

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
Centro de Ciências Químicas, Farmacêuticas e de Alimentos
Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Bioprospecção



Dissertação

**Síntese e avaliação do potencial anticolinesterásico de
tiazolidin-4-onas tendo como precursor a 2-
cicloexilmetilamina**

Bruna Caetano Moreira

Pelotas, 2021

Universidade Federal de Pelotas / Sistema de Bibliotecas
Catalogação na Publicação

M835s Moreira, Bruna Caetano

Síntese e avaliação do potencial anticolinesterásico de tiazolidin-4-onas tendo como precursor a 2-cicloexilmetilamina. / Bruna Caetano Moreira ; Wilson João Cunico Filho, orientador ; Geonir Machado Siqueira, coorientador. — Pelotas, 2021.

98 f.

Dissertação (Mestrado) — Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Bioprospecção, Centro de Ciências Químicas, Farmacêuticas e de Alimentos, Universidade Federal de Pelotas, 2021.

1. Tiazolidin-4-onas. 2. Cicloexilmetilamina. 3. Reação assistida por micro-ondas. 4. Acetilcolinesterase. I. Cunico Filho, Wilson João, orient. II. Siqueira, Geonir Machado, coorient. III. Título.

CDD : 574.192

BRUNA CAETANO MOREIRA

**Síntese e avaliação do potencial anticolinesterásico de
tiazolidin-4-onas tendo como precursor a 2-
cicloexilmetilamina**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós Graduação em Bioquímica e Bioprospecção, do Centro de Ciências Químicas, Farmacêuticas e de Alimentos da Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Bioquímica e Bioprospecção.

Orientador: Wilson João Cunico Filho

Pelotas, 2021

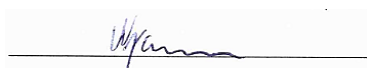
Bruna Caetano Moreira

Síntese e avaliação do potencial anticolinesterásico de tiazolidin-4-onas tendo como precursor a 2-cicloexilmetilamina

Dissertação aprovada, como requisito parcial, para obtenção do grau de Mestre em Bioquímica e Bioprospecção, Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Bioprospecção, Centro de Ciências Químicas, Farmacêuticas e de Alimentos, Universidade Federal de Pelotas.

Data da defesa: 30 de abril de 2021.

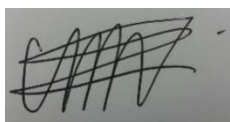
Banca examinadora:



Prof. Dr. Wilson João Cunico Filho (Orientador). Doutor em Química pela Universidade Federal de Santa Maria.



Prof. Dr. Rogério Vescia Lourega. Doutor em Química pela Universidade Federal de Santa Maria.



Prof. Dr. Claudio Martin Pereira de Pereira. Doutor em Química pela Universidade Federal de Santa Maria.

Pelotas, 2021

Dedico este trabalho ao meu orientador Prof. Dr. Wilson Cunico pela oportunidade e auxílio, e a minha família pelo contínuo apoio durante a vida acadêmica.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente gostaria de agradecer a Deus por me permitir ter saúde para me dedicar a este trabalho, visto o cenário atual que estamos passando frente ao covid-19, e por me conduzir a fazer algo que eu gosto e que me trará felicidade.

Agradeço a minha família, sobretudo meus pais Claudia S. C. Moreira e Sílvia C. F. Moreira, por todo o apoio, incentivo, por torcer muito pelo meu sucesso, e pelos conselhos durante a minha jornada acadêmica, visto que sempre me incentivaram a dar o meu melhor e sempre me apoiaram em minhas decisões, bem como nunca me deixaram desistir e me ensinaram a confrontar as dificuldades com positividade e fé. Agradeço também a minha tia Adriana F. Moreira pelo incentivo e reconforto nos momentos difíceis enfrentados durante o caminho acadêmico. Por fim, mas não menos importante gostaria de agradecer a minha vó Dalila R. F. Moreira que fez parte de toda a minha trajetória acadêmica, me proporcionando afeto e moradia e sempre acreditou no meu potencial.

Gostaria de agradecer a segunda família que ganhei, meus colegas do laboratório LaQuiabio, que sempre ajudaram em todas as etapas da minha vida acadêmica. Agradeço especialmente a uma grande amiga e de certa forma orientadora, a pós-doutoranda Adriana M. Neves por todos os ensinamentos, por toda a dedicação dentro e fora do meio acadêmico, por ser um exemplo de pessoa colaborativa e incentivadora, pessoa maravilhosa que tenho como uma irmã, que nunca me abandona, principalmente em momentos difíceis, e mesmo em meio a pandemia se faz presente na minha vida de forma online. Agradeço também as mestrandas Melinda G. Victor e Cinara Ávila por toda a ajuda e incentivo nos momentos bons e nos ruins durante nossa caminhada, principalmente em meio a pandemia do covid-19, que por mais que tenhamos que manter o distanciamento social, nos mantivemos em contato via web.

Agradeço ao meu orientador professor Wilson Cunico pela oportunidade e pelos ensinamentos, bem como pela amizade, e incentivo em meio a pandemia onde a pós-graduação se tornou um pouco mais difícil. Gostaria de agradecer também ao meu coorientador o professor Geonir M. Siqueira pela amizade, por toda a dedicação desde a minha graduação, e por todos os conselhos e apoio. Com certeza vocês contribuíram significativamente para o meu crescimento profissional.

Agradeço ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Bioprospecção, e a Universidade Federal de Pelotas.

Agradeço a CAPES, CNPQ e a FAPERGS pelo auxílio financeiro. Em especial a CAPES por ser o órgão financiador desse trabalho.

“Existem muitas hipóteses em ciência que estão erradas. Isso é perfeitamente aceitável, eles são a abertura para achar as que estão certas”

(Carl Sagan)

RESUMO

MOREIRA, Bruna Caetano. **Síntese e avaliação do potencial anticolinesterásico de tiazolidin-4-onas tendo como precursor a 2-cicloexilmetilamina.** Orientador: Wilson Cunico. 2021. 989 fls. Dissertação (Mestrado Bioquímica e Bioprospecção) - Centro de Ciências Químicas, Farmacêuticas e de Alimentos, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

Uma nova série de 1,3-tiazolidin-4-onas (**5a-m**) foi sintetizada usando 2-ciclohexiletanamina, alguns benzaldeídos (R-PhCHO, onde R é igual a H; 2-OCH₃; 2,5-OCH₃; 2-Cl; 3-Cl; 4-Cl; 2-NO₂; 3-NO₂; 4-NO₂; 2-F; 3-F; 4-F; CH₃) e o ácido mercaptoacético por reação multicomponente *one-pot*. Utilizou-se procedimentos de aquecimento térmico convencional e por irradiação de micro-ondas, obtendo bons rendimentos gerais. A reação de micro-ondas proporcionou os produtos em menores tempos, utilizou menos solvente, bem como demonstrou rendimentos similares a metodologia convencional. Todos os compostos foram identificados e caracterizados por Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrometro de Massas (CG-EM) e por Ressonância Magnética Nuclear (RMN de ¹H e ¹³C). As tiazolidinonas funcionalizadas foram projetadas sem nitrogênio básico em suas estruturas e com cadeia de carbono menor entre o anel tiazolidin-4-ona e o anel ciclohexano. Alguns compostos foram selecionados para teste como inibidores da enzima acetilcolinesterase (AChE), no entanto, nenhum dos compostos testados mostrou inibição de AChE em ambos os tecidos do córtex cerebral e do hipocampo. Em conclusão, este trabalho apresenta treze 1,3-tiazolidin-4-onas inéditas, obtidas através de 2 metodologias e os resultados biológicos sugerem que, em comparação com trabalhos anteriores do grupo de pesquisa LaQuiABio, um nitrogênio básico é essencial para a atividade inibitória da AChE.

Palavras-chave: Tiazolidin-4-onas, cicloexilmetilamina, reação assistida por micro-ondas, acetilcolinesterase.

ABSTRACT

MOREIRA, Bruna Caetano. **Synthesis and evaluation of the anticholinesterase potential of thiazolidin-4-ones with the precursor 2-cyclohexylmethylamine.** 2021. 98 pg. Dissertation (Master in Biochemistry and Bioprospecting) - Center of Chemical, Pharmaceutical and Food Sciences, Federal University of Pelotas, Pelotas.

A new series of 1,3-thiazolidin-4-ones (**5a-m**) was synthesized using 2-cyclohexylethanamine, some benzaldehydes (R-PhCHO, onde R é igual a H; 2-OCH₃; 2,5-OCH₃; 2-Cl; 3-Cl; 4-Cl; 2-NO₂; 3-NO₂; 4-NO₂; 2-F; 3-F; 4-F; CH₃) and mercaptoacetic acid by a *one-pot* multicomponent reaction. Conventional thermal heating and microwave irradiation procedures were used, obtaining good general yields. The microwave reaction provided the products in shortest time, used less solvent, and showed similar yields to the conventional methodology. All compounds were identified and characterized by Gas Chromatography coupled with Mass Spectrometer (GC-MS) and Nuclear Magnetic Resonance (¹H and ¹³C NMR). The functionalized thiazolidinones were designed without basic nitrogen in their structures and with a smaller carbon chain between the thiazolidin-4-one ring and the cyclohexane ring. Some compounds were selected for testing as inhibitors of the enzyme acetylcholinesterase (AChE), however, none of the tested compounds showed inhibition of AChE in both tissues of the cerebral cortex and the hippocampus. In conclusion, this work presents thirteen unpublished 1,3-thiazolidin-4-ones, obtained through 2 methodologies and the biological results suggest that, in comparison with previous work by the research group LaQuiABio, a basic nitrogen is essential for the inhibitory activity of AChE.

Keywords: Thiazolidin-4-ones • Cyclohexylmethylamine • Microwave-assisted reaction • Acetylcholinesterase.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Estrutura dos derivados da tiazolidinona.....	13
Figura 2.	Estrutura de fármacos que contém o heterociclo da tiazolidinona.....	14
Figura 3.	Estruturas de ACh e tiazoheterociclos com atividade inibitória da AChE em comparação com o heterociclo proposto neste trabalho.....	15
Figura 4.	Biossíntese da acetilcolina.....	19
Figura 5.	Variação dos substituintes da 4-tiazolidinona.....	20
Figura 6.	Mecanismos de aquecimento para: (a) aquecimento convencional, e (b) aquecimento por micro-ondas.....	23

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

A β – placas de proteínas beta amiloide
ACh – Acetilcolina
AChE – Acetilcolinesterase
AChEs – inibidores da anticolinesterase
CAT – colina acetiltransferase
CCD – Cromatografia de Camada Delgada
CG/EM – Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrômetro de Massas
ChAT - concentração da colina acetiltransferase
ChE – Colinesterase
COSY - do inglês *Correlation Spectroscopy*
DA – Doença de Alzheimer
FDA – do inglês *Food and Drug Administration*
FID - do inglês *Free Induction Decay*
HSQC - do inglês *Heteronuclear Single-Quantum Correlation*
MCRs – do inglês Reações multicomponentes
MO – Micro-ondas
NFT – do inglês *Neurofibrillary tangles*
NMDA – *N*-metil-*D*-aspartato
APP – proteína amiloidogênica precursora de beta-amiloide
RMN – Ressonância Magnética Nuclear
SN – Sistema nervoso
SNC – Sistema nervoso central
SNP – Sistema nervoso periférico

Sumário

1. INTRODUÇÃO	<u>1314</u>
2. OBJETIVO.....	17
2.1. Objetivo Geral	17
2.2. Objetivos Específicos	<u>1718</u>
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	<u>1920</u>
3.1. Doença de Alzheimer (DA)	<u>1920</u>
3.2. Sistema Colinérgico	<u>1920</u>
3.3. Hipótese Colinérgica	<u>2021</u>
3.4. Inibidores da Acetilcolinesterase (AChE).....	<u>2122</u>
3.5. Tiazolidinonas	<u>2223</u>
3.6. Síntese da 2,3-dissubstituída-4-tiazolidinona	<u>2223</u>
3.7. Metodologias alternativas para a obtenção da 2,3-disubstituída-tiazolidin-4-ona...	<u>2425</u>
4. ARTIGO.....	<u>2728</u>
5. DISCUSSÃO	<u>8586</u>
6. CONCLUSÃO.....	<u>9091</u>
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	<u>9293</u>
ANEXO 1: Comprovante de submissão do artigo	<u>9798</u>
Anexo 2: Aprovação Comitê de Ética em Experimentação Animal UFPel.....	<u>9899</u>

1. INTRODUÇÃO

Doenças neurodegenerativas são aquelas em que ocorre a destruição progressiva e irreversível dos neurônios e das células responsáveis pelas funções do sistema nervoso (SN). A Doença de Alzheimer (DA) é uma doença neurodegenerativa de grande impacto socioeconômico, esta patologia acomete aproximadamente 15 milhões de pessoas em todo o mundo (HUSSEIN e col., 2020; SHIN e col., 2019; SONG e col., 2020). A DA é causada pela acumulação de placas de proteínas beta amiloide e tau de enovelamento anômalo no cérebro, além de estar associada ao encolhimento do cérebro e perda localizada de neurônios colinérgicos, principalmente no hipocampo e córtex cerebral, que estão associadas às funções mentais, tais como: reconhecimento de estímulos sensoriais, memória e pensamento abstrato (KLADNIK e col., 2020; SONG e col., 2020). Nesta doença, ocorre a deficiência de neurotransmissores, como acetilcolina, noradrenalina, dopamina, serotonina, glutamato e substância P em menor extensão (Petronilha et al. 2011; Wang et al. 2019; Cranston et al. 2020).

O principal neurotransmissor é a acetilcolina (ACh) que está envolvida diretamente nos processos motores, cognitivos e de memória. Em nível celular, a DA está associada à redução das taxas de ACh no processo sináptico, diminuindo a neurotransmissão colinérgica cortical. A enzima acetilcolinesterase (AChE) é responsável pela hidrólise da ACh em acetato e colina interrompendo a transmissão colinérgica (PETRONILHOA e col., 2011; VIEGAS e col., 2004; WANG e col., 2019). Diante disso, a AChE é um dos principais alvos terapêuticos para tratar a sintomatologia da DA. A administração de inibidores da AChE impede a degradação da ACh e, consequentemente, aumenta os níveis deste neurotransmissor nas sinapses colinérgicas. Além disso, existem evidências de que a inibição da colinesterase poderia diminuir a formação de fragmentos da proteína amiloidogênica precursora de beta-amiloide (APP) e, dessa forma, das placas amiloides, que são uma das principais características patológicas da DA (Wang et al. 2019; Jin et al. 2020).

Contudo, há uma necessidade de ampliar o número de fármacos inibidores da AChE com uma janela terapêutica mais abrangente. Neste

contexto, alguns estudos demonstraram uma possível atividade inibitória do núcleo heterocíclico 1,3-tiazolidin-4-onas sobre a enzima AChE. Esse heterociclo possui a presença dos heteroátomos enxofre e nitrogênio que permite uma disponibilidade de pares de elétrons não compartilhados e diferença de eletronegatividade comparados aos hidrocarbonetos originais (Tselikhovsky and Buchwald 2011; Kumar et al. 2017; da Silva et al. 2020; Hassan et al. 2020; Sahiba et al. 2020).

Os tiazóis são exemplos de anéis de cinco membros aromáticos com enxofre e nitrogênio, que se tornaram muito interessantes devido aos antibióticos β -lactâmicos. Isso ocorreu especialmente após a primeira estrutura com tiazol ser descoberta nas penicilinas (JAIN e col., 2012; VITAKU e col., 2014). Um heterociclo saturado derivado de tiazol, a tiazolidinona, é um anel heterocíclico biologicamente ativo tendo um átomo de enxofre na posição 1, um átomo de nitrogênio na posição 3 e um grupo carbonil nas posições 2, 4 ou 5 (Figura 1). Os vários derivados, 2-tiazolidinona (A), 4-tiazolidinona (B), 5-tiazolidinona (C), 2-tioxo-4-tiazolidinona (D), tiazolidin-2,4-diona (E), estão associados a inúmeras propriedades farmacológicas (KALHOR e BANIBAIRAMI, 2020; NIRWAN e col., 2019).

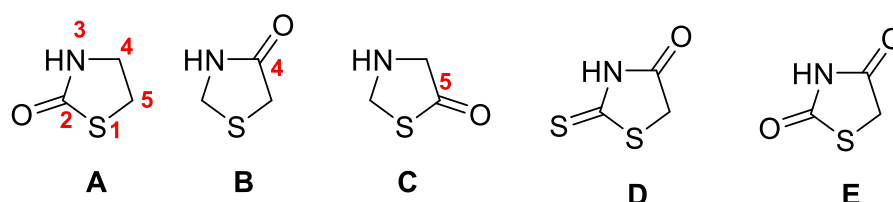


Figura 1: Estrutura dos derivados de tiazolidinona.

A tiazolidinona e seus derivados são componentes chave de produtos naturais e fármacos. A Figura 2 mostra algumas estruturas de fármacos baseadas nos derivados das tiazolidinonas como, por exemplo: rosiglitazona, pioglitazona, ralitolina, etozolina, tiazolidomicin e epalrestat (KALHOR e BANIBAIRAMI, 2020; NIRWAN e col., 2019). Além disso, a 4-tiazolidinona é considerada um anel farmacologicamente bioativo para o desenvolvimento de novos agentes terapêuticos (AGRAWAL, 2021; GÜZEL-AKDEMIR e col., 2020; MENDES e col., 2018).

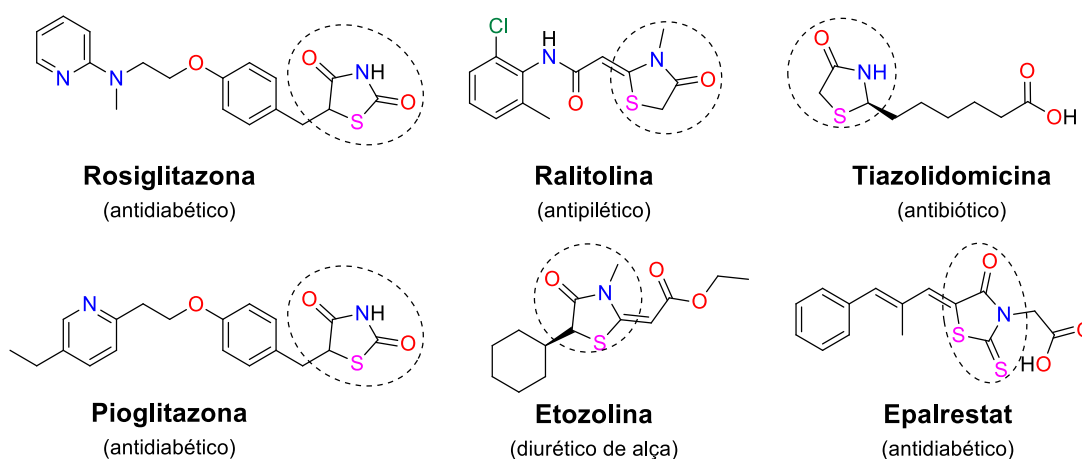


Figura 2: Estrutura de fármacos que contém o heterociclo tiazolidinona.

Com base na grande aplicabilidade das 4-tiazolidinonas na área da química orgânica e medicinal, o grupo de pesquisa do Laboratório de Química Aplicada a Bioativos (LaQuiABio), já publicou inúmeros trabalhos na literatura descrevendo a síntese desse núcleo bioativo e também as potenciais atividades biológicas como, por exemplo: atividade inibidor da acetilcolinesterase (BERWALDT e col., 2019; DA SILVA e col., 2020; DAS NEVES e col., 2020), antitumoral (DA SILVEIRA e col., 2017; PEDRA e col., 2018) antinociceptivo (NEVES e col., 2018), anti-inflamatória (GOUVÊA e col., 2016) antioxidante (BOSENBECKER e col., 2014; CAMPOS e col., 2013), entre outras.

Nosso grupo de pesquisa estudou alguns tiazoheterociclos (tiazolidinona (da Silva e col. 2020), tiazinanona (Neves et al. 2020) e benzotiazinona (Berwaldt e col. 2019) como inibidores de AChE projetados por similaridade estrutural química com o neurotransmissor ACh. Neste trabalho, estudamos a influência da falta de um nitrogênio básico como mostrado na Figura 3.

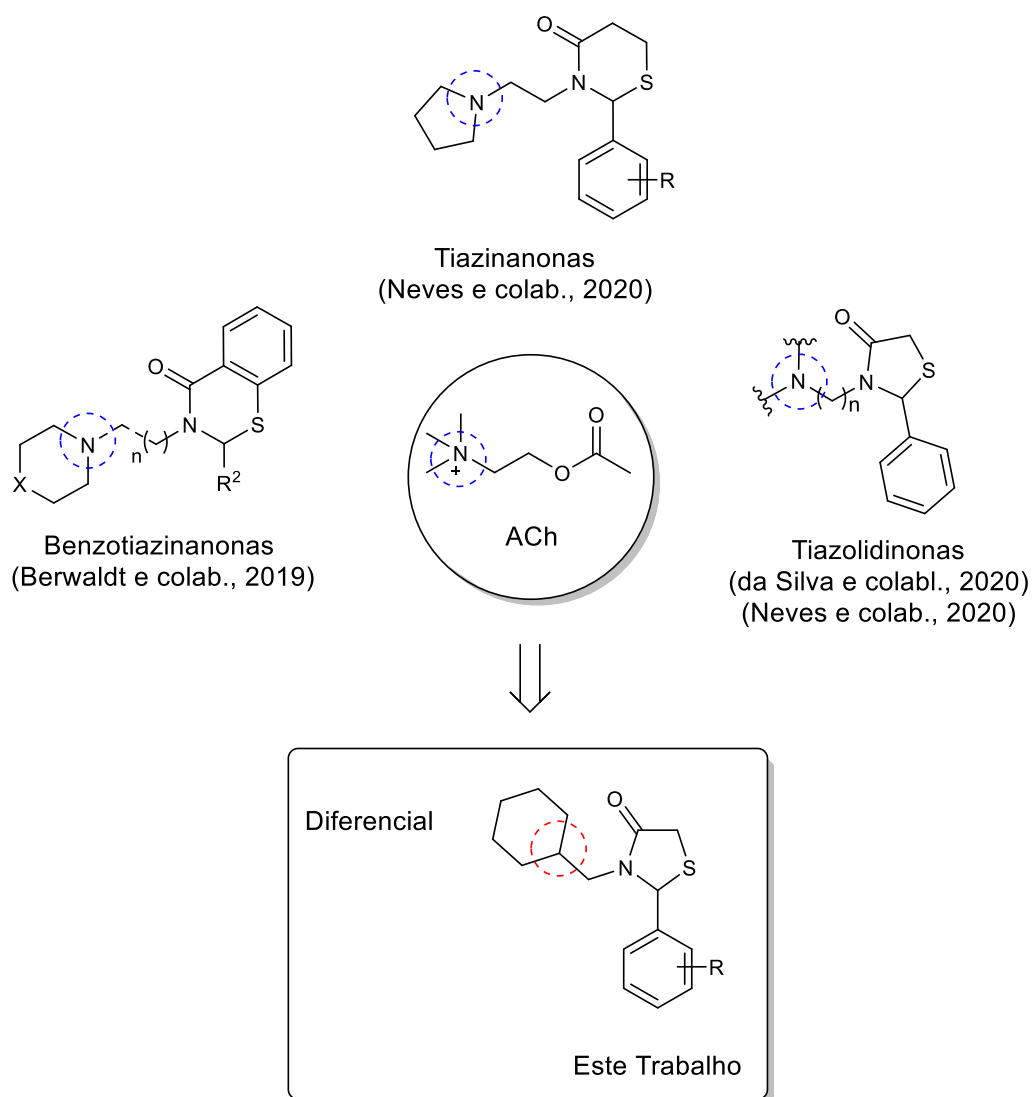


Figura 3: Estruturas de ACh e tiazoheterociclos com atividade inibitória da AChE em comparação com o heterociclo proposto neste trabalho.

2. OBJETIVO

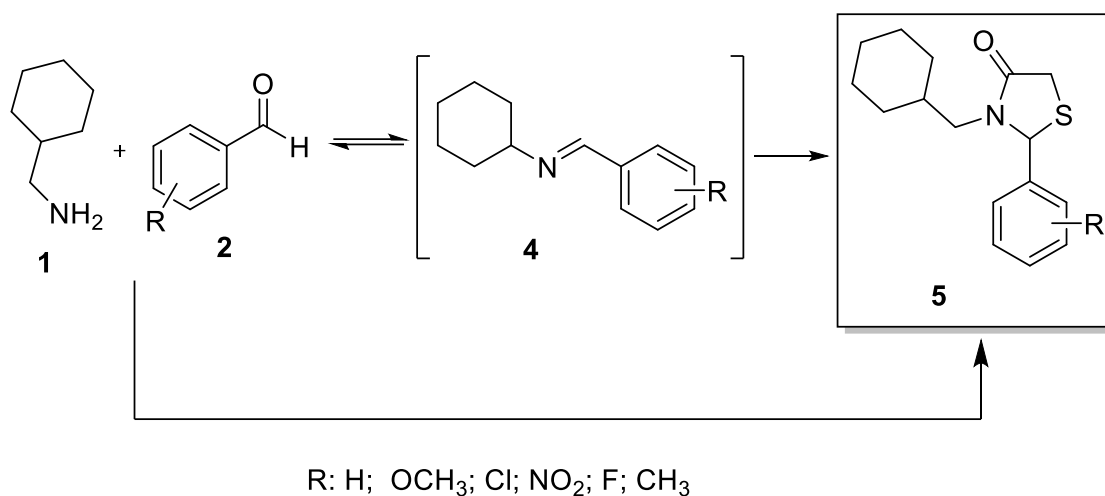
2.1. Objetivo Geral

O objetivo deste trabalho foi realizar a síntese de uma série de 1,3-tiazolidin-4-onas derivadas da 2-cicloexiletanamina e, posteriormente, foi estudada a aplicação dessas moléculas, verificando sua ação *in vitro* sobre a atividade da enzima AChE, como possíveis inibidores da acetilcolinesterase (AChEs).

2.2. Objetivos Específicos

(a) Estudar as condições reacionais para a obtenção das 1,3-tiazolidin-4-onas **5**, por meio da metodologia de aquecimento térmico convencional, através da reação entre 2-ciclohexiletanamina **1**, benzaldeídos substituídos **2** e o ácido mercaptoacético **3** (Esquema 1). Para a síntese será escolhida a melhor condição e a variação estrutural da série de compostos de benzaldeídos que contenham em sua estrutura grupos doadores e retiradores de elétrons como substituintes nas posições *orto*, *meta* ou *para*;

(b) Estudar metodologias alternativas como irradiação por micro-ondas para a realização da série de 2 aril-3-(2-cicloexilmetil)tiazolidin-4-onas **5** (Esquema 1). Posteriormente, comparar os resultados obtidos entre as metodologias de irradiação de micro-ondas e a metodologia de aquecimento convencional, a fim de avaliar qual foi mais eficiente para a realização da série, visto que a metodologia por irradiação de micro-ondas apresenta diversas vantagens, como menor tempo de reação, menor gasto de solvente, controle seletivo de pressão e temperatura, e os compostos apresentam rendimentos similares ou maiores daqueles gerados em processos convencionais;

Esquema 1.

(c) Identificar e caracterizar a estrutura dos compostos sintetizados através da interpretação dos dados de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) e por Cromatografia Gasosa Acoplada a Espectrometria de Massas (CG/EM);

(d) Avaliar o efeito inibitório *in vitro* das tiazolidin-4-onas sintetizadas sobre a enzima AChE expressa em córtex cerebral e hipocampo de ratos;

(e) Estudar a influência da falta do nitrogênio básico, a influência da cadeia de carbono entre o anel tiazolidin-4-ona e o anel ciclohexano, e a propriedade eletrônica do substituinte no anel fenil. Para complementar os resultados obtidos da relação de estrutura-atividade e da ação sobre a enzima AChE das moléculas deste trabalho com tiazoheterociclos (Berwaldt et al. 2019; da Silva et al. 2020; das Neves et al. 2020) de trabalhos publicados anteriormente.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1. Doença de Alzheimer (DA)

A Doença de Alzheimer (DA) é uma desordem neurodegenerativa, de grande impacto socioeconômico, acometendo aproximadamente 15 milhões de pessoas em todo o mundo (HUSSEIN e col., 2020; SHIN e col., 2019; SONG e col., 2020). As regiões cerebrais associadas às funções mentais, particularmente o córtex frontal e o hipocampo, são aquelas mais comprometidas pelas alterações bioquímicas decorrentes de DA (FRONZA e colab., 2019; GONÇALVES e OUTEIRO, 2015; VIEGAS e col., 2004). A DA é causada pela acumulação no cérebro, devido as placas de proteínas beta amiloide ($A\beta$) e emaranhados neurofibrilares (NFT) compostos por tau de enovelamento anômalo, além de estar associada ao encolhimento do cérebro e perda localizada de neurônios colinérgicos, principalmente, no hipocampo e córtex cerebral, que estão associadas às funções mentais, tais como: reconhecimento de estímulos sensoriais, memória e pensamento abstrato. Essas alterações ocorrem junto com o estresse oxidativo, neuroinflamação crônica, excitotoxicidade e disfunção mitocondrial. Juntos, esses eventos são considerados os principais efetores da disfunção sináptica e da progressão neurodegenerativa (KLADNIK e col., 2020; SONG e col., 2020).

Várias hipóteses têm sido propostas para explicar o mecanismo de desenvolvimento da DA. A hipótese mais aceita é colinérgica, a qual sugere que a deterioração cognitiva e o déficit de memória são causados principalmente, pelo baixo nível de colina no cérebro, especialmente acetilcolina (ACh). Contudo, a manutenção dos níveis de ACh é importante para o alívio destes sintomas nos pacientes (XIE e col., 2013).

3.2. Sistema Colinérgico

A ACh foi o primeiro neurotransmissor a ser descoberto em 1914, pelo fisiologista inglês Henry Hallet Dale (1875-1968). Este neurotransmissor é considerado um dos mais importantes uma vez que ele exerce ação em ambos sistemas nervoso central (SNC) - constituído pelo encéfalo e pela medula

espinhal - que está envolvido na memória e na aprendizagem e periférico (SNP) - do qual fazem parte o sistema nervoso somático e o sistema nervoso autônomo (CRANSTON e col., 2020; LORO e col., 2018).

A ACh também demonstra funções excitatórias e inibitórias, ou seja, pode facilitar o impulso elétrico em um neurônio ou pode inibi-lo. Em função disso, o funcionamento cerebral pode ser comprometido se houver déficit dele no organismo, causando hiperatividade, déficit de atenção, Mal de Alzheimer, etc (PETRONILHOA e col., 2011).

3.3. Hipótese Colinérgica

O defeito da neurotransmissão tem sido extensivamente investigado em DA. A hipótese colinérgica surgiu a partir dos estudos realizados em cérebros de pacientes com DA. Nesse contexto, foi evidenciado um déficit colinérgico específico envolvendo as projeções colinérgicas a partir de uma população de neurônios do prosencéfalo basal e do *nucleus basalis de Meynert* até o córtex cerebral e hipocampo (BOWEN e col., 1976).

Desde o início da década de 70, a importância da função colinérgica nos processos de aprendizagem e memória ficou evidente, visto que os estudos a respeito da importância do sistema colinérgico na DA demonstraram diversas características, como por exemplo: a diminuição na concentração da colina acetiltransferase (ChAT), bem como uma diminuição variável dos neurônios colinérgicos situados no núcleo basal de Meynert - conhecida como a fonte produtora da enzima colina acetiltransferase (CAT). Assim que produzida, a CAT é transportada para os neurônios pré-sinápticos onde sintetiza a ACh a partir da acetil coenzima A e da colina, como ilustrado na Figura 3 (GARCÍA-SOLDEVILLA e col., 2019). A ACh após formada, é liberada na fenda sináptica, onde será acoplada a dois tipos de receptores, o muscarínico e o nicotínico. O restante é degradado pela enzima AChE, na fenda sináptica, em acetato e colina (VIEGAS e col., 2004).

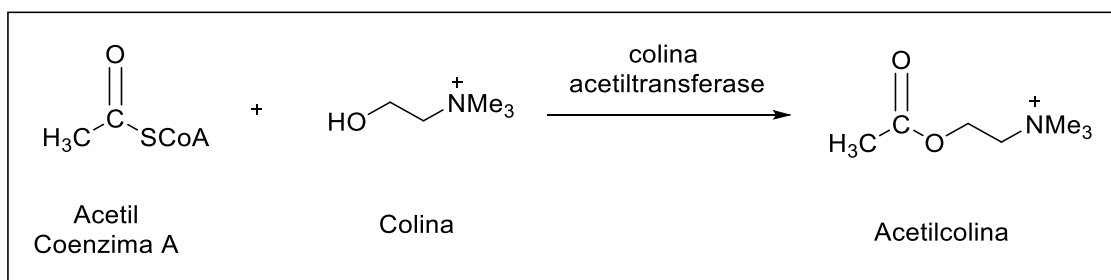


Figura 4: Biossíntese da acetilcolina

Diante do exposto, a hipótese colinérgica enfatiza que a atividade da AChE provoca um aumento na hidrólise de ACh com consequente declínio na neurotransmissão colinérgica. Desta forma, como estratégia para a farmacoterapia da DA, os pesquisadores buscam o desenvolvimento de moléculas com ação inibitória sobre a AChE, cujo objetivo é aumentar a concentração de ACh na fenda sináptica por inibição da colinesterase (ChE).

3.4. Inibidores da Acetilcolinesterase (AChE)

A hipótese colinérgica determina que pacientes com DA demonstram disfunção cognitiva devido à grande perda de células colinérgicas e a sua incapacidade de transmitir impulsos neurológicos através das sinapses colinérgicas. Desta forma, os fármacos anticolinesterásicos atuam inibindo a atividade enzimática da AChE, ou seja, eles impossibilitam a hidrólise do neurotransmissor ACh. Consequentemente, ocorre um aumento tanto na intensidade, quanto na duração da ação deste neurotransmissor (Jung and Park 2007). Atualmente, apenas quatro inibidores da AChE são aprovados pela agência *Food and Drug Administration* (FDA) dos EUA para o tratamento da DA: rivastigmina (Exelon®), galantamina (Razadyne®, Reminyl®), tacrina (Cognex®), e donepezil (Aricept®). Cabe ressaltar que três destes compostos (galantamina, tacrina e donepezil) possuem um núcleo heterocíclico com átomo de nitrogênio presente em sua estrutura. Além dos inibidores da acetilcolinesterase, também foi aprovado um antagonista do receptor do glutamato do tipo *N*-metil-D-aspartato (NMDA) (memantina) para o tratamento da DA (GARCÍA-SOLDEVILLA e col., 2019; VIEGAS e col., 2004).

3.5. Tiazolidinonas

Compostos heterocíclicos são aqueles que possuem no anel um elemento diferente do carbono, ou seja, um oxigênio, um enxofre ou um nitrogênio, sendo estes os mais comuns. A química de anéis de cinco membros contendo dois heteroátomos tem sido um campo de estudo interessante por décadas na área da química orgânica sintética e da química medicinal. O heterociclo da 4-iminotiazolidinona ou tiazolodinedionas pertence à estrutura central de vários compostos sintéticos e o anel pode ser substituído nas posições 2, 3 e 5 (Figura 5). A presença de enxofre e nitrogênio na estrutura aumenta suas propriedades medicinais e farmacológicas, mas a substituição na posição 2 resulta especificamente em derivados com ampla diversidade de atividades biológicas (AGRAWAL, 2021; SAHIBA e col., 2020).

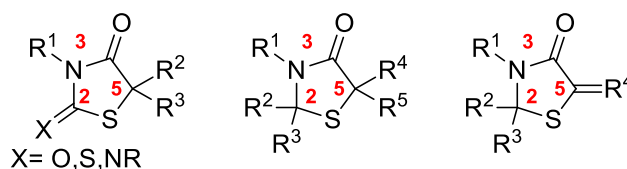


Figura 5: Variação dos substituintes da tiazolidin-4-ona.

3.6. Síntese da 2,3-dissubstituída-4-tiazolidinona

As 4-tiazolidinonas são dotadas de propriedades químicas fundamentais para a preparação dos diversos compostos bioativos e os heterociclos de cinco membros despertaram um interesse crescente na química orgânica por ser valiosos alvos de síntese. Na literatura a síntese de tiazolidinonas é conhecida por meio de reação em multicomponente ou processo de duas etapas. (AYYASH e HAMMADY, 2020; BHOSLE e col., 2019; PREETI e SINGH, 2018).

As reações multicomponentes (MCRs) têm papel significativo na síntese rápida e elegante de compostos heterocíclicos a partir de blocos de construção simples. Os MCRs apresentam alta economia de átomo, procedimento experimental simples e protocolo de alta seletividade devido à construção de CC e CX (X= heteroátomo). O protocolo mais comumente utilizado para a síntese de 4-tiazolidinonas é a reação multicomponente entre uma amina

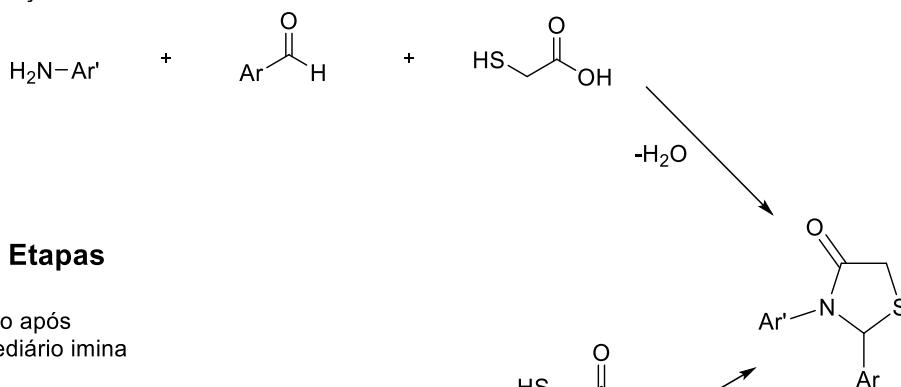
primária, aldeído e ácido tioglicólico (ácido mercaptoacético) (Esquema 2) (BHOSLE e col., 2019; NEVES e col., 2019; GOUVÊA e col., 2012; SUBHEDAR e col., 2020).

As reações para a obtenção das tiazolidin-4-onas também prosseguem em duas etapas com formação inicial da imina. O intermediário imina é formado a partir do nitrogênio da amina primária que ataca a carbonila do aldeído ou cetona. Este intermediário é isolado e em uma segunda etapa de reação, sofre o ataque do ácido tioglicólico pelo nucleófilo de enxofre seguido de ciclização intramolecular e eliminação de água levando a formação do heterociclo (Esquema 2) (AGRAWAL, 2021; KALHOR e col., 2017).

Esquema 2.

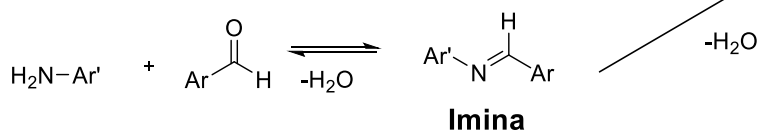
Reação Multicomponente

Adição de todos os reagentes
no início da reação



Reação Duas Etapas

Adição do ácido após
formação do intermediário imina

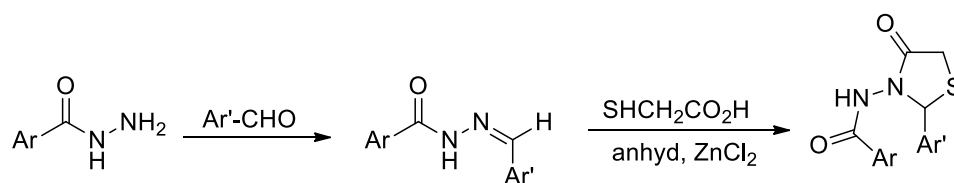


Além dos tradicionais reagentes existem muitos outros descritos na literatura que podem ser utilizados como, por exemplo, na reação da hidrazida ácida com aldeídos aromáticos gera as hidrazonas correspondentes que ao reagir posteriormente com ácido tioglicólico, formam as 2-substituídas-tiazolidin-4-onas (Reação 1 - Esquema 3). Outro exemplo para produzir tiazolidin-4-ona usa a hidrazina carbotioamida que foi preparada por condensação de um éster aromático com tiosemicarbazida, a qual sofreu a

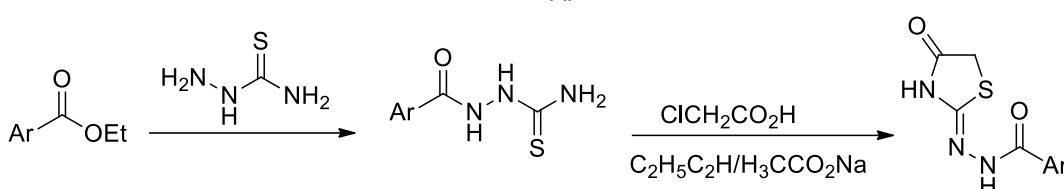
heterociclicização após reação com ácido cloroacético na presença de acetato de sódio (Reação 2 - Esquema 3). As tiazolidin-4-onas substituídas podem ser sintetizadas através da reação entre a amina primária com cloreto de cloroacetila em DMF à temperatura ambiente e, em seguida, ocorre a ciclização da acetamida resultante na presença de tiocianato de amônio (Reação 3 – Esquema 3) (Agrawal 2021).

Esquema 3.

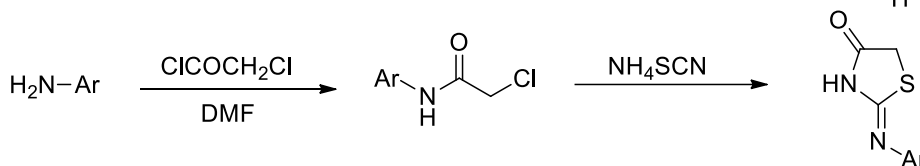
Reação 1



Reação 2



Reação 3



Especificamente O estudo de diferentes metodologias para a obtenção de 4-tiazolidinona envolve a utilização de três componentes (amina, aldeído e ácido mercaptoacético) para a formação do anel da 2,3-disubstituída-tiazolidin-4-ona, sendo este o principal foco desta dissertação.

3.7. Metodologias alternativas para a obtenção da 2,3-disubstituída-tiazolidin-4-ona

A tiazolidin-4-ona são obtidas por rotas sintéticas com o uso da metodologia de aquecimento térmico convencional, no entanto, cada vez mais busca-se por metodologias alternativas como, por exemplo, a de irradiação micro-ondas (MO). Essa metodologia vem ganhando um espaço na química orgânica por diminuir o tempo de reação, muitas vezes de dias e horas para minutos ou segundos, possibilitando condições experimentais mais amenas, eliminando, em alguns casos, a utilização de solventes orgânicos. Outra

vantagem do uso da irradiação por MO na síntese orgânica está relacionado às reações que apresentam rendimentos similares ou maiores daqueles gerados em processos convencionais, além do controle seletivo de alta precisão relacionados a evolução da temperatura de incidência na amostra, bem como o controle da pressão durante o processo de aquecimento por MO. O surgimento de reatores de MO específicos para as reações orgânicas é uma tecnologia inovadora para a química e seu uso tornou-se difundido nos últimos anos, sendo uma tecnologia que continua a evoluir rapidamente (Vakili et al. 2018; Cruz et al. 2019; Nain et al. 2019).

As micro-ondas são radiações eletromagnéticas com frequências na região entre 30 GHz e 300 MHz, podendo aquecer a reação por meio de um mecanismo dielétrico que envolve a polarização dipolar e a condução iônica. Os compostos polares adsorvem as MO com eficiência e têm a capacidade de transformar a radiação eletromagnética em calor, com isto, todo o volume da amostra sofre aquecimento absorvendo energia de irradiação de MO. A distribuição da irradiação MO acontece de forma homogênea (monomodo) onde a temperatura de toda a amostra aumenta simultaneamente ao ser convertida em calor garantindo segurança e reprodutibilidade dos experimentos, ao contrário do aquecimento convencional, no qual a amostra sofre o aquecimento não seletivo transmitido por condução e convecção da superfície para o interior e, conseqüentemente, dependente de uma agitação eficiente para facilitar a distribuição do calor (Figura 6) (Chatel and Varma 2019; Díaz-Ortiz et al. 2019; Henary et al. 2020; Saini et al. 2020).

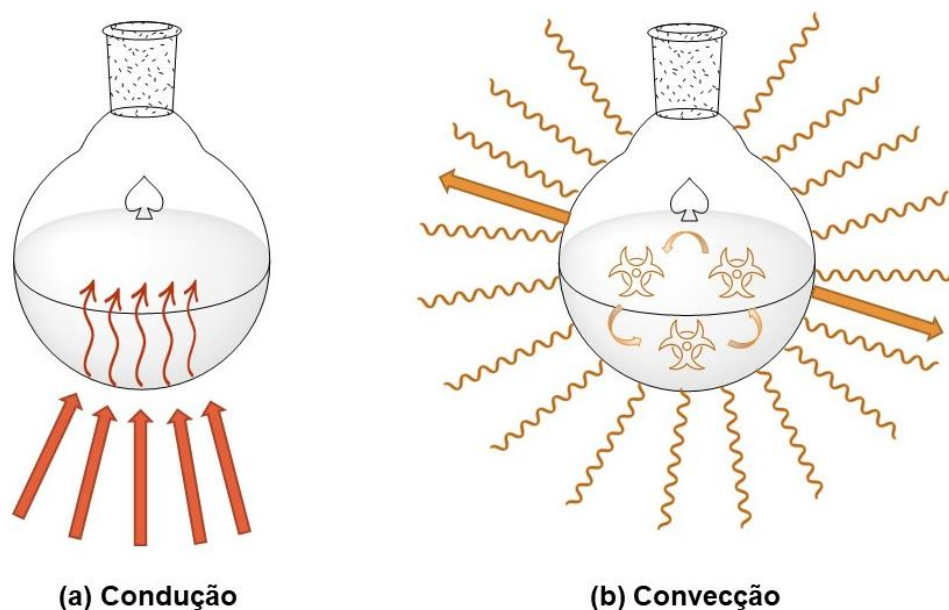


Figura 6: Mecanismos de aquecimento para: (a) aquecimento térmico convencional, e (b) aquecimento por irradiação de micro-ondas.

A técnica de irradiação de MO é atualmente usada para realizar uma ampla gama de reações químicas como, por exemplo, a síntese das tiazolidin-4-onas. O trabalho de SAINI e col., 2020 se refere a uma revisão atual de análogos de tiazolidin-4-onas, sintetizadas por diferentes autores, via a metodologia de irradiação de MO e descreve a eficácia dessa metodologia, além de relatar a potencial atividade antiviral e antimicrobiano dos compostos estudados. Em síntese orgânica, o uso de irradiação de MO tornou-se cada vez mais prevalente, assim como também na área da química medicinal, uma vez que se tornou uma nova habilidade de auxiliar na síntese mais rápida de compostos para a descoberta e expansão no surgimento de novos fármacos (SAINI e col., 2020).

4. ARTIGO

Design, synthesis and evaluation of anti-cholinesterase potential of thiazolidin-4-ones from 2-cyclohexylethanamine and arenealdehydes

Bruna C. Moreira¹ • Adriana M. Neves¹ • Cinara T. Ávila¹ • Melinda G. Victor¹ • Mayara S. P. Soares² • Roselia M. Spanevello² • Geonir M. Siqueira¹ • Wilson Cunico^{1*}

Manuscrito formatado nas normas da revista Medicinal Chemistry Research

<https://www.springer.com/journal/44/submission-guidelines>

Design, synthesis and evaluation of anti-cholinesterase potential of thiazolidin-4-ones from 2-cyclohexylethanamine and arenealdehydes

Bruna C. Moreira¹ • Adriana M. Neves¹ • Cinara T. Ávila¹ • Melinda G. Victor¹ •

Mayara S. P. Soares² • Roselia M. Spanevello² • Geonir M. Siqueira¹ • Wilson

Cunico^{1*}

¹ Laboratório de Química Aplicada a Bioativos (LaQuiABio), Centro Ciências Químicas, Farmacêuticas e de Alimentos, Universidade Federal de Pelotas, Campus Universitário s/n, Capão do Leão, RS, Brasil, CEP: 96010-900.

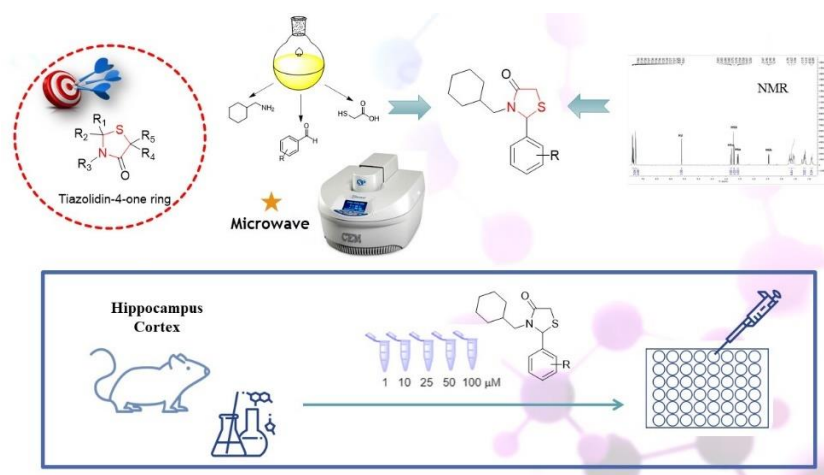
² Laboratório de Neuroquímica, Inflamação e Câncer (NEUROCAN), Centro de Ciências Químicas Farmacêuticas e de Alimentos, Universidade Federal de Pelotas, RS, Brasil.

* E-mail address: wjcunico@yahoo.com.br

Abstract

A new series of 1,3-thiazolidin-4-ones (**5a-m**) was synthesized using 2-cyclohexylethanamine, some aldehydes and mercaptoacetic acid by a *one-pot* multicomponent reaction. Conventional thermal heating and microwave irradiation procedures were used, obtaining good general yields. The microwave reaction provided the products in less time, less solvent was used, and showed similar yields to the conventional methodology. All compounds were identified and characterized by GC-MS and ^1H and ^{13}C NMR. The functionalized thiazolidinones were designed without basic nitrogen in their structures and with a smaller carbon chain between the thiazolidin-4-one ring and the cyclohexane ring. Some compounds were selected for testing as inhibitors of the enzyme acetylcholinesterase (AChE), however, none of the tested compounds showed inhibition of AChE in both tissues of the cerebral cortex and the hippocampus. In conclusion, this work presents thirteen unpublished 1,3-thiazolidin-4-ones, obtained through 2 methodologies and the biological results suggest that, in comparison with previous work by the research group LaQuiABio, a basic nitrogen is essential for the inhibitory activity of AChE.

Graphical Abstract



Keywords: Thiazolidin-4-ones • Cyclohexylmethylaniline • Microwave-assisted reaction • Acetylcholinesterase.

1. INTRODUCTION

Neurodegenerative diseases are known for progressive and irreversible destruction of neurons, the cells responsible for functions of the central nervous system (CNS) (Mohammad et al. 2017). When this happens, depending on the disease, the patient gradually loses his motor, physiological and/or cognitive abilities. Alzheimer's disease (AD) is a neurodegenerative disorder of great socioeconomic impact, responsible for about 50-60% of the total number of cases dementia among people over 65 years old. This pathology affects about 1.5% of the population aged 65-69 years old, 21% between 85-86 and 39% over 90 years old, affecting approximately 15 million people worldwide. The brain regions associated with mental functions, principally the frontal cortex and the hippocampus, are those most affected by the biochemical changes resulting from AD (Viegas et al. 2004; Du et al. 2018; Kumar et al. 2018). AD is caused by the accumulation of amyloid beta protein plaques and anomalous folding tau in the brain, in addition to being associated with brain shrinkage and localized loss of cholinergic neurons. Especially in the hippocampus and cerebral cortex, which are associated with mental functions such as recognition sensory stimuli, memory and abstract thinking (Kladnik et al. 2020; Song et al. 2020).

The neurotransmitter acetylcholine (ACh) is directly involved in motor, cognitive and memory processes. AD is associated with reduction in ACh rates in the synaptic process, decreasing cortical cholinergic neurotransmission. The enzyme acetylcholinesterase (AChE) is responsible for the degradation of ACh in carboxylic acid and choline, interrupting cholinergic transmission. Therefore, AChE is one of the main therapeutic targets to treat the symptoms of AD. Administration of AChE inhibitors prevents the degradation of ACh and, consequently, increases the levels of this neurotransmitter in cholinergic synapses. Furthermore, there is evidence that

cholinesterase inhibition could decrease the formation of fragments of amyloidogenic beta-amyloid precursor protein (APP) and, thus, amyloid plaques, which are one of the main pathological features of AD (Kladnik et al. 2020; Song et al. 2020).

One of the most important and explored class in organic chemistry is the heterocycle. This importance could be justified due the most of clinical drugs have at least one heterocycle nucleus in its structure. They have been effective against several diseases, presenting a range of biological activities and pharmaceutical applications. What makes these heterocycles so remarkable is the presence of heteroatoms and unshared electrons. In this context, heterocycles widely studied in the literature are those that contain sulfur and nitrogen in their structure as thiazoles, thiazolidinones, thiazinanones, thiazolidinediones among others (Tselikhovsky and Buchwald 2011; Kumar et al. 2017; da Silva et al. 2020; Hassan et al. 2020; Sahiba et al. 2020).

Thiazoles are examples of five-membered aromatic rings, which have become very interesting due to β -lactam antibiotics. This occurred especially after the first thiazole structure was discovered in penicillins (Jain et al. 2012; Vitaku et al. 2014). A saturated heterocycle derived from thiazole is thiazolidinone, a biologically active heterocyclic ring having a sulfur atom in position 1, a nitrogen atom in position 3 and a carbonyl group in positions 2, 4 or 5. The various derivatives, 2-thiazolidinone, 4-thiazolidinone, 5-thiazolidinone, 2-thioxo-thiazolidin-4-one, and thiazolidine-2,4-dione, are associated with numerous pharmacological properties (Nirwan et al. 2019; Kalhor and Banibairami 2020). The thiazolidin-4-one heterocycle is present in the structure of commercially available drugs, such as the anticonvulsant ralitoline and the diuretic etozoline.

Therefore, thiazolidin-4-one is considered a suitable pharmacologically bioactive ring for the development of new therapeutic agents (Mendes et al. 2018;

Güzel-Akdemir et al. 2020; Agrawal 2021). Based on the wide applicability of thiazolidin-4-ones in the area of organic and medicinal chemistry, the Laboratory of Chemistry Applied to Bioactive (LaQuiABio) has already reported works in the literature describing the synthesis and the biological activities of thiazolidinones, such as: acetylcholinesterase inhibitory activity (Berwaldt et al. 2019; da Silva et al. 2020; das Neves et al. 2020), antinociceptive (Neves et al. 2018), antitumoral (da Silva et al. 2016; da Silveira et al. 2017, 2019), and anti-inflammatory (Gouvêa et al. 2016). Our research group studied some thiazoheterocycles (thiazolidinone (da Silva et al. 2020), thiazinanone (Neves et al. 2020) and benzothiazinone (Berwaldt et al. 2019) as AChE inhibitors designed by chemical structural similarity with the neurotransmitter ACh. Continuing the studies developed by our research group, this work synthesized a series of 1,3-thiazolidin-4-ones (**5a-m**) derived from 2-cyclohexylethanamine and the in vitro assay as inhibitors of AChE activity in the cerebral cortex and rat hippocampus were also studied.

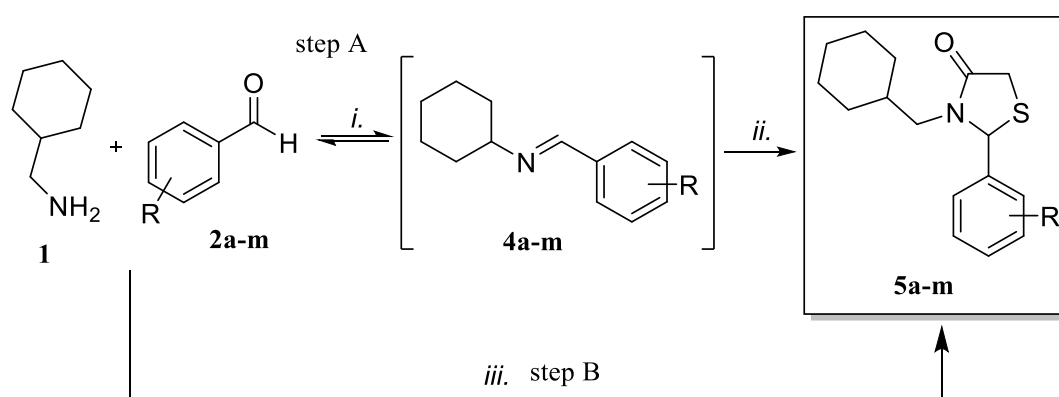
2. RESULTS AND DISCUSSION

2.1. Synthesis of 1,3-thiazolidin-4ones derived from 2-cyclohexylmethylamine

Thiazolidin-4-ones **5a-m** were synthesized by one-pot multicomponent procedure. Firstly, the addition/substitution reaction to carbonyl occurred between 2-cyclohexylmethylamine **1** and arenealdehydes **2a-m**, with electron donating or electron withdrawing groups, under stirring and reflux of toluene for 2 hours to the development of intermediate imine **4a-m**. Subsequently, mercaptoacetic acid **3** was added to the mixture and remained under stirring and heating for an additional 4 hours until the reagent was completely consumed (as shown in TLC hexane / ethyl acetate 7: 3). This cyclocondensation reaction afforded the thiazolidin-4-ones **5a-m** (step A, Scheme 1). In

addition, a non-conventional methodology was used and the reactions were also carried out in a 300 W Discover microwave apparatus. The reaction is one-pot multicomponent and all reagents were added at the beginning and the mixture remained in microwave irradiation for 15 minutes in a closed system and reflux of toluene to provide thiazolidin-4-ones **5a-m** (step B, Scheme 1). The main advantage of using the microwave methodology is that it reduces the reaction time when compared to the conventional heating methodology. Different monosubstituted or disubstituted arenealdehydes have substituents in the ortho, meta or para positions with electron donor substituent, such as $-\text{CH}_3$ and $-\text{OCH}_3$, or electron withdrawn substituent, such as $-\text{Cl}$, $-\text{F}$ and $-\text{NO}_2$, were used as reactant.

Scheme 1.



i. Toluene, 110°C, 2h.

ii. HSCH_2COOH (**3**), toluene, 110°C, 4h.

iii. Toluene, HSCH_2COOH (**3**), MW: 300 W, 100°C, 15 min.

R: a: H; b: 2- OCH_3 ; c: 3- OCH_3 ; d: 2,5- OCH_3 ; e: 2-Cl; f: 4-Cl;
g: 2- NO_2 ; h: 3- NO_2 ; i: 4- NO_2 ; j: 2-F; k: 3-F; l: 4-F; m: 4- CH_3

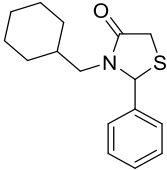
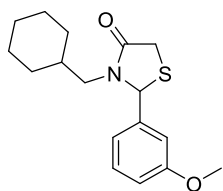
There is no logical cleavage pattern for the base peak once different kind of fragments were observed and, in some cases, the molecular ion is the base peak.

As for the ^1H NMR, the aromatic hydrogens were found around 7.00-7.50 ppm, the hydrogen H2 (CH) of thiazolidinone ring was observed in a range of 6.22-5.56 ppm in a form of a singlet or some cases as a doublet ($^4J \sim 1.2$ Hz) and the two diastereotopic

hydrogens H5 (CH₂) were found in a range of 3.87-3.68 ppm as doublet (²*J*~15 Hz) and 3.76-3.61 as double doublet (²*J*~15 and ⁴*J*~1.5 Hz). Another diastereotopic hydrogens H6 (CH₂) appear at 3.77-3.56 ppm as a double doublet (²*J*~13.8 and ³*J*~8.6 Hz) and at 2.49-2.41 ppm also as a double doublet (²*J*~14 and ³*J*~5.8 Hz). At 1.73-0.90 ppm there are the aliphatic hydrogens of the cyclohexane ring. In ¹³C NMR, the signals that confirm the product formation is the carbonyl signal C=O (C4) at 172.2-171.3 ppm and the characteristic sign of CH (C2) of the thiazolidinone ring at 64.0-57.4 ppm. The other signals of the compound are in the aromatic region between 160-120 ppm and at 48-25 ppm to the part of the aliphatic bonded to the nitrogen of the ring. The 2D NMR data (COSY and HSQC) helped to the complete assignment of all protons and carbons.

Thiazolidin-4-ones **5a-m** were obtained with moderate to excellent yields (45-98%) in the conventional heating methodology, with the exception of two compounds **5f** (31%) and **5j** (10%) which have substituting groups (Cl and F) of the benzene ring, and with moderate to good yields (56-85%) in the microwave methodology (Table 1).

Table 1. Nomenclature of the synthesized substances

	Structure	Nomenclature	Yield (%)	
			Conv.	MW
5a	 Molecular Weight: 275,4100	3-(cyclohexylmethyl)-2-phenylthiazolidin-4-one	89	70
5b	 Molecular Weight: 305,4360	3-(cyclohexylmethyl)-2-(3-methoxyphenyl)thiazolidin-4-one	66	72

5c		3-(cyclohexylmethyl)-2-(2,5-dimethoxyphenyl)thiazolidin-4-one	62	84
Molecular Weight: 335,4620				
5d		2-(2-chlorophenyl)-3-(cyclohexylmethyl)thiazolidin-4-one	49	58
Molecular Weight: 309,8520				
5e		2-(3-chlorophenyl)-3-(cyclohexylmethyl)thiazolidin-4-one	45	49
Molecular Weight: 309,8520				
5f		2-(4-chlorophenyl)-3-(cyclohexylmethyl)thiazolidin-4-one	31	74
Molecular Weight: 309,8520				
5g		3-(cyclohexylmethyl)-2-(2-nitrophenyl)thiazolidin-4-one	98	56
Molecular Weight: 320,4070				
5h		3-(cyclohexylmethyl)-2-(3-nitrophenyl)thiazolidin-4-one	57	60
Molecular Weight: 320,4070				

5i		3-(cyclohexylmethyl)-2-(4-nitrophenyl)thiazolidin-4-one	89	54
Molecular Weight: 320,4070				
5j		3-(cyclohexylmethyl)-2-(2-fluorophenyl)thiazolidin-4-one	10	67
Molecular Weight: 293,4004				
5k		3-(cyclohexylmethyl)-2-(3-fluorophenyl)thiazolidin-4-one	49	67
Molecular Weight: 293,4004				
5l		3-(cyclohexylmethyl)-2-(4-fluorophenyl)thiazolidin-4-one	88	40
Molecular Weight: 293,4004				
5m		3-(cyclohexylmethyl)-2- <i>p</i> -tolylthiazolidin-4-one	82	48
Molecular Weight: 289,4370				

Our study demonstrates the effectiveness of the microwave methodology that provides the desired products in minutes, less reaction time than conventional heating (hours). In this way, the efficiency of this methodological alternative is evidenced, making the methodology chemically more favorable to the environment, in addition to

presenting more stable yields, without the majority of the compounds needing further purification such as recrystallization.

2.2 In vitro evaluation in brain AChE activity

These results contribute to the structure-activity relationship and the action on the AChE enzyme of the molecules in this work with thiazoheterocycles (Berwaldt et al. 2019; da Silva et al. 2020; das Neves et al. 2020) from previously published works. It is worth mentioning that the previous thiazoheterocycles have tertiary nitrogen (in a ring or not, Figure 2) and inhibited AChE activity.

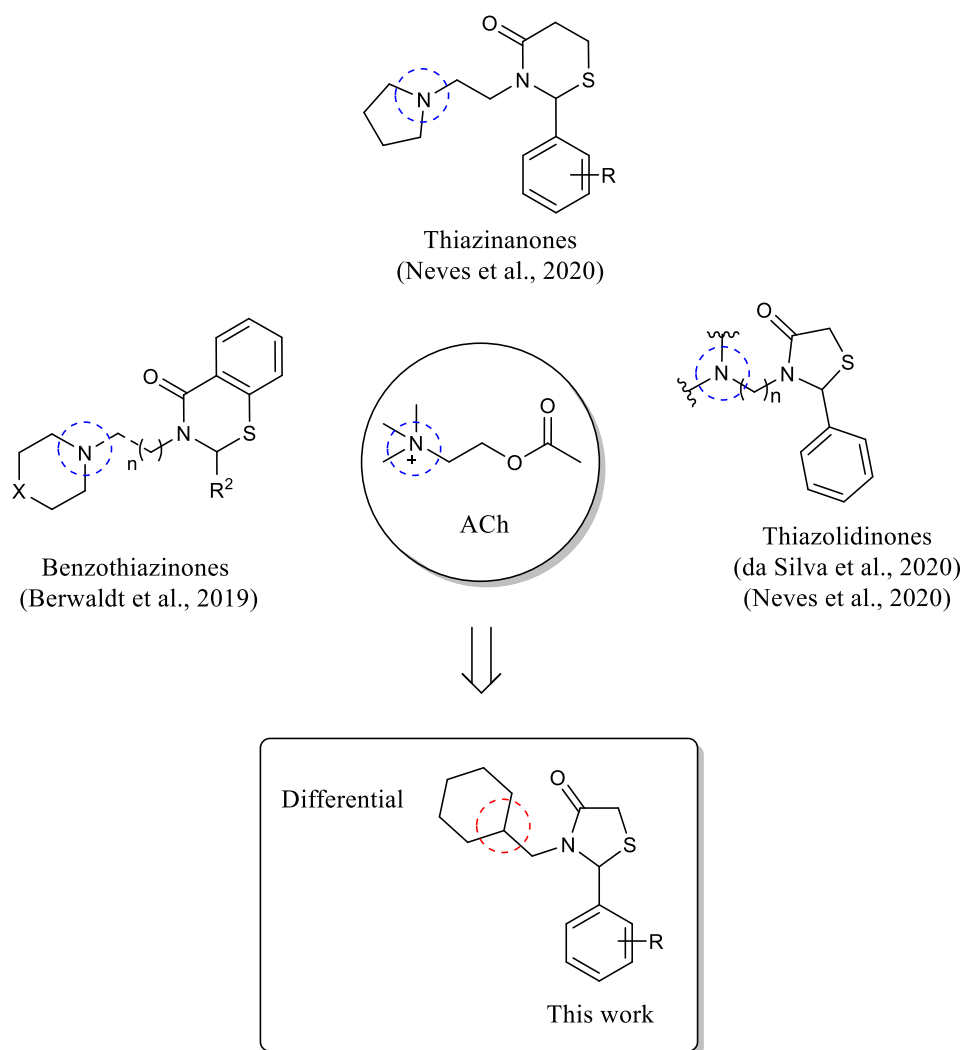


Figure 2: Structures of ACh and thiazo heterocycles with AChE inhibitory activity.

To evaluate the effects of the present compounds on the activity of AChE, cerebral cortex and hippocampus of rats were used, since it is already well described that these two brain structures play an important role in the formation of memory. In addition, it is already well defined that changes in both structures are found in patients with Alzheimer's Disease.

First, some thiazolidin-4-ones were tested by choosing the different substituents with activating (OCH_3) and deactivating (Cl , F , NO_2) groups of the benzene ring for the biological test. Therefore, tests were performed for seven thiazolidinones **5a**, **5b**, **5c**, **5d**, **5h**, **5k**, **5m**. All compounds were solubilized in methanol and introduced into the enzyme assays at the final concentrations of 1, 10, 25, 50 and 100 μM using the method of Ellmann et al. (1961) in the AChE activity of the hippocampus and cerebral cortex of rats (Figures 3 and 4). It should be noted that in addition to water control, the action of methanol on AChE activity was also determined, in order to confirm that the solvent does not interfere with enzymatic activity. Based on the results, it can be demonstrated that methanol did not alter AChE activity compared to the water control group ($P > 0.05$). Figures 3 and 4 show that methanol does not interfere with the general test.

Cerebral Cortex

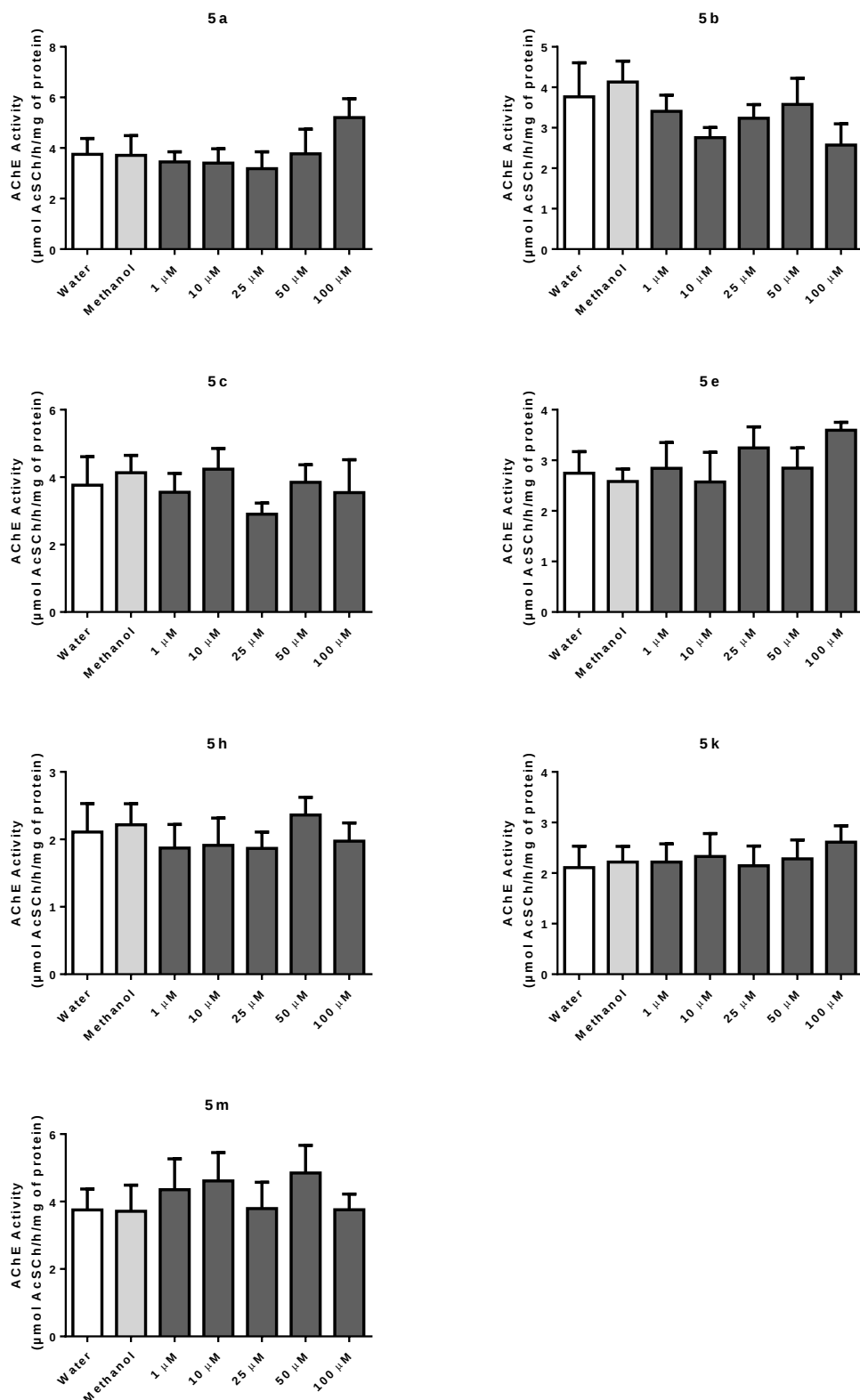


Figure 3: In vitro effect of thiazolidinones **5a**, **5b**, **5c**, **5e**, **5h**, **5k**, **5m** in the activity of AChE enzyme in cerebral cortex of rats (n=5).

Hippocampus

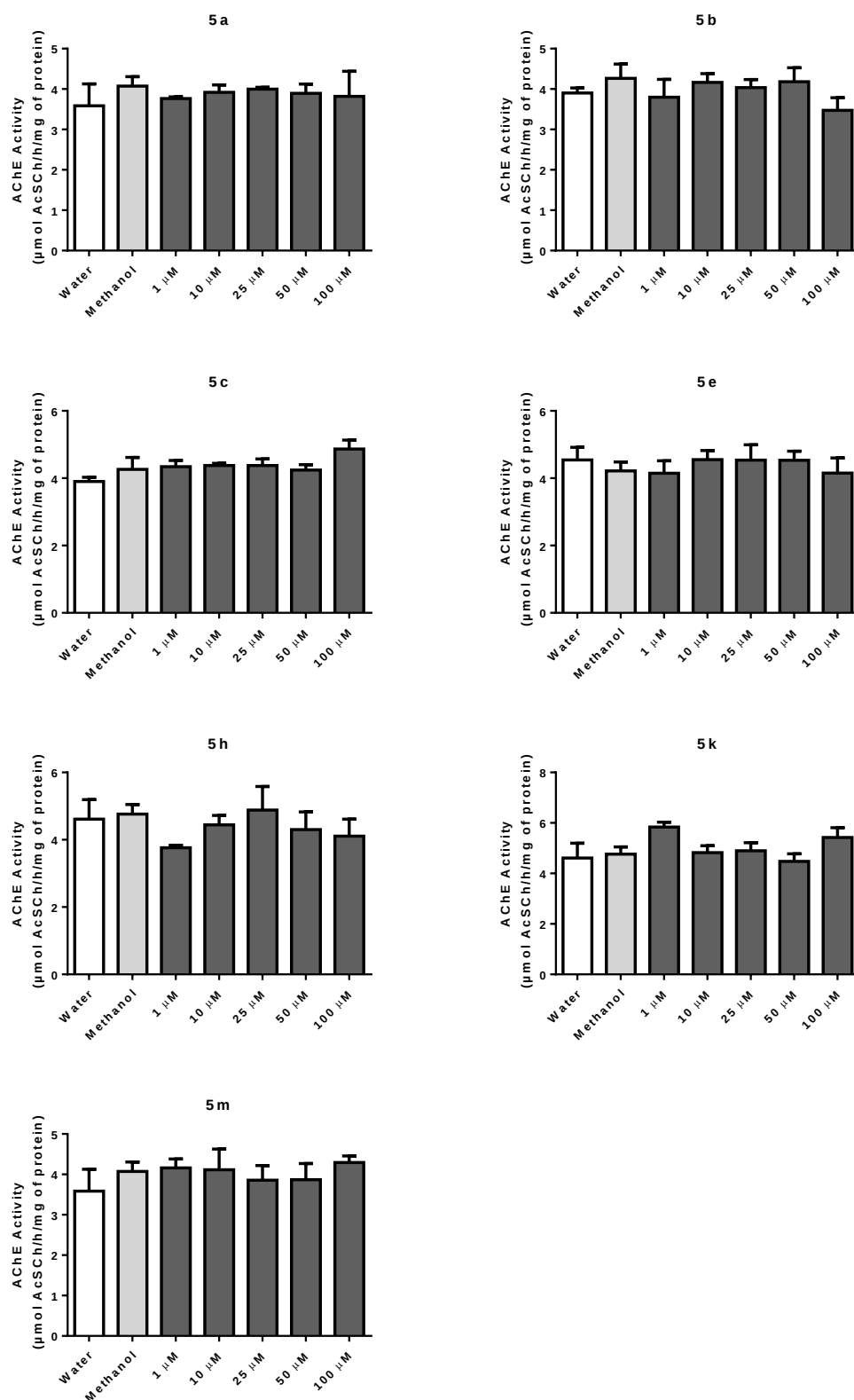


Figure 4: In vitro effect of thiazolidinones **5a**, **5b**, **5c**, **5e**, **5h**, **5k**, **5m** on AChE enzyme activity in rat hippocampus (n=5).

Table 2: *In vitro* effect of compounds **5a**, **5b**, **5c**, **5e**, **5h**, **5k**, **5m** on the activity of the enzyme acetylcholinesterase (AChE) in the cerebral cortex and hippocampus of rats, in relation to the control group water and methanol.

Compounds		Control (water)	Control (methanol)	1 μ M	10 μ M	25 μ M	50 μ M	100 μ M
5a	Cerebral Cortex	3,75 $\pm$ 0,62	3,71 $\pm$ 0,77	3,44 $\pm$ 0,40	3,40 $\pm$ 0,56	3,18 $\pm$ 0,66	3,76 $\pm$ 0,97	5,20 $\pm$ 0,74
	Hippocampus	3,58 $\pm$ 0,54	4,07 $\pm$ 0,23	3,76 $\pm$ 0,039	3,91 $\pm$ 0,18	3,99 $\pm$ 0,04	3,89 $\pm$ 0,23	3,81 $\pm$ 0,62
5b	Cerebral Cortex	3,76 $\pm$ 0,84	4,13 $\pm$ 0,5	3,40 $\pm$ 0,40	2,75 $\pm$ 0,24	3,23 $\pm$ 0,33	3,57 $\pm$ 0,64	2,57 $\pm$ 0,52
	Hippocampus	3,90 $\pm$ 0,12	4,26 $\pm$ 0,35	3,79 $\pm$ 0,44	4,16 $\pm$ 0,21	4,03 $\pm$ 0,20	4,18 $\pm$ 0,34	3,47 $\pm$ 0,62
5c	Cerebral Cortex	3,76 $\pm$ 0,84	4,13 $\pm$ 0,51	3,55 $\pm$ 0,56	4,23 $\pm$ 0,61	2,90 $\pm$ 0,33	3,84 $\pm$ 0,51	3,54 $\pm$ 0,97
	Hippocampus	3,90 $\pm$ 0,12	4,26 $\pm$ 0,35	4,34 $\pm$ 0,18	4,37 $\pm$ 0,19	4,37 $\pm$ 0,19	4,24 $\pm$ 0,32	4,86 $\pm$ 0,26
5e	Cerebral Cortex	2,74 $\pm$ 0,42	2,58 $\pm$ 0,24	2,84 $\pm$ 0,50	2,57 $\pm$ 0,58	3,24 $\pm$ 0,41	2,84 $\pm$ 0,40	3,59 $\pm$ 0,15
	Hippocampus	4,54 $\pm$ 0,37	4,21 $\pm$ 0,26	4,14 $\pm$ 0,36	4,55 $\pm$ 0,27	4,53 $\pm$ 0,45	4,53 $\pm$ 0,54	4,15 $\pm$ 0,45
5h	Cerebral Cortex	2,10 $\pm$ 0,42	2,21 $\pm$ 0,31	1,87 $\pm$ 0,35	1,91 $\pm$ 0,40	1,86 $\pm$ 0,24	2,36 $\pm$ 0,26	1,97 $\pm$ 0,26
	Hippocampus	4,61 $\pm$ 0,58	4,76 $\pm$ 0,28	3,76 $\pm$ 0,07	4,44 $\pm$ 0,28	4,88 $\pm$ 0,70	4,30 $\pm$ 0,52	4,11 $\pm$ 0,46
5k	Cerebral Cortex	2,10 $\pm$ 0,42	2,21 $\pm$ 0,31	2,22 $\pm$ 0,35	2,32 $\pm$ 0,45	2,14 $\pm$ 0,39	2,28 $\pm$ 0,37	2,61 $\pm$ 0,32
	Hippocampus	4,61 $\pm$ 0,58	4,76 $\pm$ 0,28	5,83 $\pm$ 0,19	4,82 $\pm$ 0,27	4,90 $\pm$ 0,31	4,47 $\pm$ 0,29	5,42 $\pm$ 0,38
5m	Cerebral Cortex	3,75 $\pm$ 0,62	3,71 $\pm$ 0,77	4,35 $\pm$ 0,91	4,61 $\pm$ 0,84	3,79 $\pm$ 0,78	4,84 $\pm$ 0,82	3,76 $\pm$ 0,46
	Hippocampus	3,58 $\pm$ 0,54	4,07 $\pm$ 0,23	4,16 $\pm$ 0,21	4,11 $\pm$ 0,51	3,85 $\pm$ 0,36	3,87 $\pm$ 0,39	4,29 $\pm$ 0,16

Based on the results obtained, it can be seen that none of the compounds showed a potential inhibitory effect of enzymatic activity on AChE in cerebral cortex and hippocampus at any concentration evaluated (Figures 3 and 4). According to the lack of results, other thiazolidinones have not been tested.

Once none of the thiazolidinones of this work showed AChE inhibitory activity, it suggested that a basic nitrogen is necessary for an interaction with the enzyme and/or it is necessary for protonation and, therefore is essential for the activity. Besides, the electronic property of substituent at phenyl ring did not influence the activity. Another important factor could be the carbon chain bond between thiazolidinone ring and cyclohexane ring, since a large (two or more) $-\text{CH}_2$ groups may be preferable for recognition of the substrate by AChE (da Silva et al. 2020).

3. CONCLUSION

A new series of 1,3-thiazolidin-4-ones (**5a-m**) was synthesized using 2-cyclohexylethanamine, substituted aldehydes and mercaptoacetic acid by multicomponent reactions in conventional heating with moderate to excellent yields (45-98%) with exception of two compounds, **5f** (31%) and **5j** (10%) that showed lower yields, and by microwave irradiation with moderate to good yields (56-85%). The microwave provided the desired products in minutes, a shorter time than conventional heating (hours). The microwave irradiation methodology proved to be more efficient compared to the conventional methodology, since it showed greater efficiency of the reaction, greater safety in the handling of reagents, reduction of solvent, as well as shorter reaction time with yields similar to the conventional one. All compounds were identified and characterized by GC-MS and by ^1H and ^{13}C NMR. None of the tested compounds showed in vitro AChE inhibition in cerebral cortex and hippocampus. These important results contribute to the structure-activity relationship of such thiazoheterocycles. Since none of the thiazolidinones in this study had an AChE inhibitory presentation, it was suggested that a basic nitrogen is necessary for an interaction with the enzyme and / or is necessary for protonation and, therefore, essential for activity. Another important factor could be the carbon chain link between the thiazolidinone ring and the hexane, since a large (two or more) groups - CH_2 it may be preferable for the recognition of the substrate by AChE (da Silva et al. 2020). In addition, the electronic property of the substituent on the phenyl ring did not influence the activity, which guides us to future studies.

4. EXPERIMENTAL

4.1 Materials and Methods

All solvents and reagents were purchased from Sima-Aldrich Pvt LTd. All reactions are monitored by thin layer chromatography (Merk). The 1D-NMR spectra were obtained using the Bruker Ac-200F spectrometer (^1H at 200MHz and ^{13}C at 50 MHz), in deuterated chloroform (CDCl_3), containing trimethylsilane (TMS) as an internal standard. The 1D-NMR analyzes of proton ^1H and carbon ^{13}C were obtained from the Federal University of Santa Catarina (UFSC) and Federal University of Pelotas (UFPel), for the characterization of compounds **5a-m**. 2D-NMR spectra were obtained using the Bruker Ac-200F spectrometer (250 MHz) in deuterated chloroform (CDCl_3), containing trimethylsilane (TMS) as an internal standard. Spectra processing took place using the FID file using the Magnetic Resonance Companion (MestReC) NMR Manager or Advanced Chemistry Development (ACD 1D NMR Manager). The chromatograms were obtained on a Shimadzu Gas Chromatograph GC-2010 gas chromatograph, HP-1 synthesis column 30 m x 0.32 mm x 0.25 μm . The mass spectra were obtained in a Shimadzu GC-2010-plus device, with automatic injector GC-MS-QP2010SE System AOC-20i, RDS-SMS column 30 m x 0.32 mm x 0.25 μm , at the Federal University of Pelotas. The microwave device of the brand CEMDiscovery-SP W / Activent, model N° 909150, serial N°. DC8141, volts.: 90/140 vac Max Cur.: 7.3 A, frequency 50/60 Hz, Max. PWR.: 725 W, MFG. DATE.: 32231, MAG. Freq.: 2455 MHz, Max. Microwave Power: 300 W, Prod. Tag.: 2118141, 250 V. The melting points of thiazolidin-4-ones derived from cyclohexylmethylamine were determined in a Fisatom brand device, with three capillary tubes, model 430, 230 V, 60 Hz, 50 W. Thermometer up to 360 °C.

4.2. General procedure for synthesis of thiazolidinones 5a-m

4.2.1. Conventional heating

In a 100 mL flask containing 70 mL of toluene and connected to a Dean-Stark system, 1 mmol of 2- cyclohexylmethylamine **1** and 1 mmol of the substituted benzaldehyde **2a-m** were added. The mixture was refluxing for 2 hours, until the formation of the imine intermediate **3a-m**. Afterwards, 3 mmol of the mercaptoacetic acid **4** was added and the reaction was kept under stirring and reflux for another 3 hours to provide the thiazolidin-4-ones **5a-m**. The mixture was washed with saturated sodium bicarbonate solution (NaHCO_3), the organic layer is separated, dried with anhydrous magnesium sulfate (MgSO_4) and the solvent removed in a rotary evaporator. Purification of the crude product was done, when necessary, by washing with hot hexane.

4.2.2. Microwave

In a 50 mL flask, 1 mmol of cyclohexylmethylamine **1**, 1 mmol of substituted benzaldehyde **2a-m**, 3 mmol of mercaptoacetic acid **3** and 10 ml of toluene were added. The reaction was carried out using the microwave device (DiscoverSP CEM) in a closed system, at a temperature of 100 °C, 300W, during 15 min. Subsequently, the reaction mixture was washed with saturated NaHCO_3 solution, separating the organic phase, which was dried with MgSO_4 and the remaining solvent was removed in the rotary evaporator. When necessary, the products were purified by washing with hot hexane (3x10 mL).

4.2.3. Structural Data

3-(cyclohexylmethyl)-2-phenylthiazolidin-4-one (5a) it was obtained as white solid, 89% yield (70% MW), mp 72–75 °C. ¹H RMN (600 MHz, CDCl₃) δ (ppm, *J*_{H-H} = Hz): 7.37 (m, 3H, HAr), 7.27 (dd, 2H, HAr, *J* = 5.7, 2.6), 5.61 (d, 1H, H2, *J* = 1.7), 3.82 (dd, 1H, H5a, *J* = 15.5, 1.5), 3.72 (d, 1H, H5b, *J* = 15.5), 3.57 (dd, 1H, H6a, *J* = 13.8, 8.6), 2.46 (dd, 1H, H6b, *J* = 13.8, 5.9), 1.70-1.56 (m, 6H), 1.21-1.11 (m, 3H), 0.94-0.87 (m, 2H). ¹³C NMR (150 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 171.5 (C4), 139.8, 129.1, 129.1, 126.8, 64.0 (C2), 48.9 (C6), 35.5 (C7), 32.8 (C5), 31.0 (C8'), 30.4 (C8), 26.3 (C9'), 25.8 (C9), 25.7 (C10). MS *m/z* (%): 275 (62), 242 (31), 179 (66), 132 (86), 106 (51), 91 (100).

3-(cyclohexylmethyl)-2-(3-methoxyphenyl)thiazolidin-4-one (5b) it was obtained as yellow solid, 66% yield (72% MW), mp 58–61 °C. ¹H RMN (600 MHz, CDCl₃) δ (ppm, *J*_{H-H} = Hz): 7.29 (t, 1H, HAr, *J* = 7.9), 6.88 (d, 1H, HAr, *J* = 8.1), 6.84 (d, 1H, HAr, *J* = 7.6), 6.79 (br, 1H, HAr), 5.58 (s, 1H, H2), 3.81 (s, 3H, H17, OCH₃), 3.87-3.80 (m, 1H, H5a), 3.71 (d, 1H, H5b, *J* = 15.7), 3.58 (dd, 1H, H6a, *J* = 13.7, 8.5), 2.49 (dd, 1H, H6b, *J* = 13.7, 5.8), 1.72-1.56 (m, 6H), 1.19-1.14 (m, 3H), 0.93-0.83 (m, 2H). ¹³C NMR (150 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 171.6 (C4), 160.2, 141.5, 130.2, 119.0, 114.4, 112.3, 64.0 (C2), 55.4 (C17), 49.0 (C6), 35.6 (C7), 32.8 (C5), 31.0 (C8'), 30.4 (C8), 26.3 (C10), 25.8 (C9'), 25.7 (C9). MS *m/z* (%): 305 (*M*⁺, 65); 274 (100), 214 (70), 198 (40), 178 (55), 166 (60).

3-(cyclohexylmethyl)-2-(2,5-dimethoxyphenyl)thiazolidin-4-one (5c) it was obtained as brown solid 62% yield (84% MW), mp 95–98 °C. ¹H RMN (600 MHz, CDCl₃) δ (ppm, *J*_{H-H} = Hz): 6.83 (dt, 2H, HAr, *J* = 8.8, 5.8), 6.63 (d, 1H, HAr, *J* = 2.8), 5.92 (s, 1H, H2), 3.83 (s, 3H, H17, OCH₃), 3.80 (s, 3H, H18, OCH₃), 3.73 (dd, 1H, H5a, *J* = 15.5, 1.5), 3.64 (dd, 1H, H6a, *J* = 11.0, 5.7), 3.61 (d, 1H, H5b, *J* = 15.4), 2.49 (dd, 1H, H6b, *J* = 13.7, 5.9), 1.70-1.60 (m, 6H), 1.21-1.14 (m, 3H), 0.97-0.88 (m, 2H). ¹³C NMR (150 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 172.2 (C4), 153.9, 151.0, 129.1, 113.8, 112.2, 58.8 (C2), 56.1 (C17), 55.8 (C18), 49.3 (C6), 35.7 (C7), 32.5 (C5), 31.0 (C8'), 30.5 (C8), 26.4 (C10), 25.8 (C9'), 25.7 (C9). MS *m/z* (%): 335 (100), 302 (20), 260 (20), 239 (80), 192 (55), 151 (90).

2-(2-chlorophenyl)-3-(cyclohexylmethyl)thiazolidin-4-one (5d) it was obtained as yellow solid, 49% yield (58% MW), mp 58–61 °C. ¹H RMN (600 MHz, CDCl₃) δ (ppm, *J*_{H-H} = Hz): 7.42 (dd, 1H, HAr, *J* = 7.2, 1.9), 7.28-7.31 (m, 2H, HAr), 7.15 (dd, 1H, HAr, *J* = 7.0, 2.3), 6.03 (s, 1H, H2), 3.73 (dd, 1H, H5a, *J* = 15.4, 0.9), 3.67 (dd, 2H, H5b, H6a, *J* = 16.4, 8.0), 2.45 (dd, 1H, H6b, *J* = 13.8, 5.8), 1.74-1.60 (m, 6H), 1.23-1.15 (m, 3H), 0.97-0.91 (m, 2H). ¹³C NMR (150 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 172.2 (C4), 137.3, 132.8, 130.4, 129.8, 127.7, 126.6, 60.3 (C2), 49.4 (C6), 35.8 (C7), 32.2 (C5), 31.0 (C8'), 30.4 (C8), 26.3 (C10), 25.8 (C9'), 25.7 (C9). MS *m/z* (%): 309 (*M*⁺, 65), 274 (100), 214 (70), 198 (40), 178 (55), 166 (60).

2-(3-chlorophenyl)-3-(cyclohexylmethyl)thiazolidin-4-one (5e) it was obtained as yellow solid, 45% yield (49% MW), mp 76–71 °C. ¹H RMN (600 MHz, CDCl₃) δ (ppm, *J*_{H-H} = Hz): 7.32 (d, 2H, HAr, *J* = 5.1), 7.26 (s, 1H, HAr), 7.15 (dd, 1H, HAr, *J* = 3.6), 5.56 (s, 1H, H2), 3.82 (d, 1H, H5a, *J* = 15.5), 3.71 (d, 1H, H5b, *J* = 15.5), 3.60 (dd, 1H, H6a, *J* = 13.8, 8.6), 2.45 (dd, 1H, H6b, *J* = 13.8, 5.8), 1.74-1.60 (m, 6H), 1.23-1.15 (m, 3H), 0.97-0.94 (m, 2H). ¹³C NMR (150 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 171.4 (C4), 142.2, 135.1, 130.5, 129.3, 126.8, 124.9, 63.4 (C2), 49.0 (C6), 35.5 (C7), 32.7 (C5), 31.0 (C8'), 30.4 (C8), 26.3 (C10), 25.8 (C9'), 25.6 (C9). MS *m/z* (%): 309 (*M*⁺, 91), 214 (99), 166 (100), 140 (65), 125 (85), 55 (81).

2-(4-chlorophenyl)-3-(cyclohexylmethyl)thiazolidin-4-one (5f) it was obtained as white solid, 31% yield (74% MW), mp 83–85 °C. ¹H RMN (600 MHz, CDCl₃) δ (ppm, *J*_{H-H} = Hz): 7.36 (d, 2H, HAr, *J* = 8.4), 7.21 (d, 2H, HAr, *J* = 8.4), 5.58 (d, 1H, H2, *J* = 1.4), 3.80 (dd, 1H, H5a, *J* = 15.5, 1.4), 3.72 (d, 1H, H5b, *J* = 15.5), 3.58 (dd, 1H, H6a, *J* = 13.7, 8.6), 2.42 (dd, 1H, H6b, *J* = 13.7, 5.7), 1.70-1.54 (m, 6H), 1.19-1.14 (m, 3H), 0.95-0.89 (m, 2H). ¹³C NMR (150 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 171.4 (C4), 138.4, 135.0, 129.4, 128.3, 63.3 (C2), 48.9 (C6), 35.5 (C7), 32.8 (C5), 31.0 (C8'), 30.4 (C8), 26.3 (C10), 25.8 (C9'), 25.7 (C9). MS *m/z* (%): 309 (*M*⁺, 35), 276 (19), 213 (50), 166 (89), 125 (100), 55 (57).

3-(cyclohexylmethyl)-2-(2-nitrophenyl)thiazolidin-4-one (5g) it was obtained as yellow solid, 98% yield (56% MW), mp 58–61 °C. ¹H RMN (600 MHz, CDCl₃) δ (ppm, *J*_{H-H} = Hz): 8.16 (dd, 1H, HAr, *J* = 8.1, 1.0), 7.70-7.69 (m, 1H, HAr), 7.55-7.53 (m, 1H, HAr), 7.26 (dd, 1H, HAr, *J* = 7.8, 0.9), 6.22 (d, 1H, H2, *J* = 0.9), 3.77 (dd, 1H, H6a, *J* = 13.8, 8.6), 3.68 (dd, 1H, H5a, *J* = 15.8, 0.8), 3.62 (d, 1H, H5b, *J* = 15.7), 2.41 (d, 1H, H6b, *J* = 13.8, *J* = 5.9), 1.72-1.60 (m, 6H), 1.22-1.12 (m, 3H), 0.96-0.92 (m, 2H). ¹³C NMR (150 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 172.2 (C4), 147.0, 136.8, 134.7, 129.3, 126.2, 126.0, 59.3 (C2), 49.7 (C6), 35.8 (C7), 31.7 (C5), 31.0 (C8'), 30.4 (C8), 26.3 (C10), 25.7 (C9'), 25.6 (C9). MS *m/z* (%): 320 (*M*⁺, 1), 303 (70), 207 (82), 186 (60), 134 (50), 55 (100).

3-(cyclohexylmethyl)-2-(3-nitrophenyl)thiazolidin-4-one (5h) it was obtained as yellow solid, 57% yield (60% MW), mp 89–92 °C. ¹H RMN (600 MHz, CDCl₃) δ (ppm, *J*_{H-H} = Hz): 8.23 (dt, 1H, HAr, *J* = 7.2, 2.0), 8.14 (d, 1H, HAr, *J* = 1.6), 7.62 (dd, 1H, HAr, *J* = 5.7, 4.4), 5.70 (d, 1H, H2, *J* = 1.6), 3.86 (dd, 1H, H5a, *J* = 15.6, 1.5), 3.76 (d, 1H, H5b, *J* = 15.6), 3.64 (dd, 1H, H6a, *J* = 13.9, 8.7), 2.43 (dd, 1H, H6b, *J* = 13.9, 5.8), 1.71-1.55 (m, 6H), 1.19-1.13 (m, 3H), 0.94-0.91 (m, 2H). ¹³C NMR (150 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 171.4 (C4), 148.7, 142.5, 132.6, 130.4, 124.1, 121.96, 63.0 (C2), 49.1 (C6), 35.5 (C7), 32.7 (C5), 31.0 (C8'), 30.3 (C8), 26.2 (C10), 25.7 (C9'), 25.6 (C9). MS *m/z* (%): 320 (*M*⁺·40), 225 (96), 209 (35), 151 (40), 96 (80), 55 (100).

3-(cyclohexylmethyl)-2-(4-nitrophenyl)thiazolidin-4-one (5i) it was obtained as yellow solid, 89% yield (54% MW), mp 106–109 °C. ¹H RMN (600 MHz, CDCl₃) δ (ppm, *J*_{H-H} = Hz): 8.26 (d, 2H, HAr, *J* = 8.6), 7.44 (d, 1H, HAr, *J* = 8.6), 5.69 (d, 1H, H2, *J* = 1.4), 3.83 (dd, 1H, H5a, *J* = 15.6, 1.3), 3.75 (d, 1H, H5b, *J* = 15.6), 3.65 (dd, 1H, H6a, *J* = 13.9, 8.7), 2.47 (dd, 1H, H6b, *J* = 13.8, 5.8), 1.72-1.55 (m, 6H), 1.20-1.15 (m, 3H), 0.94-0.91 (m, 2H). ¹³C NMR (150 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 171.4 (C4), 148.2, 147.3, 127.5, 124.5, 62.8 (C2), 49.2 (C6), 35.8 (C7), 32.6 (C5), 31.0 (C8'), 30.3 (C8), 26.2 (C10), 25.7 (C9'), 25.6 (C9). MS *m/z* (%): 320 (*M*⁺·22), 225 (42), 209 (28), 96 (60), 55 (100), 41 (80).

3-(cyclohexylmethyl)-2-(2-fluorophenyl)thiazolidin-4-one (5j) it was obtained as white solid, 10% yield (67% MW), mp 81–83 °C. ¹H RMN (600 MHz, CDCl₃) δ (ppm, *J*_{H-H} = Hz): 7.33 (dd, 1H, HAr, *J* = 8.2, 1.7), 7.21 (dd, 1H, HAr, *J* = 7.5, 1.8), 7.18-7.16 (m, 1H, HAr), 7.11-1.08 (m, 1H, HAr), 5.91 (d, 1H, H2, *J* = 1.7), 3.81 (dd, 1H, H5a, *J* = 15.4, 1.4), 3.68 (d, 1H, H5b, *J* = 15.4), 3.62 (dd, 1H, H6a, *J* = 13.8, 8.5), 2.46 (dd, 1H, H6b, *J* = 13.8, 5.8), 1.71-1.60 (m, 6H), 1.23-1.16 (m, 3H), 0.95-0.90 (m, 2H). ¹³C NMR (150 MHz, CDCl₃) δ (ppm, *J*_{C-F} = Hz): 171.7 (C4), 160.4 (d, C12, *J* = 248.6), 130.5 (d, C16, *J* = 8.3), 127.6 (d, C14, *J* = 3.1), 127.3 (d, C11, *J* = 11.5), 124.8 (d, C15, *J* = 3.6), 116.2 (d, C13, *J* = 21.2), 57.4 (d, C2, *J* = 4.3), 49.2 (C6), 35.7 (C7), 32.6 (C5), 31.0 (C8'), 30.4 (C8), 26.3 (C10), 25.8 (C9'), 25.7 (C9). MS *m/z* (%): 293 (*M*⁺·61), 198 (77), 150 (84), 124 (55), 109 (100), 55 (62).

3-(cyclohexylmethyl)-2-(3-fluorophenyl)thiazolidin-4-one (5k) it was obtained as white solid, 49% yield (67% MW), mp 107–109 °C. ¹H RMN (600 MHz, CDCl₃) δ (ppm, *J*_{H-H} = Hz): 7.36 (dd, 1H, HAr, *J* = 7.9, 2.1), 7.06-7.04 (m, 1H, HAr), 6.98 (dd, 1H, HAr, *J* = 9.2, 1.9), 5.59 (d, 1H, H2, *J* = 1.5), 3.81 (dd, 1H, H5a, *J* = 15.5, 1.8), 3.71 (d, 1H, H5b, *J* = 15.5), 3.60 (dd, 1H, H6a, *J* = 13.8, 8.6), 2.46 (dd, 1H, H6b, *J* = 13.8, 5.9), 1.73-1.56 (m, 6H), 1.19-1.14 (m, 3H), 0.95-0.90 (m, 2H). ¹³C NMR (150 MHz, CDCl₃) δ (ppm, *J*_{C-F} = Hz): 171.4 (C4), 163.2 (d, C13, *J* = 248.1), 142.7 (d, C11, *J* = 6.5), 130.8 (d, C15, *J* = 8.1), 122.3 (d, C16, *J* = 2.8), 116.1 (d, C12, *J* = 21.2), 113.7 (d, C14, *J* = 22.2), 63.3 (d, C2, *J* = 1.5), 49.0 (C6), 35.5 (C7), 32.7 (C5), 31.0 (C8'), 30.4 (C8), 26.3 (C10), 25.7 (C9'), 25.6 (C9). MS *m/z* (%): 293 (*M*⁺·61), 198 (77), 150 (84), 124 (55), 109 (100), 55 (62).

3-(cyclohexylmethyl)-2-(4-fluorophenyl)thiazolidin-4-one (5l) it was obtained as yellow solid, 88% yield (40% MW), mp 109–112 °C. ¹H RMN (600 MHz, CDCl₃) δ (ppm, *J*_{H-H} = Hz): 7.28-7.26 (m, 2H, HAr), 7.08 (t, 2H, HAr, *J* = 8.5), 5.61 (s, 1H, H2), 3.80 (dd, 1H, H5a, *J* = 15.5, 1.3), 3.72 (d, 1H, H5b, *J* = 15.5), 3.56 (dd, 1H, H6a, *J* = 13.8, 8.7), 2.43 (dd, 1H, H6b, *J* = 13.8, 5.9), 1.72-1.53 (m, 6H), 1.18-1.14 (m, 3H), 0.92-0.88 (m, 2H). ¹³C NMR (150 MHz, CDCl₃) δ (ppm, *J*_{C-F} = Hz): 171.3 (C4), 163.0 (d, C14, *J* = 248.6), 135.5 (d, C11, *J* = 2.9), 128.8 (d, C12, *J* = 8.4), 116.1 (d, C13, *J* = 21.8), 113.7 (d, C14, *J* = 22.2), 63.3 (d, C2, *J* = 1.5), 63.4 (C2), 48.9 (C6), 35.5 (C7), 32.8 (C5), 31.0 (C8'), 30.4 (C8), 26.8 (C10), 25.8 (C9'), 25.6 (C9). MS *m/z* (%): 293 (*M*⁺·62), 260 (39), 197 (60), 150 (100), 124 (56), 109 (81).

3-(cyclohexylmethyl)-2-*p*-tolylthiazolidin-4-one (5m) it was obtained as white solid, 82% yield (48% MW), mp 116–118 °C. ¹H RMN (600 MHz, CDCl₃) δ (ppm, *J*_{H-H} = Hz): 7.19 (d, 2H, HAr, *J* = 8.0), 7.15 (d, 2H, HAr, *J* = 8.1), 5.59 (d, 1H, H2, *J* = 1.6), 3.80 (dd, 1H, H5a, *J* = 15.5, 1.3), 3.71 (d, 1H, H5b, *J* = 15.5), 3.56 (dd, 1H, H6a, *J* = 13.7, 8.6), 2.45 (dd, 1H, H6b, *J* = 13.7, 5.9), 2.36 (s, 3H, H15), 1.72-1.54 (m, 6H), 1.19-1.15 (m, 3H), 0.95-0.89 (m, 2H). ¹³C NMR (150 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 171.5 (C4), 139.1, 136.8, 129.8, 126.8, 63.9 (C2), 48.9 (C6), 35.5 (C7), 32.9 (C5), 31.0 (C8'), 30.4 (C8), 26.3 (C10), 25.8 (C9'), 25.7 (C9), 21.3 (C15). MS *m/z* (%): 289 (*M*⁺·70), 256 (65), 193 (49), 146 (100), 121 (61), 105 (98).

4.3. AChE Assay

4.3.1 Animals

Five Wistar male rats (60 days of life, 300–400 g) were obtained from the Central Animal House of the Federal University of Pelotas, Pelotas, RS, Brazil. All procedures involving the animals were approved by Committee of Ethics and Animal Experimentation of the institution (CEEAA 9220).

4.3.2. In vitro assay of the AChE activity

Animals were anesthetized and euthanased. The brain was removed and cerebral cortex and hippocampus were collected. The brain structures were homogenized in 10 mM Tris HCl buffer (pH 7.4) and centrifuged at 1300 g for 10 min. at 4 °C. The pellet was discarded and the supernatant was used for the assay of AChE total activity. AChE activity was determined on a microplate according to the method of Ellmann et al. (1961) which has as its principle the hydrolysis of the substrate acetylthiocholine converting into two products, thiocoline and acetate. Thiocoline, in turn, reacts with 5,5-dithio-bis- (2-nitrobenzoic acid) (DTNB) to form a chromophore group, 5-thio-2-nitrobenzoic which is quantified spectrophotometrically at 412 nm during 2 min. with interval of 27 at 30°C. The compounds were solubilized in methanol and added in the AChE assays in the final concentrations of the 1, 10, 25, 50 e 100 µM. Cerebral cortex or hippocampus homogenates were pre-incubated with the compounds for 2 min. Water and vehicle (methanol) was used as control. The reaction was started by adding acetylcholine iodide as substrate. AChE activity was expressed in µmoles of AcSCh/h/mg of protein.

Proteins were determined by the method of Bradford et al. (1976) using the Comassie Blue reagent, with bovine albumin being used as a standard.

4.3.3 Statistical analysis

The data were evaluated by one-way ANOVA followed by the Tukey's test for multiple comparisons. The difference between mean values was considered significant when $P < 0.05$ compared to the control group. All data were expressed as mean $\pm$ standard error.

5. Supplementary information

The supplementary information contains the GC-MS, the ^1H and ^{13}C NMR and the 2D NMR spectra for all compounds.

6. Acknowledgements

The authors thank UFPel, CNPq and FAPERGS for the financial support. Fellowships granted to W.C. and R.M.S by CNPq.

7. References

- Agrawal N (2021) Synthetic and therapeutic potential of 4-thiazolidinone and its analogs. *Curr Chem Lett* 10:119–138. <https://doi.org/10.5267/j.ccl.2020.11.002>
- Ayyash AN, Hammady AO (2020) Synthesis and Bioactivity Screening of New 1, 3-Thiazolidin-4-One Compounds Bearing (Thiadiazols / Triazoles) Moieties. *J Phys Conf Ser* 1660:. <https://doi.org/10.1088/1742-6596/1660/1/012025>
- Berwaldt GA, Gouvêa DP, da Silva DS, et al (2019) Synthesis and biological evaluation of benzothiazin-4-ones: a possible new class of acetylcholinesterase inhibitors. *J Enzyme Inhib Med Chem* 34:197–203. <https://doi.org/10.1080/14756366.2018.1543286>
- Bhosle MR, Kharote SA, Bondle GM, Mali JR (2019) Tromethamine organocatalyzed efficient tandem-multicomponent synthesis of new thiazolyl-4-thiazolidinones in

- aqueous medium. *Synth Commun* 49:1286–1300.
<https://doi.org/10.1080/00397911.2019.1597124>
- Bosenbecker J, Bareño VDO, Difabio R, et al (2014) Synthesis and antioxidant activity of 3-(Pyridin-2-ylmethyl)-1,3-thiazinan(thiazolidin)-4-ones. *J Biochem Mol Toxicol* 28:425–432. <https://doi.org/10.1002/jbt.21581>
- Bowen DM, Smith CB, White P, Davison AN (1976) Neurotransmitter-related enzymes and indices of hypoxia in senile dementia and other abiotrophies. *Brain* 99:459–496. <https://doi.org/10.1093/brain/99.3.459>
- Campos JC, Gouvêa DP, Ribeiro C da S, et al (2013) Efficient synthesis and antioxidant evaluation of 2-Aryl-3-(pyrimidin-2-yl)-Thiazolidinones. *J Biochem Mol Toxicol* 27:445–450. <https://doi.org/10.1002/jbt.21506>
- Chatel G, Varma RS (2019) Ultrasound and microwave irradiation: Contributions of alternative physicochemical activation methods to Green Chemistry. *Green Chem* 21:6043–6050. <https://doi.org/10.1039/c9gc02534k>
- Cranston AL, Wysocka A, Steczkowska M, et al (2020) Cholinergic and inflammatory phenotypes in transgenic tau mouse models of Alzheimer's disease and frontotemporal lobar degeneration. *Brain Commun* 2:1–17.
<https://doi.org/10.1093/braincomms/fcaa033>
- Cruz JN, Silva SG, Bezerra FWF, et al (2019) Síntese Orgânica, Inorgânica E De Nanomateriais Assistida Por Micro-Ondas: Uma Mini Revisão. *As Ciências Exatas e da Terra no Século XXI* 2 123–131. <https://doi.org/10.22533/at.ed.80519071012>
- da Silva DS, da Silva CEH, Soares MSP, et al (2016) Thiazolidin-4-ones from 4-(methylthio)benzaldehyde and 4-(methylsulfonyl)benzaldehyde: Synthesis, antglioma activity and cytotoxicity. *Eur J Med Chem* 124:574–582.
<https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2016.08.057>

- da Silva DS, Soares MSP, Martini F, et al (2020) In Vitro Effects of 2-{4-[Methylthio(methylsulfonyl)]phenyl}-3-substitutedthiazolidin-4-ones on the Acetylcholinesterase Activity in Rat Brain and Lymphocytes: Isoform Selectivity, Kinetic Analysis, and Molecular Docking. *Neurochem Res* 45:241–253. <https://doi.org/10.1007/s11064-019-02929-8>
- da Silveira EF, Azambuja JH, de Carvalho TR, et al (2017) Synthetic 2-aryl-3-((piperidin-1-yl)ethyl)thiazolidin-4-ones exhibit selective in vitro antitumoral activity and inhibit cancer cell growth in a preclinical model of glioblastoma multiforme. *Chem Biol Interact* 266:1–9. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2017.02.001>
- da Silveira EF, Ferreira LM, Gehrcke M, et al (2019) 2-(2-Methoxyphenyl)-3-((Piperidin-1-yl)ethyl)thiazolidin-4-One-Loaded Polymeric Nanocapsules: In Vitro Antiglioma Activity and In Vivo Toxicity Evaluation. *Cell Mol Neurobiol* 39:783–797. <https://doi.org/10.1007/s10571-019-00678-4>
- das Neves AM, Berwaldt GA, Avila CT, et al (2020) Synthesis of thiazolidin-4-ones and thiazinan-4-ones from 1-(2-aminoethyl)pyrrolidine as acetylcholinesterase inhibitors. *J Enzyme Inhib Med Chem* 35:31–41. <https://doi.org/10.1080/14756366.2019.1680659>
- das Neves AM, Campos JC, Gouvêa DP, et al (2019) Synthesis of Novel Thiazolidin-4-ones and Thiazinan-4-ones Analogous to Rosiglitazone. *J Heterocycl Chem* 56:251–259. <https://doi.org/10.1002/jhet.3402>
- Díaz-Ortiz, Prieto P, de la Hoz A (2019) A Critical Overview on the Effect of Microwave Irradiation in Organic Synthesis. *Chem Rec* 19:85–97. <https://doi.org/10.1002/tcr.201800059>
- Du X, Wang X, Geng M (2018) Alzheimer's disease hypothesis and related therapies. *Transl Neurodegener* 7:1–7. <https://doi.org/10.1186/s40035-018-0107-y>

- Fronza MG, Baldinotti R, Martins MC, et al (2019) Rational design, cognition and neuropathology evaluation of QTC-4-MeOBnE in a streptozotocin-induced mouse model of sporadic Alzheimer's disease. *Sci Rep* 9:1–14.
<https://doi.org/10.1038/s41598-019-43532-9>
- García-Soldevilla MA, Enjuanes García A, Barragán Martínez D, et al (2019) Therapeutic aspects in dementias. *Med* 12:4357–4366.
<https://doi.org/10.1016/j.med.2019.03.014>
- Gonçalves S, Outeiro TF (2015) A disfunção cognitiva nas doenças neurodegenerativas. *Rev Bras Ciências do Envelhec Hum* 12:. <https://doi.org/10.5335/rbceh.v12i3.6007>
- Gouvêa DP, Bareño VDO, Bosenbecker J, et al (2012) Ultrasonics promoted synthesis of thiazolidinones from 2-aminopyridine and 2-picolilamine. *Ultrason Sonochem* 19:1127–1131. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2012.03.004>
- Gouvêa DP, Berwaldt GA, Neuenfeldt PD, et al (2016) Synthesis of novel 2-Aryl-3-(2-morpholinoethyl)-1,3-thiazinan-4-ones via ultrasound irradiation. *J Braz Chem Soc* 27:1109–1115. <https://doi.org/10.5935/0103-5053.20160009>
- Güzel-Akdemir Ö, Trawally M, Özbek-Babuç M, et al (2020) Synthesis and antibacterial activity of new hybrid derivatives of 5-sulfamoyl-1H-indole and 4-thiazolidinone groups. *Monatshefte fur Chemie* 151:1443–1452.
<https://doi.org/10.1007/s00706-020-02664-9>
- Hassan AA, Aly AA, Ramadan M, et al (2020) Stereoselective synthesis of 2-(2,4-dinitrophenyl)hydrazono- and (2-tosylhydrazono)-4-oxo-thiazolidine derivatives and screening of their anticancer activity. *Monatshefte fur Chemie* 151:1453–1466.
<https://doi.org/10.1007/s00706-020-02671-w>
- Henary M, Kananda C, Rotolo L, et al (2020) Benefits and applications of microwave-assisted synthesis of nitrogen containing heterocycles in medicinal chemistry. *RSC*

- Adv 10:14170–14197. <https://doi.org/10.1039/d0ra01378a>
- Hussein RA, Afifi AH, Soliman AAF, et al (2020) Neuroprotective activity of *Ulmus pumila* L. in Alzheimer's disease in rats; role of neurotrophic factors. *Heliyon* 6:1–13. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2020.e05678>
- Jain AK, Vaidya A, Ravichandran V, et al (2012) Recent developments and biological activities of thiazolidinone derivatives: A review. *Bioorganic Med Chem* 20:3378–3395. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2012.03.069>
- Jin X, Wang M, Shentu J, et al (2020) Inhibition of acetylcholinesterase activity and β -amyloid oligomer formation by 6-bromotryptamine A, a multi-target anti-Alzheimer's molecule. *Oncol Lett* 19:1593–1601. <https://doi.org/10.3892/ol.2019.11226>
- Jung M, Park M (2007) Acetylcholinesterase inhibition by flavonoids from *Agrimonia pilosa*. *Molecules* 12:2130–2139. <https://doi.org/10.3390/12092130>
- Kalhor M, Banibairami S (2020) Design of a new multi-functional catalytic system Ni/SO₃H@zeolite-Y for three-component synthesis of: N -benzo-imidazo- or -thiazole-1,3-thiazolidinones. *RSC Adv* 10:41410–41423. <https://doi.org/10.1039/d0ra08237f>
- Kalhor M, Banibairami S, Mirshokraie SA (2017) A one-pot multi-component reaction for the facile synthesis of some novel 2-aryl thiazolidinones bearing benzimidazole moiety using La(NO₃)₃·6H₂O as an efficient catalyst. *Res Chem Intermed* 43:5985–5994. <https://doi.org/10.1007/s11164-017-2974-8>
- Kladnik J, Ristovski S, Kljun J, et al (2020) Structural isomerism and enhanced lipophilicity of pyrrithione ligands of organoruthenium(II) complexes increase inhibition on AChE and BuChE. *Int J Mol Sci* 21:1–17. <https://doi.org/10.3390/ijms21165628>

- Kumar D, Gupta SK, Ganeshpurkar A, et al (2018) Development of Piperazinediones as dual inhibitor for treatment of Alzheimer's disease. *Eur J Med Chem* 150:87–101. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2018.02.078>
- Kumar R, Patil S, Pharm M (2017) Biological Prospective of 4-Thiazolidinone: a Review. *HygeiaJDMed* 9:3590. <https://doi.org/10.15254/H.J.D.Med.9.2017.166>
- Loro LB, Jaeger De Belli A, Gr C, et al (2018) HISTÓRIA DA NEUROTRANSMISSÃO: UM BREVE RELATO HISTORY OF NEUROTRANSMISSION: A BRIEF REPORT MARCELO GARCIA TONETO e LUIZ GUSTAVO GUILHERMANO 2
- Mendes CP, Postal BG, Oliveira GTC, et al (2018) Insulin stimulus-secretion coupling is triggered by a novel thiazolidinedione/sulfonylurea hybrid in rat pancreatic islets. *J Cell Physiol* 234:509–520. <https://doi.org/10.1002/jcp.26746>
- Mohammad D, Chan P, Bradley J, et al (2017) Acetylcholinesterase inhibitors for treating dementia symptoms - a safety evaluation. *Expert Opin Drug Saf* 16:1009–1019. <https://doi.org/10.1080/14740338.2017.1351540>
- Nain S, Singh R, Ravichandran S (2019) Importance of Microwave Heating In Organic Synthesis. *Adv J Chem A* 2:94–104. <https://doi.org/10.29088/sami/ajca.2019.2.94104>
- Neves AHS, da Silva DS, Siqueira GM, et al (2018) The antinociceptive evaluation of 2,3-substituted-1,3-thiazolidin-4-ones through thermal stimulation in mice. *Med Chem Res* 27:186–193. <https://doi.org/10.1007/s00044-017-2052-1>
- Nirwan S, Chahal V, Kakkar R (2019) Thiazolidinones: Synthesis, Reactivity, and Their Biological Applications. *J Heterocycl Chem* 56:1239–1253. <https://doi.org/10.1002/jhet.3514>
- Pedra NS, De Cássia Araújo Galdino K, Da Silva DS, et al (2018) Endophytic fungus

- isolated from *achyrocline satureioides* exhibits selective antiglioma activity-the role of sch-642305. *Front Oncol* 8:1–20. <https://doi.org/10.3389/fonc.2018.00476>
- Petronilha EDC, Pintob AC, Villara JDF (2011) Acetilcolinesterase: Alzheimer e guerra química. *Ciência e Tecnol* 3–14
- Preeti, Singh KN (2018) Multicomponent reactions: A sustainable tool to 1,2-and 1,3-azoles. *Org Biomol Chem* 16:9084–9116. <https://doi.org/10.1039/c8ob01872c>
- Sahiba N, Sethiya A, Soni J, et al (2020) Saturated Five-Membered Thiazolidines and Their Derivatives: From Synthesis to Biological Applications. Springer International Publishing
- Saini N, Sharma A, Thakur VK, et al (2020) Microwave assisted green synthesis of thiazolidin-4-one derivatives: A perspective on potent antiviral and antimicrobial activities. *Curr Res Green Sustain Chem* 3:100021. <https://doi.org/10.1016/j.crgsc.2020.100021>
- Shin J, Kong C, Lee J, et al (2019) Focused ultrasound-induced blood-brain barrier opening improves adult hippocampal neurogenesis and cognitive function in a cholinergic degeneration dementia rat model. *Alzheimer's Res Ther* 11:1–15. <https://doi.org/10.1186/s13195-019-0569-x>
- Song X, Wang T, Guo L, et al (2020) In Vitro and in Vivo Anti-AChE and Antioxidative Effects of *Schisandra chinensis* Extract: A Potential Candidate for Alzheimer's Disease. *Evidence-based Complement Altern Med* 2020:1. <https://doi.org/10.1155/2020/2804849>
- Subhedar DD, Yadav PA, Pawar SR, Bhanage BM (2020) Environmentally Benign Synthesis of 4-Thiazolidinone Derivatives Using a Co/Al Hydrotalcite as Heterogeneous Catalyst. *Catal Letters*. [https://doi.org/10.1007/s10562-020-03436-](https://doi.org/10.1007/s10562-020-03436-0)

- Tsvelikhovsky D, Buchwald SL (2011) Concise palladium-catalyzed synthesis of dibenzodiazepines and structural analogues. *J Am Chem Soc* 133:14228–14231. <https://doi.org/10.1021/ja206229y>
- Vakili R, Xu S, Al-Janabi N, et al (2018) Microwave-assisted synthesis of zirconium-based metal organic frameworks (MOFs): Optimization and gas adsorption. *Microporous Mesoporous Mater* 260:45–53. <https://doi.org/10.1016/j.micromeso.2017.10.028>
- Viegas C, Da Silva Bolzani V, Furlan M, et al (2004) Natural products as candidates for useful drugs in the treatment of Alzheimer's disease. *Quim Nova* 27:655–660. <https://doi.org/10.1590/s0100-40422004000400021>
- Vitaku E, Smith DT, Njardarson JT (2014) Analysis of the structural diversity, substitution patterns, and frequency of nitrogen heterocycles among U.S. FDA approved pharmaceuticals. *J Med Chem* 57:10257–10274. <https://doi.org/10.1021/jm501100b>
- Wang Y, Xia J, Shen M, et al (2019) Effects of Bis-MEP on reversing amyloid plaque deposition and spatial learning and memory impairments in a mouse model of β -amyloid peptide- And ibotenic acid-induced Alzheimer's disease. *Front Aging Neurosci* 11:1–11. <https://doi.org/10.3389/fnagi.2019.00003>
- Xie L, Kang H, Xu Q, et al (2013) Sleep drives metabolite clearance from the adult brain. *Science* (80-) 342:373–377. <https://doi.org/10.1126/science.1241224>

Supplementary Material

Synthesis and evaluation of anti-cholinesterase potential of thiazolidin-4-ones from 2-cyclohexylethanamine and arenealdehydes

Bruna C. Moreira · Adriana M. Neves · Cinara T. Ávila · Melinda G. Victor · Mayara S.

P. Soares · Roselia M. Spanevello · Geonir M. Siqueira · Wilson Cunico

Table of Contents	Figure / Table	Page
GC-MS spectra	S01-S13	2-14
¹ H- and ¹³ C-NMR spectra	S14-S39	15-27
2D NMR (COSY and HSQC)	S40-S42	28-29

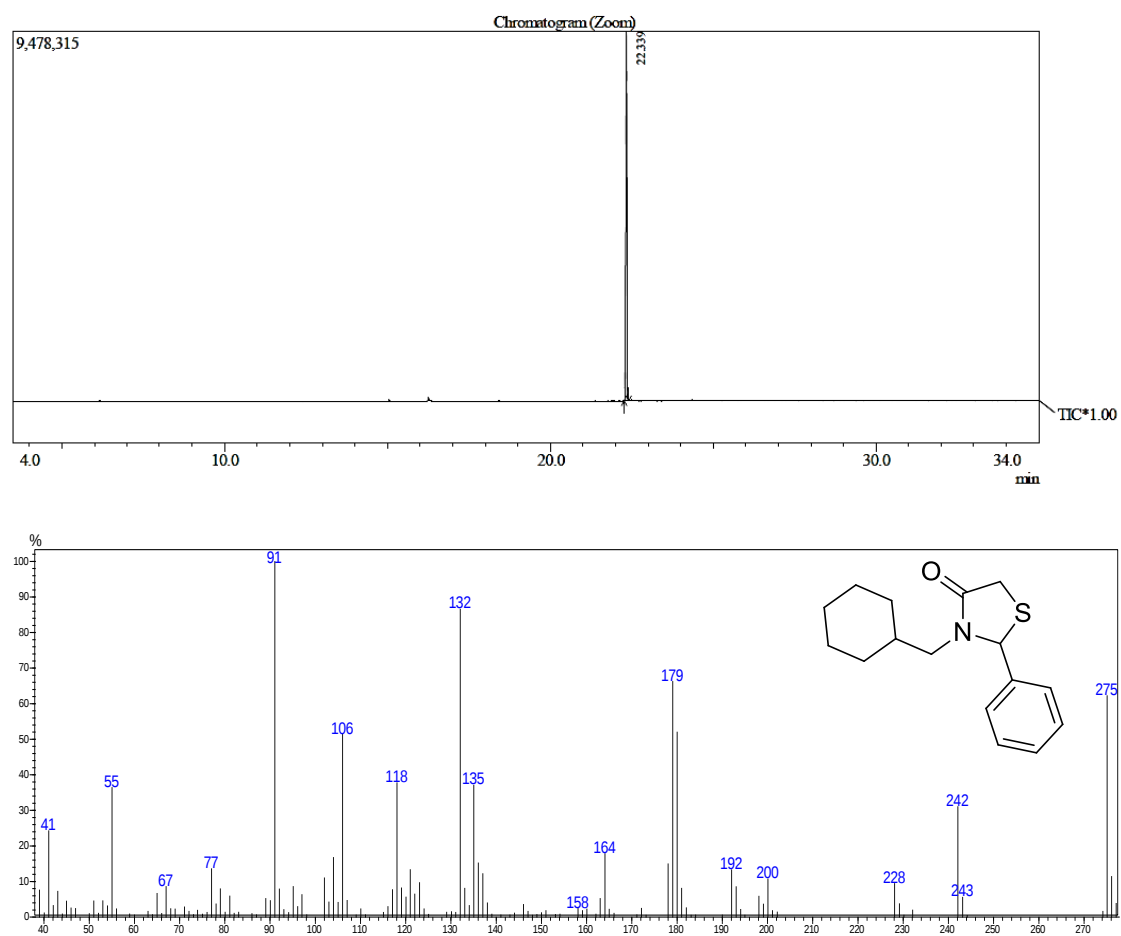


Figure S01: GC/MS of thiazolidin-4-one 5a.

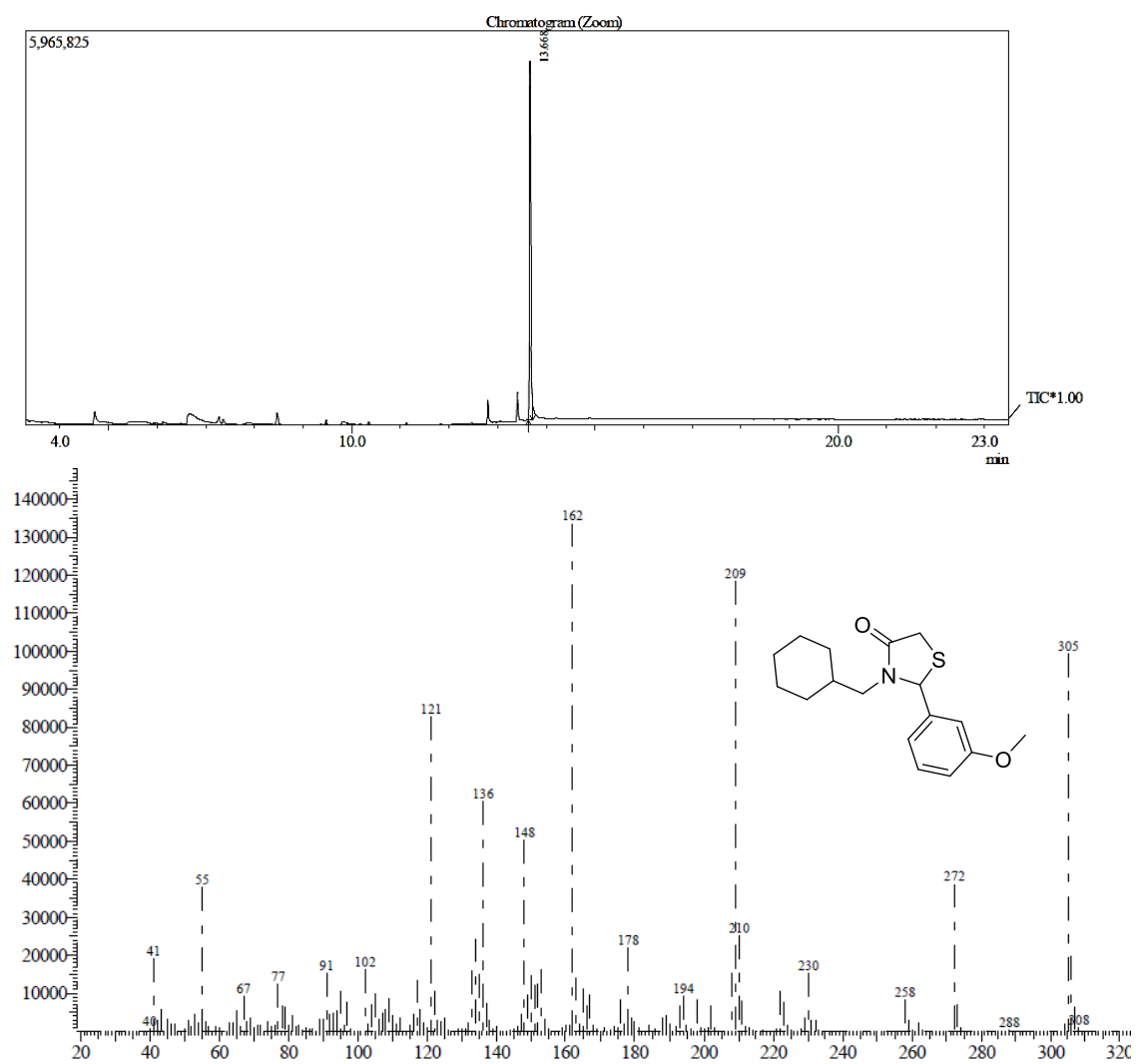


Figure S02: GC/MS of thiazolidin-4-one 5b.

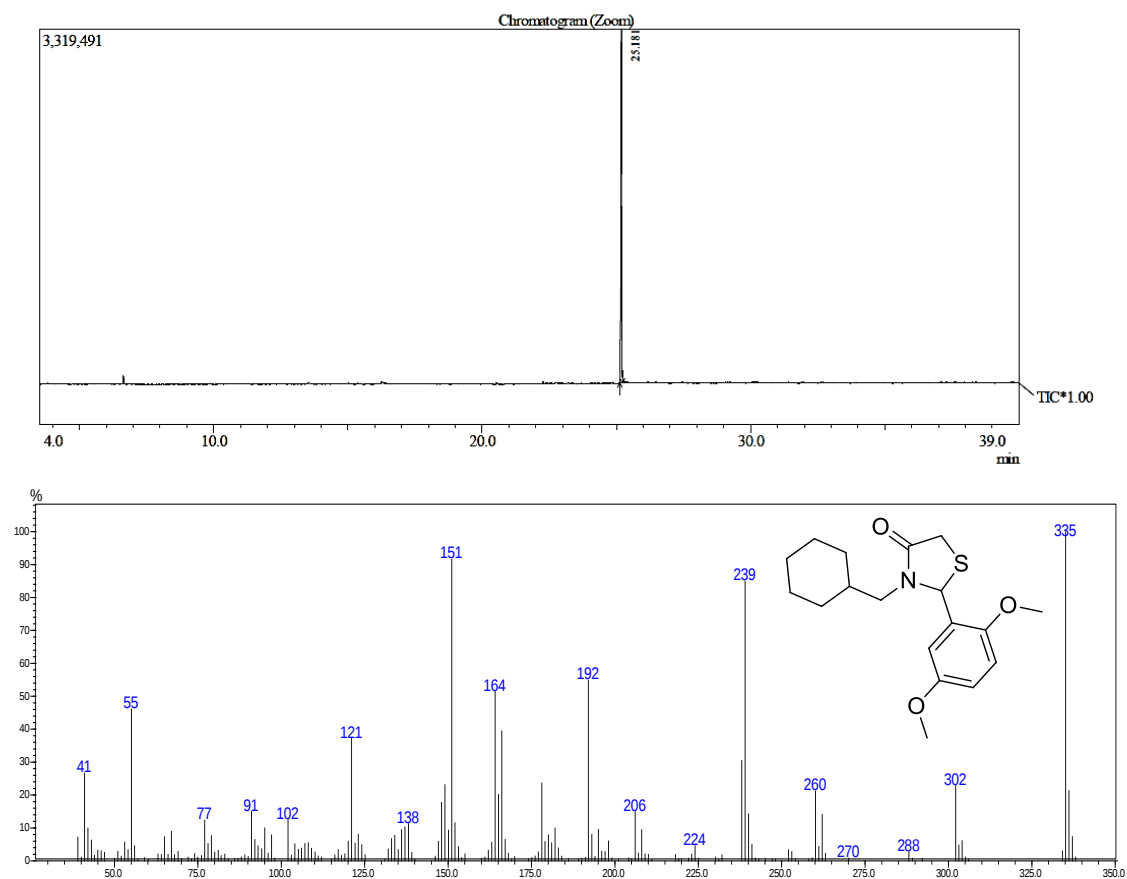


Figure S03: GC/MS of thiazolidin-4-one 5c.

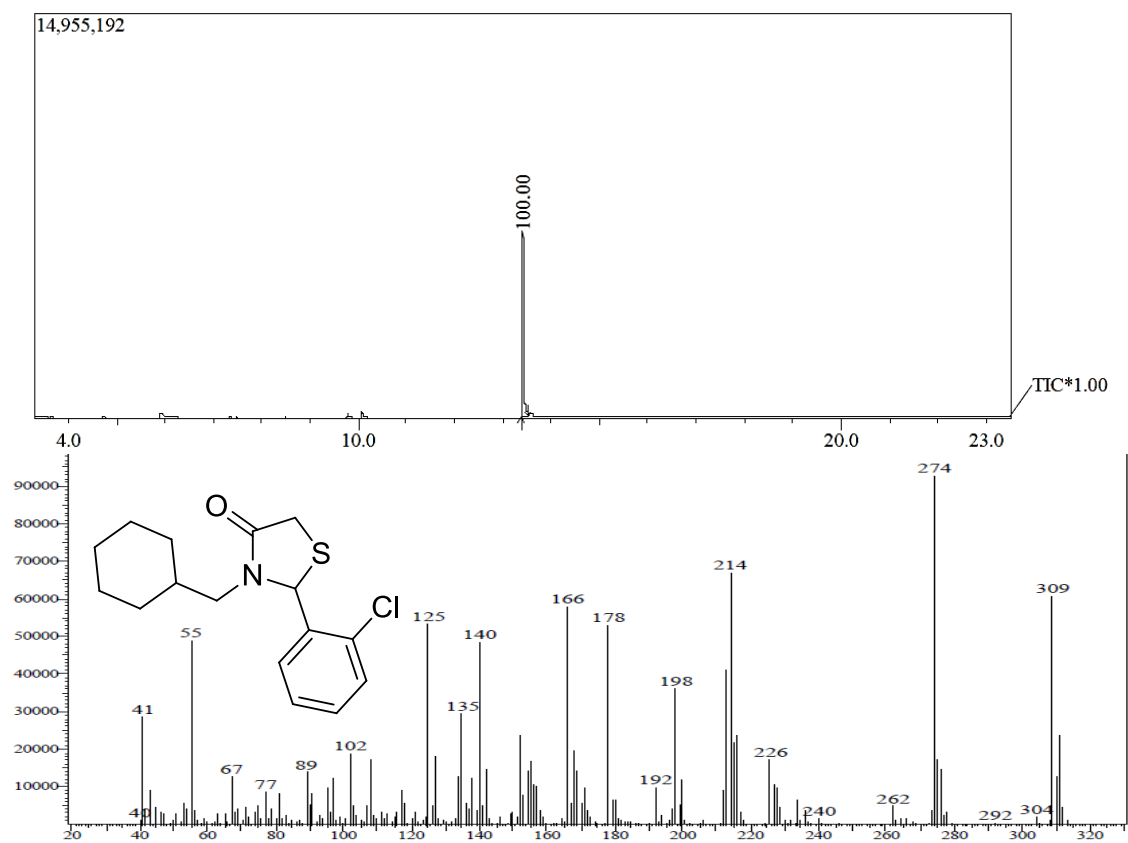


Figure S04: GC/MS of thiazolidin-4-one 5d.

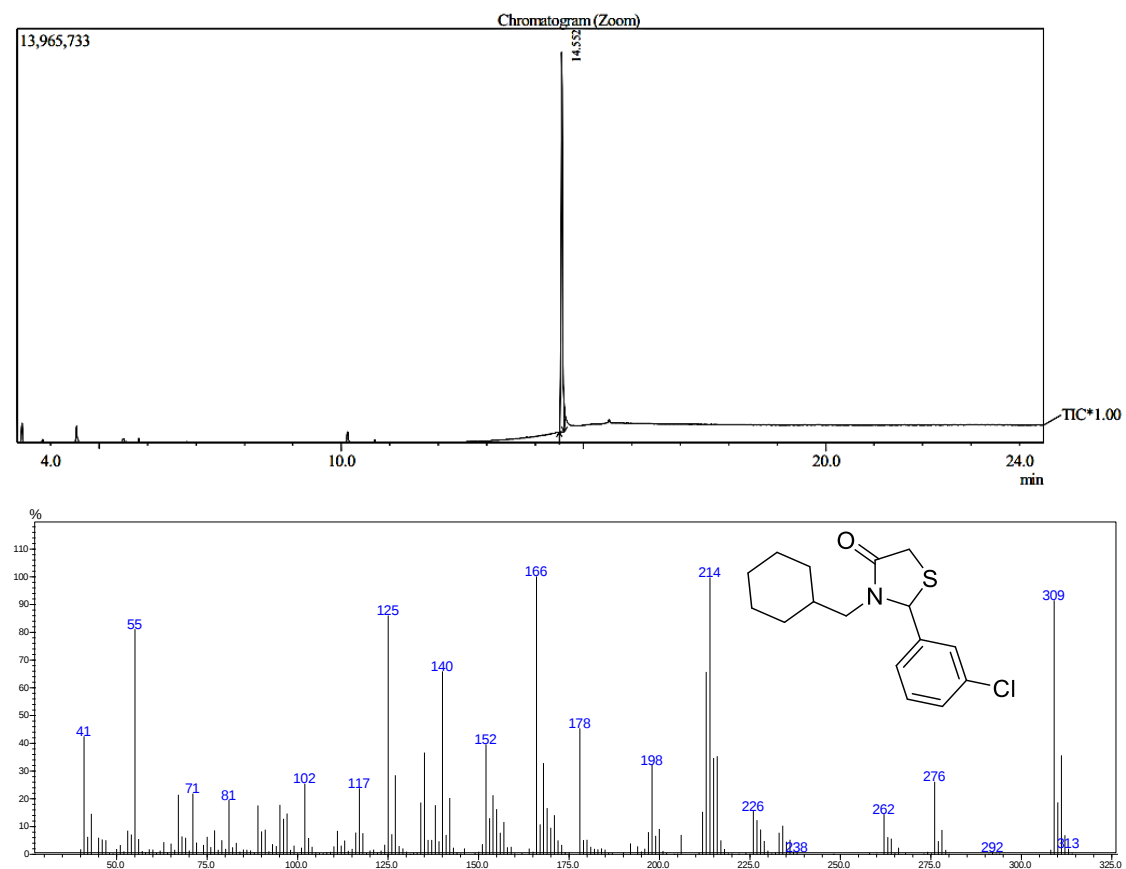


Figure S05: GC/MS of thiazolidin-4-one 5e.

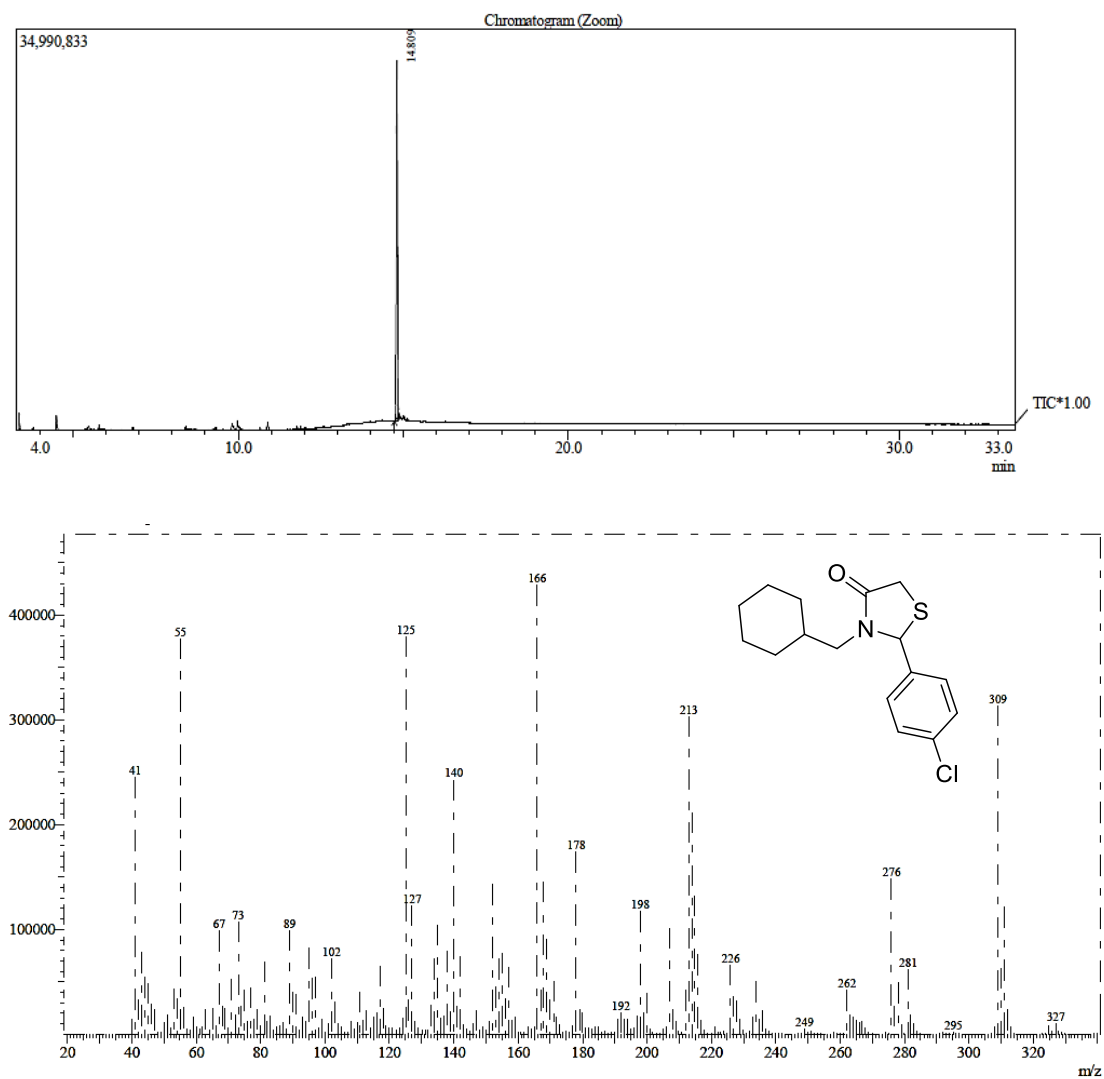


Figure S06: GC/MS of thiazolidin-4-one **5f**.

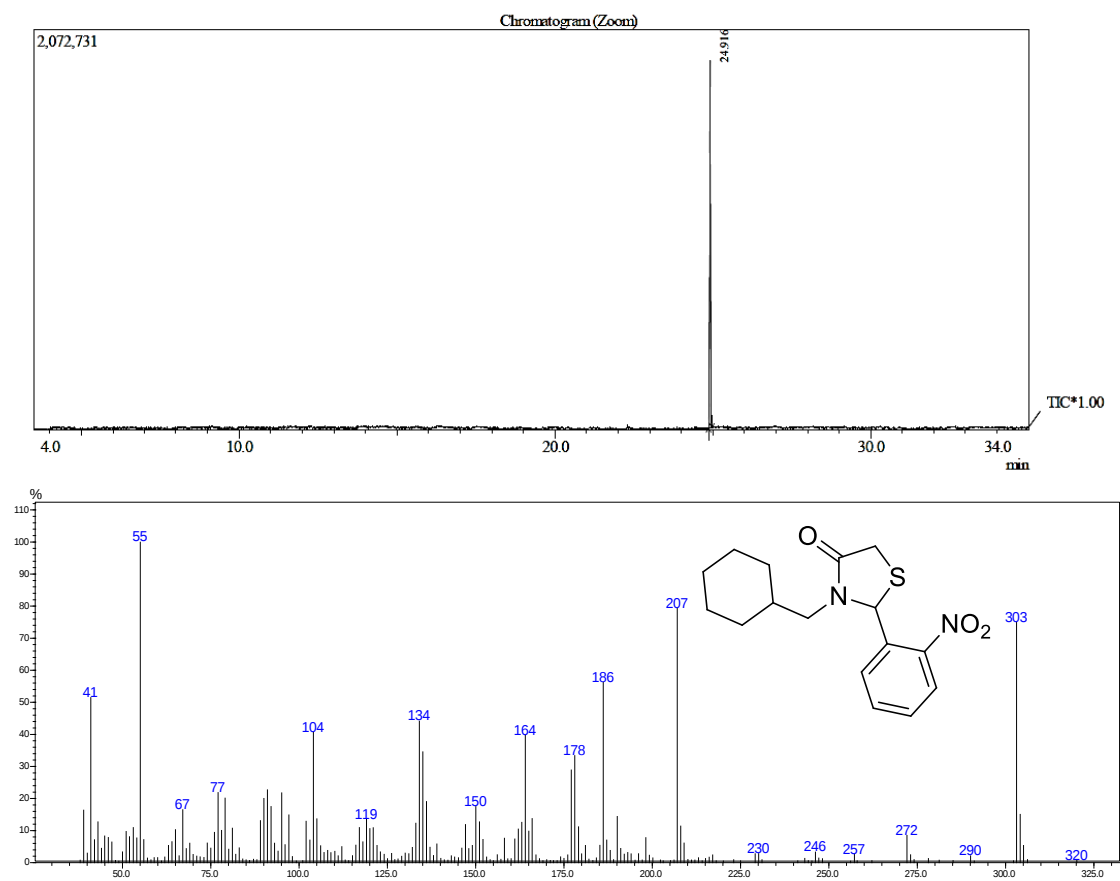


Figure S07: GC/MS of thiazolidin-4-one **5g**.

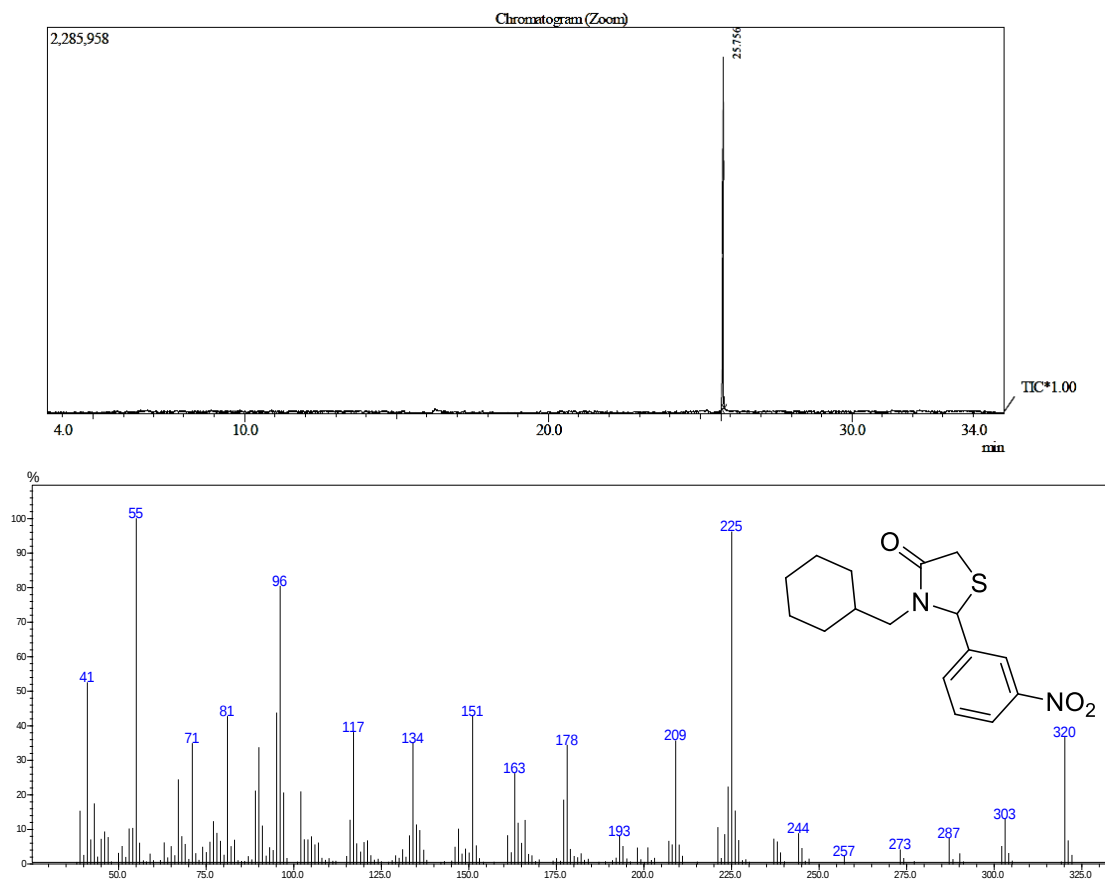


Figure S08: GC/MS of thiazolidin-4-one 5h.

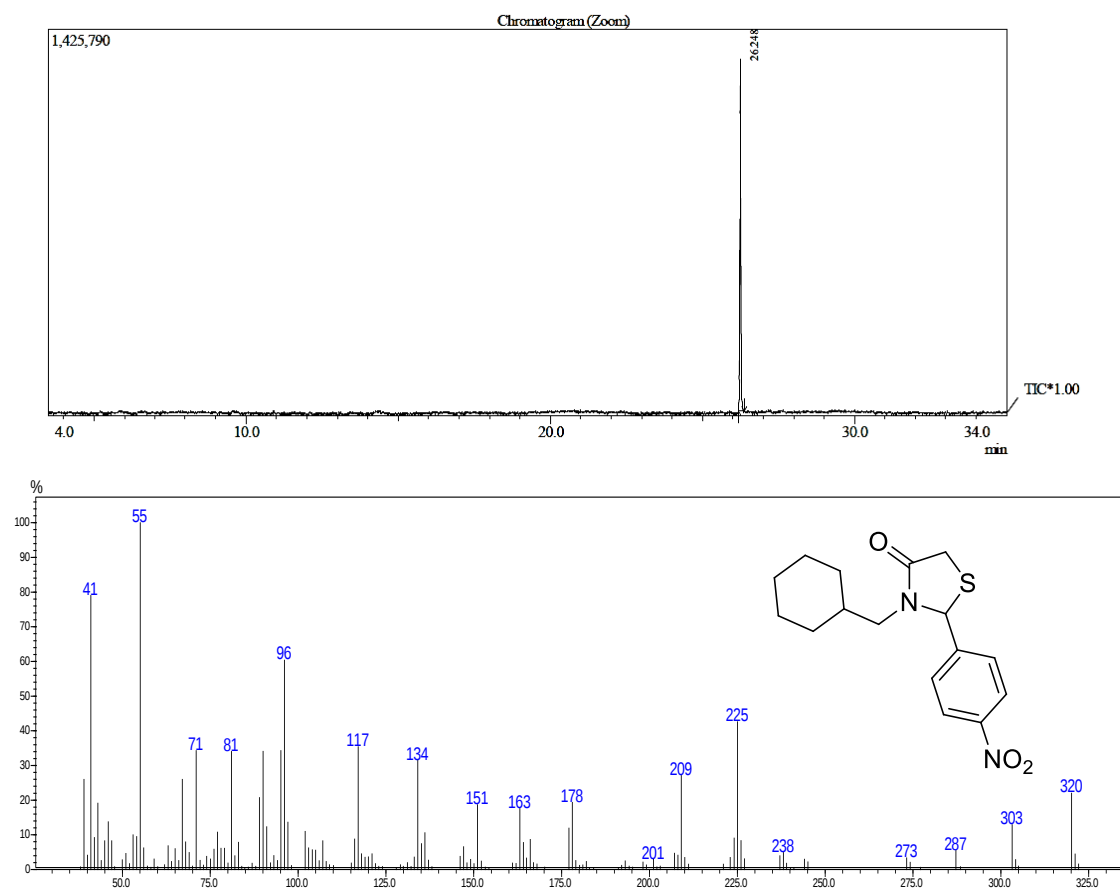


Figure S09: GC/MS of thiazolidin-4-one 5i.

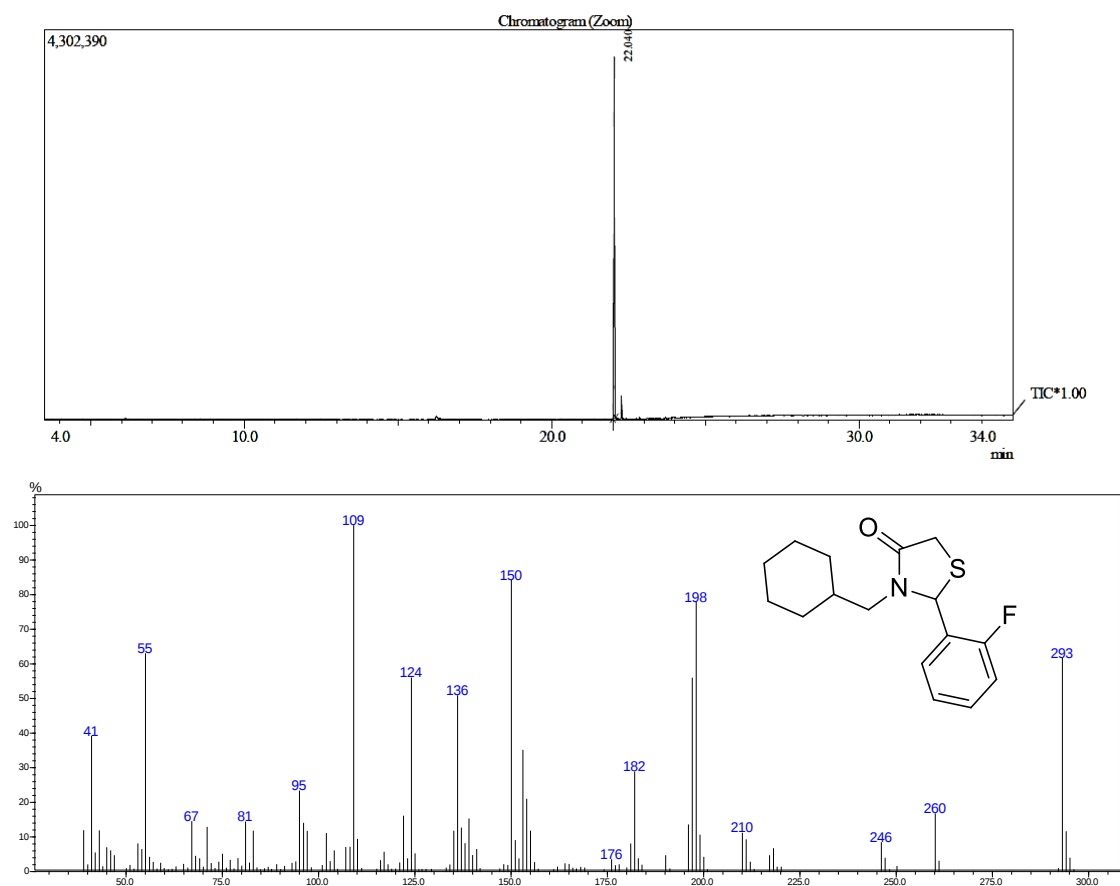


Figure S10: GC/MS of thiazolidin-4-one **5j**.

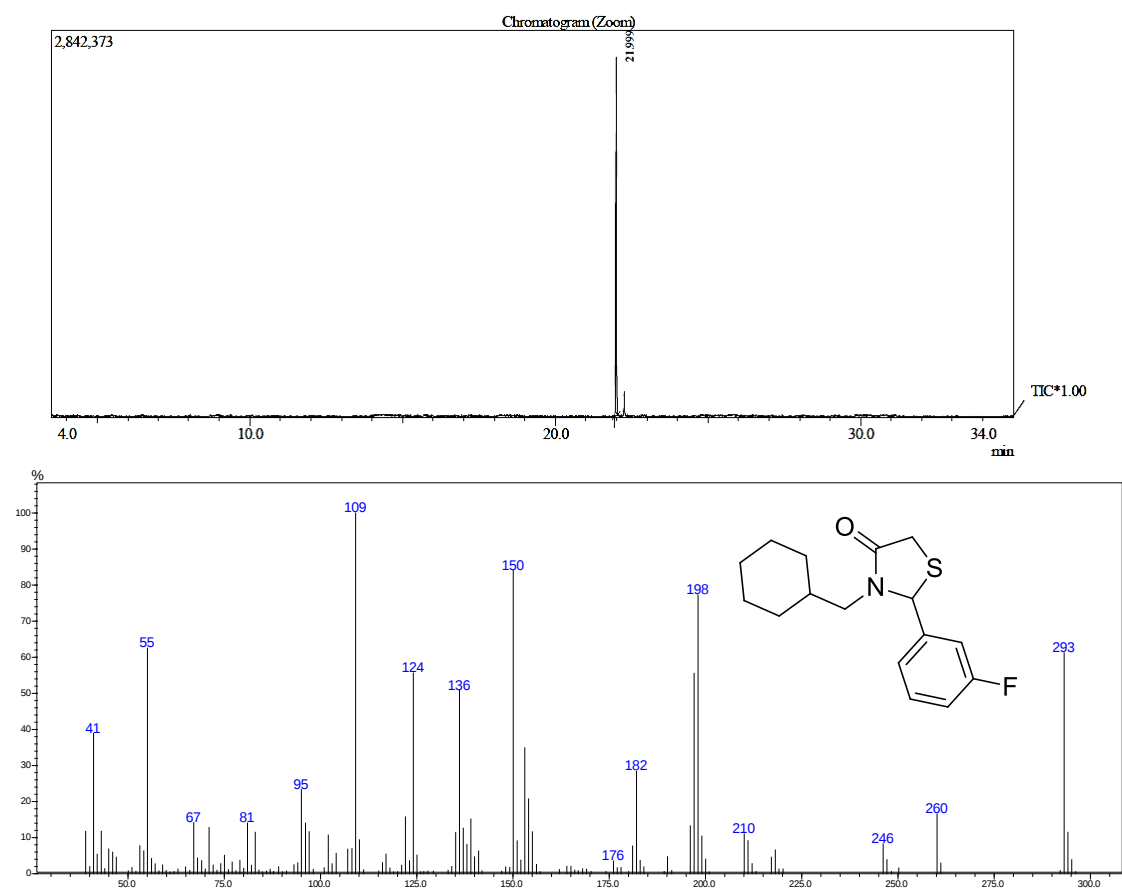


Figure S11: GC/MS of thiazolidin-4-one 5k.

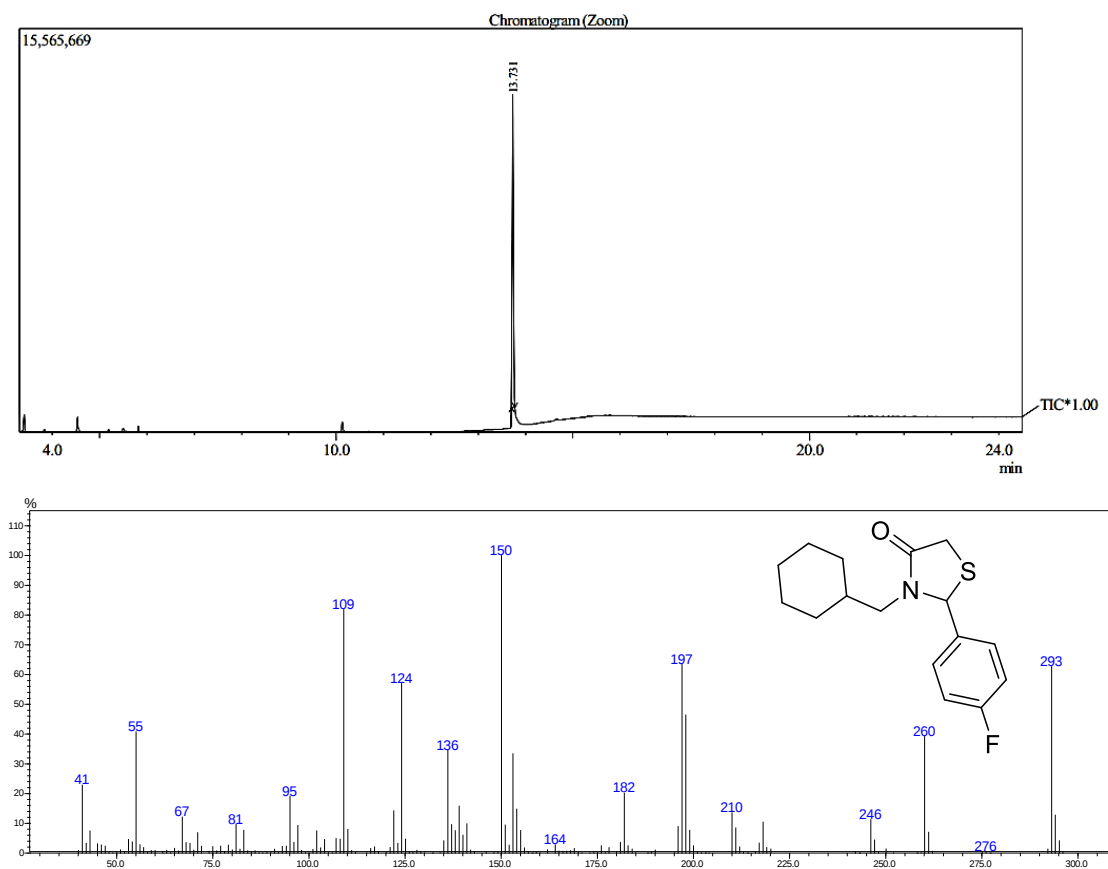


Figure S12: GC/MS of thiazolidin-4-one 5l.

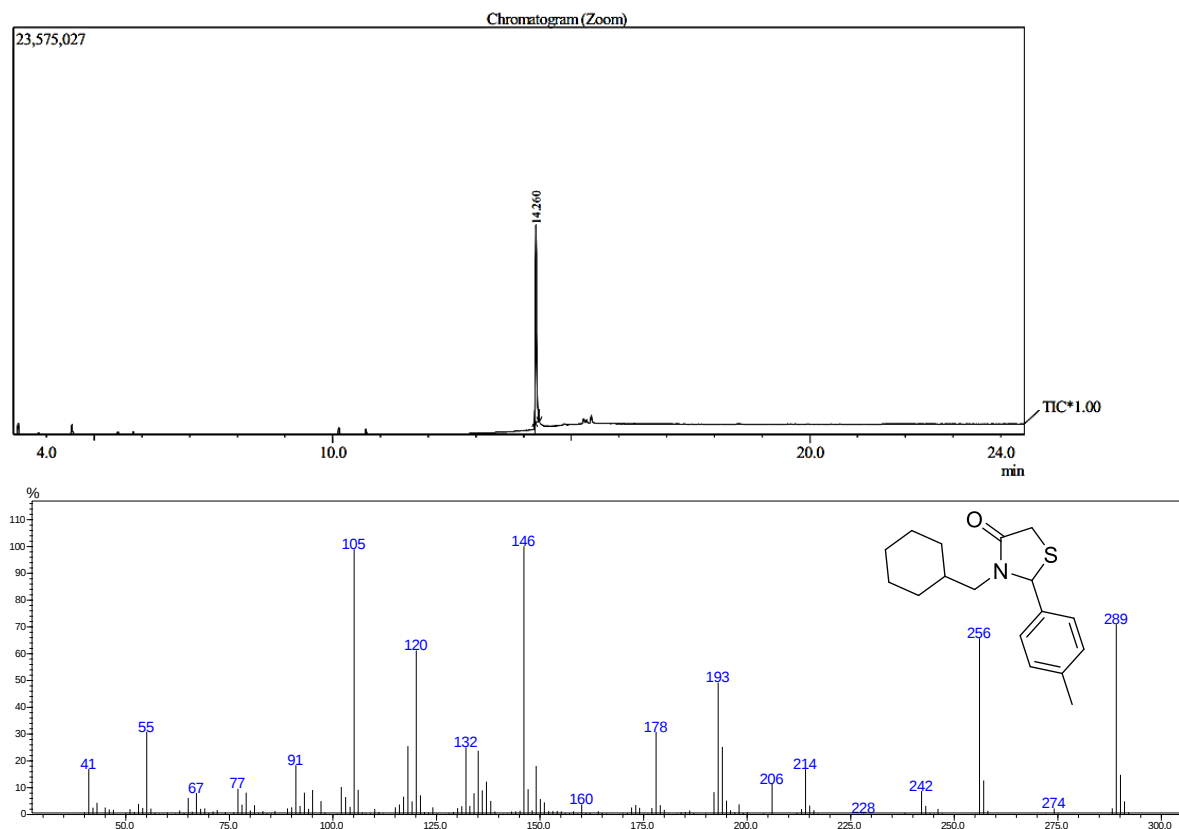


Figure S13: GC/MS of thiazolidin-4-one 5m.

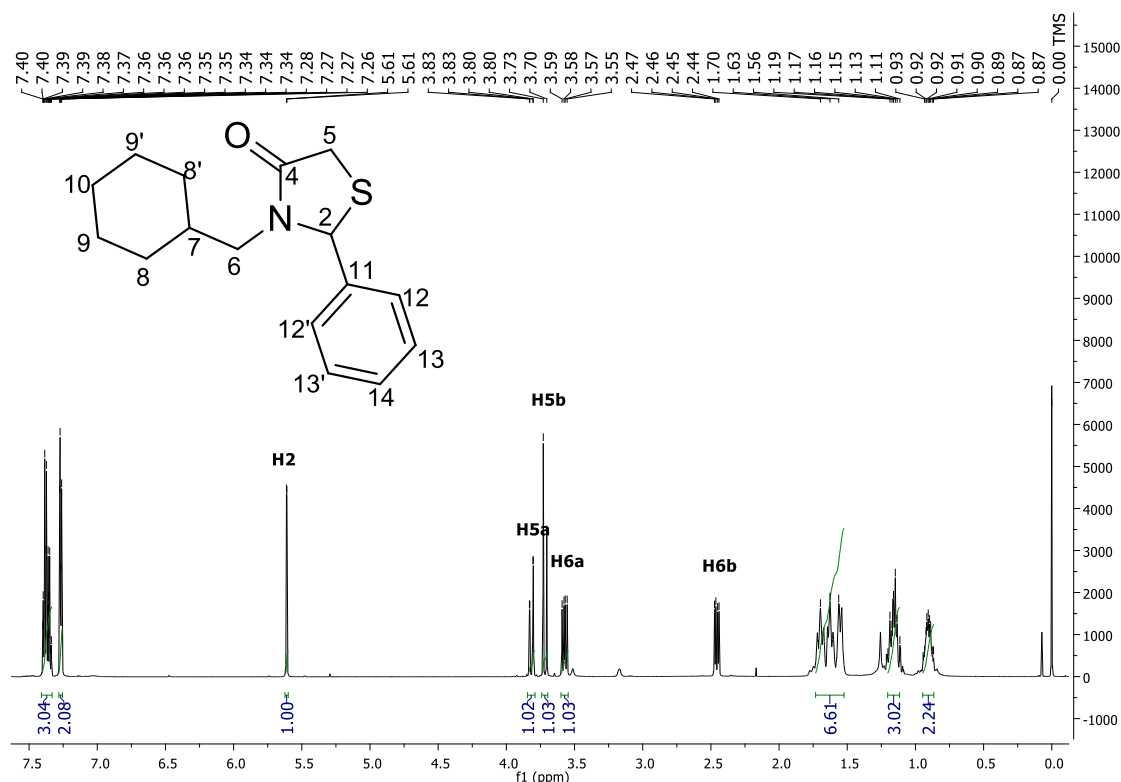


Figure S14: NMR ^1H spectrum of thiazolidin-4-one 5a.

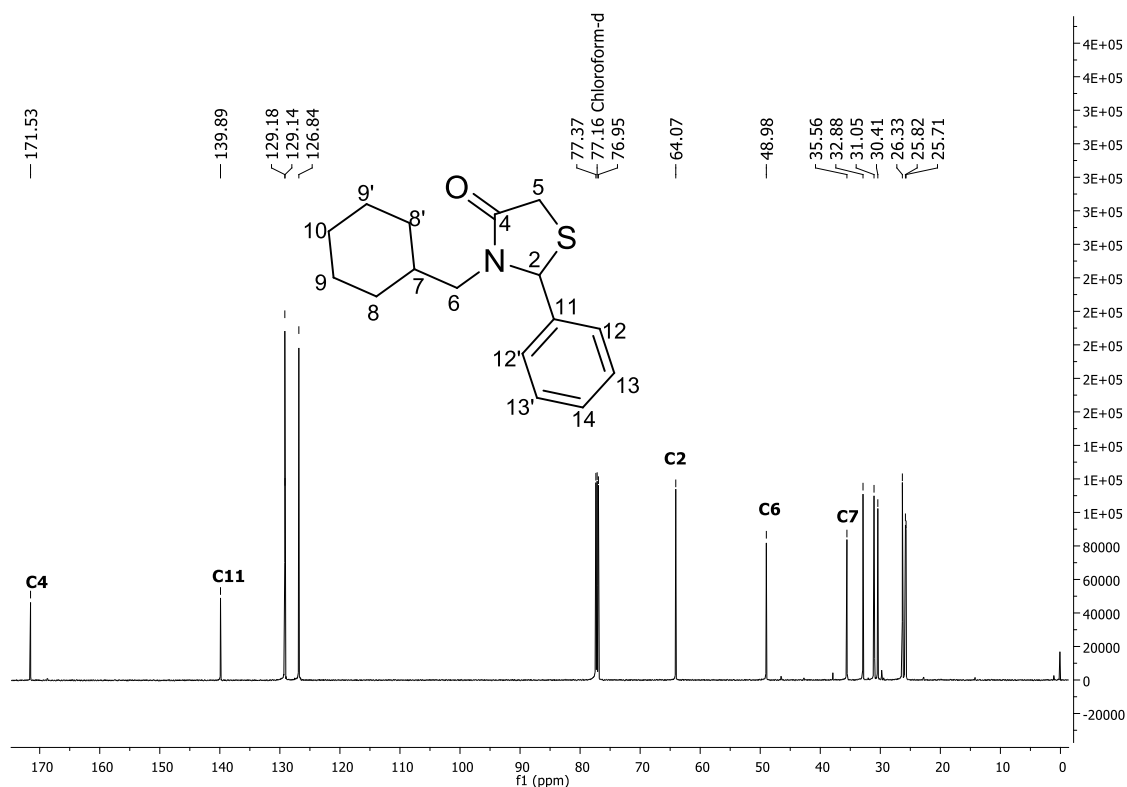


Figure S15: NMR ^{13}C spectrum of thiazolidin-4-one 5a.

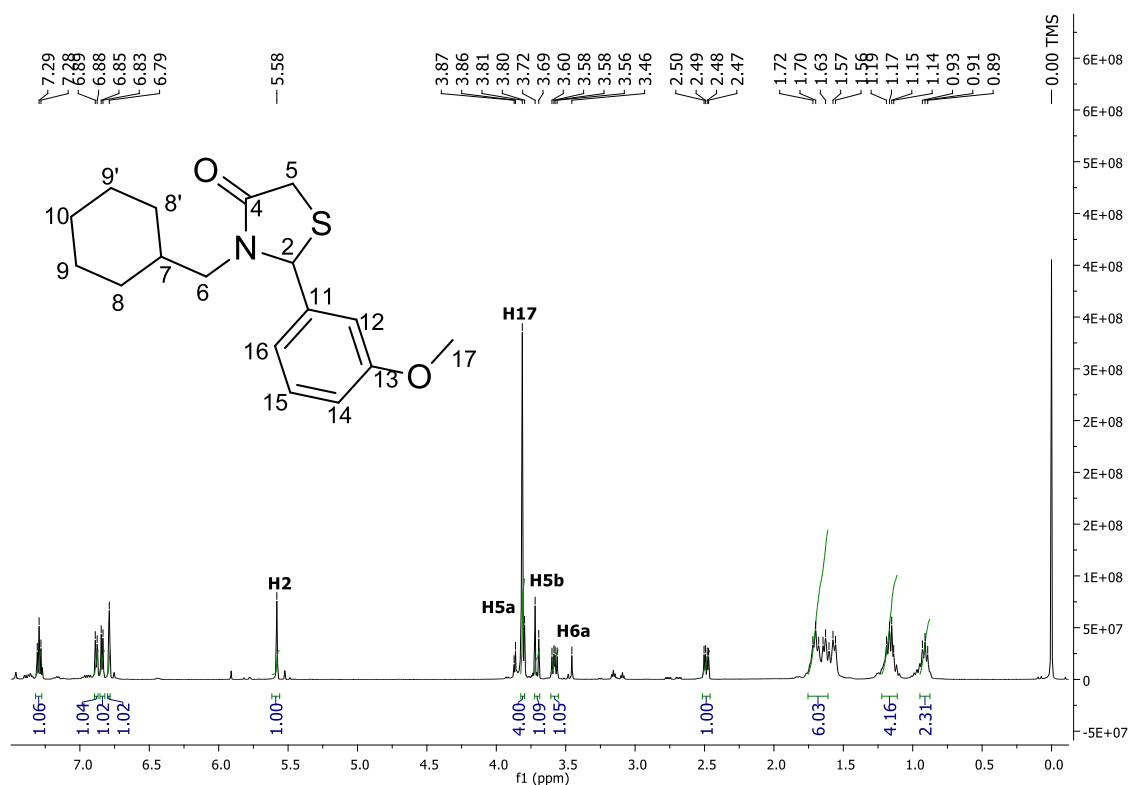


Figure S16: NMR ¹H spectrum of thiazolidin-4-one **5b**.

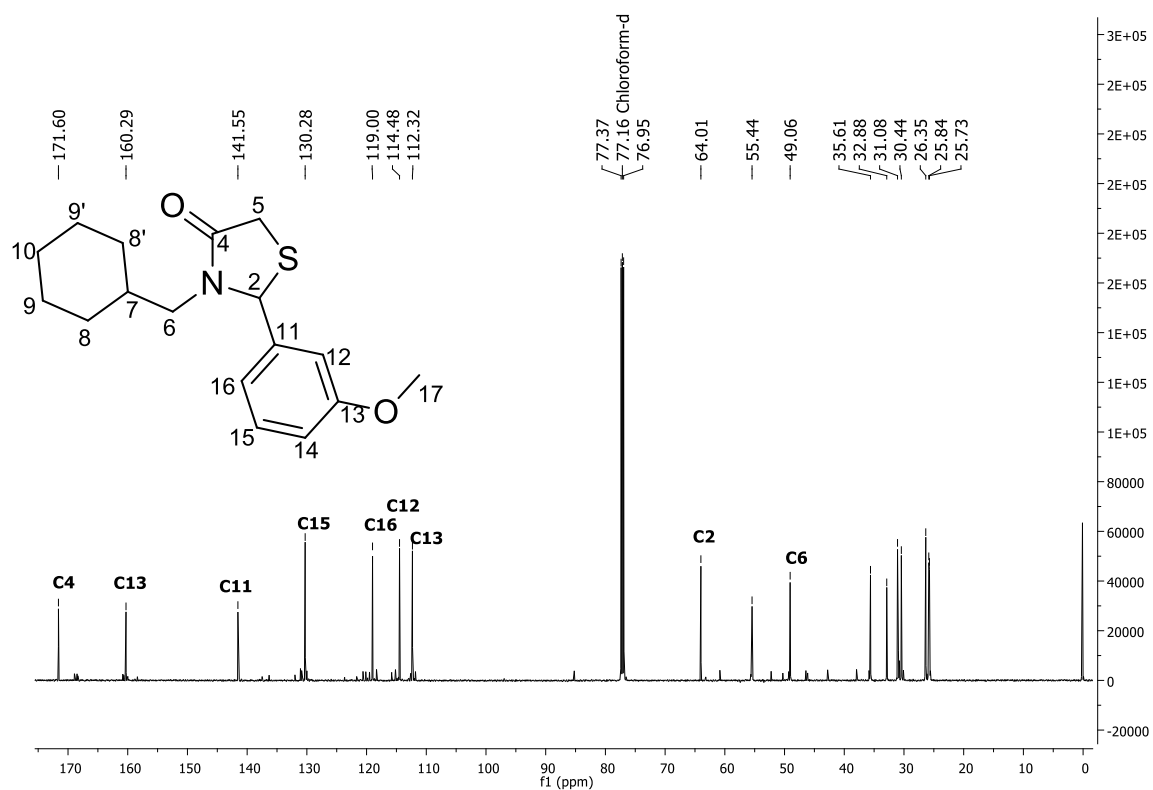


Figure S17: NMR ¹³C spectrum of thiazolidin-4-one **5b**.

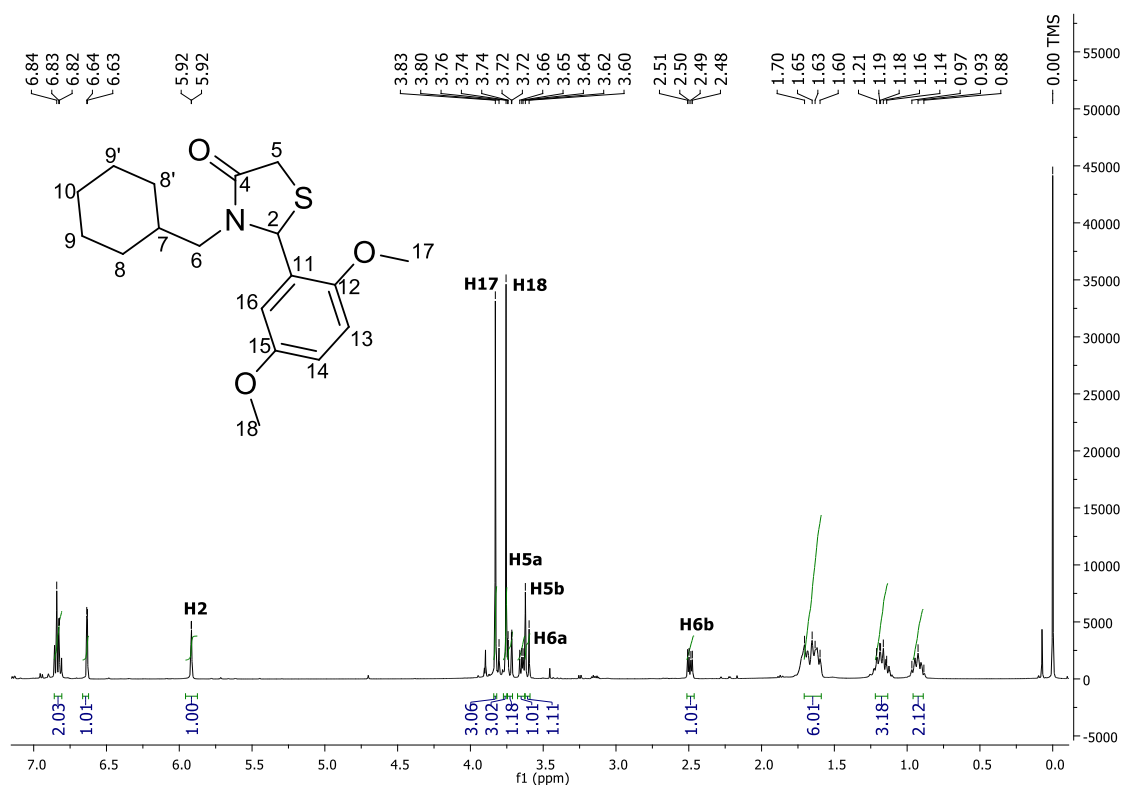


Figure S18: NMR ¹H spectrum of thiazolidin-4-one 5c.

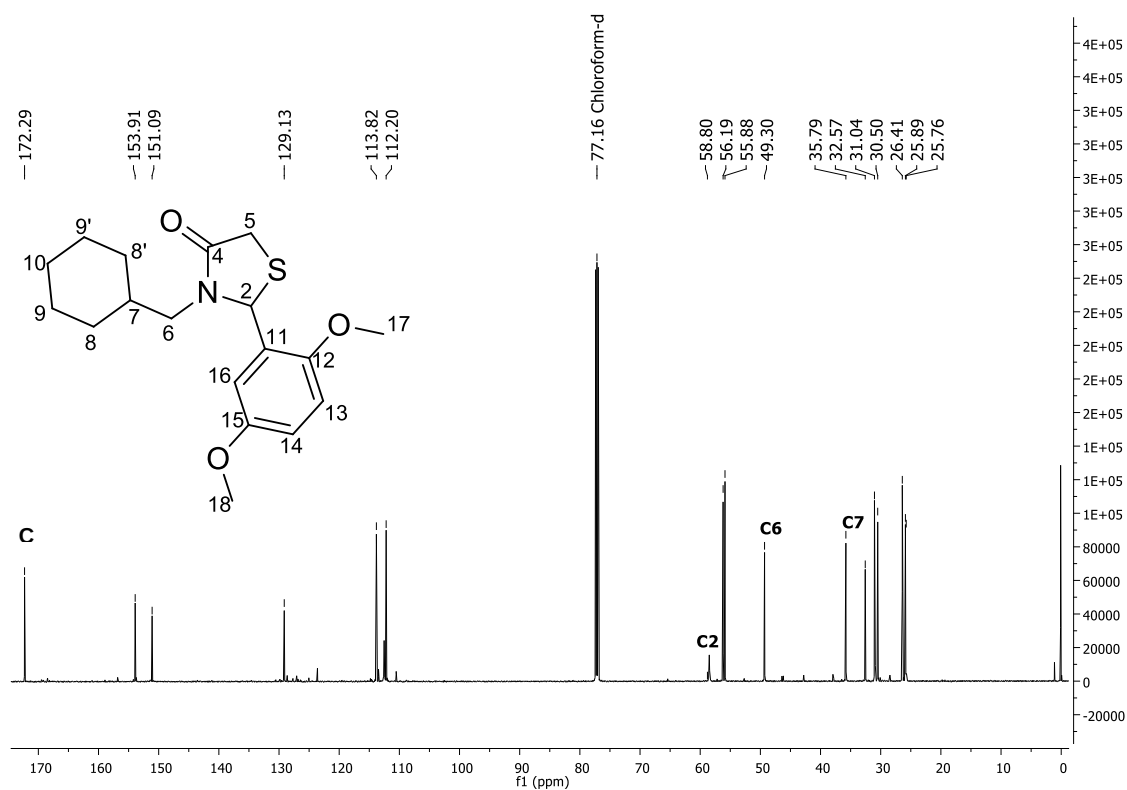


Figure S19: NMR ¹³C spectrum of thiazolidin-4-one 5c.

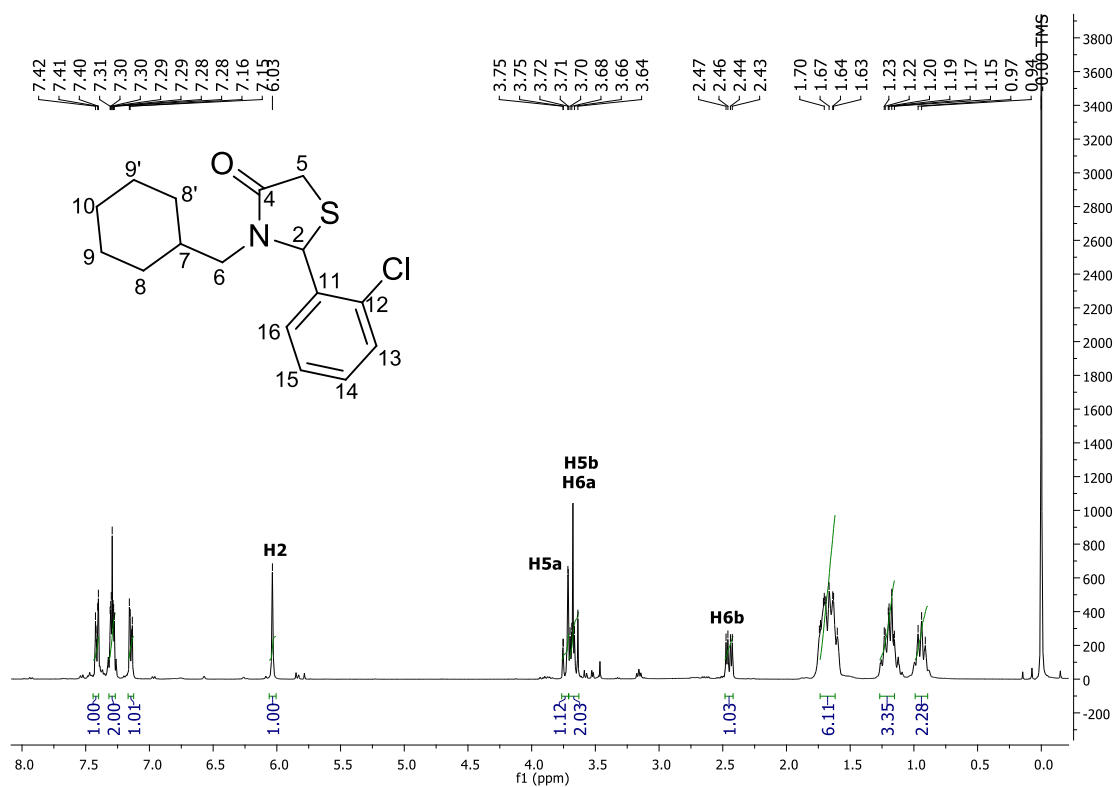


Figure S20: NMR ¹H spectrum of thiazolidin-4-one 5d.

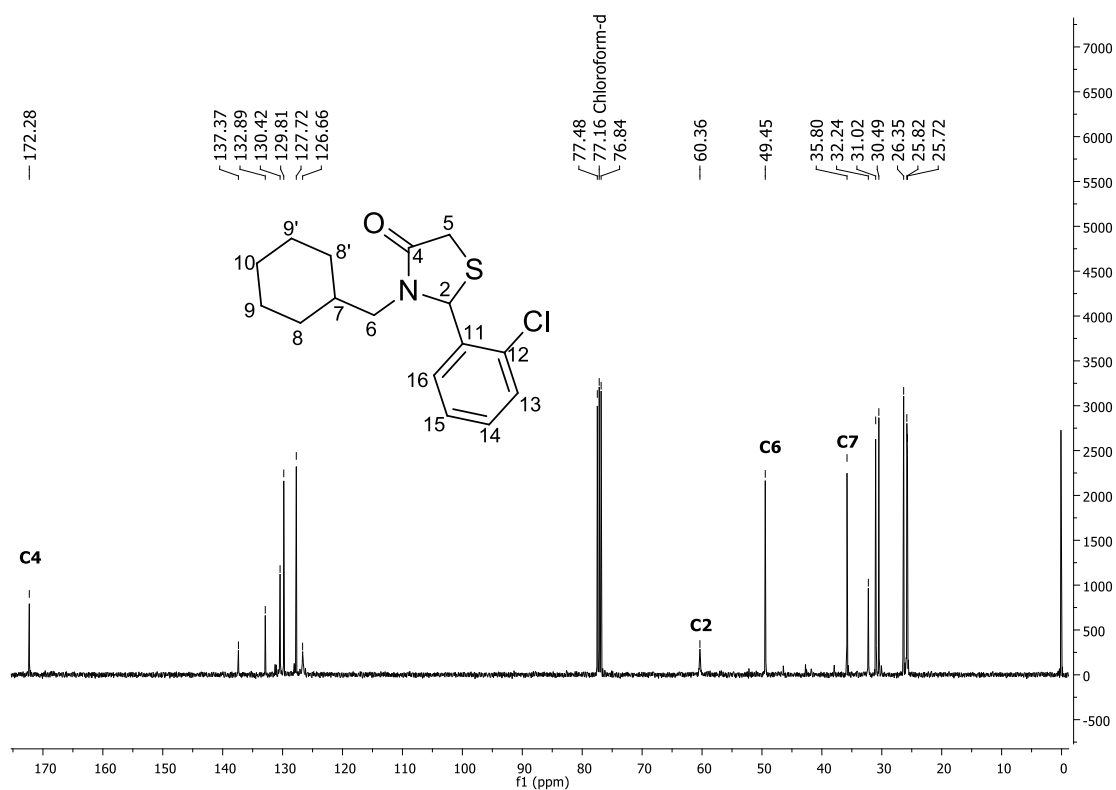


Figure S21: NMR ¹³C spectrum of thiazolidin-4-one 5d.

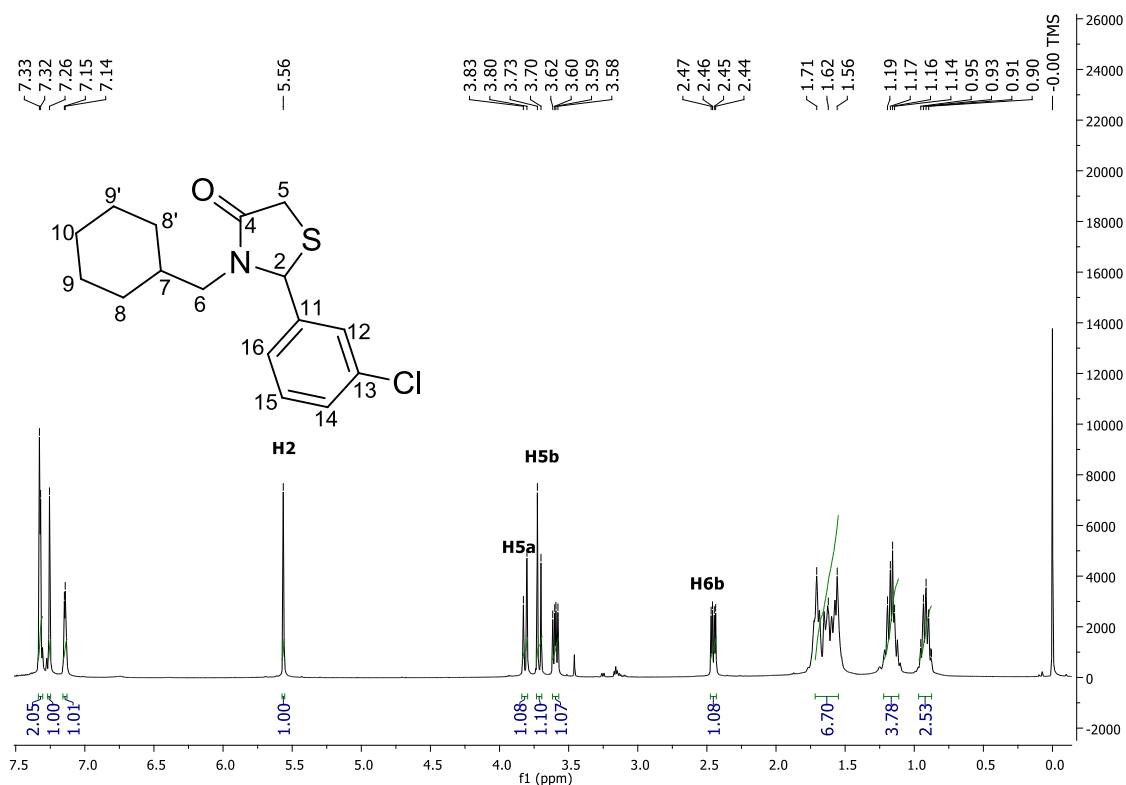


Figure S22: NMR ¹H spectrum of thiazolidin-4-one 5e.

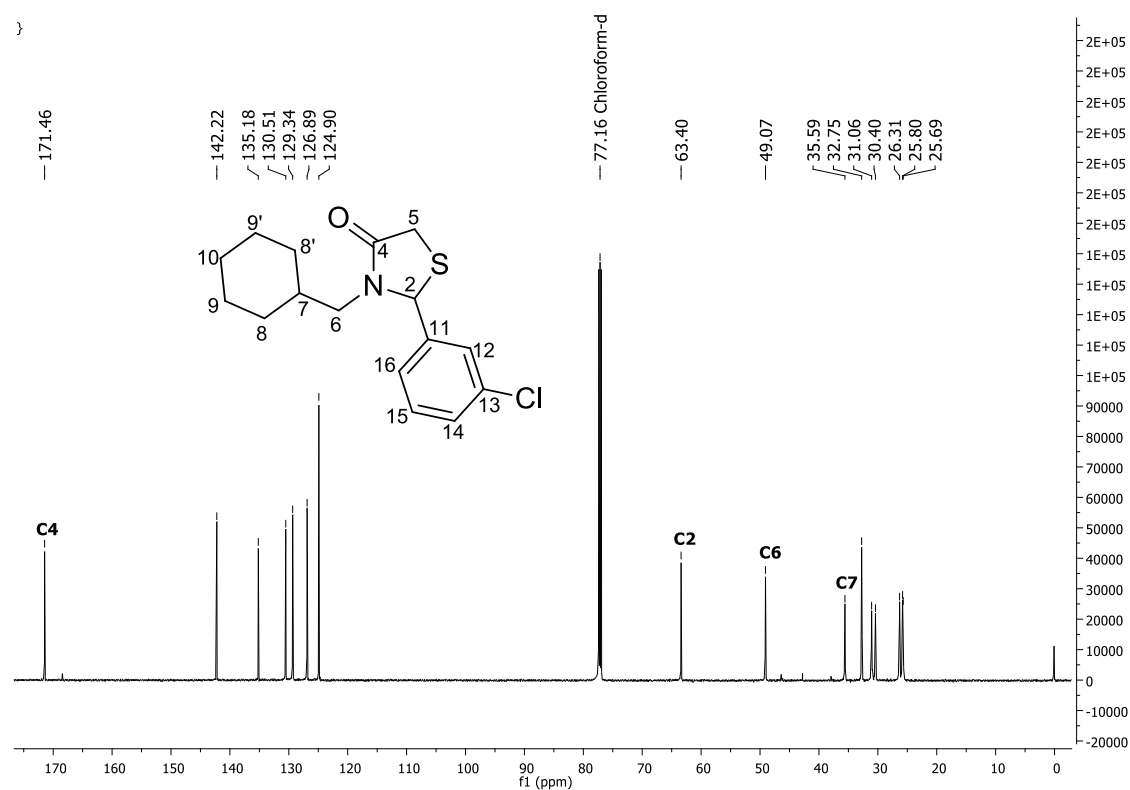


Figure S23: NMR ¹³C spectrum of thiazolidin-4-one 5e.

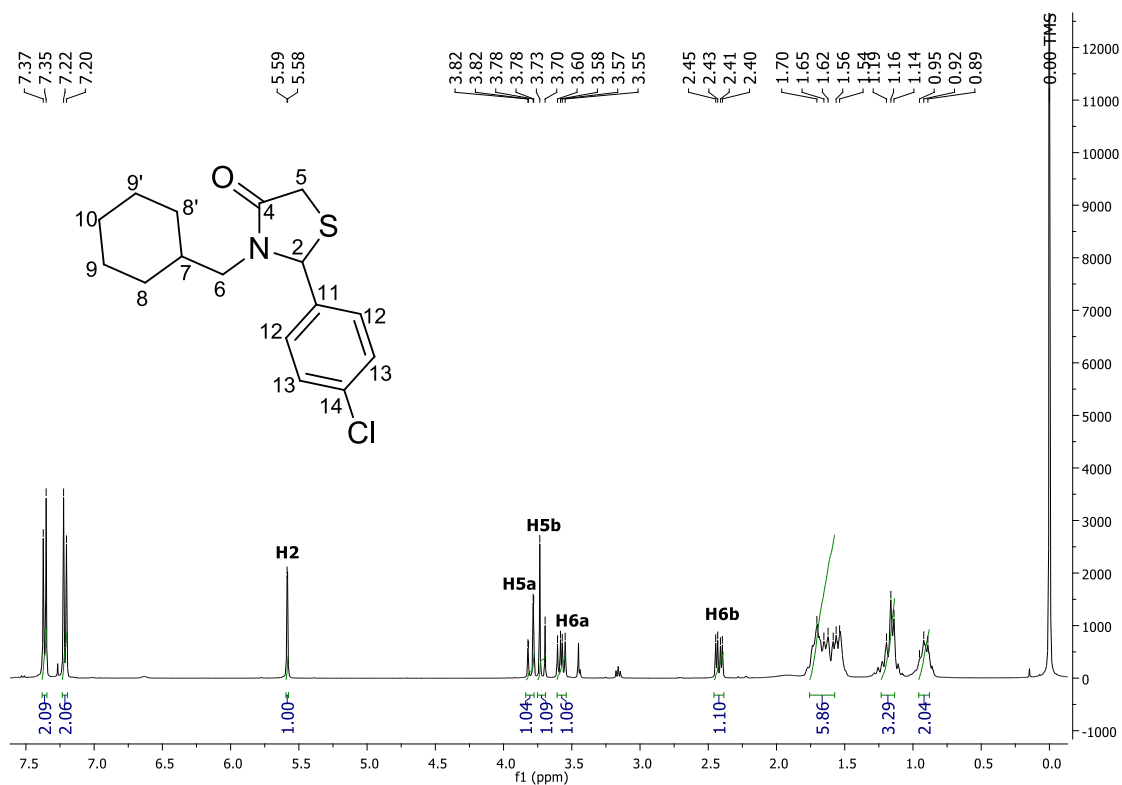


Figure S24: NMR ¹H spectrum of thiazolidin-4-one 5f.

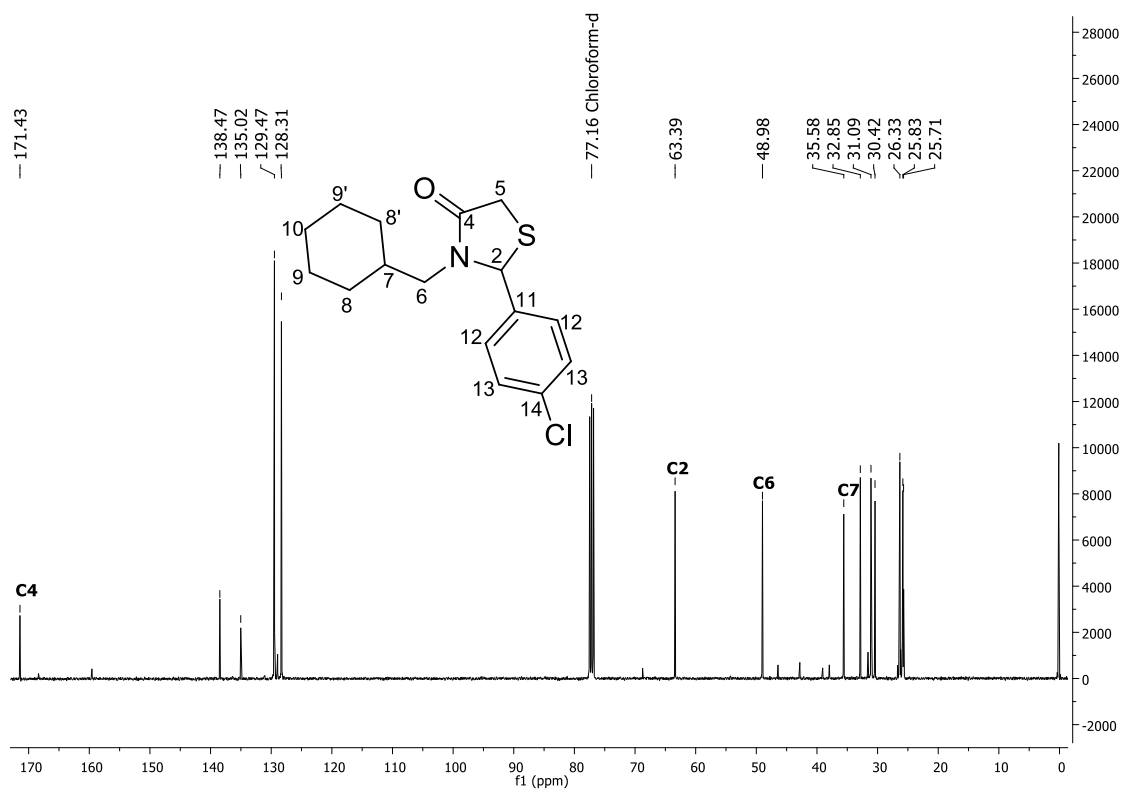


Figure S25: NMR ¹³C spectrum of thiazolidin-4-one 5f.

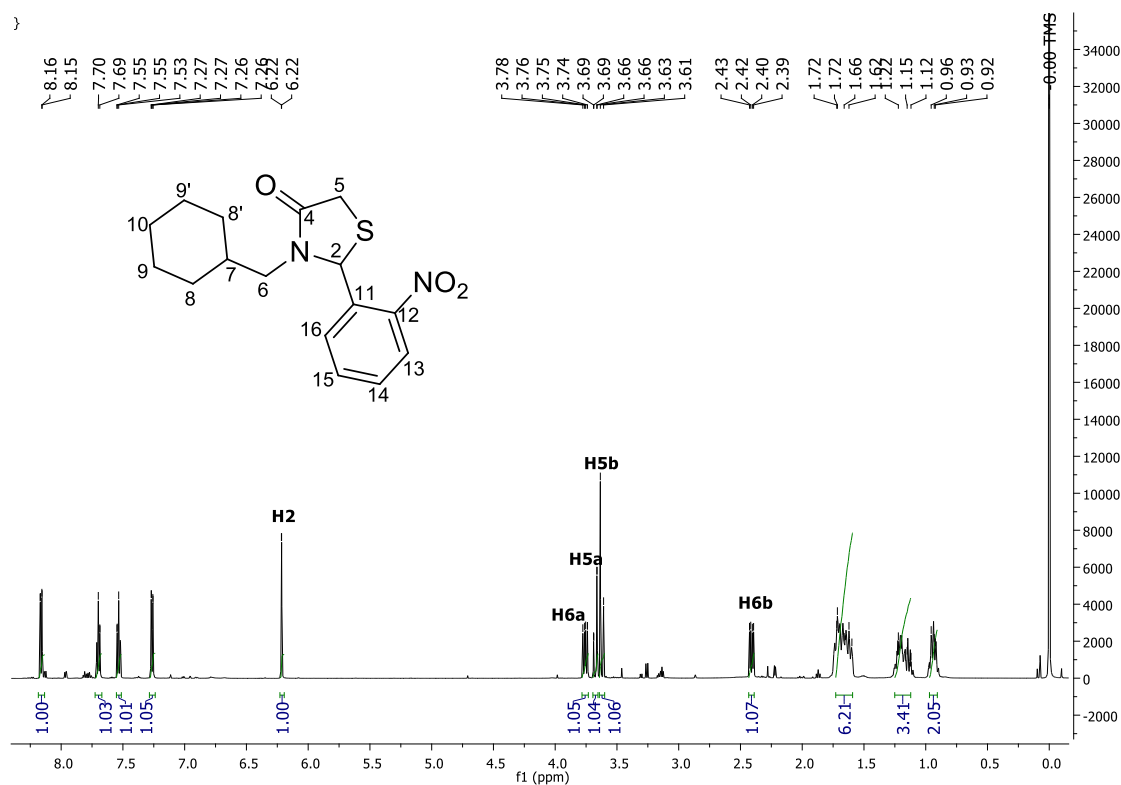


Figure S26: NMR ¹H spectrum of thiazolidin-4-one 5g.

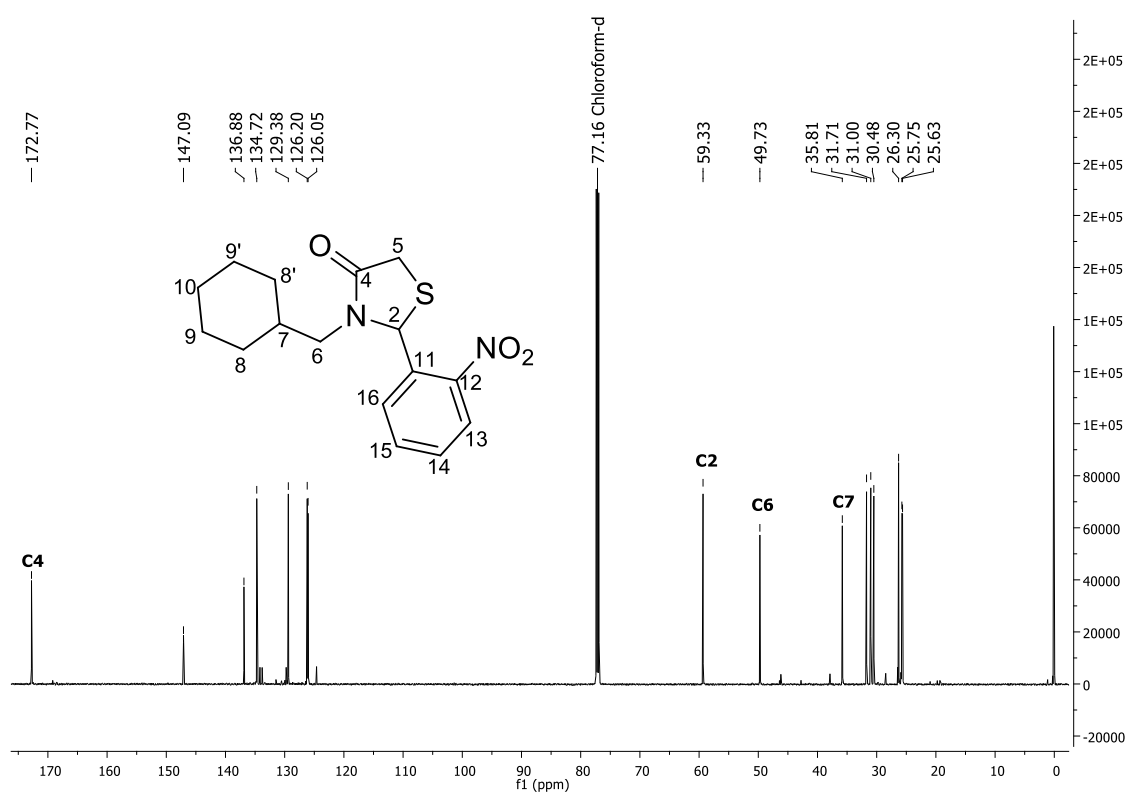
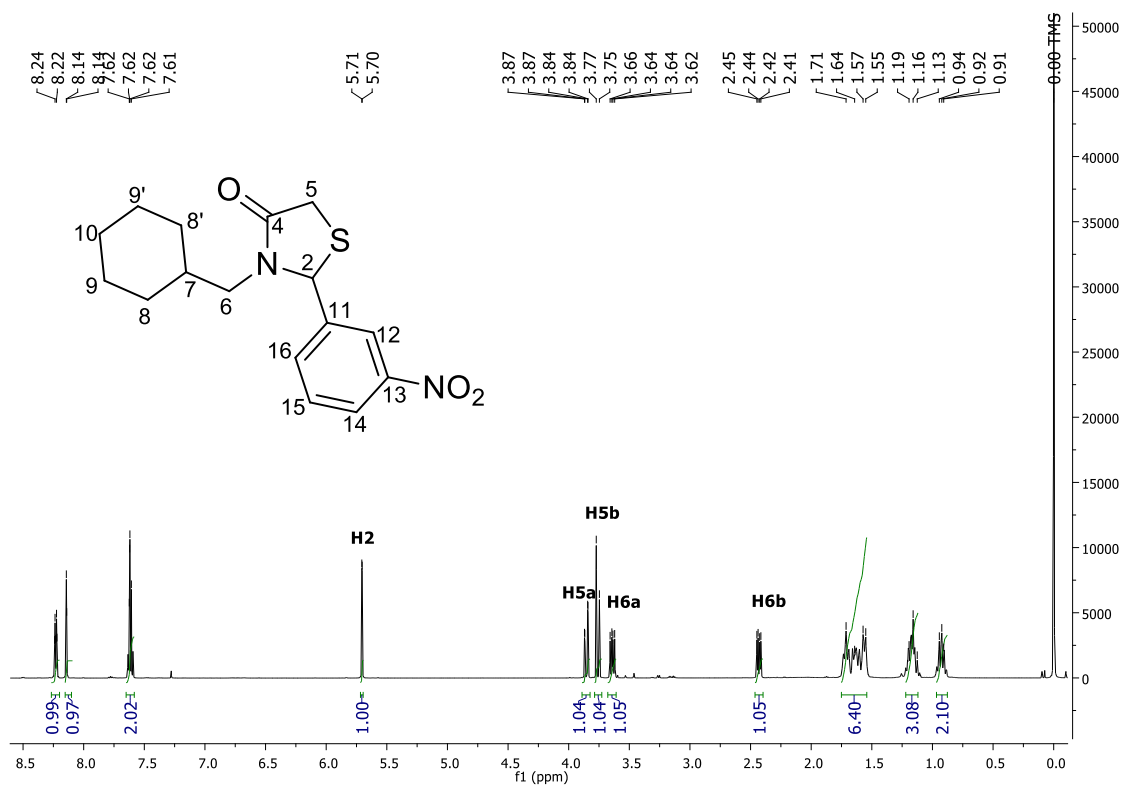
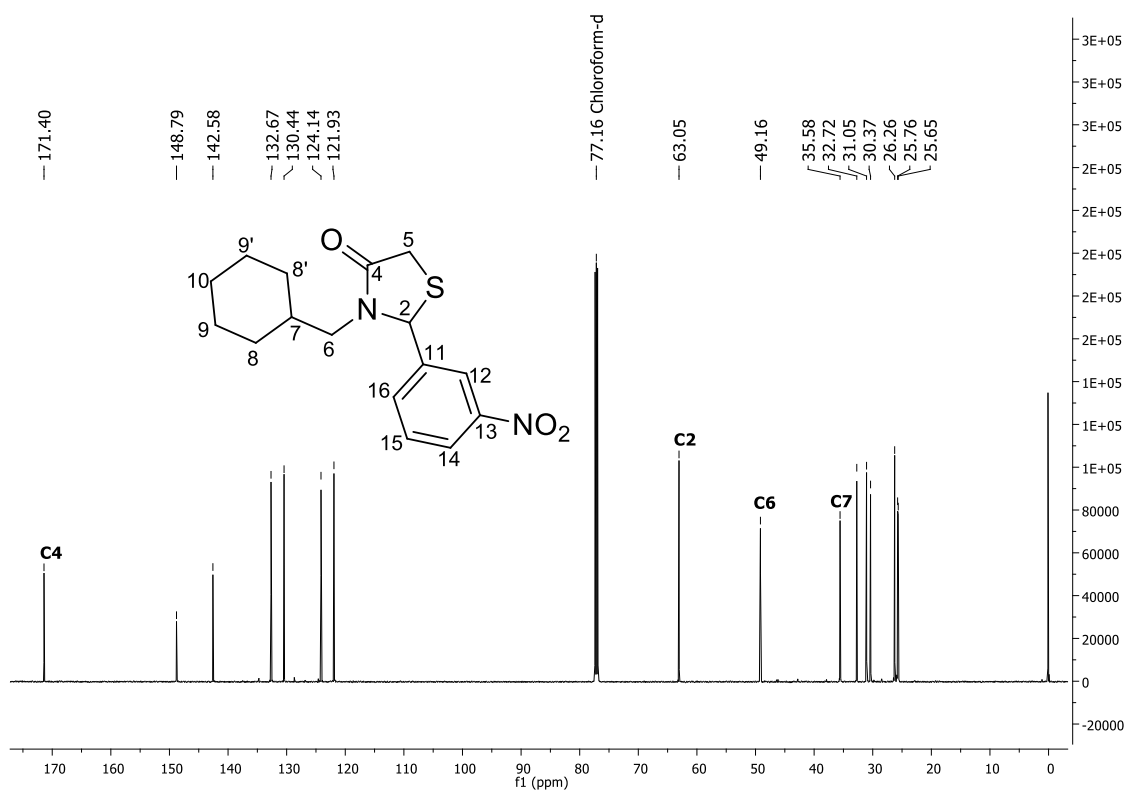


Figure S27: NMR ¹³C spectrum of thiazolidin-4-one 5g.

Figure S28: NMR ¹H spectrum of thiazolidin-4-one 5h.Figure S29: NMR ¹³C spectrum of thiazolidin-4-one 5h.

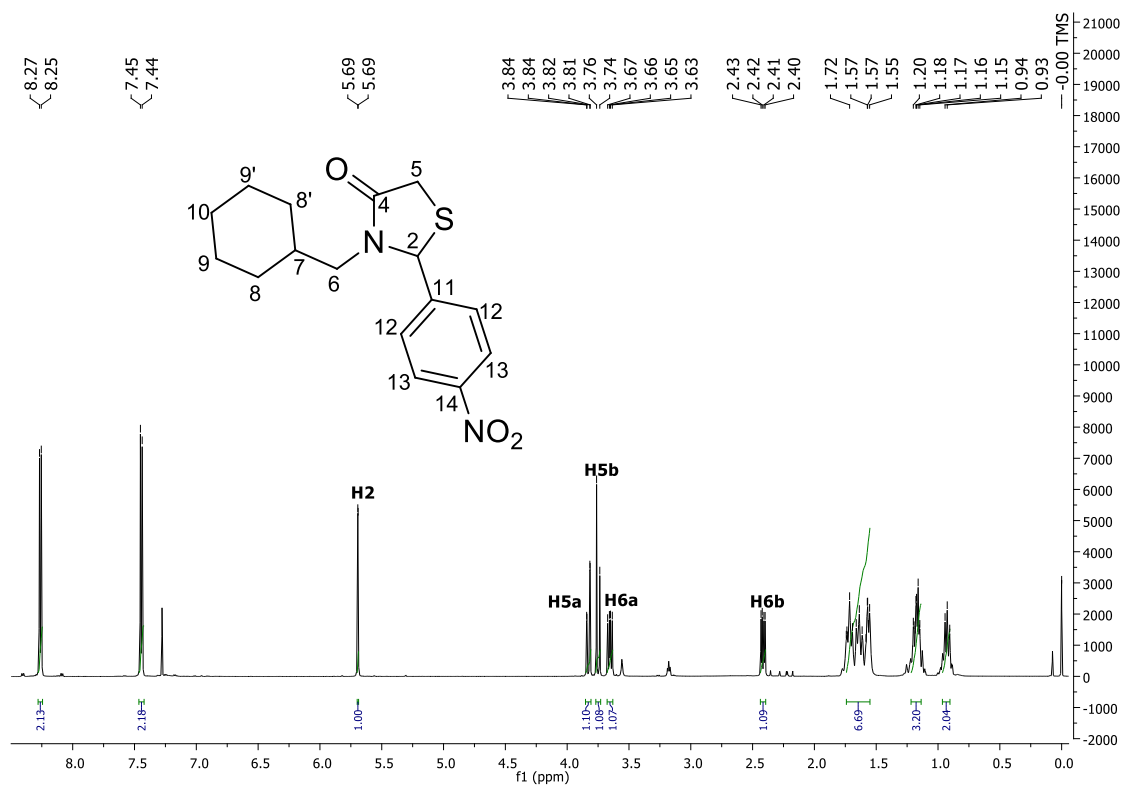


Figure S30: ^1H NMR spectrum of thiazolidin-4-one **5i.**

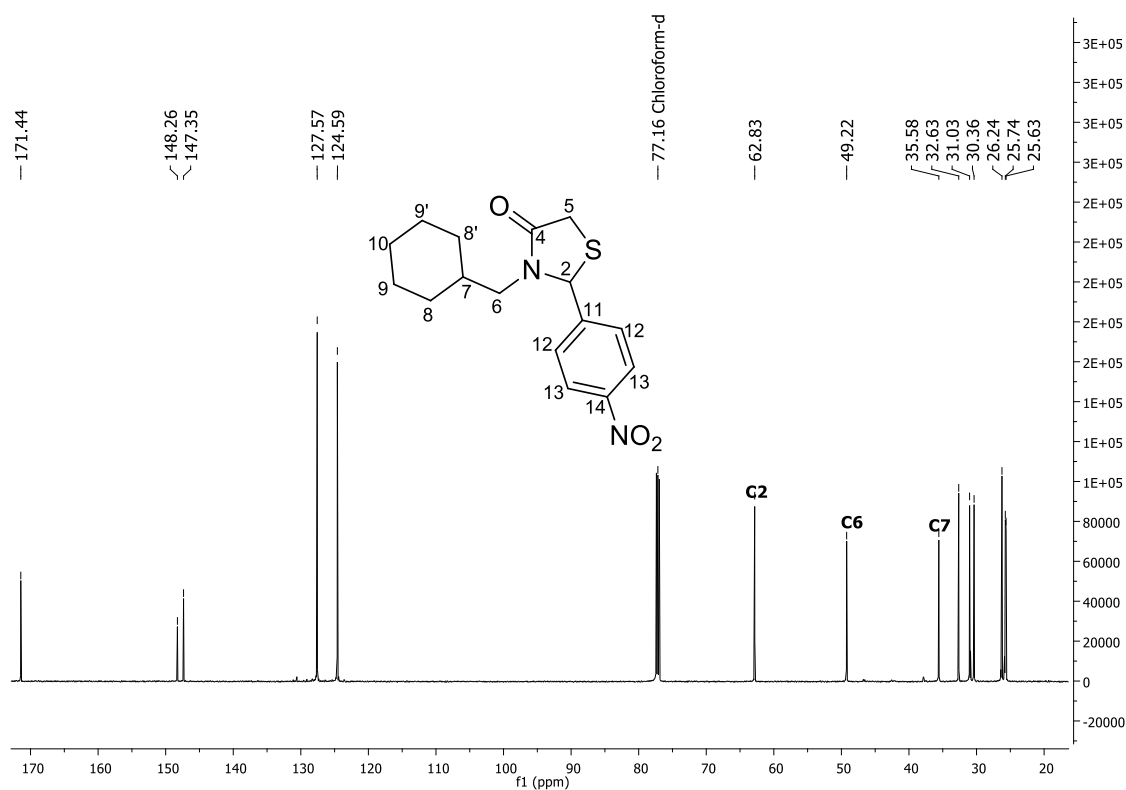


Figure S31: ^{13}C NMR spectrum of thiazolidin-4-one **5i.**

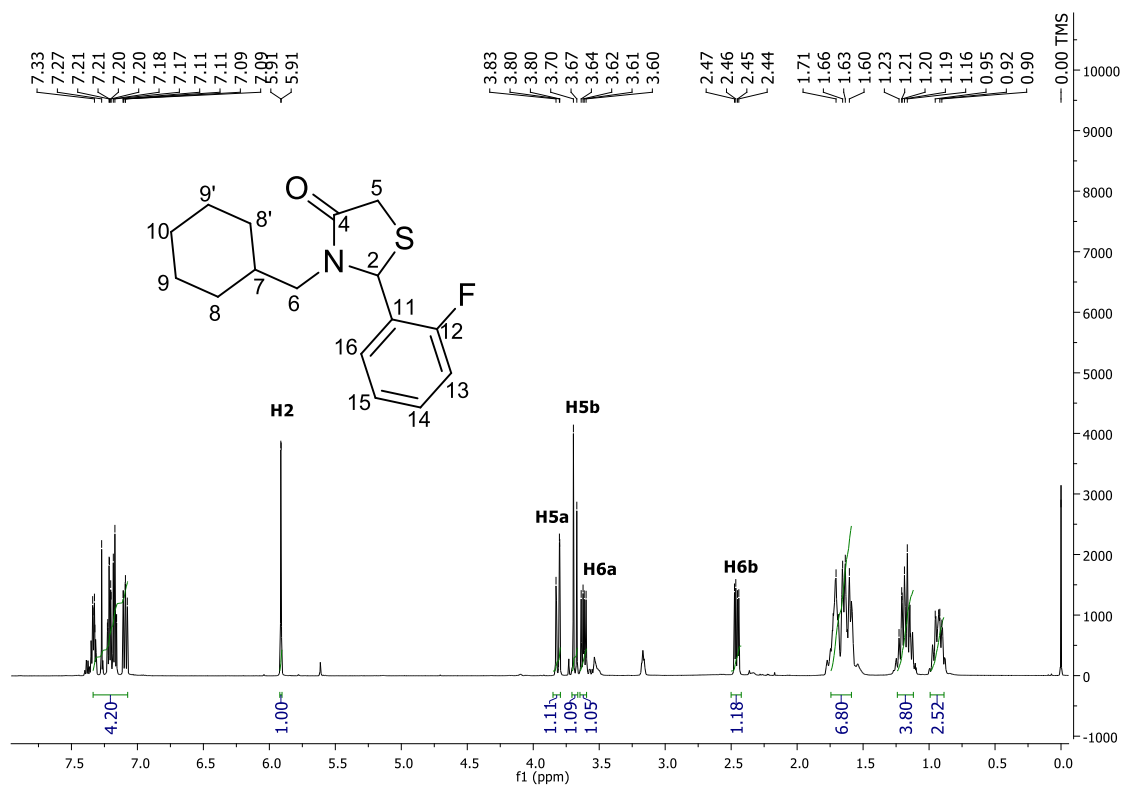


Figure S32: NMR ¹H spectrum of thiazolidin-4-one 5j.

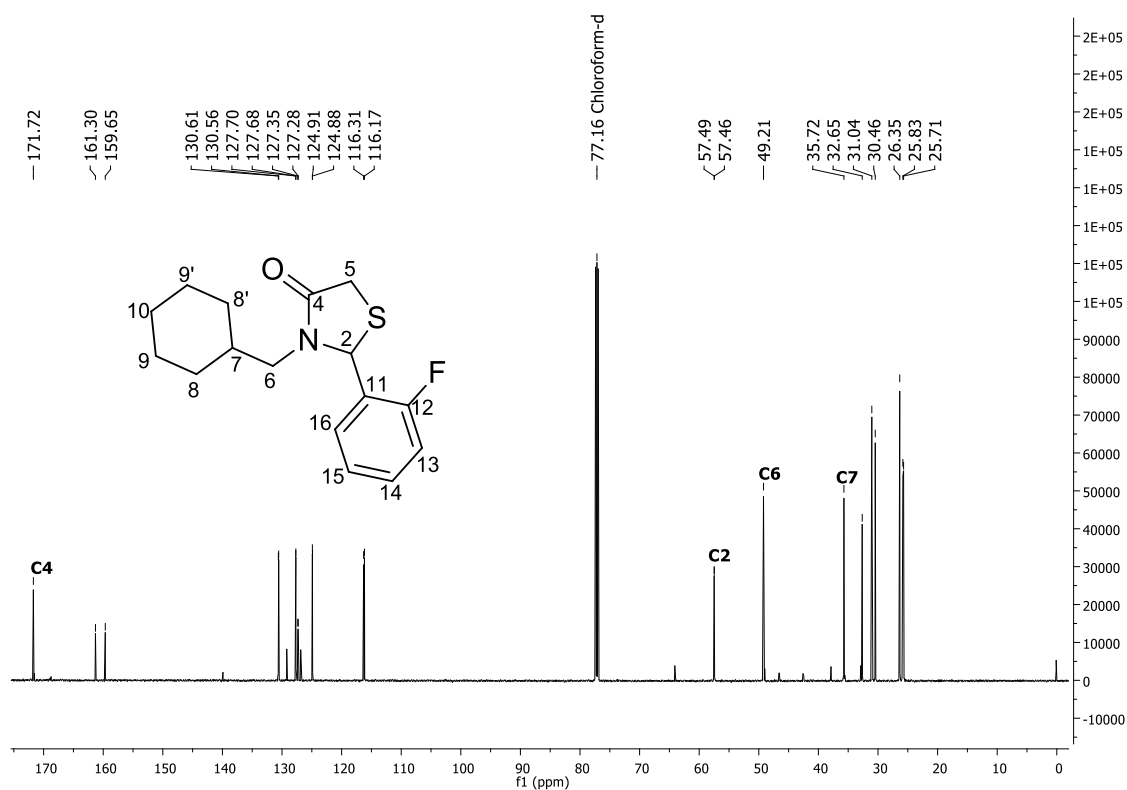


Figure S33: NMR ¹³C spectrum of thiazolidin-4-one 5j.

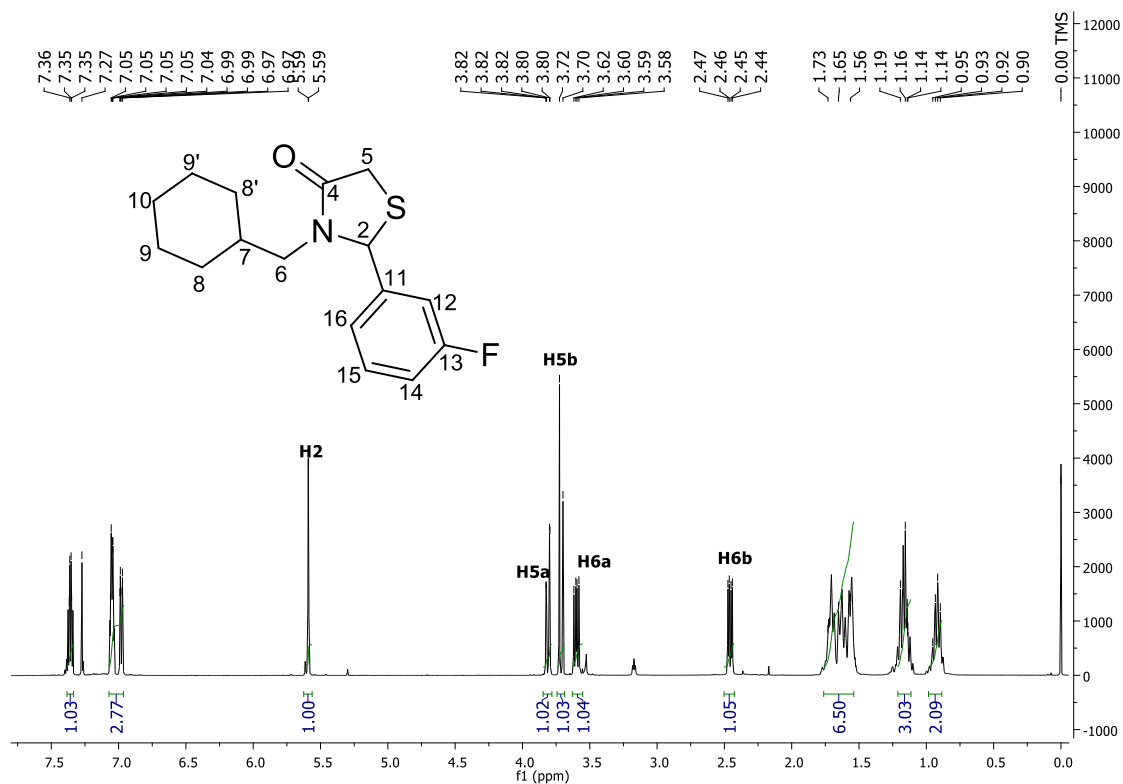


Figure S34: NMR ¹H spectrum of thiazolidin-4-one **5k**.

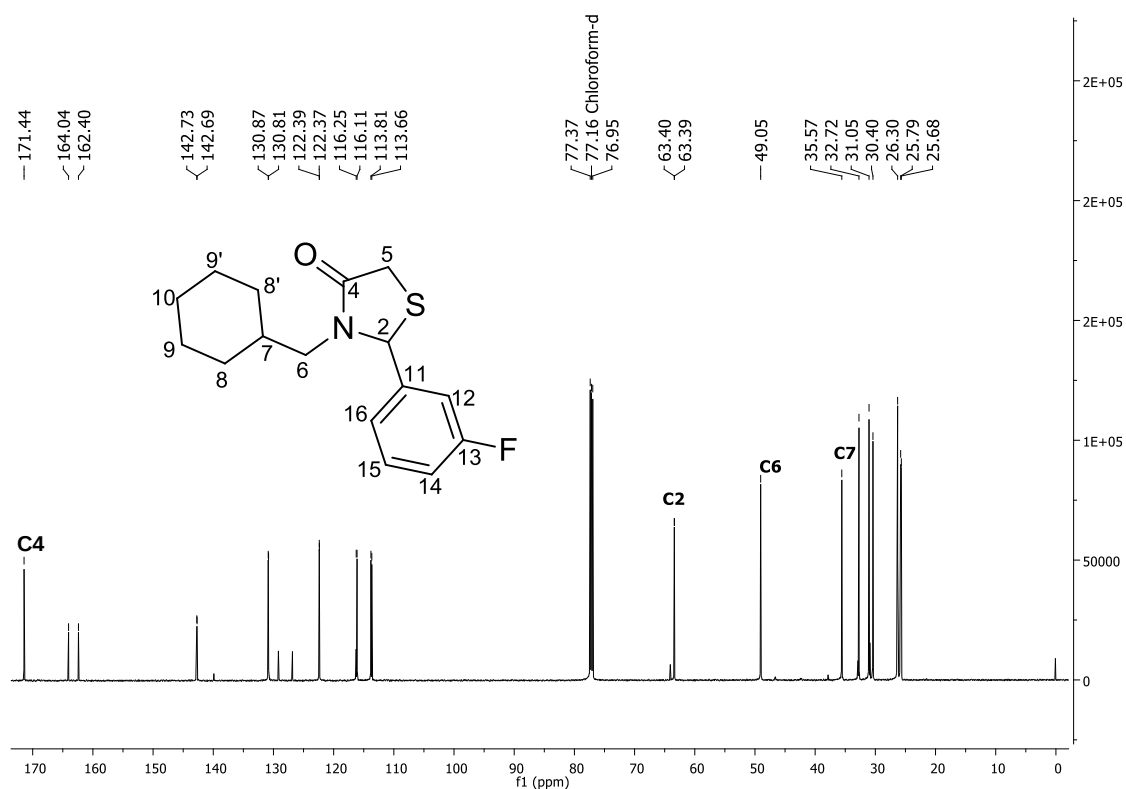


Figure S35: NMR ¹³C spectrum of thiazolidin-4-one **5k**.

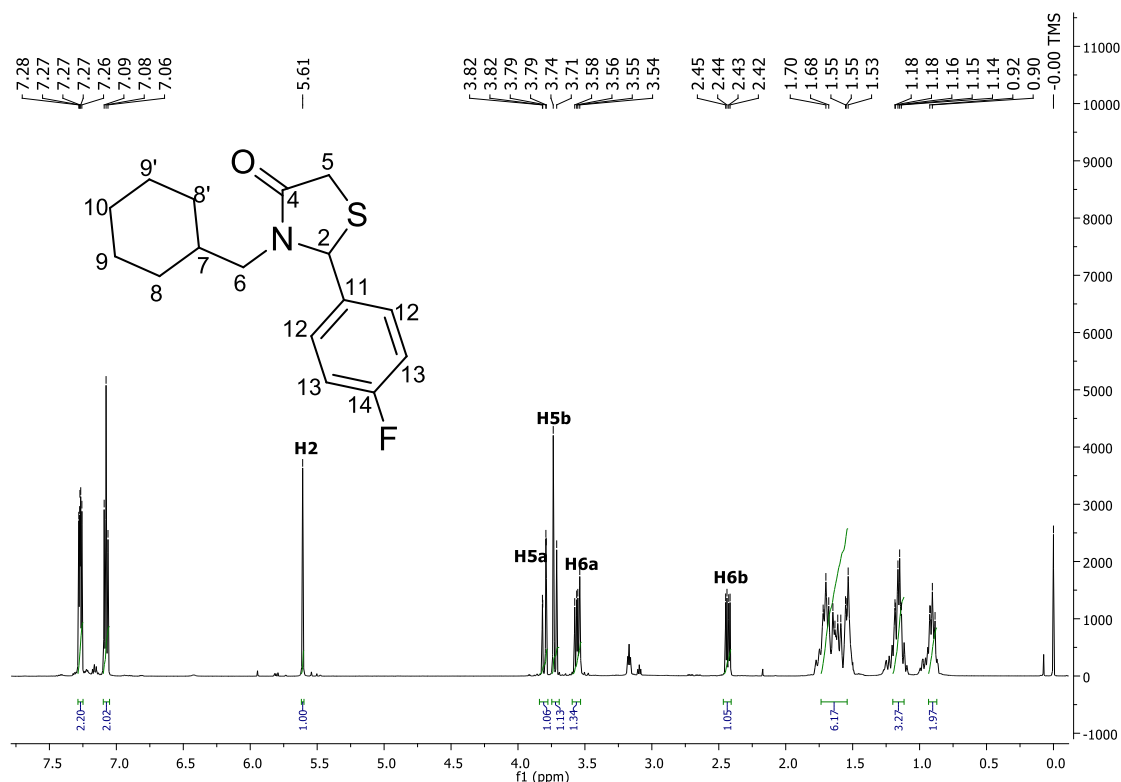


Figure S36: ^1H NMR spectrum of thiazolidin-4-one 5l.

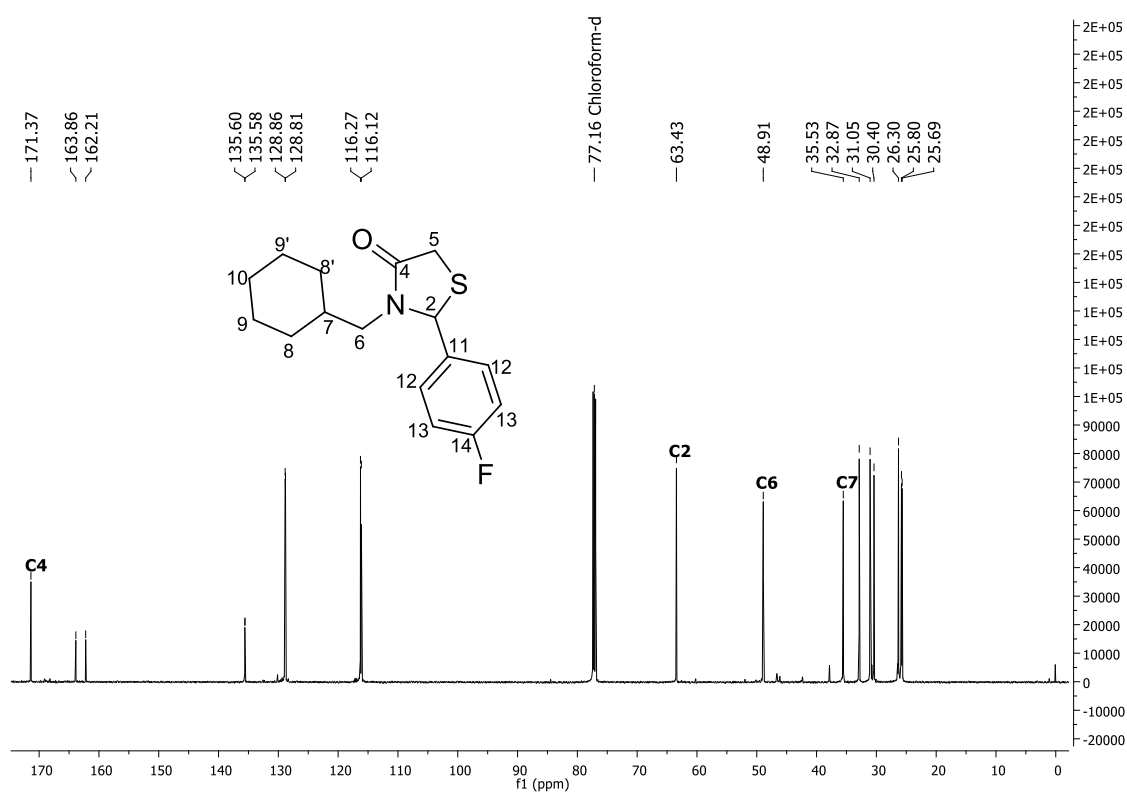


Figure S37: ^{13}C NMR spectrum of thiazolidin-4-one 5l.

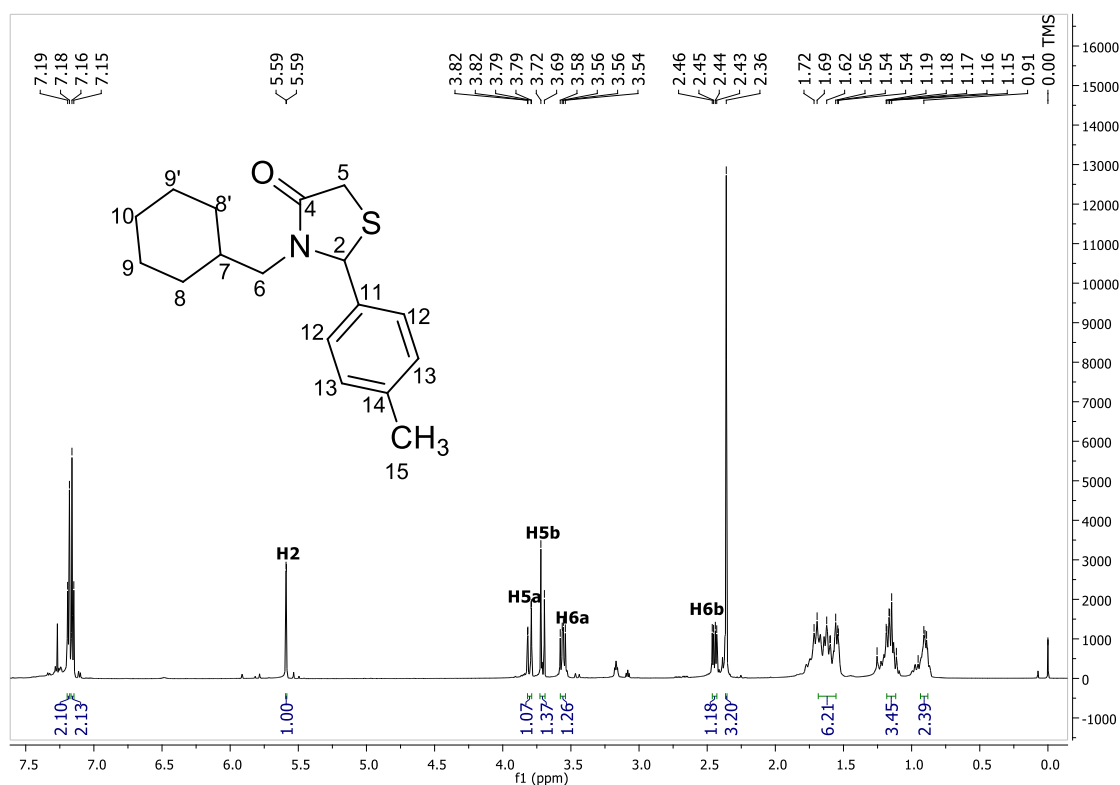


Figure S38: NMR ¹H spectrum of thiazolidin-4-one 5m.

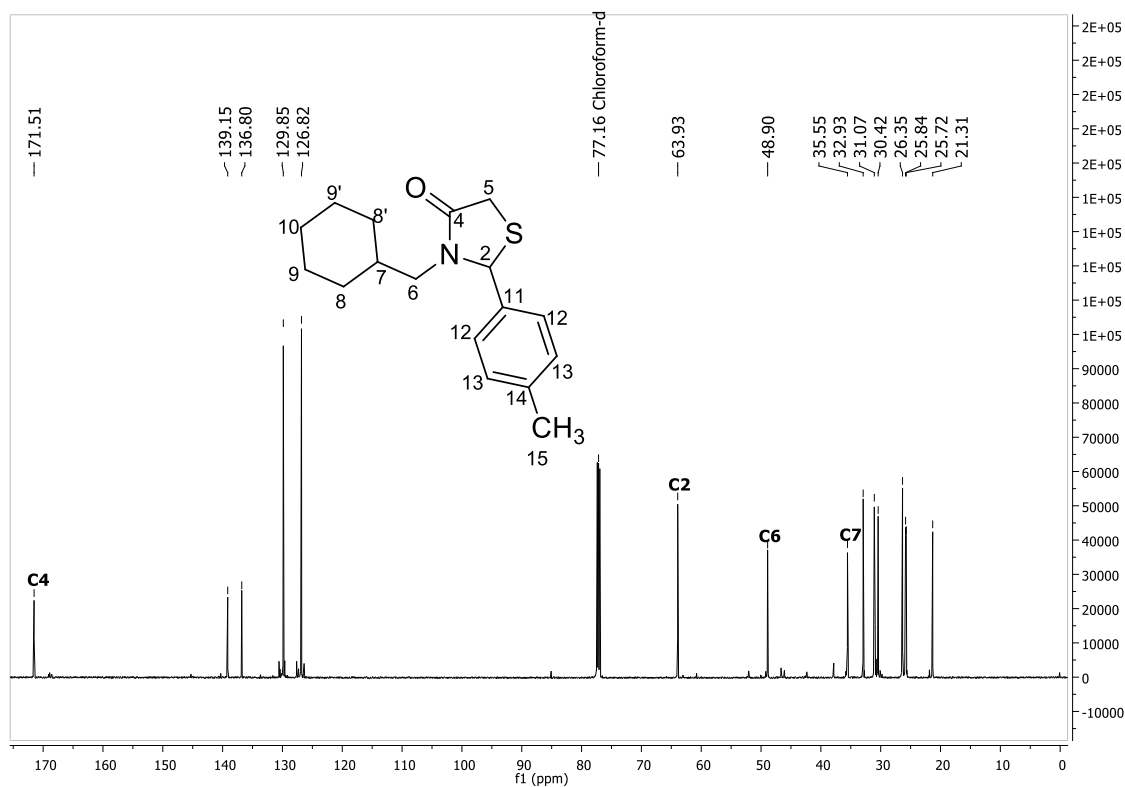


Figure S39: NMR ¹³C spectrum of thiazolidin-4-one 5m.

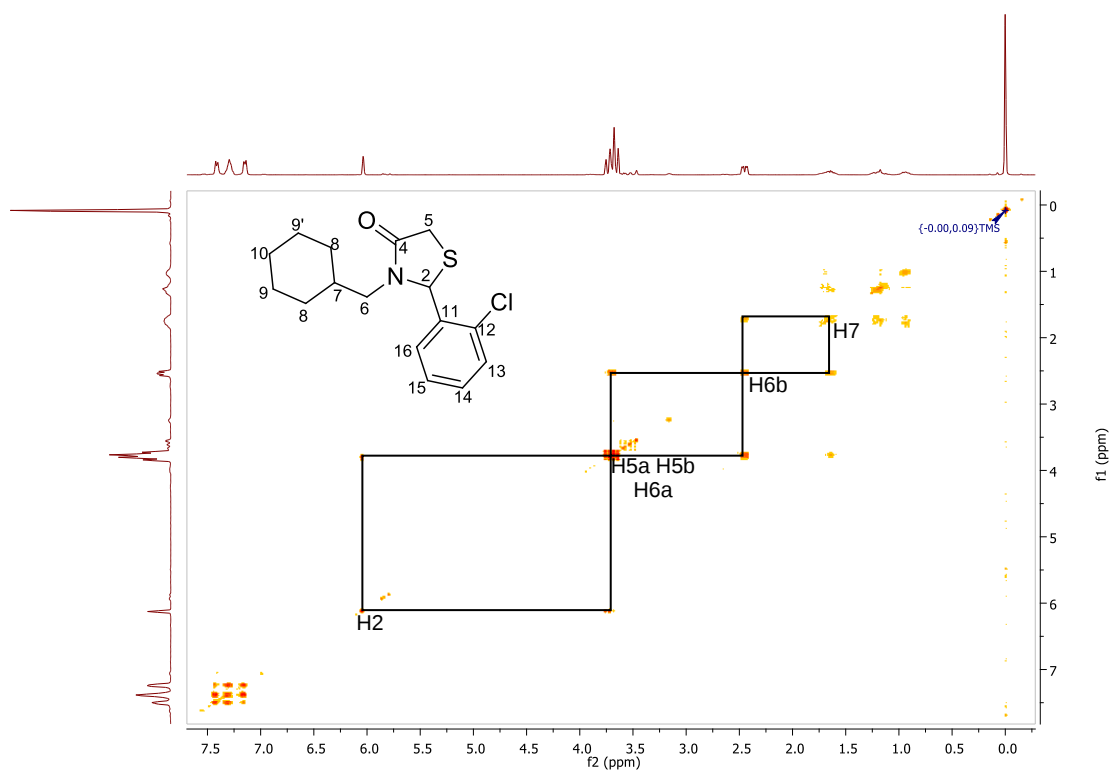


Figure S40. 2D NMR COSY spectrum of thiazolidin-4-one **5d**.

0

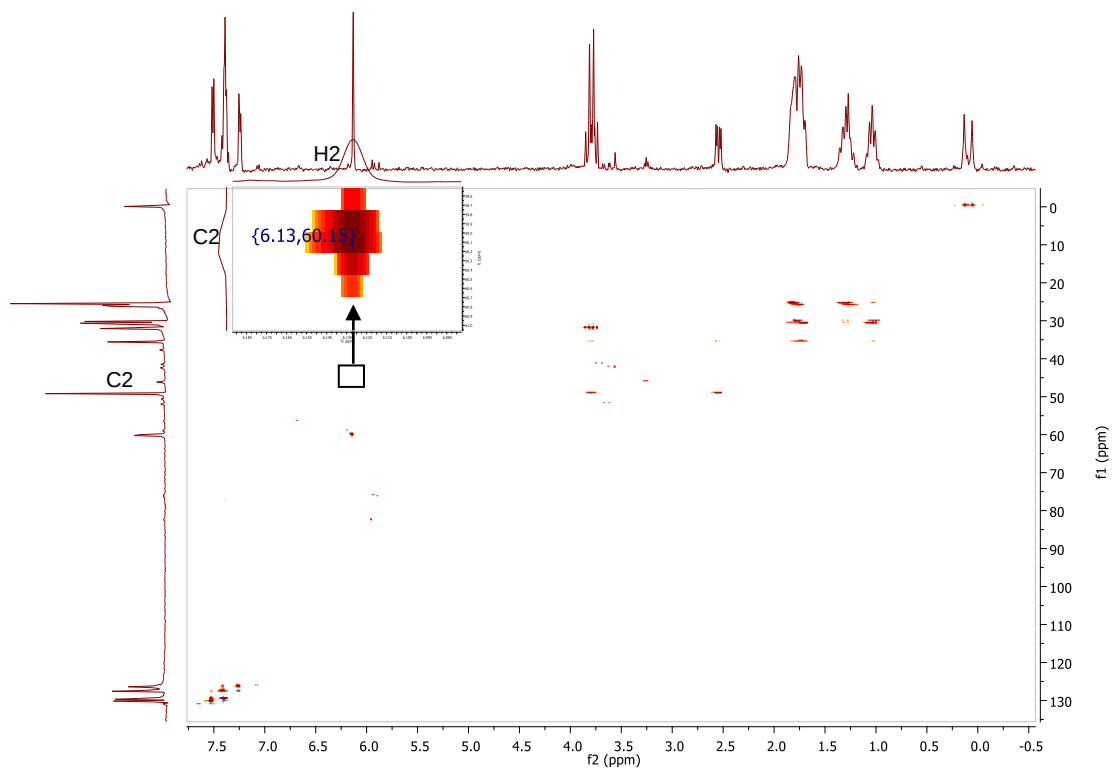


Figure S41. 2D NMR HSQC spectrum of thiazolidin-4-one **5d**.

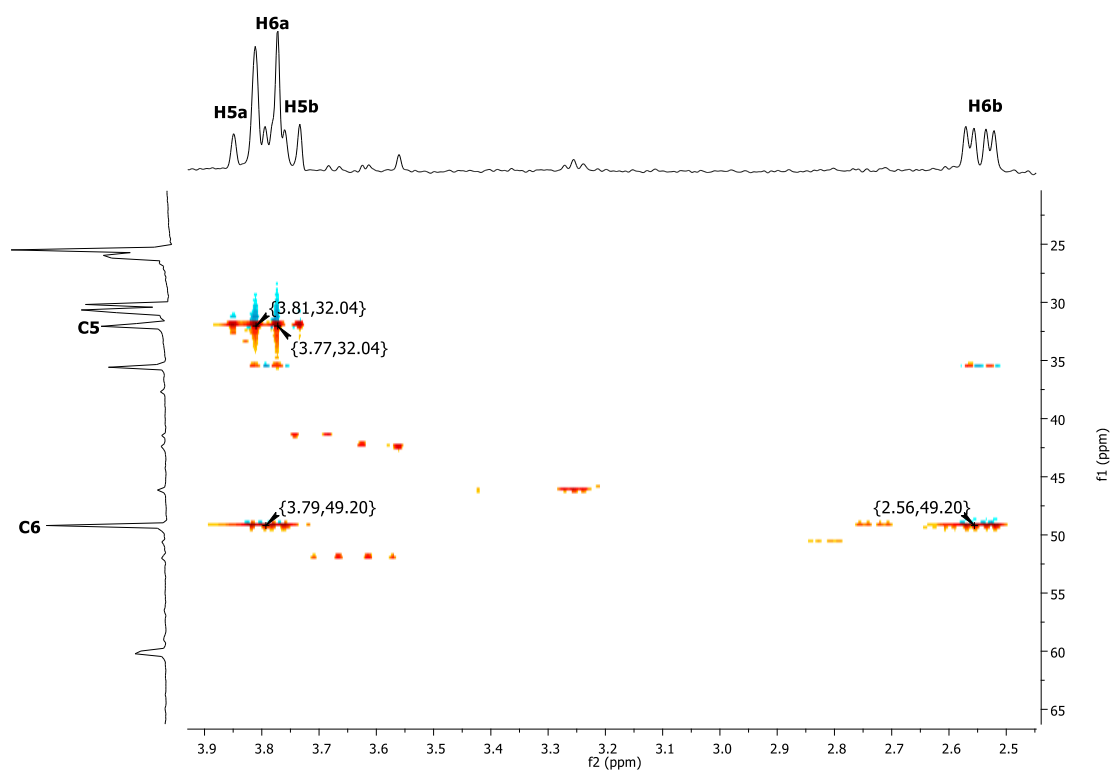
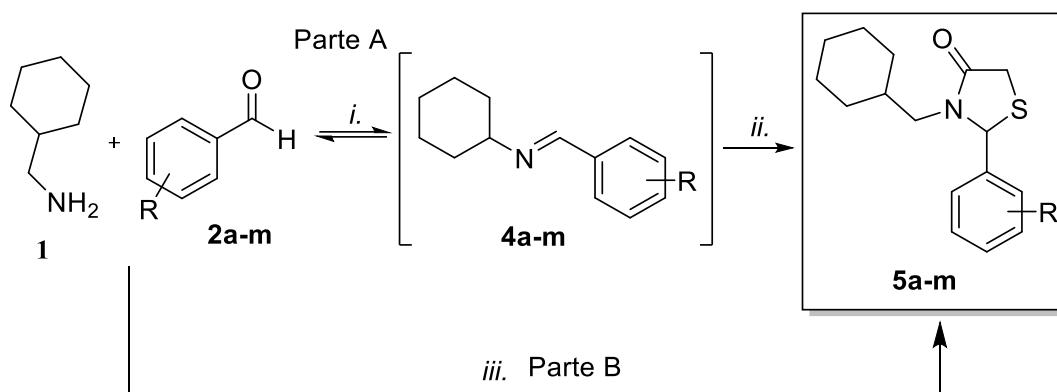


Figure S42: Expansion of 2D NMR HSQC to show the H5a, H5b, H6a e H6b of thiazolidin-4-one **5d**.

5. DISCUSSÃO

As tiazolidin-4-onas **5a-m** foram sintetizadas pelo procedimento multicomponente *one-pot*. Em primeiro lugar, a reação de adição/substituição a carbonila ocorreu entre 2-cicloexilmetilamina **1** e aldeídos **2a-m**, com grupos doadores ou retiradores de elétrons, sob agitação e refluxo de tolueno por 2 horas para o desenvolvimento da imina intermediária **4a-m**. Subsequentemente, o ácido mercaptoacético **3** foi adicionado à mistura e permaneceu sob agitação e aquecimento durante mais 4 horas até que o reagente foi completamente consumido (como mostrado em Cromatografia de Camada Delgada (CCD) em hexano/acetato de etila 7:3). Esta reação de ciclocondensação proporcionou as tiazolidin-4-onas **5a-m** (Parte A, Esquema 4). Além disso, foi utilizada uma metodologia não convencional e as reações também foram realizadas em um aparelho de micro-ondas 300 W Discover. A reação é multicomponente *one-pot* e todos os reagentes foram adicionados no início e a mistura permaneceu em irradiação de micro-ondas por 15 minutos em refluxo de tolueno para fornecer tiazolidin-4-onas **5a-m** (Parte B, Esquema 4). A principal vantagem de utilizar a metodologia de micro-ondas é que ela reduz o tempo de reação quando comparada à metodologia de aquecimento convencional. Diferentes benzaldeídos monossustituídos ou dissustituídos com substituintes nas posições orto, meta ou para com substituinte doador de elétrons, como -CH₃ e -OCH₃, ou substituinte retirado de elétrons, como -Cl, -F e -NO₂, foram usados como reagentes.

Esquema 4.



i. Tolueno, 110°C, 2h.

ii. HSCH₂COOH (**3**), tolueno, 110°C, 4h.

iii. Tolueno, HSCH₂COOH (**3**), MO: 300 W, 100°C, 15 min.

R: a: H; b: 2-OCH₃; c: 3-OCH₃; d: 2,5-OCH₃; e: 2-Cl; f: 4-Cl;
g: 2-NO₂; h: 3-NO₂; i: 4-NO₂; j: 2-F; k: 3-F; l: 4-F; m: 4-CH₃

Com a intenção de apresentar uma descrição de fragmentações semelhantes observadas na série de tiazolidin-4-onas sintetizadas, a seguir é apresentado o CG/EM do composto **5d** (Figura 7).

Neste composto o íon molecular é referente ao fragmento de razão m/z 309, que corresponde a massa molar do mesmo. Destaca-se que os fragmentos de razão m/z 309 e 125 apresentam o M+2 característico da presença de um átomo de cloro e o pico base corresponde ao fragmento de maior intensidade possui razão m/z 274 (perda do átomo de cloro).

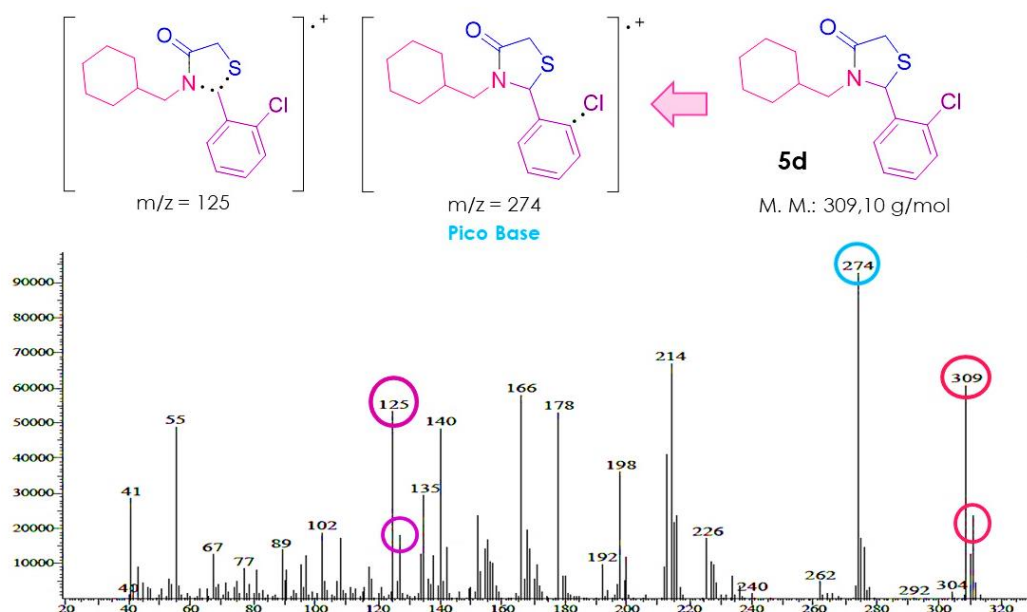


Figura 7: Espectro de massas da tiazolidin-4-ona **5d**.

Neste composto, no espectro de RMN de ^1H o sinal mais blindado é referente ao H2 com deslocamento químico de 6,22 ppm na forma de um simpleto e confirma a formação do heterociclo tiazolidin-4-ona **5d**. Na expansão espectral A verifica-se os hidrogênios diasterotópicos H5a e H5b. Os hidrogênios diasterotópicos foram observados em uma faixa de 3,87-3,68 ppm como duplete e 3,76-3,61 como duplo duplete. Outros hidrogênios diasterotópicos H6a e H6b aparecem em 3,77-3,56 ppm como um duplo duplete e em 2,49-2,41 ppm também como um duplo duplete.

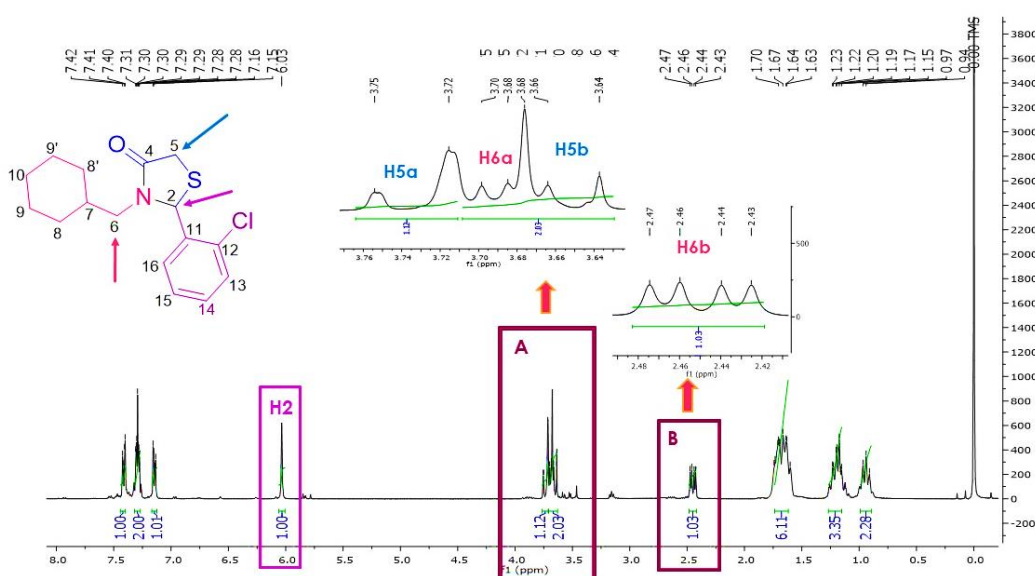


Figura 8: RMN de ^1H da tiazolidin-4-ona **5d**.

No RMN de ^{13}C da tiazolidin-4-ona **5d**, os sinais que confirmam a formação do produto são o sinal da carbonila C=O (C4) em 172,2-171,3 ppm e o sinal característico de CH (C2) do anel de tiazolidinona em 64,0-57,4 ppm. Os outros sinais do composto estão na região aromática entre 160-120 ppm e 48-25 ppm para a parte do alifático ligado ao nitrogênio do anel. Os dados de RMN de 2D (COSY e HSQC) ajudaram na atribuição completa de todos os prótons e carbonos.

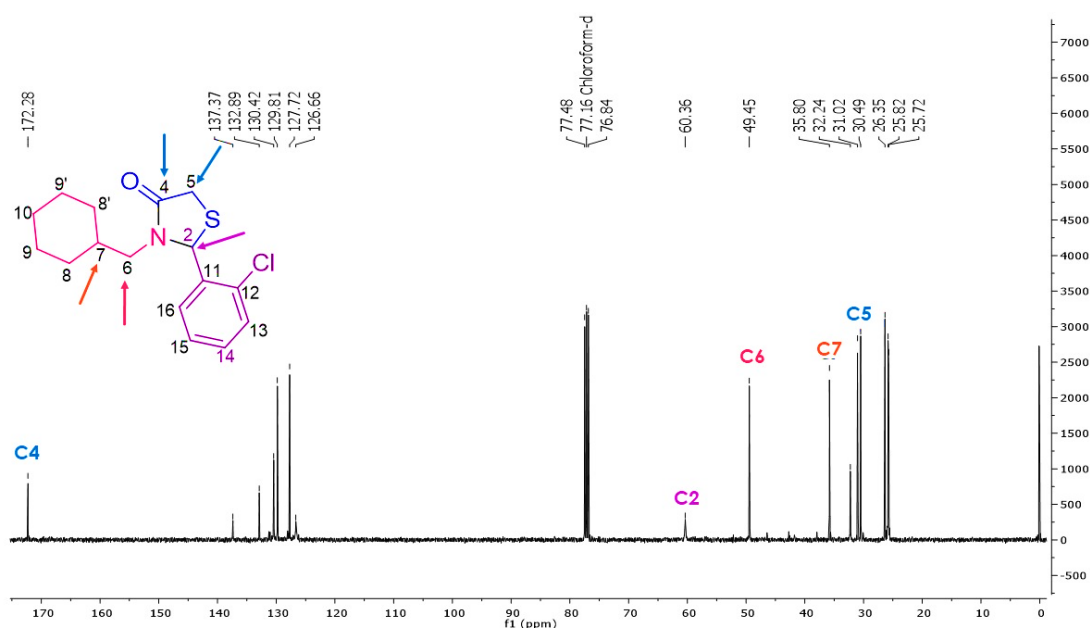


Figure 9: RMN de ^{13}C da tiazolidinona **5d**.

As tiazolidin-4-onas **5a-m** foram obtidas com rendimentos moderados a excelentes (45-98%) na metodologia de aquecimento convencional, com exceção de dois compostos **5f** (31%) e **5j** (10%) que possuem grupos substituintes (Cl e F) no anel benzênico, e com rendimentos moderados a bons (56-85%) na metodologia de micro-ondas. Nosso estudo demonstra a eficácia da metodologia de micro-ondas que fornece os produtos desejados em minutos, menos tempo de reação do que o aquecimento convencional (horas). Desse modo, fica evidenciada a eficiência dessa alternativa metodológica, tornando a metodologia quimicamente mais favorável ao meio ambiente, além de apresentar rendimentos mais estáveis, sem que a maioria dos compostos necessite de purificação adicional, como recristalização.

5.2 Avaliação in vitro na atividade cerebral de AChE

Esses resultados contribuem para a relação estrutura-atividade e a ação sobre a enzima AChE das moléculas neste trabalho e de tiazoheterociclos (Berwaldt et al. 2019; da Silva et al. 2020; das Neves et al. 2020) de trabalhos publicados anteriormente. Vale ressaltar que os tiazoheterociclos anteriores possuem nitrogênio terciário (em um anel ou não, Figura 10).

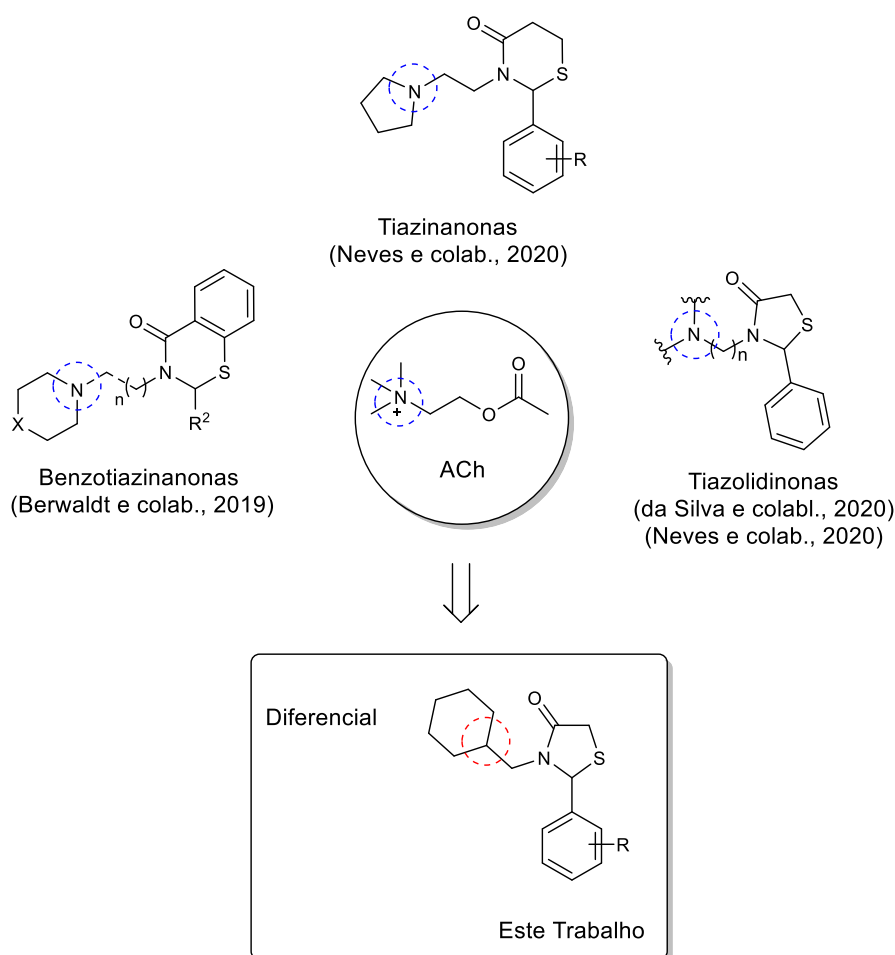


Figura 10: Estruturas de ACh e tiazoheterociclos com atividade inibitória da AChE.

Para avaliar os efeitos dos presentes compostos sobre a atividade da AChE, foram utilizados córtex cerebral e hipocampo de ratos, uma vez que já está bem descrito que essas duas estruturas cerebrais desempenham um papel importante na formação da memória. Além disso, já está bem definido que alterações em ambas as estruturas são encontradas em pacientes com Doença de Alzheimer.

Primeiramente, algumas tiazolidin-4-onas foram testadas escolhendo os diferentes substituintes com grupos ativantes (OCH_3) e desativantes (Cl , F ,

NO₂) do anel benzênico. Portanto, os testes foram realizados para sete tiazolidin-4-onas **5a**, **5b**, **5c**, **5d**, **5h**, **5k**, **5m**. Todos os compostos foram solubilizados em metanol e introduzidos nos ensaios enzimáticos nas concentrações finais de 1, 10, 25, 50 e 100 µM usando o método de Ellmann e col. (1961) na atividade AChE do hipocampo e córtex cerebral de ratos. Cabe ressaltar, que além do controle da água, também foi determinada a ação do metanol sobre a atividade da AChE, confirmando que o mesmo não alterou a atividade da AChE em relação ao grupo controle de água.

Com base nos resultados obtidos, pode-se verificar que nenhum dos compostos apresentou um potencial efeito inibitório da atividade enzimática sobre a AChE no córtex cerebral e hipocampo nas concentrações avaliadas. Devido à falta de resultados, as demais tiazolidin-4-onas não foram testadas.

Como nenhuma das tiazolidinonas neste estudo apresentou atividade inibitória da AChE, sugere-se que um nitrogênio básico é necessário para uma interação com a enzima e/ou é necessário para a protonação e, portanto, essencial para a atividade. Além disso, a propriedade eletrônica do substituinte no anel fenil não influenciou a atividade. Outro fator importante poderia ser a ligação da cadeia de carbono entre o anel tiazolidinona e o anel ciclohexano, uma vez que um grande (dois ou mais) grupo -CH₂ pode ser preferível para o reconhecimento do substrato pela AChE (da Silva et al 2020).

6. CONCLUSÃO

Uma nova série de 1,3-tiazolidin-4-onas (**5a-m**) foi sintetizada usando 2-ciclohexiletanamina, aldeídos substituídos e ácido mercaptoacético por reação multicomponente em um único recipiente em procedimentos simultâneos de aquecimento e micro-ondas em geral. As tiazolidin-4-onas **5a-m** foram mencionadas acima com um resultado baixo a excelente (10-98%) na metodologia de aquecimento convencional e moderados a bons negócios (56-85%) na metodologia de micro-ondas. Ao estudar as condições de reação para a obtenção de 1,3-tiazolidin-4-ona, observamos a aplicação da metodologia de micro-ondas que oferece os produtos desejados em minutos, menos tempo de reação do que o aquecimento convencional que oferece em horas. Todos os

compostos foram identificados e caracterizados por CG-MS e por RMN de ^1H e ^{13}C .

Neste estudo, obtemos fortes evidências de que o heterociclo contendo nitrogênio básico pode ser essencial para a inibição da AChE. Esses resultados importantes contribuem para a relação estrutura-atividade desses tiazoheterociclos, uma vez que os tiazoheterociclos contendo um nitrogênio terciário (em um anel ou não) inibiram significativamente a atividade enzimática da AChE. Sugerindo que um nitrogênio básico é necessário para uma interação com a enzima e, portanto, essencial para a atividade. Devido a estabilidade das moléculas sintetizadas, demonstram ter potencial para serem testadas para outros tipos de atividade biológica.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Agrawal N (2021) Synthetic and therapeutic potential of 4-thiazolidinone and its analogs. *Curr Chem Lett* 10:119–138. <https://doi.org/10.5267/j.ccl.2020.11.002>
- Ayyash AN, Hammady AO (2020) Synthesis and Bioactivity Screening of New 1, 3-Thiazolidin-4-One Compounds Bearing (Thiadiazols / Triazoles) Moieties. *J Phys Conf Ser* 1660:. <https://doi.org/10.1088/1742-6596/1660/1/012025>
- Berwaldt GA, Gouvêa DP, da Silva DS, et al (2019) Synthesis and biological evaluation of benzothiazin-4-ones: a possible new class of acetylcholinesterase inhibitors. *J Enzyme Inhib Med Chem* 34:197–203. <https://doi.org/10.1080/14756366.2018.1543286>
- Bhosle MR, Kharote SA, Bondle GM, Mali JR (2019) Tromethamine organocatalyzed efficient tandem-multicomponent synthesis of new thiazolyl-4-thiazolidinones in aqueous medium. *Synth Commun* 49:1286–1300. <https://doi.org/10.1080/00397911.2019.1597124>
- Bosenbecker J, Bareño VDO, Difabio R, et al (2014) Synthesis and antioxidant activity of 3-(Pyridin-2-ylmethyl)-1,3-thiazinan(thiazolidin)-4-ones. *J Biochem Mol Toxicol* 28:425–432. <https://doi.org/10.1002/jbt.21581>
- Bowen DM, Smith CB, White P, Davison AN (1976) Neurotransmitter-related enzymes and indices of hypoxia in senile dementia and other abiotrophies. *Brain* 99:459–496. <https://doi.org/10.1093/brain/99.3.459>
- Campos JC, Gouvêa DP, Ribeiro C da S, et al (2013) Efficient synthesis and antioxidant evaluation of 2-Aryl-3-(pyrimidin-2-yl)-Thiazolidinones. *J Biochem Mol Toxicol* 27:445–450. <https://doi.org/10.1002/jbt.21506>
- Chatel G, Varma RS (2019) Ultrasound and microwave irradiation: Contributions of alternative physicochemical activation methods to Green Chemistry. *Green Chem* 21:6043–6050. <https://doi.org/10.1039/c9gc02534k>
- Cranston AL, Wysocka A, Steczkowska M, et al (2020) Cholinergic and inflammatory phenotypes in transgenic tau mouse models of Alzheimer's disease and frontotemporal lobar degeneration. *Brain Commun* 2:1–17. <https://doi.org/10.1093/braincomms/fcaa033>
- Cruz JN, Silva SG, Bezerra FWF, et al (2019) Síntese Orgânica, Inorgânica E De Nanomateriais Assistida Por Micro-Ondas: Uma Mini Revisão. *As Ciências Exatas e da Terra no Século XXI* 2 123–131. <https://doi.org/10.22533/at.ed.80519071012>
- da Silva DS, da Silva CEH, Soares MSP, et al (2016) Thiazolidin-4-ones from 4-(methylthio)benzaldehyde and 4-(methylsulfonyl)benzaldehyde: Synthesis, antiglioma activity and cytotoxicity. *Eur J Med Chem* 124:574–582. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2016.08.057>
- da Silva DS, Soares MSP, Martini F, et al (2020) In Vitro Effects of 2-{4-[Methylthio(methylsulfonyl)]phenyl}-3-substitutedthiazolidin-4-ones on the Acetylcholinesterase Activity in Rat Brain and Lymphocytes: Isoform Selectivity, Kinetic Analysis, and Molecular Docking. *Neurochem Res* 45:241–253. <https://doi.org/10.1007/s11064-019-02929-8>

- da Silveira EF, Azambuja JH, de Carvalho TR, et al (2017) Synthetic 2-aryl-3-((piperidin-1-yl)ethyl)thiazolidin-4-ones exhibit selective in vitro antitumoral activity and inhibit cancer cell growth in a preclinical model of glioblastoma multiforme. *Chem Biol Interact* 266:1–9. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2017.02.001>
- da Silveira EF, Ferreira LM, Gehrcke M, et al (2019) 2-(2-Methoxyphenyl)-3-((Piperidin-1-yl)ethyl)thiazolidin-4-One-Loaded Polymeric Nanocapsules: In Vitro Antiglioma Activity and In Vivo Toxicity Evaluation. *Cell Mol Neurobiol* 39:783–797. <https://doi.org/10.1007/s10571-019-00678-4>
- das Neves AM, Berwaldt GA, Avila CT, et al (2020) Synthesis of thiazolidin-4-ones and thiazinan-4-ones from 1-(2-aminoethyl)pyrrolidine as acetylcholinesterase inhibitors. *J Enzyme Inhib Med Chem* 35:31–41. <https://doi.org/10.1080/14756366.2019.1680659>
- das Neves AM, Campos JC, Gouvêa DP, et al (2019) Synthesis of Novel Thiazolidin-4-ones and Thiazinan-4-ones Analogous to Rosiglitazone. *J Heterocycl Chem* 56:251–259. <https://doi.org/10.1002/jhet.3402>
- Díaz-Ortiz, Prieto P, de la Hoz A (2019) A Critical Overview on the Effect of Microwave Irradiation in Organic Synthesis. *Chem Rec* 19:85–97. <https://doi.org/10.1002/tcr.201800059>
- Du X, Wang X, Geng M (2018) Alzheimer's disease hypothesis and related therapies. *Transl Neurodegener* 7:1–7. <https://doi.org/10.1186/s40035-018-0107-y>
- Fronza MG, Baldinotti R, Martins MC, et al (2019) Rational design, cognition and neuropathology evaluation of QTC-4-MeOBnE in a streptozotocin-induced mouse model of sporadic Alzheimer's disease. *Sci Rep* 9:1–14. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-43532-9>
- García-Soldevilla MA, Enjuanes García A, Barragán Martínez D, et al (2019) Therapeutic aspects in dementias. *Med* 12:4357–4366. <https://doi.org/10.1016/j.med.2019.03.014>
- Gonçalves S, Outeiro TF (2015) A disfunção cognitiva nas doenças neurodegenerativas. *Rev Bras Ciências do Envelhec Hum* 12:. <https://doi.org/10.5335/rbceh.v12i3.6007>
- Gouvêa DP, Bareño VDO, Bosenbecker J, et al (2012) Ultrasonics promoted synthesis of thiazolidinones from 2-aminopyridine and 2-picolilamine. *Ultrason Sonochem* 19:1127–1131. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2012.03.004>
- Gouvêa DP, Berwaldt GA, Neuenfeldt PD, et al (2016) Synthesis of novel 2-Aryl-3-(2-morpholinoethyl)-1,3-thiazinan-4-ones via ultrasound irradiation. *J Braz Chem Soc* 27:1109–1115. <https://doi.org/10.5935/0103-5053.20160009>
- Güzel-Akdemir Ö, Trawally M, Özbek-Babuç M, et al (2020) Synthesis and antibacterial activity of new hybrid derivatives of 5-sulfamoyl-1H-indole and 4-thiazolidinone groups. *Monatshefte fur Chemie* 151:1443–1452. <https://doi.org/10.1007/s00706-020-02664-9>
- Hassan AA, Aly AA, Ramadan M, et al (2020) Stereoselective synthesis of 2-(2,4-dinitrophenyl)hydrazono- and (2-tosylhydrazono)-4-oxo-thiazolidine derivatives and screening of their anticancer activity. *Monatshefte fur Chemie* 151:1453–1466. <https://doi.org/10.1007/s00706-020-02671-w>
- Henary M, Kananda C, Rotolo L, et al (2020) Benefits and applications of microwave-assisted synthesis of nitrogen containing heterocycles in

- medicinal chemistry. RSC Adv 10:14170–14197.
<https://doi.org/10.1039/d0ra01378a>
- Hussein RA, Afifi AH, Soliman AAF, et al (2020) Neuroprotective activity of *Ulmus pumila* L. in Alzheimer's disease in rats; role of neurotrophic factors. *Heliyon* 6:1–13. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2020.e05678>
- Jain AK, Vaidya A, Ravichandran V, et al (2012) Recent developments and biological activities of thiazolidinone derivatives: A review. *Bioorganic Med Chem* 20:3378–3395. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2012.03.069>
- Jin X, Wang M, Shentu J, et al (2020) Inhibition of acetylcholinesterase activity and β -amyloid oligomer formation by 6-bromotryptamine A, a multi-target anti-Alzheimer's molecule. *Oncol Lett* 19:1593–1601.
<https://doi.org/10.3892/ol.2019.11226>
- Jung M, Park M (2007) Acetylcholinesterase inhibition by flavonoids from *Agrimonia pilosa*. *Molecules* 12:2130–2139.
<https://doi.org/10.3390/12092130>
- Kalhor M, Banibairami S (2020) Design of a new multi-functional catalytic system Ni/SO₃H@zeolite-Y for three-component synthesis of: N -benzoimidazo- or -thiazole-1,3-thiazolidinones. RSC Adv 10:41410–41423.
<https://doi.org/10.1039/d0ra08237f>
- Kalhor M, Banibairami S, Mirshokraie SA (2017) A one-pot multi-component reaction for the facile synthesis of some novel 2-aryl thiazolidinones bearing benzimidazole moiety using La(NO₃)₃·6H₂O as an efficient catalyst. *Res Chem Intermed* 43:5985–5994.
<https://doi.org/10.1007/s11164-017-2974-8>
- Kladnik J, Ristovski S, Kljun J, et al (2020) Structural isomerism and enhanced lipophilicity of pyrithione ligands of organoruthenium(II) complexes increase inhibition on AChE and BuChE. *Int J Mol Sci* 21:1–17.
<https://doi.org/10.3390/ijms21165628>
- Kumar D, Gupta SK, Ganeshpurkar A, et al (2018) Development of Piperazinediones as dual inhibitor for treatment of Alzheimer's disease. *Eur J Med Chem* 150:87–101. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2018.02.078>
- Kumar R, Patil S, Pharm M (2017) Biological Prospective of 4-Thiazolidinone: a Review. *HygeiaJDMed* 9:3590.
<https://doi.org/10.15254/H.J.D.Med.9.2017.166>
- Loro LB, Jaeger De Belli A, Gr C, et al (2018) HISTÓRIA DA NEUROTRANSMISSÃO: UM BREVE RELATO HISTORY OF NEUROTRANSMISSION: A BRIEF REPORT MARCELO GARCIA TONETO e LUIZ GUSTAVO GUILHERMANO 2
- Mendes CP, Postal BG, Oliveira GTC, et al (2018) Insulin stimulus-secretion coupling is triggered by a novel thiazolidinedione/sulfonylurea hybrid in rat pancreatic islets. *J Cell Physiol* 234:509–520.
<https://doi.org/10.1002/jcp.26746>
- Mohammad D, Chan P, Bradley J, et al (2017) Acetylcholinesterase inhibitors for treating dementia symptoms - a safety evaluation. *Expert Opin Drug Saf* 16:1009–1019. <https://doi.org/10.1080/14740338.2017.1351540>
- Nain S, Singh R, Ravichandran S (2019) Importance of Microwave Heating In Organic Synthesis. *Adv J Chem A* 2:94–104.
<https://doi.org/10.29088/sami/ajca.2019.2.94104>
- Neves AHS, da Silva DS, Siqueira GM, et al (2018) The antinociceptive evaluation of 2,3-substituted-1,3-thiazolidin-4-ones through thermal

- stimulation in mice. *Med Chem Res* 27:186–193.
<https://doi.org/10.1007/s00044-017-2052-1>
- Nirwan S, Chahal V, Kakkar R (2019) Thiazolidinones: Synthesis, Reactivity, and Their Biological Applications. *J Heterocycl Chem* 56:1239–1253.
<https://doi.org/10.1002/jhet.3514>
- Pedra NS, De Cássia Araújo Galdino K, Da Silva DS, et al (2018) Endophytic fungus isolated from *achyrocline satureioides* exhibits selective antiglioma activity-the role of sch-642305. *Front Oncol* 8:1–20.
<https://doi.org/10.3389/fonc.2018.00476>
- Petronilha EDC, Pintob AC, Villara JDF (2011) Acetilcolinesterase: Alzheimer e guerra química. *Ciência e Tecnol* 3–14
- Preeti, Singh KN (2018) Multicomponent reactions: A sustainable tool to 1,2- and 1,3-azoles. *Org Biomol Chem* 16:9084–9116.
<https://doi.org/10.1039/c8ob01872c>
- Sahiba N, Sethiya A, Soni J, et al (2020) Saturated Five-Membered Thiazolidines and Their Derivatives: From Synthesis to Biological Applications. Springer International Publishing
- Saini N, Sharma A, Thakur VK, et al (2020) Microwave assisted green synthesis of thiazolidin-4-one derivatives: A perspective on potent antiviral and antimicrobial activities. *Curr Res Green Sustain Chem* 3:100021.
<https://doi.org/10.1016/j.crgsc.2020.100021>
- Shin J, Kong C, Lee J, et al (2019) Focused ultrasound-induced blood-brain barrier opening improves adult hippocampal neurogenesis and cognitive function in a cholinergic degeneration dementia rat model. *Alzheimer's Res Ther* 11:1–15. <https://doi.org/10.1186/s13195-019-0569-x>
- Song X, Wang T, Guo L, et al (2020) In Vitro and in Vivo Anti-AChE and Antioxidative Effects of *Schisandra chinensis* Extract: A Potential Candidate for Alzheimer's Disease. *Evidence-based Complement Altern Med* 2020:. <https://doi.org/10.1155/2020/2804849>
- Subhedar DD, Yadav PA, Pawar SR, Bhanage BM (2020) Environmentally Benign Synthesis of 4-Thiazolidinone Derivatives Using a Co/Al Hydrotalcite as Heterogeneous Catalyst. *Catal Letters*.
<https://doi.org/10.1007/s10562-020-03436-0>
- Tselikhovsky D, Buchwald SL (2011) Concise palladium-catalyzed synthesis of dibenzodiazepines and structural analogues. *J Am Chem Soc* 133:14228–14231. <https://doi.org/10.1021/ja206229y>
- Vakili R, Xu S, Al-Janabi N, et al (2018) Microwave-assisted synthesis of zirconium-based metal organic frameworks (MOFs): Optimization and gas adsorption. *Microporous Mesoporous Mater* 260:45–53.
<https://doi.org/10.1016/j.micromeso.2017.10.028>
- Viegas C, Da Silva Bolzani V, Furlan M, et al (2004) Natural products as candidates for useful drugs in the treatment of Alzheimer's disease. *Quim Nova* 27:655–660. <https://doi.org/10.1590/s0100-40422004000400021>
- Vitaku E, Smith DT, Njardarson JT (2014) Analysis of the structural diversity, substitution patterns, and frequency of nitrogen heterocycles among U.S. FDA approved pharmaceuticals. *J Med Chem* 57:10257–10274.
<https://doi.org/10.1021/jm501100b>
- Wang Y, Xia J, Shen M, et al (2019) Effects of Bis-MEP on reversing amyloid plaque deposition and spatial learning and memory impairments in a mouse model of β -amyloid peptide- And ibotenic acid-induced Alzheimer's

disease. *Front Aging Neurosci* 11:1–11.
<https://doi.org/10.3389/fnagi.2019.00003>

Xie L, Kang H, Xu Q, et al (2013) Sleep drives metabolite clearance from the adult brain. *Science* (80-) 342:373–377.
<https://doi.org/10.1126/science.1241224>

ANEXO 1: Comprovante de submissão do artigo

14/04/2021

Yahoo Mail - MCRE-D-21-00400 - Submission Confirmation

MCRE-D-21-00400 - Submission Confirmation

De: Medicinal Chemistry Research (MCRE) (em@editorialmanager.com)

Para: wjcunico@yahoo.com.br

Data: quarta-feira, 14 de abril de 2021 18:19 BRT

Dear Dr. Cunico,

Thank you for submitting your manuscript, Design, synthesis and evaluation of anti-cholinesterase potential of thiazolidin-4-ones from 2-cyclohexylethanamine and arenealdehydes, to Medicinal Chemistry Research.

The submission id is: MCRE-D-21-00400

Please refer to this number in any future correspondence.

During the review process, you can keep track of the status of your manuscript by accessing the journal's website.

Your username is: wjcunico

If you forgot your password, you can click the 'Send Login Details' link on the EM Login page at

<https://www.editorialmanager.com/mcre/>

Should you require any further assistance please feel free to e-mail the Editorial Office by clicking on "Contact Us" in the menu bar at the top of the screen.

With kind regards,
Springer Journals Editorial Office
Medicinal Chemistry Research

Now that your article will undergo the editorial and peer review process, it is the right time to think about publishing your article as open access. With open access your article will become freely available to anyone worldwide and you will easily comply with open access mandates. Springer's open access offering for this journal is called Open Choice (find more information on www.springer.com/openchoice). Once your article is accepted, you will be offered the option to publish through open access. So you might want to talk to your institution and funder now to see how payment could be organized; for an overview of available open access funding please go to www.springer.com/oafunding.

Although for now you don't have to do anything, we would like to let you know about your upcoming options.

****Our flexible approach during the COVID-19 pandemic****

If you need more time at any stage of the peer-review process, please do let us know. While our systems will continue to remind you of the original timelines, we aim to be as flexible as possible during the current pandemic.

This letter contains confidential information, is for your own use, and should not be forwarded to third parties.

Recipients of this email are registered users within the Editorial Manager database for this journal. We will keep your information on file to use in the process of submitting, evaluating and publishing a manuscript. For more information on how we use your personal details please see our privacy policy at <https://www.springernature.com/production-privacy-policy>. If you no longer wish to receive messages from this journal or you have questions regarding database management, please contact the Publication Office at the link below.

In compliance with data protection regulations, you may request that we remove your personal registration details at any time. (Use the following URL: <https://www.editorialmanager.com/mcre/login.asp?a=r>). Please contact the publication office if you have any questions.

Anexo 2: Aprovação Comitê de Ética em Experimentação Animal UFPel

15/04/2021

SEI/UFPel - 0433222 - Parecer



PARECER Nº
PROCESSO Nº

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
4/2019/CEEA/REITORIA
23110.046528/2018-11

Certificado

Certificamos que a proposta intitulada "Potencial anticolinérgico de heterociclos contendo átomos de nitrogênio e enxofre: estudos *in vitro* e *in vivo*" processo número 23110.046528/2018-11, de responsabilidade de Roselia Maria Spanevello- que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) – encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e recebeu parecer FAVORÁVEL a sua complementação pela Comissão de Ética em Experimentação Animal, em reunião de 10/12/2018.

Finalidade	(X) Pesquisa () Ensino
Vigência da autorização	15/01/2019 a 15/11/2021
Espécie/linhagem/raça	<i>Rattus norvegicus</i> /Wistar
Nº de animais	366
Idade	20 com 1-3 dias e 336 com 60 dias
Sexo	Machos
Origem	Biotério Central-UFPel

Código para cadastro CEEA 46528-2018

https://sei.ufpel.edu.br/sei/controlador.php?acao=documento_imprimir_web&acao_origem=emvue_visualizar&id_documento=505984&infra_sistema=1... 1/2

15/04/2021

SEI/UFPel - 0433222 - Parecer

M.V. Dra. Anelize de Oliveira Campello Felix

Presidente da CEEA



Documento assinado eletronicamente por ANELIZE DE OLIVEIRA CAMPELLO FELIX, Médico Veterinário, em 12/02/2019, às 10:30, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 62, § 1º, do Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2017.



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site http://sei.ufpel.edu.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador 0433222 e o código CRC 9E2E8840.