



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ**

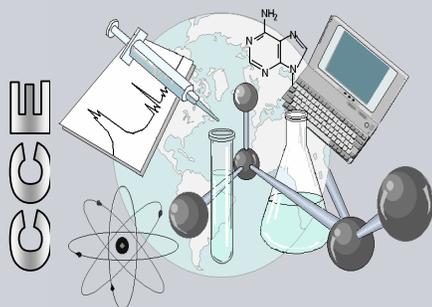
**CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS**

**DEPARTAMENTO DE QUÍMICA**

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA**

*Síntese, Modelagem Molecular e Avaliação da  
Atividade Farmacológica de  
N,N-dimetilcarbamatos de cicloexila  
2-fenilaminossustituídos*

Dissertação apresentada por  
**Mariane Cristovão Bagatin** ao  
Programa de Pós-Graduação em  
Química do Departamento de Química do  
Centro de Ciências Exatas da  
Universidade Estadual de Maringá como  
parte dos requisitos para a obtenção do  
título de Mestre em Química



**Centro de  
Ciências Exatas**

**MARINGÁ, MARÇO/2013**



Universidade Estadual de Maringá  
Centro de Ciências Exatas  
Programa de Pós-Graduação em Química

*Síntese, Modelagem Molecular e Avaliação da  
Atividade Farmacológica de N,N-dimetilcarbamatos de  
cicloexila 2-fenilaminossustituídos*

***Mestranda:*** Mariane Cristovão Bagatin

***Orientadora:*** Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Gisele de Freitas Gauze Bandoch



Maringá, Março de 2013.

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)  
(Biblioteca Central - UEM, Maringá – PR., Brasil)

B144s Bagatin, Mariane Cristovão  
Síntese, modelagem molecular e avaliação da  
atividade farmacológica de N,N-dimetilcarbamatos de  
cicloexila 2-fenilaminossustituídos/ Mariane  
Cristovão Bagatin. -- Maringá, 2013.  
121 f. : il., figs., tabs.

Orientadora: Prof.a. Dr.a. Gisele de Freitas  
Gauze Bandoch.  
Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual de  
Maringá, Centro de Ciências Exatas, Programa de Pós-  
Graduação em Química, 2013.

1. Carbamatos. 2. Doença de Alzheimer. 3.  
Anticolinesterásicos. 4. Modelagem molecular. I.  
Bandoch, Gisele de Freitas Gauze, orient. II.  
Universidade Estadual de Maringá. Centro de Ciências  
Exatas. Programa de Pós-Graduação em Química. III.  
Título.

CDD 22. ED. 547.1

JLM-001027



**Universidade Estadual de Maringá**

Centro de Ciências Exatas  
Departamento de Química  
Programa de Pós-Graduação em Química

Este é o exemplar definitivo da Dissertação apresentada por **Mariane Cristovão Bagatin**, perante a Comissão Julgadora do Programa de Pós-Graduação em Química em 25 de março de 2013.

**COMISSÃO JULGADORA:**

Profa. Dra. Gisele de Freitas Gauze Bandoch  
Presidente - DQI/UEM

Profa. Dra. Maria Helena Sarragiotto  
Membro - DQI/UEM

Prof. Dr. Paulo Roberto de Oliveira  
Membro - UTFPR

A tarefa não é ver aquilo que ninguém viu,  
mas pensar o que ninguém pensou  
sobre aquilo que todo mundo vê.

*Arthur Schopenhauer*

*Á minha família, pelo total apoio  
em todas as minhas decisões, e ao Eduardo  
pelo carinho, companhia e compreensão.  
Dedico esta dissertação.*

## AGRADECIMENTOS

- A Deus por toda força e fé ao longo dessa caminhada.
- A minha família pelo apoio, incentivo e por sempre acreditarem em mim.
- Ao Eduardo pelo amor, carinho, e apoio em todos os momentos.
- A Prof. Gisele pela orientação e dedicação, por todos os ensinamentos e principalmente pela amizade.
- Ao Prof. Ernani pela orientação e auxílio desde o início.
- A todos os integrantes do grupo ECO<sup>DM</sup> pelo convívio e parceria, especialmente ao Augusto pela ajuda com as sínteses, ao Thiago e ao Ulisses pela ajuda com os computadores e cálculos.
- A Ivânia e a Ana pelas análises de RMN.
- Aos professores do DQI pelos ensinamentos.
- Ao CNPQ pela bolsa de mestrado.

## RESUMO

### Síntese, Modelagem Molecular e Avaliação da Atividade Farmacológica de N,N-dimetilcarbamatos de cicloexila 2-fenilaminossustituídos

*Palavras Chave:* carbamatos, doença de Alzheimer, anticolinesterásicos, modelagem molecular.

O presente trabalho reporta a síntese e a avaliação teórico-experimental das séries inéditas de isômeros *cis* e *trans* N,N-dimetilcarbamatos de cicloexila 2-fenilaminossustituídos como potenciais inibidores de colinesterases. Primeiramente realizou-se a síntese e purificação dos compostos com os seguintes substituintes: anilina, *p*-metoxianilina, *p*-fluoranilina e *p*-nitroanilina. Para cada série de isômeros foram utilizadas diferentes metodologias descritas na literatura. Os produtos foram caracterizados através das análises espectroscópicas de RMN de  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  e HSQC, e medidas do ponto de fusão.

Para determinar a preferência conformacional dos carbamatos *cis* e *trans* foram realizados cálculos computacionais utilizando o pacote de programa Gaussian09. Primeiramente foram realizados cálculos de superfície de energia potencial com nível de teoria HF/6-31G, seguido por cálculos de otimização e frequência com B3LYP/6-311++G(d,p) e cálculos de NBO (versão 5.0) com nível de teoria B3LYP/6-311++G(d,p). Para os carbamatos *trans* foram observadas duas conformações uma com ambos os substituintes na axial (**aa**) e outra com ambos os substituintes na equatorial (**ee**), sendo que esta é responsável por mais de 97% da população no equilíbrio. Em relação aos carbamatos *cis*, observou-se dois possíveis rotâmeros com o grupo carbamato na equatorial e o grupo fenilamino na axial (**ea1** e **ea2**); e outros dois com o grupo carbamato na axial e o grupo fenilamino na equatorial (**ae1** e **ae2**), sendo que estes apresentaram a menor energia e são responsáveis por mais de 80% da população no equilíbrio. Os valores de  $^3J_{\text{HH}}$  obtidos a partir dos espectros de RMN de  $^1\text{H}$  são concordantes com os cálculos teóricos.

Para determinar a potencial atividade anticolinesterásica dos compostos obtidos neste trabalho, foram realizados os ensaios enzimáticos utilizando o Método de Ellman modificado. De modo geral, os testes mostraram que a isômeria *cis-trans* não influencia de forma significativa a atividade destes compostos, no entanto, a presença dos substituintes doadores e retirados na posição *para* do anel aromático, pode aumentar ou diminuir a atividade do composto, dependendo da série analisada.

O cloridrato de *cis-N,N*-dimetilcarbamato de 2-fenilaminocicloexila (**8a**) apresentou inibição significativa na atividade da enzima AChE (IC<sub>50</sub> de 59,2 mmol/L) e uma elevada inibição na atividade da enzima BuChE (IC<sub>50</sub> 6,0 mmol/L), sendo este o derivado com maior potencial farmacológico para o combate da doença de Alzheimer.

Finalmente, para analisar a seletividade dos compostos frente à enzima butirilcolinesterase, foram realizados cálculos de *docking* molecular de forma a determinar as interações existentes. Os cálculos mostraram que os compostos interagem de forma mais efetiva com o sítio ativo da enzima BuChE, onde o grupo carbamato está próximo aos resíduos chave da tríade catalítica.

## ABSTRACT

### Synthesis, Molecular Modeling and Evaluation of Pharmacological Activity of *N,N*-dimethylcarbamates of 2-phenylaminecyclohexyl

*Keywords: carbamates, Alzheimer's disease, cholinesterase inhibitors, molecular modeling.*

This work reports the synthesis and theoretical-experimental evaluation of novel series of *cis* and *trans* *N,N*-dimethylcarbamates of 2-phenylaminecyclohexyl as potential cholinesterase inhibitors. Firstly, were performed the synthesis and purification of the compounds with the following substituents: aniline, *p*-methoxyaniline, *p*-fluoranylina and *p*-nitroaniline. For each series of isomers were utilized different methodologies described in the literature. The products were characterized by NMR spectroscopic analysis of  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  and HSQC, and melting point measurements.

To determine the conformational preference of *cis* and *trans* carbamates were performed theoretical calculations using the software package Gaussian09. First were performed calculations of potential energy surface with HF/6-31G level of theory, followed by optimization and frequency calculations with B3LYP/6-311++G(d, p) and NBO calculations were performed (version 5.0) with level of theory B3LYP/6-311++G(d, p). For the *trans* carbamates were observed two conformations one with both substituents in axial (**aa**) and other with both substituents in equatorial (**ee**), and this accounts for over 97% of the equilibrium population. For the *cis* carbamates, were observed two possible rotamers with the carbamate group in the equatorial and the phenylamino group in axial (**ea1** and **ea2**) and two with the carbamate group in axial and the phenylamino group in equatorial (**ae1** and **ae2**), and they had the lowest energy and are responsible for over 80% of the population at equilibrium.  $^3J_{\text{HH}}$  values obtained from  $^1\text{H}$  NMR spectra are in agreement with theoretical calculations.

To determine the potential anticholinesterase activity of the compounds obtained in this study, enzymatic assays were performed using the modified Ellman's method. Generally, the test showed the *cis-trans* isomerism does not influence significantly the activity of these compounds, however, the presence of donating and withdrawing substituents at the *para* position of the aromatic ring may increase or decrease the activity of the compound, depending on the series analyzed.

The *cis*-*N,N*-dimethylcarbamate of 2-phenylaminecyclohexyl (**8a**) showed significant inhibition of the AChE enzyme activity ( $IC_{50}$  of 59,2  $\mu$ mol/L) and a high inhibition in BuChE enzyme activity ( $IC_{50}$  6,0  $\mu$ mol/L), and this derivative with greater pharmacological potential to combat Alzheimer's disease.

Finally, to examine the selectivity of compounds against the enzyme butyrylcholinesterase were realized docking calculations to determine the possible interactions. The calculation showed that compounds interact more effectively with the active site of enzyme BuChE, where the carbamate group is close to key residues of the catalytic triad.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Representação esquemática do sítio ativo da AChE.....	3
<b>Figura 2.</b> Representação do mecanismo de hidrólise da acetilcolina catalisado pela enzima AChE.....	4
<b>Figura 3.</b> Inibidores de colinesterases utilizados no tratamento sintomático da DA.....	5
<b>Figura 4.</b> Reações das colinesterases pelo método espectrofotométrico de Ellman.....	11
<b>Figura 5.</b> Ilustração da técnica de <i>docking</i> molecular.....	15
<b>Figura 6.</b> Estrutura das duas novas séries de derivados carbamatos <i>cis</i> e <i>trans-N,N</i> -dimetilcarbamatos de cicloexila 2-fenilaminossustituídos.....	17
<b>Figura 7.</b> Ângulos diedro avaliados para a obtenção das SEP.....	42
<b>Figura 8.</b> Representação de uma SEP.....	42
<b>Figura 9.</b> Estruturas otimizadas no nível de teoria B3LYP/6-311++G(d,p) para os <i>trans-N,N</i> -dimetilcarbamatos de cicloexila 2-fenilaminossustituídos ( <b>3a- 3d</b> ).....	44
<b>Figura 10.</b> Estruturas otimizadas no nível de teoria B3LYP/6-311++G(d,p) do isômero <i>cis-N,N</i> -dimetilcarbamato de 2-fenilaminocicloexila.....	46
<b>Figura 11.</b> Interações estéricas entre os grupos fenilamino, carbamato e os hidrogênios 1,3-diaxiais.....	47
<b>Figura 12.</b> Compostos utilizados na determinação da atividade anticolinesterásica.....	50
<b>Figura 13.</b> Efeito dos cloridratos de <i>trans-N,N</i> -dimetilcarbamato de cicloexila 2-fenilaminossustituídos e do <i>trans-N,N</i> -dimetilcarbamato de 2-(4-nitrofenilamino)cicloexila ( <b>3d</b> ) na inibição da colinesterase plasmática (BuChE).....	51

<b>Figura 14.</b> Efeito dos cloridratos de <i>trans-N,N</i> -dimetilcarbamato de cicloexila 2-fenilaminossustituídos e do <i>trans-N,N</i> -dimetilcarbamato de 2-(4-nitrofenilamino)cicloexila ( <b>3d</b> ) na inibição da colinesterase eritrocitária (AChE).....	51
<b>Figura 15.</b> Efeito dos cloridratos de <i>cis-N,N</i> -dimetilcarbamato de cicloexila 2-fenilaminossustituídos na inibição da colinesterase plasmática (BuChE).....	52
<b>Figura 16.</b> Efeito dos cloridratos de <i>cis-N,N</i> -dimetilcarbamato de cicloexila 2-fenilaminossustituídos na inibição da colinesterase eritrocitária (AChE) .....	52
<b>Figura 17.</b> Efeito do fármaco Exelon na inibição da colinesterase plasmática (BuChE)....	53
<b>Figura 18.</b> Efeito do fármaco Exelon na inibição da colinesterase eritrocitária (AChE).....	53
<b>Figura 19.</b> Sítio ativo da enzima acetilcolinesterase complexada com o cloridrato de <i>trans-N,N</i> -dimetilcarbamato de 2-(4-metoxifenilamino)cicloexila.....	56
<b>Figura 20.</b> Sítio ativo da enzima butirilcolinesterase complexada com o cloridrato de <i>trans-N,N</i> -dimetilcarbamato de 2-(4-metoxifenilamino)cicloexila.....	56
<b>Figura 21.</b> Representação da estrutura terciária da enzima AChE complexado com o cloridrato de <i>trans-N,N</i> -dimetilcarbamato de 2-(4-metoxifenilamino)cicloexila.....	57
<b>Figura 22.</b> Representação da estrutura terciária da enzima BuChE complexado com o cloridrato de <i>trans-N,N</i> -dimetilcarbamato de 2-(4-metoxifenilamino)cicloexila.....	57

## LISTA DE ESQUEMAS

**Esquema 1.** Rota sintética para obtenção dos isômeros *trans-N,N*-dimetilcarbamatos de cicloexila 2-fenilaminossustituídos.....29

**Esquema 2.** Rota sintética para obtenção dos isômeros *cis-N,N*-dimetilcarbamatos de cicloexila 2-aminossustituídos.....36

## LISTA DE TABELAS

- Tabela 1.** Deslocamentos químicos de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  (ppm) e multiplicidade dos sinais para o *trans*-2-fenilaminocicloexanol (**2a**) e *trans*-*N,N*-dimetilcarbamato de fenilaminocicloexila (**3a**).....31
- Tabela 2.** Deslocamentos químicos de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  (ppm) e multiplicidade dos sinais para o *trans*-2-(4-metoxifenilamino)cicloexanol (**2b**) e *trans*-*N,N*-dimetilcarbamato de 2-(4-metoxifenilamino)cicloexila (**3b**) .....32
- Tabela 3.** Deslocamentos químicos de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  (ppm) e multiplicidade dos sinais para o do *trans*-2-(4-fluorfenilamino)cicloexanol (**2c**) *trans*-*N,N*-dimetilcarbamato de 2-(4-fluorfenilamino)cicloexila (**3c**).....33
- Tabela 4.** Deslocamentos químicos de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  (ppm) e multiplicidade dos sinais para o do *trans*-2-(4-nitrofenilamino)cicloexanol (**2d**) e *trans*-*N,N*-dimetilcarbamato de 2-(4-nitrofenilamino)cicloexila (**3d**).....34
- Tabela 5.** Deslocamentos químicos de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  (ppm) e multiplicidade dos sinais para o *cis*-2-fenilaminocicloexanona (**5a**), *cis*-2-fenilaminocicloexanol (**6a**) e *cis*-*N,N*-dimetilcarbamato de fenilaminocicloexila (**7a**).....39
- Tabela 6.** Deslocamentos químicos de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  (ppm) e multiplicidade dos sinais para o *cis*-2-(4-metoxifenilamino)cicloexanona (**5b**), *cis*-2-(4-metoxifenilamino)cicloexanol (**6b**) e *cis*-*N,N*-dimetilcarbamato de 2-(4-metoxifenilamino)cicloexila (**7b**).....40
- Tabela 7.** Deslocamentos químicos de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  (ppm) e multiplicidade dos sinais para o *cis*-2-(4-fluorfenilamino)cicloexanona (**5c**), *cis*-2-(4-fluorfenilamino)cicloexanol (**6c**) e *cis*-*N,N*-dimetilcarbamato de 2-(4-fluorfenilamino)cicloexila (**7c**).....41
- Tabela 8.** Valores de energia, população e momento de dipolo ( $\mu$ ) para cada confômero dos isômeros *trans*-*N,N*-dimetilcarbamatos de cicloexila 2-fenilaminossustituídos obtidos por cálculos teóricos.....45

**Tabela 9.** Valores de energia, população e momento de dipolo ( $\mu$ ) para cada confômero dos isômeros *cis-N,N*-dimetilcarbamatos de cicloexila 2-aminossustituídos obtidos por cálculos teóricos.....47

**Tabela 10.** Interação hiperconjugativa obtida através das análises de NBO para os derivados *cis-N,N*-dimetilcarbamatos de cicloexila 2-fenilaminossustituídos.....48

**Tabela 11.** Valores de  $IC_{50}$  dos cloridratos de *cis* e *trans-N,N*-dimetilcarbamato de cicloexila 2-fenilaminossustituídos e do composto padrão Exelon.....54

## ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

ACh	Acetilcolina
AChE	Acetilcolinesterase
AG	Algoritmo Genético
AOAC	Associação Oficial de Química Analítica (do inglês <i>Association Official Analytical Chemistry</i> )
B3LYP	Método de três parâmetros de Becke com funcional de correlação de Lee, Yang e Parr.
BuChE	Butirilcolinesterase
DA	Doença de Alzheimer
DTNB	Ácido 5,5'-ditio-bis-2-nitrobenzóico
HF	Hartree-Fock
HSQC	Heteronuclear Single Quantum Coherence
IChE	Inibidores de Colinesterases
MP2	Correlação eletrônica de Møller-Plesset de segunda ordem
NBO	Orbital Natural de Ligação (do inglês <i>Natural Bond Orbital</i> )
<i>N</i> -selectride	Tri-sec-butilborohidreto de sódio
PDB	Banco de dados de proteína (do inglês <i>Protein Data Bank</i> )
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
RMSD	Desvio Quadrático Médio (do inglês <i>Root Mean Square Deviation</i> )
sl	Singleto largo
STO	Orbital Tipo Slater (do inglês <i>Slater Typer Orbitals</i> )
TFD	Teoria do Funcional de Densidade
TNB	5-tio-2-nitrobenzoato
$\delta$	Deslocamento Químico
$J$	Constante de Acoplamento
$\mu$	Momento de Dipolo

# ÍNDICE

1. Introdução .....	01
1.1 Acetilcolinesterase.....	02
1.2 Butirilcolinesterase.....	04
1.3 Inibidores de Colinesterases ou Anticolinesterásicos .....	05
1.4 Carbamatos como Inibidores de Colinesterases.....	06
1.5 Método de Ellman.....	10
1.6 Modelagem Molecular.....	11
1.6.1 Métodos de Estrutura Eletrônica.....	12
1.6.1.1 Conjunto de funções de base.....	13
1.6.2 Teoria dos Orbitais Naturais de Ligação (NBO).....	14
1.6.3 Docking Molecular .....	15
2. Objetivos.....	17
2.1 Objetivos Gerais.....	17
2.2 Objetivos Específicos.....	17
3. Parte Experimental.....	18
3.1 Síntese dos compostos.....	18
3.1.1 Síntese dos derivados <i>trans-N,N</i> -dimetilcarbamatos de cicloexila 2-fenilaminossustituídos.....	18
3.1.2 Síntese dos derivados <i>cis-N,N</i> -dimetilcarbamatos de cicloexila 2-fenilaminossustituídos.....	21
3.2 Experimentos de RMN.....	25
3.3 Cálculos Teóricos .....	25
3.4 Método de Ellman modificado.....	25
3.4.1 Preparo dos Reagentes.....	26
3.4.2 Determinação das Colinesterases Totais.....	27
3.4.3 Determinação da Butirilcolinesterase.....	27
3.5 Docking Molecular.....	28
4. Resultados e Discussão.....	29
4.1 Síntese dos compostos.....	29
4.1.1 Derivados <i>trans-N,N</i> -dimetilcarbamatos de cicloexila 2-fenilaminossustituídos.....	29
4.1.2 Derivados <i>cis-N,N</i> -dimetilcarbamatos de cicloexila 2-fenilaminossustituídos.....	36
4.2 Análise Conformacional.....	42
4.2.1 <i>Trans-N,N</i> -dimetilcarbamatos de cicloexila 2-fenilaminossustituídos.....	43
4.2.2 <i>Cis-N,N</i> -dimetilcarbamatos de cicloexila 2-fenilaminossustituídos.....	45
4.3 Avaliação da Atividade Anticolinesterásica.....	49
4.4 Docking Molecular.....	55
5. Conclusão.....	58
6. Referências.....	59

# 1. INTRODUÇÃO

A doença de Alzheimer, conhecida pela sigla DA, foi descrita pela primeira vez por Alois Alzheimer em 1906,<sup>1</sup> trata-se de uma doença neurodegenerativa causada pelo deterioramento das células nervosas ocasionando falhas na transferência de informação e sinapse, declínio progressivo de memória e de outras funções cognitivas.<sup>2</sup> A DA está associada a uma série de sintomas psiquiátricos levando a distúrbios comportamentais, perda das habilidades de fala, de reconhecimento e motora, dificuldade de realizar tarefas simples do dia a dia, mudanças de humor e personalidade, confusão de tempo e espaço, podendo evoluir à demência e até a morte.<sup>1,3,4</sup>

É o tipo mais comum de deterioração mental, afetando de 4% a 6% da população acima de 65 anos, 46% daqueles com mais de 80 anos, e mais de 50% dos idosos acima de 95 anos.<sup>4</sup> Atualmente, estima-se que mais de 26 milhões de pessoas em todo o mundo sejam acometidas pela DA.<sup>1</sup>

Com o aumento da expectativa de vida e o envelhecimento da população, a DA tem se tornado um dos problemas de saúde pública mais alarmante do século. Segundo o instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), a Europa ocupa a primeira posição na proporção de população com mais de 60 anos de idade (19,8%) seguida pela América do Norte (16,3%). No Brasil há atualmente 15 milhões de pessoas acima de 65 anos, com projeção que essa faixa etária atinja 15% da população brasileira em 2020.<sup>3</sup> Estima-se que mais de 106 milhões de pessoas no mundo apresentarão algum sintoma da doença em 2050.<sup>1</sup>

Apesar de inúmeros estudos, as causas da DA não tem sido completamente elucidadas e infelizmente ainda não há cura para a doença. No entanto, existem várias hipóteses para explicar seu mecanismo de ação e assim buscar formas de minimizar seus danos e sua progressão, entre elas:

- A hipótese amilóide: as placas amilóides são formadas pela deposição progressiva do peptídeo  $\beta$ -amilóide em placas senis extracelulares, esses peptídeos derivam da quebra proteolítica de uma proteína integral de membrana denominada APP, esta é quebrada enzimaticamente por três diferentes proteases denominadas alfa, beta e gama secretase. Esse acúmulo de placas causa a destruição de neurônios por criar processos inflamatórios crônicos nas regiões afetadas, interfere na regulação de cálcio essencial para a condução dos estímulos nervosos, e aumenta a produção de radicais livres, tóxicos para as células nervosas.<sup>5-7</sup>
- A hipótese da proteína Tau: os emaranhados neurofibrilares encontrados dentro dos neurônios, são agregados anormais da proteína associada ao microtúbulo

(tau), esta proteína apresenta sua estrutura quimicamente modificada em pacientes com a DA. Nestas pessoas ocorre uma fosforilação anormal da Tau, que acaba se desligando do microtúbulo, aglutinando-se com outros fragmentos da Tau e formando os emaranhados fibrilares. Quando isto acontece, os microtúbulos se desintegram e o sistema de transporte neuronal sofre um colapso.<sup>8-10</sup>

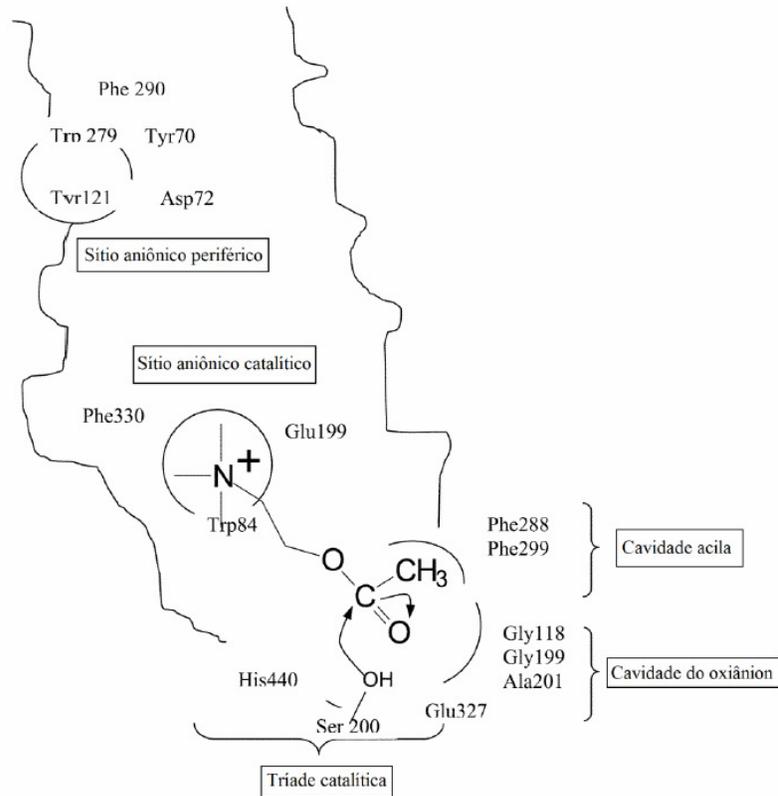
- A hipótese colinérgica: Esta hipótese é baseada em uma acentuada queda da atividade colinérgica devido a uma degeneração dos neurônios colinérgicos do prosencéfalo basal e a perda da transmissão colinérgica no hipocampo e no córtex cerebral, que é causada devido à diminuição na quantidade de neurotransmissores nestas regiões, sendo o principal deles a acetilcolina (ACh).<sup>11</sup>

Até o momento, a estratégia terapêutica mais eficiente para o tratamento sintomático da DA está baseada na hipótese colinérgica, em que se utilizam drogas que aumentam a concentração da acetilcolina no cérebro, através da inibição das enzimas colinesterases (acetilcolinesterase e butirilcolinesterase).<sup>11,12</sup>

## 1.1 Acetilcolinesterase

A acetilcolinesterase (AChE), ou colinesterase verdadeira, está presente principalmente nas hemácias, sinapses (terminações nervosas) e músculos estriados. É uma enzima alostérica da classe das hidrolases, com 537 resíduos de aminoácidos na sua sequência. Ela é responsável pela finalização da transmissão de impulsos nervosos nas sinapses colinérgicas, pois catalisa a hidrólise do neurotransmissor acetilcolina convertendo-a em dois componentes, colina e ácido acético.<sup>13</sup>

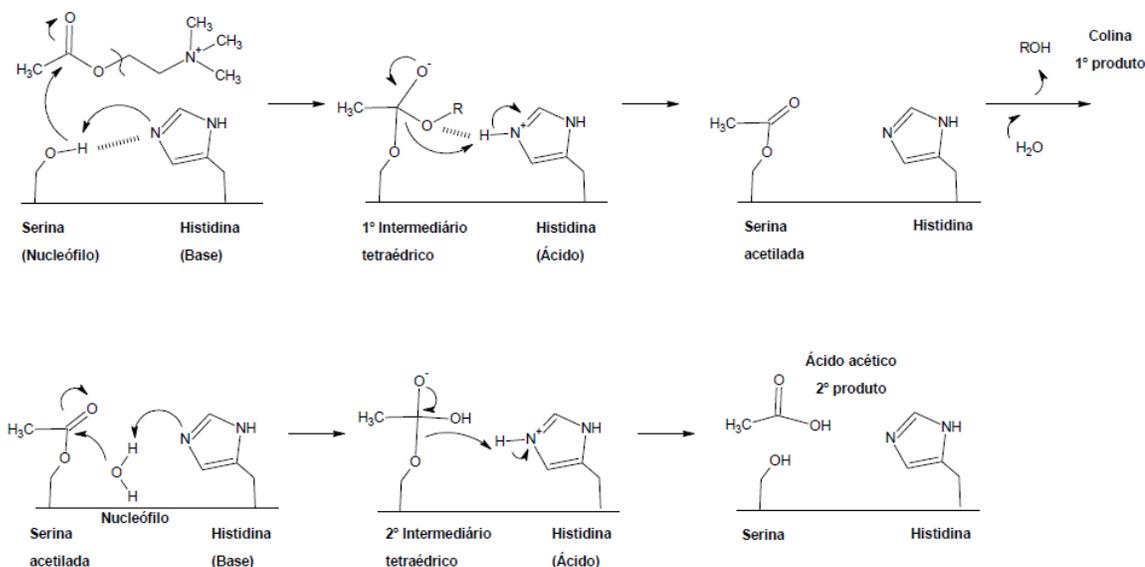
Através da análise de sua estrutura tridimensional, observou-se que o sítio ativo se encontra na porção inferior de uma cavidade estreita e profunda com 20 Å de comprimento, denominada “cavidade aromática”, composta em mais de 50% do seu volume por anéis aromáticos de resíduos de aminoácidos. Este sítio ativo consiste do sítio aniônico catalítico (tríade catalítica) formada pelos resíduos Ser200, Hsd440 e Glu327,<sup>14</sup> da cavidade do oxianion e da cavidade da acila, além disso há um sítio aniônico periférico (Figura 1).<sup>15,16</sup>



**Figura 1.** Representação esquemática do sítio ativo da AChE.

O neurotransmissor acetilcolina é estocado nos terminais nervosos, em estruturas denominadas vesículas, sendo liberado quando o nervo terminal é ativado, entrando na sinapse e se ligando ao receptor, que rapidamente o hidrolisa.<sup>17</sup>

Na hidrólise da ACh o centro aniônico da acetilcolinesterase atrai o nitrogênio quaternário da molécula de acetilcolina, fixando e orientando o substrato para o centro do sítio aniônico catalítico para que ocorra a hidrólise.<sup>18</sup> O mecanismo de hidrólise (Figura 2) envolve um ataque nucleofílico do oxigênio da Ser200 ao carbono da carbonila da ACh, gerando um intermediário tetraédrico com a His440 que é estabilizado por ligações de hidrogênio com os resíduos de aminoácidos da cavidade do oxianion. Em seguida o intermediário sofre eliminação, gerando colina livre e serina acetilada. Uma molécula de água interage com a serina acetilada formando um novo intermediário tetraédrico, terminando assim a hidrólise e regenerando o sítio catalítico da enzima.<sup>16,17</sup>



**Figura 2.** Representação do mecanismo de hidrólise da acetilcolina catalisado pela enzima AChE.

## 1.2 Butirilcolinesterase

A butirilcolinesterase (BuChE) é considerada uma pseudocolinesterase, sendo encontrada principalmente nos tecidos como fígado, pele, músculo e também no plasma. Ela contém 574 resíduos de aminoácidos e sua estrutura primária é similar a da acetilcolinesterase, de modo que seu sítio ativo também contém uma tríade catalítica com os resíduos Ser198, Hsd438, e Glu325.<sup>19</sup> Há também um sítio aniônico e um de acilação, no entanto seu sítio apresenta um maior volume em relação a acetilcolinesterase.<sup>12</sup>

Por muitos anos a butirilcolinesterase foi considerada uma enzima não específica e não essencial para a transmissão colinérgica, apesar de não se saber ao certo sua função fisiológica no corpo humano,<sup>19,20</sup> recentes pesquisas tem apontado a importância da função da BuChE no sistema colinérgico.<sup>8</sup>

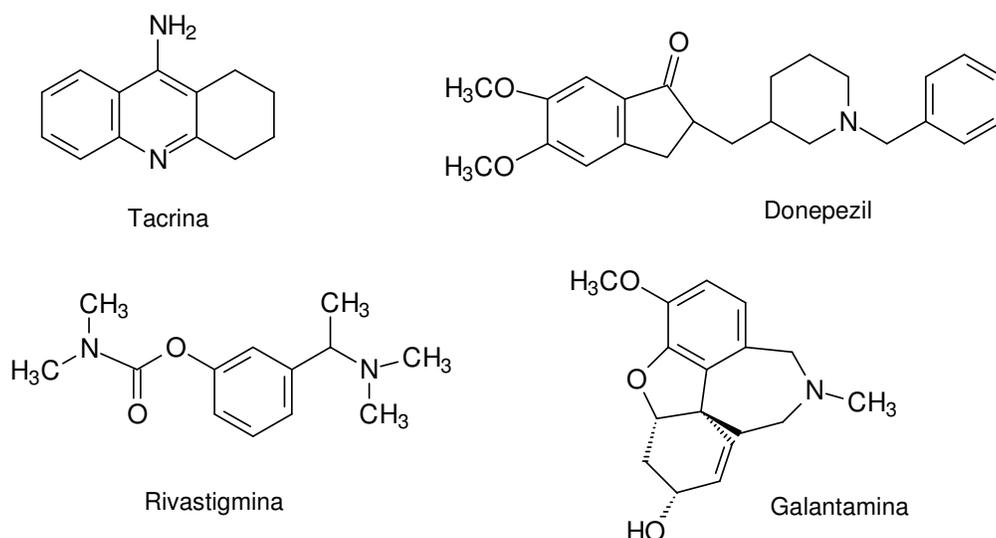
Sabe-se que em condições fisiológicas a atividade da colinesterase no cérebro está relacionada principalmente com a AChE. Contudo na decorrência da DA, a atividade da BuChE aumenta substancialmente no hipocampo e córtex temporal, enquanto a atividade da AChE é reduzida.<sup>12,21</sup> A BuChE age como um mecanismo compensatório na ausência da AChE hidrolisando a ACh e mantendo a função colinérgica.<sup>19, 22</sup>

Devido a hipótese colinérgica e a inúmeros relatos sobre as múltiplas funções das colinesterases na patogênese e desenvolvimento da DA, as enzimas AChE e BuChE são alvos muito atrativos para o desenvolvimento de novas drogas anti-DA,<sup>10-16</sup> conhecidas como inibidores de colinesterases ou anticolinesterásicos.

### 1.3 Inibidores de Colinesterases ou Anticolinesterásicos

Os inibidores de colinesterases (IChE) foram as primeiras drogas descobertas para o tratamento sintomático da doença de Alzheimer. É uma estratégia terapêutica usada para compensar o déficit colinérgico que ocorre na doença, e visa o aumento da disponibilidade de acetilcolina, por meio da inibição reversível, pseudo-irreversível ou irreversível da acetilcolinesterase e butirilcolinesterase. Esses inibidores são capazes de produzir uma melhora das funções cognitivas, retardando o avanço da doença.<sup>23</sup>

Atualmente existem quatro medicamentos que atuam como IChE, liberados pela ANVISA para o tratamento da DA, sendo eles: tacrina, rivastigmina, donepezil e galantamina (Figura 3).



**Figura 3.** Inibidores de colinesterases utilizados no tratamento sintomático da DA.

A tacrina ou Cognex®, aprovada em 1993, foi o primeiro fármaco comercial para o tratamento da doença. Seu mecanismo de ação está baseado na inibição reversível de ambas as enzimas (AChE e BuChE). Possui um tempo de meia-vida baixo (3-5 h) exigindo uma posologia de 10 mg quatro vezes ao dia. Devido a seus efeitos colaterais, sua toxicidade hepática e baixa biodisponibilidade esta droga caiu em desuso.<sup>24</sup>

O donepezil ou Aricept®, aprovado em 1996, é um inibidor reversível, com alta seletividade para AChE, possui um tempo de meia vida de aproximadamente 70 horas. O tratamento é iniciado com 5 mg uma vez ao dia. É uma droga bem tolerada, apresentando alguns efeitos colaterais como náuseas, vômito e diarreia.<sup>25,26</sup>

A rivastigmina ou Exelon®, aprovada em 2000, pertence à classe dos carbamatos, seu mecanismo de ação está baseado em uma inibição pseudo-irreversível com afinidade

a ambas as enzimas. Possui um tempo de meia vida baixo de 1-2 horas, apresentando, porém, uma atividade prolongada de 8-10 horas. O tratamento é iniciado com 1,5 mg duas vezes ao dia podendo chegar a 6 mg duas vezes ao dia.<sup>24,27</sup>

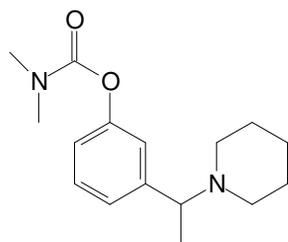
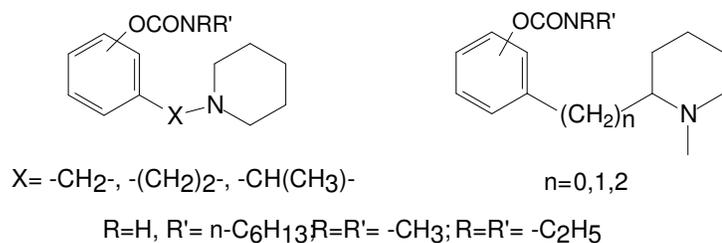
A galantamina ou Reminyl®, aprovada em 2001, é um alcalóide natural da família dos lírios, apresenta uma inibição reversiva e seletiva a AChE. Possui um tempo de meia vida de aproximadamente 7 horas, sendo administrada inicialmente em duas doses diárias de 4 mg.<sup>28</sup>

## 1.4 Carbamatos como Inibidores de Colinesterases

Devido aos efeitos colaterais apresentados pelos medicamentos empregados atualmente, e pelo fato de não haver uma cura definitiva para DA, a busca por novos inibidores continua sendo de grande importância. Diversas pesquisas têm sido realizadas no intuito de desenvolver fármacos que sejam mais potentes, seguros e melhor tolerados. Neste contexto, os inibidores de colinesterases do tipo carbamato são conhecidos há décadas. Estes compostos apresentam uma inibição pseudo-irreversível, atuando por uma carbamoilação do resíduo serina no sítio ativo da enzima.<sup>29</sup>

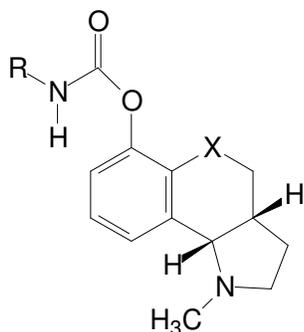
A fisostigmina, um composto que possui o grupo carbamato, foi o primeiro inibidor da AChE utilizado no tratamento da DA. Contudo, a alta incidência de efeitos colinérgicos colaterais<sup>30</sup> associado a altas doses do composto, fez com que este deixasse de ser utilizado. A rivastigmina, citada anteriormente (Figura 3), é um outro exemplo, possui em sua estrutura um grupo carbamato *N,N*-substituído, e é um fármaco usado clinicamente contra a DA. Baseados nesses compostos, diversos estudos têm sido realizados na busca de novos carbamatos, que atuem como inibidores de colinesterases e que futuramente possam vir a ser utilizados no tratamento da DA.

Dentre os diversos estudos podemos citar o de Mustazza<sup>31</sup> e col. no qual os autores se basearam na estrutura da rivastigmina para sintetizar uma série de fenilcarbamatos. Entre os compostos o 1-[1-(3-dimetilcabamoiloxifenil)etil]piperidina (**I**), apresentou uma significativa atividade *in vitro* com IC<sub>50</sub> de 7,0 e 8,0 nM para AChE e BuChE respectivamente, e também uma baixa toxicidade.



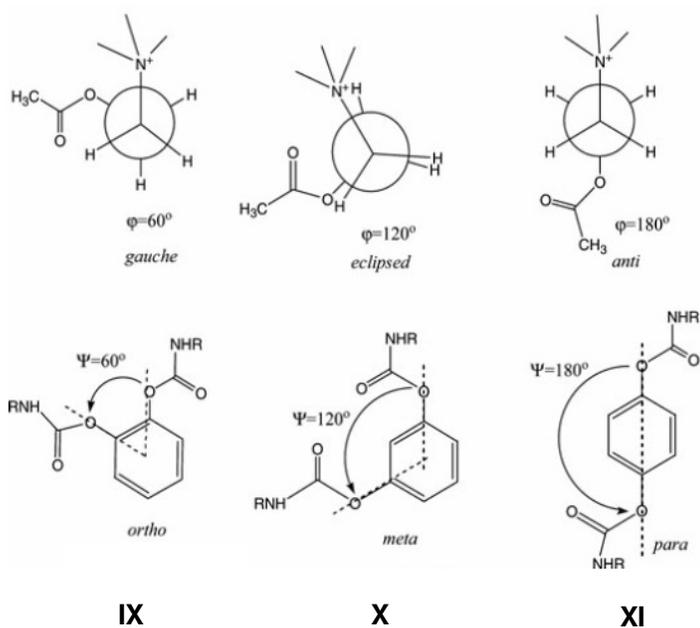
**I**  
1-[1-(3-dimetilcabamoiloxifenil)etil]piperidina

Posteriormente, Bolognesi<sup>32</sup> e col. também se basearam na estrutura da rivastigmina para sintetizar e avaliar a atividade anticolinesterásica de uma série de compostos que incluem o grupo dimetilamino- $\alpha$ -metilbenzil em diferentes sistemas tricíclicos. Os autores concluíram que os derivados metilcarbamatos apresentaram uma atividade inibitória maior em relação aos etilcarbamatos, apesar de não terem se mostrado seletivos as enzimas AChE/BuChE. O composto **IV** se apresentou como o mais potente inibidor da série com  $IC_{50}$  de 8,1 nM e 10,5 nM para AChE e BuChE, respectivamente.



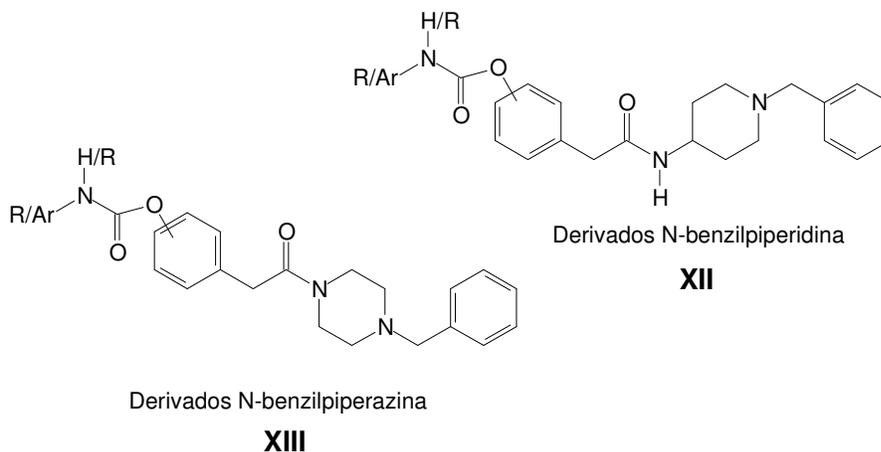
Composto	X	R
<b>II</b>	O	Me
<b>III</b>	CH <sub>2</sub>	Me
<b>IV</b>	S	Me
<b>V</b>	O	CH(CH <sub>3</sub> )Ph
<b>VI</b>	O	(CH <sub>2</sub> ) <sub>6</sub> CH <sub>3</sub>
<b>VII</b>	O	Et
<b>VIII</b>	CH <sub>2</sub>	Et

No estudo de Lin<sup>33</sup> e col. foi sintetizada uma série de carbamatos benzeno-1,2-, 1,3- e 1,4-di-N-substituídos conformacionalmente restritos, que imitam as conformações *gauche*, eclipsada e *anti* da acetilcolina. Os autores avaliaram que os compostos 1,4-di-N-substituídos (**XI**) são os mais potentes, seguidos por 1,3 (**X**) e 1,2-di-N-substituídos (**IX**). Estes compostos *para* substituídos possuem um ângulo de 180° entre as ligações C(benzeno)-O, imitando o confômero anti C-O/C-N preferido da acetilcolina.

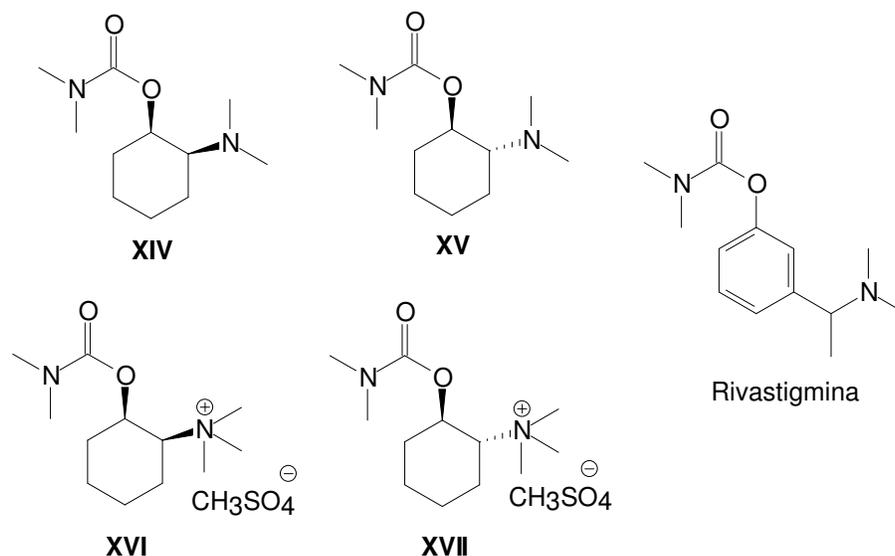


Eles também observaram nessa série que os substituintes menos volumosos como n-butil e n-hexil foram mais potentes que os substituintes volumosos como n-octil, t-butil e benzil carbamatos. Segundo eles uma possível razão é que o sítio de ligação do grupo acetil na AChE é relativamente pequeno quando comparado a outras serinas hidrolases, sendo mais apropriado para substituintes pequenos.

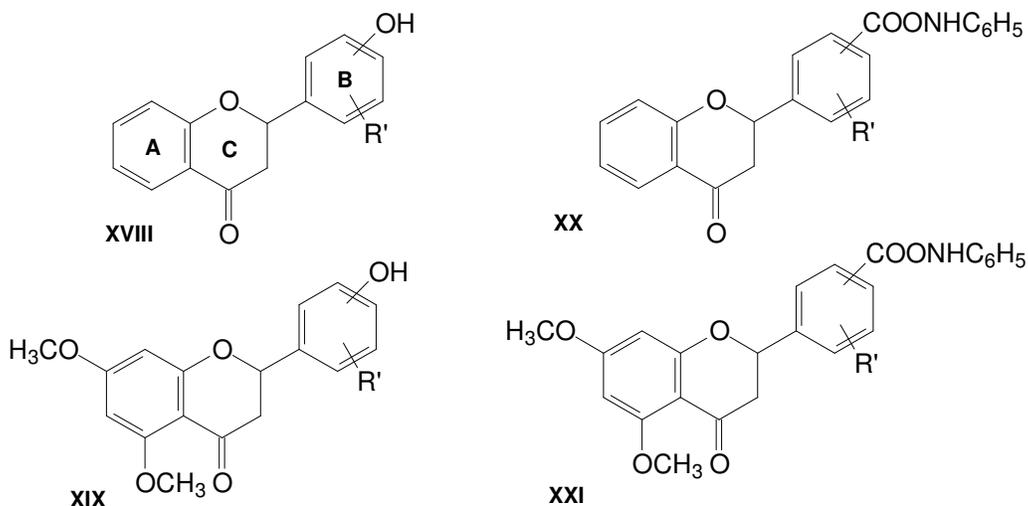
Wieckowska<sup>34</sup> e col. avaliaram a atividade anticolinesterásica de novos derivados alquil e arilcarbamatos com grupos *N*-benzilpiperidina (**XII**) e *N*-benzilpiperazina (**XIII**). Os autores mostraram que esses fragmentos foram determinantes para a seletividade entre AChE e BuChE. Os derivados carbamatos da *N*-benzilpiperazina (**XIII**) foram inibidores seletivos da BuChE, enquanto os derivados da *N*-benzilpiperidina (**XII**) mostraram uma atividade inibitória da BuChE/AChE não seletiva.



Em outro trabalho, Bocca<sup>35</sup> e col. basearam-se no carbamato neostigmina para estudar uma série de isômeros *cis* e *trans* de *N,N*-dimetilcarbamatos de 2-*N,N*-dimetilaminocicloexila (**XIV** e **XV**) e de seus sais metil sulfatos (**XVI** e **XVII**). Os autores mostraram que os compostos na forma de sal foram mais ativos que aqueles na forma neutra. O sal *trans* (**XVII**) mostrou boa seletividade para a inibição da colinesterase eritrocitária (AChE), apresentando um limite máximo de inibição em torno de 90%, contra apenas 55% para a inibição da colinesterase plasmática (BuChE). O sal *cis* (**XVI**) não se mostrou seletivo, pois inibiu de forma considerável ambas as enzimas.



Recentemente, Anand<sup>36</sup> e col. utilizaram derivados de flavanonas e introduziram grupos carbamatos para potencializar a atividade. Os autores observaram que a troca dos grupos hidroxila do anel B (**XVIII** e **XIX**) pelo grupo fenil carbamato (**XX** e **XXI**), aumentou drasticamente a atividade, sugerindo assim que esta porção da estrutura influencia na atividade da AChE. A presença de dois grupos metoxila no anel aromático A da flavanona (**XIX** e **XXI**), conferiu uma maior atividade inibitória se comparado aos compostos sem este grupo. Outro fator que os autores analisaram foi como a presença de grupos retiradores e doadores no anel B influenciam na atividade dos compostos. Derivados com grupos doadores de elétrons, como -OCH<sub>3</sub>, apresentaram uma maior atividade inibitória em relação aos derivados com grupos retiradores de elétrons, como -NO<sub>2</sub>.

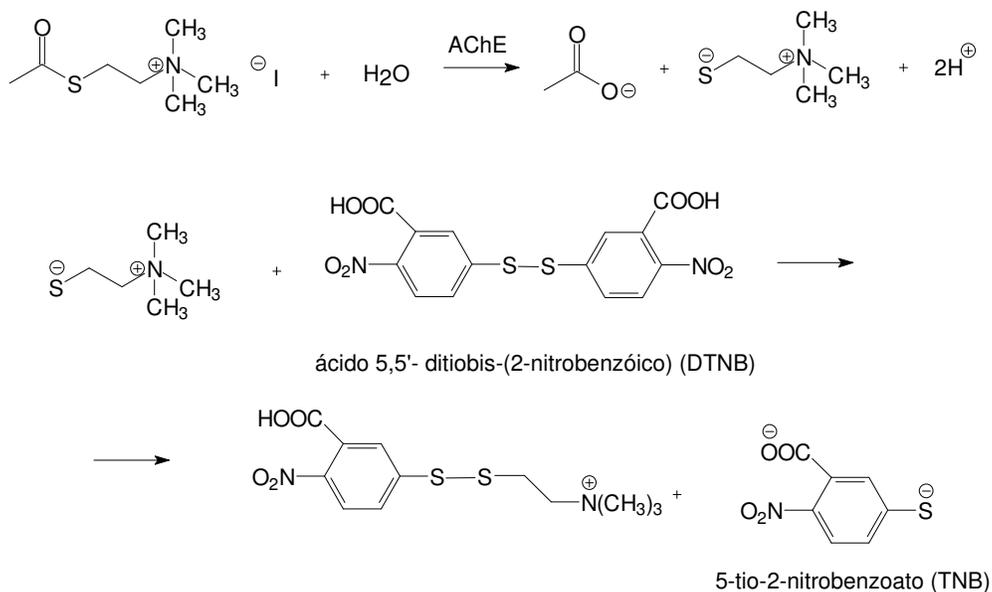


## 1.5 Método de Ellman

O método mais utilizado atualmente na determinação da atividade colinesterásica em sangue total, eritrócitos ou plasma, é o ensaio espectrofotométrico descrito por Ellman e colaboradores<sup>37</sup> com suas diversas modificações.<sup>38</sup> O método de Ellman é a forma diagnóstica mais difundida e barata que permite analisar a acetilcolinesterase e a butirilcolinesterase separadamente, sendo os resultados precisos e confiáveis.

As principais modificações que foram realizadas neste método são referentes ao tipo de substrato utilizado e suas respectivas concentrações, temperatura e tampão, sendo que a Associação Oficial de Química Analítica (AOAC) recomenda como método de referência o de Ellman e col. modificado por Harlin e Ross.<sup>39,40</sup>

Este método baseia-se na hidrólise de um substrato éster da tiocolina (ex. acetiltiocolina) pelas enzimas colinesterases (acetilcolinesterase ou butirilcolinesterase). A tiocolina formada reage então com o ácido 5,5'-ditio-bis-2-nitrobenzóico, também conhecido como DTNB ou reagente de Ellman, produzindo assim o 5-tio-2-nitrobenzoato (TNB) um ânion amarelo que possui um máximo de absorvância em 412 nm (Figura 4).<sup>41</sup>



**Figura 4.** Reações das colinesterases pelo método espectrofotométrico de Ellman.

É um método rápido e sensível, que pode ser realizado nas frações de sangue, no entanto, há a necessidade dos compostos envolvidos serem solúveis em água. O método apresenta uma relação direta entre a atividade enzimática e a leitura espectrofotométrica, ou seja, o aumento da absorbância é diretamente proporcional a atividade da enzima, de acordo com a lei de Lambert-Beer.<sup>37,39</sup>

## 1.6 Modelagem Molecular

Modelagem molecular é o termo geral utilizado para descrever o uso de computadores para construir moléculas e realizar uma variedade de cálculos nestas moléculas, de forma a prever seu comportamento e suas características químicas. O termo modelagem molecular é frequentemente utilizado como sinônimo do termo Química Computacional.<sup>42</sup> A aplicação de métodos computacionais no estudo e no planejamento de compostos bioativos tem se tornado uma prática rotineira e importante nos dias atuais.

### 1.6.1 Métodos de Estrutura Eletrônica

Grandes avanços na descrição microscópica de sistemas atômicos e moleculares têm sido alcançados devido ao desenvolvimento da mecânica quântica, iniciada no século passado com o trabalho de grandes cientistas, como Schrödinger, Einstein, Dirac, Plank, Heisenberg e outros. Os métodos de estrutura eletrônica<sup>43</sup> baseiam-se nessa teoria para descrever criteriosamente o comportamento de núcleos e, principalmente, dos elétrons nas espécies químicas.<sup>44</sup> Essa descrição abrange tanto a localização da densidade eletrônica quanto suas interações e efeitos sobre os orbitais atômicos e moleculares.

Cálculos computacionais podem fornecer informações sobre a geometria mais estável, comprimentos de ligação, ângulos diedros, frequências vibracionais, barreiras de rotação interna, distribuição eletrônica, potencial de ionização, afinidades eletrônicas, momentos de dipolo, constantes de acoplamento, entre outras.<sup>45</sup>

Para a realização destes cálculos vários métodos foram desenvolvidos sendo que estes estão subdivididos em semi-empíricos, *ab-initio* e os métodos baseados na teoria do funcional de densidade (TFD). Segue abaixo uma breve descrição das principais características desses métodos.

**Métodos semi-empírico:** é um método parametrizado, onde certas informações são aproximadas ou completamente omitidas, como algumas integrais em relação aos elétrons. Para corrigir estas deficiências utilizam-se parâmetros derivados de dados experimentais.

A vantagem destes cálculos é que possuem um custo computacional bastante reduzido. Porém podem gerar, em alguns casos, valores não exatos e algumas propriedades podem ser preditas erroneamente.<sup>44</sup> Esses métodos encontram aplicação principalmente em moléculas orgânicas com cadeia relativamente longa, já que se consegue um ganho no tempo de máquina. Alguns exemplos de métodos semi-empíricos são: HÜCKEL, CNDO, AM1 e PM3.

**Métodos *ab-initio*:** são derivados inteiramente de princípios teóricos, não incluindo parâmetros experimentais. Todas as informações necessárias são calculadas com base apenas em algumas constantes físicas fundamentais, tais como massa e carga do elétron, massa e carga dos núcleos envolvidos, velocidade da luz e a constante de Plank. Dentre esses métodos, o mais utilizado atualmente é o de Hatree-Fock (HF).<sup>46</sup> Nesse método, a equação de Schrödinger para sistemas com muitos elétrons é separada em equações mais simples de um elétron, sendo que cada equação monoelétrica é resolvida individualmente para fornecer a função de onda do referido elétron, chamada orbital, e uma energia chamada de energia orbital.

Como cada função é tratada como independente, as coordenadas de um elétron são dadas somente em relação ao núcleo. Um dado elétron só interage com o campo médio dos outros elétrons, não sendo consideradas as correlações entre os elétrons. Essa é uma das limitações na teoria de Hartree-Fock.

Para suprir essa limitação métodos *ab-initio* mais sofisticados tem sido desenvolvidos. Tais métodos consideram os efeitos de correlação eletrônica, onde cada elétron passa a interagir individualmente com os outros elétrons do sistema, e não mais com o campo médio. Um método *ab-initio* normalmente utilizado é a teoria de perturbação de segunda ordem de Møller-Plesset (MP2).<sup>47,48</sup> Este método oferece resultados mais precisos, porém necessita de recursos computacionais mais sofisticados e requer um maior tempo de máquina.

**Teoria do Funcional de densidade (TFD):** Nesse método a energia de um sistema é obtida como uma função de sua densidade eletrônica,<sup>49,50</sup> que é expressa como uma combinação linear de funções de base, matematicamente similar aos orbitais HF.

No início da década de 90, Becke<sup>51</sup> percebeu que haveria vantagens ao mesclar a teoria do funcional de densidade com o método de Hartree-Fock, originando os chamados métodos híbridos. O mais popular deles nos dias de hoje é o B3LYP, sigla que identifica o uso do funcional de troca-correlação de Becke no qual está incluído o funcional de correlação desenvolvido por Lee, Yang e Parr.<sup>52</sup> Por utilizar parâmetros empíricos, o método B3LYP não é classificado como *ab-initio*.

Cabe observar que nem todos os métodos TFD são híbridos ou parametrizados, logo, poderiam ser chamados de *ab-initio*. Contudo, os parâmetros empíricos estão presentes nos mais utilizados e, é comum considerar a TFD uma classe à parte para diferenciá-la dos outros métodos.

Esse método tem sido amplamente utilizado por fornecer resultados, na maioria das vezes mais precisos que a teoria HF e com um tempo de cálculo bem menor que o método MP2. Devido a estas vantagens, o método B3LYP foi utilizado na realização deste trabalho.

### **1.6.1.1 Conjunto de funções de base**

Para que um cálculo possa ser executado é necessário, além da escolha do método, a especificação de um conjunto de funções de bases.<sup>43,44</sup> As funções de base são representações matemáticas dos orbitais moleculares<sup>53</sup> e podem ser interpretadas como a restrição do elétron em uma região específica do espaço. Funções de base maiores impõem menores restrições ao espaço ocupado pelos elétrons, aumentando a precisão da

forma dos orbitais moleculares. Aumentando-se as funções de base espera-se obter resultados mais satisfatórios, mas em contrapartida o tempo de cálculo também é aumentado.

Nos primórdios da química computacional, adotou-se o conjunto de bases mínimo (STO – Slater Type Orbitals), composto apenas por orbitais atômicos do átomo livre. O problema dessas funções é a sua forma matemática, que acaba por dificultar os cálculos. Com o desenvolvimento de novas teorias e aprimoramento dos métodos, foi introduzido o uso de funções Gaussianas, que são funções de bases com “valência dividida”, que melhoram a flexibilidade das bases, permitindo que os orbitais atômicos se expandam ou se contraíam. Por exemplo, a base de pople 3-21G representa cada orbital interno por uma combinação de três Gaussianas primitivas, e cada orbital de valência é representado por dois grupos de funções, um formado por duas Gaussianas primitivas e o outro por apenas uma.<sup>50</sup>

É possível ainda melhorar a base aumentando-se o número de Gaussianas ou ainda aprimorá-las pela introdução de funções de polarização, denotadas por uma letra entre parêntesis ou por asteriscos: 3-21G(d,p) ou 3-21G\*\*.<sup>54,55</sup> As funções de polarização auxiliam na descrição das distorções da nuvem eletrônica e são fundamentais na descrição de ligações químicas e ângulos de ligação. Além disso, há sistemas em que é fundamental a descrição de regiões mais afastadas no núcleo, como o caso dos ânions ou dos átomos com pares isolados. Para isso, adicionam-se funções de difusão, identificadas pelo símbolo mais (+), nos átomos pesados, e, se necessário, nos átomos de hidrogênio.<sup>56</sup>

### **1.6.2 Teoria dos Orbitais Naturais de Ligação (NBO)**

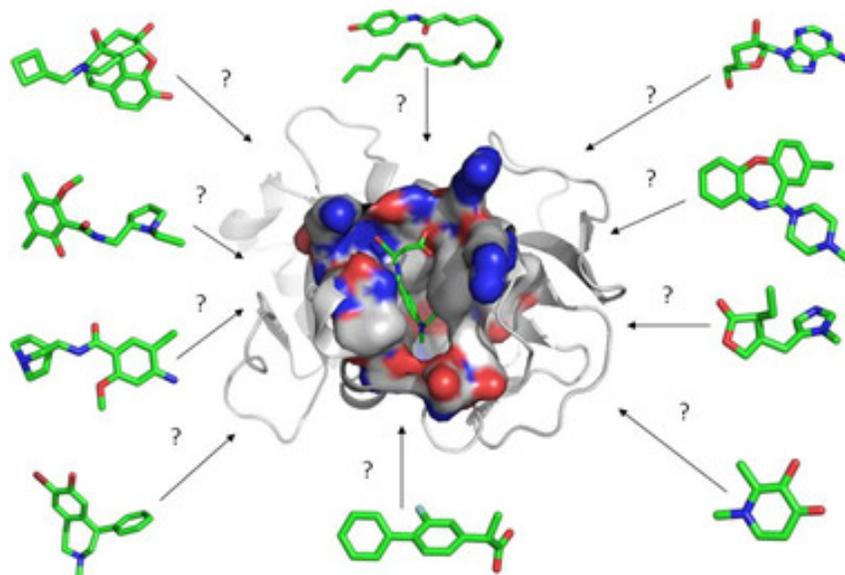
Os cálculos de orbitais de ligação (NBO, do inglês, “*natural bonding orbitals*”) fornecem informações sobre os efeitos eletrônicos, tais como interações hiperconjugativas, além dos efeitos estéricos, que neste caso, é o efeito entre os orbitais presentes na molécula. Os NBO's são orbitais localizados em cada ligação presente na molécula, diferentemente dos orbitais moleculares, os quais se estendem por toda molécula. A grande vantagem deste tipo de cálculo é a possibilidade de investigar as interações existentes especificamente entre determinados orbitais, sendo assim possível analisar as interações atrativas/repulsivas existentes entre orbitais de cada ligação.<sup>57</sup>

### 1.6.3 Docking Molecular

O *docking* molecular é uma técnica de modelagem molecular que objetiva prever a estrutura (ou estruturas) do complexo intermolecular formado entre duas ou mais moléculas.<sup>58</sup> Esta técnica tem sido utilizada para prever a possibilidade de interação de moléculas de um banco de dados no sítio de ligação do receptor de interesse e também para compreender como os complexos proteína-ligante interagem (Figura 5), sendo uma ferramenta essencial na escolha de alvos terapêuticos para o desenvolvimento de novos fármacos.<sup>59</sup>

De forma geral, o cálculo de *docking* faz uma previsão da conformação e orientação do ligante dentro do sítio ativo do alvo molecular.<sup>60</sup> As informações obtidas deste complexo podem auxiliar no esclarecimento do mecanismo de reconhecimento,<sup>61</sup> bem como indicar de que forma o ligante pode ser modificado a fim de melhorar sua função, ou quais as características necessária para o desenho de novos compostos que aumentem ou inibam a atividade do alvo desejado.<sup>62</sup>

Existem mais de sessenta programas de *docking* atualmente, dentre eles os mais utilizados são AutoDock<sup>63</sup>, DOCK<sup>64</sup>, FlexX<sup>65</sup>, GOLD<sup>66</sup>, Glide<sup>67</sup> e Pyrx<sup>68</sup>. Cada programa difere na forma de representação do receptor, no tratamento do ligante, no tipo de função *scoring* e no algoritmo de busca.<sup>69,70</sup>



**Figura 5.** Ilustração da técnica de *docking* molecular.

O algoritmo de busca é empregado na pesquisa dos possíveis modos de ligação entre o ligante e a proteína, permitindo explorar os graus de liberdade translacional, rotacional e conformacional do ligante no sítio receptor da proteína. Um bom algoritmo de busca deve explorar as formas de ligação entre o ligante e o receptor.<sup>71,72</sup> As funções *scoring* são usadas para avaliar a afinidade entre a proteína e o ligante, elas ajudam a refinar os resultados obtidos, pois determinam a complementaridade entre geometria, interações eletrostáticas, ligações de hidrogênio, interações de van der Waals e termos de solvatação.<sup>73</sup> Estas funções são aplicadas para eleger os modos de ligação teoricamente mais próximos do modo de ligação “real”, dentre os modos de ligação explorados pelo algoritmo de busca, classificando-os de acordo com as energias de interação. Quanto maior a precisão desta função, maior a qualidade dos resultados.<sup>74</sup>

Dentre os programas citados anteriormente, o AutoDock, é o mais bem sucedido, com mais de 3300 citações desde o seu lançamento em 1998. Os autores oferecem gratuitamente um conjunto de ferramentas que podem ser facilmente utilizadas para definir, executar e analisar os cálculos a partir de uma interface gráfica intuitiva.<sup>59</sup>

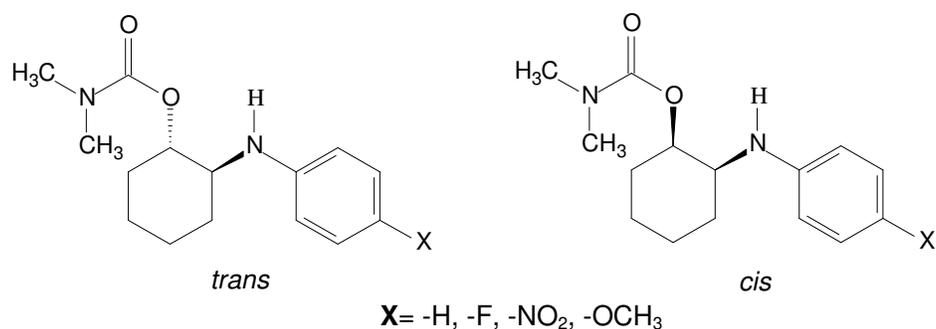
Ele é projetado para realizar o docking do ligante flexível com o sítio ativo de uma molécula rígida, e consiste de duas partes principais: o Autodock realiza o encaixe do ligante a um conjunto de grades que descrevem a proteína alvo, e o Autogrid pré-cálcula essas grades fazendo uma avaliação da energia através de potenciais. O programa usa como algoritmos de busca o Lamarckian, algoritmo genético e *simulated annealing*.<sup>69,72</sup>

O AutoDock tem sido aplicado com sucesso na predição dos modos de ligação de complexos proteína-ligante. A medida da precisão dos cálculos de *docking* baseia-se na proximidade entre a conformação escolhida a partir do *docking* e aquela observada experimentalmente no complexo proteína-ligante obtida por cristalografia. Uma solução é considerada bem sucedida se o RMSD (desvio quadrático médio) for menor ou igual a 2 Å.<sup>75</sup>

## 2. OBJETIVOS

### 2.1 Objetivos Gerais

O objetivo deste trabalho é realizar a síntese e a avaliação teórico-experimental da atividade de duas novas séries de potenciais inibidores de colinesterases (Figura 6).



**Figura 6.** Estrutura das duas novas séries de derivados carbamatos *cis* e *trans*-*N,N*-dimetilcarbamatos de cicloexila 2-fenilaminossustituídos.

### 2.2 Objetivos Específicos

- Sintetizar duas novas séries de *cis* e *trans*-*N,N*-dimetilcarbamatos de cicloexila 2-fenilaminossustituídos, com substituintes doadores e receptores no anel aromático.
- Caracterizar os compostos sintetizados por espectroscopia de RMN de <sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C.
- Realizar um estudo teórico para determinar os fatores que governam o comportamento conformacional dos carbamatos em estudo.
- Realizar testes farmacológicos *in vitro* para avaliar a atividade anticolinesterásica dos derivados carbamatos.
- Avaliar a influência dos substituintes doadores e receptores na atividade dos compostos como inibidores de colinesterases.
- Realizar cálculos de *docking* molecular para avaliar as possíveis interações entre os compostos sintetizados e o sítio ativo das enzimas acetilcolinesterase e butirilcolinesterase.

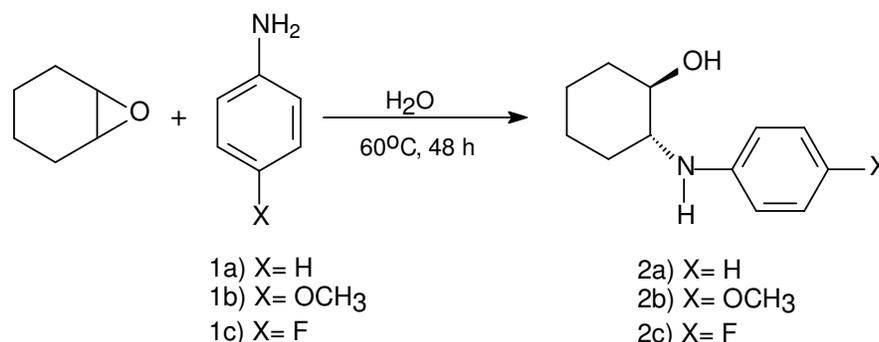
### 3. PARTE EXPERIMENTAL

#### 3.1 Síntese dos compostos

A seguir estão descritos os procedimentos utilizados na preparação das novas séries de isômeros *cis* e *trans*-*N,N*-dimetilcarbamatos de cicloexila 2-fenilaminossustituídos. Os solventes e reagentes utilizados nas sínteses foram purificados de acordo com procedimentos descritos na literatura.<sup>76</sup>

##### 3.1.1 Síntese dos derivados *trans*-*N,N*-dimetilcarbamatos de cicloexila 2-fenilaminossustituídos

- Preparação dos *trans*-2-fenilaminocicloexanóis (**2a-2c**).<sup>77</sup>



Em um balão de duas bocas, equipado com condensador de refluxo e agitador magnético, foram adicionados 49 mmol (5,0 mL) de óxido de cicloexeno e 51 mmol da amina aromática desejada (4,6 mL de anilina, 6,3 g de *p*-metoxianilina ou 4,8 mL de *p*-fluoranilina) em 100 mL de água deionizada. A reação foi mantida sob agitação vigorosa a 60°C por 48 horas. Após este período deixou-se a mistura reacional atingir a temperatura ambiente. Em seguida, a mistura foi basificada com uma solução 5 M de hidróxido de sódio até pH 12 e extraída com acetato de etila (3 x 30 mL). A fase orgânica foi seca com sulfato de sódio anidro e o solvente removido em evaporador rotatório. O produto obtido foi seco sob vácuo a temperatura ambiente, em pistola Abderhalden contendo óxido de cálcio.

*trans*-2-fenilaminocicloexanol: 50% de rendimento, sólido branco, p.f.: 57,8-58,6 °C.

*trans*-2-(4-metoxifenilamino)cicloexanol: 80% de rendimento, sólido marrom, p.f.: 67,1-67,9 °C.

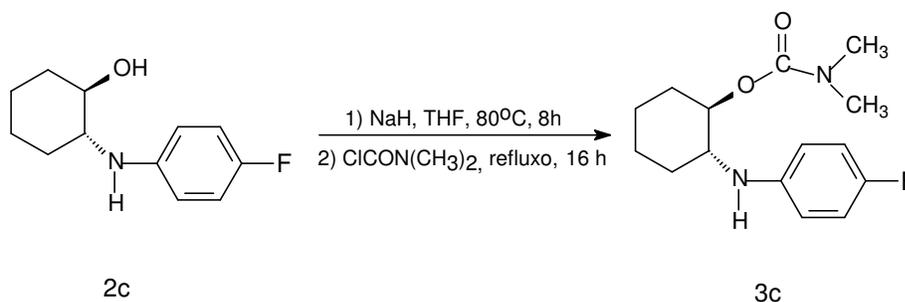
*trans*-2-(4-fluorfenilamino)cicloexanol: 50% de rendimento, sólido branco, p.f.: 94,5-95,2 °C.



Após atingir a temperatura ambiente, verteu-se a mistura reacional sobre uma solução gelada de bicarbonato de sódio 1% (50 mL) e extraiu-se o produto com éter etílico (3 x 30 mL). Lavou-se a fase etérea com uma solução gelada de bicarbonato de sódio 1% (2 x 20 mL) e água gelada (2 x 20 mL). A fase orgânica foi seca com sulfato de sódio anidro e o solvente removido em evaporador rotatório.

O composto **3a** foi purificado, lavando-se o sólido obtido repetidas vezes com hexano gelado, obtendo-se um sólido branco com 50% de rendimento e p.f.: 72,9 – 73,5 °C. O composto **3b** foi eluído em coluna de sílica gel, com gradiente de polaridade hexano/éter (8:2), obtendo-se um líquido marrom viscoso. O composto **3d** foi eluído em coluna de sílica gel, com gradiente de polaridade hexano/éter(1:1), obtendo-se um sólido amarelo com rendimento de 20% e p.f.: 111,0 – 114,0°C.

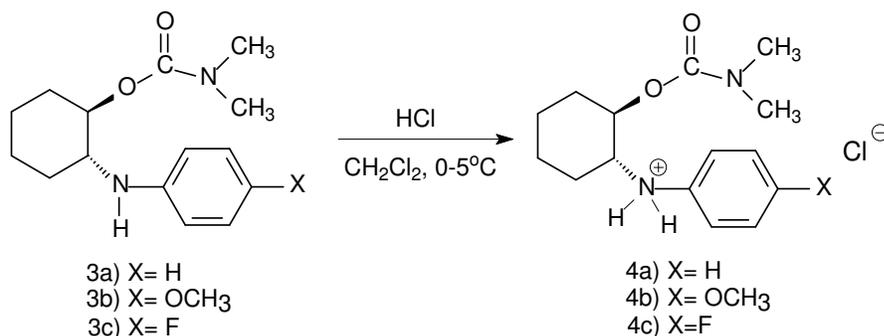
- Preparação do *trans*-*N,N*-dimetilcarbamato de 2-(4-fluorfenilamino)cicloexila (**3c**).



Em um balão de duas bocas, previamente flambado, equipado com condensador de refluxo, agitador magnético e sob atmosfera de nitrogênio adicionou-se 12 mmol (2,5 g) do amino álcool **2c** em 30 mL de THF anidro e então 24 mmol (0,6 g) de hidreto de sódio. A mistura reacional foi mantida sob agitação a 80°C por 8 horas. A seguir, adicionou-se lentamente 18 mmol (1,65 mL) de cloreto de *N,N*-dimetilcarbamoíla previamente destilado, mantendo a reação sob refluxo por 15 horas.

Após atingir a temperatura ambiente, verteu-se a mistura reacional sobre uma solução gelada de bicarbonato de sódio 1% (50 mL) e extraiu-se o produto com éter etílico (3 x 30 mL). Lavou-se a fase etérea com uma solução gelada de bicarbonato de sódio 1% (2 x 20 mL) e água gelada (2 x 20 mL). A fase orgânica foi seca com sulfato de sódio anidro e o solvente removido em evaporador rotatório. O composto **3c** foi eluído em coluna de sílica gel, com gradiente de polaridade hexano/éter (8:2), obtendo-se um sólido branco com rendimento de 35% e p.f.: 54,5 – 56,4 °C.

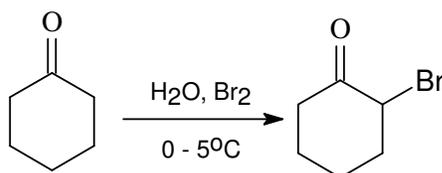
- Preparação dos cloridratos de *trans*-*N,N*-dimetilcarbamatos de cicloexila 2-fenilaminossustituídos (**4a – 4c**).



Solubilizou-se 3,8 mmol dos carbamatos (1,0 g de **3a**, 1,1 g de **3b** e 1,1 g de **3c**) em 10 mL de diclorometano, a solução foi resfriada em banho de gelo e em seguida adicionou-se HCl (37%) até reação ácida no papel tornassol. Adicionou-se sulfato de sódio anidro, filtrou-se e removeu-se o solvente em evaporador rotatório. Os cloridratos obtidos (**4a – 4c**) foram secos sob vácuo.

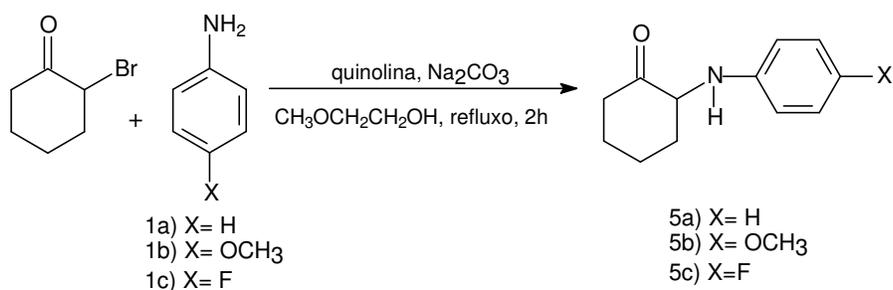
### 3.1.2 Síntese dos derivados *cis*-*N,N*-dimetilcarbamatos de cicloexila 2-fenilaminossustituídos

- Preparação da 2-bromociclohexanona.<sup>80</sup>



Em um balão de três bocas, equipado com condensador de refluxo, funil de adição e agitador magnético, foram colocados 180 mmol (19,0 mL) de ciclohexanona em 70 mL de água destilada. A mistura foi resfriada em banho de gelo e em seguida foram gotejados lentamente 180 mmol (9,5 mL) de bromo molecular. Terminada a adição, retirou-se o banho de gelo, mantendo a agitação até o completo descoramento da solução. Em seguida extraiu-se o produto com éter etílico (3 x 30 mL). A solução etérea foi lavada com água e com uma solução de bicarbonato de sódio 3%. Em seguida a fase etérea foi seca com sulfato de sódio anidro, filtrada e o solvente removido em evaporador rotatório. O produto obtido foi destilado a pressão reduzida (73°C/ 2 mmHg) obtendo-se um rendimento de 70% de um líquido incolor que foi mantido sob refrigeração.

- Preparação das 2-fenilaminocicloexanonas (**5a - 5c**).<sup>81</sup>



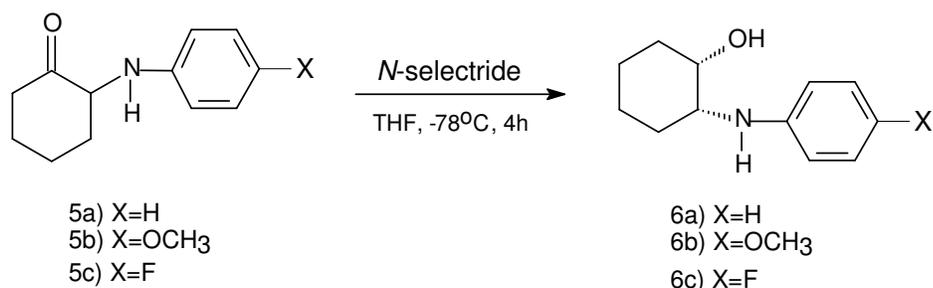
Em um balão de duas bocas, previamente flambado, equipado com condensador de refluxo, agitador magnético e sob atmosfera de nitrogênio, adicionou-se 0,2 mol (23 mL) de 2-bromocicloexanona, 0,2 mol da amina aromática desejada (18,2 mL **1a**, 24,6 g de **1b** e 19,0 mL de **1c**), 0,3 mol (31,8 g) de carbonato de sódio e 0,02 mol (2,4 mL) de quinolina em 150 mL de 2-metoxietanol. A mistura foi mantida sob agitação e refluxo por duas horas. Decorrido este tempo, deixou-se a mistura atingir a temperatura ambiente e o sólido foi removido por filtração e lavado com clorofórmio. O filtrado foi separado e o solvente foi removido por destilação a vácuo (80°C/30 mmHg).

2-(fenilamino)cicloexanona: 31% de rendimento, sólido branco, p.f.: 81,1–82,1 °C.

2-(4-metoxifenilamino)cicloexanona: 30% de rendimento, sólido marrom, p.f.: 91,4–92,8 °C.

2-(4-fluorfenilamino)cicloexanona: 30% de rendimento, sólido branco, p.f.: 75,7–76,0 °C.

- Preparação dos *cis*-2-fenilaminocicloexanóis **6a - 6c**.<sup>82</sup>



Em um balão de duas bocas, previamente flambado, equipado com agitador magnético e atmosfera de nitrogênio, dissolveu-se 4,55 mmol da respectiva 2-fenilaminocicloexanona (0,9 g de **5a**, 1,0 g de **5b** e 1,0 g de **5c**) em 25 mL de THF anidro. A solução foi resfriada a –78°C, e em seguida adicionou-se 9,1 mmol (9,1 mL) do tri-sec-butilborohidreto de sódio (1M). A mistura reacional foi mantida a –78°C sob agitação por 4 horas. Após este tempo deixou-se a mistura atingir a temperatura ambiente, em seguida

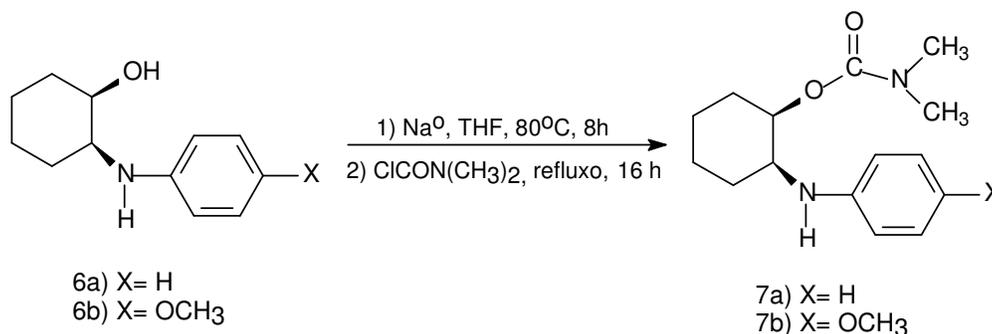
adicionou-se lentamente e em banho de gelo 2 mL de água, 5 mL de etanol, 4 mL de NaOH (6 M) e 5 mL de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (30%). A essa mistura adicionou-se 20 mL de água destilada e extraiu-se com éter etílico (3 x 40 mL). A fase etérea foi seca com sulfato de sódio anidro, filtrada e o solvente foi removido em evaporador rotatório. O produto formado foi lavado com hexano gelado e seco sob vácuo a temperatura ambiente, em pistola Abderhalden contendo óxido de cálcio.

*cis*-2-fenilaminocicloexanol: 36% de rendimento, sólido branco, p.f.: 69,5–71,6 °C.

*cis*-2-(4-metoxifenilamino)cicloexanol: 46% de rendimento, sólido marrom, p.f.: 50,6–52,4 °C.

*cis*-2-(4-fluorfenilamino)cicloexanol: 50% de rendimento, sólido branco, p.f.: 73,3–74,3 °C.

- Preparação dos *cis*-*N,N*-dimetilcarbamatos de cicloexila 2-fenilaminossubstituídos (**7a** – **7b**).<sup>79</sup>

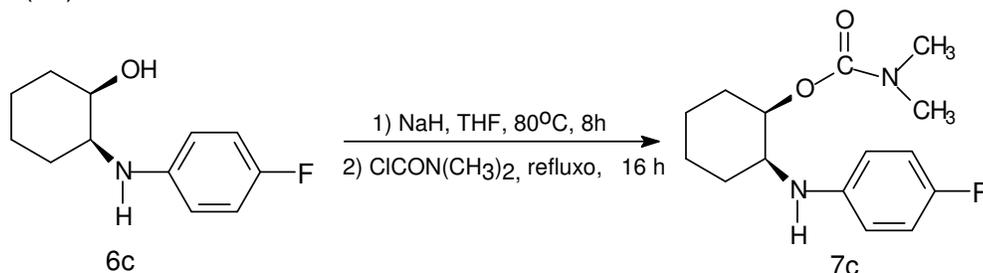


Em um balão de duas bocas, previamente flambado, equipado com condensador de refluxo, agitador magnético e sob atmosfera de nitrogênio adicionou-se 23 mmol do amino álcool (4,4 g de **6a**, ou 5,1 g de **6b**) em 30 mL de THF anidro e então 45 mmol (1,0 g) de sódio metálico. A mistura reacional foi mantida sob agitação a 80°C por 8 horas. A seguir, adicionou-se lentamente 34 mmol (3,1 mL) de cloreto de *N,N*-dimetilcarbamoila destilado, mantendo a reação sob refluxo por 15 horas.

Após atingir a temperatura ambiente, verteu-se a mistura reacional sobre uma solução gelada de bicarbonato de sódio 1% (50 mL) e extraiu-se o produto com éter etílico (3 x 30 mL). Lavou-se a fase etérea com uma solução gelada de bicarbonato de sódio 1% (2 x 20mL) e água gelada (2 x 20 mL). A fase orgânica foi seca com sulfato de sódio anidro e o solvente removido em evaporador rotatório.

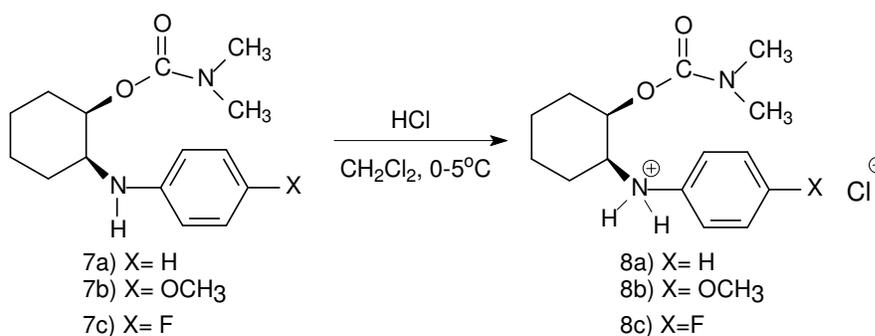
O composto **7a** foi purificado, lavando-se o sólido obtido repetidas vezes com hexano gelado, obtendo-se um sólido branco com rendimento de 39% e p.f.: 68,1 – 70,0°C. O composto **7b** foi eluído em coluna de sílica gel, com gradiente de polaridade hexano/éter (8:2), obtendo-se um líquido marrom viscoso com rendimento 23%.

- Preparação dos *cis-N,N*-dimetilcarbamato de 2-(4-fluorfenilamino)cicloexila (**7c**).



Em um balão de duas bocas, previamente flambado, equipado com condensador de refluxo, agitador magnético e sob atmosfera de nitrogênio adicionou-se 12 mmol (2,5 g) do amino álcool **6c** em 30 mL de THF anidro e então 24 mmol (0,6 g) de sódio metálico. A mistura reacional foi mantida sob agitação a 80°C por 8 horas. A seguir, adicionou-se lentamente 18 mmol (1,6 mL) de cloreto de *N,N*-dimetilcarbamoila destilado, mantendo a reação sob refluxo por 15 horas. Após atingir a temperatura ambiente, verteu-se a mistura reacional sobre uma solução gelada de bicarbonato de sódio 1% (50 mL) e extraiu-se o produto com éter etílico (3 x 30 mL). Lavou-se a fase etérea com uma solução gelada de bicarbonato de sódio 1% (2 x 20mL) e água gelada (2 x 20 mL). A fase orgânica foi seca com sulfato de sódio anidro e o solvente removido em evaporador rotatório. O composto **7c** foi eluído em coluna de sílica gel, com gradiente de polaridade hexano/éter (8:2), obtendo-se um sólido branco com rendimento de 45% e p.f.: 66,4 – 67,5 °C.

- Preparação dos cloridratos de *cis-N,N*-dimetilcarbamatos de cicloexila 2-fenilaminossustituídos (**8a – 8c**).



Solubilizou-se 3,8 mmol dos carbamatos (1,0 g de **7a**, 1,1 g de **7b** e 1,1 g de **7c**) em 10 mL de diclorometano, a solução foi resfriada em banho de gelo e em seguida adicionou-se HCl (37%) até reação ácida no papel tornassol. Em seguida adicionou-se sulfato de sódio anidro, filtrou-se e removeu-se o solvente em evaporador rotatório. Os cloridratos obtidos (**8a-8c**) foram secos sob vácuo.

### 3.2 Experimentos de RMN

Os espectros de RMN de  $^1\text{H}$  e de  $^{13}\text{C}$  foram obtidos em um espectrômetro Varian, modelo Mercury Plus BB operando a 300,059 MHz para o núcleo de hidrogênio e 75,457 MHz para o núcleo de carbono. As soluções foram preparadas a partir da diluição de 20 mg de amostra em 0,7 mL de  $\text{CDCl}_3$  e a temperatura da probe foi mantida a  $25^\circ\text{C}$ , utilizando  $\text{Me}_4\text{Si}$  como referência interna, sob condições típicas de operação para o  $^1\text{H}$  (janela espectral em torno de 4000 Hz, número de pontos igual a 32k, zero filled de 128k para a obtenção de uma resolução digital de 0,03 Hz).

### 3.3 Cálculos Teóricos

Os cálculos teóricos foram realizados utilizando o pacote de Programas Gaussian 09.<sup>83</sup> Para todos os compostos, foram obtidas superfícies de energia potencial (através do giro de  $360^\circ$  de determinados diedros), em nível de teoria HF/6-31G, com a finalidade de observarmos a posição de menor energia que os grupos adotam no espaço. As estruturas de mais baixa energia foram então otimizadas em um alto nível de teoria (B3LYP/6-311++G(d,p) e caracterizadas como mínimos absolutos por meio de cálculos de frequências vibracionais. Cálculos de NBO (versão 5.0) foram realizados para avaliar as interações hiperconjugativas utilizando o nível de teoria B3LYP/6-311++G(d,p).

### 3.4 Método de Ellman modificado

Os ensaios enzimáticos foram realizados no Laboratório de Toxicologia do Departamento de Ciências Básicas da Saúde da Universidade Estadual de Maringá, utilizando o Método de Ellman modificado.<sup>40</sup> As amostras de sangue total utilizadas foram coletadas a qualquer hora do dia, sem necessidade de preparação especial do voluntário. As amostras foram acondicionadas em frascos de vidros na geladeira, a temperatura de 2 a  $8^\circ\text{C}$  por no máximo 48 horas, utilizando heparina como anticoagulante.

### 3.4.1 Preparo dos Reagentes

Solução de Hidróxido de Potássio 0,05N

Adicionou-se 3,30 g de hidróxido de potássio (KOH) em um balão volumétrico de 1000 mL e completou-se o volume com água destilada.

Solução de Cromato de Potássio 40 µg/mL

Adicionou-se 0,04 g de cromato de potássio em um balão volumétrico de 100 mL e completou o volume com um solução de KOH 0,05 N. Transferiu 10 mL dessa solução para um balão de 100 mL e completou o volume com a solução de KOH 0,05N.

Solução de fosfato dibásico de sódio 0,1 M (Reagente 1)

Adicionou-se 26,81 g de fosfato dibásico de sódio heptahidratado ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ) em um balão volumétrico de 1000 mL e completou-se o volume com água destilada.

Solução de diidrogenofosfato de potássio 0,1 M (Reagente 2)

Adicionou-se 13,61 g de diidrogenofosfato de potássio ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) em um balão volumétrico de 1000 mL e completou-se o volume com água destilada.

Tampão fosfato pH 7,0

Adicionou-se volume suficiente do reagente 2 (cerca de 150 mL) em 100 mL do reagente 1 para ajustar o pH para 7,0 com auxílio de pHmetro.

Tampão fosfato pH 8,0

Adicionou-se volume suficiente do reagente 2 (cerca de 150 mL) em 450 mL do reagente 1 para ajustar o pH para 8,0 com auxílio de pHmetro.

Solução de iodeto de acetilticolina 0,075 M

Adicionou-se 0,11 g de iodeto de acetilticolina em um balão volumétrico de 5 mL e completou-se o volume com água destilada.

Solução de ácido ditionitrobenzóico (DTNB) 10 mM

Adicionou-se 0,04 g de ácido 5,5'-ditio-bis-2-nitrobenzóico (DTNB) em um balão volumétrico de 10 mL e adicionou-se 9 mL de tampão fosfato pH 7,0. Acrescentou 15 mg de bicarbonato de sódio e completou-se o volume com o mesmo tampão.

### *3.4.2 Determinação das colinesterases totais*

Adicionou-se 10 mL de tampão fosfato pH 8,0 em tubos de ensaio de 15 mL com tampa e em seguida pipetou-se 10 µL de amostra de sangue. Após homegeinização, pipetou-se 3 mL desta solução em cinco tubos de ensaio, adicionou-se 40 µL da concentração desejada do composto em estudo em cada um dos tubos e incubou-se por 10 minutos a 30°C.

Em seguida, as soluções dos tubos de ensaio foram transferidas para cinco cubetas, sendo que duas cubetas foram utilizadas como referência e nas outras três foram realizadas as medidas (compartimento amostra). Em cada cubeta foi adicionado 50 µL da solução de DTNB e então ajustou o zero de absorbância a 412 nm com as duas cubetas de referência. Na cubeta do compartimento amostra, adicionou-se 20 µL da solução de iodeto de acetiltiocolina, homogeneizou-se e realizou-se a leitura de absorbância a cada minuto, durante cinco minutos. Este último procedimento foi repetido para as outras duas cubetas restantes.

### *3.4.3 Determinação da butirilcolinesterase*

Centrifugou o sangue heparinizado a 2000 rpm por 10 minutos e separou o plasma. Adicionou-se 12 mL de tampão fosfato pH 8,0 em tubos de ensaio de 15 mL com tampa e em seguida pipetou-se 20 µL de plasma. Após homegeinização, pipetou-se 3 mL desta solução em cinco tubos de ensaio, adicionou-se 40 µL da concentração desejada do composto em estudo em cada um dos tubos e incubou-se por 10 minutos a 30°C.

Em seguida, as soluções dos tubos de ensaio foram transferidas para cinco cubetas, sendo que duas cubetas foram utilizadas como referência e nas outras três foram realizadas as medidas (compartimento amostra). Em cada cubeta foi adicionado 25 µL da solução de DTNB e então ajustou o zero de absorbância a 412 nm com as duas cubetas de referência. Na cubeta do compartimento amostra, adicionou-se 20 µL da solução de iodeto de acetiltiocolina, homogeneizou-se e realizou-se a leitura de absorbância a cada minuto, durante cinco minutos. Este último procedimento foi repetido para as outras duas cubetas restantes.

### 3.5 Docking Molecular

Os estudos de *docking* foram realizados utilizando o Autodock do programa Pyrx 0.9.<sup>68</sup> Os compostos em estudo foram docados nas estruturas cristalográficas 1GQR, acetilcolinesterase complexada com rivastigmina, e 1POM, butirilcolinesterase complexada com o íon colina, selecionadas do Protein Data Bank. Para cada arquivo PDB moléculas de água e ligantes (exceto os ligantes principais rivastigmina e íon colina) foram retirados. A partir destes arquivos foram feitos o *redocking* para validar os parâmetros escolhidos. As estruturas dos *compostos* em estudo foram desenhadas e otimizadas no programa Gaussian 09.<sup>83</sup>

Os cálculos de *docking* entre as enzimas e os compostos foram realizadas construindo uma caixa de 50x50x50 Å centrada nas coordenadas X= 8,058, Y= 64,887 e Z= 61,330 para a acetilcolinesterase e X= 132,478, Y= 114,974 e Z= 38,835 para a butirilcolinesterase, com um espaçamento de grade de 0,375 Å. O algoritmo Genético (AG) foi utilizado com um protocolo padrão de 50 poses obtidas para o ligante, uma população inicial de 150 indivíduos aleatórios, um número máximo de  $2,5 \times 10^5$  avaliações de energia e um máximo de  $2,7 \times 10^4$  gerações.

Os resultados de docking que apresentaram um RMSD inferior a 2.0 Å foram agrupados, e os resultados finais de cada ligante foram selecionados considerando a energia de ligação, sobreposição com o ligante cristalografado e interações com os resíduos da enzima.

Os melhores resultados foram submetidos a minimizações de energia através do programa NAMD2, o campo de força adotado para as proteínas foi o CHARMM C35b2-C36a2, enquanto que o dos ligantes foram geradas no mesmo formato pelo servidor SwissParam.<sup>84</sup>

A minimização de energia foi simulada com os complexos imersos em uma caixa com água cujas dimensões estavam a no mínimo 10 Å da superfície mais externa da proteína. Foram adicionadas quantidades apropriadas de contra-íons Na<sup>+</sup> ou Cl<sup>-</sup> para neutralizar as cargas do sistema, a temperatura e pressão ajustadas para 300K e 1 atm respectivamente.

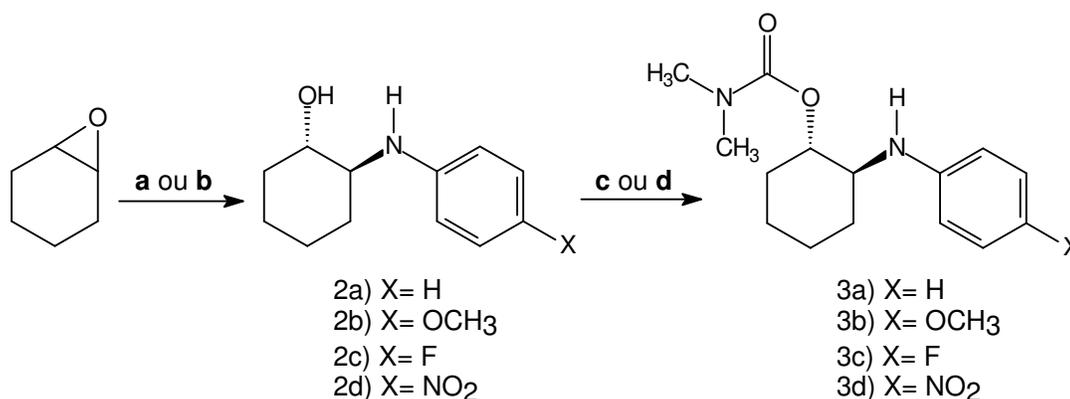
Após as minimizações de energia, os complexos proteína-ligante passaram por um redocking usando os mesmos parâmetros do docking onde obteve-se um RMSD (*root mean square deviation*) de no máximo 1,5 Å.

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 Síntese dos compostos

#### 4.1.1 Derivados *trans*-*N,N*-dimetilcarbamato de cicloexila 2-fenilaminossustituídos

De acordo com o Esquema 1, a preparação dos derivados *trans*-*N,N*-dimetilcarbamatos de cicloexila 2-fenilaminossustituídos foi realizada a partir da abertura do óxido de cicloexila com aminas aromáticas, obtendo-se como produtos intermediários os *trans*-2-fenilaminocicloexanóis (**2a-2d**) que foram posteriormente carbamoilados, para obtenção dos respectivos carbamatos (**3a-3d**).



Reagentes e condições: (a) amina aromática e H<sub>2</sub>O, a 60°C por 48 horas; (b) *p*-nitroanilina, alumina e benzeno, a 80°C por 48 horas; (c) Na<sup>o</sup>/THF a 80°C por 8 horas, cloreto de *N,N*-dimetilcarbamoila, refluxo por 16 horas, (d) NaH/THF a 80°C por 8 horas, cloreto de *N,N*-dimetilcarbamoila em refluxo por 16 horas.

**Esquema 1.** Rota sintética para obtenção dos isômeros *trans*-*N,N*-dimetilcarbamatos de cicloexila 2-fenilaminossustituídos.

Na preparação do *trans*-2-fenilaminocicloexanol (**2a**), *trans*-2-(4-metoxifenilamino)cicloexanol (**2b**) e *trans*-2-(4-fluorfenilamino)cicloexanol (**2c**), a aminólise do epóxido de cicloexila foi realizada na ausência de catalisador, utilizando água como solvente. Bonollo e colaboradores<sup>77</sup> demonstraram que a eficiência dessa reação depende do controle rigoroso das condições de pH. Sob condições ácidas (pH= 5,0), mesmo que o anel oxirano esteja em princípio ativado e que a amina esteja presente em concentração suficiente na forma desprotonada, a reação é lenta (100 horas) e a conversão é acompanhada pela hidrólise do amino álcool com a formação do correspondente *trans*-1,2-diol. Sob condições neutras a reação é mais rápida (45 horas) e o *trans*-1,2-diol não é

formado. No entanto, quando o processo é realizado em meio levemente básico, o tempo reacional é reduzido para 25 horas. A condição ideal para a reação é atingida quando 1,0 mmol do óxido de cicloexeno são misturados como 1,05 mmol de amina em 2,0 mL de água deionizada, sendo que o pH resultante de 8,30 sofre pouca variação durante a reação.

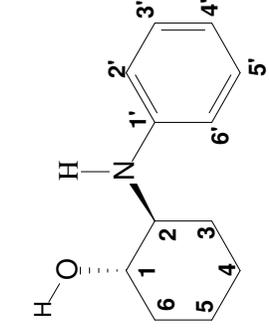
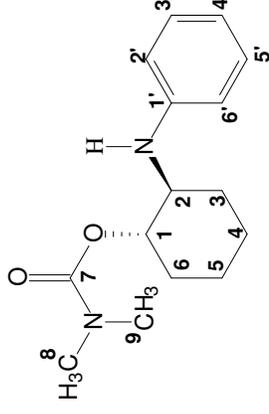
É importante destacar que devido à baixa reatividade da *p*-nitroanilina, o derivado *trans*-2-(4-nitrofenilamino)cicloexanol (**2d**) não pôde ser obtido a partir da metodologia utilizada na síntese dos demais compostos.<sup>77</sup> No decorrer deste trabalho, várias metodologias para a síntese de **2d** foram testadas sem sucesso, utilizando líquido iônico como solvente<sup>85,86</sup> e diferentes tipos de catalisadores, tais como MgO<sup>87</sup> e CdCl<sub>2</sub>.<sup>88</sup> No entanto, o produto desejado (**2d**) somente foi obtido quando utilizamos alumina como catalisador. Apesar disso, a presença do reagente de partida (*p*-nitroanilina), dificultou a purificação do composto diminuindo consideravelmente o rendimento desta reação (20%) em relação ao obtido na síntese dos demais derivados (50%-80%).

Na carbamoilação dos *trans*-2-fenilaminocicloexanóis utilizou-se sódio metálico para a preparação do correspondente alcóxido e posterior reação de substituição nucleofílica na carbonila do cloreto de *N,N*-dimetilcarbamoila, tendo como grupo abandonador o íon cloreto. No entanto, na síntese do derivado *trans*-*N,N*-dimetilcarbamato de 2-(4-fluorfenilamino)cicloexila (**3c**), a análise conjunta dos dados de RMN e de GC-MS mostrou a formação de uma mistura de compostos, sendo 25% do *trans*-*N,N*-dimetilcarbamato de 2-fenilaminocicloexila (**3a**) e 75% do composto desejado (**3c**). Algumas tentativas de separação dos compostos por cromatografia em coluna foram realizadas sem sucesso. Desse modo, foi necessário substituir o sódio metálico por hidreto de sódio, sendo que esta reação foi realizada com êxito.

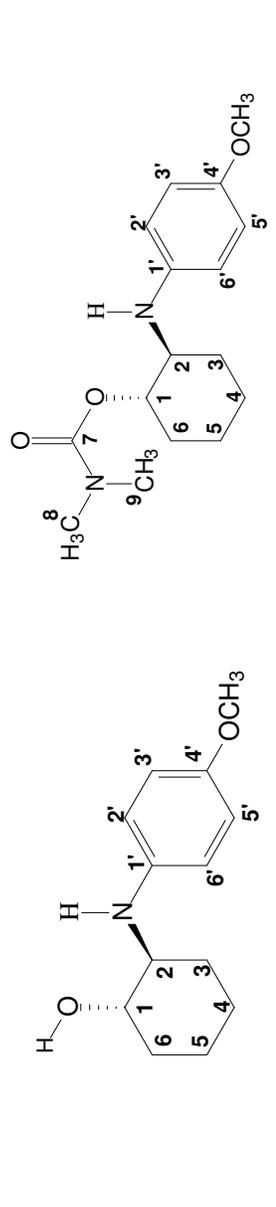
A caracterização dos derivados *trans*-2-fenilaminocicloexanóis (**2a-2d**) e *trans*-*N,N*-dimetilcarbamatos de cicloexila 2-fenilaminossustituídos (**3a-3d**) foi baseada na análise dos dados espectroscópicos de RMN de <sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C, e HSQC, anexados no final deste trabalho (Anexos 1-24). Nas Tabelas 1 a 4, estão compilados os dados de deslocamento químico de <sup>1</sup>H e de <sup>13</sup>C para estes compostos.

**Tabela 1.** Deslocamentos químicos de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  (ppm) em  $\text{CDCl}_3$  e multiplicidade dos sinais para o *trans*-2-fenilaminocicloexanol (**2a**) e *trans*-*N,N*-dimetilcarbamato de fenilaminocicloexila (**3a**).

		<b>2a</b>		<b>3a</b>		
C/H	$\delta^1\text{H}$	$J$ (Hz)	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^1\text{H}$	$J$ (Hz)	$\delta^{13}\text{C}$
1	3,33	ddd (9,6; 9,6; 4,5)	74,6	4,64	ddd (9,3; 9,3; 4,2)	76,8
2	3,12	ddd (11,2; 9,1; 3,9)	60,2	3,32	ddd (9,3; 9,3; 4,2)	57,2
3	1,04	m	31,7	1,46	m	31,7
4	2,10	m		2,02	m	
ax	1,32	m	25,1	1,38	m	24,4
eq	1,70	m		1,75	m	
5	1,32	m	24,4	1,38	m	24,3
ax	1,78	m		1,75	m	
eq	1,36	m	33,3	1,24	m	32,2
6	2,10	m		2,18	m	
eq						
1'	--	--	148,0	--	--	148,2
2'	6,70	m	114,5	6,60	m	113,1
3'	7,18	ddd (8,4; 7,2; 4,2)	129,5	7,12	ddd (8,7; 7,2; 4,2)	129,2
4'	6,70	m	118,5	6,64	m	116,9
5'	7,18	ddd (8,4; 7,2; 4,2)	129,5	7,12	ddd (8,7; 7,2; 4,2)	129,2
6'	6,70	m	114,5	6,60	m	113,1
7						157,0
8				2,67	s	35,9
9				2,81	s	36,5
NH	2,85	sl	-	3,97	sl	-

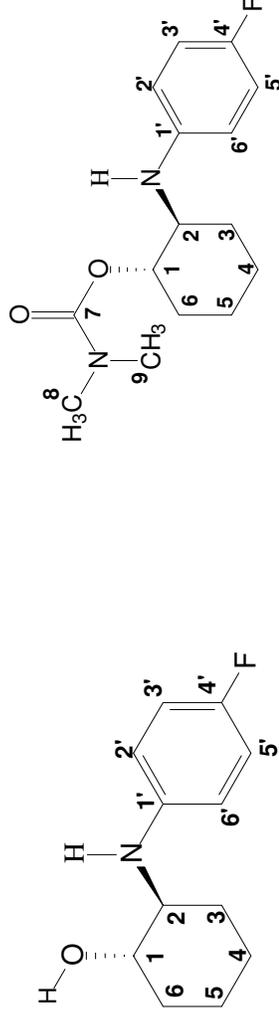


**Tabela 2.** Deslocamentos químicos de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  (ppm) em  $\text{CDCl}_3$  e multiplicidade dos sinais para o *trans*-2-(4-metoxifenilamino)cicloexanol (**2b**) e *trans*-*N,N*-dimetilcarbamato de 2-(4-metoxifenilamino)cicloexila (**3b**).



		<b>2b</b>		<b>3b</b>		
C/H	$\delta^1\text{H}$	$J$ (Hz)	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^1\text{H}$	$J$ (Hz)	$\delta^{13}\text{C}$
1	3,31	ddd (9,6; 9,6; 4,2)	74,5	4,62	ddd (9,3; 9,3; 4,2)	76,9
2	2,98	ddd (11,2; 9,1; 3,9)	61,7	3,28	ddd (9,3; 9,3; 4,2)	58,1
3	1,00	m	31,6	1,44	m	31,5
4	2,08	m		2,00	m	
ax	1,28	m	25,2	1,32	m	24,4
eq	1,70	m		1,72	m	
5	1,28	m	24,4	1,32	m	24,2
ax	1,75	m		1,72	m	
eq	1,34	m	33,3	1,22	m	32,3
6	2,10	m		2,14	m	
1'	--	--	141,8	--	--	142,5
2'	6,77	d (9,0)	115,0	6,57	d (9,0)	114,5
3'	6,67	d (9,0)	116,5	6,73	d (9,0)	114,8
4'	--	--	153,0	--	--	151,8
5'	6,67	d (9,0)	116,5	6,73	d (9,0)	114,8
6'	6,77	d (9,0)	115,0	6,57	d (9,0)	114,5
$\text{OCH}_3$	3,74	s	55,9	3,72	s	55,9
7				--	--	156,9
8				2,67	s	35,8
9				2,82	s	36,4
NH	3,00	sl	-	3,64	sl	-

**Tabela 3.** Deslocamentos químicos de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  (ppm) em  $\text{CDCl}_3$  e multiplicidade dos sinais para o do *trans*-2-(4-fluorfenilamino)cicloexanol (**2c**) *trans*-*N,N*-dimetilcarbamato de 2-(4-fluorfenilamino)cicloexila (**3c**).



C/H	<b>2c</b>				<b>3c</b>			
	$\delta$ $^1\text{H}$	$J$ (Hz)	$\delta$ $^{13}\text{C}$	$J_{\text{C-F}}$ (Hz)	$\delta$ $^1\text{H}$	$J$ (Hz)	$\delta$ $^{13}\text{C}$	$J_{\text{C-F}}$ (Hz)
1	3,32	ddd (9,3;9,3;4,2)	74,6		4,63	ddd (9,3; 9,3; 4,0)	76,9	
2	3,01	ddd (11,2;9,1;3,9)	61,3		3,25	ddd (9,6; 9,6; 3,9)	58,0	
3	ax 1,02	m	31,7		1,47	m	31,7	
4	eq 2,08	m			2,00	m		
5	ax 1,28	m	25,1		1,35	m	24,5	
6	eq 1,72	m	24,4		1,74	m	24,3	
1'	ax 1,28	m			1,35	m		
2'	eq 1,76	m	33,4		1,74	m	32,3	
3'	ax 1,36	m			1,23	m		
4'	eq 2,10	m			2,14	m		
5'	ax --	m	144,2	2,2	--	--	144,6	1,7
6'	eq 6,64	m	115,7	7,1	6,54	m	114,0	7,2
7	ax 6,88	m	115,9	21,9	6,83	m	115,5	22,2
8	eq --	m	156,4	234,7	--	--	155,6	234,3
9	ax 6,88	m	115,9	21,9	6,83	m	115,5	22,2
NH	2,92	sl	115,7	7,1	6,54	m	114,0	7,2
					--	--	156,9	
					2,67	s	35,9	
					2,82	s	36,5	
					3,83	sl	-	



Destaca-se para os derivados 2-fenilaminocicloexanóis (**2a-2d**) a presença de H1 entre  $\delta_H$  3,31-3,46 ppm, como sendo o mais desblindado devido ao efeito indutivo retirador causado pela hidroxila, e H2 vizinho ao grupo fenilamino, entre  $\delta_H$  2,98-3,29 ppm. Nos espectros de RMN de  $^{13}C$ , observam-se os sinais de C1 entre  $\delta_C$  74,5-74,9 ppm e de C2 entre  $\delta_C$  59,3-61,7 ppm.

A introdução do anel aromático foi confirmada pela presença dos sinais na região de  $\delta_H$  6,63-8,07 ppm correlacionados com os sinais entre  $\delta_C$  112,1-129,5 ppm nos mapas de contorno HSQC. No espectro de RMN de  $^1H$  para o derivado da anilina (**2a**) (Anexo 1), observa-se sinais de cinco hidrogênios do sistema aromático em  $\delta_H$  6,70 (m, 3H) e 7,18 (ddd, 2H) ppm, que através do mapa de contorno HSQC (Anexo 3), correlaciona-se com os carbonos em  $\delta_C$  114,5, 118,5 e 129,5 ppm, além do sinal em  $\delta_C$  148,0 ppm relativo ao carbono não ligado a hidrogênio.

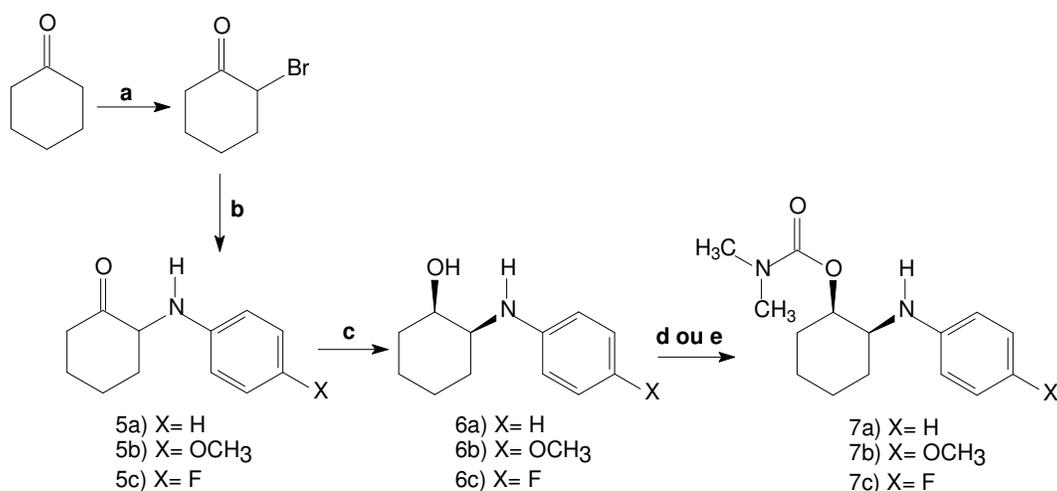
Para os derivados *para*-substituídos (**2b-2d**) os padrões de acoplamento relativos ao sistema aromático apresentam grande similaridade. No espectro de RMN de  $^1H$  (Anexo 4) para o derivado da *p*-metoxianilina (**2b**), observam-se sinais de quatro hidrogênios do sistema aromático em  $\delta_H$  6,67 (d,  $J=9,0$  Hz, H3'/H5') e 6,77 (d,  $J=9,0$  Hz, H2'/H6') ppm que através do mapa de contorno HSQC (Anexo 6), correlacionam-se com os carbonos em  $\delta_C$  116,5 e 115,0 ppm respectivamente, além dos sinais em  $\delta_C$  141,8 e 153,0 ppm relativos aos dois carbonos não ligados a hidrogênios C1' e C4' respectivamente.

Os derivados *trans*-*N,N*-dimetilcarbamatos de cicloexila 2-fenilaminossustituídos (**3a-3d**) foram caracterizados pela desblindagem de H1 e C1 devido a substituição do grupo hidroxila pelo grupo carbamato. Nos espectros de RMN de  $^1H$  destes compostos, observa-se a presença de H1 entre  $\delta_H$  4,62-4,64 ppm que através dos mapas de contorno HSQC, correlaciona-se com o carbono entre  $\delta_C$  76,2-76,9 ppm. A presença do grupo carbamato foi confirmada pelos sinais dos hidrogênios metílicos na região de  $\delta_H$  2,67-2,70 (s, 3H) e 2,80-2,82 (s, 3H) ppm, que através dos mapas de contorno HSQC (Anexos 15, 18, 21 e 24), correlacionam-se com os carbonos entre  $\delta_C$  35,8-35,9 e 36,4-36,5 ppm respectivamente, além do sinal entre  $\delta_C$  156,9-157,0 ppm relativo ao carbono carbonílico.

A partir dos valores das constantes de acoplamento  $^3J_{HH}$  para os hidrogênios H1 e H2, é possível prever a conformação mais estável. Como em ambos os hidrogênios há valores de  $^3J_{HH}$  maiores que 9,3 Hz, é possível inferir de acordo com a curva de Karplus, que estes hidrogênios encontram-se na posição axial, estando os grupos carbamato e fenilamino na posição equatorial.

#### 4.1.2 Derivados *cis*-*N,N*-dimetilcarbamatos de cicloexila 2-fenilaminossustituídos

Para a obtenção dos isômeros *cis* (Esquema 2), primeiramente foi realizada a preparação da 2-bromocicloexanona a partir da  $\alpha$ -bromação da cicloexanona. Nesta reação é necessário o controle rigoroso da temperatura (0°-5°) para que o produto desejado seja obtido com um bom rendimento (70%). A síntese das 2-fenilaminocicloexanonas (**5a-5c**) ocorreu através da reação de substituição nucleofílica da 2-bromocicloexanona com a respectiva amina aromática, utilizando quinolina como catalisador e etoxietanol como solvente. Os produtos (**5a-5c**) foram obtidos com um rendimento médio de 30%. Várias modificações foram realizadas na tentativa de melhorar o rendimento desta reação, principalmente na escolha do solvente utilizado na recristalização. No entanto, nenhum resultado satisfatório foi obtido.



Reagentes e condições: (a) Br<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>O, 0-5°C; (b) Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, quinolina, metoxietanol em refluxo por 2 horas; (c) *N*-selectride, THF a -78°C por 4 horas (d) Na<sup>0</sup>/THF a 80°C por 8 horas, cloreto de *N,N*-dimetilcarbamoila em refluxo por 16 horas, (e) NaH/THF a 80°C por 8 horas, cloreto de *N,N*-dimetilcarbamoila em refluxo por 16 horas.

**Esquema 2.** Rota sintética para obtenção dos isômeros *cis*-*N,N*-dimetilcarbamatos de cicloexila 2-aminossustituídos.

A obtenção da 2-(4-nitrofenilamino)cicloexanona e por consequência de seu derivado carbamato não foi possível. Devido à baixa reatividade da *p*-nitroanilina a reação de substituição com a 2-bromocicloexanona não ocorreu. Algumas modificações foram feitas, tais como aumento da temperatura e do tempo do reacional, porém o reagente de partida foi isolado em todos os casos. Como não foi encontrada nenhuma rota sintética alternativa para obtenção deste derivado, o mesmo não pode ser sintetizado.

Para a síntese dos *cis*-2-fenilaminocicloexanóis (**6a-6c**), foi realizada a redução estereosseletiva das 2-fenilaminocicloexanonas (**5a-5c**) com N-selectride. Nesta etapa o controle da temperatura (-78°C) foi muito importante para que apenas o isômero *cis* fosse obtido.

A carbamoilação dos derivados *cis* ocorreu da mesma forma que para os derivados *trans*, sendo que para o amino álcool **6c** também houve a necessidade de utilizar o hidreto de sódio no lugar do sódio metálico.

A caracterização dos derivados *cis*-2-fenilaminocicloexanona (**5a-5c**), *cis*-2-fenilaminocicloexanóis (**6a-6c**) e *cis*-*N,N*-dimetilcarbamatos de cicloexila 2-fenilaminossustituídos (**7a-7c**) também foi baseada na análise dos dados espectroscópicos de RMN de <sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C e HSQC, anexados no final deste trabalho (Anexos 25-51). Nas Tabelas 5 a 7, estão compilados os dados de deslocamento químico de <sup>1</sup>H e de <sup>13</sup>C para estes compostos.

Destaca-se para as 2-fenilaminocicloexanonas (**5a-5c**) a presença da carbonila da cetona (C1) entre  $\delta_c$  208,5 – 209,1 ppm e a presença de H2 entre  $\delta_H$  3,92 – 4,00 ppm. A introdução do anel aromático foi confirmada pela presença dos sinais na região de  $\delta_H$  6,54 – 7,17 ppm correlacionados com os sinais entre  $\delta_c$  113,2 - 129,5 ppm nos mapas de contorno HSQC. No espectro de RMN de <sup>1</sup>H para o derivado da anilina (**5a**) (Anexo 25), observam-se sinais de cinco hidrogênios do sistema aromático em  $\delta_H$  7,17 (m, 2H) 6,71 (m, 1H) e 6,60 (m, 1H) ppm que através do mapa de contorno HSQC (Anexo 27), correlacionam-se com os carbonos em  $\delta_c$  129,5, 117,7, 113,2 ppm, além do sinal em  $\delta_c$  146,7 ppm relativo ao carbono não ligado a hidrogênio.

Para os derivados *para*-substituídos (**5b** e **5c**) os padrões de acoplamento relativos ao sistema aromático apresentam grande similaridade. No espectro de RMN de <sup>1</sup>H (Anexo 28) para o derivado da *p*-metoxianilina (**5b**), observam-se sinais de quatro hidrogênios do sistema aromático em  $\delta_H$  6,77 (d,  $J=9,0$  Hz, H3'/H5') e 6,57 (d,  $J=9,0$  Hz, H2'/H6') ppm que através do mapa de contorno HSQC (Anexo 30), correlacionam-se com os carbonos em  $\delta_c$  115,2 e 114,6 ppm respectivamente, além dos sinais em  $\delta_c$  152,4 e 141,2 ppm relativos aos dois carbonos não ligados a hidrogênios.

Para os derivados 2-fenilaminocicloexanóis (**6a-6c**) destaca-se o aparecimento de H1 na região de  $\delta_H$  4,00 - 4,05 ppm e C1 entre  $\delta_c$  67,8 -67,9 ppm. O sinal de H2, vizinho ao grupo fenilamino, encontra-se entre  $\delta_H$  3,29 - 3,39 ppm correlacionado com C2 entre  $\delta_c$  55,1 -55,9 ppm.

Os derivados *cis*-*N,N*-dimetilcarbamatos de cicloexila 2-fenilaminossustituídos (**7a-7c**) foram caracterizados, pela desblindagem de H1 e C1 devido a introdução do grupo carbamato. Nos espectros de RMN de <sup>1</sup>H destes compostos, observa-se a presença de H1 entre  $\delta_H$  5,00 – 5,02 ppm que através dos mapas de contorno HSQC, correlaciona-se

com o carbono entre  $\delta_C$  72,7 – 73,3 ppm. A presença do grupo carbamato foi confirmada pelos sinais dos hidrogênios metílicos na região de  $\delta_H$  2,88 -2,91 (s, 6H) ppm, que através dos mapas de contorno HSQC (Anexos 45, 48 e 51), correlaciona-se com os carbonos entre  $\delta_C$  35,8 – 36,6 ppm, além do sinal entre  $\delta_C$  156,0 - 156,4 ppm relativo ao carbono carbonílico.

Os valores das constantes de acoplamento  $^3J_{HH}$  para H2 são maiores que 9,3 Hz, o que indica que este hidrogênio encontra-se na posição axial e por consequência o grupo fenilamino encontra-se na posição equatorial. Já para H1, não foi possível verificar a presença de constantes de acoplamentos grandes, o que indica que no confômero majoritário este hidrogênio encontra-se na posição equatorial e o grupo carbamato na posição axial.

Para a realização dos testes farmacológicos houve a necessidade de preparar os sais dos respectivos carbamatos, de forma a aumentar a solubilidade em água. Inicialmente tentamos metilar o nitrogênio do grupo amino para que o produto formado tivesse uma maior similaridade estrutural com a neostigmina. Duas metodologias foram testadas, a primeira foi uma metilação exaustiva com iodeto de metila<sup>89</sup> em acetona anidra, a temperatura ambiente por oito horas, e a segunda uma metilação com dimetilsulfato<sup>35</sup> em THF sob refluxo por 48 horas. Como em ambos os casos o produto desejado não foi obtido e devido a muitos fármacos serem administrados na forma de cloridratos, optou-se pela síntese desses para a realização dos testes farmacológicos.

Os compostos foram então preparados na forma de cloridrato, sendo que o cloridrato do *trans-N,N*-dimetilcarbamato de 2-(4-nitrofenilamino)cicloexila não pode ser obtido, provavelmente devido a presença do grupo nitro, que diminui a disponibilidade do par de elétrons do átomo de nitrogênio da amina para a protonação.

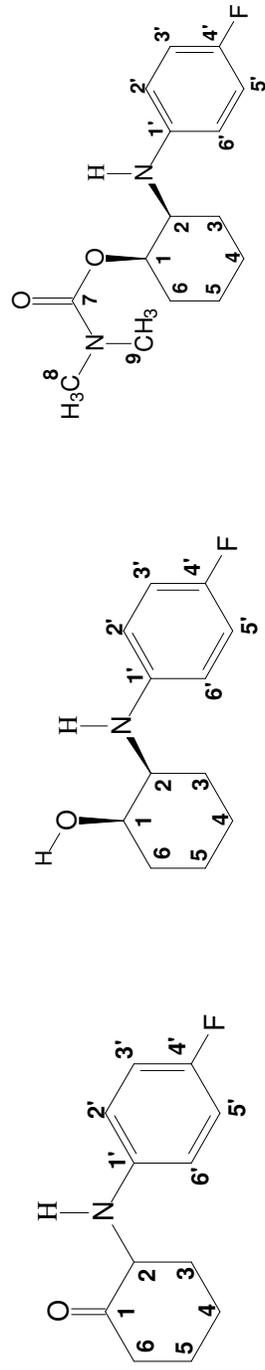
A confirmação da obtenção dos cloridratos de *cis* e *trans--N,N*-dimetilcarbamatos de cicloexila 2-fenilaminossustituídos (**4a-4c** e **8a-8c**) foi realizada através dos espectros de RMN de  $^1H$ , anexados no final deste trabalho (Anexos 52-57). Para os derivados *trans* (**4a-4c**) a principal mudança foi a desblindagem de H2, que está ligado diretamente ao grupo fenilaminossustituído, da região de  $\delta_H$  3,25 - 3,40 ppm para  $\delta_H$  3,54 - 3,59 ppm, Para os derivados *cis* (**8a-8c**) observou-se uma blindagem nos sinais de H1 e H2, da região de  $\delta_H$  5,00 – 5,02 ppm para  $\delta_H$  4,65 – 4,69 ppm e da região de  $\delta_H$  3,38 – 3,50 ppm para  $\delta_H$  3,31 - 3,33 ppm, respectivamente.



**Tabela 6.** Deslocamentos químicos de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  (ppm) em  $\text{CDCl}_3$  e multiplicidade dos sinais para o *cis*-2-(4-metoxifenilamino)cicloexanona (**5b**), *cis*-2-(4-metoxifenilamino)cicloexanol (**6b**) e *cis*-*N,N*-dimetilcarbamato de 2-(4-metoxifenilamino)cicloexila (**7b**).

C/H	<b>5b</b>		<b>6b</b>		<b>7b</b>		
	$\delta^1\text{H}$	$J$ (Hz)	$\delta^{13}\text{C}$	$J$ (Hz)	$\delta^1\text{H}$	$J$ (Hz)	$\delta^{13}\text{C}$
1	-	-	209,1	-	67,8	-	73,0
2	3,92	dd (12,3;5,7)	63,0	m	55,9	ddd (9,6; 3,3; 3,3)	54,7
3 ax	1,44	m	36,2	m	27,4	m	28,4
eq	2,60	m	-	m	-	m	-
4 ax	1,69	m	28,3	m	23,9	m	23,9
eq	2,13	m	-	m	-	m	-
5 ax	1,75	m	24,3	m	20,4	m	20,8
eq	1,90	m	-	m	-	m	-
6 ax	2,40	m	41,4	m	31,4	m	29,5
eq	2,55	m	-	m	-	m	-
1'	--	--	141,2	--	141,4	--	141,3
2'	6,57	d (9,0)	114,6	d (9,0)	115,0	d (9,0)	115,0
3'	6,77	d (9,0)	115,2	d (9,0)	115,8	d (9,3)	115,1
4'	--	--	152,4	--	152,7	--	152,1
5'	6,77	d (9,0)	115,2	d (9,0)	115,8	d (9,3)	115,1
6'	6,57	d (9,0)	114,6	d (9,0)	115,0	d (9,0)	115,0
OCH <sub>3</sub>	3,74	s	56,0	s	56,2	s	55,8
7	-	-	-	-	-	-	156,1
8	-	-	-	-	2,90	s	36,0
9	-	-	-	-	2,90	s	36,4
NH	-	-	-	-	4,00	sl	-

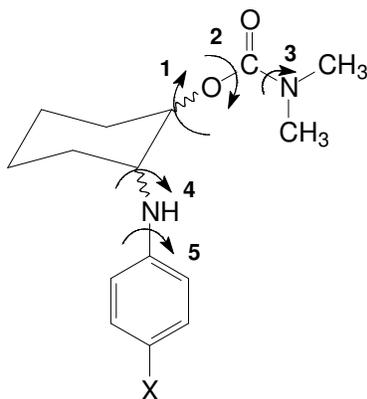
**Tabela 7.** Deslocamentos químicos de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  (ppm) em  $\text{CDCl}_3$  e multiplicidade dos sinais para o *cis*-2-(4-fluorfenilamino)cicloexanona (**5c**), *cis*-2-(4-fluorfenilamino)cicloexanol (**6c**) e *cis*-*N,N*-dimetilcarbamato de 2-(4-fluorfenilamino)cicloexila (**7c**).



C/H	5c			6c			7c		
	$\delta^1\text{H}$	$J$ (Hz)	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^1\text{H}$	$J$ (Hz)	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^1\text{H}$	$J$ (Hz)	$\delta^{13}\text{C}$
1	-	-	208,5	4,01	m	67,9	5,01	m	72,7
2	3,92	dd (12,0;6,0)	62,4	3,30	ddd(9,3;3,7;3,7)	55,8	3,38	ddd (9,6;3,3;3,3)	54,2
3 ax	1,43	m	35,7	1,59	m	27,3	1,51	m	28,1
eq	2,62	m		1,66	m		1,81	m	
4 ax	1,70	m	28,1	1,37	m	24,0	1,36	m	23,8
eq	2,18	m		1,67	m		1,68	m	
5ax	1,81	m	24,0	1,44	m	20,2	1,49	m	20,7
eq	1,92	m		1,61	m		1,49	m	
6 ax	2,41	m	41,1	1,59	m	31,5	1,48	m	29,4
eq	2,58	m		1,83	m		1,96	m	
1'	--	--	142,9	--	--	143,7	--	--	143,5
2'	6,54	m	113,8	6,58	m	115,0	6,51	m	114,2
3'	6,87	m	115,7	6,87	m	115,9	6,82	m	115,5
4'	--	--	155,8	--	--	156,1	--	--	155,6
5'	6,87	m	115,7	6,87	m	115,9	6,82	m	115,5
6'	6,54	m	113,8	6,58	m	115,0	6,51	m	114,2
7									156,0
8							2,88	s	35,8
9							2,88	s	36,3
NH	-	-	-	2,75	sl	-	3,82	sl	-

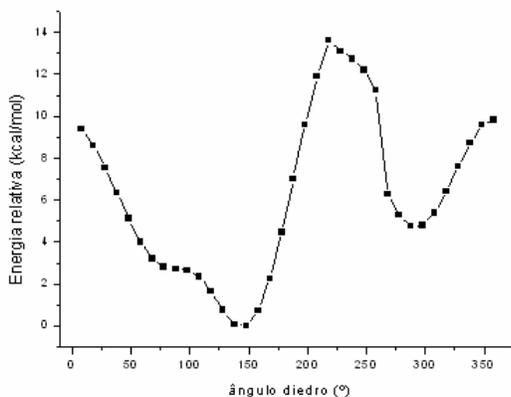
## 4.2 Análise Conformacional

Com a finalidade de investigar a conformação preferencial dos isômeros *cis* e *trans* dos carbamatos e a influência dos substituintes no equilíbrio conformacional, primeiramente foram realizados os cálculos de superfície de energia potencial (SEP), para determinação das estruturas de menor energia. Essas superfícies são gráficos de energia obtidos a partir do giro de determinados diedros. As setas na Figura 7 representam os diedros que foram analisados para ambos os isômeros e a numeração mostra a seqüência em que estes giros foram feitos.



**Figura 7.** Ângulos diedro avaliados para a obtenção das SEP.

Cada diedro é girado de 10° em 10° em um total de 360° e a energia de cada posição é calculada, a Figura 8 mostra a SEP obtida a partir do giro do diedro 1. As estruturas de menores energias são utilizadas para o giro do próximo diedro, e assim sucessivamente, até que todas as rotações possíveis tenham sido analisadas.



**Figura 8.** Representação de uma SEP.

As estruturas mais estáveis foram então otimizadas e os valores de energia obtidos foram usados na determinação da contribuição (população) de cada confômero no equilíbrio.

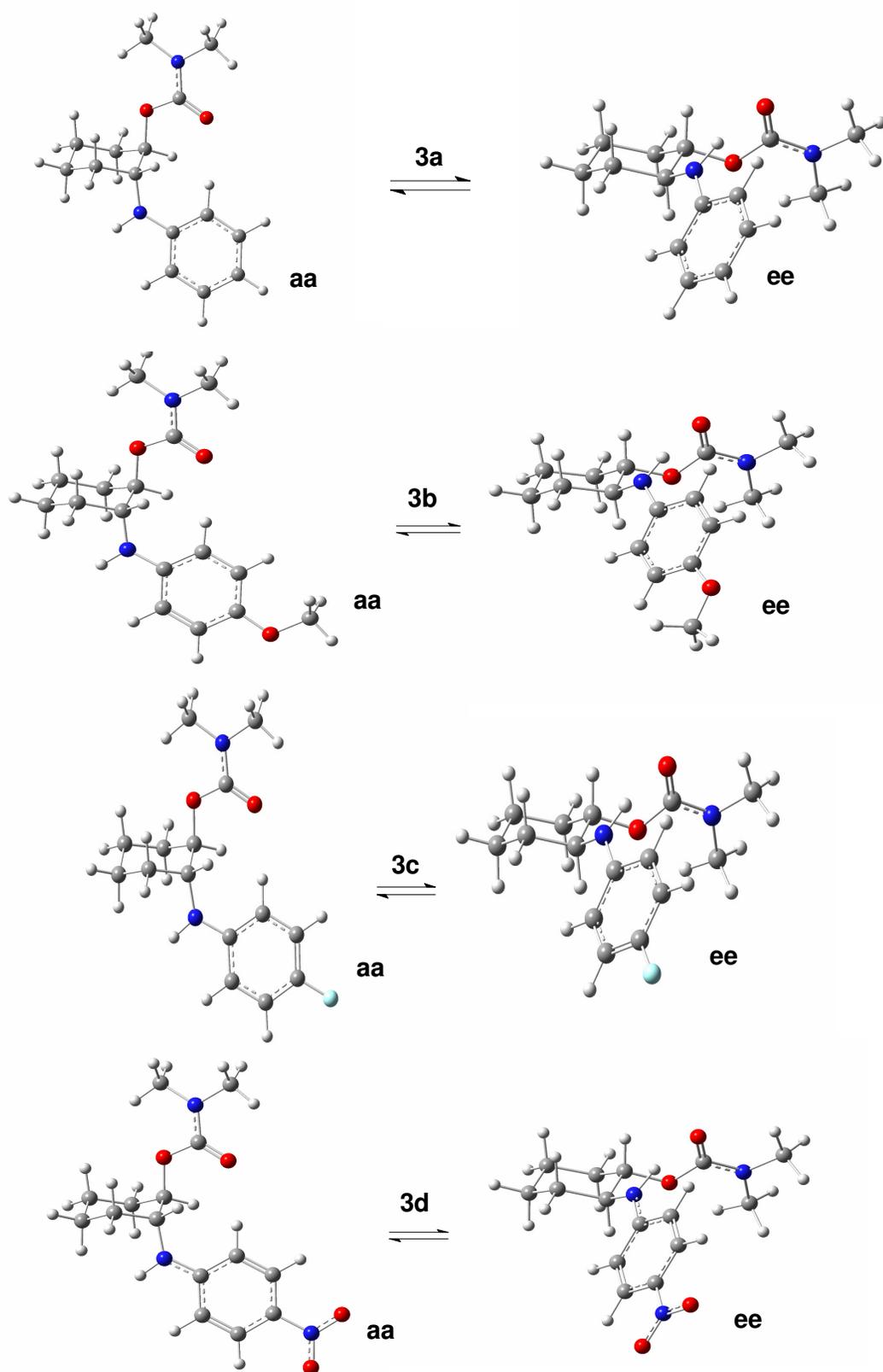
Para estes cálculos foi utilizada a seguinte equação na qual  $n_1$  e  $n_2$  são as frações molares de cada confômero no equilíbrio,  $\Delta E$  é a diferença de energia entre os confômeros,  $R$  é a constante universal dos gases (8,31 J/molK),  $T$  a temperatura ambiente e  $K$  a constante de equilíbrio.

$$k = \frac{n_1}{n_2} = 2 \exp\left(\frac{-\Delta E}{RT}\right)$$

#### 4.2.1 *Trans-N,N-dimetilcarbamatos de cicloexila 2-fenilaminossustituídos*

Para os isômeros *trans-N,N*-dimetilcarbamatos de cicloexila 2-fenilaminossustituídos duas conformações são possíveis, uma com os dois substituintes na axial, representada pela sigla **aa** e outra com os dois substituintes na equatorial, representada por **ee**. A Figura 9 mostra o equilíbrio conformacional para todos os compostos da série de isômeros *trans*. Para o derivado da *p*-metoxianilina (**3b**) foram obtidos dois possíveis rotâmeros em relação à posição do grupo metoxila para cada conformação, porém como as estruturas têm energias e características muito próximas, consideramos apenas a estrutura de mais baixa energia para o cálculo das populações.

Os dados de energia, população e momento de dipolo ( $\mu$ ) para os confômeros *trans* obtidos a partir dos cálculos teóricos estão apresentados na Tabela 8.



**Figura 9.** Estruturas otimizadas no nível de teoria B3LYP/6-311++G(d,p) para os *trans*-*N,N*-dimetilcarbamatos de cicloexila 2-fenilaminossustituídos. (**3a-3d**).

A análise dos dados da Tabela 8 mostra que todos os confôrmeros **aa** apresentam uma maior energia em relação aos confôrmeros **ee**, isto porque a presença de grupos volumosos na posição axial gera uma repulsão com os hidrogênios 1,3-diaxiais desestabilizando estes confôrmeros. Desse modo, o equilíbrio conformacional está deslocado para o confôrmero **ee**, sendo este responsável por mais de 97% da população para todos os compostos da série.

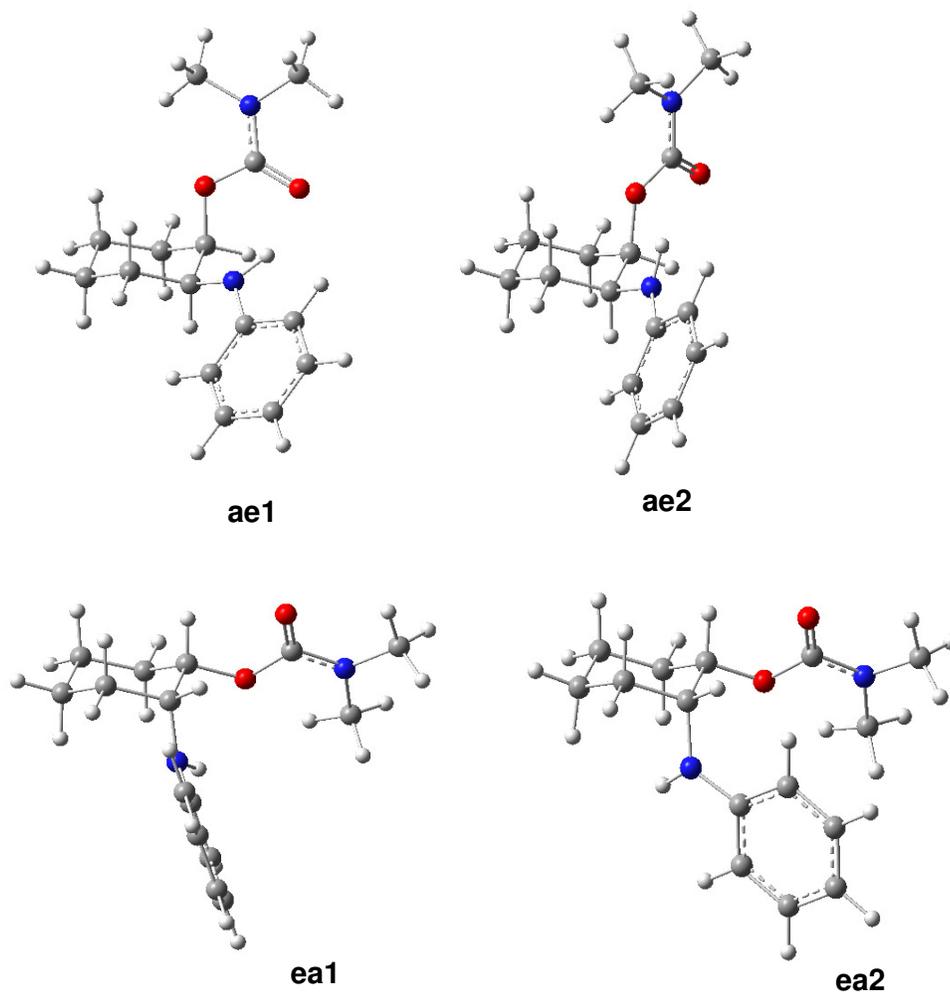
**Tabela 8.** Valores de energia, população e momento de dipolo ( $\mu$ ) para cada confôrmero dos isômeros *trans-N,N*-dimetilcarbamatos de cicloexila 2-fenilaminossustituídos obtidos por cálculos teóricos.

Composto		Energia (Hartree)	E <sub>rel</sub> (Kcal)	População (%)	$\mu$ (D)
<b>3a</b>	aa	-845,0609942	2,52	1,4	4,49
	ee	-845,0649656	0	98,6	3,77
<b>3b</b>	aa	-959,6142967	2,10	2,8	4,31
	ee	-959,6175831	0	97,2	4,00
<b>3c</b>	aa	-944,3285963	2,37	1,8	6,30
	ee	-944,3323229	0	98,2	5,21
<b>3d</b>	aa	-1049,6318255	3,20	0,4	11,46
	ee	-1049,6368684	0	99,6	10,20

Estes resultados estão de acordo com os valores das constantes de acoplamento  $^3J_{HH}$  obtidos a partir dos espectros de RMN de  $^1H$ , onde  $^3J_{HH}$  é maior que 9,3 Hz para os hidrogênios H1 e H2, indicando que estes se encontram na posição axial e os substituintes (carbamato e fenilamino) encontram-se na posição equatorial.

#### 4.2.2 *Cis-N,N*-dimetilcarbamatos de cicloexila 2-fenilaminossustituídos

Para os isômeros *cis-N,N*-dimetilcarbamatos de cicloexila 2-fenilaminossustituídos duas conformações são possíveis, uma com o grupo carbamato na axial e o grupo fenilamino na equatorial, representada pela sigla **ae** e outra com o grupo carbamato na equatorial e o grupo fenilamino na axial, representada por **ea**. Para cada uma das conformações foram obtidas duas estruturas de mínimo de energia (rotâmeros) que serão representadas por **ae1**, **ae2**, **ea1** e **ea2**. A Figura 10 representa as estruturas obtidas para o derivado da anilina (**7a**), sendo que para os demais compostos as mesmas conformações foram obtidas.



**Figura 10.** Estruturas otimizadas no nível de teoria B3LYP/6-311++G(d,p) do isômero *cis* *N,N*-dimetilcarbamato de 2-fenilaminocicloexila.

Para o derivado da *p*-metoxianilina (**7b**), foram obtidos dois possíveis rotômeros em relação à posição do grupo metoxila para cada uma das estruturas (**ae1**, **ae2**, **ea1** e **ea2**), porém como estas têm energias e características muito próximas, consideramos apenas as estruturas de energia mais baixa.

Na Tabela 9 estão compilados os dados de energia, população e momento de dipolo ( $\mu$ ) para cada confômero dos carbamatos *cis* obtidos por cálculos teóricos. Os cálculos de população e energia relativa para cada derivado foram realizados com as estruturas mais estáveis de cada confômero, neste caso **ae1** e **ea1**.

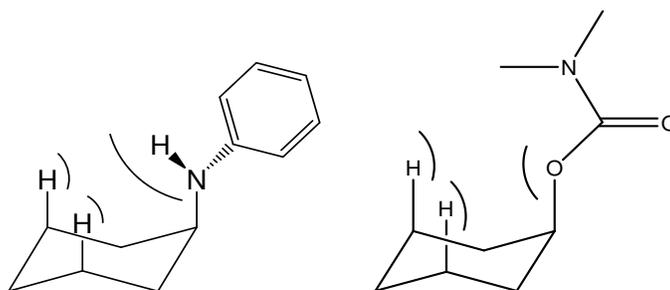
A análise dos dados da Tabela 9 mostra que os confômeros com o grupo carbamato na axial (**ae**) apresentam uma menor energia em relação aos confômeros com o grupo fenilamino na axial (**ea**). Estes resultados estão de acordo com os valores das

constantes de acoplamento  $^3J_{\text{HH}}$  obtidos a partir dos espectros de RMN de  $^1\text{H}$ . Neste caso, observou-se valores de  $^3J_{\text{HH}}$  acima de 9,3 Hz apenas para o hidrogênio H2, indicando que este encontra-se na posição axial e conseqüentemente o grupo fenilamino encontra-se na posição equatorial.

**Tabela 9.** Valores de energia, população e momento de dipolo ( $\mu$ ) para cada confôrmero dos isômeros *cis*-*N,N*-dimetilcarbamatos de cicloexila 2-aminosubstituídos obtidos por cálculos teóricos.

Composto	Energia (Hartree)	$E_{\text{rel}}$ (Kcal)	População (%)	$\mu$ (D)	
<b>7a</b>	ae1	-845,0625760	0	87,0	4,60
	ae2	-845,0622728	-	-	3,32
	ea1	-845,0607694	1,13	13,0	2,78
	ea2	-845,0595500	-	-	2,55
<b>7b</b>	ae1	-959,6153670	0	81,1	6,37
	ae2	-959,6153138	-	-	4,48
	ea1	-959,6139930	0,86	18,9	1,563
	ea2	-959,6123572	-	-	1,46
<b>7c</b>	ae1	-944,3299295	0	87,8	4,26
	ae2	-944,3294946	-	-	2,90
	ea1	-944,3280616	1,17	12,2	4,17
	ea2	-944,3268366	-	-	3,65

Na conformação **ae**, o grupo carbamato (apesar de ter um volume maior que o grupo fenilamino) possui seus átomos relativamente distantes do anel cicloexânico, diminuindo as repulsões 1,3-diaxiais. Por outro lado, na conformação **ea** o grupo fenilamino encontra-se perto do anel, causando uma maior repulsão entre o hidrogênio do grupo amino e os hidrogênios 1,3-diaxiais (Figura 11).

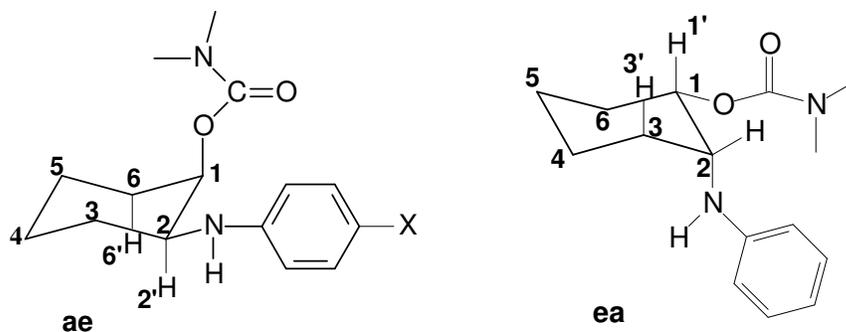


**Figura 11.** Interações estéricas entre os grupos fenilamino, carbamato e os hidrogênios 1,3-diaxiais.

Para avaliar a estabilização causada pelas interações hiperconjugativas nos conformêros **ae** e **ea**, foram realizadas análises de NBO. A Tabela 10 mostra as principais interações que envolvem os grupo substituintes.

A análise dos resultados obtidos mostra que quando o grupo carbamato encontra-se na posição axial (**ae**) existe uma interação de orbital estabilizante entre  $\sigma_{C2-H2'} \rightarrow \sigma^*_{C1-O}$ , que possui uma energia consideravelmente maior que a interação entre  $\sigma_{C1-H1'} \rightarrow \sigma^*_{C2-N}$ , que ocorre quando o grupo fenilamino encontra-se na posição axial (**ea**). Isto ocorre porque o orbital antiligante  $\sigma^*_{C1-O}$  é um melhor acceptor de elétrons que o orbital antiligante  $\sigma^*_{C2-N}$ . Através do somatório das principais interações hiperconjugativas dos grupos substituintes, é possível observar que estas são mais efetivas na conformação **ae**, sendo que há uma diferença em torno de 1,50 kcal/mol em relação a conformação **ea**.

**Tabela 10.** Interação hiperconjugativa obtida através das análises de NBO para os derivados *cis*- *N,N*-dimetilcarbamatos de cicloexila 2-fenilaminossustituídos.



			E (Kcal/mol)		
Conformação	NBO doador	NBO receptor	7a	7b	7c
<b>ae</b>	$\sigma_{C2-H2'}$	$\sigma^*_{C1-O}$	5,90	5,87	5,88
	$\sigma_{C6-H6'}$	$\sigma^*_{C1-O}$	4,91	4,92	4,91
	$\sigma_{C3-C4}$	$\sigma^*_{C2-N}$	2,71	2,68	2,71
	$\sigma_{C6-C1}$	$\sigma^*_{C2-N}$	2,56	2,55	2,57
	Total		16,08	16,02	16,07
<b>ea</b>	$\sigma_{C1-H1'}$	$\sigma^*_{C2-N}$	3,98	3,95	3,98
	$\sigma_{C3-H3'}$	$\sigma^*_{C2-N}$	4,27	4,21	4,29
	$\sigma_{C5-C6}$	$\sigma^*_{C1-O}$	3,04	3,06	3,03
	$\sigma_{C3-C2}$	$\sigma^*_{C1-O}$	3,29	3,33	3,29
	Total		14,58	14,55	14,59

A preferência conformacional obtida a partir dos cálculos teóricos está de acordo com os dados obtidos experimentalmente. Analisando os espectros de RMN de  $^1\text{H}$  dos compostos *cis-N,N*-dimetilcarbamatos de cicloexila 2-fenilaminossustituídos (Anexos 43, 46 e 49) observa-se que o hidrogênio ligado ao carbono que contém o grupo carbamato (H1) encontra-se mais desblindado em relação ao mesmo hidrogênio nos isômeros *trans* (Anexos 13, 16, 19 e 22). A explicação para a desblindagem de H1 nos isômeros *cis* está relacionada com a preferência conformacional. Como nestes isômeros o confômero **ae** é majoritário, H1 apresenta um maior caráter de hidrogênio equatorial, enquanto nos isômeros *trans* que possuem o confômero **ee** como preferencial, H1 apresenta um maior caráter de hidrogênio axial. Sabe-se que devido ao movimento dos elétrons na presença de um campo magnético os hidrogênios na posição equatorial são mais desblindados em relação aos hidrogênios na posição axial.<sup>90</sup>

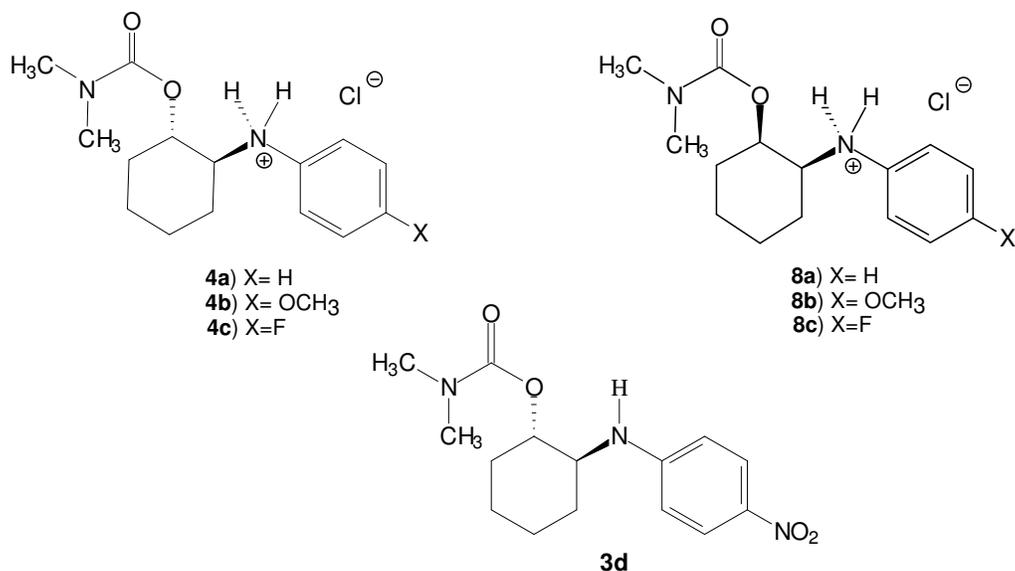
### 4.3 Avaliação da Atividade Anticolinesterásica

Para determinar o potencial de atividade anticolinesterásica dos carbamatos obtidos neste trabalho, foram realizados os ensaios enzimáticos utilizando o Método de Ellman modificado.<sup>40</sup>

Como mencionado anteriormente, este método exige que os compostos em estudo sejam solúveis em água, sendo necessária a preparação dos sais dos respectivos carbamatos. No entanto, não foi possível a obtenção do respectivo cloridrato para o derivado *trans-N,N*-dimetilcarbamato de 2-(4-nitrofenilamino)cicloexila (**3d**), porém o composto se apresentou solúvel a baixas concentrações, sendo possível realizar as análises.

Desse modo, para a realização dos testes foram utilizados os seguintes compostos **4a-4c**, **3d** e **8a-8c** (Figura 12). As análises foram realizadas em triplicata em cinco concentrações diferentes (0,01; 0,025; 0,05; 0,1 e 0,2 mol/L). Para algumas amostras houve a necessidade de utilizar outras concentrações além das cinco já citadas.

Nestes experimentos foi possível avaliar o potencial de inibição de cada composto testado contra as enzimas butirilcolinesterase (encontrada no plasma) e acetilcolinesterase (encontrada nos eritrócitos), bem como a atividade contra ambas as enzimas (sangue total).



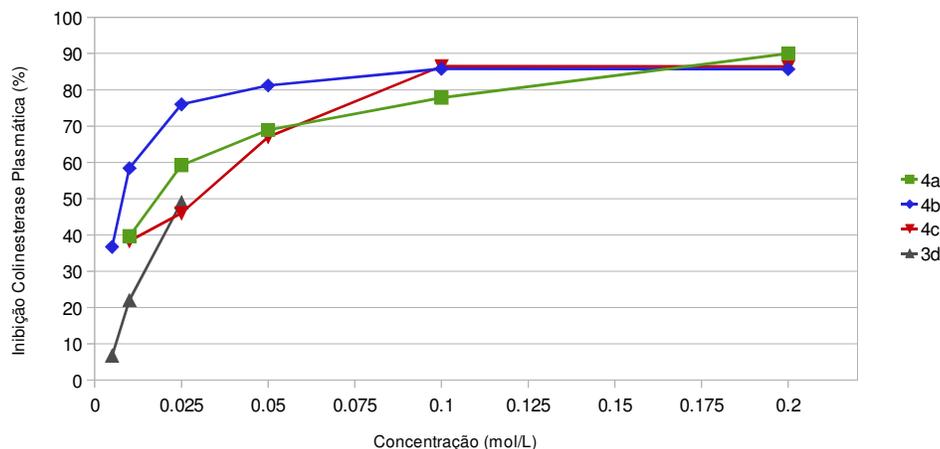
**Figura 12.** Compostos utilizados na determinação da atividade anticolinesterásica.

Os resultados obtidos para os cloridratos de *trans*-*N,N*-dimetilcarbamato de cicloexila 2-fenilaminossustituídos (**4a-4c**) e para o *trans*-*N,N*-dimetilcarbamato de 2-(4-nitrofenilamino)cicloexila (**3d**) são demonstrados nas Figuras 13 e 14. Os valores de IC<sub>50</sub> foram obtidos a partir das curvas de porcentagem de inibição *versus* concentração.

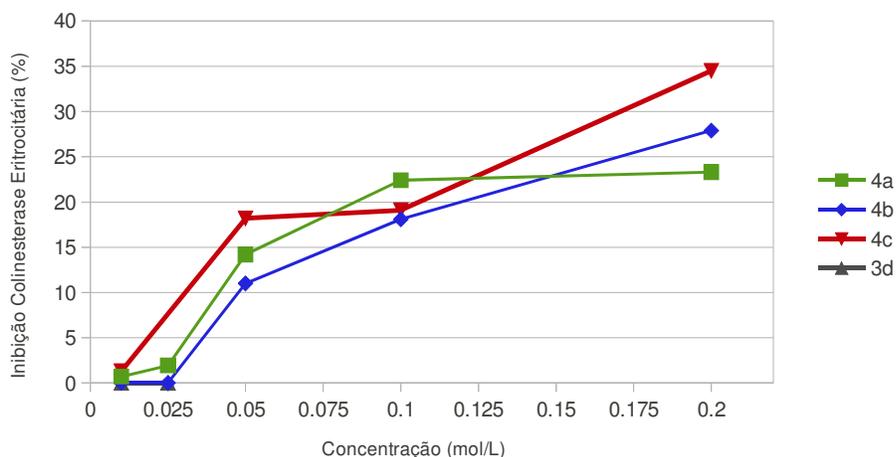
A análise da Figura 13 mostra que os compostos **4a - 4c** apresentaram uma inibição máxima na atividade da BuChE em torno de 90% na concentração de 0,2 mol/L sendo que o composto **4b** apresentou na concentração de 0,01 mol/L uma inibição de 58,4% contra 39,7% e 38,3% para os compostos **4a** e **4c** respectivamente.

O composto **4b** apresentou a maior capacidade inibitória da série com um valor de IC<sub>50</sub> de 8,0 mmol/L, seguido por **4a** com 17,9 mmol/L e **4c** com 29,8 mmol/L. Devido a baixa solubilidade do composto **3d**, este somente pode ser testado nas concentrações de 0,025; 0,01 e 0,005 mol/L. Não foi possível fazer uma previsão na tendência da atividade deste, pois mesmo na máxima concentração o valor de IC<sub>50</sub> não foi alcançado.

Em relação à inibição da colinesterase eritrocitária (Figura 14), ou seja, da acetilcolinesterase, observa-se que os compostos da série não inibiram 50% da atividade da enzima em nenhuma das concentrações analisadas, não sendo possível obter os valores de IC<sub>50</sub>. O composto **4c** foi o que apresentou a maior porcentagem de inibição com 34,5% na concentração de 0,2 mol/L, enquanto os compostos **4a** e **4b** inibiram 23,3% e 27,9% respectivamente.



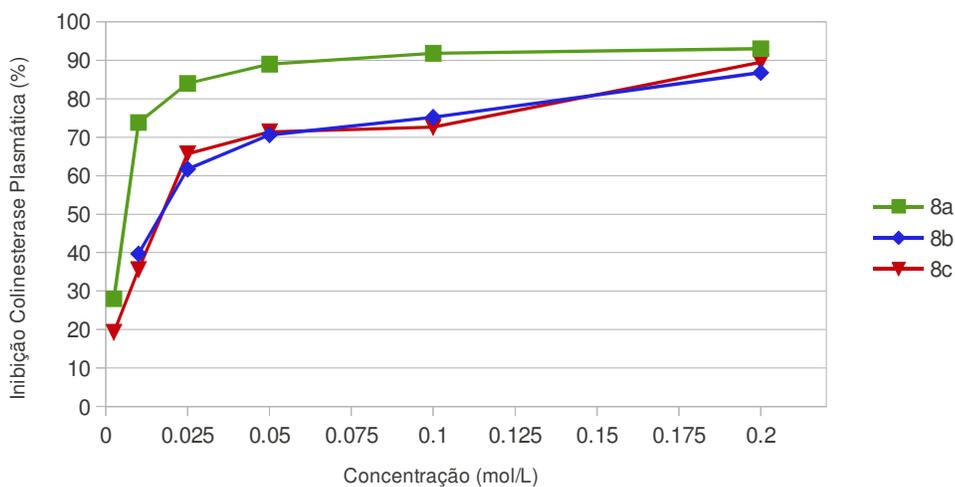
**Figura 13.** Efeito dos cloridratos de *trans-N,N*-dimetilcarbamato de cicloexila 2-fenilaminossustituídos e do *trans-N,N*-dimetilcarbamato de 2-(4-nitrofenilamino)cicloexila (**3d**) na inibição da colinesterase plasmática (BuChE).



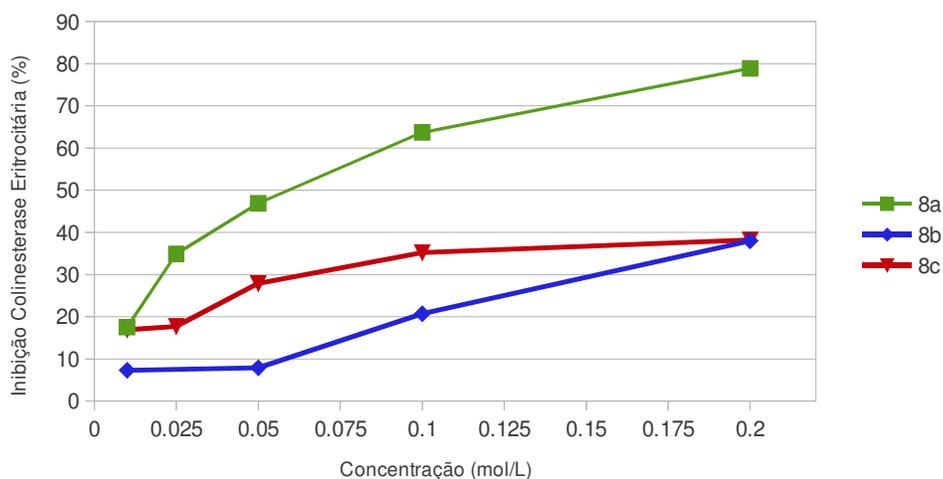
**Figura 14.** Efeito dos cloridratos de *trans-N,N*-dimetilcarbamato de cicloexila 2-fenilaminossustituídos e do *trans-N,N*-dimetilcarbamato de 2-(4-nitrofenilamino)cicloexila (**3d**) na inibição da colinesterase eritrocitária (AChE).

As Figura 15 e 16 apresentam os resultados obtidos para os derivados *cis-N,N*-dimetilcarbamato de cicloexila 2-fenilaminossustituídos. Observa-se que os compostos **8a** - **8c** também apresentaram uma inibição máxima na atividade da enzima BuChE, em torno de 90% na concentração de 0,2 mol/L. O composto **8a** se mostrou mais ativo em menores concentrações inibindo 73,8% da atividade da enzima, contra 39,7% de **8b** e 35,6% de **8c** em 0,01 mol/L. O valor de IC<sub>50</sub> encontrado para **8a** foi de 6,0 mmol/L contra 17,0 e 17,2 mmol/L de **8b** e **8c** respectivamente.

Em relação à inibição da colinesterase eritrocitária (Figura 16), verifica-se que o composto **8a** também apresentou uma maior atividade inibitória em relação aos demais, com 78,9% de inibição em 0,2 mol/L, enquanto **8b** e **8c** apresentaram apenas 38%. O IC<sub>50</sub> obtido para o composto **8a** foi de 59,2 mmol/L, sendo que na máxima concentração os compostos **8b** e **8c** não alcançaram 50% de inibição da enzima AChE.



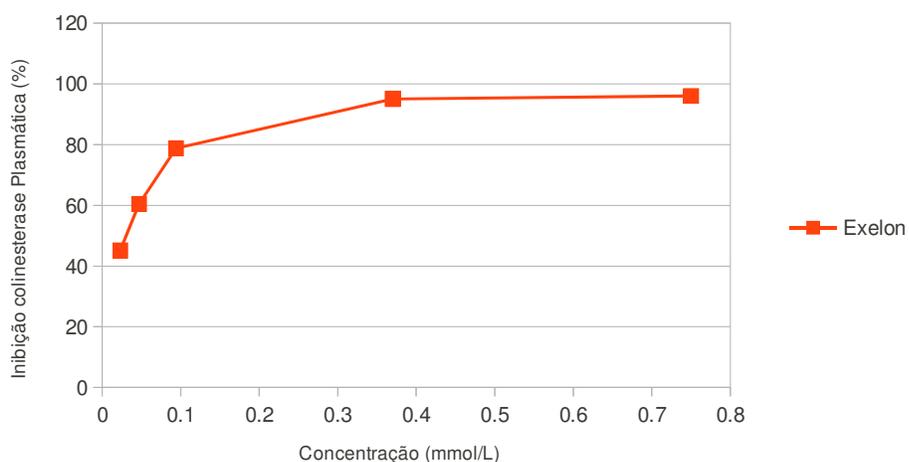
**Figura 15.** Efeito dos cloridratos de *cis-N,N*-dimetilcarbamato de cicloexila 2-fenilaminossustituídos na inibição da colinesterase plasmática (BuChE).



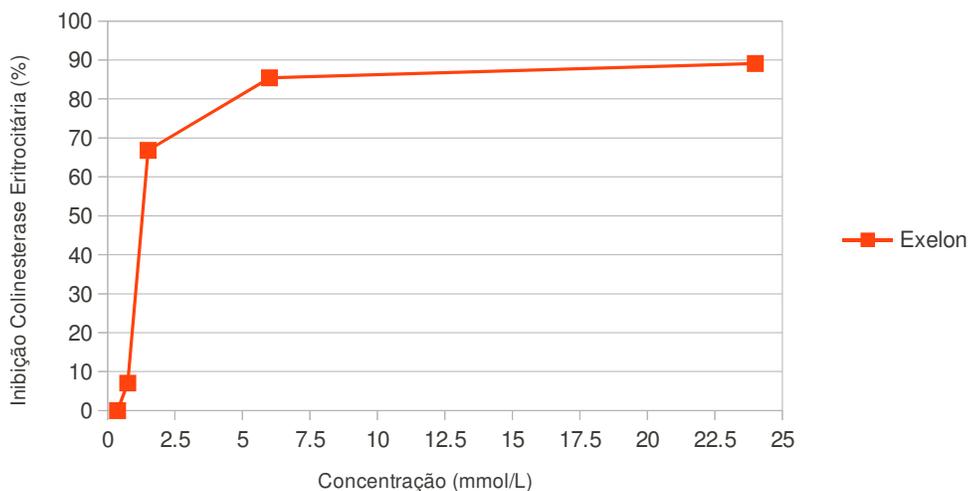
**Figura 16.** Efeito dos cloridratos de *cis-N,N*-dimetilcarbamato de cicloexila 2-fenilaminossustituídos na inibição da colinesterase eritrocitária (AChE).

Para avaliar os resultados obtidos, utilizou-se como padrão o fármaco Exelon (3,0 mg), que contém como princípio ativo a rivastigmina. As análises foram realizadas em triplicata e em oito concentrações diferentes; 0,023; 0,047; 0,094; 0,37; 0,75; 1,5; 6,0; 24,0 mmol/L.

A Figura 17 mostra os resultados obtidos para a inibição da BuChE. O fármaco apresenta uma alta taxa de inibição (96%) na concentração de 0,75 mmol/L e este valor permanece alto mesmo a concentrações mais baixas. O valor de  $IC_{50}$  encontrado foi de 0,031 mmol/L para a inibição da BuChE e de 1,29 mmol/L para a inibição da AChE (Figura 18) .



**Figura 17.** Efeito do fármaco Exelon na inibição da colinesterase plasmática (BuChE).



**Figura 18.** Efeito do fármaco Exelon na inibição da colinesterase eritrocitária (AChE).

Na Tabela 11 estão compilados os valores de IC<sub>50</sub> de todos os compostos estudados e do composto padrão Exelon. De modo geral os compostos em estudo apresentaram boa seletividade para a inibição da colinesterase plasmática, sendo possível observar que a isômeria *cis* e *trans* não influencia de forma significativa na atividade.

A análise dos dados para a série *trans* (compostos **4a-4c**) mostra que a presença do grupo metoxila (**4b**) potencializou a atividade anticolinesterásica, sendo este aproximadamente duas vezes mais ativo que o derivado **4a**. Para a série *cis* a presença de substituintes ativadores (**8b**) e desativadores (**8c**) no anel aromático, diminuem significativamente a atividade desses compostos em relação ao derivado não substituído (**8a**). Em ambas as séries foi possível verificar que a presença do substituinte fluor no anel aromático não potencializou a atividade desses compostos.

**Tabela 11.** Valores de IC<sub>50</sub> dos cloridratos de *cis* e *trans*-*N,N*-dimetilcarbamato de cicloexila 2-fenilaminossustituídos e do composto padrão Exelon.

Composto	Valor de IC <sub>50</sub> (mmol/L) para Butirilcolinesterase	Valor de IC <sub>50</sub> (mmol/L) para Acetilcolinesterase
<b>4a</b>	17,9	n.a
<b>4b</b>	8,0	n.a
<b>4c</b>	29,8	n.a
<b>8a</b>	6,0	59,2
<b>8b</b>	17,0	n.a
<b>8c</b>	17,2	n.a
<b>Rivastigmina</b>	0,031	1,29

\*n.a= não ativo (IC<sub>50</sub> ≥ 100 mmol/L)

Em comparação com o estudo realizado por Bocca e col.<sup>35</sup> para uma série de isômeros *cis* e *trans* de *N,N*-dimetilcarbamatos de 2-*N,N*-dimetilaminocicloexila e de seus sais metil sulfato, os compostos testados neste trabalho se apresentaram mais ativos frente a enzima BuChE. No estudo de Bocca e col., os autores encontraram para o compostos mais ativo da série um IC<sub>50</sub> de 59 mmol/L para a BuChE. Esses dados demonstram que a presença do grupo fenilamino potencializou a inibição da enzima butirilcolinesterase.

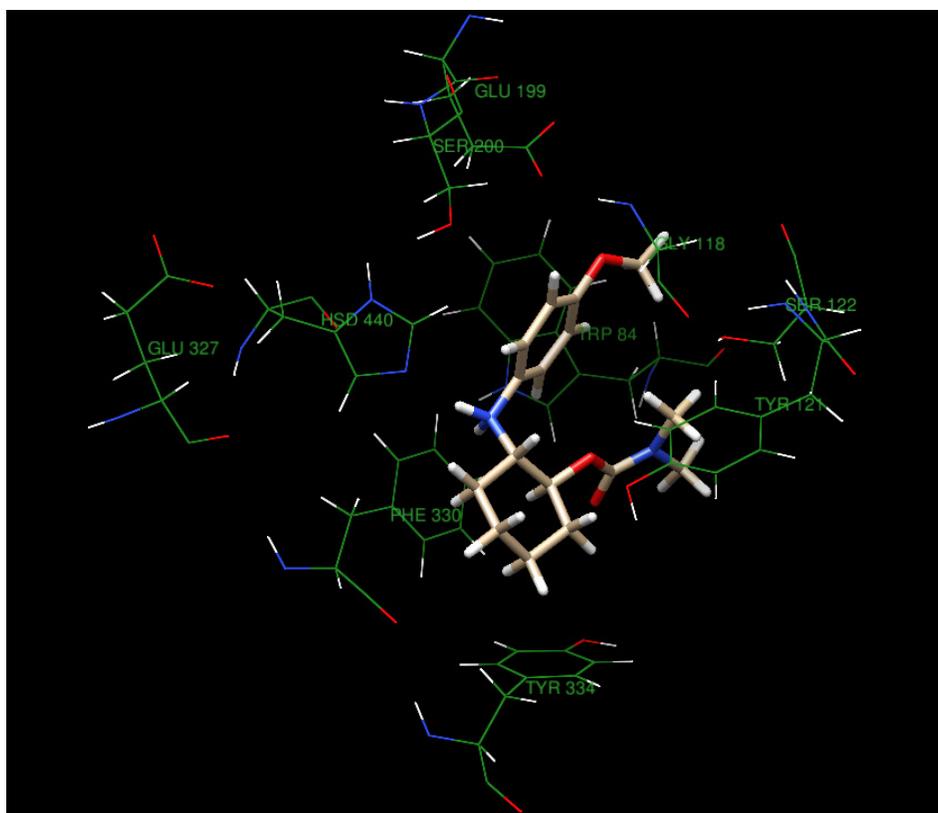
## 4.4 Docking Molecular

Os cálculos de *docking* molecular foram realizados com o intuito de avaliar as interações enzima-inibidor e propor um modelo de ligação a partir dos resultados obtidos experimentalmente. Os compostos testados experimentalmente como inibidores de colinesterases, foram docados em ambas as enzimas (AChE e BuChE) e suas interações analisadas. Os cálculos foram realizados para todos os compostos, mas devido à similaridade dos resultados obtidos, o composto mais ativo da série (**4b**) será utilizado como modelo para a discussão. É importante destacar que somente o confômero mais estável de cada isômero foi utilizado nos cálculos de *docking*.

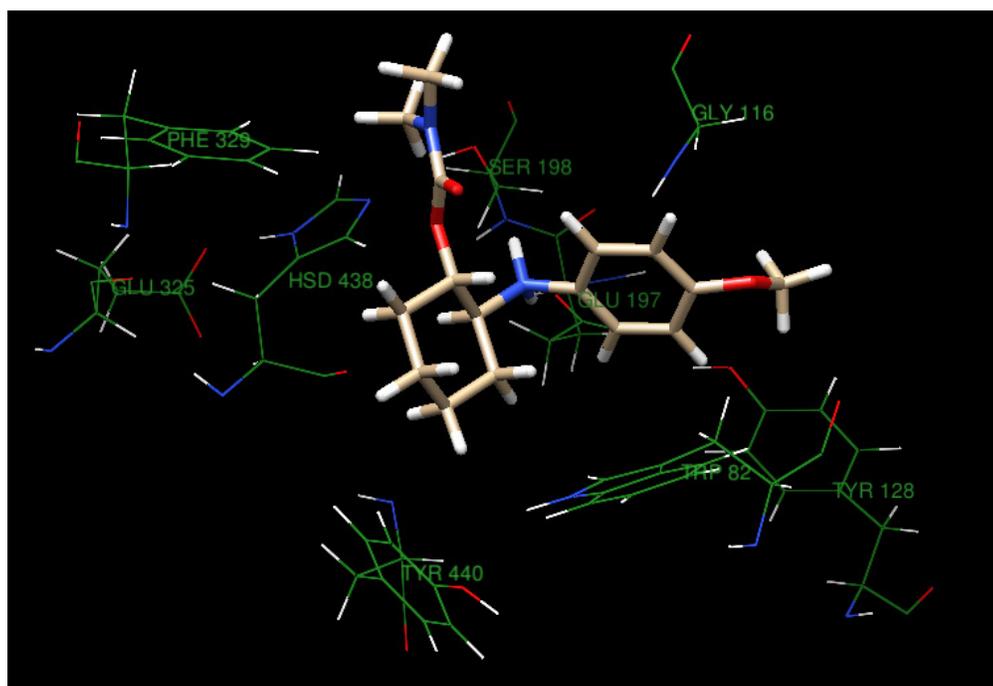
A Figura 19 mostra o cloridrato de *trans-N,N*-dimetilcarbamato de 2-(4-metoxifenilamino)cicloexila (**4b**) complexado com a enzima AChE. Observa-se que o ligante é estabilizado por resíduos do sítio aniônico catalítico Glu199 e Phe330, e por um dos resíduos da cavidade do oxianion o Gly118. Há uma ligação de hidrogênio entre Hsd440 e o grupo amino protonado, sendo que os resíduos Trp84, Tyr334, Tyr121 ajudam na estabilização através de interações de van der Waals. Como visto anteriormente (Tópico 1.1) o mecanismo de hidrólise da acetilcolina envolve principalmente os resíduos da tríade catalítica (Ser200, His440 e Glu327). Analisando o complexo enzima-substrato, é possível observar que o grupo carbamato encontra-se distante dos resíduos da tríade catalítica, o que diminui a possibilidade de inibição da enzima.

A Figura 20 representa o ligante complexado com a enzima BuChE. Observa-se neste caso, que o grupo carbamato está próximo aos resíduos da tríade catalítica da enzima (Ser198, Hsd438 e Glu325), facilitando assim o ataque nucleofílico do oxigênio da Ser198 a carbonila do grupo carbamato. Verifica-se ainda que o grupo fenilamino é estabilizado por ligações de hidrogênio com Glu197, Gly116 e Ser198 e que os resíduos Tyr128, Trp82 e Tyr440 ajudam na estabilização do ligante através de interações de van der Waals.

De modo geral, os resultados obtidos a partir do *docking* molecular mostram que os compostos avaliados estão localizados no sítio ativo de ambas as enzimas, no entanto na butirilcolinesterase, o grupo carbamato encontra-se próximo aos resíduos da tríade catalítica, e na acetilcolinesterase este grupo encontra-se mais afastado. Estes resultados estão de acordo com os dados obtidos experimentalmente, nos quais os compostos testados se mostraram inibidores seletivos da enzima butirilcolinesterase

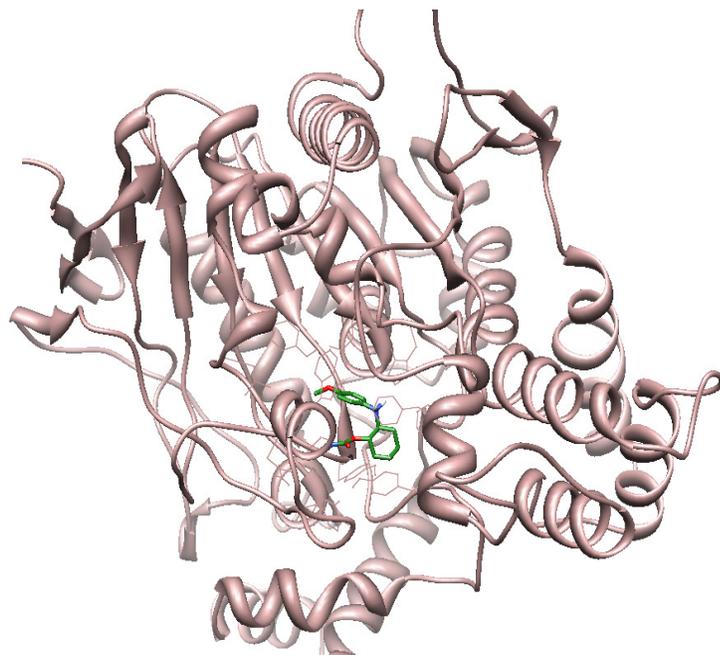


**Figura 19.** Sítio ativo da enzima acetilcolinesterase (AChE) complexada com o cloridrato de *trans*-*N,N*-dimetilcarbamato de 2-(4-metoxifenilamino)cicloexila (**4b**).

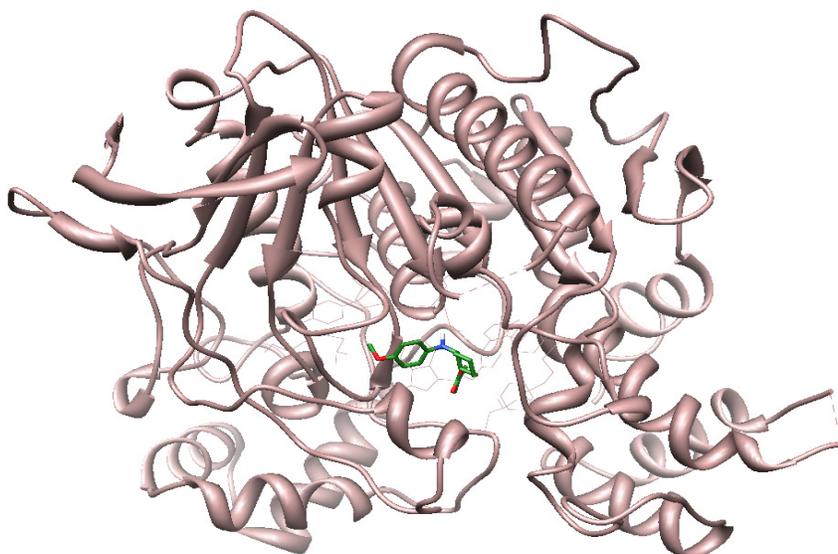


**Figura 20.** Sítio ativo da enzima butirilcolinesterase (BuChE) complexada com o cloridrato de *trans*-*N,N*-dimetilcarbamato de 2-(4-metoxifenilamino)cicloexila (**4b**).

Adicionalmente, pode-se destacar a diferença no tamanho do sítio ativo das enzimas AChE (Figura 21) e BuChE (Figura 22). Sabe-se que a estrutura primária da BuChE é similar a da AChE, no entanto, seu sítio ativo apresenta um maior volume em relação à AChE.<sup>12</sup> Como os compostos em estudo apresentam substituintes volumosos verifica-se que estes se acomodam melhor no sítio ativo da BuChE.



**Figura 21.** Representação da estrutura terciária da enzima AChE complexada com o cloridrato de *trans*-*N,N*-dimetilcarbamato de 2-(4-metoxifenilamino)cicloexila.



**Figura 22.** Representação da estrutura terciária da enzima BuChE complexada com o cloridrato de *trans*-*N,N* dimetilcarbamato de 2-(4-metoxifenilamino)cicloexila.

## 5. CONCLUSÃO

Os compostos inéditos das séries *cis* e *trans-N,N*-dimetilcarbamato de cicloexila 2-fenilaminossustituídos foram sintetizados com sucesso. As técnicas de RMN de  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  e HSQC foram fundamentais para a caracterização destes compostos, bem como de seus precursores.

A partir dos cálculos teóricos determinou-se que para os isômeros *trans*, o conformero majoritário possui ambos os substituintes na posição equatorial (**ee**). Para os isômeros *cis*, o conformero mais estável é aquele que possui o grupo carbamato na posição axial e o grupo fenilamino na equatorial (**ae**). A preferência conformacional dos isômeros *cis* pode ser justificada tanto por efeitos estéricos quanto por efeitos eletrônicos. Não foi observada variação significativa do equilíbrio conformacional com a mudança dos substituintes em nenhuma das séries. Os dados de constante de acoplamento  $^3J_{\text{HH}}$  obtidos pelos espectros de RMN de  $^1\text{H}$  estão de acordo com os cálculos teóricos, porque mostram que os conformeros **ee** e **ae** são majoritários no equilíbrio.

Os testes farmacológicos mostraram que os compostos de ambas as séries foram seletivos para a enzima butirilcolinesterase e que a isômeria *cis-trans* não influencia de forma significativa a atividade destes compostos. No entanto, a presença dos substituintes doadores e retirados na posição *para* do anel aromático, pode aumentar ou diminuir a atividade do composto, dependendo da série analisada. Para a série *trans* (compostos **4a-4c**) a presença do grupo metoxila (**4b**) potencializou a atividade anticolinesterásica, sendo este aproximadamente duas vezes mais ativo que o derivado **4a**. Para a série *cis* (compostos **8a-8c**) a presença dos substituintes no anel aromático, diminuiu significativamente a atividade desses compostos (**8b** e **8c**) em relação ao derivado não substituído (**8a**). O cloridrato de *cis-N,N*-dimetilcarbamato de 2-fenilaminocicloexila (**8a**) apresentou inibição significativa na atividade da enzima AChE ( $\text{IC}_{50}$  de 59,2 mmol/L) e uma elavada inibição na atividade da enzima BuChE ( $\text{IC}_{50}$  6,0 mmol/L), sendo este o derivado com maior potencial farmacológico para o combate da doença de Alzheimer.

Os cálculos de *docking* molecular foram realizados para todos os compostos em ambas as enzimas AChE e BuChE, sendo que estes apresentaram similaridade no modo de ligação. Foi possível observar que os compostos interagem de forma mais efetiva com o sítio ativo da enzima BuChE, onde o grupo carbamato está próximo aos resíduos chave da tríade catalítica. Estes resultados estão de acordo com os dados obtidos experimentalmente.

## 6. REFERÊNCIAS

1. Oehlrich D., Berthelot D. J. C., Gijzen H. J. M., *J. Med. Chem.* **2011**, 54, 669-698.
2. Rios C. L., Egea J., Contelles J. M., León R., Samadi A., Iriepa I., Moraleda I., Gálvez E. García G. A., López M. G., Villarroya M., Romero A., *J. Med. Chem.*, **2010**, 53, 5129-5143.
3. Viegas F. P. D., Simões M. C. R., Rocha M. D., Castelli M. R., Moreira M. S., Viegas Junior C., *Rev. Virtual Quím.*, **2011**, 3(4), 286-306.
4. Alzheimer Association, *Alzheimer's & Dementia*, **2012**, 8, 131-168.
5. Kim J., Lee H. J., Lee K. W., *J. Neurochem.*, **2010**, 112, 1415–1430.
6. Peng H., Talreja T., Xin Z., Cuervo J. H., Kumaravel G., Humora M. J., Xu L., Rohde E., Gan L., Jung M. Y., Shackett M. N., Chollate S., Dunah A. W., Snodgrass-belt P. A., Arnold H. M., Taveras A. G., Rhodes K. J., Scannevin r. H., *Med. Chem. Lett.*, **2011**, 2, 786–791
7. Cheng Y, Ono M., Kimura H., Kagawa S., Nishii R., Kawashima H., Saji H., *Med. Chem. Lett.*, **2010**, 1, 321–325
8. Alonso A. C., Zaidi T., Grundke-Iqbal I., Iqbal K., *Proc. Natl. Acad. Sci*, **1994**, 91, 5562-5566.
9. Alonso A. del C., Zaidi T., Novak M. , Grundke-Iqbal I., Iqbal K., *Neurobiology*, **2001**, 98(12), 6923-6928.
10. Gong C., Liu F., Grundke-Iqbal I., Iqbal K., *J. Biomed. Biotechnol.*, **2006**, 1-11.
11. Martorana A., Esposito Z., Koch G., *CNS Neurosc. & Ther.*, **2010**, 16, 235–245.
12. Lane R. M., Potkin S. G., Enz A., *Int. J. Neuropsychopharmacol.*, **2006**, 9, 101-124.
13. Hufani M., Filocamo L., Lappa S., Maggi A., *Drug Future*, **1997**, 22, 397- 410.
14. Nascimento E. C. M., Martins J. B. L., Santos M. L., Gargano R., *Chem. Phys. Lett*, **2008**, 458, 285-289.
15. Kryger G., Silman I., Sussman J. L., *J. Physiol. (Paris)*, **1998**, 92(3-4), 191-194.
16. Araújo J. Q., Estudos de *docking* e QSAR-3D dependente do receptor de inibidores da acetilcolinesterase, Tese de Doutorado, Rio de Janeiro, **2010**.
17. Houghton P. J., Ren Y., Howes M.J., *Nat. Prod. Rep.*, **2006**, 23, 181-199.
18. Coyle J. T., Price D. L., DeLong M. R., *Science*, **1983**, 219, 1184 - 1190.
19. Darvesh S., Hopkins D. A., Geula C., *Neuroscience*, **2003**, 4, 131-138.

20. Vellom D. C., Radic Z., Li Y., Pickering N. A., Camp S., Taylor P., *Biochemistry*, **1993**, 32, 12-17.
21. Darreh-shori T., Brimijoin S., Kadir A., Almkvist O., Nordberg A., *Neurobiol. Dis.*, **2006**, 24, 326-333.
22. Mesulam M. M., Guillozet A., Shaw P., Levey A., Duysen G., Lockridge O., *Neuroscience*, **2002**, 110, 4, 627-639.
23. Monczor M., *Curr. Med. Chem.*, **2005**, 5, 5-13.
24. Engelhardt E., Brucki S. M. T., Cavalcanti J. L. S., Forlenza O. V., Laks J., Vale F. A. C., *Arq. Neuropsiquiatr.*, **2005**, 63(4), 1104-1112.
25. Kása P., Rakonczay Z., Gulya K., *Prog. Neurobiol.*, **1997**, 52, 535.
26. Francis P. T., Palmer A. M., Snape M., Wilcock G. K., *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry*, **1999**, 66, 137-147.
27. Polinsky R. J., *Clinical Therapeutics*, **1998**, 20(4), 634-647.
28. Auld D. S., Kornecook T. J., Bastianetto S., Quirion R., *Prog. Neurobiol.*, **2002**, 68, 209-245.
29. Francotte P., Graindorge E., Boverie S., Tullio P., Pirotte B., *Curr. Med. Chem.*, **2004**, 11, 1757-1778.
30. Minett T.S.C, Bertolucci P.H.F., *Rev. Neurociências*, **2000**, 8, 11-14.
31. Mustazza C., Borioni A., Giudice M. R., Gatta F., Ferretti R., Meneguz A., Volpe M. T., Lorenzini P., *Eur. J. Med. Chem.*, **2002**, 37(2), 91–109.
32. Bolognesi M. L., Bartolini M., Cavalli A., Andrisano V., Rosini M., Minarini A., Melchiorre C., *J. Med. Chem.*, **2004**, 47(24), 5945–5952.
33. Lin M.C., Hwang M.T., Chang H. G., Lin C. S., Lin G., *J. Biochem. Mol. Toxic.*, **2007**, 21, 6, 348-353.
34. Wieckowska A., Badja M., Guzior N., Malawska B., *Eur. J. Med. Chem.*, **2010**, 45, 5602-5611.
35. Bocca C. C., Rittner R., Höehr N. F., Pinheiro G. M. S., Abiko L. A., Basso E. A., *J. Mol. Struct.*, **2010**, 983, 194-199.
36. Anand P., Singh B., *Med. Chem. Res.*, **2012**.
37. Ellman G. L., Courtney K. D., Andres V., Featherstone R. M., *Biochem. Pharmacol.*, **1961**, 7, 88-95.
38. Oliveira-Silva j. J., Alves S. R., Meyer A., Perez F., Sarcinelli P. N., Mattos R. C. O. C., Moreira J. C., *Rev. Saúde Pública*, **2001**, 35(2), 130-135.

39. Silva E. S., Mídio A. F., *Ver. Bras. Toxic.*, **1996**, 9(1), 1-9.
40. Harlin K. S., Ross P. F., *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, **1990**, 73(4), 616-619.
41. Resmi H., Taylan E., *Turk. J. Biochem.*, **2010**, 35(3), 275–278.
42. Mukesh B. Rakesh K.; *Int. J. Res. Ayurveda & Pharm.*, **2011**, 2, 1746-1751.
43. Young, D. *Computacional Chemistry: A practical Guide for Applying Techniques to Real World Problems*, Jonh Wiley: New York, **2001**.
44. Foresman, J. B.; Frish A. E. *Exploring Chemistry with Eletronic Structure Methods*, 2<sup>a</sup> ed; Gaussian Inc: Pitsburg, **1996**.
45. Grant, C. D.; Richards, W. G. *Computacional Chemistry*; Oxford University Press Inc.; New York, **1995**.
46. Morgon N. H., Custódio R., *Quim. Nova*, **1995**, 18(1), 44-55.
47. Moller C., Plesset M. S., *Phys. Rev.*, **1936**, 46(7), 618-622.
48. Head-Gordon M., Pople J. A., Frisch M. J., *Chem. Phys. Lett.* **1988**, 153(6), 503-506.
49. Kohn W., Becke A. D., Parr R. G., *J. Phys. Chem.*, **1996**, 100, 12974-12980.
50. Freitas L. C. G., *Quim. Nova*, **1999**, 22(2), 293-298.
51. Becke A. D., *J. Chem. Phys.*, **1993**, 98(2), 1372-1377.
52. Lee C., Yang W., Parr R. G., *Phys. Rev. B*, **1988**, 37(2), 785-789.
53. Minkin V. I., (Ed.) *Pure Appl. Chem.*, **1999**, 71, 1919-1981.
54. Jasien P. G., Stevens W. J., Krauss M., *J. Mol. Struct. (Theochem.)*, **1986**, 139, 197-206.
55. Shavitt I., *Isr. J. Chem.*, **1993**, 33, 357-367
56. Gauze G. F., Estudo por espectroscopia de RMN e cálculos teóricos de derivados da norcânfora e de ditianos. Tese de Doutorado; UEM: Maringá, **2008**.
57. Weinhold F.; Landis C. R.; *Chemistry Education: Research and Praticce in Europe*, **2001**.
58. Leach A. R. *Molecular modeling. Principles and applications*. 2 ed. Personal Education, **2001**.
59. Mihasan M., *J. Biosci.*, **2012**, 37, 1089–1095.
60. Kitchen D. B., Decornez H., Furr J. R., Bajorath J., *Drug Discovery*, **2004**, 3, 935-949.

61. Erickson J. A., Jalaie M., Robertson D. H., Lewis R. A., Vieth M., *J. Med. Chem.*, **2004**, 47, 45-55.
62. Hou T., Wang J., Chen L., Xu X., *Protein Engineering*, **1999**, 12(8), 639–647.
63. Morris G. M., Goodsell D. S., Halliday R. S., Huey R., Hart W. E., Belew R. K., Olson A. J., *J. Comp. Chem.*, **1998**, 19, 1639-1662.
64. Ewing T.J., Makino S., Skillman A. G., Kuntz I. D., *J. Comput. Aided Mol. Des.*, **2001**, 15, 411–428.
65. Rarey M., Kramer B., Lengauer T., Klebe G., *J. Mol. Biol.*, 1996, 261, 470-489.
66. Jones G., Willet P., Galen R. C., Leach A. R., Taylor R., *J. Mol. Biol.* **1997**, 267, 727-748.
67. Friesner R. A., et. al., *J. Med. Chem.*, **2004**, 47, 1739-1749.
68. Wolf L. K., *Chem. Eng. News*, **2009**, 87, 31-33.
69. Lazarova M., *Int. Scientific Conf. Comp. Science*, **2008**, 55-60.
70. Moitessier N., Englebienne P., Lee D., Lawandi J., Corbeil C. R., *Br. J. Pharmacol.*, **2008**, 153, 7–26.
71. Taylor R. D., Jewsbury P. J., Essex J. W., *J. Comput. Aided Mol. Des.*, **2002**, 16, 151–166.
72. Teramoto R., Fukunishi H., *J. Chem. Inf. Model.*, **2007**, 47, 526-534.
73. Lee K., Lee J. W., *Current Proteomics*, **2008**, 5, 10-19.
74. Wang R., Lu Y., Wang S., *J. Med. Chem.*, **2003**, 46, 2287-2303.
75. Krovat E. M., Steindl T., Langer T., *Curr. Comput. Aid. Drug Des.*, **2005**, 1, 93-102.
76. Perrin D. D., Armarego W. L. F., Perrin D. R., *Purification of Laboratory Chemicals*. Pergamond Press: Oxford, **1983**.
77. Bonollo S., Fringuelli F., Pizzo F., Vaccaro L., *Green Chem.*, **2006**, 8, 960-964.
78. Sriraghavan K., Ramakrishnan V. T., *Synthetic commun.*, **2001**, 31(7), 1105-1121.
79. Bernard C., Maurette M. T., Latters A., *Bull. Soc. Chem. Fr.*, **1976**, 1-2, 145.
80. Allinger J., Allinger N. L., *Tetrahedron*, **1958**, 2, 64-74.
81. Liu S., Xie J., Wang L., Zhou Q., *Ang. Chem. Int. Ed.*, **2007**, 46, 7506-7508.
82. Basso E. A., Abiko L. A., Gauze G. F., Pontes R. M., *J. Org. Chem.*, **2011**, 76 (1), 145–153.

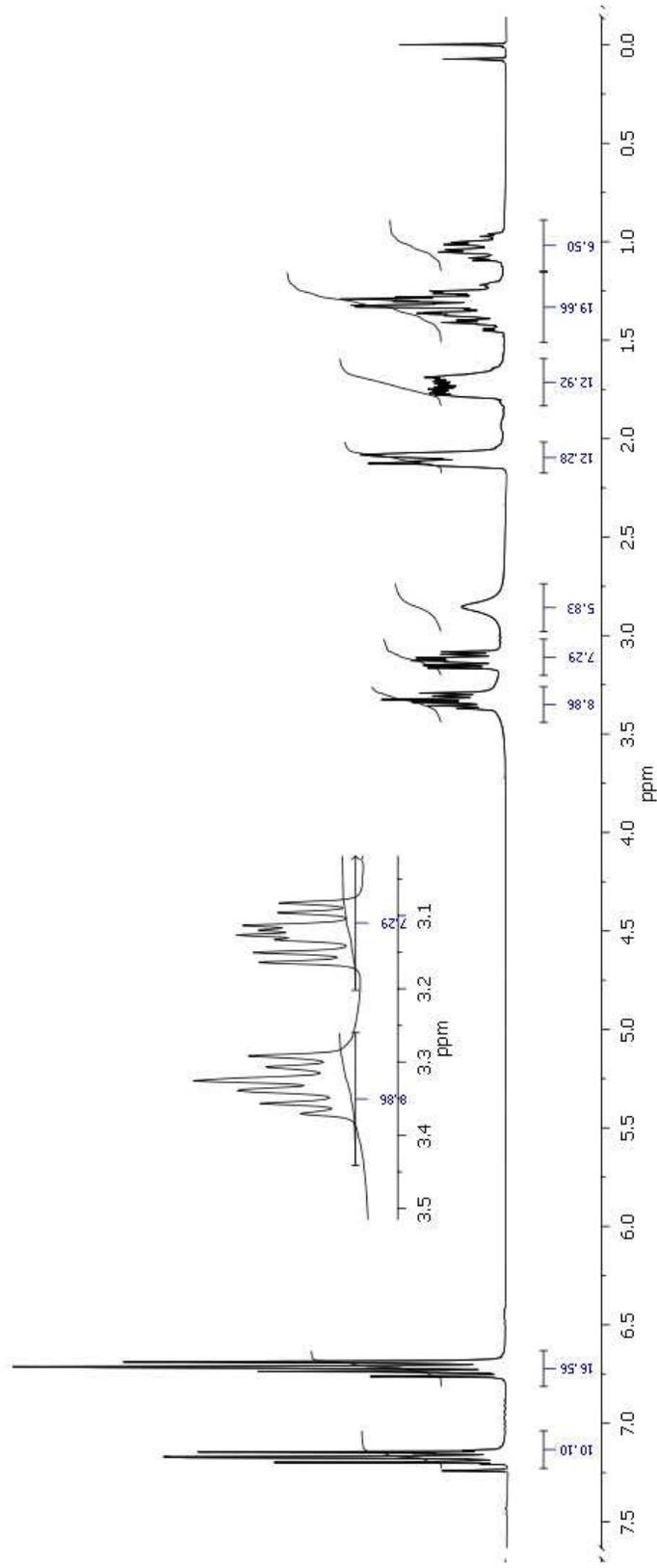
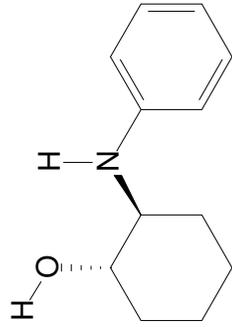
83. Frisch M. J., Trucks G. W., Schlegel H. B., Scuseria G. E., Robb M. A., Cheeseman J. R., Scalmani G., Barone V., Mennucci B., Petersson G. A., Nakatsuji H., Caricato M., Li X., Hratchian H. P., Izmaylov A. F., Bloino J., Zheng G., Sonnenberg J. L., Hada M., Ehara M., Toyota K., Fukuda R., Hasegawa J., Ishida M., Nakajima T., Honda Y., Kitao O., Nakai H., Vreven T., Montgomery Jr. J. A., Peralta J. E., Ogliaro F., Bearpark M., Heyd J. J., Brothers E., Kudin K. N., Staroverov V. N., Keith T., Kobayashi R., Normand J., Raghavachari K., Rendell A., Burant J. C., Iyengar S. S., Tomasi J., Cossi M., Rega N., Millam J. M., Klene M., Knox J. E., Cross J. B., Bakken V., Adamo C., Jaramillo J., Gomperts R., Stratmann R. E., Yazyev O., Austin A. J., Cammi R., Pomelli C., Ochterski J. W., Martin R. L., Morokuma K., Zakrzewski V. G., Voth G. A., Salvador P., Dannenberg J. J., Dapprich S., Daniels A. D., Farkas O., Foresman J. B., Ortiz J. V., Cioslowski J., Fox D. J., Gaussian, Inc., Wallingford CT, **2010**.
84. Zoete V., Cuendet M. A., Grosdidier A., Michielin O., *J. Comput. Chem*, **2011**, 32, 2359-68
85. Dupont J., Consorti C. S., Suarez P. A. Z., Souza R. F., *Org. Syn.*, **2004**, 10, 236-240.
86. Earle M. J., McCormac P. B., Seddon K. R., *Chem. Commun.* **1998**, 2245-2246.
87. Sarvari M. H., *Can. J. Chem.* **2008**, 86, 65-71
88. Kumar S. R., Leelavathi P., *Can. J. Chem.* **2007**, 85, 37-41.
89. Sommer H. Z, Lipp I. H., *J. Org. Chem.* **1971**, 36(6), 824-828.
90. Eliel E. L.; Wilen S. H.; Mander L. N., *Stereochemistry of Organic Compounds*; Wiley: New York, **1994**.

---

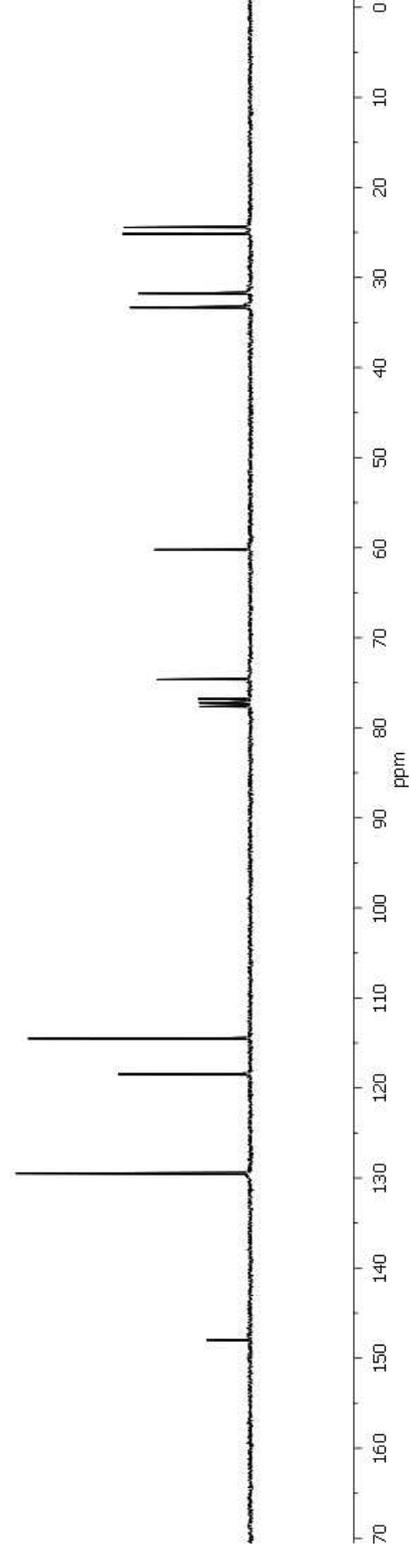
# **Anexos**

## **Espectros de RMN**

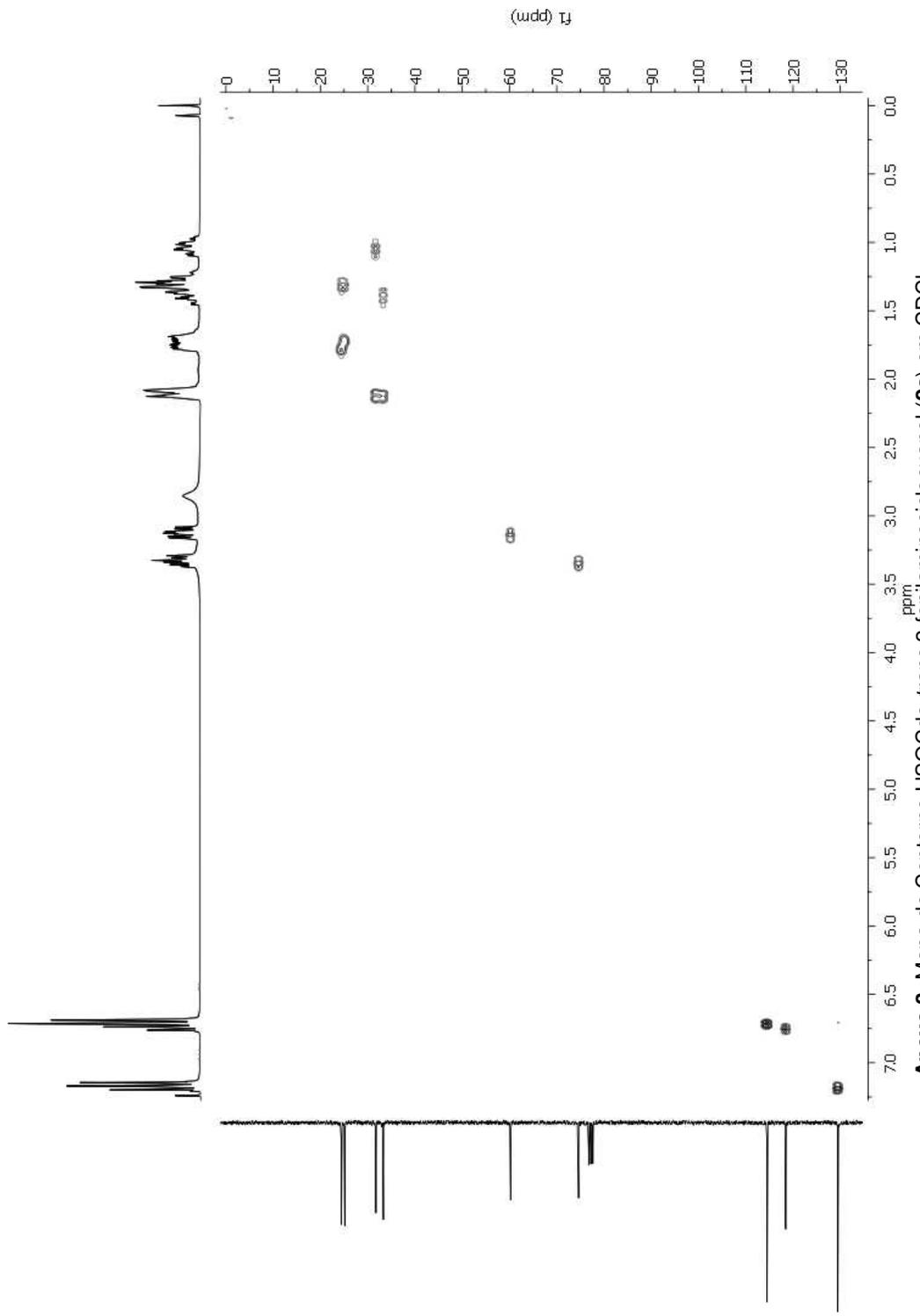
---



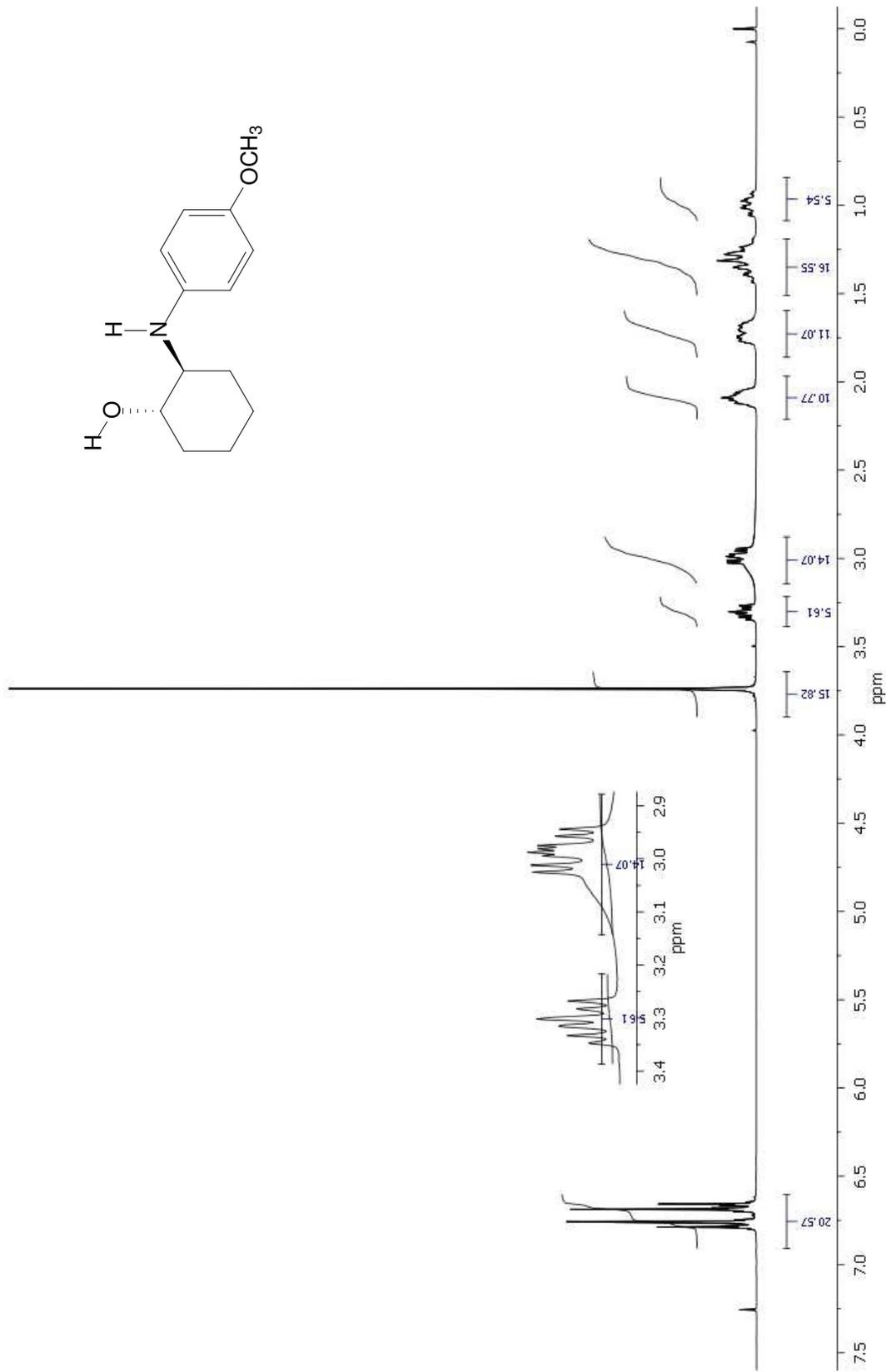
Anexo 1. Espectro de RMN de <sup>1</sup>H a 300 MHz do *trans*-2-fenilaminociclohexanol (2a) em CDCl<sub>3</sub>.



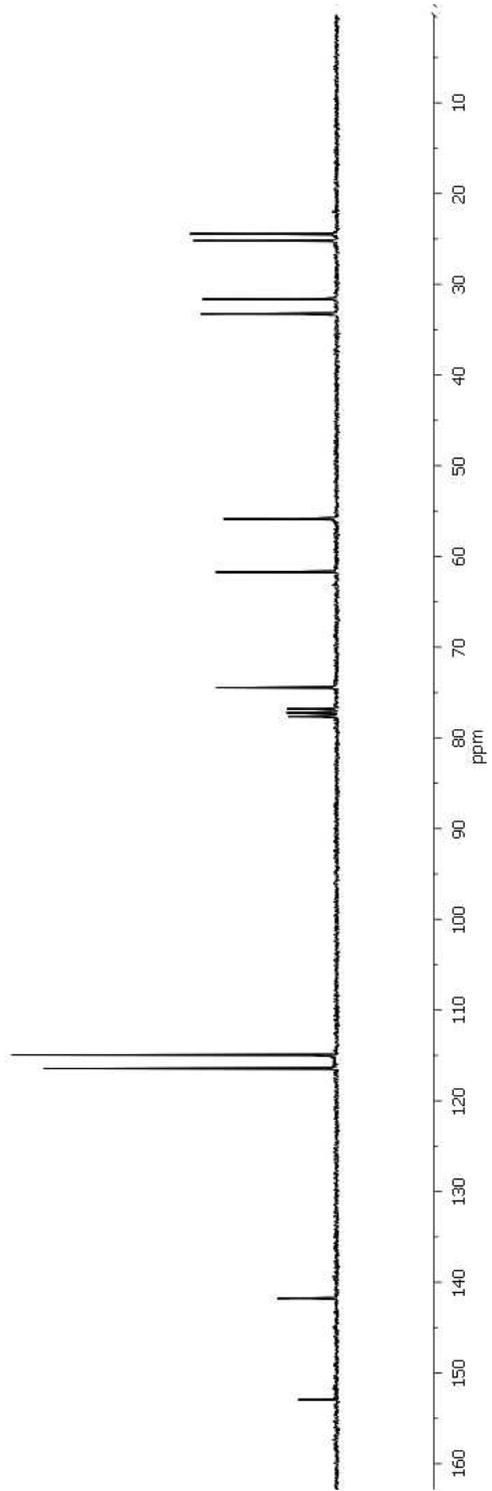
**Anexo 2.** Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  a 75 MHz do *trans*-2-fenilaminocicloexanol (2a) em  $\text{CDCl}_3$



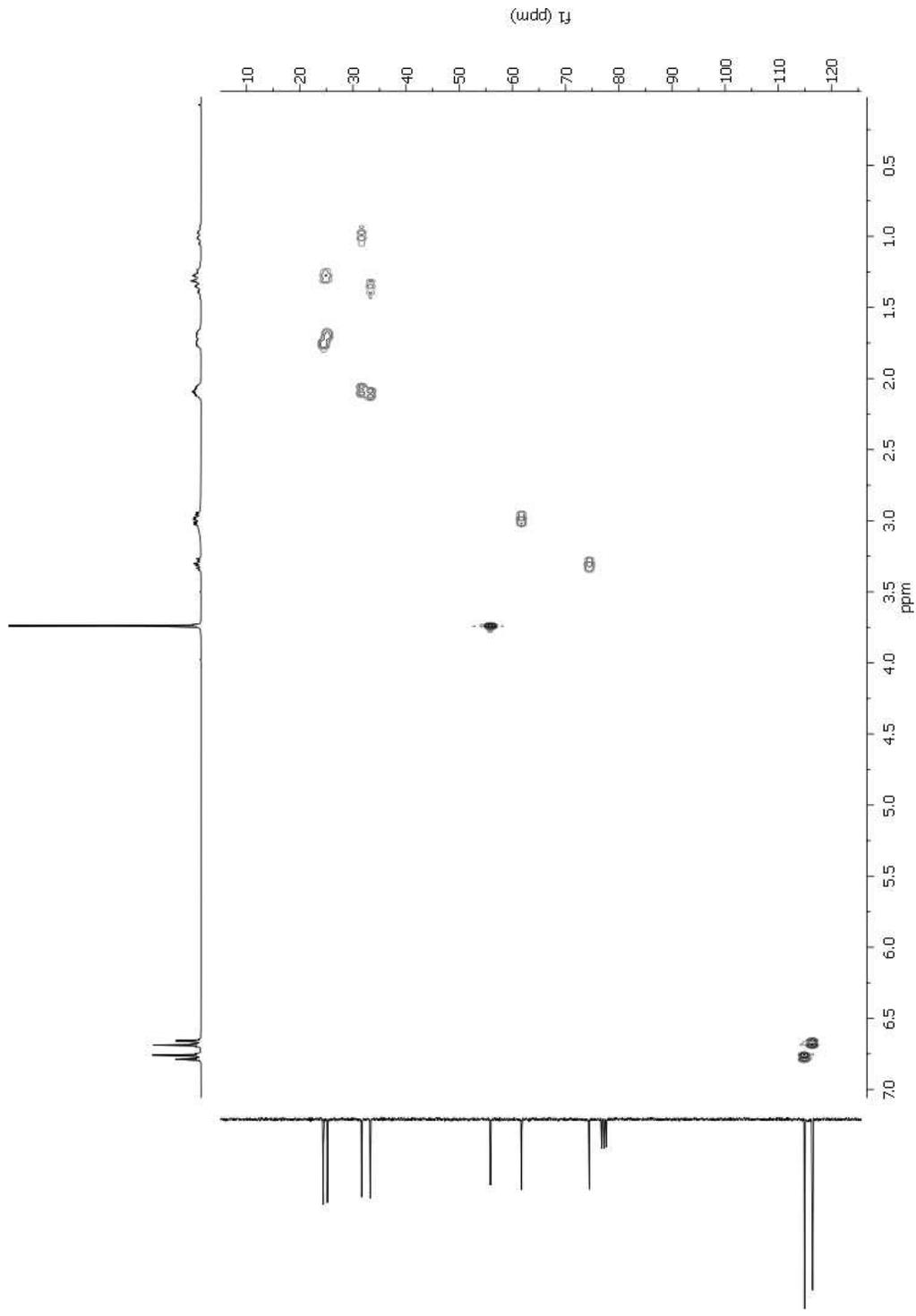
**Anexo 3.** Mapa de Contorno HSQCdo *trans*-2-fenilaminociclohexanol (2a) em CDCl<sub>3</sub>.



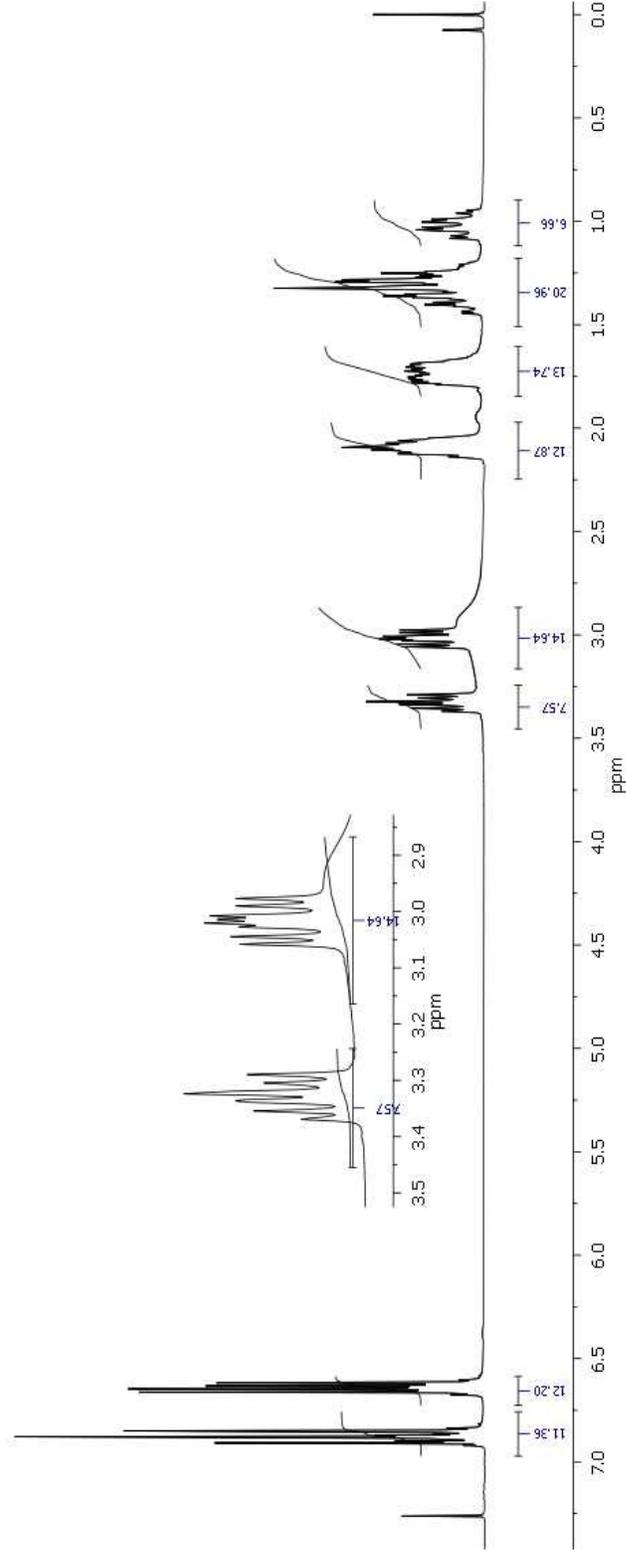
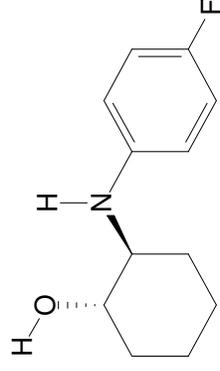
**Anexo 4.** Espectro de RMN de <sup>1</sup>H a 300 MHz do *trans*-2-(4-metoxifenilamino)ciclohexanol (**2b**) em CDCl<sub>3</sub>.



**Anexo 5.** Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  a 75 MHz do *trans*-2-(4-metoxifenilamino)cicloexanol (**2b**) em  $\text{CDCl}_3$ .

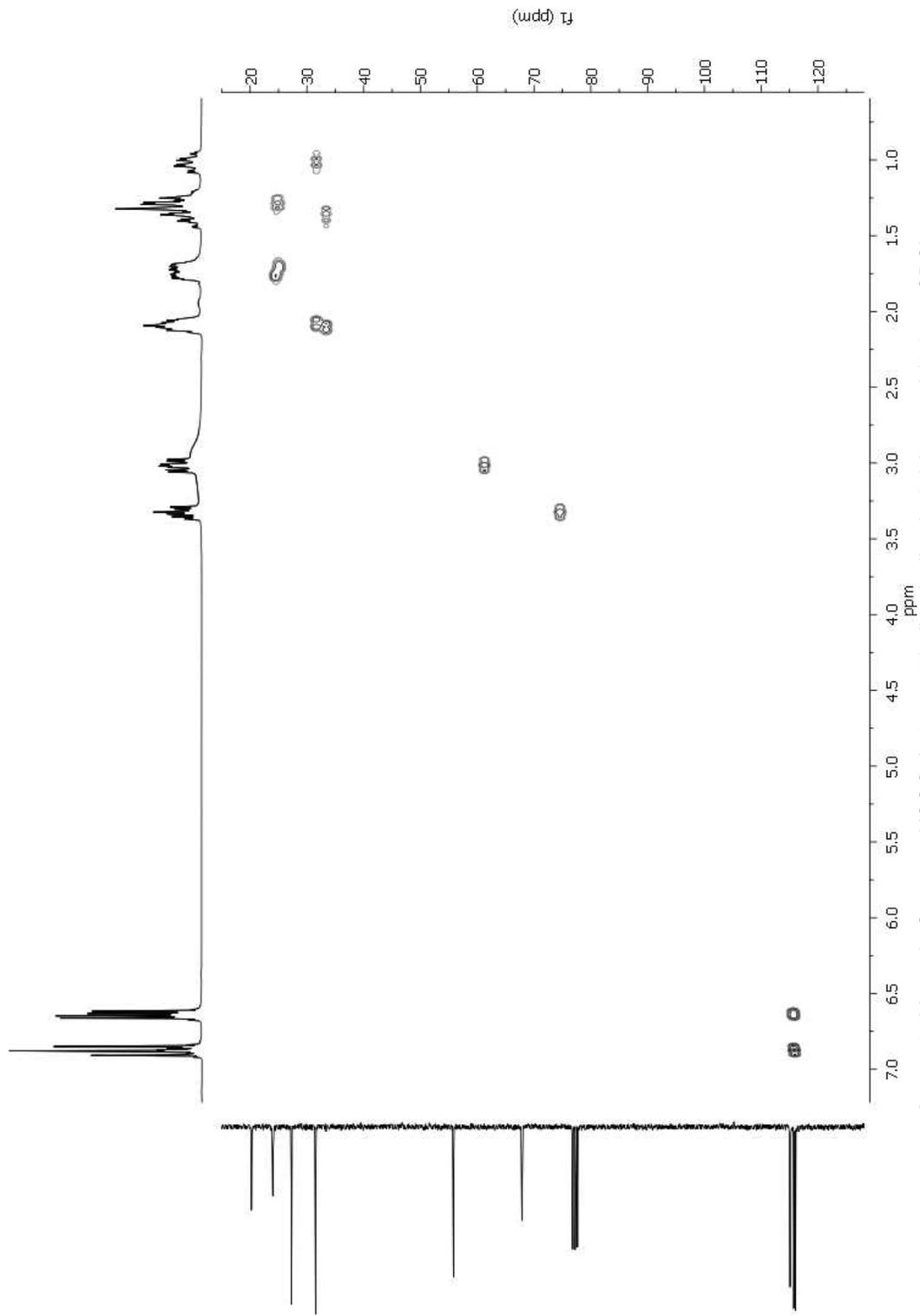


**Anexo 6.** Mapa de Contorno HSQC do *trans*-2-(4-metoxifenilamino)cicloexanol (**2b**) em  $\text{CDCl}_3$ .

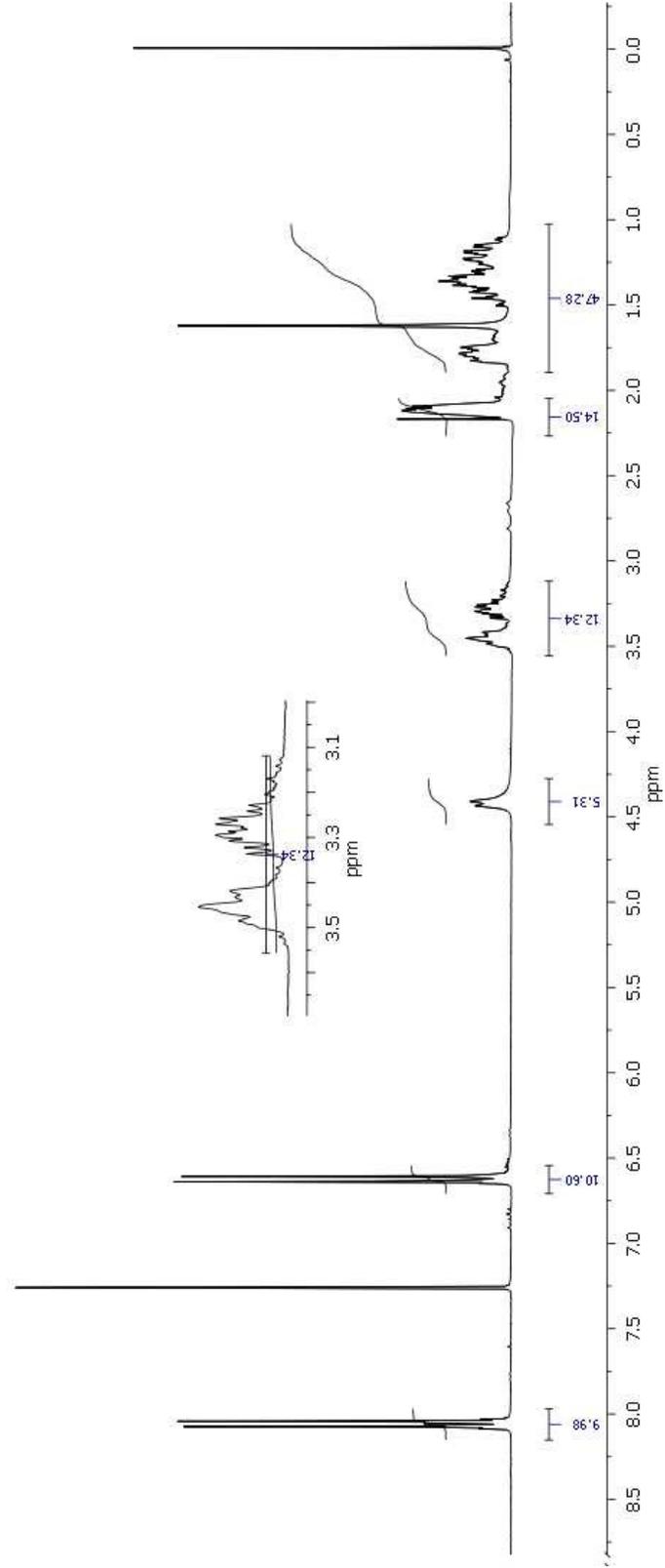
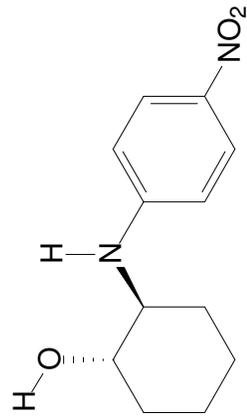


Anexo 7. Espectro de RMN de <sup>1</sup>H a 300 MHz do *trans*-2-(4-fluorofilamino)cicloexano (**2c**) em CDCl<sub>3</sub>.

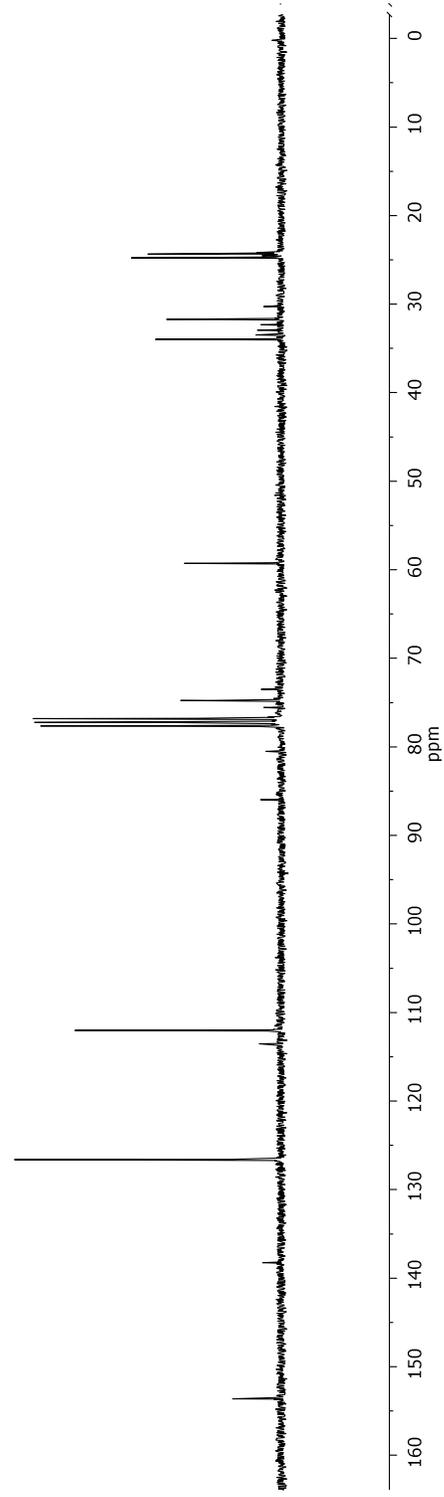




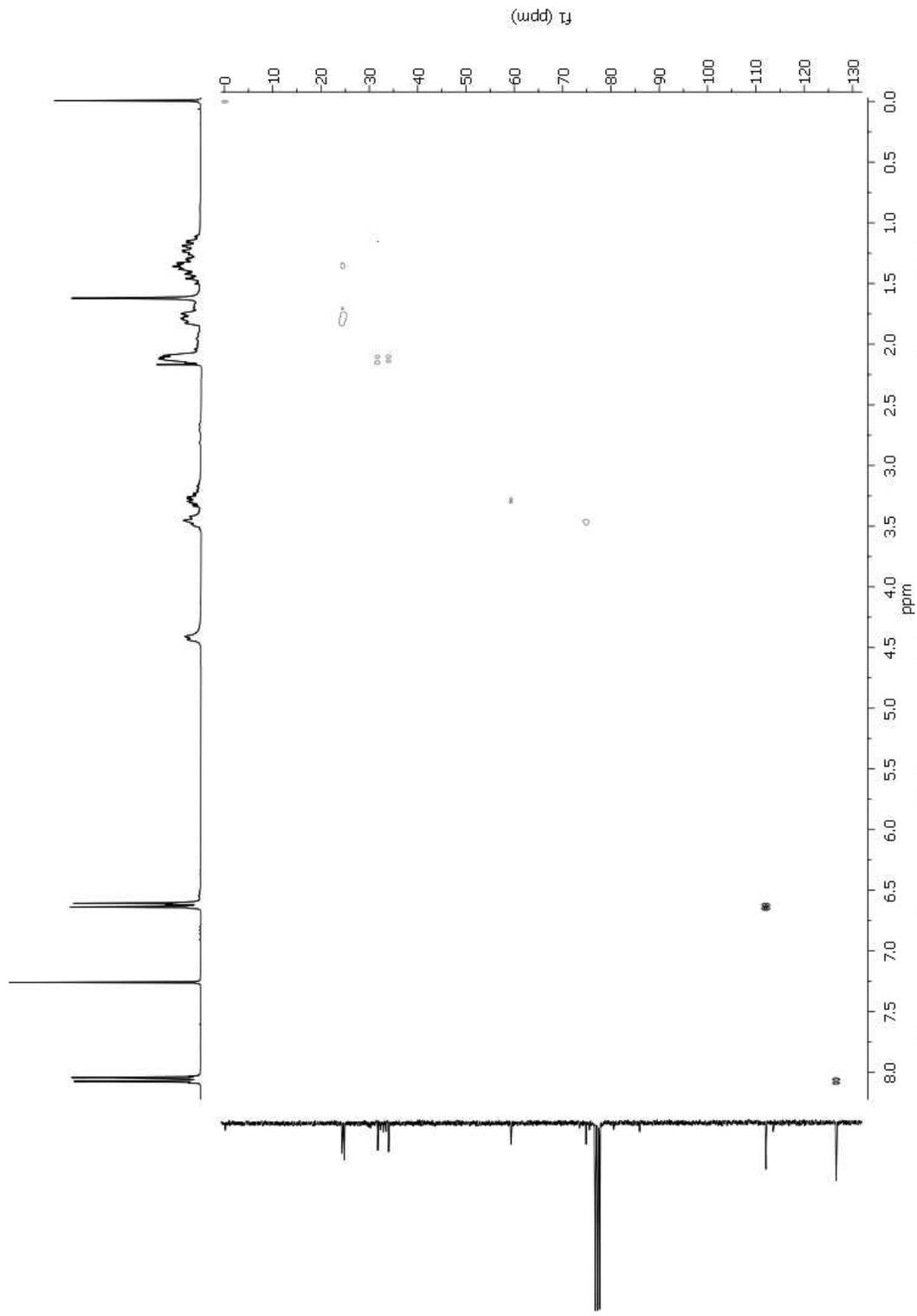
**Anexo 9.** Mapa de Contorno HSQC do *trans*-2-(4-fluorfenilamino)cicloexanol (**2c**) em  $\text{CDCl}_3$ .



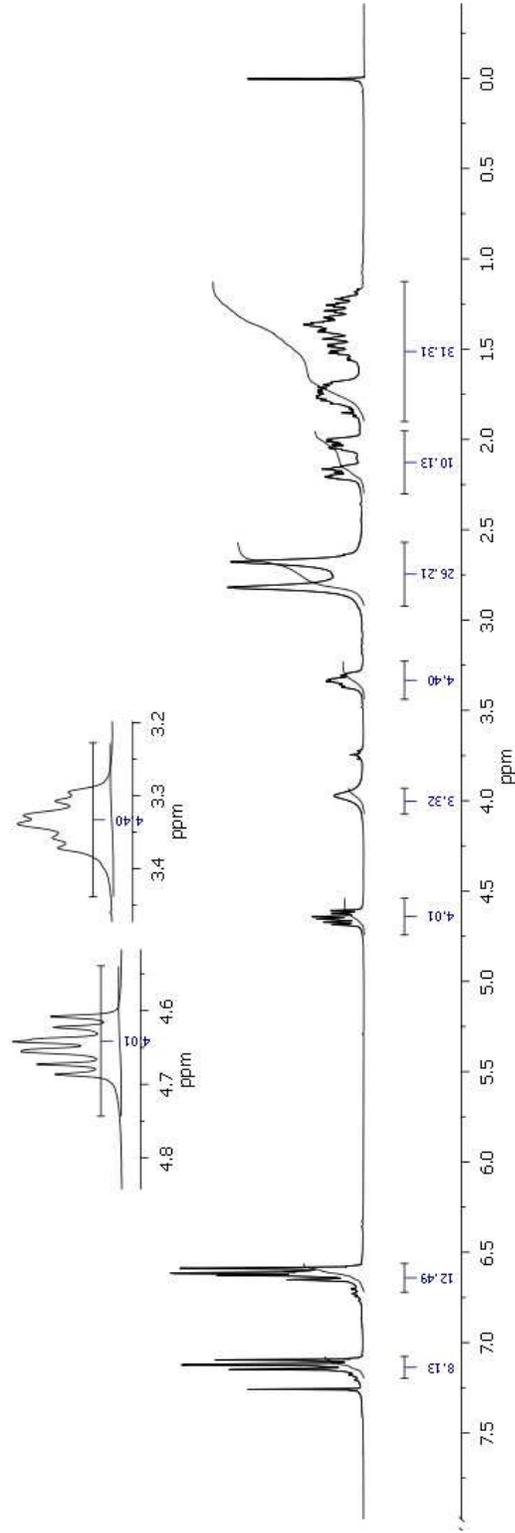
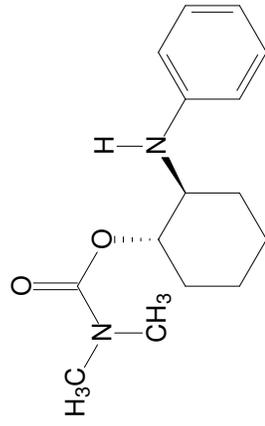
Anexo 10. Espectro de RMN de <sup>1</sup>H a 300 MHz do *trans*-2-(4-nitrofenilamino)cicloexanol (2d) em CDCl<sub>3</sub>.



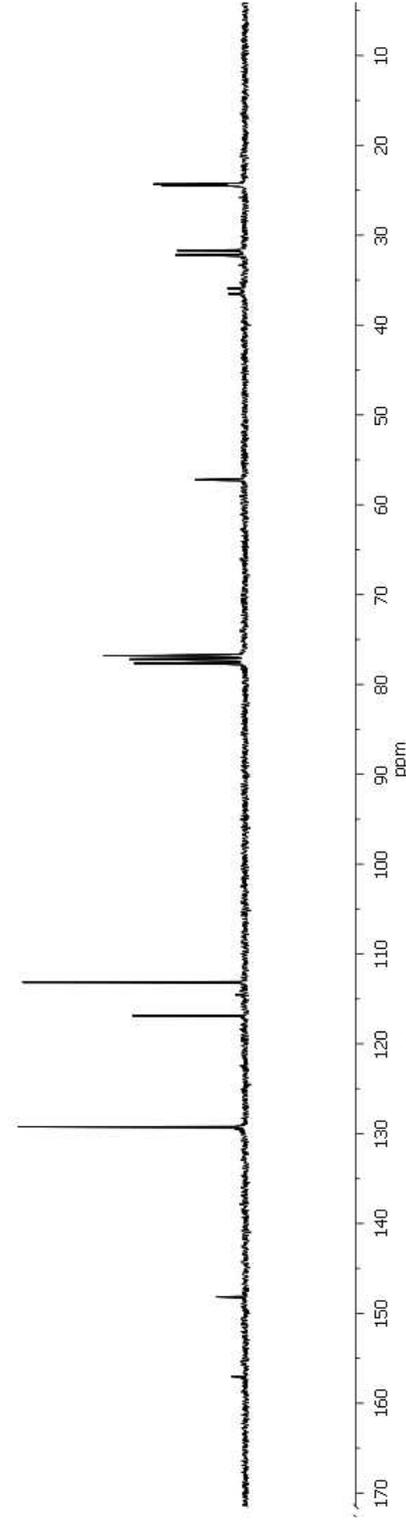
**Anexo 11.** Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  a 75 MHz do *trans*-2-(4-nitrofenilamino)cicloexanol (**2d**) em  $\text{CDCl}_3$ .



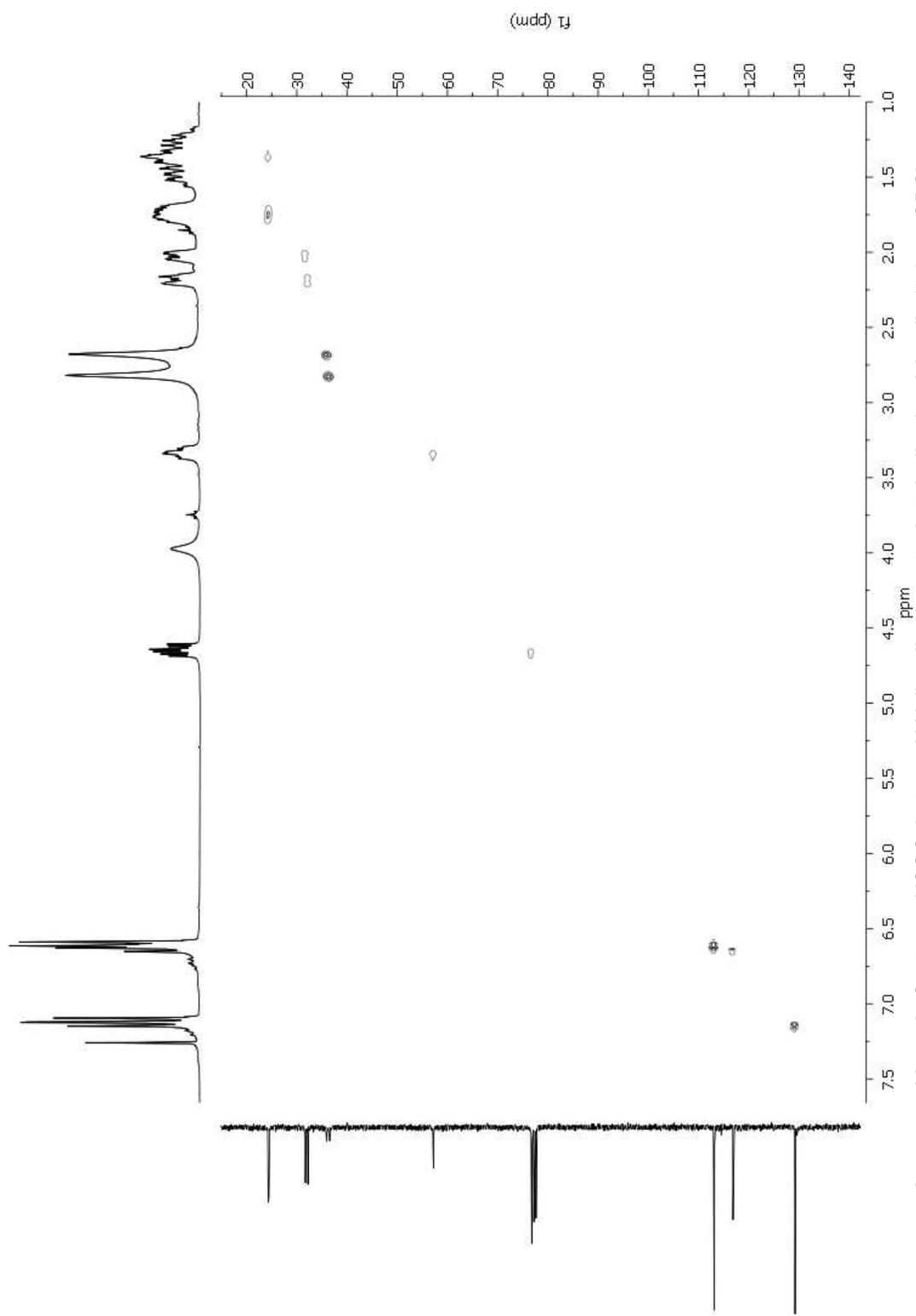
Anexo 12. Mapa de Contorno HSQC do *trans*-2-(4-nitrofenilamino)cicloexanol (**2d**) em  $\text{CDCl}_3$ .



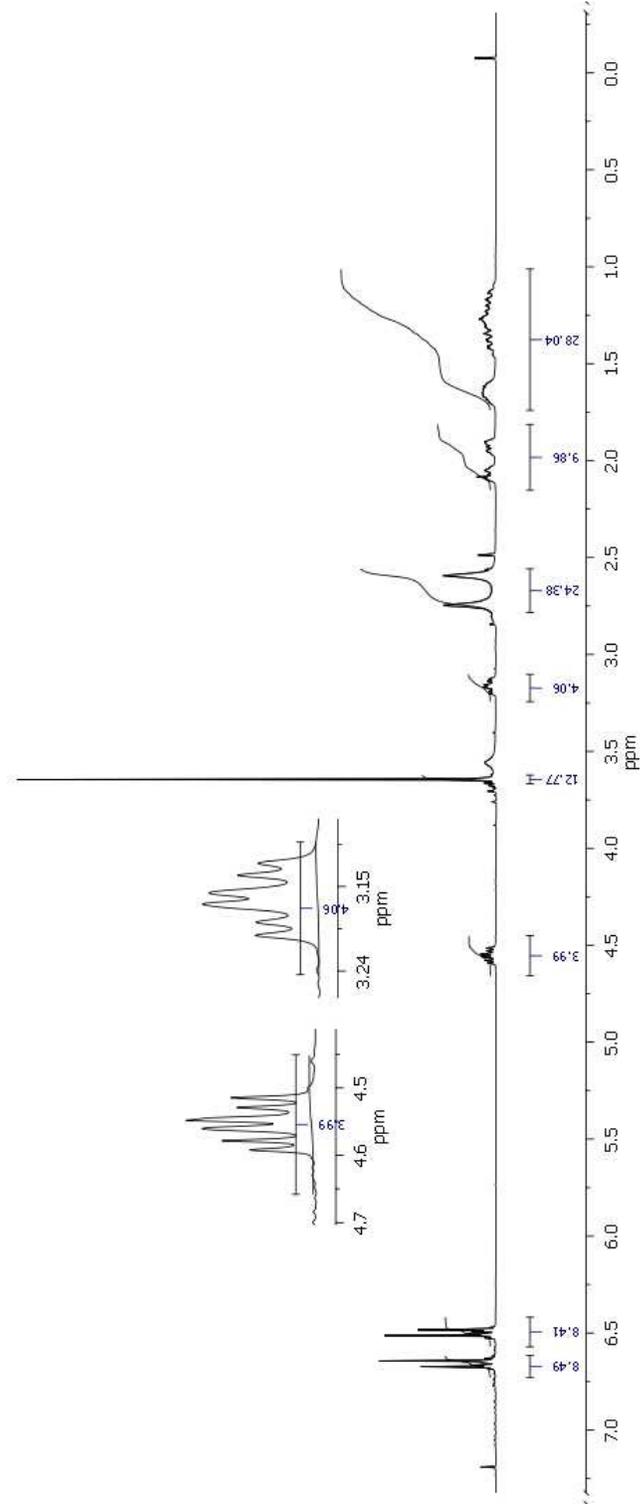
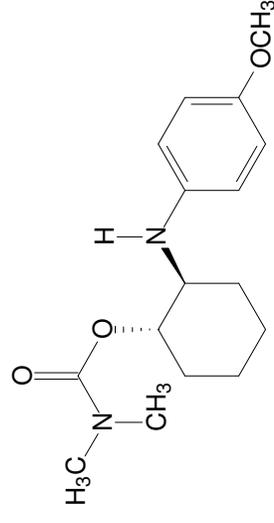
**Anexo 13.** Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  a 300 MHz do *trans-N,N*-dimetilcarbamato de 2-fenilaminocicloexila (**3a**) em  $\text{CDCl}_3$ .



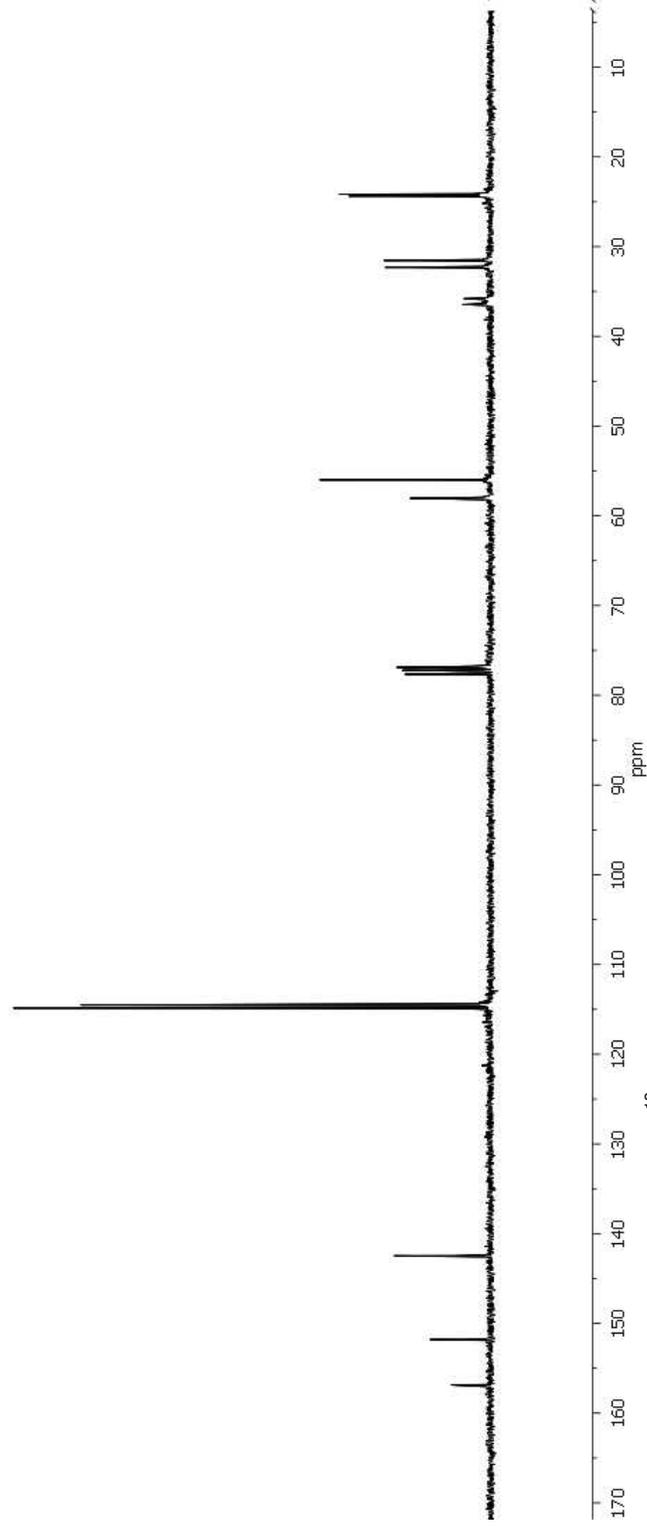
**Anexo 14.** Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  a 75 MHz do *trans*-*N,N*-dimetilcarbamato de 2-fenilaminocicloexila (3a) em  $\text{CDCl}_3$ .



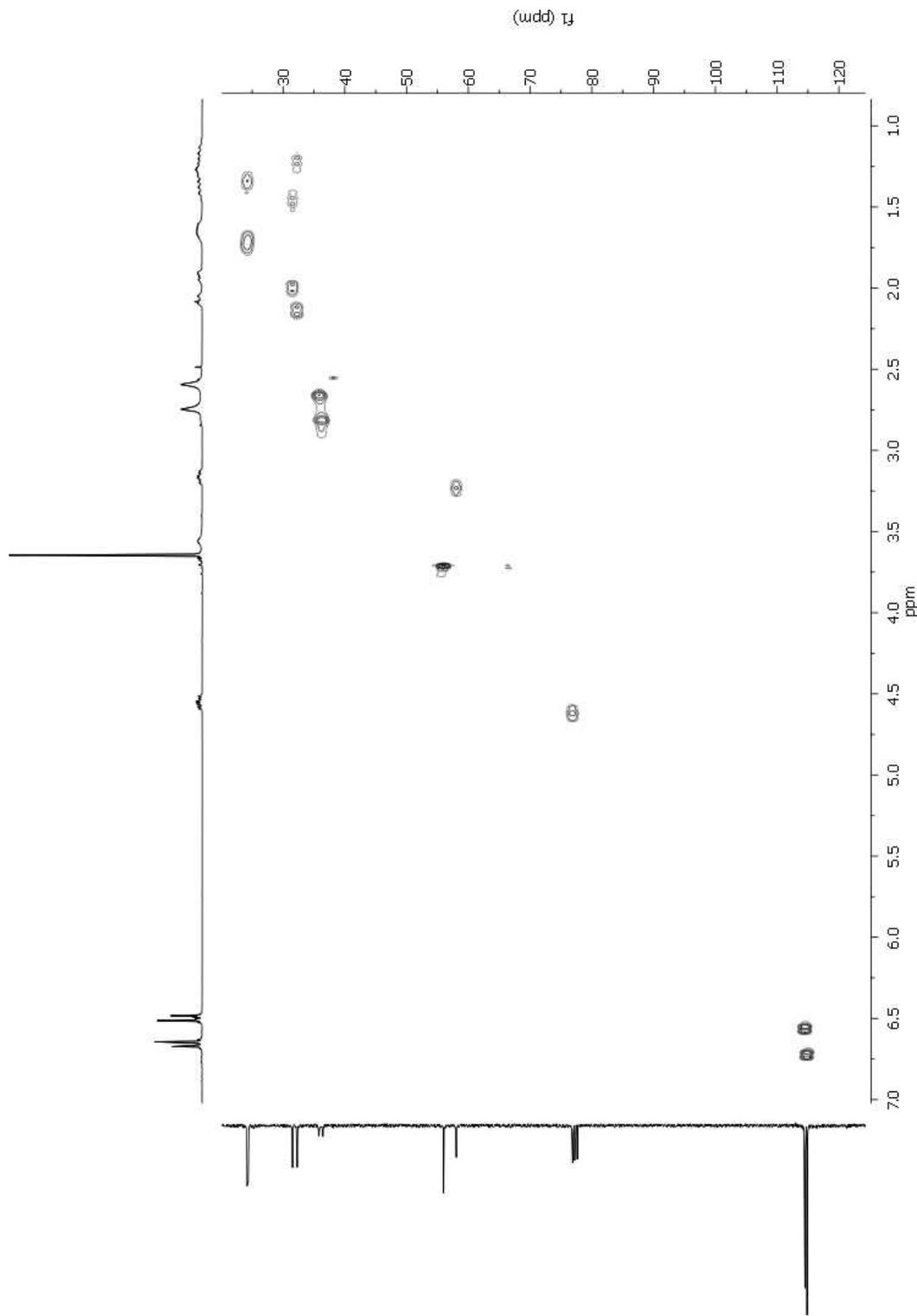
Anexo 15. Mapa de Contorno HSQC do *trans-N,N*-dimetilcarbamato de 2-fenilaminocicloexila (**3a**) em  $\text{CDCl}_3$ .



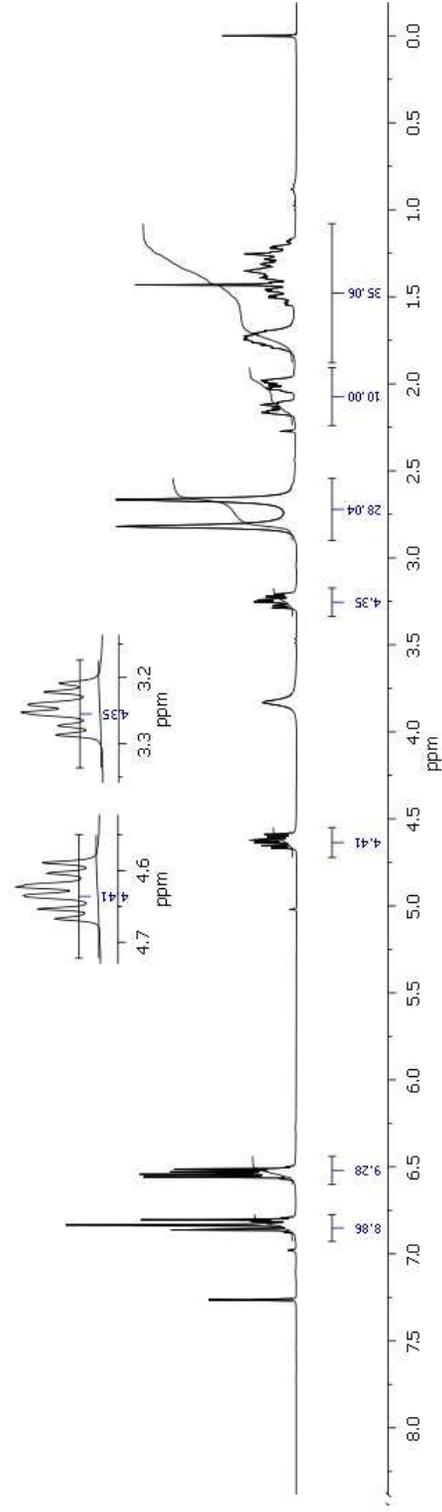
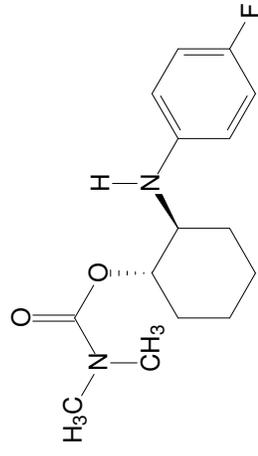
**Anexo 16.** Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  a 300 MHz do *trans*-*N,N*-dimetilcarbamato de 2-(4-metoxifenilamino)cicloexila (**3b**) em  $\text{CDCl}_3$ .



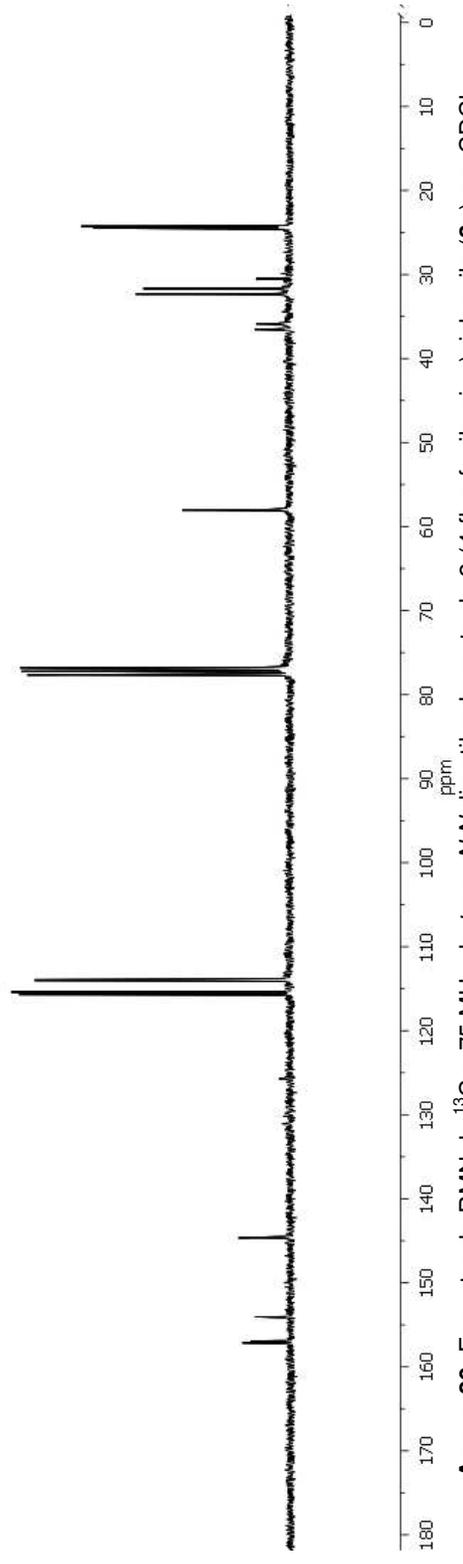
**Anexo 17.** Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  a 75 MHz do *trans-N,N*-dimetilcarbamato de 2-(4-metoxifenilamino)cicloexila (**3b**) em  $\text{CDCl}_3$ .



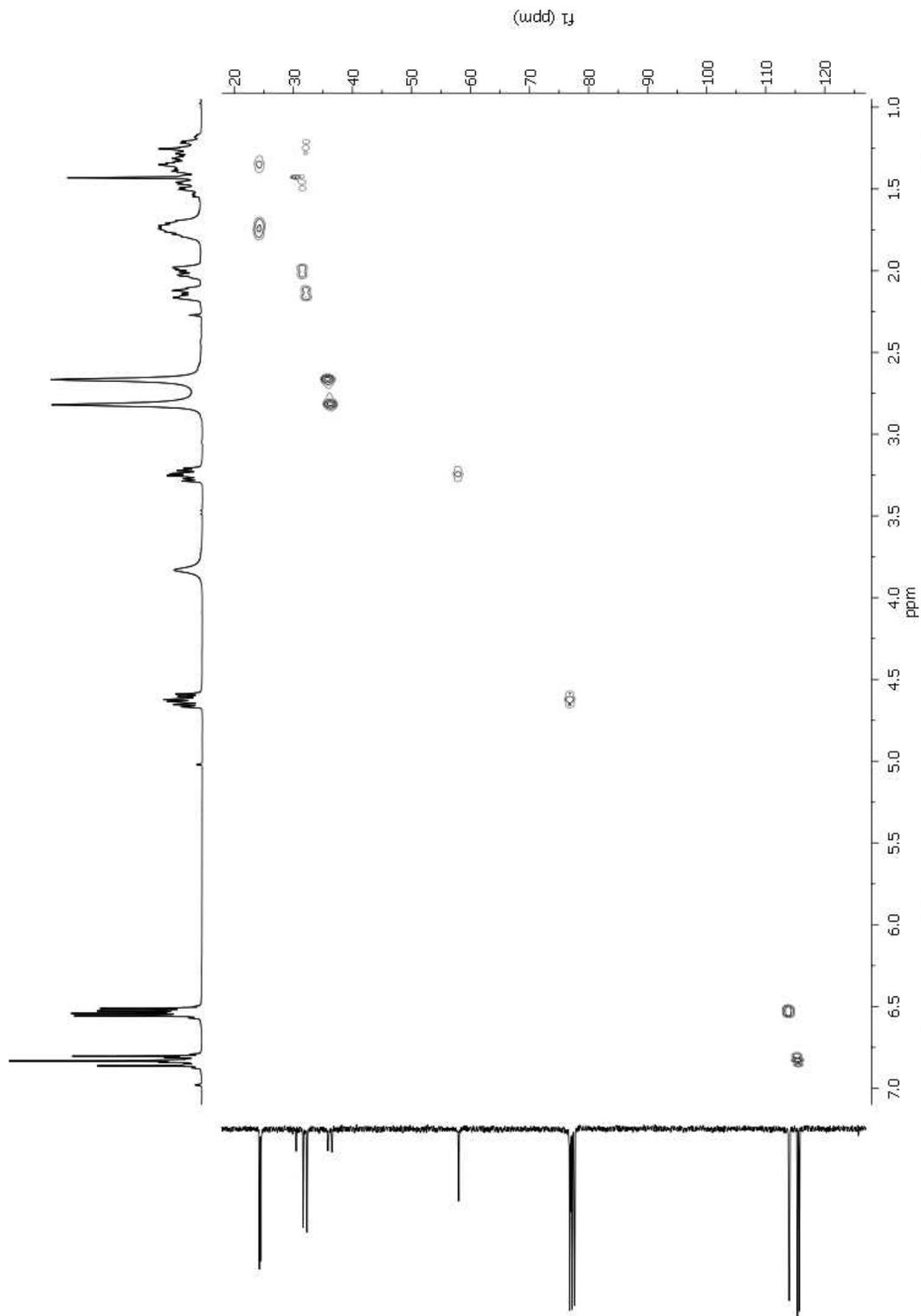
Anexo 18. Mapa de Contorno HSQC do *trans*-*N,N*-dimetilcarbamato de 2-(4-metoxifenilamino)cicloexila (**3b**) em CDCl<sub>3</sub>.



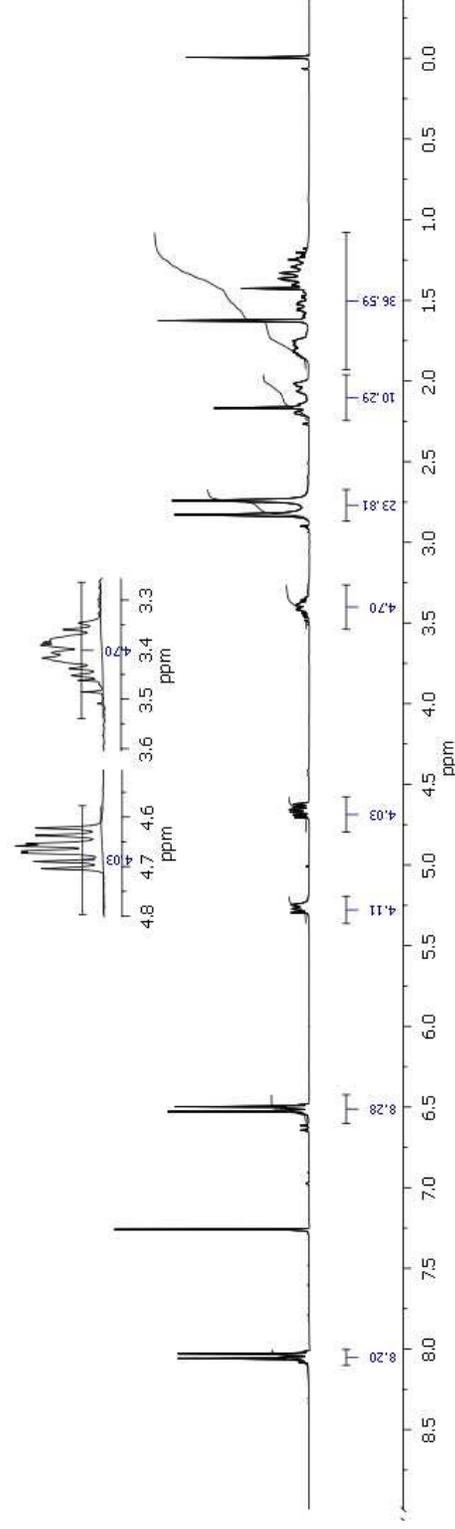
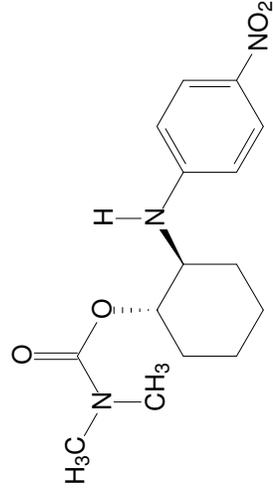
**Anexo 19.** Espectro de RMN de <sup>1</sup>H a 300 MHz do *trans*-*N,N*-dimetilcarbamato de 2-(4-fluorofilamino)cicloexila (**3c**) em CDCl<sub>3</sub>.



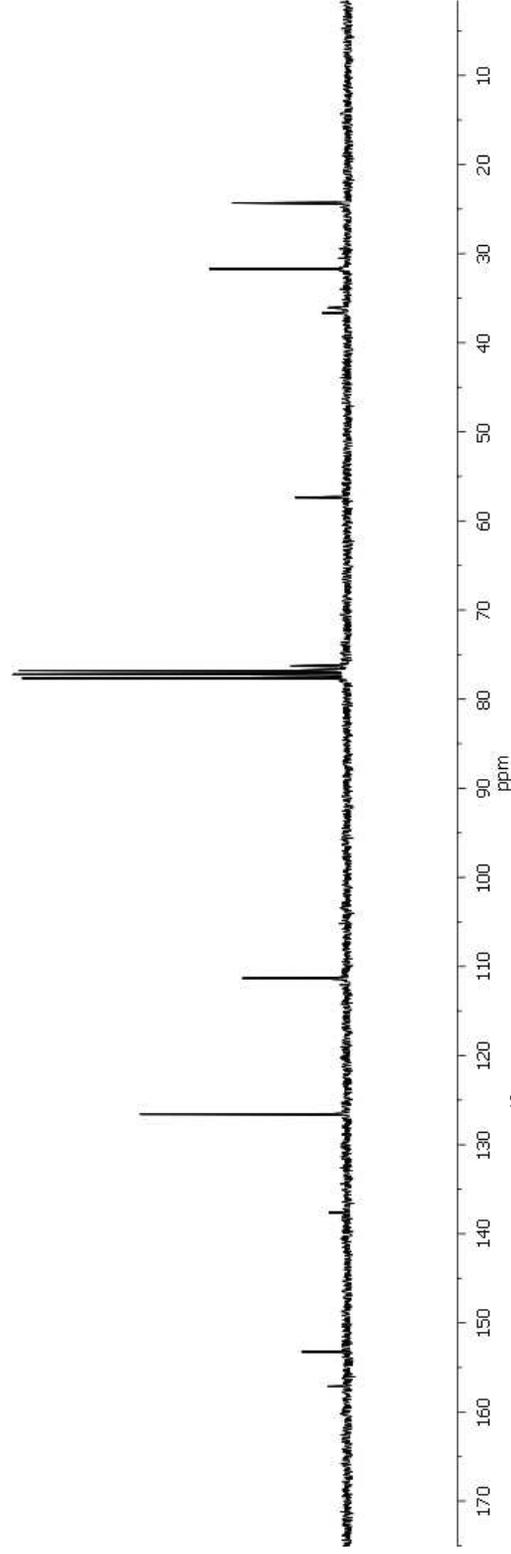
**Anexo 20.** Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  a 75 MHz do *trans-N,N*-dimetilcarbamato de 2-(4-fluorofenilamino)cicloexila (**3c**) em  $\text{CDCl}_3$ .



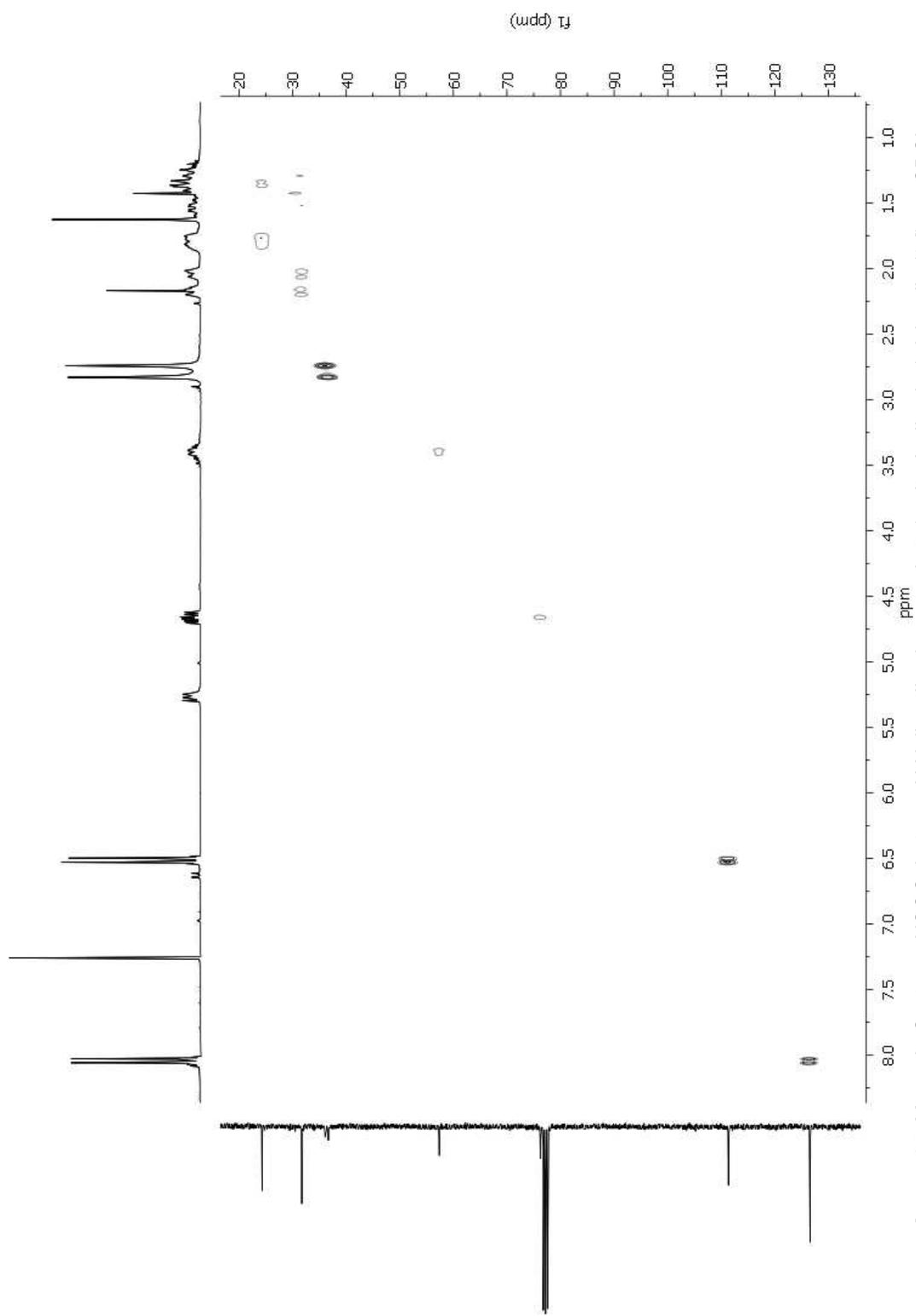
**Anexo 21.** Mapa de Contorno HSQC do *trans*-*N,N*-dimetilcarbamato de 2-(4-fluorfenilamino)cicloexila (**3c**) em  $\text{CDCl}_3$ .



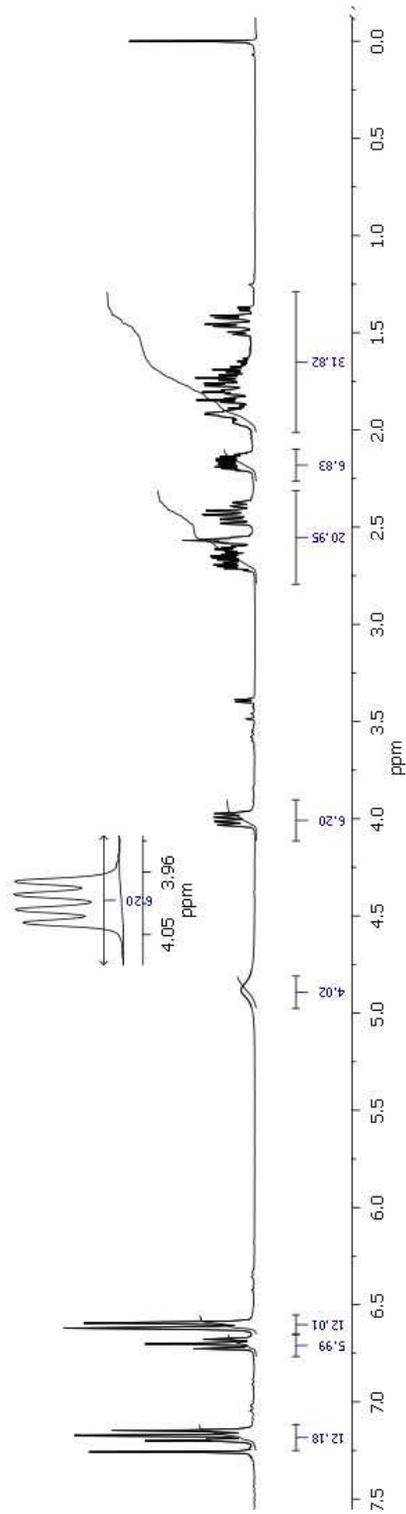
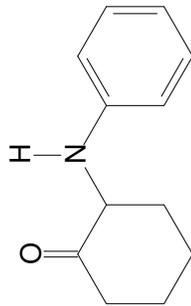
**Anexo 22.** Espectro de RMN de <sup>1</sup>H a 300 MHz do *trans*-N,N-dimetilcarbamato de 2-(4-nitrofenilamino)cicloexila (**3d**) em CDCl<sub>3</sub>.



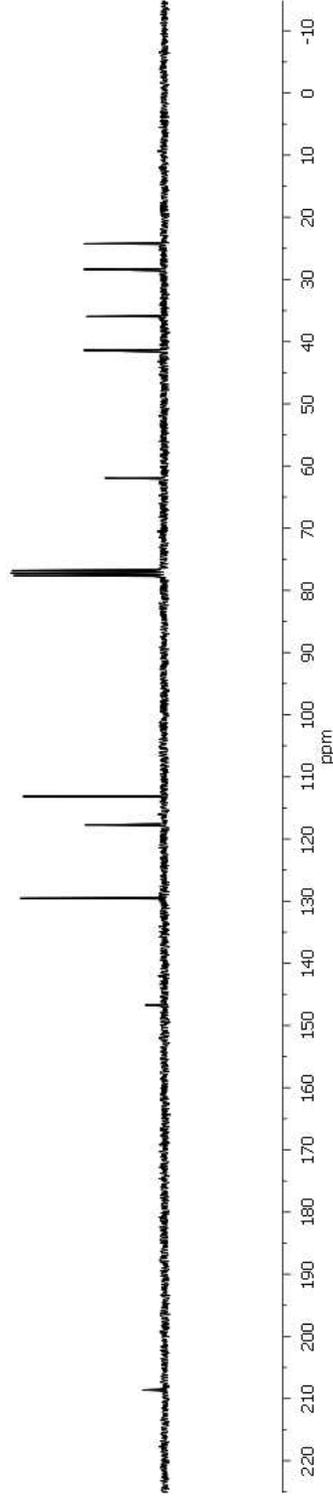
**Anexo 23.** Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  a 75 MHz do *trans*-*N,N*-dimetilcarbamato de 2-(4-nitrofenilamino)cicloexila (**3d**) em  $\text{CDCl}_3$ .



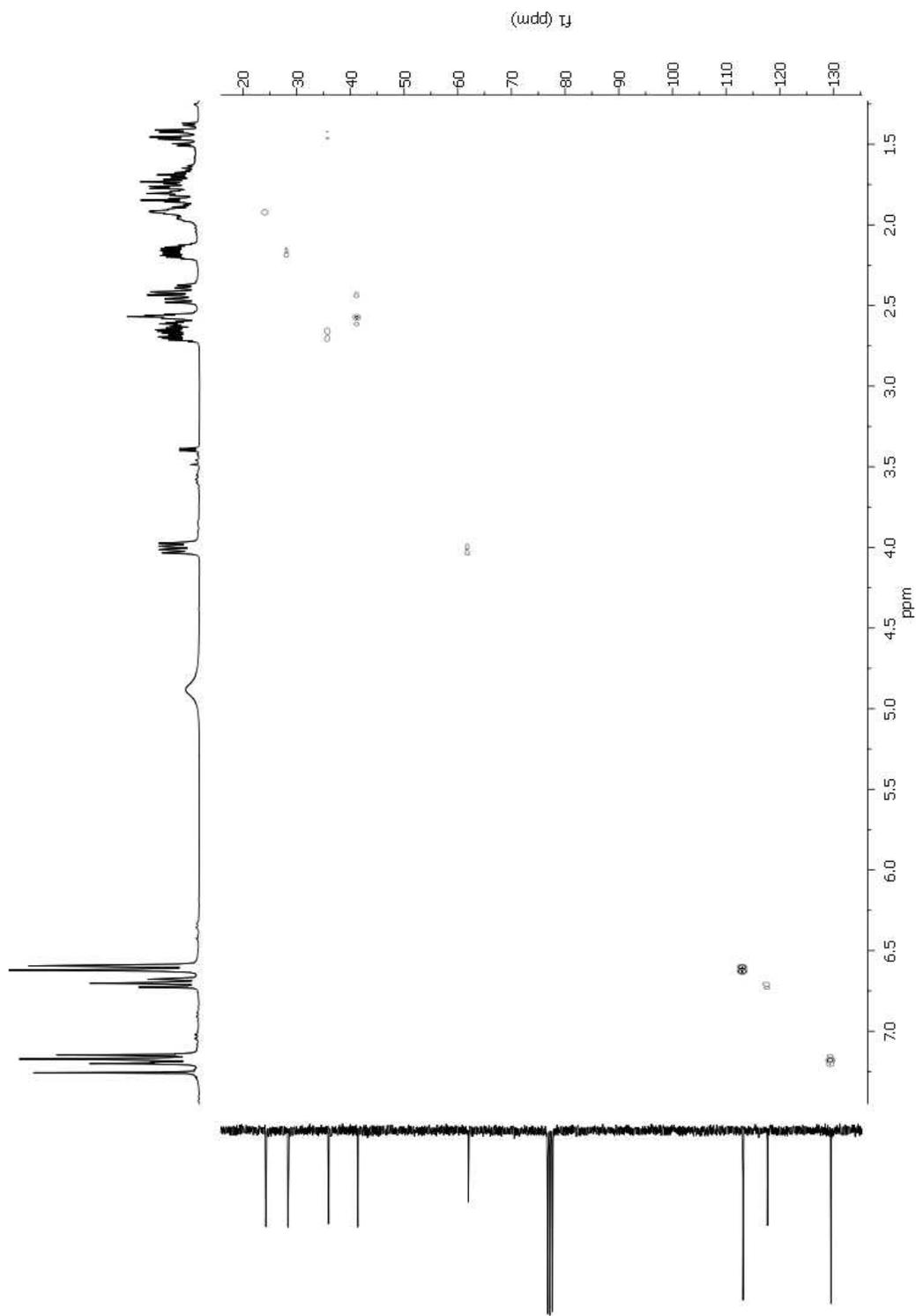
Anexo 24. Mapa de Contorno HSQC do *trans*-*N,N*-dimetilcarbamato de 2-(4-nitrofenilamino)cicloexila (**3d**) em  $\text{CDCl}_3$ .



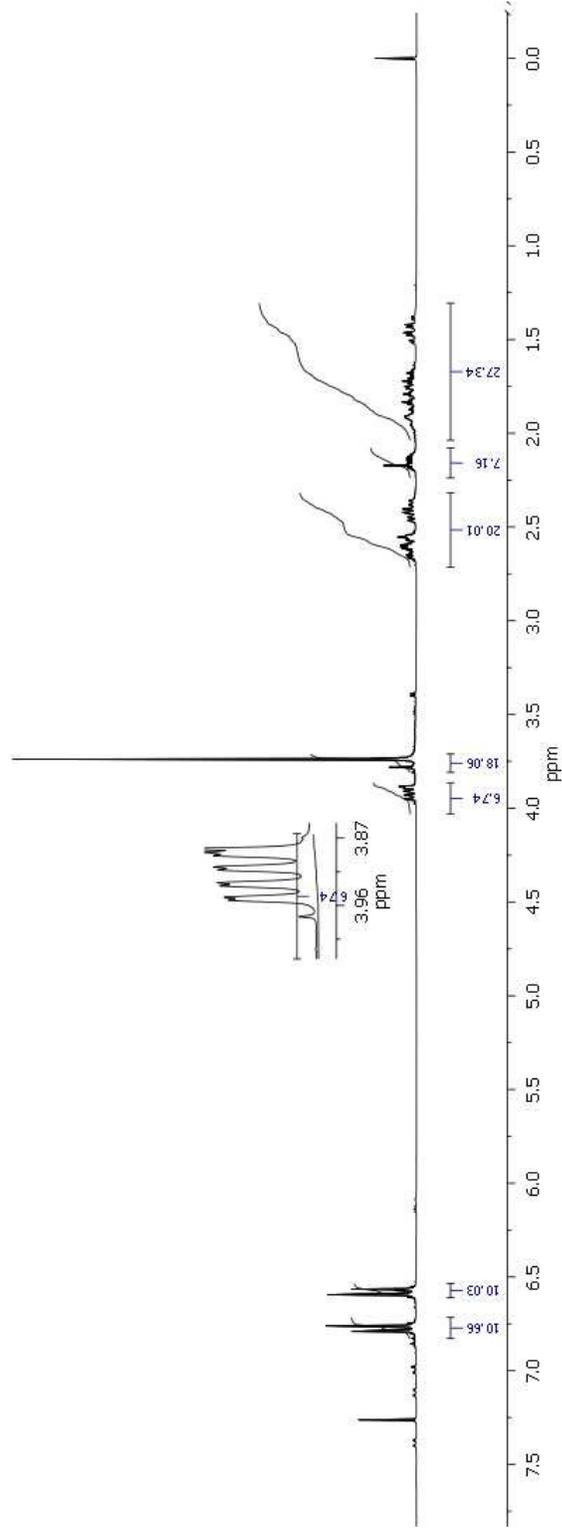
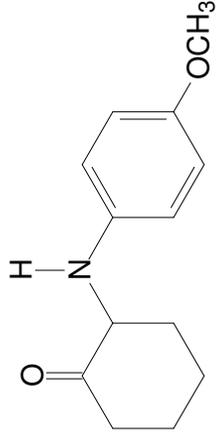
**Anexo 25.** Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  a 300 MHz do 2-fenilaminociclohexanona (**5a**) em  $\text{CDCl}_3$ .



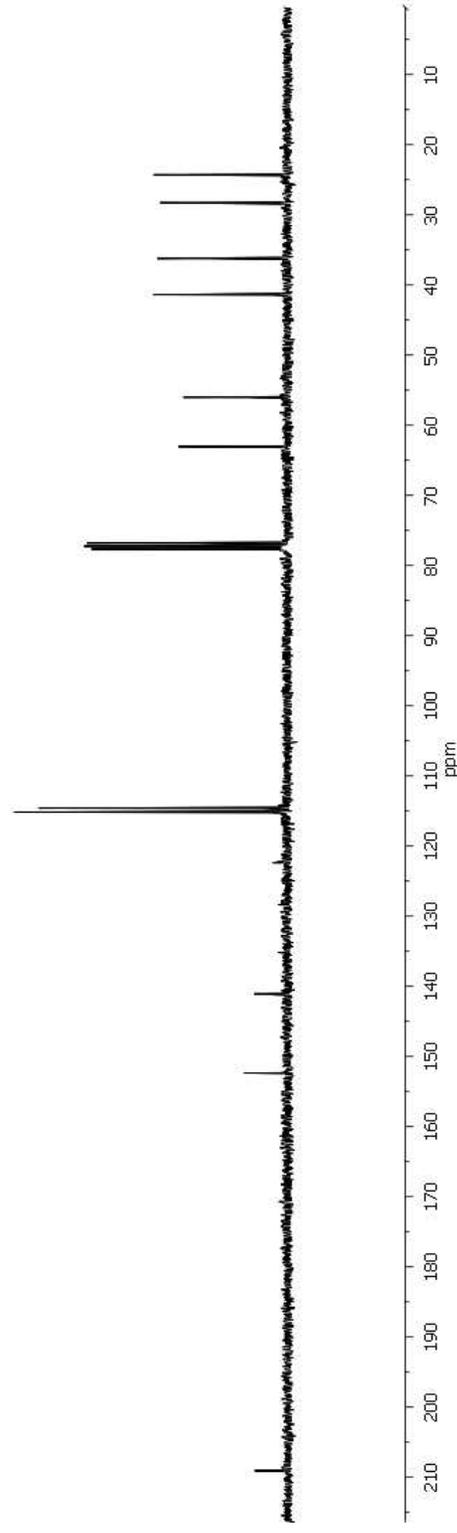
**Anexo 26.** Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  a 75 MHz do 2-fenilaminociclohexanona (**5a**) em  $\text{CDCl}_3$ .



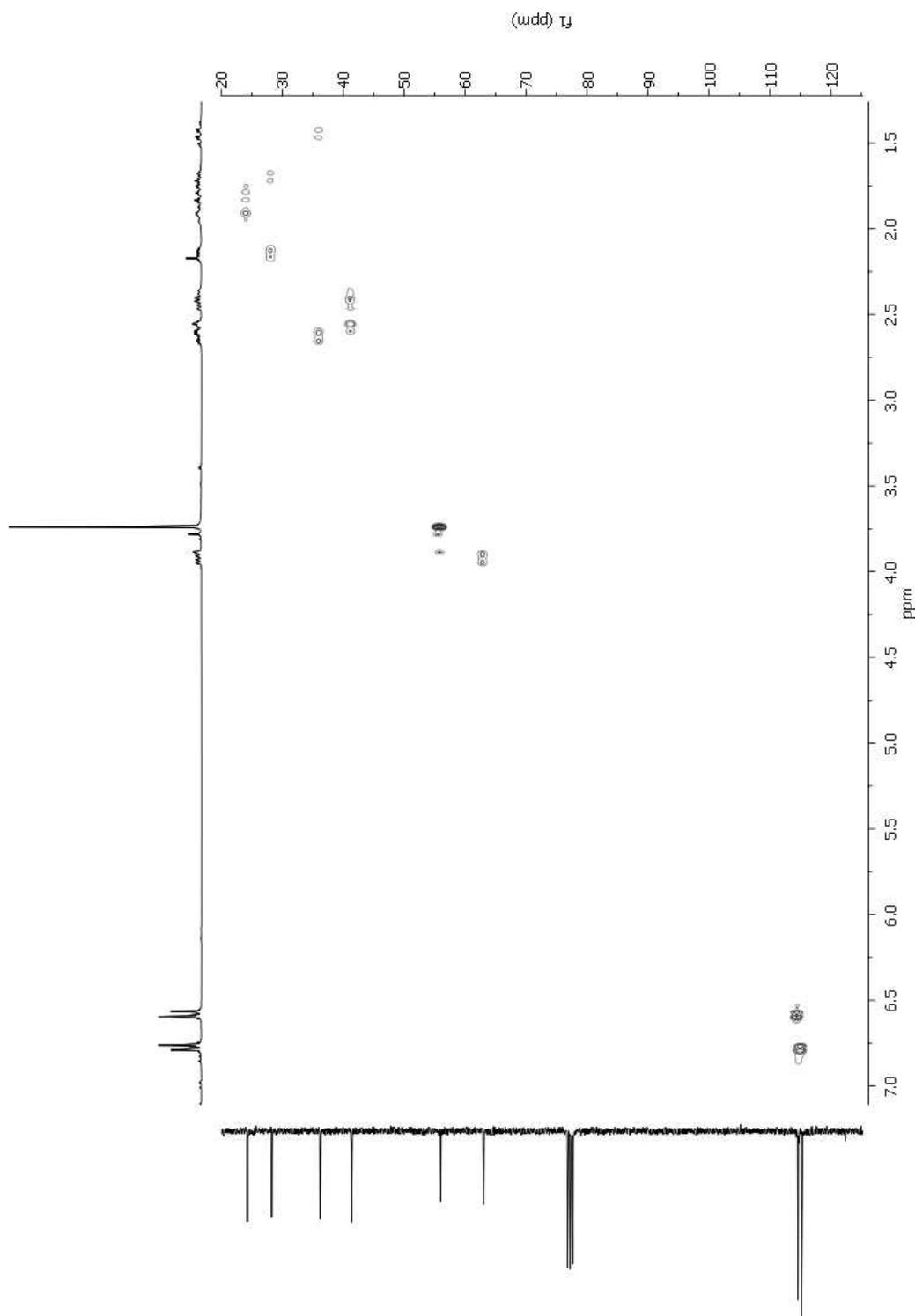
Anexo 27. Mapa de Contorno HSQC do 2-fenilaminociclohexanona (5a) em CDCl<sub>3</sub>.



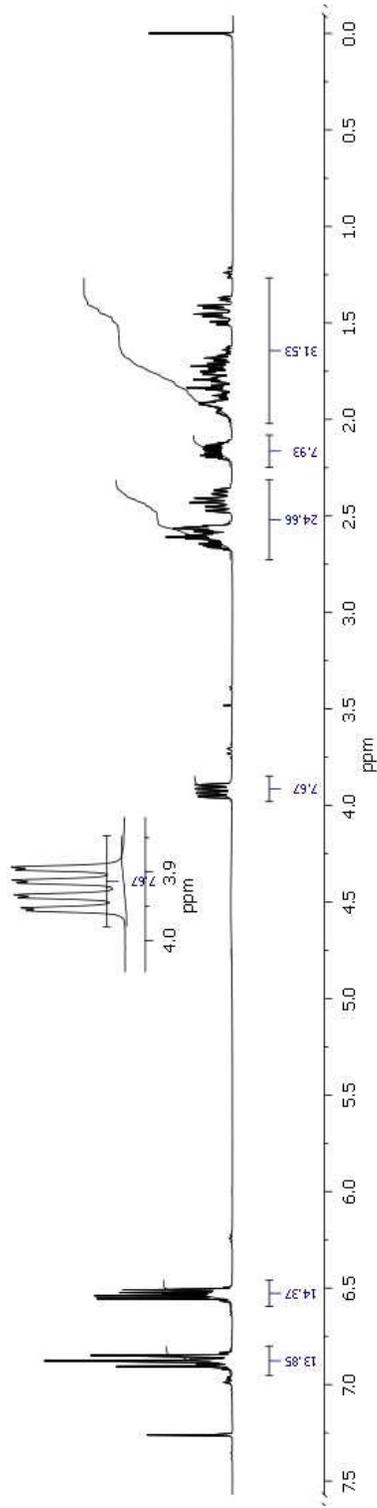
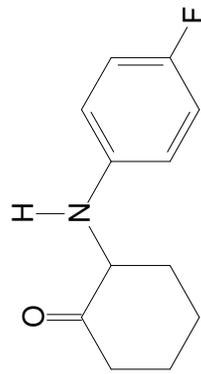
**Anexo 28.** Espectro de RMN de <sup>1</sup>H a 300 MHz do 2-(4-metoxifenilamino)ciclohexanona (**5b**) em CDCl<sub>3</sub>.



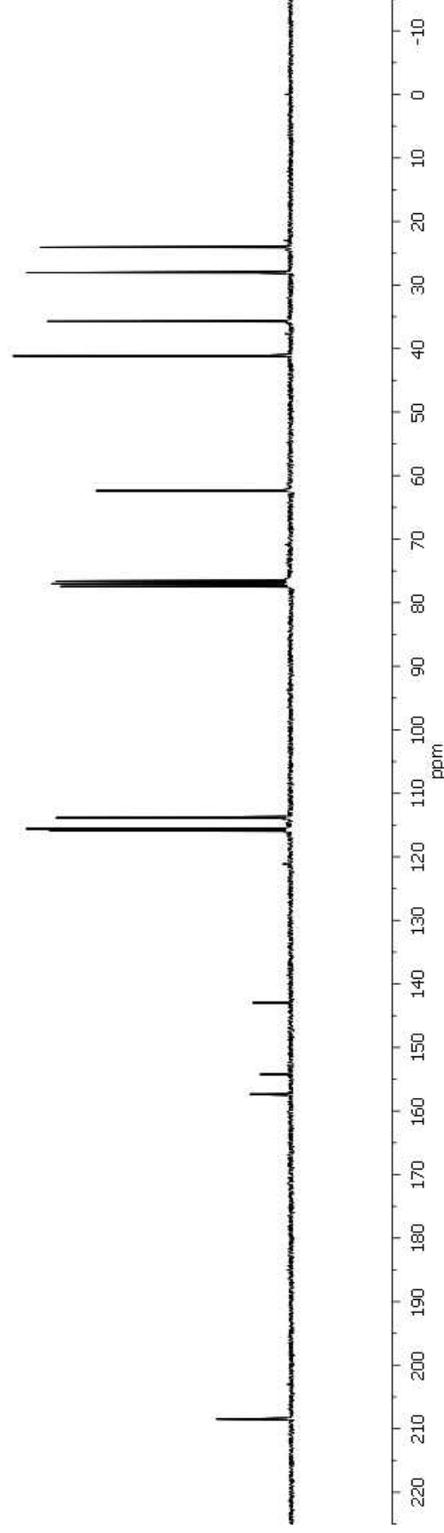
**Anexo 29.** Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  a 75 MHz do 2-(4-metoxifenilamino)ciclohexanona (**5b**) em  $\text{CDCl}_3$ .



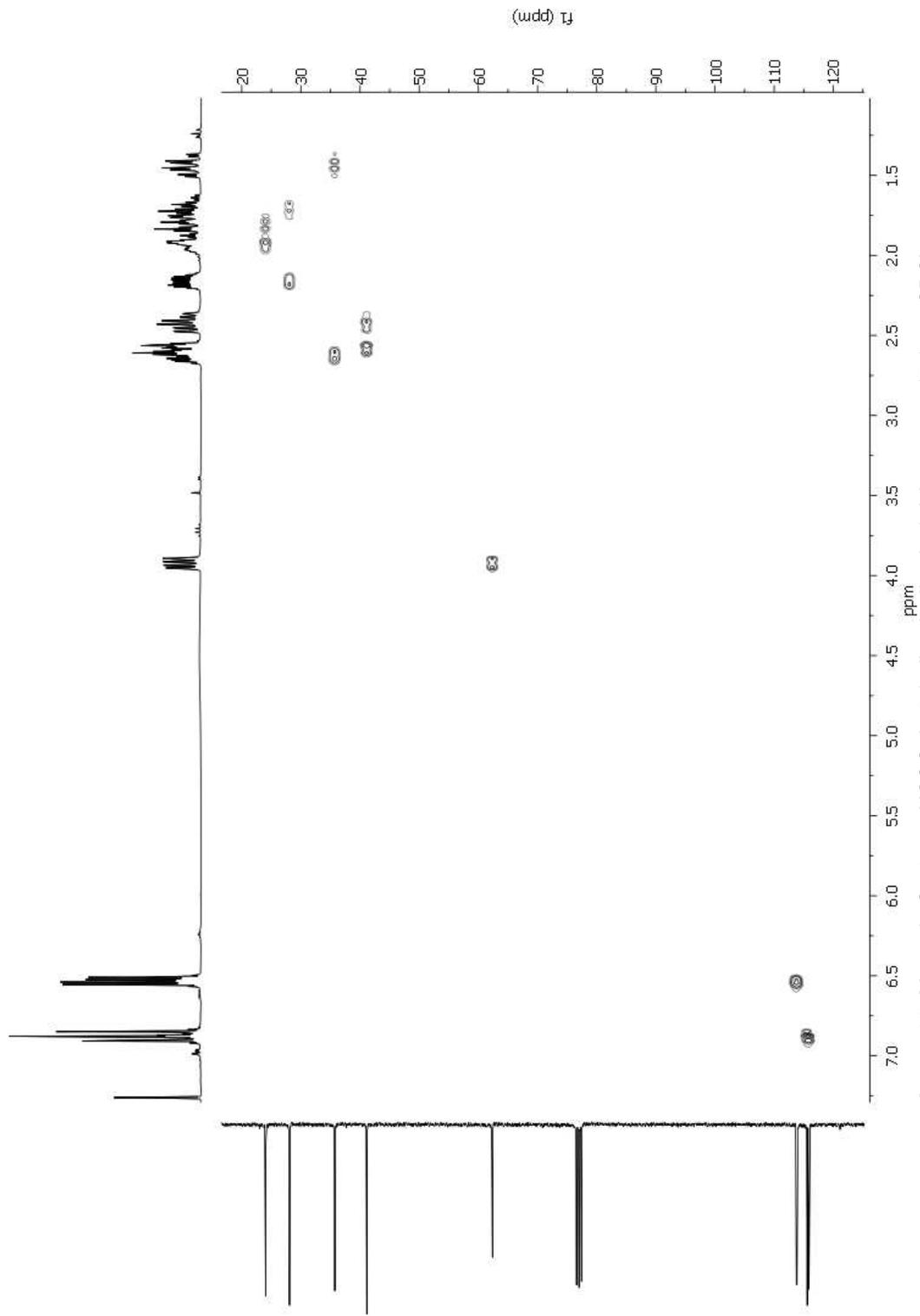
Anexo 30. Mapa de Contorno HSQC do 2-(4-metoxifenilamino)cicloexanona (5b) em  $\text{CDCl}_3$ .



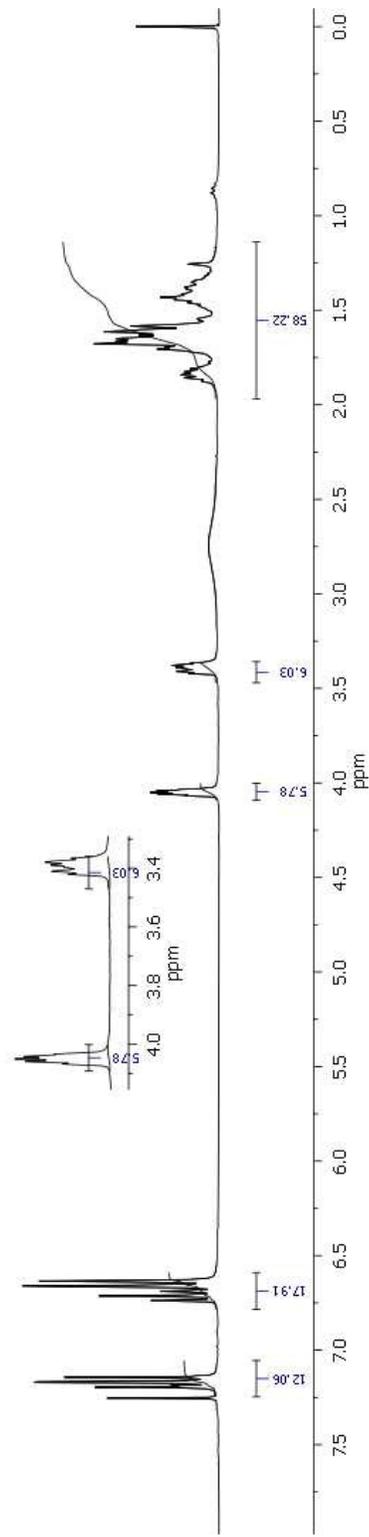
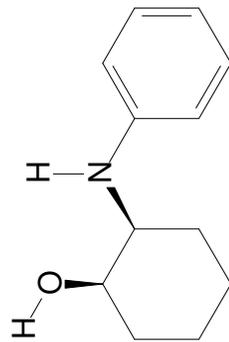
Anexo 31. Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  a 300 MHz do 2-(4-fluorofenilamino)ciclohexanona (5c) em  $\text{CDCl}_3$ .



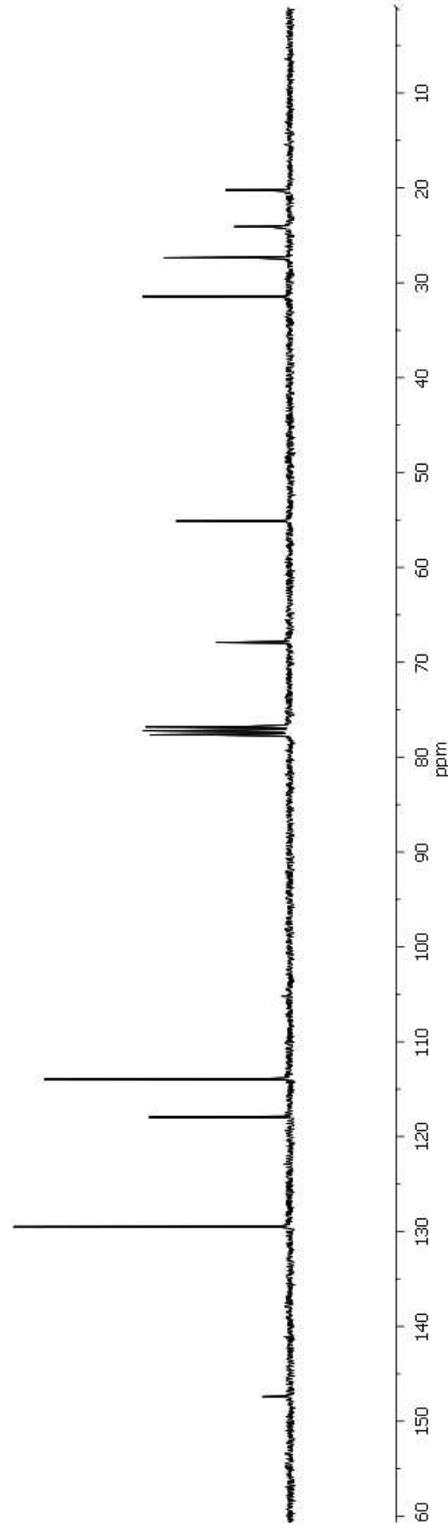
**Anexo 32.** Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  a 75 MHz do 2-(4-fluorfenilamino)cicloexanona (5c) em  $\text{CDCl}_3$ .



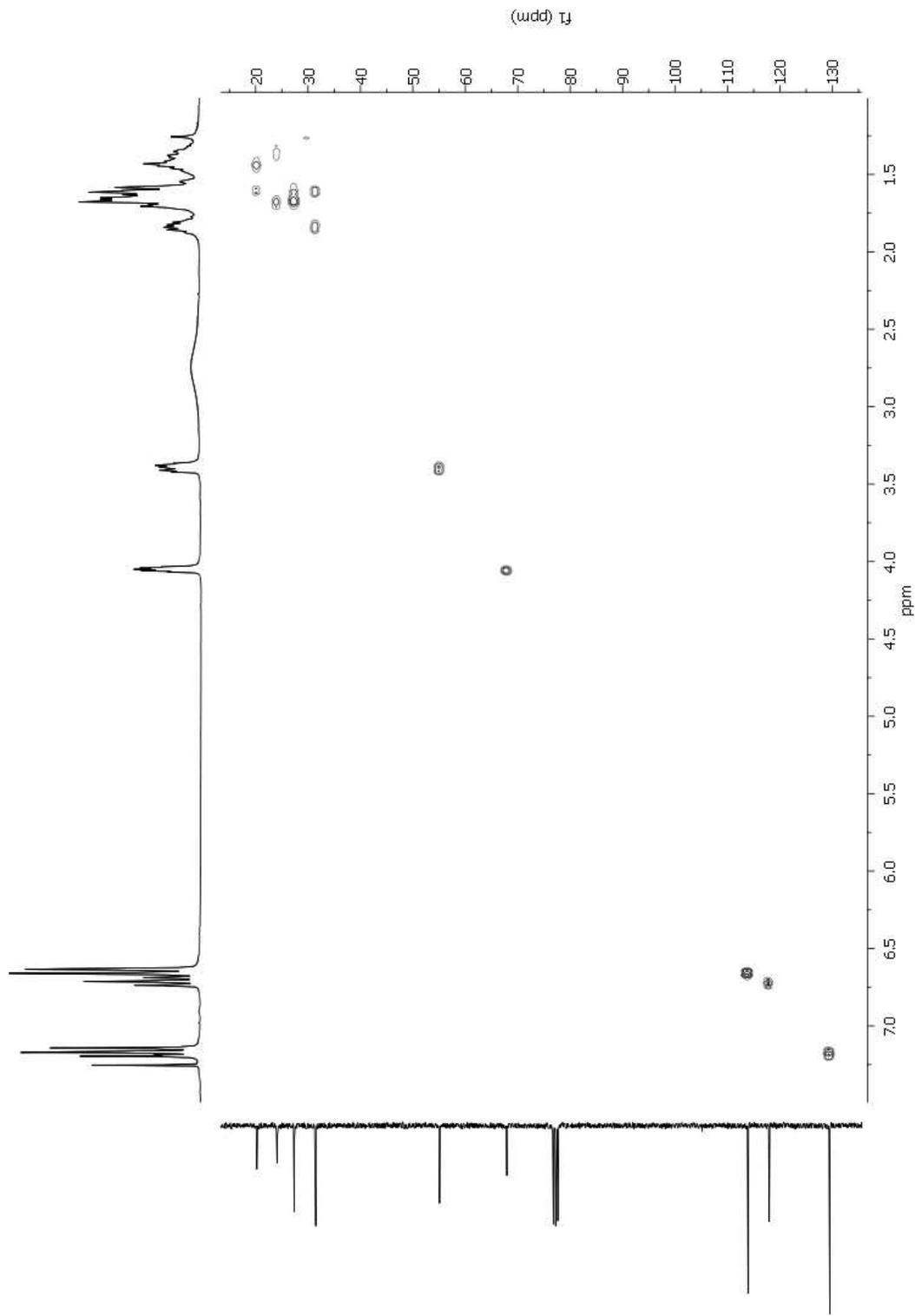
**Anexo 33.** Mapa de Contorno HSQC do 2-(4-fluorofenilamino)ciclohexanona (**5c**) em  $CDCl_3$ .



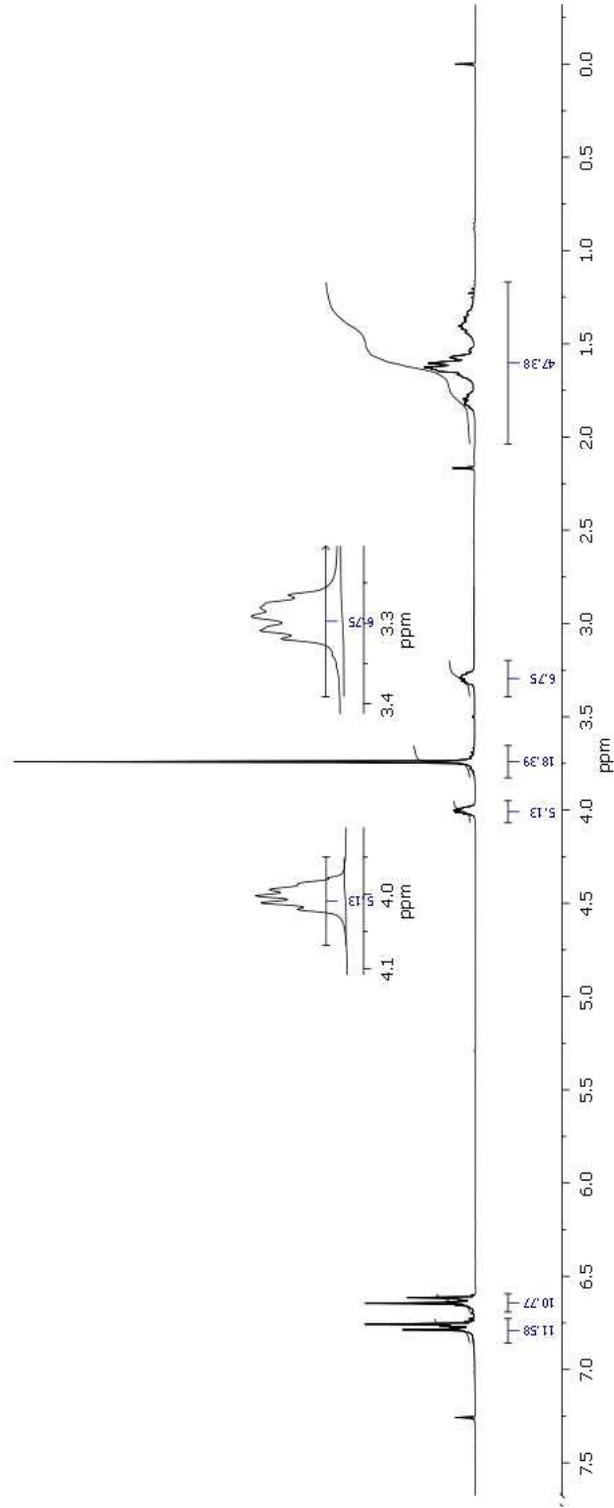
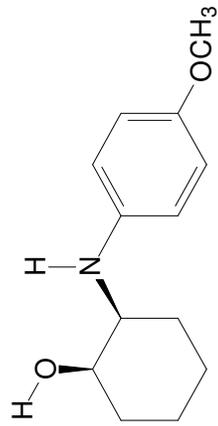
**Anexo 34.** Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  a 300 MHz do *cis-N,N*-dimetilcarbamato de 2-fenilaminocicloexanol (**6a**) em  $\text{CDCl}_3$ .



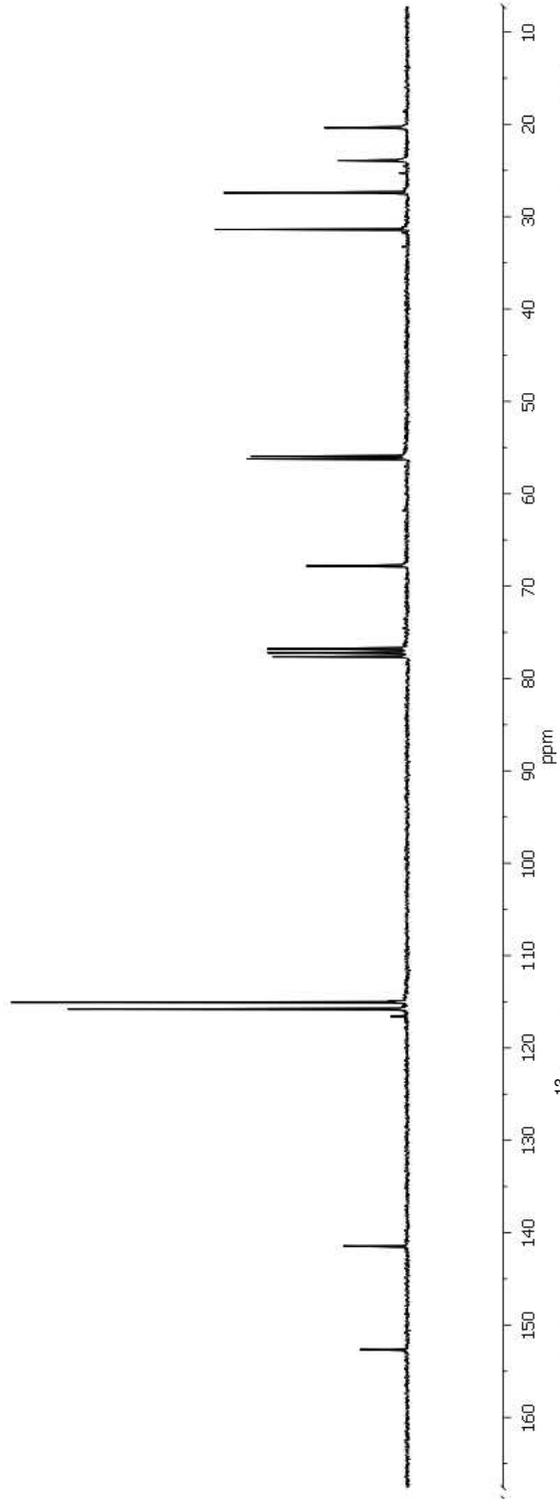
**Anexo 35.** Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  a 75 MHz do *cis*-*N,N*-dimetilcarbamato de 2-fenilaminocicloexanol (**6a**) em  $\text{CDCl}_3$ .



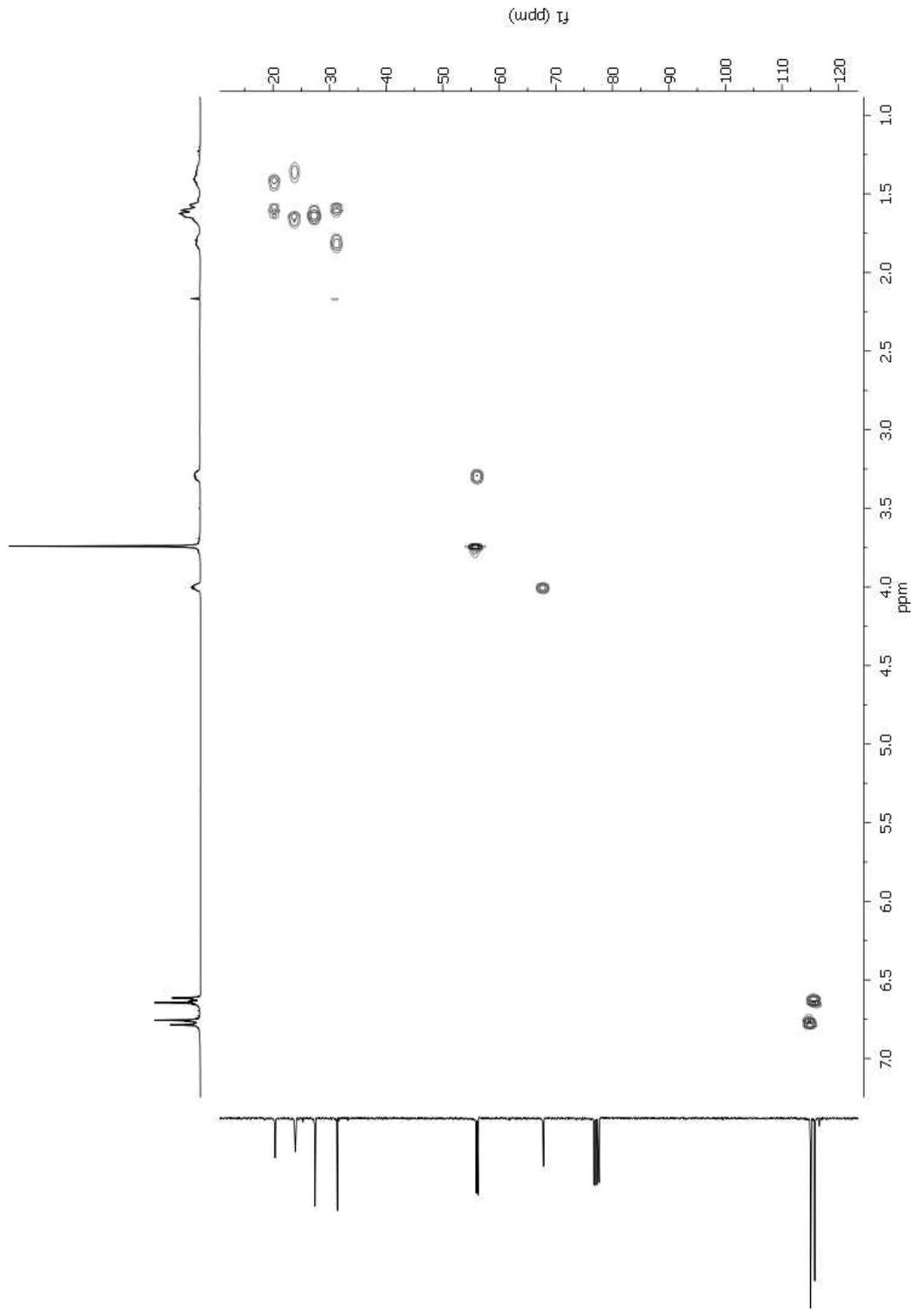
**Anexo 36.** Mapa de Contorno HSQC do *cis*-*N,N*-dimetilcarbamato de 2-fenilaminocicloexanol (**6a**) em CDCl<sub>3</sub>.



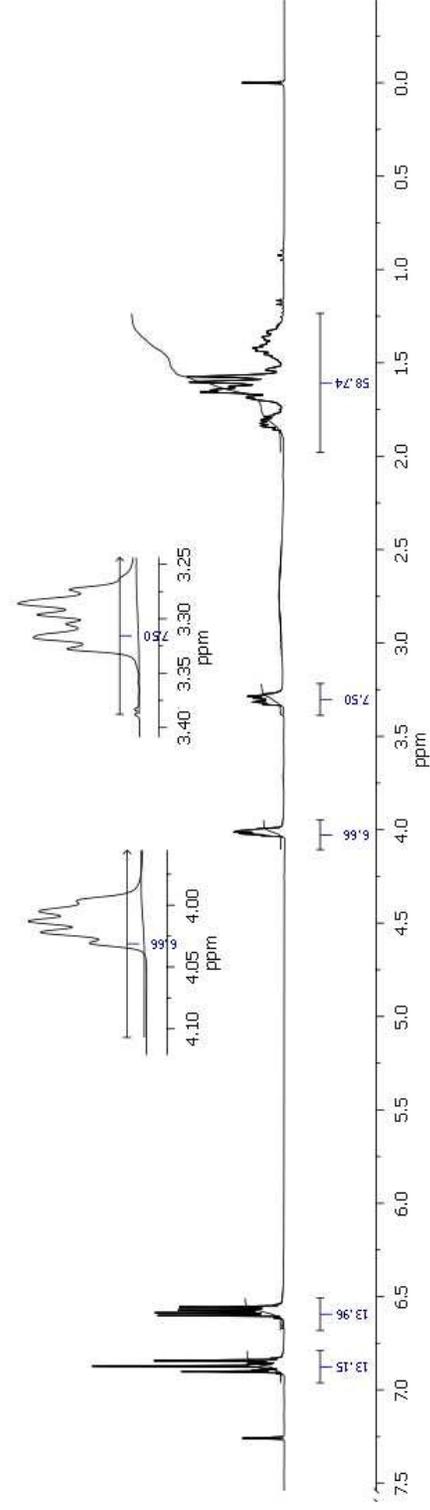
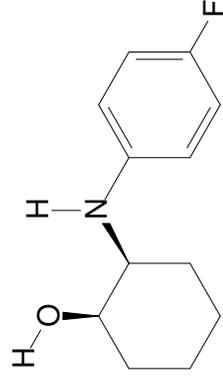
**Anexo 37.** Espectro de RMN de <sup>1</sup>H a 300 MHz do *cis-N,N*-dimetilcarbamato de 2-(4-metoxifenilamino)cicloexanol (**6b**) em CDCl<sub>3</sub>.



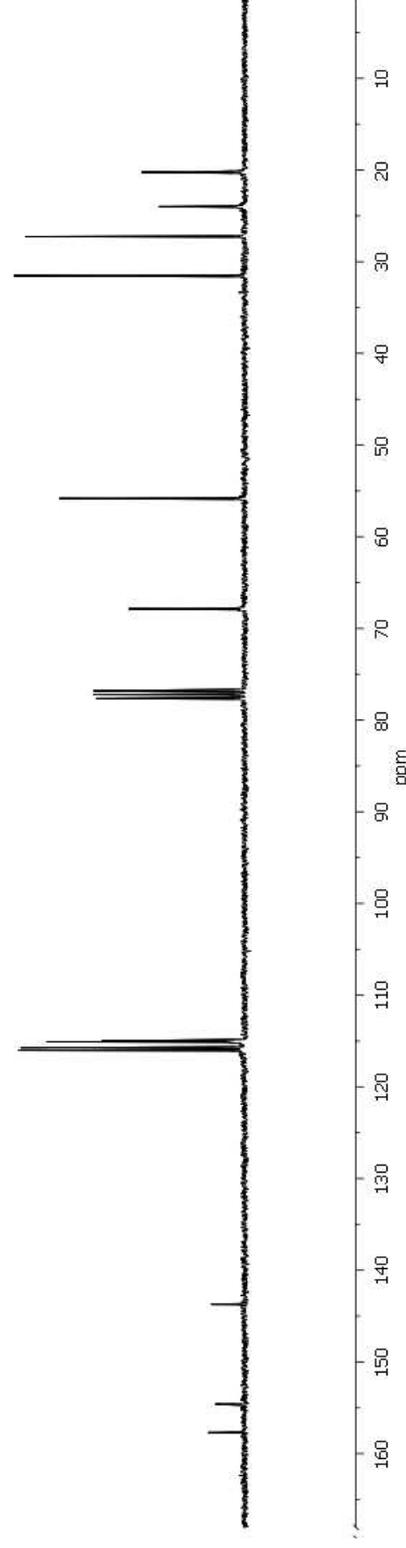
**Anexo 38.** Espectro de RMN de <sup>13</sup>C a 75 MHz do *cis-N,N*-dimetilcarbamato de 2-(4-metoxifenilamino)cicloexanol (**6b**) em CDCl<sub>3</sub>.



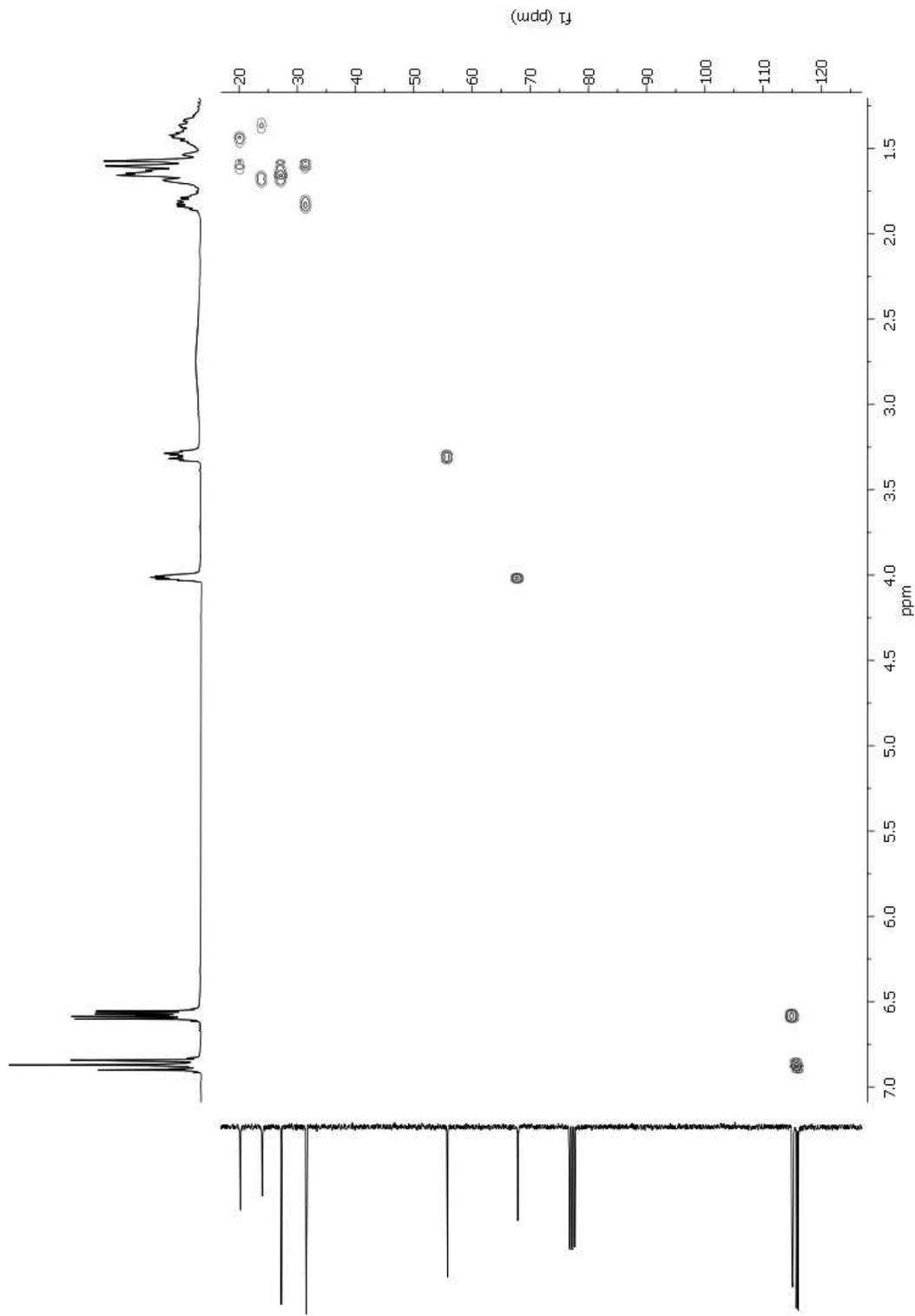
**Anexo 39.** Mapa de Contorno HSQC do *cis-N,N*-dimetilcarbamato de 2-(4-metoxifenilamino)ciclohexanol (**6b**) em  $\text{CDCl}_3$ .



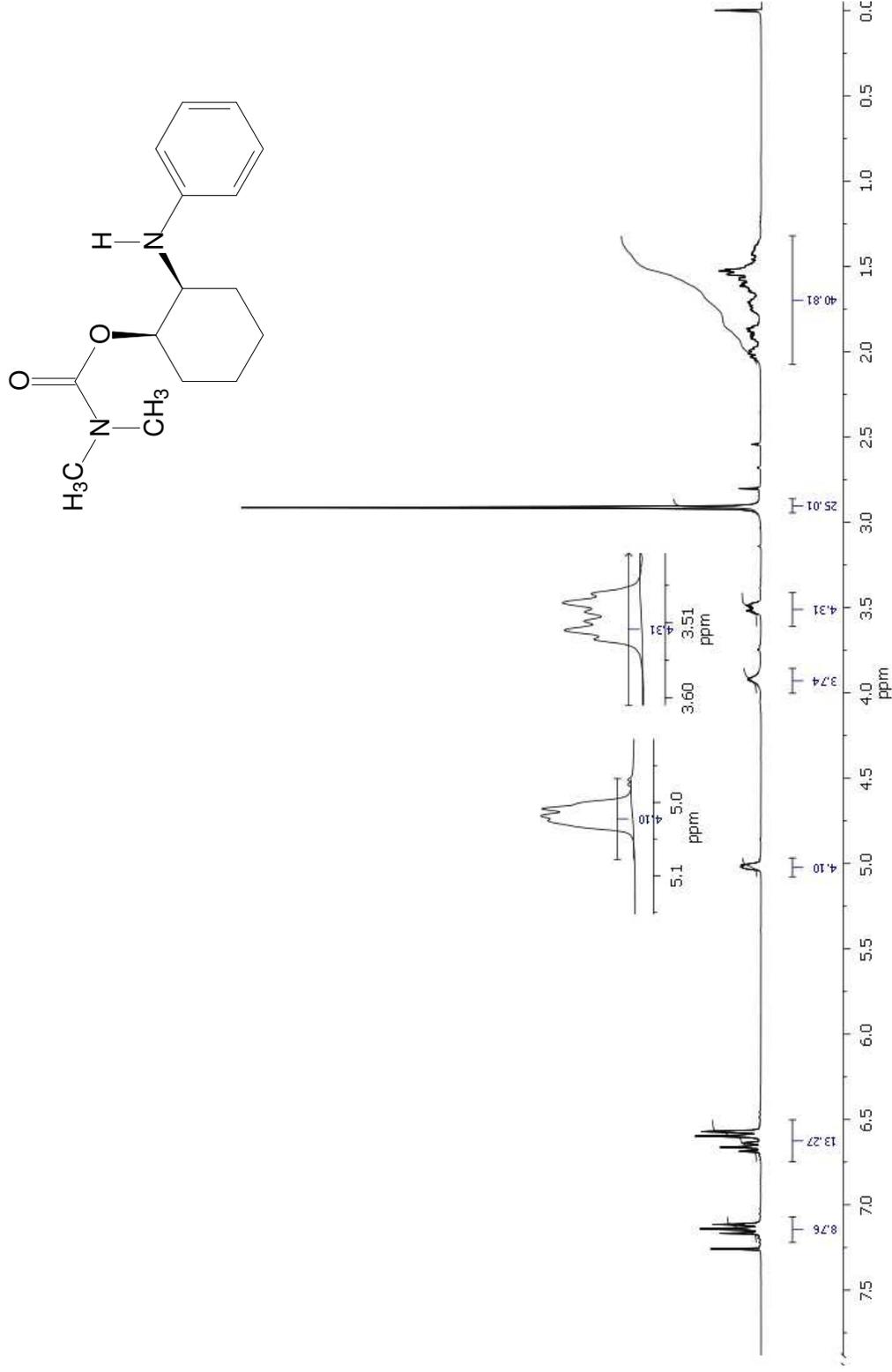
**Anexo 40.** Espectro de RMN de <sup>1</sup>H a 300 MHz do *cis-N,N*-dimetilcarbamato de 2-(4-fluorofenilamino)cicloexanol (**6c**) em CDCl<sub>3</sub>.



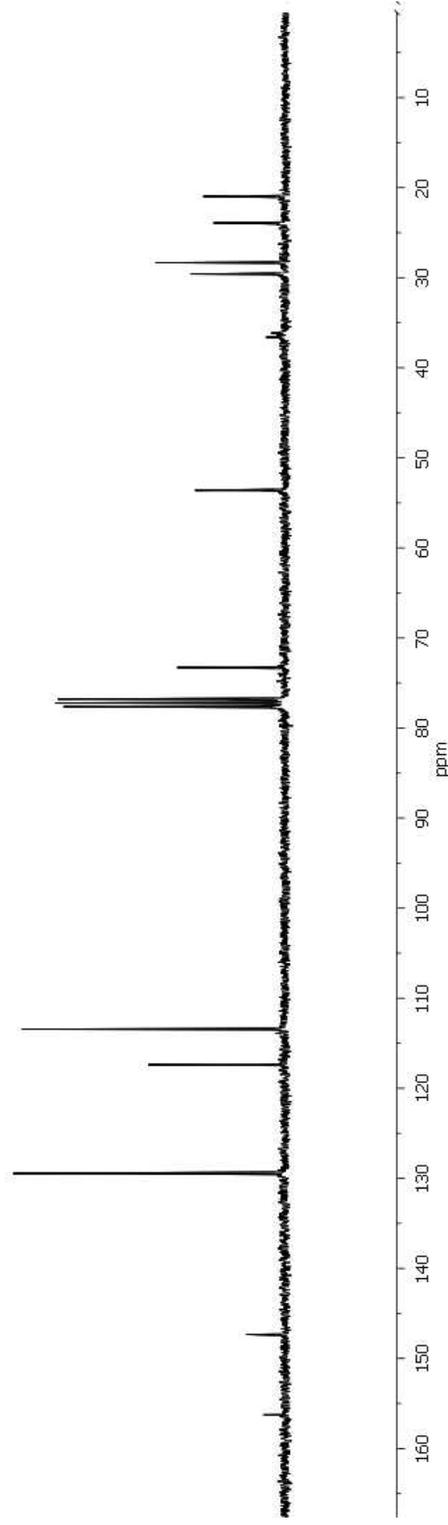
**Anexo 41.** Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  a 75 MHz do *cis*-*N,N*-dimetilcarbamato de 2-(4-fluorofenilamino)cicloexanol (6c) em  $\text{CDCl}_3$ .



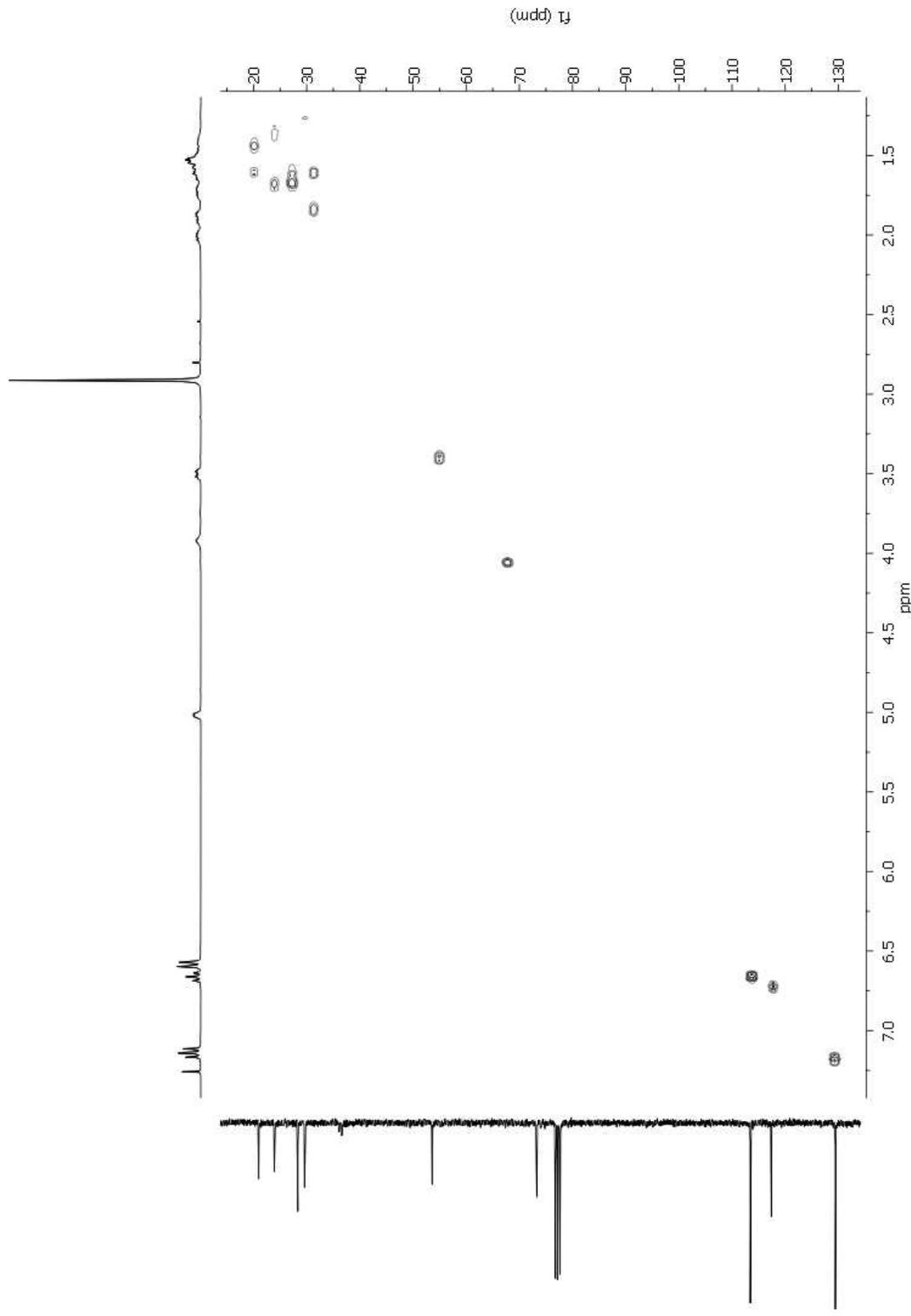
Anexo 42. Mapa de Contorno HSQC do *cis-N,N*-dimetilcarbamato de 2-(4-fluorofenilamino)cicloexanol (**6c**) em  $\text{CDCl}_3$ .

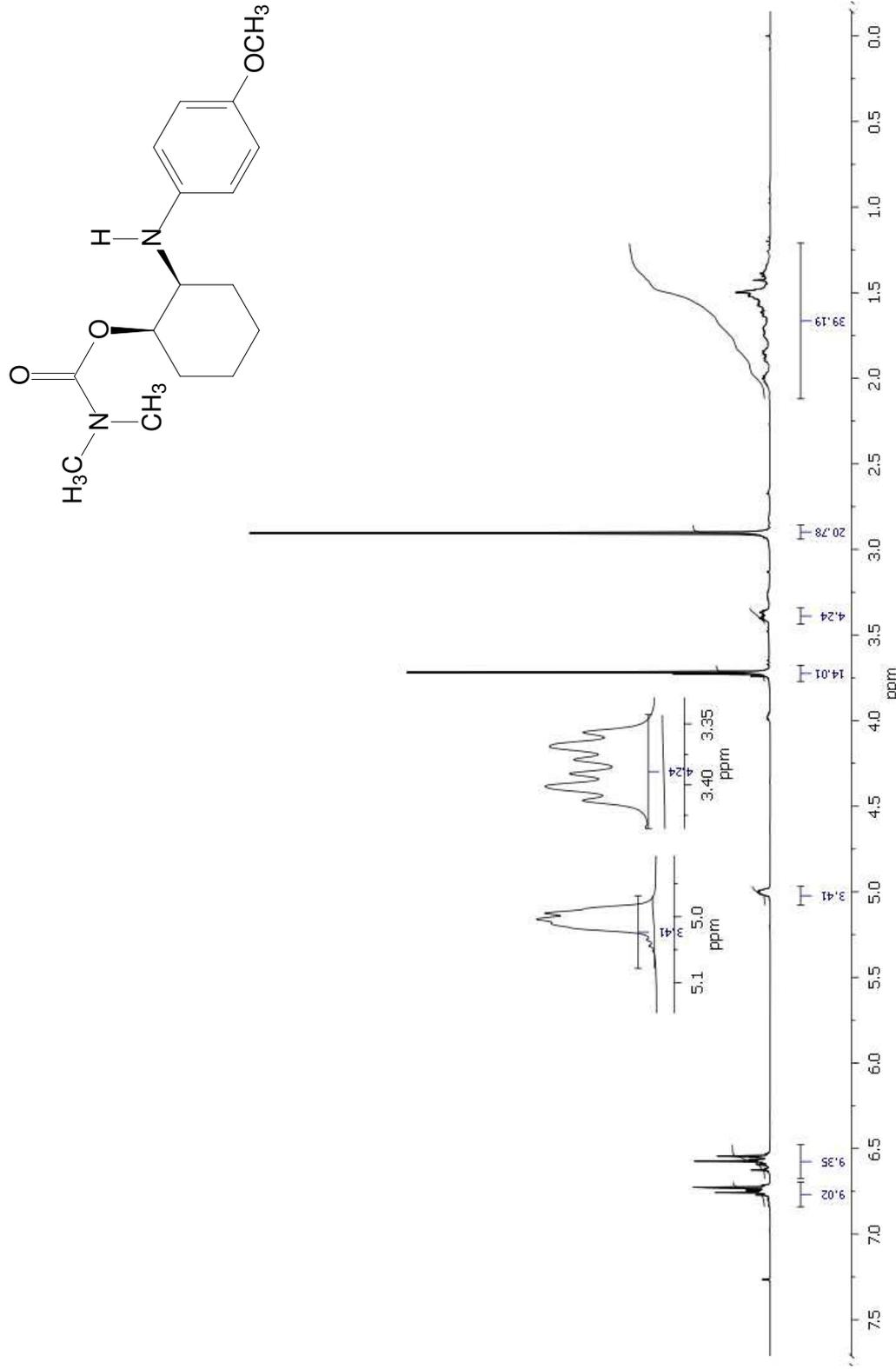


**Anexo 43.** Espectro de RMN de <sup>1</sup>H a 300 MHz do *cis*-*N,N*-dimetilcarbamato de 2-fenilaminocicloexila (7a) em CDCl<sub>3</sub>.

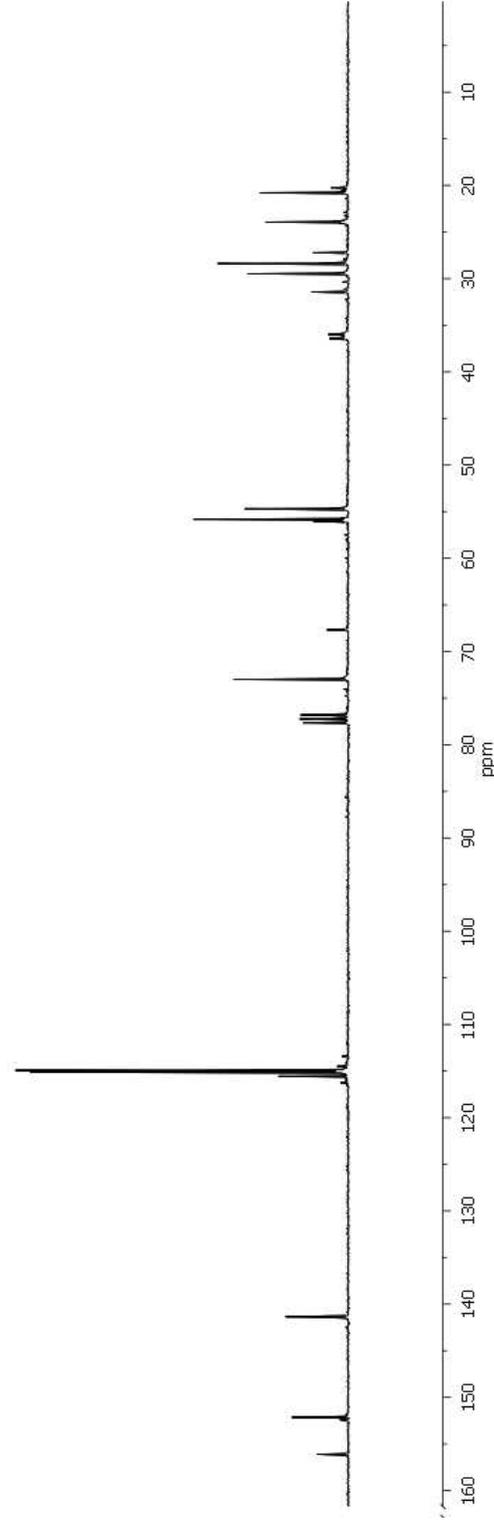


**Anexo 44.** Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  a 75 MHz do *cis-N,N*-dimetilcarbamato de 2-fenilaminocicloexila (**7a**) em  $\text{CDCl}_3$ .

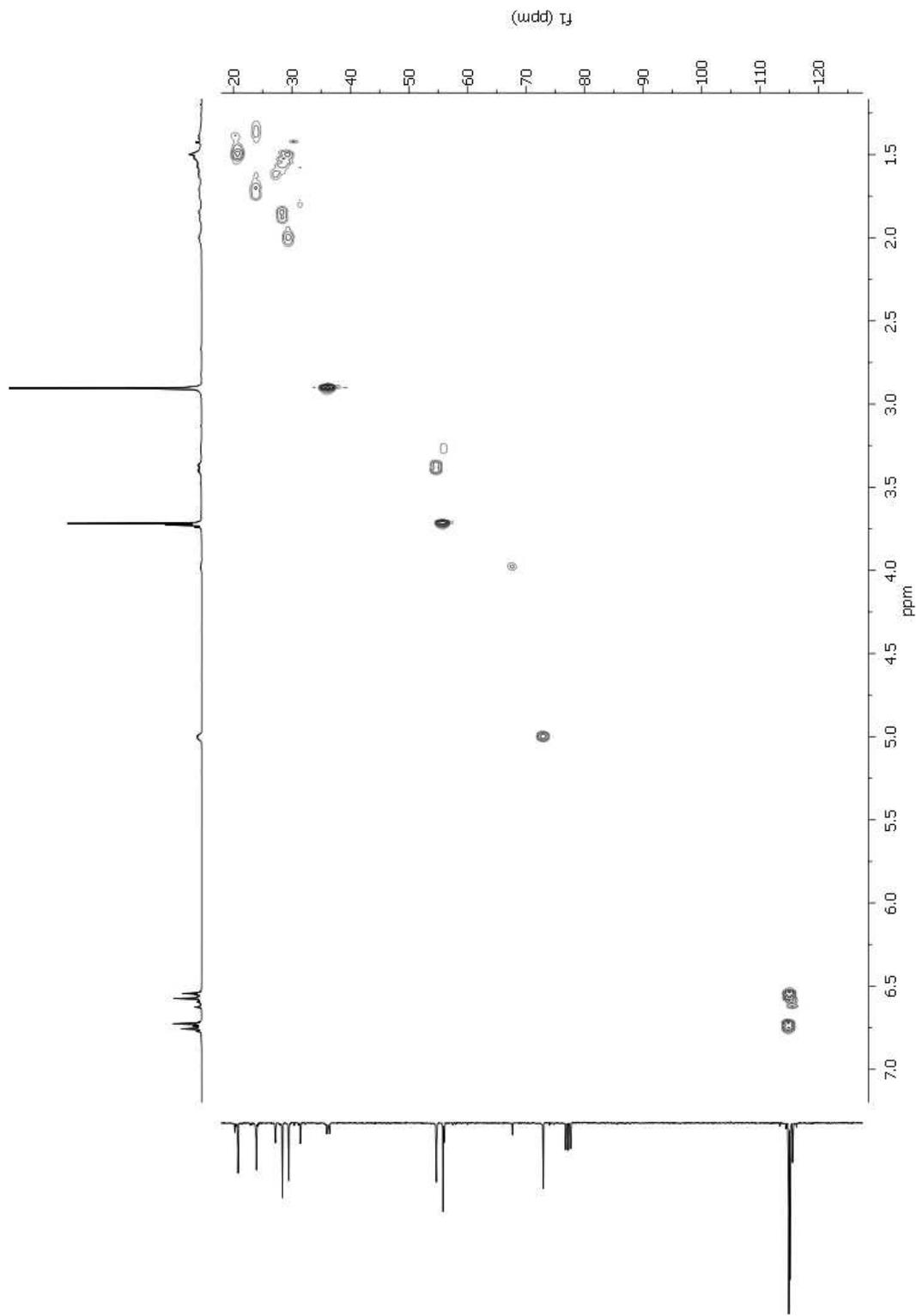


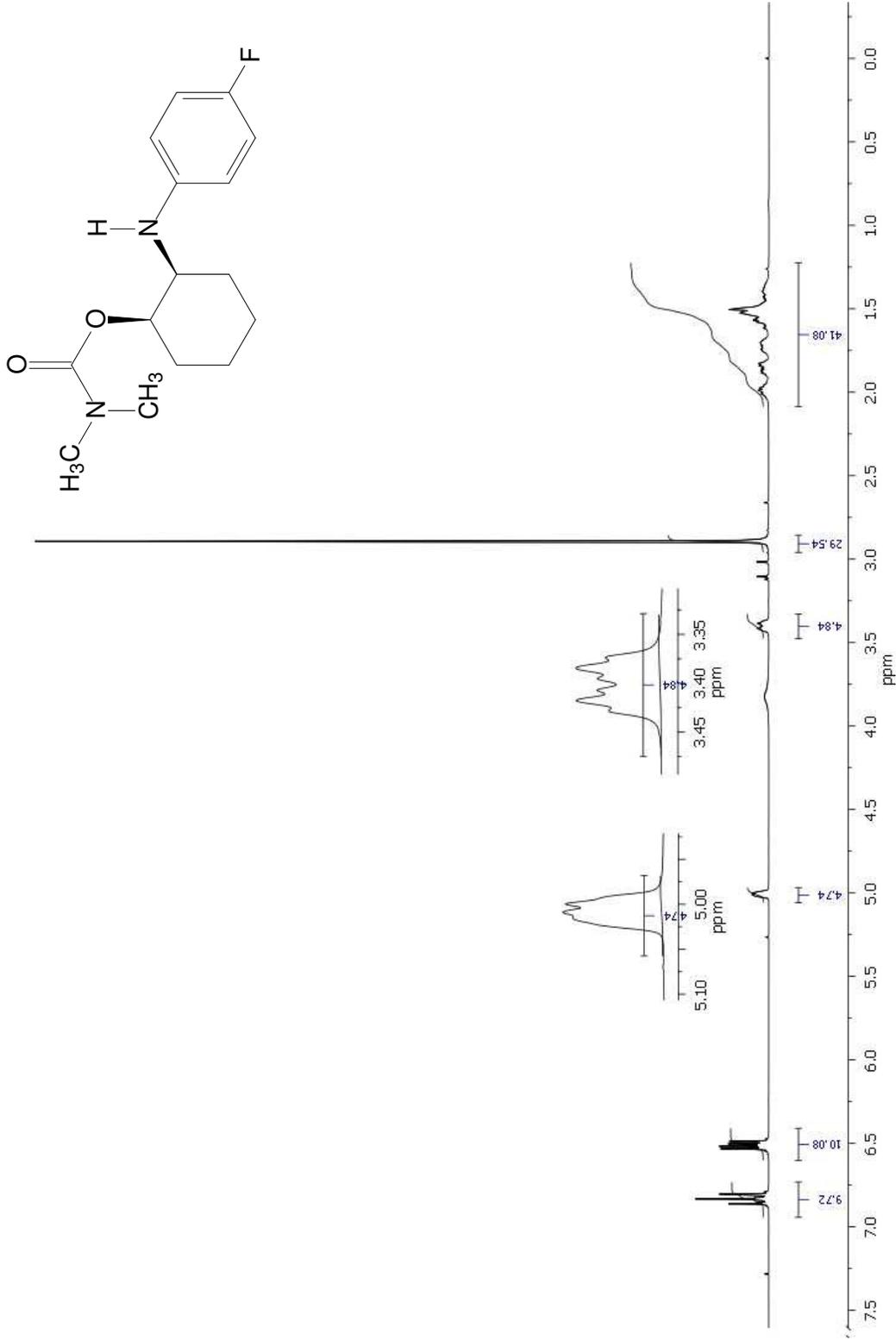


**Anexo 46.** Espectro de RMN de <sup>1</sup>H a 300 MHz do *cis*-*N,N*-dimetilcarbamato de 2-(4-metoxifenilamino)cicloexila (**7b**) em CDCl<sub>3</sub>.

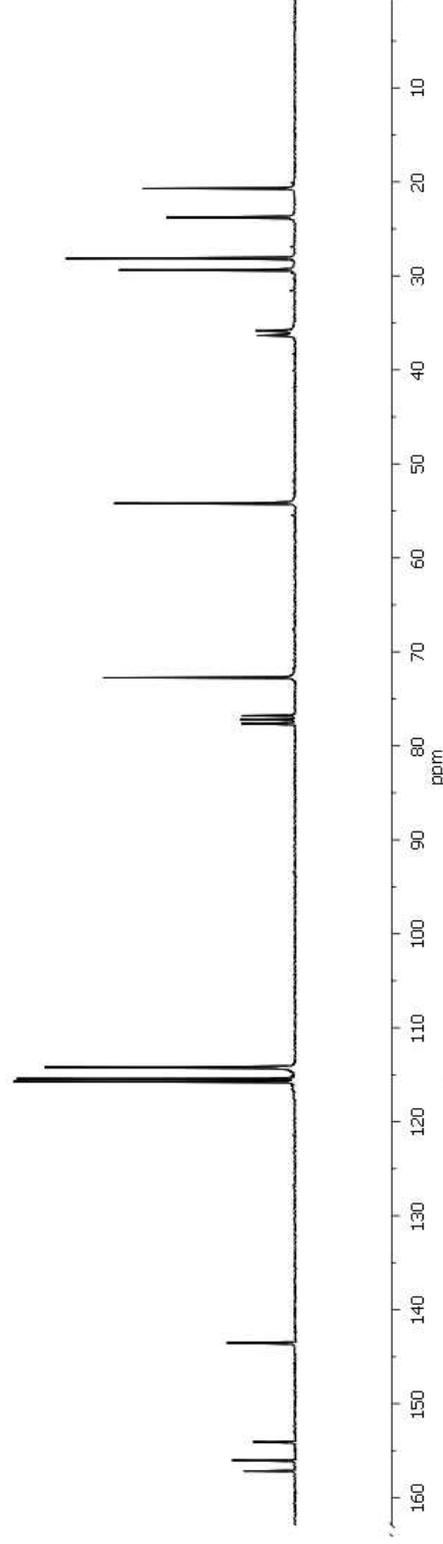


**Anexo 47.** Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  a 75 MHz do *cis-N,N*-dimetilcarbamato de 2-(4-metoxifenilamino)cicloexila (**7b**) em  $\text{CDCl}_3$ .

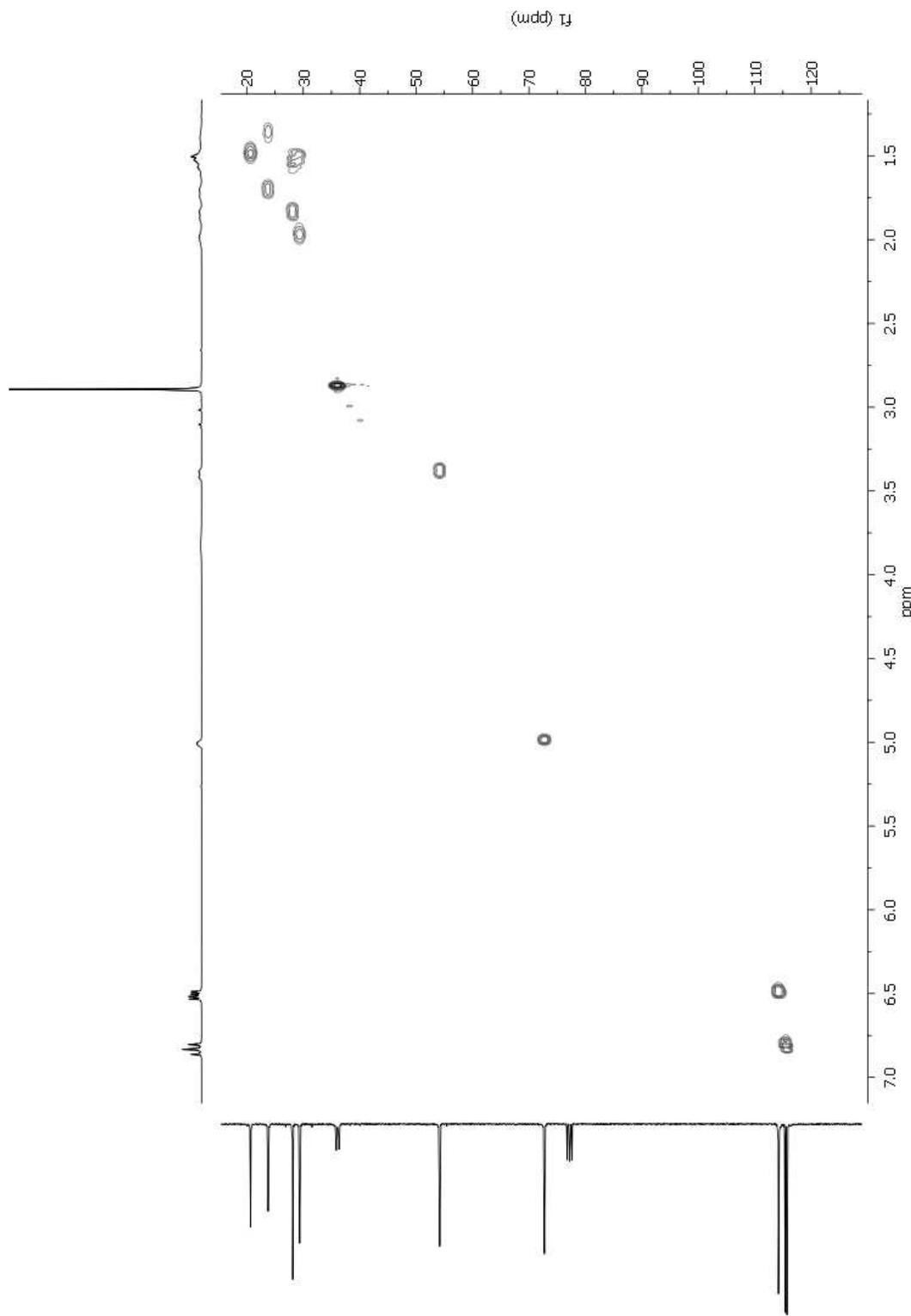




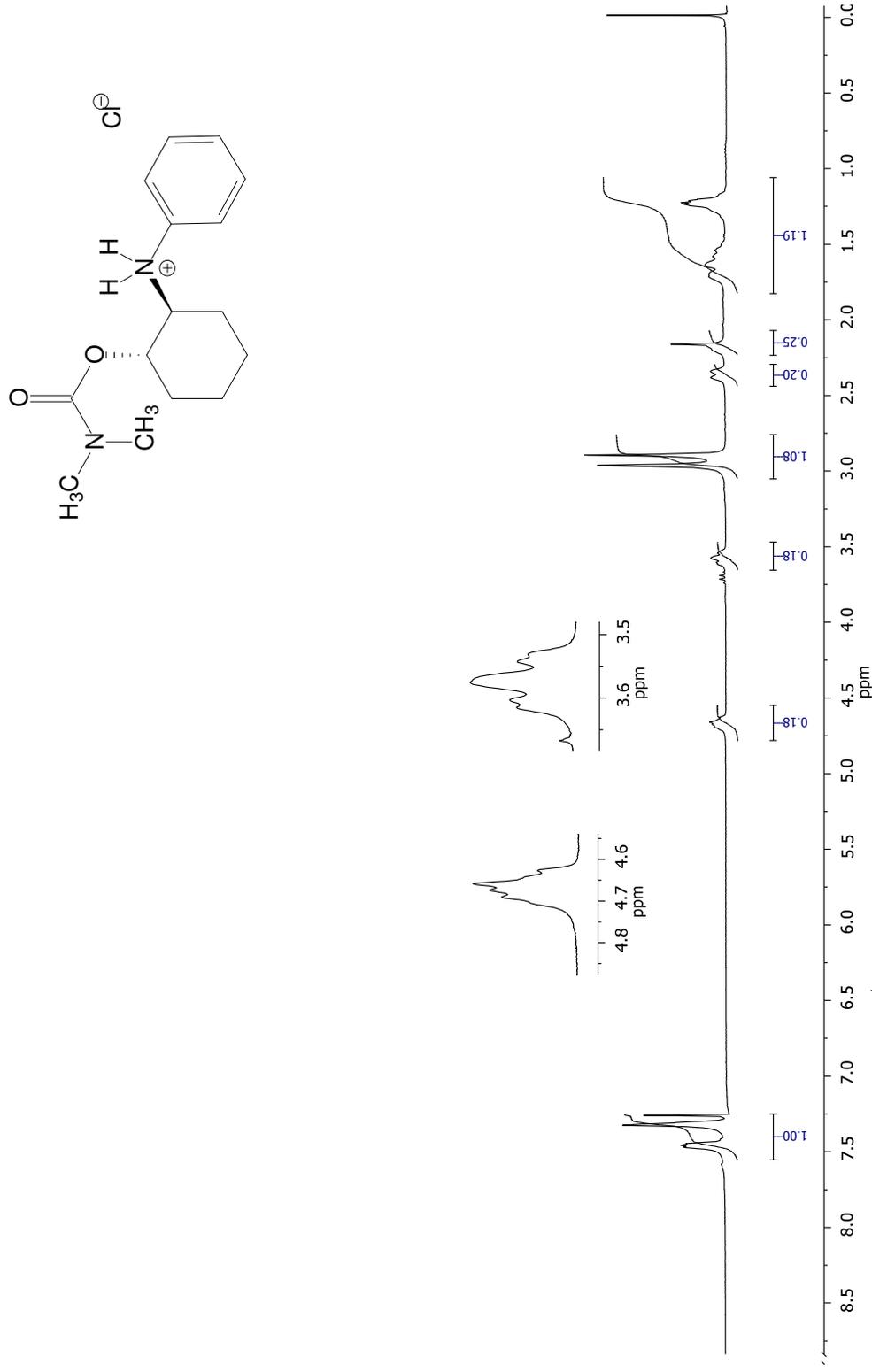
**Anexo 49.** Espectro de RMN de <sup>1</sup>H a 300 MHz do *cis-N,N*-dimetilcarbamato de 2-(4-fluorfenilamino)cicloexila (**7c**) em CDCl<sub>3</sub>.



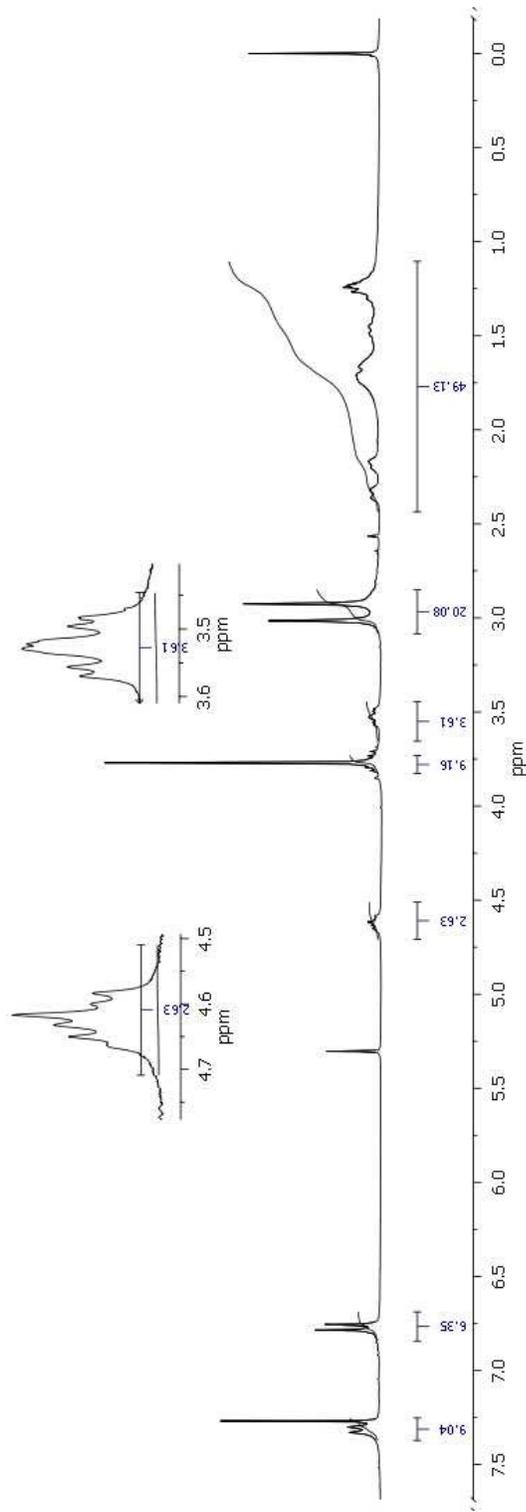
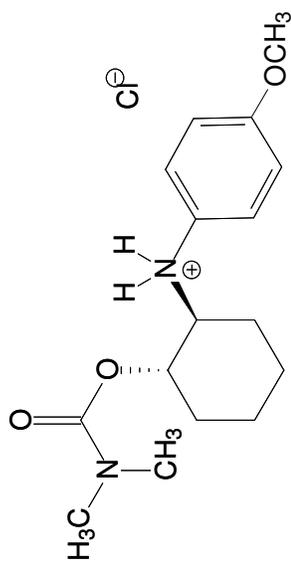
**Anexo 50.** Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  a 75 MHz do *cis-N,N*-dimetilcarbamato de 2-(4-fluorofenilamino)cicloexila (**7c**) em  $\text{CDCl}_3$ .



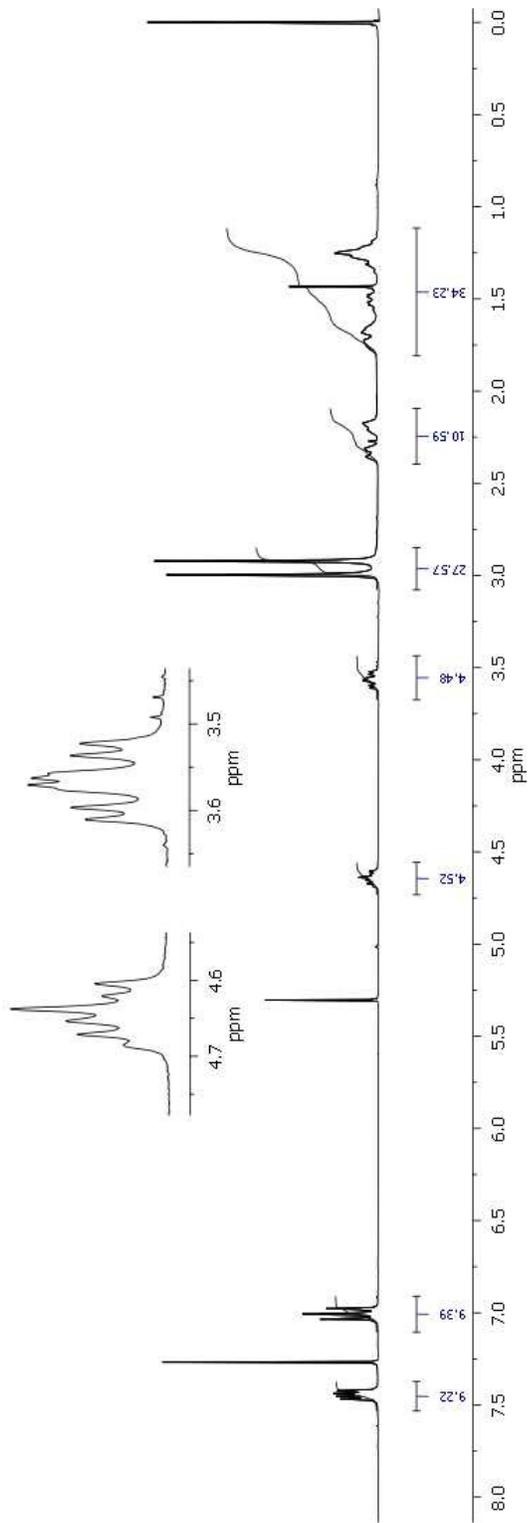
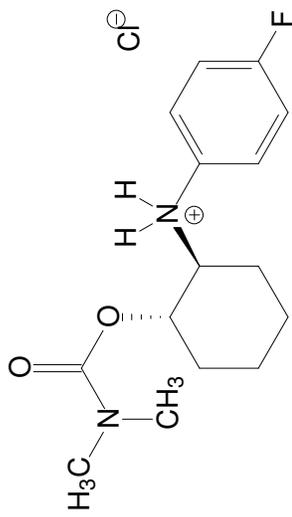
Anexo 51. Mapa de Contorno HQSC do *cis-N,N*-dimetilcarbamato de 2-(4-fluorfenilamino)cicloexila (**7c**) em CDCl<sub>3</sub>.



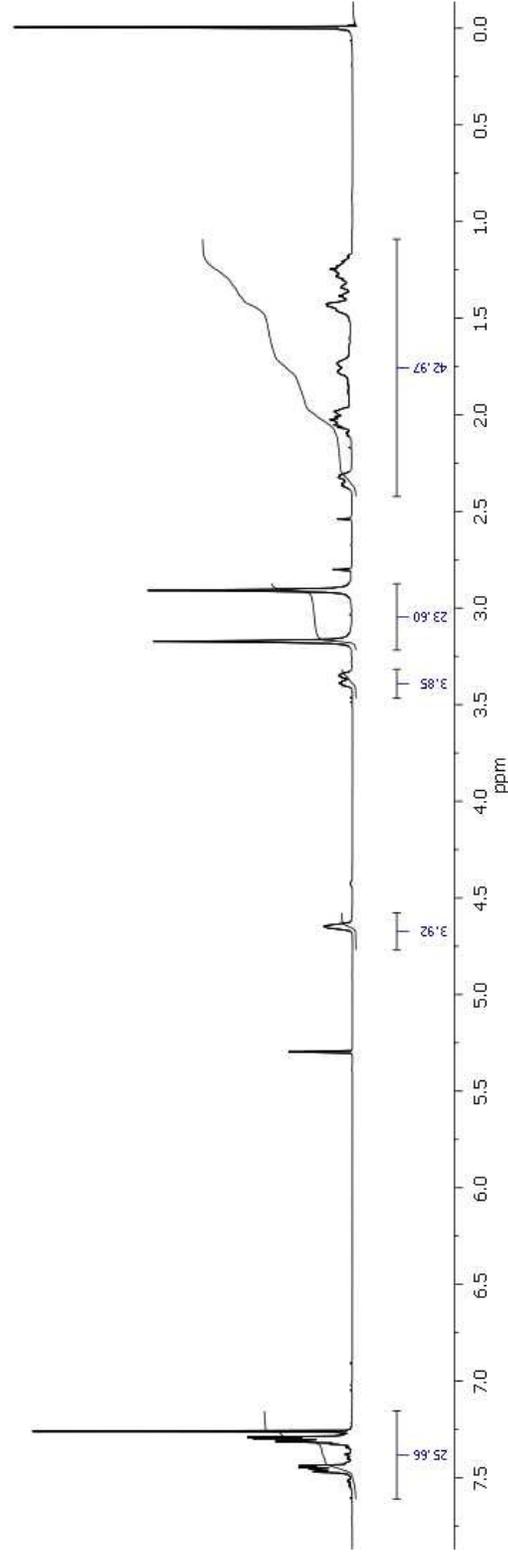
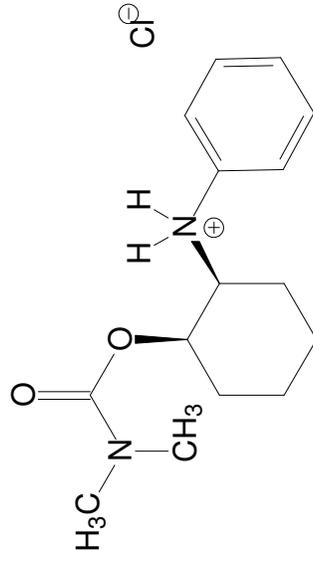
**Anexo 52.** Espectro de RMN de <sup>1</sup>H a 300 MHz do cloridrato *trans*-*N,N*-dimetilcarbamato de 2-fenilaminocicloexila (**4a**) em CDCl<sub>3</sub>.



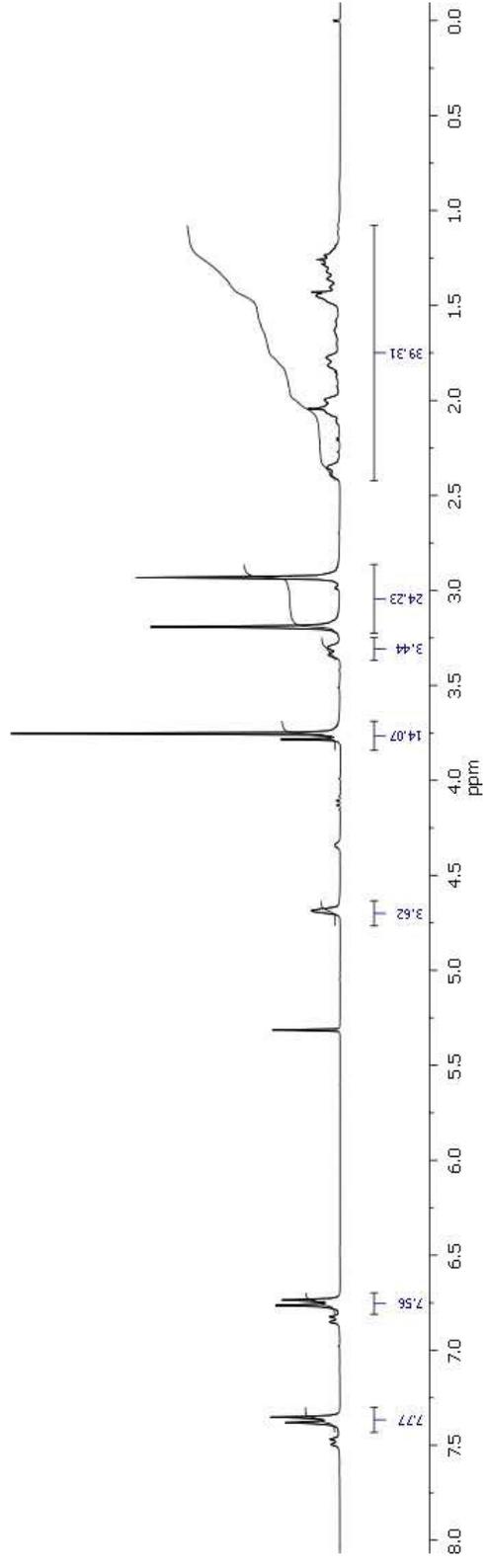
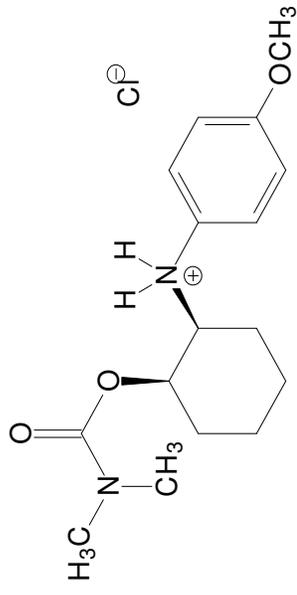
**Anexo 53.** Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  a 300 MHz do cloridrato *trans-N,N*-dimetilcarbamato de 2-(4-metoxifenilamino)cicloexila (**4b**) em  $\text{CDCl}_3$ .



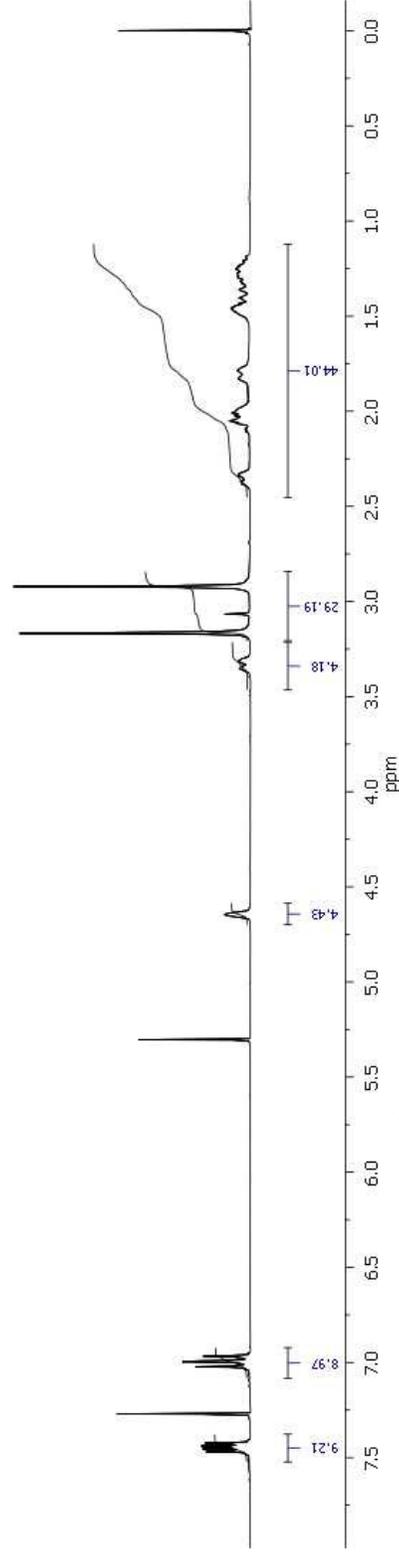
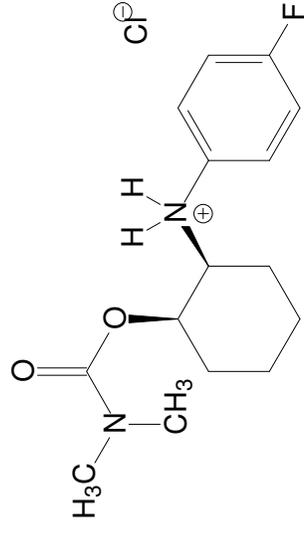
**Anexo 54.** Espectro de RMN de <sup>1</sup>H a 300 MHz do cloridrato *trans-N,N*-dimetilcarbamato de 2-(4-fluorofilamino)cicloexila (**4c**) em CDCl<sub>3</sub>.



**Anexo 55.** Espectro de RMN de <sup>1</sup>H a 300 MHz do cloridrato *cis*-N,N-dimetilcarbamato de 2-fenilaminocicloexila (**8a**) em CDCl<sub>3</sub>.



**Anexo 56.** Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  a 300 MHz do cloridrato *cis*-*N,N*-dimetilcarbamato de 2-(4-metoxifenilamino)cicloexila (**8b**) em  $\text{CDCl}_3$ .



**Anexo 57.** Espectro de RMN de <sup>1</sup>H a 300 MHz do cloridrato *cis-N,N*-dimetilcarbamato de 2-(4-fluorfenilamino)cicloexila (**8c**) em CDCl<sub>3</sub>.