

GABRIELA MILANE FURLANI

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL INIBIDOR DE ACETILCOLINESTERASE DE
EXTRATOS DE *Coffea arabica* L. E DERIVADOS SEMISSINTÉTICOS DE CAFEÍNA**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agroquímica, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

Orientador: Marcelo Henrique dos Santos

Coorientador: Eduardo Vinícius V. Varejão

**VIÇOSA - MINAS GERAIS
2022**

**Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Central da Universidade
Federal de Viçosa - Campus Viçosa**

T

F985a Furlani, Gabriela Milane, 1995-
2022 Avaliação do potencial inibidor de acetilcolinesterase de
extratos de *Coffea arabica* L. e derivados semissintéticos da
cafeína / Gabriela Milane Furlani. – Viçosa, MG, 2022.
1 dissertação eletrônica (97 f.): il. (algumas color.).

Inclui apêndice.

Orientador: Marcelo Henrique dos Santos.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa,
Departamento de Química, 2022.

Inclui bibliografia.

DOI: <https://doi.org/10.47328/ufvbbt.2022.163>

Modo de acesso: World Wide Web.

1. Cafeína. 2. Inibidores da Colinesterase. 3. *Coffea
arabica* L. I. Santos, Marcelo Henrique dos, 1971-
II. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de Química.
Programa de Pós-Graduação em Agroquímica. III. Título.

CDD 22. ed. 547.7

Bibliotecário(a) responsável: Renata de Fátima Alves CRB6/2578

GABRIELA MILANE FURLANI

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL INIBIDOR DE ACETILCOLINESTERASE DE
EXTRATOS DE *Coffea arabica* L. E DERIVADOS SEMISSINTÉTICOS DE CAFEÍNA**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agroquímica, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

APROVADA: 17 de fevereiro de 2022.

Assentimento:

Gabriela Milane Furlani
Autora

Marcelo Henrique dos Santos
Orientador

AGRADECIMENTOS

A Deus, por abençoar toda minha trajetória e me conceder força e coragem pra enfrentar os desafios da vida. Obrigada Senhor, por nunca deixar que me sentisse só.

À Nossa Senhora, pela intercessão ao Pai e por me cobrir com seu manto de amor e bondade.

À Selma, minha mãe, que me ensinou a ser resiliente, a lutar pelos meus sonhos e a fazer o meu melhor. A senhora é meu maior exemplo!

Ao Gabriel, meu irmão, por fazer parte do meu crescimento pessoal e principalmente, por dar apoio a nossa mãe quando não pude estar presente.

Ao Danillo, por cuidar com tanto carinho de mim, por deixar meus dias mais coloridos e acima de tudo, obrigada por ser meu melhor amigo!

Ao Fábio, por cuidar tão bem da nossa família.

Às minhas amigas Gabi Marques e Luisa, por tornarem mais leve essa jornada.

À minha amiga Bianca, por todos ensinamentos, conselhos e disponibilidade. Sem você o caminho teria sido muito mais difícil.

Ao Júnio, por colaborar no estudo de *docking* molecular, fazer as análises de RMN e além disso, obrigado pelos ensinamentos e por sempre estar disponível.

Aos amigos do LASA, Gui Ferraz, Gabi Moura, Cris, Tássia e Sabriny. Em especial, ao Gui Ferraz, pelas infinitas horas de trabalho e por todo companheirismo.

À Luana e ao professor João Paulo V. Leite, do departamento de Bioquímica da UFV, por realizar os testes biológico com a acetilcolinesterase.

Ao professor Marcelo Henrique dos Santos, pela orientação e principalmente por toda dedicação para que esse trabalho se realizasse.

Ao professor Eduardo V. V. Varejão pela co-orientação e ensinamentos durante minha jornada desde a graduação.

Aos professores e técnicos do Departamento de Química pelo suporte na realização deste trabalho.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela concessão da bolsa de estudos e apoio financeiro.

Aos órgãos de fomento: Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA-Café) e Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG).

Ao Programa de Pós-graduação em Agroquímica, seus professores, e a todos que contribuíram para minha formação.

A todos que me ajudaram direta e indiretamente.

Agradeço!

RESUMO

FURLANI, Gabriela Milane, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, fevereiro de 2022. **Avaliação do potencial inibidor de acetilcolinesterase de extratos de *Coffea arabica* L. e derivados semissintéticos de cafeína.** Orientador: Marcelo Henrique dos Santos. Coorientador: Eduardo Vinícius Vieira Varejão.

Para a síntese de novos fármacos e agroquímicos, os metabólitos secundários caracterizam-se como importantes blocos construtores, em virtude de apresentarem uma gama de atividades biológicas. Tendo isto em vista, no presente trabalho foi realizado um estudo químico dos grãos *Coffea arabica* L. e a síntese de derivados da cafeína. No estudo químico do café foram obtidos dois extratos: o hexânico e o etanólico. O extrato hexânico é constituído basicamente de triacilgliceróis e diterpenos, nele foi possível identificar o cafestol e o kahweol que são conhecidos por apresentar atividade antiproliferativa. Já no extrato etanólico foi possível identificar principalmente a cafeína e o ácido clorogênico. Além disso, foram obtidos 8 derivados da cafeína com rendimentos de 51% a 95%, dentre estes, 4 compostos são inéditos tendo sua síntese descrita pela primeira vez. A síntese dos éteres de cafeína mostrou ser um protocolo eficiente e simples, haja vista os bons rendimentos obtidos para a maioria das reações. Os extratos, os derivados da cafeína, bem com a cafeína, o cafestol e o acetato de cafestol foram avaliados quanto à atividade antiacetilcolinesterase. Dos extratos e frações testados, a fração F2 e o extrato etanólico apresentaram inibição significativa de 49,29% e 38,17%, respectivamente, numa concentração próxima de 400 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Os derivados da cafeína sintetizados nesse trabalho foram testados pela primeira vez como possíveis inibidoras de AChE. O composto **CAF-Br** se destacou dos demais e denotou efeito significativo com uma inibição de 55% a 50 $\mu\text{mol L}^{-1}$. Assim, foi realizado um estudo de *docking* molecular do composto **CAF-Br** que apresentou resultados em conformidade com os dados experimentais. Este trabalho abre perspectivas para o desenvolvimento e otimização de estruturas promissoras como novos inibidores da acetilcolinesterase entre outros alvos de interesse.

Palavras-chave: *Coffea arabica* L.. Cafeína. Antiacetilcolinesterase. *Docking* molecular.

ABSTRACT

FURLANI, Gabriela Milane, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, February 2022. **Evaluation of the acetylcholinesterase inhibitory potential of extracts of *Coffea arabica* L. and semi-synthetic derivatives of caffeine.** Advisor: Marcelo Henrique dos Santos. Co-advisor: Eduardo Vinícius Vieira Varejão.

For the synthesis of new drugs and agrochemicals, secondary metabolites are characterized as important building blocks, as they present a range of biological activities. With this in mind, in the present work, a chemical study of *Coffea arabica* L. grains and the synthesis of caffeine derivatives was carried out. In the chemical study of coffee, two extracts were obtained: hexane and ethanol. The hexane extract is basically composed of triacylglycerols and diterpenes, in it it was possible to identify cafestol and kahweol that are known to have antiproliferative activity. In the ethanol extract, it was possible to identify mainly caffeine and chlorogenic acid. In addition, 8 caffeine derivatives were obtained with yields from 51% to 95%, among these 3 compounds are new and their synthesis described for the first time. The synthesis of caffeine ethers proved to be an efficient and simple protocol, given the good yields obtained for most reactions. The extracts, caffeine derivatives, as well as caffeine, cafestol and cafestol acetate were evaluated for anti-acetylcholinesterase activity. Of the extracts and fractions tested, the F2 fraction and the ethanolic extract showed significant inhibition of 49,29% and 38,17%, respectively, at a concentration close to 400 $\mu\text{g mL}^{-1}$. The caffeine derivatives synthesized in this work were tested for the first time as possible AChE inhibitors. The CAF-Br compound stood out from the others and showed a significant effect with an inhibition of 55% at 50 $\mu\text{mol L}^{-1}$. Thus, a molecular *docking* study of the CAF-Br compound was carried out, which presented results in accordance with the experimental data. This work opens perspectives for the development and optimization of promising structures as new acetylcholinesterase inhibitors among other targets of interest.

Keywords: *Coffea arabica* L.. Caffeine. Antiacetylcholinesterase. Molecular docking.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Componentes dos grãos de <i>Coffea arabica L</i>	17
Figura 2 – Estruturas químicas de alguns compostos ativos presentes no café	18
Figura 3 – Espectro no infravermelho (ATR) do extrato hexânico	22
Figura 4 – Cromatograma obtido para a porção insaponificável. Os diterpenos kahweol (a) e cafestol (b) foram identificados	23
Figura 5 – Espectro de massas do kahweol (a) (70 eV) obtido por análise da porção insaponificável.....	23
Figura 6 – Espectro de massas do cafestol (b) (70 eV) obtido por análise da porção insaponificável.....	23
Figura 7 – Cromatograma obtido para a fração F2 . Os diterpenos kahweol (a) e cafestol (b) foram identificados	24
Figura 8 – Espectro de massas do kahweol (a) (70 eV), obtido da análise de F2	24
Figura 9 – Espectro de massas do cafestol (b) (70 eV), obtido da análise de F2	24
Figura 10 – Espectro no infravermelho (ATR) do extrato etanólico	26
Figura 11 – Cromatografia em Camada Delgada (CCD) utilizando como fase estacionária sílica-gel e fase móvel AcOEt. Revelação em câmara de luz ultravioleta (254 nm). 1 . Extrato hexânico, 2 . Insaponificável, 3 . F2, 4 . Extrato etanólico, 5 . Cafeína, 6 . Cafestol, 7 . Ácido cafeico, 8 . Ácido clorogênico, 9 . β -sitosterol, 10 . Trigonelina	26
Figura 12 – Estrutura química da cafeína	31
Figura 13 – Paracetamol, Salidroside, Ethamolin, Zidovudina, Aspirina	33
Figura 14 – Espectro no Infravermelho (ATR) do composto CAF-Paracetamol.....	43
Figura 15 – Espectro de Massas (IE, 70 eV) do CAF-Paracetamol	44
Figura 16 – Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) do composto CAF-Paracetamol	46
Figura 17 – Espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) do composto CAF-Paracetamol . 47	
Figura 18 – Resultado de homologia entre a enzima AChE das espécies <i>Homo sapiens</i> (4EY6) e <i>Torpedo californica</i> (1C2O). Em destaque estão os resíduos pertencentes ao sítio ativo. Símbolos: * equivalente; . não equivalente, porém similar	56
Figura 19 – <i>Re-docking</i> da galantamina na AChE humana (4EY6). Galantamina cristalizada na enzima em cores por elemento e em amarelo, galantamina obtida do estudo de <i>docking</i> molecular	57

Figura 20 – A. Resultado de <i>Docking</i> molecular do composto CAF-Br na AChE humana (representação da pose de menor energia no interior da AChE); B. representação da estrutura 2D da AChE com a pose de menor energia do inibidor CAF-Br ; C. sobreposição entre a pose de menor energia de CAF-Br e a galantamina cristalizada na AChE.....	60
Figura 21 – Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) do Cafestol	66
Figura 22 – Espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) do Cafestol	67
Figura 23 – Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) do Acetato de Cafestol	68
Figura 24 – Espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) do Acetato de Cafestol	69
Figura 25 – Espectro no Infravermelho (ATR) da Cafeína	70
Figura 26 – Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) da Cafeína	71
Figura 27 – Espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) da Cafeína	72
Figura 28 – Espectro no Infravermelho (ATR) do composto CAF-Br	73
Figura 29 – Espectro de Massas (IE, 70 eV) do composto CAF-Br	74
Figura 30 – Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) do composto CAF-Br	75
Figura 31 – Espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) do composto CAF-Br	76
Figura 32 – Espectro no Infravermelho (ATR) do composto CAF-N₃	77
Figura 33 – Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) do composto CAF-N₃	78
Figura 34 – Espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) do composto CAF-N₃	79
Figura 35 – Espectro no Infravermelho (ATR) do composto CAF-Etanolamina	80
Figura 36 – Espectro de Massas (IE, 70 eV) do composto CAF-Etanolamina	81
Figura 37 – Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, MeOD) do composto CAF-Etanolamina .	82
Figura 38 – Espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz, MeOD) do composto CAF-Etanolamina	83
Figura 39 – Espectro no Infravermelho (ATR) do composto CAF-Fenol	84
Figura 40 – Espectro de Massas (IE, 70 eV) do composto CAF-Fenol	85
Figura 41 – Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) do composto CAF-Fenol	86
Figura 42 – Espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) do composto CAF-Fenol	87
Figura 43 – Espectro no Infravermelho (ATR) do composto CAF-<i>p</i>-Cresol	88

Figura 44 – Espectro de Massas (IE, 70 eV) do composto CAF-<i>p</i>-Cresol	89
Figura 45 – Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) do composto CAF-<i>p</i>-Cresol	90
Figura 46 – Espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) do composto CAF-<i>p</i>-Cresol	91
Figura 47 – Espectro no Infravermelho (ATR) do composto CAF-Tirosol	92
Figura 48 – Espectro de Massas (IE, 70 eV) do composto CAF-Tirosol	93
Figura 49 – Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) do composto CAF-Tirosol	94
Figura 50 – Espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) do composto CAF-Tirosol	95
Figura 51 – Espectro no Infravermelho (ATR) do composto CAF-Cumarina	96
Figura 52 – Espectro de Massas (IE, 70 eV) do composto CAF-Cumarina	97

LISTA DE ESQUEMAS

Esquema 1 – Primeira rota sintética reportada para a cafeína	31
Esquema 2 – Esquema geral para obtenção dos derivados.....	34
Esquema 3 – Mecanismo de reação proposto da bromação da cafeína	42
Esquema 4 – Proposta de mecanismo de reação adição/eliminação 1,6.	42
Esquema 5 – Fragmentos propostos para o composto CAF-Paracetamol	44

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1** – Inibição da fração F2 e do extrato etanólico do *Coffea arabica L.* contra acetilcolinesterase (*Electrophorus electricus*, tipo VI) 54
- Tabela 2** – Inibição da fração F2 e do extrato etanólico do *Coffea arabica L.* contra acetilcolinesterase (*Electrophorus electricus*, tipo VI) 54
- Tabela 3** – Porcentagem de inibição e valores de energia (kcal mol^{-1}) para os complexos enzima substrato de **CAF-Br** e galantamina, o controle positivo do teste *in vitro*. 58
- Tabela 4** – Valores de energia (kcal mol^{-1}) para as interações entre os resíduos de aminoácidos da enzima AChE humana e a molécula **CAF-Br**..... 59

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

DTNB	5,5'-Dithiobis-(2-nitrobenzoic acid)
ACh	Acetilcolina
AChE	Acetilcolinesterase
CDCl ₃	Clorofórmio deuterado
<i>J</i>	Constante de acoplamento escalar
©	<i>Copyright</i>
CCD	Cromatografia em camada delgada
DCM	Diclorometano
DMAC	Dimetilacetamida
DMSO	Dimetil sulfóxido
DA	Doença de Alzheimer
d	Dupleto
dd	Duplo dupleto
δ	Deslocamento químico
Rf	Fator de retenção
Hz	Hertz
IV	Infravermelho
IUPAC	<i>International Union of Pure and Applied Chemistry</i>
®	Marca registrada
MHz	Megahertz
MeOH	Metanol
m	Multiplete
PDB	<i>Protein Data Bank</i>
PDBQT	<i>Protein Data Bank, Partial Charge & Atom Type</i>
q	Quarteto
RMN de ¹³ C	Ressonância Magnética Nuclear de carbono-13
RMN de ¹ H	Ressonância Magnética Nuclear de hidrogênio-1
s	Simpleto
t	Triplete
UV	Ultravioleta
v/v	Volume/volume

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1	15
ESTUDO QUÍMICO DE <i>Coffea arabica</i> L.....	15
1. INTRODUÇÃO	15
1.1. Importância das plantas como fonte de compostos bioativos	15
1.2. Composição química e potencial biológico do café.....	16
2. OBJETIVO.....	18
2.1. Objetivo Geral	18
2.2. Objetivos específicos	18
3. MATERIAIS E MÉTODOS	19
3.1. Informações gerais.....	19
3.2. Obtenção do material vegetal	19
3.3. Preparação do extrato hexânico: Fração lipídica.....	20
3.3.1. Saponificação	20
3.3.2. Fracionamento da porção insaponificável	20
3.4. Preparação do extrato etanólico.....	20
3.5. Hidrólise do acetato de cafestol (padrão)	21
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	21
4.1. Extrato hexânico: Fração lipídica	21
4.2. Extrato etanólico.....	25
4.3. Cafestol.....	27
5. CONCLUSÃO	27
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	28
CAPÍTULO 2	31
SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DOS DERIVADOS DA CAFEÍNA	31
1. INTRODUÇÃO	31
2. MATERIAIS E MÉTODOS	34
2.1. Síntese do derivado 8-bromo-1,3,7-trimetil-3,7-diidro-1 <i>H</i> -purina-2,6-diona (CAF-Br). 34	
2.2. Síntese do derivado 8-azido-1,3,7-trimetil-3,7-diidro-1 <i>H</i> -purina-2,6-diona (CAF-N₃)... 35	
2.3. Síntese do derivado 8-((2-hidroxietil)amina)-1,3,7-trimetil-3,7-diidro-1 <i>H</i> -purina-2,6-diona (CAF-Etanolamina).	36
2.4. Síntese dos derivados a partir de compostos fenólicos	37
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	41

4. CONCLUSÃO	48
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	48
CAPÍTULO 3	50
AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTI-ACETILCOLINESTERASE.....	50
1. INTRODUÇÃO	50
2. MATERIAIS E MÉTODOS	51
2.1. Ensaio de inibição enzimática.....	51
2.2. Docking molecular	52
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	53
3.1. Ensaio de inibição enzimática	53
3.2. Docking molecular	54
3.3. Avaliação de homologia entre a AChE humana e a utilizada nos testes in vitro	55
3.4. Validação da metodologia de docking molecular	57
3.5. <i>Docking</i> molecular do composto CAF-Br	57
4. CONCLUSÃO	60
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	61
CONCLUSÃO GERAL	64
APENDICE A – Espectros	65

CAPÍTULO 1

ESTUDO QUÍMICO DE *Coffea arabica* L.

1. INTRODUÇÃO

1.1. Importância das plantas como fonte de compostos bioativos

Desde os primórdios da humanidade, as plantas são utilizadas para fins medicinais. Aproximadamente 80% da população mundial depende dos componentes derivados de plantas, importantes para o cuidado com a saúde e bem-estar. Estes componentes são ricos em fitoquímicos que possuem a notável capacidade de curar, tratar e prevenir doenças. Tais propriedades medicinais são devido a existência do grupo heterogêneo de produtos metabólicos naturais, conhecidos como metabólitos secundários (CHANDRAN *et al.*, 2020). Os metabólitos secundários são responsáveis pela interação química entre planta e meio ambiente, a fim de garantir a perpetuação da espécie no meio em que está inserida, atuando no mecanismo de defesa planta-planta, planta-animal e planta-meio ambiente (THAKUR *et al.*, 2019). Com base na natureza química e nas vias biossintéticas, esses metabólitos são classificados em três grupos principais: (1) terpenos (carotenoides, esteróis e glicosídeos), (2) fenólicos (ácidos fenólicos, lignina, cumarinas, estilbenos, lignanas, flavonoides e taninos) e (3) compostos contendo nitrogênio (glucosinolatos e alcalóides) (YADAV *et al.*, 2021).

No contexto da síntese de novos fármacos e agroquímicos os metabólitos secundários caracterizam-se como importantes blocos construtores, em virtude de apresentarem uma gama de atividades biológicas, tais como: anticancerígena, antiofídica, anestésica, sedativa, anti-inflamatória, antibacteriana, antifúngica, inseticida, moluscicida, antimicrobiana, antiespasmódica, antiparasitária, antialérgica, antioxidante e hipoglicemiante (BROWN; LISTER; MAY-DRACKA, 2014; EL-HOSSARY *et al.*, 2017; PUPO; GALLO; VIEIRA, 2007; VALDIR CECHINEL FILHO; ROSENDO A. YUNES, 1998).

Diante de tantos aspectos positivos e inúmeros benefícios que os produtos naturais podem proporcionar para a saúde humana, foi selecionada para este trabalho a espécie *Coffea arabica* L., detentora de um arsenal químico valioso e com propriedades biológicas contra vários alvos de interesse.

1.2. Composição química e potencial biológico do café

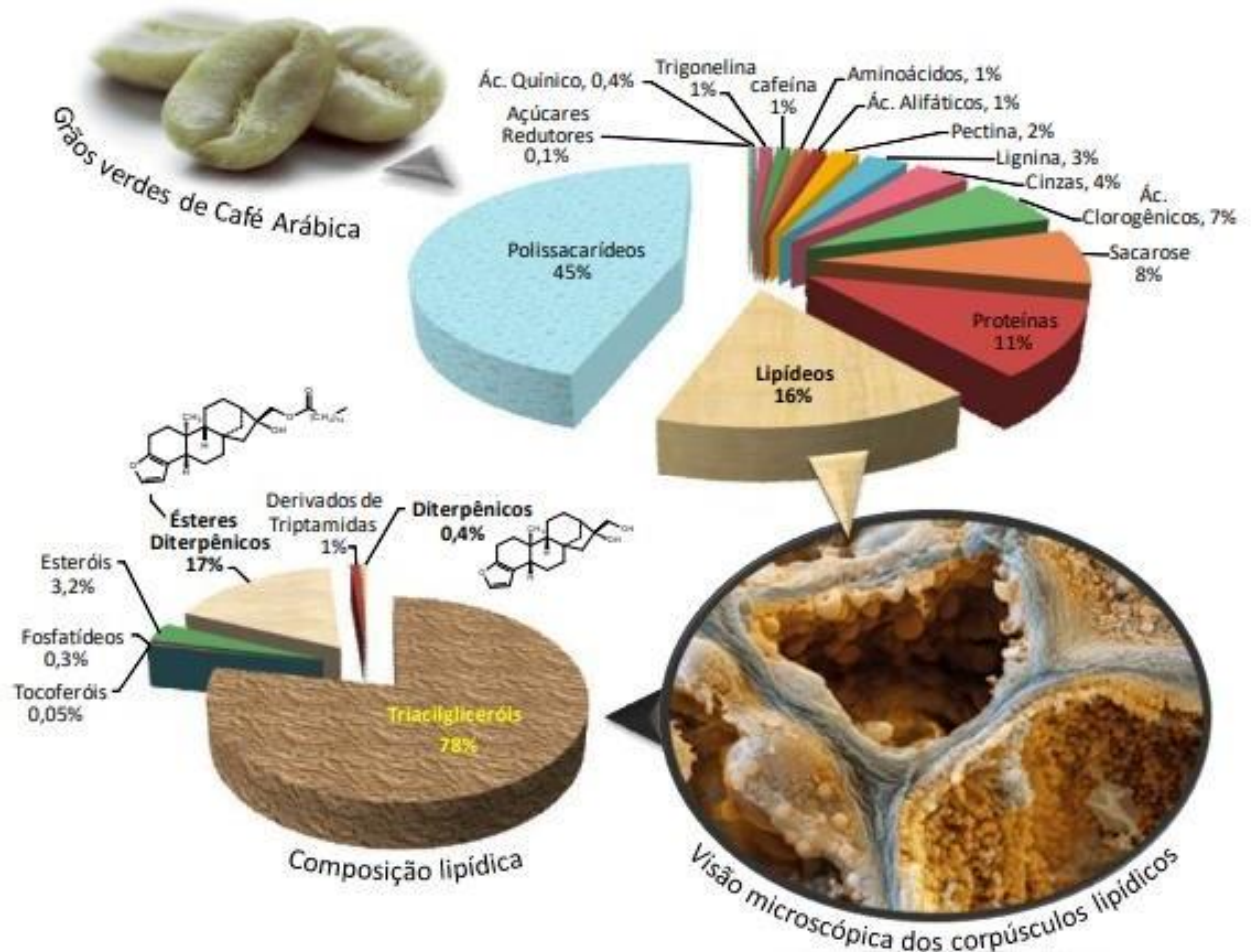
O café é uma bebida amplamente consumida e apreciada em todo mundo, não só pelo seu sabor, cor e aroma muito característicos, mas também pelo seu efeito estimulante. O Brasil é o maior produtor e exportador do mundo, seguido por Vietnã, Colômbia e Indonésia (SANTOS *et al.*, 2021).

O mercado internacional é dominado pelo *Coffea arabica L.* (arábica) e *Coffea canephora* espécies Pierre (robusta), sendo o café Arábica o mais apreciado e produzido. *Coffea arabica L.* é uma espécie de café natural da Arábia ou da Etiópia que pertence à família botânica das Rubiáceas. No Brasil, as variedades mais comuns são a Typica, Bourbon, Catuaí, Acaíá e Mundo Novo. Algumas delas já produziram outras subvariedades como a Caturra, além de híbridos como a Catuaí (Mundo Novo com Caturra) além das subvariedades, como a Bourbon Amarelo e Vermelho, Catuaí Amarelo e Vermelho (SANTOS *et al.*, 2021).

Quimicamente, é possível diferenciar tais espécies através do teor em diversos componentes: cafeína, diterpenos, ácidos graxos, esteróis, β -carbólinas, minerais, compostos fenólicos, trigonelina, aminoácidos, aminas biogênicas, entre muitos outros (ALVES; CASAL; OLIVEIRA, 2009). O café verde contém uma composição não volátil de aproximadamente 800 substâncias, principalmente de lipídios e polissacarídeos estruturais (FARAH, 2012). Constituintes químicos com aspectos funcionais e efeitos associados à saúde humana têm sido alvos de pesquisas, entre os quais se destacam a cafeína (GASPAR & RAMOS, 2016), os ácidos clorogênicos (MUBARAK *et al.*, 2012) e a fração lipídica (CÁRDENAS *et al.*, 2014 e 2015; GUZZO *et al.*, 2015; MOEENFARD *et al.*, 2016) (**Figura 1**), pela presença representativa dos ésteres diterpênicos, que tornam o óleo do café singular quanto ao seu aproveitamento, principalmente como protetor solar e pela ação cicatrizante.

O grão de café verde (grão maduro e seco, sem a torra) apresenta uma composição química muito complexa (ALVES; CASAL; OLIVEIRA, 2009). Estima-se que tal grão possua cerca de 2.000 substâncias que são responsáveis por atividades biológicas como antioxidantes, anti-inflamatórias, antimicrobianos, antiviral, antienvelhecimento, anticancerígeno, anticelulite, proteção solar (SANTOS *et al.*, 2021), antidiabética (FEBRINA; HAPPYANA; MAOLANA, 2021) e neuroprotetora (CARNEIRO *et al.*, 2021).

Figura 1 – Componentes dos grãos de *Coffea arabica* L.

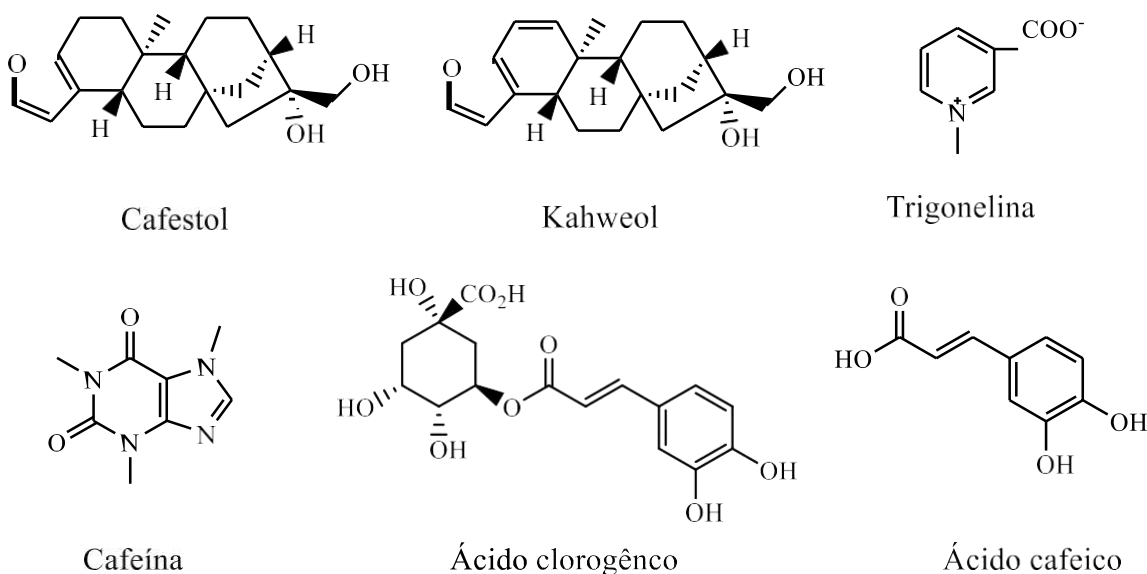


Fonte: NOVAIS, F. J. M., 2017.

Dentre os compostos ativos responsáveis por diversas atividades biológicas os ácidos clorogênicos, ácido cafeico, trigonelina, cafeína e os diterpenos cafestol, kahweol (ou caveol) ganham destaque (**Figura 2**).

Neste trabalho, foi realizado um estudo químico do extrato dos grãos de *Coffea arabica* L., afim de explorar seus componentes majoritários, promover reações de semissínteses a partir da cafeína e avaliar suas atividades biológicas.

Figura 2 – Estruturas químicas de alguns compostos ativos presentes no café.



Fonte: Autoria Própria

2. OBJETIVO

2.1. Objetivo geral

O presente trabalho objetivou o estudo químico dos grãos verdes de *Coffea arabica L.*, síntese de ésteres derivados da cafeína e a avaliação do potencial biológico.

2.2. Objetivos específicos

- Realizar o estudo químico do extrato do *Coffea arabica L.*
- Sintetizar derivados de cafeína;
- Caracterizar os compostos sintetizados utilizando técnicas espectrométricas e espectroscópicas;
- Avaliar as frações dos extratos do café e dos compostos sintetizados quanto à capacidade de inibir a enzima acetilcolinesterase em experimentos *in vitro*;
- Avaliar por estudos de *docking* molecular a interação entre os derivados e a enzima acetilcolinesterase.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Informações gerais

Todos os solventes e reagentes utilizados são de grau analítico. Colunas cromatográficas foram realizadas utilizando-se sílica-gel (230-400 mesh). As reações foram monitorizadas por cromatografia em camada delgada (CCD), utilizando placas de sílica pré-revestidas com suporte de alumínio (Macherey-Nagel DC-Fertigfolien ALUGRAM® Xtra SIL G/UV254). As placas de CCD foram observadas sob luz UV ($\lambda = 254$ nm)

O espectro de infravermelho (IV) foi registrado num espectrofotômetro VARIAN 660-IR (Varian, Palo Alto, CA, EUA) equipado com GladiATR *scanning* de 4000 para 500 cm^{-1} do Departamento de Química da Universidade Federal de Viçosa.

O cromatógrafo gasoso acoplado ao espectrômetro de massas foi usado para obter o cromatograma por ionização por impacto eletrônico (EI, 70 eV) no equipamento SHIMADZU CGMS-QP5050A (Shimadzu Europe, Duisburg, Alemanha) do Departamento de Química da Universidade Federal de Viçosa.

Os espectros de ressonância magnética nuclear, RMN de ^1H (400 MHz) e de ^{13}C (100 MHz), foram obtido em espectrômetro BRUKER 400 MHz (Billerica, Massachusetts, EUA) do Departamento de Química da Universidade Federal de Minas Gerais.

A faixa de fusão foi registrada no equipamento MQAPF-302 Microchemistry da Universidade Federal de Viçosa.

A numeração da estrutura foi utilizada para assinalar os hidrogênios e carbonos nos espectros de RMN e não segue o sistema da IUPAC. O *software* ChemBioDraw Ultra 14.0[®] (Chemical Structure Drawing Standard, PerkinElmer) foi utilizado para a obtenção do nome do composto orgânico.

3.2. Obtenção do material vegetal

Os grãos verdes de *Coffea arabica* L. (café arábica; variedade catuaí-amarelo; safra 2019/2020) foram obtidos da indústria de beneficiamento Incofex (Viçosa, MG, Brazil), possuindo como características: peneira (55%); quebra (8%); umidade (11,5%).

3.3. Preparação do extrato hexânico: Fração lipídica

O preparo do extrato hexânico foi realizado pesando-se 1,116 kg de grãos de café verde (sem torra), triturados com a granulometria de 1,70 mm e colocados em um erlenmeyer com 1 L de hexano a fim de se extrair a fração lipídica (óleo) composta por ésteres diversos, incluindo diterpenos de interesse. Inicialmente, o solvente e os grãos de café permaneceram em contato por 7 dias, logo após, o solvente foi rotaevaporado à 50 °C sob pressão reduzida, obtendo-se o óleo. O hexano foi recuperado e adicionado novamente ao erlenmeyer e o processo de extração foi repetido. Após 10 extrações foram obtidos 118,4012 g de extrato.

3.3.1. Saponificação

Em um balão de 25 mL, foram adicionados 5 mL (4,3877g) de extrato hexânico e 5 mL de solução aquosa de KOH 2,5 molar. O balão foi selado e colocado em uma chapa de aquecimento padrão à temperatura de 70 °C e mantido sob agitação por 2 h. Decorrido este tempo deixou-se a mistura reacional esfriar até a temperatura ambiente e, posteriormente, realizou-se extração com hexano (3 x 10 mL). O solvente foi rotaevaporado a 50 °C sob pressão reduzida, obtendo-se 2,1325 g de insaponificável (NOVAES *et al.*, 2020).

3.3.2. Fracionamento da porção insaponificável

Uma massa de 2,0045 g da fração insaponificável foi purificada por cromatografia em coluna de sílica gel 60, usando com o fase móvel misturas, em gradiente, de hexano e acetato de etila (AcOEt) nas seguintes proporções: 25:1, 20:1 e 15:1 (v/v). Após reunião de frações por CCD, de acordo com suas similaridades, foram obtidos 244,3 mg de fração F2.

3.4. Preparação do extrato etanólico

Para a obtenção do extrato etanólico 100 g de grãos de café verde (sem torra), previamente extraídos com hexano, foram transferidos a um erlenmeyer e adicionou-se 100 mL de etanol a fim de se extrair os componentes polares, tais como: cafeína, ácidos clorogênicos e trigonelina. Inicialmente, o solvente e os grãos de café foram mantidos em contato por 48 horas. Logo após, o solvente foi rotaevaporado à 50 °C, obtendo assim, o extrato etanólico. O etanol

foi recuperado e adicionado ao erlenmeyer novamente para repetir o processo de extração. Após três extrações foram obtidos 3,1948 g de extrato.

3.5. Hidrólise do acetato de cafestol (padrão)

Em um balão reacional de 25 mL foram adicionados 50 mg de **acetato de cafestol** (Sigma Aldrich®) e 2 mL de solução aquosa de KOH 2,5 molar. O balão foi selado e colocado em uma chapa de aquecimento padrão a temperatura de 70 °C e mantido sob agitação por 12 h. Após este tempo deixou-se a mistura reacional esfriar até a temperatura ambiente e posteriormente realizou-se extração com CH₂Cl₂ (4 x 3 mL), em seguida o solvente foi rotaevaporado a 50 °C, obtendo-se o **cafestol** com o rendimento de 98%.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O café é constituído por diterpenos, cafeína, ácidos graxos, esteróis, β -carbolinas, minerais, compostos fenólicos, trigonelina, aminoácidos, aminas biogênicas, entre muitos outros (ALVES; CASAL; OLIVEIRA, 2009). Através das análises por CG-MS dos extratos hexânico e etanólico foi possível realizar um estudo químico qualitativo, identificando o perfil dos principais constituintes químicos do café arábica quando comparado a padrões frequentemente contidos nos grãos de café. Além disso, as análises espectroscópicas e espectrométricas possibilitou correlacionar os dados obtidos na cromatografia com os padrões estruturais que geraram os espectros de massa e no infravermelho.

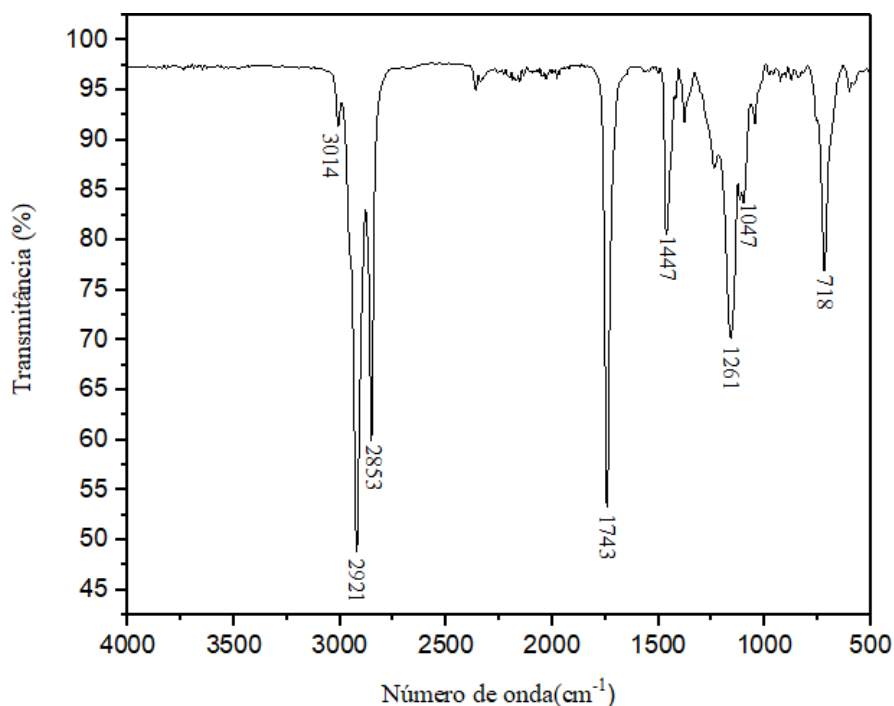
4.1. Extrato hexânico: Fração lipídica

A fração lipídica dos grãos verdes de café Arábica são constituídos por tocoferóis (0,05%), fosfatídeos (0,3%), esteróis (3,2%), derivados de triptamidas (1%), diterpenos (0,4%), ésteres diterpênicos (17%) e triacilgliceróis (78%) (KOLLING-SPEER *et al.*, 1999; SPEER & KÖLLING-SPEER, 2006; FARAH, 2012)

No espectro no infravermelho (ATR) do **Extrato hexânico (Figura 3)** foram observadas as bandas de estiramento C_{sp2}-H em 3014 cm⁻¹ e C_{sp3}-H em 2921-2853 cm⁻¹. A banda em 1743 cm⁻¹ é referente ao estiramento C=O para ésteres, tal banda é uma informação relevante, já que grande parte da composição da fração lipídica é formada por triacilgliceróis. Além disso, tal banda também pode ser associada ao estiramento C=O dos diterpenos cafestol

e kahweol que estão presentes na forma esterificada com diferentes ácidos graxos (cerca de 17%), como linoléico (44%) e palmítico (30%) (LIMA *et al.*, 2020).

Figura 3 – Espectro no infravermelho (ATR) do extrato hexânico.

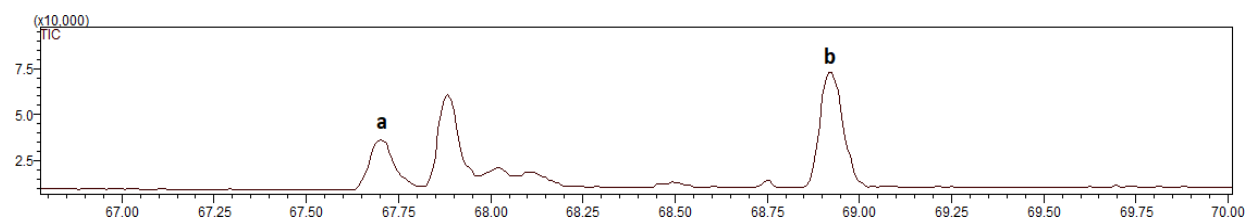


Fonte: autoria própria.

Afim de hidrolisar os ésteres diterpenos cafestol e kahweol foi realizada uma saponificação, seguida da extração da **fração insaponificável** para realizar a análise por cromatografia gasosa acoplada ao espectrômetro de massas (CG-EM).

O cromatograma (**Figura 4**) obtido na análise por CG-EM da **fração insaponificável** apresentou os picos dos compostos kahweol e cafestol, confirmando presença de tais compostos nesta fração obtida por reação de saponificação. Nos tempos de retenção iguais a 67,73 e 66,17 minutos observam-se os picos referentes ao kahweol (**a**) e ao cafestol (**b**), respectivamente.

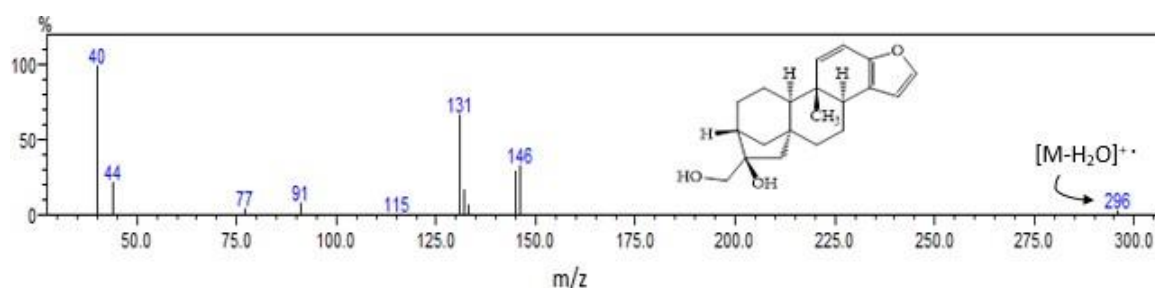
Figura 4 – Cromatograma obtido para a porção insaponificável. Os diterpenos kahweol (**a**) e cafestol (**b**) foram identificados.



Fonte: autoria própria.

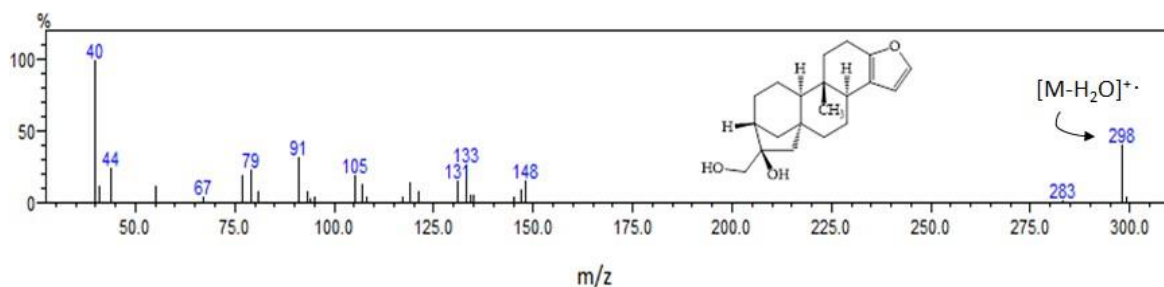
Pôde-se confirmar a presença desses diterpenos por meio dos espectros de massas. O fragmento em $296\ m/z$ (**Figura 5**) é referente a estrutura do kahweol com a perda de H_2O . O fragmento em $298\ m/z$ (**Figura 6**) corresponde ao cafestol que também teve perda de H_2O (NOVAES *et al.*, 2015)

Figura 5 – Espectro de massas do kahweol (**a**) (70 eV) obtido por análise da porção insaponificável.



Fonte: autoria própria.

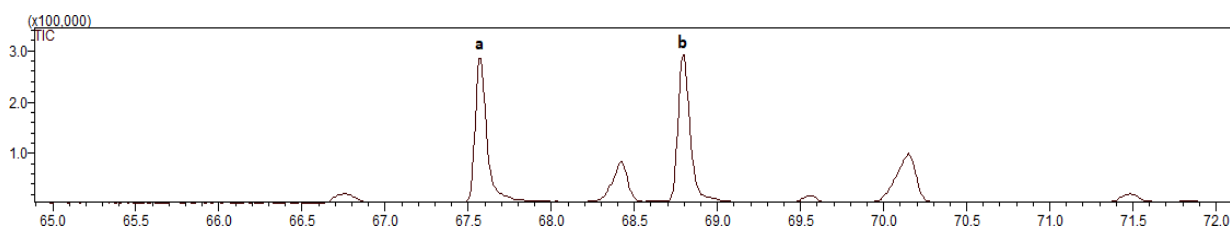
Figura 6 – Espectro de massas do cafestol (**b**) (70 eV) obtido por análise da porção insaponificável.



Fonte: autoria própria.

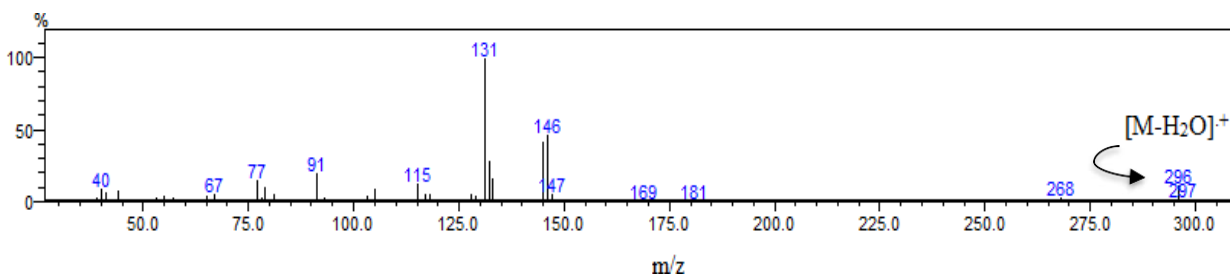
Em seguida, foi realizado o fracionamento da **porção insaponificável**, afim de se isolar os diterpenos cafestol e kahweol. Sendo assim, obtiveram-se duas frações a **F1** e **F2**. No cromatograma da fração **F2** verificou-se a presença dos diterpenos, entretanto a fração não ficou pura e tais impurezas ficaram evidentes tanto no cromatograma (**Figuras 7**), quanto no RMN.

Figura 7 – Cromatograma obtido para a fração **F2**. Os diterpenos kahweol (**a**) e cafestol (**b**) foram identificados.



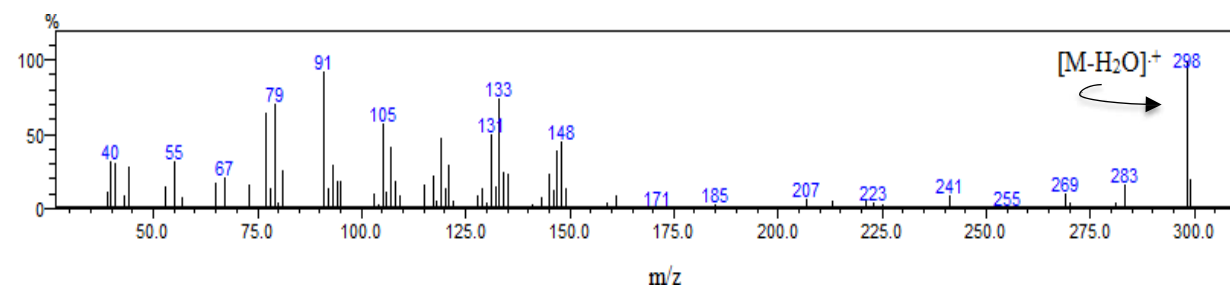
Fonte: autoria própria.

Figura 8 – Espectro de massas do kahweol (**a**) (70 eV), obtido da análise de **F2**



Fonte: autoria própria.

Figura 9 – Espectro de massas do cafestol (**b**) (70 eV), obtido da análise de **F2**.



Fonte: autoria própria.

A fração **saponificável** basicamente é constituída por sais sódicos derivados de ácidos graxos. Dentre eles estão o ácido palmítico (32,8-33,5%), o ácido esteárico (7,6-7,8%), ácido oleico (8,5-8,7%), o ácido linoleico (44,6-46%), o ácido linolênico (1,3-1,4%), o ácido

araquídico (2,9-3,2%) e o ácido behênico (0,7-1,0%) (SPEER; KÖLLING-SPEER, 2006; TSUKUI; OIGMAN; REZENDE, 2014).

4.2. Extrato etanólico

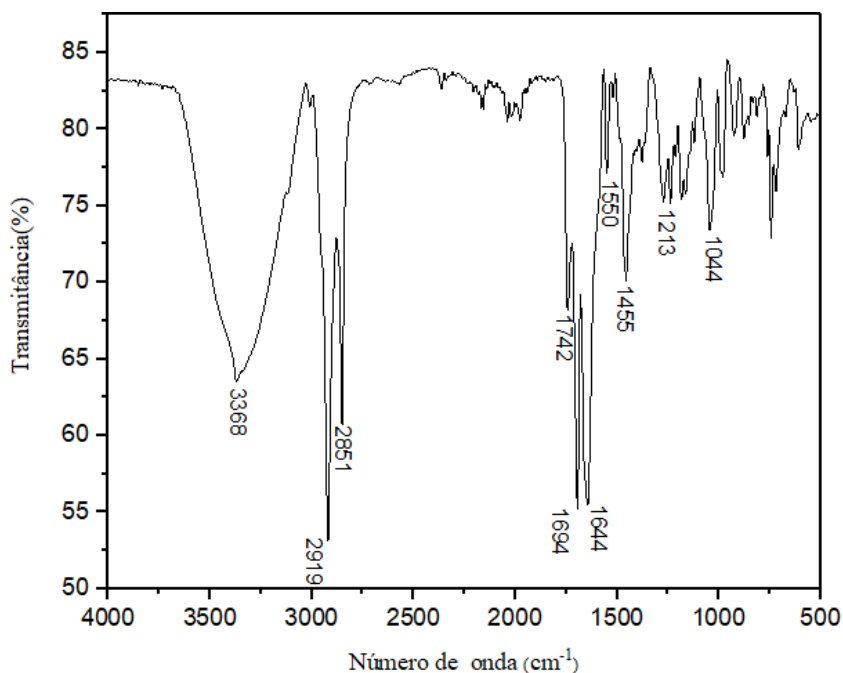
O solvente etanol foi utilizado afim de se extrair dos grãos verdes de café a cafeína, compostos fenólicos como os ácidos clorogênicos (ACG) e trigonelina. O ácido clorogênico é o éster do ácido cafeico e do ácido quínico. O termo "ácidos clorogênicos" refere-se a uma família de ésteres de polifenóis que são formados a partir de ácidos *trans*-cinâmicos (ácido ferúlico, ácido cafeico e ácido *p*-cumárico) com ácido quínico (MOREIRA *et al.*, 2014).

No espectro no infravermelho (ATR) do **extrato etanólico (Figura 10)** observa-se em 3368 cm^{-1} uma banda de estiramento O–H larga e intensa que envolvem a formação extensiva de ligações de hidrogênio, características de álcoois e fenóis. Tal banda é uma informação relevante uma vez que o ácidos clorogênicos apresentam estas funções em suas estruturas. Bandas de estiramento $\text{C}_{\text{sp}^3}\text{-H}$ aparecem em $2851\text{-}2919\text{ cm}^{-1}$.

A absorção forte em 1742 cm^{-1} é referente ao estiramento C=O para ésteres, indicando mais uma vez a presença de ácido clorogênico, a banda em 1694 cm^{-1} correspondente a C=O de ácidos carboxílicos, alusivo ao ácido cafeico e a banda em 1644 cm^{-1} está associado ao estiramento C=O de amida, informação relevante para indicar a presença de cafeína.

Na região de C=C de aromáticos observa-se uma banda fraca em 1550 cm^{-1} , que pode ser referente a aromaticidade da cafeína, ácidos clorogênicos e trigonelina. A absorção em 1044 cm^{-1} é referente a vibração de estiramento da ligação C-O de álcoois, éteres, ésteres e ácidos carboxílicos.

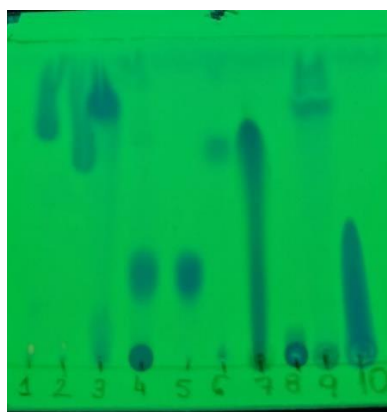
Figura 10 – Espectro no infravermelho (ATR) do extrato etanólico.



Fonte: autoria própria.

Além dos extratos e frações, para realizar o estudo químico do café arábica foi feita uma CCD utilizando como fase estacionária sílica-gel e fase móvel AcOEt, na qual aplicou-se frações obtidas do *Coffea arabica* L. e padrões de substâncias de interesse oriundas do café (**Figura 11**).

Figura 11 – Cromatografia em Camada Delgada (CCD) utilizando como fase estacionária sílica-gel e fase móvel AcOEt. Revelação em câmara de luz ultravioleta (254 nm). **1**. Extrato hexânico, **2**. Insaponificável, **3**. F2, **4**. Extrato etanólico, **5**. Cafeína, **6**. Cafestol, **7**. Ácido cafeico, **8**. Ácido clorogênico, **9**. β -sitosterol, **10**. Trigonelina.



Fonte: autoria própria.

Em suma, pôde-se evidenciar a presença de cafestol e β -sitosterol na **fração insaponificável e F2**. Já no **extrato etanólico** foi evidenciado a presença de cafeína e ácido clorogênico.

Entretanto, novos estudos cromatográficos por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) e CG-EM serão realizados para quantificação dos principais constituintes dos grãos do café.

4.3. Cafestol

A partir do acetato de cafestol (padrão) obtido da Sigma Aldrich® foi possível ter êxito em formar, com bom rendimento, o cafestol através de uma hidrólise. A estrutura do composto foi confirmada através do RMN de ^1H e ^{13}C (apêndice). Tais compostos também foram utilizados nos testes biológicos descritos no capítulo 3. O intuito foi explorar suas atividades biológicas para futuramente isolar e realizar modificações estruturais, com o objetivo de potencializar a atividade biológica nos alvos.

5. CONCLUSÃO

Foram obtidos dos grãos verdes do *Coffea arabica L.* os **extratos hexânico e etanólico**. O **extrato hexânico** (fração lipídica) é constituído principalmente por triacilgliceróis e ésteres diterpênicos e através da análise em infravermelho foi possível verificar as funções químicas mais importantes que formam esses compostos. O extrato hexânico foi submetido a saponificação, obtendo-se a fração insaponificável, que foi fracionada por meio de coluna cromatográfica, que resultou as subfrações F1 e F2. Na porção F2 foi confirmada a presença de cafestol e caveol, entretanto não foi possível isolá-los até o momento.

No espectro de infravermelho do **extrato etanólico** verificou-se as principais funções químicas presentes na cafeína, ácidos clorogênicos e trigonelina, tais informações indicam a presença desses compostos no extrato.

Após a análise dos extratos dos grãos de café verde, foi possível verificar que a metodologia utilizada foi eficiente e possibilitou obtenção de duas frações com características bem diferenciadas sendo evidenciados os componentes majoritários, que poderão servir como base para a sínteses novas moléculas bioativas.

Neste sentido, através da análise da CCD confirmou-se a eficiência do etanol em extrair a cafeína, sequencialmente ao uso do hexano. Nota-se uma boa resolução cromatográfica da

caféina em relação aos demais constituintes do **extrato etanólico**, o que nos permite purificá-la de forma eficiente e utilizar para obter novos derivados semissintéticos (Capítulo 2).

Este estudo gera perspectiva para o isolamento eficiente dos componentes dos grãos de café em escala preparativa.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALVES, R. C.; CASAL, S.; OLIVEIRA, B. Benefícios do café na saúde: Mito ou realidade? **Química Nova**, v. 32, n. 8, p. 2169–2180, 2009.

BROWN, D. G.; LISTER, T.; MAY-DRACKA, T. L. New natural products as new leads for antibacterial drug discovery. **Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters**, v. 24, n. 2, p. 413–418, 2014.

CÁRDENAS, C., QUESADA, A. R. e MEDINA, M. Á. Insights on the antitumor effects of kahweol on human breast cancer: Decreased survival and increased production of reactive oxygen species and cytotoxicity. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 447, p. 452-458, 2014.

CÁRDENAS, C., QUESADA, A. R. e MEDINA, M. Á. Chapter 70 – Kahweol, a Coffee Diterpene with Anti-inflammatory Properties. In: Preedy, V. (Ed.) **Coffee in Health and Disease Prevention**, 1st Edition (2015), p. 627-633.

CARNEIRO, S. M.; OLIVEIRA, M. B. P. P.; ALVES, R. C. Neuroprotective properties of coffee: An update. **Trends in Food Science and Technology**, v. 113, p. 167–179, 2021.

CHANDRAN, H. *et al.* Plant tissue culture as a perpetual source for production of industrially important bioactive compounds. **Biotechnology Reports**, v. 26, p. 00450, 2020.

DHEER, D.; SINGH, V.; SHANKAR, R. Medicinal attributes of 1,2,3-triazoles: Current developments. **Bioorganic Chemistry**, v. 71, p. 30–54, 2017.

EL-HOSSARY, E. M. *et al.* Antifungal potential of marine natural products. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 126, p. 631, 2017.

FARAH, A. Coffee Constituents. In: Y.-F. Chu (Ed.), **Coffee: Emerging Health Effects and Disease Prevention**, John Wiley & Sons Inc., Iowa, p. 21-58, 2012.

FEBRINA, L.; HAPPYANA, N.; MAOLANA SYAH, Y. Metabolite profiles and antidiabetic activity of the green beans of Luwak (civet) coffees. **Food Chemistry**, v. 355, p. 129496, 2021.

GASPAR, S.; RAMOS, F. Caffeine: Consumption and Health Effects. Reference Module in Food: **Science Encyclopedia of Food and Health**, p. 573–578, 2016.

GARG, S. K. Chapter 47 - Green Coffee Bean. In: *Nutraceuticals- Efficacy, Safety and Toxicity*. **Academic Press**. London,UK, p. 653-667, 2016.

GUZZO, L. S. *et al.* Involvement of endogenous opioid peptides in the peripheral antinociceptive effect induced by the coffee specific diterpene kahweol. **Pharmacological Reports**, v. 67, p. 1010–1015, 2015.

HAIDER, S.; ALAM, M. S.; HAMID, H. 1,2,3-Triazoles: Scaffold With Medicinal Significance. **Inflammation and Cell Signaling**, p. 1–12, 2014.

ISLAM, M.T. *et al.* Therapeutic Potential of Essential Oils Focusing on Diterpenes. **Phytotherapy Research**, p. 1420-1444, 2016.

KÖLLING-SPEER, I.; STROHSCHNEIDER, S.; SPEER, K. Determination of Free Diterpenes in Green and Roasted Coffees. **Journal of High Resolution Chromatography**, v. 22, p. 43–46, 1999.

LIMA, F. A. *et al.* Fast and Highly Selective Continuous-Flow Catalytic Hydrogenation of a Cafestol-Kahweol Mixture Obtained from Green Coffee Beans. **ACS Omega**, v. 5, n. 40, p. 25712–25722, 2020.

MOEENFARD, M. *et al.* Anti-angiogenic properties of cafestol and kahweol palmitate diterpene esters. **Journal of Cellular Biochemistry**, v. 117, p. 2748-2756, 2016.

MOREIRA, I. *et al.* Efeito do solvente na extração de ácidos clorogênicos, cafeína e trigonelina em coffea arabica. **Química Nova**, v. 37, n. 1, p. 39–43, 2014.

MUBARAK, K., BONDONNO, C. P., LIU, A. H., CONSIDINE, M. J., RICH, L., MAS, E., CROFT, K. D., HODGSON, J. M. Acute Effects of Chlorogenic Acid on Nitric Oxide Status, Endothelial Function, and Blood Pressure in Healthy Volunteers: A Randomized Trial. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 60, p. 9130–9136, 2012.

NOVAES, F. J. M. *et al.* Isolating valuable coffee diterpenes by using an inexpensive procedure. **Industrial Crops and Products**, v. 152, n. April, p. 112494, 2020.

NOVAES, F. J. M. *et al.* New approaches on the analyses of thermolabile coffee diterpenes by gas chromatography and its relationship with cup quality. **Talanta**, v. 139, p. 159–166, 2015.

OH, S. H. *et al.* Kahweol inhibits proliferation and induces apoptosis by suppressing fatty acid synthase in HER2-overexpressing cancer cells. **Food and Chemical Toxicology**, v. 121, 2018.

PUPO, M. T.; GALLO, M. B. C.; VIEIRA, P. C. *Biologia química: uma estratégia moderna para a pesquisa em produtos naturais*. **Química Nova**, v. 30, n. 6, p. 1446–1455, 2007.

REN, Y. *et al.* Cafestol and kahweol: A review on their bioactivities and pharmacological properties. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 20, n. 17, 2019.

SANTOS, É. M. DOS *et al.* Coffee by-products in topical formulations: A review. **Trends in**

Food Science and Technology, v. 111, p. 280–291, 2021.

SPEER, K.; KÖLLING-SPEER, I. The lipid fraction of the coffee bean. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, v. 18, p. 201-216, 2006.

THAKUR, M. *et al.* Improving production of plant secondary metabolites through biotic and abiotic elicitation. **Journal of Applied Research on Medicinal and Aromatic Plants**, p. 1–12, 2019.

TSUKUI, A.; OIGMAN, S. S.; REZENDE, C. M. Oil green coffee beans: Diterpenes cafestol and kahweol. **Revista Virtual de Química**, v. 6, n. 1, p. 16–33, 2014.

FILHO, V. C.; YUNES, R. A.. Estratégias Para a Obtenção De Compostos Farmacologicamente Ativos a Partir De Plantas Mediciniais. Conceitos Sobre Modificação Estrutural Para Otimização Da Atividade. **Química Nova**, v. 21, n. 1, p. 99–105, 1998.

KOTOWSKI, U. *et al.* Wirkung des Kaffeebestandteils Cafestol auf Kopf-Hals-Tumorzelllinien. **Strahlentherapie und Onkologie**, v. 191, n. 6, p. 511–517, 2015.

WEI, F.; TANOKURA, M. Chapter 17 - Organic Compounds in Green Coffee Beans. In: *Coffee in Health and Disease Prevention*. **Academic Press**, London, UK, p. 149-162, 2015.

YADAV, B. *et al.* Secondary metabolites in the drought stress tolerance of crop plants: A review. **Gene Reports**, v. 23, p. 101040, 2021.

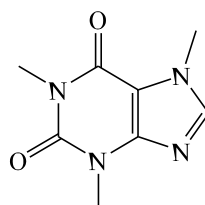
CAPÍTULO 2

SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DOS DERIVADOS DA CAFEÍNA

1. INTRODUÇÃO

A cafeína (1,3,7-trimetil-3,7-diidro-1*H*-purina-2,6-diona) (**Figura 12**) é um alcalóide da classe das metilxantinas encontrado em grandes quantidades em grãos de café, chá e erva-mate. Além disso, está presente em outros produtos naturais como a cola, nozes, sementes de guaraná e grãos de cacau (LONDZIN *et al.*, 2021).

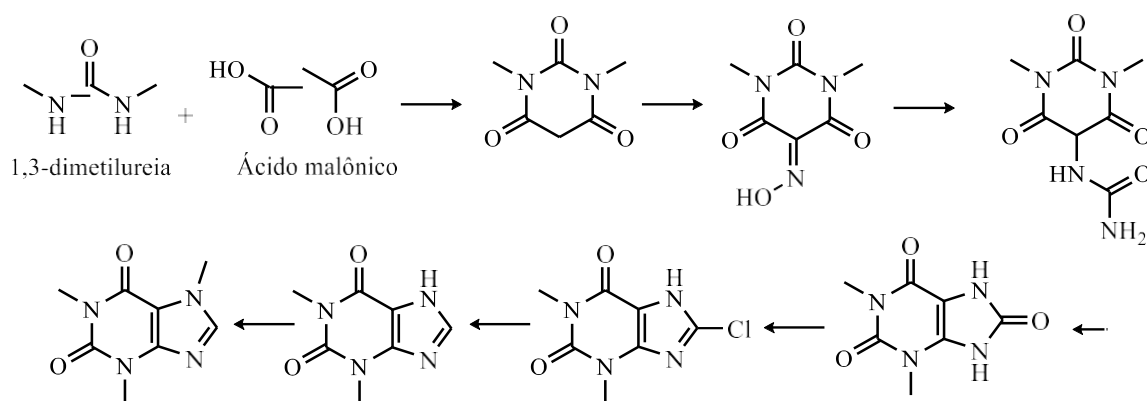
Figura 12 – Estrutura química da cafeína.



Fonte: autoria própria.

Este alcaloide não apenas pode ser obtido por meio de produtos naturais, mas também de forma sintética. O químico alemão Hermann Emil Fischer foi o primeiro a sintetizar a cafeína em 1895 (**Esquema 1**) e a elucidar sua estrutura molecular, que fazia parte do seu trabalho contemplado com o Prêmio Nobel em 1902 (FAUDONE; ARIFI; MERK, 2021).

Esquema 1 – Primeira rota sintética reportada para a cafeína.



Fonte: FISCHER, 1895.

A cafeína é um estimulante do sistema nervoso central, sendo a substância psicoativa mais consumida no mundo (XIE *et al.*, 2021). Ela está contida nas formulações de muitos fármacos, como analgésicos, anti-histamínicos, pílulas dietéticas, remédios para resfriado e estimulantes da atividade psicofísica. Além disso, encontra-se também em diversos alimentos como café, chás, chocolates, refrigerantes e energéticos (ANASTOPOULOS *et al.*, 2020).

Sob a influência da cafeína, o estado de alerta e concentração aumentam e a atividade locomotora é estimulada. O que não pode ser ignorado é que alguns indivíduos podem apresentar ansiedade, tremores e intoxicação, caracterizada por inquietação, insônia, distúrbios gastrointestinais e outros sintomas em altas doses ou em níveis normais de consumo, dependendo de cada organismo (XIE *et al.*, 2021).

Além da melhora do desempenho cognitivo, vários estudos têm demonstrado que a cafeína apresenta outras notáveis particularidades, dentre elas estão a atividade anti-acetilcolinestase (tratamento para Alzheimer) (POHANKA; DOBES, 2013), neuroprotetora, antioxidante, anticâncer e anti-inflamatória. Ademais, seu efeito pode diminuir o risco de doença hepática, diabetes, doença cardiovascular, doença de Parkinson, bem como redução da pressão arterial e melhora do desempenho do sistema imunológico (VAN DAM *et al.*, 2020; GHAMRAN; FARAHANI; TAVANAI, 2021).

Mesmo apresentando tantos benefícios, há estudos que comprovam características não benéficas deste alcaloide, que incluem aumento do risco de doença arterial coronariana, gastrite, absorção reduzida de vitaminas, deficiência de ferro, baixo peso em recém-nascidos, parto prematuro e fraturas em mulheres. Geralmente, uma ingestão moderada de cafeína de até 400 mg por dia, é geralmente considerada saudável para adultos e não está associada a efeitos adversos (GHAMRAN; FARAHANI; TAVANAI, 2021).

Diante a tantos benefícios proporcionados a saúde humana diversos análogos foram/são sintetizados na expectativa de se obter compostos com atividades superiores, maior toxicidade seletiva e menos efeitos colaterais. Kaplânek *et al.* (2015) sintetizaram um conjunto de novos agentes anticancerígenos baseados em cafeína-hidrazonas contendo fração 2-hidroxiaril-ou 2-N-heteroaril. A avaliação da atividade anticancerígena demonstrou que vários derivados apresentaram atividade significativa e grande índice de seletividade para células de leucemia linfoblástica T.

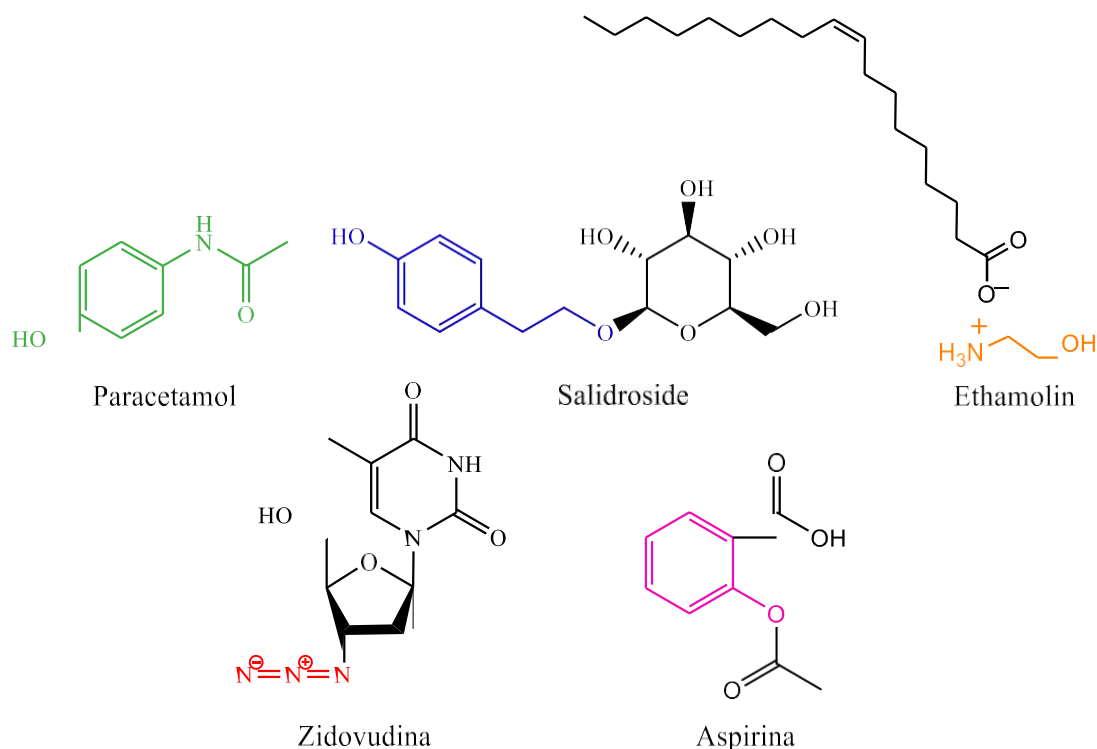
Jasiewicz *et al.* (2018) sintetizaram uma série de novos análogos de di- e poliamina-cafeína, na qual todos os compostos apresentaram capacidade antioxidante. Outro estudo interessante é de Rivara *et al.* (2013), que sintetizaram análogos de (E)-8-(3-clorostiril)cafeína levando a derivados de 9-deazaxantina como antagonistas duplos de A2A/Inibidores de MAO-

B. Os resultados foram promissores, sendo consideradas uma nova descoberta no campo de agentes anti-Parkinson.

Diante do exposto, nota-se que é promissora a realização de pesquisas que envolvam a o desenvolvimento de novos derivados da cafeína, uma vez que já é comprovada a eficiência deste composto e vários análogos sobre diversas patologias, possibilitando o desenvolvimento de novos fármacos.

Sendo assim, foi realizado neste trabalho modificações estruturais da cafeína através da hibridação molecular, que consiste em ligar covalentemente estruturas inteiras ou apenas os grupos farmacofóricos, que são as porções da molécula responsáveis pela bioatividade. A nova estrutura química formada recebe o nome de híbrido (ARAÚJO *et al.*, 2015). O paracetamol, tirosol, fenóis, azida e etanolamina foram os grupos farmacofóricos utilizados para sintetizar os derivados. Na **Figura 13** são apresentados exemplos de fármacos comercializados que contém essas porções.

Figura 13 – Paracetamol, Salidroside, Ethamolin, Zidovudina, Aspirina.

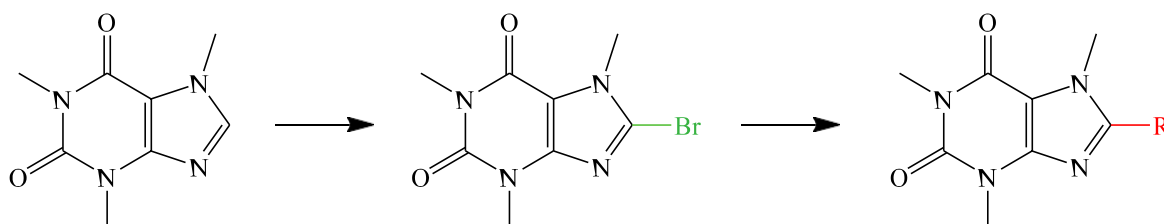


Fonte: autoria própria.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

Com o objetivo de funcionalizar a cafeína, foi obtido o derivado bromado na posição C-8, que serviu de precursor para os demais derivados sintetizados no presente trabalho (**Esquema 2**).

Esquema 2 – Esquema geral para obtenção dos derivados.

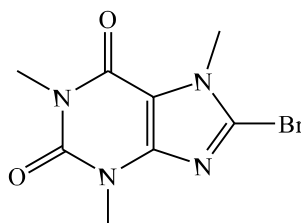


R= Grupo variável para os diferentes derivados.

Fonte: autoria própria.

2.1. Síntese do derivado 8-bromo-1,3,7-trimetil-3,7-diidro-1H-purina-2,6-diona (CAF-Br).

O composto **CAF-Br** foi sintetizado de acordo com a metodologia descrita por Arsenyan *et al.*, (2020). A um balão de fundo redondo foram adicionados cafeína (10 mmol; 1 eq), NBS (20 mmol ; 2 eq) e CH_2Cl_2 (30 mL). O sistema reacional foi deixado sob agitação até que os sólidos se dissolvessem no solvente. Em seguida H_2O destilada (10mL) foi adicionada e a reação foi agitada durante 5 dias. Posteriormente, adicionou-se uma solução aquosa de NaOH (2,5 M, 10 mL) e houve agitação até a descoloração. A fase orgânica foi separada, lavada com água (3 x 40 mL), seca com Na_2SO_4 anidro e evaporada sob pressão reduzida.



Aparência: sólido branco

R_f: 0,69 (Acetato de etila)

Massa molar (g/mol): 271,99 (ChemDraw Ultra 12.0[®])

Temperatura de fusão: 208,9-209,6

Rendimento: 53%

IV (ART) $\tilde{\nu}_{\max}/\text{cm}^{-1}$: 1701, 1652, 1448, 1340, 741.

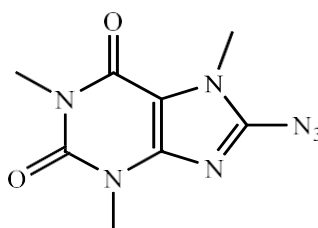
EM, m/z (%): 272 (M^+ 93%), 273 (90%), 108 (61%), 67(100%), 55 (58%).

RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ : 3,94 (s, 3H, H14); 3,53 (s, 3H, H12); 3,37 (s, 3H, H10).

RMN de ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) δ : 154,55 (C3); 148,13 (C1); 128,26 (C5); 109,48 (C8); 77,16 (C4); 34,08(C14); 29,95 (C10); 28,13 (C12).

2.2. Síntese do derivado 8-azido-1,3,7-trimetil-3,7-diidro-1H-purina-2,6-diona (CAF-N₃).

O composto CAF-N₃ foi sintetizado de acordo com a metodologia adaptada descrita por Mueller *et al.*, (2012). A um balão de fundo redondo foi adicionado o composto CAF-Br (1,83 mmol; 1eq), DMSO (5 mL) e a NaN₃ (2,75 mmol; 1,5eq). A reação foi agitada durante 6 h a 65 °C. Após o sistema reacional atingir temperatura ambiente, foi adicionado água (5 mL) e realizou-se extração líquido-líquido com acetato de etila (4 x 10ml). A fase orgânica foi seca com Na₂SO₄ anidro e concentrada a pressão reduzida.



Aparência: sólido amarelo claro

R_f: 0,70 (Acetato de etila)

Massa molar (g/mol): 235,21 (ChemDraw Ultra 12.0[®])

Temperatura de fusão: 244,3-246,2 °C

Rendimento: 88%

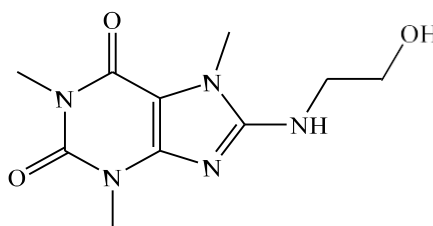
IV (ART) $\tilde{\nu}_{\max}/\text{cm}^{-1}$: 2162, 1698, 1665, 1284, 1214, 741.

RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ : 3,69 (s, 3H, H14); 3,50 (s, 3H, H12); 3,35 (s, 3H, H10).

RMN de ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) δ : 154,83 (C3); 151,55 (C1); 147,33 (C5); 145,85 (C8); 106,27 (C4); 31,19 (C14); 29,91 (C12); 27,95 (C10).

2.3. Síntese do derivado 8-((2-hidroxi)etil)amina)-1,3,7-trimetil-3,7-diidro-1H-purina-2,6-diona (CAF-Etanolamina).

O composto **CAF-Etanolamina** foi sintetizado de acordo com a metodologia adaptada descrita por Georgieva *et al.* (2014). A um tubo reacional foi adicionado o composto **CAF-Br** (0,366 mmol) e etanolamina em excesso (230 μ L). A reação foi agitada durante 2 h a 130 °C. O composto foi purificado por coluna cromatográfica de sílica gel eluída com hexano-acetato de etila (1:2 v/v) e concentrado sob pressão reduzida.



Aparência: sólido branco

R_f: 0,38 (Acetato de etila/ Etanol 2:1 v/v)

Massa molar (g/mol): 253,26 (ChemDraw Ultra 12.0[®])

Temperatura de fusão: 208,6-210,4°C

Rendimento: 95%

IV (ART) $\tilde{\nu}_{\max}/\text{cm}^{-1}$: 3349, 3239, 2961, 1690, 1624, 1351, 1220, 745.

EM, m/z (%): 253 (M^+ 100%), 222 (81%), 209 (37%), 165 (33%), 82 (60%), 67 (47%).

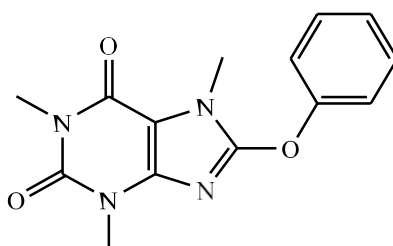
RMN de ^1H (400 MHz, CD_3OD) δ : 3,75 (t, $J = 5,8$ Hz, 2H, H17); 3,69 (s, 3H, H11); 3,58 (t, $J = 5,8$ Hz, 2H, H16); 3,49 (s, 3H, H15); 3,32 (s, 3H, H14)

RMN de ^{13}C (100 MHz, CD_3OD) δ : 155,33 (C8); 154,25 (C3); 152,25 (C1); 103,13 (C4); 60,83 (C17); 39,52 (C16); 29,77 (C11); 27,73 (C15); 22,64 (C14).

2.4. Síntese dos derivados a partir de compostos fenólicos:

Os compostos foram sintetizados de acordo com a metodologia adaptada descrita por Kadi *et al.*, (2019). A um tubo reacional foi adicionado o **CAF-Br** (0,366mmol; 1 eq), o respectivo composto aromático ligado diretamente a uma hidroxila (0,366 mmol;1 eq) (**CAF-Fenol**, **CAF-*p*-Cresol**, **CAF-Tirosol**, **CAF-Paracetamol** ou **CAF-Cumarina**), K₂CO₂ seco (0,366 mmol;1 eq) e 1 mL de DMF anidro. O sistema reacional foi mantido a 120°C durante 3 h em atmosfera inerte. Após a reação atingir temperatura ambiente, foi adicionado água (5 mL) e realizou-se extração líquido-líquido com acetato de etila (4 x 10ml). A fase orgânica foi seca com Na₂SO₄ anidro e concentrada a pressão reduzida. Em algumas reações, após essas etapas, foi necessário realizar purificação por coluna cromatográfica de sílica gel.

CAF-Fenol: 1,3,7-trimetil-8-fenoxi-diidro-1H-purina-2,6-diona



Aparência: sólido branco

R_f: 0,32 (Hexano/Acetato de etila 2:1 v/v)

Massa molar (g/mol): 286,29 (ChemDraw Ultra 12.0[©])

Temperatura de fusão: 140-143 °C (KADI, *et al.*, 2019)

Rendimento: 95%

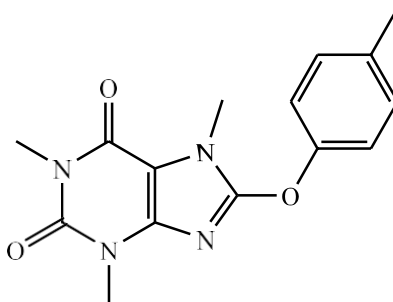
IV (ART) $\tilde{\nu}_{\max}/\text{cm}^{-1}$: 1700, 1646, 1592, 1515, 1443, 1282, 12020, 742.

EM, m/z (%): 286 (M⁺ 100%), 195 (17%), 91 (76%), 83 (51%), 67 (29%).

RMN de ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ : 8,02 (s, 1H); 7,49 (m, 2H, H18, H20); 7,29 (dd, $J = 14,9, 7.8$ Hz, 2H, H17, H21); 7,25 – 7,16 (m, 1H, H19); 3,42 (s, 3H, H14); 2,97 (s, 3H, H12); 2,90 (s, 3H, H10).

RMN de ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) δ : 162,74 (C8); 155,02 (C3); 153,43 (C1); 151,73 (C5); 129,86 (C18, C28); 125,78 (C19); 119,50 (C17, C21); 115,45 (C4); 36,64 (C14); 29,99 (C12); 27,93 (C10).

CAF *p*-Cresol: 1,3,7-trimetil-8-(*p*-toliloxi)-3,7-diidro-1*H*-purina-2,6-diona



Aparência: sólido bege claro

R_f: 0,26 (Hexano/Acetato de etila 2:1 v/v)

Massa molar (g/mol): 300,32 (ChemDraw Ultra 12.0[®])

Temperatura de fusão: 101,6-103,4 °C

Rendimento: 76%

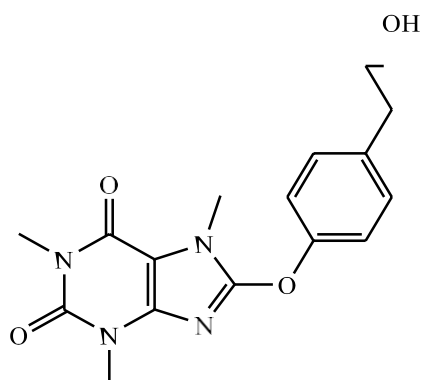
IV (ART) $\tilde{\nu}_{\text{max}}/\text{cm}^{-1}$: 2951, 2924, 1709, 1653, 1498, 1447, 1200, 741.

EM, m/z (%): 300 (M^+ 97%), 214 (15%), 105 (100%), 83 (32%)

RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ : 7,18 (d, $J = 8,6$ Hz, 2H, H17, H21); 7,16 (d, $J = 8,6$ Hz, 2H, H18, H20); 3,85 (s, 3H, H14); 3,43 (s, 3H, H12); 3,39 (s, 3H, H10); 2,36 (s, 3H, H24).

RMN de ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) δ : 155,01 (C8); 153,89 (C3); 151,75 (C1); 151,28 (C5); 146,00 (C16); 135,50 (C19); 130,29 (C18, C20); 119,38 (C17, C18); 103,82 (C4); 30,47 (C14); 29,99 (C12); 27,90 (C10); 20,95 (C22).

CAF-Tirosol: 8-(4-(2-hidroxietil) fenoxi) -1,3,7-trimetil-3,7-diidro-1H-purina-2,6-diona



Aparência: sólido branco

R_f: 0,26 (Hexano/Acetato de etila 1:3 v/v)

Massa molar (g/mol): 330,34 (ChemDraw Ultra 12.0[®])

Temperatura de fusão: 127,8-130,4 °C

Rendimento: 90%

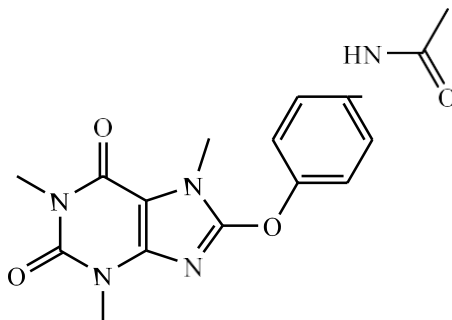
IV (ART) $\tilde{\nu}_{\max}/\text{cm}^{-1}$: 3383, 2945, 2876, 1698, 1645, 1498, 1445, 1202, 745.

EM, m/z (%): 330 (M^+ 100%), 299 (23%), 135 (33%), 105 (25%), 83 (29%).

RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ : 7,32 – 7,26 (m, 2H, H17, H21); 7,26 – 7,21 (m, 2H, H18, 20); 3,88 (s, 3H, H10); 3,44 (s, 3H, H13); 3,41 (s, 3H, H11); 2,9 (t, $J = 7,3$ Hz, 2H, H22); 3,8 (t, $J = 7,3$ Hz, 2H, H22)

RMN de ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) δ : 155,02 (C8); 153,79 (C3); 151,96 (C1); 151,74 (C16); 145,96 (C5); 136,42 (C19); 130,42 (C18, C20); 119,69 (C21, C17); 63,54 (C23); 38,53 (C22); 30,52 (C10); 30,04 (C13); 27,97 (C11)

CAF-Paracetamol: N- (4 - ((1,3,7-trimetil-2,6-dioxo-2,3,6,7-tetraidro-1H-purin-8-il) oxi) fenil) acetamida.



Aparência: sólido bege

R_f: 0,35 (Acetato de etila)

Massa molar (g/mol): 343,34 (ChemDraw Ultra 12.0[©])

Temperatura de fusão: 264,4-265,9 °C

Rendimento: 51%

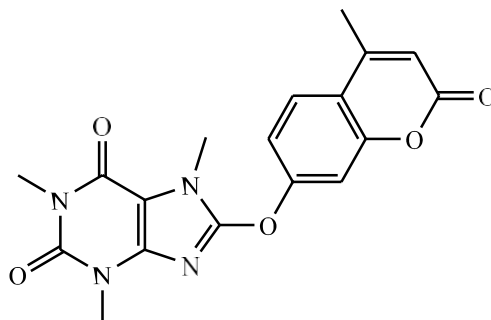
IV (ART) $\tilde{\nu}_{\max}/\text{cm}^{-1}$: 3324, 3135, 3047, 1685, 169, 1519, 1473, 1235, 1017.

EM, m/z (%): 343 (M⁺ 97%), 328 (1%), 301 (23%), 106 (100%), 83 (37%), 44 (31%).

RMN de ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ : 9,19 (s, 1H, H22); 7,52 (d, $J = 8,9$ Hz, 2H, H18, H20); 7,13 (d, $J = 8,9$ Hz, 2H, H17, H21); 3,76 (s, 3H, H14); 3,33 (s, 3H, H12); 3,24 (s, 3H, H10); 2,07 (s, 3H, H24).

RMN de ¹³C (100 MHz, CDCl₃) δ :169.70, 154.89, 153.94, 151.67, 149.02, 145.90, 136.14, 121.02, 119.94, 103.80, 77.16, 30.29, 29.78, 27.75, 23.70.

CAF-Cumarina: 1,3,7-trimetil-8 - ((4-metil-2-oxo-2H-cromen-7-il) oxi) -3,7-diidro-1H-purina-2,6-diona



Aparência: sólido branco

R_f: 0,52 (Acetato de etila)

Massa molar (g/mol): 368,11 (ChemDraw Ultra 12.0[®])

Temperatura de fusão: 284,5-286,2 °C

Rendimento: 70%

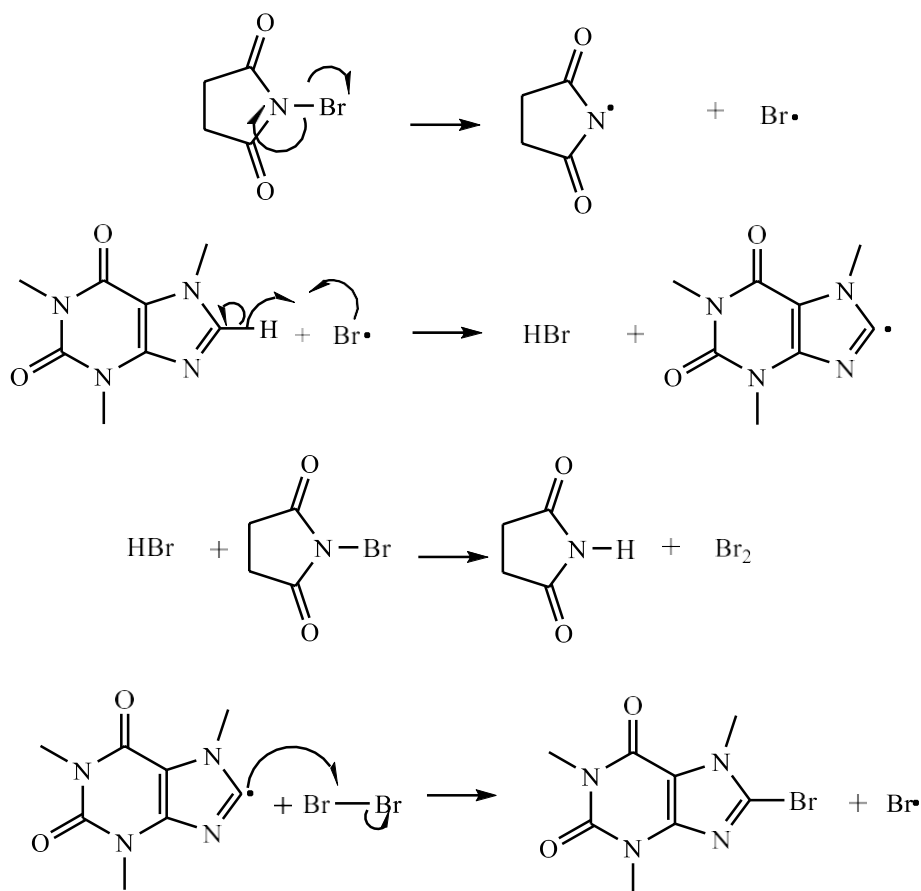
IV (ART) $\tilde{\nu}_{\max}/\text{cm}^{-1}$: 3077, 2948, 1732, 1702, 1663, 1611, 1518, 1270, 739.

EM, m/z (%): 368 (M^+ 100%), 282 (20%), 173 (48%), 103 (20%), 83 (46%), 67 (36%).

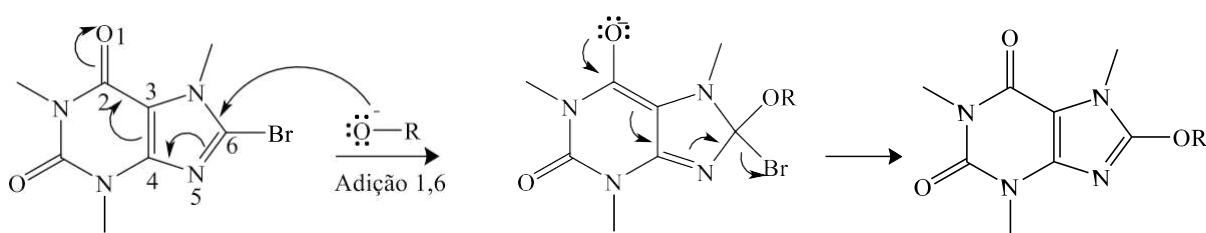
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A cafeína, um dos constituintes mais notáveis e conhecidos do café, foi submetida à modificação química para produzir uma série de derivados que apresentam diferentes substituintes. A síntese do derivado **CAF-Br** foi realizada via reação radicalar (CAREY; SUDBERG, 2001). O mecanismo da reação é apresentado no **Esquema 3**.

A síntese dos outros derivados da cafeína foi realizada a partir do **CAF-Br** por meio de reações de adição/eliminação 1,6, semelhante à adição/eliminação 1,4 de Michael (BRUICE, P Y.4^oed, 2006). A proposta de mecanismo da reação é apresentada no **Esquema 4**.

Esquema 3 – Mecanismo proposto para a reação de bromação da cafeína.

Fonte: autoria própria.

Esquema 4 – Proposta de mecanismo de reação adição/eliminação 1,6.

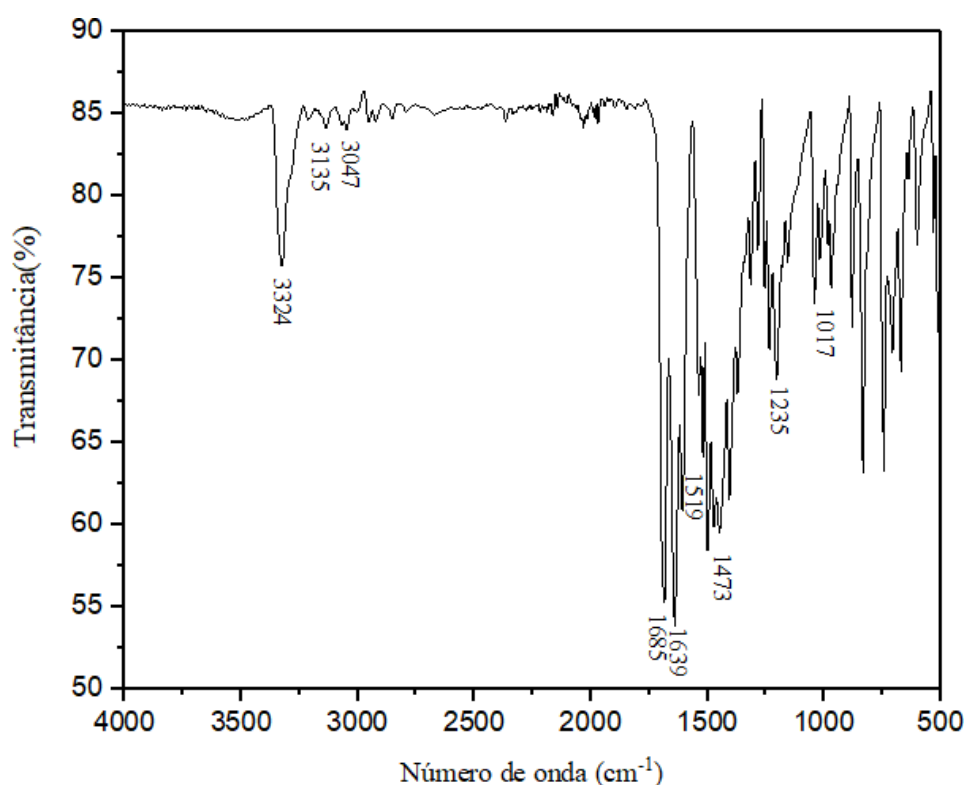
Fonte: autoria própria.

Os compostos apresentaram rendimentos que variaram de 51 a 95%. Apesar de exibirem elevada pureza no CG-EM e nas placas de CCD, o **CAF-Etanolamina**, **CAF-Fenol** e **CAF-Tirosol** apresentaram contaminação de seus respectivos reagentes de partida no RMN de ^1H e ^{13}C e deverão ser purificados por cromatografia. Entretanto, suas estruturas puderam ser inequivocamente determinadas após análise espectral.

Os derivados foram caracterizados por EM, IV e RMN. Todos os espectros estão apresentados no apêndice I. Para discutir a caracterização dos produtos, usou-se como exemplo o **CAF-Paracetamol**.

No espectro no infravermelho do composto **CAF-Paracetamol** (Figura 14), observa-se a banda de estiramento N-H da amida secundária em 3324 cm^{-1} . Na região de $3150\text{-}1051\text{ cm}^{-1}$ aparecem os estiramentos característicos das ligações C-H de aromáticos. As bandas em 1685 cm^{-1} e 1639 cm^{-1} são referentes aos estiramentos das ligações C=O de amidas. Na faixa de $1600\text{-}1475\text{ cm}^{-1}$ nota-se as bandas correspondentes aos estiramentos das ligações C=C do anel aromático. Por fim, a banda em 1017 cm^{-1} é referente ao estiramento C-O de éter.

Figura 14 – Espectro no Infravermelho (ATR) do composto **CAF-Paracetamol**.

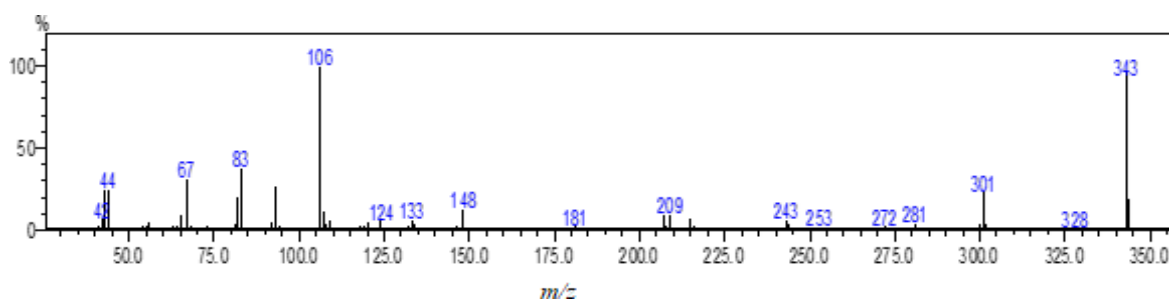


Fonte: autoria própria.

No espectro de massas do composto **CAF-Paracetamol** (Figura 15) identifica-se o pico do íon molecular em m/z 343. Uma segmentação α do íon molecular gera o pico m/z 328 e a perda de uma molécula neutra de etenona ($\text{C}_2\text{H}_2\text{O}$) gera o pico com m/z 301. Por fim, o pico em m/z 106 aparece com maior intensidade, devido à perda de um radical com massa de 237

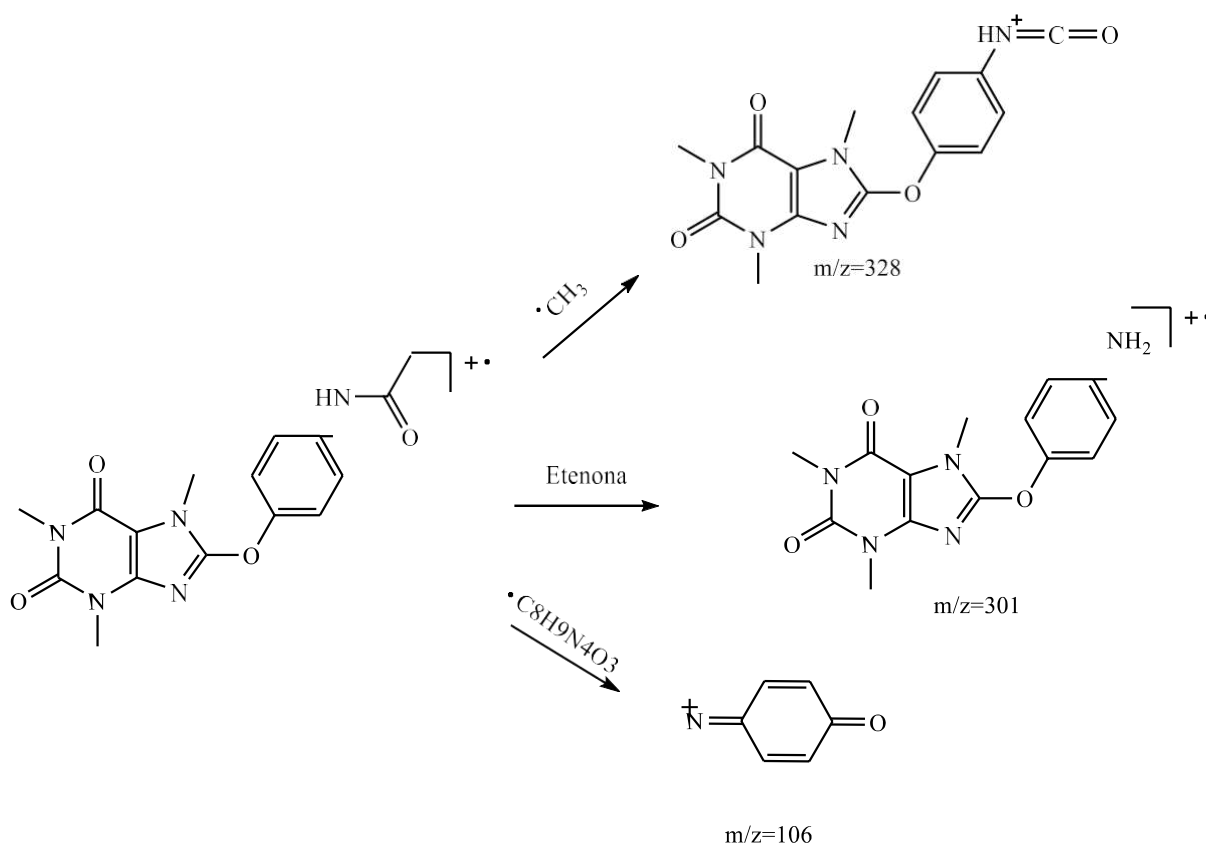
u.m.a ($C_8H_9N_4O_3^+$) aliado ao fato do fragmento possuir estabilização do cátion pela conjugação do sistema (**Esquema 5**).

Figura 15 – Espectro de Massas (IE, 70 eV) do CAF-Paracetamol.



Fonte: autoria própria.

Esquema 5 – Fragmentos propostos para o composto CAF- Paracetamol.



Fonte: autoria própria.

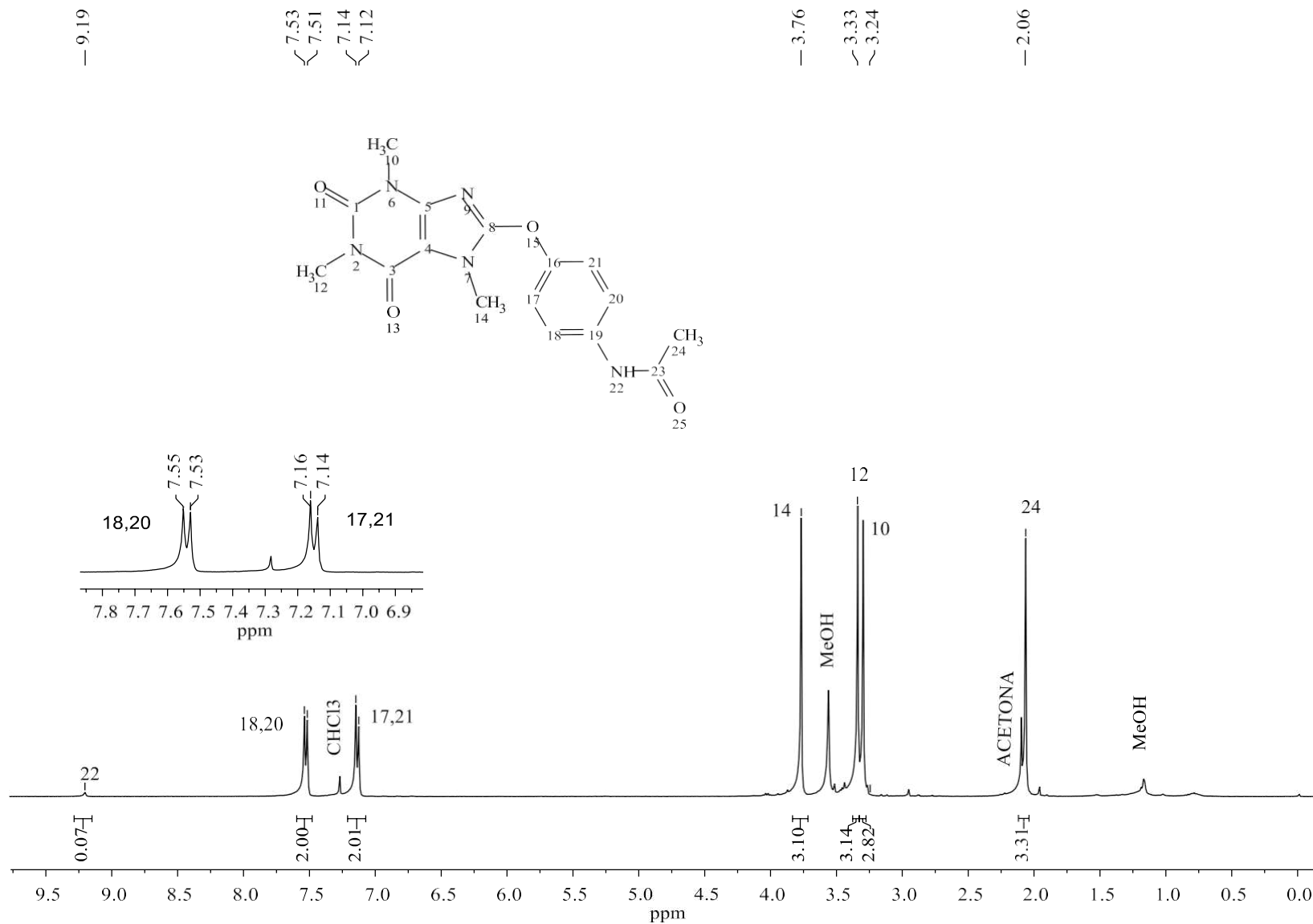
Para as análises dos espectros de RMN, foram utilizados dados de literatura dos núcleos da cafeína (KENT; BELL, 2019) e do paracetamol (DA S. SANTOS; CALNAGO, 2013), além de simulações utilizando o programa ChemBioDraw Ultra 14[®].

No espectro de RMN de ^1H do composto **CAF-Paracetamol (Figura 16)**, nota-se um simpleto bem pequeno fortemente desblindado em 9,19 ppm, correspondente ao H22 da porção amida. Os picos —NH são, com frequência, muito largos e fracos, sem nenhum acoplamento distinto com hidrogênios de carbono adjacente. Essa condição pode ser causada por troca química do próton —NH (PAVIA *et al.*, 4^oed, 2010). Os sinais para os hidrogênios aromáticos encontram-se na região de 6,5-8,0 ppm, também como esperado, correspondentes aos hidrogênios H18/H21 e H17/H21, eles são desblindados pelo grande campo anisotrópico gerado pelos elétrons do sistema π do anel. Os sinais dos hidrogênios metilênicos H14, H12 e H10 da porção cafeína aparecem como simpletos na região de 3 ppm. E por fim, o sinal de H24 aparece em 2,07 ppm, sendo os hidrogênios metilênicos mais blindados.

No espectro de RMN de ^{13}C do composto **CAF-Paracetamol (Figura 17)**, nota-se um sinal em 169,17 ppm, característico de carbonos de amidas, referente ao C23. Em 154 ppm observa-se o sinal de C8, desblindado pela ligação com oxigênio e também pela dupla ligação com nitrogênio. Na região de carbonos de carbonilas é identificado C3 em 153,94 ppm e C1 em 151,67 ppm. Verifica-se o sinal de C5 em 149,02 ppm, sua desblindagem deve-se a presença da dupla ligação. O sinal de C6 aparece em 145 ppm, condizente com a desblindagem causada pelo efeito de anisotropia magnética gerada pelo anel aromático. Os sinais dos carbonos C18, C20, C17 e C21 podem ser identificados na região entre 110-175 ppm, própria de carbonos em anéis aromáticos. Devido à simetria do anel os carbonos C18/C20 e C17/C21 apresentam um único sinal para cada par, com maior intensidade. O sinal de C4 aparece em 103,8 ppm, característico de carbono com dupla ligação. Por fim, os sinais de C10, C12, C14 e C24 aparecem na faixa de 8-30 ppm, região própria de carbonos metilênicos.

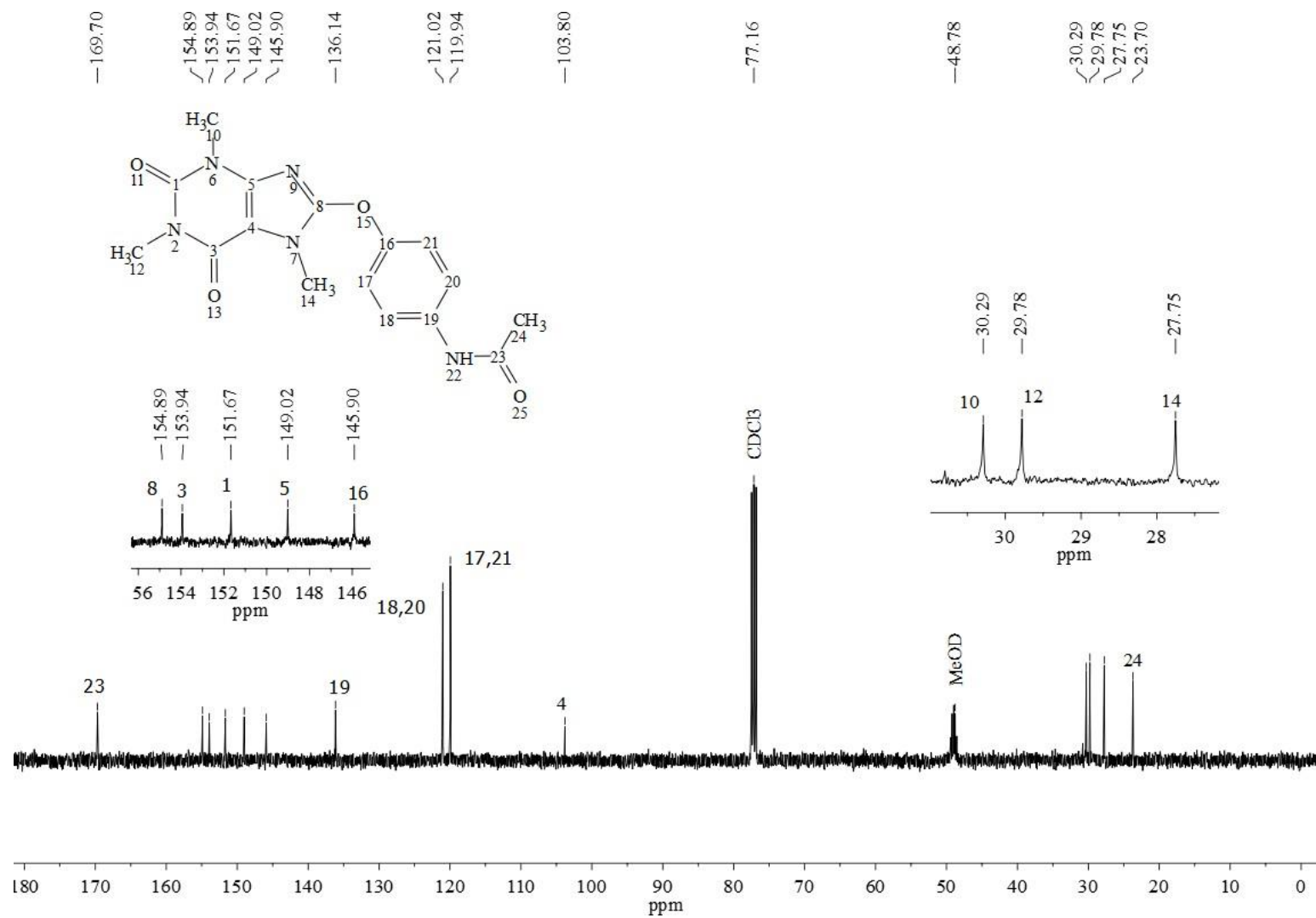
Após a análise estrutural química, constatou-se que se trata de um composto sintetizado pela primeira vez, não sendo descrito em bases de dados estruturais (Scifinder®).

Figura 16 – Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) do composto **CAF-Paracetamol**.



Fonte: autoria própria.

Figura 17 – Espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) do composto **CAF-Paracetamol**.



Fonte: autoria própria.

4. CONCLUSÃO

Todos os compostos sintetizados puderam ser adequadamente identificados, tendo suas estruturas confirmadas pelas técnicas espectroscópicas e espectrométricas convenientes. A bromação da cafeína mostrou ser uma metodologia eficaz. A síntese dos éteres de cafeína mostrou ser um protocolo eficiente e simples, haja vista os bons rendimentos obtidos para a maioria das reações. Por fim, dos compostos sintetizados o **CAF-*p*-Cresol**, **CAF-Tirosol**, **CAF-Paracetamol** e **Caf-Cumarina** são inéditos.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ARAÚJO, C. R. M. *et al.* Desenvolvimento de fármacos por hibridação molecular: Uma aula prática de química medicinal usando comprimidos de paracetamol e sulfadiazina e a ferramenta virtual SciFinder®. **Química Nova**, v. 38, n. 6, p. 868–873, 2015.

ANASTOPOULOS, I. *et al.* Removal of caffeine, nicotine and amoxicillin from (waste) waters by various adsorbents. A review. **Journal of Environmental Management**, v. 261, 2020.

ARSENYAN, P. *et al.* 8-Ethynylxanthines as promising antiproliferative agents, angiogenesis inhibitors, and calcium channel activity modulators. **Chemistry of Heterocyclic Compounds**, v. 56, n. 6, p. 776–785, 2020.

BRUICE, PAULA YURKANIS. Química Orgânica. **Editora Pearson**. 4ª edição.

CAREY, F. A.; SUNDBERG, R. J.; *Advanced Organic Chemistry Part A: Structure and Mechanisms*, 4ª ed.. **Kluwer Academic/ Plenum Publishers**, Nova York, v. 298, p. 705 – 712, 2001.

DA S. SANTOS, M.; COLNAGO, L. A. Validação de método quantitativo por RMN de ¹H para análises de formulações farmacêuticas. **Química Nova**, v. 36, n. 2, p. 324–330, 2013.

FAUDONE, G.; ARIFI, S.; MERK, D. The Medicinal Chemistry of Caffeine. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 64, n. 11, p. 7156–7178, 2021.

FISCHER E, ACH L. “Synthese des Caffeïns” (Synthesis of caffeine). **Berichte der Deutschen Chemischen Gesellschaft zu Berlin** (in German). p. 3135-3143, 1895.

GEORGIEVA, M.; ZLATKOV, A.; PEIKOV, P. Synthesis, Structural and Spectral Analysis of some 8-substituted Trimethylxanthine with Antiproliferative Activity. **World Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, 2014.

GHAHRAMAN, M. A.; FARAHANI, S.; TAVANAI, E. A comprehensive review of the effects of caffeine on the auditory and vestibular systems. **Nutritional Neuroscience**, v. 0, n. 0, p. 1–14, 2021.

JASIEWICZ, B. *et al.* Antioxidant and cytotoxic activity of new di- and polyamine caffeine analogues. **Free Radical Research**, v. 52, n. 6, p. 724–736, 2018.

KADI, A. A. *et al.* Synthesis, biological evaluation and Structure Activity Relationships (SARs) study of 8-(substituted)aryloxycaffeine. **Arabian Journal of Chemistry**, v. 12, n. 8, p. 2356–2364, 2019.

KAPLÁNEK, R. *et al.* Caffeine-hydrazones as anticancer agents with pronounced selectivity toward T-lymphoblastic leukaemia cells. **Bioorganic Chemistry**, v. 60, p. 19–29, 2015.

KENT, J. E.; BELL, N. G. A. Molecular Properties of Caffeine Explored by NMR: A Benchtop NMR Experiment for Undergraduate Physical-Chemistry Laboratories. **Journal of Chemical Education**, v. 96, n. 4, p. 786–791, 2019.

LONDZIN, P. *et al.* Potential of caffeine in alzheimer's disease - a review of experimental studies. **Nutrients**. v. 13, p.1-33, 2021.

MUELLER, C. *et al.* Preparation of 8-triazolylxanthine derivatives as adenisine receptor antagonists. **PCT Int.**, 2012.

PAVIA, DONALD L. *et al.* **Introdução à Espectroscopia**. 4ª Edição, 2010.

POHANKA, M.; DOBES, P. Caffeine inhibits acetylcholinesterase, but not butyrylcholinesterase. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 14, n. 5, p. 9873–9882, 2013.

RIVARA, S. *et al.* Synthesis of (E)-8-(3-chlorostyryl)caffeine analogues leading to 9-deazaxanthine derivatives as dual A2A antagonists/MAO-B inhibitors. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 56, n. 3, p. 1247–1261, 2013.

VAN DAM, R. M.; HU, F. B.; WILLETT, W. C. Coffee, Caffeine, and Health. **New England Journal of Medicine**, v. 383, n. 4, p. 369–378, 2020.

XIE, G. *et al.* Caffeine-related effects on cognitive performance: Roles of apoptosis in rat hippocampus following sleep deprivation. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 534, p. 632–638, 2021.

CAPÍTULO 3

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTI-ACETILCOLINESTERASE

1. INTRODUÇÃO

A Doença de Alzheimer (DA) é um distúrbio neurodegenerativo progressivo, sendo a principal causa de demência em idosos. Os sintomas associados incluem perda de memória, diminuição da função cognitiva e de habilidades de comunicação. A doença tende a progredir gradualmente até atingir um nível grave de demência (MORADI *et al.*, 2018; RAMPA *et al.*, 2016).

Ainda não são totalmente conhecidos os fatores que provocam a Doença de Alzheimer, entretanto, sabe-se que os fatores genéticos, o estresse oxidativo, a formação de β -amilóide, a inflamação e a hipofunção colinérgica, incluindo o declínio dos níveis de acetilcolina (ACh), predisõem o indivíduo a desenvolver o distúrbio (RAMPA *et al.*, 2016).

A acetilcolina é um neurotransmissor e tem um importante papel no auxílio da aprendizagem, atenção, memória e motivação. Uma das principais formas de manter os níveis de ACh no cérebro é a inibição de colinesterases, como a acetilcolinesterase (AChE) e a butirilcolinesterase (BChE), que são enzimas que catalisam a hidrólise de ACh em colina e ácido acético (NAJAFI *et al.*, 2019).

Pesquisas sobre potenciais inibidores da AChE é de grande importância como etapa preliminar para o desenvolvimento de novos medicamentos (ARAÚJO, SANTOS E GONSALVES, 2016).

Segundo Pohanka & Dobes (2013) em uma concentração de $175 \mu\text{mol L}^{-1}$ que a cafeína apresenta atividade de inibição da acetilcolinesterase. Além disso, estudos reportam que tal xantina demonstra ter efeitos neuroprotetores (KOLAHDOUZAN & HAMADEH, 2017) e reduzir o risco da doença de Alzheimer (ESKELINEN & KIVIPELTO, 2010; STAZI *et al.*, 2022). O consumo de cafeína, em dosagens de 3-5 mg/kg, está associado a um menor risco de DA e Doença de Parkinson (DP) em estudos epidemiológicos e pré-clínicos. Pesquisas em animais *in vitro* e *in vivo* sugerem que a cafeína pode ter papel terapêutico para pacientes já diagnosticados com a doença neurodegenerativa (KOLAHDOUZAN & HAMADEH, 2017).

Considerando as propriedades neuroprotetoras da cafeína, objetivou-se avaliar a possibilidade dos derivados sintetizados atuarem como inibidores da AChE, gerando compostos capazes de fornecer benefícios terapêuticos em doenças neurodegenerativas.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. Ensaio de inibição enzimática

Os ensaios foram realizados em parceria com o Laboratório de Biodiversidade (Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular- UFV). A inibição AChE foi determinada por ensaio espectrofotométrico em microplaca de 96 poços (TPP, Trasadingen Suíça), de acordo com a metodologia de Ellman et al. (1961) com modificações.

Todos os extratos e frações obtidos do *Coffea arabica L.*, assim como o cafestol, acetato de cafestol, cafeína e seus derivados foram submetidos ao teste de inibição da AChE. Os extratos foram preparadas na concentração de 20 mg mL⁻¹ e os compostos 2500 µmol L⁻¹ em MeOH. As soluções foram armazenadas no congelador e reutilizadas para a produção das soluções intermediárias das repetições. Sendo assim, foram utilizadas três microplacas, com triplicata para cada composto. A cada dia, as amostras eram solubilizadas por banho ultrassônico (Sander[®], modelo Soniclean 2), com frequência de 40 kHz e temperatura entre 30 a 35 °C, e diluídas cinco vezes em tampão A (Tris-HCl 50 mmol L⁻¹, pH 8,0). Obteve-se, então, a solução intermediária na concentração de 4 mg mL⁻¹ para os extratos e 500 µmol L⁻¹ para os compostos.

Em um reservatório de pipeta multicanal foi adicionados 5 mL de solução de albumina sérica bovina (0,1 % de BSA em tampão A), 2,4 mL de solução de iodeto de acetiltiocolina em água ultrapura (14,5 mmol L⁻¹), 12 mL de solução de ácido 5,5'-ditio-bis-(2-nitrobenzóico) (3 mmol L⁻¹ de DTNB em tampão A contendo 10 mmol L⁻¹ de NaCl e 20 mmol L⁻¹ de MgCl₂). Os controles negativo e positivo foram realizados utilizando-se metanol e fisostigmina inibidor padrão, a 15 µmol L⁻¹, enquanto os outros compostos foram testados na concentração de 50 µmol L⁻¹ e os extratos a 400 µg mL⁻¹.

A montagem da placa foi realizada adicionando nos poços 200 µL do mix (albumina sérica bovina, iodeto de acetiltiocolina, DTNB), em seguida foram adicionados na placa 25 µL de amostra/controlado nos poços em triplicata. Procedeu-se com a leitura do *Background* a 405 nm e 30 °C em espectrofotômetro (Thermoplate, modelo TP-reader). Para realizar o ensaio cinético 25 µL da enzima AChE (0,2 U mL⁻¹, 0,1% de tampão A) (*Electrophorus electricus*, tipo VI, Sigma Aldrich) diluída em BSA foram adicionados na placa e efetuou-se a leitura da placa (agitação inicial de 5 segundos, λ=405 nm, à 30 °C) a cada 5 minutos, por 25 minutos.

A inibição da hidrólise enzimática foi avaliada a partir da diferença de valores de absorvância obtidos nas leituras sem e com a adição da enzima. Assim, a porcentagem de inibição foi calculada a partir da fórmula:

% de inibição da atividade AChE

$$= \frac{\text{Absorvância do controle} - \text{Absorvância da amostra}}{\text{Absorvância do controle}} \times 100$$

2.2. Docking molecular

A estrutura tridimensional (3D) da acetilcolinesterase da espécie *Torpedo californica* com resolução de 4,20 Å, (BOURNE *et al.*, 1999) e da acetilcolinesterase da espécie *Homo sapiens* com resolução de 2,39 Å complexada com galantamina, (CHEUNG *et al.*, 2012) foram obtidas do banco de dados de proteínas (PDB) sob os códigos 1C2O e 4EY, respectivamente.

O programa PC Spartan[®] (HEHRE D & K, 2014) foi utilizado para construir e otimizar as estruturas 3D dos compostos utilizados neste estudo, que em sequência tiveram suas cargas calculadas pelo método semiempírico RM1 (SIMAS & ROCHA, 2007). Através do *software* Molegro Virtual Docker[®] foi possível calcular as energias de ancoragem dos compostos dentro dos sítios ativos das enzimas.

Os sítios de ligação das enzimas foram limitados a esferas com raio de 15 Å ao redor da cavidade enzimática responsável pela atividade das mesmas. Foi levado em consideração a influência das moléculas de água durante os estudos de *docking*. E todos resíduos foram ajustados para serem flexíveis dentro das esferas. Devido à natureza estocástica do algoritmo de ancoragem, 10 execuções foram realizadas para cada composto, sendo que, para cada execução, 10 poses eram analisadas. O *re-docking* do inibidor cristalizado na estrutura da enzima foi utilizado para validar o protocolo de acoplamento. Para determinar o grau de identidade entre os resíduos dos sítios ativos da acetilcolinesterase humana e a de peixe e para verificar a similaridade entre eles, executou-se o alinhamento destas estruturas usando Swiss-Pdb Viewer (GUEX & PEITSCH, 1997).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Ensaio de inibição enzimática

O ensaio de inibição da enzima AChE foi realizado com todos os extratos e frações obtidos do *Coffea arabica L.*, bem como o acetato de cafestol, o cafestol, a cafeína e seus derivados. Apenas o derivado CAF-Cumarina não foi testado, pois foi insolúvel em metanol. Dos extratos e frações testados, a fração **F2** e o **extrato etanólico** apresentaram atividade significativa (**Tabela 1**). Entre os compostos submetidos ao ensaio biológico somente o derivado **CAF-Br** apresentou inibição da AChE.

A fração **F2** foi isolada do extrato hexânico, que não apresentou atividade. A porção lipídica extraída pelo hexano é constituída principalmente por triacilgliceróis e ésteres diterpenos. O kahweol e o cafestol, apresentam atividades anti-inflamatórias, antioxidantes, hepatoprotetoras, antidiabéticas e anticancerígenas (REN *et al.*, 2019; FARIAS; PARK; PARK, 2019). No entanto, considerando que os dados sobre o efeito neuroprotetor destes dois compostos são bastante limitados na literatura (SOCAŁA *et al.*, 2021) e sabendo que tais substâncias não apresentaram inibição da enzima AChE na concentração testada, a atividade da fração **F2** não pode ser justificada pela presença dos diterpenos cafestol e kahweol. Logo, não foi possível definir quais compostos influenciaram na inibição da AChE. Mas, é possível chegar à conclusão de que as substâncias responsáveis pela atividade estão presentes em maiores quantidades em **F2** do que no extrato hexânico.

O **extrato etanólico** é constituído principalmente de cafeína, compostos fenólicos como os ácidos clorogênicos (ACG) e trigonelina (MOREIRA *et al.*, 2014.). Kwon *et al.*, (2010), reportou que in vitro, o ácido clorogênico inibe a atividade da acetilcolinesterase com IC₅₀= 98,17 µg/mL e Zhou, Chan & Zhou, (2012) relataram que a trigonelina inibe fracamente a AChE. Sendo assim, a atividade deste extrato pode ser justificada pela presença dos compostos fenólicos (ácidos clorogênicos) e a trigonelina, mas não pela presença da cafeína, já que tal xantina não apresentou atividade de inibição nesse ensaio.

Vale ressaltar que a cafeína, na concentração de 50 µmol L⁻¹, não apresentou atividade de inibição contra a AChE neste ensaio.

Tabela 1 – Inibição da fração F2 e do extrato etanólico do *Coffea arabica L.* contra acetilcolinesterase (*Electrophorus electricus*, tipo VI).

Composto	Concentração ($\mu\text{g/mL}$)	Inibição (%)	Desvio padrão
Extrato etanólico	405,49	49,29	3,82
F2	402,31	38,17	0,82

Fonte: autoria própria.

Dentre os compostos testados, apenas o **CAF-Br** apresentou uma inibição notória (**Tabela 2**). Ele é o único derivado com um halogênio em sua estrutura. Apesar de não ser um composto inédito, a sua atividade de inibição da AChE não foi relatada na literatura.

Tabela 2 – Inibição da fração F2 e do extrato etanólico do *Coffea arabica L.* contra acetilcolinesterase (*Electrophorus electricus*, tipo VI).

Composto	Concentração ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	Inibição (%)	Desvio padrão
Cafeína	50	0	0
CAF-Br	50	55,29	5,85
Fisostigmina	15	81,7	1,46

Fonte: autoria própria.

3.2. Docking molecular

Além dos ensaios *in vitro* para a determinação da atividade inibitória de um ligante frente a uma proteína, estudos computacionais são de suma importância para a compreensão do mecanismo de interação enzima-ligante que geram os dados *in vitro*. Para adquirir esta informação é necessário saber o posicionamento tridimensional e as interações intermoleculares existentes entre o ligante e a proteína. Assim, admitindo que as proteínas regulam suas funções biológicas por meio destas interações, a predição da geometria e da energia de ligação é um recurso de grande interesse para o planejamento de novos fármacos e compreensão do modo de ação dos mesmos (SOUZA, 2012; GUIMARÃES, 2013).

A técnica de *docking* molecular prediz o modo de ligação de uma pequena molécula (ligante) na região de ligação de uma proteína (sítio ativo). Este recurso é um dos mais relevantes para o estudo de reconhecimento molecular e descoberta de novos fármacos. Além de predizer o modo de ligação, ela quantifica a afinidade de ligação (SOUZA, 2012; GUIMARÃES, 2013).

Os programas de *docking* molecular geralmente são formados por um algoritmo de busca (orientação e conformação) e por uma função de pontuação. O algoritmo de busca é empregado na pesquisa de possíveis modos de ligação entre a proteína e o ligante, com o intuito de se alcançar uma complementaridade eletrostática e estérica. Assim, tal algoritmo deve realizar uma pesquisa detalhada da energia potencial para que se obtenha o mínimo local. Já a função de pontuação é utilizada para escolher os modos de ligação teoricamente mais próximos do modo de ligação “real”, dentre os modos de ligação analisados pelo algoritmo de busca, classificando-os de acordo com as energias de interação (SOUZA, 2012; GUIMARÃES, 2013).

Os valores da função de desempenho de docagem (*docking scoring function*), utilizados pelo programa MVD[®] (*Molegro Virtual Docker*), usa o algoritmo de evolução diferencial, um tipo de algoritmo evolucionário onde uma população de indivíduos é submetida a variações aleatórias causadas por operadores como recombinação e mutação. A função de avaliação *MolDock* do MVD[®] leva em consideração a interação intermolecular entre o proteína e ligante e a energia de interação intramolecular do ligante. (THOMSEN & CHRISTENSEN, 2006; SOUZA, 2012; GUIMARÃES, 2013).

Uma vez discutida a importância e percorrido alguns princípios dos estudos de *docking*, nas seções a seguir serão apresentados resultados que contemplam e justificam os valores de inibição observada nos testes *in vitro* para o principal composto bioativo: **CAF-Br**. Portanto, serão apresentados, nesta ordem, o estudo de homologia entre a enzima humana e a que foi empregada no teste biológico do presente trabalho; validação da metodologia de docagem molecular utilizada por meio de estudo de re-*docking* e, por último, será apresentado e discutido os resultados da interação enzima-ligante obtidos no estudo *in silico*.

3.3. Avaliação de homologia entre a AChE humana e a utilizada nos testes *in vitro*

Visto que a avaliação do potencial colinesterásico dos compostos foi realizado com AChE da espécie *Torpedo californica*, é preciso realizar o estudo de homologia entre a enzima usada no teste com a enzima da espécie *Homo sapiens*. Esta análise tem a intuito de garantir que os resultados encontrados no teste com a enzima proveniente de peixe sejam reprodutíveis na enzima humana. O resultado de homologia encontrado para esta enzima está apresentado na **Figura 18**.

O alinhamento entre as sequências da AChE humana e de peixe mostrou que existe similaridade entre ambas. O valor da raiz quadrática média (RMSD) para este estudo foi de

0,63 Å e segundo dados da literatura (WARREN *et al.*, 2006; KONTOYIANNI *et al.*, 2004; LEACH *et al.*, 2006), valores abaixo de 1,0 Å são considerados aceitáveis para garantir a existência de uma boa homologia entre as enzimas avaliadas. Além disso, o fato de o sítio ativo de ambas enzimas serem 100% iguais contribui na garantia de que os resultados encontrados no teste com a enzima proveniente do peixe sejam reproduzíveis na AChE humana.

Figura 18 – Resultado de homologia entre a enzima AChE das espécies *Homo sapiens* (4EY6) e *Torpedo californica* (1C2O). Em destaque estão os resíduos pertencentes ao sítio ativo. Símbolos: * equivalente; . não equivalente, porém similar.

4EY6	4	EDAELLVTVR	GGRLRGIRLK	TPGGPVSAFL	GIPFAEPPMG	PRRFLPPEPK
1C2O	5	DPQLLVRVR	GGQLRGIRLK	APGGPVSAFL	GIPFAEPPVG	SRRFMPPEPK
		* . *** **	** .*****	.*****	***** .*	.*** .*****
4EY6	54	QPWSGVVDAT	TFQSVCYQYV	DTLYPGFEGT	EMWNPNSRELS	EDCLYLNVT
1C2O	54	RPWSGVLDAT	TFQNVCYQYV	DTLYPGFEGT	EMWNPNSRELS	EDCLYLNVT
		.***** .***	** .*****	*****	*****	*****
4EY6	104	PYPRPTSPTP	VLVWIYGGGF	YSGASSLDVY	DGRFLVQAER	TVLVSMNYRV
1C2O	104	PYPRPASPTP	VLIWIYGGGF	YSGAASLDVY	DGRFLAQVEG	AVLVSMNYRV
		***** .*****	** .*****	***** .*****	***** * *	.*****
4EY6	154	GAFGFLALPG	SREAPGNVGL	LDQRLALQWV	QENVAAFGGD	PTSVTLFGES
1C2O	154	GTFGFLALPG	SREAPGNVGL	LDQRLALQWV	QENIAAFGGD	PMSVTLFGES
		* .*****	*****	*****	*** .*****	* *****
4EY6	204	AGAASVGMHL	LSPPSRGLFH	RAVLQSGAPN	GPWATVGMGE	ARRRATQLAH
1C2O	204	AGAASVGMHI	LSLPSRSLFH	RAVLQSGTPN	GPWATVSAGE	ARRRATLLAR
		***** .	** *** .***	***** .**	***** .**	***** ** .
4EY6	254	LVGCP-----	-NDTELVACL	RTRPAQVLVN	HEWHVLPQES	VFRFSFVPPV
1C2O	254	LVGCPPGGAG	GNDTELIACL	RTRPAQDLVD	HEWHVLPQES	IFRFSFVPPV
		*****	***** .***	***** ** .	*****	.*****
4EY6	304	DGDFLSDTPE	ALINAGDFHG	LQVLVGVVKD	EGSYFLVYGA	PGFSKDNESL
1C2O	304	DGDFLSDTPE	ALINTGDFQD	LQVLVGVVKD	EGSYFLVYGV	PGFSKDNESL
		*****	**** .*** .	*****	*****	*****
4EY6	354	ISRAEFLAGV	RVGVPQVSDL	AAEAVVLHYT	DWLHPEDPAR	LREALSDVVG
1C2O	354	ISRAQFLAGV	RIGVPQASDL	AAEAVVLHYT	DWLHPEDPTH	LRDAMSAVVG
		**** .*****	* .**** **	*****	***** .	** .* * **
4EY6	404	DHNVVCPVAQ	LAGRLAAQGA	RVYAYVFEHR	ASTLSWPLWM	GVPHGYEIEF
1C2O	404	DHNVVCPVAQ	LAGRLAAQGA	RVYAYIFEHR	ASTLTWPLWM	GVPHGYEIEF
		*****	*****	***** .****	**** .*****	*****
4EY6	454	IFGIPLDPSR	NYTAEKIFA	QRLMRYWANF	ARTGDPNEP-	-RDP-QWPPY
1C2O	454	IFGLPLDPSL	NYTTEERIFA	QRLMKYWTNF	ARTGDPNDPR	DSKSPQWPPY
		*** .*****	*** .** .***	**** .** .**	***** .*	. *****
4EY6	504	TAGAQQYVSL	DLRPLEVRRG	LRAQACAFWN	RFLPKLLSA	
1C2O	504	TTAQQYVSL	NLKPVEVRRG	LRAQTCAFWN	RFLPKLLSAT	
		* .*****	* .*****	**** .*****	*****	

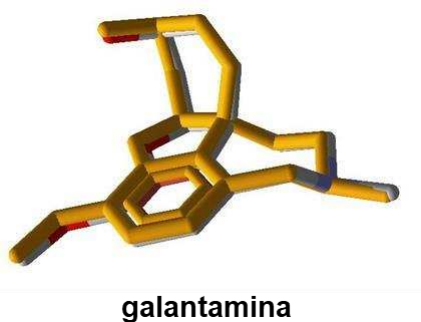
Fonte: autoria própria.

3.4. Validação da metodologia de docking molecular

Com a finalidade de validar a metodologia utilizada no estudo de *docking* molecular foi realizado o *re-docking* da estrutura da galantamina que estava cristalizada na estrutura da AChE humana (PDB 4EY6).

Tanto pelo valor de RMSD encontrado para a sobreposição das estruturas docada e cristalizada da galantamina (RMSD = 0,216 Å) quanto pela imagem a seguir (**Figura 19**) é possível perceber que a metodologia de *docking* molecular utilizada mostrou-se robusta e confiável.

Figura 19 – *Re-docking* da galantamina na AChE humana (4EY6). Galantamina cristalizada na enzima em cores por elemento e em amarelo, galantamina obtida do estudo de *docking* molecular.



Fonte: autoria própria

3.5. Docking molecular do composto CAF-Br.

Por meio da complementaridade química entre as estruturas em estudo ocorre o reconhecimento molecular de um ligante no sítio receptor de um alvo. Este é um processo que envolve fatores entrópicos e entálpicos considerando o efeito do ambiente proteico na distribuição de cargas do ligante, a flexibilidade da proteína e do ligante e possíveis interações com moléculas de água presentes no meio (SOUZA, 2012). Por isto, as moléculas de água cristalizadas na proteína foram consideradas nos estudos de *docking*.

Nas interações proteína-ligante o solvente tem um papel importante, já que pode aumentar a entropia do sistema devido a efeitos hidrofóbicos, modificar as características do sítio ativo e também mediar a formação de ligações de hidrogênio (GUIMARÃES, 2013).

As técnicas de docagem molecular obtém uma média de estruturas estáveis do ligante na proteína e calcula essa estabilidade relativa. Dessa forma, é preciso analisar todos os modos

de interação, afim de encontrar a estrutura de menor energia. Por isso, foi considerado a flexibilidade conformacional do ligante introduzido no sítio ativo da proteína e as possíveis interações que ambos podem realizar entre si. Como exemplo, pode-se citar a formação de ligações de hidrogênio, interações iônicas e hidrofóbicas, interações de van der Waals, interações do tipo π - π e empilhamento- π entre grupamentos aromáticos, interações do tipo cátion- π envolvendo grupamentos positivamente carregados e anéis aromáticos, por último interações envolvendo metais (SOUZA, 2012; GUIMARÃES, 2013).

Os valores de energia total (valores da função *score*) para o composto mais ativo na inibição da AChE (**CAF-Br**) podem ser vistos na **Tabela 3**. Pelos dados foi observada correlação entre a inibição da AChE pelo composto **CAF-Br** e galantamina, onde os valores *score* foram coerentes com os valores de inibição *in vitro*.

Tabela 3 – Porcentagem de inibição e valores de energia (kcal mol^{-1}) para os complexos enzima substrato de **CAF-Br** e galantamina, o controle positivo do teste *in vitro*.

Enzima-ligante	<i>In vitro</i> - % inibição	<i>In silico</i> – <i>Score</i> ^a
AChE - galantamina	87% ^b	-146,43
AChE - CAF-Br	55%	-81,53

^a Valores de energia em kcal mol^{-1} . ^b teste realizado por Silva, J. G. (2019), não publicado.

Fonte: autoria própria.

Maiores informações e detalhes sobre como ocorre a formação dos complexos enzima-ligante da Tabela 5 podem ser obtidos na **Tabela 4** e na **Figura 20**. Importantes interações, como as com os resíduos de serina catalítica (Ser²⁰³) foi observado para o ligante. Além disso, valores significativos de energia de interação foram alcançados com a histidina pertencente a tríade catalítica e os resíduos de glicina e triptofano, que possuem papel essencial no direcionamento do substrato no sítio ativo e estabilização de cargas (CHEUNG *et al.*, 2012; BOURNE *et al.*, 1999; NACHON *et al.*, 2013).

Vale ressaltar que os estudos de *docking* molecular, por não levarem em consideração diversas interações dinâmicas e a grande movimentação das proteínas, não pode ser utilizado para afirmar de modo incontestável os dados apresentados nesta seção. Mas devido a facilidade de execução e rápida resposta, podem ser usados para fazer suposições de como ocorre a

interação enzima-ligante, bem como pode ser uma ferramenta no desenvolvimento e otimização de estrutura promissoras.

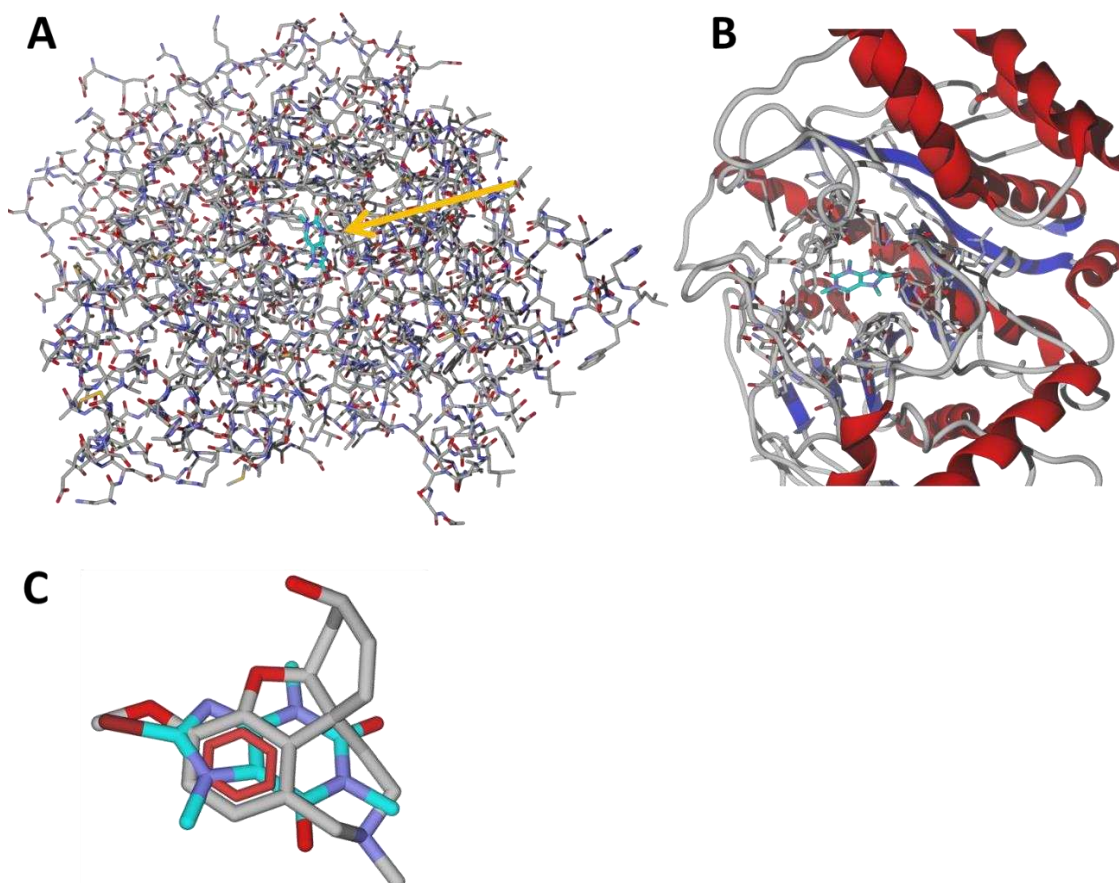
Tabela 4 – Valores de energia (kcal mol^{-1}) para as interações entre os resíduos de aminoácidos da enzima AChE humana e a molécula **CAF-Br**.

	Aminoácido ou água	Energia (kcal mol^{-1})
1	Ala 204	-0,35
2	Glu 202	-1,02
3	Gly 121	-10,10
4	Gly 122	-5,12
5	Gly 448	-0,85
6	His 447	-7,50
7	Phe 295	-2,16
8	Phe 297	-5,61
9	Phe 338	-8,95
10	Ser 125	-0,83
11	Ser 203	-3,63
12	Trp 86	-11,40
13	Trp 236	-1,05
14	Tyr 124	-8,20
15	Tyr 337	-13,05
16	H ₂ O 114	-1,19
17	H ₂ O 119	-0,53
18	H ₂ O 159	-3,33
19	H ₂ O 161	-0,43
20	H ₂ O 190	-1,60
21	H ₂ O 191	-0,39

* Valores de energia em kcal mol^{-1} . Em negrito resíduos pertencentes a função catalítica.

Fonte: autoria própria.

Figura 20 – **A.** Resultado de *Docking* molecular do composto **CAF-Br** na AChE humana (representação da pose de menor energia no interior da AChE); **B.** representação da estrutura 2D da AChE com a pose de menor energia do inibidor **CAF-Br**; **C.** sobreposição entre a pose de menor energia de **CAF-Br** e a galantamina cristalizada na AChE.



Fonte: autoria própria

Além das importantes interações realizadas pelo derivado **CAF-Br** com a AChE, como pode ser notado na Figura 21 C, a sobreposição entre a pose de menor energia do composto **CAF-Br** e o inibidor comercial galantamina da AChE sugere que ambas moléculas interagem na mesma região da enzima.

4. CONCLUSÃO

Dos extratos e frações testados, a fração **F2** e o **extrato etanólico** apresentaram inibição significativa de 49,29% e 38,17%, respectivamente, numa concentração próxima de 400 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Os derivados da cafeína sintetizados nesse trabalho foram testadas pela primeira

vez como possíveis inibidoras de AChE. Entretanto, apenas o composto **CAF-Br** apresentou efeito significativo com uma inibição de 55% a $50 \mu\text{mol L}^{-1}$. Através do estudo de *docking* molecular foi possível concluir que o composto **CAF-Br** e o inibidor comercial galantamina da AChE interagem na mesma região da enzima. Esses achados indicam que a bioconjugação da cafeína com halogênios, pode ser considerada um protótipo importante para estudos adicionais sobre a inibição da AChE.

Novos estudos deverão ser propostos tanto no fracionamento dos extratos ativos para se obter compostos isolados, como na síntese de novos derivados a fim de se avaliar suas atividades de inibição da AChE.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ARAÚJO, C. R.; SANTOS, V.; GONSALVES, A. . Acetylcholinesterase - AChE: A pharmacological interesting enzyme. **Revista Virtual de Química**, v. 8, n. 6, p. 1818–1834, 2016.

BOURNE, Y.; GRASSI, J.; BOUGIS, P. E.; MARCHOT, P. Conformational Flexibility of the Acetylcholinesterase Tetramer Suggested by X-Ray. **Deposited in the Protein Data**, v. 274, 1999.

CHEUNG J, RUDOLPH M. J, BURSHTYEN F, CASSIDY M. S, GARY E. N, LOVE J., Structures of human acetylcholinesterase in complex with pharmacologically important ligands. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 55, p. 10282–10286, 2012.

ELLMAN, G. L.; COURTNEY, K. D.; ANDRES, V.; FEATHERSTONE, R. M. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. **Biochemical Pharmacology**, v. 7, n. 2, p. 88–95, 1961.

ESKELINEN, M. H. & KIVIPELTO, M. Caffeine as a protective factor in dementia and Alzheimer's disease. **J. Alzheimers Dis**, v.20, p. 167–174, 2010.

FARIAS-PEREIRA, R.; PARK, C.S.; PARK, Y. Mechanisms of action of coffee bioactive components on lipid metabolism. **Food Sci. Biotechnol**, v. 28, p. 1287–1296, 2019.

GUDEX & PEITSCH, **Swiss-Pdb Viewer**, 1997.

GUIMARÃES A. P., Estudos por modelagem molecular da enzima timidilato quinase do Variola virus, 2013.

HEHRE D & K. **Spartan**. Versão: 1.1.4, 2014.

KOLAHDOUZAN, M. & HAMADEH, M. J. The neuroprotective effects of caffeine in neurodegenerative diseases. **CNS Neurosci. Ther.**, v. 23, p. 272–290, 2017.

KONTOYIANNI, M.; MCCLELLAN, L. M. AND SOKOL, G. S. Evaluation of Docking Performance: Comparative Data on Docking Algorithms. **Journal of Medicinal Chemistry**, v.47, p. 558–565, 2004.

KWON, S. H. *et al.* Neuroprotective effects of chlorogenic acid on scopolamine-induced amnesia via anti-acetylcholinesterase and anti-oxidative activities in mice. **European Journal of Pharmacology**, v. 649, n. 1–3, p. 210–217, 2010.

LEACH, A. R.; SHOICHET, B. K.; AND PEISHOFF, C.E. , Prediction of protein-ligand interactions. Docking and scoring: Successes and gaps. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 49, p.5851–5855, 2006.

MOREIRA, I. *et al.* Efeito do solvente na extração de ácidos clorogênicos, cafeína e trigonelina em coffee arabica. **Química Nova**, v. 37, n. 1, p. 39–43, 2014.

MORADI, A. *et al.* Synthesis, docking study, and biological evaluation of novel umbelliferone/hymecromone derivatives as acetylcholinesterase/butyrylcholinesterase inhibitors. **Medicinal Chemistry Research**, v. 27, n. 7, p. 1741–1747, 2018.

NACHON, F. *et al.* Crystal structures of human cholinesterases in complex with huprine W and tacrine: Elements of specificity for anti-Alzheimer's drugs targeting acetyl- and butyrylcholinesterase. **Biochemical Journal**, v. 453, p.393–399, 2013.

NAJAFI, Z. *et al.* Novel tacrine-coumarin hybrids linked to 1,2,3-triazole as anti-Alzheimer's compounds: *In vitro* and *in vivo* biological evaluation and docking study. **Bioorganic Chemistry**, v. 83, n. 4, p. 303–316, 2019.

POHANKA, M. & DOBES, P. Caffeine inhibits acetylcholinesterase, but not butyrylcholinesterase. **Int. J. Mol. Sci.**, v.14, p. 9873–9882, 2013.

RAMPA, A. *et al.* Naturally inspired molecules as multifunctional agents for Alzheimer's disease treatment. **Molecules**, [S. l.], v. 21, n. 5, p. 1–16, 2016. DOI: 10.3390/molecules21050643.

REN, Y. *et al.* Cafestol and kahweol: A review on their bioactivities and pharmacological properties. **Int. J. Mol. Sci.**, v. 20, p.4238, 2019.

SIMAS, A. M & ROCHA, G. B., Métodos Semi-empíricos de Estrutura Eletrônica em Química Quântica, ed. **Editora Livraria da Física**, São Paulo, 2007.

THOMSEN & CHRISTENSEN. **Molegro Virtual Docker**, 2006.

SOUZA, S. D. Estudo de inibidores de colinesterases aplicando técnicas de QSAR-2D (HQSAR) e docking molecular. **Universidade Federal Do Rio De Janeiro**, 2012.

SOCALA, K. *et al.* Neuroprotective effects of coffee bioactive compounds: A review. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, n. 1, p. 1–64, 2021.

STAZI, M. *et al.* Long-term caffeine treatment of Alzheimer mouse models ameliorates behavioural deficits and neuron loss and promotes cellular and molecular markers of neurogenesis. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 79, n. 1, 2022.

WARREN, G. L. *et al.* A critical assessment of docking programs and scoring functions. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 49, p. 5912–5931, 2006.

ZHOU, J.; CHAN, L. & ZHOU, S. Trigonelline: A Plant Alkaloid with Therapeutic Potential for Diabetes and Central Nervous System Disease. **Current Medicinal Chemistry**, v. 19, p. 3523–3531, 2012.

CONCLUSÃO GERAL

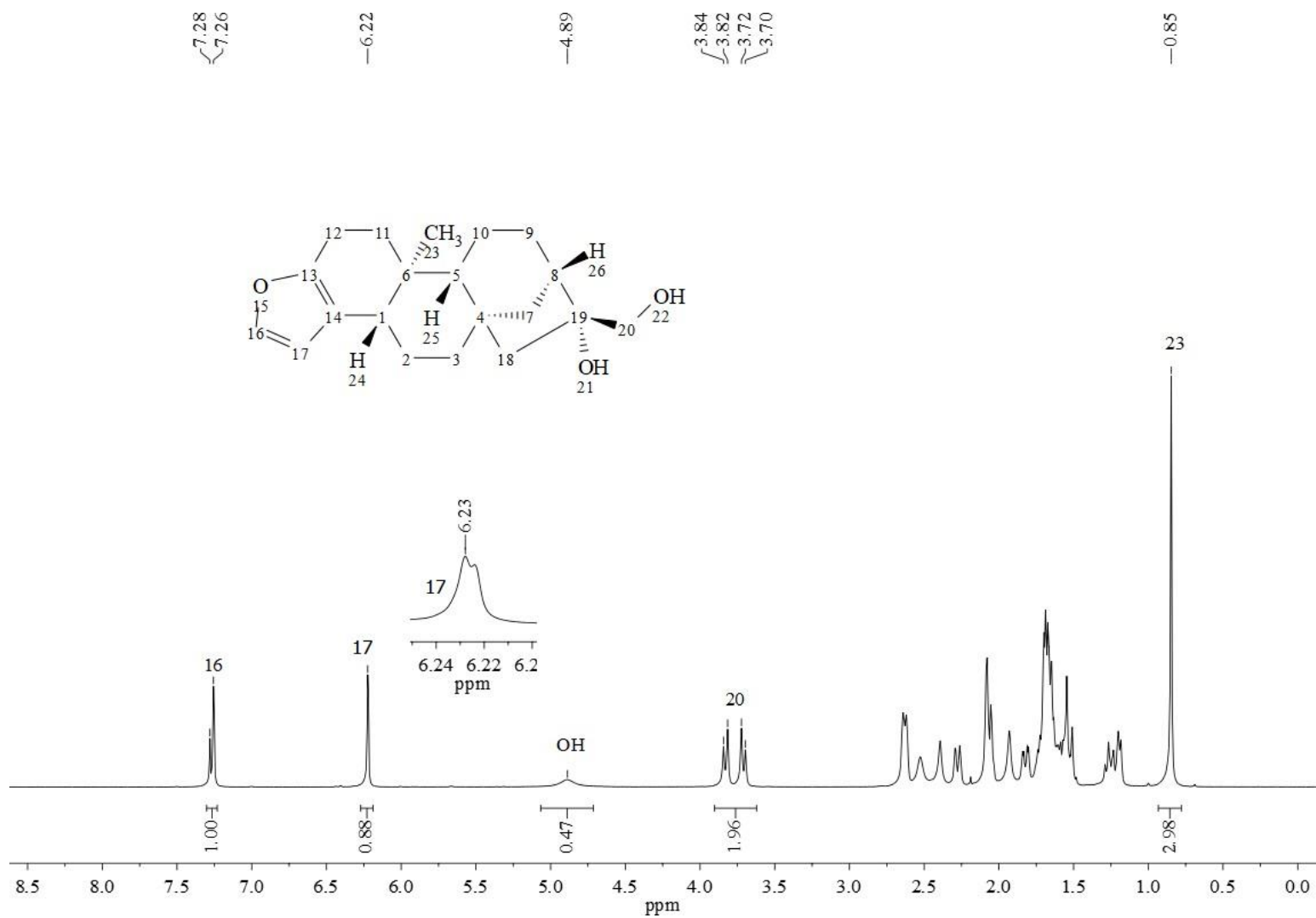
Até o momento neste trabalho, foi possível realizar um estudo químico dos componentes do café através dos extratos hexânico e etanólico, sendo confirmada a presença dos diterpenos (cafestol e kahweol) na fração lipídica, e no extrato etanólico constatou-se a presença de cafeína, trigonelina e ácido clorogênico. Além disso, foram sintetizados oito derivados da cafeína com rendimentos de 51 a 95%, dentre estes os compostos **CAF-*p*-Cresol**, **CAF- Tirosol**, **CAF-Paracetamol** e **Caf-Cumarina** são inéditos, sendo reportados pela primeira vez na literatura suas sínteses.

O ensaio de inibição da enzima AChE foi realizado com todos os extratos e frações obtidos do *Coffea arabica* L., bem como o acetato de cafestol, o cafestol, a cafeína e seus derivados. A fração **F2** e o **extrato etanólico** apresentaram inibição frente a enzima nas concentrações testadas. Dentre os derivados, apenas o composto **CAF-Br** apresentou atividade significativa à 50 $\mu\text{mol L}^{-1}$. Ao mesmo tempo, o estudo por *docking* molecular apresentou resultados em conformidade com os dados experimentais. Estes estudos são inéditos e promissores, dando a possibilidade ao desenvolvimento e otimização de estruturas promissoras.

Este trabalho abre perspectivas para se trabalhar na otimização da técnica de purificação dos diterpenos e ácidos clorogênicos afim de realizar hibridações moleculares de novos derivados e testá-los em alvos de interesse. Além disso, os estudos sugerem que a síntese de derivados de cafeína halogenados são promissores, levando em consideração os resultados de inibição da AChE para o **CAF-Br**.

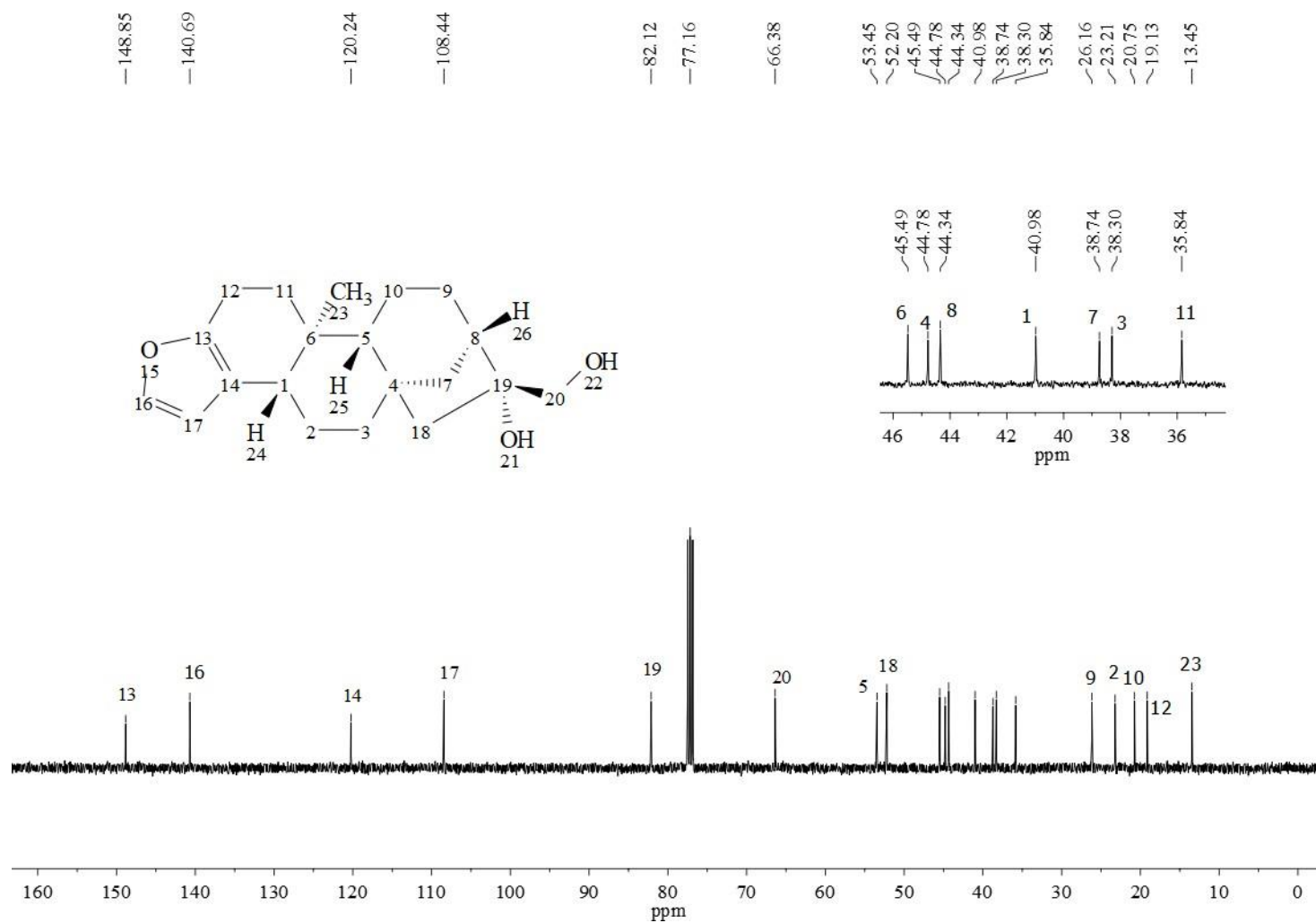
Por fim, destaca-se que as descobertas obtidas até momento possibilitam a valorização dos grãos de café como fonte útil de substâncias precursoras de produtos essenciais à indústria de fármacos, medicamentos e agroquímicos.

APENDICE A – Espectros

Figura 21 – Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) do **Cafestol**.

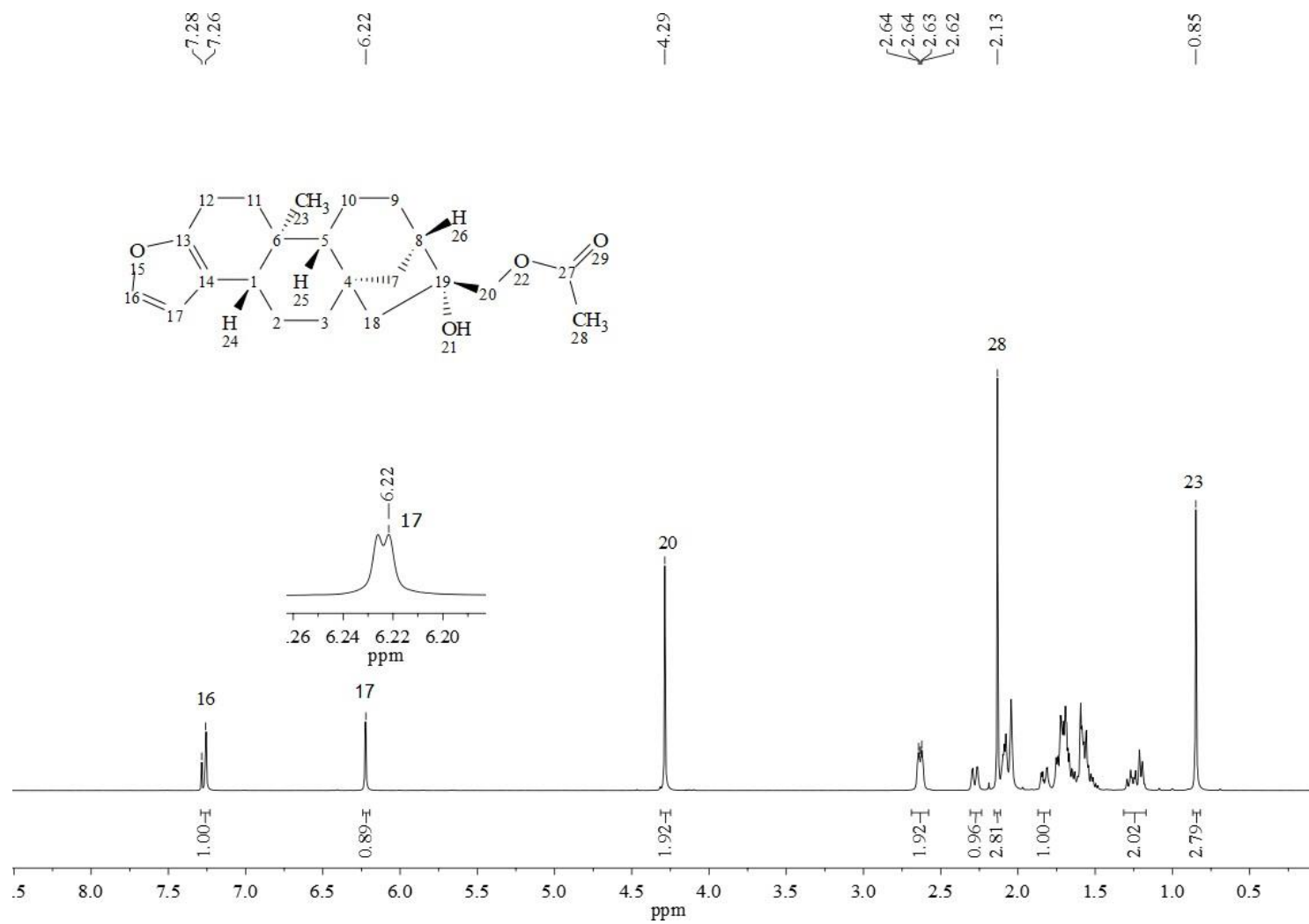
Fonte: autoria própria.

Figura 22 – Espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) do **Cafestol**.



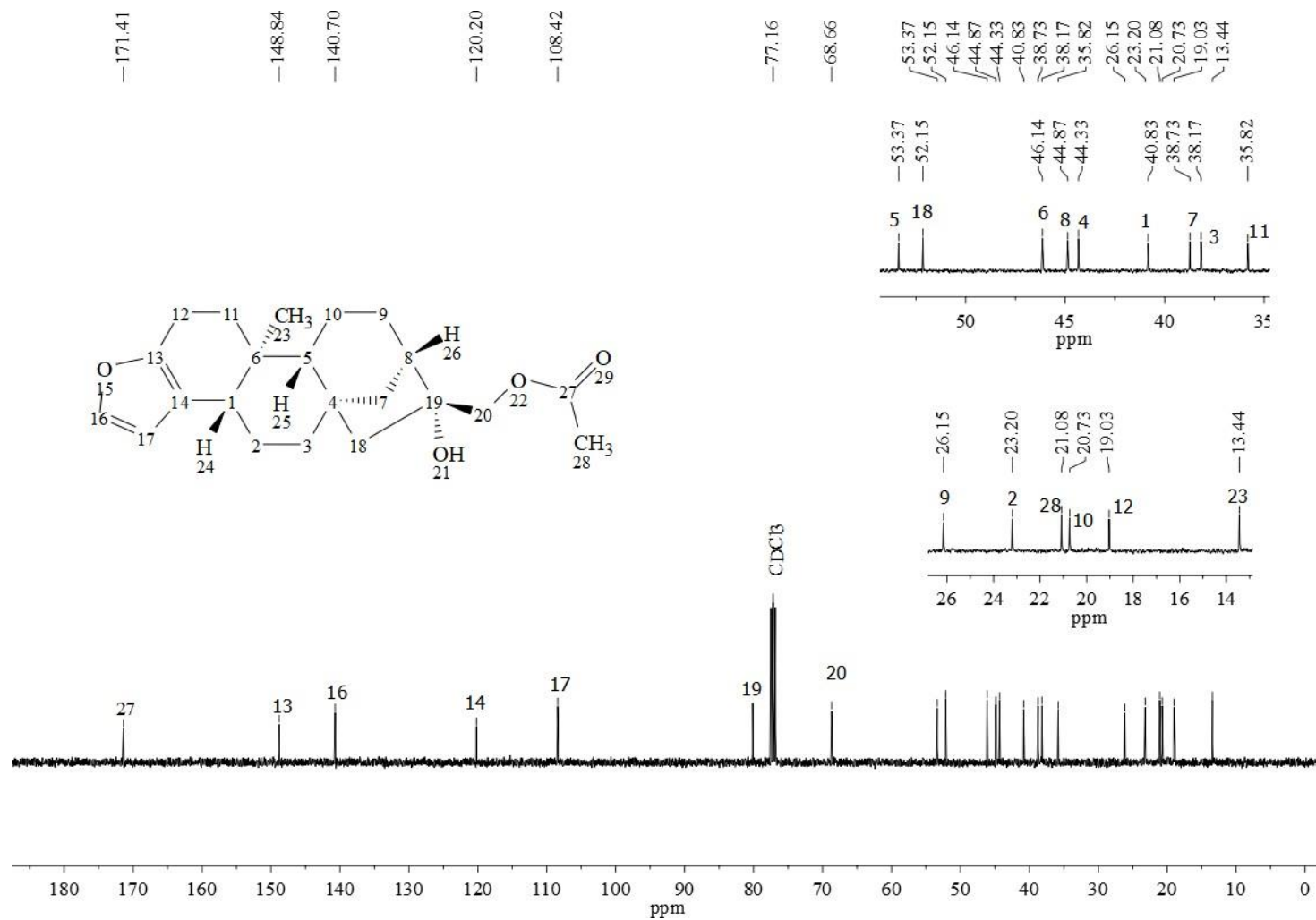
Fonte: autoria própria.

Figura 23 – Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) do Acetato de Cafestol.



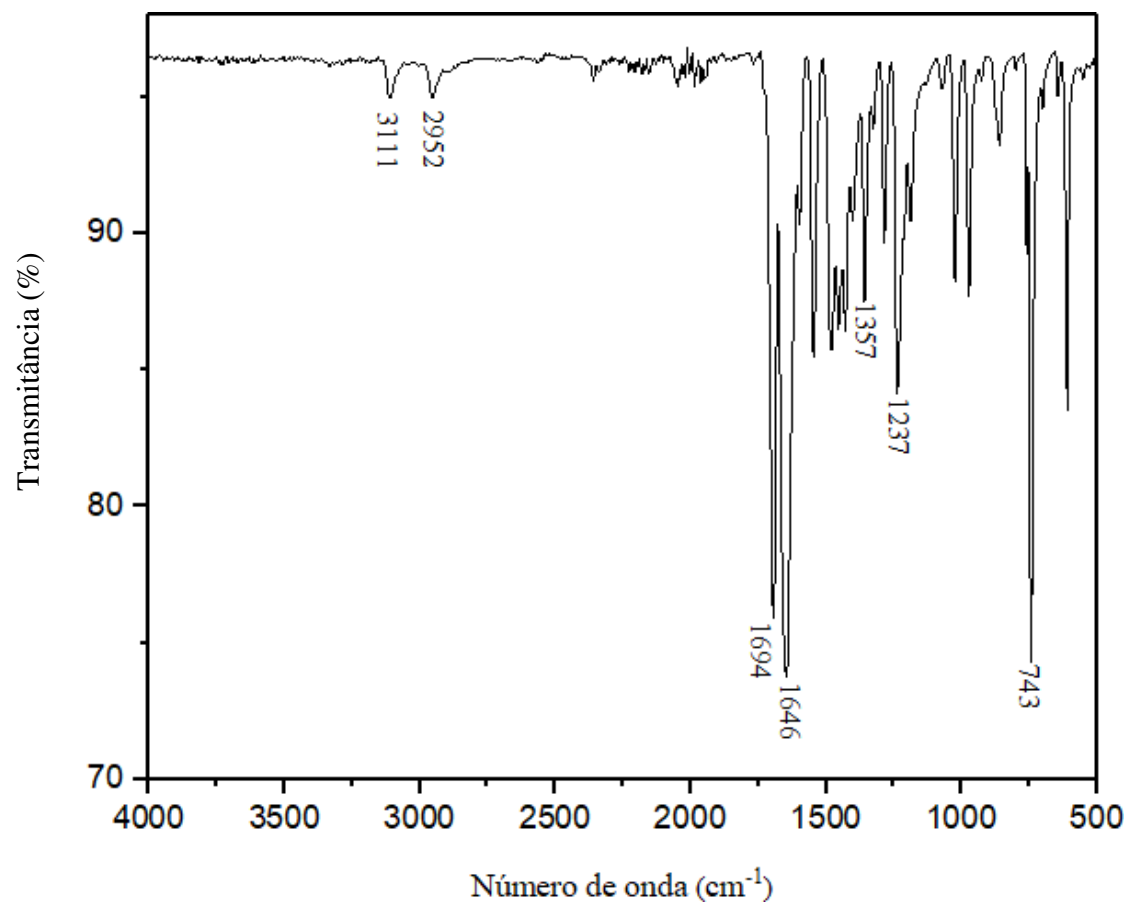
Fonte: autoria própria.

Figura 24 – Espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) do Acetato de Cafestol.



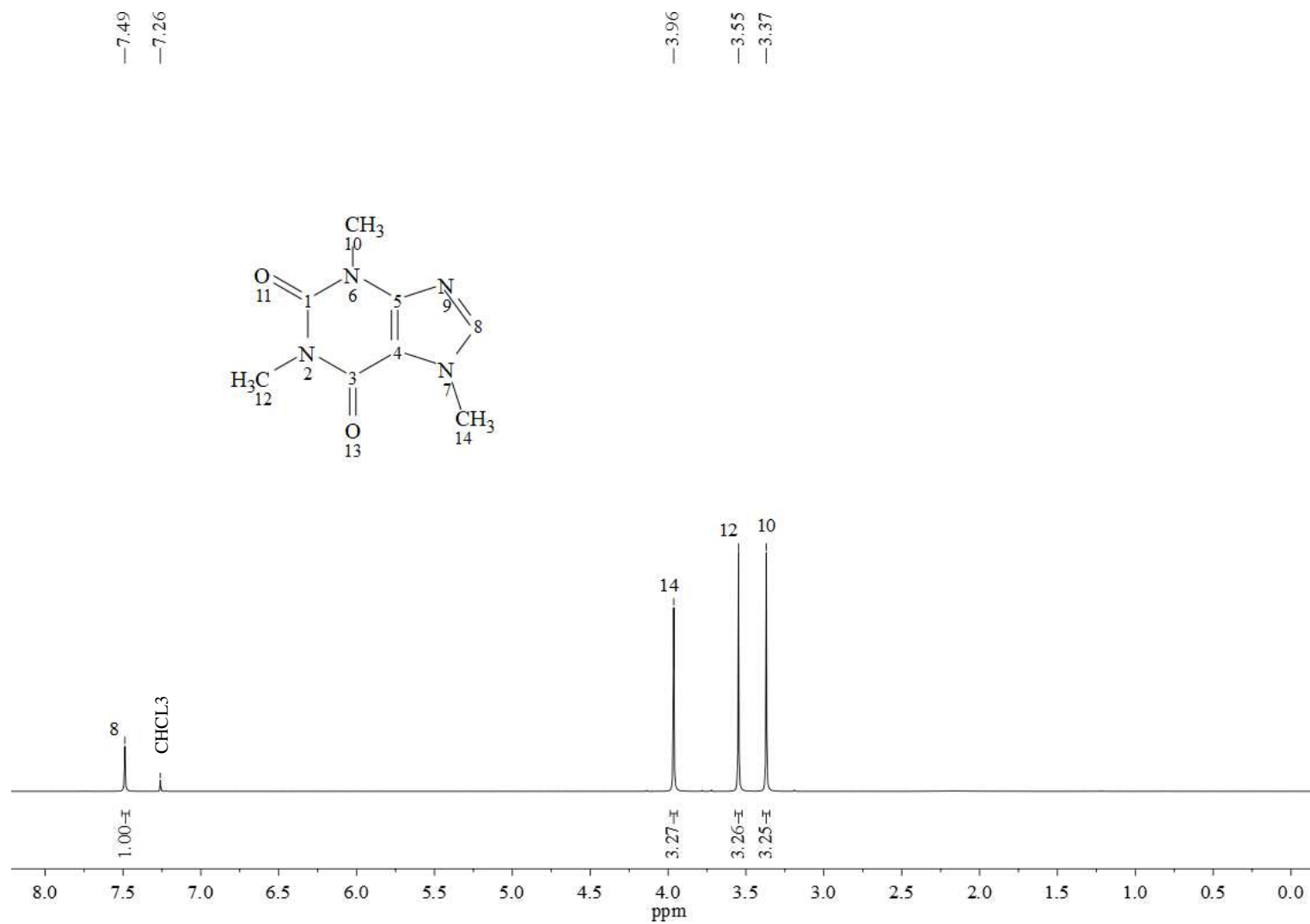
Fonte: autoria própria.

Figura 25 – Espectro no Infravermelho (ATR) da **Cafeína**.



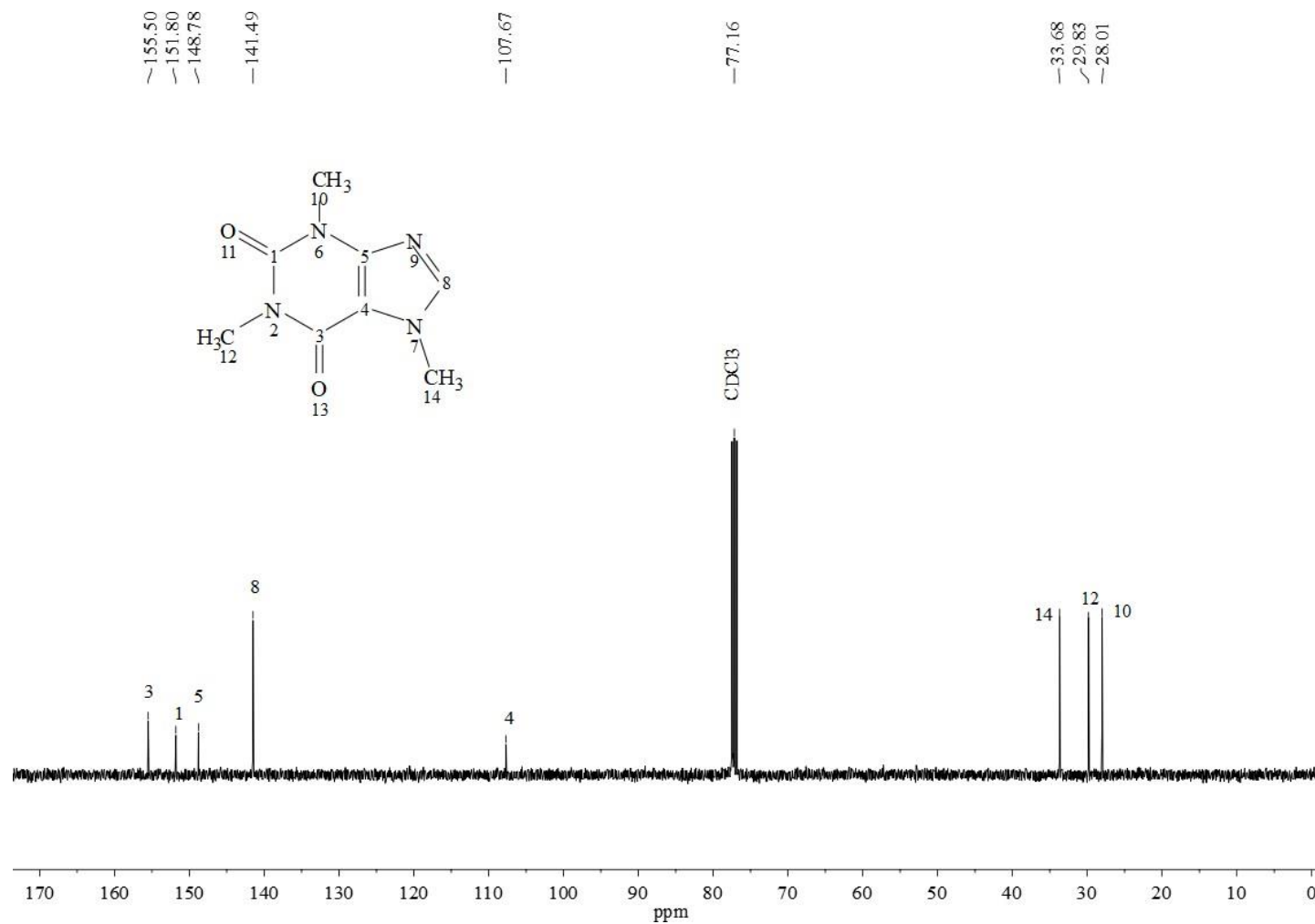
Fonte: autoria própria.

Figura 26 – Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) da **Cafeína**.



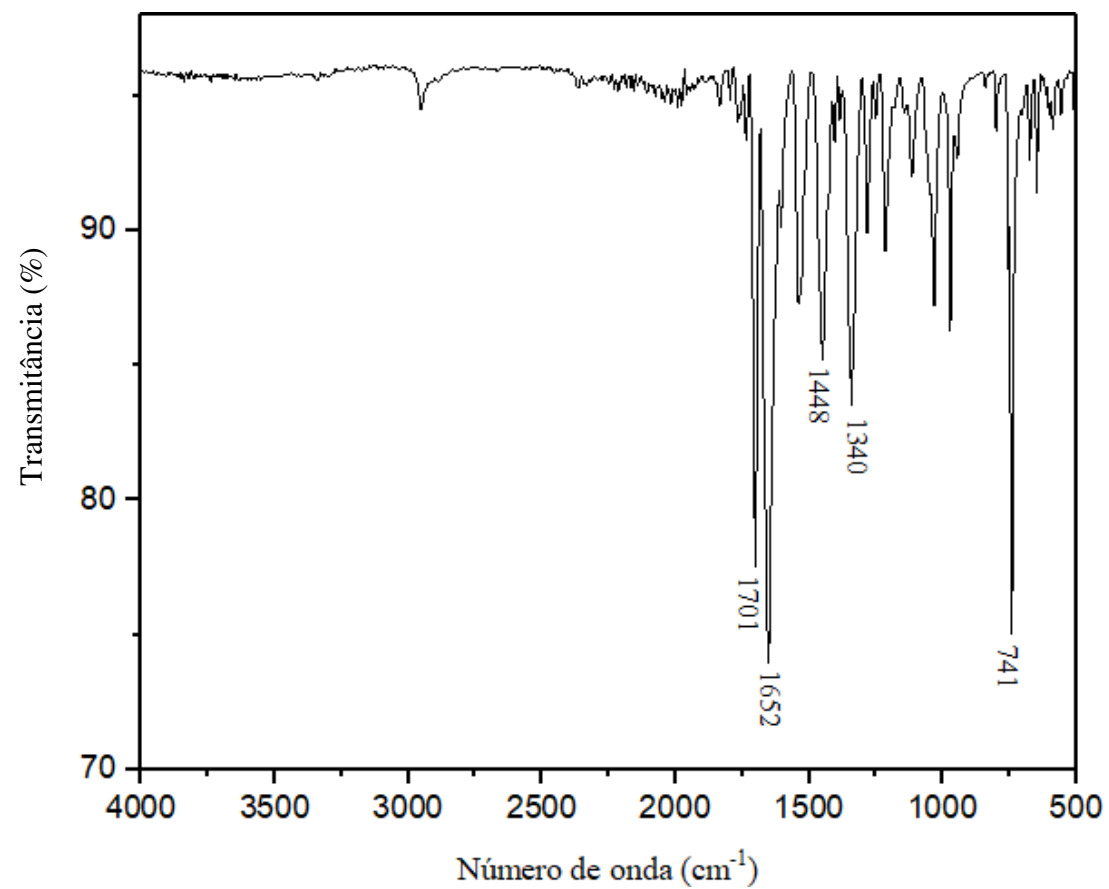
Fonte: autoria própria.

Figura 27 – Espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) da Cafeína.



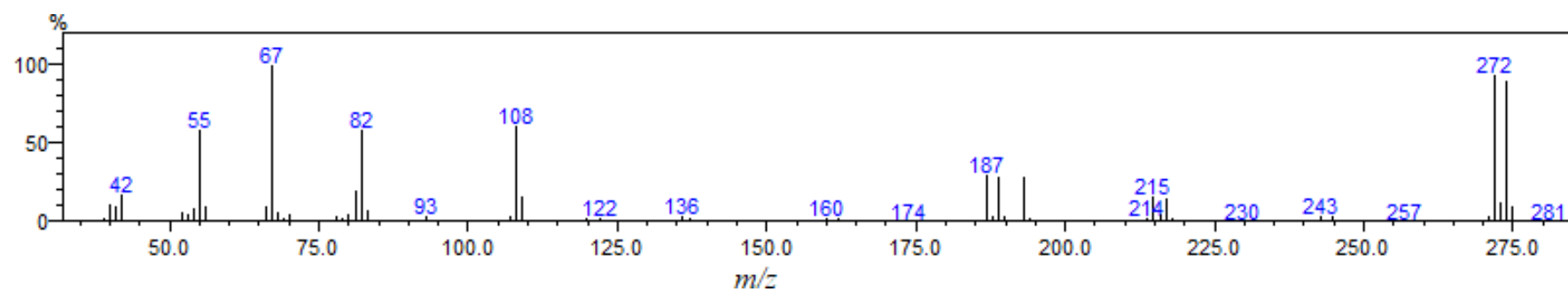
Fonte: autoria própria.

Figura 28 – Espectro no Infravermelho (ATR) do composto **CAF-Br**.



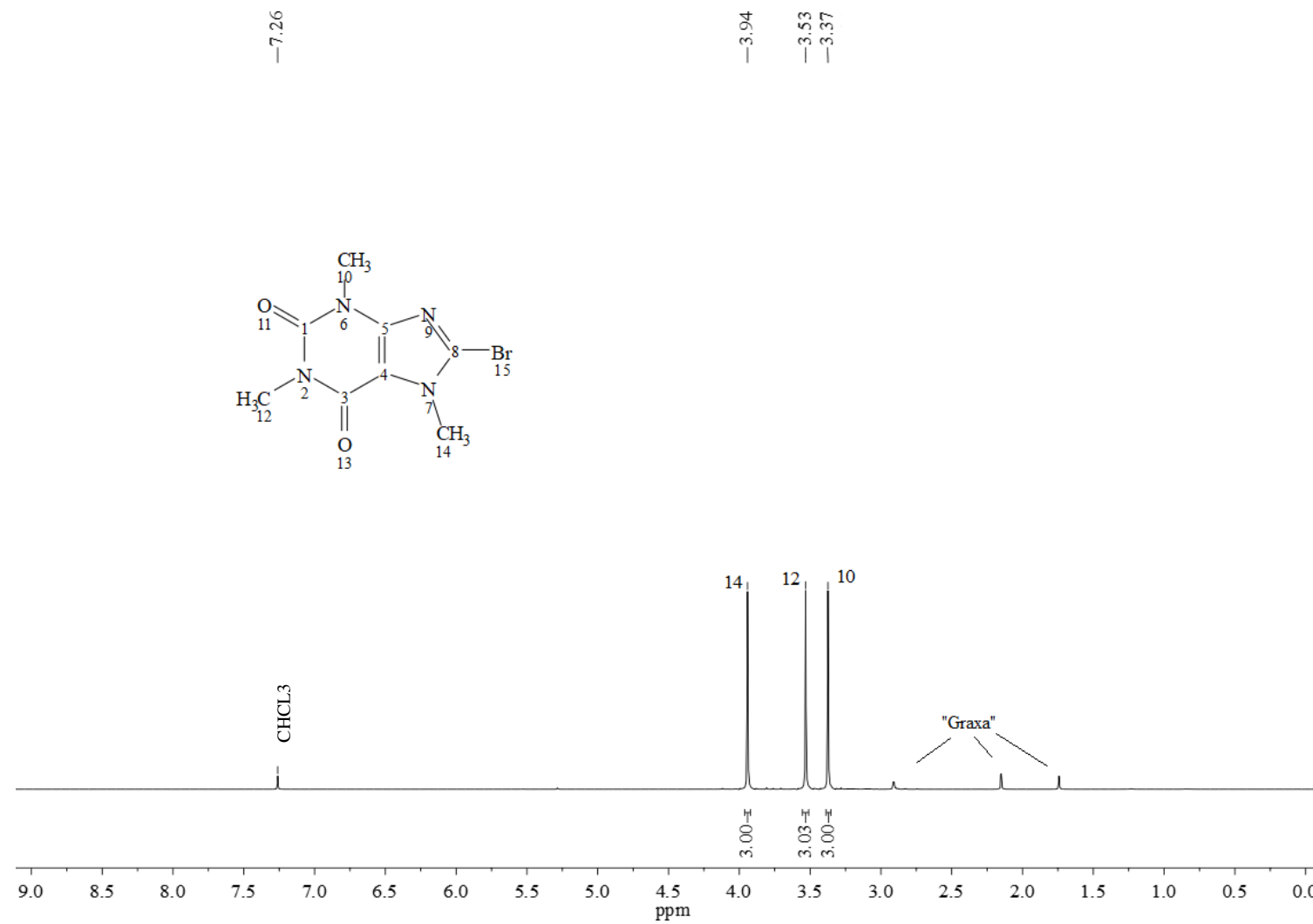
Fonte: autoria própria.

Figura 29 – Espectro de Massas (IE, 70 eV) do composto **CAF-Br**.



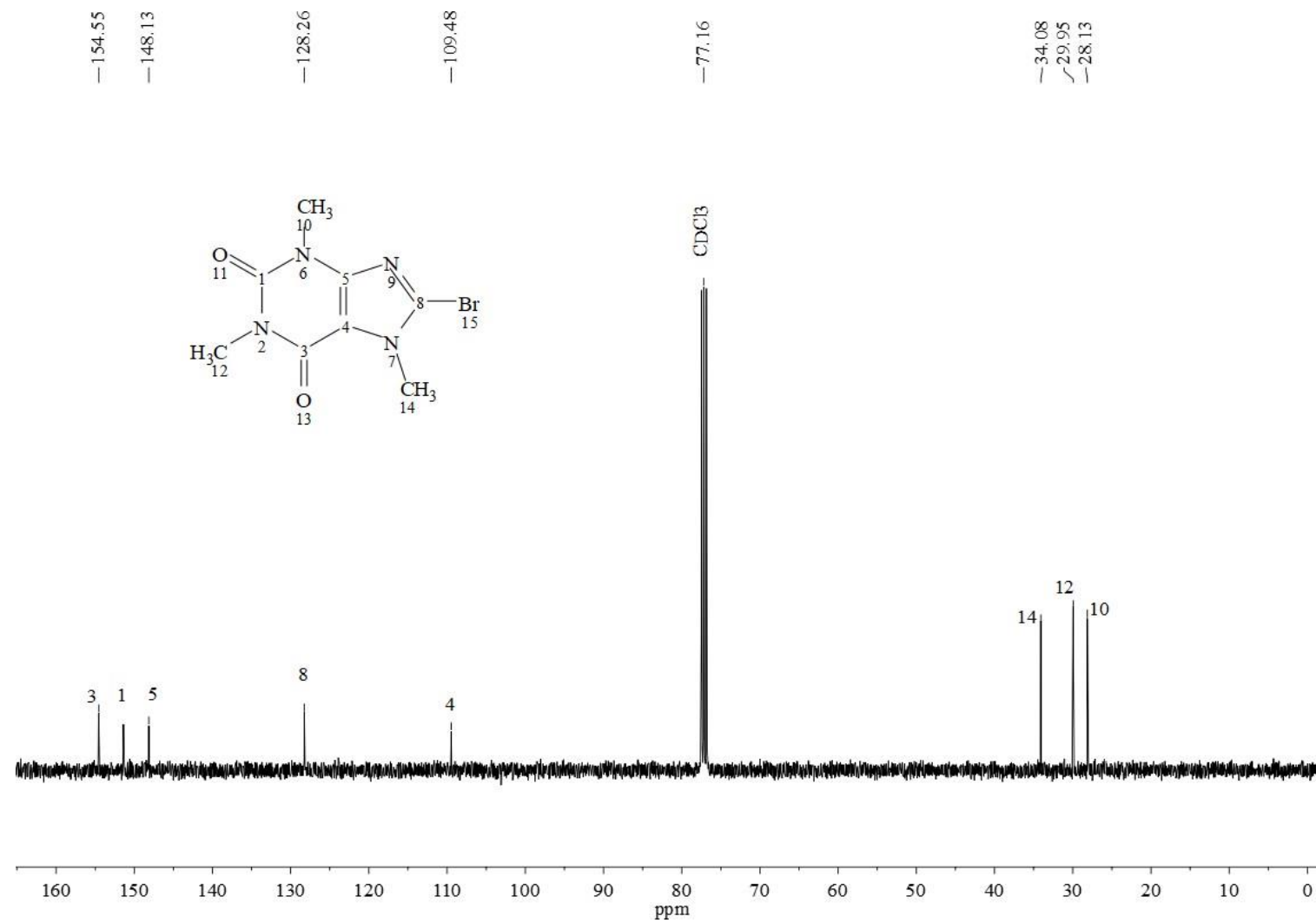
Fonte: autoria própria.

Figura 30 – Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) do composto CAF-Br.



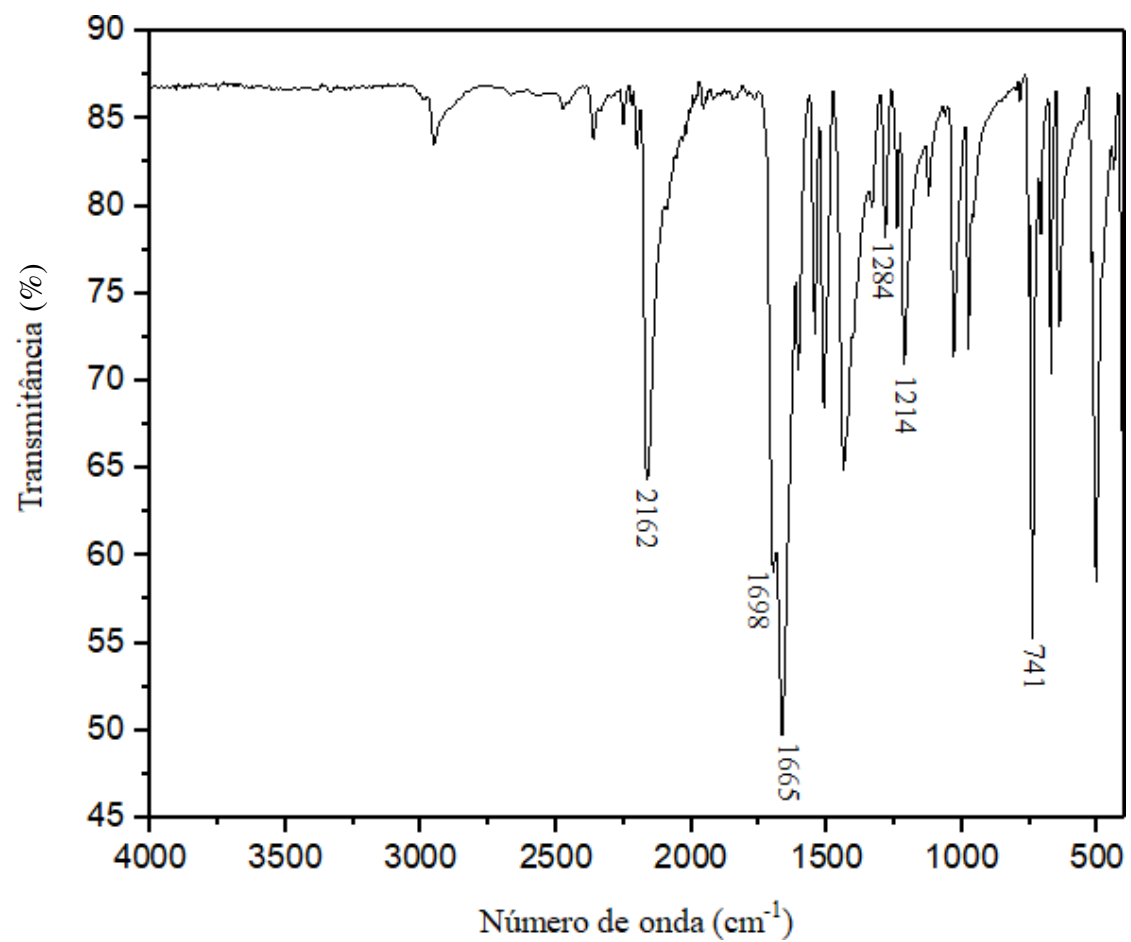
Fonte: autoria própria.

Figura 31 – Espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) do composto CAF-Br.



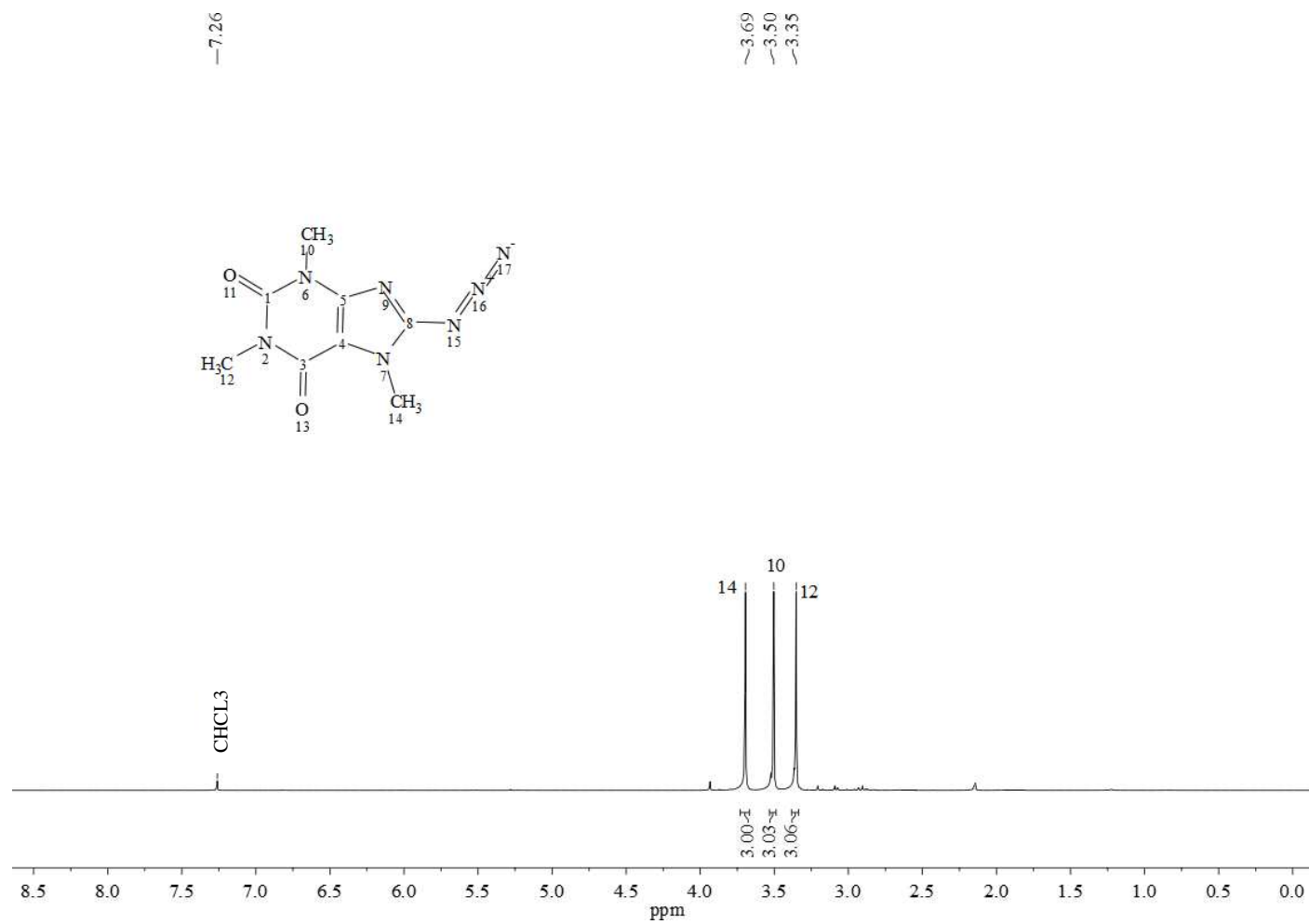
Fonte: autoria própria.

Figura 32 – Espectro no Infravermelho (ATR) do composto CAF-N₃.



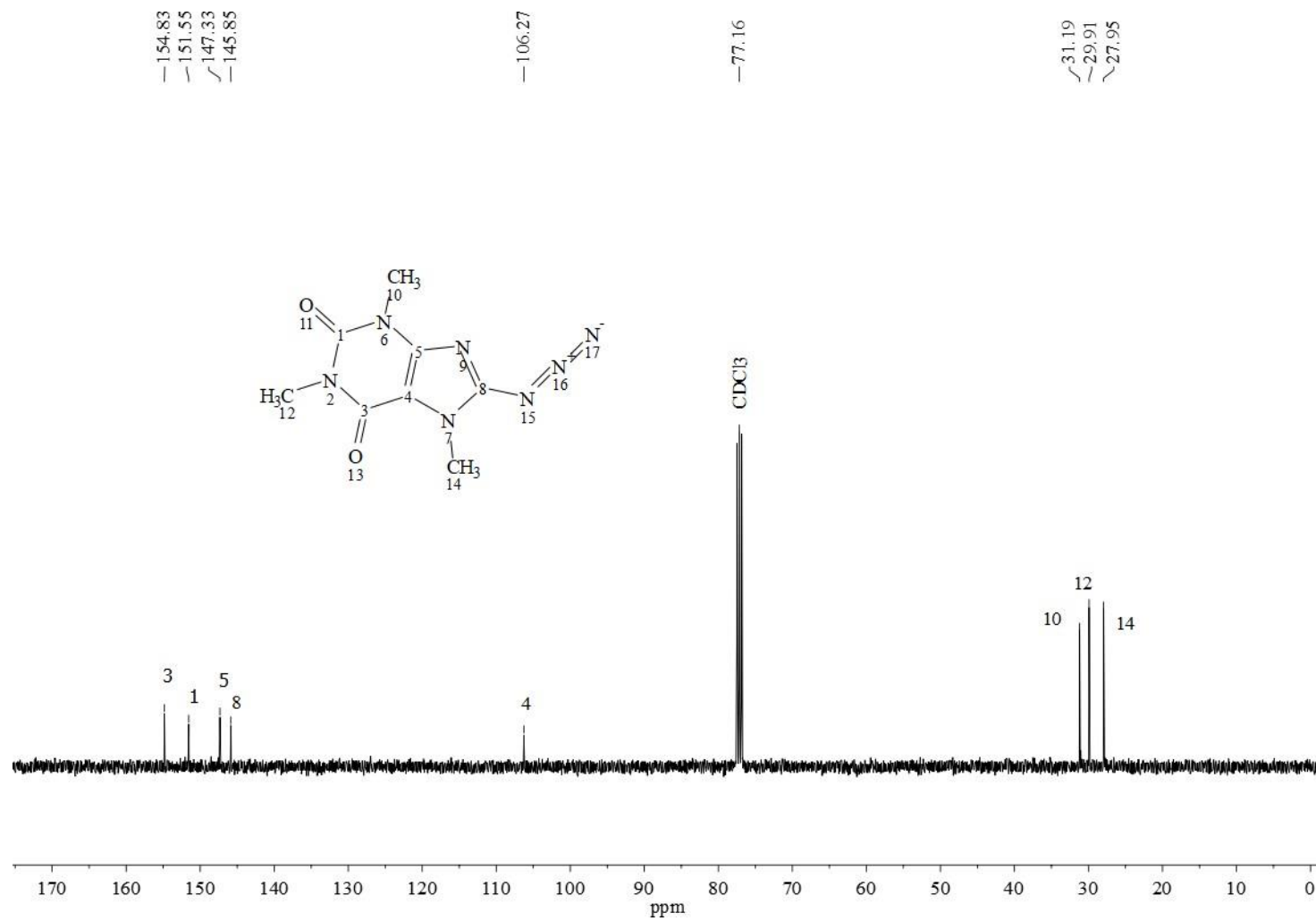
Fonte: autoria própria.

Figura 33 – Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) do composto **CAF-N₃**.



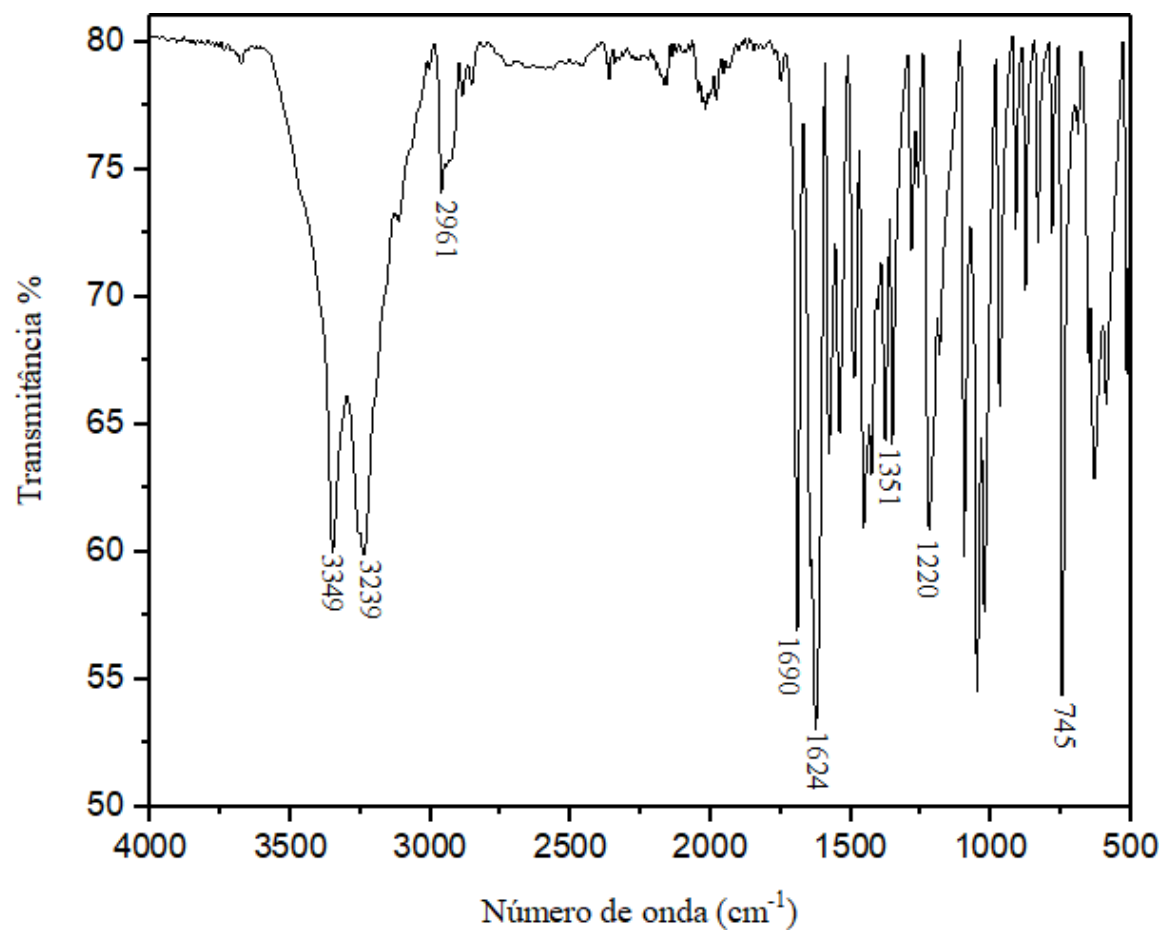
Fonte: autoria própria.

Figura 34 – Espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) do composto CAF- N_3 .



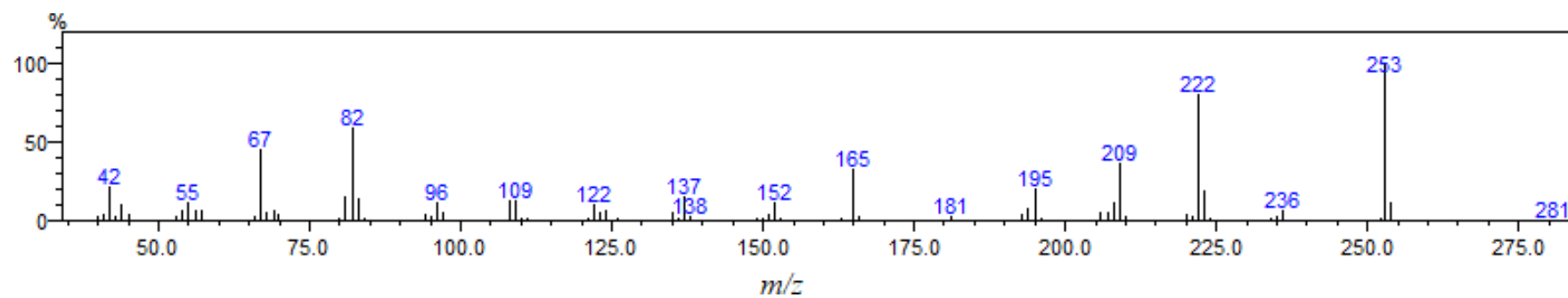
Fonte: autoria própria.

Figura 35 – Espectro no Infravermelho (ATR) do composto CAF-Etanolamina.



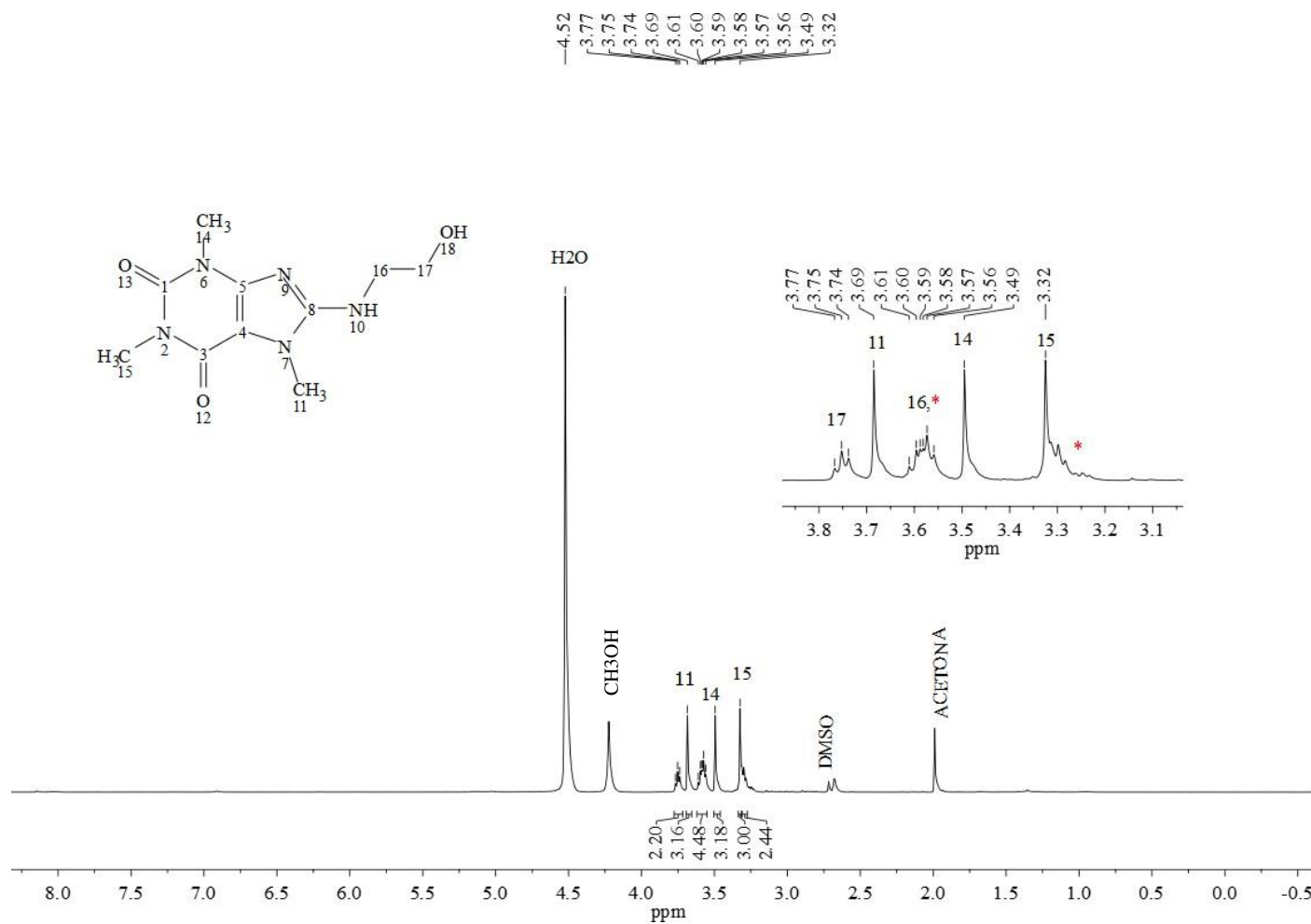
Fonte: autoria própria.

Figura 36 – Espectro de Massas (IE, 70 eV) do composto **CAF-Etanolamina**.



Fonte: autoria própria.

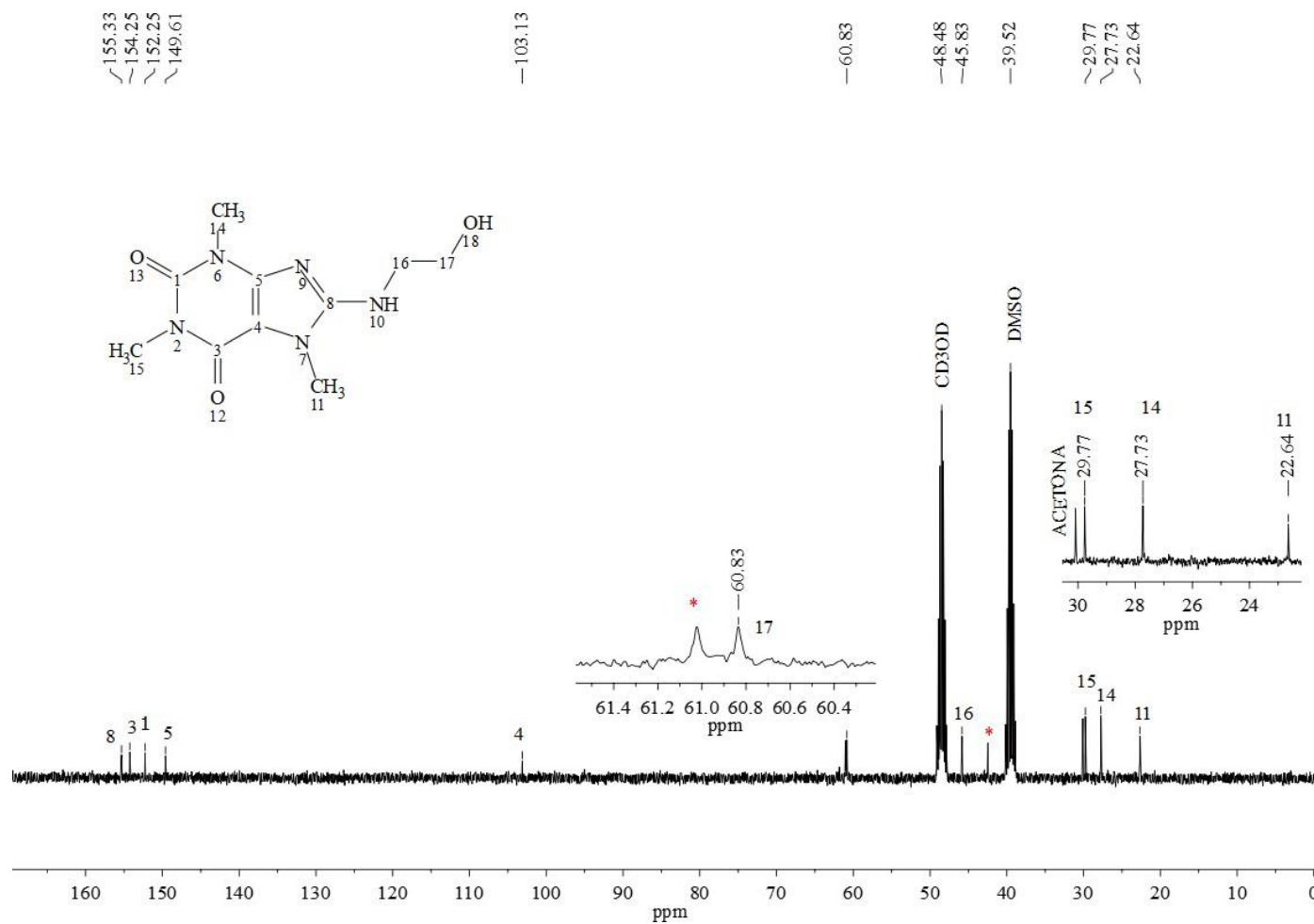
Figura 37 – Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, MeOD) do composto **CAF-Etanolamina**.



Fonte: autoria própria.

*Contaminação com reagente de partida (etanolamina).

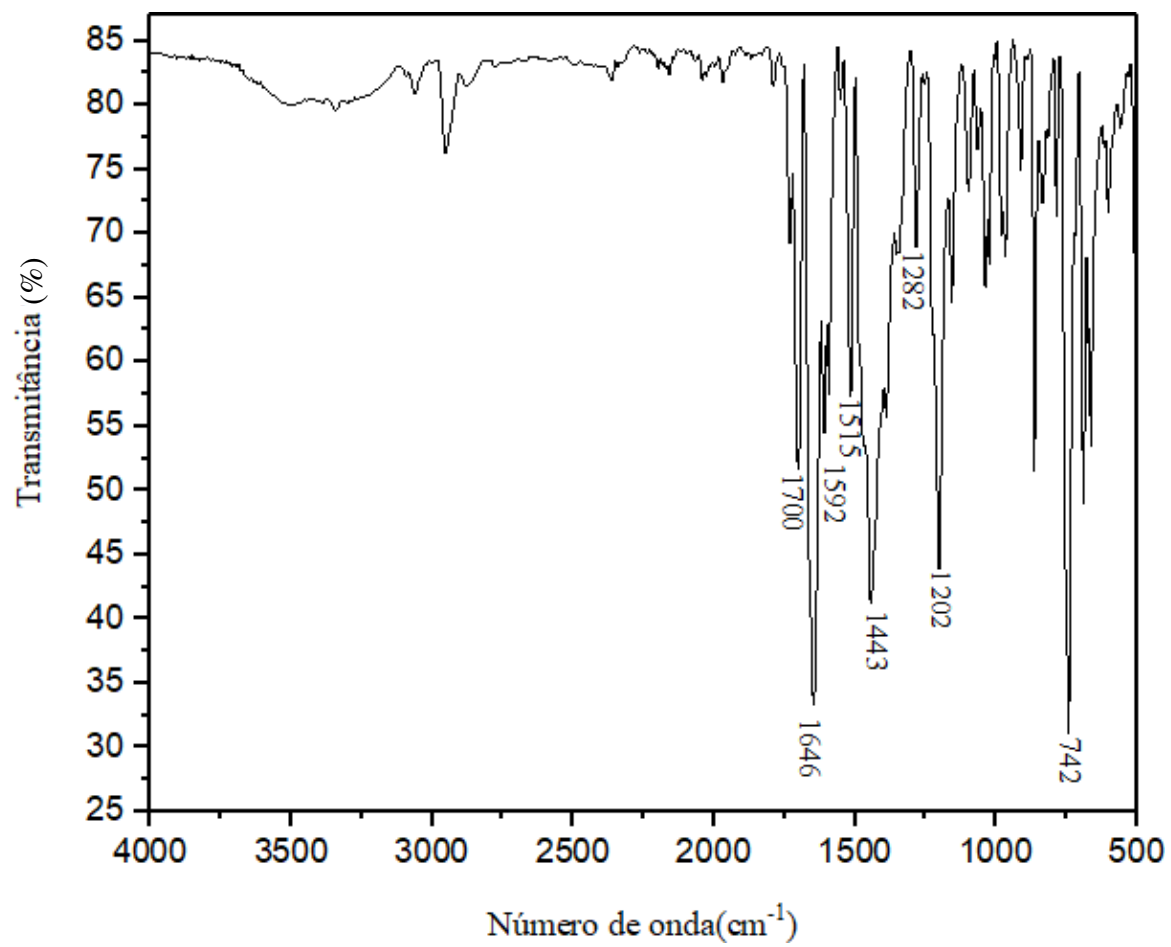
Figura 38 – Espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz, MeOD) do composto **CAF-Etanolamina**.



Fonte: autoria própria.

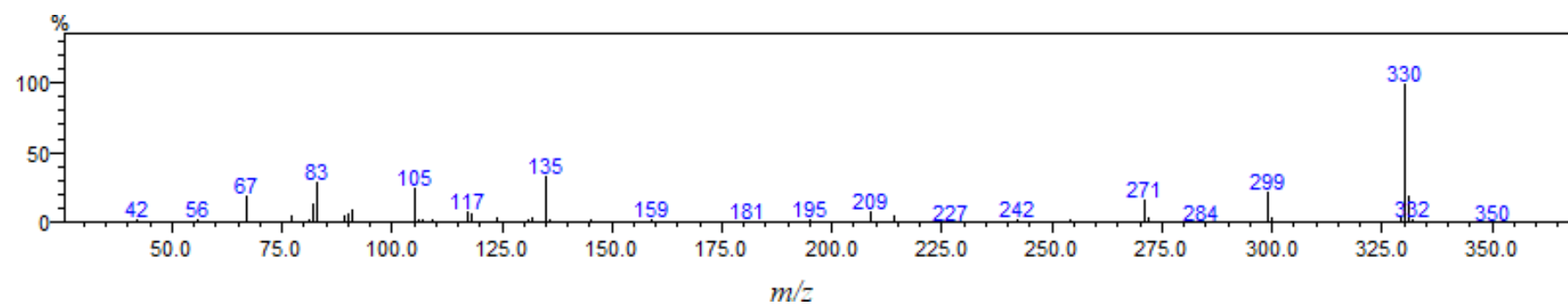
* Contaminação com reagente de partida (etanolamina)

Figura 39 – Espectro no Infravermelho (ATR) do composto **CAF-Fenol**.



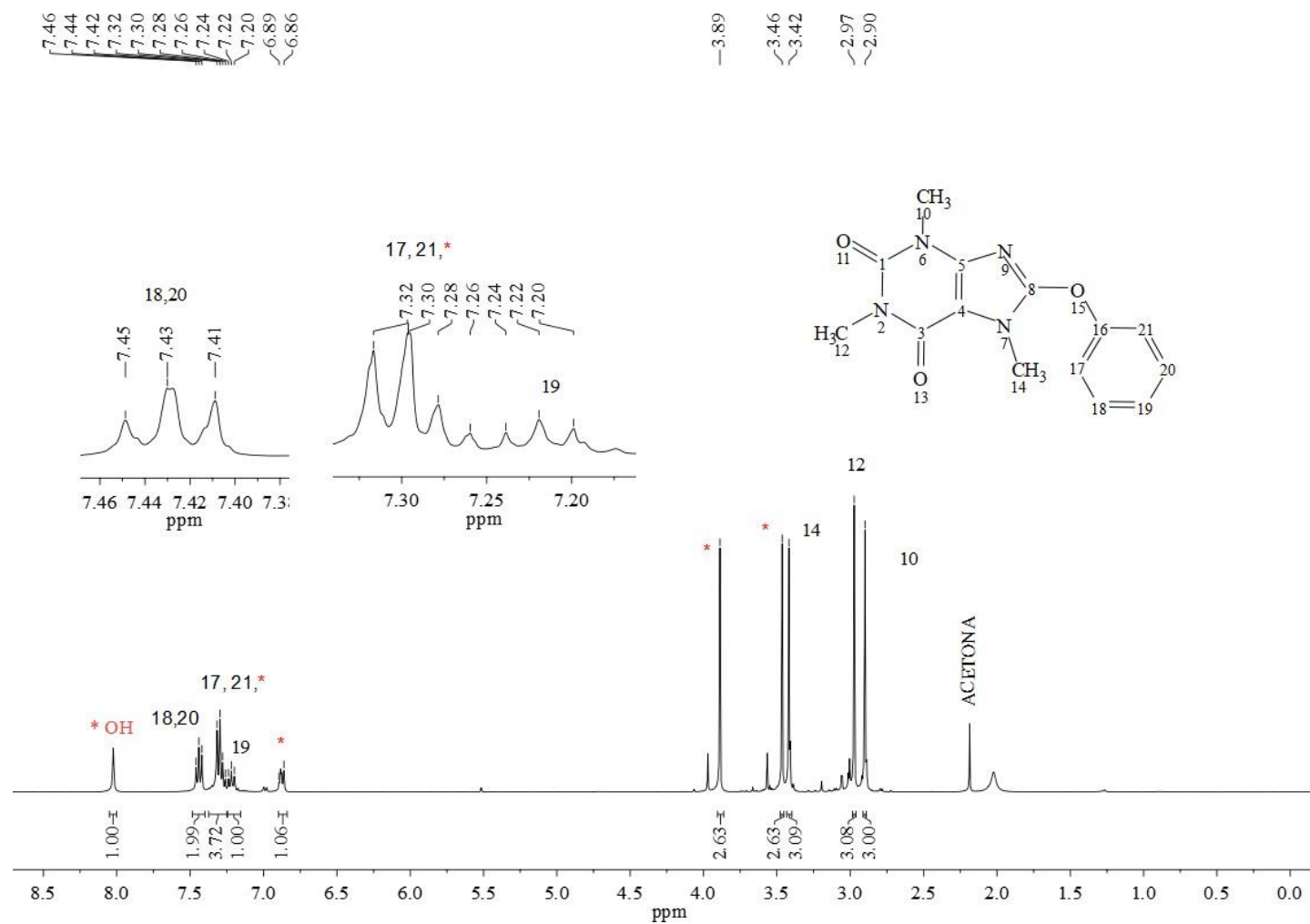
Fonte: autoria própria.

Figura 40 – Espectro de Massas (IE, 70 eV) do composto **CAF-Fenol**.



Fonte: autoria própria.

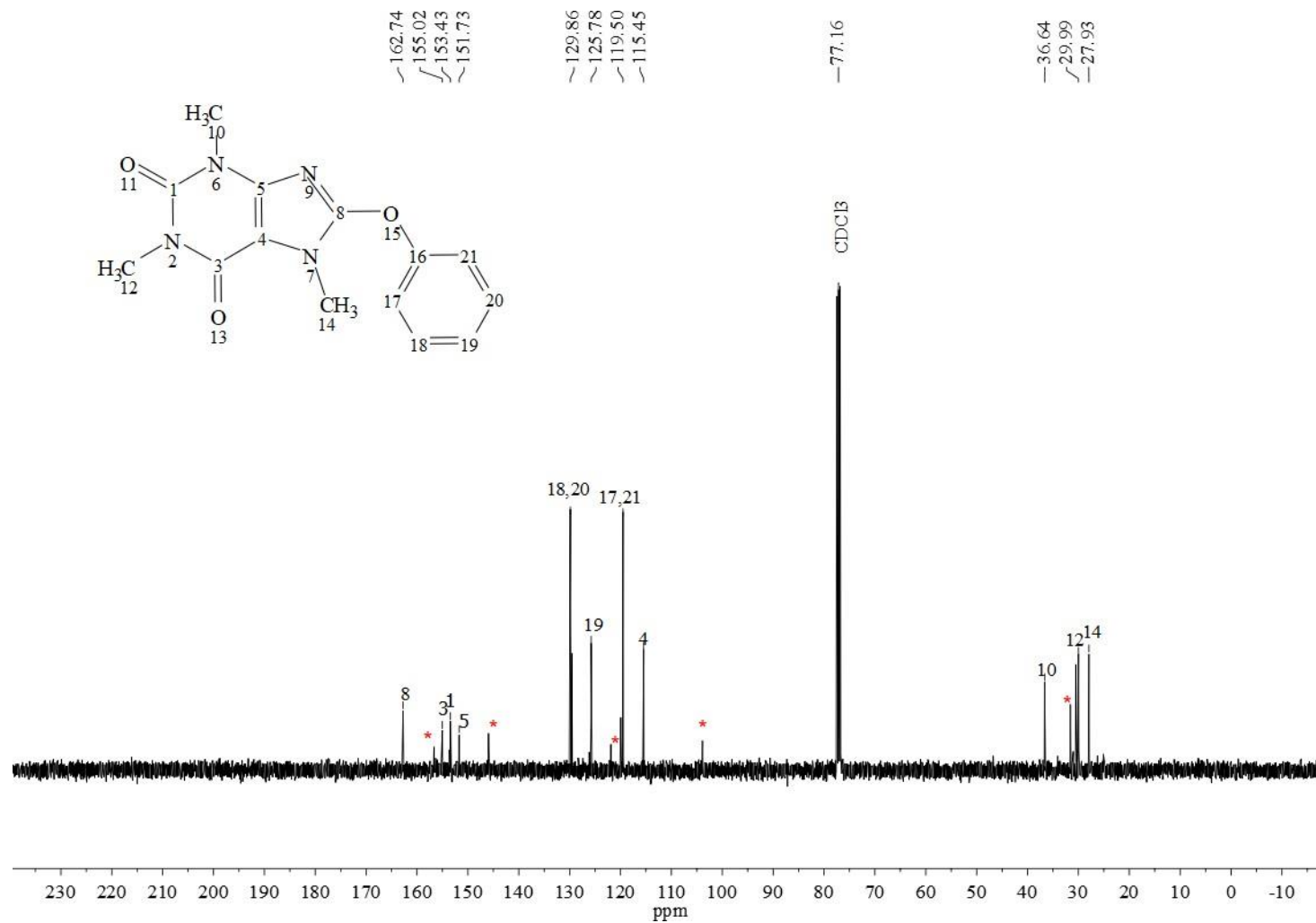
Figura 41 – Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) do composto CAF-Fenol.



Fonte: autoria própria.

*Contaminação com reagentes de partida (CAF-Br e fenol).

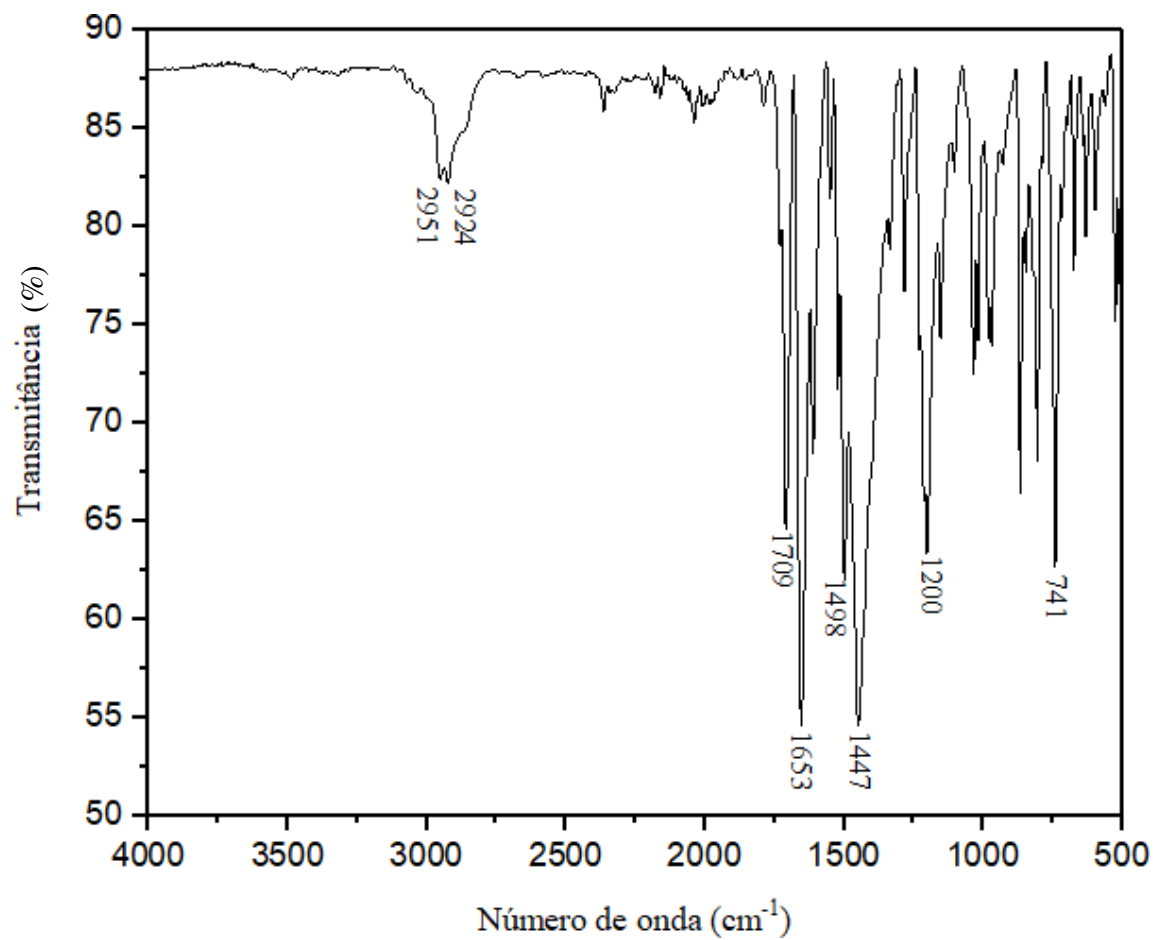
Figura 42 – Espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) do composto **CAF-Fenol**.



Fonte: autoria própria.

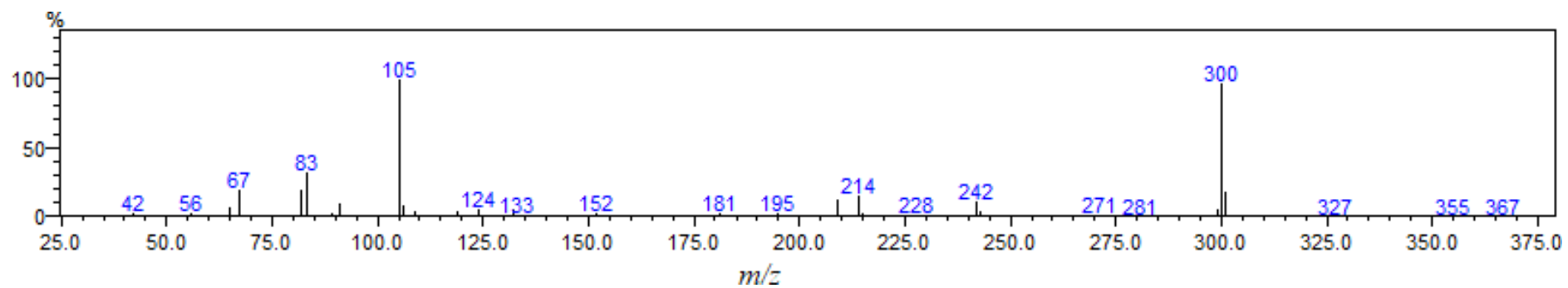
*Contaminação com reagentes de partida (**CAF-Br** e fenol).

Figura 43 – Espectro no Infravermelho (ATR) do composto CAF-*p*-Cresol.



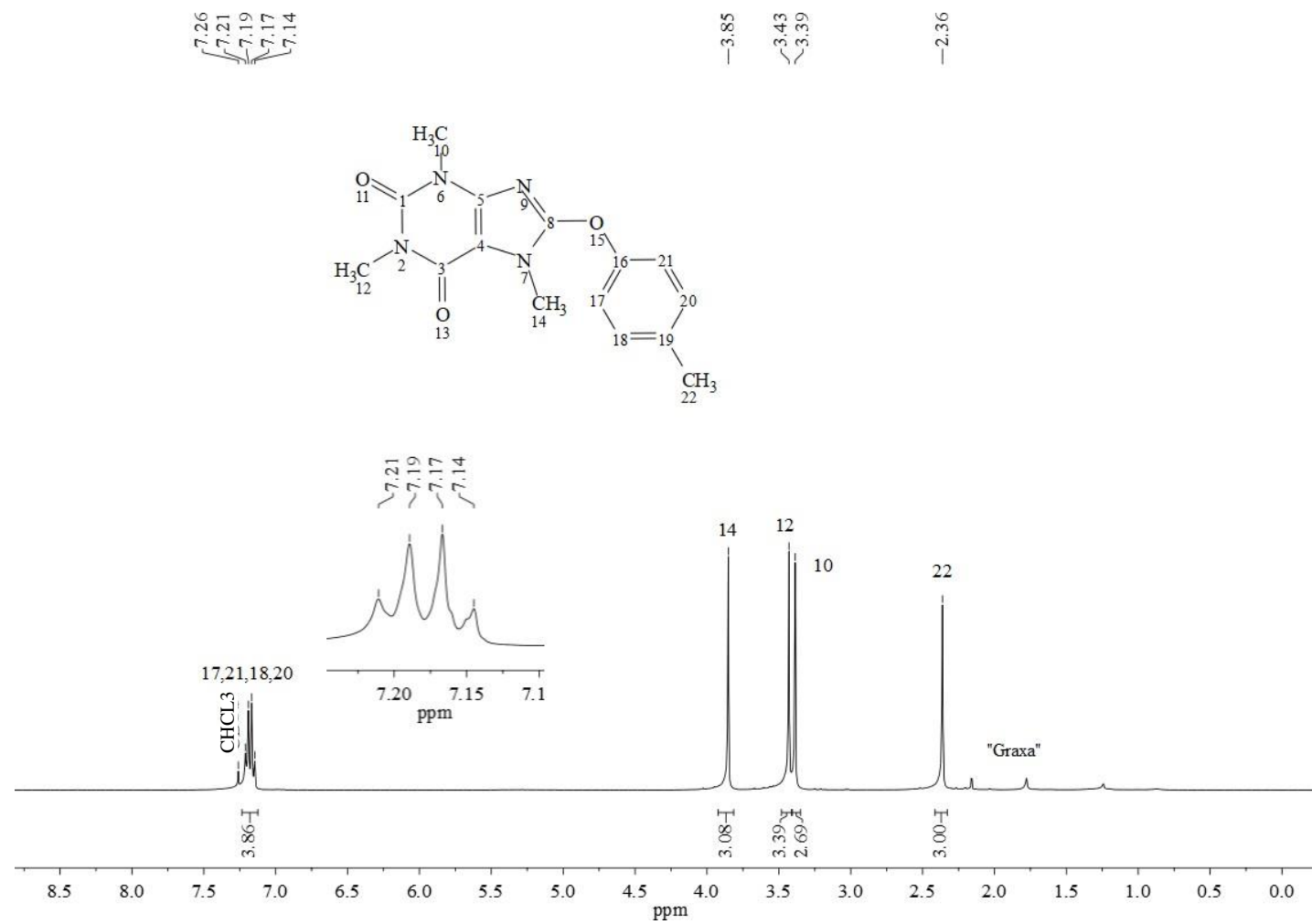
Fonte: autoria própria.

Figura 44 – Espectro de Massas (IE, 70 eV) do composto **CAF-*p*-Cresol**.



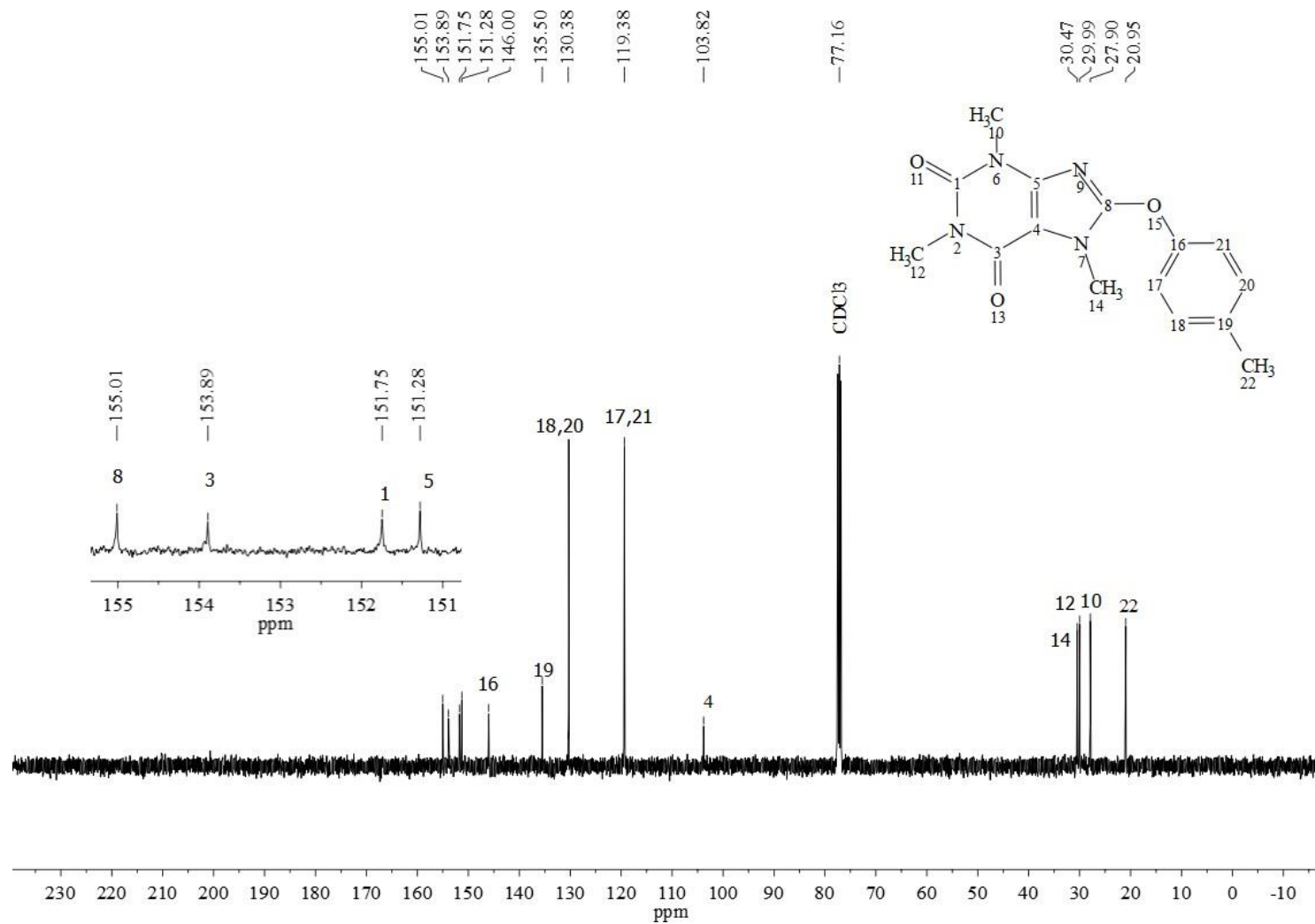
Fonte: autoria própria.

Figura 45 – Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) do composto **CAF-*p*-Cresol**.



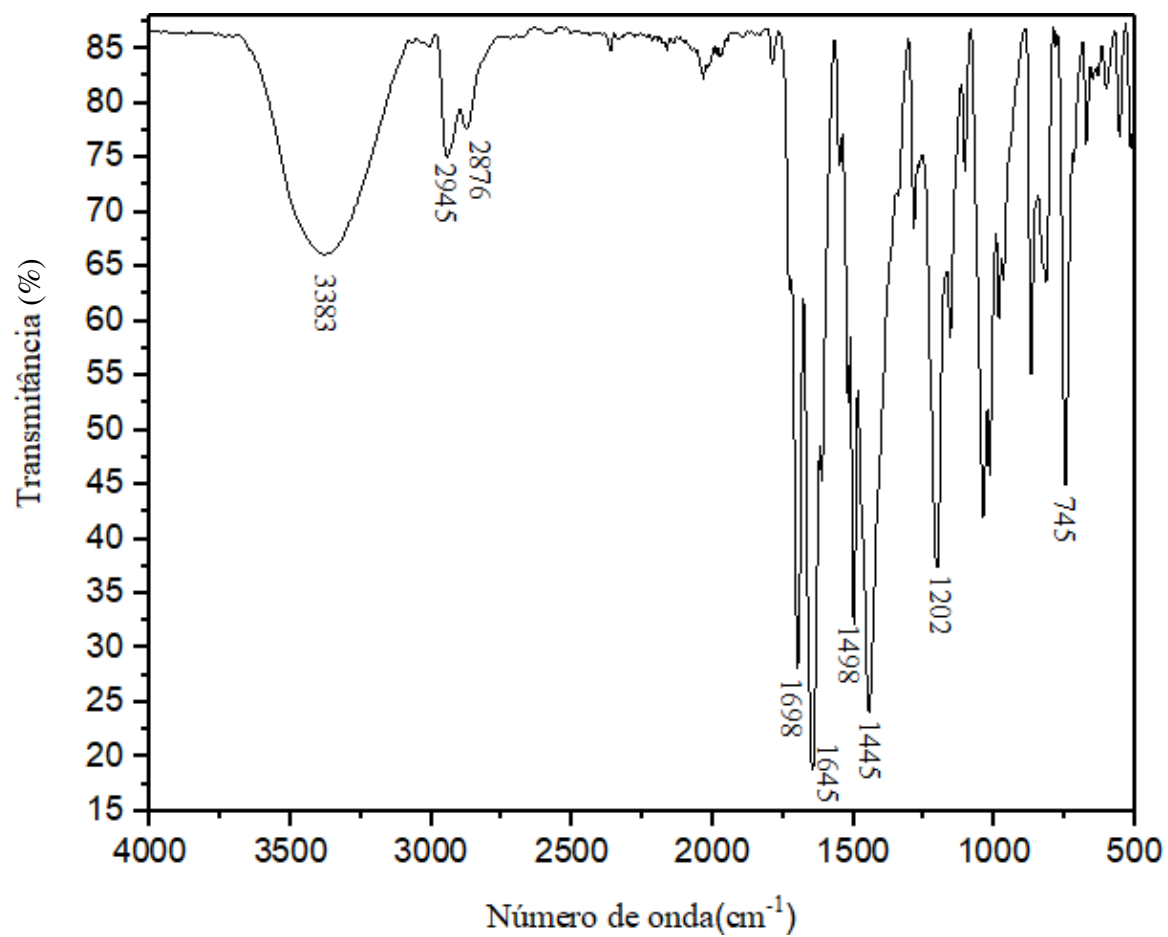
Fonte: autoria própria.

Figura 46 – Espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) do composto CAF-*p*-Cresol.



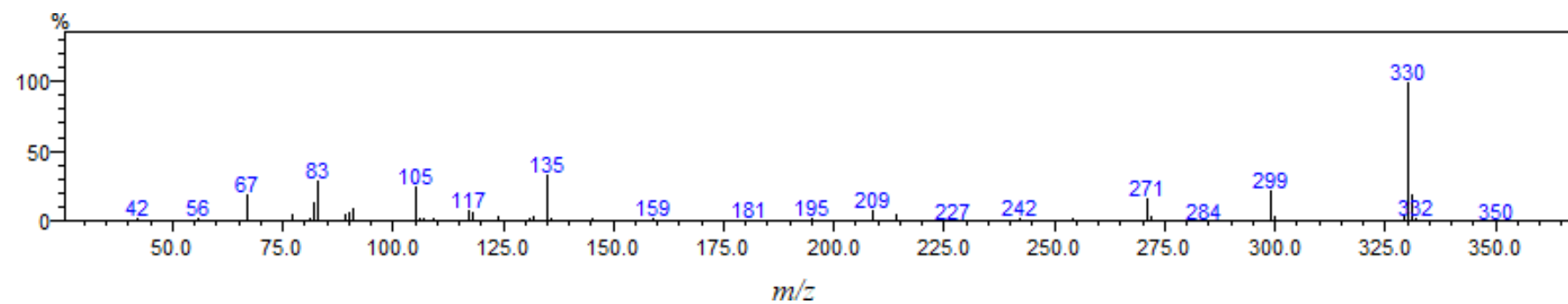
Fonte: autoria própria.

Figura 47 – Espectro no Infravermelho (ATR) do composto CAF-Tirosol.



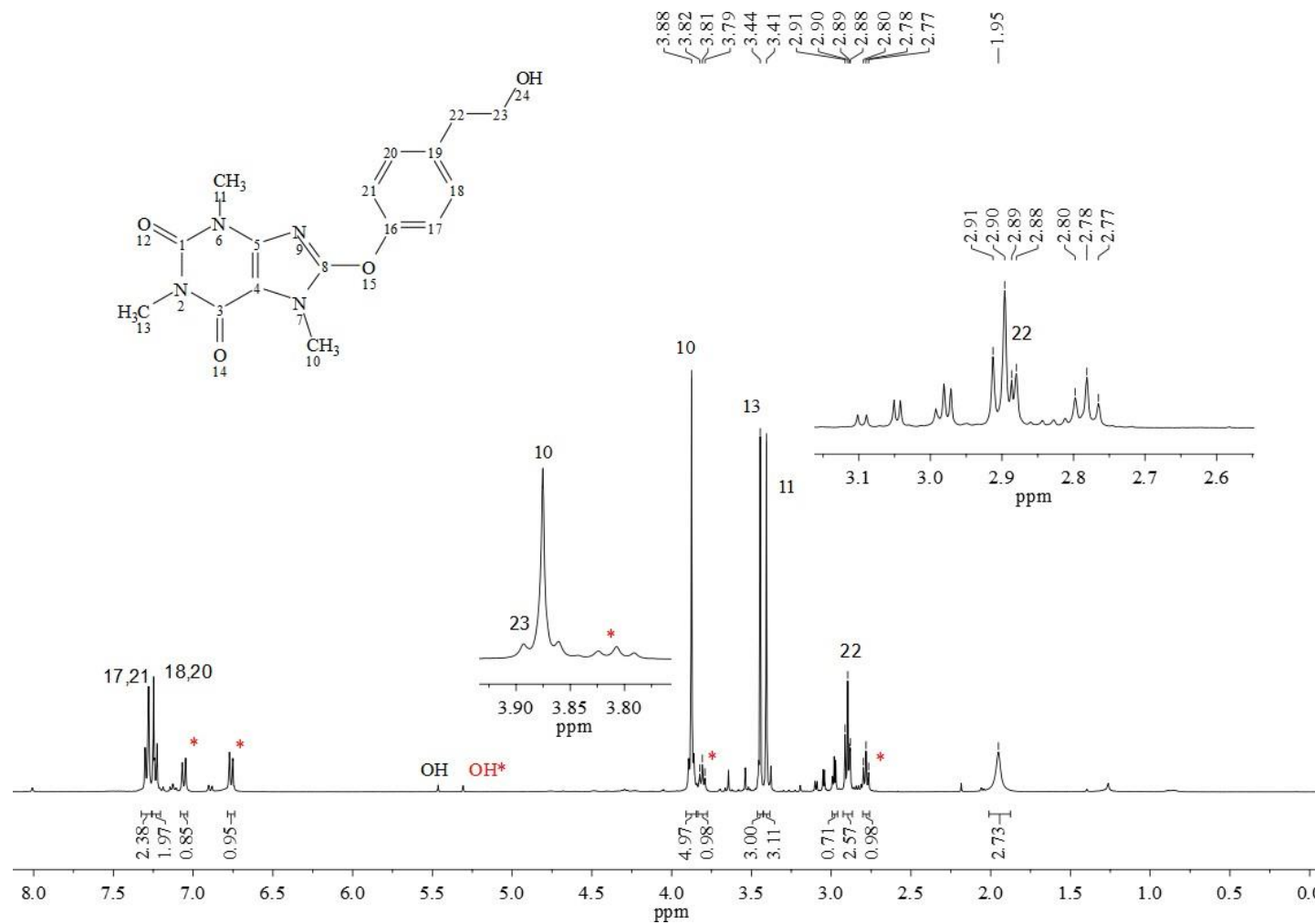
Fonte: autoria própria.

Figura 48 – Espectro de Massas (IE, 70 eV) do composto **CAF-Tirosol**.



Fonte: autoria própria.

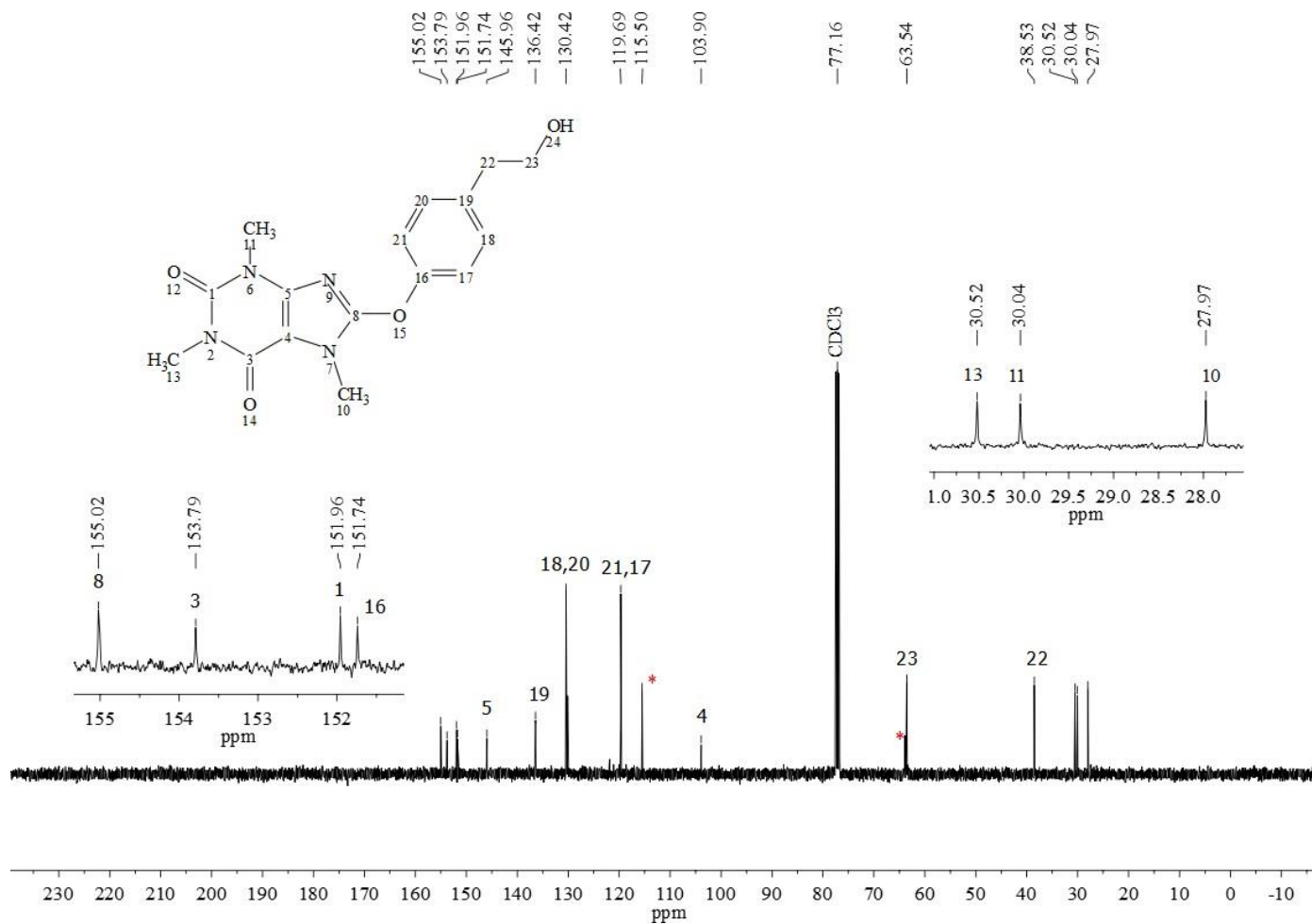
Figura 49 – Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) do composto **CAF-Tirosol**.



Fonte: autoria própria.

*Contaminado com reagente de partida (Tirosol).

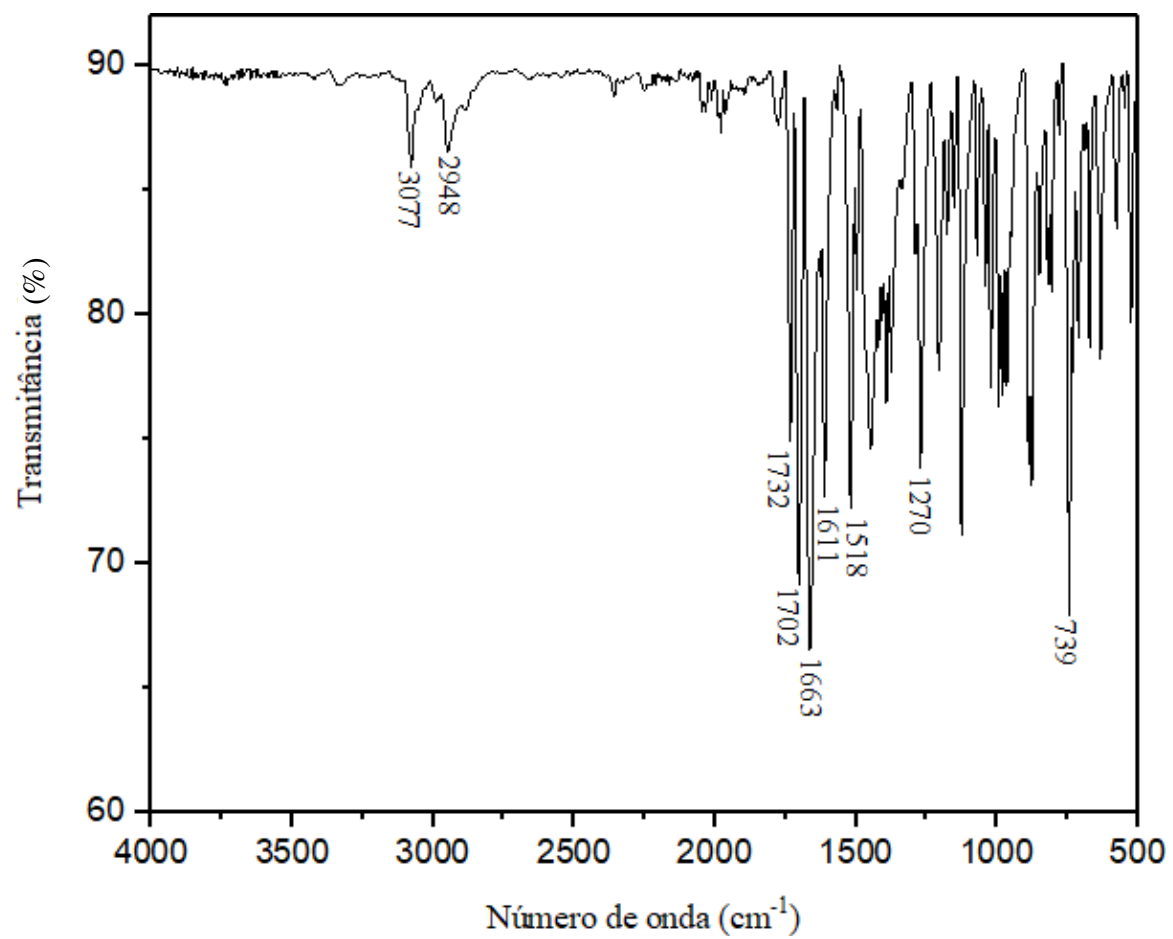
Figura 50 – Espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) do composto CAF-Tirosol.



Fonte: autoria própria.

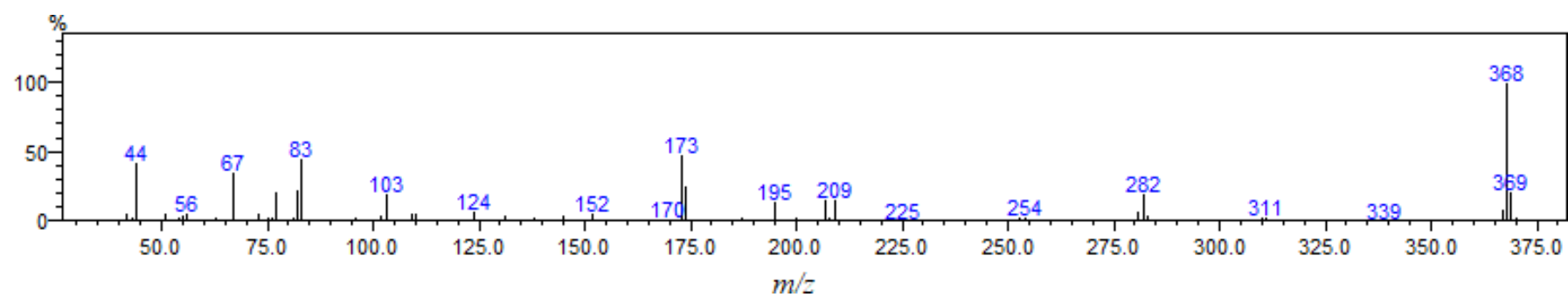
*Contaminado com reagente de partida (Tirosol)

Figura 51 – Espectro no Infravermelho (ATR) do composto **CAF-Cumarina**.



Fonte: autoria própria.

Figura 52 – Espectro de Massas (IE, 70 eV) do composto **CAF-Cumarina**.



Fonte: autoria própria.