



UFRRJ

**INSTITUTO DE CIÊNCIAS EXATAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA**

DISSERTAÇÃO

**Síntese e avaliação da atividade anticolinesterásica de novos
derivados do produto natural harmana.**

Marcela Cristina Oliveira Nogueira

2013

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO

**INSTITUTO DE CIÊNCIAS EXATAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA**

**SÍNTESE DE AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTICOLINESTERÁSICA
DE NOVOS DERIVADOS DO PRODUTO NATURAL HARMANA.**

MARCELA CRISTINA OLIVEIRA NOGUEIRA

Orientador

Dr. Victor Marcos Rumjanek – UFRRJ

Co-Orientadores

Dr. Arthur Eugen Kümmerle - UFRRJ

Dr. Jochen Junker - FioCruz

Dissertação submetida como requisito
Parcial para obtenção do grau de
Mestre em Ciências, no Curso de Pós-
Graduação em Química Área de
concentração Química Orgânica.

Seropédica, RJ

Março de 2013

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS EXATAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

MARCELA CRISTINA OLIVEIRA NOGUEIRA

Dissertação submetida como requisito Parcial para obtenção do grau de **Mestre** em Ciências,
no Curso de Pós-Graduação em Química Área de concentração Química Orgânica

DISSERTAÇÃO APROVADA EM ____/____/____

Dr. VICTOR MARCOS RUMJANEK - UFRRJ

(Orientador)

Dr. DOUGLAS SIQUEIRA DE ALMEIDA CHAVES - UFRRJ

Dra. CLÁUDIA JORGE DO NASCIMENTO - UNIRIO

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais Graça e Miguel pela educação, apoio, amizade, brigas e cobranças ao longo de toda a minha vida. A eles devo tudo e sei que cada segundo ao lado deles é importante para minha formação pessoal e profissional.

Ao meu orientador, Dr. Victor Marcos Rumjanek, pela recepção e amizade com que me recebeu na UFRRJ desde o primeiro momento, mas principalmente pela confiança depositada e os conselhos dados.

Ao meu co-orientador, Dr. Arthur Eugen Kümmerle, pela recepção no laboratório, orientação, esforço e apoio dedicados a este trabalho.

Ao meu co-orientador, Dr. Jochen Junker, pela orientação, amizade e companheirismo ao longo desses anos.

Aos professores da pós-graduação, em especial à profa. Rosane pela disposição em ajudar-me sempre, pela amizade, preocupação e cuidados dedicados.

À minha irmã Janaína, cuja amizade e companheirismo foram essenciais ao longo destes anos, me ensinando sempre que a distância, embora amargure um pouco o coração com a saudade, não é suficiente para separar pessoas que se amam.

Aos amigos Cristina Costa e Silva e Paulo Baía pela amizade, carinho, dedicação e preocupação com minha trajetória pessoal e profissional.

Aos meus amigos Carolina Passos, Sabrina Neves, Aline Figueira, Paolla Linhares, Vinícius Gonçalves, Daniel Rosa, Cristiane Frauches e Mariana Albuquerque pela ajuda na elaboração desta dissertação, pelo apoio e amizade tanto em ambiente profissional como pessoal. Todos os momentos juntos foram essenciais para que eu adotasse a “Rural” como minha segunda casa.

À Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro pela disponibilidade para a concretização deste trabalho.

À CAPES pelo fornecimento da bolsa.

**“A tarefa não é tanto ver aquilo que ninguém viu,
mas pensar no que ninguém ainda pensou
sobre aquilo que todo mundo vê”.**

(Arthur Schopenhauer)

RESUMO

Nogueira, Marcela Cristina Oliveira. **SÍNTESE E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTICOLINESTERÁSICA DE NOVOS DERIVADOS DO PRODUTO NATURAL HARMANA**. 2013. Dissertação (mestrado em Química Orgânica). Instituto de Ciências Exatas, Departamento de Química, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2013.

O aumento da expectativa de vida é uma ocorrência mundial que mostra o relativo sucesso da política de saúde pública, e o Brasil está entre os países onde as pessoas estão vivendo por mais tempo e com melhor qualidade de vida. No entanto, o aumento da expectativa de vida tem um efeito negativo: o aparecimento de doenças degenerativas típicas de idades mais avançadas, incluindo várias formas de demência, como a doença de Alzheimer (DA). A DA é uma doença irreversível e progressiva, caracterizada pela deterioração neuronal que resulta em perda de funções cognitivas como memória habilidades de comunicação, julgamento e raciocínio. Donepezil, rivastigmina e galantamina são medicamentos utilizados para o tratamento da doença de Alzheimer e agem inibindo a acetilcolinesterase (AChE) reversivelmente. Evidências sugerem que a enzima butirilcolinesterase (BChE), intimamente relacionada com a AChE, desempenha um papel significativo na DA, porque está envolvida em funções neurais, como a co-regulação da neurotransmissão colinérgica e não colinérgica. O objetivo deste trabalho foi fornecer novas substâncias com ação anticolinesterásica utilizando β -carbolinas derivadas do produto natural harmana, e realizar um estudo cinético para determinar o perfil de inibição das enzimas AChE e BChE. Inicialmente, realizou-se uma triagem com sete derivados β -carbolínicos. Posteriormente, fez-se a avaliação cinética empregando o método de Ellman. Todos apresentaram um forte perfil inibitório anticolinesterásico, tanto para a AChE e BChE e uma inibição não competitiva reversível.

Palavras-chave: Doença de Alzheimer, β -carbolina, colinesterase, cinética enzimática.

ABSTRACT

The increase in life expectancy is a worldwide occurrence that shows the relative success of public health politics, and Brazil is among the countries where people are living longer and in better physical health. However, the increase in life expectancy has a negative effect: the appearance of degenerative diseases typical of old age, including several forms of dementia, such as Alzheimer's Disease (AD) that is certainly the most important. It is an irreversible and progressive disease characterized by neuronal deterioration that results in loss of cognitive functions such as memory, communication skills, judgment and reasoning. Donepezil, rivastigmine and galantamine are medicines used for the treatment of AD and act reversibly inhibiting acetylcholinesterase (AChE). Evidences suggest that the enzyme butyrylcholinesterase (BChE), closely related to AChE, plays a significant role in AD because it is involved in neural functions such as cholinergic co-regulation and non-cholinergic neurotransmission. The aim of this research is to provide new substances with anticholinesterase action by using β -carboline derivatives from the natural product harmane and carry out a kinetic study to determine the inhibition profile of the enzymes AChE e BChE, which could help in the discovery of new compounds which could be useful in the treatment of AD. Firstly, a screening was carried out with seven β -carboline derivatives. In a second stage, a kinetic investigation, employing Ellman's method, was carried out with these compounds and all of them presented high anticholinesterase action for both AChE and BChE. All seven derivatives presented a non-competitive reversible inhibition.

Keywords: Alzheimer's disease, β -carboline, cholinesterase, enzyme kinetics.

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1: Rendimento calculado e o tempo reacional para a reação de redução dos aldeídos.	37
Tabela 2: Rendimento calculado e o tempo reacional para a reação de redução de bromação.	37
Tabela 3: Valores de absorvâncias e concentrações do sal de benzila da fenil-harmana (7) utilizados para o cálculo do percentual de inibição da AChE.	57
Tabela 4: Percentual de inibição de AChE pelo sal de benzila do fenil-pirido-indol (7).	58
Tabela 5: Percentual de inibição de AChE pelo composto 2.	59
Tabela 6: Percentual de inibição de AChE pelo composto 3.	60
Tabela 7: Percentual de inibição de AChE pelo composto 4.	61
Tabela 8: Percentual de inibição de AChE pelo composto 5.	62
Tabela 9: Percentual de inibição de AChE pelo composto 8.	63
Tabela 10: Percentual de inibição de AChE pelo composto 9.	64
Tabela 11: Percentual de inibição de BChE pelo composto 2.	65
Tabela 12: Percentual de inibição de BChE pelo composto 3.	66
Tabela 13: Percentual de inibição de BChE pelo composto 4.	67
Tabela 14: Percentual de inibição de BChE pelo composto 5.	68
Tabela 15: Percentual de inibição de BChE pelo composto 7.	69
Tabela 16: Percentual de inibição de BChE pelo composto 8.	70
Tabela 17: Percentual de inibição de BChE pelo composto 9.	71
Tabela 18: Valores de CI_{50} para os compostos avaliados quanto à atividade inibitória da AChE e BChE.	73
Tabela 19: Valores de $1/V^{\circ}$ e $1/[S]$ para o composto 7 como demonstrativo de cálculo da cinética enzimática de AChE.	75

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Placa senil e emaranhado neurofibrilar no córtex cerebral na Doença de Alzheimer.	1
Figura 2: Cascata envolvida na patologia e potenciais biomarcadores da DA.....	4
Figura 3: Diagrama energético de uma reação catalisada e de uma reação não catalisada. ΔG^\ddagger = energia livre de ativação e ΔG^0 = variação de energia livre.....	5
Figura 4: Formação do complexo enzima-substrato.....	7
Figura 5: Gráfico de Michaelis-Menten.	8
Figura 6: Gráfico de Lineaweaver e Burk.....	9
Figura 7: Gráfico de Michaelis-Menten e de Lineweaver e Burk para uma inibição reversível competitiva.....	11
Figura 8: Gráficos de Michaelis-Menten e Lineweaver-Burk para uma inibição reversível não competitiva.	13
Figura 9: Gráficos de Lineweaver-Burk de inibição reversível incompetitiva.....	14
Figura 10: Estrutura tridimensional da acetilcolinesterase de <i>Electrophorus electricus</i>.	16
Figura 11: A) Ilustração do sítio esterásico contendo a tríade catalítica, externamente o sítio periférico aniônico (PAS) B) Interação do substrato (ACh) com o sítio esterásico da AChE.....	17
Figura 12: Visão do centro ativo da AChE de mamíferos.	18
Figura 13: Estrutura da acetilcolina.....	19
Figura 14: Transporte, síntese e degradação da acetilcolina nos nervos pré-sinápticos e sinápticos.	19
Figura 15: Princípio ativo do Bladan.....	22
Figura 16: Exemplos de metil-carbamatos.....	22
Figura 17: Inibidores comerciais da AChE.....	24
Figura 18: Estruturas do núcleo indólico e anel piridínico presentes nos alcalóides β-carbolínicos.....	26
Figura 19: Similaridade estrutural entre as β-carbolinas, a triptamina e a serotonina.	27
Figura 20: Grupos estruturais das β-carbolinas.....	28
Figura 21: Ilustração de um experimento de STD aplicados para uma amostra contendo um receptor na presença de pequenas moléculas ligantes e não ligantes.....	31
Figura 22: Proposta dos novos derivados a serem sintetizados.....	33
Figura 23: Inibição de AChE pelo composto 7.	59

Figura 24: Inibição de AChE pelo composto 2.	60
Figura 25: Inibição de AChE pelo composto 3.	61
Figura 26: Inibição de AChE pelo composto 4.	62
Figura 27: Inibição de AChE pelo composto 5.	63
Figura 28: Inibição de AChE pelo composto 8.	64
Figura 29: Inibição de AChE pelo composto 9.	65
Figura 30: Inibição de BChE pelo composto 2.....	66
Figura 31: Inibição de BChE pelo composto 3.....	67
Figura 32: Inibição de BChE pelo composto 4.....	68
Figura 33: Inibição de BChE pelo composto 5.....	69
Figura 34: Inibição de BChE pelo composto 7.....	70
Figura 35: Inibição de BChE pelo composto 8.....	71
Figura 36: Inibição de BChE pelo composto 9.....	72
Figura 37: Cinética de inibição de AChE pelo composto 7.....	76
Figura 38: Cinética de inibição de AChE pelo composto 2.....	76
Figura 39: Cinética de inibição de AChE pelo composto 4.....	77
Figura 40: Cinética de inibição de AChE pelo composto 5.....	77
Figura 41: Cinética de inibição de AChE pelo composto 8.....	78
Figura 42: Cinética de inibição de AChE pelo composto 9.....	78
Figura 43: Cinética de inibição de BChE pelo composto 2.....	79
Figura 44: Cinética de inibição de BChE pelo composto 4.....	79
Figura 45: Cinética de inibição de BChE pelo composto 5.....	80
Figura 46: Cinética de inibição de BChE pelo composto 7.....	80
Figura 47: Cinética de inibição de BChE pelo composto 8.....	81
Figura 48: Cinética de inibição de BChE pelo composto 9.....	81

ÍNDICE DE ESQUEMAS

Esquema 1: Modelo de Michaelis-Menten.	7
Esquema 2: Interação entre uma enzima e seu inibidor, e a equação representativa de k_i para formação do complexo enzima-inibidor.	10
Esquema 3: Mecanismo de uma inibição reversível competitiva.....	10
Esquema 4: Reações envolvidas em uma inibição reversível não competitiva.	12
Esquema 5: Reações envolvidas em uma inibição reversível incompetitiva.	13
Esquema 6: Mecanismo de hidrólise da ACh pela AChE.....	21
Esquema 7: Formação dos alcalóides β -carbonílicos a partir da condensação de Pictet-Spengler.	Error! Bookmark not defined.
Esquema 8: Equilíbrio de dissociação da harmana.....	30
Esquema 9: Reação para a obtenção da harmana.....	34
Esquema 10: Acoplamento de Suzuki para a produção do álcool p-fenil benzílico.	36
Esquema 11: Reações envolvidas na síntese dos haletos de benzila.....	36
Esquema 12: Reação geral para obtenções dos sais da harmana.	38
Esquema 13: Reação para a obtenção do 1-fenil-2,3,4,9-tetraidro-1H-pirido[3,4-b]indol (13).....	41
Esquema 14: Reação para a obtenção do 1-fenil-9H-pirido[3,4-b]indol (6).	42
Esquema 15: Rota geral para a obtenção dos sais.....	44
Esquema 16: Mecanismo de reação de redução de aldeídos para a obtenção dos álcoois benzílicos.....	49
Esquema 17: Mecanismo de reação para a reação de bromação dos álcoois benzílicos.	49
Esquema 18: Mecanismo proposto para a reação de bromação dos álcoois benzílicos.	50
Esquema 19: Mecanismo proposto para a reação de síntese da harmana.	50
Esquema 20: Mecanismo proposto para a reação de formação do 1-fenil-2,3,4,9-tetraidro-1H-pirido[3,4-b]indol (13).....	51
Esquema 21: Mecanismo de reação proposto para a obtenção do 1-fenil-9H-pirido[3,4-b]indol (6).	52
Esquema 22: Mecanismo de reação proposto para a síntese dos sais da harmana e dos fenil-pirido-indois.	54
Esquema 23 : Reações envolvidas no método de Ellman.	55

ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

ABS - Absorvância

ACh - Acetilcolina

AChE - Acetilcolinesterase

AChE-Is - Inibidores seletivos da acetilcolinesterase

ACTI - Iodeto de acetiltiocolina

BChE - Butirilcolinesterase

BChE-Is - Inibidores seletivos da butirilcolinesterase

BCTI - Iodeto de butiriltiocolina

BSA - Albumina sérica bovina

DA - Doença de Alzheimer

dB - Decibel

DMSO-d₆ - Dimetilsulfóxido deuterado

DTNB - Ácido 5,5'- ditiobis [2-nitrobenzóico]

E - Enzima

ES - Complexo enzima-substrato.

MAO - Enzima monoaminoxidase

P - Produto

[S] - Concentração de substrato

SNC - Sistema nervoso central

r.f - radiofrequência

RMN - Ressonância Magnética Nuclear

STD - *Satuation Transfer Difference*

SUMÁRIO

ÍNDICE DE TABELAS.....	ix
ÍNDICE DE FIGURAS	x
ÍNDICE DE ESQUEMAS.....	xii
ABREVIATURAS E SÍMBOLOS	xiii
1 - INTRODUÇÃO	1
2 - REVISÃO DE LITERATURA	2
2.1 - A Doença de Alzheimer.....	2
2.2 - Enzimas	5
2.2.1 - Aspectos gerais.....	5
2.2.2 - Processos de inibição enzimática	9
2.2.2.1 - Inibidores reversíveis	9
2.2.2.1.1 - Inibidores competitivos.....	10
2.2.2.1.2- Inibidores não competitivos.....	12
2.2.2.1.3 - Inibidores incompetitivos	13
2.2.2.2 - Inibidores irreversíveis	14
2.2.3 - Colinesterases	15
2.3 - Acetilcolina.....	18
2.4 - Inibidores reversíveis e irreversíveis de colinesterases.....	21
2.4.1 - Inibidores irreversíveis de colinesterases.....	21
2.4.1 - Inibidores reversíveis de colinesterases.....	23
2.5 - Alcalóides	25
2.5.1 - Aspectos Gerais	25
2.5.2 - Alcalóides β -carbolínicos	26
2.6 - Análise da interação ligante-receptor por STD-RMN (<i>Saturation transfer difference</i>)	30
2.6.1 - Tempo de saturação	31
2.6.2 - Equilíbrio cinético da ligação	32
3 - OBJETIVOS	33
4 - PARTE EXPERIMENTAL.....	34
4.1 - Materiais e métodos	34

4.1.1 - Equipamentos	34
4.1.2 - Solventes e reagentes utilizados	34
4.2 - Procedimentos.....	34
4.2.1 - Síntese da harmana (1)	34
4.2.2 - Síntese do álcool p-fenil benzílico (12).....	36
4.2.3 - Síntese dos haletos de benzila.....	36
4.2.4 - Síntese dos sais da harmana - procedimento geral.....	38
4.2.5 - Síntese do fenil-pirido-indol	41
4.2.5.1 - Síntese do 1-fenil-2,3,4,9-tetraidro-1H-pirido[3,4-b]indol (13).....	41
4.2.5.2 - Síntese do 1-fenil-9H-pirido[3,4-b]indol (6).....	42
4.2.6 - Síntese dos sais fenil-pirido-indois - procedimento geral	44
4.2.7 - Ensaios Químico-biológicos.....	47
4.2.7.1 - Avaliação da atividade anticolinesterásica	47
4.2.7.2 - Cinética enzimática	48
5 - RESULTADOS E DISCUSSÃO	49
5.1 - Síntese dos haletos de benzila.....	49
5.2 - Síntese da harmana	50
5.3 - Síntese do fenil-pirido-indol (6).....	51
5.4 - Síntese dos sais da harmana e sais fenil-pirido-indois	53
5.5 - Avaliação da atividade anticolinesterásica	55
5.6 - Cinética Enzimática	74
5.3 - Análise da interação via STD-RMN	82
6 - CONCLUSÕES	83
ANEXO I.....	84
7 - REFERÊNCIAS	108

1 - INTRODUÇÃO

A doença de Alzheimer (DA) é a forma mais comum de demência senil progressiva e irreversível, causada pela deterioração neuronal e manifesta-se inicialmente por alterações da memória recente. Com a progressão da doença outros sintomas aparecem, tais como confusão mental, mudanças de humor e irritabilidade. As funções cognitivas superiores como a linguagem, a orientação e a capacidade de julgamento e raciocínio são severamente afetadas. Por fim, as funções vitais são perdidas, levando o indivíduo à morte. (MÖLSÄ *et al.*, 1986; WALDEMAR *et al.*, 2007) .

A prevalência da doença é inferior a 1% em indivíduos com idade entre 60 e 64 anos, mas mostra um incremento percentual quase exponencial com o aumento da idade, de modo que em pessoas com 85 anos ou mais, a incidência está entre 24% a 33% dos pacientes. Em 2001, mais de 24 milhões de pessoas possuíam a doença, um número que deverá duplicar a cada 20 anos até 81 milhões em 2040 devido ao aumento previsto da expectativa de vida (FERRI *et al.*, 2005).

Apesar dos muitos esforços realizados para tentar esclarecer as causas da DA, pouco sabe-se sobre seu desenvolvimento (ORHAN *et al.*, 2007). Dentre os vários mecanismos patogênicos envolvidos no processo, a formação das placas senis ou neuríticas e a formação dos novelos neurofibrilares são os marcadores histopatológicos desta doença (**Figura 1**).

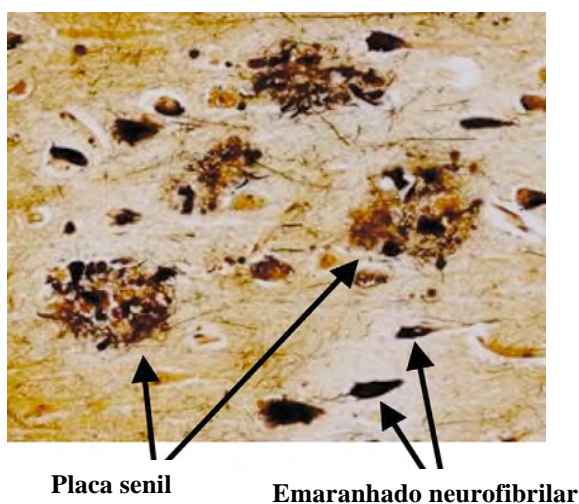


Figura 1: Placa senil e emaranhado neurofibrilar no córtex cerebral na Doença de Alzheimer. (ORHAN, 2007).

A perda de neurônios colinérgicos provoca distúrbios em regiões de extrema importância para a formação da memória e o processo de cognição, devido a diminuição da

acetilcolina (ACh) no cérebro. Por esta razão, uma das estratégias para o tratamento dessa doença é a utilização de medicamentos inibidores da acetilcolinesterase (AChE), tais como donepezil, galantamina e rivastigmina, que agem inibindo a acetilcolinesterase (AChE). Estudos indicam que a inibição da butirilcolinesterase (BChE) também aumenta os níveis de ACh no cérebro, melhorando o desempenho cognitivo em ratos, o que torna importante a busca por inibidores duais (DEMARIN, 2011).

Os alcalóides β -carbolínicos vêm sendo descritos devido às várias ações farmacológicas sobre o sistema nervoso central (SNC), atuando como neurotransmissores e neuromoduladores. São descritas interações com os receptores da dopamina e com os sistemas neurotransmissores da serotonina tais como, receptores benzodiazepínicos e ácido γ -aminobutírico (GABA) (CALLAWAY *et al.*, 1994). Tais compostos são ainda potentes inibidores das enzimas topoisomerase e monoaminoxidase (MAO) (BUCKHOLTZ, 1980; AIRAKSINEN & KARI, 1981; HUSBAND *et al.*, 2001).

Estudos recentes mostram também que estes compostos possuem afinidade pelas enzimas acetilcolinesterase e butirilcolinesterase (GEISSLER *et al.*, 2010; TORRES *et al.*, 2012). Com isso, esta pesquisa pretendeu fornecer novas substâncias com ação anticolinesterásica utilizando derivados β -carbolínicos do produto natural harmana, além de avaliar, através dos estudos cinéticos, o tipo de inibição das enzimas AChE e BChE, afim de desenvolver novos compostos que possam ser úteis no tratamento dos sintomas da DA.

2 - REVISÃO DE LITERATURA

2.1 - A Doença de Alzheimer

O aumento da expectativa de vida é um fenômeno mundial que mostra o relativo sucesso das políticas de saúde pública, porém, isso tem como efeito negativo o aparecimento de doenças degenerativas típicas de idades mais avançadas, como a Doença de Alzheimer (DA). As taxas de incidência de DA têm mostrado grande variabilidade. Dados de 2001 mostraram que a prevalência de paciente com DA variaram de 3,2 por cada 1.000 pessoas-ano na Índia a 25,2 por cada 1.000 em Indianópolis nos EUA (CHANDRA *et al.*, 2001; HENDRIE *et al.*, 2001). No Brasil, A prevalência de demência na população com mais dos 65 anos, observada em 2001, foi de 7,1%, sendo que a DA foi responsável por 55% dos casos (HERRERA *et al.*, 2002). Já em 2003, A taxa de incidência foi 7,7 por 1.000 pessoas-ano no estado de São Paulo (NITRINI *et al.*, 2004) e 14,8 por 1.000 pessoas-ano no Rio Grande do Sul em 2008 (CHAVES *et al.*, 2009). A população de idosos (idade > 60 anos) neste mesmo

ano era de cerca de 18,7 milhões de pessoas, 1,3 milhões destes sofriam alguma forma de demência sendo quase 800 mil casos confirmados da DA (CRI, 2008).

O mal de Alzheimer é considerado um grande problema de saúde, devido ao enorme impacto causado ao indivíduo, à família, ao sistema de saúde e à sociedade como um todo, uma vez que, quase a metade dos pacientes é internada em instituições de saúde e o restante, recebe tratamento em casa, envolvendo em seus cuidados, familiares e amigos (FRANCIS *et al.*, 1999; ZIMMERMAN & SOREQ, 2006). Gastos com tratamentos médicos (medicamentos, casas de saúde, enfermagem doméstica), gastos indiretos dada a menor produtividade do paciente e das pessoas envolvidas em seu cuidado, bem como a necessidade de longos tratamentos e os efeitos colaterais associados aos medicamentos utilizados na terapêutica atual, justificam a busca por novos compostos úteis, mais eficazes e mais acessíveis para o tratamento da DA .

A doença foi descrita pela primeira vez em 1907 pelo médico alemão Alois Alzheimer que diagnosticou um quadro de doença progressiva em uma mulher de 51 anos que já sofria com os sintomas há quatro anos e meio. Em 1910, Kraepelin denominou o quadro clínico como Doença de Alzheimer (DA) (FREITAS, 2002).

Geralmente, a DA dura cerca de 8 a 10 anos desde os primeiros sintomas até a morte. As regiões do cérebro como hipocampo e córtex cerebral, que estão associadas às funções mentais como reconhecimento de estímulos sensoriais, memória e pensamento abstrato, são as mais afetadas pelas alterações bioquímicas causadas pela DA (DEMARIN, 2011; VIEGAS, 2004).

Morfologicamente, a DA caracteriza-se pelo acúmulo de um peptídeo chamado β -amilóide A-42 ($A\beta$), que é um fragmento de uma proteína β -amilóide maior (β -APP), existente normalmente no cérebro humano. Os níveis elevados desse peptídeo resultam em agregação, formando placas e levando a perda de neurônios (HARDY & ALLSOP, 1991; HAASS, 1992; MUDHER & LOVESTONE, 2002). Em 2009, esta teoria foi atualizada, sugerindo que a própria proteína β -amilóide, e não o peptídeo $A\beta$ é o responsável principal pela DA (NIKOLAEV *et al.*, 2009). Já os emaranhados neurofibrilares, são pequenos novos proteínas que acumulam-se no citoplasma do neurônio. Esses novos são formados pela proteína tau, que é componente dos microtúbulos neuronais. A Tau tem como função regular os microtúbulos através do seu nível de fosforilação. A hiperfosforilação da tau diminui sua afinidade pela tubulina, uma proteína componente dos microtúbulos. Com isto, há a desagregação do microtúbulo e agregação das proteínas Tau no citoplasma do neurônio, dando origem aos novos neurofibrilares (**Figura 2**).

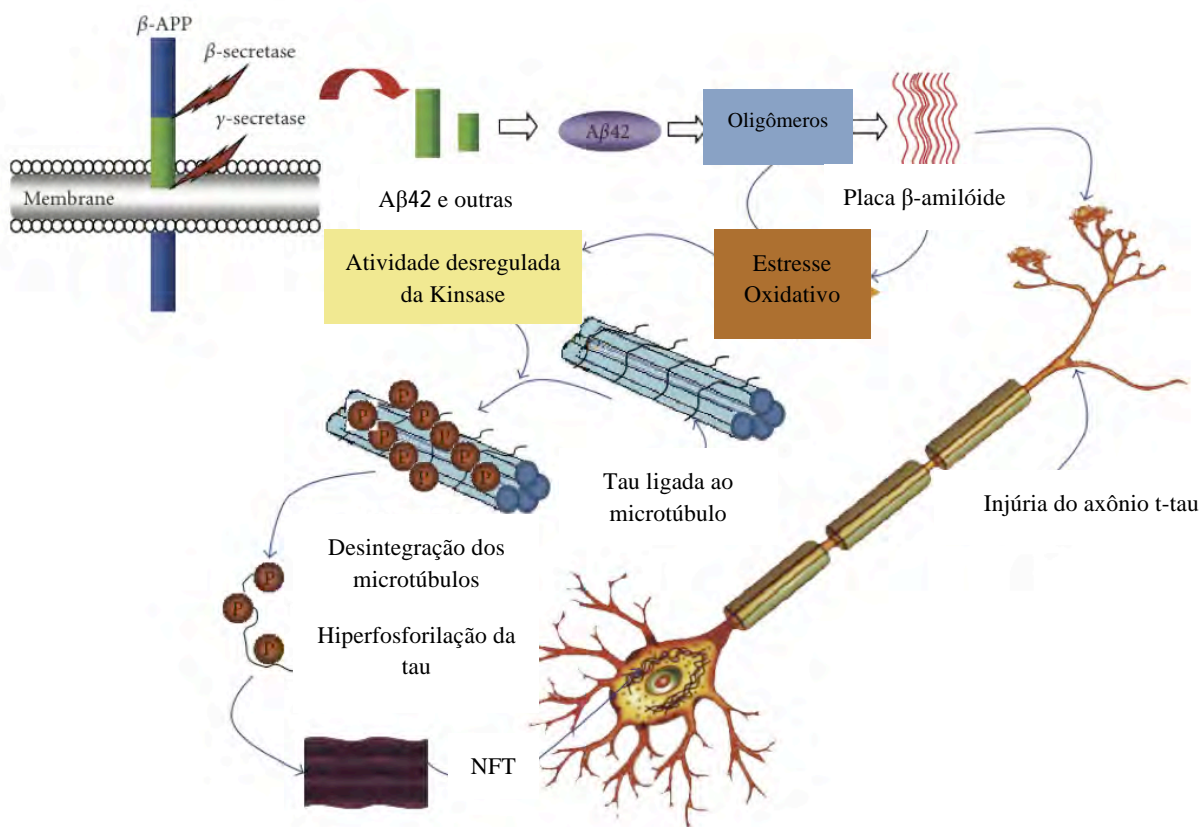


Figura 2: Cascata envolvida na patologia e potenciais biomarcadores da DA. (Adaptado de Anoopi, 2010.)

Embora ainda não exista cura, algumas substâncias são úteis para o retardo da deterioração cognitiva da DA (KATALINIC *et al.*, 2010). Uma das abordagens mais úteis no projeto de descoberta do fármaco para o tratamento da DA é baseado no desenvolvimento de inibidores da enzima acetilcolinesterase (AChE). Sabe-se que a perda de neurônios colinérgicos provoca distúrbios em regiões de extrema importância para a formação da memória e o processo de cognição, devido a diminuição da acetilcolina (ACh) no cérebro. Os avanços obtidos na compreensão da evolução e das razões moleculares da gênese da DA têm demonstrado que o uso de inibidores da AChE pode ser uma das formas mais eficientes de controle da evolução da doença (VIEGAS, 2004; KATALINIC *et al.*, 2010).

2.2 - Enzimas

2.2.1 - Aspectos gerais

Enzimas são catalisadores biológicos específicos, que em geral são constituídas por aminoácidos (com exceção das ribozimas). Atuam por diminuir a energia de ativação (ΔG^\ddagger) necessária para que uma reação aconteça. A figura abaixo, ilustra o diagrama de energia de uma reação catalisada e de outra não catalisada por enzimas. Sendo a velocidade de uma reação inversamente proporcional ao valor de sua energia livre de ativação, conseqüentemente, as enzimas aumentam a velocidade de uma reação. Isso pode ocorrer na ordem de 10^6 a 10^{12} vezes mais do que em uma reação não catalisada (BERG *et al.*, 2002).

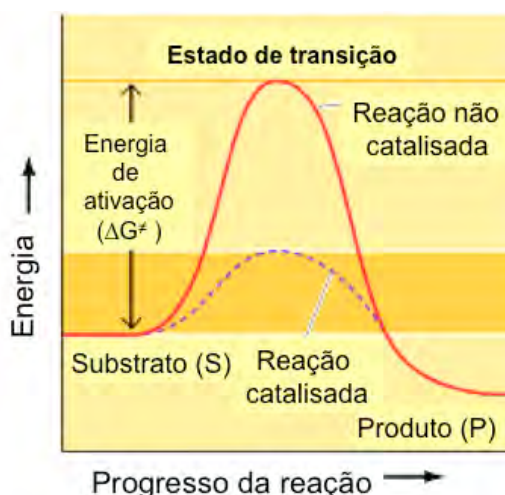


Figura 3: Diagrama energético de uma reação catalisada e de uma reação não catalisada. ΔG^\ddagger = energia livre de ativação e ΔG^0 = variação de energia livre. (www.biorom.uma.es)

As enzimas são fundamentais para qualquer processo bioquímico. Agem em seqüências organizadas, catalisando centenas de reações sucessivas onde seus substratos são modificados, o que possibilita a síntese de macromoléculas complexas a partir de moléculas precursoras simples. De maneira geral, as enzimas possuem três propriedades distintas que permitem que elas exerçam um papel central na promoção e regulação dos processos bioquímicos (BERG *et al.*, 2002; NELSON & COX, 2002). São essas propriedades:

1 - Condições reacionais favoráveis. A atividade de cada enzima é dependente do pH, da temperatura, da presença de co-fatores ou coenzimas (quando requeridas) e das concentrações de substratos e produtos;

2 - Elevada especificidade da reação;

3 - Capacidade de regulação da concentração e da atividade, que permite o ajuste do metabolismo de forma a produzir uma atuação harmoniosa das muitas diferentes atividades necessárias para a manutenção da vida.

O estudo das enzimas tem uma grande importância prática. Em algumas doenças, especialmente nas desordens genéticas, podem ocorrer deficiências ou mesmo a ausência total de uma ou mais enzimas. Outras condições anormais também podem ser causadas pela excessiva atividade de uma enzima. Muitos fármacos exercem seu efeito biológico por meio de interações com as enzimas. Contudo, a importância das enzimas não se dá apenas na área médica, mas também na indústria química, no processamento de alimentos e na agricultura (NELSON & COX, 2002).

A catálise enzimática é essencial para os sistemas vivos. Sob condições biológicas relevantes, as reações não catalisadas tendem a ser lentas. Além disso, muitas reações bioquímicas comuns envolvem eventos químicos que são desfavoráveis no ambiente celular, tais como: a formação de intermediários carregados ou a colisão de duas ou mais moléculas com a orientação precisa necessária para que ocorra a reação. Por estes motivos, sem o processo de catálise, as reações necessárias para a manutenção da vida, como por exemplo, a digestão dos alimentos, os envios de sinais através dos nervos e a uma simples contração muscular, não ocorreriam com velocidade útil (NELSON & COX, 2002).

A atividade catalítica depende da integridade física e química da enzima, ou seja, da integridade das estruturas protéicas primária, secundária, terciária e quaternária. Se uma enzima é desnaturada ou dissociada em subunidades, a atividade catalítica geralmente é destruída. Se uma enzima é degradada em seus aminoácidos constituintes, a sua atividade catalítica é sempre destruída. (NELSON & COX, 2002).

As reações catalisadas pelas enzimas (E) são caracterizadas pela formação de um complexo (ES) entre o substrato (S) e a enzima em uma região específica chamada de sítio ativo, representado na **Figura 4**. Esta interação entre E e S ocorre por interações intermoleculares (ligações hidrogênio, interações iônicas, hidrofóbicas, entre outras) e promove a formação do estado de transição de menor energia, o que conseqüentemente aumenta a velocidade da reação. (BERG *et al.*, 2002).



Figura 4: Formação do complexo enzima-substrato. (www.portalsaofrancisco.com.br)

Algumas enzimas possuem um sítio peculiar (sítio alostérico) que permite que moléculas pequenas se liguem e provoquem mudanças conformacionais no sítio ativo. Tal mudança pode tornar o sítio ativo mais ou menos ativo e influenciar a cinética enzimática (DEVLIN, 2007).

Mecanismos de reações detalhados têm sido propostos para muitas enzimas e os estudos de cinética enzimática são de extrema importância para a elucidação dos mesmos. A maioria das enzimas tem algumas propriedades cinéticas comuns, e estas seguem o modelo de Michaelis-Menten (MICHAELIS & MENTEN, 1913) onde a enzima (E) se combina com o substrato (S), formando o complexo enzima-substrato (ES), o que pode prosseguir para formar o produto (P) ou dissociar em enzima (E) e substrato (S), como ilustra o **Esquema 1**. Muitas enzimas, contudo, não correspondem a este modelo cinético, pois apresentam múltiplos sítios regulatórios como, por exemplo, as enzimas alostéricas.



Esquema 1: Modelo de Michaelis-Menten. (www.portalsaofrancisco.com.br)

A velocidade V_0 de formação do produto é dada pela equação de Michaelis - Menten (EQ.1), onde $V_{m\acute{a}x}$ é a velocidade em condições de saturação, isto é, todas as moléculas de enzimas estão na forma de complexo ES. A medida que concentração do substrato é aumentada, a velocidade catalítica da enzima aumenta de forma hiperbólica, aproximando-se de uma velocidade máxima. K_M é a constante de Michaelis-Menten, numericamente igual à concentração de substrato que corresponde à metade da $V_{m\acute{a}x}$ de uma determinada enzima (BERG *et al.*, 2002).

$$V_0 = V_{\text{máx}} \frac{[S]}{[S] + K_m} \quad (\text{EQ.1})$$

A equação (EQ.1) é caracterizada pelo gráfico de Michaelis - Menten (**Figura 5**), composto por V_0 contra $[S]$, onde é possível obter os valores de K_M e $V_{\text{máx}}$. (BERG *et al.*, 2002).

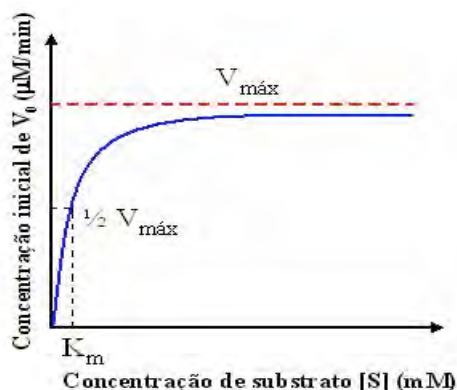


Figura 5: Gráfico de Michaelis-Menten. (www.portalsaofrancisco.com.br)

Valores pequenos de K_M refletem a afinidade elevada da enzima pelo substrato e, portanto, atingirá a máxima eficiência catalítica em baixas concentrações de substrato. Pela construção do gráfico de Michaelis-Menten é possível calcular valores aproximados de K_M e V_{MAX} . Com o objetivo de obter valores precisos, Lineweaver e Burk inverteram a equação de Michaelis-Menten (LINEWEAVER & BURK, 1934), dando origem à equação de Lineweaver e Burk (EQ.2) (BERG *et al.*, 2002).

$$\frac{1}{v_0} = \frac{K_m}{V_{\text{max}}} \times \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{\text{max}}} \quad (\text{EQ.2})$$

Através desta equação, pode-se obter um gráfico de $1/V_0$ contra $1/[S]$, chamado de traçado de Lineaweaver e Burk ou duplo recíproco (**Figura 6**), que fornece uma linha reta interceptando o eixo y, caracterizado por valores de $1/V_{\text{máx}}$, e uma inclinação de $k_M/V_{\text{máx}}$. O intercepto no eixo x é $-1/k_M$.

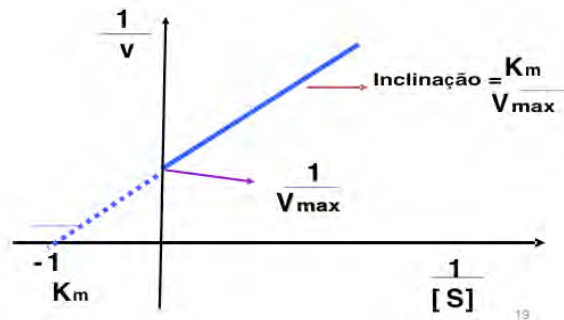


Figura 6: Gráfico de Lineweaver e Burk.
(Fonte: www.themedicalbiochemistrypage.org)

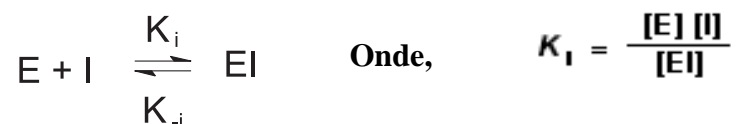
2.2.2 - Processos de inibição enzimática

Os inibidores enzimáticos são substâncias que interferem na catálise, diminuindo ou parando as reações enzimáticas. Como as enzimas catalisam praticamente todos os processos celulares, os inibidores enzimáticos são empregados como reguladores das vias metabólicas, tendo assim diversas aplicabilidades. Pode-se citar como exemplo de inibidores comerciais diversos fármacos, conservantes de alimentos e venenos. O estudo dos inibidores enzimáticos pode fornecer informações valiosas sobre os mecanismos enzimáticos e também pode ajudar a definir diversos caminhos metabólicos. (NELSON & COX, 2002).

Os processos de inibição enzimática estão divididos em dois tipos, inibição reversível e inibição irreversível. A diferença básica entre estes tipos está na formação do complexo enzima-substrato, isto é, na estabilidade gerada pela ligação do substrato com a enzima (CAMPOS, 1999; BISSWANGER, 2008).

2.2.2.1 - Inibidores reversíveis

Os inibidores reversíveis interagem de forma não-covalente com a enzima, formando um complexo em um sistema em equilíbrio (EI). A enzima, com isso, apresenta um grau definido de inibição, que é dependente das concentrações da enzima e dos reagentes no meio (inibidor e substrato) (CAMPOS, 1999). A afinidade de um inibidor por uma enzima pode ser representada pela constante de inibição (K_i) (**Esquema 2**)

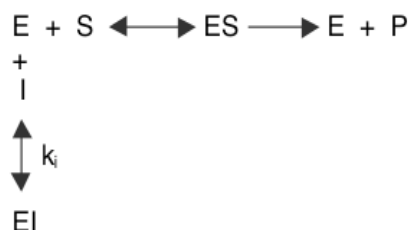


Esquema 2: Interação entre uma enzima e seu inibidor, e a equação representativa de k_i para formação do complexo enzima-inibidor. (Adaptado de MARQUES, 2008)

Entre os inibidores reversíveis distinguem-se três tipos de inibição, a inibição reversível competitiva, não-competitiva e incompetitiva e a estimativa de K_i varia de acordo com o tipo de inibição. Em todos os casos, quanto menor for o valor de K_i , mais fortemente o inibidor se liga à enzima. Sendo assim, Os valores de K_i tornam-se úteis para avaliar o potencial inibitório de diferentes compostos (PRATT & CORNELLY, 2006).

2.2.2.1.1 - Inibidores competitivos

Os inibidores competitivos competem com o substrato pelo centro ativo da enzima, por serem estruturalmente semelhantes ao substrato (**Esquema 3**). Os inibidores competitivos produzem um complexo enzima-inibidor semelhante ao complexo enzima-substrato, porém cataliticamente inativo. Como o processo é reversível, a simples adição de substrato pode deslocar o equilíbrio de modo a favorecer a formação do complexo enzima-substrato (ES) e diminuir a probabilidade de um inibidor se ligar a enzima (CAMPOS, 1999; NELSON & COX, 2002).



Esquema 3: Mecanismo de uma inibição reversível competitiva. (MARQUES, 2008).

A velocidade inicial da reação é proporcional à concentração do complexo enzima-substrato (ES) no modelo estacionário. Desse modo, em uma concentração fixa de inibidor que esteja abaixo da saturação da enzima, pode-se esperar que na presença de uma concentração de substrato muito alta (saturante), todas as enzimas podem ser levadas a formar

o complexo ES. Com isso, a velocidade inicial máxima, na presença de um inibidor competitivo, é igual a $V_{\text{máx}}$ velocidade inicial máxima em ausência de inibidor (ou seja, a $V_{\text{máx}}$ não se altera). Já a K_M aparente aumentará na presença de um inibidor competitivo pois, qualquer que seja a concentração deste, existirá uma fração de enzima sob forma de EI, a qual não possui afinidade pelo S.

A **Figura 7** fornece os gráficos de Michaelis-Menten (esquerda) e o gráfico de Lineweaver-Burk (direita) para uma inibição competitiva. No gráfico de Lineweaver-Burk as retas interceptam o eixo y no mesmo ponto, ou seja, o valor de $V_{\text{máx}}$ permanece o mesmo e o valor de K_M aumenta (LINEWEAVER & BURK, 1934).

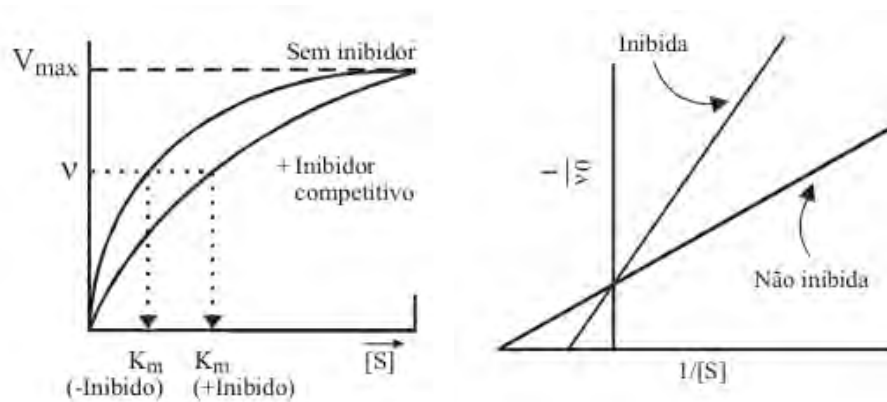


Figura 7: Gráfico de Michaelis-Menten e de Lineweaver e Burk para uma inibição reversível competitiva. (MOTA, 2011).

O valor de K_I , no caso de uma inibição reversível competitiva, é dado pela equação (EQ.5) (CHENG & PRUSSOFF, 1973).

$$K_I = \frac{CI_{50}}{(S/K_M + 1)} \quad (\text{EQ.3})$$

Onde:

K_I = Constante de inibição;

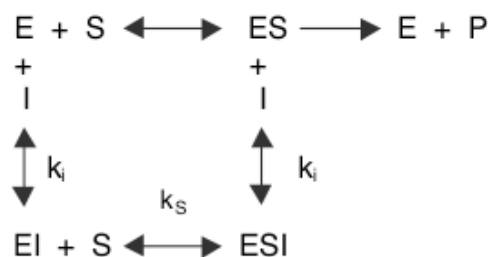
CI_{50} = Concentração do composto que inibe 50% da atividade enzimática;

K_M = Constante de Michaelis-Menten;

S = Concentração do substrato.

2.2.2.1.2 - Inibidores não competitivos

Os inibidores não competitivos ligam-se reversivelmente à enzima e/ou ao complexo ES em um sítio próprio de ligação, diferente do sítio ativo, formando o complexo ESI. Este tipo de inibição, depende somente da concentração do inibidor (CAMPOS, 1999; NELSON & COX, 2002; BERG *et al.*, 2002). O processo de inibição não competitiva é descrito no **Esquema 4**.



Esquema 4: Reações envolvidas em uma inibição reversível não competitiva. (MARQUES, 2008)

Através do esquema anterior, é possível observar que na presença deste tipo de inibidor, uma parte da enzima permanece ora sob a forma de complexo não produtivo (ESI), ora sob a forma enzima-inibidor (EI). Sendo assim, a $V_{m\acute{a}x}$ na presença de um inibidor não competitivo será menor que a $V_{m\acute{a}x}$ observada na ausência de inibidor. Por outro lado, o valor de K_M permanece o mesmo pois, na presença do inibidor, as formas da enzima que podem se combinar com o substrato (E e EI) apresentam a mesma afinidade para com este.

A **Figura 8** representa uma inibição não competitiva segundo os gráficos de Michaelis-Menten (esquerda) e Lineweaver-Burk (direita). Neste último, as retas se encontram no mesmo ponto do eixo x, ou seja, o valor de K_M não varia, e a $V_{m\acute{a}x}$ diminui (LINEWEAVER & BURK, 1934).

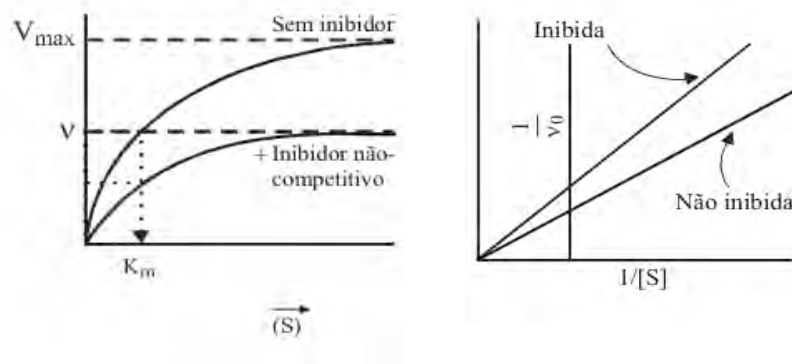


Figura 8: Gráficos de Michaelis-Menten e Lineweaver-Burk para uma inibição reversível não competitiva. (MOTA, 2011).

O valor de K_I no caso de uma inibição reversível não competitiva é igual ao valor do CI_{50} . (CHENG & PRUSSOFF, 1973)

$$K_I = CI_{50}$$

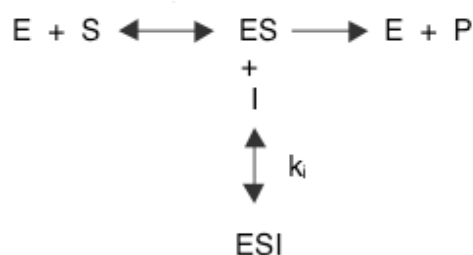
Onde:

K_I = Constante de inibição;

CI_{50} = Concentração do composto que inibe 50% da atividade enzimática.

2.2.2.1.3 - Inibidores incompetivos

Um inibidor incompetivo se liga somente ao complexo enzima-substrato, conforme mostra o **Esquema 5**.



Esquema 5: Reações envolvidas em uma inibição reversível incompetiva. (MARQUES, 2008).

A **Figura 9** mostra os gráficos de Michaelis-Menten (esquerda) e Lineweaver-Burk (direita) para uma inibição incompetitiva. No gráfico de Lineweaver-Burk as retas na ausência e na presença de inibidor são paralelas, ou seja, o valor de K_M e $V_{m\acute{a}x}$ na presença de inibidor diminuem.

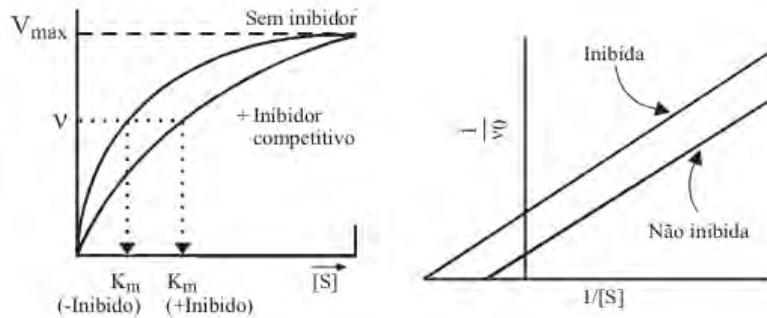


Figura 9: Gráficos de Lineweaver-Burk de inibição reversível incompetitiva. (MOTA, 2011)

A equação (EQ.5) que descreve o valor de K_I no caso de uma inibição reversível incompetitiva é descrita abaixo (CHENG & PRUSSOFF, 1973):

$$K_I = \frac{CI_{50}}{(K_M/S + 1)} \quad (\text{EQ.4})$$

Onde:

K_I = Constante de inibição;

CI_{50} = Concentração do composto que inibe 50% da atividade enzimática;

K_M = Constante de Michaelis e Menten;

S = Concentração do substrato.

2.2.2.2 - Inibidores irreversíveis

Os inibidores irreversíveis se ligam às enzimas levando a inativação definitiva da mesma, geralmente por formação de ligações covalentes, podendo provocar a destruição de grupos funcionais essenciais para a ação da enzima. A inibição irreversível é progressiva, aumentando com o tempo até atingir seu máximo. Por inativarem as enzimas, esses inibidores

são muito tóxicos para os organismos. Uma vez inativada, para que o nível de catálise volte ao estágio inicial, é necessário a síntese de novas enzimas (CAMPOS, 1999; NELSON & COX, 2002).

2.2.3 - Colinesterases

As colinesterases fazem parte de um grupo numeroso de enzimas classificadas como esterases que, de forma geral, atuam sobre ligações éster produzindo um ácido carboxílico e um álcool (FRAGA, 2010). Desempenham papéis importantes na neurotransmissão colinérgica central e periférica (NACHMANSOHN & ROTHENBERG, 1945), sendo classificadas de acordo com suas propriedades catalíticas e especificidades a substratos, sensibilidade a inibidores e distribuição tecidual (MASSOULIÉ, 1993).

Considera-se que as colinesterases, constituam uma família de enzimas subdivididas em dois tipos principais (PATOCKA *et al.*, 2004; CHATONNET & LOCKRIDGE, 1989):

1 - A acetilcolinesterase (AChE), que exibe uma especificidade para a acetilcolina e interrompe a transmissão dos impulsos nervosos pela rápida hidrólise desse neurotransmissor na membrana pós-sináptica da junção neuromuscular;

2 - A butirilcolinesterase (BChE), que não é tão específica. Catalisa a hidrólise da acetilcolina, mas possui maior afinidade por substratos mais hidrofóbicos como a butirilcolina, por exemplo.

A primeira determinação da estrutura primária da AChE foi de uma espécie de peixe elétrico, *Eletrophorus electricus*, que possui abundante quantidade da enzima em seu órgão elétrico (SCHUMACHER, 1986; SUSSMAN, 1991) (**Figura 10**). Posteriormente, as sequências da AChE de várias outras espécies foram obtidas, inclusive da humana (SOREQ, 1990).

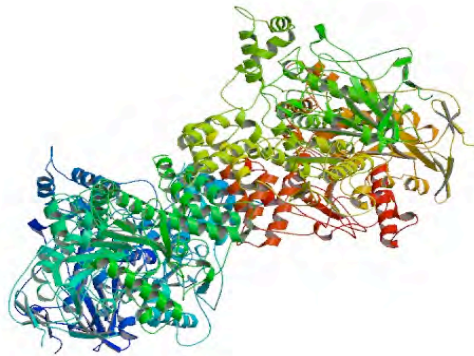


Figura 10: Estrutura tridimensional da acetilcolinesterase de *Electrophorus electricus*.
(<http://www.rcsb.org/pdb/home/home.do>).

A AChE e a BChE têm aproximadamente o mesmo número de aminoácidos por subunidade catalítica, 575 e 574 respectivamente, e suas diferenças no peso molecular são devidas a diferenças na glicosilação. A AChE possui 4 e a BChE 9 cadeias de carboidratos por subunidade. As ligações de dissulfeto de ambas as enzimas, estão localizadas exatamente na mesma posição, sugerindo dobramento proteico similar. As sequências de aminoácidos dos sítios ativos da AChE e BChE estão conservadas em muitas espécies estudadas e os resíduos de serina, histidina e glutamato são considerados importantes para a atividade catalítica de ambas. (MIKAMI, 2005).

O sítio ativo da AChE situa-se na parte inferior de um estreitamento chamado de superfície gorge a cerca de 20 Å de profundidade, alinhado com resíduos hidrofóbicos, os quais parecem ser importantes na orientação do substrato ao sítio ativo (JONHSON & MOORE, 1999). Este sítio ativo é formado por um sítio esterásico que contém uma tríade catalítica formada pela serina, histidina e glutamato ou aspartato e um sítio aniônico ou carregado negativamente a qual a cadeia de nitrogênio quaternário da ACh carregada positivamente se liga (SILMAN *et al.*, 1994) (**Figura 11 A**). Na borda ou superfície do gorge, cerca de 14 Å do sítio ativo, situa-se um segundo sítio aniônico conhecido como sítio aniônico periférico (peripheral anionic site - PAS) (BOURNE *et al.*, 2005). Apesar da hidrólise do substrato ocorrer na tríade catalítica em ambas as colinesterases, algumas diferenças no curso catalítico como, por exemplo, o maior volume do centro ativo, pode ser importante na determinação da preferência pelo substrato e na afinidade pelo inibidor (EKHOLM, 2001).

Existem duas importantes áreas a serem consideradas: a região de ligação e acomodação do substrato onde a ACh se liga à AChE por ligação iônica a um resíduo de aspartato ou glutamato e a ligação do hidrogênio ao resíduo de tirosina. A outra região é responsável pelo mecanismo de hidrólise do substrato ACh, composta pelos aminoácidos serina e histidina (**Figura 11 B**).

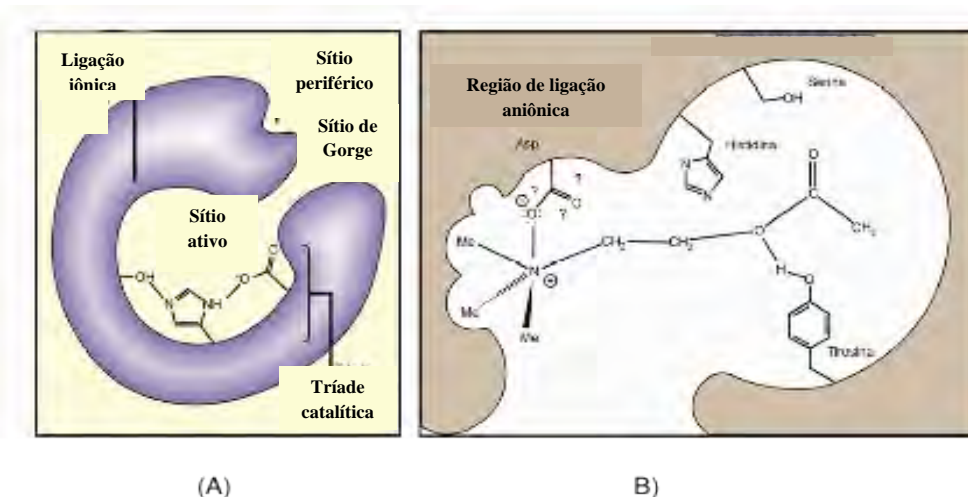


Figura 11: A) Ilustração do sítio esterásico contendo a tríade catalítica, externamente o sítio periférico aniônico (PAS) (Adaptado de Soreq & Seidman (2001). B) Interação do substrato (ACh) com o sítio esterásico da AChE.(Adaptado de Patrick, 2001).

Levando-se em consideração a grande homologia entre a AChE e a BChE, MILLARD & BROOMFIELD (1992), propuseram por análise computacional um modelo para a BChE humana com base na estrutura da AChE. Nesse modelo, observou-se, conforme o esperado, uma grande similaridade entre as enzimas. Uma diferença encontrada entre elas foi a presença de apenas um resíduo aromático na BChE, na entrada da superfície de gorge (a AChE possui 3). Pela ausência de resíduos aromáticos, o sítio ativo da BChE é mais espaçoso do que o da AChE.

A **Figura 12** demonstra a estrutura tridimensional do sítio ativo da AChE o qual é formado por resíduos da chamada tríade catalítica: serina, histidina e glutamato).

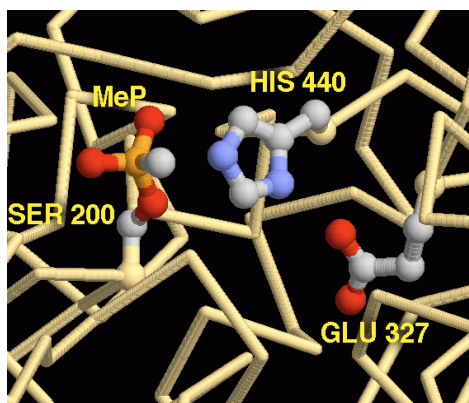


Figura 12: Visão do centro ativo da AChE de mamíferos.
(<http://www.rcsb.org/pdb/home/home.do>).

Evidências sugerem que a BChE atue como um corregulador da atividade da ACh no SNC, uma vez que, a inibição dessa enzima aumenta de maneira dose dependente os níveis desse neurotransmissor no cérebro (GIACOBINE, 2000). Na ausência da AChE, a BChE parece substituí-la na manutenção da integridade estrutural e fisiológica do sistema colinérgico (MESULAM *et al.*, 2002).

2.3 - Acetilcolina

A ACh (**Figura 13**) é considerada uma importante molécula sinalizadora encontrada em bactérias, protozoários, algas e plantas e acredita-se que sua existência venha desde o início da história evolucionária das espécies, antes do surgimento do sistema nervoso em animais (KAWASHIMA & FUJI, 2003; GOTTI & CLEMENT, 2004). A neurotransmissão química foi investigada por Otto Loewi em 1921 que identificou a ACh como uma substância cardioativa liberada pelo nervo vago e nomeou-a inicialmente como “vagusstoff” (vagoessência) (VAN DER ZEE & LUITEN, 1999). Desde então, a ACh foi o primeiro composto a ser identificado como um neurotransmissor e passou a ser amplamente estudado nas sinapses do SNC e sistema nervoso periférico (DESCARRIES *et al.*, 1997).

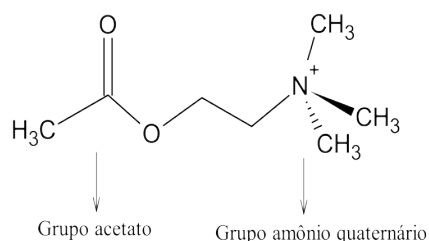


Figura 13: Estrutura da acetilcolina.

É amplamente distribuída no cérebro e possui efeitos principalmente excitatórios que são efetivados pelos chamados receptores colinérgicos nicotínicos e muscarínicos (CANEPA, *et al.*, 1966). Os receptores muscarínicos no cérebro atuam a nível pré-sináptico. Muitos efeitos comportamentais associados às vias colinérgicas parecem ser produzidos pela ação da ACh sobre estes receptores. Os receptores nicotínicos também estão disseminados no cérebro, porém em menor quantidade que os receptores muscarínicos. Esses receptores exibem, em sua maioria, localização pré-sináptica e atuam ao facilitar a liberação de outros transmissores como glutamato e dopamina, embora atuem pós-sinápticamente em algumas situações (RANG *et al.*, 2004).

A síntese da ACh é iniciada na célula transmissora ou pré-sináptica e, posteriormente, ocorre o armazenamento em vesículas sinápticas (**Figura 14**). Quando um potencial de ação é disparado, ocorre a despolarização da membrana plasmática celular com conseqüente influxo de Ca^{2+} . Tal influxo deflagra a fusão das vesículas sinápticas com a membrana plasmática assim, a acetilcolina é liberada na fenda sináptica e se difunde até o receptor na célula pós-sináptica.

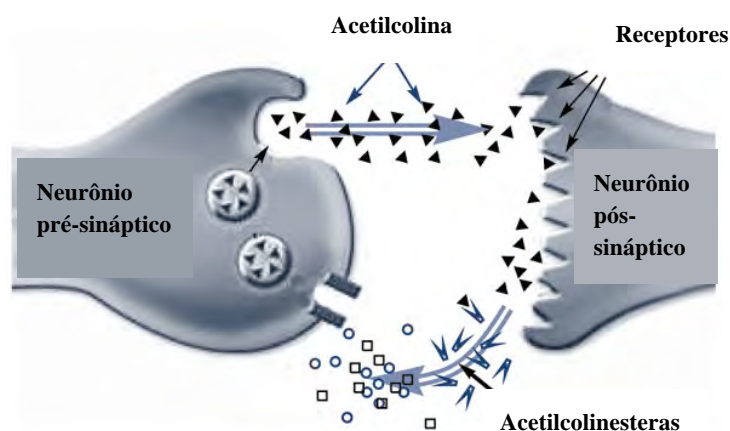


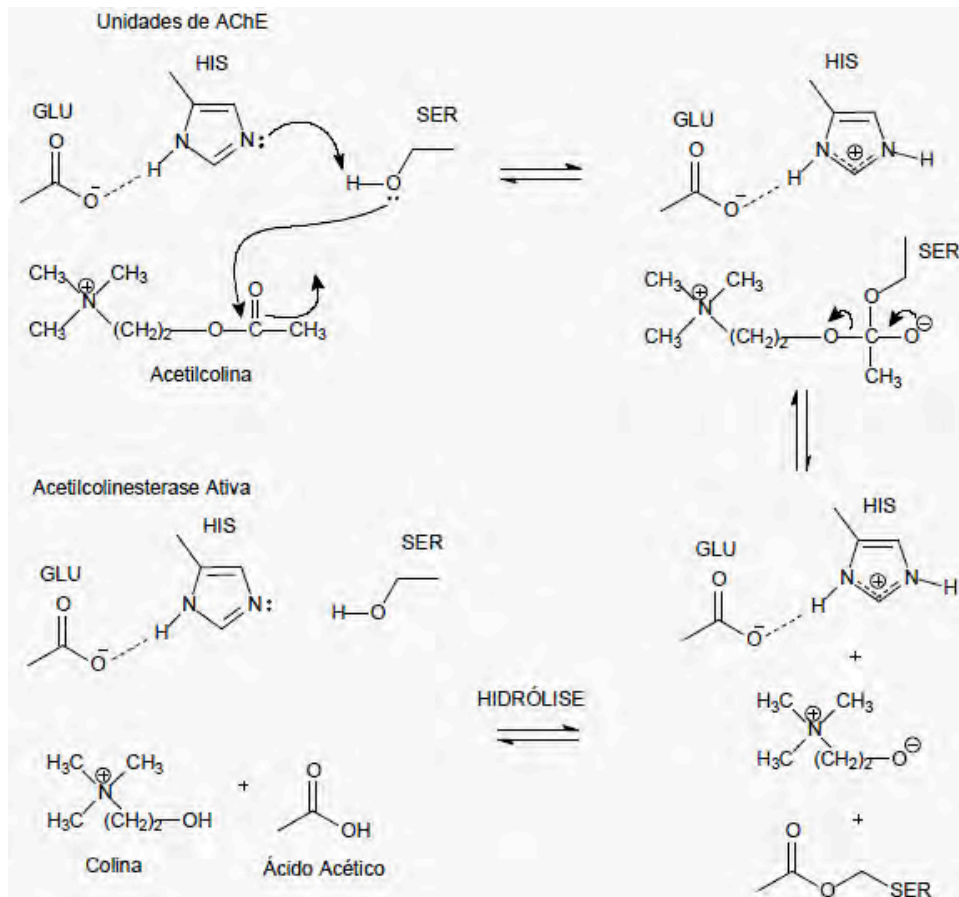
Figura 14: Transporte, síntese e degradação da acetilcolina nos nervos pré-sinápticos e sinápticos. (Adaptado de www.vrp.com).

Ao interagir com a ACh na célula pós-sináptica, o receptor sofre uma mudança conformacional, o que culmina no influxo de Na^+ . Tal evento leva à despolarização da membrana plasmática nesta célula, dando início a um novo potencial de ação.

Para exercer seus efeitos, a ACh deve manter-se na fenda sináptica em certas concentrações e por um determinado tempo. Após, esta deve ser removida antes que a sinapse seja capaz de responder a outro sinal, o que requer a ação da AChE e ou BChE, que catalisam a hidrólise da ACh, como mostra o **Esquema 6**.

A hidrólise é iniciada pela ligação da ACh no sítio ativo da AChE. Neste processo, as cadeias laterais de aminoácidos são extremamente importantes na formação do complexo enzima-substrato e, mais diretamente, no processo catalítico. No sítio ativo, o fragmento histidina está próximo do fragmento serina e pode estabilizar a conformação do sítio ativo através de ligações de hidrogênio. Toda atividade enzimática é dependente do pH e, de fato, no caso da AChE, esta atividade possui um valor máximo em um pH consistente com o valor do ponto isoelétrico ($\text{P.I} = 7,5$) de um fragmento histidina. Além dos fragmentos de aminoácidos envolvidos na formação do complexo enzima-substrato, há aqueles que estão envolvidos mais diretamente na catálise, como o fragmento serina que está localizado no sítio ativo. O seu grupo hidroxila nucleofílico reage com o carbono do grupo acila da acetilcolina. Com isso, a serina é acetilada e a colina torna-se o grupo de saída.

Por fim, ocorre a hidrólise do fragmento serina acetilado, com formação de acetato e conseqüente regeneração da enzima. Uma vez que a colina e o acetado tenham deixado o sítio ativo, a enzima é capaz de ligar-se com mais substratos e repetir a reação catalítica. Na fenda sináptica, a colina é absorvida pelas células pré-sinápticas e usada na síntese de mais ACh. O acetato é transportado para outros tecidos e metabolizado.



Esquema 6: Mecanismo de hidrólise da ACh pela AChE. (Adaptado de SANTOS, 2007).

2.4 - Inibidores reversíveis e irreversíveis de colinesterases

Três domínios distintos na AChE constituem locais de ligação para os inibidores: O bolsão acil do centro ativo, o subsítio colina do centro ativo e o sítio aniônico periférico. (TAYLOR & RADIC, 1996).

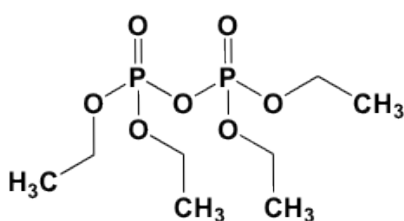
Alguns inibidores da AChE são utilizados terapêuticamente, enquanto outros tem mostrado uso como inseticidas. Esta diferença na atividade depende do tipo de inibição e ligação que os inibidores efetua.

2.4.1 - Inibidores irreversíveis de colinesterases

Os organofosforados inibem a AChE humana irreversivelmente por fosforilação do grupo hidroxila da serina que ativa a ACh nas sinapses colinérgicas dos sistemas nervosos

central e periférico (PANGY *et al.*, 2003; ELHANANY *et al.*, 2001). Seu principal uso está na agricultura para controlar pragas como insetos e outras espécies que danificam o cultivo. Porém, ao serem aplicados podem contaminar outras matrizes ambientais como rios e mares, quando são carregados no processo de lixiviação. Isto, faz com que estes agentes sejam tóxicos não só para as espécies-alvo mas também para muitas espécies não-alvo (SILVA FILHO, 2004).

O primeiro organofosforado utilizado como pesticida comercial foi o Bladan que tinha como princípio ativo o tetraetilpirofosfato (TEEP) (**Figura 15**).



Tetraetilpirofosfato

Figura 15: Princípio ativo do Bladan

Outro exemplo de inibidor irreversível são os metil-carbamatos, derivados do ácido carbâmico altamente eficientes quanto à ação pesticida principalmente inseticida. Os compostos desse grupo possuem alta atividade inseticida, baixa ação residual, (devido a instabilidade química das moléculas) e baixa toxicidade a longo prazo, quando comparadas com derivados fosforados (SOARES, 1998).

Embora os metil-carbamatos sejam estruturalmente diferentes dos organofosforados, eles atuam de forma similar, fazendo uma ligação no sitio ativo da enzima AChE, inibindo-a. Contudo, possuem uma duração mais curta (SOARES, 1998). A **Figura 16** demonstra alguns exemplos de metil-carbamatos.

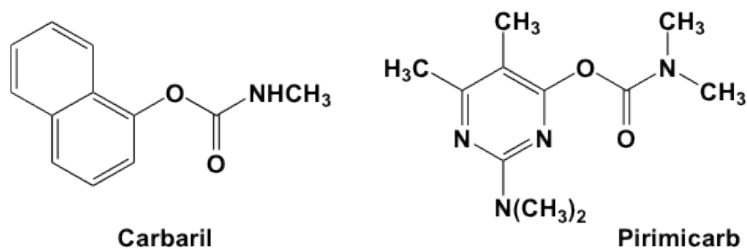


Figura 16: Exemplos de metil-carbamatos.

Os organofosforados e os metil-carbamatos inibem a enzima AChE, responsável pela hidrólise do neurotransmissor ACh nas fibras colinérgicas do sistema nervoso (CASTRO, 2002). Essas fibras são responsáveis pela estimulação de vários órgãos do corpo e dos músculos voluntários, ocorrendo no sistema nervoso central e nos sistemas periféricos simpático e parassimpático. Neste tipo de fibra nervosa, a ACh é responsável pela transmissão do impulso nervoso, através da sinapse, até receptores específicos, que podem ser de dois tipos, nicotínicos ou muscarínicos. A terminação do impulso nervoso ocorre através da hidrólise da ACh, realizada pela AChE. Desta forma, a inibição irreversível da AChE resulta de acúmulo de ACh em todos os sítios de transmissão colinérgica, com consequente superestimulação das estruturas enervadas por aquelas fibras (CASTRO, 2002).

Os efeitos do acúmulo de ACh no corpo humano (síndrome colinérgica) podem ser divididos em três tipos: centrais, muscarínicos e nicotínicos. A sequência dos aparecimentos dos sintomas depende da rota de intoxicação e da quantidade de agente absorvido. Em intoxicações fatais, a morte ocorre por parada respiratória de origem central (depressão do centro respiratório) ou periférica (paralisia dos músculos respiratórios) (CASTRO, 2002).

2.4.1 - Inibidores reversíveis de colinesterases

A AChE é uma enzima substrato-específica que degrada o neurotransmissor acetilcolina na sinapse neuronal. A ACh é conhecida por ser essencial para o processo de memória. Além do papel catalítico da AChE, ela também age como promotora na formação do peptídeo A β (FAN *et al.*, 2008) que, como descrito anteriormente, está relacionada com a gênese da DA.

Evidências sugerem que a enzima butirilcolinesterase (BChE), intimamente relacionada com a AChE, tem um papel significativo na DA (GREIG *et al.*, 2005; FARLOW, 2007), uma vez que está envolvida em funções neurais tais como a correção da neurotransmissão colinérgica e não-colinérgica. (MESULAM *et al.*, 2002).

Inibidores reversíveis de colinesterases podem ser utilizados no tratamento paliativo da DA, visando gerar um aumento nas concentrações de ACh no córtex cerebral. Estudos indicam que inibidores seletivos da butirilcolinesterase (BChE-Is) elevam os níveis extracelulares de ACh no cérebro, melhorando o desempenho cognitivo em roedores (HARTMANN *et al.*, 2007), sem os clássicos efeitos colaterais adversos dos inibidores de acetilcolinesterase seletivos (AChE-Is) ou não seletivos, tais como náuseas e vômitos.

Um dos primeiros fármacos sintéticos utilizados para o tratamento da DA foi a tacrina, mas devido a elevada hepatotoxicidade, com o tempo caiu em desuso (PENG, 1995). Outros fármacos, tais como, o donepezil, a rivastigmina e a galantamina (**Figura 17**), continuam sendo usados para o controle dos sintomas de DA, mas somente o donepezil é utilizado para o tratamento da DA nos estágios mais avançados (BIRKS, 2006).

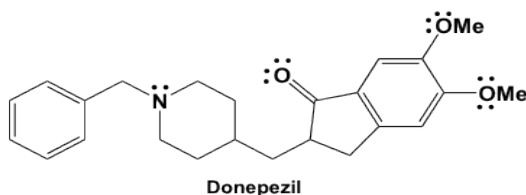
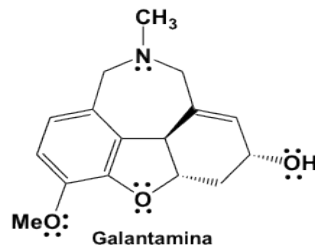
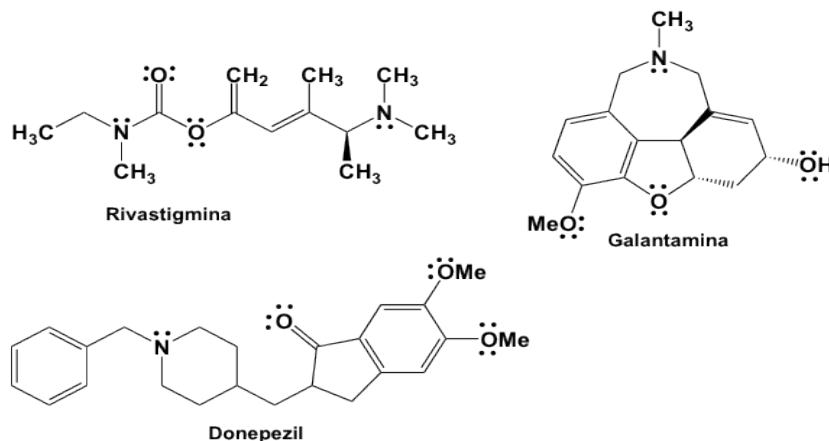


Figura 17: Inibidores comerciais da AChE.

O donepezil foi o segundo medicamento a ser aprovado pelo FDA em 1996 e pela ANVISA em 2000 para o tratamento de DA pois assim como a tacrina é um inibidor reversível da AChE (ROGERS *et al.*, 1998). Sua meia-vida longa (aproximadamente 70 horas) e sua baixa hepatotoxicidade constituem algumas vantagens em relação à tacrina. O Donepezil é o único produto comercial que é um inibidor seletivo da AChE, já a rivastigmina e a galantamina são inibidores não seletivos. Assim sendo, quase todos os fármacos comercializados produzem os efeitos colaterais descritos acima.

A galantamina é o fármaco mais recente desse grupo, aprovado pela FDA e pela ANVISA em 2001 e apresenta efeitos de modulação alostérica dos receptores nicotínicos (potencializador alostérico). Embora não esteja estabelecido com clareza o significado clínico dessa modulação, sabe-se que existe uma relação entre o processo cognitivo e os receptores nicotínicos. Tem meia vida de aproximadamente 7 horas, podendo ser administrada em duas doses diárias. (LEVIN & SIMON, 1998; CACABELOS *et al.*, 1999; CARAMELLI *et al.*, 2004).

Apesar de haver diferenças farmacológicas entre os inibidores de colinesterases citados acima, não há vantagens evidentes na eficácia e no perfil de efeitos adversos. Todos apresentam náuseas, problemas gastrointestinais, diarreia, perda de peso, bradicardia, síncope

e insônia como efeitos colaterais mais comuns. Além disso, nenhum desses fármacos impede a progressão da demência. Estes medicamentos agem na inibição das colinesterases e permitem uma ação temporal maior da acetilcolina sobre os receptores colinérgicos. Tal fato permite a diminuição dos sintomas associados às fases iniciais da DA sem prejudicar, *a priori*, o metabolismo dos neurônios colinérgicos, mas não interfere no processo de produção do peptídeo A β . Sendo assim, tais medicamentos propõem efeitos paliativos, pois apenas os aspectos cognitivos são melhorados ou mais preservados, mas o decorrer do processo degenerativo não é bloqueado ou retardado (DOWNEY, 2008).

Estudos mais recentes tem tido como objetivo a procura de inibidores duais da AChE, ou seja, aqueles que inibem simultaneamente a AChE e a agregação do peptídeo A β catalizada pela AChE (PIAZZI *et al.*, 2007; RIZZO *et al.*, 2009; RIZZO *et al.*, 2010). Esses inibidores se ligam a ambos os sítios aniônicos da AChE que são responsáveis tanto pela inibição catalítica quanto pela agregação de amilóide A β .

2.5 - Alcalóides

2.5.1 - Aspectos Gerais

Os alcalóides são um grupo de substâncias químicas presentes nas plantas, sendo muitos deles utilizados como protótipos para a elaboração de fármacos. Desde os primórdios da civilização, pode-se observar o uso de extratos vegetais contendo alcalóides (SIMÕES *et al.*, 1999). Atualmente, muitos alcalóides são utilizados na terapêutica, devido a ampla variedade de estruturas químicas responsáveis pelas diferentes ações farmacológicas observadas para esta classe de compostos (ELIZABETSKY, 2006). Entre as diversas ações farmacológicas podem ser citadas a atividade antidiurética (ajmalicina), hipotensiva (reserpina, iombina), alucinogênica (mescalina), antimalárica (quinina), antitussígena (codeína e noscapina), miorelaxante (tubocurarina) (PELLETIER, 1983; HENRIQUES *et al.*, 1999).

Nas espécies vegetais, os alcalóides são produtos de detoxificação de substâncias nocivas geradas pelo metabolismo primário e são fonte de reserva de nitrogênio. Possuem também funções hormonais na regulação do crescimento vegetal, além de estarem relacionados ao sistema de defesa da planta contra microorganismos e vírus patogênicos (NOWACKI *et al.*, 1975; SIMÕES *et al.*, 1999). De maneira geral, eles são formados a partir de aminoácidos. Os mais utilizados em sua biossíntese são: ácido α -aspártico (piridinas e

isoquinoleínas), α -lisina (piperidinas e quinolizidinas), α -tirosina (isoquinolinas, benzilisoquinolinas e betalaínas), α -triptofano (derivados da triptamina, β -carbolinas, indóis complexos), α -histidina (imidazóis). Entre os outros precursores usados na biossíntese deste grupo, pode-se citar o ácido mevalônico, ácido antranílico, terpenos e esteróides (ROBINSON, 1974; SIMÕES *et al.*, 1999).

2.5.2 - Alcalóides β -carbolínicos

As β -carbolinas pertencem aos alcalóides do grupo indólico que, além de apresentarem um núcleo indólico, possuem um anel piridínico (**Figura 18**).

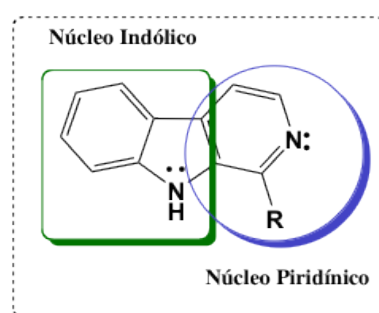


Figura 18: Estruturas do núcleo indólico e anel piridínico presentes nos alcalóides β -carbolínicos.

Os alcalóides β -carbolínicos são conhecidos por suas ações psicoativas, sendo descritos por sua acentuada atividade alucinógena. Estudos etnofarmacológicos apontam seu uso na cultura indígena Sul – Americana (GLENNON *et al.*, 2000; MOURA *et al.*, 2006) e em tribos africanas (HAMANN *et al.*, 2008), assim como a harmina e a harmalina, que são substâncias ativas de espécies de *Banisteriopsis caapi* utilizadas em rituais pelos índios na Amazônia (WANG *et al.*, 2010)

Acredita-se que o efeito alucinógeno das β -carbolinas ocorram devido à inibição da enzima monoaminoxidase (MAO) e a interação com receptores de triptamina e serotonina no SNC, devido à similaridade estrutural com essas aminas indólicas (**Figura 19**). Tal afinidade mostra ser altamente dependente dos substituintes no núcleo indólico e também da saturação do anel piridínico, o que pode ser interessante na modulação desses efeitos (GRELLA *et al.*, 1998; GLENNON *et al.*, 2000; HUSBANDS *et al.*, 2001).

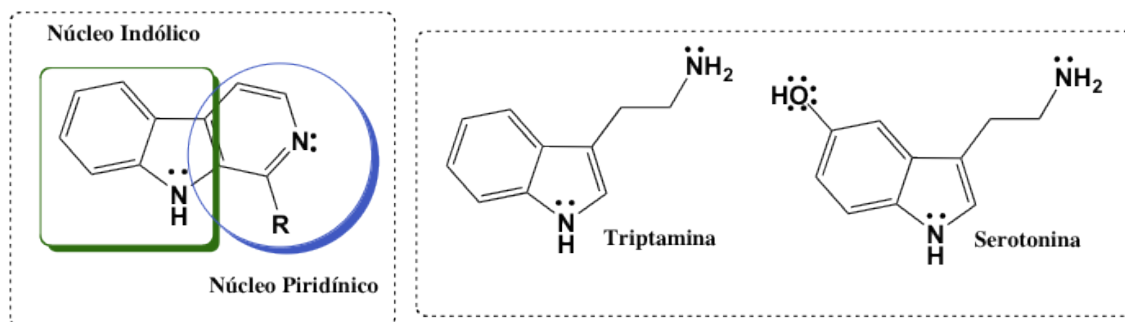


Figura 19: Similaridade estrutural entre as β -carbolinas, a triptamina e a serotonina.

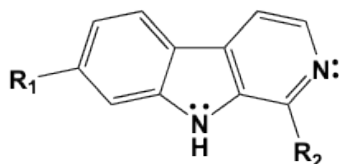
Além disso, as β -carbolinas interagem com receptores benzodiazepínicos (HERRAIZ & CHAPARRO, 2008), glutamato do tipo *N*-metil-*D*-aspartato (NMDA), dopaminérgicos (MOURA *et al.*, 2006), com receptores do ácido γ -aminobutírico (GABA), opióides, e também com as enzimas do citocromo P450 (HERRAIZ & CHAPARRO, 2006).

São descritas também uma ampla variedade de propriedades farmacológicas tais como os efeitos sobre o sistema cardiovascular (HUSBANDS *et al.*, 2001), atividade antiparasitária e antiviral (RIVAS *et al.*, 1999; KUSURKAR & GOSWAMI, 2004), propriedades convulsivantes e anticonvulsivante (FARZIN & MANSOURI, 2006), atividade antineoplásicas e citotóxicas (HEMMATEENEJAD *et al.*, 2006); ação antioxidante (SHI *et al.*, 2000), ação neuroprotetora, antidepressiva e/ou ansiolítico (BONNET; SCHERBAUM; WIEMANN, 2008) e mostra uma potente inibição das enzimas topoisomerase I (HEMMATEENEJAD *et al.*, 2006). Estes alcalóides também implicam em processos de toxicod dependência alcoólica. Estudos demonstraram que a infusão crônica da harmana leva a um aumento na ingestão voluntária de etanol em ratos (HAMANN *et al.*, 2008).

Os alcalóides β -carbolínicos podem ser obtidos através de uma reação por meio da condensação de Pictet-Spengler (**Esquema 7**) entre indolaminas e substâncias carbonílicas (AFSAH *et al.*, 1985; KUSURKAR & GOSWAMI, 2004). A aromaticidade é restaurada por tautomerismo e posteriormente, é formada a substância com o esqueleto β -carbolina, por oxidação (DEWICK, 2002).

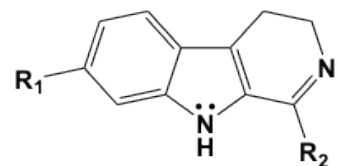
As β -carbolinas podem ser divididas em três grupos estruturais dependendo do grau de saturação do anel: (a) as totalmente aromáticas (**Figura 20a**); (b) as diidro- β -carbolinas (**Figura 20b**); (c) as tetradiidro- β -carbolinas, com o anel piridínico totalmente saturado (**Figura 20c**) (GLENNON *et al.*, 2000).

a - Sistema β -carbolina



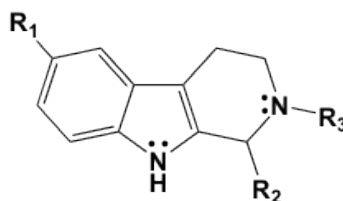
$R_1 = H$ e $R_2 = H$ (Nor-harmana)
 $R_1 = H$ e $R_2 = CH_3$ (Harmana)
 $R_1 = OH$ e $R_2 = CH_3$ (Harmol)
 $R_1 = OCH_3$ e $R_2 = CH_3$ (Harmina)

b - Sistema diidro- β -carbolina



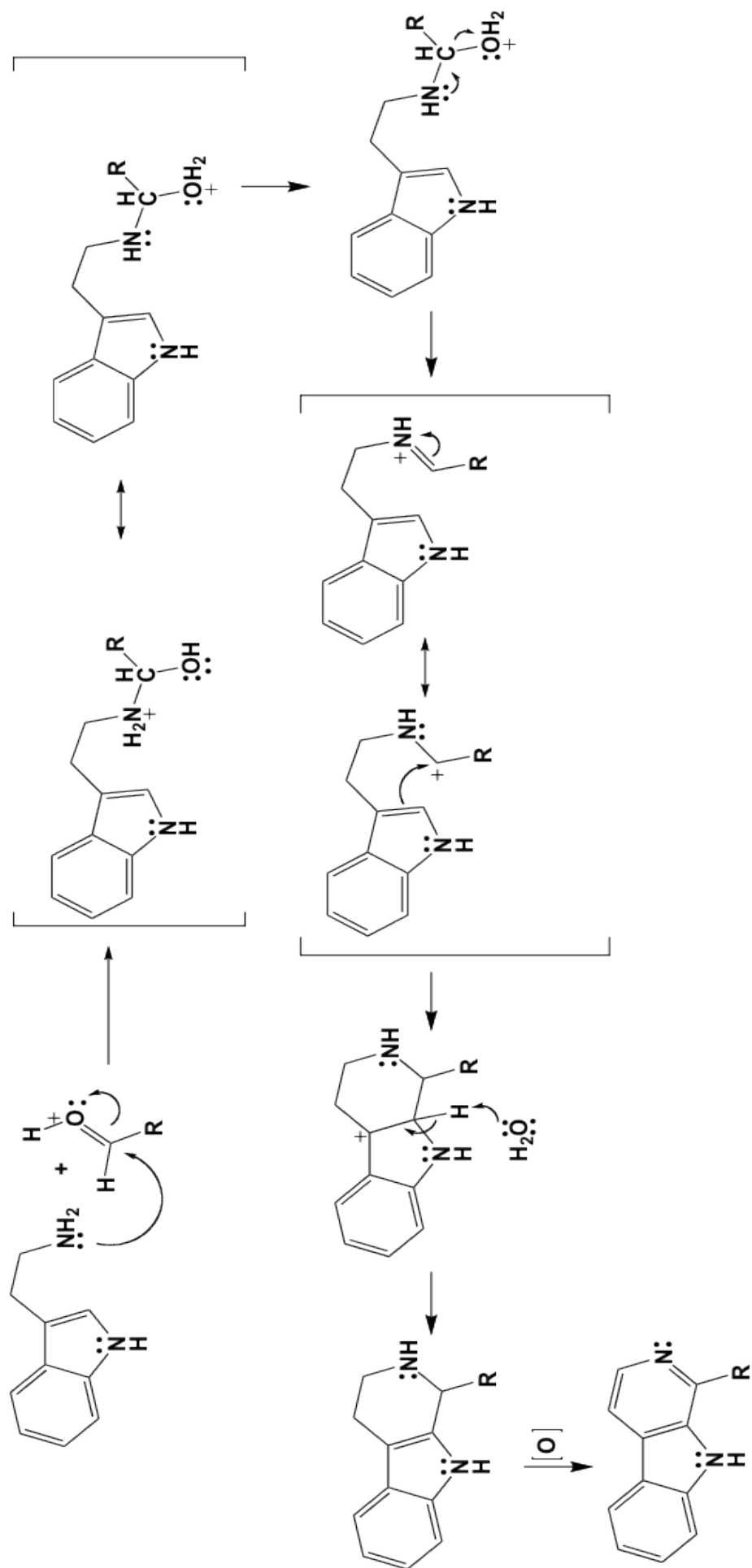
$R_1 = OH$ e $R_2 = CH_3$ (Harmalol)
 $R_1 = OCH_3$ e $R_2 = CH_3$ (Harmalina)

c - Sistema tetraidro- β -carbolina



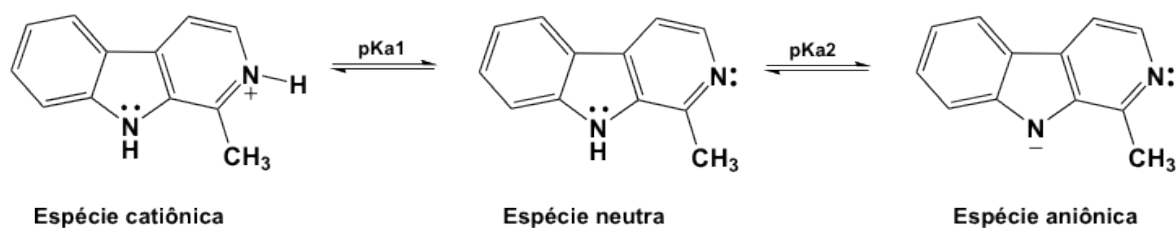
$R_1 = H$; $R_2 = H$ e $R_3 = H$ (1,2,3,4-tetraidro- β -carbolina)
 $R_1 = H$; $R_2 = H$ e $R_3 = CH_3$ (2-metil-1,2,3,4-tetraidro- β -carbolina)
 $R_1 = OCH_3$; $R_2 = H$ e $R_3 = H$ (6-metoxi-1,2,3,4-tetraidro- β -carbolina)
 $R_1 = H$; $R_2 = CH_3$ e $R_3 = H$ (1-metil-1,2,3,4-tetraidro- β -carbolina)

Figura 20: Grupos estruturais das β -carbolinas.



Esquema 7: Formação dos alcalóides β -carbonílicos a partir da condensação de Pictet-Spengler.

Os alcalóides do tipo harmana tem sido alvo de interesse desde o início do século devido as suas diversas propriedades farmacológicas (LUTOMSK, 1959), e possui dois pontos chaves para o estudo dos equilíbrios de dissociação em soluções aquosas: o grupo NH fracamente ácido do anel indólico e o átomo de nitrogênio básico do anel piridínico (HARDIMAN *et al*, 1987). A harmana em solução aquosa, dependendo do pH, existe em pelo menos três espécies diferentes: catiônica, neutra e aniônica. A o **Esquema 8** representa o equilíbrio de dissociação da harmana.



Esquema 8: Equilíbrio de dissociação da harmana.

2.6 - Análise da interação ligante-receptor por STD-RMN (*Saturation transfer difference*)

A STD é uma técnica que vem sendo amplamente utilizada para estudar interações moleculares entre ligantes e receptores macromoleculares (proteínas e peptídeos, glicídeos, lipídeos e ácidos nucleicos) através do efeito NOE (*Nuclear Overhauser Effect*).

O NOE é definido como a mudança na área do sinal proveniente de um núcleo causada pela saturação do sinal de um segundo núcleo. Essa alteração resulta da transferência de polarização entre núcleos acoplados dipolarmente via mecanismos de relaxação spin-rede (T_1). (FIGUEIREDO, 2007).

De modo geral, dois experimentos são registrados na técnica de STD (Figura 21):

1 - 1D ^1H -RMN, sob condições de equilíbrio térmico (espectro de referência ou *off-resonance*) e

2 - Um segundo experimento de RMN - ^1H , onde alguns hidrogênios do receptor são seletivamente irradiados com potência baixa de r.f por um determinado período (tempo de saturação) que geralmente leva alguns segundos. Com isso, magnetização é transferida para os ligantes por relaxamento transversal ^1H - ^1H e mecanismos de troca de produtos químicos na interface da interação ligante-receptor.

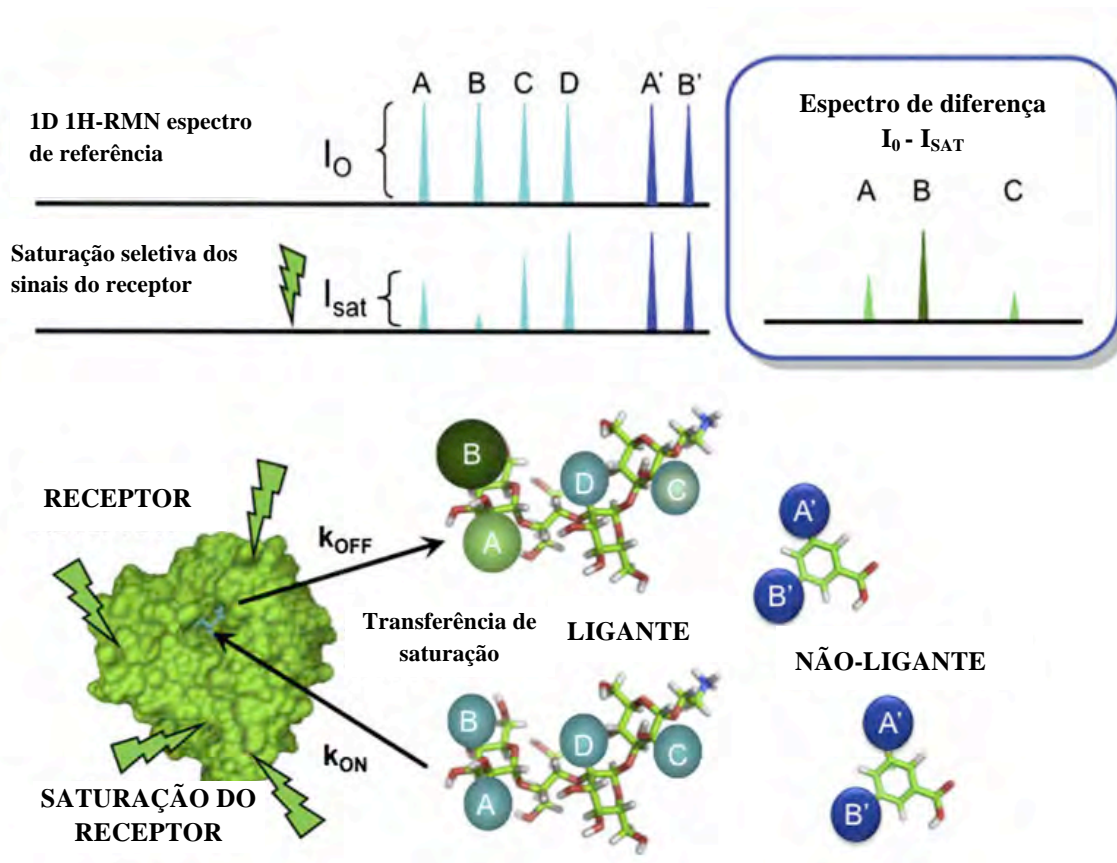


Figura 21: Ilustração de um experimento de STD aplicados para uma amostra contendo um receptor na presença de pequenas moléculas ligantes e não ligantes. (Adaptado de ANGULO, 2011).

Através da subtração dos espectros adquiridos antes e após o pulso de r.f obtém-se o espectros de STD (MILAGRE, 2011).

Esperimentalmente, a STD é particularmente simples, sendo necessário a amostra conter o receptor (molécula grande com massa molecular de acima de 15 kDa) em baixa concentração (10^{-7} - 10^{-8} M) e um grande excesso molar do ligante (1:10 até 1:1000) (MAYER & MEYER, 1999). Contudo, alguns fatores influenciam os experimentos de STD, como o tempo de saturação, a relação molar ligante-receptor e o equilíbrio cinético da ligação. Estes faotres estão intimamente relacionados.

2.6.1 - Tempo de saturação

O tempo de saturação é definido como sendo o tempo em que o pulso de r.f satura o receptor. Um curto tempo de saturação não seria o suficiente para magnetizar o receptor e este transferir magnetização para o ligante, por outro lado um longo tempo de saturação poderia

fazer com que até mesmo os prótons do ligante que não estão interagindo intimamente com o receptor, possam receber magnetização e apresentar sinais no STD (MAYER & MEYER, 1999).

2.6.2 - Equilíbrio cinético da ligação

O receptor e o ligante em geral existem em um equilíbrio dinâmico, caracterizado pela constante de dissociação (K_D) que é definida como $K_D = [L][R] / [LR]$, para uma reação $L+R \rightarrow LR$, onde L corresponde ao ligante e R corresponde ao receptor.

O equilíbrio cinético, está intimamente relacionado com o tempo de saturação e é dependente da afinidade do ligante pelo receptor. Uma baixa afinidade é definida por uma troca rápida entre o estado $LR \rightarrow R$, o que faz com que menos magnetização seja transmitida ao ligante e, conseqüentemente, uma menor intensidade no espectro do STD é observado. Por outro lado, um ligante com alta afinidade, teria uma troca lenta entre os estados $LR \rightarrow R$. Como a aquisição dos espectros para a observação do NOE é possível apenas para as moléculas em estado dissociado. Sendo assim, para uma molécula com alta afinidade não seria possível obter espectros de STD. Em geral, moléculas com constante de dissociação entre 10^{-3} e 10^{-9} são melhor observadas (MAYER & MEYER, 1999; ANGULO, 2011).

3 – OBJETIVOS

Tendo demonstrado a importância de novos estudos na busca de fármacos inibidores de acetilcolinesterases para o tratamento da doença de Alzheimer, este estudo tem por objetivo:

- Sintetizar novos sais da harmana, através da introdução de grupos fenil-substituídos (5-10) e sintetizar novos derivados da harmana com padrão estrutural inédito, através da substituição da metila pela fenila (fenil-pirido-indol), bem como sintetizar os sais de benzila (8), metila (9) e alila (10) e correspondentes;

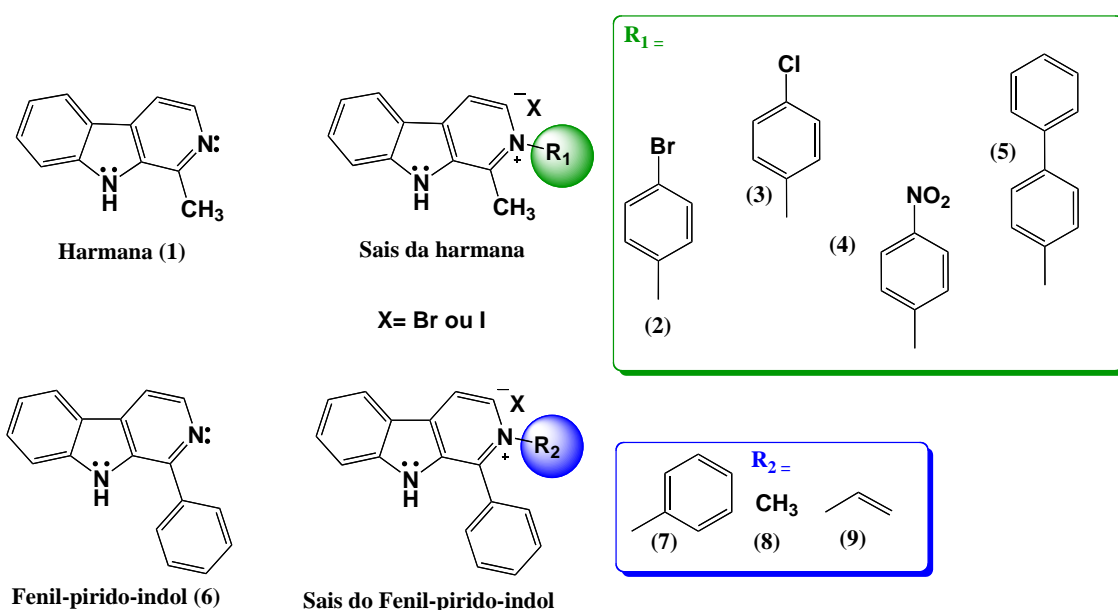


Figura 22: Proposta dos novos derivados a serem sintetizados.

- Avaliar os compostos sintetizados quanto à atividade anticolinesterásica e o perfil de inibição dos compostos ativos, através de estudos cinéticos utilizando o método de Ellman (Ellman *et al.*, 1961);
- Avaliar a interação dos compostos sintetizados com AChE por STD-RMN (*saturation transfer difference*), afim de evidenciar o epítipo do ligante;
- Estudar a relação estrutura-atividade destes compostos, para dar seguimento ao planejamento de novos derivados.

4 - PARTE EXPERIMENTAL

4.1 - Materiais e métodos

4.1.1 – Equipamentos

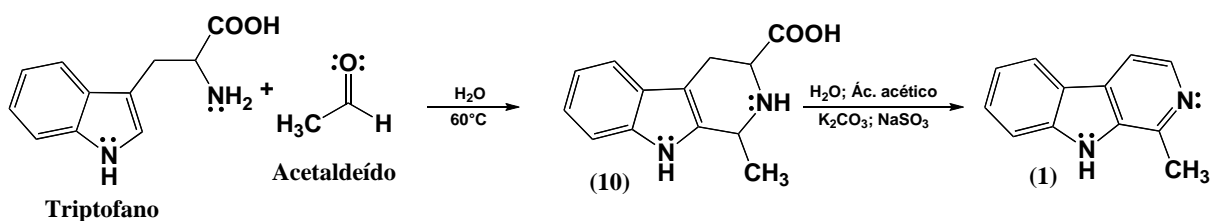
Placas de agitação e aquecimento Fisatom (modelo 752A); Rotaevaporador Fisatom (modelo 802) com banho Fisatom (modelo 550); Aparelho de Ressonância Magnética Nuclear – 400 e 500 MHz; leitora de microplaca de 96 poços marca Bio-Rad (modelo i-Mark).

4.1.2 - Solventes e reagentes utilizados

Os reagentes e os solventes listados abaixo, foram utilizados sem nenhum tratamento prévio.- Triptamina (Sigma Aldrich), triptofano (Sigma Aldrich), benzaldeído, *p*-Br benzaldeído, *p*-Nitrobenzaldeído, 2,4-metilenodioxibenzaldeído, aldeído da bifenila iodeto de metila, brometo de benzila, brometo de alila, ácido clorídrico, piridina, carbonato de potássio, éter etílico, dimetilsulfóxido, cloreto de *p*-toluenosulfonila, diclorometano, metanol, hexano, acetato de etila, ácido trifluoro acético, acetonitrila, dimetilsulfóxido, dimetilsulfóxido deuterado (DMSO - d₆), HCl 35% (Vetec), tris-HCl (Amresco), ácido 5,5'- ditiobis [2-nitrobenzóico] (Sigma Aldrich), iodeto de acetiltiocolina (Sigma Aldrich), iodeto de butiriltiocolina (Sigma Aldrich), acetilcolinesterase de peixe elétrico tipo VI-S (Sigma Aldrich), butirilcolinesterase de soro equino (Sigma Aldrich), albumina sérica bovina (Sigma Aldrich), fisostigmina (Sigma Aldrich), água destilada, etanol (Merck).

4.2 – Procedimentos

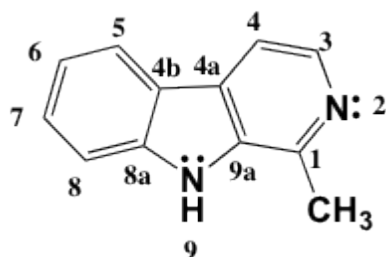
4.2.1 - Síntese da harmana (1) (SYDER, 1948).



Esquema 9: Reação para a obtenção da harmana.

Em um balão de 500 mL adicionou-se 5 g de triptofano e 9,6 mL de acetaldeído em 30 mL de água. A suspensão amarelada foi inicialmente aquecida a 60°C por 3 horas e posteriormente deixada em agitação à temperatura ambiente por 24 horas. Após, a suspensão foi aquecida até a fervura (aproximadamente 100°C), para retirar o excesso de acetaldeído. Quando o sistema entrou em ebulição, o aquecimento foi suspenso. À solução quente, adicionou-se 35 mL de solução de dicromato de potássio 10% (K₂CrO₃) e 8 mL de ácido acético glacial. Esta suspensão foi novamente aquecida por 5 minutos e posteriormente resfriada. A esta, adicionou-se uma solução gelada de sulfito de sódio e, posteriormente, adicionou-se carbonato de sódio até que o pH estivesse neutro. A suspensão marrom final foi filtrada e posteriormente a harmana foi extraída extensivamente com éter etílico destilado. À fase orgânica adicionou-se sulfato de magnésio (MgSO₄). Esta foi filtrada e então, o éter etílico foi evaporado. O produto final obtido como um sólido amarelado com 68% de rendimento.

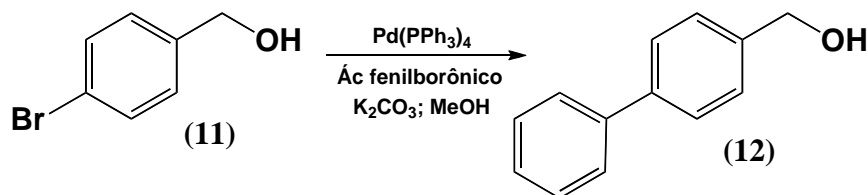
Caracterização:



RMN ¹H (DMSO-d₆): δ 2,78 [s, (CH₃), 3H]; 7,24 [t, (H₆), 1H]; 7,54 [t, (H₇), 1H]; 7,94 [d, (H₅), 1H]; 8,20 [d, (H₄), 1H]; 8,22 [d, (H₅), 1H]; 11,58 NH.

RMN ¹³C (DMSO-d₆): δ 20,85; 112,39; 113,13; 119,67; 121,51; 122,19; 127,33; 128,30; 134,93; 137,91; 140,81; 143,12

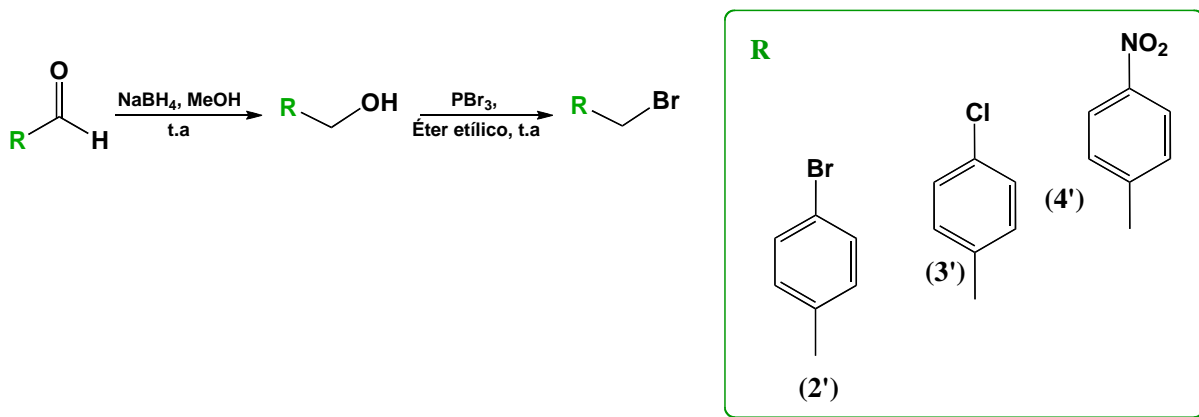
4.2.2 - Síntese do álcool p-fenil benzílico (12) (SUZUKI, 1995).



Esquema 10: Acoplamento de Suzuki para a produção do álcool p-fenil benzílico.

Em um balão de fundo redondo, adicionou-se o 0,185 g de carbonato de potássio (1,33 mmol), 0,1g do álcool *para*-bromo benzílico e o ácido borônico (0,53 mmol). Após a adição, a solução foi degaseificada com N₂ e à ela adicionou-se ainda 0,78g do catalisador de paládio (0,64 mmol). A reação foi deixada sob agitação por 4 horas em atmosfera inerte. Ao fim, o solvente foi evaporado e o resíduo extraído com acetato de etila e água e água. O sólido amarelado obtido foi lavado com hexano.

4.2.3 - Síntese dos haletos de benzila



Esquema 11: Reações envolvidas na síntese dos haletos de benzila.

Em um balão de 50 mL, adicionou-se 0,3 g do álcool correspondente, 1,5 equivalentes de Borohidreto de sódio (NaBH₄) em aproximadamente 20 mL de metanol. A reação foi acompanhada por CCD utilizando Hexano: Acetato de Etila 50% e utilizando o 2,4-dinitrofenilidrazina como revelador de aldeído na placa. Após o término da reação o metanol foi evaporado e o álcool correspondente obtido foi pesado e teve seu rendimento calculado. A **Tabela 1** exibe o rendimento reacional e o tempo de cada reação.

Tabela 1- Rendimento calculado e o tempo reacional para a reação de redução dos aldeídos.

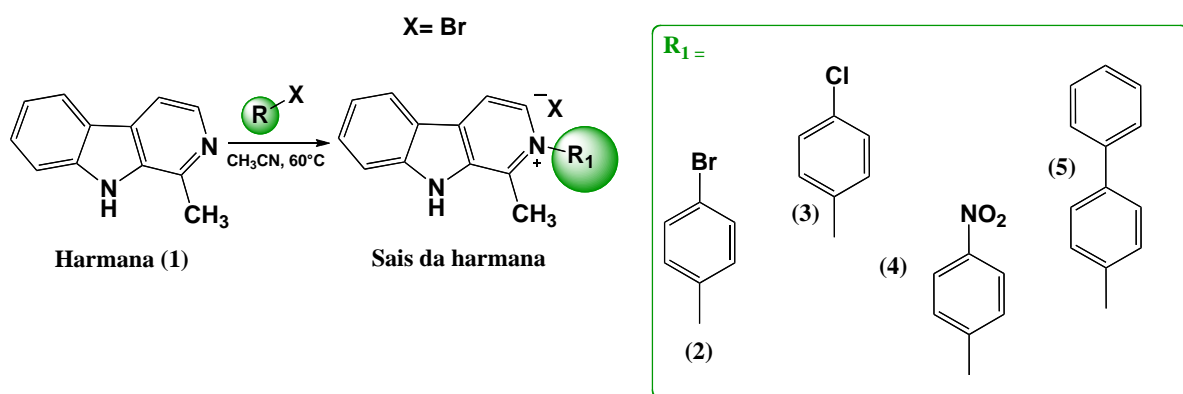
Compostos	Rendimento (%)	Tempo de reação (horas)
2°	80	2h
3°	94	2 h
4°	93	1,5 h

Prosseguindo com a rota sintética para a obtenção dos haletos de benzila, realizou-se a reação de bromação, utilizando 0,2g do álcool correspondente e 3 equivalentes de PBr₃ em éter etílico. A reação foi acompanhada por CCD utilizando DCM: Metanol 20%. Após observado o término da reação, evaporou-se o éter etílico. O rendimento e o tempo de cada reação são exibidos na tabela abaixo.

Tabela 2- Rendimento calculado e o tempo reacional para a reação de redução de bromação.

Compostos	Rendimento (%)	Tempo de reação (horas)
2°	72	4,5 h
3°	61	4 h
4°	76	5 h

4.2.4 - Síntese dos sais da harmana - procedimento geral (FRAGA & BARREIRO, 1994).



Esquema 12: Reação geral para obtenções dos sais da harmana.

Em um tubo selado adicionou-se 0,7 g da harmana e 1,1 equivalentes do haleto de benzila correspondente, em acetonitrila. A reação prosseguiu sob agitação à 60°C por 12 horas, sendo acompanhada por CCD utilizando DCM: Metanol 20%, até que fosse observado o desaparecimento da banda correspondente a harmana. Após a reação, a acetonitrila foi parcialmente evaporada. À suspensão formada adicionou-se acetato de etila e em seguida esta foi filtrada. Todos os sais foram obtidos como sólidos amorfos de coloração amarela com P.F acima de 250°C.

Rendimento reacional:

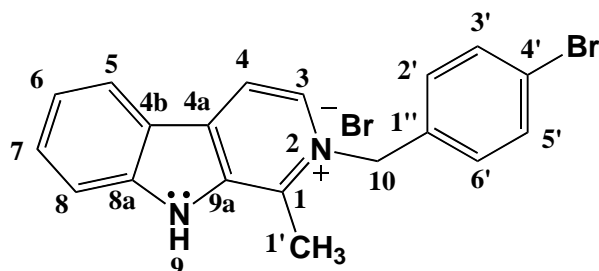
composto 2: 63% de rendimento

composto 3: 49% de rendimento

composto 4: 93% de rendimento

composto 5: 87% de rendimento

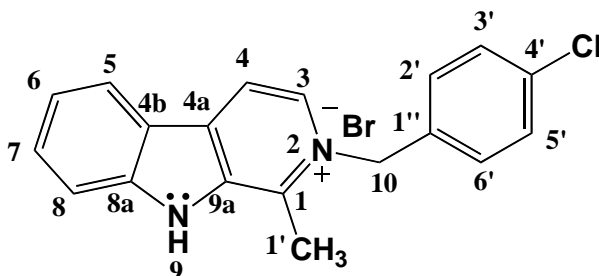
Caracterização composto 2:



RMN ^1H (DMSO – d_6): δ 3,04 [s, (CH_3), 3H]; 6,03 [s, (H_{10}), 2H]; 7,22 [dd, ($\text{H}_{3'}$ e $\text{H}_{5'}$), 2H]; 7,49 [dd, (H_6 – H_7 e H_8), 3H]; 7,82 [dd, ($\text{H}_{2'}$ e $6'$), 2H]; 8,53 [dd, (H_5), 1H]; 8,78 [d, (H_3 e H_4), 2H]; 12,98 [s, (H_9), 1H].

RMN ^{13}C (DMSO – d_6): δ 16,06; 59,17; 112,50; 113,37; 116,55; 119,93; 120,22; 122,25; 122,42; 124,09; 129,84; 131,74; 132,52; 134,35; 134,80; 135,87; 141,32; 144,26.

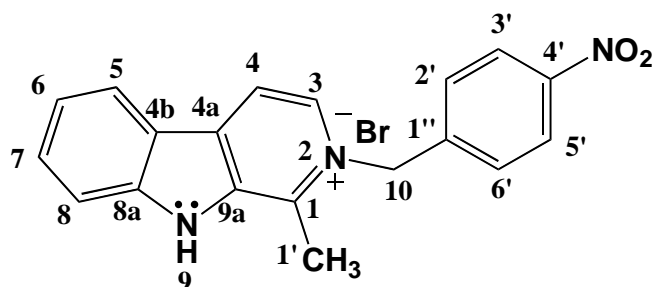
Caracterização do composto 3:



RMN ^1H (DMSO – d_6): δ 3,05 [s, (CH_3), 3H]; 6,05 [s, (H_{10}), 2H]; 7,31, [dd, ($\text{H}_{2'}$ e $\text{H}_{6'}$), 2H]; 7,50 [dd, ($\text{H}_{3'}$ – $\text{H}_{5'}$ e H_8), 3H]; 8,52 [dd, (H_5), 1H]; 8,81 [d, (H_3 e H_4), 2H]; 12,95 [s, (H_9), 1H].

RMN ^{13}C (DMSO – d_6): δ 16,03; 59,12; 113,35; 116,54; 120,21; 122,21; 124,08; 129,56; 132,41; 139,75; 133,88; 134,77; 135,85; 141,27; 144,23.

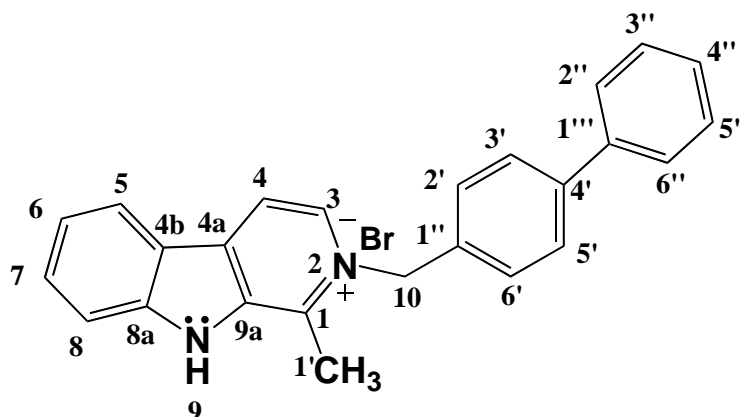
Caracterização do composto 4:



RMN ^1H (DMSO – d_6): δ 3,02 [s, (CH_3), 3H]; 6,24 [s, (H_{10}), 2H]; 7,50, [dd, ($\text{H}_{3'}$ - $\text{H}_{5'}$ e 8), 3H]; 7,83 [dd, ($\text{H}_{2'}$ – $\text{H}_{6'}$), 2H]; 8,26 [dd, (H_6 e H_7), 2H]; 8,55 [dd, (H_5), 2H]; 8,84 [d, (H_3 e H_4), 2H]; 13,00 [s, (H_9), 1H].

RMN ^{13}C (DMSO – d_6): δ 16,07; 59,14; 113,37; 116,69; 120,23; 122,28; 124,12; 124,65; 128,65; 131,95; 132,52; 134,93; 135,91; 141,44; 142,29; 144,31; 147,85.

Caracterização do composto 5:

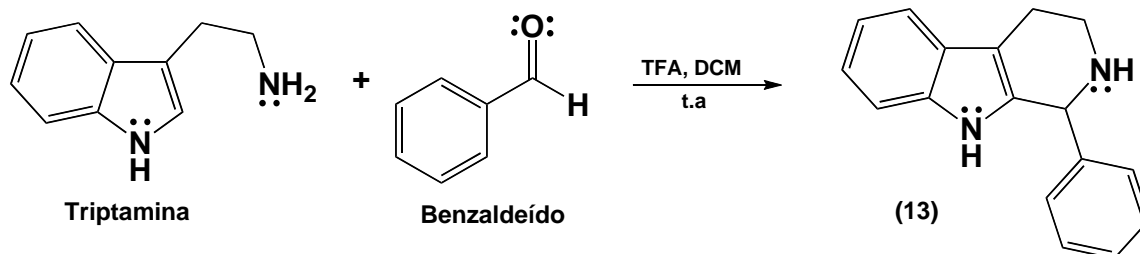


RMN ^1H (DMSO – d_6): δ 3,14 [s, (CH_3), 3H]; 6,13 [s, (H_{10}), 2H]; 7,45 [dd, ($\text{H}_{4'}$ – $\text{H}_{2'''}$ – $\text{H}_{3'''}$ – $\text{H}_{4'''}$ – $\text{H}_{5'''}$ e $\text{H}_{6'''}$), 6H]; 7,70 [dd, ($\text{H}_{2'}$ – $\text{H}_{6'}$ – $\text{H}_{2''}$ e $\text{H}_{6''}$), 4H]; 8,54 [dd, (H_5), 1H]; 8,81 [d, (H_4), 1H]; 8,90 [d, (H_3), 1H]; 13,07 [s, (H_9), 1H].

RMN ^{13}C (DMSO – d_6): δ 16,26; 59,60; 113,41; 116,57; 120,27; 122,17; 124,12; 127,16; 127,21; 127,88; 128,31; 129,53; 132,34; 134,10; 134,88; 135,90; 139,77; 140,81; 141,31; 144,30.

4.2.5 - Síntese do fenil-pirido-indol

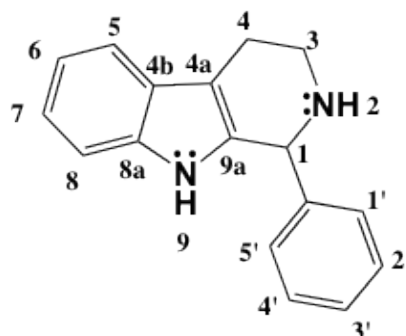
4.2.5.1 - Síntese do 1-fenil-2,3,4,9-tetraidro-1H-pirido[3,4-b]indol (13) (DONG *et al.*, 2010)



Esquema 13: Reação para a obtenção do 1-fenil-2,3,4,9-tetraidro-1H-pirido[3,4-b]indol (13).

Em um balão de 250 mL, adicionou-se 0,5 g de triptamina (3,12 mmol), 0,33 g benzaldeído (3,12 mmol), 0,1 mL de ácido trifluoroacético (9 mmol) e 20 mL de diclorometano. A reação prosseguiu à temperatura ambiente por 24h, sendo acompanhada por cromatografia em camada fina (CCF) com n-hexano: acetato de etila 50% como eluente. Após o término da reação, o solvente foi evaporado. Ao resíduo sólido, adicionou-se DCM (aproximadamente 15mL). A solução formada foi transferida para um funil de separação, onde fez-se uma extração líquido-líquido, utilizando 30 mL de uma solução aquosa de carbonato de potássio (K₂CO₃) 5%. Após a extração, a fase orgânica foi seca com sulfato de magnésio (MgSO₄), filtrada e em seguida evaporada. O produto de interesse, o 1-fenil-2,3,4,9-tetraidro-1H-pirido[3,4-b]indol (13), foi obtido como um sólido amorfo de coloração amarelada com 88% de rendimento reacional.

Caracterização:

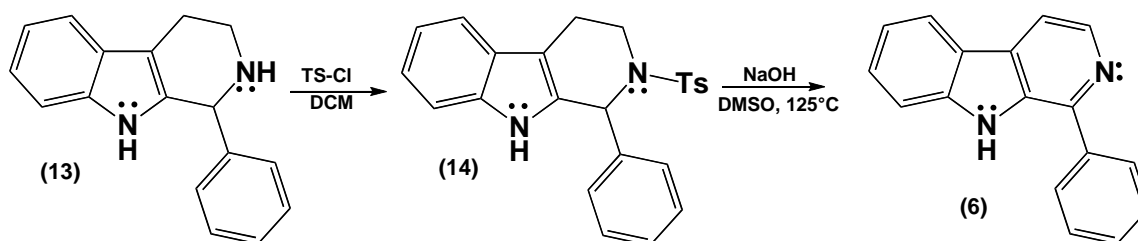


RMN ^1H (D_2O): δ 2,4 [dt, (H4), 2H]; 2,6 [dt, (H3), 2H]; 5,6 [s, (H1), 1H]; 7,15 [t, (H6), 1H]; 7,20 [t, (H7), $J = 8,04$ Hz, 1H]; 7,25 [d, (H1'-H5'), 2H]; 7,3 [d, (H8), $J = 8,04$ Hz, 1H]; 7,40 [t, (H4'-H2'), 2H]; 7,45 [tt, (H3'), 1H]; 7,6 [d, (H5), $J = 8,1$ Hz, 1H];

Onde s = simpleto; d = dupletto; t = tripleto; tt = triplo-tripletto; J = Constante de acoplamento.

OBS: Em D_2O H9 e H2 são trocados com o deutério do solvente. Com isto, não observou-se o deslocamentos característicos destes.

4.2.5.2 - Síntese do 1-fenil-9H-pirido[3,4-b]indol (6) (DONG *et al.*, 2010)



Esquema 14: Reação para a obtenção do 1-fenil-9H-pirido[3,4-b]indol (6).

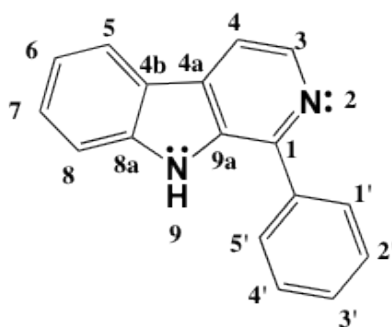
Em um balão de 250 mL adicionou-se 0,65 g (2,28 mmol) do 1-fenil-2,3,4,9-tetraidro-1H-pirido[3,4-b]indol (13), 0,73 g de Piridina (9,24 mmol) em 20 mL de DCM à 0°C. Posteriormente adicionou-se 1,16 g de carbonato de potássio (2,20 mmol). O sistema permaneceu sob agitação por aproximadamente 15 minutos. Em seguida adicionou-se 0,53 g

cloreto de de *p*-toluenosulfonila (10 mmol), pouco a pouco ao balão. Após a adição do cloreto de de *p*-toluenosulfonila, removeu-se o banho de gelo e a reação prosseguiu à temperatura ambiente por 6 horas, sendo acompanhada por CCF com n-Hexano: acetato de etila 50% como eluente.

Após a constatação do término da reação, o meio reacional foi transferido para um funil de separação onde fez-se uma extração líquido-líquido utilizando 15 mL de uma solução aquosa de HCl 2N, 30 mL de água e 10 mL de solução saturada de cloreto de sódio como fase aquosa. Posteriormente a fase orgânica foi seca com sulfato de sódio, filtrada e evaporada.

O sólido obtido no processo de extração (intermediário *N*-tosilado), ainda sem purificação, foi adicionado a um balão de 500 mL, juntamente com uma solução de hidróxido de sódio 30% (1.60 g, 12.00 mmol) em 12 mL de dimetilsulfóxido (DMSO). A mistura foi aquecida à 125 °C, prosseguindo assim até o término da reação (7h), verificado por CCF com n-hexano : acetato de etila 30% como eluente. Após o resfriamento do balão à temperatura ambiente, adicionou-se 60 mL de água gelada, o que levou a precipitação do produto final. A fenil-harmana foi obtida como um sólido de coloração amarelada com 94% de rendimento.

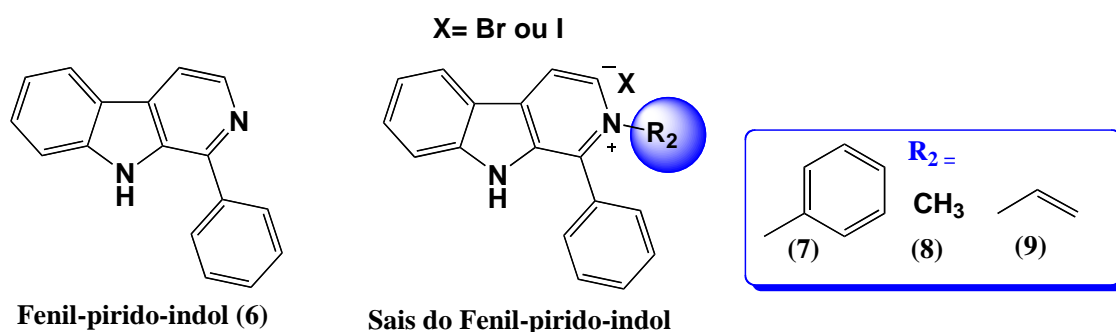
Caracterização:



RMN ¹H (DMSO-d₆): δ 7,5 [m, (H8-H7-H1'-H2'-H3'-H4'-H5') 7H]; 8,3 [m, (H3-H4-H5-H6-H7) 5H]; 11,5 [s, (N-H) 1H]. Onde m = multipletto

RMN ¹³C (DMSO-d₆): δ 144; 141; 138,8; 133,5; 129,2; 129,1; 129,0; 128,8; 128,6; 122,1; 121,3; 120; 114; 112;

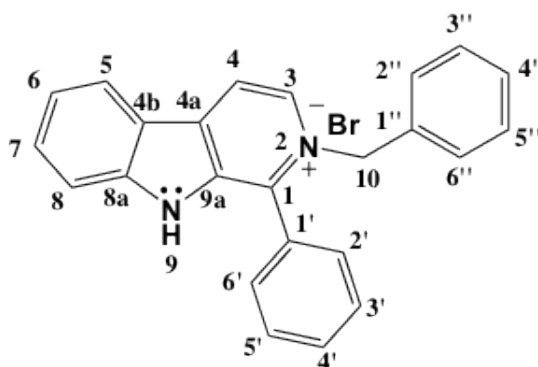
4.2.6 - Síntese dos sais fenil-pirido-indóis - procedimento geral (Adaptados de FRAGA & BARREIRO, 1994)



Esquema 15: Rota geral para a obtenção dos sais.

Em um balão de 50 mL adicionou-se 0,07 g da fenil-harmana (0,87 mmol), 1 equivalente do haleto de alquila correspondente (iodeto de metila, brometo alila ou brometo de benzila) e 5mL de acetonitrila. A reação prosseguiu sob refluxo a 60°C, sendo acompanhada por CCF com Diclorometano : metanol 10% como eluente por 24 h a 32 h, dependendo da natureza do grupo R. Após o término da reação, o solvente foi evaporado. O produto sólido correspondente foi re-suspensão em éter etílico e filtrado. Os dados do tempo de cada reação, rendimento e o aspecto do produto final são apresentados abaixo.

Sal de benzila do fenil-pirido-indol (7)



Tempo de reação = 32h ; Rendimento reacional = 57% Aspecto: Sólido amorfo de coloração amarelada

Caracterização :

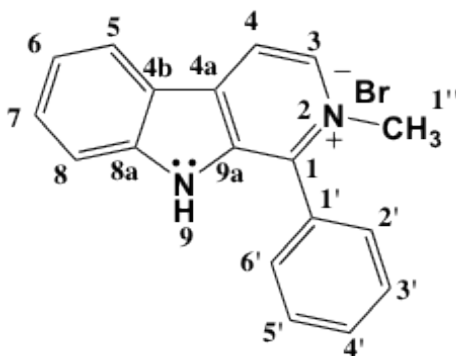
RMN ^1H (D_2O): δ 5,86 [s, (CH_2Ph), 2H]; 6,92 [dd, ($\text{H3}' - \text{H5}'$), 2H]; 7,26 [m, ($\text{H3}'' - \text{H4}'' - \text{H5}''$), 3H]; 7,47 [t, ($\text{H4}'$), 1H]; 7,64 [m, ($\text{H8} - \text{H2}' - \text{H6}' - \text{H2}'' - \text{H6}'$), 5H]; 7,73 [t, (H6), 1H]; 7,78 [dd, (H11), 1H]; 8,57 [d, (H13), $J = 8,15$ Hz, 1H]; 8,95 [d, (H6), $J = 6,45$ Hz, 1H]; 8,99 [d, (H5), $J = 6,45$ Hz, 1H];

RMN ^{13}C (D_2O): δ 60,3; 112,47; 116,85; 119,55; 121,87; 123,13; 127,32; 127,28; 127,94; 128,69; 128,95; 129,34; 129,51; 131,52; 131,56; 132,18; 133,54; 133,67; 135,82; 140,88; 144,05.

Onde s = simpleto; d = dupleteo; m = multipleteo, dd = duplo-dupleteo; J = Constante de acoplamento.

OBS: Em D_2O H9 é trocado com o deutério do solvente. Logo, não observou-se o deslocamento característico deste.

Sal de Metila do fenil-pirido-indol (8):



Tempo de reação = 24h; Rendimento reacional = 64% Aspecto : Sólido amorfo de coloração amarelada

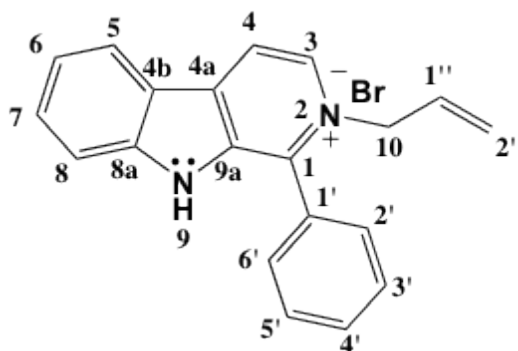
Caracterização:

RMN ^1H (D_2O): δ 3,13 [s, (CH_3), 3H]; 7,43 [t, ($\text{H4}'$), 1H]; 7,6 [d, (H8), 1H] $J = 8,49$ Hz; 7,64 [t, ($\text{H3}' - \text{H5}'$), 2H]; 7,7 [m, ($\text{H6} - \text{H7} - \text{H2}' - \text{H6}'$), 4H]; 8,3 [d, (H5), 1H] $J = 8,21$ Hz ; 8,4 [d, (H4), $J = 6,6$ Hz, 1H]; 8,45 [d, (H3), $J = 6,6$ Hz, 1H]; Onde s = simpleto; d = dupleteo; m = multipleteo, dd = duplo-dupleteo; J = Constante de acoplamento.

RMN ^{13}C (DMSO- d_6): δ 46,41; 113,60; 117,34; 120,03; 122,16; 124,01; 129,04; 130,08; 131,83; 131,83; 132,30; 132,95; 135,07; 135,42; 140,72; 144,84.

OBS: Em D_2O H9 é trocado com o deutério do solvente. Logo, não observou-se o deslocamento característico deste.

Sal de alila da fenil-pirido-indol (9)



Tempo de reação = 32 h; Rendimento reacional = 63% Aspecto : Sólido amorfo de coloração amarelada

Caracterização:

RMN ^1H (D_2O): δ 5,0 [dd, (H2''), 2H]; 5,3 [dd, (H10), 2H]; 5,95 [m, (H1''), 1H]; 7,35 [t, (H4'), 1H]; 7,45 [d, (H8), 1H]; 7,55 [t, (H3'-H5'), 2H]; 7,7 [m, (H6-H2'-H6'), 3H]; 7,75 [t, (H7), 1H]; 8,2 [d, (H5), 1H]; 8,36 [d, (H3-H4) 2H]. Onde s = simpleto; d = duplete; m = multiplete, dd = duplo-duplete.

OBS: Em D_2O H9 é trocado com o deutério do solvente. Logo, não observou-se o deslocamento característico deste.

RMN ^{13}C (DMSO- d_6): δ 59, 36; 113,62; 117,81; 119,83; 122,24; 124,12; 128,63; 129,94; 130,19; 132,48; 132,86; 133,10; 134,18; 135,67; 140,76; 145,04.

4.2.7 - Ensaio Químico-biológicos

Os ensaios para avaliação da atividade anticolinesterásica utilizando o método de Ellman (ELLMAN *et al.*, 1961) e o posterior estudo cinético, foram realizados em placas de 96 poços em triplicata na ausência e na presença de compostos β -carbolínicos em diferentes concentrações. A densidade óptica foi medida utilizando leitor de microplaca de 96 poços Bio-Rad modelo i-Mark, em comprimento de onda 415nm. Foram realizados no mínimo 3 ensaios independentes, para desta forma ser calculado o desvio padrão, ou seja, a margem de erro do ensaio.

4.2.7.1 - Avaliação da atividade anticolinesterásica

Para a avaliação da atividade anticolinesterásica, as seguintes soluções foram preparadas: (1) tampão tris/HCl 50mM pH 8,0; (2) tampão tris/HCl 50mM pH 8,0 contendo 0,1% de albumina sérica bovina (BSA); (3) 5,5'-ditiobis-[2-nitrobenzoíco] (DTNB ou reagente de Ellman) 0,5mM; (4) iodeto de acetilticolina (ACTI) 2,5mM; (5) enzima acetilcolinesterase 0,22U/mL; (6) iodeto de butirilticolina (BCTI) 2,5mM e (7) enzima butirilcolinesterase 0,22U/mL.

Em uma placa de 96 cavidades, foram adicionados 25 μ L de iodeto de acetilticolina ou iodeto de butirilticolina dissolvidos no tampão (2); 125 μ L de DTNB dissolvidos no tampão (2); 50 μ L de tampão (2); 25 μ L dos compostos β -carbolínicos dissolvidos em etanol (cavidades em teste) ou etanol (cavidades de controle). Em seguida foi medida a absorvância das cavidades (λ 405nm), sendo esta leitura o branco da avaliação. Logo após, adicionou-se a cada cavidade 25 μ L da enzima AChE ou BChE (0,22U/mL) dissolvida em de tampão (1). Em seguida, a absorvância foi medida (λ 415nm) a cada 13 segundos por 3 vezes.

Os ensaios para a avaliação da atividade anticolinesterásica foram realizados em triplicatas (para o cálculo do desvio padrão) e em diferentes concentrações. Após a adição da enzima, foi levada ao leitor de microplaca e a absorvância foi medida em um comprimento de onda de 415nm. As absorvâncias obtidas foram utilizadas para o cálculo da porcentagem de inibição. Assim, foram confeccionados os gráficos (concentração x porcentagem de inibição) e calculados os valores de CI_{50} (μ M), com os respectivos desvios padrões.

As soluções dos compostos β -carbolínicos foram preparadas em etanol absoluto, devido a baixa solubilidade destes em meio aquoso. Apesar dos derivados serem sais, estes não apresentaram alta solubilidade em meio aquoso.

4.2.7.2 - Cinética enzimática

A cinética de interação dos β -carbolínicos com a AChE e BChE foi determinada através de gráficos de Lineweaver e Burk (LINEWEAVER & BURK, 1934), onde o eixo das abcissas representa o inverso da concentração de substrato (ACTI ou BCTI) ($1/S$) e o eixo das ordenadas representa o inverso da atividade enzimática ($1/V^\circ$). Nas 96 cavidades da placa foram adicionados: 25 μ L de substrato (iodeto de acetiltiocolina 0,4mM – 2,5mM) ou (iodeto de butiriltiocolina 0,3mM – 2,5mM) dissolvido em tampão (2), 125 μ L de DTNB (0,5mM) dissolvido em tampão (2), 50 μ L de tampão (2), 25 μ L do β -carbolínico dissolvido em etanol, 25 μ L de AChE ou BChE (0,22U/mL) dissolvida em tampão (1). A absorvância foi medida ($\lambda = 415\text{nm}$) a cada 13 segundos por 3 vezes. As concentrações de substrato variaram (para ACTI 0,04mM – 0,25mM e para BCTI 0,03mM – 0,25mM) na ausência e na presença dos compostos.

Para a avaliação da cinética com AChE utilizou-se as seguintes concentrações: Composto **2** (7 μ M e 13 μ M), composto **4** (7 μ M e 13 μ M), composto **5** (1 μ M e 2 μ M), composto **7** (5 μ M e 10 μ M), composto **8** (20 μ M e 50 μ M) e composto **9** (10 μ M e 20 μ M).

Para a avaliação da cinética em BChE utilizou-se as seguintes concentrações: Composto **2** (0,1 μ M e 0,2 μ M), composto **4** (5 μ M e 10 μ M), composto **5** (0,8 μ M e 2 μ M), composto **7** (0,8 μ M e 1,5 μ M), composto **8** (15 μ M e 25 μ M) e composto **9** (15 μ M e 35 μ M).

Com a análise dos gráficos obtidos neste experimento ($1/V^\circ$ contra $1/[S]$), foi possível deduzir os valores de K_M e $V_{\text{máx}}$ (LINEWEAVER & BURK, 1934). Tendo caracterizado a natureza de inibição e conhecido os valores de CI_{50} , foram calculados os valores de K_I . Para uma inibição não competitiva o valor de K_I é igual ao valor do CI_{50} (CHENG & PRUSSOF, 1973).

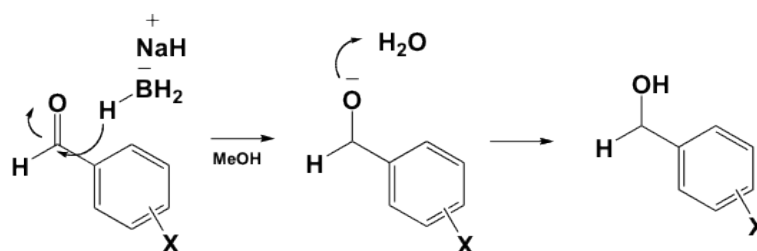
4.2.2 - Análise da interação composto-AChE por STD-RMN

A análise por STD foi feita com uma razão molar ligante receptor de 100:1, utilizando tampão fosfato de sódio em água deuterada (pH 7,5) como solvente. Todos os espectros de STD foram adquiridos com a mistura ligante receptor, utilizando uma sonda BBO de 5 mm através da sequência de pulso 'stdiffesgp' encontrada no catálogo de experimentos padrões da Bruker[®]. Um total de 512 transientes foram adquiridos, usando como pontos de excitação, on-resonance: -0,5 ppm e off-resonance: -50 ppm, com uma potência de 40 dB.

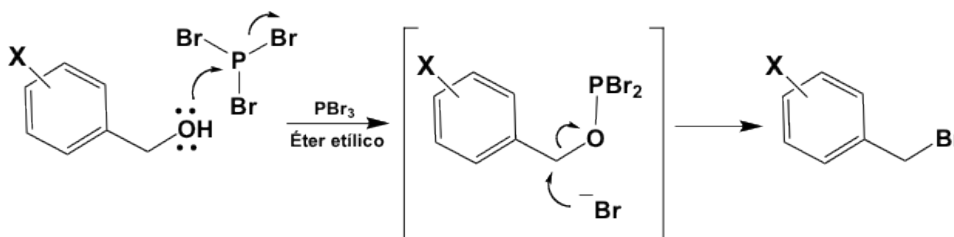
5 - RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 - Síntese dos haletos de benzila

Objetivando a síntese dos sais da harmana propostos, iniciou-se a síntese dos haletos de benzila a partir dos seus aldeídos correspondentes. Através da clássica metodologia de redução de aldeídos utilizando NaBH_4 como agente redutor (**Esquema 16**), foi possível obter os álcoois correspondentes em bons rendimentos (80-93%) e com pouco tempo reacional. A rota sintética foi prosseguida com a bromação desses álcoois, com o uso do PBr_3 , cujo mecanismo geral é apresentado no (**Esquema 17**).

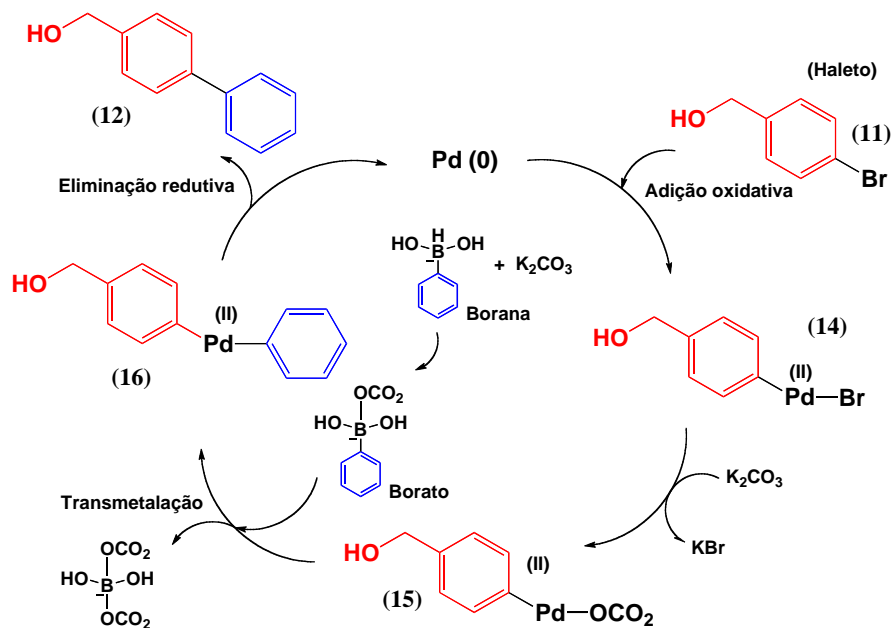


Esquema 16: Mecanismo de reação de redução de aldeídos para a obtenção dos álcoois benzílicos.



Esquema 17: Mecanismo de reação para a reação de bromação dos álcoois benzílicos.

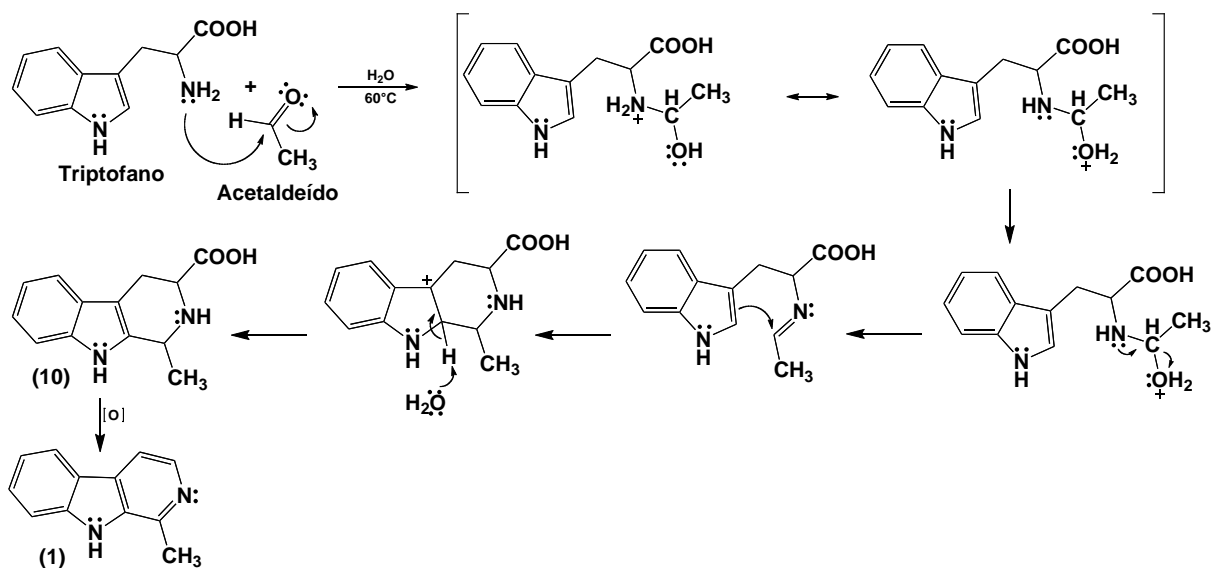
A síntese do composto 5, diferente dos outros haletos benzílicos, iniciou-se com a reação de acoplamento cruzado de Suzuki entre o álcool *para*-bromo benzílico e o ácido fenil borônico, sob catálise de paládio, resultando em um composto bifenílico (**Esquema 18**). Em seguida, fez-se a bromação do álcool com PBr_3 .



Esquema 18: Mecanismo proposto para a reação de bromação dos alcoóis benzílicos.

5.2 - Síntese da harmana

A síntese da harmana (1) iniciou-se com a condensação do triptofano com o acetaldeído em meio aquoso. Após a etapa de condensação, o produto intermediário foi oxidado, levando a formação da harmana com bons rendimentos reacionais. O mecanismo proposto para esta reação é mostrado no **Esquema 19**.

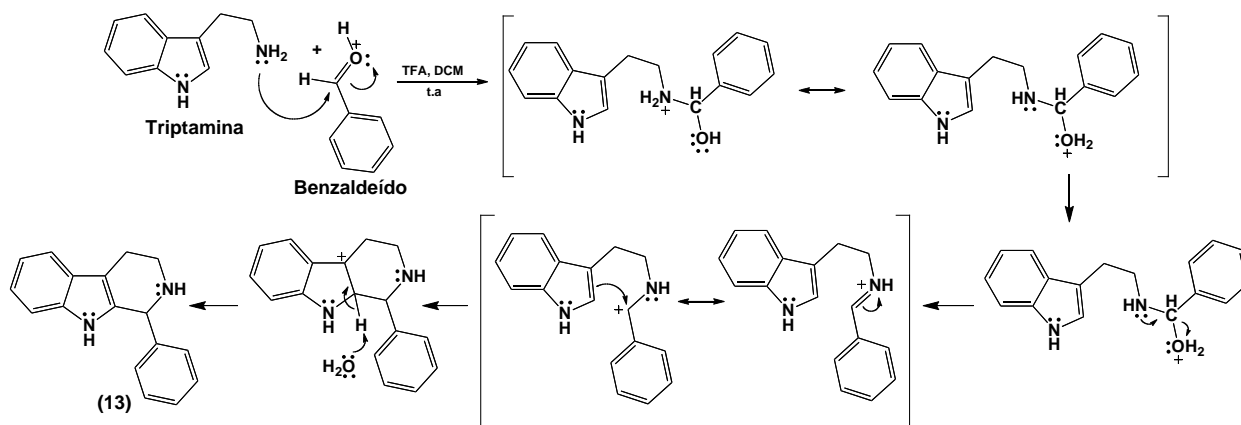


Esquema 19 – Mecanismo proposto para a reação de síntese da harmana.

Através da análise dos espectros de RMN-¹H e RMN-¹³C foi possível confirmar a formação do produto desejado (NH δ 11,58 e CH₃ 2,78). Com isto, **1** pôde ser então utilizado para a síntese dos diferentes sais propostos (2-5), através da alquilação do nitrogênio piridínico com os diferentes haletos de benzilas previamente sintetizados.

5.3 - Síntese do fenil-pirido-indol (6)

A síntese dos novos derivados iniciou-se com a triptamina, quando esta reagiu em meio ácido com o benzaldeído (**Esquema 20**). Em meio ácido (pH próximo de 4), ocorre a protonação do oxigênio da carbonila do aldeído, preferencialmente ao nitrogênio indolil etanamínico da piridina. Isto favorece o ataque nucleofílico deste nitrogênio ao carbono carbonílico do benzaldeído, visto que agora o carbono carbonílico é mais eletrofílico.

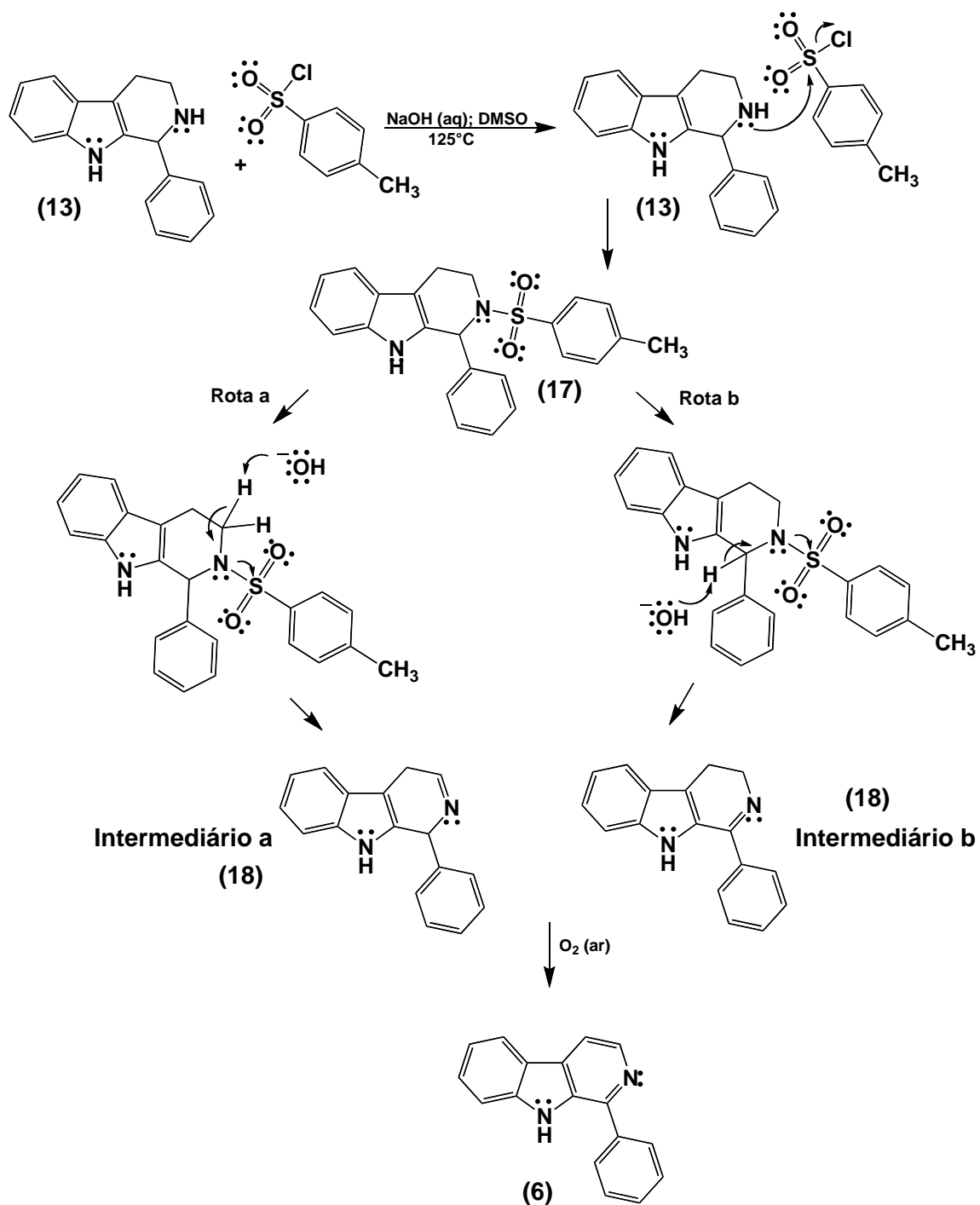


Esquema 20 – Mecanismo proposto para a reação de formação do 1-fenil-2,3,4,9-tetraidro-1H-pirido[3,4-b]indol (13)

O produto 1-fenil-2,3,4,9-tetraidro-1H-pirido[3,4-b]indol (**13**), foi obtido como um sólido amorfo de coloração amarelada com 88% de rendimento. O espectro de RMN de ¹H (anexo 1), obtido em D₂O no aparelho de 500 MHz mostra um simpleto em 5,6 ppm correspondente ao Ph-CH-NH, confirmando a formação do heterociclo conjugado ao núcleo indólico.

Prosseguindo com a rota sintética para a obtenção do fenil-pirido-indol, oxidou-se o anel heterocíclico conjugado ao grupo indol (**13**) através da metodologia também descrita por

Dong e colaboradores (DONG *et al.*, 2010). O esquema 21 mostra o mecanismo proposto para esta reação.



Esquema 21 – Mecanismo de reação proposto para a obtenção do 1-fenil-9H-pirido[3,4-b]indol (6).

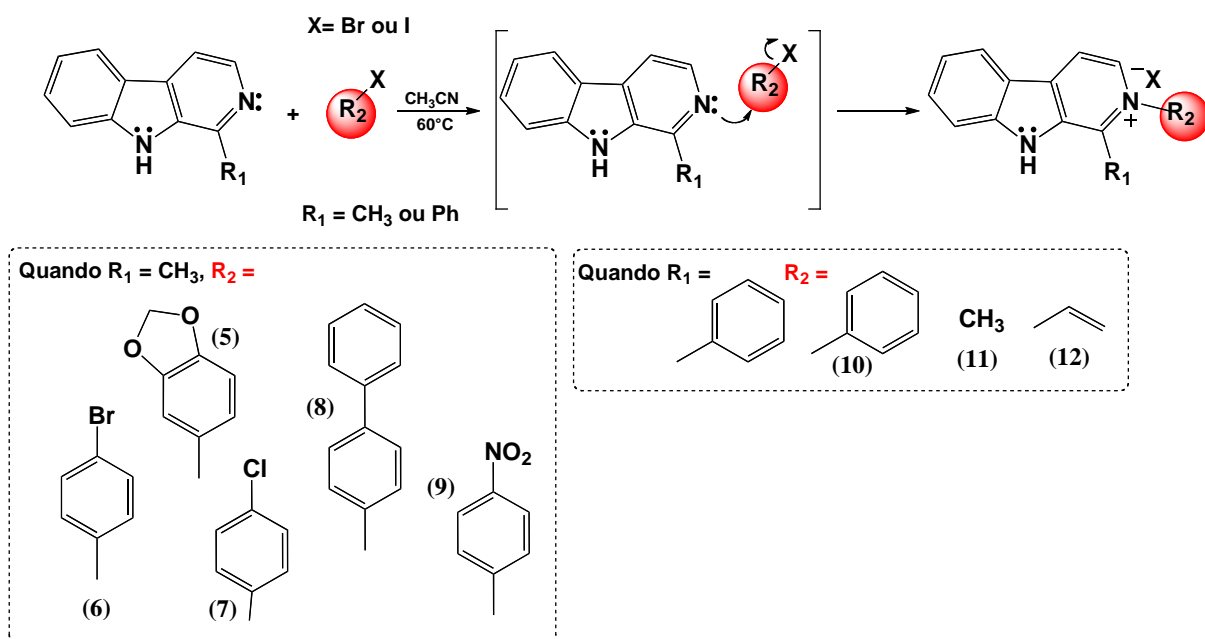
Neste mecanismo o intermediário *N*-tosilado possui dois sítios hidrogenados passíveis ao ataque do grupo do ânion hidroxila. Sendo o hidrogênio 3 o mais ácido, visto que este está mais próximo do nitrogênio do núcleo indólico e do piridínico, além de ser bis-benzílico, acredita-se que este seja preferencialmente abstraído (rota b). Após a formação do intermediário b que, ao longo da reação que é então oxidado, formando o fenil-pirido-indol desejado (6).

O espectro de RMN-¹H obtido em DMSO-d₆ do fenil-pirido-indol mostra dois multipletos. Um em 7,5 ppm correspondentes aos sete hidrogênios aromáticos mais blindados eletronicamente (H7-H8-H1'-H2'-H3'-H4'-H5'). Os outros cinco hidrogênios mais desblindados situam-se em 8,3 ppm (H3-H4-H5-H6-H7). Como o espectro foi adquirido em DMSO-d₆, foi possível observar o sinal de N-H em 11,5 ppm.

O fenil-pirido-indol, obtido como um sólido amorfo de coloração amarela com 94% de rendimento, foi utilizado na rota sintética para a obtenção dos sais de benzila (8), metila (9) e alila (10) e propostos.

5.4 - Síntese dos sais da harmana e sais fenil-pirido-indois

O mecanismo de obtenção dos sais da harmana e do fenil-pirido-indol envolvem uma reação de substituição nucleofílica do tipo 2 (S_N2), como mostra o **esquema 22**. Embora fosse esperado a possibilidade de que os sais de benzila e alila reagissem por um mecanismo também S_N1, aparentemente o mecanismo preferencial é a S_N2, visto que para a síntese destes sais, ao modificarmos o meio reacional através da troca da acetonitrila pelo etanol e metanol (reagentes que favorecem S_N1), não observamos a formação dos produtos desejados, mesmo após 24 horas de reação. Isto nos levou a crer que o mecanismo envolvido na reação, de fato é S_N2.



Esquema 22 – Mecanismo de reação proposto para a síntese dos sais da harmana e dos fenil-pirido-indóis.

Os espectros de RMN ^1H obtidos em D_2O dos compostos confirmam a formação dos produtos. No espectro do sal de metila do fenil-pirido-indol (8) é possível verificar o simpleto em 3,13 ppm correspondente à metila, que está altamente desblindada devido a ligação com o nitrogênio, formando um sal de amônio quaternário.

No espectro do sal alila do fenil-pirido-indol (9) observa-se um duplo-duplete em 5,0 ppm dos hidrogênios metilênicos $\text{CH}-\underline{\text{CH}}_2$. Um duplo-duplete em 5,3 ppm dos hidrogênios metilênicos $\text{N}-\underline{\text{CH}}_2-\text{CH}$ altamente desblindados devido a ligação com o nitrogênio, formando um sal de amônio quaternário. Observa-se também um multiplete do hidrogênio metínico em 5,95 ppm. No espectro de RMN ^{13}C obtido em $\text{DMSO}-d_6$, verifica-se também um sinal em 59 ppm, correspondente ao metileno do grupo alila, altamente desblindado.

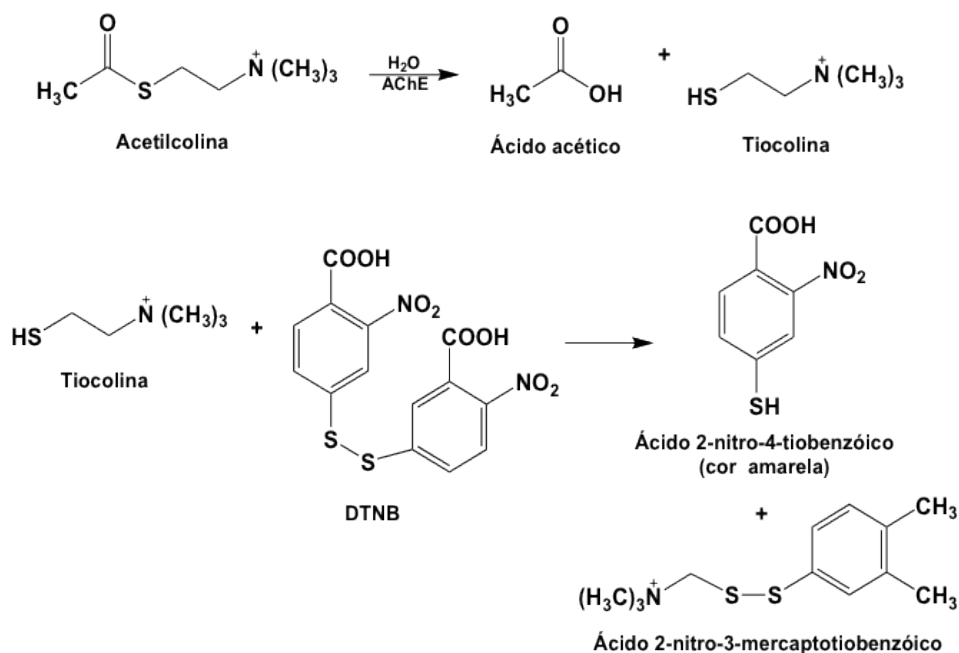
No espectro do sal de benzila do fenil-pirido-indol (7) observa-se o simpleto em 5,8 ppm dos hidrogênios metilênicos da benzila, que estão altamente desblindados devido a ligação com o nitrogênio, formando um sal de amônio quaternário. RMN ^{13}C obtido em D_2O observa-se um sinal em 60 ppm correspondente ao metileno do grupo benzila altamente desblindado.

5.5 - Avaliação da atividade anticolinesterásica

Os alcalóides β -carbolínicos vêm sendo descritos na literatura devido ao seu uso como inibidores de acetilcolinesterase, especialmente os sais de amônio quaternário, que apresentam melhor atividade em comparação com as aminas livres. (BECHER *et al.*, 2009; SCHOTT *et al.*, 2006). A razão para esta diferença de atividade entre as formas neutras e catiônicas ainda não são bem descritas mas sabe-se que, que a carga positiva dos derivados β -carbolínicos não mimetiza a subunidade colínica dos substratos endógenos (TORRES *et al.*, 2012), ao contrário do que acreditava-se (GHOSAL *et al.*, 1972; GEISSLER *et al.*, 2010).

Torres, em sua dissertação de mestrado (TORRES, 2011), avaliou a atividade anticolinesterásica de diferentes sais da harmana. Dentre estes, o sal de benzila da harmana demonstrou ser um dos mais ativos da série, inibindo AChE e BChE com CI_{50} de $1,74 \pm 0,035$ e $2,62 \pm 0,021 \mu M$, respectivamente.

Neste trabalho, buscou-se avaliar o efeito de diferentes substituintes no anel benzílico desses sais da harmana, além da avaliação do efeito da substituição da metila pela fenila no anel β -carbolínicos. Os ensaios para a avaliação da atividade anticolinesterásica foram realizados através da modificação do método de Ellman (ELLMAN *et al.*, 1961). Neste ensaio colorimétrico, as enzimas acetilcolinesterase ou butirilcolinesterase hidrolisam a acetilcolina em ácido acético e tiocolina. A tiocolina, por sua vez, reage com o 5,5'-ditiobis-[2-nitrobenzóico] (DTNB ou reagente de Ellman) gerando o ácido 2-nitro-4-tiobenzóico que tem coloração amarela (**Esquema 23**).



Esquema 23 : Reações envolvidas no método de Ellman.

Inicialmente, adicionou-se às cavidades o iodeto de acetilcolina ou iodeto de tiobutirilcolina, o DTNB, o tampão 0,1% BSA, os compostos em diferentes concentrações (nas cavidades de teste) e etanol (nas cavidades de controle, onde a enzima não é inibida, ou seja, trabalha-se com 100% de atividade enzimática). Após isto, fez-se a primeira leitura da absorvância. Esta leitura constituiu o branco da avaliação, ou seja, os valores obtidos nesta leitura são os valores descontados na leitura final (após a hidrólise enzimática). Em seguida, adicionou-se a acetilcolinesterase às cavidades e novamente os valores de absorvância foram medidos, contudo de tempos em tempos (a cada 13 segundos fez-se uma nova leitura, por três vezes seguidas). Dos valores de absorvância obtidos nestas leituras, subtraiu-se o valor do branco de cada cavidade. Como os ensaios foram feitos em triplicata, em seguida, calculou-se a média de absorvância para cada uma destas. Assim sendo, cada concentração possuiu três valores de média nas três leituras observadas. **A tabela 3** mostra os cálculos feitos para o sal de benzila do fenil-pirido-indol (6) como exemplo da metodologia aplicada.

Tabela 3 – Valores de absorvâncias e concentrações do sal de benzila da fenil-harmana (7) utilizados para o cálculo do percentual de inibição da AChE.

		Absorvâncias da 1° leitura			
Concentração do sal de benzila (μM)	Média \pm dp*1° triplicata	Média \pm dp*2° triplicata	Média \pm dp*3° triplicata	Média \pm dp*Controle	
10	0,337 \pm 0,00	0,328 \pm 0,00	0,328 \pm 0,01	0,494 \pm 0,01	
15	0,335 \pm 0,00	0,324 \pm 0,00	0,305 \pm 0,00	0,522 \pm 0,02	
20	0,273 \pm 0,01	0,260 \pm 0,00	0,256 \pm 0,01	0,489 \pm 0,02	
		Absorvâncias da 2° leitura			
Concentração do sal de benzila (μM)	Média \pm dp*1° triplicata	Média \pm dp*2° triplicata	Média \pm dp*3° triplicata	Média \pm dp*Controle	
10	0,380 \pm 0,00	0,366 \pm 0,01	0,367 \pm 0,01	0,553 \pm 0,01	
15	0,371 \pm 0,00	0,361 \pm 0,00	0,340 \pm 0,00	0,582 \pm 0,01	
20	0,307 \pm 0,01	0,290 \pm 0,01	0,289 \pm 0,01	0,548 \pm 0,02	
		Absorvâncias da 3° leitura			
Concentração do sal de benzila (μM)	Média \pm dp*1° triplicata	Média \pm dp*2° triplicata	Média \pm dp*3° triplicata	Média \pm dp*Controle	
10	0,417 \pm 0,00	0,402 \pm 0,01	0,406 \pm 0,01	0,615 \pm 0,01	
15	0,407 \pm 0,00	0,399 \pm 0,01	0,375 \pm 0,00	0,643 \pm 0,00	
20	0,339 \pm 0,01	0,322 \pm 0,01	0,320 \pm 0,01	0,605 \pm 0,02	

*dp = Desvio-padrão.

Desta maneira, a absorvância observada refletiu diretamente a atividade enzimática (a enzima, no volume em que é adicionada não possui valor de absorvância relevante). Com isto foi possível comparar os valores de cada triplicata com o valor da triplicata do controle e calcular o percentual de inibição da seguinte maneira:

$$\text{Percentual de inibição} = 100 - (\text{Tc} \times 100 / \text{Xt})$$

Onde: Tc = Triplicata do controle; Xt = média da triplicata da concentração ser calculada;

Por exemplo, a primeira triplicata na concentração 10 μM na primeira leitura: Percentual de inibição = $100 - (0,494 \times 100 / 0,337) = 31,74$.

O mesmo foi feito para todas as triplicatas das demais concentrações. Com os valores obtidos calculou-se a média das triplicatas nas três leituras e o desvio-padrão correspondente. A tabela abaixo mostra o percentual de inibição de acetilcolinesterase do sal de benzila (7) nas diferentes concentrações testadas.

Tabela 4 – Percentual de inibição de AChE pelo sal de benzila do fenil-pirido-indol (7).

Concentração (μM)	% Inibição \pm dp*
10	33,25 \pm 0,38
15	38,69 \pm 0,19
20	46,07 \pm 0,10
25	52,97 \pm 0,24
30	57,76 \pm 0,23
35	60,52 \pm 0,30
40	64,98 \pm 0,35

*dp = desvio padrão

A partir da porcentagem de inibição calculada para no mínimo três concentrações diferentes, foi possível confeccionar os gráficos (concentração x porcentagem de inibição), e utilizando o modelo matemático de regressão linear foram calculados os valores de CI_{50}

(concentração efetiva que inibe 50% da atividade enzimática) conforme ilustrado na **Figura 19**.

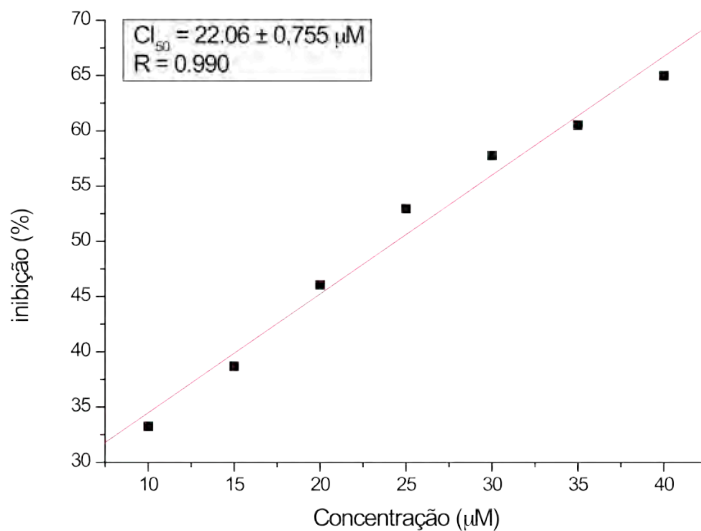


Figura 23: Inibição de AChE pelo composto 7.

Da mesma forma procedeu-se com os outros compostos sintetizados, como pode ser observado nas tabelas e gráficos abaixo.

Tabela 5: Percentual de inibição de AChE pelo composto 2.

Concentração (µM)	% Inibição±dp*
3	31,45 ± 0,44
5	41,44 ± 0,27
8	51,86 ± 0,09
10	63,63 ± 0,11

*dp = desvio padrão

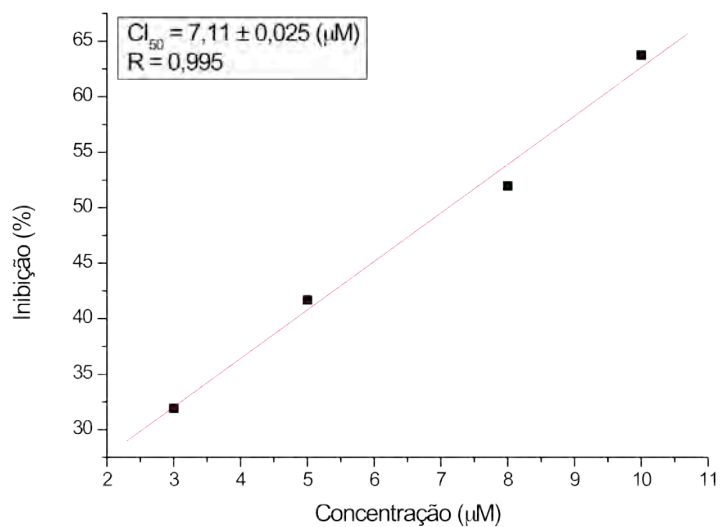


Figura 24: Inibição de AChE pelo composto 2.

Tabela 6: Percentual de inibição de AChE pelo composto 3 .

Concentração (µM)	% Inibição±dp*
1	20,43±0,1990,370,37
3	36,09±0,21
5	45,69±0,06
6	53,51±0,02
8	61,86±0,06

*dp = desvio padrão

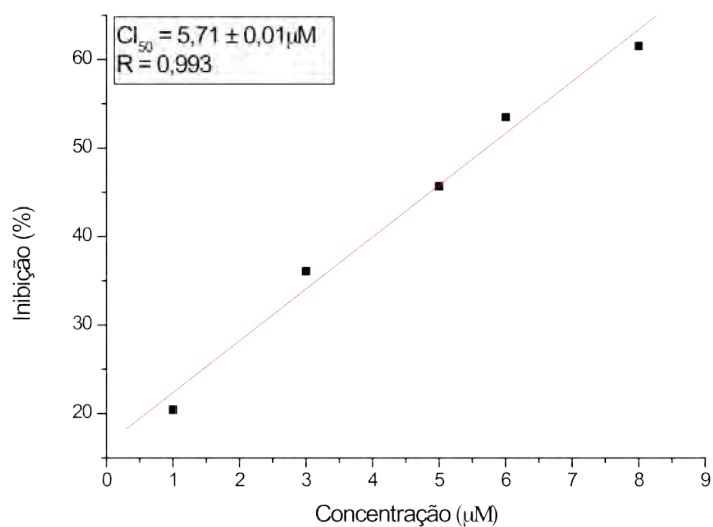


Figura 25: Inibição de AChE pelo composto 3.

Tabela 7: Percentual de inibição de AChE pelo composto 4.

Concentração (µM)	% Inibição±dp*
2	27,17±0,390,370,37
4	34,45±0,23
10	54,93±0,42
13	65,46±0,17
15	67,60±0,06

*dp = desvio padrão

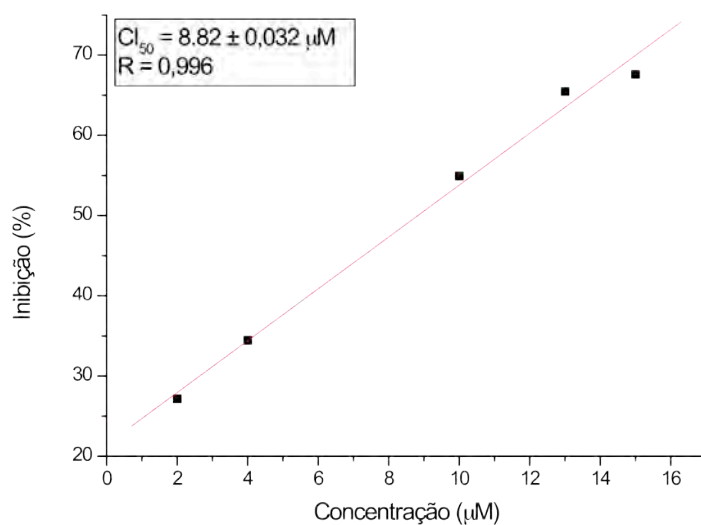


Figura 26: Inibição de AChE pelo composto 4.

Tabela 8: Percentual de inibição de AChE pelo composto 5.

Concentração (µM)	% Inibição±dp*
1	36,53±0,330,370,37
1,5	45,96±0,28
2	52,63±0,29
2,5	59,58±0,17
3	63,66±0,08

*dp = desvio padrão

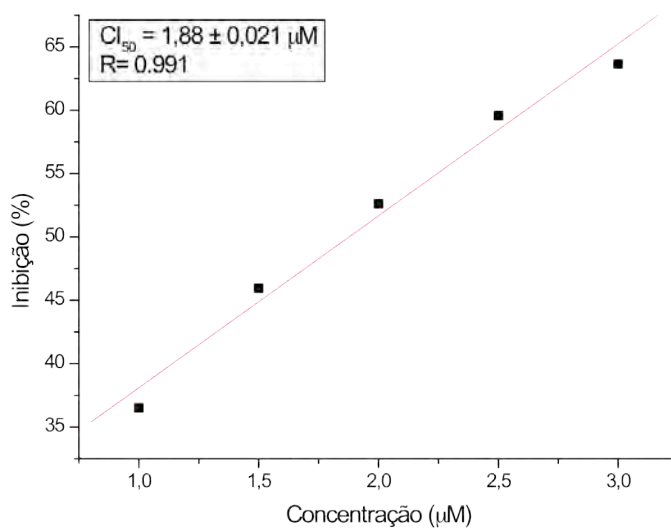


Figura 27: Inibição de AChE pelo composto 5.

Tabela 9: Percentual de inibição de AChE pelo composto 8.

Concentração (µM)	% Inibição±dp*
20	34,84±0,11
30	40,98±0,20
40	44,55±0,21
70	58,00±0,17
80	62,38±0,06

*dp = desvio padrão

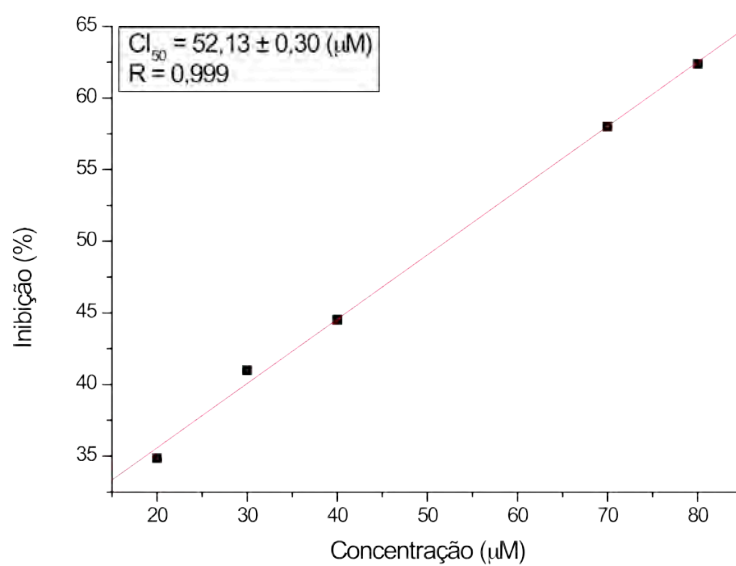


Figura 28: Inibição de AChE pelo composto 8.

Tabela 10: Percentual de inibição de AChE pelo composto 9.

Concentração (µM)	%Inibição±dp*
5	19,13±0,
10	31,12±0,
15	39,59±0,
20	44,88±0,
25	53,53±0,

*dp = desvio padrão

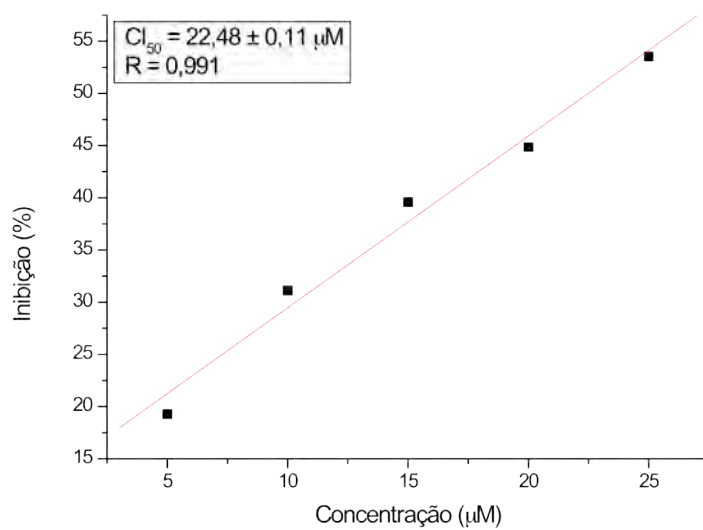


Figura 29: Inibição de AChE pelo composto 9.

Tabela 11: Percentual de inibição de BChE pelo composto 2.

Concentração (µM)	% Inibição±dp*
4	42,14±0,23
4,5	41,86±0,17
5	52,04±0,11
6,5	67,41±0,12

*dp = desvio padrão

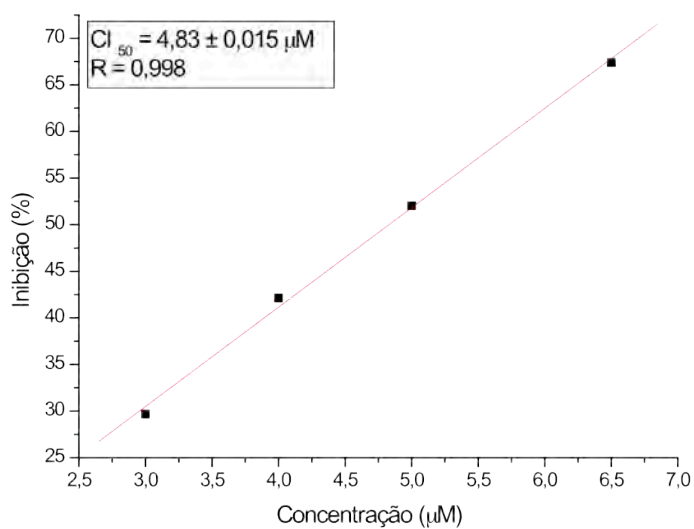


Figura 30: Inibição de BChE pelo composto 2.

Tabela 12: Percentual de inibição de BChE pelo composto 3.

Concentração (μM)	% Inibição±dp*
4	42,96±0,25
4,5	47,67±0,19
5	53,60±0,09
6,5	63,98±0,17
8	74,20±0,16

*dp = desvio padrão

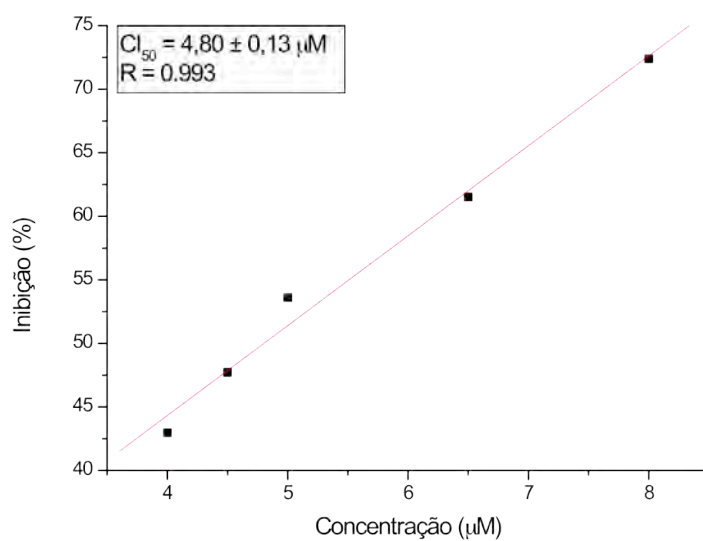


Figura 31: Inibição de BChE pelo composto 3.

Tabela 13: Percentual de inibição de BChE pelo composto 4.

Concentração (µM)	% Inibição±dp*
3	21,28±0,06
5	28,97±0,43
7	38,85±0,26
9	43,86±0,52
11	50,72±0,52
13	55,73±0,28
14	62,30±0,27

*dp = desvio padrão

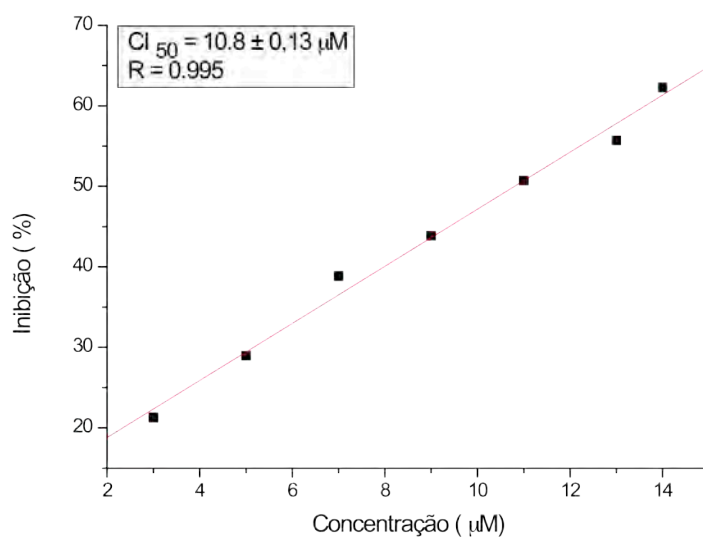


Figura 32: Inibição de BChE pelo composto 4.

Tabela 14: Percentual de inibição de BChE pelo composto 5.

Concentração (µM)	% Inibição±dp*
0,8	35,19±0,05
1	39,33±0,23
1,5	49,53±0,32
2,0	54,84±0,37
2,5	70,40±0,23

*dp = desvio padrão

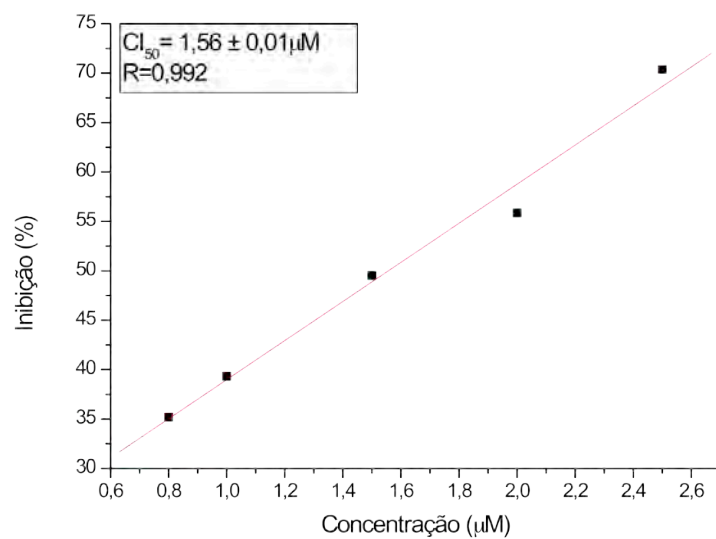


Figura 33: Inibição de BChE pelo composto 5.

Tabela 15: Percentual de inibição de BChE pelo composto 7.

Concentração (µM)	%Inibição±dp*
0,5	30,67±
1	43,85±
1,5	51,23±
2	58,04±
2,5	67,10±

*dp = desvio padrão

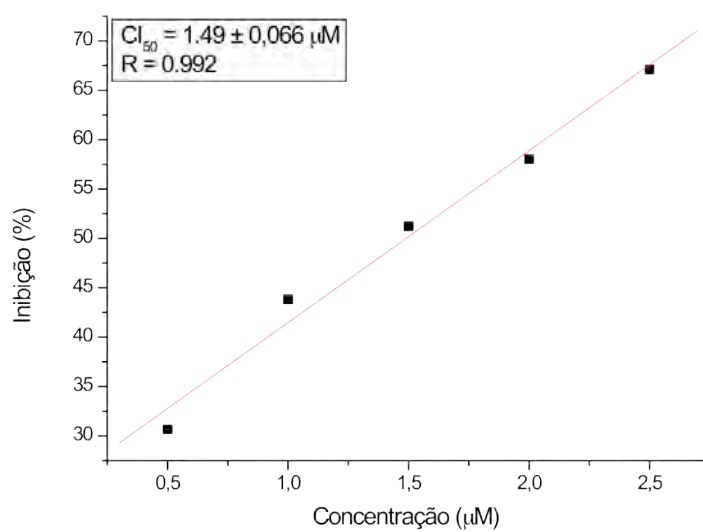


Figura 34: Inibição de BChE pelo composto 7.

Tabela 16: Percentual de inibição de BChE pelo composto 8.

Concentração (µM)	%Inibição±dp*
10	26,32±0,22
20	40,69±0,15
30	55,60±0,07
35	61,36±0,02
40	64,66±0,02
45	70,89±0,01

*dp = desvio padrão

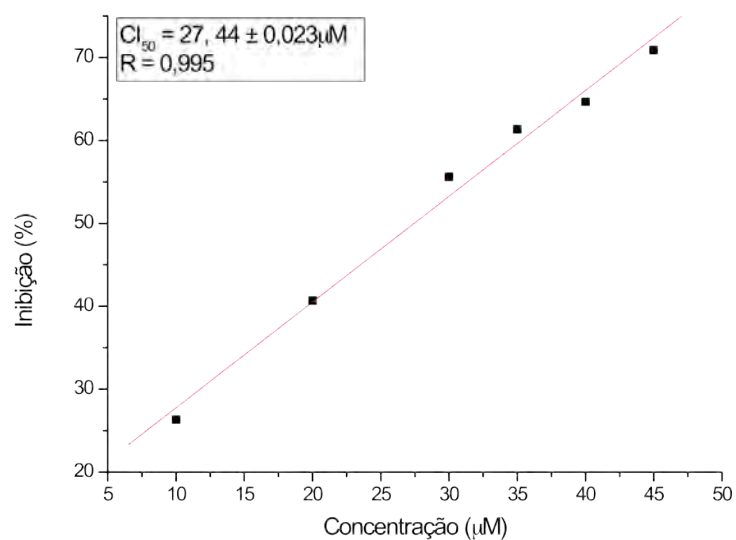


Figura 35: Inibição de BChE pelo composto 8.

Tabela 17: Percentual de inibição de BChE pelo composto 9.

Concentração (µM)	%Inibição±dp*
7	23,05±
11	30,83±
15	34,24±
19	36,73±
23	43,44±
27	47,85±
30	51,11±
34	53,61±

*dp = desvio padrão

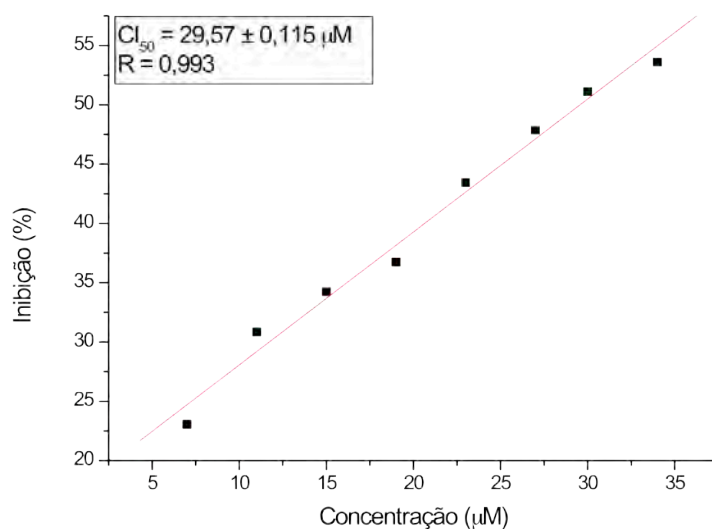
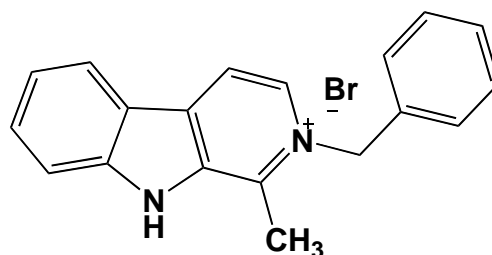


Figura 36: Inibição de BChE pelo composto 9.

Como é possível observar, todos os derivados forneceram ótimos valores de CI_{50} tanto para AChE quanto para BChE, sendo menores que os valores de CI_{50} apresentados pela harmana Tabela X) Os compostos **2**, **4** e **5** forneceram valores de CI_{50} próximos ao da fisostigmina (um conhecido inibidor de colinesterases) e galantamina ($CI_{50}=8,70\pm 0,05\mu M$ em AChE) e ($CI_{50}=24,4\pm 2,84\mu M$ em BChE), um dos fármacos utilizados comercialmente para o tratamento da DA (BECHER *et al.*, 2005; GEISSLER *et al.*, 2010). O composto **3** merece especial destaque pois mostrou um valor menor de CI_{50} tanto para AChE quanto para BChE. Torres em sua dissertação de mestrado mostrou que o sal de benzila da harmana possui valores de CI_{50} igualmente baixos ($1,74\pm 0,035\mu M$ para AChE e $2,62\pm 0,021\mu M$ para BChE).

Os resultados dos ensaios dos compostos **2**, **3** e **4** mostram que o aumento do volume estérico na região *para* do anel benzílico, através da introdução de grupos retiradores de elétrons como Br, Cl e NO_2 , respectivamente, não otimizou as propriedades anticolinesterásicas desta classe de compostos, tendo como padrão comparativo o sal de benzila da harmana. No entanto, aparentemente esta redução na atividade inibitória não é devida ao volume dos grupos substituintes, pois o composto **5** (*para* fenila) apresentou atividade inibitória semelhante ao protótipo **7** ($CI_{50} = 1,88\pm 0,035$ e $1,65\pm 0,035$ em AChE e BChE, respectivamente). A redução da atividade quando da introdução de grupos elétron-retiradores pode estar relacionada com uma possível redução da densidade eletrônica do anel benzílico, o que pode acarretar em redução das interações hidrofóbicas realizadas pela nuvem

π com o sítio das colinesterases. Possivelmente a introdução de grupos doadores de elétrons poderia aumentar a atividade, o que está sendo investigado no momento.



Sal de benzila da harmana

Tabela 18: Valores de CI_{50} para os compostos avaliados quanto à atividade inibitória da AChE e BChE.

Compostos	AChE	BChE	Seletividade
	$CI_{50}(\mu M) \pm *dp$	$CI_{50}(\mu M) \pm *dp$	$(CI_{50} BChE/CI_{50}AChE)$
Harmana	$380 \pm 0,005$	$90,0 \pm 0,0002$	0,236
2	$7,11 \pm 0,018$	$4,83 \pm 0,037$	0,679
3	$5,71 \pm 0,049$	$4,80 \pm 0,016$	0,84
4	$8,82 \pm 0,032$	$10,8 \pm 0,004$	1,22
5	$1,88 \pm 0,027$	$1,56 \pm 0,084$	0,823
7	$22,06 \pm 0,037$	$1,49 \pm 0,172$	0,067
8	$52,13 \pm 0,028$	$27,44 \pm 0,052$	0,526
9	$22,48 \pm 0,195$	$29,57 \pm 0,043$	1,31
Fisostigmina	$1,56 \pm 0,067$	$3,70 \pm 0,320$	2,370

*dp = desvio padrão

De acordo com a **Tabela 21**, é possível observar que a seletividade, ou seja, a afinidade dos compostos pelas enzimas pode ser levemente modificado pela natureza dos grupos adicionados ao nitrogênio piridínico, formando o sal de amônio quaternário. Em estudos anteriores, observou-se que grupos alifáticos de pequeno volume, tais como os sais de metila e etila da harmana, favoreciam a inibição da BChE. Por outro lado, grupos alifáticos volumosos tal como o sal de butila, favoreciam a inibição da AChE. (TORRES et. al., 2012). Através destes resultados é possível observar que não somente o volume do substituinte impacta diretamente na atividade e na seletividade desta classe de compostos, mas também a natureza eletrônica.

Estudos anteriores mostraram que a adição do anel de benzila, para formação do sal de amônio quaternário, favorecia o aumento da atividade em ambas as enzimas estudadas (TORRES et. al., 2012), mas levando a uma leve seletividade pela AChE. Tendo em vista que todos os sais da harmana são sais de benzila substituídos, foi possível avaliar a contribuição de cada substituinte na região *para* a estes anéis, como discutido anteriormente. Sendo assim, grupos retiradores de elétrons tais como NO₂, Cl e Br, tendem a diminuir a interação destes compostos com as colinesterases, se comparado às interações observadas para o sal de benzila da harmana, que apresenta uma $CI_{50} = 1,74 \pm 0,035$ e $2,62 \pm 0,021$ para AChE e BChE, respectivamente (TORRES, 2011). É interessante notar também que estas substituições tornaram os **compostos 2, 3 e 4** menos seletivos. Estes resultados indicam que a seletividade pode ser modulada, como pode ser observado nos dados expostos na **Tabela 20**.

A substituição da metila pela fenila na síntese dos sais do fenil-pirido-indol, embora não tenha levado a perda da atividade, não se mostrou favorável pois todos os sais apresentaram menor atividade em AChE. Contudo o sal de benzila desta classe de compostos (7), mostrou-se altamente seletivo por BChE, indicando que a esta classe pode ser explorada para novos compostos inibidores seletivos da BChE..

5.6 - Cinética Enzimática

A cinética enzimática foi realizada segundo o método de Ellman já descrito na parte experimental deste trabalho (FRANCIS *et al.*, 1999; BAYNES, 1991). Um exemplo da metodologia de cálculo utilizado para avaliação da cinética enzimática pode ser observado na **Tabela 22**, que mostra os valores de $1/V_0$ e $1/[S]$ obtidos para o composto **7**. Com estes valores confeccionou-se então o gráfico de Lineweaver-Burk (**Figura 35**). Como descrito

anteriormente na introdução, o formato do gráfico obtido mostra de forma clara e objetiva, o tipo de inibição que ocorre.

Tabela 19: Valores de $1/V^{\circ}$ e $1/[S]$ para o composto 7 como demonstrativo de cálculo da cinética enzimática de AChE.

$1/[S]$	$1/V^{\circ} \pm dp^*$ (Controle)	$1/V^{\circ}(5\mu M) \pm dp^*$	$1/V^{\circ}(10\mu M) \pm dp^*$
25,00	6,613 \pm 0,023	12,397 \pm 0,021	19,867 \pm 0,007
20,00	5,772 \pm 0,018	11,598 \pm 0,012	16,90 \pm 0,002
11,76	3,828 \pm 0,049	7,281 \pm 0,040	11,734 \pm 0,006
10,00	3,460 \pm 0,032	6,401 \pm 0,021	10,251 \pm 0,003
6,66	2,632 \pm 0,027	4,969 \pm 0,023	7,550 \pm 0,012
5,649	2,448 \pm 0,029	4,449 \pm 0,054	6,982 \pm 0,007
5,00	2,341 \pm 0,017	3,981 \pm 0,030	6,716 \pm 0,018
4,545	2,236 \pm 0,059	3,916 \pm 0,047	6,736 \pm 0,040
4,166	2,103 \pm 0,018	3,937 \pm 0,038	6,102 \pm 0,021
4,00	1,979 \pm 0,015	3,762 \pm 0,011	5,890 \pm 0,027

dp*=desvio padrão

O mesmo procedimento foi adotado para todos os sais sintetizados para ambas as enzimas, como pode ser observado nos gráficos a seguir.

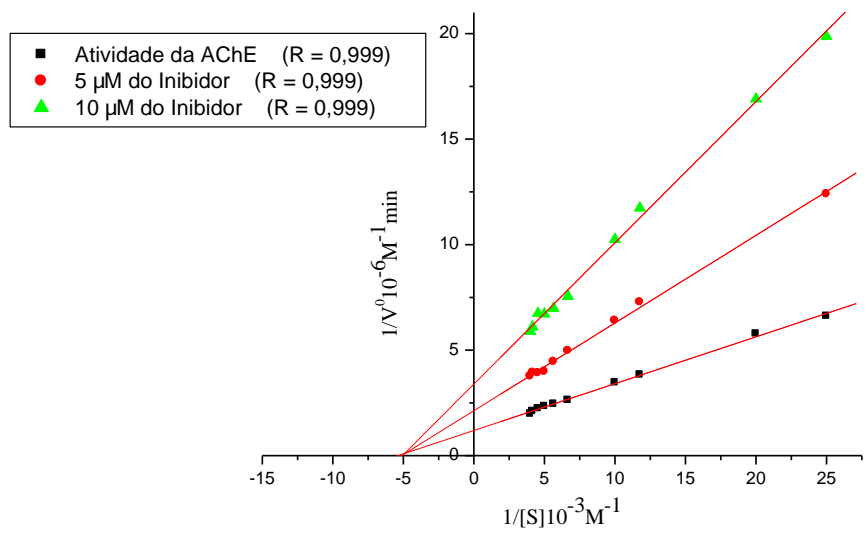


Figura 37: Cinética de inibição de AChE pelo composto 7.

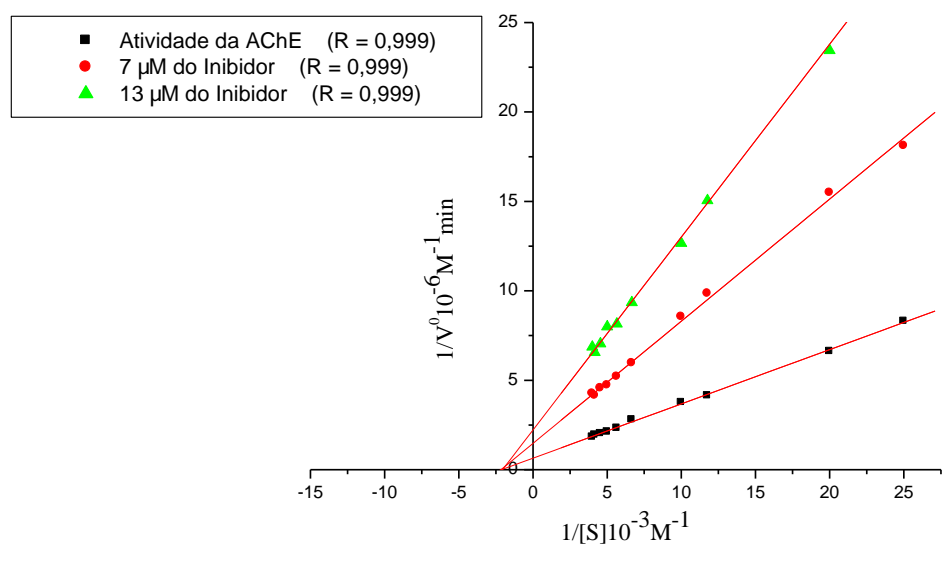


Figura 38: Cinética de inibição de AChE pelo composto 2.

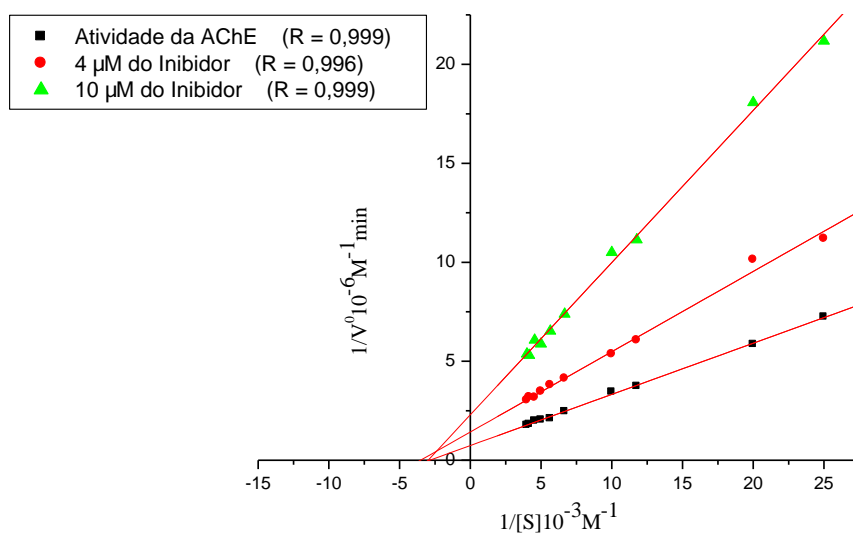


Figura 39: Cinética de inibição de AChE pelo composto 4.

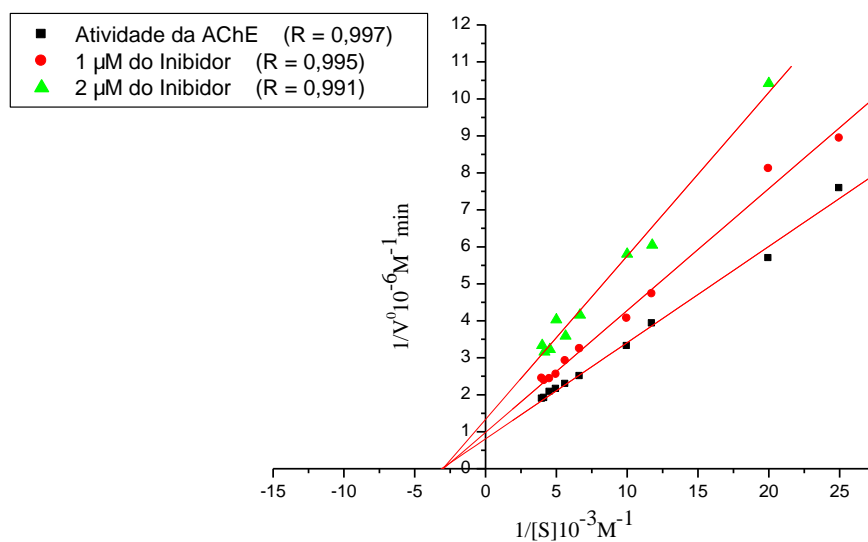


Figura 40: Cinética de inibição de AChE pelo composto 5.

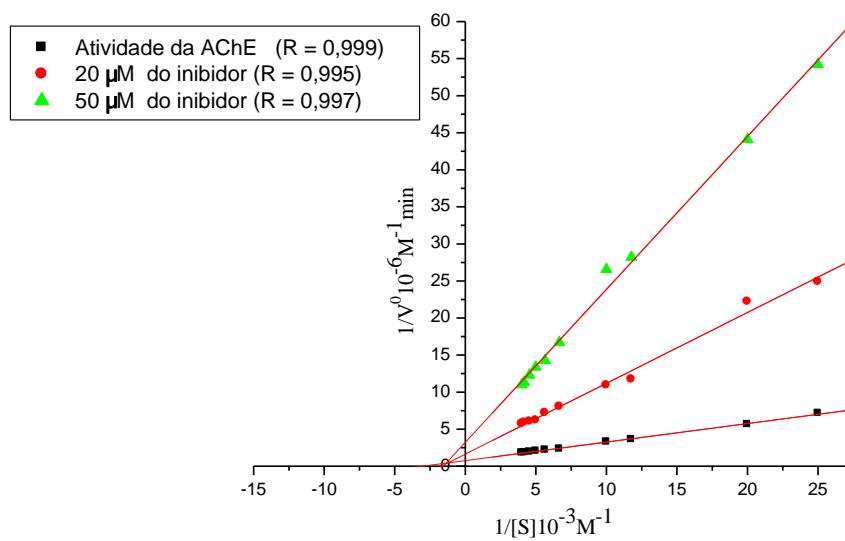


Figura 41: Cinética de inibição de AChE pelo composto 8.

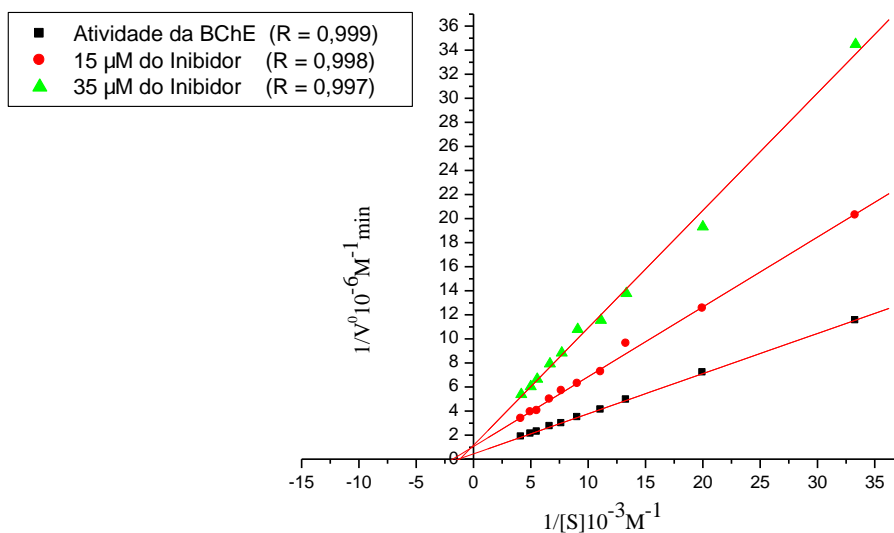


Figura 42: Cinética de inibição de AChE pelo composto 9.

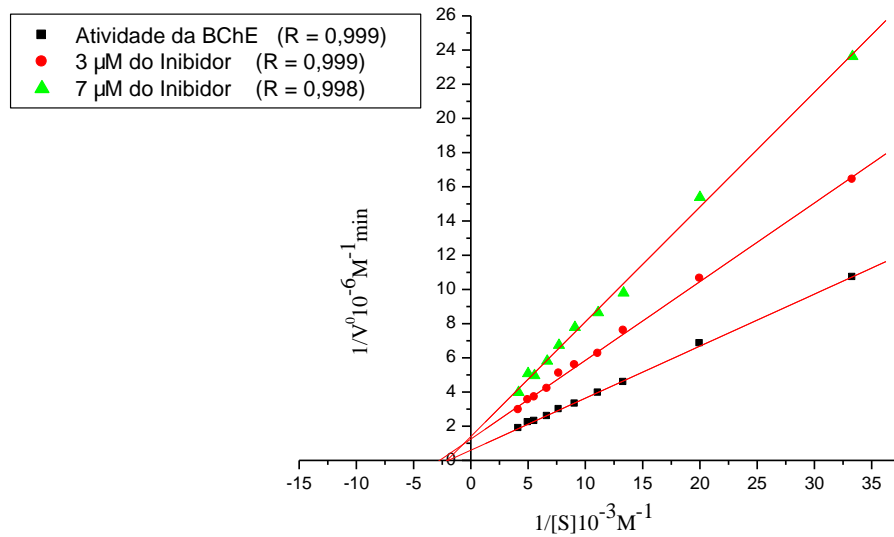


Figura 43: Cinética de inibição de BChE pelo composto 2.

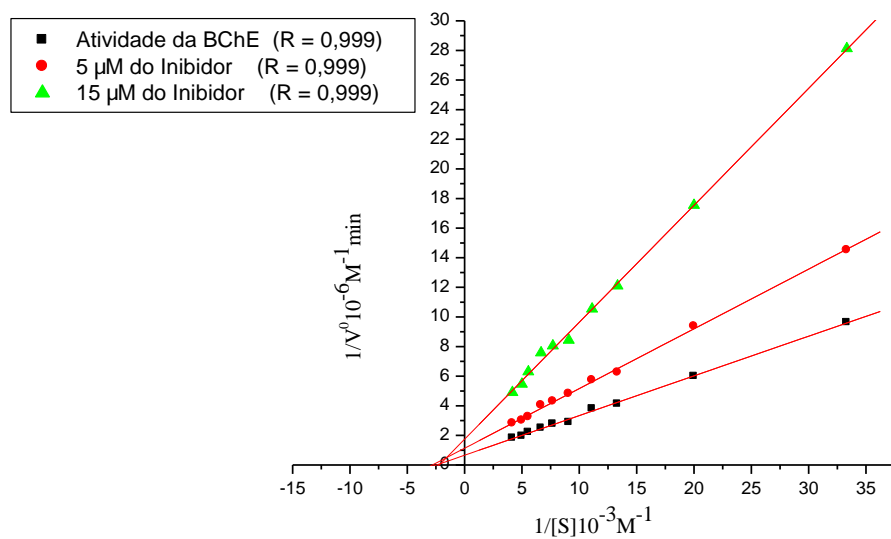


Figura 44: Cinética de inibição de BChE pelo composto 4.

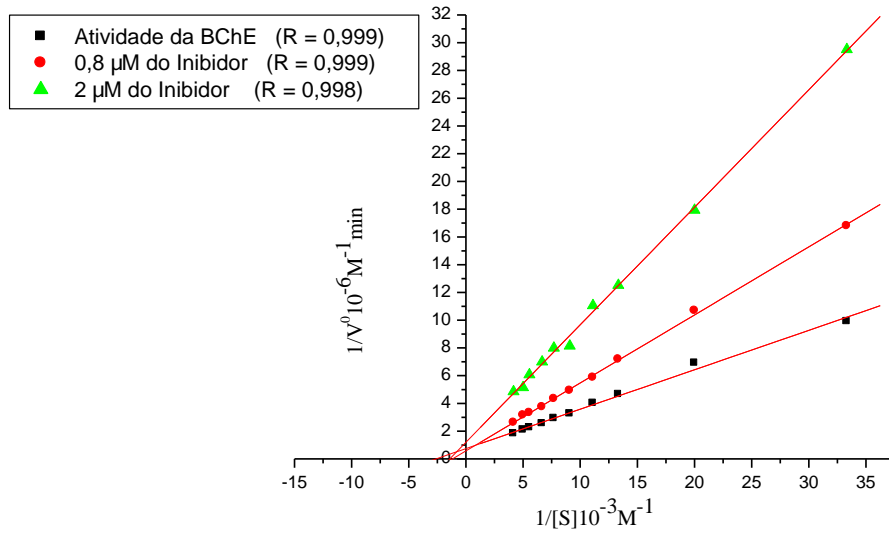


Figura 45: Cinética de inibição de BChE pelo composto 5.

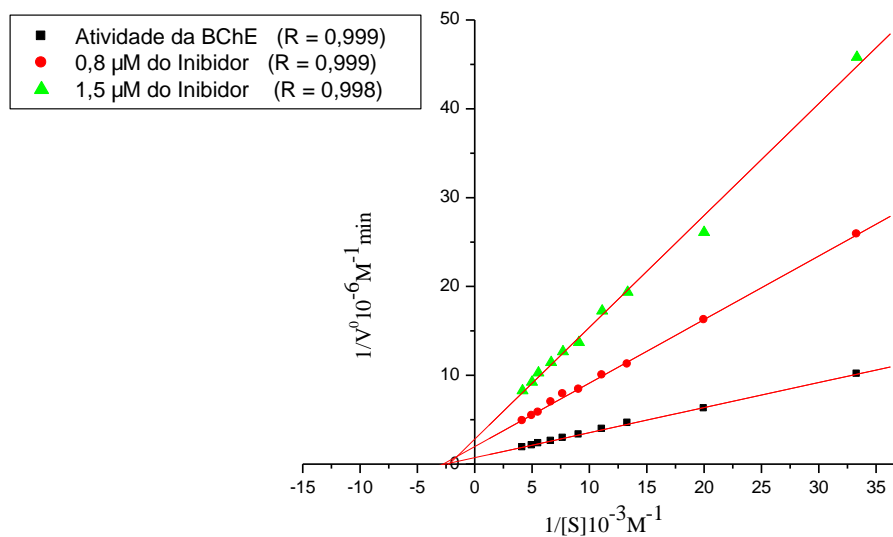


Figura 46: Cinética de inibição de BChE pelo composto 7.

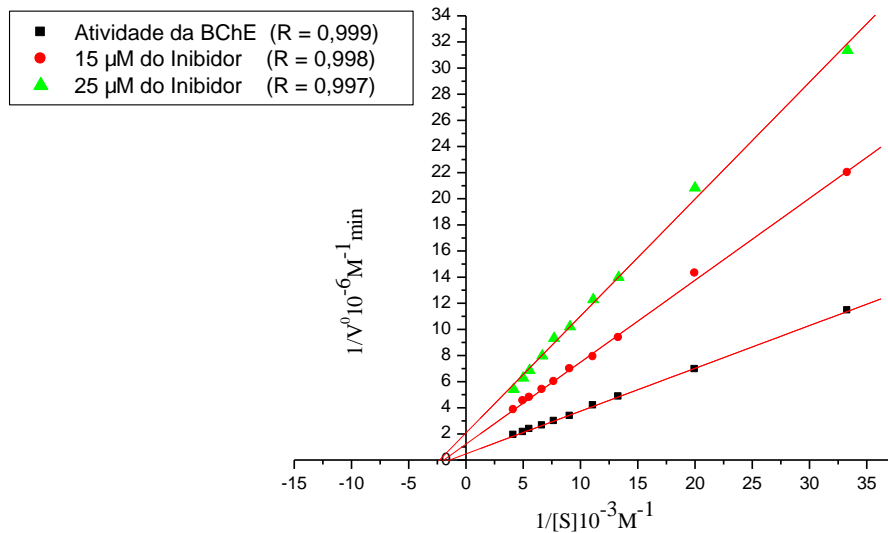


Figura 47: Cinética de inibição de BChE pelo composto 8.

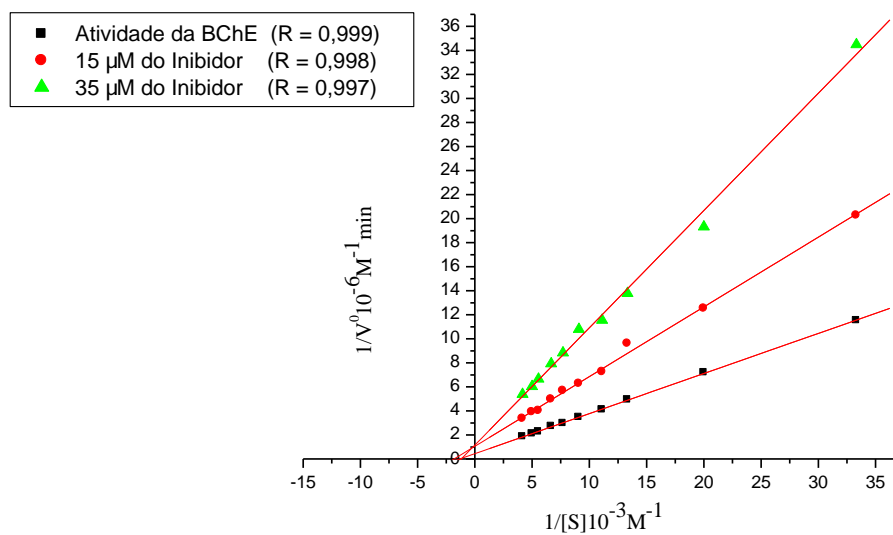


Figura 48: Cinética de inibição de BChE pelo composto 9.

Com base neste estudo cinético pode-se observar que todos os compostos analisados agem como inibidores reversíveis não competitivos, que são caracterizados pela interação do inibidor em um sítio próprio de ligação, e não no sítio ativo da enzima. Estes dados corroboram com os dados recentemente publicados na literatura para esta classe de compostos (TORRES *et al.*, 2012). Tendo observado este tipo de inibição, foi possível estimar o valor de K_i como sendo igual ao valor de CI_{50} (CHENG & PRUSSOF, 1973).

Torres e colaboradores observaram também que os sais dos compostos β -carbolínicos atuam inibindo a enzima provavelmente em um sítio aniônico próximo à entrada do canal onde está o sítio ativo, o que explica a diferença entre os valores de CI_{50} da harmana e dos seus derivados. Não tendo carga positiva em sua estrutura, a harmana atua inibindo as enzimas apenas por interações de Van der Waals, já os seus derivados que possuem uma carga positiva em sua estrutura, atuam inibindo as enzimas neste centro aniônico por interações iônicas que são muito mais fortes que as de Van der Waals.

A **Tabela 24** correlaciona o valor de CI_{50} com o valor de K_i para uma inibição do tipo não competitiva.

5.3 - Análise da interação via STD-RMN

Os ensaios de STD foram feitos para alguns dos compostos sintetizados e mostraram que os anéis aromáticos β -carbolínico e benzílico interagem com maior proximidade do receptor, o que corrobora com os dados químicos-biológicos observados nos ensaios cinéticos, que indicam o maior potencial inibitório dos benzilsubstituídos frente aos alquilsubstituídos. Além disso, estes estudos indicam que mesmo com o aumento estérico dos substituintes tanto no anel piridínico quanto na substituição da metila pela fenila nos sais fenil-pirido-indois, estes continuam interagindo dentro da cavidade enzimática. Tal fato é importante para dar prosseguimento ao planejamento de novas estruturas, uma vez que sabe-se que a conformação dos padrões estruturais analisados no momento da interação, permite o aumento estérico destes e mantém a atividade destes compostos mesmo com a modificação eletrônica destes substituintes.

6 – CONCLUSÕES

A análise da atividade anticolinesterásica dos derivados β -carbolínicos indicou que estes sais foram até 200 vezes mais potentes (**5**) em relação à harmana (**1**), indicando que estes compostos são interessantes para estudos mais avançados (*in vivo*), uma vez que, alguns derivado forneceram valores de CI_{50} (*in vitro*) próximos ao valor de CI_{50} da fisostigmina.

Todos os compostos testados agiram como inibidores não competitivos, ou seja, interagem com sítios da AChE e BChE diferentes do sítio ativo.

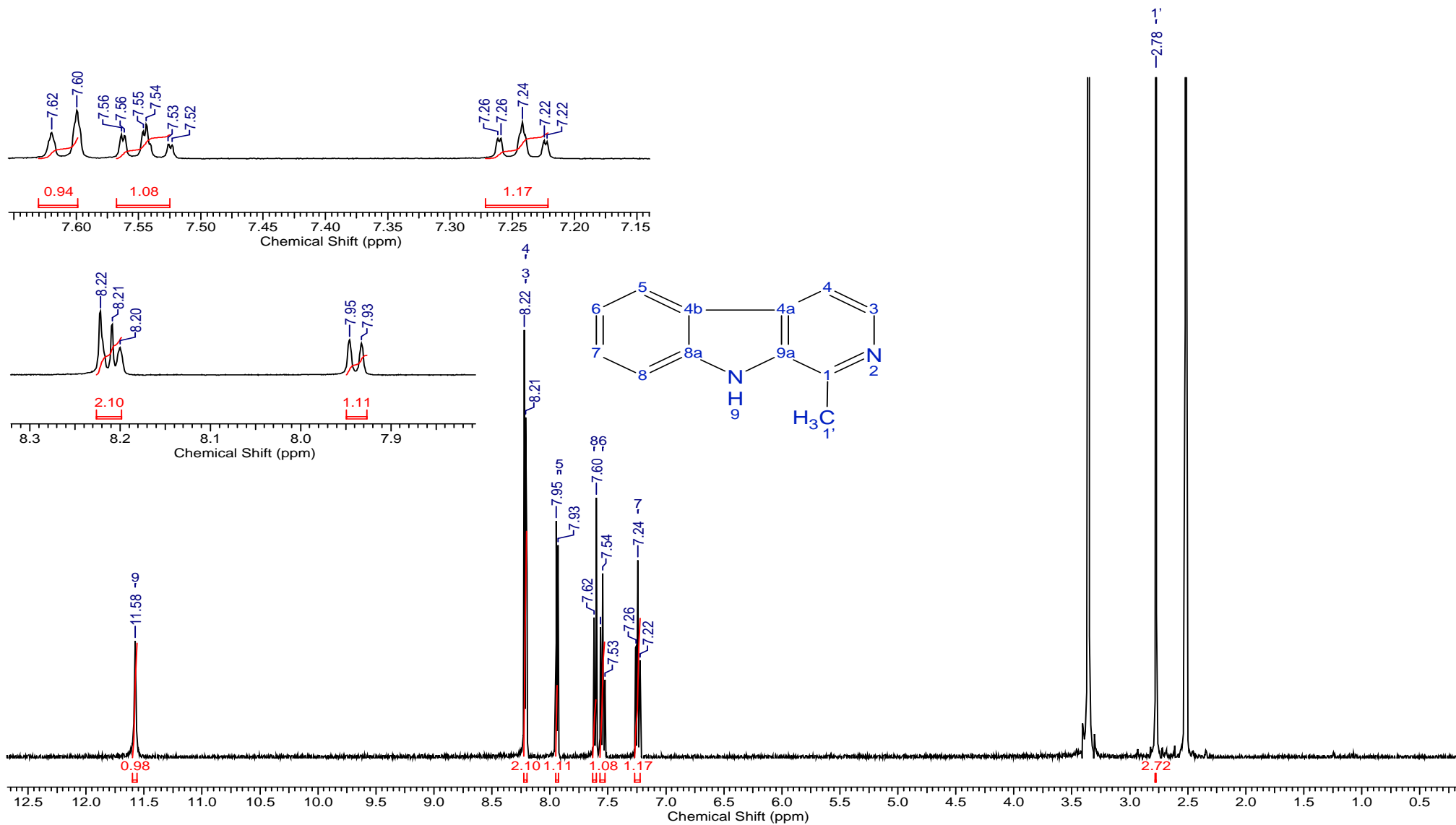
Uma vez que, para AChE, o composto mais ativo foi o **5**, nota-se que este, diferentemente dos outros compostos testados, possui um anel aromático a mais que poderia estar contribuindo para que haja interações π - π com resíduos aromáticos da enzima. Adicionalmente, este composto se mostra mais lipofílico que os outros da série, o que pode ser interessante já que as enzimas alvo se encontram no sistema nervoso central.

De modo geral, a geração de carga positiva nesta série de derivados β -carbolínicos levou a um ganho considerável de potência. A seletividade parece estar relacionada ao volume e à natureza dos grupos acrescentados ao nitrogênio piridínico. Sobre estes substituintes, a adição de grupos retiradores de elétrons à posição *para* da benzila, nos sais da harmana, mostrou diminuir a seletividade destes compostos, contudo houve a manutenção do potencial inibitório destes compostos.

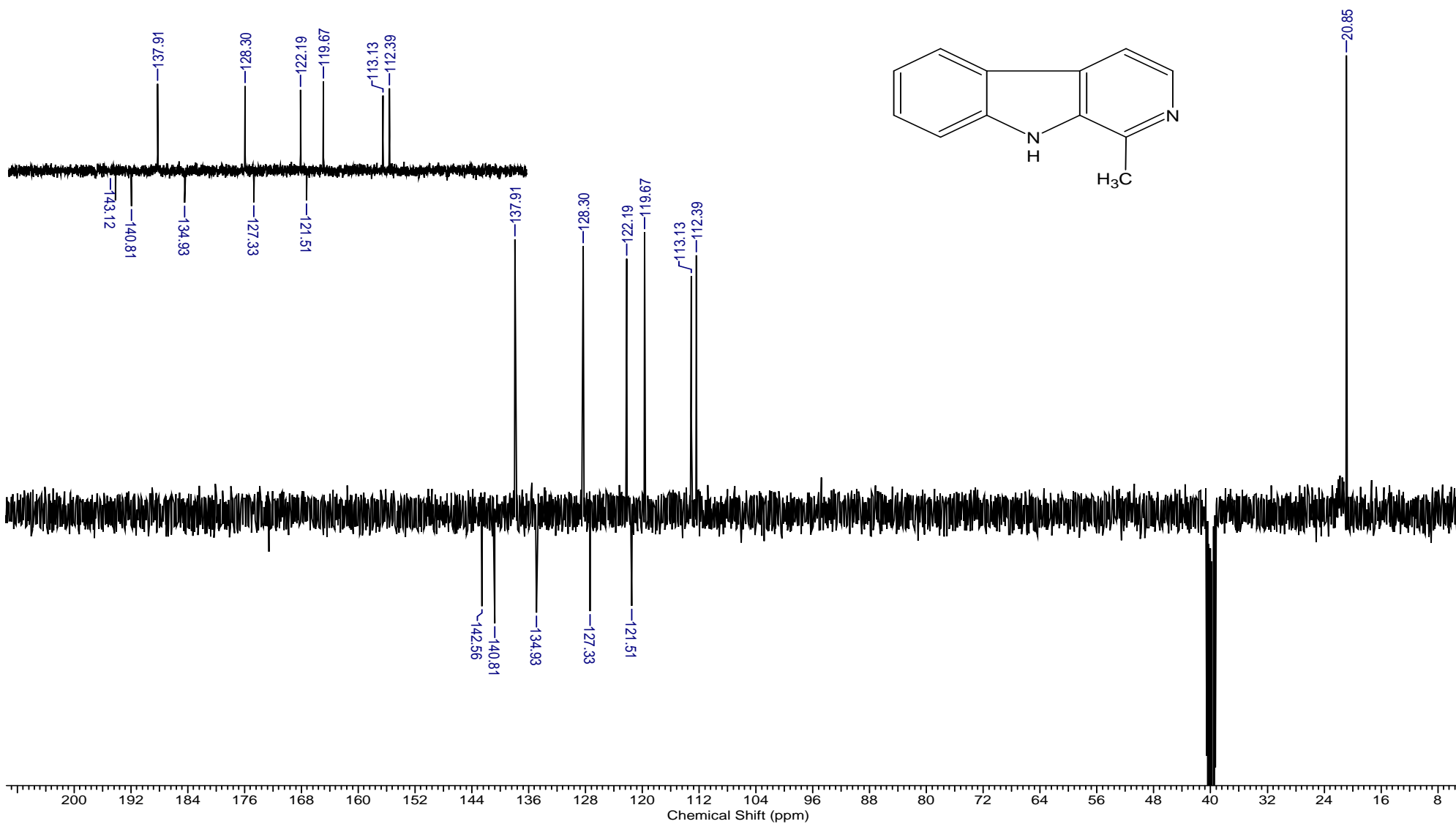
Os estudos de STD-RMN mostraram que o aumento do volume estérico do substituinte ainda faz com que estes compostos interajam dentro da cavidade enzimática, além de corroborar os dados experimentais de que os anéis benzílicos adicionados aos sais da harmana formam mais um sítio de interação com a enzima, sendo por tanto, importante para a atividade observada.

Finalmente, os sais de fenil-pirido-indol, apesar de terem apresentado menor atividade geral frente a AChE, levaram ao composto **7** que se mostrou bastante seletivo pela butirilcolinesterase, indicando uma promissora série a ser explorada.

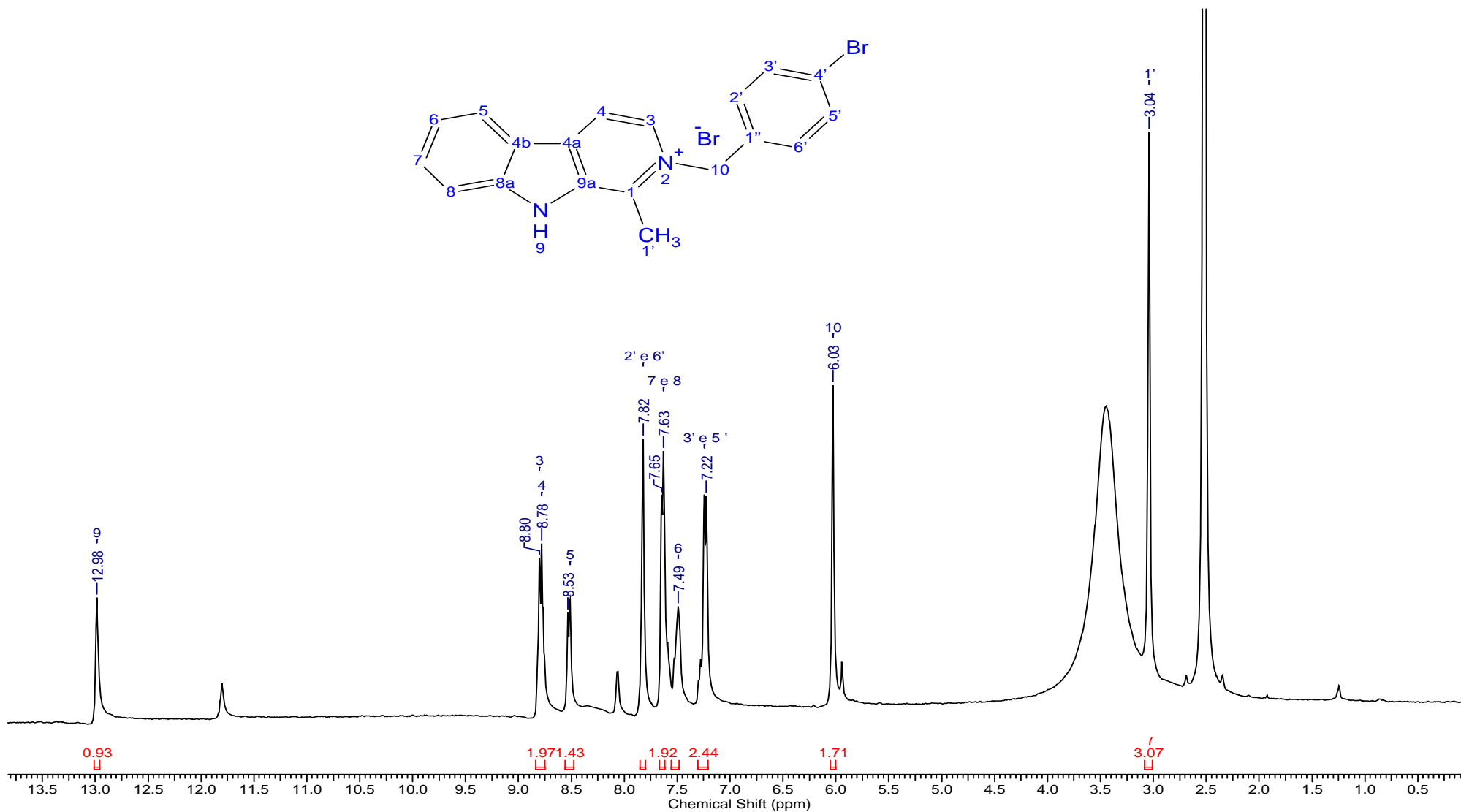
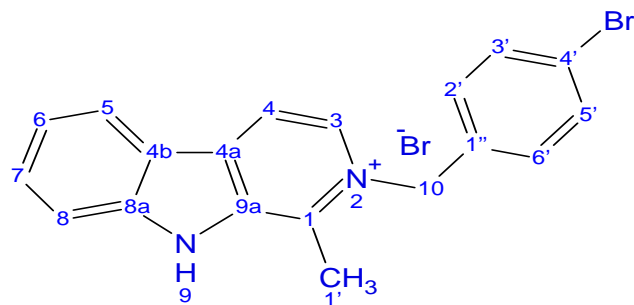
ANEXO I



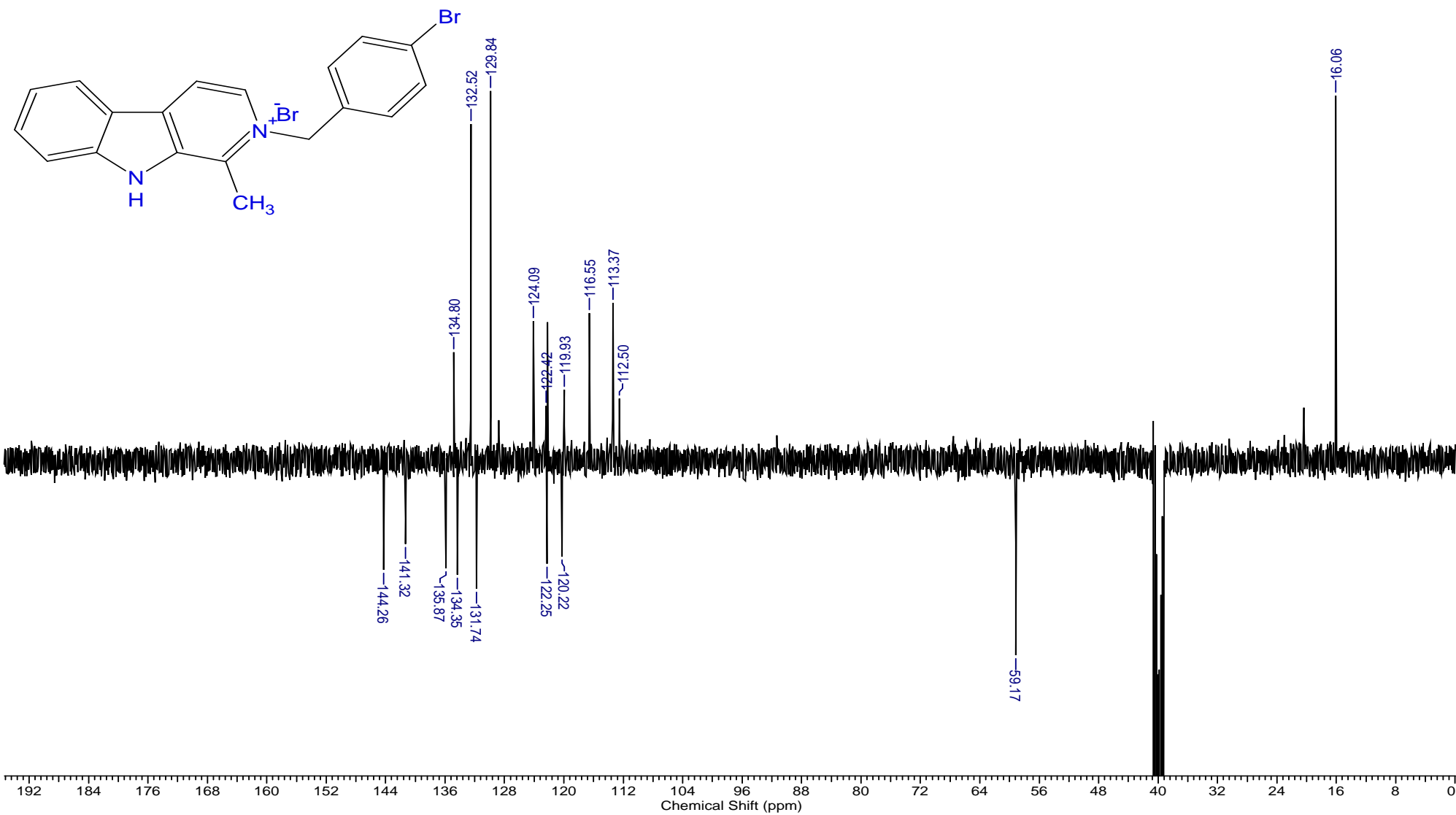
Espectro de RMN- ^1H da harmana obtido em DMSO-d_6 (500 MHz)



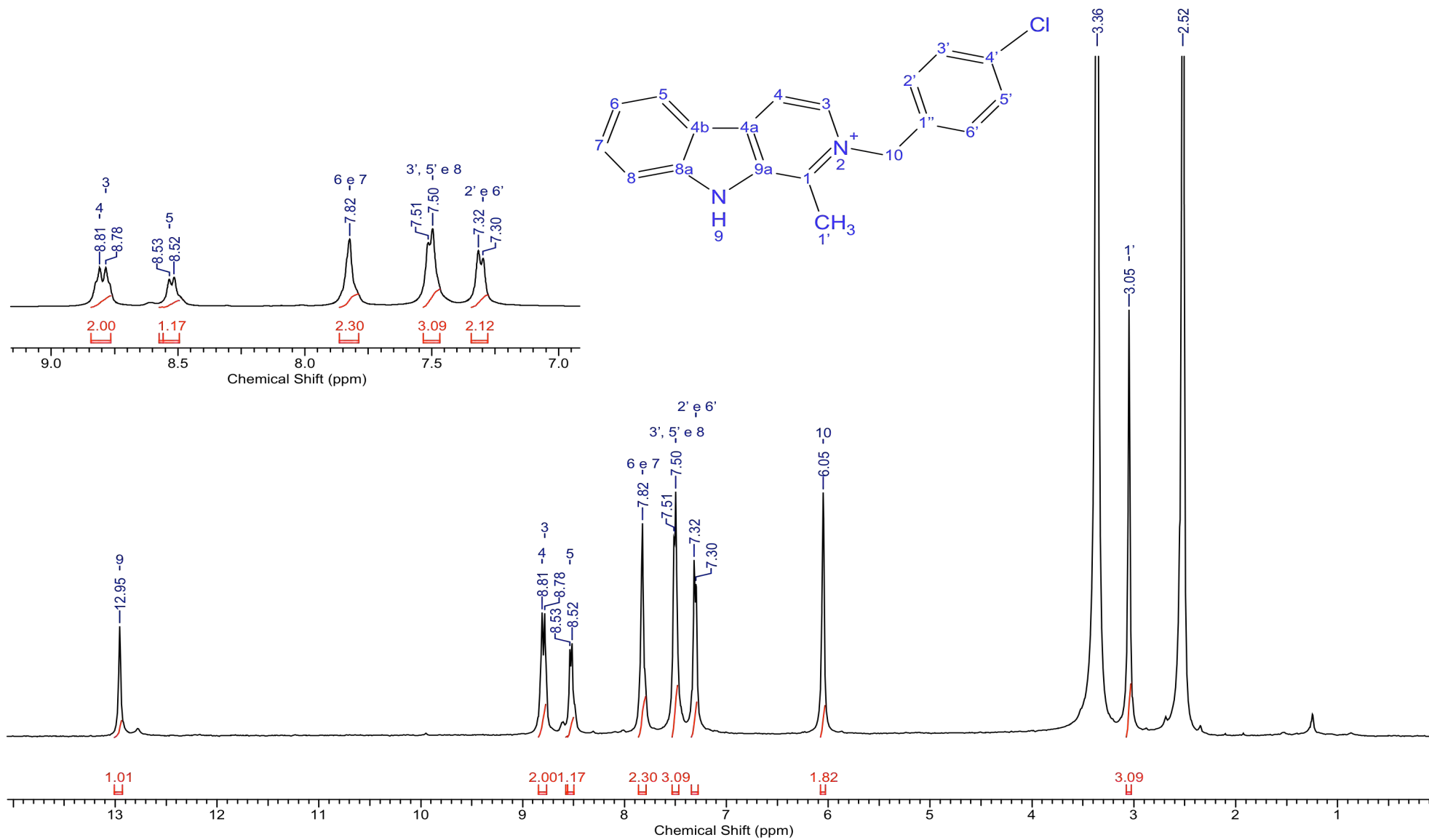
Espectro de RMN - ^{13}C da harmana obtido em DMSO- d_6 (500 MHz)



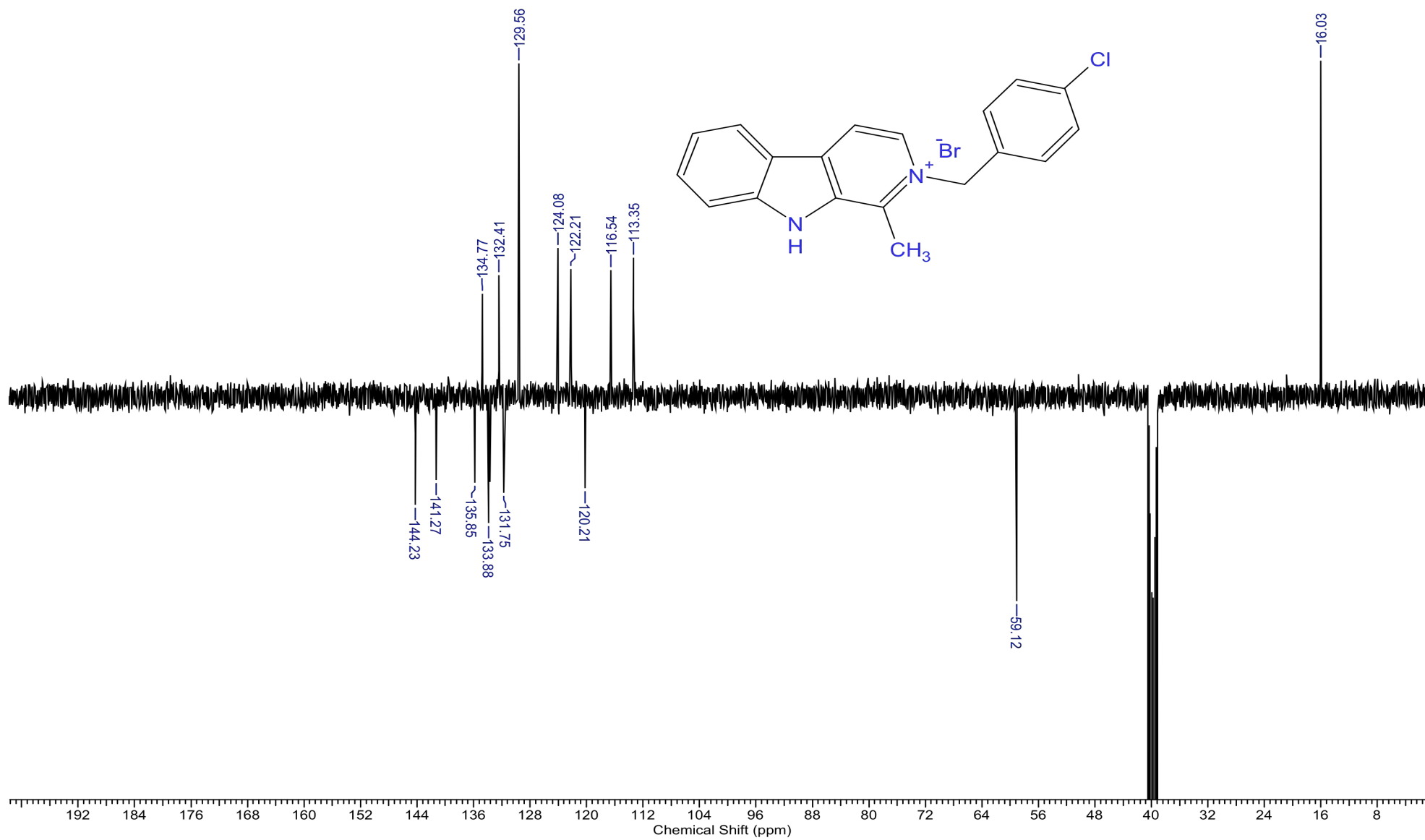
Espectro de RMN-¹H do composto 2 obtido em DMSO-d₆ (500 MHz)



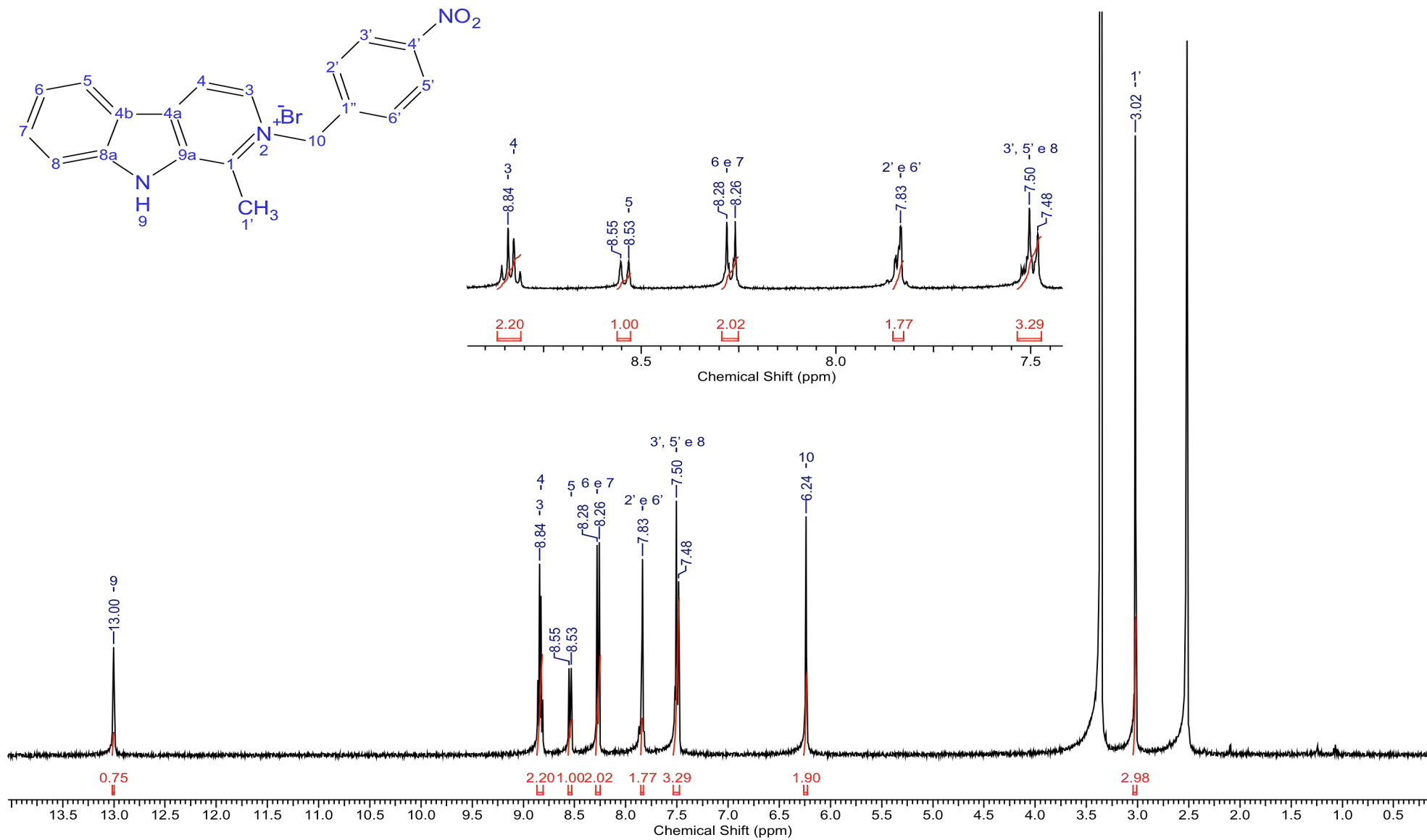
Espectro de RMN - ^{13}C do composto 2 obtido em DMSO- d_6 (500 MHz)



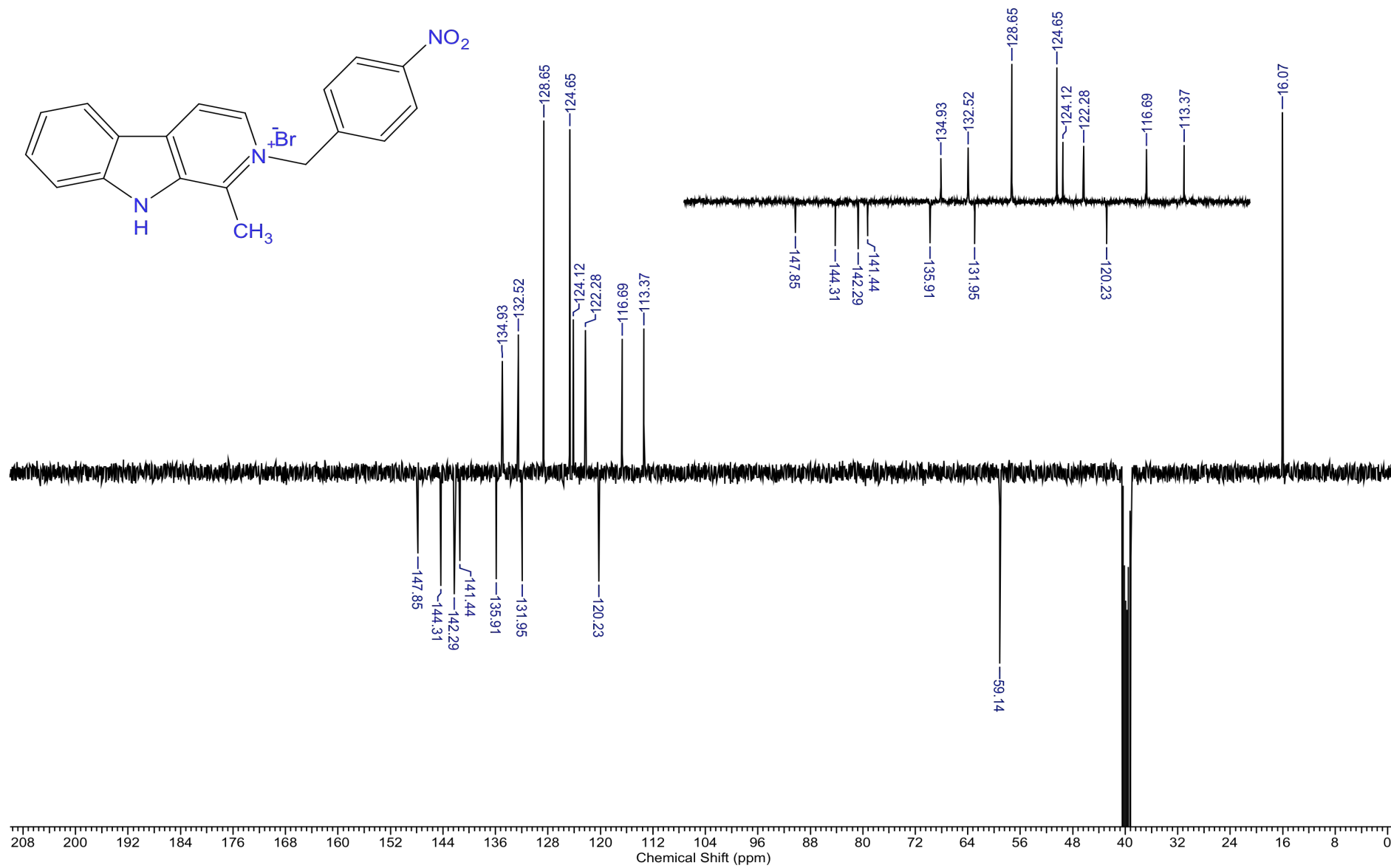
Espectro de RMN – ^1H do composto 3 obtido em DMSO-d_6 (500 MHz)



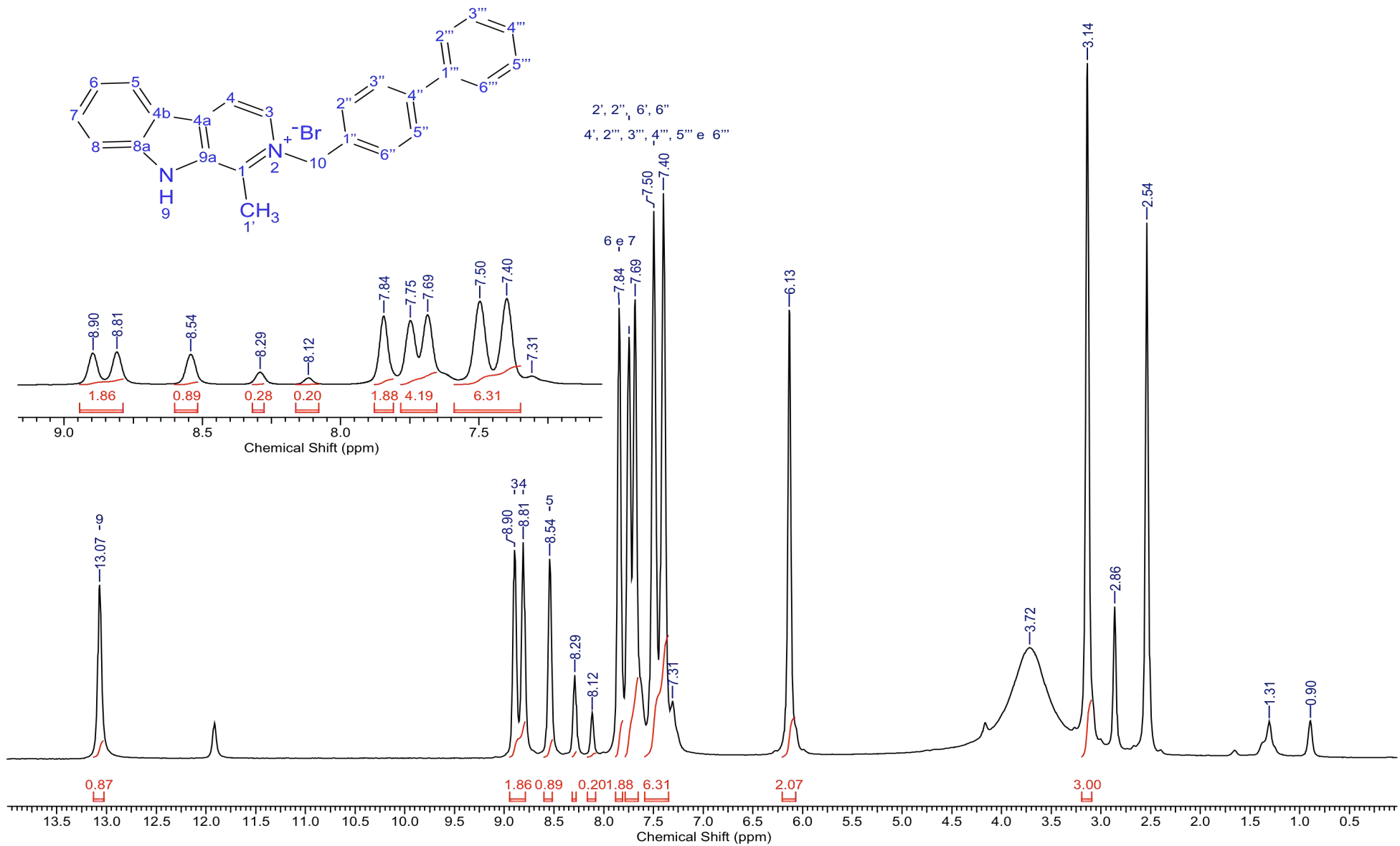
Espectro de RMN – ^{13}C do composto 3 obtido em DMSO-d_6 (500 MHz)



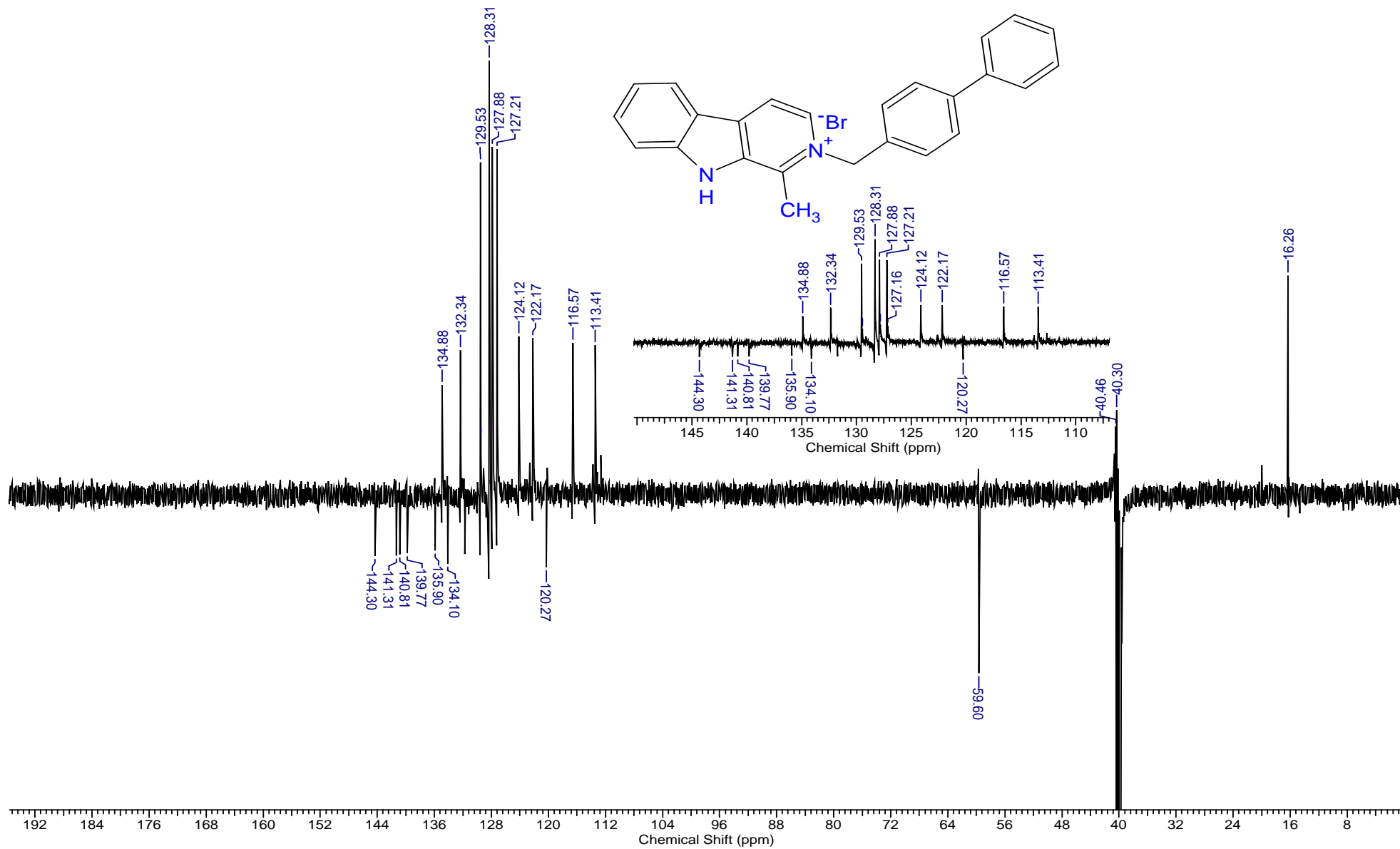
Espectro de RMN –¹H do composto 4 obtido em DMSO-d₆ (500 MHz).



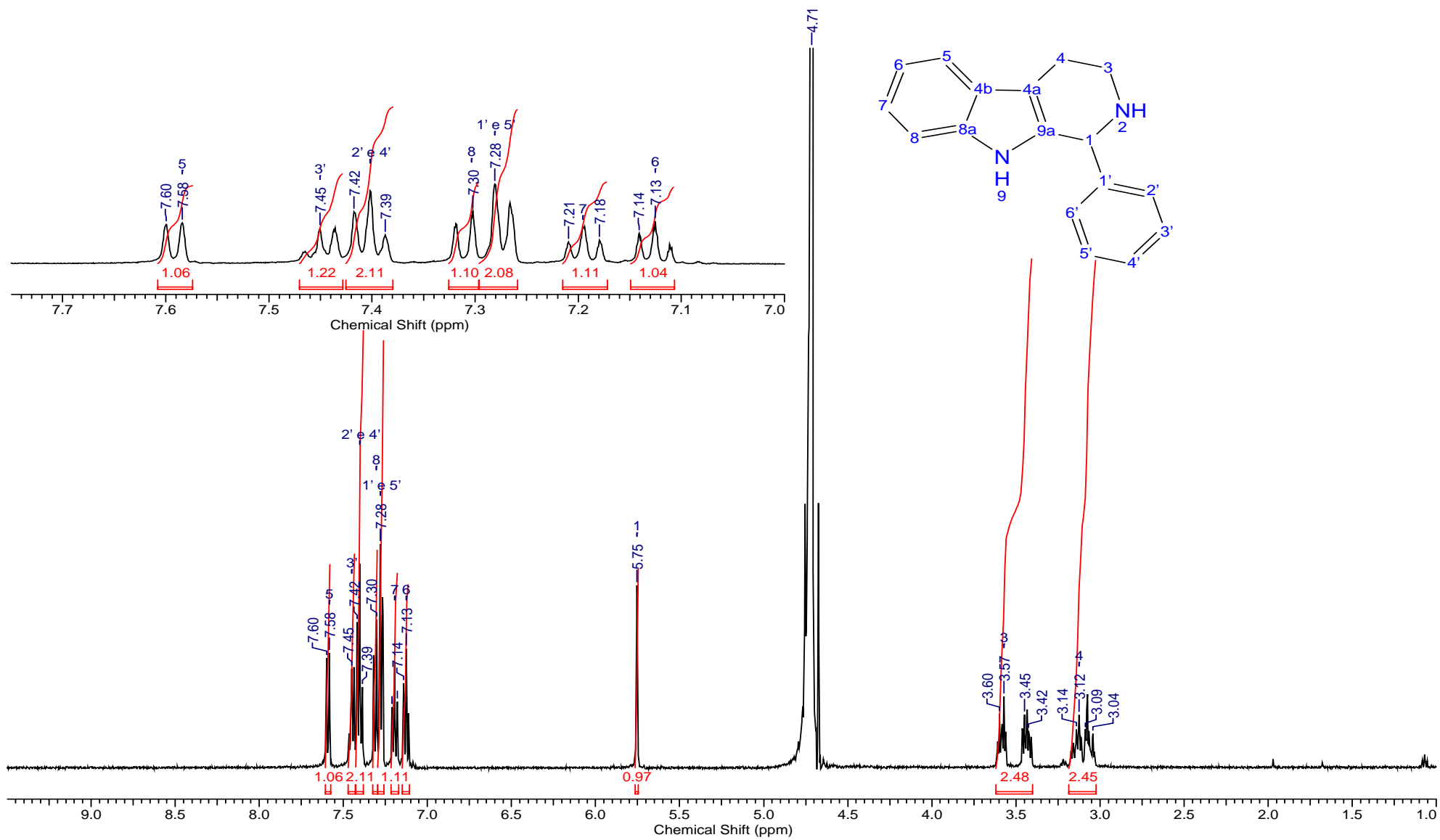
Espectro de RMN – ¹³C do composto 4 obtido em DMSO-d₆ (500 MHz).



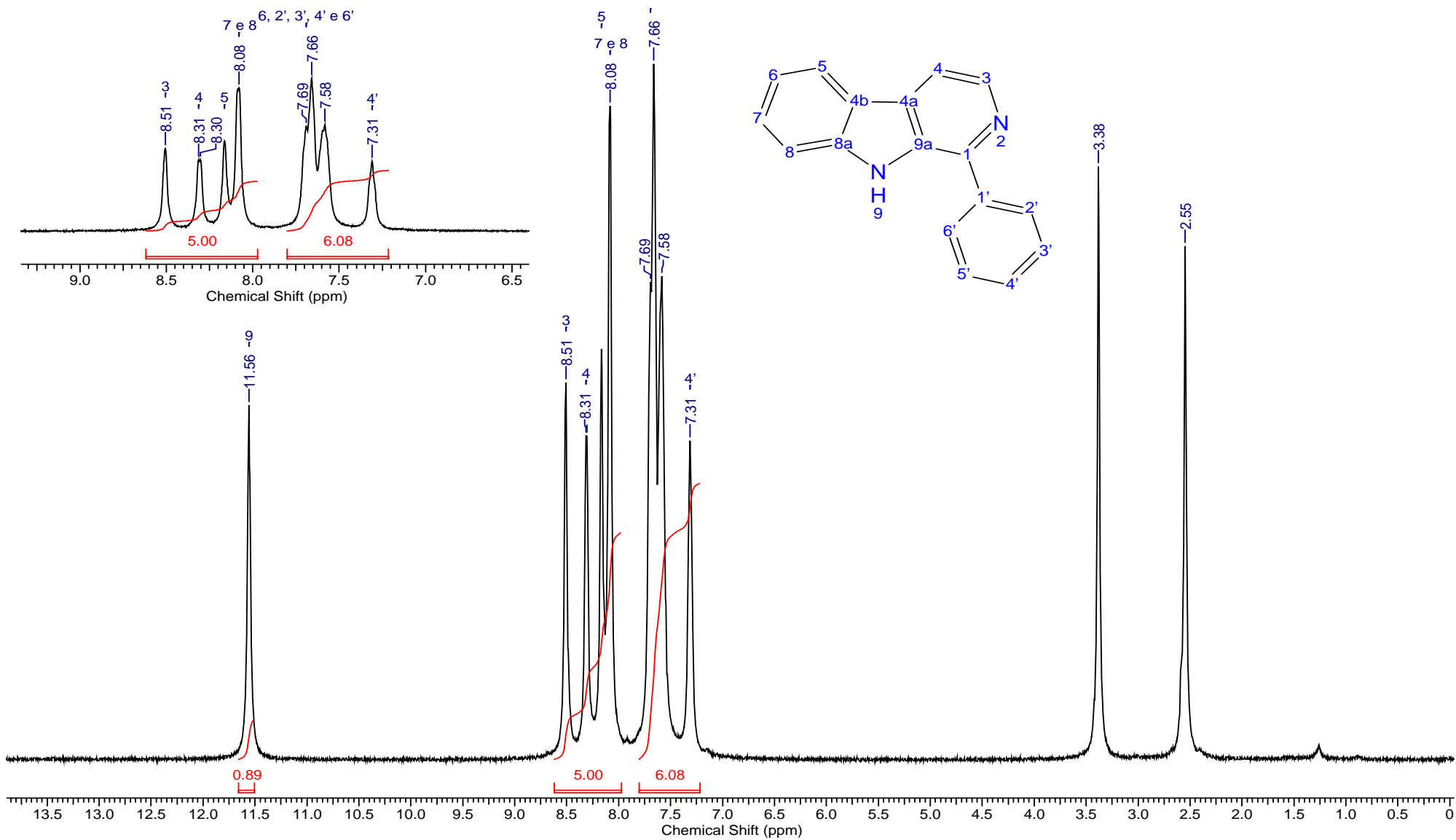
Espectro de RMN – ¹H do composto 5 obtido em DMSO-d₆ (500 MHz).



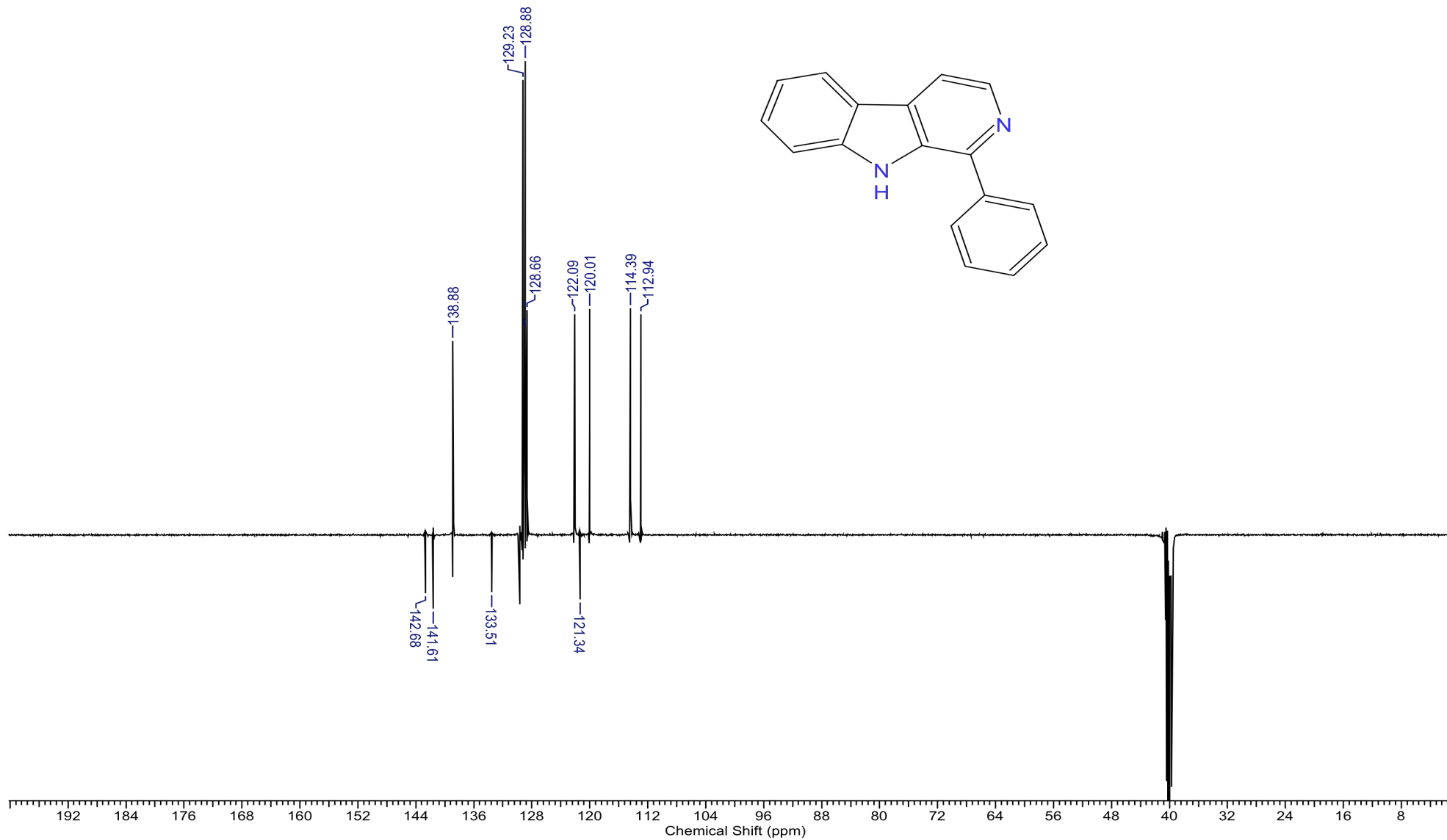
Espectro de RMN – ^{13}C do composto 5 obtido em DMSO-d_6 (500 MHz).



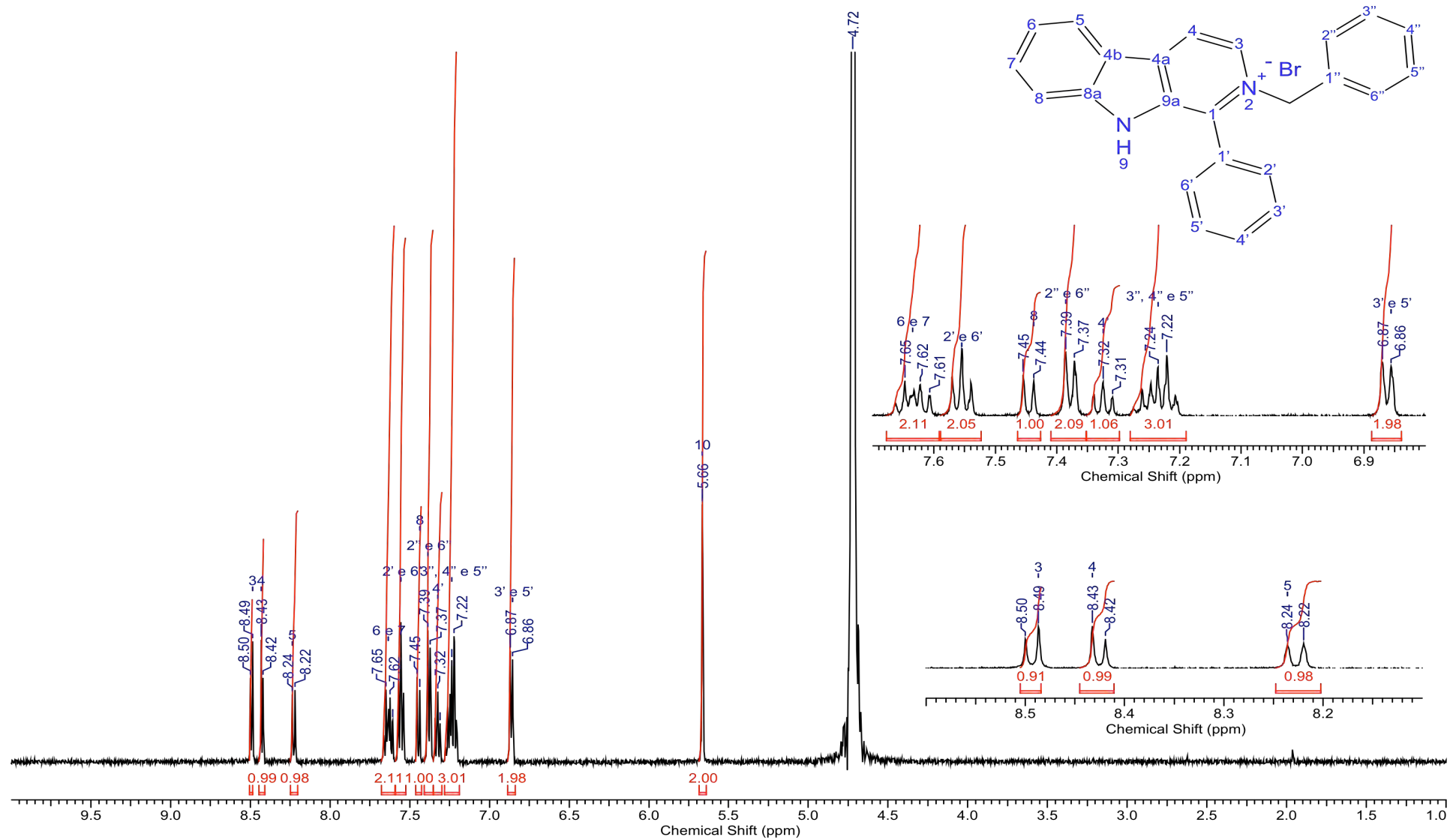
Espectro de RMN – ^1H do composto 13 obtido em D_2O (500 MHz).



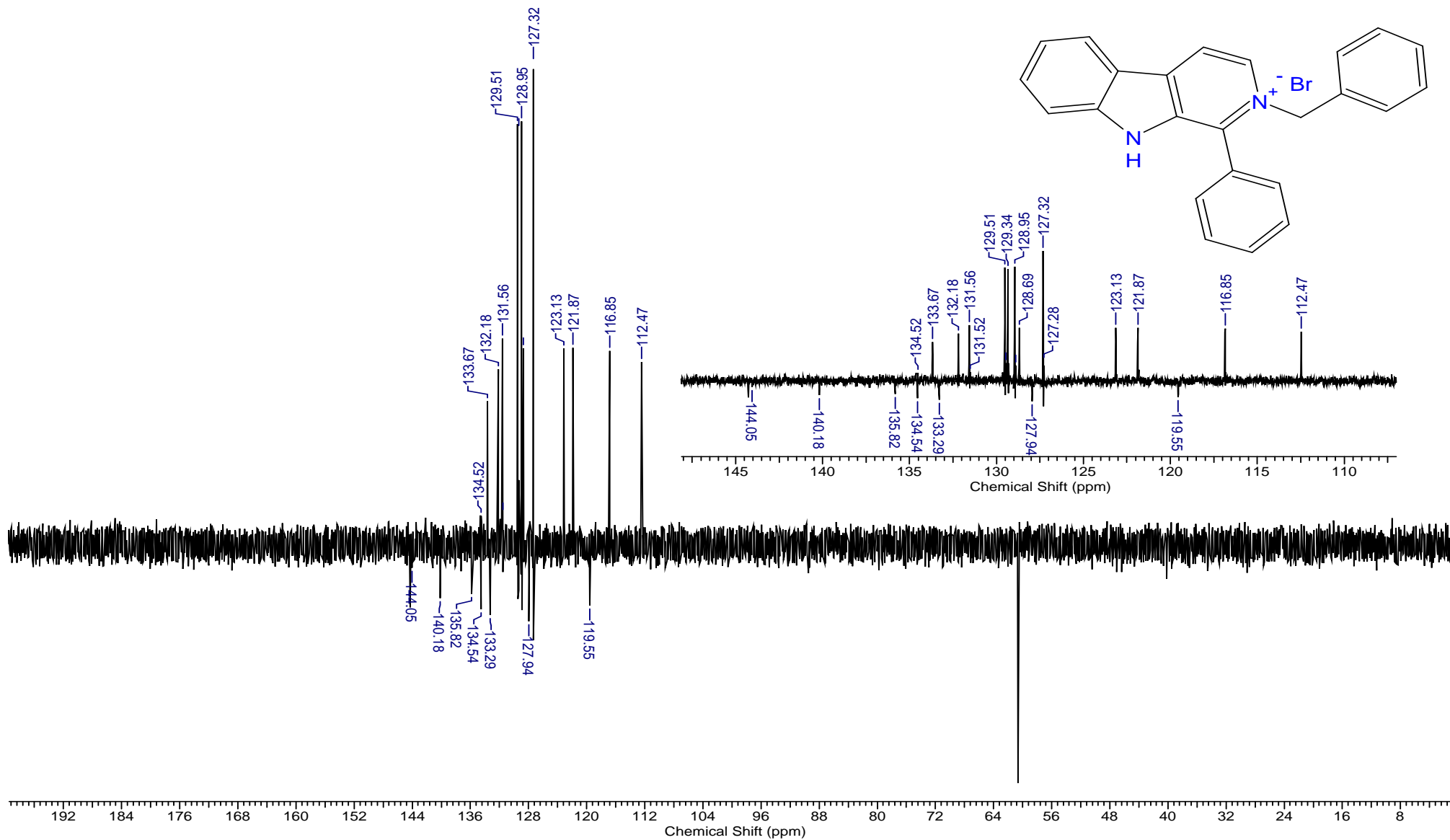
Espectro de RMN – ^1H do fenil-pirido-indol obtido em DMSO-d_6 (500 MHz).



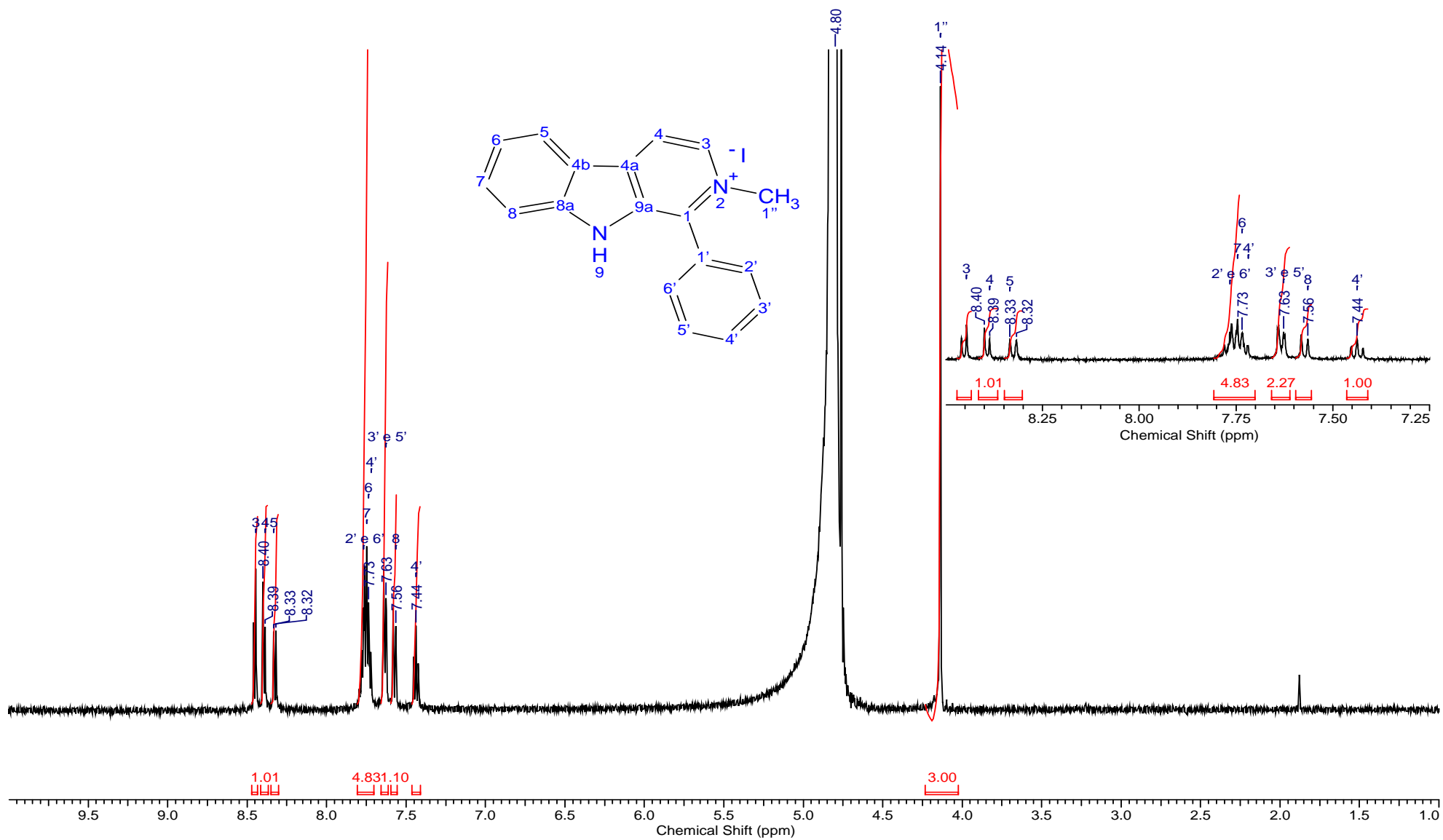
Espectro de RMN – ^{13}C do fenil-pirido-indol obtido em $\text{DMSO-}d_6$ (500 MHz).



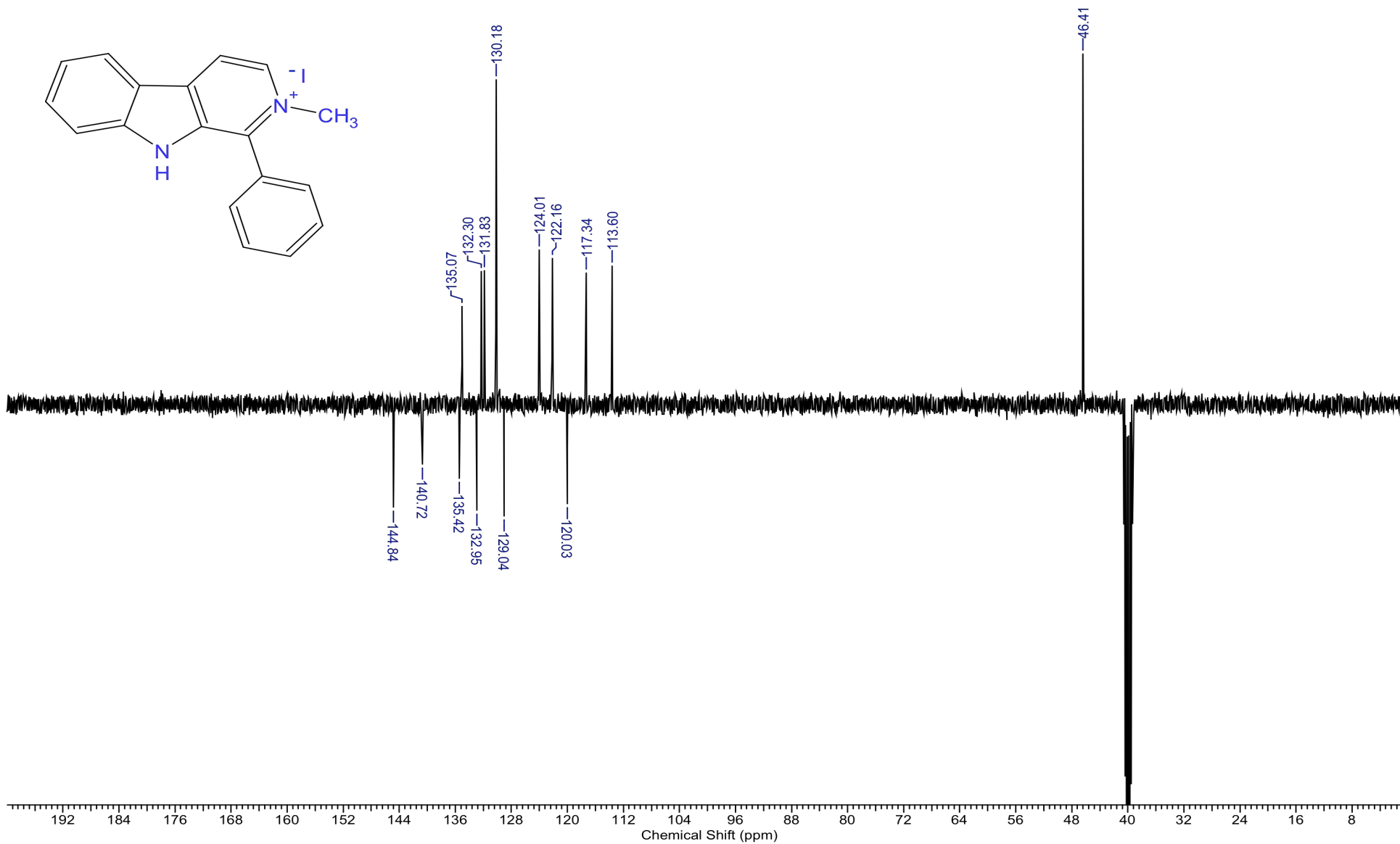
Espectro de RMN – ^1H do composto 7 obtido em D_2O (400 MHz).



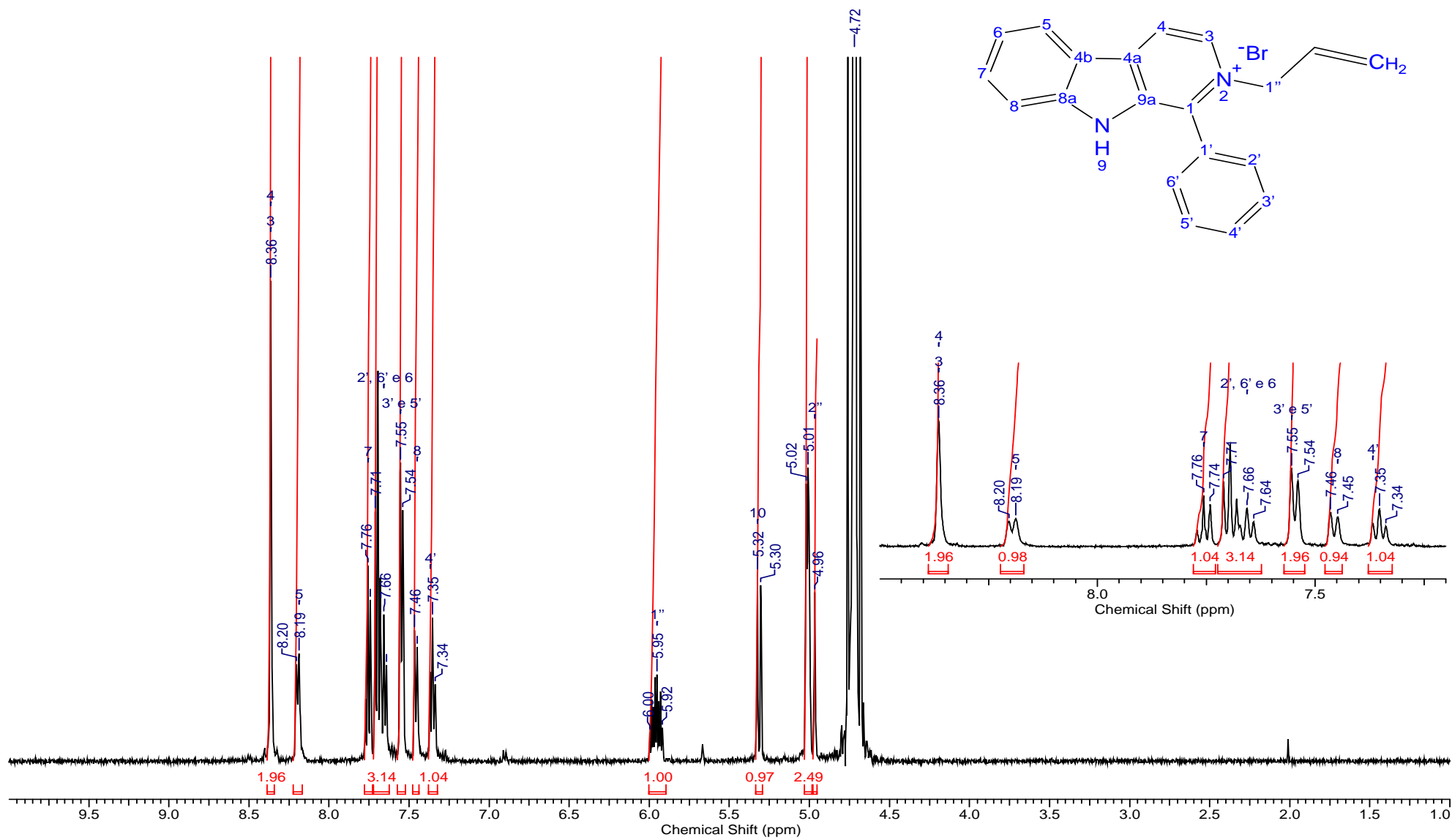
Espectro de RMN – ¹³C do composto 7 obtido em D₂O (400 MHz).



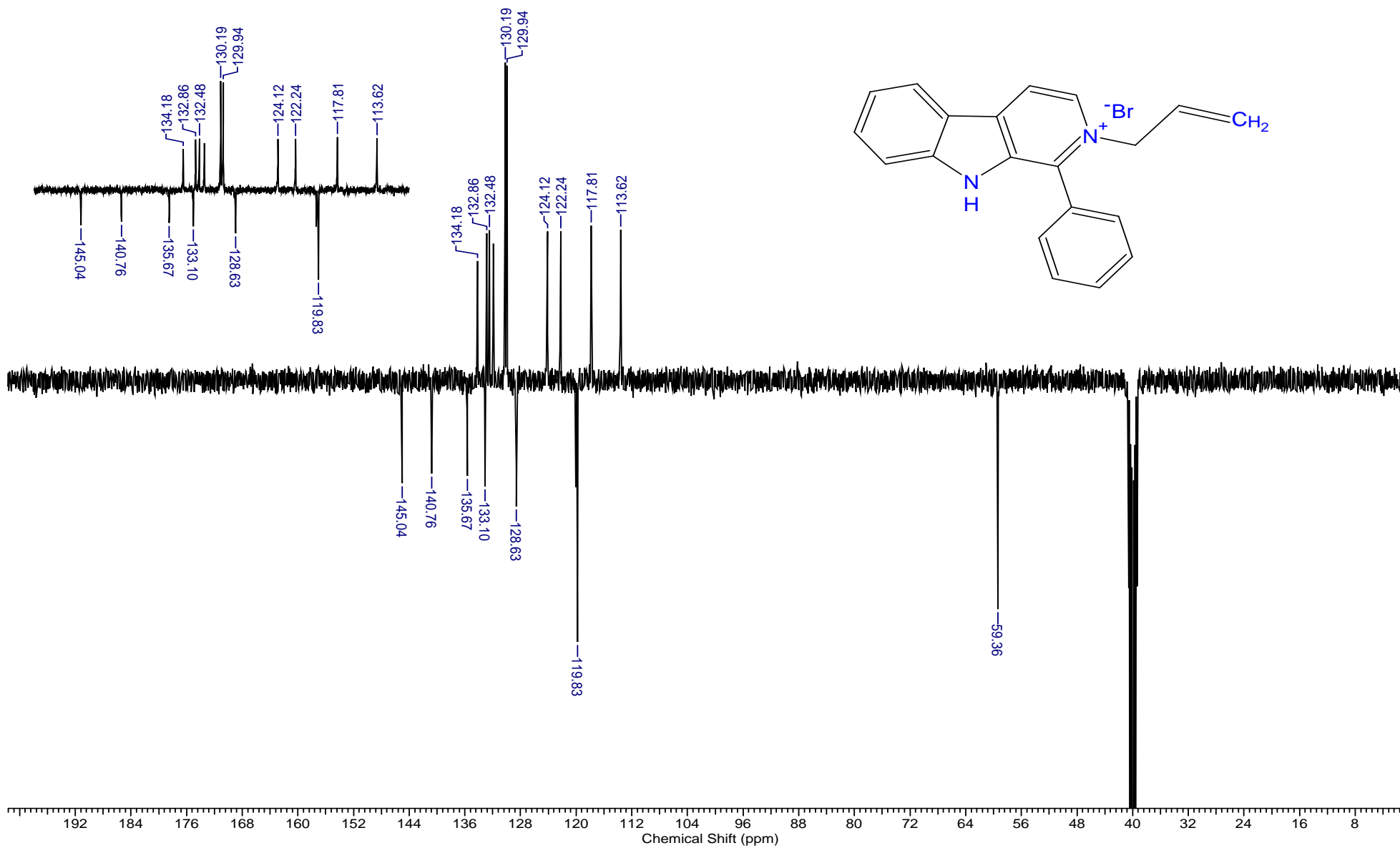
Espectro de RMN – ^1H do composto 8 obtido em D_2O (400 MHz).



Espectro de RMN – ¹³C do composto 8 obtido em DMSO-d₆ (500 MHz).



Espectro de RMN – ^1H do composto 9 obtido em D_2O (400 MHz).

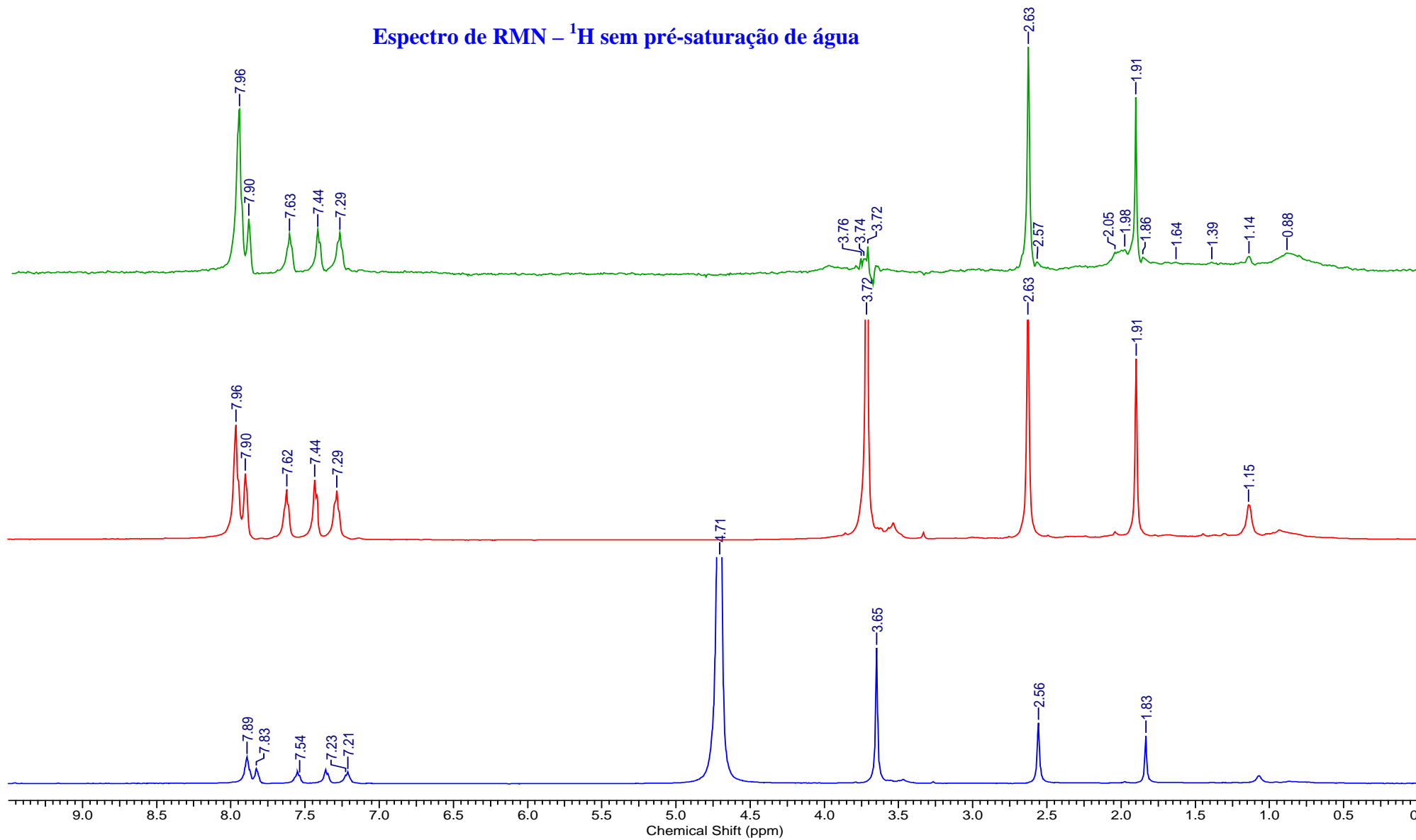


Espectro de RMN – ^{13}C do composto 9 obtido em D_2O (400 MHz).

Espectro de RMN – STD

Espectro de RMN – ^1H com pré-saturação de água

Espectro de RMN – ^1H sem pré-saturação de água

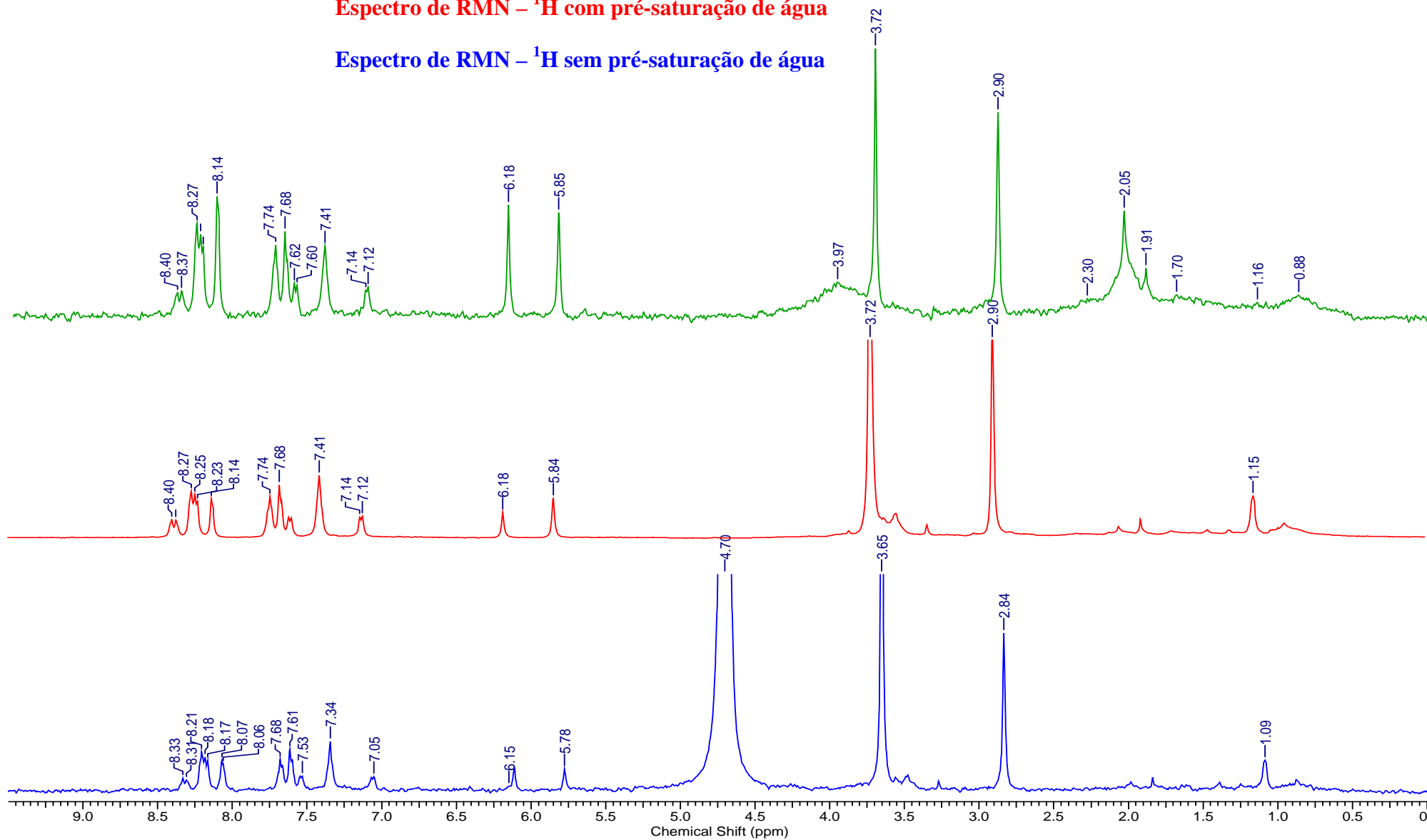


Espectro de RMN – ^1H da harmana obtido em D_2O (500 MHz).

Espectro de RMN – STD

Espectro de RMN – ^1H com pré-saturação de água

Espectro de RMN – ^1H sem pré-saturação de água

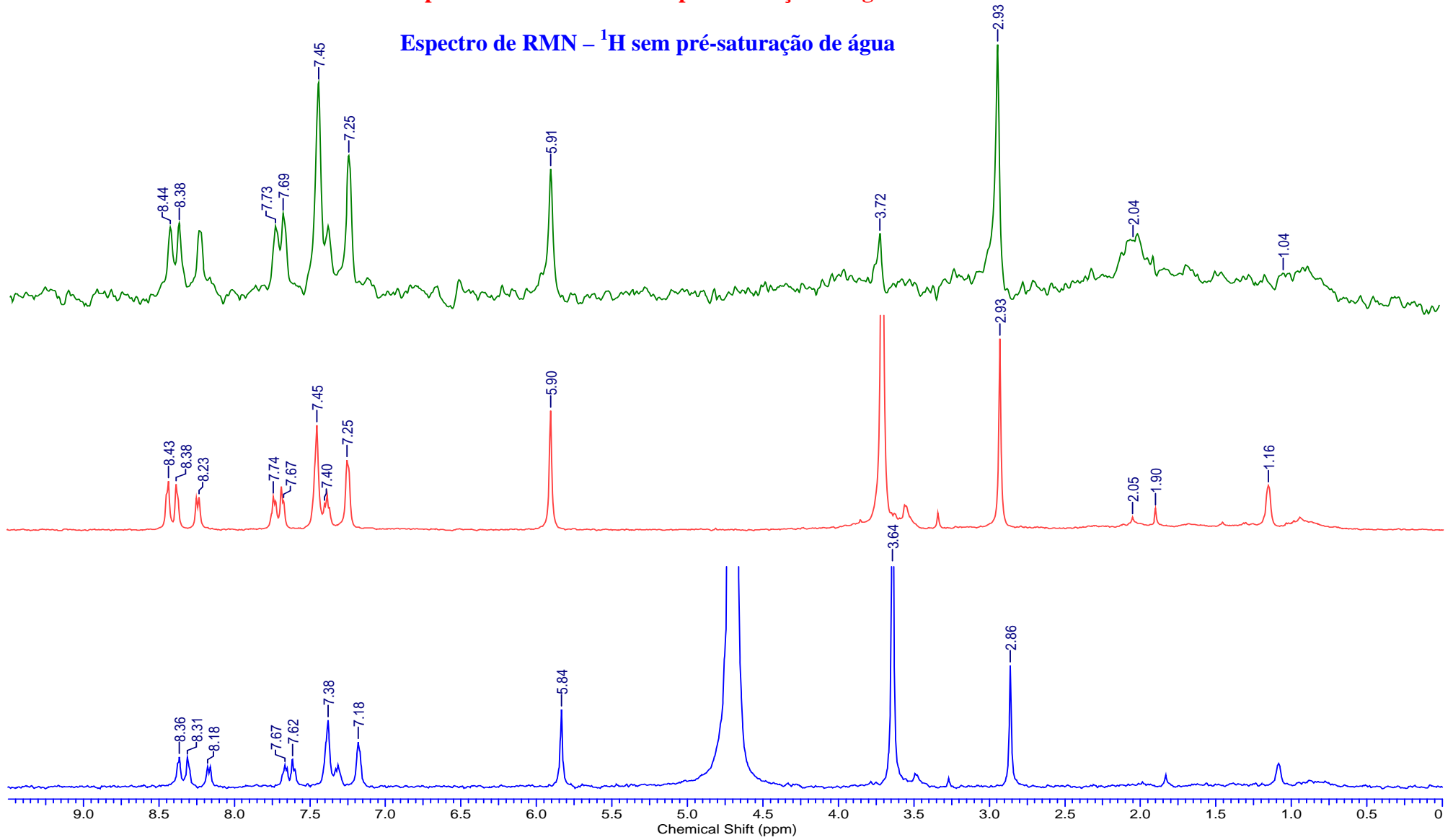


Espectro de RMN – ^1H do composto 2 obtido em D_2O (500 MHz).

Espectro de RMN – STD

Espectro de RMN – ¹H com pré-saturação de água

Espectro de RMN – ¹H sem pré-saturação de água

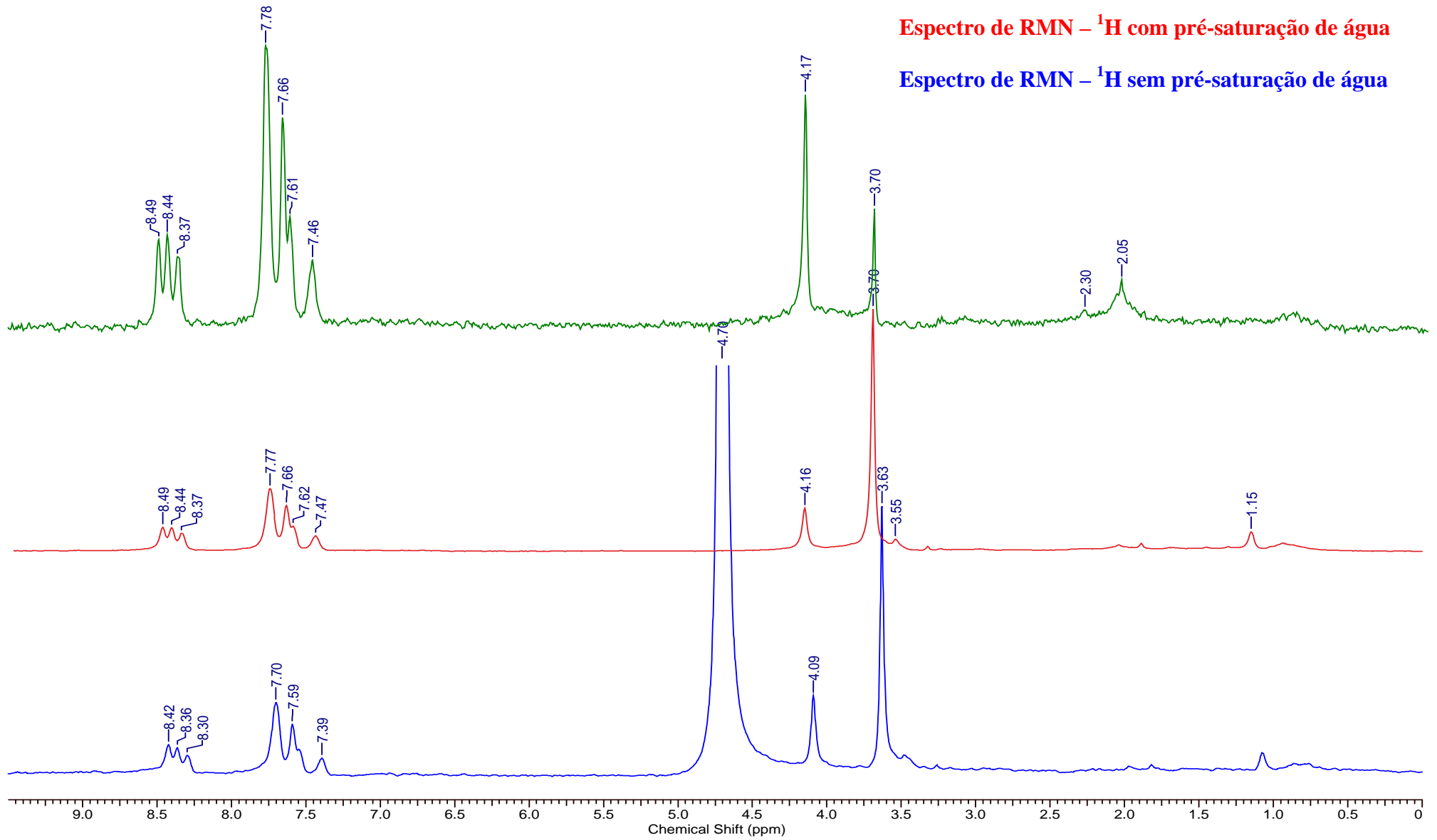


Espectro de RMN – ¹H do sal de benzila da harmana obtido em D₂O (500 MHz).

Espectro de RMN – STD

Espectro de RMN – ^1H com pré-saturação de água

Espectro de RMN – ^1H sem pré-saturação de água



Espectro de RMN – ^1H do composto 8 obtido em D_2O (500 MHz).

7 - REFERÊNCIAS

AIRAKSINEN, M. M.; KARI, I. Beta-carbolines, psychoactive compounds in the mammalian body 2 effects. *Medical Biology*. v. 59, pp. 190-211, 1981.

AFSAH, E. M.; HAMMOUDA, M.; HAMAMA W. S. Pictet-Spengler reactions of Tryptamine and tryptophan with cycloalkanones and ketonicMannich bases. *Monarshefte für Chemie*. V. 116, pp. 851-855, 1985.

ANGULO, J.; NIETO, P. M. STD-NMR: application to transient interaction between biomolecules – a quantitative approach. *Eur Biophys Journal*, v. 40, pp. 1357–1369, 2011.

ANOOP, A.; SINGH, K.P.; JACOB, R. S, MAJI, S.K, Biomarkers for Alzheimer’s Disease Diagnosis *Int J Alzheimer Dis*. 2010; 2010:

BAYNES, J. W. *Bioquímica médica*. Tradução da 2ª Edição. Rio de Janeiro: Mosby Elsevier, 1991. ISBN: 978-85-352-2298-2.

BECHER, P. G.; BEUCHAT, J.; GADEMANN, K.; JÜTTNER, F. Nostocarboline: Isolation and Synthesis of a New Cholinesterase Inhibitor from Nostoc 78-12A. *J. Nat. Prod*. v. 68, pp. 1793-1795, 2005.

BERG, J. M.; TYMOCZKO, J. L.; STRVER, L. *Bioquímica*. 6ª Edição. Guanabara Koogan, 2008. ISBN: 8527713691.

BIRKS, J.; HARVEY, R. J. Donepezil for dementia due to Alzheimer's disease. *Cochrane Database of Systematic Reviews*. (1), CD001190, 2006.

BISSWANGER, H. *Enzymes Kinetics. Principles and methods*. 2ª Edição; Wiley-VCH; VERLAG GMBH & CO.KGA, 2008. ISBN: 978-3-527-31957-2

BONNET, U.; SCHERBAUM, N.; WIEMANN, M. The endogenous alkaloid harmaline: Acidifying and activity-reducing effects on hippocampal neurons in vitro. *Progress in neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry*. v. 32, pp. 362-367, 2008.

BOURNE, Y.; RADIC, Z.; KOLB, H. C.; SHARPLESS, K. B.; MARCHOT, P. Structural insights into conformational flexibility at the peripheral site and within the active center gorge of AChE. *Chemico-Biological Interactions*. v. 157, pp. 159-165, 2005.

BUCKHOLTZ, N. S. Neurobiology of tetrahydro-beta-carbolines. *Life Sciences*. v. 27, pp. 893-903, 1980. Butler, M. S. The role of natural product chemistry in drug discovery. *Journal of Natural Products*. v. 67, pp. 2141-2153, 2004.

CACABELOS, R.; TAKEDA, M.; WINBLAD, B. The glutamatergic system and neurodegeneration in dementia: preventive strategies in Alzheimers disease. *International Journal of Geriatric Psychiatry*. v. 14, pp. 3-47, 1999.

CALLAWAY, J. C.; GYNTHNER, J.; POSO, A.; VEPSALAINEM, J.; AIRALKSINEM, M. M. J. *Journal of Heterocyclic Chemistry*. v. 31, pp. 431-435, 1994.

CAMPOS, L.S. *Entender a Bioquímica*. 2º Edição. Lisboa: Escolar Editora, 1999. ISBN: 972-592-108-9.

CANEPA, F. G; PAULING, P.; SORUM, H. Structure of acetylcholine and other substrates of cholinergic systems. *Nature*. v. 210, pp. 907- &, 1966.

CARAMELLI, P.; CHAVES, M. L. F.; Engelhardt E, et al. Effects of galantamine on attention and memory in Alzheimers disease measured by computerized neuropsychological tests: results of the Brazilian Multi-Center galantamine study (GAL-BRA-01). *Arquivos de Neuro-Psiquiatria*. v. 62, pp. 379-384, 2004.

CASS, H. Herbs for the nervous system: Ginkgo, Kava, Valerian, Passionflower. *Seminars in Integrative Medicine*. v. 2, pp. 82-88, 2004.

CASTRO, A. T. Estudo por modelagem molecular da reativação da acetilcolinesterase inibida por agentes químicos neurológicos. 121 f. Dissertação (mestrado em área envolvida) – IME, Rio de Janeiro, 2002.

CHANDRA, V; PANDAV, R; DODGE, H. H; JOHNSTON, J. M; DEKOSKY, S. T; GANGULI, M.. Incidence of Alzheimer's disease in a rural community in India: the Indo-US study. *Neurology*; 57:985–989.5. 2001

CHATONNET, A.; LOCKRIDGE, O. Comparison of butyrylcholinesterase and acetylcholinesterase. *The Biochemical Journal*. Londres, v.260, n.3, pp. 625-634, 1989.

CHAVES, M.L.; CAMOZZATO, A.L.; GODINHO, C. Incidence of Mild Cognitive Impairment and Alzheimer Disease in Southern Brazil. *J Geriatr Psychiatry Neurol*; 22(3): 181-7. 2009

CHENG, Y. & PRUSOFF, W. H. Relationship between the inhibition constant (K_I) and the concentration of inhibitor which causes 50 per cent inhibition (I_{50}) of an enzymatic reaction. *Biochem. Pharmacol.* v. 22, pp. 3099–3108, 1973.

DALE, M. C.; LEBRETTO, S. E.; PATTERSON, C.; ANDERSON, J.; CHOUDHURY, T.; MCCAFFERTY, F.; MCWILLIAM, C.; RICHARDSON, M. Clinical experience of galantamine in dementia: A series of case reports. *Current Medical Research and Opinion*. v. 19, pp. 508-518, 2003.

DEMARIN, V.; ZAVOREO, I.; KES, V.B.; SIMUNDIC, A. M. Biomarkers in Alzheimer's disease. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*, 2011, 49, 773.

DESCARRIES, L.; LISIGER, V.; STERIADE M. Diffuse transmission by acetylcholine in the CNS. *Progress in Neurobiology*. v. 53, pp. 603-625, 1997.

DEVLIN, M. T. *Manual de Bioquímica com Correlações Clínicas*. Tradução da 6ª Edição. Blücher, 2007. ISBN: 9788521204060.

DEWICK, P. M. The biosynthesis of C-5-C-25 terpenoid compounds. *Natural Product Reports*. v. 19, pp. 181-122, 2002. DOWNEY, D. Pharmacologic management of Alzheimer Diseases. *Journal of Neuroscience Nursing*. v. 40, n.1, pp. 55-59, 2008.

DONG, J; SHI, X.; YAN, J.; XING, J.; ZHANG, Q.; XIAO, S. Efficient and Practical One-Pot Conversions of *N*-Tosyltetrahydroisoquinolines into Isoquinolines and of *N*-Tosyltetrahydro- β -carbolines into β -Carbolines through Tandem β -Elimination and Aromatization. *Eur. J. Org. Chem.* pp. 6987–6992, 2010.

EKHOLM, M. Predicting relative binding free energies of substrate and inhibitors of acetylcholin- and butyrylcholinesterases. *Journal of Molecular Structure-Theochem.* v. 572, pp. 25-34, 2001.

ELHANANY, E.; ORDENTLICH, A.; DGANY, O.; KAPLAN, D.; SEGALL, Y.; BARAK, R.; VELLAN, B.; SHAFFERMAN, A. Resolving pathways of interaction of covalent inhibitors with the active site of acetylcholinesterases: MALDI-TOF/MS analysis of various nerve agent phosphyl adducts. *Chemical Research in Toxicology.* v. 14, pp. 912-918, 2001.

ELISABETSKY, E.; COSTA-CAMPOS, L. The alkaloid alstonine: a review of its pharmacological properties. *Evidence based complementary and alternative medicine.* v. 3, pp. 39-48, 2006.

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

FAN, P.; HAY, A.; MARSTON, A.; HOSTETTMANN, K., Acetylcholinesterase-Inhibitory Activity of Linarin from *Buddleja davidii*, Structure-Activity Relationships of Related Flavonoids, and Chemical Investigation of *Buddleja nitida*. *Pharmaceutical Biology,* v. 46, pp. 596-601, 2008.

FARLOW, M. R. Effective pharmacologic management of Alzheimer's disease. *American Journal of Medicine.* v. 120, pp. 388-397, 2007.

FARZIN, D.; MANSOURI, N. Antidepressant-like effect of harmaline and other β -carbolines in the mouse forced swim test. *European Neuropsychopharmacology.* v. 16, pp. 324-328, 2006.

FERRI, C.P; PRICE, M; BRAYANE, C; BRODATY, M; FRATIGLIONI, M; GANGULI, M; Hall, M.K; HASEGAWA, K; HENDRIE, H; Huang, Y; JORM, A ; MATHERS, C; MENEZES, P. R; RIMMER, E; SCAZUFCA, M. Global prevalence of dementia: a Delphi consensus study. *The Lancet*, 366, 2112. (2005).

FIGUEIREDO, I. M.; MARSAIOLI. A. J.; Mapeamento das interações proteína-ligante através de técnicas de RMN de ^1H utilizando detecção do ligante. *Quim. Nova*, vol. 30, n. 7, pp. 1597-1605, 2007

FRAGA, C. A. M., BARREIRO, E. J., Synthesis and antinociceptive properties of new structurally planned imidazo[1,2-a]pyridine 3-acylarylhydrazone derivatives, **Eur. J. Med. Chem.**, 33, 225–235, 1994.

FRANCIS, P. T.; PALMER, A. M.; SNAPE, M.; WILCOCK, G. K. J. The cholinergic hypothesis of Alzheimer's disease: a review of progress. *Journal of Neurology Neurosurgery and Psychiatry*. v. 66, pp. 137-147, 1999.

FREITAS, E. V.; et al. *Tratado de Geriatria e Gerontologia*. Guanabara Koogan, 2002.

GEISSLER, T.; BRANDT, W.; PORZEL, A.; SCHLESNIZIG, D.; KEHLEN, A.; WESSJOHANN, L.; ARNOLD, N. Acetylcholinesterase inhibitors from the toadstool *Cortinarius infractus*. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*. v. 18, pp. 2173-2177, 2010.

GHOSAL, S.; BHATTACH, S. K.; MEHTA, R. Naturally occurring and synthetic beta-carbolines as cholinesterase inhibitors. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. v. 61, (5), pp. 808, 1972.

GIACOBINE, E. In: Giacobin, E. (ed.), *Cholinesterases and cholinesterase inhibitors*. pp. 181-226, 2000.

GLENNON, R. A.; DUKAT, M.; GRELLA, B. Binding of β -carbolines and related agents at serotonin (5-HT_2 and 5-HT_{1A}), dopamine (D_2) and benzodiazepine receptors. *Drug and alcohol dependence*. v. 60, pp. 121-132, 2000.

GOTTI, C.; CLEMENT, F. Neuronal nicotinic receptors: from structure to pathology. *Progress in Neurobiology*. v. 74, pp. 363-396, 2004.

GREIG, N. H.; UTSUKI, T.; INGRAM, D. K. Selective butyrylcholinesterase inhibition elevates brain acetylcholine, augments learning and lowers Alzheimer beta-amyloid peptide in rodent. *Proceedings of the national academy of sciences of the united states of America*. v. 102, pp. 17413-17418, 2005.

GRELLA, B.; DUKAT, M.; YOUNG, R.; TEITLER, M.; DEIVIS, K. H.; GAUTHIER, C. B.; GLENNON, R. A. Investigation of hallucinogenic and related β -carbolines. *Drug and Alcohol Dependence*. v. 50, pp. 99-107, 1998.

HAASS, C.; SCHLOSSMACHER, M. G.; HUNG, A. Y.; VIGO, C. P.; MELLON, A.; Ostaszewski, B. L.; Lieberburg, I.; Koo, E. H.; Schenk, D.; Teplow, D. B.; Selkoe, D. J. Amyloid β -peptide is produced by cultured cells during normal metabolism. *Nature*. V. 359, pp. 322-325, 1992.

HAMANN, J.; WERNICKE, C.; LEHMANN, J. 9-Methyl- β -carboline up-regulates the appearance of differentiated dopaminergic neurones in primary mesencephalic culture. *Neurochemistry International*. v. 52, pp. 688-700, 2008.

HARDIMAN, J.; CARREL, H. L.; ZACHARIAS, D. E.; GLUSKER, J. P. The structure of harman, a comutagen. *Bioorganic Chemistry*. v.15, pp. 127-132, 1987.

HARDY, J.; ALLSOP, D. Amyloid deposition as the central event in the aetiology of Alzheimer's disease. *Trends in Pharmacological Sciences*, v.12, pp. 383-388, 1991.

HARTMANN, J.; KIEWERT, C.; DUYSSEN, E. G. Excessive hippocampal acetylcholine levels in acetylcholinesterase-deficient mice are moderated by butyrylcholinesterase activity. *Journal of Neurochemistry*. v. 100, pp. 1421-1429, 2007.

HEMMATEENEJAD, B.; ABBASPOUR, A.; MAGHAMI, H. Partial least squares-based multivariate spectral calibration method for simultaneous determination of beta-carboline

derivatives in *Peganum harmala* seed extracts. *Analytica Chimica Acta*. v. 575, pp. 290-299, 2006.

HENDRI, H. C.; OGUNNIY, A.; HALL, K. S. Incidence of dementia and Alzheimer disease in 2 communities: Yoruba residing in Ibadan, Nigeria, and African Americans residing in Indianapolis, Indiana. *JAMA*; 285:739–747. 2001

HENRIQUES, A. T.; KERBER, V. A.; MORENO, P. R. H. Alcalóides: Generalidades e aspectos básicos. In: Simões, C. M. O. et al., *Farmacognosia. Da planta ao medicamento*. 1^o Edição. Ed. Universidade/UFRGS. Ed. UFSC. Porto Alegre/ Florianópolis, 1999.

HERRAIZ, T.; GALISTEO, O. J.; CHAPARRO, R. C. Preparation of beta-carboline compounds, useful as inhibitors of monoamino-oxidase for treating e.g. depression, comprises enzymatic oxidation of natural tetrahydro precursors. Consejo Superior Investigaciones Cientif. Patent: ES2278534-A1; WO2007085679-A1; ES2278534-B1, 2008.

HERRAIZ, T.; CHAPARRO, R. C. Human monoamine oxidase enzyme inhibition by coffee and β -carbolines norharman and harman isolated from coffee. *Life Sciences*. v. 78, pp. 795-802, 2006.

HERRERA, E. J.; CARMELLI, P.; SILVEIRA, A.D.; Epidemiologic survey of dementia in a community-dwelling Brazilian population. *Alzheimer Dis Assoc Disord*;16:103-108. 2002

HUSBANDS, S. M.; GLENONI, R. A.; GORGERAL, S.; GOUGH, R.; TYACKE, R.; CROSBY, J.; NUTT, D. J.; LEWIS, J. W.; HUDSON, A. L. Beta-carboline binding to imidazoline receptors. *Drug Alcohol Dependence*. v. 64, pp. 203-208, 2001.

ISHIDA, J.; WANG, H. K.; OYAMA, M.; COSENTINO, M. L.; HU, C. Q.; LEE, K. H. Anti-AIDS agents. 46. Anti-HIV activity of harman, an anti-HIV principle from *Symplocos setchuensis*, and its derivatives. *Journal of Natural Products*. v. 64, pp. 958-960, 2001.

JOHNSON, G.; MOORE, S.W. The adhesion function on acetylcholinesterase is located at peripheral anionic site. *Biochemical and Biophysical Research Communicatins* 1999; 258:758-762.

KATALINIC, M.; KUSAK, G.; DOMACINOVIC, J.; SINKO, G.; JELIC, D.; ANTOLOVIC, R.; DOVARIK, Z. Structural aspects of flavonoids as inhibitors of human butyrylcholinesterase. *European Journal of Medicinal Chemistry*, v. 45, pp. 186-192, 2010.

KAWASHIMA, K.; FUJII, T. The lymphocytic cholinergic system and its contribution to the regulation of immune activity. *Life Sciences*. v. 74, pp. 675- 696, 2003.

KUSURKAR, R. S.; GOSWAMI, S. K. Efficient one-pot synthesis of anti-HIV and anti-tumour β -carboline. *Tetrahedron*. v. 60, pp. 5315-5318, 2004.

LANCTÔT, K. L., HERRMANN, N., YAU, K. K., KHAN, L. R.; LIU, B. A.; LOULOU, M. M.; EINARSON, T. R. Efficacy and safety of cholinesterase inhibitors in alzheimer's diseases: a meta analysis. *Canadian Medical Association or its Licensors*. v. 169, pp. 557-564, 2003.

LEVIN, E. D., SIMON, B. B. Nicotinic acetylcholine involvement in cognitive function in animals. *Psychopharmacology*. v. 138, pp. 217-230, 1998.

LINEWEAVER, H. BURK, D. The determination of enzyme dissociation constants. *J. Amer. Chem. Soc.* v. 56, pp. 658-666; 1934.

LUTOMSK, J. Qualitative and quantitative chromatografhic investigation of alkaloids of *Passiflora incarnata*. *Biul. Inst. Roslin Lecznicych*. v. 5, pp. 181-198, 1959.

MARQUES, P. R. B. O.; YAMANAKA, H. Biossensores baseados no processo de inibição enzimática. *Quím. Nova* vol.31 no.7 São Paulo 2008.

MAYER, M.; MEYER B. Characterization of ligand binding by saturation transfer difference NMR spectroscopy. *Angewandte Chemie-Int Ed* 38:1784–1788 (1999).

MESULAM, M.M.; GUILLOZET, A. ; SHAW, P. Acetylcholinesterase knockouts establish central cholinergic pathways and can use butyrylcholinesterase to hydrolyze acetylcholine. *Neuroscience*. v. 110, pp. 627-639, 2002.

MICHAELIS. L.; MENTEN. M. L. Die Kinetik der Invertinwirkung. *Biochemische Zeitschrift*. v. 49, pp. 333-369, 1913.

MIKAMI, L. R. Variabilidade dos Exons 2 e 4 do gene BChE e sua relação com a atividade da butirilcolinesterase. Curitiba, 2005. Tese (Doutorado em ciências biológicas) – Área de genética. Universidade Federal do Paraná. Curitiba, 2005.

MILAGRE, C. D. F.; CABECA, L. F.; MARTINS, L. G.; MARSAIOLI, A. J. STD-NMR spectroscopy: A case study of fosfomycin binding interactions in living bacterial cells. *J. Braz. Chem. Soc*, v. 22, pp.286-291, 2011

MILLARD, C.B.; BROOMFIELD. C.A. A computer model of glycosylated human butyrylcholinesterase. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. San Diego, v. 189, p. 1280-1286, 1992.

MÖLLER. E. E. A FAMILY WITH ALZHEIMER'S DISEASE. *Acta Psychiatrica Scandinavica*. v. 21, pp. 233-244, 1946.

MOTTA, V. T, *Bioquímica, Básica segunda edição*, e.d. Medbook, 2011

MOURA, D. J.; RORIG, C.; VIEIRA, D. L. Effects of beta-carboline alkaloids on the object recognition task in mice. *Life Sciences*. v. 79, pp. 2099-2104, 2006.

MÖUSÄ, P.K.; MARTTILA, R. J.; RINNE, U. K. Survival and cause of death in Alzheimer's disease and multi-infarct dementia. *Acta Neurologica Scandinavica*. v. 74, n. 2, pp. 103-107, 1986.

MUDHER, A.; LOVESTONE, S. Alzheimer's disease – do tauists and baptists finally shake hands? *Trends in Neurosciences*. v. 25, n. 1, pp. 22-25, 2002.

NACHMANSOHN, D.; ROTHENBERG, M. A. Studies on cholinesterase .1. On the specificity of the enzyme in nerve tissue. *Journal of Biological Chemistry*. v. 158, pp. 653-666, 1945.

NACHMANSOHN, D.; WILSON, I. B. The enzymic hydrolysis and synthesis of acetylcholine. *Advances in Enzymology and Related Subjects of Biochemistry*. v. 12, pp. 259-339, 1951.

NELSON, N.L.; COX, M. M. *Lehninger Princípios da Bioquímica*. 3º Edição. Sarvier, 2002. ISBN: 85-7378-125-4.

NIKOLAEV, A.; MCLAUGHLIN, T.; O'LEARY, D.; TESSIER-LAVIGNE, M. APP binds DR6 to trigger axon pruning and neuron death via distinct caspases. *Nature*. v. 457, pp. 981-990, 2009.

NITRINI, R; CARMELLI, P.; HERRERA, E.J. Incidence of Dementia in a Community-Dwelling Brazilian Population. *Alzheimer Dis Assoc Disord*;18:241– 246. 2004

NODARI, R. O.; GUERRA, M. P. Biodiversidade: aspectos biológicos, geográficos, legais e éticos. Em *Farmacognosia: da planta ao medicamento*, ed. por C. M. O. Simões, E. P. Schenkel, G. Gosmann, J. C. P. Mello, L. A. Mentz, e P. R. Petrovick, pp. 11-24, Editora UFSC/Editora UFRGS, Florianópolis/Porto Alegre, 2003.

NOWACKI, E.; JURZYSTA M; GORSKI P. Study on origin and protective function of alkaloids in plants. 2. Effect of availability of nitrogen on alkaloid synthesis in Solanaceae. *Bulletin del Academie Polonaise des Sciences-Serie des Sciences Biologiques*. v. 23, pp. 219-225, 1975.

ORHAN, I.; KARTAL, M.; TOSUN, F.; SENER, B. Screening of Various Phenolic Acids and Flavonoid Derivatives for Their Anticholinesterase Potential. *Zeitschrift für Naturforschung*, v. 62, pp. 829-832, 2007.

PANG, Y. P.; KOLLMEYER, T. M. ; HONG, F. ; LEE, J-C.; MAMMOND, P. I.; HAUGALO, K. S.; BRIMJOIN, S. Rational design of alkylene-linked bis-pyridiniumalidoximes as improved acetylcholinesterase reactivators. *Chemistry & Biology*. v.10, pp. 491-502, 2003.

PATOCKA, J.; KUCA, K.; JUN, D. Acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase - important enzymes of human body. *Acta Medica, Hradec Králové*, v. 47, n.4, p.215- 228, 2004.

PATRICK, G.L. *Medicinal Chemistry*, second ed., Oxford, 2001, pp. 432-482.

PELLETIER, S. W.; The nature and definition of an alkaloid. In: *Alkaloids and Biological Perspectives*. John Wiley, New York, pp. 1-31, 1983.

PENG, L. F. Acetylcholinesterase inhibition by territrem B derivatives. *Journal Natural Products*. v. 58, pp. 857-862, 1995.

PIAZZI, L.; CAVALLI, A.; BELLUTI, F.; BISI, A.; GOBBI, S.; BARTOLINI, M.; ANDRISANO, V.; RACANATINI, M.; RAMPA, A. Extensive SAR and Computational Studies of 3-{4-[(Benzylmethylamino)methyl]phenyl}-6,7-dimethoxy-2H-2-chromenone (AP2238) Derivatives. *Journal of Medicinal Chemistry*. v. 50, pp. 4250-4254, 2007.

PRATT, C. W.; CORNELLY, K. *Bioquímica Essencial*. 1º Edição. Guanabara Koogan, 2006.

ISBN: 85-277-1128-1. RANG, H.P.; DALE, M.M.; RITTER, J.M. *Farmacologia*, 5ª edição. Elsevier. pp. 920, 2004. ISBN: 8535213686.

RATES, S. M. K. Plants as source of drugs. *Toxicon: Official Journal of the International Society on Toxinology*. v. 39, pp. 603-613, 2001.

RIVAS, P.; BRUCE, K.; CASSELS.; MORELLO, A.; REPETTO, Y. Effects of some β -carboline alkaloids on intact *Trypanosoma cruzi* epimastigotes. *Comparative Biochemistry and Physiology C-Toxicology & Pharmacology*. v. 122, pp. 27-31, 1999.

RIZZO, S.; CAVALLI, A.; CECCARINI, L.; BARTOLINI, M.; BELLUTI, F.; BISI, A.; ANDRISANO, V.; RECANATINI, M.; RAMPA, A. Structure-Activity Relationships and Binding Mode in the Human Acetylcholinesterase Active Site of Pseudo-Irreversible Inhibitors Related to Xanthostigmine. *Chemmedchem*. v. 4, pp. 670-679, 2009.

RIZZO, S.; BARTOLINI, M.; CECCARINI, L.; PIAZZI, L.; GOBBI, S.; CAVALI, A.; RECANATINI, M.; RAMPA, A. Targeting Alzheimer's disease: Novel indanone hybrids

bearing a pharmacophoric fragment of AP2238. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*. v. 18, pp. 1749-1760, 2010.

ROBINSON, T. *Metabolism and Function of Alkaloids in Plants*. *Science*. v. 184, pp. 430-435, 1974.

ROGERS, S. L.; DOODY, R. S.; MOHS, R. C. Friedhoff LT and the Donepezil Study Group. Donepezil improves cognition and global function in Alzheimer disease: a 15-week, doubleblind doubleblind, placebo-controlled study. *Archives of Internal Medicine*. v. 158, pp. 1021-1031, 1998.

ROGERS, S.L.; Farlow M. R.; Mohs, R. A 24-week, double-blind, placebo-controlled trial of donepezil in patients with Alzheimer's disease. *Neurology*. v. 50, pp.136-145, 1998.

SANTOS, V. M. R.; DONNICI, C. L.; DACOSTA, J. B. N.; CAIXEIRO, J. M. R. Compostos organofosforados pentavalentes: histórico, métodos sintéticos de preparação e aplicações como inseticidas e agentes antitumorais. *Química Nova*, vol. 30, n.1, pp. 159-170, 2007.

SCHOTT, B. H.; RICHARDSON-KLAVEHN, A.; HENSON, R. N. A.; BECKER, C.; HEINZE, H.; DUZEL, E. Neuroanatomical dissociation of encoding process related to priming and explicit memory. *Journal of Neuroscience*, v.26, pp.792-800, 2006.

SCHUMACHER, M.; CAMP, S.; MAULET, Y.; NEWTON, M.; MACPHEEQUIGLEY, K.; TAYLOR, S.S.; FRIEDMAN, T.; TAYLOR, P. Primary structures of Torpedo-californica acetylcholinesterase deduced from its cDNA sequence. *Nature*. v. 319, pp. 407-409, 1986.

SHI, C. C.; CHEN, S. Y.; WANG, G. J. Vasorelaxant effect of Harman. *European Journal of Pharmacology*. v. 390, pp. 319-325, 2000.

SILMAN, I.; HAREL, M.; AXELSEN, P.; RAVES, M.; SUSSMAN, J. L. Three-dimensional structure of acetylcholinesterase and of its complexes with anticholinesterase agents. *Biochemical Society transactions*. v. 22, pp.745-749, 1994.

SILVA FILHO, M. V.; OLIVEIRA, M. M.; SALLES, J. B.; CUNHA BASTOS, V. L. F.; CASSANO, V. P. F.; CUNHA BASTOS, J. Methyl-paraoxon inhibition kinetics for acetylcholinesterase from brain of neotropical fishes. *Toxicology Letters*. v. 153 pp. 247-254, 2004.

SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMAN, G., MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. *Farmacognosia. Da planta ao medicamento*. 1º Edição. Universidade/UFRGS. Ed. UFSC. Porto Alegre/ Florianópolis, 1999.

SNYDER, R. H.; STANLEY, M.; KATZ, L. The synthesis of derivative of β -carboline. *Contribution from the noyes chemical laboratory-University of Illinois*, v.70, pp. 222 – 225, 1948.

SOARES, L. F. *Intoxicações Agudas por Carbamatos em Pediatria. Aspectos Epidemiológicos, Clínicos e Terapêuticos*. Rio de Janeiro, 1998. (Monografia do Curso de Especialização em Pediatria) Universidade Federal Fluminense – UFF. Rio de Janeiro, 1998.

SOREQ, H.; BEN-AZIZ, R.; PRODY, C.A.; SEIDMAN, S.; GNATT, A.; NEVILLE, L.; LIEMAN-HURWITZ, J.; LEV-LEHMAN, E.; GINZBERG, D.; LIPIDOT-LIFSON, Y. Molecular cloning and construction of the coding region for human acetylcholinesterase reveals a G + C-rich attenuating structure. *Proceedings of the Nacional Academy of Science*. v. 87, pp. 9688-9692, 1990.

SOREQ, H.; SEIDMAN, S..Acetylcholinesterase-new roles for and old actor. *Nat. Rev. Neurosci.* 2, 294-302. 2001

SUSSMAN, J.L.; HAREL, M.; PROLOW. F.; OEFNER, C.; GOLDMAN, A.; TOKER, L.; SILMAN, I. Atomic structure of acetylcholinesterase from *Torpedo-californica*: a prototypic acetylcholine-binding protein. *Science*. v. 253, pp. 872-879, 1991.

SUZUKI, A.; MYAURA, N. Palladium-catalyzed cross – Coupling reactions of organoboron compounds. *Chem. Rev*, v.95, pp. 2457-2483, 1995.

TAYLOR, P. Anticholinesterase Agents. In: Hardman, J. G.; Gilman, A. G.; Limbird, L. E. (Ed). *The Pharmacology Basis of Therapeutics*. McGraw-Hill, New York, USA, pp. 161-176, 1996.

TURK, T.; MACEK, P.; SUPUT, D. Inhibition of acetylcholinesterase by a pseudozoanthoxanthin-like compounds isolated from the zoanthid *parazoanthus-axinellae* (oschmidt). *Toxicon*. v. 33, pp. 133-142, 1995.

VAN DER ZEE, E. A.; LUITEN, P. G. M. Muscarine acetylcholine receptors in the hippocampus, neocortex and amygdala : a review of immunocytochemical localization in relation to learning and memory. *Progress and Neurobiology*. v. 58, pp. 409-471, 1999.

VIEGAS, C. J.; DA SILVA, V. B.; FURLAN, M.; ALBERTO, C. M. F.; BARREIRO, E. J. Produtos Naturais como candidatos a fármacos úteis no tratamento do Mal de Alzheimer. *Química Nova*, v. 27, n. 4, pp. 655-660, 2004.

WALDEMAR, G.; DUBOIS, B.; EMER, M. The Category Cued Recall test in very mild Alzheimer's disease: discriminative validity and correlation with semantic memory functions. *European Journal of Neurology*. v. 14, n. 1, pp. 102-108, 2007.

WANI, M. C.; WALL, P. C.; HAROLD, L. T.; MONROE, E.; ANDREW, T. M. Plant antitumor agents. VI. Isolation and structure of taxol, a novel antileukemic and antitumor agent from *Taxus brevifolia*. *J. Am. Chem. Soc.* V. 93, pp. 2325–2327, 1971.

WANG, Y. H.; SAMOYLENKO, V.; TEKWANI, B. L.; KHAN, I.A.; MILLER, L. S.; CHAURASIYA, N. D.; RAHMAN, M. M. D.; TRIPATHI, L. M.; KHAN, I. S.; JOSHI, V. C.; WIGGER, F. T.; MUHAMMAD, I. Composition, standardization and chemical profiling of *Banisteriopsis caapi*, a plant for the treatment of neurodegenerative disorders relevant to Parkinson's disease. *Journal of ethnopharmacology*; 128(3):662-71. 2010

ZIMMERMAN, G.; SOREQ, H. Termination and beyond: acetylcholinesterase as a modulator of synaptic transmission. *Cell and Tissue Research*. v. 326, pp. 655–669, 2006.

Sites consultados:

Esquema 1 - Modelo de Michaelis-Menten <http://www.portalsaofrancisco.com.br/alfa/enzimas/enzimas-9.php>. Acessado em 19 de janeiro de 2013 às 11:24h.

Figura 12 - Centro ativo da Acetilcolinesterase. Disponível em: <http://www.rcsb.org/pdb/101/motm.do?momID=54>. Consultado em 23 de janeiro de 2013 às 14:56h.

Figura 10 - Estrutura tridimensional da acetilcolinesterase. Disponível em http://www.rcsb.org/pdb/images/1c2o_bio_r_500.jpg . Consultado em 23 de janeiro de 2013 às 15:00h.

Figura 4 - Formação do complexo enzima-substrato. <http://www.portalsaofrancisco.com.br/alfa/enzimas/enzimas-9.php>. Acessado em 19 de janeiro de 2013 às 11:24h.

Figura 5 - Gráfico de Michaelis-Menten. Disponível em <http://www.portalsaofrancisco.com.br/alfa/enzimas/enzimas-9.php>. Acessado em 19 de janeiro de 2013 às 11:24h

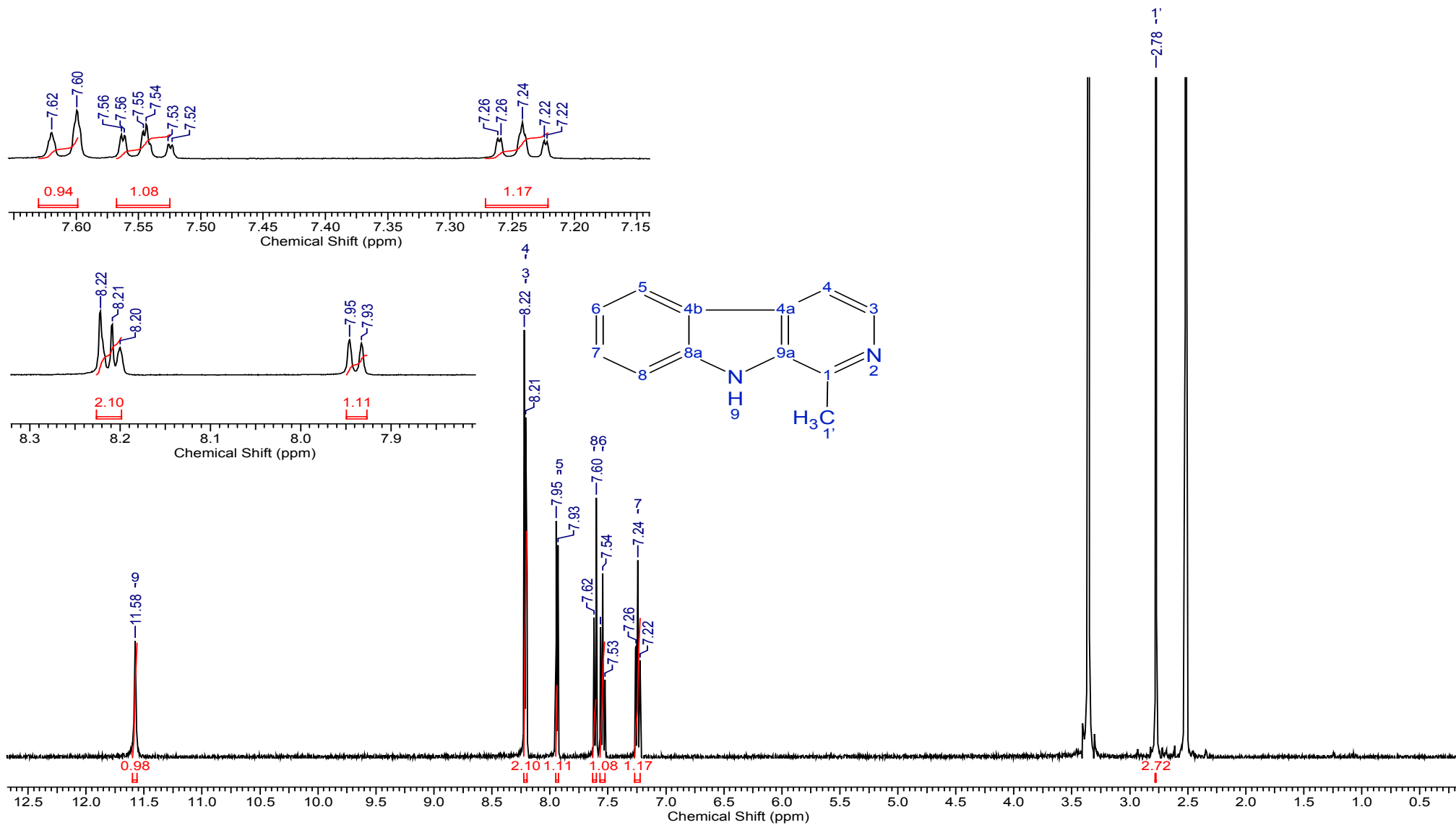
Figura 3 - Diagrama energético de uma reação catalisada e de uma reação não catalisada. Disponível em <http://www.biorom.uma.es/contenido/UIB/Jmoldesarrollo/enzimas/enzima5.html>. Acessado em 19 de janeiro de 2013 às 12:15h

Figura 6 - Gráfico de Lineaweaver e Burk - disponível em <http://www.themedicalbiochemistrypage.org>. Consultado em 23 de janeiro de 2013 às 13:52.

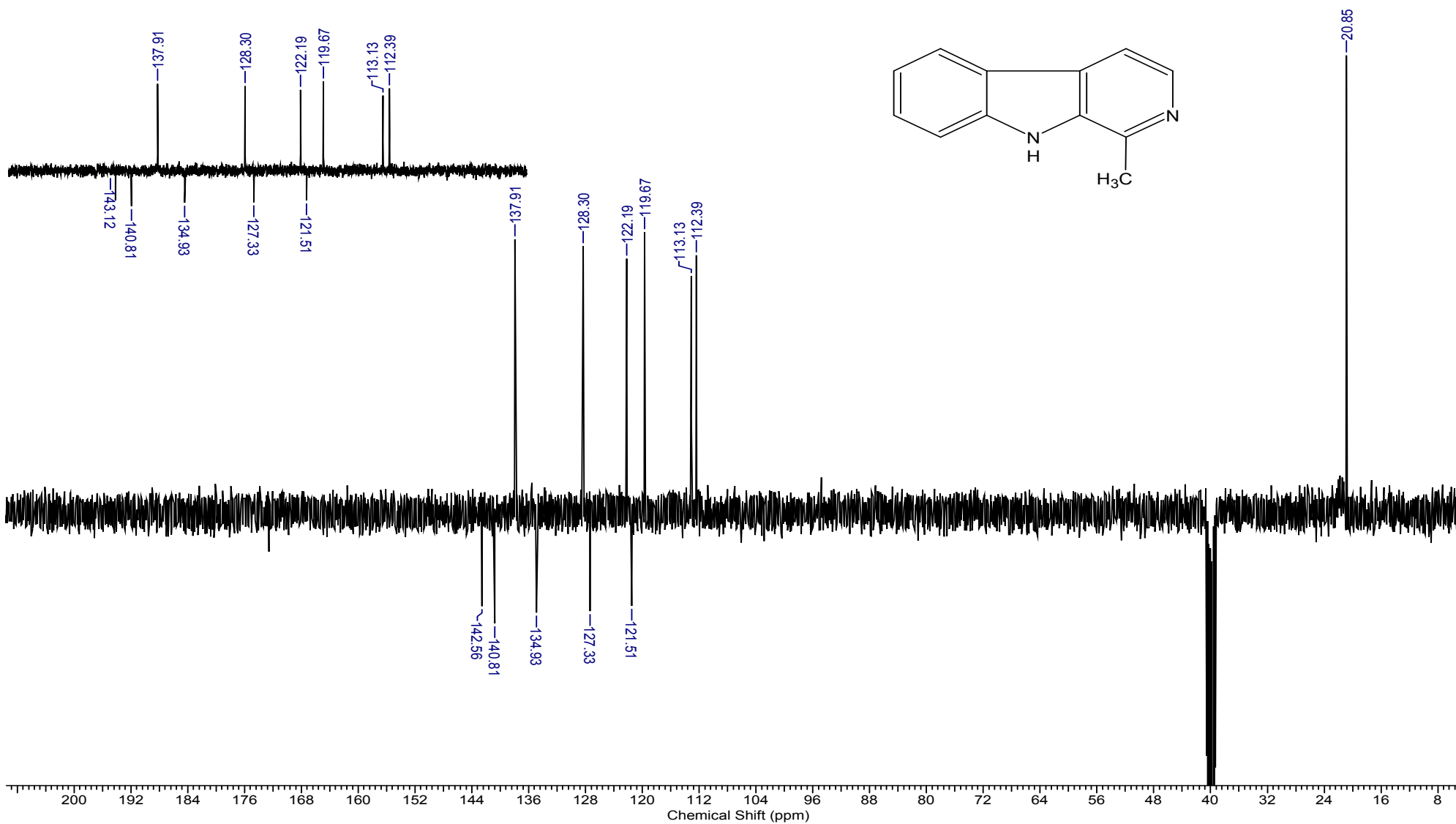
Figura 14 - Transporte, síntese e degradação da acetilcolina nos nervos pré-sinápticos e sinápticos. Disponível em <http://www.vrp.com>. Acessado em 3 de fevereiro de 2013 às 10:57h

Figura 6 - Gráfico de Lineaweaver e Burk - disponível em <http://www.themedicalbiochemistrypage.org>. Consultado em 23 de janeiro de 2013 às 13:52.

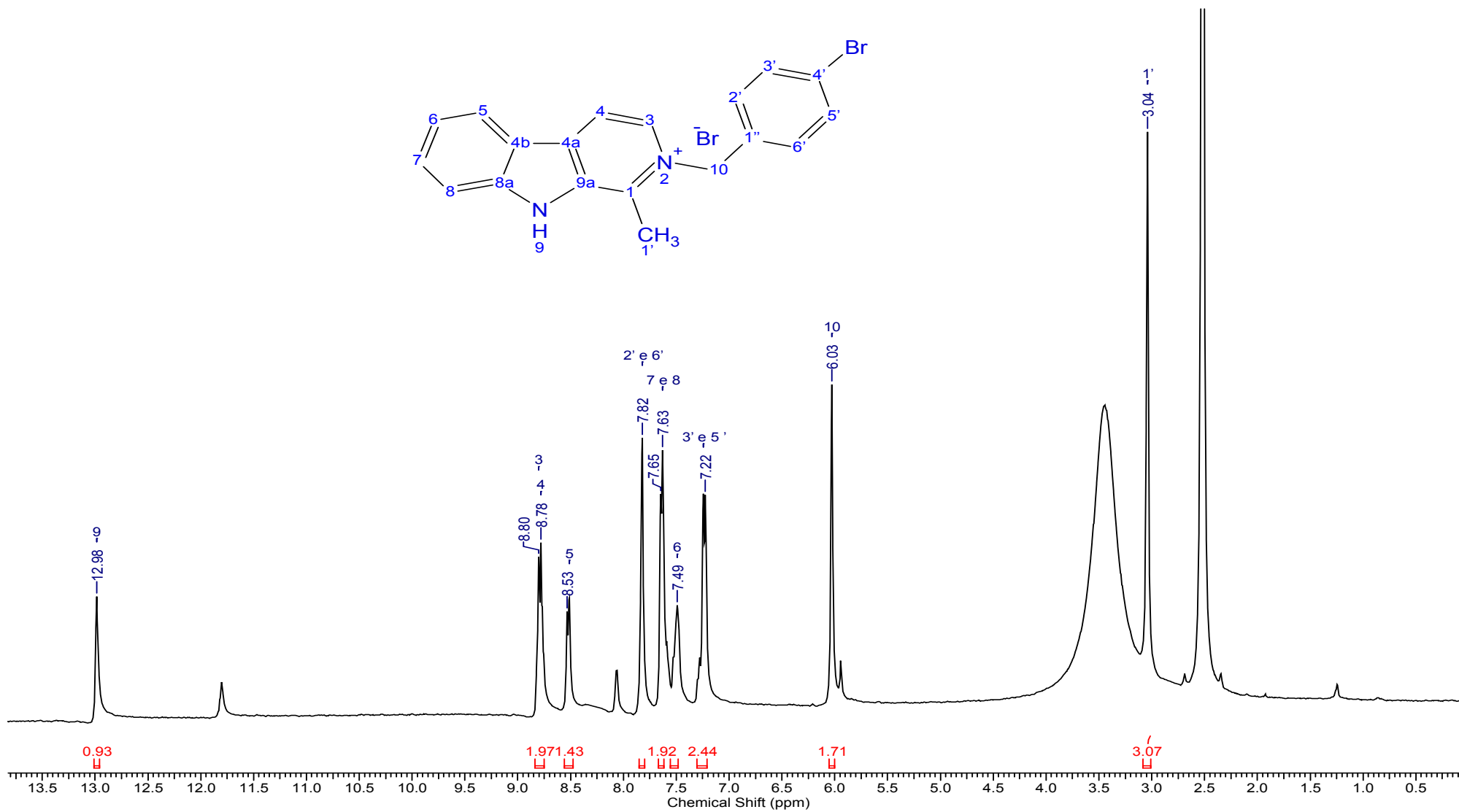
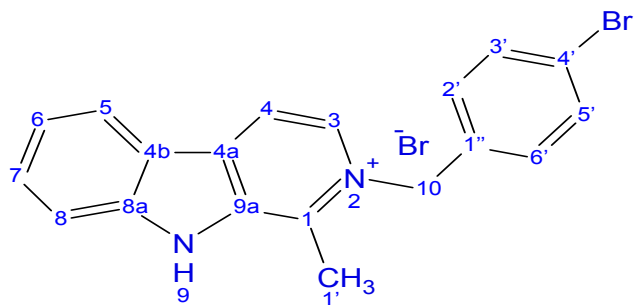
Figura 14 - Transporte, síntese e degradação da acetilcolina nos nervos pré-sinápticos e sinápticos. Disponível em <http://www.vrp.com>. Acessado em 3 de fevereiro de 2013 às 10:57h



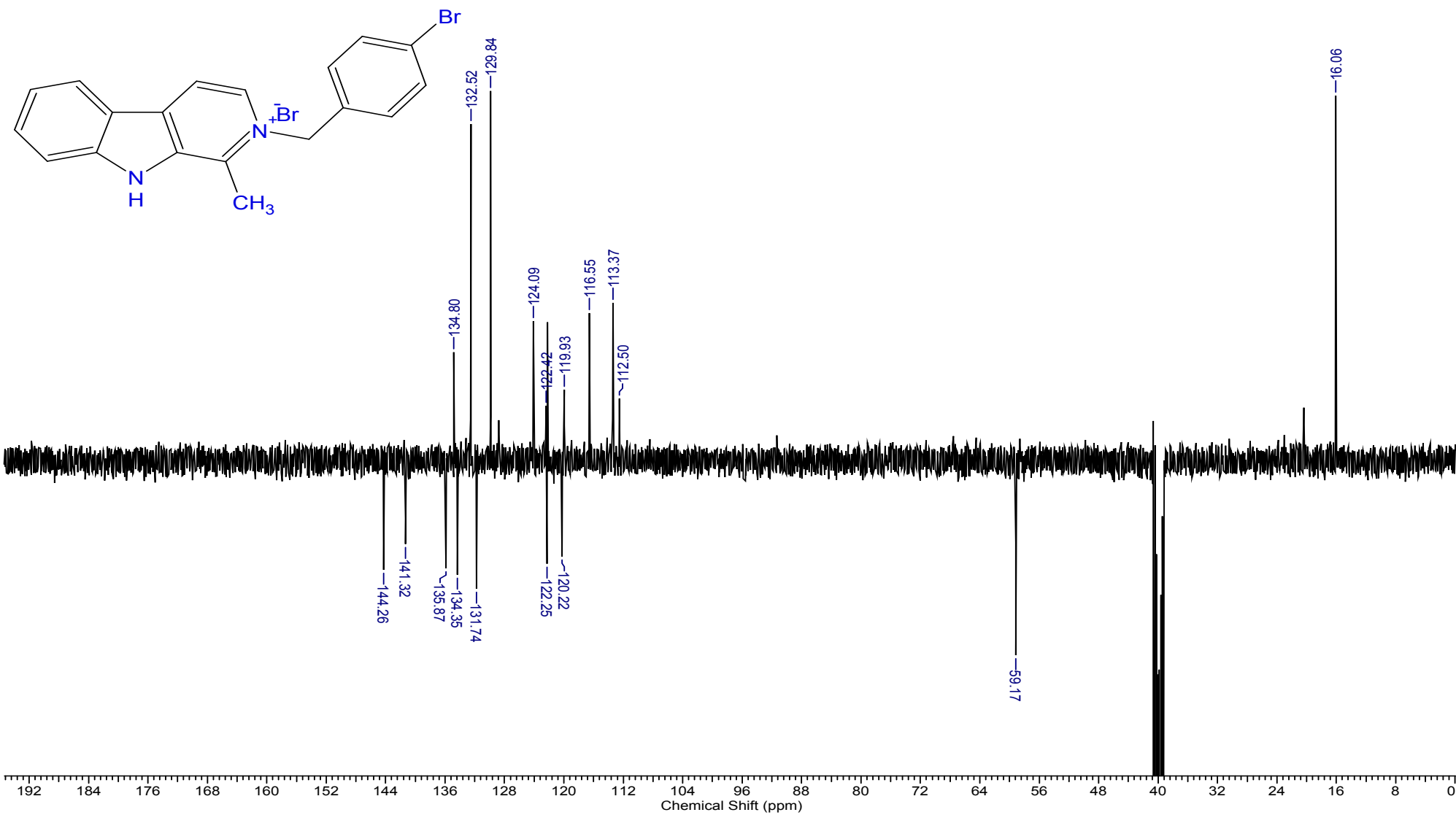
Espectro de RMN- ^1H da harmana obtido em DMSO-d_6 (500 MHz)



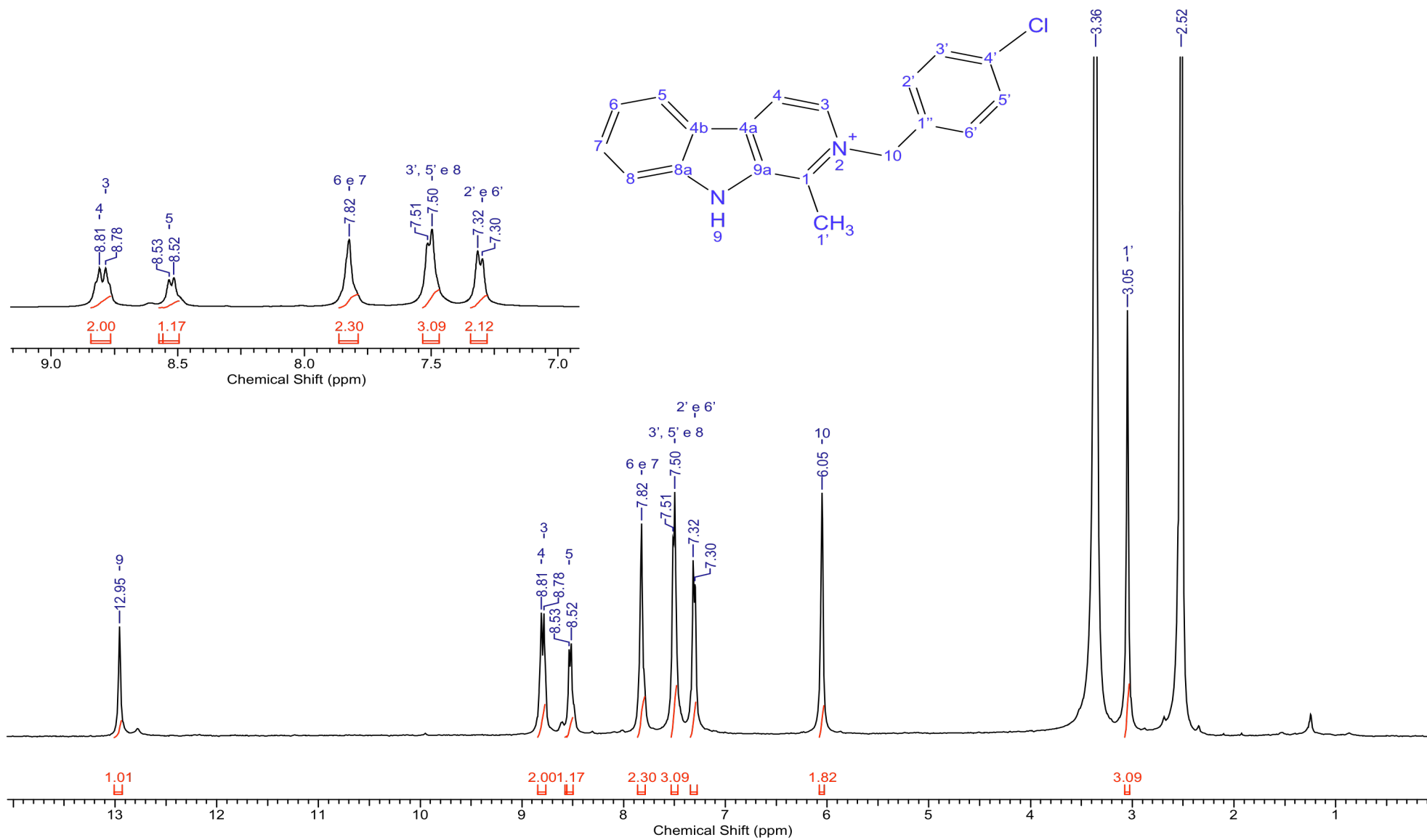
Espectro de RMN - ^{13}C da harmana obtido em DMSO-d_6 (500 MHz)



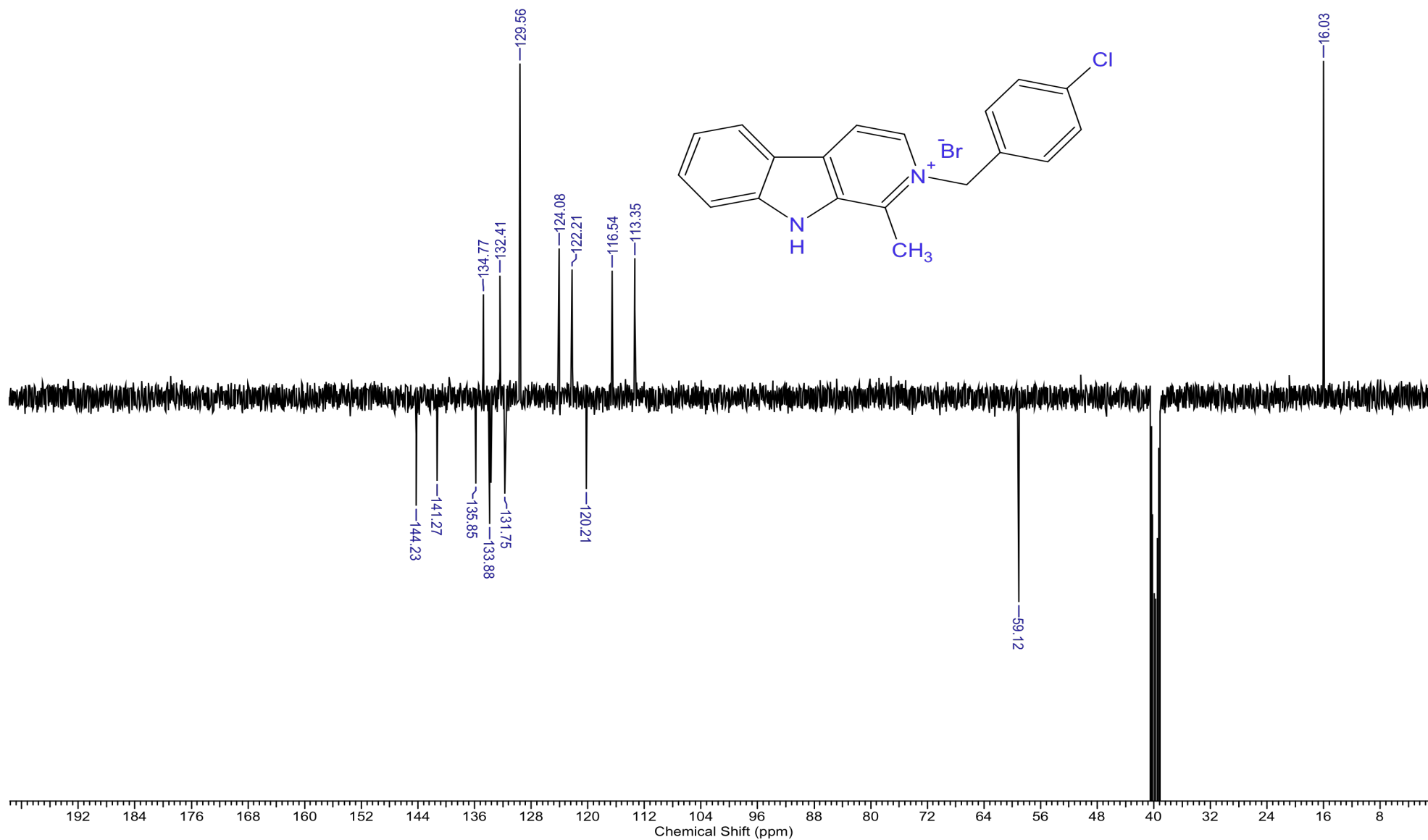
Espectro de RMN- ^1H do composto 2 obtido em DMSO-d_6 (500 MHz)



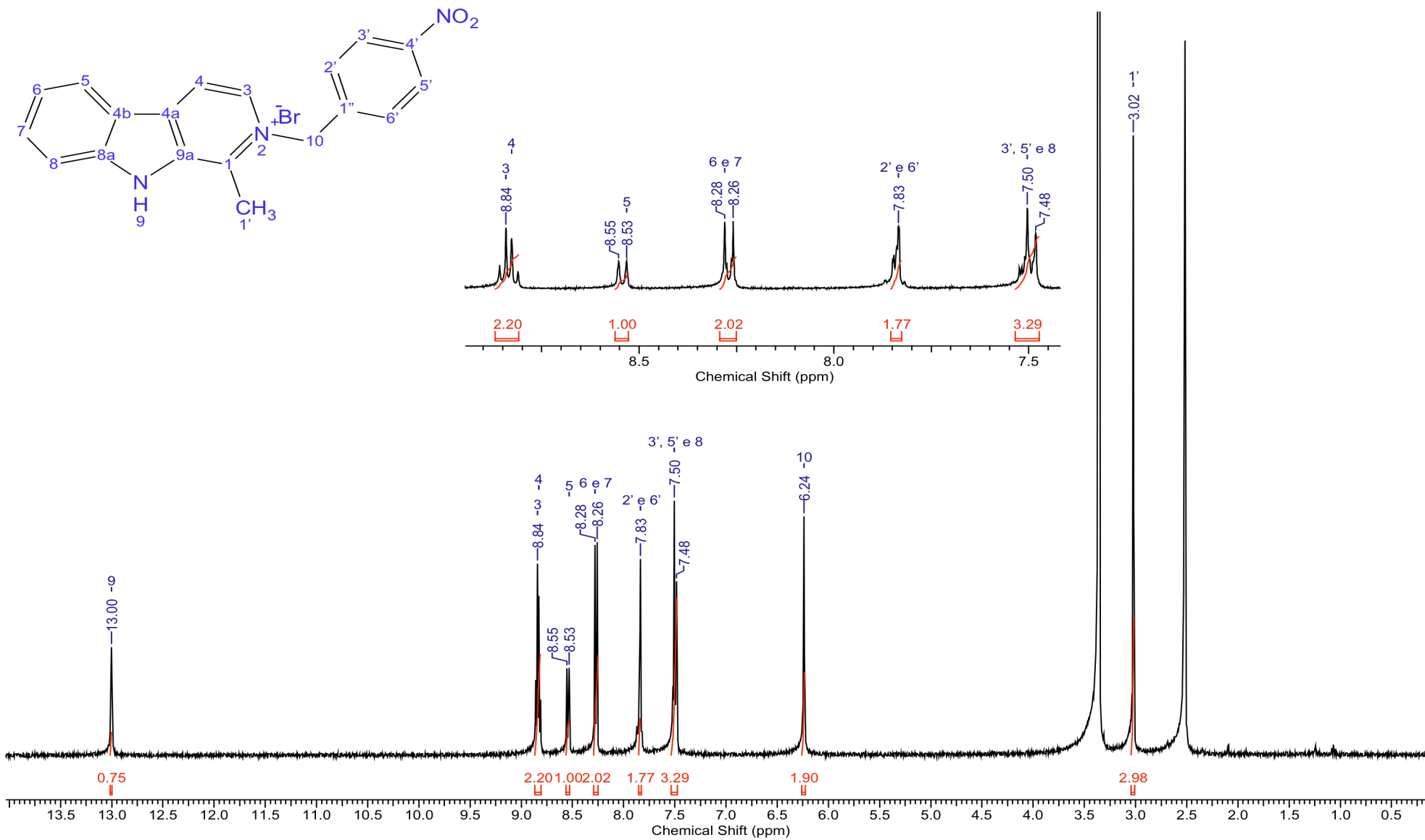
Espectro de RMN - ¹³C do composto 2 obtido em DMSO-d₆ (500 MHz)



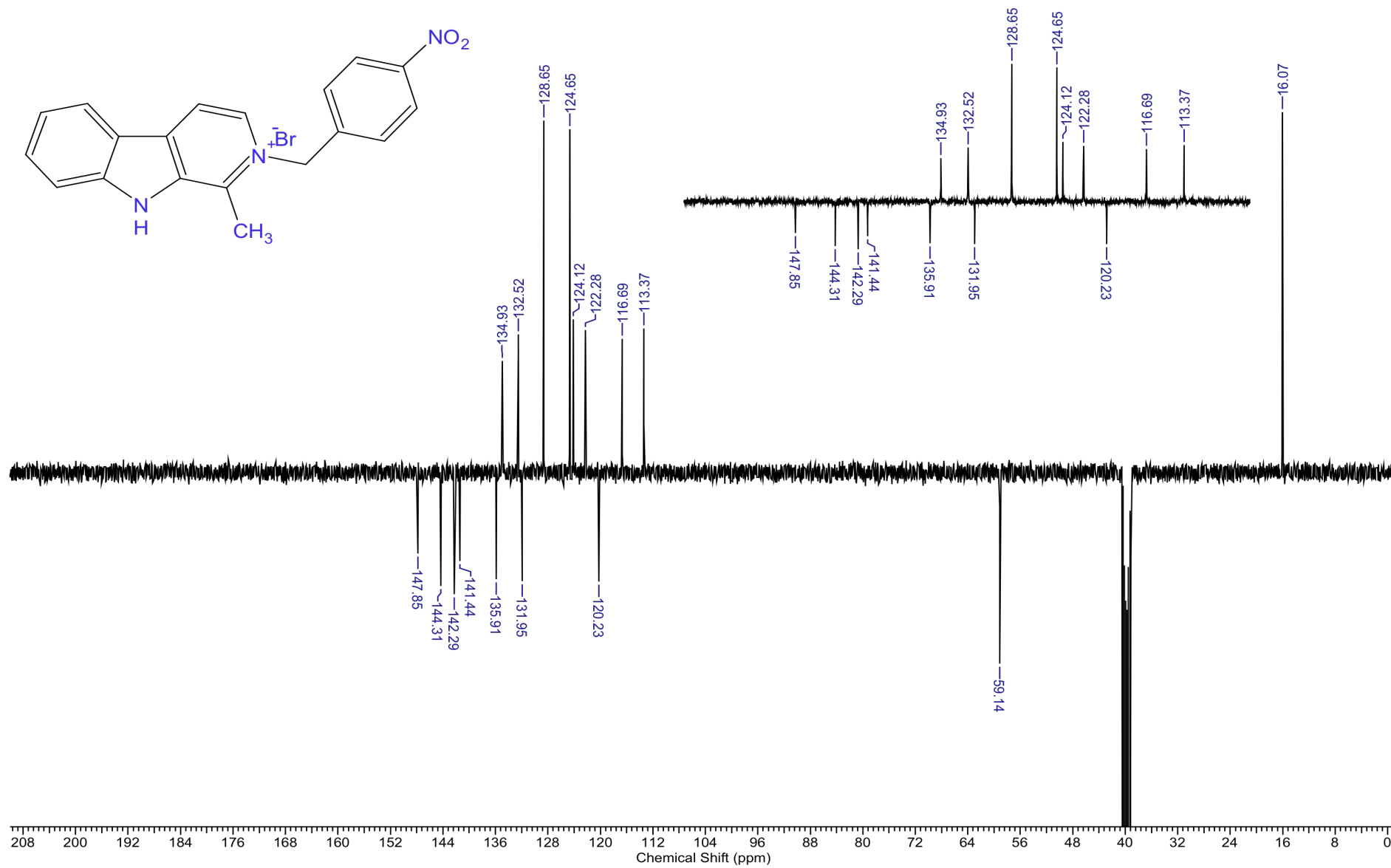
Espectro de RMN – ^1H do composto 3 obtido em DMSO-d_6 (500 MHz)



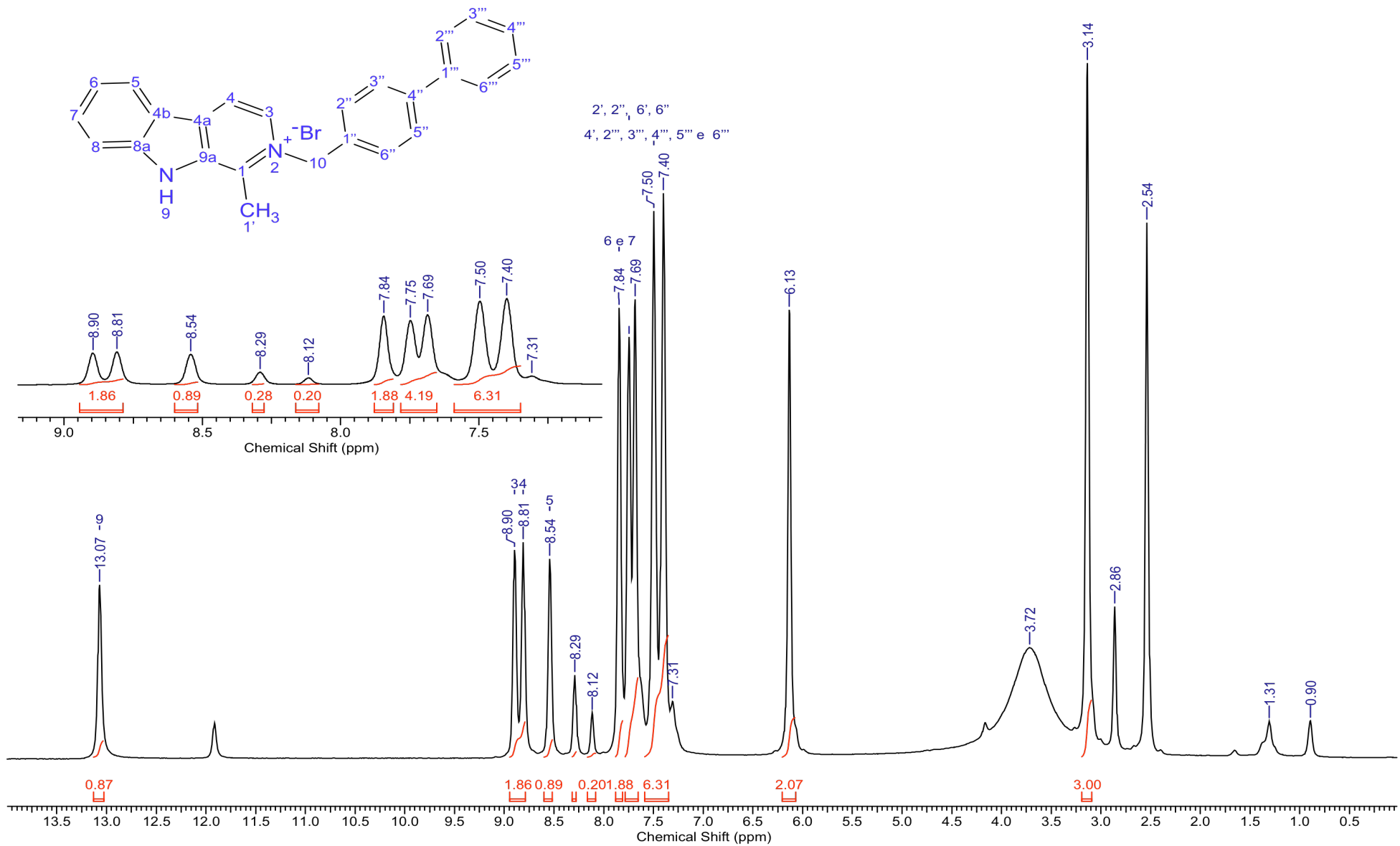
Espectro de RMN – ^{13}C do composto 3 obtido em DMSO-d_6 (500 MHz)



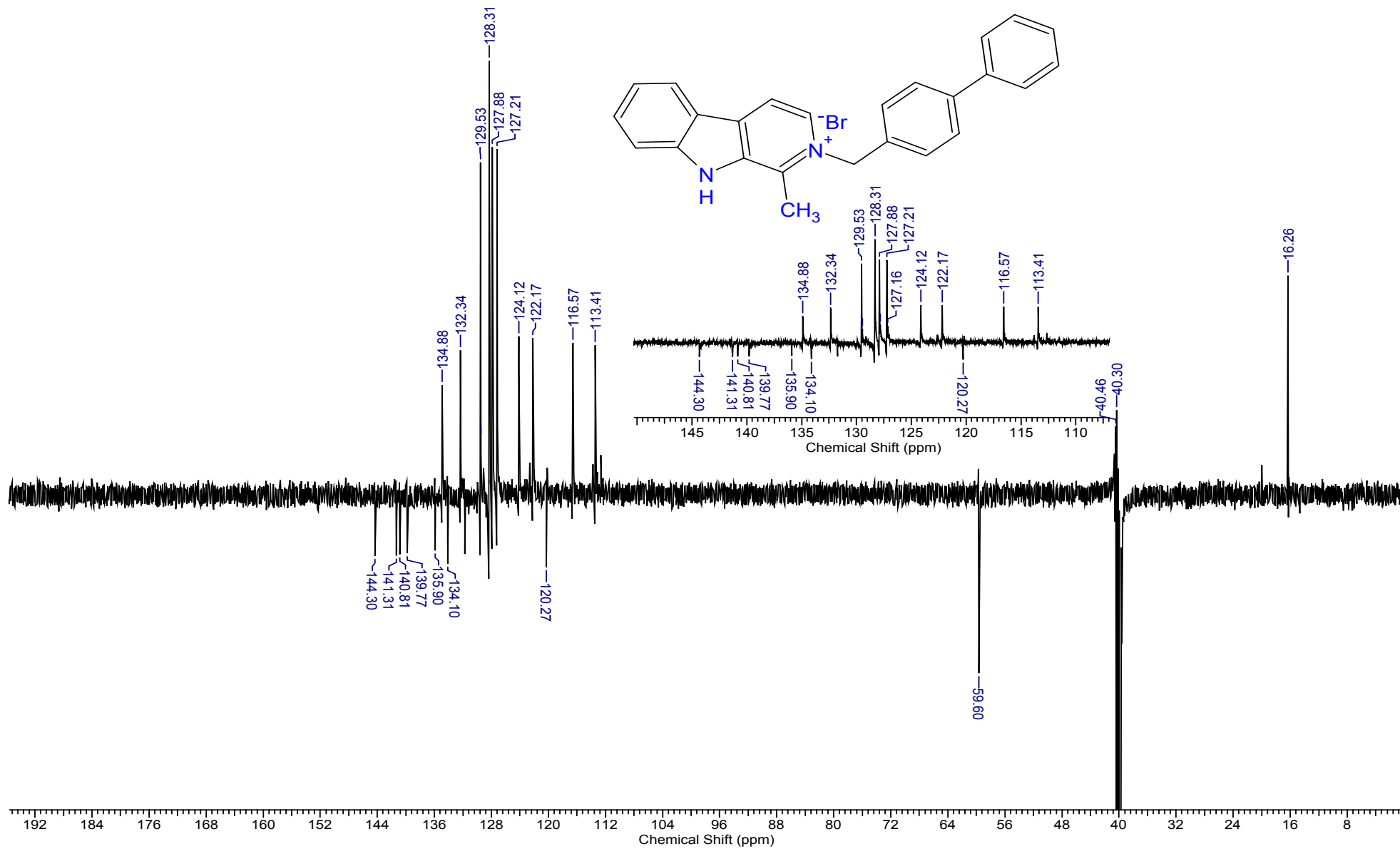
Espectro de RMN –¹H do composto 4 obtido em DMSO-d₆ (500 MHz).



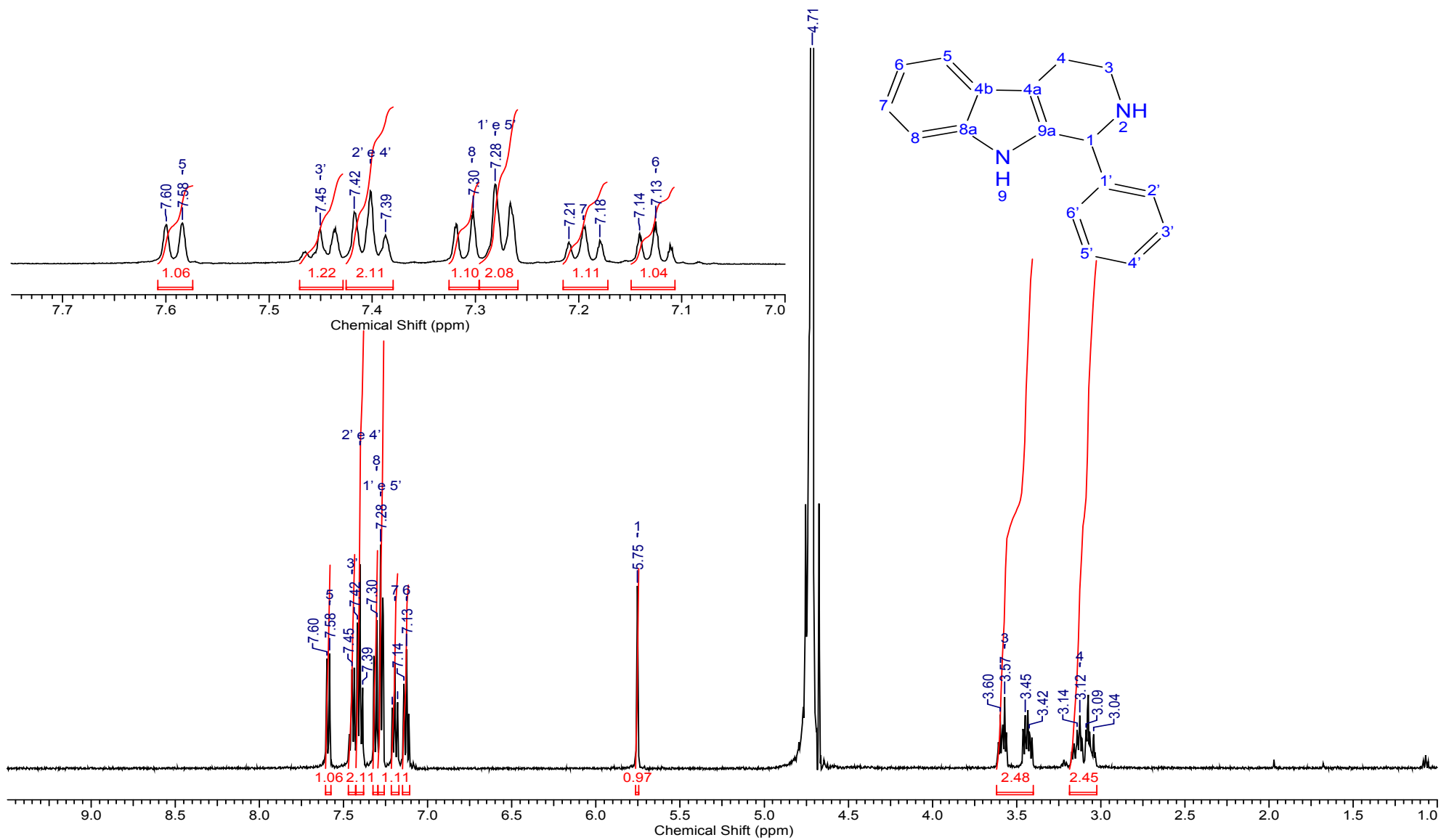
Espectro de RMN – ¹³C do composto 4 obtido em DMSO-d₆ (500 MHz).



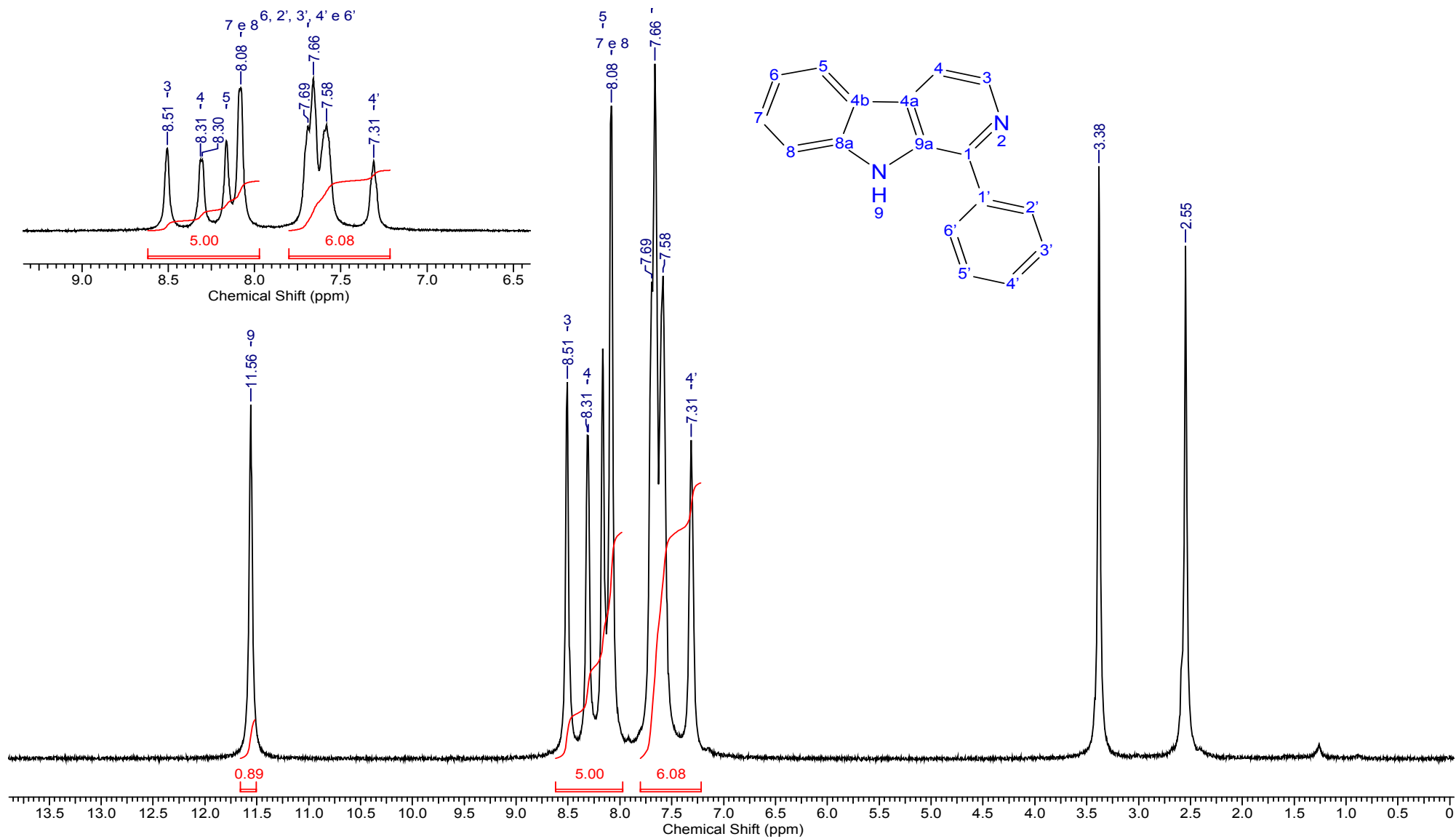
Espectro de RMN – ¹H do composto 5 obtido em DMSO-d₆ (500 MHz).



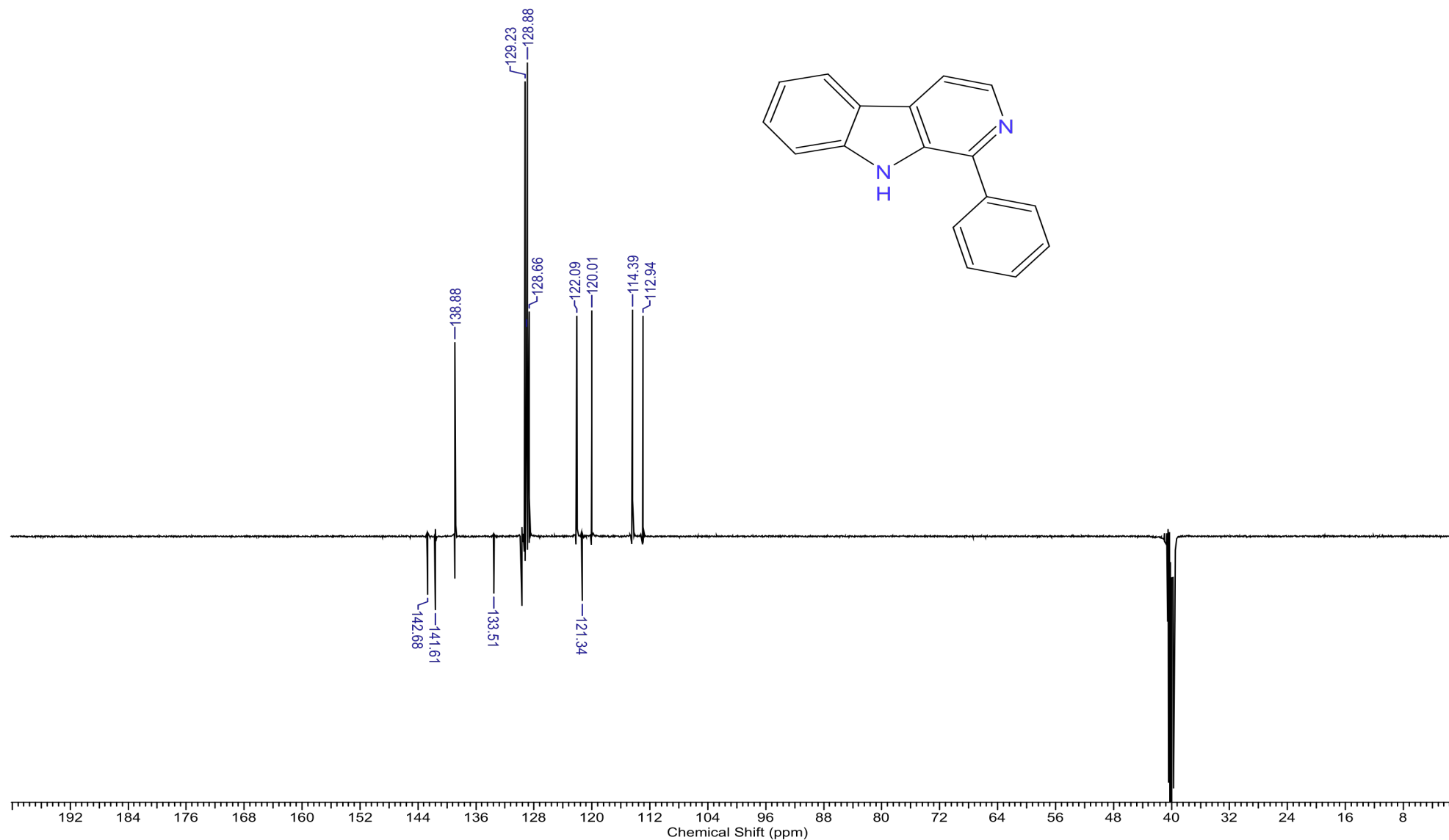
Espectro de RMN – ¹³ do composto 5 obtido em DMSO-d₆ (500 MHz).



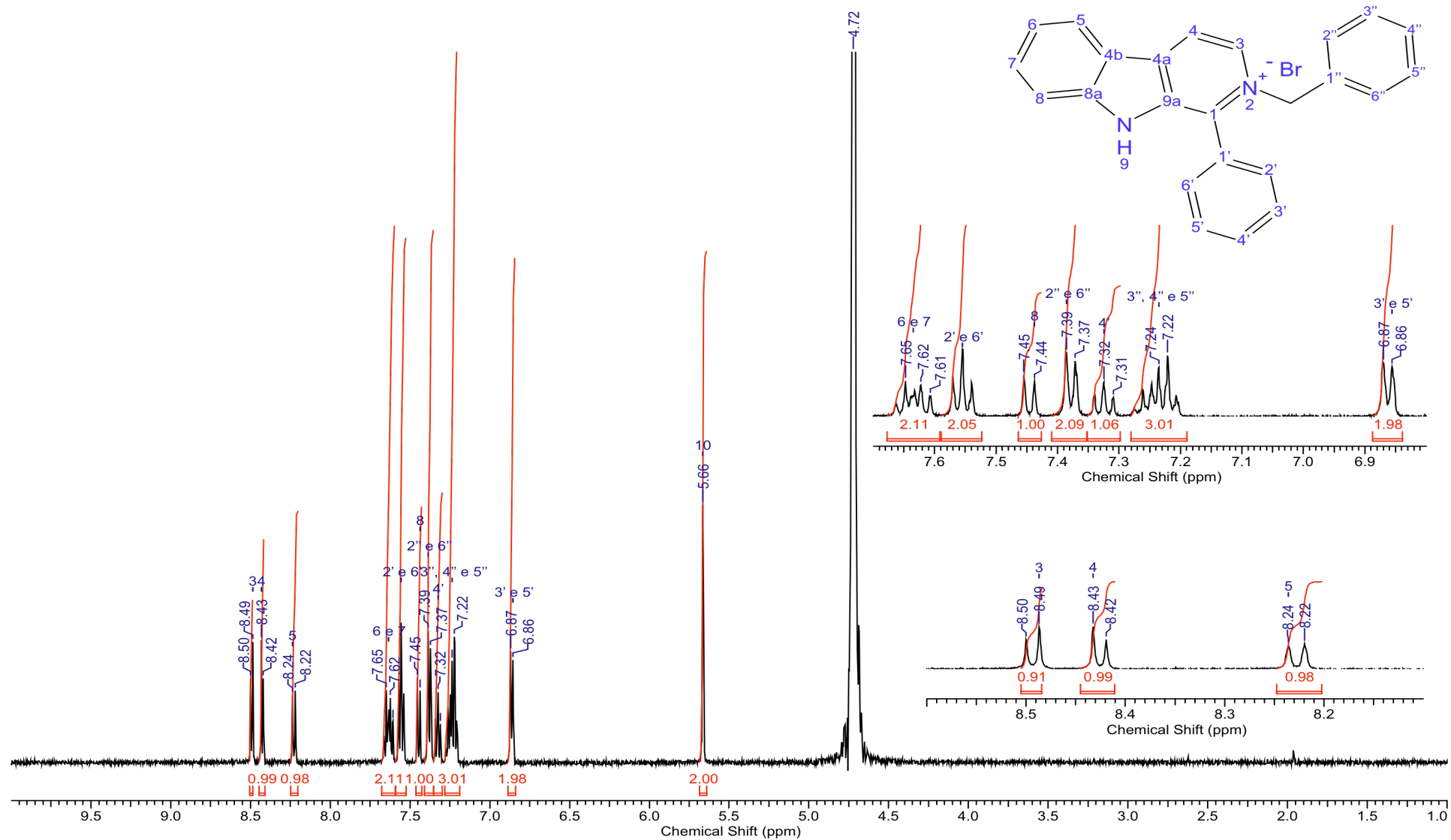
Espectro de RMN – ^1H do composto 13 obtido em D_2O (500 MHz).



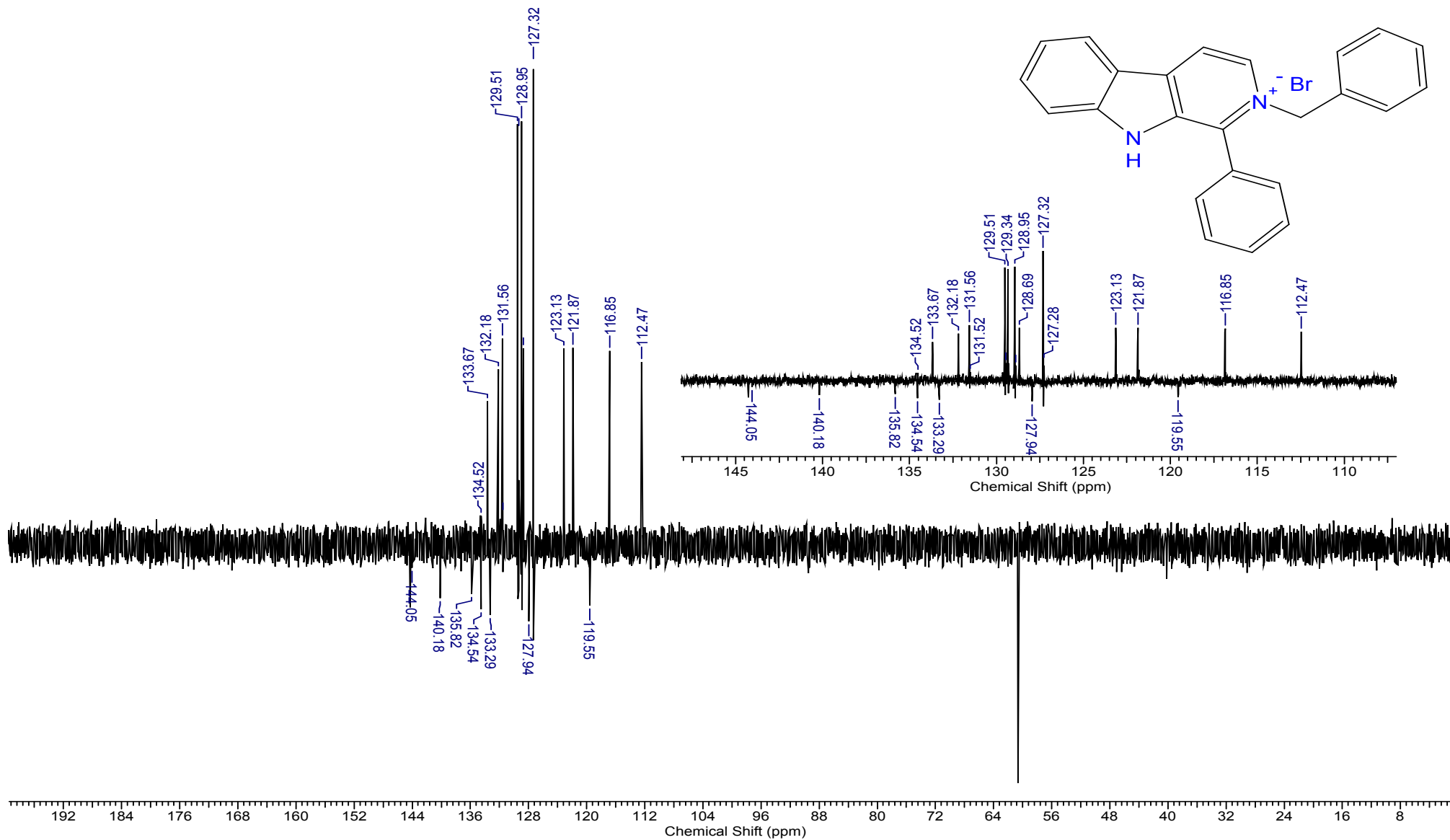
Espectro de RMN – ^1H do fenil-pirido-indol obtido em DMSO-d_6 (500 MHz).



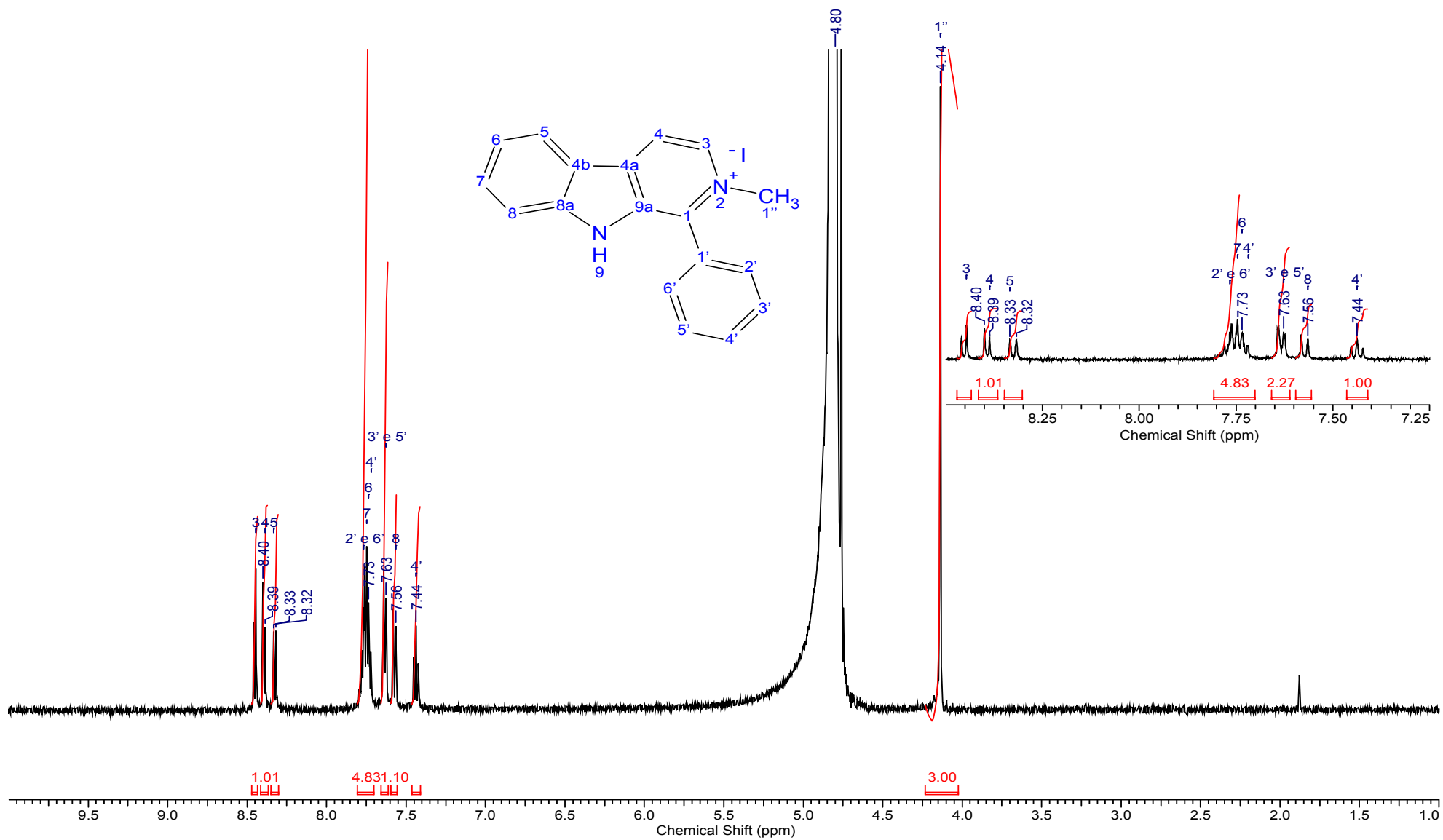
Espectro de RMN – ^{13}C do fenil-pirido-indol obtido em DMSO-d_6 (500 MHz).



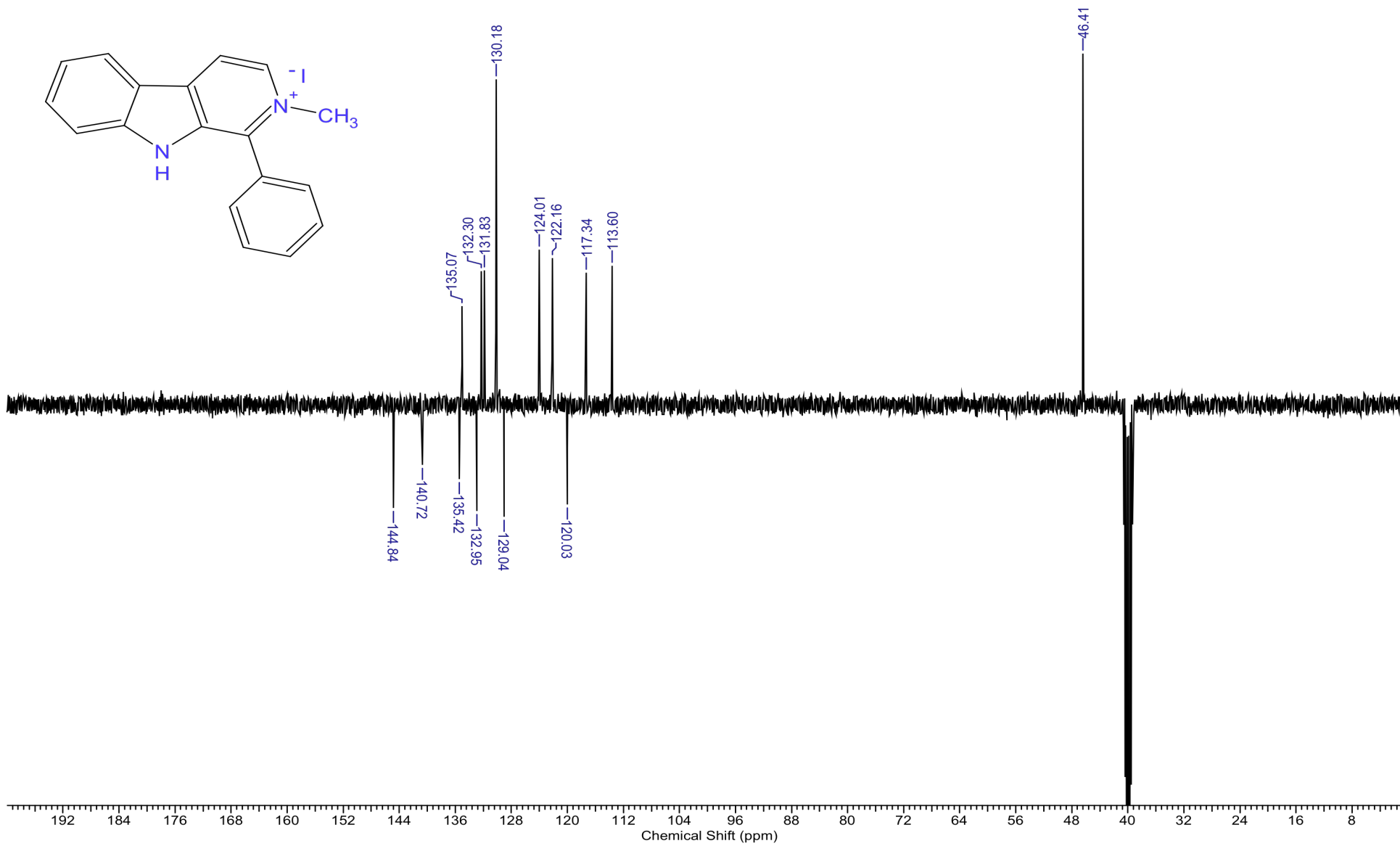
Espectro de RMN – ^1H do composto 7 obtido em D_2O (400 MHz).



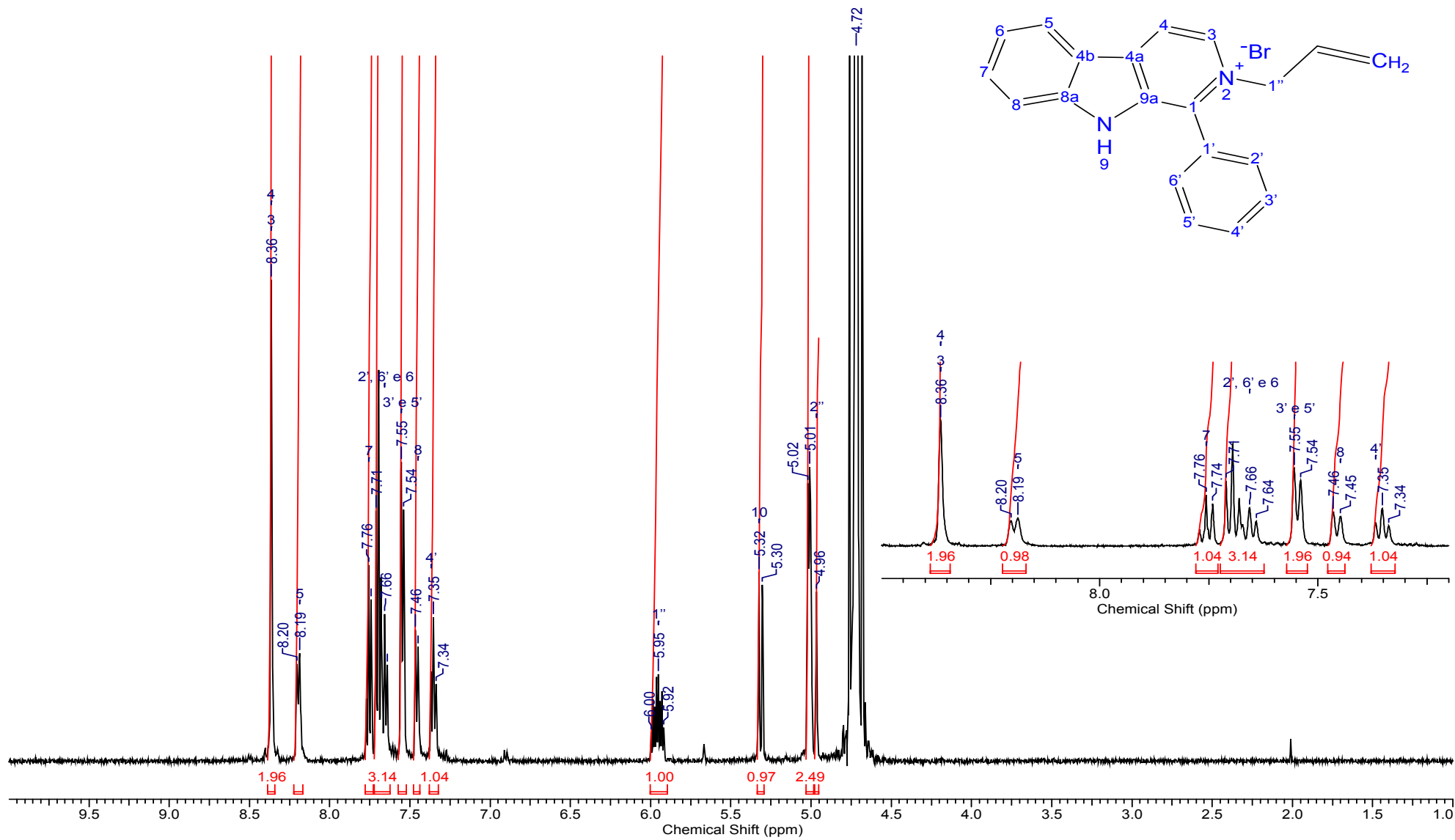
Espectro de RMN – ¹³C do composto 7 obtido em D₂O (400 MHz).



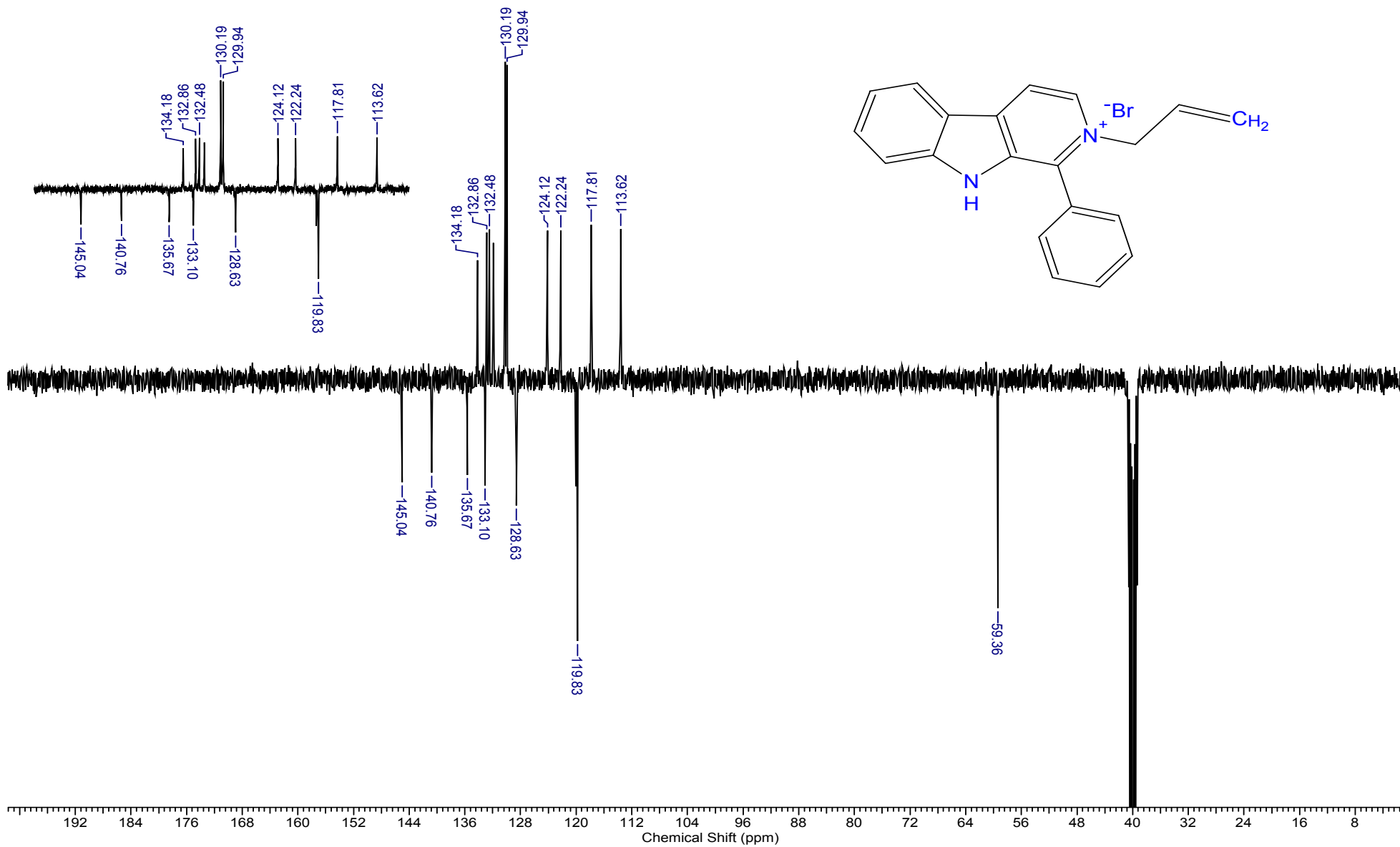
Espectro de RMN – ^1H do composto 8 obtido em D_2O (400 MHz).



Espectro de RMN – ¹³C do composto 8 obtido em DMSO-d₆ (500 MHz).



Espectro de RMN – ^1H do composto 9 obtido em D_2O (400 MHz).

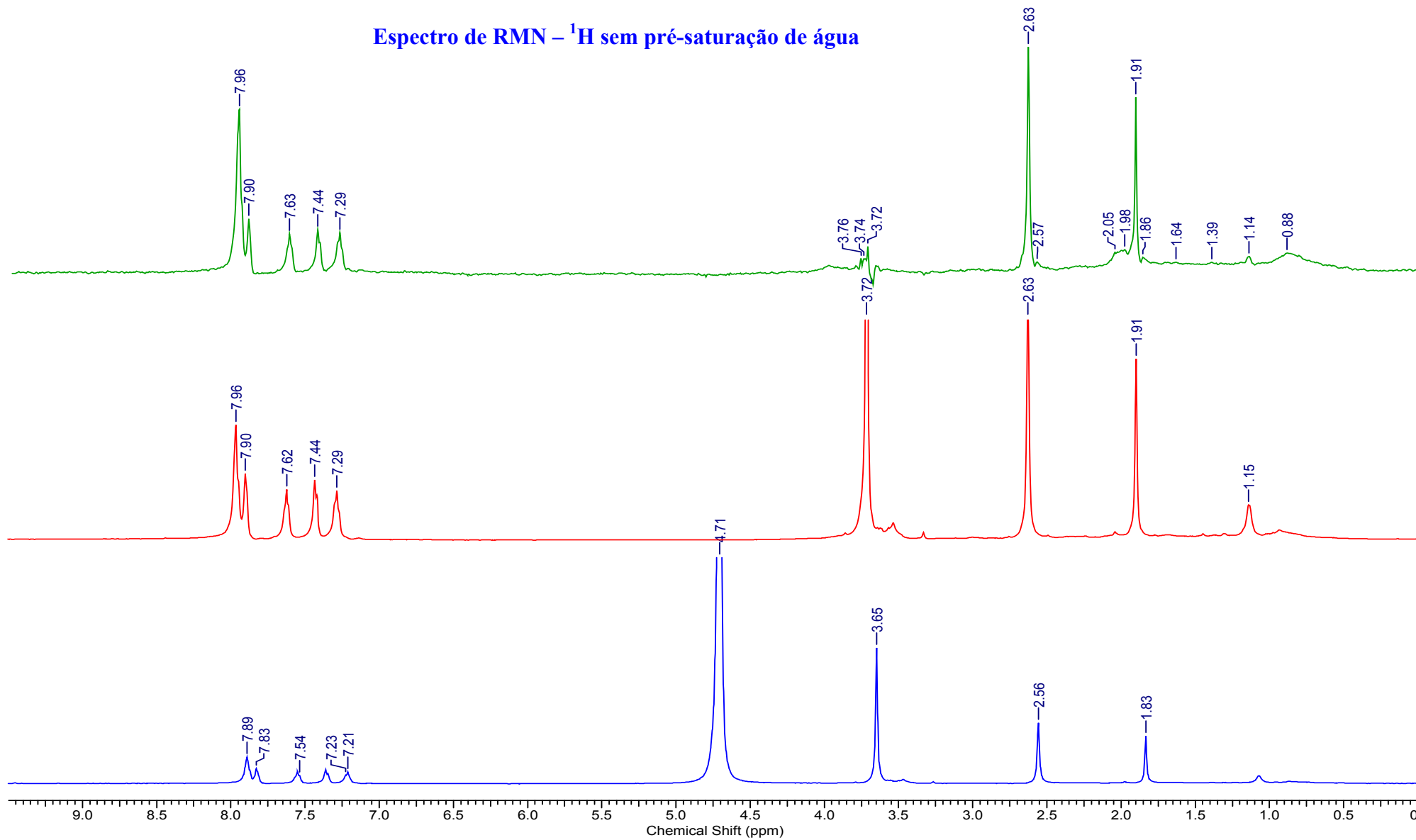


Espectro de RMN – ¹³C do composto 9 obtido em D₂O (400 MHz).

Espectro de RMN – STD

Espectro de RMN – ^1H com pré-saturação de água

Espectro de RMN – ^1H sem pré-saturação de água

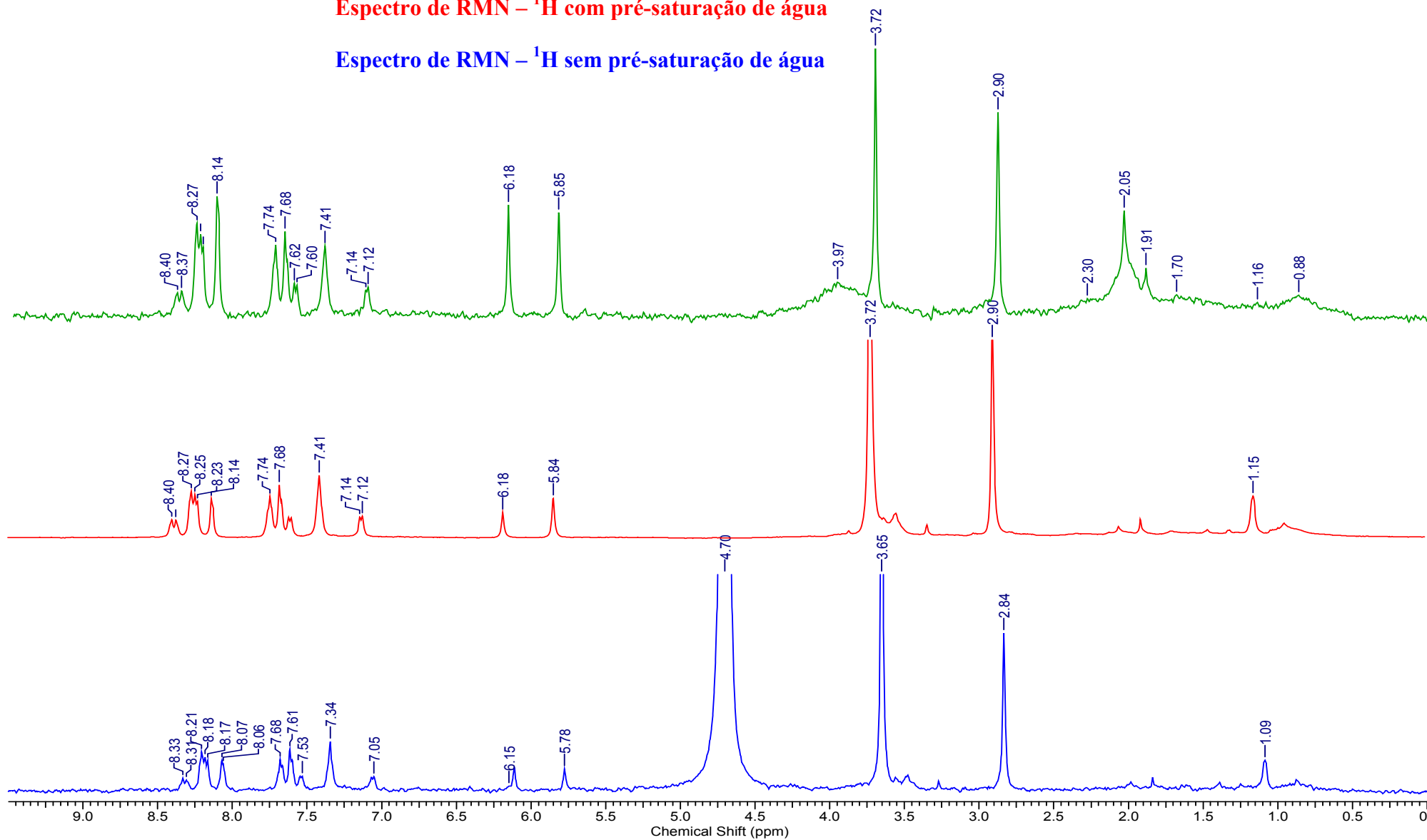


Espectro de RMN – ^1H da harmana obtido em D_2O (500 MHz).

Espectro de RMN – STD

Espectro de RMN – ^1H com pré-saturação de água

Espectro de RMN – ^1H sem pré-saturação de água

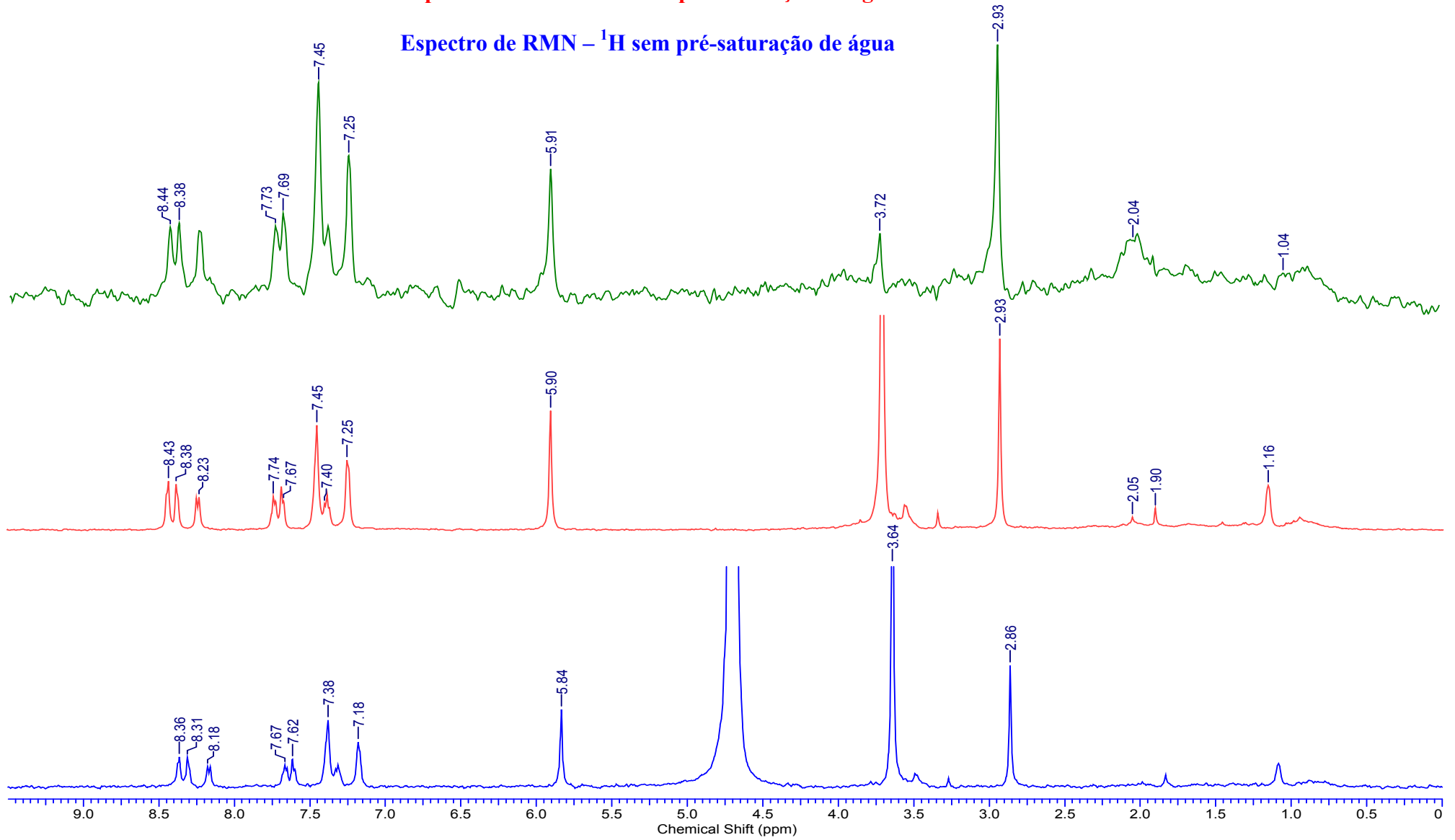


Espectro de RMN – ^1H do composto 2 obtido em D_2O (500 MHz).

Espectro de RMN – STD

Espectro de RMN – ^1H com pré-saturação de água

Espectro de RMN – ^1H sem pré-saturação de água

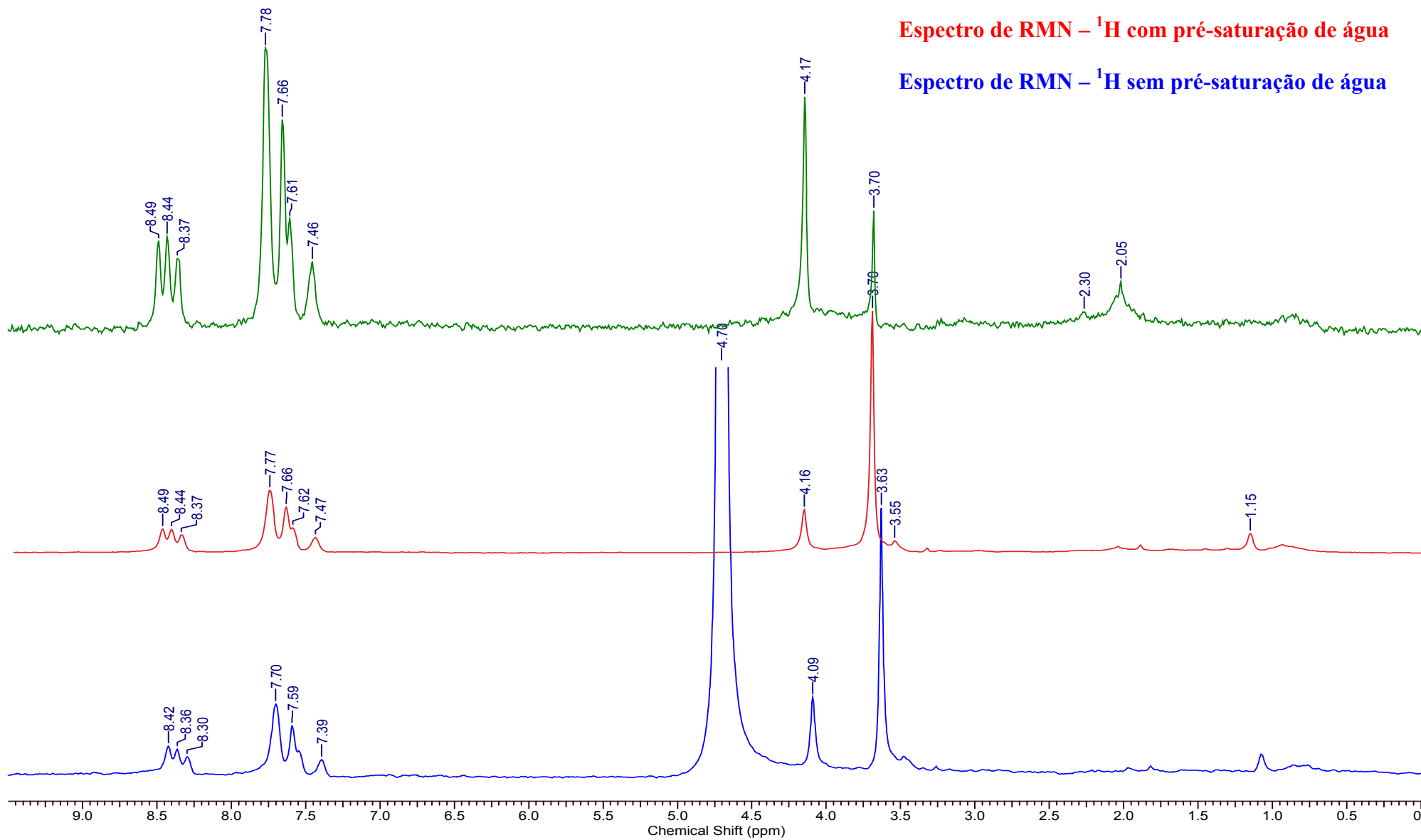


Espectro de RMN – ^1H do sal de benzila da harmana obtido em D_2O (500 MHz).

Espectro de RMN – STD

Espectro de RMN – ^1H com pré-saturação de água

Espectro de RMN – ^1H sem pré-saturação de água



Espectro de RMN – ^1H do composto 8 obtido em D_2O (500 MHz).