avaliadas. Os dímeros de tacrina apresentaram-se com significativo perfil de seletividade para algumas linhagens, sendo o composto **16** mais seletivo para SKMEL5 em pelo menos uma ordem de grandeza. Por outro lado os dímeros de tacrina podem combinar citotoxicidade com

manipulação seletiva do sistema colinérgico. Além disso, os derivados de tacrina podem apresentar significativa capacidade de interação com vários alvos de DNA, além da tubulina e do transportador multidrogas, sendo que, embora essa capacidade de interação não apresente correlações simples com as atividades *in vivo*, há possibilidades de se estabelecer relações estrutura-atividade. Neste contexto, observa-se que a natureza (alquílica *versus* aromática) e o comprimento do espaçador bem como a dimensão do anel alicíclico (5, 6 ou 7 carbonos) da componente hidroacridina dos dímeros parecem estar entre os elementos que modulam a citotoxicidade dessa classe de moléculas. Isso pode ser inferido a partir da análise das variações observadas nas atividades citotóxicas dos dímeros, suas energias de interação e conformações de associação com possíveis biomoléculas.

Abstract

This work presents the synthesis of fifteen new tacrine dimers and results for K_i , IC_{50} , kinetic mechanism and molecular docking analysis in relation to cholinesterases; and the assessment results of the antitumorigenic activity of these new molecules for ten representative cell lines as well as modeling.

Tacrine dimers were obtained in good yields (78% on average) being the lowest yield (43%) for compound **24** (naphthalene spacer) and the highest yield (98%) for compound **21** (benzidinic spacer). These good yields can be understood in terms of activation of the nucleophilic aromatic substitution reaction by pyridine nitrogen. Moreover, the availability of nonbinding electron pair of the amine spacer associated to the appropriate molecular orientation at the time of reaction seem important for the efficiency of the reactions where steric effects and conformational restriction seems to determine the occurrence of the process. Moreover, crystallization is a more effective technique to obtain higher yields of reaction.

In enzymatic assays, the dimers obtained were cholinesterase inhibitors in a nanomolar order. The most potent AChE inhibitor was compound **15** ($K_{i \text{ EeAChE}} = 0.61 \text{ nM}$) whereas for BChE was compound **16** ($K_{i \text{ hBChE}} = 3.14 \text{ nM}$). Within the dimers with aromatic spacers, the highest inhibitory potency was achieved by compound **21** ($K_{i \text{ hAChE}} = 2.67 \text{ nM}$), being this compound one with better selectivity profile for hAChE (44 times more selective). In contrast, the best selectivity profile for hBChE was reached by the dimer **25** with naphthalene spacer (38 times more selective). Thus, aromatic spacers are useful strategy for establishing interaromatic interactions with the middle region of the enzyme gorge, allowing modulating the selectivity of ligands. Furthermore, as in the case of compound **16**, the expansion of the hydrophobic region of tacrine dimers can enlarge their inhibitory capacity. Similar to tacrine, it was observed that their dimers are mixed inhibitors, and performance data obtained on the evaluation of inhibitory activity against non-human cholinesterase can be extended to the expected power to human cholinesterase. Finally, as observed for compound **15**, the parameters of optimal length (10\AA) and structural flexibility of the spacers are essential to the effectiveness of cholinesterase dual inhibitors.

The antitumorigenic activity evaluation showed that the tacrine dimers have IC_{50} in the micromolar order on average, being the compound **16** the most potent ($IC_{50 \text{ SKMEL5}} < 7.5 \text{ nM}$), besides being the most potent compound for the cell lines IMR32, SKOV3, SKMEL2, BT549 and U87MG. Among the compounds with aromatic spacers, compound **26** is of broader spectrum being more potent than compound **16** for C6, TOV21G and COLO205 cell lines. Tacrine was found to be inactive in all tested cell lines. Tacrine dimers presented with significant selectivity profile for some cell lines, the compound **16** being more selective for SKMEL5 at least one order of magnitude. Moreover, tacrine dimers may combine selective cytotoxicity with cholinergic system manipulation. In addition, tacrine derivatives may have significant ability to interact with multiple DNA targets, in addition to tubulin and multidrug transporter, and, although this interaction capability not present simple correlations with *in vivo* activity,

there are possibilities for establishing structure-activity relationships. In this context, it is noted that the nature (alkyl *versus* aromatic) and spacer length and the size of the alicyclic ring (5, 6, or 7 carbons) from tetrahydroacridine component of dimers appear to be among the factors that modulate the cytotoxicity of this class of molecules. This can be inferred from the variations observed in cytotoxic activities of dimers, their interaction energies and possible association conformations with biomolecules.

Sumário

Índice de tabelas	V
Índice de esquemas.....	VI
Índice de figuras	VII
Lista de siglas, símbolos, abreviaturas e seus significados	X
Capítulo 1 – Introdução	1
1.1 - Tacrina	1
1.2 - Colinesterases.....	1
1.2.1 - Inibidores colinesterásicos	3
1.2.2 - Derivados diméricos da tacrina.....	4
1.2.3 - Estudos de inibição colinesterásica.....	5
1.3 – Derivados acridínicos e câncer.....	10
1.4 - Reação de Friedländer.....	12
1.5 - Reação de substituição nucleofílica aromática	12
1.6 - <i>Docking</i> molecular	13
1.7 – Objetivos deste trabalho	16
1.8 – Referências bibliográficas	16
Capítulo 2 - Síntese e caracterização.....	21
2.1 – Aspectos gerais.....	21
2.2 - Síntese das cloroidroacridinas.....	22
2.3 - Síntese dos dímeros de tacrina e análogos	28
2.4 - Conclusões	36
2.5 – Referências bibliográficas	36
Capítulo 3 – Avaliação de atividade inibitória colinesterásica	38
3.1 - Cinética de inibição.....	38
3.1.1 – Mecanismos cinéticos.....	38
3.1.2 – Constantes inibitórias	39
3.1.2.1 – Efeito da basicidade dos dímeros sobre seu potencial inibitório.....	40
3.1.2.2 – Análise comparativa da atividade dos dímeros sobre às enzimas hAChE e <i>Ee</i> AChE	41
3.1.2.3 – Análise comparativa da atividade da tacrina e dos dímeros sobre as enzimas ChEs.....	43
3.1.2.4 – Análise comparativa da atividade dos dímeros sobre as enzimas humanas.....	43
3.1.2.5 – Análise do efeito da variação de "n" na atividade dos dímeros	44
3.1.2.6 – Análise comparativa da atividade dos dímeros sobre as BChEs.....	44
3.1.2.7 – Efeito da mudança da fonte da enzima sobre a atividade inibitória dos dímeros	46
3.1.3 – CI_{50} dos dímeros em relação às colinesterases	46

3.1.4 – Afinidade dos dímeros pelas colinesterases acetiladas (α).....	47
3.2 - <i>Docking</i> molecular	48
3.2.1 – Acetilcolinesterase.....	48
3.2.2 – Butirilcolinesterase	52
3.3 – Conclusões e perspectivas	55
3.4 - Referências bibliográficas.....	56
Capítulo 4 – Avaliação de atividade antiproliferativa.....	60
4.1 – Atividade antiproliferativa	60
4.2 - Dímeros de tacrina e vias de sinalização celular.....	62
4.3 - Comparação entre os resultados de atividade antiproliferativa e anticolinesterásica	63
4.4 - Modelagem molecular.....	65
4.4.1 - DNA fita simples	66
4.4.2 - DNA fita dupla com possibilidade de <i>bis</i> -intercalação.....	67
4.4.3 - DNA fita dupla com monointercalação	69
4.4.4 - DNA fita dupla com ênfase na interação envolvendo a fenda menor.....	71
4.4.5 - Tetrâmero de DNA.....	73
4.4.6 - Topoisomerase II - DNA.....	74
4.4.7 - Topoisomerase I - DNA	77
4.4.8 - Tubulina	77
4.4.9 - Transportador multidroga	79
4.4.10 - Análise comparativa entre os alvos testados.....	80
4.5 – Conclusões e perspectivas	80
4.6 – Referências bibliográficas	81
Capítulo 5 - Parte experimental.....	86
5.1 - Aspectos gerais	86
5.2 - Procedimentos de síntese e caracterização.....	87
5.2.1 - Ácido antranílico.....	87
5.2.2 – Éster espirocarbinolamina	87
5.2.3 – Composto 5	88
5.2.4 - Composto 6	89
5.2.5 - Composto 7	89
5.2.6 - Composto 14	90
5.2.7 - Composto 15	91
5.2.8 - Composto 16	91
5.2.9 - Composto 17	92
5.2.10 - Composto 18	92

5.2.11 – Composto 19	93
5.2.12 - Composto 20	94
5.2.13 - Composto 21	94
5.2.14 – Composto 22	95
5.2.15 – Composto 23	96
5.2.16 – Composto 24	96
5.2.17 – Composto 25	97
5.2.18 – Composto 26	97
5.2.19 – Composto 27	98
5.2.20 – Composto 28	98
5.2.21 – Composto 29	99
5.2.22 – Composto 30	99
5.2.23 – Composto 31	100
5.3 - Procedimentos de avaliação de atividade anticolinesterásica	100
5.4 - Procedimentos de avaliação antiproliferativa	102
5.5 - Procedimentos de modelagem molecular	103
5.6 – Referências bibliográficas	103
Anexo I – Artigos publicados.....	105
Anexo II – Artigos em preparação	105
Anexo III – Trabalhos apresentados em congressos	105
Anexo IV - Espectros de IV (ATR) e RMN.....	106
AIV.1 - Ácido antranílico.....	106
AIV.2 - Éster espirocarbinolamina.....	107
AIV.3 - Composto 5	109
AIV.4 - Composto 6	110
AIV.5 - Composto 7	112
AIV.6 - Composto 14	113
AIV.7 - Composto 15	115
AIV.8 - Composto 16	116
AIV.9 - Composto 17	118
AIV.10 - Composto 18	119
AIV.11 - Composto 19	121
AIV.12 - Composto 20	122
AIV.13 - Composto 21	124
AIV.14 - Composto 22	125
AIV.15 - Composto 23	127

AIV.16 - Composto 24	128
AIV.17 - Composto 25	130
AIV.18 - Composto 26	131
AIV.19 - Composto 27	133
AIV.20 - Composto 28	134
AIV.21 - Composto 29	136
AIV.22 - Composto 30	137
AIV.23 - Composto 31	139

Índice de tabelas

Capítulo 2

Tabela 2.1- Rendimentos no preparo dos compostos 5-7	24
Tabela 2.2 - Dímeros obtidos e rendimentos de reação	29
Tabela 2.3 - Rendimentos médios (%) por tipo de espaçador e por "n"	30

Capítulo 3

Tabela 3.1 - Constantes inibitórias dos dímeros para hAChE, hBChE, <i>Ee</i> AChE, eqBChE	39
Tabela 3.2 - CI_{50} dos dímeros em relação às enzimas hAChE, hBChE, <i>Ee</i> AChE, eqBChE	46
Tabela 3.3 - Valores de α para as interações estudadas neste trabalho	47

Capítulo 4

Tabela 4.1 - Atividade antiproliferativa dos dímeros de tacrina: CI_{50}	60
Tabela 4.2 - Constantes inibitórias dos dímeros em relação às hChEs	64
Tabela 4.3 – Possíveis alvos moleculares para bioligantes com atividade antitumorigênica	65
Tabela 4.4 - Energias de formação do complexo "DNA fita simples" - dímero	66
Tabela 4.5 - Energias de formação do complexo "DNA fita dupla" - dímero	67
Tabela 4.6 - Energias de formação do complexo "DNA fita dupla" - dímero	70
Tabela 4.7 - Energias de formação do complexo "fenda menor do DNA" - dímero	71
Tabela 4.8 – Energias de formação do complexo "fenda menor do DNA" - composto 29 e derivado	72
Tabela 4.9 – Energias de formação do complexo "tetrâmero de DNA" - dímero	74
Tabela 4.10 - Energias de formação do complexo "Topo II:DNA" - dímero	75
Tabela 4.11 - Energias de formação do complexo "Topo I:DNA" - dímero	77
Tabela 4.12 – Energias de formação do complexo Tubulina - dímero	78
Tabela 4.13 – Energias de formação do complexo MDR - dímero	80

Índice de esquemas

Capítulo 1

Esquema 1.1 – Hidrólise de acetilcolina assistida por colinesterase.....	1
Esquema 1.2 - Dimerização da tacrina.....	4
Esquema 1.3 - Equilíbrio de dissociação do complexo Enzima-Inibidor (EI). E: Enzima. I: Inibidor.....	5
Esquema 1.4 - Aspectos químicos do método do DTNB.....	6
Esquema 1.5 - Equilíbrios envolvidos na ação enzimática e sua inibição [42].....	7
Esquema 1.6 – Conversão de MTT por redutase mitocondrial.....	11
Esquema 1.7 - Reação de Friedländer. R ¹ -R ⁴ podem ser hidrogênio, alquila, arila ou halogênio.....	12
Esquema 1.8 – Propostas de mecanismos para a reação de Friedländer.....	12
Esquema 1.9 - Mecanismo de adição-eliminação para substituição nucleofílica aromática.....	13

Capítulo 2

Esquema 2.1- Rota de síntese adotada para a obtenção dos dímeros de tacrina.....	21
Esquema 2.2 – Obtenção de ácido antranílico a partir da hidrólise básica de <i>o</i> -aminobenzonitrila.....	22
Esquema 2.3 - Proposta de mecanismo para a reação de hidrólise básica de nitrila.....	22
Esquema 2.4 – Síntese das cloridroacridinas (5-7).	23
Esquema 2.5 - Síntese de cloridroacridinas em duas etapas.....	23
Esquema 2.6 - Proposta de mecanismo para formação do composto 6	24
Esquema 2.7 - Mecanismo para formação do espiro.....	25
Esquema 2.8 - Síntese de dímeros de tacrina e análogos.....	28
Esquema 2.9 - Proposta de mecanismo para a síntese do composto 18	28
Esquema 2.10 - Contribuintes de ressonância não simétricos da diamina naftalênica 11	30

Capítulo 3

Esquema 3.1 - Possíveis relações de equilíbrio que envolvem o sistema enzima-substrato-inibidor.....	47
--	----

Capítulo 4

Esquema 4.1 - Derivação do composto 29 com introdução de grupo amida no espaçador.....	72
---	----

Índice de figuras

Capítulo 1

Figura 1.1 - Fórmula estrutural da tacrina.	1
Figura 1.2 - <i>Cartoon</i> da estrutura de raios-X da AChE.....	2
Figura 1.3 - Alguns dos inibidores colinesterásicos em uso na clínica.	3
Figura 1.4 - Dímeros de tacrina.	4
Figura 1.5 - Curva de dose-resposta para determinação de CI_{50}	6
Figura 1.6 - Curvas cinéticas a diferentes concentrações de substrato e de inibidor.	7
Figura 1.7 - Possíveis mecanismos de inibição enzimática.....	8
Figura 1.8 - Padrões gráficos para os mecanismos: A - Competitivo; B - Misto; C - Incompetitivo.	8
Figura 1.9 - Métodos gráficos para determinação de K_i e α	9
Figura 1.10 - Avaliação cinética de local de ligação durante inibição enzimática.....	9
Figura 1.11 - Estrutura de raios-X de derivado acridínico intercalando o DNA.....	10
Figura 1.12 - Placa de cultivo de 96 poços para leitura após aplicação de MTT [59].	11
Figura 1.13 - Descrição geral dos métodos para o planejamento de novos ligantes [67].	13
Figura 1.14 - Percentual de citações de programas de <i>docking</i> molecular no <i>Web of Science</i> [70].....	14
Figura 1.15 - Mudanças interacionais inter- e intramoleculares avaliadas no <i>docking</i> [73].	15
Figura 1.16 – Dímeros deste trabalho.	16

Capítulo 2

Figura 2.1 - Diaminas utilizadas na síntese dos dímeros de tacrina.	21
Figura 2.2 - Modelo com superfícies de van der Waals para os compostos do tipo espiro.	24
Figura 2.3 - Espectro IV do composto 6	26
Figura 2.4 - Espectro de RMN de 1H do composto 6	26
Figura 2.5 - Espectro de RMN de ^{13}C e subespectro DEPT 135 do composto 6	27
Figura 2.6 - Espectro IV do composto 21	31
Figura 2.7 - Espectro de RMN de 1H do composto 21	32
Figura 2.8 - Expansão do espectro de RMN de 1H do composto 21	32
Figura 2.9 - Expansão do RMN de 1H do composto 21	33
Figura 2.10 - Espectro de RMN de ^{13}C e subespectro DEPT 135 do composto 21	34
Figura 2.11 - Representação ORTEP da estrutura de raios-X do composto 21	34
Figura 2.12 - Expansão da estrutura cristalina do composto 21	35
Figura 2.13 - Distâncias interatômicas e intermoleculares medidas por raios-X para o composto 21	35

Capítulo 3

Figura 3.1 – Sobreposição dos duplos recíprocos para o composto 21 em relação à hAChE.	38
Figura 3.2 – Tacrina na fenda catalítica de <i>TcAChE</i>	40
Figura 3.3 – Diferenças entre resíduos de aminoácidos de hAChE e <i>EeAChE</i>	42
Figura 3.4 – Região de <i>back door</i> de hAChE e <i>EeAChE</i>	42
Figura 3.5 – Sobreposição das estruturas de hBChE e eqBChE..	45
Figura 3.6 – Análise cinética de Yonetani-Theorell à 4,3 nM em THA para o composto 18	48
Figura 3.7 - Conformação de ligação do composto 21 na fenda de <i>TcAChE</i>	49
Figura 3.8 – Isômeros de TZ2PA6 e composto 18 na fenda de AChE.	50
Figura 3.9 – Edrofônio e composto 18 na fenda de AChE.	52
Figura 3.10 - Conformação de interação do composto 21 na fenda de hBChE.	52
Figura 3.11 - Composto 30 na fenda de hBChE.	53
Figura 3.12 - Composto 16 na fenda de hBChE.	54

Capítulo 4

Figura 4.1 - Vias de sinalização celular.	63
Figura 4.2 - Ligante pertencente ao complexo 452D.	66
Figura 4.3 - Conformação de ligação do composto 16 ao DNA fita simples.	66
Figura 4.4 - Ligante <i>bis</i> -intercalante pertencente ao complexo 1CX3.	67
Figura 4.5 - Conformação de ligação do composto 26	68
Figura 4.6 - Ligação em <i>threading</i> sugerida para os compostos 20 e 23	69
Figura 4.7 - Ligante de monointercalação pertencente ao complexo 2KY7.	69
Figura 4.8 - Conformação de ligação do composto 26 no modelo de monointercalação.	70
Figura 4.9 - Ligantes originais dos complexos 2K4L e 1ZPH.	71
Figura 4.10 - Composto 29 e derivado amida em ligação às estruturas 2K4L e 1ZPH.	73
Figura 4.11 - Ligante acridínico presente no complexo 3EUM.	73
Figura 4.12 - Conformação de ligação sugerida para o composto 20	74
Figura 4.13 - Etoposídeo.	75
Figura 4.14 - Ligantes dos complexos 4BUL e 4G0U.	75
Figura 4.15 - Conformação de ligação do composto 16 no complexo com Topo II - DNA.	76
Figura 4.16 - Camptotecina.	77
Figura 4.17 - Podofilotoxina.	78
Figura 4.18 - Conformação de ligação do composto 26 no dímero $\alpha\beta$ -tubulina.	79

Capítulo 5

Figura 5.2.1 – Representação ORTEP da estrutura de raios-X do composto 18.	93
Figura 5.2.2 - Representação ORTEP da estrutura de raios-X do composto 21.	95

Lista de siglas, símbolos, abreviaturas e seus significados

ACh	Acetilcolina
AChEI	Inibidor de acetilcolinesterase
hAChE	Acetilcolinesterase humana
TcAChE	Acetilcolinesterase de <i>Torpedo californica</i>
AD	AutoDock
ADV	AutoDock Vina
ADT	AutoDock Tools
ALA	Resíduo de alanina
ASN	Resíduo de asparagina
ASP	Resíduo de aspartato
ARG	Resíduo de arginina
ATR	Reflectância total atenuada
hBChE	Butirilcolinesterase humana
CCD	Dispositivo de carga acoplada
CD ₃ OD	Metanol deuterado
ChEs	Colinesterases
CI ₅₀	Concentração que inibe a taxa de atividade ou de crescimento em 50%
CR	Composto de referência, original da estrutura de raios-X
d	Dupleto
δ	Deslocamento químico
DEPT 135	Intensificação sem distorção por transferência de polarização
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DTNB	Ácido 5,5'-ditio- <i>bis</i> -2-nitrobenzoico
<i>Ee</i>	<i>Electrophorus eel</i>
eq	Referente à enzima de origem eqüina
FDA	Administração de alimentos e medicamentos dos Estados Unidos
FUNED	Fundação Ezequiel Dias
GLU	Resíduo de glutamato
GLY	Resíduo de glicina
h	Referente à enzima de origem humana
HIS	Resíduo de histidina
Hz	Hertz
ICs	Inibidores colinesterásicos

ILE	Resíduo de isoleucina
ITC	Calorimetria de titulação isotérmica
IV	Infravermelho
<i>J</i>	Constante de acoplamento <i>spin-spin</i>
kcal	Quilocaloria
K_i	Constante inibitória ou de dissociação
K_m	Constante de Michaelis-Menten
LEU	Resíduo de leucina
λ	Comprimento de onda
m	Multiplete
μM	micro molar (10^{-6} mol/L)
nM	nano molar (10^{-9} mol/L)
MHz	Mega Hertz (10^6 Hertz)
MTT	Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazola
ORTEP	<i>Oak Ridge Thermal Ellipsoid Plot</i>
PRO	Resíduo de prolina
PA	Para análise
PBS	Tampão salino de fosfato pH 7,4
PDB	Banco de dados de proteínas
PHE	Resíduo de fenilalanina
ppm	Parte por milhão
qu	Quinteto
QSAR	Relação quantitativa entre estrutura e atividade
RMN de ^{13}C	Ressonância Magnética Nuclear de Carbono 13
RMN de ^1H	Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio
s	Simpleto
SCA	Subsítio catalítico aniônico
SER	Resíduo de serina
SPA	Subsítio periférico aniônico
t	Triplete
τ	Proteína Tau
<i>Tc</i>	<i>Torpedo californica</i>
TFA	Ácido trifluoracético
TMS	Tetrametilsilano
THA	Tacrina

THF	Tetraidrofurano
THR	Resíduo de treonina
TRP	Resíduo de triptofano
TYR	Resíduo de tirosina
VAL	Resíduo de valina
V_{max}	Velocidade máxima de uma reação catalisada por enzima
1ACJ	Estrutura de <i>TcAChE</i> complexada com tacrina obtida por raios-X
1B41	Estrutura de hAChE obtida por raios-X
1C2O	Estrutura de <i>EeAChE</i> obtida por raios-X
1EVE	Estrutura de <i>TcAChE</i> complexada com donepezil obtida por raios-X
1E66	Estrutura de <i>TcAChE</i> complexada com huprina X obtida por raios-X
1P0I	Estrutura de hBChE obtida por raios-X
2CKM	Estrutura de <i>TcAChE</i> complexada com <i>bis-7-THA</i> obtida por raios-X
3LII	Estrutura de hAChE mutante nativa obtida por raios-X

Capítulo 1 – Introdução

1.1 - Tacrina

A tacrina (THA) é uma tetraidroacridina que possui um grupo amina substituinte na posição 9 (Figura 1.1). Essa substituição constitui elemento estrutural significativo para que a forma molecular protonada, que possui um hidrogênio ligado ao nitrogênio piridínico, predomine nas condições de pH fisiológico, fato importante para sua farmacologia [1].

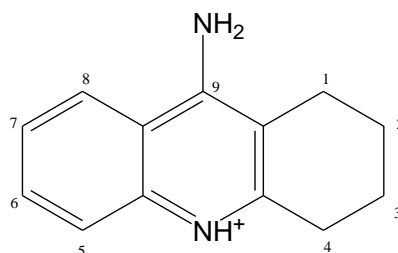
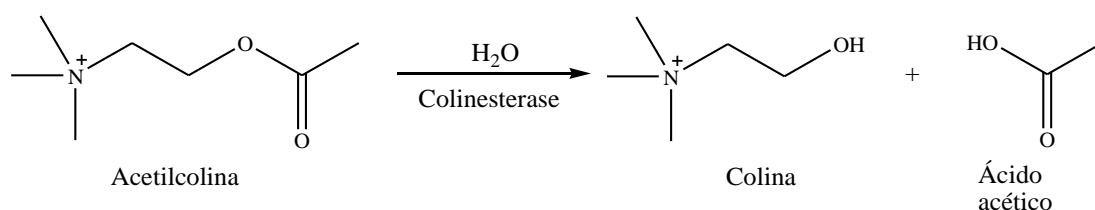


Figura 1.1 - Fórmula estrutural da tacrina em pH 7.

A THA foi sintetizada pela primeira vez em 1945 por Albert e Gledhil, os quais avaliavam o efeito de modificações bioisostéricas na atividade antibacteriana de derivados acridínicos [2]. Desde então, a THA tem sido avaliada no contexto de quadros clínicos de interesse, tais como, aqueles associados à doenças neurodegenerativas, *overdose*, doenças causadas por bactérias, dentre outros, mostrando assim, habilidade de modular a atividade de vários alvos biomoleculares, dentre os quais, as colinesterases são um dos mais significativos [3,4,5].

1.2 - Colinesterases

As colinesterases (ChEs) estão envolvidas primariamente no término da transmissão sináptica pela hidrólise do neurotransmissor acetilcolina (Esquema 1.1).



Esquema 1.1 – Hidrólise de acetilcolina assistida por colinesterase.

A maioria dos organismos possuem dois tipos de ChEs: acetilcolinesterase (AChE) e butirilcolinesterase (BChE) [6]. A primeira é seletiva para acetilcolina, enquanto a segunda possui ação hidrolítica sobre uma variedade de ésteres, dentre os quais ressalta-se a butirilcolina, cuja hidrólise é catalisada mais eficientemente pela BChE [7]. As ChEs pertencem ao seletivo grupo das enzimas ditas cataliticamente

perfeitas, que possuem sua ação limitada pelo processo de difusão [8-10]. Esse fato associado à importância biológica dessas enzimas têm despertado grande interesse da comunidade científica. Desta forma, inúmeros estudos de titulação por fluorescência, marcação química e mutagênese sítio-dirigida têm possibilitado uma crescente compreensão dos mecanismos moleculares envolvidos na ação hidrolítica dessas biomoléculas (Esquema 1.1, pág. 1) [11]. Em 1991, o grupo dos professores Joel Sussman e Israel Silman publicaram a elucidação estrutural por raios-X da AChE (Figura 1.2) [12].

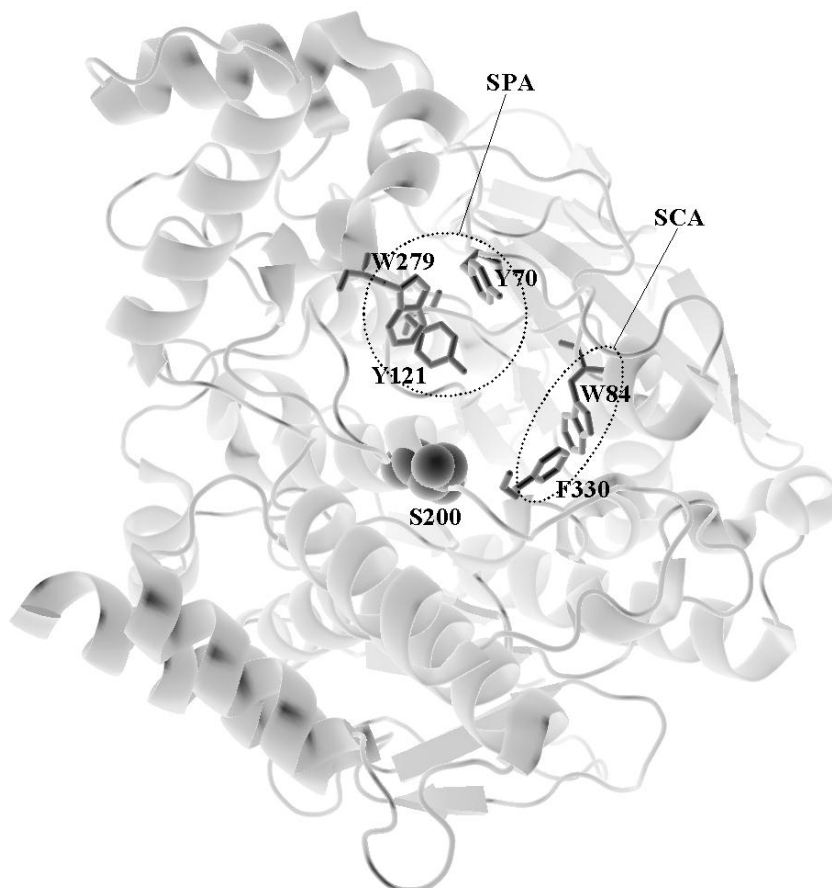


Figura 1.2 - *Cartoon* da estrutura de raios-X da AChE. SPA: Subsítio periférico aniônico. SCA: Subsítio catalítico aniônico.

Na Figura 1.2 podemos observar o padrão estrutural de alfa beta hidrolase da AChE. Ao centro em modelo espaço cheio (superfície de van der Waals) mostra-se o resíduo catalítico de serina (S200). Além disso, duas outras regiões da fenda catalítica das ChEs são ressaltadas. A primeira que corresponde à entrada da fenda da enzima é constituída na AChE pelos resíduos W279, Y121 e Y70. Essa região é conhecida como subsítio periférico aniônico (SPA). A segunda região é formada pelos resíduos W84 e F330, sendo conhecida como subsítio catalítico aniônico (SCA). Esses dois subsítios são importantes no contexto do desenvolvimento de inibidores colinesterásicos conforme será apresentado nas seções seguintes deste texto. Em 2003 Yvain Nicolet e colaboradores obtiveram a estrutura molecular da BChE [13], verificando que o padrão estrutural é semelhante ao de AChE, diferindo essencialmente na composição de aminoácidos que recobrem a fenda catalítica. Atualmente, as estruturas cristalográficas de vários complexos envolvendo essas enzimas são conhecidas [14].

1.2.1 - Inibidores colinesterásicos

Os compostos com habilidade de reduzir a atividade catalítica das ChEs são significativamente estratégicos. Além de proporcionar a redução na deficiência cognitiva e de memória bem como das más condições psiquiátricas de doentes de Alzheimer, tais como apatia e alucinações visuais [15], os inibidores colinesterásicos (ICs) têm proporcionado resultados terapêuticos significativos no contexto de outras desordens cognitivas, tais como doença de Parkinson, doença com corpos de Lewy, demência vascular, injúria traumática cerebral e desordem cognitiva em esclerose múltipla [16-21]. Mais que isso essa classe de compostos têm sido capaz de anular o efeito causado por entorpecentes, podendo ser aplicados como co-fármaco no tratamento de dependentes químicos [22]. Além disso, os ICs têm sido utilizados no tratamento de glaucoma, miastênia gravis e como reativador colinesterásico nos casos de envenenamento por compostos organofosforados. Neste último caso, o grupo fosfato da fosfo-enzima inativa é atacado via reação de substituição pelo IC, resultando em um derivado fosforado do inibidor e na enzima ativa, restaurada [23]. Por outro lado, o desenvolvimento de ICs é importante na investigação do papel da alteração da transmissão colinérgica em patologias de um modo geral [24,25]. A Figura 1.3 mostra alguns dos ICs usados na clínica.

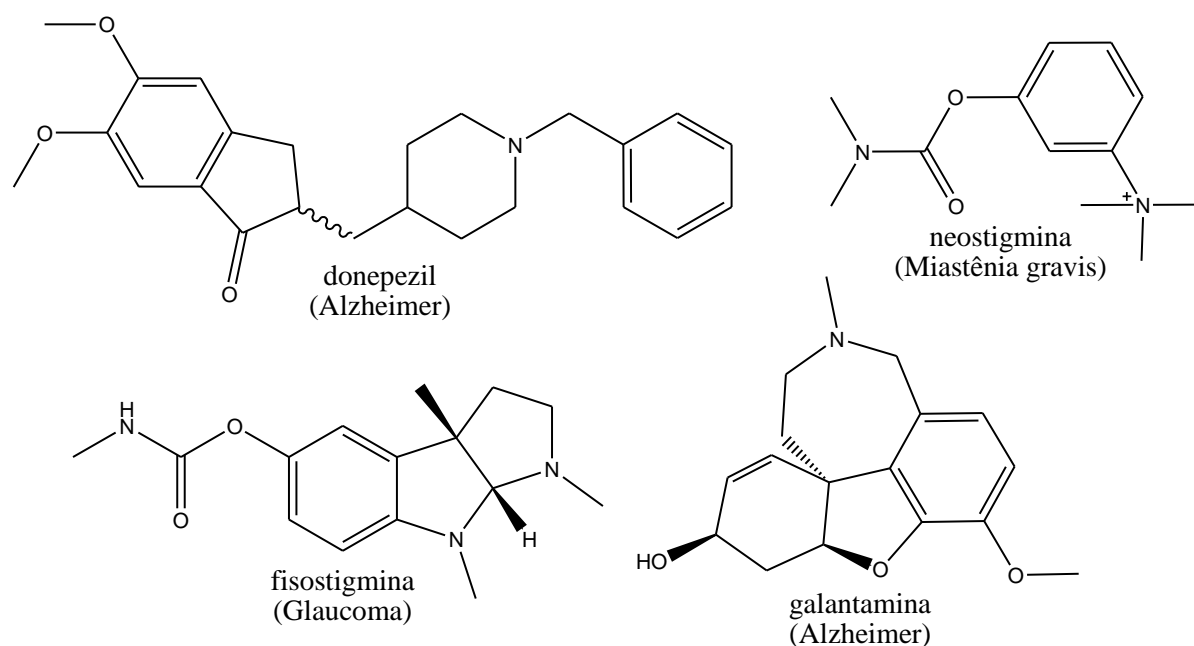
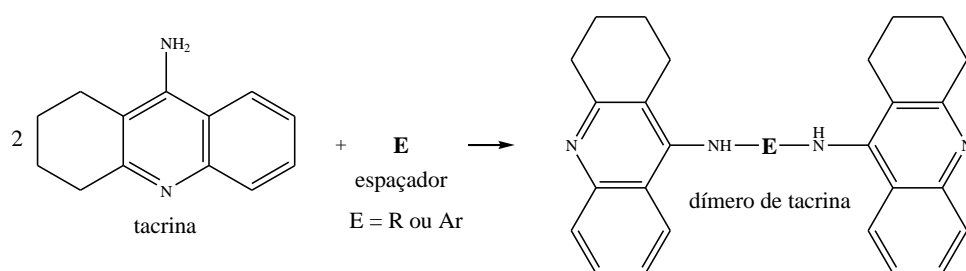


Figura 1.3 - Alguns dos inibidores colinesterásicos em uso na clínica.

Dos compostos mostrados na Figura 1.3, a galantamina e o donepezil são inibidores colinesterásicos reversíveis. Este último na sua associação com a enzima interage tanto com os resíduos da região SPA quanto com aqueles da região SCA (Figura 1.2, pág. 2) [26]. Em contrapartida, a fisostigmina e a neostigmina são inibidores pseudo-irreversíveis que reagem quimicamente com a hidroxila de S200, processo cuja reversão se dá de forma lenta [27].

1.2.2 - Derivados diméricos da tacrina

A tacrina foi o primeiro fármaco aprovado pelo FDA para tratamento da doença de Alzheimer [28]. Apesar do uso clínico dessa substância, a ocorrência de efeitos colaterais hepatotóxicos tem motivado o desenvolvimento de análogos visando melhorar o perfil farmacocinético dessa classe de substâncias [29]. Nesse contexto, uma das estratégias mais promissoras é a de dimerização da tacrina, a qual segue usualmente o padrão mostrado no Esquema 1.2, no qual **E** geralmente é uma cadeia alquílica linear conforme exemplifica a Figura 1.4.



Esquema 1.2 - Dimerização da tacrina.

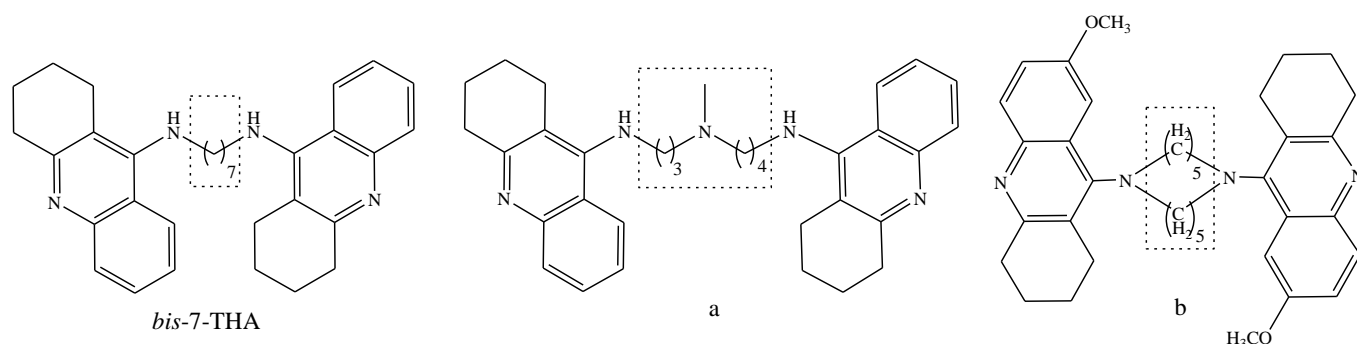


Figura 1.4 - Dímeros de tacrina [30-32].

O sucesso da estratégia de dimerização da tacrina se fundamenta no fato de que as ChEs possuem na sua fenda catalítica dois sítios interacionais (SCA e SPA, Figura 1.2, pág. 2), os quais apresentam individualmente significativa afinidade pela tacrina e análogos. Assim, o alcance simultâneo dos dois sítios por um ligante resulta em maior afinidade pela enzima [30]. A *bis-7-THA* (Figura 1.4) foi o primeiro dímero de tacrina sintetizado. Enquanto o K_i da tacrina em relação à AChE é de 80 nM, a *bis-7-THA* apresentou para o mesmo alvo K_i de 1,4 nM. Esses resultados sugerem que nas mesmas condições, a enzima avaliada é mais inibida pelo dímero. Uma das implicações esperadas naturalmente é a redução da dose necessária para alcançar os efeitos terapêuticos desejados [31]. Algumas variações na natureza química do espaçador são ressaltadas pelo contorno pontilhado na Figura 1.4. Nesse contexto são exemplificados espaçadores de natureza alquílica homogênea (*bis-7-THA* e **b**) e de natureza alquílica com heteroátomo de nitrogênio (amina terciária) (**a**). Além da dimerização em si e em decorrência da adoção da mesma, a estratégia de variação na natureza química do espaçador também tem sido adotada

com o intuito de se melhorar o perfil farmacodinâmico dos dímeros de tacrina através do alcance de interações extras na região catalítica das ChEs. Um exemplo é dado pelo composto **a** da Figura 1.4 (pág. 4) que possui K_i de 0,01 nM em relação à AChE. Esse ganho de potência em relação à *bis-7*-THA é racionalizado como resultante de interação iônica que ocorre entre a amina protonada do ligante e um resíduo de aminoácido carregado negativamente que pertence à região da fenda catalítica do receptor, a qual situa-se entre os pontos de interação das componentes tacrina do ligante [31,33]. Assim, efeitos de aumento de potência bem como de especificidade têm sido obtidos a partir da exploração de interações específicas entre os espaçadores dos dímeros e a região de meia fenda do sítio catalítico das ChEs. Embora haja vários trabalhos de produção de derivados diméricos de tacrina com vistas à inibição colinesterásica, praticamente inexistem estudos sistemáticos sobre o uso de espaçadores aromáticos e seus efeitos na potência de inibição e no mecanismo cinético dos dímeros de tacrina. Considerando que a região de meia fenda do sítio catalítico das ChEs é rica em resíduos de aminoácidos aromáticos, o uso de espaçadores aromáticos pode resultar em interações interaromáticas que ampliem a afinidade desses ligantes pelas ChEs [12]. Outro aspecto pouco explorado é o do efeito que variações no volume do anel alicíclico da tacrina têm sobre seu potencial e mecanismos cinéticos. Esse fato é reforçado pela quantidade limitada de informações relacionadas com o papel que interações fracas tem na ação de bioligantes [34-36].

1.2.3 - Estudos de inibição colinesterásica

A capacidade inibitória de um composto em relação à atividade de um biocatalisador pode ser expressa pelo CI_{50} ou pela constante inibitória (K_i). O primeiro expressa a concentração do inibidor necessária para reduzir em 50% a atividade catalítica da enzima enquanto K_i é a constante do equilíbrio de dissociação mostrado no Esquema 1.3 [37].



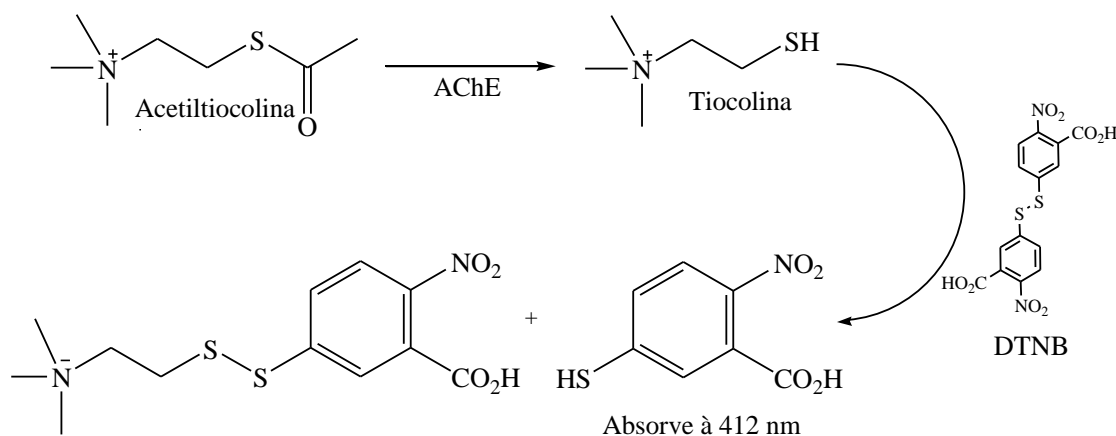
Esquema 1.3 - Equilíbrio de dissociação do complexo Enzima-Inibidor (EI). E: Enzima. I: Inibidor.

Assim, quanto mais potente o inibidor menor será a concentração de I e portanto menor será o valor de K_i . Os inibidores considerados potentes possuem valores de K_i na ordem de 10^{-9} M embora sejam relatados casos de até 10^{-15} M [31,38]. A energia livre de Gibbs padrão (ΔG°) para o processo de ligação relaciona-se com K_i conforme mostrado na Equação 1.1 [35].

$$\Delta G^\circ = -RT \ln K_i \quad (1.1)$$

Onde R é a constante dos gases e T a temperatura. Os parâmetros CI_{50} e K_i podem ser determinados a partir de medidas de variação da absorvância do meio de reação devido à variação da concentração de uma espécie de referência [7]. Para os estudos de inibição colinesterásica deste trabalho a substância de

referência foi um derivado do DTNB (ácido 5,5'-ditio-*bis*-2-nitrobenzoico), sendo substratos-modelo a acetiltiocolina e a butiriltiocolina. Estes, após hidrólise, reagem com o DTNB gerando um produto que absorve à 412 nm (Esquema 1.4).



Esquema 1.4 - Aspectos químicos do método do DTNB.

As atividades enzimáticas a diferentes concentrações do inibidor inferidas das medidas espectrofotométricas possibilitam a obtenção das curvas de dose-reposta tal como exemplifica a Figura 1.5.

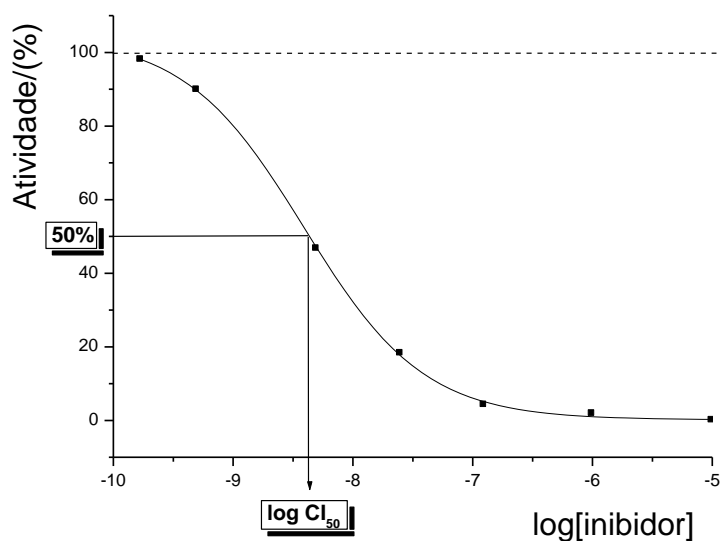


Figura 1.5 - Curva de dose-resposta para determinação de CI_{50} .

Na Figura 1.5 a concentração do inibidor é expressa através de seu logaritmo, o que possibilita uma regressão sigmoideal dos dados e a obtenção do valor de CI_{50} [37].

Para determinação das constantes cinéticas e de ligação, os dados são tratados conforme os modelos derivados da cinética enzimática, cujos fundamentos foram propostos por Michaelis-Menten [39,40]. Neste sentido são construídas as curvas que relacionam velocidade com concentração do substrato à diferentes concentrações do inibidor, Figura 1.6 (pág. 7).

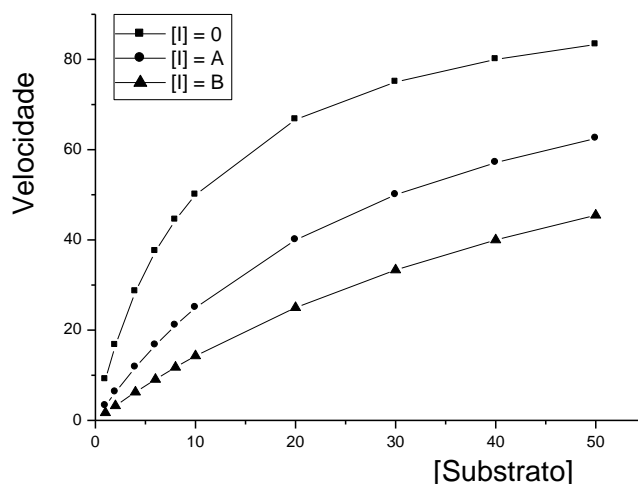


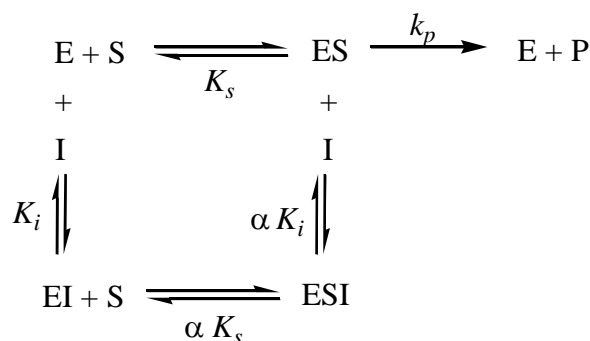
Figura 1.6 - Curvas cinéticas a diferentes concentrações de substrato e de inibidor.

Os dados são submetidos à regressão que visa o ajuste aos modelos sumariados nas Equações 1.2 e 1.3 [41].

$$v = \frac{V_{max}[S]}{K_m + [S]} \quad (1.2)$$

$$v = \frac{V_{max}[S]}{[S] \left(1 + \frac{[I]}{\alpha K_i} \right) + K_m \left(1 + \frac{[I]}{K_i} \right)} \quad (1.3)$$

Onde V_{max} representa a velocidade máxima da reação catalisada, $[S]$ representa a concentração do substrato nas condições do experimento, $[I]$ a concentração do inibidor e α o parâmetro de alteração das constantes de ligação conforme se depende do Esquema 1.5.



Esquema 1.5 - Equilíbrios envolvidos na ação enzimática e sua inibição [42].

K_s significa a constante de ligação do substrato à enzima e k_p a constante cinética de formação do produto. No caso dos estudos enzimáticos realizados neste trabalho, os produtos (P) seriam tiocolina e ácido acético para AChE ou ácido butírico para BChE.

Os inibidores enzimáticos não-covalentes podem apresentar um de três tipos de mecanismos de inibição reversível: competitiva, mista ou incompetitiva [43]. Esses mecanismos são distintos quanto à sequência de ligação do inibidor e do substrato à enzima (Figura 1.7, pág. 8).

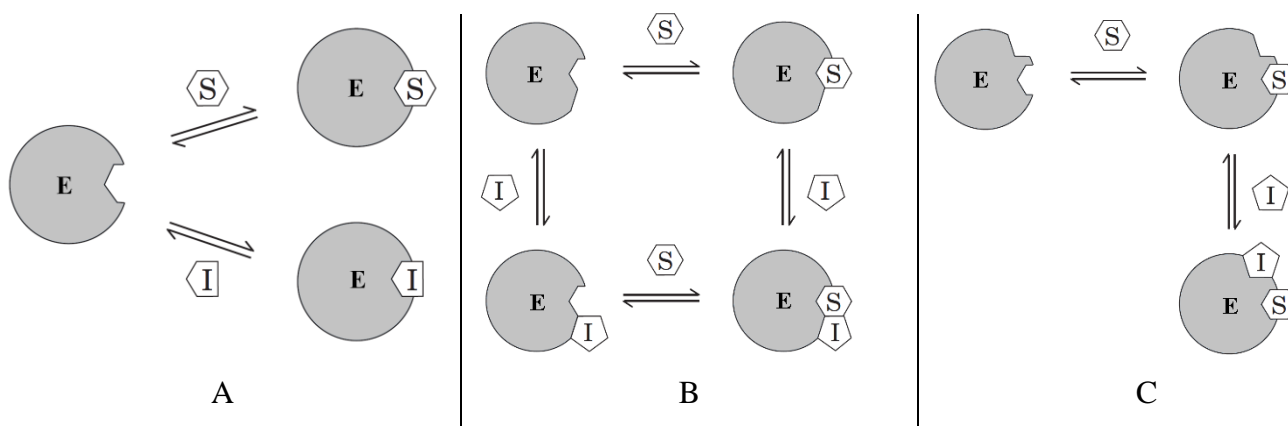


Figura 1.7 - Possíveis mecanismos de inibição enzimática: A – Competitiva; B – Mista; C – Incompetitiva. E: Enzima. S: Substrato. I: Inibidor.

Pela Figura 1.7 vemos que na inibição competitiva (A) a ligação do substrato (S) à enzima (E) exclui a ligação do inibidor (I) e vice-versa. No caso da inibição do tipo mista (B) a ligação de S ou I não é mutuamente excludente visto que ambos não competem entre si pelo mesmo sítio no receptor. Já na inibição do tipo incompetitiva o inibidor se liga exclusivamente ao complexo ES, o que evidencia o caráter sequencial deste mecanismo inibitório. O conhecimento dos mecanismos cinéticos de inibição consiste em ferramenta de estudo para compreensão da forma de ação das enzimas além de possibilitar significativas informações para o desenvolvimento de novos bioligantes com afinidades e formas de ligação diferenciadas [44].

Os mecanismos de inibição podem ser determinados a partir de gráficos dos inversos de velocidade em função dos inversos de concentração do substrato à diferentes concentrações do inibidor, conforme mostrado na Figura 1.8. Esses gráficos são conhecidos como curvas de Lineweaver-Burk [45].

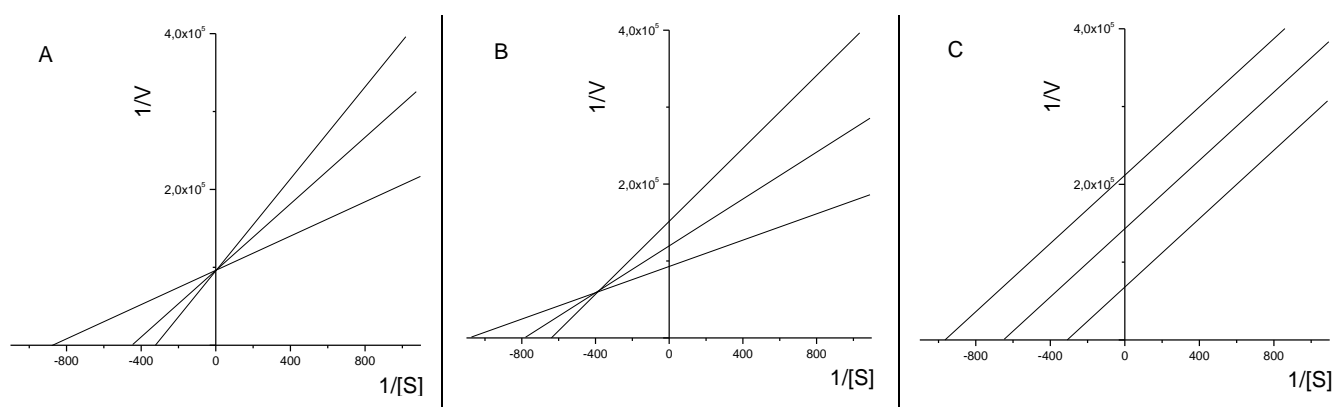


Figura 1.8 - Padrões gráficos para os mecanismos: A - Competitivo; B - Misto; C - Incompetitivo.

As curvas apresentadas na Figura 1.8 podem ser descritas algebricamente por recíprocas de equações como a Equação 1.3 (pág. 7). Um exemplo é mostrado na Equação 1.4 (pág. 9).

$$\frac{1}{v} = \left(1 + \frac{[I]}{K_i}\right) \left(\frac{K_m}{V_{max}} \frac{1}{[S]}\right) + \frac{1 + \frac{[I]}{\alpha K_i}}{V_{max}} \quad (1.4)$$

Dos gráficos mostrados na Figura 1.8 (pág. 8), os valores dos interceptos no eixo das ordenadas e das inclinações das retas, à diferentes concentrações do inibidor, possibilitam a determinação de parâmetros de ligação do inibidor à enzima como a constante inibitória K_i e a constante α , conforme ilustra a Figura 1.9 [46].

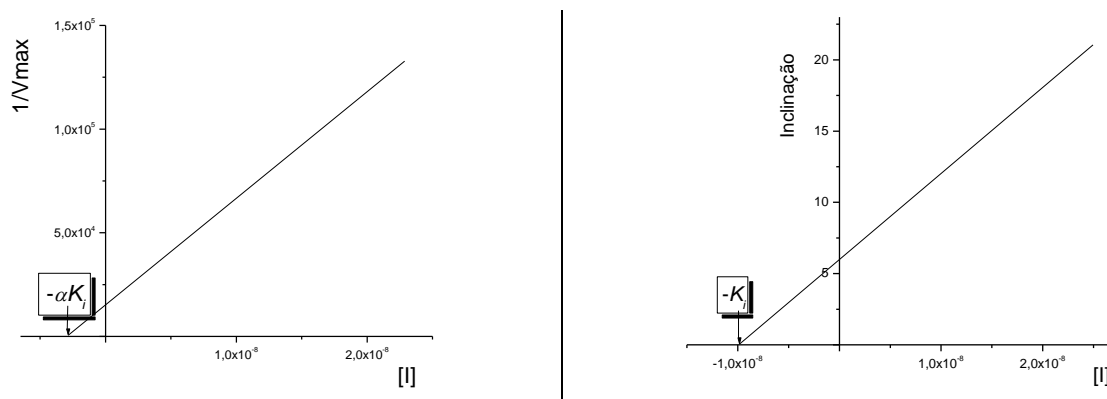


Figura 1.9 - Métodos gráficos para determinação de K_i e α .

Na modelagem molecular uma das informações mais importantes refere-se ao local de interação do ligante na biomolécula. Essa informação tanto simplifica quanto amplia a qualidade da análise. No caso de ligantes inéditos essa informação pode ser obtida indiretamente através de medidas cinéticas como as mencionadas acima. Neste caso, realiza-se um procedimento experimental no qual a enzima é inibida simultaneamente por dois inibidores: um com local de interação conhecido e outro com local de interação desconhecido. As curvas que surgem deste experimento permitem distinguir se as duas moléculas competem ou não entre si [47]. A Figura 1.10 traz exemplos. Neste trabalho foram realizados experimentos tomando como referência a tacrina, cuja estrutura de raios-X é conhecida.

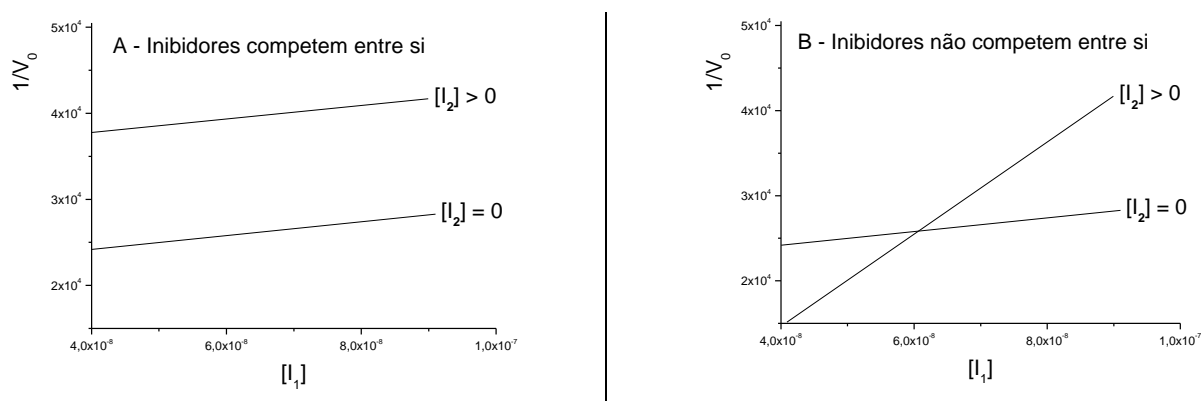


Figura 1.10 - Avaliação cinética de local de ligação durante inibição enzimática.

1.3 – Derivados acridínicos e câncer

O câncer consiste na multiplicação exacerbada de células, a qual pode ser resultante de falhas nos mecanismos de controle do ciclo celular [48]. Com vistas a reverter essa condição, moléculas com habilidade de intercalar o DNA têm sido usadas com sucesso. Um exemplo dessa classe de substâncias são os derivados de acridina, análogos da tacrina [49]. A Figura 1.11 ilustra a forma de ligação ao DNA de um derivado acridínico [50].

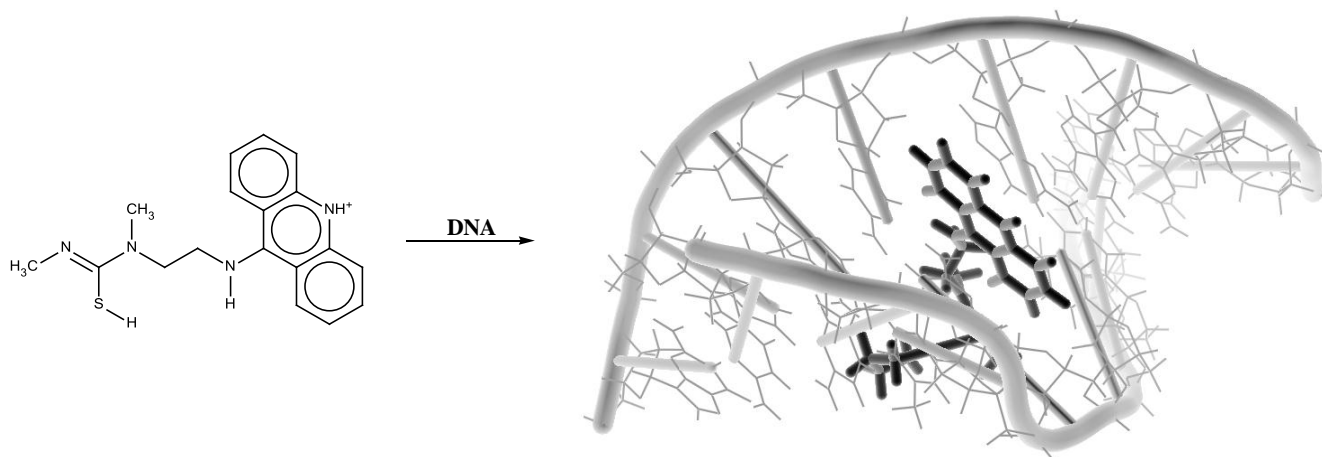
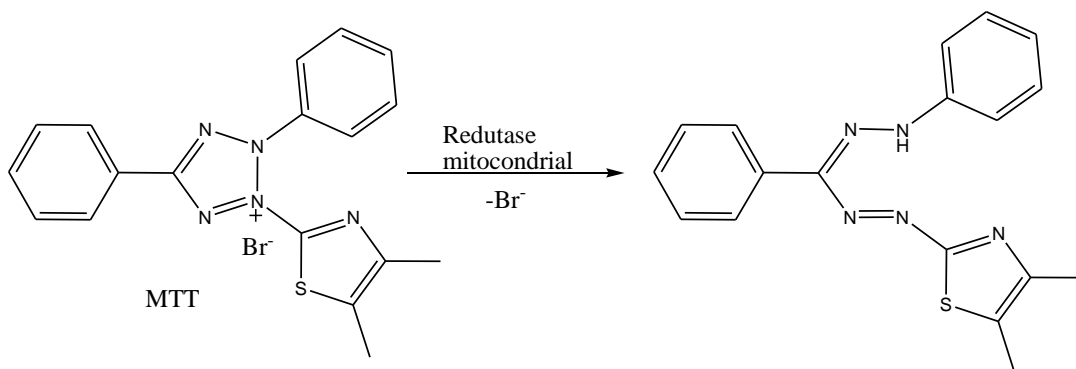


Figura 1.11 - Estrutura de raios-X de derivado acridínico intercalando o DNA.

Na Figura 1.11 a fração acridina projeta-se entre os pares de bases nitrogenadas do ácido nucléico gerando um complexo, fato que pode resultar na alteração de processos dependentes do DNA [51,52]. Dentre os derivados de acridina, as hidroacridinas, tais como a tacrina (Figura 1.1, pág. 1), têm sido avaliadas com relativo sucesso como antiproliferativo [53]. Além do DNA em si, outros complexos moleculares que envolvem o DNA tem sido alvos de compostos intercaladores dentre os quais cita-se aqueles envolvendo as enzimas topoisomerases [54].

Uma das etapas de estudo da atividade anticâncer de um composto é aquela na qual o composto é avaliado quanto ao seu perfil citotóxico sobre células cancerígenas em cultivo [55,56]. Nesses cultivos as células são postas em meios líquidos em recipientes estéreis, os quais contém o teor de nutrientes balanceado para que as células possam se desenvolver plenamente [57]. Nessas condições de cultivo são adicionadas as substâncias-testes e avaliada a viabilidade celular em relação às referências.

Um dos testes mais utilizados para se avaliar a citotoxicidade de um composto é o teste de MTT [58]. Nesse experimento, após as células serem submetidas ao tratamento com um dado composto por um tempo padrão, as mesmas recebem uma solução com o composto brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazola (MTT) o qual forma no meio um derivado corado, dada a ação das enzimas celulares do tipo redutases, processo ilustrado no Esquema 1.6 (pág. 11).



Esquema 1.6 – Conversão de MTT por redutase mitocondrial.

Esse processo é proporcional a atividade metabólica celular. Assim, quanto mais células viáveis e em divisão, maior será a quantidade de MTT reduzido e mais corada a solução resultante. Há significativa relação de proporcionalidade entre a absorbância medida por um espectrofotômetro e a quantidade de células viáveis no meio. Tendo uma referência é possível avaliar o efeito citotóxico da substância-teste. A Figura 1.12 ilustra uma placa de leitura para o teste, onde diferentes concentrações de um composto citotóxico é avaliado.

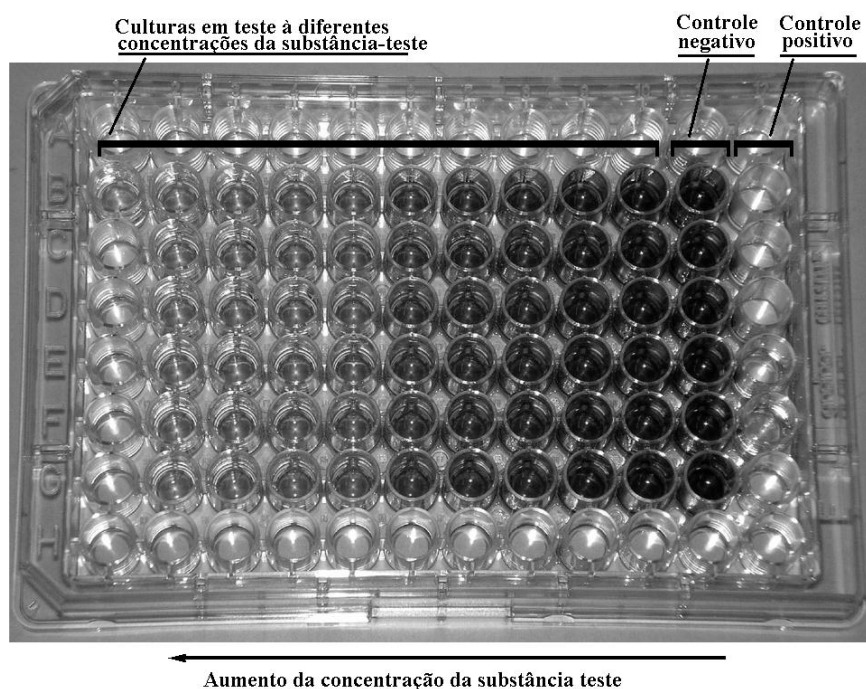
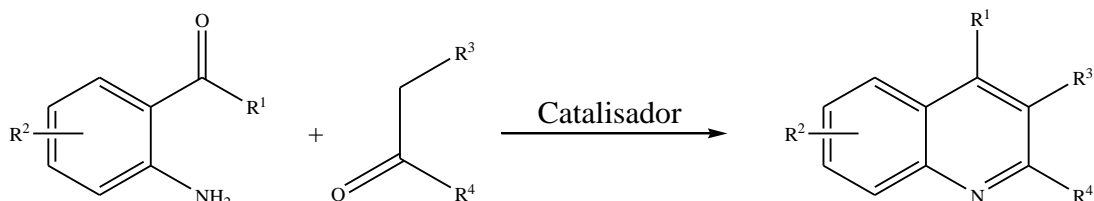


Figura 1.12 - Placa de cultivo de 96 poços para leitura após aplicação de MTT [59].

Na Figura 1.12 da esquerda para direita o número de células viáveis aumenta, resultando em coloração mais intensa. A absorbância reflete isso. As culturas pertencentes ao controle negativo não recebem tratamento enquanto aquelas do controle positivo são tratadas com solução de peróxido de hidrogênio.

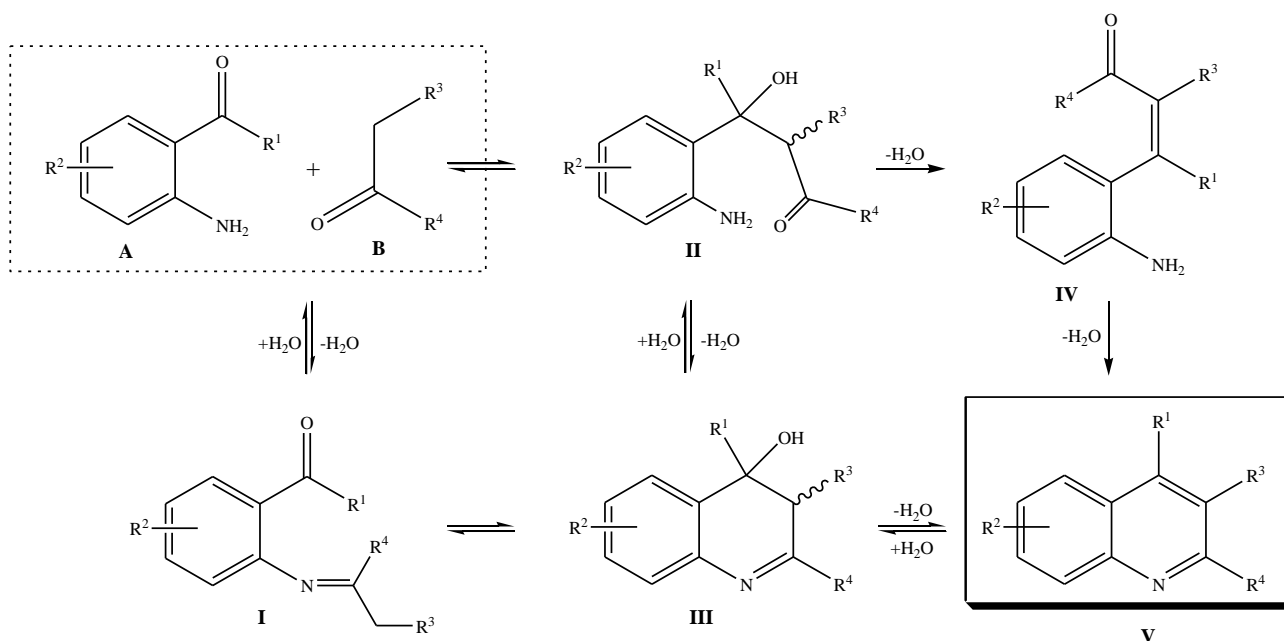
1.4 - Reação de Friedländer

O sistema quinolínico presente na tacrina e derivados é bastante comum e importante [60]. Uma das estratégias de síntese deste núcleo, conhecida como reação de Friedländer [61], é mostrada no Esquema 1.7.



Esquema 1.7 - Reação de Friedländer. R^1 - R^4 podem ser hidrogênio, alquila, arila ou halogênio.

Embora as características da reação de Friedländer sejam em geral bem entendidas, seu mecanismo não foi ainda bem estabelecido [62]. Neste contexto, duas possibilidades mecanísticas têm sido propostas para essa reação conforme se busca mostrar no Esquema 1.8 [63,64].

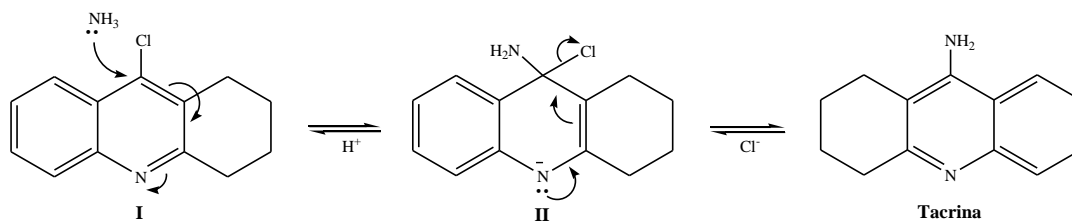


Esquema 1.8 – Propostas de mecanismos para a reação de Friedländer.

Partindo da amina aromática **A** e do composto carbonílico **B**, uma das vias envolve a formação inicial da base de Schiff **I** seguida de reação aldólica intramolecular para dar a hidroxiimina **III**, a qual perde água produzindo a quinolina **V**. Alternativamente, tem sido proposto que a etapa inicial seja a reação aldólica intermolecular a qual gera o composto **II** que produz a quinolina **V** via intermediário **III**.

1.5 - Reação de substituição nucleofílica aromática

Uma das reações chave na obtenção de dímeros de tacrina é a de substituição nucleofílica aromática, que consiste geralmente na substituição de um halogênio ligado a um anel aromático por um nucleófilo conforme se vê na proposta de mecanismo apresentada no Esquema 1.9 (pág. 13) [64].



Esquema 1.9 - Mecanismo de adição-eliminação para substituição nucleofílica aromática.

No Esquema 1.9 ilustra-se a obtenção da tacrina a partir de um cloreto hidroacridínico. A espécie intermediária **II** será formada especialmente nos casos onde houver possibilidade de estabilização por ressonância da carga negativa no sistema aromático, efeito alcançado através de grupos retiradores de elétrons ligados ao anel aromático em *orto* e/ou *para* relativamente ao halogênio. Conforme se vê no Esquema 1.9, no caso de cloridroacridinas o efeito ativador é desempenhado pelo próprio nitrogênio piridínico [65].

1.6 - Docking molecular

No contexto da química medicinal, a modelagem molecular pode ser definida com um conjunto de procedimentos teórico-computacionais visando o desenvolvimento racional de bioligantes. Tais procedimentos se fundamentam no conhecimento de propriedades de alguma substância em particular e que podem ser estendidas à previsão do comportamento de outras moléculas [66]. A modelagem molecular pode ter duas abordagens: uma na qual as previsões independem do conhecimento prévio da estrutura do alvo biomolecular, como é o caso do QSAR; outra na qual as previsões tem por base o conhecimento da estrutura do alvo [67]. Nesta última se insere o *docking* molecular, conforme mostra a Figura 1.13.

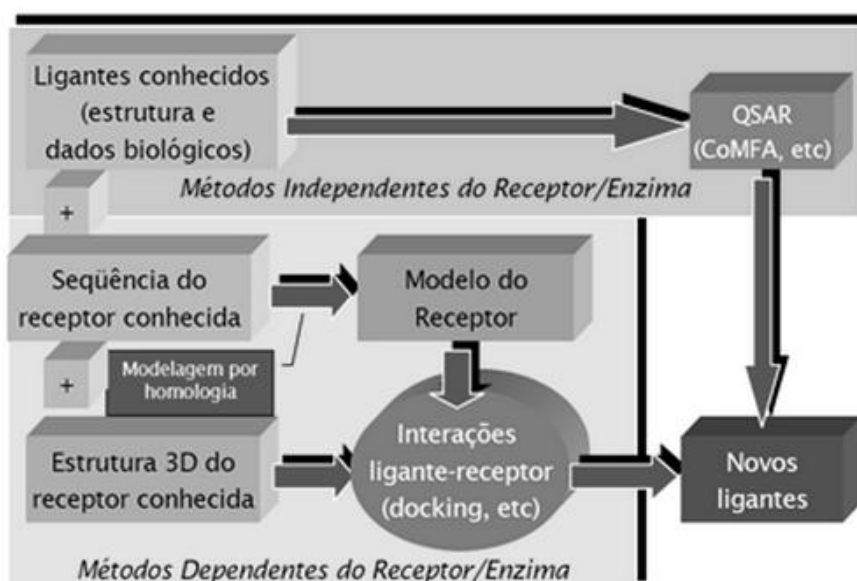


Figura 1.13 - Descrição geral dos métodos para o planejamento de novos ligantes [67].

O *docking* molecular visa encontrar a estrutura do complexo bioligante-receptor, estimando ainda a energia envolvida. Neste último caso, um programa de *docking* molecular se propõe a prever quais seriam os melhores bioligantes numa lista para um determinado alvo (*Virtual Screening*) [68]. O *docking* molecular possui duas etapas: uma na qual busca-se as conformações de melhor ajuste do bioligante na superfície do receptor; e outra onde se usa uma função que associa valores de energia a cada uma das conformações obtidas. Tais funções se fundamentam em métodos como o de campo de força, os empíricos e aqueles baseados em estruturas conhecidas [35].

O programa Autodock é o mais utilizado para *docking* (Figura 1.14) [69].

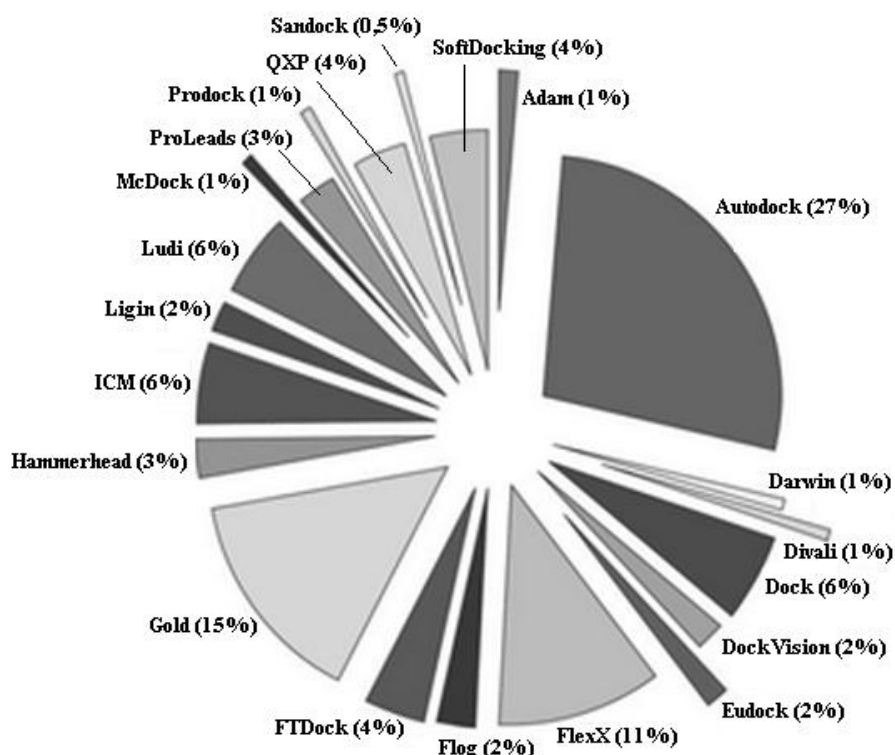


Figura 1.14 - Percentual de citações de programas de *docking* molecular no *Web of Science* [70].

Esse programa tem servido de base para o desenvolvimento de outros programas dentre os quais uma versão otimizada é o Autodock Vina [71]. Este programa faz uso de um campo de força de energia semiempírico para avaliar as conformações de ligação do sistema ligante-receptor. O mesmo tem o seu campo de força parametrizado a partir de um número significativo de dados de ligação experimentais para complexos ligante-receptor [72].

A Figura 1.15 (pág. 15) indica os aspectos gerais considerados pelo Autodock.

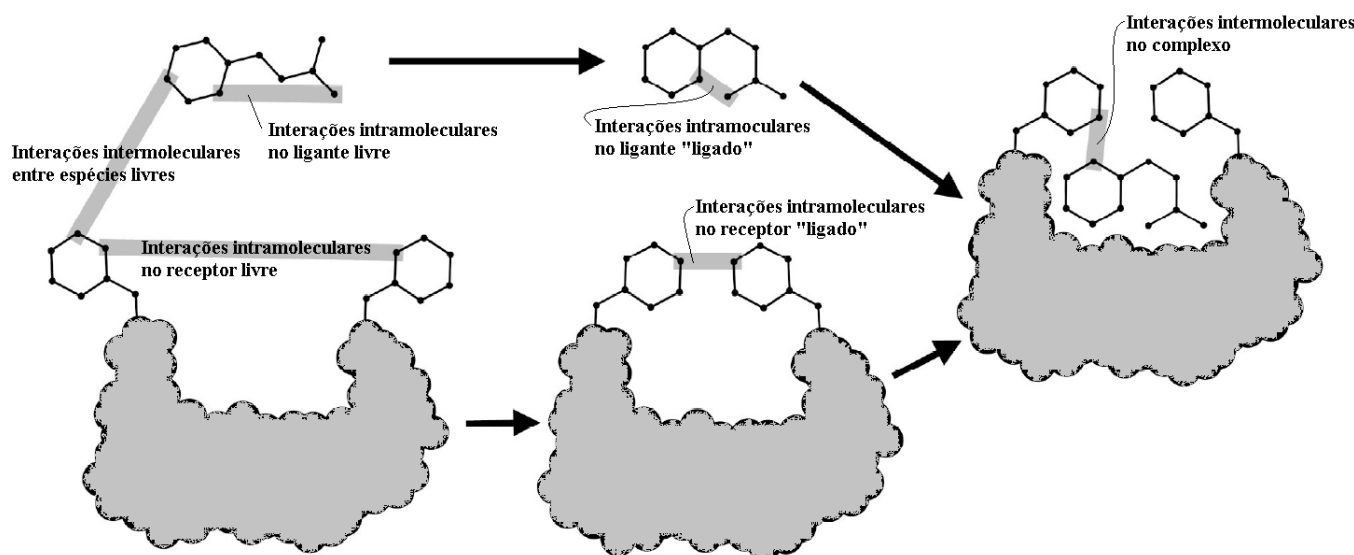


Figura 1.15 - Mudanças interacionais inter- e intramoleculares avaliadas no *docking* [73].

A Figura 1.15 mostra que o programa considera as variações interacionais intra- e intermoleculares envolvidas na ligação. Essas variações são tratadas individualmente para compor o valor final de energia livre de ligação (ΔG), conforme mostrado na Equação 1.5 [73,74].

$$\Delta G = (V_l^{L-L} - V_{nl}^{L-L}) + (V_l^{R-R} - V_{nl}^{R-R}) + (V_l^{R-L} - V_{nl}^{R-L} + \Delta S_{conf}) \quad (1.5)$$

Onde V_l^{L-L} e V_{nl}^{L-L} referem-se à contribuição energética das interações intramoleculares presentes no ligante ligado (l) e não-ligado (nl) respectivamente, enquanto V_l^{R-R} e V_{nl}^{R-R} são as contribuições correspondentes relacionadas com o receptor e V_l^{R-L} e V_{nl}^{R-L} ao complexo. O fator ΔS_{conf} refere-se à perda entrópica conformacional associado ao processo. Cada componente energética mostrada na Equação 1.5 leva em consideração as contribuições detalhadas na Equação 1.6 [73,74].

$$V = W_{vdw} \sum_{i,j} \left(\frac{A_{ij}}{r_{ij}^{12}} - \frac{B_{ij}}{r_{ij}^6} \right) + W_{hlig} \sum_{i,j} E(t) \left(\frac{C_{ij}}{r_{ij}^{12}} - \frac{D_{ij}}{r_{ij}^{10}} \right) + W_{elec} \sum_{i,j} \frac{q_i q_j}{\epsilon(r_{ij}) r_{ij}} + W_{sol} \sum_{i,j} (S_i V_j + S_j V_i) e^{\frac{-r_{ij}^2}{2\sigma^2}} \quad (1.6)$$

Na Equação 1.6 são apresentados quatro termos onde são consideradas respectivamente as contribuições das interações de van der Waals "*vdw*", das ligações de hidrogênio "*hlig*", das interações eletrostáticas "*elec*" e das alterações da esfera de solvatação "*sol*". O símbolo W em cada termo corresponde ao peso obtido a partir dos dados experimentais do conjunto de treino do programa de *docking*. Os índices i e j referem-se aos pares formados na análise entre os átomos i do ligante e os átomos j do receptor, sendo r a distância entre i e j e q a carga dos átomos. Os parâmetros $A-B$ e $C-D$ são característicos das funções potenciais 6-12 e 10-12 respectivamente. O termo $E(t)$ que compõe o segundo termo expressa as direções relativas das ligações de hidrogênio. No último termo da Equação 1.6, V expressa o volume dos átomos, S o parâmetro de solvatação e σ o parâmetro de ajuste de distância para melhor adequação dos resultados.

1.7 – Objetivos deste trabalho

- 1) Síntese e caracterização de novos dímeros de tacrina. Essas novas moléculas (Figura 1.16) seriam distintas tanto em relação ao tipo de espaçador (**E**) utilizado quanto em relação ao número de carbonos do anel alicíclico ($n = 0, 1$ ou 2). A troca de espaçadores alifáticos lineares por espaçadores aromáticos bem como a variação em "n" visam melhorar as propriedades farmacocinéticas e farmacodinâmicas dos dímeros de tacrina.

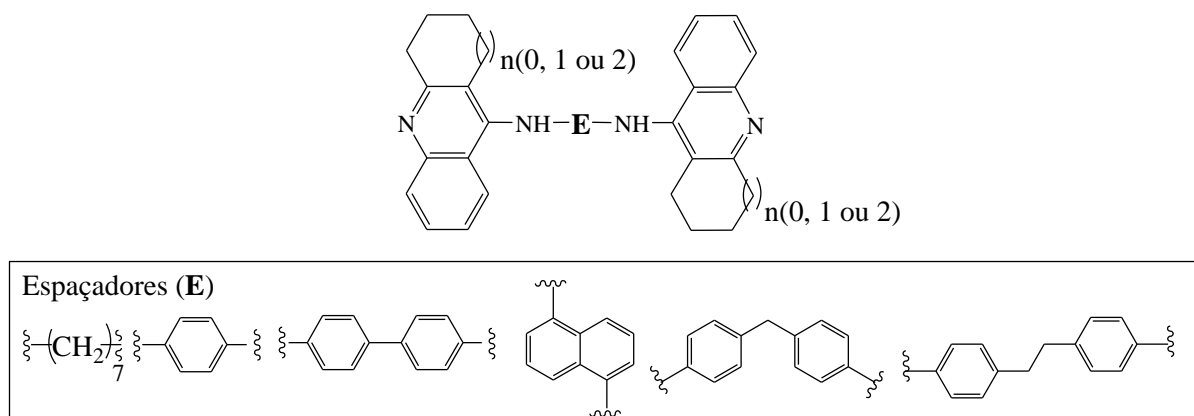


Figura 1.16 – Dímeros deste trabalho.

- 2) Caracterização cinética e *docking* molecular dos novos dímeros de tacrina em relação à enzimas colinesterases (hAChE, *Ee*AChE, hBChE e eqBChE). O intuito dessa etapa foi compreender os efeitos que as modificações estruturais aplicadas nas moléculas dos dímeros de tacrina teriam no seu comportamento interacional com os diferentes alvos colinesterásicos.
- 3) Avaliação da atividade antiproliferativa dos novos dímeros de tacrina sobre linhagens celulares representativas e *docking* molecular para possíveis alvos biomoleculares. O intuito dessa etapa foi selecionar dentre os novos dímeros de tacrina aqueles com potencial aplicação na terapia contra o câncer bem como compreender os mecanismos moleculares subjacentes à ação desses ligantes como antiproliferativos.

1.8 – Referências bibliográficas

- [1] Steinberg, G. M.; Mednick, M. L.; Maddox, J.; Rice, R.; Cramer, J. A hydrophobic binding site in acetylcholinesterase. *J. Med. Chem.*, **1975**, 18, 1056-1061.
- [2] Albert, A.; Gledhill, W. J. Improved synthesis of aminoacridines, part IV. Substituted 5-aminoacridines. *J. Soc. Chem. Ind.*, **1945**, 64, 169-172.
- [3] Summers, W. K.; Kaufman, K. R.; Altman, F. Jr.; Fischer, J. M. THA A review of the literature and its use in treatment of five overdose patients. *Clin. Toxicol.*, **1980**, 16, 269-281.
- [4] 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. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **1993**, 90, 9031-9035.

- [5] Nachon, F.; Carletti, E.; Ronco, C.; Trovaslet, M.; Nicolet, Y.; Jean, L.; Renard, P. Crystal structures of human cholinesterases in complex with huprine W and tacrine: elements of specificity for anti-Alzheimer's drugs targeting acetyl- and butyryl-cholinesterase. *Biochem. J.*, **2013**, 453, 393-399.
- [6] Harel, M.; Sussman, J. L.; Krejci, E.; Bon, S.; Chanal, P.; Massoulié, J.; Silman, I. Conversion of acetylcholinesterase to butyrylcholinesterase: modeling and mutagenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **1992**, 89, 10827-10831.
- [7] Ellman, G. L.; Courtney, K. D.; Andres, J. R. V.; Featherstone, M. A new and rapid colorimetric determination of AChE activity. *Biochem. Pharmacol.*, **1961**, 7, 88-95.
- [8] Rosenberry, T. L. Catalysis by acetylcholinesterase: Evidence that the rate-limiting step for acylation with certain substrates precedes general acid-base catalysis. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **1975**, 72, 3834-3838.
- [9] Nolte, H.-J.; Rosenberry, T. L.; Neumann, E. Effective charge on acetylcholinesterase active sites determined from the ionic strength dependence of association rate constants with cationic ligands. *Biochemistry*, **1980**, 19, 3705-3711.
- [10] Hasinoff, B. B. Kinetics of acetylthiocholine binding to electric eel acetylcholinesterase in glycerol/water solvents of increased viscosity. Evidence for a diffusion-controlled reaction. *Biochim. Biophys. Acta*, **1982**, 704, 52-58.
- [11] Botti, S. A.; Felder, C. E.; Lifson, S.; Sussman, J. L.; Silman, I. A modular treatment of molecular traffic through the active site of cholinesterase. *Biophys. J.*, **1999**, 77, 2430-2450.
- [12] Sussman, J. L.; Harel, M.; Frolow, F.; Oefner, C.; Goldman, A.; Toker, L.; Silman, I. Atomic structure of acetylcholinesterase from *Torpedo californica*: a prototypic acetylcholine-binding protein. *Science*, **1991**, 253, 872-879.
- [13] Nicolet, Y.; Lockridge, O.; Masson, P.; Fontecilla-Camps, J. C.; Nachon, F. Crystal structure of human butyrylcholinesterase and of its complexes with substrate and products. *J. Biol. Chem.*, **2003**, 278, 41141-41147.
- [14] Protein Data Bank. www.rcsb.org. Acessada em 16/11/2013.
- [15] Lee, T.; Lee, D.; Lee, Y.; Gong, Y-D. Solid-phase synthesis of yhiazolo[4,5-b]pyridine derivatives using Friedländer reaction. *J. Comb. Chem.*, **2010**, 12, 95-99.
- [16] Spencer, C. M.; Noble, S. Rivastigmine. A review of its use in Alzheimer's disease. *Drug Aging*, **1998**, 13, 391-411.
- [17] McKeith, I.; Del Ser, T.; Spano, P.; Emre, M.; Wesnes, K.; Anand, R.; Cicin-Sain, A.; Ferrara, R.; Spiegel, R. Efficacy of rivastigmine in dementia with Lewy bodies: A randomised, double-blind, placebo-controlled international study. *Lancet*, **2000**, 356, 2031-2036.
- [18] Werber, E. A.; Rabey, J. M. The beneficial effect of cholinesterase inhibitors on patients suffering from Parkinson's disease and dementia. *J. Neural Transm.*, **2001**, 108, 1319-1325.
- [19] Kumar, V.; Anand, R.; Messina, J.; Hartma, R.; Veach, J. An efficacy and safety analysis of Exelon in Alzheimer's disease patients with concurrent vascular risk factors. *Eur. J. Neurol.*, **2000**, 7, 159-169.
- [20] Masanic, C. A.; Bayey, M. T.; van Reekum, R.; Simard, M. Open-label study of donepezil in traumatic brain injury. *Arch. Phys. Med. Rehabil.*, **2001**, 82, 896-901.
- [21] Porcel, J.; Montalban, X. Anticholinesterasics in the treatment of cognitive impairment in multiple sclerosis. *J. Neurol. Sci.*, **2006**, 245, 177-181.

- [22] Hikida, T.; Kitabatake, Y.; Pastan, I.; Nakanishi, S. Acetylcholine enhancement in the nucleus accumbens prevents addictive behaviors of cocaine and morphine. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **2003**, *100*, 6169-6173.
- [23] Musilek, K.; Pavlikova, R.; Marek, J.; Komloova, M.; Holas, O.; Hrabinoval, M.; Pohanka, M.; Dohnal, V.; Dolezal, M.; Gunn-Moore, F.; Kuca, K. The preparation, in vitro screening and molecular docking of symmetrical bisquaternary cholinesterase inhibitors containing a but-(2*E*)-en-1,4-diyl connecting linkage. *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.*, **2011**, *26*, 245-253.
- [24] Bergmann, F.; Wilson, I. B.; Nachmansohn, D. The inhibitory effect of stilbamidine, curare and related compounds and its relationship to the active groups of acetylcholine esterase; action of stilbamidine upon nerve impulse conduction. *Biochim. Biophys. Acta*, **1950**, *6*, 217-224.
- [25] Austin, L.; Berry, W. K. Two selective inhibitors of cholinesterase. *Biochem. J.*, **1953**, *54*, 695-700.
- [26] Kryger, G., Silman, I., Sussman, J. L. Structure of acetylcholinesterase complexed with E2020 (Aricept): implications for the design of new anti-Alzheimer drugs. *Structure Fold.Des.*, **1999**, *7*, 297-307.
- [27] Baron, P., Millard, C.B., Harel, M., Dvir, H., Enz, A., Sussman, J.L., Silman, I. Kinetic and structural studies on the interaction of cholinesterases with the anti-Alzheimer drug rivastigmine. *Biochemistry*, **2002**, *41*, 3555-3564.
- [28] Davis, K. L.; Powchik, P. Tacrine. *Lancet*, **1995**, *345*, 625-630.
- [29] Tumiatti, V.; Minarini, A.; Bolognesi, M. L.; Milelli, A.; Rosini, M.; Melchiorre, C.; Tacrine derivatives and Alzheimer's Disease. *Curr. Med. Chem.*, **2010**, *17*, 1825-1838.
- [30] Pang, Y-P.; Quiram, P.; Jelacic, T.; Hong, F.; Brimijoin, S. Highly potent, selective, and low cost bis-tetrahydroaminacrine inhibitors of acetylcholinesterase: steps toward novel drugs for treating Alzheimer's disease. *J. Biol. Chem.*, **1996**, *271*, 23646-23649.
- [31] Butini, S.; Campiani, G.; Borriello, M.; Gemma, S.; Panico, A.; Persico, M.; Catalanotti, B.; Ros, A.; Brindisi, M.; Agnusdei, M.; Fiorini, I.; Nacci, V.; Novellino, E.; Belinskaya, T.; Saxena, A.; Fattorusso, C. Exploiting protein fluctuations at the active-site gorge of human cholinesterases: further optimization of the design strategy to develop extremely potent inhibitors. *J. Med. Chem.*, **2008**, *51*, 3154-3170.
- [32] Korabecny, J.; Musilek, K.; Zemek, F.; Horova, A.; Holas, O.; Nepovimova, E.; Opletalova, V.; Hroudova, J.; Fisar, Z.; JungY-S.; Kuca, K. Synthesis and in vitro evaluation of 7-methoxy-N-(pent-4-enyl)-1,2,3,4-tetrahydroacridin-9-amine - new tacrine derivate with cholinergic properties. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2011**, *21*, 6563-6566.
- [33] Ouberai, M.; Brannstrom, K.; Vestling, M.; Olofsson, A.; Dumy, P.; Chierici, S.; Garcia, J. Clicked tacrine conjugates as acetylcholinesterase and β -amyloid directed compounds. *Org. Biomol. Chem.*, **2011**, *9*, 1140-1147.
- [34] Hasan, F. B.; Cohen, S. G.; Cohen, J. B. Hydrolysis by Acetylcholinesterase. *J. Biol. Chem.*, **1980**, *255*, 3898-3904.
- [35] Sotriffer, C.; Klebe, G.; Stahl, M.; Bohm, H. J.; Docking and scoring functions and virtual screening in Burger's medicinal chemistry and drug discovery, John Wiley and Sons Inc, New York, **2003**, *1*, 281-332.
- [36] Koellner, G.; Steiner, T.; Millard, C. B.; Silman, I.; Sussman, J. L. A neutral molecule in a cation-binding site: specific binding of a PEG-SH to acetylcholinesterase from *Torpedo californica*. *J. Mol. Biol.*, **2002**, *320*, 721-725.

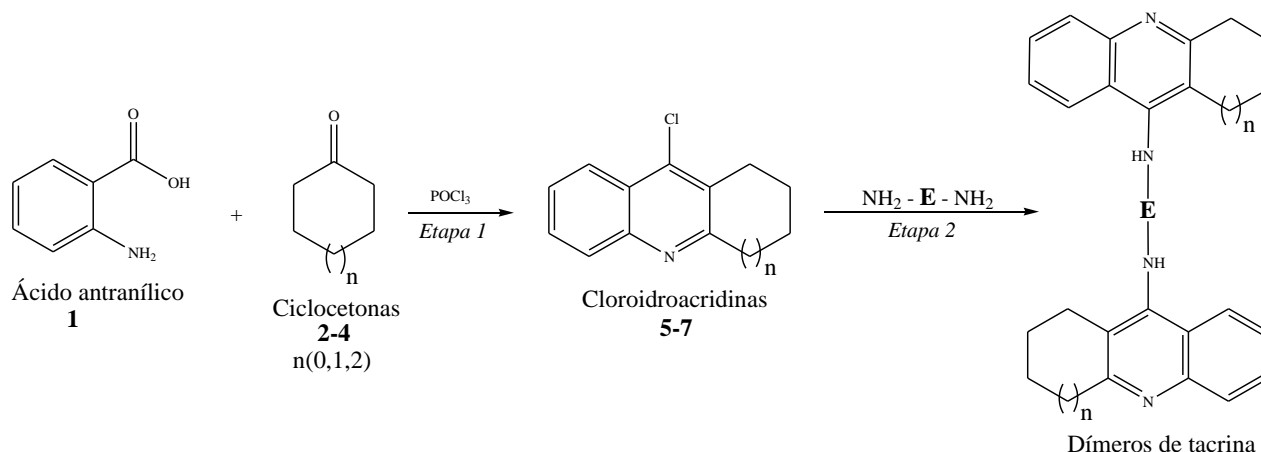
- [37] Nowicki, J-P.; Scatton, B. Measurement and expression of drug effects in *The practice of medicinal chemistry*, 3rd ed.; Wermuth, C.G. Ed.; Burlington: Academic Press **2008**; pp. 73-84.
- [38] Lewis, W.G.; Green, L.G.; Grynszpan, F.; Radić, Z.; Carlier, P.R.; Taylor, P.; Finn, M.G.; Sharpless, K.B. Click chemistry in situ: acetylcholinesterase as a reaction vessel for the selective assembly of a femtomolar inhibitor from an array of building blocks. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2002**, 41, 1053-1057.
- [39] Michaelis, L.; Menten, M. L. Die kinetik der invertinwirkung. *Biochem. Zeitsch.* **1913**, 49, 333-369
- [40] Johnson, K. A.; Goody, R. S. The original Michaelis constant: translation of the 1913 Michaelis-Menten paper. *Biochemistry*, **2011**, 50, 8264–8269.
- [41] Copeland, R. A. *Enzymes: A practical introduction to structure, mechanism, and data analysis*. John Wiley and Sons Inc, New York, **2000**.
- [42] Tanarro, C. M. G.; Gütschow, M. Hyperbolic mixed-type inhibition of acetylcholinesterase by tetracyclic thienopyrimidines. *J. Enzym. Inhib. Med. Chem.*, **2011**, 26, 350-358.
- [43] Nelson, D. L.; Cox, M. M. *Lehninger principles of biochemistry*, 4ed. Nova Iorque, W. H. Freeman, **2004**.
- [44] Segel, I. H. *Enzyme Kinetics*, Wiley, New York. **1975**.
- [45] Lineweaver, H.; Burk, D. The determination of enzyme dissociation constants. *J. Am. Chem. Soc.*, **1934**, 56, 658-666.
- [46] Dixon, M. The determination of enzyme inhibitor constants. *Biochem. J.*, **1953**, 55, 170-171.
- [47] Yonetani, T., and Theorell, H. Studies on liver alcohol dehydrogenase complexes III. Multiple inhibition kinetics in the presence of two competitive inhibitors. *Arch. Biochem. Biophys.*, **1964**, 106, 243-251.
- [48] Fearon, E. R. Human cancer syndromes - clues to the origin and nature of cancer. *Science*, **1997**, 278, 1043–1050.
- [49] Gallego, J.; Reid, B. R. Solution structure and dynamics of a complex between DNA and the antitumor *bis*-naphthalimide LU-79553: intercalated ring flipping on the millisecond time scale. *Biochemistry*, **1999**, 38, 15104-15115.
- [50] Baruah, H.; Wright, M. W.; Bierbach, U. Solution structural study of a DNA duplex containing the guanine-N7 adduct formed by a cytotoxic platinum-acridine hybrid agent. *Biochemistry*, **2005**, 44, 6059-6070.
- [51] Lerman, L. S. Structural considerations in the interaction of DNA and acridines. *J. Mol. Biol.*, **1961**, 3, 18-30.
- [52] Lerman, L. S. Acridine mutagens and DNA structure. *J. Cell. Comp. Physiol.*, **1964**, 64, 1-6.
- [53] Hu, M-K. Synthesis and in vitro evaluation of bis-tacrine congeners. *J. Pharm. Pharmacol.*, **2001**, 53, 83-88.
- [54] Wang, J. C. DNA Topoisomerases. *Annu. Rev. Biochem.*, **1996**, 65, 635-692.
- [55] Alley, M. C.; Scudiero, D. A.; Monks, A.; Hursey, M. L.; Czerwinski, M. J.; Fine, D. L.; Abbott, B. J.; Mayo, J. G.; Shoemaker, R. H.; Boyd, M. R. Feasibility of drug screening with panels of human tumor cell lines using a microculture tetrazolium assay. *Cancer Res.*, **1988**, 48, 589-601.
- [56] Holbeck, S. L.; Collins, J. M.; Doroshow, J. H. Analysis of Food and Drug Administration-approved anticancer agents in the NCI60 panel of human tumor cell lines. *Mol. Cancer Ther.*, **2010**, 9, 1451-1460.

- [57] American Type Culture Collection: ATCC. *www.atcc.org*. Acessada em 16/11/2013.
- [58] Mosmann, T. Rapid Colorimetric Assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Methods*, **1983**, 65, 55-63.
- [59] Wikipedia: The Free Encyclopedia. *http://en.wikipedia.org/wiki/MTT_assay*. Acessada em 16/11/2013.
- [60] Kouznetsov, V.; Méndez, L. Y. V.; Gómez, C. M. M. Recent progress in the synthesis of quinolines *Curr. Org. Chem.*, **2005**, 9, 141-161.
- [61] Cheng, C.-C.; Yan, S.-J. The Friedländer synthesis of quinolines *Org. React.*, **1982**, 28, 37-45.
- [62] Contelles, J. M.; Mayoral, E. P.; Samadi, A.; Carreiras, M. C.; Soriano, E. Recent advances in the Friedlander reaction. *Chem. Rev.*, **2009**, 109, 2652-2671.
- [63] Jones, G. *In The chemistry of heterocyclic compounds*; Jones, G., Ed.; Wiley: New York, **1977**, 32, 1-158.
- [64] Clayden, J.; Greevs, N.; Warren, S.; Wothers, P. *Organic chemistry*, 1st Ed, Oxford University Press, New York, USA, **2001**.
- [65] Eicher, T.; Hauptmann, S. *The chemistry of heterocycles: Structure, reactions, syntheses, and applications*. 2st Ed, Wiley-VCH Veriag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, **2003**, 393-398.
- [66] Sippl, W. Pharmacophore identification and pseudo-receptor modeling in *The practice of medicinal chemistry*, 3rd ed.; Wermuth, C.G. Ed.; Burlington: Academic Press, **2008**, 572-586.
- [67] Sant'Anna, C. M. R. Métodos de modelagem molecular para estudo e planejamento de compostos bioativos: uma introdução. *Rev. Virtual Quim.*, **2009**, 1, 49-57.
- [68] Schneider, G.; Böhm, H. J. Virtual screening and fast automated docking methods. *Drug Discov. Today*, **2002**, 7, 64-70.
- [69] Goodsell, D. S.; Morris, G. M.; Olson, A. J. Automated docking of flexible ligands: applications of AutoDock. *J. Mol. Recognit.*, **1996**, 9, 1-5.
- [70] Sousa, S. F.; Fernandes, P. A.; Ramos, M. J. Protein–ligand docking: current status and future challenges. *Proteins: Struct. Funct. Bioinf.*, **2006**, 65, 15-26.
- [71] Trott, O.; Olson, A. J. AutoDock Vina: Improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading. *J. Comp. Chem.*, **2009**, 31, 455-461.
- [72] Wang, R.; Fang, X.; Lu, Y.; Yang, C.; Wang, S. The PDBbind database: methodologies and updates. *J. Med. Chem.*, **2005**, 48, 4111-4119.
- [73] Huey, R.; Morris, G. M.; Olson, A. J.; Goodsell, D. S. A Semiempirical free energy force field with charge-based desolvation. *J. Comput. Chem.*, **2007**, 28, 1145-1152.
- [74] Morris, G. M.; Goodsell, D. S.; Halliday, R. S.; Huey, R.; Hart, W.E.; Belew, R. K.; Olson, A. J. Automated docking using a Lamarckian genetic algorithm and an empirical binding free energy function. *J. Comp. Chem.*, **1998**, 19, 1639-1662.

Capítulo 2 - Síntese e caracterização

2.1 – Aspectos gerais

Para a síntese dos dímeros de tacrina utilizou-se uma rota de síntese em duas etapas (Esquema 2.1).



Esquema 2.1- Rota de síntese adotada para a obtenção dos dímeros de tacrina.

Na primeira etapa o ácido antranílico (**1**) é posto em reação com uma cicloetona (**2-4**) em POCl_3 . As cetonas **2-4** são distintas quanto ao número de carbonos no anel. A variação em "n" visa avaliar o efeito da mudança do volume da região hidrofóbica na bioatividade do dímero gerado, aspecto a ser investigado nos testes *in vitro*, em cultura celular e por *docking* molecular. Na segunda etapa o composto do tipo cloridroacridina reage com diferentes diaminas gerando os dímeros de tacrina. As diaminas utilizadas (**8-13**) são comerciais [1] (Figura 2.1).

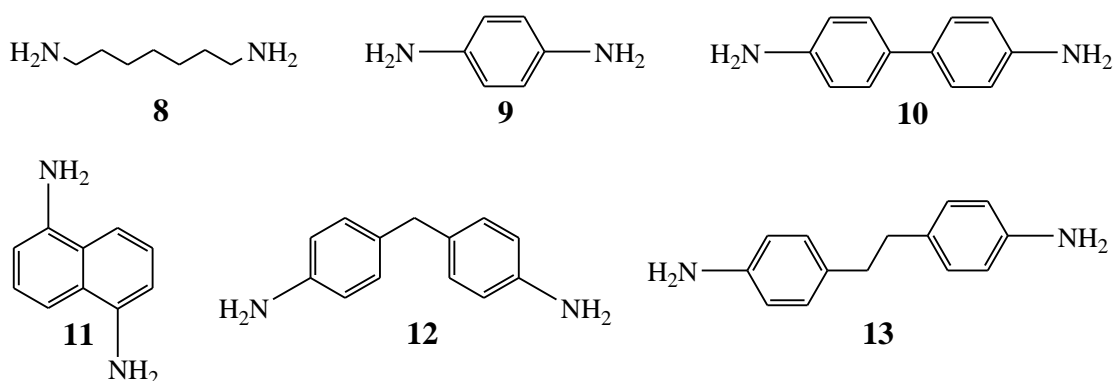
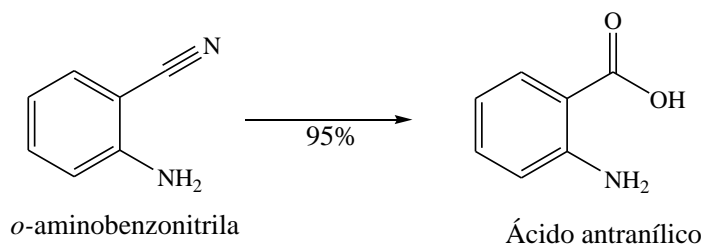


Figura 2.1 - Diaminas utilizadas na síntese dos dímeros de tacrina.

Como se observa na Figura 2.1, com exceção de **8**, as diaminas empregadas são aromáticas. Os dímeros gerados a partir dessas diaminas são inéditos [2]. A escolha da amina alifática **8** visou a produção de dímeros para comparação do efeito gerado pela introdução de grupos aromáticos como espaçadores. Nessa proposta supôs-se que as moléculas resultantes apresentariam melhor perfil interacional com os alvos visto que a região da enzima com a qual se espera que os espaçadores dos dímeros interajam preferencialmente é rica em resíduos aromáticos [4,5].

2.2 - Síntese das cloroidroacridinas

O preparo dos intermediários cloroidroacridinas se deu a partir do ácido antranílico (**1**) como mostrado no Esquema 2.1 (pág. 21). O composto foi obtido a partir da *o*-aminobenzonitrila conforme mostrado no Esquema 2.2. Essa transformação foi realizada segundo as condições descritas por Saemian *et al* [6] que empregou uma solução aquosa de KOH sob aquecimento para promover a conversão, com bons rendimentos, de *o*-aminobenzonitrila ao ácido antranílico. Não obstante, a maior parte dos dímeros descritos neste trabalho derivou de ácido antranílico adquirido comercialmente.

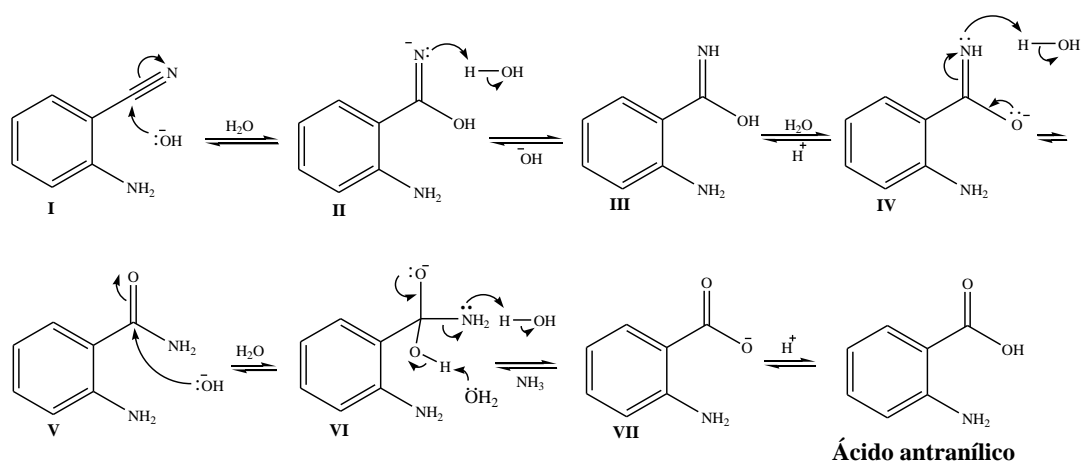


Condições de reação

KOH(48 eq.), água, refluxo a 100°C, 5h.

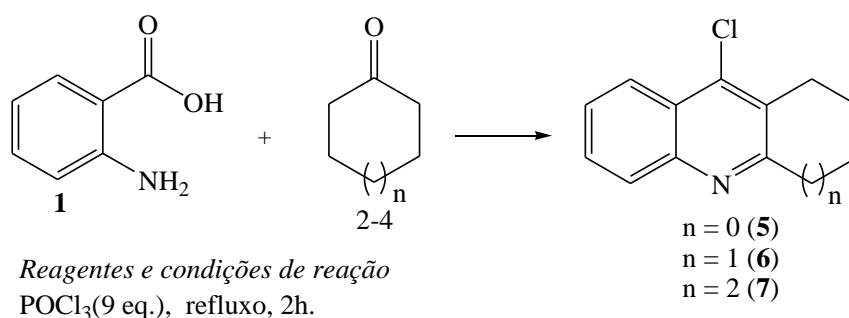
Esquema 2.2 – Obtenção de ácido antranílico a partir da hidrólise básica de *o*-aminobenzonitrila.

Uma proposta de mecanismo de reação para a hidrólise da nitrila é apresentada no Esquema 2.3 [7]. Nessa proposta mecanística temos, inicialmente, o ataque nucleofílico do ânion hidróxido ao carbono nitrílico de **I** com migração de um par de elétrons para o nitrogênio. Este, então, abstrai um próton da água do meio gerando a espécie hidroxilimínica **III**. A abstração de um próton do composto **III** por uma base do meio gera o composto **IV**. O nitrogênio da estrutura **IV** abstrai um próton da água do meio gerando a amida **V** cuja carbonila sofre ataque nucleofílico com subsequente migração para o oxigênio de um dos pares eletrônicos da ligação C=O. Na etapa seguinte, envolvendo o composto **VI**, o nitrogênio abstrai um próton da água via par eletrônico não ligante, o que ocorre em concomitância com a migração de um par eletrônico do oxigênio restabelecendo a dupla ligação C=O e assistindo a liberação de amônia. A protonação da estrutura **VII** gera o ácido antranílico.



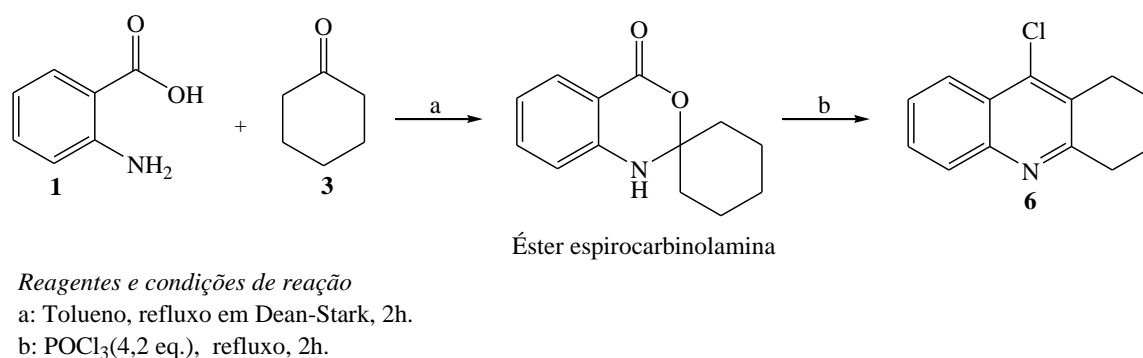
Esquema 2.3 - Proposta de mecanismo para a reação de hidrólise básica de nitrila.

Na etapa seguinte, com vistas à obtenção dos compostos do tipo cloroidroacridina, reagiu-se o ácido antranílico com diferentes ciclocetonas (Esquema 2.4), segundo metodologia descrita por Hu *et al* [8].



Esquema 2.4 – Síntese das cloroidroacridinas (**5-7**).

Os rendimentos são sumariados na Tabela 2.1 (pág. 24). Embora as condições descritas por Hu *et al* tenham sido reproduzidas os rendimentos de reação obtidos foram inferiores ao descritos por esses autores para a obtenção de **5-7** (45% a 94%) [8]. Em função dos menores rendimentos obtidos, avaliou-se a metodologia descrita por Carlier *et al* para a obtenção de **5-7** [9]. Empregando-se esta metodologia a cloroidroacridina é obtida em duas etapas, com formação de um intermediário do tipo espiro, conforme representado no Esquema 2.5.



Esquema 2.5 - Síntese de cloroidroacridinas em duas etapas.

Entretanto, apenas o composto **6** foi obtido com esta metodologia. Nos demais casos (compostos **5** e **7**) não se conseguiu obter o composto intermediário (espiro). Neste contexto observa-se que na conformação de menor energia cicloalcanos com anéis de 5 e 7 membros possuem 6,2 kcal/mol de energia armazenada na forma de tensão de anel contra 0,1 kcal/mol do cicloexano [10]. Pode-se supor que mudanças conformacionais necessárias durante a formação do espiro sofram maiores restrições energéticas no caso das cetonas **2** e **4**. Por outro lado, enquanto na conformação de menor energia estimada [11] as cetonas **2-4** não apresentam sobreposição de seus átomos de hidrogênio, a conformação de menor energia para os intermediários do tipo espiro correspondentes (Figura 2.2, pág. 24) mostram maior sobreposição entre dois pares de hidrogênios para os espiros de **2** e **4** (estruturas **A** e **C**), e nenhuma sobreposição para o espiro de **3** (estrutura **B**). A mesma observação pode ser feita na face oposta à mostrada na Figura 2.2 (pág. 24). Assim, a formação dos espiros de **2** e **4** seria dificultada por impedimento estérico.

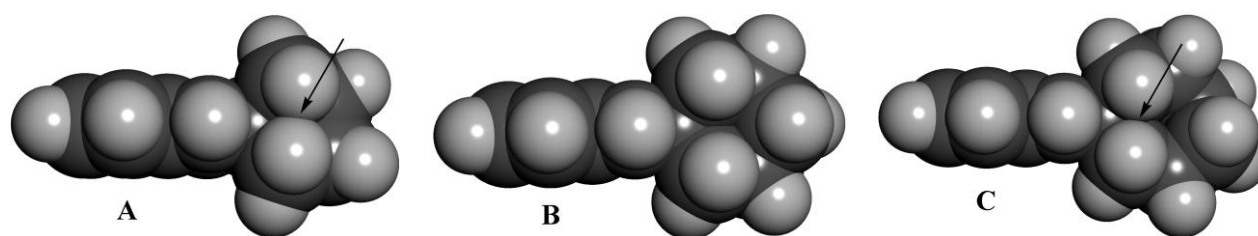


Figura 2.2 - Modelo com superfícies de van der Waals para os compostos do tipo espiro correspondentes às ciclocetonas **4-6**, **A-C**, respectivamente.

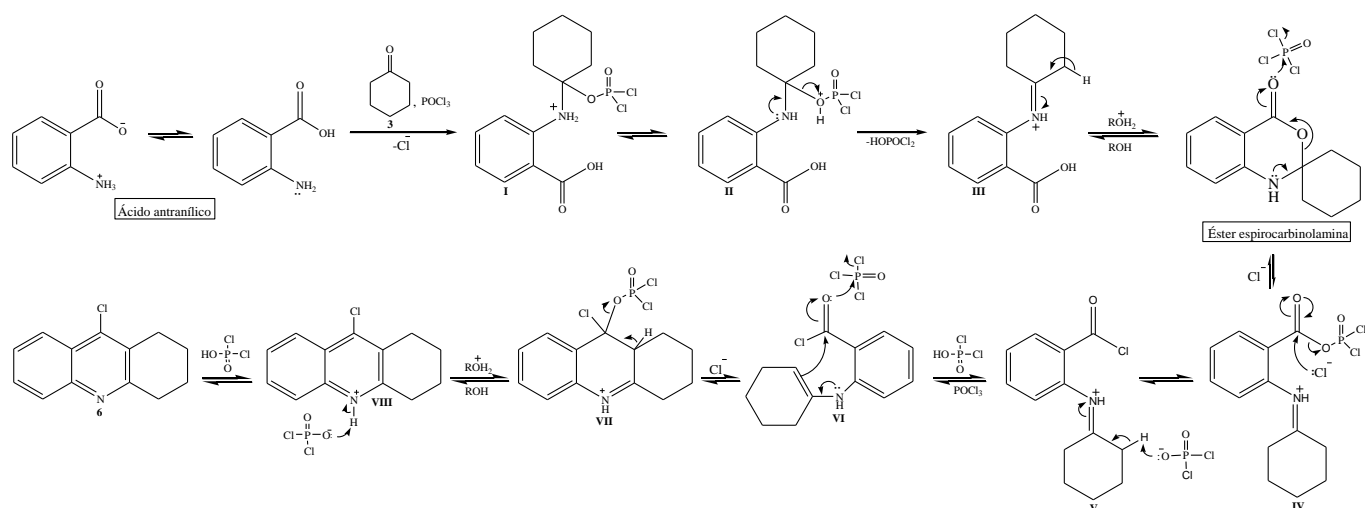
A Tabela 2.1 resume os resultados obtidos pelas duas metodologias.

Tabela 2.1- Rendimentos no preparo dos compostos **5-7**

Composto			
	5	6	7
Rendimento/(%)	28 ^a _{-b,c}	21 ^a 82 ^b	20 ^a _{-b,c}

^aResultados obtidos pela metodologia utilizada por Hu *et al* [8]. ^bResultados obtidos pela metodologia utilizada por Carlier *et al* [9]. ^cNão foi observada a formação do correspondente éster espirocarbinolamina nesta reação, sendo recuperado o material de partida.

As reações de síntese das cloroidroacridinas são exemplos de condensações de Friedländer [12]. A mesma tem sido adotada na produção de derivados e análogos de tacrina [13]. No Esquema 2.6 apresenta-se uma proposta de mecanismo de formação do composto **6** em presença de POCl_3 [7].

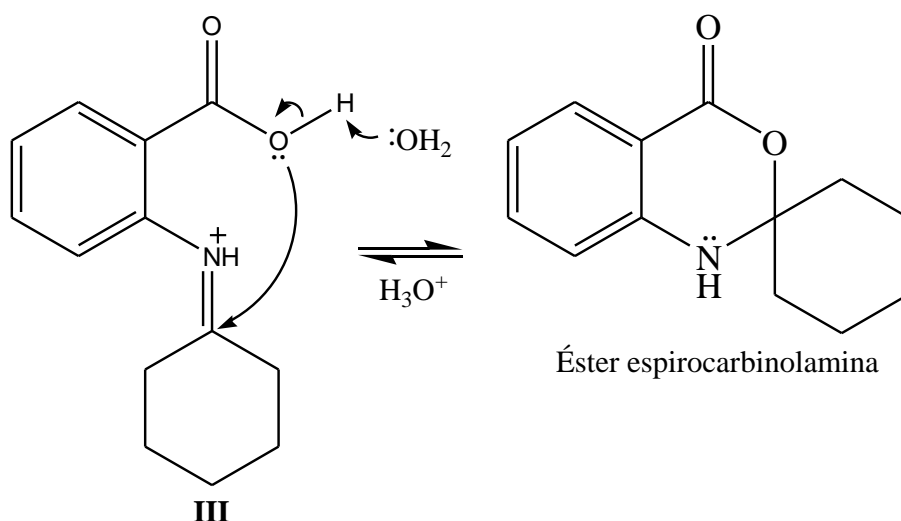


Esquema 2.6 - Proposta de mecanismo para formação do composto **6**.

Inicialmente, ocorre o ataque nucleofílico do nitrogênio amina do ácido antranílico sobre a carbonila de **3**, concomitante com o ataque do oxigênio da carbonila sobre o fósforo do POCl_3 , resultando na formação da espécie **I**. Nesta, a abstração do próton do nitrogênio amina por um oxigênio gera o composto **II**, no qual o par eletrônico não ligante do nitrogênio assiste a saída de uma molécula de HOPOCl_2 , estabelecendo

uma ligação dupla N=C, com formação do cátion imínico **III**. A perda de um próton pelo carboxila, seguida do ataque desta ao grupo imínio, leva à formação do éster espirocarbinolamina, o qual ataca o POCl_3 , gerando o derivado **IV**. Um cloreto, então, realiza um ataque nucleofílico à carbonila, com formação de **V**, e eliminação de PO_2Cl_2^- , o qual abstrai um próton de **V**, gerando a espécie **VI**. Nesta, o par eletrônico da amina assiste o ataque nucleofílico intramolecular realizado à carbonila, a qual simultaneamente ataca o POCl_3 , resultando na espécie tricíclica **VII**, a qual, via prototropismo e eliminação de ROH_2^+ , com concomitante aromatização do sistema, gera **VIII**, que perde um próton para PO_2Cl_2^- , resultando no composto **6**.

Conforme mostra o Esquema 2.7, a formação da espécie química do tipo espiro, na reação conduzida em aparato Dean-Stark, poderia ocorrer caso um par eletrônico do carboxilato de **III** (Esquema 2.6, pág. 24) atacasse o grupo imínio.



Esquema 2.7 - Mecanismo para formação do éster espirocarbinolamina.

Os compostos **5-7** foram caracterizados espectroscopicamente. Alguns aspectos serão ressaltados para os resultados de IV e RMN em relação ao composto **6**. Para este, a Figura 2.3 (pág. 26) mostra o espectro IV. A análise do conjunto das bandas sugere inicialmente a formação de uma molécula com sinais característicos de alquil-aromáticos na qual não há carbonila dada a ausência da banda intensa correspondente na região de 1700 cm^{-1} . Além disso, observa-se a presença da banda característica do estiramento de ligação do tipo Ar-X em 1481 cm^{-1} [14].

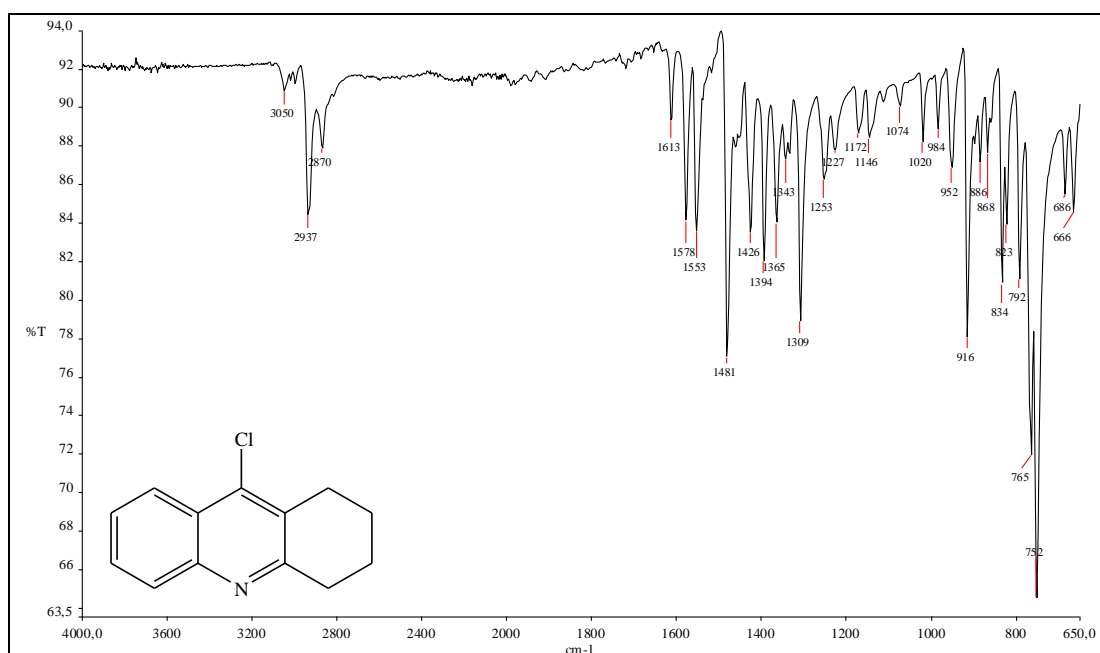


Figura 2.3 - Espectro IV do composto **6**.

A Figura 2.4 representa o espectro de RMN de ^1H do composto **6**. As integrais sugerem um total de 12 hidrogênios, como esperado.

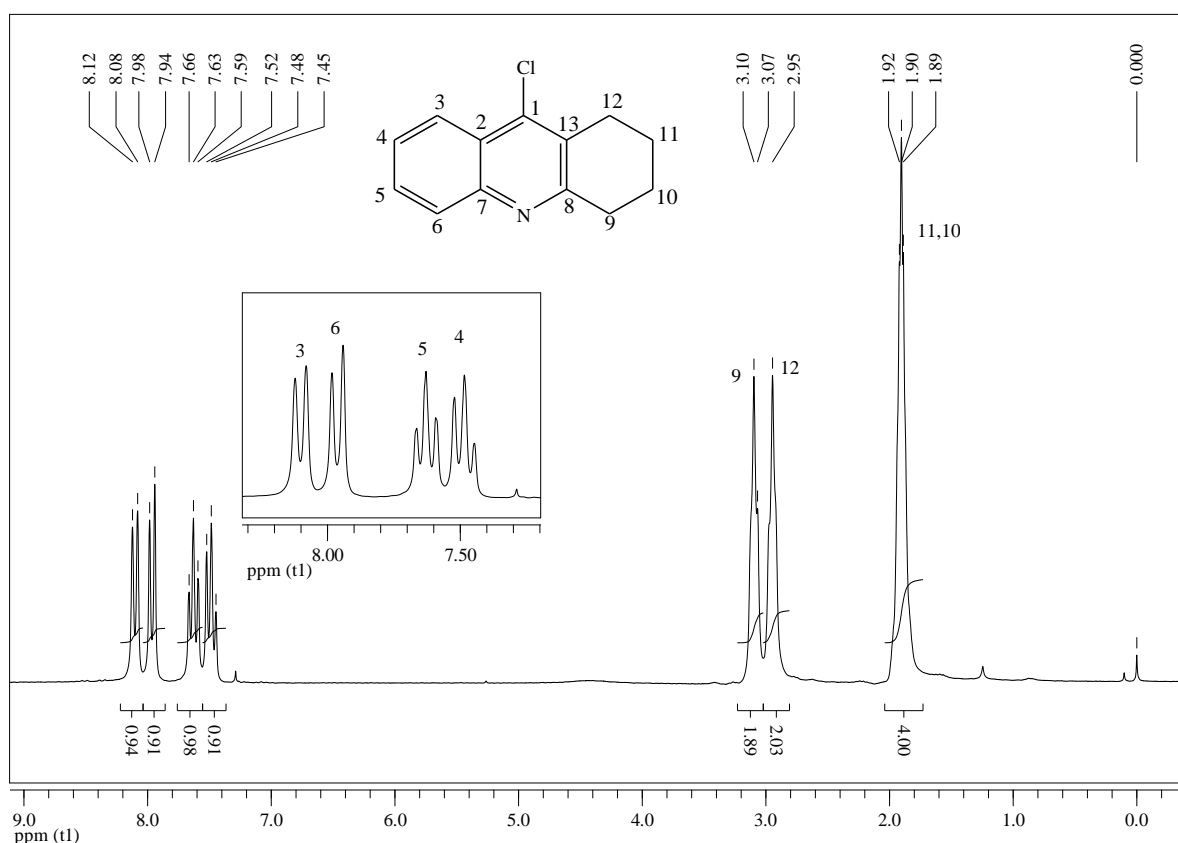


Figura 2.4 - Espectro de RMN de ^1H do composto **6** (200 MHz, CDCl_3).

Os quatro hidrogênios aromáticos (H3-H6) foram atribuídos aos sinais entre δ 7,45 e 8,12 ppm, e os hidrogênios H9-H12 aos sinais entre δ 1,89 e 3,10 ppm. A multiplicidade dos sinais correspondentes aos hidrogênios H6/H3 e H5/H4 estão de acordo com os dois dupletos e dois tripletos, respectivamente,

observados entre δ 8,07 e 7,55 ppm. O duplete em δ 8,10 ppm ($J = 7,8$ Hz) foi atribuído ao hidrogênio H3, pois o mesmo seria o menos blindado, devido tanto ao efeito de redução de densidade eletrônica sobre H3 causado pelo nitrogênio piridínico, quanto ao efeito doador de densidade eletrônica por ressonância pelo cloro, que aumenta a densidade eletrônica sobre o hidrogênio H6, sem afetar H3. Desta forma, o duplete em δ 7,96 ppm ($J = 7,8$ Hz) foi atribuído ao hidrogênio H6. Os sinais referentes aos hidrogênios H5 (δ 7,63 ppm, $J = 7,8$ Hz) e H4 (δ 7,48 ppm, $J = 7,8$ Hz), em função de possuírem dois hidrogênios em suas vizinhanças, apresentaram-se como tripletos. A atribuição nesse caso seguiu a mesma linha da análise de atribuição relativa feita para os hidrogênios H6 e H3, sendo o hidrogênio H5 o menos blindado, portanto com sinal mais afastado do TMS. Entre δ 2,90 e 3,15 ppm, observaram-se dois simpletos aparentes, cada um correspondendo a dois hidrogênios (2 H12 e 2 H9). A posição relativa desses sinais é influenciada pelo caráter benzílico desses núcleos. O multiplete entre δ 1,95 e 1,85 ppm foi atribuído aos hidrogênios H11 e H10. O espectro de RMN de ^1H obtido para o composto **6** é coerente com resultados de outros autores [8,9] e com as previsões baseadas em simulação com o ChemDraw [15].

A Figura 2.5 representa o espectro de RMN de ^{13}C do composto **6**. O número de sinais observados é coerente com o número esperado de carbonos. Ressalta-se ainda a coerência existente entre o número de sinais no subespectro DEPT 135 e o esperado.

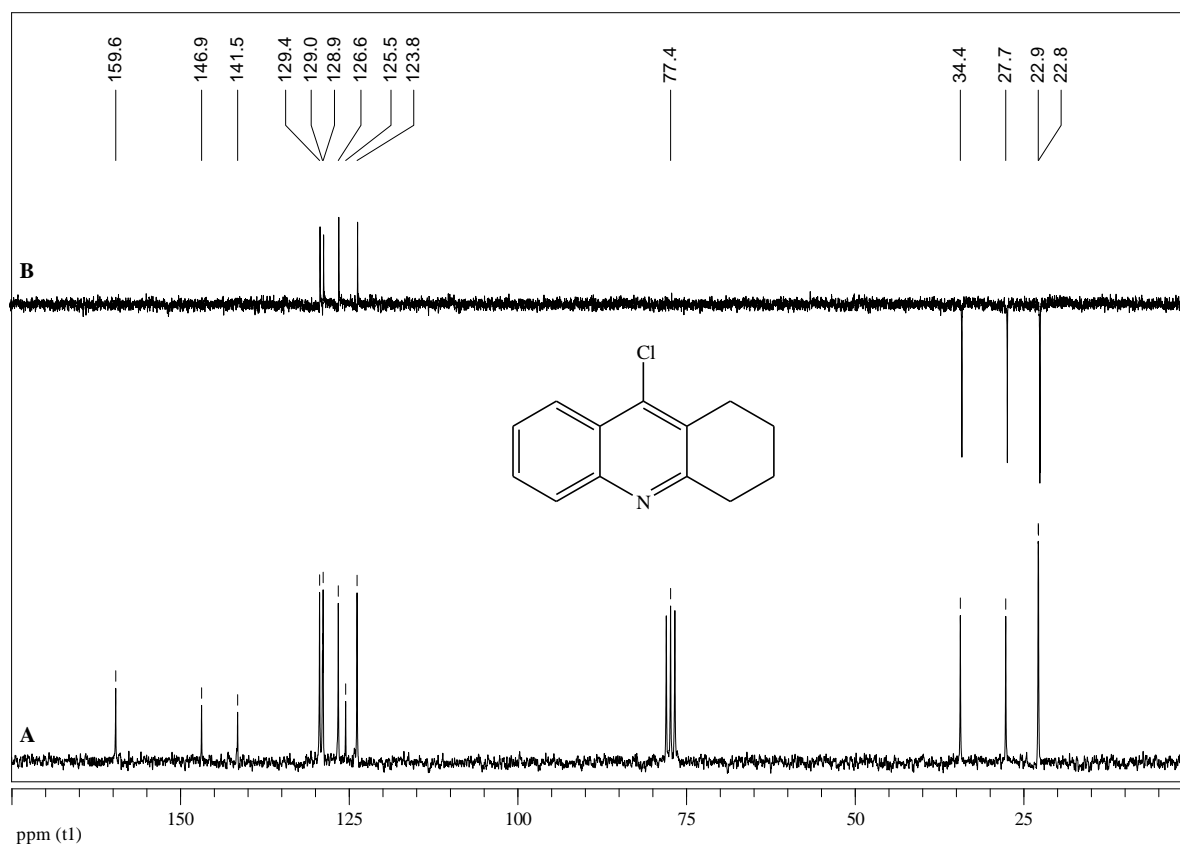
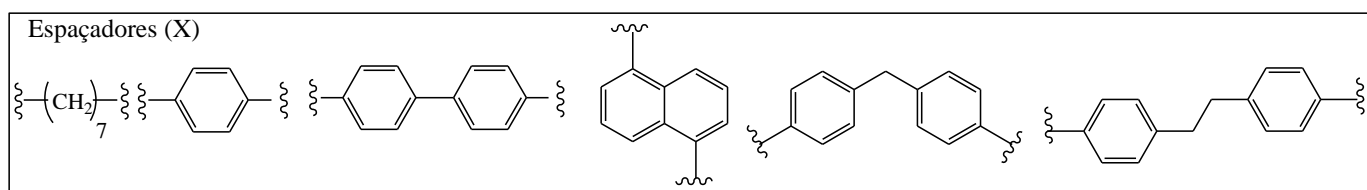
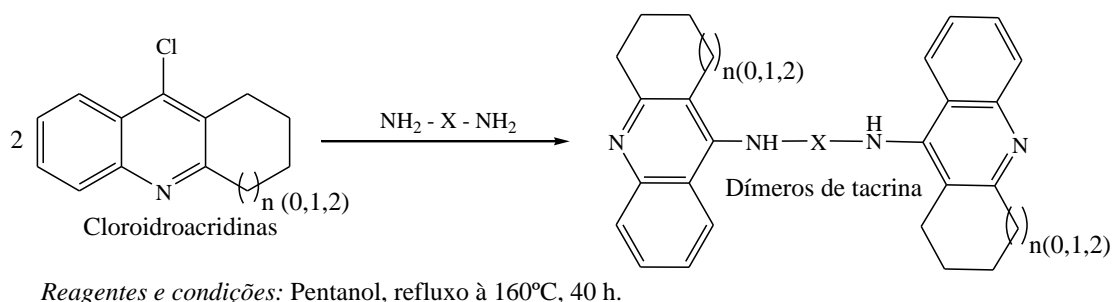


Figura 2.5 - Espectro de RMN de ^{13}C (50 MHz, CDCl_3) (A) e subespectro DEPT 135 (B) do composto **6**.

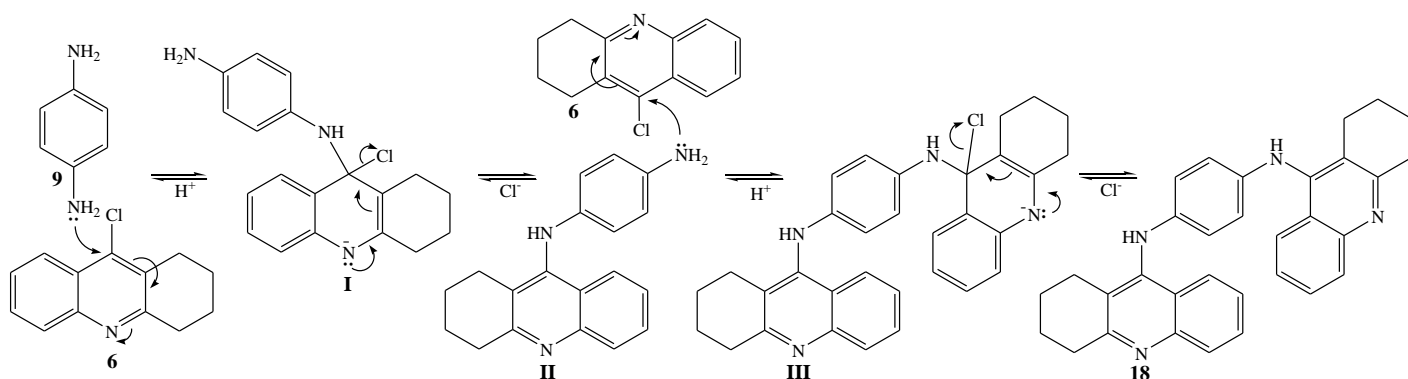
2.3 - Síntese dos dímeros de tacrina e análogos

Obtidas as cloridroacridinas **5-7** procedeu-se a sequência de síntese para a obtenção dos dímeros de tacrina conforme mostra o Esquema 2.8.



Esquema 2.8 - Síntese de dímeros de tacrina e análogos.

A metodologia utilizada [9] foi escolhida por envolver apenas uma etapa e apresentar bons rendimentos [8,16,17]. A proposta de mecanismo de síntese dos dímeros é ilustrada no Esquema 2.9 para o composto **18**.

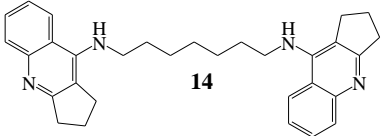
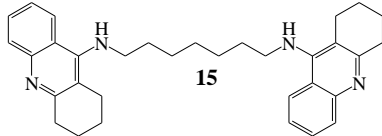
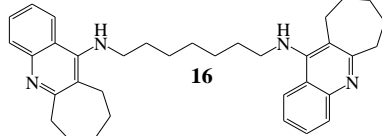
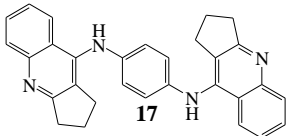
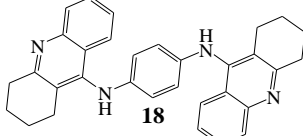
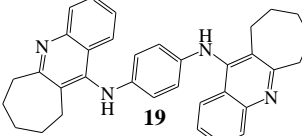
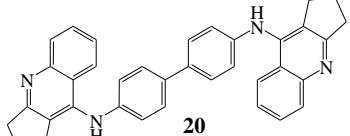
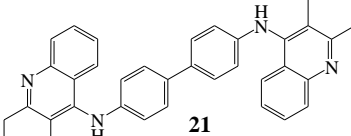
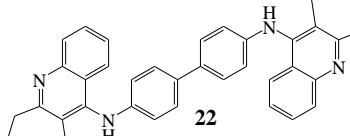
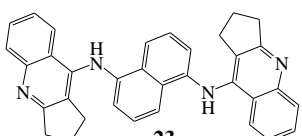
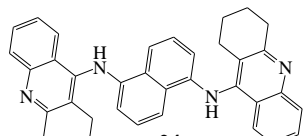
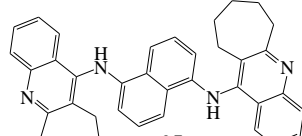
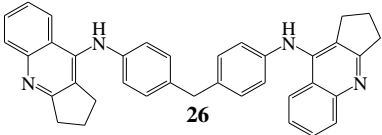
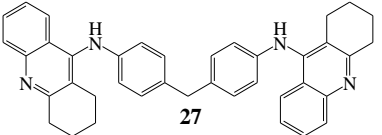
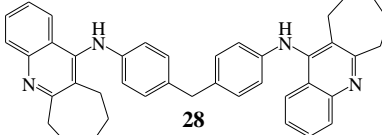
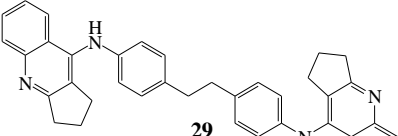
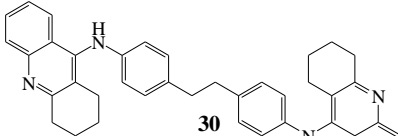
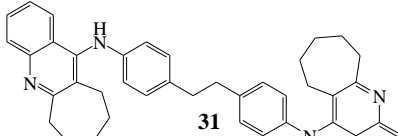


Esquema 2.9 - Proposta de mecanismo para a síntese do composto **18**.

Inicialmente o composto **9** faz um ataque nucleofílico ao composto **6** levando à formação do intermediário tetraédrico **I**, o qual após a eliminação do ânion cloreto e rearomatização converte-se à **II**. A repetição dessa etapa gera o composto **18**. A proposta de mecanismo apresentada segue o padrão adição-eliminação [7].

A Tabela 2.2 (pág. 29) apresenta os dímeros obtidos e os rendimentos de reação.

Tabela 2.2 – Dímeros obtidos e rendimentos de reação (*Rendimento obtido/literatura [8])

 14	 15	 16
79/36*	83/47*	61/22*
 17	 18	 19
77	74	85
 20	 21	 22
95	98	92
 23	 24	 25
64	43	57
 26	 27	 28
92	87	90
 29	 30	 31
94	85	55

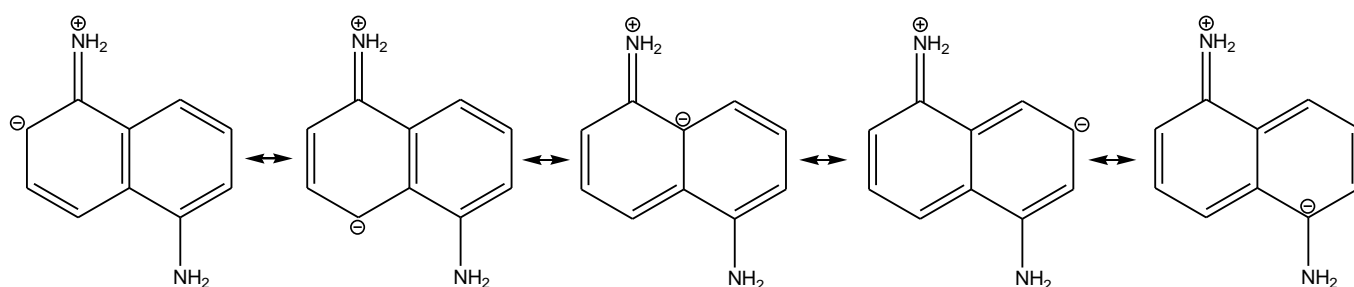
Conforme se pode calcular da Tabela 2.2 e se sumariza na Tabela 2.3 (pág. 30) o rendimento médio das reações de síntese dos dímeros foi de 78%. Para reações de substituição nucleofílica aromática esse é um valor significativo [7]. Isso pode ser uma evidência do efetivo papel ativador do nitrogênio piridínico ao estabilizar a carga que surge durante o processo conforme mostrado no Esquema 2.9 (pág. 28) [18]. Relativo aos dímeros **14-16**, já descritos na literatura, os rendimentos aqui obtidos foram melhores [8] provavelmente em função da maior eficiência do processo de purificação via cristalização.

Tabela 2.3 – Rendimentos médios (%) por tipo de espaçador e por "n"

Dímeros	"n"			Média por espaçador
	0	1	2	
14-16	79	83	61	74
17-19	77	74	85	79
20-22	95	98	92	95
23-25	64	43	57	55
26-28	92	87	90	90
29-31	94	85	55	78
Média por "n"	84	78	73	78*

*média global

Os dímeros com "n=0" tiveram rendimento médio de 84%, superior aos demais. Parte dessa observação pode ser justificada pela maior eficiência do processo de purificação por cristalização para esses compostos, visto que os mesmos mostraram-se menos solúveis, em oposição aqueles para os quais "n=1 ou = 2". Os compostos com "n=0" parecem apresentar interações intermoleculares no estado sólido mais intensas fato consonante com seus maiores pontos de fusão. Por outro lado, os compostos **23-25** apresentaram rendimento médio inferior aos demais. Conforme se observa no Esquema 2.9 (pág. 28) a substituição nucleofílica envolve um par eletrônico não ligante da amina de onde se depreende que a disponibilidade desse par eletrônico deva ser um dos fatores importantes no desenvolvimento dessa reação. Dentre as aminas avaliadas (**8-13**, pág. 21), a amina naftalênica **11** é a que possui o maior número de estruturas de ressonância (cinco estruturas, Esquema 2.10) para estabilização no sistema aromático dos elétrons advindos do grupo amino, o que implica em menor disponibilidade dos mesmos para o ataque nucleofílico. As demais diaminas aromáticas possuem no máximo três estruturas de ressonância.

Esquema 2.10 - Contribuintes de ressonância não-simétricos da diamina naftalênica **11**.

Além disso, a estimativa teórica de basicidade para as monoaminas, as diaminas e as aminas análogas à da estrutura **II** no Esquema 2.9 (pág. 28) sugere menor basicidade para as aminas naftalênicas em todos os casos, o que indica menor disponibilidade do par eletrônico não ligante [19]. Assim essas observações sugerem que o menor rendimento de reação para a série **23-25** possa estar associada à menor disponibilidade dos elétrons não ligantes da amina do espaçador naftalênico. Não obstante outros fatores parecem contribuir para o rendimento de reação visto que compostos como os da série **14-16** apresentam espaçadores diamina com maior disponibilidade de seus pares eletrônicos não ligantes. Em relação aos dímeros com espaçadores aromáticos, exceto para a série **23-25** já discutida, os dímeros com espaçadores

lineares apresentam o menor rendimento médio. Um dos fatores que determinam a cinética e o rendimento de reações é o de direcionabilidade adequada para que a reação ocorra [20]. Neste sentido, pode-se supor que os dímeros, cujos espaçadores possuem maior liberdade conformacional, tenham, dentre as possibilidades de orientação possíveis, um número menor de conformações adequado à correta orientação de reação, especialmente que algumas delas podem significar, após a adição da primeira cloridroacridina, o posicionamento da segunda componente amina em proximidade com o substituinte hidroacridina, sendo, portanto, estericamente impedido de interagir com as cloridroacridinas presentes no meio. No caso dos dímeros com espaçadores aromáticos, a disposição da segunda amina estará suficientemente afastada da primeira hidroacridina incorporada, já que o espaçador é mais rígido. Esse fator além de auxiliar no entendimento do melhor desempenho dos compostos da série **20-22** explicaria o melhor resultado relativo entre os compostos das séries **26-28** e os da série **29-31** visto serem os primeiros menos flexíveis.

Os dímeros apresentados na Tabela 2.2 (pág. 29) foram caracterizados por análises de IV e RMN. Os compostos **18** e **21** também foram caracterizados por raios-X. Ilustrativamente serão abordados alguns aspectos dessas caracterizações para o composto **21**.

A Figura 2.6 representa o espectro IV do composto **21** onde se ressalta duas diferenças em relação aos reagentes: *i*) um conjunto de bandas em torno de 3300 cm^{-1} característico de estiramento de ligação N-H de amina secundária aromática; *ii*) a intensificação das bandas referentes ao estiramento da ligação C-H de anel benzênico que ocorre em 3159 cm^{-1} , evidenciando a incorporação do grupo benzidina à molécula [14].

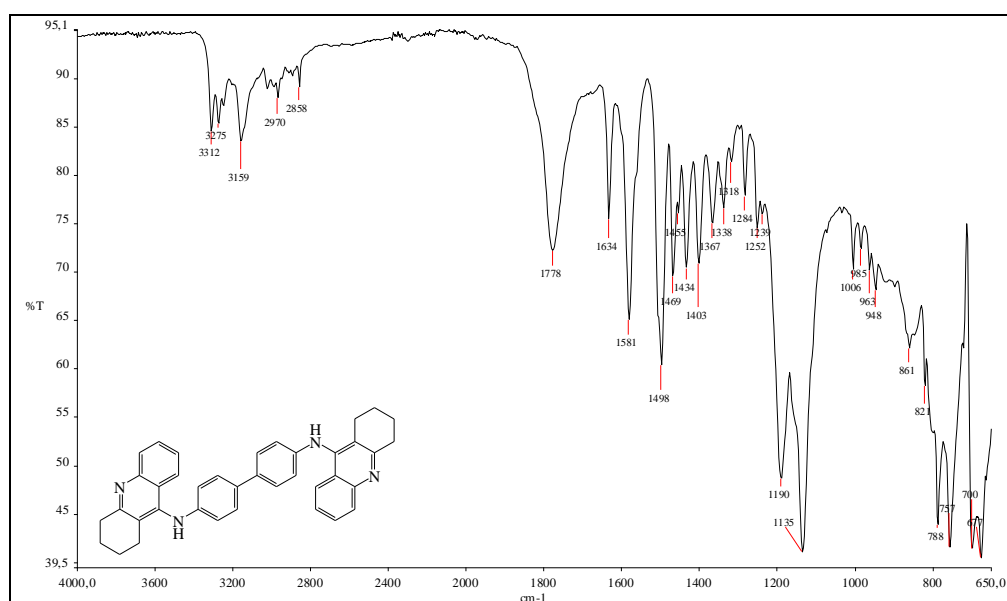


Figura 2.6 - Espectro IV do composto **21**.

A Figura 2.7 (pág. 32) representa o espectro de RMN de ^1H do composto **21**. Observa-se que a razão entre o valor de integração dos sinais dos hidrogênios aromáticos e dos hidrogênios alifáticos é de 1 para 1, conforme esperado para o composto **21** e diferente daquela esperada para os reagentes.

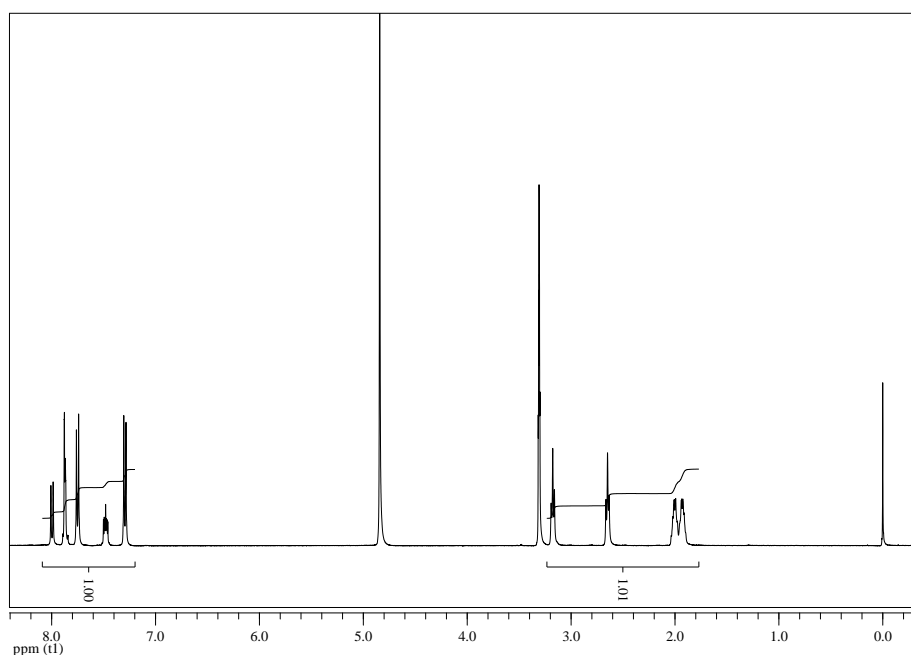


Figura 2.7 - Espectro de RMN de ^1H do composto **21** (400 MHz, CD_3OD).

A Figura 2.8 representa a expansão dos sinais na região característica de hidrogênios aromáticos.

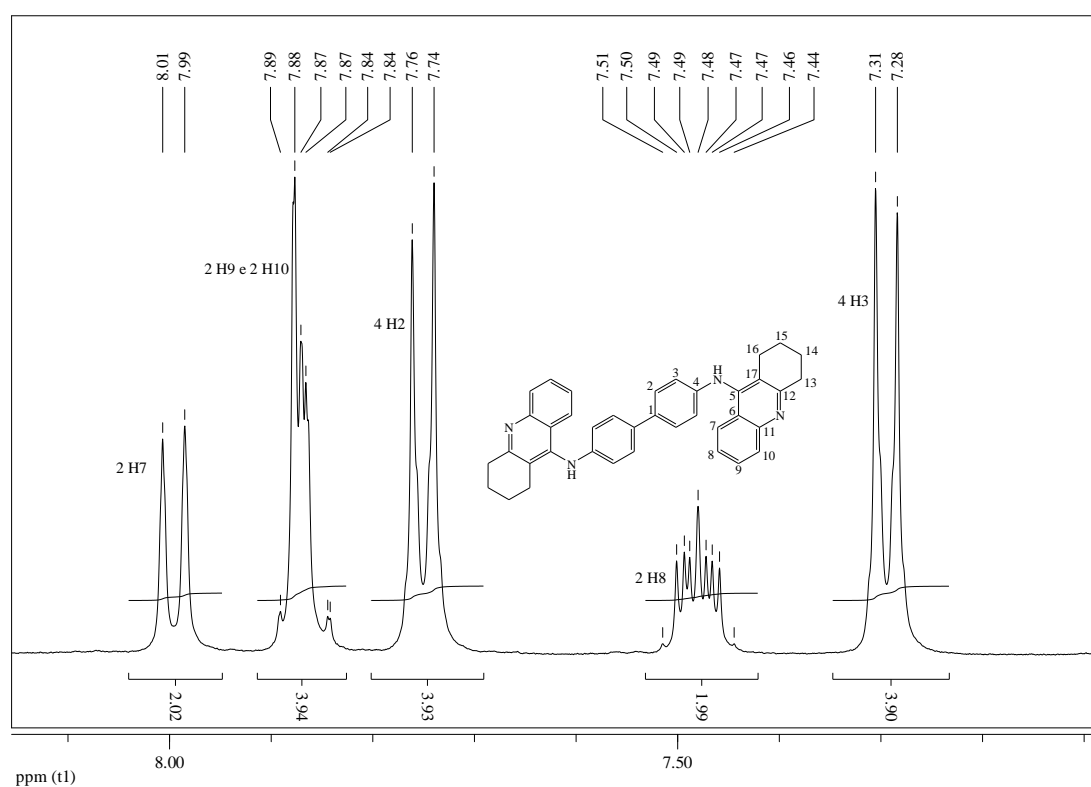


Figura 2.8 - Expansão do espectro de RMN de ^1H do composto **21** na região entre δ 8,15 e δ 7,60 ppm.

Na Figura 2.8 verificamos um duplete em δ 8,00 ppm ($J = 8,7$ Hz) referente aos hidrogênios H7. O posicionamento do sinal mais afastado do TMS está associado ao efeito de menor blindagem eletrônica provocado pelo nitrogênio piridínico. Entre δ 7,90-7,83 ppm, temos um multipeto que foi atribuído aos hidrogênios H9 e H10. A maioria dos espectros dos dímeros sintetizados apresenta esses sinais bem característicos do núcleo derivado da tacrina (um tripeto mais afastado do TMS e um dupeto mais

próximo do TMS). O duplete em δ 7,75 ppm ($J = 8,6$ Hz) foi atribuído aos hidrogênios H2. O duplete em δ 7,29 ppm ($J = 8,6$ Hz) foi atribuído aos hidrogênios H3. Como os hidrogênios H3 possuem uma densidade eletrônica maior quando comparados aos H2, o sinal no RMN de ^1H referente aos mesmos estaria mais próximo do sinal do TMS. Tal fato é racionalizado na suposição de que os hidrogênios H3 ao estarem em posição *orto* em relação ao carbono ligado ao nitrogênio são blindados por ressonância. Entre δ 7,52 e 7,44 ppm observa-se um multipeto referente a dois hidrogênios, o qual foi atribuído aos hidrogênios H8. Estes seriam os hidrogênios mais blindados do sistema quinolínico conforme análise das estruturas de ressonância.

A expansão do RMN de ^1H do composto **21** na região correspondente aos hidrogênios alifáticos é mostrada na Figura 2.9. Observamos nessa ampliação um tripeto em δ 3,18 ppm ($J = 6,3$ Hz) referente aos quatro hidrogênios H13. Estes são considerados menos blindados dada a maior proximidade com o nitrogênio piridínico. Em δ 2,65 ppm ($J = 6,2$ Hz) observa-se outro tripeto, o qual foi atribuído aos hidrogênios H16. Aos hidrogênios H14 e H15 foram atribuídos os dois multipletos observados entre δ 2,05-1,97 ppm. O espectro de RMN de ^1H do composto **21** e atribuições acima concordam com as simulações de espectro com o ChemDraw [15].

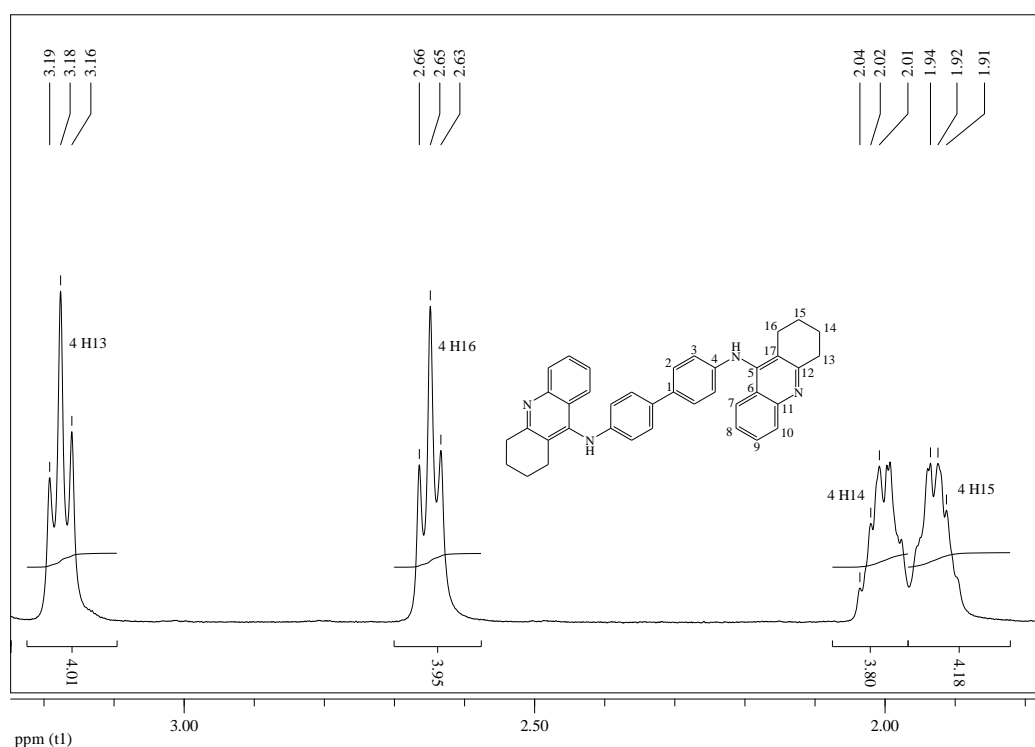


Figura 2.9 - Expansão do RMN de ^1H de **21** na região entre δ 3,25 e δ 1,80 ppm (400 MHz, CD_3OD).

Na Figura 2.10 (pág. 34) apresentam-se o espectro de RMN de ^{13}C do composto **21** e o subspectro DEPT 135. O espectro apresenta um total de dezessete sinais distintos para a substância em análise, sendo treze na região correspondente à de carbonos aromáticos e quatro na região correspondente à de carbonos alifáticos. O subspectro DEPT 135 indica seis tipos de carbonos de "CH" e quatro tipos de carbonos de "CH₂". Em conjunto essas observações concordam com o esperado para o composto **21**.

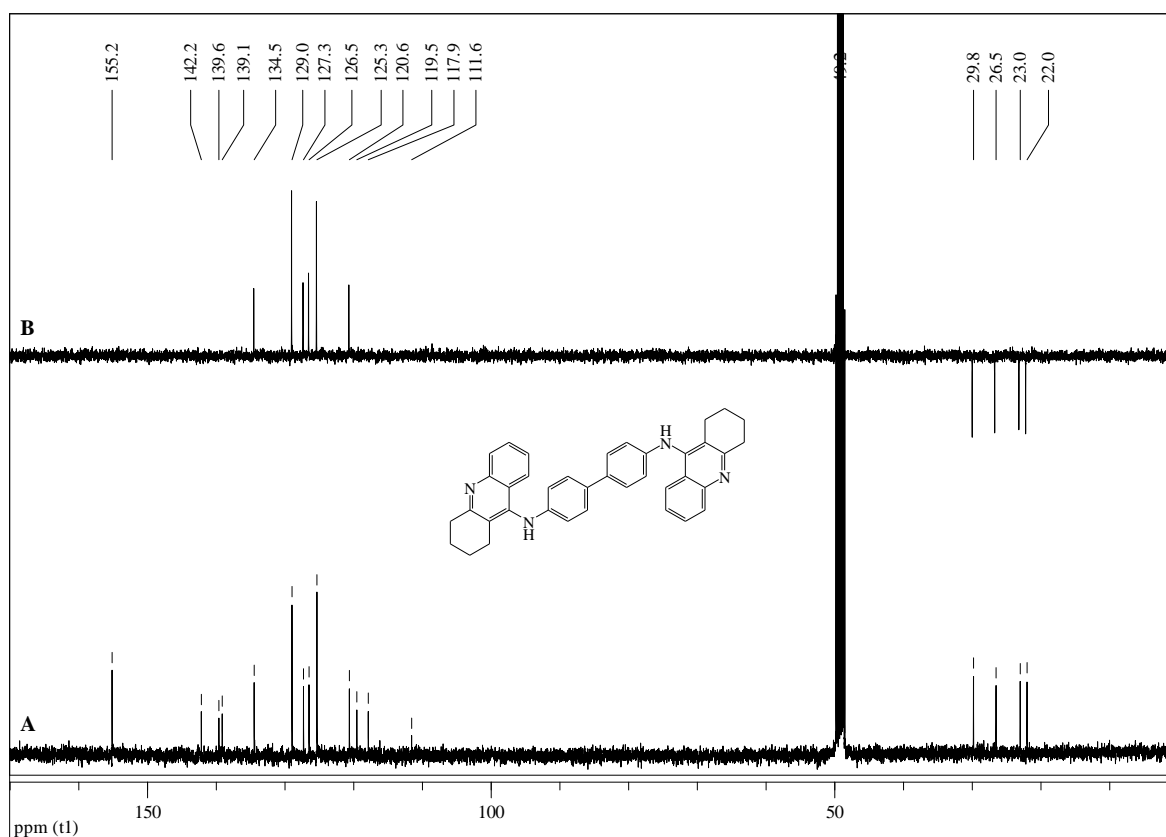


Figura 2.10 - Espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz, CD_3OD) (A) e subspectro DEPT 135 de **21** (B).

As estruturas de raios-X têm servido a muitos propósitos na química visto fornecerem informações tanto relativo ao conhecimento da disposição espacial dos grupos componentes de uma molécula quanto da forma como um ligante está associado a uma biomolécula de interesse. Essas e outras informações permitem o estabelecimento da relação entre a estrutura e a atividade, o esclarecimento sobre a reatividade/afinidade dos compostos e propriedades espectroscópicas [21]. Nesse contexto, foi realizada a determinação da estrutura de raios-X do composto **21**, cuja representação ORTEP está apresentada na Figura 2.11. O deslocamento dos elipsoides estão desenhados ao nível de probabilidade de 50%.

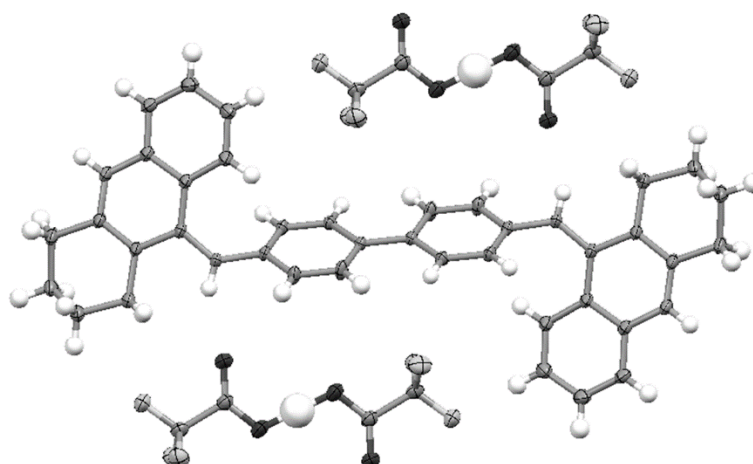


Figura 2.11 - Representação ORTEP da estrutura de raios-X do composto **21**.

Como se observa na Figura 2.11, a estrutura obtida por raios-X concorda com aquela esperada e sugerida pelas demais análises. Como se observa a molécula não é plana o que pode sugerir que a ressonância dos

elétrons do nitrogênio amínico ocorra predominantemente no sistema aromático quinolínico [7]. Tal fato repercute no comprimento das ligações químicas medidas entre o nitrogênio amina e os carbonos quinolínico (1,352 Å) e benzidínico (1,427 Å). Outro ponto a destacar é que embora **21** seja um cátion bivalente há quatro moléculas de TFA para cada unidade dimérica. Nesse contexto, observa-se que as moléculas de TFA formam um par entre si, unidas por uma ligação de hidrogênio curta (2,431 Å) [22]. Adicionalmente, observa-se que os nitrogênios amínicos não se apresentam como aceptores de prótons, fato que corrobora a proposta de ressonância de seus elétrons não-ligantes. As ligações de hidrogênio cumprem papel significativo na estabilização da estrutura do cristal do composto **21** conforme se depreende da análise da Figura 2.12.

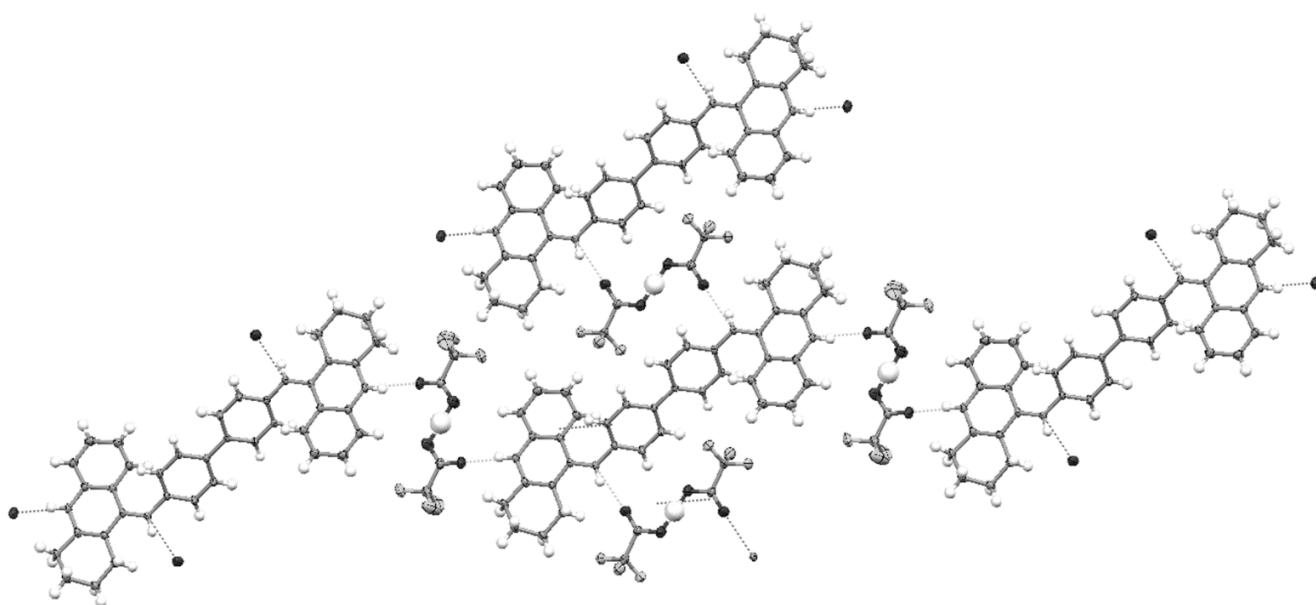


Figura 2.12 - Expansão da estrutura cristalina de **21** onde são ressaltadas as ligações de hidrogênio.

A análise da Figura 2.12 mostra que cada nitrogênio do dímero está envolvido em uma ligação de hidrogênio com o que seria o oxigênio carbonílico de uma unidade de TFA. Tal padrão de disposição se repete ao longo de toda a estrutura cristalina.

A Figura 2.13 mostra as distâncias interatômicas e intermoleculares medidas para **21**.

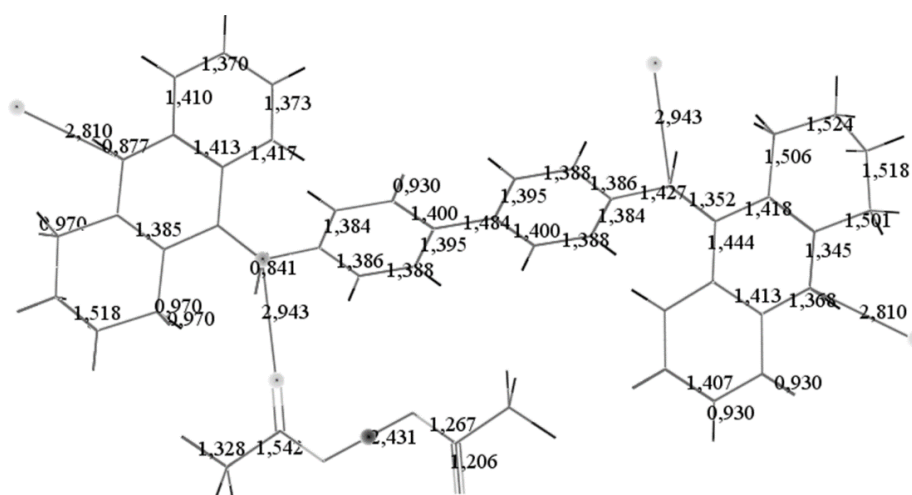


Figura 2.13 - Distâncias interatômicas e intermoleculares (Å) medidas por raios-X para o composto **21**.

Como se observa na Figura 2.13 (pág. 35) o comprimento das ligações entre carbonos hibridizados em sp^3 oscila entre 1,50 e 1,52 Å. No TFA, esse tipo de ligação chega à 1,542 Å, o que sugere repulsão entre os grupos trifluormetila e carboxilato. Além disso, verifica-se que o comprimento da ligação de hidrogênio feita pelo nitrogênio quinolínico (2,810 Å) é inferior àquele do mesmo tipo de ligação feito pelo nitrogênio amínico (2,943 Å) sugerindo efeito de aumento da força de ligação associada à carga positiva do nitrogênio piridínico. Observa-se ainda que o comprimento da ligação "C-H" é influenciada pelo estado de hibridização do carbono, onde $C(sp^3)$ -H (0,97 Å) > $C(sp^2)$ -H (0,93 Å). A análise dos comprimentos de ligação dos anéis do espaçador benzidínico mostra a redução no comprimento de ligação à medida que se migra do centro (1,484 Å) para a extremidade (1,386 Å), o que sugere o predomínio do efeito retirador eletrônico do nitrogênio amínico. Pela mesma linha de análise, observa-se que o comprimento das ligações diminui no sistema piridínico à medida que aproximamos do heteroátomo nitrogênio [18]. Em conjunto, conclui-se que o comprimento das ligações químicas no composto **21** resultam de efeitos de ressonância e de indução.

2.4 - Conclusões

Dímeros de tacrina podem ser obtidos com bons rendimentos, o que pode ser evidência do papel ativador de reação de substituição nucleofílica aromática por nitrogênio do tipo 9-aminopiridínico. A disponibilidade de par eletrônico não-ligante, associada ao quesito de adequada orientação, parece ser importante para o rendimento das reações. Nesse sentido, efeitos estéricos e de restrição conformacional podem determinar a ocorrência ou não da reação. A cristalização mostrou ser uma técnica mais efetiva na obtenção dos dímeros de tacrina. A estrutura dos dímeros evidencia que os comportamentos químicos dos mesmos resulta de um balanço entre efeitos de ressonância eletrônica e efeitos de indução estereoeletrônica.

2.5 – Referências bibliográficas

- [1] Sigma-Alcrich. <http://www.sigmaaldrich.com>. Acessada em 16/11/2013.
- [2] Scifinder. <http://www.cas.org/products/scifinder>. Acessada em 16/11/2013.
- [4] Butini, S.; Campiani, G.; Borriello, M.; Gemma, S.; Panico, A.; Persico, M.; Catalanotti, B.; Ros, A.; Brindisi, M.; Agnusdei, M.; Fiorini, I.; Nacci, V.; Novellino, E.; Belinskaya, T.; Saxena, A.; Fattorusso, C. Exploiting protein fluctuations at the active-site gorge of human cholinesterases: further optimization of the design strategy to develop extremely potent inhibitors. *J. Med. Chem.*, **2008**, 51, 3154-3170.
- [5] Hu, M-K. Synthesis and in vitro evaluation of bis-tacrine congeners. *J. Pharm. Pharmacol.*, **2001**, 53, 83-88.
- [6] Saemian, N.; Arjomandi, O. K.; Shirvani, G. Synthesis of a series of carbon-14 labelled 4-aminoquinazolines and quinazolin-4 (3H)-ones. *J. Label Compd. Radiopharm.*, **2009**, 52, 173-176.
- [7] Clayden, J.; Greeves, N.; Warren, S.; Wothers, P. Organic chemistry, 1st Ed, Oxford University Press, New York, USA, **2001**.

- [8] Hu, M-K.; Wu, L. J.; Hsiao, G.; Yen, M-H. Homodimeric tacrine congeners as acetylcholinesterase inhibitors. *J. Med. Chem.*, **2002**, 45, 2277-2282.
- [9] Carlier, P. R.; Han, Y. F.; Chow, E. S. H.; Li, C. P. L.; Wang, H.; Lieu, T. X.; Wong, H. S.; Pang, Y. P. Evaluation of Short-tether Bis-THA AChE inhibitors. A further test of the dual binding site hypothesis. *Bioorg. Med. Chem.*, **1999**, 7, 351-357.
- [10] Anslyn, E. V.; Dougherty, D. A. Strain and stability in modern physical organic chemistry. Sausalito, CA: University Science, **2006**.
- [11] Discovery Studio v3.1.1.11157, Accelrys Softwares Inc, **2001**.
- [12] Cheng, C.-C.; Yan, S.-J. The Friedländer synthesis of quinolines *Org. React.*, **1982**, 28, 37-45.
- [13] Costa, J. S.; Pisoni, D. S.; da Silva, C. B.; Petzhold, C. L.; Russowsky, D.; Ceschi, M. A. Lewis acid promoted friedländer condensation reactions between anthranilonitrile and detones for the synthesis of tacrine and its analogues. *J. Braz. Chem. Soc.*, **2009**, 20 (8), 1448-1454.
- [14] Silverstein, R. M.; Webster, R. X. Spectrometric identification of organic compounds. 6th Ed, John Wiley & Sons, Inc., New York, EUA, **1997**.
- [15] CambridgeSoft Corporation, ChemDraw[®] Ultra: chemical structure drawing standard, **2003**, www.cambridgesoft.com.
- [16] Pang, Y-P.; Quiram, P.; Jelacic, T.; Hong, F.; Brimijoin, S. Highly potent, selective, and low cost bis-tetrahydroaminacrine inhibitors of acetylcholinesterase: steps toward novel drugs for treating Alzheimer's disease. *J. Biol. Chem.*, **1996**, 271, 23646-23649.
- [17] Pang, Y-P.; Hong, F.; Quiram, P.; Jelacic, T.; Brimijoin, S. Synthesis of alkylene linked bis-THA and alkylene linked benzyl-THA as highly potent and selective inhibitors and molecular probes of acetylcholinesterase. *J. Chem. Soc., Perkin Trans.*, **1997**, 1, 171-176.
- [18] Eicher, T.; Hauptmann, S. The chemistry of heterocycles: structure, reactions, syntheses, and applications. 2nd Ed, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, **2003**, 393-398.
- [19] MarvinSketch 5.5.0.1, ChemAxon Ltd., **2011**, www.chemaxon.com.
- [20] Levine, R. D. The steric factor in transition state theory and in collision theory. *Chem. Phys. Lett.*, **1990**, 175, 331-337.
- [21] Bennett, D. J.; Carswell, E. L.; Cooke, A. J.; Edwards, A. S.; Nimz, O. Design, structure activity relationships and X-ray co-crystallography of non-steroidal LXR agonists. *Curr. Med. Chem.*, **2008**, 15, 195-209.
- [22] Wang, Z.; Luecke, H.; Yao, N.; Quijcho, F. A. A low energy short hydrogen bond in very high resolution structures of protein receptor-phosphate complexes. *Nat. Struct. Biol.*, **1997**, 4, 519-522.

Capítulo 3 – Avaliação de atividade inibitória colinesterásica

3.1 - Cinética de inibição

3.1.1 – Mecanismos cinéticos

A análise de sobreposição dos gráficos de duplos recíprocos a diferentes concentrações do inibidor (Figura 1.8, pág. 8) mostrou que os compostos **14-31** (Tabela 2.2, pág. 29), de forma similar à tacrina, apresentam-se como inibidores mistos de AChE e BChE. A Figura 3.1 exemplifica o padrão observado para o composto **21** (representativo dos demais) em relação à hAChE.

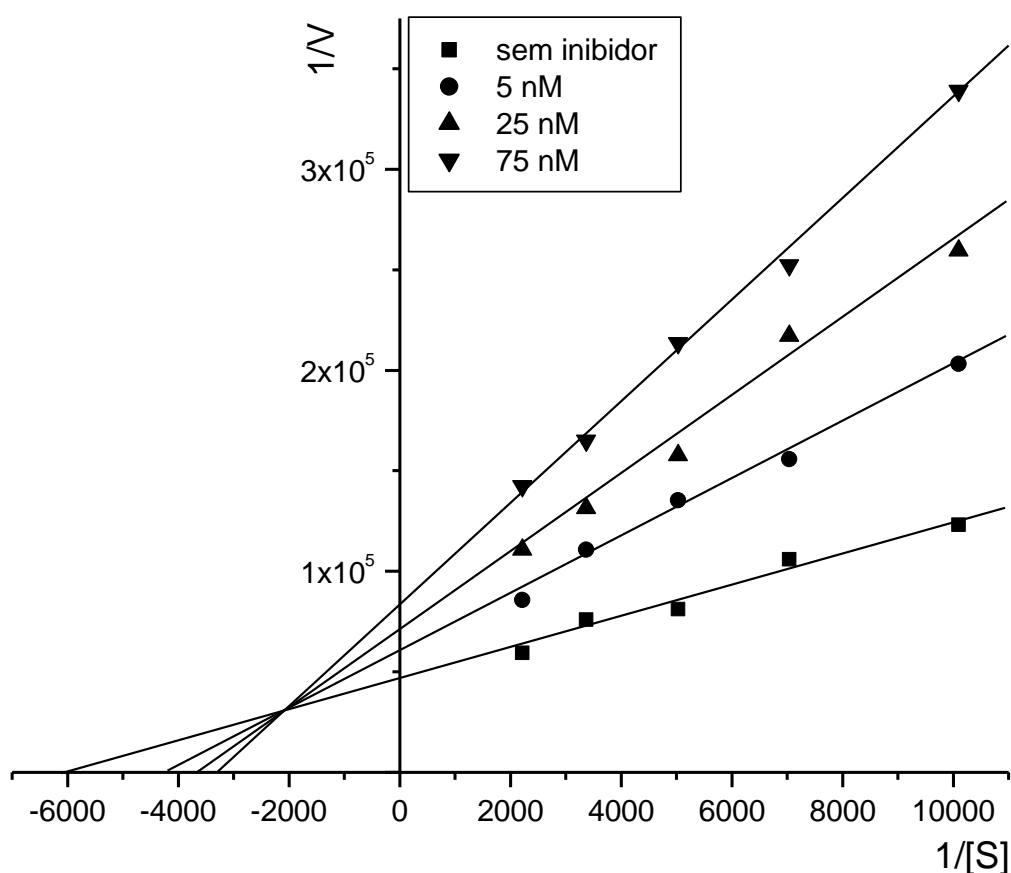


Figura 3.1 – Sobreposição dos duplos recíprocos para o composto **21** em relação à hAChE.

Os resultados de análise dos mecanismos cinéticos sumarizados na Figura 3.1 podem sugerir que, embora os dímeros ocupem significativa fração da fenda catalítica, os mesmos não competem pelo sítio de ligação do substrato, diferente, por exemplo, do inibidor edrofônio, o qual se posiciona em contato íntimo com o resíduo serina do sítio catalítico [1,2]. Essas observações são coerentes tanto com as estruturas de raios-X de complexos de inibidores duais quanto com resultados sugeridos por modelagem molecular [3-6]. A literatura mostra que embora haja representantes para os três tipos de mecanismos cinéticos dentre os inibidores catiônicos de ChEs, a maioria é do tipo misto [7].

3.1.2 – Constantes inibitórias

As constantes inibitórias (K_i) para os compostos avaliados em relação às colinesterases são apresentadas na Tabela 3.1. As mesmas foram obtidas a partir do método das inclinações [8].

Tabela 3.1 - Constantes inibitórias dos dímeros para hAChE, *Ee*AChE, hBChE e eqBChE

Composto	$K_i^a \pm DP^b$ (nM)				Seletividade	
	<i>Ee</i> AChE ^c	hAChE ^d	hBChE ^e	eqBChE ^f	hAChE ^g	hBChE ^h
THA	18,3 ± 5,14	23,2 ± 3,04	2,78 ± 0,15	2,71 ± 0,46	0,12	8,35
14	28,0 ± 12,9	6,43 ± 1,27	124 ± 43,9	202 ± 158	19,3	0,05
15	0,61 ± 0,21	1,12 ± 0,07	40,5 ± 7,66	20,4 ± 4,60	36,2	0,03
16	1,01 ± 0,77	1,20 ± 0,07	3,14 ± 2,48	11,0 ± 0,90	2,62	0,38
17	109 ± 13,7	106 ± 6,43	78,4 ± 37,6	419 ± 90,6	0,74	1,35
18	51,0 ± 1,29	19,8 ± 1,68	61,9 ± 25,9	345 ± 192	3,12	0,32
19	265 ± 43,2	728 ± 43,2	33,4 ± 13,9	22,5 ± 7,50	0,05	21,8
20	83,1 ± 11,0	6,93 ± 1,08	35,7 ± 3,59	53,2 ± 7,28	5,15	0,19
21	10,0 ± 1,55	2,67 ± 0,21	117 ± 36,2	27,1 ± 9,23	43,8	0,02
22	22,1 ± 9,68	31,0 ± 0,16	92,7 ± 9,03	977 ± 59,5	2,99	0,33
23	96,1 ± 17,6	397 ± 82,6	31,9 ± 1,07	324 ± 64,6	0,08	12,5
24	111 ± 21,7	395 ± 98,6	16,2 ± 2,27	274 ± 12,6	0,04	24,4
25	131 ± 40,6	1190 ± 44,8	31,6 ± 0,95	91,8 ± 6,79	0,03	37,7
26	39,4 ± 8,66	13,2 ± 3,37	148 ± 12,3	117 ± 46,6	11,2	0,09
27	31,4 ± 6,45	3,18 ± 0,77	22,2 ± 2,60	40,8 ± 16,5	6,98	0,14
28	190 ± 62,0	233 ± 86,7	658 ± 1,26	1170 ± 49,7	2,82	0,35
29	37,7 ± 8,19	15,9 ± 6,23	68,3 ± 1,09	244 ± 2,66	4,30	0,23
30	5,13 ± 0,37	30,8 ± 2,99	20,0 ± 1,80	122 ± 25,5	0,65	1,54
31	30,0 ± 5,59	1540 ± 82,6	95,3 ± 25,5	563 ± 40,6	0,06	16,2

^a K_i é a média de pelo menos três experimentos. ^bDesvio padrão. ^cAcetilcolinesterase de *Electrophorus electricus*.

^dAcetilcolinesterase humana. ^eButirilcolinesterase humana. ^fButirilcolinesterase equina. ^g $K_{i(hBChE)}/K_{i(hAChE)}$. ^h $K_{i(hAChE)}/K_{i(hBChE)}$.

Os valores de K_i obtidos para os compostos de referência, THA e composto **15**, tem coerência com aqueles publicados [3,5]. Como se observa na Tabela 3.1, o composto **15** é o IC mais potente para AChE. Essa maior potência inibitória é atribuída à habilidade dessa molécula em estabelecer interações específicas de forma otimizada nas regiões SCA e SPA (Figura 1.2, pág. 2), especialmente da AChE [3,4]. Em acordo com a proposta da distância ótima entre as componentes hidroacridina dos dímeros de tacrina para adequada interação simultânea com SPA e SCA, alguns dos dímeros com espaçadores aromáticos, os quais se mostraram mais potentes que THA, possuem distância entre componentes hidroacridina similar ao composto **15**, por exemplo, compostos **21**, **27** e **30** [3,9]. A análise da correlação entre potência inibitória dos dímeros e a distância estimada entre os nitrogênios piridínicos mostra que os menores valores de K_i são observados para os dímeros com 14,5 a 16 Å de distância entre as unidades

hidroacridínicas. Isso se aplica particularmente à AChE. Não obstante, observa-se que há compostos com potencial inibitório na ordem de nanomolar para todos os tipos de espaçadores usados, o que sugere flexibilidade na posição dos sítios interacionais específicos do receptor [9-11].

Inibidores colinesterásicos de estrutura molecular rígida como a tacrina e a galantamina devem parte de sua potência inibitória à pequena perda entrópica associada à formação do complexo EI [12]. Conforme se observa na Tabela 3.1 (pág. 39), a despeito do ganho entrópico no processo de ligação devido à maior rigidez dos dímeros com espaçadores aromáticos, isso não supera a menor habilidade desses ligantes em ajustar suas componentes de maneira a interagir de forma ótima com os domínios adequados do alvo, como se dá com o composto **15**. Embora haja flexibilidade quanto à distância entre os sítios de interação, grupos rígidos no espaçador dificultam o ajuste, ou mesmo que isso ocorra, pode ocasionar alterações estruturais na enzima, as quais podem possuir significativo custo energético [4].

3.1.2.1 – Efeito da basicidade dos dímeros sobre seu potencial inibitório

Conforme estimativas do programa Marvin Sketch (ver procedimentos de modelagem molecular, pág. 103), o espaçador aromático leva à redução significativa na "basicidade do nitrogênio piridínico" resultando em espécies neutras ou com menor densidade de carga positiva resultante em condições de pH fisiológicas. Menor basicidade para séries congêneres à tacrina resultam em menor potencial de inibição da AChE [13,14]. Isso é coerente com a contribuição direta de uma ligação de hidrogênio envolvendo o nitrogênio piridínico da tacrina e a carbonila peptídica de HIS440 do alvo (3,2 Å, Figura 3.2). Outra interação iônica desfavorecida pela remoção da carga no ligante envolve o resíduo GLU199, o qual também é aceito como possível componente de SCA [15,16]. As interações com HIS440 e GLU199 não encontram correspondência similar em SPA [4]. Além disso, a ausência de "carga no nitrogênio piridínico" reduz o efeito de interação cátion- π com TRP84 e PHE330 [17].

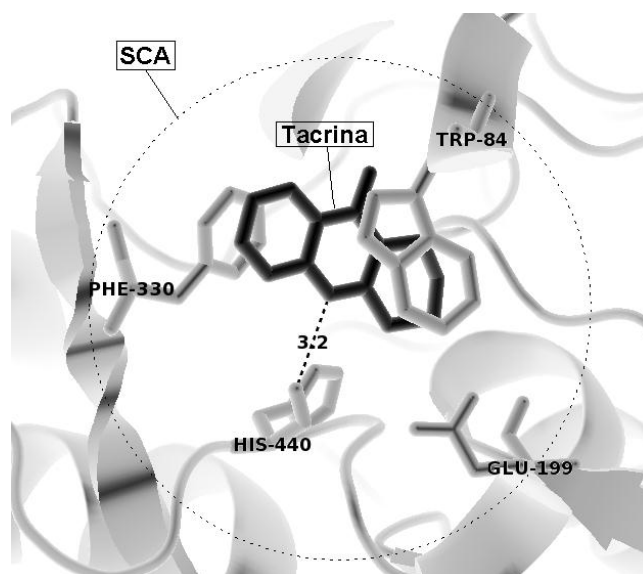


Figura 3.2 – Tacrina na fenda catalítica de *TcAChE* [15].

Em pH 7, estima-se com o programa Marvin Sketch que a espécie biprotonada do composto **15** compoñha 97,5% do equilíbrio (2,5% mono-protonado) contra 85,5% do composto **21** (14% mono-protonada). Em pH 8 (o mesmo dos experimentos), enquanto a espécie biprotonada para **15** é estimada em 79,5% (20% mono-protonada), a correspondente para **21** é de 30,5% (49,5% mono-protonada). Isso poderia sugerir que a menor tendência à protonação seria a causa do menor potencial inibitório dos dímeros com espaçadores aromáticos. Para comprovar essa hipótese, realizou-se um estudo de inibição em pH 7,2 para o composto **21** em relação à *EeAChE*. Neste pH, a composição estimada das espécies carregadas de **21** é similar àquela de **15** em pH 8: 78,7%; 20,0% e 1,3% da mais para a menos protonada. Entretanto, o K_i obtido foi de $11,0 \pm 1,0$ nM, pouco distinto daquele obtido em pH 8 para *EeAChE* ($K_i = 10,0 \pm 1,55$ nM). Isso pode sugerir que a atividade inibitória dessa classe de compostos depende da protonação apenas de um dos nitrogênios o qual estará alocado na região SCA da fenda. Dados de raios-X mostram que quando um átomo de nitrogênio amina do dímero é substituído por um átomo de enxofre, o que gera efeito de desprotonação em um dos nitrogênios piridínicos, a fração protonada liga-se em SCA [18]. Coerente com isso, Butini e colaboradores sintetizaram um dímero de THA biprotonável, com espaçador benzênico separado por grupo etilênico da amina de THA, o qual apresentou $K_i = 1,63 \pm 0,29$ nM em relação à hAChE [5]. Esse valor é similar àquele obtido para **21** em relação à hAChE ($K_i = 2,67 \pm 0,51$ nM). Por outro lado, a presença no ligante de uma unidade hidroacridina protonada parece ser indispensável à atividade inibitória. Conforme mostra a literatura, dentre os inibidores colinesterásicos diméricos com espaçadores aromáticos, os mais potentes possuem pelo menos uma unidade tacrina [5,19]. Em oposição, compostos como estilbamidina [20] e galamina [11], os quais, embora sendo diméricos e cátions bivalentes, não possuem uma unidade tacrina, e talvez por isso, apresentam menor potencial inibitório. No que se refere aos aspectos farmacocinéticos, o uso de espaçadores aromáticos com consequente redução na "basicidade dos nitrogênios piridínicos" mostra-se vantajoso na medida em que pode favorecer a mobilidade através da barreira hematoencefálica [20,13].

3.1.2.2 – Análise comparativa da atividade dos dímeros sobre às enzimas hAChE e *EeAChE*

Comparando os resultados de K_i para as duas AChEs, a análise da Tabela 3.1 (pág. 39) mostra que quanto menor o volume do ligante mais potente ele será para a enzima humana, de maneira que, com o aumento de "n", observa-se uma tendência de o K_i para *EeAChE* ser menor que o K_i para hAChE. A sobreposição das estruturas de raios-X dessas duas colinesterases mostra que a fenda catalítica para ambas é essencialmente a mesma em termos dos resíduos que participam da catálise [21,22]. Não obstante, algumas diferenças podem justificar o perfil inibitório diferenciado dos dímeros. Nesse sentido, como mostra a Figura 3.3 (pág. 42), o *cluster* hidrofóbico envolvendo os resíduos VAL294 (*loop* acila), ALA343 (hélice 14) e VAL365 (hélice 15) em hAChE é substituído por ILE294, VAL343 e ILE365 em *EeAChE*.

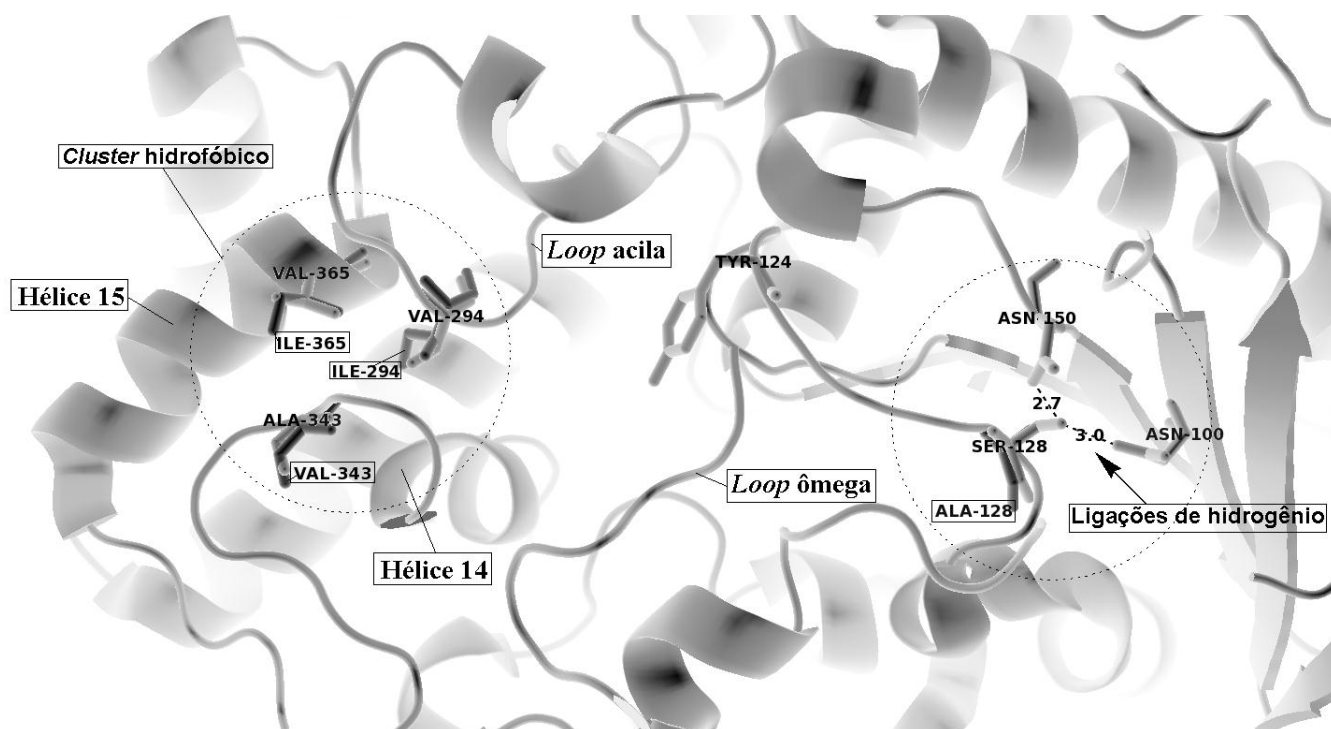


Figura 3.3 – Diferenças entre resíduos de aminoácidos de hAChE e *EeAChE*. Resíduos de *EeAChE* em cinza escuro, identificados com símbolos em bordas.

Como se observa na Figura 3.3, os resíduos ILE294, VAL343 e ILE365 em *EeAChE* possuem grupamento hidrofóbico maior gerando distinto efeito de interação. Ainda da análise da Figura 3.2 podemos ver que na base do *loop* de TYR124 (SPA), o resíduo SER128 em hAChE é substituído por A128 em *EeAChE*. No primeiro caso, a hidroxila de SER128 estabelece ligação de hidrogênio tanto com a carbonila amida da cadeia lateral do resíduo ASN150 (2,7Å) quanto com o nitrogênio amida da cadeia lateral de ASN100 (3,0 Å). Isso poderia gerar maior estabilidade e menor adaptabilidade por parte do *loop* de TYR124 (SPA) de hAChE frente aos dímeros resultando em menor potência dos dímeros com maior "n" [6]. Uma última distinção a ser discutida neste ponto é ilustrada na Figura 3.4.

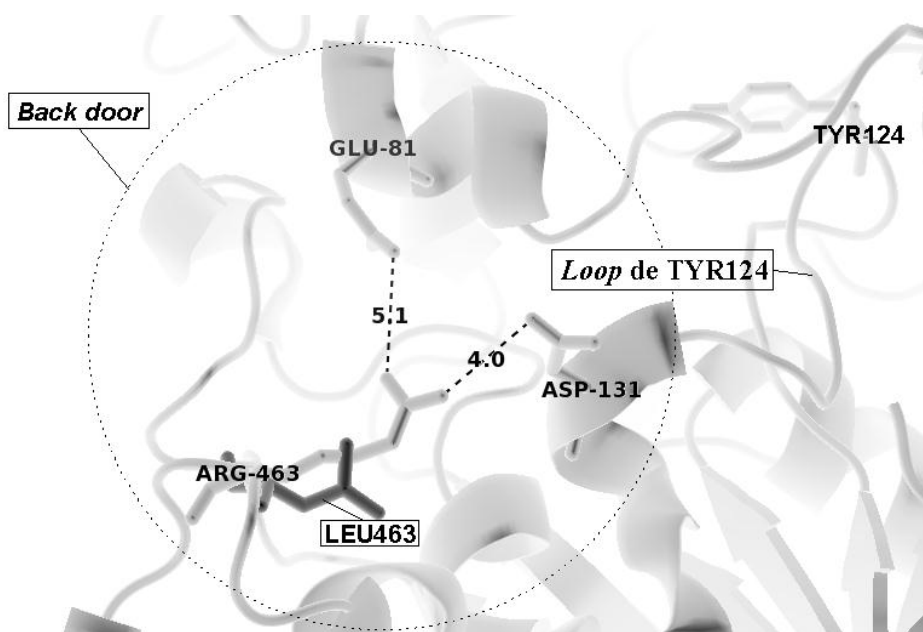


Figura 3.4 – Região de *back door* de hAChE e *EeAChE*. Resíduo de *EeAChE*: LEU463.

Como se observa na Figura 3.4 (pág. 42), na região externa ao suposto *back door* [23-25], o resíduo ARG463 em hAChE é substituído por LEU463 em *EeAChE*, o que pode resultar em maior estabilidade e menor adaptabilidade dos *loops* da fenda catalítica de hAChE, dadas possíveis interações eletrostáticas de ARG463 com os resíduos GLU81 (5,1 Å, *loop* Ω) e ASP131 (4,0 Å, *loop* de TYR124 no SPA). A maior potência de THA bem como huprina X na inibição de *TcAChE* é atribuída ao melhor empilhamento do ligante com o resíduo F330, o qual substitui TYR337 de hAChE [26]. Essa análise não se aplica à *EeAChE* visto que essa permuta de resíduo não ocorre. Entretanto, a comparação por sobreposição das estruturas de raios-X de *TcAChE* e *EeAChE* mostra que essas estruturas são similares entre si no que diz respeito aos pontos mencionados anteriormente, fato que corrobora a discussão acima [27,22].

3.1.2.3 – Análise comparativa da atividade da tacrina e dos dímeros sobre as enzimas ChEs

Da Tabela 3.1 (pág. 39) a tacrina é o inibidor mais potente de BChE. Esse comportamento é distinto daquele observado em relação a AChE. Supõe-se que embora a superfície de interação dos dímeros com os alvos seja maior que a da tacrina em si, isso parece não gerar um conjunto de interações específicas o suficiente para compensar os aspectos de perda entrópica associados à ligação de moléculas com maior liberdade conformacional, ainda que isso possa significar para a fenda catalítica de BChE um conjunto maior de moléculas de água liberadas na interação [28]. Por outro lado, o caráter aromático do ligante, ampliado nos dímeros, é prejudicado pela redução de 14 para 8 no número de resíduos aromáticos na fenda de BChE relativo à AChE. Essa ausência de resíduos aromáticos se estende à entrada da fenda catalítica de BChE, a qual não possui formalmente um SPA. Destaca-se que esse é um dos principais elementos da estrutura da fenda catalítica da AChE responsável pela interação com ligantes diméricos de tacrina [5,29]. Finalmente, cabe destacar que a introdução de um espaçador reduz a possibilidade de interação entre o grupo amina da tacrina e as moléculas de água estruturais da enzima bem como aquelas do meio, as quais, em conjunto, interagem significativamente com resíduos da fenda catalítica [15,30].

3.1.2.4 – Análise comparativa da atividade dos dímeros sobre as enzimas humanas

Os resultados de inibição de BChE obtidos para os dímeros com espaçadores aromáticos foram significativos, com destaque para o composto **24** ($K_i = 16,2$ nM) em relação à enzima humana. A inibição em ordem nanomolar observada nesses casos é sugestiva da habilidade que esses ligantes possuem de estabelecer interações específicas com a fenda catalítica da enzima [5]. Os dímeros **23-25** incluindo outros dois com "n = 2" (**19** e **31**) são os mais seletivos para BChE. Curiosamente, os maiores ganhos de potência na transição de hAChE para hBChE ocorrem entre os dímeros **23-25** e em menor escala entre os dímeros **17-19**. Dentre os compostos avaliados, esses dímeros possuem o espaçador menos flexível. Essas observações são coerentes com o fato de a fenda catalítica de BChE possuir maior espaço livre, o que permite acomodação de moléculas com maior "n" e menos flexíveis [31,5,7]. A comparação entre os resultados de potência inibitória em relação à hBChE para os compostos **21**, **15**, **27** e **30** e outros de

mesma natureza descritos na literatura parecem sugerir a existência de um comprimento ótimo de espaçador para inibição dessa enzima, evidenciando um possível sítio interacional periférico [5,32,31].

3.1.2.5 – Análise do efeito da variação de "n" na atividade dos dímeros

A estratégia de homologação de carbonos em anéis alicíclicos com vista a melhor ajuste ligante-biomolécula tem sido aplicada com sucesso no desenvolvimento de bioligantes [24,33]. Steinberg *et al* observou que a ampliação de "n" em hidroacridinas ("n = 0, 1 e 2") resultava em aumento da potência inibitória sobre AChE [14]. Como se observa na Tabela 3.1 (pág. 39), o efeito inibitório da variação no número de grupos metilênicos no anel alicíclico sobre hAChE e, em alguns casos, sobre *Ee*AChE, resultou na seguinte ordem de potência: "n = 1" > "n = 0" > "n = 2". No caso do espaçador linear: "n = 1" > "n = 2" > "n = 0". Esses resultados sugerem que embora os subsítios de interação do receptor possuam flexibilidade suficiente para comportar um anel alicíclico com sete membros, sua melhor ligação depende de maior flexibilidade do espaçador utilizado. Compostos com espaçadores menos flexíveis apresentaram maior potência relativa se possuírem "n" compatível. Correa-Basurto *et al* concluiu que ligantes com menor volume estariam mais aptos ao empilhamento π - π com TRP84 em SCA de *Tc*AChE (Figura 3.2, pág. 40) [34]. O melhor compromisso entre essas observações é verificado para o caso em que "n = 1". Um ponto interessante dos resultados é que a taxa de decréscimo de potência na transição de "n = 1" para "n = 2" é maior para hAChE que para hBChE. Isso pode ser tanto um reflexo da maior disponibilidade volumétrica quanto do menor rol de interações específicas em hBChE [29]. A tubocurarina, molécula mais volumosa, embora interaja com SCA de BChE, é inibidor periférico de AChE, requerendo maiores concentrações para inibição de AChE [35].

Para BChE, o efeito da variação de "n" na potência inibitória depende do tipo de espaçador bem como da enzima. Mesmo assim pode-se afirmar que o aumento em "n" gera aumento de potência com notável efeito para dímeros com espaçadores lineares. Esse fato pode ser avaliado em função do maior espaço na fenda de BChE, com especial ênfase para a região do *pocket* butila [36,31]. Tomando como referência a série com espaçador alquílico, o uso de espaçador aromático resultou em maior potência inibitória para hBChE nos seguintes casos: para a série com "n = 0", relativo ao composto **14**, todos os dímeros com espaçadores aromáticos são mais potentes, exceto **26**. Na série com "n = 1" são mais potentes que **15** os compostos **24**, **27** e **30**. Assim, o uso de espaçadores aromáticos pode constituir uma forma de melhorar o potencial de interação com hBChE. Por outro lado, os melhores resultados de inibição para eqBChE foram obtidos para os compostos com espaçador alquílico, exceto para **20** e **26** (série com "n = 0").

3.1.2.6 – Análise comparativa da atividade dos dímeros sobre as BChEs

Na comparação entre os dois tipos de BChE, a Tabela 3.1 (pág. 39) mostra que os dímeros são em geral mais potentes para hBChE. A sobreposição entre o modelo por homologia para eqBChE (90,7% de

identidade) e a estrutura de raios-X de hBChE revela quatro diferenças possivelmente significativas na região da fenda catalítica (Figura 3.5).

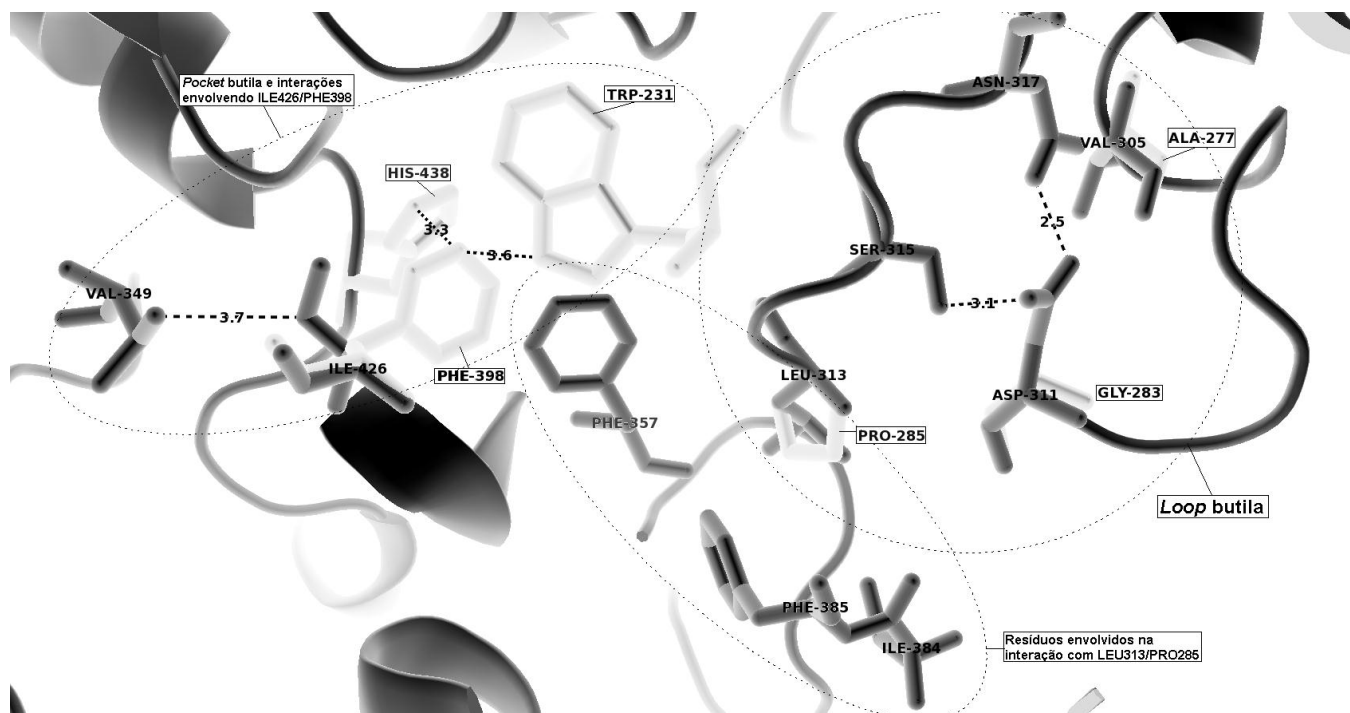


Figura 3.5 – Sobreposição das estruturas de hBChE e eqBChE. Resíduos de hBChE em cinza claro, identificados com símbolos em bordas.

Na Figura 3.5, observamos três distinções no *loop* butila onde os resíduos GLY283, PRO285 e ALA277 em hBChE são substituídos em eqBChE por ASP311, LEU313 e VAL305, respectivamente [36-39]. A outra diferença consiste na substituição de PHE398 em hBChE por ILE426 em eqBChE. A cadeia lateral do resíduo PHE398, projetada para a luz da fenda está em íntimo contato com os resíduos TRP231 (*pocket* butila) (3,6 Å) e HIS438 (catalítico) (3,3 Å). O resíduo ILE426, diferentemente, tem sua cadeia lateral projetada para o seio da fase proteica na direção do resíduo VAL349 à 3,7 Å. O *loop* acila/butila mostra grande mobilidade estrutural, fato que tem sugerido um papel funcional para essa componente estrutural das colinesterases [4,5]. A alteração de sua dinâmica observada em simulações por dinâmica molecular tem sido associada à ação de potentes inibidores [6]. No modelo por homologia de eqBChE observa-se que a cadeia lateral do resíduo LEU313 projeta-se na direção do *pocket* lipofílico formado pelos resíduos PHE357, ILE384 e PHE385 de forma mais íntima que a cadeia lateral do resíduo PRO285 na mesma região para hBChE. Além disso, o resíduo ASP311 em eqBChE participa de uma cadeia de ligações de hidrogênio envolvendo os resíduos ASN317 (2,5 Å) e SER315 (3,1 Å) que parece conferir estabilidade ao *loop* butila em eqBChE. Correspondente a essa posição, o resíduo GLY283 em hBChE, além de não estabelecer interações específicas dentro da cadeia proteica, confere maior flexibilidade estrutural à mesma dados os menores efeitos estéricos [40]. Assim, supõe-se que o *loop* mais flexível de hBChE seja mais susceptível de ter alterada sua função pela presença do inibidor dimérico. Além disso, a presença do resíduo mais volumoso VAL305 na entrada da fenda catalítica de eqBChE pode compor elemento de obstrução estérica para a ligação dos dímeros de tacrina [36].

3.1.2.7 – Efeito da mudança da fonte da enzima sobre a atividade inibitória dos dímeros

A comparação entre os valores de K_i de um dado composto em relação as duas AChEs mostra uma variação média de $2,5 \pm 1,2$ vezes de uma enzima para outra. Em relação à BChE, as variações nos valores se dão em média $2,7 \pm 1,1$ vezes. Isso pode sugerir que as conclusões em termos de potência obtidas com ChEs equivalentes às humanas poderão ser estendidas a estas com um limite relativamente estreito de oscilação. Entretanto, alguns compostos apresentam acentuada diferença em K_i , a saber: AChE: **31** (51 vezes), **20** (12 vezes), **27** (10 vezes) e **25** (9 vezes); BChE: **24** (17 vezes), **22** (11 vezes), **23** (10 vezes) e **18** (6 vezes). Com isso, as extensões de atividade devem ser feitas com cautela, especialmente para o caso da AChE. Nesse sentido observa-se que as particularidades estruturais das ChEs de fontes diferentes parecem ter maior efeito na inibição de AChE, o que pode sugerir maior susceptibilidade de controle por parte de inibidores específicos, distintamente de BChE [5,29,31].

3.1.3 – CI_{50} dos dímeros em relação às colinesterases

Os valores de CI_{50} obtidos para os dímeros são mostrados na Tabela 3.2 [41].

Tabela 3.2 - CI_{50} dos dímeros em relação às enzimas hAChE, hBChE, *Ee*AChE, eqBChE

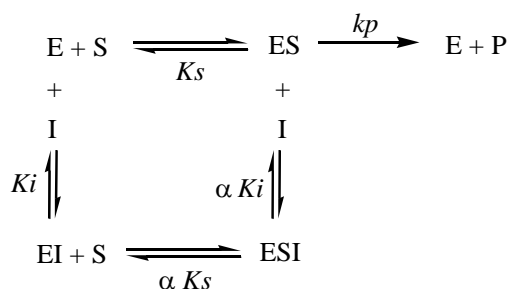
Composto	$CI_{50}^a \pm DP/(nM)$				Seletividade	
	<i>Ee</i> AChE	hAChE	hBChE	eqBChE	hAChE	hBChE
THA	29,4 ± 3,60	122 ± 7,46	47,3 ± 4,05	4,33 ± 0,06	0,39	2,58
14	59,8 ± 8,07	23,0 ± 3,32	246 ± 25,4	179 ± 23,6	10,7	0,09
15	13,0 ± 0,33	7,28 ± 0,69	141 ± 19,6	64,3 ± 4,14	19,4	0,05
16	16,5 ± 1,21	18,4 ± 1,60	39,9 ± 1,25	28,3 ± 3,80	2,17	0,46
17	377 ± 28,4	632 ± 68,7	452 ± 127	608 ± 43,7	0,72	1,40
18	284 ± 57,0	117 ± 25,4	267 ± 11,8	186 ± 23,7	2,28	0,44
19	3120 ± 211	4720 ± 80,5	354 ± 154	169 ± 35,3	0,08	13,3
20	685 ± 81,4	14,5 ± 3,40	1460 ± 192	262 ± 1,74	101	0,01
21	69,5 ± 7,09	54,8 ± 23,9	135 ± 8,90	77,7 ± 10,7	2,46	0,41
22	562 ± 20,1	15,1 ± 1,16	85,1 ± 26,5	2110 ± 94,8	5,64	0,18
23	330 ± 51,0	224 ± 14,4	165 ± 32,3	315 ± 85,8	0,74	1,36
24	270 ± 9,68	312 ± 37,2	329 ± 37,7	157 ± 11,9	1,05	0,95
25	1140 ± 406	1080 ± 98,2	103 ± 24	153 ± 35,1	0,10	10,5
26	32,7 ± 9,97	61,8 ± 4,61	109 ± 16,3	63,5 ± 10,9	1,76	0,57
27	155 ± 8,40	8,94 ± 0,42	206 ± 45,0	113 ± 12,9	23,0	0,04
28	2490 ± 532	477 ± 66,2	1520 ± 133	201 ± 24,8	3,19	0,31
29	59,5 ± 9,56	121 ± 0,35	15,1 ± 1,91	65,9 ± 3,22	0,12	8,01
30	28,7 ± 8,82	196 ± 2,31	40,3 ± 6,22	87,7 ± 10,4	0,21	4,86
31	60,1 ± 22,3	2850 ± 781	4870 ± 27,6	2630 ± 108	1,71	0,59

^a CI_{50} é a média de pelo menos três determinações.

Em linhas gerais, a comparação entre os valores de K_i e CI_{50} mostra que para um dado espaçador, as relações de potência permanecem as mesmas, independente do uso de CI_{50} ou K_i . Não obstante, algumas exceções podem ser observadas, inclusive no quesito seletividade. Esses resultados sugerem que o uso do CI_{50} como elemento de avaliação comparativa pode ser feito, ainda que de forma preliminar [1].

3.1.4 – Afinidade dos dímeros pelas colinesterases acetiladas (α)

O equilíbrio de inibição das ChEs pode ser tratado conforme mostra o Esquema 3.1.



Esquema 3.1 - Possíveis relações de equilíbrio que envolvem o sistema enzima-substrato-inibidor.

Onde E refere-se à enzima, S substrato, K_s constante de dissociação do substrato, K_i constante de dissociação do inibidor, α parâmetro de alteração das constantes de dissociação em função da presença do substrato ou do inibidor e k_p constante cinética da etapa de decomposição. Os valores de α obtidos para os compostos **14-31** são apresentados na Tabela 3.3 [43].

Tabela 3.3 - Valores de α para as interações estudadas neste trabalho

Composto	hAChE	hBChE	EeAChE	EqBChE	Composto	hAChE	hBChE	EeAChE	eqBChE
THA	5,41	3,13	1,4	2,41	23	1,05	4,29	1,96	1,71
14	2,57	1,03	2,22	3,92	24	1,62	2,98	2,06	1,65
15	2,30	2,21	5,15	1,16	25	1,87	1,27	2,27	2,24
16	10,7	9,67	2,24	3,00	26	2,36	2,5	2,16	2,20
17	2,40	4,13	1,38	1,78	27	3,65	1,68	2,09	1,55
18	1,62	1,61	2,57	1,50	28	3,72	6,11	1,19	3,80
19	65,8	2,12	2,06	4,39	29	6,18	1,24	4,00	1,13
20	2,39	8,19	2,71	1,68	30	4,74	3,38	31,0	1,41
21	7,12	1,91	2,16	1,73	31	1,77	2,59	2,77	12,7
22	1,90	1,97	5,77	1,71					

Em geral, os valores de α obtidos estão no intervalo de 2-10, comum à tacrina e derivados [14], evidenciando que os dímeros conservam alta afinidade pela enzima acetilada [44]. Alguns compostos apresentam maior similaridade de interação para as duas formas da enzima, tais como **23** em relação à hAChE ($\alpha = 1,05$) e **14** em relação à hBChE ($\alpha = 1,03$). Em contrapartida, o composto **19** em relação à hAChE parece apresentar padrão distinto de interação com as duas formas da enzima [45]. Em parte esse comportamento poderia ser entendido em termos de seu maior volume e menor flexibilidade do espaçador, ou, sob outro ponto de vista, pode se tratar de um ligante com maior perfil competitivo. Neste

caso, a acetilação da enzima poderia gerar dificuldade de acomodação do grupo ligante, o qual possui maior volume e proximidade ao sítio esterático [14]. No global, os valores de α mostrados na Tabela 3.3 (pág. 47) corroboram o perfil de cinética mista dos dímeros [1]. Dentre as enzimas investigadas, *EeAChE* apresenta a menor variação de α para ampla faixa de variação de valores de K_i . Em média, as enzimas humanas apresentam maior α médio (3,04 hAChE, 2,89 hBChE, 2,54 *EeAChE* e 2,05 eqBChE), o que indica que esses inibidores tem a sua ligação mais afetada pela acetilação das enzimas humanas. Termodinamicamente, a redução média na energia livre de interação dos inibidores avaliados devido à acetilação/butilação da enzima é de 6% [28]. Neste contexto, os maiores valores são verificados para as enzimas humanas: hAChE (7,9%), hBChE (5,9%), *EeAChE* (5,5%) e eqBChE (4,7%). Cineticamente, o aumento no valor de K_i com a acetilação/butilação da enzima pode evidenciar a redução no valor de K_{on} (constante cinética de associação), o que sugere efeito de impedimento estérico/alteração conformacional provocado pela acetilação/butilação da enzima [45]. Mesma análise aplica-se ao aumento de K_s pelo inibidor [45]. Neste caso, pode-se inferir que os dímeros interferem no mecanismo de captação do substrato, possivelmente pela ligação com a região da enzima que participa desse processo [46,1].

3.2 - Docking molecular

3.2.1 – Acetilcolinesterase

Neste trabalho, adotou-se o procedimento de *docking* molecular com receptor rígido, por isso, tomou-se como base para estimar a conformação de interação a estrutura do complexo *bis-7-THA:TcAChE* [4,28]. A pressuposição de que a ligação dos dímeros ocorre na fenda catalítica das colinesterases, a qual foi feita para definição de *grid*, se deu a partir da análise cinética de Yonetani-Theorell tendo como referência a tacrina (Figura 1.10, pág. 9). Neste experimento, confirmou-se o comportamento competitivo entre o composto **21** e THA pela fenda catalítica de *EeAChE* (Figura 3.6) [15,47,48].

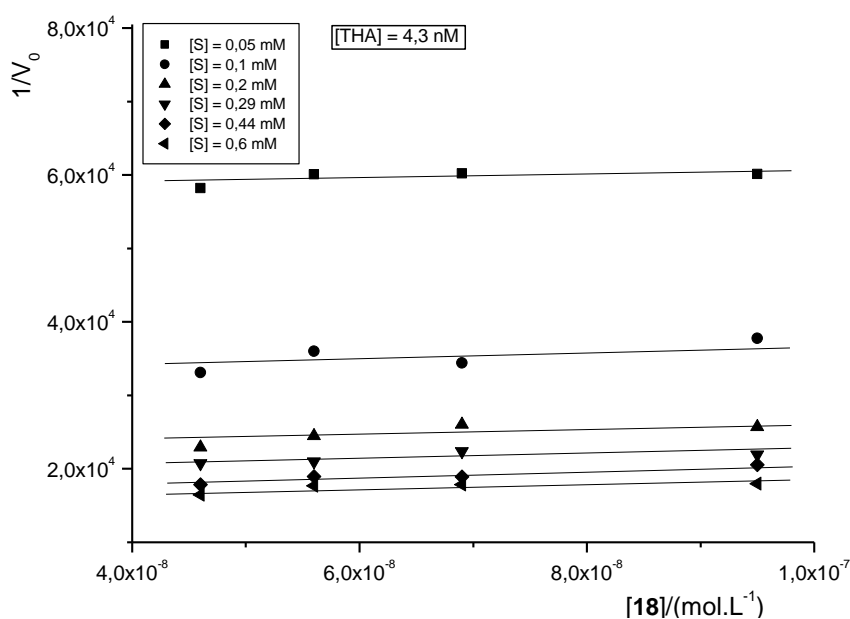


Figura 3.6 – Análise cinética de Yonetani-Theorell à 4,3 nM em THA para o composto **18**.

A Figura 3.7 mostra a conformação de ligação do composto **21** na fenda catalítica de *TcAChE* obtida por *docking*. Esse resultado é representativo para os inibidores/AChEs avaliados neste trabalho.

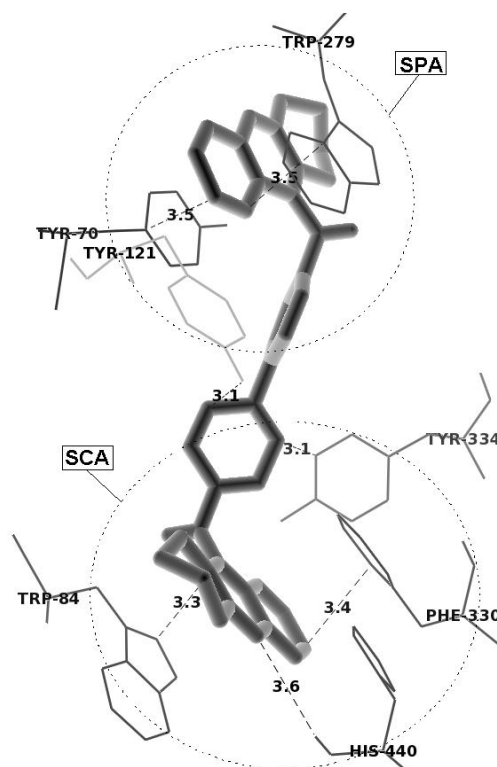


Figura 3.7 - Conformação de ligação do composto **21** na fenda de *TcAChE*.

Como se observa na Figura 3.7, o composto **21** estabelece dois empilhamentos π - π duplos nos quais participam as frações quinolínicas da molécula dimérica: Um na parte superior da Figura 3.7, envolvendo os resíduos TRP279 (3,5 Å) e TYR70 (3,5 Å); outro, na parte inferior da Figura 3.7, envolvendo os resíduos PHE330 (3,4 Å) e TRP84 (3,3 Å). Além dessas interações, a carbonila peptídica do resíduo HIS440 atua como aceitador na ligação de hidrogênio com o nitrogênio piridínico protonado do dímero (3,6 Å). O resíduo HIS440 é um dos três componentes da tríade catalítica, comum a essa classe de enzimas [49]. Adicionalmente, o resíduo TYR121 pode estabelecer uma ligação de hidrogênio com aceitador π a 3,1 Å com o espaçador aromático. Finalmente, ressalta-se que o resíduo TYR334 estabelece interação interaromática parcial com o espaçador à 3,1 Å. Disposição similar pode ser vista para outras classes de ligantes que possuem benzidina [50].

Em linhas gerais, as conformações de interação sugeridas pelo *docking* molecular para os dímeros de tacrina em relação às colinesterases são coerentes àquelas verificadas para compostos diméricos [4,15,18]. Esse padrão de ligação é característico de ligantes com maior poder de alteração da atividade dessas enzimas [5]. Neste contexto, elementos estruturais aos quais se atribuem importante papel na função/flexibilidade conformacional/estrutural, tais como domínios estruturais do tipo SH3 *like* têm a sua disposição alterada/retida pela ligação dos dímeros [51]. Nesse sentido é que se enquadra a organização/retenção de posição de resíduos aromáticos tais como TYR70/TYR121/TRP279 em SPA ou TRP84/PHE330/TYR334 em SCA em torno das componentes aromáticas do ligante. Esses domínios

compõem possíveis *hot spots* da proteína, cuja perda de mobilidade gera perda da atividade enzimática [52]. Tais interações contribuem de forma significativa para a definição da energia de interação dos compostos, o que reflete na sua capacidade inibitória expressa por K_i (Tabela 3.1, pág. 39). Efetivamente, os resultados de *docking* sugerem que a estratégia de se buscar interações interaromáticas entre o espaçador aromático do ligante e os resíduos aromáticos de meia-fenda das colinesterases em avaliação é válida (Figura 3.7, pág. 49). Entretanto, a introdução do componente aromático nessa região gera uma perda de flexibilidade na molécula ligante o que repercute na redução da efetividade das interações interaromáticas passíveis de ocorrerem em SPA/SCA. Em contrapartida, os melhores resultados são verificados para os compostos com nítida habilidade de combinar as interações em SCA/SPA com aquelas na região de meia fenda. Nesse contexto, a tese do comprimento ideal do espaçador se confirma para a maioria dos compostos avaliados. O efeito do aumento de "n" na potência dos compostos em relação à BChE é visto no *docking* molecular como associado ao maior espaço disponível na fenda catalítica dessa enzima para acomodar maiores volumes, especialmente aptos à interações de natureza hidrofóbica. Na contrapartida, para AChE, os resultados mostram que o melhor benefício interacional será obtido para os compostos nos quais "n = 1", similar à tacrina.

No contexto das interações dos dímeros com a região de meia fenda, o *docking* mostra que os espaçadores aromáticos estão em maior contato com o resíduo de TYR334 (3,0 Å, Figura 3.8). Ao contrário, o anel aromático triazólico do composto *syn* TZ2PA6, um inibidor fentomolar de AChE [19], projeta-se, de forma oposta a dos dímeros, na direção do *pocket* acila (4,1 Å, PHE290), além de interagir via nitrogênio com uma molécula de água estrutural (3,1 Å).

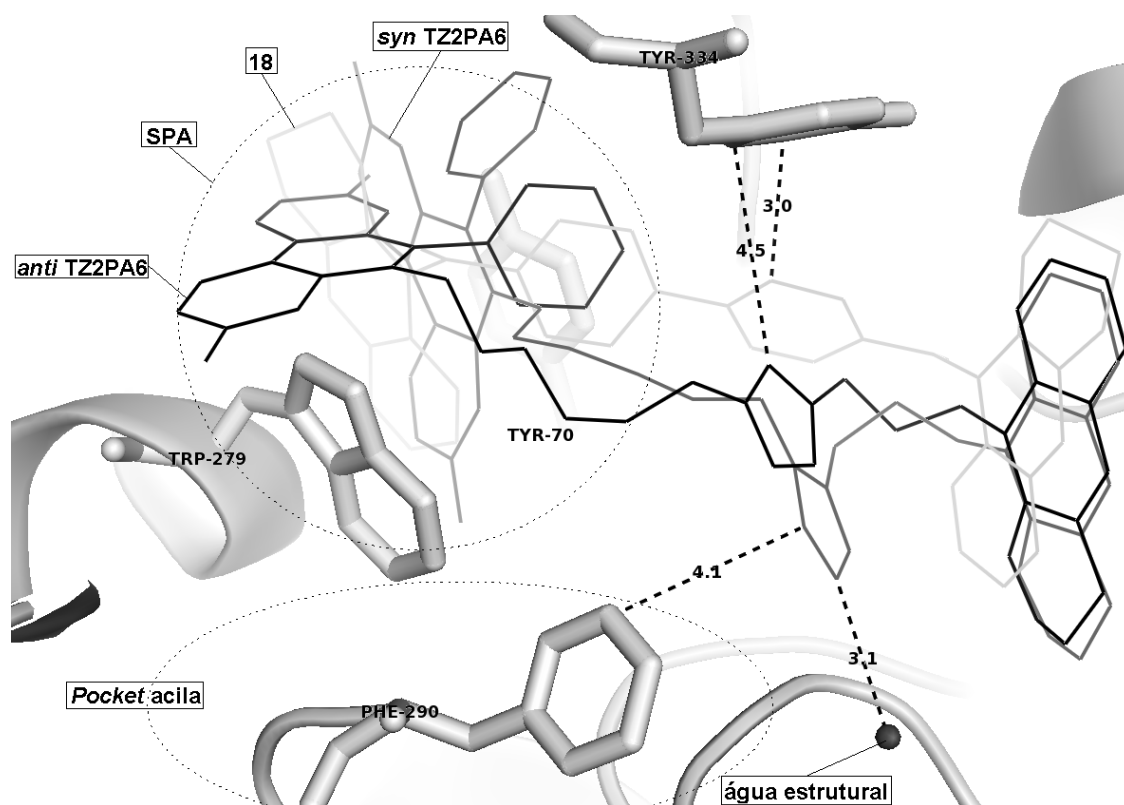


Figura 3.8 – Isômeros de TZ2PA6 e composto **18** na fenda de AChE.

Por sua vez, o isômero *anti* TZ2PA6, que é bem menos potente que o isômero *syn* TZ2PA6, dispõe seu anel aromático na meia fenda de forma similar à dos dímeros aqui apresentados (Figura 3.8, 4.5 Å em relação à TYR334, pág. 50). Em outras palavras, o isômero *anti* tem seu anel aromático significativamente mais afastado do *pocket* acila. Concomitante, e talvez em consequência, o isômero *anti*, contrário ao *syn*, não estabelece empilhamento aromático duplo em SPA (TRP279/TYR70, Figura 3.8, pág. 50) [19]. Nesse sentido, várias das conformações de ligação dos dímeros com espaçadores aromáticos sugeridas pelo *docking* indicam inabilidade no estabelecimento de tais interações com SPA, mesmo em se utilizando a estrutura 2CKM [4]. Por outro lado, a estrutura de raios-X para o composto *bis*-5-THA mostra que essa molécula, similar ao isômero *anti* supramencionado, não estabelece empilhamento duplo em SPA, além de orientar seu espaçador alifático para íntimo contato com o resíduo TYR334 [4]. Essa molécula possui uma relação de potência com *bis*-7-THA (composto **15**) similar àquela observada entre o composto **18** com espaçador aromático e o composto **15**. O comprimento dos espaçadores das espécies *bis*-5-THA e **18** são comparáveis [4]. Essas observações em conjunto parecem sugerir que a projeção do espaçador aromático na direção do *pocket* acila pode ser um importante elemento na estratégia de planejamento de bioligante para esse alvo. Evidências extras para essa afirmação podem ser verificadas em outros resultados presentes na literatura para AChE [5,3,14]. Interações específicas com essa região são apontadas como importantes na alteração da atividade da enzima [5]. Não obstante, Butini e colaboradores observaram através de seus resultados de *docking* que compostos com espaçadores aromáticos projetados na direção do *cluster* definido pelos resíduos PHE329-TYR332-ASP70 apresentariam melhor potencial de inibição para BChE. Nesse sentido, os autores sugerem a habilidade dos ligantes em reter a estrutura desse *hot spot* interferindo em sua mobilidade/função, gerando efeito inibitório da atividade enzimática. Para esse autor, o afastamento dessa condição gera perda de potência [5].

A disposição das cargas positivas do ligante relativa aos resíduos aromáticos mostrada na Figura 3.7 (pág. 49) é característica dos vários inibidores colinesterásicos diméricos catiônicos bivalentes [15]. Neste contexto, a distância mínima média verificada para os dímeros de tacrina em relação ao oxigênio da cadeia lateral de SER200 (O γ) foi de $5,0 \pm 0,5$ Å, coerente com o valor mínimo médio de $4,5 \pm 0,5$ Å observado para outros inibidores mistos de AChE [4,15,18,21,26] e superior ao valor observado, por exemplo, para o inibidor competitivo edrofônio, de 3,4 Å [2] (Figura 3.9, pág. 52). Conforme ilustrado na Figura 3.9 (pág. 52), o composto **18** apresenta distância mínima da SER200 de 4,9 Å.

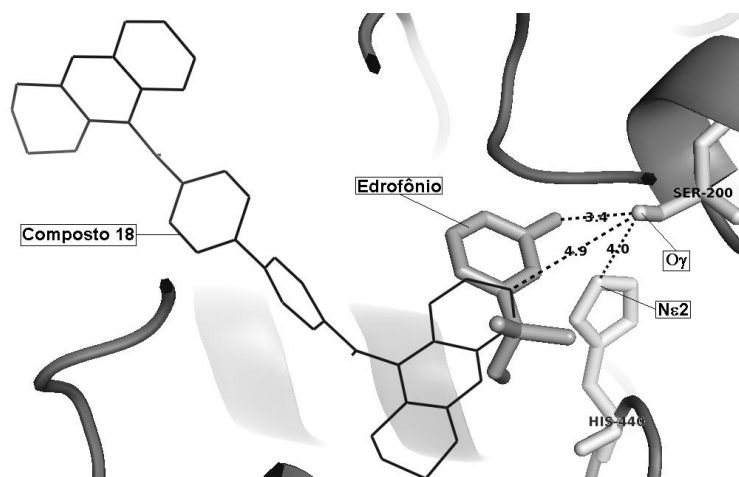


Figura 3.9 – Edrofônio e composto **18** na fenda de AChE.

Contrário aos dímeros, o edrofônio estabelece interação específica com SER200 (Figura 3.9). Neste contexto, a carbonila do edrofônio interage por ligação de hidrogênio com O γ de SER200, determinando um deslocamento para 4,0 Å do O γ de SER200 relativo ao nitrogênio imidazólico da cadeia lateral de HIS440 (N ϵ 2). Esse deslocamento da posição normal (2,7 Å) reduz, se não elimina, o mecanismo tradicional de estabilização de O γ de SER200 por N ϵ 2 de HIS440. De forma diferente, a região dos dímeros mais próxima à SER200, além de mais distante que aquela apresentada pelo edrofônio, é de natureza hidrofóbica, não estabelecendo, portanto, interações mais fortes com a hidroxila de SER200.

3.2.2 – Butirilcolinesterase

A análise dos resultados da Tabela 3.1 (pág. 39) mostra que o composto **21** apresenta o que seria o melhor perfil de seletividade para AChE com $K_{i(\text{hBChE})}/K_{i(\text{hAChE})} = 44$. A Figura 3.10 apresenta a conformação de ligação sugerida por *docking* molecular para o composto **21** na fenda catalítica de hBChE.

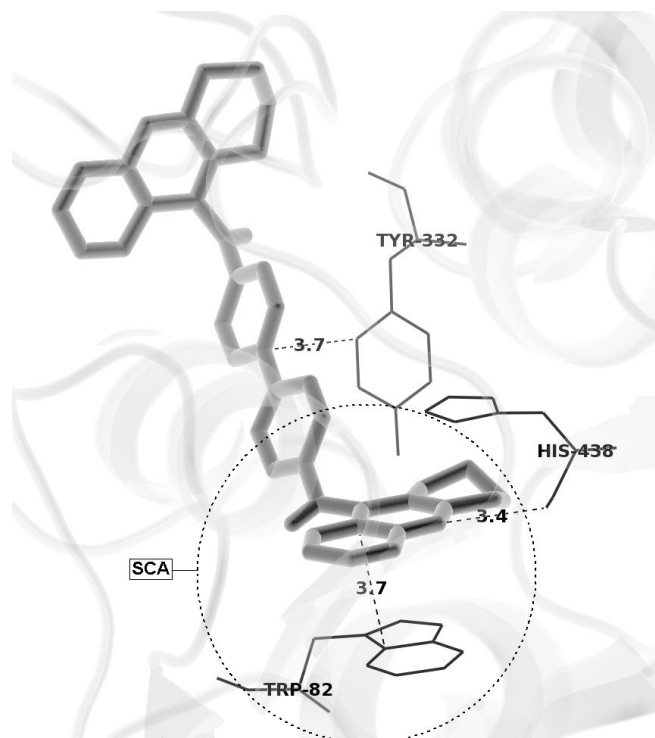


Figura 3.10 - Conformação de interação do composto **21** na fenda de hBChE.

Como se observa na Figura 3.10 (pág. 52), o número de interações específicas estabelecidas entre **21** e BChE é menor que aquele observado na fenda catalítica de AChE (Figura 3.7, pág. 49). Nesse sentido, é notável a ausência dos empilhamentos π - π duplos. Dentre as interações mais significativas observadas na Figura 3.10, lista-se aquelas entre: *i*) a porção quinoliníca do ligante e o resíduo TRP82 via empilhamento π - π à 3,7 Å; *ii*) o espaçador aromático e o resíduo TYR332 à 3,7 Å; e, *iii*) a carbonila peptídica do resíduo HIS438 e o nitrogênio piridínico protonado do ligante (3,4 Å). Um aspecto particular de BChE é o grande volume relativo da sua fenda catalítica, aspecto que parece ser coerente com sua menor especificidade enquanto colinesterase [36]. Um fato decisivo para a alteração no padrão interacional relativo entre AChE e BChE diz respeito à ausência de SPA nesta última, gerando seletividade para AChE por parte de compostos aptos à interagir via empilhamento π - π com SPA [53,29]. Não obstante, alguns trabalhos têm sugerido o papel compensatório para SPA em BChE exercido pelo resíduo TYR332 [54]. Empilhamentos do tipo π - π cumprem papel importante na bioquímica, sendo exemplo notável as interações estabilizadoras da estrutura do DNA [55]. Boehr *et al*, através de medidas de ITC, sugerem que cada empilhamento π - π contribui com 2 kcal/mol para a energia de interação [56]. Desta forma, pode-se inferir a partir dos valores obtidos para K_i (Tabela 3.1, pág. 39) que a maior parte da energia de interação dos dímeros pode ser resultante desse tipo de interação [28]. Essa interação específica tem sido usada para o planejamento de ligantes específicos para fosfotransferases [56], sendo também base para o desenvolvimento de inibidores seletivos para AChE/BChE [53]. Experimentos de mutagênese sítio dirigida convertem o comportamento de AChE frente à inibidores para o de BChE pela substituição de resíduos aromáticos da entrada da fenda, os quais são aptos ao estabelecimento de interações π - π [29].

Dentre as conformações de interação com BChE obtidas por *docking* para os compostos **14-31** (pág. 29), verifica-se contribuição significativa da interação com os resíduos TYR332 (empilhamento π - π , 3,6 Å) e ASP70 (ligação de hidrogênio, 2,4 Å), conforme ilustrado para o composto **30** na Figura 3.11 [5].

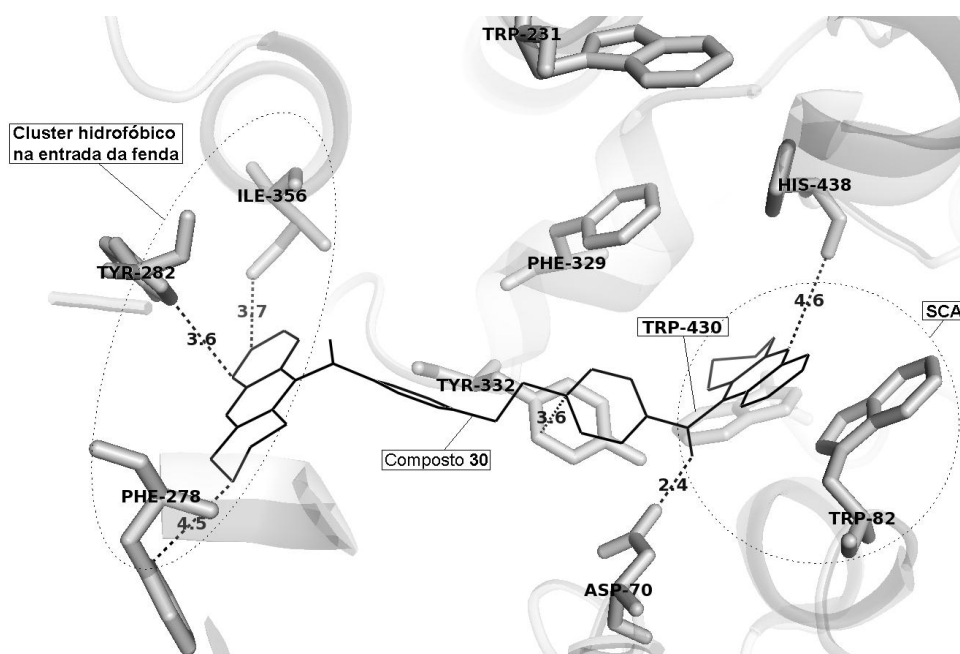


Figura 3.11 - Composto **30** na fenda de hBChE.

Alguns autores sugerem que a interação de ligantes diméricos com a região de ASP70 compete com o estabelecimento de interações por parte do ligante com o resíduo PHE278. Neste contexto, a ampliação desta pode reduzir aquela [31]. No caso dos dímeros com espaçadores aromáticos, essa competição se daria especialmente com TRP82 visto que a interação com a dupla TYR332-ASP70 resulta em leve perda de empilhamento π - π com TRP82 em SCA. Isso pode ser visto na comparação entre as distâncias do composto 21 em relação à HIS438 (3,4 Å, Figura 3.10, pág. 52) com a do composto 30 (4,6 Å, Figura 3.11, pág. 53). Neste último caso, a melhor interação com ASP70 (2,4 Å) gera perda no empilhamento com TRP82 e afastamento de HIS438. O resíduo TYR332 tem sido mencionado como possível componente de SPA para BChE [54]. Alguns resultados com inibidores duais mostram que moléculas com menores espaçadores são melhores inibidores de BChE, fato que poderia ser justificado pelo alcance da adequada interação com TYR332 [3,9]. Não obstante, interações com os resíduos TRP231, PHE329 e TRP430 parecem também ser significativas (Figura 3.11, pág. 53). As moléculas com espaçadores mais longos, tais como da série **29-31** parecem aptas a interagir também com resíduos da entrada da fenda tais como PHE278 (4,5 Å), ILE356 (3,6 Å) e TYR282 (3,6 Å, Figura 3.11, pág. 53). No caso de PHE278, o *docking* sugere que a componente hidroacridina dos dímeros mais longos apresentam interação do tipo face-borda com o resíduo PHE278. Esse resíduo tem sido sugerido como outro possível sítio interacional periférico para BChE [31]. Resultados para moléculas mais longas com sonda benzênica corroboram essa afirmação [3]. Já com os resíduos ILE356 e TYR282, esses ligantes parecem compor pequeno *cluster* hidrofóbico. Resultados de ensaios com mutantes de colinesterases sugerem diferentes sítios de interação na entrada da fenda de AChE/BChE [35,57].

O mais potente dos inibidores diméricos de BChE é o composto **16**. Em uma das conformações de ligação indicadas pelo *docking*, essa molécula, devido a sua flexibilidade associada a uma fenda maior, especialmente na região do *pocket* butila [36], é apta a interagir uma de suas unidades hidroacridínicas com SCA enquanto a outra é projetada para o *pocket* butila (Figura 3.12).

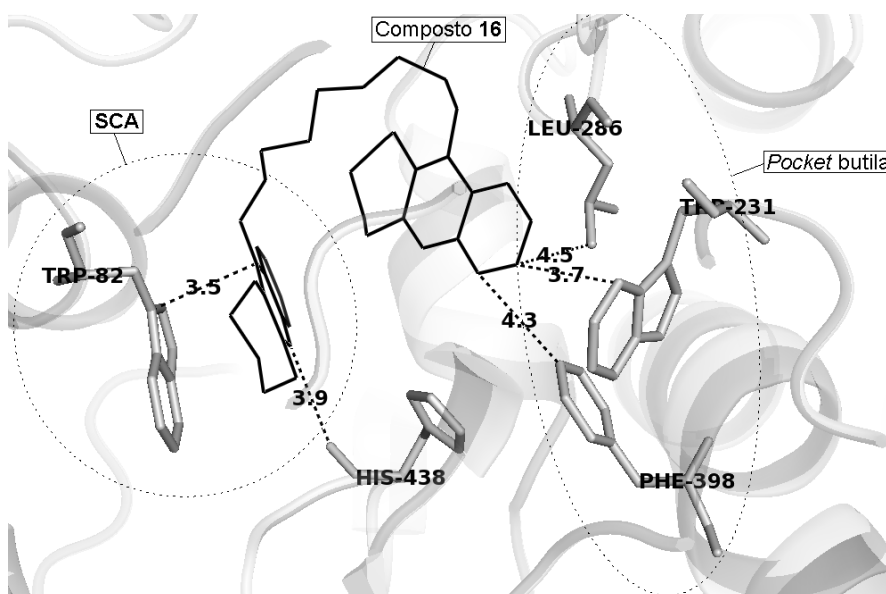


Figura 3.12 - Composto **16** na fenda de hBChE.

Como se observa na Figura 3.12 (pág. 54), a molécula fica toda inserida na região inferior da fenda catalítica de BChE. O aumento em "n" com crescente hidrofobicidade resulta efetivamente em maior atividade inibitória para BChE, conforme já sugerido na literatura [31]. Entretanto, os resultados da Tabela 3.1 (pág. 39) mostram que se isso não for acompanhado de ganho de flexibilidade no espaçador haverá perda de potência inibitória.

3.3 – Conclusões e perspectivas

Derivados diméricos de tacrina tendem à ação via mecanismo de inibição mista em relação às enzimas do tipo colinesterase, independente da natureza do espaçador utilizado. Os dados de potência relativa obtidos pela avaliação da atividade inibitória frente às enzimas colinesterases não-humanas podem ser estendidos com significativa segurança à potência esperada em relação às colinesterases humanas. O uso de espaçadores aromáticos constitui em ferramenta molecular útil no intuito de se obter interações interaromáticas com as regiões de meia fenda das enzimas do tipo colinesterase, melhorando seu perfil farmacodinâmico. Nesse contexto, é possível manipular o perfil de seletividade dos inibidores pela alteração do tipo de espaçador aromático utilizado. Espaçadores aromáticos podem repercutir positivamente nas propriedades farmacocinéticas de dímeros de tacrina. A ampliação da região hidrofóbica dos dímeros de tacrina constitui ferramenta estratégica para ampliar o potencial de inibição dessa classe em relação às enzimas investigadas. Finalmente cabe ressaltar que os parâmetros de comprimento ideal e flexibilidade estrutural são indispensáveis para a efetividade de inibidores duais das enzimas colinesterases.

A realização do trabalho de inibição de enzimas colinesterases com dímeros de tacrina abre a perspectiva para que novos dímeros possam ser obtidos, explorando-se o uso de espaçadores que combinem maior flexibilidade com a natureza aromática. Nesse contexto, novos elementos podem ser adicionados no planejamento, como o uso de grupos carregados nos espaçadores, sendo exemplo o grupo piridínico. Por outro lado, a investigação do estado de protonação dos dímeros pode ser melhor contemplada através de medidas experimentais, sendo os dados de interação inibidor-enzima levantados de forma direta, como, por exemplo, através de medidas de titulação calorimétrica. Esses resultados serão de maior alcance especialmente se acompanhados de análises por cálculos de dinâmica molecular. O perfil inibitório significativo dos dímeros com espaçadores aromáticos associado a um possível melhor perfil farmacocinético abrem a perspectiva para que algumas dessas moléculas sigam adiante para avaliação de sua farmacologia *in vivo*. Neste contexto, o uso de culturas de células-modelo do tecido nervoso constituiu-se em estratégia promissora para avaliação do potencial de aplicação dos dímeros em pacientes com Parkinson e Alzheimer. Finalmente, cabe destacar que, no contexto da natureza múltipla das doenças neurodegenerativas, dada a atividade colinesterásica significativa dos dímeros, outros alvos biomoleculares poderiam ser avaliados, sendo exemplos os canais de cálcio e a enzima beta secretase.

3.4 - Referências bibliográficas

- [1] Copeland, R. A. Enzymes: a practical introduction to structure, mechanism, and data analysis. John Wiley and Sons Inc, New York, **2000**.
- [2] Ravelli, R. B. G.; Raves, M. L.; Ren, Z.; Bourgeois, D.; Roth, M.; Kroon, J.; Silman, I.; Sussman, J. L. Static Laue diffraction studies on acetylcholinesterase. *Acta Cryst. Sec. D*, **1998**, 54, 1359-1366.
- [3] Pang, Y-P.; Quiram, P.; Jelacic, T.; Hong, F.; Brimijoin, S. Highly potent, selective, and low cost bis-tetrahydroaminacrine inhibitors of acetylcholinesterase: steps toward novel drugs for treating Alzheimer's disease. *J. Biol. Chem.*, **1996**, 271, 23646-23649.
- [4] Rydberg, E. H.; Brumshtein, B.; Greenblatt, H. M.; Wong, D. M.; Shaya, D.; Williams, L. D.; Carlier, P. R.; Pang, Y. P.; Silman, I.; Sussman, J. L. Complexes of alkylene-linked tacrine dimers with *Torpedo californica* acetylcholinesterase: binding of bis-5-tacrine produces a dramatic rearrangement in the active-site gorge. *J. Med. Chem.*, **2006**, 49, 5491-5500.
- [5] Butini, S.; Campiani, G.; Borriello, M.; Gemma, S.; Panico, A.; Persico, M.; Catalanotti, B.; Ros, A.; Brindisi, M.; Agnusdei, M.; Fiorini, I.; Nacci, V.; Novellino, E.; Belinskaya, T.; Saxena, A.; Fattorusso, C. Exploiting protein fluctuations at the active-site gorge of human cholinesterases: further optimization of the design strategy to develop extremely potent inhibitors. *J. Med. Chem.*, **2008**, 51, 3154-3170.
- [6] Senapati, S.; Bui, J. M.; McCammon, J. A. Induced fit in mouse acetylcholinesterase upon binding a femtomolar inhibitor: a molecular dynamics Study. *J. Med. Chem.*, **2005**, 48, 8155-8162.
- [7] Taylor, J. L.; Mayer, R. T.; Himel, C. M. Conformers of acetylcholinesterase: a mechanism of allosteric control. *Mol. Pharmacol.*, **1994**, 45, 74-83.
- [8] Segel, I. H. *Enzyme Kinetics*, Wiley, New York. **1975**.
- [9] Carlier, P. R.; Han, Y. F.; Chow, E. S. H.; Li, C. P. L.; Wang, H.; Lieu, T. X.; Wong, H. S.; Pang, Y. P. Evaluation of short-tether bis-THA aChE inhibitors. A further test of the dual binding site hypothesis. *Bioorg. Med. Chem.*, **1999**, 7, 351-357.
- [10] Bergmann, F.; Segal, R. The relationship of quaternary ammonium salts to the anionic sites of true and pseudo cholinesterase. *Biochem. J.*, **1954**, 58, 692-698.
- [11] Taylor, P.; Lappi, S. Interaction of fluorescence probes with acetylcholinesterase. The site and specificity of propidium binding. *Biochemistry*, **1975**, 14, 1989-1997.
- [12] Greenblatt, H. M.; Kryger, G.; Lewis, T.; Silman, I.; Sussman, J. L. Structure of acetylcholinesterase complexed with (3)-galanthamine at 2.3 Å resolution. *FEBS Lett.*, **1999**, 463, 321-326.
- [13] Desai, M. C.; Thadeio, P. F.; Lipinski, C. A.; Liston, D. R.; Spencer, R. W.; Williams, I. H. Physical parameters for brain uptake: optimizing Log P, Log D and pKa of THA. *Biorg. Med. Chem. Lett.*, **1991**, 1, 411-414.
- [14] Steinberg, G. M.; Mednick, M. L.; Maddox, J.; Rice, R.; Cramer, J. A Hydrophobic binding site in acetylcholinesterase. *J. Med. Chem.*, **1975**, 18, 1056-1061.
- [15] 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. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **1993**, 90, 9031-9035.
- [16] Sussman, J. L.; Harel, M.; Silman, I. Three-dimensional structure of acetylcholinesterase and of its complexes with anticholinesterase drugs. *Chem. Biol. Interact.*, **1993**, 87, 187-97.
- [17] Dougherty, D. A.; Stauffer, D. A. Acetylcholine binding by a synthetic receptor: implications for biological recognition. *Science*, **1990**, 250, 1558-1560.

- [18] Colletier, J. P.; Sanson, B.; Nachon, F.; Gabellieri, E.; Fattorusso, C.; Campiani, G.; Weik, M. Conformational flexibility in the peripheral site of *Torpedo californica* acetylcholinesterase revealed by the complex structure with a bifunctional inhibitor. *J. Am. Chem. Soc.*, **2006**, 128, 4526-4527.
- [19] Bourne, Y.; Kolb, H. C.; Radić, Z.; Sharpless, K. B.; Taylor, P.; Marchot, P. Freeze-frame inhibitor captures AChE in a unique conformation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **2004**, 101, 1449-1454.
- [20] Bergmann, F.; Wilson, I. B.; Nachmansohn, D. The inhibitory effect of stilbamidine, curare and related compounds and its relationship to the active groups of acetylcholine esterase; action of stilbamidine upon nerve impulse conduction. *Biochim. Biophys. Acta*, **1950**, 6, 217-224.
- [21] Cheung, J.; Rudolph, M. J.; Burshteyn, F.; Cassidy, M. S.; Gary, E. N.; Love, J.; Franklin, M. C.; Height, J. J. Structures of human acetylcholinesterase in complex with pharmacologically important ligands. *J. Med. Chem.*, **2012**, 55, 10282-10286.
- [22] Bourne, Y.; Grassi, J.; Bougis, P. E.; Marchot, P. Conformational flexibility of the acetylcholinesterase tetramer suggested by x-ray crystallography. *J. Biol. Chem.*, **1999**, 274, 30370-30376.
- [23] Gilson, M. K.; Straatsma, T. P.; McCammon, J. A.; Ripoll, D. R.; Faerman, C. H.; Axelsen, P. H.; Silman, I.; Sussman, J. L. Open "back door" in a molecular dynamics simulation of acetylcholinesterase. *Science*, **1994**, 263, 1276-1278.
- [24] Doucet-Personeni, C.; Bentley, P. D.; Fletcher, R. J.; Kinkaid, A.; Kryger, G.; Pirard, B.; Taylor, A.; Taylor, R.; Taylor, J.; Viner, R.; Silman, I.; Sussman, J. L.; Greenblatt, H. M.; Lewis, T. A structure-based design approach to the development of novel, reversible acetylcholinesterase inhibitors. *J. Med. Chem.*, **2001**, 44, 3203-3215.
- [25] Kronman, C.; Ordentlich, A.; Barak, D.; Velan, B.; Shafferman, A. The "back door" hypothesis for product clearance in acetylcholinesterase challenged by site-directed mutagenesis. *J. Biol. Chem.*, **1994**, 269, 27819-27822.
- [26] Greenblatt, H. M.; Dvir, H.; Silman, I.; Sussman, J. L. Acetylcholinesterase: a multifaceted target for structure-based drug design of anticholinesterase agents for the treatment of Alzheimer's disease. *J. Mol. Neurosci.*, **2003**, 20, 369-383.
- [27] Dvir, H.; Jiang, H. L.; Wong, D. M.; Harel, M.; Chetrit, M.; He, X. C.; Jin, G. Y.; Yu, G. L.; Tang, X. C.; Silman, I.; Bai, D. L.; Sussman, J. L. X-ray structures of *Torpedo californica* acetylcholinesterase complexed with (+)-huperzine A and (-)-huperzine B: structural evidence for an active site rearrangement. *Biochemistry*, **2002**, 41, 10810-10818.
- [28] Sotriffer, C.; Klebe, G.; Stahl, M.; Bohm, H. J.; Docking and scoring functions and virtual screening in Burger's medicinal chemistry and drug discovery, John Wiley and Sons Inc, New York, **2003**, 1, 281-332.
- [29] Harel, M.; Sussman, J. L.; Krejci, E.; Bon, S.; Chanal, P.; Massoulié, J.; Silman, I. Conversion of acetylcholinesterase to butyrylcholinesterase: Modeling and mutagenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **1992**, 89, 10827-10831.
- [30] Koellner, G.; Kryger, G.; Millard, C. B.; Silman, I.; Sussman, J. L.; Steiner, T. Active-site gorge and buried water molecules in crystal structures of acetylcholinesterase from *Torpedo californica*. *J. Mol. Biol.*, **2000**, 296, 713-735.
- [31] Campiani, G.; Fattorusso, C.; Butini, S.; Gaeta, A.; Agnusdei, M.; Gemma, S.; Persico, M.; Catalanotti, B.; Savini, L.; Nacci, V.; Novellino, E.; Holloway, H. W.; Greig, N. H.; Belinskaya, T.; Fedorko, J. M.; Saxena, A. Development of molecular probes for the identification of extra interaction sites in the mid-gorge and peripheral sites of butyrylcholinesterase (BuChE). Rational design of novel, selective, and highly potent BuChE inhibitors. *J. Med. Chem.*, **2005**, 48, 1919-1929.

- [32] Bolognesi, M. L.; Bartolini, M.; Mancini, F.; Chiriano, G.; Ceccarini, L.; Rosini, M.; Milelli, A.; Tumiatti, V.; Andrisano, V.; Melchiorre, C. Bis(7)-tacrine derivatives as multitarget-directed ligands: Focus on anticholinesterase and antiamyloid activities. *ChemMedChem*, **2010**, *5*, 1215-1220.
- [33] Lam, P. Y.; Jadhav, P. K.; Eyermann, C. J.; Hodge, C. N.; Ru, Y.; Bacheler, L. T.; Meek, J. L.; Otto, M. J.; Rayner, M. M.; Wong, Y. N.; Chang, C. H.; Weber, P. C.; Jackson, D. A.; Sharpe, T. R.; Viitanen, S. E. Rational design of potent, bioavailable, nonpeptide cyclic ureas as HIV protease inhibitors. *Science*, **1994**, *263*, 380-384.
- [34] Correa-Basurto, J.; Espinosa-Raya, J.; González-May, M.; Espinoza-Fonseca, L. M.; Vázquez-Alcántara, I.; Trujillo-Ferrara, J. Inhibition of acetylcholinesterase by two aryl derivatives: 3a-Acetoxy-5H-pyrrolo (1,2-a) (3,1)benzoxazin-1,5-(3aH)-dione and cis-N-p-Acetoxy-phenylisomaleimide. *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.*, **2006**, *21*, 133-138.
- [35] Morel, N.; Bon, S.; Greenblatt, H. M.; Van Belle, D.; Wodak, S. J.; Sussman, J. L.; Massoulié, J.; Silman, I. Effect of mutations within the peripheral anionic site on the stability of acetylcholinesterase. *Mol. Pharmacol.*, **1999**, *55*, 982-92.
- [36] Nicolet, Y.; Lockridge, O.; Masson, P.; Fontecilla-Camps, J. C.; Nachon, F. Crystal structure of human butyrylcholinesterase and of its complexes with substrate and products. *J. Biol. Chem.*, **2003**, *278*, 42, 41141-41147.
- [37] Arnold, K.; Bordoli, L.; Kopp, J.; Schwede, T. The SWISS-MODEL workspace: a web-based environment for protein structure homology modelling. *Bioinformatics*, **2006**, *22*, 195-201.
- [38] Schwede, T.; Kopp, J.; Guex, N.; Peitsch, M. C. SWISS-MODEL: an automated protein homology-modeling server. *Nucleic Acids. Res.*, **2003**, *31*, 3381-3385.
- [39] Guex, N.; Peitsch, M. C. SWISS-MODEL and the Swiss-PdbViewer: an environment for comparative protein modelling. *Electrophoresis*, **1997**, *18*, 2714-2723.
- [40] Neurath, H. The role of glycine in protein structure. *J. Am. Chem. Soc.*, **1943**, *65*, 2039-2041.
- [41] Korabecny, J.; Holas, O.; Musilek, K.; Pohanka, M.; Opletalova, V.; Dohnal, V.; Kuca, K. Synthesis and in vitro evaluation of new tacrine derivatives-bis-alkylene linked 7-MEOTA. *Lett. Org. Chem.*, **2010**, *7*, 327-331.
- [42] Tanarro, C. M. G.; Gütschow, M. Hyperbolic mixed-type inhibition of acetylcholinesterase by tetracyclic thienopyrimidines. *J. Enzym. Inhib. Med. Chem.*, **2011**, *26*, 350-358.
- [43] Dixon, M. The determination of enzyme inhibitor constants. *Biochem. J.*, **1953**, *55*, 170-171.
- [44] Krupka, R. M. Acetylcholinesterase: trimethylammonium-ion inhibition of deacetylation. *Biochemistry*, **1964**, *3*, 1749-1754.
- [45] Debord, J.; Merle, L.; Bollinger, J. C.; Dantoine, T. Inhibition of butyrylcholinesterase by phenothiazine derivatives. *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.*, **2002**, *17*, 197-202.
- [46] Szegletes, T.; Mallender, W. D.; Thomas, P. J.; Rosenberry, T. L. Substrate binding to the peripheral site of acetylcholinesterase initiates enzymatic catalysis. Substrate inhibition arises as a secondary effect. *Biochemistry*, **1999**, *38*, 122-133.
- [47] Yonetani, T., and Theorell, H. Studies on liver alcohol dehydrogenase complexes III. Multiple inhibition kinetics in the presence of two inhibitors. *Arch. Biochem. Biophys.*, **1964**, *106*, 243-251.
- [48] Rosenberry, T. L.; Bernhard, S. A. Studies of catalysis by acetylcholinesterase: Synergistic effects of inhibitors during the hydrolysis of acetic acid esters. *Biochemistry*, **1972**, *11*, 4308-4332.
- [49] Sussman, J. L.; Harel, M.; Frolow, F.; Oefner, C.; Goldman, A.; Toker, L.; Silman, I. Atomic structure of AChE from *Torpedo californica*: a prototypic acetylcholine-binding protein. *Science*, **1991**, *253*, 872-879.

- [50] Zhang, J.; Adrián, F. J.; Jahnke, W.; Cowan-Jacob, S. W.; Li, A. G.; Iacob, R. E.; Sim, T.; Powers, J.; Dierks, C.; Sun, F.; Guo, G. R.; Ding, Q.; Okram, B.; Choi, Y.; Wojciechowski, A.; Deng, X.; Liu, G.; Fendrich, G.; Strauss, A.; Vajpai, N.; Grzesiek, S.; Tuntland, T.; Liu, Y.; Bursulaya, B.; Azam, M.; Manley, P. W.; Engen, J. R.; Daley, G. Q.; Warmuth, M.; Gray, N. S. Targeting Bcr-Abl by combining allosteric with ATP-binding-site inhibitors. *Nature*, **2010**, 463, 501-506.
- [51] Cohen, G. B.; Ren, R.; Baltimore, D. Modular binding domains in signal transduction proteins. *Cell*, **1995**, 80, 237-248.
- [52] Arkin, M. R.; Wells, J. A. Small-molecule inhibitors of protein-protein interactions: progressing towards the dream. *Nat. Rev. Drug Discovery*, **2004**, 3, 301-317.
- [53] Wiesner, J.; Kříž, Z.; Kuča, K.; Jun, D.; Koča, J. Why acetylcholinesterase reactivators do not work in butyrylcholinesterase. *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.*, **2010**, 25, 318-322.
- [54] Nachon, F.; Ehret-Sabatier, L.; Loew, D.; Colas, C.; van Dorselaer, A.; Goeldner M. Trp82 and Tyr332 are involved in two quaternary ammonium binding domains of human butyrylcholinesterase as revealed by photoaffinity labeling with [3H]DDF. *Biochemistry*, **1998**, 37, 10507-10513.
- [55] Watson, J. C.; Crick, F. H. C. Molecular structure of nucleic acids. *Nature*, **1953**, 171, 737-738.
- [56] Boehr, D. D.; Farley, A. R.; Wright, G. D.; Cox, J. R. Analysis of the pi-pi stacking interactions between the aminoglycoside antibiotic kinase APH(3^{II})-IIIa and its nucleotide ligands. *Chem. Biol.*, **2002**, 9, 1209-1217.
- [57] Cousin, X.; Bon, S.; Duval, N.; Massoulié, J.; Bon, C. Cloning and expression of acetylcholinesterase from *Bungarus fasciatus* venom. A new type of COOH-terminal domain; involvement of a positively charged residue in the peripheral site. *J. Biol. Chem.*, **1996**, 271, 15099-15108.

Capítulo 4 – Avaliação de atividade antiproliferativa

4.1 – Atividade antiproliferativa

Os compostos **14-31** (Tabela 2.2, pág. 29) foram avaliados quanto a sua atividade antiproliferativa em relação a um painel de dez linhagens celulares tumorigênicas. Os procedimentos experimentais são descritos no Capítulo 5 (pág. 95). A Tabela 4.1 sumariza os resultados das avaliações conduzidas e expressas através do CI_{50} , ou seja, a concentração dos compostos no meio de cultivo necessária para reduzir em 50% o número de células viáveis em relação à referência não-tratada [1]. Nos casos onde a inibição celular foi inferior ao CI_{50} apresenta-se a porcentagem de inibição da proliferação celular na máxima concentração testada (MCT) para o composto. Por exemplo, para a linhagem C6 o composto **14** à concentração de $0,75 \mu M$ reduziu em 25% o número de células viáveis. Os casos onde não se verificou inibição da proliferação celular para as concentrações avaliadas dos compostos no meio de cultura é indicado por hífen (-). A linhagens celulares foram selecionadas segundo critérios de representatividade, importância e contexto, atendo-se naturalmente à disponibilidade e viabilidade de cultivo. Exceto C6, as linhagens celulares são humanas.

Tabela 4.1 - Atividade antiproliferativa dos dímeros de tacrina: $CI_{50}/(\mu M)$ ou porcentagem de inibição na máxima concentração testada (valores em itálico com expoente "d")

Composto	MCT ^b	Linhagem Celular ^a									
		C6	IMR32	U87MG	TOV21G	SKOV3	SKMEL2	SKMEL5	BT549	COLO205	NCH226
THA	15	- ^c	-	-	-	-	-	-	-	-	-
14	0,75	25 ^d	10 ^d	-	19 ^d	30 ^d	3 ^d	-	-	-	8,0 ^d
15	8,5	5,2	2,2	-	8,5	7,7	6,5	2,8	-	4,9	-
16	7,9	0,75	0,085	29^d	4,7	5,4	0,13	61^e	4,8	1,6	20^d
17	1,7	1,6	1,5	-	1,5	22,5 ^d	5 ^d	7,0 ^d	-	1,7	8,0 ^d
18	3,0	40 ^d	25 ^d	-	17 ^d	11 ^d	19 ^d	3,0	-	-	-
19	3,8	3,5	0,50	-	32 ^d	-	4,0 ^d	-	-	-	8,0 ^d
20	8,1	5,0	40 ^d	-	26 ^d	25 ^d	10 ^d	11 ^d	17 ^d	6,3	4,5 ^d
21	7,5	7,4	10 ^d	-	-	-	13 ^d	12 ^d	-	-	-
22	7,6	30 ^d	35 ^d	-	28 ^d	-	1,5 ^d	-	-	-	7,0 ^d
23	2,9	1,5	2,8	-	29 ^d	22 ^d	13 ^d	27 ^d	9,0 ^d	2,9	10 ^d
24	6,7	6,6	6,0	-	15 ^d	-	28 ^d	13 ^d	-	-	6,0 ^d
25	7,3	33 ^d	0,88	-	39 ^d	10 ^d	9,0 ^d	-	-	-	9,0 ^d
26	4,1	0,15	1,8	-	1,4	43^d	28^d	1,8	24^d	0,75	9,0^d
27	7,5	7,5	-	-	-	5,0 ^d	10 ^d	17 ^d	-	-	5,0 ^d
28	7,8	38 ^d	0,74	-	15 ^d	-	6,0 ^d	-	-	-	4,0 ^d
29	8,9	1,1	1,1	-	38 ^d	35 ^d	24 ^d	8,8	-	3,2	3,0 ^d
30	7,2	3,0	10 ^d	-	24 ^d	10 ^d	19 ^d	7,2	-	-	-
31	7,1	37 ^d	0,67	-	15 ^d	12 ^d	14 ^d	-	-	-	4,0 ^d
Etoposídeo	10	35 ^d	0,51	-	1,6	-	21 ^d	26 ^d	-	16 ^d	7,0 ^d

^aC6: glioma de rato. IMR32: neuroblastoma. U87MG: glioblastoma-astrocitoma. TOV21G e SKOV3: ovário. SKMEL2 e 5: melanoma. BT549: mama. COLO205: cólon. NCH226: pulmão [2]. ^bMáxima concentração testada/ (μM) . ^cNão inibe na MCT. ^dPorcentagem de inibição na máxima concentração testada. ^eEste composto inibe 61% da proliferação celular na menor concentração avaliada que foi 7,5 nM.

A estratégia de dimerização molecular tem sido utilizada com sucesso no desenvolvimento de candidatos à fármacos visando diversos alvos biomoleculares [3]. Nesse sentido, a Tabela 4.1 (pág. 60) mostra que em relação à tacrina a dimerização resultou em significativa potencialização da atividade antiproliferativa. Além disso, em relação ao fármaco etoposídeo, os dímeros mostraram melhor potencial de ação em vários casos. Neste contexto, os diferentes espaçadores e componentes cíclicos definem uma gama significativa de atividades inibitórias, oscilando desde ausência de inibição até CI_{50} em faixas inferiores à nanomolar. O composto **16** é dentre todos o mais ativo e ao mesmo tempo seletivo visto ter apresentado de forma reprodutível um potencial inibitório para SKMEL5 pelo menos uma ordem de potência superior em relação às demais linhagens celulares. Assim, trata-se de um composto com premissa de seguir nos testes de avaliação *in vivo* além daqueles para esclarecimento de mecanismos de ação. Dentre os compostos com espaçadores aromáticos, o composto **26** é o de mais amplo espectro, sendo mais potente que o composto **16** para três linhagens celulares. Em comum com **16**, o composto **26** possui dimensões de espaçamento análogas entre as unidades hidroacridina. Por outro lado, o volume do anel alicíclico de **26** é menor. Os compostos **25**, **28** e **31** apresentaram-se seletivos na ordem de 10^{-7} M para IMR32. Para células humanas **20** foi seletivo para COLO205 enquanto **24** foi seletivo para IMR32. Os compostos **21** e **27** mostraram-se seletivos para C6.

Conforme mencionado no tópico 1.3 da introdução (pág. 10), derivados acridínicos, tais como dímeros de tacrina, possuem a habilidade de intercalar o DNA. Neste contexto cabe destacar que a maior tendência à protonação dessas moléculas nas condições fisiológicas repercute em maior potencial intercalatório, já que a carga positiva do ligante possibilita interação mais intensa com os grupos fosfato negativos da cadeia do DNA [4]. No caso de derivados diméricos da tacrina, as moléculas com maior susceptibilidade à protonação (mais básicas) são mais ativas que as menos básicas numa proporção de 5:2 em relação às linhagens celulares avaliadas [1]. Em outras palavras, de cada sete linhagens celulares avaliadas, cinco serão mais afetadas por moléculas mais básicas. Essa proporção aproxima-se daquela de 6:3 observada entre **16** e **26**, compostos mais e menos protonável, respectivamente.

Os compostos com espaçadores aromáticos foram mais ativos na série com "n = 0". Os resultados dentro desta série são coerentes com aqueles observados para inibidores intercaladores de Topo I e Topo II, já que o aumento do volume de substituintes hidrofóbicos em compostos diméricos resulta em perda de potência [5]. Na série com "n = 1" o composto **15**, que possui espaçador linear, mostrou-se como o mais potente e com espectro de ação mais amplo. Algumas exceções são verificadas para a linhagem não humana para a qual o composto **30** foi mais ativo. Não obstante, embora haja melhor desempenho para o composto **15**, os resultados para os compostos dessa série são da mesma ordem de grandeza. Na série com "n = 2" o composto **16** mostrou-se mais citotóxico que os demais. Assim, os compostos com espaçadores lineares parecem ganhar potência com o aumento em "n". Por outro lado, a introdução de espaçadores aromáticos parece inverter essa tendência. Naturalmente que se há de especular o efeito da redução extra no número de carbonos dos anéis alicíclicos sobre a atividade antiproliferativa de dímeros com

espaçadores aromáticos, sem perder de vista que a redução no número de anéis do agente intercalador de três para dois resulta em perda de potência [5]. A princípio o melhor compromisso com a maior atividade parece se dar com aqueles compostos cujo comprimento do espaçador corresponde à ordem de sete grupos metílenos, resultado coerente a literatura [1].

Especificamente, dentre os compostos com espaçadores aromáticos aqueles para os quais "n = 0" são os mais ativos sobre as linhagens C6, SKOV3, BT549 e COLO205, sendo os únicos ativos no caso desta última linhagem. Para IMR32 os compostos da série com "n = 2" foram os mais ativos seguido dos compostos com "n = 0". A linhagem SKOV3 é resistente a tratamentos [1]. Assim, parecem promissores os resultados observados tanto ao composto **16** quanto aos compostos da série "n = 0". Os compostos desta última série são estimados como os mais polares o que favorece sua interação com a molécula carregada do DNA [4]. Além disso, esses compostos apresentam o sistema de anéis na disposição mais planar dentre as séries avaliadas, o que favorece a intercalação ao DNA [6].

Vários fatores estão envolvidos na atividade antiproliferativa de um composto, dentre os quais destaca-se a possibilidade de interação do ligante com alvos moleculares que controlam o processo de divisão celular [7-9]. Naturalmente que a capacidade de penetrar a célula depende das propriedades físico-químicas da molécula, sendo que aquelas com maior lipofilicidade normalmente alcançam o citosol mais rapidamente [10]. Estima-se que os dímeros de tacrina especialmente aqueles com espaçadores aromáticos possuam carga global relativa menor nas condições de pH fisiológico, fato que favorece, dada sua maior lipofilicidade, sua penetração na célula e portanto sua maior atividade. Por outro lado, a ação de transportadores multidroga pode ser maior ou menor, independente da capacidade do composto agir sobre um determinado alvo biomolecular [11]. Com isso, as atividades também podem ser diferenciadas quanto a ação dos transportadores multidroga presentes na membrana celular. Assim, compostos como o **16** podem ser mais ativos por possuírem maior mobilidade em função de maior lipofilicidade, combinada à menor interação com transportadores multidroga e finalmente maior interação com alvos específicos na célula.

4.2 - Dímeros de tacrina e vias de sinalização celular

O controle do ciclo celular é efetuado por uma série de proteínas as quais constituem sequências sinalizatórias que possibilitam que um dado sinal seja convertido em ações de estímulo ou interrupção da divisão celular [12,13]. Essas sequências sinalizatórias são algumas vezes nomeadas em função de uma proteína chave pertencente à via [14,15]. A Figura 4.1 (pág. 63) ilustra algumas dessas vias. Compostos análogos ao dímeros de tacrina têm demonstrado agir pelas vias das proteínas p53 e caspase 3, resultando em apoptose celular [16-18].

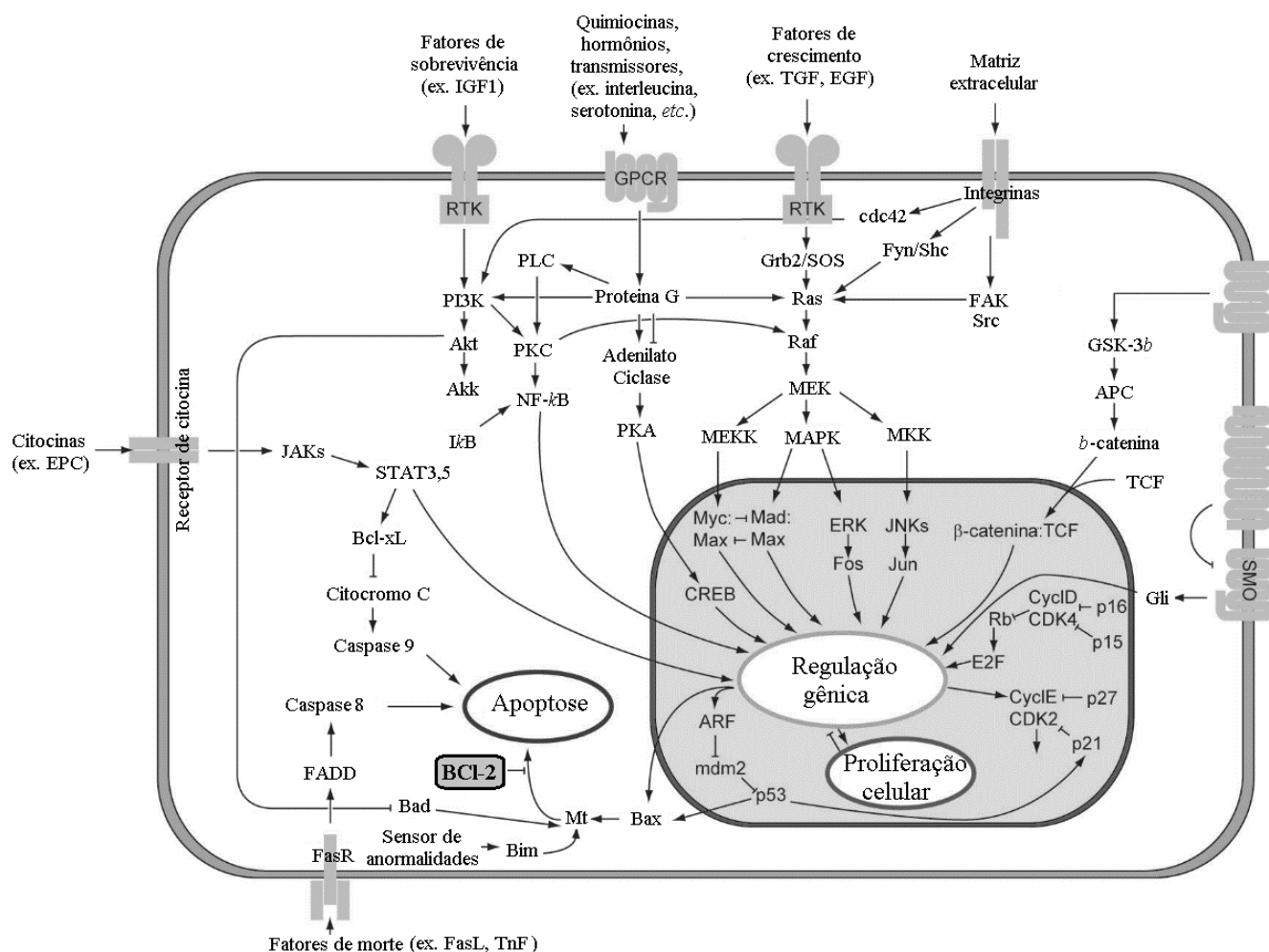


Figura 4.1 - Vias de sinalização celular [19].

No intuito de se avaliar a ação dos compostos **14-31** sob a ótica da via regulatória afetada durante o tratamento, alguns testes de expressão gênica estão em andamento por ocasião de escrita desta tese. Um dos testes já realizados e que se encontra em estágio de confirmação visou determinar o nível de expressão gênica da proteína BCL-2, a qual, como pode ser visto na Figura 4.1, é um regulador negativo de uma das vias de apoptose [20]. Os resultados parciais obtidos até o momento em relação à expressão gênica de BCL-2 levam a supor que os compostos **14-31** regulam negativamente a expressão dessa proteína, repercutindo na redução do seu teor e, em consequência, em apoptose celular.

Testes com outras proteínas da via apoptótica (BAX, Caspase 8, TRAIL R₁₋₄) e de outras vias como a de reparo (MLH1, MSH2, PMS2) e a de controle do ciclo celular (p53, p63, MDM2), além de ensaios de genotoxicidade (ensaio "Cometa") serão conduzidos com vistas ao melhor entendimento das formas de ação dos dímeros de tacrina sobre as linhagens celulares.

4.3 - Comparação entre os resultados de atividade antiproliferativa e anticolinesterásica

A Tabela 4.2 (pág. 64) rememora alguns resultados de atividade anticolinesterásica dos dímeros de tacrina.

Tabela 4.2 – CI_{50} dos dímeros em relação às hChEs: $CI_{50} \pm$ Desvio Padrão/(nM)

Composto	AChE	BChE	Composto	AChE	BChE	Composto	AChE	BChE
THA	122 ± 7,46	47,3 ± 4,05	20	14,5 ± 3,40	1460 ± 192	26	61,8 ± 4,61	109 ± 16,3
14	23,0 ± 3,32	246 ± 25,4	21	54,8 ± 23,9	135 ± 8,90	27	8,94 ± 0,42	206 ± 45,0
15	7,28 ± 0,69	141 ± 19,6	22	15,1 ± 1,16	85,1 ± 26,5	28	477 ± 66,2	1520 ± 133
16	18,4 ± 1,60	39,9 ± 1,25	23	224 ± 14,4	165 ± 32,3	29	121 ± 0,35	15,1 ± 1,91
17	632 ± 68,7	452 ± 127	24	312 ± 37,2	329 ± 37,7	30	196 ± 2,31	40,3 ± 6,22
18	117 ± 25,4	267 ± 11,8	25	1080 ± 98,2	103 ± 24	31	2850 ± 781	4870 ± 27,6
19	4720 ± 80,5	354 ± 154						

Conforme se observa nas Tabelas 4.1 (pág. 60) e 4.2, o composto **16** além de ser um candidato à atividade antiproliferativa, é inibidor nanomolar das ChEs. Assim, pode se supor que sua ação antiproliferativa viria acompanhada de forte ação sobre o sistema colinérgico. Mesma análise seria válida para o composto **15**. Disso pode resultar restrições ou particularidades quanto a aplicação dessas moléculas. Neste contexto ressalta-se que o composto **16** apresenta significativa atividade sobre IMR32. Caso essa ação antineuroblastoma seja mais benéfica quando em associação com a inibição colinesterásica, o resultado da terapia poderia ser mais efetivo. Nesse caso supõe-se que o neuroblastoma tenha seu desenvolvimento dependente de sinalização colinérgica. Por outro lado o composto **19** é menos ativo sobre AChE conservando atividade na ordem de submicromolar sobre IMR32. Assim essa molécula poderia ser utilizada no tratamento de neuroblastoma numa perspectiva de menor efeito sobre a sinalização colinérgica quando comparada com **16**. Os compostos **23-25** também apresentam atividades ChEIs que os tornam um pouco mais adequados ao tratamento do câncer com menor interferência na sinalização colinérgica. Nesse sentido o composto **25** ($CI_{50(AChE)} = 1,1 \mu M$) poderia ser usado nos casos de neuroblastoma e câncer de ovário. Outros exemplos podem ser citados incluindo o composto **31**. No oposito a essas observações tem-se a tacrina, a qual não apresenta efeito sobre o ciclo celular, embora possua atividade anticolinesterásica significativa.

Os genes para as ChEs encontram-se em regiões cromossômicas às quais estão associadas anomalias vinculadas ao desenvolvimento de cânceres [21]. Nesse sentido tem sido especulado o papel desses genes em situações deletérias ao organismo [22]. Um exemplo seria a atividade de chaperona molecular das ChEs resultando na formação de precipitados proteicos nocivos ao sistema nervoso [23]. O teor de ChEs é anômalo em quadros clínicos desfavoráveis como câncer, diabetes, síndrome de Down, dentre outros [24-26]. Especificamente, o teor de BChE pode ser maior que o normal, o que sugere que essa enzima esteja envolvida na gênese ou manutenção de condições deletérias [27]. Seguindo essa análise, supõe-se que a inibição seletiva de BChE constitua uma possível estratégia anticâncer. Assim, o composto **19** poderia ser usado no tratamento de neuroblastoma não apenas atuando sobre os alvos tradicionais mas também

agindo sobre a BChE ($CI_{50} = 0,35 \mu\text{M}$), com menor impacto sobre a atividade do sistema colinérgico dependente de AChE.

Em síntese supõe-se que dentre os dímeros acima encontrem-se combinações de estratégias que resultem em efeitos terapêuticos úteis.

A comparação entre os resultados dos dímeros para as linhagens celulares e para as ChEs parece sugerir que os compostos mais ativos pertencem à série que possibilita o melhor compromisso de encaixe no seu alvo. No caso das ChEs isso ocorreria com "n = 1" e no suposto caso do DNA com "n = 0".

4.4 - Modelagem molecular

Os dímeros foram submetidos ao procedimento de *docking* molecular em relação a alguns receptores que se acredita serem significativos no contexto do câncer. Os mesmos são sumariados na Tabela 4.3.

Tabela 4.3 – Possíveis alvos moleculares para bioligantes com atividade antitumorigênica

Alvo	O que o alvo representa	Ref.
DNA fita simples	Alvos genéticos envolvidos na transcrição citosólica	[28]
DNA fita dupla	Material genético cerne dos processos de replicação e transcrição	[29-32]
Fenda menor do DNA	Simula região preferencial interacional de sistemas aromáticos estendidos	[33,34]
Tetrâmero de DNA	Telômero do DNA	[35]
Complexo Topo II-DNA	Sistema de controle topológico do DNA	[36-38]
Complexo Topo I-DNA	Mesmo que Topo II-DNA	[39]
Tubulina	Componente do citoesqueleto envolvido na citocinese	[40]
MDR	Transportador multidroga envolvido em resistência	[41]

Os compostos **14**, **17**, **20**, **23**, **26** e **29** para os quais "n = 0" foram considerados representativos dos dímeros visto apresentarem resultados de CI_{50} para várias das linhagens celulares avaliadas, o que possibilita uma análise comparativa. Adicionalmente o composto **16** foi avaliado visto sua maior citotoxicidade. A obtenção das estruturas dos alvos bem como os procedimentos do *docking* estão descritos no Capítulo 5 (pág. 103). Em geral as energias de formação de complexos obtidas experimentalmente possuem pouca correlação com os resultados *in vivo*. Mesmo nas situações onde o alvo molecular é claramente determinado [42]. Isso tem sido associado à farmacocinética do ligante: solubilidade na membrana plasmática, biotransformação, excreção da molécula e derivados por transportadores, ação inespecífica, *etc.* [10]. Assim as avaliações de conformações e energias por *docking* foram feitas no intuito de se buscar possíveis mecanismos. Nas tabelas das seções a seguir os compostos tomados como referência (CR) são aqueles com atividade sobre o alvo e que compõe o complexo original da estrutura de raios-X, representadas por quatro caracteres conforme convenção do PDB.

4.4.1 - DNA fita simples

Utilizou-se a estrutura 452D [28] cujo ligante original do complexo é apresentado na Figura 4.2.

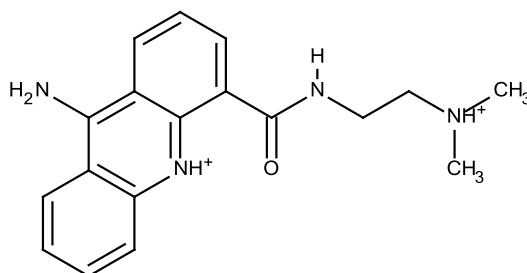


Figura 4.2 – Ligante pertencente ao complexo 452D.

Como se observa na Figura 4.2 esse ligante possui um sistema amino-acridina análogo aos dímeros derivados da tacrina. Alvos de ácido nucléico monofita estão presentes no citosol, os quais participam da síntese proteica [43]. As energias obtidas por *docking* para a formação do complexo entre os dímeros e o DNA monofita são sumariados na Tabela 4.4 (Nesta e demais tabelas, os valores são dados em módulo).

Tabela 4.4 - Energia de interação estimada para a formação do complexo "DNA fita simples" - dímero

Composto	THA	14	16	17	20	23	26	29	CR*
Energia/(kcal/mol)	4,9	3,6	6,2	6,3	6,6	6,6	6,7	6,9	5,9

*Nesta e demais tabelas CR refere-se ao composto de referência, original da estrutura de raios-X.

Como se observa na Tabela 4.4 a maioria dos dímeros apresenta energia de interação superior à referência, o que pode sugerir significativo potencial de ação. Além disso, o valor para o composto **26**, embora não sendo o maior, é coerente com o bom resultado obtido por este composto nos testes. Por outro lado, o perfil de interação da conformação de associação observado no *docking* do composto **16** com o DNA monofita é um dos melhores visto a formação de um conjunto significativo de interações conforme se vê na Figura 4.3.

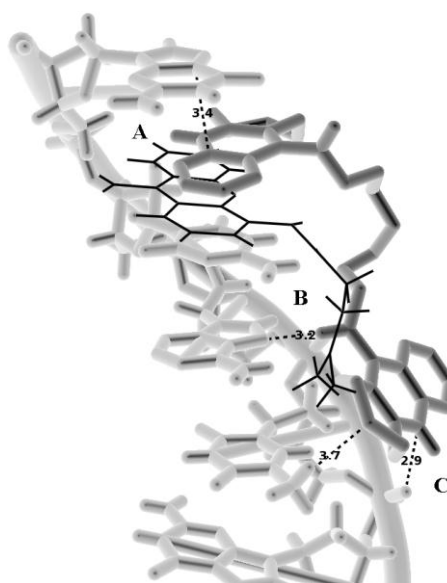


Figura 4.3 - Conformação de interação do composto **16** (cinza) com o DNA fita simples. Nesta e demais figuras o ligante natural do complexo é mostrado em linhas pretas.

A Figura 4.3 (pág. 66) mostra que o composto **16**, através de seu sistema quinolínico protonado, participa de empilhamento duplo (região **A**) com as bases nitrogenadas acima e abaixo do plano do anel à 3,4 Å. A carga que surge pela protonação do sistema quinolínico é um fator que favorece a interação de empilhamento [44,45]. Na região **B** da Figura 4.3, observa-se que o nitrogênio amínico do ligante forma ligação de hidrogênio à 3,2 Å com um dos nitrogênios doadores de par eletrônico pertencente à adenina. Na parte inferior da Figura 4.3 (região **C**, pág. 66) verifica-se a interação entre o grupo alifático do ligante e uma metila do receptor à 3,7 Å. Essa interação, além das forças de London envolvidas, apresenta efeito entrópico considerável ao deslocar moléculas de água que antes interagem com ambas estruturas [46]. Ainda na parte inferior da Figura 4.3 (pág. 66) destaca-se a potencial interação à 2,9 Å entre o segundo grupo quinolínico protonado do ligante e um oxigênio negativo da estrutura fosfo-pentose do receptor. Esse conjunto de interações talvez possa significar em alguns casos uma justificativa para o melhor perfil de ação dessa molécula sobre as linhagens celulares testadas. Por outro lado, o *docking* envolvendo o composto **23** mostra que para alcançar a ligação de hidrogênio que o composto **16** alcança entre seu grupo amina aromático e um dos nitrogênios purínicos da adenina (3,2 Å) seria necessário o comprometimento da interação entre a carga do nitrogênio piridínico e um dos oxigênios carregados do segmento de ácido nucleico. Esse fato também parece corroborar para a maior potência de **16** em alguns casos.

4.4.2 - DNA fita dupla com possibilidade de *bis*-intercalação

Medidas físico-químicas têm demonstrado que dímeros derivados de acridina intercalam o DNA [47,48]. Para avaliar a possibilidade de *bis*-intercalação conduziu-se experimentos com a estrutura 1CX3 [29]. A mesma apresenta originalmente um *bis*-intercalador, o qual é mostrado na Figura 4.4.

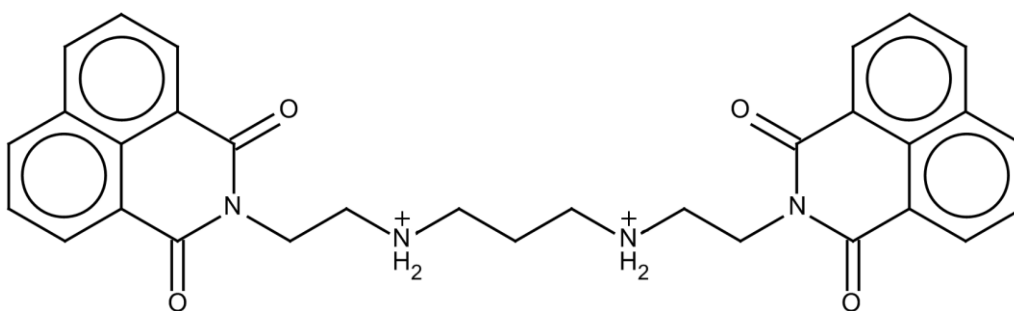


Figura 4.4 - Ligante *bis*-intercalante pertencente ao complexo 1CX3.

Como se observa na Figura 4.4 este ligante possui unidades naftalênicas intercaladoras que mimetizam o sistema quinolínico dos dímeros avaliados neste trabalho. Na Tabela 4.5 são apresentadas as energias de formação do complexo entre os dímeros e o DNA obtidas por *docking*.

Tabela 4.5 - Energia de interação estimada para a formação do complexo "DNA fita dupla" - dímero

Composto	Tacrina	14	16	17	20	23	26	29	CR
Energia/(kcal/mol)	6,5	5,0	5,1	8,5	8,7	8,6	9,4	9,1	9,6

Como se observa na Tabela 4.5 (pág. 67) as energias de interação dos dímeros são menores que a da referência. Não obstante, o melhor desempenho indicado para o composto **26** é coerente com os melhores resultados de ação dessa molécula dentre os dímeros com espaçadores aromáticos. Conforme as conformações de interação sugeridas, o composto **26** foi dentre todos aquele com melhor perfil intercalatório, fato que se busca mostrar na Figura 4.5.

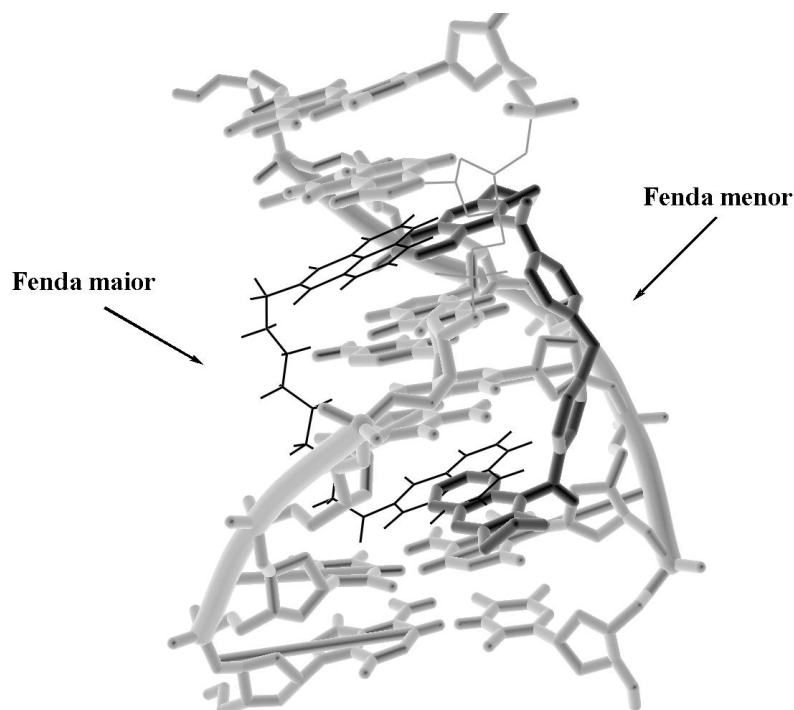


Figura 4.5 - Conformação de interação do composto **26** em alvo de DNA.

Na Figura 4.5 observa-se a sugestão segundo a qual o composto **26** é apto à empilhar duplamente suas unidades hidroacridina com o espaçador projetado para a fenda menor, contrário ao ligante original do complexo, o qual embora intercale, projeta seu espaçador linear para a fenda maior. A projeção do espaçador mostrada para **26** é predominante aos dímeros avaliados em relação a maioria dos alvos deste trabalho, indicando ser essa uma característica desses compostos. Em oposição à **26**, o dímero **20** é o que apresenta perfil intercalatório menos expressivo, observação que parece coerente com sua menor citotoxicidade.

No modelo mostrado na Figura 4.5 a *bis*-intercalação foi avaliada no contexto de sítios de *bis*-intercalação separados entre si por dois pares de bases. Os compostos deste trabalho também foram avaliados para modelos nos quais esse espaçamento ocorre à três e quatro pares de bases, estruturas 1MNV [30] e 1AL9 [31], respectivamente. Nestes casos, nenhum dos dímeros mostrou-se apto à *bis*-intercalação, o que sugeriu ser o comprimento dos espaçadores um fator de restrição à intercalações duplas cujos sítios são separados por mais de dois pares de bases. Entretanto, uma característica sugerida pelo *docking* para os compostos **20** e **23** em relação a esses alvos foi a habilidade dos mesmos em intercalar por *threading* [49], conforme se vê na Figura 4.6 (pág. 69).

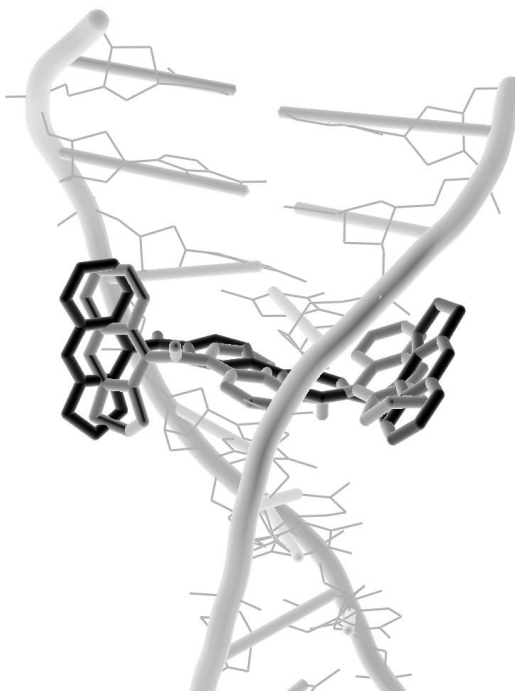


Figura 4.6 - Interação em *threading* sugerido para **20** (preto) e **23** (cinza).

Na Figura 4.6 os compostos projetam suas unidades hidroacridina para as fendas do DNA, estando o espaçador (benzidínico ou naftalênico) realizando o papel intercalatório. Compostos com esse perfil possuem cinética de interação distinta daqueles cujo modo de interação predominante é o intercalatório simples [50-52]. Isso repercute em potencial de ação diferenciado. Nesse sentido, cabe destacar que os compostos acima, especialmente **20**, apresentam menor potencial de ação sobre as células avaliadas.

4.4.3 - DNA fita dupla com monointercalação

No intuito de se avaliar as energias de formação de complexo envolvidas nos casos em que apenas uma das componentes hidroacridina do dímero intercala enquanto a outra projeta-se para as fendas do DNA utilizou-se como modelo de receptor a estrutura 2KY7, cujo ligante natural é mostrado na Figura 4.7 [32].

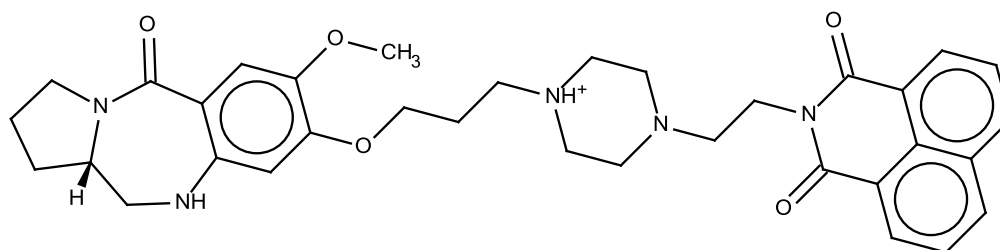


Figura 4.7 - Ligante de monointercalação pertencente ao complexo 2KY7.

Como se observa na Figura 4.7 esse ligante possui um sistema naftalênico em uma das extremidades que mimetiza o sistema quinolínico dos dímeros enquanto na outra extremidade um sistema tricíclico com componente alicíclico remete à componente alicíclica da fração hidroacridina dos dímeros. Além disso, o

espaçador com componente cíclica pode ser tomado como elemento de similaridade com os espaçadores dos dímeros. Os energias obtidas para os dímeros selecionados são apresentados na Tabela 4.6.

Tabela 4.6 - Energia de interação estimada para a formação do complexo "DNA fita dupla" – dímero

Composto	Tacrina	14	16	17	20	23	26	29	CR
Energia/(kcal/mol)	7,5	9,4	9,3	11,0	11,3	10,6	11,5	11,2	15,9

Como se observa na Tabela 4.6 a maior energia foi indicada para o composto **26**, coerente com seu melhor desempenho entre os compostos com espaçadores aromáticos. Os valores de energia de interação apresentados na Tabela 4.6 são maiores que aqueles obtidos para os mesmos ligantes e mostrado na Tabela 4.5 (pág. 67) o que talvez sugira a maior possibilidade desses ligantes em apresentarem este mecanismo. A Figura 4.8 ilustra a conformação de interação do composto **26** com o DNA cujo complexo refere-se a um ligante que combina monointercalação com interação com a fenda menor.

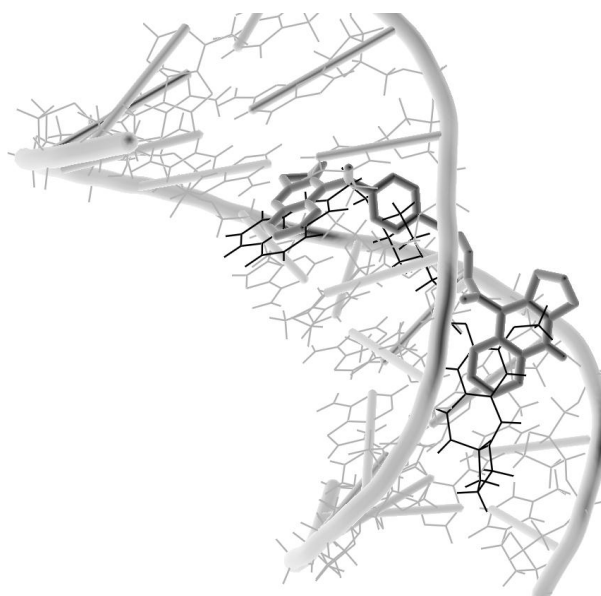


Figura 4.8 - Conformação de interação do composto **26** (cinza) no modelo de monointercalação.

Uma característica sugerida pela modelagem é que a fração alicíclica da componente hidroacridina deste dímero bem como da maioria projeta-se para a fenda menor. Esse talvez seja um argumento que justifique porque o composto **16** é melhor ligante que **14** uma vez que aproveita melhor as interações de baixa polaridade além de gerar um número maior de moléculas de água livres. Por outro lado, a fração hidroacridina protonada seria melhor estabilizada na região de empilhamento na maioria dos casos. Esse aspecto é coerente com resultados da literatura também para outros tipos de alvos como as colinesterases, as quais possuem maior afinidade por um ligante com componente acridina protonada que interage por empilhamento com o resíduo de triptofano indólico próximo à tríade catalítica das ChEs [53,54].

4.4.4 - DNA fita dupla com ênfase na interação envolvendo a fenda menor

Outra possibilidade de interação de bioligantes com o DNA seria aquela que ocorre apenas nas fendas. O PDB mostra que muitos compostos cujas estruturas possuem os mesmos elementos estruturais que os dímeros de tacrina deste trabalho comportam-se como ligantes ao DNA através de suas fendas [55]. Como as sugestões de conformação de interação dos dímeros apontam preferência pela fenda menor, foram avaliados dois modelos de complexos cujos ligantes originais possuem estruturas as quais assemelham-se àquelas dos compostos deste trabalho. Esses ligantes são mostrados na Figura 4.9.

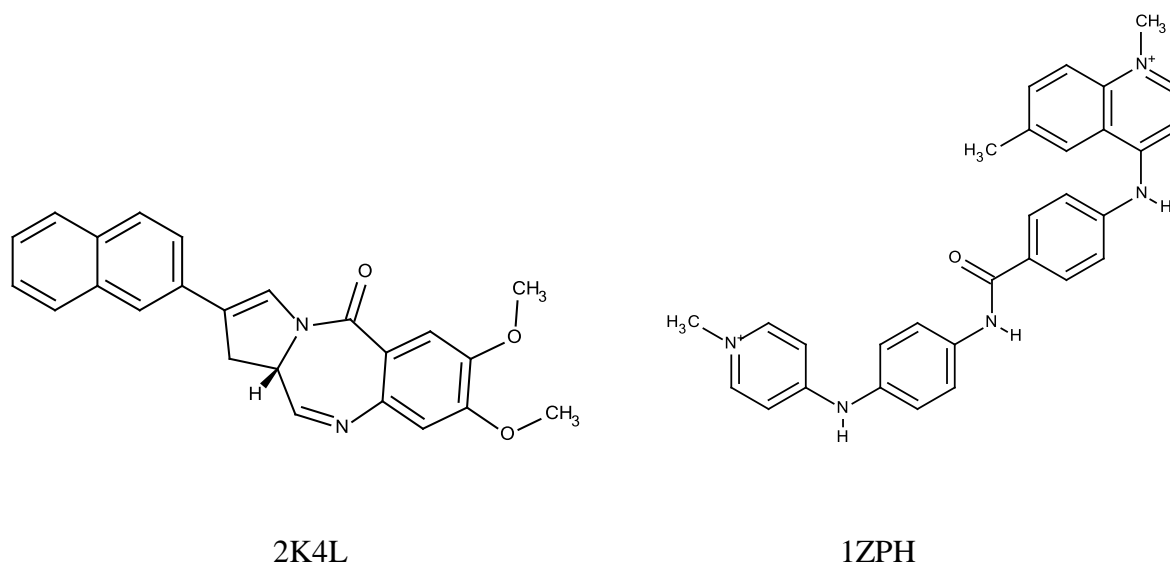


Figura 4.9 - Ligantes originais dos complexos 2K4L [33] e 1ZPH [34].

Os padrões naftalênico, estilbênico, de dupla carga positiva e amino-quinolínico comuns aos dímeros aparecem na Figura 4.9. As energias obtidas por *docking* são apresentadas na Tabela 4.7.

Tabela 4.7 - Energias estimadas para a formação do complexo "fenda menor do DNA" – dímero

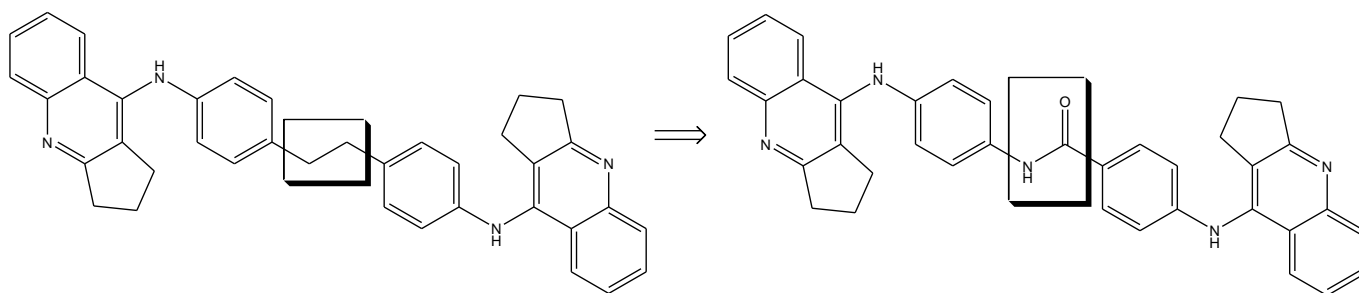
Estrutura	Composto								
	Tacrina	14	16	17	20	23	26	29	CR
2K4L	8,5	10	10,6	12	13,3	12,7	13	12,3	8,9
1ZPH	7,1	9	9,5	9,4	11,6	9,8	11	10,3	15,5

Em linhas gerais os dois modelos fornecem resultados relativos cuja tendência parece ser similar, embora no primeiro caso os compostos possam interagir mais intensamente que a referência, fato contrário ao observado no segundo. O composto **26** possui o segundo maior valor de energia, o que pode ser um indicativo de que a ligação total ou parcial nessa região do DNA possa contribuir para sua ação distinta.

A versatilidade na interação com receptor é estratégica para maior eficiência da ação do bioligante [56,57]. A comparação na região de interação do composto **20**, menos potente, nos dois modelos mostra que enquanto em 2K4L ele se liga preferencialmente à sequência TAAAG, em 1ZPH ele se liga à

sequência TTAAG, as quais são significativamente similares entre si. A mesma observação não ocorre para os compostos mais potentes **16** e **26**, os quais ligam-se à sequências distintas nos dois alvos. Isso poderia sugerir maior versatilidade de interação com DNA, resultando em maior efetividade de ação, justificando o comportamento observado a esses compostos. A especificidade de intercaladores por sequências de bases do DNA têm sido descrita [58-60].

Um aspecto observado em muitos ligantes de fenda menor é a presença de ligação amida no centro do espaçador [55]. Um exemplo é o ligante 1ZPH mostrado na Figura 4.9 (pág. 71). Para verificar o efeito dessa característica no potencial de ligação dos dímeros de tacrina modelou-se a transformação indicada no Esquema 4.1 onde um grupo amida foi introduzido no centro do composto **29**.



Esquema 4.1 - Derivação do composto **29** com introdução de amida no espaçador.

As energias de formação dos complexos com a fenda menor do DNA obtidas por *docking* molecular tanto para o composto **29** quanto para seu derivado amida são mostradas na Tabela 4.8.

Tabela 4.8 – Energias de formação do complexo "fenda menor do DNA" - composto **29** ou derivado

Estrutura	Composto	
	29	Derivado amida
2K4L	12,3	13,4
1ZPH	10,3	11,5

Como se observa na Tabela 4.8 a presença de um grupo amida no espaçador pode repercutir em ganho de interação. Os *dockings* mostram que o grupo amida é capaz de estabelecer ligações de doação e aceção de hidrogênio com as pentoses e com as bases nitrogenadas do DNA. A Figura 4.10 (pág. 73) busca ilustrar esses aspectos para as duas estruturas deste estudo.



Figura 4.10 - Composto **29** (cinza) e derivado amida (cinza escuro) em conformação de interação com as estruturas 2K4L (esquerda) e 1ZPH (direita).

Assim, para 2K4L, as ligações mencionadas são sugeridas à 2,9 Å e 3,6 Å enquanto para 1ZPH a mesma ocorre à 2,9 Å entre o nitrogênio amida e uma carbonila de uma citosina do DNA.

4.4.5 - Tetrâmero de DNA

As extremidades do material genético apresentam-se como fitas simples, as quais são estabilizadas através da formação de múltímeros de DNA [61]. Essas regiões conhecidas como telômeros desempenham importante papel no ciclo celular, sendo o controle do tempo de vida dos organismos uma das funções mais proeminentes [62,63]. Essa região e a enzima que atua sobre a mesma (telomerase) tem sido apontados como alvos na terapia contra o câncer [64]. Um dos modelos tomados como adequados para avaliação de atividade de compostos antitumorígenicos são os tetrâmeros de DNA. Por isso neste trabalho utilizou-se um modelo de tetrâmero de DNA para *docking*, cujo ligante presente no complexo 3EUM [35] é mostrado na Figura 4.11.

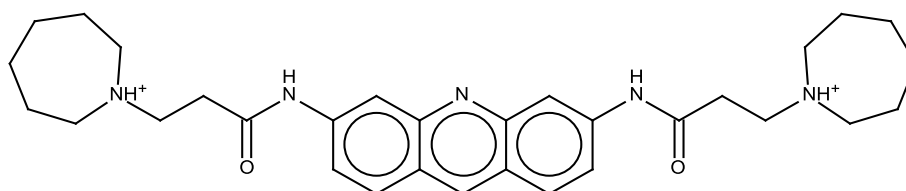


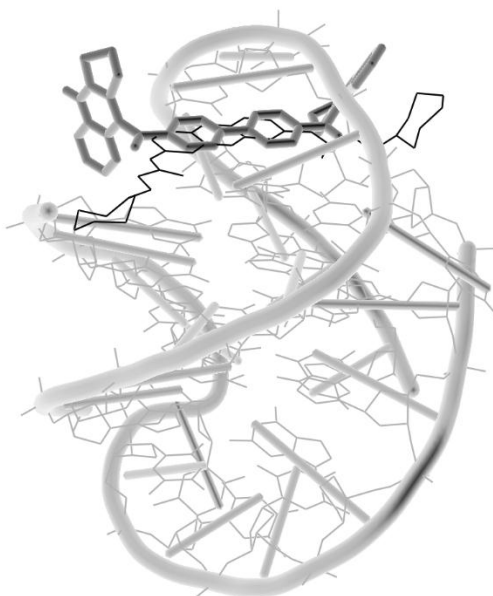
Figura 4.11 - Ligante acridínico presente no complexo 3EUM.

Como se observa na Figura 4.11, essa molécula possui o núcleo acridínico análogo àquele presente nos derivados da tacrina. Além disso, os anéis *azo*-alíclicos poderiam sugerir similaridade com os anéis alíclicos anexos aos sistemas quinolínicos dos ligantes avaliados neste trabalho. As energias de formação de complexo entre o tetrâmero e os dímeros de tacrina são apresentadas na Tabela 4.9 (pág. 74).

Tabela 4.9 – Energia de interação estimada para a formação do complexo "tetrâmero de DNA" - dímero

Composto	Tacrina	14	16	17	20	23	26	29	CR
Energia/(kcal/mol)	8,0	9,0	7,9	9,6	10,8	9,4	9,5	9,6	13,0

Na Tabela 4.9 todos os compostos avaliados apresentam-se como inferiores à referência quanto ao potencial de interação. Neste contexto, o projeto de intercalação para esse tipo de alvo talvez requiera um elemento intercalante no centro do ligante, o qual deve possuir ainda substituições nas suas extremidades aptas a aproveitar possíveis interações no entorno. Esse fato seria parcialmente alcançado pelo composto **20**, conforme se vê na Figura 4.12.

Figura 4.12 - Conformação de interação sugerida para o composto **20** (cinza).

O perfil de *threading* observado a esse ligante, embora repercutindo maior energia de interação, é coincidente com menor atividade sobre as células, o que é coerente com a cinética lenta associável a esse tipo de interação. Por outro lado, o composto **16**, mais potente, apresenta o menor energia de interação para esse tipo de alvo, o que poderia sugerir não ser esse um tipo de alvo vinculável à ação de alguns dímeros de tacrina.

4.4.6 - Topoisomerase II - DNA

Embora a capacidade de intercalar o DNA seja importante na terapia contra o câncer, um quesito que amplia a ação dos bioligantes é a capacidade de ligar-se ao complexo Topo II - DNA [65]. Esse complexo é formado durante a transcrição e a replicação do DNA visando reduzir os efeitos de super- e subespiralamento que impedem o avanço do processo de síntese [66]. Nesse complexo o DNA é clivado em dois pontos e religado. Sua inibição constitui o modo de ação de alguns fármacos como o etoposídeo (Figura 4.13, pág. 75). A estrutura molecular do complexo Topo II – DNA - Etoposídeo foi elucidada o

que favorece a realização de estudos por *docking* molecular, especialmente que esse foi um dos compostos de referência usados nos testes de avaliação antiproliferativa (Tabela 4.1, pág. 60) [36].

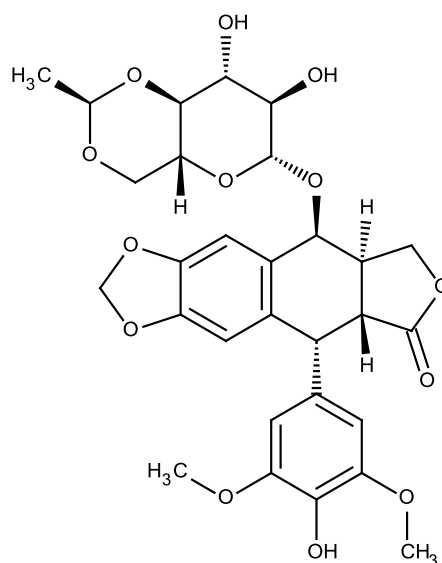


Figura 4.13 – Etoposídeo.

Além da estrutura supramencionada foram avaliados outros dois modelos do mesmo complexo: um com dupla ruptura no DNA cujo ligante é um derivado de acridina, 4G0U [37]; outro no qual o DNA está intacto, 4BUL [38]. As estruturas dos ligantes originais são mostradas na Figura 4.14.

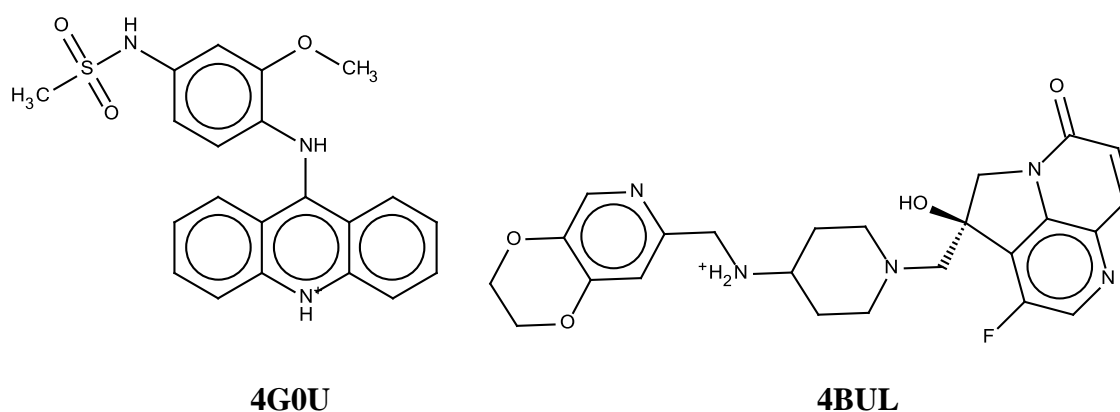


Figura 4.14 - Ligantes dos complexos 4G0U e 4BUL.

Como se observa na Figura 4.14 esses ligantes possuem elementos estruturais comuns aos compostos avaliados neste trabalho. As energias sugeridas para a formação de complexos entre as três estruturas modelo mencionadas acima e os dímeros são apresentadas na Tabela 4.10.

Tabela 4.10 - Energia (kcal/mol) estimada para a formação do complexo "Topo II:DNA" – dímero

Estrutura	Composto								
	Tacrina	14	16	17	20	23	26	29	CR
3QX3	8,6	10,7	11,8	11,7	13,4	13,1	13,3	13,4	14,0
4G0U	8,9	9,8	10,0	10,9	12,0	11,5	12,3	12,7	13,6
4BUL	13,4	17,0	17,3	18,8	22,2	22,1	20,3	20,4	20,8

Para as conformações de interação associadas às energias da Tabela 4.10 (pág. 75) verificou-se que os compostos **20** e **23**, embora apresentando valores de energia maiores, ligam-se em posições do receptor que não possuem significado inibitório. Por outro lado, a tendência a *threading* é visualizada em algumas das conformações de interação sugeridas, especialmente para o composto **20**, observações que remetem ao menor perfil citotóxico desses ligantes.

Os resultados para 3QX3 sugerem que o etoposídeo seja o composto mais potente. Entretanto isso não repercute claramente nos resultados de atividade, o que pode levar a supor que o *docking* em uma estrutura de receptor com o próprio ligante possa gerar interações otimizadas resultando em potenciais superiores aparentes. Não obstante pode-se supor que os dímeros de tacrina além de atuarem como inibidores desse complexo, talvez possam apresentar outros mecanismos de ação. Ou mesmo que a princípio sejam menos potentes, os mesmos seriam também alvos menos efetivos para transportadores multidrogas [11] ou do metabolismo celular [10].

Os compostos **26** e **16** apresentam as melhores conformações de interação em termos da orientação e distâncias envolvidas nas ligações sugeridas pelo *docking*. Esses resultados são coerentes com o melhor perfil de ação dessas moléculas. A comparação entre os compostos **26** e **29** nos complexos parece sugerir que o ganho de comprimento do segundo em relação primeiro não resultou em melhoria no alcance interacional visto a similaridade das mesmas. Assim o custo entrópico passaria a ser um fator que desfavorece o composto com maior liberdade conformacional [46]. Por outro lado, o composto **16** apresenta um significativo conjunto de interações com particular ênfase para sua interação com um sítio hidrofóbico, fato análogo ao observado para **16** na fenda catalítica das colinesterases. A Figura 4.15 busca ilustrar esse aspecto.

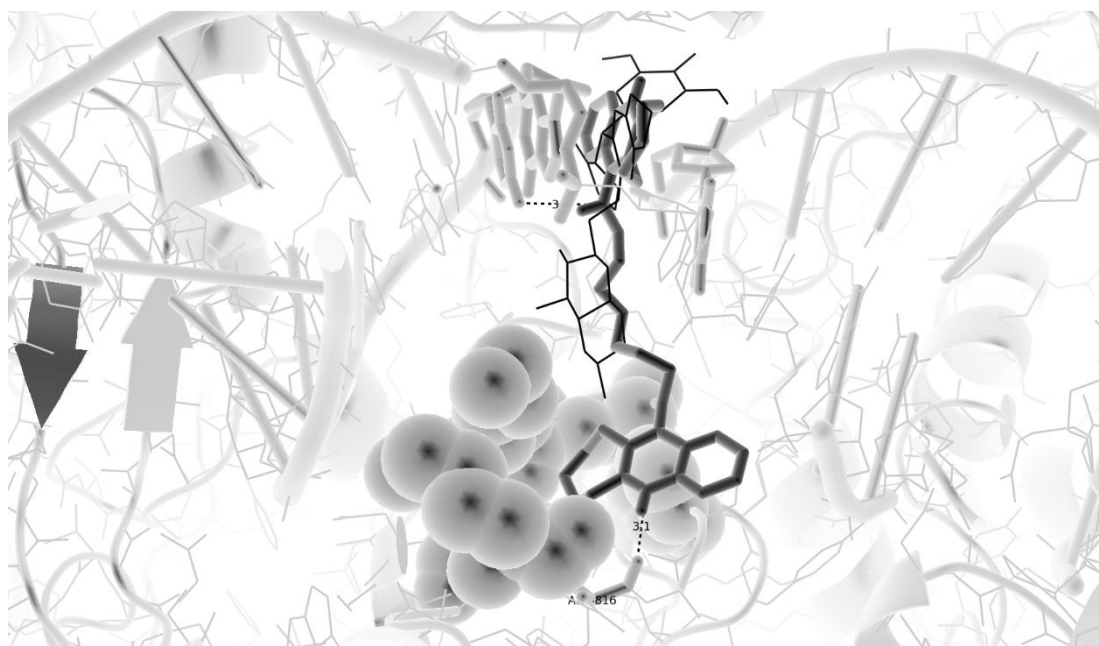


Figura 4.15 - Conformação de interação do composto **16** (cinza) com complexo com Topo II – DNA.

Na Figura 4.15 (pág. 76) além do empilhamento entre as bases nitrogenadas (parte superior do ligante), o hidrogênio piridínico da fração inferior interage à 3,1 Å com a carbonila de A816 enquanto a componente alicíclica projeta-se para uma região hidrofóbica formada por resíduos como MET781, MET782, VAL785 e PRO819 representados no modelo espaço cheio. Essa é uma configuração característica de ligações que resultam em ação mais efetiva do ligante sobre o alvo [54].

4.4.7 - Topoisomerase I - DNA

Derivados da camptotecina (Figura 4.16) são utilizados na clínica contra o câncer [67]. Essa molécula age sobre o complexo Topo I - DNA resultando na estabilização do sistema com o DNA monoclivado [68]. O complexo Topo I - DNA, análogo em função ao de Topo II, participa do controle topológico do material genético, porém clivando apenas uma das fitas [66].

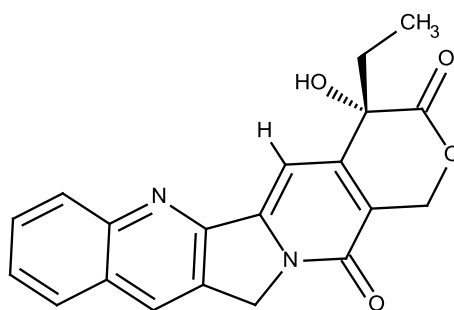


Figura 4.16 – Camptotecina.

Neste trabalho realizou-se *docking* entre os dímeros e a estrutura 1T8I [37] na qual a camptotecina está complexada com o sistema Topo I – DNA. Os resultados são apresentados na Tabela 4.11.

Tabela 4.11 - Energia estimada para a formação do complexo "Topo I:DNA" - dímero

Composto	Tacrina	14	16	17	20	23	26	29	CR
Energia/(kcal/mol)	8,0	8,8	11,2	12,1	13,7	13,7	12,9	13,3	9,1

Dos dados da Tabela 4.11 pode-se supor que os compostos avaliados são possíveis agentes de inibição do complexo Topo I – DNA. Apesar dos maiores valores de energia para os compostos **20** e **23**, a interação dos mesmos se dá de forma improdutivo. A diferença de energias entre os compostos **14** e **16** talvez possa sugerir ser este um alvo que distinga os dois quanto à atividade nas células já que o primeiro foi bem menos potente.

4.4.8 - Tubulina

Um alvo proteico importante associado à ação de compostos com atividade antiproliferativa é a tubulina, a qual compõe o citoesqueleto celular e cuja integridade de funcionamento e interação com outras

proteínas é indispensável à homeostase e citocinese [70]. A ação antitumorigênica da podofilotoxina (Figura 4.17) fundamenta-se na interação com esse alvo.

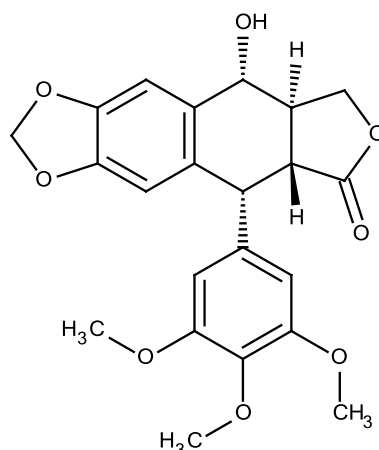


Figura 4.17 - Podofilotoxina.

Uma das revisões realizadas durante este doutorado buscou organizar e entender os elementos chave das estratégias de síntese disponíveis para a podofilotoxina, a qual ainda é obtida para fins terapêuticos por extração a partir de fontes naturais.

Neste trabalho avaliou-se as energias de formação de complexos entre os dímeros de tacrina e a tubulina [38]. Os resultados são apresentados na Tabela 4.12.

Tabela 4.12 – Energia estimada para a formação do complexo Tubulina - dímero

Composto	Tacrina	14	16	17	20	23	26	29	CR
Energia/(kcal/mol)	7,5	9,1	10,2	11,1	10,9	12,1	12,1	11,4	8,8

Em relação à podofilotoxina, os resultados da Tabela 4.12 parecem sugerir que os dímeros de tacrina são potenciais bioligantes da tubulina. Dentre as maiores energias observa-se aquela para o composto **26**, fato coerente com sua citotoxicidade.

Conforme as sugestões do *docking*, os dímeros na sua conformação de interação interagem preferencialmente na interface entre as duas subunidades do receptor, similar à podofilotoxina. Essa região é formada por um sítio hidrofóbico significativamente extenso, o qual hospeda a podofilotoxina. As metoxilas deste ligante perfazem conjunto significativo de interações nesse sítio. Espera-se que a podofilotoxina por possuir pequena liberdade conformacional e ser predominantemente hidrofóbica gere significativo ganho entrópico na formação do complexo visto a liberação das moléculas de água que solvata a interface das subunidades do receptor [46]. Dentre os dímeros, o composto **16** é de todos o que mais alcança interações no sítio hidrofóbico e interações específicas em outros pontos do receptor, fato coerente com sua maior toxicidade. Mesmo assim o custo entrópico de sua ligação associado à sua maior protonabilidade parece interferir negativamente na sua capacidade de ação. Isso porque a projeção do grupo protonado para o interior de uma fase hidrofóbica sofrerá resistência por parte das moléculas de

água de solvatação e outros grupos com interação preferencial [46]. Em consonância os dímeros de tacrina com espaçadores aromáticos, por serem menos protonáveis que aqueles com espaçadores alifáticos, terão favorecimento termodinâmico para projetar sua componente hidroacridina desprotonada para o interior do sítio hidrofóbico. Não obstante, em função da menor flexibilidade desses ligantes, essa melhor projeção ocorre à custa do não estabelecimento de interações específicas significativas pelo restante do ligante nos demais pontos do receptor, o que parece restringir o efeito dos dímeros para esse alvo. A melhor combinação de efeitos hidrofóbicos com interações específicas parece ser alcançada para o composto **26**, justamente o mais ativo com espaçador aromático. Nesse sentido, o aumento em "n", que se esperaria ampliar o contato hidrofóbico do composto **26**, seria proibido pela menor flexibilidade de seu espaçador, a qual comprometeria a formação do complexo visto a forma restritiva da região de ligação do receptor. Coerente com essa observação, a atividade do composto **28** é inferior, bem como de outros derivados da série com "n = 2". A Figura 4.18 busca ilustrar algumas dessas colocações.

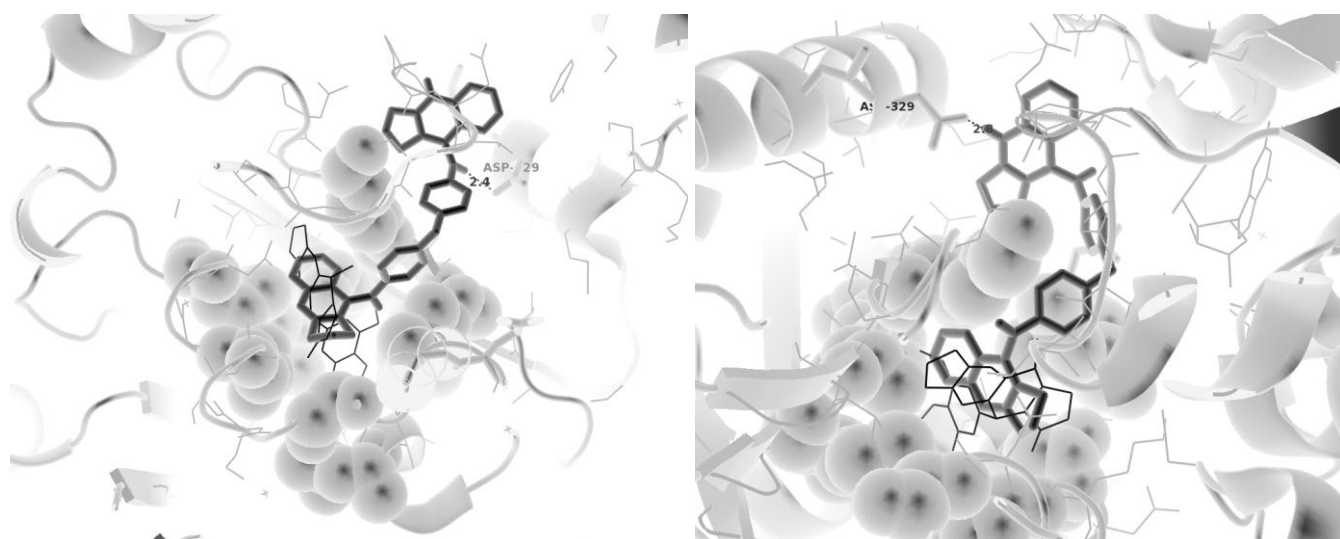


Figura 4.18 - Conformação de ligação do composto **26** no dímero $\alpha\beta$ -tubulina.

Na Figura 4.18 em duas das conformações de ligação sugeridas para **26** na tubulina verificamos que enquanto a fração hidroacridina "neutra" projeta-se para o sítio mostrado no modelo espaço cheio, a fração protonada "carregada" projeta-se para o meio estabelecendo nos dois casos ligações de hidrogênio com o resíduo D329 à 3,3 Å ou 2,8 Å.

4.4.9 - Transportador multidrogas

Um dos principais agentes que contribuem para a resistência das células à ação de moléculas com perfil antitumorigênico são os transportadores multidrogas (MDRs), os quais expulsam o candidato à fármaco da célula [11]. Essas ATPases transmembrana possuem grande versatilidade de ligação no seu sítio interacional [39]. Compostos análogos aos dímeros de tacrina são alvos dos MDRs visto a redução em até 50% da citotoxicidade sobre linhagens que os superexpressam [1]. Em função desses aspectos realizou-se *docking* com a estrutura 4KSD [39] a qual representa um transportador multidrogas. As energias obtidas

por *docking* para formação dos complexos entre os dímeros e o modelo de MDR são apresentadas na Tabela 4.13.

Tabela 4.13 – Energia de interação estimadas para a formação do complexo MDR - dímero

Composto	Tacrina	14	16	17	20	23	26	29
Energia/(kcal/mol)	7,7	9,4	9,3	10,2	10,9	11,6	12,2	11,6

Da Tabela 4.13 ressalta-se que o composto **26** apresenta o maior valor de energia. O mesmo é o mais citotóxico para três das linhagens celulares investigadas: C6, TOV21G e COLO205 (Tabela 4.1, pág. 60). Em contrapartida, o composto **16**, mais citotóxico no geral, apresenta a menor energia de interação. Aparentemente a ligação relativamente mais intensa de **26** resultaria em maior efeito inibitório sobre esse tipo de receptor, enquanto a ligação menos favorável por parte de **16** resultaria no não transporte do mesmo. Isso talvez sugira que os casos de energia de interação intermediários sofram ação mais efetiva dos MDRs. Essa suposição parece coerente com o fato de que ATPases requerem uma mudança conformacional adequada para sua atividade [70,71].

4.4.10 - Análise comparativa entre os alvos testados

O composto **16** é mais citotóxico que seu homólogo inferior, composto **14**. A análise das tabelas mostra que quatro valores de Energia de interação para os dois apresentam maiores diferenças: Topo I, Topo II, DNA monófito e tubulina. Isso pode sugerir que algum desses mecanismos seja subjacente à maior potência de **16**, sendo a ação sobre o ácido nucléico monofita o mais provável. No oposto, a ação inibitória sobre telomerase e transportador multidrogas não seriam mecanismos prováveis para essas moléculas.

Dentre os alvos para o composto **26** a maior energia foi sugerida para a formação do complexo com DNA-Topo II, o que reforça o papel deste mecanismo. Essa ação combinada com a *bis*-intercalante talvez compunham parte significativa da farmacodinâmica desse dímero.

Os dímeros **20-25** apresentam-se com perfil de interação do tipo *threading* em muitos dos alvos avaliados, sugerindo que o sistema aromático conjugado no espaçador pode levar a esse tipo de ligação, resultando em cinética distinta com perda de atividade.

A tacrina coerente com os resultados experimentais apresenta menores valores de energia de interação. Supõe-se que sua estabilização nesses alvos não é suficiente para alterar o mecanismo de ação dos mesmos.

4.5 – Conclusões e perspectivas

As estratégias de modificação molecular adotadas geraram compostos com atividade citotóxica não verificadas à tacrina. Esses derivados possuem significativa variedade tanto no perfil de seletividade

quanto no de atividades, sendo desde inativos até ativos na escala subnanomolar. Os dímeros de tacrina combinam citotoxicidade com manipulação seletiva do sistema colinérgico. Os resultados preliminares de biologia molecular indicam que os dímeros de tacrina provocam apoptose celular pela regulação negativa da via de BCL2. Neste contexto, conforme sugere a modelagem, os dímeros de tacrina podem apresentar capacidade significativa de interação com vários alvos de DNA, além da tubulina e do transportador multidrogas. Embora essa capacidade de interação não apresente correlações simples com as atividades *in vivo*, há possibilidades de relações estrutura-atividade. A natureza e o comprimento do espaçador bem como a dimensão do anel alicíclico da componente hidroacridina dos dímeros parecem estar entre os elementos que modulam a citotoxicidade dessa classe de moléculas.

Os resultados nas avaliações de atividade antiproliferativa abrem perspectivas para que os dímeros de tacrina, em especial os compostos **16** e **26**, tenham sua farmacologia investigada *in vivo*. Além disso, conforme mencionado no tópico 4.2 (pág. 62), dado o caráter promissor desses dímeros e a possibilidade de reconhecimento de regiões específicas do DNA pelos mesmos, é estratégico investigar, em maiores detalhes, não apenas as vias de sinalização celular afetadas (apoptose, reparo, controle do ciclo celular, genotoxicidade), mas também as biomoléculas moduladas pelos dímeros de tacrina. Neste contexto, medidas físico-químicas de interação ligante-DNA (fluorescência, RMN, ITC) serão úteis à melhor compreensão dos eventos moleculares envolvidos, permitindo melhor planejamento de novos ligantes, especialmente se acompanhadas de análises por cálculos de dinâmica molecular. Por outro lado, o planejamento, a síntese e a avaliação da atividade antiproliferativa de derivados dos dímeros de tacrina que incluam características como a habilidade dos espaçadores de formar ligações de hidrogênio e interação carga-carga com alvos de DNA pode revelar compostos ainda mais promissores que aqueles deste trabalho.

4.6 – Referências bibliográficas

- [1] Hu, M-K. Synthesis and in vitro evaluation of *bis*-tacrine congeners. *J. Pharm. Pharmacol.*, **2001**, 53, 83-88.
- [2] American Type Culture Collection: ATCC. *www.atcc.org*. Acessada em 16/11/2013.
- [3] Ciapetti, P.; Giethlen, B. Molecular variations based on isosteric replacements. in *The practice of medicinal chemistry*, 3rd ed.; Wermuth, C.G. Ed.; Burlington: Academic Press **2008**, 290-342.
- [4] Belmont, P.; Jourdan, M.; Demeunynck, M.; Constant, J. F.; Garcia, J.; Lhomme, J.; Croisy, A.; Carrez, D. Abasic site recognition in DNA as a new strategy to potentiate the action of anticancer alkylating drugs. *J. Med. Chem.*, **1999**, 42, 5153-5159.
- [5] Spicer, J. A.; Gamage, S. A.; Rewcastle, G. W.; Finlay, G. J.; Bridewell, D. J. A.; Baguley, B. C.; Denny, W. A. Bis(phenazine-1-carboxamides): structure-activity relationships for a new class of dual topoisomerase I/II-directed anticancer drugs. *J. Med. Chem.* **2000**, 43, 1350-1358.
- [6] Bair, K. W.; Andrews, C. W.; Tuttle, R. L.; Knick, V. C.; Cory, M.; McKee, D. D. 2-[(Arylmethyl)amino]-2-methyl-1,3-propanediol DNA intercalators. An examination of the effects of aromatic ring variation on antitumor activity and DNA binding. *J. Med. Chem.*, **1991**, 34, 1983-1990.

- [7] Roussidis, A. E.; Theocharis, A. D.; Tzanakakis, G. N.; Karamanos, N. K. The importance of c-Kit and PDGF receptors as potential targets for molecular therapy in breast cancer. *Curr. Med. Chem.*, **2007**, *14*, 735-743.
- [8] Fu, W.; Madan, E.; Yee, M.; Zhang, H. Progress of molecular targeted therapies for prostate cancers. *Biochim. Biophys. Acta*, **2012**, *1825*, 140-152.
- [9] Shigetomi, H.; Higashiura, Y.; Kajihara, H.; Kobayashi, H. Targeted molecular therapies for ovarian cancer: an update and future perspectives. *Onc. Report*, **2012**, *28*, 395-408.
- [10] Barreiro, E. J.; Fraga, C. A. M. Química medicinal: as bases moleculares da ação dos fármacos, 2nd ed. **2008**, Art-Med Ltda, Porto Alegre.
- [11] Roninson, I. B. The role of the MRD1 (p-glycoprotein) gene in multidrug resistance *in vitro* and *in vivo*. *Biochem. Pharmacol.*, **1992**, *43*, 95-102.
- [12] Morgan, D.O. Cyclin-dependent kinases: engines, clocks, and microprocessors. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*, **1997**, *13*, 261-291.
- [13] Chau, B. N.; Wang, J. Y. J. Coordinated regulation of life and death by RB. *Nat. Rev. Cancer*, **2003**, *3*, 130-138.
- [14] Sherr, C. J.; McCormick, F. The RB and p53 pathways in cancer. *Cancer Cell*, **2002**, *2*, 103-112.
- [15] Levine, A. J. p53, the cellular gatekeeper for growth and division. *Cell*, **1997**, *88*, 323-331.
- [16] Dassonneville, L.; Watez, N.; Baldeyrou, B.; Mahieu, C.; Lansiaux, A.; Banaigs, B.; Bonnard, I.; Bailly, C. Inhibition of topoisomerase II by the marine alkaloid ascididemin and induction of apoptosis in leukemia cells. *Biochem. Pharmacol.*, **2000**, *60*, 527-537.
- [17] Cotter, T. G.; Lennon, S. V.; Glynn, J. G.; Martin, S. J. Cell death via apoptosis and its relationship to growth, development and differentiation of both tumour and normal cells. *Anticancer Research*, **1990**, *10*, 1153-1159.
- [18] Solary, E.; Bertrand, R.; Pommier, Y. Apoptosis induced by DNA topoisomerase I and II inhibitors in human leukemic HL-60 cells. *Leuk. Lymph.*, **1994**, *15*, 21-32.
- [19] Wikipedia: The Free Encyclopedia. http://en.wikipedia.org/wiki/Cell_signaling. Acessada em 16/11/2013.
- [20] Petros, A. M.; Medek, A.; Nettesheim, D. F.; Kim, D. H.; Yoon, H. S.; Swift, K.; Matayoshi, E. D.; Oltersdorf, T.; Fesik, S. W. Solution structure of the antiapoptotic protein Bcl-2. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **2001**, *98*, 3012-3017.
- [21] Lapidot-Lifson, Y.; Prody, C. A.; Ginzberg, D.; Meytes, D.; Zakut, H.; Soreq, H. Coamplification of human acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase genes in blood cells: correlation with various leukemias and abnormal megakaryocytopoiesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **1989**, *86*, 4715-4719.
- [22] Soreq, H.; Lapidot-Lifson, Y.; Zakut, H. A role for cholinesterases in tumorigenesis. *Cancer Cells*, **1991**, *3*, 511-516.
- [23] Inestrosa N. C.; Alvarez, A.; Pérez, C. A.; Moreno, R. D.; Vicente, M.; Linker, C.; Casanueva, O. I.; Soto, C.; Garrido, J. Acetylcholinesterase accelerates assembly of amyloid-beta-peptides into Alzheimer's fibrils: possible role of the peripheral site of the enzyme. *Neuron*, **1996**, *16*, 881-891.
- [24] Vidal, C. J. Expression of cholinesterases in brain and non-brain tumours. *Chem. Biol. Interact.*, **2005**, *157-158*, 227-232.

- [25] Lakshmi, K. T.; Surekha, R. H.; Srikanth, B.; Jyothy, A. Serum cholinesterases in Down syndrome children before and after nutritional supplementation. *Singapore Med. J.*, **2008**, 49, 561-564.
- [26] Rao, A. A.; Gumpeny R. Sridhar b, Undurti N. Das. Elevated butyrylcholinesterase and acetylcholinesterase may predict the development of type 2 diabetes mellitus and Alzheimer's disease. *Med. Hypotheses*, **2007**, 69, 1272-1276.
- [27] Brass, N.; Racz, A.; Heckel, D.; Remberger, K.; Sybrecht, G. W.; Meese, E. U. Amplification of the genes BCHE and SLC2A2 in 40% of squamous cell carcinoma of the lung. *Cancer Res.*, **1997**, 57, 2290-2294.
- [28] Todd, A. K.; Adams, A.; Thorpe, J. H.; Denny, W. A.; Wakelin, L. P. G.; Cardin, C. J. Major groove binding and 'DNA-induced' fit in the intercalation of a derivative of the mixed topoisomerase I/II poison N-(2-(dimethylamino)ethyl)acridine-4-carboxamide (DACA) into DNA: x-ray structure complexed to d(CG(5-BrU)ACG)2 at 1.3-Å resolution. *J. Med. Chem.*, **1999**, 42, 536-540.
- [29] Gallego, J.; Reid, B. R. Solution structure and dynamics of a complex between DNA and the antitumor *bis*-naphthalimide LU-79553: intercalated ring flipping on the millisecond time scale. *Biochemistry*, **1999**, 38, 15104-15115.
- [30] Hou, M.-H.; Robinson, H.; Gao, Y.-G.; Wang, A. H.-J. Crystal structure of actinomycin D bound to the CTG triplet repeat sequences linked to neurological diseases. *Nucleic Acids Res.*, **2002**, 30, 4910-4917.
- [31] Robinson, H.; Priebe, W.; Chaires, J. B.; Wang, A.H. Binding of two novel *bis*-daunorubicins to DNA studied by NMR spectroscopy. *Biochemistry*, **1997**, 36, 8663-8670.
- [32] Rettig, M.; Langel, W.; Kamal, A.; Weisz, K. NMR structural studies on the covalent DNA binding of a pyrrolobenzodiazepine-naphthalimide conjugate. *Org. Biomol. Chem.*, **2010**, 8, 3179-3187.
- [33] Antonow, D.; Barata, T.; Jenkins, T. C.; Parkinson, G. N.; Howard, P. W.; Thurston, D. E.; Zloh, M. Solution structure of a 2:1 C2-(2-naphthyl) pyrrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepine DNA adduct: molecular basis for unexpectedly high DNA helix stabilization. *Biochemistry*, **2008**, 47, 11818-11829.
- [34] Adams, A., Leong, C., Denny, W.A., Guss, J.M. Structures of two minor-groove-binding quinolinium quaternary salts complexed with d(CGCGAATTCGCG)(2) at 1.6 and 1.8 Å resolution. *Acta Crystallogr. Sect.D*, **2005**, 61, 1348-1353.
- [35] Campbell, N. H.; Patel, M.; Tofa, A. B.; Ghosh, R.; Parkinson, G. N., Neidle, S. Selectivity in ligand recognition of G-quadruplex loops. *Biochemistry*, **2009**, 48, 1675-1680.
- [36] Wu, C. C.; Li, T.K.; Farh, L., Lin, L. Y.; Lin, T. S.; Yu, Y. J.; Yen, T. J.; Chiang, C. W.; Chan, N. L. Structural basis of type II topoisomerase inhibition by the anticancer drug etoposide. *Science*, **2011**, 333, 459-462.
- [37] Wu, C. C.; Li, Y. C.; Wang, Y. R.; Li, T. K.; Chan, N. L. On the structural basis and design guidelines for type II topoisomerase-targeting anticancer drugs. *Nucleic Acids Res.*, **2013**, 16, 1-11.
- [38] Miles, T. J.; Hennessy, A. J.; Bax, B.; Brooks, G.; Brown, B. S.; Brown, P.; Cailleau, N.; Chen, D., Dabbs, S.; Davies, D. T.; Esken, J. M.; Giordano, I.; Hoover, J. L.; Huang, J., Jones, G. E.; Kusalakumari Sukmar, S. K.; Spitzfaden, C.; Markwell, R. E.; Minthorn, E. A.; Rittenhouse, S.; Gwynn, M. N.; Pearson, N. D. Novel hydroxyl tricyclics (e.g., GSK966587) as potent inhibitors of bacterial type IIA topoisomerases. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2013**, 23, 5437-5431.
- [39] Staker, B. L.; Feese, M. D.; Cushman, M.; Pommier, Y.; Zembower, D.; Stewart, L.; Burgin, A. B. Structures of three classes of anticancer agents bound to the human topoisomerase I-DNA covalent complex. *J. Med. Chem.*, **2005**, 48, 2336-2345.

- [40] Ravelli, R. B.; Gigant, B.; Curmi, P. A.; Jourdain, I.; Lachkar, S.; Sobel, A.; Knossow, M. Insight into tubulin regulation from a complex with colchicine and a stathmin-like domain. *Nature*, **2004**, 428, 198-202.
- [41] Ward, A. B.; Szewczyk, P.; Grimard, V.; Lee, C. W.; Martinez, L.; Doshi, R.; Caya, A.; Villaluz, M.; Pardon, E.; Cregger, C.; Swartz, D. J.; Falson, P. G.; Urbatsch, I. L.; Govaerts, C.; Steyaert, J.; Chang, G. Structures of P-glycoprotein reveal its conformational flexibility and an epitope on the nucleotide-binding domain. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **2013**, 110, 13386-13391.
- [42] Strumberg, D.; Pommier, Y.; Paull, K.; Jayaraman, M.; Nagafuji, P.; Cushman, M. Synthesis of cytotoxic indenoisoquinoline topoisomerase I poisons. *J. Med. Chem.*, **1999**, 42, 446-457.
- [43] Chapeville, F.; Lipmann, F.; von Ehrenstein, G.; Weisblum, B.; Ray, W. J.; Jr., Benzer, S. On the role of soluble ribonucleic acid in coding for amino acids. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **1962**, 48, 1086-1092.
- [44] Ninkovic, D. B.; Janjic, G. V.; Zaric, S. D. Crystallographic and *ab Initio* study of pyridine stacking interactions. Local nature of hydrogen bond effect in stacking interactions. *Cryst. Growth Des.*, **2012**, 12, 1060-1063.
- [45] Li, P.; Zhao, C.; Smith, M. D.; Shimizu, K. D. Comprehensive experimental study of *N*-heterocyclic π -stacking interactions of neutral and cationic pyridines. *J. Org. Chem.*, **2013**, 78, 5303-5313.
- [46] Sottriffer, C.; Klebe, G.; Stahl, M.; Bohm, H. J.; Docking and scoring functions and virtual screening in Burger's Medicinal Chemistry and Drug Discovery, John Wiley and Sons Inc, New York, **2003**, 1, 281-332.
- [47] Braña, M. F.; Casarrubios, L.; Domínguez, G.; Fernández, C.; Pérez, J. M.; Quiroga, A. G.; Navarro-Ranninger, C.; Pascual-Teresa, B. Synthesis, cytotoxic activities and proposed mode of binding of a series of bis{[(9-oxo-9,10-dihydroacridine-4-carbonyl)- amino]alkyl}alkylamines. *Eur. J. Med. Chem.*, **2002**, 37, 301-313.
- [48] Hörmann, A.; Chaudhuri, B.; Fretz, H. DNA binding properties of the marine sponge pigment fascalysin. *Bioorg. Med. Chem.*, **2001**, 9, 917-921.
- [49] Liaw, Y.-C.; Gao, Y.-G.; Robinson, H.; van der Marel, G.A.; van Boom, J. H.; Wang, A. H.-J. Antitumor drug nogalamycin binds DNA in both grooves simultaneously: molecular structure of nogalamycin-DNA complex. *Biochemistry*, **1989**, 28, 9913-9918.
- [50] Islam, S. A.; Neidle, S.; Gandecha, B. M.; Partridge, M.; Patterson, L. H.; Brown, J. R. Comparative computer graphics and solution studies of the DNA interaction of substituted anthraquinones based on doxorubicin and mitoxantrone. *J. Med. Chem.*, **1985**, 28, 857-864.
- [51] Agbandjie, M.; Jenkins, T.C.; McKenna, R.; Rezka, A.; Neidle, S. Anthracene-9,10-diones as potential anticancer agents. Synthesis, DNA-binding, and biological studies on a series of 2,6-disubstituted derivatives. *J. Med. Chem.*, **1992**, 35, 1418-1429.
- [52] Tanious, F. A.; Jenkins, T. C.; Neidle, S.; Wilson, W. D. Substituent Position Dictates the Intercalative DNA-Binding Mode for Anthracene-9,10-dione Antitumor Drugst. *Biochemistry*, **1992**, 31, 11632-11640.
- [53] Steinberg, G. M.; Mednick, M. L.; Maddox, J.; Rice, R.; Cramer, J. A hydrophobic binding site in acetylcholinesterase. *J. Med. Chem.*, **1975**, 18, 1056-1061.
- [54] 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. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **1993**, 90, 9031-9035.

- [55] Protein Data Bank. *www.rcsb.org*. Acessada em 16/11/2013.
- [56] Butini, S.; Campiani, G.; Borriello, M.; Gemma, S.; Panico, A.; Persico, M.; Catalanotti, B.; Ros, A.; Brindisi, M.; Agnusdei, M.; Fiorini, I.; Nacci, V.; Novellino, E.; Belinskaya, T.; Saxena, A.; Fattorusso, C. Exploiting protein fluctuations at the active-site gorge of human cholinesterases: further optimization of the design strategy to develop extremely potent inhibitors. *J. Med. Chem.*, **2008**, 51, 3154-3170.
- [57] Spurny, R.; Billen, B.; Howard, R. J.; Brams, M.; Debaveye, S.; Price, K. L.; Weston, D. A.; Strelkov, S. V.; Tytgat, J.; Bertrand, S.; Bertrand, D.; Lummis, S. C.; Ulens, C. Multisite binding of a general anesthetic to the prokaryotic pentameric *Erwinia chrysanthemi* ligand-gated ion channel (ELIC). *J. Biol. Chem.*, **2013**, 288, 8355-8364.
- [58] Lisgarten, J. N.; Coll, M.; Portugal, J.; Wright, C. W.; Aymami, J. The antimalarial and cytotoxic drug cryptolepine intercalates into DNA at cytosine-cytosine sites. *Nature Struct. Biol.*, **2002**, 9, 57-60.
- [59] Murr, M. M.; Harting, M. T.; Guelev, V.; Ren, J.; Chaires, J. B.; Iverson, B. L. An *octakis*-intercalating molecule. *Bioorg. Med. Chem.*, **2001**, 9, 1141-1148.
- [60] Arimondo, P. B.; Baldeyrou, B.; Laine, W.; Bal, C.; Alphonse, FA.; Routier, S.; Coudert, G.; Mérour, J-Y.; Colson, P.; Houssier, C.; Bailly, C. DNA interaction and cytotoxicity of a new series of indolo[2,3-b]quinoxaline and pyridopyrazino[2,3-b]indole derivatives. *Chem. Biol. Interac.*, **2001**, 138, 59-75.
- [61] Greider, C. W. Telomere length regulation. *Annu. Rev. Biochem.*, **1996**, 65, 337-365.
- [62] Griffith, J. D.; Comeau, L.; Rosenfield, S.; Stansel, R. M.; Bianchi, A.; Moss, H.; de Lange, T. Mammalian telomeres end in a large duplex loop. *Cell*, **1999**, 97, 503-514.
- [63] Lingner, J.; Cech, T. R. Telomerase and chromosome end maintenance. *Curr. Opin. Genet. Dev.*, **1998**, 8, 226-232.
- [64] Gavathiotis, E.; Heald, R. A.; Stevens, M. F. G.; Searle, M. S. Drug recognition and stabilisation of the parallelstranded DNA quadruplex d(TTAGGGT)₄ containing the human telomeric repeat. *J. Mol. Biol.*, **2003**, 334, 25-36.
- [65] Bromberg, K. D.; Osheroff, N.; Mechanism of action of topoisomerase II-targeted anticancer drugs in DNA Topoisomerases in cancer therapy: present and future, Toshiwo Andoh Ed., Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York, **2003**.
- [66] Wang, J. C. DNA Topoisomerases. *Annu. Rev. Biochem.*, **1996**, 65, 635-692.
- [67] Efferth, T.; Fu, Y. J.; Zu, Y. G.; Schwarz, G.; Konkimalla, V. S.; Wink, M. Molecular target-guided tumor therapy with natural products derived from traditional chinese medicine. *Curr. Med. Chem.*, **2007**, 14, 2024-2032.
- [68] Pommier, Y. Diversity of DNA topoisomerases I and inhibitors. *Biochimie*, **1998**, 80, 255-270.
- [69] Lodish, H.; Berk, A.; Matsudaira, P.; Kaiser, C. A.; Krieger, M.; Scott, M. R.; Zipursky, S. L.; Darnell, J. Molecular cell biology, 5th edn, W. H. Freeman and Company, New York, **2003**.
- [70] Schmitt, L.; Tampé, R. Structure and mechanism of ABC transporters. *Curr. Opin. Struct. Biol.*, **2002**, 12, 754-760.
- [71] Jorgensen, P. L.; Håkansson, K. O.; Karlsh, S. J. D. Structure and mechanism of Na,K-ATPase: functional sites and their interactions. *Annu. Rev. Physiol.*, **2003**, 65, 817-849.

Capítulo 5 - Parte experimental

5.1 - Aspectos gerais

O tolueno (Sigma-Aldrich) foi tratado em refluxo sobre peneira molecular (Sigma UOP tipo 3Å) por 24 horas, sendo armazenado com peneira molecular em atmosfera de argônio. O DMSO foi agitado com hidreto de cálcio por 24 horas sendo então destilado e armazenado com peneira molecular. O THF foi agitado em hidreto de cálcio por 24 horas, então agitado sobre sódio metálico por 24 horas e finalmente destilado a partir de hidreto de lítio de alumínio antes do uso sendo coletado sobre peneira molecular [1]. As demais substâncias (Sigma-Aldrich) foram utilizadas sem tratamento.

Nas análises por cromatografia em camada delgada utilizou-se placas Polygram-UV254 0,20 mm Macherey – Nagel, as quais foram reveladas conforme um dos métodos: com solução etanólica de ácido fosfomolibdico (12g de $2\text{H}_3\text{PO}_4 \cdot 20\text{MoO}_3 \cdot 48\text{H}_2\text{O}$ em 250 mL de etanol); solução aquosa de permanganato de potássio [KMnO_4 (6g) + K_2CO_3 (20g) + 5% $\text{NaOH}(\text{aq})$ (5 mL) + água (300 mL)]; solução etanólica à 1% em ninidrina; com vapores de iodo (I_2); e/ou sob lâmpada de ultravioleta ($\lambda = 254$ ou 365 nm).

As cromatografias de adsorção em coluna foram realizadas utilizando-se gel de sílica Aldrich (70-230 *mesh* e 230-400 *mesh*).

As temperaturas de fusão foram medidas em um aparelho Gehaca Ponto de fusão PF1500 e não foram corrigidas. A menos que se especifique, este e demais equipamentos usados estão no DQ-UFMG.

Os espectros na região do infravermelho (IV) foram obtidos em um Espectrômetro FTIR Perkin Elmer modelo Spectrum One equipado com um acessório horizontal ATR-FTIR (Farmácia-UFMG).

Os espectros de RMN de ^1H e de RMN de ^{13}C a 200 e à 400 MHz foram obtidos em espectrômetros Bruker *AVANCE* (DPX 200 e DRX 400, respectivamente). Os deslocamentos químicos (δ) foram referenciados pelos sinais de TMS ou eventualmente pelos sinais do clorofórmio deuterado para RMN de ^1H e pelo sinal de clorofórmio deuterado para RMN de ^{13}C . Os solventes deuterados utilizados foram clorofórmio, metanol e ácido trifluoracético. A multiplicidade das bandas de absorção dos hidrogênios nos espectros de RMN de ^1H foi indicada segundo a seguinte convenção: s (simpleto), d (duplete), t (tripleto), q (quarteto), qn (quinteto) e, m (multiplete). Os espectros de RMN de ^1H são tabulados na seguinte ordem: deslocamento químico em ppm (multiplicidade, integração, constante de acoplamento).

A caracterização por raios-X de monocristal foi realizada à 150K utilizando-se um difratômetro GEMINI à 4-círculos com detector CCD (LabCri-Física-UFMG) [2].

As análises elementares foram realizadas num equipamento Perkin Elmer Series II - CHNS/S Analyser 2400. O desvio padrão para a análise elementar é resumido na seguinte expressão: $\text{C}_{m \pm 1,6} \text{H}_{n \pm 0,5} \text{N}_{o \pm 1,1}$.

As análises de HRMS foram realizadas em um cromatógrafo líquido Shimadzu com detector de massas de alta resolução modelo LCMS-IT-TOF.

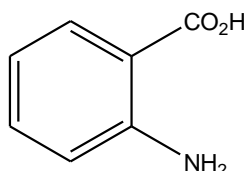
As leituras de absorbância para as curvas de dose-resposta e os ensaios cinéticos foram realizados a 412 nm num espectrofotômetro Thermo Scientific Multiskan® Spectrum Microplate (ICB-UFMG).

Nos testes de atividade antiproliferativa realizados na FUNED [3] as células foram cultivadas à 37°C e 5% em atmosfera de CO₂ em incubadores Thermo Scientific modelo Series II water Jacket CO₂ Incubator. A avaliação morfológica das células foi realizada com um microscópio Nikon Japan modelo 802583-204520 com contraste de fases 2 ELWD 0.3. Os procedimentos de separação celular foram realizados em uma centrífuga Beckman modelo CS-6R. O controle osmótico dos meios de cultura foi feito com um osmômetro crioscópico Osmomat 030 da Gonotec. As quantidades de células foram determinadas através de um analisador de tamanho e contador de partículas Beckman Coulter Z2. As leituras de absorvância nos testes de MTT foram feitas à 500 nm em um espectrofotômetro Multiskan EX Microplate Photometer da empresa Thermo Scientific.

5.2 - Procedimentos de síntese e caracterização

5.2.1 - Ácido antranílico (ácido *o*-aminobenzóico)

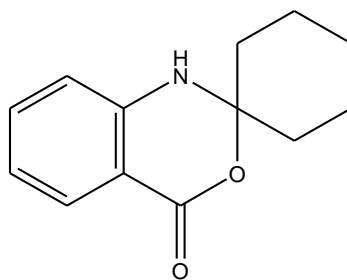
A 2-aminobenzonitrila (1,08 g, 9,14 mmol) foi adicionada a 400 mL de uma solução aquosa de KOH (24,92 g, 0,44 mol). A mistura foi agitada magneticamente sob refluxo a 100°C por 5 horas, sendo então resfriada à temperatura ambiente. O pH foi ajustado para 3,5 pela adição de 29 mL de HCl concentrado. Realizou-se extração com acetato de etila (3 x 200 mL), secou-se a fase orgânica com Na₂SO₄, filtrou-se a solução resultante e realizou-se a remoção do solvente em evaporador rotatório a 50°C acoplado a uma bomba de vácuo, de onde se obteve um sólido bege (1,18 g, 8,68 mmol) [4]. Rendimento da reação: 95%.



Aspecto físico: Sólido bege. **Ponto de fusão:** 143,8-145,4 °C. **IV/(cm⁻¹):** 3322, 3236, 2537, 1660, 1574, 1368, 1315, 1275, 1230, 1137, 929, 849, 764, 740, 703, 690 e 658. **RMN de ¹H (200 MHz, CDCl₃) δ/(ppm):** 8,40-6,91 (m, 5H), 6,84-6,56 (m, 2H). **RMN de ¹³C (50 MHz, CDCl₃) δ/(ppm):** 174,1, 151,5, 135,5, 132,5, 117,1, 116,8, 109,9.

5.2.2 – Éster espirocarbinolamina (1,4-diidrospiro[3,1-benzoxazino-2,1'-cicloexano]-4-ona)

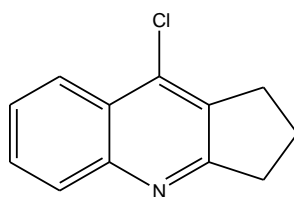
A uma solução do ácido 2-aminobenzóico (2,47 g, 17,98 mmol) em tolueno (5 mL) foi adicionada cicloexanona (2,14 g, 21,78 mmol). A mistura resultante, sob agitação magnética, foi posta em refluxo em aparato Dean-Stark por 2 horas. O sistema foi resfriado à temperatura ambiente, e, em seguida, à 0 °C, por 12 horas. Após este período, observou-se a formação de precipitado amarelo aciculiforme. Da filtração a vácuo seguida de lavagem do precipitado com 3,5 mL de tolueno, 3,5 mL de hexano, 3,5 mL de etanol e secagem em bomba de alto vácuo por 8 horas obtiveram-se 3,52 g (16,2 mmol) do produto [5]. Rendimento da reação: 90%.



Aspecto físico: Sólido amarelo aciculiforme. **Ponto de fusão:** 143,5-147,5 °C. **IV/(cm⁻¹):** 3287, 2942, 2929, 2850, 1682, 1612, 1586, 1509, 1486, 1470, 1304, 1089, 1023, 740, 699. **RMN de ¹H (200 MHz, CDCl₃) δ/(ppm):** 7,88 (d, 1H), 7,37 (t, 1H), 7,00-6,70 (m, 2H), 5,20 (s, 1H), 2,28-1,15 (m, 10H). **RMN de ¹³C (50 MHz, CDCl₃) δ/(ppm):** 164,5, 146,0, 135,6, 130,2, 119,7, 116,5, 113,0, 90,6, 37,7 (2C), 27,5, 24,7 (2C).

5.2.3 – Composto 5 (9-cloro-2,3-diidro-1H-ciclopenta[*b*]quinolina)

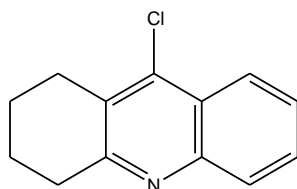
A uma mistura do ácido 2-aminobenzóico (8,22 g, 59,95 mmol) e ciclopentanona (6,07 g, 72,21 mmol), sob agitação magnética, e em banho de gelo, foi adicionado, lentamente (gota à gota), POCl₃ (82,25 g, 536,4 mmol). A mistura resultante foi posta em refluxo sob agitação por duas horas e então resfriada à temperatura ambiente. Seguiu-se a adição lenta e sob agitação magnética da mistura reacional a uma solução aquosa de KOH (224 g em 400 mL de água) em banho de gelo. A mistura reacional foi então submetida à extração bifásica com CH₂Cl₂ (4X de 100 mL). A fase orgânica foi seca com MgSO₄, filtrada e o solvente removido sob vácuo em evaporador rotatório [6]. Após secagem em bomba de alto vácuo, o produto foi purificado empregando-se coluna de sílica *flash* (eluente hexano: acetato de etila:triethylamina – 10:4:0,1) e secado em bomba de alto vácuo, por oito horas, obtendo-se um sólido bege (3,36g, 16,48 mmol). Rendimento da reação: 28%.



Aspecto físico: Sólido bege. **Ponto de fusão:** 85-87 °C. **IV/(cm⁻¹):** 3025, 2956, 2911, 1991, 1637, 1606, 1557, 1494, 1463, 1435, 1422, 1390, 1376, 1304, 1253, 1157, 1139, 1090, 1021, 929, 866, 840, 740. **RMN de ¹H (200 MHz, CDCl₃) δ/(ppm):** 7,98 (d, 1H, *J* 7,9), 7,89 (d, 1H, *J* 7,9), 7,53 (t, 1H, *J* 7,9), 7,39 (t, 1H, *J* 7,9), 3,07 (t, 2H, *J* 7,5), 2,98 (t, 2H, *J* 7,5), 2,08 (qn, 2H, *J* 7,9). **RMN de ¹³C (50 MHz, CDCl₃) δ/(ppm):** 167,6, 148,6, 137,7, 134,1, 129,3, 129,0, 126,6, 125,4, 123,7, 35,7, 30,5, 22,9. **Análise elementar:** calc. para C₁₂H₁₀ClN: C 70,77; H 4,95; N 6,88; encontrado: C 71,15; H 4,51; N 7,14. **HRMS (ESI):** calc. para C₁₂H₁₀ClN [M + H]⁺: 204,0580; encontrado: 204,0524.

5.2.4 - Composto 6 (9-cloro-1,2,3,4-tetraidroacridina)

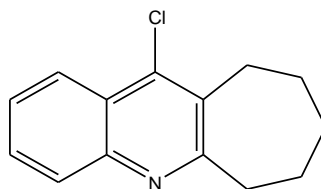
O éster espirocarbinolamina (3,38 g, 15,54 mmol) foi adicionado lentamente ao POCl₃ (10,01 g, 65,31 mmol) em um balão de 25 mL. A mistura resultante foi posta em refluxo sob agitação por duas horas. Após esse período, a mistura foi resfriada à temperatura ambiente e, então, adicionada lentamente e sob agitação magnética a uma solução aquosa de KOH (32,95 g de KOH em 61,01 g de água) em banho de gelo. Adicionaram-se, então, 100 mL de CH₂Cl₂ para extração inicial do produto desejado. Separaram-se as fases e repetiu-se a extração por três vezes com CH₂Cl₂. As fases orgânicas foram reunidas e secas com MgSO₄. O material resultante foi filtrado sendo o solvente removido em evaporador rotatório [6]. Após secagem em bomba de alto vácuo, o produto foi purificado via coluna de sílica *flash* (eluente clorofórmio:triethylamina - 10:0,1) e secado em bomba de alto vácuo por oito horas obtendo-se um sólido amarelo (3,08 g, 14,16 mmol). Rendimento da reação: 91%.



Aspecto físico: Sólido amarelo. **Ponto de fusão:** 65-67 °C. **IV/(cm⁻¹):** 3050, 2937, 2870, 1613, 1578, 1553, 1481, 1426, 1394, 1365, 1343, 1309, 1253, 1227, 1172, 1146, 1074, 1020, 984, 952, 916, 868, 834, 792, 765, 750, 686. **RMN de ¹H (200 MHz, CDCl₃) δ/(ppm):** 8,10 (d, 1H, *J* 7,8), 7,96 (d, 1H, *J* 7,8), 7,63 (t, 1H, *J* 7,8), 7,48 (t, 1H, *J* 7,8), 3,15- 2,90 (m, 4H), 1,95-1,85 (m, 4H). **RMN de ¹³C (50 MHz, CDCl₃) δ/(ppm):** 159,6, 146,8, 141,7, 129,5, 129,0, 128,8, 126,7, 125,5, 123,9, 34,3, 27,7, 22,8. **Análise elementar:** calc. para C₁₃H₁₂ClN: C 71,72; H 5,56; N 6,43; encontrado: C 72,13; H 5,62; N 6,63. **HRMS (ESI):** calc. para C₁₃H₁₂ClN [M + H]⁺: 218,0737; encontrado: 218,1100.

5.2.5 - Composto 7 (11-cloro-7,8,9,10-tetraidro-6H-ciclohepta[b]quinolina)

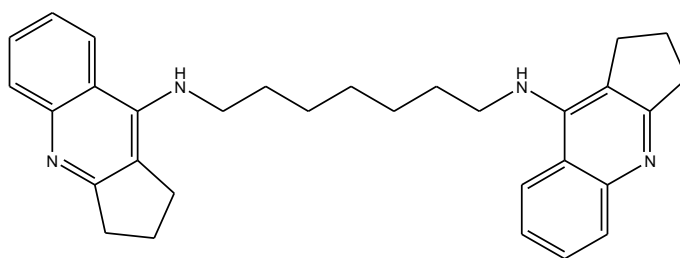
A uma mistura de ácido 2-aminobenzóico (2,05 g, 14,98 mmol) e cicloheptanona (1,69 g, 15,08 mmol) num balão de 50 mL, sob agitação magnética em banho de gelo, foi adicionado lentamente (gota à gota) POCl₃ (20,56 g, 134,1 mmol). A mistura resultante foi posta em refluxo sob agitação por duas horas. Após esse período seguiu o resfriamento à temperatura ambiente e adição lenta (gota à gota) sob agitação da mistura reacional a uma solução aquosa de KOH (56,13 g em 100 mL de água) em banho de gelo. A mistura foi então submetida à extração com CH₂Cl₂ (4X de 60 mL). A fase orgânica foi seca com MgSO₄, filtrada, sendo o solvente removido em evaporador rotatório [6]. Após recristalização em acetona por 24 horas em freezer a 0°C e secagem em bomba de alto vácuo por 8 horas obteve-se um sólido marrom (0,54 g, 2,31 mmol). Rendimento de reação: 16 %.



Aspecto físico: sólido marrom. **Ponto de fusão:** 91-93 °C. **IV/(cm⁻¹):** 3070, 2917, 2846, 1582, 1556, 1482, 1449, 1397, 1372, 1334, 1315, 1254, 1204, 1097, 1029, 957, 887, 841, 813, 750, 727. **RMN de ¹H (200 MHz, CDCl₃) δ/(ppm):** 7,94 (d, 1H, *J* 7,6), 7,83 (d, 1H, *J* 7,6), 7,46 (t, 1H, *J* 7,6), 7,33 (t, 1H, *J* 7,6), 3,16-2,86 (m, 4H), 1,85-1,37 (m, 6H). **RMN de ¹³C (50 MHz, CDCl₃) δ/(ppm):** 164,7, 146,4, 139,7, 133,8, 129,1, 128,9, 126,7, 125,4, 124,5, 40,2, 31,9, 30,4, 27,5, 26,9. **Análise elementar:** calc. para C₁₄H₁₄ClN: C 72,57; H 6,09; N 6,04; encontrado: C 72,90; H 6,32; N 6,84. **HRMS (ESI):** calc. para C₁₄H₁₄ClN [M + H]⁺: 232,0893; encontrado: 232,0810.

5.2.6 - Composto **14** (*N*-[7-({1*H*,2*H*,3*H*-ciclopenta[*b*]quinolin-9-il} amino)heptil]-1*H*,2*H*,3*H*-ciclopenta[*b*]quinolin-9-amina)

Foram adicionados 228,6 mg (1,12 mmol) do composto **5** a uma solução contendo 76,5 mg (0,59 mmol) de heptano-1,7-diamina em 1,5 mL de pentanol em um balão de 25 mL, ao qual foi adaptado um condensador para refluxo. A mistura foi submetida à agitação magnética e aquecimento à 160°C por 40 horas. Resfriou-se, então, o sistema à temperatura ambiente e adicionaram-se 30 mL de HCl 2M [5]. Esse sistema acidulado permaneceu sob agitação e aquecimento de 40°C por duas horas de onde se verificou a formação de um precipitado. O mesmo foi separado por filtração e lavado em sequência com 2 mL de cada um dos seguintes solventes: água, tolueno e hexano. O produto foi então seco em bomba de alto vácuo por 12 horas e recristalizado à partir da mistura ácido trifluoroacético (TFA): água. Rendimento de 79 %.

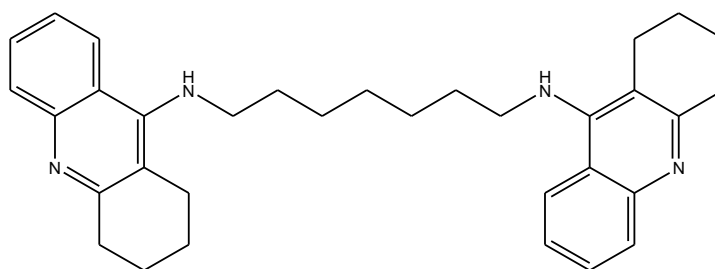


Aspecto físico: sólido cinza. **Ponto de fusão:** decompõe à 333 °C. **IV/(cm⁻¹):** 3229, 2929, 2706, 1735, 1632, 1580 1566, 1473, 1421, 1362, 1230, 1084, 881, 855, 766, 727, 672. **RMN de ¹H (400 MHz, CD₃OD) δ/(ppm):** 8,31 (d, 2H, *J* 7,8), 7,82 (t, 2H, *J* 7,8), 7,71 (d, 2H, *J* 7,8), 7,60 (t, 2H, *J* 7,8), 3,79 (t, 4H, *J* 7,5), 3,36 (t, 4H, *J* 7,5), 3,16 (t, 4H, *J* 7,5), 2,26 (qn, 4H, *J* 7,5), 1,79-1,70 (m, 4H), 1,52-1,41 (m, 6H). **RMN de ¹³C (100 MHz, CD₃OD) δ/(ppm):** 155,7, 139,9, 134,7, 128,3, 124,7, 121,4, 119,3, 112,3,46,8, 33,5, 33,4, 33,2, 31,0, 28,5, 24,6. **Análise elementar:** calc. para C₃₁H₃₆N₄·3C₂H₂O₂F₃·H₂O: C

53,88; H 5,01; N 6,79; encontrado: C 54,09; H 5,23; N 7,26. **HRMS (ESI):** calc. para $C_{31}H_{36}N_4$ $[M + H]^+$: 465,3018; encontrado: 465,3182.

5.2.7 - Composto **15** (*N*-{7-[(1,2,3,4-tetraidroacridin-9-il)amino]heptil}-1,2,3,4-tetraidroacridin-9-amina)

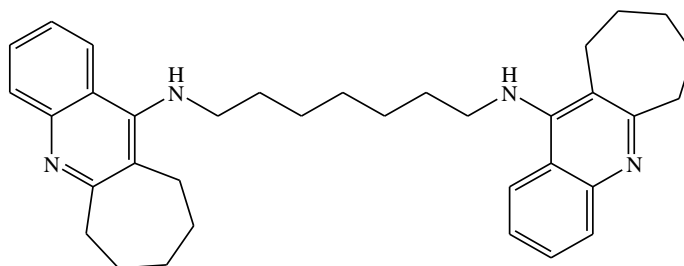
Este composto foi sintetizado via procedimento similar àquele adotado para o composto **14** sendo as seguintes as quantidades empregadas: m (composto **6**) = 206,9 mg (0,95 mmol) e m (composto **8**) = 61,5 mg (0,47 mmol). Entretanto, este composto foi recristalizado numa mistura de metanol e água. Rendimento 83%.



Aspecto físico: sólido verde claro. **Ponto de fusão:** 146-156 °C. **IV/(cm⁻¹):** 3233, 2929, 2854, 1633, 1570, 1520, 1443, 1416, 1358, 1330, 1252, 1177, 1034, 757, 702, 677. **RMN de ¹H (400 MHz, CD₃OD)** δ /(ppm): 8,38 (d, 2H, *J* 7,9), 7,84 (t, 2H, *J* 7,9), 7,77 (d, 2H, *J* 7,9), 7,57 (t, 2H, *J* 7,9), 3,95 (t, 4H, *J* 7,0), 3,01 (t, 4H, *J* 5,2), 2,72-2,65 (m, 4H), 2,03-1,78 (m, 12H), 1,52-1,41 (m, 6H). **RMN de ¹³C (100 MHz, CD₃OD)** δ /(ppm): 158,9, 152,6, 140,6, 135,0, 127,3, 127,2, 121,0, 117,9, 113,7, 32,4, 30,8, 30,2, 28,5, 25,8, 23,9, 22,7. **Análise elementar:** calc. para $C_{33}H_{40}N_4 \cdot 4HCl$: C 62,07; H 6,95; N 8,77; encontrado: C 62,06; H 6,99; N 8,54. **HRMS (ESI):** calc. para $C_{33}H_{40}N_4$ $[M + H]^+$: 494,3331; encontrado: 494,2961.

5.2.8 - Composto **16** (*N*-[7-({6*H*,7*H*,8*H*,9*H*,10*H*-ciclohepta[*b*]quinolin-11-il)amino]eptil]-6*H*,7*H*,8*H*,9*H*,10*H*-ciclohepta[*b*]quinolin-11-amina)

Este composto foi sintetizado via procedimento similar àquele adotado para o composto **14** sendo as seguintes as quantidades empregadas: m (composto **7**) = 223,0 mg (0,96 mmol) e m (composto **8**) = 62,2 mg (0,48 mmol). Rendimento 61%.

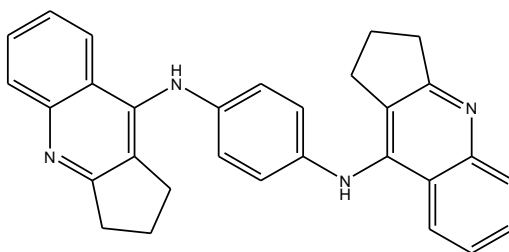


Aspecto físico: sólido alaranjado. **Ponto de fusão:** 160-165 °C. **IV/(cm⁻¹):** 3262, 2924, 2852, 2707, 1634, 1584, 1560, 1531, 1498, 1467, 1425, 2353, 1304, 1210, 1141, 1076, 966, 837, 750, 673. **RMN de ¹H**

(400 MHz, CD₃OD) δ /(ppm): 8,33 (d, 2H, *J* 7,8), 7,85 (t, 2H, *J* 7,8), 7,79 (d, 2H, *J* 7,8), 7,61 (t, 2H, *J* 7,8), 3,78 (t, 4H, *J* 7,8), 3,17 (t, 4H, *J* 5,5), 2,98 (t, 4H, *J* 5,3), 2,00-1,90 (m, 4H), 1,90-1,70 (m, 12H), 1,44-1,37 (m, 6H). **RMN de ¹³C (100 MHz, CD₃OD) δ /(ppm):** 160,5, 158,7, 139,5, 134,7, 128,1, 126,2, 121,3, 119,5, 118,7, 36,0, 33,1, 32,5, 30,8, 28,8, 28,6, 28,4, 27,7. **Análise elementar:** calc. para C₃₅H₄₄N₄·4C₂HO₂F₃: C 52,87; H 4,95; N 5,74; encontrado: C 53,83; H 4,52; N 6,42. **HRMS (ESI):** calc. para C₃₅H₄₄N₄ [M + H]⁺: 521,3644; encontrado: 521,3404.

5.2.9 - Composto **17** (1-*N*,4-*N*-bis({1*H*,2*H*,3*H*-ciclopenta[*b*]quinolin-9-il})benzeno-1,4-diamina)

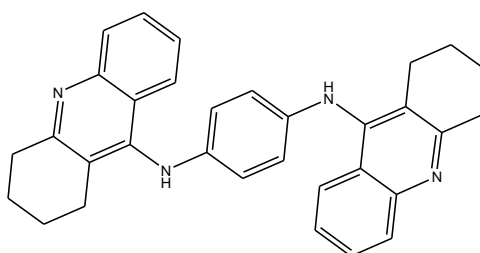
Este composto foi sintetizado via procedimento similar àquele adotado para o composto **14** sendo as seguintes as quantidades empregadas: m (composto **5**) = 231,1 mg (1,13 mmol) e m (composto **9**) = 61,5 mg (0,52 mmol). Rendimento 77%.



Aspecto físico: Sólido marrom. **Ponto de fusão:** >360 °C. **IV/(cm⁻¹):** 3229, 2547, 1781, 1659, 1585, 1557, 1539, 1513, 1496, 1464, 1444, 1423, 1384, 1336, 1237, 1180, 1131, 1018, 851, 802, 761, 715, 706, 664. **RMN de ¹H (400 MHz, CD₃OD) δ /(ppm):** 8,46 (d, 2H, *J* 7,8), 7,96 (t, 2H, *J* 7,8), 7,89 (d, 2H, *J* 7,8), 7,74 (t, 2H, *J* 7,8), 7,44 (s, 4H), 3,25 (t, 4H, *J* 7,5), 2,52 (t, 4H, *J* 7,5), 2,23-2,11 (m, 4H). **RMN de ¹³C (100 MHz, CD₃OD) δ /(ppm):** 165,0, 153,5, 140,4, 139,9, 135,1, 129,0, 128,6, 125,5, 121,7, 120,6, 119,2, 33,8, 33,7, 25,0. **Análise elementar:** calc. para C₃₀H₂₆N₄·2C₂HO₂F₃: C 60,9; H 4,21; N 8,35; encontrado: C 61,39; H 3,52; N 8,75. **HRMS (ESI):** calc. para C₃₀H₂₆N₄ [M + H]⁺: 443,2236, encontrado: 443,2278.

5.2.10 - Composto **18** (1-*N*,4-*N*-bis(1,2,3,4-tetraidroacridin-9-il)benzeno-1,4-diamina)

Este composto foi sintetizado via procedimento similar àquele adotado para o composto **14** sendo as seguintes as quantidades empregadas: m (composto **6**) = 232,1 mg (1,07 mmol) e m (composto **9**) = 57,4 mg (0,53 mmol). Rendimento 74%.



Aspecto físico: Sólido marrom. **Ponto de fusão:** 186-192 °C. **IV/(cm⁻¹):** 3292, 2952, 1777, 1643, 1586, 1568, 1505, 1435, 1414, 1376, 1335, 1256, 1187, 1123, 1016, 800, 787, 756, 700. **RMN de ¹H (200 MHz, CF₃O₂D) δ/(ppm):** 7,93-7,52 (m, 6H), 7,35 (t, 2H, *J* 6,8), 7,16 (s, 4H), 3,14-2,89 (m, 4H), 2,75-2,58 (m, 4H), 2,06-1,86 (m, 8H). **RMN de ¹³C (50 MHz, CF₃O₂D) δ/(ppm):** 156,5, 155,8, 141,4, 140,4, 136,3, 128,8, 127,7, 127,2, 121,6, 119,5, 118,3, 31,0, 26,3, 23,5, 22,5. **Análise elementar:** calc. para C₃₂H₃₀N₄·2C₂HO₂F₃: C 61,89; H 4,62; N 8,02; encontrado: C 62,05; H 3,93; N 8,45. **HRMS (ESI):** calc. para C₃₂H₃₀N₄ [M + H]⁺: 471,2549; encontrado: 471,2430. **Cristalografia de raios-X:** fórmula C₃₂H₃₂N₄·2(C₄HF₆O₄), célula unitária triclinica, grupo espacial P-1, arestas a = 8,7040 (3) Å, b = 10,8569 (3) Å, c = 11,5890 (3) Å, ângulos interarestas α = 100,578 (3), β = 103,072 (3), γ = 96,793 (3), v = 1033,93 Å³, Z: 1 Z': 0, fator R = 5,41. A representação ORTEP da estrutura de raios-X do composto **18** ao nível de 50% de probabilidade é mostrada na Figura 5.2.1.

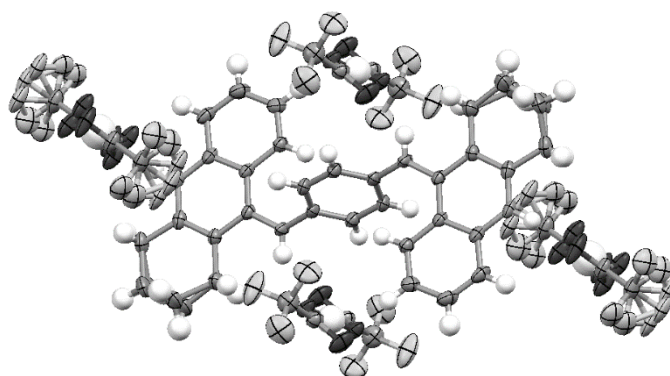
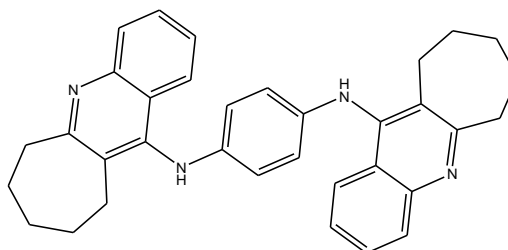


Figura 5.2.1 – Representação ORTEP da estrutura de raios-X do composto **18**.

5.2.11 – Composto **19** (1-*N*,4-*N*-bis({6*H*,7*H*,8*H*,9*H*,10*H*-ciclohepta[*b*]quinolin-11-il})benzeno-1,4-diamina)

Este composto foi sintetizado via procedimento similar àquele adotado para o composto **14** sendo as seguintes as quantidades empregadas: m (composto **7**) = 233,8 mg (1,00 mmol) e m (composto **9**) = 54,66 mg (0,50 mmol). Rendimento 85%.

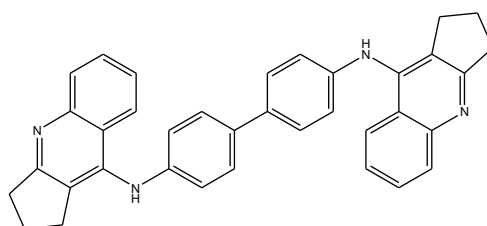


Aspecto físico: sólido alaranjando. **Ponto de fusão:** 255-260 °C. **IV/(cm⁻¹):** 3253, 2925, 1776, 1661, 1585, 1558, 1416, 1190, 1120, 966, 800, 758, 705. **RMN de ¹H (400 MHz, CD₃OD) δ/(ppm):** 8,18 (d, 2H, *J* 8,7), 7,96-7,89 (m, 4H), 7,65-7,59 (m, 2H), 7,18 (s, 4H), 3,28 (m, 4H), 2,90 (t, 4H, *J* 8,0), 1,95-1,89 (m, 8H), 1,67-1,59 (m, 4H). **RMN de ¹³C (100 MHz, CD₃OD) δ/(ppm):** 163,2, 155,0, 141,8, 139,7,

135,1, 129,1, 126,7, 125,2, 125,0, 121,7, 36,6, 33,1, 29,4, 28,5, 27,7. **Análise elementar:** calc. para $C_{34}H_{34}N_4 \cdot 2C_2HO_2F_3 \cdot H_2O$: C 61,29; H 5,14; N 7,52; encontrado: C 61,38; H 4,0; N 7,76. **HRMS (ESI):** calc. para $C_{34}H_{34}N_4 [M + H]^+$: 499,2862; encontrado: 499,2886.

5.2.12 - Composto **20** (*N*-{4-[4-({1*H*,2*H*,3*H*-ciclopenta[*b*]quinolin-9-il)amino)fenil]fenil}-1*H*,2*H*,3*H*-ciclopenta[*b*]quinolin-9-amina)

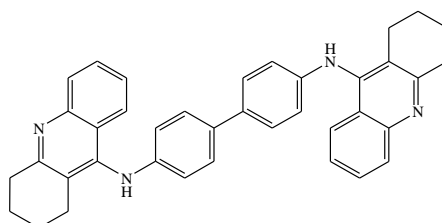
Este composto foi sintetizado via procedimento similar àquele adotado para o composto **14** sendo as seguintes as quantidades empregadas: m (composto **5**) = 262,6 mg (1,29 mmol) e m (composto **10**) = 124,2 mg (0,67 mmol). Rendimento 95%.



Aspecto físico: sólido amarelo claro. **Ponto de fusão:** 252-256 °C. **IV/(cm⁻¹):** 3225, 2792, 1667, 1640, 1616, 1583, 1556, 1532, 1492, 1441, 1426, 1377, 1186, 1174, 1005, 829, 798, 765, 718. **RMN de ¹H (400 MHz, CD₃OD) δ/(ppm):** 8,47 (d, 2H, *J* 7,8), 7,96 (t, 2H, *J* 7,8), 7,88 (d, 2H, *J* 7,8), 7,84 (d, 4H, *J* 8,5), 7,74 (t, 2H, *J* 7,8), 7,44 (d, 4H, *J* 8,5), 3,23 (t, 4H, *J* 7,5), 2,49 (t, 4H, *J* 7,5), 2,14 (qn, 4H, *J* 7,5). **RMN de ¹³C (100 MHz, CD₃OD) δ/(ppm):** 164,8, 153,5, 140,9, 140,6, 140,4, 135,0, 129,4, 129,0, 128,5, 125,5, 121,7, 119,2, 112,3, 33,7, 33,6, 25,0. **Análise elementar:** calc. para $C_{36}H_{30}N_4 \cdot 2C_2HO_2F_3 \cdot 3H_2O$: C 60,0; H 4,78; N 7,0; encontrado: C 60,25; H 3,09; N 7,03. **HRMS (ESI):** calc. para $C_{36}H_{30}N_4 [M + H]^+$: 519,2549; encontrado: 519,2311.

5.2.13 - Composto **21** (*N*-(4-{4-[(1,2,3,4-tetraidroacridin-9-il)amino]fenil}fenil)-1,2,3,4-tetraidroacridin-9-amina)

Este composto foi sintetizado via procedimento similar àquele adotado para o composto **14** sendo as seguintes as quantidades empregadas: m (composto **6**) = 266,0 mg (1,22 mmol) e m (Composto **10**) = 118,0 mg (0,64 mmol). Rendimento 98 %.



Aspecto físico: sólido alaranjado. **Ponto de fusão:** 186-192 °C. **IV/(cm⁻¹):** 3312, 3159, 2970, 1778, 1634, 1581, 1498, 1469, 1403, 1252, 1190, 1135, 1006, 861, 788, 757, 700, 675. **RMN de ¹H (400 MHz, CD₃OD) δ/(ppm):** 8,00 (d, 2H, *J* 8,7), 7,90-7,83 (m, 4H), 7,75 (d, 4H, *J* 8,7), 7,52-7,44 (m, 2H), 7,29 (d, 4H, *J* 8,6), 3,18 (t, 4H, *J* 6,3), 2,65 (t, 4H, *J* 6,1), 2,05-1,97 (m, 4H), 1,97-1,87 (m, 4H). **RMN de ¹³C**

(100 MHz, CD₃OD) δ /(ppm): 155,2, 142,2, 139,6, 139,1, 134,5, 129,0, 127,3, 126,5, 125,3, 120,6, 119,5, 117,9, 111,6, 29,8, 26,5, 23,0, 22,0. **Análise elementar:** calc. para C₃₈H₃₄N₄·4C₂HO₂F₃: C 55,1; H 3,82; N 5,59; encontrado: C 55,6; H 2,83; N 5,69. **HRMS (ESI):** calc. para C₃₈H₃₄N₄ [M + H]⁺: 547,2862; encontrado: 547,3013. **Cristalografia de raios-X:** fórmula C₃₈H₃₆N₄·2(C₄HF₆O₄), célula unitária triclinica, grupo espacial P-1, arestas a = 9,7578(2) Å, b = 11,2552(3) Å, c = 11,8308(3) Å, ângulos interarestas α = 115,403(2), β = 97,181(2), γ = 106,900(2), V = 1075,12 Å³, Z: 1 Z': 0, fator R = 4,93. A representação ORTEP da estrutura de raios-X do composto **21** ao nível de 50% de probabilidade é mostrada na Figura 5.2.2.

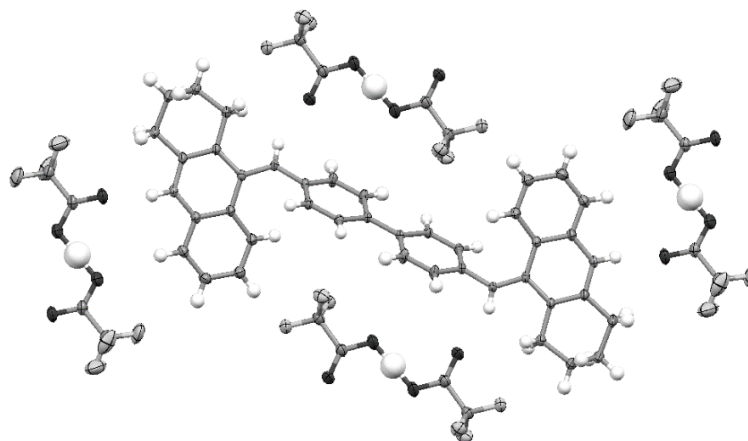
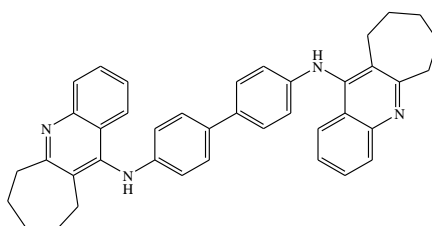


Figura 5.2.2 - Representação ORTEP da estrutura de raios-X do composto **21**.

5.2.14 – Composto **22** (*N*-{4-[4-({6*H*,7*H*,8*H*,9*H*,10*H*-cicloepa[*b*]quinolin-11-il}amino)fenil]fenil}-6*H*,7*H*,8*H*,9*H*,10*H*-cicloepa[*b*]quinolin-11-amina)

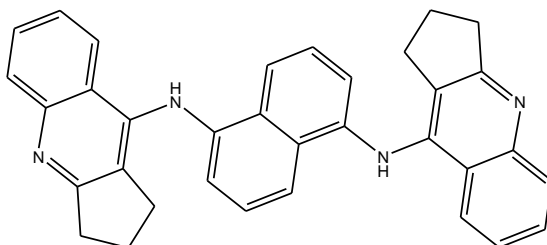
Este composto foi sintetizado via procedimento similar àquele adotado para o composto **12** sendo as seguintes as quantidades empregadas: m (composto **7**) = 244,9 mg (1,05 mmol) e m (composto **10**) = 96,9 mg (0,53 mmol). Rendimento 92 %.



Aspecto físico: sólido amarelo. **Ponto de fusão:** 138-144 °C. **IV/(cm⁻¹):** 3250, 3134, 2935, 1770, 1663, 1582, 1515, 1494, 1359, 1207, 1186, 1130, 1003, 963, 811, 786, 756, 721, 708, 677. **RMN de ¹H (400 MHz, CD₃OD) δ /(ppm):** 8,20 (d, 2H, *J* 8,2), 7,99-7,88 (m, 4H), 7,69 (d, 4H, *J* 8,6), 7,62 (t, 2H, *J* 8,2), 7,20 (d, 4H, *J* 8,6), 3,35-3,24 (m, 4H), 2,90 (t, 4H, *J* 5,2), 1,98-1,86 (m, 8H), 1,68-1,58 (m, 4H). **RMN de ¹³C (100 MHz, CD₃OD) δ /(ppm):** 163,2, 154,8, 144,0, 139,6, 138,9, 135,1, 129,7, 129,2, 126,8, 125,5, 124,1, 122,4, 121,7, 36,7, 33,1, 29,4, 28,5, 27,7. **Análise elementar:** calc. para C₄₀H₃₈N₄·4C₂HO₂F₃: C 55,93; H 4,11; N 5,44; encontrado: C 56,90; H 3,29; N 5,69. **HRMS (ESI):** calc. para C₄₀H₃₈N₄ [M + H]⁺: 575,3175; encontrado: 575,3061.

5.2.15 – Composto **23** (1-*N*,5-*N*-bis({1*H*,2*H*,3*H*-ciclopenta[*b*]quinolin-9-il})naftaleno-1,5-diamina)

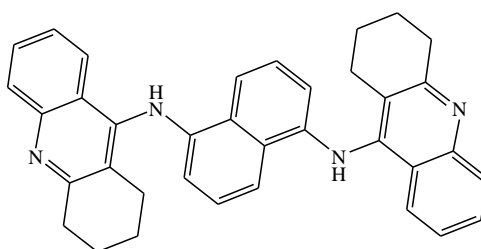
Este composto foi sintetizado via procedimento similar àquele adotado para o composto **14** sendo as seguintes as quantidades empregadas: m (composto **5**) = 206,2 mg (1,01 mmol) e m (composto **11**) = 78,8 mg (0,50 mmol). Rendimento 64 %.



Aspecto físico: sólido verde escuro. **Ponto de fusão:** decompõe à 310 °C. **IV/(cm⁻¹):** 2548, 1633, 1584, 1548, 1520, 1459, 1405, 1223, 1148, 1037, 857, 788, 740, 672. **RMN de ¹H (400 MHz, CD₃OD) δ/(ppm):** 8,63 (d, 2H, *J* 7,0), 8,15 (d, 2H, *J* 7,0), 8,00 (t, 2H, *J* 7,0), 7,91 (t, 2H, *J* 7,0), 7,80 (t, 2H, *J* 8,0), 7,72-7,66 (m, 4H), 3,20-3,14 (m, 4H), 2,25-1,96 (m, 4H), 1,89-1,65 (m, 4H). **RMN de ¹³C (50 MHz, CF₃CO₂D) δ/(ppm):** 164,9, 154,3, 142,7, 140,2, 139,7, 136,0, 130,1, 130,0, 129,3, 124,5, 122,0, 120,1, 119,8, 119,5, 34,1, 33,4, 24,8. **Análise elementar:** calc. para C₃₄H₂₈N₄·2C₂HO₂F₃·2H₂O: C, 60,32; H, 4,53; N, 7,40; encontrada: C 59,69; H 2,91; N 8,48. **HRMS (ESI):** calc. para C₃₄H₂₈N₄ [M + H]⁺: 493,2922, encontrada: 493,2452.

5.2.16 – Composto **24** (1-*N*,5-*N*-bis(1,2,3,4-tetraidroacridin-9-il)naftaleno-1,5-diamina)

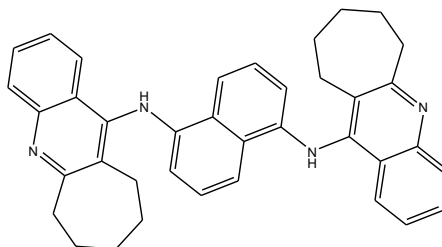
Este composto foi sintetizado via procedimento similar àquele adotado para o composto **14** sendo as seguintes as quantidades empregadas: m (composto **6**) = 208,2 mg (0,96 mmol) m (composto **11**) = 75,6 mg (0,48 mmol). Rendimento 42 %.



Aspecto físico: sólido marrom escuro. **Ponto de fusão:** decompõe à 280 °C. **IV/(cm⁻¹):** 3389, 2864, 2613, 1639, 1586, 1552, 1380, 1332, 1280, 1054, 924, 866, 786, 758, 658. **RMN de ¹H (400 MHz, CD₃OD) δ/(ppm):** 8,09 (d, 2H, *J* 8,2), 7,98 (d, 2H, *J* 8,2), 7,81 (t, 2H, *J* 8,2), 7,73 (d, 2H, *J* 8,2), 7,65 (t, 2H, *J* 8,2), 7,60-7,52 (m, 2H), 7,29 (t, 2H, *J* 8,2), 3,23-3,10 (m, 4H), 2,64-2,45 (m, 4H), 2,11-1,66 (m, 8H). **RMN de ¹³C (100 MHz, CD₃OD) δ/(ppm):** 155,4, 153,5, 138,3, 130,8, 127,1, 126,9, 126,2, 126,0, 124,7, 124,2, 120,9, 120,0, 119,3, 117,6, 28,5, 24,8, 21,7, 20,6. **Análise elementar:** calc. para C₃₆H₃₂N₄·3C₂HO₂F₃·H₂O: C 57,27; H 4,23; N 6,36; encontrado: C 57,74; H 3,64; N 7,82. **HRMS (ESI):** calc. para C₃₆H₃₂N₄ [M + H]⁺: 521,2783; encontrado: 521,5498.

5.2.17 – Composto **25** (1-*N*,5-*N*-bis({6*H*,7*H*,8*H*,9*H*,10*H*-ciclohepta[*b*]quinolin-11-il})naftaleno-1,5-diamina)

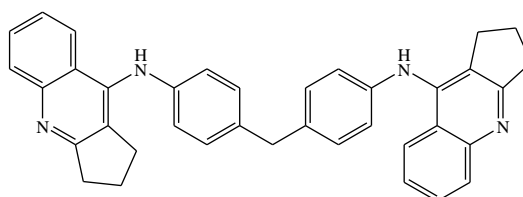
Este composto foi sintetizado via procedimento similar àquele adotado para o composto **14** sendo as seguintes as quantidades empregadas: m (composto **7**) = 211,4 mg (0,91 mmol) e m (composto **11**) = 72,5 mg (0,46 mmol). Rendimento 57 %.



Aspecto físico: sólido verde escuro. **Ponto de fusão:** decompõe à 252°C. **IV/(cm⁻¹):** 3286, 2936, 1770, 1638, 1583, 1501, 1455, 1403, 1371, 1272, 1192, 1137, 965, 859, 784, 759, 680, 661. **RMN de ¹H (400 MHz, CD₃OD) δ/(ppm):** 8,14 (d, 2H, *J* 8,6), 8,04-7,86 (m, 6H), 7,61-7,49 (m, 4H), 7,42-7,28 (m, 2H), 3,26 (m, 4H), 2,69 (t, 4H, *J* 5,4), 1,94-1,74 (m, 8H), 1,55-1,14 (m, 4H). **RMN de ¹³C (100 MHz, CD₃OD) δ/(ppm):** 163,1, 156,8, 141,5, 132,2, 129,2, 129,0, 128,1, 126,4, 124,5, 123,6, 123,0, 122,2, 121,7, 121,1, 36,5, 32,9, 28,9, 27,8, 27,7. **Análise elementar:** calc. para C₃₈H₃₆N₄·3C₂H₂O₂F₃·H₂O: C 58,15; H 4,55; N 6,16; encontrado: C 57,68; H 3,91; N 7,82. **HRMS (ESI):** calc. para C₃₈H₃₆N₄ [M + H]⁺: 549,3096; encontrado: 549,3467.

5.2.18 – Composto **26** (*N*-(4-([4-({1*H*,2*H*,3*H*-ciclopenta[*b*]quinolin-9-il)amino)fenil]metil)fenil)-1*H*,2*H*,3*H*-ciclopenta[*b*]quinolin-9-amina)

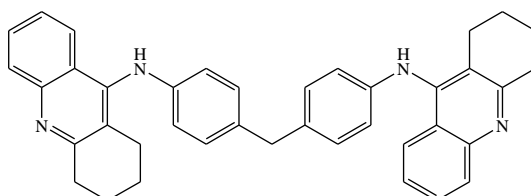
Este composto foi sintetizado via procedimento similar àquele adotado para o composto **14** sendo as seguintes as quantidades empregadas: m (composto **5**) = 193,0 mg (0,95 mmol) e m (composto **12**) = 94,3 mg (0,48 mmol). Rendimento 92%.



Aspecto físico: sólido bege. **Ponto de fusão:** >360 °C. **IV/(cm⁻¹):** 3112, 2977, 2759, 2719, 2643, 1634, 1614, 1582, 1540, 1507, 1429, 1373, 1281, 1184, 1106, 1019, 882, 826, 788, 779, 760, 707, 673. **RMN de ¹H (400 MHz, CD₃OD) δ/(ppm):** 8,43 (d, 2H, *J* 7,8), 7,93 (t, 2H, *J* 7,8), 7,85 (d, 2H, *J* 7,8), 7,71 (t, 2H, *J* 7,8), 7,38 (d, 4H, *J* 8,3), 7,29 (d, 4H, *J* 8,3), 4,16 (s, 2H), 3,19 (t, 4H, *J* 7,6), 2,37 (t, 4H, *J* 7,8), 2,08 (qn, 4H, *J* 7,6). **RMN de ¹³C (100 MHz, CD₃OD) δ/(ppm):** 164,5, 153,8, 142,8, 140,3, 139,1, 135,0, 131,4, 128,8, 128,7, 125,4, 121,6, 120,3, 118,5, 42,6, 33,6, 33,3, 24,9. **Análise elementar:** calc. para C₃₇H₃₂N₄·3C₂H₂O₂F₃·H₂O: C 57,85; H 4,23; N 6,28; encontrado: C 58,26; H 4,18; N 7,26. **HRMS (ESI):** calc. para C₃₇H₃₂N₄ [M + H]⁺: 533,2783; encontrado: 533,2968.

5.2.19 – Composto **27** (*N*-[4-({4-[(1,2,3,4-tetraidroacridin-9-il)amino]fenil}metil)fenil]-1,2,3,4-tetraidroacridin-9-amina)

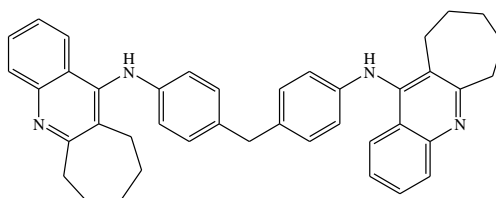
Este composto foi sintetizado via procedimento similar àquele adotado para o composto **14** sendo as seguintes as quantidades empregadas: m (composto **6**) = 197,5 mg (0,91 mmol) e m (composto **12**) = 89,9 mg (0,45 mmol). Entretanto, este composto foi recristalizado a partir de mistura de metanol e água. Rendimento 87%.



Aspecto físico: sólido laranja. **Ponto de fusão:** 286-292 °C. **IV/(cm⁻¹):** 3401, 2866, 1633, 1578, 1548, 1500, 1431, 1403, 1376, 1334, 1251, 1175, 1110, 1016, 870, 820, 756, 702, 676. **RMN de ¹H (400 MHz, CD₃OD) δ/(ppm):** 7,90-7,84 (m, 6H), 7,39 (t, 2H, *J* 8,0), 7,32 (d, 4H, *J* 8,0), 7,17 (d, 4H, *J* 8,0), 4,09 (s, 2H), 3,15 (t, 4H, *J* 6,0), 2,59 (t, 4H, *J* 8,0), 1,99-1,89 (m, 8H). **RMN de ¹³C (100 MHz, CD₃OD) δ/(ppm):** 155,4, 154,4, 140,7, 139,6, 134,3, 131,2, 127,0, 126,5, 125,6, 121,0, 120,5, 111,1, 42,0, 32,4, 29,8, 26,3, 23,0, 22,0. **Análise elementar:** calc. para C₃₉H₃₆N₄·3HCl·H₂O: C 68,07; H 6,04; N 8,14; encontrado: C 68,33; H 5,76; N 8,28. **HRMS (ESI):** calc. para [C₃₉H₃₆N₄ + H]⁺: 561,3018, encontrado: 561,3596.

5.2.20 – Composto **28** (*N*-[4-({4-({6*H*,7*H*,8*H*,9*H*,10*H*-cicloeppta[*b*]quinolin-11-il)amino]fenil}metil)fenil)-6*H*,7*H*,8*H*,9*H*,10*H*-cicloeppta[*b*]quinolin-11-amina)

Este composto foi sintetizado via procedimento similar àquele adotado para o composto **14** sendo as seguintes as quantidades empregadas: m (composto **7**) = 195,1 mg (0,84 mmol) e m (composto **12**) = 82,8 mg (0,42 mmol). Entretanto, este composto foi recristalizado a partir de mistura de metanol e água. Rendimento 90 %.

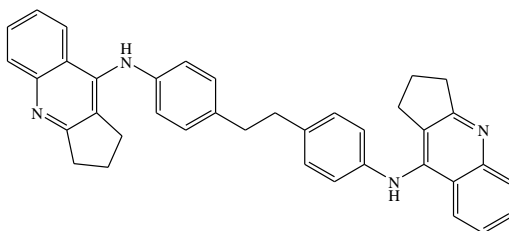


Aspecto físico: sólido verde claro. **Ponto de fusão:** 246-251 °C. **IV/(cm⁻¹):** 3215, 2926, 2850, 2776, 1633, 1578, 1557, 1508, 1496, 1410, 1377, 1335, 1212, 1185, 1108, 107, 1019, 966, 920, 896, 862, 820, 766, 678. **RMN de ¹H (400 MHz, CD₃OD) δ/(ppm):** 8,14 (d, 2H, *J* 8,3), 7,91 (t, 2H, *J* 8,3), 7,89 (d, 2H, *J* 8,3), 7,56 (t, 2H, *J* 8,3), 7,25 (d, 4H, *J* 8,6), 7,10 (d, 4H, *J* 8,6), 4,02 (s, 2H), 3,28-3,22 (m, 4H), 2,82 (t, 4H, *J* 5,3), 1,93-1,82 (m, 8H), 1,60-1,50 (m, 4H). **RMN de ¹³C (100 MHz, CD₃OD) δ/(ppm):** 162,9, 155,1, 142,6, 140,9, 139,5, 135,0, 132,0, 128,9, 126,7, 124,5, 122,0, 121,6, 42,4, 36,6, 33,1, 29,2, 28,4,

27,7. **Análise elementar:** calc. para $C_{41}H_{40}N_4 \cdot 4HCl \cdot 2H_2O$: C 63,9; H 6,28; N 7,27; encontrado: C 64,0; H 4,41; N 6,94. **HRMS (ESI):** calc. para $C_{41}H_{40}N_4 [M + H]^+$: 589,3409; encontrado: 589,3879.

5.2.21 – Composto **29** (*N*-[4-(2-{4-[(1,2,3,4-tetraidroacridin-9-il)amino]fenil}etil)fenil]-1,2,3,4-tetraidroacridin-9-amina)

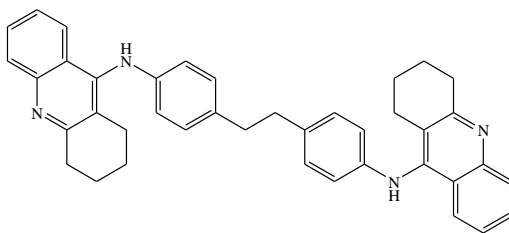
Este composto foi sintetizado via procedimento similar àquele adotado para o composto **14** sendo as seguintes as quantidades empregadas: m (composto **5**) = 189,5 mg (0,93 mmol) e m (composto **13**) = 97,8 mg (0,46 mmol). Rendimento 94%.



Aspecto físico: sólido cinza claro. **Ponto de fusão:** 267-270 °C. **IV/(cm⁻¹):** 3107, 2956, 2703, 2632, 1780, 1632, 1582, 1525, 1463, 1427, 1372, 1333, 1295, 1279, 1203, 1188. 1020, 960, 893, 834, 756, 653. **RMN de ¹H (400 MHz, CD₃OD) δ/(ppm):** 8,41 (d, 2H, *J* 8,0), 7,92 (t, 2H, *J* 8,0), 7,84 (d, 2H, *J* 8,0), 7,70 (t, 2H, *J* 8,0), 7,28 (d, 4H, *J* 8,3), 7,23 (d, 4H, *J* 8,3), 3,17 (t, 4H, *J* 7,7), 3,07 (s, 4H), 2,34 (t, 4H, *J* 7,5), 2,07 (qn, 4H, *J* 7,5). **RMN de ¹³C (100 MHz, CD₃OD) δ/(ppm):** 164,4, 153,8, 143,3, 140,3, 138,8, 134,9, 131,3, 128,8, 128,5, 125,3, 121,6, 120,2, 118,3, 39,3, 33,6, 33,3, 24,8. **Análise elementar:** calc. para $C_{38}H_{34}N_4 \cdot 3C_2HO_2F_3 \cdot H_2O$: C 58,28; H 4,34; N 6,18; encontrado: C 58,41; H 3,01; N 7,13. **HRMS (ESI):** calc. para $C_{38}H_{34}N_4 [M + H]^+$: 547,2862; encontrado: 547,3234.

5.2.22 – Composto **30** (*N*-[4-(2-{4-[(1,2,3,4-tetraidroacridin-9-il)amino]fenil}etil)fenil]-1,2,3,4-tetraidroacridin-9-amina)

Este composto foi sintetizado via procedimento similar àquele adotado para o composto **14** sendo as seguintes as quantidades empregadas: m (composto **6**) = 188,7 mg (0,87 mmol) e m (composto **13**) = 90,0 mg (0,42 mmol). Rendimento 85%.

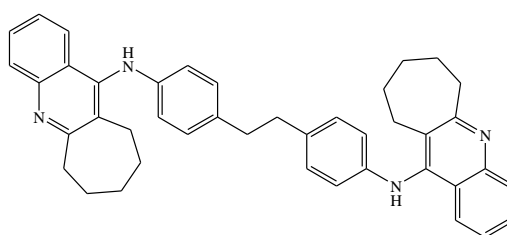


Aspecto físico: sólido amarelo. **Ponto de fusão:** 248-253 °C. **IV/(cm⁻¹):** 2936, 1634, 1580, 1550, 1500, 1402, 1376, 1335, 1253, 1176, 1018, 826, 757, 677. **RMN de ¹H (400 MHz, CD₃OD) δ/(ppm):** 7,88-7,73 (m, 6H), 7,37 (t, 2H, *J* 7,7), 7,23 (d, 4H, *J* 8,3), 7,13 (d, 4H, *J* 8,3), 3,12 (t, 4H, *J* 6,0), 3,03 (s, 4H),

2,57 (t, 4H, *J* 6,0), 1,99-1,84 (m, 8H). **RMN de ^{13}C (100 MHz, CD_3OD) $\delta/(\text{ppm})$** : 156,2, 155,2, 142,3, 141,1, 140,3, 135,0, 131,8, 127,6, 127,2, 126,2, 121,2, 119,6, 117,4, 39,3, 30,4, 26,9, 23,7, 22,7. **Análise elementar**: calc. para $\text{C}_{40}\text{H}_{38}\text{N}_4 \cdot 3\text{C}_2\text{HO}_2\text{F}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$: C 59,10; H 4,64; N 5,99; encontrado: C 59,06; H 3,01; N 7,13. **HRMS (ESI)**: calc. para $\text{C}_{40}\text{H}_{38}\text{N}_4$ $[\text{M} + \text{H}]^+$: 575,3175; encontrado: 575,3698.

5.2.23 – Composto **31** (*N*-(4-{2-[4-({6*H*,7*H*,8*H*,9*H*,10*H*-cicloepa[*b*]quinolin-11-il)amino)fenil]etil}fenil)-6*H*,7*H*,8*H*,9*H*,10*H*-cicloepa[*b*]quinolin-11-amina)

Este composto foi sintetizado via procedimento similar àquele adotado para o composto **14** sendo as seguintes as quantidades empregadas: m (composto **7**) = 193,0 mg (0,83 mmol) e m (composto **13**) = 88,3 mg (0,42 mmol). Rendimento 55%.



Aspecto físico: sólido laranja. **Ponto de fusão**: 136-142 °C. **IV**/(cm^{-1}): 3153, 3071, 2927, 2718, 1631, 1579, 1547, 1514, 1405, 1379, 1263, 1218, 1075, 1021, 964, 882, 841, 818, 766, 722, 672. **RMN de ^1H (400 MHz, CD_3OD) $\delta/(\text{ppm})$** : 8,10 (d, 2H, *J* 8,6), 7,91 (t, 2H, *J* 8,0), 7,86 (d, 2H, *J* 8,5), 7,55 (t, 2H, *J* 7,7), 7,20 (d, 4H, *J* 8,3), 7,07 (d, 4H, *J* 8,3), 3,27-3,18 (m, 4H), 2,98 (s, 2H), 2,81 (t, 4H, *J* 5,2), 1,94-1,81 (m, 8H), 1,60-1,49 (m, 4H). **RMN de ^{13}C (100 MHz, CD_3OD) $\delta/(\text{ppm})$** : 162,7, 155,2, 142,3, 141,3, 139,5, 135,0, 131,9, 128,8, 126,7, 124,5, 124,1, 121,8, 121,6, 39,2 36,5, 33,1, 29,2, 28,5, 27,7. **Análise elementar**: calc. para $\text{C}_{42}\text{H}_{42}\text{N}_4 \cdot 2\text{C}_2\text{HO}_2\text{F}_3 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$: C 62,44; H 5,70; N 6,36; encontrado: C 62,40; H 4,65; N 7,46. **HRMS (ESI)**: calc. para $\text{C}_{42}\text{H}_{42}\text{N}_4$ $[\text{M} + \text{H}]^+$: 603,3566; encontrado: 603,3526.

5.3 - Procedimentos de avaliação de atividade anticolinesterásica

As curvas de dose resposta para determinação do CI_{50} foram obtidas seguindo a metodologia proposta por Ellman e colaboradores [7]. Foram utilizadas as enzimas hAChE (acetilcolinesterase humana, recombinante, expressa em células HEK 293, pó liofilizado, ≥ 1.500 unidades/mg de proteína), hBChE (humana, recombinante, expressa em cabra, ≥ 500 unidades/mg de proteína), *EeAChE* (*Electrophorus electricus*, Tipo VI-S, pó liofilizado, 200-1.000 unidades/mg de proteína) e eqBChE (de soro equino, pó liofilizado, ≥ 900 unidades/mg de proteína), todas adquiridas da Sigma-Aldrich [8]. Da mesma empresa foram também adquiridos os demais reagentes utilizados: DTNB (ácido 5,5'-ditiobis(2-nitrobenzoico)), ATChI (iodeto de acetilcolina) e BTChI (iodeto de butirilcolina). As reações foram conduzidas em tampão fosfato pH 8 em placas de 96 poços, sendo as leituras realizadas à 412 nm após 2,5 minutos de reação. As concentrações de ATChI, BTChI e DTNB no meio reacional foram de 0,3 mM, enquanto das enzimas 0,1 u/mL. Foram avaliadas pelo menos sete concentrações do inibidor na faixa entre 10^{-3} e 10^{-10}

M. Todas as medidas foram realizadas em triplicata. A porcentagem de inibição foi calculada com a Equação 5.1.

$$I(\%) = \left(1 - \frac{\Delta A_i}{\Delta A}\right) \times 100 \quad (5.1)$$

Onde ΔA_i refere-se à variação da absorbância na presença do inibidor e ΔA à variação da absorbância no meio de catálise sem inibidor. As curvas de dose-resposta foram construídas pela regressão sigmoideal dos dados do *plot* da % de inibição em função do logaritmo decimal da concentração molar do inibidor com o auxílio do programa Origin 6.0 [10]. O CI_{50} foi determinado a partir das curvas de dose-resposta, sendo a concentração do inibidor para a qual a atividade enzimática apresenta valor de 50% [11].

Os ensaios de cinética seguiram a metodologia descrita por Ellman e colaboradores [7]. As leituras foram realizadas em um leitor de Elisa em placas de 96 poços. Os experimentos foram conduzidos em tampão fosfato pH 8. Os inibidores foram avaliados em pelo menos 04 concentrações, coerentes com o valor de CI_{50} previamente determinado. Pelo menos três concentrações diferentes do substrato foram utilizadas nos experimentos, com valores coerentes ao K_m das enzimas. Todos os experimentos foram conduzidos em triplicata. Na determinação das velocidades utilizou a Equação 5.2 [7].

$$v \left(\frac{mol}{L.min} \right) = \frac{\Delta A}{min} / 13600 \quad (5.2)$$

Onde ΔA refere-se à variação de absorbância de uma substância de referência em um dado comprimento de onda em função do tempo de reação e 13600 refere-se ao coeficiente de absorvidade molar do ânion 5-tio-2-nitro-benzóico.

Em função do perfil cinético observado para os dímeros de tacrina, as análises foram conduzidas seguindo as deduções possibilitadas pela Equação 5.3, característica de inibidores mistos [12-17].

$$v_o = \frac{V_{max}[S]}{[S] \left(1 + \frac{[I]}{\alpha K_i}\right) + K_m \left(1 + \frac{[I]}{K_i}\right)} \quad (5.3)$$

Onde v_o é a velocidade inicial, V_{max} é a velocidade máxima de reação enzimática, $[S]$ é a concentração de substrato utilizada no experimento, $[I]$ é a concentração do inibidor, α é o fator de alteração da constante inibitória dada a presença do substrato ligado previamente à enzima e K_m é a constante de Michaelis-Menten. As constantes inibitórias foram determinadas pelo método das inclinações [18]. Os valores de alfa foram obtidos a partir dos gráficos de Dixon [19]. Nesse contexto, as inclinações bem como os valores de $1/V_{max}$ foram determinados a partir dos gráficos de Lineweaver-Burk [20].

5.4 - Procedimentos de avaliação antiproliferativa

Os ensaios de atividade antiproliferativa da tacrina e derivados foram realizados na FUNED onde há um banco de células desenvolvido a partir de culturas adquiridas da ATCC [21]. As células são mantidas em nitrogênio líquido à 5% em DMSO em meio de cultura até o momento de cultivo quando então passam por um processo de descongelamento rigorosamente estéril. Normalmente as células são cultivadas à 37°C e em atmosfera de 5% de CO₂ para manutenção das condições ótimas de pH. Os meios de cultura das células são definidos pela ATCC [21], no site da qual, através do código da célula (*e.g.* IMR32) é possível encontrar todas as informações referentes à forma de cultivo. Neste trabalho todas as linhagens celulares foram cultivadas conforme as orientações da ATCC. Como exemplo, a linhagem IMR32 "neuroblastoma" foi cultivada em meio EMEM (*Eagle's Minimum Essential Medium*) aditivado em 10% com soro fetal bovino. Todos os trabalhos de manipulação das células foram conduzidos em fluxo laminar em cabine estéril em ambiente limpo. Os cultivos são realizados em recipientes próprios, novos e estéreis, não-reutilizáveis. As vidrarias foram todas autoclavadas.

Para o ensaio com MTT [22] foram aplicadas 10⁵ células/200µL de meio/ poço em placas de 96 poços. Após 24 horas, com a formação de monocamada de células, remove-se suavemente o sobrenadante, lava-se a monocamada celular com 100 µL de PBS, aplica-se 198 µL de meio à 1% de SFB e 2µL de solução etanólica do composto. A concentração final do etanol no meio de cultura foi de 1% V/V, valor que não altera o desenvolvimento celular, conforme os testes realizados com essas células. Os poços de referência recebem 2µL de etanol. Como controle de morte, aplicou-se 2µL de solução de H₂O₂ à 30%. Após 24 horas de aplicação dos compostos, remove-se o sobrenadante, lava-se as células com 200 µL de PBS à 1%, aplica-se então 100 µL de solução de MTT em meio de cultura à 1% em SFB. As células foram postas em condição de cultura por três horas, após o que, as mesmas são centrifugadas à 1000 rpm por 10 minutos. Remove-se então o sobrenadante, aplica-se 50 µL de DMSO a cada poço e realiza-se a leitura à 500 nm. A absorbância do controle de morte é tomada como branco, sendo subtraída dos valores de absorbância das demais medidas. A porcentagem de células viáveis para cada concentração do composto é calculada com a Equação 5.4:

$$\text{Células viáveis}/(\%) = \left(\frac{A}{A_r} \right) \times 100 \quad (5.4)$$

Onde A refere-se à absorbância da amostra tratada e A_r à absorbância da referência. As curvas de dose-resposta são construídas pelo *plot* da porcentagem de viabilidade em função do logaritmo da concentração no meio de cultura do composto em análise. O ajuste da curva sigmoideal foi realizada com o programa Origin 6.0 [10]. A partir da curva de regressão infere-se o valor de concentração do composto para o qual a viabilidade celular é de 50%.

5.5 - Procedimentos de modelagem molecular

As estruturas dos ligantes para os *dockings* foram desenhadas, minimizadas e adequadas quanto à conformação e às extensões com os programas Marvin Sketch 5.8.0 [23], DS Visualizer 3.1 [24], VegaZZ [25] e AutoDock Tools 1.5.4 (ADT) [26]. As propriedades físico-químicas e espectroscópicas foram estimadas com os programas Marvin Sketch 5.8.0 e ChemDraw [27]. As estruturas de raios-X dos receptores foram obtidas no PDB [28] enquanto o modelo por homologia para eqBChE foi obtido no Swiss-Model (UniProtAC Q9N1N9) [29-31]. A remoção de moléculas de água e correção estrutural dos receptores foi realizada com o programa SwissPDB Viewer 4.0.1[31] enquanto os hidrogênios polares e adequação de formato foi realizada com o ADT. A correção estrutural com o SwissPDB Viewer consiste substancialmente na reposição dos resíduos de superfície ausentes em determinada estrutura de raios-X (geralmente isso ocorre em regiões da biomolécula que são móveis mesmo no cristal). Os *dockings* foram conduzidos com o programa AutoDock Vina [32] onde a estrutura do ligante foi tomada como flexível e a do receptor rígida. Os *grids* foram definidos de maneira a exceder em 5 Å a região de interação do ligante com o complexo, com resolução padrão de 1 Å. O erro padrão das estimativas de energia livre no contexto do conjunto de treino para o Vina são de 2,8 kcal/mol [32]. As visualizações foram feitas com o programa Pymol Viewer™ 1.3 [33].

5.6 – Referências bibliográficas

- [1] Armarego, W. L. F.; Chai, C. L. L. Purification of laboratory chemicals, 6th Edition, Elsevier Inc., **2009**.
- [2] Laboratório de Cristalografia, Departamento de Física - ICEX - UFMG. <http://www.labcri.ufmg.br>. Acessada em 16/11/2013.
- [3] Fundação Ezequiel Dias. <http://funed.mg.gov.br>. Acessada em 16/11/2013.
- [4] Saemian, N.; Arjomandi, O. K.; Shirvani, G. Synthesis of a series of carbon-14 labelled 4-aminoquinazolines and quinazolin-4 (3*H*)-ones. *J. Label Compd. Radiopharm.*, **2009**, 52, 173-176.
- [5] Carlier, P. R.; Han, Y. F.; Chow, E. S. H.; Li, C. P. L.; Wang, H.; Lieu, T. X.; Wong, H. S.; Pang, Y. P. Evaluation of short-tether bis-THA aChE inhibitors. A further test of the dual binding site hypothesis. *Bioorg. Med. Chem.*, **1999**, 7, 351-357.
- [6] Hu, M-K.; Wu, L. J.; Hsiao, G.; Yen, M-H. Homodimeric tacrine congeners as acetylcholinesterase inhibitors. *J. Med. Chem.*, **2002**, 45, 2277-2282.
- [7] Ellman, G. L.; Courtney, K. D.; Andres, J. R. V.; Featherstone, M. A new and rapid colorimetric determination of AChE activity. *Biochem. Pharmacol.*, **1961**, 7, 88-95.
- [8] Sigma-Alcrich. <http://www.sigmaaldrich.com>. Acessada em 16/11/2013.
- [10] Microcal™ Software, Inc. Northampton, MA 01060 USA. www.microcal.com. **1999**.
- [11] Nowicki, J-P.; Scatton, B. Measurement and expression of drug effects in The practice of medicinal chemistry, 3rd ed.; Wermuth, C.G. Ed.; Burlington: Academic Press **2008**, 73-84.
- [12] Pang, Y-P.; Quiram, P.; Jelacic, T.; Hong, F.; Brimijoin, S. Highly potent, selective, and low cost bis-tetrahydroaminacrine inhibitors of acetylcholinesterase: steps toward novel drugs for treating Alzheimer's disease. *J. Biol. Chem.*, **1996**, 271, 23646-23649.

- [13] Rydberg, E. H.; Brumshtein, B.; Greenblatt, H. M.; Wong, D. M.; Shaya, D.; Williams, L. D.; Carlier, P. R.; Pang, Y. P.; Silman, I.; Sussman, J. L. Complexes of alkylene-linked tacrine dimers with *Torpedo californica* acetylcholinesterase: binding of bis-5-tacrine produces a dramatic rearrangement in the active-site gorge. *J. Med. Chem.*, **2006**, 49, 5491-5500.
- [14] Bolognesi, M. L.; Andrisano, V.; Bartolini, M.; Banzi, R.; Melchiorre, C. Propidium-based polyamine ligands as potent inhibitors of acetylcholinesterase and acetylcholinesterase-induced amyloid- β aggregation. *J. Med. Chem.*, **2005**, 48, 24-27.
- [15] Rizzo, S.; Bisi, A.; Bartolini, M.; Mancini, F.; Belluti, F.; Gobbi, S.; Andrisano, V.; Rampa, A. Multi-target strategy to address Alzheimer's disease: design, synthesis and biological evaluation of new tacrine-based dimers. *Eur. J. Med. Chem.*, **2011**, 46, 4336-4343.
- [16] Huang, L.; Su, T.; Shan, W.; Luo, Z.; Sun, Y.; He, F.; Li, X. Inhibition of cholinesterase activity and amyloid aggregation by berberine-phenyl-benzoheterocyclic and tacrine-phenylbenzoheterocyclic hybrids. *Bioorg. Med. Chem.*, **2012**, 20, 3038-3048.
- [17] Copeland, R. A. Enzymes: a practical introduction to structure, mechanism, and data analysis. John Wiley and Sons Inc, New York, **2000**.
- [18] Segel, I. H. Enzyme Kinetics, Wiley, New York. **1975**.
- [19] Dixon, M. The determination of enzyme inhibitor constants. *Biochem. J.*, **1953**, 55, 170-171.
- [20] Lineweaver, H.; Burk, D. The determination of enzyme dissociation constants. *J. Am. Chem. Soc.*, **1934**, 56, 658-666.
- [21] American Type Culture Collection: ATCC. www.atcc.org. Acessada em 16/11/2013.
- [22] Mosmann, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Methods*, **1983**, 65, 55-63.
- [23] MarvinSketch 5.8.0, ChemAxon Ltd., **2013**, www.chemaxon.com.
- [24] Discovery Studio v3.1.1.11157, Accelrys Softwares Inc, **2001**.
- [25] Pedretti, A.; Vistoli, G. VegaZZ 3.0.1.22 Windows version, **2013**.
- [26] Morris, G. M.; Goodsell, D. S.; Halliday, R. S.; Huey, R.; Hart, W.E.; Belew, R. K.; Olson, A. J. Automated docking using a Lamarckian genetic algorithm and an empirical binding free energy function. *J. Comp. Chem.*, **1998**, 19, 1639-1662.
- [27] CambridgeSoft Corporation, ChemDraw[®] Ultra: Chemical Structure Drawing Standard. www.cambridgesoft.com, **2003**.
- [28] Protein Data Bank. www.rcsb.org. Acessada em 16/11/2013.
- [29] Arnold, K.; Bordoli, L.; Kopp, J.; Schwede, T. The SWISS-MODEL workspace: a web-based environment for protein structure homology modelling. *Bioinformatics*, **2006**, 22, 195-201.
- [30] Schwede, T.; Kopp, J.; Guex, N.; Peitsch, M. C. SWISS-MODEL: an automated protein homology-modeling server. *Nucleic Acids. Res.*, **2003**, 31, 3381-3385.
- [31] Guex, N.; Peitsch, M. C. SWISS-MODEL and the Swiss-PdbViewer: an environment for comparative protein modelling. *Electrophoresis*, **1997**, 18, 2714-2723.
- [32] Trott, O.; Olson, A. J. AutoDock Vina: improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading. *J. Comp. Chem.*, **2009**, 31, 455-461.
- [33] DeLano, W. L. The PyMOL Molecular Graphics System on the World Wide Web. www.pymol.org. **2002**.

Anexo I – Artigos publicados

A.I.1 - Aquino, R. A. N.; Modolo, L. V.; Alves, R. B.; de Fátima, A. Design of new drugs for the treatment of Alzheimer's disease based on tacrine structure. *Curr. Drug. Targets*, **2013**, 14, 378-397.

A.I.2 - Aquino, R. A. N.; Modolo, L. V.; Alves, R. B.; de Fátima, A. Synthesis, kinetic studies and molecular modeling of novel tacrine dimers as cholinesterase inhibitors. *Org. Biomol. Chem*, **2013**, 11, 8395-8409.

Anexo II – Artigos em preparação

Aquino, R. A. N.; de Fátima, A. Podophyllotoxin: asymmetric total synthesis, *Mini-Rev. Org. Chem.* **2014**.

Aquino, R. A. N.; Silva, L. M.; de Fátima, A. Evaluation of anticancer activity of tacrine dimeric derivatives. *J. Pharm. Pharmacol.*, **2014**.

Anexo III – Trabalhos apresentados em congressos

A.III.1 - 33ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química – Águas de Lindóia - 2010

Dimerização da tacrina como procedimento de ampliação da especificidade e do potencial de inibição da acetilcolinesterase

A.III.2 - XX Semana de Iniciação Científica da UFMG - 2012

Braga, T.C.; Aquino, R.A.N.; de Fátima, A. Estudos visando à síntese de híbridos da tacrina.

A.III.3 - XX Semana de Iniciação Científica da UFMG - 2012

Reis, F.S.; Aquino, R.A.N.; de Fátima, A. Estudos Visando à Síntese de Dímeros da Tacrina: Potenciais Substâncias para o Tratamento do Mal de Alzheimer.

A.III.4 - 35ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química – Águas de Lindóia - 2012

Aquino, R.A.N.; Braga, T.C.; de Fátima, A.; dos Santos, L.H.R.; Alves, R.B. Síntese, Raios-X e Modelagem Molecular de Homodímeros de Tacrina.

A.III.5 – 6th Brazilian Symposium on Medicinal Chemistry - BrazMedChem 2012

Aquino, R.A.N.; da Silva, D.L; Modolo, L.V.; de Fátima, A. Xanthenones as new cholinesterase inhibitors: synthesis, *in vitro* studies and molecular modeling.

A.III.6 – 6th Brazilian Symposium on Medicinal Chemistry - BrazMedChem 2012

Terra, B.S.; Aquino, R.A.N.; da Silva, D.L; Modolo, L.V.; de Fátima, A. Kinetic studies and molecular docking of tacrine analogs towards cholinesterases.

Anexo IV - Espectros de IV (ATR) e RMN

AIV.1 - Ácido antranílico

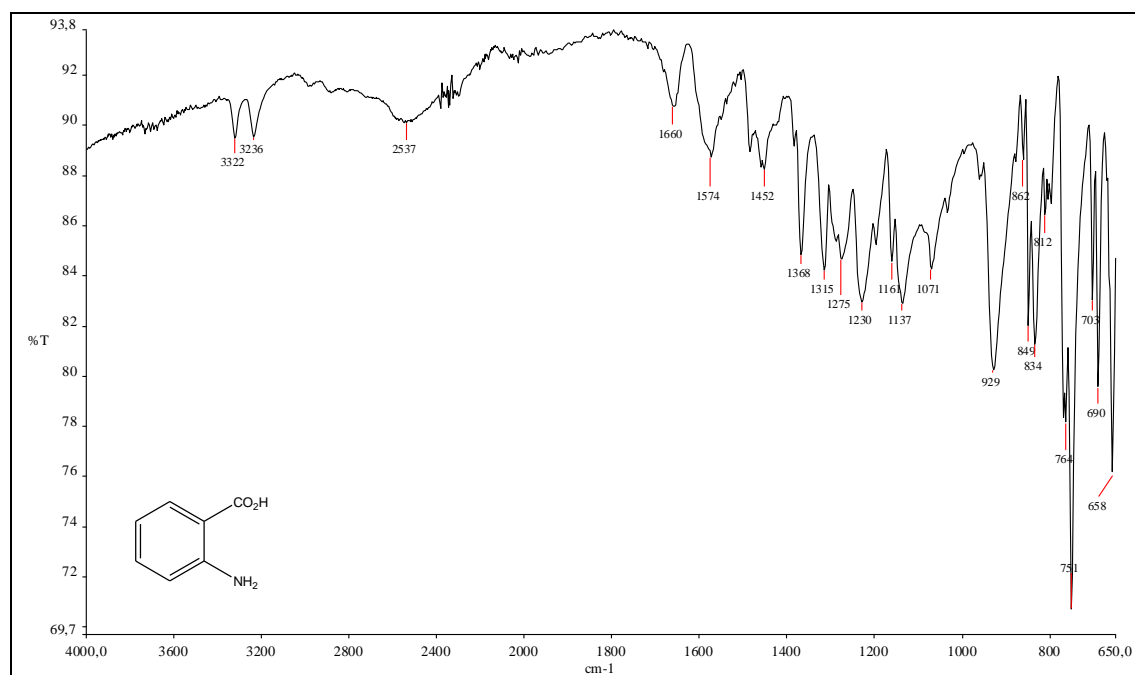


Figura AIV.1 – Espectro na região de IV do ácido antranílico.

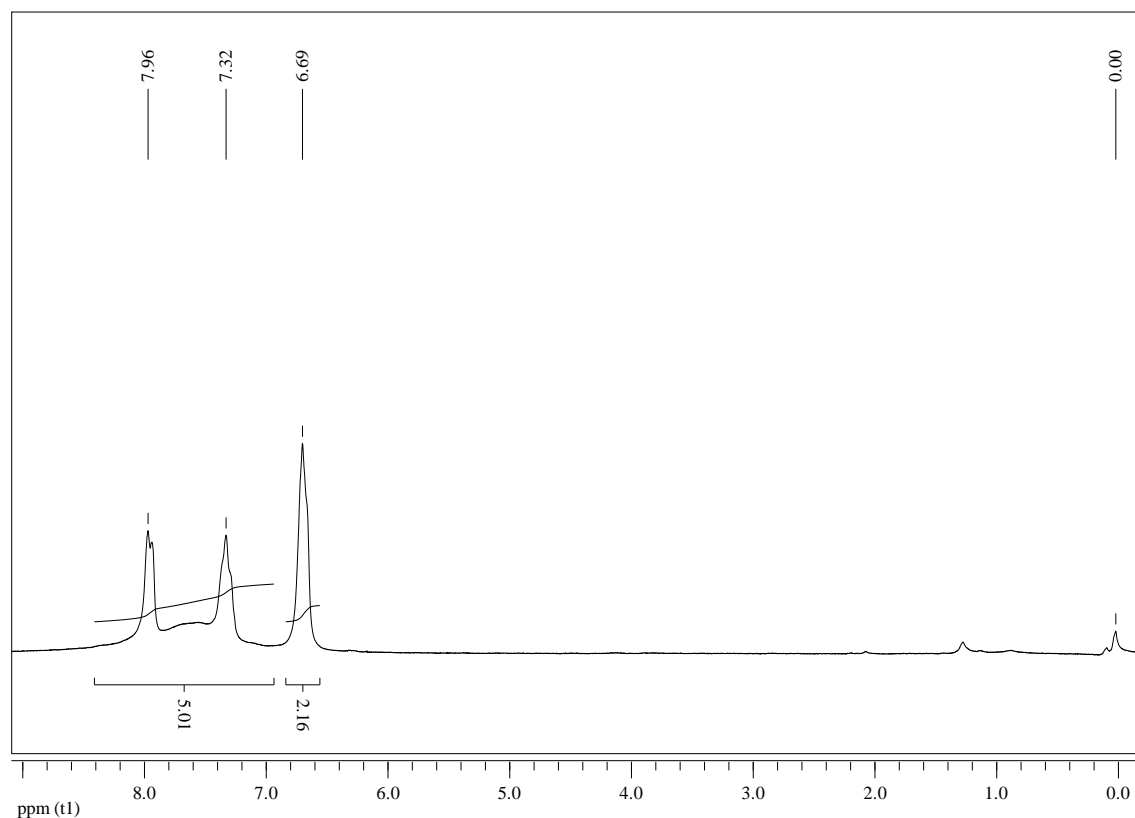


Figura AIV.2 – Espectro de RMN de ¹H do ácido antranílico (200 MHz, CDCl₃).

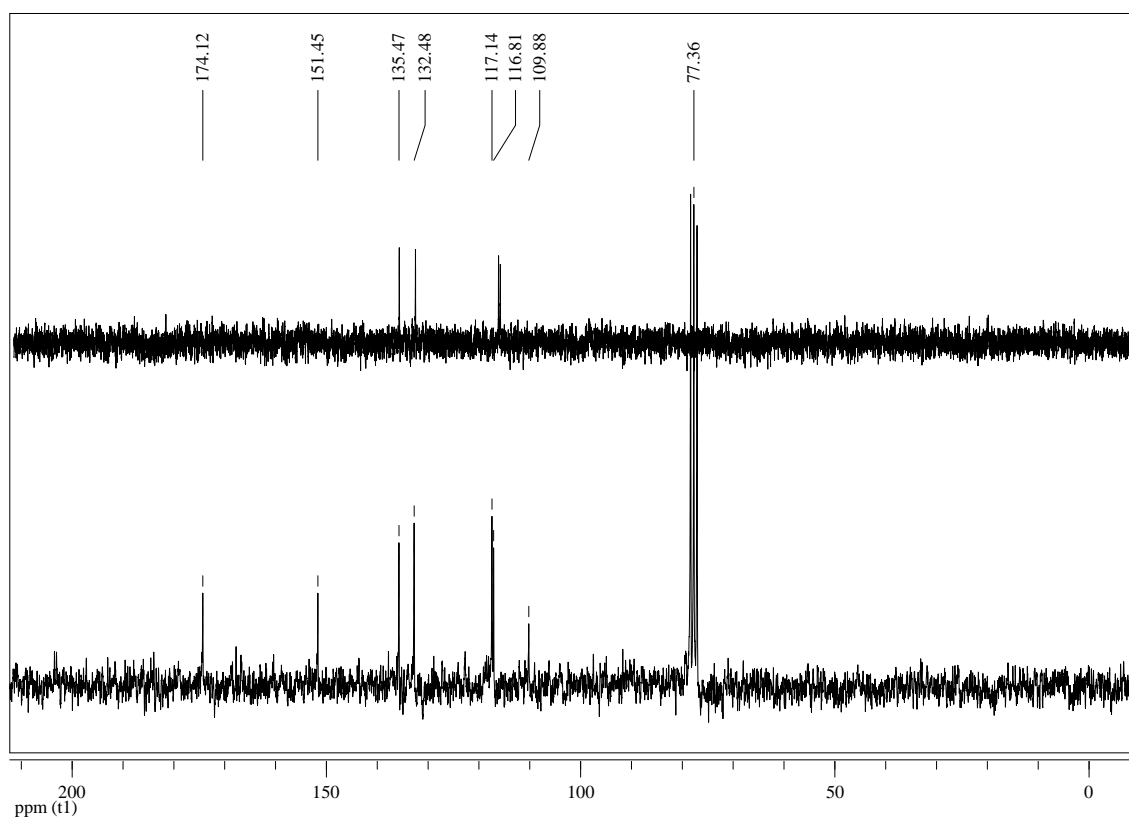


Figura AIV.3 – Espectro de RMN de ^{13}C e subspectro DEPT 135 do ácido antranílico (50 MHz, CDCl_3).

AIV.2 - Éster espirocarbinolamina

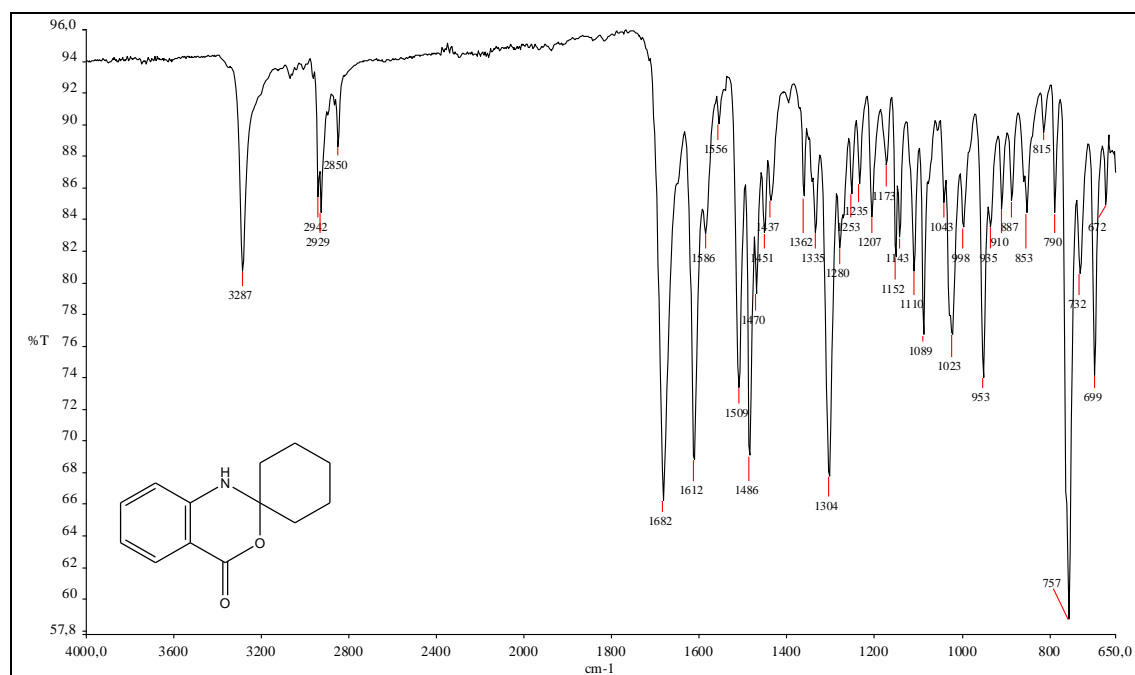


Figura AIV.4 – Espectro na região de IV do éster espirocarbinolamina.

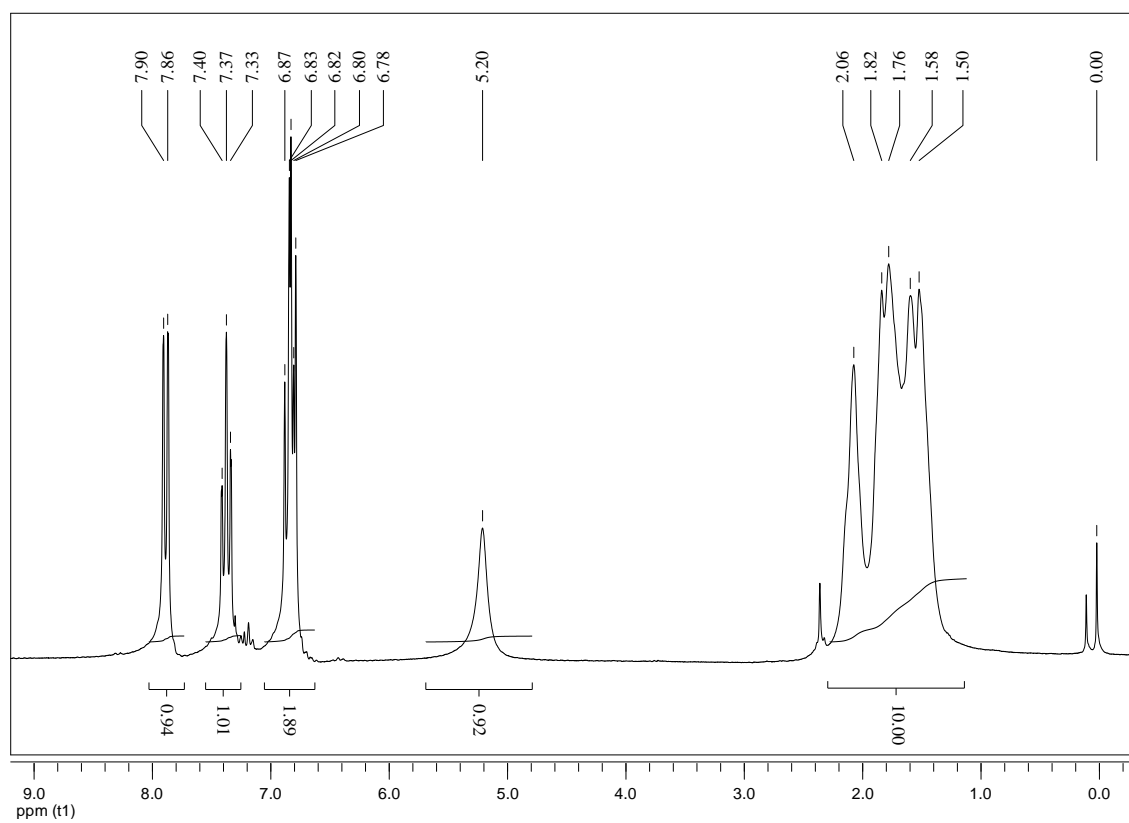


Figura AIV.5 – Espectro de RMN de ^1H do éster espirocarbinolamina (200 MHz, TFAD).

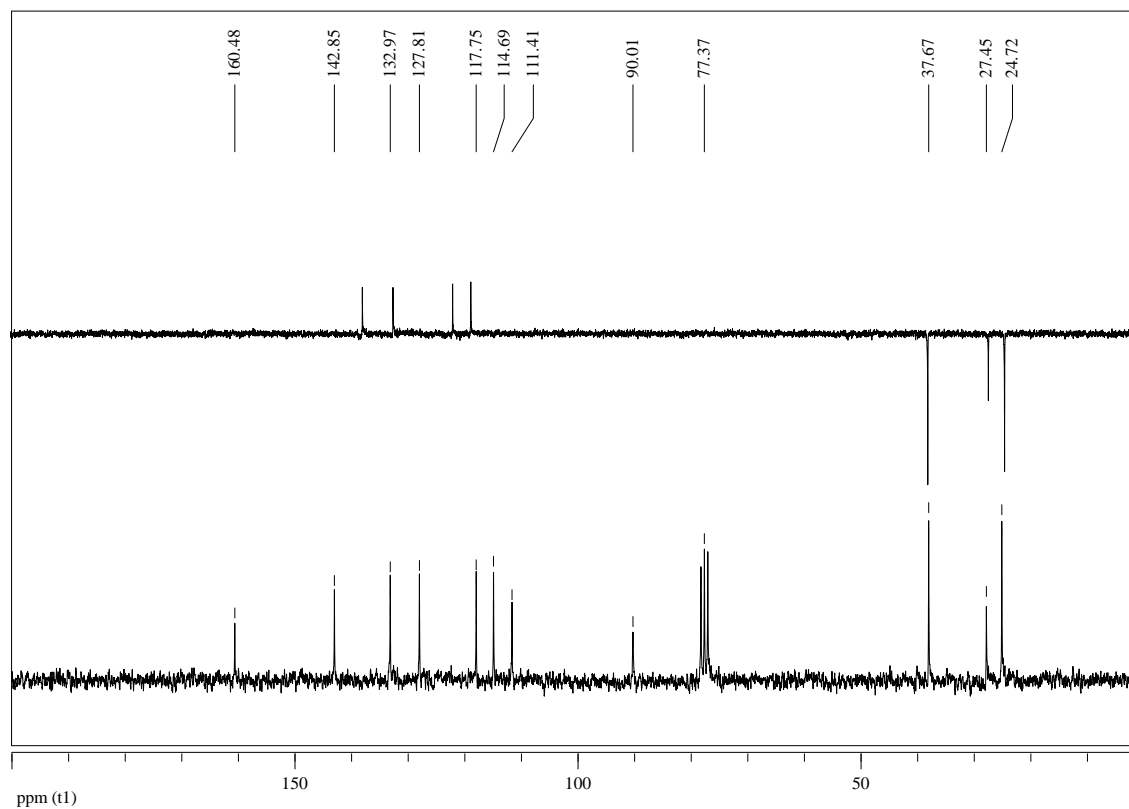


Figura AIV.6 – Espectro de RMN de ^{13}C e DEPT 135 do éster espirocarbinolamina (50 MHz, CDCl_3).

AIV.3 - Composto 5

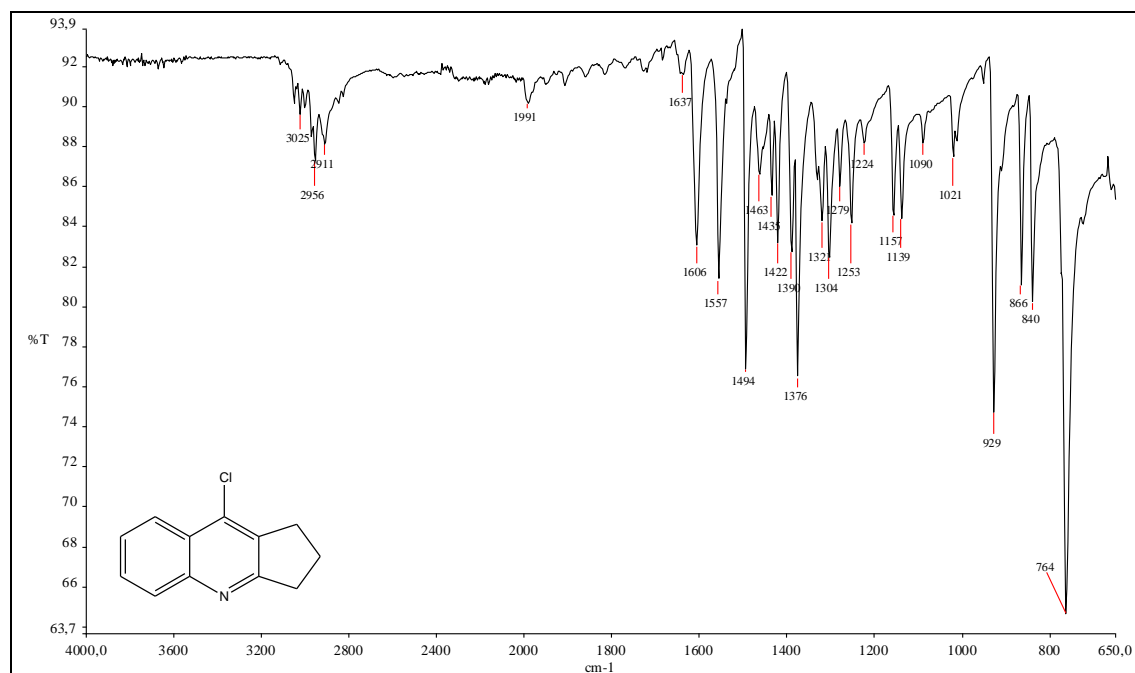
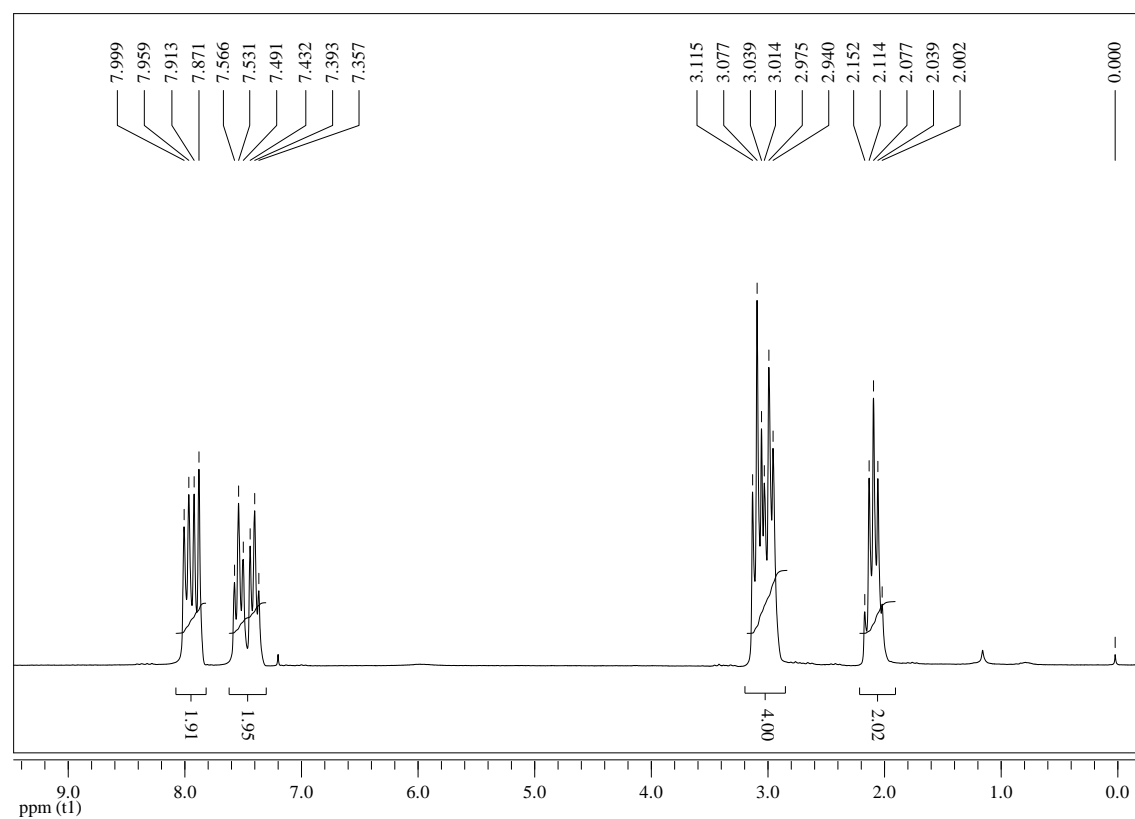


Figura AIV.7 – Espectro na região de IV do composto 5.

Figura AIV.8 – Espectro de RMN de ¹H do composto 5 (200 MHz, CDCl₃).

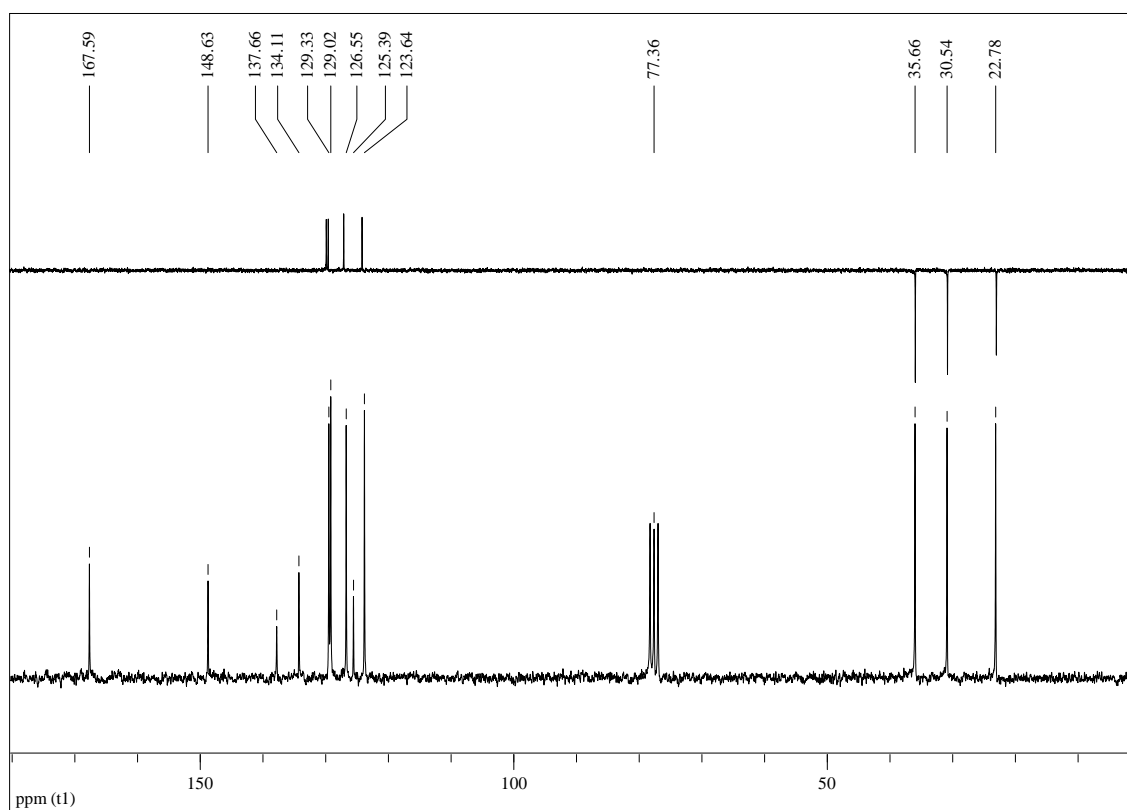


Figura AIV.9 – Espectro de RMN de ^{13}C e subspectro DEPT 135 do composto **5** (50 MHz, CDCl_3).

AIV.4 - Composto **6**

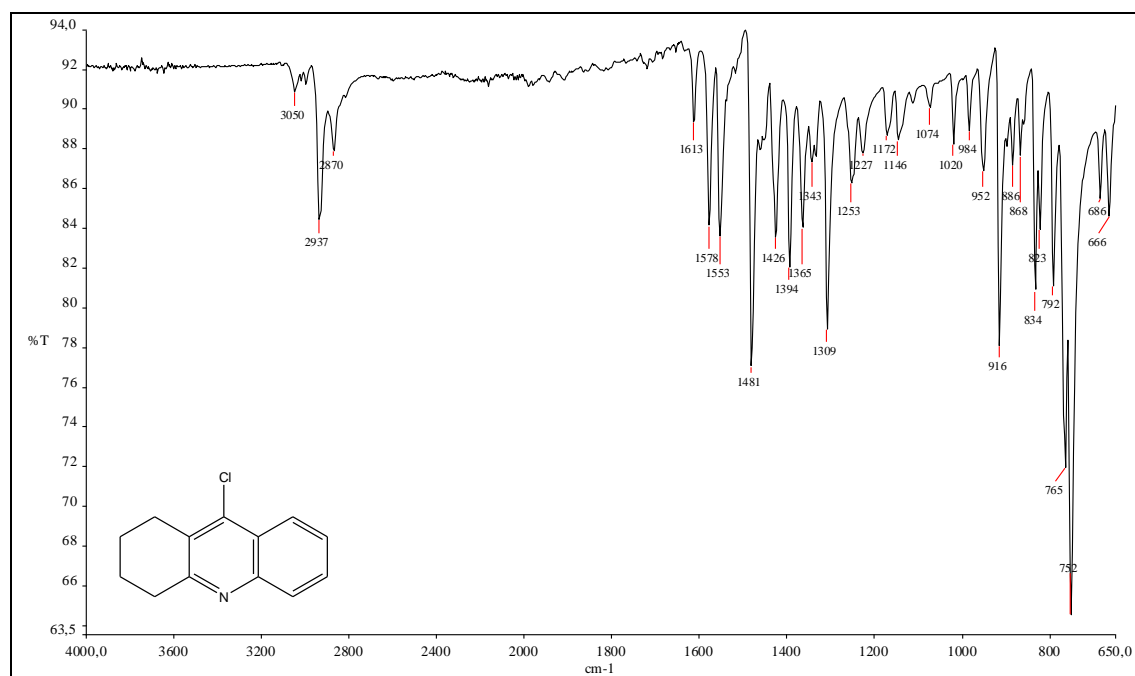


Figura AIV.10 – Espectro na região de IV do composto **6**.

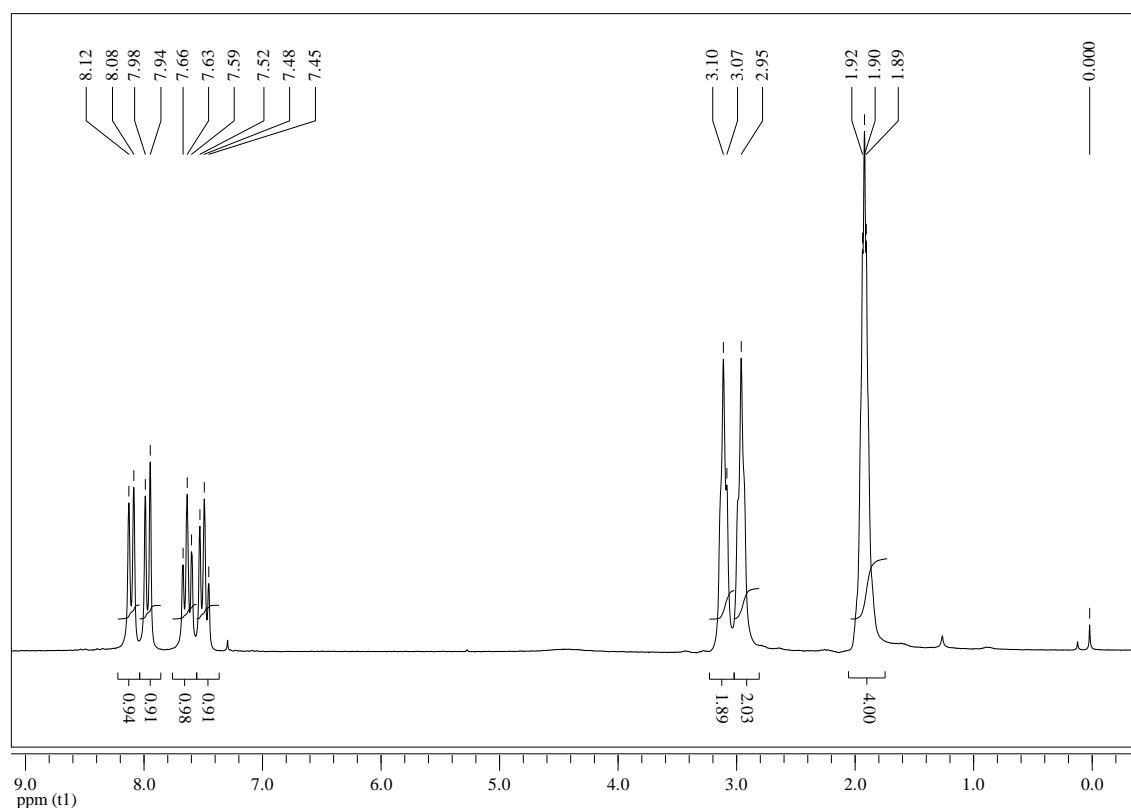


Figura AIV.11 – Espectro de RMN de ^1H do composto **6** (200 MHz, CDCl_3).

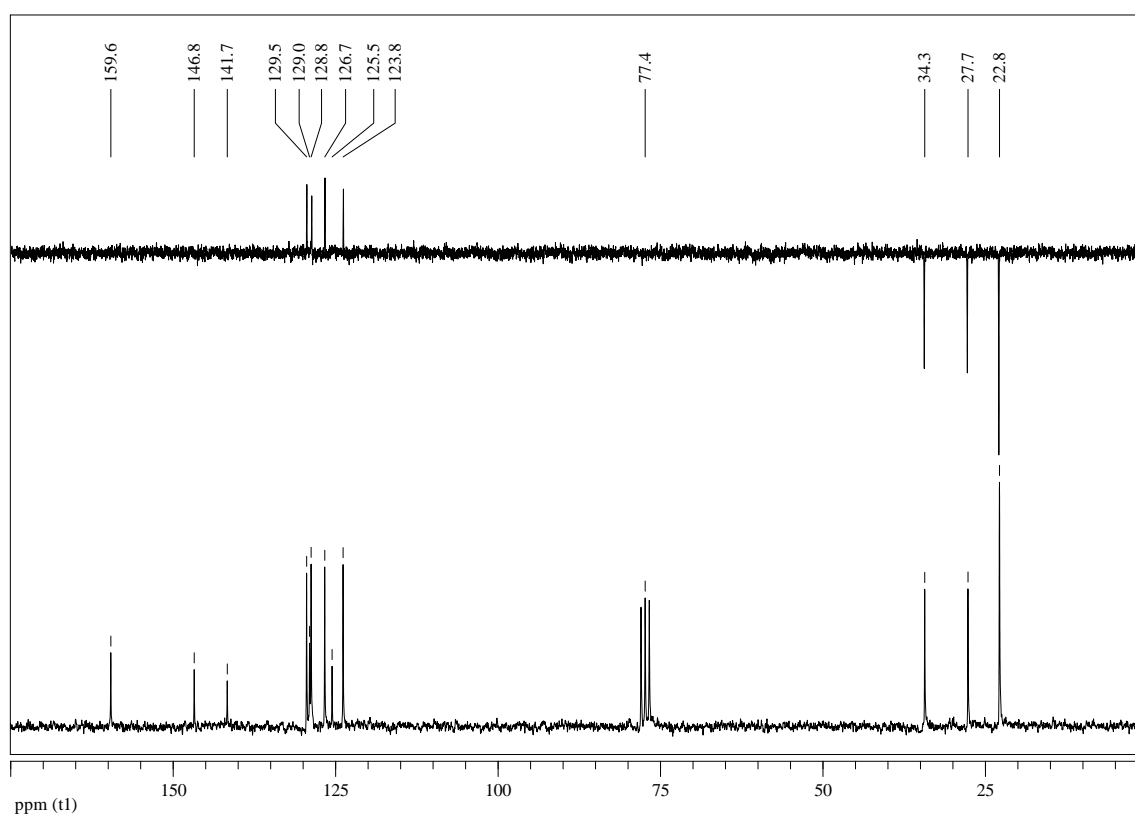


Figura AIV.12 – Espectro de RMN de ^{13}C e subespectro DEPT 135 do composto **6** (50 MHz, CDCl_3).

AIV.5 - Composto 7

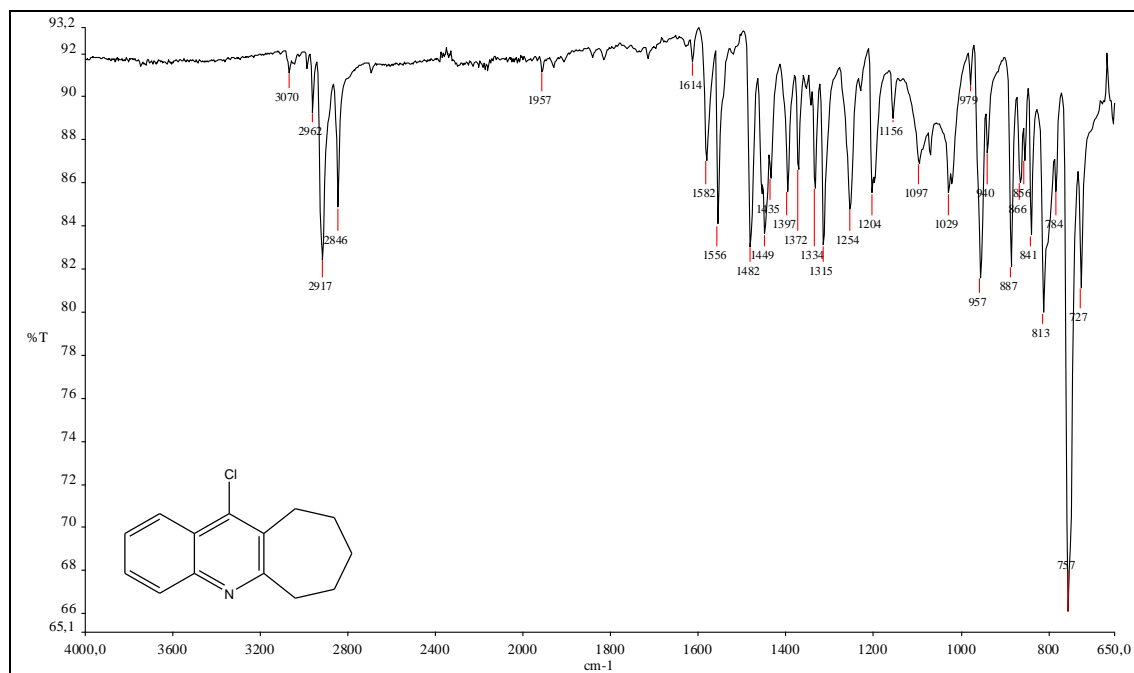
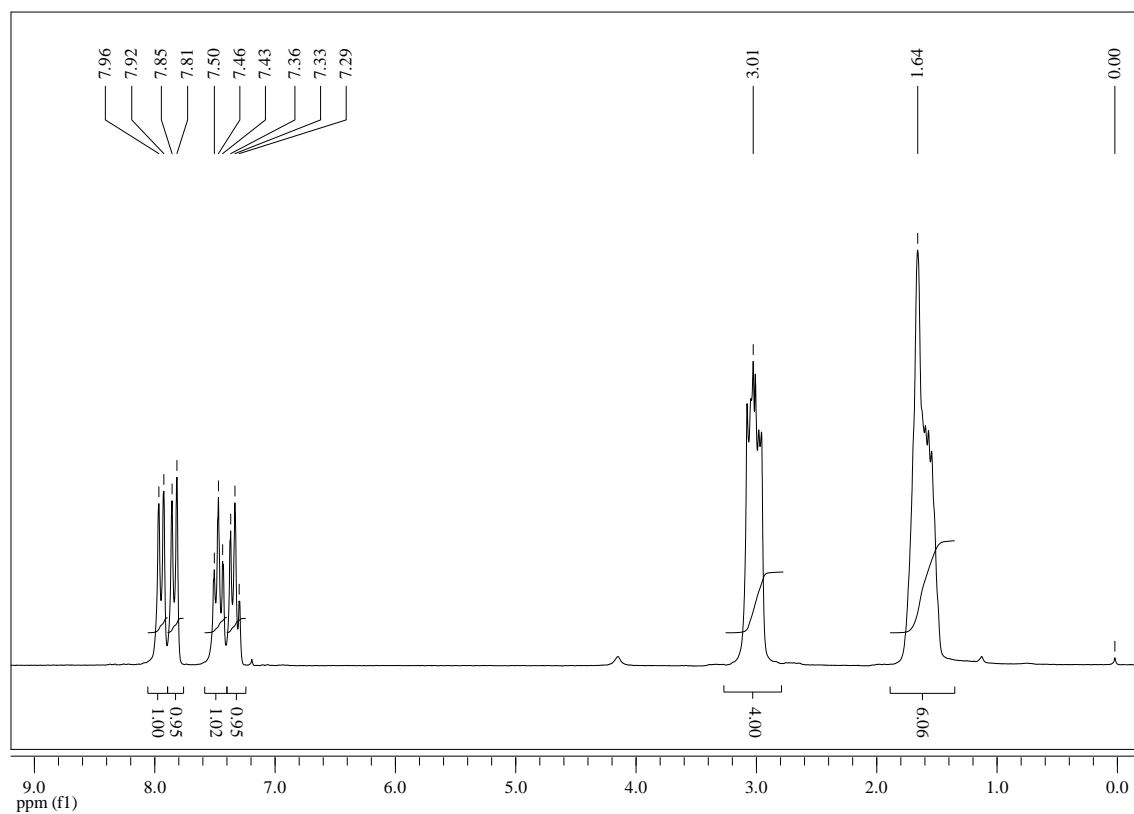


Figura AIV.13 – Espectro na região de IV do composto 7.

Figura AIV.14 – Espectro de RMN de ¹H do composto 7 (200 MHz, CDCl₃).

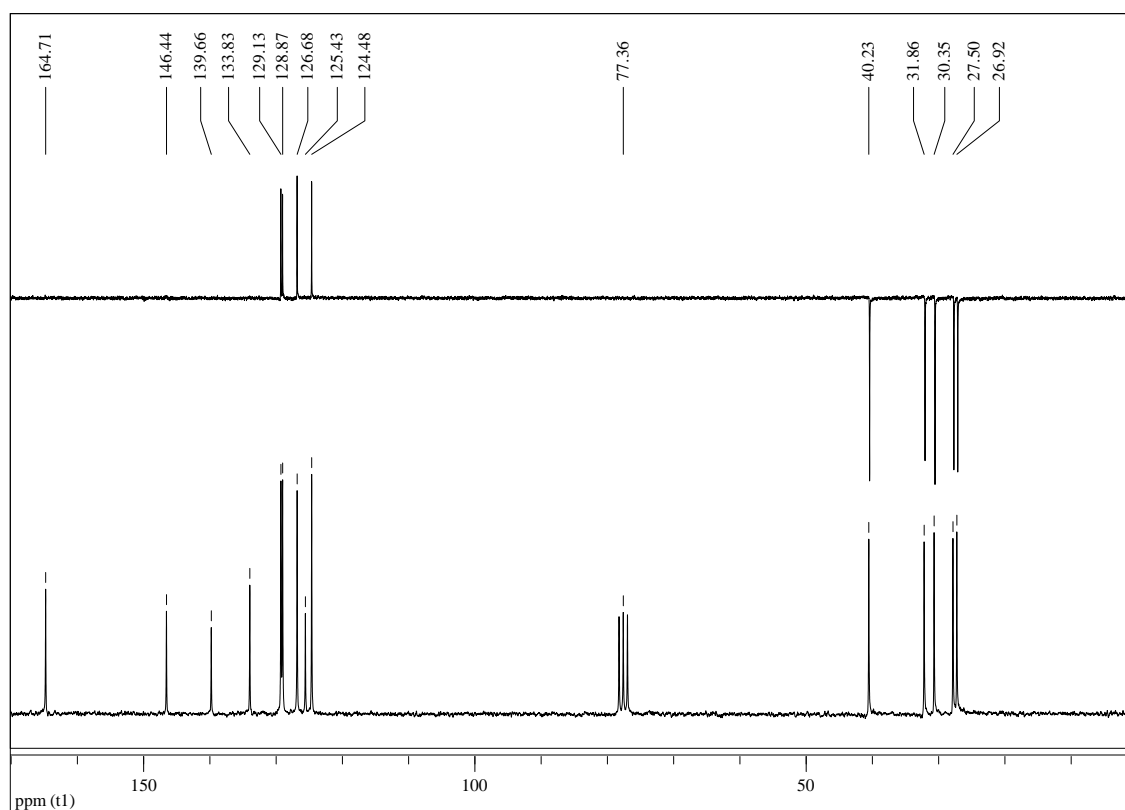


Figura AIV.15 – Espectro de RMN de ^{13}C e subspectro DEPT 135 do composto **7** (50 MHz, CDCl_3).

AIV.6 - Composto 14

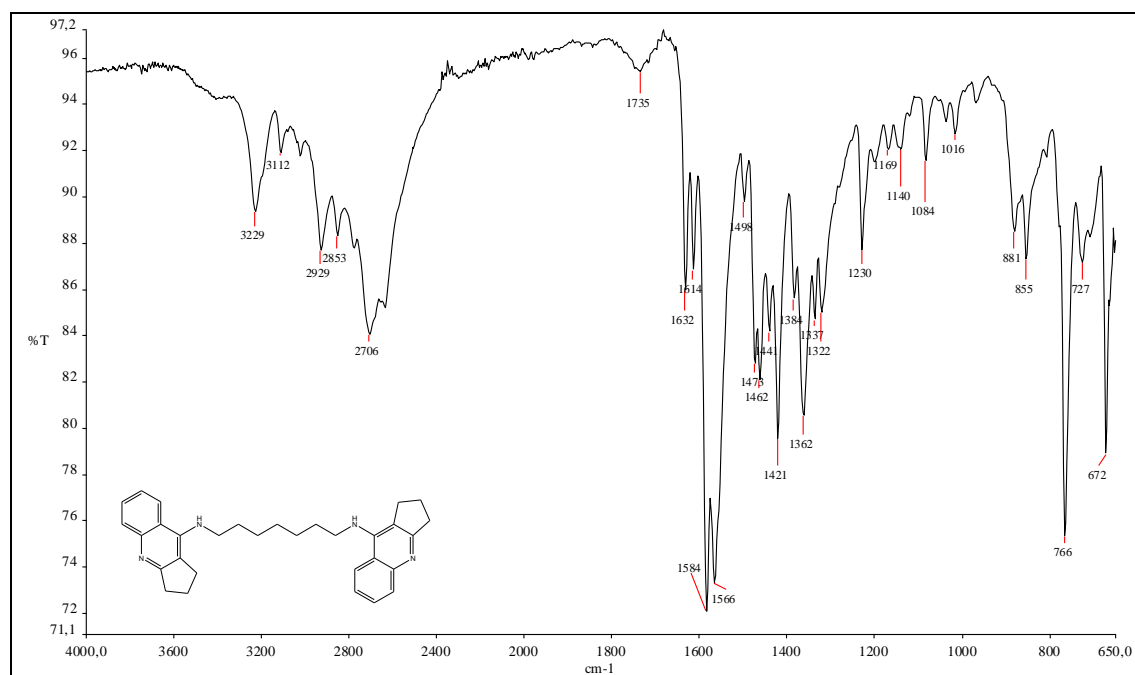


Figura AIV.16 – Espectro na região de IV do composto **14**.

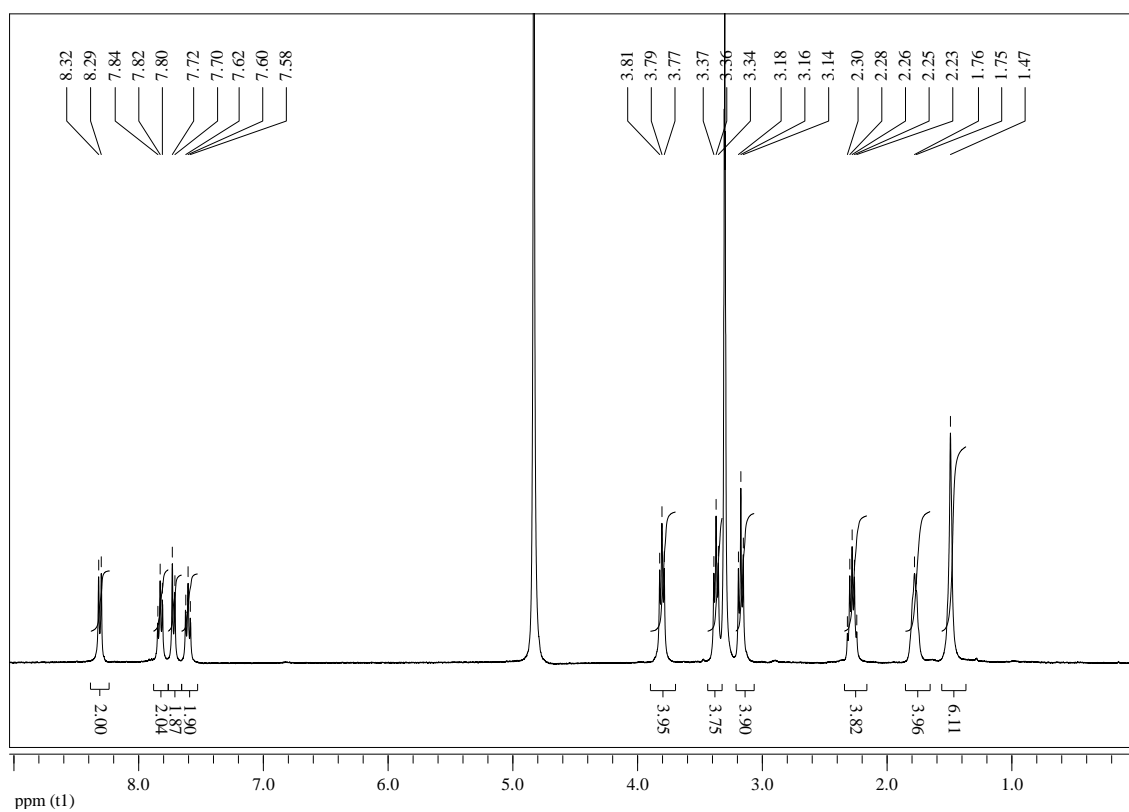


Figura AIV.17 – Espectro de RMN de ^1H do composto **14** (400 MHz, CD_3OD).

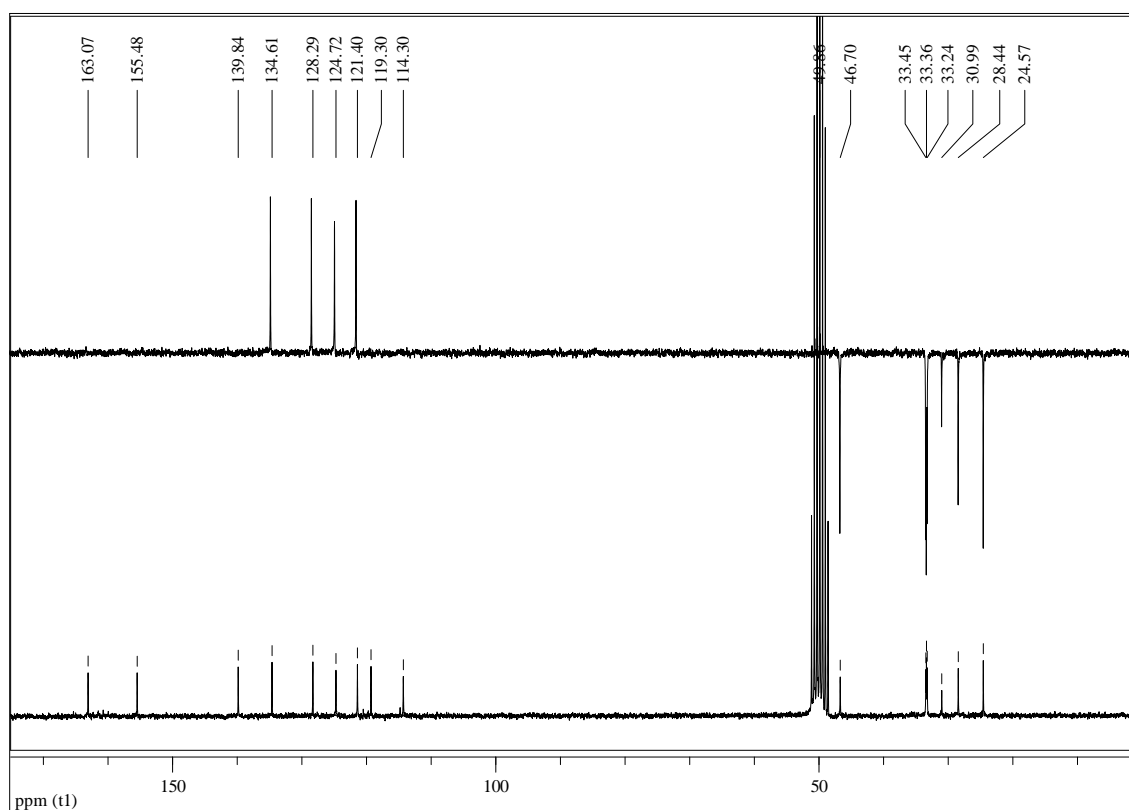


Figura AIV.18 – Espectro de RMN de ^{13}C e subspectro DEPT 135 do composto **14** (100 MHz, CD_3OD).

AIV.7 - Composto 15

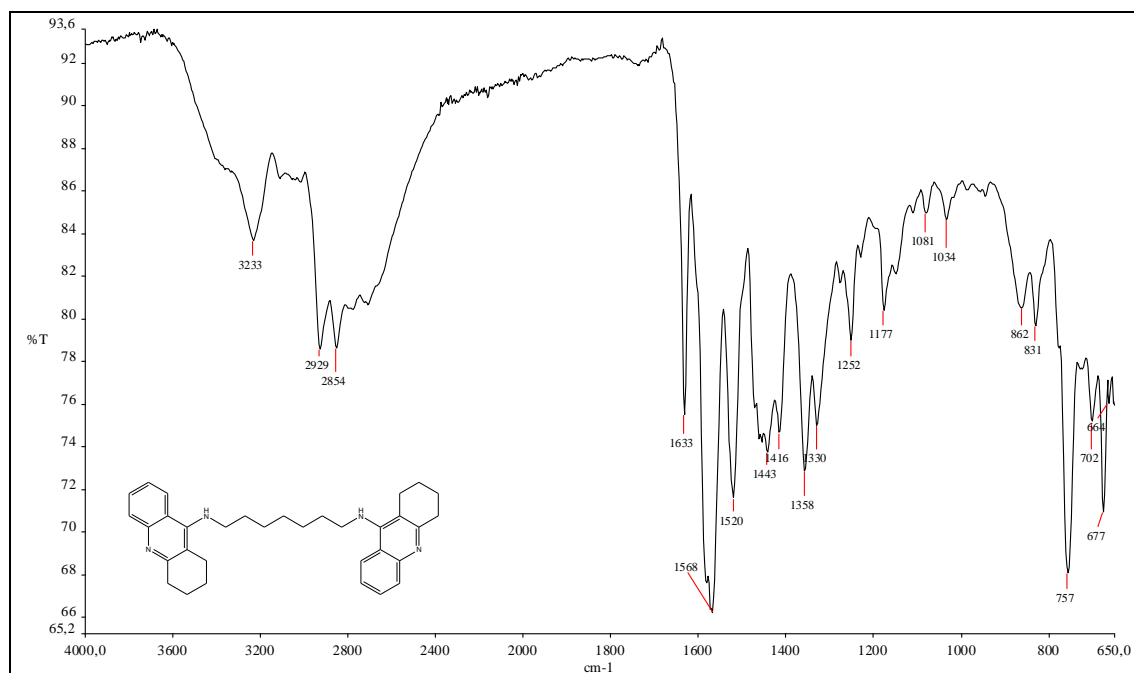
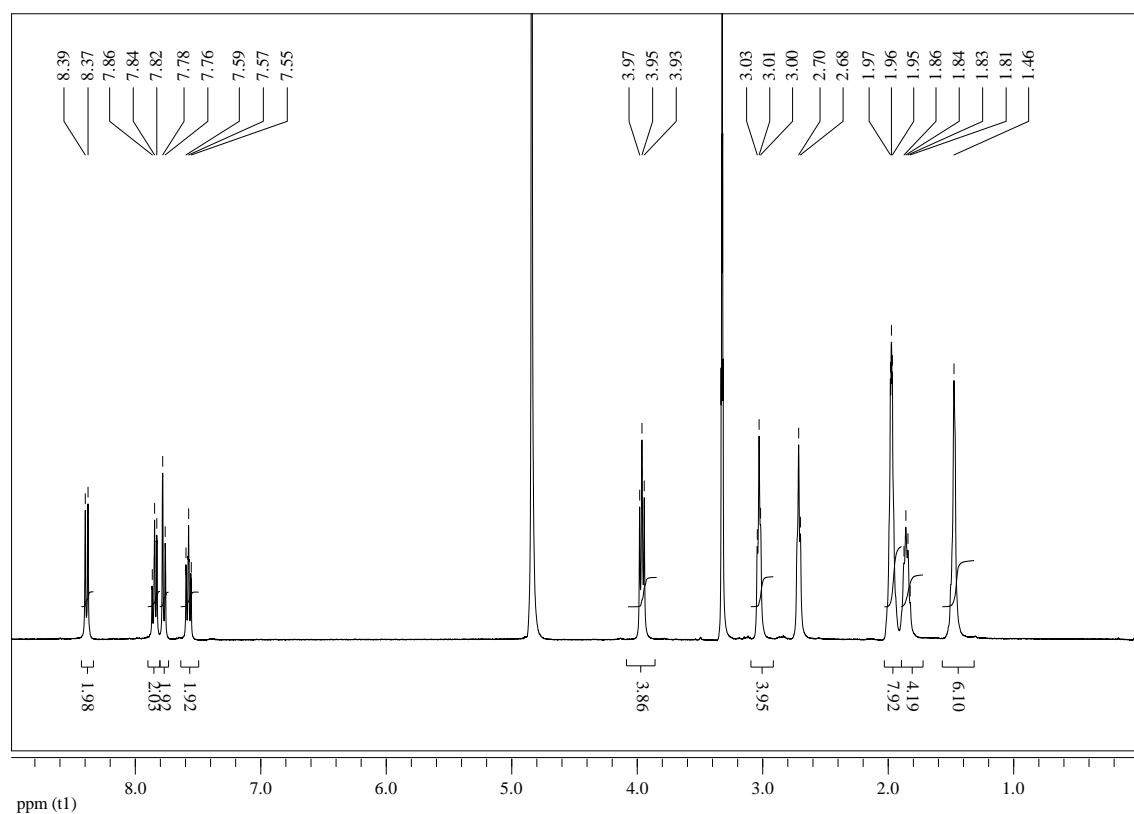


Figura AIV.19 – Espectro na região de IV do composto 15.

Figura AIV.20 – Espectro de RMN de ^1H do composto 15 (400 MHz, CD_3OD).

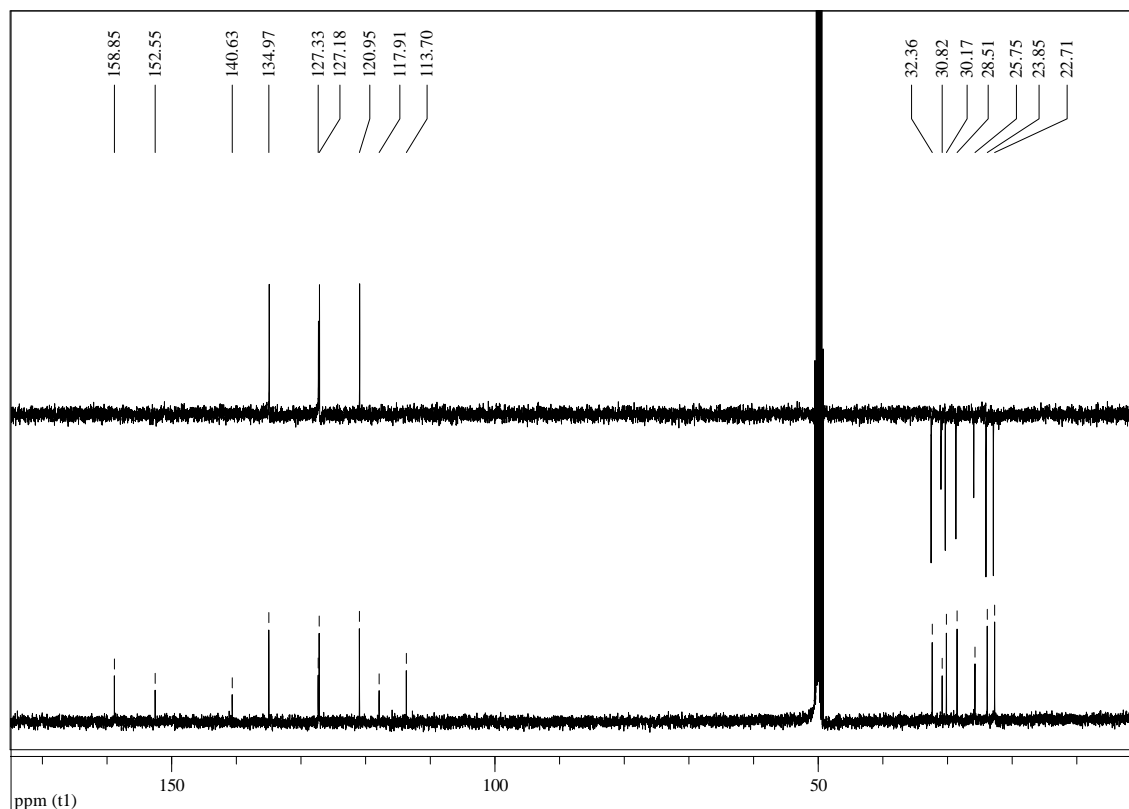


Figura AIV.21 – Espectro de RMN de ^{13}C e subspectro DEPT 135 do composto **15** (100 MHz, CD_3OD).

AIV.8 - Composto 16

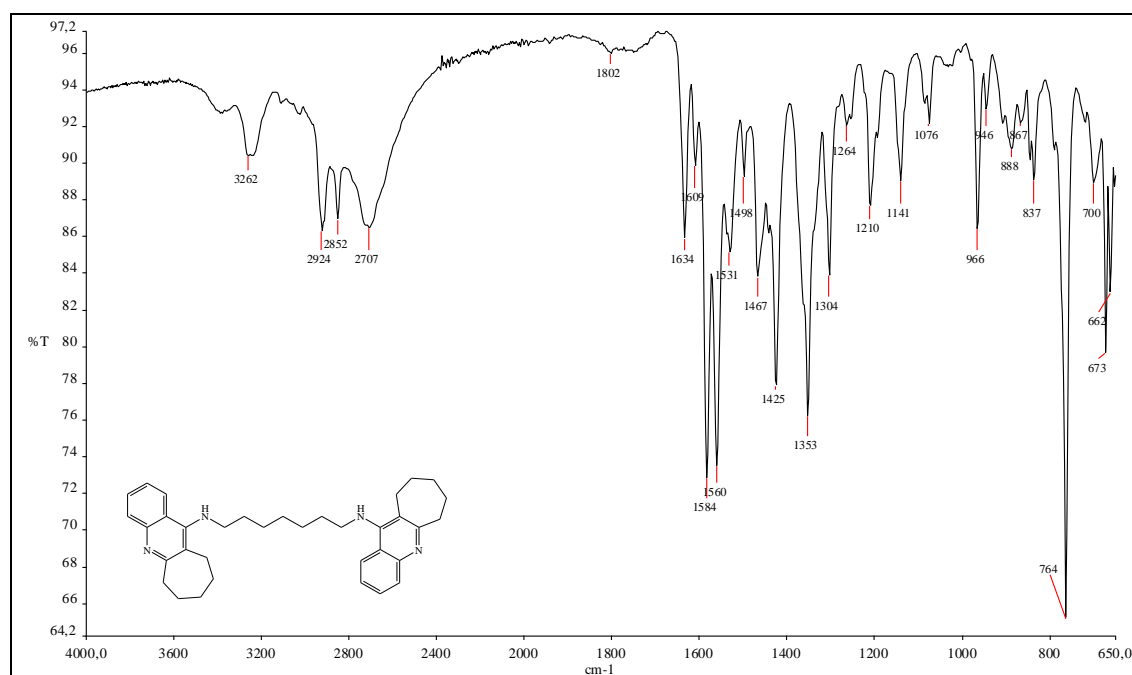


Figura AIV.22 – Espectro na região de IV do composto **16**.

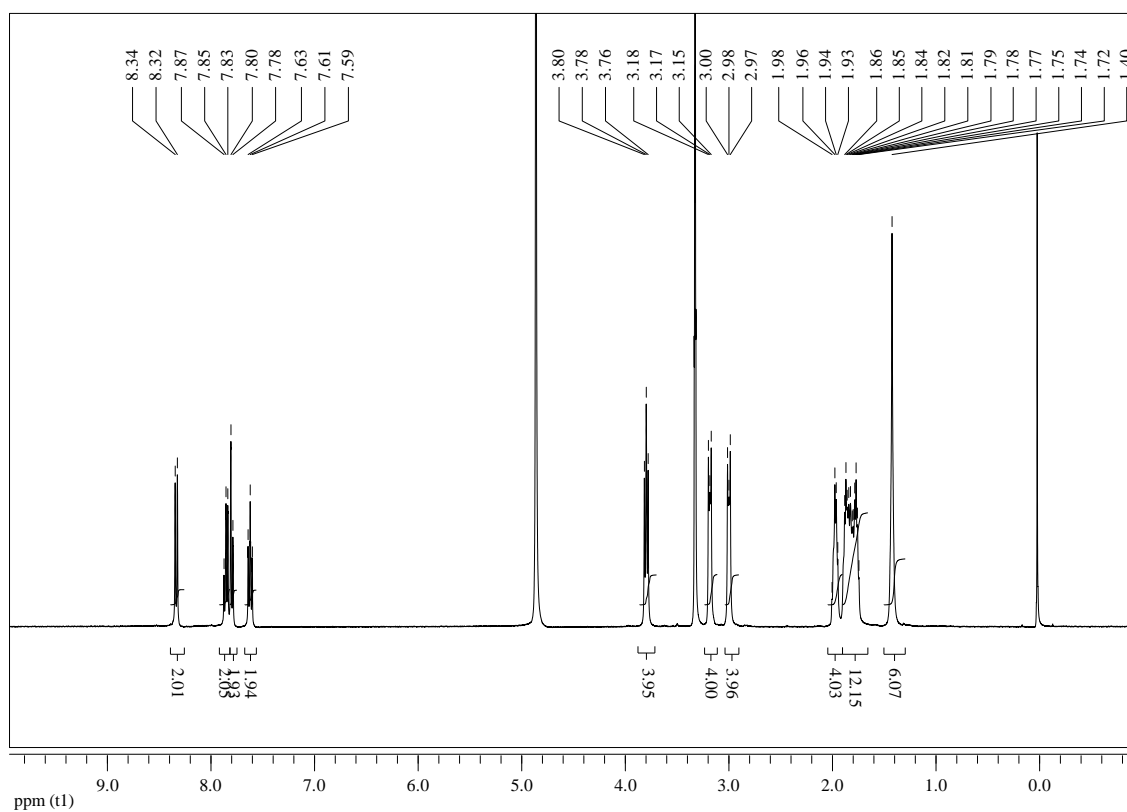


Figura AIV.23 – Espectro de RMN de ^1H do composto **16** (400 MHz, CD_3OD).

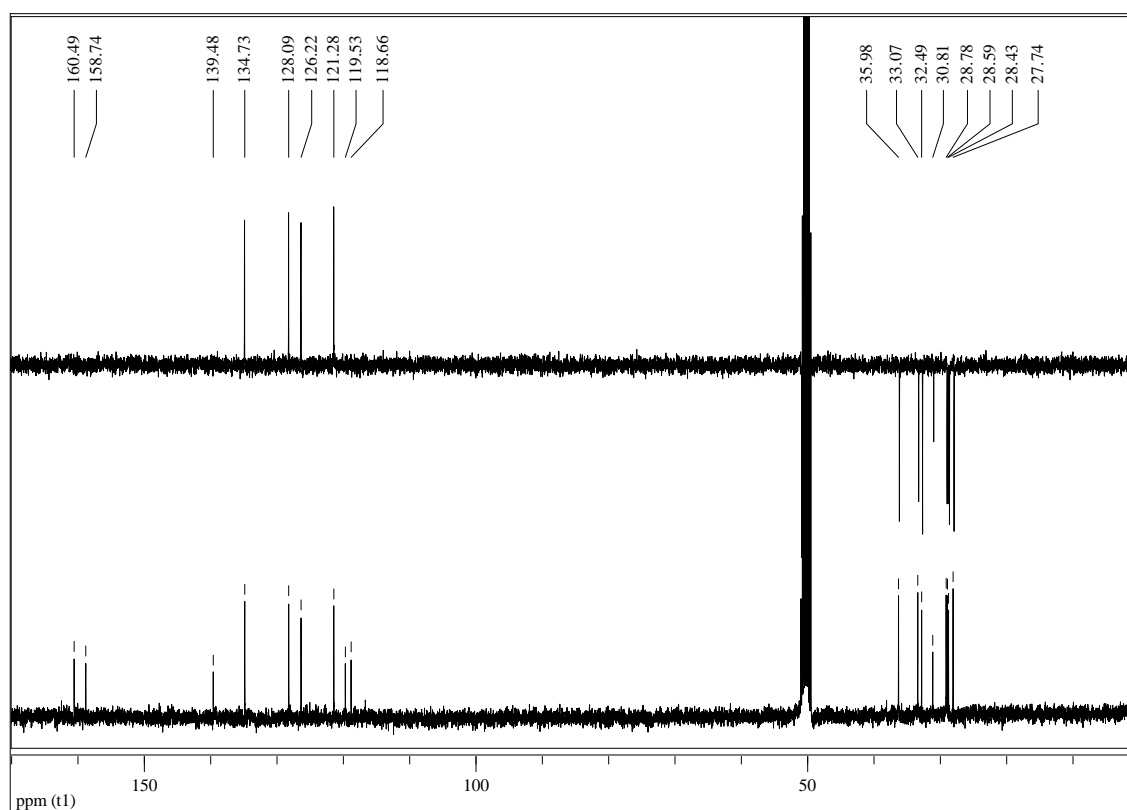


Figura AIV.24 – Espectro de RMN de ^{13}C e subspectro DEPT 135 do composto **16** (100 MHz, CD_3OD).

AIV.9 - Composto 17

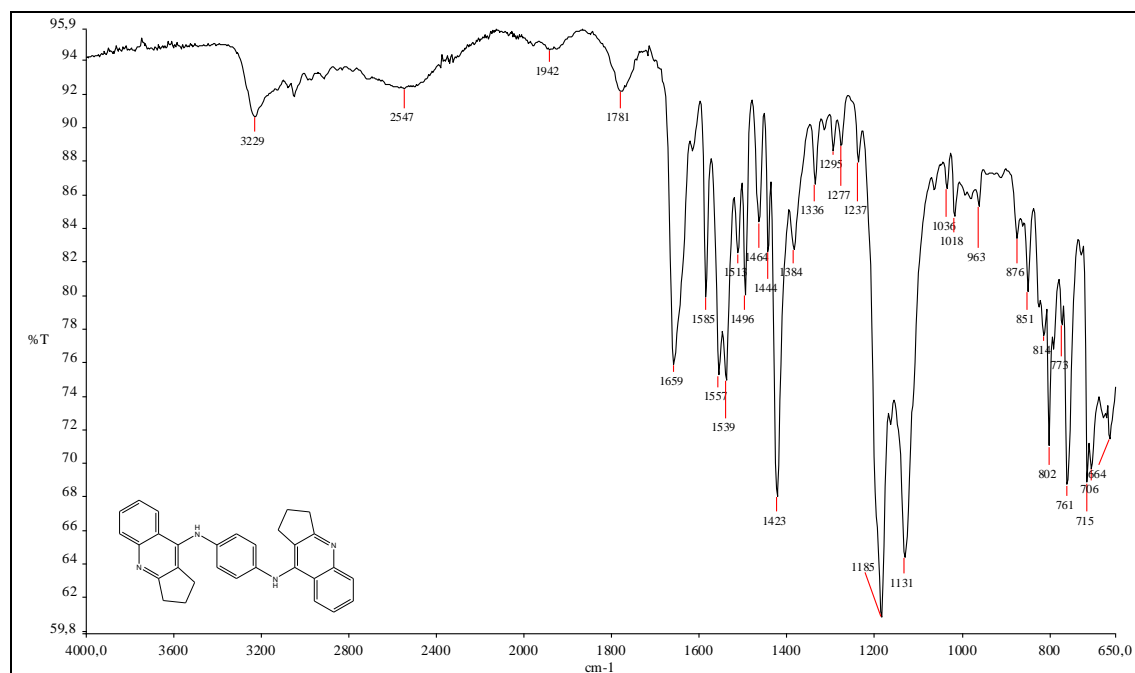
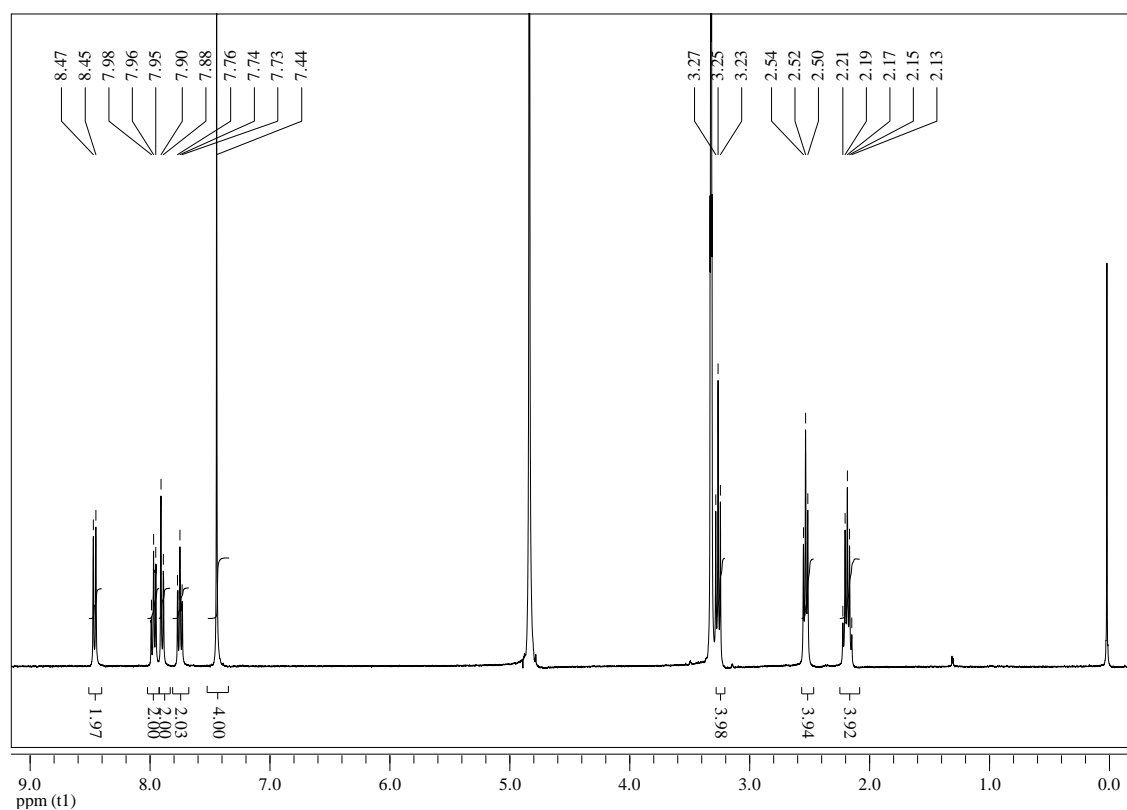


Figura AIV.25 – Espectro na região de IV do composto 17.

Figura AIV.26 – Espectro de RMN de ¹H do composto 17 (400 MHz, CD₃OD).

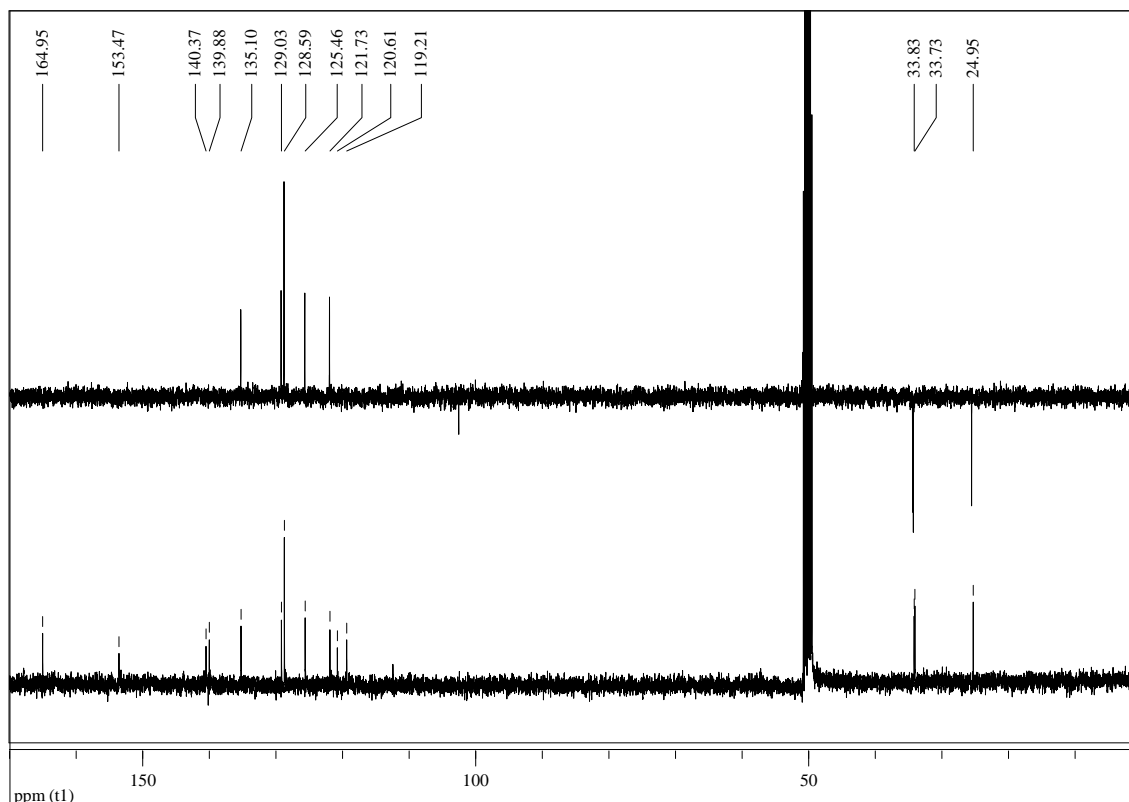


Figura AIV.27 – Espectro de RMN de ^{13}C e subspectro DEPT 135 do **17** (100 MHz, CD_3OD).

AIV.10 - Composto 18

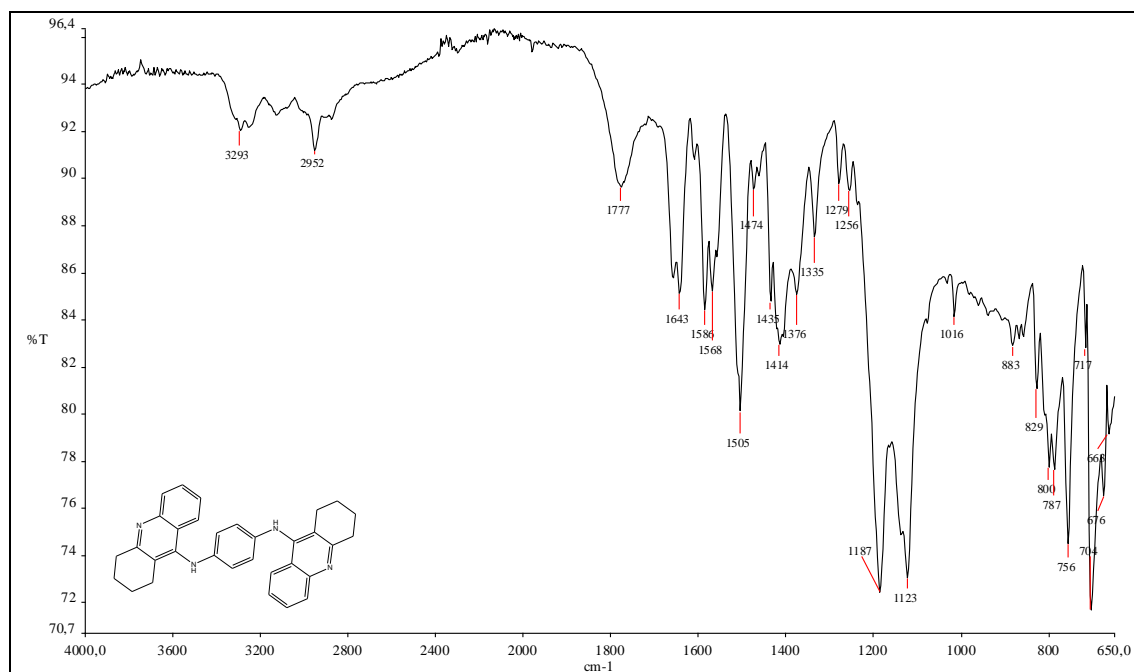


Figura AIV.28 – Espectro na região de IV do composto **18**.

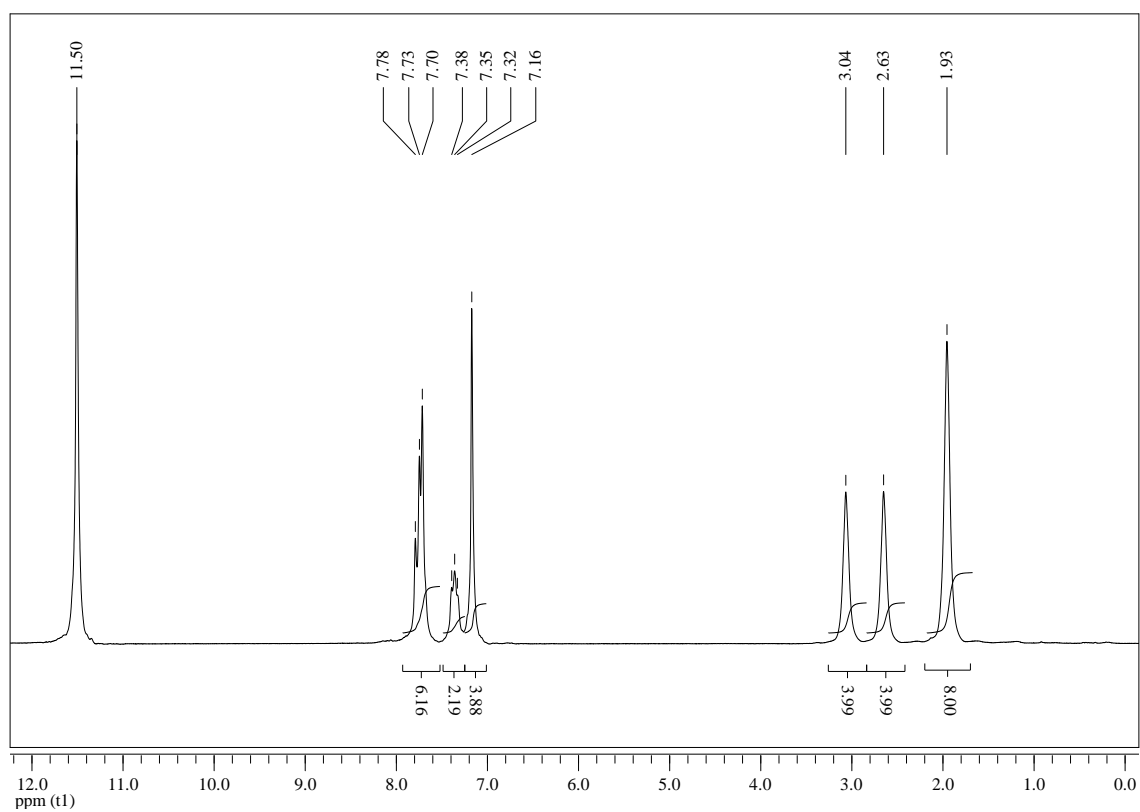


Figura AIV.29 – Espectro de RMN de ^1H do composto **18** (200 MHz, $\text{CF}_3\text{O}_2\text{D}$).

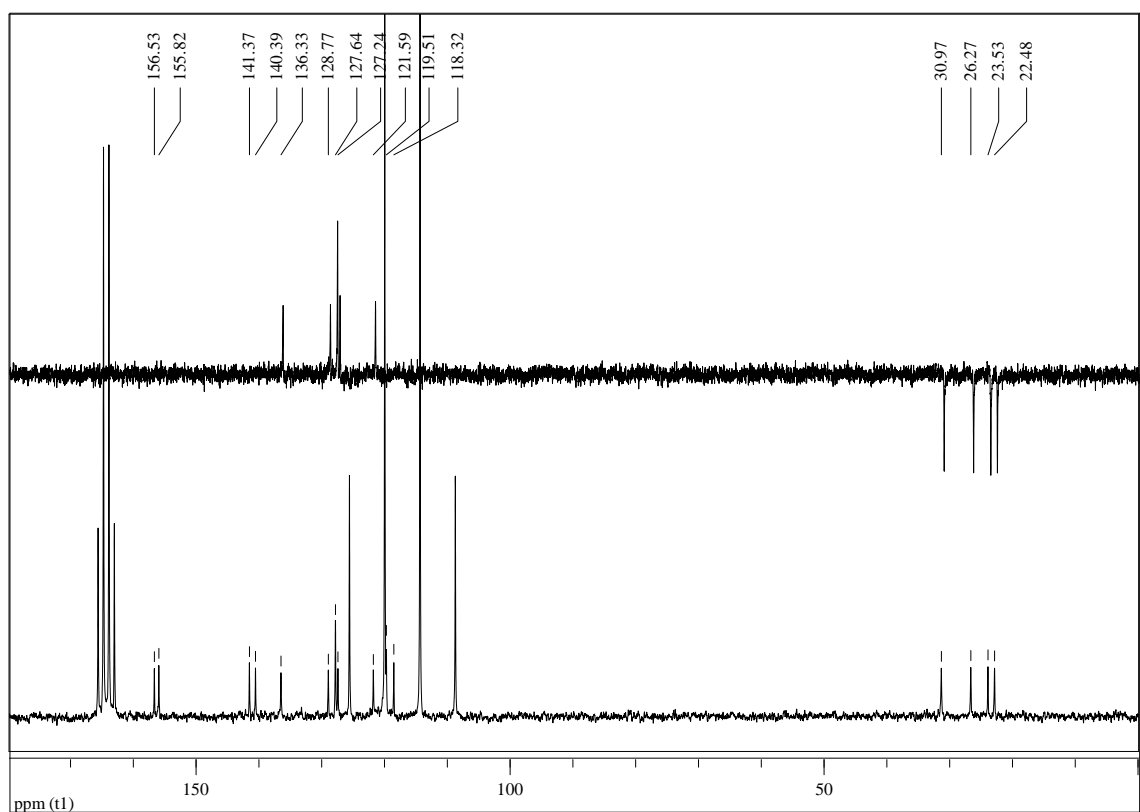


Figura AIV.30 – Espectro de RMN de ^{13}C e subspectro DEPT 135 do composto **18** (100 MHz, $\text{CF}_3\text{O}_2\text{D}$).

AIV.11 - Composto 19

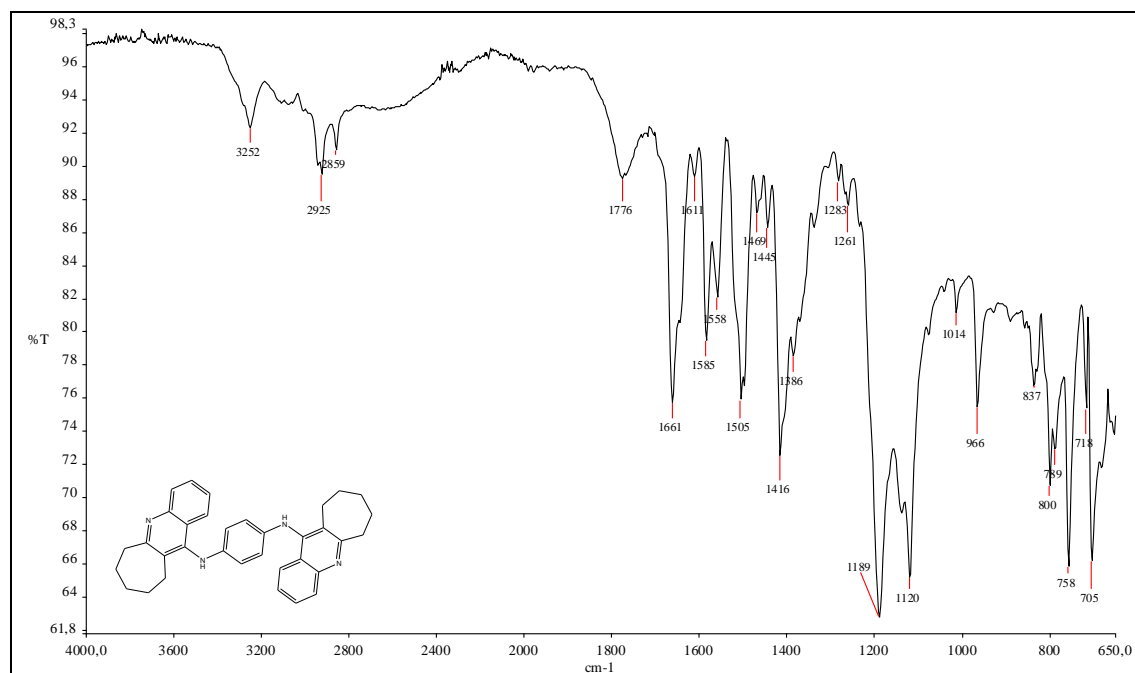
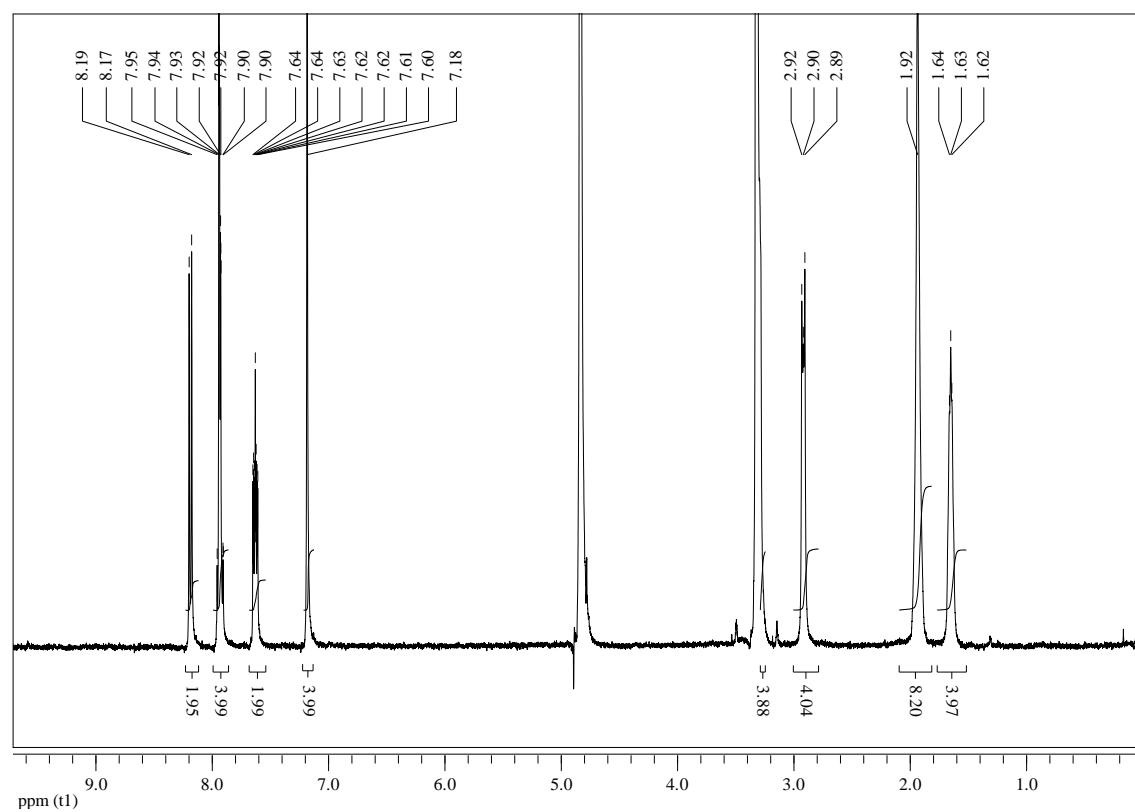


Figura AIV.31 – Espectro na região de IV do composto 19.

Figura AIV.32 – Espectro de RMN de ¹H do composto 19 (400 MHz, CD₃OD).

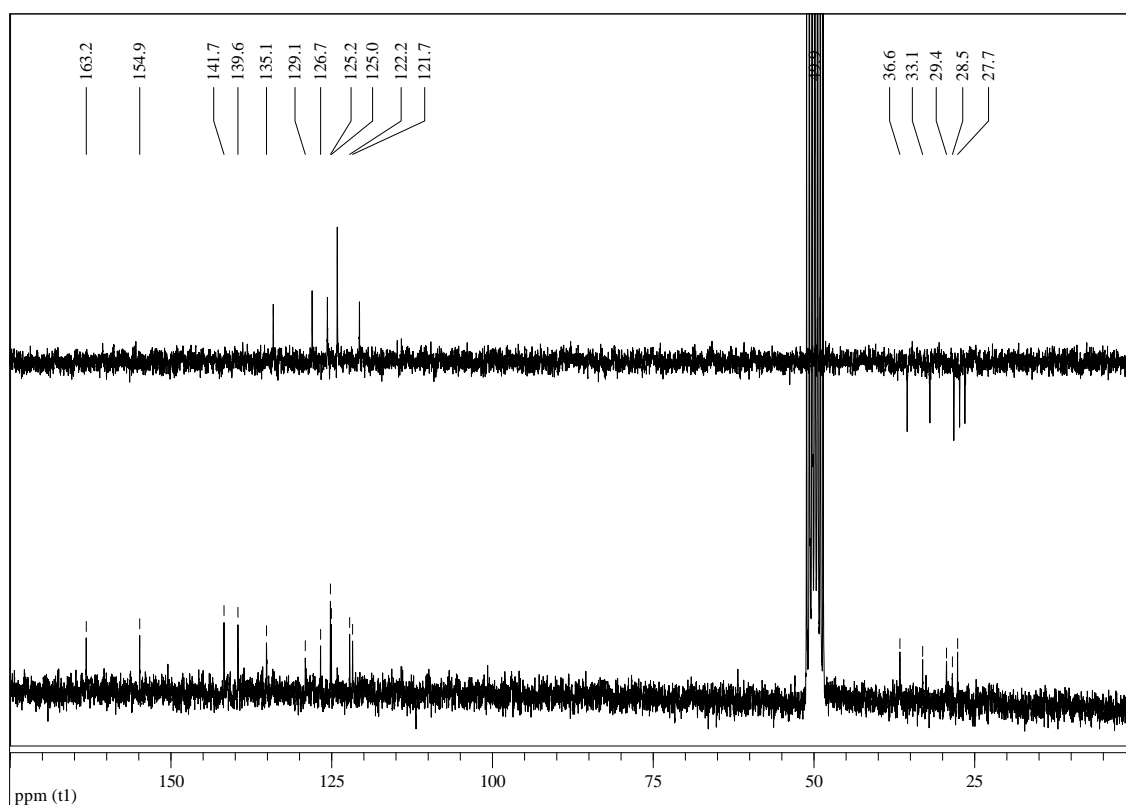


Figura AIV.33 – Espectro de RMN de ^{13}C e subspectro DEPT 135 do **19** (100 MHz, CD_3OD).

AIV.12 - Composto 20

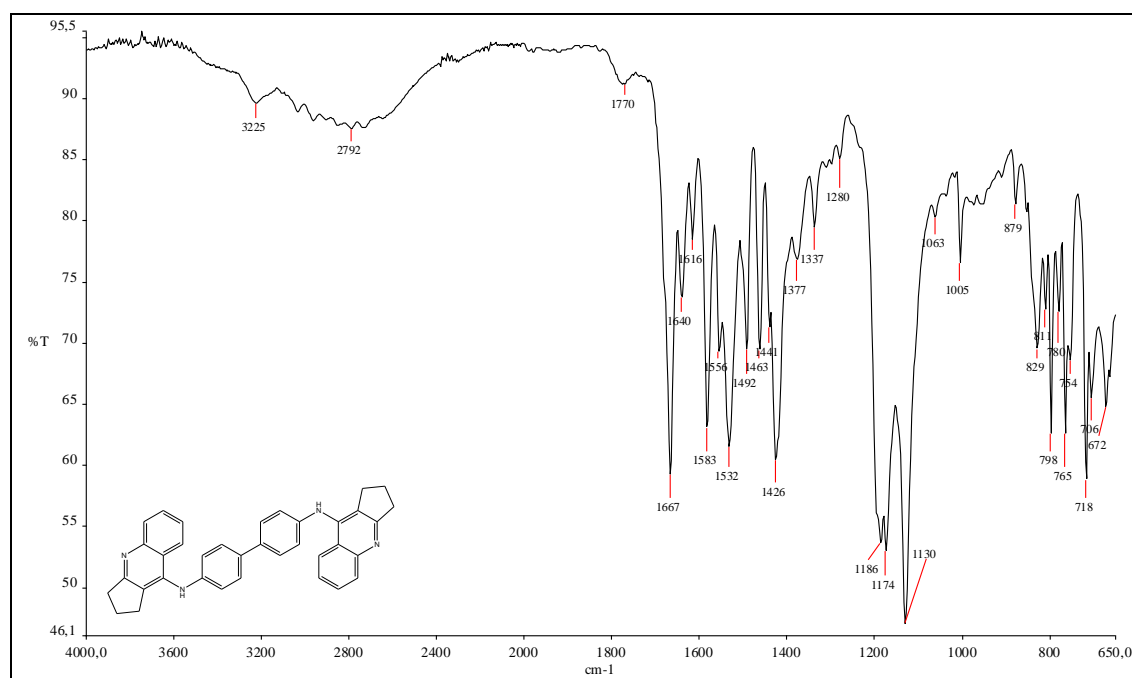


Figura AIV.34 – Espectro na região de IV do composto **20**.

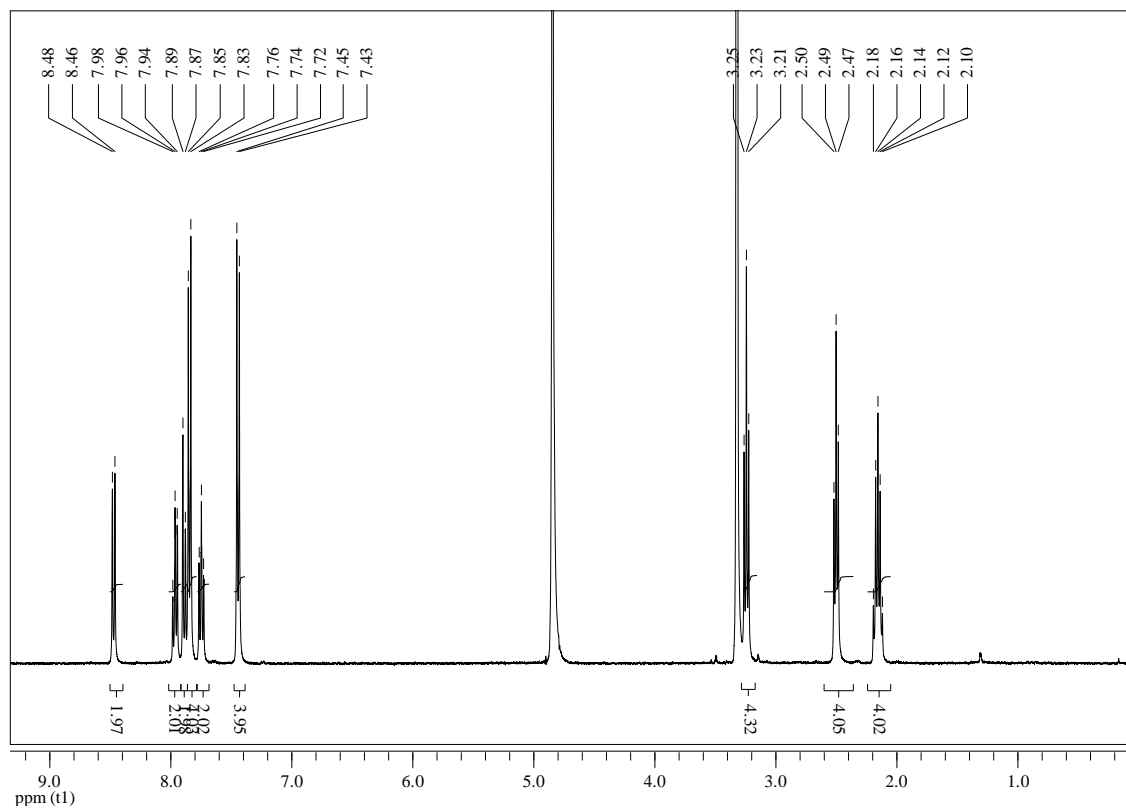


Figura AIV.35 – Espectro de RMN de ^1H do composto **20** (400 MHz, CD_3OD).

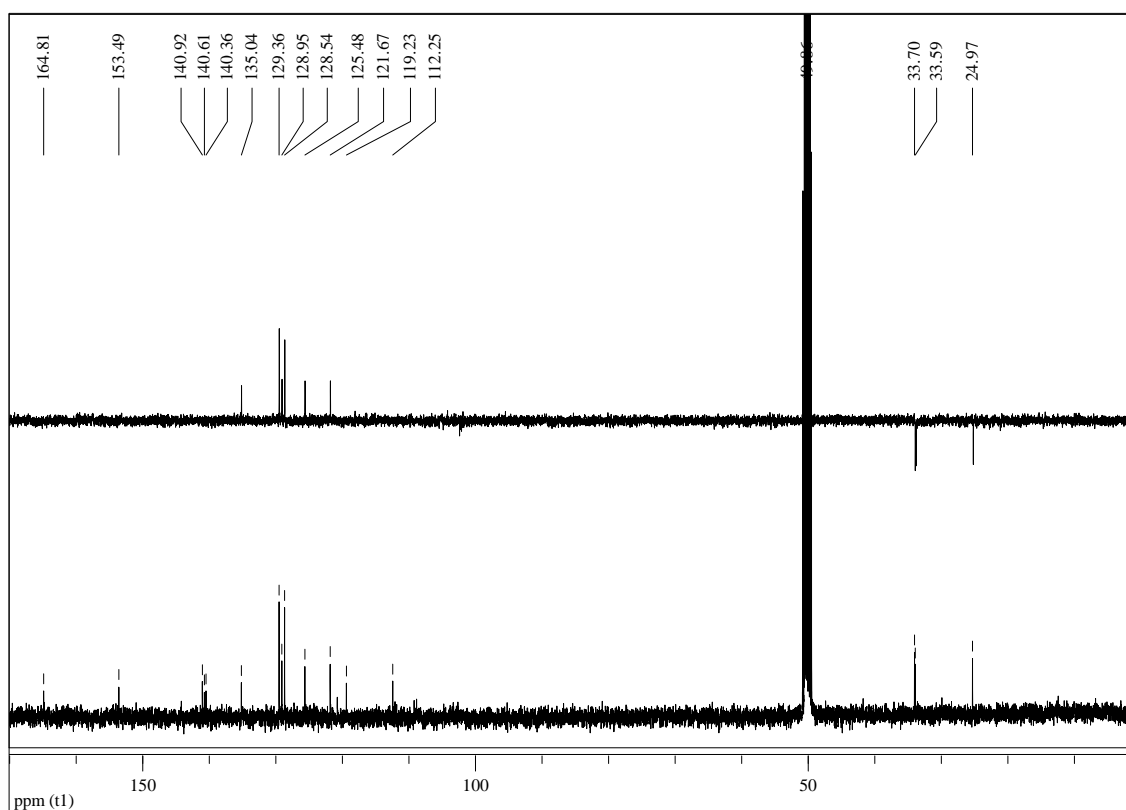
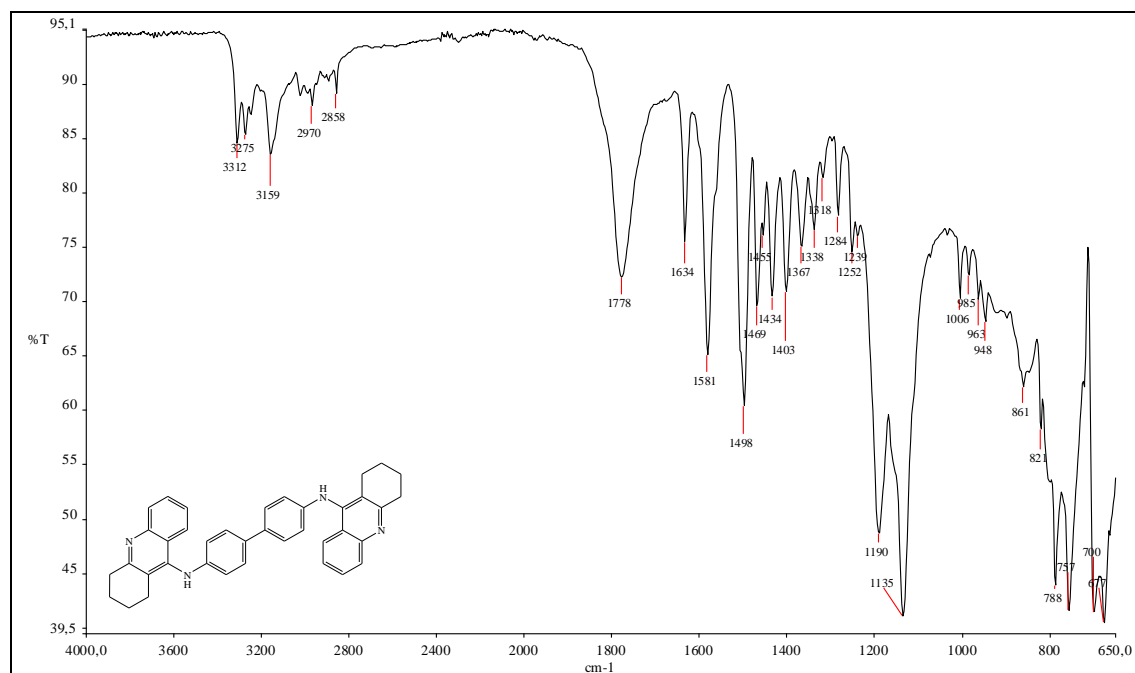
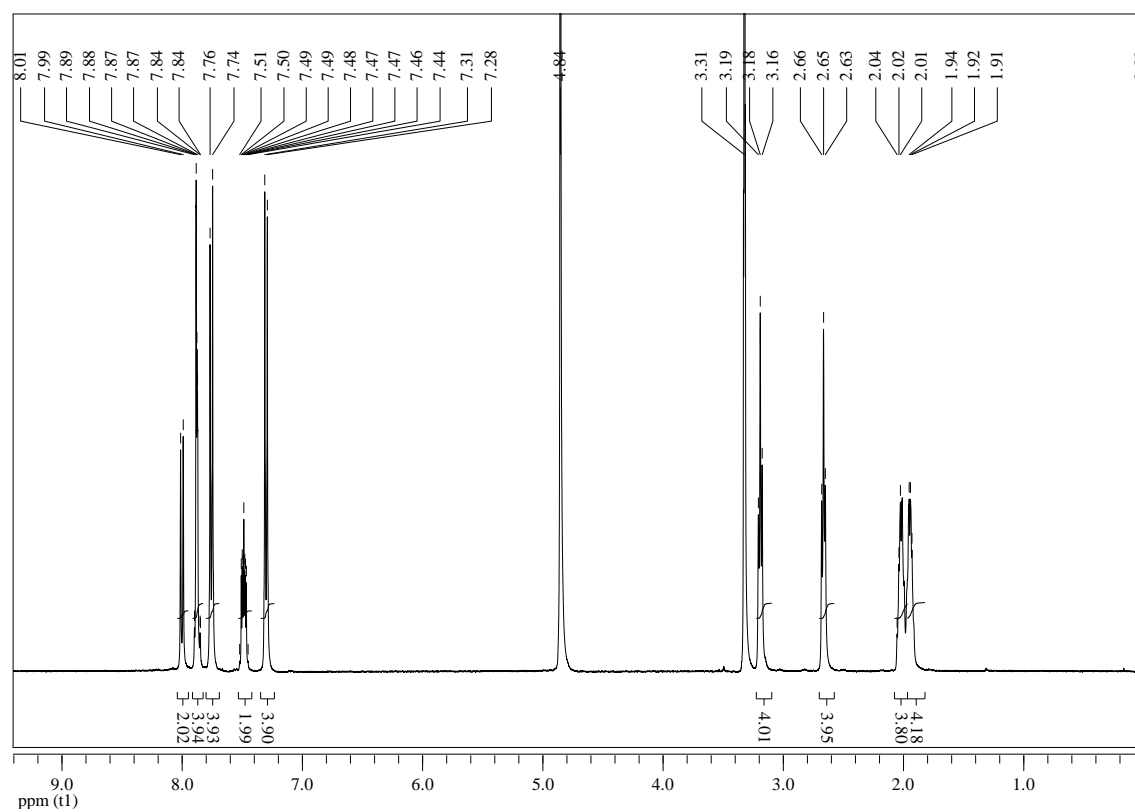


Figura AIV.36 – Espectro de RMN de ^{13}C e subspectro DEPT 135 do composto **20** (100 MHz, CD_3OD).

AIV.13 - Composto 21

Figura AIV.37 – Espectro na região de IV do composto **21**.Figura AIV.38 – Espectro de RMN de ¹H do composto **21** (400 MHz, CD₃OD).

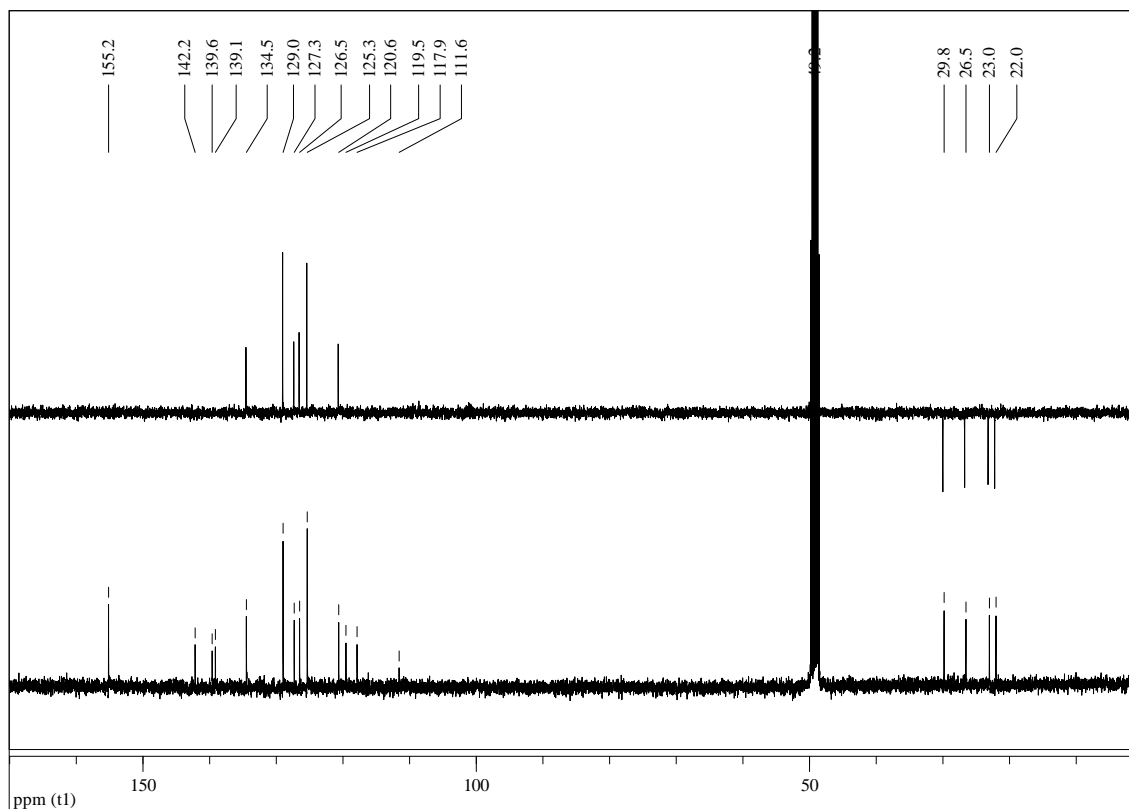


Figura AIV.39 – Espectro de RMN de ^{13}C e subspectro DEPT 135 do composto **21** (100 MHz, CD_3OD).

AIV.14 - Composto **22**

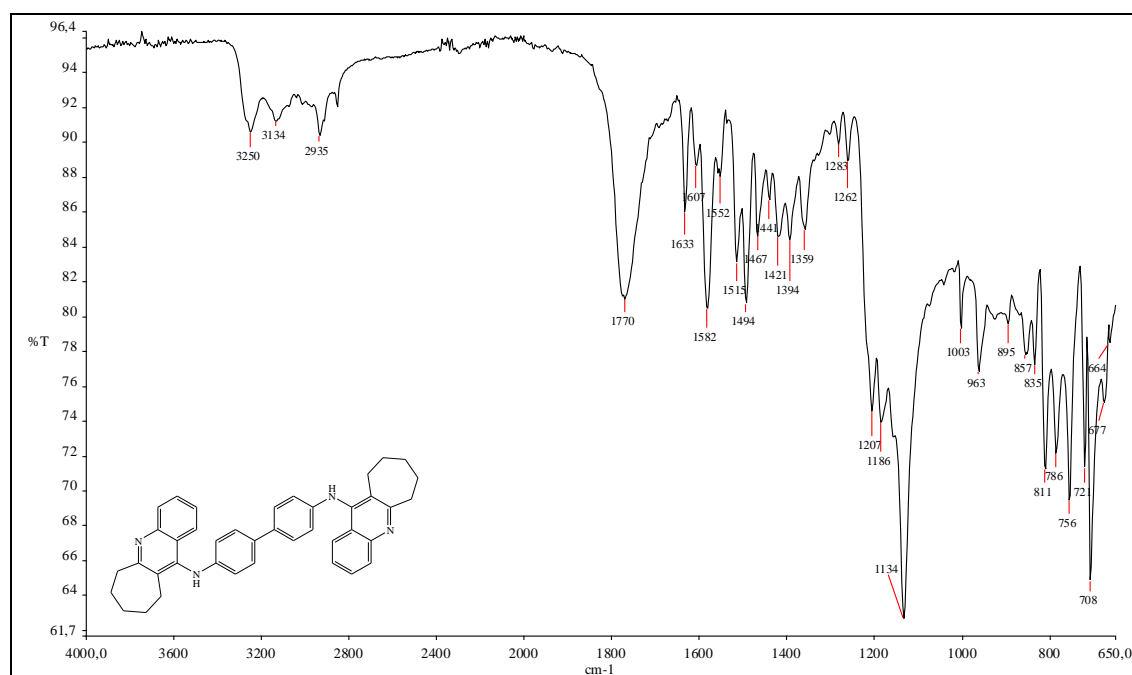


Figura AIV.40 – Espectro na região de IV do composto **22**.

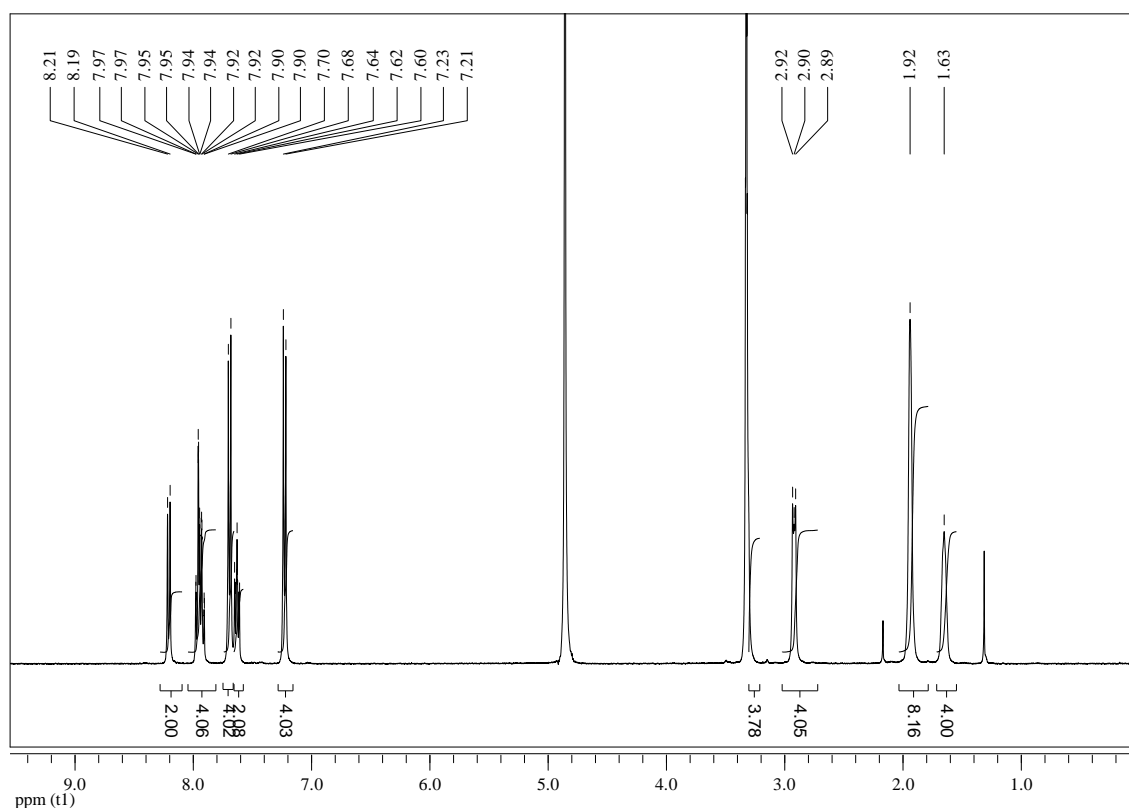


Figura AIV.41– Espectro de RMN de ^1H do composto **22** (400 MHz, CD_3OD).

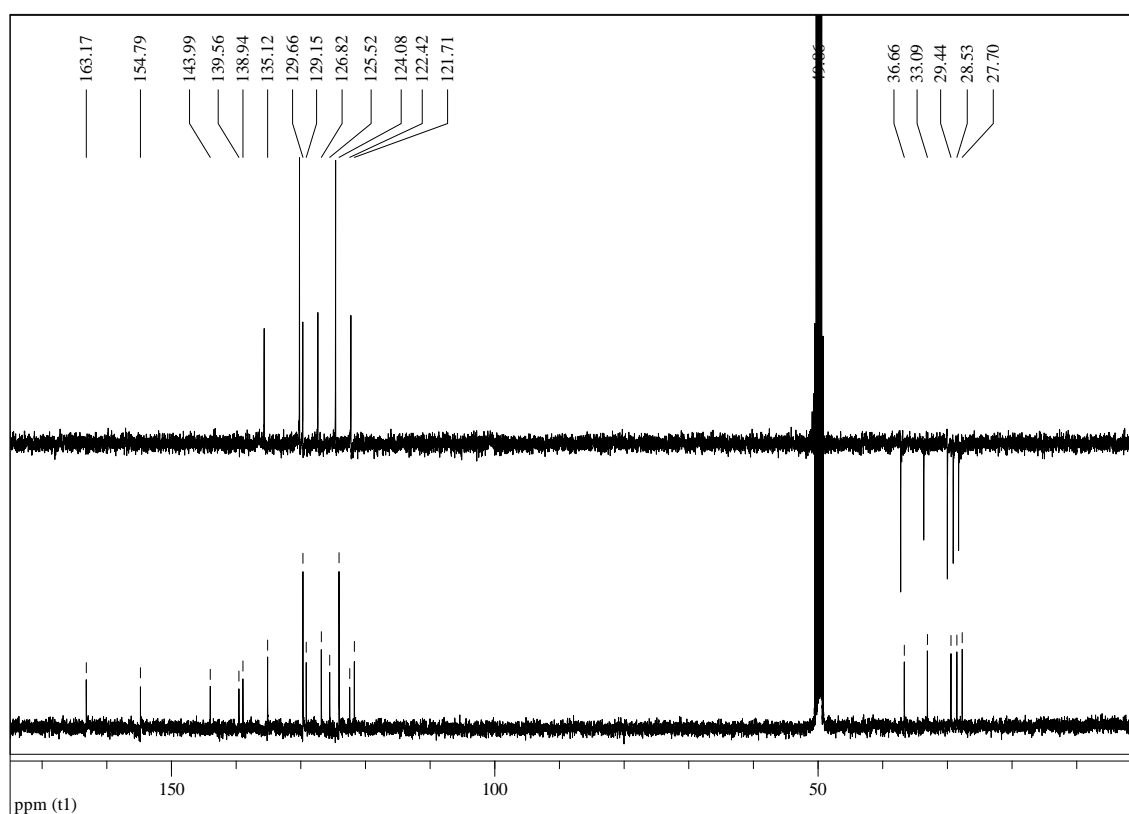


Figura AIV.42 – Espectro de RMN de ^{13}C e subspectro DEPT 135 do composto **22** (100 MHz, CD_3OD).

AIV.15 - Composto 23

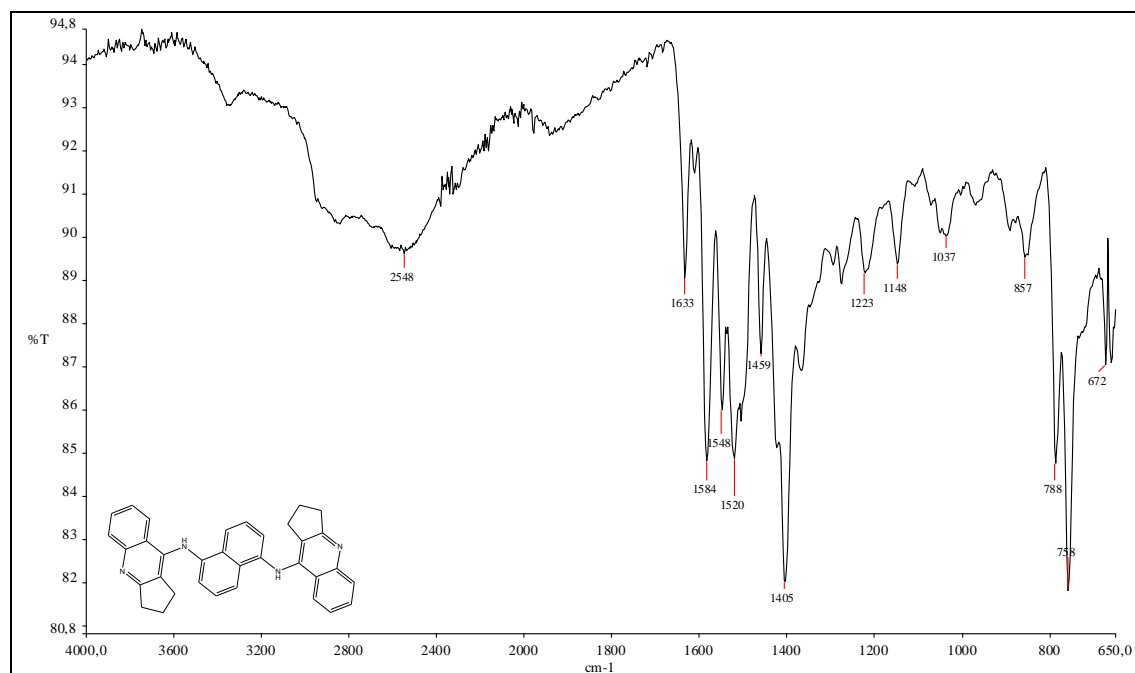
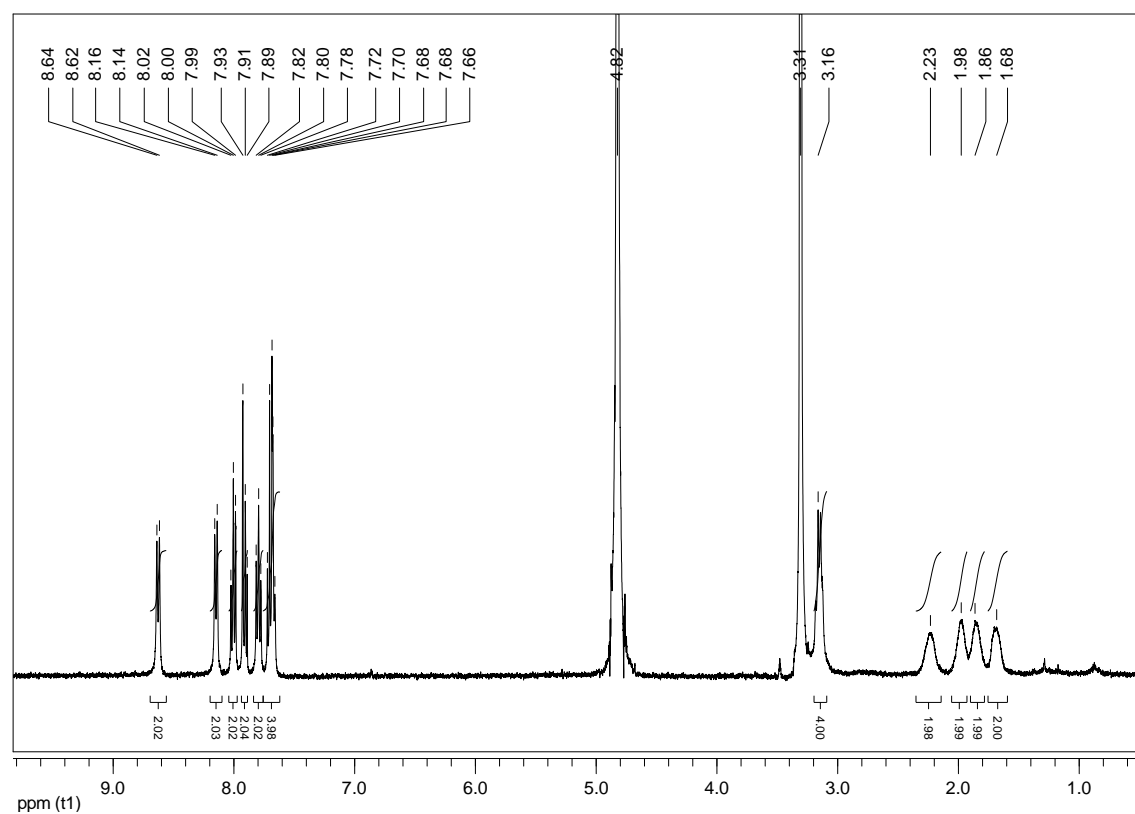


Figura AIV.43 – Espectro na região de IV do composto 23.

Figura AIV.44 – Espectro de RMN de ¹H do composto 23 (400 MHz, CD₃OD).

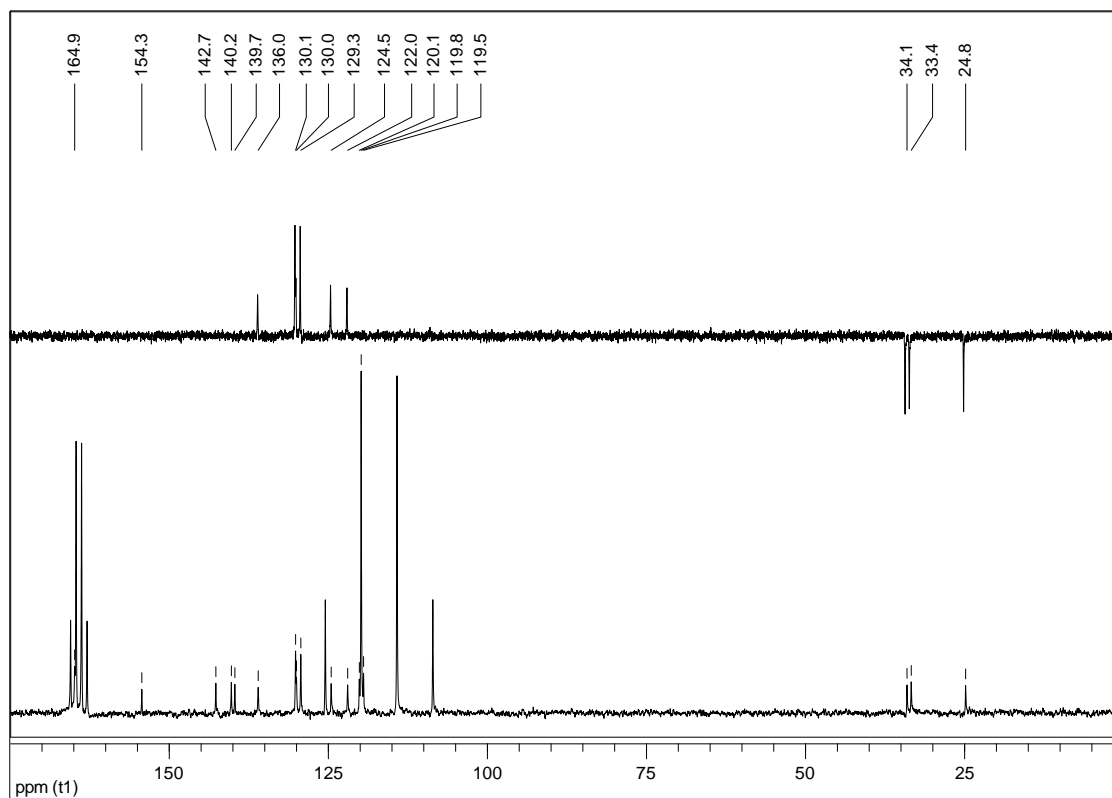


Figura AIV.45 – Espectro de RMN de ^{13}C e subspectro DEPT 135 do composto **23** (100 MHz, $\text{CF}_3\text{O}_2\text{D}$).

AIV.16 - Composto **24**

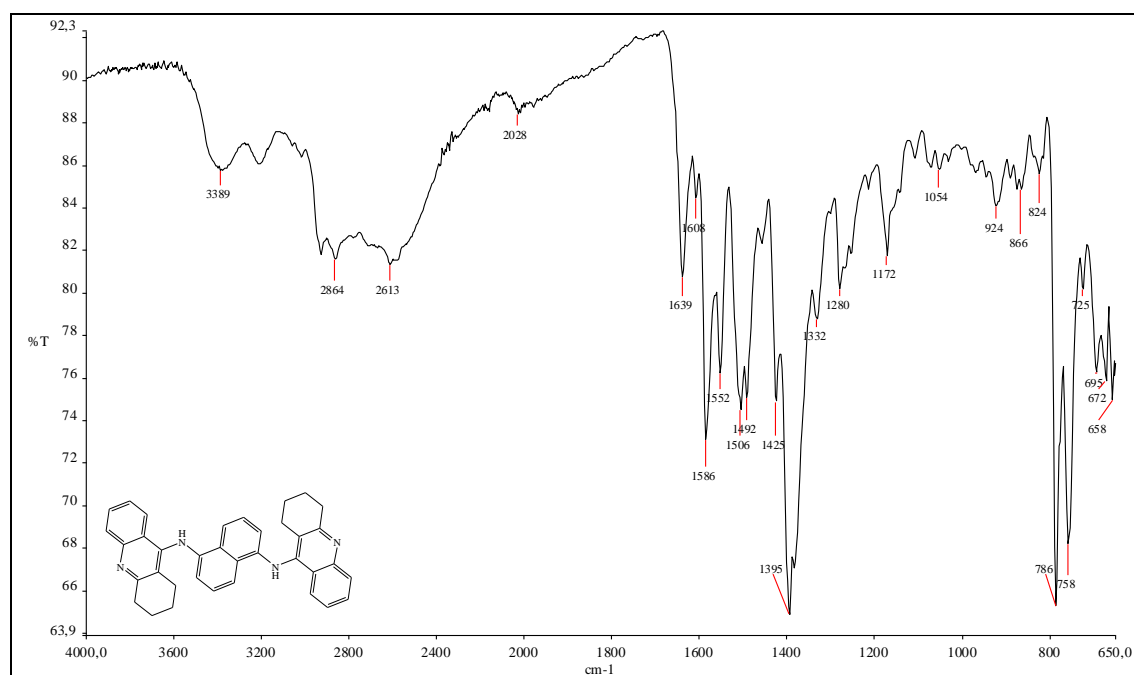


Figura AIV.46 – Espectro na região de IV composto **24**.

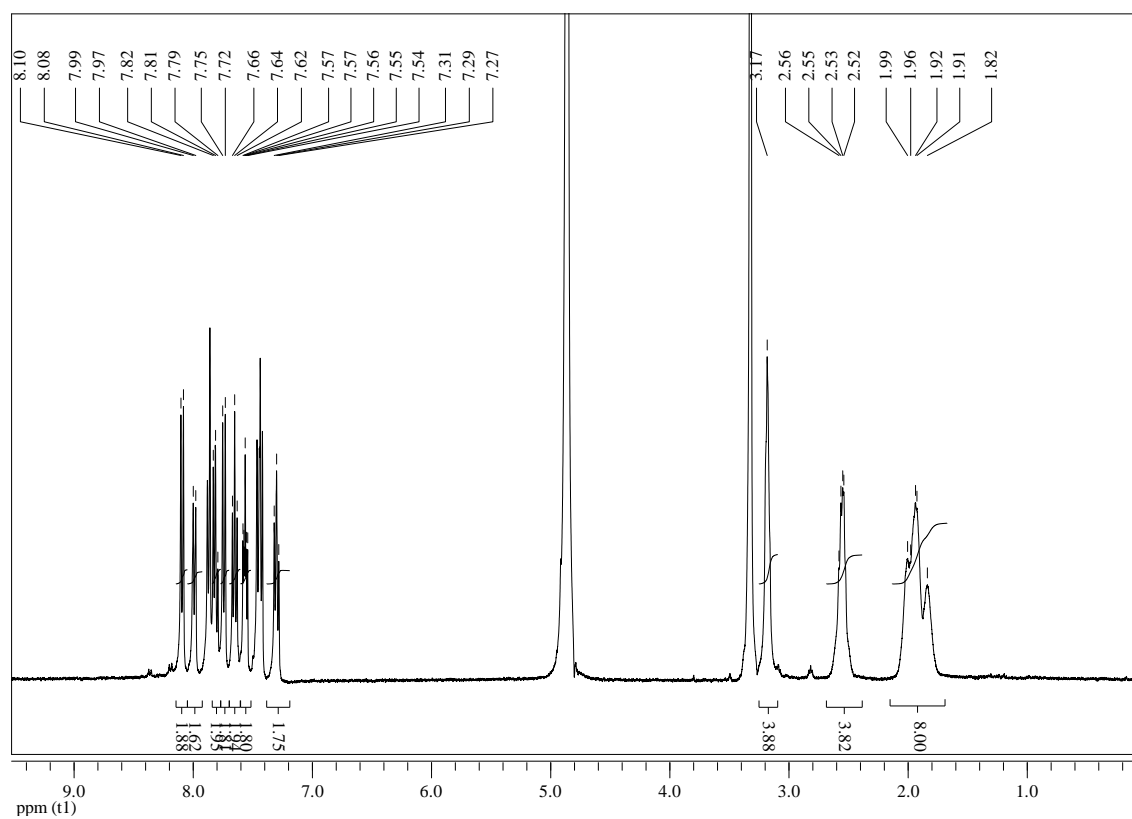


Figura AIV.47 – Espectro de RMN de ^1H do composto **24** (400 MHz, CD_3OD).

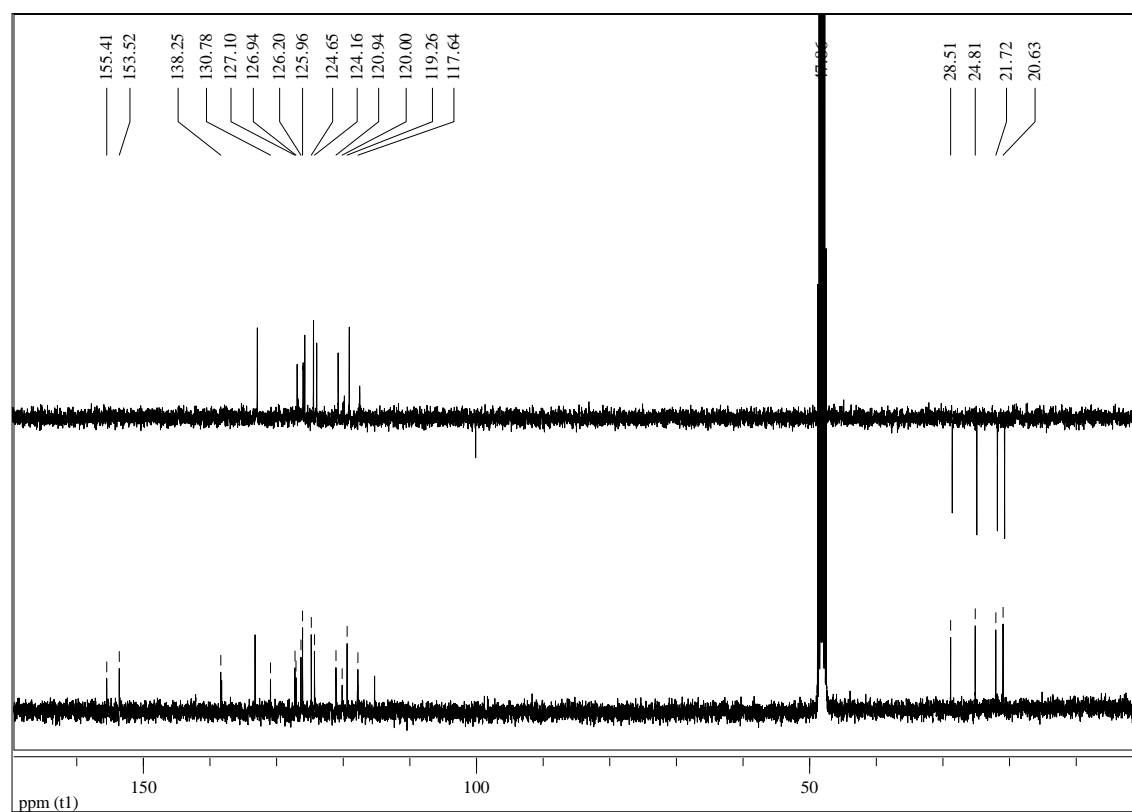


Figura AIV.48 – Espectro de RMN de ^{13}C e subspectro DEPT 135 do composto **24** (100 MHz, CD_3OD).

AIV.17 - Composto 25

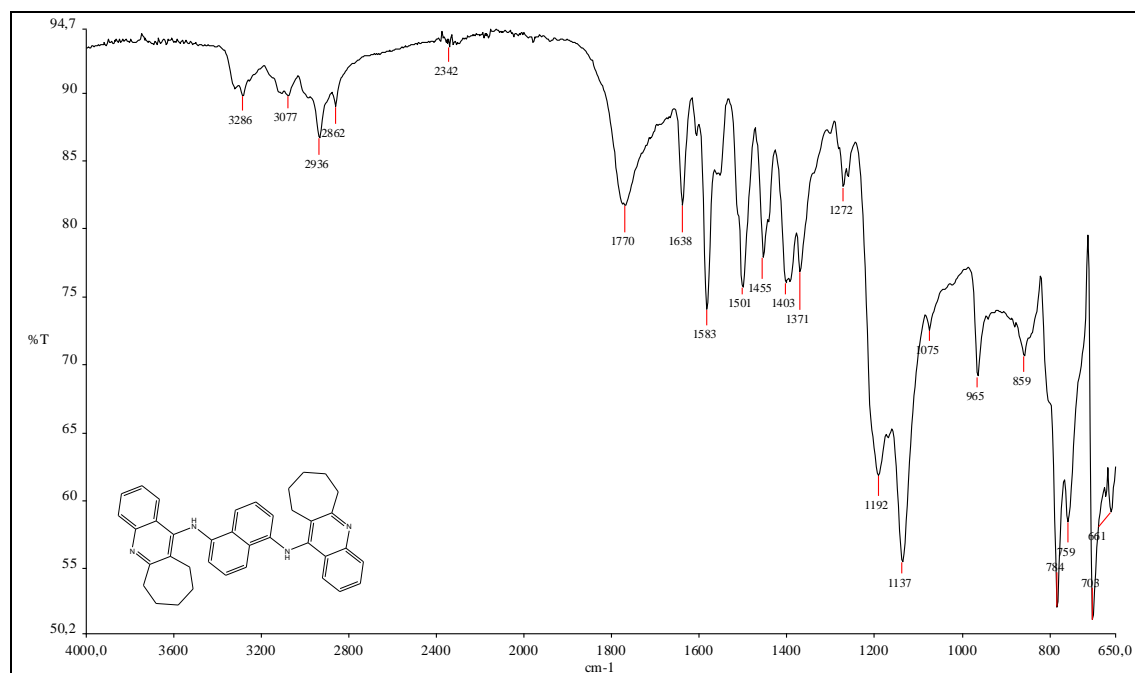
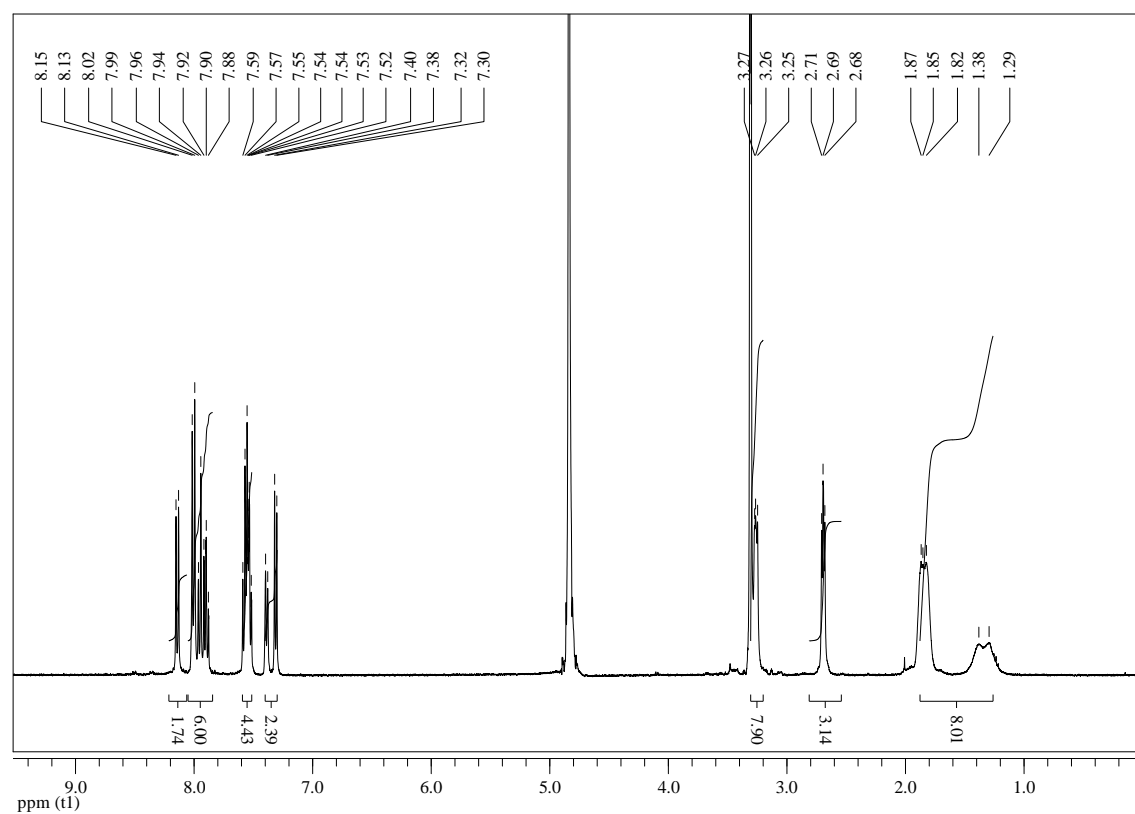


Figura AIV.49 – Espectro na região de IV do composto 25.

Figura AIV.50 – Espectro de RMN de ¹H do composto 25 (400 MHz, CD₃OD).

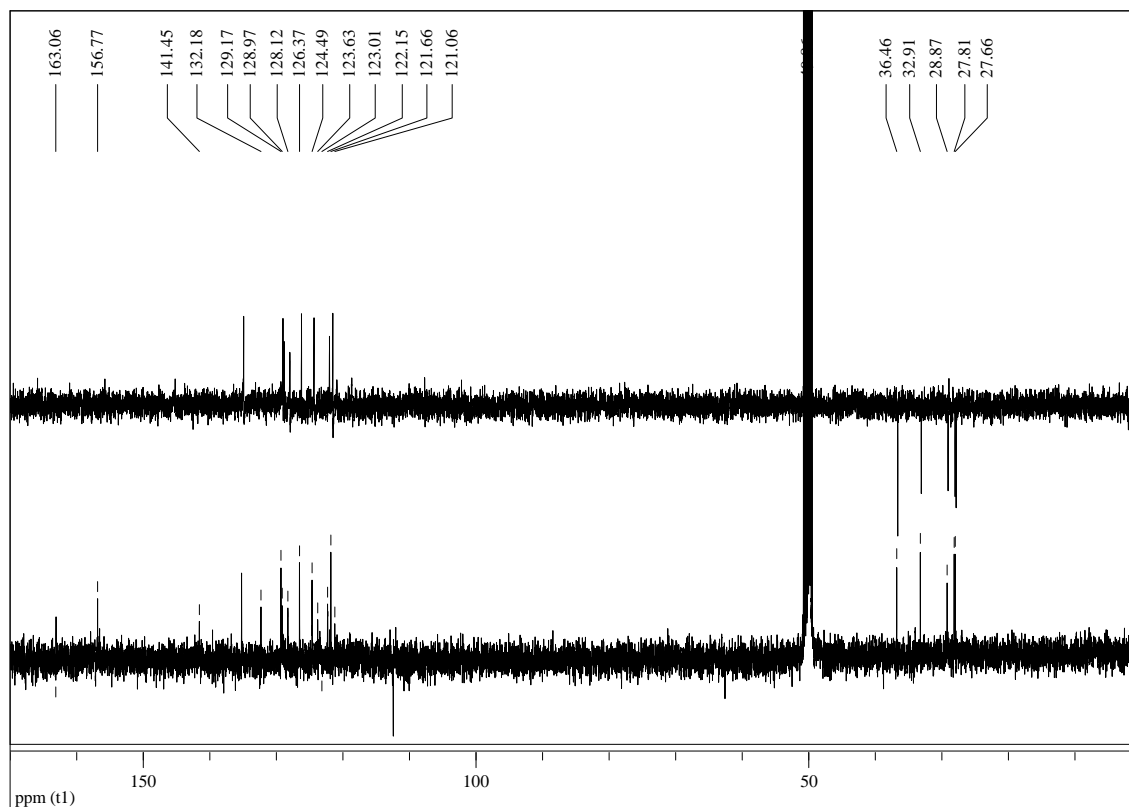


Figura AIV.51 – Espectro de RMN de ^{13}C e subspectro DEPT 135 do composto **25** (100 MHz, CD_3OD).

AIV.18 - Composto 26

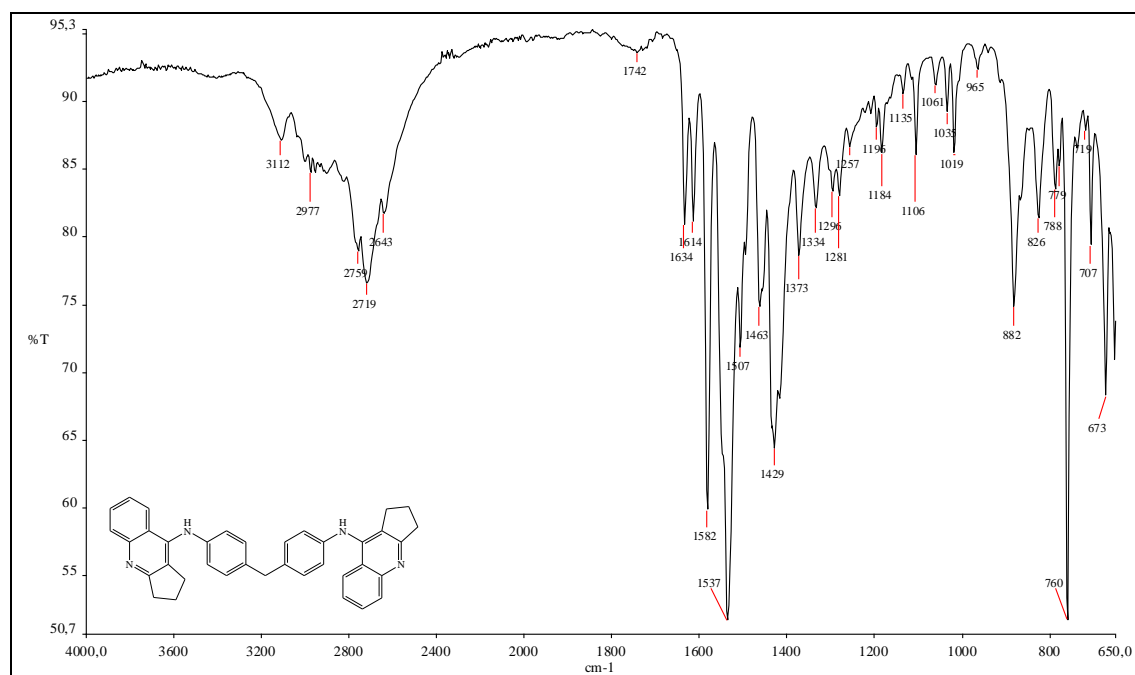


Figura AIV.52 – Espectro na região de IV do composto **26**.

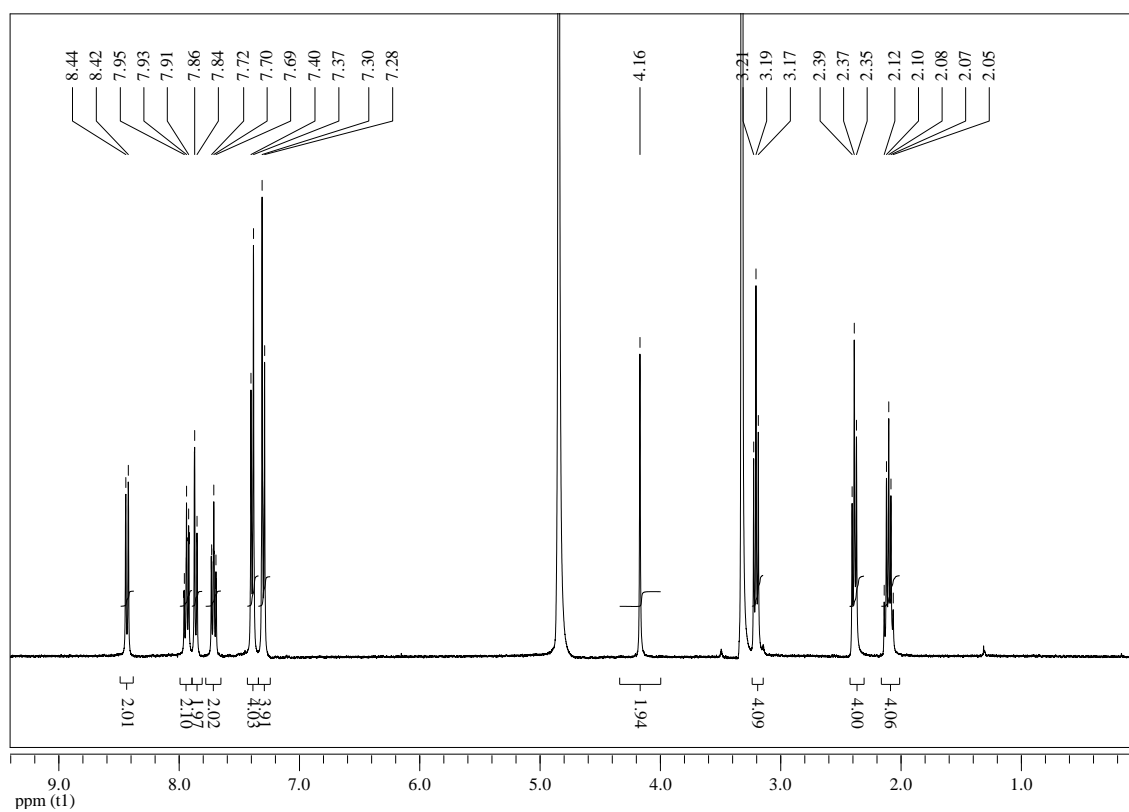


Figura AIV.53 – Espectro de RMN de ^1H do composto **26** (400 MHz, CD_3OD).

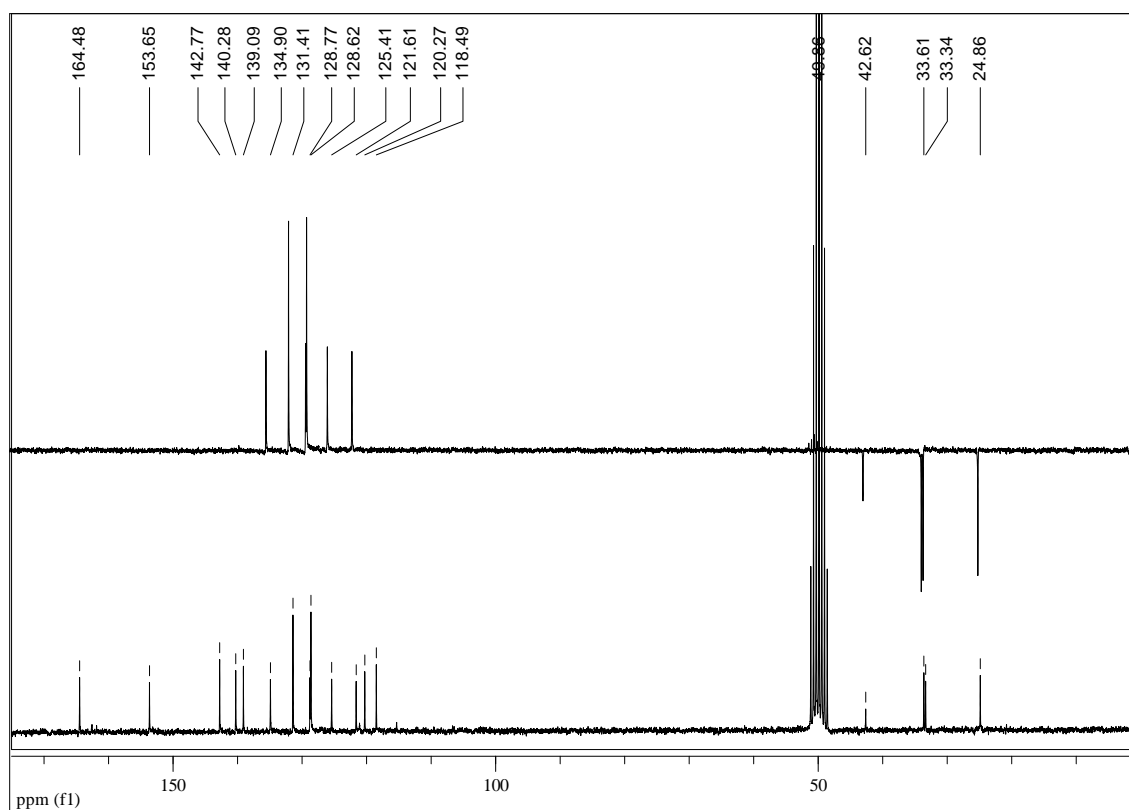


Figura AIV.54 – Espectro de RMN de ^{13}C e subspectro DEPT 135 do composto **26** (100 MHz, CD_3OD).

AIV.19 - Composto 27

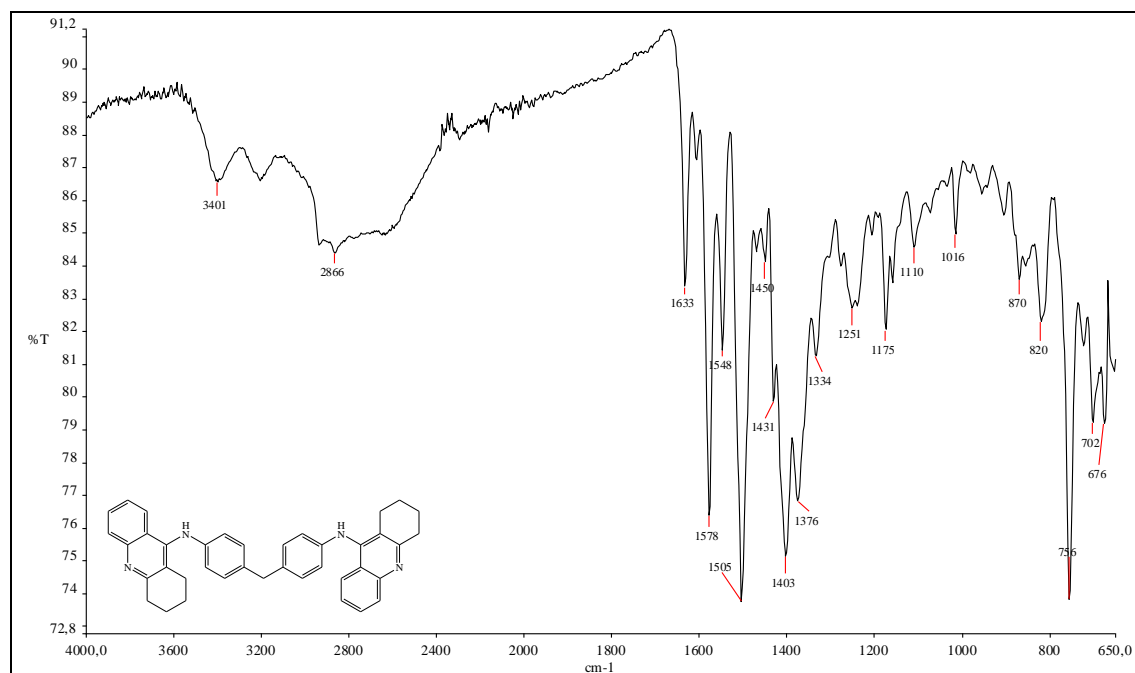
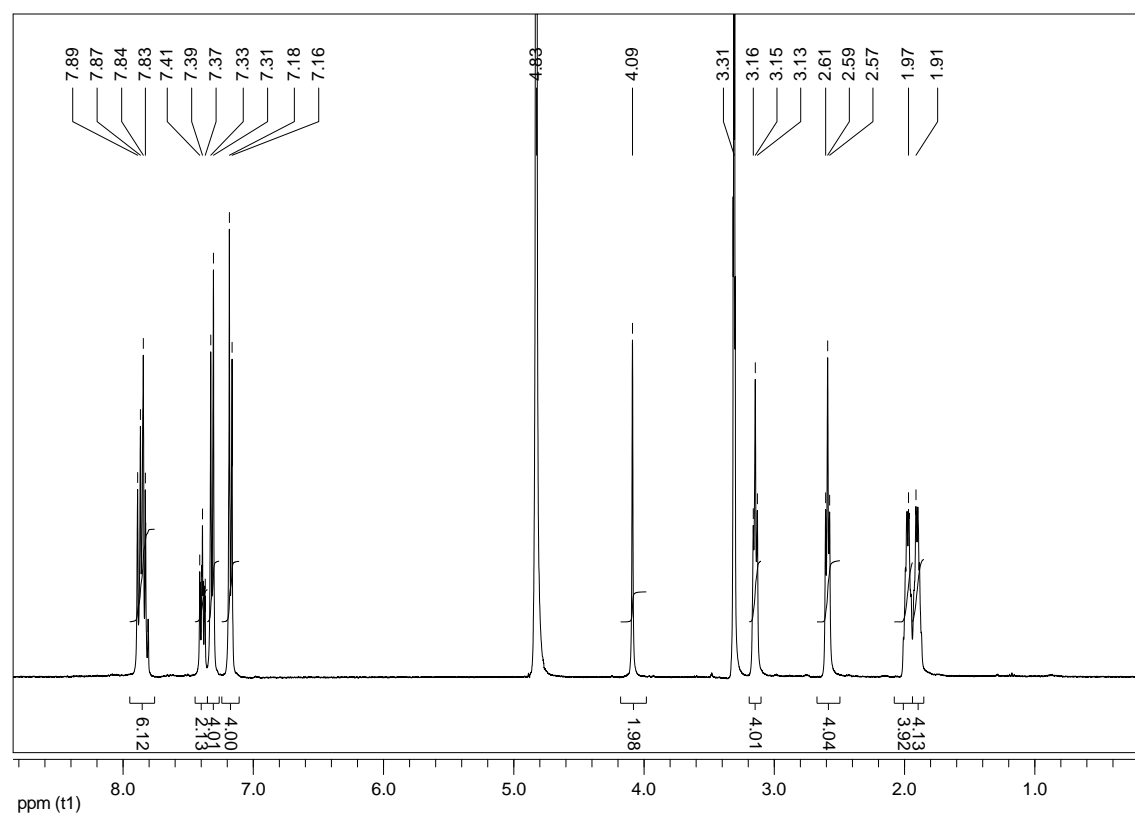


Figura AIV.55 – Espectro na região de IV do composto 27.

Figura AIV.56 – Espectro de RMN de ^1H do composto 27 (400 MHz, CD_3OD).

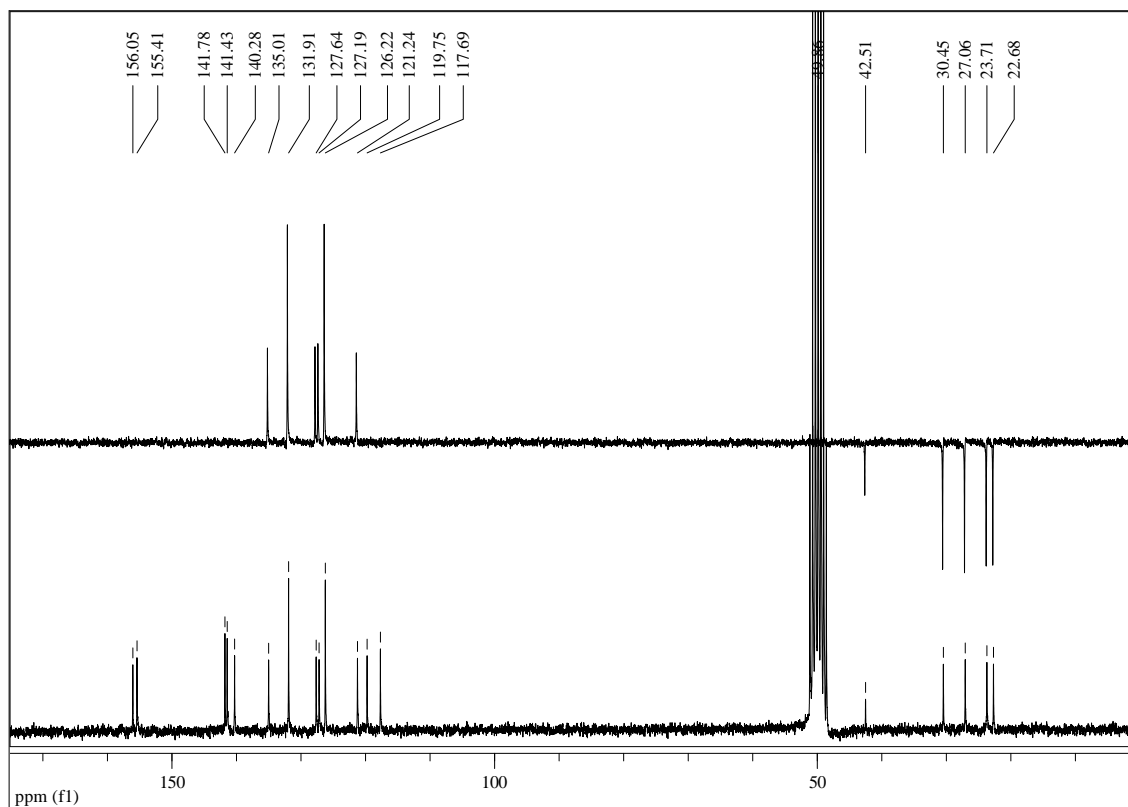


Figura AIV.57 – Espectro de RMN de ^{13}C e subspectro DEPT 135 do composto **27** (100 MHz, CD_3OD).

AIV.20 - Composto **28**

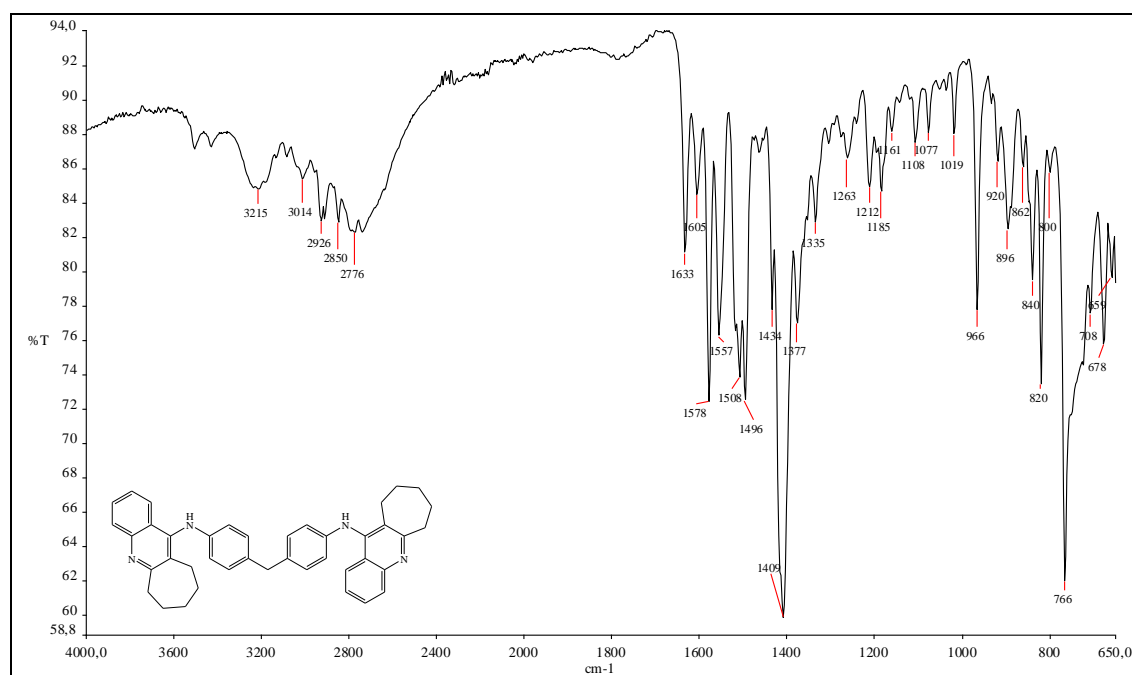


Figura AIV.58 – Espectro na região de IV do composto **28**.

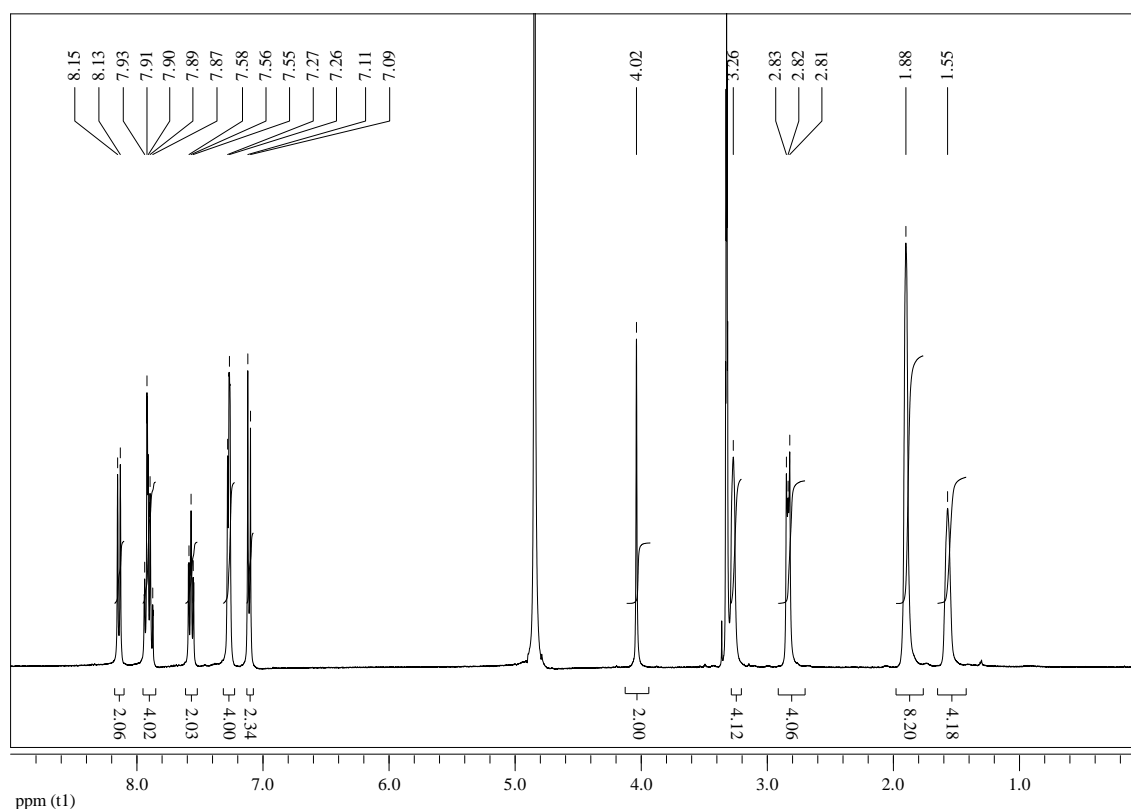


Figura AIV.59 – Espectro de RMN de ^1H do composto **28** (400 MHz, CD_3OD).

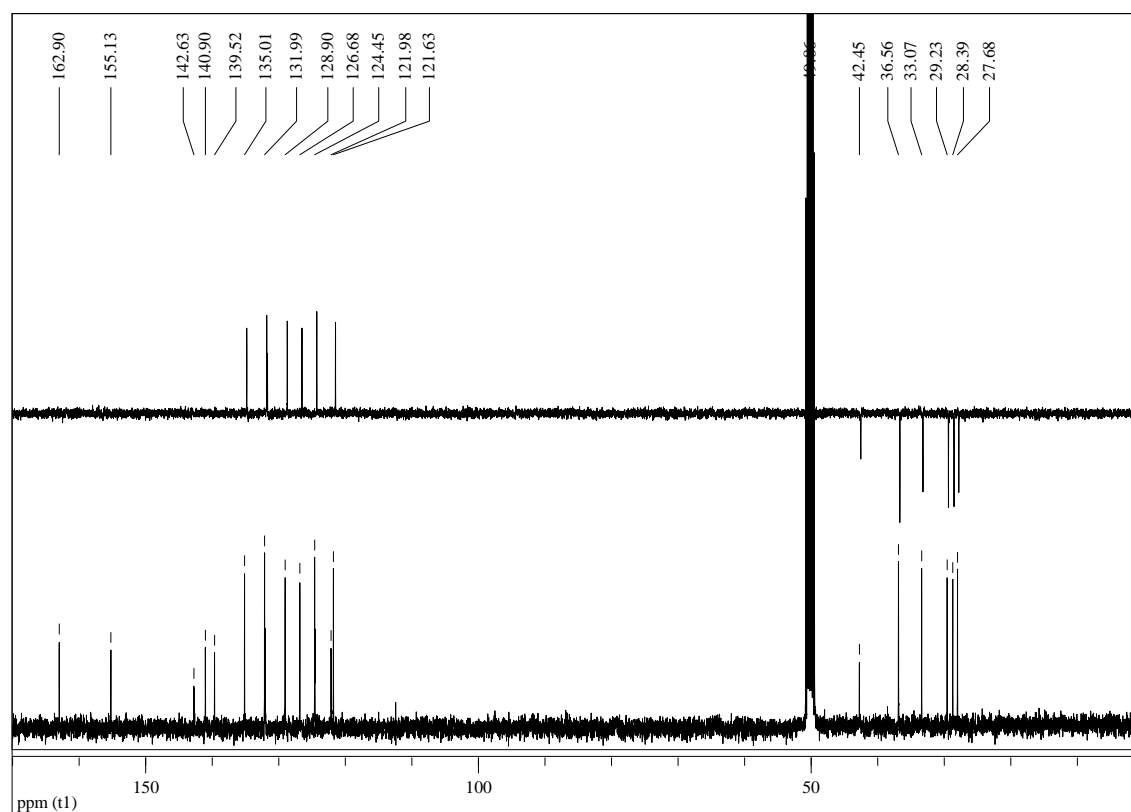


Figura AIV.60 – Espectro de RMN de ^{13}C e subspectro DEPT 135 do composto **28** (100 MHz, CD_3OD).

AIV.21 - Composto 29

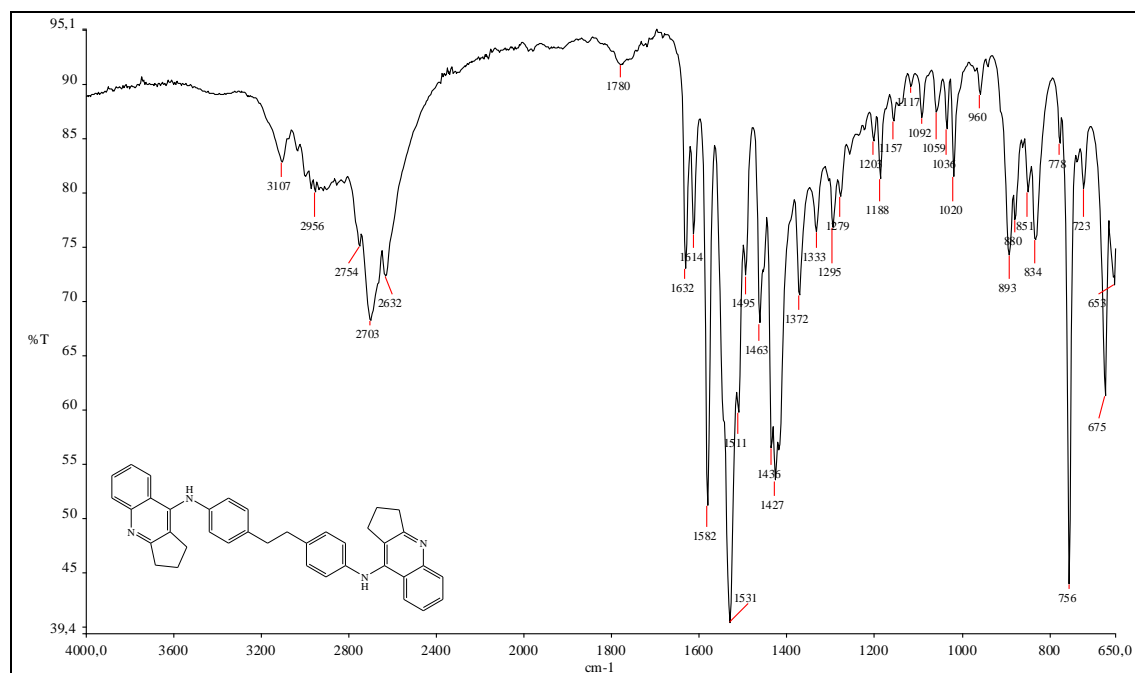
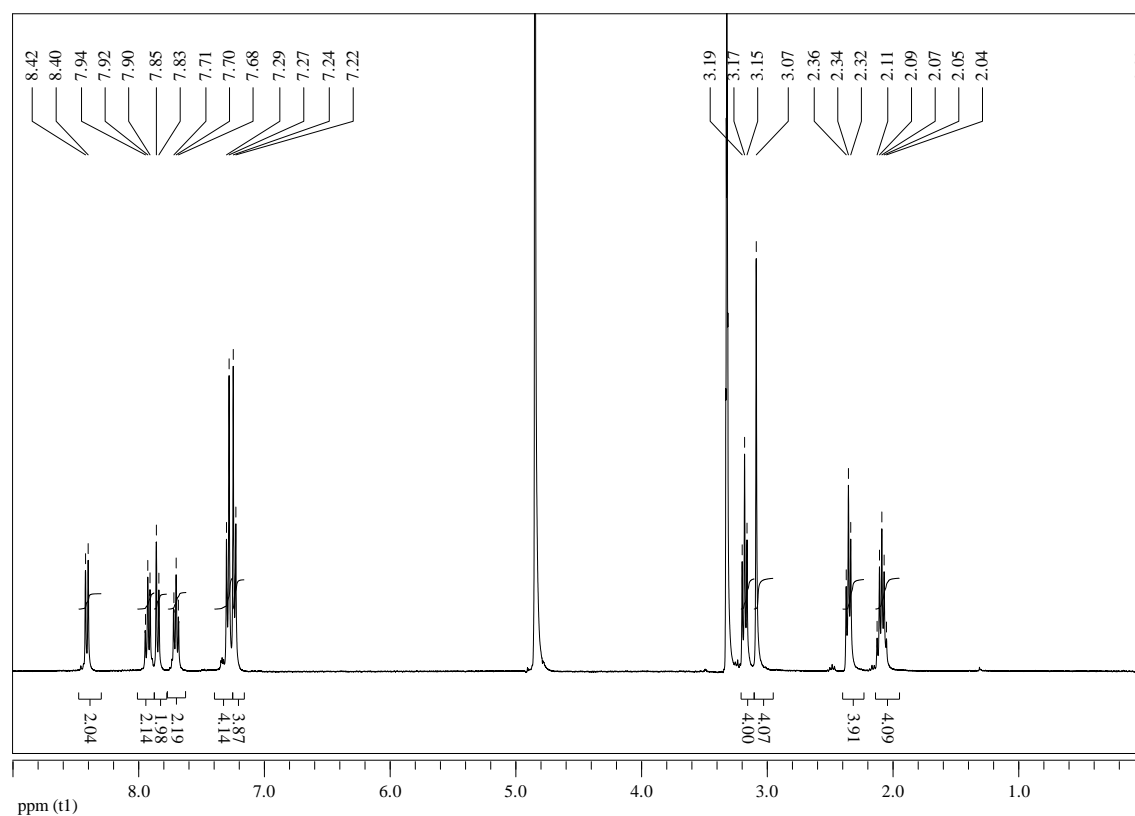


Figura AIV.61 – Espectro na região de IV do composto 29.

Figura AIV.62 – Espectro de RMN de ¹H do composto 29 (400 MHz, CD₃OD).

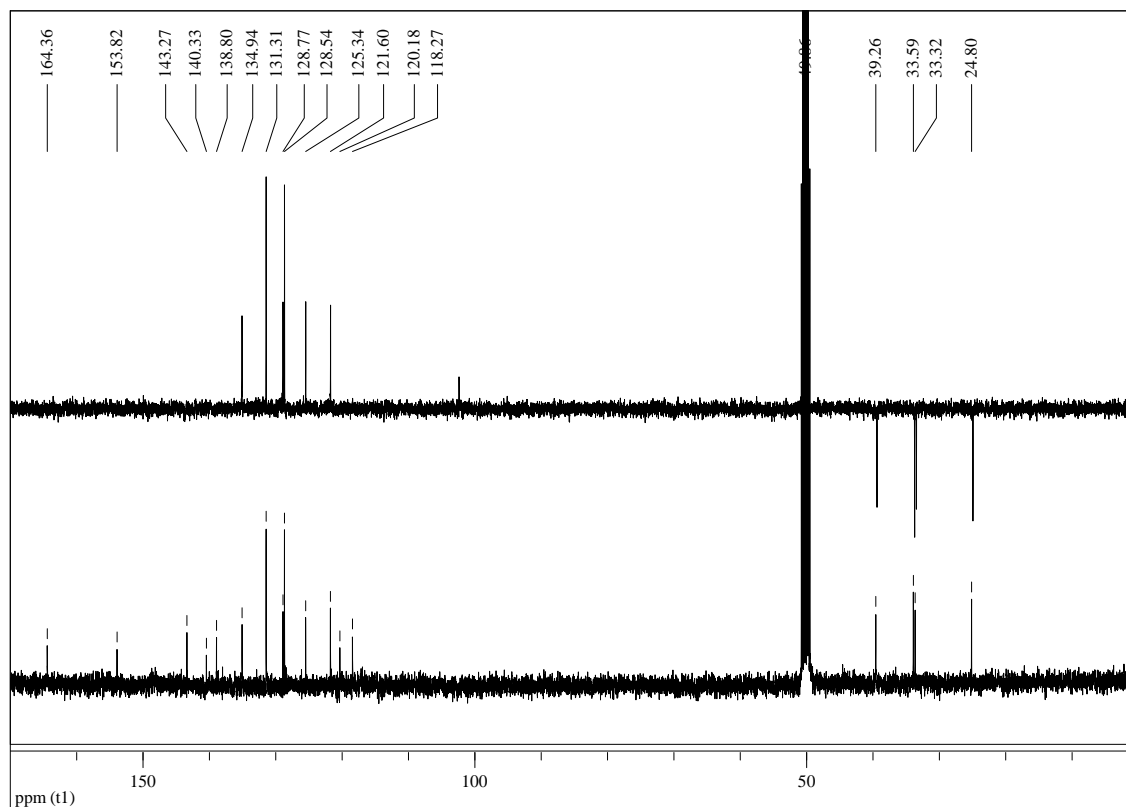


Figura AIV.63 – Espectro de RMN de ^{13}C e subspectro DEPT 135 do composto **29** (100 MHz, CD_3OD).

AIV.22 - Composto 30

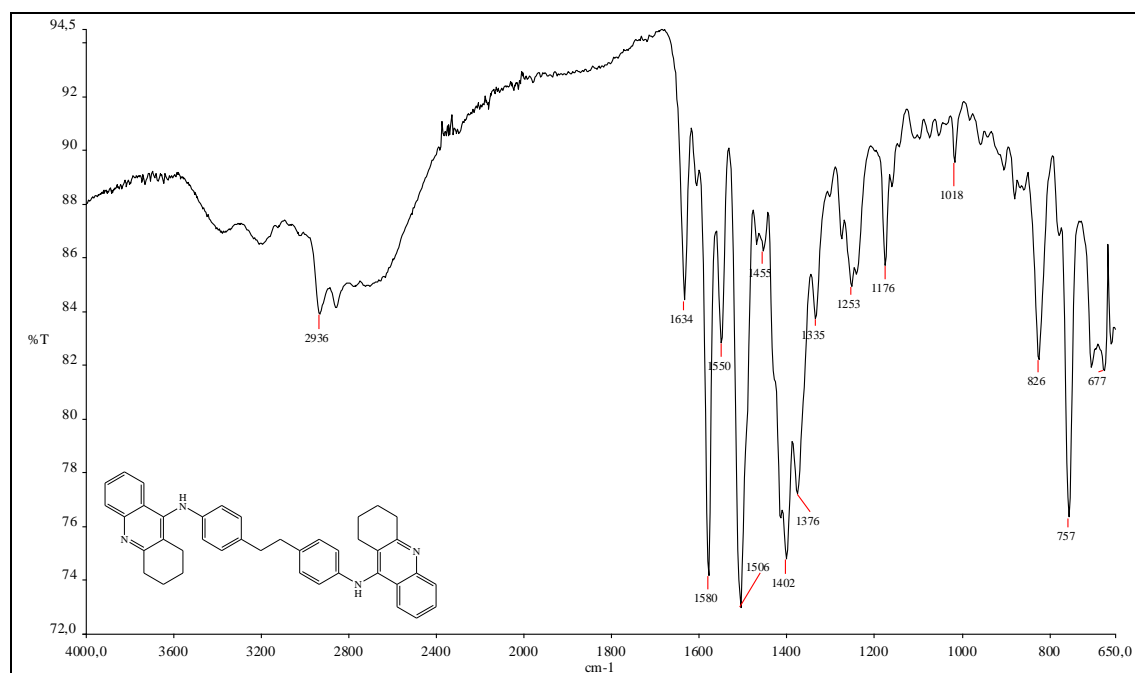


Figura AIV.64 – Espectro na região de IV do composto **30**.

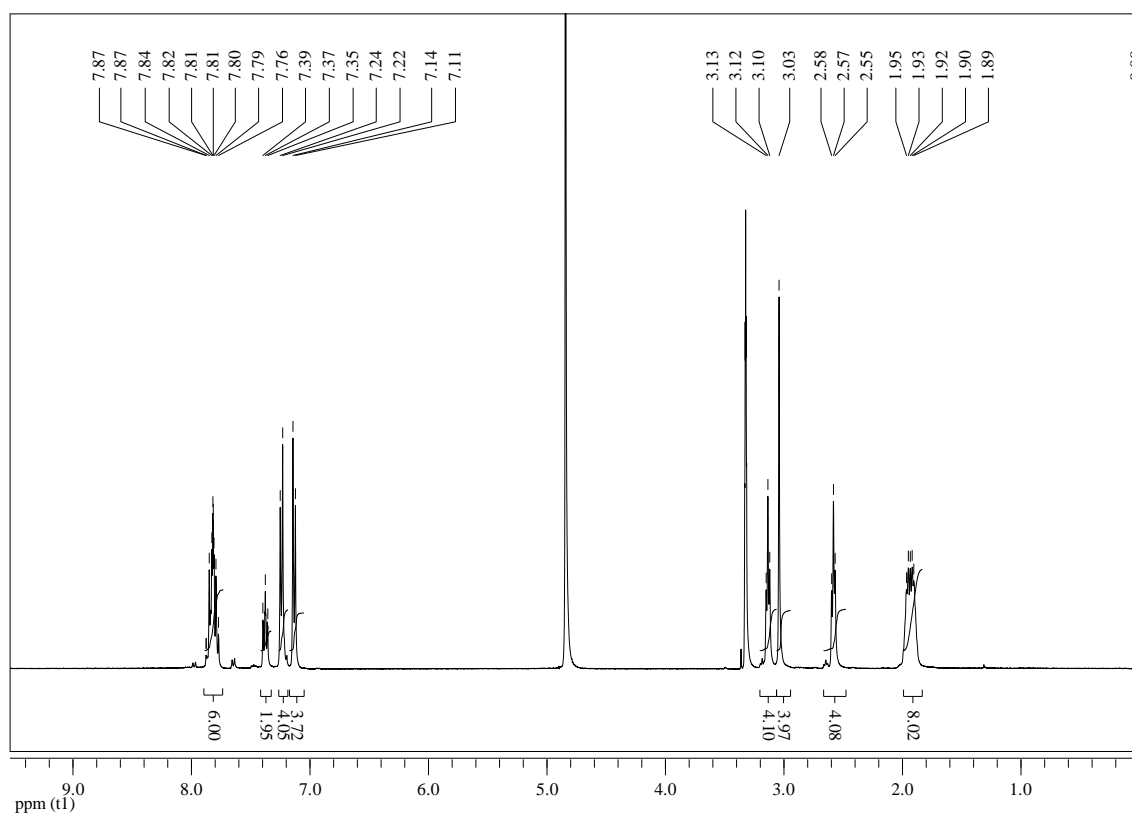


Figura AIV.65 – Espectro de RMN de ^1H do composto **30** (400 MHz, CD_3OD).

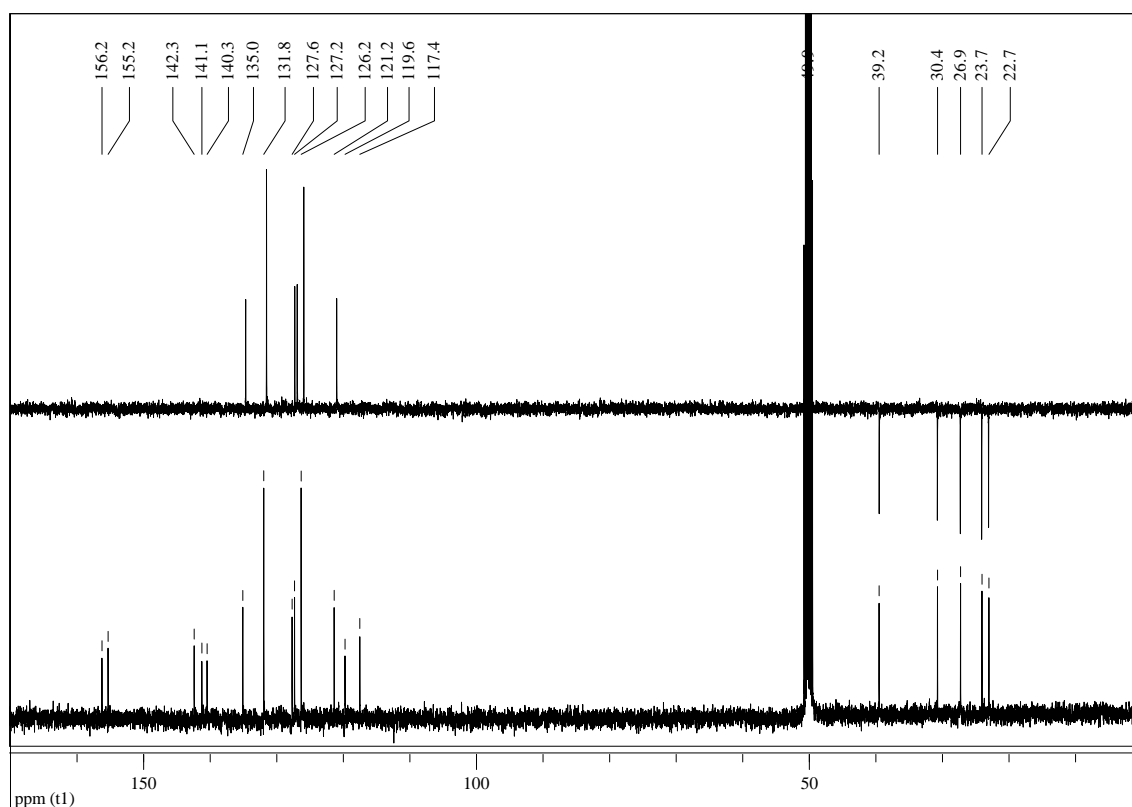


Figura AIV.66 – Espectro de RMN de ^{13}C e subspectro DEPT 135 do composto **30** (100 MHz, CD_3OD).

AIV.23 - Composto 31

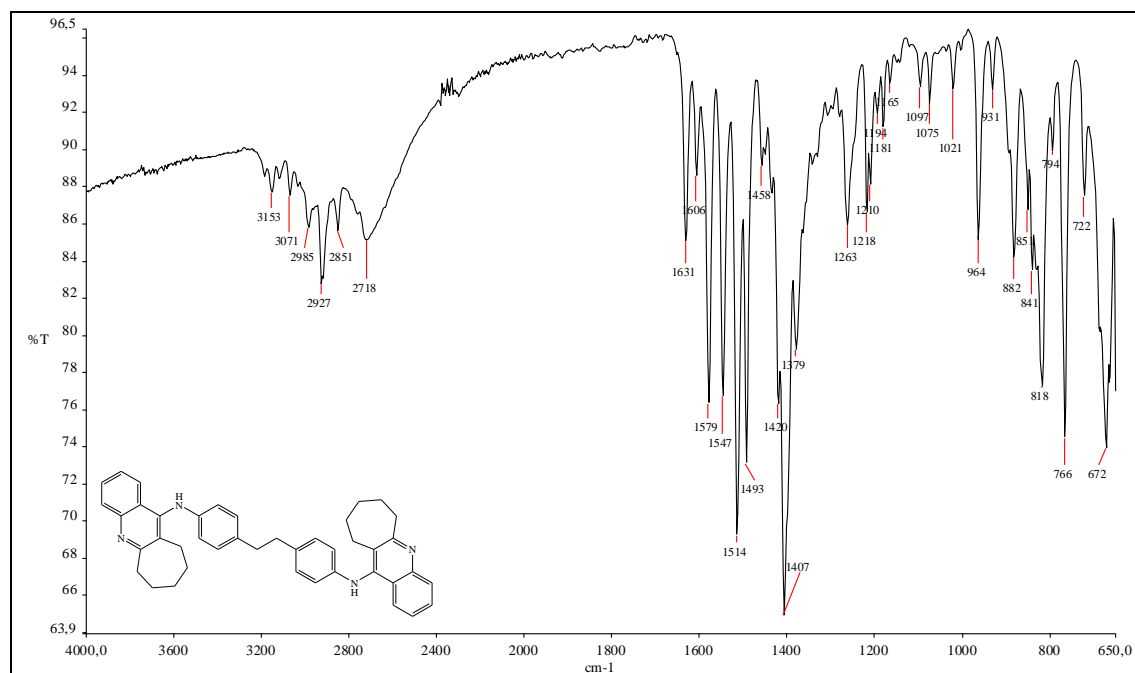
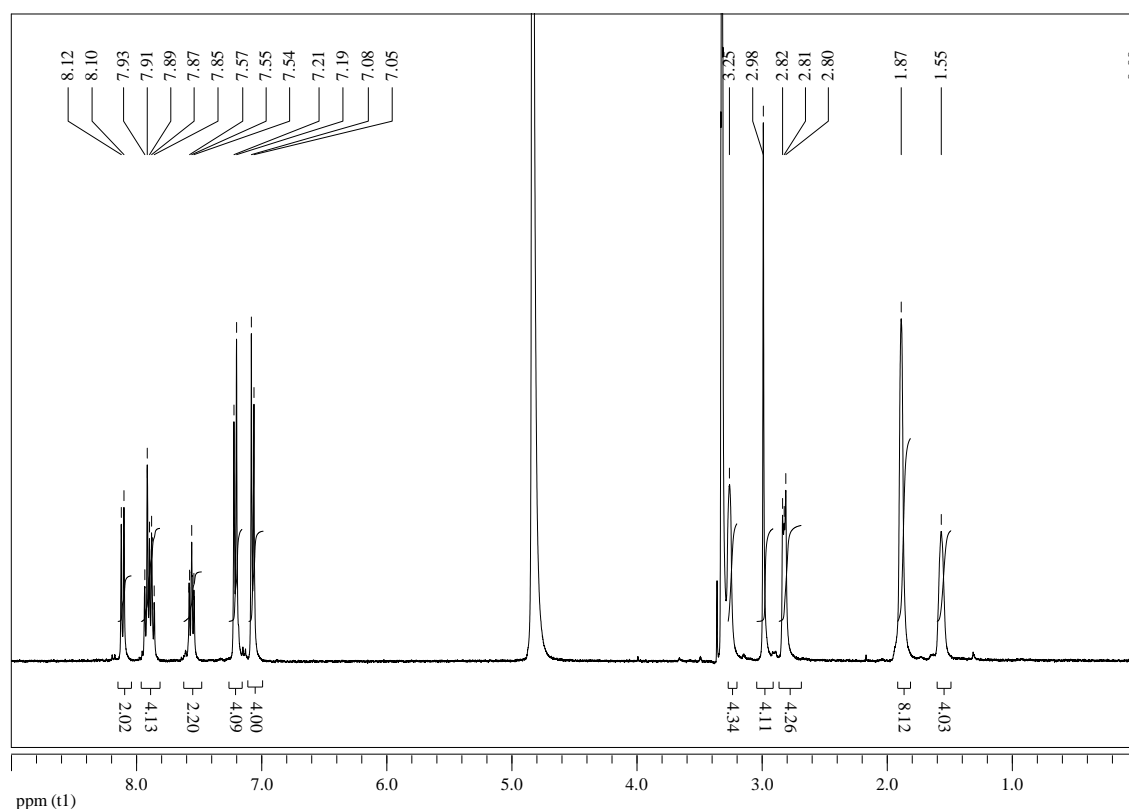


Figura AIV.67 – Espectro na região de IV do composto 31.

Figura AIV.68 – Espectro de RMN de ^1H do composto 31 (400 MHz, CD_3OD).

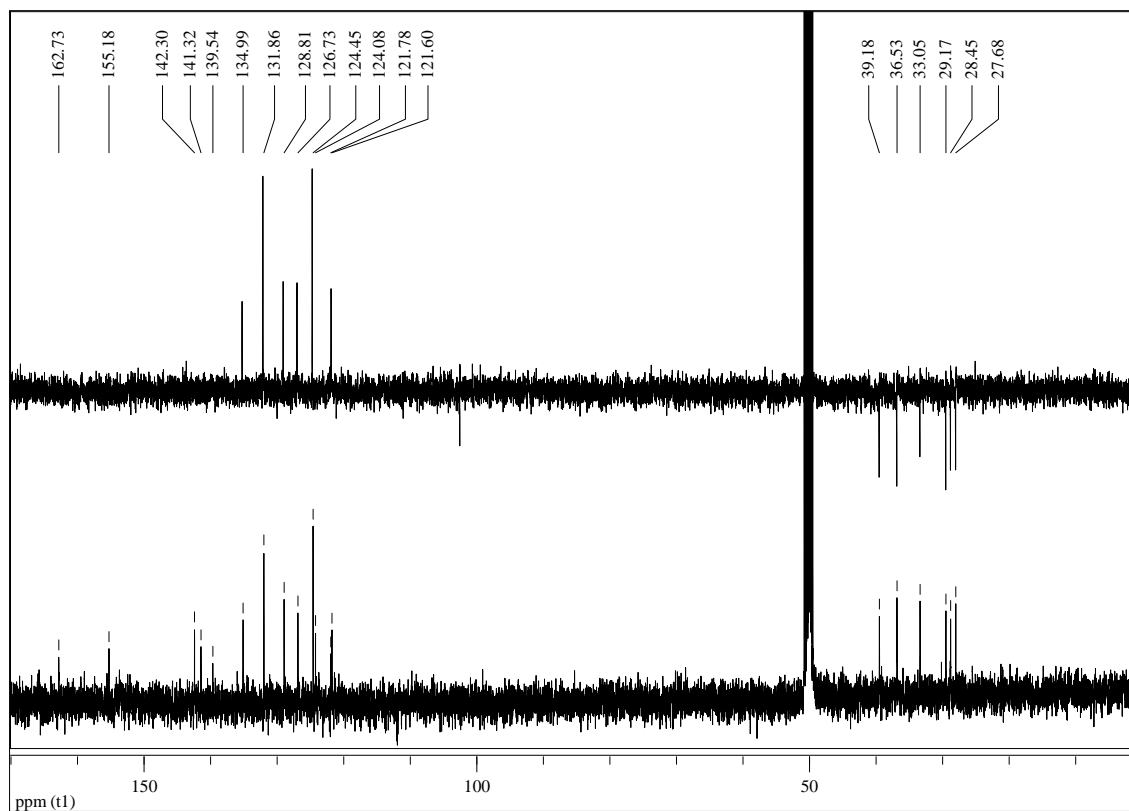


Figura AIV.69 – Espectro de RMN de ^{13}C e subspectro DEPT 135 do composto **31** (100 MHz, CD_3OD).