

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

INSTITUTO DE QUÍMICA

RAFAEL PARREIRA LORINI

**SÍNTESE DE HÍBRIDOS 2-AMINOMETILFENOL-LOFINA E DÍMEROS
BIS-LOFINA COM POTENCIAL APLICAÇÃO NO TRATAMENTO DA
DOENÇA DE ALZHEIMER**

PORTO ALEGRE, 2014
UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

INSTITUTO DE QUÍMICA

RAFAEL PARREIRA LORINI

**SÍNTESE DE HÍBRIDOS 2-AMINOMETILFENOL-LOFINA E DÍMEROS
BIS-LOFINA COM POTENCIAL APLICAÇÃO NO TRATAMENTO DA
DOENÇA DE ALZHEIMER**

Trabalho de conclusão apresentado junto à atividade de ensino “Trabalho de Conclusão de Curso – QUI” do Curso de Química, como requisito parcial para a obtenção de grau de Bacharel em Química.

Prof. Dr. Marco Antônio Ceschi
Orientador

PORTO ALEGRE, 2014

“Rise and rise again until lambs become lions”.

(Robin Hood)

AGRADECIMENTOS

Foram quatro anos de muito aprendizado. Ao olhar para trás na trajetória que percorri, tenho a certeza de que aquele guri de 17 anos recém-feitos estaria orgulhoso principalmente da pessoa que me tornei neste tempo de faculdade. Além das lições acadêmicas, obtive conhecimentos e memórias que serão carregadas comigo pelo resto de minha vida. E nada mais justo do que agradecer àqueles que sempre estiveram do meu lado e que foram os responsáveis pelo meu crescimento pessoal.

Primeiramente, gostaria de agradecer aos meus pais, Irineu e Áurea, e aos meus irmãos, Lucas e Carolina, que mesmo sofrendo com a distância e a saudade, sempre se preocuparam em me fornecer condições e conselhos valiosos, de qualquer parte do mundo em que estivessem, para poder realizar o sonho de cursar a faculdade. O seu amor com certeza foi a força motriz necessária para que pudesse concluir minha jornada.

Também sou muito grato a toda família Lorini, que me apoiaram e ajudaram sempre que necessário, perto ou longe. À Nona Isolina e Nono Dionísio, meus exemplos de honestidade e integridade. Toda família é o exemplo do sucesso que a perseverança e dedicação podem obter.

Essa jornada tornou-se muito mais especial pelas amizades que aqui fiz. Todas extremamente importantes para mim, especialmente o companheirismo, auxílios, risadas, distrações e apoios de Rafael Brito, Laíse Borba, Hermann Gehlen, Letícia Monteiro, Mateus Schneider, Gabriela Wentz e Thereza Lemos. Levo comigo um pedaço de cada um de vocês, que guardarei sempre com o maior carinho, minha segunda família.

Agradeço a todos do SinPol por alegrarem todos os meus dias com as piadas, músicas, brincadeiras e amizades que obtive. Em especial ao doutorando João P. Bizarro Lopes e ao Professor Marco A. Ceschi pela grande orientação.

Por fim, meus maiores agradecimentos a Juliana Isidoro, pela compreensão, incentivo e motivação na reta final do trabalho.

RESUMO

A doença de Alzheimer é uma desordem neurodegenerativa que afeta principalmente idosos a partir dos 60 anos de idade, resultando na perda significativa de funções cerebrais. Esta condição não possui cura e são conhecidos diversos fatores que influenciam sua progressão, destacando a diminuição do neurotransmissor acetilcolina. A hipótese colinérgica tem sido a estratégia terapêutica mais utilizada no combate a doença e visa-se a busca e síntese de moléculas capazes de inibir a enzima acetilcolinesterase, responsável pela hidrólise da acetilcolina. Devido as características estruturais da enzima, a síntese de dímeros do tipo bis-lofina, com variações na cadeia alquílica espaçadora e substituintes no núcleo lofínico, é de grande interesse como uma nova plataforma de moléculas bioativas com potencial aplicação no tratamento da doença de Alzheimer.

O caráter multifatorial da doença de Alzheimer permite que novos estudos sejam realizados visando-se a síntese de moléculas multifuncionais, potencialmente atuando em mais de um fator característico da doença. A partir do núcleo salicilaldeído, de reconhecida atividade biológica como antioxidante e inibidor de proteínas, neste trabalho realizou-se a síntese e caracterização de híbridos 2-aminometilfenol-lofina, através da reação de aminação redutiva, variando o agente redutor. As moléculas sintetizadas foram purificadas por

cromatografia em coluna e analisadas por Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio e Carbono. Os produtos estão sendo disponibilizados para análise de atividade biológica de inibição das enzimas colinesterases no Departamento de Bioquímica – Instituto de Ciências Biológicas – UFRGS.

Palavras-chave: Alzheimer, dímeros, híbridos, colinesterases, lofina, salcildeído, aminação reductiva.

LISTA DE ESQUEMAS

Esquema 1 – Obtenção dos dímeros *bis*-tacrina desenvolvido por Pang e colaboradores

Esquema 2 – Esquema geral de obtenção do composto 2-aminometilfenol-lofina

Esquema 3 – Proteção da 1,6-hexanodiamina

Esquema 4 – Síntese de mono-6-lofina protegida

Esquema 5 – Hidrólise de mono-6-lofina protegida

Esquema 6 – Reação genérica de aminação reductiva

Esquema 7 – Uso de NaCNBH_3 para obtenção de 2-aminometilfenol-lofina

Esquema 8 – Reação de aminação reductiva para obtenção do 2-aminometilfenol-lofina

Esquema 9 – Síntese de compostos bis-lofinas

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Estrutura do neurotransmissor acetilcolina

Figura 2 – Ação do composto dímero *bis*-tacrina nos sítios ativos da enzima acetilcolinesterase

Figura 3 – Tacrina

Figura 4 – Imidazol e compostos imidazólicos

Figura 5 – Estrutura do salicilaldeído

Figura 6 – Espectro de RMN-¹H da 1,6-hexanodiamina protegida

Figura 7 – Espectro de RMN-¹³C da 1,6-hexanodiamina protegida

Figura 8 – Espectro de RMN-¹H da 1,6-hexanoamina-lofina protegida

Figura 9 – Espectro de RMN-¹H da 1,6-hexanoamina-lofina purificada

Figura 10 – Espectro de RMN-¹³C da 1,6-hexanoamina-lofina purificada

Figura 11 – Espectro de RMN-¹H da 2-aminometilfenol-lofina

Figura 12 – Espectro de RMN-¹H da 2-aminometilfenol-lofina após segunda purificação

Figura 13 – Espectro de RMN-¹³C da 2-aminometilfenol-lofina após segunda purificação

Figura 14 – Espectro bis-lofinas substituídas

Figura 15 – Espectro de RMN-¹H do dímero bis-lofina n= 7 e X₂=4-Br (R6RL)

Figura 16 – Espectro de RMN-¹³C do dímero bis-lofina n= 7 e X₂=4-Br (R6RL)

ABREVIATURAS

DA	Doença de Alzheimer
AChE	Acetilcolinesterase
BuChE	Butirilcolinesterase
CAS	Sítio ativo catalítico
PAS	Sítio periférico aniônico
CCD	Cromatografia em camada delgada
UV	Ultravioleta
RMN- ¹ H	Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio
RMN- ¹³ C	Ressonância Magnética Nuclear de Carbono
Hz	Hertz
ppm	Partes por milhão
δ	Deslocamento químico
TMS	Tetrametilsilano
CDCl ₃	Clorofórmio deuterado
(Boc) ₂ O	Carbonato de di- <i>terc</i> -butila
nM	Nanomol por litro

g	Gramas
mL	mililitros

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	10
2. OBJETIVOS.....	11
2.1. Objetivo Geral.....	11
2.2. Objetivos Específicos.....	11
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	11
3.1. Doença de Alzheimer e a hipótese colinérgica.....	11
3.2. Lofina e Bis-Lofina.....	14
3.3. Salicilaldeído.....	15
4. METODOLOGIA.....	15
4.1. Reação de Aminoação	
Redutiva.....	15
4.2. Purificação e caracterização dos produtos.....	16
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	17
5.1. Intermediários aminolofina.....	17
5.1.1. Reação de proteção da 1,6 hexanodiamina.....	17
5.1.2. Síntese da 1,6-hexanoamina-lofina protegida via reação	
tetracomponente.....	19
5.1.3. Hidrólise da 1,6-hexanoamina-lofina protegida.....	21
5.2. Compostos 2-aminometilfenol-lofina.....	23
5.3. Compostos	
bis-lofina.....	27
5.4. Testes de inibição das enzimas colinesterases.....	30
6. CONCLUSÕES.....	31

7. PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL.....	32
7.1. Reação de proteção da 1,6-hexanodiamina.....	32
7.2. Síntese da 1,6-hexanoamina-lofina protegida via reação tetracomponente.....	33
7.3. Hidrólise da 1,6-hexanoamina-lofina protegida.....	33
7.4. Síntese de 2-aminometilfenol-lofina.....	33
7.4.1. Primeiro procedimento.....	33
7.4.2. Segundo procedimento.....	34
7.5. Síntese de dímeros bis-lofina.....	34
8. REFERÊNCIAS.....	35

1. INTRODUÇÃO

A doença de Alzheimer (DA) é uma desordem neurodegenerativa que resulta na perda significativa e progressiva de funções cerebrais. Essa condição afeta principalmente idosos a partir dos 60 anos de idade e mais de trinta e seis milhões de pessoas mundialmente, o que demonstra a importância de estudos visando o tratamento da mesma. O estágio inicial da doença é caracterizado pela perda de memória de fatos recentes, podendo ocorrer também depressão, ansiedade e mudança de personalidade. Geralmente após alguns anos, notam-se sinais da disfunção cerebral como a dificuldade de linguagem, deficiência sensorial, dificuldade na função motora e incapacidade do paciente de realizar tarefas diárias.

A primeira droga aprovada nos Estados Unidos pelo FDA (*Food and Drug Administration*) para o tratamento da DA foi a

9-amino-1,2,3,4-tetraidroacridina, a tacrina, comercializada como *Tacrina*® ou *Cognex*®, sendo um composto de amplo perfil farmacológico, porém apresenta efeitos colaterais gastrointestinais e alta hepatotoxicidade. É de alto interesse a busca por compostos bioativos análogos a tacrina, melhorando a sua potência e diminuindo a toxicidade, e compostos bioativos baseados em grupos de reconhecida atividade farmacológica, obtendo uma nova plataforma para a síntese de novos fármacos.

A construção de moléculas híbridas é uma estratégia importante no desenho da arquitetura de um novo protótipo de fármacos a partir da combinação de características estruturais e biológicas definidas de compostos distintos. Esta estratégia permite agregar ao híbrido diferentes grupos farmacofóricos e assim, modular simultaneamente múltiplos alvos de doenças multifatoriais tal como a doença de Alzheimer.

Dentre esses grupos com atividade farmacológica, destaca-se o núcleo imidazol um heterociclo presente em diversas moléculas bioativas, e o núcleo salicilaldeído, reconhecido como um importante antioxidante.

É de interesse para este trabalho a obtenção de híbridos 2-aminometilfenol-lofina e dímeros lofina-lofina, com a finalidade de produzir uma biblioteca de compostos para a realização de ensaios biológicos tais como inibição das enzimas colinesterases, atividade antioxidante, entre outras, para potencial uso no tratamento da DA.

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Este trabalho teve como principal objetivo a síntese e caracterização de híbridos 2-aminometilfenol-lofina obtidos via reação tetracomponente para a obtenção do núcleo lofínico, seguido de uma reação de aminação redutiva do

intermediário imina gerado *in situ*. Outro objetivo do trabalho foi a obtenção de alguns dímeros lofina-lofina de interesse para o grupo de pesquisa.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Síntese de intermediários contendo o núcleo lofínico ligado a uma cadeia espaçadora contendo a função amina.
2. Analisar a reação de aminação reductiva utilizando-se diferentes redutores e condições reacionais.
3. Purificação e caracterização dos compostos sintetizados.
4. Construir uma biblioteca de compostos híbridos 2-aminometilfenol-lofina e dímeros bis-lofina de interesse para avaliação preliminar da atividade inibitória das enzimas colinesterases.

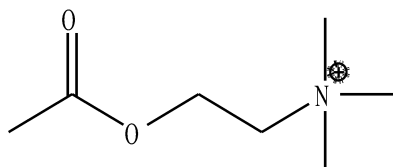
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 DOENÇA DE ALZHEIMER E A HIPÓTESE COLINÉRGICA

A etiologia da DA permanece desconhecida, e diversos fatores contribuem para o seu desenvolvimento, como a deposição de peptídeos β -amilóide, agregação e formação de proteínas tau, estresse oxidativo e a deficiência de neurotransmissores como a acetilcolina, noradrenalina e serotonina.¹

A principal estratégia de tratamento envolve a hipótese colinérgica, que originalmente postulou que a perda das funções colinérgicas no sistema nervoso central contribui significativamente para o declínio cognitivo, associado com a idade avançada e a DA. Este declínio também está associado à diminuição do número de neurotransmissores acetilcolina^{2,3} (Figura 1), que sofrem hidrólise pela enzima acetilcolinesterase (AChE).

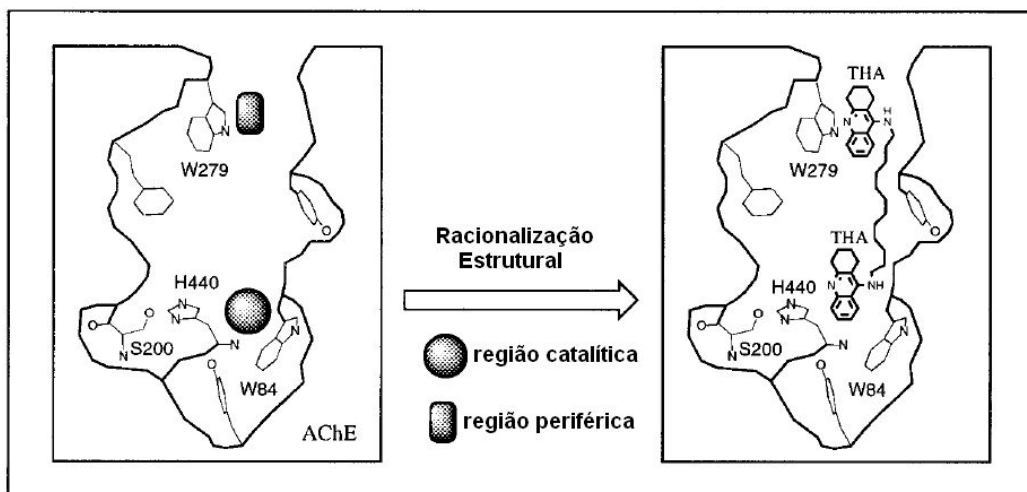
Figura - Estrutura do neurotransmissor acetilcolina.



Há dois tipos de enzima colinesterase: acetilcolinesterase (AChE) e butirilcolinesterase (BuChE). A AChE é predominantemente encontrada no cérebro, onde é dez vezes mais abundante que a BuChE. A BuChE é principalmente encontrada nos músculos cardíaco e liso, pele e plasma.⁴ Embora evidências iniciais sugiram que a BuChE do sistema nervoso central possa estar envolvida no dano neuronal associado à doença de Alzheimer, as estratégias terapêuticas têm como alvo a inibição da AChE, já que esta é a enzima envolvida na transmissão sináptica, ao passo que a BuChE é localizada fora da região onde ocorrem as sinapses.

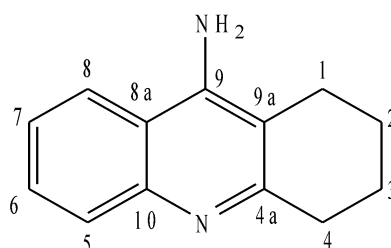
Pang e colaboradores realizaram estudos computacionais que evidenciaram a estrutura da AChE⁵, um gargalo estreito e profundo de aproximadamente 20 angstroms, e a existência de dois sítios de interação: o sítio catalítico ativo (*Catalytic Active Site* – CAS), ao fundo da cavidade enzimática, e o sítio periférico aniônico (*Peripheral Anionic Site* – PAS), próximo à entrada da cavidade (Figura 2).

Figura 2 - Ação do composto dímero *bis*-tacrina nos sítios ativos da enzima acetilcolinesterase.⁵

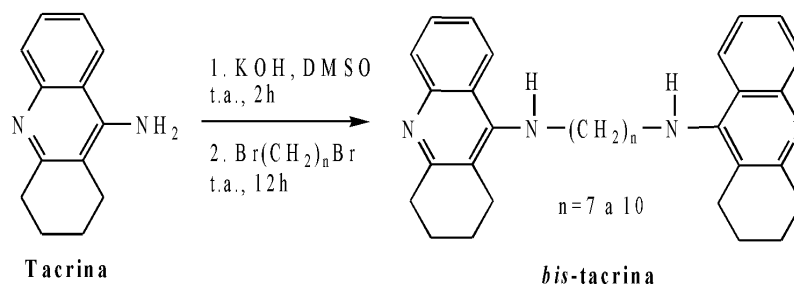


A tacrina (Figura 3), primeiro fármaco aprovado para doença de Alzheimer, atua inibindo o CAS da enzima, com pouca interação no PAS. Para permitir a interação simultânea com os dois sítios, uma estratégia utilizada foi a síntese de dímeros de tacrina para aumentar a potência e seletividade do fármaco (Esquema 1), gerando uma nova plataforma de compostos⁶. Dentre esses compostos obtidos, o bis-(7)-tacrina mostrou-se aproximadamente mil e quinhentas vezes mais potente na inibição da AChE do que a tacrina⁷, o que evidencia a necessidade de pesquisa de dímeros e híbridos para aumentar a eficácia dessa inibição, minimizando os efeitos colaterais.

Figura 3 – Tacrina



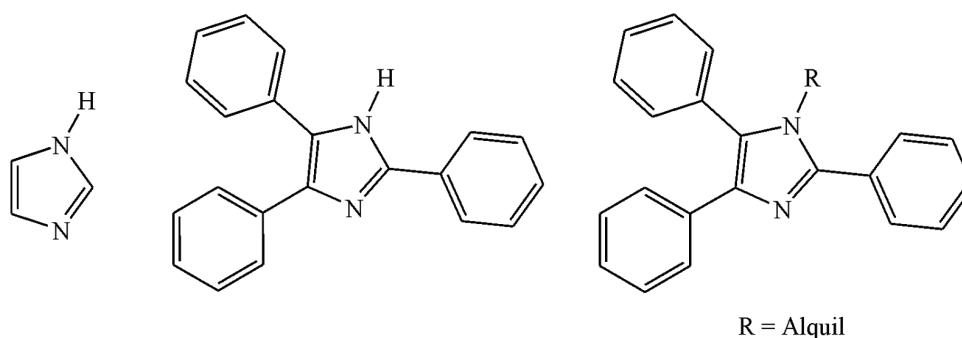
Esquema 1 - Obtenção dos dímeros bis-tacrina desenvolvido por Pang e colaboradores.



3.2 LOFINA E BIS-LOFINA

O núcleo imidazol é um núcleo heterocíclico aromático que serve como bloco de construção para diversos compostos bioativos devido a sua interação com o hormônio histamina, estando presente em diversos fármacos⁸. Além disso, o núcleo imidazólico se mostrou efetivo no bloqueio dos canais β -amiloide, que são poros formados em membranas celulares, induzidos pelo acúmulo de peptídeos A β , e que permitem a entrada de cálcio extracelular⁹. A lofina apresenta tal anel imidazólico trissubstituído com três grupos fenila, e seus derivados *N*-substituídos são uma classe de heterociclos de grande importância devido a seu interesse biológico.^{10,11} (Figura 4)

Figura 4 – Imidazol e compostos imidazólicos.



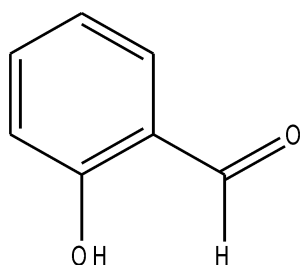
Investigou-se as metodologias existentes na literatura para a obtenção de lofinas *N*-substituídas^{12,13,14} e, a partir destas, uma metodologia para a

síntese de homodímeros do tipo bis-lofina. Esta classe de compostos são de interesse para o estudo de inibição das enzimas colinesterases e, portanto, de potencial aplicação no tratamento da doença de Alzheimer, aumentando o escopo de moléculas com diferentes substituintes e cadeia alquílica espaçadora.

3.3 SALICILALDEÍDO

A molécula do salicilaldeído (Figura 5) possui reconhecida atividade farmacológica como inibidor de proteínas, bactericida, precursor de agentes quelantes de metais e atividade antioxidante ^{15,16, 17}. Considerando o caráter multifatorial da DA, utilizou-se este núcleo para a obtenção de híbridos 2-aminometilfenol-lofina. Estes híbridos potencialmente podem apresentar uma concomitante inibição das colinesterases, atividade antioxidante e outras atividades de interesse. A síntese desses compostos foi realizada através de uma redução aminativa, adaptando-se procedimento em literatura¹⁷.

Figura 5 – Estrutura do salicilaldeído

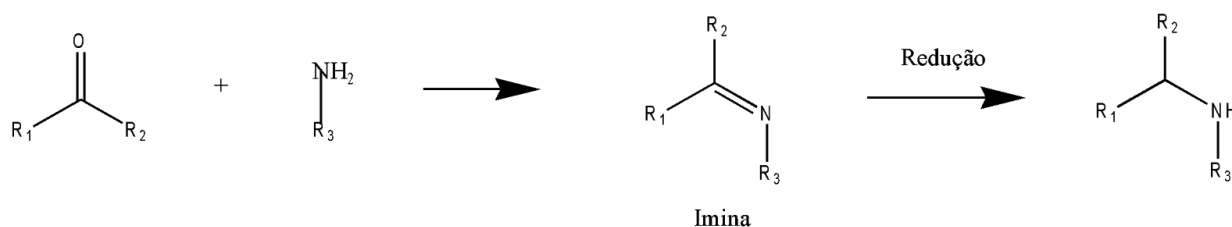


4. METODOLOGIA

4.1 REAÇÃO DE AMINAÇÃO REDUTIVA

A aminação redutiva consiste em uma reação que permite a conversão de aldeídos ou cetonas em suas respectivas aminas, em uma única etapa reacional. Nesta reação, o intermediário imina gerado *in situ* é reduzido na presença de um agente redutor apropriado. (Esquema 2). É considerada como uma das reações mais importantes para obtenção de aminas, utilizada em grande escala na indústria farmacêutica.

Esquema 2 – Reação genérica de aminação redutiva



No presente trabalho, esta metodologia é utilizada para a obtenção dos híbridos 2-aminometilfenol-lofina, na presença dos redutores NaBH₄ e NaCNBH₃.

4.2 PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DOS PRODUTOS

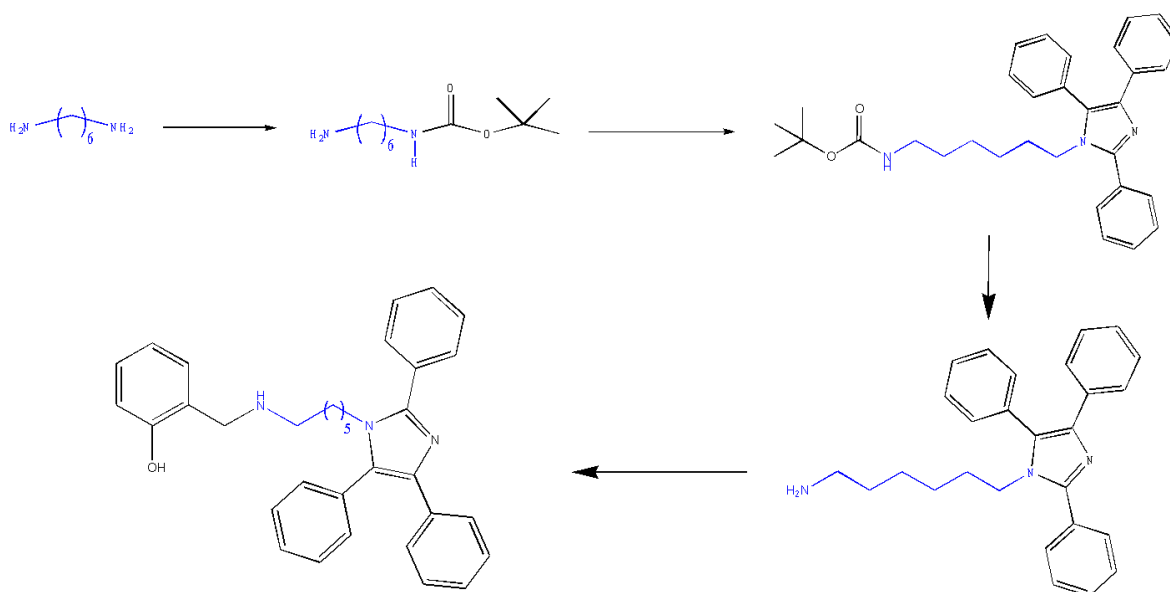
Os compostos descritos nesse trabalho foram purificados utilizando cromatografia em coluna, tendo como fase estacionária sílica-gel Acrós Orgânica 60 angstroms (60-200 mesh). A cromatografia em camada delgada (CCD) foi realizada para acompanhamento das reações. Foram utilizadas placas de alumínio com 0,2 mm de sílica-gel *Macherey-Nagel*. Utilizou-se como revelador da CCD lâmpada de ultravioleta (UV) em 254 nanômetros ou vanilina e aquecimento.

Nesses métodos, foram empregados como eluente diferentes misturas de hexano, acetato de etila e trietilamina ou clorofórmio, metanol e hidróxido de amônio.

A caracterização dos compostos foi realizada via Ressonância Magnética Nuclear de hidrogênio (RMN- ^1H) e de carbono-13 (RMN- ^{13}C) com espectrômetro *Varian VNMRS* de 300 MHz e 75,5 MHz, respectivamente, do Instituto de Química – UFRGS. A técnica de RMN- ^{13}C foi realizada em modo *Attached Proton Test* (APT), em que os carbonos primários e terciários se apresentam abaixo da linha de base e os carbonos secundários e quaternários se apresentam acima da linha de base. O deslocamento químico (δ) está relacionado em partes por milhão (ppm) em referência ao tetrametilsilano (TMS), padrão interno para espectros de hidrogênio, em clorofórmio deuterado (CDCl_3), utilizado como solvente para análise.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A síntese do composto de interesse foi realizado em etapas, de acordo com o Esquema 3.



Esquema 3 – Esquema geral de obtenção do composto
2-aminometilfenol-lofina

5.1 INTERMEDIÁRIOS AMINOLOFINA

5.1.1 Reação de proteção da 1,6-hexanodiamina

Inicialmente, foi realizada a proteção seletiva de um dos grupos amino da 1,6-hexanodiamina usando-se como grupo protetor o carbonato de di-*tert*-butila (Boc_2O) em relação estequiométrica apropriada¹⁸. Obteve-se rendimento de 46%. (Esquema 4)

Esquema 4 – Reação de proteção da 1,6-hexanodiamina

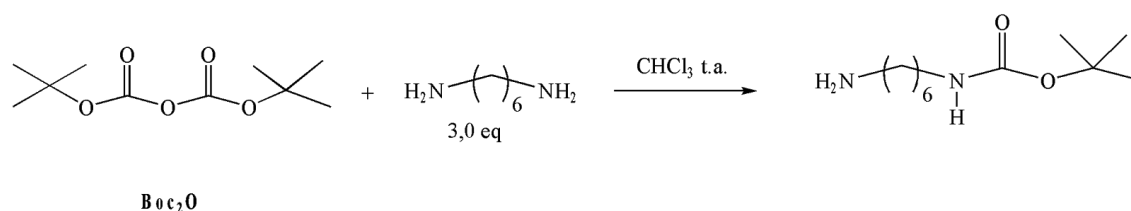
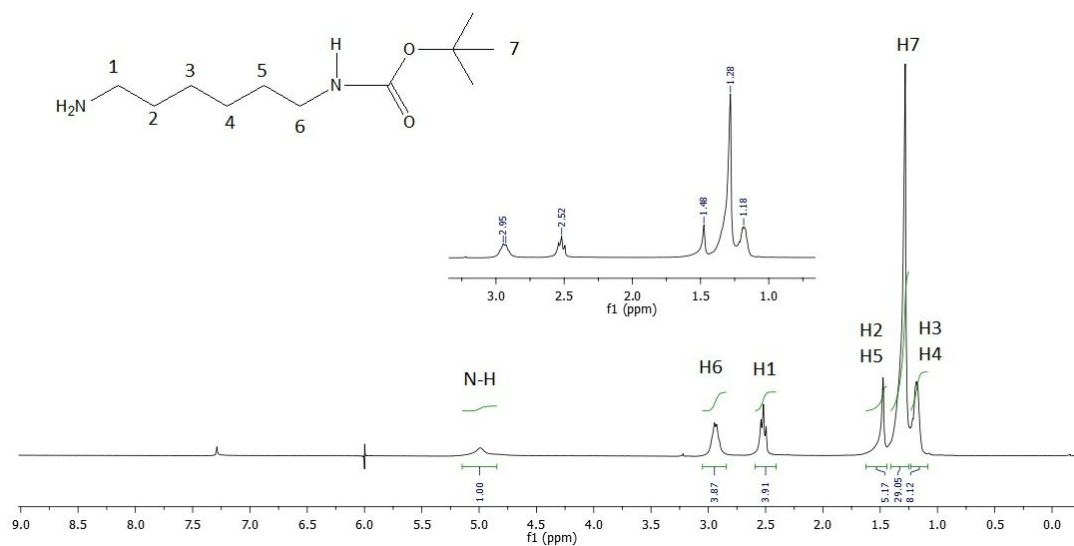
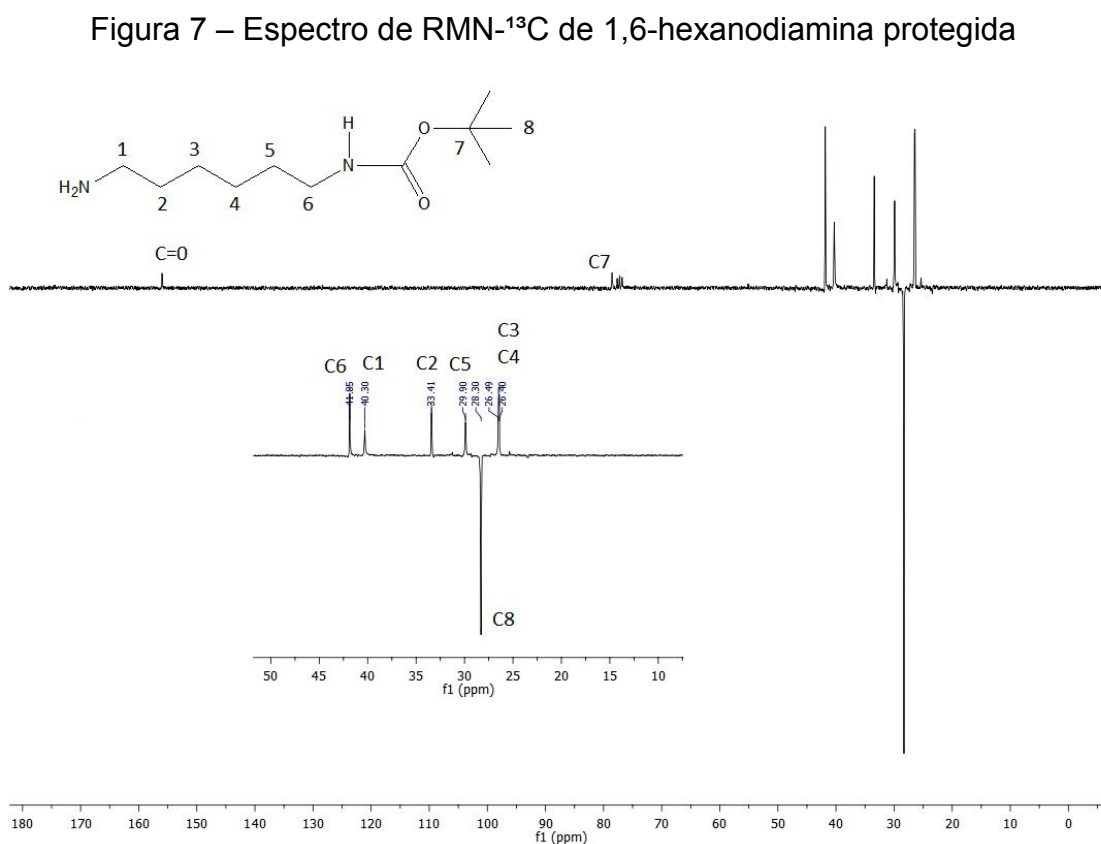


Figura 6 – Espectro de RMN-¹H de 1,6-hexanodiamina protegida



A caracterização por RMN-¹H (Figura 6) apresenta o singlete H7 característico dos hidrogênios da metila do Boc_2O em 1,28 ppm e um singlete do hidrogênio ligado ao nitrogênio protegido em 5,0 ppm. Isso evidencia a proteção da diamina em apenas um dos nitrogênios do composto. Os

multipletos H1 e H6 em 2,52 e 2,95 ppm, respectivamente, referem-se aos prótons dos carbonos mais próximos aos átomos de nitrogênio, enquanto que os multipletos em 1,18 e 1,48 ppm referem-se aos prótons da cadeia alquílica da diamina, H3, H4 e H2, H5, respectivamente. O singlete referente aos hidrogênios da amina desprotegida são observados no mesmo deslocamento químico dos hidrogênios H3 e H4.



A caracterização por RMN-¹³C (Figura 7), realizada no modo APT, demonstra os carbonos das metilas C8 do grupo protetor em 28,3 ppm e o carbono quaternário C7 em 78,6 ppm. O carbono referente a carbonila apresenta-se em 155 ppm. Os carbonos C1 a C6 referentes a cadeia alquílica apresentam-se em deslocamentos químicos entre 26,4 e 41,8 ppm.

5.1.2 Síntese da 1,6-hexanoamina-lofina protegida via reação tetracomponente

A próxima etapa da síntese consistiu na utilização da 1,6-hexanodiamina protegida em uma reação tetracomponente, gerando o núcleo lofínico no nitrogênio não protegido, obtendo a 1,6-hexanoamina-lofina protegida com base em uma metodologia desenvolvida pelo nosso grupo de pesquisa.¹⁹ (Esquema 5). Obteve-se este composto com rendimento de 89%, sendo que este foi purificado posteriormente por cromatografia em coluna, tendo em vista a necessidade da otimização do processo (Figura 8).

Esquema 5 – Síntese da 1,6-hexanoamina-lofina protegida

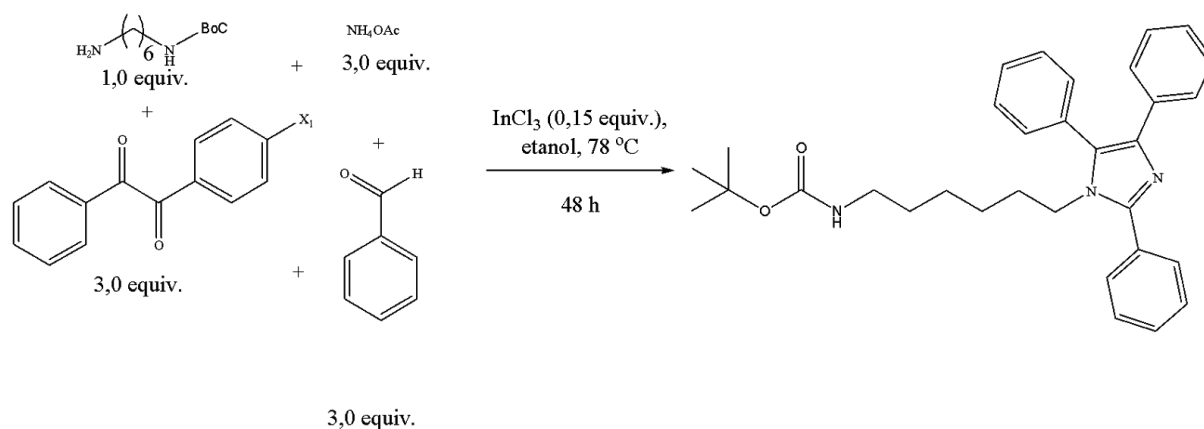


Figura 8 – Espectro de RMN-¹H da 1,6-hexanoamina-lofina protegida

A caracterização por RMN-¹H demonstra a manutenção da proteção da amina em apenas um dos nitrogênios do composto pelo grupo protetor, devido ao singlete em 1,4 ppm característico dos hidrogênios da metila do Boc₂O. Além disso, podemos evidenciar os multipletos característicos do grupo lofina entre 7,3 e 7,7 ppm. Os multipletos observados em 2,7, 3,8 e 6,6 ppm são observados referentes aos hidrogênios da cadeia alquílica espaçadora.

5.1.3 Hidrólise da 1,6-hexanamina-lofina protegida

A seguir, realizou-se a desproteção da 1,6-hexanoamina-lofina via hidrólise em meio ácido, com rendimento de 67% (Esquema 6). O produto desta reação é o composto precursor para a realização da reação de aminação redutiva com o salicilaldeído, gerando o 2-aminometilfenol-lofina de interesse para o trabalho. A reação global com as três etapas teve rendimento de 27%.

Esquema 6 – Hidrólise de mono-6-lofina protegida

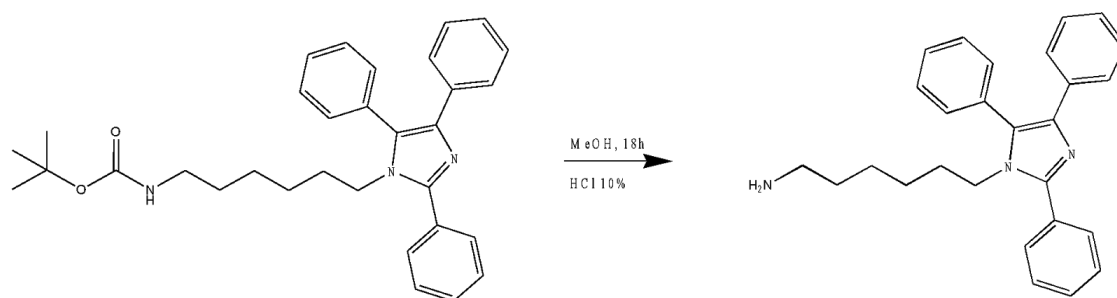
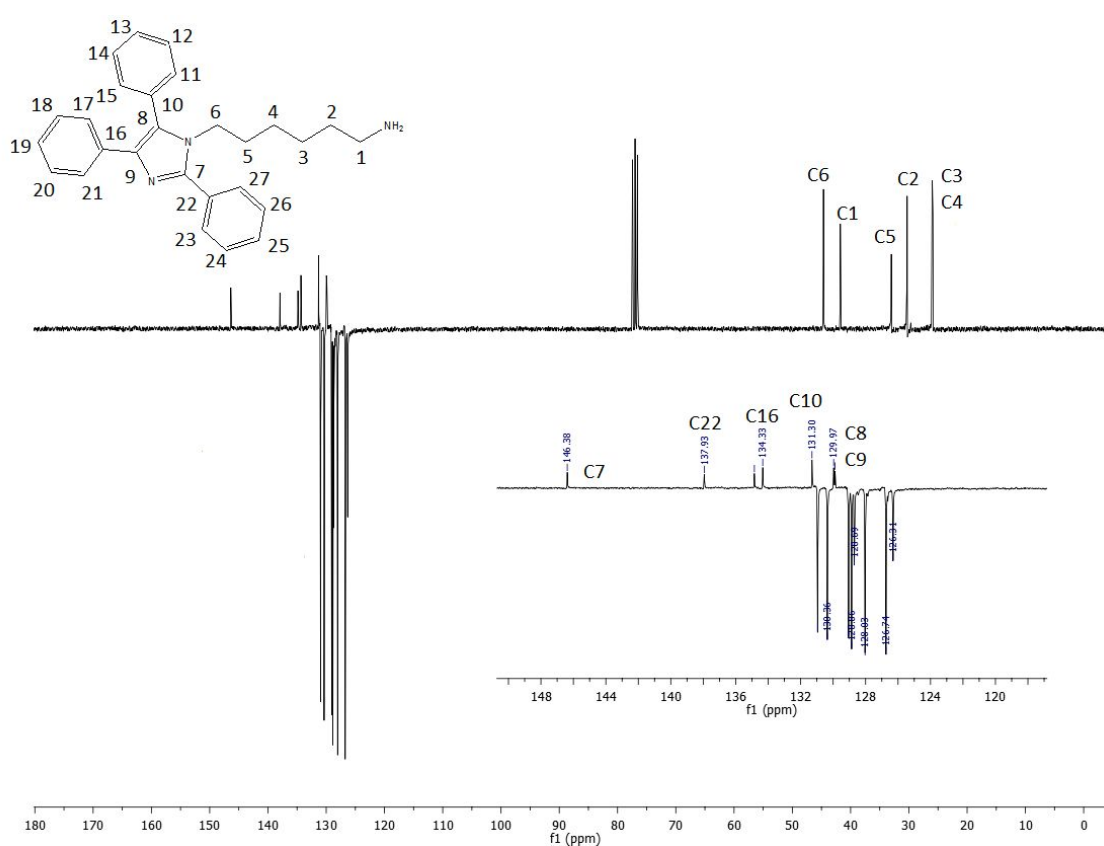


Figura 9 – Espectro de RMN-¹H de 1,6-hexanoamina-lofina purificada

Na Figura 9, é possível observar a ausência do singlete característico do grupo protetor, demonstrando a obtenção do produto desprotegido. Observa-se também o singlete em 1,66 ppm referente aos hidrogênios da amina. Os multipletos H3 e H4 observados em 0,98 ppm, H2 e H5 em 1,19 e 1,33 ppm, e os tripletos H1 e H6 em 2,52 e 3,86 ppm referem-se aos hidrogênios da cadeia alquílica. Os multipletos H7, H8 e H9 são característicos dos grupos benzílicos da lofina, e são observados entre 7,1 e 7,4 ppm.

Figura 10 – Espectro de RMN-¹³C de 1,6-hexanoamina-lofina purificada



A Figura 10 mostra o espectro de RMN-¹³C obtido, em que se observa os carbonos C1 a C6 referentes a cadeia alquílica entre 26 e 44 ppm. Observa-se a ausência do pico referente a carbonila do grupo protetor e observa-se os carbonos característicos do grupo lofina entre 126 e 147 ppm.

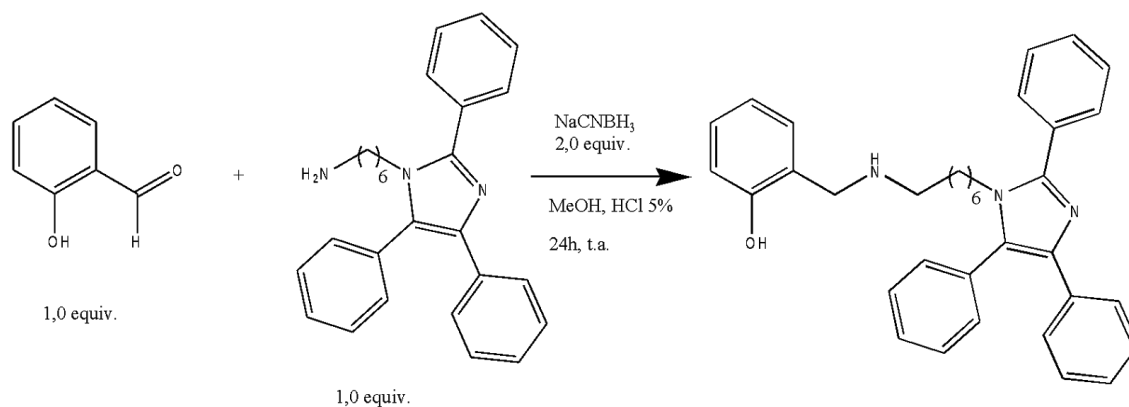
As reações foram posteriormente otimizadas para obtenção do intermediário 1,6-hexanoamina-lofina em maior rendimento. Para isso, foi

realizado um estudo avaliando-se o tempo de reação e a relação estequiométrica entre os reagentes.

5.2 COMPOSTOS 2-AMINOMETILFENOL-LOFINA

Após a obtenção da 1,6-hexanoamina-lofina, partiu-se para a síntese dos compostos 2-aminometilfenol-lofina. Inicialmente, estudou-se a reação de aminação redutiva empregando-se 1,0 equivalente do intermediário 1,6-hexanoamina-lofina e salicilaldeído, 2,0 equivalentes de NaCNBH₃ como redutor, metanol como solvente e HCl 5%, por 24h.²⁰ (Esquema 7)

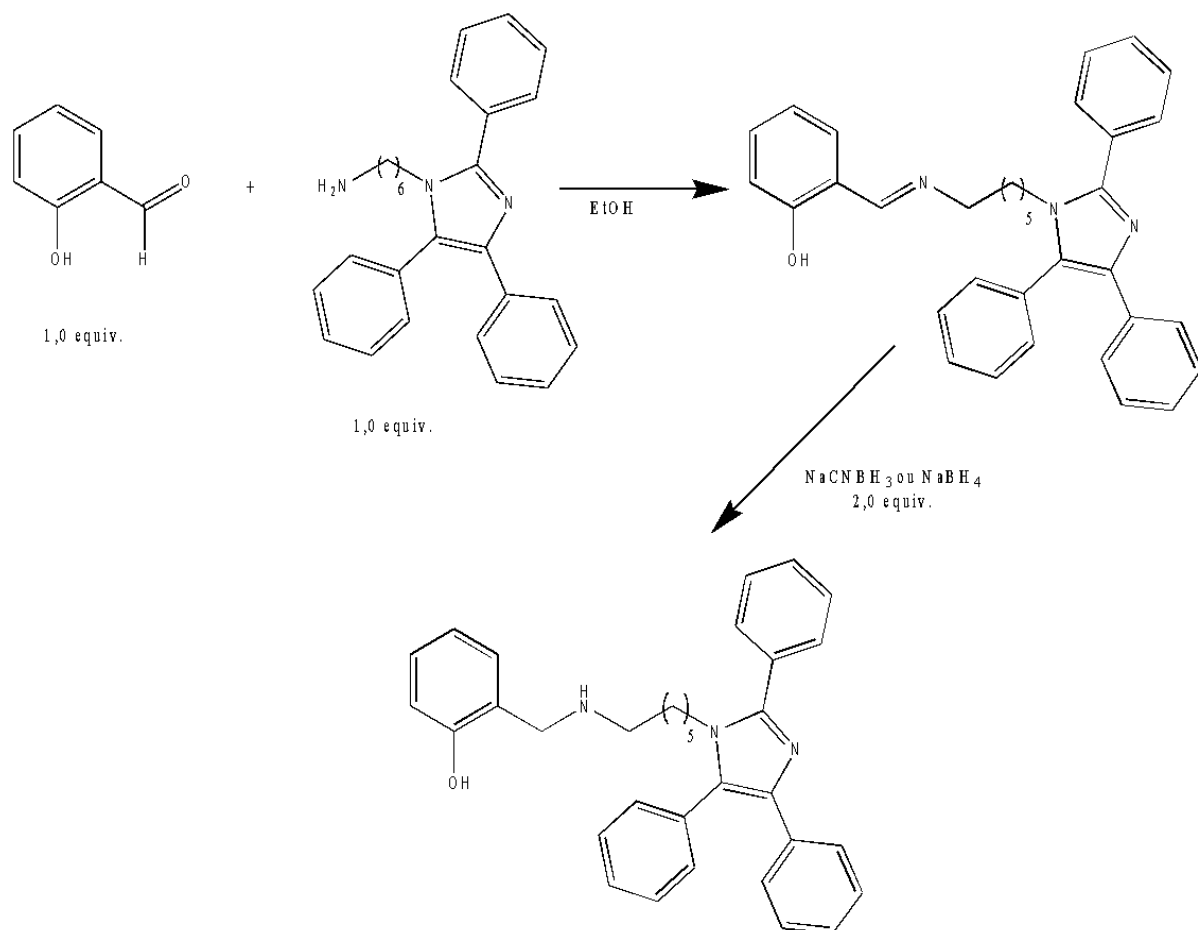
Esquema 7 - Uso de NaCNBH₃ para obtenção de 2-aminometilfenol-lofina



O acompanhamento da reação foi realizado por CCD utilizando como eluente hexano – acetato de etila – trietilamina na proporção 80:19:1 (v/v/v). Teve-se como referência os compostos de partida salicilaldeído e 1,6-hexamino-lofina, a avaliação por CCD apresentou apenas traços do composto de interesse.

Dessa forma, decidiu-se estudar outro procedimento experimental para a reação de aminação redutiva¹⁷, utilizando-se as seguintes condições reacionais: 1,0 equivalente da 1,6-hexanoamina-lofina e 1,0 equivalente do salicilaldeído em etanol como solvente, com intuito de gerar a imina correspondente *in situ*, para posterior adição do agente redutor, levando ao composto de objetivo do trabalho (Esquema 8). Os agentes redutores

estudados foram NaBH_4 e NaCNBH_3 , visando a otimização do rendimento reacional. O término da reação foi avaliado por CCD.



Esquema 8 - Reação de aminação redutiva para obtenção do 2-aminometilfenol-lofina.

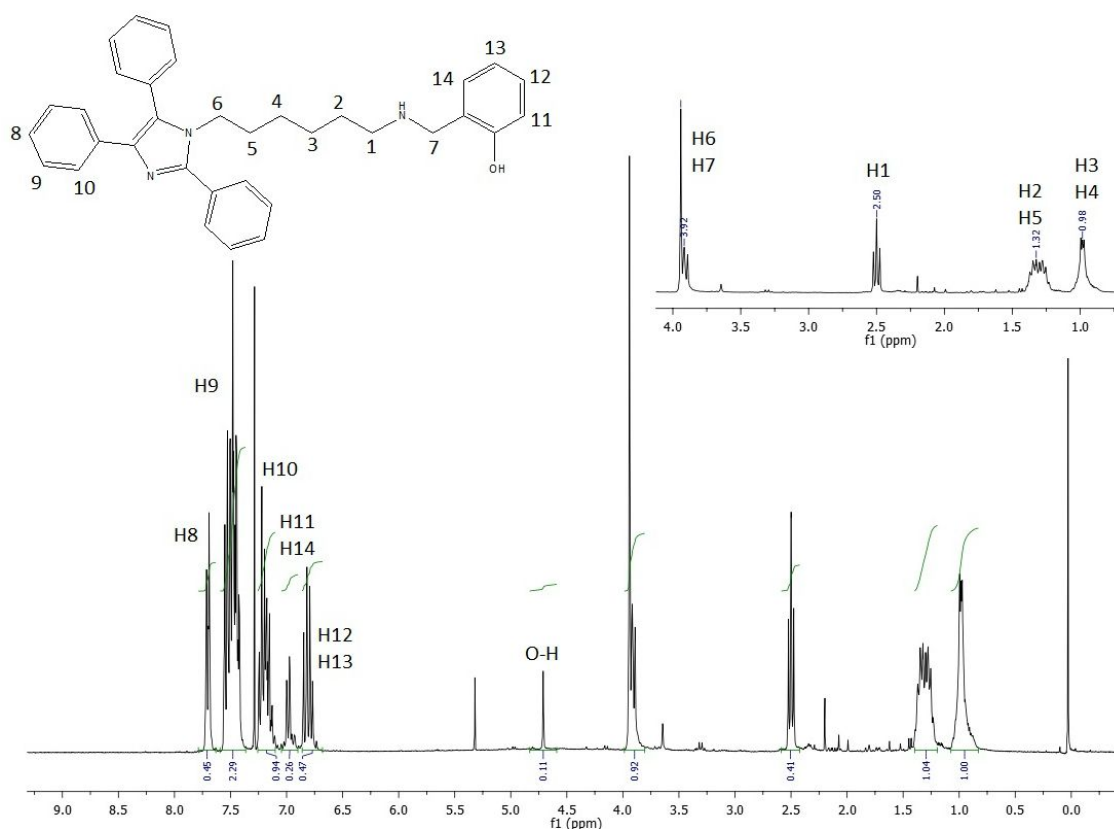
Essa estratégia demonstrou-se eficiente, pois se obteve o composto de interesse com rendimento de 78% com a utilização do NaBH_4 , enquanto que o emprego do NaBH_3CN resultou em rendimento de 37% (Tabela 1).

Tabela 1 - Reação de aminação redutiva

Entrada	Redutor	Solvente	Tempo (h)	Rendimento (%) ^a
1	NaBH_3CN	MeOH	24	-
2	NaBH_3CN	EtOH	7	37

^aAs reações foram realizadas a temperatura ambiente.

Figura 11 – Espectro de RMN-¹H de 2-aminometilfenol-lofina

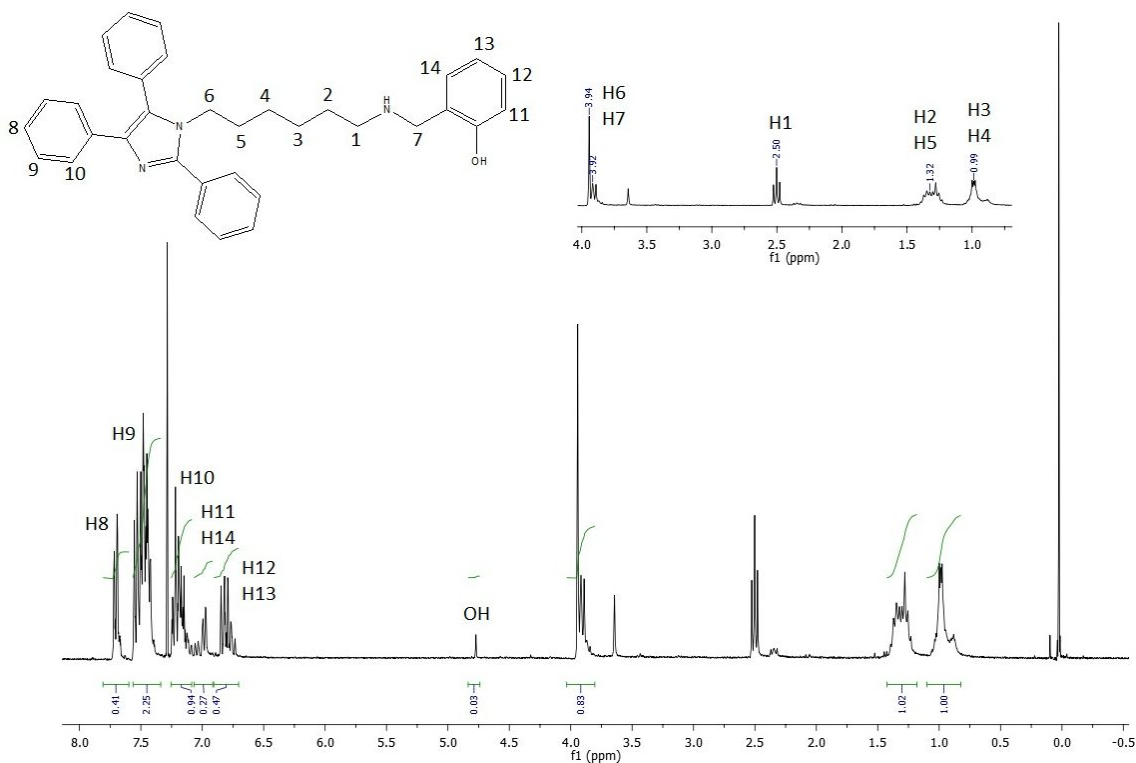


A Figura 11 mostra o espectro de RMN-¹H do produto após a segunda estratégia de reação de aminação redutiva. Em 3,92 ppm observa-se o singlete referente ao hidrogênio H7. Em 4,4 ppm observa-se o singlete referente ao hidrogênio da hidroxila do grupo salicil. Os multipletos observados entre 7,3 e 7,5 ppm são característicos do núcleo lofina, enquanto que os multipletos entre 6,4 e 7,0 ppm são característicos aos hidrogênios do anel aromático do núcleo salicil. Em mesmo deslocamento químico do H7, observa-se o tripleto H6; em 2,5 ppm o tripleto H1; e em 1,32 e 0,98 ppm estão os multipletos de H2 e H5, e H3 e H4, respectivamente.

Buscando a utilização desses compostos para a análise biológica, verificou-se as impurezas na região entre 1,4 e 2,3 ppm, tendo-se a necessidade de uma repurificação dos produtos, via cromatografia em coluna.

Utilizou-se como fase móvel clorofórmio – metanol - hidróxido de amônio em proporção 95:4:1 (v/v/v) e utilização de gradiente até 60:39:1 (v/v/v).

Figura 12 – Espectro de RMN-¹H da 2-aminometilfenol-lofina após segunda purificação



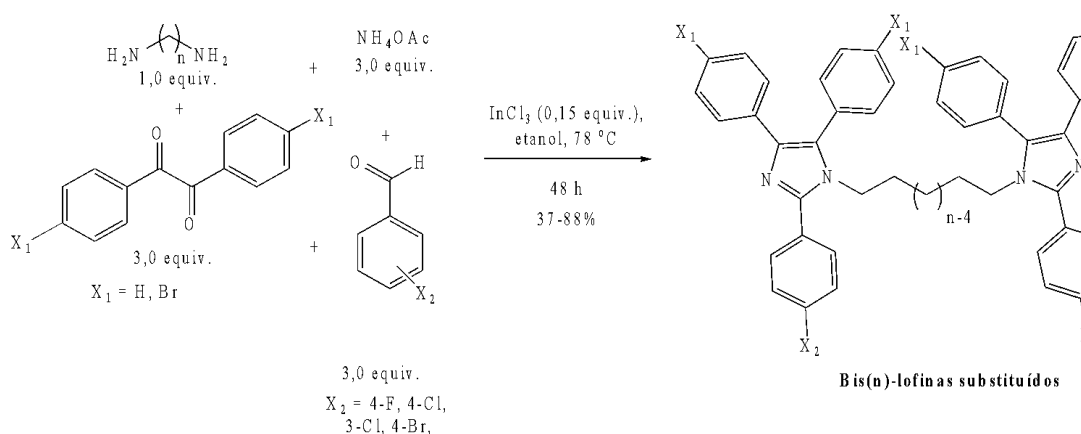
A Figura 12 apresenta o espectro após a repurificação da 2-aminometilfenol-lofina. Observam-se os mesmos picos referentes ao composto de interesse, no entanto, é também possível observar a ausência dos picos de impurezas na região entre 1.4 e 2.3 ppm. Portanto, o produto é obtido com pureza necessária para a subsequente análise biológica.

Figura 13 – Espectro de RMN-¹³C de 2-aminometilfenol-lofina após segunda purificação

De posse do composto 2-aminometilfenol-lofina purificado, realizou-se a caracterização via RMN-¹³C (Figura 13). Observam-se os picos referentes a cadeia alquílica C1 a C6 entre 25 e 49 ppm, além do C7 referente ao carbono metilênico originário do salicilaldeído em 52,6 ppm. Os picos característicos do núcleo salicil C9 em 147 ppm, C10 em 157 ppm e C11 a C14 entre 115 e 120 ppm, e os característicos do núcleo salicil entre 125 e 137 ppm, além do C8 em 160 ppm.

5.3 COMPOSTOS BIS-LOFINA

Os compostos bis-lofina foram sintetizados a partir de metodologia desenvolvida pelo grupo de pesquisa no qual esse trabalho se insere^{19,21,22}, sendo uma reação tetracomponente entre 1,n-alcanodiamina, benzila, benzaldeído e acetato de amônio, para a geração da amônia *in situ*, utilizando como catalisador um ácido de Lewis, com o objetivo de ampliar o escopo de compostos e avaliação de inibição das enzimas colinesterases. (Esquema 9)



Esquema 9 – Síntese de compostos bis-lofinas

Os compostos do tipo bis-lofina de interesse para este trabalho (Figura 14) foram obtidos com apenas uma purificação de cromatografia em coluna e

em rendimentos entre 37 e 88%, conforme a tabela 2. A escolha dos substituintes utilizados foi feita visando complementar a biblioteca desses compostos já existentes para o potencial combate a DA.

Figura 14 – Dímeros bis-lofinas substituídos

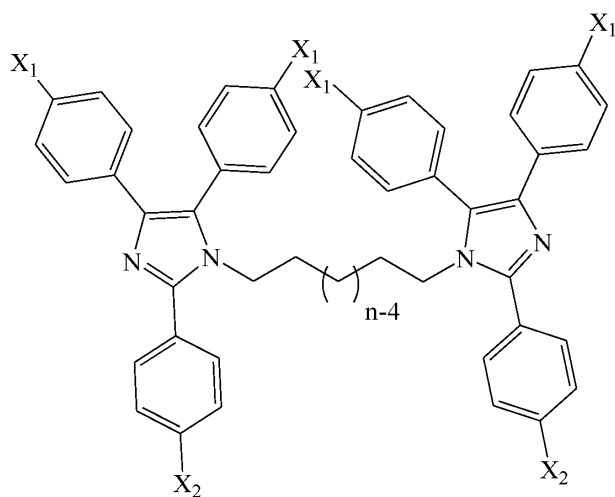
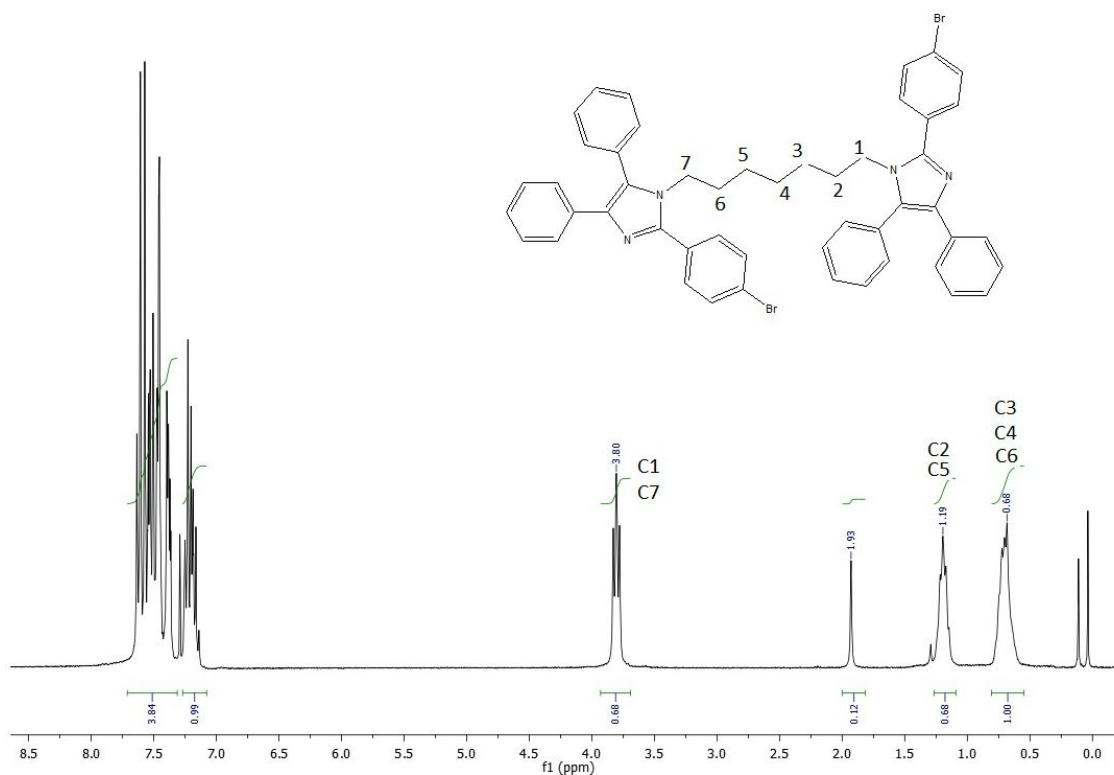


Tabela 2 - Rendimentos dos dímeros bis-lofinas.

Entrada	Composto	n	X ₁	X ₂	Rendimento (%)
1	R1RL	8	Br	H	37
2	R2RL	7	H	4-Cl	53
3	R3RL	7	H	4-F	39
4	R4RL	8	H	4-Br	67
5	R6RL	7	H	4-Br	88
6	R7RL	6	H	3-Cl	73

Figura 15 – Espectro de RMN-¹H do dímero bis-lofina n= 7 e X₂=4-Br (R6RL)



A Figura 15 apresenta o espectro de RMN-¹H do composto codificado como R6RL, que possui uma cadeia espaçadora alquílica de 7 carbonos e bromo como substituinte na posição 4 do reagente benzila.

Observa-se o tripleto em 3,80 ppm dos hidrogênios H1e H7 com deslocamento químico maior que a 1,7-heptanodiamina, indicando o acoplamento dos núcleos lofínicos. Os multipletos em 1,19 referem-se aos hidrogênios H2 e H6, e o multipletos em 0,68 ppm aos H3 e H5, mesmo deslocamento químico apresentado pelo H4. Os multipletos referentes ao anel benzílico do grupo lofina, apresentam-se entre 7,1 e 7,4 ppm.

Figura 16 – Espectro de RMN-¹³C do dímero bis-lofina n= 7 e X₂=4-Br (R6RL)

O espectro de RMN-¹³C apresentado na Figura 16 apresenta os picos dos carbonos C2 a C7 entre 24 e 28 ppm e C1 e C7 em 45 ppm referentes aos da cadeia alquílica espaçadora. Os sete carbonos quaternários do núcleo lofina apresentam-se entre 123 e 155 ppm, com destaque para o correspondente aos dois carbonos ligados ao bromo, observado em 155 ppm. Os demais carbonos benzílicos apresentam-se entre 126 e 133 ppm.

5.4 TESTES DE INIBIÇÃO DAS ENZIMAS COLINESTERASES

A biblioteca de compostos bis-lofina foram avaliados em testes *in vitro*, referentes à atividade inibitória frente às enzimas AChE e BuChE, em córtex do cérebro de ratos. A atividade da enzima foi medida empregando-se o método de Ellman²³ (Tabela 3). Os ensaios biológicos foram realizados no Departamento de Bioquímica - Instituto de Ciências Básicas da Saúde – UFRGS.

Tabela 3 - Atividade biológica dos compostos bis-lofina

Entrada	Composto	N	X ₁	X ₂	% de moléculas ativas em 300 nM	
					AChE	BuChE
1	R1RL	8	Br	H	n.a	n.a
2	R2RL	7	H	4-Cl	n.a	n.a
3	R3RL	7	H	4-F	n.a	n.a
4	R4RL	8	H	4-Br	n.a	13,06±3,65
5	R6RL	7	H	4-Br	n.a	n.a
6	R7RL	6	H	3-Cl	n.a	13,75± 5,23%
7	Lofina	-	-	-	n.a	17,39± 7,21%

n.a. – não-ativo.

É possível analisar que os compostos com cadeia espaçadora de 7 carbonos, nas entradas 2, 3 e 5, não apresentaram atividade biológica para

nenhuma das duas enzimas. O composto da entrada 1, contendo um grupo brometo substituinte no reagente benzila também não apresentou atividade biológica. Os compostos das entradas 4 e 6 apresentaram seletividade para a enzima BuChE e com potência equivalente a lofina.¹⁹

6. CONCLUSÕES

A metodologia do trabalho descrito para a obtenção dos híbridos 2-aminometilfenol-lofina demonstrou-se bastante eficaz. A etapa determinante é a reação de aminação redutiva, na qual obteve-se uma síntese com bom rendimento.

Observa-se com essa síntese que o agente redutor de maior eficácia é o NaBH_4 em comparação ao NaCNBH_3 , sendo essa uma metodologia importante para a obtenção de uma biblioteca de compostos de interesse para realização de testes biológicos visando a DA. Os compostos puros foram confirmados via análises de RMN de ^1H .

Neste trabalho também foram sintetizados 6 novos compostos do tipo bis-lofina através de metodologia otimizada pelo nosso grupo de pesquisa. Os rendimentos foram satisfatórios e com obtenção dos compostos puros para análise biológica, analisados via RMN de ^1H e ^{13}C . A avaliação biológica realizada demonstrou os resultados preliminares da inibição das enzimas AChE e BuChE, sendo que os compostos com cadeia de 7 carbonos não apresentaram atividade. Esses resultados servem como parâmetro para as sínteses de novos compostos.

A sequência do trabalho segue com o aumento da biblioteca de compostos com potencial atividade biológica para o tratamento da doença de Alzheimer, variando substituintes no anel salicílico e variando o tamanho da cadeia aquílica.

7. PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

7.1 REAÇÃO DE PROTEÇÃO DA 1,6-HEXANODIAMINA

Dissolveu-se 2,35 g (3,0 equivalentes) de 1,6-hexanodiamina em 80,8 mL de clorofórmio e adicionou-se gota a gota, a 0 °C 0,73 g (0,5 equivalente) de carbonato de di-terc-butila (Boc_2O) dissolvido em 6,8 mL de clorofórmio, por 1,5 hora. Após a adição, manteve-se a reação sob agitação em temperatura ambiente por 22 horas. Depois deste período, adicionou-se mais 0,37 g (0,25 equivalente) de Boc_2O em 3,4 mL de CHCl_3 gota a gota por 1,5 hora, a 0 °C. A seguir, deixou-se a mistura reacional alcançar a temperatura ambiente e manteve-se nestas condições por mais 7 horas, repetindo a última etapa. Após, manteve-se nestas condições por 1,5h e a temperatura ambiente por 16h.

O solvente foi removido em evaporador rotatório. A mistura resultante foi diluída com 45 mL de acetato de etila e foi feita a lavagem por 3 vezes com 18 mL de uma solução saturada de NaCl. A fase orgânica obtida foi seca com Na_2SO_4 anidro e filtrada. Evaporou-se o solvente e realizou-se a purificação por cromatografia em coluna com fase móvel de clorofórmio – metanol – trietilamina na proporção 95:4:1 (v/v/v) gradiente até 90:9:1 (v/v/v) e caracterização por RMN- ^1H e RMN- ^{13}C .

7.2 SÍNTESE DA 1,6-HEXANOAMINA-LOFINA PROTEGIDA VIA REAÇÃO TETRACOMPONENTE

Adicionou-se 64,8 mg da 1,6-hexanodiamina protegida, 63,1 mg de benzila, 31,5 mg de benzaldeído e 23,1 mg de acetato de amônio (NH_4OAc) (1,0 equivalente cada), sob refluxo em 1 mL de etanol, empregando-se 9,9 mg (0,15 equivalente) de tricloreto de índio (InCl_3) como catalisador. O sistema foi mantido sob agitação, em refluxo, em banho de óleo a 78 °C., durante 36 horas. Após, o solvente foi removido em evaporador rotatório e posteriormente por alto vácuo (5 horas, a 50 °C).

7.3 HIDRÓLISE DA 1,6-HEXANOAMINA-LOFINA PROTEGIDA

Dissolveu-se a mono-6-lofina protegida em metanol acidificado com HCl a 10%, mantendo a reação em refluxo a 90 °C por cerca de 18 horas, realizando o acompanhamento da reação via CCD, usando como fase móvel hexano – acetato de etila – trietilamina em proporção 70:29:1 (v/v/v), e revelação em vanilina sob aquecimento.

O tratamento da reação ocorreu com adição de NaOH concentrado até atingir pH 11 e subsequente evaporação do solvente. A seguir, extraiu-se com três vezes de 10 ml de acetato de etila, secagem da fase orgânica com Na₂SO₄ anidro e filtração. Manteve-se o produto obtido em vácuo por 1,5 h a 80 °C. O produto foi então purificado via cromatografia em coluna com fase móvel de clorofórmio – metanol – hidróxido de amônio em proporção 95:4,5:0,5 (v/v/v) gradiente até 85:14,5:0,5 (v/v/v) e caracterização por RMN-¹H e RMN-¹³C.

7.4 SÍNTESE DE 2-AMINOMETILFENOL-LOFINA

7.4.1 Primeiro procedimento

Adicionou-se 180,0 mg de 1,6-hexanoamina-lofina e 55,0 mg de salicilaldeído (1,0 equivalente cada) e 56,7 mg de NaCNBH₃ (2,0 equivalentes) a 5 mL de metanol acidificado até pH aparente igual a 4 com HCl 5%, mantendo-se a temperatura ambiente por 24h.

O acompanhamento da reação foi realizado por CCD utilizando como eluente hexano – acetato de etila – trietilamina em proporção 80:19:1 (v/v/v).

7.4.2 Segundo procedimento

Dissolveu-se 197,5 mg da 1,6-hexanoamina-lofina e 61 mg do salicilaldeído em 2 mL de etanol, mantendo a temperatura ambiente por 5 horas. Após esse tempo, resfriou-se o meio a 0 °C para adição de 1,0 equivalente do agente redutor (37,8 mg de NaBH₄ ou 62,84 mg de NaCNBH₃), e posteriormente manteve-se a mistura reacional a temperatura ambiente. Realizou-se o acompanhamento da reação via CCD utilizando como eluente hexano –

acetato de etila – trietilamina em proporção 80:19:1 (v/v/v). Verificou-se o término da reação após 2 horas.

A reação foi interrompida adicionando-se 10 mL de água. A mistura resultante foi extraída três vezes com 10 mL de acetato de etila e três vezes com 10 mL de salmoura. Após evaporação do solvente em evaporador rotatório, realizou-se a purificação por cromatografia em coluna utilizando-se como fase móvel clorofórmio – metanol – hidróxido de amônio em proporção 10:1:1 (v/v/v) no modo isocrático.

7.5 SÍNTHESE DE DÍMEROS BIS-LOFINA

A reação tetracomponente entre 1,n-alcanodiaminas (n=6, 7, 8), benzilas, benzaldeído e acetato de amônio, foi realizada sob refluxo em etanol por 48 h, empregando-se tricloreto de índio como catalisador. Os produtos foram obtidos após purificação por cromatografia em coluna em sílica gel, empregando-se como mistura eluente hexano - acetato de etila – trietilamina em proporção 90:9:1 (v/v/v) em gradiente até 50:49:1 (v/v/v).

8. REFERÊNCIAS

1. 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. **Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions**. V. 1, 171-176, 1997.

2. a) BARTUS, R. T.; **Experimental Neurology**. v. 163, 495-529, 2000;
b) BARTUS, R. T.; DEAN III, R. L.; BEER, B.; LIPPA, A. S.; **Science**. V 217, pg 408.
3. HUANG, L.; SU, T.; SHAN, W.; LUO, Z.; SUN, Y.; HE, F.; LI, X.; **Bioorganic and Medicinal Chemistry**. V 20, pg 3038, 2012.
4. DOOLEY, M.; LAMB, H. M., **Drugs & Aging**. V 16, PG 199, 2000.
5. PANG, Y.-P.; KOZIKOWSKI, A. P., **Journal of Computational Aided Molecular Design**.v 8, pg 669, 1994.
6. PANG, Y. P.; QUIRAM, P.; JELACIC, T.; HONG, F.; BRIMIJOIN, S.; Highly Potent, Selective, and Low Cost Bis-tetrahydroaminacrine Inhibitors of Acetylcholinesterase. **The Journal of Biological Chemistry**. V. 271, n. 39,pg 23646-23649, 1996.
7. RYDBERG, E. H. *et al.*; Complexes of Alkylene-Linked Tacrine Dimers with *Torpedo californica* Acetylcholinesterase: Binding of Bis(5)-tacrine Produces a Dramatic Rearrangement in the Active-Site Gorge. **Journal of Medicinal Chemistry**. V 49, pg 5491-5500, 2006.
8. SATYANARAYANA, V. S. V.; SIVAKUMAR, A.; An efficient and novel one-pot synthesis of 2,4,5-triaryl-1*H*-imidazoles catalyzed by UO₂(NO₃)₂·6H₂O under heterogeneous conditions. **Chemical Papers** . v 65, pg 519-526, 2011.
9. ARISPE, N.; DIAZ, J. C.; FLORA, M.; Efficiency of Histidine-Associating Compounds for blocking the Alzheimer's AB Channel Activity and Cytotoxicity. **Biophysical Journal**. v. 95, p. 4879-4889, 2008.
10. JIN Z, *Nat Prod Rep* **2005**, 22, 196
11. LEE, J.C. *et al.*; **Nature**. V 372, pg 739, 1994.
12. M.M.; Derikvand F.; Haghghi M., *Monatshefte für Chemie* **2008**, 139, 31
13. Frantz DE, Morency L, Soheili A, Murry JA, Grabowski EJJ, Tillyer RD *Org Lett*, **2006**, 6, 843
14. SSKO, J.; MELLINGER M., **Pure and Applied Chemistry**. v. 74, pg 349, 2002

15. PRUDENT, R.; LÓPEZ-RAMOS, M.; MOUCADEL, V.; BARETTE, C.; GRIERSON, D.; MOUAWAD, L.; FLORENT, J. C.; LAFANÈCHERE, L.; SCHMIDT, F.; COCHET, C.; Salicylaldehyde derivatives as new protein kinase CK2 inhibitors. **Biochimica et biophysica Acta**. V 1780, pg 1412-1420, 2008.
16. PELTTARI, E.; KARHUMAKI, E.; LANGSHAW, J.; PERAKYLA, H.; ELO, H.; Antimicrobial Properties of substituted Salicylaldehydes and Related Compounds. **Z. Naturforsch.** V 62, pg 487-497, 2007.
17. HORACKOVA, M.; PONKA, P.; BYCZKO, Z., The antioxidant effects of a novel iron chelator salicylaldehyde isonicotinoyl hydrazone in the prevention of H₂O₂ injury in adult cardiomyocytes. **Cardiovascular Research**. V 47, pg 529-536, 2000.
18. HUANG, Z.; LUO, W.; LI Y.; HUANG, S.; TAN, J.; OU, T.; LI, D.; GU, L. O-Hydroxyl- or o-amino benzylamine-tacrine hybrids: Multifunctional biometals chelators, antioxidants, and inhibitors of cholinesterase activity and amyloid-B aggregation. **Bioorganic Medicinal Chemistry**. V 20, pg 5884-5892, 2012.
19. DA COSTA, J. S. **Síntese de compostos híbridos tacrina-lofina, tacrina-tianeptina e dímeros bis(n)-lofinas com potencial aplicação no tratamento da doença de Alzheimer**. 2014. Tese. Doutorado. UFRGS. Porto Alegre.
20. LANE, C. F.; Sodium Cyanoborohydride - A Highly Effective Reducing Agent for Organic Functional Compounds. **Synthesis**, 135, 1975.
21. Pisoni, D. S.; da Costa, J. S.; Gamba, D.; Petzhold, C. L.; Borges, A. C. A.; Ceschi, M. A.; Lunardi, P.; Gonçalves, C. A. S. *Eur. J. Med. Chem.* **2010**, 45, 526.
22. DA COSTA, J. S.; LOPES, J. P. B.; RUSSOWSKY, D.; PETZOLD, C. L.; BORGES, A. C. A.; CESCHI, M. A.; KONRATH, E.; Batassini, C.; LUNARDI, P. S.; GONÇALVES, C. A. S. Synthesis of tacrine-lophine hybrids via one-pot four component reaction and biological evaluation as acetyl- and butyrylcholinesterase inhibitors.

European Journal of Medicinal Chemistry . v 62, pg 556-563,
2013.

23. ELLMAN, G.L.; COURTNEY, K.D.; ANDRES, V.; FEATHERSTONE,
R.M. A New and Rapid Colorimetric Determination of
Acetylcholinesterase Activity. **Biochemical Pharmacology**. v. 7, pg
88-95, 1961.