

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

**NOVAS ACILGUANIDINAS INDÓLICAS PLANEJADAS COMO  
INIBIDORES SELETIVOS DE BUTIRILCOLINESTERASE**

**LETÍCIA BERSOT DE OLIVEIRA**

**Seropédica – RJ**

**Julho/2022**



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

**NOVAS ACILGUANIDINAS INDÓLICAS PLANEJADAS  
COMO INIBIDORES SELETIVOS DE  
BUTIRILCOLINESTERASE**

**LETÍCIA BERSOT DE OLIVEIRA**

*Sob a Orientação da Professora*  
**Dr<sup>a</sup>. Renata Barbora Lacerda**

*e Co-orientação do Professor*  
**Dr. Arthur Eugen Kümmerle**

Dissertação submetida como requisito parcial para obtenção do grau de Mestra em Química, no Programa de Pós-Graduação em Química, Área de Concentração em Química.

Seropédica-RJ  
Julho 2022

O48n Oliveira, Leticia Bersot de , 1994-  
Novas acilguanidinas indólicas planejadas como  
inibidores seletivos de butirilcolinesterase /  
Leticia Bersot de Oliveira. - Paracambi, 2022.  
130 f.

Orientadora: Renata Barbosa Lacerda.  
Coorientador: Arthur Eugen Kummerle.  
Dissertação (Mestrado). -- Universidade Federal  
Rural do Rio de Janeiro, Programa de Pós Graduação em  
Química, 2022.

1. Doença de Alzheimer. I. Lacerda, Renata Barbosa,  
1980-, orient. II. Kummerle, Arthur Eugen, -,  
coorient. III Universidade Federal Rural do Rio de  
Janeiro. Programa de Pós Graduação em Química. IV. Título.

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

**LETICIA BERSOT DE OLIVEIRA**

Dissertação submetida como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestra em Química, no Programa de Pós-Graduação em Química, Área de concentração Química.

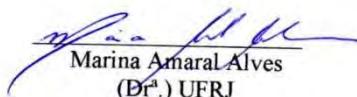
DISSERTAÇÃO APROVADA EM 18/07/2022



Renata Barbosa Lacerda  
(Dr.<sup>a</sup>) UFRRJ (Orientadora)



Marco Edilson Freire de Lima  
(Dr.) UFRRJ



Marina Amaral Alves  
(Dr.<sup>a</sup>) UFRJ

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço ao órgão de fomento CNPQ pela bolsa de estudo possibilitando suporte financeiro e acadêmico ao longo da pós-graduação e a todos que me ajudaram direta ou indiretamente para a realização deste trabalho.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior-Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

## RESUMO

A Doença de Alzheimer (DA) é um distúrbio neurodegenerativo que afeta a memória e funções motoras, sendo considerada uma enfermidade multifatorial e de origem indeterminada. A principal estratégia terapêutica para o tratamento da DA é o uso de fármacos anticolinesterásicos, inibidores das enzimas acetilcolinesterase (AChE) e butirilcolinesterase (BuChE). O presente trabalho tem como objetivo o planejamento estrutural, síntese, caracterização, avaliação *in vitro* e *in silico* de uma nova série de derivados 1H-indol-2-acilguanidínicos, desenhados como candidatos a inibidores de colinesterases. Os derivados propostos foram desenhados através da troca bioisostérica do núcleo 4,5-dibromopirrólico, presente nos inibidores seletivos de BuChE descritos na tese de doutorado de Goulart (2021), pelo heterociclo aromático indol. A síntese dos derivados baseou-se na obtenção do intermediário-chave *terc*-butil-(1H-indol-2-carboxamido)(metiltio)metileno)carbamato, através da reação entre o cloreto de ácido indólico e o agente guanilante isometiltioureia mono-protegida, e posterior condensação com benzilaminas de interesse, seguido da remoção do grupo de proteção em meio ácido. Os produtos foram caracterizados por RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$ . A triagem *in vitro* da inibição de AChE e BuChE destacou os melhores produtos (**28c**) e (**28d**) como inibidores seletivos de BuChE, os quais inibiram a atividade da BuChE em mais de 60% na concentração de 30  $\mu\text{M}$  e com  $\text{CI}_{50}$  de 5,9 e 5,5  $\mu\text{M}$ , respectivamente. A relação estrutura-atividade corroborou resultados prévios que já apontavam para a importância da função acilguanidina livre para a inibição de BuChE, e indica também que a presença de substituintes bromos no anel heteroaromático parece ser importante para a atividade desses derivados, o que precisa ainda ser comprovado a partir da avaliação de análogos indólicos bromados. Adicionalmente, substituintes halogenados no anel benzílico da acilguanidina favoreceram a atividade anti-BuChE. A utilização da ferramenta SwissADME permitiu prever que as novas acilguanidinas têm bom potencial farmacocinético. Estudos de ancoramento molecular realizados possibilitaram a compreensão dos possíveis modos de interação dos compostos com a BuChE. Os resultados demonstraram que o planejamento estrutural foi bem sucedido, porém não houve otimização em relação a atividade enzimática. Como perspectivas futuras temos a realização de ensaios de atividade antioxidante e complexação com metais, além da proposição de novos análogos na tentativa de otimização da atividade anti-BuChE, bem como para uma melhor compreensão da relação estrutura-atividade. Adicionalmente pretendemos investigar outros alvos farmacológicos para as acilguanidinas indólicas e dibromopirrólicas.

**Palavras-chave:** Doença de Alzheimer, inibidores de colinesterase, indol, acilguanidinas

## ABSTRACT

Alzheimer's Disease (AD) is a neurodegenerative disorder that affects memory and motor functions, being considered a multifactorial disease of undetermined origin. The main therapeutic strategy for the treatment of AD is the use of anticholinesterase drugs, inhibitors of acetylcholinesterase (AChE) and butyrylcholinesterase (BuChE) enzymes. The present work aims at the structural design, synthesis, characterization, *in vitro* and *in silico* evaluation of a new series of 1H-indole-2-acylguanidinic derivatives designed as candidates for cholinesterase inhibitors. The proposed derivatives were designed through the bioisosteric exchange of the 4,5-dibromopyrrole nucleus, present in the selective inhibitors of BuChE described in Goulart's doctoral thesis (2021), by the indole aromatic heterocycle. The synthesis of derivatives was based on obtaining the key intermediate *tert*-butyl-(1H-indol-2-carboxamido)(methylthio)methylene)carbamate through the reaction between indolic acid chloride and mono-protected isomethylthiourea and later condensation with benzylamines of interest, followed by removal of the protection group in an acidic medium. The products were characterized by <sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C NMR. *In vitro* screening of AChE and BuChE inhibition highlighted the best products (**28c**) and (**28d**) as selective inhibitors of BuChE, which inhibited BuChE activity by more than 60% at a concentration of 30 μM and with an IC<sub>50</sub> of 5.9 and 5.5 μM, respectively. The structure-activity relationship corroborated previous results that already pointed to the importance of the free acylguanidine function for the inhibition of BuChE, and also indicates that the presence of bromo substituents in the heteroaromatic ring seems to be important for the activity of these derivatives, which still needs to be proven from the evaluation of brominated indole analogues. Additionally, halogenated substituents on the benzyl ring of acylguanidine favored anti-BuChE activity. Using the SwissADME tool, it was possible to predict that the new acylguanidines have good pharmacokinetic potential. Molecular docking studies carried out made it possible to understand the possible modes of interaction of compounds with BuChE. As perspectives, we have the proposition of new analogues of the series obtained for its optimization, as well as for a better understanding of the structure-activity relationship. The results showed that the structural planning was successful, but there was no optimization regarding the enzymatic activity. As future perspectives, we carry out assays of antioxidant activity and complexation with metals, in addition to proposing new analogues in an attempt to optimize the anti-BuChE activity, as well as for a better understanding of the

structure-activity relationship. Additionally, we intend to investigate other pharmacological targets for the indole and dibromopyrrolic acylguanidines.

**Keywords:** Alzheimer, cholinesterase inhibitors, indol, acylguanidines



## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1:</b> Cérebro saudável (esquerda) vs. Cérebro com Alzheimer (direita) (Adaptado de BIORENDER, 2020).	2
<b>Figura 2:</b> A- Síntese da acetilcolina (adaptado de ARAÚJO, SANTOS & GONSALVES, 2016). B- Hidrólise dos ésteres de colina pelas colinesterases.	3
<b>Figura 3:</b> Ciclo da acetilcolina (SILVERTHORN, 2017).	4
<b>Figura 4:</b> Mecanismo de ação dos anticolinesterásicos (Adaptado de PATRICK, 2013).	5
<b>Figura 5:</b> O sítio ativo de acetilcolinesterase humana (hAChE) (Adaptado de GOULART e colaboradores, 2021).	6
<b>Figura 6:</b> a) Sítio ativo da acetilcolinesterase (Adaptado de PATRICK, 2013). b) Representação do mecanismo catalítico de hidrólise pelas colinesterases (GOULART et.al., 2021).	7
<b>Figura 7:</b> O sítio ativo butirilcolinesterase humana (hBChE) (Adaptado de GOULART e colaboradores, 2021).	9
<b>Figura 8:</b> Velocidades de hidrólise da AChE e BuChE, frente a concentrações crescentes de substrato (adaptada de RUSSO, 1977).	10
<b>Figura 9a-b:</b> Relação estrutura-hidrólise da acetilcolina (RUSSO, 1977).	11
<b>Figura 10:</b> Quebra da Proteína Precursora Amiloide (Adaptado de WANG et. al., 2012).	12
<b>Figura 11:</b> Estrutura dos fármacos Verubecestat® e Atabecestat® respectivamente.	13
<b>Figura 12:</b> Resultado da hiperfosforilação da proteína Tau em neurônios (Adaptado de DESIGNUA, 2020).	13
<b>Figura 13:</b> Inibidores de colinesterase (PETRONILHO, PINTO e VILLAR, 2011).	14
<b>Figura 14:</b> Inibidores de agregados neurofibrilares (Adaptado de CAMPAGNA et. al., 2010).	16
<b>Figura 15:</b> Molécula mais promissora de CAMPAGNA e colaboradores (Adaptado de CAMPAGNA et. al., 2010).	16
<b>Figura 16:</b> Efeito do inibidor neurofibrilar: A $A\beta_{1-40}$ (50 $\mu$ M) foi incubada sozinha (figuras A-C) e na presença de 5 $\mu$ M do composto (14) (D-F). Alíquotas de cada reação foram testadas em vários períodos de tempo. Na reação de controle: (A) no tempo zero; (B) no dia 3; (C) após 7 dias. Na presença de (14): (D) no tempo zero; (E) no dia 3; (F) após 7 dias. As barras da escala preta são da ordem de 100 nm (CAMPAGNA et. al., 2010).	17

<b>Figura 17:</b> Inibidores de colinesterases e moléculas alvo de Ghanei-Nasab e colaboradores, destaque para o composto com maior atividade (Adaptado de GHANEI-NASAB et. al., 2016). .....	18
<b>Figura 18:</b> Ligação do íon guanidínico com oxianíons (Adaptado de ESPÍRITO SANTO, 2017). .....	18
<b>Figura 19:</b> Terfenilguanidinas inibidoras de $\beta$ -secretase (Adaptado de HU, 2007).....	19
<b>Figura 20:</b> Estrutura das guanilhidrazonas para o tratamento da DA (Adaptado de NETO et al., 2017).....	20
<b>Figura 21:</b> Acilguanidinas inibidoras de BuChE sintetizadas pelo grupo LADMOL-QM (Adaptado de GOULART et. al., 2021 - Tese PPGQ - UFRRJ).....	20
<b>Figura 22:</b> Exemplo de modificação bioisostérica clássica (Adaptado de ELIAS, OLIVEIRA & SILVEIRA, 2018).....	21
<b>Figura 23:</b> Exemplo de bioisosterismo não-clássico (Adaptado de SILVA, 2009). ....	22
<b>Figura 24:</b> Fluxograma do planejamento estrutural e relações estruturais entre os protótipos e os novos derivados planejados. ....	26
<b>Figura 25:</b> Espectro de RMN $^1\text{H}$ do agente guanilante ( <b>33</b> ).....	31
<b>Figura 26:</b> Espectro de RMN $^1\text{H}$ do intermediário-chave. ....	33
<b>Figura 27:</b> Espectro de RMN $^{13}\text{C}$ (DEPTQ) do intermediário-chave. ....	34
<b>Figura 28:</b> Espectro de massa do intermediário chave. ....	35
<b>Figura 29:</b> Espectro de RMN $^1\text{H}$ da acilguanidina ( <b>38a</b> ) monoprottegida. ....	38
<b>Figura 30:</b> Espectro de RMN $^{13}\text{C}$ (DEPTQ) da acilguanidina monoprottegida ( <b>38a</b> ). ....	39
<b>Figura 31:</b> Espectro de RMN $^1\text{H}$ do composto ( <b>30a</b> ). ....	44
<b>Figura 32:</b> Espectro de RMN $^{13}\text{C}$ do composto ( <b>30a</b> ). ....	45
<b>Figura 33:</b> % de inibição de compostos sintetizados pelo grupo LADMOL-QM (GOULART, 2021).....	51
<b>Figura 34:</b> Modelo BOILED-EGG para as acilguanidinas protegidas ( <b>38a-h</b> ).....	52
<b>Figura 35:</b> Modelo BOILED-EGG para as acilguanidinas desprotegidas ( <b>30a-h</b> ). ....	53
<b>Figura 36:</b> Ancoramento do composto ( <b>30a</b> ) na cavidade da enzima EEBuChE. ....	54
<b>Figura 37:</b> Docking dos compostos ( <b>30a</b> ), ( <b>30b</b> ) ( <b>30c</b> ), ( <b>30d</b> ) e ( <b>30e</b> ).....	55
<b>Figura 38:</b> Sobreposição de docking dos compostos ( <b>30a</b> ), ( <b>30b</b> ) ( <b>30c</b> ), ( <b>30d</b> ) e ( <b>30e</b> ). ....	56
<b>Figura 39:</b> Sobreposição de docking do composto de GOULART (2021) em laranja e do derivado ( <b>30a</b> ) em roxo. ....	57
<b>Figura 40:</b> Docking do composto ( <b>30f</b> ). ....	58

**Figura 41:** Docking dos compostos **(30g)** e **(30h)** respectivamente.....58

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Resíduos chaves presente no sítio ativo da acetilcolinesterase e butirilcolinesterase. (Adaptado de HA, MATTHEW & YEONG, 2020) .....	08
<b>Tabela 2.</b> Características gerais dos inibidores das colinesterases (Adaptado de FORLENZA, 2005).....	14
<b>Tabela 3.</b> Regra do Hidreto de Grimm (Adaptado de BARREIRO & FRAGA, 2009).....	20
<b>Tabela 4.</b> Acilguanidinas protegidas, rendimentos reacionais e características físicas.....	35
<b>Tabela 5.</b> Principais sinais nos espectros de RMN <sup>1</sup> H (500 MHz, CDCl <sub>3</sub> , δ-ppm) que permitem a caracterização dos derivados acilguanidínicos protegidos ( <b>38a-h</b> ).....	38
<b>Tabela 6.</b> Principais sinais nos espectros de RMN <sup>13</sup> C (DEPTQ, 500 MHz, CDCl <sub>3</sub> , δ-ppm) que permitem a caracterização dos derivados acilguanidínicos protegidos ( <b>38a-h</b> ).....	38
<b>Tabela 7.</b> Acilguanidinas indólicas desprotegidas (livres) sintetizadas, rendimentos reacionais e características físicas.....	40
<b>Tabela 8.</b> Principais sinais de RMN <sup>1</sup> H (DMSO-d <sub>6</sub> , δ-ppm) para as acilguanidinas finais ( <b>30a-h</b> ).....	43
<b>Tabela 9.</b> Principais sinais de RMN <sup>13</sup> C (DEPTQ, DMSO-d <sub>6</sub> , δ-ppm) para as acilguanidinas finais ( <b>30a-h</b> ).....	43
<b>Tabela 10.</b> Atividade anticolinesterásica dos derivados guanidínicos protegidos.....	46
<b>Tabela 11.</b> Atividade anticolinesterásica dos derivados guanidínicos livres ( <b>30a-f</b> ).....	47
<b>Tabela 12.</b> Propriedades farmacocinéticas das acilguanidinas protegidas e produtos finais desprotegidos.....	48

## LISTA DE ESQUEMAS

<b>Esquema 1.</b> Análise retrossintética do projeto.....	26
<b>Esquema 2.</b> Análise retrossintética do projeto.....	27
<b>Esquema 3.</b> Metilação e proteção do agente guanilante.....	27
<b>Esquema 4.</b> Mecanismo proposto para a obtenção do agente guanilante.....	28
<b>Esquema 5.</b> Obtenção do intermediário-chave.....	30
<b>Esquema 6.</b> Mecanismo proposto para a formação do cloreto de ácido.....	30
<b>Esquema 7.</b> Proposta de mecanismo para a obtenção do intermediário-chave.....	31
<b>Esquema 8.</b> Formação da acilguanidina fenética protegida.....	34
<b>Esquema 9.</b> Proposta de mecanismo de formação das acilguanidinas monoprotégidas.....	34
<b>Esquema 10.</b> Reação de desproteção das acilguanidinas.....	39
<b>Esquema 11.</b> Proposta de mecanismo para a desproteção em meio ácido das acilguanidinas.....	39
<b>Esquema 12.</b> Reações do ensaio de Ellman.....	45
<b>Esquema 13.</b> Síntese do sal 2-metil-isotiourônio.....	59
<b>Esquema 14.</b> Síntese do agente guanilante, a N-Boc-S-metilisotioureia.....	59
<b>Esquema 15.</b> Síntese do cloreto de ácido indólico.....	60
<b>Esquema 16.</b> Procedimento geral para a obtenção das acilguanidinas protegidas.....	61
<b>Esquema 17.</b> Procedimento geral para a obtenção das acilguanidinas desprotegidas.....	64

## LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

$\mu\text{M}$  – micromolar

ACh – Acetilcolina

AChE – Acetilcolinesterase

A $\beta$  – beta-amiloide

BChE – Butirilcolinesterase

BCTI – Iodeto de butiriltocolina

BSA – Albumina Sérica Bovina

CI<sub>50</sub> – Concentração inibitória média

d – duplete

DA – Doença de Alzheimer

DMSO-d<sub>6</sub> – Dimetilsulfóxido deuterado

DTNB – Ácido 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzóico

ELISA – Ensaio de imunoabsorção enzimática

FDA – Food and Drug Administration

m – múltiplo

PDB – Protein Data Bank

pH – Potencial Hidrogeniônico

PPA – proteína percussora da amiloide

ppm – partes por milhão

Ptau – proteína Tau

RMN – Ressonância Magnética Nuclear

RMN <sup>13</sup>C (DEPTQ) – Ressonância Magnética Nuclear de Carbono 13

RMN <sup>1</sup>H – Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio

s – simpleto

SN<sub>2</sub> – Substituição Nucleofílica Bimolecular

WDI – *World Drug Index*

$\lambda$  – comprimento de onda

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO .....	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	3
2.1 A HIPÓTESE COLINÉRGICA .....	3
2.2 A BUTIRILCOLINESTERASE (BuChE) .....	8
2.3 OUTRAS HIPÓTESES .....	11
2.4 FÁRMACOS UTILIZADOS NO TRATAMENTO DA DOENÇA DE ALZHEIMER	14
2.5 NÚCLEO INDOL E SUAS PROPRIEDADES .....	15
2.6 GUANIDINAS E SUAS PROPRIEDADES BIOLÓGICAS .....	18
2.7 BIOISOSTERISMO COMO FERRAMENTA DE PLANEJAMENTO .....	21
2.8 PROPRIEDADES <i>DRUGLIKE</i> .....	22
3. OBJETIVOS.....	25
3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	25
3.2 PLANEJAMENTO ESTRUTURAL DOS COMPOSTOS 1H-INDOL-2- ACILGUANIDÍNICOS.....	25
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	27
4.1 TRIAGEM FARMACOLÓGICA <i>IN VITRO</i> FRENTE AS ENZIMAS ACETILCOLINESTERASE (AChE) E BUTIRILCOLINESTERASE (BuChE).....	47
4.2 ANÁLISE DAS PROPRIEDADES ADME E <i>DRUGLIKE</i> .....	51
4.3 ANÁLISE DO ANCORAMENTO MOLECULAR ( <i>DOCKING</i> ).....	53
5. CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS .....	60
6. MATERIAIS E MÉTODOS .....	62
6.1 PROCEDIMENTOS SINTÉTICOS.....	63
6.2 AVALIAÇÃO <i>IN VITRO</i> DOS NOVOS DERIVADOS GUANIDÍNICOS E ACILGUANIDÍNICOS SOBRE A ATIVIDADE DAS ENZIMAS ACETILCOLINESTERASE (AChE) E BUTIRILCOLINESTERASE (BuChE).....	74
6.3 ESTUDO DE INTERAÇÃO ENZIMÁTICA <i>IN SILICO</i> DOS DERIVADOS GUANIDÍNICOS E ACILGUANIDÍNICOS .....	75

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	76
8. ANEXOS .....	80

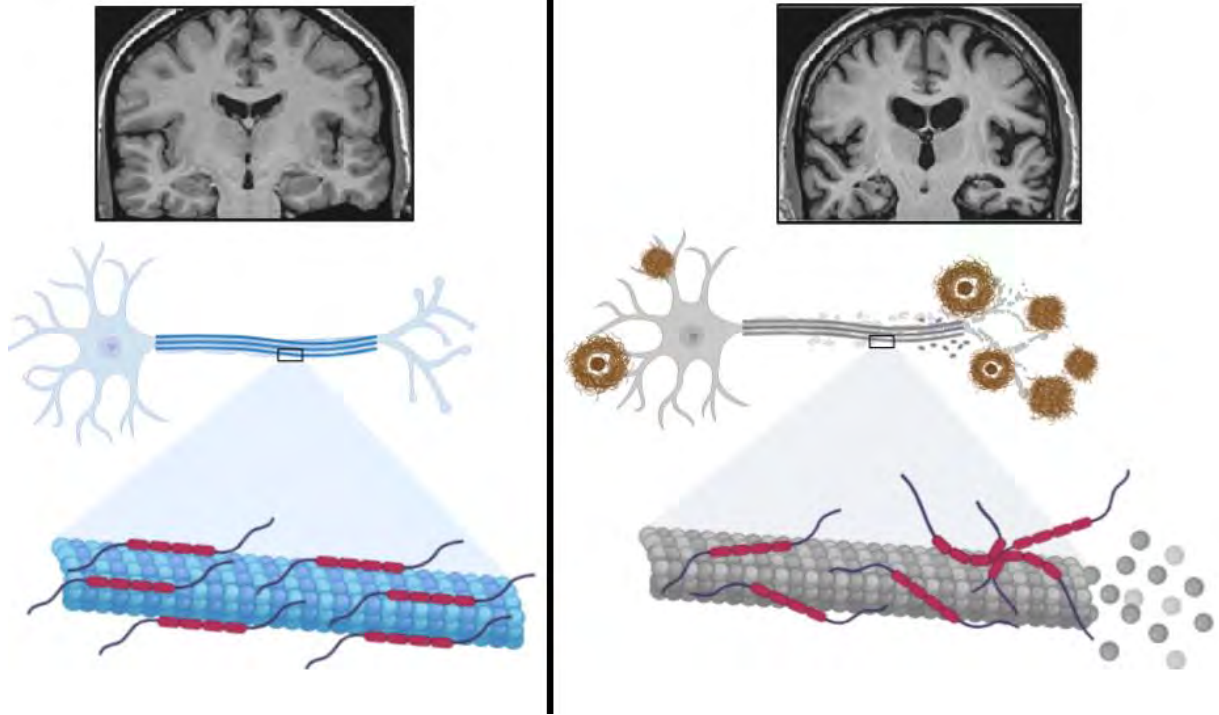


## 1. INTRODUÇÃO

A Doença de Alzheimer (DA) é uma enfermidade neurodegenerativa, considerada um dos principais tipos de demência, na qual ocorre perda das funções cognitivas: a linguagem, orientação, memória e atenção são afetadas; o que é causado pela morte de células cerebrais. A DA foi nomeada em homenagem ao primeiro médico a descrever a doença, Alois Alzheimer, em 1906. Alzheimer estudou e publicou o caso de uma paciente aparentemente saudável de 51 anos, que desenvolveu um quadro de perda progressiva de memória, desorientação e distúrbio de linguagem, tornando-se incapaz de cuidar de si mesma. Após o falecimento da paciente, aos 55 anos, o Dr. Alzheimer examinou seu cérebro e descreveu as alterações, que hoje são conhecidas como as principais alterações histológicas da doença. A Organização Mundial da Saúde (OMS) estima que o número de casos com demência seja de 55,2 milhões no mundo e este número deverá aumentar nos próximos anos, podendo chegar a 139 milhões até o ano de 2050. No Brasil, o número de pessoas com demências já ultrapassa 1,2 milhão (OMS, 2021).

Não se sabe por que a Doença de Alzheimer ocorre; porém, os sintomas associados à DA devem-se, em parte, à morte de neurônios; ao aparecimento de placas na parte externa dos neurônios, formadas pelo depósito de uma proteína chamada  $\beta$ -amiloide ( $A\beta$ ) e de emaranhados neurofibrilares que resultam da hiperfosforilação anormal da proteína tau, emaranhados estes que levam, gradativamente, à morte neural. Todas estas características são estudadas em hipóteses levantadas para a busca de um tratamento. Quando há a morte de neurônios, ocorre uma queda do nível de receptores colinérgicos e de acetilcolina (ACh) no cérebro; responsáveis pela transmissão dos estímulos nervosos de um neurônio a outro, sua atividade e permanência na fenda sináptica são reguladas pela enzima acetilcolinesterase (AChE) e também pela butirilcolinesterase (BuChE); um foco importante de pesquisas tem sido aumentar a atividade colinérgica na esperança de melhorar a cognição, sendo chamada assim de Hipótese Colinérgica e um método de tratamento desta hipótese é inibir a degradação intrassináptica da acetilcolina usando inibidores de colinesterases (PATRICK, 2013).

A Figura 1 compara um cérebro saudável e um cérebro com a Doença de Alzheimer e suas principais alterações, mostrando os depósitos de proteína  $A\beta$  e os emaranhados neurofibrilares.



**Figura 1:** Cérebro saudável (esquerda) vs. Cérebro com Alzheimer (direita) (Adaptado de BIORENDER, 2020).

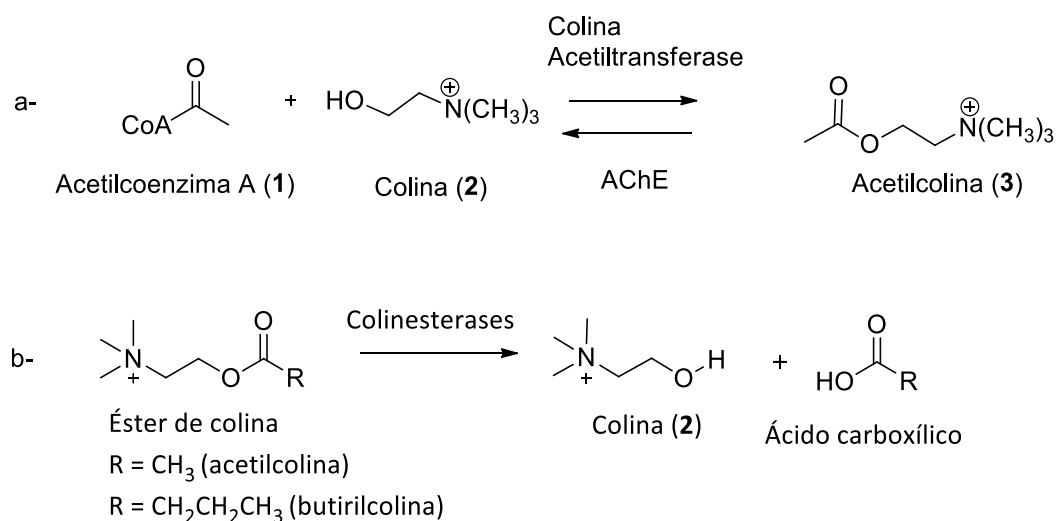
## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Neste capítulo serão apresentados conceitos que justificam a busca por novas moléculas que possuam atividade anticolinesterásica, fundamentais para o tratamento da Doença de Alzheimer.

### 2.1 A HIPÓTESE COLINÉRGICA

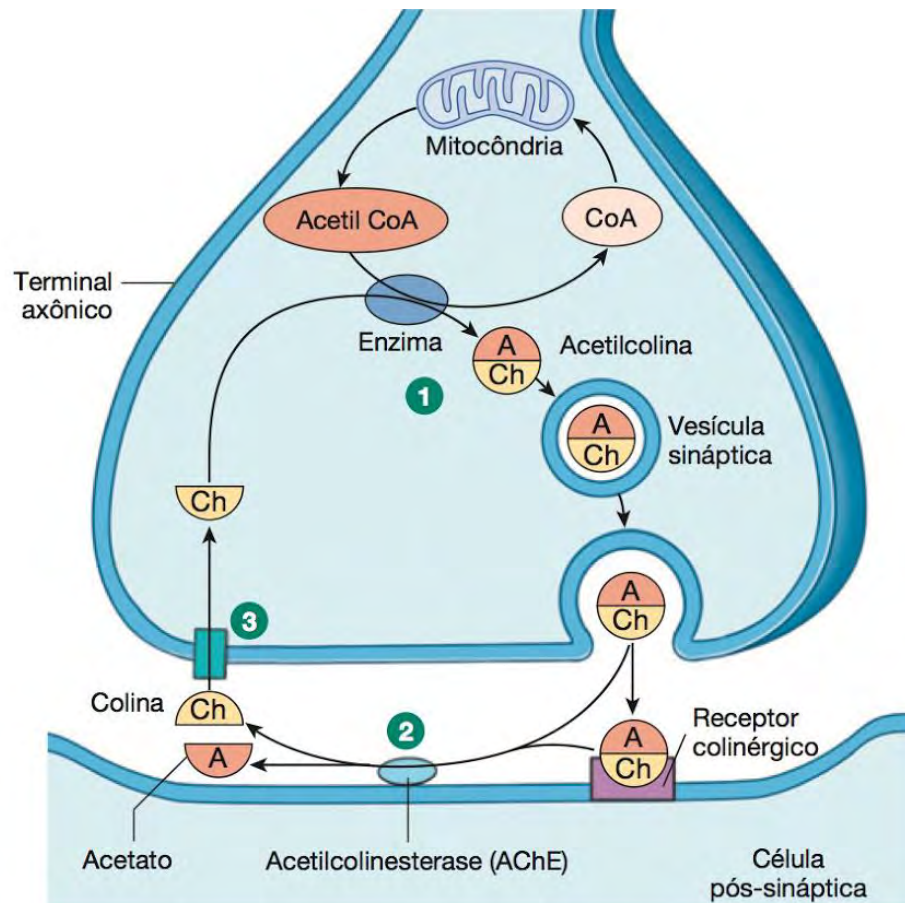
O fundamento da hipótese colinérgica está relacionado à capacidade de fármacos potencializadores da função colinérgica central induzirem uma melhora do perfil cognitivo e, também, de alguns efeitos comportamentais provenientes da Doença de Alzheimer (VIEGAS JR., BOLZANI, *et al.*, 2004)

Há um grande número de neurotransmissores no corpo, sendo a acetilcolina (**3**) um dos mais importantes: responsável pela contração dos músculos esqueléticos; interrupção de funções como digestão, defecação e micção; além da estimulação do coração (PATRICK, 2013). Este neurotransmissor é sintetizado a partir da Colina (**2**) e da Acetil-coenzima A (**1**) no terminal axônio, gerando um subproduto denominado Coenzima A e esta reação é catalisada pela enzima Colina Acetiltransferase, como pode ser observado na Figura 2a. De maneira geral os ésteres de colina são degradados pelas colinesterases de acordo com a Figura 2b.



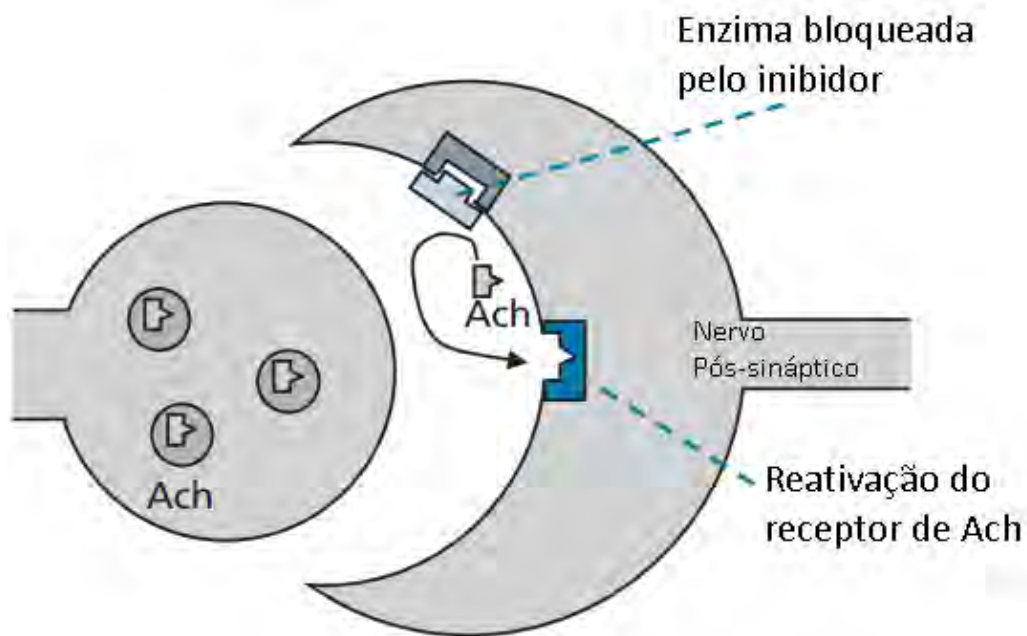
**Figura 2:** A- Síntese da acetilcolina (adaptado de ARAÚJO, SANTOS & GONSALVES, 2016). B- Hidrólise dos ésteres de colina pelas colinesterases.

Na fenda sináptica (Figura 3) a acetilcolina é hidrolisada pela enzima acetilcolinesterase (AChE) e o produto resultante (a colina) é então transportado de volta para o terminal axônio regenerando o ciclo de acetilcolina (SILVERTHORN, 2017).



**Figura 3:** Ciclo da acetilcolina (SILVERTHORN, 2017).

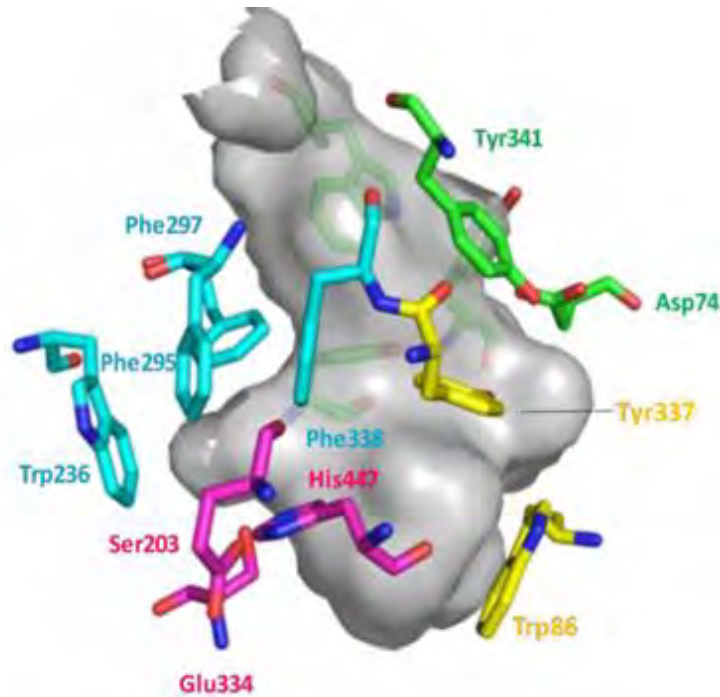
A utilização de fármacos inibidores de colinesterase impede a enzima de degradar a acetilcolina (Figura 4), bloqueando seu sítio ativo. Este impedimento acarreta em maiores níveis de ACh disponível na fenda sináptica, levando a um aumento de comunicação entre as células nervosas, acarretando assim, na estabilização e até mesmo na melhora dos sintomas da demência (GOODMAN e GILMAN, 2003).



**Figura 4:** Mecanismo de ação dos anticolinesterásicos (Adaptado de PATRICK, 2013).

Segundo Patrick (2013), a AChE também pode desempenhar um papel ativo nos depósitos de proteína  $A\beta$  em cérebros com Alzheimer. O sítio de ligação periférico da enzima é capaz de se ligar à proteína  $\beta$ -amilóide, que em vias normais é solúvel e possui uma função antioxidante. Porém, na ligação à acetilcolinesterase, a proteína sofre uma alteração conformacional e torna-se insolúvel. Um dos ramos de pesquisa para medicamentos a serem desenvolvidos propõe que estes interrompam a progressão da doença ao impedir a ligação da proteína  $\beta$ -amilóide ao sítio periférico de ligação da acetilcolinesterase.

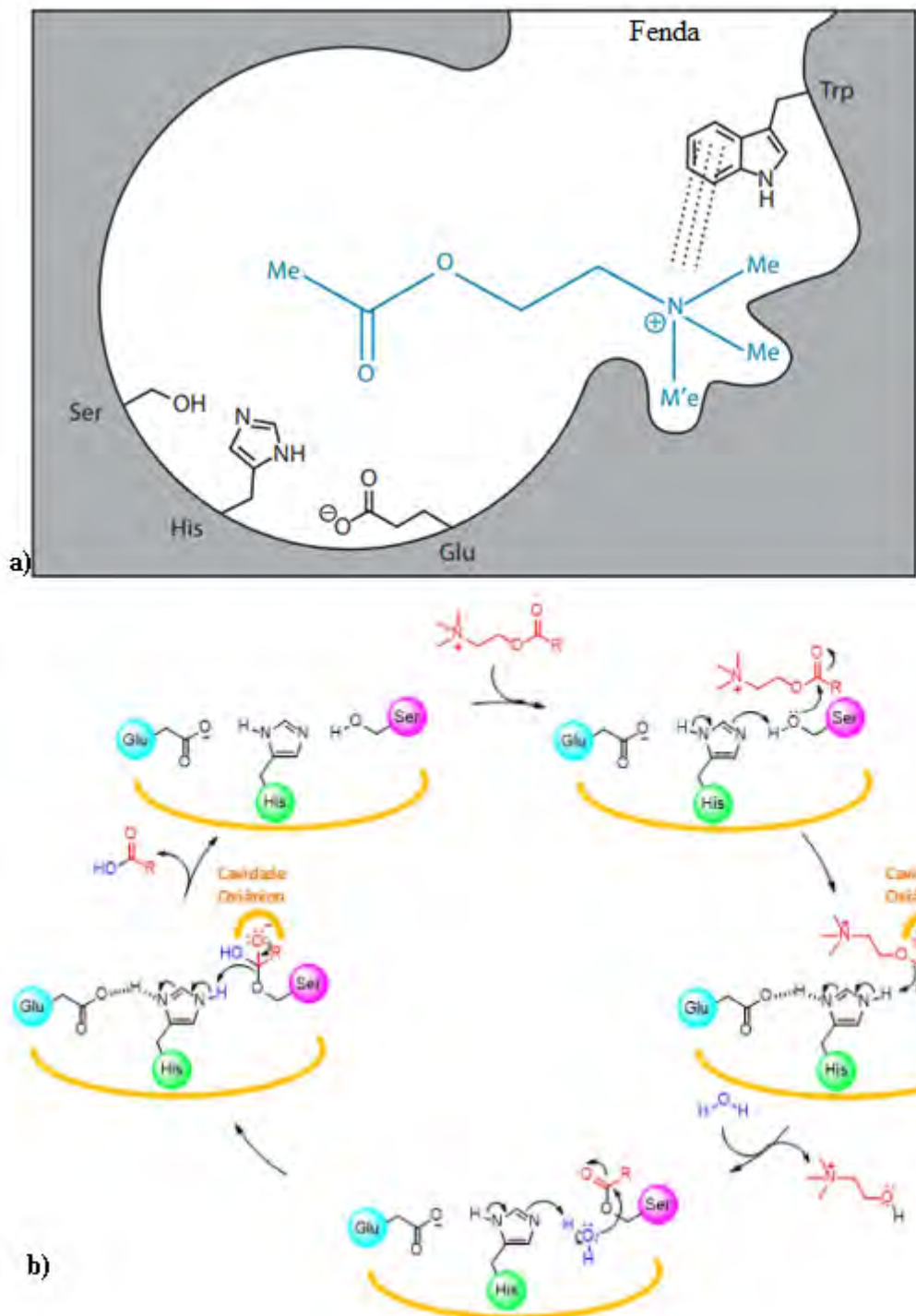
O planejamento destes fármacos anticolinesterásicos depende da forma do sítio ativo da enzima, suas interações com a acetilcolina e seu mecanismo de hidrólise. O sítio ativo (Figura 5) da acetilcolinesterase se encontra na base de uma fenda de 20 Å e, na entrada da fenda, existe um sítio de ligação periférico. Acredita-se que este sítio inicial desempenhe um papel crucial no reconhecimento da acetilcolina como substrato. Uma de suas principais interações é a  $\text{cation-}\pi$  entre o anel heteroaromático de um resíduo de triptofano e o nitrogênio quaternário carregado de acetilcolina. Após a acetilcolina ser “capturada”, ela é rapidamente levada através da fenda para o sítio ativo. Esse processo é auxiliado pelo fato de que esta fenda é revestida com 14 resíduos de aromáticos, que também formam ligações  $\text{cation-}\pi$  com a acetilcolina e, assim, canalizam o substrato para baixo da fenda (PATRICK, 2013).



**Figura 5:** O sítio ativo de acetilcolinesterase humana (hAChE) (Adaptado de GOULART e colaboradores, 2021).

Os principais aminoácidos do sítio ativo são os resíduos que se ligam à acetilcolina, bem como os envolvidos no seu mecanismo de hidrólise, são eles: serina, histidina e glutamato, como pode ser observado pela Figura 6a.

No mecanismo de hidrólise (Figura 6b), a acetilcolina se aproxima e a serina atua como um nucleófilo utilizando seu par de elétrons para formar uma ligação com o éster de acetilcolina. A histidina age como um catalisador ácido e protona a porção alcoxi (OR) do intermediário, transformando em um grupo de saída melhor. O grupo carbonila é restituído e expulsa a colina. A subunidade acila da acetilcolina é agora vinculada covalentemente ao sítio ativo. A colina sai do sítio ativo e é substituída por água, que atua como um nucleófilo e ataca o grupo acila. A água é normalmente um nucleófilo pobre, mas a histidina auxilia o processo novamente, agindo como um catalisador básico e removendo um próton. Ao final, a hidrólise da serina acetilada regenera o sítio catalítico da enzima e forma um equivalente do ácido carboxílico correspondente (PATRICK, 2013).



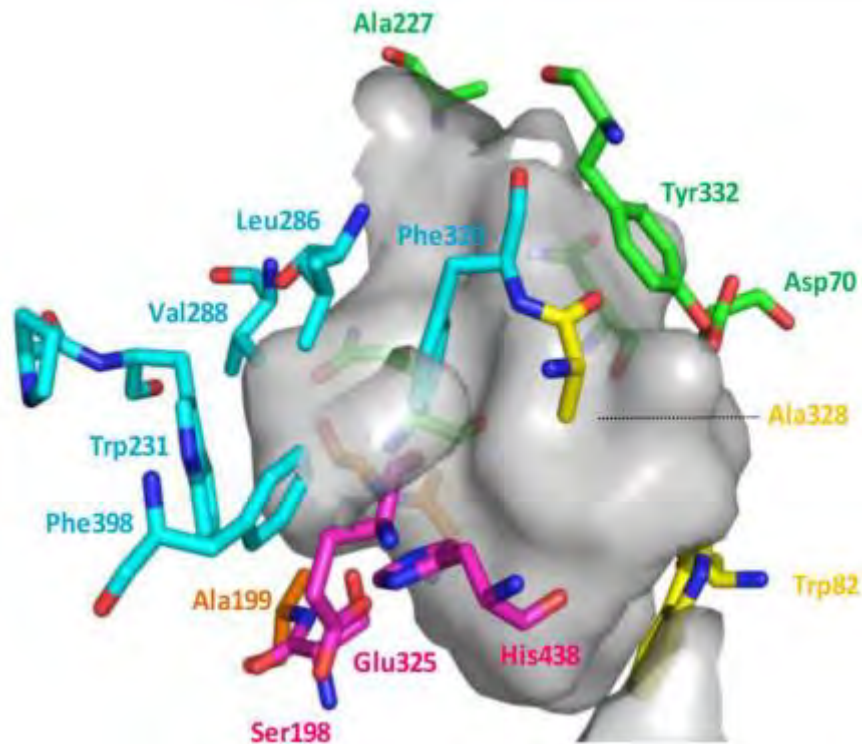
**Figura 6:** **a)** Sítio ativo da acetilcolinesterase (Adaptado de PATRICK, 2013). **b)** Representação do mecanismo catalítico de hidrólise pelas colinesterases (GOULART *et al.*, 2021).

Além da colinesterase, a butirilcolinesterase (BuChE) é uma segunda enzima capaz de metabolizar a acetilcolina. Apesar da BuChE compartilhar esta função, segundo a literatura, seu papel no cérebro ainda não está totalmente elucidado (WILLIAMS, ZHOU e ZHAN, 2019).

## 2.2 A BUTIRILCOLINESTERASE (BuChE)

A existência da colinesterase no soro humano foi demonstrada por Valquist em 1935. Allen em 1940 demonstrou a existência de outra colinesterase nas hemácias, diferente daquela do soro. Existem, portanto, dois tipos de colinesterases, cada uma com um comportamento distinto (RUSSO, 1977). Enquanto a acetilcolinesterase está localizada principalmente nos neurônios, a butirilcolinesterase (também chamada de pseudocolinesterase ou colinesterase plasmática) está distribuída pelo corpo inteiro: presente nos pulmões, plasma, cérebro, fígado e coração. A BuChE é análoga à AChE (Figura 7): ambas as enzimas possuem uma garganta de 20 Å, composta por um sítio aniônico periférico, um sítio de ligação da colina, um sítio catalítico oxianion, um sítio de ligação acila e um sítio de tríade catalítica – cadeias laterais de resíduos de serina, histidina e glutamato (HA, MATTHEW e YEONG, 2020). Sua sequência de aminoácidos apresenta uma semelhança de aproximadamente 70%, porém suas estruturas tridimensionais se diferem e a principal diferença entre a AChE e a BuChE ocorre no sítio de ligação acila; enquanto há dois resíduos de fenilalanina (Phe295 e Phe297) na AChE, que impedem o acesso de moléculas mais volumosas no sítio catalítico, estes são substituídos por dois resíduos alifáticos (Leu286 e Val288) na BuChE. Além disso, seis dos catorze resíduos aromáticos que revestem a garganta da AChE e o sítio periférico aniônico são substituídos por resíduos alifáticos na BuChE. Desde modo, a cavidade da BuChE é cerca de 200 Å maior que a cavidade da AChE (PURGATORIO, DE CANDIA, *et al.*, 2019), possibilitando uma ação de moléculas inibidoras de maior volume. A Tabela 1 resume estas diferenças entre o sítio ativo de ambas as enzimas.





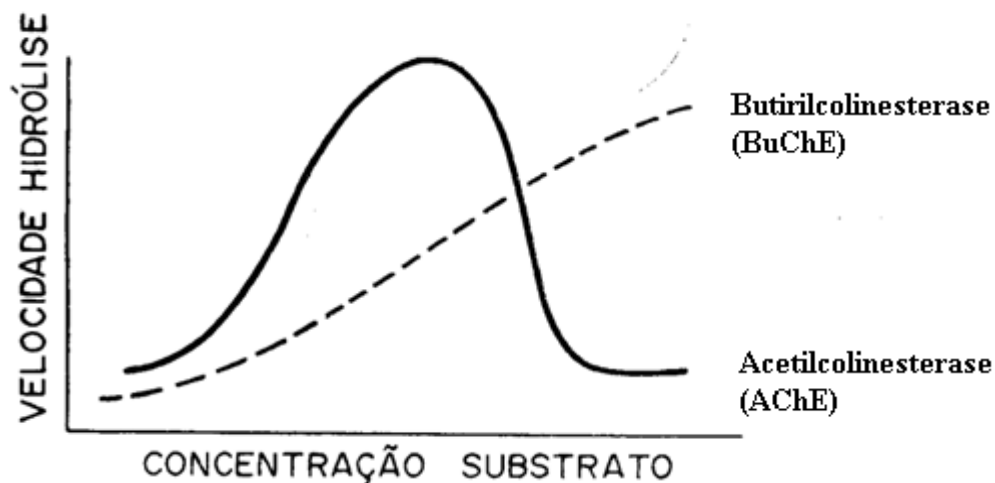
**Figura 7:** O sítio ativo butirilcolinesterase humana (hBChE) (Adaptado de GOULART e colaboradores, 2021).

**Tabela 1:** Resíduos chaves presente no sítio ativo da acetilcolinesterase e butirilcolinesterase. (Adaptado de HA, MATTHEW & YEONG, 2020).

Sítios no Centro Ativo	Resíduos de Aminoácidos Envolvidos	
	AChE	BuChE
Sítio Aniônico Periférico	Asp74, Tyr72, Tyr 124, Trp 286	Asp70, Asn72, Gln124
Sítio ligante de Colina	Trp86, Tyr337	Trp86, Ala337
Fenda Oxiânion	Gly118, Gly119, Ala201	Gly116, Gly117, Ala199
Sítio ligante acila	Phe295, Phe297	Leu286, Val288

<b>Triade catalítica</b>	Ser203, His447, Glu327	Ser198, His438, Glu325
--------------------------	------------------------	------------------------

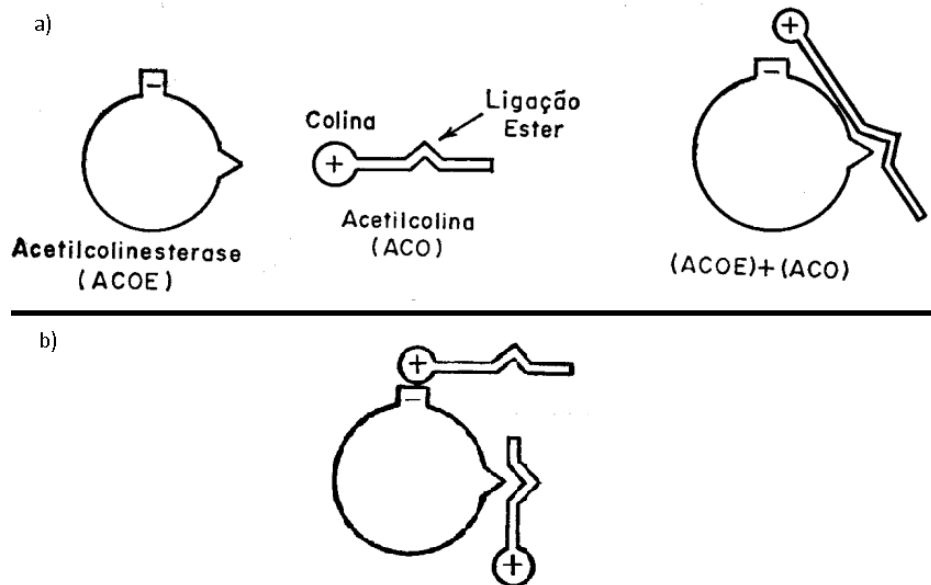
Uma característica importante que distingue a BuChE da AChE é sua resposta cinética frente à concentração de ACh; refletida em seus valores de afinidade pelo substrato ( $K_m$ ) (Figura 8). A butirilcolinesterase (pseudocolinesterase) é menos eficiente na hidrólise de ACh quando há baixas concentrações, porém, muito eficiente em concentrações elevadas. Em cérebros com DA, conforme há a diminuição dos níveis de acetilcolina presentes, sua principal enzima também diminui, entretanto, os níveis de BuChE aumentam. A razão entre BuChE e AChE muda drasticamente nas regiões corticais podendo chegar à uma proporção onze vezes maior (HA, MATTHEW e YEONG, 2020), evidenciando o caráter compensatório da BuChE na ausência de AChE. Desta forma a BuChE parece ter papel importante na hidrólise da ACh em fase tardia da DA e seus os inibidores seletivos são potenciais candidatos a fármacos para o tratamento da DA em estágios avançados (GOULART, 2021).



**Figura 8:** Velocidades de hidrólise da AChE e BuChE, frente a concentrações crescentes de substrato (adaptada de RUSSO, 1977).

A explicação da inibição da ação da AChE por elevadas concentrações de substrato (ACh) foi dada por Haldane em 1930. Este autor postulou que uma molécula do substrato deve fixar-se a dois pontos da enzima antes que a reação ocorra (Figura 9a). Havendo numerosas moléculas de substrato em seu entorno, a enzima combina-se com a acetilcolina de tal forma

que não se processa a atividade enzimática (Figura 9b). Quando há excesso de substrato a fixação se faz em um ponto apenas, diminuindo a velocidade de hidrólise (RUSSO, 1977).



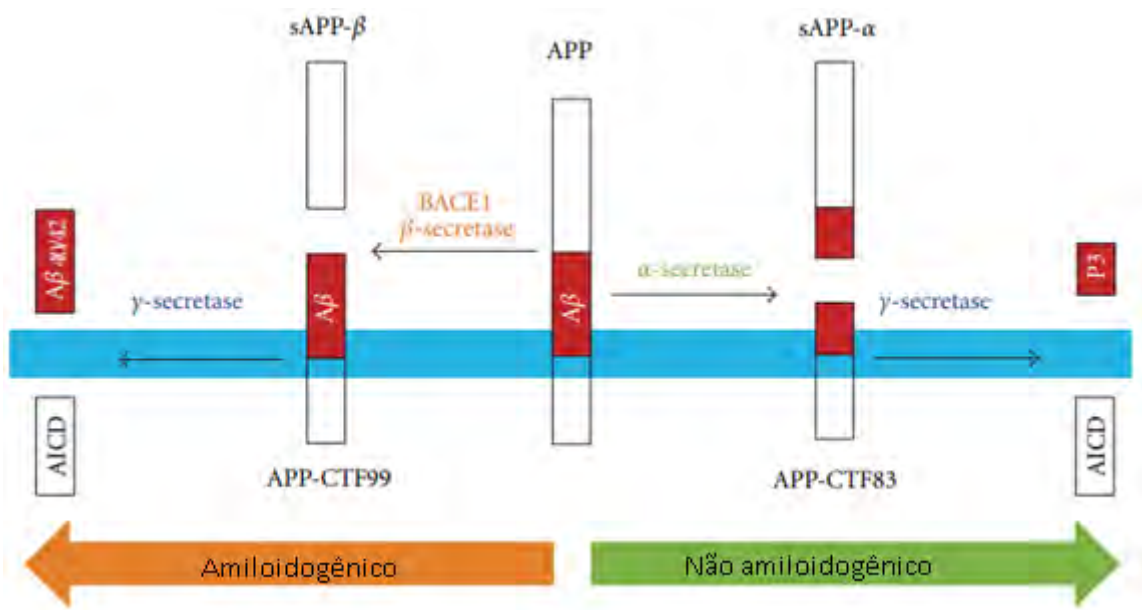
**Figura 9a-b.**Relação estrutura-hidrólise da acetilcolina (RUSSO, 1977).

### 2.3 OUTRAS HIPÓTESES

Outras hipóteses também são levantadas para explicar a DA, que é considerada uma doença multifatorial e uma delas é a Hipótese Amiloide. Desde sua descoberta, os sintomas da DA são associados aos emaranhados neurofibrilares e a presença de placas formadas pelo peptídeo beta-amiloide, que é o resultado da quebra da proteína precursora amiloide (PPA). Embora não se possa dizer com clareza a função fisiológica da PPA, ela parece exercer um papel importante no desenvolvimento do cérebro, na regulação da atividade da proteína G, na memória e na plasticidade sináptica; (NALIVAEVA e TURNER, 2013), onde fragmentos com diversas funções fisiológicas são gerados a partir desta proteína.

Duas secretases, a  $\gamma$ -secretase e a  $\beta$ -secretase (BACE-1), quebram a PPA em diferentes lugares, como pode ser observado na Figura 10, originando fragmentos amiloidogênicos  $A\beta$  de diferentes tamanhos; os fragmentos que contêm 40 e 42 resíduos de aminoácidos são denominados respectivamente:  $A\beta_{1-40}$  e  $A\beta_{1-42}$ , produzidos pela BACE-1. Na hipótese amiloide a  $A\beta_{1-40}$  teria a capacidade de interagir com íons metálicos presentes no cérebro e formar oligômeros e, em seguida, as fibrilas, encontradas nas placas amiloides da Figura 1. Apesar do

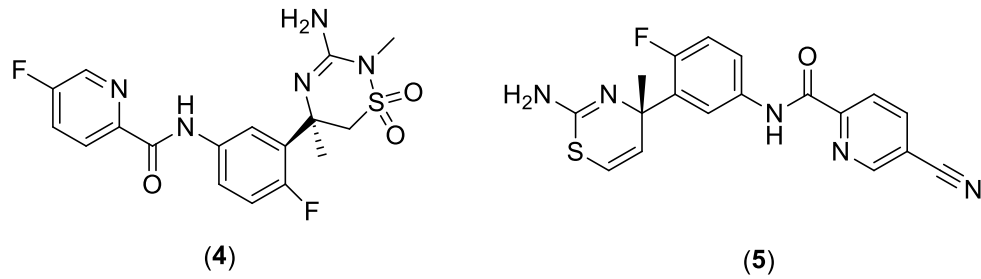
primeiro fragmento ser o mais comum, o segundo fragmento é mais hidrofóbico e é considerado o de maior potencial amiloidogênico, embora, ambos sejam capazes de se agregar e originar protofibrilas, fibrilas e então, placas insolúveis (DE FALCO, CUKIERMAN, *et al.*, 2016).



**Figura 10:** Quebra da Proteína Precursora Amiloide (Adaptado de WANG *et al.*, 2012).

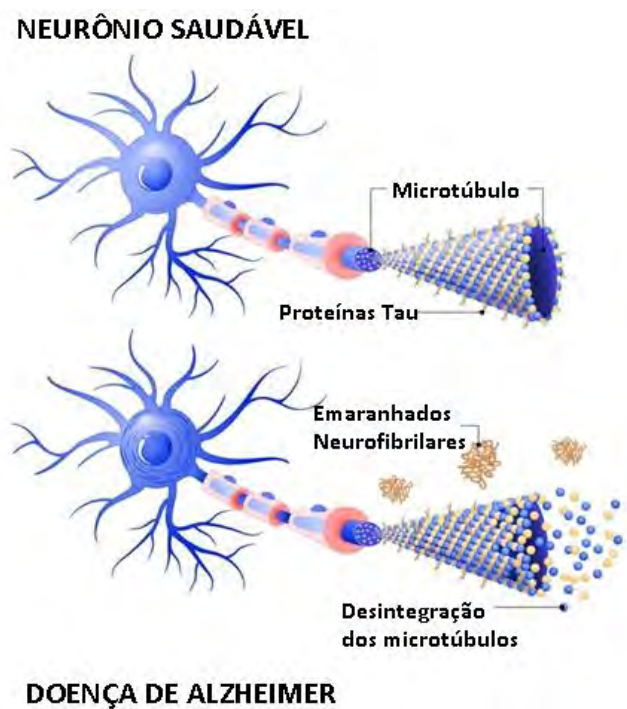
Apesar da força científica da hipótese amilóide, até o momento os ensaios clínicos não conseguiram demonstrar claramente seu benefício e, como consequência, esta teoria vem sendo questionada (McDADE *et al.*, 2021), dando margem para uma nova ótica acerca das pesquisas de anticolinesteráricos.

Em 2018, apenas algumas semanas após a farmacêutica Merck & Co. publicar os resultados de seu ensaio do inibidor de BACE-1 Verubecestat® (4) e seu insucesso em tratar a DA nas fases leve e moderada, as ações da empresa despencaram. A empresa Johnson & Johnson e o parceiro Shionogi encerraram o desenvolvimento em estágio avançado de Atabecestat® (5) em pacientes assintomáticos por questões de segurança. As estruturas dos fármacos estão mostradas na Figura 11. Resultados completos dos estudos da Merck no New England Journal of Medicine (EGAN *et al.*, 2018) apontam que duas doses diferentes do medicamento não retardaram a progressão clínica da doença nas fases leve e moderada, apesar de alcançar redução quase máxima de β-amiloide (Aβ), sugerindo assim que uma vez que a demência está presente, a progressão da DA pode ser independente da produção dos resíduos Aβ.



**Figura 11:** Estrutura dos fármacos Verubecestat® e Atabecestat® respectivamente.

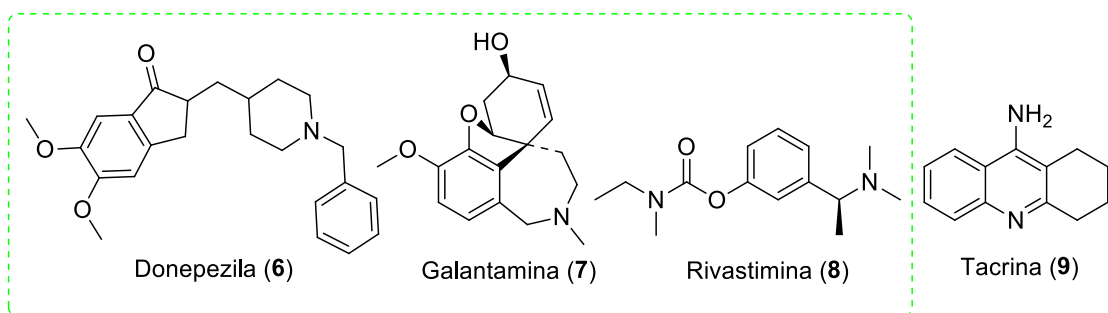
Outra hipótese muito importante para compreender a Doença de Alzheimer como um todo é a Hipótese da Proteína Tau, baseada no processo de hiperfosforilação da proteína Tau (PTau). Esta proteína está associada aos microtúbulos das células nervosas, onde reações de fosforilação são fundamentais para a estabilidade desses neurônios. Nos portadores da Doença de Alzheimer, mutações fazem ocorrer uma fosforilação descontrolada levando à desintegração destes microtúbulos, formando filamentos helicoidais que se depositam e atuam como barreiras físicas ao transporte axonal, prejudicando a transmissão sináptica, como pode ser observado na Figura 12 (DESIGNUA, 2020).



**Figura 12:** Resultado da hiperfosforilação da proteína Tau em neurônios (Adaptado de DESIGNUA, 2020).

## 2.4 FÁRMACOS UTILIZADOS NO TRATAMENTO DA DOENÇA DE ALZHEIMER

Atualmente os inibidores de colinesterases (I-ChE) são os principais fármacos licenciados e aprovados pela FDA (Administração de Alimentos e Medicamentos) nos Estados Unidos para o tratamento da Doença de Alzheimer; são eles: donepezila (6) (Aricept®), galantamina (7) (Reminyl®) e rivastigmina (8) (Exelon®), mostrados na Figura 13.



**Figura 13:** Inibidores de colinesterase (PETRONILHO, PINTO e VILLAR, 2011).

Os estudos de fármacos I-ChE começaram em 1993 com a tacrina (9) e esta se tornou o alicerce da terapia baseada na Hipótese Colinérgica; entretanto seu uso possui efeitos colaterais fortes como: dores musculares, náuseas, dor de estômago, vômitos, perda de peso, e também uma grande hepatotoxicidade, em cerca de 50% dos casos segundo Forlenza (2005). Devido a esses efeitos, a tacrina (9) não é mais comercializada.

Alguns anos depois a donepezila (6) foi aprovada (1996) e seus efeitos colaterais mais comuns são: diarreia, tonturas, perda de apetite, dores musculares, náuseas, cansaço, problemas para dormir, vômitos e perda de peso. A donepezila (6) é altamente específica para a acetilcolinesterase encontrada principalmente no interior do cérebro, e parece não afetar a butirilcolinesterase, diferentemente da tacrina (9) e rivastigmina (8), que inibem as colinesterases em todo o corpo (BARNER e GRAY, 1998).

A galantamina (7) é um produto natural, isolado de várias espécies do gênero *Eucharis* como a *E. amazonica* e *E. x glandiflora* (LUIZ JUNIOR & MARCUCCI, 2016); é um inibidor reversível seletivo para acetilcolinesterase, que também pode ser preparado sinteticamente. Seus efeitos permanecem mesmo após o término do tratamento, além de estimular os receptores nicotínicos de ACh pré e pós-sinápticos, gerando uma maior liberação de acetilcolina e

melhorando a capacidade cognitiva. Suas características promoveram um grande avanço no planejamento de novos fármacos no tratamento da DA (VIEGAS JR., BOLZANI, *et al.*, 2004). Contudo, atualmente o fármaco mais utilizado para a DA é a rivastigmina, pela sua inibição tanto de AChE quanto de BuChE, apresentando uma maior eficácia no aumento dos níveis de colina no cérebro sem a alta hepatotoxicidade da tacrina (FERRO, GUIMARÃES e GONÇALVES, 2019).

Um resumo sobre as principais características dos I-ChE pode ser observado na Tabela 2.

**Tabela 2:** Características gerais dos inibidores das colinesterases (Adaptado de FORLENZA, 2005).

	<b>Tacrina</b>	<b>Donepezila</b>	<b>Rivastigmina</b>	<b>Galantamina</b>
<b>Disponível no ano</b>	1993	1997	1998	2000
<b>Enzimas Inibidas</b>	AchE e BuchE	AchE	AchE e BuchE	AchE
<b>Ainda é comercializada?</b>	Não	Sim	Sim	Sim
<b>Modulação dos receptores nicotínicos?</b>	Não	Não	Não	Sim

Em razão da grande importância dos inibidores de colinesterases como estratégia no combate à Doença de Alzheimer e, devido aos seus graves efeitos colaterais adversos, cresce a necessidade pela busca de novos fármacos com ação inibitória semelhantes.

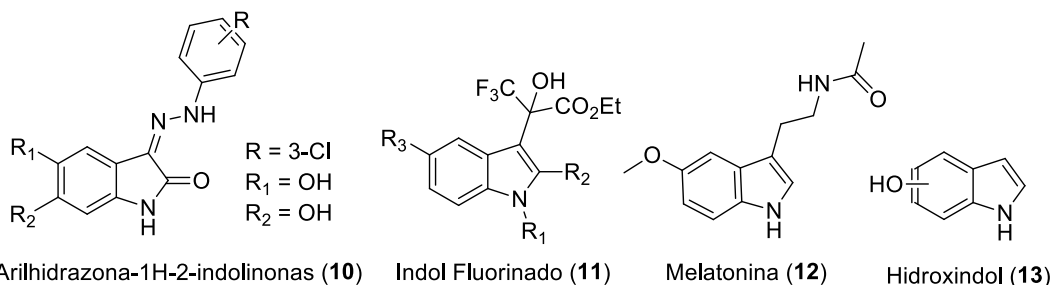
## 2.5 NÚCLEO INDOL E SUAS PROPRIEDADES

O núcleo indol é formado por um sistema aromático constituído de um anel de benzeno condensado a um anel nitrogenado de cinco membros, o pirrol; ocorrendo na natureza em diversos alcaloides e também sendo parte da estrutura da dietilamida do ácido lisérgico (LSD), por exemplo. O indol é considerado uma estrutura privilegiada em Química Medicinal por estar presente em diferentes arcabouços moleculares e possuir propriedades versáteis de interação intermolecular, com excelentes características de fármaco (*druglike*) que resultam em quimiotecas bioativas de interesse medicinal (HORTON, BOURNE & SMYTHE, 2003).

Podemos encontrar na literatura pesquisas envolvendo o grupo indol em diversos segmentos, com destaque para atividades antimicrobiana, analgésica, anticâncer, antihipertensiva, anti-asma, antimalárica e também anti-Alzheimer (CAMPAGNA *et al.*, 2010).

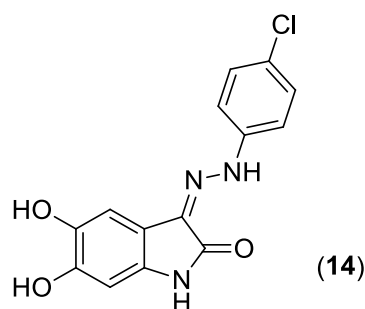
O trabalho de Campagna e colaboradores em 2010 mostrou a síntese e avaliação de derivados indólicos (**10**), como pode ser observado na Figura 14, atuando como inibidores dos

agregados neurofibrilares da  $\beta$ -A típicos da DA. As moléculas (11), (12) e (13) serviram como inspiração para o grupo de pesquisa de CAMPAGNA e colaboradores pois segundo Levine III (2007) estas moléculas atuam na inibição das interações entre proteínas. Nas novas arilhidrazona-1H-2-indolinonas de CAMPAGNA *et. al.* (2010), são descritos vários substituintes em 3 posições diferentes da molécula (10).



**Figura 14:** Inibidores de agregados neurofibrilares (Adaptado de CAMPAGNA *et. al.*, 2010).

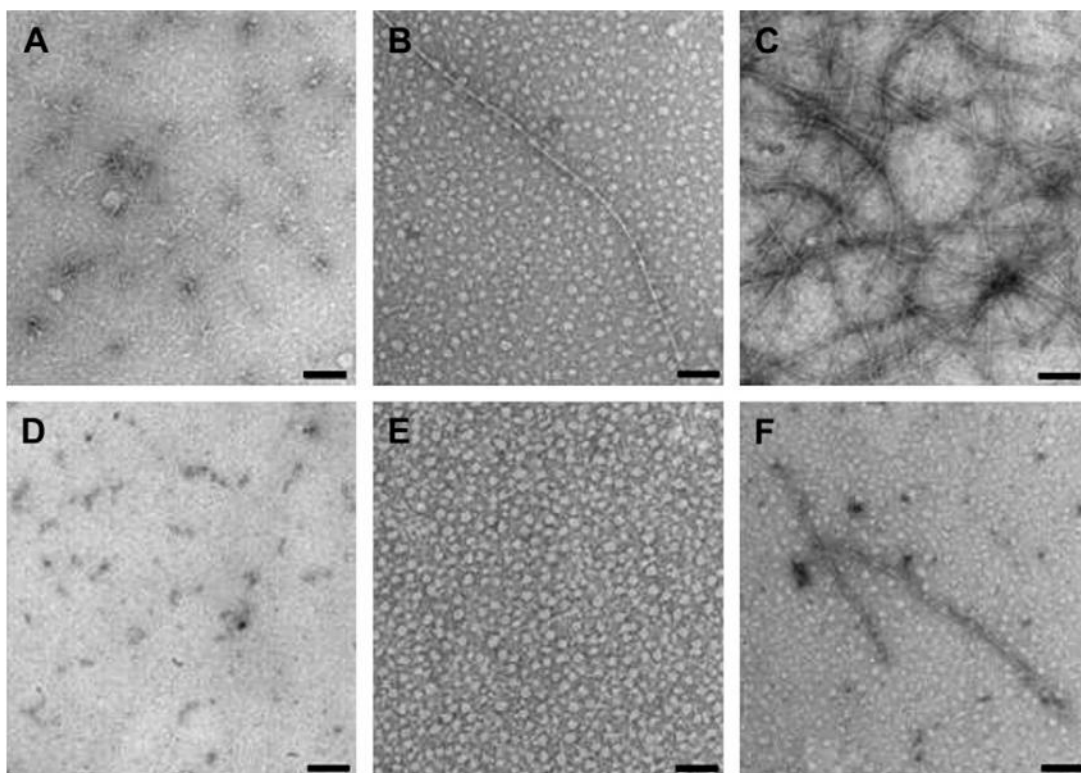
Dentre 45 moléculas sintetizadas por CAMPAGNA *et. al.*, (2010), a molécula (14) foi a que mais se destacou (Figura 15) nos testes *in vitro*, com melhores valores de concentração inibitória média  $CI_{50}$  (na ordem de micromolar -  $\mu$ M) e melhor solubilidade em água.



**Figura 15:** Molécula mais promissora de CAMPAGNA e colaboradores (Adaptado de CAMPAGNA *et. al.*, 2010).

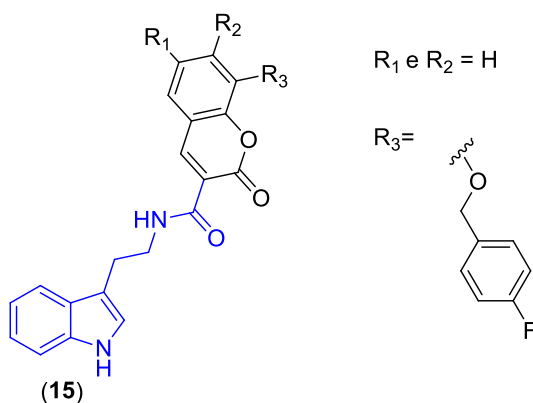
O composto selecionado foi submetido à testes biofísicos com a  $A\beta_{1-40}$  (Figura 16) e mostrou uma clara diminuição e atraso da formação de fibrilas amiloides.





**Figura 16:** Efeito do inibidor neurofibrilar: A  $A\beta_{1-40}$  ( $50 \mu\text{M}$ ) foi incubada sozinha (figuras A-C) e na presença de  $5 \mu\text{M}$  do composto (**14**) (D-F). Aliquotas de cada reação foram testadas em vários períodos de tempo. Na reação de controle: (A) no tempo zero; (B) no dia 3; (C) após 7 dias. Na presença de (**14**): (D) no tempo zero; (E) no dia 3; (F) após 7 dias. As barras da escala preta são da ordem de  $100 \text{ nm}$  (CAMPAGNA *et. al.*, 2010).

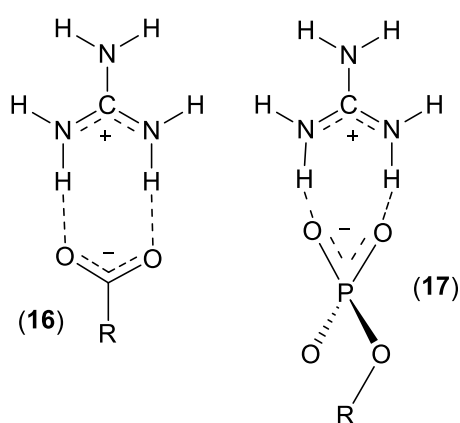
Algumas *N*-(2-(1H-indol-3-il)etil)-2-oxo-2H-cromeno-3-carboxamidas (**15**) planejadas por Ghanei-Nasab e colaboradores em 2016, foram testados para a AChE e BuChE e, a maioria delas apresentou atividade significativa para AChE (Figura 17). O melhor resultado foi obtido com o composto cujo  $R_1$  e  $R_3$  são hidrogênios e  $R_2$  sendo a subunidade 7-(4-fluorobenzil)oxi exibindo valor de  $CI_{50}$  de  $0,16 \mu\text{M}$ . Resultados de *docking* com a AChE, mostraram que este derivado pode ocupar o sítio aniônico periférico (PAS) e o sítio aniônico catalítico (CAS) desta enzima, e o anel indólico também interage com o PAS por meio de uma interação  $\pi$ - $\pi$  com o resíduo de aminoácido Trp279.



**Figura 17:** Inibidores de colinesterases e moléculas alvo de Ghanei-Nasab e colaboradores, destaque para o composto com maior atividade (Adaptado de GHANEI-NASAB *et. al.*, 2016).

## 2.6 GUANIDINAS E SUAS PROPRIEDADES BIOLÓGICAS

Moléculas contendo o núcleo guanidínico apresentam diversas atividades biológicas, dentre elas podemos destacar: anti-HIV, anti-bactericida, antiparasítica etc. Esta atividade ocorre devido a capacidade de interação por ligações de hidrogênio e também devido a sua estrutura básica, capaz de ligar-se a espécies carregadas negativamente como carboxilatos (16) ou fosfatos (17) (SACZEWSKI & BALEWSKI, 2009), como pode ser observado pela Figura 18.

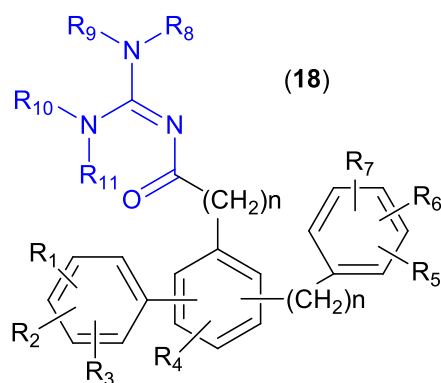


**Figura 18:** Ligação do íon guanidínico com oxiânions (Adaptado de ESPÍRITO SANTO, 2017).

Algumas moléculas com este núcleo são estudadas para o tratamento da Doença de Alzheimer, e segundo a literatura, a presença do grupamento guanidínico com o nitrogênio

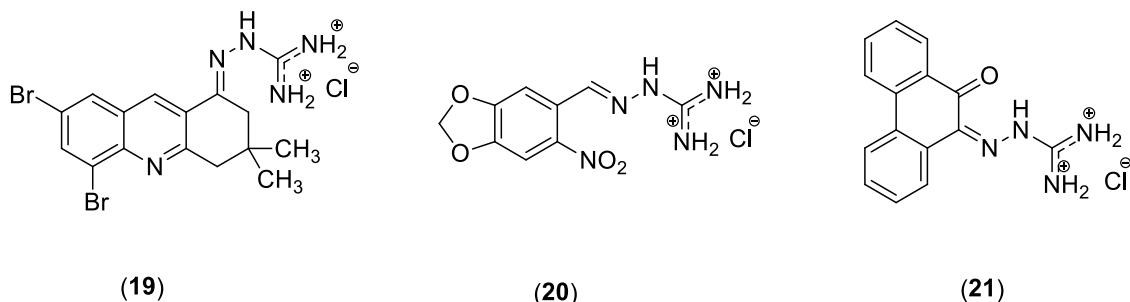
protonado consegue interagir com o sítio ativo das colinesterases (ROZENGART, BASOVA, *et al.*, 2003).

Em 2007 foram registradas patentes de Terfenilacilguanidinas (**18**), mostradas na Figura 19, pois apresentaram eficácia na inibição da enzima  $\beta$ -secretase, podendo ser utilizadas como fármacos para o tratamento da DA, prevenindo assim a formação dos depósitos da proteína A $\beta$  (HU, 2007).



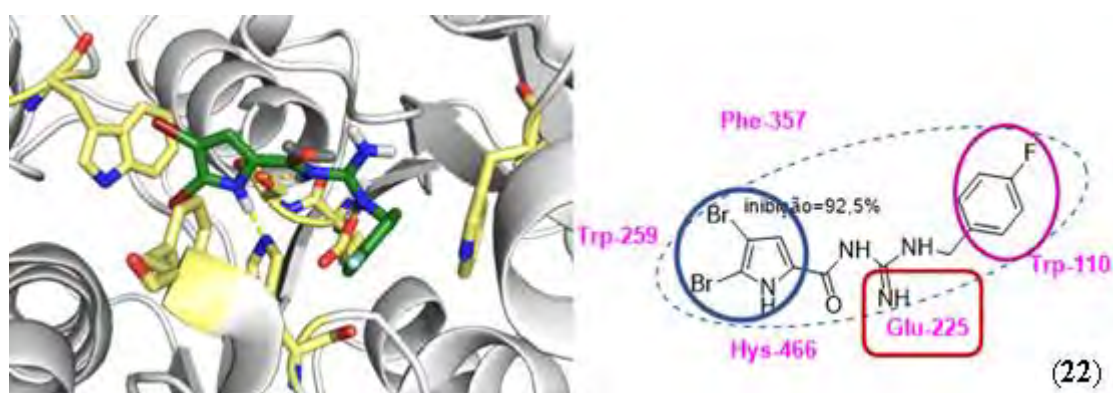
**Figura 19:** Terfenilguanidinas inibidoras de  $\beta$ -secretase (Adaptado de HU, 2007).

Novos compostos com uma subunidade guanidínica foram sintetizados por Neto e colaboradores em 2017, estes podem ser observados na Figura 20. Todos os resultados revelaram que as guanilhidrazonas são candidatos muito promissores, mostrando interação com aminoácidos da tríade catalítica da acetilcolinesterase. Os estudos destacaram o composto (**19**) com resultados (94,31% de inibição) mais satisfatórios que a tacrina (93,50%), sendo o composto mais ativo com  $CI_{50}=1,97 \mu M$ , porém os autores ressaltam que mais experimentos biológicos devem ser realizados para confirmar os resultados da pesquisa.



**Figura 20:** Estrutura das guanilhidrazonas para o tratamento da DA (Adaptado de NETO et al., 2017).

Recentemente, acilguanidinas bromopirrólicas (**22**) desenvolvidas por nosso grupo de pesquisa LaDMol-QM na UFRRJ e descritas na tese de doutorado da discente Paula do N. Goulart - resultados ainda não publicados (2021), demonstraram o caráter farmacofórico da subunidade acilguanidina ligada ao núcleo dibromopirrólico para a inibição seletiva da BuChE, importante para a fase tardia da DA. As acilguanidinas sintetizadas por Goulart foram identificadas como inibidoras seletivas de BuChE, *in vitro*, com valores de  $CI_{50}$  das moléculas mais promissoras variando entre 2,0 e 4,8  $\mu M$  e os estudos de *docking* molecular realizados demonstraram que tanto o núcleo bromopirrólico como a função acilguanidina realizam importantes interações com aminoácidos presentes no sítio ativo da BuChE (Figura 21); do tipo Bromo- $\pi$ , interações de hidrogênio e interações entre os NHs guanidínicos e o resíduo de aminoácido do ácido glutâmico. Adicionalmente, a avaliação *in silico* também indicou que as acilguanidinas bromopirrólicas descritas também possuem bom perfil *druglike*.



**Figura 21:** Acilguanidinas inibidoras de BuChE sintetizadas pelo grupo LADMOL-QM (Adaptado de GOULART *et. al.*, 2021 - Tese PPGQ - UFRRJ).

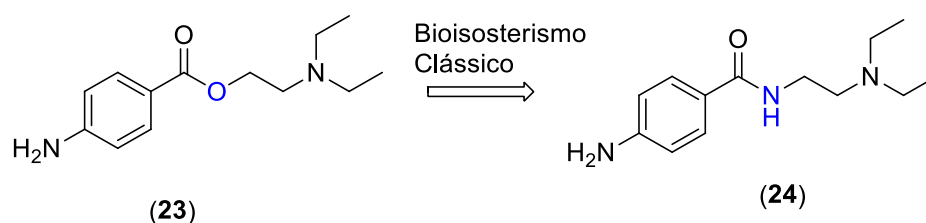
Tendo em vista as importantes propriedades farmacofóricas do núcleo heterocíclico indol e da subunidade guanidínica, as quais são também corroboradas por resultados de

pesquisas anteriores do LADMOL-QM, é natural a busca pelo planejamento estrutural e síntese de compostos originais que preservem estes atributos como candidatos a novos fármacos para o tratamento da Doença de Alzheimer (DA), adotando ferramentas de planejamento como o bioisosterismo e estudando as propriedades farmacocinéticas das moléculas sintetizadas para garantir uma característica adequada de fármaco (*druglike*).

## 2.7 BIOISOSTERISMO COMO FERRAMENTA DE PLANEJAMENTO

O conceito de bioisosterismo segundo Barreiro e Fraga (2008) refere-se a: compostos ou subunidades estruturais de compostos bioativos que apresentam volumes moleculares, formas, distribuições eletrônicas e propriedades físico-químicas semelhantes, capazes de apresentar propriedades biológicas semelhantes. Dentre as ferramentas para o planejamento de um fármaco, o bioisosterismo ocupa o lugar de destaque por sua versatilidade.

O bioisosterismo surgiu a partir do princípio de isosterismo, desenvolvido por Langmuir, aplicado em moléculas de substância bioativas, ao estudar o comportamento químico e a reatividade de determinadas substâncias com átomos de igual número de elétrons de valência, como o N<sub>2</sub> e CO, por exemplo. Em, 1970, Burger classificou e dividiu os bioisósteros em duas grandes categorias: Bioisósteros Clássicos e Bioisósteros Não-clássicos. O Bioisosterismo Clássico (Figura 22) entre a procainá (23), um anestésico e a procainamida (24), usada no tratamento de arritmia cardíaca, atende de maneira geral as exigências de Grimm sobre a Regra do Hidreto.



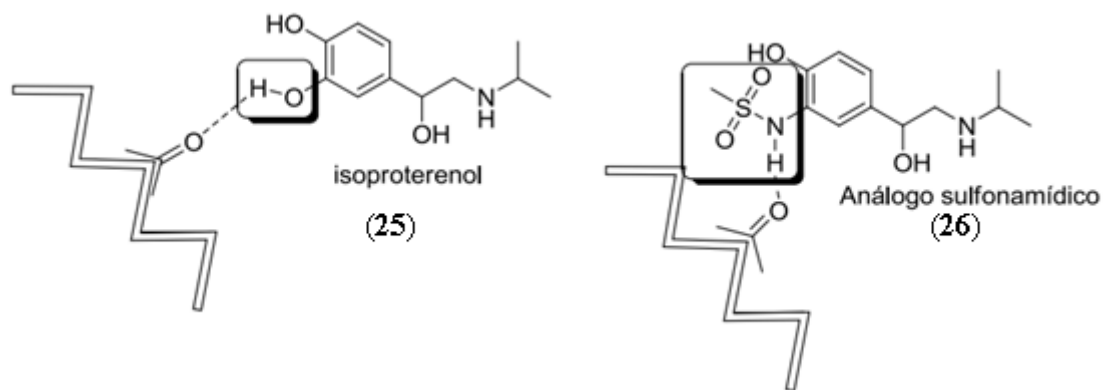
**Figura 22:** Exemplo de modificação bioisostérica clássica (Adaptado de ELIAS, OLIVEIRA & SILVEIRA, 2018).

Na Regra do Hidreto, a adição de um hidreto a um átomo fornece um pseudo-átomo com as mesmas propriedades físicas daqueles presentes na coluna imediatamente posterior da Tabela Periódica.

**Tabela 3:** Regra do Hidreto de Grimm (Adaptado de BARREIRO & FRAGA, 2009).

Número de Elétrons					
6	7	8	9	10	11
C	N	-O-	-F	Ne	Na <sup>+</sup>
	CH	-NH-	-OH	FH	NeH
		-CH <sub>2</sub> -	-NH <sub>2</sub>	OH <sub>2</sub>	FH <sub>2</sub>
			-CH <sub>3</sub>	NH <sub>3</sub>	H <sub>3</sub> O <sup>+</sup>
				CH <sub>4</sub>	NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>

Já o Bioisosterismo não-clássico (Figura 23) não atende as regras eletrônicas e estéricas dos bioisósteros clássicos, mas podem produzir atividade biológica similar (SILVA, 2009).

**Figura 23:** Exemplo de bioisosterismo não-clássico (Adaptado de SILVA, 2009).

## 2.8 PROPRIEDADES DRUGLIKE

Os estudos acerca do caminho que um princípio ativo percorre no organismo vivo a partir de sua administração até atingir a circulação para enfim exercer o efeito desejado e ser excretado pelo corpo, fazem parte da fase de planejamento chamada farmacocinética. Os estudos de propriedades ADME são fundamentais na busca por novos candidatos a fármacos, pois avaliam e exploram teoricamente, os processos farmacocinéticos de absorção (A),

distribuição (**D**), metabolização (**M**) e excreção (**E**). Tendo em vista estas propriedades, ao longo do tempo foram desenvolvidos por pesquisadores vários métodos chamados de regras ou filtros, fazendo assim um candidato a fármaco ter um melhor “perfil *druglike*” (RODRIGUES *et. al.*, 2021).

O método mais popular empregado para a predição da absorção oral de novos candidatos a fármacos é a Regra de Lipinski. O estudo de Lipinski foi baseado em um conjunto de dados coletadas do *World Drug Index* (WDI) e estabeleceu que candidatos a fármacos apresentariam baixa absorção oral e permeabilidade se infringisse ao menos duas propriedades:

- ✓ Massa Molar maior que 500;
- ✓ Número de doadores de ligação de hidrogênio maior que 5;
- ✓ Número de aceptores de ligação de hidrogênio maior que 10;
- ✓ Coeficiente de partição octanol/água (Log P) maior que 5.

Esta regra partiu da observação de que a maioria dos medicamentos administrados por via oral no mercado são moléculas relativamente pequenas e moderadamente lipofílicas, o que garante a boa solubilidade e permeação; sendo assim o aumento da massa molar pode impedir a difusão através das cadeias laterais alifáticas compactadas na bicamada lipídica das membranas biológicas. O Log P é a razão entre a concentração da substância na fase orgânica e sua concentração na fase aquosa. Deve haver um equilíbrio na solubilidade, pois fármacos mais lipossolúveis são melhores absorvidos, porém, esta redução de hidrossolubilidade pode comprometer etapas anteriores, como dissolução e solubilização do fármaco (MODA, 2007).

Além das propriedades abordadas por Lipinski, outros parâmetros são considerados para a avaliação da biodisponibilidade oral segundo as regras de Veber e Lovering. Veber e colaboradores (2002) propuseram em seu estudo que a biodisponibilidade oral de fármacos está relacionada à duas propriedades:

- ✓ Área de superfície polar topológica (TPSA)  $\leq 140 \text{ \AA}^2$ ;
- ✓ Número de ligações rotacionáveis  $\leq 10$

Onde quanto maior a presença de ligações rotacionáveis maior o número de conformações significativamente diferentes. Segundo Veber e colaboradores, um menor número de ligações rotacionáveis é ideal para garantir a estabilidade conformacional da molécula e sua passagem através das membranas. A TPSA é definida como a área de superfície ocupada por átomos de nitrogênio e oxigênio, diretamente associados à capacidade de formação

das ligações de hidrogênio e também à polaridade da molécula, que influencia na interação com as membranas celulares e sua migração para a porção lipídica.

Por outro lado, na teoria de Lovering e colaboradores (2009) verificou que a complexidade da molécula é um fator significativo na transição de candidatos a fármacos até a aprovação do medicamento. As propriedades mais importantes para a determinação dessa complexidade molecular são:

- ✓ Porcentagem de carbonos com hibridização  $sp^3$ ;
- ✓ Número de centros quirais

Na teoria de Lovering uma alta porcentagem de carbonos com hibridização  $sp^3$  tornam o composto estruturalmente mais complexo, permitindo a exploração de espaços químicos diversos que não são acessíveis com moléculas planas, por exemplo. Ou seja, quanto maior a complexidade do protótipo a fármaco melhor sua potência ou especificidade a um sítio ativo, sem necessariamente aumentar seu peso molecular (LOVERING, 2009).

Estes estudos teóricos de farmacocinética podem contribuir para que possíveis triagens sejam conduzidas na tentativa de facilitar o processo de tomada de decisão e aumentar a probabilidade de encontrar ou desenvolver compostos viáveis farmacologicamente em seres humanos. A partir dos dados obtidos pela análise farmacocinética, observando as propriedades medicinais de subunidades importantes na química medicinal e com o auxílio da ferramenta de bioisosterismo, é possível propor uma série de compostos que venham a ser inibidores da enzima butirilcolinesterase, candidatos a protótipos de fármacos para o tratamento da Doença de Alzheimer.



### 3. OBJETIVOS

O presente trabalho tem como objetivos gerais o planejamento estrutural, a síntese, caracterização estrutural e avaliação farmacológica *in vitro* e *in silico* de derivados 1H-indol-2-acilguanidínicos com estrutura química original, planejados como candidatos a novos protótipos de fármacos inibidores seletivos de BuChE potencialmente úteis para o tratamento da Doença de Alzheimer.

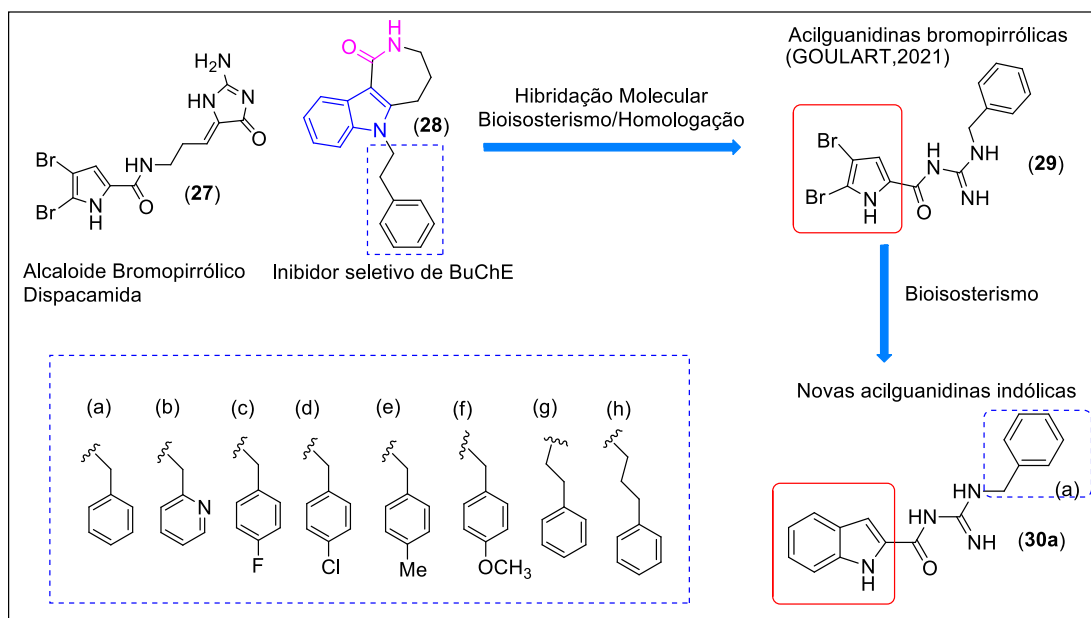
#### 3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Síntese e caracterização estrutural (RMN de  $H^1$  e  $C^{13}$ ) dos novos derivados 1H-indol-2-acilguanidínicos;
- Avaliação do perfil farmacológico dos novos compostos sintetizados (estudos *in vitro* da inibição da acetilcolinesterase e butirilcolinesterase);
- Estudo das propriedades ADME e *druglike* utilizando o *software* SwissADME;
- Estudos de modelagem molecular por *docking* dos compostos planejados com a butirilcolinesterase;

#### 3.2 PLANEJAMENTO ESTRUTURAL DOS COMPOSTOS 1H-INDOL-2-ACILGUANIDÍNICOS

O planejamento estrutural dos novos derivados 1H-indol-2-acilguanidínicos (**30a-h**) foi baseado na série de alcilguanidinas bromopirrólicas desenvolvidas por Goulart (2021) (**29**), as quais, por sua vez foram planejadas como análogos sintéticos do alcaloide marinho dispacamida (**27**) e hibridação molecular com inibidores seletivos de BuChE (**28**). As acilguanidinas indólicas descritas neste trabalho foram planejadas pela troca bioisostérica do núcleo dibromopirrólico presente nas acilguanidinas bromopirrólicas previamente descritas, pelo anel heterocíclico indol, o qual está presente em diversas classes de substâncias

bioativas, inclusive inibidores seletivos de BuChE. Adicionalmente, assim como na série bromopirrólica, foram mantidos os diferentes substituintes aromáticos ligados ao nitrogênio acilguanidínico como fonte de variabilidade estrutural da série, importante para a compreensão futura das relações estrutura-atividade (REA) (Figura 24).

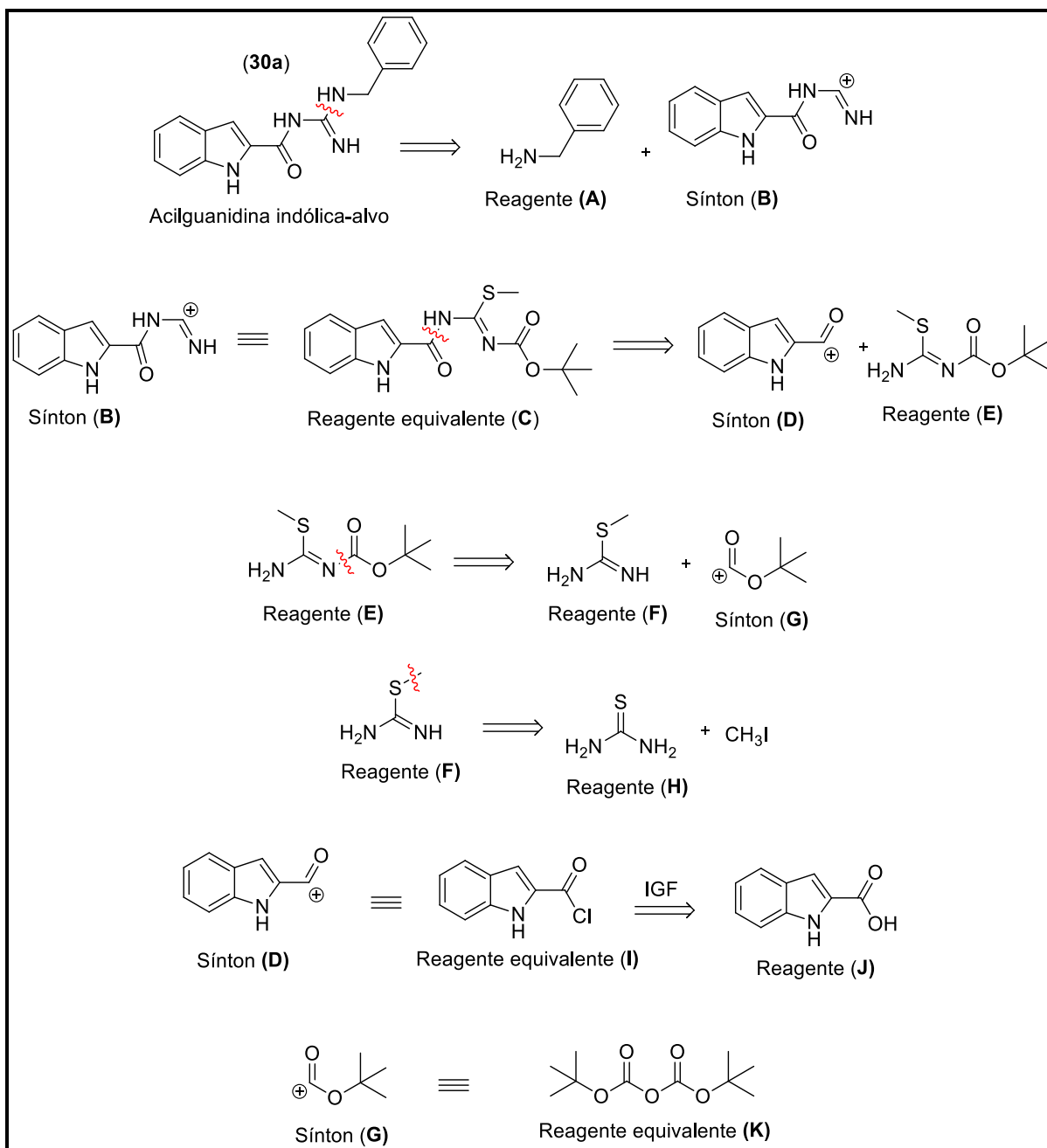


**Figura 24:** Fluxograma do planejamento estrutural e relações estruturais entre os protótipos e os novos derivados planejados.

#### 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Para identificarmos uma rota sintética viável para a obtenção dos compostos alvo, fez-se necessário uma análise retrossintética dos mesmos. Desta forma, de acordo com o Esquema 1, partindo da acilguanidina indólica (**30a**), através da desconexão da ligação carbono-nitrogênio da função guanidina podemos identificar como precursores a benzilamina A e o sínton B, o qual pode corresponder ao reagente C. Um sínton é uma unidade hipotética, geralmente um íon, que auxilia a visualização das possíveis abordagens sintéticas a serem empregadas na preparação das moléculas-alvo.

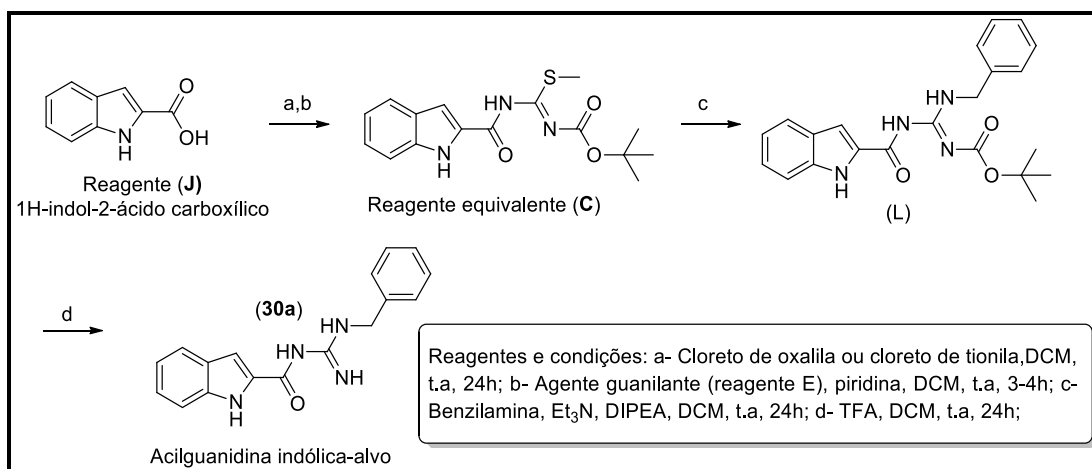
Através da desconexão do carbono carbonílico e o nitrogênio da isotiouréia de C podemos identificar o reagente E e o sínton D como possíveis precursores. O reagente E, por sua vez, pode ser identificado como produto da reação entre uma isometiltiouréia (reagente F) e o anidrido *Boc* (H), equivalente ao sínton G. A isometiltiouréia (F) é o produto reação de metilação do reagente comercial tiouréia (H). O sínton D, por sua vez, tem como possível reagente correspondente o cloreto de ácido indólico (I), o qual, por interconversão de grupo funcional (IGF), identificamos como derivado do ácido carboxílico indólico, disponível comercialmente, que será o principal reagente de partida (J) (Esquema 1).



**Esquema 1:** Análise retróssintética do projeto.

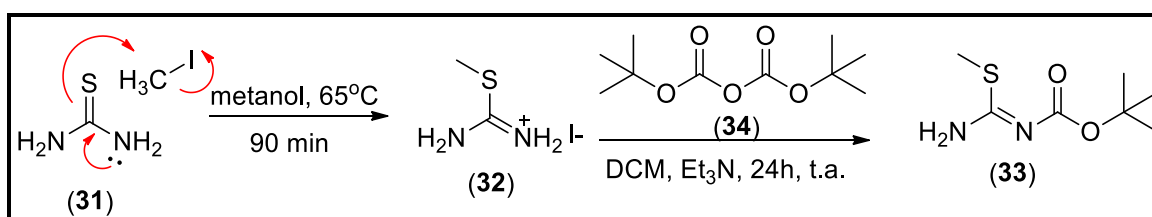
Após análise retróssintética descrita acima, podemos propor a rota sintética mostrada no Esquema 2 para a obtenção dos compostos acilguanidínicos planejados (30a-h). Dessa forma, partindo do reagente comercial 1H-indol-2-ácido carboxílico (J) podemos obter o cloreto de ácido correspondente através da reação com cloreto de tionila ou cloreto de oxalila e posteriormente obtermos o intermediário-chave (C) pela reação do cloreto de ácido com o agente guanilante (E). Este último pode ser obtido a partir da tiouréia (H) após reações de

metilação do átomo de enxofre, em uma reação de substituição nucleofílica bimolecular (SN<sub>2</sub>), e posterior proteção de um dos nitrogênios com anidrido Boc, em uma reação de substituição nucleofílica à carbonila.



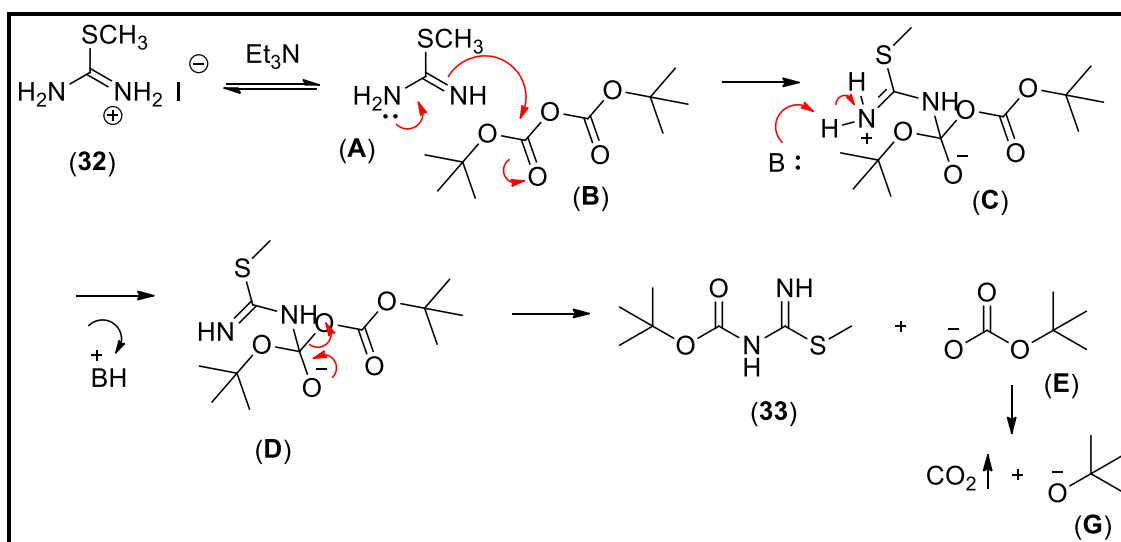
**Esquema 2:** Análise retrosintética do projeto.

De acordo com as rotas descritas anteriormente, foi feito primeiramente a reação de metilação da tiouréia (31) com iodeto de metila em metanol sob refluxo para obtenção do sal isometiltiourônio (32) como um sólido amarelo em 90% de rendimento. O mecanismo de metilação da tiouréia consiste em uma reação de substituição nucleofílica bimolecular (SN<sub>2</sub>), na qual o enxofre ataca o carbono eletrofílico da metila, deixando o iodeto livre na forma de sal de amônio e formando o isometil tiourônio (Esquema 3). A partir do sal de isometiltiourônio foi realizada a reação de proteção de um dos nitrogênios para obtenção do derivado monoprotetido correspondente (33) em 85% de rendimento.



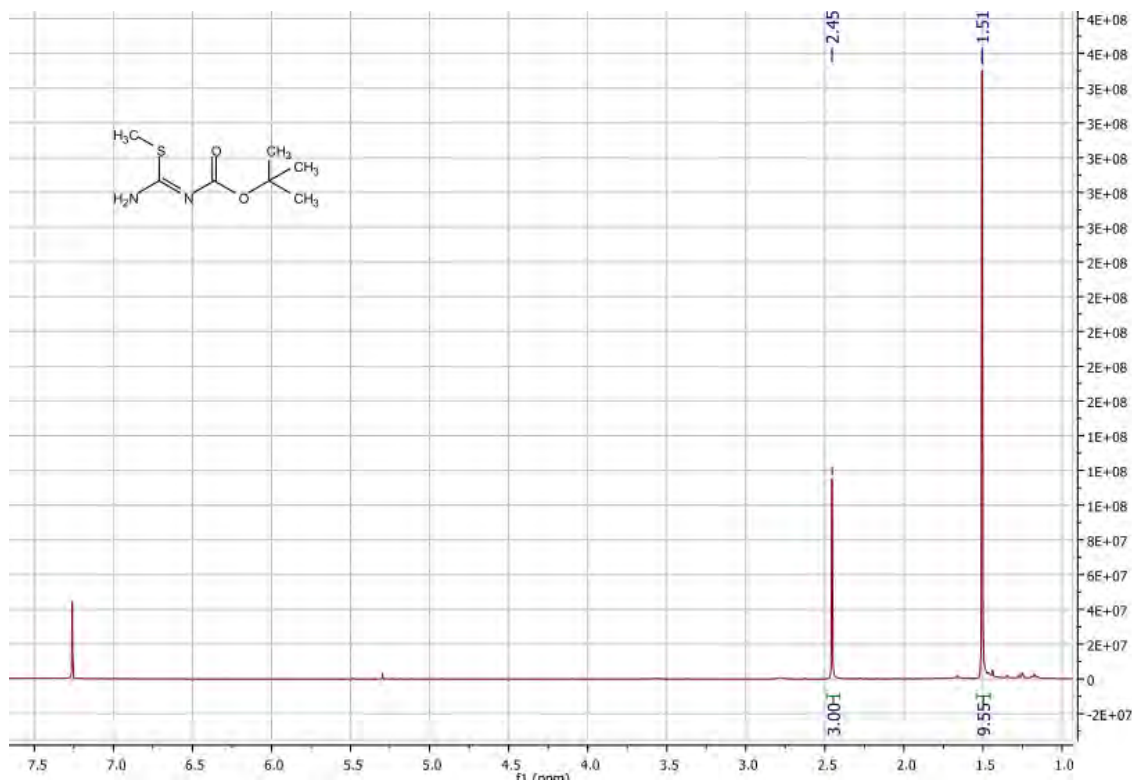
**Esquema 3:** Reações para obtenção do agente guanilante (33).

O mecanismo proposto para a reação de monoproteção do sal passa por uma reação de substituição nucleofílica acílica. Inicialmente, o nitrogênio de uma das aminas age como nucleófilo e ataca o carbono carbonílico do dicarbonato de di-*tert*-butila (anidrido Boc -  $(\text{Boc})_2\text{O}$ ) (**34**). Conseqüentemente, a ligação  $\text{C}=\text{O}$  se quebra e um intermediário tetraédrico é formado, seguido da abstração do hidrogênio do amônio por uma base presente no meio, neste caso a trietilamina. O intermediário tetraédrico formado é instável, assim, o íon carbonato é eliminado, restituindo a ligação dupla, resultando na formação da 2-metil-isotioureia *N*-protegida. O carbonato de *tert*-butila eliminado sofre decomposição em  $\text{CO}_2$  (gás) e *tert*-butóxido (Esquema 4). Esta reação é realizada através da adição lenta de anidrido Boc em diclorometano sobre excesso do sal em meio básico para garantir a monoproteção e obtenção do agente guanilante, um sólido branco obtido em 85% de rendimento, o qual foi caracterizado através de seu espectro de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) de Hidrogênio ( $^1\text{H}$ ) e Carbono 13 ( $^{13}\text{C}$ ) (DEPTQ).



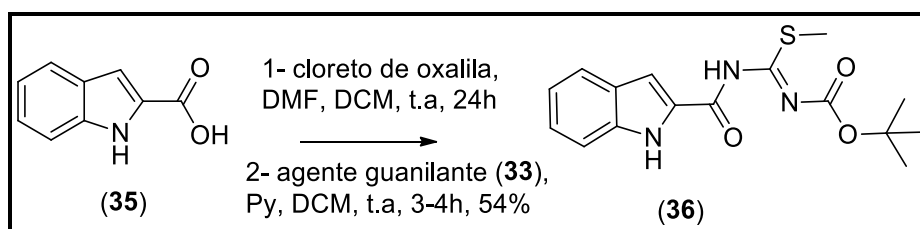
**Esquema 4:** Mecanismo proposto para a obtenção do agente guanilante (**33**).

O espectro de RMN  $^1\text{H}$  (Figura 25) mostra as metilas do grupo *Boc* como um único simpleto (s) em 1,5 ppm, a metila do enxofre como um simpleto em 2,45 ppm e os hidrogênios ligados ao nitrogênio em 7,2 ppm.



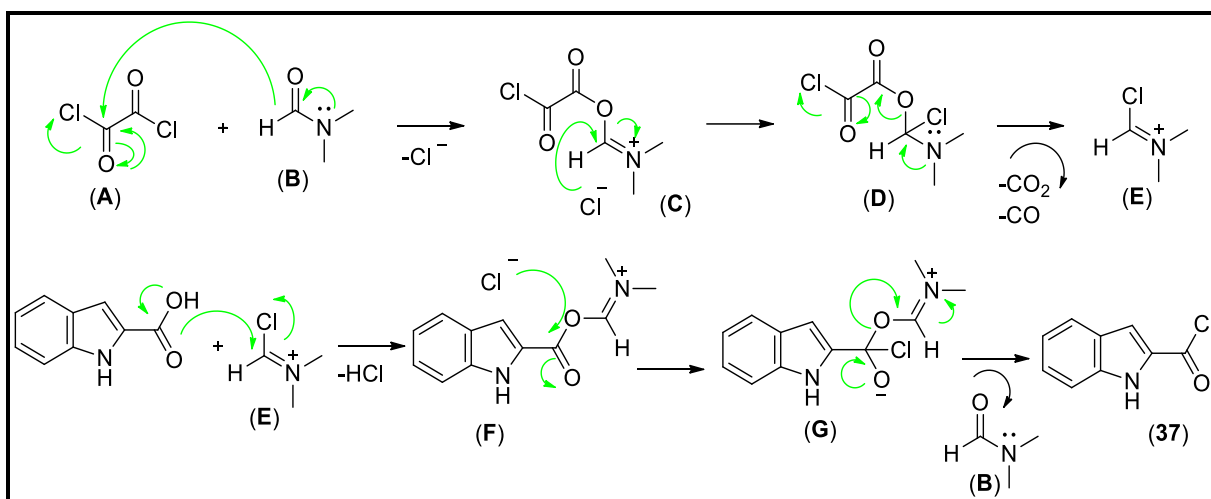
**Figura 25:** Espectro de RMN  $^1\text{H}$  do agente guanilante (**33**).

De posse do agente guanilante (**33**), a etapa seguinte consistiu na formação do cloreto de ácido a partir do reagente comercial ácido carboxílico indólico, para posterior obtenção do intermediário chave para formação das acilguanidinas. Primeiramente o ácido carboxílico indólico (**35**) foi submetido à reação com cloreto de oxalila em diclorometano e *N,N*-dimetilformamida, para formação do cloreto de ácido, em seguida o meio reacional é evaporado e o produto bruto é solubilizado em diclorometano e submetido à reação com o agente guanilante em piridina (Esquema 5).



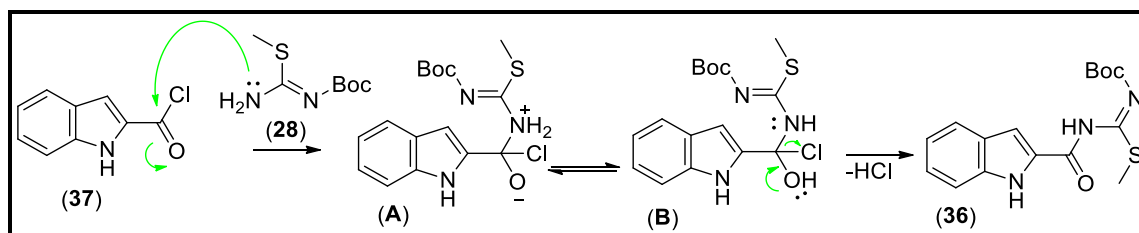
**Esquema 5:** Obtenção do intermediário-chave.

O mecanismo para a formação do cloreto de ácido indólico (**36**) está ilustrado no Esquema 6, no qual podemos observar que a reação gera o desprendimento de monóxido de carbono (CO), dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>) e ácido clorídrico (HCl). Adicionalmente, há a formação do intermediário reagente de Vilsmeier (**E**), eletrófilo que irá reagir como o ácido carboxílico para formação do cloreto de ácido correspondente. O cloreto de ácido (**37**) é extremamente reativo frente à presença de água (umidade presente na atmosfera) e nucleófilos em geral, esta espécie não é isolada ou estocada, sendo usada *in situ*.



**Esquema 6:** Mecanismo proposto para a formação do cloreto de ácido.

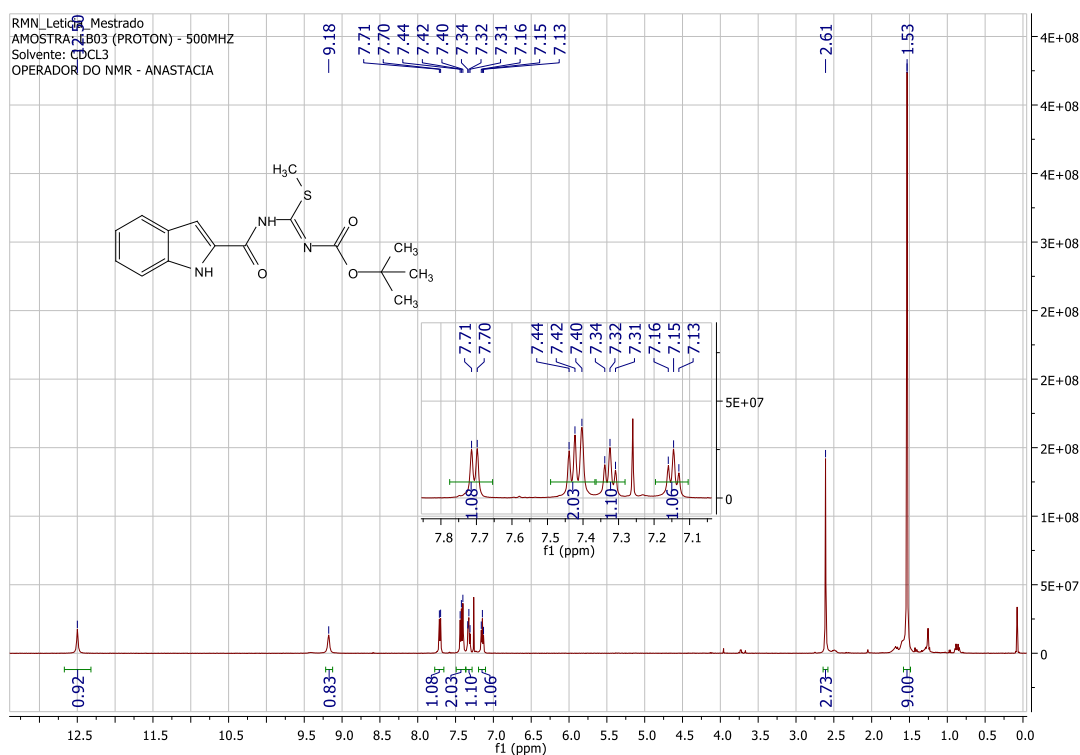
Por sua alta reatividade, após evaporação do solvente, o cloreto de ácido formado na primeira etapa reage com o agente guanilante (**33**) na presença de diclorometano e piridina, através de uma reação de substituição nucleofílica acílica (Esquema 7) para a obtenção do intermediário (**36**), que foi purificado a partir da técnica de cromatografia líquida em coluna aberta.



**Esquema 7:** Proposta de mecanismo para a obtenção do intermediário-chave.

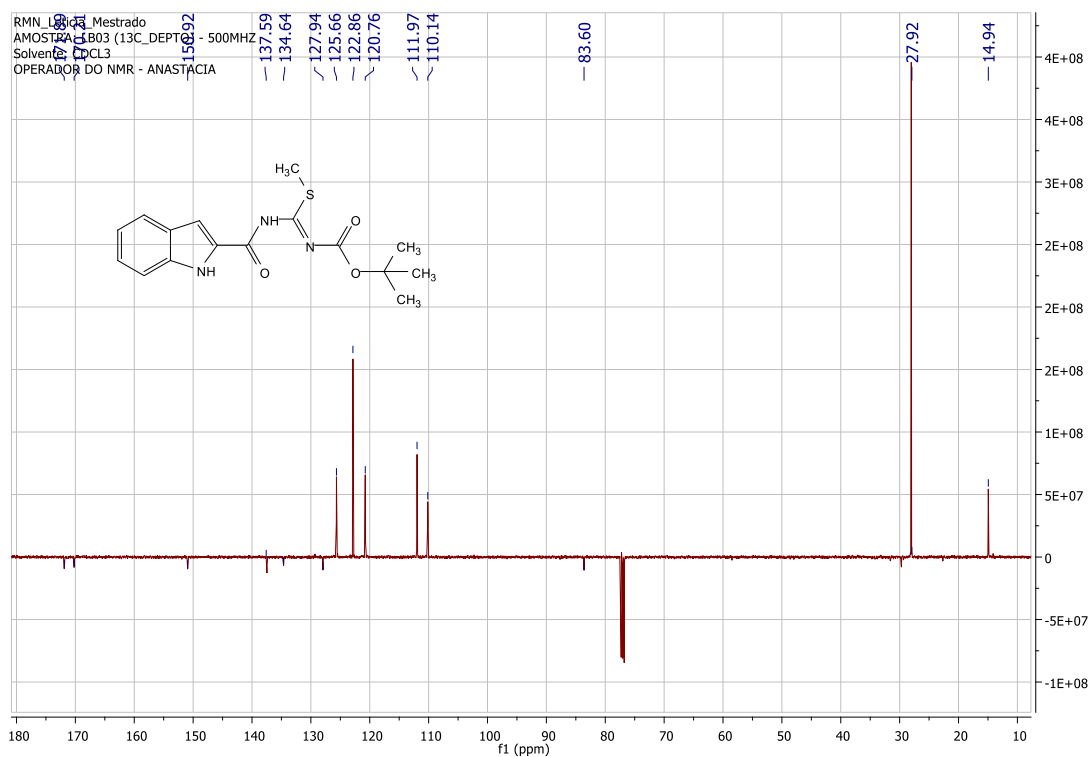


O intermediário chave (**36**) obtido teve sua estrutura confirmada por espectros de RMN  $^1\text{H}$  e RMN  $^{13}\text{C}$  (DEPTQ) (Figuras 26 e 27). No espectro de hidrogênio podemos observar a presença dos hidrogênios das metilas do grupo de proteção *Boc* como um único simpleto em 1,53 ppm, a metila do enxofre como um simpleto em 2,61 ppm, os cinco hidrogênios do heterociclo indol aparecem em quatro sinais na região entre 7,71-7,13 ppm, além do NH da amida em 12,5 ppm e NH do indol em 9,18 ppm.



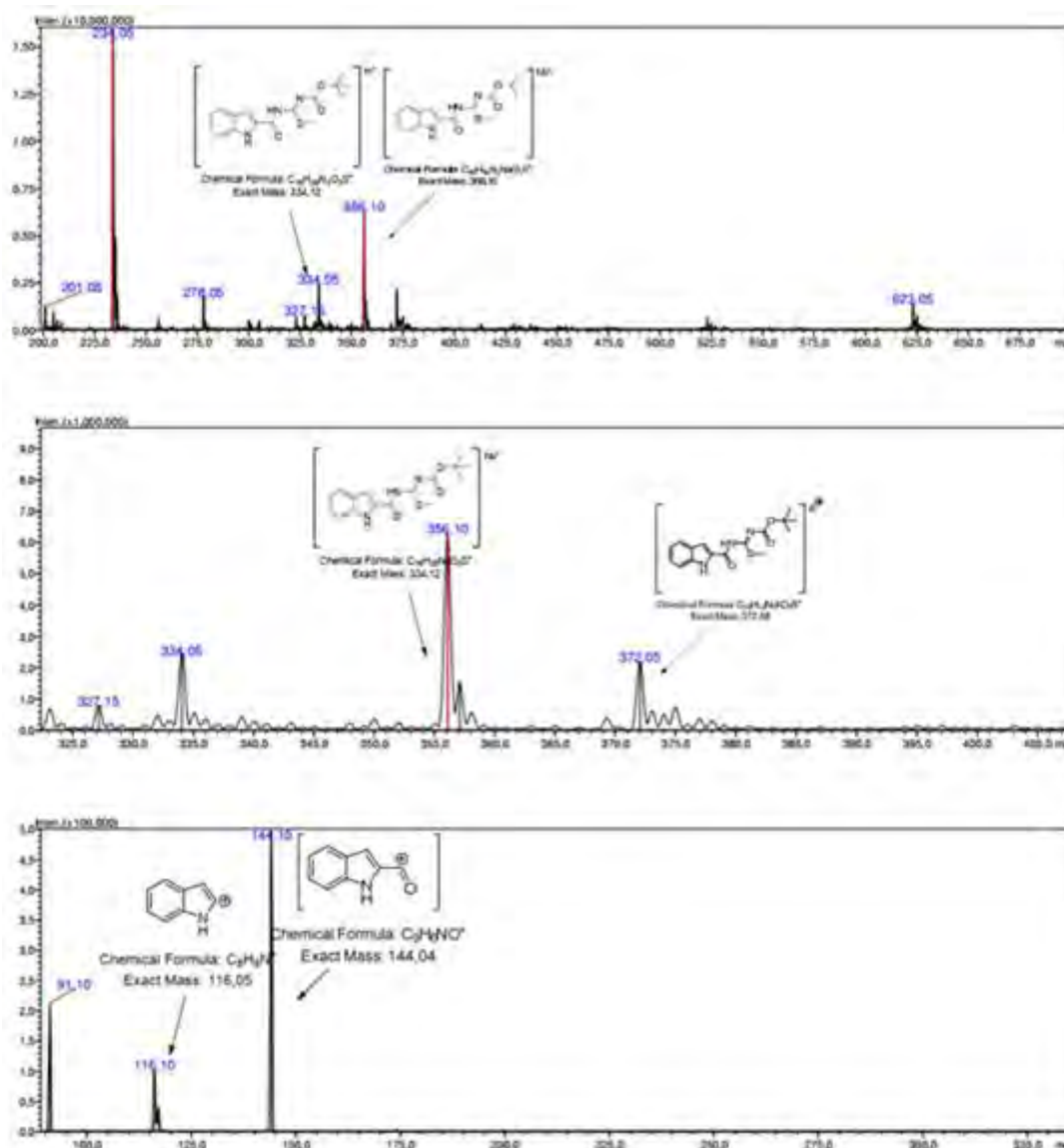
**Figura 26:** Espectro de RMN  $^1\text{H}$  do intermediário-chave.

O espectro de carbono (DEPTQ) (Figura 25) mostra o sinal das metilas do Boc em 27,9 ppm, a metila do enxofre em 14,9 ppm, o carbono quaternário do grupo *terc*-butila em 83,6 ppm, os CH's aromáticos entre 127 e 110 ppm, além dos carbonos carbonílicos na região de 170 ppm.



**Figura 27:** Espectro de RMN <sup>13</sup>C (DEPTQ) do intermediário-chave.

Adicionalmente, também foi feito o espectro de massas do intermediário-chave (**36**), através do qual pode-se identificar alguns fragmentos característicos da molécula sintetizada (Figura 28).

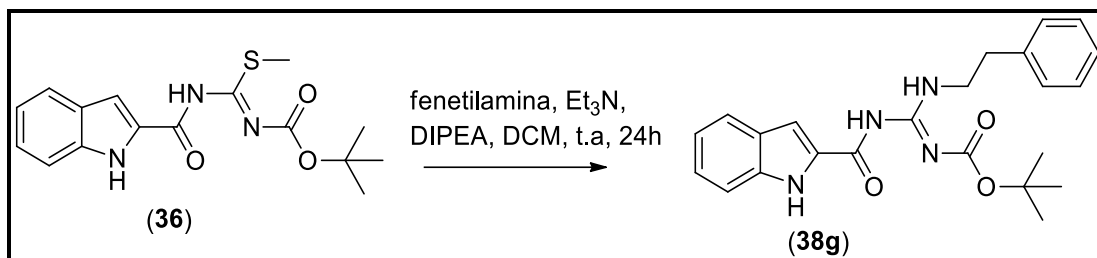


**Figura 28:** Espectro de massa do intermediário chave.

De posse do intermediário-chave (**36**) e após a caracterização de sua estrutura, como descrito acima, a etapa seguinte consistiu nas reações de condensação com as aminas (**a-h**) para a formação das acilguanidinas protegidas (**38a-h**).

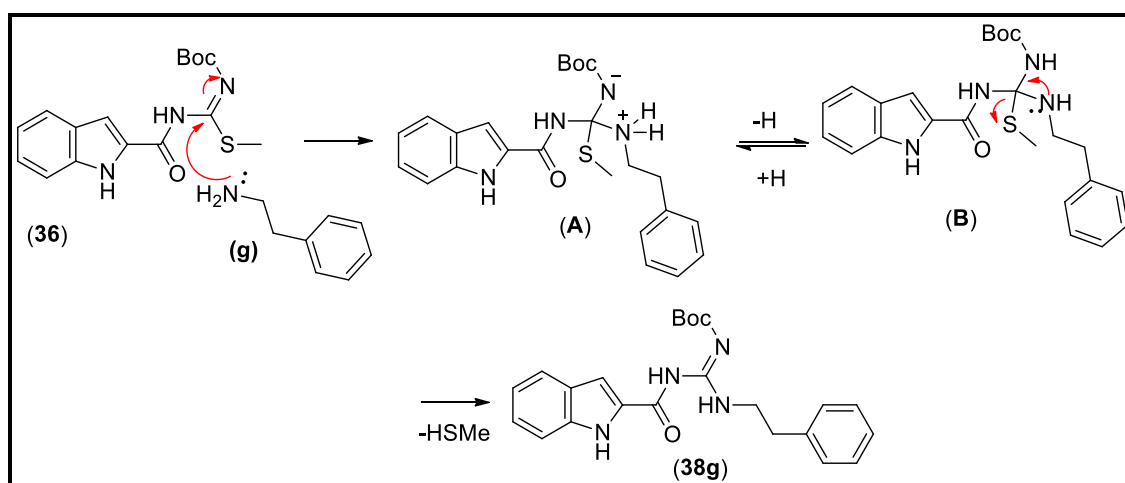
Inicialmente foi feita reação com a fenetilamina (**g**) em diclorometano, trietilamina e DIPEA (di-isopropiletilamina) para a formação da acilguanidina indólica (**38g**) (Esquema 8), fornecendo o produto como um óleo castanho que através de uma análise inicial do espectro de ressonância magnética nuclear, verificou-se como estando impuro com excesso de amina. Diante disso, todas as acilguanidinas protegidas passaram por um processo de purificação a

partir da técnica de cromatografia líquida em coluna aberta, e após esta etapa seu aspecto físico, assim como de todos os produtos desta série, passou a ser de um sólido branco cristalino.



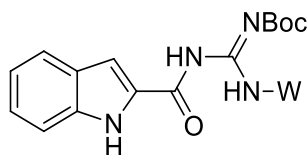
**Esquema 8:** Formação da acilguanidina fenetílica protegida.

A reação de adição das aminas ocorre através do ataque nucleofílico do nitrogênio da amina (Esquema 9) ao carbono imínico eletrofílico do intermediário-chave (36) formando um intermediário tetraédrico a partir do qual ocorre a restauração da dupla ligação imínica com a perda do grupo tiometila na forma de metanotiol (HSMe), de odor desagradável e característico perceptível ao longo da execução e isolamento das reações em questão.



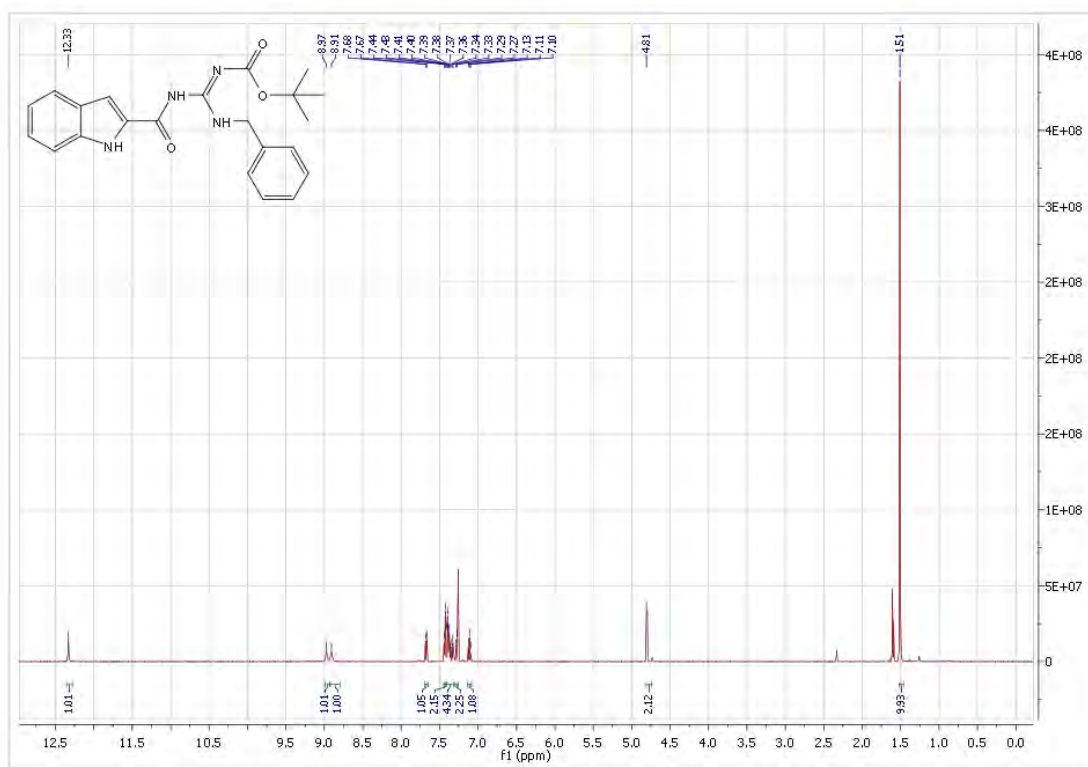
**Esquema 9:** Proposta de mecanismo de formação das acilguanidinas monoprotetidas.

A Tabela 4 resume algumas características de todas as acilguanidinas protegidas sintetizados.

**Tabela 4:** Acilguanidinas protegidas, rendimentos reacionais e características físicas.

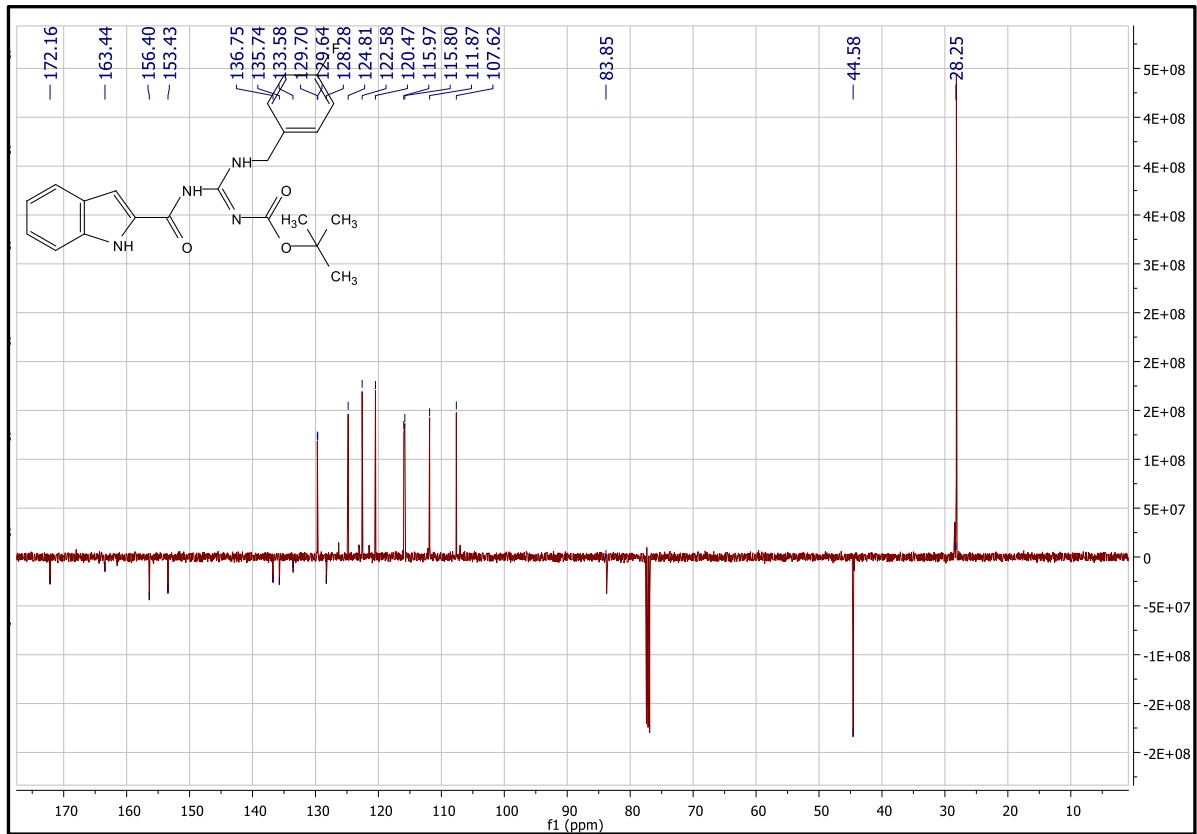
Derivado	W	R (%)	P.F. (°C)	Aspecto Físico
<b>38a</b>	Benzil	61,28	158-160	Sólido branco
<b>38b</b>	Picolil	8,47	126-128	Sólido branco
<b>38c</b>	<i>p</i> -fluor-benzil	36,51	128-130	Sólido branco
<b>38d</b>	<i>p</i> -cloro-benzil	56,23	150-152	Sólido branco
<b>38e</b>	<i>p</i> -metil-benzil	68,32	146-148	Sólido branco
<b>38f</b>	<i>p</i> -metóxi-benzil	75,36	148-150	Sólido branco
<b>38g</b>	fenetil	54,94	150-152	Sólido branco
<b>38h</b>	fenilpropil	75,58	138-140	Sólido branco

A acilguanidina (**38a**) foi caracterizada através de seus espectros de RMN  $^1\text{H}$  (Figura 27) e RMN  $^{13}\text{C}$  (Figura 28). Esta classe de derivados tem como sinais de hidrogênio característicos as metilas do grupo de proteção *Boc*, que aparecem como um simpleto com integração de nove hidrogênios entre 1,5 ppm, os sinais de hidrogênio da amida em torno de 12 ppm, os hidrogênios ligados aos nitrogênios da função guanidina entre 8,5 e 9 ppm, e os metilenos espaçadores que separam o anel aromático e a função acilguanidina em torno de 4,8 ppm. Os sinais dos anéis aromáticos aparecem na região característica em torno de 7 ppm. Adicionalmente, é importante observarmos o desaparecimento do sinal correspondente à metila do grupo tiometila em 2,5 ppm, do intermediário chave anterior (**36**). Abaixo, é mostrado o espectro de RMN  $^1\text{H}$  (Figura 29) do derivado acilguanidínico protegido (**38a**) para ilustrar os sinais característico desta classe.



**Figura 29:** Espectro de RMN  $^1\text{H}$  da acilguanidina (**38a**) monoprotetida.

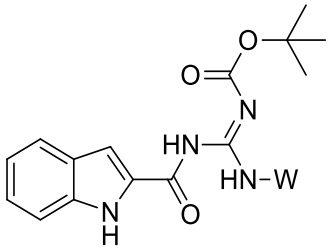
Os espectros de RMN  $^{13}\text{C}$  (DEPTQ) dos derivados (**38a-h**) apresentam como características principais a presença dos sinais das carbonilas e carbono imínico ( $\text{C}=\text{N}$ ) entre 153 e 172 ppm, os carbonos das metilas e o carbono quaternário do grupo de proteção *Boc* em torno de 28 e 83 ppm, respectivamente, além do sinal do metileno, ou metilenos (a depender do substituinte), em torno de 44 ppm. Os sinais dos carbonos do anel aromático aparecem em torno de 107 e 136 ppm. Também observamos o desaparecimento do sinal correspondente ao carbono da metila do grupo tiometila do intermediário anterior (**36**), em torno de 15 ppm. Abaixo, é mostrado o espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  (DEPTQ) do derivado acilguanidínico protegido (**38a**) para ilustrar os sinais característico desta classe (Figura 30).



**Figura 30:** Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  (DEPTQ) da acilguanidina monoprotetida (**38a**).

Os sinais no espectro de RMN  $^1\text{H}$  e RMN  $^{13}\text{C}$  (DEPTQ) de toda a série das acilguanidinas monoprotetidas estão resumidos na Tabela 5 e 6, respectivamente.

**Tabela 5:** Principais sinais nos espectros de RMN  $^1\text{H}$  (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$ -ppm) que permitem a caracterização dos derivados acilguanidínicos protegidos (**38a-h**).

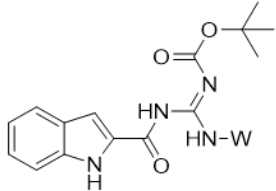
					
Composto	W	NH's	CH (Aromáticos)	CH <sub>2</sub>	(CH <sub>3</sub> ) <sub>3</sub> (Boc)
<b>38a</b>	Benzil	12,33/8,97/8,91	7,67 – 7,11	4,8	1,51
<b>38b</b>	Picolil	12,27/9,36/9,24	8,66-7,11	4,9	1,53
<b>38c</b>	<i>p</i> -fluor-benzil	12,32/8,99/8,86	7,68-7,07	4,77	1,51
<b>38d</b>	<i>p</i> -cloro-benzil	12,31/8,95/8,89	7,68-7,10	4,76	1,51
<b>38e</b>	<i>p</i> -metil-benzil*	12,33/9,00/8,86	7,68-7,11	4,75	1,50
<b>38f</b>	<i>p</i> -metóxi-benzil**	12,34/9,05/8,82	7,68-6,92	4,74	1,50
<b>38g</b>	fenetil	12,29/9,04/8,64	7,69-7,12	3,84/3,02	1,51
<b>38h</b>	fenilpropil	12,34/8,96/8,61	7,69-7,12	3,62/2,77/1,5 2	1,52

\*: Sinal do grupo metila como um simpleto em 2,36 (integração para 3 hidrogênios).

\*\* : Sinal do grupo metoxila como um simpleto em 3,81 (integração para 3 hidrogênios).



**Tabela 6:** Principais sinais nos espectros de RMN  $^{13}\text{C}$  (DEPTQ, 500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$ -ppm) que permitem a caracterização dos derivados acilguanidínicos protegidos (**38a-h**).

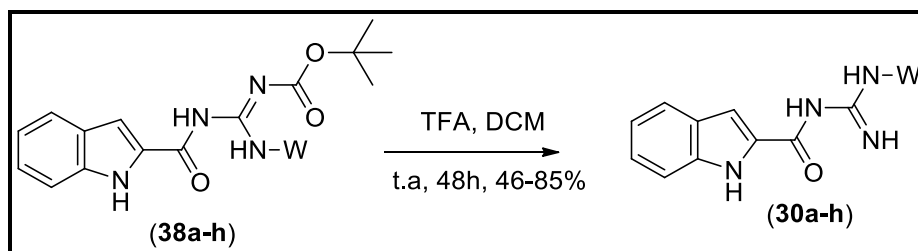
							
Código	W	$\underline{\text{C}}=\text{O}$ e $\underline{\text{C}}=\text{N}$	$\underline{\text{C}}\text{H}$ Aromático	$\underline{\text{C}}$ quater. Aromático	$\underline{\text{C}}$ quat Boc	$\underline{\text{C}}\text{H}_2$	$\underline{\text{C}}\text{H}_3$ Boc
<b>38a</b>	Benzil	171,97/ 156,3/ 153,30	128,90- 107,35	137,69/ 136,53/ 135,67/ 128,19	83,52	45,23	28,05
<b>38b</b>	Picolil	171,77 /156,72/ 156,09	149,36- 107,08	153,16/ 136,51/ 135,71/ 128,20	83,46	46,83	28,08
<b>38c</b>	<i>p</i> -fluor- benzil	172,02/ 163,32/ 156,27	129,57- 107,47	153,31/ 136,59/ 135,60/ 133,45/ 129,51	83,62	44,45	28,05
<b>38d</b>	<i>p</i> -cloro- benzil	172,01/ 156,31/ 153,31	129,14- 107,51	136,60/ 136,20/ 135,55/ 133,61/ 128,14	83,46	46,83	28,08
<b>38e</b>	<i>p</i> -metil- benzil*	171,95/ 156,23/ 153,28	129,56- 107,31	137,52/ 136,53/ 135,72/ 134,61/ 128,2	83,46	44,97	28,05
<b>38f</b>	<i>p</i> - metóxi- benzil**	171,97/ 159,23/ 156,17	129,21- 107,34	153,28/ 136,56/ 135,74/ 129,66/ 128,20	83,45	44,71	28,05
<b>38g</b>	fenetil	171,93/ 156,32/ 153,28	128,78- 107,28	138,60/ 136,56/ 135,76/ 128,74	83,36	42,78/ 35,66	28,02

\*: Sinal do grupo metila em 21,16 ppm.

\*\* : Sinal do grupo metoxila em 55,33 ppm.

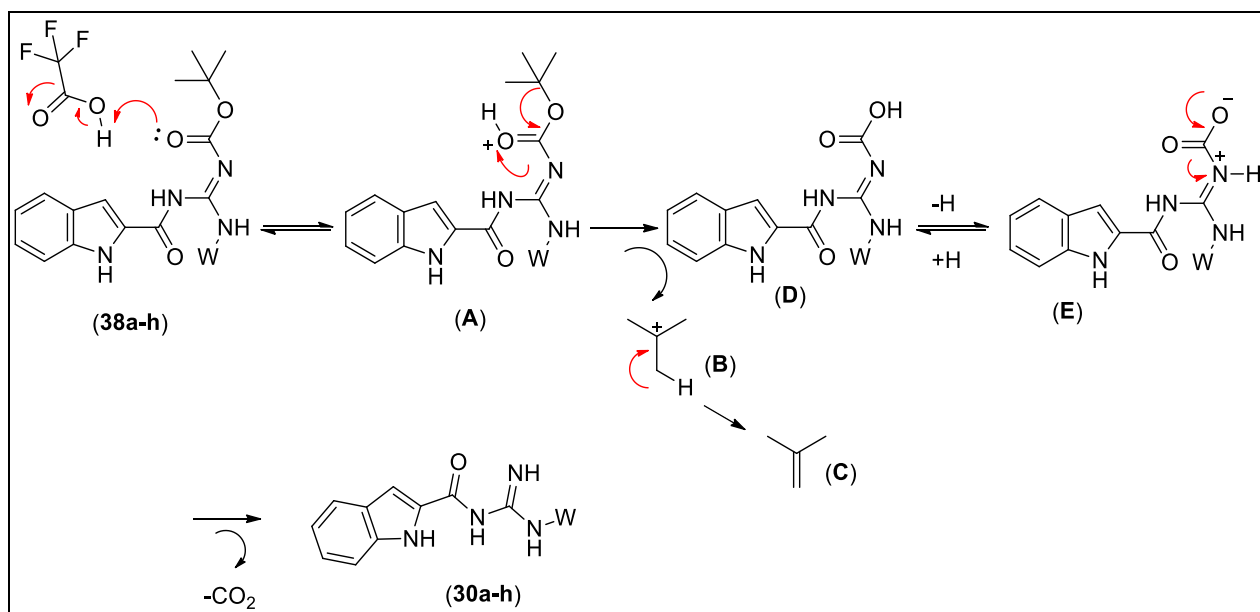
A etapa seguinte consistiu na remoção do grupo de proteção *Boc* em meio ácido para a obtenção das acilguanidinas desprotegidas correspondentes (**30a-h**) (Esquema 10). A reação foi realizada em ácido trifluoroacético (TFA) e diclorometano à temperatura ambiente durante pelo menos 48h, até a confirmação do consumo total da acilguanidina protegida de partida através das placas de cromatografia em camada fina analítica, levando à formação dos

compostos finais desprotegidos (**30a-h**) em bons rendimentos após uma etapa de isolamento consistindo apenas na remoção do TFA e do solvente utilizado sob vácuo.



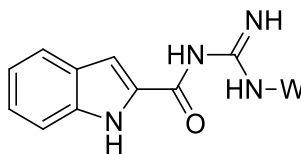
**Esquema 10:** Reação de desproteção das acilguanidinas.

O mecanismo proposto para a reação de desproteção está ilustrado no Esquema 11 e se inicia com a protonação do oxigênio da carbonila do grupo *Boc* e posterior rearranjo com a perda de 2-metilpropeno e dióxido de carbono ( $\text{CO}_2$ ) para a formação das acilguanidinas livres (**30a-h**). A Tabela 7 resume algumas características dos intermediários protegidos sintetizados.



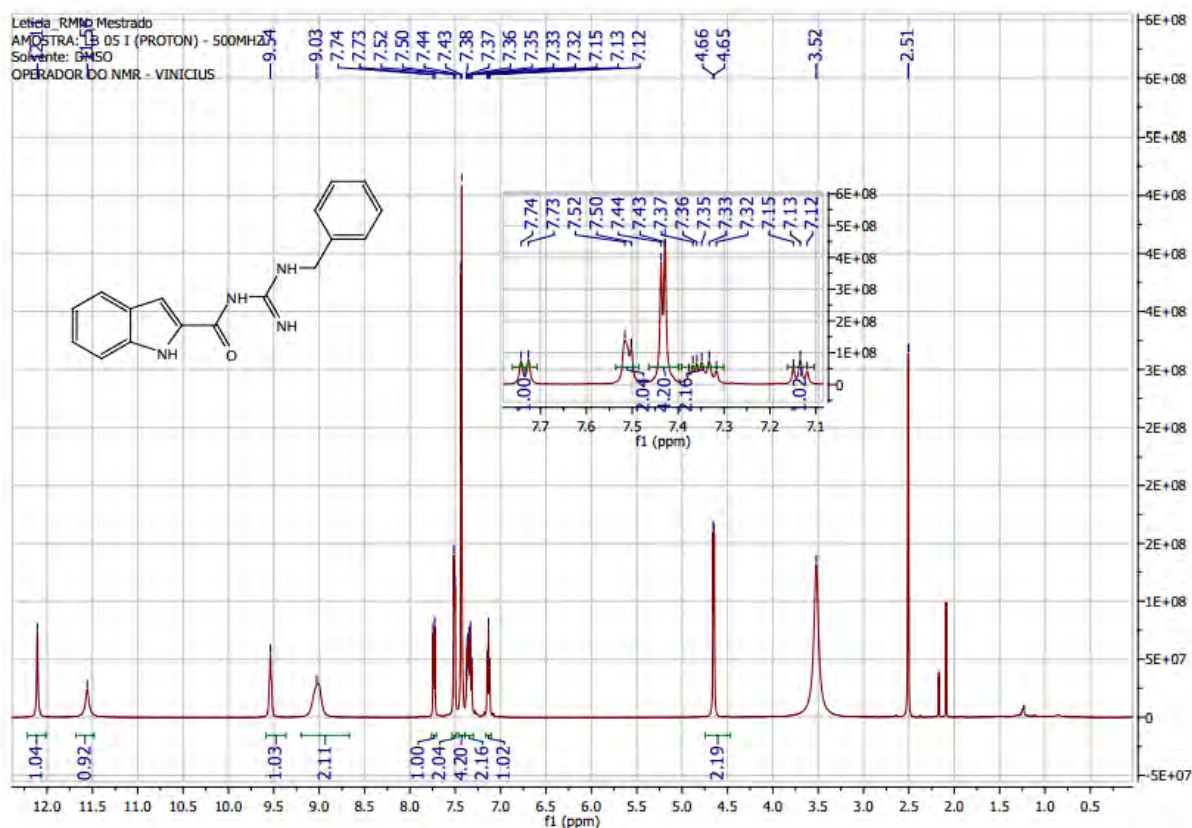
**Esquema 11:** Proposta de mecanismo para a desproteção em meio ácido das acilguanidinas.

**Tabela 7:** Acilguanidinas indólicas desprotegidas (livres) sintetizadas, rendimentos reacionais e características físicas.



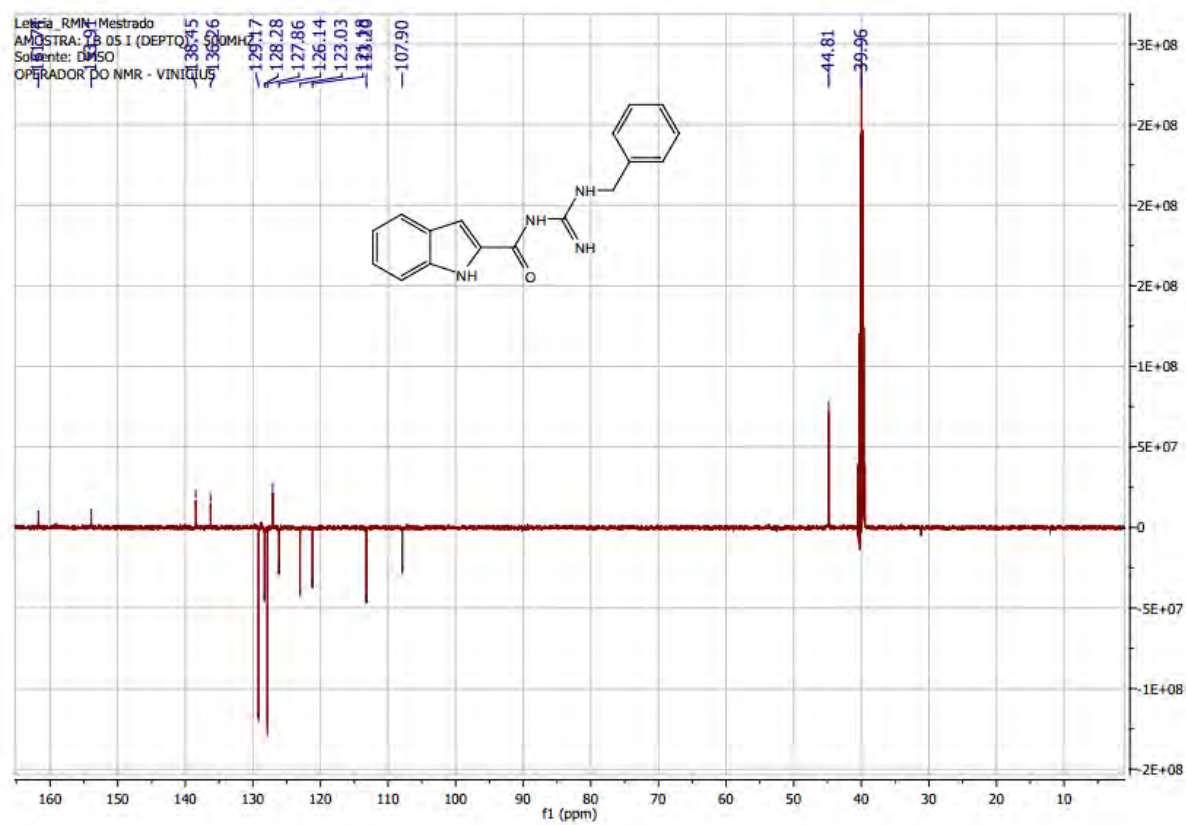
Derivado	W	Rendimento (%)	P.F. (°C)	Aspecto Físico
<b>30a</b>	Benzil	75,34	208-210	Sólido marrom acinzentado
<b>30b</b>	Picolil	70,33	-	Óleo castanho escuro
<b>30c</b>	<i>p</i> -fluor-benzil	72,48	-	Óleo castanho escuro
<b>30d</b>	<i>p</i> -cloro-benzil	46,56	212-214	Sólido marrom acinzentado
<b>30e</b>	<i>p</i> -metil-benzil	80,21	212-214	Sólido marrom acinzentado
<b>30f</b>	<i>p</i> -metóxi-benzil	49,88	216-218	Sólido marrom acinzentado
<b>30g</b>	fenetil	74,06	196-198	Sólido marrom acinzentado
<b>30h</b>	fenilpropil	85,27	158-160	Sólido marrom acinzentado

Todas as acilguanidinas (**30a-h**) foram caracterizadas através de seus respectivos espectros de RMN  $^1\text{H}$  e RMN  $^{13}\text{C}$  (DEPTQ) realizados em Dimetilsulfóxido deuterado (DMSO- $d_6$ ), cujos principais sinais estão mostrados nas Tabelas 8 e 9 respectivamente. Os espectros do derivado **30a** são utilizados como exemplos para esta série de derivados. Os principais sinais de hidrogênio (Figura 31) que caracterizam as acilguanidinas livres são aqueles ligados aos nitrogênios, em 12,1 (NHCO) e 11,5/9,5/9,03 ppm (outros NH's guanidínicos). Estes derivados também podem ser caracterizados pela presença dos sinais dos aromáticos entre 7 e 8 ppm. Adicionalmente, observamos o duplete (d) em 4,6 ppm correspondendo ao metileno espaçador. Nota-se também a ausência do sinal referente às metilas do grupo *Boc*, em 1,5 ppm, confirmando a desproteção. Os sinais em 2,5 ppm e 3,5 ppm é referente ao solvente utilizado para a realização da ressonância magnética nuclear.



**Figura 31:** Espectro de RMN  $^1\text{H}$  do composto (30a).

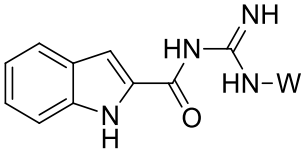
No espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  (DEPTQ) (Figura 32) podemos destacar os sinais da carbonila e do carbono imínico, ambos da função acilguanidina, em 161 e 153 ppm respectivamente. Observamos também o metileno espaçador em 44,8 ppm além de não ser possível observar os sinais que caracterizariam a presença do grupo Boc, em torno de 28 ppm (metilas) e em torno de 80 ppm (carbono quaternário da terc-butila), confirmando mais uma vez o sucesso da desproteção.



**Figura 32:** Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  do composto (30a).

Os sinais no espectro de RMN  $^1\text{H}$  e RMN  $^{13}\text{C}$  (DEPTQ) de toda a série das acilguanidinas desprotegidas estão resumidos na Tabela 8 e 9, respectivamente.

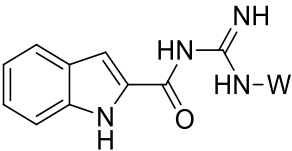
**Tabela 8:** Principais sinais de RMN <sup>1</sup>H (DMSO-d<sub>6</sub>, δ-ppm) para as acilguanidinas finais (**30a-h**).

				
Composto	W	NH's	CH (Aromáticos)	CH <sub>2</sub>
<b>30a</b>	Benzil	12,11/11,5/9,54/9,03	7,74-7,12	4,66
<b>30b</b>	Picolil	12,17/11,58/9,75/8,65	8,65-5,76	4,79
<b>30c</b>	<i>p</i> -fluor-benzil	12,10/11,43/9,46/9,18	7,75-7,12	4,63
<b>30d</b>	<i>p</i> -cloro-benzil	12,10/11,42/9,48/8,95	7,75-7,12	4,64
<b>30e</b>	<i>p</i> -metil-benzil*	12,10/11,57/9,51/9,01	7,74-7,13	4,60
<b>30f</b>	<i>p</i> -metóxi-benzil**	12,09/11,40/9,36/8,97	7,74-6,98	4,55
<b>30g</b>	fenetil	12,08/9,16	7,73-7,11	3,64/2,94
<b>30h</b>	Fenilpropil	12,09/11,49/9,21/8,90	7,74-7,12	3,39/2,69/1,92

\*: Sinal do grupo metila como um simpleto em 2,32 (integração para 3 hidrogênios)

\*\* : Sinal do grupo metoxila como um simpleto em 3,77 (integração 3 hidrogênios)

**Tabela 9:** Principais sinais de RMN <sup>13</sup>C (DEPTQ, DMSO-d<sub>6</sub>, δ-ppm) para as acilguanidinas finais (**30a-h**).

					
Comp.	W	C=O e C=N	CH Aromático	C <sub>quater</sub> Aromático	CH <sub>2</sub>
<b>30a</b>	Benzil	161,74/153,91	129,17-107,9	138,45/136,26/127,07	44,81
<b>30b</b>	Picolil	161,80/154,18	149,19-107,9	138,47/128,68/126,24	46,06
<b>30c</b>	<i>p</i> -fluor-benzil	163,12/161,58	130,14-107,91	159,01/153,77/138,47/128,7/127,04	46,06
<b>30d</b>	<i>p</i> -cloro-benzil	161,57/ 153,88	129,74-107,92	138,48/135,38/132,87/128,70/127,04	44,13
<b>30e</b>	<i>p</i> -metil-benzil *	161,73/153,84	129,69-107,88	138,44/137,57/133,19/127,07	44,60

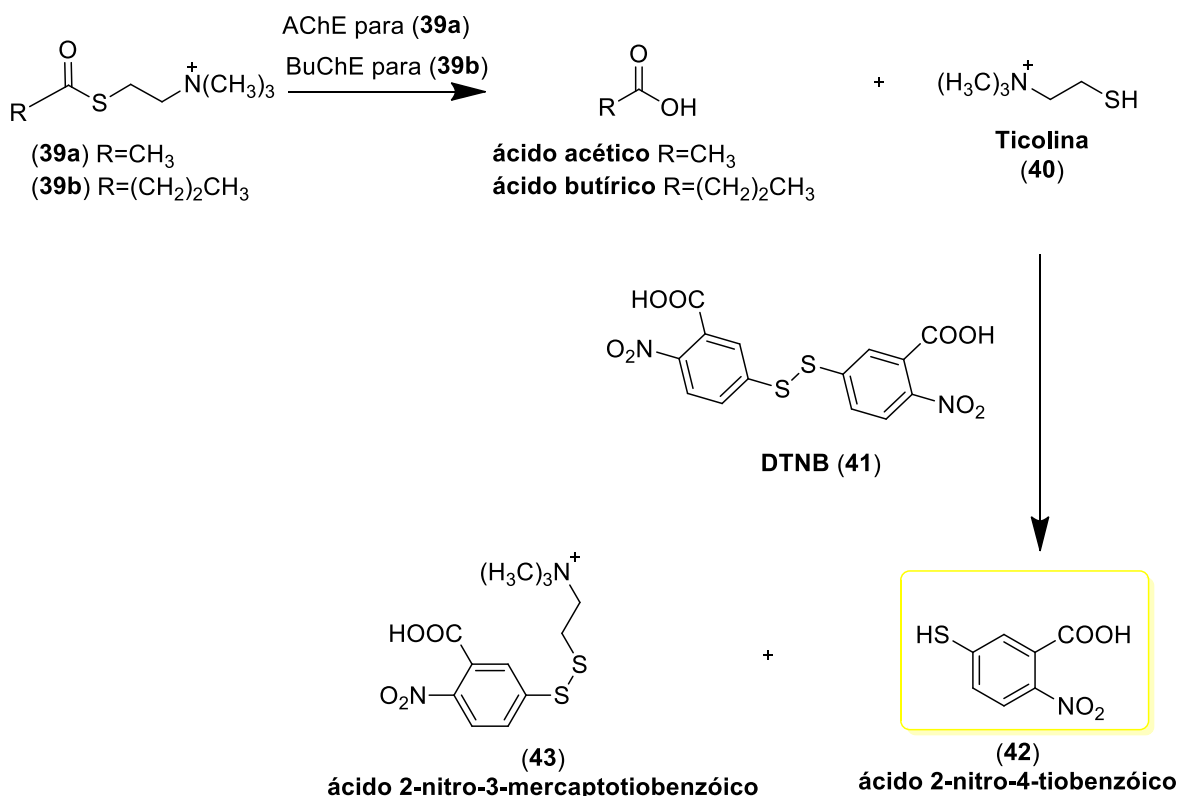
<b>30f</b>	<i>p</i> -metóxi-benzil**	159,02	129,11-107,37	138,00/127,56/126,61	43,97
<b>30g</b>	fenetil	161,36/153,38	128,89-107,52	138,06/137,95/128,20/126,62	42,48/33,69
<b>30h</b>	fenilpropil	161,66/153,73	128,87-107,84	141,49/138,44/127,07	41,39/32,48/29,88

\*: Sinal do grupo metila em 21,17 ppm

\*\* : Sinal do grupo metoxila em 55,2 ppm

#### 4.1 TRIAGEM FARMACOLÓGICA *IN VITRO* FRENTE AS ENZIMAS ACETILCOLINESTERASE (AChE) E BUTIRILCOLINESTERASE (BuChE)

A triagem farmacológica foi realizada pelas alunas de doutorado do grupo LadMol-QM (UFRRJ) Nathália Nadur e Larissa Ferreira. As acilguanidinas protegidas e livres sintetizadas foram submetidas à triagem farmacológica para avaliar a ação das mesmas sobre a atividade das enzimas AChE e BuChE através do método de Ellman. A metodologia consiste na clivagem enzimática da acetiltiocolina (**39a**) ou butiriltiocolina (**39b**) promovida pela AChE ou BChE, levando a formação de ácido acético ou butírico, respectivamente e tiocolina (**40**). A tiocolina é um marcador da atividade enzimática, que ao reagir com o Reagente de Ellman, o ácido 5,5-ditiobis(2-nitrobenzóico) (DTNB) (**41**), leva a formação do ácido 2-nitro-4-tiobenzóico (**42**) e do ácido 2-nitro-3-mercaptotiobenzóico (**43**). O produto ácido 2-nitro-4-tiobenzóico (**42**) apresenta coloração amarela, a qual pode ser quantificada por medida da absorbância em um leitor de microplaca para ensaio de imunoabsorção enzimática (ELISA), um espectrofotômetro equipado com filtro de luz a  $\lambda = 415$  nm. Desta forma, a atividade da enzima é medida de maneira indireta por meio da reação do produto de clivagem enzimática com um reagente pró-cromofórico (Esquema 12).

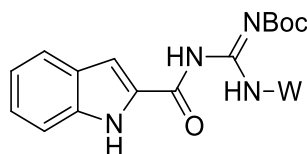


**Esquema 12:** Reações do ensaio de Ellman.

A Tabela 10 mostra os resultados obtidos para os derivados protegidos frente as enzimas AChE e BuChE. Os resultados mostram que os derivados protegidos (**38a-h**), de forma geral não foram capazes de inibir a atividade das enzimas AChE e BuChE na concentração de triagem utilizada (30 $\mu$ M). A única exceção foi o derivado picolila (**38b**), o qual foi capaz de inibir a atividade da BuChE em 54,8% na concentração de triagem utilizada no ensaio (30 $\mu$ M). Através desses resultados, observamos de forma geral que, a presença do grupo *Boc* parece ser ruim para a inibição dessas enzimas, o que já havia sido observado na série de acilguanidinas bromopirróllicas descritas por Goulart (2021).



**Tabela 10:** Atividade anticolinesterásica dos derivados guanidínicos protegidos (**38a-h**) na concentração de 30  $\mu\text{M}$ .

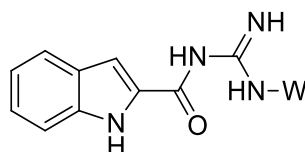


Derivado	W	% de inibição sobre a AChE <sup>a</sup>	CI <sub>50</sub> ( $\mu\text{M}$ ) <sup>b</sup>	% de inibição sobre a BuChE <sup>c</sup>	CI <sub>50</sub> ( $\mu\text{M}$ ) <sup>b</sup>
<b>38a</b>	benzil	0	-	0	-
<b>38b</b>	picolil	15,3	-	54,8	-
<b>38c</b>	<i>p</i> -fluor-benzil	10,9	-	11,4	-
<b>38d</b>	<i>p</i> -cloro-benzil	7,4	-	2,2	-
<b>38e</b>	<i>p</i> -metil-benzil	10,6	-	5,3	-
<b>38f</b>	<i>p</i> -metóxi-benzil	19,4	-	7,5	-
<b>38g</b>	fenetil	0	-	8,9	-
<b>38h</b>	fenilpropil	8,8	-	0,7	-

<sup>a</sup>AChE de enguia elétrica; <sup>b</sup> Concentração necessária para inibir 50% da atividade colinesterásica, dados obtidos  $\pm$  desvio padrão (DP) de triplicatas de ensaios independentes; <sup>c</sup>BuChE de soro equino.

Os resultados da triagem *in vitro* para os derivados acilguanidínicos livres (**30a-h**) (Tabela 11) mostraram que a maioria dos compostos são inibidores fracos das enzimas AChE e BuChE, com exceção dos derivados (**30c**) e (**30d**). Estes derivados, os quais possuem os substituintes *p*-cloro-benzil e *p*-fluorobenzil, se destacam na série proposta como inibidores seletivos de BuChE, com inibição de 63,9% e 74,1%, respectivamente, e potências de CI<sub>50</sub> de 5,9  $\mu\text{M}$  e 5,5  $\mu\text{M}$ , respectivamente. Estes derivados possuem substituintes halogênicos, com alta eletronegatividade, na posição *para* do anel benzeno e apenas um metileno como unidade espaçadora. Adicionalmente, podemos destacar que de forma geral a remoção do grupo *Boc*, ou seja, a presença da subunidade acilguanidina livre é importante para a atividade de inibição da butirilcolinesterase (BuChE), o que também corrobora os resultados descritos por Goulart.

**Tabela 11:** Atividade anticolinesterásica dos derivados guanidínicos livres (**30a-h**) na concentração de 30  $\mu\text{M}$ .

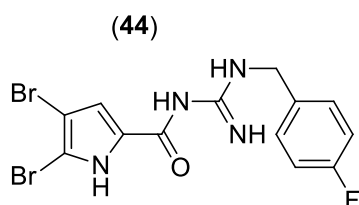


Derivado	W	% de inibição sobre a AChE <sup>a</sup>	CI <sub>50</sub> ( $\mu\text{M}$ ) <sup>b</sup>	% de inibição sobre a BuChE <sup>c</sup>	CI <sub>50</sub> ( $\mu\text{M}$ ) <sup>b</sup>
<b>30a</b>	benzil	6,2	-	45	-
<b>30b</b>	picolil	26,3	-	22,3	-
<b>30c</b>	<i>p</i> -fluor-benzil	15,8	-	63,9	5,9
<b>30d</b>	<i>p</i> -cloro-benzil	9,5	-	74,1	5,6
<b>30e</b>	<i>p</i> -metil-benzil	12,8	-	6,7	-
<b>30f</b>	<i>p</i> -metóxi-benzil	23,2	-	33,6	-
<b>30g</b>	fenetil	8,0	-	42,1	-
<b>30h</b>	fenilpropil	22,7	-	44,6	19,8

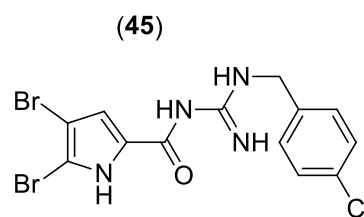
<sup>a</sup>AChE de enguia elétrica; <sup>b</sup> Concentração necessária para inibir 50% da atividade colinesterásica, dados obtidos  $\pm$  desvio padrão (DP) de triplicatas de ensaios independentes;

<sup>c</sup>BuChE de soro equino.

Comparando a série de acilguanidinas indólicas deste projeto com a série de acilguanidinas bromopirrólicas previamente descritas, a presença do anel heterociclo bromado parece ser muito importante para a atividade anti-BuChE destes derivados. Ao comparar com os resultados recentes do grupo LADMOL-QM de Goulart (2021), a presença de bromo em análogos pirrólicos (**44**) e (**45**) com os mesmos substituintes *p*-fluor-benzil e *p*-cloro-benzil promove uma % de inibição sobre a BuChE elevada (Figura 33). Infelizmente os CI<sub>50</sub> para estes derivados bromopirrólicos ainda não foram feitos, o que é muito importante para uma melhor comparação com a série indólica análoga.



% de inibição sobre a BuChE= 92,5



% de inibição sobre a BuChE= 91,5

**Figura 33:** % de inibição de compostos sintetizados pelo grupo LADMOL-QM (GOULART, 2021).

#### 4.2 ANÁLISE DAS PROPRIEDADES ADME E DRUGLIKE

Parâmetros físico-químicos como: Área de superfície polar topológica, log P, solubilidade, absorção intestinal humana (HIA) e permeação da barreira hematoencefálica (BBB) através de um gráfico chamado BOILED-EGG foram analisados no *software* SWISSADME para as acilguanidinas protegidas (**38a-h**) e livres (**30a-h**). Um resumo das propriedades dos compostos e enquadramento nas regras e filtros farmacocinéticos de Lipinski e Veber estão na Tabela 12.

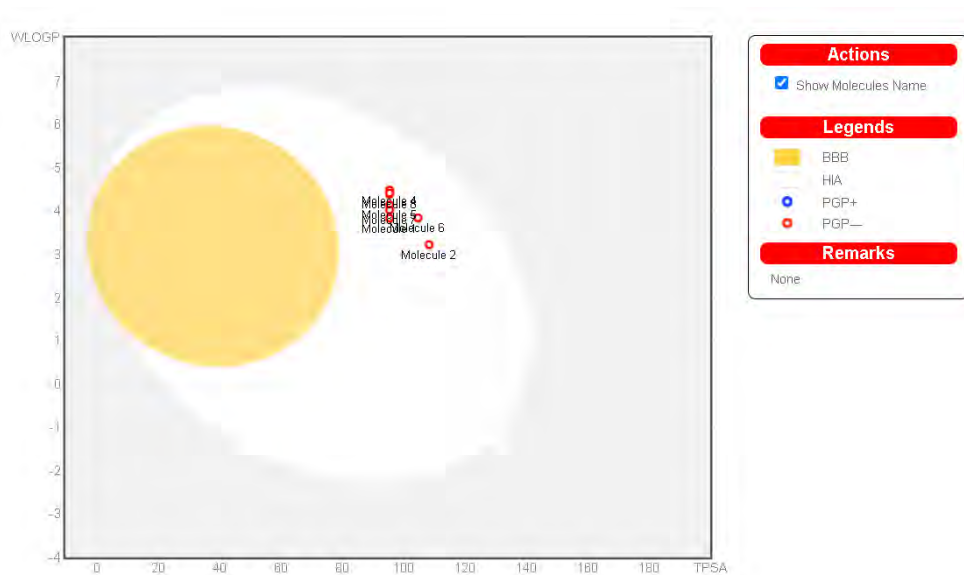
**Tabela 12:** Propriedades farmacocinéticas das acilguanidinas protegidas e produtos finais desprotegidos.

Composto	W	TPSA (Å <sup>2</sup> )	logP	Veber	Lipinski
<b>38a</b>	benzil	95,58	3,71	Sim	Sim
<b>38b</b>	picolil	108,47	2,96	Sim	Sim
<b>38c</b>	<i>p</i> -fluor-benzil	95,58	3,9	Sim	Sim
<b>38d</b>	<i>p</i> -cloro-benzil	95,58	4,15	Sim	Sim
<b>38e</b>	<i>p</i> -metil-benzil	95,58	3,93	Sim	Sim
<b>38f</b>	<i>p</i> -metóxi-benzil	104,81	3,59	Sim	Sim
<b>38g</b>	fenetil	95,58	4,01	Sim	Sim
<b>38h</b>	fenilpropil	95,58	4,29	Não	Sim
<b>30a</b>	benzil	80,77	2,57	Sim	Sim
<b>30b</b>	picolil	93,66	1,8	Sim	Sim
<b>30c</b>	<i>p</i> -fluor-benzil	80,77	2,79	Sim	Sim
<b>30d</b>	<i>p</i> -cloro-benzil	80,77	2,99	Sim	Sim
<b>30e</b>	<i>p</i> -metil-benzil	80,77	2,92	Sim	Sim
<b>30f</b>	<i>p</i> -metóxi-benzil	90	2,56	Sim	Sim
<b>30g</b>	fenetil	80,77	2,81	Sim	Sim
<b>30h</b>	fenilpropil	80,77	3,16	Sim	Sim

As acilguanidinas protegidas apresentaram um valor calculado de Área de Superfície Polar em torno de 95 Å<sup>2</sup>, a exceção foi o derivado com o substituinte picolila com valor de TPSA calculado igual a 108,4 Å<sup>2</sup>. Os compostos protegidos obtiveram logP entre 2,96 e 4,29.

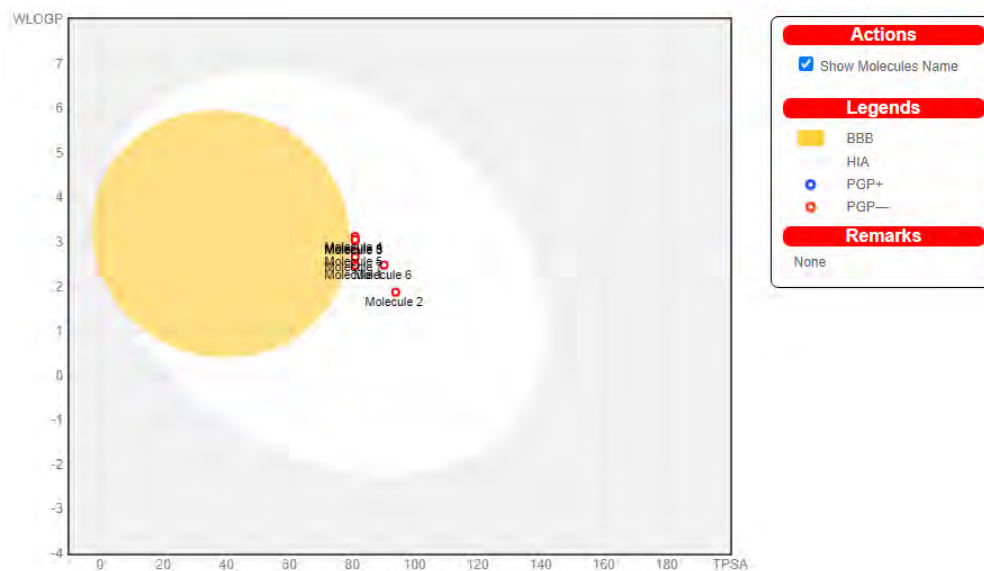
Estes valores, além dos parâmetros teóricos como tamanho, polaridade, flexibilidade e insaturações colocam estas moléculas dentro do radar de biodisponibilidade, indicando que as mesmas têm grande probabilidade de apresentarem biodisponibilidade oral. Já as acilguanidinas desprotegidas correspondentes apresentaram valores de TPSA calculado em torno de 80 Å, com exceção dos derivados com os substituintes picolila (93,66 Å) e metoxila (90,00 Å). Os valores de log P para as acilguanidinas desprotegidas ficaram em torno de 1,8-3,16 para a maioria dos derivados, o derivado menos lipofílico, mais polar, foi o derivado picolílico com logP de 1,8 e os mais lipofílicos foram aqueles com os substituintes fenilpropílico com logPs de 3,16. Com exceção do número de insaturações, todos os valores calculados colocam as acilguanidinas desprotegidas dentro do radar de biodisponibilidade, indicando alta probabilidade de absorção gastrointestinal.

Os gráficos BOILED-EGG gerados pelo *software* SWISSADME exemplifica estes dados. Todos os compostos avaliados, tanto protegidos (Figura 34) quanto as acilguanidinas livres (Figura 35), aparecem dentro de uma área branca do modelo BOILED-EGG; todos os compostos que ficam nesta área do gráfico BOILED-EGG, de acordo com o *software*, possuem uma alta probabilidade de absorção gastrointestinal, porém fora de uma área amarela, esta região é uma área destinada a compostos com alta probabilidade de atravessar a barreira hemato-encefálica, o que seria desejável para os candidatos atuarem no sistema nervoso central.



**Figura 34:** Modelo BOILED-EGG para as acilguanidinas protegidas (38a-h).

As acilguanidinas livres (Figura 35) aparecem bem mais perto da área amarela que as acilguanidinas protegidas, indicando que futuras modificações podem ser feitas para otimizar esta questão farmacocinética.



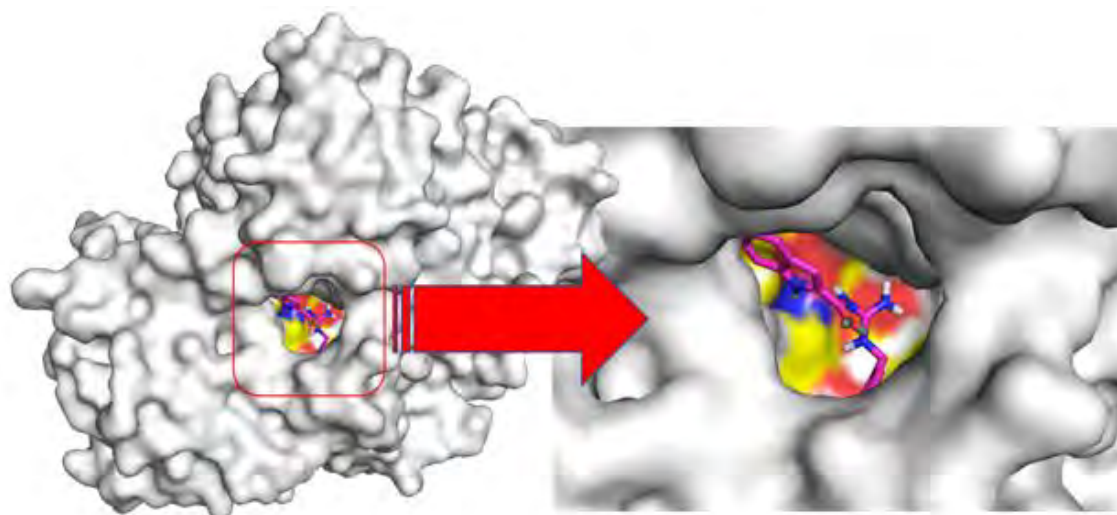
**Figura 35:** Modelo BOILED-EGG para as acilguanidinas desprotegidas (30a-h).

#### 4.3 ANÁLISE DO ANCORAMENTO MOLECULAR (*DOCKING*)

O *docking* da série de compostos foi realizado pelo aluno de doutorado do grupo LaDMol-QM (UFRRJ) Lucas Caruso. Para a realização do estudo de ancoramento molecular entre os compostos e a enzima BuChE foi utilizado um modelo de enzima análogo a butirilcolinesterase de enguia elétrica (EeBuChE), que possui a vantagem de uma alta similaridade com a enzima humana a um baixo custo, previamente empregado em outros trabalhos do grupo LADMOL-QM (SANTOS *et. al.*, 2019), para publicações de artigos e teses de doutorado; sendo assim um modelo válido que produz respostas consistentes quando comparados com as análises *in vitro* do grupo.

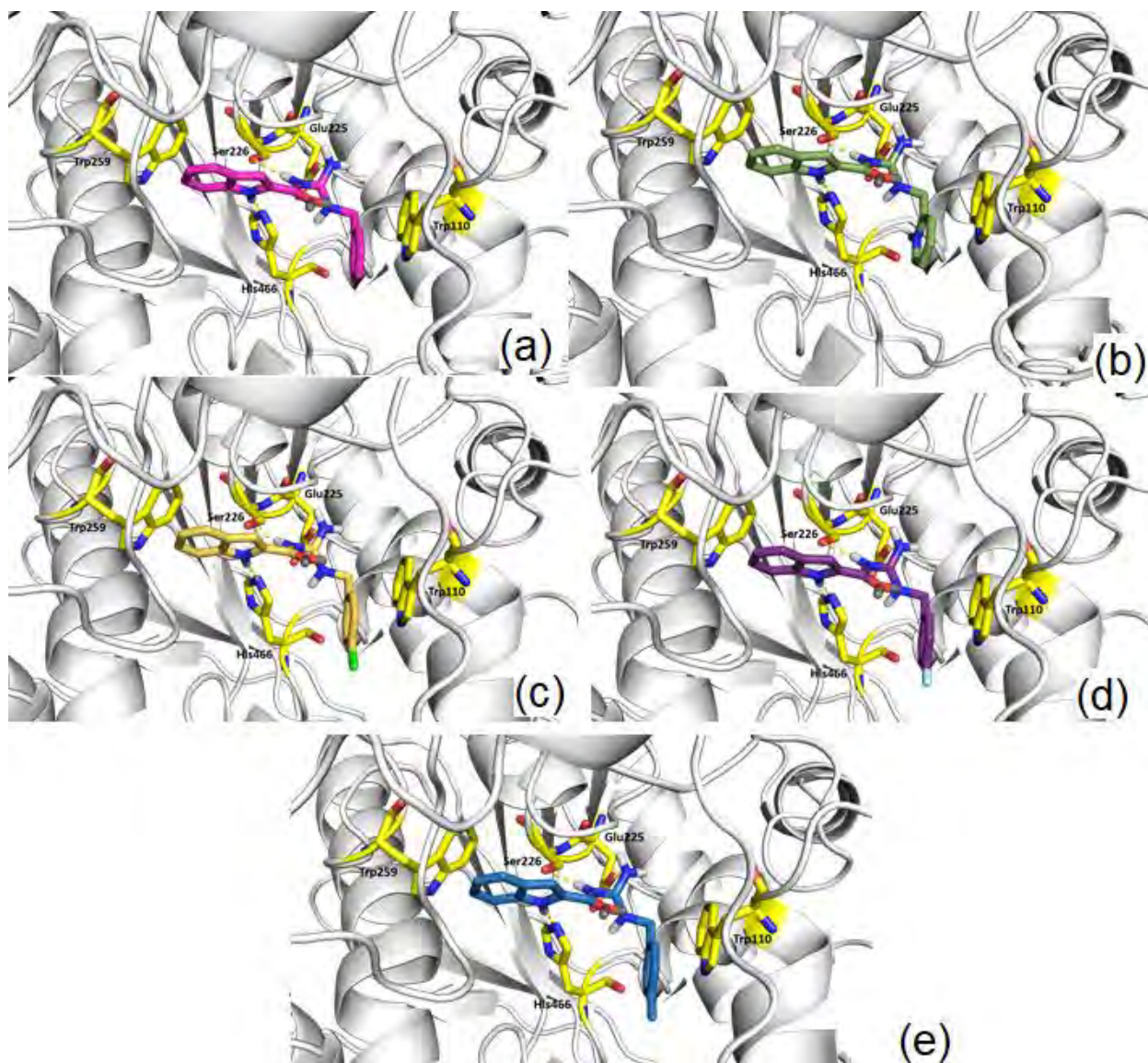
Na análise de ancoramento molecular do programa GOLD, cada corrida do programa produz um encaixe da molécula e um valor de “Score”, um número adimensional que representa a afinidade da interação molécula-enzima, portanto, por analogia, quanto maior o Score de uma pose da molécula, melhor sua interação, o GoldScore auxilia a avaliação da melhor posição de ancoramento. A Figura 36 mostra a perspectiva de ancoramento de uma molécula da série, na cavidade da enzima EeBuChE, todas as outras moléculas também se alocaram nesta região.

Para a análise de *docking* apenas os compostos finais de acilguanidinas livres (**30a-h**) foram estudados.



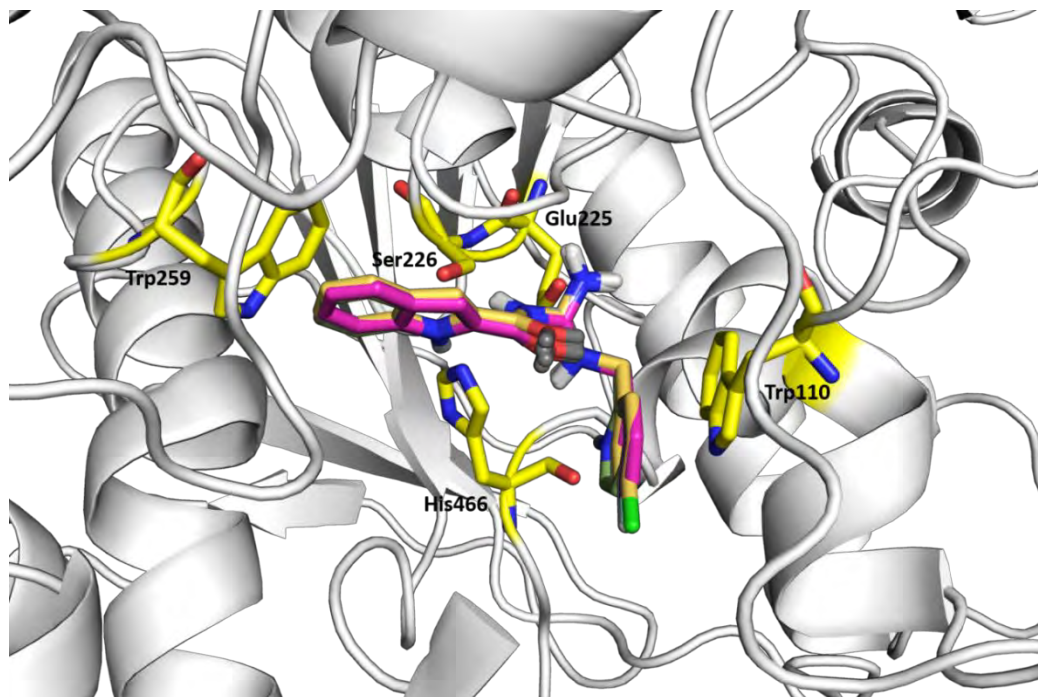
**Figura 36:** Ancoramento do composto (**30a**) na cavidade da enzima EEBuChE.

Foi verificado que, de forma geral, as moléculas dessa série interagem dentro da cavidade do sítio ativo através de algumas interações principais com os resíduos de aminoácidos Glutamato225, Serina226, Histidina466 e Triptofano110. Os compostos (**30a**), (**30b**), (**30c**), (**30d**) e (**30e**) apresentaram comportamentos semelhantes (Figura 37) e interação do tipo: ligação de hidrogênio entre o NH indólico e o resíduo do aminoácido His466, interação entre o NH guanidínico e o resíduo do aminoácido Ser266, interação do carboxilato do resíduo de Glu225 com a guanidina protonada e a interação  $\pi$ - $\pi$  entre o anel aromático da acilguanidina e o resíduo do aminoácido Try110. O resíduo de Triptofano259 destacado não está emparelhado em uma posição favorável e não foi concluída nenhuma interação com os compostos. Cabe destacar que os compostos (**30c**) e (**30d**) possuem um maior número de interações intermoleculares (em relação à série proposta) com a enzima butirilcolinesterase visto no ensaio de *docking* como também uma alta porcentagem de inibição de acordo com o ensaio *in vitro*, ou seja, os mesmos compostos se destacaram nos dois ensaios realizados independentes.



**Figura 37:** *Docking* dos compostos (30a), (30b) (30c), (30d) e (30e)

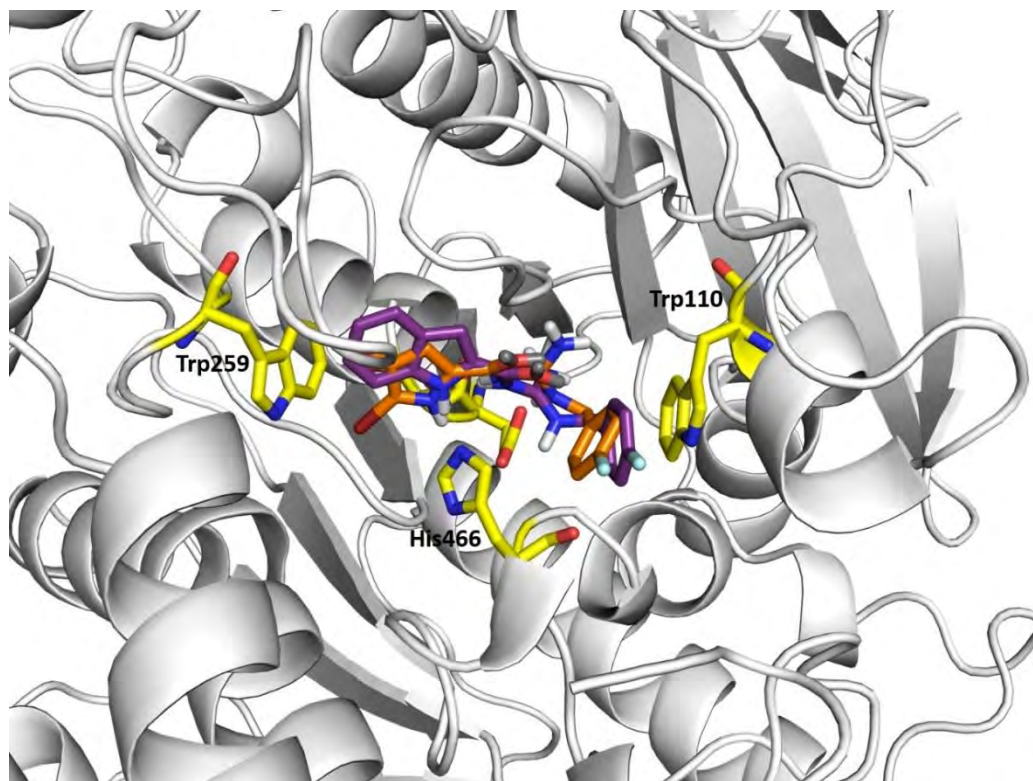
Esta tendência pode ser melhor visualizada na Figura 38 com a sobreposição dos 5 compostos (30a), (30b) (30c), (30d) e (30e).



**Figura 38:** Sobreposição de *docking* dos compostos (30a), (30b) (30c), (30d) e (30e).

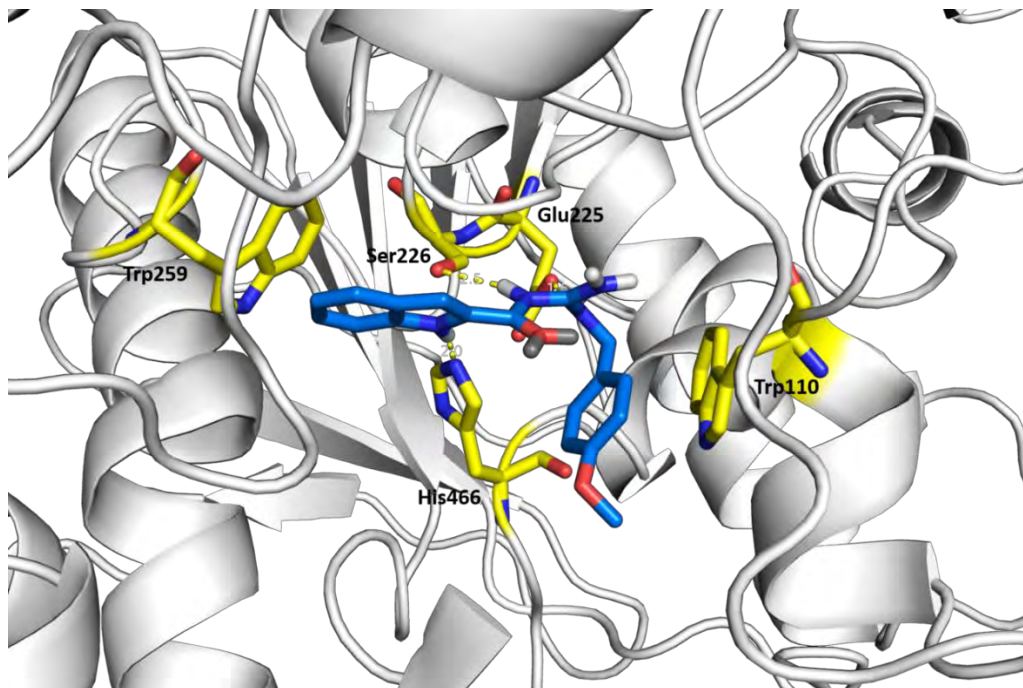
Ao realizar uma análise de *docking* comparando compostos sintetizados anteriormente (Figura 39) pelo grupo de pesquisa LADMOL-QM (GOULART, 2021); estruturalmente semelhantes ao deste projeto e com testes de inibição enzimática favoráveis para a BuChE, podemos perceber que o estudo de modelagem molecular foi satisfatório e de concordância com uma tendência prevista, onde moléculas semelhantes produzem o mesmo encaixe na enzima BuChE e com interações análogas. Destaque para a interação do tipo  $\pi$ - $\pi$  do derivado benzilamínico (30a) e do resíduo de Trp110, com um emparelhamento mais favorável que o derivado de GOULART (2021).





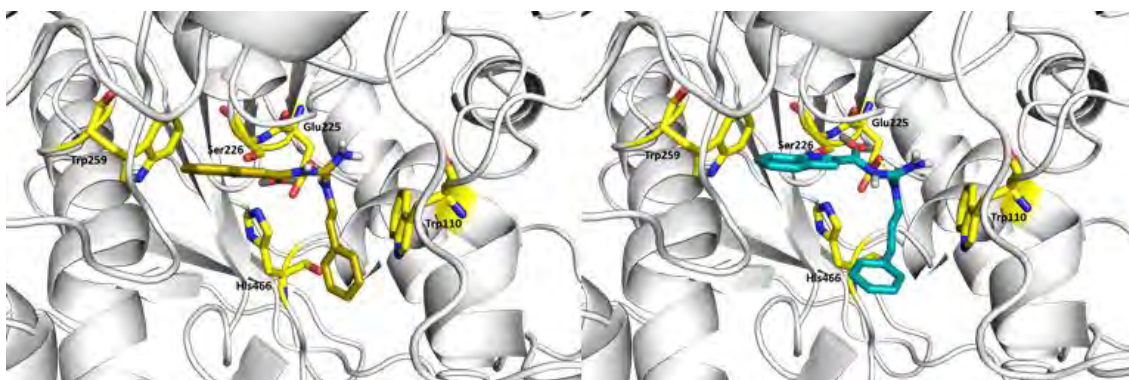
**Figura 39:** Sobreposição de docking do composto de GOULART (2021) em laranja e do derivado (30a) em roxo.

Para o composto (30f), na melhor pose de *docking* ocorre a perda da interação com o carboxilato e o nitrogênio protonado, sendo substituída por mais uma interação entre o NH da guanidina e o resíduo de Glu225 (Figura 40). Também há a perda da interação entre o anel aromático da acilguanidina e o resíduo do aminoácido Try-110.



**Figura 40:** *Docking* do composto (30f).

Os compostos (30g) e (30h) com dois e três metilenos espaçadores respectivamente não possuem interação com a Histidina, restando apenas para o composto (30g) uma interação com o H do grupo indol e o resíduo de Serina226 e uma interação do tipo ligação de hidrogênio da guanidina com o resíduo Glu225. Para o (30h) foi encontrada apenas uma interação do tipo ligação de hidrogênio com o NH e o resíduo de Glutamato225 (Figura 41).



**Figura 41:** *Docking* dos compostos (30g) e (30h) respectivamente.

A tendência de comportamento (interação  $\pi$ - $\pi$  entre o anel aromático da acilguanidina e o resíduo do aminoácido triptofano) mostra substituintes com grupos retiradores de elétrons (flúor e cloro) no grupo de maior interação com a enzima, enquanto nos derivados que possuem uma cadeia maior (com dois e três metilenos – e uma possibilidade maior de conformações considerando suas ligações de rotação livre) e um grupo doador (metoxila), há duas ou uma interação apenas; abrindo margem para se explorar como perspectiva futura deste trabalho outros substituintes retiradores e doadores de elétrons e outros tamanhos de cadeia para nível de aferição e validação do estudo.

## 5. CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS

Este trabalho gerou 16 novas 1H-indol-2-acilguanidinas (entre protegidas e desprotegidas) com estrutura química original planejadas de forma racional através de estratégias clássicas da Química Medicinal. As metodologias sintéticas e de purificação aplicadas se mostraram satisfatórias, gerando rendimentos de moderados a bons, e todos os compostos foram devidamente caracterizados por RMN  $^1\text{H}$  e RMN  $^{13}\text{C}$ .

Os derivados 1H-indol-2-acilguanidinas (**30c**) e (**30d**) se destacaram como inibidores seletivos de BuChE, inibindo a atividade desta enzima em mais de 60% na concentração de 30  $\mu\text{M}$  e  $\text{CI}_{50}$  de 5,997 e 5,498  $\mu\text{M}$ , respectivamente. A relação estrutura-atividade corroborou resultados prévios do nosso grupo de pesquisa, demonstrando a importância da função acilguanidina livre para a inibição seletiva de BuChE, bem como a presença de substituintes eletronegativos na posição *para* do anel benzeno, sugerindo que halogênios como substituintes contribuem para melhor atividade inibitória. Os resultados também sugerem que a presença do núcleo heterociclo bromado é importante para uma melhor inibição da BuChE, o que ainda precisa ser melhor avaliado experimentalmente.

Os resultados *in vitro* foram corroborados pelos estudos de *docking* com a BuChE, que exibiram os compostos ancorados com as subunidades indólicas, guanidínicas e acilguanidínicas voltadas para o interior da cavidade enzimática, isto é, no CAS, tendo como interações principais: ligação de hidrogênio entre o anel indólico e o resíduo de Histidina 466, a interação de hidrogênio entre os NH's guanidínicos e a Serina 226, interação entre o nitrogênio protonado da guanidina e o resíduo de Glutamato 225 e interação do tipo  $\pi$ - $\pi$  entre o anel aromático das diferentes aminas propostas para a série de derivados e o resíduo de Triptofano 110.

A previsão de propriedades farmacocinéticas e *druglike* indicou que as moléculas propostas têm características adequadas como candidatos a protótipos de fármacos, com grande probabilidade de boa absorção gastrointestinal e perfil *druglike* adequado de acordo com as regras de Lipinski e Veber. Esses estudos também indicaram que as acilguanidinas livres têm maior potencial para atravessar a barreira hematoencefálica que os análogos protegidos correspondentes.

De forma geral podemos concluir que o planejamento estrutural dos novos compostos foi bem sucedido pois dois derivados foram identificados como inibidores seletivos de BuChE. Como perspectivas, algumas investigações ainda precisam ser feitas para otimização e melhor

compreensão de REA, como por exemplo a síntese de derivados indólicos bromados e/ou derivados indólicos com a subunidade acilguanidina na posição 3 do heterociclo. Adicionalmente, temos a perspectiva de realização de ensaios de atividade antioxidante e complexação com metais bem como a investigação de outros alvos farmacológicos.

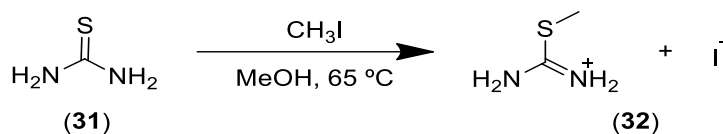
## 6. MATERIAIS E MÉTODOS

Para a padronização dos experimentos faz-se necessário destacar os seguintes equipamentos, métodos de análise e metodologia de purificação:

- Fase orgânica das reações seca sob sulfato de sódio anidro, filtrada e o solvente evaporado à pressão reduzida em evaporador rotatório, modelo RV 10 digital e banho IKA, modelo HB 10 digital;
- Acompanhamento das reações feito através da técnica de cromatografia em camada fina analítica (CCFA), na qual foram utilizadas placas de alumínio Kieselgel 60 (HF- 254, Merck) com 0,2 mm de espessura. A visualização das substâncias em CCFA foi realizada em lâmpada ultravioleta ( $\lambda = 254$  e  $365$  nm);
- A purificação dos compostos foi realizada a partir da técnica de cromatografia líquida em coluna aberta. Para a confecção da pastilha, utilizou-se sílica gel 70-230 mesh (Merck). Como fase móvel, utiliza-se misturas solventes de acordo com as propriedades físico-químicas de cada composto;
- Espectros de RMN  $^1\text{H}$  obtidos em aparelhos Bruker Avance-500 e Bruker Avance-400 (ICE-UFRRJ), operando a 500MHz, respectivamente. Amostras dissolvidas em  $\text{CDCl}_3$  e  $\text{DMSO-d}_6$ , contendo tetrametilsilano (TMS) como referência interna e colocadas em tubos de 5 mm de diâmetro;
- Espectros de RMN  $^{13}\text{C}$  obtidos operando a 400 MHz e à 500 MHz, em aparelho Bruker Avance-400 e Bruker Avance-500 (ICE-UFRRJ), respectivamente, e as amostras foram dissolvidas em  $\text{CDCl}_3$  e  $\text{DMSO-d}_6$ , contendo TMS como referência interna. As áreas dos picos foram obtidas por integração eletrônica e sua multiplicidade descrita com: s-simpleto / sl-simpleto largo / d-dubleto / t-tripleto / q-quarteto / m-multipleto / dd-duplo dubleto;

Para a síntese dos derivados foi necessário a obtenção de dois blocos de construção: primeiramente foi sintetizado o bloco da isometiltioureia protegida, para então sintetizar o cloreto de ácido indólico, formando assim o intermediário chave e na sequência foi feita a síntese dos derivados guanidínicos substituídos, seguidos pela reação de desproteção em meio ácido.

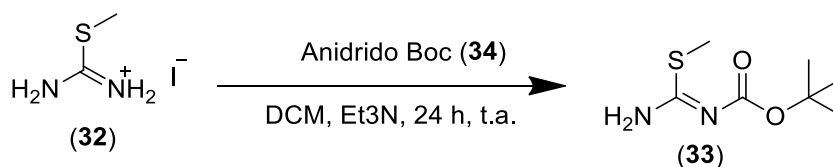
## 6.1 PROCEDIMENTOS SINTÉTICOS



**Esquema 13:** Síntese do sal 2-metil-isotiourônio.

Em um balão de 100 ml foram adicionados tiourea (5 g; 0,065 mol), iodeto de metila (4,1 ml; 0,065 mol) e metanol (100ml). A mistura foi aquecida a 65 °C por 90 minutos. O metanol foi removido sob vácuo no evaporador rotatório, restando no balão um sólido amarelo. O produto resultante foi transferido para um funil de Buchner e lavado com Et<sub>2</sub>O gelado (5x50 ml), sob vácuo. (Rendimento: 92,30%)

## REAÇÃO DE PROTEÇÃO DA ISOMETILTIOUREIA



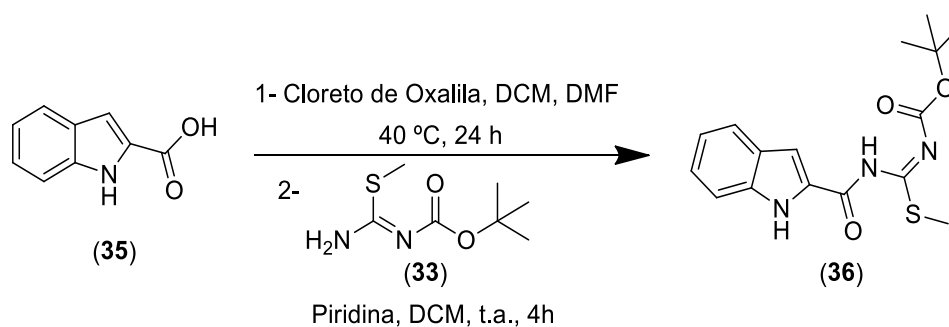
**Esquema 14:** Síntese do agente guanilante, a N-Boc-S-metilisotiureia.

A um balão contendo o sal de isometiltiourea (4g; 18,32 mmols), diclorometano (DCM) (20 ml) e Et<sub>3</sub>N (2,556 ml; 18,32 mmols), em banho de gelo, foi adicionado lentamente (gota-a-gota), ao longo de uma hora aproximadamente, uma solução de anidrido *Boc* (BOC<sub>2</sub>O) (2 g; 9,16 mmols) em 10 ml de diclorometano. O banho de gelo foi removido e a reação ficou sob agitação até o outro dia em temperatura ambiente. O isolamento foi feito com extração líquido-líquido utilizando água destilada, gerando um óleo transparente que com o tempo se solidifica na forma de um sólido branco com odor forte e característico. (Rendimento: 85%)

RMN  $^1\text{H}$  (500 MHz)  $\text{CDCl}_3$  / TMS ( $\delta$ -ppm):  $\delta$  7.28 (s, 1H), 2.45 (s, 3H), 1.51 (s, 9H).

RMN  $^{13}\text{C}$  (500 MHz)  $\text{CDCl}_3$  / TMS ( $\delta$ -ppm):  $\delta$  171,7 ( $\text{C}=\text{O}$ );  $\delta$  160,9 ( $\text{C}=\text{N}$ );  $\delta$  78,1 ( $\text{C}(\text{CH}_3)_3$ );  $\delta$  28,2 ( $\text{C}(\text{CH}_3)_3$ );  $\delta$  3,1 ( $\text{SCH}_3$ ).

### SÍNTESE DO INTERMEDIÁRIO-CHAVE TERC-BUTIL-((1H-INDOL-2-CARBOXAMIDO)(METILTIO)METILENO)CARBAMATO



Esquema 15: Síntese do cloreto de ácido indólico.

A uma suspensão de ácido carboxílico indólico (800 mg; 4,9 mmol) em DCM (10 ml), adiciona-se cloreto de oxalila gota-a-gota (1,28 ml; 14,9 mmol) e *N,N*-dimetilformamida (DMF) (0,05 ml). Após 24 horas a 40 °C a mistura foi concentrada no rotavapor e imediatamente levada a seguinte reação de formação do intermediário chave. Característica: sólido amarelo/amarronzado.

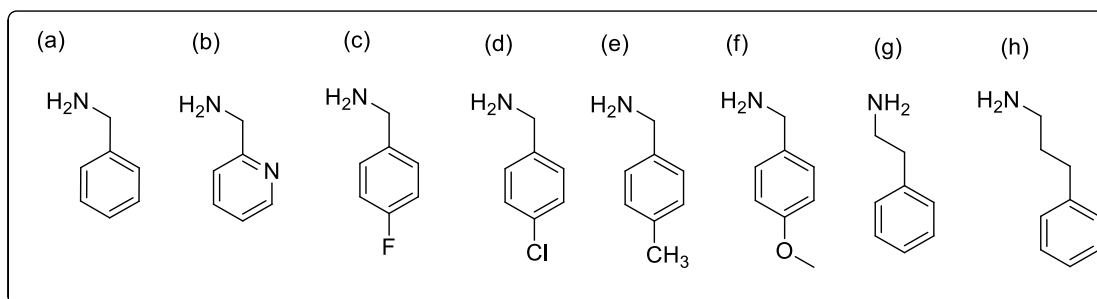
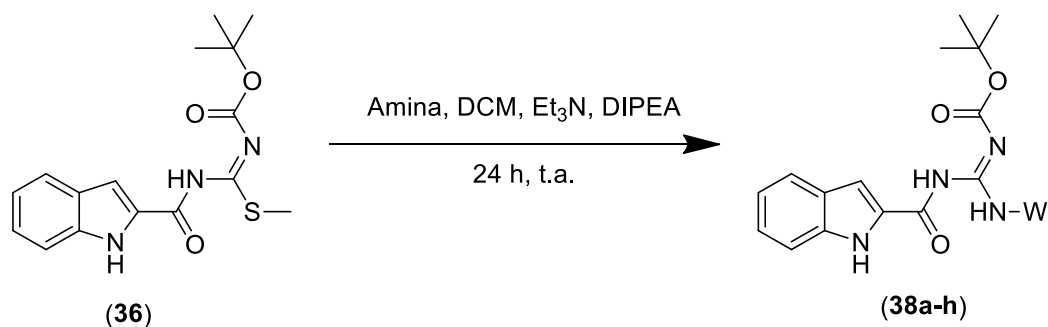
A isometiltioureia monoprotetida (950 mg; 5 mmol) foi solubilizada em 15 ml de diclorometano e 1,5 ml de piridina. O cloreto de ácido foi solubilizado em diclorometano (10 ml) e foi adicionado gota-a-gota à solução da amina. A mistura continuou sob agitação a temperatura ambiente por aproximadamente 4 horas. A mistura reacional foi diluída e realiza-se uma extração com água destilada e posteriormente uma cromatografia em coluna aberta para a purificação do produto. (Rendimento: 53,71%).

RMN  $^1\text{H}$  (500 MHz)  $\text{CDCl}_3$  / TMS ( $\delta$ -ppm): 12,5 (s, 1H,  $\text{NHCO}$ ); 9,18 (s, 1H,  $\text{NH}$  indol); 7,71-7,13 (5 H, aromáticos); 2,61 (s, 3 H,  $\text{SCH}_3$  metilas); 1,53 (s, 9H,  $\text{CH}_3$  Boc).



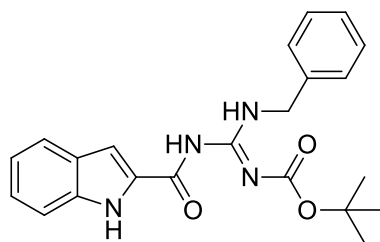
**DEPTQ (500 MHz) CDCl<sub>3</sub> / TMS (δ-ppm):** 171,89 (C=O); 170,21 (C=O); 150,84 (C=N); 137,46/134,64,127,94; 125,66/122,86/120,76/111,97/110,15 (CH aromáticos); (3 C<sub>quaternário</sub> aromáticos); 83,60 (C<sub>quaternário</sub> Boc); 27,92 (CH<sub>3</sub> Boc), 14,94 (SCH<sub>3</sub>).

### CONDENSAÇÃO DAS AMINAS DE INTERESSE



**Esquema 16:** Procedimento geral para a obtenção das acilguanidinas protegidas.

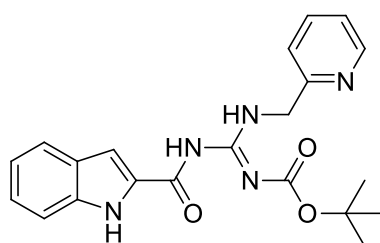
Em um balão contendo o intermediário-chave em diclorometano (79,1 mg; 0,2375 mmol), foi adicionado 0,1 ml de Et<sub>3</sub>N e 0,1 ml de *N,N*-diisopropiletilamina (DIPEA), em seguida adicionou-se 1.1 equivalentes da amina de interesse. A mistura reacional ficou sob temperatura ambiente por 24 horas. O isolamento é feito realizando uma extração líquido-líquido utilizando água destilada.



(38a)

**RMN  $^1\text{H}$  (500 MHz)  $\text{CDCl}_3$  / TMS ( $\delta$ -ppm):** 12,33 (s, 1H,  $\text{NHCO}$ ); 8,97 (s, 1H,  $\text{NHC=N}$ ); 8,91 (s, 1 H,  $\text{NH}$  indol); 7,67-7,11 (10 H, aromáticos); 4,8 (d, 2H,  $J = 4,4$  Hz,  $\text{CH}_2$ ); 1,51 (s, 9H,  $\text{CH}_3$  Boc).

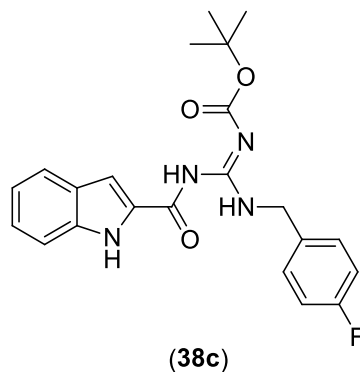
**DEPTQ (500 MHz)  $\text{CDCl}_3$  / TMS ( $\delta$ -ppm):** 171,97 ( $\text{C=O}$ ); 156,3 ( $\text{C=O}$ ); 153,3 ( $\text{C=N}$ ); 128,9 – 107,35 (10  $\text{CH}$  aromáticos); 137,69/136,53/135,67/128,19 (4  $\text{C}$ quaternário aromáticos); 83,52 ( $\text{C}$ quaternário Boc); 45,23 ( $\text{CH}_2$ ); 28,05 ( $\text{CH}_3$  Boc).



(38b)

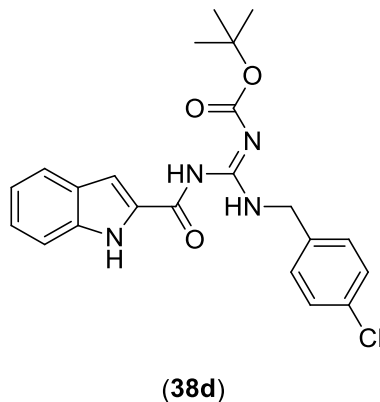
**RMN  $^1\text{H}$  (500 MHz)  $\text{CDCl}_3$  / TMS ( $\delta$ -ppm):** 12,27 (s, 1H,  $\text{NHCO}$ ); 9,36 (s, 1H,  $\text{NHC=N}$ ); 9,24 (s, 1 H,  $\text{NH}$  indol); 8,66 - 7,11 (9 H, aromáticos); 4,9 (d, 2H,  $J = 5,1$  Hz,  $\text{CH}_2$ ); 1,53 (s, 9H,  $\text{CH}_3$  Boc).

**DEPTQ (500 MHz)  $\text{CDCl}_3$  / TMS ( $\delta$ -ppm):** 171,77 ( $\text{C=O}$ ); 156,72 ( $\text{C=O}$ ); 156,09 ( $\text{C=N}$ ); 149,36-107,08 (9  $\text{CH}$  aromáticos); 153,16/136,51/135,71/128,20 (4  $\text{C}$ quaternário aromáticos); 83,46 ( $\text{C}$ quaternário Boc); 46,83 ( $\text{CH}_2$ ); 28,08 ( $\text{CH}_3$  Boc).



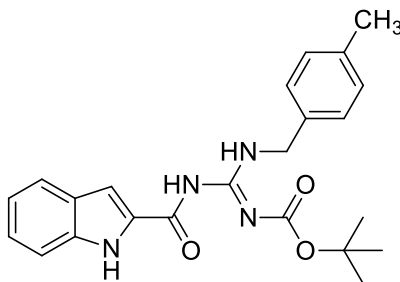
**RMN  $^1\text{H}$  (500 MHz)  $\text{CDCl}_3$  / TMS ( $\delta$ -ppm):** 12,32 (s, 1H,  $\text{NHCO}$ ); 8,99 (s, 1H,  $\text{NHC=N}$ ); 8,86 (s, 1 H,  $\text{NH}$  indol); 7,68-7,07 (9 H, aromáticos); 4,77 (d, 2H,  $J = 5,7$  Hz,  $\text{CH}_2$ ); 1,51 (s, 9H,  $\text{CH}_3$  Boc).

**DEPTQ (500 MHz)  $\text{CDCl}_3$  / TMS ( $\delta$ -ppm):** 172,02 ( $\text{C=O}$ ); 163,32 ( $\text{C=O}$ ); 156,27 ( $\text{C=N}$ ); 129,57-107,47 (9  $\text{CH}$  aromáticos); 153,31/136,59/135,60/133,45/129,51 (5  $\text{C}$ quaternário aromáticos); 83,62 ( $\text{C}$ quaternário Boc); 44,45 ( $\text{CH}_2$ ); 28,05 ( $\text{CH}_3$  Boc).



**RMN  $^1\text{H}$  (500 MHz)  $\text{CDCl}_3$  / TMS ( $\delta$ -ppm):** 12,31 (s, 1H,  $\text{NHCO}$ ); 8,95 (s, 1H,  $\text{NHC=N}$ ); 8,89 (s, 1 H,  $\text{NH}$  indol); 7,68-7,10 (9 H, aromáticos); 4,76 (d, 2H,  $J = 5,7$  Hz,  $\text{CH}_2$ ); 1,51 (s, 9H,  $\text{CH}_3$  Boc).

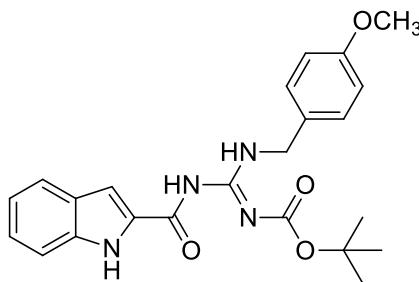
**DEPTQ (500 MHz)  $\text{CDCl}_3$  / TMS ( $\delta$ -ppm):** 172,01 ( $\text{C=O}$ ); 156,31 ( $\text{C=O}$ ); 153,31 ( $\text{C=N}$ ); 129,14-107,51 (9  $\text{CH}$  aromáticos); 136,60/136,20/135,55/133,61/128,14 (5  $\text{C}$ quaternário aromáticos); 83,46 ( $\text{C}$ quaternário Boc); 46,83 ( $\text{CH}_2$ ); 28,08 ( $\text{CH}_3$  Boc).



(38e)

**RMN  $^1\text{H}$  (500 MHz)  $\text{CDCl}_3$  / TMS ( $\delta$ -ppm):** 12,33 (s, 1H,  $\text{NHCO}$ ); 9,00 (s, 1H,  $\text{NHC=N}$ ); 8,86 (s, 1 H,  $\text{NH}$  indol); 7,68-7,11 (9 H, aromáticos); 4,75 (d, 2H,  $\text{CH}_2$ ); 2,36 (s, 3 H,  $\text{CH}_3$  metilas); 1,50 (s, 9H,  $\text{CH}_3$  Boc).

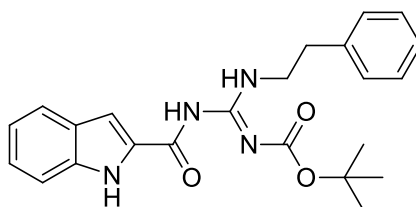
**DEPTQ (500 MHz)  $\text{CDCl}_3$  / TMS ( $\delta$ -ppm):** 171,95 ( $\text{C=O}$ ); 156,23 ( $\text{C=O}$ ); 153,28 ( $\text{C=N}$ ); 129,56-107,31 (9  $\text{CH}$  aromáticos); 137,52/136,53/135,72/134,61/128,2 (5  $\text{C}$ quaternário aromáticos); 83,46 ( $\text{C}$ quaternário Boc); 44,97 ( $\text{CH}_2$ ); 28,05 ( $\text{CH}_3$  Boc), 21,16 ( $\text{CH}_3$ ).



(38f)

**RMN  $^1\text{H}$  (500 MHz)  $\text{CDCl}_3$  / TMS ( $\delta$ -ppm):** 12,34 (s, 1H,  $\text{NHCO}$ ); 9,05 (s, 1H,  $\text{NHC=N}$ ); 8,82 (s, 1 H,  $\text{NH}$  indol); 7,68-6,92 (9 H, aromáticos); 4,74 (d, 2H,  $\text{CH}_2$ ); 3,81 (s, 3 H,  $\text{CH}_3$  metoxila); 1,50 (s, 9H,  $\text{CH}_3$  Boc).

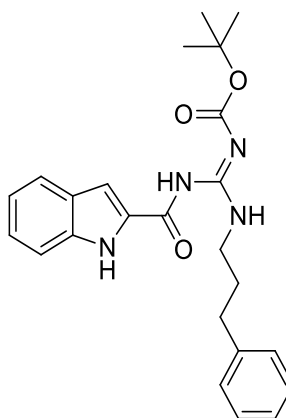
**DEPTQ (500 MHz)  $\text{CDCl}_3$  / TMS ( $\delta$ -ppm):** 171,97 ( $\text{C=O}$ ); 159,23 ( $\text{C=O}$ ); 156,17 ( $\text{C=N}$ ); 129,21-107,34 (9  $\text{CH}$  aromáticos); 153,28/136,56/135,74/129,66/128,20 (5  $\text{C}$ quaternário aromáticos); 83,45 ( $\text{C}$ quaternário Boc); 55,33 ( $\text{CH}_3$  metoxila); 44,71 ( $\text{CH}_2$ ); 28,05 ( $\text{CH}_3$  Boc).



(38g)

**RMN  $^1\text{H}$  (500 MHz)  $\text{CDCl}_3$  / TMS ( $\delta$ -ppm):** 12,29 (s, 1H,  $\text{NHCO}$ ); 9,04 (s, 1H,  $\text{NHC=N}$ ); 8,64 (s, 1 H,  $\text{NH}$  indol); 7,69-7,12 (10 H, aromáticos); 3,84 (dd, 2H,  $\text{CH}_2$ ); 3,02 (t, 2H,  $\text{CH}_2$ ); 1,51 (s, 9H,  $\text{CH}_3$  Boc).

**DEPTQ (500 MHz)  $\text{CDCl}_3$  / TMS ( $\delta$ -ppm):** 171,93 ( $\text{C=O}$ ); 156,32 ( $\text{C=O}$ ); 153,28 ( $\text{C=N}$ ); 128,78-107,28 (10  $\text{CH}$  aromáticos); 138,60/136,56/135,76/128,74 (4  $\text{C}$ quaternário aromáticos); 83,36 ( $\text{C}$ quaternário Boc); 42,78 ( $\text{CH}_2$ ); 35,66 ( $\text{CH}_2$ ); 28,02 ( $\text{CH}_3$  Boc).

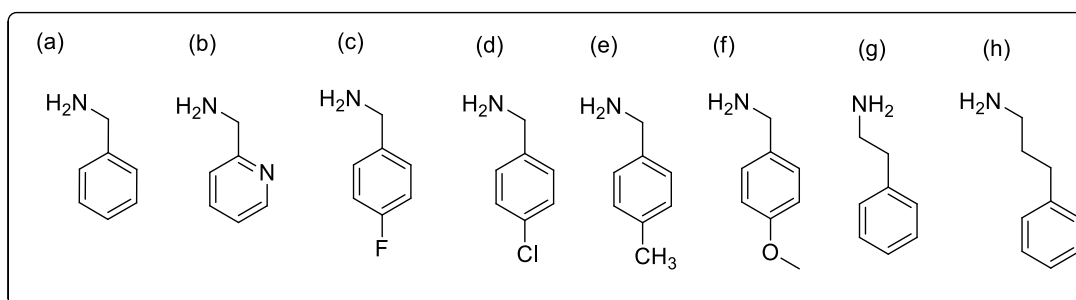
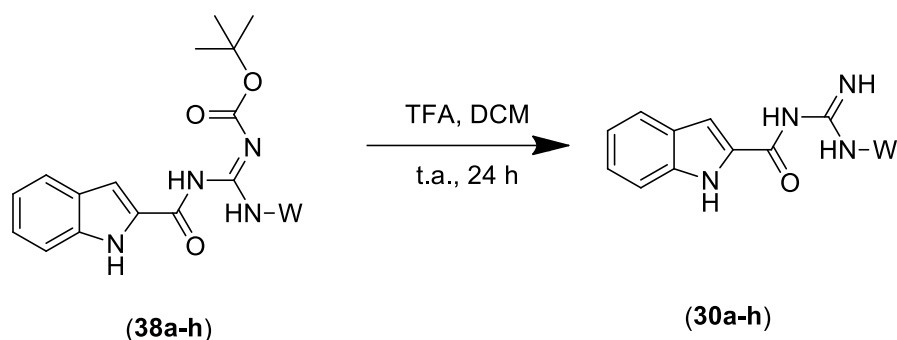


(38h)

**RMN  $^1\text{H}$  (500 MHz)  $\text{CDCl}_3$  / TMS ( $\delta$ -ppm):** 12,34 (s, 1H,  $\text{NHCO}$ ); 8,96 (s, 1H,  $\text{NHC=N}$ ); 8,61 (s, 1 H,  $\text{NH}$  indol); 7,69-7,12 (10 H, aromáticos); 3,62 (dd, 2H,  $\text{CH}_2$ ); 2,77 (t, 2H,  $\text{CH}_2$ ); 2,05 (p, 2H,  $\text{CH}_2$ ); 1,52 (s, 9H,  $\text{CH}_3$  Boc).

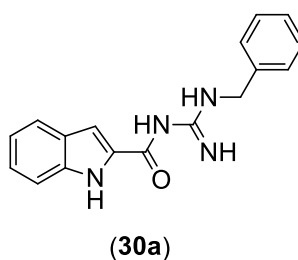
**DEPTQ (500 MHz)  $\text{CDCl}_3$  / TMS ( $\delta$ -ppm):** 171,91 ( $\text{C=O}$ ); 156,39 ( $\text{C=O}$ ); 153,42 ( $\text{C=N}$ ); 128,57-107,27 (10  $\text{CH}$  aromáticos); 141,09/136,22/135,77/128,22 (4  $\text{C}$ quaternário aromáticos); 83,37 ( $\text{C}$ quaternário Boc); 40,52 ( $\text{CH}_2$ ); 33,05 ( $\text{CH}_2$ ); 30,70 ( $\text{CH}_2$ ); 28,07 ( $\text{CH}_3$  Boc).

## DESPROTEÇÃO FINAL EM MEIO ÁCIDO



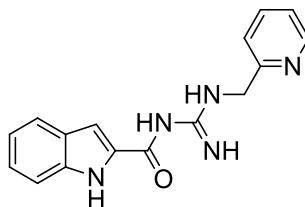
**Esquema 17:** Procedimento geral para a obtenção das acilguanidinas desprotegidas.

A uma solução da acilguanidina protegida em DCM (5 ml) são adicionados 4 equivalentes de ácido trifluoracético (TFA). A mistura fica sob agitação à temperatura ambiente até o consumo total do reagente de partida (entre 48 e 72 horas). O produto é isolado e vaporando a mistura reacional em pressão reduzida.



**RMN <sup>1</sup>H (500 MHz) DMSO-d<sub>6</sub> / TMS (δ-ppm):** 12,11 (s, 1H, NHCO); 11,5 (s, 1H, NH); 9,54 (s, 1H, NHC=N); 9,03 (s, 1 H, NH indol); 7,74-7,12 (10 H, aromáticos); 4,66 (dd, 2H, CH<sub>2</sub>).

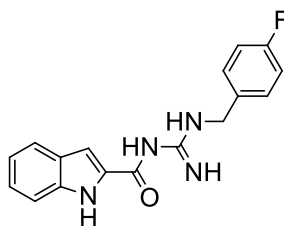
**DEPTQ (500 MHz) DMSO-d6 / TMS ( $\delta$ -ppm):** 161,74 ( $\underline{\text{C}}=\text{O}$ ); 153,91 ( $\underline{\text{C}}=\text{N}$ ); 129,17-107,9 (10  $\underline{\text{C}}\text{H}$  aromáticos); 138,45/136,26/127,07 (3  $\underline{\text{C}}$ quaternário aromáticos); 44,81 ( $\underline{\text{C}}\text{H}_2$ ).



(30b)

**RMN  $^1\text{H}$  (500 MHz) DMSO-d6 / TMS ( $\delta$ -ppm):** 12,17 (s, 1H,  $\underline{\text{N}}\text{HCO}$ ); 11,58 (s, 1H,  $\underline{\text{N}}\text{H}$ ); 9,75 (s, 1H,  $\underline{\text{N}}\text{HC}=\text{N}$ ); 8,65 (s, 1 H,  $\underline{\text{N}}\text{H}$  indol); 8,65-5,76 (9 H, aromáticos); 4,79 (dd, 2H,  $\underline{\text{C}}\text{H}_2$ ).

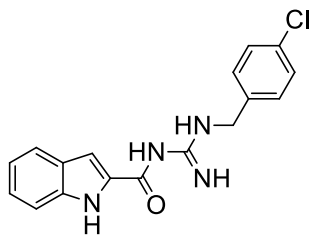
**DEPTQ (500 MHz) DMSO-d6 / TMS ( $\delta$ -ppm):** 161,80 ( $\underline{\text{C}}=\text{O}$ ); 154,18 ( $\underline{\text{C}}=\text{N}$ ); 149,19-107,9 (9  $\underline{\text{C}}\text{H}$  aromáticos); 138,47/128,68/126,24 (3  $\underline{\text{C}}$ quaternário aromáticos); 46,06 ( $\underline{\text{C}}\text{H}_2$ ).



(30c)

**RMN  $^1\text{H}$  (500 MHz) DMSO-d6 / TMS ( $\delta$ -ppm):** 12,10 (s, 1H,  $\underline{\text{N}}\text{HCO}$ ); 11,43 (s, 1H,  $\underline{\text{N}}\text{H}$ ); 9,46 (s, 1H,  $\underline{\text{N}}\text{HC}=\text{N}$ ); 9,18 (s, 1 H,  $\underline{\text{N}}\text{H}$  indol); 7,75-7,12 (9 H, aromáticos); 4,63 (d, 2H,  $\underline{\text{C}}\text{H}_2$ ).

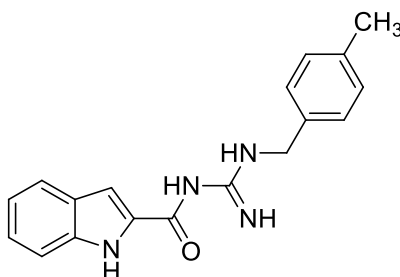
**DEPTQ (500 MHz) DMSO-d6 / TMS ( $\delta$ -ppm):** 163,12 ( $\underline{\text{C}}=\text{O}$ ); 161,58 ( $\underline{\text{C}}=\text{N}$ ); 130,14-107,91 (9  $\underline{\text{C}}\text{H}$  aromáticos); 159,01/153,77/138,47/128,7/127,04 (5  $\underline{\text{C}}$ quaternário aromáticos); 46,06 ( $\underline{\text{C}}\text{H}_2$ ).



(30d)

**RMN  $^1\text{H}$  (500 MHz) DMSO- $d_6$  / TMS ( $\delta$ -ppm):** 12,10 (s, 1H,  $\text{NHCO}$ ); 11,42 (s, 1H,  $\text{NH}$ ); 9,48 (s, 1H,  $\text{NHC=N}$ ); 8,95 (s, 1 H,  $\text{NH}$  indol); 7,75-7,12 (9 H, aromáticos); 4,64 (dd, 2H,  $\text{CH}_2$ ).

**DEPTQ (500 MHz) DMSO- $d_6$  / TMS ( $\delta$ -ppm):** 161,57 ( $\text{C=O}$ ); 153,88 ( $\text{C=N}$ ); 129,74-107,92 (7  $\text{CH}$  aromáticos); 138,48/135,38/132,87/128,70/127,04 (5  $\text{C}$ quaternário aromáticos); 44,13 ( $\text{CH}_2$ ).

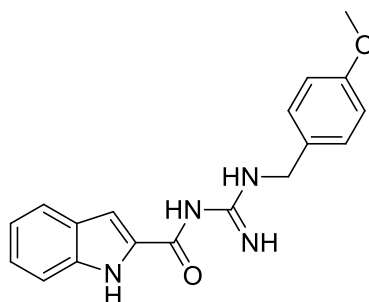


(30e)

**RMN  $^1\text{H}$  (500 MHz) DMSO- $d_6$  / TMS ( $\delta$ -ppm):** 12,10 (s, 1H,  $\text{NHCO}$ ); 11,57 (s, 1H,  $\text{NH}$ ); 9,51 (s, 1H,  $\text{NHC=N}$ ); 9,01 (s, 1 H,  $\text{NH}$  indol); 7,74-7,13 (9 H, aromáticos); 4,60 (dd, 2H,  $\text{CH}_2$ ); 2,32 (s, 3H,  $\text{CH}_3$  metila).

**DEPTQ (500 MHz) DMSO- $d_6$  / TMS ( $\delta$ -ppm):** 161,73 ( $\text{C=O}$ ); 153,84 ( $\text{C=N}$ ); 129,69-107,88 (7  $\text{CH}$  aromáticos); 138,44/137,57/133,19/127,07 (4  $\text{C}$ quaternário aromáticos); 44,60 ( $\text{CH}_2$ ); 21,17 ( $\text{CH}_3$  metila)

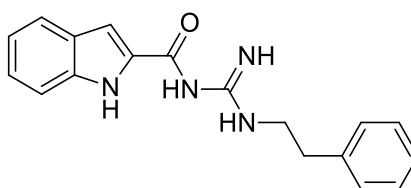




(30f)

**RMN  $^1\text{H}$  (500 MHz) DMSO- $d_6$  / TMS ( $\delta$ -ppm):** 12,09 (s, 1H,  $\text{NHCO}$ ); 11,40 (s, 1H,  $\text{NH}$ ); 9,36 (s, 1H,  $\text{NHC=N}$ ); 8,97 (s, 1 H,  $\text{NH}$  indol); 7,74-6,98 (9 H, aromáticos); 4,55 (dd, 2H,  $\text{CH}_2$ ); 3,77 (s, H,  $\text{CH}_3$  metoxila).

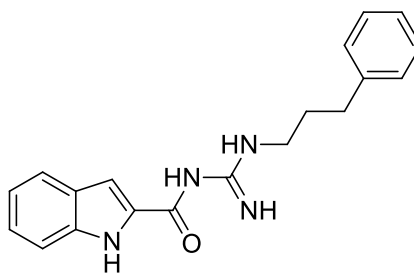
**DEPTQ (500 MHz) DMSO- $d_6$  / TMS ( $\delta$ -ppm):** 159,02 ( $\text{C=O}$ ); 129,11-107,37 (7  $\text{CH}$  aromáticos); 138,00/127,56/126,61 (3  $\text{C}$ quaternário aromáticos); 43,97 ( $\text{CH}_2$ ); 55,20 ( $\text{CH}_3$  metoxila)



(30g)

**RMN  $^1\text{H}$  (500 MHz) DMSO- $d_6$  / TMS ( $\delta$ -ppm):** 12,08 (s, 1H,  $\text{NHCO}$ ); 9,16 (s, 1 H,  $\text{NH}$ ); 7,73-7,11 (10 H, aromáticos); 3,64 (m, 2H,  $\text{CH}_2$ ); 2,94 (t, 2H,  $\text{CH}_2$ ).

**DEPTQ (500 MHz) DMSO- $d_6$  / TMS ( $\delta$ -ppm):** 161,36 ( $\text{C=O}$ ); 153,38 ( $\text{C=N}$ ); 128,89-107,52 (8  $\text{CH}$  aromáticos); 138,06/137,95/128,20/126,62 (4  $\text{C}$ quaternário aromáticos); 42,48 ( $\text{CH}_2$ ); 33,69 ( $\text{CH}_2$ ).



(30h)

**RMN  $^1\text{H}$  (500 MHz) DMSO- $d_6$  / TMS ( $\delta$ -ppm):** 12,09 (s, 1H,  $\text{NHCO}$ ); 11,49 (s, 1H,  $\text{NH}$ ); 9,21 (s, 1H,  $\text{NHC=N}$ ); 8,90 (s, 1 H,  $\text{NH}$  indol); 7,74-7,12 (10 H, aromáticos); 3,39 (q, 2H,  $\text{CH}_2$ ); 2,69 (t, 2 H,  $\text{CH}_2$ ); 1,92 (qu, 2H,  $\text{CH}_2$ ).

**DEPTQ (500 MHz) DMSO- $d_6$  / TMS ( $\delta$ -ppm):** 161,66 ( $\text{C=O}$ ); 153,73 ( $\text{C=N}$ ); 128,87-107,84 (8  $\text{CH}$  aromáticos); 141,49/138,44/ 127,07 (3  $\text{C}$ quaternário aromáticos); 41,39 ( $\text{CH}_2$ ); 32,48 ( $\text{CH}_2$ ); 29,88 ( $\text{CH}_2$ );

## 6.2 AVALIAÇÃO *IN VITRO* DOS NOVOS DERIVADOS GUANIDÍNICOS E ACILGUANIDÍNICOS SOBRE A ATIVIDADE DAS ENZIMAS ACETILCOLINESTERASE (AChE) E BUTIRILCOLINESTERASE (BuChE)

A atividade anticolinesterásica foi determinada de acordo com o método adaptado de Ellman (ELLMAN, 1961). Todas as soluções utilizadas nos ensaios foram preparadas em tampão tris-HCl 0,02 M com potencial hidrogeniônico (pH = 7,5) e as soluções estoque dos compostos foram preparadas em EtOH (10 mM). Em uma placa de 96 poços de fundo plano foram adicionadas soluções de tratamento com o composto inibidor nas concentrações finais variando entre 300  $\mu\text{M}$  e 0,07831  $\mu\text{M}$ . O controle veículo (EtOH) foi utilizado como referência (controle negativo). Foram adicionados ácido 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzóico (DTNB) à butirilcolinesterase isolada de soro equino (EqBChE) na presença de albumina sérica bovina (BSA). A absorbância foi registrada utilizando um leitor de placas iMark (Bio-Rad) equipado com um filtro de luz de comprimento de onda ( $\lambda$ ) no valor de 415 nm e esta medida usada como uma referência em branco. Após incubação de 10 minutos à temperatura ambiente, iodeto de butiriltiocolina (BCTI) foi adicionado e a absorbância foi registrada à temperatura ambiente a  $\lambda = 415$  nm por 10 vezes com intervalos de 30 segundos a cada leitura. A atividade enzimática

foi calculada como porcentagem da média dos valores de absorbância medidos para o controle tratado com DMSO, descontada da média dos valores de referência em branco. Os ensaios foram realizados em triplicatas (para o cálculo do desvio-padrão). Os valores de  $CI_{50}$  foram calculados no programa Graphpad Prism 7.0 usando o modelo de regressão não-linear para inibição dose-resposta.

### **6.3 ESTUDO DE INTERAÇÃO ENZIMÁTICA *IN SILICO* DOS DERIVADOS GUANIDÍNICOS E ACILGUANIDÍNICOS**

As moléculas foram desenhadas em 2D no software ChemDraw e sua otimização de parâmetros como: conformação e comprimento de ligação foram feitos no Spartan via método semi-empírico PM-6, onde também houve a criação do modelo 3D das mesmas, considerando suas respectivas formas catiônicas, visto que em meio biológico (pH=7), estas encontram-se protonadas. Assim sendo, as moléculas foram ancoradas no sítio ativo da enzima. Foram feitas 10 corridas de ancoramento para cada análogo desprotegido, totalizando 80 poses de ancoramento molecular (*docking*).

O software GOLD 5.6 (CCDC Software Ltd., Cambridge, UK) foi utilizado para realizar o ancoramento molecular das moléculas com a estrutura cristalográfica da BuChE de enguia elétrica (*Electrophorus electricus*) (EeBuChE) obtida no banco de dados de proteínas (PDB, do inglês Protein Data Bank) de código 1CB2 e resolução de 4,5 Å. Foram utilizados o raio de ligação a 15 Å em torno de átomo de oxigênio do resíduo da serina 203 e a função Goldscore e para a previsão da interação do compostos com a EeBChE. Após a análise de todas as poses no GOLD 5.6, observou-se que nem sempre o maior valor de Goldscore representava de fato a pose correta, pois este método busca mecanicamente por melhores interações mesmo que não acompanhe os ângulos e tamanhos de ligação condizentes com a realidade, acarretando assim um erro associado que foi levado em consideração no momento da análise.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ARAÚJO, C. R. M.; SANTOS, V. L. A.; GONSALVES, A. A. cetilcolinesterase - AChE: Uma Enzima de Interesse. **Revista Virtual de Química**, Novembro 2016. 1819-1834.
- BARNER, E. L.; GRAY, S. L. Donepezil Use in Alzheimer Disease. **The Annals of Pharmacotherapy**, v. 32, Janeiro 1998.
- BARREIRO, E. J.; FRAGA, C. A. M. **Química Medicinal: As Bases Moleculares da Ação dos Fármacos**. 2ª. ed. Porto Alegre: Artmed, 2008.
- BioRender**. Disponível em: <<https://app.biorender.com/>>. Acesso em: 07 Agosto 2020.
- CAMPAGNA, F. et al. Synthesis and biophysical evaluation of arylhydrazono-1H-2-indolinones as b-amyloid aggregation inhibitors. **European Journal of Medicinal Chemistry**, n. 46, 2011. 275-284.
- DA SILVA, F. D. C. et al. Synthesis, HIV-RT inhibitory activity and SAR of 1-benzyl-1H-1,2,3-triazole derivatives of carbohydrates. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 44, p. 373-383, 2009.
- DE FALCO, A. et al. Doença de Alzheimer: Hipóteses etiológicas e perspectivas de tratamento. **Química Nova**, v. 39, p. 63-80, 2016.
- DESIGNUA. **Shutterstock**, 2020. Disponível em: <<https://www.shutterstock.com/pt/image-vector/alzheimers-disease-change-tau-protein-that-581982592>>. Acesso em: Julho 2020.
- EGAN, Michael F.; KOST, James; TARIOT, Pierre N.; AIDEN, Paul S.; CUMMINGS, Jeffrey L.; VELLAS, Bruno; SUR, Cyrille; MUKAI, Yuki; VOSS, Tiffini; FURTEK, Christine; MAHONEY, Erin; MOZLEY, Lyn Harper; VANDENBERGHE, Rik; MO, Yi; MICHELSON, David. Randomized Trial of Verubecestat for Mild-to-Moderate Alzheimer's Disease. **The New England Journal of Medicine**, [s. l.], 3 maio 2018.
- ESPÍRITO SANTO, R. D. **Síntese e caracterização de compostos guanidínicos e estudo da atividade leishmanicida**. Presidente Prudente: [s.n.], 2017.
- ELIAS, Thiago Castilho; OLIVEIRA, Humberto César Brandão; SILVEIRA, Nelson José Freitas. MB-Isoster: A software for Bioisosterism Simulation. **Journal of Computacional Chemistry**, [s. l.], 15 ago. 2018.
- FERRO, E. D. S.; GUIMARÃES, A. P.; GONÇALVES, A. S. L. **Estudo de ancoramento molecular (docking) de potenciais inibidores da butirilcolinesterase humana (HssBChE)**. Congresso Brasileiro de Engenharia Química em Iniciação Científica. Uberlândia: [s.n.]. 2019.

FORLENZA, O. V. Tratamento farmacológico da Doença de Alzheimer. **Revista de Psiquiatria Clínica**, v. 32, p. 137-148, 2005.

GHANEI-NASAB, S. et al. Synthesis and anticholinesterase activity of coumarin-3-carboxamides bearing tryptamine moiety. **European Journal of Medicinal Chemistry**, 2016.

GOODMAN, L. S.; GILMAN, A. G. **As Bases farmacológicas da terapêutica**. 10ª Edição. ed. Rio de Janeiro: McGraw-Hill, 2003.

GOULART, P.N.; CARUSO, L.; NADUR, N.F.; FRANCO, D.P.; KÜMMERLE, A.E.; LACERDA, R.B. Butirilcolinesterase - BuChE: um Potencial Alvo para o Desenvolvimento de Fármacos para o Tratamento da Doença de Alzheimer. **Revista Virtual de Química**, [s. l.], v. 13, ed. 1, 25 fev. 2021.

GOULART, P. N. **Acilguanidinas e guanidinas, análogos de alcaloides bromopirrólicos, planejadas como inibidores seletivos de butirilcolinesterase**. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Seropédica. 2021.

HA, Z. Y.; MATTHEW, S.; YEONG, K. Y. Butyrylcholinesterase: A Multifaceted Pharmacological Target and Tool. **Current Protein and Peptide Science**, v. 21, p. 99-109, 2020.

HORTON, Douglas A.; BOURNE, Gregory T.; SMYTHE, Mark L. The Combinatorial Synthesis of Bicyclic Privileged Structures or Privileged Substructures. **Chemical Reviews**, [s. l.], v. 103, n. 3, p. 893–930, 1 out. 2002.

HU, B. **Terphenyl guanidines as foreign patent documents**. US7285682B2, 23 Outubro 2007.

LEVINE III, H. Small molecule inhibitors of Abeta assembly. **Amyloid**, n. 13, Setembro 2007. 185-197.

LOVERING, Frank; BIKKER, Jack; HUMBLET, Christine. Escape from flatland: increasing saturation as an approach to improving clinical success. **J Med Chem**, [s. l.], v. 52, p. 6752–6756, 14 out. 2019

LUIZ JUNIOR, Hilton; MARCUCCI, Maria C. Uso tradicional terapêutico de espécies pertencentes ao gênero vegetal *Eucharis Planchon & Linden* (Amaryllidaceae). **Revista Fitos**, [s. l.], v. 10, 1 jan. 2016.

MASSOULIÉ, Jean; PEZZEMENTI, Leo; BON, Suzanne; KREJCI, Eric; VALLETTE, François-Marie. Molecular and cellular biology of cholinesterases. **Progress in Neurobiology**, [s. l.], v. 41, p. 31-91, 1993.

- McDade, E., Llibre-Guerra, J.J., Holtzman, D.M. *et al.* The informed road map to prevention of Alzheimer Disease: A call to arms. **Mol Neurodegeneration** 16, 49 mullar(2021).
- MODA, Tiago Luiz. **Desenvolvimento de modelos in silico de propriedades ADME para a triagem de novos candidatos a fármacos**. 2007. Dissertação (Mestrado em Ciências: Física Aplicada) - Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, [S. l.], 2007.
- NALIVAEVA, N. N.; TURNER, A. J. The amyloid precursor protein: A biochemical enigma in brain development, function and disease. **FEBS Letters**, 27 June 2013. 2046-2054.
- NETO, D. C. F. *et al.* A new guanylhydrazone derivative as a potential acetylcholinesterase inhibitor for Alzheimer's disease: synthesis, molecular docking, biological evaluation and kinetic studies by nuclear magnetic resonance. **RSC Advances**, v. 7, p. 33944–33952, 2017.
- OMS. Relatório Mundial de Envelhecimento e Saúde. **WHO**, 2021. Disponível em: <<https://www.who.int/publications/i/item/9789240033245>>. Acesso em: 06 Junho 2022.
- PATRICK, G. L. **An Introduction to Medicinal Chemistry**. 5ª. ed. [S.l.]: Oxford, 2013.
- PETRONILHO, E. D. C.; PINTO, A. C.; VILLAR, J. D. F. Acetilcolinesterase: Alzheimer e Guerra Química. **Revista Militar de Ciência e Tecnologia**, 2011.
- PURGATORIO, R. *et al.* Investigating 1,2,3,4,5,6-hexahydroazepino[4,3-b]indole as scaffold of butyrylcholinesterase-selective inhibitors with additional neuroprotective activities for Alzheimer's disease. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 177, p. 414-424, 2019.
- RODRIGUES, Gabriela dos Santos; AVELINO, Júnior A.; SIQUEIRA, Ariane L. N.; RAMOS, Luciana F. P.; DOS SANTOS, Gabriela B. O uso de softwares livres em aula prática sobre filtros moleculares de biodisponibilidade oral de fármacos. **Química Nova**, [s. l.], v. 44, n. 8, p. 1036-1044, 23 mar. 2021.
- ROZENGART, E. V. *et al.* Guanidine Derivatives: Conformation, Capability for Chelation, Study as Reversible Inhibitors of Cholinesterases of Different Origin. **Zhurnal Evolyutsionnoi Biokhimii i Fiziologii**, v. 39, p. 393-404, 2003.
- RUSSO, R. P. Colinesterases. **Revista Brasileira de Anestesiologia**, Junho 1977. 308-329.
- SACZEWSKI, F.; BALEWSKI, Ł. Biological activities of guanidine compounds, v. 19, p. 1417-1448, 2009.
- SANTOS, S. N. *et al.* Regioselective microwave synthesis and derivatization of 1,5-diaryl-3-amino-1,2,4-triazoles and a study of their cholinesterase inhibition properties. **RSC Advances**, v. 9, p. 20356–20369, 2019.
- SILVA, Fábio Pedrosa Lins. **Síntese de novos derivados adutos de morita-baylis-hillman: bioisosterismo clássico na otimização de leishmanicidas**. 2009. Dissertação (Mestrado em

Química) - Centro de Ciências Exatas e da Natureza, Universidade Federal da Paraíba, [S. l.], 2009.

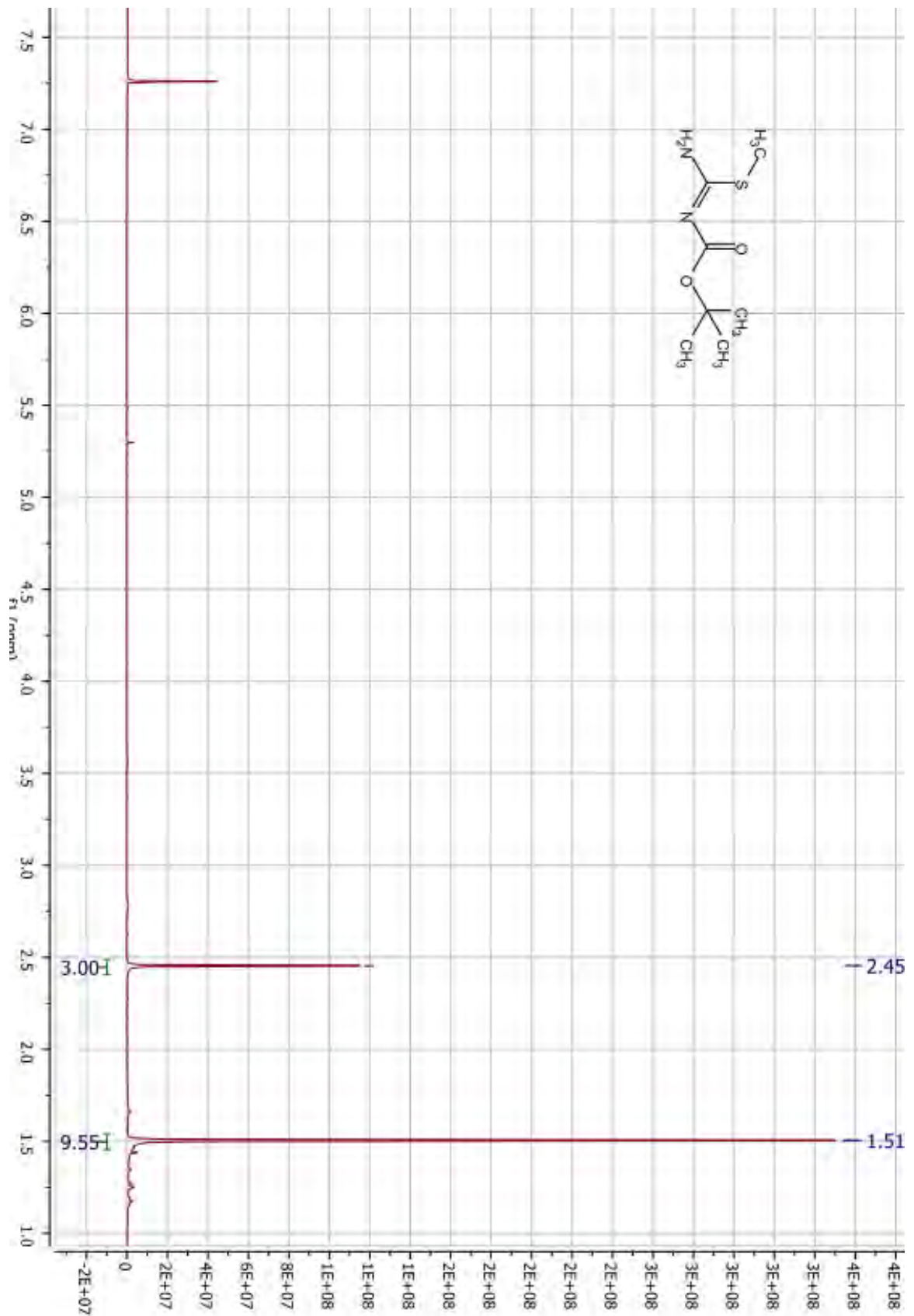
SILVERTHORN, D. U. **Fisiologia Humana**: Uma Abordagem Integrada. 7<sup>a</sup>. ed. [S.l.]: Artmed, 2017.

VEBER, D. F. et al. Molecular properties that influence the oral bioavailability of drug candidates. **J. Med. Chem.**, n. 12, Junho 2002. 2615-2623.

VIEGAS JR., C. et al. Produtos naturais como candidatos a fármacos úteis no tratamento do mal de Alzheimer. **Química Nova**, v. 27, n. 4, p. 655-660, 2004.

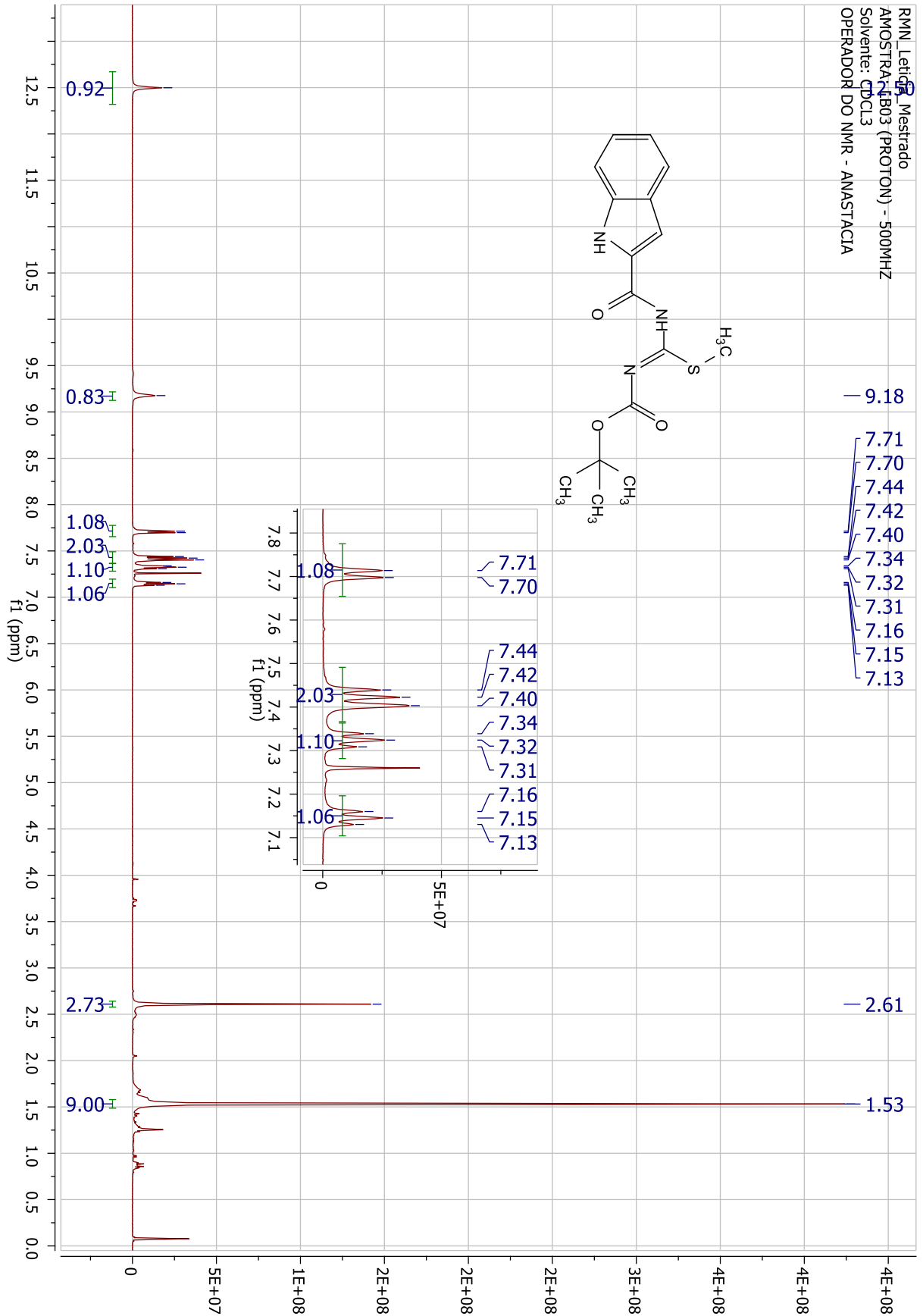
WANG, H. et al. Consequences of Inhibiting Amyloid Precursor Protein Processing Enzymes on Synaptic Function and Plasticity. **Neural Plasticity**, 2012.

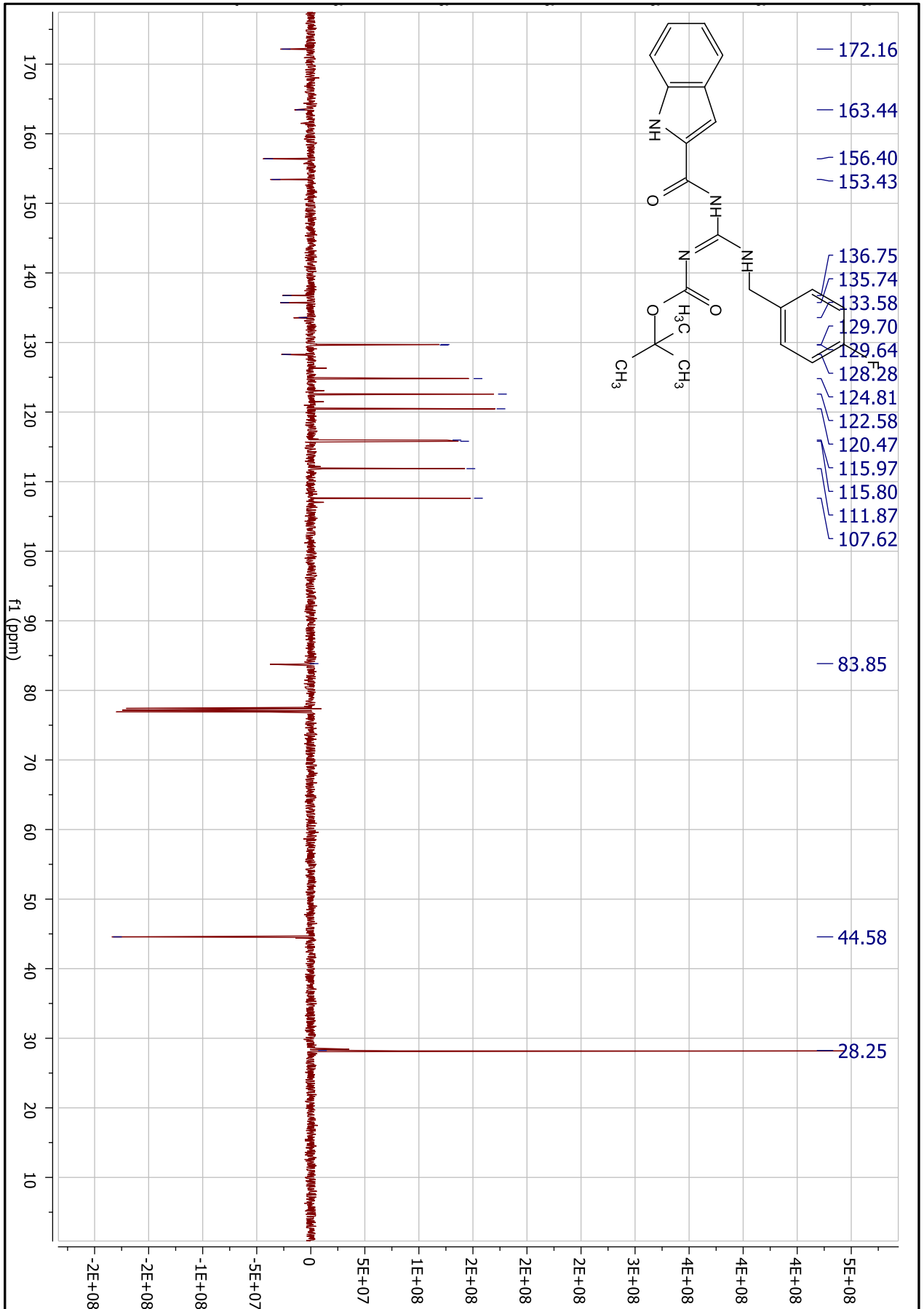
## 8. ANEXOS

Anexo 1: Espectro de RMN  $^1\text{H}$  do composto (33) em  $\text{CDCl}_3$  a 500 MHz

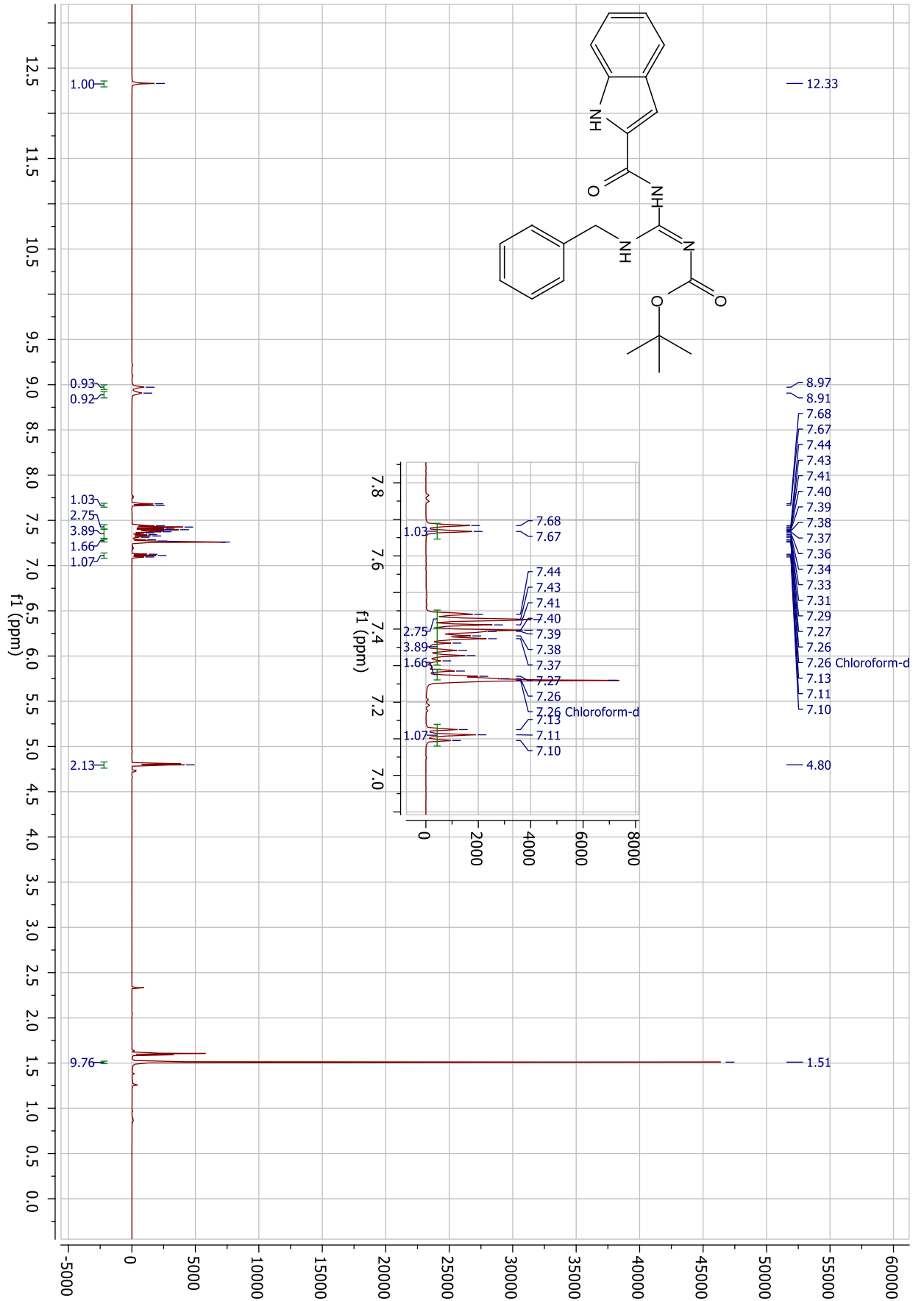


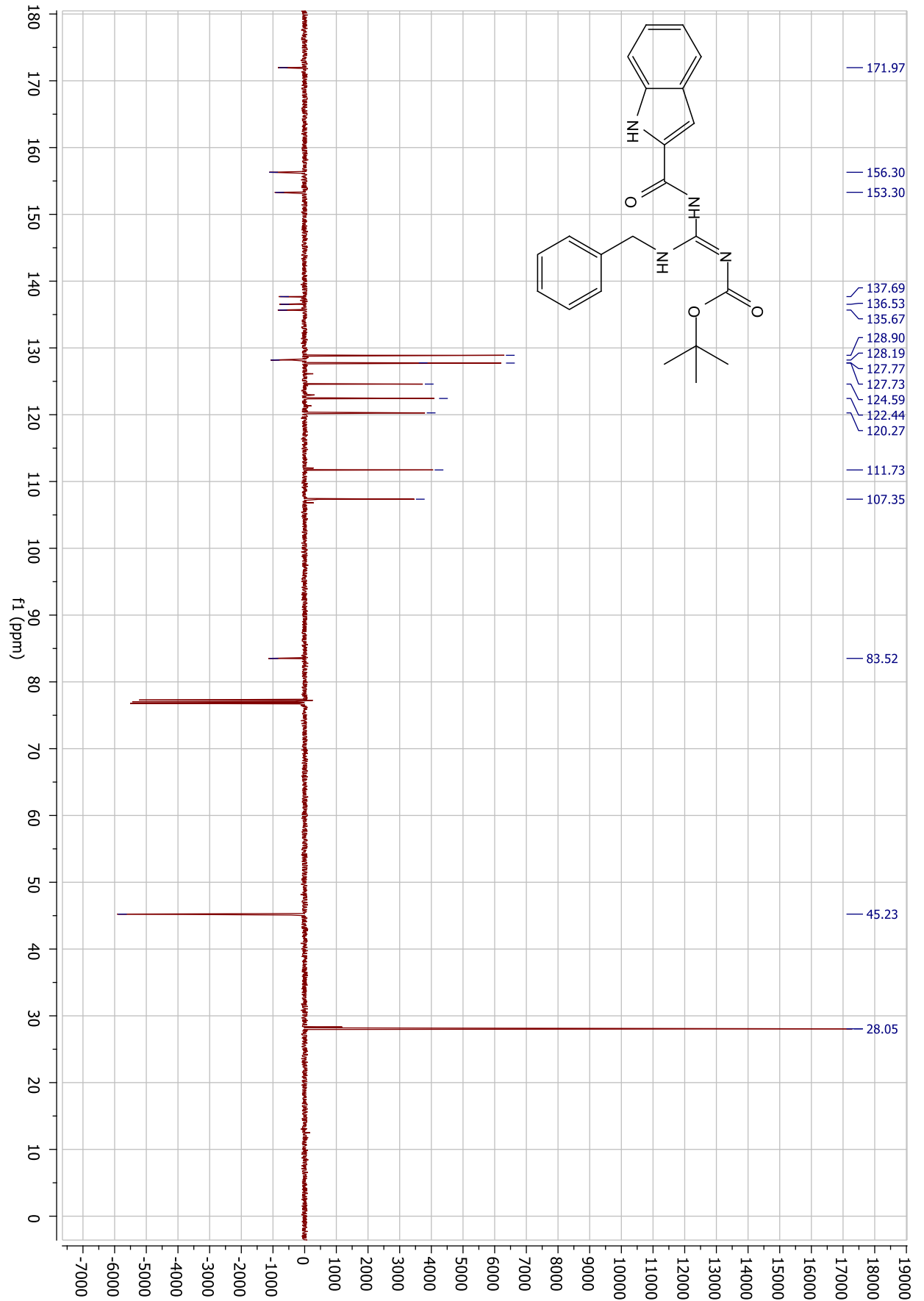
Anexo 2: Espectro de RMN  $^1\text{H}$  do composto (36) em  $\text{CDCl}_3$  a 500 MHz



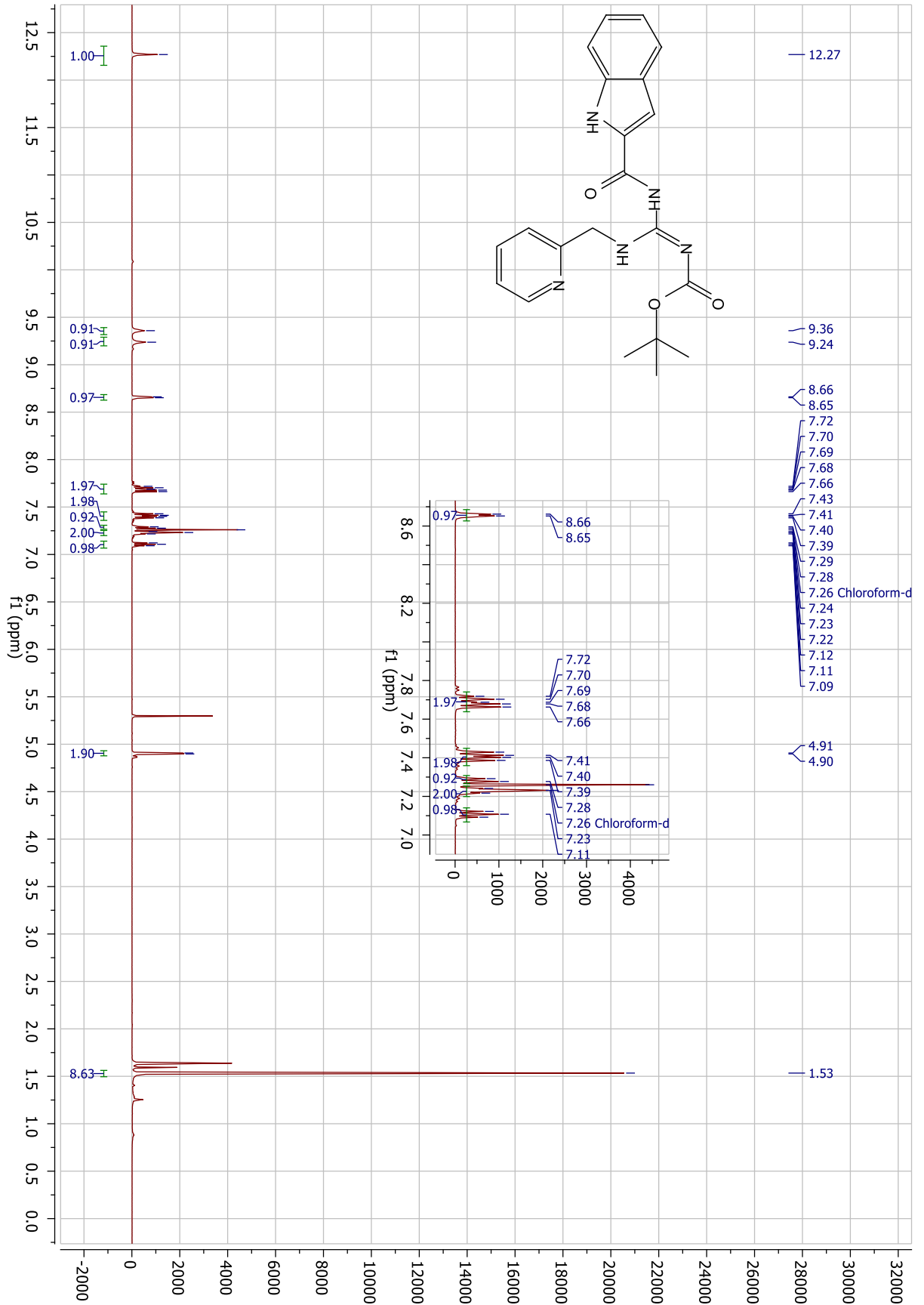
Anexo 3: Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  do composto (36) em  $\text{CDCl}_3$  a 500 MHz

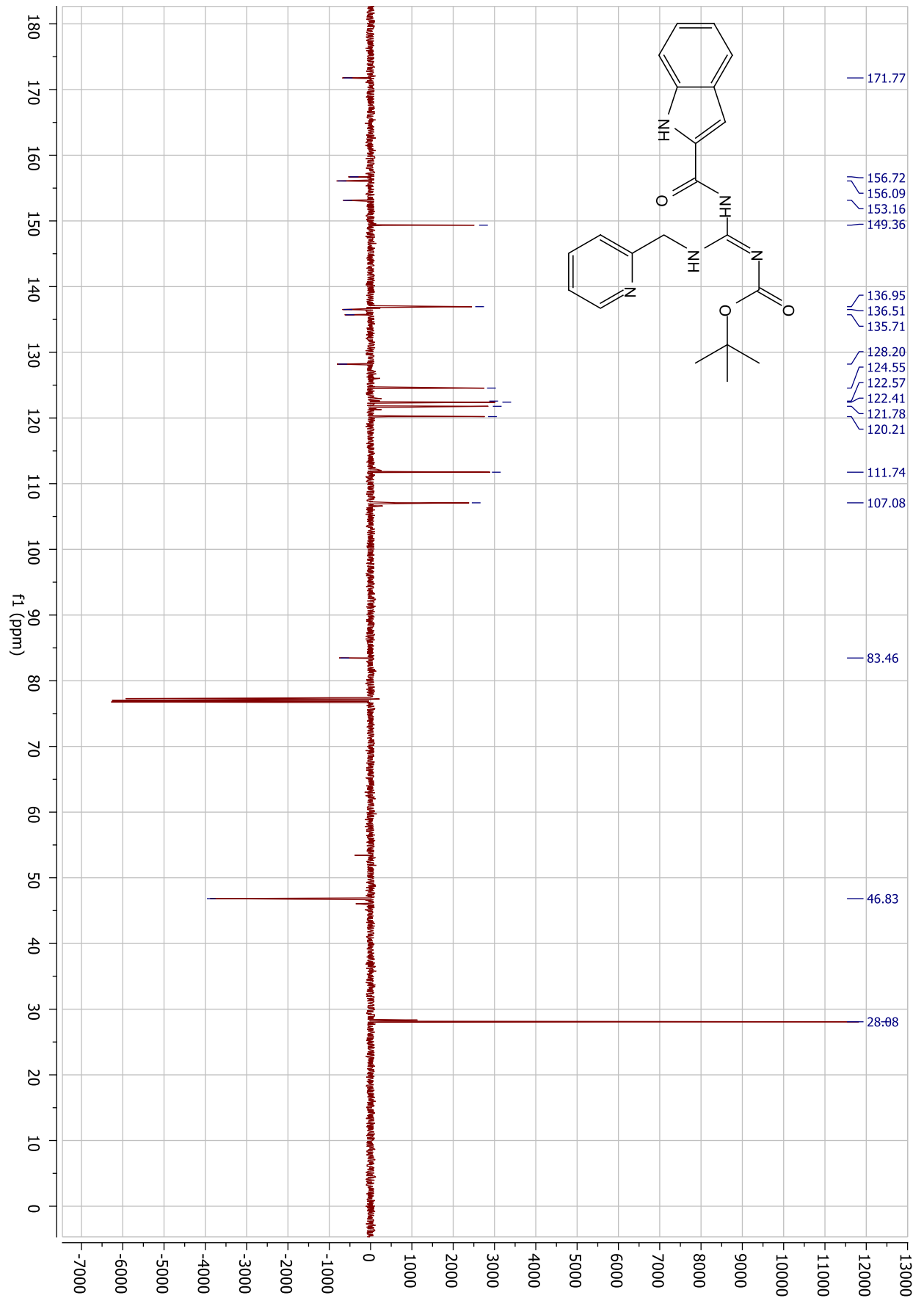
Anexo 4: Espectro de RMN  $^1\text{H}$  do composto (38a) em  $\text{CDCl}_3$  a 500 MHz



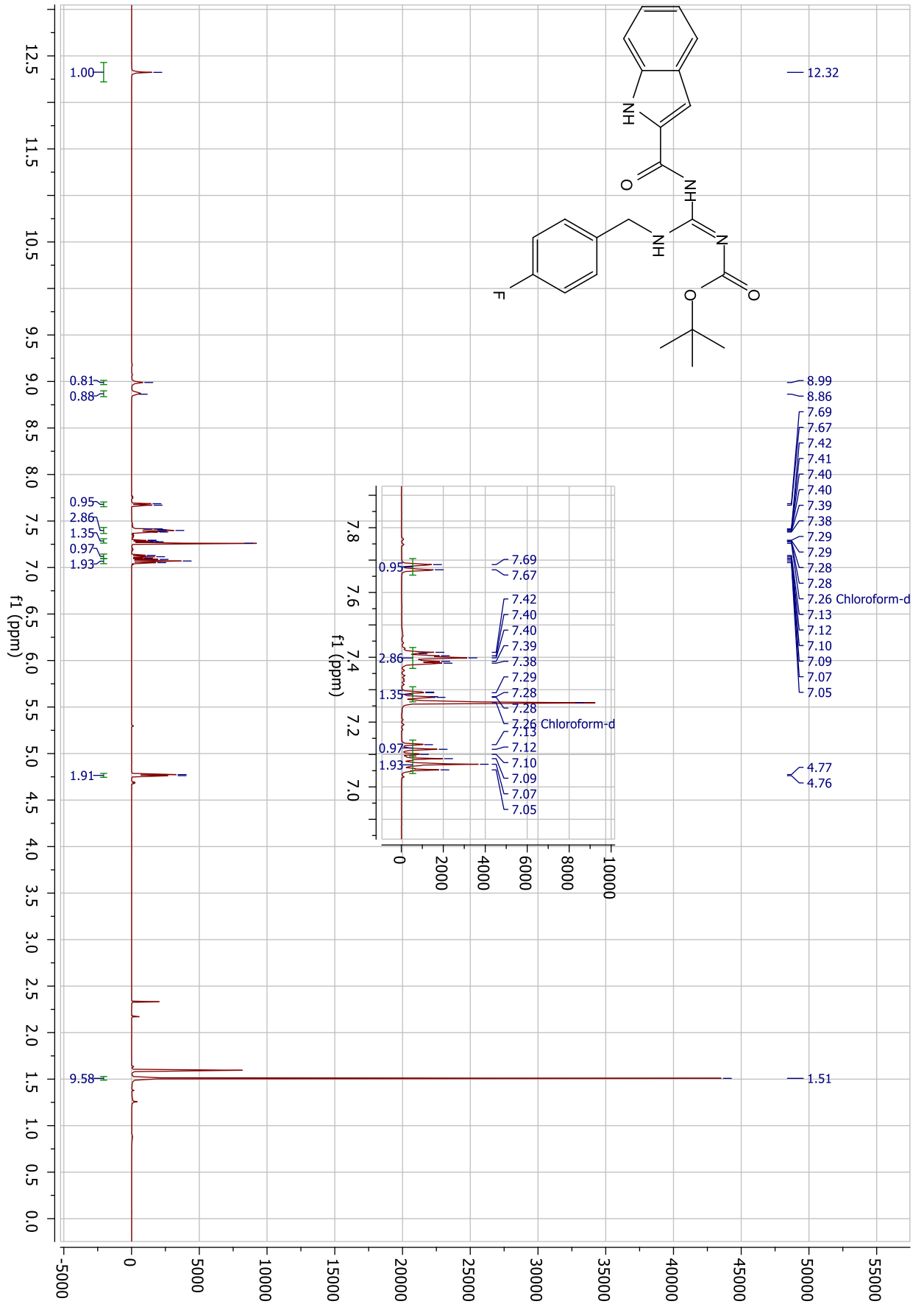
Anexo 5: Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  do composto (38a) em  $\text{CDCl}_3$  a 500 MHz

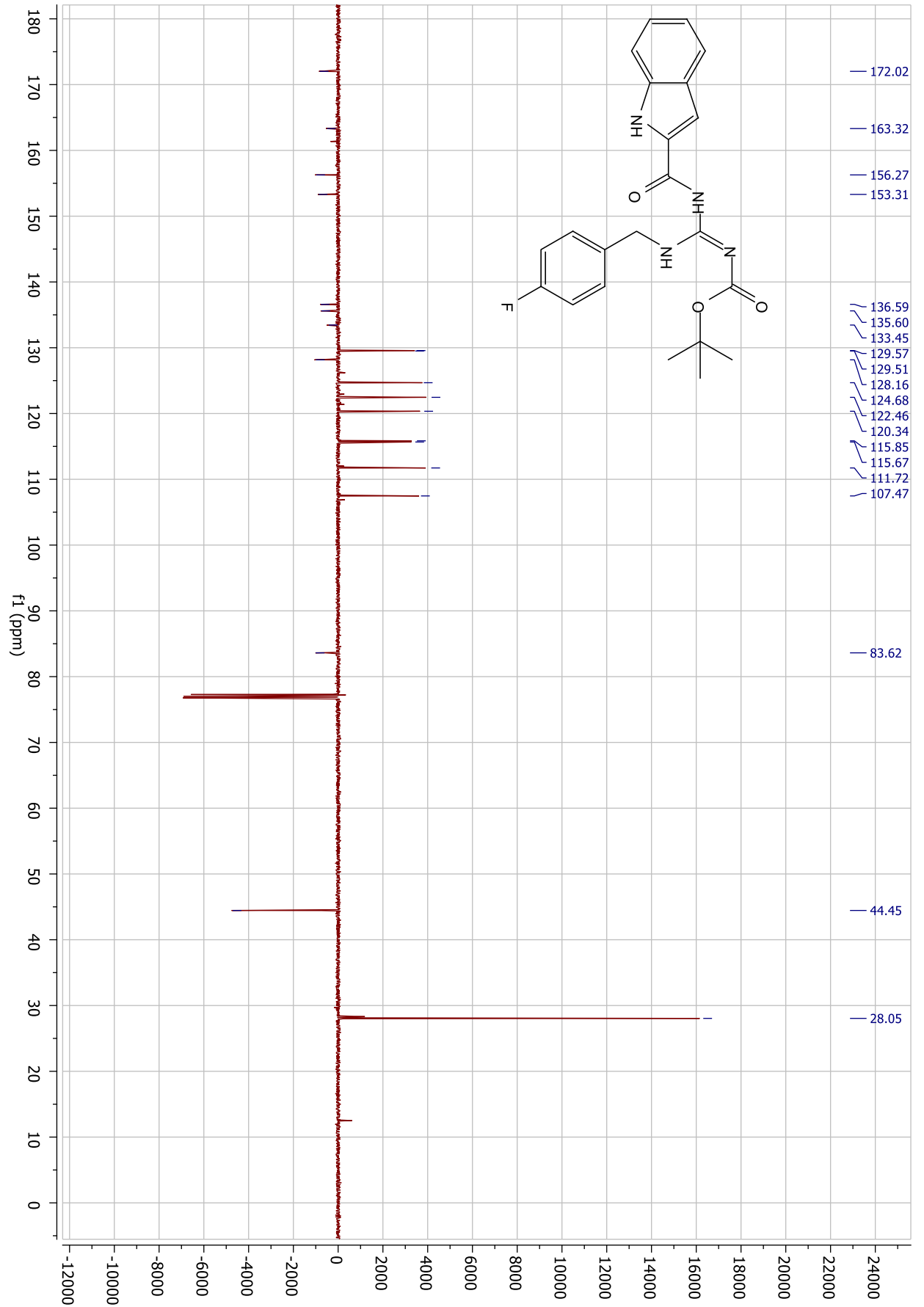
Anexo 6: Espectro de RMN  $^1\text{H}$  do composto (38b) em  $\text{CDCl}_3$  a 500 MHz



Anexo 7: Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  do composto (38b) em  $\text{CDCl}_3$  a 500 MHz

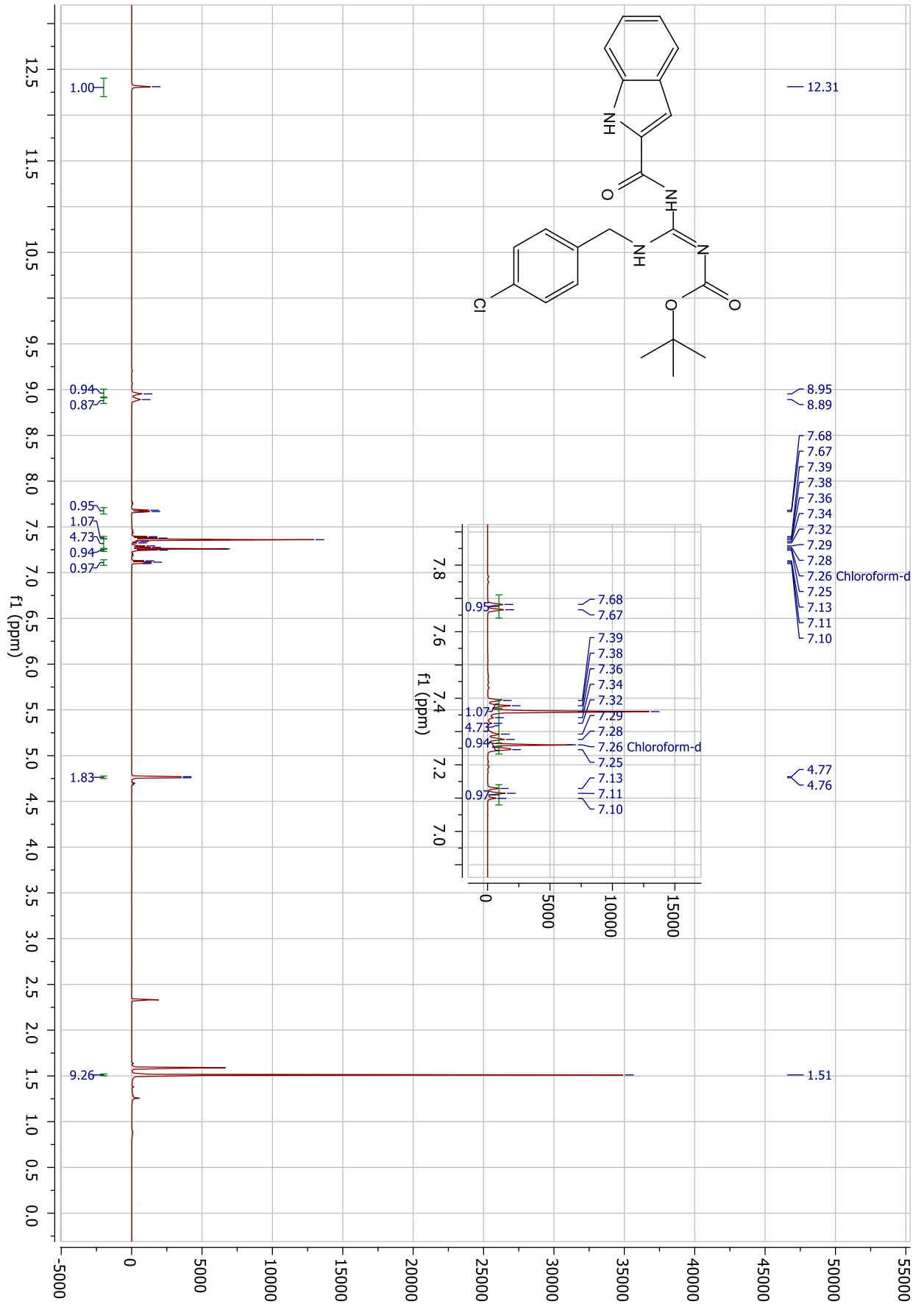
Anexo 8: Espectro de RMN  $^1\text{H}$  do composto (38c) em  $\text{CDCl}_3$  a 500 MHz

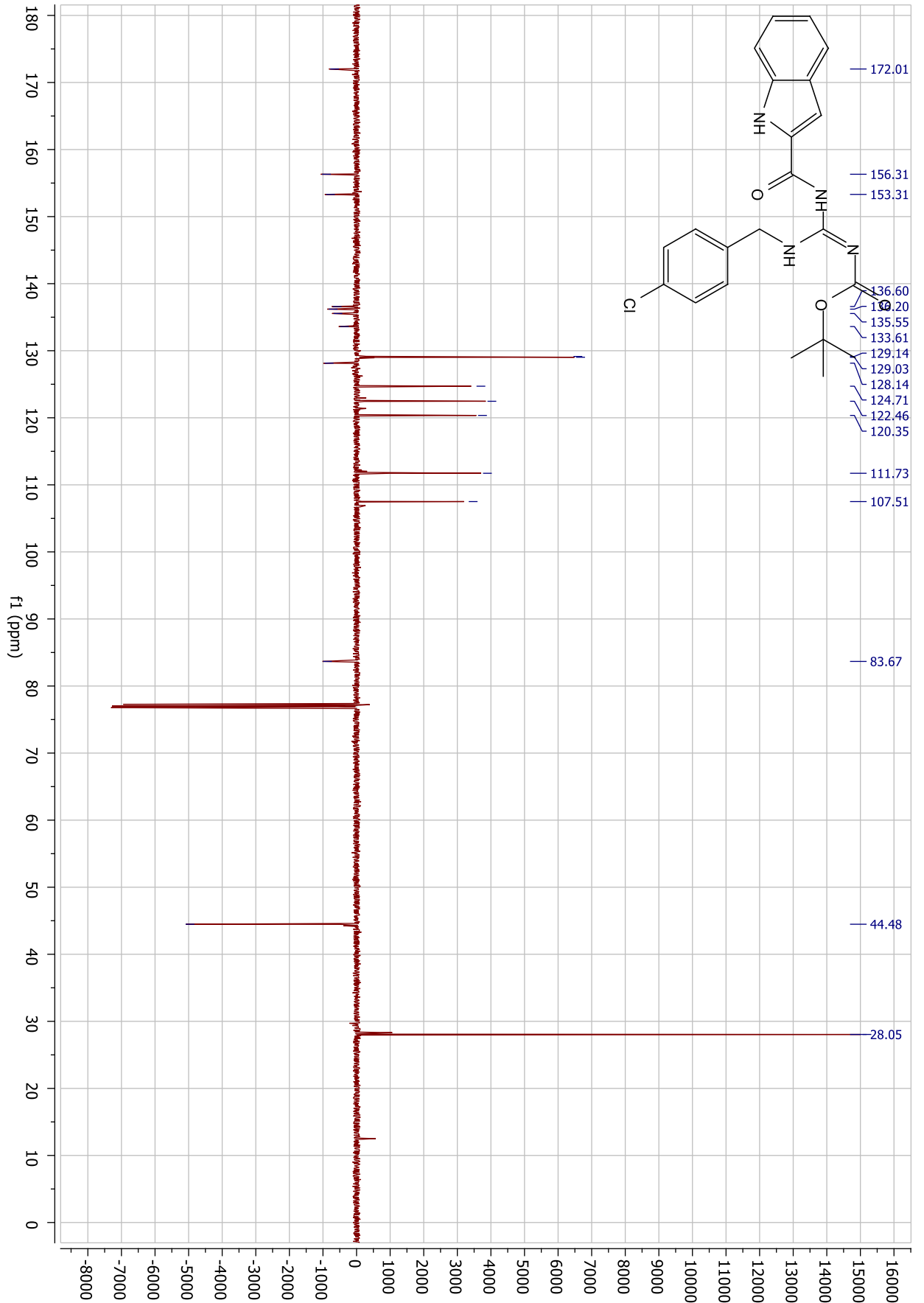


Anexo 9: Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  do composto (38c) em  $\text{CDCl}_3$  a 500 MHz

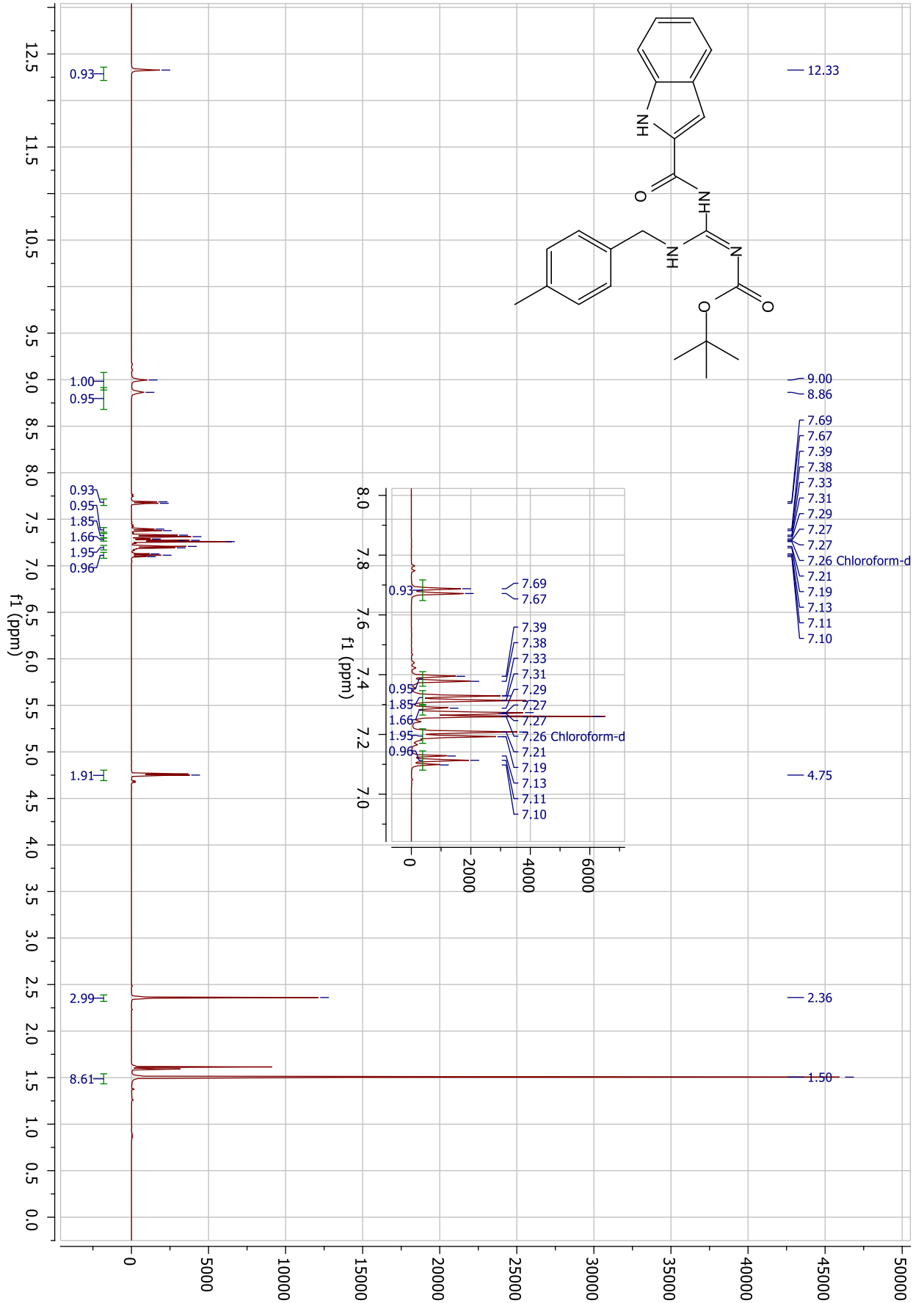


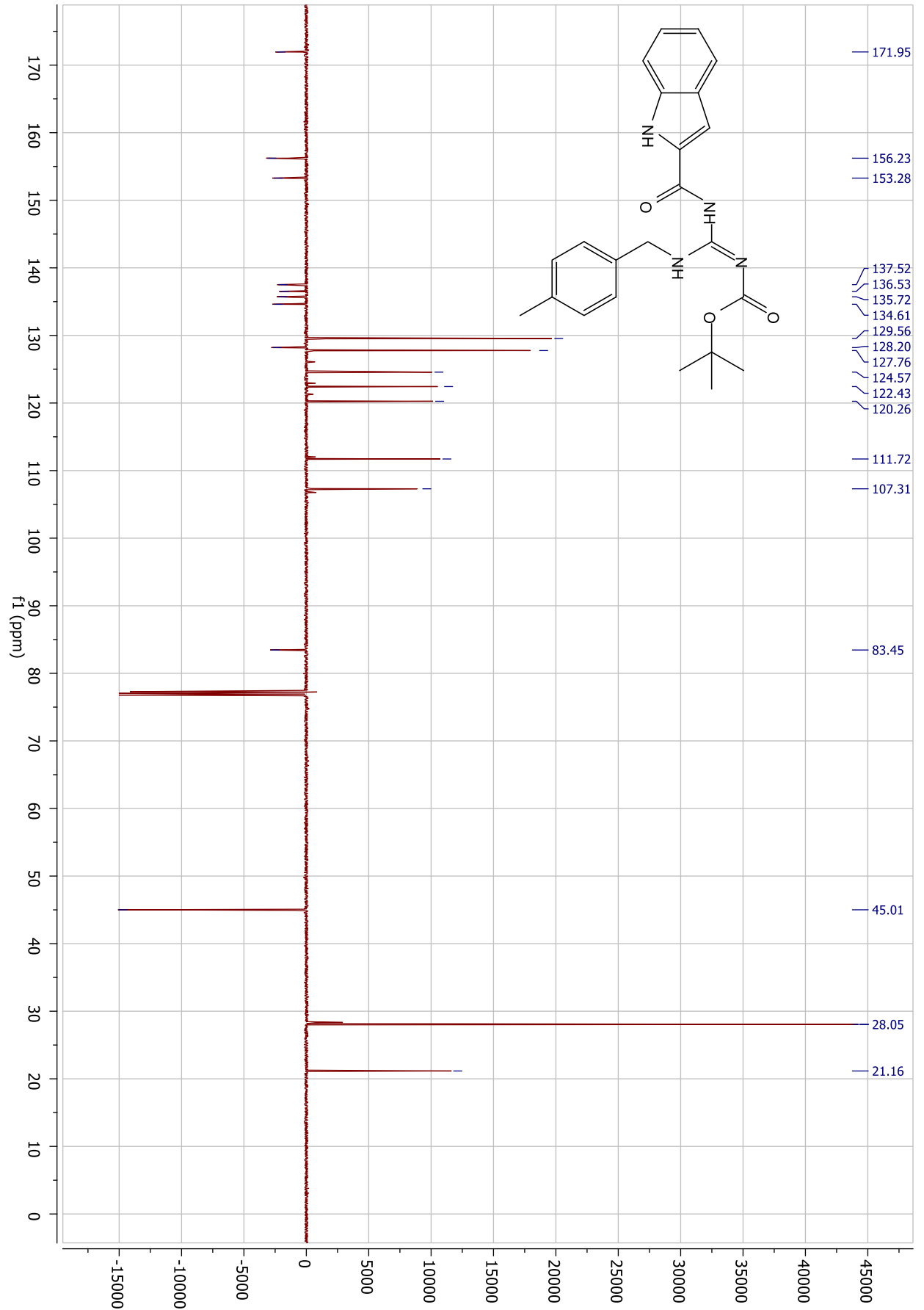
Anexo 10: Espectro de RMN  $^1\text{H}$  do composto (38d) em  $\text{CDCl}_3$  a 500 MHz



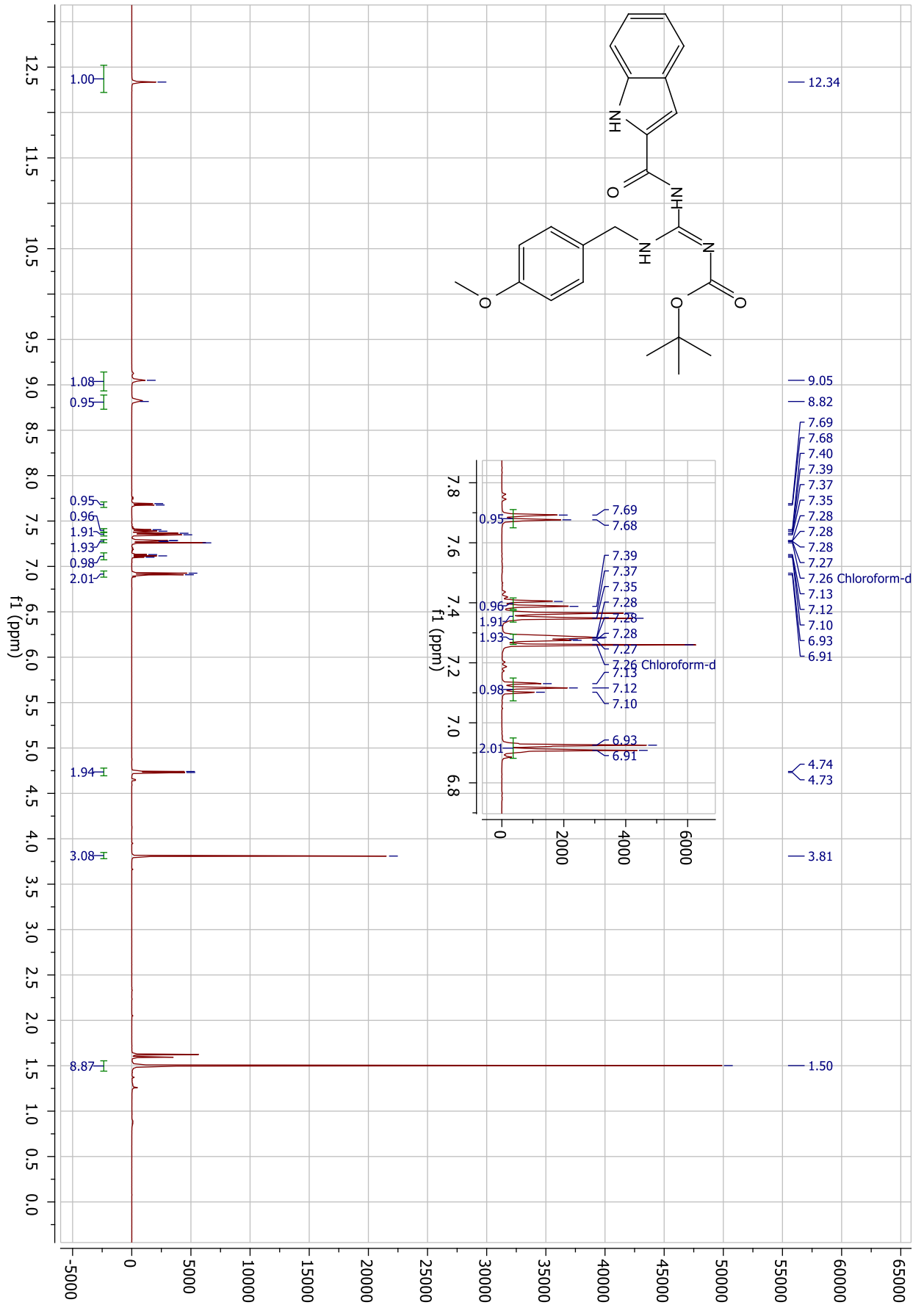
Anexo 11: Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  do composto (38d) em  $\text{CDCl}_3$  a 500 MHz

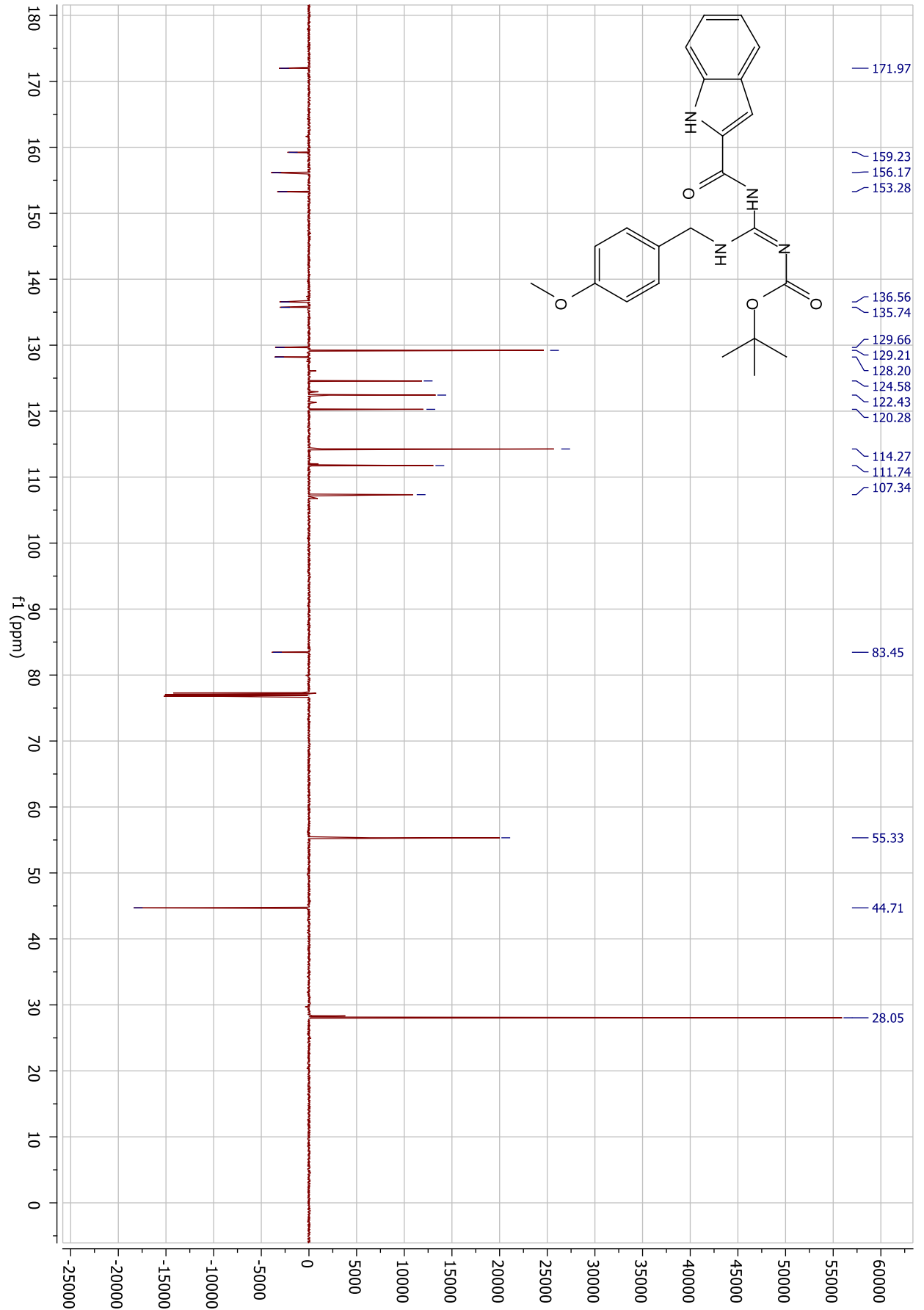
Anexo 12: Espectro de RMN  $^1\text{H}$  do composto (38e) em  $\text{CDCl}_3$  a 500 MHz



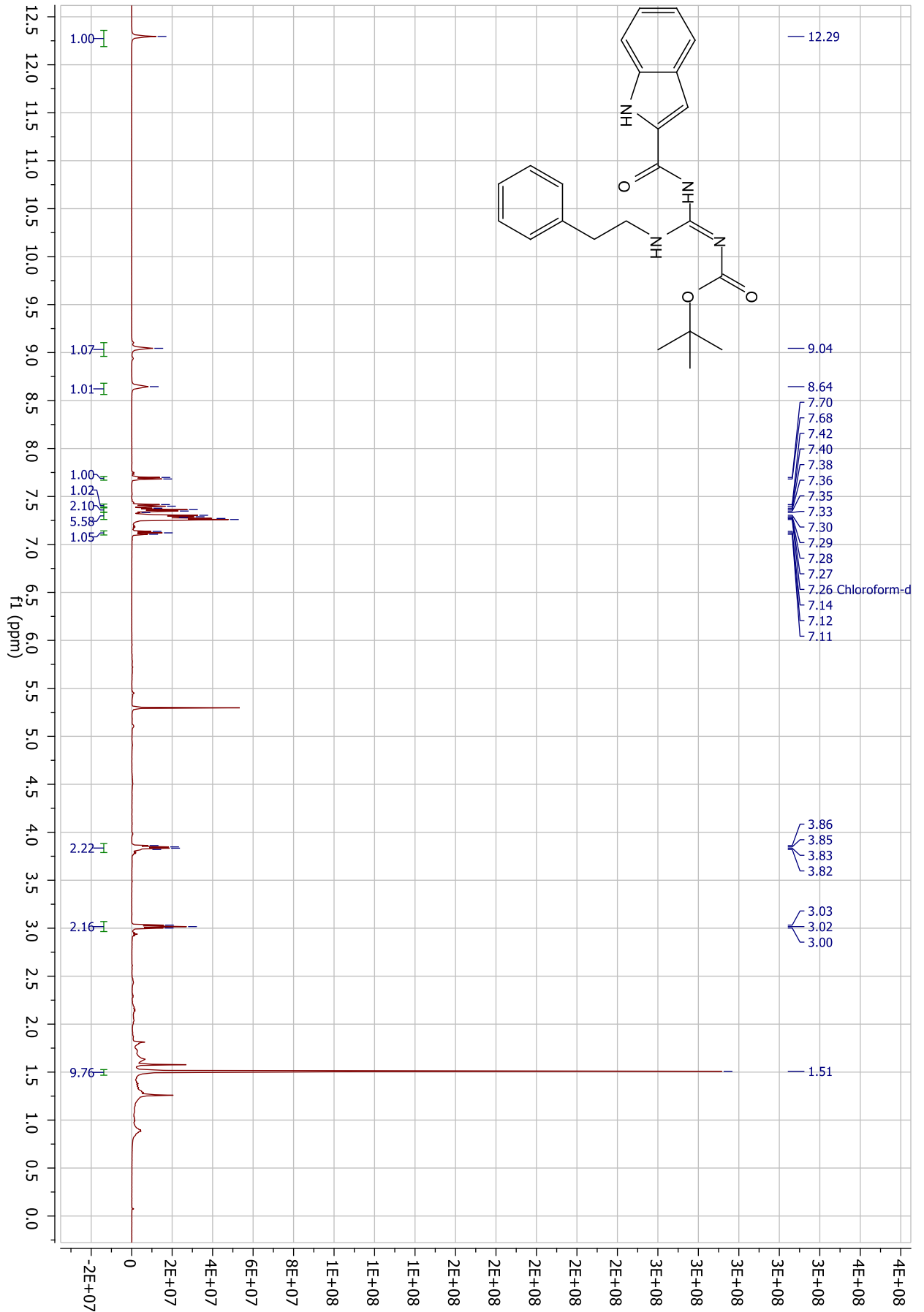
Anexo 13: Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  do composto (38e) em  $\text{CDCl}_3$  a 500 MHz

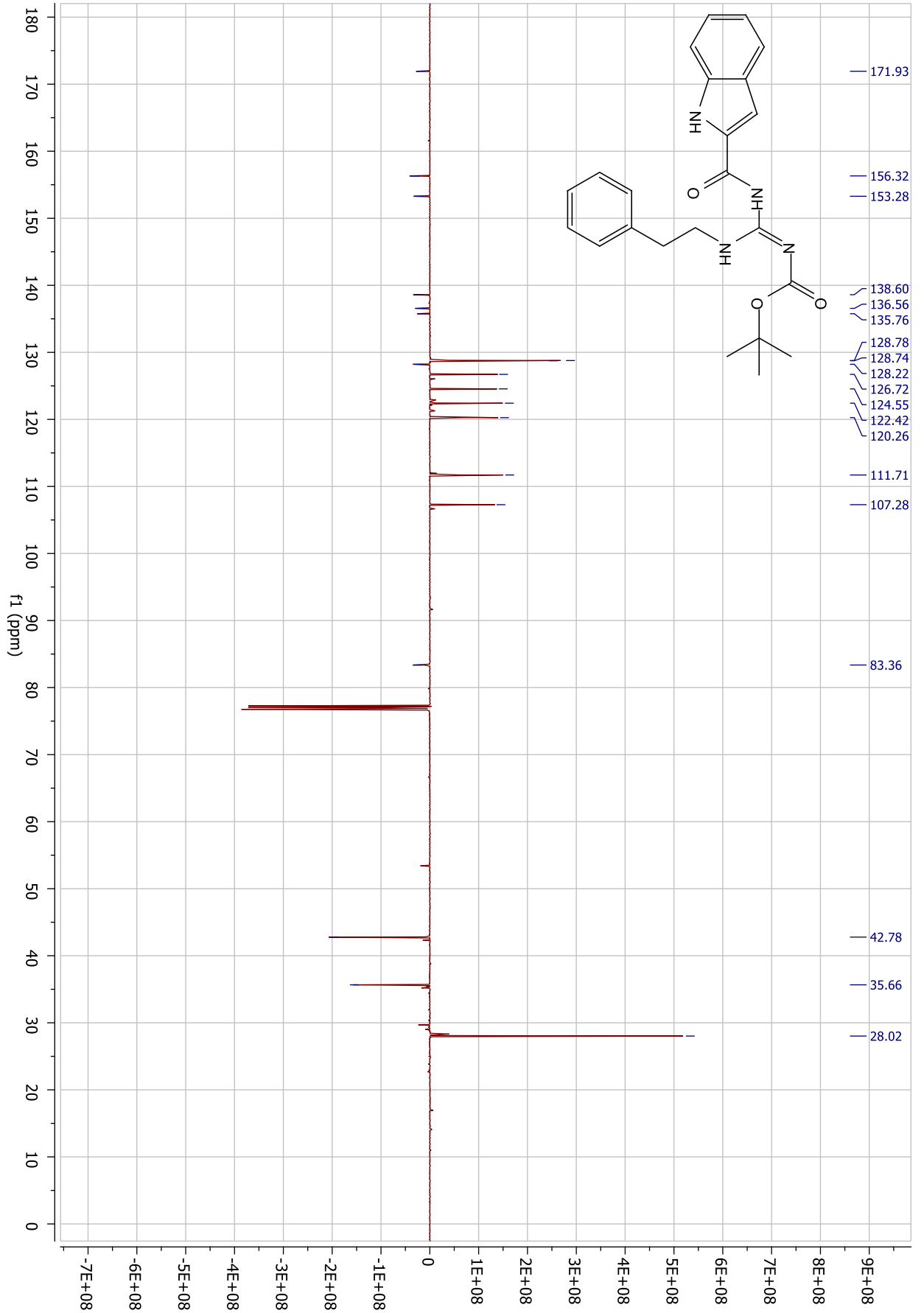
Anexo 14: Espectro de RMN <sup>1</sup>H do composto (38f) em CDCl<sub>3</sub> a 500 MHz



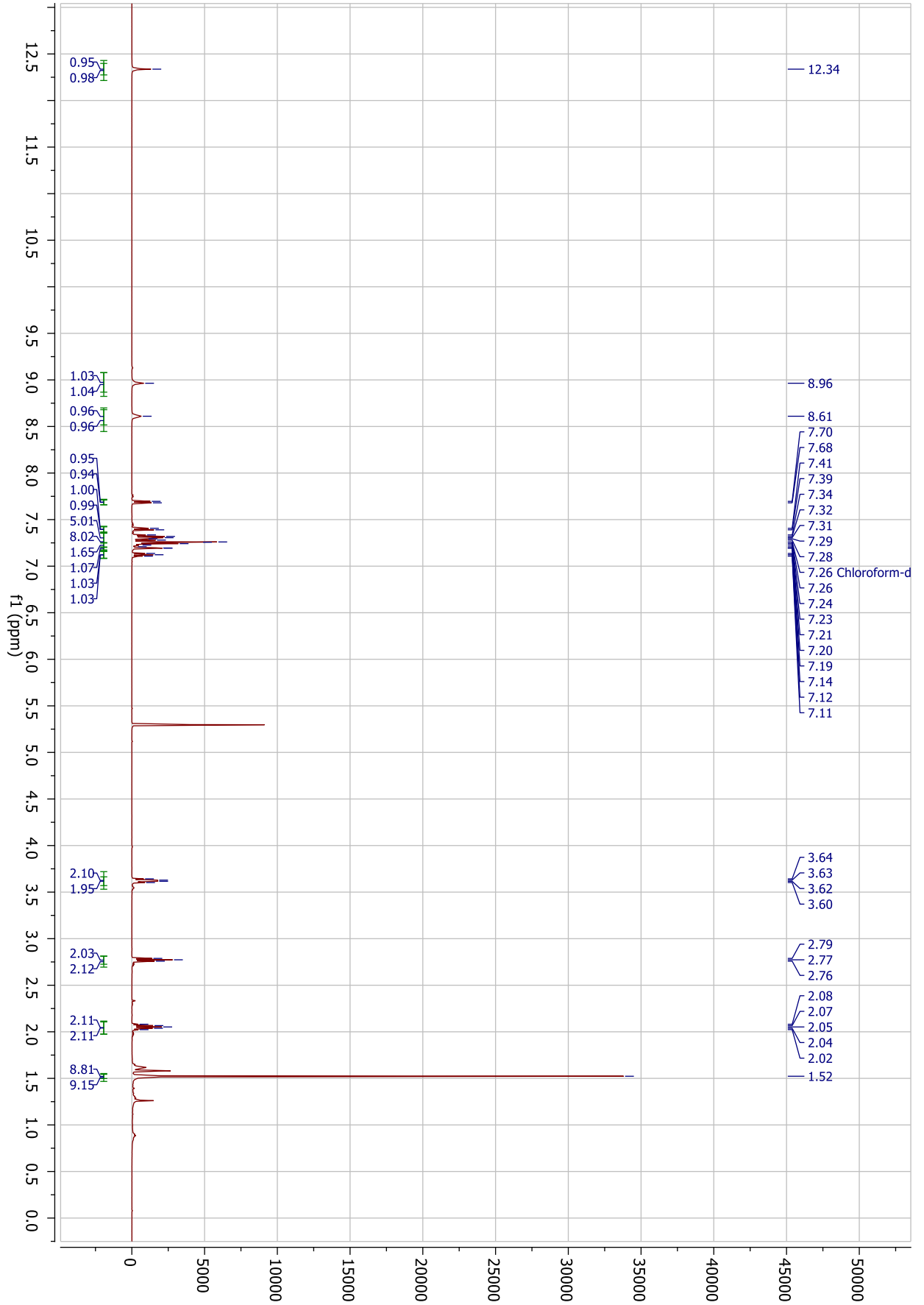
Anexo 15: Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  do composto (38f) em  $\text{CDCl}_3$  a 500 MHz

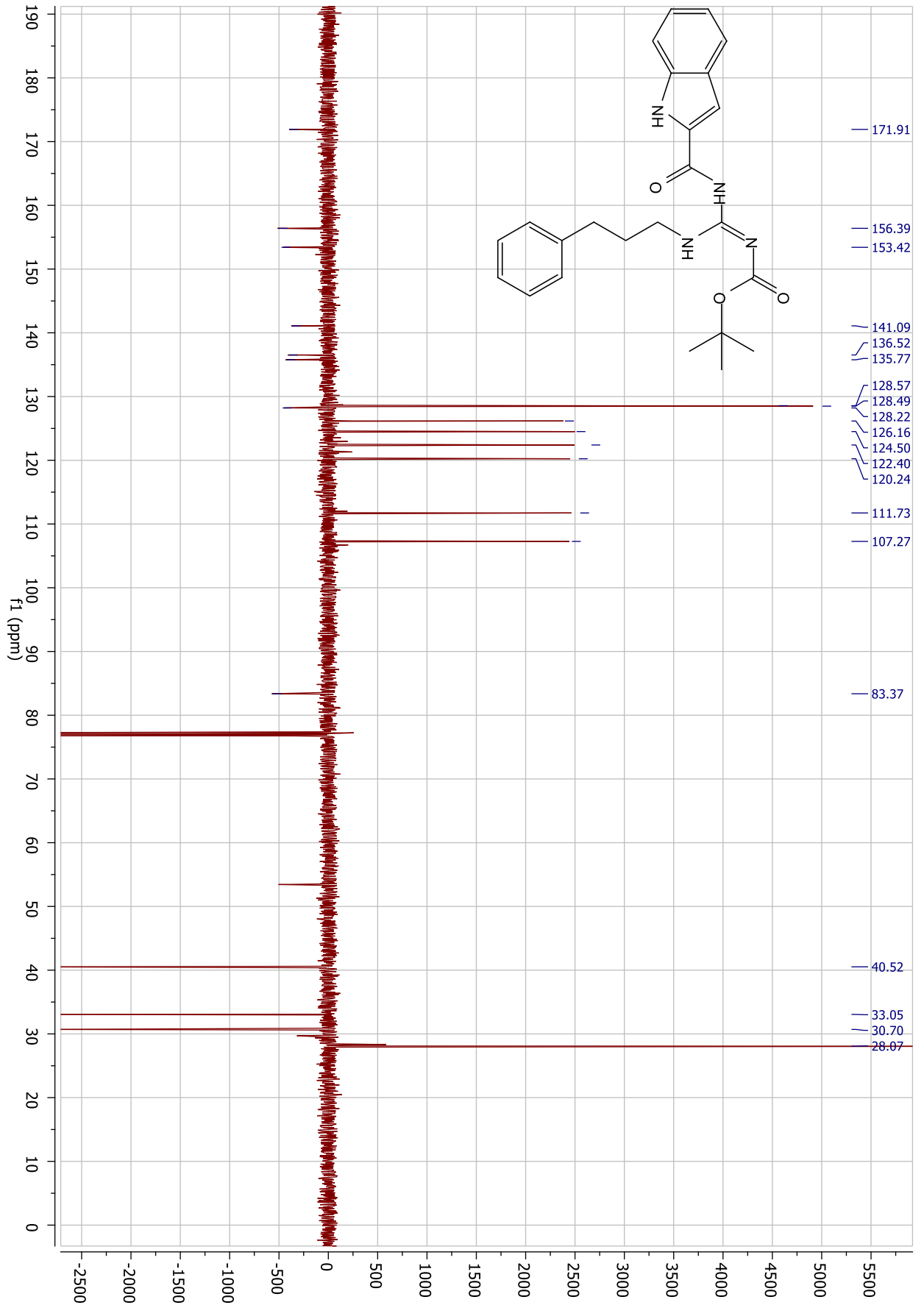
Anexo 16: Espectro de RMN  $^1\text{H}$  do composto (38g) em  $\text{CDCl}_3$  a 500 MHz



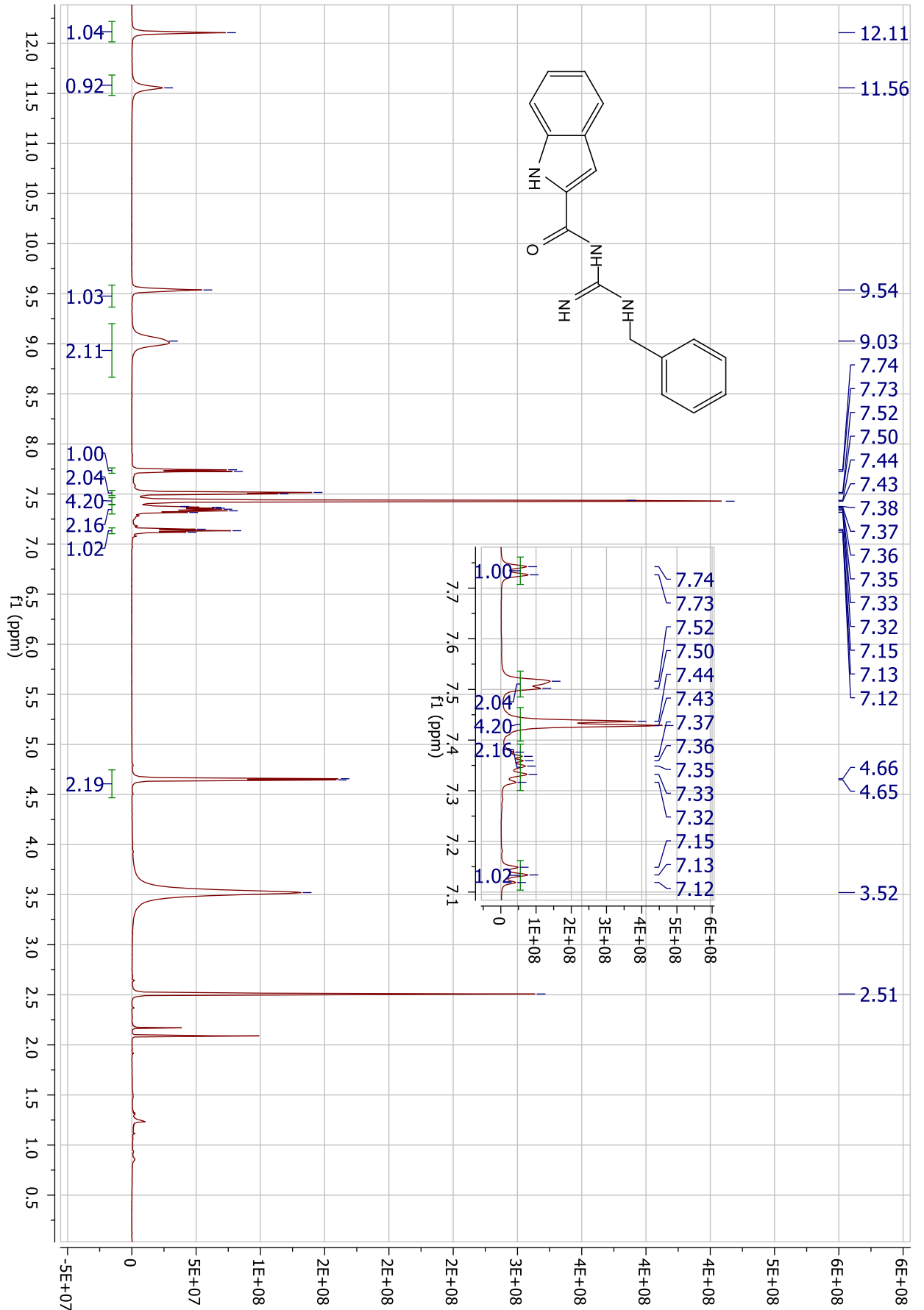
Anexo 17: Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  do composto (38g) em  $\text{CDCl}_3$  a 500 MHz

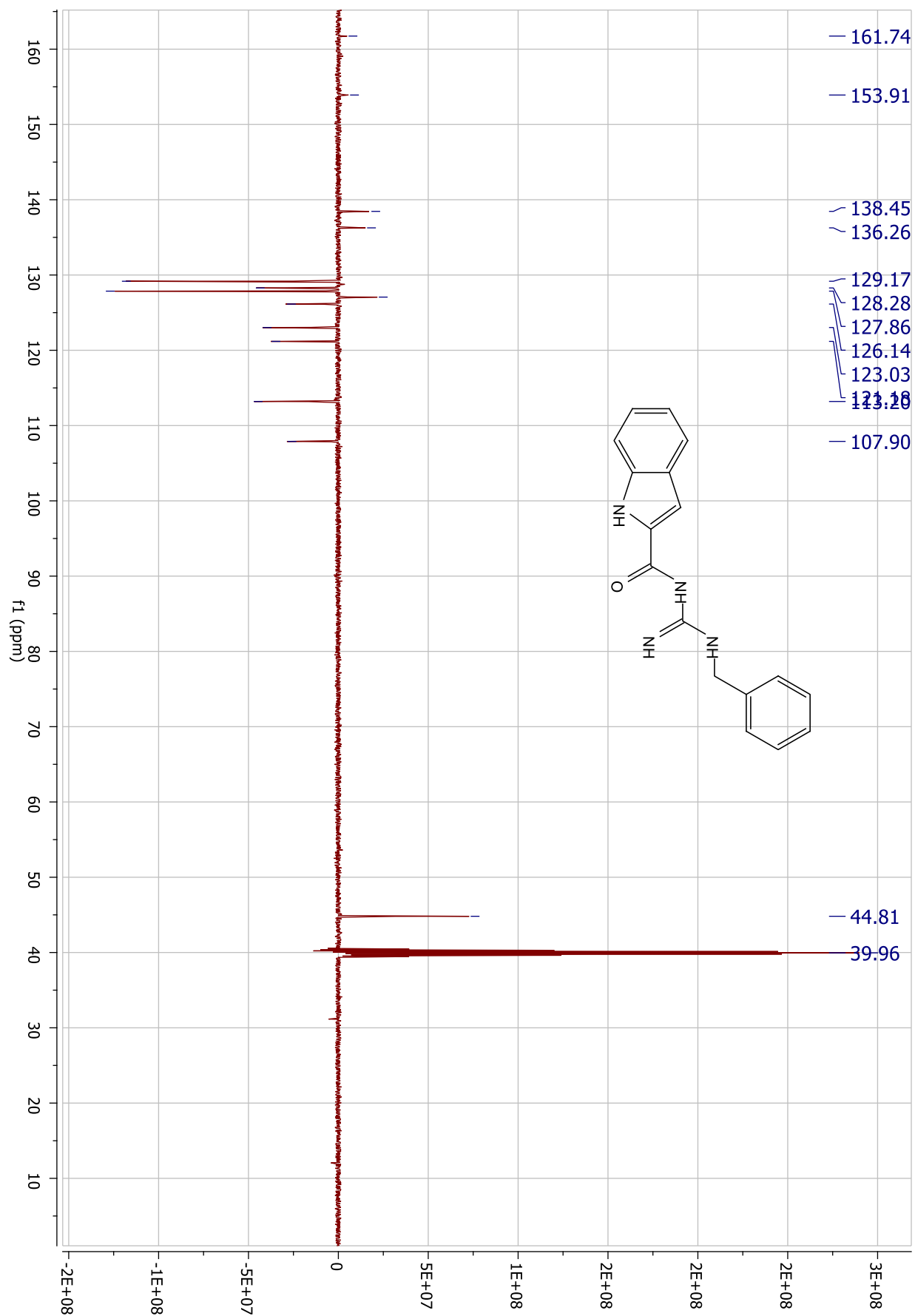


Anexo 18: Espectro de RMN  $^1\text{H}$  do composto (38h) em  $\text{CDCl}_3$  a 500 MHz

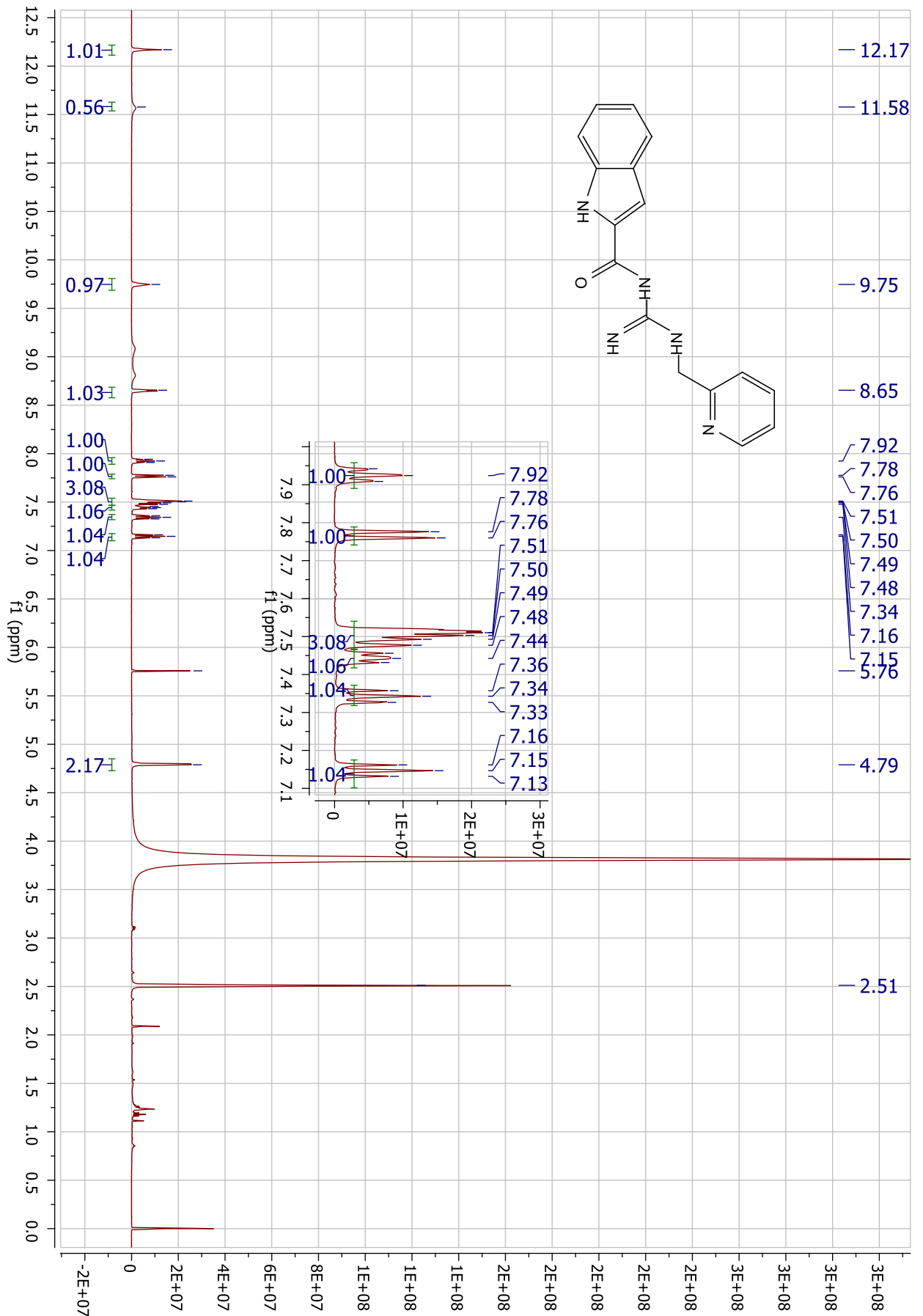
Anexo 19: Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  do composto (38h) em  $\text{CDCl}_3$  a 500 MHz

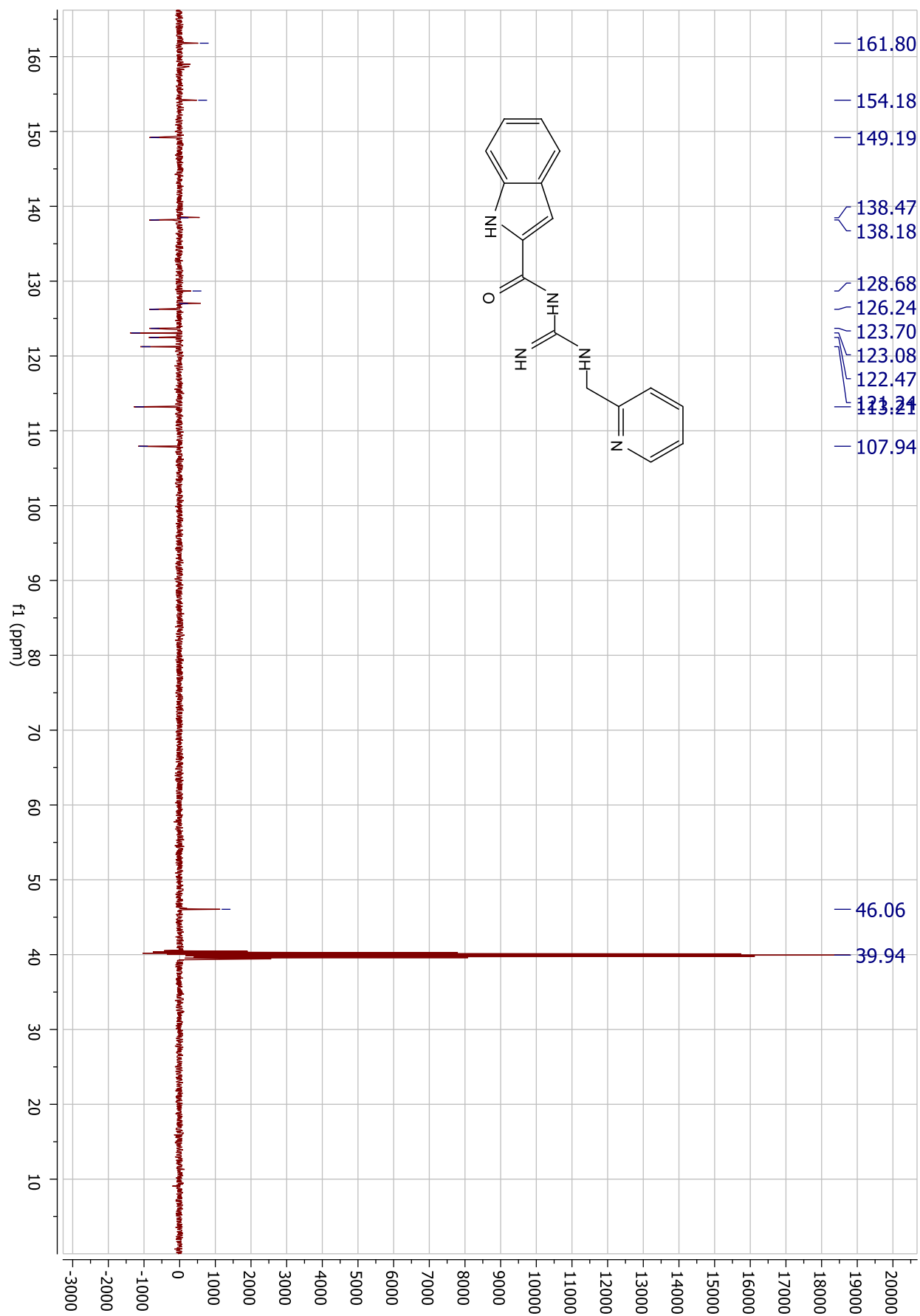
Anexo 20: Espectro de RMN  $^1\text{H}$  do composto (30a) em DMSO- $d_6$  a 500 MHz



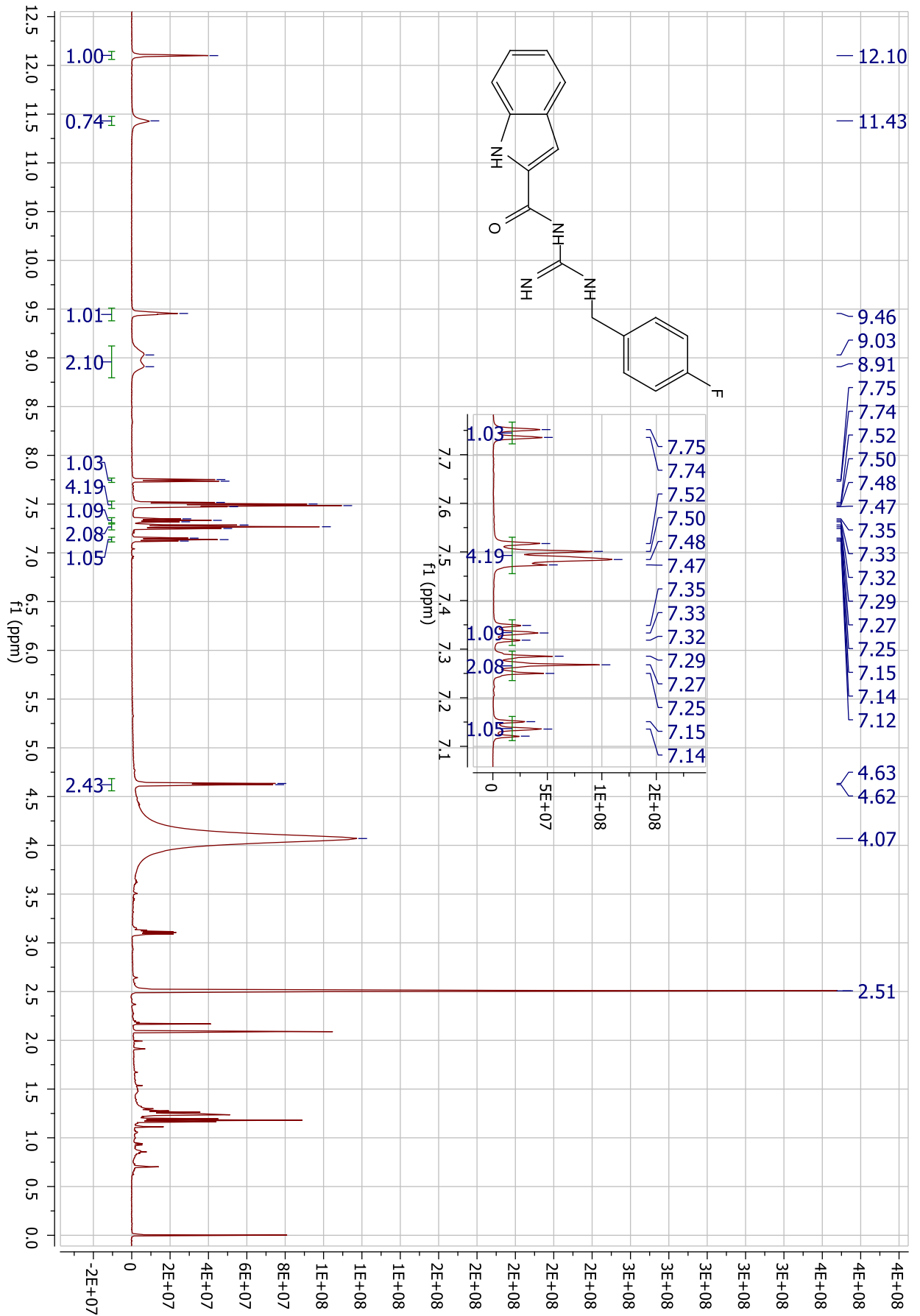
Anexo 21: Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  do composto (30a) em DMSO- $d_6$  a 500 MHz

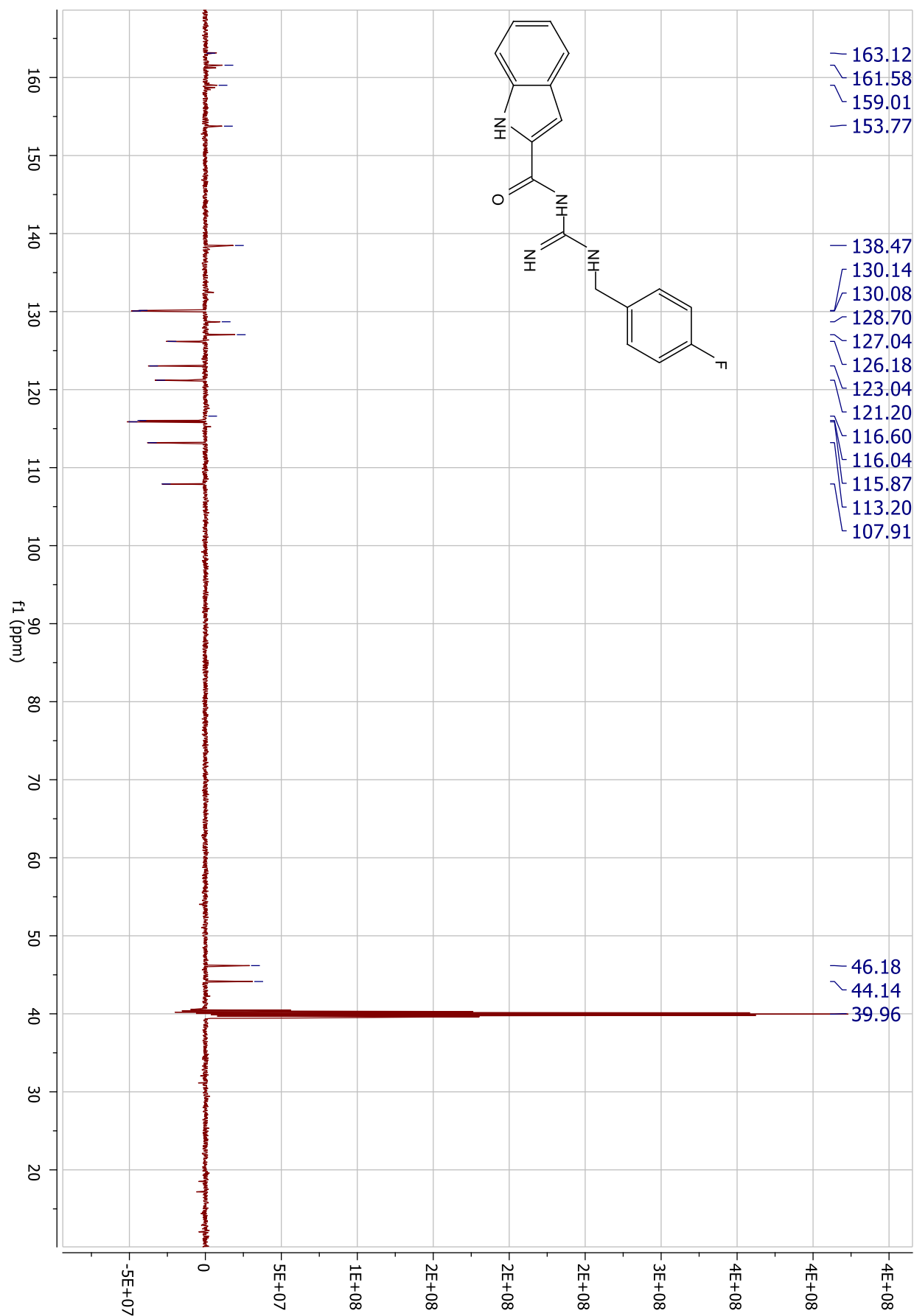
Anexo 22: Espectro de RMN  $^1\text{H}$  do composto (30b) em DMSO- $d_6$  a 500 MHz



Anexo 23: Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  do composto (30b) em DMSO-d<sub>6</sub> a 500 MHz

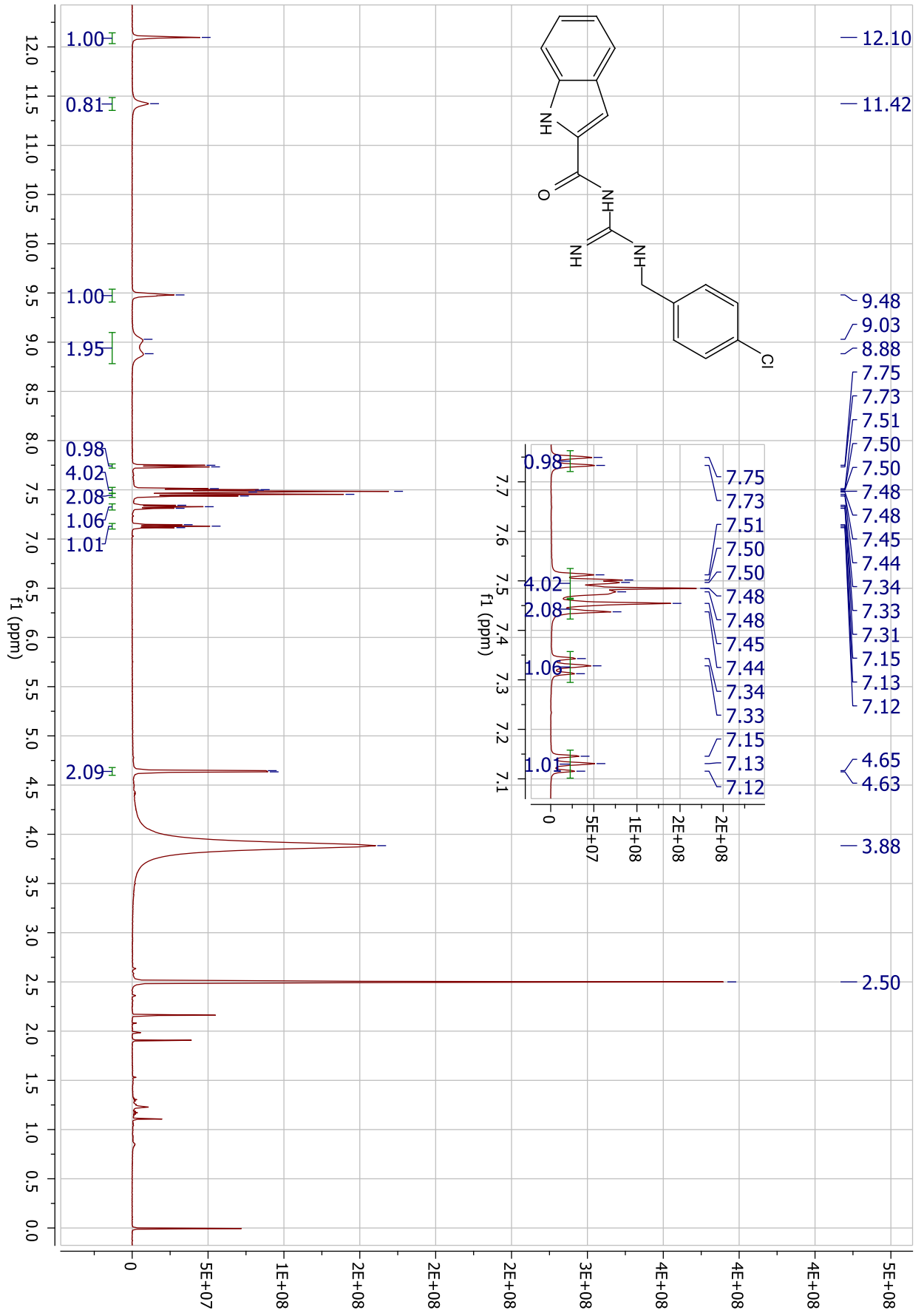
Anexo 24: Espectro de RMN  $^1\text{H}$  do composto (30c) em DMSO- $d_6$  a 500 MHz

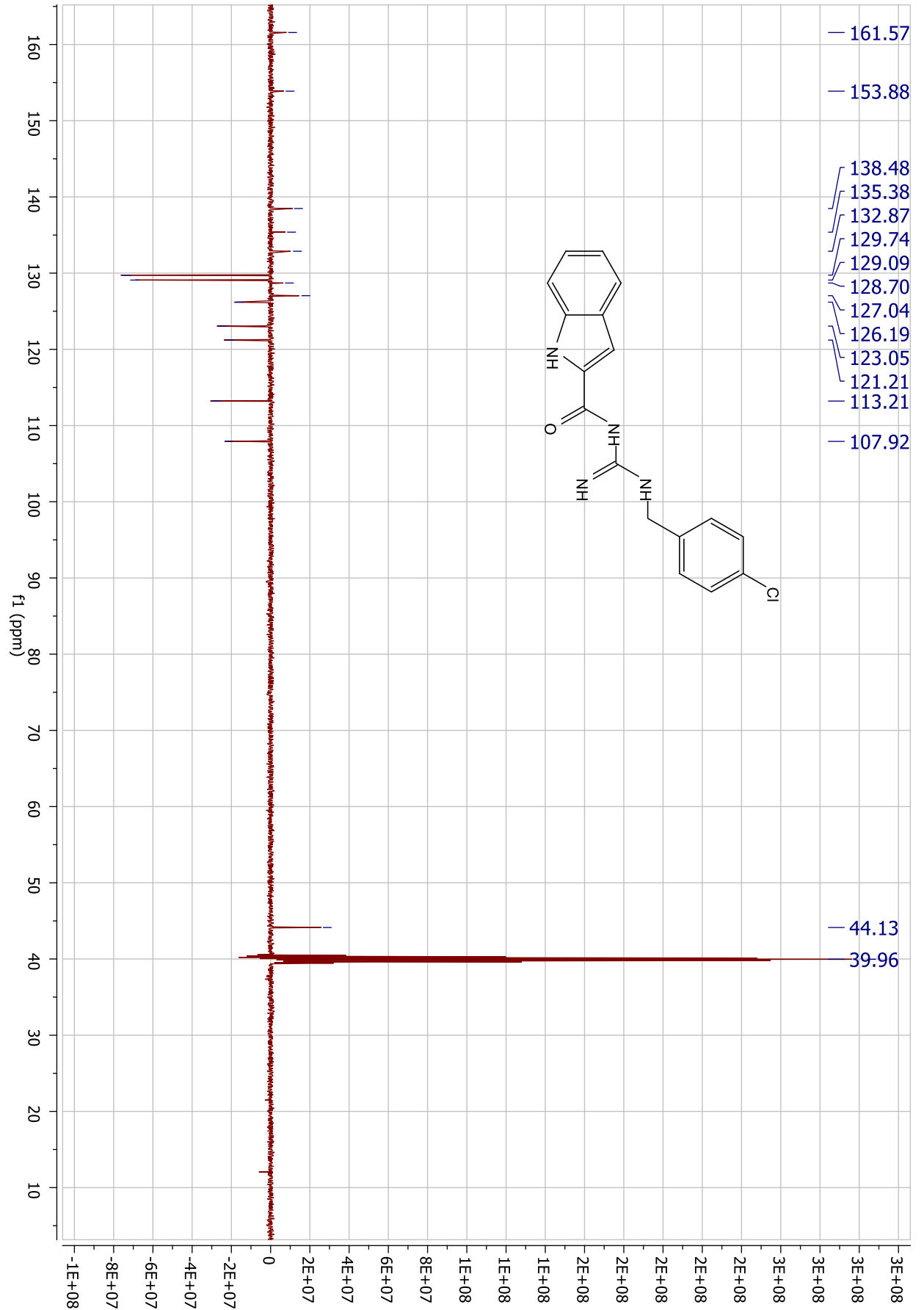


Anexo 25: Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  do composto (30c) em DMSO- $d_6$  a 500 MHz

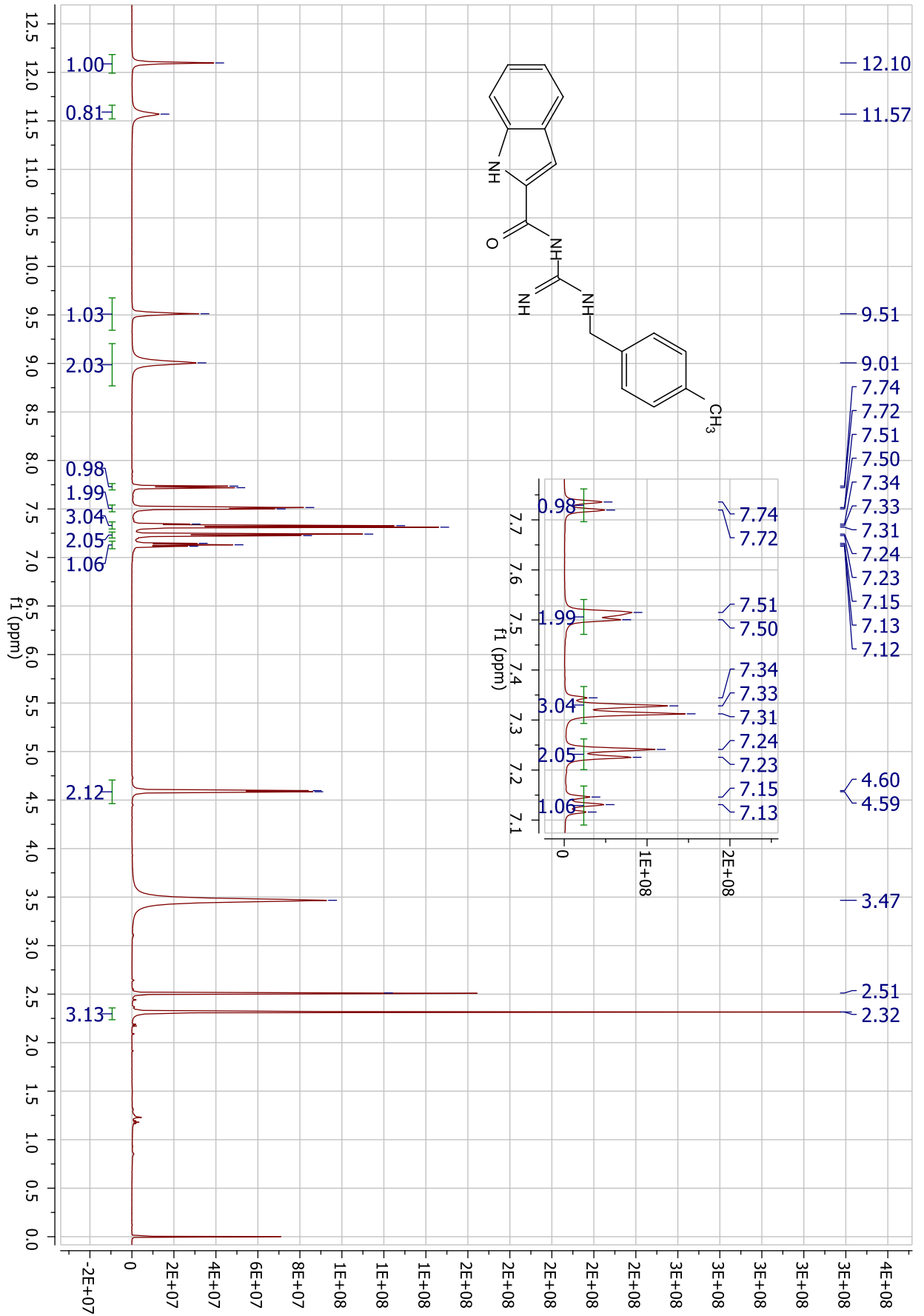


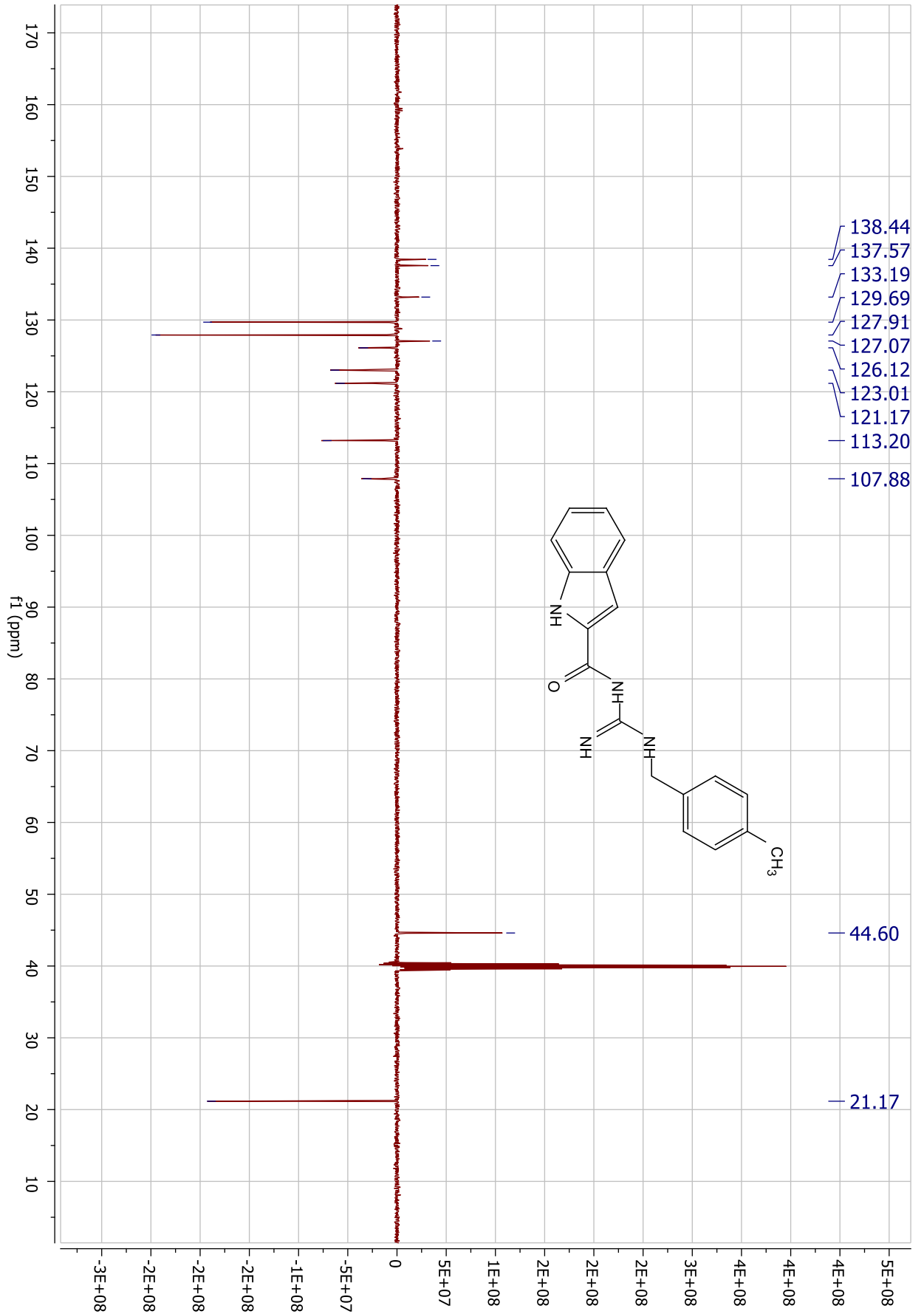
Anexo 26: Espectro de RMN  $^1\text{H}$  do composto (30d) em DMSO- $d_6$  a 500 MHz



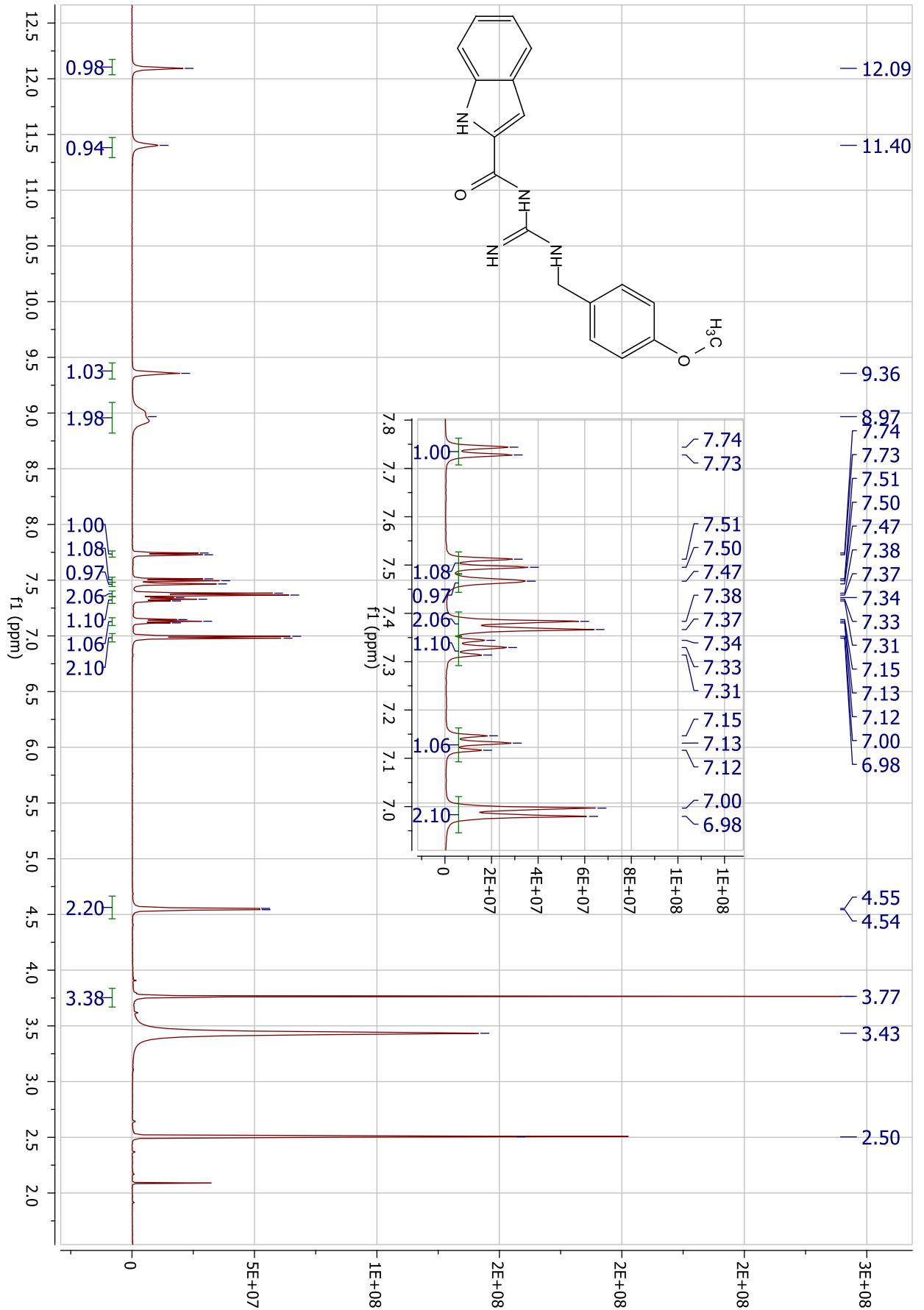
Anexo 27: Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  do composto (30d) em DMSO-d<sub>6</sub> a 500 MHz

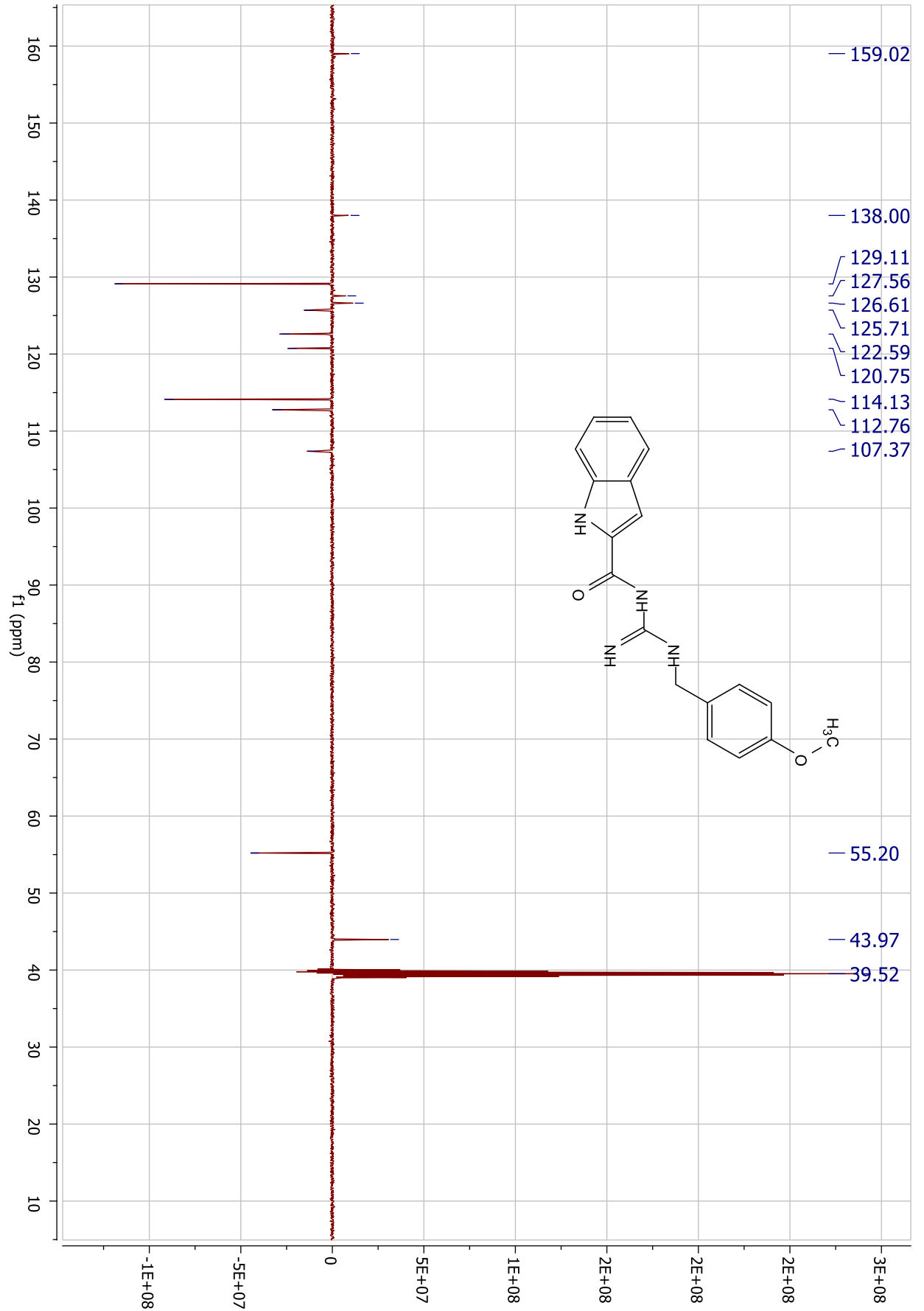
Anexo 28: Espectro de RMN  $^1\text{H}$  do composto (30e) em DMSO- $d_6$  a 500 MHz

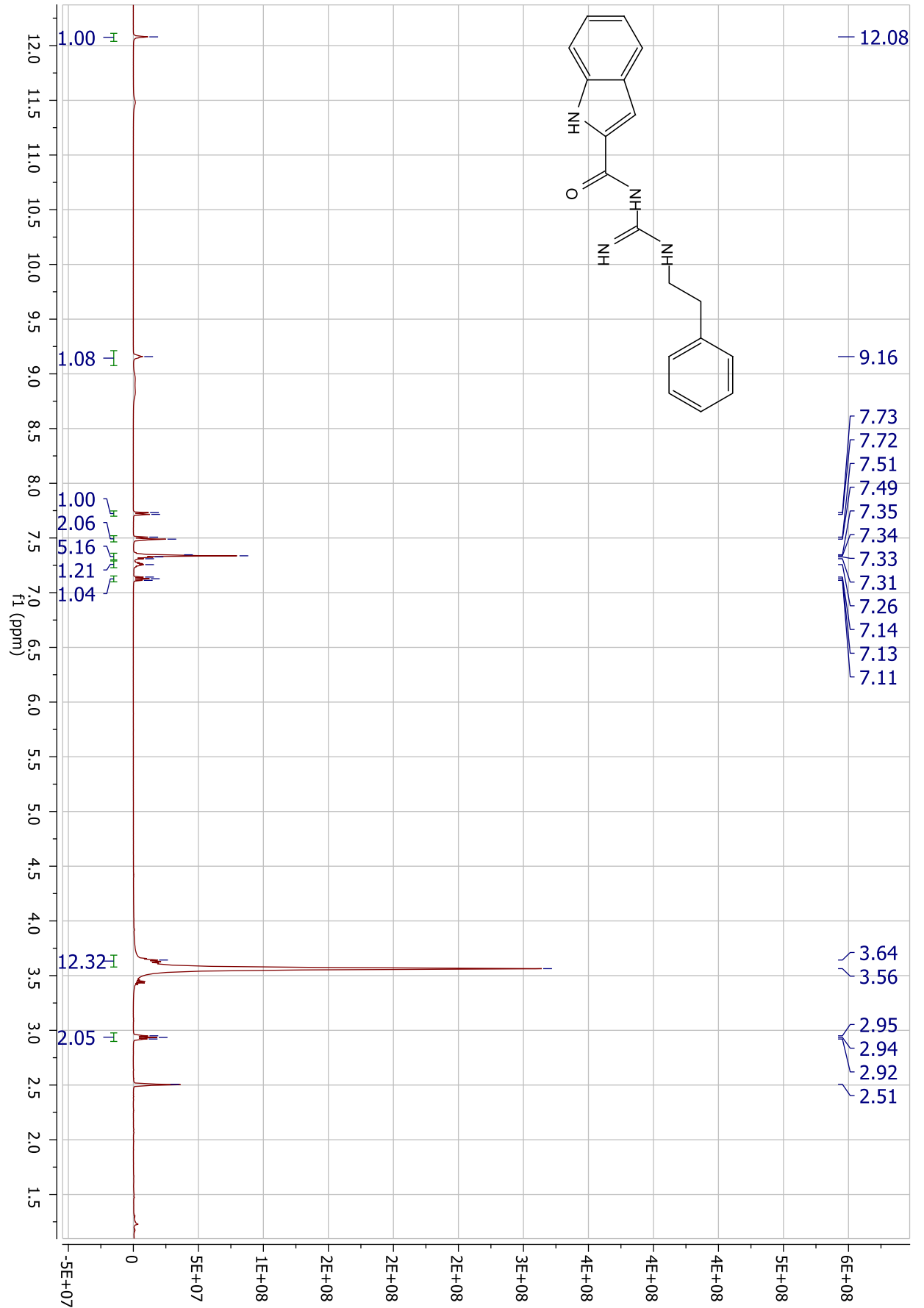


Anexo 29: Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  do composto (30e) em DMSO-d<sub>6</sub> a 500 MHz

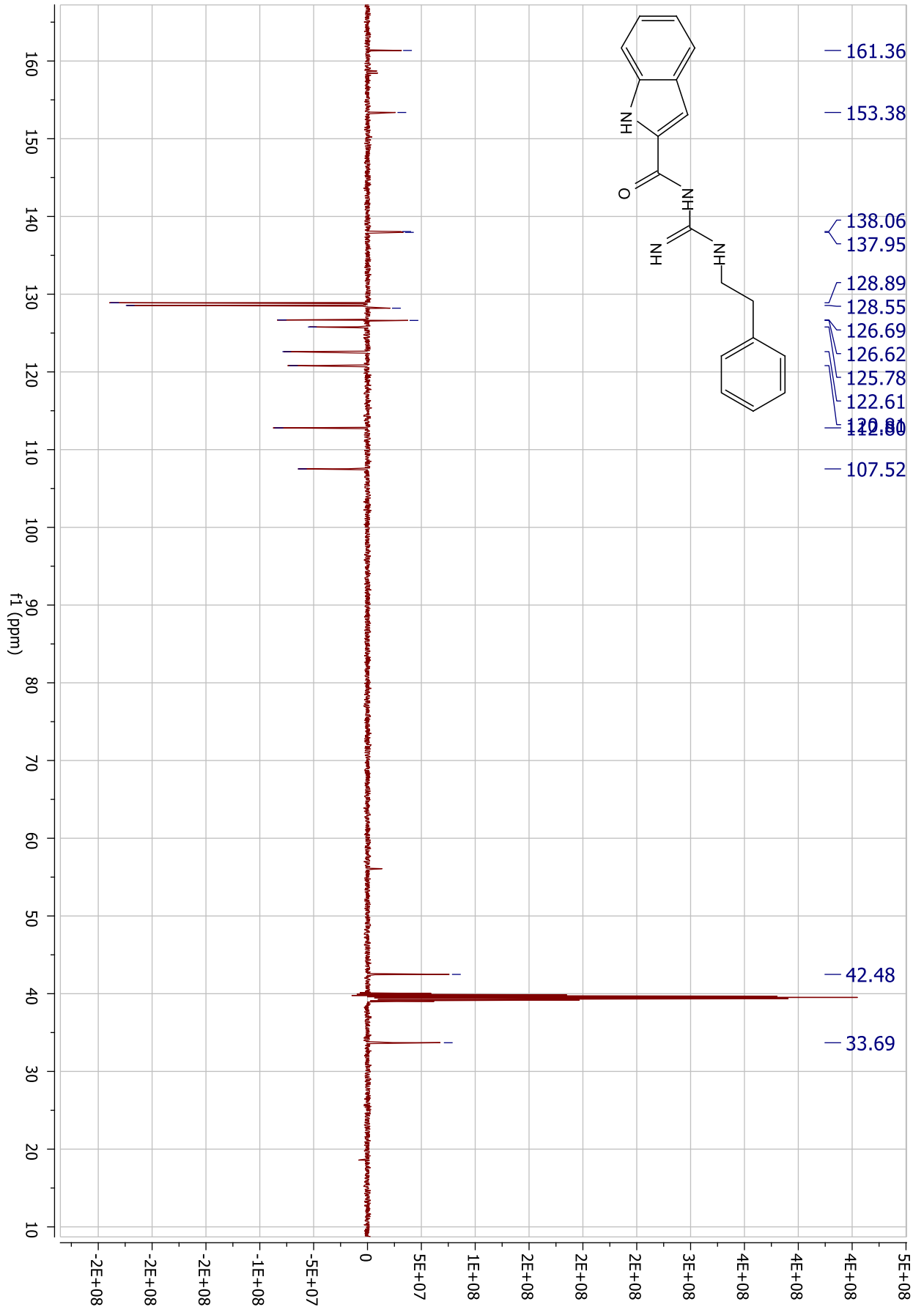
Anexo 30: Espectro de RMN  $^1\text{H}$  do composto (30f) em DMSO-d<sub>6</sub> a 500 MHz



Anexo 31: Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  do composto (30f) em DMSO-d<sub>6</sub> a 500 MHz

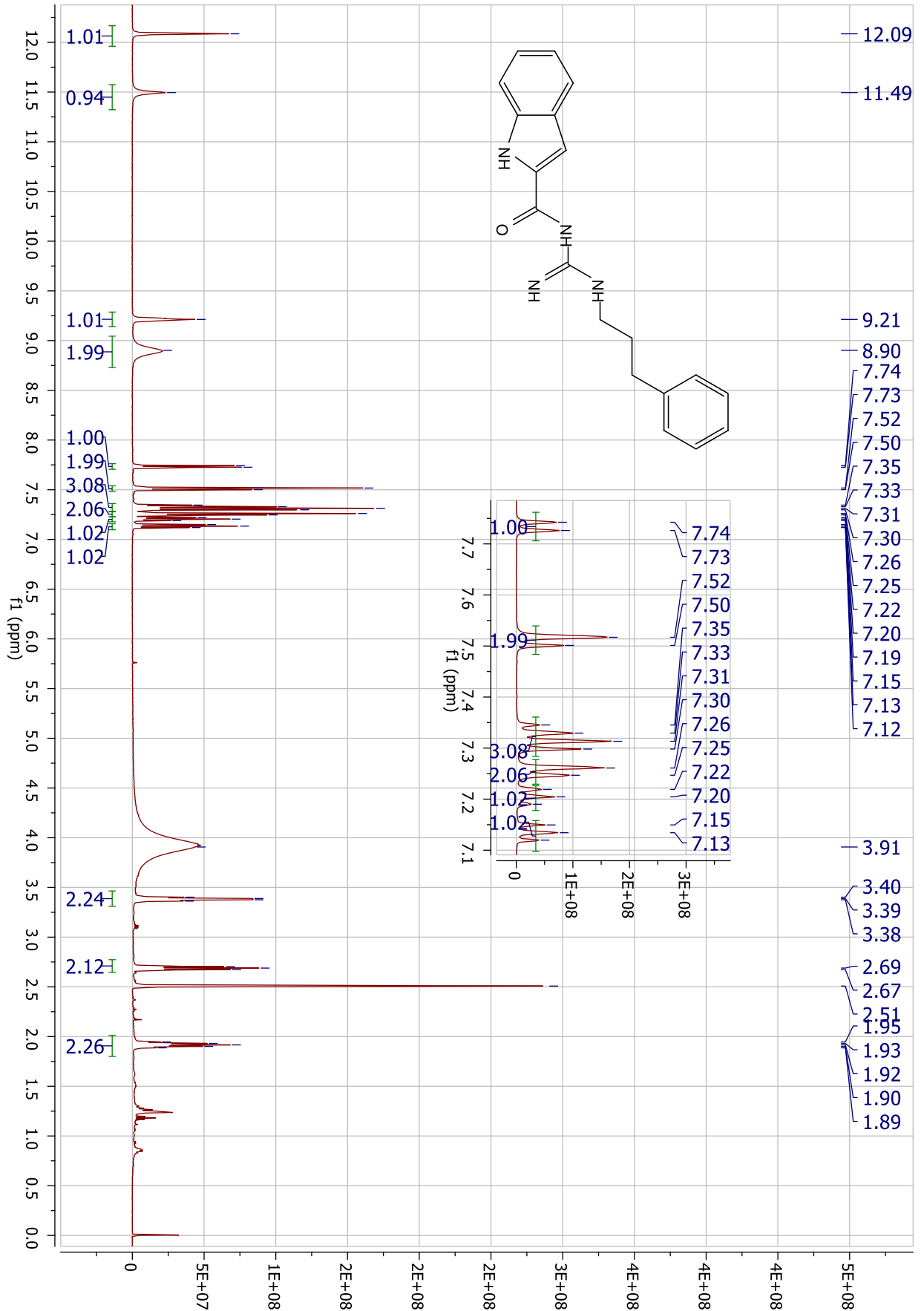
Anexo 32: Espectro de RMN  $^1\text{H}$  do composto (30g) em DMSO- $d_6$  a 500 MHz

Anexo 33: Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  do composto (30g) em DMSO- $d_6$  a 500 MHz





Anexo 34: Espectro de RMN  $^1\text{H}$  do composto (30h) em DMSO- $d_6$  a 500 MHz



Anexo 35: Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  do composto (30h) em DMSO-d<sub>6</sub> a 500 MHz