

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA  
FACULDADE DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

LUCIANA DE CAMARGO NASCENTE

SÍNTESE E AVALIAÇÃO DE DERIVADOS TETRAIDROACRIDÍNICOS  
PLANEJADOS A PARTIR DOS LIPÍDEOS FENÓLICOS DO LCC COMO  
LIGANTES MULTIALVO PARA A DOENÇA DE ALZHEIMER

Brasília  
2023

LUCIANA DE CAMARGO NASCENTE

SÍNTESE E AVALIAÇÃO DE DERIVADOS TETRAIDROACRIDÍNICOS  
PLANEJADOS A PARTIR DOS LIPÍDEOS FENÓLICOS DO LCC COMO LIGANTES  
MULTIALVO PARA A DOENÇA DE ALZHEIMER

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêutica da Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade de Brasília, como requisito parcial para a obtenção do Título de Doutor em Ciências Farmacêuticas.

Orientador: Dr. Luiz Antonio Soares Romeiro

Brasília  
2023

Não autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de ensino, estudo ou pesquisa.

LUCIANA DE CAMARGO NASCENTE

SÍNTESE E AVALIAÇÃO DE DERIVADOS TETRAIDROACRIDÍNICOS  
PLANEJADOS A PARTIR DOS LIPÍDEOS FENÓLICOS DO LCC COMO LIGANTES  
MULTIALVO PARA A DOENÇA DE ALZHEIMER

Qualificação apresentada como requisito parcial para a obtenção do Título de Doutor em Ciências Farmacêuticas pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade de Brasília.

Aprovada em \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de 2023.

**Banca Examinadora**

---

Dr. Luiz Antonio Soares Romeiro (UnB)

---

Dr. Ricardo Menegatti (UFG)

---

Dra. Laís Flávia Nunes Lemes (UCB)

---

Dra. Cecília Beatriz Fiuza Favali (UnB)

---

Dra. Giselle de Andrade Ramos (MS)

Brasília  
2023

## AGRADECIMENTOS

A Deus por ter me sustentado, dando-me força e coragem para chegar até aqui e ao meu anjo da guarda, por estar comigo em todos os momentos da minha vida.

Aos meus pais, Alberto Torres Nascente e Maria Alice de Camargo Nascente pela paciência e ajuda quando precisei deixar Amanda com eles. Ao meu avô e avó pelo incentivo e ao meu irmão e cunhada Pedro e Daniela pelo amor, dedicação e compreensão e agora com nosso pequeno Benício.

À minha filha Amanda que veio no meio do desenvolvimento da minha primeira tentativa de ser Doutora e que me ensina todos os dias o real sentido da vida. E agora depois de quase nove anos, entre noites sem dormir, choros incansáveis, brincadeiras, abraços e “Mamãe, Eu te amo”, estou finalmente entregando minha tese.

Ao Prof. Dr. Luiz Antonio Soares Romeiro pela orientação, discussões teóricas, dedicação, paciência e por ser uma pessoa fantástica que me proporcionou a oportunidade de compreender melhor a Química Orgânica. Se eu sou a profissional que eu sou hoje é graças a ele que nunca me deixou desistir e sempre esteve comigo nas horas boas e difíceis. A convivência já de vinte anos fez dele, além de um grande orientador, um grande amigo que me incentiva todos os dias e me mostra sempre que eu sou capaz mesmo com todas as dificuldades que possam existir.

À profa. Italiana Dra. Maria Laura Bolognesi e à todos do Laboratório Alma Master da Universidade de Bologna que me receberam de braços abertos na visita técnica que fiz em julho de 2018. Foi uma experiência incrível poder aprender com eles.

A uma pessoa muito querida que conheci no desenvolvimento deste trabalho, meu professor de italiano Caio Franco Mitidiero, que não mediu esforços para me ajudar enquanto estive na Itália e que sempre me incentivou e me motivou mesmo quando achei que não iria conseguir. Hoje além de

professor ele se tornou um grande amigo. Gratidão pelo apoio e pelas horas de conversas e risadas.

Aos professores e alunos do Laboratório de Desenvolvimento de Inovações Terapêuticas (LDT) pelo incentivo, discussões teóricas e pelos momentos agradáveis vividos e em especial à Sarah Melo e Andressa Souza pela grande ajuda no desenvolvimento deste trabalho.

A todos os colegas e professores que participaram da minha vida acadêmica durante este período e a todos que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

A Central Analítica da Universidade de Brasília, e ao Centro Nordestino de Aplicação e Uso de Ressonância Magnética Nuclear da Universidade Federal do Ceará, a Dr. Edilberto R. Silveira e a Dr. Patrícia Coelho pela concessão de espectros RMN de  $^1\text{H}$  e RMN de  $^{13}\text{C}$ .

À Universidade de Brasília pelo espaço cedido, apoio e investimento.

E desde já, à banca examinadora pelo aceite do convite e pelas contribuições prestadas.

## RESUMO

A doença de Alzheimer continua sendo um dos grandes desafios da saúde pública, cujo número de pacientes afetados aumentará de 35 milhões para surpreendentes 139 milhões até 2050. A incerteza sobre a etiologia e a natureza multifatorial da doença de Alzheimer (DA) são razões para a falta de fármacos eficazes ao mesmo tempo que são a base para o desenvolvimento de ligantes multialvos-dirigidos (LMAD). À medida que os casos aumentam nos países em desenvolvimento, há necessidade de novos medicamentos que sejam não apenas eficazes, mas também acessíveis. Com essa motivação, descrevemos os primeiros LMAD sustentáveis, derivados do líquido da casca de castanha de caju (LCC) – resíduo alimentar barato com propriedades anti-inflamatórias. Aplicamos uma combinação das estruturas dos componentes do LCC funcionalizados e modelos de acetilcolinesterase (AChE)/butirilcolinesterase (BChE) bem estabelecidos para a tacrina. Os LMAD foram selecionados com base na toxicidade em células hepáticas, neuronais e microgliais. Estudos enzimáticos revelaram inibidores potentes e seletivos de AChE/BChE (**43**, **44** e **61**), com atividades subnanomolares. A investigação em células da microglia BV-2 revelou atividades antineuroinflamatórias e neuroprotetoras para **43** e **44** (a 0,01  $\mu\text{M}$ ), confirmando o planejamento racional para esta classe de compostos.

Palavras-chave: Doença de Alzheimer, colinesterases, Ligantes Multialvo-dirigidos, Híbridos tacrina, LCC

## ABSTRAT

Alzheimer's disease remains one of the great public health challenges, whose number of affected patients will increase from 35 million to an astonishing 139 million by 2050. Uncertainty about the etiology and multifactorial nature of Alzheimer's disease (AD) are reasons for the lack of effective drugs while being the basis for developing multi-target ligands (MTDLs). As cases increase in developing countries, there is a need for new drugs that are not only effective but also affordable. With that motivation, we describe the first sustainable MTDLs, derived from cashew nut shell liquid (CNSL) – inexpensive food waste with anti-inflammatory properties. We apply a combination of functionalized CNSL component structures and well-established acetylcholinesterase (AChE)/butyrylcholinesterase (BChE) tacrine templates. MTDLs were selected based on hepatic, neuronal, and microglial cell toxicity. Enzymatic studies revealed potent and selective AChE/BChE inhibitors (**43**, **44**, and **61**) with subnanomolar activities. Investigation in BV-2 microglial cells revealed antineuroinflammatory and neuroprotective activities for **43** and **44** (at 0.01  $\mu$ M), confirming the rational design for this class of compounds.

Keywords: Alzheimer's disease, cholinesterases, Multi-target-directed ligands, tacrine hybrids, CNSL



## LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Projeção da população por sexo e idade para o Brasil até 2060	22
Figura 1: Multifatores relacionados com a DA	25
Figura 2: Biossíntese da acetilcolina (ACh) e transmissão colinérgica	27
Figura 3: Desenho hipotético da enzima AChE	28
Figura 4: Inibidores da enzima AChE	32
Figura 5: Tetraidroacridinas utilizadas na síntese de LMADs	33
Figura 7: Memantina: Antagonista de receptor NMDA	33
Figura 8: Anti-inflamatórios não esteroidais	34
Figura 9: LMADs contendo as subunidades tetraidroacridinas	36
Figura 10: Lipídeos fenólicos não isoprenóides constituintes do LCC	37
Figura 11: Planejamento racional de compostos anticolinesterásicos a partir dos lipídeos fenólicos do LCC	40
Figura 12: Hibridação molecular de derivados do LCC com derivados da THA	39
Figura 13: Mistura de anacardatos de cálcio ( <b>76</b> )	48
Figura 14: Sinais de RMN de $^1\text{H}$ para o anel aromático das THAs 1 e 5	52
Figura 15: Translocação nuclear de NF- $\kappa$ B em células BV-2 induzidas por LPS tratadas com <b>19a</b> , <b>5</b> , <b>43</b> e <b>44</b>	66
Figura 16: Numeração e legendas empregadas nos assinalamentos de sinais em espectros de RMN de $^1\text{H}$ e RMN $^{13}\text{C}$	75

## LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1: Crescimento do número de pessoas com demência (em milhões) em países de elevado, baixo e médio rendimento.	23
Gráfico 2: Efeito dos híbridos na sobrevivência/morte celular através do ensaio de MTT em células SH-SY5Y nas concentrações de 0,1 $\mu\text{M}$ e 1 $\mu\text{M}$ dos derivados-alvo 43, 44, 47, 61, 62, 65, 73 e 74 por 24 horas	60
Gráfico 3: Efeito dos híbridos na sobrevivência/morte celular através do ensaio de MTT em células BV-2 nas concentrações de 0,1 $\mu\text{M}$ e 1 $\mu\text{M}$ dos derivados-alvo 43, 44, 47, 61, 62, 65, 73 e 74 por 24 horas	61
Gráfico 4: Efeitos anti-inflamatórios de 43, 44, 47, 61, 62, 65, 73 e 74 contra LPS em células BV-2. As células BV-2 foram tratadas com concentração crescente dos compostos selecionados (0,01 $\mu\text{M}$ e 0,1 $\mu\text{M}$ ) por 24 horas e expostas a LPS 100 ng/mL por mais 24 horas	62
Gráfico 5: Expressão de citocinas e enzimas pró-inflamatórias em células BV-2 induzidas por LPS tratadas com 19a, 1, 43 e 44 . As células BV-2 foram tratadas com 1 (0,1 $\mu\text{M}$ ) por 24 horas e expostas a LPS 100 ng/mL por mais 24 horas	63
Gráfico 6: Secreção de IL1- $\beta$ em células BV-2 ativadas tratadas com 43 e 44. As células BV-2 foram tratadas com 43 e 44 (0,1 $\mu\text{M}$ ) por 24 horas e expostas a 100 ng / mL LPS por mais 24 horas	65
Gráfico 7: Estabilidade do composto 43 no plasma humano após incubação a 37 °C. A concentração foi avaliada por meio de HPLC-MS. As análises foram realizadas em duplicata	68

## LISTA DE ESQUEMAS

Esquema 1: Rota sintética para obtenção de intermediários e derivados-alvo	44
Esquema 2: Rota sintética para obtenção dos intermediários <b>78</b> e <b>35</b>	50
Esquema 3: Obtenção das tetraidroacridinas THA ( <b>1</b> ) e 6-Cl-THA ( <b>5</b> )	52

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Composições químicas dos LCC natural e técnico	38,49
Tabela 2: Composição percentual relativa de insaturações nos constituintes fenólicos do LCC obtida por CG/MSa	38
Tabela 3: Dados de Rendimento e RMN ( <sup>1</sup> H e <sup>13</sup> C) para os derivados de <b>27-29</b> e <b>35</b>	52
Tabela 4: Dados de Rendimento e RMN ( <sup>1</sup> H e <sup>13</sup> C) para os derivados de <b>37-39</b> e <b>41</b>	52
Tabela 5: Estudo das condições experimentais para as reações S <sub>N</sub> 2 entre as THAs ( <b>1</b> , <b>5</b> e <b>6</b> ) e os mesilatos ( <b>38-40</b> e <b>42</b> )	54
Tabela 6: Dados de Rendimento e RMN ( <sup>1</sup> H e <sup>13</sup> C) para os derivados-alvo <b>43-47</b> , <b>49-50</b> e <b>55-56</b>	55
Tabela 7: Perfil de atividades dos compostos <b>43-47</b> , <b>49-50</b> , <b>61-62</b> , <b>64-65</b> e <b>73-74</b> e compostos de referência <b>1</b> , <b>5</b> e <b>6</b> frente às enzimas hAChE e hBChE	57
Tabela 8: Perfil de citotoxicidade em células HepG2 dos compostos <b>43-47</b> , <b>49-50</b> , <b>61-62</b> , <b>64-65</b> e <b>73-74</b> e compostos de referência <b>1</b> e <b>19a</b>	59
Tabela 9: Predições da permeabilidade da BHE <i>in vitro</i> (P <sub>e</sub> ) para os derivados <b>43</b> e <b>44</b> e fármacos comerciais relacionadas ao SNC	68

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

**Acetil-CoA** – Acetilcoenzima A

**ACh** – acetilcolina

**AChE** – Enzima acetilcolinesterase

**iAChE** – Inibidores da enzima acetilcolinesterase

**AcOEt** – Acetato de etila

**AINEs** – Anti-inflamatórios não esteroidais

**ALH** – Aceptor de ligação de hidrogênio

**AMPA** – Ácido  $\alpha$ -Amino-3-hidróxi-5-metil-4-isoxazolepropiónico

**Ar** – Aromático

**BnBr** – Brometo de benzila

**BHE** – Barreira hematoencefálica

**BuCh** – Butirilcolina

**BuChE** – Butirilcolinesterase

**CAT** – Enzima colina-acetiltransferase

**CCD** – Cromatografia em camada delgada

**COX** – Ciclo-oxigenase

**DA** – Doença de Alzheimer

**DCM** – Diclorometano

**DP** – Doença de Parkinson

**EN** – Emaranhados neurofibrilares

**ERN** – Espécies reativas de nitrogênio

**ERO** – Espécies reativas de oxigênio

**FDA** – Food and Drug Administration

**IL** – Interleucina

**LCC** – Líquido da casca da castanha de caju

**LMAD** – Ligantes multialvo-dirigidos

**MeCN** – Acetonitrila

**Mel** – Iodeto de Metila

**MeOH** – Metanol

**NMDA** – *N*-metil-D-aspartato

**OMS** – Organização Mundial da Saúde

**PM** – Padrões moleculares

**R<sub>f</sub>** – Fator de retenção

**RMN de <sup>1</sup>H** – Ressonância magnética nuclear de hidrogênio

**RMN de <sup>13</sup>C** – Ressonância magnética nuclear de carbono-13

**SAC** – Sítio ativo catalítico

**SAP** – Sítio aniônico periférico

**S<sub>N</sub>2** – Substituição nucleofílica bimolecular

**SNC** – Sistema nervoso central

**TEA** – Trietilamina

**THA** – Tacrina

**TNF- $\alpha$**  – Fator de necrose tumoral alfa

**$\beta$ A** –  $\beta$ -Amiloide

**6-CITHA** – 6-Clorotacrina

**7-MeOTHA** – 7-Metóxitacrina

# SUMÁRIO

1.	<b>INTRODUÇÃO</b>	18
2.	<b>REVISÃO DA LITERATURA</b>	21
2.1	PREVALÊNCIA DA DOENÇA DE ALZHEIMER	22
2.2	A DOENÇA DE ALZHEIMER	23
2.3	A HIPÓTESE COLINÉRGICA	26
2.4	A HIPÓTESE AMILOIDE	29
2.5	A HIPÓTESE DA PROTEÍNA TAU HIPERFOSFORILADA	29
2.6	A HIPÓTESE GLUTAMATÉRGICA	30
2.7	OUTROS MECANISMOS PATOGENICOS	30
2.8	ESTRATÉGIAS TERAPÊUTICAS	32
2.8.1	<b>Inibidores da enzima AChE</b>	32
2.8.2	<b>Antagonistas de receptores NMDA</b>	33
2.8.3	<b>Derivados polifenólicos</b>	34
2.8.4	<b>Derivados anti-inflamatórios não esteroidais</b>	34
2.9	LIGANTES MULTIALVO-DIRIGIDOS (LMADs)	35
2.10	LIPÍDEOS FENÓLICOS DO LCC: A MATÉRIA-PRIMA	37
3.	<b>PLANEJAMENTO ESTRUTURAL</b>	42
4.	<b>PLANEJAMENTO SINTÉTICO</b>	43
5.	<b>OBJETIVOS</b>	46
5.1	OBJETIVO GERAL	47
5.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	47
6.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	48
6.1	DESENVOLVIMENTO SINTÉTICO	49
6.2	AVALIAÇÃO BIOLÓGICA	56
6.2.1	<b>Perfil de atividade frente às enzimas AChE e BChE humanas</b>	56
6.2.2	<b>Ensaio de Ensaio de toxicidade em células de hepatoma humano (HepG2)</b>	59
6.2.3	<b>Ensaio de citotoxicidade em células SH-SY5Y</b>	61
6.2.4	<b>Ensaio de citotoxicidade em células BV-2</b>	61
6.2.5	<b>Ensaio em células BV-2 após ativação por LPS</b>	62
6.2.6	<b>Ensaio de expressão gênica em células Bv2 após insulto de LPS</b>	
6.2.7	<b>Previsão de permeabilidade pela barreira hematoencefálica</b>	68

6.2.8	<b>Ensaio de estabilidade plasmática</b>	69
7.	<b>CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS</b>	70
7.1	CONCLUSÕES	71
7.2	PERSPECTIVAS	72
8.	<b>PARTE EXPERIMENTAL</b>	73
8.1	GENERALIDADES, MATERIAIS E MÉTODOS	74
8.2	METODOLOGIA SINTÉTICA E CARACTERIZAÇÃO DOS COMPOSTOS	76
8.2.1	<b>Obtenção do líquido da casca da castanha de caju a partir das castanhas de caju (LCC Natural)</b>	76
8.2.2	<b>Obtenção da mistura de ácidos anacárdicos (19) a partir do LCC natural</b>	76
8.2.3	<b>Obtenção da mistura de cardanois (20) e cardois (21) a partir do LCC técnico</b>	77
8.2.4	<b>Procedimento geral para obtenção das misturas O-metiladas de ácidos anacárdicos (24), cardanois (25) e cardois (26)</b>	77
8.2.5	<b>Procedimento geral para obtenção dos derivados 2-(8-hidróxiocetil)6-metóxi)benzoato de metila (27), 8-(3-metóxi)fenil)octan-1-ol (28) e 8-(3,5-dimetóxi)fenil)octan-1-ol (29)</b>	78
8.2.6	<b>Obtenção dos derivado 3-(8-hidroxiocetil)fenol (78)</b>	80
8.2.7	<b>Obtenção dos derivado 8-(3-benzilóxi)fenil)octan-1-ol (35)</b>	81
8.2.8	<b>Procedimento Geral para obtenção dos derivados metanossulfonatos 37-39 e 41</b>	82
8.2.9	<b>Procedimento geral para obtenção das tetraidroacridínas THA (1) e 6-CI-THA (5)</b>	84
8.2.10	<b>Procedimento geral para obtenção dos derivados-alvo 43-47, 49-50, 55-56</b>	85
8.2.11	<b>Procedimento geral para obtenção dos derivados-alvo 64-65</b>	89
8.2.12	<b>Procedimento geral para obtenção dos derivados-alvo 61-62</b>	90
8.2.13	<b>Procedimento geral para obtenção dos derivados-alvo 73-74</b>	92
8.3	AVALIAÇÃO BIOLÓGICA	93
8.3.1	<b>Inibição de AChE e BuChE</b>	93
8.3.2	<b>Determinação da hepatotoxicidade em células Hep G2</b>	94
8.3.3	<b>Determinação da toxicidade e do perfil de atividade dos compostos selecionados em células SH-SY5Y e BV-2</b>	94
8.3.4	<b>Ensaio de viabilidade MTT</b>	95
8.3.5	<b>Extração de RNA</b>	96
8.3.6	<b>Reação em cadeia da polimerase em tempo real (PCR)</b>	96
8.3.7	<b>Microscopia confocal de imunofluorescência</b>	96



8.3.8	<b>Quantificação de IL-1<math>\beta</math></b>	97
8.3.9	<b>Análise estatística</b>	97
8.3.10	<b>Ensaio PAMPA</b>	97
8.3.11	<b>Ensaio de estabilidade plasmática</b>	98
9.	<b>REFERÊNCIAS</b>	101
10.	<b>ANEXOS</b>	113

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29

# INTRODUÇÃO

---

## 1. INTRODUÇÃO

A Doença de Alzheimer (DA), descrita há mais de 110 anos por Emil Kraepelin, é a principal causa de demência entre pessoas de faixa acima dos 60 anos de idade. Com forte impacto social, econômico e de saúde pública, a DA atinge cerca de 55 milhões de pessoas em todo o mundo, com perspectiva de alcançar 78 milhões em 2030 e 139 milhões em 2050, em face do aumento da expectativa de vida (Gauthier et al., 2022; Alzheimer's Association, 2022).

A DA apresenta-se em múltiplos mecanismos patogênicos que envolvem a deposição de proteínas beta-amiloide levando à formação de placas senis (CASTRO; MARTINEZ, 2006); a hiperfosforilação da proteína tau que destrói a organização de microtúbulos nos neurônios e leva à formação de emaranhados neurofibrilares (ALONSO; GRUNDKE-IQBAL, 1996; PEREZ-NIEVAS et al., 2013) e à atrofia neuronal; o aumento do estresse oxidativo (ANDERSEN, 2004; DUMONT; BEAL, 2011); o comprometimento da função mitocondrial (CANO-ABAD et al., 2001); e a deterioração da transmissão sináptica (JELLINGER, 2006; CUMMINGS, 2004; KOLEV et al., 2009; ITO et al., 2010; BERTRAM et al., 2010). Esta última suportou a hipótese colinérgica, na qual inibidores reversíveis da enzima acetilcolinesterase (AChEi) constituem os principais medicamentos aprovados pela *Food and Drug Administration* (FDA) para o tratamento inicial da DA, pela restauração parcial da hipofunção colinérgica com melhora nos processos cognitivos. Além disso, estudos com cérebros de pacientes com Alzheimer mostraram que os níveis de citocinas pró-inflamatórias e.g. Interleucinas (IL-1b, IL-6, IL-12) e fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) bem como proteína c-reativa, também estão associados à patogênese da doença, induzindo o processo de neurodegeneração e ocasionando alterações funcionais e/ou morte cerebral (HOLMES et al., 2009; TAKADA, 2017).

Tendo em consideração sua característica multifatorial e que a terapêutica baseada em único alvo não interrompe o progresso da doença, novos estudos baseados no planejamento racional de fármacos têm focado atenção à estratégia denominada ligantes multialvo-dirigidos (LMAD) por meio de arcabouços multifuncionais capazes de atuar em distintos alvos moleculares na cascata neurodegenerativa da DA (LEÓN; GARCIA; MARCO-CONTELLES, 2011; RAMPA et al., 2011; BOLOGNESI et al., 2011; CAVALLI et al., 2008; LUO,

1 et al., 2011; DOS SANTOS TRAMONTIN et. al., 2020; LEMES et. al., 2016;  
2 RAMOS et. al., 2021).

3 Os principais constituintes do líquido da casca da castanha de caju (LCC),  
4 um resíduo da indústria de beneficiamento da castanha de caju, não comestível  
5 e abundante no Nordeste brasileiro, têm sido explorados no planejamento  
6 racional de fármacos *e.g.* bactericidas, fungicidas, antiproliferativos, anti-  
7 inflamatórios e anticolinesterásicos. Neste sentido, descrevemos neste trabalho  
8 a síntese e avaliação de derivados tetraidroacridínicos planejados a partir dos  
9 lipídeos fenólicos do LCC como ligantes multialvos para Doença de Alzheimer em  
10 continuidade aos nossos esforços visando a obtenção de candidatos a fármacos  
11 sustentáveis e de baixo custo para o tratamento de doenças neurodegenerativas.

1

2

3

4

5

6

7

8

9

10

11

12

13

14

15

16

17

18

19

20

21

22

23

# **REVISÃO DA LITERATURA**

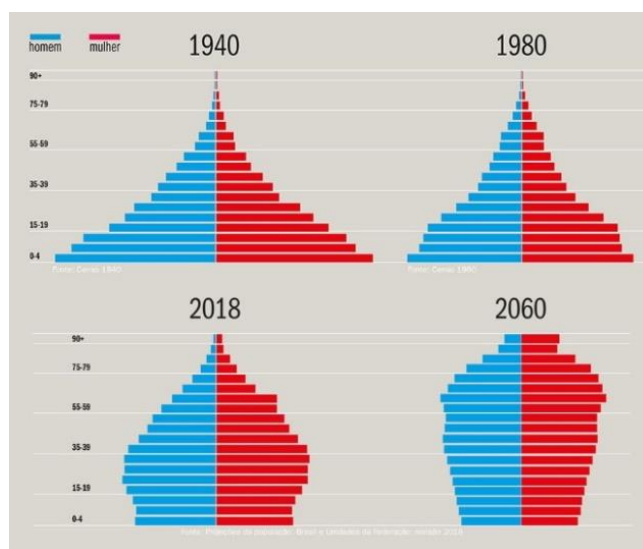
---

## 2. REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1. PREVALÊNCIA DA DOENÇA DE ALZHEIMER

O envelhecimento populacional no Brasil vem alterando a pirâmide etária nas últimas décadas (Figura 1), seguindo a tendência mundial de estreitamento da base e alargamento do corpo e topo (idosos). Segundo o Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE, 2018), o Brasil apresenta mais de 28 milhões de pessoas nessa faixa etária, número que representa 13% da população do país. As estatísticas apontam que em 2043 um quarto da população deverá ter mais de 60 anos, enquanto a proporção de jovens até 14 anos será de 16,3%. E a partir de 2047 a população deverá parar de crescer, contribuindo para o processo de envelhecimento populacional (PERISSÉ, MARLI, 2019)

**Figura 1:** Projeção da população por sexo e idade para o Brasil até 2060



**Fonte:** Projeções da População: Brasil e unidade de Federação, revisão 2018 (IBGE 2018)

Com o aumento de idosos observa-se também o aumento na prevalência de doenças neurodegenerativas e.g. Doença de Alzheimer (DA) e Doença de Parkinson (DP). A prevalência de pessoas entre 65 e 69 anos de idade que possuem a Doença de Alzheimer é de 1,4 % e aumenta consideravelmente aos 85 anos (20,8 %), subindo para 38,6 % aos 90 anos (SANTOS et al., 2020).

Cerca de 55 milhões de pessoas no mundo sofrem com demência e aproximadamente 10 milhões de novos casos são registrados por ano. Em razão do envelhecimento da população global, a Organização Mundial da Saúde (OMS

1 2021) estima que os atuais 55 milhões com a DA aumentará para 139 milhões  
2 até 2050. Muito deste aumento deve-se claramente ao aumento do número de  
3 pessoas com demência em países de baixo e médio rendimento (Gráfico 1).

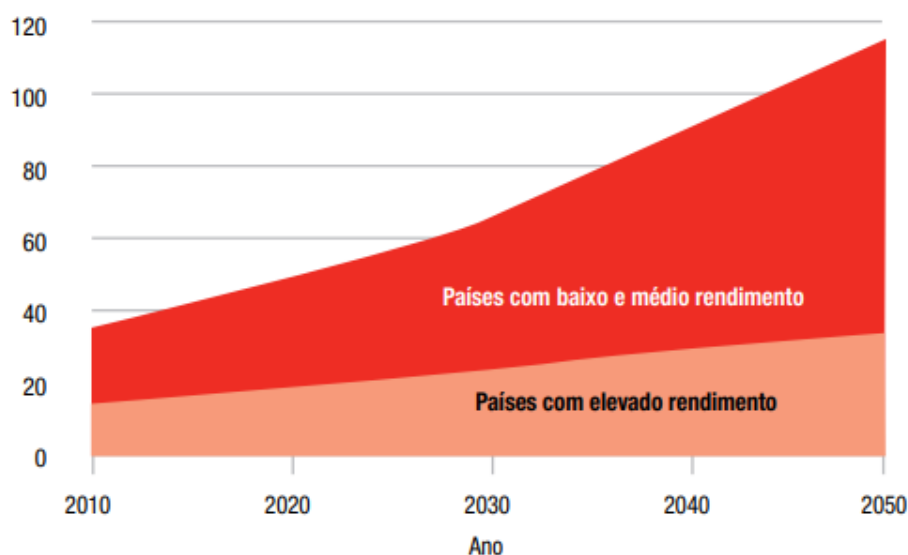
4

5

6

7 **Gráfico 1:** Crescimento do número de pessoas com demência (em milhões) em  
8 países de elevado, baixo e médio rendimento.

9



10

11 **Fonte:** Alzheimer's Disease Internacional, 2019

12

13

14 Os nove países, computados em 2010, com o maior número de pessoas com  
15 demência foram a China (5,4 milhões), EUA (3,9 milhões), Índia (3,7 milhões),  
16 Japão (2,5 milhões), Alemanha (1,5 milhões), Rússia (1,2 milhões), França (1,1  
17 milhão), Itália (1,1 milhão) e o Brasil (1,0 milhão) (ALZHEIMER'S DISEASE  
18 INTERNACIONAL, 2019). Em 2019, a OMS estimou o gasto total com  
19 demências no mundo seja em torno 1,3 trilhão de dólares, equivalente a 1,1 %  
20 do PIB mundial e que aumenta a cada ano, juntamente com o aumento da  
21 população idosa (SANTOS et al., 2020).

22

23

24

## 2.2. A DOENÇA DE ALZHEIMER

Em 1906, Alois Alzheimer descreveu aspectos anatomopatológicos da doença dos neurônios do Córtex Cerebral cujas principais características eram o acúmulo de placas senis, de emaranhados neurofibrilares e a perda neuronal. Em 1910, Emil Kraepelin estudou casos semelhantes dessa doença e propôs o nome Doença de Alzheimer em homenagem ao psiquiatra e neuropatologista Alois Alzheimer (VIEGAS et al., 2011).

No desenvolvimento da DA há a redução das extensões neuronais e atrofia cerebral com redução no peso e volume do cérebro, acometendo principalmente as porções mesiais dos lobos temporais. A doença também leva a alterações comportamentais e pode afetar as pessoas de diversas formas; entretanto o sintoma mais comum começa afetando principalmente a memória recente (ALZHEIMER'S ASSOCIATION, 2012). Isto acontece devido à degradação de neurônios colinérgicos em muitas áreas do Sistema Nervoso Central (SNC), responsáveis pelas funções de aprendizado, memória, raciocínio, comportamento e controle emocional (FRANCIS et al., 1999; MICHAELIS, 2003; LANTHIER et al., 2019) causando desordem neurodegenerativa e redução dos transmissores, entre os quais a acetilcolina (JUNIOR et al., 2004).

Na DA avançada, as pessoas precisam de ajuda para tomar banho, se vestir, usar o banheiro, comer e realizar outras atividades diárias. Aqueles nos estágios finais da doença perdem a capacidade de comunicar-se, deixam de reconhecer os entes queridos e tornam-se dependentes de cuidados contínuos o que leva ao agravamento da demência e evolução até a morte (ALZHEIMER'S ASSOCIATION, 2009).

A DA não têm etiologia completamente elucidada, mas estudos evidenciam que esta doença neurodegenerativa é uma síndrome multifatorial resultante de complexos fatores neuroquímicos e pode estar relacionada com fatores ambientais e fenômenos epigenéticos (BOLOGNESI et al., 2009).

A fisiopatologia da DA está associada à atrofia neuronal, o aumento do estresse oxidativo (ANDERSEN, 2004; DUMONT; BEAL, 2011), o comprometimento da função mitocondrial (CANO-ABAD et al., 2001) e a deterioração da transmissão sináptica (JELLINGER, 2006; NANGIALASCHE et al., 2010; CUMMINGS, 2004; KOLEV, et al., 2009; ITO et al., 2010; BERTRAM,

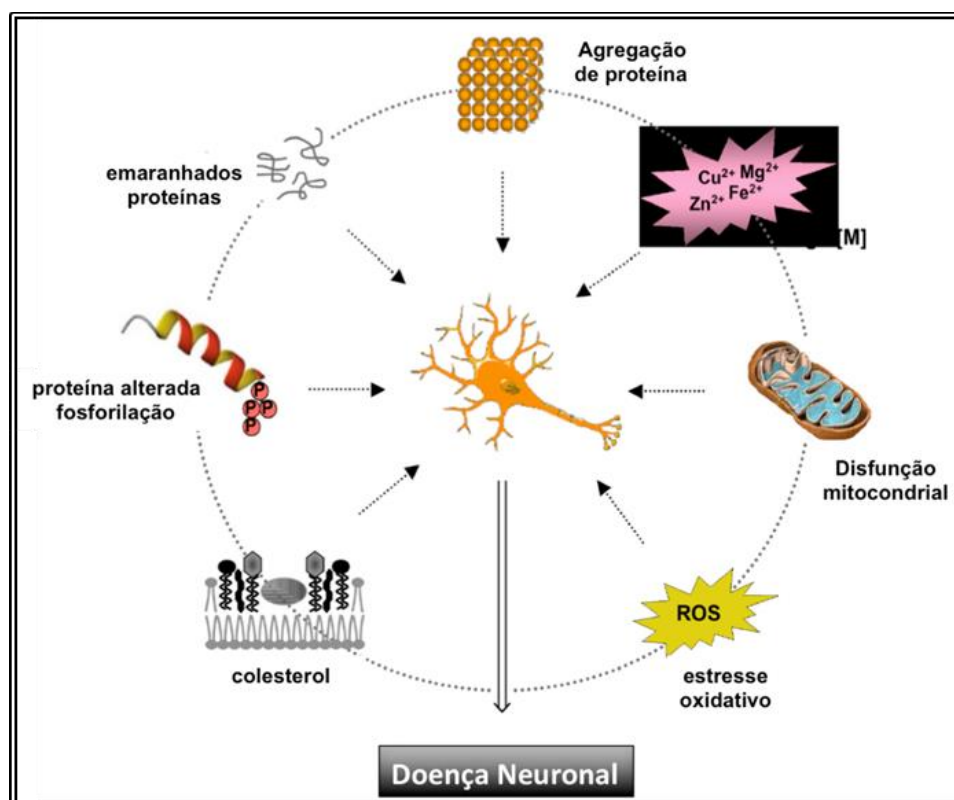


1 et al., 2010), desequilíbrio de metais, disfunção da mitocôndria, aumento do  
 2 colesterol e outros fatores vasculares (BOLOGNESI et al., 2009) (Figura 2).

3

4

5 **Figura 2:** Multifatores relacionados com a DA



6

7

8 **Fonte:** Adaptada da Referência BOLOGNESI, *et. al.*, 2009.

9

10

11 Além disso, estudos com cérebros de pacientes com Alzheimer mostraram  
 12 que os níveis de citocinas pró-inflamatórias e.g. IL-6 e TNF- $\alpha$ , proteína c-reativa,  
 13 estavam associado na patogenia da doença, induzindo o processo de  
 14 neurodegeneração e ocasionando alterações funcionais e/ou morte cerebral  
 15 (HOLMES et al., 2009; TAKADA, 2017).

16 Tendo em consideração sua característica multifatorial e que a terapêutica  
 17 baseada em único alvo não interrompe o progresso da doença, novos estudos  
 18 baseados no planejamento racional de fármacos tem focado sua atenção à  
 19 estratégia denominada ligantes multialvo-dirigidos (LMAD), com arcabouços  
 20 multifuncionais capazes de atuar em distintos alvos moleculares na cascata  
 21 neurodegenerativa da DA (LEÓN; GARCIA; MARCO-CONTELLAS, 2011;  
 22 RAMPA et al., 2011; BOLOGNESI et al., 2011; CAVALLI et al., 2008; LUO, et al.,

1 2011; DOS SANTOS TRAMONTIN et. al., 2020; SANTOS et al., 2020).

2 Neste sentido, diferentes hipóteses a respeito das bases moleculares da DA  
3 foram levantadas e gradualmente vêm sendo modificadas devido ao avanço  
4 tecnológico ao longo do tempo.

### 7 2.3. A HIPÓTESE COLINÉRGICA

10 A primeira hipótese a descrever os mecanismos fisiopatológicos da DA foi a  
11 hipótese colinérgica (WILSON et al., 2004). Ela é baseada na deficiência de  
12 acetilcolina (ACh) que ocorre devido à atrofia do *nucleus basalis de Meynert*, o  
13 qual é a fonte produtora da enzima colina acetiltransferase (CAT). Essa enzima  
14 é transportada para estruturas-alvo no SNC para formação hipocampal, córtex  
15 cerebral e amígdala, dentre outros, onde catalisa a reação de biossíntese da  
16 ACh, a partir da colina e da acetilcoenzima A (acetil-CoA) (MINETT;  
17 BERTOLUCCI, 2000; JUNIOR et al., 2004; CHALUPOVA et al., 2019).

18 Depois de liberada na fenda sináptica, a ACh pode ser acoplada aos  
19 receptores muscarínico e nicotínico, e o restante degradada pela enzima  
20 acetilcolinesterase (AChE) em colina e acetato. A redução da neurotransmissão  
21 colinérgica resulta em perda de memória e deterioração de outras funções  
22 cognitivas e não cognitivas, e pode favorecer processos de formação de  
23 proteínas beta-amiloide, levando à formação de placas senis (CASTRO;  
24 MARTINEZ, 2006; KARRAN; MERCKEN; STROOPER, 2011), à  
25 hiperfosforilação da proteína Tau – que destrói a organização de microtúbulos  
26 nos neurônios e leva à formação de emaranhados neurofibrilares (ALONSO;  
27 GRUNDKE-IQBAL, 1996, PEREZ-NIEVAS et al., 2013)

28 Outra enzima estudada no processo da DA é a butirilcolinesterase (BuChE)  
29 que é capaz de hidrolisar substratos mais volumosos como butirilcolina (BuCh).  
30 Em um cérebro saudável, a enzima AChE hidrolisa predominantemente a  
31 acetilcolina em acetato e colina, enquanto a BuChE desempenha papel durante  
32 a regulação do tônus colinérgico. Em baixas concentrações de acetilcolina, a  
33 atividade da AChE se torna altamente dominante, enquanto a BuChE é mais  
34 eficiente em hidrólise quando há altas concentrações de acetilcolina (MUSHTAQ  
35 et al., 2014). As duas enzimas exibem diversidade de características cinética

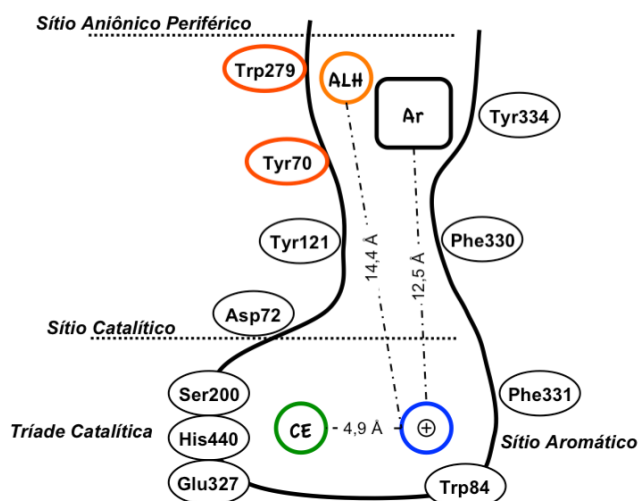
1 dependendo das concentrações de acetilcolina (CHAUDHARY et al., 2018).  
 2 Estudos sugerem que a AChE não é necessária para o estabelecimento das vias  
 3 colinérgicas e que a BuChE pode substituir essa enzima ao exercer a função de  
 4 hidrólise de acetilcolina no cérebro normal (MESULAM et al., 2002). A  
 5 reatividade maior da BChE foi observada em placas senis da DA sugerindo que  
 6 a BChE poderia facilitar a formação dessas placas (BIZZARRO et al., 2010).

7 AChE e BuChE apresentam sítio catalítico, sítio aniônico periférico e vários  
 8 sítios aromáticos periféricos na BuChE (CHEN; BAZINWT, 2015; PEZZEMENTI;  
 9 NACHON; CHATONNET, 2011). A AChE possui 20 Å desde o sítio aniônico  
 10 periférico – composto por resíduos de aminoácidos Trp279, Tyr70, Tyr121 e  
 11 Asp72 – até a tríade catalítica – composta por resíduos de aminoácidos Ser200,  
 12 His440 e Glu327. O sítio aromático é responsável pela interação com o grupo  
 13 amino protonado da colina (Figura 4) (LUO, *et al.*, 2011, SAMADI, *et al.*, 2011,  
 14 HUANG, *et al.* 2010, KORABECNY, *et al.*, 2010)

15

16 **Figura 3:** Desenho hipotético da região ortoestérica da enzima AChE

17



18

19

20

21

**Fonte:** ROMEIRO, L.A.S., 2011

22 Neste sentido, a enzima acetilcolinesterase (AChE) constitui um dos alvos  
 23 terapêuticos de diversos estudos, cuja inibição, tanto do sítio ativo catalítico  
 24 (SAC) quanto aniônico periférico (SAP), está relacionada ao aumento da  
 25 disponibilidade de acetilcolina para sinapse entre os neurônios bem como  
 26 diminuição da velocidade de agregação beta-amiloide induzida pela própria  
 27 AChE. Porém, apesar dos primeiros fármacos propostos para DA e aprovados

1 pela FDA serem os inibidores de AChE na fenda sináptica, esses inibidores  
2 aliviam os sintomas da doença e retardam sua evolução mas não revertem o  
3 estado patológico (YIANNOPOULOU; PAPAGEORGIOU, 2013; FAN; CHIU,  
4 2010).

#### 5 2.4. A HIPÓTESE AMILOIDE

6  
7

8 A hipótese amiloide sugere que a DA está relacionada com a deposição e  
9 agregação do peptídeo  $\beta$ -amiloide<sub>40/42</sub> causando problemas de disfunção  
10 neuronal, oxidação e fosforilação da proteína Tau (MORLEY et al., 2012,  
11 FRISONI, 2022). Na DA, o  $\beta$ -amiloide<sub>40</sub> ( $\beta$ A<sub>40</sub>) é produzido em pequenas  
12 quantidades, enquanto há produção exacerbada de  $\beta$ A<sub>42</sub> que é mais tóxico com  
13 potencial de agregação superior. O acúmulo desses peptídeos provoca déficit na  
14 neurotransmissão colinérgica, serotoninérgica, dopaminérgica e noradrenérgica  
15 com predomínio da disfunção colinérgica (LI et al., 2012).

16 Essa hipótese da cascata amiloide é a teoria mais aceita relacionada com a  
17 etiologia da DA, mas ainda não está suficientemente comprovado que os  
18 depósitos de placas de  $\beta$ A e de emaranhados neurofibrilares sejam os  
19 causadores da doença. Apesar disso, estudos na área de Química Farmacêutica  
20 e Medicinal têm buscado substâncias que bloqueiem ou revertam a formação  
21 dos agregados de  $\beta$ A insolúveis (CAVALLI et al., 2007; JUNIOR et al., 2004;  
22 BOLOGNESI et al., 2011).

23

#### 24 2.5. A HIPÓTESE DA PROTEÍNA TAU HIPERFOSFORILADA

25

26 Essa hipótese mostra que alterações da proteína Tau e formação de  
27 neurofilamentos são responsáveis pela indução do mecanismo da DA (WILSON  
28 et al., 2004). A proteína Tau é componente essencial dos microtúbulos que se  
29 encontram na forma polimerizada e o polímero torna-se instável quanto mais  
30 fosforilada for a proteína. A hiperfosforilação da Tau está relacionada com a  
31 diminuição da estabilidade do citoesqueleto ocasionando prejuízos estruturais e  
32 funcionais e favorecendo a morte celular devido à formação dos emaranhados  
33 neurofibrilares (EN) (PAULA et al., 2009). Estudos indicam que o acúmulo de A $\beta$   
34 pode ser o evento ativador da hiperfosforilação da proteína Tau, porém os fatores

1 que desencadeiam este desequilíbrio ainda não são bem entendidos (FALCO et  
2 al., 2016; PICHET BINETTE et al., 2022).

3 A inibição da agregação da proteína Tau e bloqueio da hiperfosforilação são  
4 as principais estratégias de tratamento que estão sendo exploradas. A terapia  
5 utilizada e clinicamente mais avançada é o cloreto de metiltionínio (azul de  
6 metileno) que dissolve filamentos de proteína Tau isolados em cérebros com a  
7 DA, *in vitro*, e para evitar a agregação em modelos celulares (CITRON et al.,  
8 2010; MORLEY et al., 2012; SANCHEZ-MUT et al. 2014).

9

## 10 2.6. A HIPÓTESE GLUTAMATÉRGICA

11

12

13 A hipótese glutamatérgica tem sido estudada desde a década de 80, com  
14 papel importante na DA. Ela é baseada nos receptores de *N*-metil-D-aspartato  
15 (NMDA), que apresentam estrutura complexa com diferentes sítios de ligação  
16 para o glutamato e diversos moduladores. O glutamato é o principal  
17 neurotransmissor excitatório do SNC e tem sua atividade mediada por  
18 receptores NMDA, do ácido  $\alpha$ -amino-3-hidróxi-5-metil-4-isoxazolapropiônico  
19 (AMPA) e de kainato. Nessa hipótese, acredita-se que o glutamato liberado ative  
20 inicialmente os receptores de AMPA e de kainato, que, apesar da baixa  
21 afinidade, promoveriam a rápida despolarização da célula por meio da entrada  
22 de íons de sódio ( $\text{Na}^+$ ) e cálcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ), levando ao aumento das concentrações  
23 intracelulares destes metais capaz de iniciar o processo de apoptose neuronal.

24 Uma vez que a proteína beta-amiloide induz a ativação de receptores NMDA,  
25 e conseqüentemente aumenta o influxo de cálcio, relacionado à morte neuronal,  
26 o uso de antagonistas fracos NMDA tem sido a estratégia, na fase mais  
27 avançada da doença, para a homeostase de cálcio intracelular (ROSINI et al.,  
28 2008).

29

30

31

32

## 2.7. OUTROS MECANISMOS PATOGÊNICOS

As lesões provocadas na DA são geralmente associadas à disfunção mitocondrial, aumento da resposta inflamatória e estresse oxidativo.

O estresse oxidativo está ligado à presença de agregados amiloides que podem produzir espécies reativas de oxigênio (ERO) e espécies reativas de nitrogênio (ERN) na presença de íons metálicos, gerando danos ao sistema de membranas neuronais com consequente peroxidação de lipídeos e oxidação das proteínas membranares, levando à morte das células neuronais (MACHADO; CARVALHO; SOBRINHO, 2020). O controle da produção de ERO é, portanto, de particular interesse na prevenção ou tratamento da DA (LANTHIER et al., 2019).

A ativação do sistema imune e inflamação – provocadas por processos de lesão e destruição no SNC, provavelmente devido à deposição de peptídeos beta-amiloide – estão relacionados à patogênese e manutenção da DA. Estudos sugerem que proteínas desdobradas e agregadas, no cérebro, se ligam à receptores de reconhecimento de padrões na micróglia e astrócitos e desencadeiam resposta imune inata, caracterizada pela liberação de mediadores inflamatórios e neuroinflamação, que contribuem para a progressão e gravidade da DA (HENEKA; KUMMER; LATZ, 2014; TRUDLER; FARFARA FRENKEL, 2010).

As citocinas, as quais podem ser produzidas a partir da ativação de micróglia e astrócitos no SNC, também contribuem diretamente para o processo de neuroinflamação. A micróglia produz citocinas pró-inflamatórias como as Interleucinas (IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-12) e o TNF- $\alpha$  que estão associados na patogênese da doença induzindo o processo de neurodegeneração e ocasionando alterações funcionais e/ou morte cerebral (HOLMES et al., 2009; TAKADA, 2017). A IL-1 $\beta$ , em particular, é uma das principais colaborando para a evolução da DA devido ao estímulo para a produção de peptídeo  $\beta$  amiloide neurotóxico; o aumento da fosforilação de proteína tau; a ativação de mais micróglia e astrócitos, liberando maior quantidade de citocinas; além de estimular a síntese de óxido nítrico; e assim, contribuindo para a neurodegeneração (HOLMES et al., 2009; TAKADA, 2017; MACHADO; CARVALHO; SOBRINHO, 2020).

Inibidores das enzimas GSK3-beta (HERNANDEZ et al., 2009) e BACE-1 (HUANG et al., 2010), gama-secretase (WOLFE, 2008; LUNDKIST; NASLUND,

1 2007), de receptores nACh (BELLUARDO et al., 2000; VAN BEEK; CLAASSEN,  
2 2011), de histonas H3 (GEMKOW et al., 2009; BITNER et al., 2011), AMPA  
3 (MALÁ et al., 2012) e GABA (LUCHETTI; HUITINGA; SWAAB, 2011), inibidores  
4 de HDAC (BANG et al., 2015), antioxidantes (DUMONT; BEAL, 2011) bem como  
5 anticorpos, também têm sido investigados como alvos terapêuticos da DA  
6 (SABBAGH et al., 2009).

7

## 8 2.8. ESTRATÉGIAS TERAPÊUTICAS

9

### 10 2.8.1 – Inibidores da enzima AChE

11

12 Para o tratamento DA foram desenvolvidos da classe dos inibidores da  
13 enzima AChE (iAChE). Os medicamentos aprovados para este fim  
14 compreendem os agentes anticolinesterásicos tacrina (**1**, Cognex®, THA),  
15 donepezil (**2**, Aricept®), o produto natural galantamina (**3**, Reminyl®) e  
16 rivastigmina (**4**, Exelon®) (Figura 4). Estes fármacos atuam no sentido de  
17 restaurar o nível do neurotransmissor acetilcolina (ACh) por meio da inibição  
18 reversível da enzima acetilcolinesterase. Entretanto, o uso clínico destes  
19 agentes é limitado em função dos efeitos adversos periféricos com excessiva  
20 ativação do sistema colinérgico. A tacrina (IC<sub>50</sub>: 500 nM) foi o primeiro fármaco  
21 aprovado em 1993, pelo Food and Drug Administration (FDA), para o tratamento  
22 da DA e retirado do uso clínico cinco anos depois devido aos efeitos adversos  
23 hepatotóxicos, causados pela estimulação de ERO, e gastrointestinais  
24 apresentados (LANTHIER et al, 2019).

25

26

27

28

29

30

31

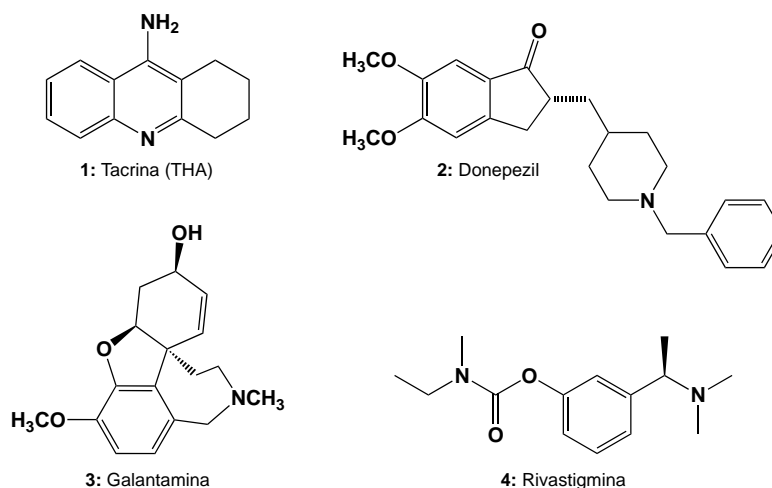
32

33

34

35

1 **Figura 4:** Inibidores da enzima AChE



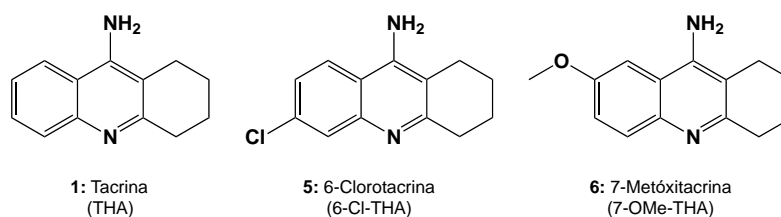
2

3

4 Em 2019, Chalupova e colaboradores sintetizaram novos análogos da THA,  
 5 **1**), mais potente e com toxicidade limitada em comparação com a tacrina,  
 6 utilizando as tetraidroacridinas 6-clorotacrina (**5**, 6-Cl-THA) e 7-metóxitacrina (**6**,  
 7 7-OMe-THA) (Figura 5). Os derivados com a 6-clorotacrina mostraram ser  
 8 melhores inibidores da AChE com melhor perfil e seletividade que a THA  
 9 (CHALUPOVA et al., 2019).

10

11 **Figura 5:** Tetraidroacridinas utilizadas na síntese de LMAD



12

13

14 Evidências experimentais mostraram que inibidores de AChE (iAChE)  
 15 capazes de se interagirem simultaneamente ao SAC e SAP podem ter maior  
 16 efeito benéfico na terapia da DA por sua ação antiagregante. A afinidade de  
 17 iAChE pelo SAP inibe a velocidade da agregação de  $\beta$ A diminuindo a formação  
 18 de monômeros de  $\beta$ A em fibrilas e outros complexos altamente tóxicos  
 19 (LANTHIER et al, 2019).

20

21 **2.8.2 – Antagonistas de receptores NMDA**

22

23 Adicionalmente aos inibidores da enzima acetilcolinesterase, a utilização

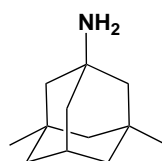


1 de antagonista não-competitivo de receptores NMDA, como por exemplo a  
2 memantina (7), bloqueia a abertura dos canais e a ativação patológica do  
3 receptor, preservando a ativação e a aquisição ou o processamento da  
4 informação cognitiva permitindo neuroplasticidade (ENGELHARDT; LAKS;  
5 CAVALCANTI 2003; FALCO et al., 2016). No âmbito desta estratégia,  
6 compostos com perfil antagonista NMDA têm sido avaliados na cascata da DA  
7 (BOLOGNESI et al., 2009; HOWLETT et al., 1999), em especial contendo  
8 poliaminas em suas estruturas (MASUKO et al., 2010; TUMIATTI, 2008;  
9 IGARASHI; KASHIWAGI, 2010; PÖHLER et al., 2007; BOLOGNESI et al., 2007).

10

11 **Figura 7:** Memantina: Antagonista de receptor NMDA

12



7: Memantina

13

14

15

### 16 2.8.3 – Derivados polifenólicos

17

18 Fitoquímicos, incluindo polifenóis, cuja ações antioxidante e anti-inflamatória  
19 diminuem a inflamação neuronal, também têm sido usados como  
20 neuroprotetores, contribuindo para melhora na função cognitiva. Exemplos como  
21 a cúrcuma, as catequinas, o licopeno, o resveratrol inibem a agregação de  $\beta$ A, a  
22 hiperfosforilação da proteína TAU e a produção de citocinas.

23

### 24 2.8.4 – Derivados anti-inflamatórios não-esteroidais

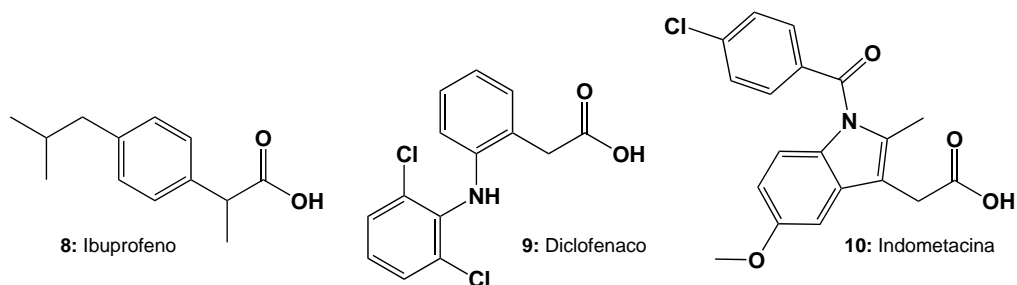
25

26 Outros medicamentos, como os anti-inflamatórios não-esteroidais (AINEs),  
27 principalmente ibuprofeno (8), diclofenaco (9) e indometacina (10), que  
28 diminuem o estado inflamatório no SNC a partir da inibição das ciclooxigenases  
29 (COX) e inibem as vias de ativação da micróglia, têm sido utilizados no  
30 tratamento da DA (SANTOS et al., 2020). Neste sentido, faz-se necessário  
31 abordar mecanismos imunológicos inflamatórios que podem estar envolvidos na  
32 patogênese da DA, contribuindo para o estudo de novas terapias capazes de

1 modular as vias moleculares envolvidas no desenvolvimento da doença  
2 (MACHADO; CARVALHO; SOBRINHO, 2020).

3

4 **Figura 8:** Anti-inflamatórios não-esteroidais



5

6

7

8

## 9 2.9 LIGANTES MULTIALVO-DIRIGIDOS (LMAD)

10

11

12 Tendo em consideração que desde 2003 nenhum novo medicamento foi  
13 aprovado pelo FDA para DA (CUMMINGS et. al., 2019) estudos na área da  
14 Química Farmacêutica e Medicinal, por meio da exploração da estratégia de  
15 modificação estrutural de protótipos naturais e/ou hibridização molecular, têm se  
16 concentrado na busca de novos protótipos úteis ao tratamento da DA que sejam  
17 mais eficientes que os fármacos atualmente na clínica (LANTHIER et al, 2019;  
18 HIREMATHAD et al, 2018; BANG et al, 2015; CHEN et al, 2018; RIOS et al,  
19 2010; LIN et al., 2017; BOLOGNESI et al, 2007; FISCHER, 2008).

20

21 Sabendo que a DA apresenta característica multifatorial e que a terapêutica  
22 baseada em único alvo não atendeu à expectativa de interromper o progresso  
23 da doença, um novo paradigma no planejamento racional de fármacos tem  
24 focado sua atenção à estratégia denominada ligante multialvo-dirigido (LMAD),  
25 com arcabouços multifuncionais capazes de atuar em distintos alvos  
26 moleculares na cascata neurodegenerativa da DA (RAMOS, 2014; ROLDÁN-  
PEÑA et. al., 2019).

27

28 Nas últimas décadas, os LMAD baseados em derivados tetraidroacridínicos  
têm sido explorados, alguns deles visando minimizar os efeitos adversos

1 encontrados na tacrina, enquanto outros fazem uso de arca-bouços substituídos  
2 mesmo tóxicos como as tetraidroacridinas **5** (6-CITHA, IC<sub>50</sub>: 7,18 nM) e **6** (7-  
3 MeOTHA, IC<sub>50</sub>: 10500 nM) (Figura 5). (NEPOVIMOVA et. al., 2014).

4 O primeiro híbrido da tacrina foi a bis-(7)-tacrina (11) sintetizado em 1996  
5 representando o primeiro inibidor dual projetado para interagir simultaneamente  
6 com o SAC e SAP da AChE. Essa interação permitiu obter um dos mais potentes  
7 e seletivos inibidores de AChE com IC<sub>50</sub> de 0,40 nM. A partir desta estratégia,  
8 uma gama de compostos híbridos planejados como heterodímeros da THA,  
9 contendo diferentes espaçadores entre as subunidades aromáticas, foram  
10 desenvolvidos, cujos alguns exemplos estão apresentados na Figura 9. Carlier  
11 et al. (1999) desenvolveram o derivado 12 (IC<sub>50</sub>: 8,8 nM) contendo a subunidade  
12 5-amino-5,6,7,8-tetraidro-2(1H)-quinolona e espaçador com dez unidades  
13 metilênicas. Por sua vez, visando agregar propriedades antioxidantes ao perfil  
14 iAChE, Fang et al. (2008) identificaram o derivado 13 (IC<sub>50</sub>: 4,4 nM) com melhor  
15 perfil entre a série de compostos híbridos THA-feruloilamida. O derivado 14  
16 (IC<sub>50</sub>: 19,3 nM), concebido como híbrido THA-flurbiprofeno, foi explorado por  
17 Eriksen et al. (2013). Baseados em estudos de modelagem molecular, Camps et  
18 al (2008) desenvolveram o composto 15 (IC<sub>50</sub>: 0,3 nM) contendo a subunidade  
19 6-Cl-THA. Rodriguez-Franco et al. (2006) exploraram a capacidade antioxidante  
20 da melatonina para a obtenção do híbrido 16 contendo a subunidade 6,8-diCl-  
21 THA que exibiu perfil anticolinesterásico com IC<sub>50</sub> de 8,0 pM. Por sua vez, Rosini  
22 et al. (1998), baseados nas propriedades antioxidante e antagonista fraca do  
23 antagonista adrenérgico misto carvedilol, planejaram o uso da subunidade  
24 carbazola na concepção do híbrido **17** (IC<sub>50</sub>: 1,5 nM), com a THA contendo  
25 espaçador protonável análogo à poliamina espermidina. Por fim, Mao et al.  
26 (2012) híbridos THA-*o*-hidroxibenzilamínicos com destaque para o derivado **18**  
27 (IC<sub>50</sub>: 6,1 nM).

28

29

30

31

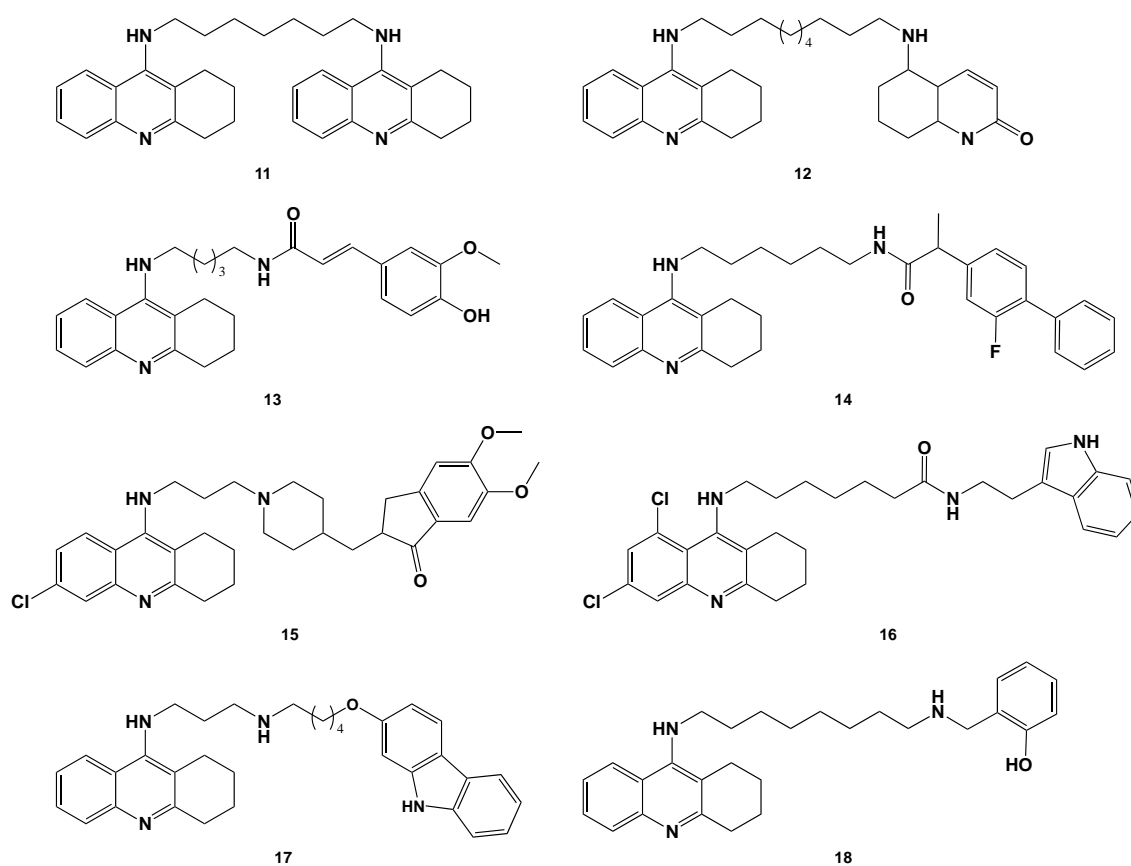
32

33

34

1 **Figura 9:** LMAD contendo as subunidades tetraidroacridinas

2



3

4

5

6

7 **2.9. LIPÍDEOS FENÓLICOS DO LCC: A MATÉRIA-PRIMA**

8

9

10 Com o passar dos anos, temos percebido a necessidade de desenvolver  
 11 novos medicamentos que atendam a complexidade da DA e que sejam  
 12 sustentáveis, não só do ponto de vista ambiental, mas também financeiro para  
 13 que sejam acessíveis às pessoas e sistema de saúde que deles necessitam.  
 14 Sendo assim, temos explorado nos últimos anos, em nosso grupo de pesquisa,  
 15 a possibilidade de desenvolver novas estratégias farmacológicas para a DA a  
 16 partir dos lipídeos fenólicos presentes no líquido da casca da castanha de caju  
 17 (LCC).

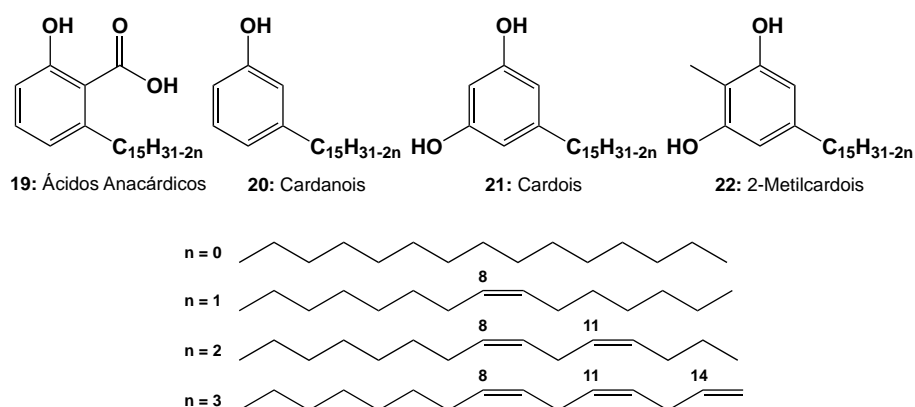
18 O líquido da casca da castanha do caju (LCC) consiste em um óleo de  
 19 coloração escura obtido da casca da castanha do caju – fruto do cajueiro  
 20 (*Anacardium occidentale* L.) nativo do Brasil (VORIRIN et al., 2013). O LCC, uma

1 das fontes mais ricas em misturas de lipídeos fenólicos não-isoprenoides e.g.  
 2 ácidos anacárdicos (**19**), cardanois (**20**), cardois (**21**) e 2-metilcardois (**22**)  
 3 (Figura 10), compreende 25 % do peso do fruto, sendo uma matéria-prima barata  
 4 e de fácil acesso a partir da castanha de caju *in natura* (LCC natural) ou como  
 5 subproduto do beneficiamento industrial da castanha (LCC técnico) (MENGER;  
 6 SORRELS, 2006; MAZZETTO et al., 2009). Os compostos fenólicos do LCC  
 7 apresentam núcleo aromático contendo cadeia lateral com 15 carbonos com  
 8 variação no número de insaturações em posição *meta* às hidroxilas fenólicas  
 9 (Figura ) (ULIASSI et al, 2021).

10

11 **Figura 10:** Lipídeos fenólicos não isoprenóides constituintes do LCC

12



13

14

15 O LCC *in natura* ou natural, produzido no mesocarpo esponjoso da castanha  
 16 do caju, é composto majoritariamente pela mistura de ácidos anacárdicos (**19**),  
 17 seguida das misturas de cardois (**21**), cardanois (**20**) e 2-metilcardois (**22**). Por  
 18 sua vez, estes mesmos constituintes quando obtidos durante o processo de  
 19 beneficiamento da castanha geram o LCC técnico uma vez que são submetidos  
 20 a temperaturas próximas a 200 °C levando à descarboxilação da mistura de  
 21 ácidos anacárdicos (**19**) favorecendo a formação da mistura de cardanois (**20**) e  
 22 de polímeros não identificados (MAZZETTO et al., 2009; AMORATI et al., 2010;  
 23 ULIASSI, et al., 2021).

24 A composição dos principais constituintes nos LCC natural e técnico está  
 25 resumida na Tabela 1.

26

27

28

1 **Tabela 1:** Composições químicas dos LCC natural e técnico<sup>a</sup>

Constituinte	LCC Natural	LCC Técnico
Ácidos Anacárdicos (19)	71,70-82,00 %	1,09-1,75 %
Cardanois (20)	1,60-9,20 %	67,82-94,60 %
Cardois (21)	13,80-20,10 %	3,80-18,86 %
2-Metilcardois (22)	1,65-3,90 %	1,20-4,10 %
Componentes Minoritários	2,20 %	3,05-3,98 %
Material Polimérico	----	0,34-21,63 %

2 <sup>a</sup>Reproduzido de Mazzetto e Lomonaco (2009).

3

4 Os lipídeos fenólicos do LCC são considerados quimicamente versáteis para  
5 interconversões de grupos funcionais, explorando as reações de fenóis bem  
6 como das insaturações presentes nas cadeias alifáticas em C-8', C-11' e C-14,  
7 cuja composição percentual está descrita na Tabela 2.

8

9 **Tabela 2:** Composição percentual relativa de insaturações nos constituintes fenólicos do LCC  
10 obtida por CG/MS<sup>a</sup>

Constituinte	Ácidos Anacárdicos (19)	Cardanois (20)	Cardois (21)	2-Metilcardois (22)
Saturado	2,2-3,0 %	3,9 -4,4 %	0,2-2,7 %	0,9-1,3 %
Monoeno (8')	25,0-33,3 %	21,6-32,2 %	8,4-15,2 %	16,3-25,3 %
Dieno (8', 11')	17,8-32,1 %	15,4-18,2 %	24,2-28,9 %	20,6-24,4 %
Trieno (8', 11', 14')	36,3-50,4 %	45,1-59,0 %	36,5-67,2 %	49,8-62,2 %

11 <sup>a</sup>Reproduzido de Mazzetto e Lomonaco (2009).

12

13 O LCC, como subproduto da indústria do caju, é um resíduo não comestível  
14 de baixo custo e sustentável para o desenvolvimento de novos medicamentos  
15 explorando suas reatividades químicas a partir de procedimentos clássicos de  
16 síntese orgânica, ou suas propriedades estruturais como compostos puros e  
17 bioativos (BAUER; BRONSTRUP, 2014; LEMES et al., 2015; OLIVEIRA, 2016;  
18 KIAMETIS et al., 2017; CARDOSO, 2017; CERONE et al., 2019; ROMEIRO et  
19 al., 2019).

20 Do ponto de vista químico, os lipídeos fenólicos do LCC configuram-se como  
21 matéria-prima versátil para transformações químicas explorando a reatividade

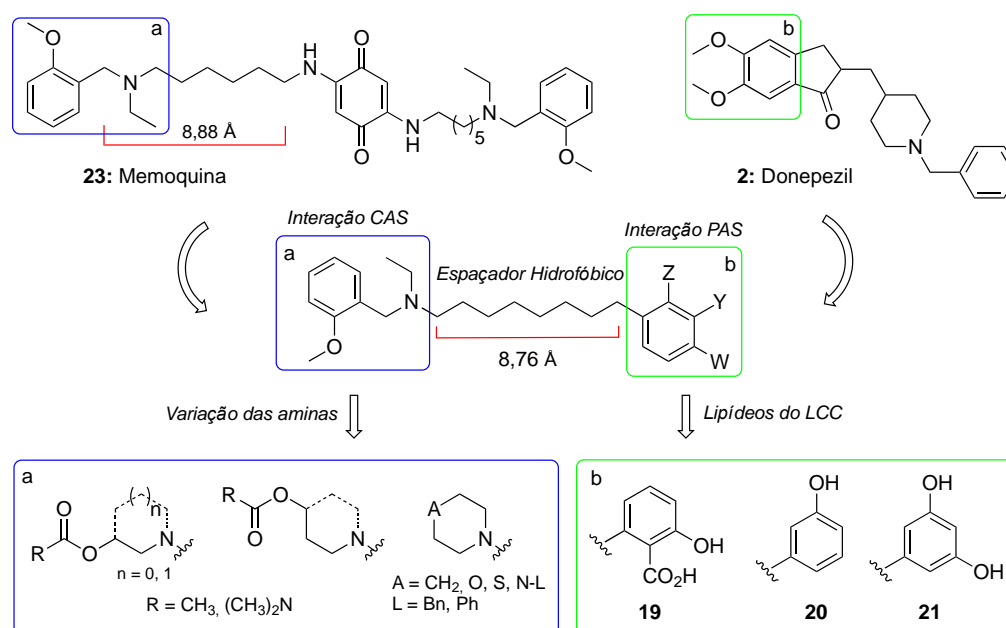
1 dos grupos funcionais polares, o anel aromático e as insaturações na cadeia  
2 alifática em C-8, C-11 e C-14 (MAZZETTO, LOMONACO, 2009).

3 Considerando o arcabouço molecular destes compostos, os derivados  
4 fenólicos do LCC constituem sistema biofórico natural que compreende  
5 características eletrônicas e hidrofóbicas, as quais são requisitos estruturais  
6 relevantes ao reconhecimento molecular por diferentes biomacromoléculas,  
7 além de interações com estruturas lipídicas de membranas. Há várias décadas,  
8 as misturas dos derivados fenólicos do LCC bem como seus derivados isolados  
9 e semissintéticos têm demonstrado relevantes atividades com diferentes perfis  
10 biológicos/farmacológicos e.g. anticolinesterásica, bactericida, fungicida,  
11 antiproliferativa, anti-inflamatória, epigenética (PAULA et al., 2009; STASIUK;  
12 BARTOSIEWICZ; KOZUBEC, 2008; DE SOUZA et al., 2018; SUNG et al., 2008;  
13 GREEN et al., 2008; CHANDREGOWDA; RUSH; REDDY, 2009; ROMEIRO et  
14 al., 2019).

15 Estudos desenvolvidos em nosso grupo de pesquisa sobre inibidores da  
16 iAChE planejados a partir do LCC (Figura 11) evidenciaram características  
17 estruturais relevantes para a inibição da enzima com IC<sub>50</sub> variando de 1 µM a 20  
18 µM (LEMES, 2016; RAMOS, 2014; LEMES et al., 2016; RAMOS, 2018; RAMOS  
19 et al., 2021).

20  
21  
22

**Figura 11:** Planejamento racional de compostos anticolinesterásicos a partir dos lipídeos fenólicos do LCC



a. Subunidade farmacofórica

1 Neste sentido, esta proposta dá continuidade a esta estratégia de  
2 planejamento racional visando obter híbridos dos lipídeos fenólicos do LCC (**19-**  
3 **21**) com tetraidroacridinas (THA, 6-Cl-THA, 7-OMe-THA) na obtenção de novos  
4 agentes terapêuticos multifuncionais candidatos úteis ao tratamento da DA.

5

6

7

8

9

10

11

12

13

14

15

16

17

18

19

20

21

22

23

24

25

26

27

28

29

30

31



1

2

3

4

5

6

7

8

9

10

11

12

13

14

15

# PLANEJAMENTO

---

### 3. PLANEJAMENTO ESTRUTURAL

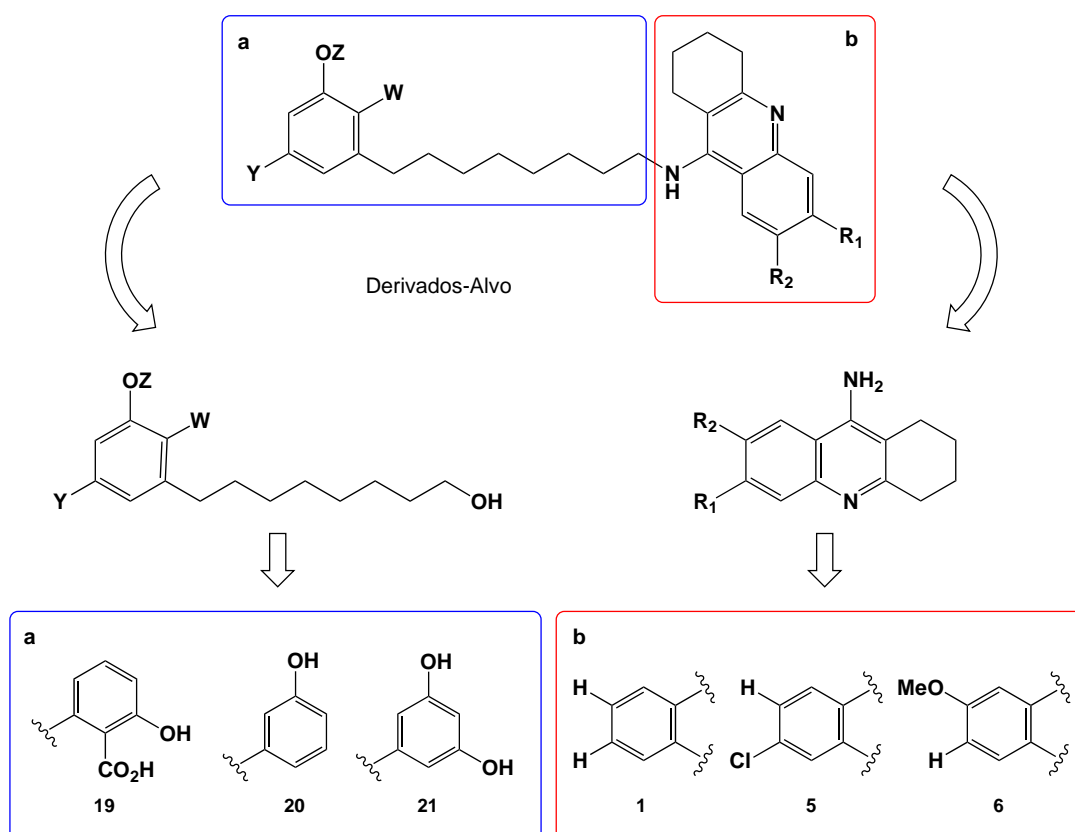
Os compostos-alvo foram planejados a partir da hibridação molecular dos lipídeos fenólicos do LCC com tetraidroacridinas de forma a gerar novos padrões moleculares com arcabouço estrutural complementar aos resíduos de aminoácido da AChE.

Neste sentido, foram planejados três padrões moleculares utilizando como produtos de partida as misturas fenólicas do LCC – ácido anacárdico (**19**), cardanol (**20**) e cardol (**21**) – visando explorar efeitos antioxidante, anti-inflamatório adicionais destes compostos (LEMES et al, 2015; DE SOUZA et al., 2018; ULIASSI et al., 2021).

Adicionalmente, para que os novos híbridos apresentassem perfil de inibição da AChE e atividade antineuroinflamatória em uma única estrutura, idealizamos a hibridação molecular com as tetraidroacridinas tacrina (**1**, THA), 6-clorotacrina (**5**, 6-Cl-THA) e 7-metóxitacrina (**6**, 7-MeOTHA).

O planejamento molecular está apresentado na Figura 12.

**Figura 12:** Hibridação molecular de derivados do LCC com derivados da THA



#### 4. PLANEJAMENTO SINTÉTICO

O planejamento sintético para a obtenção dos derivados-alvo das 3 séries, convergente e de domínio nos trabalhos do laboratório, compreendeu a exploração de procedimentos sintéticos clássicos, e.g. proteção e desproteção de grupos funcionais, bem como interconversão de grupos funcionais por meio de O-alkilações, ozonólise, redução com hidretos metálicos, hidrogenação e reações de substituição nucleofílica bimolecular ( $S_N2$ ).

A rota sintética foi planejada, sempre que possível, de acordo com os princípios da Química Verde<sup>1</sup>. Neste sentido, algumas reações assistidas por micro-ondas, sem solvente ou com solventes menos agressivos, e reatores de fluxo contínuo, foram utilizados a fim de melhorar a sustentabilidade geral do planejamento sintético.

Inicialmente, as misturas dos componentes naturais insaturados **19-21**, extraídas e isoladas dos LCC natural e técnico, seriam O-metiladas com iodeto de metila levando às misturas **22-26** e submetidas a clivagens oxidativas (ozonólise) seguidas de tratamento redutivo dos ozonídeos secundários com boridreto de sódio ( $\text{NaBH}_4$ ) fornecendo os respectivos álcoois **27-29**.

Para investigar a contribuição dos grupos fenólicos, primeiramente a mistura de ácidos anacárdicos (**19**) seria convertida na mistura de ésteres metílicos (**30**) com iodeto de metila e bicarbonato de sódio, a qual juntamente com as misturas **19-21** seriam O-benziladas com brometo de benzila para fornecer as misturas **31-33**, que após ozonólise e tratamento redutivo com  $\text{NaBH}_4$  levaria aos respectivos álcoois **34-36**. De posse dos álcoois **27-29** e **34-36**, estes seriam convertidos em seus metanossulfonatos **37-42** pela reação com cloreto de mesila e trietilamina (TEA) em diclorometano seco.

Para obtenção dos híbridos acridínicos, os mesilatos **37-42** seriam submetidos a reações de substituição nucleofílica bimolecular ( $S_N2$ ) com as tetraidroacridinas THA (**1**), 6-Cl-THA (**5**), 7-MeOTHA (**6**), na presença de hidróxido de potássio em DMSO com assistência de radiação micro-ondas, que forneceria os derivados **43-60**. A desproteção dos grupos benzila, por meio de hidrogenólise na presença de catalisador Pd/C 10 %, levaria aos derivados hidroxilados **61-69**. Por fim, a remoção dose ésteres metílicos nos derivados

---

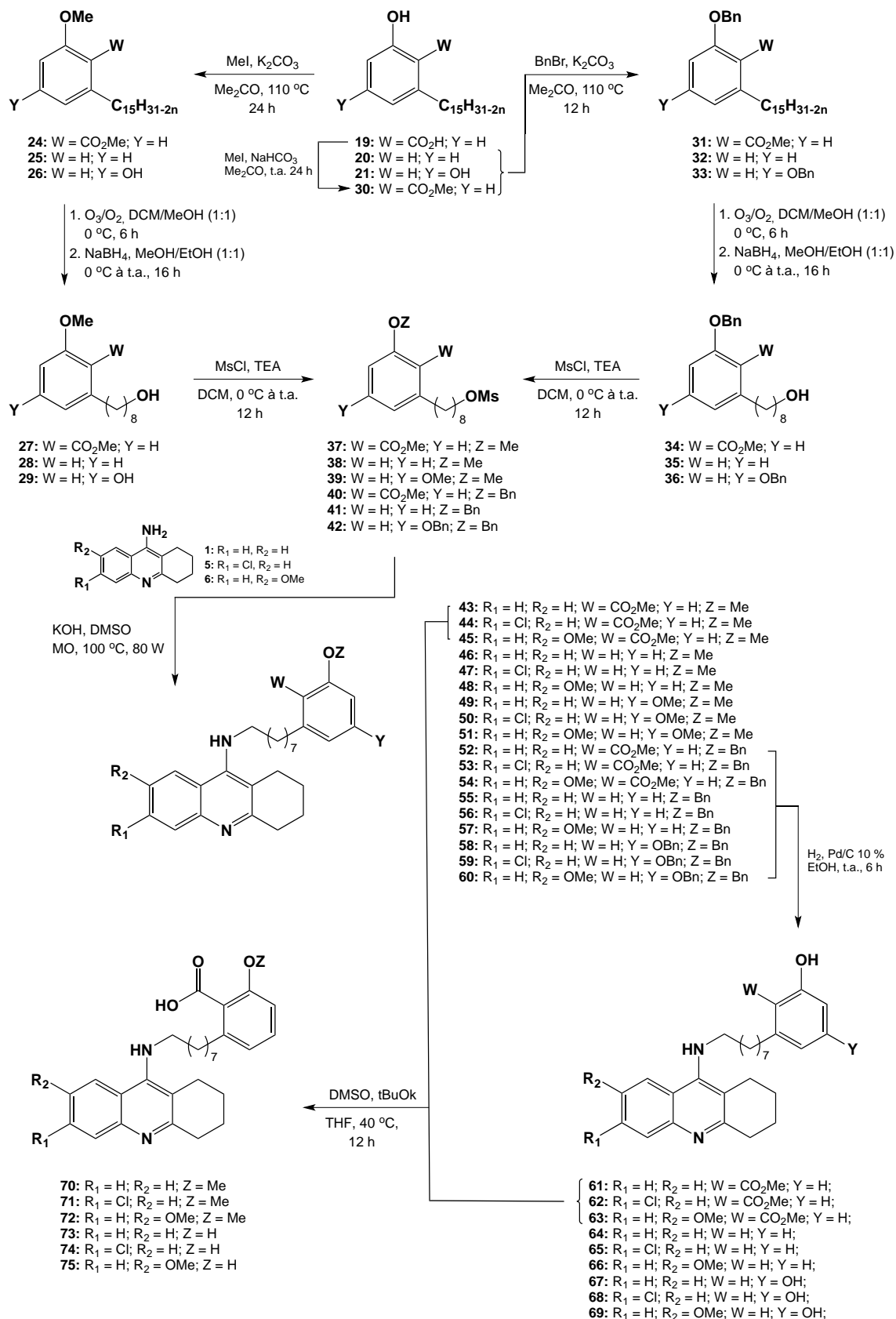
<sup>1</sup> Utilização de técnicas químicas e metodologias que reduzem ou eliminam o uso de solventes e reagentes ou geração de produtos e sub-produtos tóxicos, que são nocivos à saúde humana ou ao ambiente.

1 salicílicos **43-45** e **61-63** com DMSO e *tert*-butóxido de potássio forneceria os  
 2 derivados **70-75** (Esquema 1).

3

4 **Esquema 1:** Rota sintética para obtenção de intermediários e derivados-alvo

5



6

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33

## **OBJETIVOS**

---

## 5. OBJETIVOS

### 5.1 OBJETIVO GERAL

No âmbito de uma linha de pesquisa que visa o emprego dos lipídeos fenólicos não-isopropenoides do cajueiro (*Anacardium occidentale*) como matéria-prima sustentável e de baixo custo, o presente tem por objetivo a utilizar misturas de ácidos anacárdicos, cardanois e cardois na obtenção racional de novos ligantes multialvo híbridos da tacrina candidatos a agentes terapêuticos para o tratamento da DA.

### 5.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Compreenderam os objetivos específicos:

- Obter e purificar as misturas de lipídeos fenólicos do LCC;
- Sintetizar e caracterizar de intermediários e derivados-alvo;
- Caracterizar propriedades físico-química e espectroscópica dos compostos intermediários e derivados-alvo;
- Avaliar o perfil inibitório dos derivados-alvo para AChE e BuChE;
- Avaliar a hepatotóxica e acitotóxica dos derivados-alvo em modelos experimentais *in vitro*;
- Prever da permeabilidade pela barreira hematoencefálica;
- Avaliar da estabilidade plasmática;

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31

## **RESULTADOS E DISCUSSÃO**

---

## 6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

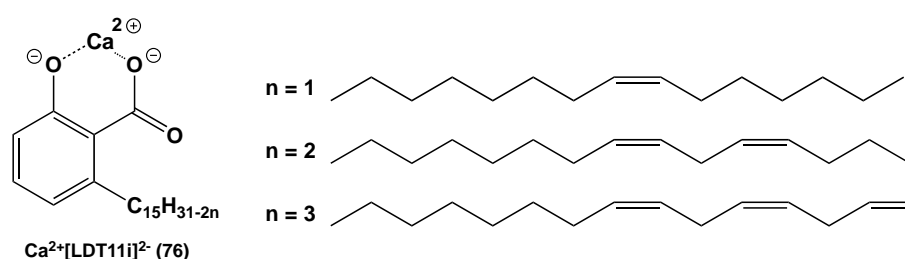
### 6.1 DESENVOLVIMENTO SÍNTÉTICO

Iniciamos a síntese dos derivados intermediários a partir da extração de lipídeos fenólicos (**19-21**) dos LCC natural e técnico.

Para obtenção da mistura de ácidos anacárdicos (**19**), as castanhas foram cortadas e separadas as amêndoas das cascas da castanha de caju. As cascas foram picotadas e colocadas em refluxo com etanol por 7 horas para obtenção do LCC natural – composto pelas misturas de ácidos anacárdicos (**19**), cardanois (**20**) e cardois (**21**).

A mistura **19** foi obtida a partir da reação do extrato de LCC natural com hidróxido de cálcio levando à precipitação do anacardato de cálcio (**76**) (Figura 13) o qual, solubilizado em acetato de etila, foi tratado com solução de ácido clorídrico a 50 % para liberação dos ácidos fornecendo a referida mistura em rendimento de 70 % em relação à massa aplicada.

**Figura 13:** Mistura de anacardatos de cálcio (**76**)



A mistura **19**, apresentando material polimérico polar, foi purificada em coluna cromatográfica contendo gel de sílica eluída com gradientes de hexano:acetato de etila (7:3), e apresentou fator de retenção ( $R_f$ ) 0,3 (hexano<sub>90%</sub>:AcOEt<sub>10%</sub>) em cromatografia em camada delgada (CCD), padrão em nosso laboratório.

Para a obtenção das misturas de cardanois (**20**) e cardois (**21**) foi utilizado o LCC técnico doado pela indústria Resibras-Cashol (Fortaleza-CE). O LCC técnico é um óleo – gerado como resíduo da indústria de beneficiamento da castanha de caju – que quando aquecido a temperaturas de 190 °C-200 °C leva à descarboxilação dos ácidos



1 anacárdicos convertendo-os na mistura de cardanois e polímeros polares. Todo esse  
2 óleo é subproduto do agronegócio de caju com baixíssimo valor agregado, justificando  
3 a sua utilização como matéria prima barata e abundante no Nordeste do Brasil  
4 (MAZZETTO; LOMONACO, 2009).

5 Neste contexto, as misturas **20** e **21** foram purificadas em coluna cromatográfica  
6 contendo gel de sílica, eluída com de mistura de hexanos, apresentando respectivos  
7 rendimentos de 68 % e 23 %. Este resultado está de acordo com a literatura  
8 (MAZZETO, LOMONACO, 2009), cujos conteúdos máximos para as misturas são de  
9 aproximadamente 70 % para cardanois e 25 % de cardois. As misturas **20** e **21**, não  
10 caracterizadas por métodos espectroscópicos, apresentaram fatores de retenção de  
11  $R_f$  0,7 (DCM) para mistura de cardanois (**20**) e de  $R_f$  0,3 (DCM) para a mistura de  
12 cardois (**21**), de acordo com os padrões presentes no laboratório e por  $R_f$ s já descritos  
13 na literatura. A Tabela 1 (pág. **22**) apresenta dados dos percentuais para as principais  
14 misturas encontradas nos LCCs natural e técnico corroborando os resultados  
15 encontrados.

16 De posse das misturas **19-21**, estas foram submetidas a reações de O-metilação  
17 com MeI e  $K_2CO_3$  em acetona sob refluxo levando à obtenção das misturas de 2-  
18 metóxicanacardatos de metila (**24**, 74 %), metóxicardanol (**25**, 48 %), e dimetóxicardol  
19 (**26**, 66 %). As misturas O-metiladas foram purificadas por cromatografia em coluna  
20 contendo gel de sílica eluída com gradiente de misturas de hexano e acetato de etila  
21 (5 %-10 %).

22 Para a síntese dos álcoois **27-29** os intermediários O-metilados **24-26** foram  
23 submetidos à reações de ozonólise, por meio de fluxos contínuos de ozônio/oxigênio  
24 em mistura de diclorometano e metanol (1:1) a 0 °C. Após consumo de todo o material  
25 de partida identificado por CCD, a mistura foi purgada com fluxo de nitrogênio seguida  
26 de tratamento redutivo do ozonídeo secundário com boridreto de sódio gerando os  
27 produtos **27** (60 %), **28** (70 %) e **29** (43 %).

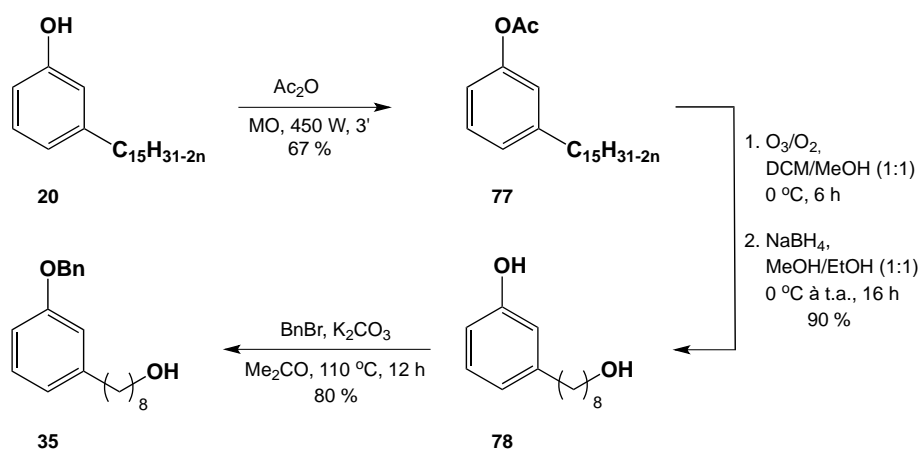
28 Para investigar a contribuição dos grupos fenólicos, o planejamento sintético inicial  
29 foi alterado em função da indisponibilidade de reagentes controlados pelo Ministério  
30 do Exército. Neste sentido, a mistura de cardanois (**20**) foi primeiramente O-acetilada  
31 com anidrido acético e catálise com ácido fosfórico, sob assistência de radiação micro-  
32 ondas em forno convencional, levando à mistura de cardanois acetilados (**77**) em  
33 rendimento de 67 %. Posteriormente **77** foi submetida à reação de ozonólise para

1 obtenção do derivado álcool **78** em 80 % de rendimento. Por fim, já na Universidade  
 2 de Bolonha, o grupo fenólico de **78** foi quimiosseletivamente protegido como éter  
 3 benzílico por meio da reação com brometo de benzila e carbonato de potássio em  
 4 acetona fornecendo o derivado **35** em 92 % de rendimento (Esquema 2).

5

6 **Esquema 2:** Rota sintética para obtenção dos intermediários **78** e **35**

7

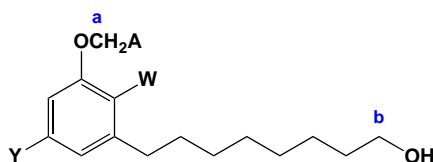


8

9

10 Os grupos metileno contendo a hidroxila alcoólica nos derivados **27-29** e **35** foram  
 11 caracterizados por RMN de  $^1\text{H}$  como tripletos variando entre 2,54 ppm e 2,64 ppm,  
 12 corroborados pelos deslocamentos químicos que variaram entre 62,9 ppm e 63,2 ppm  
 13 no RMN de  $^{13}\text{C}$  (Tabela 3).

14 **Tabela 3:** Dados de Rendimento e RMN ( $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$ ) para os derivados de **27-29** e **35**



27: W = CO<sub>2</sub>Me; Y = H; A = H  
 28: W = H; Y = H; A = H  
 29: W = H; Y = OMe; A = H  
 35: W = H; Y = H; A = Ph

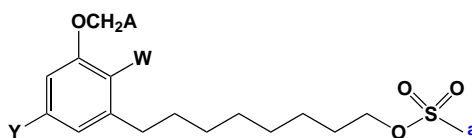
15

Composto	Rend. (%)	RMN $^1\text{H}$ (a) (ppm)	RMN $^{13}\text{C}$ (a) (ppm)	RMN $^1\text{H}$ (b) (ppm)	RMN $^{13}\text{C}$ (b) (ppm)
<b>27</b>	60	3,81	56,0	3,62	63,1
<b>28</b>	70	3,81	55,3	3,64	63,2
<b>29</b>	43	3,78	55,3	3,63	63,1
<b>35</b>	74*	5,07	70,1	3,65	63,1

16 \* considerando duas etapas: ozonólise e benzilação

Dando prosseguimento à rota sintética planejada, os álcoois **27-29** e **35** foram transformados em seus ésteres metanossulfônicos **37-39** e **41** por meio de reação com cloreto de mesila e TEA em diclorometano seco em rendimentos que variaram de 78 % a 87 %. A caracterização dos mesilatos se deu pela presença de simpletos entre 2,96 ppm e 3,00 ppm em RMN de  $^1\text{H}$  referentes às metilas do grupo sulfonila, confirmados pelos deslocamentos químicos na faixa de 37,2 e ppm 37,5 ppm nos espectros de RMN de  $^{13}\text{C}$  (Tabela 4).

**Tabela 4:** Dados de Rendimento e RMN ( $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$ ) para os derivados de **37-39** e **41**



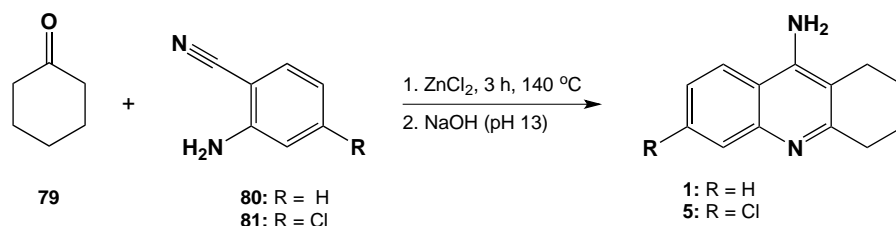
37: W = CO<sub>2</sub>Me; Y = H; A = H  
 38: W = H; Y = H; A = H  
 39: W = H; Y = OMe; A = H  
 41: W = H; Y = H; A = Ph

Composto	Rend (%)	RMN $^1\text{H}$ (a) (ppm)	RMN $^{13}\text{C}$ (a) (ppm)
<b>37</b>	85	3,00	37,5
<b>38</b>	78	2,98	37,5
<b>39</b>	80	2,99	37,4
<b>41</b>	87	2,96	37,2

Para finalizar a estratégia sintética convergente, foram sintetizadas as tetraidroacridinas – THA (**1**) e 6-Cl-THA (**5**) – a partir de ciclohexanona (**79**) e 2-aminobenzonitrila (**80**) ou 2-amino-4-clorobenzonitrila (**81**) levando às respectivas aminas em iguais rendimentos de 70 % (Esquema 3), após recristalização em etanol/água para remover o ZnCl<sub>2</sub> e as impurezas. Destacamos que o derivado 7-OMe-THA (**7**) foi gentilmente doado pelo professor Kamil Kuca do Departamento de Química da Faculdade de Ciências da Universidade Hradec Králové (República Tcheca).

1 **Esquema 3:** Obtenção das tetraidroacridinas THA (**1**) e 6-Cl-THA (**5**)

2



3

4

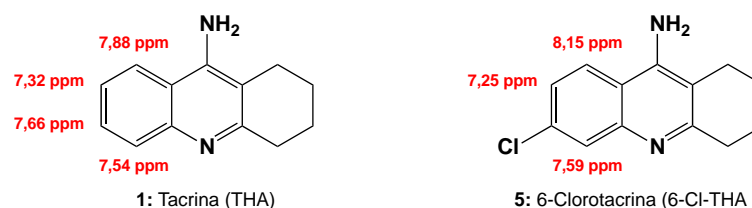
5 A caracterização estrutural das tetraidroacridinas **1** e **5** por RMN de hidrogênio

6 está apresentada na Figura 14.

7

8 **Figura 14:** Sinais de RMN de <sup>1</sup>H para o anel aromático das THAs **1** e **5**

9



10

11

12 De posse dos derivados tetraidroacridínicos **1**, **5** e **6**, os intermediários mesilados

13 **37-39** e **41** foram submetidos à reação de substituição nucleofílica bimolecular (S<sub>N</sub>2)

14 assistida por reator de micro-ondas. Esse procedimento melhorou rendimentos e

15 reduziu o tempo de reação (de 12 h para 12 min), em comparação ao aquecimento

16 convencional. Para formação do nucleófilo nas respectivas THA foi utilizada solução

17 de KOH em DMSO seco. Apesar do DMF ser um ótimo solvente para reação de

18 substituição nucleofílica, buscamos utilizar solventes mais sustentáveis e

19 ecologicamente corretos. Neste sentido, optamos pelo DMSO por ser mais seguro

20 (PRATI, *et al.* 2016).

21 As condições reacionais permitiram a substituição nucleofílica no carbono

22 eletrofílico na posição alfa ao mesilato dos respectivos intermediários resultando nos

23 derivados-alvo **43-47**, **49-50** e **55-56** em rendimentos que variaram de 20 % a 34 %.

24 Apesar dos baixos rendimentos, essa reação específica foi realizada de acordo com

25 o estudo de Perna (2017), no qual diferentes condições experimentais foram avaliadas

26 (Tabela 5).

27

28

1 **Tabela 5:** Estudo das condições experimentais para as reações  $S_N2$  entre as THAs (1, 5 e 6)  
 2 e os mesilatos (38-40 e 42)

Base	Catalisador	Solvente	Temperatura (°C)	Tempo (h)	Radiação Micro-ondas	Rendimento (%)
NaNH <sub>2</sub>	--	THF	t.a.	24	Não	--
NaNH <sub>2</sub>	--	THF	66	24	Não	--
NaNH <sub>2</sub>	--	THF	170	2	Sim	Traços
NaH	KI	DMF	120	8	Não	10
NaH	KI	DMF	120	1	Sim	--
NaH	--	DMF	120	1	Sim	--
NaH	--	DMF	120	0,2	Sim	11
KOH	--	DMSO	t.a.	15	Não	30
KOH	--	DMSO	120	0,2	Sim	33

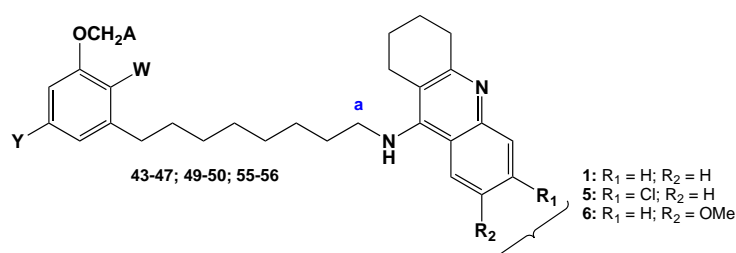
3

4

5 A ausência dos simpletos em torno de 3,00 ppm no espectro de RMN de <sup>1</sup>H bem  
 6 como dos deslocamentos químicos em torno de 37,5 ppm em RMN de <sup>13</sup>C referente  
 7 à metila do grupo sulfonila confirmaram a saída dos grupos mesila. Adicionalmente,  
 8 os sinais observados nos espectro de RMN de <sup>13</sup>C na faixa de 62,9 ppm e 63,2 ppm,  
 9 referentes aos grupos metilenos ligados a oxigênio nos derivados **27-29** e **35**, foram  
 10 deslocados para a faixa de 33,4 ppm e 35,9 ppm característica de grupos metilenos  
 11 ligado a nitrogênio, corroborando a formação dos derivados-alvo tetraidroacridínicos  
 12 (Tabela 6).

13

14 **Tabela 6:** Dados de Rendimento e RMN (<sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C) para os derivados-alvo **43-47**, **49-50** e **55-**  
 15 **56**



16

Derivados	W	Y	A	THA	Rend. (%)	RMN de <sup>1</sup> H (a) (ppm)	RMN de <sup>13</sup> C (a) (ppm)
<b>43</b>	CO <sub>2</sub> Me	H	H	1	20	2,53	33,4
<b>44</b>	CO <sub>2</sub> Me	H	H	5	34	2,51	33,3

45	CO <sub>2</sub> Me	H	H	6	24	2,51	33,3
46	H	H	H	5	28	2,57	35,9
47	H	H	H	6	29	2,53	35,9
49	H	OMe	H	5	35	2,58	33,4
50	H	OMe	H	6	25	2,58	33,9
55	H	H	Bn	5	32	2,55	33,9
56	H	H	Bn	6	24	2,56	33,8

1

2

3

4

5

6

7

8

9

10

11

12

13

14

15

16

17

18

19

20

21

22

23

24

25

26

27

28

Dentre os derivados-alvo, os derivados éteres benzílicos **55** e **56** foram hidrogenados usando sistema H-cube. Essa reação acontece com fluxo contínuo de hidrogênio que permitiu remover o grupo benzílico e obter a hidroxila fenólica livre nos derivados **64** (41 %) e **65** (45 %). A ausência do sinal em 5,02 ppm, característico do metileno do grupo benzílico no espectro de RMN de <sup>1</sup>H, corrobora a hidrogenólise do referido grupo protetor.

Partindo do princípio que a atividade anti-inflamatória parece derivar dos compostos com as funções fenol e ácido benzoico, foram sintetizados os derivados contendo a subunidade salicilato de metila **61** (25 %) e **62** (25 %), por meio da desproteção seletiva do grupo metoxila nos éteres **43** e **44** usando BBr<sub>3</sub> em diclorometano, bem como com a subunidade salicílica a partir da hidrólise dos ésteres metílicos **64** e **65** com solução de KOH 3,5 M em MeOH/H<sub>2</sub>O (2:1) sob radiação micro-ondas fornecendo os respectivos ácidos **73** (84 %) e **74** (54 %). A análise dos espectros de RMN de <sup>1</sup>H e de <sup>13</sup>C dos novos derivados mostrou ausência dos sinais referentes às metilas dos grupos metoxila – 3,81 ppm e 51,9 ppm – bem como dos ésteres – 3,89 ppm e 55,8 confirmando as respectivas interconversões de grupos funcionais.

De posse de todos os derivados foi realizada a relação estrutura-atividade para validar a hipótese sobre os derivados do LCC na atividade anti-inflamatória.

## 6.2 AVALIAÇÃO BIOLÓGICA

### 6.2.1 Perfil de atividade frente às enzimas AChE e BChE humanas

É sabido que os inibidores de colinesterases são eficazes quanto à melhora temporária do comportamento e bem-estar, bem como retardam o declínio cognitivo de pacientes com DA. Além da AChE, há evidências pré-clínicas que sugerem que a

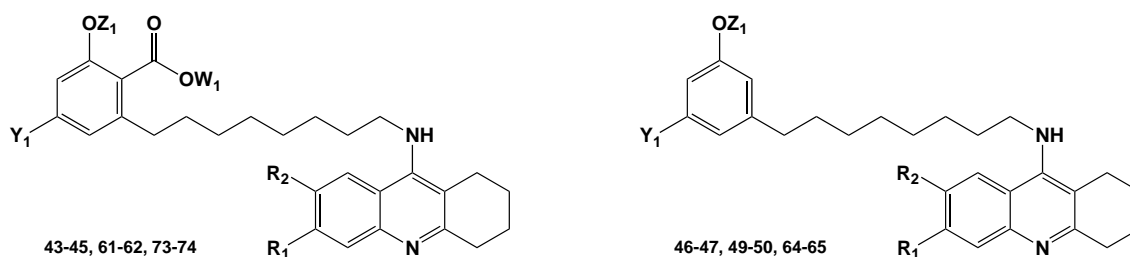
1 inibição da BChE pode ser importante para manter a normalidade da função  
 2 colinérgica na DA, uma vez que aparece mais pronunciada durante o curso da doença.  
 3 Dados da literatura confirmam que a tacrina (1) e seus derivados atuam como  
 4 inibidores duais de AChE e BChE (MEHTA, ADEM E SABBAGH,2012). Sendo assim,  
 5 a atividade inibitória dos derivados sintetizados e dos compostos de referência  
 6 derivados da THA (1, 5 e 6) foram avaliados quanto ao perfil de inibição de AChE e  
 7 BChE humanas pelo método de Ellman (ELLMAN et al., 1961).

8 Todos os híbridos avaliados apresentaram atividade inibitória de AChE e BChE  
 9 satisfatória com valores de IC<sub>50</sub> que variaram da ordem de nanomolar a picomolar e  
 10 foram significativamente mais potentes que os compostos de referência 1, 5 e 6  
 11 (Tabela 7).

12 A THA 1 não substituída mostra ligeira seletividade para hBuChE, enquanto a o  
 13 composto 5 (6-Cl-THA) é inibidor mais potente de hAChE graças ao efeito positivo do  
 14 átomo de cloro (SAVINI, et al., 2003). Além disso, a presença de substituinte metoxila  
 15 (7) é prejudicial para ambas as inibições de AChE e BuChE, embora potencialmente  
 16 positiva em termos de metabolismo/toxicidade (SOUKUP et al., 2013). Notavelmente,  
 17 todos os híbridos 25-35 mostraram melhor atividade em relação aos compostos de  
 18 referência 1, 5 e 6 (hAChE: 1,2- a 13,5 vezes para derivados da tacrina e de 1,1- a 5,7  
 19 vezes para derivados da Cl-tacrina; hBuChE: 1,5- a 1300 vezes para derivados da  
 20 tacrina e de 4,2 a 1900 vezes para derivados da Cl-tacrina), corroborando a eficácia  
 21 da estratégia de hibridação molecular. No entanto, os perfis inibitórios da  
 22 AChE/BuChE exibem tendências variáveis. Assim, a relação estrutura-atividade será  
 23 discutida separadamente para as duas enzimas.

24

25 **Tabela 7:** Perfil de atividades dos compostos 43-47, 49-50, 61-62, 64-65 e 73-74 e compostos  
 26 de referência 1, 5 e 6 frente às enzimas hAChE e hBChE



27

Derivados							
Nº	W <sub>1</sub>	Y <sub>1</sub>	Z <sub>1</sub>	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	hAChE IC <sub>50</sub> ± SEM (nM)	hBChE IC <sub>50</sub> ± SEM (nM)

<b>43</b>	Me	H	Me	H	H	20,8 ± 3,8	0,0352 ± 0,0077
<b>44</b>	Me	H	Me	Cl	H	2,54 ± 0,07	0,265 ± 0,027
<b>45</b>	Me	H	Me	H	OMe	1260 ± 10	3,49 ± 0,09
<b>61</b>	Me	H	H	H	H	17,0 ± 2,7	0,177 ± 0,005
<b>62</b>	Me	H	H	Cl	H	2,81 ± 0,14	4,25 ± 0,48
<b>73</b>	H	H	H	H	H	184 ± 59	11,2 ± 2,3
<b>74</b>	H	H	H	Cl	H	13,4 ± 4,2	120 ± 12
<b>46</b>	--	H	Me	H	H	40,0 ± 3,3	7,72 ± 0,96
<b>47</b>	--	H	Me	Cl	H	5,71 ± 0,43	25,8 ± 0,5
<b>64</b>	--	H	H	H	H	19,2 ± 4,0	3,74 ± 0,10
<b>65</b>	--	H	H	Cl	H	4,19 ± 0,81	19,4 ± 4,0
<b>49</b>	--	OMe	Me	H	H	47,2 ± 9,8	29,2 ± 5,4
<b>50</b>	--	OMe	Me	Cl	H	5,10 ± 0,99	83,2 ± 3,5
<b>1</b>	--	--	--	H	H	230 ± 12	45,8 ± 3,0
<b>5</b>	--	--	--	Cl	H	14,5 ± 0,9	505 ± 28
<b>6</b>	--	--	--	H	OMe	8000 ± 650	8860 ± 640

1

2

3

4 Considerando o perfil inibitório para a enzima *hAChE*, o composto **44** – híbrido do  
5 ácido anacárdico dimetilado com 6-Cl-THA (**5**) – foi o mais potente (IC<sub>50</sub>: 2,54 nM),  
6 enquanto o menos ativo foi o derivado **45** (IC<sub>50</sub>: 1260 nM) que difere de **44** quanto à  
7 subunidade THA em que foi utilizada a tetraidroacridina 7-OMe-THA (**6**). Isso reforça  
8 a que a subunidade 6-Cl-THA é mais eficaz que a 7-OMe-THA no reconhecimento do  
9 sítio ativo catalítico da enzima. Como confirmação da relevância da subestrutura das  
10 THA dentro dos subconjuntos homogêneos dos híbridos, como força motriz para o  
11 reconhecimento pela *hAChE*, a potência da subunidade farmacofórica é classificada  
12 na seguinte ordem: 6-Cl-THA (**5**) > THA (**1**) > 7-OMe-THA (**6**). Quanto às subestruturas  
13 derivada dos lipídeos fenólicos do LCC, os derivados metóxicardanois **46** e **47** e os  
14 metoxicardois **49** e **50** exibiram perfis semelhantes, sugerindo que uma segunda  
15 metoxila no anel aromático não faz interações adicionais. As metilas da subunidade  
16 salicílica do ácido anacárdico (funções carboxílicas e fenólicas) foram benéficas para  
17 a afinidade como visto nos derivados dimetilados **43** e **44**, enquanto os ésteres  
18 metílicos **61** e **62** foram inibidores mais eficazes do que os ácidos anacárdicos livres  
**73** e **74**.



1 Os resultados mais marcantes foram observados para a inibição de *hBChE*, com  
2 três derivados-alvo (**43**, **44** e **61**) exibindo perfis subnanomolares. Para inibição da  
3 *hAChE* foi observado melhor perfil dos derivados contendo a subunidade THA (**1**),  
4 sendo mais potentes que os derivados híbridos com a 6-Cl-THA (**5**). Na verdade, este  
5 resultado é consistente com achados anteriores, mostrando que a inserção do átomo  
6 de cloro na posição **6** do núcleo da tacrina é prejudicial para a inibição de *hBChE* por  
7 causa do impedimento estérico (SAVINI et al., 2003). A presença da subunidade do  
8 ácido anacárdico parece importante para aumentar a interação com a enzima. Na  
9 verdade, o subconjunto dos híbridos do ácido anacárdico (**43-44** e **61-62**) foi mais  
10 potente do que os correspondentes para o cardanol (**46-47** e **64-65**) e cardol (**49-50**).  
11 Mais uma vez, a metilação dos híbridos do ácido anacárdico – em ambas as funções  
12 carboxílico e fenol – faz uma contribuição favorável para a atividade, visto que os  
13 derivados **43** e **44** e o éster metílico **61** foram mais potentes do que os derivados de  
14 ácido livre **73** e **74**. Particularmente, **43**, **44** e **61** foram os inibidores com melhor perfil  
15 da série.

16 De todos os derivados, o composto **43** apresentou inibição mais potente da série  
17 para *hBuChE* com alta potência e seletividade sobre *hAChE* (DIGHE et al., 2016;  
18 KOŠAK et al., 2018; HOFFMANN et al. 2019; LI et al., 2020), incluindo alguns  
19 inibidores multifuncionais relatados recentemente (PANEK et al., 2018; VIAYNA et al.,  
20 2014; BUTINI et al., 2013).

21

## 22 6.2.2 Ensaio de toxicidade em células de hepatoma humano (HepG2)

23

24 A falha de alguns candidatos ao tratamento da DA pode ser atribuída à toxicidade  
25 após a administração crônica de medicamentos. Particularmente, em pacientes  
26 geriátricos, devido ao envelhecimento, comorbidade e politerapia subsequente, há um  
27 risco aumentado de interações medicamentosas e hepatotoxicidade. Além disso, a  
28 tacrina (**1**) foi retirada do mercado por seus efeitos adversos graves, sendo o mais  
29 notório o hepatotóxico (CUMMINGS; MORSTORF; ZHONG, 2014).

30 Neste sentido, foram determinados os perfis de toxicidade nas linhagens de  
31 células de hepatoma humano HepG2 (Tabela **8**), SH-SY5Y semelhante a neurônio  
32 humano e linha de células BV-2.

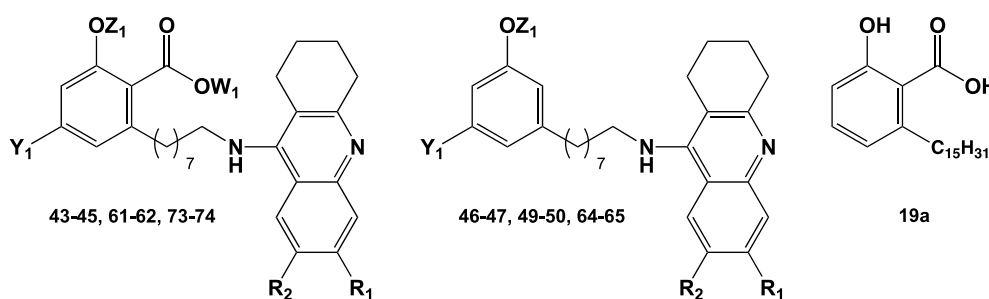
1 A hepatotoxicidade de **43-35** foi avaliada preliminarmente usando um sistema *in*  
 2 *vitro* baseado em HepG2, em comparação com os compostos de referência **19a** e **1**.  
 3 A linha celular HepG2 tem sido amplamente empregada como sistema *in vitro*  
 4 adequado, graças às suas características celulares homogêneas e consistentes.

5 Para progredir com as moléculas potencialmente desprovidas de  
 6 hepatotoxicidade, estabelecemos como ponto de corte inicial viabilidade celular maior  
 7 que 80% a concentração de 10  $\mu\text{M}$ . Com base nos dados obtidos, bem como nos  
 8 perfis de inibidores de colinesterase, os compostos **43, 44, 47, 61, 62, 65, 73 e 74**  
 9 foram selecionados como os mais promissores para continuar o estudo.

10

11

12 **Tabela 8:** Perfil de citotoxicidade em células HepG2 dos compostos **43-47, 49-50, 61-62, 64-**  
 13 **65 e 73-74** e compostos de referência **1 e 19a**



14

Derivados						Citotoxicidade em Células HepG2 % de células viáveis <sup>a</sup>		
Nº	W <sub>1</sub>	Y <sub>1</sub>	Z <sub>1</sub>	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	0,1 $\mu\text{M}$	1 $\mu\text{M}$	10 $\mu\text{M}$
<b>43</b>	Me	H	Me	H	H	93,4 $\pm$ 4,0	97,7 $\pm$ 6,8	93,8 $\pm$ 2,9
<b>44</b>	Me	H	Me	Cl	H	95,4 $\pm$ 2,4	95,1 $\pm$ 1,8	81,5 $\pm$ 2,4**
<b>45</b>	Me	H	Me	H	OMe	94,7 $\pm$ 3,9	92,9 $\pm$ 9,2	93,2 $\pm$ 1,3
<b>61</b>	Me	H	H	H	H	89,9 $\pm$ 7,2	90,2 $\pm$ 1,4	89,6 $\pm$ 3,6
<b>62</b>	Me	H	H	Cl	H	100,0 $\pm$ 2,5	93,4 $\pm$ 3,6	99,4 $\pm$ 5,3
<b>73</b>	H	H	H	H	H	94,4 $\pm$ 6,0	85,5 $\pm$ 0,5	61,4 $\pm$ 3,5****
<b>74</b>	H	H	H	Cl	H	94,9 $\pm$ 7,7	92,5 $\pm$ 4,9	78,5 $\pm$ 2,3****
<b>46</b>	--	H	Me	H	H	95,6 $\pm$ 5,6	81,0 $\pm$ 1,3	84,2 $\pm$ 10,3*
<b>47</b>	--	H	Me	Cl	H	90,3 $\pm$ 4,2	86,6 $\pm$ 2,4	88,1 $\pm$ 5,2
<b>64</b>	--	H	H	H	H	105,5 $\pm$ 0,5	108,2 $\pm$ 5,7	100,8 $\pm$ 2,5
<b>65</b>	--	H	H	Cl	H	100,0 $\pm$ 5,0	100,0 $\pm$ 2,9	92,7 $\pm$ 7,6
<b>49</b>	--	OMe	Me	H	H	98,8 $\pm$ 5,0	86,0 $\pm$ 15,9	59,1 $\pm$ 3,1****

<b>50</b>	--	OMe	Me	Cl	H	91,3 ± 3,6	95,5 ± 3,7	90,0 ± 3,3
<b>1</b>	--	--	--	H	H	97,79 ± 6,5	95,0 ± 3,6	82,3 ± 2,8*
<b>19a</b>	H	H	H	--	--	95,4 ± 2,2	92,2 ± 2,6	110 ± 18

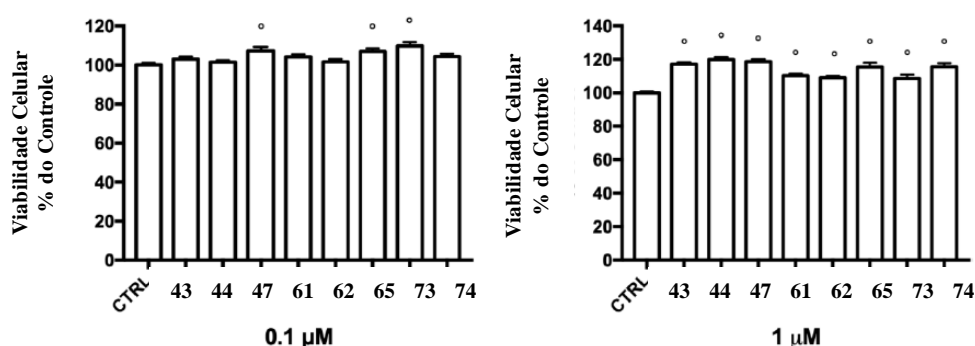
<sup>a</sup> Os resultados são expressos como a média de pelo menos três experiências.\* A significância foi determinada por ANOVA; Teste de comparação múltipla de Dunnett  $p \leq 0,05$ , \*\*  $p \leq 0,01$ , \*\*\*  $p \leq 0,001$  e \*\*\*\*  $p \leq 0,0001$ .

### 6.2.3 Ensaio de citotoxicidade em células SH-SY5Y

As moléculas menos tóxicas no ensaio de citotoxicidade anterior **43**, **44**, **47**, **61**, **62**, **65**, **73** e **74** foram selecionadas para avaliação através do ensaio de viabilidade MTT tratando células humanas diferenciadas SH-SY5Y com concentrações crescentes (0,1  $\mu\text{M}$  a 1  $\mu\text{M}$ ) dos compostos selecionados por 24 h (Gráfico 2). A tacrina (**1**) e o ácido anacárdico saturado (**19a**) foram usados como compostos de referência.

Todos os compostos não foram significativamente neurotóxicos em ambas as concentrações testadas, sendo a viabilidade celular comparável ou mesmo ligeira e significativamente aumentada em relação às células de controle.

**Gráfico 2:** Efeito dos híbridos na sobrevivência/morte celular através do ensaio de MTT em células SH-SY5Y nas concentrações de 0,1  $\mu\text{M}$  e 1  $\mu\text{M}$  dos derivados-alvo **43**, **44**, **47**, **61**, **62**, **65**, **73** e **74** por 24 horas



### 6.2.4 Ensaio de citotoxicidade em células de BV-2

Paralelamente ao ensaio anterior, os mesmos híbridos também foram avaliados quanto à citotoxicidade frente à linhagem celular de micróglias (BV-2) em três

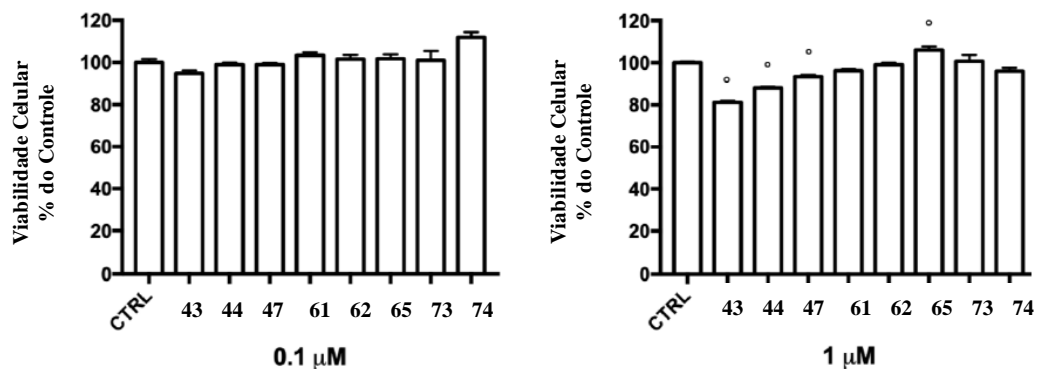
1 concentrações, 0,1  $\mu\text{M}$ , 1  $\mu\text{M}$  e 10  $\mu\text{M}$  por 24 horas e a viabilidade celular medida pelo  
 2 ensaio de MTT (Gráfico 3).

3 Na concentração mais baixa (0,1  $\mu\text{M}$ ), os compostos não foram citotóxicos, pois a  
 4 viabilidade celular das células tratadas era comparável aos controles. A 1  $\mu\text{M}$ , apenas  
 5 os compostos **43**, **44** e **47** mostraram ligeira, embora significativa, citotoxicidade.

6

7

8 **Gráfico 3:** Efeito dos híbridos na sobrevivência/morte celular através do ensaio de MTT em  
 9 células BV-2 nas concentrações de 0,1  $\mu\text{M}$  e 1  $\mu\text{M}$  dos derivados-alvo **43**, **44**, **47**, **61**, **62**, **65**,  
 10 **73** e **74** por 24 horas



11

### 12 6.2.5 Ensaio em células BV-2 após ativação por LPS

13

14

15 Para avaliar o potencial antineuroinflamatório, submetemos os compostos menos  
 16 tóxicos (**43**, **44**, **47**, **61**, **62**, **65**, **73** e **74**) à triagem baseada em fenótipo em células  
 17 BV2. A descoberta de que pacientes com DA apresentam níveis aumentados de  
 18 mediadores inflamatórios e a associação entre os genes de risco da DA e as funções  
 19 imunes inatas indicam importante papel para a neuroinflamação na patogênese da DA  
 20 (LENG; EDISON, 2021).

21 As células BV-2 foram tratadas com as amostras por 24 horas e  
 22 subsequentemente expostas a 100 ng/mL de LPS por mais 24 horas (). Conforme  
 23 avaliado pelo ensaio MTT, o tratamento com LPS induziu redução significativa da  
 24 viabilidade celular. Os derivados híbridos do ácido anacárdico (**62**, **73-74**) e cardanol  
 25 (**65**) não mostraram capacidade de neutralizar o dano induzido por LPS (a viabilidade  
 26 celular das células tratadas era comparável às células expostas ao LPS) (Gráfico 3).

1 Por outro lado, os derivados híbridos do ácido anacárdico dimetilados **43** e **44**,  
2 metóxicardanol **47** e o éster metílico do ácido anacárdico **61** reduziram  
3 significativamente a morte celular induzida por LPS. Em particular, enquanto **12**  
4 mostrou efeito moderado, embora significativo, já em 0,01  $\mu\text{M}$ , **9** proporcionou  
5 proteção total contra LPS apenas na concentração testada mais alta (0,1  $\mu\text{M}$ ).  
6 Notavelmente, ambos os derivados híbridos **43** e **44** (independentemente da  
7 subunidade tacrina) restauraram a viabilidade celular aos níveis normais já na  
8 concentração mais baixa de 0,01  $\mu\text{M}$ .

9

10

11

12

13

14

15

16

17

18

19

20

21

22

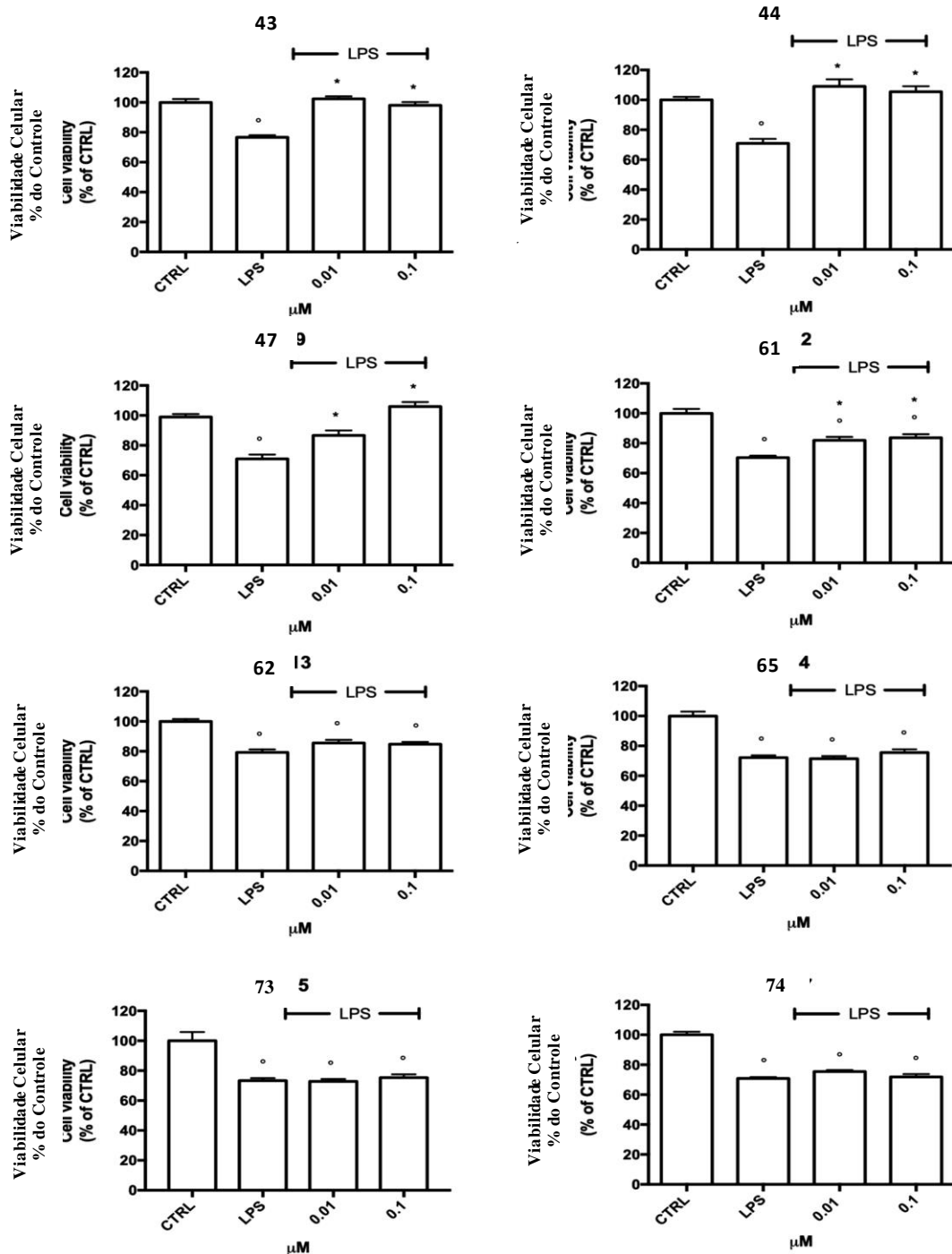
23

24

25

1 **Gráfico 4:** Efeitos anti-inflamatórios de **43, 44, 47, 61, 62, 65, 73 e 74** contra LPS em células  
 2 BV-2. As células BV-2 foram tratadas com concentração crescente dos compostos  
 3 selecionados (0,01  $\mu\text{M}$  e 0,1  $\mu\text{M}$ ) por 24 horas e expostas a LPS 100 ng/mL por mais 24 horas

4



5

6  $p < 0,05$  em comparação com CTRL; \* $p < 0,05$  em comparação com LPS.

7

8

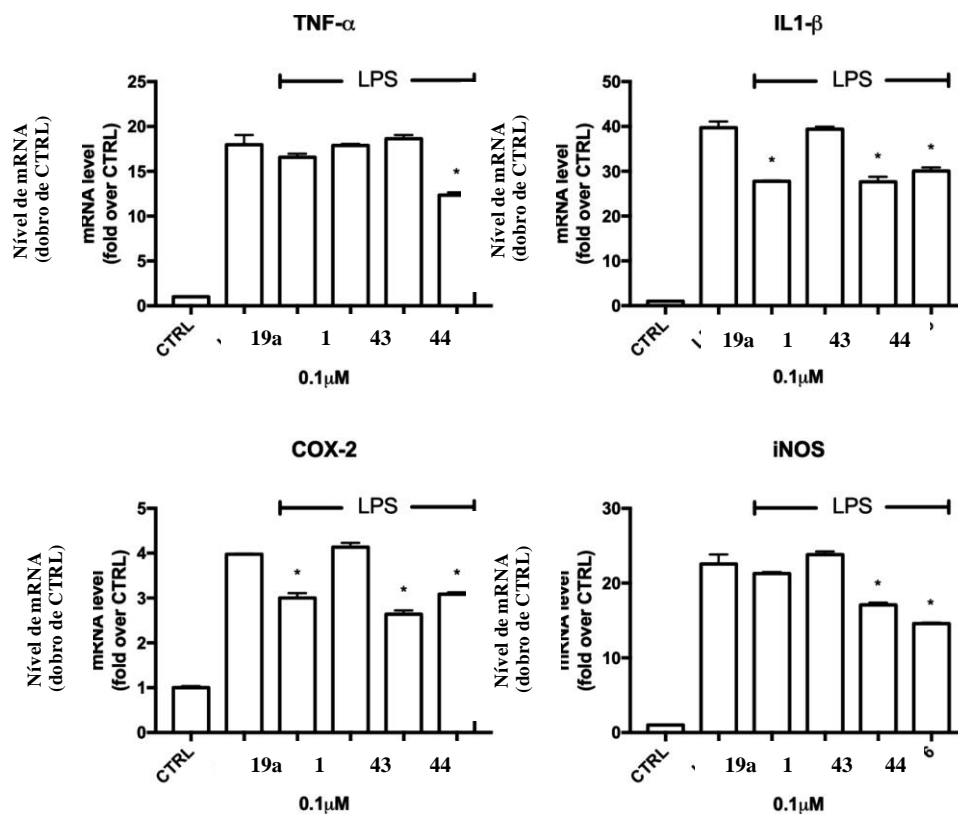
9

## 6.2.6 Ensaio de expressão gênica em células BV-2 após exposição com LPS

Os híbridos **43** e **44** foram os compostos mais eficazes não apenas na neutralização do dano induzido por LPS, mas também na inibição de *hBuChE* e *hAChE*, respectivamente. Por esse motivo, seu perfil anti-inflamatório foi investigado com mais profundidade, visando avaliar sua capacidade de modular a expressão das principais citocinas neuroinflamatórias, ou seja, IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , e mediadores, ou seja, iNOS e COX-2.

As células BV-2 foram tratadas com **43** e **44** por 24 horas e expostas a LPS 100 ng/mL por mais 24 horas, quando a expressão dos mediadores inflamatórios foi avaliada por reação em cadeia da polimerase em tempo real (RT-PCR). Os compostos de referência **19a** e **1** foram adicionados ao experimento como controles positivos e negativos, respectivamente.

**Gráfico 5:** Expressão de citocinas e enzimas pró-inflamatórias em células BV-2 induzidas por LPS tratadas com **19a**, **1**, **43** e **44**. As células BV-2 foram tratadas com **1** (0,1  $\mu$ M) por 24 horas e expostas a LPS 100 ng/mL por mais 24 horas



19

20

1 O composto original **19a** se assemelha quimicamente ao ácido salicílico e DE  
2 SOUZA (2018) demonstraram que ele possui maior atividade anti-inflamatória que o  
3 ácido acetilsalicílico *in vitro* (DE SOUZA et al., 2018). Com base nessas  
4 considerações, escolhemos **19a**, em vez dos ácidos salicílico/acetilsalicílico, como  
5 controle positivo.

6 O LPS aumentou significativamente a expressão de TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , COX-2 e iNOS  
7 em comparação com as células de controle. Como esperado, **1** não foi eficaz,  
8 enquanto **19a**, **43** e **44** suprimiram de forma significativa a transcrição dos genes COX-  
9 2 e iNOS e citocinas pró-inflamatórias (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ ). Tanto **43** quanto **44** mostraram  
10 atividade anti-inflamatória maior que **19a**. Na verdade, **44** foi capaz de reduzir  
11 significativamente a expressão de todos os mediadores inflamatórios testados e **43**  
12 desregulou significativamente IL-1 $\beta$ , COX-2 e iNOS (e não TNF- $\alpha$ ); por sua vez, **19a**  
13 reduziu apenas a expressão de IL-1 $\beta$  e COX-2. A maior atividade anti-inflamatória de  
14 **43** e **44**, em comparação com **19a**, parece estar ligada à eficácia do planejamento de  
15 hibridação aplicada.

16 Notavelmente, as evidências indicam o sistema colinérgico como mediador das  
17 interações neuroimunes (REALE, 2014) e BChE como ator importante na regulação  
18 da inflamação intrínseca e atividade das células gliais de sítios colinoceptivos  
19 (DARREH-SHORI, 2013). Assim, pode-se dizer que a maior atividade de **43** e **44** em  
20 relação a **19a** pode ser devido à modulação concomitante de ambas as vias. No  
21 entanto, a possibilidade de que isso possa ser devido à diferente biodisponibilidade  
22 celular dos dois compostos não pode ser descartada.

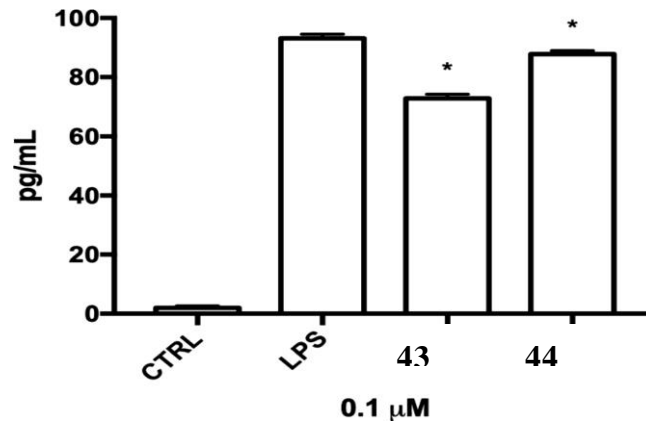
23 Os resultados sobre a atividade anti-inflamatória de **19a** estão parcialmente de  
24 acordo com os dados de De Souza et al., (2018) mostrando que **19a** é capaz de  
25 reduzir significativamente a expressão de TNF- $\alpha$ , iNOS, COX-2, NF- $\kappa$ B, IL-1 $\beta$  e IL-6.  
26 Essa discrepância pode estar relacionada às diferentes concentrações usadas (50  $\mu$ M  
27 vs 0,1  $\mu$ M). Além disso, De Souza et al. (2018) investigaram a atividade anti-  
28 inflamatória de **19a** em modelo diferente, ou seja, a linhagem celular de macrófago  
29 murino RAW264.7.

30 Como esperado, **43** não influenciou a expressão de todos os mediadores  
31 inflamatórios testados. A atividade anti-inflamatória de **43** e **44** também foi confirmada  
32 por ELISA. O pré-tratamento com **43** e **44** foi capaz de diminuir significativamente a  
33 liberação de IL-1 $\beta$  no meio de cultura quando comparado às células tratadas com LPS.



1 **Gráfico 6:** Secreção de IL1- $\beta$  em células BV-2 ativadas tratadas com **43 e 44**. As células BV-  
 2 2 foram tratadas com **43 e 44** (0,1  $\mu$ M) por 24 horas e expostas a 100 ng / mL LPS por mais  
 3 24 horas

4



5

6

\*  $p < 0,05$  em comparação com LPS.

7

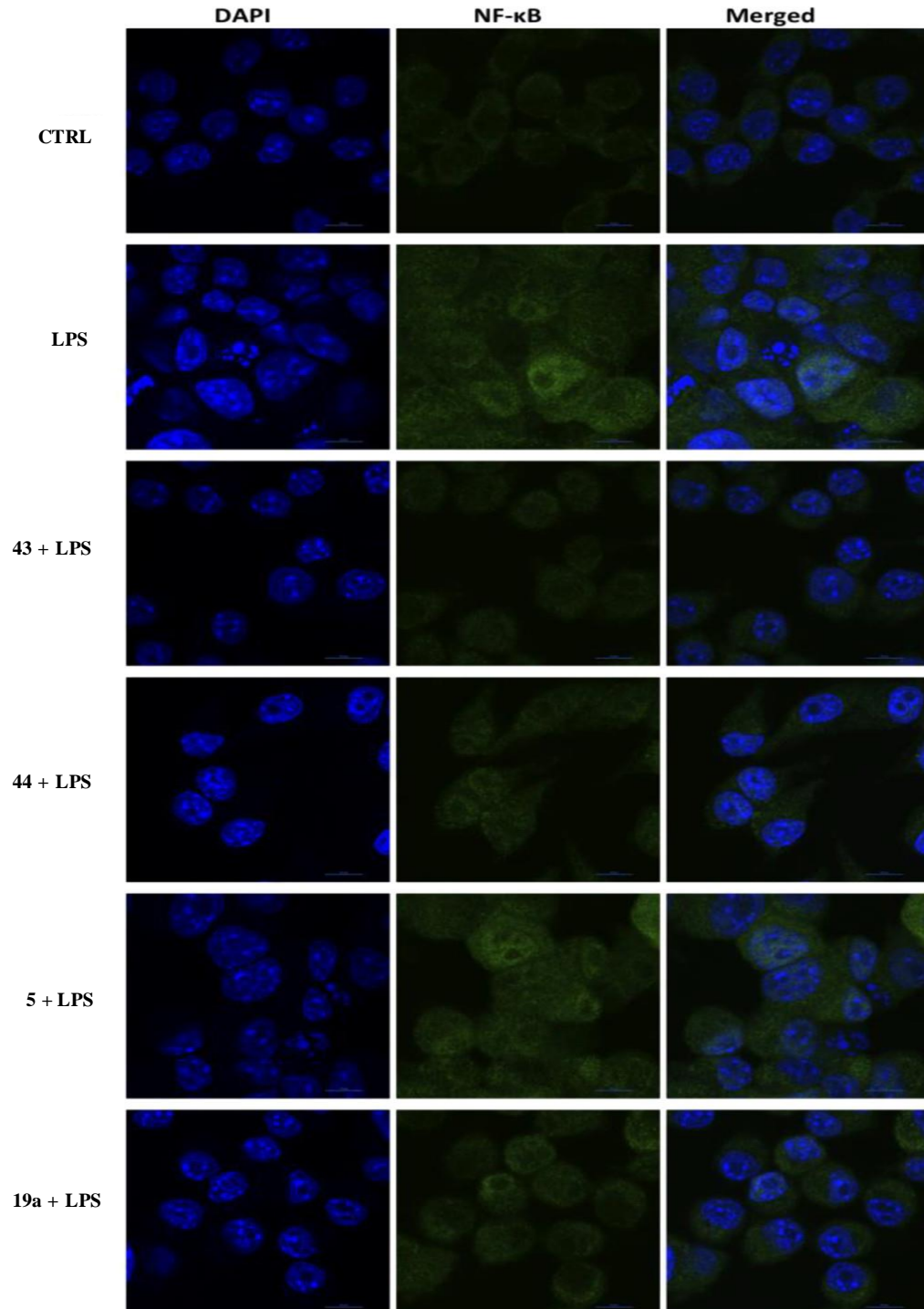
8

9 O aumento da expressão de enzimas pró-inflamatórias e citocinas é mediado pela  
 10 migração do fator de transcrição NF- $\kappa$ B para o núcleo. NF- $\kappa$ B está geralmente  
 11 localizado no citoplasma em associação com I $\kappa$ B $\alpha$ . Após a fosforilação e degradação  
 12 de I $\kappa$ B $\alpha$ , o NF- $\kappa$ B é isolado e translocado para o núcleo (LI; VERMA, 2002). Portanto,  
 13 pretendemos ainda determinar se **43 e 26** podem modular a translocação nuclear  
 14 induzida por LPS de NF- $\kappa$ B. Neste sentido, as células BV-2 foram tratadas com **43 e**  
 15 **44** a 0,1  $\mu$ M por 24 horas, e expostas a LPS por mais 24 horas, e a localização do  
 16 fator de transcrição NF- $\kappa$ B foi avaliada por imunofluorescência confocal (Figura ).

17 Os compostos **19a e 43** foram usados como compostos de referência. O LPS  
 18 induziu forte aumento nos níveis de NF- $\kappa$ B tanto no citoplasma quanto no núcleo.  
 19 Consistente com os resultados de RT-PCR, a translocação nuclear mediada por LPS  
 20 de NF- $\kappa$ B foi consideravelmente bloqueada pelo pré-tratamento com **43 e 44** e, em  
 21 menor grau, com **19a**. Isso sugere que **43 e 44** neutralizam a neuroinflamação,  
 22 inibindo a ativação transcrricional de NF- $\kappa$ B.

23 **Figura 15:** Translocação nuclear de NF- $\kappa$ B em células BV-2 induzidas por LPS tratadas com  
 24 **19a, 5, 43 e 44**

25



1  
 2 \*As células foram tratadas com os compostos **43** e **44** (0,1 μM) e **19a** e **5** como compostos de  
 3 referência (0,1 μM) por 24 horas e depois expostas a 100 ng / mL de LPS por mais 24 horas. As células  
 4 BV-2 foram imunocoradas com um anticorpo primário contra NF-κB p65 seguido por anticorpo IgG  
 5 anti-coelho conjugado com Alexa Fluor 488 secundário (verde) e os núcleos das células (azul) foram  
 6 visualizados com DAPI. Barras de escala: 10 μm.  
 7  
 8  
 9  
 10

### 6.2.7 Previsão de permeabilidade pela barreira hematoencefálica

Uma característica fundamental dos fármacos antialérgicos é sua aplicação eficaz no cérebro em concentrações terapêuticas, principalmente por causa da presença da barreira hematoencefálica (BHE). O ensaio PAMPA-BHE é uma ferramenta *in vitro* desenvolvida para prever rapidamente a permeação passiva da BHE. A permeabilidade BBB dos derivados mais promissores **43** e **44** foi estimada usando o modelo PAMPA-BHE em comparação com fármacos padrão, incluindo os AChEI tacrina (**1**) e donepezil (**2**). O ensaio previu que tanto **43** quanto **44** têm potencial de cruzar a barreira hematocefálica. Particularmente, os valores de  $P_e$  corresponderam aos de dois fármacos para DA padrão (donepezil (**2**) e **43**), conhecidos pela penetração eficaz da BHE (Tabela 9).

**Tabela 9:** Predições da permeabilidade da BHE *in vitro* ( $P_e$ ) para os derivados **43** e **44** e fármacos comerciais relacionadas ao SNC

Estimativa de Permeabilidade à BHE		
Composto	$P_e \pm SEM (\times 10^{-6} \text{ cm/s})_a$	CNS (+/-)
<b>43</b>	$6,99 \pm 1,04$	CNS +
<b>44</b>	$17,70 \pm 4,63$	CNS +
Furosemida	$0,19 \pm 0,07$	CNS -
Ranitidina	$0,35 \pm 0,31$	CNS -
Donepezil ( <b>2</b> )	$21,93 \pm 2,06$	CNS +
Tacrina ( <b>1</b> )	$5,96 \pm 0,59$	CNS +

### 6.2.8 Ensaio de estabilidade plasmática

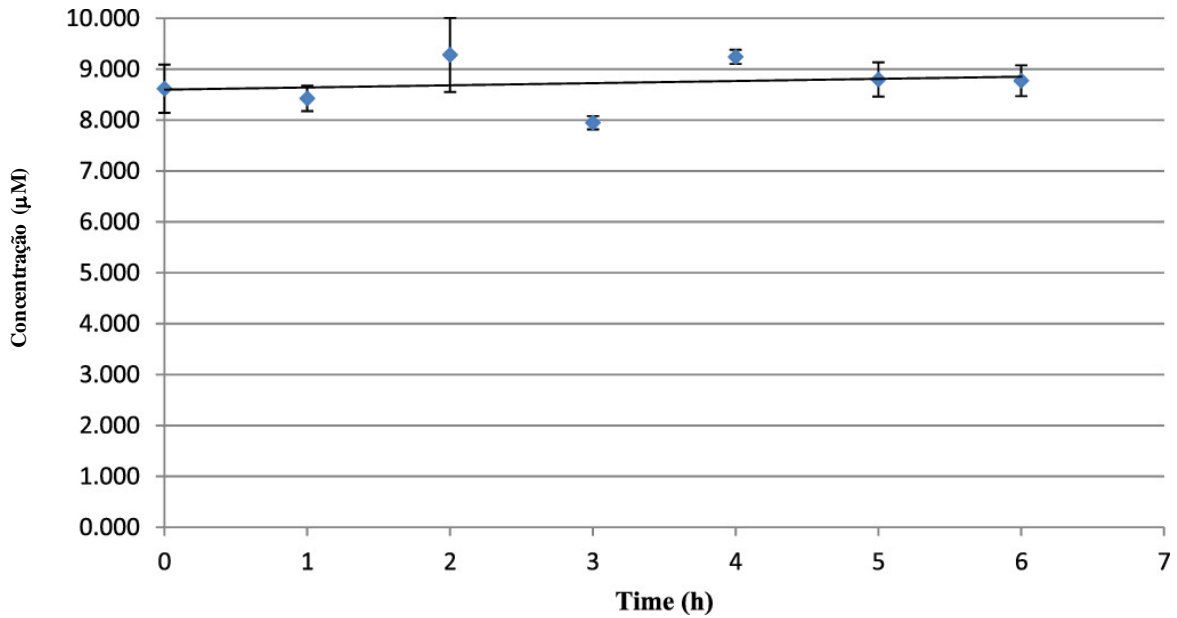
Considerando que ambos híbridos **43** e **44** carregam funcionalidade éster lábil, realizamos ensaio preliminar de estabilidade no plasma humano. Conforme determinado pela análise de HPLC-MS (Gráfico), **43** não mostrou decomposição ao

1 longo de intervalo de 6 h. Isso sugere que **43** é estável e não foi convertido no derivado  
2 desmetilado **73**, menos ativo neste período de tempo.

3

4 **Gráfico 7:** Estabilidade do composto **43** no plasma humano após incubação a 37 °C. A  
5 concentração foi avaliada por meio de HPLC-MS. As análises foram realizadas em duplicata

6



7

8

9

10

11

12

13

14

15

16

17

18

19

20

21

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30

## **CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS**

---

## 7. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

### 7.1. CONCLUSÕES

O planejamento sintético para a obtenção dos derivados-alvo das compreendeu a exploração de procedimentos clássicos e.g. O-alkilação, ozonólise, metanossulfonação, interconversão de grupos funcionais. O desenvolvimento sintético foi realizado a partir dos principais derivados fenólicos do LCC, fonte renovável e de baixo custo, para obtenção de uma nova série de híbridos da tacrina, combinando a atividade de inibição da AChE (THA (**1**), 6-Cl-THA (**5**), 7-MeO-THA (**6**)) com propriedades anti-inflamatórias (LCC). A utilização de componentes do LCC, resíduo alimentar barato e altamente disponível, que oferece recurso inestimável para o desenvolvimento de novos LMAD para a DA. Utilizamos esse recurso também pela importância e viabilidade econômica em nosso país, que apresenta renda baixa e média que está entre os maiores produtores de caju. Em princípio, as novas moléculas, além das vantagens peculiares dos LMAD, podem oferecer medicamentos mais acessíveis aos pacientes com DA.

Em relação ao desenvolvimento sintético, os derivados-alvos obtidos a partir da reação  $S_N2$  entre os metanossulfonatos e as tetraidroacridinas apresentaram rendimentos que variaram entre 20 % a 35 %. Por sua vez, as desproteções, via desbenzilação e desmetilações de éteres e ésteres, levaram aos derivados com grupos hidroxila (fenólicos e carboxílicos) em rendimentos que variaram de 25 % a 84%. Todos os compostos foram estruturalmente caracterizados por RMN de  $^1H$  e RMN de  $^{13}C$  bem como HRMS em que a maioria apresentou pureza por HPLC em torno de 95 %, exceto para o composto **47** com 94 %.

Estudos enzimáticos revelaram inibidores potentes e seletivos de AChE e BChE. Os compostos **43**, **44** e **61**, dotados de atividades subnanomolares, podem ser listados entre os inibidores de BChE mais eficazes desenvolvidos até agora. O composto **43** foi o que apresentou valor de  $IC_{50}$  mais baixo (0,0352 nM).

A investigação em células da microglia BV-2 revelou atividade protetora contra insultos neurotóxicos dos compostos **43** e **44** já à concentração de 0,01  $\mu M$ . Ambos compostos suprimem a expressão de IL-1 $\beta$ , COX-2 e iNOS induzida por LPS (TNF- $\alpha$  apenas para **44**). Particularmente, eles são capazes de neutralizar a neuroinflamação

1 por meio da inibição da ativação transcricional de NF- $\kappa$ B, sem causar citotoxicidade  
2 em linhagens celulares microgliais, neuronais e hepáticas. Com base nos dados  
3 biológicos obtidos e PAMPA-BHE, podemos especular que **43** e **44** podem acessar o  
4 cérebro em concentração nanomolar.

5

## 6 7.2.PERSPECTIVAS

7

8 Compreendem as perspectivas deste trabalho a síntese e a avaliação dos  
9 compostos contendo a subunidade 7-OMe-THA (**6**) para as séries do cardanol e  
10 cardol, bem como o estudo de novas metodologias visando a otimização dos  
11 rendimentos para obtenção dos derivados-alvo.

12

13

14

15

16

17

18

19

20

21

22

23

24

25

26

27

28

29

30

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30

**PARTE EXPERIMENTAL**

---



## 8. PARTE EXPERIMENTAL

### 8.1. GENERALIDADES, MATERIAIS E MÉTODOS

Os procedimentos experimentais em Síntese Orgânica foram realizados no Laboratório de Desenvolvimento de Inovações Terapêuticas (LDT) do Núcleo de Medicina Tropical da Universidade de Brasília. Adicionalmente, parte do projeto foi desenvolvido em colaboração com o grupo da professora Dra. Maria Laura Bolognesi do Departamento de Ciências Farmacêuticas e Biotecnologia da Universidade de Bologna, em especial, durante visita técnica em julho de 2018.

Os reagentes e solventes químicos utilizados neste trabalho foram adquiridos das indústrias Sigma-Aldrich® (EUA), Tedia® (EUA) e Synth® (Brasil) e PanReac® (Espanha). Para alguns procedimentos, o diclorometano (DCM), acetonitrila (MeCN) e trietilamina (TEA) foram previamente tratados com hidreto de cálcio e destilados antes do uso.

As reações foram realizadas sob agitação magnética, à temperatura ambiente ou em aquecimento em banho de óleo, monitoradas por cromatografia em camada delgada (CCD) utilizando cromatofolhas (5,0 x 1,5 cm) de sílica Kieselgel 60 F254 suportada em alumínio com espessura de 0,25 mm (SILICYCLE®) reveladas em lâmpada de UV (254-365 nm), que permitiu o cálculo dos fatores de retenção (R<sub>f</sub>). Quando necessário, os produtos foram revelados com solução alcoólica de FeCl<sub>3</sub> 20 % a fim de evidenciar a presença da hidroxila fenólica.

Para as reações realizadas sob radiação micro-ondas, foi utilizado Sintetizador Micro-ondas Discover SP®. Para as reações de hidrogenação foi utilizado reator de fluxo contínuo H-Cube® Mini Plus (H-Cube, ThalesNano Nanotechnology, Budapeste, Hungria). Para as reações sob refluxo com reagentes e solventes com ponto de ebulição menor que a temperatura de aquecimento, foi utilizado sistema de refrigeração dos condensadores a temperaturas que variaram de -8 °C a 10° C. A evaporação dos solventes foi realizada em evaporador rotatório Tecnal® TE-211, à pressão reduzida, variando entre 10 e 0,1 mmHg, e em temperaturas entre 40 °C e 60 °C.

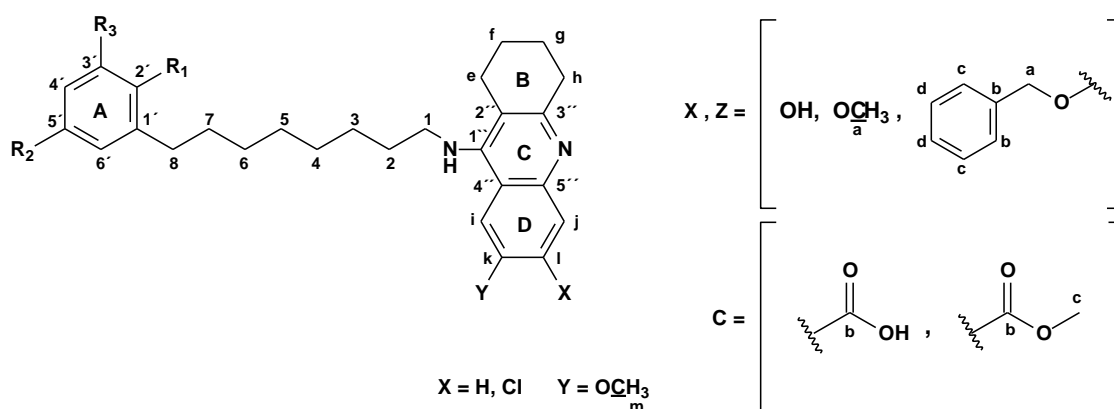
A caracterização das estruturas intermediárias foi realizada a partir da análise de espectros de ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN de <sup>1</sup>H) e de carbono-13 (RMN de <sup>13</sup>C), obtidos no Centro Nordestino de Aplicação e uso da Ressonância

1 Magnética Nuclear (CENAUREMN) da Universidade Federal do Ceará (UFC), em  
 2 aparelho Bruker Avance DRX300 e DRX500 obtidos a 300 MHz e 75 MHz ou a 500  
 3 MHz e 125 MHz. Para os derivados-alvo os espectros foram obtidos no Instituto de  
 4 Química da Universidade de Bologna Varian VXR 400 (400 MHz para  $^1\text{H}$ , 100 MHz  
 5 para  $^{13}\text{C}$ ). Para a realização dos espectros, as amostras foram solubilizadas em  
 6 clorofórmio deuterado ( $\text{CDCl}_3$ ), tendo tetrametilsilano (TMS) como referência interna.  
 7 Os valores de deslocamento químico ( $\delta$ ) são referidos em parte por milhão (ppm) em  
 8 relação ao TMS e as constantes de acoplamento (J) em Hertz (Hz). As áreas dos  
 9 sinais foram obtidas por integração eletrônica e suas multiplicidades descritas como:  
 10 simpleto (s); simpleto largo (sl); duplete (d); duplo duplete (dd); tripleto (t), quarteto (q),  
 11 quinteto (qi), multiplete (m). A numeração e legendas estão de acordo com a Figura .

12 Os espectros de massas foram registrados em aparelho Waters ZQ4000, XevoG2-  
 13 XSQTof, Acquity arc-QDA LC-MS com ionização por eletrospray (ESI) em modo  
 14 positivo. Os compostos foram nomeados de acordo com as regras IUPAC aplicadas  
 15 por ChemBioDraw Ultra (versão 16.0). A pureza dos compostos foi determinada  
 16 usando um KinetexR  $5\mu\text{M}$  EVO C18 100 A, coluna LC 150 x 4,6 mm e um instrumento  
 17 HPLC Jasco Corporation (Tóquio, Japão) (PU-1585 UV equipado com uma válvula de  
 18 loop de  $20\ \mu\text{L}$ ).

19  
 20

21 **Figura 16:** Numeração e legendas empregadas nos assinalamentos de sinais em espectros  
 22 de RMN de  $^1\text{H}$  e RMN  $^{13}\text{C}$



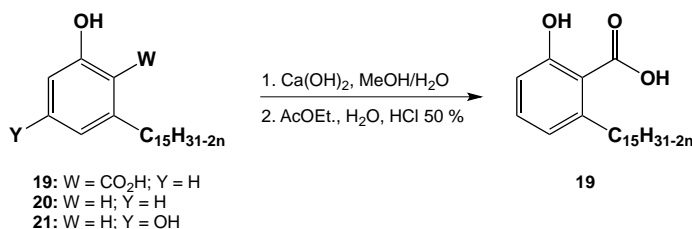
23  
 24  
 25  
 26  
 27  
 28

## 8.2 METODOLOGIA SINTÉTICA E CARACTERIZAÇÃO DOS COMPOSTOS

### 8.2.1 Obtenção do líquido da casca da castanha de caju a partir das castanhas de caju (LCC Natural)

Em um balão com sistema de refluxo foram adicionados 222 g de casca da castanha de caju, cortados em pequenos pedaços, e etanol (600 mL). A extração foi repetida a cada 2 horas com troca da mesma quantidade de solvente até obtenção de solução clara (3 trocas, ~ 7 horas). Após este período, o solvente foi evaporado à pressão reduzida fornecendo 40 g de LCC natural correspondendo a 18,2 % em relação à massa de cascas de castanhas.

### 8.2.2 Obtenção da mistura de ácidos anacárdicos (19) a partir do LCC natural

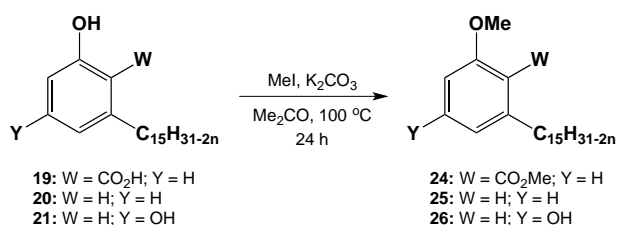


A um balão de 500 mL foram adicionados 30 g de LCC natural, 15 g de hidróxido de cálcio (Ca(OH)<sub>2</sub>) e solução contendo MeOH (180 mL) e água (30 mL). O sistema permaneceu em agitação sob refluxo de 60 °C por 3 horas. Após este período, a mistura foi filtrada a vácuo e o sólido transferido para um Erlenmeyer de 1 L no qual foram adicionados acetato de etila (150 mL), água destilada (50 mL) e solução de HCl a 50% em volume suficiente para chegar a pH 1. A solução obtida foi lavada com solução saturada de cloreto de sódio (20 mL) e seca com sulfato de sódio anidro. O solvente foi evaporado à pressão reduzida e o resíduo purificado em coluna cromatográfica contendo gel de sílica eluída com hexano e mistura de hexano e acetato de etila (7:3) fornecendo 16 g da mistura de ácidos anacárdicos (19) correspondendo a aproximadamente 54 % da massa de LCC natural utilizada.

### 8.2.3 Obtenção da mistura de cardanois (20) e cardois (21) a partir do LCC técnico

20 g de LCC técnico foram purificados em coluna cromatográfica contendo gel de sílica eluída com gradiente de mistura de hexano e acetato de etila (5 % - 10 %) fornecendo 14 g da mistura de cardanois **20** (70 % da massa aplicada). Após isolamento da mistura de cardanois a polaridade do eluente foi alterada para gradiente de mistura de hexano e acetato de etila (30 % - 35 %) fornecendo 4,8 g da mistura de cardois **22** (24 % da massa aplicada).

### 8.2.4 Procedimento geral para obtenção das misturas O-metiladas de ácidos anacárdicos (24), cardanois (25) e cardois (26)

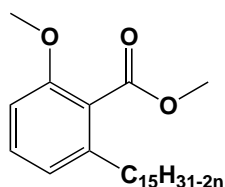


A um balão de 500 mL foram adicionados 10,0 g da mistura de **19** (36,5 mmol) ou 12,5 g da mistura de **20** (33,5 mmol) ou 5,0 g (18,7 mmol) da mistura de **21**, carbonato de potássio (2,0, 3,0 eqv, 5 eqv – respectivamente para metilação da mistura de cardanois e dimetilação de ácidos anacárdicos e cardois) e acetona (300 mL). A mistura reacional permaneceu sob agitação durante 2 horas. Ao final deste tempo, foi adicionado iodeto de metila (2,5 eqv, 3,0 eqv, 6 eqv, respectivamente) e a reação permaneceu sob refluxo a 100 °C, com sistema de resfriamento a –8 °C, por 24 horas.

Após resfriamento, o solvente foi evaporado a vácuo, o carbonato de potássio residual foi solubilizado em água destilada (40 mL) e a mistura extraída com diclorometano (3 x 30 mL). As fases orgânicas reunidas foram lavadas com solução de HCl a 10% (10 mL), solução saturada de cloreto de sódio (10 mL) e secas em sulfato de sódio anidro. Após evaporação do solvente à pressão reduzida, o resíduo foi purificado em coluna contendo gel sílica eluída com mistura de hexano e acetato de etila (5 % - 10 %) para fornecer a mistura dos compostos de O-metilnacardatos

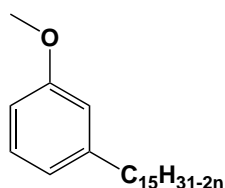
de metila **24**; mistura de hexano e acetato de etila (5 % - 8 %) para fornecer a mistura de *O*-metilcardanois **25**; e mistura de hexano e acetato de etila (5 % - 20 %) para fornecer a mistura de *O,O*-dimetilcardois **26**. Todos os compostos foram obtidos na forma de óleo castanho.

#### 2-Metóxiacardatos de metila (**24**)



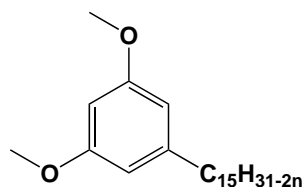
Rendimento 74 %  
Rf 0,3 (Hex:AcOEt 20%)  
Massa Molar: 376,625 g.mol<sup>-1</sup>

#### Metóxicardanois (**25**)



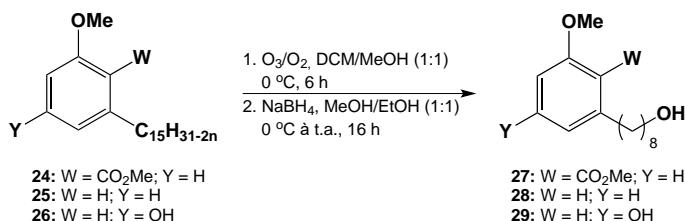
Rendimento 48 %  
Rf 0,7 (Hex:AcOEt 20%)  
Massa Molar: 236,355 g.mol<sup>-1</sup>

#### Dimetóxicardois (**26**)



Rendimento 66 %  
Rf 0,6 (Hex:AcOEt 20%)  
Massa Molar: 348,574 g.mol<sup>-1</sup>

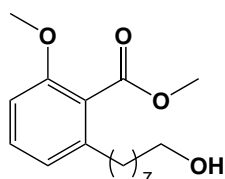
### 8.2.5 Procedimento geral para obtenção dos derivados 2-(8-hidróxiocetil)6-metóxi)benzoato de metila (**27**), 8-(3-metóxfenil)octan-1-ol (**28**) e 8-(3,5-dimetóxfenil)octan-1-ol (**29**)



A um balão de ozonólise (150 mL) foram adicionados a mistura **24** ou **25** ou **26**, diclorometano (30 mL) e metanol (30 mL) e o balão, resfriado à temperatura de aproximadamente 0 °C, foi submetido a fluxo contínuo de ozônio em oxigênio por 3

1 horas e 20 minutos (5 ciclos de 40 minutos). Ao final deste tempo, a mistura foi  
 2 purgada com nitrogênio para eliminar o excesso de ozônio. Em seguida à mistura, sob  
 3 banho de gelo, foi adicionado boroidreto de sódio (3 eqv) e a reação permaneceu sob  
 4 agitação magnética com evolução da temperatura de 0 °C à ambiente por 24 horas.  
 5 Após adição de solução de HCl a 10 % (10 mL) mistura foi extraída com diclorometano  
 6 (3 x 30 mL) e as fases orgânicas lavadas com solução saturada de cloreto de sódio  
 7 (10 mL). Após secagem com sulfato de sódio anidro, o solvente foi evaporado à  
 8 pressão reduzida e resíduo purificado em coluna contendo gel de sílica, eluída com  
 9 gradiente de mistura de hexano e acetato de etila (20 % - 35 %) fornecendo os  
 10 respectivos álcoois **27**, **28** e **29**.

11

12 2-(8-Hidróxiocetil)-6-metóxi benzoato de metila (**27**)

Óleo castanho claro

Rendimento 60 %

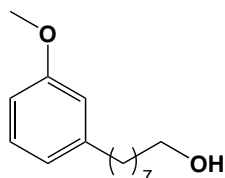
Massa Molar: 294,391 g.mol<sup>-1</sup>

13

14

15 RMN de <sup>1</sup>H (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 1,31 (m, 8H, 3-6); 1,57-1,53 (m, 4H, 2 e 7); 1,86 (s,  
 16 1H, OH); 2,54 (t, *J* = 7,8 Hz, 2H, 1); 3,62 (t, *J* = 6,6 Hz, 2H, 8); 3,81 (s, 3H, ArOCH<sub>3</sub>);  
 17 3,91 (s, 3H, ArCO<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>); 6,76 (d, *J* = 8,3 Hz, 1H, 3'); 6,82 (d, *J* = 7,7 Hz, 1H, 5');  
 18 7,26 (t, *J* = 8,0 Hz, 1H, 4'). RMN de <sup>13</sup>C (125 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 25,8; 29,4-29,5; 31,2;  
 19 32,8; 33,6; 52,3; 56,0; 63,1; 108,5; 121,6; 123,5; 130,4; 141,4; 156,4; 169,1.

20

21 8-(3-Metóxiifenil)octan-1-ol (**28**)

Óleo incolor

Rendimento 70 %

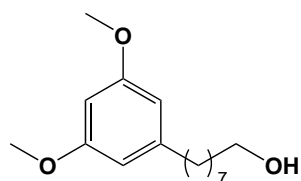
Massa Molar: 236,355 g.mol<sup>-1</sup>

22

23 RMN de <sup>1</sup>H (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 1,33 (m, 8H, 3-6); 1,54-1,58 (m, 2H, 7); 1,60-1,63 (m,  
 24 2H, 2); 2,59 (t, *J* = 6,0 Hz, 2H, 1); 3,64 (t, *J* = 6,0 Hz, 2H, 8); 3,81 (s, 3H, ArOCH<sub>3</sub>);  
 25 6,72-6,79 (m, 3H, 2',4' e 6'); 7,18-7,21 (m, 1H, 5'). RMN de <sup>13</sup>C (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ  
 26 25,9; 29,6; 29,4; 29,5; 31,5; 32,9; 36,2; 55,3; 63,2; 110,9; 114,4; 121,1; 129,3; 144,7;  
 27 159,7.

28

29

1 8-(3,5-Dimetóxiifenil)octan-1-ol (**29**)

Óleo castanho claro  
Rendimento 43 %  
Massa Molar: 266,381 g.mol<sup>-1</sup>

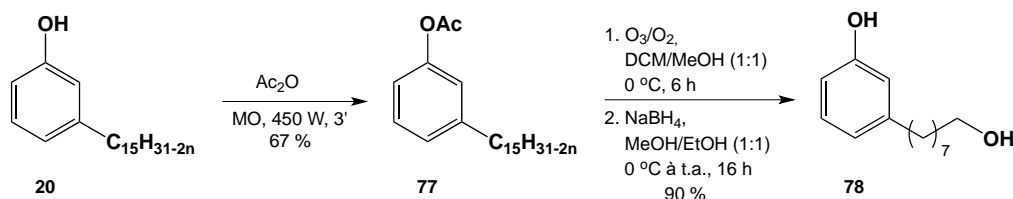
3 RMN de <sup>1</sup>H (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 1,32 (sl, 8H, CH<sub>2</sub>, 3-6); 1,53-1,60 (m, 4H, CH<sub>2</sub>, 7 e 2);  
4 2,07 (s, 1H, OH); 2,54 (t, J = 7,7 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>, 8); 3,62 (t, J = 6,6 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>, 1);  
5 3,78 (s, 6H, ArOCH<sub>3</sub>); 6,30 (t, J = 2,2 Hz, 1H, 4'); 6,35 (d, J = 2,2 Hz, 2H, 2' e 6'). RMN  
6 de <sup>13</sup>C (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 25,8; 29,3-29,6; 31,3; 32,8; 36,4; 55,3; 63,1; 97,7; 106,6;  
7 145,4; 160,8.

8

9

10 8.2.6 Obtenção dos derivado 3-(8-hidroxiocetil)fenol (**78**)

11

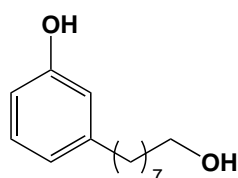


12

13 Em um Erlenmeyer 2,0 g de (~6,6 mmol), 1,25 mL de anidrido acético destilado  
14 (13,1 mmol) e ácido fosfórico (4 gotas) foram aquecidos em forno de micro-ondas  
15 convencional por 3 min (3 x 1 min) à potência de 450 W (50 %). Em seguida, a mistura  
16 foi extraída com AcOEt (3 x 10 mL) e as frações orgânicas reunidas foram lavadas  
17 com solução de NaHCO<sub>3</sub> a 5 % (10 mL), solução de HCl a 10 % (10 mL) e solução  
18 salina saturada (10 mL) e secas sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anidro. Após evaporação do solvente  
19 à pressão reduzida, a mistura foi purificada por cromatografia em coluna contendo gel  
20 de sílica eluída com diclorometano, levando à mistura acetilada **77** com 90 % de  
21 rendimento. Em seguida, em um balão de ozonólise (150 mL), 2,0 g de **77** (9,4 mmol)  
22 foram solubilizadas em diclorometano/metanol (1:1) (60 mL) e, após resfriamento do  
23 balão 0 °C, a solução foi tratada com ozônio em oxigênio por 3 horas e 20 minutos (5  
24 ciclos de 40 minutos). Posteriormente, o excesso de ozônio foi purgado com fluxo de  
25 nitrogênio e à solução, resfriada a 0 °C sob banho de gelo-água, foram adicionados  
26 mistura de metanol/etanol (1: 1) (60 mL) e 2,0 g de NaBH<sub>4</sub> (8,0 equiv) permanecendo  
27 a reação sob agitação magnética com evolução da temperatura de 0 °C à ambiente  
28 por 16 horas. Após este período, a mistura foi acidificada com solução concentrada

1 de ácido clorídrico a pH 3 e o resíduo foi extraído com acetato de etila (3 x 20 mL). As  
 2 frações orgânicas combinadas foram lavadas com solução saturada de cloreto de  
 3 sódio (10 mL), secas sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anidro e o solvente evaporado à pressão reduzida.  
 4 O resíduo foi purificado por cromatografia em coluna contendo gel de sílica eluída com  
 5 gradiente de mistura diclorometano/etanol (0 % - 5 %), levando ao álcool **78** como  
 6 óleo amarelo claro.

7

8 3-(8-Hidróxiocetil)fenol (**78**)

9

Óleo amarelado claro  
 Rendimento 67 %  
 Massa Molar: 270,460 g.mol<sup>-1</sup>

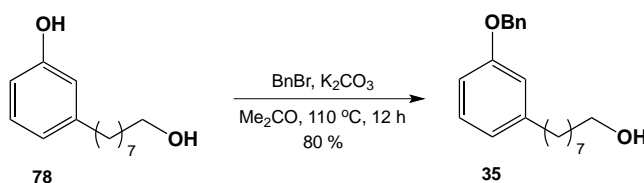
10 RMN de <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>, 500 MHz): δ 1,30 (s, 8H, 3-6); 1,56-1,58 (m, 4H, 2 e 7); 2,53 (t,  
 11 2H, J = 7,5 Hz, 1); 3,65 (t, 2H, J = 6,5 Hz, 8); 6,66 (d, 1H, J = 8,3 Hz); 6,67 (s, 1H);  
 12 6,72 (d, 1H, J = 7,4 Hz); 7,12 (t, 1H, J = 7,6 Hz). RMN de <sup>13</sup>C (CDCl<sub>3</sub>, 125 MHz): δ  
 13 25,8; 29,2; 29,3; 29,4; 31,3; 32,7; 35,9; 63,3; 112,8; 115,6; 120,8; 129,5; 144,9; 156,0.

14

15

### 16 8.2.7 Obtenção dos derivado 8-(3-benzilóxiifenil)octan-1-ol (**35**)

17



18

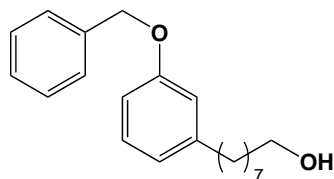
19

20 Em um balão de 50 mL foram adicionados 0,74 mmol do composto **78** (1,0 equiv)  
 21 e 1,11 mmol de K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>(1,5 equiv) e acetona (7,40 mL). Em seguida, 0,74 mmol de  
 22 brometo de benzila (1,0 equiv) foi adicionado e a reação permaneceu sob refluxo  
 23 durante 12 h. O solvente foi então evaporado à pressão reduzida e o resíduo foi  
 24 solubilizado em acetato de etila (3 x 10 mL) e lavado com água. As fases orgânicas  
 25 reunidas foram secas sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anidro e, após evaporação do solvente à vácuo,  
 26 o resíduo foi purificado em coluna cromatográfica contendo gel de sílica eluída com  
 27 mistura éter de petróleo/acetato de etila/metanol (7,5:2,0:0,5), levando ao composto  
 28 **35** obtido como um óleo incolor.

29

30



1 8-(3-Benzilóxfenil)octan-1-ol (**35**)

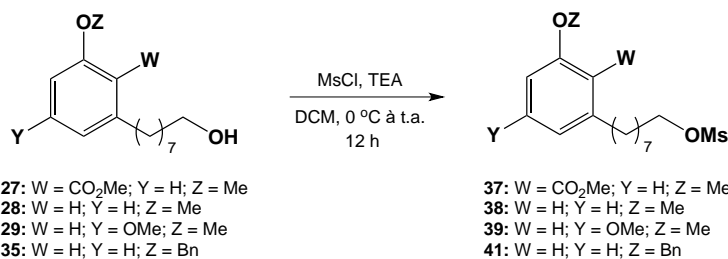
Óleo incolor  
Rendimento 92 %  
Massa Molar: 298,430 g.mol<sup>-1</sup>

3 RMN de <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz): δ 1,36 (s, 8H); 1,56-1,66 (m, 4H); 1,94 (s, OH); 2,60 (t,  
4 2H, *J* = 7,6 Hz); 3,63 (t, 2H, *J* = 6,8 Hz); 5,07 (s, 2H); 6,87-6,82 (m, 3H); 7,22 (s, 1H, *J*  
5 = 8 Hz); 7,35-7,48 (m, 5H). RMN de <sup>13</sup>C (CDCl<sub>3</sub>, 100 MHz): δ 25,7; 29,2; 29,4; 29,5;  
6 31,3; 32,7; 36,0; 62,9; 70,1; 111,7; 115,2; 121,2; 127,5; 127,9; 128,5; 129,2; 137,2;  
7 144,6; 158,8.

8

9 8.2.8 Procedimento Geral para obtenção dos derivados  
10 metanossulfonatos **37-39** e **41**

11



12

13 A um balão de 25 mL foi adicionado o álcool **27**, **28**, **29** ou **35** (1,00 mmol)  
14 trietilamina (2 eqv) e diclorometano (10mL). O sistema foi resfriado em banho de gelo  
15 e à reação adicionado, gota a gota, cloreto de mesila (1,1 eqv) e a reação  
16 permaneceu sob agitação à temperatura ambiente por 24 horas. Ao final deste  
17 período, a mistura foi extraída com diclorometano (3 x 10 mL) e as fases orgânicas  
18 reunidas lavadas com solução de bicarbonato de sódio a 5 % (10 mL), solução  
19 saturada de cloreto de sódio (10 mL) e secas em sulfato de sódio anidro. O solvente  
20 foi evaporado à pressão reduzida e o produto purificado em coluna contendo gel de  
21 sílica eluída com diclorometano fornecendo os derivados metanossulfonatos  
22 correspondentes.

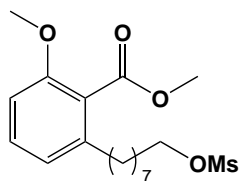
23

24

25

26

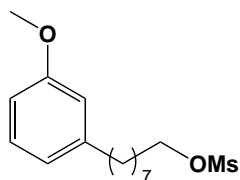
## 1 2-Metóxi-6-[8-metilsulfonyl]octil]benzoato de metila (37)



Óleo incolor  
Rendimento 85 %  
Rf 0,6 (DCM)  
Massa Molar: 372,486 g.mol<sup>-1</sup>

2  
3 RMN de <sup>1</sup>H (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 1,30 (m, 6H, CH<sub>2</sub>, 3-5); 1,38 (m, 2H, CH<sub>2</sub>, 6); 1,57  
4 (m, 2H, CH<sub>2</sub>, 7); 1,70-1,76 (m, 2H, 2); 2,53 (t, *J* = 7,8 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>, 1); 3,00 (s, 3H,  
5 SO<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>); 3,81 (s, 3H, ArOCH<sub>3</sub>); 3,90 (s, 3H, ArCO<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>); 4,21 (t, *J* = 6,0 Hz, 2H, 8);  
6 6,76 (d, *J* = 8,3 Hz, 1H, 3'); 6,81 (d, *J* = 7,7 Hz, 1H, 5'); 7,27 (t, *J* = 8,0 Hz, 1H, 4').  
7 RMN de <sup>13</sup>C (125 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 25,5; 29,0; 29,2-29,4; 31,2; 33,6; 37,5; 52,3; 56,0;  
8 70,3; 108,5; 121,6; 123,6; 130,4; 141,3; 156,4; 169,1.

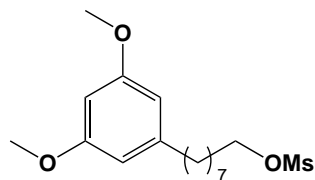
## 10 8-(3-Metóxi-fenil)octilmetanosulfonato (38)



Óleo castanho claro  
Rendimento 60 %  
Massa Molar: 314,450 g.mol<sup>-1</sup>

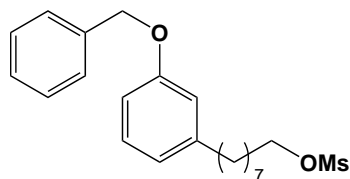
11  
12 RMN de <sup>1</sup>H (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 1,32-1,42 (m, 8H, CH<sub>2</sub>, 3-6); 1,56-1,63 (m, 2H, CH<sub>2</sub>,  
13 2); 1,79-1,89 (m, 2H, CH<sub>2</sub>, 7); 2,57 (t, *J* = 6 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>, 8); 2,98 (s, 3H, SO<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>); 3,40  
14 (t, *J* = 6 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>, 1); 3,79 (s, 3H, ArOCH<sub>3</sub>); 6,71-6,78 (m, 3H, 4', 5', 6'); 7,20 (dd,  
15 *J* = 9 Hz, 1H, 2'). RMN de <sup>13</sup>C (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 28,2; 28,7-29,1-29,3; 31,3; 32,8;  
16 34,1; 36,0; 37,5; 55,1; 110,8; 114,2; 120,8; 129,2; 144,5; 159,5.

## 18 8-(3,5-Dimetóxi-fenil)octilmetanosulfonato (39)



Óleo castanho claro  
Rendimento 80 %  
Massa Molar: 344,476 g.mol<sup>-1</sup>

19  
20 RMN de <sup>1</sup>H (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 1,33-1,44 (sl, 8H, CH<sub>2</sub>, 3-6); 1,60 (t, *J* = 6,5 Hz, 2H,  
21 CH<sub>2</sub>, 2); 1,69-1,78 (m, 2H, CH<sub>2</sub>, 7); 2,54 (t, *J* = 7,6 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>, 8); 2,99 (s, 3H,  
22 SO<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>); 3,78 (s, 6H, ArOCH<sub>3</sub>); 4,21 (t, *J* = 6,5 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>, 1); 6,30 (t, *J* = 2,2 Hz,  
23 1H, 4'); 6,34 (d, *J* = 2,2 Hz, 2H, 2' e 6'). RMN de <sup>13</sup>C (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 25,5; 29,0;  
24 29,2-29,4; 31,3; 36,3; 37,4; 55,3; 70,3; 97,7; 106,6; 145,3; 160,8.

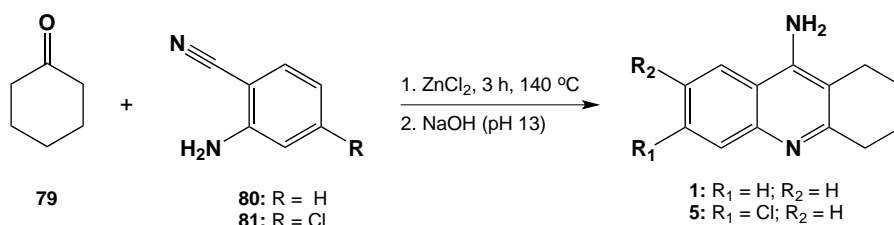
1 8- (3-(Benzilóxi)fenil)octilmetanosulfonato (**41**)

Óleo incolor  
Rendimento 87 %  
Massa Molar: 376,510 g.mol<sup>-1</sup>

2  
3 RMN de <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz): δ 1,35-1,41 (m, 8H); 1,64-1,76 (m, 4H); 2,61 (t, 2H, J =  
4 7,6 Hz); 2,96 (s, 3H); 4,21 (t, 2H, J = 6,0 Hz); 5,06 (s, 2H); 6,81-6,85 (m, 3H); 7,22 (t,  
5 1H, J = 8,0 Hz); 7,34–7,47 (m, 5H). RMN de <sup>13</sup>C (CDCl<sub>3</sub>, 100 MHz): δ 25,4; 28,9; 29,1;  
6 29,1; 29,3; 31,2; 35,9; 37,2; 69,8; 70,2; 111,7; 115,2; 121,1; 127,5; 127,9; 128,5; 129,2;  
7 137,2; 144,5; 158,8.

8

9 **8.2.9 Procedimento geral para obtenção das tetraidroacridínas THA (1) e**  
10 **6-Cl-THA (5)**



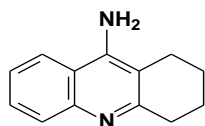
12

13

14

15 A um balão de 50 mL foram adicionados 4,7 mmol de 2-aminobenzonitrila (**80**) ou  
16 2-amino-4-clorobenzonitrila (**81**) e ZnCl<sub>2</sub> (4,7 mmol) solubilizados em ciclohexanona  
17 (**79**) (54,2 mmol). O sistema foi mantido sob refluxo a 140 °C por 3 h. Ao final deste  
18 período o sólido formado foi filtrado e adicionado à solução de NaOH a 10 % em água,  
19 pH 12, e mantido sob refluxo por 1 h. O sólido em suspensão foi filtrado e, em seguida,  
20 recristalizado em mistura etanol/água.

20

21 1,2,3,4-Tetraidroacridina-9-amina (THA,**1**)

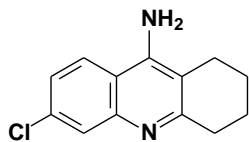
Sólido Branco  
Rendimento 70 %  
Massa Molar: 198,264 g.mol<sup>-1</sup>

22

23

24 RMN de <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz): δ 1,91 (m, 4H); 2,57 (t, 2H, J = 6,4 Hz); 3,01 (t, 2H, J =  
25 5,2 Hz), 4,65 (s, 2H), 7,32 (t, 1H, J = 7,2 Hz), 7,54 (t, 1H, J = 7,6 Hz), 7,66 (d, 1H, J =  
26 8,4 Hz), 7,88 (d, 1H, J = 8,4). RMN de <sup>13</sup>C (CDCl<sub>3</sub>, 100 MHz): δ 22,8; 22,9; 23,7; 34,2;  
27 110,4; 117,2; 119,6; 123,8; 128,4; 128,9; 146,3; 146,6; 158,6.

## 1 6-Cloro-1,2,3,4-tetraidroacridin-9-amina (Cl-6-THA, 5)



Sólido Branco

Rendimento 70 %

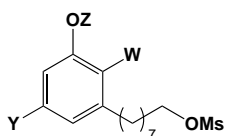
Massa Molar: 232,711 g.mol<sup>-1</sup>2  
3

4 RMN de <sup>1</sup>H (DMSO-d<sub>6</sub>, 400 MHz): δ 1,78 (m, 4H); 2,49 (t, 2H, *J* = 6,0 Hz); 2,77 (t, 2H,  
5 *J* = 5,2 Hz); 6,44 (s, 2H); 7,25 (dd, 1H, *J* = 9,0 Hz, *J* = 2,4 Hz); 7,59 (d, 1H, *J* = 2,4 Hz);  
6 8,15 (d, 1H, *J* = 8.8 Hz). RMN de <sup>13</sup>C (DMSO-d<sub>6</sub>, 100 MHz): δ 22,8; 22,9; 24,0; 33,9;  
7 109,9; 116,0; 123,2; 124,6; 126,8; 132,9; 147,5; 148,7; 159,3.

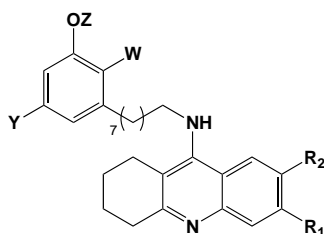
8

9

10 **8.2.10 Procedimento geral para obtenção dos derivados-alvo 43-47, 49-50,**  
11 **55-56**



37: W = CO<sub>2</sub>Me; Y = H; Z = Me  
38: W = H; Y = H; Z = Me  
39: W = H; Y = OMe; Z = Me  
41: W = H; Y = H; Z = Bn



43: R<sub>1</sub> = H; R<sub>2</sub> = H; W = CO<sub>2</sub>Me; Y = H; Z = Me  
44: R<sub>1</sub> = Cl; R<sub>2</sub> = H; W = CO<sub>2</sub>Me; Y = H; Z = Me  
45: R<sub>1</sub> = H; R<sub>2</sub> = OMe; W = CO<sub>2</sub>Me; Y = H; Z = Me  
46: R<sub>1</sub> = H; R<sub>2</sub> = H; W = H; Y = H; Z = Me  
47: R<sub>1</sub> = Cl; R<sub>2</sub> = H; W = H; Y = H; Z = Me  
49: R<sub>1</sub> = H; R<sub>2</sub> = H; W = H; Y = OMe; Z = Me  
50: R<sub>1</sub> = Cl; R<sub>2</sub> = H; W = H; Y = OMe; Z = Me  
55: R<sub>1</sub> = H; R<sub>2</sub> = H; W = H; Y = H; Z = Bn  
56: R<sub>1</sub> = Cl; R<sub>2</sub> = H; W = H; Y = H; Z = Bn

12

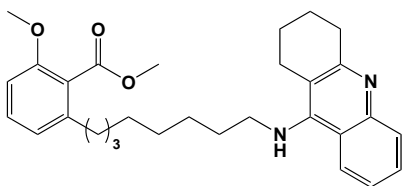
13 Em um tubo de ensaio de micro-ondas foi adicionado a respectiva acridina (0,15  
14 mmol), DMSO anidro (1,3 mL), KOH (0,24 mmol) e peneira molecular (100 mg). A  
15 mistura foi deixada em agitação magnética à temperatura ambiente por 60 min e  
16 depois desse tempo foi adicionado o respectivo metilsulfonato (0,18 mmol). Em  
17 s1'eguida o tubo de ensaio foi colocado no reator de micro-ondas por 12 minutos,  
18 temperatura 120 °C, potência 100 W em alta agitação. Ao término da reação a mistura  
19 foi lavada com diclorometano/H<sub>2</sub>O (3 x 15 mL) e evaporado à pressão reduzida.  
20 Posteriormente a mistura foi lavada com acetato de etila/H<sub>2</sub>O (3x de 15 mL) e ácido  
21 clorídrico 2 N (2 x 10 mL). As fases orgânicas foram reunidas e evaporadas à pressão  
22 reduzida e os produtos purificados em coluna de gel de sílica eluida com mistura de  
23 solvente éter de petróleo/acetato de etila/ diclorometano/metanol/hidróxido de amônio  
24 (7,5/2/0,5/1/3gotas), fornecendo os derivados-alvos 25-33 em rendimentos que  
25 variaram de 20-34 %.

26

27

28

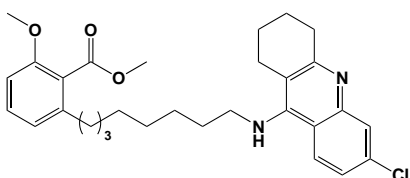
## 1 2-Metóxi-6-(8-((1,2,3,4-tetraidroacridin-9-il)amino)octil)benzoato de metila (43)



Óleo castanho  
Rendimento 20 %  
Massa Molar: 470,182 g.mol<sup>-1</sup>

2  
3 RMN de <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz): δ 1,30-1,39 (m, 8H); 1,55-1,66 (m, 4H); 1,92 (m, 4H);  
4 2,53 (t, 2H, *J* = 8,0 Hz); 2,70 (m, 2H); 3,06 (m, 2H); 3,47 (t, 2H, *J* = 7,6 Hz); 3,81 (s,  
5 3H); 3,89 (s, 3H); 6,75 (d, 1H, *J* = 8,4 Hz); 6,80 (d, 1H, *J* = 7,2 Hz); 7,26 (t, 1H, *J* = 7,6  
6 Hz); 7,33 (t, 1H, *J* = 7,2 Hz); 7,56 (t, 1H, *J* = 7,2 Hz); 7,90-7,96 (m, 2H). RMN de <sup>13</sup>C  
7 (CDCl<sub>3</sub>, 100 MHz): δ 22,4; 22,8; 24,5; 26,8; 29,1; 29,2; 29,2; 29,3; 30,9; 31,0; 31,6;  
8 32,9; 31,7; 33,4; 33,4; 49,3; 51,9; 55,9; 108,5; 113,5; 121,4; 121,5; 122,9; 123,6; 123,8;  
9 127,4; 129,0; 130,2; 141,2; 156,3; 168,8.

10

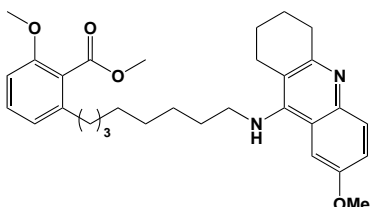
11 2-(8-((6-Cloro-1,2,3,4-tetraidroacridin-9-il)amino)octil)-6-metoxibenzoato de metila  
12 (44)

Óleo castanho  
Rendimento 34 %  
Massa Molar: 504,627 g.mol<sup>-1</sup>

13

14 RMN de <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz): δ 1,28-1,35 (m, 8H); 1,53-1,66 (m, 4H); 1,89 (s, 4H);  
15 2,51 (t, 2H *J* = 7,6 Hz); 2,63 (m, 2H); 3,04 (m, 2H); 3,50 (t, 2H, *J* = 7,2 Hz); 3,79 (s,  
16 3H); 3,87 (s, 3H); 6,72-6,79 (m, 2H); 7,24 (m, 2H); 7,89-7,93 (m, 2H). RMN de <sup>13</sup>C  
17 (CDCl<sub>3</sub>, 100 MHz): δ 22,4; 22,8; 24,4; 26,8; 29,1; 29,2; 29,2; 30,9; 31,6; 33,2; 33,4;  
18 49,4; 52,0; 55,9; 108,5; 115,0; 117,8; 121,4; 123,6; 124,4; 124,7; 126,5; 130,2; 141,2;  
19 151,4; 156,3; 168,8.

20

21 2-(8-((7-Metóxi-1,2,3,4-tetraidroacridin-9-il)amino)octil)-6-metoxibenzoato de metila  
22 (45)

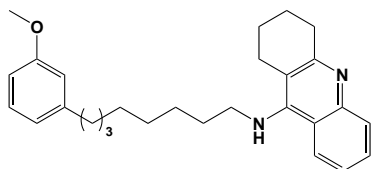
Óleo castanho  
Rendimento 23 %  
Massa Molar: 500,208 g.mol<sup>-1</sup>

23

1 RMN de  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz):  $\delta$  1,29-1,37 (m, 8H); 1,55-1,66 (m, 4H); 1,90 (m, 4H);  
 2 2,51 (t, 2H,  $J = 7,6$  Hz); 2,69 (m, 2H); 3,05 (m, 2H); 3,42 (t, 2H,  $J = 6,8$  Hz); 3,79 (s,  
 3 3H); 3,87 (s, 3H); 3,89 (s, 3H); 6,73-6,80 (m, 2H); 7,24 (m, 4H); 7,99 (d, 1H,  $J = 7,2$   
 4 Hz). RMN de  $^{13}\text{C}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 100 MHz):  $\delta$  20,9; 22,1; 24,2; 26,6; 28,8; 29,0; 29,1; 29,2;  
 5 30,9; 31,4; 33,3; 48,1; 52,1; 55,0; 103,3; 108,4; 117,8; 121,4; 122,9; 123,2; 130,2;  
 6 141,0; 154,0; 156,2; 156,6; 168,3.

7

8 *N*-(8-(3-Metóxifenil)octil)-1,2,3,4-tetraidroacridin-9-amina (**46**)



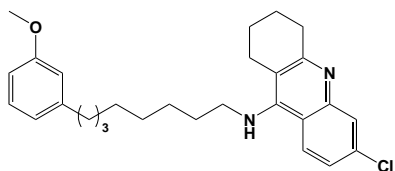
Óleo castanho  
 Rendimento 24 %  
 Massa Molar: 412,146 g.mol $^{-1}$

9

10 RMN de  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz):  $\delta$  1,30-1,39 (m, 8H); 1,55-1,66 (m, 4H); 1,92 (m, 4H);  
 11 2,53 (t, 2H,  $J = 8,0$  Hz); 2,70 (m, 2H); 3,06 (m, 2H); 3,47 (t, 2H,  $J = 7,6$  Hz); 3,77 (s,  
 12 3H); 6,70-6,75 (m, 3H); 7,17 (t, 1H,  $J = 7,6$  Hz); 7,35 (t, 1H,  $J = 7,2$  Hz); 7,58 (t, 1H,  $J$   
 13 = 7,2 Hz); 7,99 (d, 1H,  $J = 8,8$  Hz); 8,09 (d, 1H,  $J = 7,6$  Hz). RMN de  $^{13}\text{C}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 100  
 14 MHz):  $\delta$  21,5; 22,4; 22,7; 22,8; 24,0; 26,7; 29,1; 29,1; 29,3; 29,7; 31,2; 31,4; 35,9; 49,0;  
 15 55,1; 110,7; 114,3; 117,6; 120,9; 123,6; 124,4; 129,2; 130,6; 144,4; 153,5; 154,5;  
 16 159,6.

17

18 6-Cloro-*N*-(8-(3-metóxifenil)octil)-1,2,3,4-tetraidroacridin-9-amina (**47**)



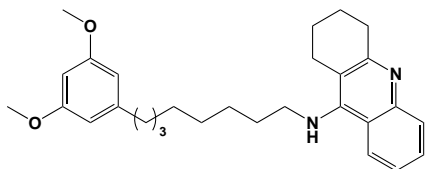
Óleo castanho  
 Rendimento 29 %  
 Massa Molar: 446,591 g.mol $^{-1}$

19

20 RMN de  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz):  $\delta$  1,32-1,38 (m, 8H); 1,60-1,68 (m, 4H); 1,91 (m, 4H);  
 21 2,57 (t, 2H  $J = 7,6$  Hz); 2,65 (m, 2H); 3,05 (m, 2H); 3,51 (t, 2H,  $J = 7,6$  Hz); 3,79 (s,  
 22 3H); 6,72-6,77 (m, 3H); 7,19 (t, 1H,  $J = 8,4$  Hz); 7,27 (m, 1H); 7,90-7,93 (m, 2H). RMN  
 23 de  $^{13}\text{C}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 100 MHz):  $\delta$  22,5; 22,8; 24,5; 26,8; 29,1; 29,2; 29,3; 31,2; 31,7; 33,5;  
 24 35,9; 49,5; 55,1; 110,7; 114,3; 115,3; 118,0; 120,8; 124,3; 124,7; 126,9; 129,1; 134,3;  
 25 144,4; 151,2; 159,6.

26

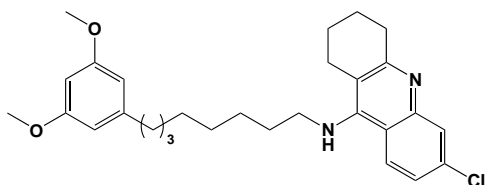
27

1 *N*-(8-(3,5-Dimetóxfenil)octil)-1,2,3,4-tetraidroacridin-9-amina (**49**)

Óleo castanho  
Rendimento 25 %  
Massa Molar: 426,173 g.mol<sup>-1</sup>

2  
3 RMN de <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz): δ 1,13-1,46 (m, 8H); 1,46-1,73 (m, 4H); 1,91 (t, 4H, *J* =  
4 6,6 Hz); 2,39-2,58 (m, 2H); 2,68 (s, 2H); 3,08 (s, 2H); 3,49 (t, 2H, *J* = 7,1 Hz); 3,61 (t,  
5 2H, *J* = 6,6 Hz); 3,75 (s, 6H); 5,79-6,46 (m, 2H); 6,76 (m, 1H); 7,28 (m, 1H); 7,54 (t,  
6 1H); 7,95 (d, 2H, *J* = 8,6 Hz). RMN de <sup>13</sup>C (CDCl<sub>3</sub>, 100 MHz): δ 22,6; 24,5; 25,2; 26,8;  
7 29,1; 29,3; 31,6; 33,4; 39,6; 49,9; 52,2; 54,8; 55,2; 57,6; 97,4; 106,5; 107,1; 108,4;  
8 119,9; 121,4; 123,0; 123,9; 130,2; 141,0; 141,3; 145,2; 159,2; 160,7.

9

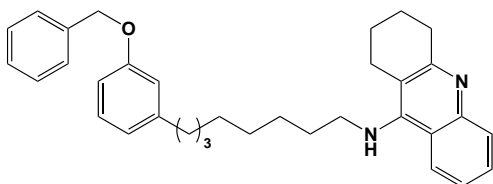
10 6-Cloro-*N*-(8-(3,5-dimetóxfenil)octil)-1,2,3,4-tetraidroacridin-9-amina (**50**)

Óleo castanho  
Rendimento 25 %  
Massa Molar: 460,618 g.mol<sup>-1</sup>

11

12 RMN de <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz): δ 1,10-1,40 (m, 8H); 1,57-1,62 (m, 4H); 1,91 (t, 4H, *J* =  
13 2,9 Hz); 2,47-2,58 (m, 2H); 2,65 (s, 2H); 3,02 (s, 2H); 3,45 (s, 2H); 3,77 (s, 6H); 6,16-  
14 6,46 (m, 3H); 7,57-6,97 (m, 2H); 7,80-7,90 (m, 2H). RMN de <sup>13</sup>C (CDCl<sub>3</sub>, 100 MHz):  
15 δ 22,6; 22,9; 24,5; 26,9; 29,1; 29,2; 29,3; 31,1; 31,7; 33,9; 36,2; 49,6; 55,2; 97,5; 106,5;  
16 115,6; 118,3; 124,2; 124,6; 127,5; 134,0; 145,2; 148,3; 150,9; 159,4; 160,7.

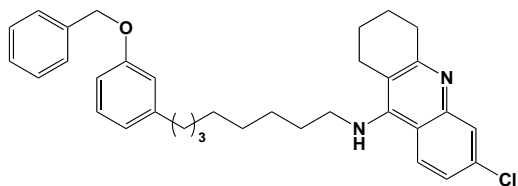
17

18 *N*-(8-(3-(Benzilóxi)fenil)octil)-1,2,3,4-tetraidroacridin-9-amina (**55**)

Óleo castanho  
Rendimento 32 %  
Massa Molar: 488,244 g.mol<sup>-1</sup>

19

20 RMN de <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz): δ 1,30-1,39 (m, 8H); 1,56-1,89 (m, 4H); 1,89 (m, 4H);  
21 2,55 (t, 2H, *J* = 7,6 Hz); 2,62 (m, 2H); 3,14 (m, 2H); 3,61 (t, 2H, *J* = 7,2 Hz); 5,02 (s,  
22 2H); 6,75-6,79 (m, 3H); 7,17 (t, 1H, *J* = 7,6 Hz); 7,30-7,42 (m, 6H); 7,53 (t, 1H, *J* = 7,2  
23 Hz); 8,00 (d, 1H, *J* = 8,4 Hz); 8,12 (d, 1H, *J* = 8,0 Hz). RMN de <sup>13</sup>C (CDCl<sub>3</sub>, 100 MHz):  
24 δ 22,8; 23,0; 24,7; 26,9; 29,1; 29,3; 29,4; 31,3; 31,8; 33,9; 35,9; 49,5; 69,9; 111,6;  
25 115,2; 115,7; 120,1; 121,1; 122,9; 123,6; 127,5; 127,9; 128,4; 128,5; 129,2; 137,1;  
26 144,5; 147,3; 150,9; 158,2; 158,8.

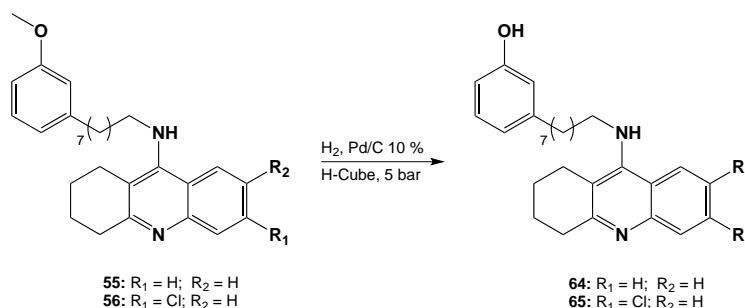
1 *N*-(8-(3-(Benzilóxi)fenil)octil)-6-cloro-1,2,3,4-tetraidroacridin-9-amina (**56**)

Óleo castanho  
Rendimento 24 %  
Massa Molar: 522,689 g.mol<sup>-1</sup>

2

3 RMN de <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz): δ 1,24-1,36 (m, 8H); 1,59-1,64 (m, 4H); 1,88-1,91 (t,  
4 4H, *J* = 8,0 Hz); 2,56 (t, 2H, *J* = 8,0 Hz); 2,63 (t, 2H, *J* = 8,0 Hz); 3,02 (t, 2H, *J* = 8,0  
5 Hz); 3,47 (t, 2H, *J* = 8,0 Hz); 5,03 (s, 2H); 6,76-6,81 (m, 3H); 7,15-7,43 (m, 8); 7,87-  
6 7,90 (m, 2H). RMN de <sup>13</sup>C (CDCl<sub>3</sub>, 100 MHz): δ 22,6; 22,9; 24,5; 26,9; 29,1; 29,2; 29,3;  
7 31,2; 31,7; 33,8; 35,9; 49,6; 69,9; 111,6; 115,2; 121,1; 124,2; 124,6; 127,5; 127,9;  
8 128,5; 129,2; 137,1; 144,4; 151,2; 158,8.

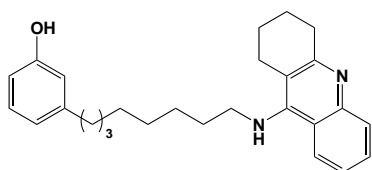
9

10 **8.2.11 Procedimento geral para obtenção dos derivados-alvo 64-65**

11

12 Em um tubo de ensaio foi adicionado 0,01 M do composto **55** ou **56** (0,76 mmol)  
13 em mistura etanol:metanol (1:1). A solução foi colocada no hidrogenador H-cube,  
14 usando Pd/C 10 % como catalisador, com fluxo de 1 mL/min, pressão de 5 Bar, e  
15 temperatura 25 °C. A mistura foi filtrada em coluna cromatográfica rápida para  
16 obtenção dos derivados **64** e **65**.

17

18 3-(8-((1,2,3,4-Tetraidroacridin-9-il)amino)octil)fenol (**64**)

Óleo castanho  
Rendimento 41 %  
Massa Molar: 398,119 g.mol<sup>-1</sup>

19

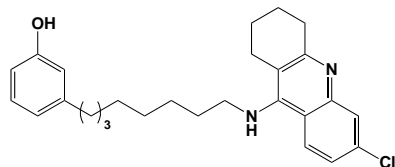
20 RMN de <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz): δ 1,22-1,45 (m, 10H); 1,67 (q, 2H, *J* = 6,8 Hz); 1,87 (m,  
21 4H); 2,44 (t, 2H, *J* = 7,6 Hz), 2,66 (m, 2H); 3,10 (m, 2H); 3,62 (t, 2H, *J* = 6,8 Hz); 4,44  
22 (br, NH); 6,62 (m, 2H); 6,73 (d, 1H, *J* = 8,0 Hz); 7,07 (t, 1H, *J* = 8,0 Hz); 7,34 (t, 1H, *J*  
23 = 8,0 Hz); 7,53 (t, 1H, *J* = 8,0 Hz); 8,00-8,06 (m, 2H). RMN de <sup>13</sup>C (CDCl<sub>3</sub>, 100 MHz):



1  $\delta$  22,3; 22,8; 24,5; 26,4; 28,5; 28,6; 29,1; 29,7; 30,7; 31,4; 32,4; 35,5; 48,9; 113,0;  
 2 114,5; 115,4; 119,2; 119,6; 123,2; 123,8; 126,8; 129,2; 129,2; 144,2; 152,1; 157,1;  
 3 157,2.

4

5 3-(8-((6-Cloro-1,2,3,4-tetrahydroacridin-9-il)amino)octil)penol (**65**)



Óleo castanho  
 Rendimento 45 %  
 Massa Molar: 432,564 g.mol<sup>-1</sup>

6

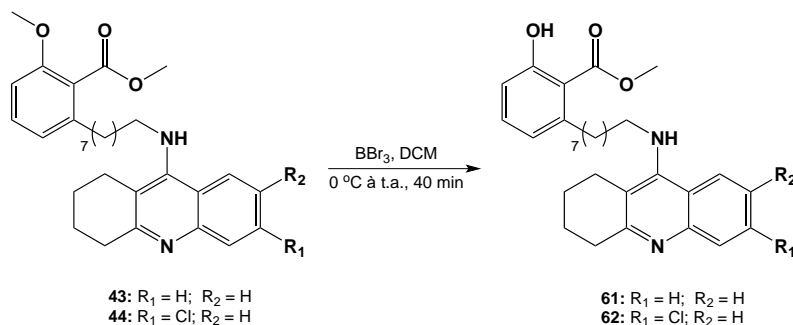
7 RMN de <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz):  $\delta$  1,13-1,40 (m, 8H); 1,51 (m, 2H); 1,69 (m, 4H); 1,84-  
 8 2,00 (m, 2H); 2,43-2,55 (m, 2H); 2,63-2,73 (m, 2H); 3,02-3,17 (m, 2H); 3,51-3,64 (m,  
 9 2H); 4,00-4,36 (m, 1H); 6,70 (m, 3H); 7,12 (m, 1H); 7,28 (m, 1H); 7,97 (m, 2H). RMN  
 10 de <sup>13</sup>C (CDCl<sub>3</sub>, 100 MHz):  $\delta$  22,3; 22,7; 24,4; 26,5; 28,6; 28,7; 29,1; 30,8; 31,5; 32,8;  
 11 35,6; 49,2; 113,0; 114,8; 115,4; 117,6; 119,8; 124,4; 124,9; 126,2; 129,2; 134,7; 144,3;  
 12 146,9; 151,8; 157,2; 158,6.

13

14

## 15 8.2.12 Procedimento geral para obtenção dos derivados-alvo 61-62

16

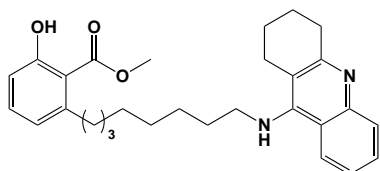


17

18 A um balão de 50 mL foi solubilizado o composto **43** ou **44** (0,25 mmol, 1 eq) em  
 19 DCM (3,0 mL) e adicionado, a 0 °C e gota a gota, BBr<sub>3</sub> (1,00 mmol, 4 eq). Após  
 20 completa reação, foi adicionada solução saturada de NaHCO<sub>3</sub> (1 mL) e água (20 mL).  
 21 Em seguida, a solução foi extraída com diclorometano/água (3 x 10 mL). As fases  
 22 orgânicas foram reunidas e evaporadas à pressão reduzida e os produtos purificados  
 23 por cromatografia em coluna contendo gel de sílica com diferentes eluentes para  
 24 obtenção dos derivados **61** e **62**.

25

1 2-Hidróxi-6-(8-((1,2,3,4-tetraidroacridin-9-il)amino)octil)benzoato de metila (61)

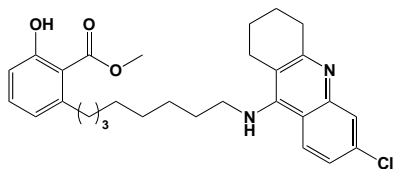


Óleo incolor  
Rendimento 25 %  
Massa Molar: 465,155 g.mol<sup>-1</sup>

2  
3 RMN de <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz): δ 1,25-1,38 (m, 8H); 1,50-1,52 (m, 2H); 1,64 (t, 2H, *J* =  
4 8,0 Hz); 1,91 (s, 4H); 2,69 (s, 2H); 2,85 (t, 2H, *J* = 8,0 Hz); 3,06 (s, 2H); 3,48 (t, 2H, *J*  
5 = 7,1 Hz); 3,92 (s, 4H); 6,69 (d, 1H, *J* = 7,5 Hz); 6,83 (d, 1H, *J* = 8,2 Hz); 7,29 (dt, 2H,  
6 *J* = 15,8; *J* = 7,7 Hz); 7,54 (t, 1H, *J* = 7,5 Hz); 7,80-8,05 (m, 2H). RMN de <sup>13</sup>C (CDCl<sub>3</sub>,  
7 100 MHz): δ 22,7; 23,0; 24,7; 26,9; 29,3; 29,4; 29,7; 31,8 31,9; 33,8; 36,4; 49,5; 52,1;  
8 112,2; 115,5; 115,6; 120,1; 122,3; 122,8; 123,6; 128,4; 128,5; 134,0; 145,8; 147,9;  
9 150,9; 158,2; 162,3; 171,8.

10

11 2-(8-((6-Cloro-1,2,3,4-tetraidroacridin-9-il)amino)octil)-6-hidroxibenzoato de metila  
12 (62)



Óleo incolor  
Rendimento 25 %  
Massa Molar: 490,600 g.mol<sup>-1</sup>

13

14 RMN de <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz): δ 1,23-1,40 (m, 8H); 1,47-1,54 (m, 2H); 1,67 (dt, 2H, *J*  
15 = 8,0 Hz); 1,88-1,89 (m, 4H); 2,63 (s, 2H); 2,79-2,92 (m, 2H); 3,04 (s, 2H), 3,51 (t, 2H,  
16 *J* = 6,8 Hz); 3,92 (s, 3H); 4,19 (s, 1H); 6,69 (d, 1H, *J* = 7,5 Hz); 6,75-6,98 (m, 1H); 7,11-  
17 7,33 (m, 2H); 7,92 (dd, 2H, *J* = 16,0 Hz, *J* = 5,2 Hz). RMN de <sup>13</sup>C (CDCl<sub>3</sub>, 100 MHz):  
18 δ 22,4; 22,8; 24,4; 26,9; 29,3; 29,4; 29,7; 31,7; 31,9; 33,3; 36,5; 49,5; 52,1; 111,0;  
19 115,0; 115,6; 117,8; 122,4; 124,4; 124,7; 126,5; 134,1; 134,6; 145,9; 151,4; 158,5;  
20 162,5; 171,8.

21

22

23

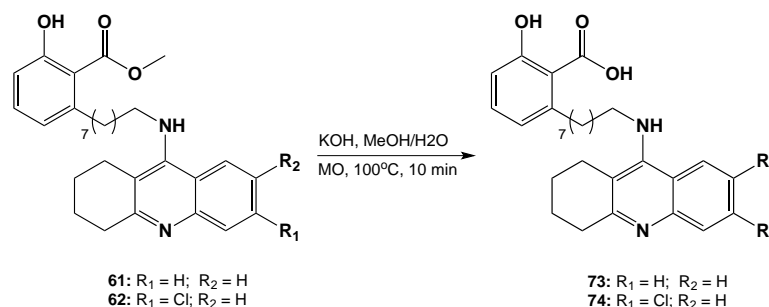
24

25

26

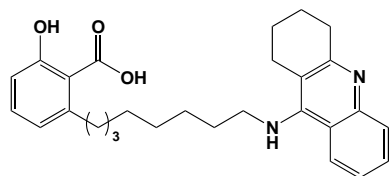
1 **8.2.13 Procedimento geral para obtenção dos derivados-alvo 73-74**

2



Em um tubo de reator de micro-ondas foram adicionados o composto **61** ou **62** (0.07 mmol, 1 eq) e solução de KOH 3.5M (2 mL, H<sub>2</sub>O:MeOH 2:1). Em seguida a reação foi submetida à radiação micro-ondas, com pré-agitação de 15 s, por 10 minutos à temperatura de 100 °C e potência 100 W. Após o final da reação e resfriamento da mistura, uma solução de HCl a 2 N foi adicionada, gota a gota, até pH 2. O precipitado branco formado foi filtrado para obtenção dos derivados-alvo **73** e **74**.

Ácido 2-hidróxi-6-(8-((1,2,3,4-tetraidroacridin-9-il)amino)octil)benzoico (**73**)



Óleo incolor  
Rendimento 84 %  
Massa Molar: 442,128 g.mol<sup>-1</sup>

RMN de <sup>1</sup>H (CD<sub>3</sub>OD, 400 MHz): δ 1,21-1,43 (m, 8H); 1,52 (s, 2H); 1,76-1,83 (m, 2H); 1,93 (s, 4H); 2,67 (s, 2H); 2,88-2,94 (m, 2H); 2,99 (s, 2H); 3,92 (t, 2H, J = 6,4 Hz); 6,62 (dd, 2H, J = 18,5 Hz, J = 7,7 Hz); 7,11 (t, 1H, J = 7,8 Hz); 7,55 (t, 1H, J = 7,6 Hz); 7,74 (d, 1H, J = 8,4 Hz); 7,81 (t, 1H, J = 7,2 Hz); 8,35 (d, 1H, J = 8,7 Hz). RMN de <sup>13</sup>C (CD<sub>3</sub>OD, 100 MHz): δ 20,4; 21,5; 23,4; 26,0; 27,9; 28,5; 28,8; 29,1; 29,9; 31,3; 31,6; 34,9; 111,4; 113,9; 118,7; 121,0; 124,9; 125,0; 132,6; 137,8; 148,2; 154,8; 159,9.

20

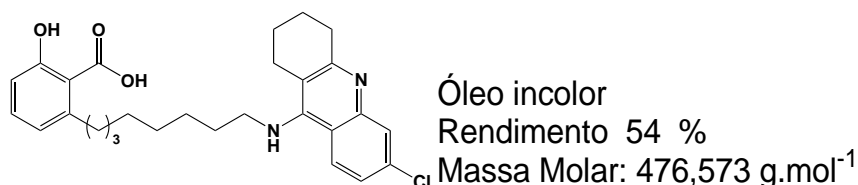
21

22

23

24

1 **Ácido-2-(8-((6-cloro-1,2,3,4-tetraidroacridin-9-il)amino)octil)-6-hidroxibenzoico (74)**



2  
3 RMN de <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz): δ 1,25-1,41 (m, 5H); 1,53 (s, 1H); 1,79 (dd, 1H, *J* =  
4 14,1 Hz, *J* = 6,8 Hz); 1,92 (d, 3H, *J* = 2,8 Hz); 2,64 (s, 1H); 2,77-2,89 (m, 1H); 2,97 (s,  
5 1H); 3,24-3,31 (m, 1H); 3,91 (t, 2H, *J* = 7,3 Hz), 6,66 (dd, 2H, *J* = 13,1 Hz, *J* = 8,0 Hz);  
6 7,17 (t, 1H, *J* = 7,8 Hz); 7,52 (dd, 1H, *J* = 9,3 Hz, *J* = 1,9 Hz); 7,75 (d, 1H, *J* = 1,9 Hz);  
7 8,35 (d, *J* = 9,3 Hz, 1H). RMN de <sup>13</sup>C (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz): δ 20,5; 21,9; 24,2; 25,9; 27,8;  
8 27,9; 28,4; 28,7; 29,7; 30,8; 31,8; 36,3; 48,3; 110,7; 111,8; 115,4; 118,5; 122,2; 125,6;  
9 126,6; 134,1; 138,3; 138,4; 147,2; 151,7; 155,4; 163,2; 173,3.

10

11 **8.3 AVALIAÇÃO BIOLÓGICA**

12

13 **8.3.1 Inibição de AChE e BuChE**

14

15 O teste foi realizado pelo método de Ellman et al. (1961). A solução estoque de  
16 *hAChE* foi preparada por dissolução de pó liofilizado de AChE humana recombinante  
17 (Sigma, Itália) em tampão fosfato 100 mM (pH 8,0) contendo 0,1 % Triton X-100.  
18 Solução estoque de BChE de soro humano (Sigma, Itália) foi preparada dissolvendo  
19 o pó liofilizado em solução aquosa de 0,1 % de gelatina. Soluções estoque dos  
20 compostos testados (1 mM) foram preparados em metanol e diluídos em metanol. A  
21 solução de ensaio consistia em um tampão de fosfato 0,1 M (pH 8,0), com a adição  
22 de 340 μM de ácido 5,5'-ditio-bis-(2-nitrobenzoico), 0,02 unidades de *hAChE* ou  
23 *hBChE* e 550 μM de substrato (iodeto de acetiltiocolina ou iodeto de butiriltiocolina,  
24 respectivamente).

25 Os ensaios foram feitos com branco contendo todos os componentes, exceto a  
26 enzima responsável pela hidrólise não enzimática do substrato. Os híbridos de tacrina  
27 testados foram adicionados à solução de ensaio e pré-incubados com a enzima por  
28 20 min antes da adição do substrato. Inicialmente, os ensaios foram realizados a 37  
29 °C em espectrofotômetro de feixe duplo JASCO V-530 (JASCO Europa, Itália)

1 equipado com porta-cubetas termostaticado (37 °C). O valor de absorvância em 412  
2 nm foi registrado em 240 s, e a atividade enzimática foi calculada a partir da inclinação  
3 da tendência linear obtida. As taxas de reação obtidas na presença e na ausência do  
4 composto testado foram comparadas, e a inibição percentual foi calculada. Cinco  
5 diferentes concentrações de cada composto foram usadas para obter inibição da  
6 atividade enzimática entre 20 % e 80 %. Os valores IC<sub>50</sub> foram determinados  
7 graficamente a partir de curvas log de concentração-inibição (Software GraphPad  
8 Prism 4.03, GraphPad Software Inc.). Cada valor final é a média de pelo menos dois  
9 experimentos independentes realizados em triplicata.

10

### 11 **8.3.2 Determinação da hepatotoxicidade em células Hep G2**

12

13 As células HepG2 (hepatócitos humanos de carcinoma de fígado, American Type  
14 Culture Collection, ATCC) foram cultivadas em DMEM suplementado com 10 % de  
15 FBS e 50 unidades/mL de penicilina/estreptomicina (Life Technologies Italia, Monza,  
16 MB, Itália) a 37 °C em atmosfera umidificada contendo 5 % de CO<sub>2</sub>. Para os  
17 experimentos, células (0,3 x 10<sup>5</sup> células/poço) foram semeadas em placa de 96 poços  
18 em meio completo. Após 24 horas, o meio foi removido e as células foram expostos  
19 às concentrações crescentes dos compostos-alvo (**43-47**, **49-50**, **61-62**, **65-66** e **73-**  
20 **74**) compostos de referência (0,1 µM, 1 µM e 10 µM), ou veículo e dissolvido em  
21 DMEM completo por 24 horas. A viabilidade celular foi medida pelo ensaio de MTT.

22

### 23 **8.3.3 Determinação da toxicidade e do perfil de atividade dos compostos** 24 **selecionados em células SH-SY5Y e BV-2**

25

26 *Reagentes Químicos:* Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM), solução de L-  
27 glutamina, penicilina/estreptomicina, solução de tripsina-EDTA, solução salina  
28 tamponada com fosfato (PBS), LPS do sorotipo *Escherichia coli* O127: B8, ácido  
29 totalmente *trans*-retinóico (RA), dimetilsulfóxido (DMSO), brometo de 3-(4,5-  
30 dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio (MTT), e os *primers* para RT-PCR foram

1 adquiridos da Sigma-Aldrich-Merck (Milão, Itália). Soro fetal bovino (FBS) e FBS de  
2 baixa endotoxina foram da Sigma-Aldrich-Merck (Milão, Itália).

3 *Culturas Celulares e Tratamentos:* A linhagem celular SH-SY5Y foi adquirida da  
4 Sigma-Aldrich-Merck (ECACC 94030304) (Milão, Itália) e foi cultivada em DMEM de  
5 alta glicose suplementado com 10 % (v/v) de FBS, 2 mM de L-glutamina, 50 U/mL de  
6 penicilina e 50 µg/mL de estreptomicina. Antes de iniciar os experimentos, as células  
7 foram diferenciadas com ácido *trans*-retinóico (10 µM) por 7 dias. As células SH-SY5Y  
8 diferenciadas foram tratadas por 24 horas com várias concentrações dos compostos  
9 testados. As células microgliais de BV-2 murino foram gentilmente cedidas pela Prof.  
10 Elisabetta Blasi (Universidade de Modena and Reggio Emilia, Modena, Itália) e foram  
11 cultivadas em DMEM de alta glicose suplementado com 10 % (v/v) de FBS de baixa  
12 endotoxina, 2 mM de L-glutamina, 50 U/mL de penicilina e 50 µg/mL estreptomicina.  
13 As células BV-2 foram tratadas por 24 horas com várias concentrações dos compostos  
14 testados e, em seguida, expostos a LPS (100 ng/mL) por mais 24 horas.

15

#### 16 **8.3.4 Ensaio de viabilidade MTT**

17

18 A viabilidade celular foi avaliada pela medição de redução de MTT conforme a  
19 referência Antognoni et al. (2020). As células foram semeadas em placas de cultura  
20 de tecidos de 96 poços e, no final dos tratamentos, incubadas com solução de MTT  
21 0,5 mg/mL por 30 min (células BV-2) ou 90 min (células SH-SY5Y). No final, a solução  
22 MTT foi substituída por DMSO para solubilizar os cristais de formazan formados.  
23 Finalmente, a formação de formazan foi medida espectrofotometricamente a 595 nm  
24 usando espectrofotômetro de microplaca (VICTOR3 V Multilabel Contador;  
25 PerkinElmer, Wellesley, MA, EUA). Os dados são expressos como porcentagem de  
26 células de controle, que são consideradas 100 % células viáveis.

27

#### 28 **8.3.5 Extração de RNA**

29

30 A extração do RNA total foi realizada usando Mini Kit RNeasy (QIAGEN GmbH,  
31 Hilden, Alemanha), seguindo o protocolo do fabricante. O rendimento e a pureza do

1 RNA foram medidos usando espectrofotômetro NanoVue (GE Healthcare, Milão,  
2 Itália).

3

#### 4 **8.3.6 Reação em cadeia da polimerase em tempo real (PCR)**

5

6 Um micrograma de RNA total foi transcrito reversamente para cDNA usando kit de  
7 síntese de cDNA iScript (Bio-Rad, Hercules, CA, EUA), seguindo as instruções do  
8 fabricante. A PCR em tempo real foi realizada em volume total de 10 µL contendo 2,5  
9 µL (12,5 ng) de cDNA, 5 µL de Advanced Universal SYBR Green Supermix (Bio-Rad)  
10 e 0,5 µL (500 nM) de cada *primer*. Os níveis de expressão de IL-1β, TNF-α, iNOS e  
11 COX-2 (Sigma-Aldrich – Merck, Milão, Itália) foram avaliados, enquanto o gene de  
12 referência para células BV-2 foi utilizado GAPDH. O seguinte protocolo foi seguido  
13 para amplificar o cDNA: 30 s a 95 °C (para ativar a polimerase) seguido de 5 s a 95  
14 °C e 30 s a 60 °C durante 40 ciclos. Os níveis de expressão normalizados foram  
15 avaliados em relação às células de controle de acordo com Método  $2^{-\Delta\Delta CT}$ .

16

#### 17 **8.3.7 Microscopia confocal de imunofluorescência**

18

19 As células BV-2 foram semeadas diretamente em placas de 6 poços. Ao final dos  
20 tratamentos, foram fixadas em temperatura ambiente com paraformaldeído a 2 % por  
21 15 minutos e, em seguida, permeabilizadas com Triton X-100 0,1 % por 10 minutos.  
22 Subsequentemente, as células BV-2 foram incubadas durante à noite com anticorpo  
23 policlonal (1:500) contra NF-κB p65. Após lavagem extensiva com PBS, as células  
24 foram expostas, durante 1 h à temperatura ambiente, a anticorpo IgG anti-coelho  
25 conjugado com Alexa Fluor 488 secundário (1:1000). Os núcleos foram corados com  
26 1 µg/mL 4'-6-diamidino-2-fenilindol (DAPI). As lâminas foram analisadas em  
27 microscópio de varredura a laser confocal C2 Plus (Nikon Instruments, Firenze, Itália).  
28 As imagens foram processadas usando o software de imagem NIS-Elements (Nikon  
29 Instruments, Firenze, Itália).

30

31

### 8.3.8 Quantificação de IL-1 $\beta$

As células BV-2 foram semeadas em placas de 6 poços e, no final dos tratamentos, os meios de cultura foram retirados para detectar a concentração de IL-1 $\beta$ . A quantificação de IL-1 $\beta$  foi realizada usando kit IL-1 $\beta$  ELISA seguindo as instruções do fabricante (Sigma-Aldrich – Merck). A absorbância (450 nm) foi medida usando espectrofotômetro de microplaca (VICTOR3 V Multilabel Counter).

### 8.3.9 Análise estatística

Todas as análises foram realizadas pelo menos em triplicata e os dados foram expressos como média  $\pm$  erro padrão. Para comparar as diferenças entre os grupos, foi usada ANOVA de uma via seguida pelo teste de Dunnett ou Tukey (Prism 7; GraphPad Software, San Diego, CA). As diferenças ao nível de  $p < 0,05$  foram consideradas estatisticamente significativas.

### 8.3.10 Ensaio PAMPA

A membrana do filtro da placa doadora foi revestida com PBL (lipídio cerebral polar, Avanti, AL, EUA) em dodecano (4  $\mu$ L de 20 mg/mL PBL em dodecano), e o poço aceitador foi preenchido com 300  $\mu$ L de PBS (pH 7,4) buffer ( $V_A$ ). Os compostos testados foram dissolvidos primeiro em DMSO e diluídos com PBS (pH 7,4) para atingir a concentração final no poço doador (40  $\mu$ M a 100  $\mu$ M). A concentração de DMSO não excedeu 0,5 % (v/v) na solução doadora. Trezentos microlitros da solução doadora foram adicionados aos poços doadores ( $V_D$ ), e a placa de filtro do doador foi cuidadosamente colocada na placa aceitadora de modo que a membrana revestida ficasse “em contato” com a solução doadora e o tampão aceitador. O composto de teste se difundiu do poço doador através da membrana lipídica (área = 0,28 cm<sup>2</sup>) para o aceitador também. As concentrações dos compostos nos poços doador e aceitador foram avaliadas após 3 h, 4 h, 5 h e 6 h de incubação em quadruplicado usando o leitor de placa UV Synergy HT (Biotek, Winooski, VT, EUA) no comprimento de onda de absorção máximo de cada composto.



1 Além disso, foi preparada e avaliada solução de concentração teórica do  
2 composto, simulando o estado de equilíbrio estabelecido se a membrana era  
3 idealmente permeável. As concentrações dos compostos nos poços doador e  
4 aceitador e a concentração de equilíbrio foram calculadas a partir da curva padrão e  
5 expressas como a permeabilidade ( $P_e$ ) de acordo com a equação (DI et al., 2003):

$$P_e = C \times \ln \left( 1 - \frac{[\text{Fármaco}] \text{ Aceptor}}{[\text{Fármaco}] \text{ Equilíbrio}} \right)$$

6  
7 Onde

$$C = \frac{(V_D \times V_A)}{(V_D \times V_A) \text{ area} \times \text{tempo}}$$

8  
9

### 10 8.3.11 Ensaio de estabilidade plasmática

11

12 A estabilidade de **43** no plasma foi avaliada incubando o composto ao longo de  
13 período de tempo de 6 h a 37 °C, e analisando sua concentração por cromatografia  
14 líquida de alta eficiência (HPLC) acoplada à espectrometria de massas (MS). O  
15 plasma humano agrupado foi adquirido à VWR (Střibrná Skalice, República Checa).  
16 A solução estoque de **5** em DMSO foi diluída com plasma para atingir uma  
17 concentração final de 10 µM de **5**. Duzentos microlitros de solução de plasma 10 µM  
18 foram pipetados para os microtubos. A primeira amostra foi retirada para ser extraída,  
19 enquanto as demais foram incubadas a 37 °C. A cada hora, uma amostra era retirada  
20 e extraída. Dez microlitros de padrão interno (IS; híbrido tacrina-trolox 200 µM descrito  
21 por Nepovimova et al. em metanol) (NEPOVIMOVA et al., 2015) foi adicionado a cada  
22 amostra, agitado em vórtice e suplementado por 700 µL de acetonitrila de grau LC –  
23 MS (VWR, Střibrná Skalice, República Tcheca). Em seguida, a amostra foi agitada (3  
24 minutos, nível 7, VM-10 Witeg, Wertheim, Alemanha) e centrifugada (10.000 RPM, 2  
25 minutos, Roth Gusto, ROTILABO, Illinois, EUA) e 700 µL de sobrenadante foram  
26 transferidos para o frasco e analisado por HPLC-MS. As amostras de calibração foram  
27 preparadas adicionando 10 µL de **5** (20 µM a 400 µM em DMSO) a 190 µL de plasma  
28 em branco; as concentrações finais estavam na faixa de 1–20 µM. Em seguida, 10 µL  
29 de IS foram adicionados e as amostras foram extraídas como acima e analisadas por  
30 HPLC-MS.

1 A análise de HPLC-MS foi realizada usando Dionex UltiMate 3000 UHPLC  
2 consistindo em uma bomba quaternária RS LPG, compartimento de coluna RS,  
3 amostrador automático RS e detector de matriz de diodos controlado pelo software  
4 Chromeleon (versão 7.2.9 build 11323) (Thermo Fisher Scientific, Germering,  
5 Alemanha ) com um espectrômetro de massa Q Exactive Plus Orbitrap com software  
6 Thermo Xcalibur (versão 3.1.66.10.) (Thermo Fisher Scientific, Bremen, Alemanha). A  
7 detecção foi realizada por espectrometria de massa no modo positivo. As  
8 configurações da fonte de eletropulverização aquecida foram as seguintes: voltagem  
9 de pulverização, 3,5 kV; temperatura capilar, 300 °C; gás de bainha, 55 unidades  
10 arbitrárias; gás auxiliar, 15 unidades arbitrárias; gás sobressalente, 3 unidades  
11 arbitrárias; temperatura do aquecedor da sonda, 250 °C; corrente máxima de  
12 pulverização, 100 µA; e nível de RF da lente S:50. A avaliação da concentração de **5**  
13 foi realizada em modo de gradiente de fase reversa usando uma coluna Kinetex EVO  
14 C18 (2,1 × 50 mm, 1,7 µm, Phenomenex, Torrance, Califórnia, EUA) com uma coluna  
15 de guarda Kinetex SecurityGuard Ultra C18 (2,1 mm, Phenomenex, Torrance,  
16 Califórnia, EUA ) A fase móvel A era água ultrapura do tipo ASTM I (resistência, 18,2  
17 MΩ cm a 25 °C) preparada pelo aparelho Barnstead Smart2Pure 3 UV/UF (Thermo  
18 Fisher Scientific, Bremen, Alemanha) com 0,1 % (v/v) de ácido fórmico (Grau LC-MS,  
19 VWR, Stříbrná Skalice, República Tcheca); a fase móvel B era acetonitrila (grau LC –  
20 MS, VWR, Stříbrná Skalice, República Tcheca) com 0,1 % (v/v) de ácido fórmico. A  
21 coluna foi temperada para 35 °C, o fluxo da fase móvel foi ajustado para 0,5 mL/minuto  
22 e o volume de injeção foi de 5 µL. O método começou com 5 % B e foi estável por 0,3  
23 minuto, e então o gradiente foi de 5 % a 100 % B em 3 minutos, foi mantido em 100  
24 % B por 0,5 minuto, então voltou a 5 % B e equilibrou por 2,2 minutos. O tempo total  
25 de execução do método foi de 6 minutos. O composto e IS foram detectados em  
26 espectrômetro de massa na varredura de corrente total de íons em intervalo de 105-  
27 700 *m/z* em modo positivo. O tempo de retenção para **5** foi de 3,32 minutos com a  
28 massa pesquisada 475,2952 e o tempo de retenção para IS foi de 3,29 min com a  
29 massa pesquisada 592,3297. A calibração teve cinco pontos (1 µM, 5 µM, 10 µM, 15  
30 µM e 20 µM) e foi linear ao longo de toda a faixa.

31

32

33

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31

**REFERÊNCIAS**

---

## 9. REFERÊNCIAS

- ALONSO AC, GRUNDKE-IQBAL I, IQBAL K. Alzheimer's disease hyperphosphorylated tau sequesters normal tau into tangles of filaments and disassembles microtubules. **Nature Medicine** v. 2, n. 7, p. 783-7, 1996.
- ALZHEIMER'S ASSOCIATION. 2022 **Alzheimer's Disease Facts and Figures**. Chicago: **Alzheimer's Association**; 2022.
- ALZHEIMER'S DISEASE INTERNATIONAL. 2009. **World Alzheimer Report 2009: Executive Summary**. Disponível em <<https://www.alzint.org/u/WorldAlzheimerReport-ExecutiveSummary.pdf>>. Acesso em julho de 2021.
- ALZHEIMER'S DISEASE INTERNATIONAL. 2019. **World Alzheimer Report 2019: Attitudes to dementia**. London: **Alzheimer's Disease International**. Disponível em <<https://www.alzint.org/u/WorldAlzheimerReport2019.pdf>> Acesso em julho de 2021.
- ANDERSEN, J. K. Oxidative stress in neurodegeneration: cause or consequence?. **Nature Medicine**, v. 10, n. 7, p. S18-S25, 2004.
- BANG, JEE; SPINA, SALVATORE; MILLER, BRUCE L. Frontotemporal Dementia. **The Lancet**, v. 386, n. 10004, p. 1672-1682, 2015.
- BELLUARDO, N., MUDO, G., BLUM, M., AMATO, G., & FUXE, K.. Neurotrophic effects of central nicotinic receptor activation. **Advances in Research on Neurodegeneration**, p. 227-245, 2000.
- BERTRAM, L., LILL, C. M., TANZI, R. E. The genetics of Alzheimer disease: back to the future. **Neuron**, v. 68, n. 2, p. 270-281, 2010.
- BITNER, R. S., MARKOSYAN, S., NIKKEL, A. L., & BRIONI, J. D.. In-vivo histamine H3 receptor antagonism activates cellular signaling suggestive of symptomatic and disease modifying efficacy in Alzheimer's disease. **Neuropharmacology**, v. 60, n. 2-3, p. 460-466, 2011.
- BIZZARRO, A., GUGLIELMI, V., LOMASTRO, R., VALENZA, A., LAURIA, A., MARRA, C., SILVERI, M. C., TIZIANO, F. D., BRAHE, C., MASULLO, C. BuChE K variant is decreased in Alzheimer's disease not in fronto-temporal dementia. **Journal of Neural Transmission**, v. 117, n. 3, p. 377-383, 2010.
- BOLOGNESI, M.L., BARTOLINI, M., TAROZZI, A., MORRONI, F., LIZZI, F., MILELLI, A., MINARINI, A., ROSINI, M., HRELIA, P., ANDRISANO, V. AND MELCHIORRE, C. Multitargeted drugs discovery: balancing anti-amyloid and anticholinesterase capacity in a single chemical entity. **Bioorganic Medicinal Chemistry Letters**, v. 21, n. 9, p. 2655-2658, 2011.
- BOLOGNESI, M.L., CAVALLI, A., VALGIMIGLI, L., BARTOLINI, M., ROSINI, M., ANDRISANO, V., RECANATINI, M. AND MELCHIORRE, C. Multi-target-directed drug design strategy: from a dual binding site acetylcholinesterase inhibitor to a trifunctional

- 1 compound against Alzheimer's disease. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 50, n.  
2 26, p. 6446-6449, 2007.
- 3 BOLOGNESI, Maria Laura; CAVALLI, Andrea; MELCHIORRE, Carlo. Memoquin: a  
4 multi-target-directed ligand as an innovative therapeutic opportunity for Alzheimer's  
5 disease. **Neurotherapeutics**, v. 6, n. 1, p. 152-162, 2009.
- 6 BUTINI, S., BRINDISI, M., BROGI, S., MARAMAI, S., GUARINO, E., PANICO, A.,  
7 SAXENA, A., CHAUHAN, V., COLOMBO, R., VERGA, L. AND DE LORENZI, E,  
8 Multifunctional cholinesterase and amyloid beta fibrillization modulators. Synthesis and  
9 biological investigation. **ACS Medicinal Chemistry Letters**, v. 4, n. 12, p. 1178-1182,  
10 2013.
- 11 CANO-ABAD, M.F., VILLARROYA, M., GARCÍA, A.G., GABILAN, N.H. AND LÓPEZ,  
12 M.G. Calcium entry through L-type calcium channels causes mitochondrial disruption  
13 and chromaffin cell death. **Journal of Biological Chemistry**, v. 276, n. 43, p. 39695-  
14 39704, 2001.
- 15 CASTRO, A. MARTINEZ, A. Targeting beta-amyloid pathogenesis through  
16 acetylcholinesterase inhibitors. **Current Pharmaceutical Design**, v. 12, n. 33, p.  
17 4377-4387, 2006.
- 18 CAVALLI, A., BOLOGNESI, M.L., CAPSONI, S., ANDRISANO, V., BARTOLINI, M.,  
19 MARGOTTI, E., CATTANEO, A., RECANATINI, M. AND MELCHIORRE, C. A small  
20 molecule targeting the multifactorial nature of Alzheimer's disease. **Angewandte**  
21 **Chemie International Edition**, v. 46, n. 20, p. 3689-3692, 2007.
- 22 CAVALLI, A., BOLOGNESI, M.L., MINARINI, A., ROSINI, M., TUMIATTI, V.,  
23 RECANATINI, M. AND MELCHIORRE, C. Multi-target-directed ligands to combat  
24 neurodegenerative diseases. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 51, n. 3, p. 347-  
25 372, 2008.
- 26 CHALUPOVA, K., KORABECNY, J., BARTOLINI, M., MONTI, B., LAMBA, D.,  
27 CALIANDRO, R., PESARESI, A., BRAZZOLOTTO, X., GASTELLIER, A.J., NACHON,  
28 F. AND PEJCHAL, J. Novel tacrine-tryptophan hybrids: Multi-target directed ligands  
29 as potential treatment for Alzheimer's disease. **European Journal of Medicinal**  
30 **Chemistry**, v. 168, p. 491-514, 2019.
- 31 CHAUDHARY, A., MAURYA, P.K., YADAV, B.S., SINGH, S. AND MANI, A. Current  
32 Therapeutic Targets for Alzheimer's disease, **Journal of Biomedicine**, v. 3, p.74-84,  
33 2018.
- 34 CHEN, C.T., BAZINET, R. P.  $\beta$ -oxidation and rapid metabolism, but not uptake  
35 regulate brain eicosapentaenoic acid levels. **Prostaglandins, Leukotrienes and**  
36 **Essential Fatty Acids**, v. 92, p. 33-40, 2015.
- 37 CHEN, M., DU, Z.Y., ZHENG, X., LI, D.L., ZHOU, R.P. AND ZHANG, K.. Use of  
38 curcumin in diagnosis, prevention, and treatment of Alzheimer's disease. **Neural**  
39 **Regeneration Research**, 13(4), p.742, 2018.

- 1 CITRON, M. Alzheimer's disease: strategies for disease modification. **Nature Reviews**  
2 **Drug Discovery**, v. 9, n. 5, p. 387-398, 2010.
- 3 CUMMINGS, J. L. Treatment of Alzheimer's disease: current and future therapeutic  
4 approaches. **Reviews in Neurological Diseases**, v. 1, n. 2, p. 60-69, 2004.
- 5 CUMMINGS, J. L., MORSTORF, T., ZHONG, K.. Alzheimer's disease drug-  
6 development pipeline: few candidates, frequent failures. **Alzheimer's Research &**  
7 **Therapy**, v. 6, n. 4, p. 1-7, 2014.
- 8 CUMMINGS, J., LEE, G., RITTER, A., SABBAGH, M. AND ZHONG, K. Alzheimer's  
9 disease drug development pipeline: 2019. **Alzheimer's & Dementia: Translational**  
10 **Research & Clinical Interventions**, v. 5, p. 272-293, 2019.
- 11 DARREH-SHORI, T., VIJAYARAGHAVAN, S., AEINEHBAND, S., PIEHL, F.,  
12 LINDBLOM, R.P., NILSSON, B., EKDAHL, K.N., LÅNGSTRÖM, B., ALMKVIST, O.,  
13 NORDBERG, A, Functional variability in butyrylcholinesterase activity regulates  
14 intrathecal cytokine and astroglial biomarker profiles in patients with Alzheimer's  
15 disease. **Neurobiology of aging**, v. 34, n. 11, p. 2465-2481, 2013.
- 16 DE SOUZA, M. Q., TEOTÔNIO, I. M. S. N, DE ALMEIDA, F. C., HEYN, G. S.; ALVES,  
17 PS; ROMEIRO, L. A. S., PRATESI, R., DE MEDEIROS NÓBREGA, Y. K., PRATESI,  
18 C. B. Avaliação molecular da atividade antiinflamatória de lipídios fenólicos extraídos  
19 do líquido da casca da castanha de caju (CNSL). **BMC Complementary and**  
20 **Alternative Medicine**, v. 18, p. 181, 2018.
- 21 DI, L., KERNS, E.H., FAN, K., MCCONNELL, O. J., CARTER, G.T. High throughput  
22 artificial membrane permeability assay for blood–brain barrier. **European Journal of**  
23 **Medicinal Chemistry**, v. 38, n. 3, p. 223-232, 2003.
- 24 DIGHE, S.N., DEORA, G.S., DE LA MORA, E., NACHON, F., CHAN, S., PARAT, M.O.,  
25 BRAZZOLOTTO, X., ROSS, B.P. Discovery and structure–activity relationships of a  
26 highly selective butyrylcholinesterase inhibitor by structure-based virtual screening.  
27 **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 59, n. 16, p. 7683-7689, 2016.
- 28 DOS SANTOS TRAMONTIN, N., DA SILVA, S., ARRUDA, R., UGIONI, K.S.,  
29 CANTEIRO, P.B., DE BEM SILVEIRA, G., MENDES, C., SILVEIRA, P.C.L. AND  
30 MULLER, A.P. Gold nanoparticles treatment reverses brain damage in Alzheimer's  
31 disease model. **Molecular Neurobiology**, v. 57, n. 2, p.926-936, 2020.
- 32 DUMONT, M., BEAL, M. F. Neuroprotective strategies involving ROS in Alzheimer  
33 disease. **Free radical biology and medicine**, v. 51, n. 5, p. 1014-1026, 2011.
- 34 ELLMAN, GL ; COURTNEY, KD ; ANDRES, V .; FEATHERSTONE, RM Uma nova e  
35 rápida determinação colorimétrica da atividade da  
36 acetilcolinesterase . **Biochem. Pharmacol.**, v. 7, p. 88 - 90, 1961.
- 37 ENGELHARDT, E., LAKS, J., CAVALCANTI, J.L. O sistema glutamatérgico ea  
38 doença de Alzheimer. **Revista Brasileira de Neurologia**, v. 39, n. 4, p. 5-21, out.-  
39 dez. 2003.

- 1 FALCO, A.D., CUKIERMAN, D.S., HAUSER-DAVIS, R.A., REY, N.A.. Doença de  
2 Alzheimer: hipóteses etiológicas e perspectivas de tratamento. **Química Nova**, v. 39,  
3 p. 63-80, 2016.
- 4 FAN, L.Y., CHIU, M.J. Pharmacological treatment for Alzheimer's disease: current  
5 approaches and future strategies. **Acta Neurol Taiwan**, v. 19, n. 4, p. 228-245, 2010.
- 6 FRANCIS, P.T., PALMER, A.M., SNAPE, M., WILCOCK, G.K.. The cholinergic  
7 hypothesis of Alzheimer's disease: a review of progress. **Journal of Neurology,**  
8 **Neurosurgery & Psychiatry**, v. 66, n. 2, p. 137-147, 1999.
- 9 FRISONI, GB, ALTOMARE, D., THAL, DR et al. O modelo probabilístico da doença  
10 de Alzheimer: a hipótese amiloide revisada. **Nat Rev Neurosci**, v. 23 , p. 53–66, 2022.
- 11 FU, W.-Y., WANG, X., IP, N. Y. Visando a neuroinflamação como estratégia  
12 terapêutica para a doença de Alzheimer: mecanismos, candidatos a drogas e novas  
13 oportunidades. **ACS Chemical Neuroscience**, v. 10, p. 872-879, 2019.
- 14 GAUTHIER S, WEBSTER C, SERVAES S, MORAIS JA, ROSA-NETO P. **World**  
15 **Alzheimer Report 2022: Life after diagnosis: Navigating treatment, care and**  
16 **support**. London, England: Alzheimer's Disease International, 2022.
- 17 GEMKOW, M. J., DAVENPORT, A. J., HARICH, S., ELLENBROEK, B. A., CESURA,  
18 A., HALLETT, D. The histamine H3 receptor as a therapeutic drug target for CNS  
19 disorders. **Drug Discovery Today**, v. 14, n. 9-10, p. 509-515, 2009.
- 20 HENEKA M. T., KUMMER M. P., LATZ E. Innate immune activation  
21 inneurodegenerative disease. **Nature Reviews Immunology**; v. 14, p. 463–477, 2014
- 22 HENEKA, MT; CARSON, MJ; EL KHOURY, J.; LANDRETH, GE; BROSSERON, F.;  
23 FEINSTEIN, DL; JACOBS, AH; WYSS-CORAY, T.; VITORICA, J.; RANSOHOFF, RM;  
24 HERRUP, K.; FRAUTSCHY, SA; FINSSEN, B.; BROWN, GC; VERKHRATSKY, A.;  
25 YAMANAKA, K.; KOISTINAHO, J.; LATZ, E.; HALLE, A.; PETZOLD, GC; TOWN, T.;  
26 MORGAN, D.; SHINOHARA, ML; PERRY, VH; HOLMES, C.; BAZAN, NG; BROOKS,  
27 DJ; HUNOT, S.; JOSEPH, B.; DEIGENDESCH, N.; GARASCHUK, O.; BODDEKE, E.;  
28 DINARELLO, CA; BREITNER, JC; COLE, GM; GOLENBOCK, DT; KUMMER, MP.  
29 Neuroinflammation in Alzheimer's disease. **The Lancet Neurology**, v. 14 , p. 388-405,  
30 2015.
- 31 HERNÁNDEZ, F., DE BARREDA, E. G., FUSTER-MATANZO, A., GOÑI-OLIVER, P.,  
32 LUCAS, J. J., & AVILA, J. The role of GSK3 in Alzheimer disease. **Brain Research**  
33 **Bulletin**, v. 80, n. 4-5, p. 248-250, 2009.
- 34 HIREMATHAD, A., KERI, R. S., ESTEVES, A. R., CARDOSO, S. M., CHAVES, S., &  
35 SANTOS, M. A. Novel Tacrine-Hydroxyphenylbenzimidazole hybrids as potential  
36 multitarget drug candidates for Alzheimer's disease. **European Journal of Medicinal**  
37 **Chemistry**, v. 148, p. 255-267, 2018.
- 38 HOFFMAN, J.L., FACCIDOMO, S., KIM, M., TAYLOR, S.M., AGOGLIA, A.E., MAY,  
39 A.M., SMITH, E.N., WONG, L.C. AND HODGE, C.W. Alcohol drinking exacerbates

- 1 neural and behavioral pathology in the 3xTg-AD mouse model of Alzheimer's disease.  
2 **International Review of Neurobiology**, 148, p.169-230, 2019.
- 3 HOLMES, C., CUNNINGHAM C., ZOTOVA E., WOOLFORD, J., DEAN, C., KERR, S.,  
4 CULLIFORD, D, PERRY, V. H. Systemic inflammation and disease progression in  
5 Alzheimer disease. **Neurology**, v. 73, n. 10, p. 768-774, 2009.
- 6 HOWLETT, D. R., GEORGE, A. R., OWEN, D. E., WARD, R. V., & MARKWELL, R. E.  
7 Common structural features determine the effectiveness of carvedilol, daunomycin and  
8 rolitetracycline as inhibitors of Alzheimer  $\beta$ -amyloid fibril formation. **Biochemical**  
9 **Journal**, v. 343, n. 2, p. 419-423, 1999.
- 10 HUANG S., LI, J., SUN, L., YE, J., FLEISHER, A., WU, T., CHEN, K., REIMAN, E.  
11 Learning brain connectivity of Alzheimer's disease by sparse inverse covariance  
12 estimation. **NeuroImage**, v. 50, n. 3, p. 935-949, 2010.
- 13 IBGE, Projeções da População: Brasil e unidade de Federação, revisão 2018.  
14 Disponível em <https://www.ibge.gov.br/apps/populacao/projecao/index.html>, Acesso  
15 em julho de 2019.
- 16 IGARASHI, K.; KASHIWAGI, K.,. Modulation of cellular function by polyamines. **The**  
17 **International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 42, n. 1, p. 39-51, 2010.
- 18 ITO, K., AHADIEH, S., CORRIGAN, B., FRENCH, J., FULLERTON, T., TENSFELDT,  
19 T Disease progression meta-analysis model in Alzheimer's disease. **Alzheimer's &**  
20 **Dementia**, v. 6, n. 1, p. 39-53, 2010.
- 21 JELLINGER, K. A. Alzheimer 100—highlights in the history of Alzheimer research.  
22 **Journal of Neural Transmission**, v. 113, n. 11, p. 1603-1623, 2006.
- 23 JUNIOR, C. V., BOLZANI, V. D. S., FURLAN, M., FRAGA, C. A. M., BARREIRO, E.  
24 J. Produtos naturais como candidatos a fármacos úteis no tratamento do Mal de  
25 Alzheimer. **Química Nova**, v. 27, p. 655-660, 2004.
- 26 KARRAN, E., MERCKEN, M., DE STROOPER, B. The amyloid cascade hypothesis  
27 for Alzheimer's disease: an appraisal for the development of therapeutics. **Nature**  
28 **Reviews Drug Discovery**, v. 10, n. 9, p. 698-712, 2011.
- 29 KOLEV, M. V., RUSEVA, M. M., HARRIS, C. L., MORGAN, B. P., DONEV, R. M.  
30 Implication of complement system and its regulators in Alzheimer's disease. **Current**  
31 **Neuropharmacology**, v. 7, n. 1, p. 1-8, 2009.
- 32 KOŠAK, U.; BRUS, B.; KNEZ, D.; ŽAKELJ, S.; TRONTELJ, J.; PIŠLAR, A.; ŠINK, R.;  
33 JUKIČ, M.; ŽIVIN, M.; PODKOWA, A.; NACHON, F.; BRAZZOLOTTO, X.; STOJAN,  
34 J.; KOS, J.; COQUELLE, N.; SAŁAT, K.; COLLETIER, J.-P.; GOBEC, S. The magic of  
35 crystal structure-based inhibitor optimization: development of a butyrylcholinesterase  
36 inhibitor with picomolar affinity and in vivo activity. **Journal of Medicinal Chemistry**,  
37 v. 61, n. 1, p. 119-139, 2018.
- 38 LANTHIER, C., PAYAN, H., LIPARULO, I., HATAT, B., LECOUTEY, C., SINCE, M.,  
39 DAVIS, A., BERGAMINI, C., CLAEYSEN, S., DALLEMAGNE, P., BOLOGNESI, M. L.,



- 1 ROCHAIS, C. Novel multi target-directed ligands targeting 5-HT<sub>4</sub> receptors with in  
2 cellulo antioxidant properties as promising leads in Alzheimer's disease. **European**  
3 **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 182, p. 111596, 2019.
- 4 LEMES, L. F. N.; DE ANDRADE RAMOS, G.; DE OLIVEIRA, A. S.; DA SILVA, F. M.  
5 R.; DE CASTRO COUTO, G.; DA SILVA BONI, M.; GUIMARÃES, M. J. R.; DE  
6 SOUZA, I. N. O.; BARTOLINI, M.; ANDRISANO, V.; DO NASCIMENTO NOGUEIRA,  
7 P. C.; SILVEIRA, E. R.; BRAND, G. D.; SOUKUP, O.; KORÁBEČNÝ, J.; ROMEIRO,  
8 N. C.; CASTRO, N. G.; BOLOGNESI, M. L.; ROMEIRO, L. A. S. Cardanol-derived  
9 AChE inhibitors: towards the development of dual binding derivatives for Alzheimer's  
10 disease. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 108, p. 687-700, 2016.
- 11 LENG, F.; EDISON, P. Neuroinflammation and microglial activation in Alzheimer  
12 disease: where do we go from here?. **Nature Reviews Neurology**, v. 17, n. 3, p. 157-  
13 172, 2021.
- 14 LEON, R.; MARCO-CONTELLES, J. A Step Further towards multitarget drugs for  
15 alzheimer and neuronal vascular diseases: targeting the cholinergic system, amyloid-  
16  $\beta$  aggregation and Ca<sup>2+</sup> dyshomeostasis. **Current Medicinal Chemistry**, v. 18, n.  
17 4, p. 552-576, 2011.
- 18 LI, J., DENG, J., SHENG, W., ZUO, Z. Metformin attenuates Alzheimer's disease-like  
19 neuropathology in obese, leptin-resistant mice. **Pharmacology Biochemistry and**  
20 **Behavior**, v. 101, n. 4, p. 564-574, 2012.
- 21 LI, QIUTANG; VERMA, INDER M. NF- $\kappa$ B regulation in the immune system. **Nature**  
22 **Reviews Immunology**, v. 2, n. 10, p. 725-734, 2002.
- 23 LI, SHAOMIN; SELKOE, DENNIS J. A mechanistic hypothesis for the impairment of  
24 synaptic plasticity by soluble A $\beta$  oligomers from Alzheimer's brain. **Journal of**  
25 **Neurochemistry**, v. 154, n. 6, p. 583-597, 2020.
- 26 LIN, H.; LI, Q.; GU, K.; ZHU, J.; JIANG, X.; CHEN, Y.; SUN, H. Therapeutic agents in  
27 Alzheimer's disease through a multi-targetdirected ligands strategy: recent progress  
28 based on tacrine core. **Current Topics in Medicinal Chemistry**, v. 17, p. 3000–3016,  
29 2017.
- 30 LUCHETTI, S., HUITINGA, I. S. D. F., SWAAB, D. F. Neurosteroid and GABA-A  
31 receptor alterations in Alzheimer's disease, Parkinson's disease and multiple sclerosis.  
32 **Neuroscience**, v. 191, p. 6-21, 2011.
- 33 LUNDKVIST, J., NÄSLUND, J.  $\gamma$ -Secretase: a complex target for Alzheimer's disease.  
34 **Current Opinion in Pharmacology**, v. 7, n. 1, p. 112-118, 2007.
- 35 LUO, Y., ZHANG, J., LIU, N., LUO, Y. AND ZHAO, B.. Copper ions influence the  
36 toxicity of  $\beta$ -amyloid (1–42) in a concentration-dependent manner in a Caenorhabditis  
37 elegans model of Alzheimer's disease. **Science China Life Sciences**, v. 54, n. 6, p.  
38 527-534, 2011.
- 39 MACHADO, A. P. R.; CARVALHO, I. O.; SOBRINHO, H. M. R.. Neuroinflamação na  
40 doença de Alzheimer. **Revista Brasileira Militar de Ciências**, v. 6, n. 14, 2020.

- 1 MASUKO, T., YOSHIDA, S., METORI, K., KIZAWA, Y., KUSAMA, T., & MIYAKE, M..  
2 Synthesis of water-soluble polyamine derivatives effective as N-methyl-D-aspartate  
3 receptor antagonists. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, v. 58, n. 6, p. 862-867,  
4 2010.
- 5 MAZZETTO, S. E., LOMONACO, D., MELE, G. Óleo da castanha de caju:  
6 oportunidades e desafios no contexto do desenvolvimento e sustentabilidade  
7 industrial. **Química Nova**, v. 32, p. 732-741, 2009.
- 8 MEBANE-SIMS, I. 2009 Alzheimer's disease facts and figures. **Alzheimer's &**  
9 **Dementia: The Journal of the Alzheimer's Association**, 2009.
- 10 MERAZ-RÍOS, M. A., LIRA-DE LEÓN, K. I., CAMPOS-PEÑA, V., DE ANDA-  
11 HERNÁNDEZ, M. A., MENA-LÓPEZ, R. Tau oligomers and aggregation in Alzheimer's  
12 disease. **Journal of Neurochemistry**, v. 112, n. 6, p. 1353-1367, 2010.
- 13 MESULAM, M. M., GUILLOZET, A., SHAW, P., LEVEY, A., DUYSSEN, E. G.,  
14 LOCKRIDGE, O. Acetylcholinesterase knockouts establish central cholinergic  
15 pathways and can use butyrylcholinesterase to hydrolyze acetylcholine.  
16 **Neuroscience**, v. 110, n. 4, p. 627-639, 2002.
- 17 MICHAELIS, M. L. Drugs targeting Alzheimer's disease: some things old and some  
18 things new. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 304, n.  
19 3, p. 897-904, 2003.
- 20 MINETT, T. S. C.; BERTOLUCCI, P. H. F.. Terapia colinérgica na doença de  
21 Alzheimer. **Revista Neurociências**, v. 8, n. 1, p. 11-14, 2000.
- 22 MEHTA, M., ADEM, A., SABBAGH, M.. New Acetylcholinesterase Inhibitors for  
23 Alzheimer's Disease. **International Journal of Alzheimer's Disease**. v. 2012, Article  
24 ID 728983, 8 paginas.
- 25 MORLEY, J. E., ARMBRECHT, H. J., FARR, S. A., & KUMAR, V. B. The senescence  
26 accelerated mouse (SAMP8) as a model for oxidative stress and Alzheimer's disease.  
27 **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease**, v. 1822, n. 5,  
28 p. 650-656, 2012.
- 29 MUSHTAQ, G., H GREIG, N., A KHAN, J., & A KAMAL, M. Status of  
30 acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase in Alzheimer's disease and type 2  
31 diabetes mellitus. **CNS & Neurological Disorders-Drug Targets (Formerly Current**  
32 **Drug Targets-CNS & Neurological Disorders)**, v. 13, n. 8, p. 1432-1439, 2014.
- 33 NEPOVIMOVA, E. , ULIASSI, E. , KORABECNY, J. , PEÑA-ALTAMIRA, L. E. ,  
34 SAMEZ, S. , PESARESI, A. , GARCIA, G. E. , BARTOLINI, M., ANDRISANO, V. ,  
35 BERGAMINI, C., FATO, R. , LAMBA, D. , ROBERTI, M., KUČA, K., MONTI , B.,  
36 BOLOGNESI, M. L. Multitarget drug design strategy: quinone–tacrine hybrids  
37 designed to block amyloid- $\beta$  aggregation and to exert anticholinesterase and  
38 antioxidant effects. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 57, n. 20, p. 8576-8589, 2014.
- 39 NEPOVIMOVA, E., KORABECNY, J., DOLEZAL, R., BABKOVA, K., ONDREJICEK,  
40 A., JUN, D., SEPSOVA, V., HOROVA, A., HRABINOVA M., SOUKUP, O., BUKUM,

- 1 N., JOST P., MUCKOVA, L., KASSA, J., MALINAK, D., ANDRS, M., KUCA, K.  
2 Tacrine–trolox hybrids: a novel class of centrally active, nonhepatotoxic multi-target-  
3 directed ligands exerting anticholinesterase and antioxidant activities with low in vivo  
4 toxicity. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 58, n. 22, p. 8985-9003, 2015.
- 5 PANEK, D., WIĘCKOWSKA, A., JOŃCZYK, J., GODYŃ, J., BAJDA, M., WICHUR, T.,  
6 PASIEKA, A., KNEZ, D., PIŚLAR, A., KORABECNY, J., SOUKUP, O., SEPSOVA, V.,  
7 SABATÉ, R., KOS, J., GOBEC, S., MALAWSKA, B. Design, synthesis, and biological  
8 evaluation of 1-benzylamino-2-hydroxyalkyl derivatives as new potential disease-  
9 modifying multifunctional anti-Alzheimer's agents. **ACS chemical neuroscience**, v. 9,  
10 n. 5, p. 1074-1094, 2018.
- 11 PAULA, V. D. J. R. D., GUIMARÃES, F. M., DINIZ, B. S., FORLENZA, O. V.  
12 Neurobiological pathways to Alzheimer's disease: Amyloid-beta, TAU protein or both?.  
13 **Dementia & Neuropsychologia**, v. 3, p. 188-194, 2009.
- 14 PEREZ-NIEVAS, B. G. , STEIN, T. D. , TAI, H-C. ,DOLS-ICARDO, O. , SCOTTON, T.  
15 C., BARROETA-ESPAR, I. , FERNANDEZ-CARBALLO, L., MUNAIN, E. L. , PEREZ,  
16 J., MARQUIE, M. , SERRANO-POZO, A., FROSCH, M. P. , LOWE, V. , PARISI, J. E.  
17 , PETERSEN, R. C., IKONOMOVIC, M. D. , LÓPEZ, O. L. , KLUNK, W. , HYMAN, B.  
18 T. , GÓMEZ-ISLA, T. Dissecting phenotypic traits linked to human resilience to  
19 Alzheimer's pathology. **Brain**, v. 136, n. 8, p. 2510-2526, 2013.
- 20 PERISSÉ PERISSÉ, C.; MARLI, M. Idosos indicam caminhos para uma melhor idade.  
21 **Revista Retratos**. n. 16, p. 18-25, fev. 2019.
- 22 PERNA, S. Scoperta di farmaci sostenibili per la malattia di Alzheimer ibridi tra la  
23 tacrina e derivati dell'olio di guscio di anacardo, *Alma Mater Studiorum – Università di*  
24 *Bologna*, **Tesi di Laurea in Ricerca e Sviluppo Di Farmaci e Piccole Molecole**,  
25 Bologna, Itália 2017.
- 26 PEZZEMENTI, L., NACHON, F., CHATONNET, A.. Evolution of acetylcholinesterase  
27 and butyrylcholinesterase in the vertebrates: an atypical butyrylcholinesterase from the  
28 Medaka *Oryzias latipes*. **PloS One**, v. 6, n. 2, p. e17396, 2011.
- 29 PICHET BINETTE P., A., FRANZMEIER, N., SPOTORNO, N. et al. Amyloid-  
30 associated increases in soluble tau relate to tau aggregation rates and cognitive  
31 decline in early Alzheimer's disease. **Nat Commun**, v. 13, p. 6635, 2022.
- 32 PÖHLER, T., SCHADT, O., NIEPEL, D., REBERNIK, P., BERGER, M. L., NOE, C. R.  
33 New polyamine-sensitive inhibitors of the NMDA receptor: Syntheses and  
34 pharmacological evaluation. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 42, n. 2,  
35 p. 175-197, 2007.
- 36 PRATI, F.; CAVALLI, A.; BOLOGNESI, M. L.. Navigating the chemical space of  
37 multitarget-directed ligands: from hybrids to fragments in Alzheimer's disease.  
38 **Molecules**, v. 21, n. 4, p. 466, 2016.
- 39 RAMOS, G. A., OLIVEIRA, A. S., BARTOLINI, M., NALDI, M., LIPARULO, I.,  
40 BERGAMINI, C., ULIASSI, E., WU, L., FRASER, P. E., ABREU, M., KIAMETIS, A. S.  
41 Discovery of sustainable drugs for Alzheimer's disease: cardanol-derived

- 1 cholinesterase inhibitors with antioxidant and anti-amyloid properties. **RSC Medicinal**  
2 **Chemistry**, n. 12, v. 7, p.1154-1163, 2021.
- 3 RAMOS, Giselle de Andrade. Síntese e avaliação farmacológica de inibidores da  
4 enzima acetilcolinesterase planejados a partir do cardol. 2014. 168 f., il. Dissertação  
5 (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade de Brasília, Brasília, 2014.
- 6 RAMPA, A., BELLUTI, F., GOBBI, S., BISI, A Hybrid-based multi-target ligands for the  
7 treatment of Alzheimer's disease. **Current Topics in Medicinal Chemistry**, v. 11, n.  
8 22, p. 2716-2730, 2011.
- 9 REALE, M.; NICOLA, M. DI.; VELLUTO, L.; D'ANGELO, C.; COSTANTINI, E.; LAHIRI,  
10 D. K.; KAMAL, M. A.; YU, Q.; GREIG, N. H. Selective acetyl-and butyrylcholinesterase  
11 inhibitors reduce amyloid- $\beta$  ex vivo activation of peripheral chemo-cytokines from  
12 Alzheimer's disease subjects: exploring the cholinergic anti-inflammatory pathway.  
13 **Current Alzheimer Research**, v. 11, n. 6, p. 608-622, 2014.
- 14 ROLDAN-PENA, J. M., ROMERO-REAL, V., HICKE, J., MAYA, I., FRANCONETTI,  
15 A., LAGUNES, I., PADRÓN, J. M., PETRALLA, S., POETA, E., NALDI, M.,  
16 BARTOLINI, M., MONTI, B., BOLOGNESI, M. LO., LÓPEZ, O., FERNANDEZ-  
17 BOLANOS, J. G. Tacrine-O-protected phenolics heterodimers as multitarget-directed  
18 ligands against Alzheimer's disease: Selective subnanomolar BuChE inhibitors.  
19 **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 181, p. 111550, 2019.
- 20 ROSINI, M., SIMONI, E., BARTOLINI, M., CAVALLI, A., CECCARINI, L., PASCU, N.,  
21 MCCLYMONT, D. W., TAROZZI, A., BOLOGNESI, M. L., MINARINI, A., TUMIATTI, V.,  
22 ANDRISANO, V., MELLOR, I. R., MELCHIORRE, C. Inhibition of  
23 acetylcholinesterase,  $\beta$ -amyloid aggregation, and NMDA receptors in Alzheimer's  
24 disease: a promising direction for the multi-target-directed ligands gold rush. **Journal**  
25 **of Medicinal Chemistry**, v. 51, n. 15, p. 4381-4384, 2008.
- 26 SABBAGH, M. N., ADLER, C. H., LAHTI, T. J., CONNOR, D. J., VEDDERS, L.,  
27 PETERSON, L. K., CAVINESS, J. N., SHILL, H. A., SUE, L., ZIABREVA, I., PERRY,  
28 E., BALLARD, C. G., AARSLAND, D., WALKER, D. G., BEACH, T. G Parkinson's  
29 disease with dementia: comparing patients with and without Alzheimer pathology.  
30 **Alzheimer Disease and Associated Disorders**, v. 23, n. 3, p. 295, 2009.
- 31 SAMADI, A., VALDERAS, C., DE LOS RÍOS, C., BASTIDA, A., CHIOUA, M.,  
32 GONZÁLEZ-LAFUENTE, L., COLMENA, I., GANDÍA, L., ROMERO, A., DELBARRIO,  
33 L., MARTÍN DE SAAVEDRA, M. D., LÓPEZ, M. G., VILLARROYA, M., MARCO-  
34 CONTELLES, J. Cholinergic and neuroprotective drugs for the treatment of Alzheimer  
35 and neuronal vascular diseases. II. Synthesis, biological assessment, and molecular  
36 modelling of new tacrine analogues from highly substituted 2-aminopyridine-3-  
37 carbonitriles. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, v. 19, n. 1, p. 122-133, 2011.
- 38 SANCHEZ-MUT, J. V., ASO, E., HEYN, H., MATSUDA, T., BOCK, C., FERRER, I.,  
39 ESTELLER, M. Promoter hypermethylation of the phosphatase DUSP22 mediates  
40 PKA-dependent TAU phosphorylation and CREB activation in Alzheimer's disease.  
41 **Hippocampus**, v. 24, n. 4, p. 363-368, 2014.

- 1 SAVINI, L., GAETA, A., FATTORUSSO, C., CATALANOTTI, B., CAMPIANI, G.,  
2 CHIASSERINI, L., PELLERANO, C., NOVELLINO, E., MCKISSIC, D. AND SAXENA,  
3 A. Specific targeting of acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase identification  
4 sites. **Journal of Medicinal Chemistry**, n. 46, v. 1, p. 1-4, 2003.
- 5 SOUKUP, O., JUN, D., ZDAROVA-KARASOVA, J., PATOCKA, J., MUSILEK, K.,  
6 KORABECNY, J., KRUSEK, J., KANIAKOVA, M., SEP SOVA, V., MANDIKOVA, J.,  
7 TREJTAR, F. A resurrection of 7-MEOTA: a comparison with tacrine. **Current**  
8 **Alzheimer Research**, v. 10, no. 8, p. 893-906, 2013.
- 9 STASIUK, M., BARTOSIEWICZ, D., KOZUBEK, A. Inhibitory effect of some natural  
10 and semisynthetic phenolic lipids upon acetylcholinesterase activity. **Food Chemistry**,  
11 v. 108, n. 3, p. 996-1001, 2008.
- 12 TAKADA, L. T. Innate immunity and inflammation in **Alzheimer s Disease**  
13 **Pathogenesis**, 2017.
- 14 TRUDLER D, FARFARA D, FRENKEL D. Toll-like receptors expression. signaling in  
15 glia cells in neuro-amyloidogenic diseases: Towards future therapeutic application.  
16 **Mediators of Inflammation**, 2010.
- 17 TUMIATTI, V., BOLOGNESI, M. L., MINARINI, A., ROSINI, M., MILELLI, A., MATERA,  
18 R., & MELCHIORRE, C. Progress in acetylcholinesterase inhibitors for Alzheimer's  
19 disease: an update. **Expert Opinion on Therapeutic Patents**, v. 18, n. 4, p. 387-401,  
20 2008.
- 21 ULIASSI, E., DE OLIVEIRA, A.S., DE CAMARGO NASCENTE, L., ROMEIRO, L.A.S.  
22 AND BOLOGNESI, M.L Cashew Nut Shell Liquid (CNSL) as a Source of Drugs for  
23 Alzheimer's Disease. **Molecules**, v. 26, no. 18, p. 5441, 2021.
- 24 VAN BEEK, A.H., CLAASSEN, J.A.. The cerebrovascular role of the cholinergic neural  
25 system in Alzheimer's disease. **Behavioural Brain Research**, v. 221, n. 2, p. 537-542,  
26 2011.
- 27 VIAYNA, E., SOLA, I., BARTOLINI, M., DE SIMONE, A., TAPIA-ROJAS, C.,  
28 SERRANO, F. G., SABATÉ, R., JUARÉZ-JIMÉNEZ, J., LUQUE, F. J., ANDRISANO,  
29 V., CLOS, M. V., INESTROSA, N. C., MUÑOZ-TORRERO, D Synthesis and  
30 multitarget biological profiling of a novel family of rhein derivatives as disease-  
31 modifying anti-Alzheimer agents. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 57, n. 6, p.  
32 2549-2567, 2014.
- 33 VIEGAS, F. P., SIMÕES, M. C. R., DA ROCHA, M. D., CASTELLI, M. R., MOREIRA,  
34 M. S., & VIEGAS JR, C. Doença de Alzheimer: caracterização, evolução e implicações  
35 do processo neuroinflamatório. **Revista Virtual de Química**, v. 3, n. 4, p. 286-306,  
36 2011.
- 37 WILSON, R. S., LI, Y., AGGARWAL, N. T., BARNES, L. L., MCCANN, J. J., GILLEY,  
38 D. W., & EVANS, D. A. Education and the course of cognitive decline in Alzheimer  
39 disease. **Neurology**, v. 63, n. 7, p. 1198-1202, 2004.

1 WOLFE, M. S.  $\gamma$ -Secretase inhibition and modulation for Alzheimer's disease. **Current**  
2 **Alzheimer Research**, v. 5, n. 2, p. 158-164, 2008.

3 YIANNOPOULOU, K. G.; PAPAGEORGIOU, S. G. Current and future treatments for  
4 Alzheimer's disease. **Therapeutic Advances in Neurological Disorders**, v. 6, n. 1,  
5 p. 19-33, 2013.

6

7

8

9

10

11

12

13

14

15

16

17

18

19

20

21

22

23

24

25

26

27

28

29

30

31

32

33

34

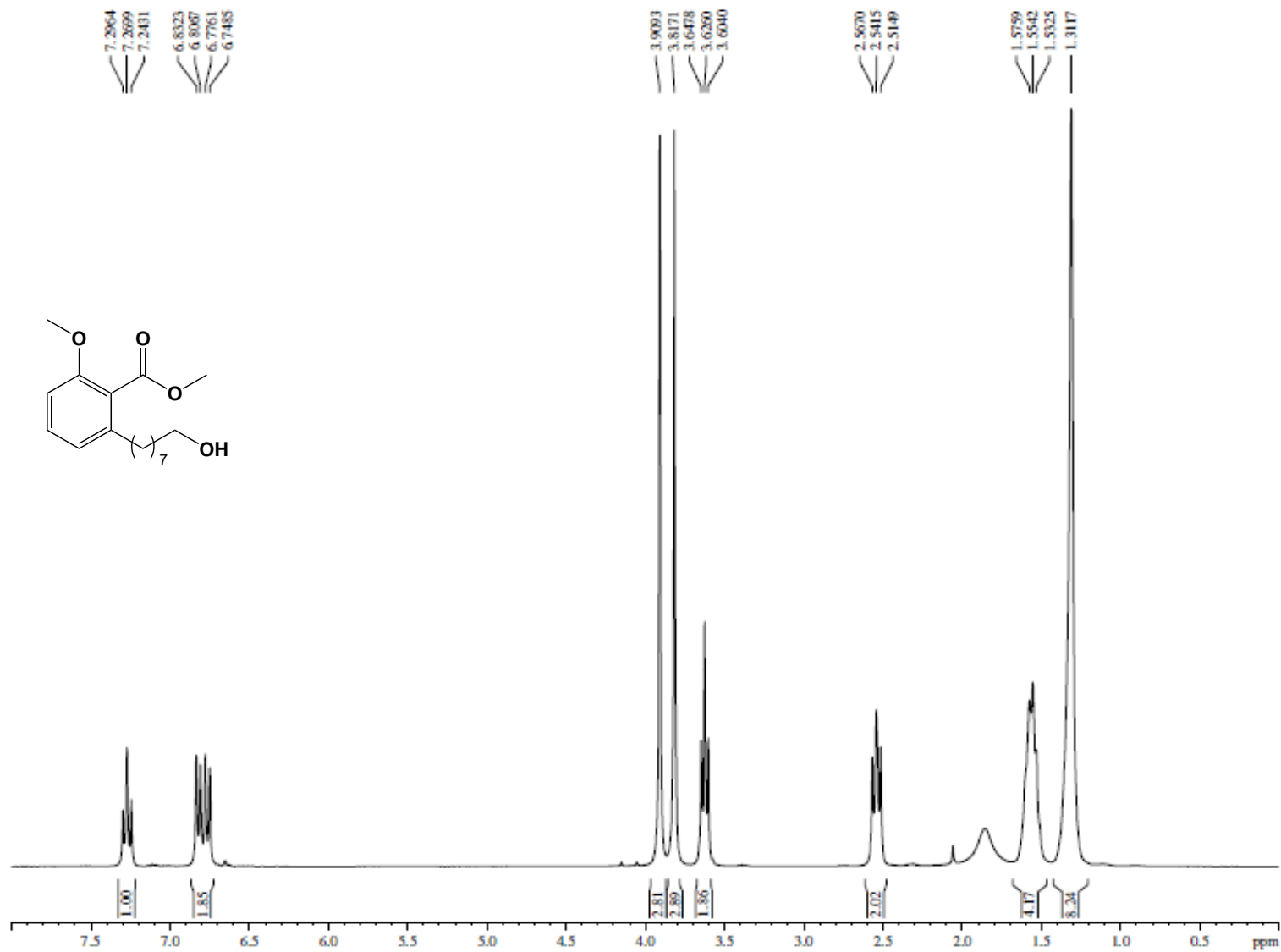
35

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37

**ANEXO**

---

**ANEXO 1: Espectro de RMN de <sup>1</sup>H (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>): 2-(8-hidróxiocetil)-6-metóxi benzoato de metila (27)**



```

NAME      LDT 74
EXPNO     1
PROCNO    1

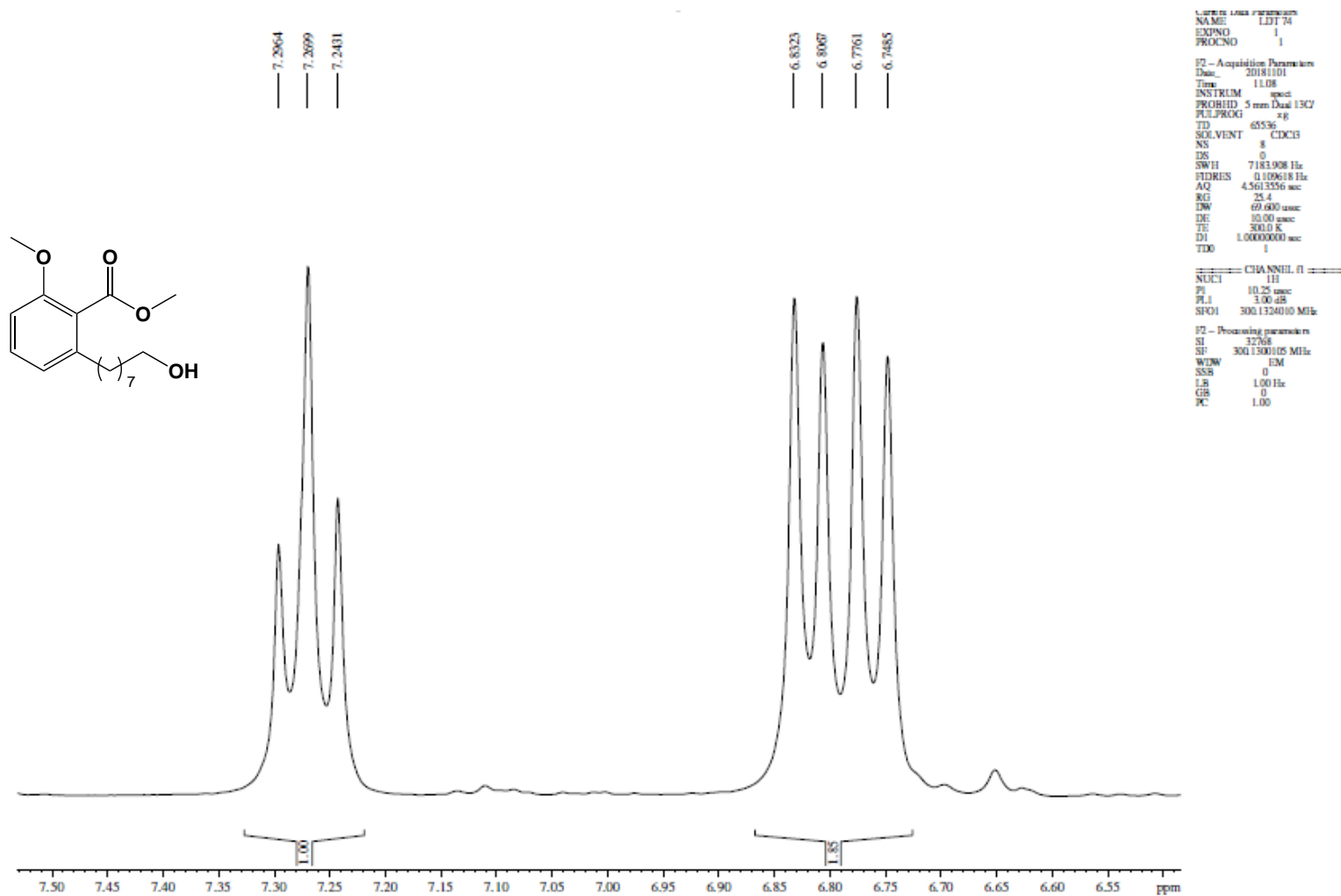
F2 - Acquisition Parameters
Date_     20181101
Time      11.08
INSTRUM   spect
PROBHD    5 mm Dual 13C/
PULPROG   zg
TD         65536
SOLVENT   CDCl3
NS         8
DS         0
SWH       7183.908 Hz
FIDRES    0.109618 Hz
AQ        4.5613356 sec
RG         25.4
DW        69.600 usec
DE        10.00 usec
TE        300.0 K
D1        1.0000000 sec
TD0       1

===== CHANNEL f1 =====
NUC1      1H
P1        10.25 usec
PL1       3.00 dB
SFO1     300.1324010 MHz

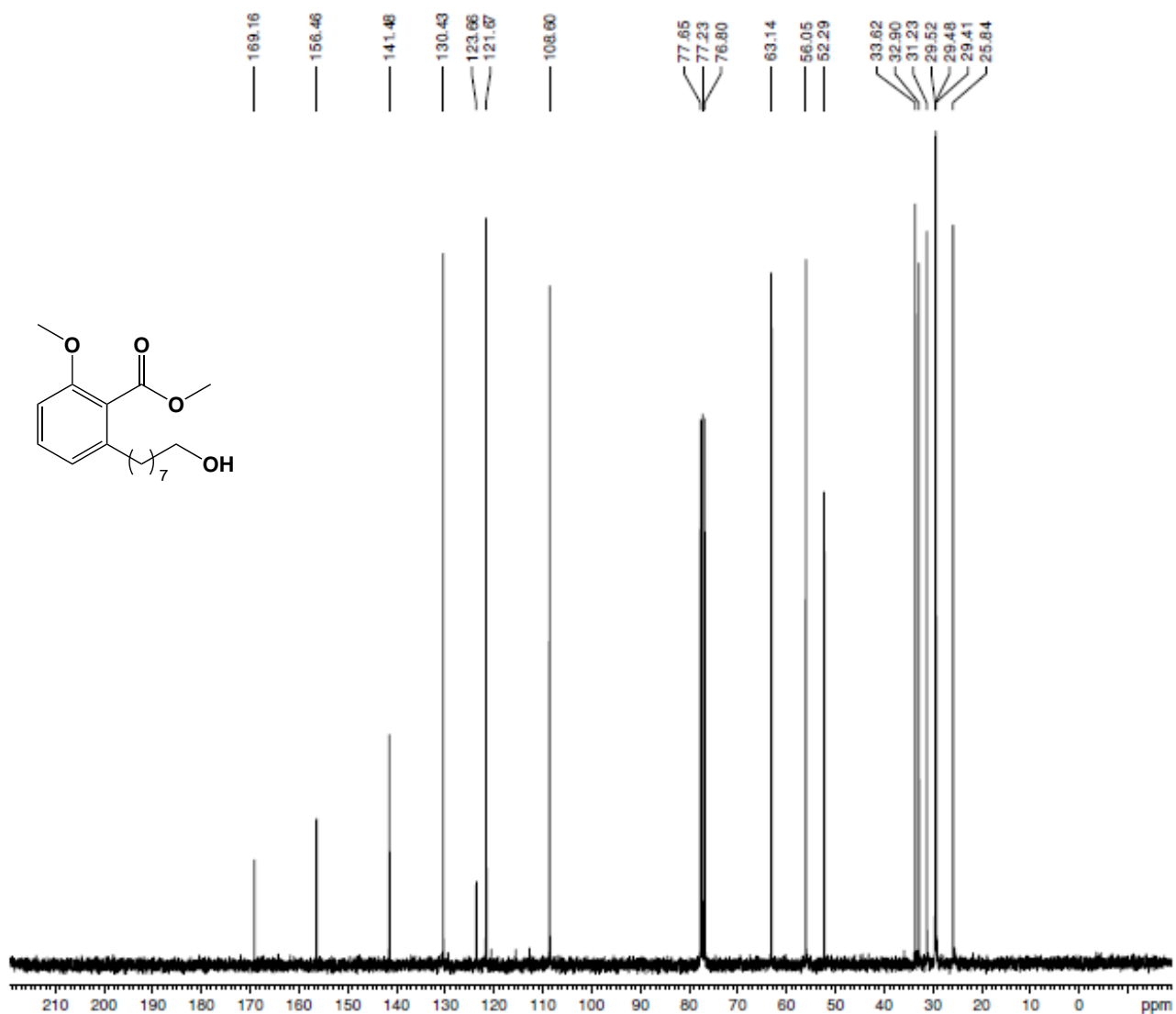
F2 - Processing parameters
SI        32768
SF        300.1300105 MHz
WDW       EM
SSB       0
LB        1.00 Hz
GB        0
PC        1.00
    
```



**ANEXO 1.1:** Expansão do espectro de RMN de  $^1\text{H}$  na região aromática (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ): 2-(8-hidróxiocetil)-6-metóxi benzoato de metila  
(27)



**ANEXO 2: Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ): 2-(8-hidróxiocetil)-6-metóxi benzoato de metila (27)**



```

NAME          LOT 74
EXPNO         2
PROCNO        1

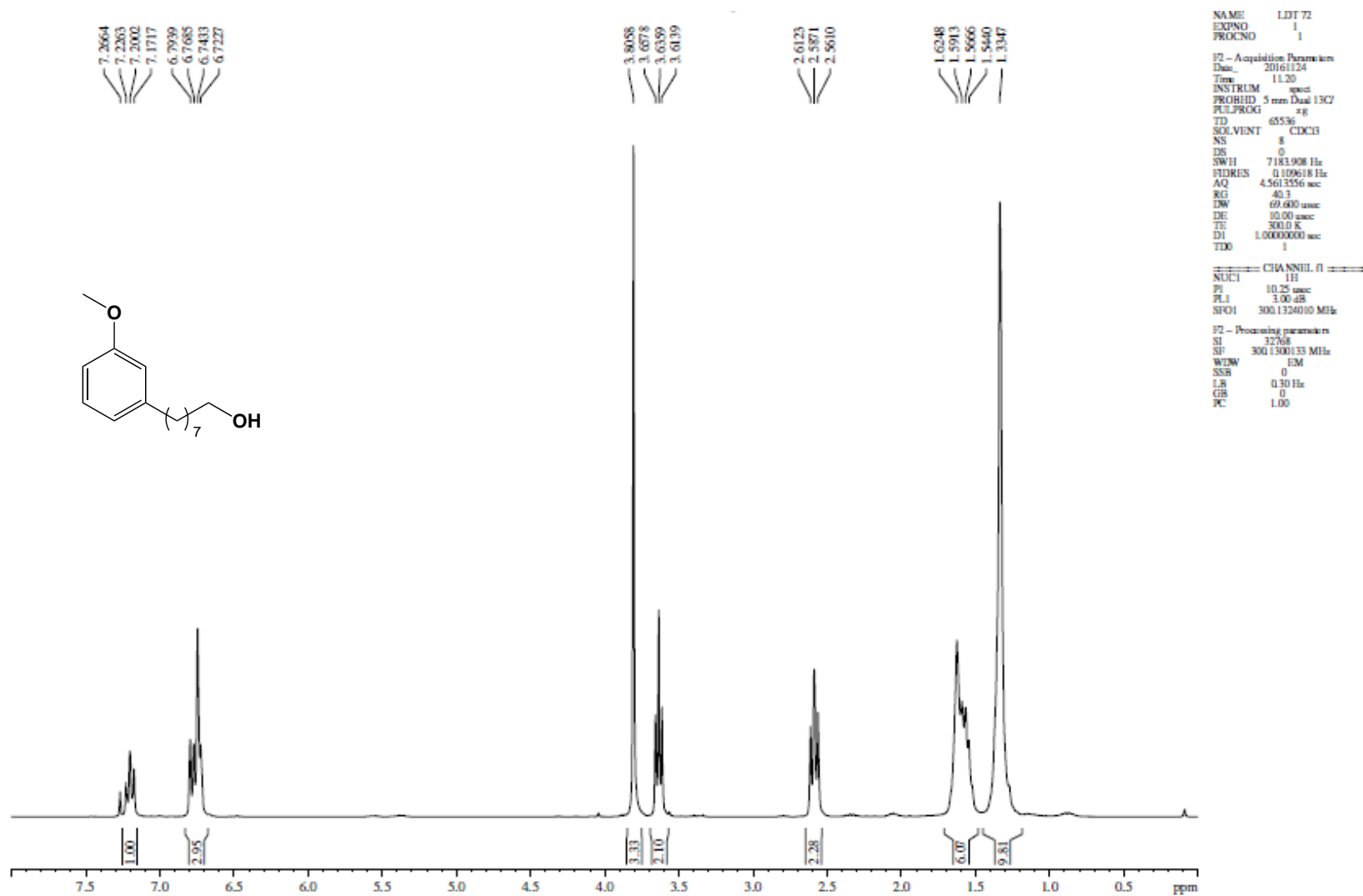
F2 - Acquisition Parameters
Date_         20161101
Time          11.42
INSTRUM      spect
PROBHD       5 mm Dual 13C/
PULPROG      zgpg
TD           32768
SOLVENT      MeOD
NS           1024
DS           0
SWH          17985.611 Hz
FIDRES      0.148877 Hz
AQ           0.9110004 sec
RG           32768
DC           27.600 usec
DE           10.00 usec
TE           300.0 K
D1           1.0000000 sec
d11          0.0300000 sec
DELTA       0.89999998 sec
TD0          1

----- CHANNEL f1 -----
NUC1         13C
P1           12.00 usec
PL1          1.00 dB
SFO1         75.4752950 MHz

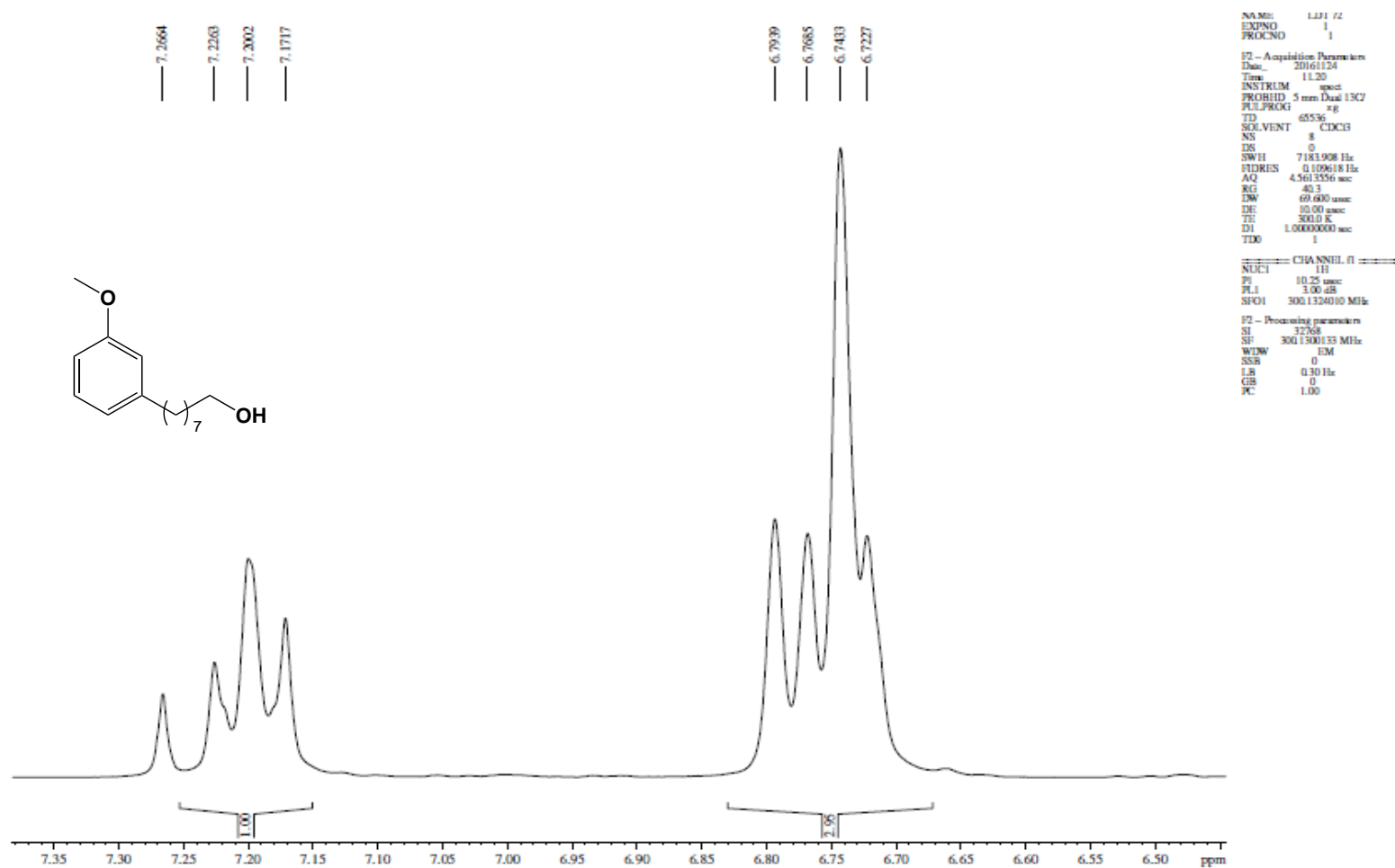
----- CHANNEL f2 -----
CPOPRG2     waltz16
NUC2         1H
PCPO2       80.00 usec
PL2          1.00 dB
PL12         18.75 dB
PL13         15.48 dB
SFO2         300.1312000 MHz

F2 - Processing parameters
SI           65536
SF           75.4671377 MHz
WDW          EM
SSB          0
LB           1.00 Hz
GB           0
PC           1.40
    
```

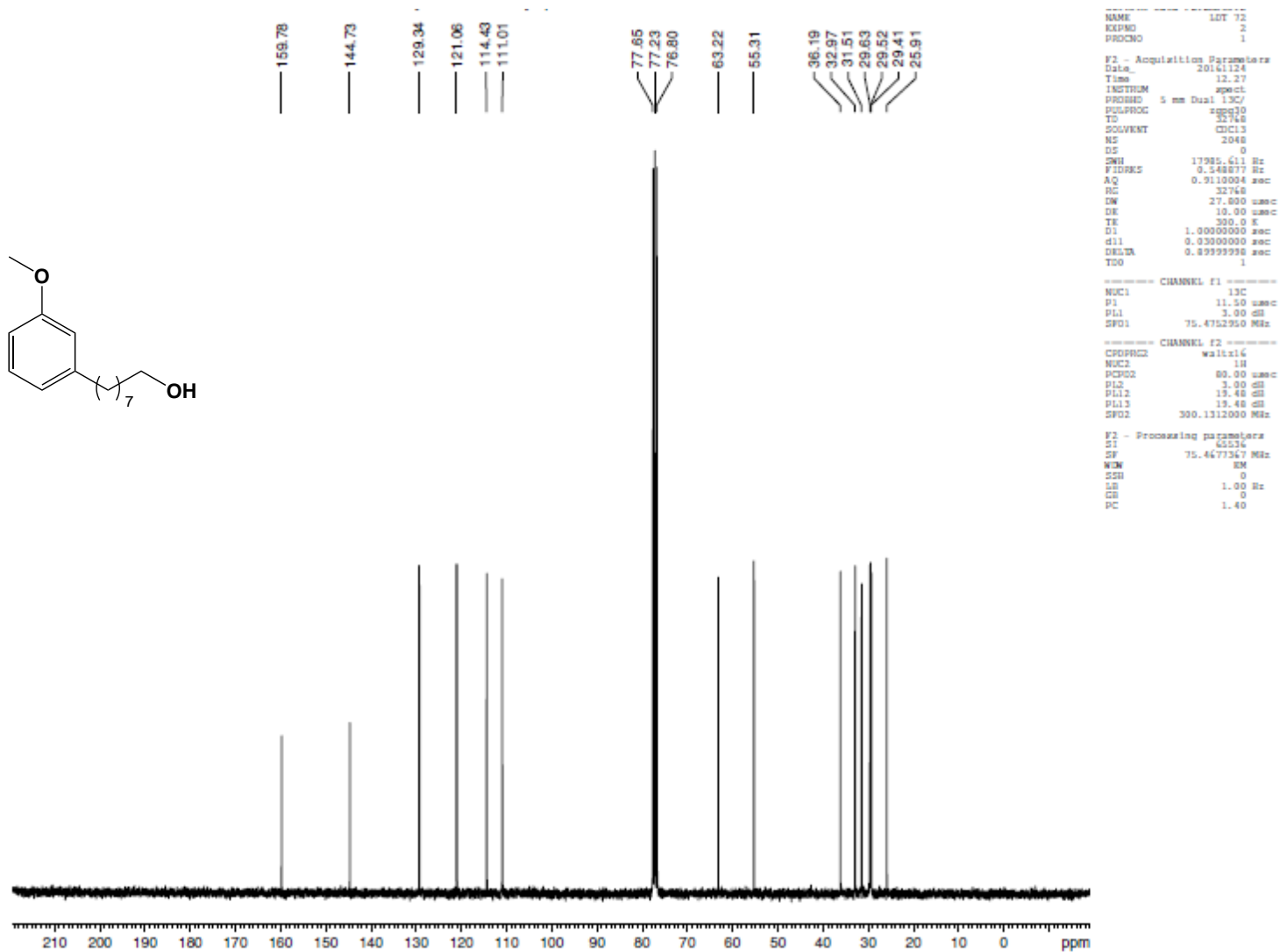
**ANEXO 3: Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ): 8-(3-metóxfenil)octan-1-ol (28)**



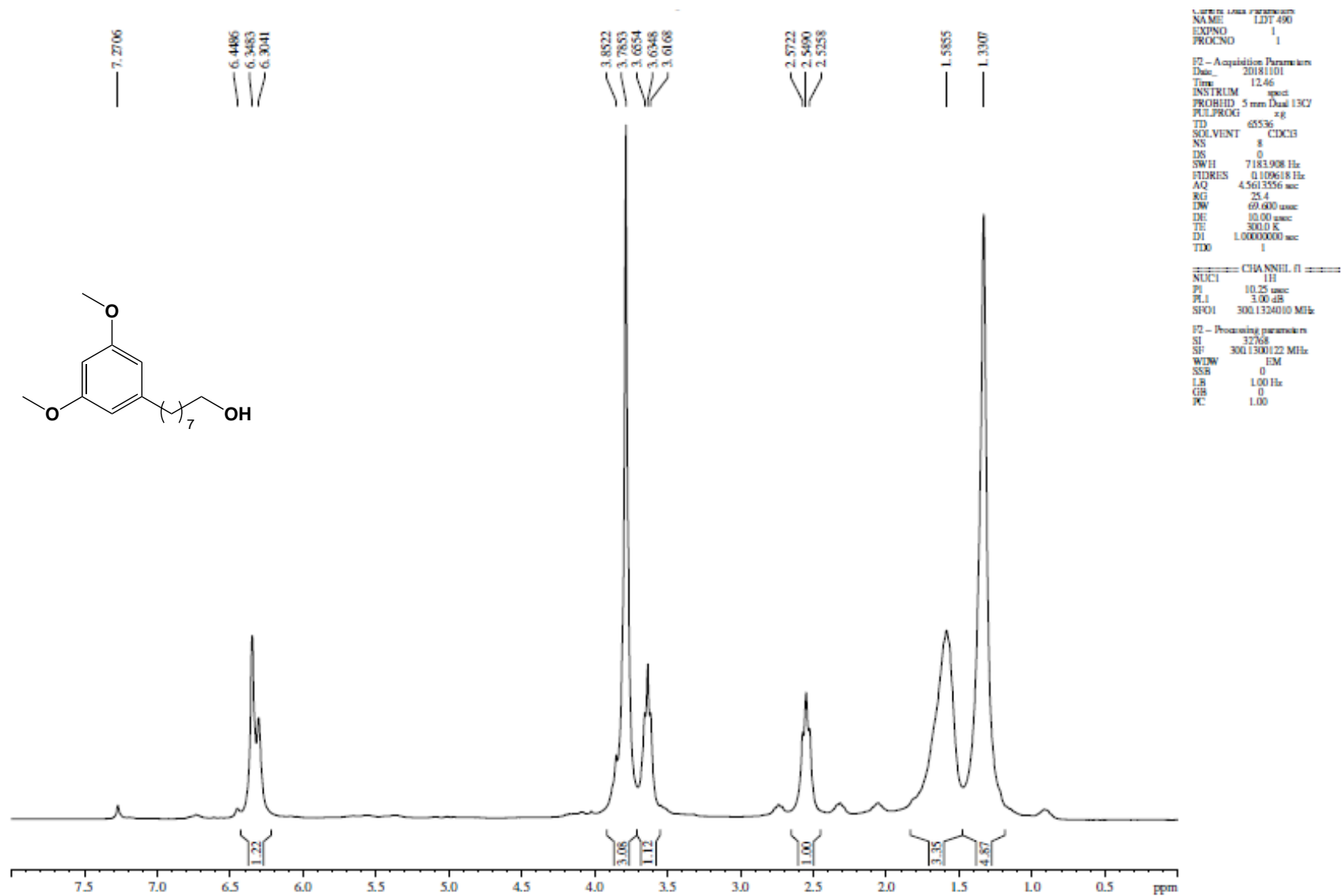
**ANEXO 3.1:** Expansão do espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) na região dos aromáticos: 8-(3-metóxfenil)octan-1-ol (**28**)



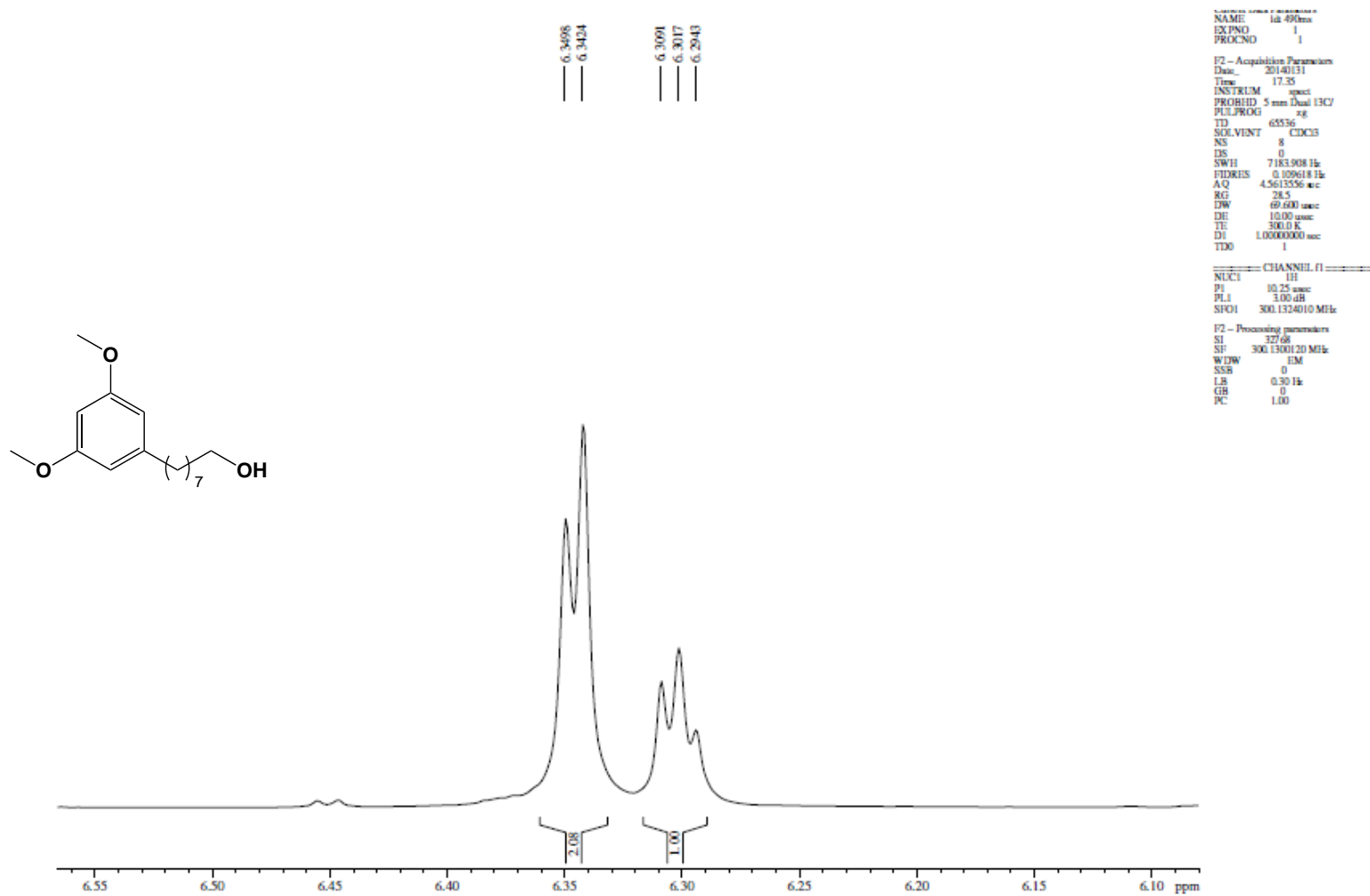
**ANEXO 4:** Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) 8-(3-metóxiifenil)octan-1-ol (**28**)



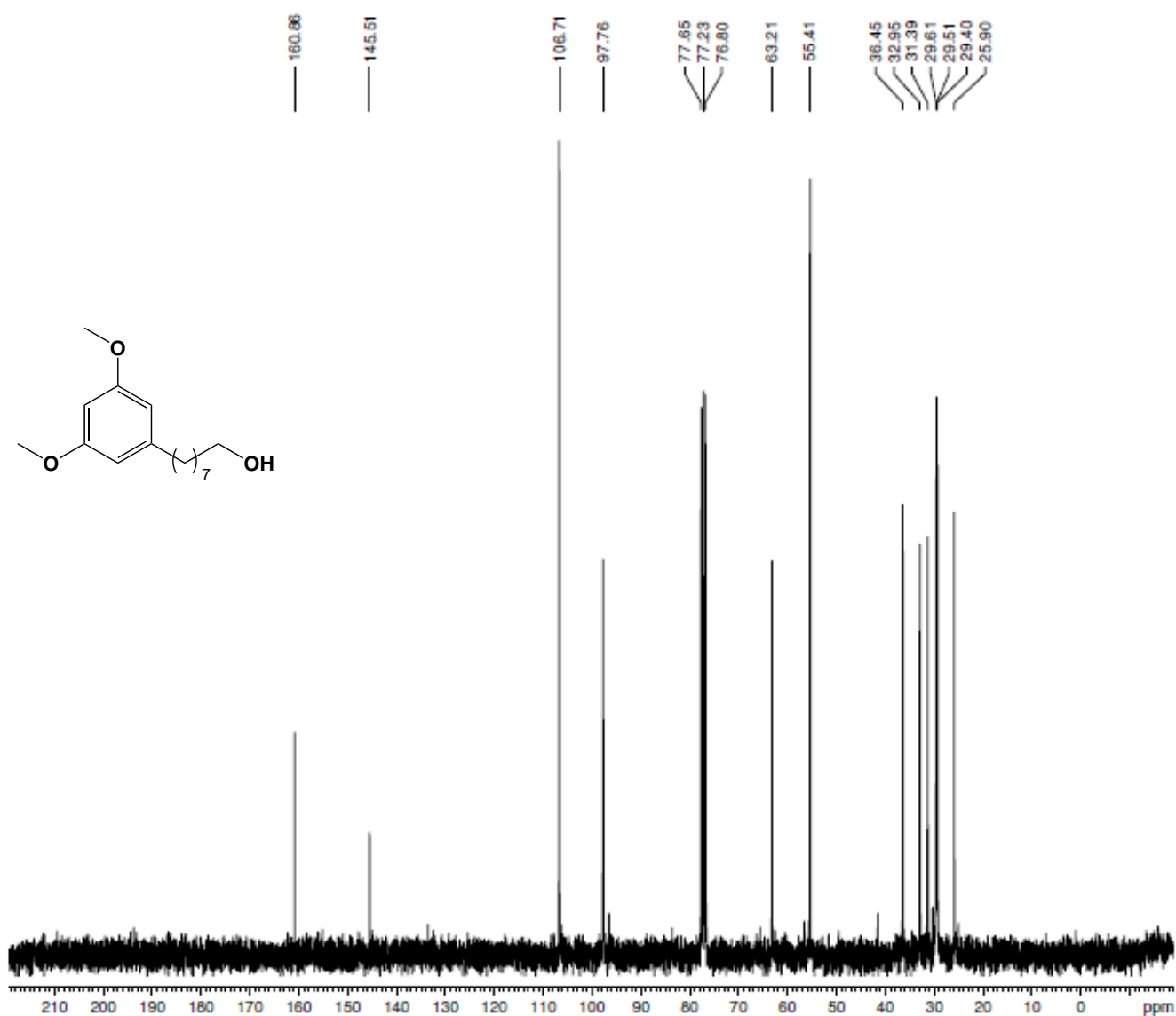
**ANEXO 5: Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ): 8-(3,5-Dimetóxicfenil)octan-1-ol (29)**



**ANEXO 5.1:** Expansão do espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) na região dos aromáticos: 8-(3,5-Dimetóxfenil)octan-1-ol (**29**)



**ANEXO 6: Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ): 8-(3,5-Dimetóxifenil)octan-1-ol (29)**



```

NAME          wai 43u
EXPNO         2
PROCNO        1

F2 - Acquisition Parameters
Date_         20181101
Time          13.01
INSTRUM       spect
PROBHD        5 mm Dual 13C/
PULPROG       zgpg
TD            32768
SOLVENT       MeOD
NS            484
DS            0
SWH           17985.411 Hz
FIDRES        0.548877 Hz
AQ            0.9110004 sec
RG            32768
DC            27.600 usec
DE            10.00 usec
TE            300.0 K
D1            1.0000000 sec
d11           0.0300000 sec
DELTA         0.89999996 sec
TD0           1

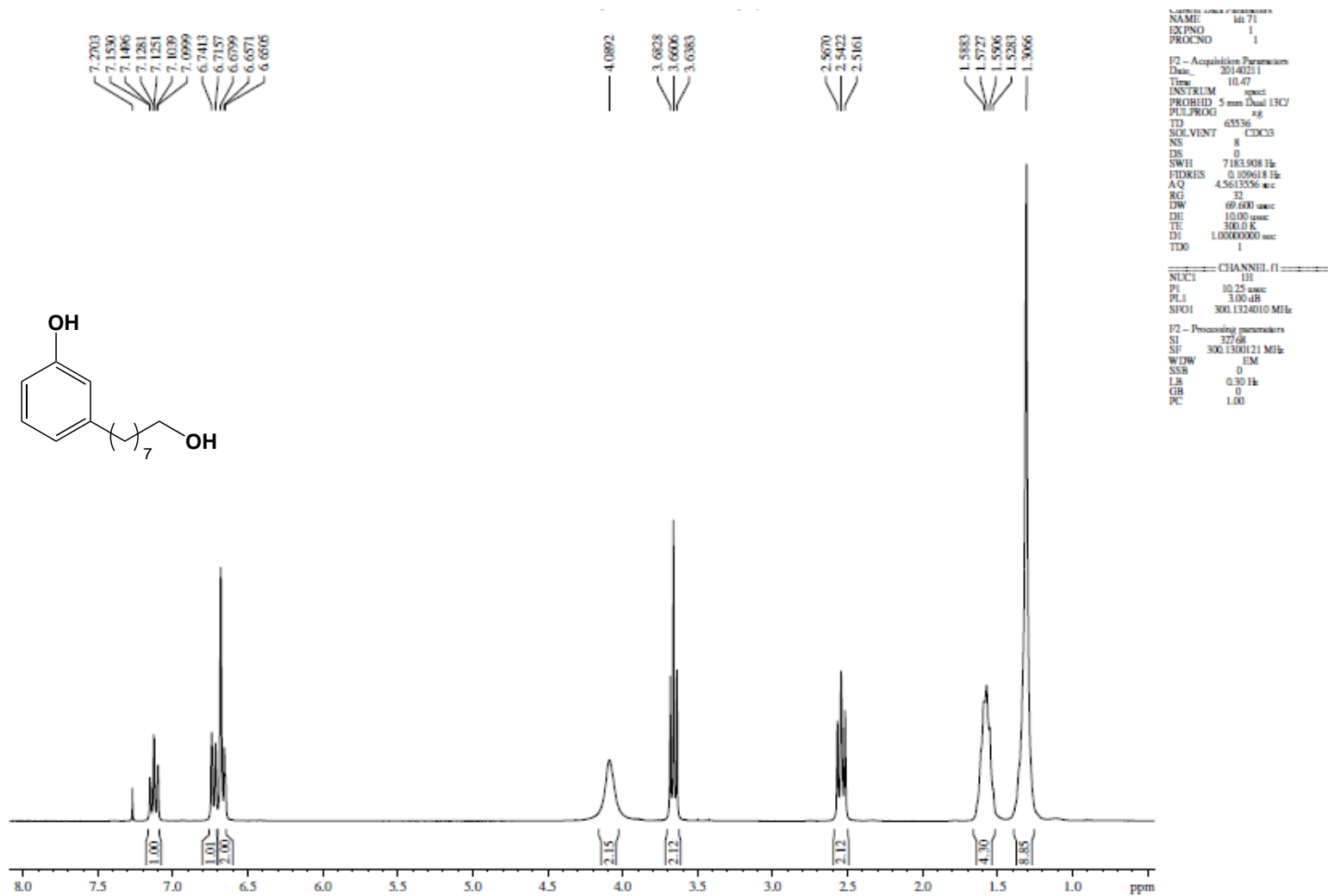
----- CHANNEL f1 -----
NUC1          13C
P1            12.00 usec
PL1           3.00 dB
SFO1          75.4752950 MHz

----- CHANNEL f2 -----
CROSSPRG      waltz16
NUC2          1H
PCPD2         80.00 usec
PL2           3.00 dB
PL12          18.78 dB
PL13          13.48 dB
SFO2          300.1312000 MHz

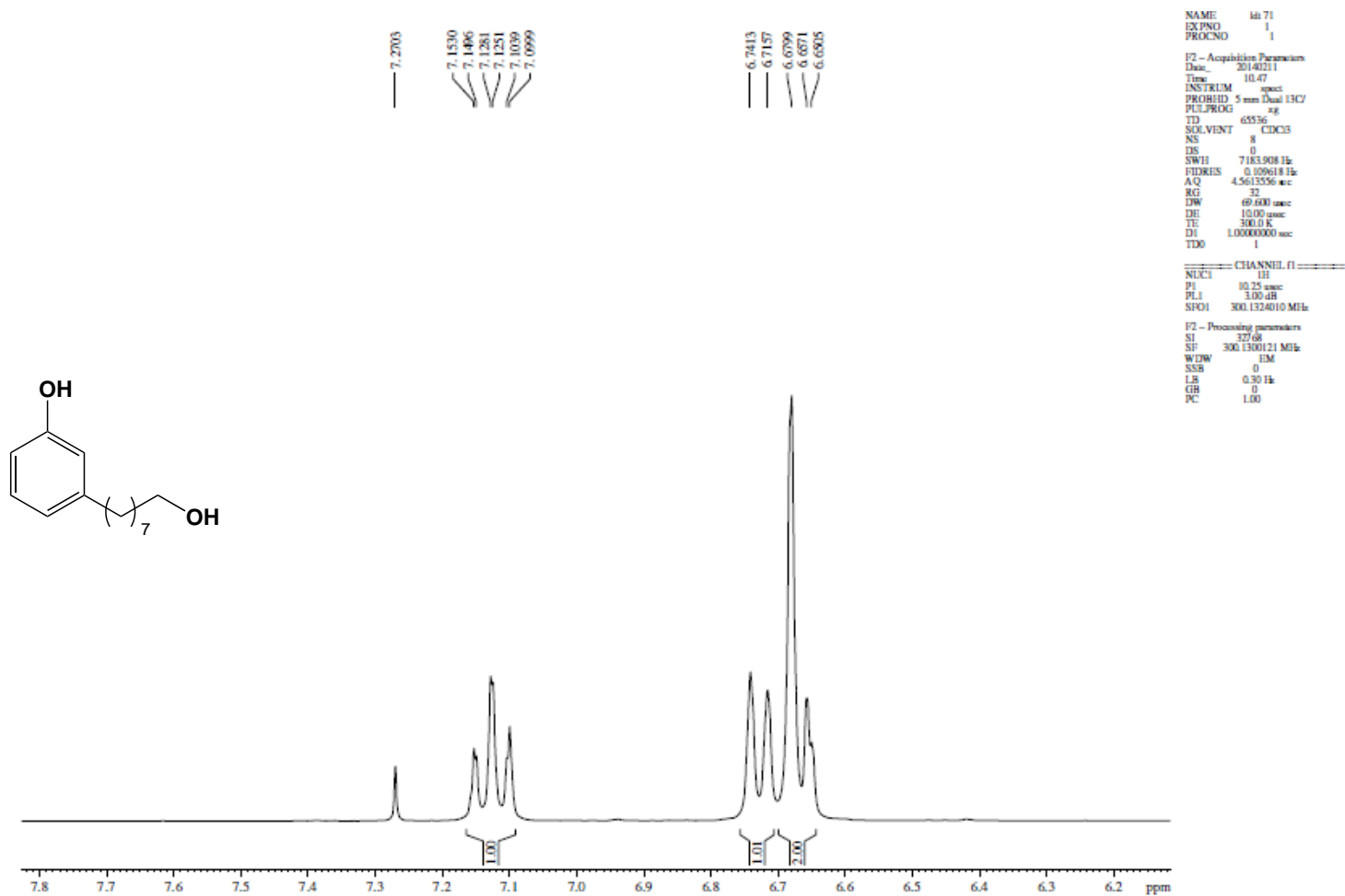
F2 - Processing parameters
SI            65536
SF            75.4671370 MHz
WDW           EM
SSB           0
GB            1.00 Hz
PC            1.40
    
```



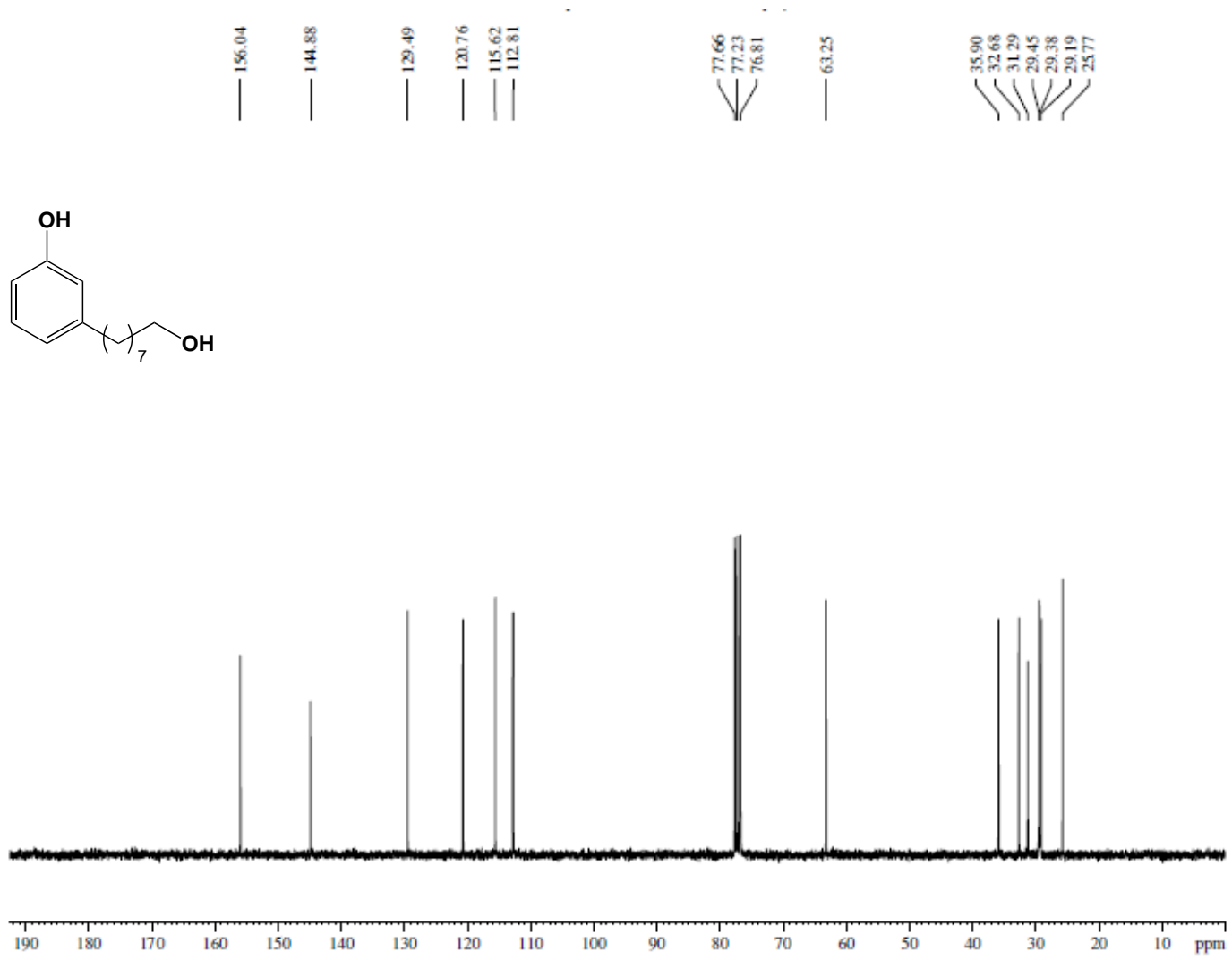
**ANEXO 7: Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ): 3-(8-hidroxiocetil)fenol (**78**)**



**ANEXO 7.1: Expansão do espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) na região dos aromáticos: 3-(8-hidroxiocetil)fenol (78)**



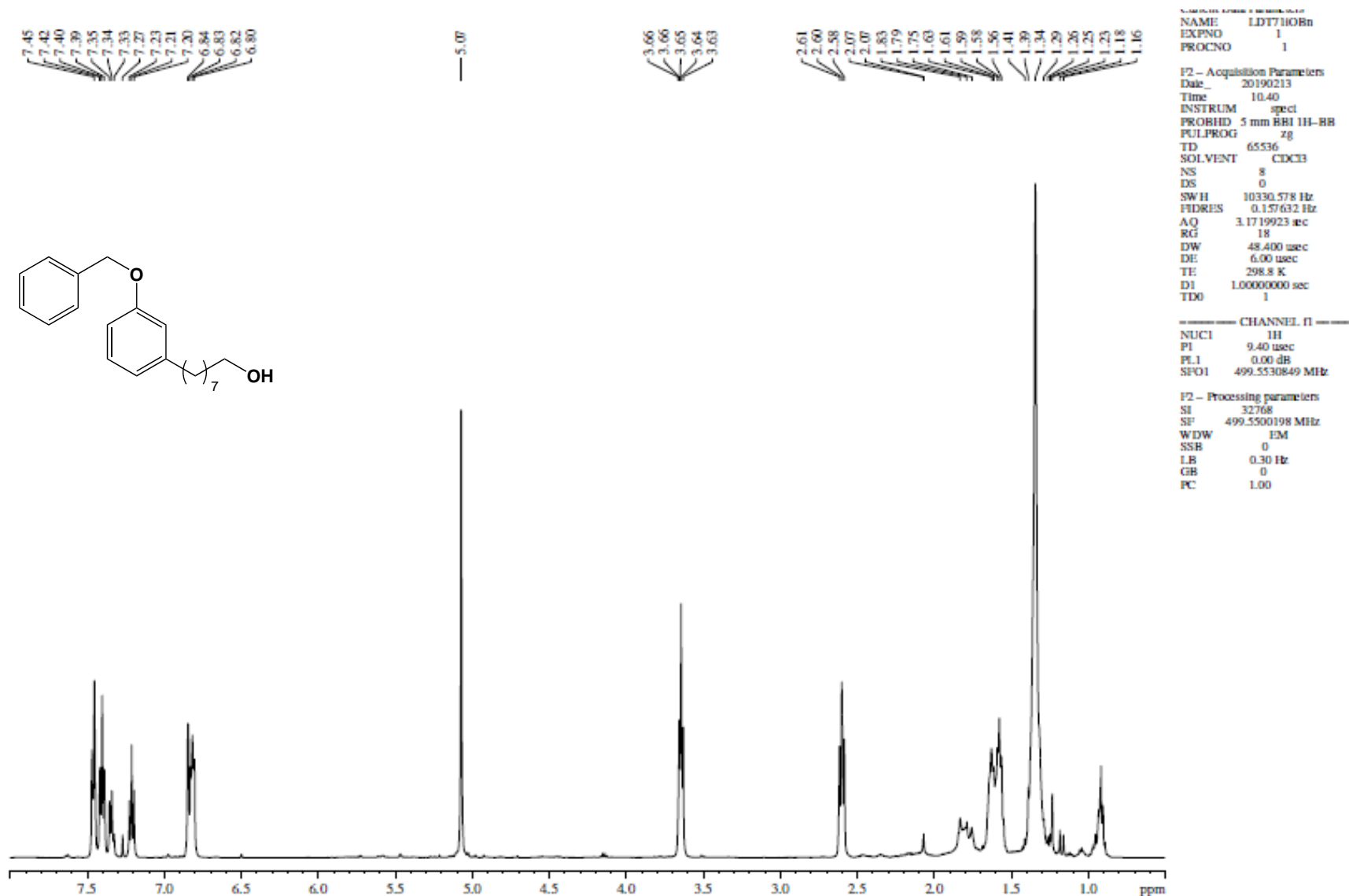
**ANEXO 8: Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ): : 3-(8-hidroxiocetil)fenol (78)**



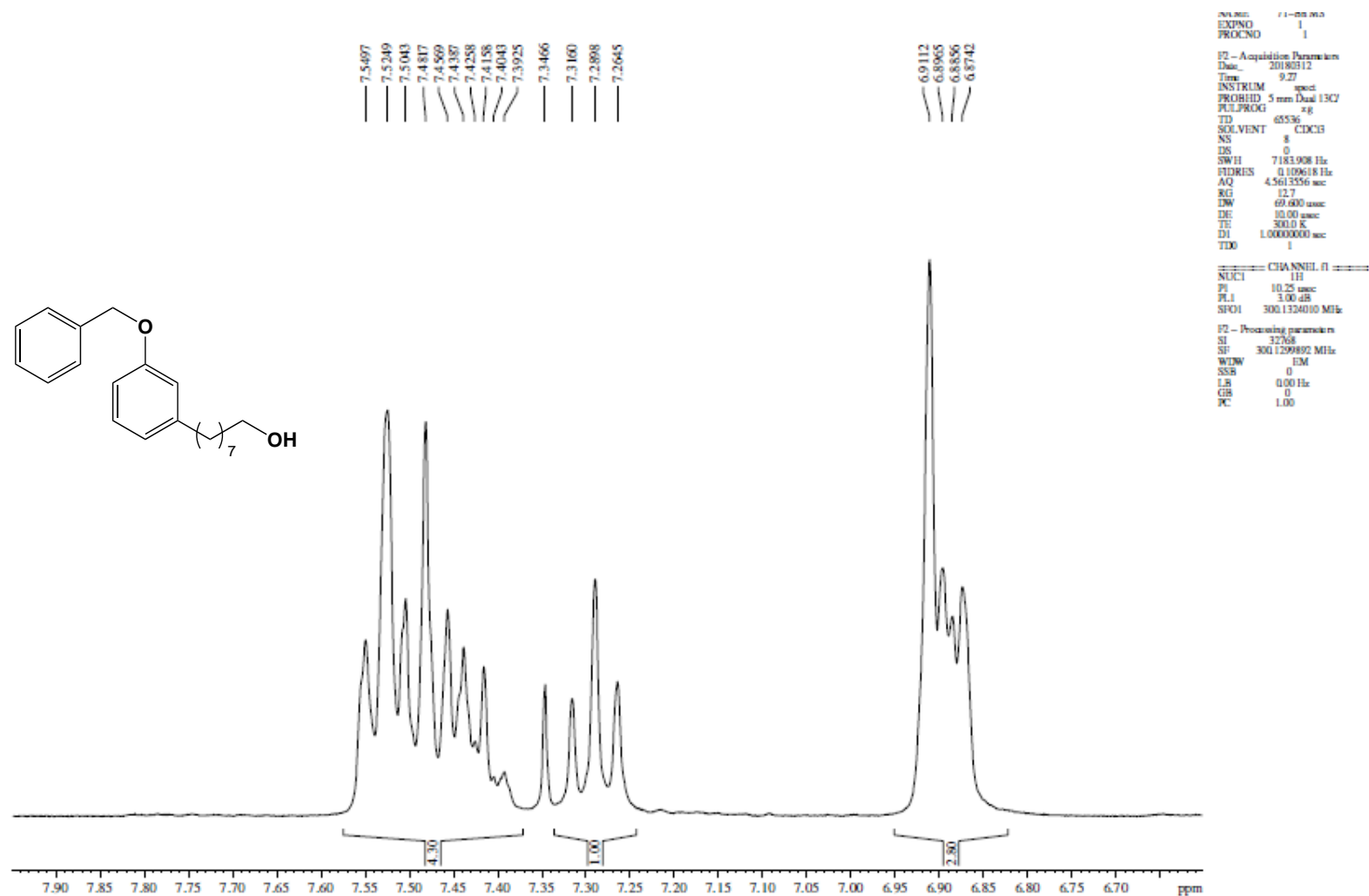
```

===== CHANNEL f1 =====
NAME      1471
EXPNO     2
PROCNO    1
F2 - Acquisition Parameters
Date_     20140211
Time      11.01
INSTRUM   spect
PROBHD    5 mm Dsd 13C
PULPROG   zgpg30
TD         65536
SOLVENT   CDCl3
NS         256
DS         0
SWH        17985.611 Hz
FIDRES     0.274439 Hz
AQ         1.8219208 sec
RG         327.68
FWS        27.800 usec
DE         10.00 usec
TE         300.0 K
D1         1.0000000 sec
d11        0.0500000 sec
DELTA     0.89999998 sec
TD0        1
===== CHANNEL f2 =====
CPDPRG2   waltz16
NUC1       13C
PI         11.50 usec
PL1        3.00 dB
SFO1       75.4732953 MHz
===== CHANNEL f2 =====
CPDPRG2   waltz16
NUC2       1H
PCPD2     80.00 usec
PL2        3.00 dB
PL12       19.48 dB
PL13       19.48 dB
SFO2       300.1312005 MHz
F2 - Processing parameters
SI         327.68
SF         75.4677386 MHz
WDW        EM
SSB        0
LB         1.00 Hz
GB         0
PC         1.40
    
```

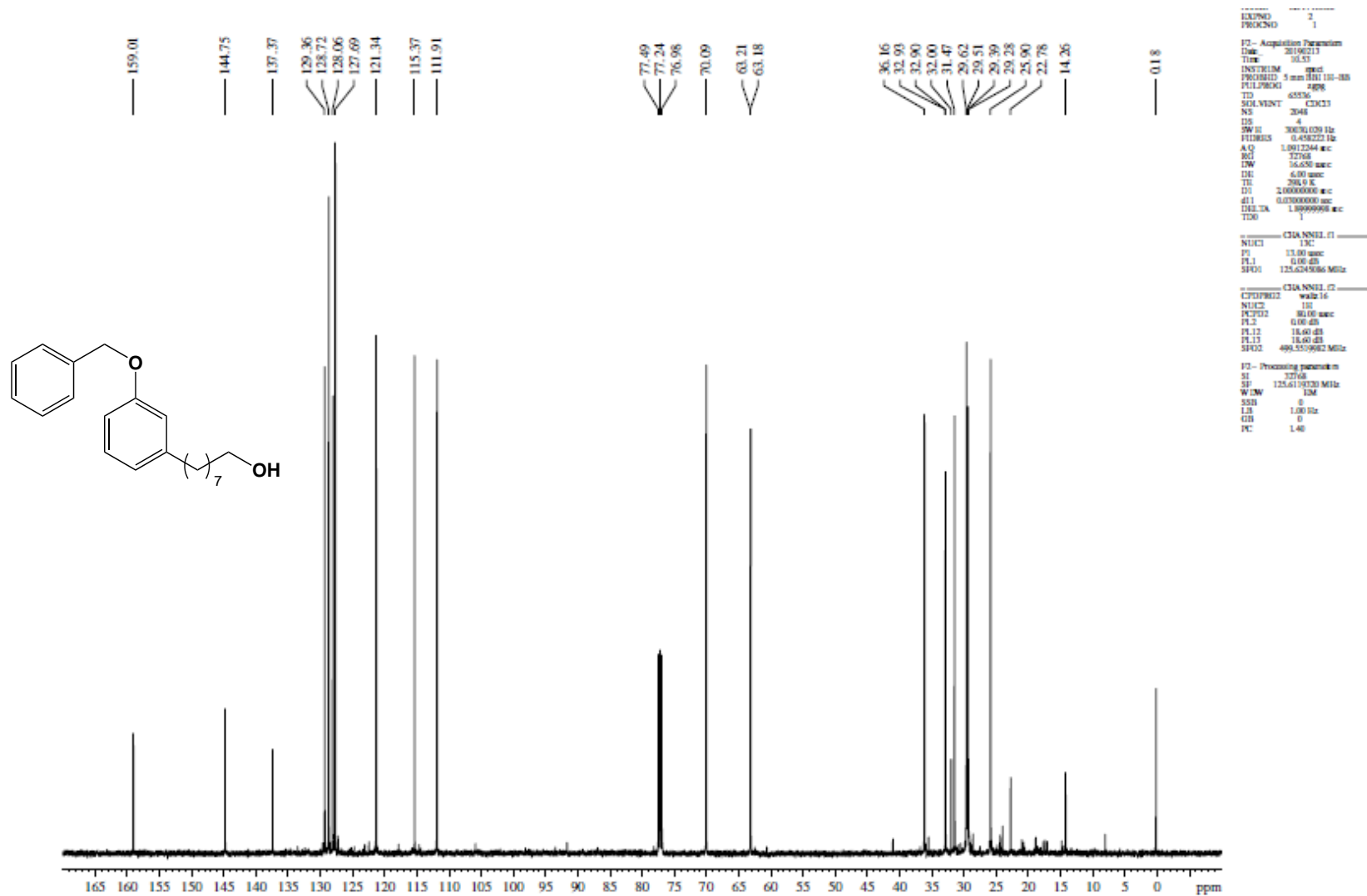
**ANEXO 9:** Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ): 8-(3-benzilóxifenil)octan-1-ol (**35**)



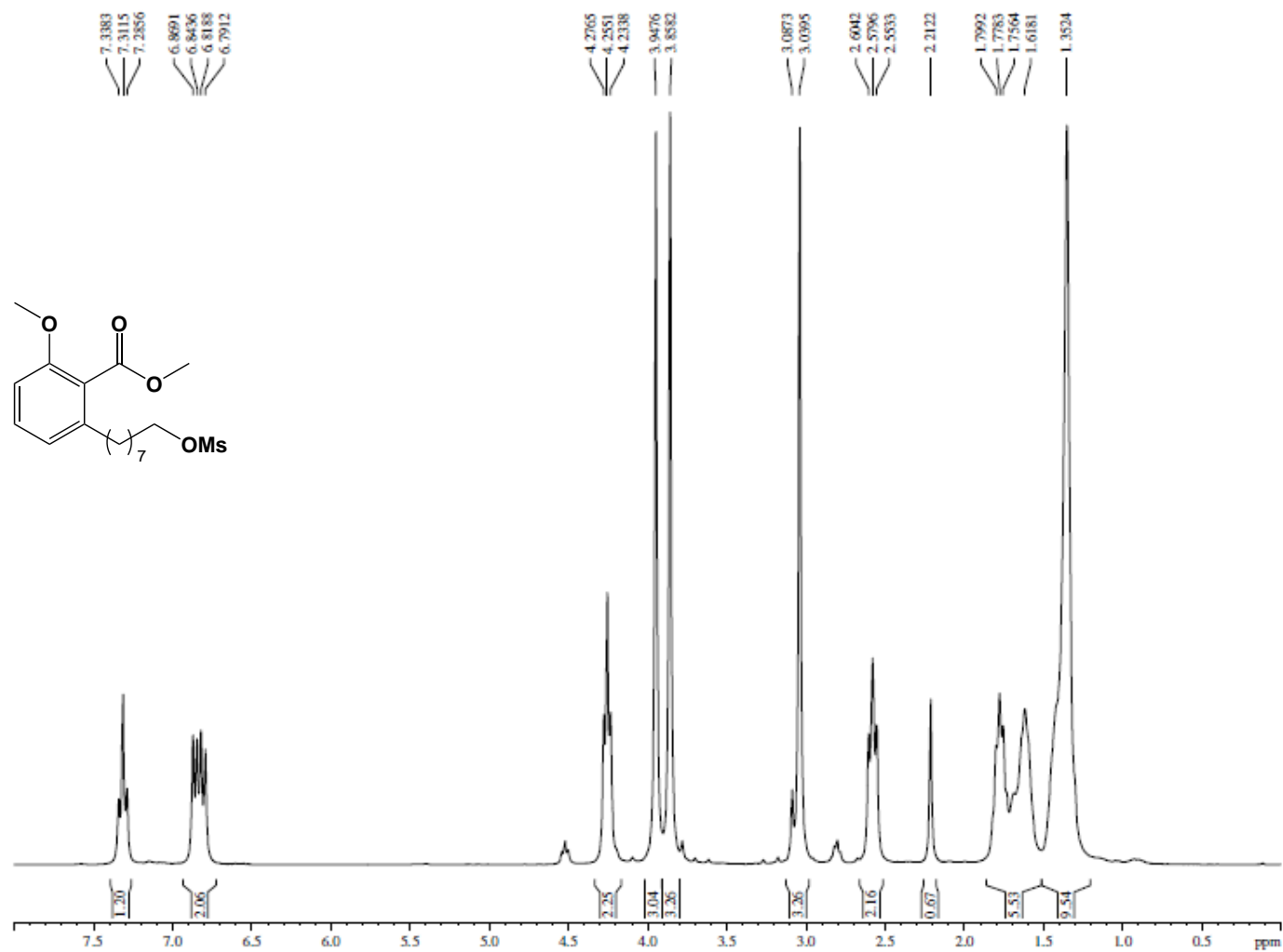
**ANEXO 9.1:** Expansão do espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) na região dos aromáticos: 8-(3-benzilófenil)octan-1-ol (**35**)



**ANEXO 10: Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ): : 8-(3-benzilóxfenil)octan-1-ol (35)**



**ANEXO 11: Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ): 2-Metóxi-6-[8-metilsulfonil]octil]benzoato de metila (37)**



```

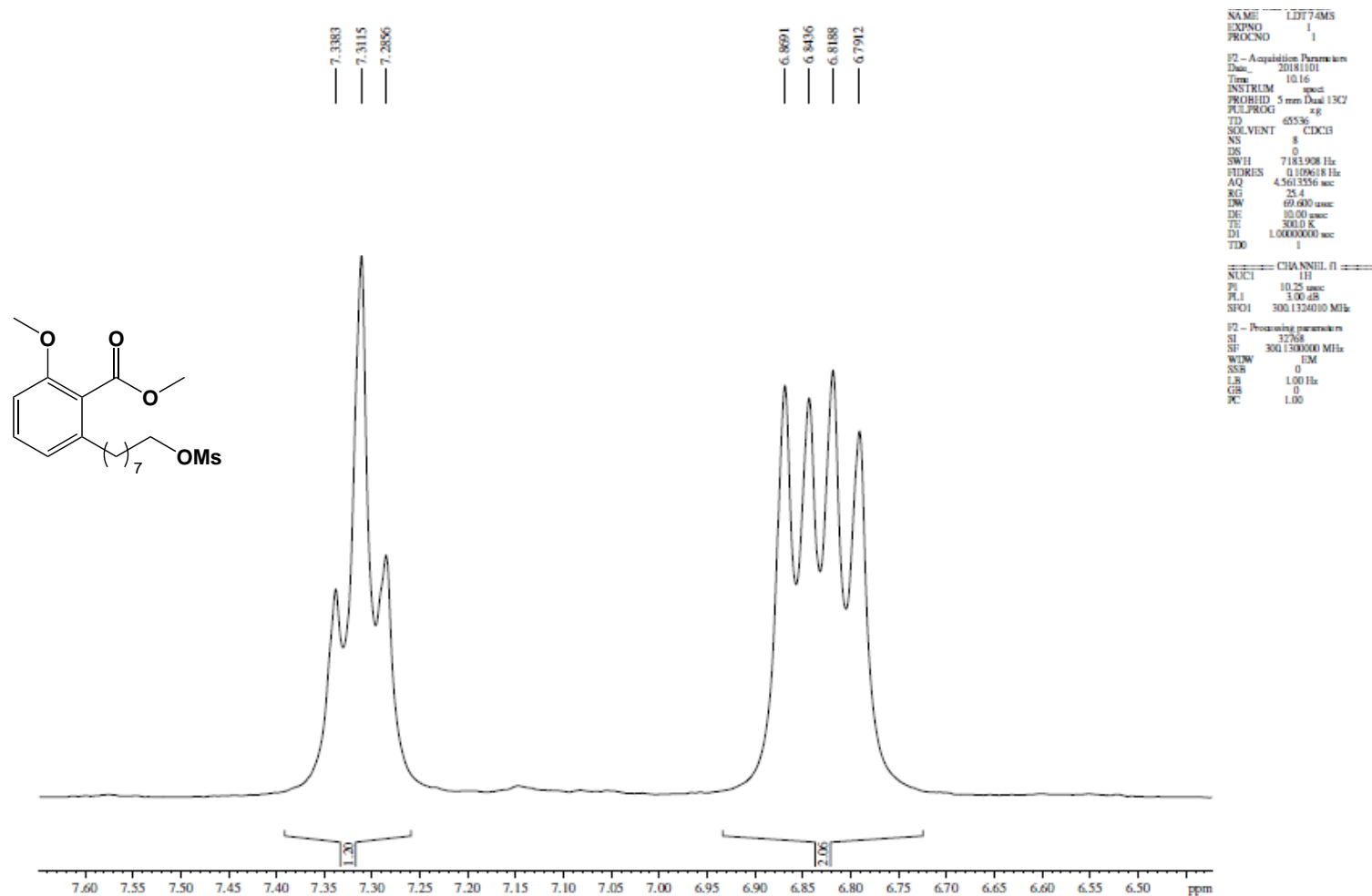
===== CHANNEL f1 =====
NAME: 11111111
EXPNO: 1
PROCNO: 1

F2 - Acquisition Parameters
Date_ 20181101
Time 10.16
INSTRUM spect
PROBHD 5 mm Dual 13C/
PULPROG zg
TD 65536
SOLVENT CDCl3
NS 8
DS 0
SWH 7183.908 Hz
FIDRES 0.109618 Hz
AQ 4.5613556 sec
RG 25.4
DW 69.600 usec
DE 10.00 usec
TE 300.0 K
D1 1.0000000 sec
TD0 1

===== CHANNEL f1 =====
NUC1 131
P1 10.25 usec
PL1 3.00 dB
SFO1 300.1324010 MHz

F2 - Processing parameters
SI 32768
SF 300.1300000 MHz
WDW EM
SSB 0
LB 1.00 Hz
GB 0
PC 1.00
    
```

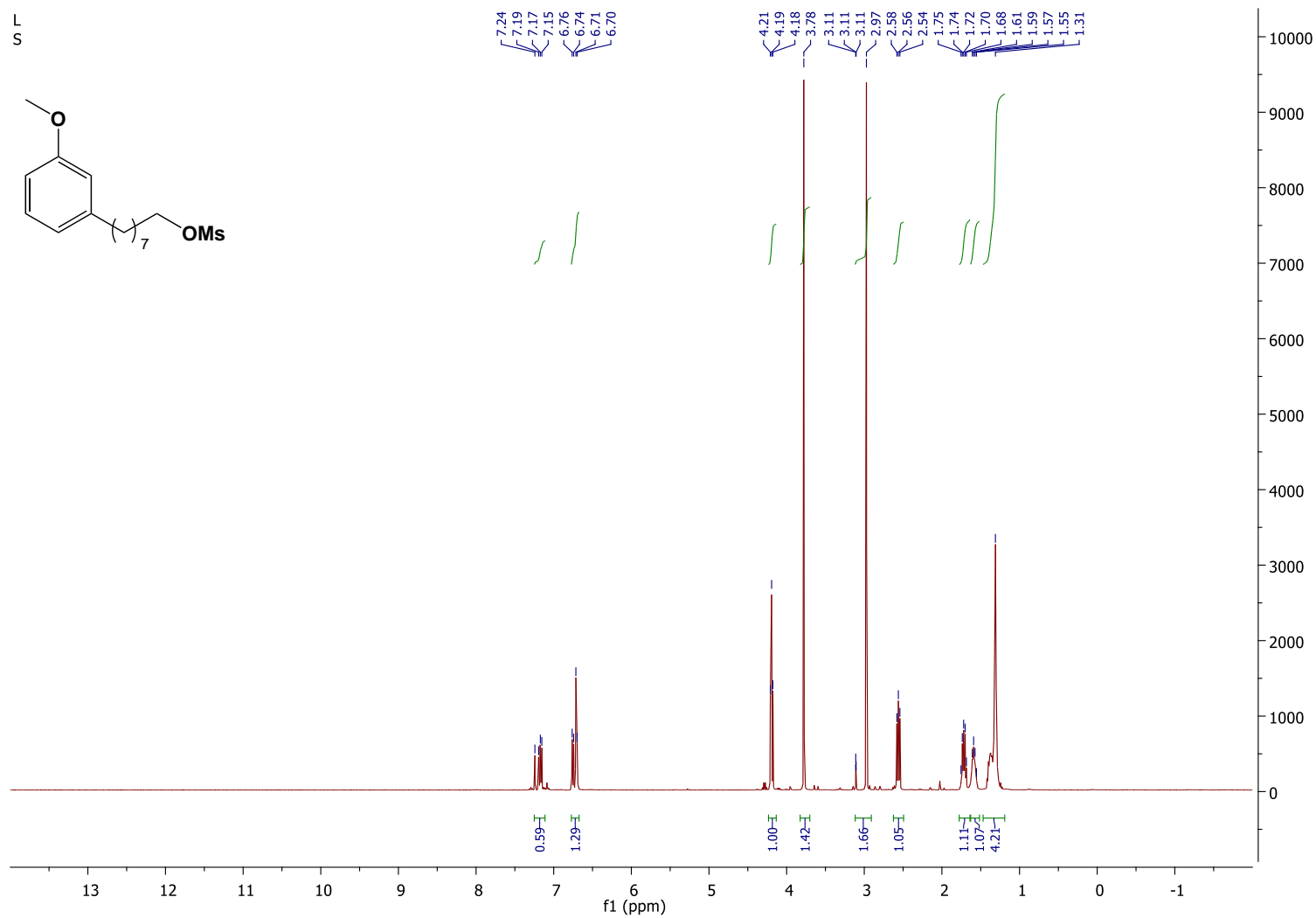
**ANEXO 11.1:** Expansão do espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) na região dos aromáticos: 2-Metóxi-6-[8-metilsulfonyloctil]benzoato de metila (**37**)



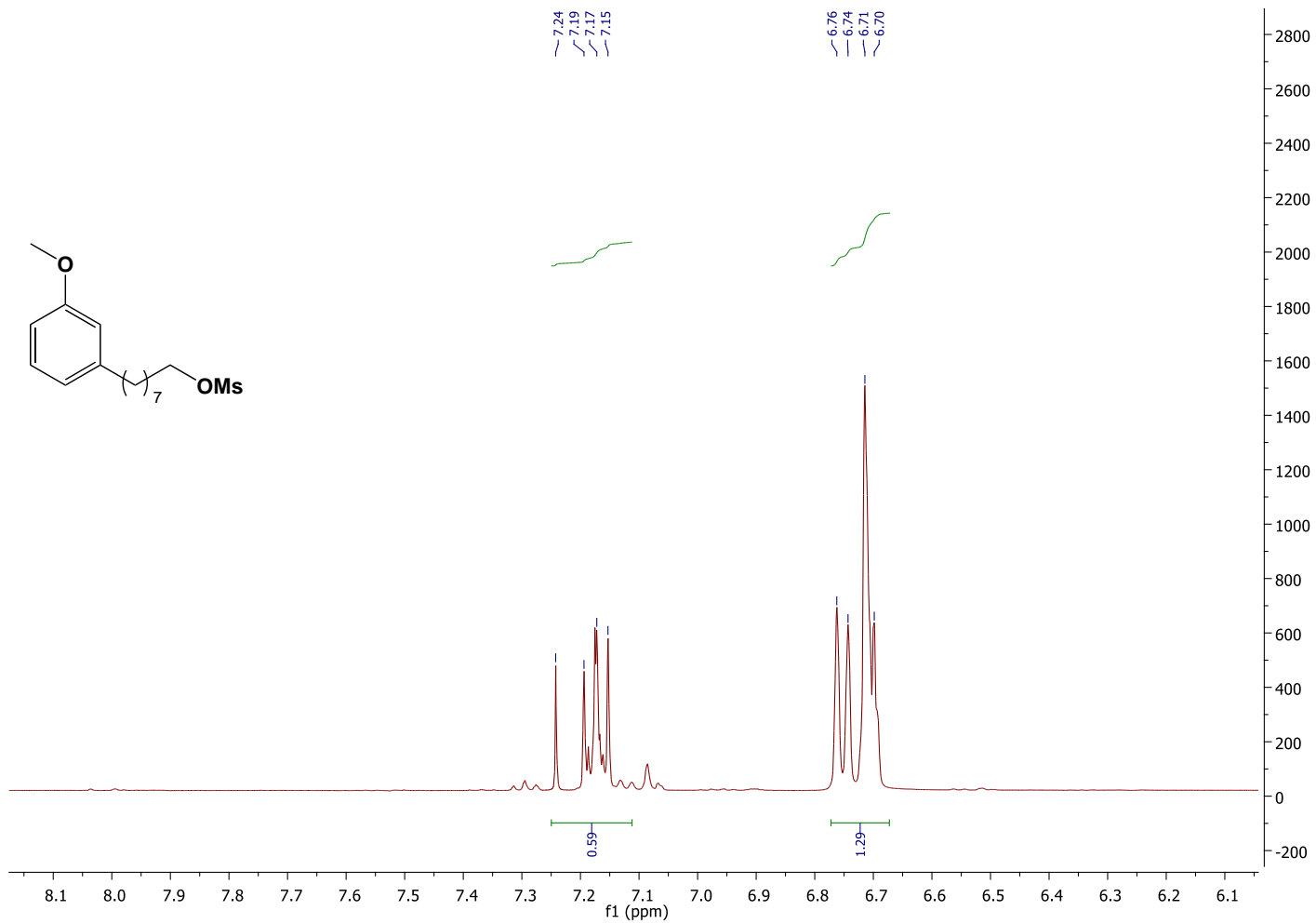




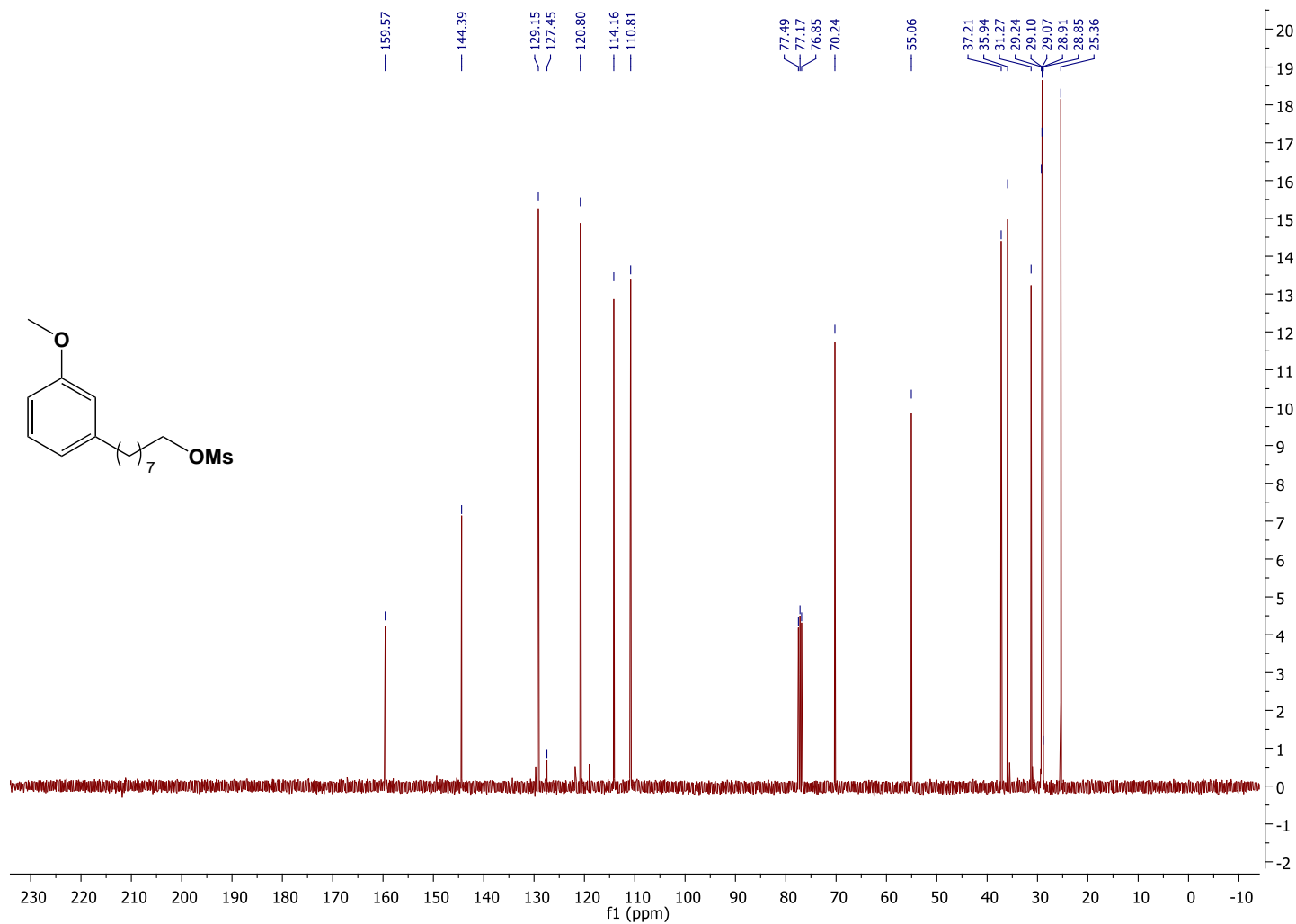
**ANEXO 13: Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ): 8-(3-metóxiifenil)octilmetanosulfonato (**38**)**



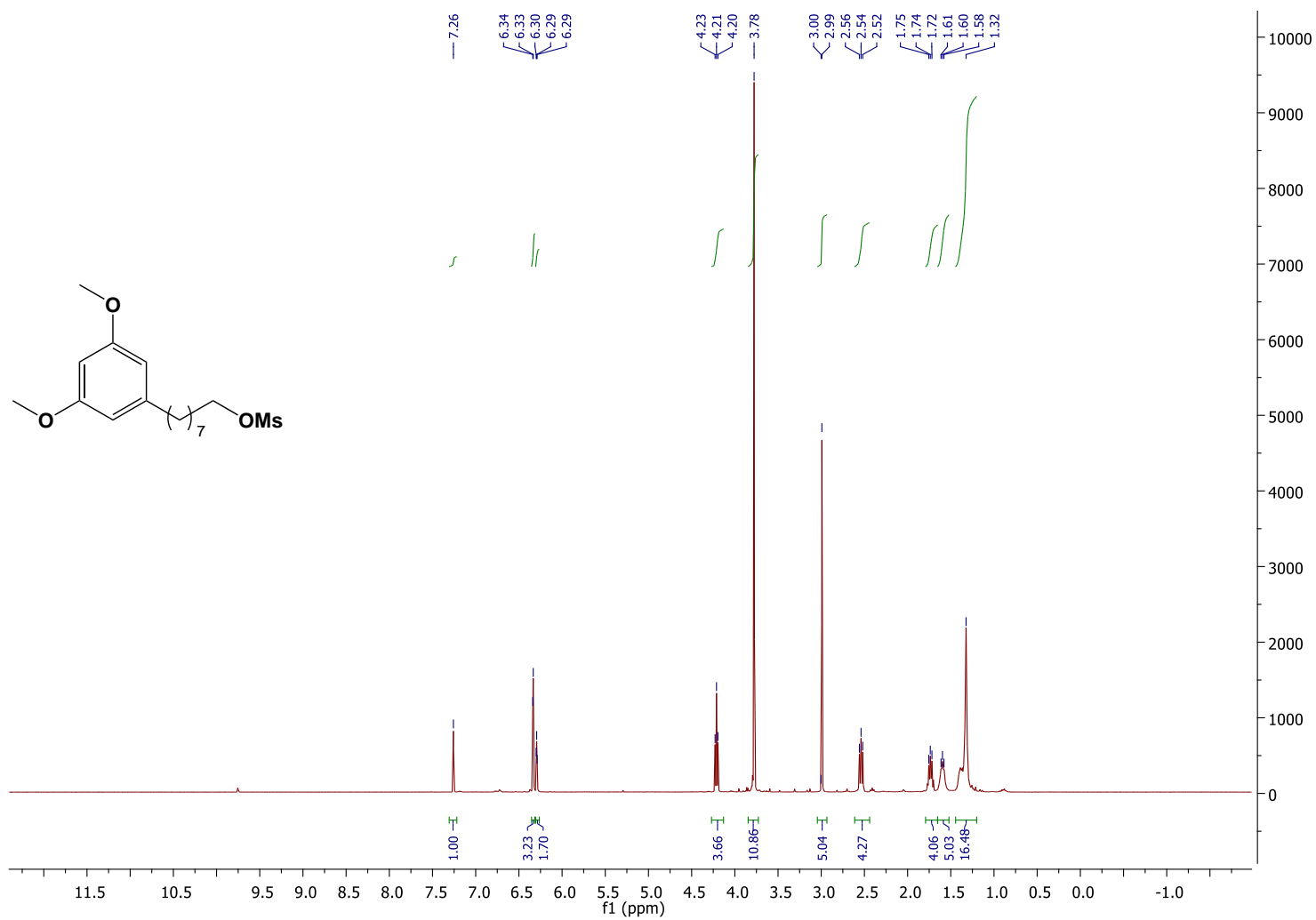
**ANEXO 13.1:** Expansão do espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) na região dos aromáticos: 8-(3-metóxfenil)octilmetanosulfonato  
(38)



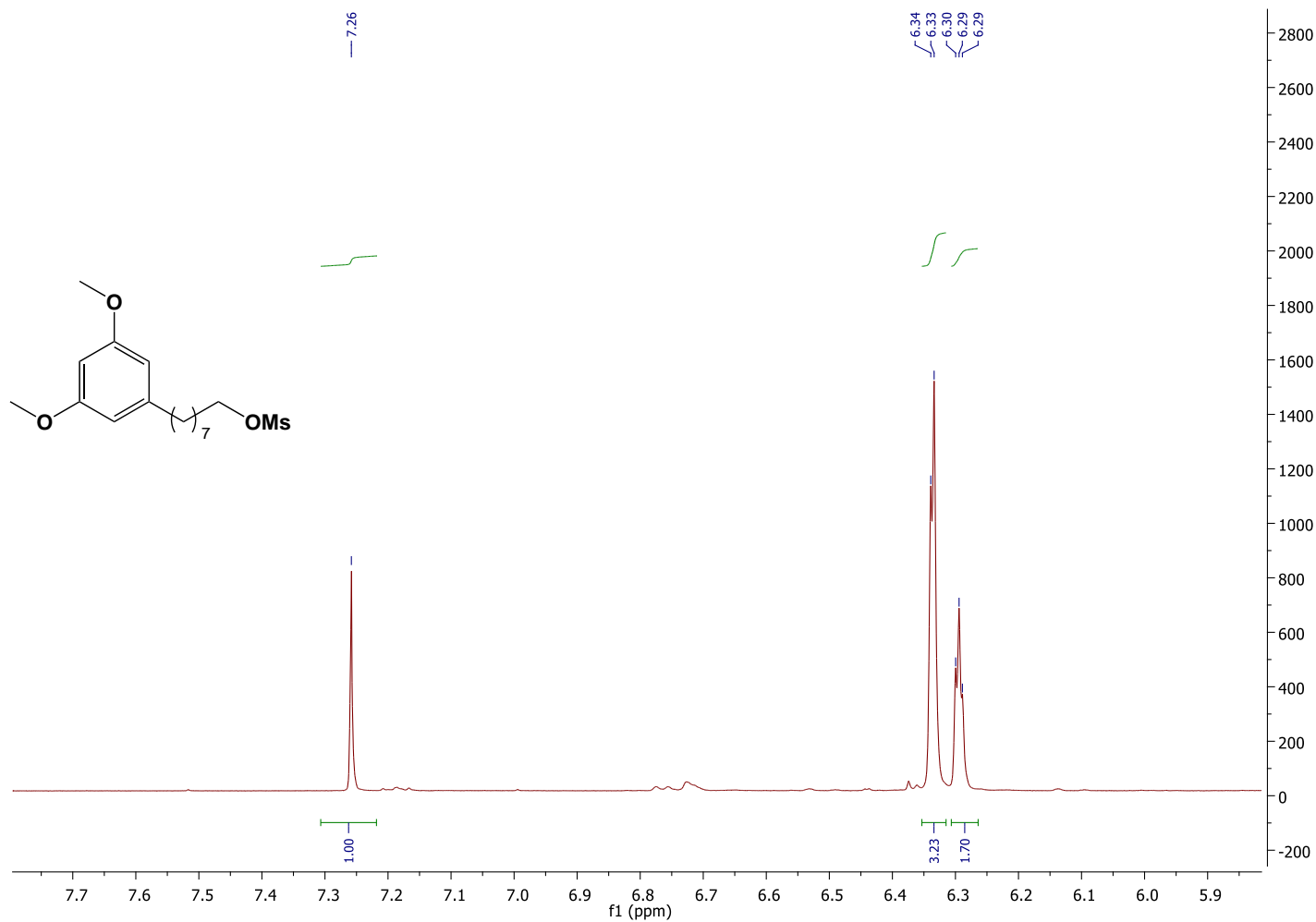
**ANEXO 14: Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ): 8-(3-metóxifenil)octilmetanosulfonato (**38**)**



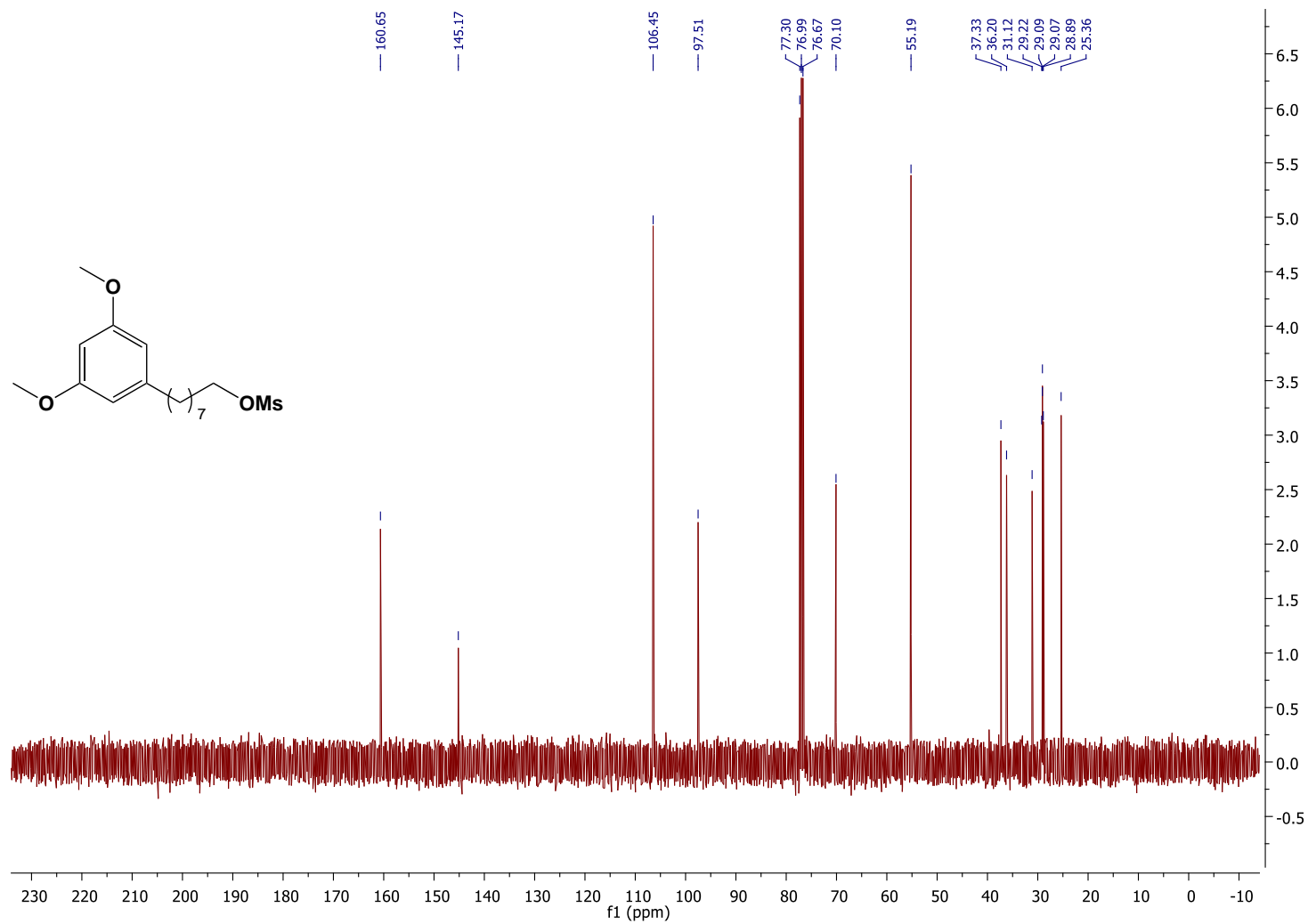
ANEXO 15: Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ): 8-(3,5-dimetóxicfenil)octilmetanossulfonato (**39**)



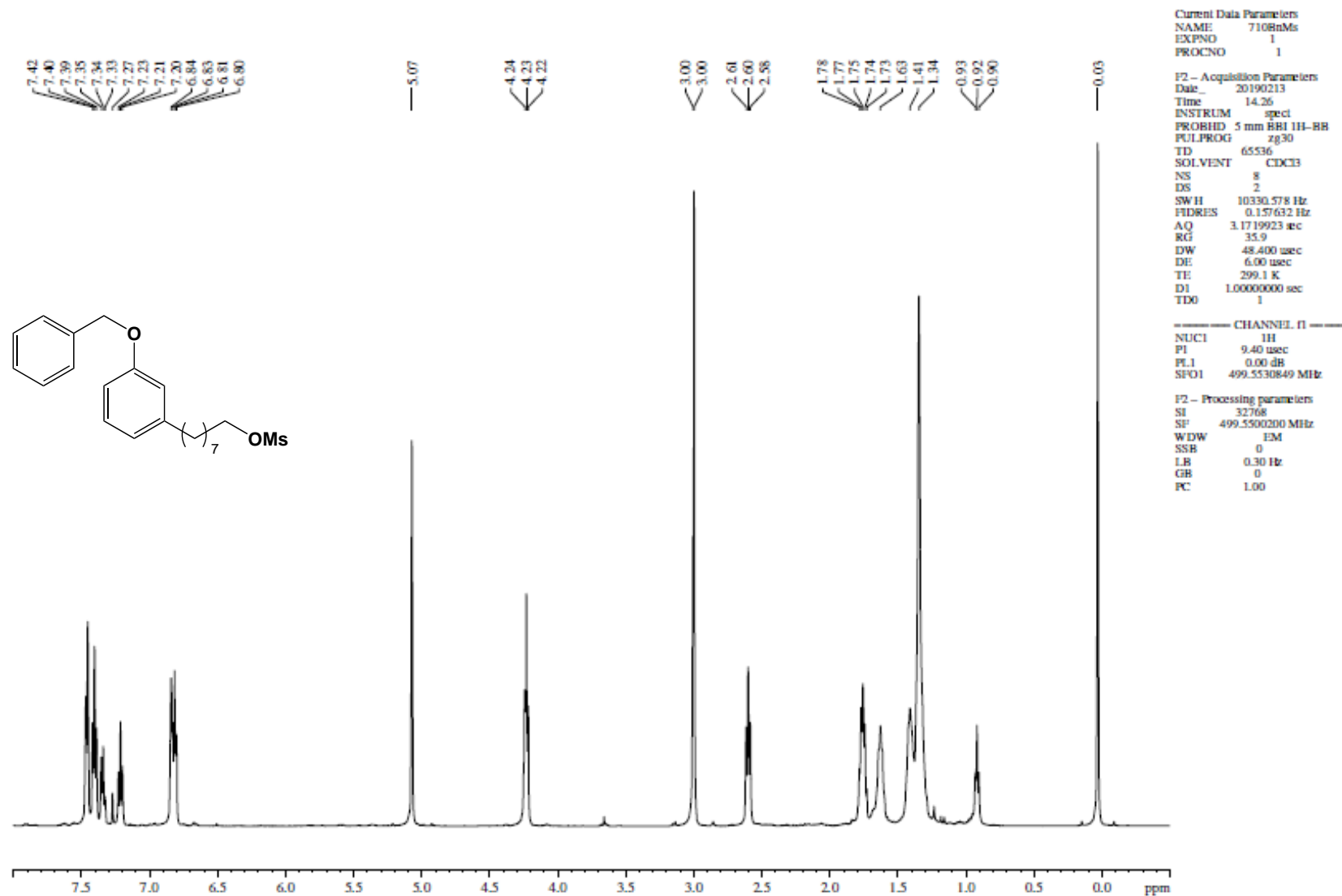
**ANEXO 15.1:** Expansão do espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) na região dos aromáticos: 8-(3,5-dimetóxiifenil)octilmetanossulfonato (**39**)



**ANEXO 16: Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ): 8-(3,5-dimetóxicfenil)octilmetanossulfonato (**39**)**

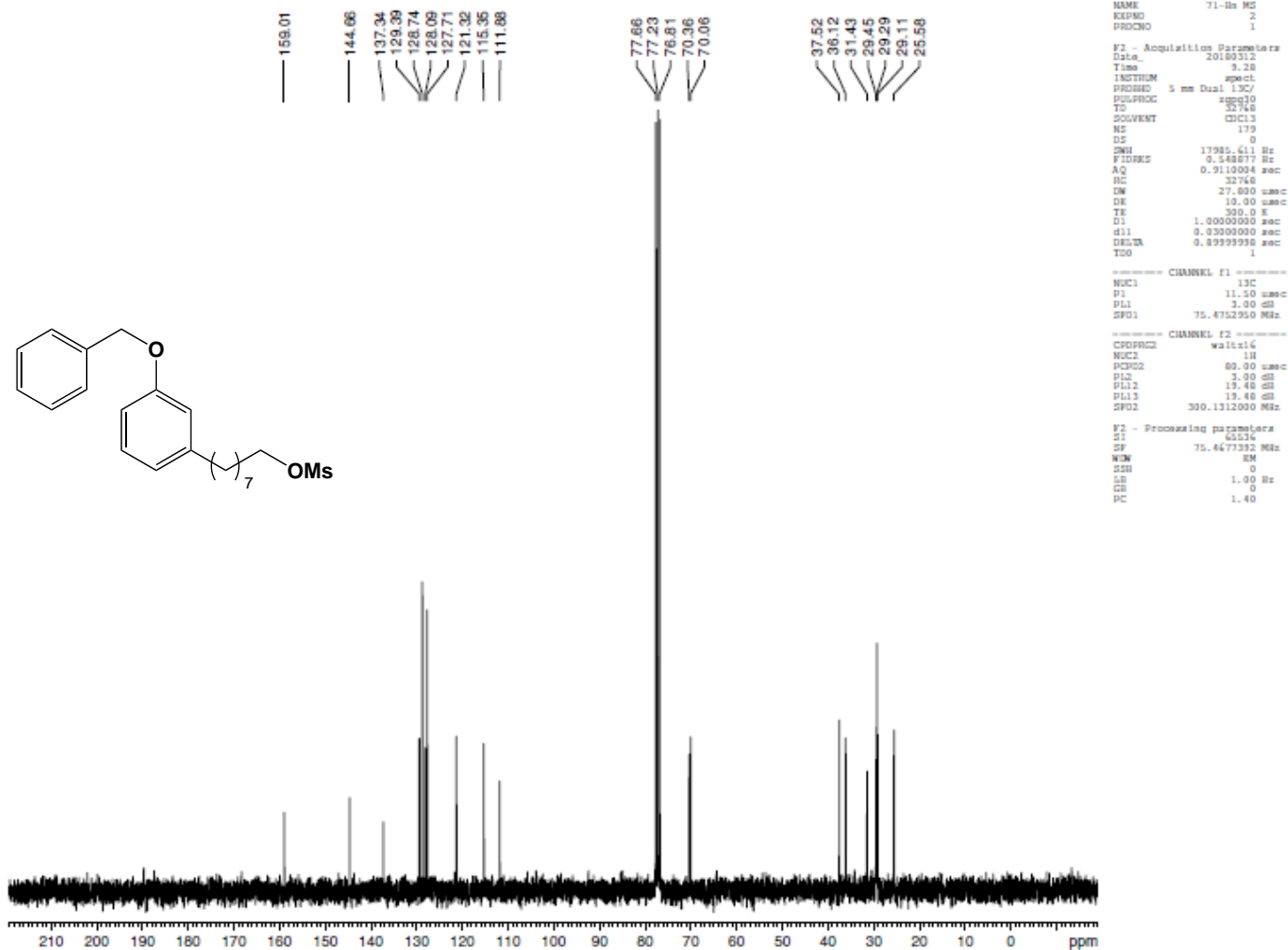


ANEXO 17: Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ): 8- (3-(Benziloxi)fenil)octilmetanosulfonato (**41**)

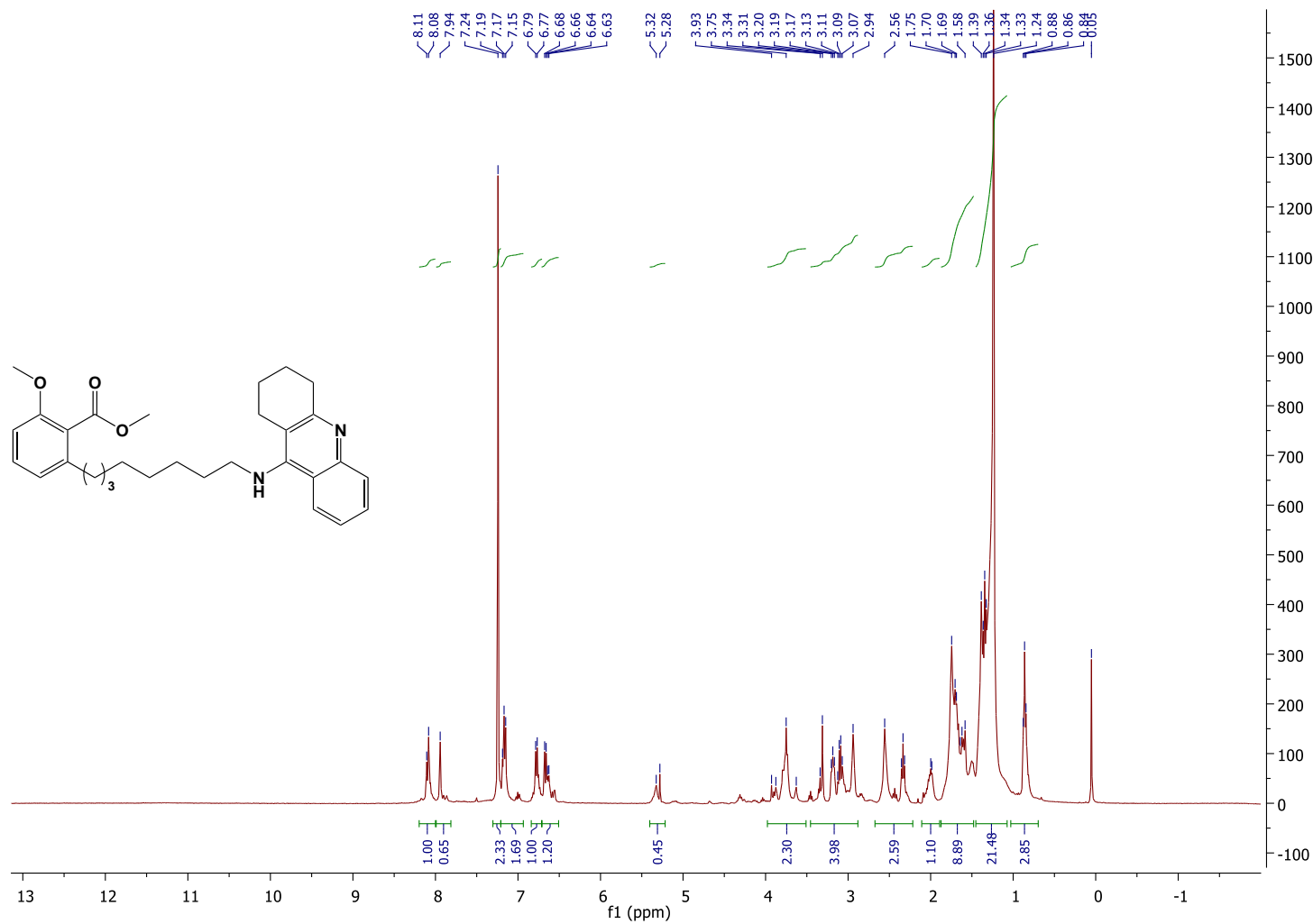




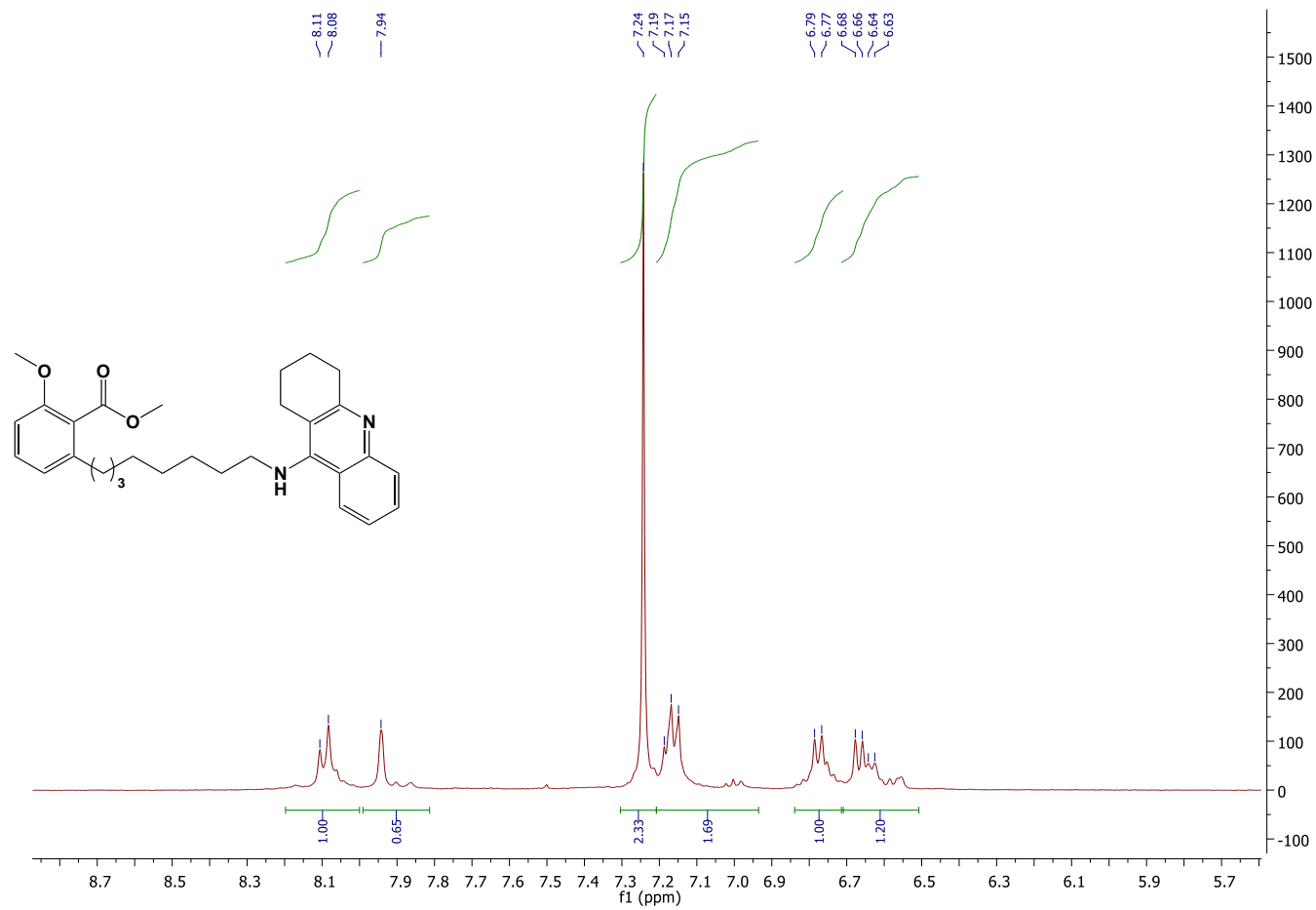
**ANEXO 18: Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ): 8- (3-(Benziloxi)fenil)octilmetanosulfonato (41)**



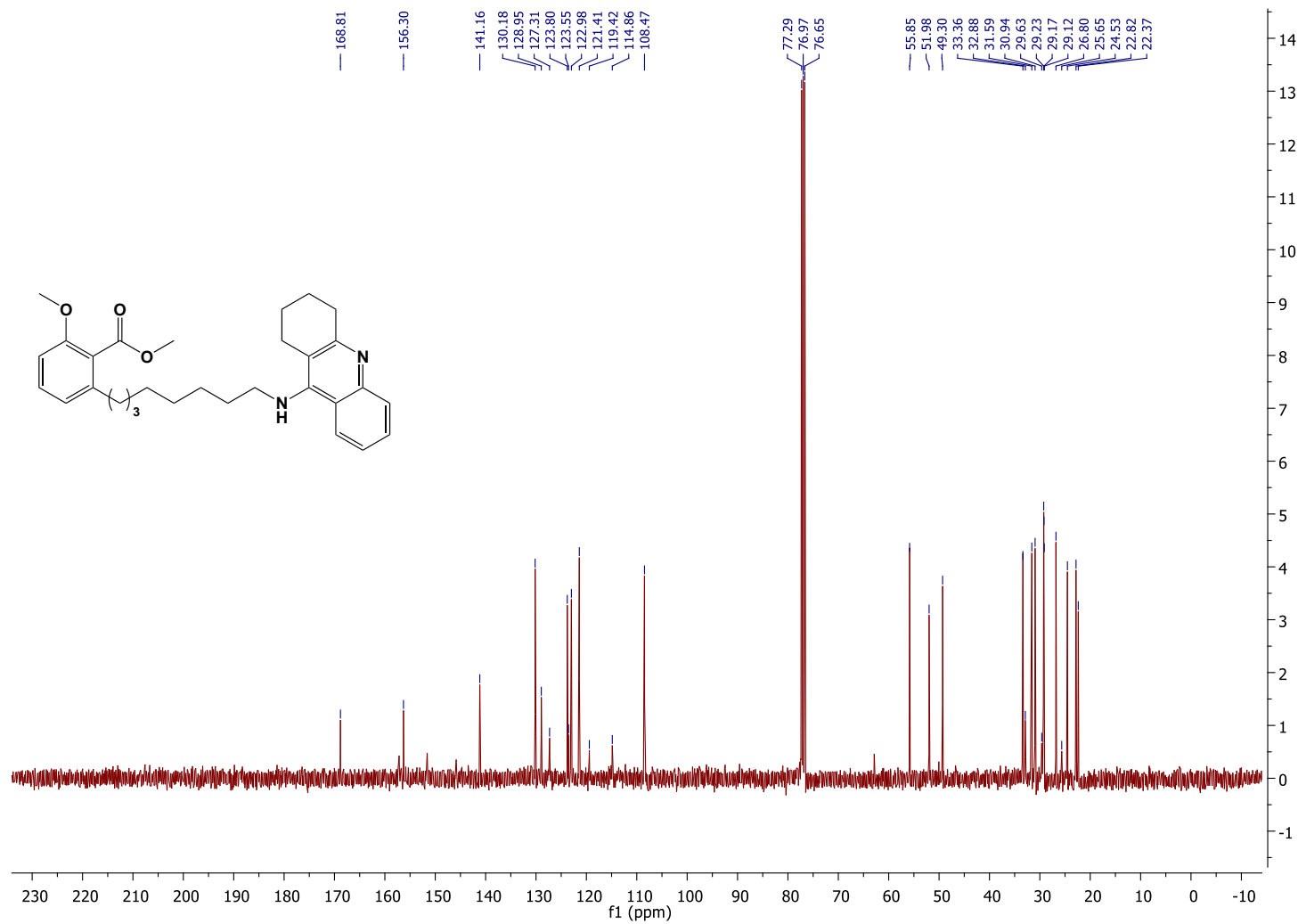
**ANEXO 19:** Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ): 2-Metóxi-6-(8-((1,2,3,4-tetraidroacridin-9-il)amino)octil)benzoato de metila (**43**)



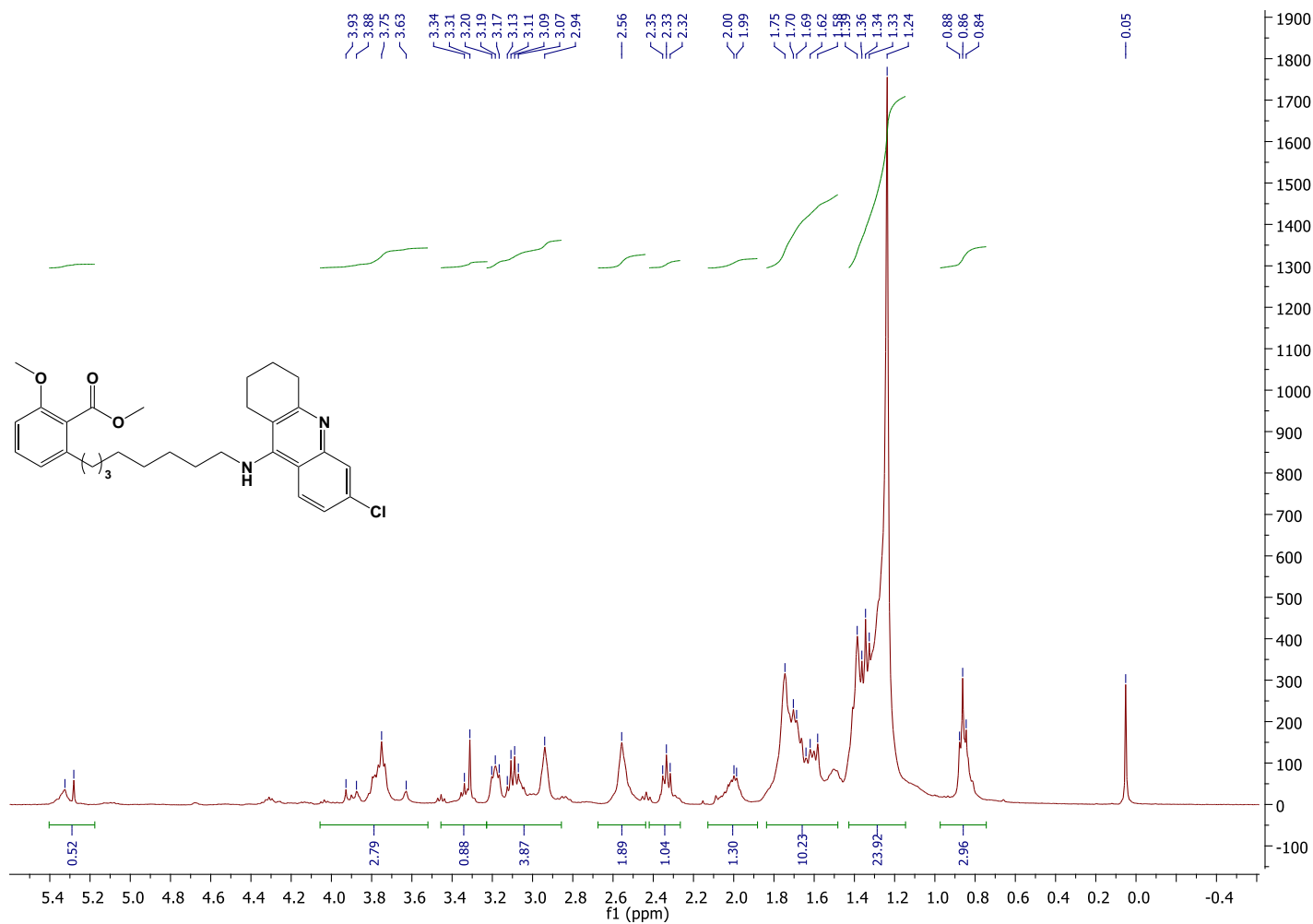
**ANEXO 19.1:** Expansão do espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) na região dos aromáticos: 2-Metóxi-6-(8-((1,2,3,4-tetraidroacridin-9-il)amino)octil)benzoato de metila (**43**)



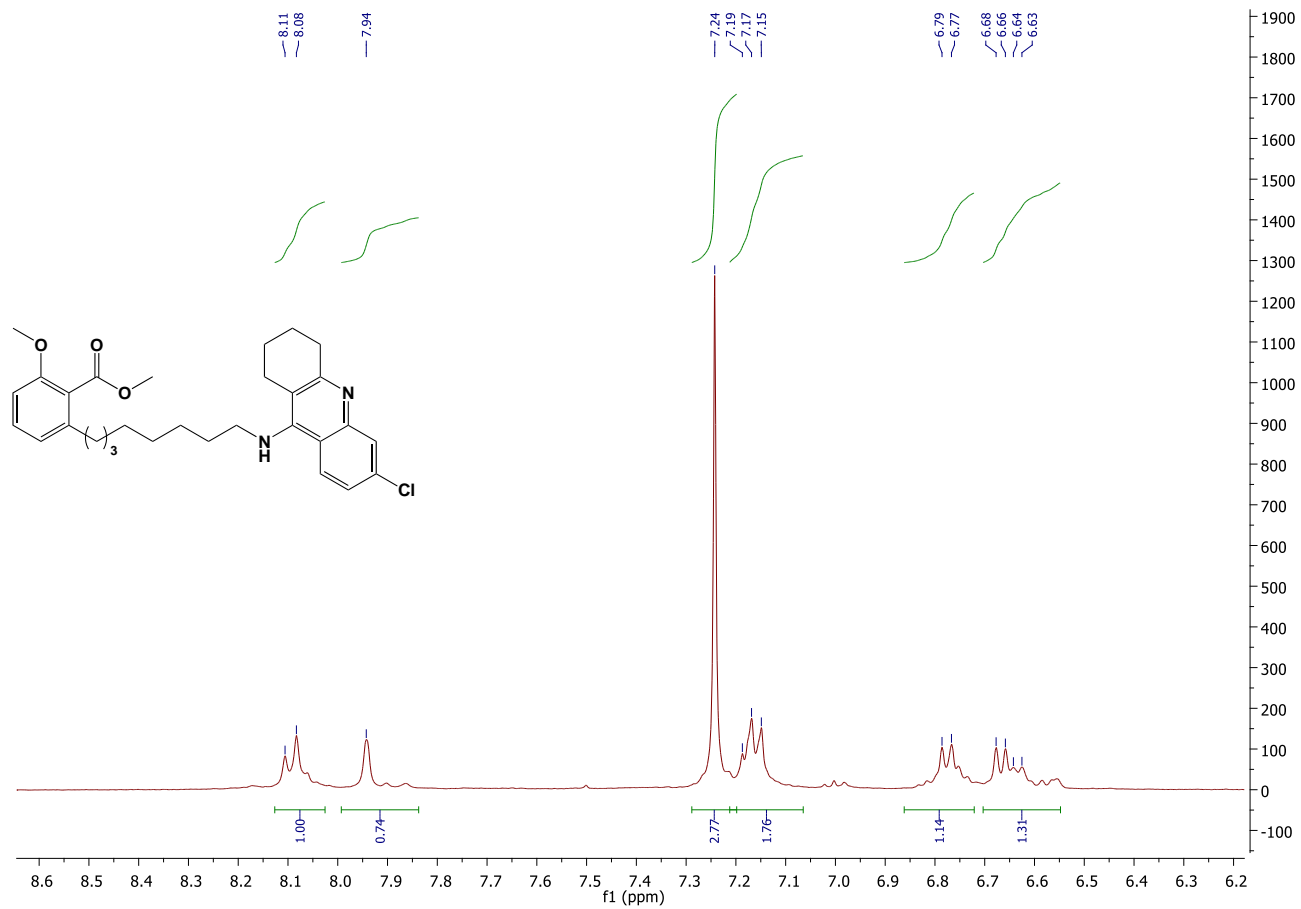
**ANEXO 20:** Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ): 2-Metóxi-6-(8-((1,2,3,4-tetraidroacridin-9-il)amino)octil)benzoato de metila (**43**)



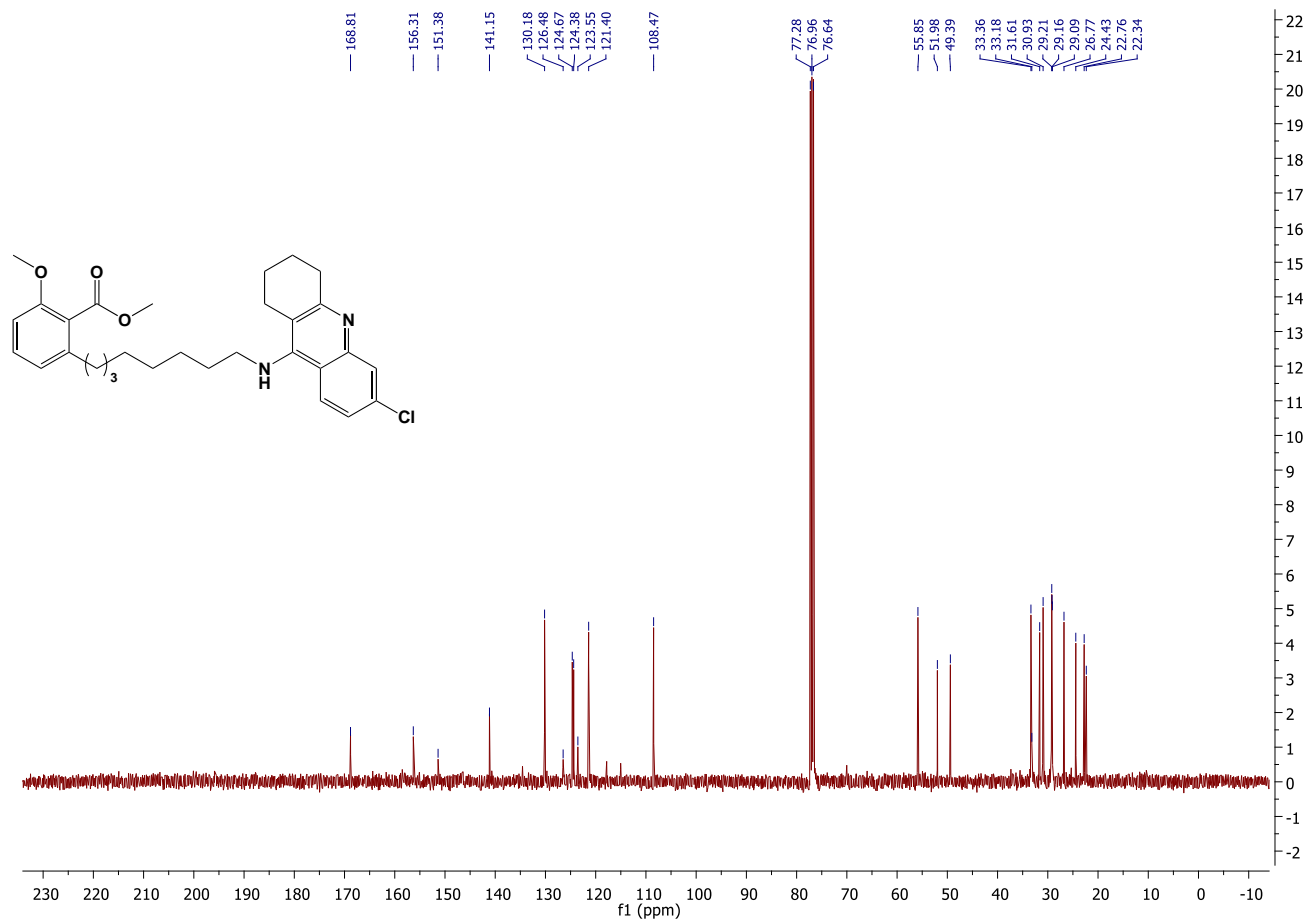
**ANEXO 21:** Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ): 2-(8-((6-chloro-1,2,3,4-tetrahydroacridin-9-il)amino)octil)-6-metoxibenzoato de metila (**44**)



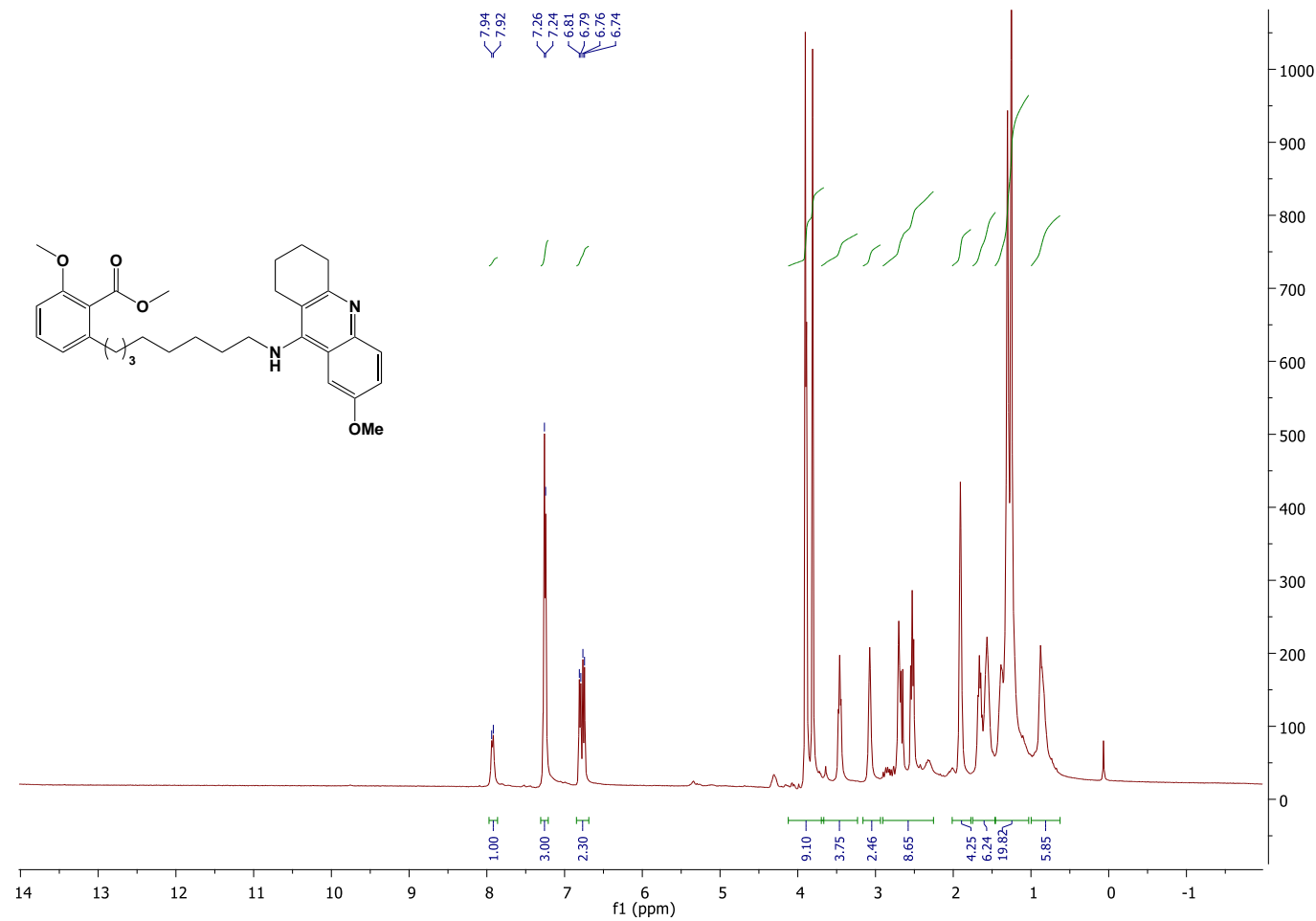
**ANEXO 21.1:** Expansão do espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) na região dos aromáticos: 2-(8-((6-cloro-1,2,3,4-tetraidroacridin-9-il)amino)octil)-6-metoxibenzoato de metila (**44**)



**ANEXO 22:** Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ): 2-(8-((6-chloro-1,2,3,4-tetrahydroacridin-9-il)amino)octil)-6-metoxibenzoato de metila (**44**)

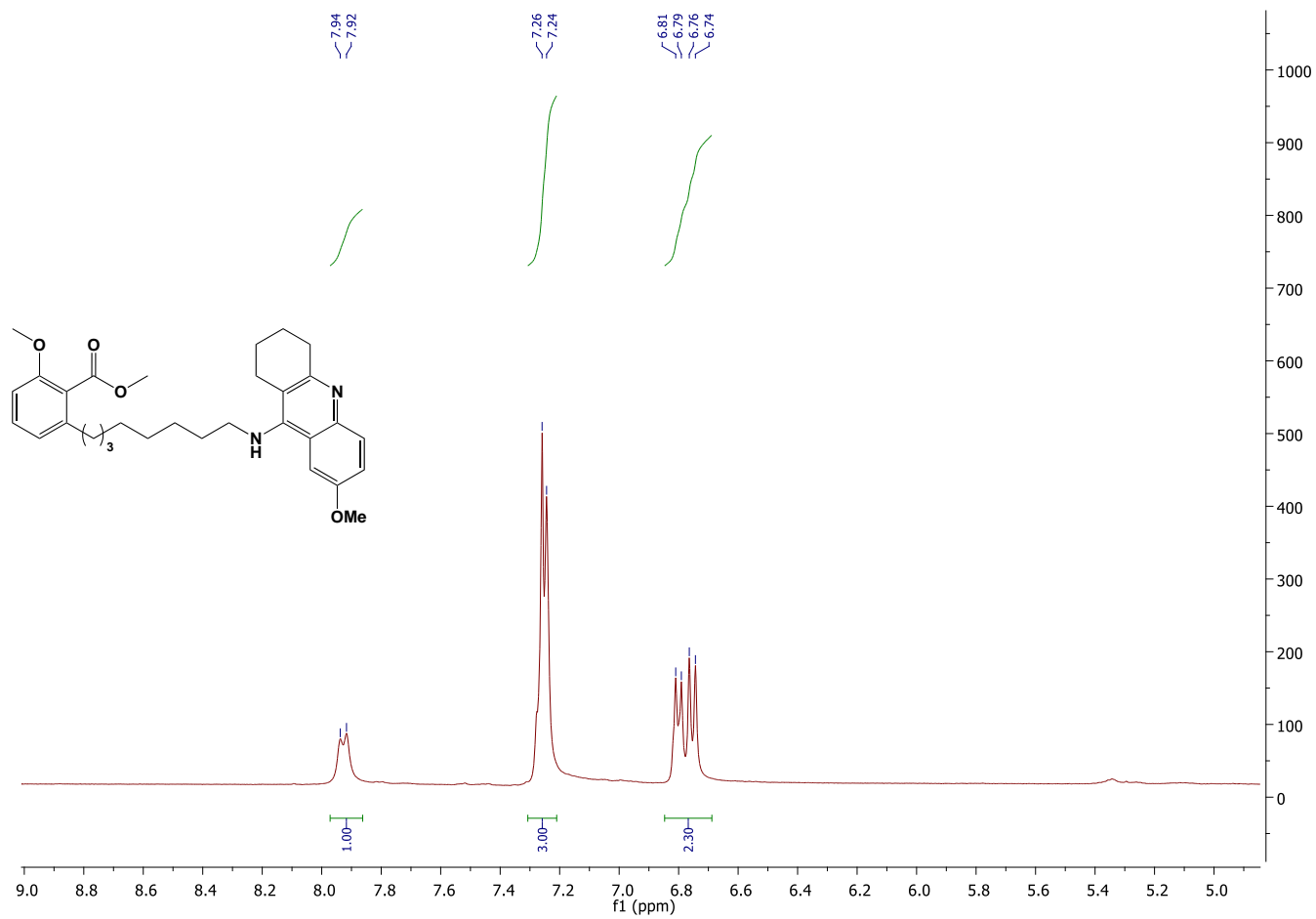


**ANEXO 23:** Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ): 2-(8-((7-metóxi-1,2,3,4-tetraidroacridin-9-il)amino)octil)-6-metoxibenzoato de metila (**45**)

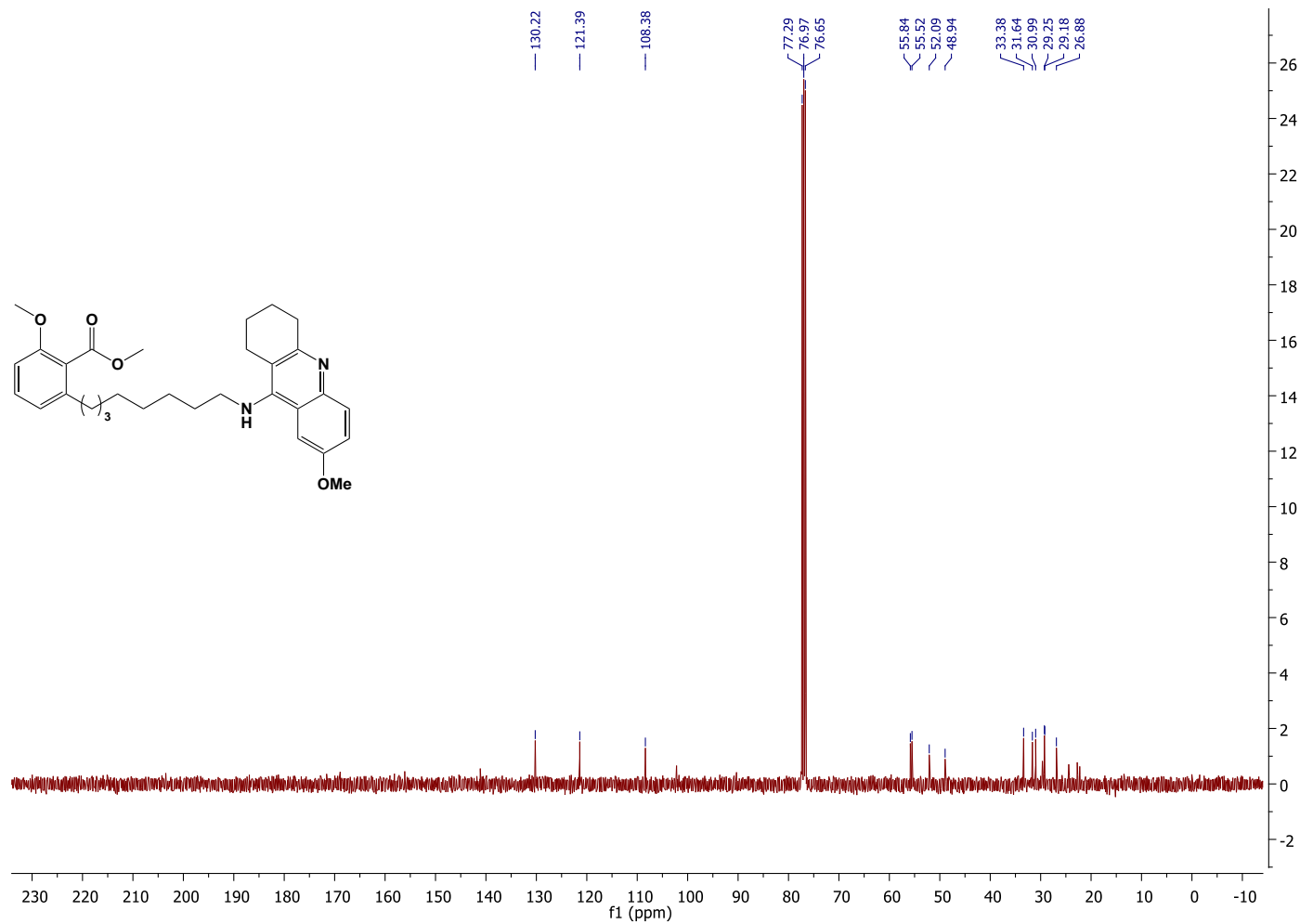




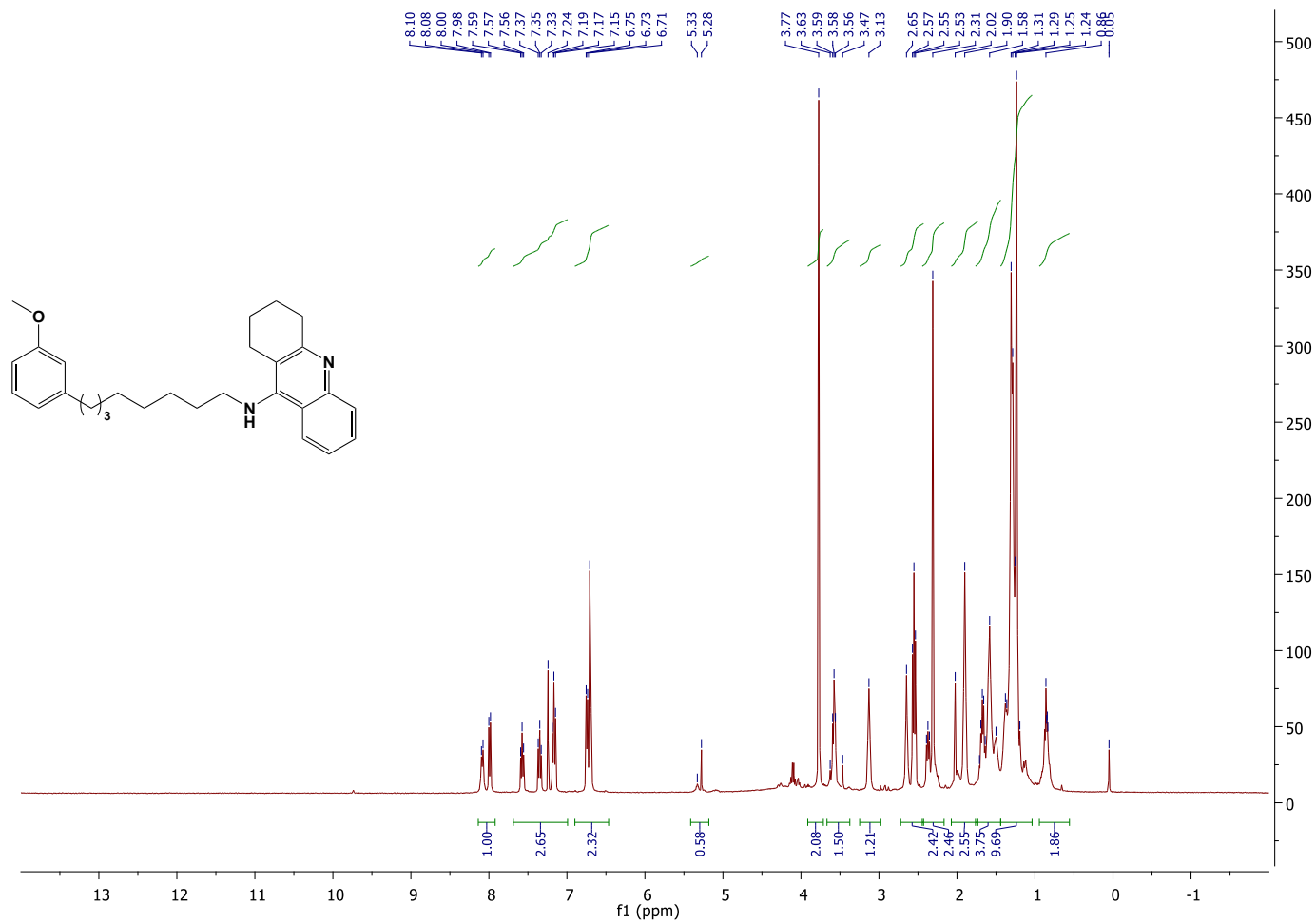
**ANEXO 23.1:** Expansão do espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) na região dos aromáticos: 2-(8-((7-metóxi-1,2,3,4-tetraidroacridin-9-il)amino)octil)-6-metoxibenzoato de metila (**45**)



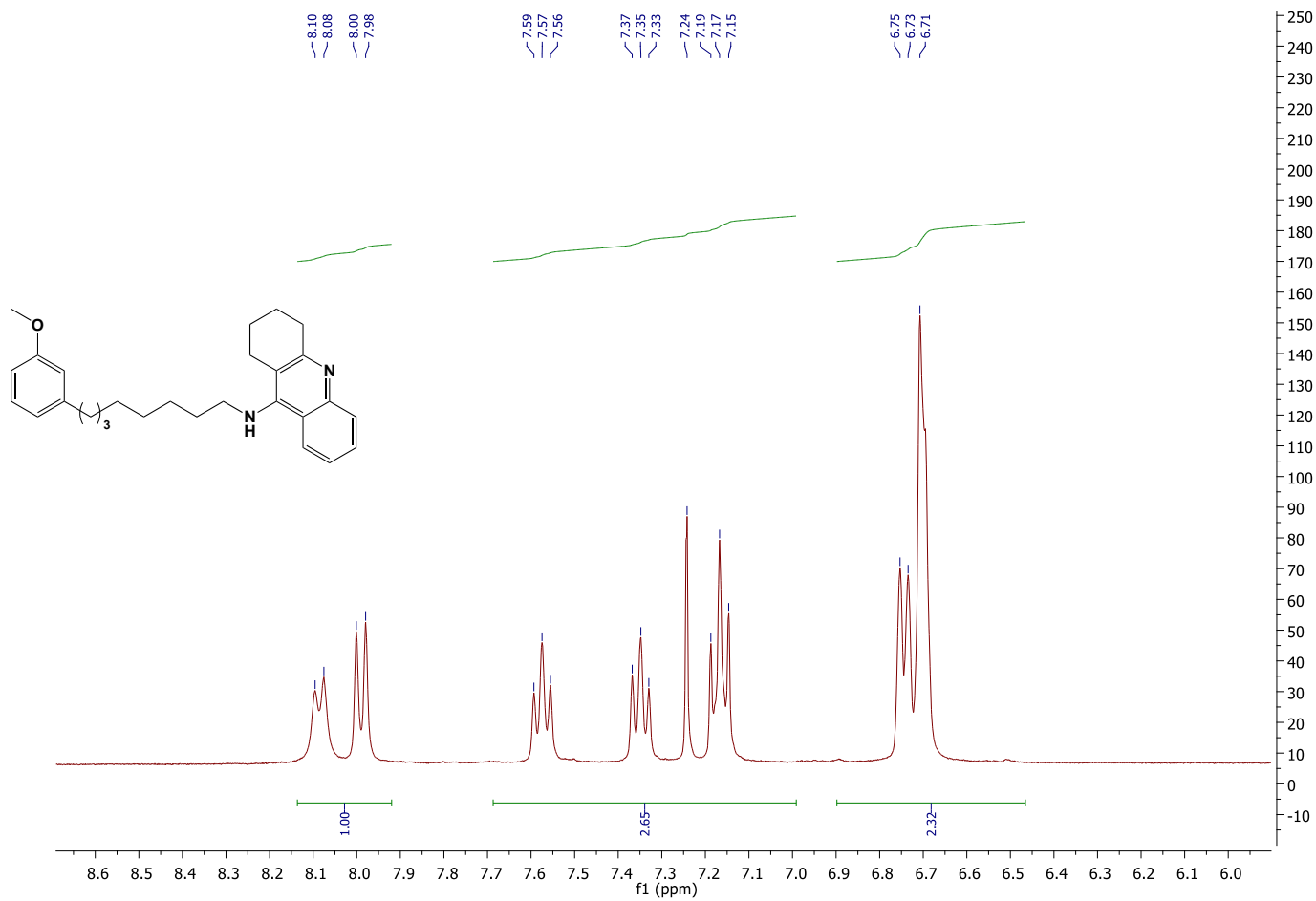
**ANEXO 24:** Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ): 2-(8-((7-metóxi-1,2,3,4-tetraidroacridin-9-il)amino)octil)-6-metoxibenzoato de metila (**45**)



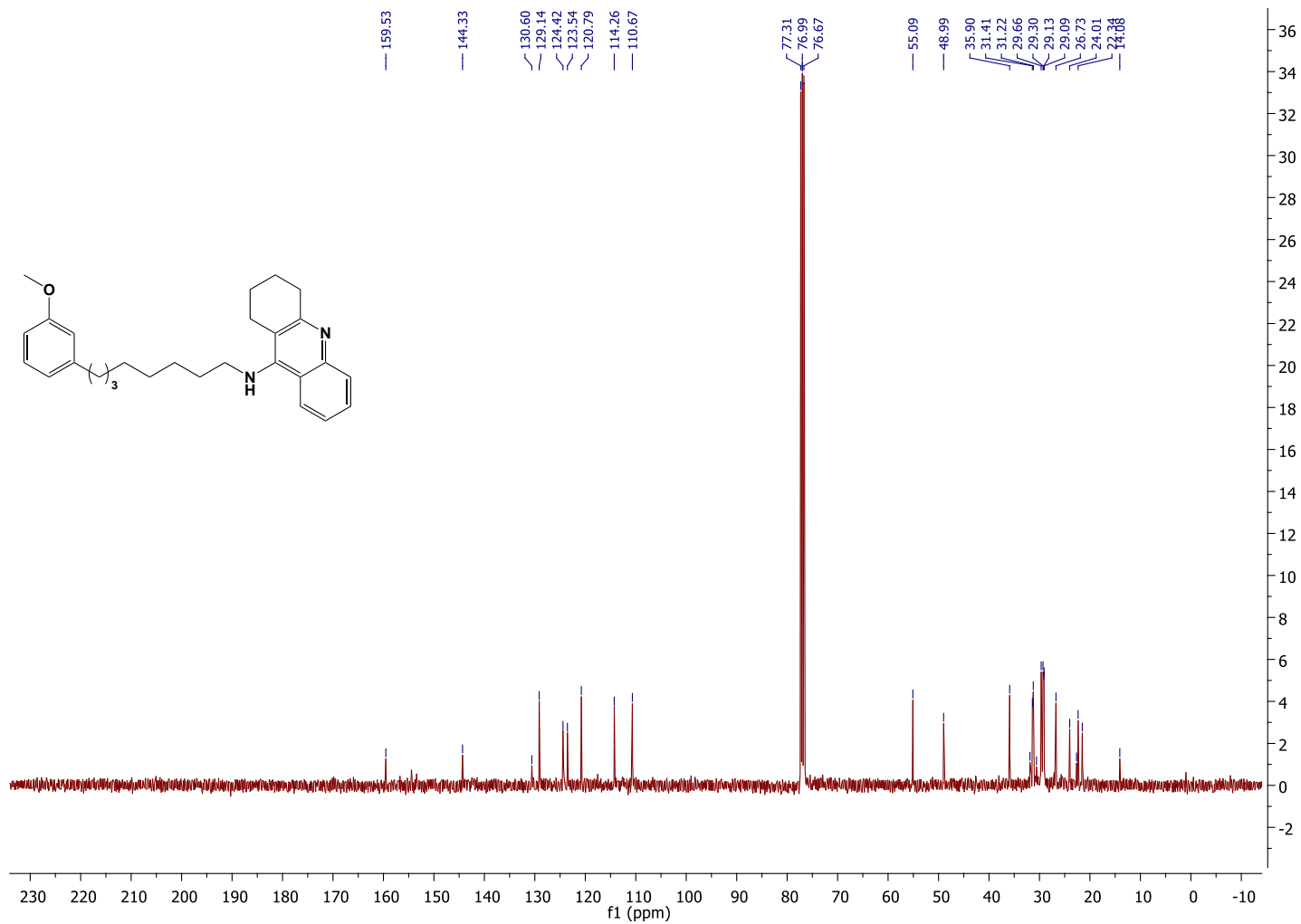
**ANEXO 25: Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ): N-(8-(3-metóxi)fenil)octil)-1,2,3,4-tetraidroacridin-9-amina (**46**)**



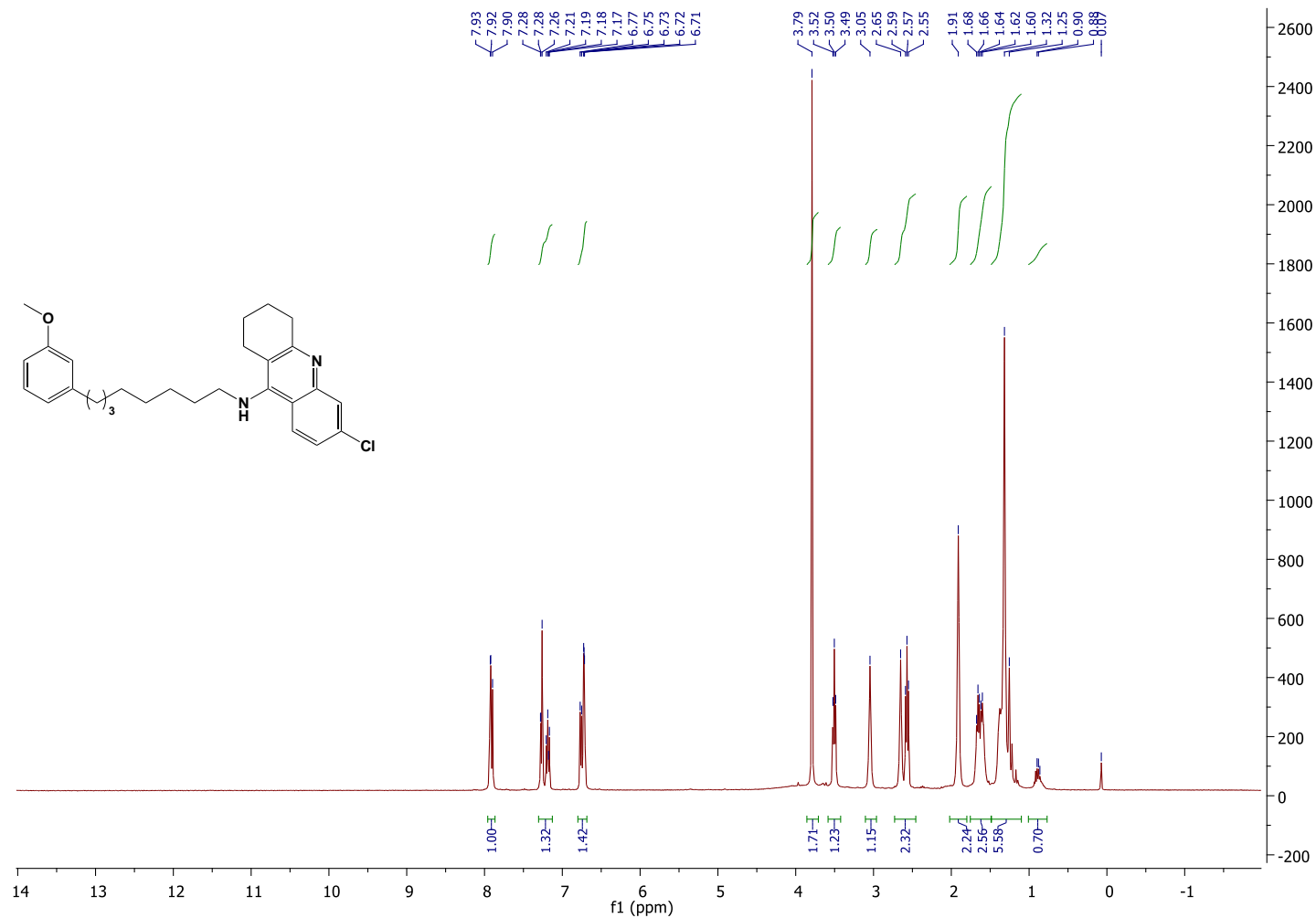
**ANEXO 25.1:** Expansão do espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) na região dos aromáticos: N-(8-(3-metóxfenil)octil)-1,2,3,4-tetraidroacridin-9-amina (**46**)



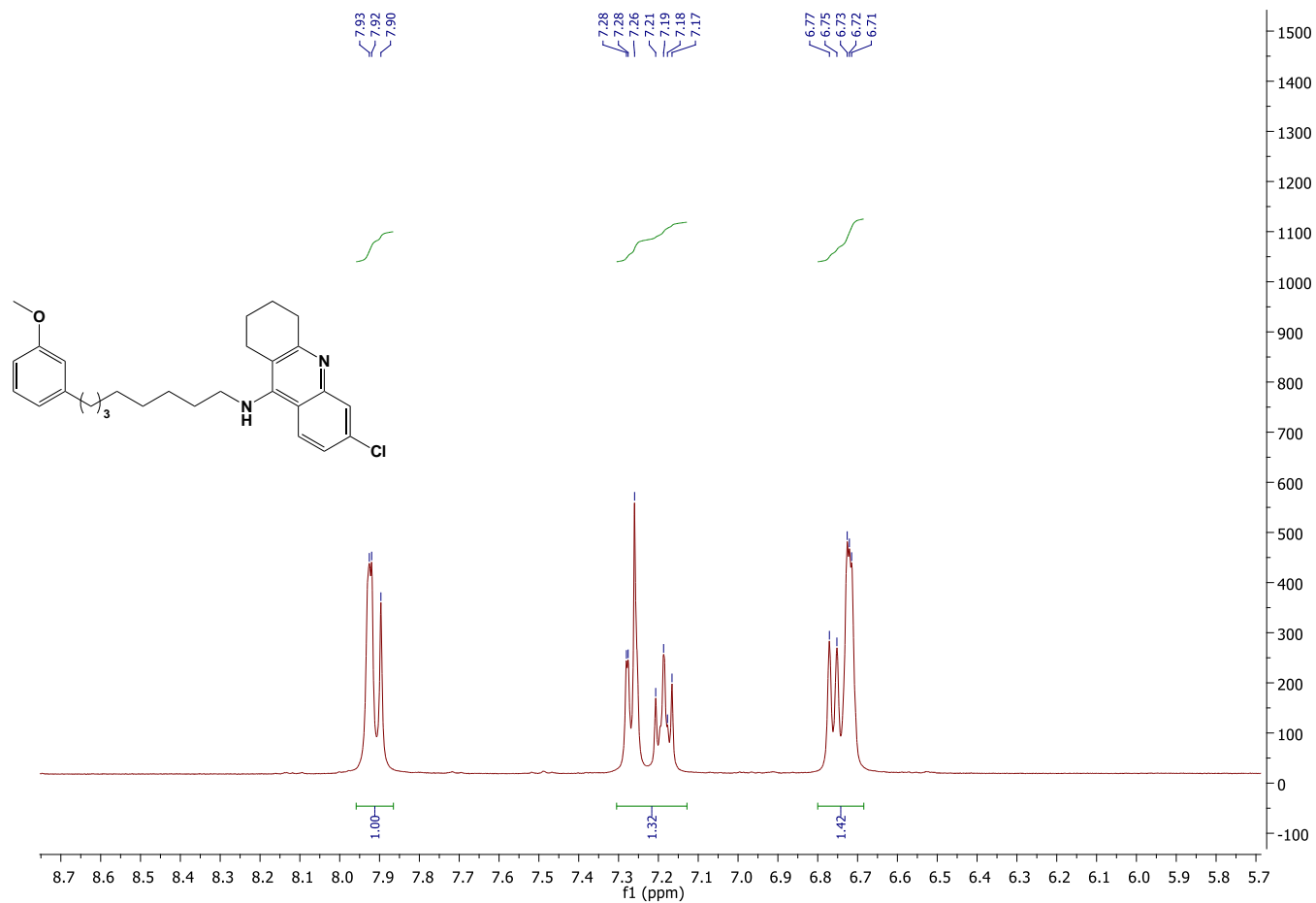
**ANEXO 26:** Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ): N-(8-(3-metóxiifenil)octil)-1,2,3,4-tetraidroacridin-9-amina (**46**)



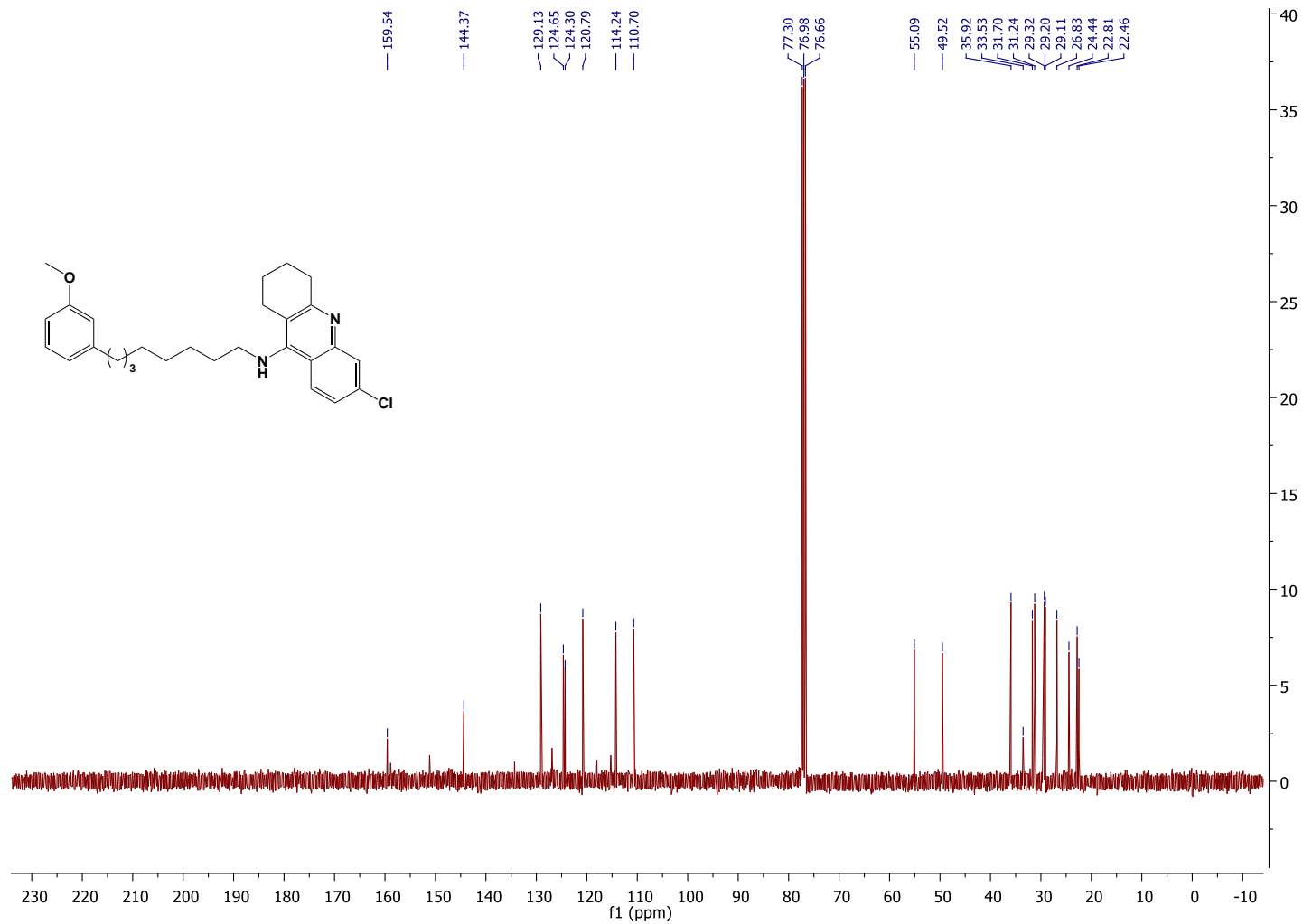
**ANEXO 27: Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ): 6-Cloro-N-(8-(3-metoxifenil)octil)-1,2,3,4-tetraidroacridin-9-amina (47)**



**ANEXO 27.1:** Expansão do espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) na região dos aromáticos: 6-Cloro-N-(8-(3-metoxifenil)octil)-1,2,3,4-tetraidroacridin-9-amina (**47**)

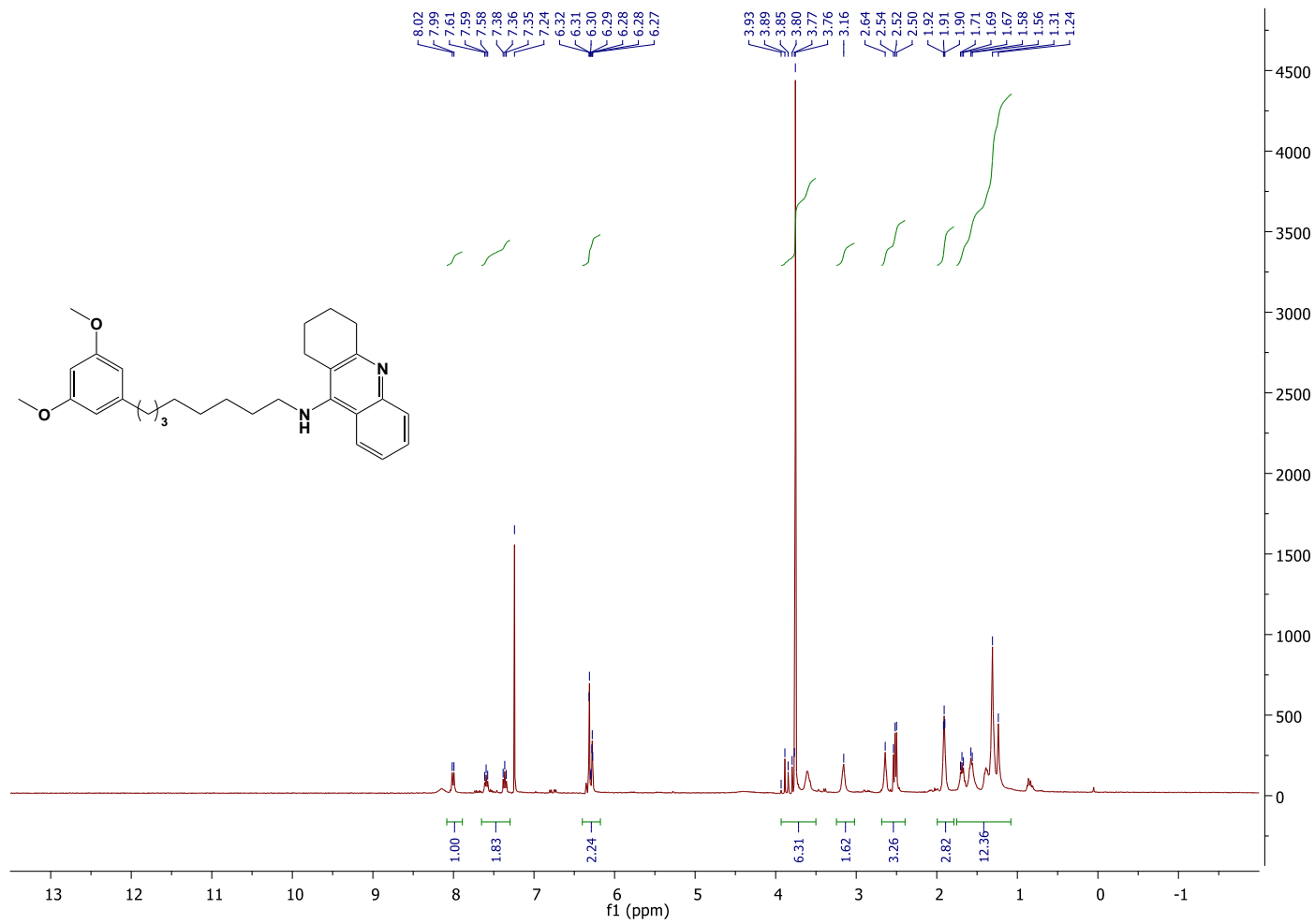


**ANEXO 28:** Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ): 6-Cloro-N-(8-(3-metoxifenil)octil)-1,2,3,4-tetraidroacridin-9-amina (**47**)

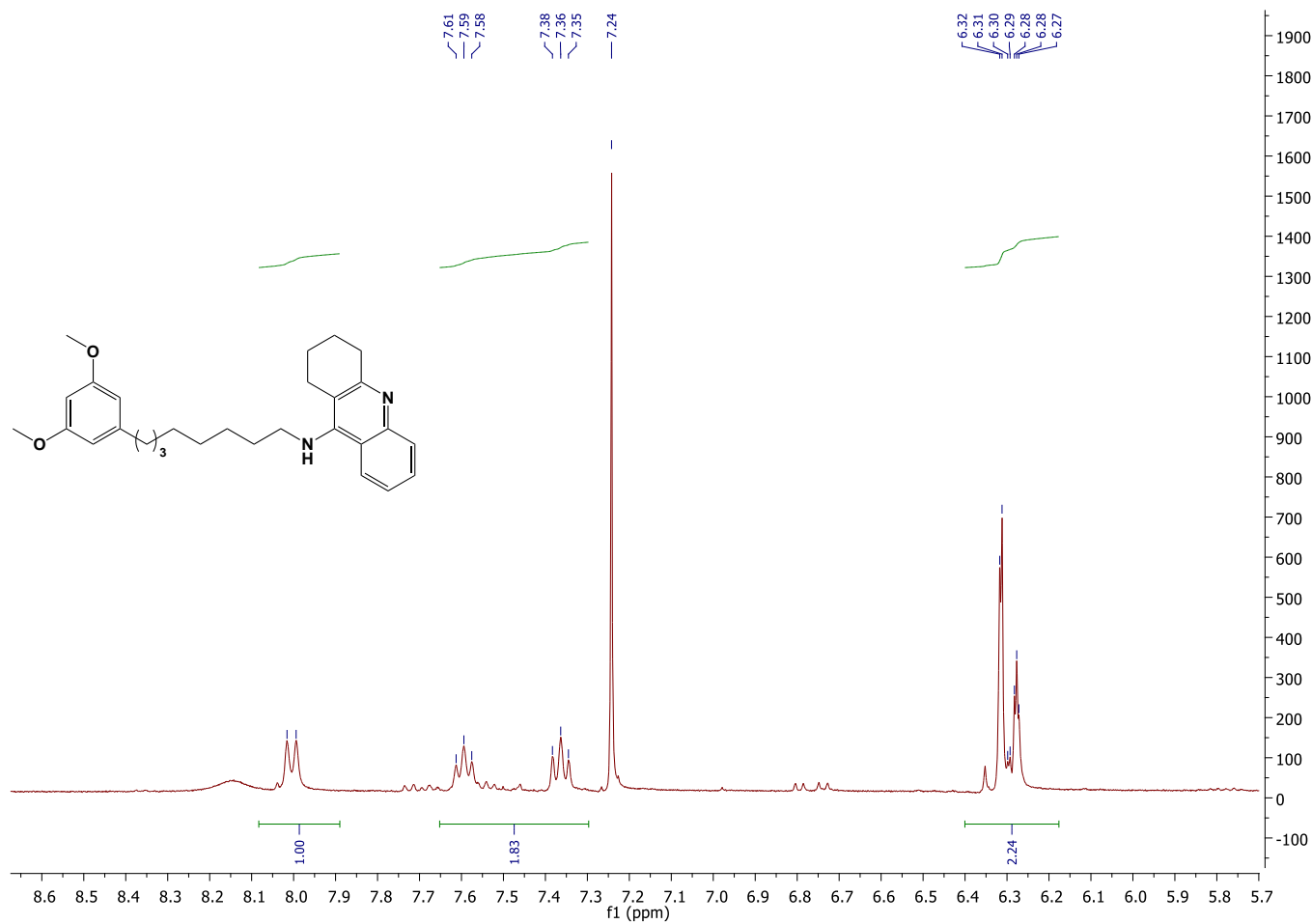




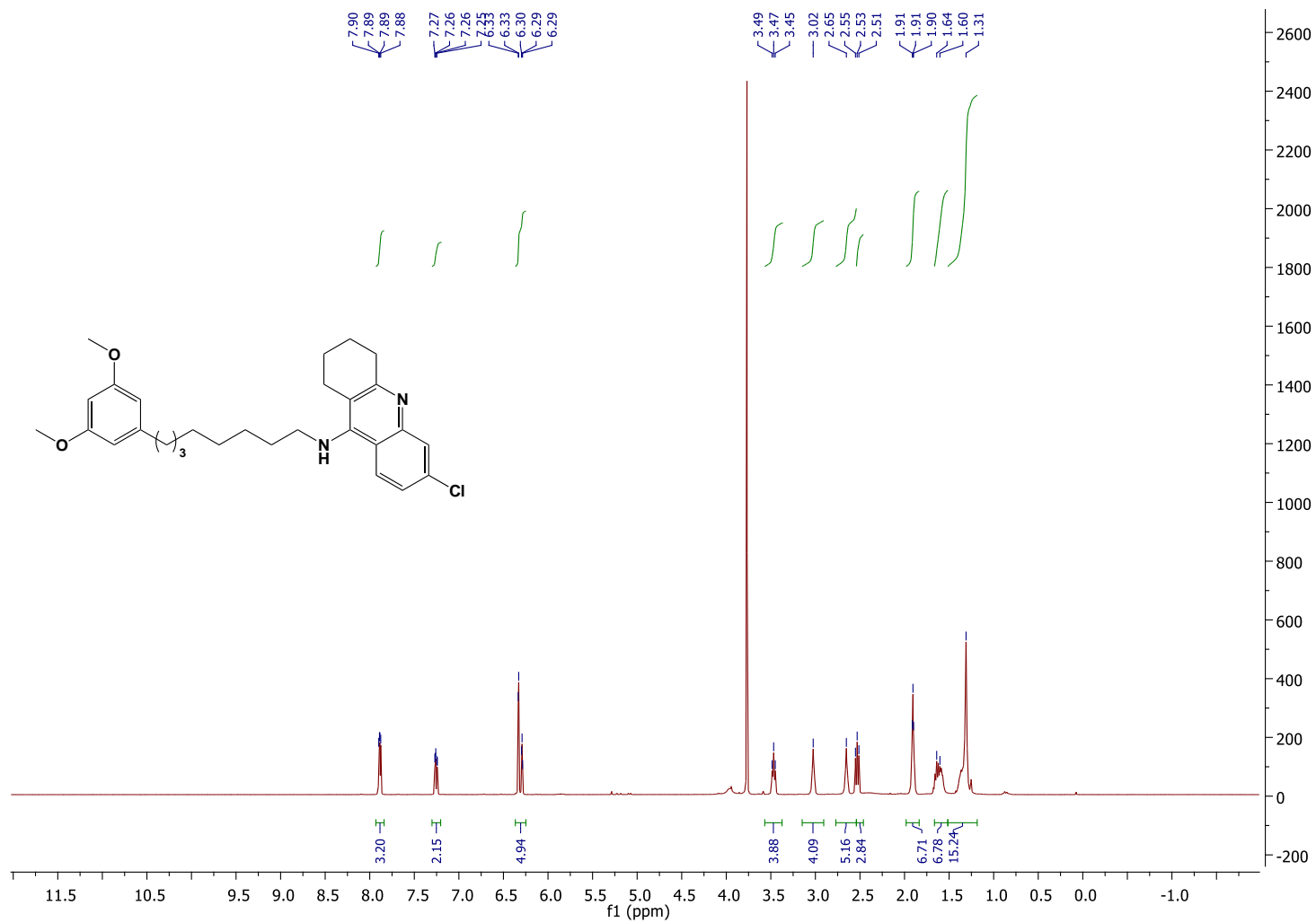
**ANEXO 29:** Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ): N-(8-(3,5-dimetoxifenil)octil)-1,2,3,4-tetraidroacridin-9-amina (**49**)



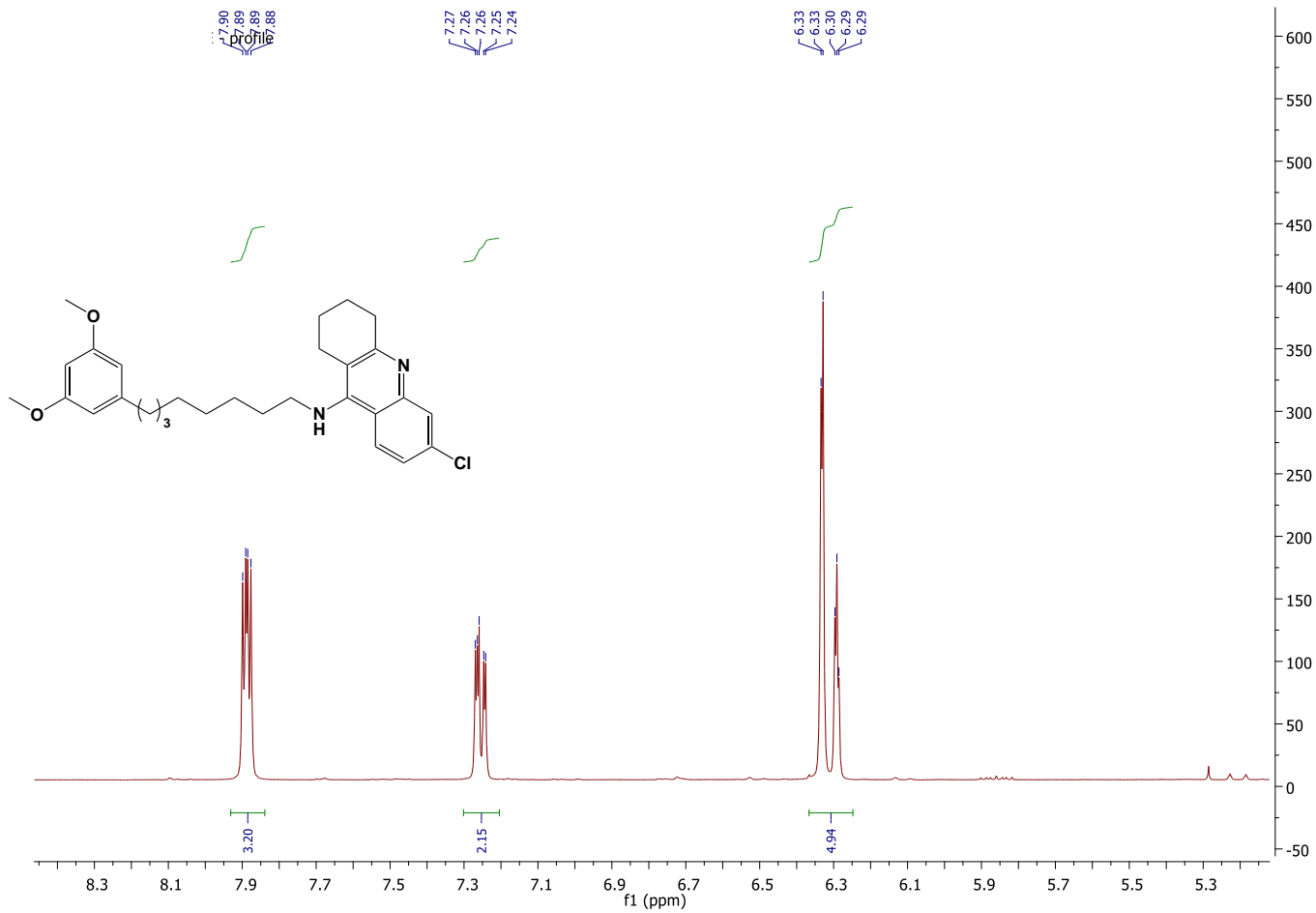
**ANEXO 29.1:** Expansão do espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) na região dos aromáticos: N-(8-(3,5-dimetoxifenil)octil)-1,2,3,4-tetraidroacridin-9-amina (**49**)



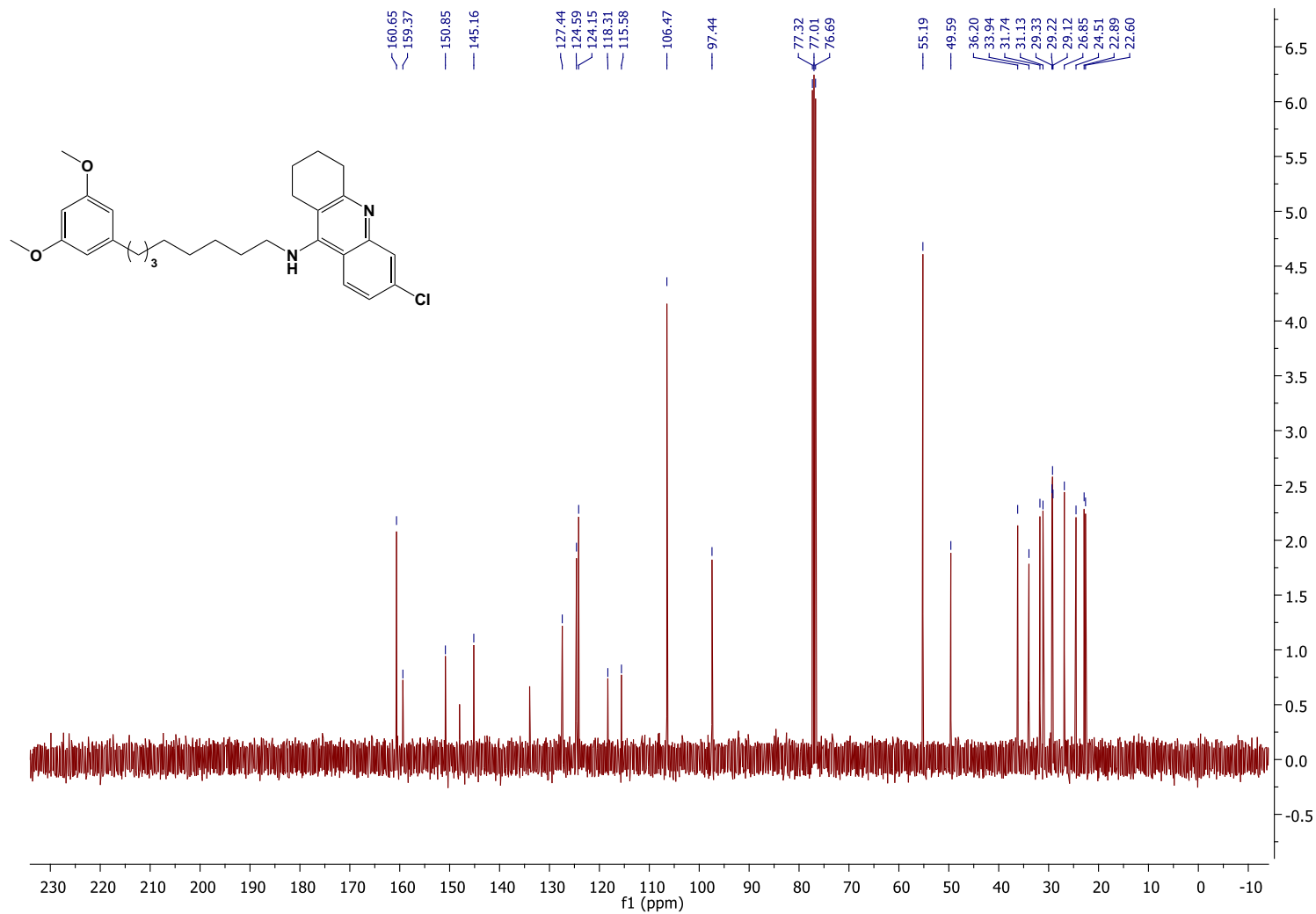
**ANEXO 30:** Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ): 6-Cloro-N-(8-(3,5-dimetóxicfenil)octil)-1,2,3,4-tetraidroacridin-9-amina (**50**)



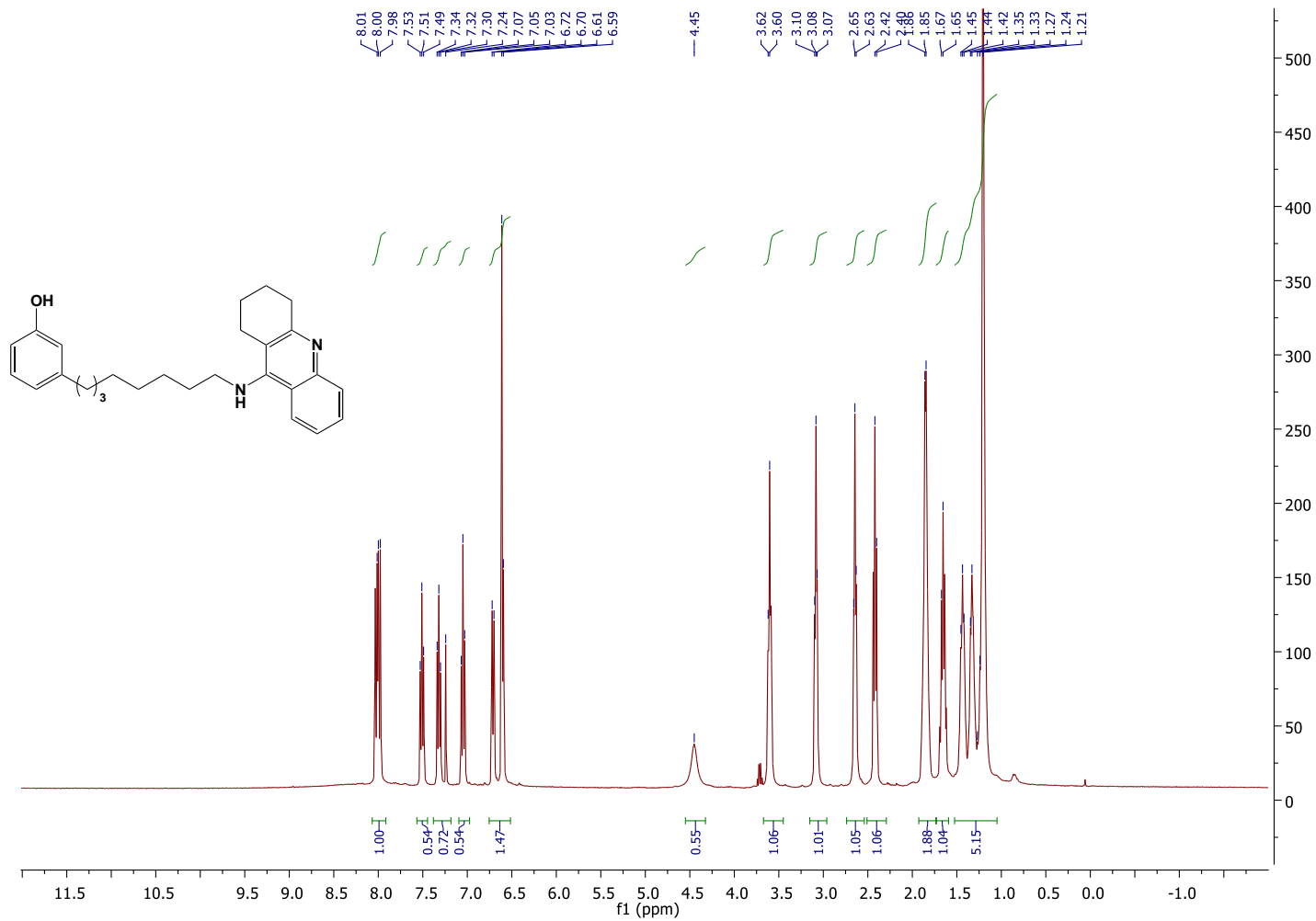
**ANEXO 30.1:** Expansão do espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) na região dos aromáticos: 6-Cloro-N-(8-(3,5-dimetóxi)octil)-1,2,3,4-tetraidroacridin-9-amina (**50**)



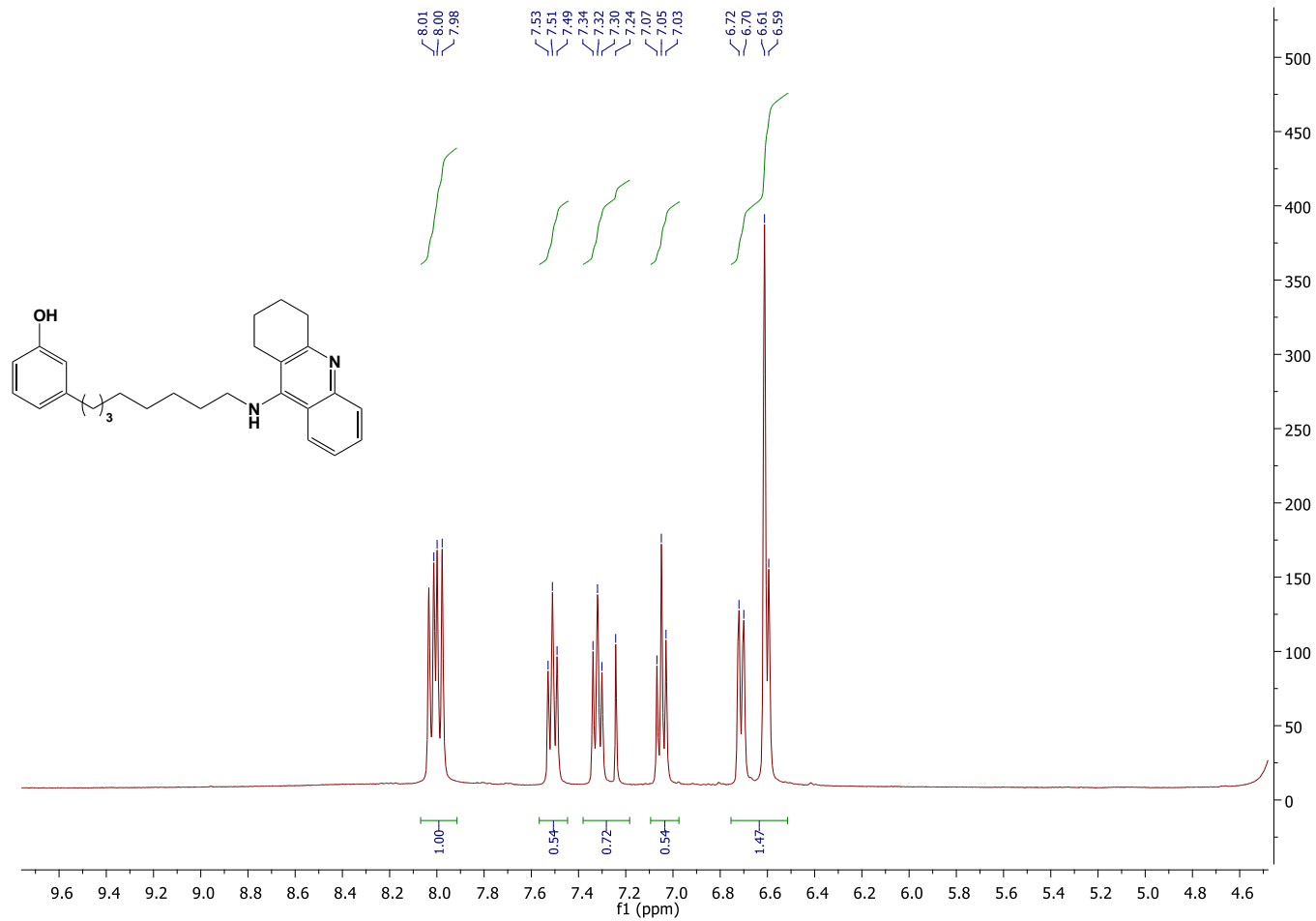
**ANEXO 31: Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ): 6-Cloro-N-(8-(3,5-dimetóxicfenil)octil)-1,2,3,4-tetraidroacridin-9-amina (50)**



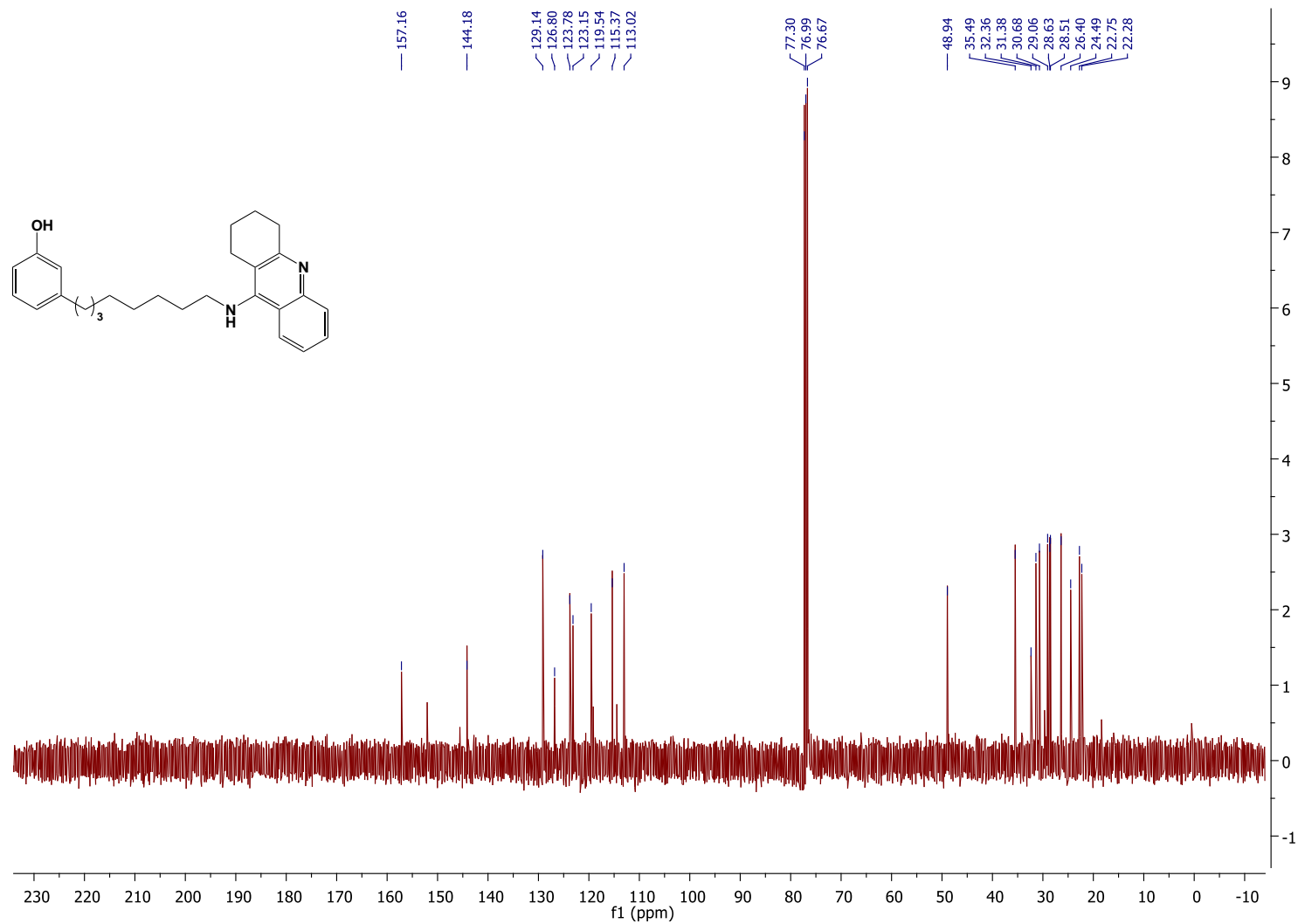
**ANEXO 32: Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ): 3-(8-((1,2,3,4-tetrahydroacridin-9-il)amino)octil)fenol (**64**)**



**ANEXO 32.1:** Expansão do espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) na região dos aromáticos: 3-(8-((1,2,3,4-tetraidroacridin-9-il)amino)octil)fenol (**64**)

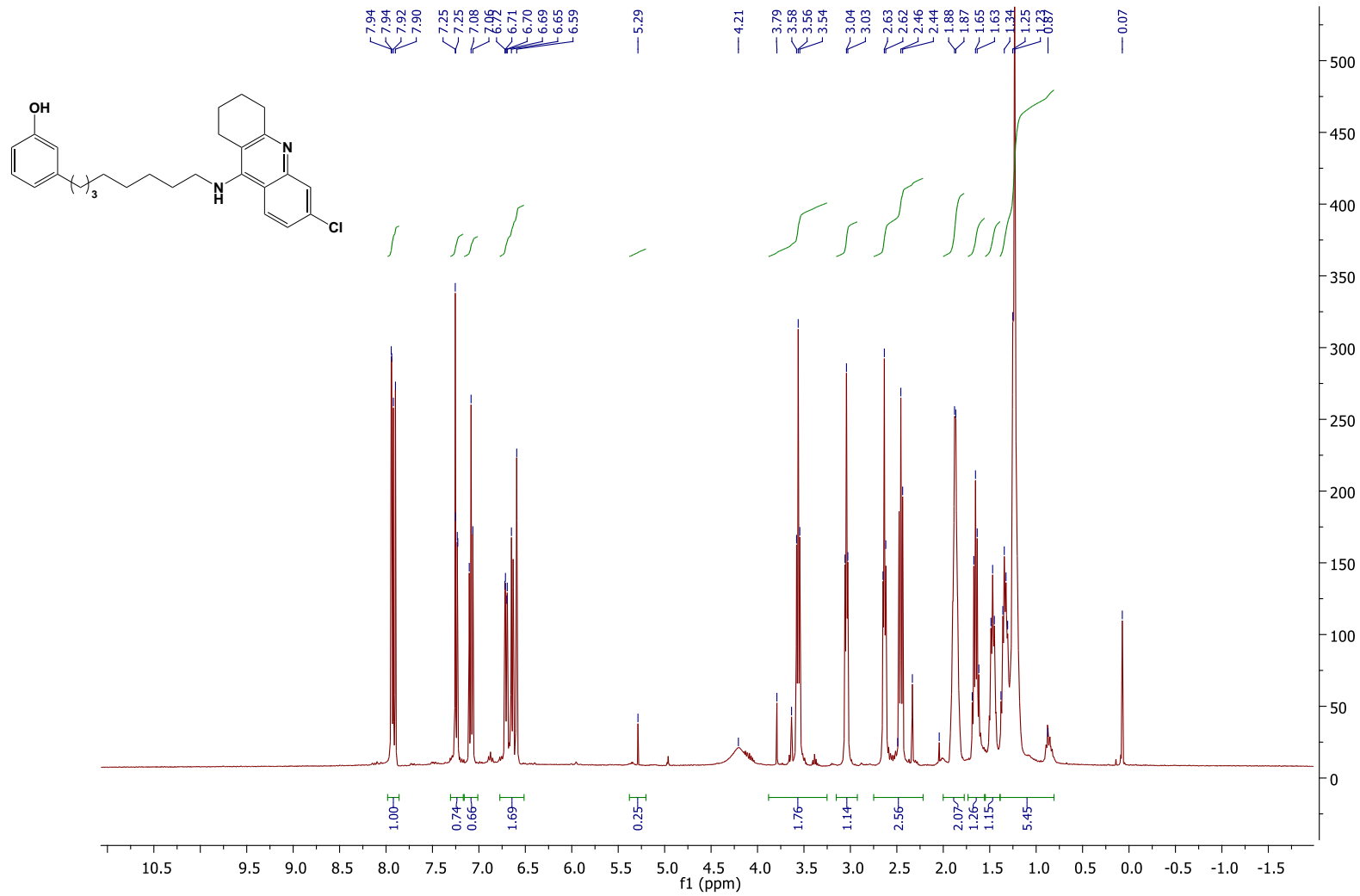


**ANEXO 33: Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ): 3-(8-((1,2,3,4-tetraidroacridin-9-il)amino)octil)fenol (**64**)**

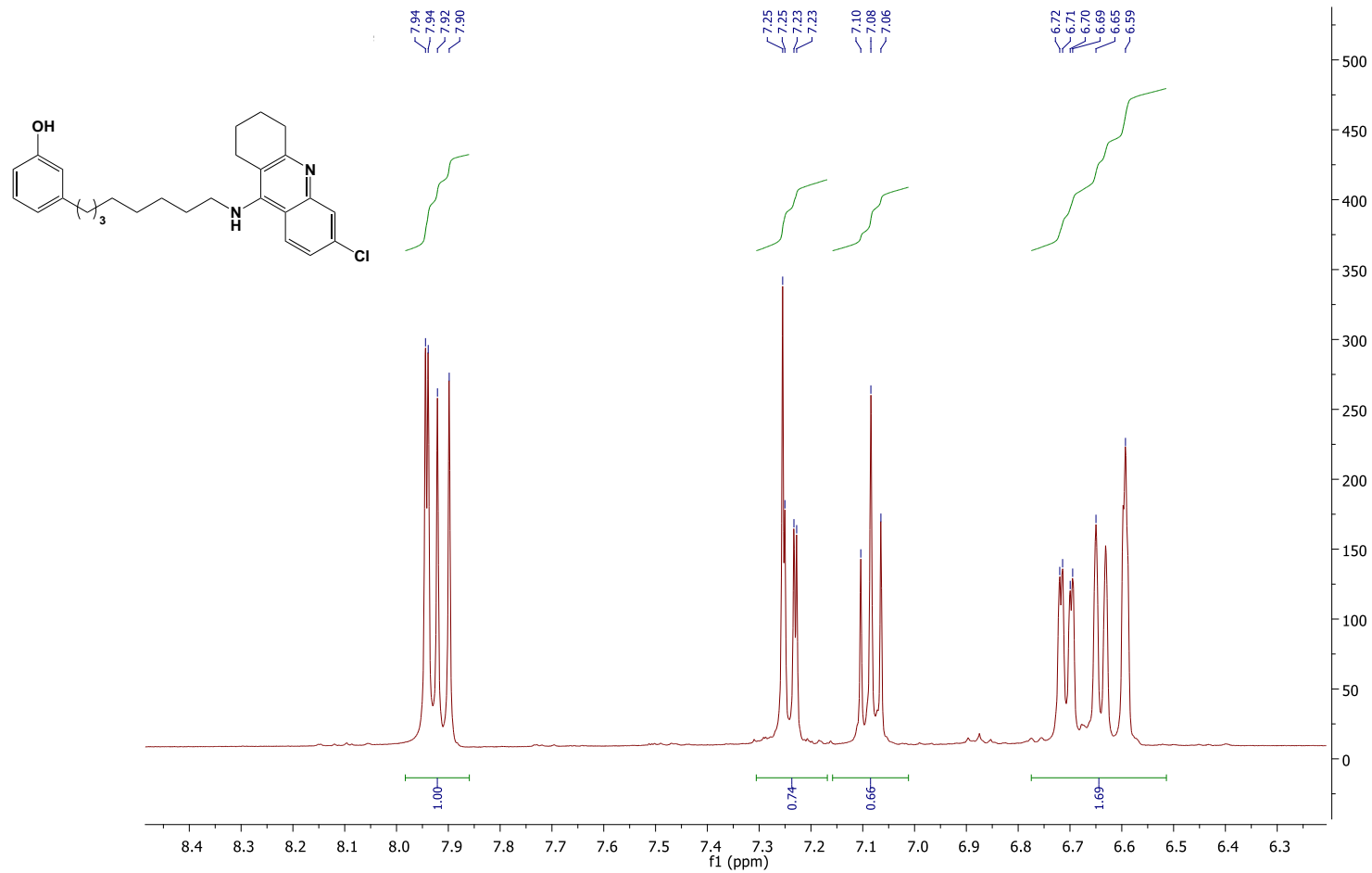




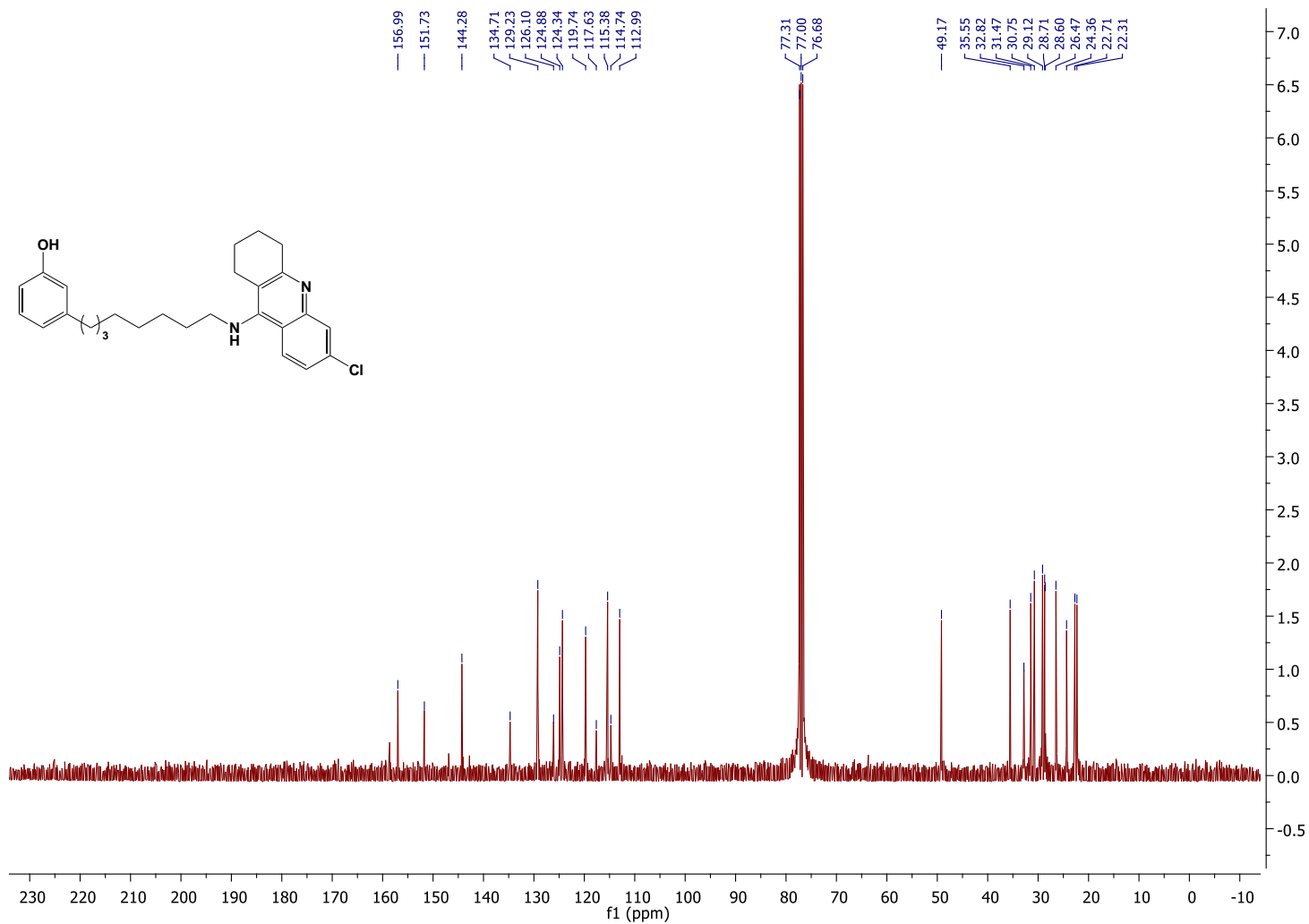
**ANEXO 34:** Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ): 3-(8-((6-cloro-1,2,3,4-tetrahydroacridin-9-il)amino)octil)penol (**65**)



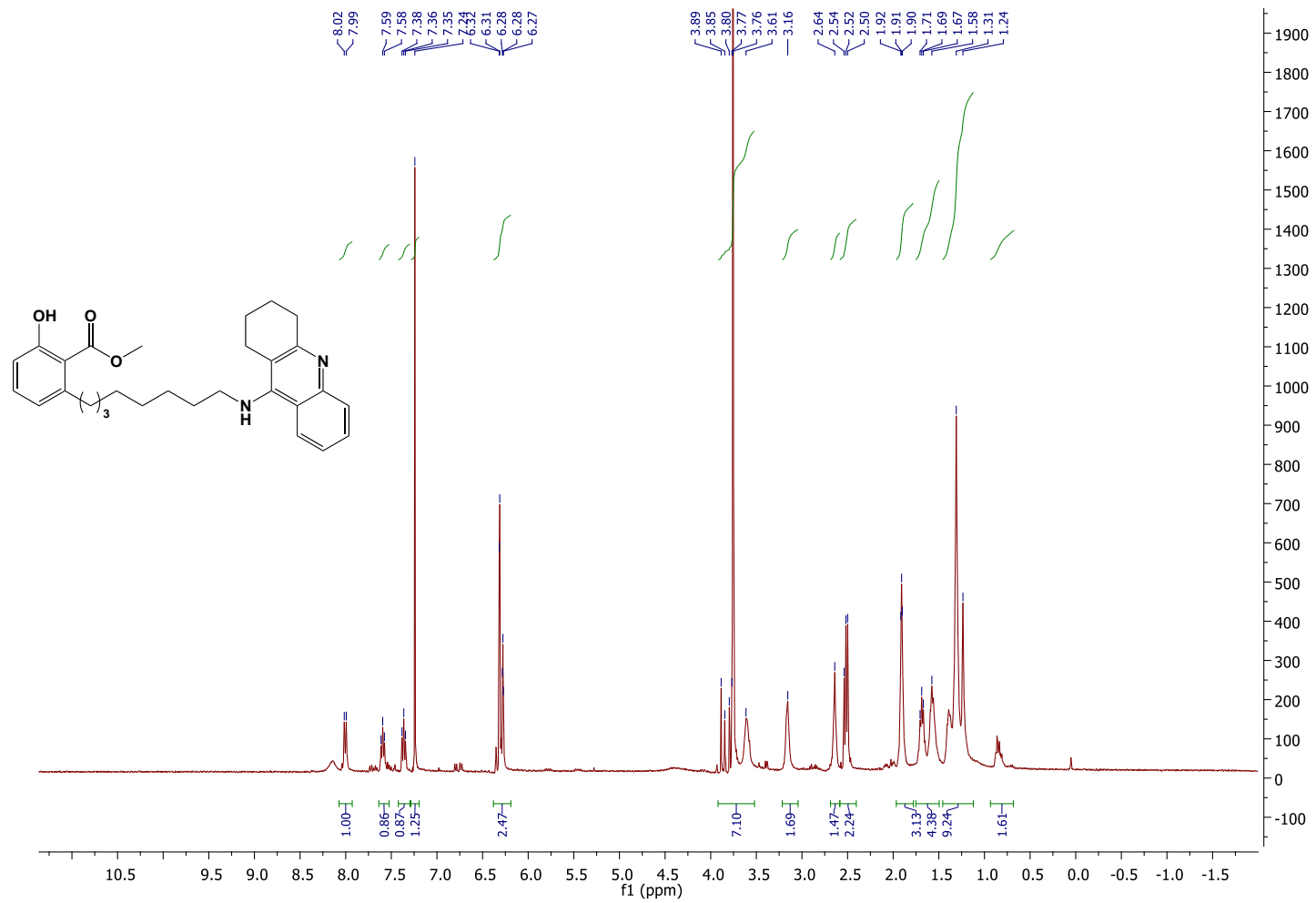
**ANEXO 34.1:** Expansão do espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) na região dos aromáticos: 3-(8-((6-cloro-1,2,3,4-tetrahydroacridin-9-il)amino)octil)penol (**65**)



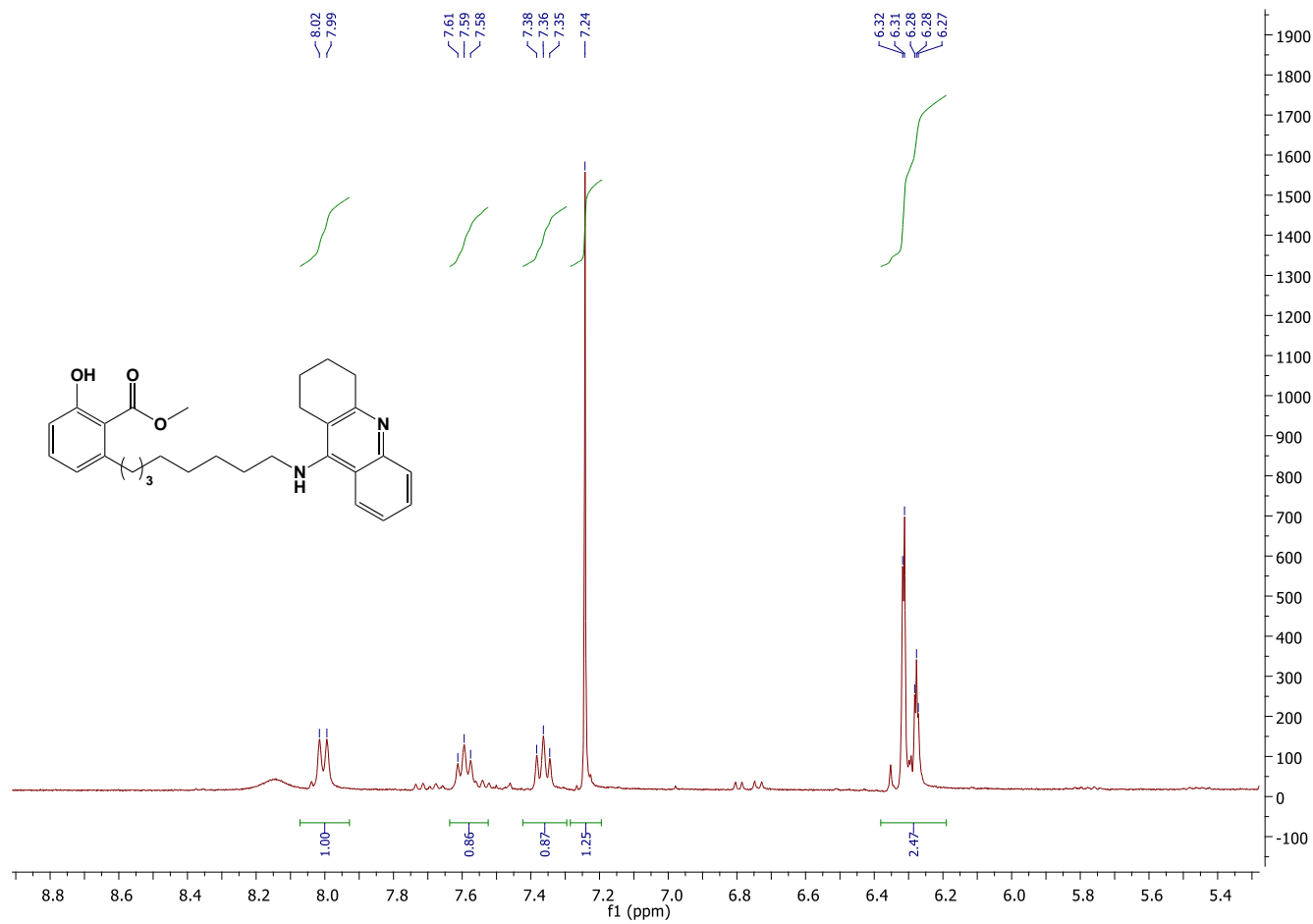
**ANEXO 35: Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ): 33-(8-((6-cloro-1,2,3,4-tetrahydroacridin-9-il)amino)octil)penol (**65**)**



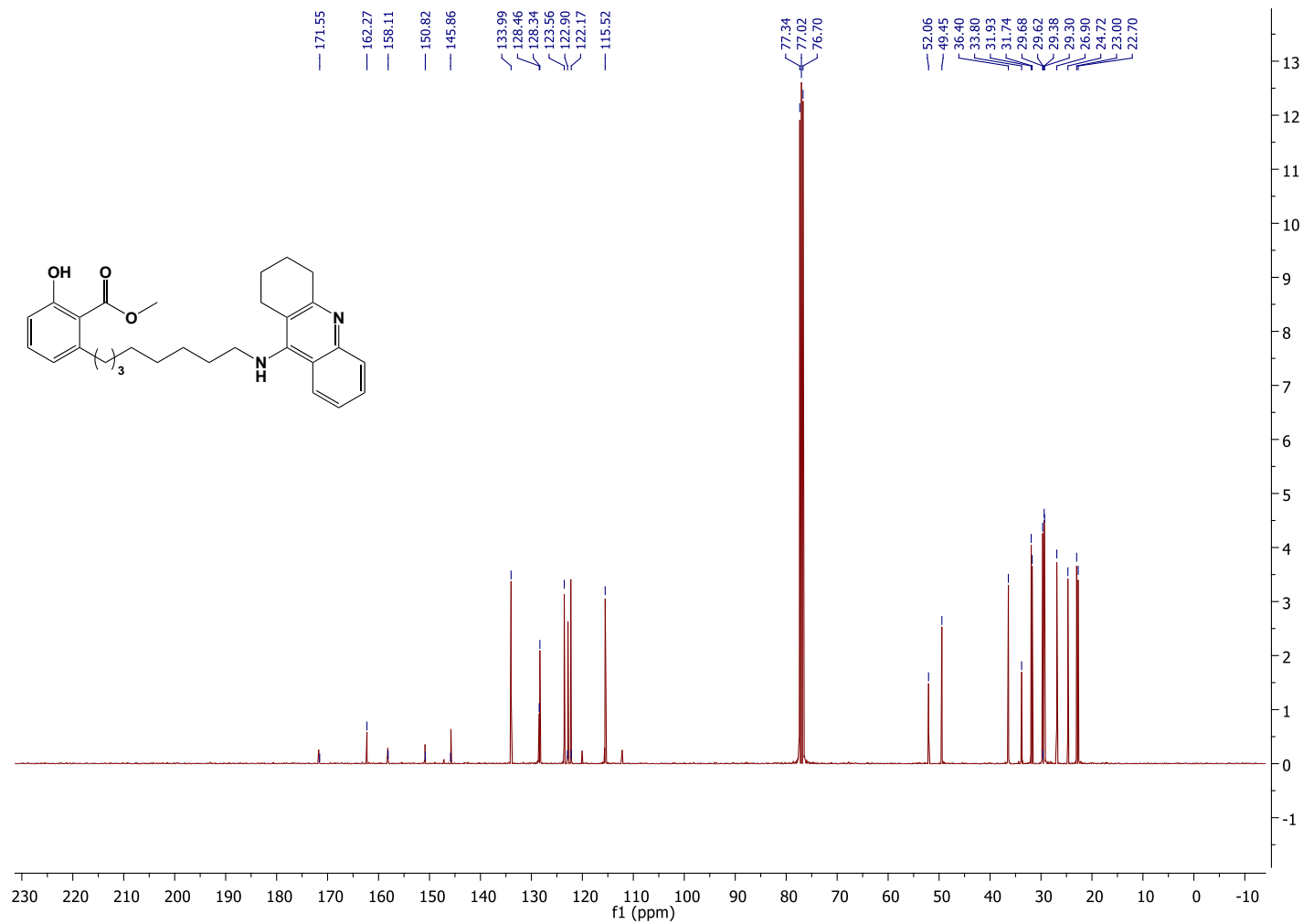
**ANEXO 36:** Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ): 2-hidróxi-6-(8-((1,2,3,4-tetraidroacridin-9-il)amino)octil)benzoato de metila (**61**)



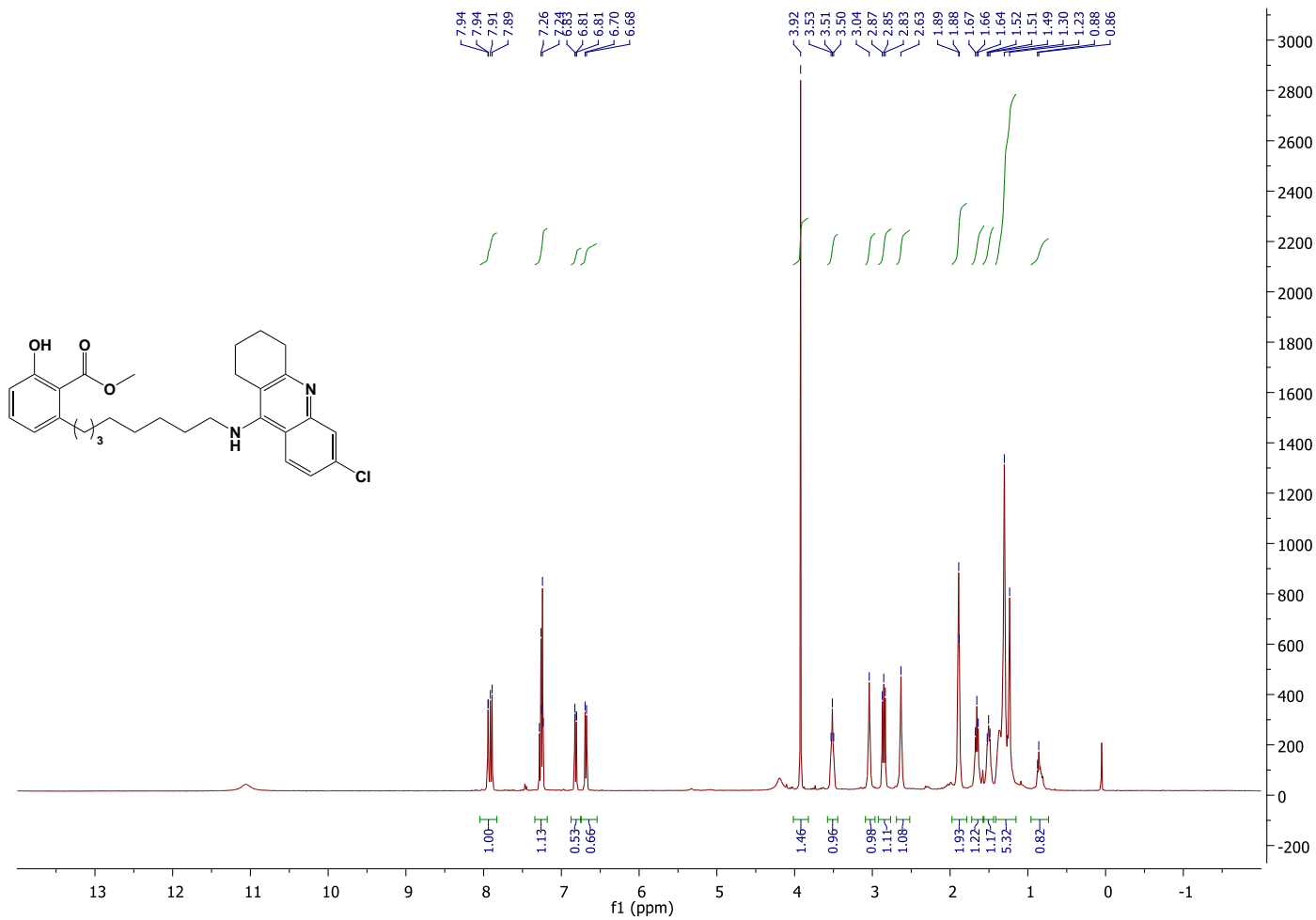
**ANEXO 36.1:** Expansão do Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) na região dos aromáticos: 2-hidróxi-6-(8-((1,2,3,4-tetraidroacridin-9-il)amino)octil)benzoato de metila (**61**)



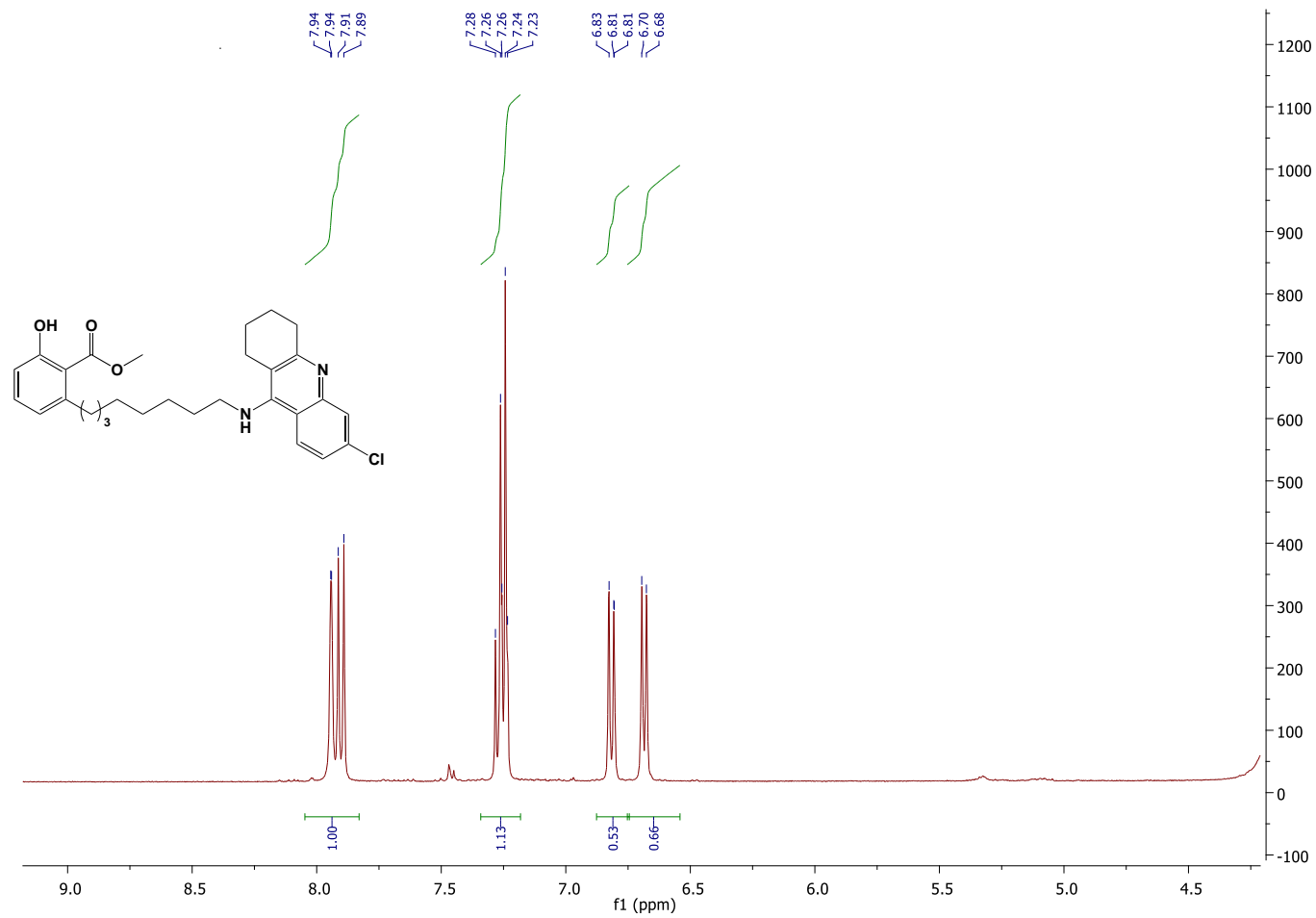
**ANEXO 37: Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ): 2-hidróxi-6-(8-((1,2,3,4-tetraidroacridin-9-il)amino)octil)benzoato de metila (61)**



**ANEXO 38:** Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ): 2-(8-((6-cloro-1,2,3,4-tetraidroacridin-9-il)amino)octil)-6-hidroxibenzoato de metila (**62**)

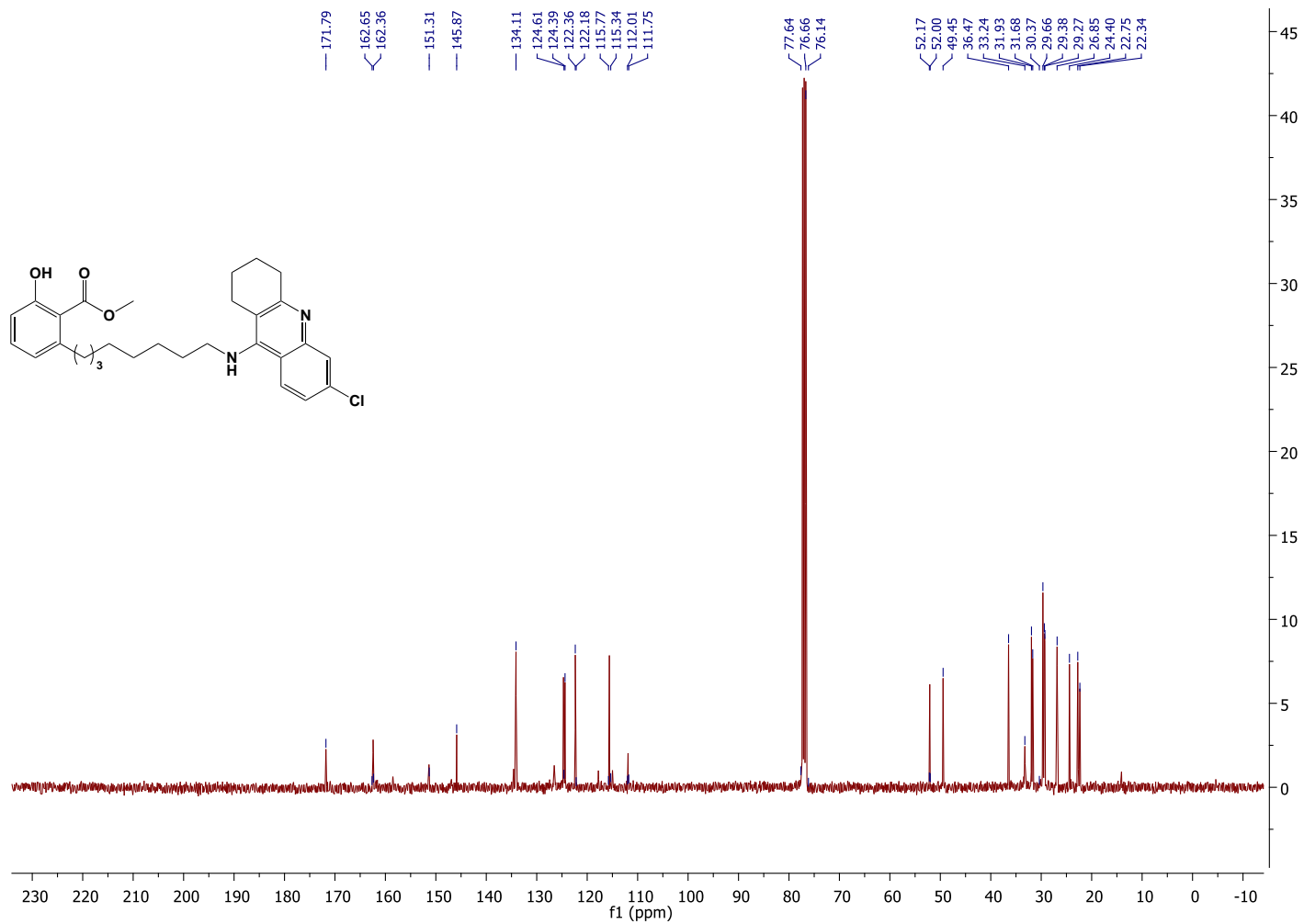


**ANEXO 38.1:** Expansão do espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) na região dos aromáticos: 2-(8-((6-cloro-1,2,3,4-tetraidroacridin-9-il)amino)octil)-6-hidroxi benzoato de metila (**62**)

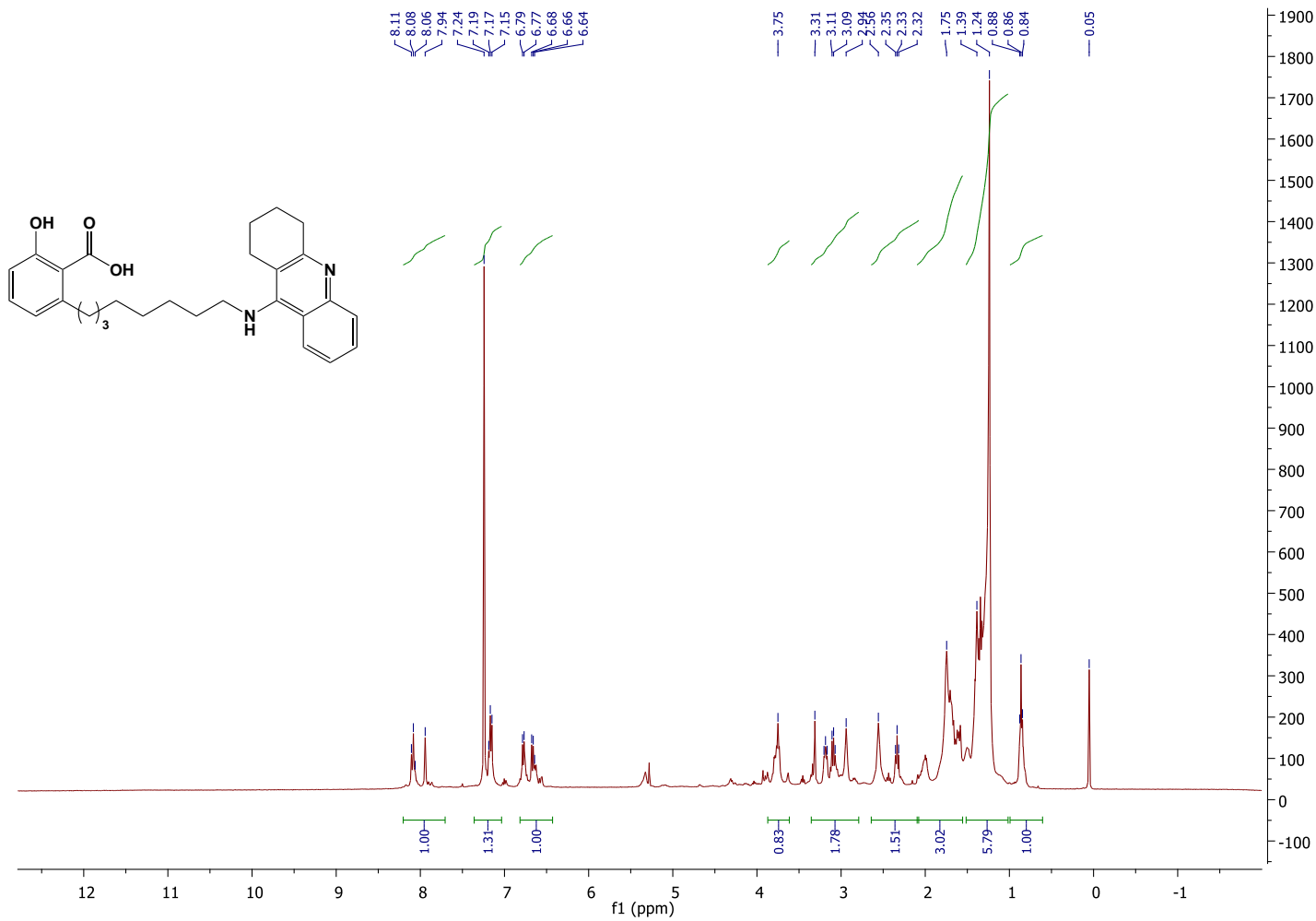




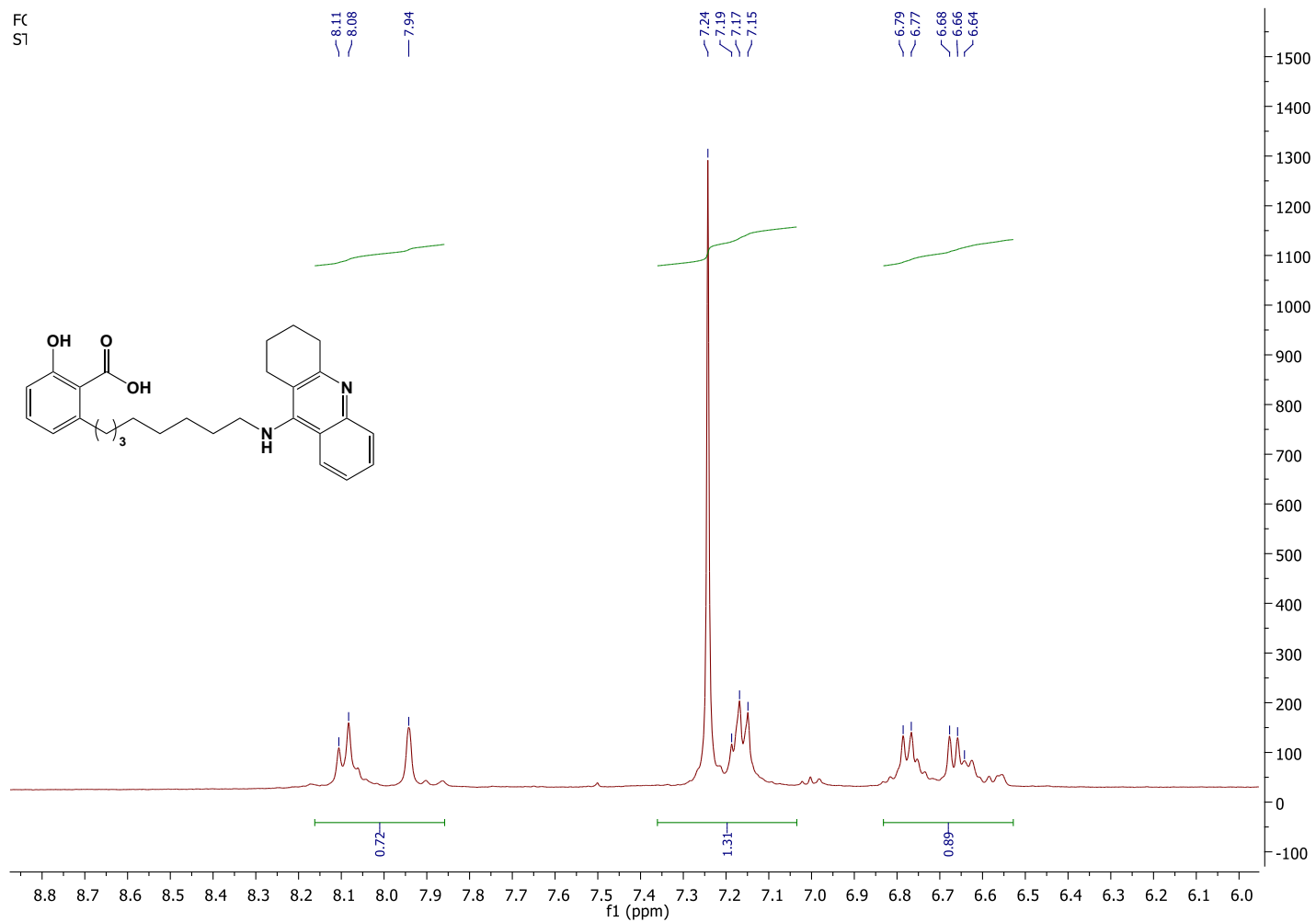
**ANEXO 39:** Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ): 2-(8-((6-cloro-1,2,3,4-tetraidroacridin-9-il)amino)octil)-6-hidroxibenzoato de metila (**62**)



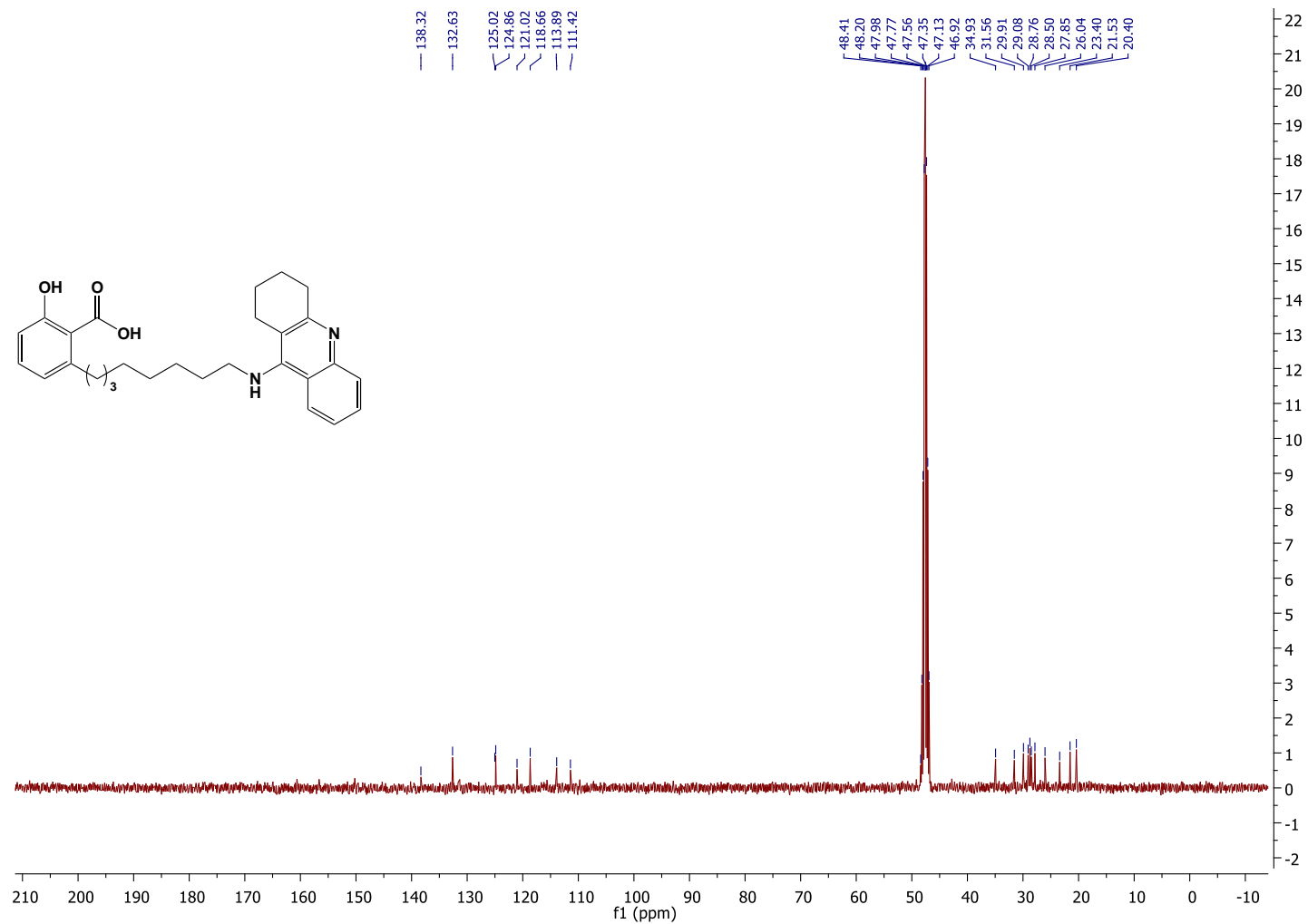
**ANEXO 40:** Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ): Ácido 2-hidróxi-6-(8-((1,2,3,4-tetraidroacridin-9-il)amino)octil)benzoico (**73**)



**ANEXO 40.1:** Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ): Ácido 2-hidróxi-6-(8-((1,2,3,4-tetraidroacridin-9-il)amino)octil)benzoico (**73**)

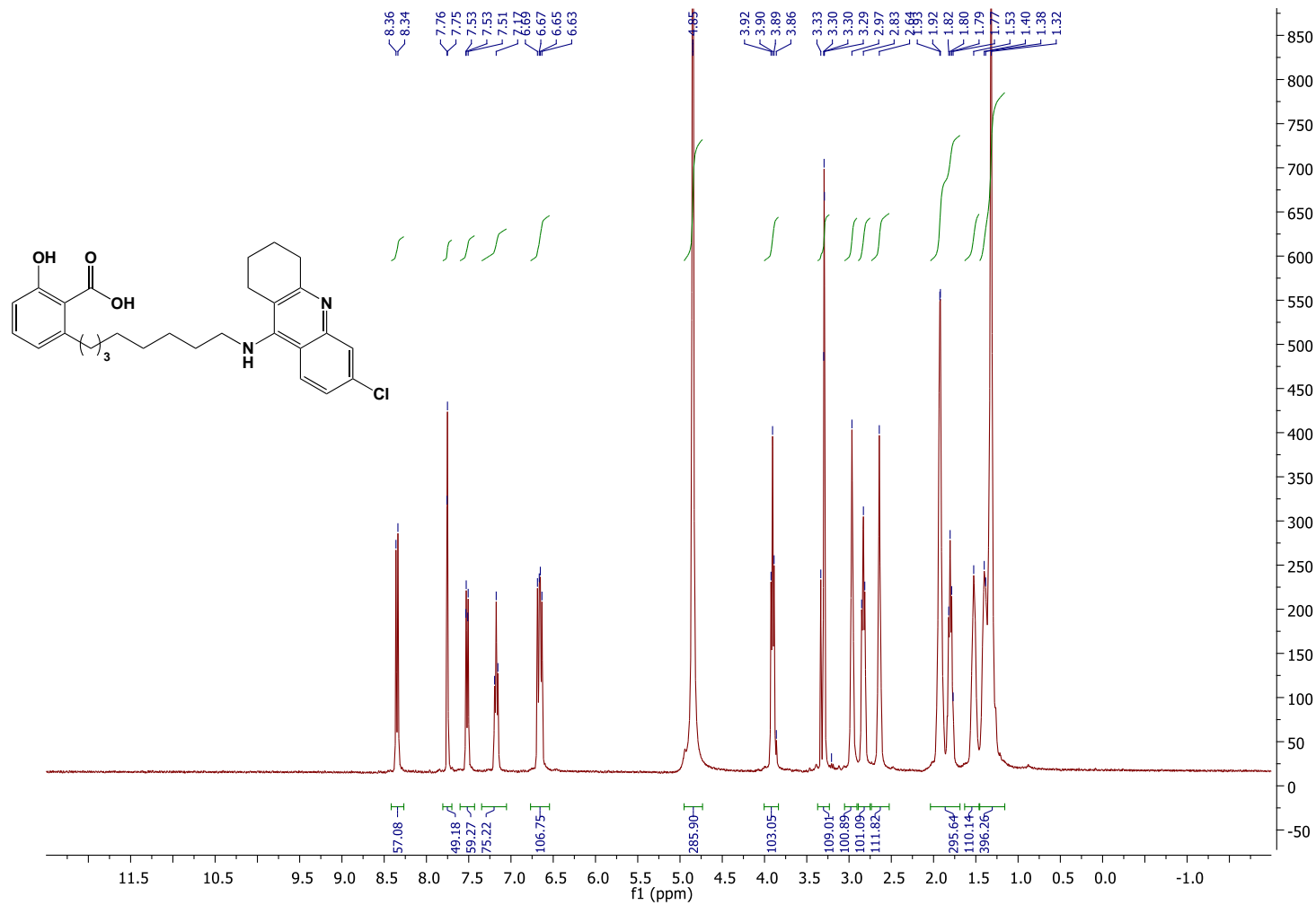


**ANEXO 41:** Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ): Ácido 2-hidróxi-6-(8-((1,2,3,4-tetraidroacridin-9-il)amino)octil)benzoico (**73**)

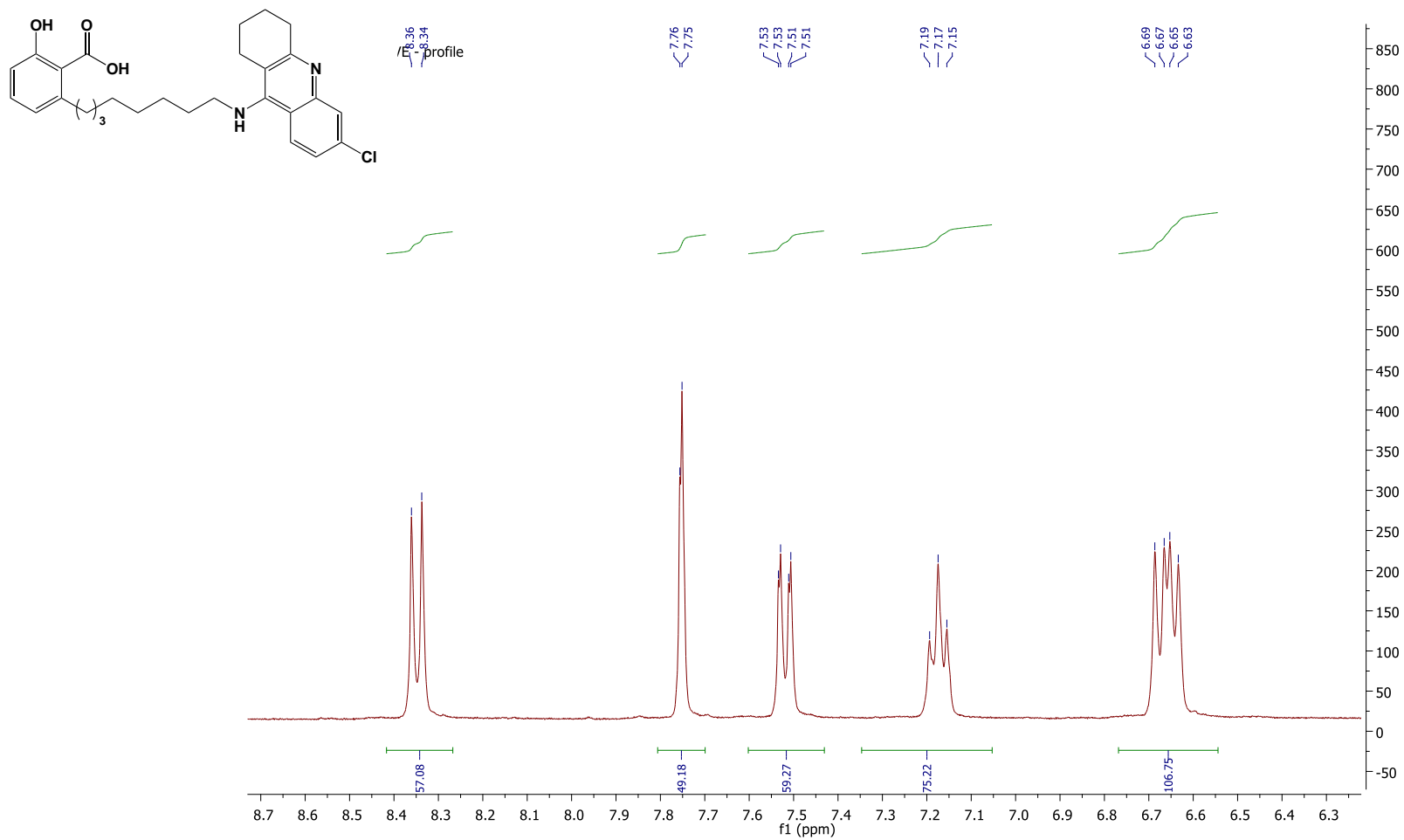


ANEXO 42: Espectro de RMN de <sup>1</sup>H (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>): Ácido-2-(8-((6-cloro-1,2,3,4-tetraidroacridin-9-il)amino)octil)-6-hidroxibenzoico

(74)



**ANEXO 42.1:** Expansão do espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) na região dos aromáticos: Ácido-2-(8-((6-cloro-1,2,3,4-tetraidroacridin-9-il)amino)octil)-6-hidrobenzoico



**ANEXO 43:** Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ): Ácido-2-(8-((6-cloro-1,2,3,4-tetraidroacridin-9-il)amino)octil)-6-hidroxisalicílico  
**(74)**

