



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE GOIÁS
UNIDADE UNIVERSITÁRIA DE CIÊNCIAS EXATAS E TECNOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO *STRICTO SENSU* EM CIÊNCIAS
MOLECULARES

KÉSIA DA PAIXÃO SILVA GONÇALVES

**SÍNTESE DE DERIVADOS DE DIIDROCUMARINAS ASSISTIDA POR
IRRADIAÇÃO DE MICRO-ONDAS E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE
ANTICOLINESTERÁSICA**

Anápolis – GO

2014

KÉSIA DA PAIXÃO SILVA GONÇALVES

**SÍNTESE DE DERIVADOS DE DIIDROCUMARINAS ASSISTIDA POR
IRRADIAÇÃO DE MICRO-ONDAS E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE
ANTICOLINESTERÁSICA**

Defesa apresentada ao programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Ciências Moleculares (nível mestrado) da Universidade Estadual de Goiás como parte dos requisitos para obtenção do título de mestre.

Orientador: Prof. Dr. Gilberto Lúcio Benedito de Aquino

Anápolis – GO

2014

SÍNTESE DE DERIVADOS DE DIIDROCUMARINAS ASSISTIDA POR
IRRADIAÇÃO DE MICRO-ONDAS E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE
ANTICOLINESTERÁSICA

KÉSIA DA PAIXÃO SILVA GONÇALVES

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Ciências Moleculares da Unidade Universitária de Ciências Exatas e Tecnológicas, da Universidade Estadual de Goiás, apresentada como parte dos requisitos necessários para obtenção do título de Mestra em Ciências Moleculares.

Aprovada por:



Prof. Dr. Gilberto Lucio Benedito de Aquino (UEG)



Profa. Dra. Giuliana Muniz Vila Verde Safadi (UEG)



Profa. Dra. Erika Crispim Resende (UFG)

*“...Nem olhos viram,
Nem ouvidos ouviram,
Nem jamais penetrou
Em coração humano
O que Deus tem preparado
Para aqueles
Que o amam.”*

I cor.2.9

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar quero agradecer a Deus, meu senhor e criador por ter me concedido a capacidade de terminar e concretizar mais esse sonho.

A CAPES pelo apoio financeiro e bolsa concedida, a Universidade Estadual de Goiás e a Universidade Federal do Paraná pelo apoio intelectual e por terem aberto suas portas para me receber.

Ao professor Gilberto Aquino por toda ajuda, por ter acreditado que eu conseguiria realizar todo o trabalho, mesmo estando fisicamente distante, pelos ensinamentos, paciência, incentivo, exemplo e amizade.

Ao professor Cid Aimbiré, por bondosamente ter me recebido na Universidade Federal do Paraná, em seu laboratório de Farmacognosia, por ter me aceito como parte das pesquisadoras de seu laboratório e por ter me ajudado tanto com a minha pesquisa. Obrigada por toda receptividade, pela forma carinhosa com que me recebeu e tratou desde o início e também por todos os cafezinhos do laboratório!

Aos meus pais e meu esposo pelo incentivo, por entenderem minhas ausências, por terem sonhado comigo e acreditado em mim. Amo vocês.

Aos amigos que fiz ao longo desses dois anos: Andrea de Lacerda Bukzem, Andreza Silva Fiqueredo, Danilo Martins dos Santos, Dayane Rodrigues da Silva, Erik Nelson de Paiva Melo, Lorena Ferreira de Souza, Luciene Mendes, Wellington Rosa de Lima Júnior e todos os alunos do mestrado que muito me fizeram sorrir e acreditar.

A todas as amigas e amigos de Curitiba, principalmente as meninas do Laboratório de Farmacognosia da UFPR. Conhecer vocês foi uma experiência maravilhosa e única, a qual jamais me esquecerei. Cláudia Seidl, sem você eu não seria capaz de realizar todos os testes. Obrigada por disponibilizar seus conhecimentos, seu tempo, sua paciência e principalmente sua atenção para comigo.

CURRICULUM VITAE

FORMAÇÃO ACADÊMICA

- **2012 - 2014:** Mestrado em Ciências Moleculares – Universidade Estadual de Goiás - UEG (em andamento).
- **2006 – 2011** – Bacharelado em Teologia – Instituto Bíblico de Anápolis.
- **2003 – 2006:** Bacharelado em Farmácia – Universidade Estadual de Goiás.

ATUAÇÃO EM PESQUISA

- **2012 – 2014:** Mestrado em Ciências Moleculares – Bolsista CAPES.

Título: Síntese e avaliação da atividade anticolinesterásica de análogos de diidrocurmarinas.

Orientador: Prof.º Dr. Gilberto Lúcio Benedito de Aquino.

TRABALHOS CIENTÍFICOS

- **2006:** TCC – Trabalho de conclusão de curso.

Título: Investigação da presença de fatores de risco para o desenvolvimento de transtornos alimentares em acadêmicos do curso de farmácia da UEG.

Orientador: Profa. Msc. Vanessa Cristiane de Santana Amaral.

PARTICIPAÇÃO EM EVENTOS

- **2012:** X Seminário de Iniciação Científica, VII Jornada de Pesquisa da UEG.
- **2005:** IV Jornada Farmacêutica e I Encontro de Analistas Clínicos.
- **2005:** III Seminário de iniciação científica e I jornada de pesquisa e pós-graduação da UEG.
- **2005:** II Seminário de Iniciação Científica e I Jornada de Pesquisa e Pós-Graduação da UEG.
- **2005:** IV Jornada Farmacêutica de Universidade Estadual de Goiás
- **2005:** 6º Congresso nacional de medicamentos genéricos.
- **2004:** II Campanha Nacional pelo Uso correto de Medicamentos.
- **2004:** II Simpósio Brasileiro de Vigilância Sanitária e I Simpósio Pan-Americano de Vigilância Sanitária.

- **2004:** IV Integração Acadêmica do curso de Farmácia
- **2003:** II Integração Acadêmica do Curso de Farmácia

ATUAÇÃO PROFISSIONAL

- **2008 - 2011** - Responsável técnica em Drogeria.
- **2010 – 2011** – Responsável Técnica em Farmácia Hospitalar e Farmácia Comunitária.
- **2007 – 2008** - Responsável técnica em Drogeria
- **2004 – 2005** – Aluna de Iniciação Científica.
- **2005 – 2006** – Monitora de Farmacologia.

PRODUÇÃO BIBLIOGRÁFICA

- **SILVA, K.P.**, BEZERRA, L. M. B., BORGES, L. M., BITENCOURT, N. K. S., HONORATO, F., AMARAL, V. C. S. Transtornos Alimentares: Considerações Clínicas e Desafios do Tratamento. Infarma (Brasília), v.18, p.9 - 11, 2006.
- **SILVA, K.P.**, NASCIMENTO, F.H., SILVA, A. P., SOUZA, A. B., MEDEIROS, C. C., MACHADO, D. A., SOUZA, D. S., FERREIRA, L., NASCIMENTO, S. B., NASCIMENTO, A. Avaliação da aquisição, uso e armazenamento de medicamentos em residências urbanas de Anápolis - GO. In: III Seminário de Iniciação Científica e I Jornada de Pesquisa e Pós- Graduação, 2005, Anápolis-GO.
- **SILVA, K.P.**, NASCIMENTO, F.H., SILVA, A. P., SOUZA, A. B., MEDEIROS, C. C., MACHADO, D. A., SOUZA, D. S., FERREIRA, L., NASCIMENTO, S. B. Aquisição, uso e estocagem de medicamentos em residências urbanas de Anápolis-Goiás In: II Simpósio Brasileiro de Vigilância Sanitária e I Simpósio Pan-americano de Vigilância Sanitária, 2004, Caldas Novas- GO.

RESUMO

A doença de Alzheimer (DA) é uma doença neurodegenerativa crônica caracterizada por perda irreversível e progressiva da memória e das funções cognitivas. Constitui a forma mais comum de demência em idosos, podendo representar até 80% dos casos e até hoje os tratamentos existentes são apenas sintomáticos e muito restritos. A principal classe de medicamentos utilizados para DA são os inibidores da acetilcolinesterase (AChE) como a tacrina, donezepil, galantamina e rivastigmina, os quais não contribuem significativamente para melhoras a longo prazo das funções cognitivas e comportamentais, além de que sua ação nem sempre é bem sucedida, justificando a busca por inibidores da AChE mais potentes e menos tóxicos. Para tanto, várias classes de compostos tem sido estudadas. Entre esses compostos com possíveis ações anticolinesterásicas, estão as diidrocurmarinas, que são neoflavonóides, derivados de curmarinas com um diversificado potencial farmacológico comprovado. O objetivo desse estudo foi sintetizar derivados de diidrocurmarinas substituídas utilizando aquecimento por irradiação de micro-ondas e avaliar, *in vitro*, a atividade anticolinesterásica desta série de diidrocurmarinas utilizando ensaio em microplaca com o reagente de Ellman. Foram sintetizadas 7 compostos e todos apresentaram capacidade de inibir a AChE, com percentuais entre 0,4 e 39% de inibição, sendo que dois deles (**5b** e **3b**) podem ser considerados como protótipos para uma nova classe de compostos, capazes de exercer atividade anticolinesterásica, e conseqüentemente favorecer na terapêutica do tratamento da DA.

Palavras chave: Doença de Alzheimer (DA), Acetilcolinesterase (AChE), Síntese, Micro-ondas, Diidrocurmarinas.

ABSTRACT

Alzheimer's disease (AD) is a neurodegenerative disorder characterized by irreversible and progressive loss of memory and cognitive functions. It is the most common form of dementia in the elderly, which can represent up to 80 % of cases and still existing treatments are only symptomatic and very restricted. The main class of drugs used for AD are acetylcholinesterase inhibitors (AChE) as tacrine, donepezil, rivastigmine and galantamine, which do not contribute significantly to long-term improvements in cognitive and behavioral functions, besides that their action is not always successful, justifying the search for inhibitors of AChE more potent and less toxic. To this end, several classes of compounds have been studied. Among these compounds with possible anticholinesterase actions are the dihydrocoumarins, which are neoflavonoids, coumarin derivatives with a demonstrated diverse pharmacological potential. The aim of this study was to synthesize replaced dihydrocoumarins derivatives using radiant heating microwave and evaluate, in vitro, the anticholinesterase activity of this series of dihydrocoumarins using microplate assay with Ellman's reagent. Seven compounds were synthesized and all showed the ability to inhibit AChE, with percentages between 0.4 and 39 % inhibition, two of which (**5b**, **3b**) can be considered as prototypes for a new class of compounds able to perform acetylcholinesterase activity, and thus promote the treatment of AD.

KeyWords: Alzheimer's Disease (DA), Acetylcholinesterase, Dihydrocoumarins, Synthesis, Microwave.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Estrutura molecular dos fármacos mais usados para o tratamento da doença de Alzheimer: Tacrina, Rivastignina, Galantamina, Donepezil e Memantina.....	24
Figura 2	Esqueleto básico das cumarinas (1,2 benzopirona)	26
Figura 3	Estrutura do Dicumarol.....	27
Figura 4	Estrutura da Galantamina.....	29
Figura 5	Estrutura da escopoletina e escopolina.....	30
Figura 6	Estrutura básica de Diidrocomarinas (10) e Flavonóides (11)	32
Figura 7	Estrutura do Tartarato de tolterodina.....	33
Figura 8	Hidroarilação de alcenos para formação de diidrocomarinas.....	37
Figura 9	Hidroarilação de Olefinas na ausência de catalisadores metálicos.....	37
Figura 10	Obtenção de diidrocomarinas e cumarinas através do ácido 5-alquil-meldrun's.....	38
Figura 11	Modelo de eventos chaves relacionados com a patologia da DA.....	44
Figura 12	Estrutura molecular da Acetilcolina (Ach).....	45

Figura 13	Ilustração esquemática do ciclo envolvendo a síntese, transmissão e hidrólise da acetilcolina. Depois observa-se a molécula de colina retornando ao neurônio para a síntese de outra molécula de acetilcolina e a continuação do ciclo.....	47
Figura 14	Sequência de reações para detecção de atividade anticolinesterásica de substâncias naturais pelo método de Ellman.....	55
Figura 15	Estrutura dos 7 compostos a serem testados quanto à inibição da atividade anticolinesterásica.....	58
Figura 16	Gráfico da energia potencial da reação, mostrando os reagentes, o intermediário (Z) e os produtos de cadeia aberta e fechada.....	77
Figura 17	Duas possibilidades de reação: controle cinético e controle termodinâmico.....	78
Figura 18	Distribuição de cargas parciais do fenol.....	79
Figura 19	Representação das interações entre um composto e os aminoácidos tanto do sítio periférico quanto do sítio catalítico da AchE. Os números se referem às posições dos aminoácidos.....	83
Figura 20	Possíveis interações intermoleculares das diidrocumarinas com os sítios ativos da acetilcolinesterase.....	84

Figura 21	Estratégia de design de atuação dos compostos testados nos sítios de ligação da AchE.....	85
------------------	-------------------------------------------------------------------------------------------	----

LISTA DE ESQUEMAS

Esquema 1	Esquema reacional para obtenção de diidrocurmarinas via ácido polifosfórico utilizando floroglucino.....	34
Esquema 2	Esquema reacional para obtenção de diidrocurmarinas via ácido polifosfórico utilizando o resorcinol.....	34
Esquema 3	Ciclização intramolecular utilizando rutênio como catalizador obtendo Cromonas (8), Terpenóides (9) e 4- aril-3,4-diidrocurmarinas (10).....	35
Esquema 4	Possível mecanismo para a Hidroarilação intramolecular de ligações triplas C-C.....	36
Esquema 5	Esquema de síntese de diidrocurmarinas proposto por Bennardi e colaboradores (2008) sob influência de radiação de microondas (MW).....	41
Esquema 6	Esquema de síntese de diidrocurmarinas utilizando reação de microondas.....	52
Esquema 7	Sequência de reações para detecção de atividade anticolinesterásica de moléculas pelo método de Ellman...	55
Esquema 8	Esquema de síntese de diidrocurmarinas utilizando reação de micro-ondas.....	74

Esquema 9	Esquema de formação dos produtos com substituição “para” (a) e “orto” (b), sendo que esta última passa pela formação de um intermediário (Z) para formação dos compostos 1b-5b	75
------------------	------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	----

LISTA DE QUADROS

Quadro 1	Fármacos aprovados par ao tratamento da DA.....	48
-----------------	-------------------------------------------------	----

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Concentrações dos compostos submetidos ao teste de Ellman.....	59
Tabela 2	Reagentes e respectivos produtos de cada reação.....	64
Tabela 3	Condições de cada reação realizada sob irradiação de micro-ondas para a geração de cada produto e os respectivos rendimentos.....	66
Tabela 4	Dados espectrais de RMN de ^1H para o composto 1a	67
Tabela 5	Dados espectrais de RMN de ^1H para o composto 1b	68
Tabela 6	Dados espectrais de RMN de ^1H para o composto 4b	69
Tabela 7	Dados espectrais de RMN de ^1H para o composto 2b	70
Tabela 8	Dados espectrais de RMN de ^1H para o composto 3b	71

Tabela 9	Dados espectrais de RMN de ^1H para o composto 2a	72
Tabela 10	Dados espectrais de RMN de ^1H para o composto 5b	73
Tabela 11	Relação dos compostos analisados pelo método de Ellman.	80
Tabela 12	Resultados dos testes para determinação da solubilidade dos solventes na microplaca.....	87
Tabela 13	Valores da inibição (%) anticolinesterásica dos solventes e misturas de solventes utilizados no estudo.....	87
Tabela 14	Solubilidade de cada composto com o respectivo solvente e/ou mistura de solventes e a concentração máxima possível de se solubilizar na dada condição.....	89

LISTA DE ABREVIATURAS

ABS	Sítio de ligação acil
Ach	Acetilcolina
AchE	Acetilcolinesterase
ACTI	Iodeto de acetiltiocolina
AIDS	Síndrome da Imunodeficiência Adquirida
APP	proteína precursora amiloide

AS	Substrato aniônico
BACE	Enzima β -secretase
BSA	soro albumina bovina
CCD	Cromatografia em camada delgada
ChAT	colina acetiltransferase
DA	Doença de Alzheimer
Da	Dalton
δ	delta
d	dubleto
dd	Duplo dubleto
ddd	Duplo duplo dubleto
DTNB	Ácido 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzóico
ES	Sítio esteárico
Hz	Hertz
in	Concentração final do composto na microplaca
IV	Infravermelho
J	joule
<i>m</i>	<i>Meta</i>
m	multipleto
MAO-A	Enzima Monoaminoxidase A
MAO-B	Enzima Monoaminoxidase B

MeOH	Metanol
mM	Milimolar
uM	Micromolar
MW	Micro-ondas
O	<i>Orto</i>
p	<i>Para</i>
PAS	sítio aniônico periférico
Phe 295	fenilalanina na posição 295 da enzima acetilcolinesterase
PPA	ácido polifosfórico
ppm	Partes por milhão
Ppt	Precipitado
PS - γ	Complexo preselina- γ -secretase
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
s	Singleto
SAR	estrutura atividade qualitativa
Sir2	Enzima reguladora de informação silenciosa 2
t	tripleto
Tau	proteína associada à microtúbulo
TFA	Ácido trifluoroacético
TGI	Trato gastro-intestinal
TMS	tetrametilsilano

Trp 286	Aminoácido triptofano 286 da enzima acetilcolinesterase
V	velocidades das reações
WD	ácido de Wells-Dawson

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO.....	23
2.	REVISÃO DA LITERATURA.....	26
2.1	Cumarinas.....	26
2.1.1	Derivados de cumarinas naturais como inibidores da Ache.....	28
2.2	Diidrocumarinas.....	31

2.2.1	Síntese de Diidrocomarinas.....	33
2.3	Irradiação de Micro-ondas.....	39
2.4	Síntese de diidrocomarinas por irradiação de micro-ondas.....	40
2.5	Doença de Alzheimer.....	41
2.5.1	Doença de Alzheimer e a Hipótese Colinérgica.....	45
2.6	Busca de novos protótipos de fármacos para o tratamento da DA.....	49
3.	OBJETIVOS.....	50
3.1	Objetivos Gerais.....	50
3.2	Objetivos Específicos.....	50
4.	METODOLOGIA.....	51
4.1	Síntese de derivados de diidrocomarinas assistida por irradiação de micro-ondas.....	51
4.1.1	Reagentes, equipamentos e laboratórios.....	51
4.1.2	Síntese	51
4.1.3	Identificação estrutural.....	53
4.2	Avaliação da atividade anticolinesterásica de derivados de diidrocomarinas sintetizados através de irradiação de micro-ondas.....	54
4.2.1	Ensaio em microplaca pelo método de Ellman modificado por	

	Rhee.....	54
4.2.2	Avaliação da atividade anticolinesterásica <i>in vitro</i>	56
4.2.3	Preparo dos tampões	57
4.2.4	Preparo da Enzima	57
4.2.5	Preparo do Substrato.....	57
4.2.6	Preparo dos Reagentes colorimétricos.....	57
4.2.7	Material a ser testado.....	58
4.2.8	Preparo das amostras.....	59
4.2.9	Ensaio em microplaca.....	61
4.2.10	Cálculo da inibição da atividade enzimática.....	61
4.2.11	Padronização da atividade enzimática.....	62
4.2.12	Teste dos solventes.....	62
5.	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	64
5.1	Síntese de derivados de diidroumarinas assistida por irradiação de micro-ondas.....	64
5.1.1	Dados dos produtos obtidos.....	67
5.1.2	Influência da temperatura e do tempo na cinética da reação...	74
5.2	Avaliação da atividade anticolinesterásica de derivados de diidroumarinas sintetizados através de irradiação de micro-ondas.....	79
5.2.1	Avaliação da atividade anticolinesterásica em microplaca pelo método de Ellman modificado por Rhee.....	79

5.2.2	Relação entre estrutura molecular e atividade biológica.....	82
5.2.3	Teste de solubilidade e atividade anticolinesterásica dos solventes.....	86
5.2.4	Solubilidade dos compostos.....	89
5.2.5	O problema de solubilidade	90
6.	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	91
	REFERÊNCIAS.....	92
8.	ANEXOS.....	100
8.1	Espectro de RMN de ^1H para o composto 1a	100
8.2	Espectro de RMN de ^{13}C para o composto 1a.....	101
8.3	Espectro de RMN de ^1H para o composto 1b.....	102
8.4	Espectro de RMN de ^{13}C para o composto 1b.....	103
8.5	Espectro de RMN de ^1H para o composto 4b.....	104
8.6	Espectro de RMN de ^{13}C para o composto 4b.....	105
8.7	Espectro de RMN de ^1H para o composto 2b.....	106
8.8	Espectro de RMN de ^{13}C para o composto 2b	107
8.9	Espectro de RMN de ^1H para o composto 3b.....	108
8.10	Espectro de RMN de ^{13}C para o composto 3b.....	109

8.11	Espectro de RMN de ^1H para o composto 2a	110
8.12	Espectro de RMN de ^1H para o composto 5b	111
8.13	Espectro de RMN de ^{13}C para o composto 5b	112
8.14	Imagem do Reator de Micro-ondas Discover modelo Explorer SP	113

1. INTRODUÇÃO

Desde as primeiras notícias descrevendo a Doença de Alzheimer (DA) em 1906, a DA se tornou uma das mais comuns causas de demência, chegando a ser 10 vezes mais frequente do que a Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (Aids). Em 2007 havia cerca de 5,1 milhões de pessoas nos Estados Unidos da América e 30 milhões de pessoas ao redor do mundo sofrendo desta doença, que afeta aproximadamente 10% das pessoas acima de 65 anos e 50% das pessoas acima de 85 anos. Estima-se que atualmente há mais de 18 milhões de pessoas no mundo sofrendo de DA e que o número de pacientes aumente acentuadamente para 70 milhões em 2050 (ADSERSEN et al, 2006; ORHAN et al, 2006; PALLAS & CAMINS, 2006; PIAZZI et al, 2008; RACCHI et al, 2004; REDDY et al, 2004; SEIDL, 2010; XIE et al, 2013).

A DA é uma doença crônica degenerativa e a progressão dos sintomas varia de paciente para paciente. Suas causas ainda são desconhecidas, mas pode estar relacionada a fatores genéticos e fatores ambientais, mas em 90% dos casos pode estar relacionada a idade (BARREIRO et al, 2002; KIM et al, 2010; SHEN et al, 2005).

Com o aumento da expectativa de vida em todo o mundo e conseqüente crescimento da população idosa, estima-se também um crescente número de casos de pessoas acometidas pela DA. De acordo com a Organização Mundial de Saúde (WHO, 2001), estima-se que em 2050 haverá um total de 25 milhões de pessoas com DA. Isso torna a DA uma das doenças mais preocupantes e um grave problema de saúde pública desse século (BALLARD et al, 2011; SEIDL, 2010).

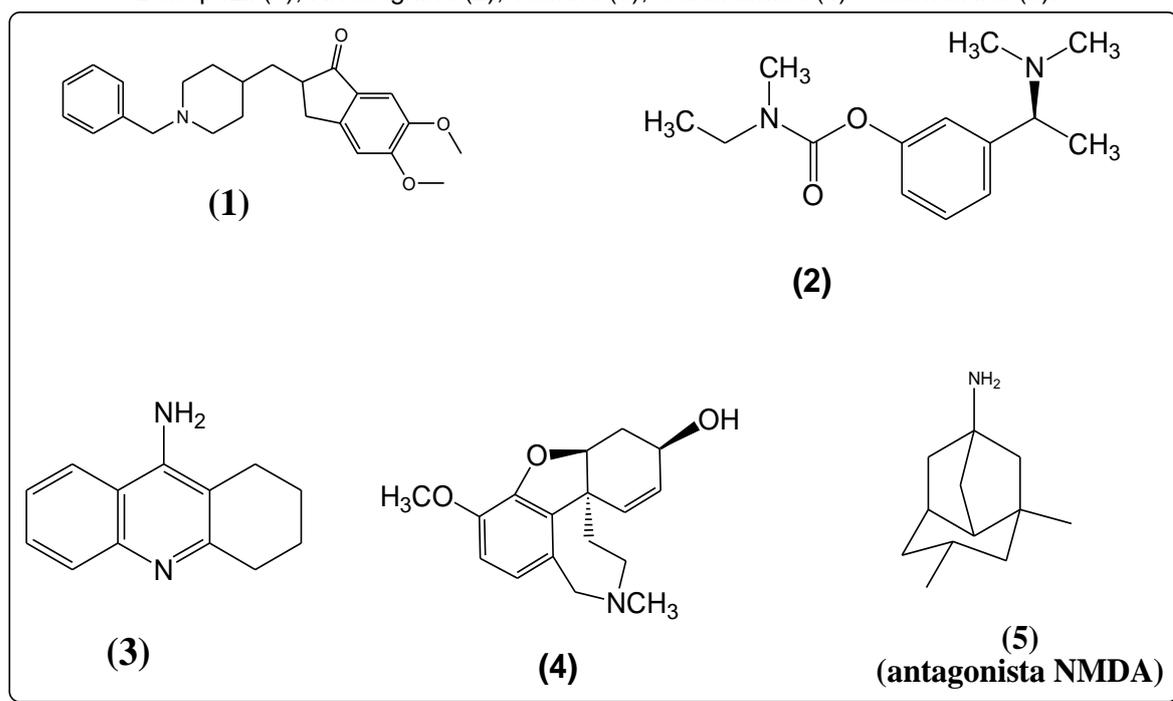
O grande número de pessoas que necessitam de cuidados constantes e serviços relacionados afeta severamente os recursos médicos, monetários e humanos. Conseqüentemente, os tratamentos em desenvolvimento que retardam ou conseguem impedir a progressão da doença tornaram-se imperativos. Nas últimas décadas, apesar de muitos esforços dedicados à pesquisa em DA, sua etiologia ainda não está clara. Até o momento, muitos fatores, incluindo depósitos de peptídeos β -amiloides (formando placas β -amiloides), estresse oxidativo e baixos níveis de acetilcolina (Ach) têm demonstrado estar associados à patogênese da DA,

e várias hipóteses com base nestes fatores têm sido propostos para explicar o mecanismo de desenvolvimento da DA (PIAZZI et al, 2008; XIE et al, 2013).

A hipótese clássica sobre o desenvolvimento da DA é a hipótese colinérgica, a qual sugere que a deterioração das funções cognitivas e da memória é causada principalmente pelo baixo nível de colina, principalmente Ach no cérebro, e a manutenção ou recuperação da Ach pode aliviar esses sintomas da DA (PIAZZI et al, 2008; XIE et al, 2013).

As drogas atuais para o tratamento da DA são limitadas a inibidores da acetilcolinesterase (AChE), a enzima responsável pela hidrólise da Ach na fenda sináptica. Os principais representantes dos inibidores da AChE são o donepezil **(1)**, rivastigmina **(2)**, galantamina **(3)**, tacrina **(4)** e memantina **(5)** (Figura 1). Esses medicamentos são capazes de aumentar a neurotransmissão colinérgica, através do aumento da disponibilidade da Ach na fenda sináptica. Além disso, os inibidores da AChE desempenham um importante papel na deposição de placas β -amiloides: além da sua função catalítica, a AChE também atua como um promotor da formação de fibrilas β -amiloides (PIAZZI et al, 2008; XIE et al, 2013).

Figura 1 – Estrutura molecular dos fármacos mais usados para o tratamento da doença de Alzheimer: Donepezil (1), Rivastigmina (2), Tacrina (3), Galantamina (4) e Memantina (5).



Fonte: CATTO et al, 2013.

Os análogos de cumarinas são agentes fitoquímicos que ocorrem naturalmente em inúmeras espécies de plantas e possuem uma vasta gama de atividades biológicas, tais como anti-inflamatória, anti tumoral, hepatoprotetora, antialérgica, anti-HIV, antiviral, antifúngica, antimicrobiana, anti-asmática, anti-oxidante, anti-nociceptiva, antidiabética e antidepressiva. Estudos também demonstraram que tanto as cumarinas naturais quanto seus análogos sintetizados quimicamente exibem potente atividade anticolinesterásica (BELLUTI et al, 2010; MEOTTI et al, 2006; SILVA, 2011). Além disso, a funcionalização do centro aromático das cumarinas tem levado ao desenvolvimento de novos análogos que se mostraram capazes de inibir também a agregação de placas β -amiloides. O reconhecimento das características estruturais essenciais dentro da estrutura das cumarinas tem ajudado na concepção de novos *designs* e síntese de análogos com uma melhor capacidade de inibir a AchE e adicionais atividades farmacológicas, incluindo atividades beta-secretase e inibição da enzima monoamina – oxidase. Além disso, os derivados da cumarina também fornecem proteção para os neurônios contra o estresse oxidativo induzido por placas β -amiloides e radicais livres (ANAND et al, 2012; LEAL et al, 2000; REDDY et al, 2004).

Estudos têm demonstrado o potencial das cumarinas como inibidores da AchE (ALIPOUR et al, 2012; ANAND et al, 2012; AUGUSTINE et al, 2012; LEAL et al, 2000; PIAZZI et al, 2008), mas não foram encontrados dados na literatura sobre estudos utilizando diidro-cumarinas (composto cujo a dupla nos carbonos C3 e C4 encontram-se hidrogenados) como possíveis compostos com atividade anticolinesterásica. Considerando a similaridade estrutural, a maior flexibilidade do anel e a maior lipofilicidade das diidro-cumarinas, acredita-se que estas podem apresentar alta potencialidade como inibidores da acetilcolinesterase e portanto, promissores fármacos no tratamento de DA.

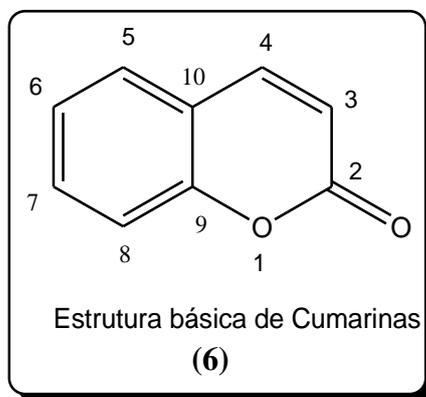
O presente trabalho discute, principalmente, o desenvolvimento e síntese de derivados da diidro-cumarinas como potenciais inibidores da AchE seguido pela descrição de um eficiente método de síntese de diidro-cumarinas assistida por irradiação de micro-ondas. Após a síntese dos compostos, foram testados *in vitro* quanto à capacidade de inibição da enzima AchE.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 – Cumarinas

As cumarinas são compostos fenólicos resultantes do metabolismo secundário das plantas, sendo biosintetizadas a partir do ácido chiquímico, tendo como precursor o ácido cinâmico. O representante mais simples das cumarinas é a cumarina 1,2-benzopirona **(6)** (**Figura 2**), é um composto orgânico aromático heterocíclico encontrado em muitas espécies de plantas, isolado pela primeira vez da *Dipterix odorata* Willd. (fabaceae), uma espécie previamente conhecida como *Cumarona odorata*, daí onde surgiu o termo cumarina. O cumaru, também conhecido como fava-tonka, contém em suas sementes grande quantidade de cumarina (1 a 3%). As cumarinas também podem ser encontradas em fungos e bactérias (RADUNZ et al, 2012).

Figura 2: Esqueleto básico das cumarinas (1,2 benzopirona)



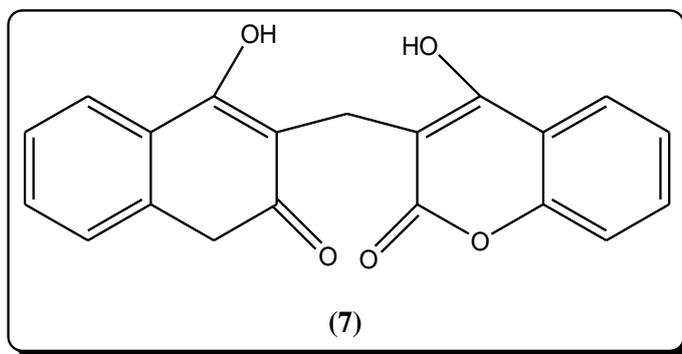
Fonte: Próprio autor

Como espécies vegetais que ocorrem naturalmente, as cumarinas são amplamente distribuídas em várias espécies de plantas pertencentes a diferentes famílias botânicas muito comuns na região nordeste do Brasil. Cerca de 1.300 cumarinas já foram isoladas de fontes naturais e recentemente têm atraído muita atenção porque possuem uma grande variedade de atividades biológicas associadas

a desordens neurológicas, especialmente a DA (LEAL et al, 2000; RADUNZ et al, 2012; XIE et al, 2013).

Estruturalmente são lactonas do ácido o-hidroxicinâmico (2H-1-benzopiran-2-ona), sendo o representante mais simples a cumarina (1,2- benzopirona). Suas propriedades farmacológicas, bioquímicas e aplicações terapêuticas dependem dos padrões de substituição. Na área de medicamentos destacam-se os derivados da 4-hidróxi-cumarina, descobertos durante a investigação de uma doença hemorrágica no gado alimentado com trevo-de-cheiro-amarelo fermentado (*Melilotus officinalis* Lam.), o que levou à descoberta da ação anticoagulante do dicumarol **(7)** (**Figura 3**). Esse foi o primeiro fármaco com essa ação por via oral e constitui o modelo para o desenvolvimento de uma classe de anticoagulantes com o núcleo básico 4-hidróxicumarina, do qual derivam importantes fármacos (RADUNZ et al, 2012).

Figura 3 – Estrutura do Dicumarol (7).



Fonte: Próprio autor

As cumarinas possuem também uma grande aplicação industrial, devido principalmente à sua forte fragrância. São utilizadas em adoçantes, lavandas, perfumes, aditivos de alimentos em combinação com a vanilina, aditivos de tintas e de borrachas para mascarar o odor e como estabilizador de sabor/odor de tabacos. Também existem estudos do uso de cumarinas em sondas fluorescentes e sensibilizadores tripleto e na indústria cosmética (AUGUSTINE et al, 2012; SONG et al, 2003; VILA NOVA et al, 2012).

Dentre as atividades farmacológicas já atribuídas em estudos às cumarinas, pode-se destacar: atividade hepatoprotetora (ANAND et al, 2012), antioxidante (BEILLEROT et al, 2008; ROUSSAKI et al, 2010), anti-inflamatória (LEE et al, 2004; ROUSSAKI et al, 2010), ação antitrombótica e vasodilatadora (MONTI et al, 2007), propriedade antimutagênica (PILLAI et al, 1999), inibição da proliferação celular (LEE et al, 2006; MORITA et al, 2004), antineoplásica (BELLUTI et al, 2010; REDDY et al, 2004), antibacteriana e antifúngica (BASANAGOUDA et al, 2010), atividade antinociceptiva (LEAL et al, 2000; MEOTTI et al, 2006) dentre muitas outras.

Há também estudos sobre o uso de cumarinas no tratamento de melanomas malignos e linfedemas (REDDY et al, 2004). Recentemente algumas cumarinas com atividade anti-HIV foram identificadas a partir de fontes vegetais (LEAL, et al, 2000; RADUNZ et al, 2012).

Os derivados da cumarina mostraram possuir efeitos no sistema nervoso central, por exemplo, as diidropiranocumarinas exercem efeitos neuroprotetores contra os efeitos excitotóxicos do glutamato, as furocumarinas exibem efeitos antidepressivos associados com a inibição das enzimas Monoaminoxidases A e B (MAO-A e MAO-B), da superóxido dismutase e da malondialdeído. Outros estudos mostraram que as cumarinas possuem atividade gabaérgica, como os benzodiazepínicos e que têm a capacidade de melhoramento da memória (HORNICK et al, 2011; PEREIRA, et al, 2009).

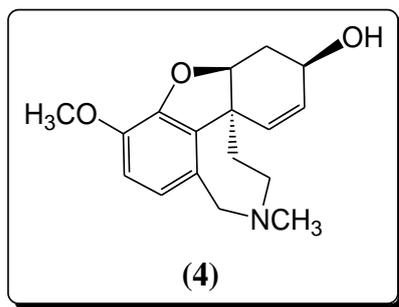
Entre os inúmeros estudos que identificam as atividades farmacológicas das cumarinas e de seus análogos sintéticos estão os estudos que mostram que esses compostos exibem uma potente atividade anticolinesterásica (PEREIRA et al, 2009; PIAZZI et al., 2008; XIE et al, 2013).

2.1.1 - Derivados de cumarinas como inibidores da Acetilcolinesterase (Ache)

Dentro dos inibidores da acetilcolinesterase de maior sucesso introduzidos como medicamentos no mercado, pequenas moléculas de origem natural têm ocupado uma posição de destaque. Dentro da ampla gama de produtos naturais, a fisostigmina, um alcaloide indólico, extraída da *Physostigma venenosum* Balfour, se tornou um dos principais agentes anticolinesterásicos. Entretanto, ela apenas

mostrou uma modesta melhora na função cognitiva em pacientes com DA e isso se deve à sua pequena capacidade de penetração no cérebro, sua bioatividade oral e parâmetros farmacocinéticos. Alcaloides de várias espécies de Amaryllidaceae também foram selecionados como possíveis agentes anticolinesterásicos e um dos mais potentes foi a galantamina **(4)** (**Figura 4**), derivada da *Galanthus nivalis* L., a qual é utilizada atualmente como o medicamento Reminyl®. Os alcaloides são seletivos, de longa duração, reversíveis e produzem vários efeitos benéficos para a função cognitiva em pacientes com DA, mas apesar desse substancial progresso, ainda existe um grande interesse em encontrar melhores inibidores da AchE, que possuam uma penetração mais rápida no sistema nervoso central, que possuam uma longa duração e menor toxicidade (FALLARERO, et al, 2008; ROLLINGER et al, 2004).

Figura 4 – Estrutura da Galantamina (4).



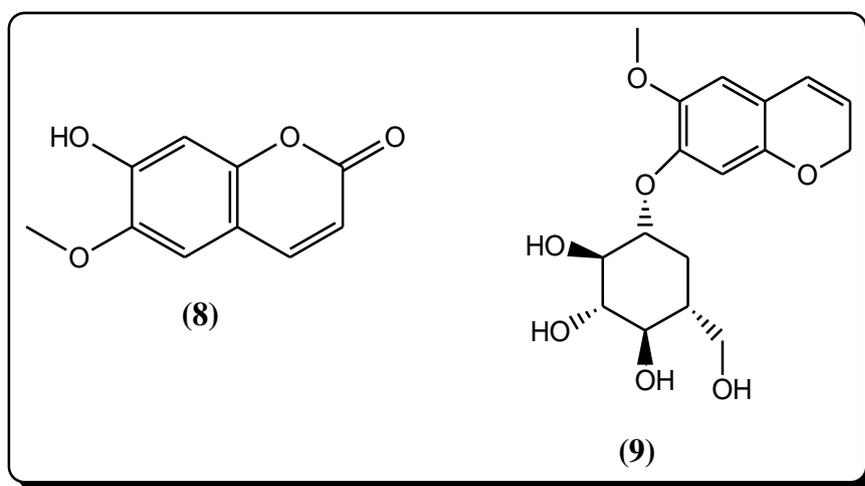
Fonte: Próprio autor

Um estudo envolvendo a medicina popular chinesa, europeia, japonesa e ayurveda realizou uma triagem entre inúmeras plantas e seus constituintes ativos conhecidas e usadas nessas comunidades por melhorarem as funções cognitivas e melhorarem sintomas de demência (e conseqüentemente serem possíveis inibidores da AchE). Foram encontradas nesse estudo algumas cumarinas naturais indicadas para esse fim (HOWES et al, 2003).

Em 2004, Rollinger e colaboradores testaram a atividade anticolinesterásica da escopoletina (1, 7-hidroxi-6-metoxicumarina) **(8)** e escopolina (2, 7-O- α -glucopiranosideo-6-metoxicumarina) **(9)** (**Figura 5**), duas cumarinas que ocorrem amplamente como metabólitos secundários de plantas, especialmente na família

Solanaceae, e elas demonstraram uma moderada, porém, significativa atividade inibitória dose-dependente e de longa duração. No mesmo ano, Lee e colaboradores (2004) também demonstraram o efeito anticolinesterásico da cumarina escopoletina, extraída de galhos da *Vaccinium oldhami* L., da família Ericaceae (HORNICK et al, 2011; LEE et al, 2004).

Figura 5- Estrutura da escopoletina (8) e da escopolina (9)



Fonte: Próprio autor

Estudos realizados com cumarinas extraídas de uma espécie de planta *T. trifolia* demonstraram também a capacidade destas de inibir de forma eficiente a enzima acetilcolinesterase *in vitro* (SANTOS, 2008). Fallarero e seus colaboradores (2008) estudaram uma série de cumarinas, algumas das quais apresentaram significativa atividade anticolinesterásica e no mesmo estudo encontraram uma cumarina que além da atividade anticolinesterásica, apresentou a capacidade de inibir a enzima butirilcolinesterase, combinação essa de resultados que tornou essa cumarina muito atrativa. Outra espécie que também apresentou cumarinas com atividade anticolinesterásica foi *C. fontanesianus* (CABRAL et al, 2012).

Em uma revisão, Barbosa-Filho e seus colaboradores (2006) avaliaram 260 moléculas naturais quimicamente definidas quanto à sua atividade anticolinesterásica. Os compostos testados foram classificados em alcaloides (139), monoterpenos (27), cumarinas (18), triterpenos (17), flavonoides (14) e outros. Neste

sentido, a descoberta de novos compostos a partir de fontes naturais e a síntese de derivados com atividade anticolinesterásica é de grande interesse (CABRAL et al, 2012; HOUGHTON et al, 2006).

Tanto as cumarinas de ocorrência natural quanto os seus análogos sintetizados quimicamente podem exibir uma potente atividade anticolinesterásica (XIE et al, 2013). Recentemente um estudo avaliou 20 derivados de cumarinas sintéticas e encontrou variáveis níveis de inibição anticolinesterásica (PUTTARAJU et al, 2013; XIE et al, 2013).

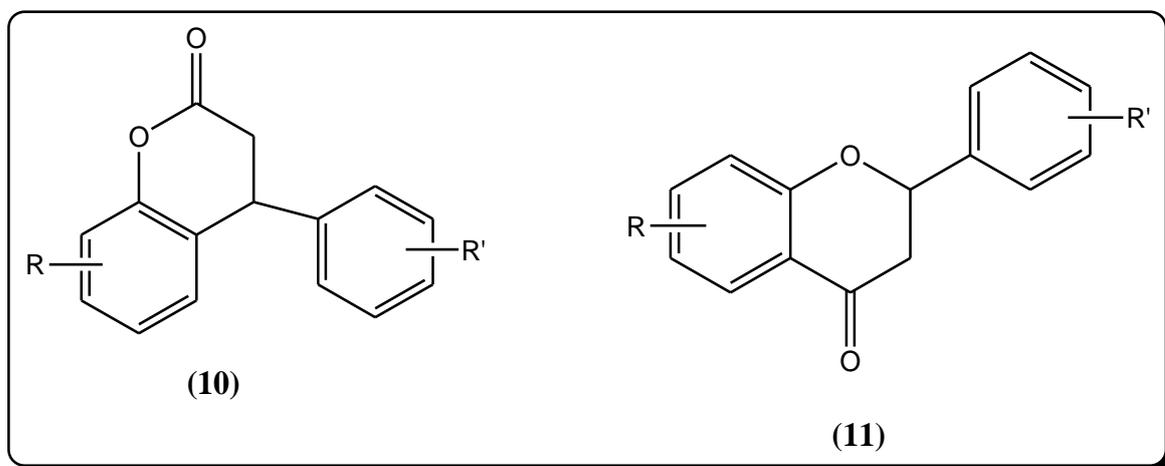
Estudos como os de ALIPOUR (et al, 2013), CATTO (et al, 2013), FALLARERO (et al, 2008) e PIAZZI (et al, 2008) sugerem que as cumarinas sintéticas e seus análogos podem ser uma classe de agentes muito importantes no tratamento de DA e de outros transtornos neurológicos.

2.2 – Diidroocumarinas

As 4-aril-3,4-diidroocumarinas, conhecidas como neoflavonóides ou neoflavononas, possuem um grande interesse sintético porque estão presentes em inúmeras moléculas naturais e são estruturas fundamentais em vários produtos farmacêuticos (AOKI et al, 2005; BENNARDI et al, 2008; JACOBSEN et al, 2012).

As diidroocumarinas **(10)** compartilham similaridades estruturais com flavonoides **(11)** (**Figura 6**) e isoflavonoides. São encontrados principalmente nas *Leguminosae*, mas ao contrário dos isoflavonoides, são também encontrados nas *Gurriiferae*, *Rubiaceae* e *Passifloraceae* e nos calomelanóis. Esses compostos polifenólicos apresentam atividade biológica semelhante ao estrogênio. A diidroocumarina diacetoxi é um composto da proteína trans-acetilase. A esplitomicina e os seus análogos são conhecidos por serem inibidores da enzima do grupo das sirtuinas, especialmente a reguladora de informação silenciosa (Sir2), os derivados do gênero *Calophyllum* são relatados por possuir atividade piscicida. Um estudo de extrato bruto do gênero *Calophyllum* e alguns derivados sintéticos mostraram também a atividade moluscicida (BEZERRA et al, 1997; DONNELLY & BOLAND, 1995; PRAKASH et al, 2010).

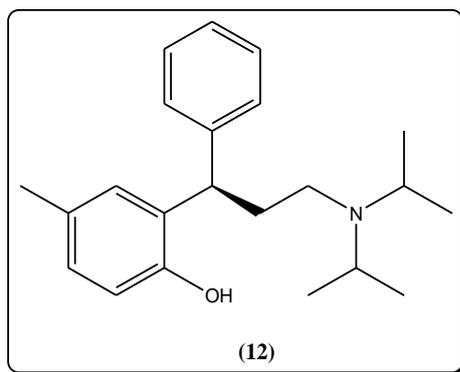
Figura 6 - Estrutura genérica de Diidrocumarinas **(10)** e Flavonóides **(11)**



Fonte: Próprio autor

As propriedades biológicas dos compostos que contém o esqueleto 4-aryl-3,4-diidrocumarinas ainda possuem poucas pesquisas a respeito, apesar de apresentarem importantes atividades biológicas, como a inibição da aldose redutase, inibição de proteínas quinases, propriedade anti-herpética e atividade estrogênica moderada, sendo que esta foi recentemente escrita. As diidrocumarinas naturais são também de grande interesse na indústria de alimentos, sendo utilizadas como agentes aromatizantes em diversos alimentos (refrigerantes, iogurtes, muffins, etc). Além disso, os neoflavonoides são amplamente usados como precursores para a síntese de importantes compostos bioativos como tartarato de tolterodina **(12)** (**Figura 7**) que é um antagonista do receptor muscarínico, usado para o tratamento do transtorno da bexiga urinária (JEON et al, 2011; PENG et al, 2012; PRAKASH et al, 2010; RODRIGUES-SANTOS & ECHEVARRIA, 2007).

Figura 7 – Estrutura química do Tartarato de tolterodina (**12**).



Fonte: Próprio autor

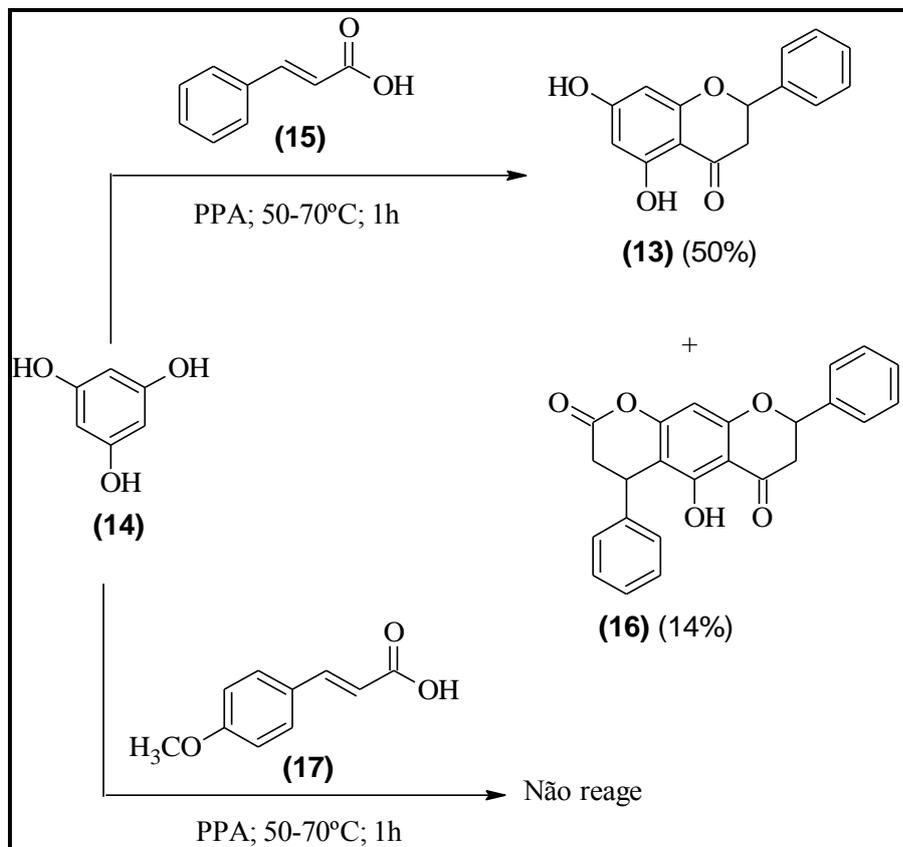
As 3,4-dihidrocumarinas têm sido largamente usadas como intermediários sintéticos em química orgânica e têm sido geralmente preparadas pela redução de suas cumarinas correspondentes. Conseqüentemente esses compostos são alvos muito interessantes para os químicos orgânicos e várias estratégias para sua síntese vêm sendo desenvolvidas (BENNARDI et al, 2008; LI et al, 2009).

2.2.1 – Síntese de Dihidrocumarinas

A síntese de dihidrocumarinas (**13**) foi realizada pela primeira vez nos anos 80 utilizando floroglucinol (**14**) e ácido cinâmico (**15**) na presença de ácido polifosfórico (PPA), obtendo como produto as dihidrocumarinas com baixos rendimentos e um subproduto (**16**) (**Esquema 1**). Entretanto, ao utilizar ácidos cinâmicos substituídos como o ácido p-metoxicinâmico (**17**), a reação não ocorria. Os autores desse estudo então refizerem a reação desta vez utilizando resorcinol (**18**) e obtiveram apenas a dihidrocumarina (**19**) como produto (**Esquema 2**) (SILVA, 2011).

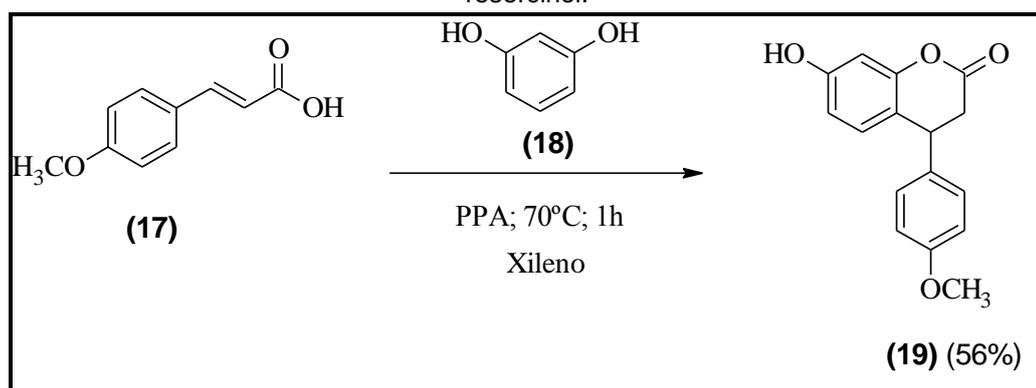
Esse resultado mostrou que os produtos da reação são formados via mecanismos diferentes, de acordo com o substituinte e que grupos doadores de elétrons facilitarão a ocorrência da reação (SILVA, 2011).

Esquema 1: Esquema reacional para obtenção de diidrocurmarinas (**19**) via ácido polifosfórico utilizando floroglucino.



Fonte: SILVA, 2011.

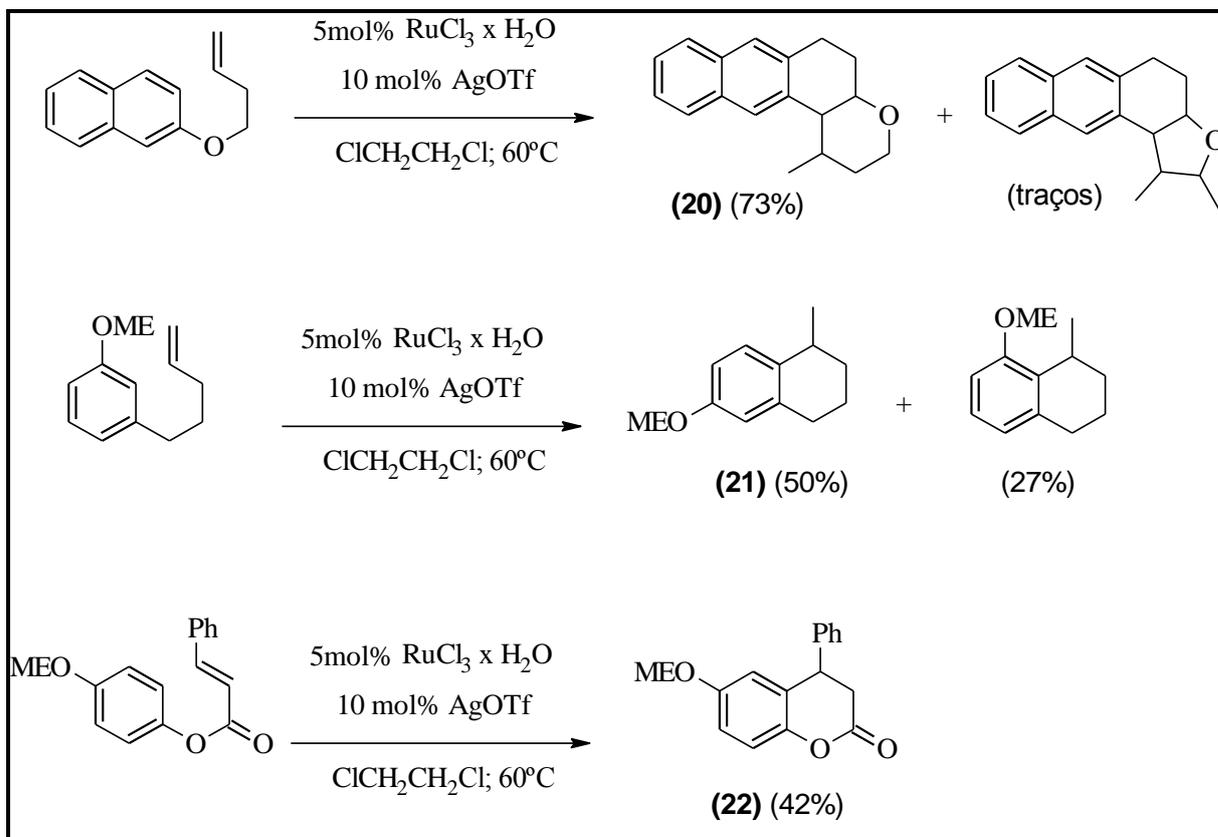
Esquema 2: Esquema reacional para obtenção de diidrocurmarinas via ácido polifosfórico utilizando o resorcinol.



Fonte: SILVA, 2011.

Em 2004, Youn e colaboradores utilizaram Rutênio como catalisador ($\text{RuCl}_3/\text{AgOTf}$) em reações intramoleculares para ciclização de alcenos e alcinos obtendo cromonas, terpenoides e as 4-aryl-3,4-diidrocurmarinas (**Esquema 3**). Seus resultados indicaram que o Ru é um catalisador eficiente (YOUN et al, 2004).

Esquema 3 - Ciclização intramolecular utilizando rutênio como catalisador obtendo Cromonas (**20**), Terpenoides (**21**) e 4-aryl-3,4-diidrocumarinas (**22**).

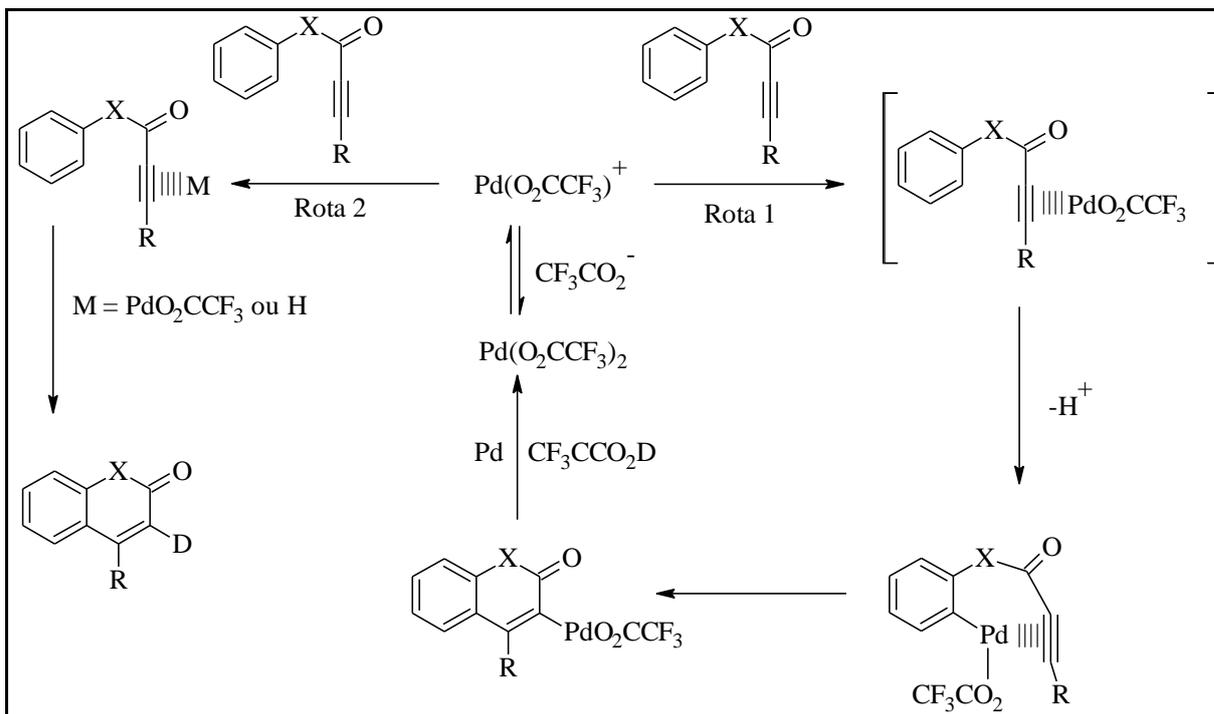


Fonte: YOUN et al, 2004.

Jia e colaboradores propuseram uma nova metodologia para hidroarilação de alcenos e alcinos através da metalação eletrofílica de ligações C-H de anéis aromáticos utilizando compostos de coordenação baseados em Pd II para formar complexos do tipo $\sigma\text{-aryl-Pd}$ (JIA et al, 2000).

O **esquema 4** mostra o mecanismo proposto por Jia e colaboradores para as suas reações. Na primeira etapa, espécies catiônicas de Pd altamente eletrofílicas são formadas quando um excesso de ácido trifluoracético (TFA) é usado na presença de Pd, formando $Pd(O_2CCF_3)^+$. Em consequência, ocorre a ativação da ligação tripla carbono-carbono com o complexo de coordenação, ao mesmo tempo em que gera aceptores C-H de aril-nucleofílicos, ou seja, há um aumento da metalação $\sigma\text{-aryl-Pd}$ (JIA et al, 2000).

Esquema 4: Possível mecanismo para a Hidroarilação Intramolecular de ligações triplas C-C.

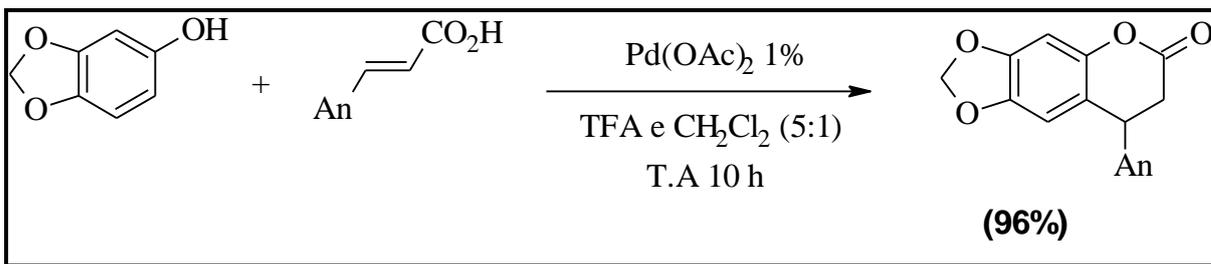


Fonte: JIA et al, 2000.

Jia e colaboradores justificaram o excesso de TFA, sugerindo a necessidade de grande quantidade de espécies catiônicas de Pd²⁺ para formar complexos estáveis de σ -*aryl*-Pd. Além disso, o TFA facilitou a hidrólise dos compostos vinil-metálicos (JIA et al, 2000; SILVA, 2011).

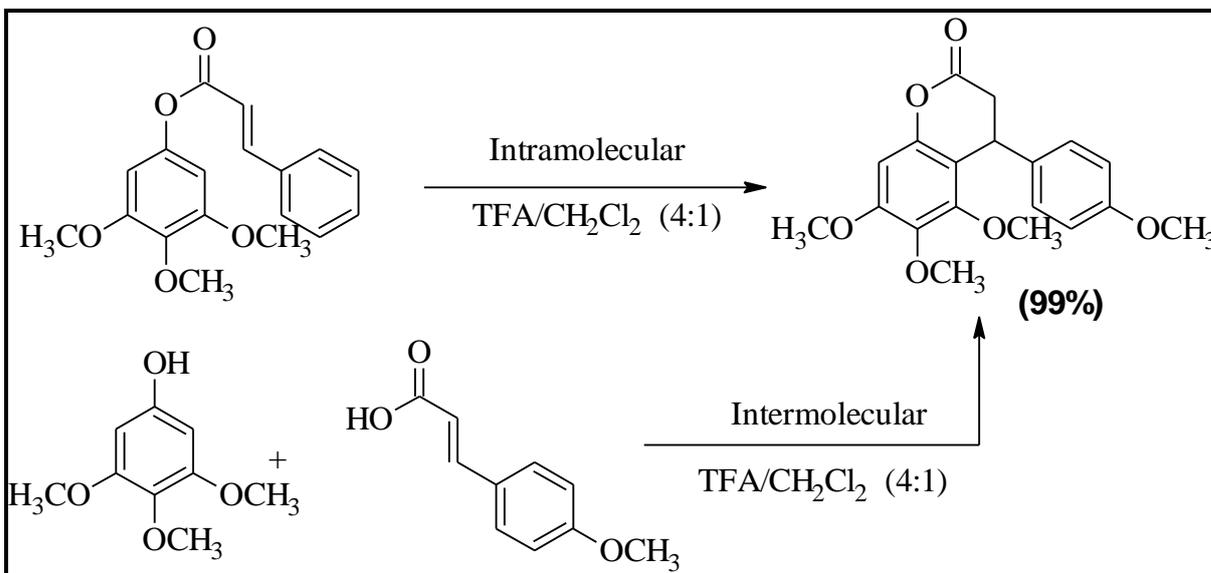
Para a obtenção de 4-*aryl*-dihidrocumarinas, Jia e colaboradores utilizaram um sistema reacional contendo TFA e CH₂Cl₂ (5:1), Pd(OAc)₂, conforme **Figura 8**. Entretanto, em 2005 Li e colaboradores afirmaram que a hidroarilação não seria catalisada por compostos de Pd II (**Figura 9**). Na verdade, a catálise ocorreria fazendo uso apenas do TFA (LI et al, 2005).

Figura 8: Hidroarilação de alkenos para formação de diidrocurmarinas



Fonte: JIA et al, 2000.

Figura 9: Hidroarilação de Olefinas na ausência de catalisadores metálicos.



Fonte: LI et al, 2005

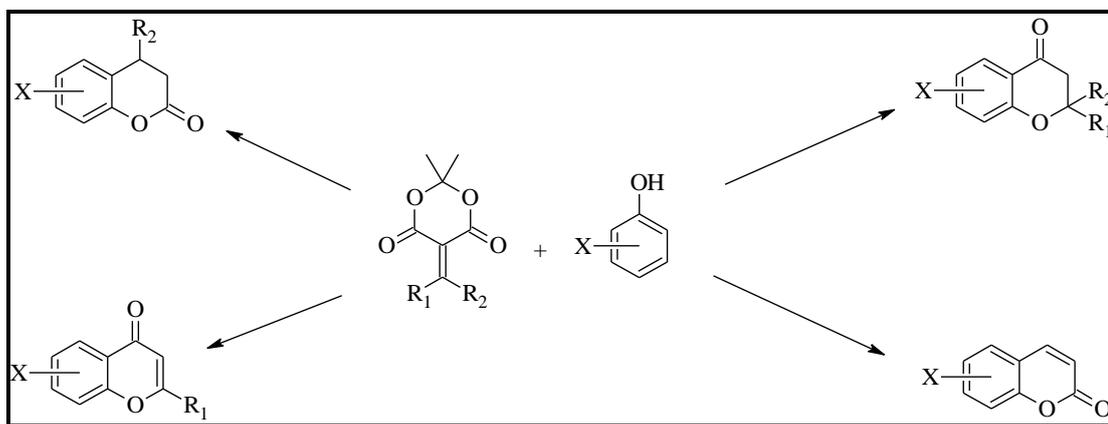
Li e colaboradores afirmam que ao realizar a síntese de acordo com o descrito na literatura, ou seja, utilizando $\text{Pd}(\text{OAc})_2$, obtem-se rendimentos de 96% e na ausência do catalizador metálico, o rendimento aumenta para 99% (LI et al, 2005).

Além disso, Li e colaboradores verificaram que as reações intermoleculares seriam mais fáceis de acontecer que as intramoleculares e que os grupos doadores de elétrons ligados ao fenol facilitariam as reações de hidroarilação. Foi relatado também que a reação é particularmente simples onde obtem-se o produto com altos

rendimentos. Outro benefício dessa abordagem é a utilização de reagentes simples, com certa complexidade estrutural e a economia de átomos em relação a metodologias anteriores que utilizavam metais pesados como Pt e Pd para catalisar as reações (LI et al, 2005).

Existem outras rotas de síntese alternativas capazes de obter diidrocurmarinas, como a reação dos ácidos 5-alkil Meldrun's com fenol (**Figura 10**) (FILLION et al, 2006). Ou a reação proposta por Aoki e colaboradores (2005), onde diidrocurmarinas foram obtidas na ausência de Pd(OAc)₂, quando etil-cinamatos foram empregados na reação, influenciando assim grupos doadores de elétrons.

Figura 10: Obtenção de diidrocurmarinas e curmarinas através do ácido 5-alkil-meldrun's.



Fonte: FILLION et al, 2006.

Apesar de tantos métodos para a síntese de diidrocurmarinas terem sido reportados até o presente, a maior parte dos procedimentos baseados em condensação de fenóis com ácidos cinâmicos foram realizados em meio ácido e em altas temperaturas. Esses procedimentos também sofrem vários inconvenientes, tais como substrato âmbito limitado, a utilização de ácidos fortes e, por vezes, a necessidade de reações com múltiplos passos, o que consome muito tempo. Conseqüentemente, um procedimento mais ameno e simples é amplamente desejável (AOKI et al, 2005; AUGUSTINE et al, 2012; MASHRAQUI et al, 2004).

2.3 Irradiação de Micro-ondas

Nos dias atuais, há uma tendência mundial para que se adote “química verde” ou “sustentável”. Isso implica que a maioria dos processos, principalmente industriais, precisariam ser repensados a partir do ponto zero no sentido de evitar a poluição do meio-ambiente. O uso de solventes voláteis, orgânicos e altamente inflamáveis é a fonte mais importante de poluição ecológica no momento. A água seria uma excelente alternativa para todo esse problema, entretanto, a maioria dos reagentes orgânicos são insolúveis em água. A aplicação da irradiação de micro-ondas pode resolver esse dilema de forma eficiente, pois a água possui uma boa habilidade de absorver micro-ondas, permitindo assim o rápido aquecimento das misturas de reação. Além disso utilizando a tecnologia de micro-ondas, é possível realizar sínteses orgânicas rápidas e eficientes e até mesmo sem o uso de solventes (EYCKEN, 2010; NIRALWAD et al, 2010). O uso de solventes inorgânicos, saudáveis e baratos como a água poderia render benefícios significativos para os defensores da “química verde”. Solventes iônicos líquidos são também os solventes mais populares, mas eles são muito caros e seus efeitos ambientais são em grande parte desconhecidos (ZAREAI et al, 2012).

Os primeiros estudos sobre o uso de irradiação de micro-ondas para acelerar transformações químicas orgânicas foram publicados em 1986 por Gedye e Giguere e seus respectivos colaboradores (GEDYE et al, 1986; GIGUERE et al, 1986). Desde então surgiram muitos estudos a respeito desse uso e o interesse na irradiação de micro-ondas, como uma técnica de aquecimento altamente eficiente e versátil, tem crescido consideravelmente (KAPPE et al, 2013; RAMIER et al, 2012). Tanto na academia quanto na indústria, o uso de reatores de micro-ondas na síntese orgânica tem aumentado ao longo dos últimos anos. Isso se evidencia pelo crescente número de publicações neste campo. Em adição ao significativo número de artigos de revisão, livros também estão sendo publicados sobre o tema da tecnologia das micro-reações e química de fluxo (KAPPE, 2011).

Pode-se afirmar que o “ponto quente” na química sintética hoje é o processamento de fluxo contínuo envolvendo “microreatores” ou dispositivos

relacionados. A síntese orgânica assistida por micro-ondas tem se tornado uma importante ferramenta para os químicos orgânicos sintéticos. Algumas das vantagens da síntese orgânica assistida por micro-ondas sobre os métodos convencionais de aquecimento (por exemplo, banhos de óleo) incluem uma redução significativa dos tempos de reação e a geração de misturas de produtos mais limpos (KAPPE, 2010; SHORE et al, 2010).

Ao longo da última década, os procedimentos assistidos por micro-ondas têm sido largamente aplicados a uma infinidade de processos que vão desde a síntese de (co) polímeros até sínteses orgânicas complexas (RAMIER et al, 2012). Por exemplo, a síntese de cumarinas, que antes era realizada apenas por meio de técnicas com múltiplos passos e o uso de inúmeros solventes, hoje pode ser realizada por meio de micro-ondas em um tempo menor e sem o uso de solventes, o que torna a síntese muito conveniente (MANHAS et al, 2006; PUTTARAJU et al, 2013; VARMA, 2013).

2.4 – Síntese de diidro-cumarinas por irradiação de micro-ondas

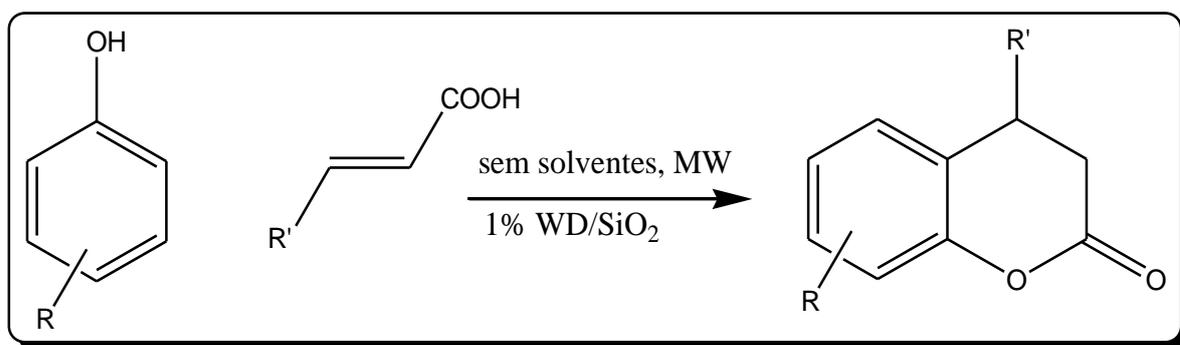
Com o desenvolvimento e aperfeiçoamento do uso de técnicas de micro-ondas (MW) para sínteses orgânicas, alguns autores vêm reportando a síntese de vários derivados de diidro-cumarinas através de micro-ondas, o que é uma possibilidade relativamente nova e abre um enorme leque de opções de aperfeiçoamento de derivados de diidro-cumarinas (BENNARDI et al, 2008; MANHAS et al, 2006; RODRIGUES-SANTOS & ECHEVARRIA, 2007).

Em 2007 Rodrigues-Santos e Aurea Echevarria reportaram a síntese de onze 4-aril-3,4-diidro-cumarinas utilizando $(CF_3SO_3)_3Y$, um ácido de Lewis mais sofisticado, como catalisador sob irradiação de micro-ondas. Essa síntese obteve altos rendimentos (68 a 80%) e o tempo médio para a síntese foi de 7 a 20 minutos, sendo mais rápido ao relatado na literatura (1 a 40 horas) (RODRIGUES-SANTOS & ECHEVARRIA, 2007).

Em 2008, Bennardi e seus colaboradores também sintetizaram diidro-cumarinas sob irradiação de micro-ondas, sem o uso de solventes, partindo de fenóis e ácidos carboxílicos α,β -insaturados e utilizando um suporte de sílica de

ácido de Wells-Dawson ($H_6P_2W_{18}O_{62} \cdot 24 H_2O$) (WD) como catalisador da reação (**Esquema 5**) (BENNARDI et al, 2008).

Esquema 5 – Esquema de síntese de diidrocurmarinas proposto por Bennardi e colaboradores (2008) sob influência de radiação de micro-ondas (MW).



Fonte: BENNARDI et al, 2008.

Em 2009, Li e seus colaboradores conseguiram sintetizar uma série de 3,4-dihidrocurmarinas derivadas de salicilaldeído e compostos 1,3-dicarbonilo sob irradiação de micro-ondas, sem o uso de solventes, com rendimentos moderados e também com um pequeno tempo de reação (LI et al, 2009).

Em todos esses estudos fica em destaque o curto tempo gasto para a síntese dos compostos e a possibilidade de ser realizada sem o uso de solventes (BENNARDI et al, 2008; MANHAS et al, 2006; RODRIGUES-SANTOS & ECHEVARRIA, 2007).

2.5 Doença de Alzheimer

A DA é a doença degenerativa que mais contribui para a diminuição das funções cognitivas. É uma doença mental complexa, multifatorial, heterogênea e irreversível. A DA foi relatada pela primeira vez em 1906, em um congresso na Alemanha, pelo médico alemão Alois Alzheimer. Na ocasião, o pesquisador descreveu características neuropatológicas de uma paciente de 55 anos de idade com histórico de 4 anos de demência progressiva. Tais neuropatologias ainda hoje

refletem as principais características da doença (BLENNOW et al, 2006; FIQUEREDO, 2013; SHEN et al, 2005).

A chance de se desenvolver DA aumenta com o avanço da idade, mas além da idade avançada, há outros fatores de risco para essa doença. Um desses fatores é a diminuição da capacidade de reserva do cérebro, o que pode ser o resultado de uma baixo nível educacional ou uma diminuição da atividade física ou mental durante o tempo de vida. Outra causa confirmada por pesquisas epidemiológicas são os ferimentos no crânio (SEIDL, 2010; SZYMANSKI et al, 2011).

As regiões do cérebro mais degeneradas pela DA são o córtex e o hipocampo, as quais estão relacionadas com as funções complexas.

Três estágios da doença foram descritos por PALLAS e CAMINS (2006):

- **1º Estágio** - A DA sempre começa pelo ataque dos neurônios do sistema límbico, particularmente aqueles localizados no hipocampo que correspondem no cérebro pela zona da memória. Nessa fase somente os neurônios colinérgicos são afetados, como se a doença escolhesse somente os neurônios da memória. Neste estágio o hipocampo perde aproximadamente 25% de seu volume. Como os neurônios dessa zona, que são responsáveis pelo elo entre e memória de curto prazo e a memória de longo prazo, estão danificados, os pacientes no estágio prematuro da doença apresentam leves declínios na capacidade de memorização. O indivíduo pode apresentar sinais menores de esquecimento relacionados, por exemplo, a nomes ou eventos recentes. Indivíduos afetados também irão apresentar dificuldades menores de comunicação e na aquisição de novas informações. O estágio prematuro dura geralmente dois a quatro anos.

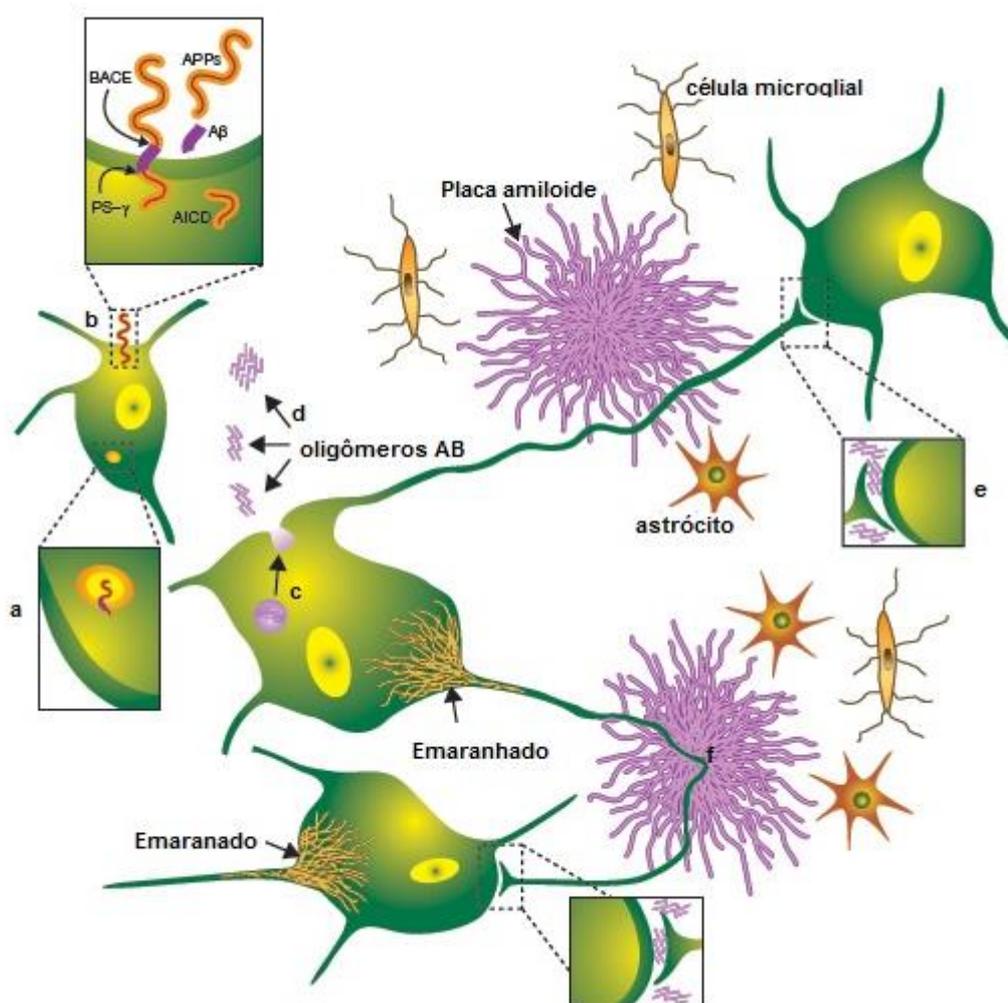
- **2º Estágio:** O estágio intermediário é o mais longo, podendo durar de dois a dez anos. A doença continua a causar devastação principalmente no sistema límbico e o hipocampo continua a perder neurônios, bem como várias outras zonas do sistema límbico são agora danificadas. Há perda de memória de curto prazo e conseqüentemente apresenta dificuldade para comunicar-se. Posteriormente, ocorre um acentuado declínio nos níveis da acetilcolina de certos neurônios, dentre estes estão aqueles localizados no telencéfalo ventral, os quais em condições normais estão envolvidos no armazenamento de informações da memória de longo prazo. O paciente, portanto, não consegue lembrar nenhuma informação nova. Durante

esse estágio, há alterações de personalidade, confusão, raiva, tristeza, falta de orientação e concentração.

- **3º Estágio:** Quando a doença ocupa uma grande parte do sistema límbico, incluindo 90% do hipocampo. Durante o estágio avançado da doença, quase nenhuma recuperação de informação é possível devido ao dano no sistema límbico. Neste ponto, a doença ataca os neurônios colinérgicos em todo o córtex cerebral destruindo assim, as memórias ali armazenadas. Há esquecimento do passado, amigos e família. Além disso, perde a memória ocasional e perde totalmente a capacidade de se comunicar ou trabalhar. Esta fase dura de um a três anos em média e termina com a morte do paciente (BLENNOW et al, 2006; SEIDL, 2010).

A figura 11 ilustra os principais eventos relacionados com o desenvolvimento do processo neurodegenerativo durante a evolução da doença de Alzheimer. Em um cérebro normal, as moléculas de APP (proteína precursora amiloide) presentes no plasma (**b**) e em vesículas intracelulares como os endossomos (**a**), são quebradas pela β -secretase (BACE) e pelo complexo presenilina- γ -secretase (PS - γ) para liberar a região de peptídeo β -amiloide. No caso de um cérebro com DA, uma porção do peptídeo β -amiloide pode sofrer oligomerização, inicialmente dentro das vesículas (**c**), e depois ser liberado no líquido intersticial cerebral (**d**), de onde os oligômeros solúveis podem se difundir para as fendas sinápticas e interferir com as funções sinápticas de maneira ainda desconhecida (**e**). Os oligômeros de A β podem ainda se polimerizar em fibras amiloides insolúveis as quais se agregam em placas esféricas, prejudicando estruturalmente e funcionalmente os axônios e dendritos adjacentes (**f**). A ativação de quinases no citoplasma dos neurônios acompanha este efeito e leva a hiperfosforilação da proteína associada à microtúbulo (tau) e sua subsequente polimerização em filamentos insolúveis que se agregam na forma de emaranhados neurofibrilares (**g**). Células da microglia ativadas e astrócitos reativos ao redor das placas participam na resposta inflamatória localizada o que pode contribuir para a neurotoxicidade (SELKOE, 2004b).

Figura 11 - Modelo de eventos chaves relacionados com a patologia da DA.



Fonte: Selkoe, 2004b.

Os cientistas propuseram inúmeras teorias explicando o mecanismo de desenvolvimento da DA. Algumas delas são: diminuição da função colinérgica (conhecida como hipótese colinérgica), cascata amiloide (hipótese amiloide), stress oxidativo, diminuição da concentração de hormônios esteroides e processo

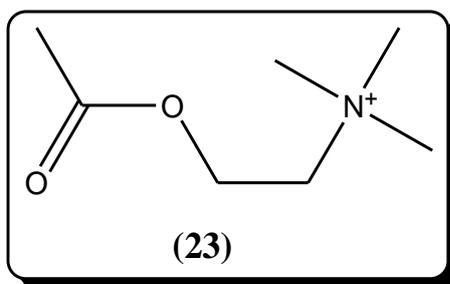
inflamatório. A hipótese colinérgica tem sido amplamente estudada e confirmada, ela afirma que a incapacidade de transmitir impulsos neurológicos entre as sinapses cerebrais é a razão para as disfunções cognitivas e comportamentais (ANAND et al, 2012; SEIDL, 2010; SZYMANSKI et al, 2011).

2.5.1 Doença de Alzheimer e a Hipótese Colinérgica

No início do século XX os cientistas descobriram que existem moléculas que funcionam como mediadores químicos entre os neurônios e o restante do corpo. Hunt, em 1907 propôs que a Ach **(23)** (**Figura 12**) seria responsável por essa mediação celular. Segundo ele, sua ação seria estimular os nervos parassimpáticos (RAFFA, 1999; SILVA, 2011; TERRY JR. & BUCCAFUSCO, 2003).

Hoje já se sabe que a neurotransmissão de impulsos nervosos via AchE é vital. O diagnóstico da DA é feito através da detecção da perda da capacidade de neurotransmissão. A alteração mais característica associada à DA é a diminuição da neurotransmissão colinérgica central. A patologia é o resultado da diminuição da atividade da colina acetiltransferase (ChAT), a enzima que sintetiza Ach. Há uma correlação entre a redução da atividade da ChAT nos casos de DA e a gravidade dos distúrbios cognitivos (CASTRO, 2006; SEIDL, 2010; SZYMANSKI et al, 2011; XIE et al, 2013).

Figura 12 - Estrutura molecular da Acetilcolina (Ach) **(23)**



Fonte: Próprio autor

Na fenda sináptica há altas concentrações de acetilcolinesterase (AChE), essa enzima hidroliza rapidamente a Ach que entrou na fenda, formando colina e um grupo acetato. A colina formada é então novamente transportada para a membrana pré-sináptica e direcionada para a síntese de outras moléculas de Ach (LLEO et al, 2006; SEIDL, 2010; SILVA, 2011)

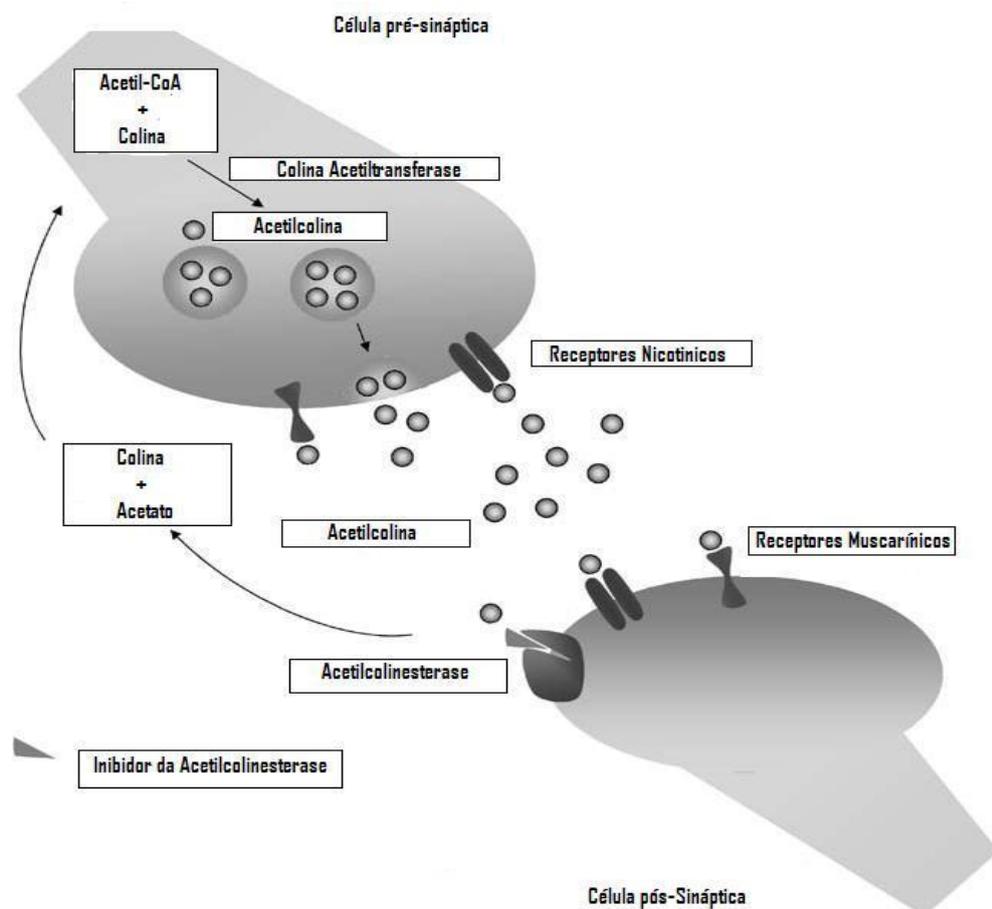
Como em pessoas portadoras de DA a quantidade de ChAT é reduzida, quanto mais colina estiver disponível para a reação, maiores serão as chances de síntese de Ach e de sua transmissão para a fenda sináptica. A ChAT limita excessos de Ach na fenda sináptica e sua inibição (a diminuição de sua concentração), promove um aumento na neurotransmissão pelo prolongamento da permanência da Ach na fenda sináptica, o que é fundamental no tratamento da doença de Alzheimer (CASTRO, 2007; LLEO et al, 2006; SILVA, 2011).

O sistema de alta afinidade transporta colina em baixas concentrações recém formadas pela reação de Ach com seus receptores. Esse sistema é usado para manter uma quantidade razoável de colina nas vesículas sinápticas, sendo considerado a etapa limitante da reação (LLEO et al, 2006; SILVA, 2006; SILVA, 2011).

A síntese de Ach é feita em uma única etapa na proporção de uma molécula de colina para cada molécula do grupo acetato. O grupo acetato é originário de uma molécula de Acetil-CoA, que tem seus níveis mantidos devido ao metabolismo da glicose (**Figura 13**) (CASTRO, 2006; TERRY JR. & BUCCAFUSCO, 2003).

Como os neurônios são incapazes de sintetizar colina, sua concentração é mantida no organismo através da dieta. Já a enzima ChAT é encontrada como uma proteína solúvel no citoplasma. Os sistemas de neurotransmissores (serotoninérgico, glutamatérgico, aminérgico e colinérgico) podem ser alterados com o envelhecimento. Destes sistemas, o colinérgico é considerado o mais importante nas funções cognitivas e conseqüentemente é o mais estudado (LLEÓ et al, 2006; SILVA, 2011).

Figura 13 – Ilustração esquemática do ciclo envolvendo a síntese, transmissão e hidrólise da acetilcolina. Depois observa-se a molécula de colina retornando ao neurônio para a síntese de outra molécula de acetilcolina e a continuação do ciclo.



Fonte: LLEÓ et al, 2006.

A hipótese colinérgica para a DA baseia-se no fato de que nos pacientes que apresentam deterioração das funções cognitivas há também redução de transmissão colinérgica (isso é observado nas autópsias de pacientes portadores da doença). Alguns pesquisadores contestam a hipótese colinérgica argumentando que ela seria válida apenas quando o paciente passa a ser sintomático. Apesar de contribuir para a discussão, essas pesquisas ainda são imaturas e a hipótese colinérgica é a mais aceita atualmente (KIM et al, 2010; SILVA, 2011; TERRY JR. & BUCCAFUSCO, 2003).

Estudos revelaram que um aumento dos níveis de Ach pela inibição da AchE pode melhorar a insuficiência na função cognitiva em estágios prematuros de DA (SEIDL, 2010). Com isso, a intensa investigação para o descobrimento de inibidores de AchE e a resposta positiva do tratamento contribuiu para o surgimento dos anticolinesterásicos presentes no mercado hoje (SZYMANSKI et al, 2011; TERRY JR & BUCCAFUSCO, 2003).

Quatro fármacos (**Figura 1 – pág.18**) foram aprovadas pelo Food and Drugs Administration (FDA) para o tratamento a DA: Tacrina, Rivastigmina, Galantamina e o Donepezil (**Tabela 1**). A Tacrina foi a primeira molécula a ser comercializada e hoje não é utilizada devido à sua hepatotoxicidade, observada em 50% dos pacientes (CASTRO, 2006; FDA, 2007; SEIDL, 2010; SILVA, 2011; ZHOU et al, 2008).

Quadro 1 – Fármacos aprovados para o tratamento da doença de Alzheimer

Nome do fármaco	Medicamento	Aprovado para as condições clínicas:	Efeitos Colaterais	Classe
Donepezila	Aricept®	Leve a moderado	Náuseas, vômitos, perda de apetite e aumento dos movimentos do TGI	Anticolinesterásico
Galantamina	Reminyl®	Leve a moderado	Náuseas, vômitos, perda de apetite e aumento dos movimentos do TGI	Anticolinesterásico
Rivastigmina	Exelon®	Leve a moderado	Náuseas, vômitos, perda de apetite e aumento dos movimentos do TGI	Anticolinesterásico
Tacrina*	Cognex®	Leve a moderado	Possível dano hepático, náusea e vômito	Anticolinesterásico
Memantina	Ebix®	Moderado a leve	Dor de cabeça, constipação confusão e tontura	Antagonista do receptor de glutamato (N-Methyl-D-aspartato)

* Tacrina não é mais utilizada hoje.

Fonte: (FDA, 2007; SEIDL, 2010).

Estudos sugerem que os inibidores da AchE também poderiam desempenhar um papel fundamental na aceleração da deposição das placas β -amiloides. É provável que a AchE interage com as placas $A\beta$ e promove a formação de fibrilas de amiloide por meio de uma associação de aminoácidos localizados na proximidade do sítio de ligação aniônico periférico da enzima (SHEN et al, 2005; ZHOU et al, 2008).

A eficácia sintomática dos medicamentos inibidores da AchE está atrelada à sua capacidade em aumentar a disponibilidade da Ach mediando a transmissão neuronal. Entretanto, esses agentes não conseguem reverter a progressão da doença e contribuem apenas modestamente na melhoria da função cognitiva em estágios leves a moderados da DA. Avanços nos conhecimentos da patogênese da DA têm conduzido inúmeros estudos de investigação de novos fármacos potencialmente anticolinérgicos para o tratamento da DA. Recentes estudos se concentraram no aumento da neurotransmissão colinérgica, utilizando receptores colinérgicos agonistas ou inibidores da AchE (CASTRO, 2006; LLEO et al, 2006; SILVA, 2011).

2.6 - Busca de novos protótipos de fármacos para o tratamento da DA

Os vários inibidores da AchE como a Tacrina e Fisostigmina são conhecidos por terem limitações quanto ao seu pequeno tempo de meia-vida ou efeitos colaterais como hepatotoxicidade. A galantamina, um fármaco seletivo de longa duração, reversível e inibidor competitivo da AchE, é considerado o mais efetivo no tratamento da DA e possui poucas limitações. Alguns outros polímeros alquilpiridínio, desidroevodiamina e carbamato, inibidores da AchE têm sido relatados para o tratamento da DA, mas devido a problemas de biodisponibilidade e possíveis efeitos colaterais, há ainda um grande interesse em encontrar novos e melhores inibidores da AchE (RHEE et al, 2001; XIE et al, 2013). A pesquisa fármacos inibidoras de AchE com ação prolongada, com maior potência e com menores riscos de efeitos

colaterais é o foco de diversos pesquisadores hoje e essa é a melhor abordagem a ser seguida na busca de novos agentes que possam ser utilizados para o tratamento de AD (SEIDL, 2010; SHEN et al, 2005).

Tendo em vista as razões acima, focado no desenvolvimento de compostos mais ativos e seletivos que são capazes tanto para reduzir a deficiência cognitiva e para diminuir a produção ou a agregação de A β na DA, o presente estudo buscou testar a capacidade de inibição da enzima AchE de uma série de compostos preparados e projetados para esse fim.

3. OBJETIVOS

3.1 - Objetivos Gerais

- Sintetizar derivados de diidroumarinas através de irradiação de micro-ondas e avaliar a atividade anticolinesterásica dos mesmos.

3.2 - Objetivos Específicos

- Sintetizar análogos de diidroumarinas.
- Realizar estudos de atividade anticolinesterásica *in vitro* das diidroumarinas sintetizadas e seus intermediários sintéticos;
- Utilizar e otimizar os ensaios com o reagente de Ellman em cromatografia em microplaca para determinar a atividade anticolinesterásica;
- Determinar a atividade anticolinesterásica das diidroumarinas pré-sintetizadas e compará-las com as respectivas estruturas moleculares;
- Propor a relação estrutura atividade qualitativa (SAR) dos compostos obtidos frente capacidade de inibir *in vitro* a atividade da enzima acetilcolinesterase;

- Caracterizar através de RMN, IV e Espectro de Massa as estruturas das moléculas sintetizadas.

4. METODOLOGIA

4.1 Síntese de derivados de diidrocumarinas assistida por irradiação de micro-ondas

4.1.1 Reagentes, equipamentos e laboratórios

Os reagentes orgânicos foram adquiridos das empresas Aldrich® ou Fisher® e foram usados sem purificações extras.

As reações foram realizadas em reator de micro-ondas monomodo da marca Discover modelo Explorer SP operando a 2450 MHz.

Os pontos de fusão foram aferidos utilizando um aparelho Mel-temp.

Os espectros de infravermelho (IV) foram obtidos a partir de um equipamento FT-IR PERKINELMER modelo Spectrum frontier.

As reações de irradiação de micro-ondas, os espectros IV e os espectros de massas foram obtidos no laboratório de análise instrumental da Universidade Estadual de Goiás (UEG).

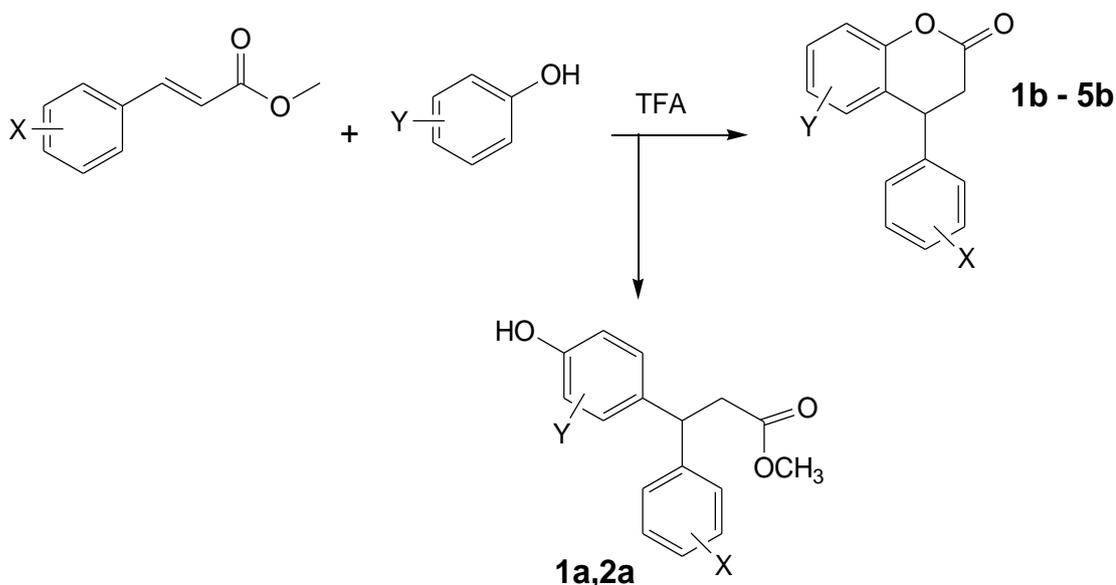
As análises de RMN foram realizadas no laboratório de Ressonância Magnética do Instituto de Química da Universidade Federal de Goiás em colaboração com o Prof. Dr. Luciano Morais Lião.

4.1.2 Síntese

Os derivados da diidrocurarina foram sintetizados a partir de ésteres cinâmicos (**21**) e compostos fenólicos (**22**) (**Esquema 6**) pela reação de hidroarilação do ácido trifluoroacético (TFA) em diclorometano, um método rápido e conveniente para síntese de 4-aryl-3,4-dihidrocurarinas (**2**) a partir de fenóis, ésteres e ácidos cinâmicos (AOKI et al, 2005).

A reação foi realizada por hidroarilação, uma mistura de 10mM de éster cinâmico e 10 mM de fenol ou naftol em 10 mL da mistura de ácido trifluoroacético e diclorometano (1:1) em temperatura ambiente. A reação foi monitorada por CCD.

Esquema 6: Esquema de síntese dos derivados de diidrocurarinas.



X	Y	Produto
-O-CH ₃	H	1a

-O-CH ₃	H	1b
-O-CH ₂ -O-	H	2a
-O-CH ₃	α-fenil	2b
-O-CH ₂ -O-	α-fenil	3b
-O-CH ₃	β-fenil	4b
-O-CH ₂ -O-	β-fenil	5b

Em uma reação assistida por micro-ondas, o éster metilcinâmico e fenol, α, β-naftol foram colocados num frasco de micro-ondas, na presença de ácido trifluoroacético, que agiu como solvente e reagente. O recipiente foi hermeticamente fechado com uma tampa removível equipada. A temperatura, o tempo e a potência da reação foram estabelecidos através do programa de computador acoplado ao reator. O aquecimento, a temperatura e a potência foram mantidos por um período variável e os produtos das reações foram avaliados.

O ácido trifluoroacético foi removido por evaporação em rotaevaporador utilizando solução ácida de vanilina (AOKI et al, 2005; Li et al, 2009).

As reações foram acompanhadas por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (CGMS) em equipamento QP-2010 Ultra da SHIMADZU. A pureza dos compostos sintetizados foi verificada também por cromatografia em camada delgada (CCD) e determinação da faixa de fusão.

Nas cromatoplasmas foram utilizados sistema de solventes hexano/acetato de etila (9:1, 8:2 e 7:3). As faixas de fusão dos compostos foram determinadas em aparelho Microquímica MQAPF-301.

4.1.3 Identificação estrutural

Para confirmar a estrutura dos compostos foram utilizadas técnicas espectroscópicas de Ressonância Magnética Nuclear de hidrogênio e carbono 13 (RMN ¹H/¹³C), espectrometria de massas e Infravermelho (IV).

Os espectros de massa foram obtidos através de um aparelho CGMS QP 210 Ultra Shimadzu. O progresso da reação foi analisado por cromatografia em camada delgada (CCD) utilizando gel de sílica Merck (60 F254) sobre chapas de alumínio, a menos que indicado de outra forma. A visualização foi realizada com luz UV a 254 nm e / ou 366 nm, a coloração de vapor de iodo. As amostras foram solubilizadas em diclorometano ou metanol.

Os espectros de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) foram obtidos em espectrômetro Bruker Avance 500 operando a 500 MHz (^1H) e 125 MHz (^{13}C), com clorofórmio ou DMSO deuterado como solvente. Os deslocamentos químicos foram expressos em valores adimensionais (ppm) em relação a um padrão interno de tetrametilsilano (TMS). A visualização dos espectros foi realizada por meio do programa ACD LA 12.0.

Os espectros de infravermelho (IV) foram obtidos a partir de pastilhas de KBr em equipamento FT-IR PERKINELMER modelo Spectrum frontier. Os dados foram transportados em formato ASCII pelo programa OriginTM versão 8.6.

4.2 Avaliação da atividade anticolinesterásica de derivados de diidrocurmarinas sintetizados através de irradiação de micro-ondas

4.2.1 Ensaio em microplaca pelo método de Ellman modificado por Rhee

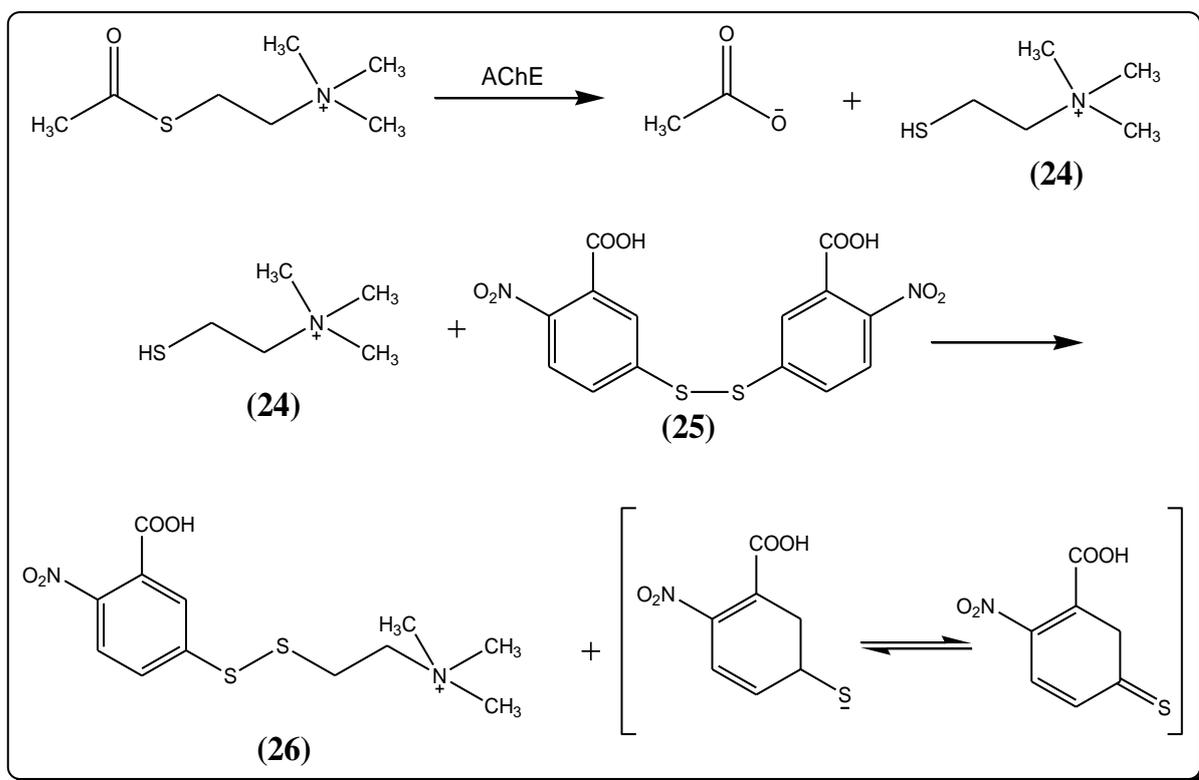
Em 1961 Ellman e colaboradores descreveram um método fotométrico para determinar a atividade anticolinesterásica. Esse novo método se mostrou extremamente sensível e aplicável tanto para pequenas quantidades de tecido quanto para baixas concentrações de enzima. Ele torna possível o estudo detalhado da cinética da AchE, onde o progresso da hidrólise é seguido pela medição de um produto da reação (ADSERSEN et al, 2006; ELLMAN et al, 1961)

No método de Ellman, a AchE é usada como substrato. Esse análogo do substrato natural já foi usada por vários pesquisadores para localização histoquímica. Vários estudos comprovaram que esse composto é um substituinte satisfatório para o substrato natural, e se difere muito menos que alguns dos

substratos sintéticos frequentemente usados em ensaios com fosfatases, tripsina, quimiotripsina, pepsina e outros (ELLMAN et al, 1961; SEIDL, 2010).

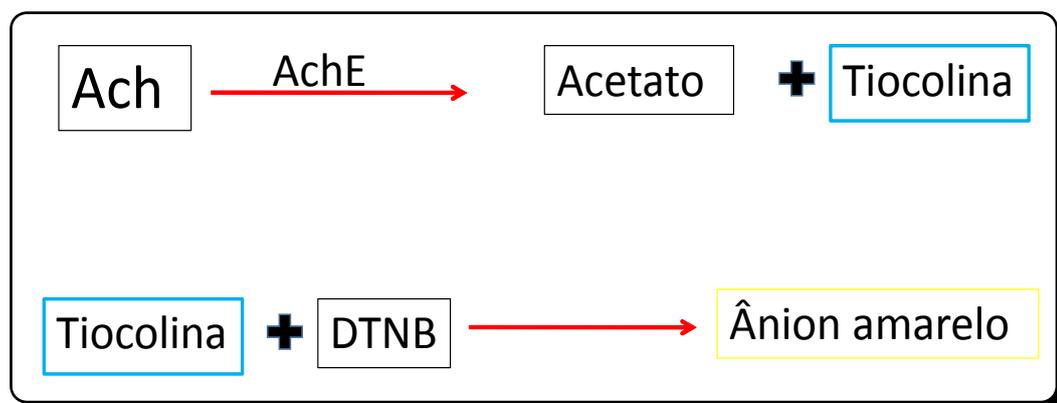
O princípio do método é a medição da taxa de produção de tiocolina (**24**) à medida que a acetiltiocolina é hidrolisada pela acetilcolinesterase. Isto ocorre pela continuação da reação da tiocolina (**24**) com reagente de Ellman (**25**) (DTNB), produzindo o ânion amarelo do ácido 5-tio-2-nitro-benzóico (**26**), como mostrado na **figura 14** e **esquema 7**. A taxa da produção do composto colorido (**26**) é medida em espectrofotômetro UV/VIS em 412 ou 405 nm (ELLMAN et al, 1961; FIQUEREDO, 2013).

Figura 14: Sequência de reações para detecção de atividade anticolinesterásica de moléculas pelo método de Ellman.



Fonte: FIQUEREDO, 2013.

Esquema 7 - Sequência de reações para detecção de atividade anticolinesterásica de moléculas pelo método de Ellman.



Fonte: Próprio autor

Em 2001 Rhee e colaboradores adaptaram para microescala a metodologia espectrofotométrica descrita por Ellman e colaboradores (1961) simplesmente fazendo o monitoramento da produção do composto colorido em placas de 96 poços utilizando um leitor de microplaca. Essa adaptação contribuiu para a maior automação do sistema e possibilitou a análise mais rápida de um número ainda maior de amostras em volumes muito menores (RHEE et al, 2001; SEIDL, 2010).

Existem vários outros métodos para determinação da atividade anticolinesterásica. Além do método colorimétrico que utiliza o reagente de Ellman (ELLMAN et al, 1961), existe também o método colorimétrico que utiliza o reagente sal *Fast Blue* e ensaios fluorimétricos, os quais utilizam substratos fluorogênicos e detecção potenciométrica ou eletroquímica. Entretanto, a maioria dos estudos para determinar a atividade anticolinesterásica de substâncias naturais, extratos vegetais, substâncias isoladas ou sintéticas utiliza um dos métodos colorimétricos de Ellman ou uma combinação de mais de um teste (SEIDL, 2010; SILVA, 2011).

4.2.2 Avaliação da atividade anticolinesterásica *in vitro*

Os ensaios de atividade anticolinesterásica pelo método de Ellman foram realizados no laboratório de Farmacognosia da Universidade Federal do Paraná (UFPR) em Curitiba, sob a supervisão do professor Titular Dr. Cid Aimbiré de M. Santos.

A capacidade de inibição dos compostos sobre a acetilcolinesterase foi testada com base no método de Ellman (ELLMAN et al, 1961) modificado por Rhee (RHEE et al, 2001).

Placas de poliestireno com 96 poços (300 µl/TPP[®]) foram utilizadas no ensaio de avaliação da atividade anticolinesterásica *in vitro*. A medida da absorbância em 412 nm foi realizada através do equipamento leitor de microplacas Tecan modelo Sunrise.

4.2.3 Preparo dos tampões

Os seguintes tampões foram utilizados (ELLMAN et al, 1961; RHEE et al, 2001 SEIDL, 2010):

- Tampão A: Tris 50 mM, pH 8,0;
- Tampão B: Tris 50 mM, pH 8,0 contendo 0,1 % de soro albumina bovina (BSA);
- Tampão C: Tris 50 mM, pH 8,0 contendo 0,1 M NaCl e 0,02 M de MgCl₂.6H₂O

4.2.4 Preparo da Enzima

Acetilcolinesterase de peixe elétrico, *Electrophoridae electricus* (Tipo VI-S, pó liofilizado, 827 U/mg sólido, 1256 U/mg proteína, Sigma®, lote 021M7025) foi utilizada em todos os ensaios de microplaca utilizando o reagente colorimétrico de Ellman.

A enzima liofilizada foi progressivamente dissolvida em tampão C para preparar soluções 500 U/ml, 3 U/mL e finalmente 0.25/mL. Esta última solução foi então estocada (congelada a -20°C), e usada em todos os ensaios (ELLMAN et al, 1961; RHEE et al, 2001 SEIDL, 2010).

4.2.5 Preparo do Substrato

Iodeto de acetiltiocolina (ACTI) (Sigma-Aldrich®) foi o substrato utilizado nos ensaios para o método com o reagente colorimétrico de Ellman nas concentração 1mM em tampão A (ELLMAN et al, 1961; RHEE et al, 2001 SEIDL, 2010).

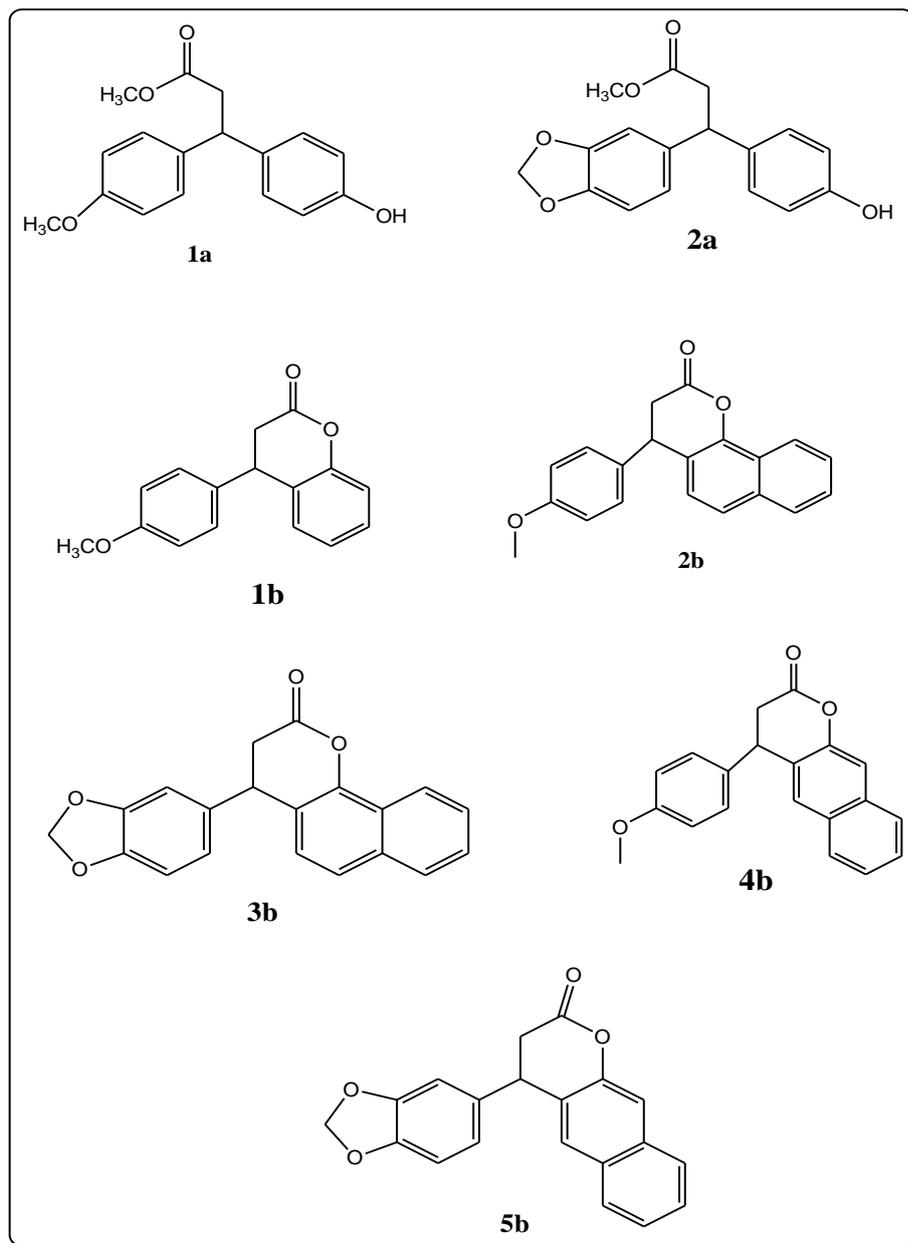
4.2.6 Preparo dos Reagentes colorimétricos

Ácido 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzóico (DTNB) (Sigma-Aldrich®), ou reagente de Ellman, foi utilizado nos ensaio na concentração de 3 mM em tampão C (SEIDL, 2010).

4.2.7 Material a ser testado

O material foi sintetizado com o uso de irradiação de micro-ondas, partindo de derivados ácidos e ésteres cinâmicos (**2**) e compostos fenólicos (**3**), na presença de ácido trifluoroacético (TFA), de acordo com o item 4.1.2 desta metodologia e as estruturas dos produtos (**1a**, **2a** e **1b-5b**) é mostrada na **Figura 15**.

Figura 15 – Estrutura dos 7 compostos a serem testados quanto à inibição da atividade anticolinesterásica.



Fonte: próprio autor

4.2.8 Preparo das amostras

Para o ensaio em microplaca cada composto foi pesado, transferido para um ependorff juntamente com o solvente (MeOH/Diclorometano 90/10) e colocado em ultrasson para completa solubilização.

Essa solução inicial foi preparada na concentração máxima permitida pela solubilidade, como previamente determinado. As diluições subseqüentes foram

efetuadas utilizando o mesmo solvente da solução inicial. As concentrações em que cada composto foi submetido ao teste de Ellman estão apresentadas na **tabela 1**. Em todos os testes o solvente utilizado foi MeOH/Diclorometano 90/10.

Tabela 1 – Concentrações dos compostos submetidos ao teste de Ellman

Composto	Concentração	Composto	Concentração
1a	71 uM (in)	2a	116 uM (in)
1a	97 uM (in)	2a	39 uM (in)
1a	36 uM (in)	2a	78 uM (in)
1a	60 uM (in)	2a	98 uM (in)
1a	90 uM (in)	2a	131 uM (in)
1a	121 uM (in)	2a	196 uM (in)
1a	181 uM (in)	2a	39 uM (in)
1a	227 uM (in)	2a	78 uM (in)
1a	36 uM (in)	2a	98 uM (in)
1a	60 uM (in)	2a	131 uM (in)
1a	90 uM (in)	2a	196 uM (in)
1a	121 uM (in)	2a	35 uM (in)
1a	181 uM (in)	2a	58 uM (in)
1a	227 uM (in)	2a	70 uM (in)
1a	36 uM (in)	2a	94 uM (in)
1a	72 uM (in)	2a	141 uM (in)
1a	121 uM (in)	2a	176 uM (in)
1a	181 uM (in)	2a	282 uM (in)
1a	242 uM (in)	2a	58 uM (in)
1a	242 uM (in)	2a	94 uM (in)
1a	279 uM (in)	2a	141 uM (in)
1a	363 uM (in)		

(in) = esta é a concentração final do composto na microplaca

Continuação – **Tabela 1**

Composto	Concentração	Composto	Concentração
1b	86 uM(in)	3b	94 uM (in)
1b	472 uM (in)	3b	53 uM (in)
1b	118 uM (in)	3b	40 uM (in)
1b	34 uM (in)	3b	81 uM (in)
1b	51 uM (in)	3b	102 uM (in)
1b	68 uM (in)	3b	163 uM (in)
1b	102 uM (in)	3b	40 uM (in)
1b	127 uM (in)	3b	81 uM (in)

1b	204 uM (in)
1b	20 uM (in)
1b	34 uM (in)
1b	34 uM (in)
1b	51 uM (in)
1b	102 uM (in)
1b	204 uM (in)

Composto	Concentração
2b	82 uM (in)
2b	37 uM (in)
2b	50 uM (in)
2b	75 uM (in)
2b	100 uM (in)
2b	150 uM (in)
2b	58 uM (in)
2b	58 uM (in)

Composto	Concentração
5b	128.9 uM (in)
5b	169.8 uM (in)
5b	48 uM (in)
5b	96 uM (in)
5b	144 uM (in)
5b	180 uM (in)
5b	48 uM (in)
5b	96 uM (in)
5b	144 uM (in)
5b	180 uM (in)
5b	48 uM (in)
5b	96 uM (in)
5b	144 uM (in)
5b	180 uM (in)

3b	102 uM (in)
3b	163 uM (in)
3b	47 uM (in)
3b	95 uM (in)
3b	119 uM (in)
3b	159 uM (in)
3b	238 uM (in)
3b	119 uM (in)
3b	238 uM (in)

Composto	Concentração
4b	110 uM (in)
4b	95 uM (in)
4b	34 uM (in)
4b	45 uM (in)
4b	68 uM (in)
4b	114 uM (in)
4b	34 uM (in)
4b	45 uM (in)
4b	68 uM (in)
4b	114 uM (in)
4b	49 uM (in)
4b	61 uM (in)
4b	98 uM (in)
4b	123 uM (in)
4b	164 uM (in)
4b	197 uM (in)
4b	246 uM (in)

4.2.9 Ensaio em microplaca

Em microplaca de 96 poços, foram adicionados em sequência os reagentes a seguir: 25 µl da solução aquosa do substrato, 125 µl de uma solução do reagente de Ellman, 50 µl de tampão B e 25 µl da solução de amostra e a absorvância foi monitorada a cada 10 s durante 300 s em 412 nm (ELLMAN et al, 1961; RHEE et al, 2001 SEIDL, 2010).

Após esse período 25 µl de uma solução aquosa de enzima Ache foram adicionados e a absorvância novamente monitorada a cada 10 s durante 230 s em 412 nm. As taxas das reações foram calculadas utilizando software apropriado (GraphPad Prism versão 5.0) (ELLMAN et al, 1961; RHEE et al, 2001 SEIDL, 2010).

4.2.10 Cálculo da inibição da atividade enzimática

A inibição da atividade enzimática (I%) foi calculada, em porcentagem, pela comparação entre as velocidades das reações (V) nos poços com amostras e a velocidade do ensaio usando tampão sem qualquer inibidor. O cálculo foi feito conforme expressão a seguir:

$$I\% = 100 - \frac{V(\text{Reação c/solvente}) - V(\text{Reação c/ amostra})}{100}$$

Qualquer aumento da absorvância antes da adição da enzima devido à hidrólise espontânea do substrato foi corretamente corrigido subtraindo-se a taxa da reação antes da adição da enzima da taxa obtida após a adição da enzima (SEIDL, 2010).

4.2.11 Padronização da atividade enzimática

Para que não houvesse alterações na atividade da enzima AchE nos testes de atividade anticolinesterásica, utilizou-se uma padronização da mesma antes de todos os ensaios. Para tal, antes de qualquer ensaio com os compostos a serem testados, realizou-se um teste em microplaca com a enzima que seria utilizada nos testes subsequentes.

Em microplaca de 96 poços, foram adicionados em sequência os reagentes a seguir: 25 µl da solução aquosa do substrato, 125 µl de uma solução do reagente de Ellman, 50 µl de tampão B e 25 µl da solução de água milliQ e a absorvância foi monitorada a cada 10 s durante 300s em 412 nm.

Após esse período, 25 µl de uma solução aquosa de enzima AchE foram adicionados e a absorvância novamente monitorada a cada 10 s durante 300 s em 412 nm. As taxas das reações foram calculadas utilizando software apropriado (GraphPad Prism versão 5.0). Após a segunda leitura, efetuou-se a subtração da taxa de reação antes da adição da enzima da taxa obtida após a adição da enzima e observou-se se essa taxa de reação estava entre 0.09 e 0.11 abs/min. Caso a taxa de reação estivesse abaixo desse intervalo, acrescentava-se mais alguns uL de uma enzima mais concentrada à amostra e efetuava-se a leitura novamente. Caso a taxa estivesse acima desse intervalo, acrescentava-se alguns uL de tampão C à amostra e efetuava o teste novamente. Esse procedimento foi repetido até que se obtivesse a enzima com a taxa de reação no intervalo 0.09 e 0.11 abs/min.

Todos os ensaios dos compostos testados foram efetuados utilizando-se a enzima padronizada. Dessa forma garantiu-se que todos os testes foram realizados como uma enzima nas mesmas condições.

4.2.12 Teste dos solventes

Como os tampões utilizados no teste de atividade anticolinesterásica em microplaca com reagente de Ellman são hidrossolúveis, é necessário que os compostos a serem testados sejam minimamente solúveis em água ou em uma mistura de solventes que não reajam com os tampões e com a enzima AchE.

Nem todos os compostos propostos para os testes deste trabalho eram solúveis em água. Então foi realizado dois *screenings* antes dos testes de atividade anticolinesterásica:

- Primeiro foram feitos testes para se determinar quais outros solventes e/ou mistura de solventes, além da água, era possível usar para o teste de atividade anticolinesterásica sem que esses solventes fossem insolúveis na presença dos

tampões e nem alterassem os resultados dos testes por interferirem na atividade da enzima AchE.

Para isso, todos os componentes com as respectivas quantidades utilizadas para o teste de Elman foram colocados na placa juntamente com o solvente a ser testado. A verificação de insolubilidade foi feita observando-se o surgimento de turvação. Caso surgisse alguma turvação, isso mostrava que o solvente testado era insolúvel com os tampões ou a enzima, o que impossibilitava o seu uso nos ensaios anticolinesterásicos propostos.

➤ O segundo teste foi realizado usando a enzima AchE com os principais solventes a fim de se determinar qual a atividade anticolinesterásica de cada solvente e conseqüentemente, qual seria a interferência do solvente e/ou mistura de solventes nos resultados finais dos ensaios utilizando os compostos. Efetuou-se o teste de Elman com os solventes e/ou mistura de solventes e a atividade de cada um foi determinada.

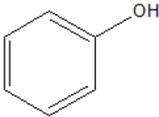
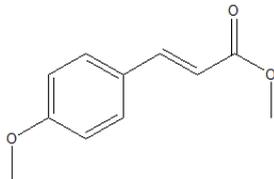
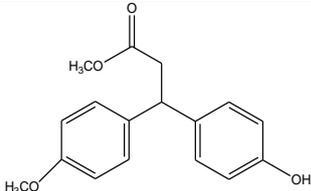
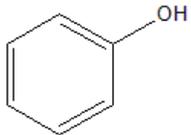
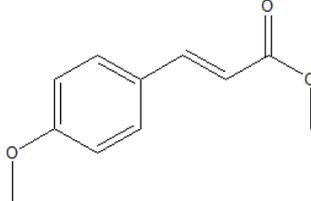
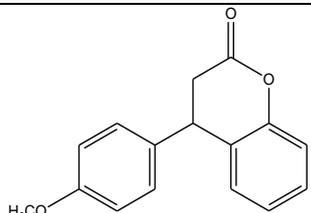
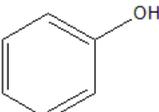
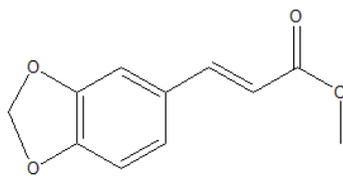
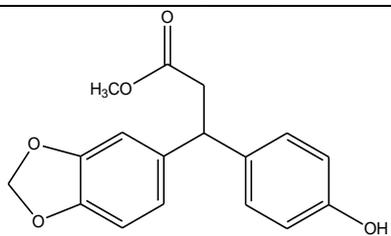
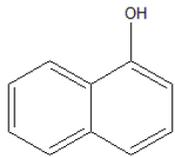
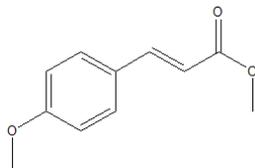
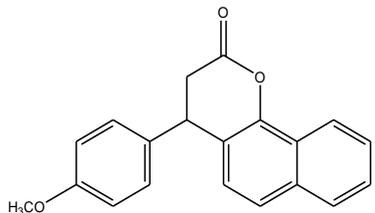
Uma vez determinados que solventes seriam possíveis de se usar, determinou-se a solubilidade dos compostos nesses solventes, de forma a conseguir as diluições mais concentradas possíveis de todos os compostos para os testes.

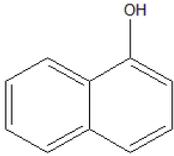
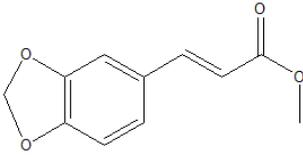
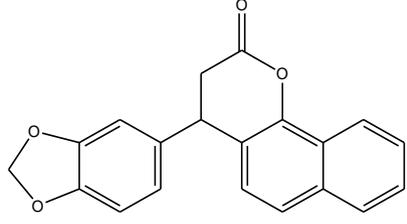
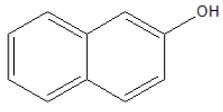
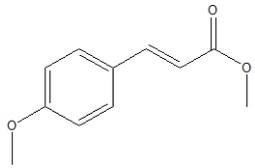
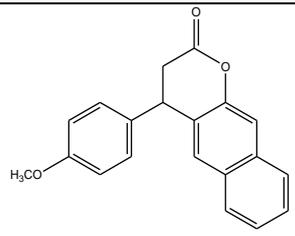
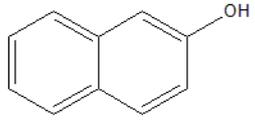
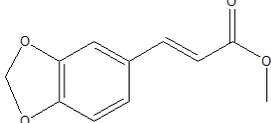
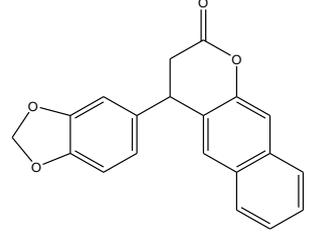
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Síntese de derivados de diidrocumarinas assistida por irradiação de micro-ondas

A **Tabela 2** mostra os reagentes com os respectivos produtos das reações realizadas sob irradiação de micro-ondas.

Tabela 2 – Reagentes e respectivos produtos de cada reação.

Reagentes		Produto
<p>Fenol</p>  <p>96g/mol</p>	<p>Éster 4-metoxicinâmico</p>  <p>176g/mol</p>	 <p>1a Metil 3-(4-hidroxifenil)-3-(4-metoxifenil) propanoato (286 g/mol)</p>
<p>Fenol</p>  <p>96g/mol</p>	<p>Éster 4-metoxicinâmico</p>  <p>176g/mol</p>	 <p>1b 4-(4-metoxifenil)-3,4-diidro-2-cromenona (254 g/mol)</p>
<p>Fenol</p>  <p>96g/mol</p>	<p>Éster 3,4-metilenodioxicinâmico</p>  <p>206g/mol</p>	 <p>2a Metil 3-(benzo[1,3]dioxo-6-il)3-(4-hidroxifenil)propanoato (300 g/mol)</p>
<p>α-naftol</p>  <p>144g/mol</p>	<p>Éster 4-metoxicinâmico</p>  <p>176g/mol</p>	 <p>2b 4-(4-metoxifenil)-3,4-diidro-2-α-benzocromenona 304 g/mol</p>

<p>α-naftol</p>  <p>144g/mol</p>	<p>Éster 3,4-metilenodioxicinâmico</p>  <p>206g/mol</p>	 <p>3b 4-(1,3-dioxifenil)-3,4-diidro-2-α-benzocromenona (318 g/mol)</p>
<p>β-naftol</p>  <p>144g/mol</p>	<p>Éster 4-metoxicinâmico</p>  <p>176g/mol</p>	 <p>4b 4-(4-metoxifenil)-3,4-diidro-2-β-benzocromenona (304 g/mol)</p>
<p>β-naftol</p>  <p>144g/mol</p>	<p>Éster 3,4-metilenodioxicinâmico</p>  <p>206g/mol</p>	 <p>5b 4-(1,3-dioxifenil)-3,4-diidro-2-β-benzocromenona (318 g/mol)</p>

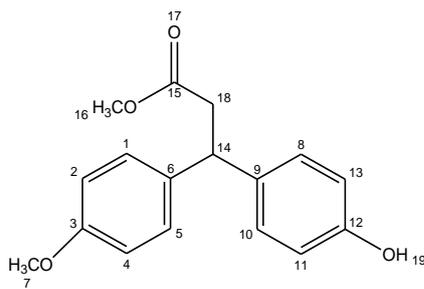
Com o objetivo de aumentar os rendimentos e diminuir os tempos de reação, foi feita uma exploração da irradiação de micro-ondas como fonte de aquecimento. Usando éster metilcinâmico com fenol, - α e β -naftol na presença de ácido trifluoroacético (TFA), várias condições de reação foram testados para obter os derivados da diidrocumarina 1a, 2a e 1b – 5b. A **Tabela 3** apresenta os resultados e as condições de cada reação com os respectivos rendimentos.

Tabela 3 – Condições de cada reação realizada sob irradiação de micro-ondas para a geração de cada produto e os respectivos rendimentos.

	Condições	Rendimento	Produto
--	-----------	------------	---------

REAGENTES		Tempo (s)	Potência (W)	Temp. (°C)	(%)	
Fenol	Éster 4-metoxicinâmico	60	100	60	85.3	1a
		60	200	100	96.4	1b
Fenol	Éster 3,4-metileno-dioxicinâmico	60	100	60	78.7	2a
α -naftol	Éster 4-metoxicinâmico	60	200	100	100	2b
α -naftol	Éster 3,4-metileno-dioxicinâmico	60	200	100	100	3b
β -naftol	Éster 4-metoxicinâmico	60	200	60	100	4b
B-naftol	Éster 3,4-metileno-dioxicinâmico	60	200	100	100	5b

5.1.1 Dados dos produtos obtidos



1a

1a

Descrição: Sólido branco a amarelo

Nome: Metil 3-(4-hidroxifenil)-3-(4-metoxifenil) propanoato

Massa molar: 286 g/mol

Fórmula molecular: C₁₇H₁₈O₄

Composição: C(71.31%), H(6.34%), O(22.35%)

Volume molar: 245.0 ± 3.0 cm³

Índice de refração: 1.564 ± 0.02

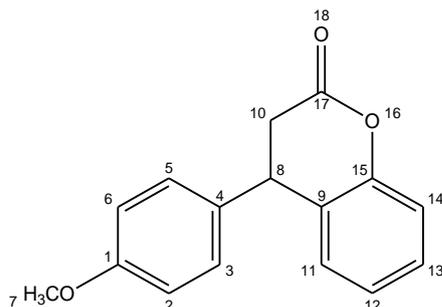
Densidade: 1.168 ± 0.06 g/cm³

Massa nominal: 286 Da

Rendimento: 85.3%

Tabela 4 - Dados espectrais de RMN de ¹H para o composto **1a**

δ (ppm)	Atribuição	Tipo de Sinal	J (Hz)
2.98	H-6	d	7.99
3.57	H-9	s	-
3.74	H-10	s	-
4.42	H-3	d	8,10
6.70	H-6	ddd	8.90, 2.91 e 2.00
6.80	H-7	ddd	8.90, 3.09 e 2.00
7.03	H-5	ddd	8.54, 2.50 e 1.82
7.11	H-8	ddd	8.36, 3.09 e 1.64



1b

1b

Descrição: Sólido branco a amarelo

Nome: 4-(4-metoxifenil)-3,4-diidro-2-cromenona

Massa molar: 254 g/mol

Fórmula molecular: C₁₆H₁₄O₃

Composição: C(75.57%) H(5.55%) O(18.88%)

Volume molar: 211.9 ± 3.0 cm³

Índice de refração: 1.587 ± 0.02

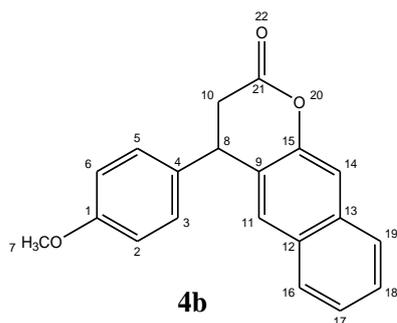
Densidade: 1.199 ± 0.06 g/cm³

Massa nominal: 254 Da

Rendimento: 96.4%

Tabela 5 - Dados espectrais de RMN de ¹H para o composto **1b**

δ (ppm)	Atribuição	Tipo de Sinal	J (Hz)
2.99	H-4	dd	15.80 e 8.20
3.06	H-3	dd	9.99 e 5.81
3.06	H-3	dd	9.99 e 5.81
3.80	H-9	s	-
4.30	H-3	dd	7.99 e 5.99
6.88	H-7	ddd	8.54, 3.09 e 1.82
6.96 - 7.00	H-3	m	-
7.05 - 7.09	H-10	m	-
7.27 - 7.32	H-3	m	-



4b

Descrição: Sólido branco a amarelo

Nome: 4-(4-metoxifenil)-3,4-diidro-2-β- benzocromenona

Massa molar: 304 g/mol

Fórmula molecular: C₂₀H₁₆O₃

Composição: C(78.93%) H(5.30%) O(15.77%)

Volume molar: 246.1 ± 3.0 cm³

Índice de refração: 1.644 ± 0.02

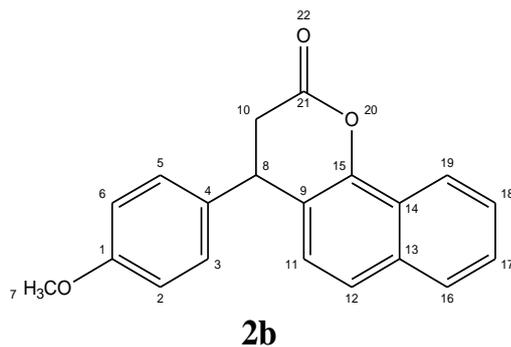
Densidade: 1.236 ± 0.06 g/cm³

Massa nominal: 304 Da

Rendimento: 100%

Tabela 6 - Dados espectrais de RMN de ¹H para o composto **4b**

δ (ppm)	Atribuição	Tipo de Sinal	J (Hz)
3.08	H-5	dd	15.62 e 6.72
3.17	H-5	dd	16.17 e 6.18
3.77 - 3.80	H-12	m	-
4.43	H-5	t	6.45
6.81 - 6.91	H-10	m	-
7.04 - 7.14	H-14	m	-
7.50 - 7.61	H-14	m	-
7.83	H-4	d	7.45
8.31	H-5	d	8.17



2b

Descrição: Sólido branco a amarelo

Nome: 4-(4-metoxifenil)-3,4-diidro-2-α-benzocromenona

Massa molar: 304 g/mol

Fórmula molecular: C₂₀H₁₆O₃

Composição: C(78.93%) H(5.30%) O(15.77%)

Volume molar: 246.1 ± 3.0 cm³

Índice de refração: 1.644 ± 0.02

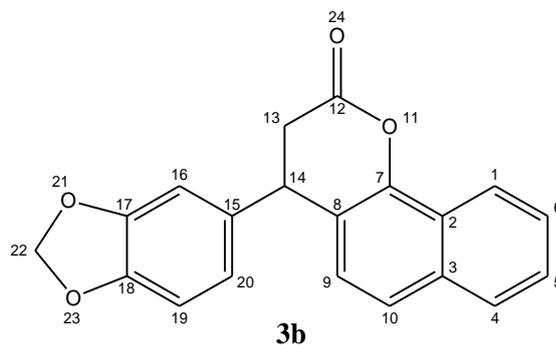
Densidade: 1.236 ± 0.06 g/cm³

Massa nominal: 304 Da

Rendimento: 100%

Tabela 7 - Dados espectrais de RMN de ¹H para o composto **2b**

δ (ppm)	Atribuição	Tipo de Sinal	J (Hz)
3.08	H-1	dd	15.62 e 6.72
3.17	H-1	dd	15.44 e 6.18
3.77 - 3.80	H-3	m	-
4.43	H-1	t	6.45
6.83 - 6.90	H-2	m	-
7.04 - 7.13	H-3	m	-
7.50 - 7.62	H-3	m	-
7.83	H-1	d	7.45
8.31	H-1	d	8.17



3b

Descrição: Sólido branco a amarelo

Nome: 4-(1,3-dioxifenil)-3,4-dihidro-2-α benzocromenona

Massa molar: 318 g/mol

Fórmula molecular: C₂₀H₁₄O₄

Composição: C(75.46%) H(4.43%) O(20.10%)

Volume molar: 233.2 ± 3.0 cm³

Índice de refração: 1.684 ± 0.02

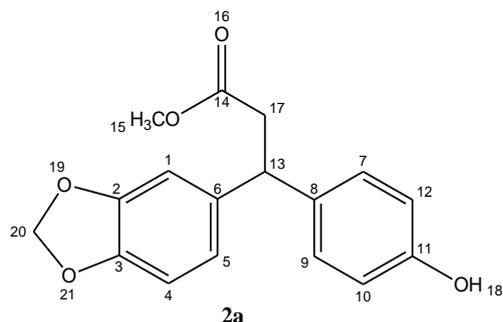
Densidade: 1.364 ± 0.06 g/cm³

Massa nominal: 318 Da

Rendimento: 100%

Tabela 8 - Dados espectrais de RMN de ¹H para o composto **3b**

δ (ppm)	Atribuição	Tipo de Sinal	J (Hz)
3.10	H-1	dd	15.99 e 2.00
3.16	H-5	dd	15.99 e 6.72
4.86	H-1	dd	6.72 e 1.82
5.87	H-2	dd	8.99 e 1.36
6.55 - 6.59	H-2	m	-
6.65 - 6.69	H-1	m	-
7.32	H-1	d	8.90
7.41 - 7.51	H-2	m	-
7.78	H-1	d	7.99
7.85	H-2	d	8.72



2a

Descrição: Sólido branco a amarelo

Nome: Metil 3-(benzo[1,3]dioxo-6-il)3-(4-hidroxifenil)propanoato

Massa molar: 300 g/mol

Fórmula molecular: C₁₇H₁₆O₅

Composição: C(67.99%) H(5.37%) O(26.64%)

Volume molar: 232.1 ± 3.0 cm³

Índice de refração: 1.598 ± 0.02

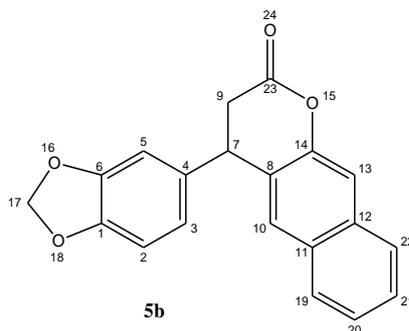
Densidade: 1.293 ± 0.06 g/cm³

Massa nominal: 300 Da

Rendimento: 78.7

Tabela 9 - Dados espectrais de RMN de ¹H para o composto **2a**

δ (ppm)	Atribuição	Tipo de Sinal	J (Hz)
3.15	H-2	dd	5.81 e 5.09
3.71	H-3	s	-
4.90	H-1	dd	5.90 e 2.82
6.27 - 6.34	H-1	m	-
6.75 - 6.81	H-2	m	-
6.99 - 7.05	H-2	m	-
7.34	H-1	d	8.90
7.38 - 7.51	H-2	m	-
7.77 - 7.81	H-1	m	-
7.84 - 7.88	H-2	m	-



5b

Descrição: Sólido branco a amarelo

Nome: 4-(1,3-dioxifenil)-3,4-diidro-2-β benzocromenona

Massa molar: 318 g/mol

Fórmula molecular: C₂₀H₁₄O₄

Composição: C(75.46%) H(4.43%) O(20.10%)

Volume molar: 233.2 ± 3.0 cm³

Índice de refração: 1.684 ± 0.02

Densidade: 1.364 ± 0.06 g/cm³

Massa nominal: 318 Da

Rendimento: 100%

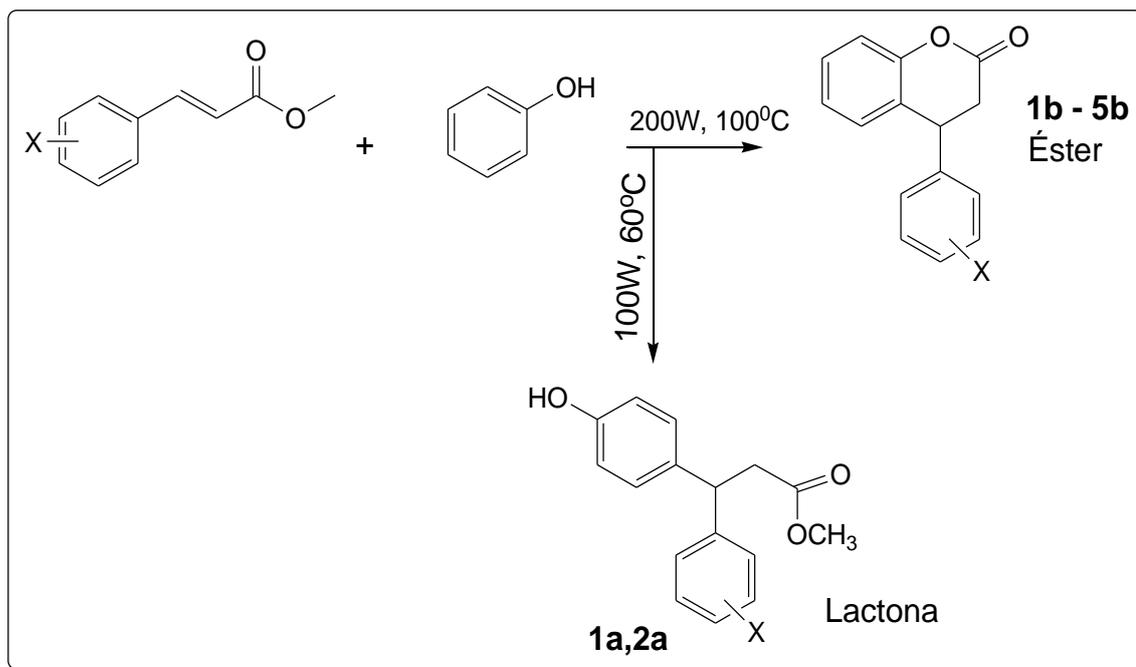
Tabela 10 - Dados espectrais de RMN de ¹H para o composto **5b**

δ (ppm)	Atribuição	Tipo de Sinal	J (Hz)
2.99	H-1	dd	15.99 e 8.17
3.80	H-3	s	-
4.30	H-1	dd	7.99 e 5.99
6.85 - 6.90	H-2	m	-
6.87 - 6.92	H-2	m	-
6.96 - 7.00	H-1	m	-
7.05 - 7.09	H-10	m	-
7.09 - 7.14	H-5	m	-
7.27 - 7.32	H-3	m	-

5.1.2 Influência da temperatura e da potência na cinética da reação

Quando uma quantidade equimolar de fenol e éster 4-metoxicinâmico ou éster 3,4-metilenodioxicinâmico, na presença de TFA, foram irradiadas durante 1 min, uma potência de 100 W e 60 ° C, os intermediários “a”, ésteres, (**Esquema 8**) foram isolados como o produto principal da reação. Quando a reação foi realizada com o aumento da potência para 200W e temperatura 200 ° C a formação de lactonas (1b-2b) como produto principal.

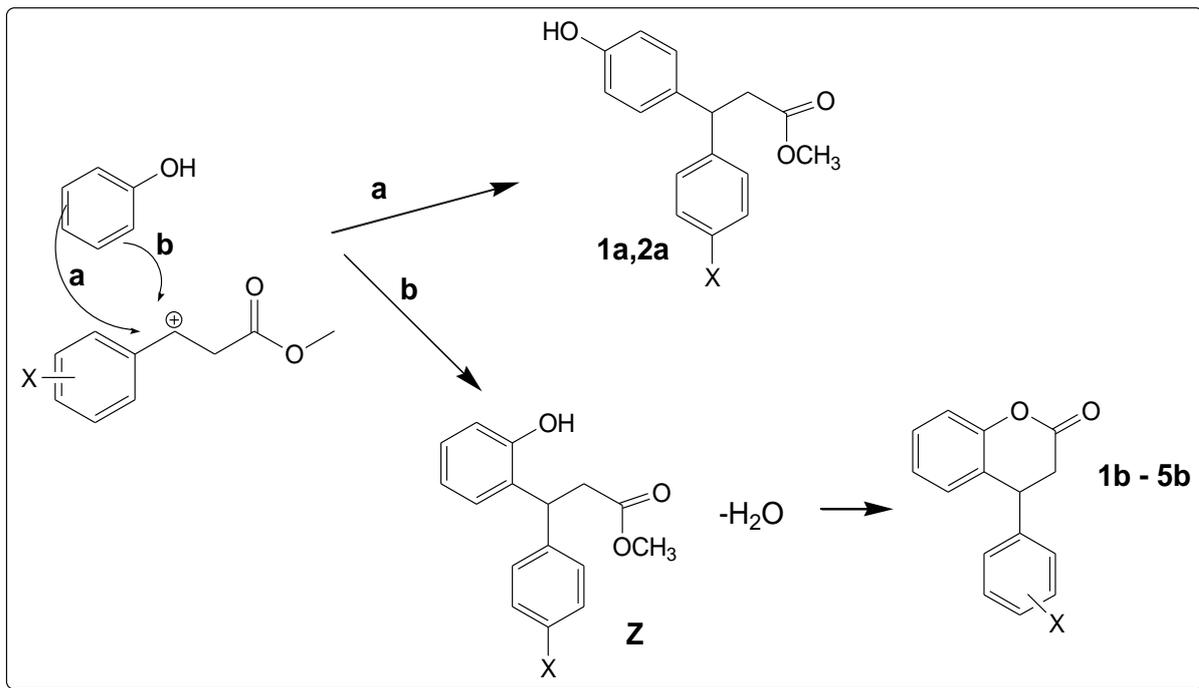
Esquema 8 – Esquema de síntese de diidrocinumarinas utilizando reação de micro-ondas.



Fonte: próprio autor

Esta situação mostrou que, dependendo da potência e da temperatura, os produtos são direcionados para substituições nas posições *orto* (*o*), no caso dos produtos **1b** e **2b** ou substituições em *para* (*p*), no caso dos produtos **1a** e **2a**, ou seja, moléculas de cadeia aberta (ésteres), conforme o **esquema 9**.

Esquema 9 – Esquema de formação dos produtos com substituição “para” (**a**) e “orto” (**b**), sendo que esta última passa pela formação de um intermediário (**Z**) para formação dos compostos **1b-5b**



Fonte: próprio autor

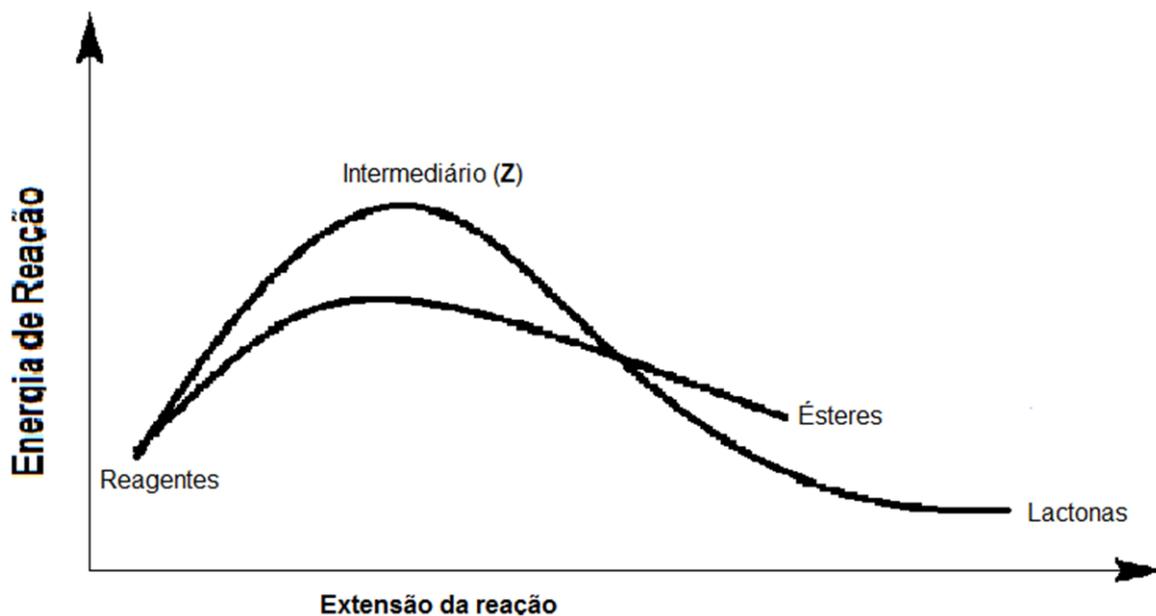
De acordo com o **esquema 7**, pode-se observar que as substituições poderiam ocorrer na posição *para* (**a**) ou na posição *orto* (**b**). As substituições na posição *para* levaram à formação dos produtos **1a** e **2a**, ou seja, moléculas acíclicas, ésteres. As substituições na posição *orto* levaram à formação de um intermediário (**Z**), o qual rapidamente sofreu ciclização, perdendo uma molécula de H_2O resultando na formação dos produtos **1b - 5b**, ou seja, lactonas.

Esse padrão de substituição *para/orto* caracteriza padrões clássicos de substituições eletrofílicas aromáticas. Quando se aumentou a temperatura e a potência da irradiação de micro-ondas das reações, foi favorecida a síntese das lactonas, mas na presença de baixas temperatura e potência, apenas os ésteres foram formados.

A explicação mais plausível para essas substituições *orto/para* seria o equilíbrio no estado de transição. Sabe-se que existem duas possibilidades de ataque nucleofílico pelo fenol: um na posição *orto* e outro na posição *para* (CAREY & SUNDBERG, 2007).

Inicialmente, observa-se que o ataque nucleofílico através da posição *orto* é desfavorecido por impedimento estérico. Há também uma menor densidade eletrônica e conseqüentemente é exigida uma maior energia para formação do intermediário (**Z**). Portanto, no primeiro momento, com temperaturas menores e menor potência, o ataque nesta posição não é favorável (mais lento). Na posição *para* há também um menor efeito indutivo em função da eletronegatividade do átomo de oxigênio do grupo hidroxil. Entretanto, o produto final da substituição *orto*, as lactonas, é termodinamicamente mais estável que os ésteres formados, ou seja, nas substituições *orto*, é exigida uma maior energia de ativação para formação do intermediário (nesse caso, maior temperatura e potência), mas quando há essa energia disponível, o equilíbrio é deslocado no sentido da formação do produto cíclico, muito estável (controle termodinâmico) (CAREY & SUNDBERG, 2007). A **Figura 16** mostra a energia potencial das reações de substituições na posição *para*, formando os produtos de cadeia abertos, ésteres e na posição *orto*, sendo esta uma reação de maior energia para a formação do intermediário (**Z**) e conseqüente formação das lactonas (CAREY & SUNDBERG, 2007; CLAYDEN et al, 2001).

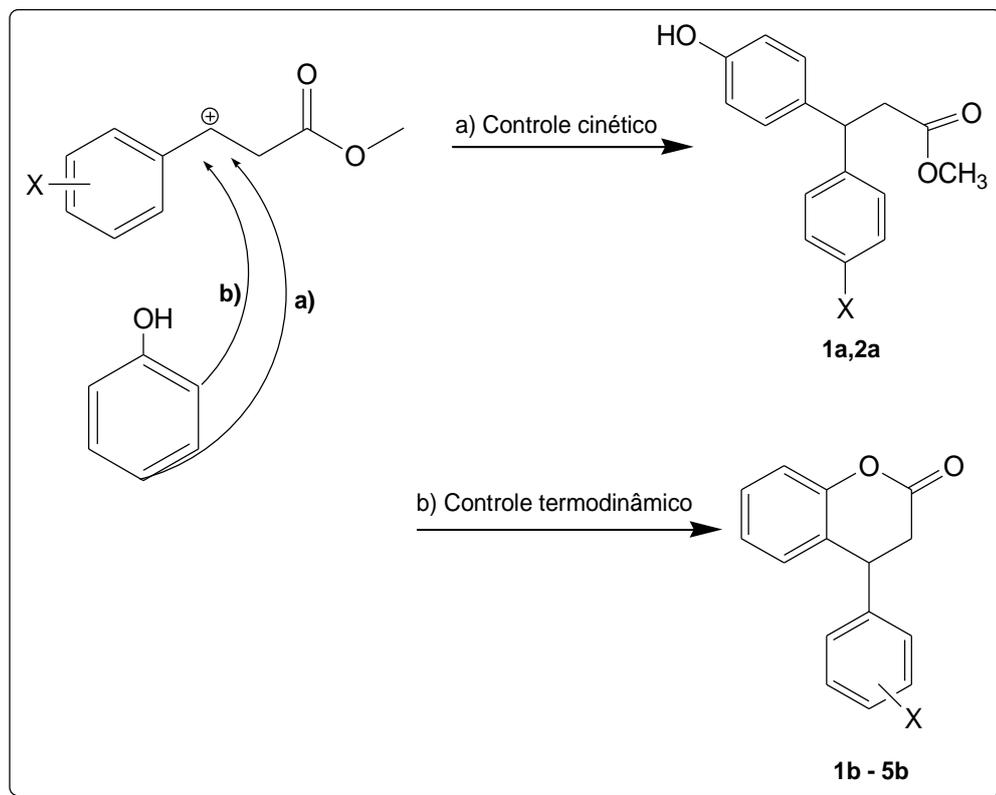
Figura 16 – Gráfico da energia potencial da reação, mostrando os reagentes, o intermediário (Z) e os produtos ésteres e lactonas.



Fonte: próprio autor

Por outro lado, como o carbocátion formado tem um tempo de vida muito pequeno no estado de transição, em um mesmo tempo, menores temperaturas e menor potência, acabam favorecendo a reação que ocorre mais rapidamente, caracterizando o controle cinético da reação. Neste caso o ataque nucleofílico ocorre na posição *para*, deslocando o equilíbrio no sentido da formação do produto não cíclico, ou seja os ésteres (1a e 2a) (Figura 17).

Figura 17: Duas possibilidades de reação: controle cinético e controle termodinâmico.

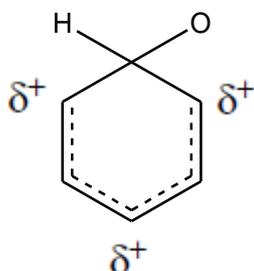


Fonte: próprio autor

O produto cíclico pode ser favorecido pela utilização de nucleófilos mais fortes, por isso a reação realizada a partir do naftol (nucleófilo mais forte) foi capaz de produzir apenas o composto cíclico, mesmo em temperaturas e potências baixas (CAREY & SUNDBERG, 2007; CLAYDEN et al, 2001).

Outra discussão importante é porque não se formou nenhum intermediário na posição *meta* (*m*). Isso pode ser explicado devido à composição do produto ser cineticamente controlada, a razão isomérica é governada pelas magnitudes relativas das energias de ativação (ΔG^\ddagger) para os estados de transição *orto*, *meta* e *para*. No estado de transição, uma carga positiva está presente no anel de benzeno, primariamente nas posições 2, 4 e 6 em relação ao fenol (**Figura 18**) (CAREY & SUNDBERG, 2007; CLAYDEN et al, 2001).

Figura 18 – Distribuição de cargas parciais do fenol.



Fonte: Carey & Sundberg, 2007.

O efeito liberador de elétrons do grupo OH interage diretamente para deslocar a carga e estabilizar os intermediários levando à formação dos intermediários *orto* e *para*, mas não estabiliza o intermediário que levaria à formação do produto *m*-substituído. O impedimento estérico, também promovido pela metila, pode impossibilitar a aproximação do fenol para a substituição eletrofílica aromática com o carbocátion (CAREY & SUNDBERG, 2007; SILVA, 2011).

Além disso, as reações de hidroarilação de ésteres e ácidos cinâmicos na presença do fenol são mais eficientes quanto maior o número de grupos doadores de elétrons ligados ao fenol. Isso significa que a reação é favorecida quando acontece na presença de fenóis com maior força nucleofílica (LI et al, 2005, SILVA, 2011).

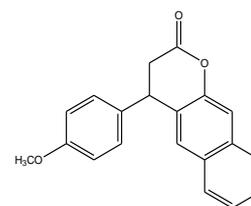
5.2 Avaliação da atividade anticolinesterásica de derivados de diidrocumarinas sintetizados através de irradiação de micro-ondas

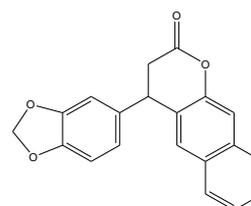
5.2.1 Avaliação da atividade anticolinesterásica em microplaca pelo método de Ellman modificado por Rhee (2001)

A **Tabela 11** mostra os compostos sintetizados por meio de irradiação de micro-ondas que foram testados quanto à sua atividade anticolinesterásica.

Tabela 11 - Relação dos compostos analisados pelo método de Ellman.

Número	Nome	Estrutura Molecular
1a	Metil 3-(4-hidroxifenil)-3-(4-metoxifenil)propanoato	
1b	4-(4-metoxifenil)-3,4-diidro-2-cromenona	
2a	Metil 3-(benzo[1,3]dioxi-6-il)3-(4-hidroxifenil)propanoato	
2b	4-(4-metoxifenil)-3,4-diidro-2-α-benzocromenona	
3b	4-(1,3-dioxifenil)-3,4-diidro-2-α-benzocromenona	

4b4-(4-metoxifenil)-3,4-diidro-2-β-
benzocromenona

5b4-(1,3-dioxifenil)-3,4-diidro-2-β-
benzocromenona

Fonte: próprio autor

Após a determinação da solubilidade dos compostos nos solventes adequados e determinada a concentração máxima possível para se realizar o teste, os compostos foram avaliados pelo método de Ellman modificado por Rhee em microplaca (RHEE et al, 2001).

A avaliação do percentual de inibição da atividade enzimática pelo método de Ellman revelou ausência de atividade ou baixos valores para os compostos **1b**, **2b** e **2a**, os quais não apresentaram nenhuma inibição acima de 10%. Entretanto, atividades até 15% de inibição podem ser considerados resultados falso-positivos (ADSERSEN et al, 2006; FIGUEREDO, 2013; KHALID et al, 2004; ORHAN et al, 2004; SEIDL, 2010)

Os compostos **1a** e **4b** mostraram valores de inibição relativamente melhores, sendo a máxima inibição de 16,79% e 22,11% respectivamente.

Os compostos que apresentaram os melhores níveis de inibição da enzima AchE foram os compostos **5b** e **3b**, sendo que o composto **5b** chegou a apresentar uma inibição de 39,27% em uma concentração de 169 uM (in) e o composto **3b** apresentou uma inibição de 29,61% e 31,25 % para as concentrações de 81 e 102 uM (in) respectivamente. Esses níveis de inibição são muito bons e bastante elevados, se comparados com outros estudos, por exemplo, o estudo de Choudhary e seus colaboradores (2005), que testaram o potencial de inibição

anticolinesterásica de alguns alcaloides e encontraram valores de IC_{50} para concentrações de até 148,2 μ M.

A atividade dos compostos parece estar relacionada às diferenças estruturais entre eles. Inicialmente, a retirada do anel piperidínico não gerou mudanças na atividade biológica. Já a esterificação parece exercer influência positiva, provavelmente devido ao aumento da lipofilicidade dos compostos (FIGUEREDO, 2013).

Nas moléculas de cadeia fechada, a mudança do grupo naftol de α para β causou também uma sensível diferença na atividade dos compostos, sendo que os compostos com o grupo β -naftol (**4b** e **5b**) apresentaram uma maior taxa de inibição do que os compostos com o grupo α -naftol (**2b** e **3b**).

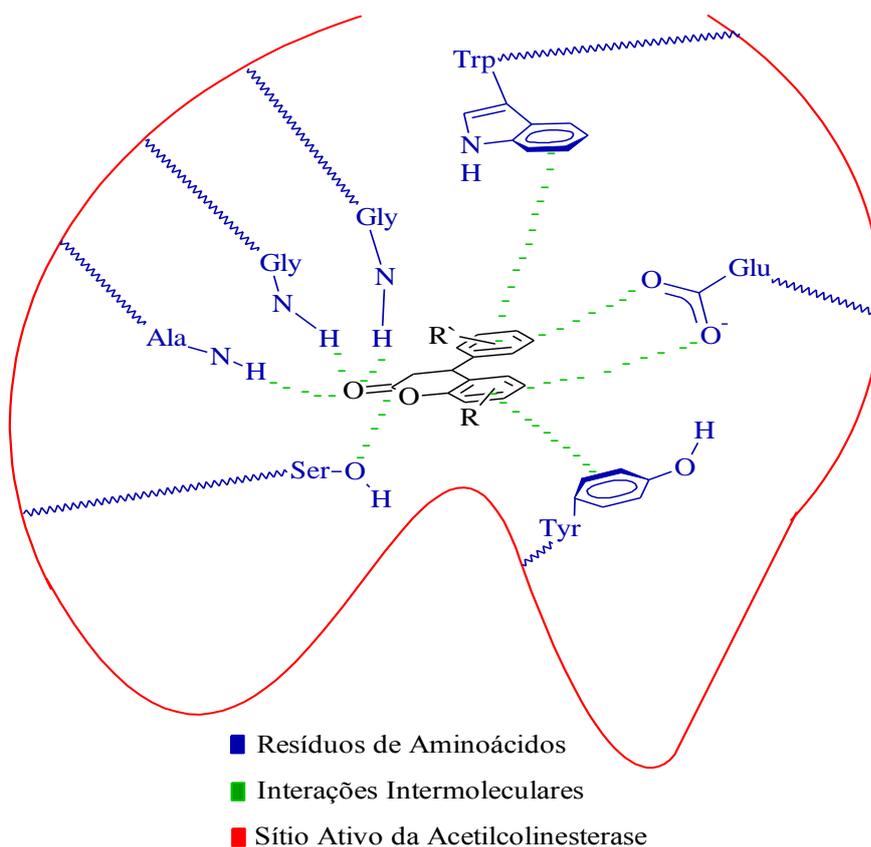
O método de Ellman se mostrou muito robusto, porém possui uma limitação importante: a exigência de alta solubilidade em água das amostras, uma vez que todas as soluções utilizadas são aquosas. As diidroumarinas são pouco solúveis em água. Para superar esse problema as amostras foram solubilizadas numa solução de diferentes solventes, mostradas adiante. Apesar disso, obteve-se uma ótima repetibilidade nos resultados obtidos para todas as diidroumarinas analisadas.

5.2.2 Relação entre estrutura molecular e atividade biológica

A estrutura de Raio-X de um análogo do complexo de estado de transição da AchE já foi descrito (SILVA, 2011). Os sítios ativos da AchE são mostrados na **Figura 19**. A figura sugere que os sítios ativos da AchE consistem pelo menos nos seguintes sítios: **(1)** um sítio de ligação do substrato aniônico (AS), com os aminoácidos Trp84, Glu199 e Phe330, o qual contém um pequeno número de cargas negativas, onde a parte amônio da Ach e vários sítios ativos se ligam através uma interação preferencial de nitrogênios quaternários com os elétrons p de grupos aromáticos; **(2)** um sítio esteárico (ES), o qual contém a tríade catalítica Ser200-His440-Glu32718 ; **(3)** um sítio de ligação acil (ABS), Phe288, e Phe299, com ligações para o grupo acetil da AchE. Além disso, AchE também possui um sítio

O subsítio esteárico (ES) caracteriza-se pela afinidade a grupos hidrofílicos. O grupo serina, localizado no subsítio esteárico, contém uma hidroxila livre capaz de efetuar um ataque nucleofílico a carbonila da acetilcolina, levando-a a hidrólise. Por analogia, é possível aceitar que todos os compostos sintetizados reagem com a serina da mesma forma. Além disso, estes compostos podem interagir como doadores de elétrons nas ligações de hidrogênio do lactona com o “buraco oxiônico” de aminoácidos formado pela Alanina e a Glicina. Portanto, quanto maior a quantidade de grupos hidrofílicos presentes, maior será a quantidade de interações (Figura 20) (PIAZZI et al; 2008; SILVA, 2011).

Figura 20 - Possíveis interações intermoleculares das diidrocurmarinas com os sítios ativos da acetilcolinesterase.



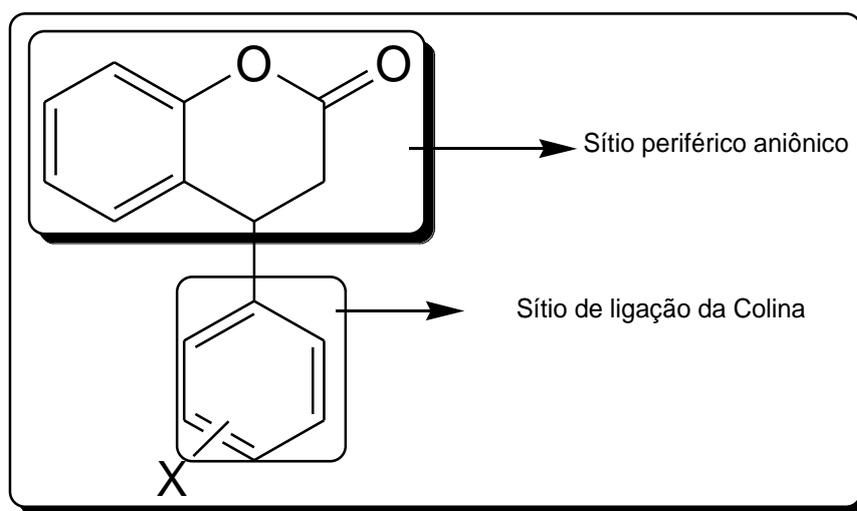
Fonte: SILVA, 2011.

De acordo com Anand e seus colaboradores (2012), o grupo carbonil, juntamente com o oxigênio endocíclico estabelecem ligações de hidrogênio com o grupo amida do aminoácido fenilalanina (Phe 295) e o grupo aromático do anel de cumarina interage com o triptofano (Trp 286) através de emparelhamento π .

Piazzini e seus colaboradores (2008) propõem que moléculas contendo grupos volumosos não conseguem penetrar no “buraco oxiónico” para estabelecer uma interação apropriada, porque o substituinte nessa posição poderia interagir negativamente com os resíduos do sítio PAS.

Considerando os sítios ativos da AchE e as estruturas moleculares das moléculas estudadas, duas hipóteses podem explicar a interação das mesmas com a AchE e explicar a capacidade de inibir a enzima: **(1)** o anel da cumarina, contendo o heterociclo 2- α -2-cromenona, demonstrou ser compatível com a atividade anticolinesterásica, atuando como grupo aniônico periférico, o qual interage com o sítio aniônico periférico (PAS); e **(2)** o anel fenil conectado com o heterociclo 2- α -2-cromenona atuou como um sítio de ligação de colina, como mostrado na **Figura 21**. Além disso, uma cadeia que liga diferentes quantidades de átomos de carbono pode ter a chance de se alinhar com a “parede” do “buraco oxiónico” da AchE (Zhou et al, 2008). Essa interação **(1)** também explica porquê as moléculas **1a** e **2a**, que não possuem o heterociclo 2- α -2-cromenona, apresentaram uma atividade anticolinesterásica praticamente irrisória, se comparada às outras moléculas estudadas.

Figura 21 - Estratégia de *design* de atuação dos compostos testados nos sítios de ligação da AchE.



Fonte: próprio autor

O aumento da porcentagem de inibição na medida em que se aumenta a quantidade de grupos contendo aceptores de ligações de hidrogênio nas diidrocomarinas, também é um fato. Esses grupos podem interagir com os aminoácidos do PAS e os grupos que possuem anel aromático interagem com os resíduos de aminoácidos do sítio catalítico aniônico (ALMEIDA, 2011; SILVA, 2011). Corroborando esse fato, o resultado das análises de atividade biológica mostrou que a resposta anticolinesterásica proveniente de moléculas derivadas do α ou β - naftol foi melhor do que o resultado das moléculas derivadas do fenol, ou seja, a substituição do fenol pelo naftol colaborou para o aumento da atividade. O aumento na quantidade de anéis aromáticos causou um leve acréscimo na inibição da enzima.

Os compostos **1a** e **2b**, que possuem apenas um grupo aceptor de ligações de hidrogênio (o grupo metoxi) na posição 4 e apresentam o valor de inibição muito baixo. Os compostos **1b** e **4b**, também possuem um grupo aceptor de ligações de hidrogênio na mesma posição com um valor de inibição máximo de 22%.

O acréscimo de um oxigênio ligado a posição 3,4 do anel aromático contribuiu de forma significativa com a porcentagem de inibição observado para os compostos **3b** e **5b** através do grupo dioximetil (OCH_2O). Obteve-se o valor aproximado de 40% de inibição. Com esse resultado, é razoável pensar que as posições 3 e 4 são privilegiadas e contribuem para o aumento da porcentagem de inibição (SILVA, 2011).

5.2.3 Teste de solubilidade e atividade anticolinesterásica dos solventes

Os testes para se determinar quais solventes e/ou mistura de solventes eram possíveis de serem usados nos ensaios de microplaca pelo método de Rhee mostraram os seguintes resultados (**Tabela 12**):

Tabela 12– Resultados dos testes para determinação da solubilidade dos solventes na microplaca.

Mistura de Solventes	Proporção da mistura (V/V)	Resultado
MeOH/Clorofórmio	90/10	Ppt na placa*
MeOH/Clorofórmio	86/14	Ppt na placa*
MeOH/Clorofórmio	90/10	Ppt na placa*
MeOH/Clorofórmio	95/5	Solúvel
MeOH/ Diclorometano	70/30	Ppt na placa*
MeOH/ Diclorometano	80/20	Ppt na placa*
MeOH/ Diclorometano	90/10	Solúvel
MeOH/ Diclorometano	95/5	Solúvel

* Ppt = precipitado - essa mistura apresentou precipitado (turvação) quando colocada na microplaca com os tampões e a enzima.

Fonte: próprio autor

Os resultados do teste de atividade anticolinesterásica dos solventes e/ou misturas de solventes são apresentados na **Tabela 13**. Os testes com os solventes MeOH e a mistura H₂O/DMSO 60/40 foram usados para uma comparação com a mistura MeOH/ Diclorometano 90/10 porque seu uso em outros estudo é comum, já que solubilizam boa parte de compostos insolúveis em água (SEIDL, 2010).

Tabela 13 – Valores da inibição (%) anticolinesterásica dos solventes e misturas de solventes utilizados no estudo.

Solvente	% inibição
MeOH/Clorofórmio - 95/5	21,46
MeOH/Diclorometano - 90/10	1,15 *
MeOH	17,74
H2O/DMSO 60/40	65,10

* valor calculado em duplicata

Fonte: próprio autor

Foi possível observar que a mistura de solventes MeOH/Diclorometano 90/10 (mistura mais utilizada neste estudo, devido à solubilidade dos compostos – ver adiante) apresentou inibição consideravelmente menor do que os outros solventes e misturas comumente usados em testes de microplaca pelo método de Ellman modificado por Rhee (SEIDL, 2010). Isso otimiza em muito os resultados dos testes anticolinesterásicos efetuados neste estudo, uma vez que ficou atestado que a interferência do solvente afeta minimamente os resultados da atividade anticolinesterásica.

Silva (2011) também estudou diidrocomarinas semelhantes e iguais às testadas nesse trabalho e realizou teste de atividade anticolinesterásica desses compostos, encontrando um percentual de inibição anticolinesterásica de 25,86%, 25,86% e 40,87% para os compostos 73, 74 e 76, respectivamente, os quais correspondem aos compostos 1b, 2b e 3b deste trabalho, sendo que os mesmos neste estudo apresentaram inibição de 3,78%, 8,26% e 29,61%. Ou seja, neste estudo os mesmos compostos apresentaram valores de inibição sensivelmente menores.

Isto pode ser explicado pelo fato de que no estudo de Silva (2011) ter usado como solvente, o DMSO diluído, o que, pode ter causado um efeito falso positivo na atividade anticolinesterásica, mascarando a real inibição dos compostos.

Outro ponto de extrema importância que não foi adotado por Silva (2011) e que pode ter acarretado nesses resultados elevados foi o teste de padronização da enzima. Durante todo o estudo de atividade anticolinesterásica no presente estudo foi possível observar que a enzima AchE, depois de descongelada a primeira vez,

sempre tem sua atividade reduzida nos sucessivos processos de congelamento/descongelamento, já que a mesma é usada em temperatura ambiente nos testes de atividade anticolinesterásica pelo método de Ellman. Observou-se que Silva (2011) não utilizou essa padronização da enzima durante seus testes, e isso pode ter proporcionado resultados mais elevados que os reais.

5.2.4 Solubilidade dos compostos

Conforme esperado, todos os compostos se mostraram insolúveis em água e em Metanol (MeOH) puro. A solubilidade dos compostos foi então testada para se determinar qual a solubilidade em cada solvente e qual a concentração máxima possível de se solubilizar para a realização do teste de atividade anticolinesterásica na microplaca. A solubilidade de cada composto com as respectivos solventes e/ ou mistura de solventes e a concentração máxima permitida pela solubilização na placa está apresentada na **Tabela 14**.

Tabela 14 – Solubilidade de cada composto com o respectivo solvente e/ou mistura de solventes e a concentração máxima possível de se solubilizar na dada condição.

Composto	Solvente	Concentração	Resultado da solubilidade
2b	DMSO	65 mM	Insolúvel
2b	MeOH/Diclorometano 90/10	150 uM (in)*	Solúvel
1a	MeOH/Diclorometano 90/10	363 uM (in) *	Solúvel
4b	MeOH/Diclorometano 90/10	246 uM (in) *	Solúvel
5b	MeOH/Diclorometano 90/10	180 uM (in) *	Solúvel
1b	MeOH/Diclorometano	204 uM (in) *	Solúvel

	90/10		
2a	MeOH/Diclorometano 90/10	580 uM (in) *	Solúvel
3b	MeOH/Diclorometano 90/10	238 uM (in) *	Solúvel

* (in) = esta é a concentração final do composto na microplaca.

5.2.5 O problema de solubilidade

Uma das maiores dificuldades enfrentadas para a execução do ensaio em microplaca com os compostos em estudo foi a necessidade da solubilidade das amostras em água, metanol, diclorometano ou uma mistura de alguns desses solventes. Os compostos não eram totalmente solúveis em apenas um dos solventes, o que era observado pelo leve turvamento das soluções. Portanto, depois de determinada cada concentração máxima que era solúvel principalmente na mistura MeOH/Diclorometano 90/10, foram feitos os testes de atividade anticolinesterásica, porém não era possível se testar concentrações acima desta máxima anteriormente determinada, e assim, mesmo quando um composto apresentou níveis diferentes de inibição, não era possível continuar os testes usando concentrações maiores para se determinar o IC₅₀, por exemplo.

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os objetivos deste trabalho foram integralmente alcançados.

A síntese dos derivados de diidrocomarinas através do uso de um equipamento de irradiação de micro-ondas mostrou-se um procedimento extremamente simples e altamente eficaz, resultando na formação do produto com rendimentos apreciáveis. Os espectros de infravermelho e de RMN confirmaram a formação dos produtos.

A obtenção do produto não cíclico, os ésteres, foi surpreendente e interessante, não só por formar um produto novo, mas também por apresentar atividade anticolinesterásica.

A atividade anticolinesterásica dos compostos foi satisfatoriamente avaliada *in vitro* através de ensaio em microplaca pelo método de Ellman.

O método de Ellman, para a determinação da atividade biológica anticolinesterásica mostrou-se muito eficiente, pois é extremamente seletivo e muito simples de se realizar.

Todas as moléculas testadas apresentaram atividade anticolinesterásica. Destas, duas moléculas (**5b** e **3b**) se mostraram mais promissoras, com valores de inibição entre 29,61% e 31,25 %. Entretanto, para que se conclua sobre seu potencial terapêutico são necessárias outras análises, como a determinação dos valores de IC₅₀, biodisponibilidade, exames pré-clínicos, clínicos e outros

Otimização do estudo através do uso de solventes adequados, os quais apresentaram uma baixa interferência na atividade anticolinesterásica e padronização da atividade enzimática antes do uso da enzima foi altamente eficaz, e estas técnicas se revelaram como técnicas novas e atraentes para estudos futuros.

Pretende-se, em trabalhos futuros, sintetizar mais diidrocumarinas e derivados, procurando obter moléculas cada vez mais seletivas, eficazes e capazes de apresentar aplicabilidade terapêutica.

REFERÊNCIAS

ADSERSEN, A. et al. Ethnopharmacological communication Screening of plants used in Danish folk medicine to treat memory dysfunction for acetylcholinesterase inhibitory activity. *Journal of Ethnopharmacology*, n. 104, p. 418-422, 2006.

ALIPOUR, M. et al, Novel coumarin derivatives bearing N-benzyl pyridinium moiety: Potent and dual binding site acetylcholinesterase inhibitors. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, n. 20, p. 7214–7222, 2012.

ALMEIDA, J. R. *Estudos de modelagem molecular e relação estrutura-atividade da acetilcolinesterase e inibidores em Mal de Alzheimer*. 126 p. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo (USP), Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, 2011.

ANAND, P. et al A review on coumarins as acetylcholinesterase inhibitors for Alzheimer's disease. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*. n. 20, p.1175–1180, 2012.

AOKI, S. et al. A convenient synthesis of dihydrocoumarins from phenols and cinnamic acid derivatives. *Tetrahedron*, n. 61, p. 9291–9297, 2005.

AUGUSTINE, J. K. et al. An efficient one-pot synthesis of coumarins mediated by propylphosphonic anhydride (T3P) via the Perkin condensation. *Tetrahedron Letters*, n.53, p. 4422–4425, 2012.

BALLARD, C. et al. Alzheimer's disease. *The Lancet*, v. 377, p. 1019–31, 2011.

BARBOSA-FILHO, J. M. et al. Natural products inhibitors of the enzyme acetylcholinesterase. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, n.16, v. 2, p. 258-285, 2006.

BARREIRO, E. J. et al. A Química Medicinal de N-Acilidrazonas: Novos Compostos-Protótipos de Fármacos analgésicos, Antiinflamatórios e Anti-Trombóticos. *Química Nova*, v. 25, n. 1, p. 129-148, 2002.

BARRETO, R. L. *Design e síntese de novos análogos estruturais da acetilcolina conformacionalmente restringidos*. 166 p. Dissertação (Mestrado) – Departamento de Química Orgânica – Instituto de Química, Unicamp, 2003.

BASANAGOUDA, M. et al. Synthesis and antimicrobial studies on novel sulfonamides containing 4-azidomethyl coumarin. *European Journal of Medicinal Chemistry*, n. 45, p. 1151–1157, 2010.

BEILLEROT, A. et al. Synthesis and protective effects of coumarin derivatives against oxidative stress induced by doxorubicin. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, n. 18, p. 1102–1105, 2008.

BELLUTI, F. et al. Design, synthesis and anticancer activities of stilbene-coumarin hybrid compounds: Identification of novel proapoptotic agentes. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, n. 18, p. 3543–3550, 2010.

BENNARDI, D. O. et al. Efficient Microwave Solvent-Free Synthesis of Flavones, Chromones, Coumarins and Dihydrocoumarins. *Letters in Organic Chemistry*, n. 5, p. 607-615, 2008.

BEZERRA, M. Z. B. et al. Synthesis of Neoflavonoids: 4-(4-methoxyphenil)-3,4-Dihydrocoumarin. *Journal Brazilian Chemical Society*, v. 8, n. 3, p. 229-234, 1997.

BHATTACHARYYA, S. S. et al., A synthetic coumarin (4-Methyl – 7 hydroxy coumarin) has anti-cancer potentials against DMBA- induced skin câncer in mice. *European Journal of Pharmacology*. n.614, p. 128-136, 2009.

BLENNOW, K. et al. Alzheimer's disease. *The Lancet*, v.368, p. 387-403, 2006.

CABRAL, R. S. et al. Anticholinesterase activity evaluation of alkaloids and coumarin from stems of *Conchocarpus fontanesianus*. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v. 22, n. 2, p. 374-380, 2012.

CAREY, A. F. & SUNDBERG, R. J. *Advanced Organic Chemistry*. 5ª ed. New York: Springer, p. 287 – 291, 2007.

CASTRO, B. M. *Funções motoras em camundongos deficientes do transportador vesicular de acetilcolina (vacht)*. 46 p. Dissertação (Mestrado) - Departamento de Farmacologia, Universidade Federal de Minas Gerais, 2006.

CATTO, M. et al. Design, synthesis and biological evaluation of coumarin alkylamines as potent and selective dual binding site inhibitors of acetylcholinesterase. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, n. 21, p. 146–152, 2013.

CHOUDHARY, M. I. et al. Cholinesterase inhibitory pregnane-type steroidal alkaloids from *Sarcococca hookeriana*. *Steroids*, n. 70, p. 295–303, 2005.

CLAYDEN J. et al. *Organic Chemistry*. 1^a ed. New York: Oxford, p.319, 2001.

DONNELLY, D. M. X. & BOLAND. G. M. Isoflavonoids and Neoflavonoids: Naturally Occurring O-Heterocycles. *Natural Product Reports*, n. 12, p. 321-338, 1995.

ELLMAN, G. L. et al. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochemical Pharmacology*, v. 7, p. 88-95,1961.

EYCKEN, E.V.V. Aqueous Microwave Assisted Chemistry. *Angewandte Chemie international Edition*, n. 49, p. 10039 – 10040, 21010.

FALLARERO, A. et al. Inhibition of acetylcholinesterase by coumarins: The case of coumarin 106. *Pharmacological Research*, n. 58, p. 215-221, 2008.

FILLION, E. et al. Yb(OTf)₃-Catalyzed Reactions of 5-Alkylidene Meldrum's Acids with Phenols: One-Pot Assembly of 3,4-Dihydrocoumarins, 4-Chromanones, Coumarins, and Chromones. *Journal Organic Chemistry*, n. 71, p. 409-412, 2006.

FIQUEREDO, A. S. *Planejamento, síntese e avaliação da atividade anticolinesterásica de análogos de piperina*. 169 p. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Ciências Moleculares, Universidade Estadual de Goiás, 2013.

GEDYE R. et al. The use of microwave ovens for rapid organic synthesis. *Tetrahedron Letters*, v.27, n.3, p. 279-282, 1986.

GIGUERE, R. J. et al. Application of commercial microwaves ovens to organics synthesis. *Tetrahedron Letters*, v.27, n.41, p. 4945-4948,1986.

HORNICK, A. et al. The coumarin scopoletin potentiates acetylcholine release from synaptosomes, amplifies hippocampal longterm potentiation and ameliorates anticholinergic- and age-impaired memory. *Neuroscience*, n.197, p. 280–292, 2011.

HOUGHTON, P. J. et al. Acetylcholinesterase inhibitors from plants and fungi. *Natural Product Reports*, n. 23, p. 181–199, 2006.

HOWES, M. J. R. et al. Plants with Traditional Uses and Activities, Relevant to the Management of Alzheimer's Disease and Other Cognitive Disorders. *Phytotherapy Research*, n. 17, p. 1–18, 2003.

JACOBSEN, C. B. et al. Enantioselective Formation of Substituted 3,4-Dihydrocoumarins by a Multicatalytic One-Pot Process. *Organic Letters*, n. 21, v. 14, p. 5526-5529, 2012.

JEON, J. H. et al. Selective Synthesis of 3,4-Dihydrocoumarins and Chalcones from Substituted Aryl Cinnamic Esters. *The Bulletin of the Korean Chemical society*, v. 32, n. 1, p. 65-70, 2011.

JIA, C. et al. New Method for Preparation of Coumarin and Quinolinones via Pd-Catalyzed Intramolecular Hydroarylation of C-C Triple bonds. *Journal Organic Chemistry*, v. 65, n.22, p. 7516-7522, 2000.

KAPPE, C. O. A chemist muses on the technique of microwaving flowing chemical reactions. *Nature*, v. 464, p.817, 2010.

KAPPE, C. O. Book Review of Micro Reaction Technology in Organic Synthesis. *Journal of the American Chemical Society*, n.133, p. 9948–9948, 2011.

KAPPE, C. O. et al. Microwave Effects in Organic Synthesis: Myth or Reality? *Angewandte Chemie international Edition*, n. 52, p. 1088 – 1094, 2013.

KIM J. et al. Naturally occurring phytochemicals for the prevention of Alzheimer's disease. *Journal of neurochemistry neurochemistry*, n. 112, p. 1415-1430, 2010.

LEAL, L. K. A. M. et al. Antinociceptive, anti-inflammatory and bronchodilator activities of Brazilian medicinal plants containing coumarin. *Journal of Ethnopharmacology*, n.70, p. 151-159, 2000.

LEE, J. H. et al. Acetylcholinesterase Inhibitors from the Twigs of *Vaccinium oldhami* Miquel. *Archives of Pharmacol Research*, v. 27, n. 1, p. 53-56, 2004.

LEE, S. et al. Synthesis and anti-angiogenesis activity of coumarin derivatives. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, n.16, p. 4596–4599, 2006.

LI, J. et al. Microwave-assisted one-pot synthesis of 3-substituted-3,4-dihydrocoumarins via tandem Konevenagel and Hantzsch reactions. *Chinese Chemical Letters*, n. 20, p. 25–28, 2009.

LI, K. et al. Trifluoroacetic Acid-Mediated Hydroarylation: Synthesis of Dihydrocoumarins and Dihydroquinolones, *Journal Organic Chemistry*, n. 70, p. 2881-2883, 2005.

LLEO, A. et al. Current Pharmacotherapy for Alzheimer's Disease. *Annual Review of Medicine*, n.57, p. 513–33; 2006.

MANHAS, M. S. et al. Microwave initiated reactions: Pechmann coumarin synthesis, Biginelli reaction, and acylation. *Tetrahedron Letters*, n. 47, p. 2423-2425, 2006.

MASHRAQUI, S. H. et al. Efficient synthesis of 3-substituted coumarins. *Synthetic Communications*, v.34, n. 17, p. 3129-3134, 2004

MEOTTI, F. C. et al. Analysis of the Antinociceptive Effect of the Flavonoid Myricitrin: Evidence for a Role of the L-Arginine-Nitric Oxide and Protein Kinase C Pathways. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, v. 316, n. 2, p. 789-796, 2006.

MORITA H. et al. Antimitotic activity of glaupalol-related coumarins from *Glaucidium palmatum*. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, n. 14, p. 3665–3668, 2004.

NIRALWAD, K. S. et al. Microwave-assisted one-pot synthesis of octahydroquinazolinone derivatives using ammonium metavanadate under solvent-free condition. *Tetrahedron Letters*, n. 51, p. 3616–3618, 2010.

ORHAN G. et al. Recent developments in natural and synthetic drug research for Alzheimer's disease. *Letters in Drug Design & Discovery*, n. 3, p. 268-274, 2006.

PALLAS M. & CAMINS A. Molecular and biochemical features in Alzheimer's disease. *Current Pharmaceutical Design*, n.12, p. 4389-4408, 2006.

PENG, S. et al. Facile synthesis of 4-substituted 3,4-dihydrocoumarins via an organocatalytic double decarboxylation process. *Organic & Biomolecular Chemistry*, n. 10, p. 2537–2541, 2012.

PEREIRA, E.C. et al. Coumarin effects on amino acid levels in mice prefrontal cortex and hippocampus. *Neuroscience Letters*, n. 454, p. 139–142, 2009.

PIAZZI, L. et al. Multi-target-directed coumarin derivatives: hAChE and BACE1 inhibitors as potential anti-Alzheimer compounds. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, n. 18, p. 423–426, 2008.

PRAKASH, G. K. S. et al. Preparation of Trifluoromethylated Dihydrocoumarins, Indanones, and Arylpropanoic Acids by Tandem Superacidic Activation of 2-

(Trifluoromethyl)acrylic Acid with Arenes. *Journal Organic Chemistry*, n. 75, p. 2219–2226, 2010.

PUTTARAJU, K. B. et al. Microwave assisted synthesis of dihydrobenzo[4,5]imidazo[1,2-a] pyrimidin-4-ones; synthesis, in vitro antimicrobial and anticâncer activities of novel coumarin substituted dihydrobenzo[4,5]imidazo [1,2-a]pyrimidin-4-ones. *European Journal of Medicinal Chemistry*, n. 69, p. 316-322, 2013.

RACCHI M. et al. Acetylcholinesterase inhibitors: novel activities of old molecules. *Pharmacological Research*, n. 50, p. 441-451, 2004.

RADUNZ, L. L. et al. Rendimento extrativo de cumarina de folhas de guaco (*Mikania glomerata* Sprengel) submetidas a diferentes temperaturas de secagem. *Revista Brasileira de Plantas medicinais*, Botucatu, v. 14, n. 3, 2012 .

RAFFA, R. B. Thermodynamics of the Drug-Receptor Interaction. *Life Sciences*, v. 65, n. 10, p. 967-980, 1999.

RAMIER, J. et al. Microwave-assisted ring-opening polymerization of d , l -lactide: a probe for the nonexistence of nonthermal microwave effects. *Macromolecular Chemistry and Physics*, n. 213, p. 784–788, 2012.

REDDY, N. S. et al. Synthesis of new coumarin 3-(N-aryl) sulfonamides and their anticancer activity. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, n. 14, p. 4093-4097, 2004.

RHEE, I. K. et al, Screening for acetylcholinesterase inhibitors from Amaryllidaceae using silica gel thin-layer chromatography in combination with bioactivity staining. *Journal of Chromatography A*, n. 915 p. 217–223, 2001.

RODRIGUES-SANTOS, C. E. & ECHEVARRIA, A. An efficient and fast synthesis of 4-aryl-3,4-dihydrocoumarins by (CF₃SO₃)₃Y catalysis under microwave irradiation. *Tetrahedron Letters*, n. 48, p. 4505-4508, 2007.

ROLLINGER, J. M. et al. Acetylcholinesterase Inhibitory Activity of Scopolin and Scopoletin Discovered by Virtual Screening of Natural Products. *Journal of Medicinal Chemistry*, n. 47, p. 6248-6254, 2004.

ROUSSAKI, M. et al. A novel synthesis of 3-aryl coumarins and evaluation of their antioxidante and lipoxygenase inhibitory activity. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, n. 20, p. 3889–3892, 2010.

SANTOS, C. E. R. *Síntese, Caracterização e Atividade Anti-Leishmania de Derivados das Classes 4-Aril-3,4-Diidrocoumarinas, Pirazolo[3,4-b]Piridin-6-Onas e*

N,N'-Difenil-Benzamidinas. 164 p. Tese (Doutorado)– Instituto de Ciências Exatas - Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, 2008.

SEIDL, C. Pesquisa de substâncias naturais inibidoras da acetilcolinesterase. 86 p. Dissertação (Mestrado) - Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná, 2010.

SELKOE J. S. Alzheimer disease: Mechanistic understanding predicts novel therapies. *Annals of Internal Medicine*, v. 140, n. 8, p. 627-638, 2004a.

SELKOE D. J. Cell biology of protein misfolding: The examples of Alzheimer's and Parkinson's diseases. *Nature Cell Biology*, v. 6, n.11, p. 1054-1061, 2004b.

SHEN, Q. et al. Synthesis and biological evaluation of functionalized coumarins as acetylcholinesterase inhibitors. *European Journal of Medicinal Chemistry*, n. 40, p. 1307–1315, 2005.

SHORE, G. et al. Propargyl Amine Synthesis Catalysed by Gold and Copper Thin Films by Using Microwave-Assisted Continuous-Flow Organic Synthesis (MACOS). *Chemistry - A European Journal*, v.16, Issue 36, p. 10959–10962, 2010.

SILVA, I. F. O. *Aspectos do envelhecimento cerebral e função cognitiva em modelo experimental animal e estudo de mecanismos de neurodegeneração em cultura celular*. 187 p. Tese (Doutorado). Departamento de bioquímica e imunologia - departamento de anatomia patológica e medicina legal - Departamento de psicologia, Universidade Federal de Minas Gerais, 2007.

SILVA, J. L. F. *Síntese de análogos de diidrocoumarina e avaliação da atividade anticolinesterásica*. 286 p. Dissertação (Mestrado) - Programa de pós-graduação *Stricto Sensu* em Ciências Moleculares, Universidade Estadual de Goiás, 2011.

SONG, A. et al. A convenient synthesis of coumarin-3-carboxylic acids via Knoevenagel condensation of Meldrum's acid with ortho-hydroxyaryl aldehydes or ketones. *Tetrahedron Letters*, n. 44, p. 1755–1758, 2003.

SZYMANSKI, P. et al, Synthesis and biological activity of derivatives of tetrahydroacridine as acetylcholinesterase inhibitors. *Bioorganic Chemistry*, n. 39, p. 138–142, 2011.

TERRY JR., A. V. & BUCCAFUSCO, J. J. The Cholinergic Hypothesis of Age and Alzheimer's Disease-Related Cognitive Deficits: Recent Challenges and Their Implications for Novel Drug Development. *The Journal of Pharmacology and experimental Therapeutics*, v. 306, n. 3, p. 821-827, 2003.

VARMA R. S. Greener routes to organics and nanomaterials: sustainable applications of nanocatalysts. *Pure and Applied Chemistry*, v. 85, n. 8, p. 1703-1710, 2013.

VILA NOVA, P. C. C. et al. Análises de cumarinas em derivados de citrus utilizando cromatografia gasosa de alta resolução com sistemas de detecção por ionização de chama e espectrometria de massas. *Journal of Biotechnology and Biodiversity*, v. 3, n.1: p. 25-31, 2012 .

WHO 2001. Alzheimer's disease: the brain killer. Disponível em: <http://whqlibdoc.who.int/searo/2001/SEA_Ment_116.pdf>. Acesso em: 23 Jan.2014.

XIE, S. S. et al. Design, synthesis and evaluation of novel tacrinecoumarin hybrids as multifunctional cholinesterase inhibitors against Alzheimer's disease. *European Journal of Medicinal Chemistry*, n. 64, p. 540-553, 2013.

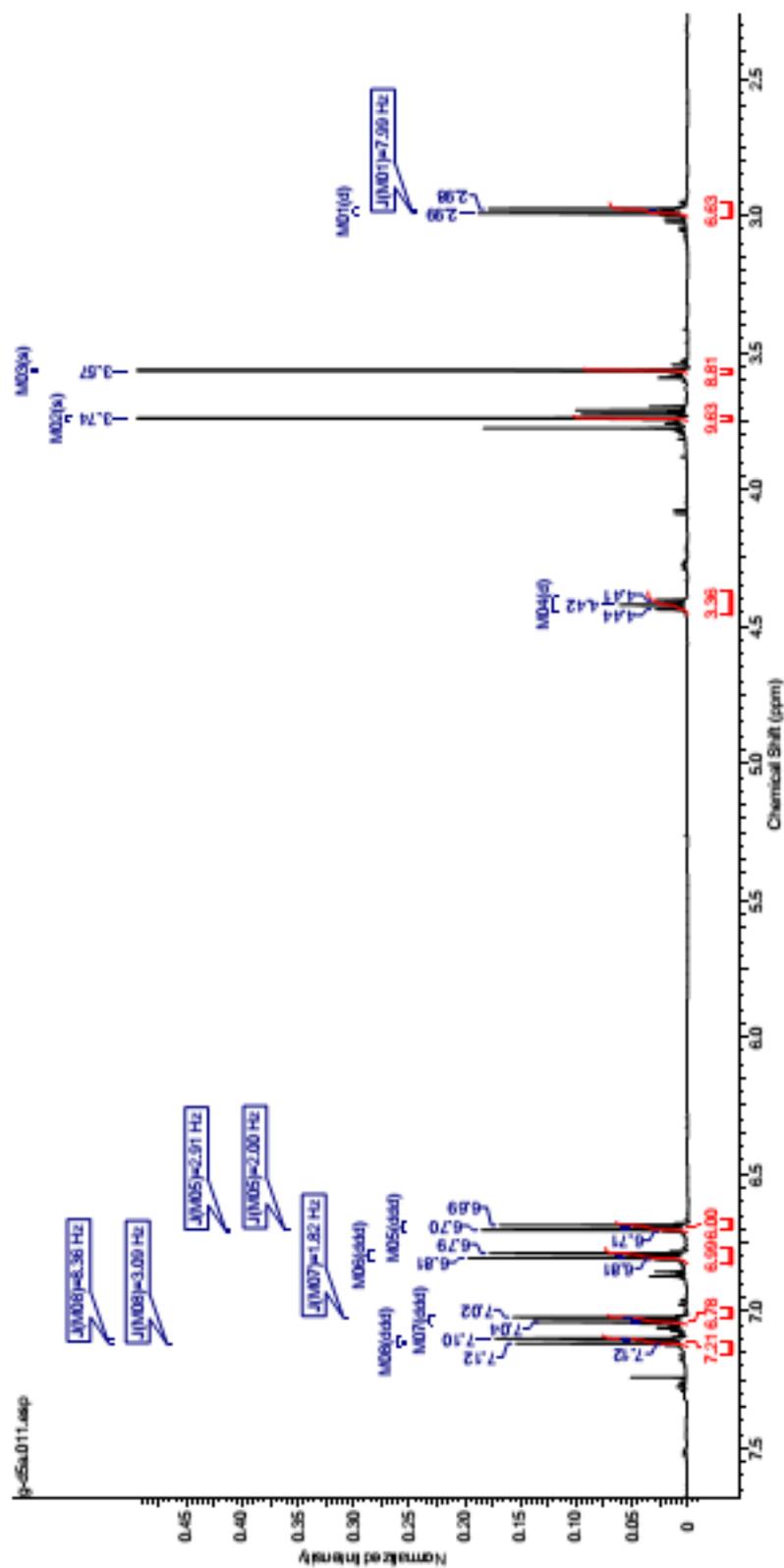
YOUN, S. W. et al. Ru(III)-Catalyzed Cyclization of Arene-Alkene Substrates via Intramolecular Electrophilic Hydroarylation. *Organic Letters*, n.4, v. 6, p. 581-584, 2004.

ZAREAI, Z. et al. Synthesis of functionalized furo[3,2-c] coumarins via a one-pot oxidative pseudo three-component reaction in poly(ethylene glycol). *Tetrahedron*, n. 68, p. 6721-6726, 2012.

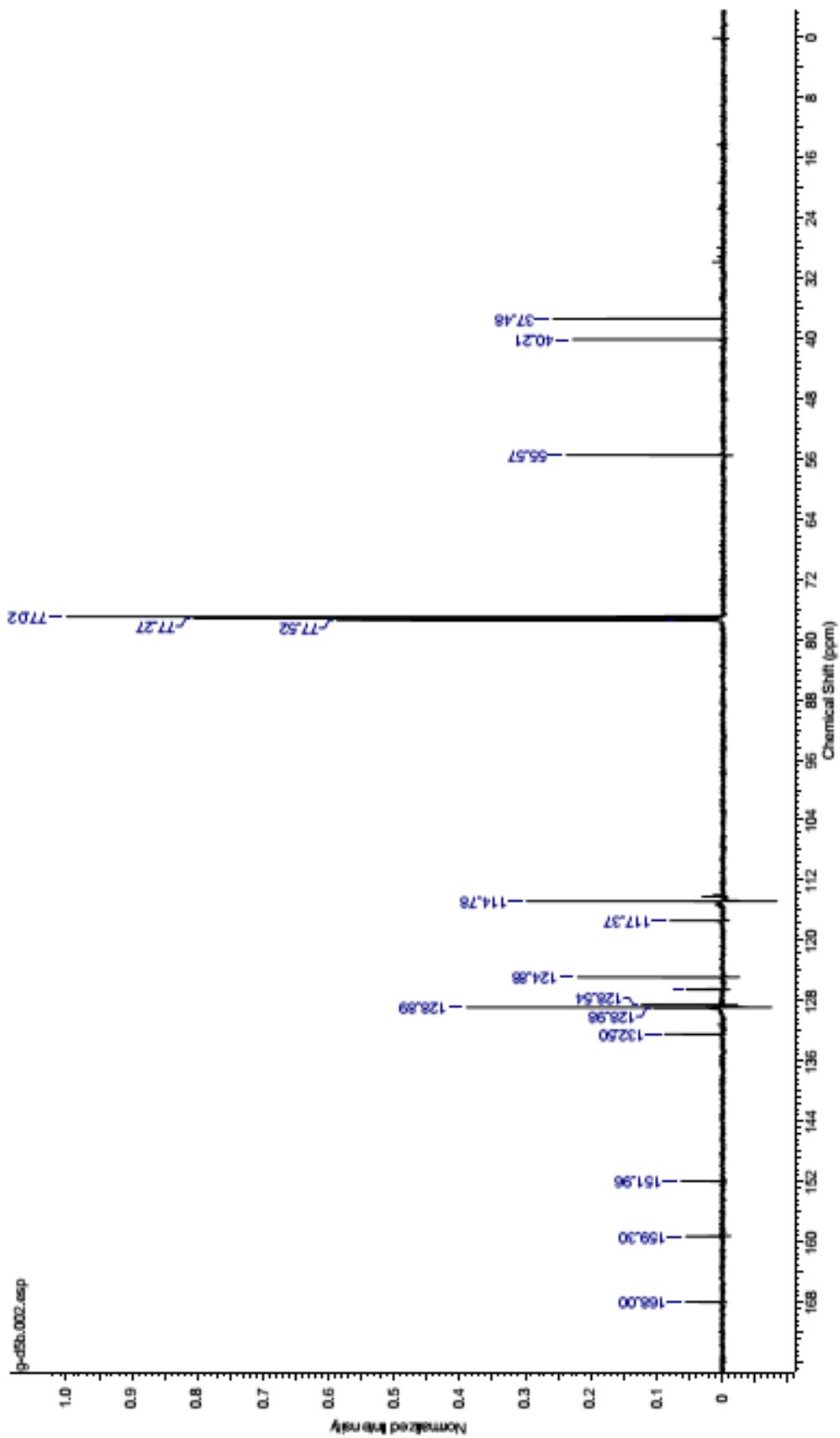
ZHOU, X. et al. Design, synthesis, and acetylcholinesterase inhibitory activity of novel coumarin analogues. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, n. 16, p. 8011-8021, 2008.

8. ANEXOS

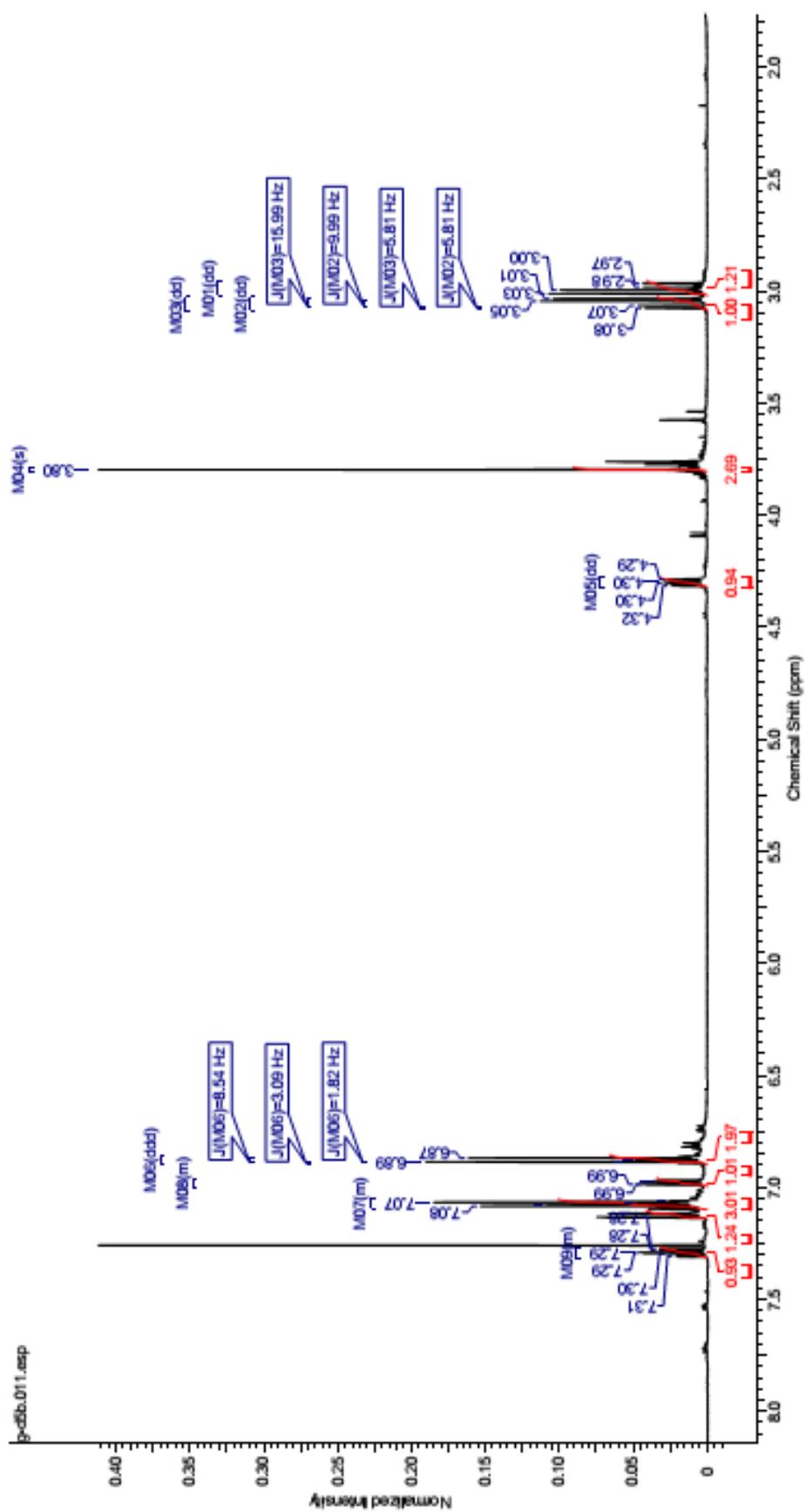
8.1 - Espectro de RMN de ^1H para o composto 1a



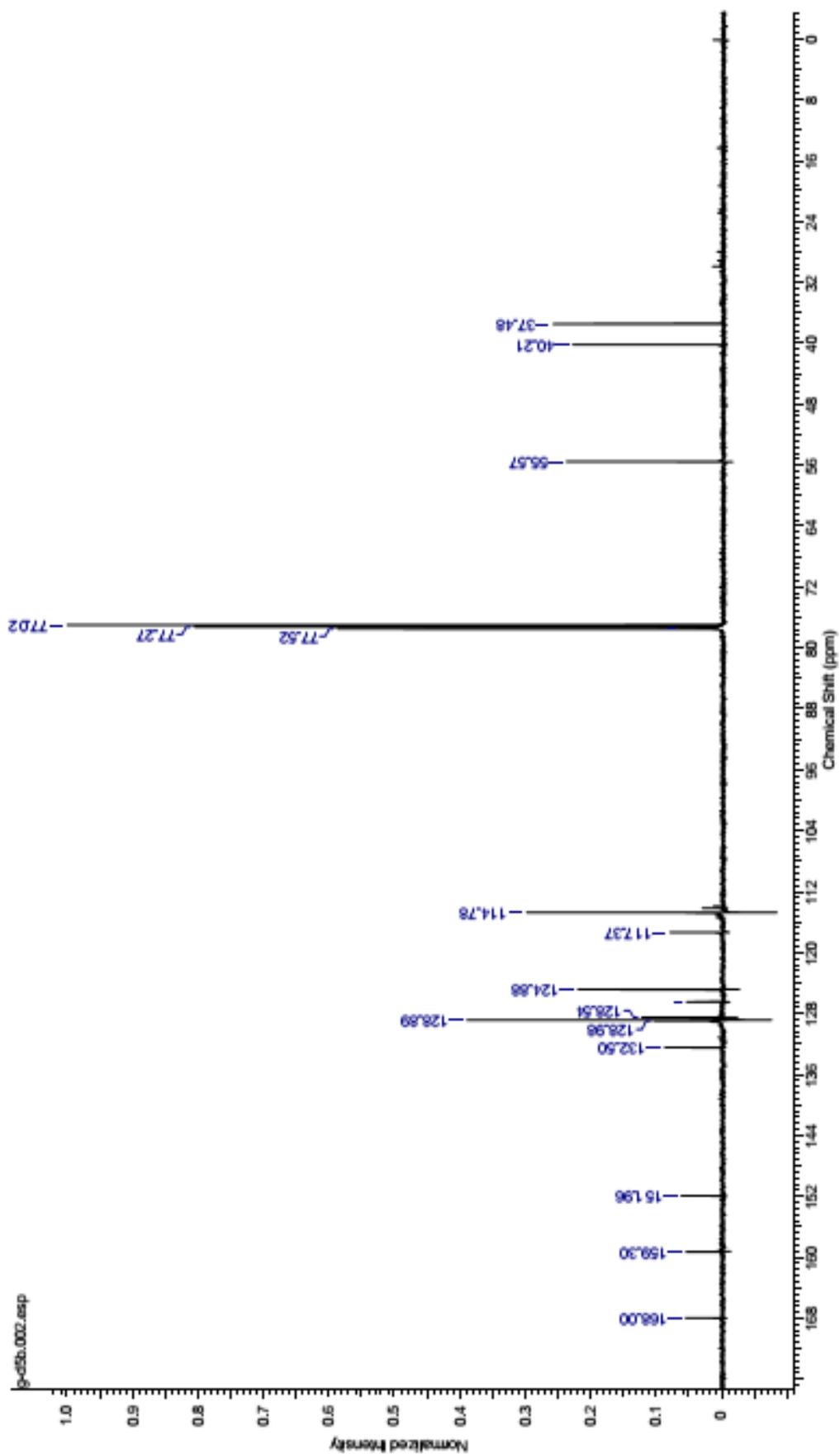
8.2 - Espectro de RMN de ^{13}C para o composto 1a



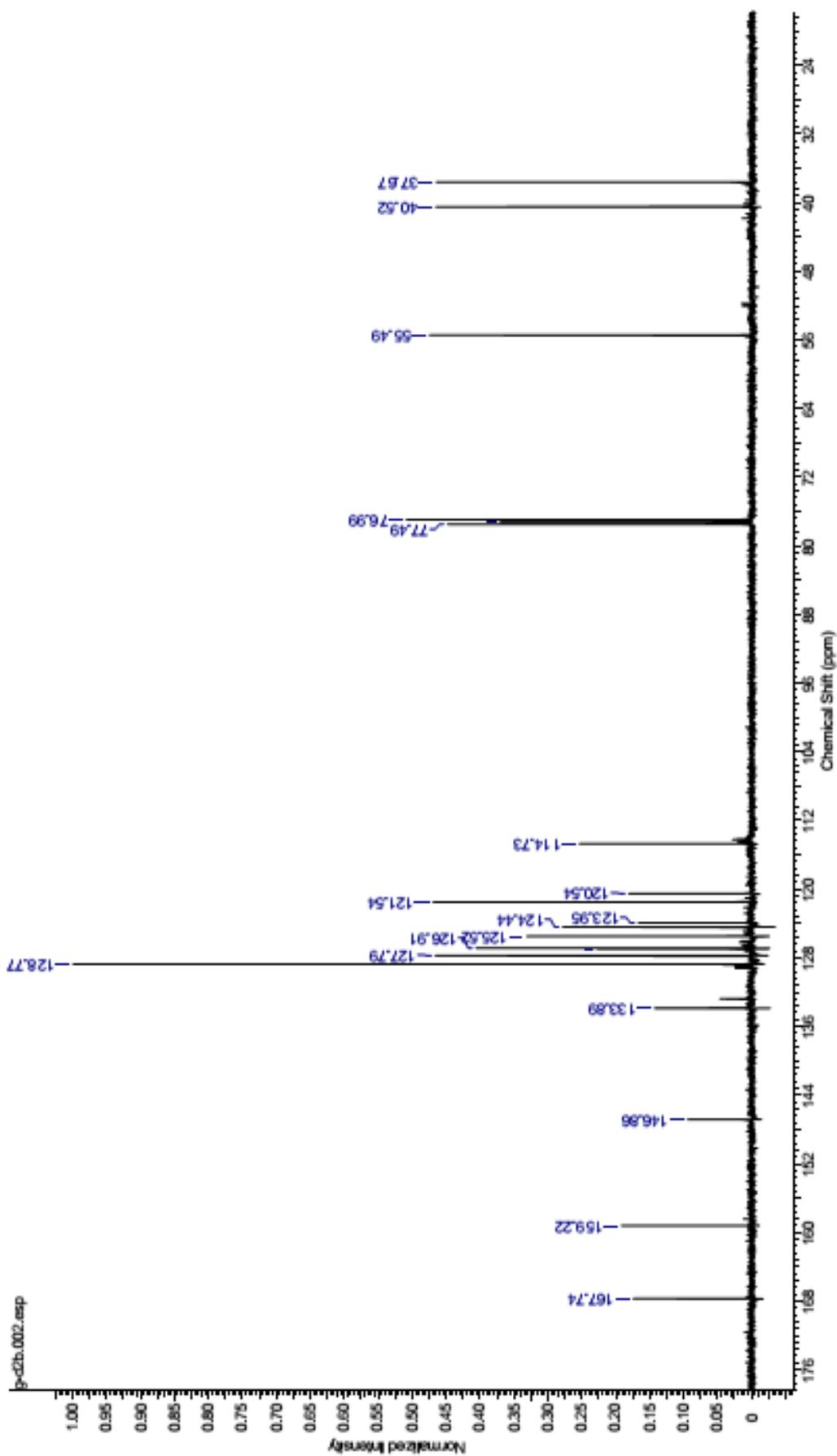
8.3 Espectro de RMN de ^1H para o composto 1b



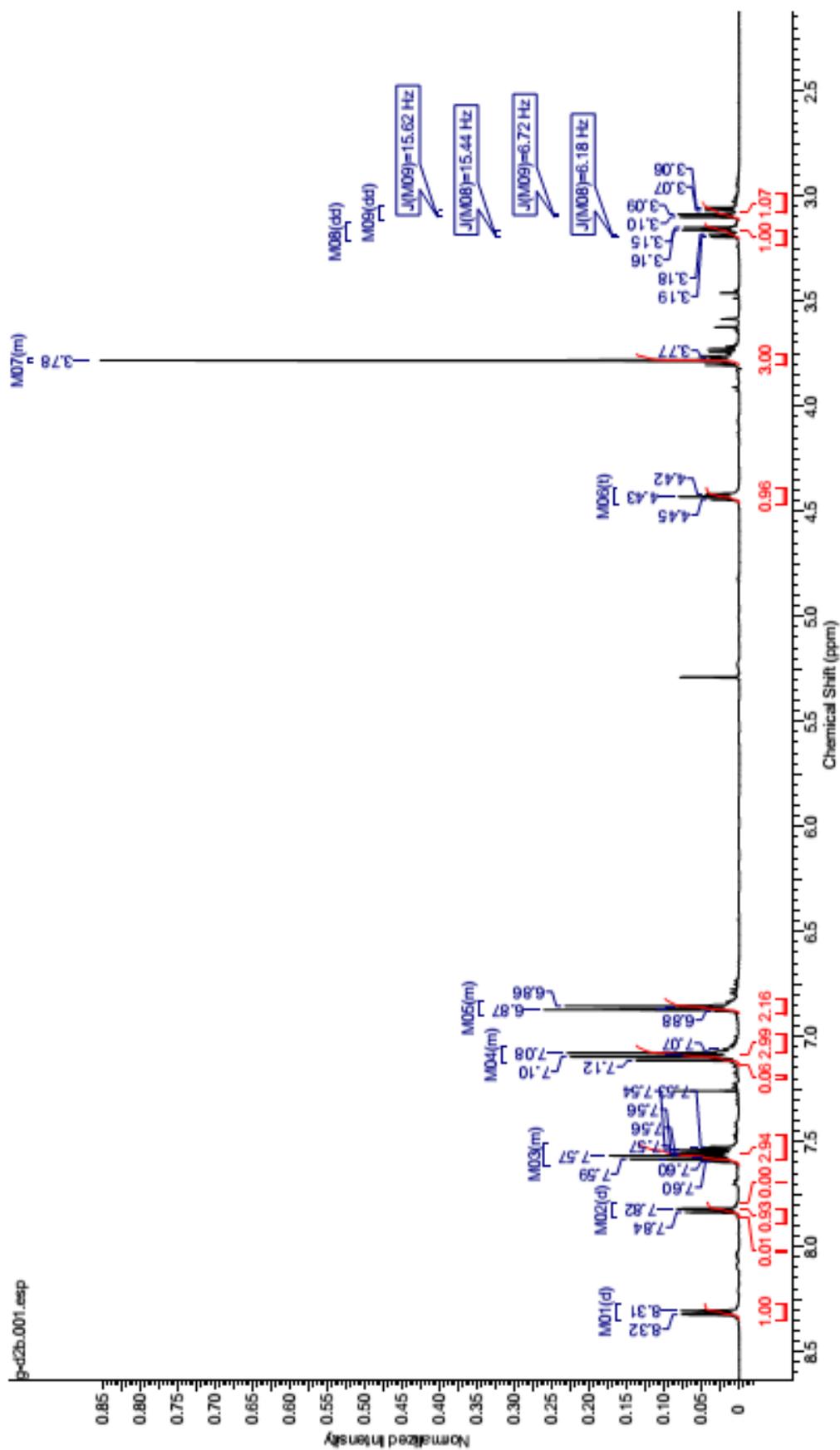
8.4 - Espectro de RMN de ^{13}C para o composto 1b



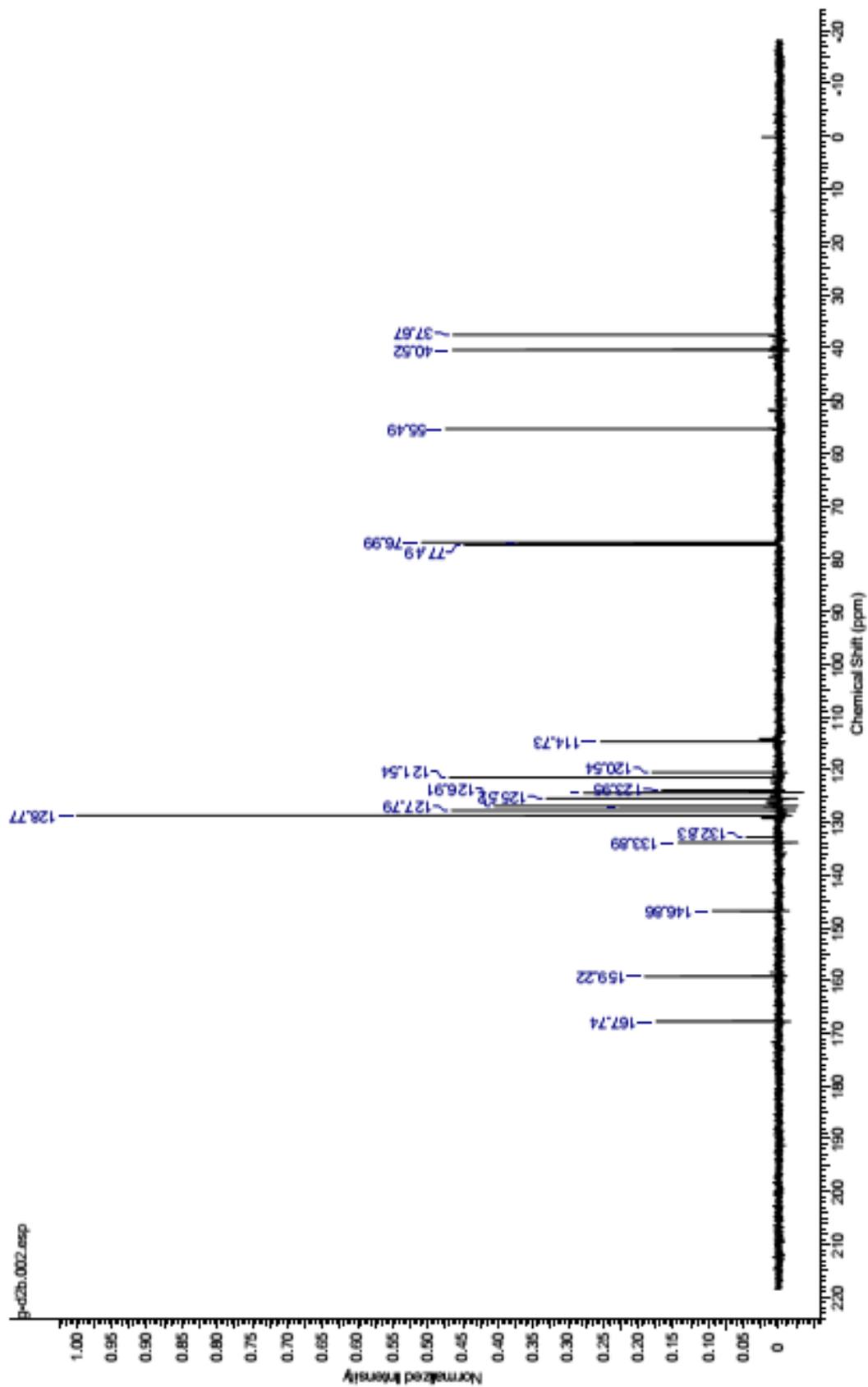
8.6 Espectro de RMN de ^{13}C para o composto 4b



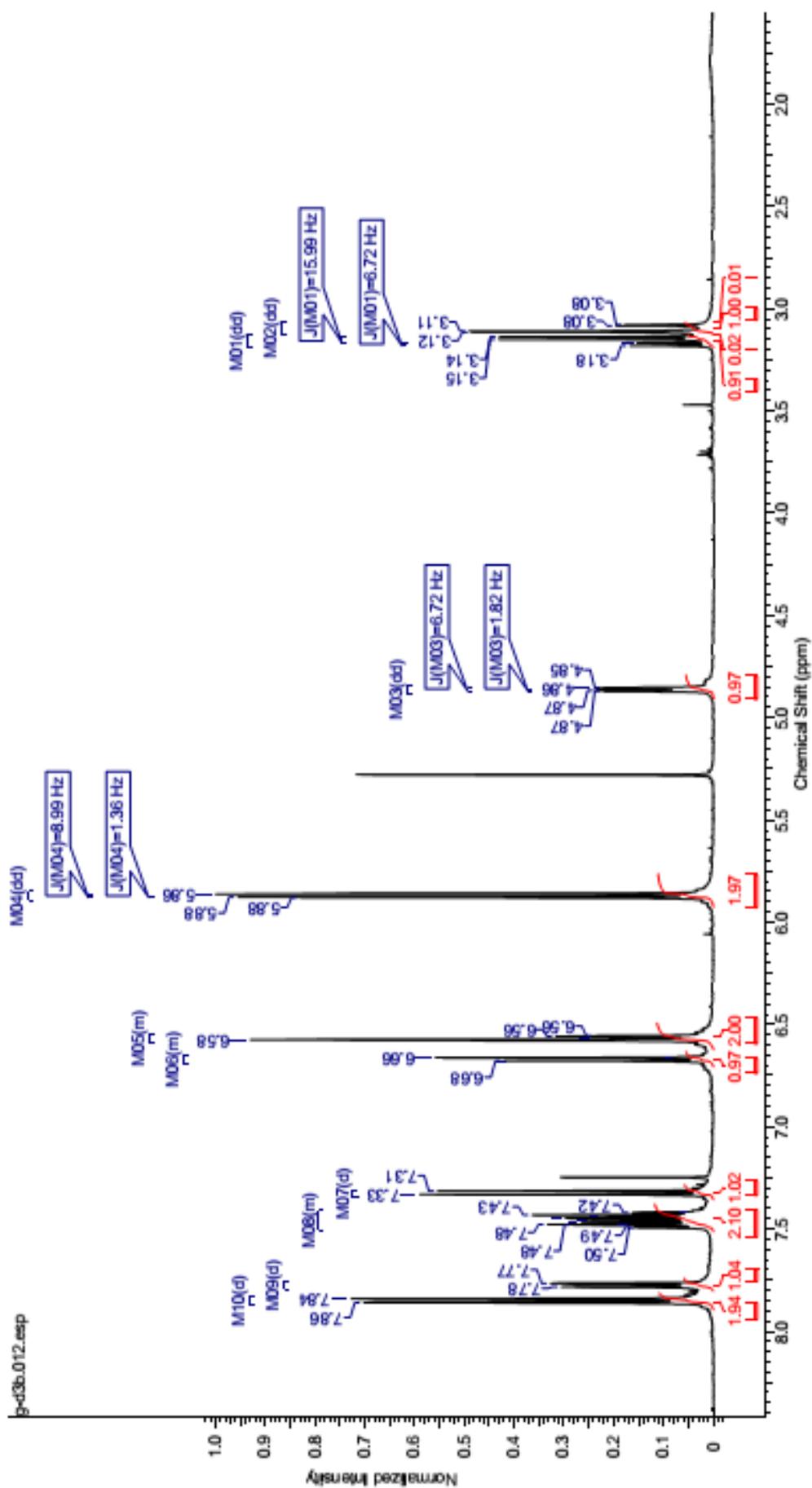
8.7 Espectro de RMN de ^1H para o composto 2b



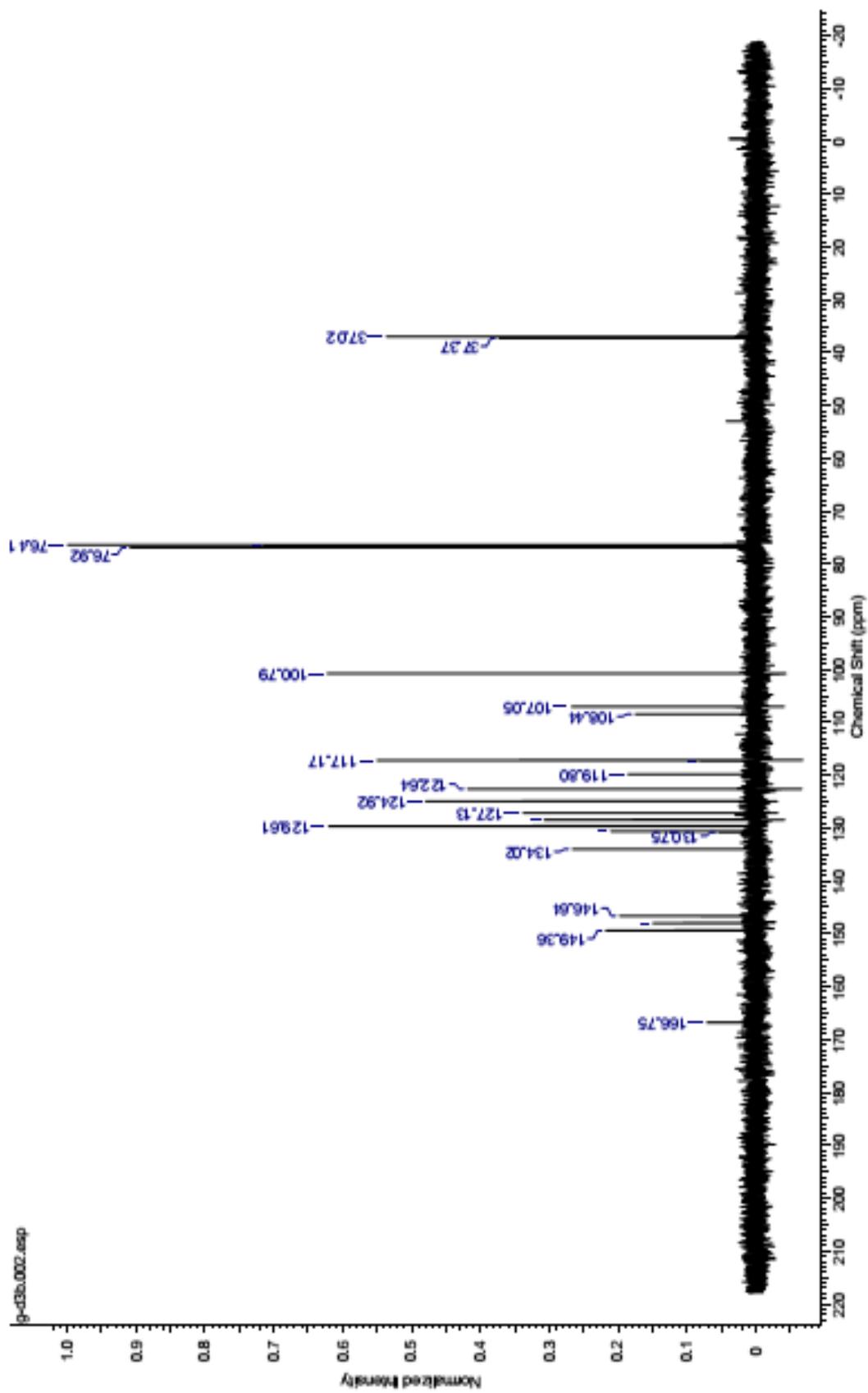
8.8 Espectro de RMN de ^{13}C para o composto 2b



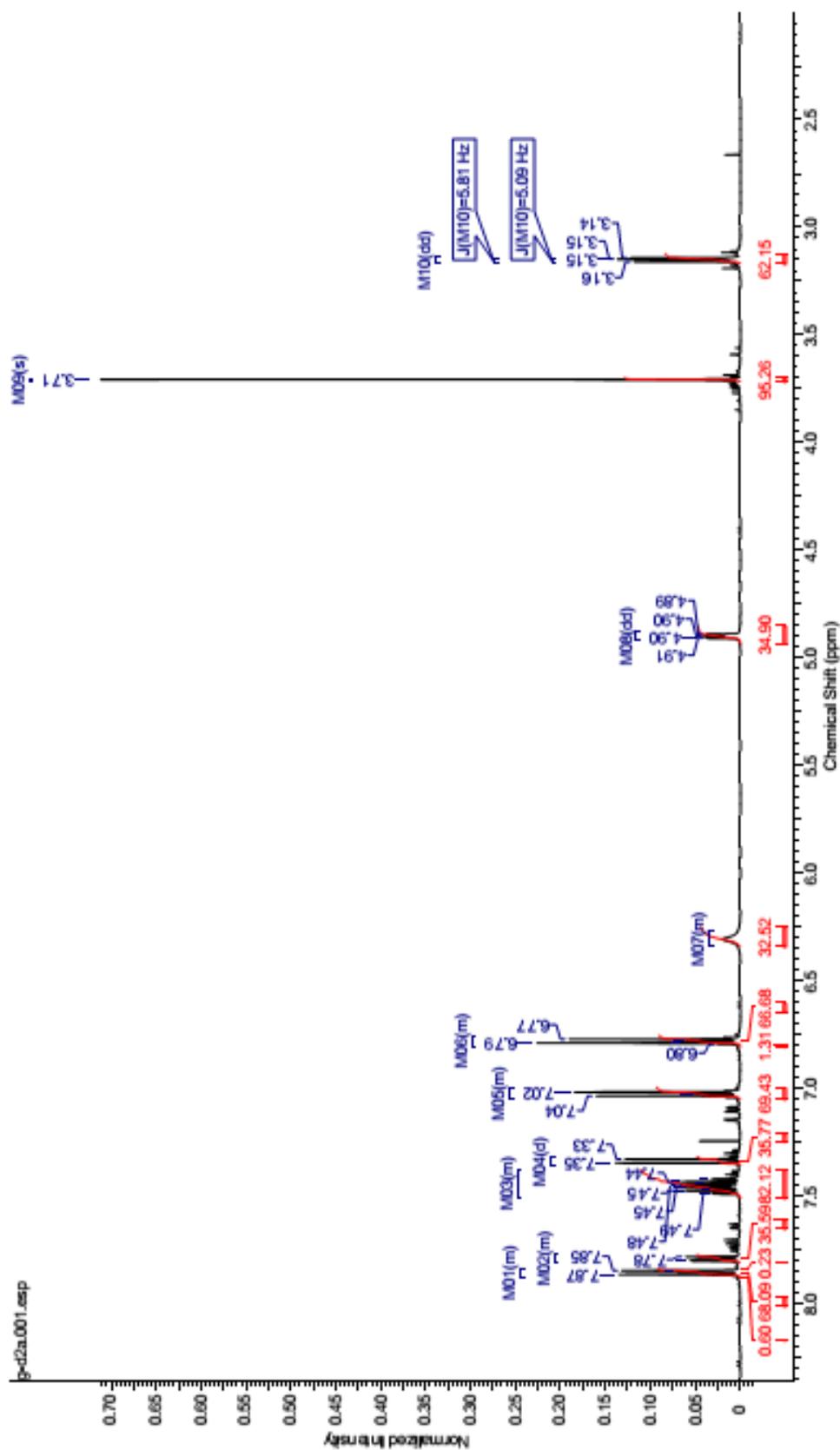
8.9 Espectro de RMN de ^1H para o composto 3b



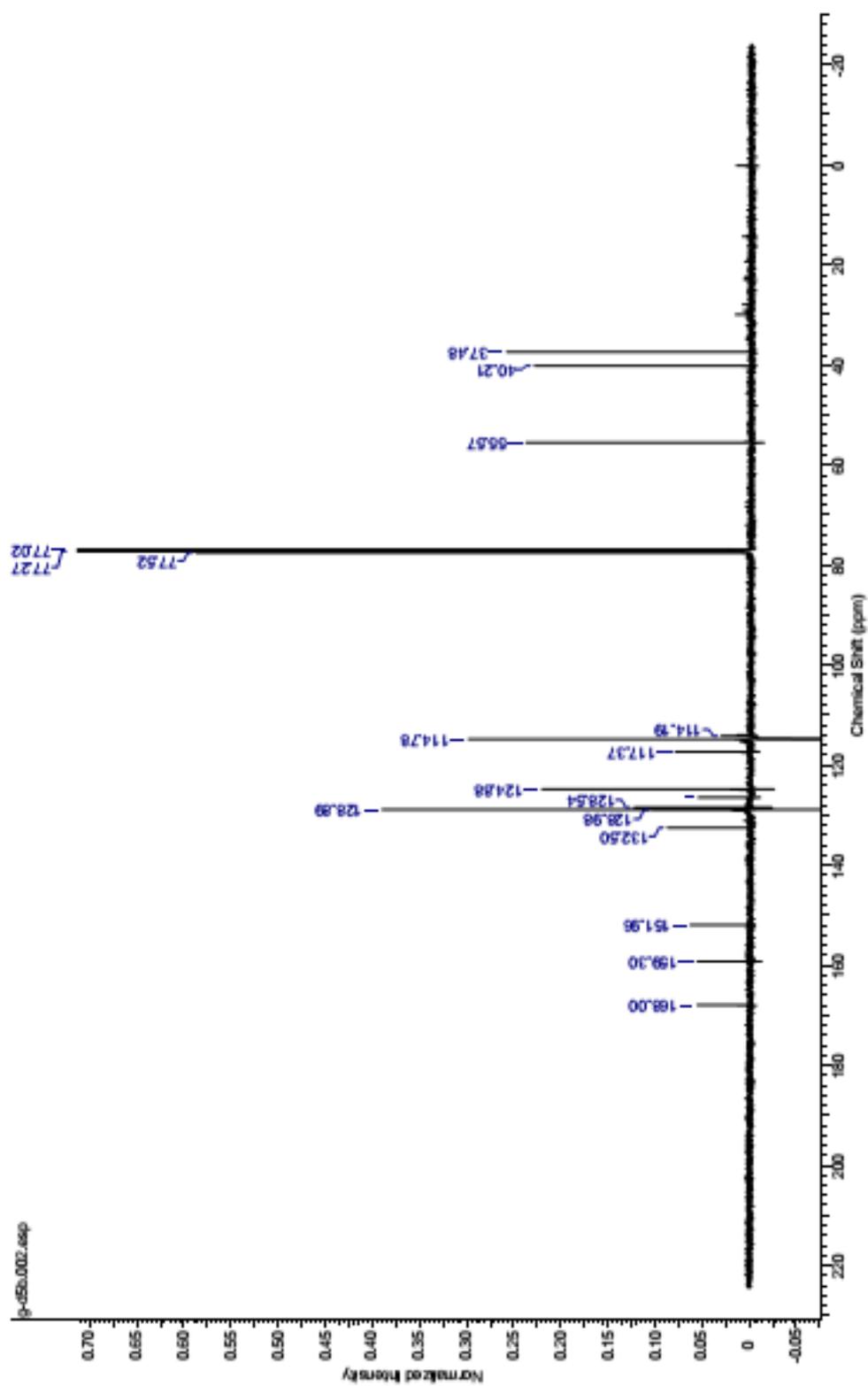
8.10 Espectro de RMN de ^{13}C para o composto 3b



8.11 Espectro de RMN de ^1H para o composto 2a



8.13 Espectro de RMN de ^{13}C para o composto 5b



8.14 – Imagem do Reator de Micro-ondas Discover modelo Explorer SP

