



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ

CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS

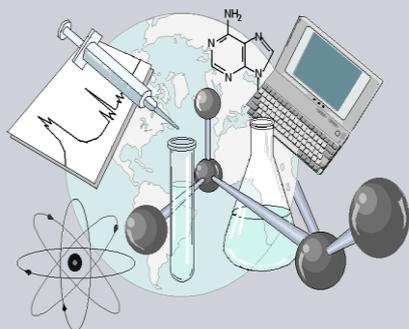
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

**Síntese, Modelagem Molecular e Avaliação da Atividade
Anticolinesterásica de *N,N*-dimetilcarbamatos de cicloexila
3-arilaminossustituídos**

Dissertação apresentada por
**Diego Alberto dos Santos
Yamazaki** 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

CEE



**Centro de
Ciências Exatas**

MARINGÁ, Fevereiro/2015

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

Y19s

Yamazaki, Diego Alberto dos Santos
Síntese, modelagem molecular e avaliação da
atividade anticolinesterásica de N,N-
dimetilcarbamatos de cicloexila 3-
arilaminossustituídos / Diego Alberto dos Santos
Yamazaki -- Maringá, 2015.
xviii, 165 f. : il., color., figs., tabs.

Orientador: Prof^a. Dr^a. Gisele de Freitas Gauze
Bandoch.

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual de
Maringá, Centro de Ciências Exatas, Departamento de
Química, Programa de Pós-Graduação em Química, 2015.

1. Carbamatos. 2. Doença de Alzheimer. 3.
Acetilcolinesterase. 4. Butirilcolinesterase. 5.
Cinética enzimática. 6. Análise conformacional. I.
Bandoch, Gisele de Freitas Gauze, orient. II.
Universidade Estadual de Maringá. Centro de Ciências
Exatas. Departamento de Química. Programa de Pós-
Graduação em Química. III. Título.

CDD 23.ed. 541.3

AHS



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 **Diego Alberto dos Santos Yamazaki**, perante a Comissão Julgadora do Programa de Pós-Graduação em Química em 23 de fevereiro de 2015.

COMISSÃO JULGADORA:

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

Profa. Dra. Fernanda Andreia Rosa
Membro - DQI/UEM

Profa. Dra. Barbara Celânia Eiorin
Membro - UEPG



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

Síntese, Modelagem Molecular e Avaliação
da Atividade Anticolinesterásica de
***N,N*-dimetilcarbamatos de cicloexila**
3-amilaminossustituídos

Diego Alberto dos Santos Yamazaki

Mestrando

Prof^a. Dr^a. Gisele de Freitas Gauze Bandoch

Orientadora



Maringá, Fevereiro de 2015

*“Se deseja ser feliz, não pense no que está por vir nem naquilo sobre
o qual você não tem controle.
Pense no agora e naquilo que é capaz de mudar.”
- Christopher Paolini -*

*À minha família,
especialmente aos meus pais,
Sônia M. dos Santos e Adilson G. Yamazaki,
pela compreensão, incentivo e incondicional apoio,
dedico esta dissertação.*

Agradecimentos

Em primeiro lugar a todos os meus familiares pelo constante apoio, incentivo e dedicação, sem vocês esse trabalho não seria possível. Amo muito vocês!

Aos professores Ernani Abicht Basso, Fernanda Andréia Rosa, Rodrigo Meneghetti Pontes e Maria Helena Sarragiotto pela contribuição direta ou indireta na realização deste trabalho;

Aos professores Miguel Machinski Jr e Simone A. G. Mossini e a todos os técnicos e servidores do laboratório de Toxicologia;

Aos professores Noboru Hioka e André Luiz Tessaro por abrirem as portas de seu laboratório para conclusão dos experimentos de cinética e a todos do grupo TFD, em especial à Bianca e Flávia, pela paciência e ajuda durante os experimentos;

Ao Ulisses pela amizade, pela constante ajuda sempre que necessário e pela valiosa contribuição a este trabalho.

À Mari pela fundamental ajuda sempre que necessário e principalmente pela valiosa contribuição com o Docking Molecular;

Ao Augusto, Andrew e Julia pelo auxílio durante a parte experimental;

A todos os integrantes do grupo ECO^{DM} pelo convívio, acolhimento, parceria e amizade, especialmente ao Andrey, Davana, Michael, Raí e Thiago F.;

Aos meninos da republica, Felipe, Luís e Roy pela paciência, convivência e amizade;

Aos meus grandes amigos de Jaboticabal e Maringá, impossível de citar todos, mas vocês são muito importantes na minha vida;

À Ivânia T. A. Schuquel e Ana Maria A. Barelli pelas análises de RMN, convivência e amizade;

Aos professores e servidores do Programa de Pós-graduação em Química;

Ao Departamento de Química da Universidade Estadual de Maringá;

A CAPES, pela bolsa concedida;

E, sobretudo, à minha orientadora, Prof.^a Dr.^a Gisele de Freitas Gauze Bandoch, por todos os ensinamentos, pela orientação, paciência, dedicação, confiança e principalmente pela amizade. Meus sinceros agradecimentos!

Índice

Resumo.....	viii
Abstract.....	x
Índice de Tabelas.....	xii
Índice de Figuras.....	xiv
Índice de Esquema.....	xvi
Abreviações.....	xvii
1. Introdução e Objetivos.....	01
1.1. Doença de Alzheimer (DA).....	02
1.2. Hipótese Colinérgica.....	03
1.3. Acetilcolinesterase (AChE)	04
1.4. Butirilcolinesterase (BuChE)	06
1.5. Inibidores de Colinesterase (IChE)	08
1.6. Carbamatos como Inibidores de Colinesterases.....	10
1.7. Objetivos.....	17
2. Fundamentação Teórica.....	19
2.1. Método de Ellman.....	20
2.2. Cinética Enzimática.....	21
2.2.1. Influência da concentração do substrato.....	21
2.2.2. Equação de Michaelis-Menten.....	22
2.2.3. Processos de Inibição Enzimática.....	24
2.3. Análise Conformacional.....	25
2.3.1. Análise Conformacional de Cicloexanos 1,3-dissubstituídos.....	26
2.3.2. Ressonância Magnética Nuclear (RMN) aplicada à Análise Conformacional.....	28
2.4. Modelagem Molecular.....	31
2.4.1. Métodos de Estrutura Eletrônica.....	31
2.4.1.1. Conjunto de Funções de Base.....	32
2.4.2. <i>Docking</i> Molecular.....	33

3. Apresentação e Discussão dos Resultados	35
3.1. Síntese dos Compostos	39
3.1.1. Síntese das 3-arilaminocicloexanonas (1a-c).....	41
3.1.2. Síntese dos <i>trans</i> -3-arilaminocicloexanois (2a-c).....	46
3.1.3. Síntese dos <i>cis</i> -3-arilaminocicloexanois (3a-c).....	47
3.1.4. Síntese dos <i>trans</i> - <i>N,N</i> -dimetilcarbamatos de cicloexila 3-arilaminossustituídos (4a-c) e <i>cis</i> - <i>N,N</i> -dimetilcarbamatos de cicloexila 3-arilaminossustituídos (5a-c)	49
3.1.5. Síntese dos cloridratos de <i>trans</i> e <i>cis</i> - <i>N,N</i> -dimetilcarbamatos de cicloexila 3-arilaminossustituído (6a-c; 7a e 7c).....	53
3.2. Análise conformacional para os <i>trans</i>-<i>N,N</i>-dimetilcarbamatos de cicloexila 3-arilaminossustituídos (4a-c) e <i>cis</i>-<i>N,N</i>-dimetilcarbamatos de cicloexila 3-arilaminossustituídos (5a-c)	56
3.2.1. Experimentos de RMN.....	56
3.2.2. Cálculos Teóricos.....	60
3.3. Determinação da Atividade Anticolinesterásica	66
3.4. Estudos cinéticos de inibição das enzimas AChE e BuChE	70
3.5. Docking Molecular	75
4. Conclusões	79
5. Parte Experimental	82
5.1. Preparação das 3-arilaminocicloexanonas (1a-c).....	83
5.2. Preparação dos <i>trans</i> -3-arilaminocicloexanois (2a-c).....	83
5.3. Preparação dos <i>cis</i> -3-arilaminocicloexanois (3a-c).....	84
5.4. Preparação dos <i>cis</i> e <i>trans</i> - <i>N,N</i> -dimetilcarbamatos de cicloexila 3-arilaminossustituídos (4a-4c; 5a e 5c).....	84
5.5. Preparação dos cloridratos de <i>N,N</i> -dimetilcarbamatos de cicloexila 3-arilaminossustituídos (6a-6c; 7a e 7c).....	85
5.6. Análises de RMN.....	85
5.7. Experimentos de RMND.....	86
5.8. Cálculos Teóricos.....	86

5.9. Ensaio para avaliação da atividade anticolinesterásica.....	86
5.9.1. Preparação dos reagentes.....	87
5.9.2. Solução estoque dos cloridratos N,N-dimetilcarbamato de cicloexila 3-arilaminossustituídos (6a-c ; 7a e 7c)	88
5.9.3. Determinação da atividade das colinesterases totais (AChE e BuChE)	88
5.9.4. Determinação da atividade da butirilcolinesterase.....	89
5.10. Experimentos de Cinética Enzimática.....	89
5.10.1. Preparação dos reagentes.....	90
5.10.2. Determinação da velocidade da reação enzimática da AChE e BuChE com e sem presença do inibidor.....	90
5.11. Docking Molecular.....	91
6. Referências Bibliográficas.....	93

Resumo

Síntese, Modelagem Molecular e Avaliação da Atividade Anticolinesterásica de *N,N*-dimetilcarbamatos de cicloexila 3-arilaminossustituídos

O grupo carbamato apresenta grande importância farmacológica como inibidor de colinesterases e no tratamento da doença de Alzheimer. No presente trabalho realizou-se a síntese, a análise conformacional, a avaliação da atividade anticolinesterásica e a determinação do modo de inibição de duas séries inéditas de isômeros *cis* e *trans-N,N*-dimetilcarbamato de cicloexila 3-arilaminossustituídos. Os compostos foram sintetizados, purificados e devidamente caracterizados por seus espectros de RMN de ^1H , ^{13}C e HSQC. O equilíbrio conformacional dos carbamatos foi determinado experimentalmente e comparado aos dados obtidos a partir dos cálculos de estrutura eletrônica. Os experimentos de RMND mostraram que o equilíbrio conformacional dos compostos não é influenciado pela variação dos solventes. Para o *trans-N,N*-dimetilcarbamato de 3-fenilaminocicloexila (**4a**) o conformero **AE** apresentou em média 90% da contribuição no equilíbrio conformacional. Para o isômero *cis-N,N*-dimetilcarbamato de 3-fenilaminocicloexila (**5a**) o conformero diequatorial (**EE**) foi dominante no equilíbrio, sendo que nos solventes mais polares o conformero diaxial (**AA**) não foi observado. Os resultados obtidos a partir dos cálculos de solvatação para o isômero *trans*, utilizando os níveis de teoria M06-2X/6-311++G(d,p) e M06-2X/6-311++G(2df,2p), foram concordantes com os dados obtidos experimentalmente. Entretanto, para o isômero *cis*, somente foi possível reproduzir a tendência observada a partir dos experimentos de RMND em M06-2X/6-311++G(2df,2p). Os carbamatos testados apresentaram uma ação inibitória dose-dependente sobre ambas as colinesterases e todos os compostos foram seletivos para a enzima BuChE, com valores de IC_{50} entre 0,11 e 0,18 mmol/L. Os cloridratos de *cis* e *trans-N,N*-dimetilcarbamato de 3-(4-metoxifenilamino)cicloexila (**6c** e **7c**) foram os mais ativos frente à BuChE, mostrando que a presença do grupo metoxila potencializou a atividade anticolinesterásica. De modo geral, estes compostos apresentaram um potencial inibitório maior que seus análogos 1,2-dissustituídos, indicando que a mudança do grupo arilamino para a posição 3 do anel cicloexânico potencializou a atividade

frente à enzima BuChE. Os estudos de cinética enzimática indicaram uma inibição não competitiva frente a AChE e uma inibição mista para a BuChE. Os cálculos de *docking* molecular e de interações não covalentes (NCI) foram concordantes com os resultados experimentais. O *docking* molecular mostrou que o composto **6c** interage com o sítio periférico aniônico e sítio ativo catalítico da BuChE, enquanto que na AChE, as interações ocorrem apenas no sítio ativo catalítico. A análise de NCI indicou que o composto **6c** apresentou uma melhor estabilização no sítio ativo da BuChE do que no sítio ativo da AChE, confirmando a seletividade para a BuChE.

Palavras Chaves: carbamatos, doença de Alzheimer, acetilcolinesterase, butirilcolinesterase, cinética enzimática, análise conformacional.

Abstract

Synthesis, Molecular Modeling and Evaluation of Anticholinesterasic Activity of *N,N*-dimethylcarbamates of cyclohexyl 3-arylaminesubstituted

The carbamate group has great pharmacological importance as a cholinesterase inhibitor and in the treatment of Alzheimer's disease. The present study describes the synthesis, conformational analysis, assessment of the anticholinesterase activity and the mode of inhibition of two new series of *cis* and *trans*-*N,N*-dimethylcarbamate of 3-arylaminesubstituted-cyclohexyl. Compounds were synthesized, purified and characterized by NMR spectroscopy analysis of ^1H , ^{13}C and HSQC. The conformational equilibrium of the carbamates has been experimentally determined and compared to data obtained from electronic structure calculations. The Dynamic NMR experiments showed that the conformational equilibrium of the compounds is not influenced by the variation of solvents. For the *trans*-*N,N*-dimethylcarbamate of 3-phenylaminecyclohexyl (**4a**), the conformer **AE** presented a contribution of *ca.* 90% on the conformational equilibrium. For the *cis*-*N,N*-dimethylcarbamate of 3-phenylaminecyclohexyl (**5a**) the diequatorial conformer (**EE**) was dominant in the equilibrium, and in most polar solvents the diaxial conformer (**AA**) was not observed. The results obtained from calculations using the theory levels M06-2X/6-311++G(d,p) and M06-2X/6-311++G(2df,2p) for the *trans* isomer were in agreement with the data experimentally obtained. However, for the *cis* isomer, was only possible to reproduce the trend experimentally observed in M06-2X/6-311++G(2df,2p). The tested carbamates exhibited a dose-dependent inhibitory action on cholinesterase and all compounds were selective for BuChE enzyme with IC_{50} values between 0.11 and 0.18 mmol / L. The hydrochloride of *cis* and *trans* *N,N*-dimethylcarbamate 3-(4-methoxyphenylamino) cyclohexyl (**6c** and **7c**) were the most active for BuChE, showing that the presence of methoxyl group enhanced the anticholinesterase activity. In general, these compounds showed an inhibitory potential greater than its 1,2-disubstituted analogs, indicating that changing the arylamine group to position 3 of the cyclohexyl ring the activity against the BuChE enzyme were enhanced. The

enzyme kinetics study indicates a noncompetitive inhibition against AChE and mixed type inhibition for BuChE. This difference in the mode of inhibition can explain the higher activity of BuChE front the carbamates studied because the mixed type inhibitor binds both the free enzyme and enzyme-substrate complex. The study of molecular docking and non-covalent interactions (NCI) were in agreement with the experimental results. Molecular docking showed that the compound **6c** interacts with the peripheral anionic site and the catalytic active site of BuChE, while in AChE interactions only occur in the catalytic active site. The NCI analysis indicated that the compound **6c** showed better stabilization in the active site of BuChE than in the active site of AChE, explaining the selectivity for BuChE.

Keywords: carbamates, Alzheimer's disease, acetylcholinesterase, butyrylcholinesterase enzyme kinetics, conformational analysis.

Índice de Tabelas

Tabela 1. Nomenclatura, fórmula estrutural e numeração dos compostos.....	36
Tabela 2. Condições reacionais empregadas para a obtenção da 3-fenilaminocicloexanona (1a).....	41
Tabela 3. Rendimento reacional, aspecto físico e ponto de fusão das 3-arilaminocicloexanonas (1a-c).....	42
Tabela 4. Deslocamentos químicos de RMN de ^1H e ^{13}C (ppm), constantes de acoplamento (Hz) e multiplicidade dos sinais para as 3-arilaminocicloexanonas (1a-c) em CDCl_3	45
Tabela 5. Rendimento reacional, aspecto físico e ponto de fusão dos <i>trans</i> -3-arilaminocicloexanois (2a-c) e <i>cis</i> -3-arilaminocicloexanois (3a-c).....	47
Tabela 6. Deslocamentos químicos de RMN de ^1H e ^{13}C (ppm), constantes de acoplamento (Hz) e multiplicidade dos sinais para os <i>trans</i> -3-arilaminocicloexanois (2a-c) em CDCl_3	48
Tabela 7. Condições reacionais para a obtenção dos carbamatos.....	49
Tabela 8. Rendimento reacional, aspecto físico e ponto de fusão dos carbamatos (4a-c) e (5a-c).....	50
Tabela 9. Deslocamentos químicos de RMN de ^1H e ^{13}C (ppm), constantes de acoplamento (Hz) e multiplicidade dos sinais para os <i>trans</i> - <i>N,N</i> -dimetilcarbamatos de cicloexila 3-arilaminossustituídos (4a-c) em CDCl_3	51
Tabela 10. Deslocamentos químicos de RMN de ^1H e ^{13}C (ppm), constantes de acoplamento (Hz) e multiplicidade dos sinais para os <i>cis</i> - <i>N,N</i> -dimetilcarbamatos de cicloexila 3-arilaminossustituídos (5a e 5c) em CDCl_3	52
Tabela 11. Rendimento reacional, aspecto físico e ponto de fusão dos cloridratos (6a-c) e (7a e 7c).....	53
Tabela 12. Deslocamentos químicos de RMN de ^1H e ^{13}C (ppm), constantes de acoplamento (Hz) e multiplicidade dos sinais para os cloridratos de <i>trans</i> - <i>N,N</i> -dimetilcarbamatos de cicloexila 3-arilaminossustituídos (6a-c) em CDCl_3	54
Tabela 13. Deslocamentos químicos de RMN de ^1H e ^{13}C (ppm), constantes de acoplamento e multiplicidade dos sinais para os cloridratos de <i>cis</i> - <i>N,N</i> -dimetilcarbamatos de cicloexila 3-arilaminossustituídos (7a e 7c) em CDCl_3	55

Tabela 14. Populações de cada confôrmero do <i>trans-N,N</i> -dimetilcarbamato de 3-fenilaminocicloexila (4a) obtidas por RMN de ¹ H a -80°C.....	59
Tabela 15. Valores de Energia, momento de dipolo, constante de equilíbrio conformacional e população obtidos no vácuo em M06-2X/6-311++G(d,p).....	61
Tabela 16. Valores de Energia, momento de dipolo, constante de equilíbrio conformacional e população em diferentes solventes obtidos em M06-2x/6-311++G(d,p) e modelo de solvatação IEF-PCM.....	63
Tabela 17. Valores de Energia, momento de dipolo, constante de equilíbrio conformacional e população em diferentes solventes obtidos em M06-2x/6-311++G(2df,2p) e modelo de solvatação IEF-PCM.....	65
Tabela 18. Valores de IC ₅₀ e de inibição máxima dos compostos em estudo frente as enzimas AChE e BuChE.....	68
Tabela 19. Valores de K_m , $V_{máx}$ e K_i para as enzimas AChE e BuChE na ausência e na presença de inibidor.....	74

Índice de Figuras

Figura 1. Ciclo metabólico da acetilcolina.....	04
Figura 2. Representação do sítio catalítico da acetilcolinesterase (PDB1EVE).....	05
Figura 3. Mecanismo de hidrólise da acetilcolina pela enzima acetilcolinesterase.....	06
Figura 4. Estrutura cristalográfica da butirilcolinesterase (PDB:1P0I).....	07
Figura 5. Inibidores de colinesterase aprovados pela FDA e ANVISA no tratamento da DA.....	09
Figura 6. Mecanismo geral da inibição pseudo-irreversível de colinesterases por carbamatos.....	11
Figura 7. Estrutura química de alguns carbamatos que apresentam atividade anticolinesterásica.....	12
Figura 8. Estrutura química geral dos compostos sintetizados por Mustazza e col.....	12
Figura 9. Possíveis conformações da acetilcolina e as estruturas químicas dos inibidores.....	13
Figura 10. Estrutura química dos derivados alquil e arilcarbamatos de (a) <i>N</i> -benzilpiperazina e (b) <i>N</i> -benzilpiperidina.....	14
Figura 11. Estrutura química dos isômeros <i>cis</i> e <i>trans</i> de <i>N,N</i> -dimetilcarbamatos de 2- <i>N,N</i> -dimetilaminocicloexila e de seus sais metil sulfato.....	15
Figura 12. Estrutura dos isômeros <i>cis</i> e <i>trans</i> de <i>N,N</i> -dimetilcarbamatos de cicloexila 2-arilaminossustituídos e seus cloridratos.....	15
Figura 13. Compostos sintetizados por Darras e col.....	17
Figura 14. Estrutura das duas novas séries de carbamato.....	20
Figura 15. Reação das colinesterases pelo método espectrofotométrico de Ellman.....	20
Figura 16. Curva de Michaelis-Menten que mostra a dependência da velocidade inicial com a concentração do substrato.....	23
Figura 17. Gráfico de Lineweaver-Burk (duplo-recíproco).....	23
Figura 18. Gráficos típicos de cada inibição.....	25

Figura 19. Equilíbrio conformacional dos isômeros <i>cis</i> e <i>trans</i> de cicloexanos 1,3-dissubstituídos.....	27
Figura 20. Compostos 1,3-dissubstituídos estudados por Paulo e col.....	28
Figura 21. Sobreposição de orbitais em diferentes ângulos diedros e curva de Karplus.....	29
Figura 22. Exemplificação dos valores de constante de acoplamentos vicinais para derivados do cicloexano.....	30
Figura 23. Mecanismo de redução das 3-arilaminocicloexanonas com N-selectride.....	46
Figura 24. Equilíbrio conformacional dos isômeros <i>trans-N,N</i> -dimetilcarbamato de 3-fenilaminocicloexila (4a) e <i>cis-N,N</i> -dimetilcarbamato de 3-fenilaminocicloexila (5a).....	56
Figura 25. Expansão dos sinais de H ₁ e H ₃ dos compostos 4a e 5a em CDCl ₃ a temperatura ambiente.....	57
Figura 26. Expansão do espectro de RMN de ¹ H em diferentes temperaturas para o <i>trans-N,N</i> -dimetilcarbamato de 3-fenilaminocicloexila (4a) em CD ₂ Cl ₂	58
Figura 27. Ângulos diedros avaliados para a obtenção das SEPs.....	60
Figura 28. Estruturas otimizadas no nível de teoria M06-2X/6311++G(d,p) para o <i>cis-N,N</i> -dimetilcarbamato de cicloexila 3-fenilamino e o <i>trans-N,N</i> -dimetilcarbamato de cicloexila 3-fenilamino.....	61
Figura 29. Repulsão diaxial do confômero EA e interação intramolecular do confômero AA	62
Figura 30. Efeito das concentrações dos cloridratos de <i>cis</i> e <i>trans</i> <i>N,N</i> -dimetilcarbamato de cicloexila 3-arilaminossubstituídos (6a – 6c) e (7a e 7c) frente às enzimas BuChE (a e c) e AChE (b e d).....	67
Figura 31. Comparação entre os resultados obtidos para o grupo arilamino nas posições 2 e 3 do anel cicloexânico.....	69
Figura 32. Efeito da concentração do substrato na atividade da AChE na ausência de inibidor.....	70
Figura 33. Efeito da concentração do substrato na atividade da BuChE na ausência de inibidor.....	71

Figura 34. Curva de Michaelis-Menten para a AChE na ausência e na presença do composto 6c nas concentrações de 0,2 e 1 mM.....	72
Figura 35. Curva de Michaelis-Menten para a BuChE na ausência e na presença do composto 6c nas concentrações de 0,1 e 1 mM.....	72
Figura 36. Gráfico de Lineweaver-Burk para a AChE.....	73
Figura 37. Gráfico de Lineweaver-Burk para a BuChE.....	73
Figura 38. Sobreposição da tacrina com o cloridrato de trans- <i>N,N</i> -dimetilcarbamato de 3-(4-metoxifenilamino)cicloexila nas enzimas AChE (a) e BuChE (b).....	75
Figura 39. (a) Modo de ligação de 6c e BuChE. (b) Gradiente de superfícies de interação não covalente (NCI).....	77
Figura 40. (a) Modo de ligação de 6c e AChE. (b) Gradiente de superfícies de interação não covalente (NCI).....	78

Índice de Esquema

Esquema 1. Rota sintética para obtenção dos <i>N,N</i> -dimetilcarbamatos de cicloexila 3-arilaminossustituídos.....	40
---	----

Tabela de Abreviações

ACh	Acetilcolina
AChE	Acetilcolinesterase
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
BuChE	Butirilcolinesterase
CAT	Colina Acetiltransferase
d	duplete
dddd	duplo duplo duplete de duplete
DA	Doença de Alzheimer
DBU	1,8-Diazabicyclo[5.4.0]undec-7-eno
[DBU][Ac]	Acetato de 1,8-diazabicyclo[5.4.0]undec-7-eno
DTNB	Ácido 5,5'-ditio-bis-2nitrobenzóico
E	Enzima
EIS	Complexo Enzima-Inibidor-Substrato
eq	Equivalente
ES	Complexo Enzima-Substrato
FDA	Food and Drugs Administration
HF	Hartee-Fock
HSQC	Heteronuclear Single Quantum Coherence
Hz	Hertz
IChE	Inibidor de Colinesterase
J	Constante de acoplamento
K_i	Constante de inibição
K_m	Constante de Michaelis-Menten
m	Multiplete
NCI	Interação Não Covalente
<i>N</i> -Selectride	Tri-sec-butilborohidreto de sódio
P	Produto
PAS	Sítio Aniônico Periférico
PDB	Protein Data Bank
PEG400	Polietilenoglicol 400

p.f.	Ponto de Fusão
ppm	Partes por milhão
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
RMND	Ressonância Magnética Nuclear Dinâmica
S	Substrato
[S]	Concentração de Substrato
s	simpleto
sl	simpleto largo
SNC	Sistema Nervoso Central
TFD	Teoria do Funcional de Densidade
THF	Tetraidrofurano
TNB-	5-Tio-2nitrobenzoato
V_0	Velocidade inicial
$V_{\text{máx}}$	Velocidade máxima
δ	Deslocamento Químico
Φ	Ângulo Diedro
μ	Momento de Dipolo

1

Introdução e
Objetivos

1.1. Doença de Alzheimer (DA)

A demência é a perda ou redução progressiva das capacidades cognitivas que ocorre em certos tipos de doenças, esse termo deriva do latim e significa “privação da própria mente”.^{1,2} É caracterizada por um conjunto de sintomas que incluem perda de memória, percepção, raciocínio, distúrbios emocionais e de personalidade. A maioria dos tipos de demência é irreversível, isto significa que as alterações no cérebro que estão causando este quadro não podem ser interrompidas ou regeneradas.¹

A doença de Alzheimer (DA) é a principal causa de demência, classificada como demência primária ou degenerativa. Esta doença foi relatada pelo médico Alois Alzheimer em 1906 em um congresso científico, sendo este o primeiro relato de uma doença complexa que envolve aspectos psiquiátricos, comportamentais, neurológicos e biológicos.^{2,3}

A DA apresenta sintomas característicos que originam distúrbios cognitivos e não cognitivos, tais como, falta de atenção, perda de memória, diminuição do raciocínio, depressão, ansiedade, isolamento social, sendo o sintoma inicial mais comum a deficiência de memória recente.^{1,2,4} Por apresentar uma elevada complexidade, os mecanismos de ocorrência da DA ainda não foram completamente elucidados.¹ Conseqüentemente, não existe cura para a DA, entretanto, é possível minimizar os danos e sua progressão realizando tratamentos adequados, que consistem na administração de fármacos e terapias de reabilitações específicas.²

A manifestação da DA está relacionada com o avanço da idade, afetando cerca de 13% das pessoas com mais de 65 anos. Com o envelhecimento populacional sua ocorrência aumenta tornando-se assim um problema de saúde pública, visto que, a incidência de morte é maior quando não há um acompanhamento adequado.^{2,5,6}

Atualmente, estima-se que existam mais de 35,6 milhões de casos da DA e outros tipos de demência no mundo, com ocorrência de 7,7 milhões de novos casos por ano. A projeção é que mais de 115 milhões de pessoas apresentarão algum sintoma da doença em 2050.^{6,7} O Brasil está entre os nove países que apresentam a maior ocorrência de pessoas com demência, com aproximadamente 1 milhão de

casos.⁶ O impacto econômico causado pela DA é muito relevante, segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), a estimativa de gasto mundial com a doença em 2010 foi de 604 bilhões de dólares.^{6,7} Devido a essas estatísticas, a DA vem sendo chamada por alguns autores como o “mal do século”.⁸

O diagnóstico clínico da DA é um diagnóstico de exclusão, baseado na história clínica do paciente, exames físico e neurológico, testes de sangue e urina, varreduras do cérebro com tomografia axial computadorizada, ressonância magnética ou eletroencefalografia. No entanto, estas ferramentas são insuficientes na sensibilidade e precisão e, o diagnóstico da doença só pode ser confirmado com autópsia, ou em casos muito raros, através de uma biópsia do cérebro.^{1,2} Embora o mecanismo biológico exato da patologia ainda não esteja claro, a autópsia sempre mostra um córtex cerebral com muitos emaranhados neurofibrilares e muitas placas neuríticas.^{1,2,9} Sendo assim, as principais características patológicas da DA estão relacionadas com o acúmulo das placas senis e agregados neurofibrilares e a perda drástica de neurônios, sendo principalmente os neurônios colinérgicos na parte basal do prosencéfalo.¹⁰

Existem atualmente várias hipóteses, baseadas nas características histopatológicas, que tentam explicar o mecanismo de ocorrência da doença, sendo uma das principais a hipótese colinérgica.

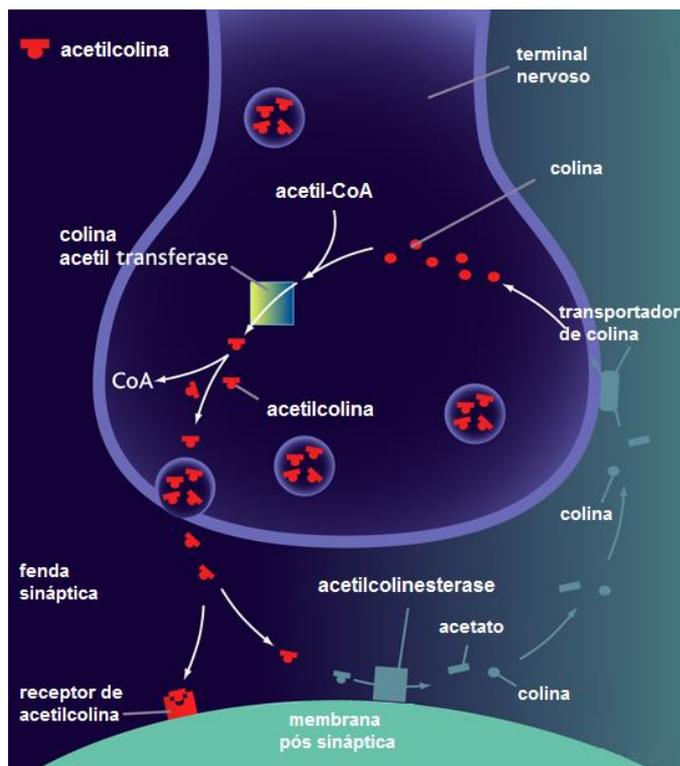
1.2. Hipótese Colinérgica

A enzima colina acetiltransferase (CAT) atua no sistema nervoso central (SNC) catalisando a produção de acetilcolina (ACh), a partir da colina e da acetilcoenzima A (acetil-CoA). A ACh formada é armazenada em vesículas sinápticas e sua liberação ocorre por exocitose mediada por Ca^{2+} . Após sua liberação, a ACh difunde-se através da fenda sináptica e acopla-se com os receptores (muscarínico e nicotínico) situados nas células pós-sinápticas. Parte da ACh perde-se no caminho ao ser hidrolisada pela enzima acetilcolinesterase (AChE) em acetato e colina (Figura 1).^{10,11}

Estudos mostram que na DA ocorre a atrofia dos núcleos basais de Meynert, levando a diminuição da produção de CAT e conseqüentemente ao déficit do neurotransmissor ACh.³ Estes estudos, em conjunto com a importância

da ACh na aprendizagem e memória, levaram à hipótese colinérgica. Assim, propôs-se que a degeneração dos neurônios colinérgicos no prosencéfalo basal e a perda da neurotransmissão colinérgica no córtex cerebral contribui significativamente para a deterioração da função cognitiva observada em pacientes com a doença de Alzheimer.^{12,13,14}

Figura 1. Ciclo metabólico da acetilcolina. (Adaptado de CNSForum)¹⁵



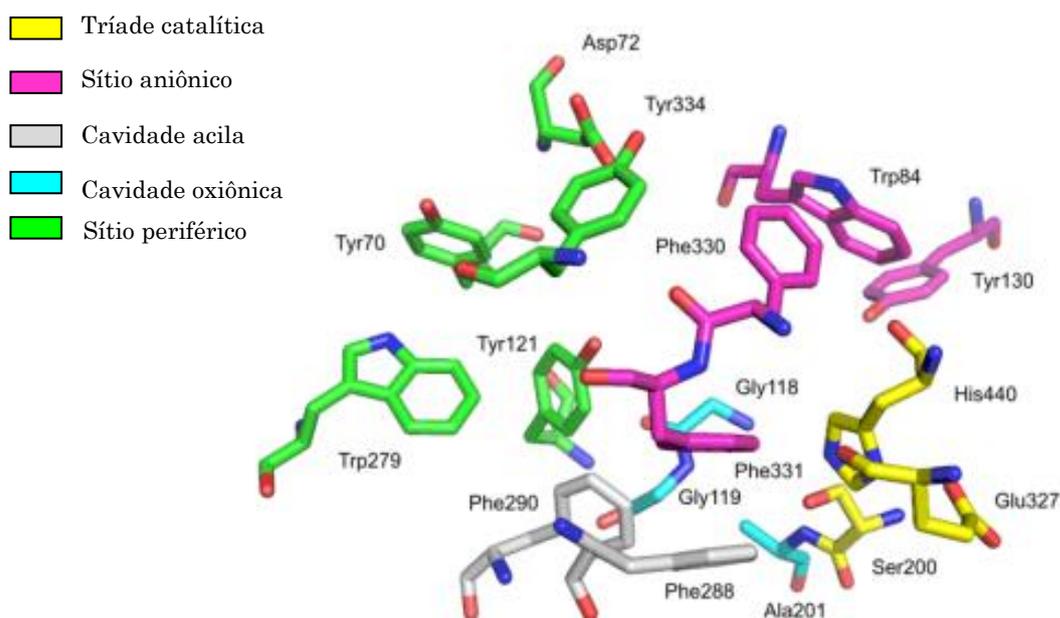
1.3. Acetilcolinesterase (AChE)

O principal papel biológico da enzima acetilcolinesterase (AChE) é a interrupção da transmissão dos impulsos nas sinapses colinérgicas por uma hidrólise rápida do neurotransmissor, acetilcolina. É uma enzima alostérica da classe das hidrolases, com 537 resíduos de aminoácidos na sua sequência e está presente principalmente nas hemácias, terminações nervosas e músculos estriados.^{16,17} Essa enzima tem se mostrado um importante alvo nas pesquisas, desde que a estrutura cristalina da AChE de torpedo californica (TcAChE) foi resolvida em 1991 por Sussman e col. Desde então, os cientistas vêm trabalhando

em cima da TcAChE e das acetilcolinesterase homólogas isoladas a partir de outras fontes, tais como insetos e mamíferos.^{18,19}

O sítio ativo da AChE (Figura 2) é composto por dois subsítios, sendo um esterásico e outro de ligação de colina (aniônico), que se ligam respectivamente ao grupo carbonila e ao nitrogênio quaternário da ACh. Este sítio ativo encontra-se na porção inferior de uma cavidade profunda e estreita, com cerca de 20 Å de profundidade e com alargamento na base.^{17,18} Essa estrutura permite que o substrato fique cercado pela proteína, possibilitando múltiplas interações substrato/enzima, o qual cria um estado de transição mais eficaz.^{18,19} Além desses dois subsítios existe ainda um segundo sítio de ligação de colina, que está afastado do sítio ativo, chamado de sítio periférico.¹⁸

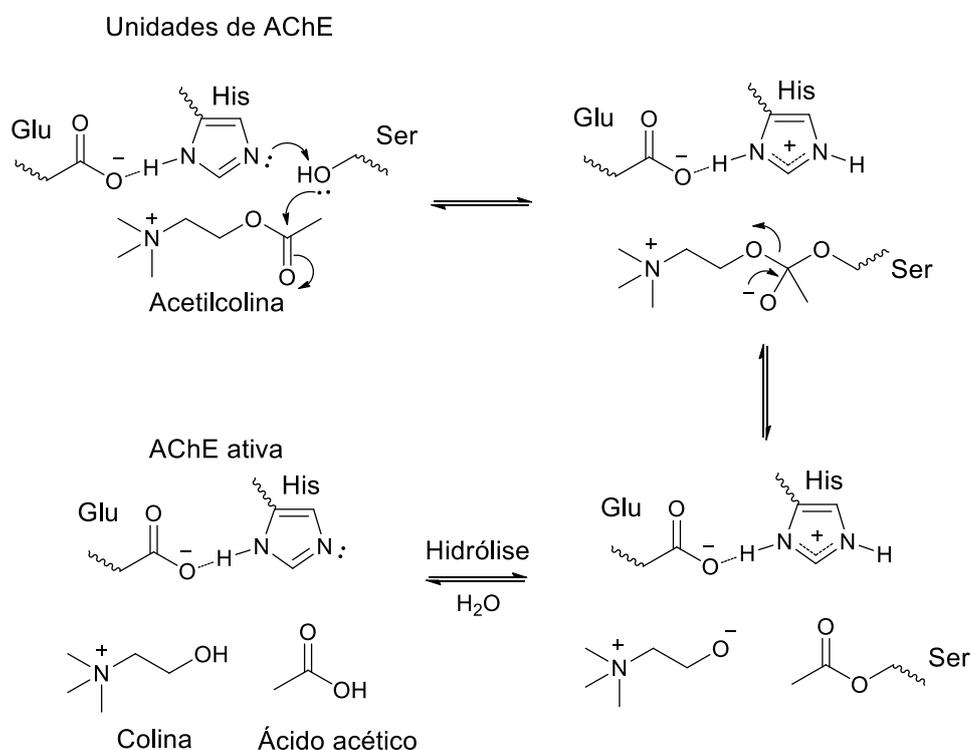
Figura 2. Representação do sítio catalítico da acetilcolinesterase (PDB: 1EVE). (Adaptada de Badja,M., 2013)²⁰



O subsítio esterásico é semelhante aos subsítios catalíticos de outras serinas hidrolases. Na AChE este subsítio é constituído por uma tríade catalítica composta pelos resíduos de aminoácidos serina (Ser200), histidina (His440) e glutamato (Glu327), que estão localizados no fundo da cavidade do sítio. Esta cavidade é cercada por 14 resíduos aromáticos, onde os anéis compõem aproximadamente 70% da superfície da cavidade, com resíduos de triptofano (Trp84) e fenilalanina (Phe330) contribuindo no sítio catalítico aniônico e

resíduos de triptofano (Trp279) e tirosina (Tyr70 e Tyr121) para o sítio periférico.²¹ Na hidrólise da ACh (Figura 3), o nitrogênio quartenário é atraído pelo sítio aniônico, que fixa e orienta o substrato para dentro do centro ativo para que ocorra a hidrólise. O mecanismo de hidrólise envolve o ataque nucleofílico do par de elétrons do átomo de oxigênio da serina ao carbono carbonílico da ACh, gerando um intermediário tetraédrico estabilizado por ligações de hidrogênio, o qual produz colina livre e serina acetilada. Ao final, a hidrólise do grupo acetila da serina pela água recupera o sítio catalítico da enzima.²²

Figura 3. Mecanismo de hidrólise da acetilcolina pela enzima acetilcolinesterase. (Adaptado de Santos, V., 2007)²²



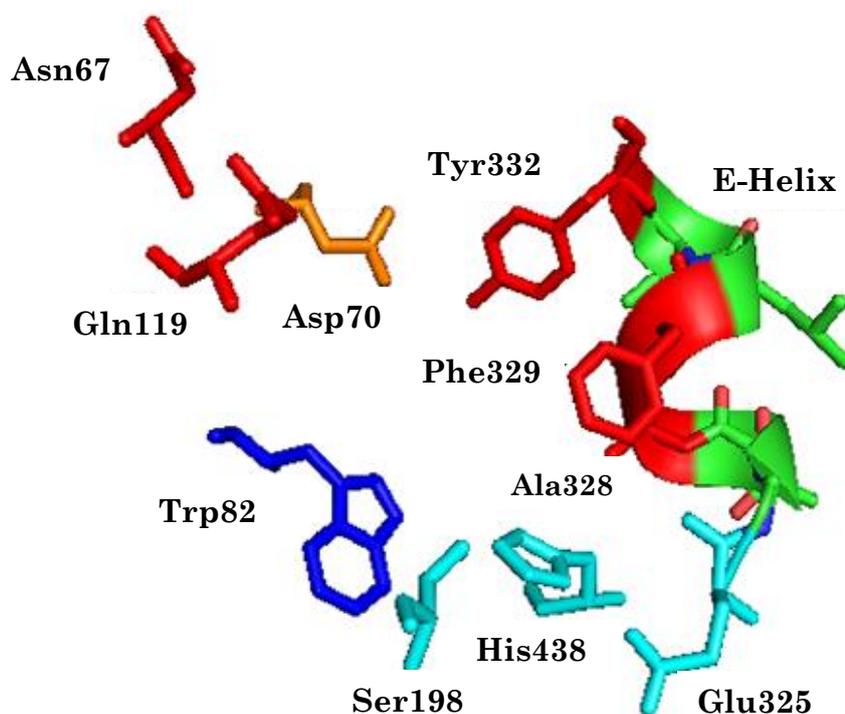
1.4. Butirilcolinesterase (BuChE)

A butirilcolinesterase (BuChE) pode ser encontrada principalmente nos tecidos do fígado, pele, músculo e no plasma. Assim como a AChE, esta enzima pertence a classe das hidrolases e sua estrutura primária é similar a da AChE, possuindo 574 resíduos de aminoácidos. Seu sítio ativo também contém uma

tríade catalítica com resíduos de serina (Ser198), histidina (His438) e glutamato (Glu325) (Figura 4).^{20,23} Apresenta também um sítio aniônico e um de acilação, no entanto seu sítio ativo possui um maior volume em relação a AChE.²⁴ Segundo Macdonald²⁵ e col. evidências experimentais mostram que os resíduos aspartato (Asp70), tirosina (Tyr332) e fenilalanina (Phe329) fazem parte do sítio aniônico periférico

A BuChE está associada com as células da glia e com os neurônios, principalmente no hipocampo, amígdala e no tálamo, diferente da AChE que se encontra quase exclusivamente nos neurônios. Há evidências que a BuChE também desempenha um papel importante no sistema nervoso como corregulador da acetilcolina. Tais evidências tem importantes implicações para o papel da BuChE na função do sistema nervoso, assim como para o curso do tratamento de doenças neurológicas tais como a DA. A importância da BuChE na neurotransmissão colinérgica foi observada através da capacidade de ratos, que tiveram a AChE bloqueada, sobreviverem até a idade adulta. Isto indica que a BuChE é capaz de compensar a falta de AChE, o que permite a regulação da neurotransmissão colinérgica.^{26,27}

Figura 4. Representação do sítio catalítico da butirilcolinesterase (PDB: 1POI). (Adaptada de Macdonald, I., 2012.)²⁵



Dependendo do estágio da DA, há um declínio nos níveis de AChE no cérebro, no entanto é possível observar um aumento progressivo da BuChE, que passa a ser responsável pela hidrólise da ACh.¹⁴ Além disso, através da autópsia de pacientes com DA, foi possível verificar a presença da BuChE em placas neuríticas e nos emaranhados neurofibrilares.^{23,27}

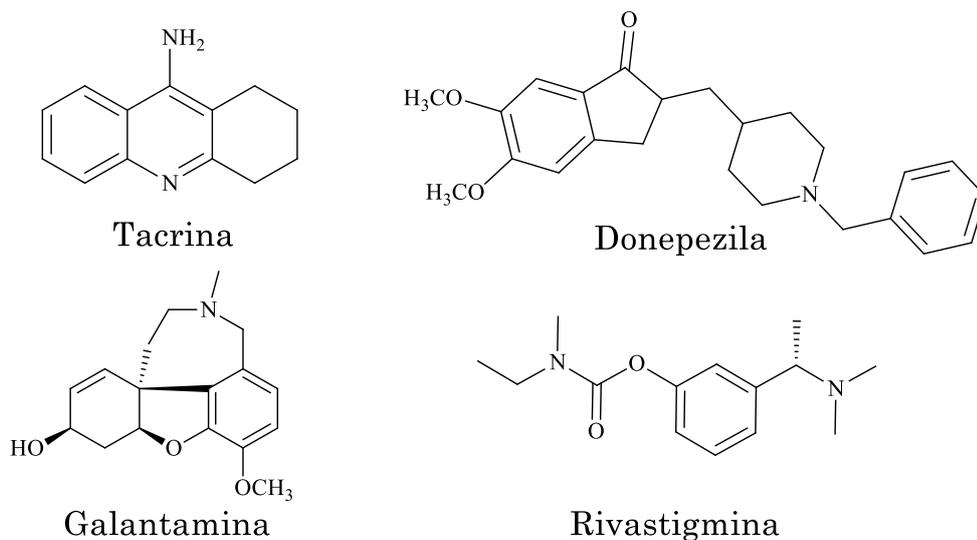
1.5. Inibidores de Colinesterases no Tratamento da DA

A hipótese colinérgica gerou uma corrida na busca de fármacos capazes de trazer benefícios e melhora significativa das funções cognitivas de pessoas com DA. Até o momento, a estratégia terapêutica mais eficiente para o tratamento sintomático da doença consiste no uso de fármacos que possam aprimorar a neurotransmissão colinérgica. Estes compostos são conhecidos como inibidores de colinesterases, pois interagem com as enzimas AChE e/ou BuChE impedindo que ocorra a hidrólise da acetilcolina, o que leva ao aumento nos níveis sinápticos deste neurotransmissor.¹¹

Os inibidores de colinesterases (IChE) podem apresentar mecanismo de inibição reversível, pseudo-irreversível e irreversível, e são capazes de produzir uma melhora das funções cognitivas retardando o avanço da doença.^{3,11}

Inúmeros IChE estão sendo investigados para o tratamento da DA. No entanto, apenas quatro inibidores foram aprovados pela *Food and Drugs Administration* (FDA) no Estados Unidos e pela ANVISA no Brasil para uso terapêutico, sendo eles: tacrina, rivastigmina, donepezila e galantamina (Figura 5). Atualmente apenas rivastigmina, donepezila e galantamina estão disponíveis comercialmente para o tratamento da DA.³

Figura 5. Inibidores de colinesterase aprovados pela FDA e ANVISA no tratamento da DA.



A tacrina (**Cognex®**) é um inibidor reversível, não competitivo, de ambas as enzimas (AChE e BuChE). Foi o primeiro fármaco aprovado para o uso no tratamento da DA pelo FDA, em 1993. Por apresentar um tempo de meia vida baixo, requer quatro doses (10 mg) diárias. O efeito colateral mais grave é o aumento das enzimas hepáticas (40% dos pacientes tratados), tendo a necessidade de monitorização laboratorial frequente. Além disso, os efeitos gastrointestinais também estão presentes. Devido aos efeitos colaterais e sua toxicidade hepática esse medicamento foi descontinuado.²⁸

A donepezila (**Aricept®**), aprovada pelo FDA em 1996, também é um inibidor reversível, mas apresenta alta seletividade para a AChE. As vantagens desse inibidor em relação à tacrina são: meia vida longa e não apresenta toxicidade hepática. Sua meia vida, de aproximadamente 70 horas, permite o uso de dose única diária. Por não ser hepatotóxica, não há a necessidade de monitorização laboratorial. Além disso, a alimentação e o horário de administração não interferem na absorção do fármaco. O tratamento é iniciado com uma dose diária de 5 mg, devendo ser aumentada para 10 mg por dia após quatro semanas, esta medida minimiza efeitos colaterais gastrointestinais.²⁸ O preço desse medicamento é próximo de 124 reais a caixa com 30 cápsulas de 5 mg.

A rivastigmina (**Excelon®**) pertence à classe dos carbamatos e foi aprovada pela FDA em 2000. Diferente dos outros dois fármacos a rivastigmina

apresenta um mecanismo de inibição pseudo-irreversível com afinidade por ambas as enzimas. Por ser pseudo-irreversível, a dissociação enzimática existe, porém é mais lenta.^{3,28} A interação da enzima com a rivastigmina na fenda sináptica leva à formação de um produto de clivagem fenólico com atividade farmacológica mínima e de rápida excreção e, de um complexo carbamoilado com a enzima que impede a hidrólise da acetilcolina, por inibição competitiva e duradoura, porém reversível.²⁹ Sendo assim, esse fármaco possui tempo de meia vida baixo de uma a duas horas, porém uma atividade prolongada de oito a dez horas. O tratamento inicial é de duas doses diárias de 1,5 mg podendo chegar a 6 mg duas vezes ao dia.³⁰ Uma caixa com 30 cápsulas de 1,5 mg desse medicamento custa aproximadamente 129 reais.

A galantamina (**Reminyl®**) é um alcaloide natural da família dos lírios e foi o último fármaco a ser aprovado pela FDA (2001). É um inibidor reversível e seletivo da AChE e também apresenta modulação alostérica dos receptores nicotínicos. Possui tempo de meia vida de aproximadamente sete horas e sua dose inicial de uso é de 4 mg duas vezes ao dia, podendo chegar a 8-12 mg duas vezes ao dia.^{3,30,31} O preço desse medicamento é próximo de 101 reais a caixa com 7 cápsulas de 8 mg.

1.6. Carbamatos como Inibidores de Colinesterases

Alguns inibidores, como donepezila e galantamina apresentam um modo de inibição reversível, onde o inibidor interfere na hidrólise do substrato pela interação com a enzima, sem que ocorra ligação covalente. Por outro lado, os organofosforados (tal como diisopropilfluorofosfato) inibem as mesmas enzimas irreversivelmente pela formação de uma forte ligação covalente com a serina da tríade catalítica. Já os carbamatos tendem a situar-se entre estes dois extremos, em que a serina catalítica é carbamoilada, mas a inibição é "pseudo-irreversível" ou "lentamente reversível", pois o intermediário acilado é lentamente hidrolisado, ocorrendo dessa forma a reativação da enzima (Figura 6).³² Além da rivastigmina, outros carbamatos, tais como, fisostigmina e neostigmina (Figura 7) também são inibidores colinesterásicos, mesmo apresentando estruturas

químicas distintas. Essas diferenças estruturais fazem com que esses compostos tenham diferentes farmacocinética, farmacodinâmica e graus de seletividade.^{33,34}

A fisostigmina foi o primeiro inibidor da AChE utilizado na DA. Porém, seu emprego foi descontinuado pela meia vida curta (aproximadamente 30 minutos), necessitando de administrações frequentes e pela alta incidência de efeitos colaterais (náusea, vômito, cólica abdominal, suor e fasciculações).²⁸ A neostigmina foi usado pela primeira vez na década de 30 para tratar a retenção urinária. Pouco depois, este fármaco mostrou-se eficaz para o tratamento de glaucoma e miastenia gravis, ambas doenças relacionadas ao sistema colinérgico.³⁵ Devido a essas características e por terem sido utilizados com sucesso no tratamento de uma série de doenças que envolvem a disfunção colinérgica, os carbamatos ganharam muita atenção, na busca de possíveis fármacos que possam ser mais eficazes e seguros no tratamento da DA.

Figura 6. Mecanismo geral da inibição pseudo-irreversível de colinesterases por carbamatos. (Fonte: Darvesh, S. 2008)³²

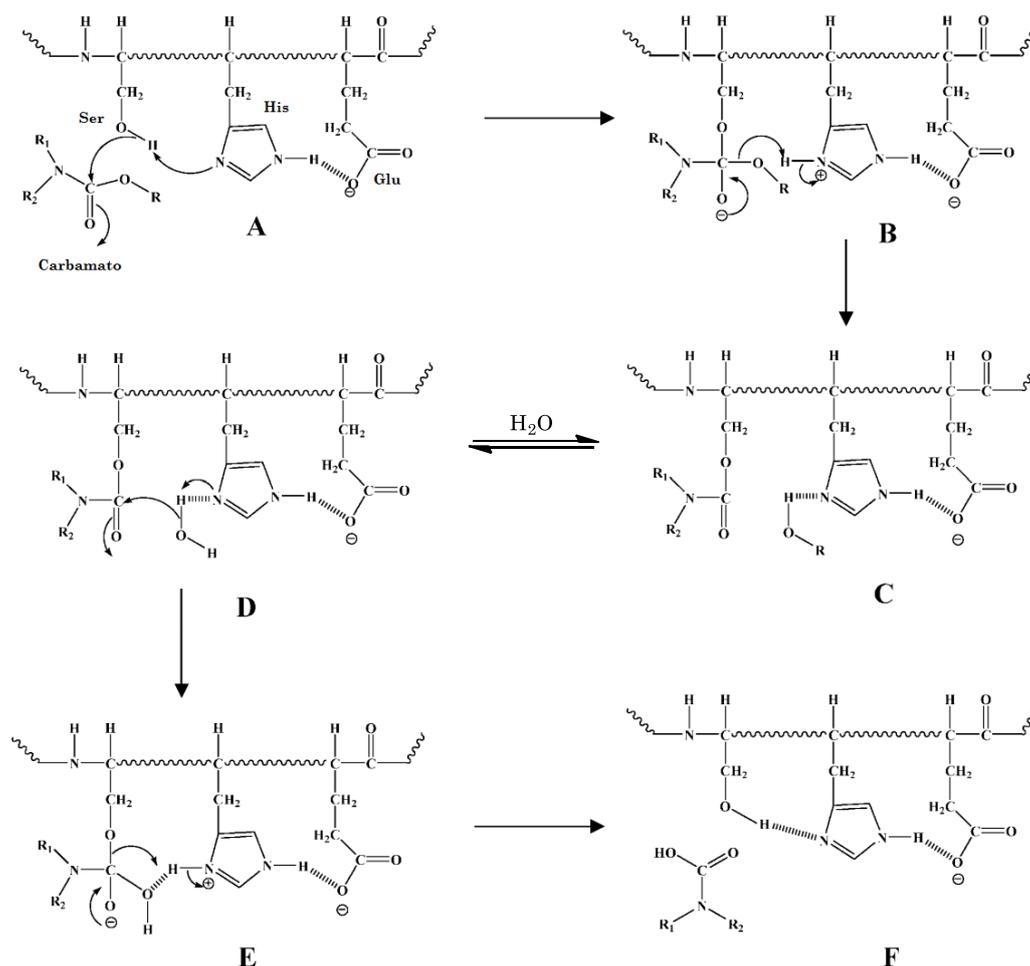
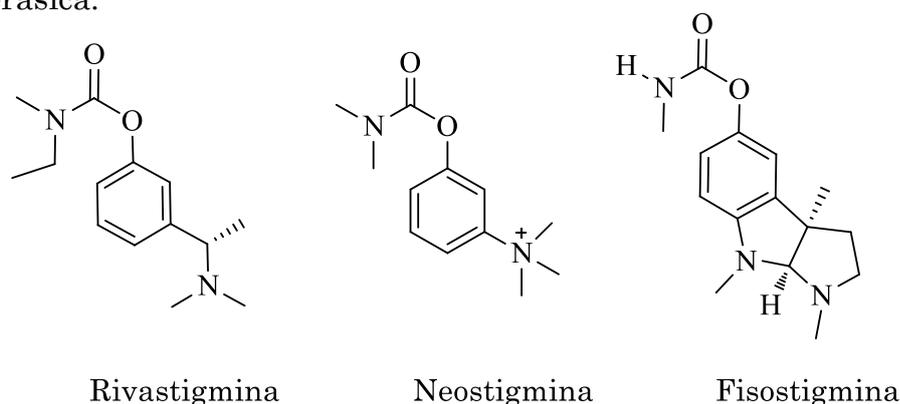
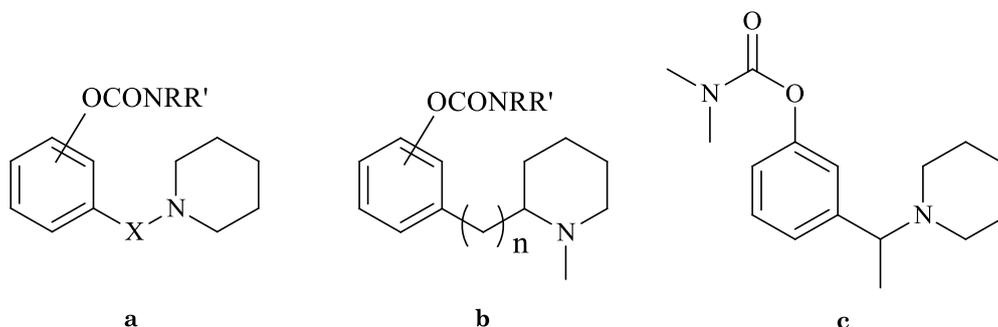


Figura 7. Estrutura química de alguns carbamatos que apresentam atividade anticolinesterásica.



Entre os diversos estudos, podemos citar o de Mustazza³⁶ e col. em que os autores basearam-se na estrutura química da rivastigmina para sintetizar uma série de fenilcarbamatos (Figura 8). Neste trabalho, os autores avaliaram a influência da posição dos substituintes do anel aromático (*orto* e *meta*) e a mudança do grupo carbamato. Na maioria dos casos, os compostos que possuíam os substituintes na posição *meta*, apresentaram maior inibição quando comparado ao seu análogo na posição *orto*. Além disso, os compostos com o grupo *N,N*-dimetilcarbamato foram os mais ativos. O composto que apresentou uma significativa atividade *in vitro* e uma baixa toxicidade foi o 1-[1-(3-dimetilcarbamoiloxifenil)etil]piperidina, (Figura 8c) com IC₅₀ de 7,0 e 8,0 nM para a AChE e BuChE, respectivamente.

Figura 8. Estrutura química geral dos compostos sintetizados por Mustazza e col.

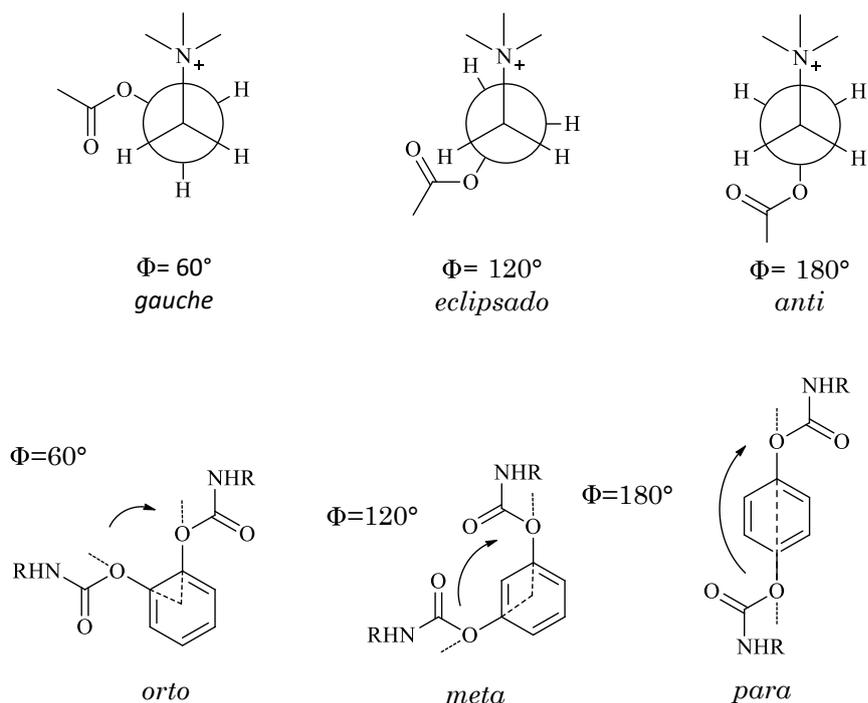


X = CH₂, (CH₂)₂ CH(CH₃); n = 0, 1, 2

R = H, R' = n-C₆H₁₃; R=R' = CH₃; R=R' = C₂H₅

Em outro estudo, Lin³⁷ e col. sintetizaram carbamatos benzeno-1,2, 1,3 e 1,4-*di-N*-substituídos, restritos conformacionalmente, que imitam respectivamente as possíveis conformações, *gauche*, *eclipsada* e *anti* da acetilcolina (Figura 9). Os resultados obtidos pelos autores mostraram que, os compostos *para*-substituídos foram mais ativos que os *meta*-substituídos, sendo os *orto*-substituídos os menos ativos. Os compostos 1,4-*di-N*-substituídos possuem um ângulo de ligação de 180° entre as ligações C_{ar}-O, imitando o confôrmero *anti*, preferencial da acetilcolina. Os autores observaram também que os substituintes menos volumosos como *n*-butila e *n*-hexila apresentaram maior inibição que os substituintes mais volumosos como *n*-octila, *t*-butila. A explicação para isto está relacionada com o tamanho do sítio de ligação do grupo acetil da AChE que é relativamente pequeno quando comparado a outras serinas hidrolases, sendo assim, substituintes menores são mais apropriados.

Figura 9. Possíveis conformações da acetilcolina e as estruturas químicas dos inibidores.

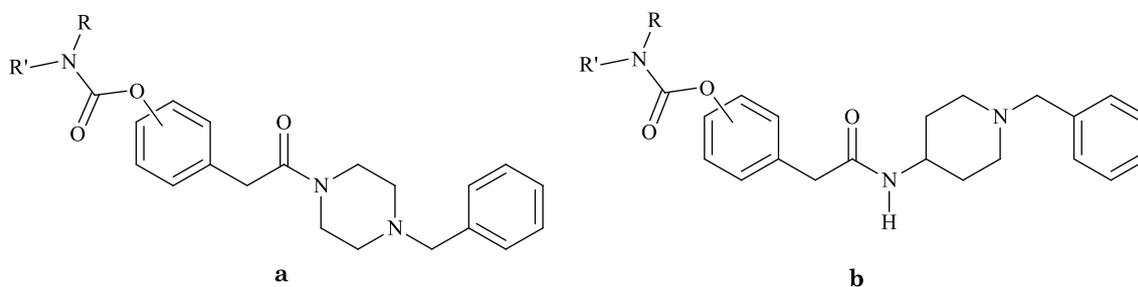


R= *n*-C₄H₉; *n*-C₆H₁₃; *n*-C₈H₁₇; *t*-C₄H₉ e CH₂Ph

Posteriormente, Wieckowska³⁸ e col. avaliaram a atividade inibitória de colinesterases de novos derivados alquil e arilcarbamatos com grupos *N*-benzilpiperidina e *N*-benzilpiperazina (Figura 10).

Os resultados obtidos estabelecem que esses grupos foram determinantes para a seletividade entre AChE e BuChE. Os derivados carbamatos da *N*-benzilpiperazina foram inibidores seletivos da BuChE, enquanto os derivados da *N*-benzilpiperidina mostraram uma atividade inibitória da BuChE/AChE não seletiva. Os autores também determinaram, através do estudo cinético, o tipo de inibição destes compostos. Para a AChE o composto mais ativo apresentou inibição não competitiva, enquanto que para a BuChE a inibição foi do tipo mista.

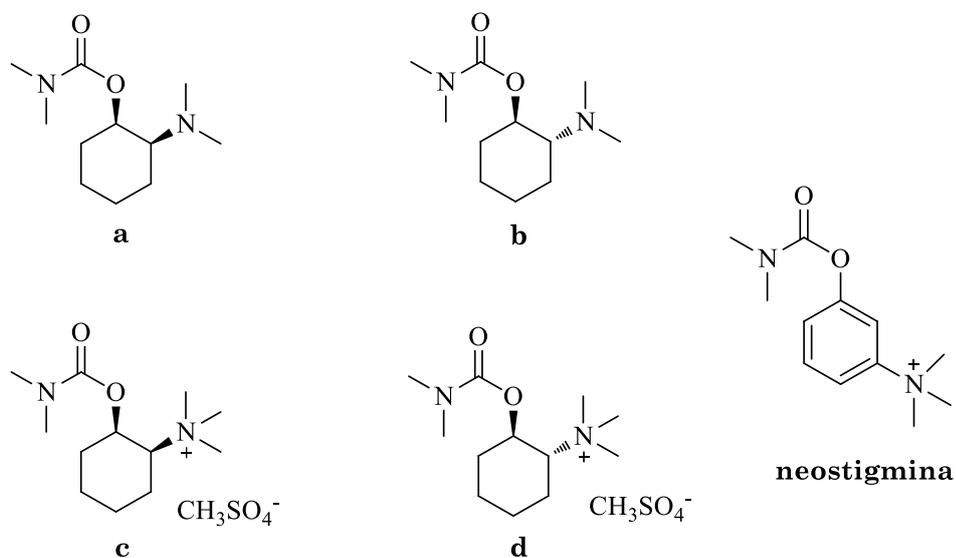
Figura 10. Estrutura química dos derivados alquil e arilcarbamatos de (a) *N*-benzilpiperazina e (b) *N*-benzilpiperidina.



R= H ou alquila, R'= Ar ou alquila.

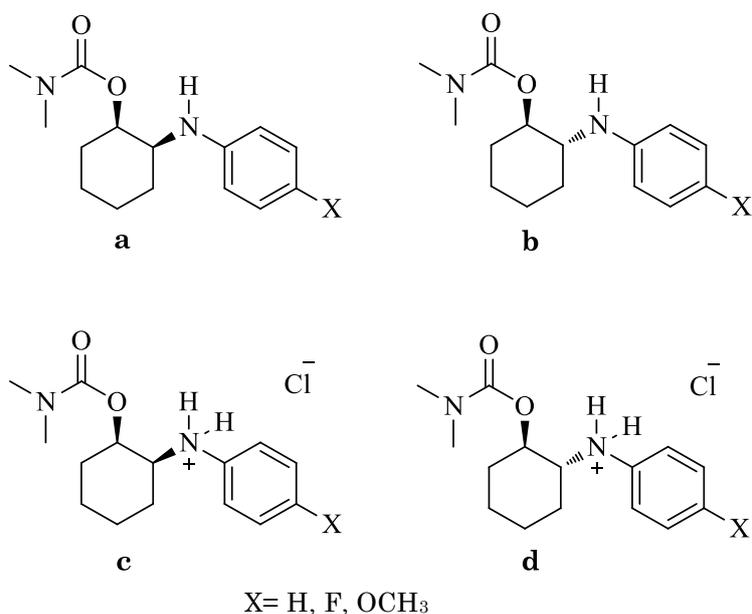
Em outro trabalho, Bocca³⁹ e col. estudaram as propriedades anticolinesterásicas dos isômeros *cis* e *trans* de *N,N*-dimetilcarbamatos de 2-*N,N*-dimetilaminocicloexila e de seus sais metil sulfato, baseando-se na estrutura da neostigmina (Figura 12). Os autores mostraram que os compostos na forma de sal foram mais ativos que aqueles na forma neutra. O sal *trans* (Figura 11-d) mostrou boa seletividade para a inibição da AChE, com valores de IC₅₀ de 21,8 mg/mL e 47,4 mg/mL para AChE e BuChE respectivamente, apresentando um limite máximo de inibição para a colinesterase eritrocitária (AChE) em torno de 90%, contra apenas 55% para a inibição da colinesterase plasmática (BuChE). O sal *cis* (Fig. 11-c) não apresentou seletividade, já que inibiu de forma semelhante ambas as enzimas.

Figura 11. Estrutura química dos isômeros *cis* e *trans* de *N,N*-dimetilcarbamatos de 2-*N,N*-dimetilaminocicloexila e de seus sais metil sulfato.



Recentemente, em um estudo realizado por nosso grupo de pesquisa, Bagatin⁴⁰ e col. avaliaram a atividade anticolinesterásica dos cloridratos *cis* e *trans* de *N,N*-dimetilcarbamatos de cicloexila 2-*N,N*-dimetilaminosubstituídos (Figura 12).

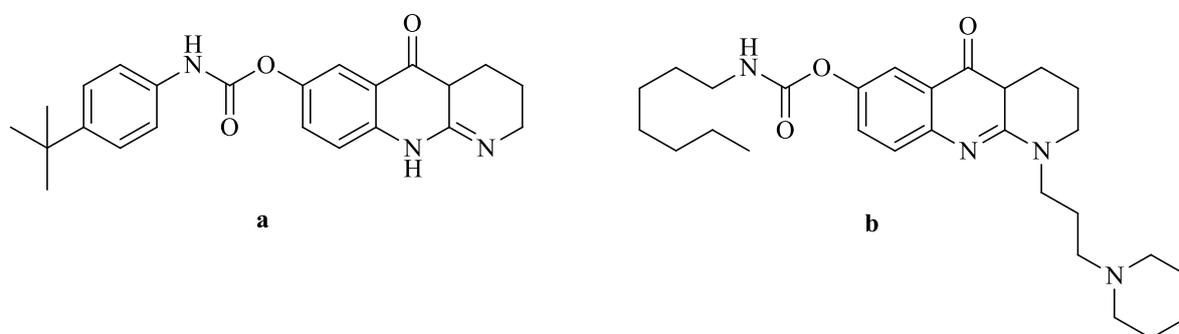
Figura 12. Estrutura dos isômeros *cis* e *trans* de *N,N*-dimetilcarbamatos de cicloexila 2-*N,N*-dimetilaminosubstituídos e seus cloridratos



Os testes de inibição *in vitro*, realizados em amostras de sangue humano, mostraram que os carbamatos de ambas as séries (*cis* e *trans*) apresentaram boa seletividade frente a enzima BuChE, sendo o composto mais ativo o cloridrato de *cis-N,N*-dimetilcarbamato de 2-fenilaminocicloexila (Figura 12c) com valores de IC₅₀ igual à 6,0 mmol/L e 59,2 mmol/L para as enzimas BuChE e AChE, respectivamente. Além disso, os carbamatos testados apresentaram uma maior atividade quando comparados à serie de compostos de Bocca e col., indicando que a presença do grupo arilamino potencializou a inibição da enzima BuChE. A seletividade para a BuChE foi comprovada através do *docking* molecular, onde foi possível observar que os compostos interagem de forma mais efetiva com o sítio ativo desta enzima, pois o grupo carbamato está próximo aos resíduos chave da tríade catalítica.

Darras⁴¹ e col. sintetizaram uma série de acil-guanidinas cíclicas com porções de carbamato e avaliaram a atividade inibitória *in vitro* da AChE e BuChE. Os autores observaram que a seletividade na inibição apresenta uma dependência com a estrutura do substituinte carbamato, bem como a posição das guanidinas *N*-substituídas. Neste estudo, o derivado com o grupo 4-*tert*-butilfenil na porção carbamato (Figura 13a), apresentou seletividade para a AChE, com IC₅₀ de 200 nM, enquanto que o derivado heptilcarbamato (Figura 13b), apresentou seletividade para a BuChE com IC₅₀ de 24,7 nM.

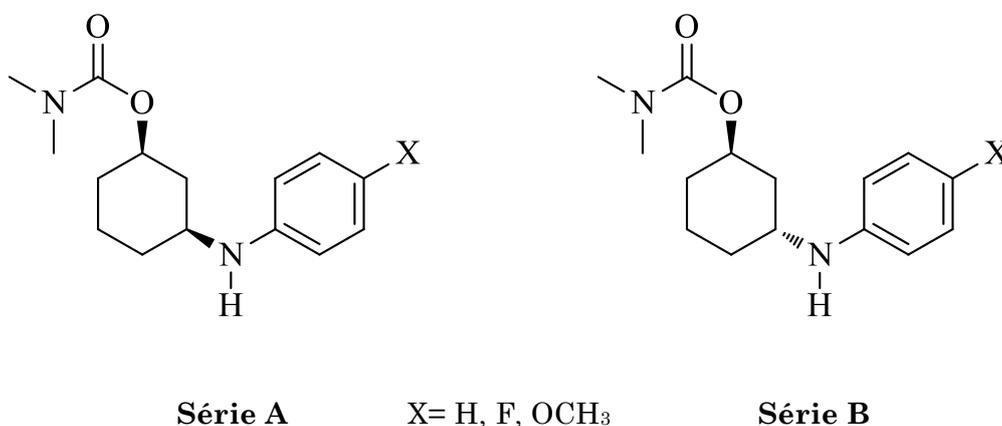
Figura 13. Compostos sintetizados por Darras e col.



1.7. Objetivos

De acordo com a importância farmacológica dos compostos com grupos carbamatos, como inibidores de colinesterases e no tratamento da doença de Alzheimer, tem-se como objetivo no presente trabalho realizar a síntese, a análise conformacional, a avaliação da atividade anticolinesterásica e a determinação do modo de inibição de duas séries inéditas de isômeros *cis* e *trans* de *N,N*-dimetilcarbamato de cicloexila 3-amilaminossustituídos e seus respectivos cloridratos. (Figura 14).

Figura 14. Estrutura das duas novas séries de carbamato.



(Série A) *cis*-*N,N*-dimetilcarbamatos de cicloexila 3-amilaminossustituídos.

(Série B) *trans*-*N,N*-dimetilcarbamatos de cicloexila 3-amilaminossustituídos.

Tendo como objetivos específicos:

- Sintetizar duas séries inéditas de isômeros *cis* e *trans* de *N,N*-dimetilcarbamatos de cicloexila 3-amilaminossustituídos, bem como seus respectivos cloridratos
- Caracterizar os compostos sintetizados por espectroscopia de RMN de ¹H e ¹³C, uni e bidimensionais.
- Realizar um estudo teórico-experimental 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.
- Comparar os resultados obtidos para os novos derivados 1,3-dissubstituídos com seus análogos 1,2-dissubstituídos, para avaliar a influência da posição do grupo arilamino na atividade dos compostos.
- Realizar estudos de cinética enzimática para determinar o modo de inibição dos compostos.
- Realizar cálculos de *docking* molecular para avaliar as possíveis interações entre os compostos sintetizados e o sítio ativo das enzimas acetilcolinesterase e butirilcolinesterase.

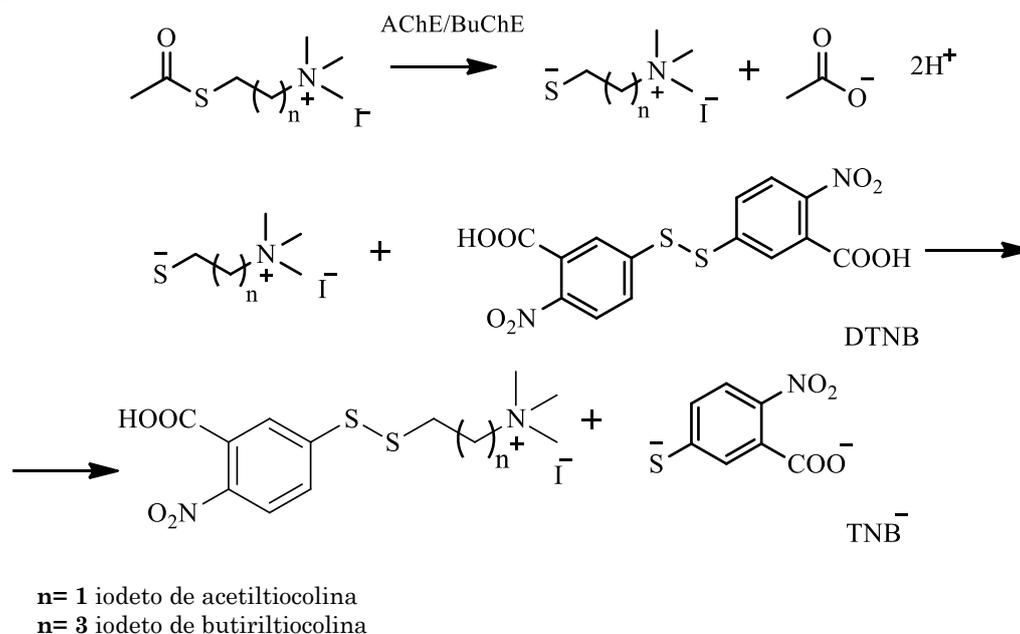
2

Fundamentação Teórica

2.1. Método de Ellman

O método espectrofotométrico mais utilizado e mais barato para a determinação da atividade colinesterásica é o método descrito por Ellman⁴² e col. com suas diversas modificações. Este método baseia-se na medida da velocidade de produção da tiocolina através da hidrólise do iodeto de acetiltiocolina ou butiriltiocolina pelas enzimas AChE ou BuChE. A tiocolina produzida reage com o reagente de Ellman, o ácido 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzóico (DTNB), formando um ânion de coloração amarela (TNB⁻) com intensa absorção em 412 nm (Figura 15).⁴³

Figura 15. Reação das colinesterases pelo método espectrofotométrico de Ellman.



Outras vantagens deste método são a rapidez nas análises, boa sensibilidade e uma relação direta entre a atividade enzimática e a leitura da absorbância. Pode ser realizado em amostras de sangue, bem como em soluções preparadas a partir das enzimas isoladas.⁴¹

2.2. Cinética Enzimática

O estudo dos parâmetros cinéticos das reações enzimáticas é bastante relevante, já que a propriedade de maior importância da enzima é a sua capacidade de atuar como catalisador. Esses estudos fazem parte da cinética enzimática e fornecem informações indiretas sobre as especificidades e os mecanismos catalíticos das enzimas.⁴⁴

Assim, entende-se por cinética enzimática a análise da redução ou aumento da velocidade da reação catalisada, causado pelo efeito da variação dos fatores (pH, temperatura, concentração do substrato e inibidores) que influenciam a atividade enzimática.^{44,45}

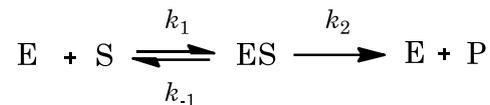
2.2.1. Influência da concentração do substrato

Um dos fatores que afetam a atividade de uma enzima purificada é a concentração de substrato [S] presente. O estudo do efeito da concentração do substrato é complicado pelo fato de a [S] variar durante o curso de uma reação a medida que o substrato é convertido em produto. Uma forma de simplificar este problema é medir a velocidade inicial da reação (V_0). Em um experimento cinético a [S] é sempre muito maior do que a concentração da enzima [E] e, se o tempo de reação é suficientemente curto, as mudanças da [S] serão negligenciáveis, podendo ser considerada constante.

A velocidade de uma reação enzimática aumenta com a concentração do substrato, até uma velocidade máxima ($V_{máx}$) ser atingida. Em concentrações muito altas do substrato ocorre a saturação, pelo substrato, de todos os sítios de ligação disponíveis da enzima.⁴⁵

2.2.2. Equação de Michaelis-Menten

Considerando uma reação enzimática simples, onde um único substrato (S) converte-se totalmente em apenas um produto (P), ocorrendo em duas reações distintas, nas quais o substrato interage com a enzima (E) formando um complexo enzima-substrato (ES) e posteriormente ocorre a dissociação em enzima livre e a formação do produto da reação (P).⁴³



As constantes de velocidade k_1 e k_{-1} governam as velocidades da reação de complexação e de dissociação do complexo ES, respectivamente. A velocidade de formação do produto P a partir de ES está relacionada com a constante de velocidade k_2 . A primeira etapa da reação é reversível e geralmente mais rápida porque apenas ligações não covalentes estão sendo formadas e quebradas. A segunda etapa da reação é mais lenta e, portanto, limita a velocidade da transformação global do reagente em produto. Dessa forma, pode-se considerar que a velocidade da reação enzimática é proporcional à concentração de ES.^{44,45}

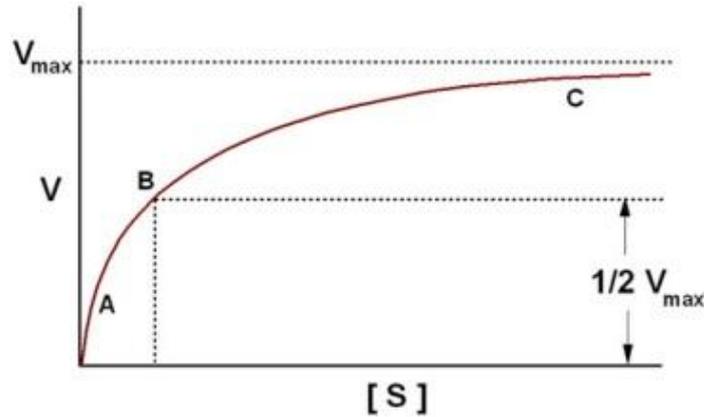
A relação entre a velocidade inicial (V_0), a velocidade máxima ($V_{m\acute{a}x}$) e a concentração inicial do substrato [S] da reação é descrita por uma curva hiperbólica (Figura 16) e pode ser expressa algebricamente pela equação de Michaelis-Menten (Equação 1). A constante de Michaelis-Menten (K_m) é dada por $(k_{-1} + k_2)/k_1$ e é equivalente a [S] quando V_0 é a metade de $V_{m\acute{a}x}$. Esta constante indica a afinidade da enzima pelo substrato, quanto menor for o valor de K_m , maior será a afinidade da enzima pelo substrato.^{44,45}

$$V_0 = \frac{V_{m\acute{a}x} [S]}{K_m + [S]} \quad \text{Equação 1}$$

A determinação de $V_{m\acute{a}x}$ a partir de um gráfico hiperbólico V_0 versus [S] é extremamente difícil, pois quando a concentração do substrato é muito alto, V_0 tende à $V_{m\acute{a}x}$. No entanto, é possível obter parâmetros cinéticos realizando a

linearização da equação de Michaelis-Menten e a partir da Equação 2 construir um gráfico de Lineweaver-Burk ou duplo-recíproco. (Figura 17).⁴⁴

Figura 16. Curva de Michaelis-Menten que mostra a dependência da velocidade inicial com a concentração do substrato.

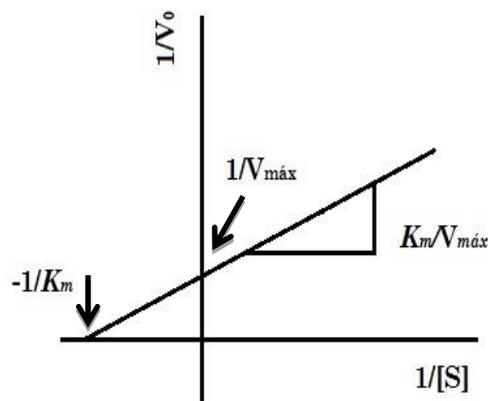


Este gráfico é utilizado para determinar os valores de K_m e $V_{m\acute{a}x}$ e a partir destes parâmetros determina-se o mecanismo de inibição enzimática. O coeficiente angular da reta é igual a $K_m / V_{m\acute{a}x}$, os interceptos no eixo x e no eixo y correspondem respectivamente a $-1/K_m$ e $1/V_{m\acute{a}x}$.^{44,45}

$$\frac{1}{V_0} = \frac{K_m}{V_{m\acute{a}x}} + \frac{1}{V_{m\acute{a}x}}$$

Equação 2

Figura 17. Gráfico de Lineweaver-Burk (duplo-recíproco)



2.2.3. Processos de Inibição Enzimática

Qualquer composto que seja capaz de interferir na atividade da enzima, diminuindo a velocidade do processo catalítico é denominado de inibidor enzimático. Os processos de inibição enzimática são divididos essencialmente em dois tipos, inibição reversível e inibição irreversível. A diferença principal está no modo de ligação para a formação do complexo enzima-inibidor (EI), que pode ou não ser desfeito. De modo geral, inibidores irreversíveis ligam-se às enzimas por meio de ligações covalentes, enquanto inibidores reversíveis ligam-se por meio de ligações não covalentes. Dessa forma, em uma inibição reversível, após a dissociação com o inibidor, a enzima retorna a sua atividade. O processo de inibição reversível pode ser dividido em quatro tipos básicos, inibição competitiva, inibição não competitiva, inibição incompetitiva e inibição mista (Figura 19).^{44,45}

A inibição competitiva é o tipo mais comum e de maior ocorrência. O inibidor liga-se de modo reversível ao mesmo sítio ativo da enzima que o substrato ocuparia e, dessa forma, compete com o substrato por esse sítio. Enquanto o inibidor estiver ligado à enzima, este impede que o substrato se ligue retardando assim, a catálise enzimática. Esse tipo de inibidor afeta apenas o valor de K_m , enquanto que $V_{máx}$ continua inalterado.^{44,45}

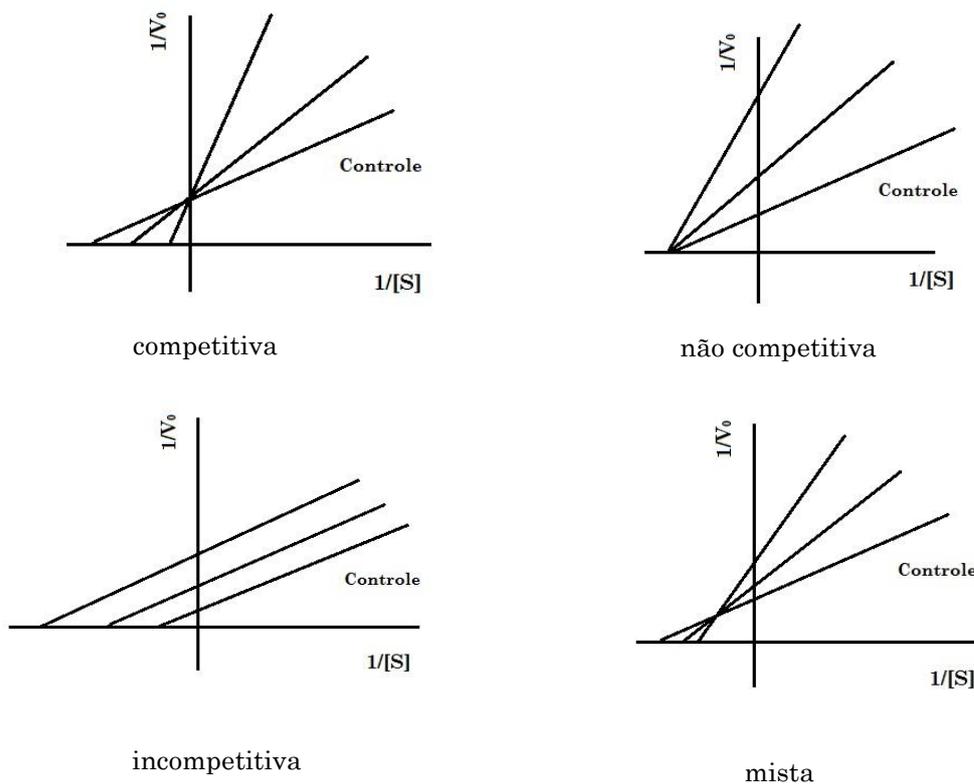
A inibição não competitiva tem a característica de diminuir a quantidade de enzima ativa resultando na diminuição da velocidade da reação, diferentemente da inibição competitiva. Nesse processo o inibidor e o substrato ligam-se a diferentes sítios na enzima, formando um complexo enzima, inibidor e substrato (EIS). Por não interferir na ligação do substrato com a enzima, o inibidor não influencia no valor de K_m .^{44,45}

Diferente do inibidor não competitivo, o inibidor incompetitivo liga-se somente ao complexo ES formando o complexo EIS e não se liga na enzima livre. Esse inibidor tem a característica de aumentar a afinidade entre a enzima e o substrato para aumentar a formação do complexo ES. Além disso, por não competir com o substrato a inibição não pode ser revertida com o aumento da [S], em quantidades altas de substrato a formação de ES aumenta e consequentemente a eficiência do inibidor é maior. Desta forma, esse tipo de

inibição afeta tanto o valor de K_m quanto a velocidade da reação, sendo ambos diminuídos.⁴⁴

A inibição mista tem esse nome pelo fato de que esse tipo de inibição apresenta comportamento característico de inibição competitiva e de inibição incompetitiva. O modelo de ligação do inibidor misto assemelha-se ao do inibidor não competitivo. O inibidor misto liga-se tanto a enzima livre quanto ao complexo ES, entretanto a afinidade do inibidor pela enzima é diferente de sua afinidade pelo complexo ES, desta forma, tanto K_m e $V_{m\acute{a}x}$ são afetados. A inibição mista difere-se da inibição não competitiva, pois esta influencia o valor de K_m .⁴⁴ Na Figura 18 estão representados os gráficos de Lineweaver-Burk característicos para os quatro tipos de inibição reversível.

Figura 18. Gráficos típicos de cada modo de inibição reversível.



2.3. Análise Conformacional

A análise conformacional consiste na determinação dos arranjos espaciais energeticamente favoráveis de uma molécula. O estudo da preferência conformacional é bastante interessante, já que a maioria dos compostos biologicamente ativos é flexível ou contém partes flexíveis e o conhecimento das características conformacionais é um pré-requisito para a compreensão da relação entre a estrutura molecular e suas propriedades, em especial a atividade biológica.⁴⁷

Diversas ferramentas podem ser utilizadas em análise conformacional, como a espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN), infravermelho, micro-ondas e fotoeletrônica, cada uma com suas peculiaridades, vantagens e desvantagens. Além disso, a química computacional tem se tornado imprescindível na complementariedade dos resultados espectroscópicos, podendo prever geometrias, interações e preferências conformacionais de maneira cada vez mais exata.^{48,49}

Os principais objetivos da análise conformacional são a determinação das geometrias moleculares, das energias relativas dos confôrmeros, e entendimento das principais forças que controlam a estabilidade conformacional relativa. Deste modo, os estudos de anéis de seis membros com dois substituintes apresentam grande relevância, principalmente por estes serem modelos úteis para determinação dos fatores que regem o equilíbrio conformacional.⁵⁰

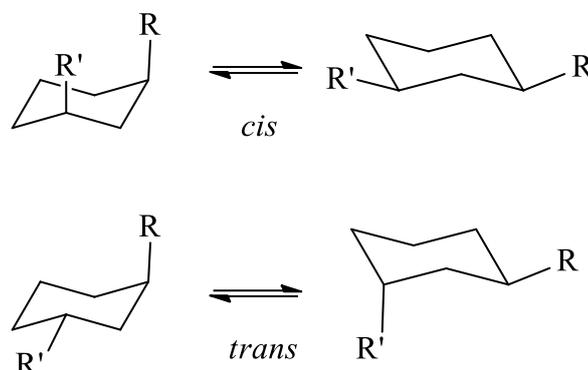
2.3.1. Análise conformacional de Cicloexanos 1,3-dissubstituídos

O confôrmero mais estável do cicloexano é a conformação chamada de cadeira, na qual os dois hidrogênios ligado ao mesmo carbono não são equivalentes. Estes hidrogênios ocupam duas posições diferentes, chamadas de axial e equatorial. Sabe-se que em temperatura ambiente ocorre a interconversão da cadeira ocasionada pela rotação em torno das ligações carbono-carbono. Esta interconversão é extremamente rápida, não sendo possível observar a temperatura ambiente. Isso pode ser facilmente entendido ao estudar derivados

monossustituídos do cicloexano. Os espectros de RMN de ^1H a temperatura ambiente destes compostos, apresentam apenas um sinal correspondente ao hidrogênio metínico. Entretanto ao realizar o mesmo experimento à baixa temperatura, é possível observar dois sinais para este hidrogênio, referentes ao hidrogênio na posição axial e ao hidrogênio na posição equatorial, ou seja, é possível observar cada um dos confôrmeros.^{49,50}

Cicloexanos 1,3-dissubstituídos são modelos muito úteis em análise conformacional, pois além de apresentarem estereoisomerismo *cis-trans*, cada um destes isômeros apresenta também equilíbrio entre confôrmeros (Figura 19). O confôrmero mais estável no isômero *cis*, em geral, é aquele que possui os dois substituintes na posição equatorial. Já o isômero *trans*, apresenta um substituinte na posição axial e outro na posição equatorial, e a estabilidade dos confôrmeros dependem do tipo dos substituintes.

Figura 19. Equilíbrio conformacional dos isômeros *cis* e *trans* de cicloexanos 1,3-dissubstituídos.

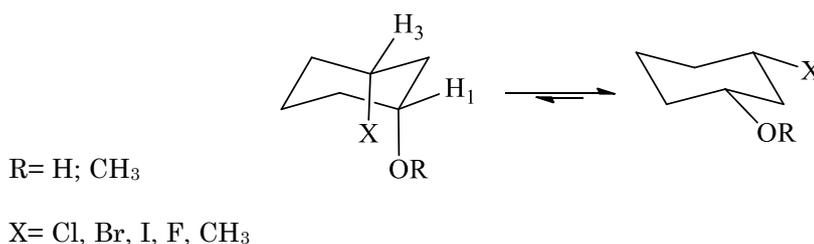


Muitos equilíbrios químicos são modificados pela mudança no ambiente molecular, deste modo os efeitos do solvente desempenham um papel importante nos equilíbrios conformacionais, principalmente quando os confôrmeros apresentam diferentes momentos de dipolo.⁵¹⁻⁵³

Oliveira e col.⁵⁴ estudaram o efeito do momento de dipolo dos confôrmeros e das interações estéricas 1,3-diaxiais sobre o equilíbrio conformacional de isômeros *cis* de cicloexanos 1,3-dissubstituídos (Figura 20). Os autores relatam que o confôrmero diequatorial é predominante em todos os solventes analisados, apesar do confôrmero diaxial apresentar o maior momento de dipolo. Assim, o

equilíbrio conformacional destes derivados 1,3-dissubstituídos não é controlado pela polaridade do solvente, como é observado para os cicloexanos 1,2-dissubstituídos, mas é determinado pelo efeito estérico 1,3-diaxial, que predomina sobre a estabilização do confômero diaxial por uma ligação de hidrogênio intramolecular.

Figura 20. Cicloexanos 1,3-dissubstituídos estudados por Oliveira e col.



2.3.2. Ressonância Magnética Nuclear (RMN) aplicada à Análise Conformacional

A espectroscopia de RMN é uma ferramenta de extrema importância em diversas áreas de pesquisa. Essa técnica é utilizada para a investigação a nível molecular, permitindo obter informações estrutural e dinâmica. Dentre os parâmetros que podem ser avaliados por RMN, dois são de bastante importância para análise conformacional: o deslocamento químico (δ) e a constante de acoplamento (J).^{55,56}

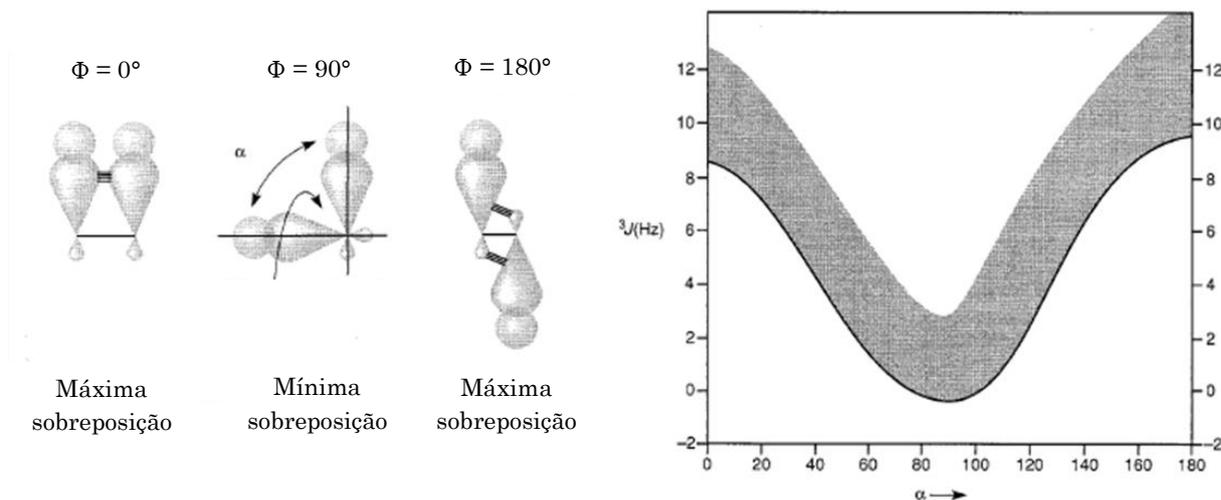
O deslocamento químico é expresso em partes por milhão (ppm) e está associado com a densidade eletrônica ao redor de um determinado átomo. Várias propriedades dos substituintes podem influenciar no deslocamento químico, tais como: eletronegatividade, pares de elétrons livres, carga nuclear efetiva das camadas eletrônicas e número quântico principal.⁵⁵

O acoplamento nuclear spin-spin, expresso em Hertz (Hz), é uma interação entre dois núcleos, transmitida através de ligações químicas, que depende da distribuição dos elétrons na cadeia de ligações que conecta tais núcleos. Em outras palavras, a constante de acoplamento mede o quanto um núcleo é afetado pela sua vizinhança.⁵⁵

A magnitude da constante de acoplamento pode ser afetada por inúmeros fatores, como por exemplo, o comprimento ou ângulos de ligação, conformação e configuração molecular, orientação dos substituintes ou dos pares de elétrons livres, hibridização e eletronegatividade dos átomos acoplados, dos átomos ligados aos núcleos acoplados e dos núcleos que participam das ligações por onde se transfere a informação, etc.⁵⁷

A relação mais conhecida entre os fatores estruturais e conformacionais de uma molécula é a curva de Karplus (Figura 21). Essa curva correlaciona o ângulo diedro de dois átomos de hidrogênio com o valor da constante de acoplamento vicinal ($^3J_{HH}$) desses átomos. Quando duas ligações σ C-H são ortogonais ($\Phi = 90^\circ$), a sobreposição é mínima e $^3J_{HH}$ é aproximadamente zero. As constantes de acoplamento serão máximas quando as ligações estiverem paralelas ($\Phi = 0^\circ$) ou antiparalelas ($\Phi = 180^\circ$).^{55,57}

Figura 21. Sobreposição de orbitais em diferentes ângulos diedros e curva de Karplus. (adaptada de Pávia, D. L.; 2001)

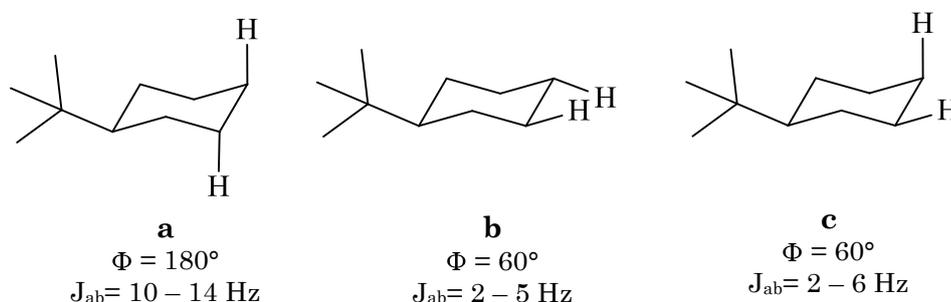


Sendo assim, a curva de Karplus é fundamental na análise conformacional de cicloexanos substituídos, através dela é possível observar que o acoplamento entre dois hidrogênios orientados na posição axial ($\Phi = 180^\circ$) terá maior magnitude do que entre dois hidrogênios orientados na posição equatorial ($\Phi = 60^\circ$).⁵⁵

A relação de Karplus está exemplificada na Figura 22, onde está representada a conformação mais estável do *t*-butilcicloexano. A conformação

preferencial para esse composto é aquela onde o grupo volumoso encontra-se na equatorial. O valor da constante de acoplamento (${}^3J_{\text{HH}}$) entre os dois hidrogênios axiais varia de 10 a 14 Hz (Figura 22a), enquanto que a interação entre os hidrogênios diequatoriais apresentam valores de ${}^3J_{\text{HH}}$ entre 2 a 5 Hz (Figura 22b). Por fim, a interação entre um hidrogênio axial e um hidrogênio equatorial tem ${}^3J_{\text{HH}}$ de 2 a 6 Hz (Figura 22c).

Figura 22. Valores de constantes de acoplamento vicinais para derivados do cicloexano. (adaptada de Pavia, D. 2012)⁵⁵



À temperatura ambiente, a interconversão entre os confôrmeros derivados do cicloexano é muito rápida, em relação à escala de tempo de detecção da espectroscopia de RMN. Neste caso, os parâmetros observados (deslocamento químico e constante de acoplamento) para o sistema em equilíbrio correspondem a média ponderada da contribuição dos confôrmeros individuais. Entretanto, em temperaturas mais baixas, a interconversão torna-se lenta o suficiente, de forma que as conformações podem ser observadas individualmente. Sendo assim, no estudo de equilíbrio conformacional faz-se necessário realizar experimentos de espectroscopia de RMN à baixa temperatura e, através da área dos sinais (integração) é possível determinar a população de cada confôrmero. Essa técnica para determinar a contribuição de cada confôrmero aliado a experimentos à baixa temperatura é chamada de Ressonância Magnética Nuclear Dinâmica (RMND).^{48,56}

Tanto a RMN de ${}^1\text{H}$ como a de ${}^{13}\text{C}$ podem ser utilizadas para este propósito, embora a maioria dos estudos de efeito da temperatura no equilíbrio conformacional sejam feitos a partir da RMN de ${}^1\text{H}$.

2.4. Modelagem Molecular

Modelagem molecular é definida pela IUPAC como uma técnica de investigação das estruturas e das propriedades moleculares usando a química computacional e as técnicas de visualização gráfica visando fornecer uma representação tridimensional, sob um dado conjunto de circunstâncias.⁵⁸ A modelagem molecular é uma ferramenta indispensável no processo de planejamento racional e descoberta de novos fármacos e na otimização de protótipos existentes, deste modo, sua aplicação tem se tornado importante nos dias atuais.⁵⁹

2.4.1. Métodos de Estrutura Eletrônica

Prever propriedades moleculares quantitativamente ou tendências qualitativas estão entre os principais objetivos dos cálculos teóricos aplicados a sistemas químicos. A partir de cálculos computacionais é possível determinar a geometria molecular mais estável, frequências vibracionais, propriedades termodinâmicas e espectroscópicas.⁶⁰

Em consequência do desenvolvimento da mecânica quântica, iniciada no século passado com os trabalhos de Schrödinger, Einstein, Dirac, Plank, Heisenberg e outros, grandes avanços na descrição microscópica de sistemas atômicos e moleculares têm sido alcançados.

Os métodos de estrutura eletrônica⁶¹ empregam as leis da mecânica quântica, ao invés das leis da física clássica, para descrever as propriedades físico-químicas das moléculas, utilizando para isto, uma descrição criteriosa do comportamento de núcleos e, principalmente, dos elétrons nas espécies químicas.⁶² Essa descrição abrange tanto a localização da densidade eletrônica quanto suas interações e efeitos sobre os orbitais atômicos e moleculares. Esses métodos podem ser subdivididos em métodos semi-empíricos, *ab-initio* e os métodos híbridos baseados na teoria do funcional de densidade (TFD).

Os métodos semi-empíricos utilizam parâmetros derivados de dados experimentais no cálculo das propriedades moleculares e não levam em

consideração as correlações eletrônicas, isto é, algumas aproximações matemáticas são corrigidas pela introdução de valores experimentais.⁶²

Por outro lado, os métodos *ab-initio* são métodos derivados inteiramente de princípios teóricos, não utilizam qualquer parâmetro experimental, partem somente dos valores da velocidade da luz, massa e carga do elétron e dos núcleos e da constante de Planck. Um método *ab-initio* bastante empregado é o de Hattree-Fock (HF).⁶⁰ Nesse método, a equação de Schrödinger para sistemas com n elétrons é separada em n equações para um elétron e resolvida individualmente. Desse modo, cada função é tratada como independente e as coordenadas de um elétron são dadas somente em relação ao núcleo, sendo assim, uma das limitações na teoria de HF.⁶³

Os métodos baseados na Teoria do Funcional de Densidade (TFD) expressam a energia de um sistema em termos de sua densidade eletrônica, $E = E[\rho(r)]$. O tratamento matemático empregado é similar ao da teoria de Hartree-Fock, uma combinação linear de funções de base para a energia.^{64,65}

As vantagens de utilizar a TFD sobre os métodos *ab-initio* é que, na maioria das vezes, fornecem resultados mais precisos com tempo de cálculo menor. Uma série de novos funcionais vem sendo desenvolvida nos últimos anos por Zhao e Truhlar,^{66,67} conhecidos como “M” (M05, M06, M06-2X, M06-HF, M06-L). Esses métodos apresentam melhores resultados que o tradicional B3LYP (funcional tri-parametrizado de Becke com funcionais de correlação de Lee, Yang e Par)⁶⁸ e tem ampla aplicabilidade em cálculos de energia conformacional, termoquímica, parâmetros espectroscópicos, cinéticos e interações não covalentes.⁶⁶

2.4.1.1. Conjunto de Funções de Base

A qualidade dos cálculos de estrutura eletrônica depende da escolha adequada do conjunto de bases. As funções de base, em química teórica, representam o conjunto de funções empregadas para a representação matemática dos orbitais moleculares e podem ser interpretadas como a restrição do elétron em uma determinada região do espaço tridimensional.⁶⁹ Um método deve ser

aliado à uma função de base para compor um nível de teoria, e assim executar um certo cálculo sobre um sistema molecular. Portanto, a escolha de um conjunto de base deve ser cuidadosa, visando à maior precisão dos cálculos, considerando-se os recursos computacionais disponíveis.

Com o desenvolvimento de novas teorias e aprimoramento dos métodos, foi introduzido o uso de conjunto de bases com valência dividida, que melhora a flexibilidade das bases, permitindo que os orbitais se adequem melhor as condições do sistema molecular, por expansão ou contração. É possível ainda melhorar a base aumentando-se o número de Gaussianas ou ainda aprimorá-las pela introdução de funções de polarização.^{70,71} As funções de polarização auxiliam na descrição das distorções da nuvem eletrônica e são fundamentais na descrição de ligações químicas e interações com pares de elétrons livres (como as ligações de hidrogênio). Além disso, há sistemas em que é fundamental a descrição de regiões mais afastadas no núcleo. Para isso, adicionam-se funções de difusão nos átomos pesados e, se necessário, no hidrogênio.⁷⁰

Por exemplo, a base 6-31G++G(d,p), utiliza seis gaussianas primitivas para representar cada orbital interno e divide cada orbital de valência em dois grupos, sendo agora de três gaussianas primitivas e o outro por apenas uma (6-31G). As funções de polarização incluem as funções tipo p no hidrogênio e d nos átomos pesados. Além disso, o símbolo “+” indica a adição de funções difusas nos átomos pesados e no átomo de hidrogênio.⁷²

2.4.2. Docking Molecular

Dentro das ferramentas de modelagem molecular, o *docking* molecular tem como objetivo definir a orientação preferencial entre duas ou mais moléculas na formação de complexos estáveis, auxiliando na compreensão do processo de reconhecimento molecular e indicando quais modificações no ligante podem ser feitas a fim de inibir ou aumentar a atividade do alvo desejado. Desta forma, essa ferramenta tem sido bastante difundida no planejamento de novos fármacos e na escolha de alvos terapêuticos.^{73,74}

Existem hoje mais de sessenta programas de *docking*, alguns dos mais utilizados são: AutoDock, Dock, Glide, MOE, FlexX, GOLD, Pyrx e ICM. Estes programas diferem-se no modo de lidar com a flexibilidade do receptor e do ligante, no tipo de função de *scoring* e no algoritmo de busca. Para uma representação mais realista do sistema a introdução de flexibilidade do receptor é necessária, no entanto, a maioria dos programas disponíveis considera a estrutura do receptor sendo rígida e apenas a do ligante flexível.⁷⁵

De modo geral os softwares de *docking* molecular são formados pela combinação do algoritmo de busca e da função de *scoring*. O algoritmo é utilizado na busca dos possíveis modos de ligação entre o ligante e o receptor, e permite explorar os graus de liberdade translacional, rotacional e conformacional do ligante.^{73,76} A função de *scoring* é aplicada para definir os modos de ligação teoricamente mais próximos do modo de ligação obtidos experimentalmente entre os demais modos de ligação, explorados pelo algoritmo de busca, ordenando-os de acordo com as energias de interação. Deste modo, as funções de *scoring* ajudam a refinar os resultados obtidos, pois avaliam a afinidade entre o ligante e o receptor, através de interações eletrostáticas, ligações de hidrogênio, interações de van der Waals e termos de solvatação.⁷⁷

3

Apresentação e Discussão dos Resultados

Nesta seção serão apresentados e discutidos os resultados obtidos. As nomenclaturas, fórmulas estruturais e numerações dos compostos em estudo encontram-se na Tabela 1.

Tabela 1. Nomenclatura, fórmula estrutural e numeração dos compostos.

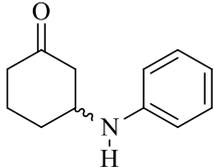
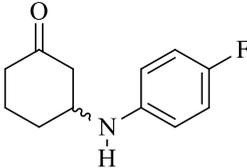
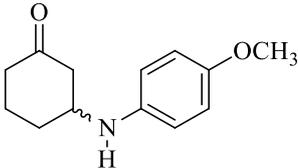
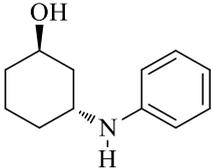
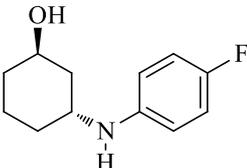
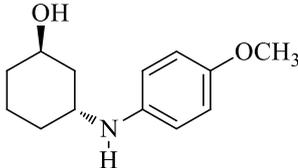
Composto	Estrutura	Nomenclatura
1a		3-fenilaminocicloexanona
1b		3-(4-fluorfenilamino)cicloexanona
1c		3-(4-metoxifenilamino)cicloexanona
2a		<i>trans</i> -3-fenilaminocicloexanol
2b		<i>trans</i> -3-(4-fluorfenilamino)cicloexanol
2c		<i>trans</i> -3-(4-metoxifenilamino)cicloexanol

Tabela 1. Nomenclatura, fórmula estrutural e numeração dos compostos (continuação).

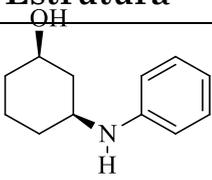
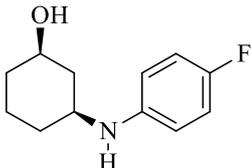
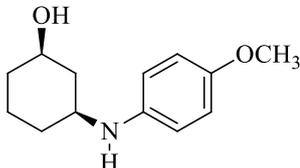
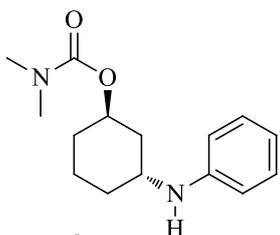
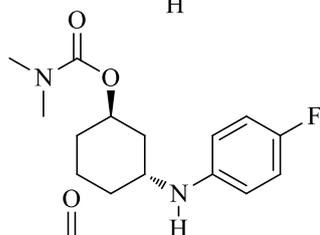
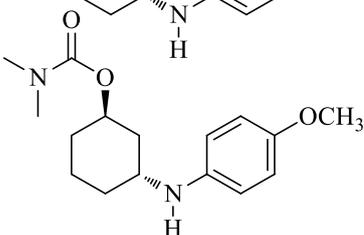
Composto	Estrutura	Nomenclatura
3a		<i>cis</i> -3-fenilaminocicloexanol
3b		<i>cis</i> -3-(4-fluorfenilamino)cicloexanol
3c		<i>cis</i> -3-(4-metoxifenilamino)cicloexanol
4a		<i>trans</i> - <i>N,N</i> -dimetilcarbamato de 3-fenilaminocicloexila
4b		<i>trans</i> - <i>N,N</i> -dimetilcarbamato de 3-(4-fluorfenilamino)cicloexila
4c		<i>trans</i> - <i>N,N</i> -dimetilcarbamato de 3-(4-metoxifenilamino)cicloexila

Tabela 1. Nomenclatura, fórmula estrutural e numeração dos compostos (continuação).

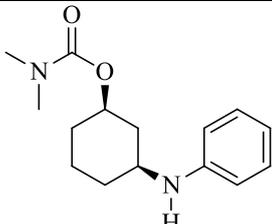
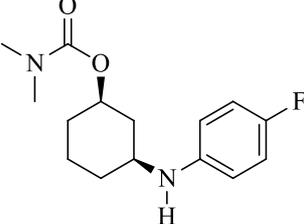
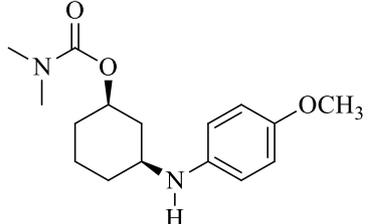
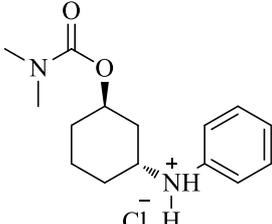
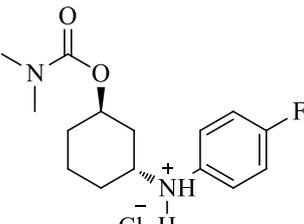
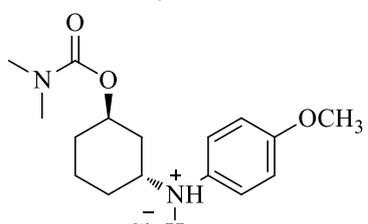
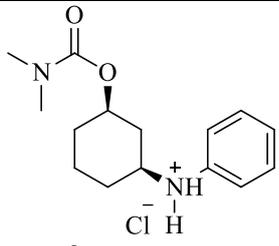
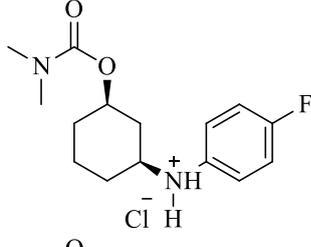
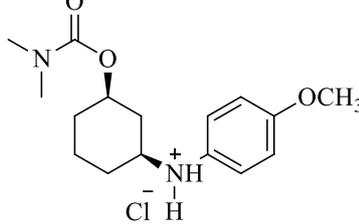
Composto	Estrutura	Nomenclatura
5a		<i>cis-N,N</i> -dimetilcarbamato de 3-fenilaminocicloexila
5b		<i>cis-N,N</i> -dimetilcarbamato de 3-(4-fluorofenilamino)cicloexila
5c		<i>cis-N,N</i> -dimetilcarbamato de 3-(4-metoxifenilamino)cicloexila
6a		Cloridrato de <i>trans-N,N</i> -dimetilcarbamato de 3-fenilaminocicloexila
6b		Cloridrato de <i>trans-N,N</i> -dimetilcarbamato de 3-(4-fluorofenilamino)cicloexila
6c		Cloridrato de <i>trans-N,N</i> -dimetilcarbamato de 3-(4-metoxifenilamino)cicloexila

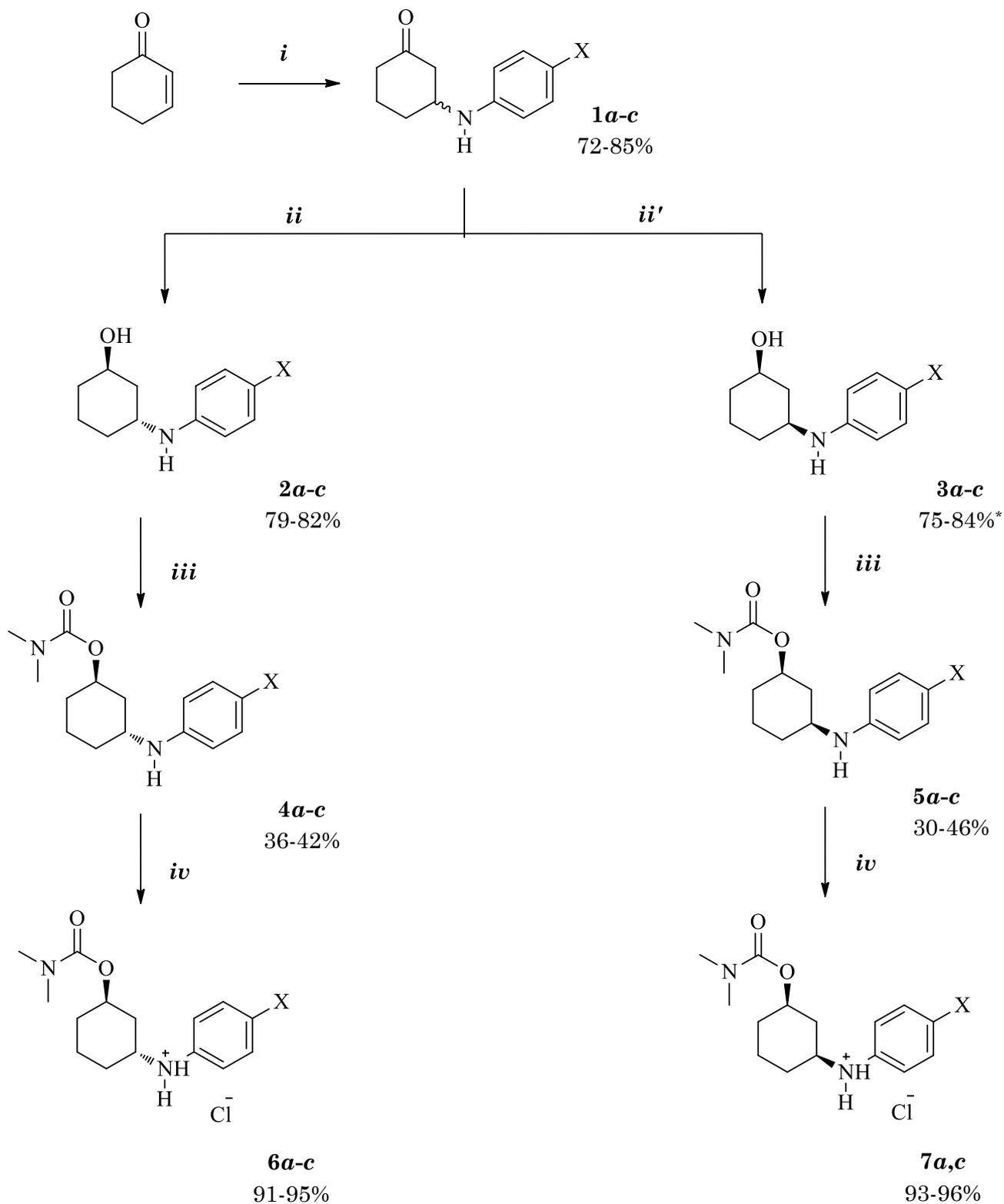
Tabela 1. Nomenclatura, fórmula estrutural e numeração dos compostos (continuação).

Composto	Estrutura	Nomenclatura
7a		Cloridrato de <i>cis</i> - <i>N,N</i> -dimetilcarbamato de 3-fenilaminocicloexila
7b		Cloridrato de <i>cis</i> - <i>N,N</i> -dimetilcarbamato de 3-(4-fluorfenilamino)cicloexila
7c		Cloridrato de <i>cis</i> - <i>N,N</i> -dimetilcarbamato de 3-(4-metoxifenilamino)cicloexila

3.1. Síntese dos Compostos

A obtenção dos compostos da série de isômeros *cis* e *trans*-*N,N*-dimetilcarbamatos de cicloexila 3-arilaminossustituídos foi realizada em três etapas partindo da cicloexa-2-nona como mostra o Esquema 1. A caracterização dos compostos foi realizada a partir da análise dos espectros de RMN de ^1H , ^{13}C e HSQC em anexo (Anexo 1 a 51).

Esquema 1. Rota sintética para obtenção dos *N,N*-dimetilcarbamatos de cicloexila 3-amilaminossustituídos.



Reagentes e condições: *i*) arilamina, [DBU][Ac], t.a., 5h; *ii*) *N*-selectride, THF, -80°C, 4h; *ii'*) NaBH₄, THF, t.a., 48h; *iii*) NaH/THF, 80°C, 8 h e cloreto de *N,N*-dimetilcarbamóia, 16h.; *iv*) HCl (37%), CH₂Cl₂. *Rendimentos obtido para a mistura de isômeros.

3.1.1. Síntese das 3-arilaminocicloexanonas (**1a-c**)

As 3-arilaminocicloexanonas foram obtidas a partir da adição aza-conjugada de Michael de aminas aromáticas a cicloexen-2-ona. Inicialmente algumas metodologias foram testadas utilizando diferentes condições e reagentes para catalisar ou promover a reação entre a cicloexen-2-ona e a anilina. (Tabela 2).

Diversos trabalhos relatam o uso de solventes próticos e de ácidos de Lewis, como sendo eficientes nas reações de aza-Michael.⁷⁸ Assim, inicialmente foi testada a utilização de água como solvente e cloreto férrico⁷⁹ em quantidade catalítica (0,1 eq) entretanto, observou-se que o produto desejado foi obtido em pequena quantidade (20%) juntamente com os reagentes de partida e não foi purificado (entrada 1). Dessa forma, houve a necessidade de buscar outras metodologias que fossem mais adequadas ao sistema proposto.

Recentemente, novos reagentes têm sido utilizados para promover a reação aza-conjugada de Michael.^{80,81} Dentro das propostas sintéticas encontradas, as que chamaram mais atenção consistiam na não utilização de solventes orgânicos, na redução de reagentes tóxicos e na redução de resíduos de acordo com os princípios da química verde.

Tabela 2. Condições reacionais empregadas para a obtenção da 3-fenilaminocicloexanona (**1a**).

Entrada	Catalisador	Solvente	Temperatura (°C)	Tempo	Rendimento (%)
1	Fe ₂ Cl ₃	Água	t.a.	15h	-
2	PEG400	-	t.a.	5h	27 ^a
3	PEG400	-	t.a.	24h	-
4	PEG400	-	50	24h	-
5	[DBU][Ac]	-	t.a.	5h	72 ^b

^a Purificação via coluna cromatográfica. ^b Purificação via recristalização.

A partir dessas pesquisas, foram testadas duas metodologias diferentes utilizando os seguintes reagentes: o polímero polietilenoglicol (PEG400)⁸² e o líquido iônico básico acetato de 1,8-diazabicyclo[5.4.0]undec-7-eno ([DBU][Ac]).^{83,84} A aplicação da metodologia descrita por Kumar e col. utilizando PEG, durante cinco horas a temperatura ambiente (entrada 2) forneceu o produto desejado, juntamente com o reagente de partida na proporção de 1:1. Desta forma, foram testadas outras condições, aumentando a temperatura e o tempo reacional na tentativa de aumentar a conversão do reagente em produto. No entanto, nenhuma melhora significativa foi alcançada (entrada 3 e 4).

O melhor resultado foi obtido na entrada 5, quando utilizou-se o líquido iônico básico [DBU][Ac] na ausência de solvente, conforme proposto por Ying e col. Os autores mostraram que mesmo tendo uma menor basicidade, o [DBU][Ac] apresenta uma melhor capacidade catalítica do que o DBU. Eles acreditam que o líquido iônico é capaz de aumentar a basicidade das aminas, o que não acontece em solventes orgânicos.

A purificação das 3-arilaminocicloexanonas (**1a-c**) foi realizada por recristalização, utilizando hexano e acetato de etila, obtendo-se um rendimento médio de 80% (Tabela 3). As principais vantagens de utilizar essa metodologia foram: facilidade de purificação do produto, bons rendimentos e a possibilidade de reutilização do líquido iônico.

Tabela 3. Rendimento reacional, aspecto físico e ponto de fusão das 3-arilaminocicloexanonas (**1a-c**).

Composto	Rendimento (%)	Aspecto físico	Ponto de fusão* (°C)
1a	72	sólido branco amorfo	58,4 – 58,6
1b	80	sólido marrom amorfo	71,2 – 73,5
1c	85	sólido branco amorfo	75,5 – 75,9

*Foi utilizado o ácido benzoico como padrão (p.f. 121,4 – 123,0 °C)

A caracterização das 3-arilaminocicloexanonas (**1a-c**) foi realizada a partir da análise dos espectros de RMN de ^1H , ^{13}C e HSQC, anexados no final deste trabalho (Anexo 1 a 9). Na Tabela 4 estão compilados os dados de deslocamento químico de ^1H e ^{13}C e os valores de constantes de acoplamento para estes compostos

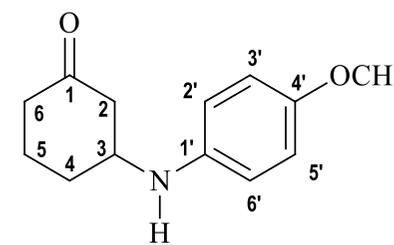
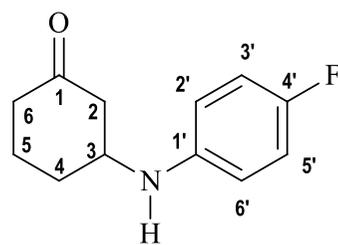
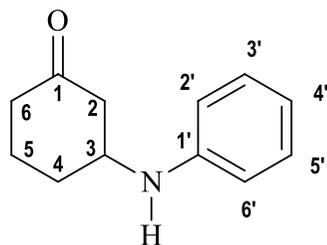
As 3-arilaminocicloexanonas (**1a-c**) apresentaram deslocamentos químicos e acoplamentos semelhantes, exceto na região dos hidrogênios aromáticos, devido à presença dos grupos substituintes. Destaca-se a presença do sinal do H_3 entre δ_{H} 3,68 a 3,79, sendo este o mais desblindado devido ao efeito indutivo retirador de elétrons do grupo amino. Observa-se também o sinal do $\text{H}_{2\text{eq}}$ na região de δ_{H} 2,78 a 2,84, sendo este mais desblindado que o sinal do $\text{H}_{2\text{ax}}$ que apresentou deslocamento químico entre δ_{H} 2,25 a 2,29. Os sinais dos hidrogênios do anel aromático podem ser observados na região de δ_{H} 6,51 a 7,18. Nos espectros de RMN de ^{13}C destaca-se a presença da carbonila (C_1) entre δ_{C} 209,7 e 209,9, o sinal de C_3 na região de δ_{C} 52,5 a 53,4 e o sinal de C_2 em torno de δ_{C} 48,5. Os carbonos do anel aromático são observados na região de δ_{C} 113,5 a 156,0.

Para o derivado da anilina (**1a**) pode-se observar no espectro de RMN de ^1H (Anexo) os cinco hidrogênios do sistema aromático em δ_{H} 6,59 (m, 2H H_2/H_6), δ_{H} 6,72 (m, 1H, H_4) e δ_{H} 7,18 (m, 2H H_3/H_5), os quais foram correlacionados, respectivamente, com os carbonos em δ_{C} 113,5 (C_2/C_6), 118,1 (C_4) e 129,6 (C_3/C_5) através do mapa de contorno HSQC (Anexo 3). O carbono que não apresenta correlação com nenhum hidrogênio encontra-se em δ_{C} 146,4 (C_1).

Analisando os espectros de RMN de ^1H e de ^{13}C juntamente com o mapa de contorno HSQC (Anexo 4 a 9) para os derivados *para*-substituídos (**1b** e **1c**) pode-se observar sinais de quatro hidrogênios do sistema aromático. Para o derivado da *p*-metoxianilina (**1c**) é observado dois dupletos em δ_{H} 6,57 (2H, H_2/H_6) e 6,76 (d, 2H, H_3/H_5) que apresentam correlação com os carbonos em δ_{C} 115,0 (C_2/C_6) e 115,2 (C_3/C_5). Os sinais dos dois carbonos sem correlação com hidrogênios estão em δ_{C} 152,0 (C_4) e 140,2 (C_1) sendo o que apresenta o maior deslocamento químico é o carbono ligado ao grupo metoxila. Outro sinal importante que pode ser observado no espectro de RMN de ^1H para este derivado é o simpleto em δ_{H} 3,73 correspondentes ao grupo metoxila, que está sobreposto com o sinal de $\text{H}_{2\text{ax}}$.

No espectro de RMN de ^1H do derivado da *p*-fluoranilina (**1b**) (Anexo 4) pode-se observar dois multipletos, em δ_{H} 6,51 (m, 2H, H_2/H_6) e 6,87 (m, 2H, H_3/H_5) que correspondem aos hidrogênios do sistema aromático. Outra característica marcante de compostos com flúor são os acoplamentos entre o átomo de carbono e o átomo de flúor que podem ser observados no espectro de RMN de ^{13}C (Anexo 5). Os sinais correspondentes aos carbonos do anel aromático estão presentes como dupletos em δ_{C} 114,5 (C_2/C_6 ; $J_{\text{C-F}} = 7,33$ Hz), 115,9 (C_3/C_5 ; $J_{\text{C-F}} = 22,3$ Hz), 142,7 (C_1 ; $J_{\text{C-F}} = 1,9$ Hz) e 156,0 (C_4 ; $J_{\text{C-F}} = 235,6$ Hz).

Tabela 4. Deslocamento químicos de RMN de ^1H e ^{13}C (ppm), constantes de acoplamento (Hz) e multiplicidade dos sinais para as 3-arilaminociclohexanonas (**1a-c**) em CDCl_3 .



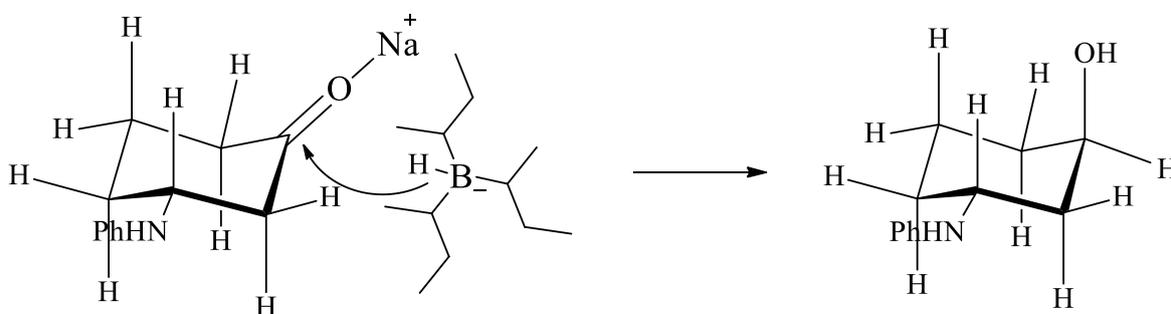
C/H	1a			1b				1c		
	$\delta^1\text{H}$	J (Hz)	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^1\text{H}$	J (Hz)	$\delta^{13}\text{C}$	J (Hz)	$\delta^1\text{H}$	J (Hz)	$\delta^{13}\text{C}$
1	-	-	209,8	-	-	209,7		-	-	209,9
2 ax	2,29	m	48,8	2,25	m	48,5		2,25	m	48,7
eq	2,84	m		2,79	m			2,78	m	
3	3,79	dddd (8,2; 8,2; 3,9; 3,9)	52,5	3,69	dddd (8,6; 8,6; 4,4; 4,4)	53,0		3,68	m	53,4
4 ax	1,70	m	31,3	1,67	m	31,1		1,66	m	31,2
eq	2,18	m		2,16	m			2,14	m	
5 ax	1,75	m	22,3	1,70	m	22,2		1,68	m	22,2
eq	2,05	m		2,02	m			2,02	m	
6 ax	2,36	m	41,3	2,36	m	41,2		2,34	m	41,2
eq	2,36	m		2,36	m			2,34	m	
1'	-	m	146,4	-	-	142,7	d (1,9)	-	m	140,2
2'	6,59	m	113,5	6,51	m	114,5	d (7,3)	6,57	d (9,9)	115,0
3'	7,18	m	129,6	6,87	m	115,9	d (22,3)	6,76	d (9,9)	115,2
4'	6,72	m	118,1	-	-	156,0	d (235,6)	-	-	152,0
5'	7,18	m	129,6	6,87	m	115,9	d (22,3)	6,76	d (9,9)	115,2
6'	6,59	m	113,5	6,51	m	114,5	d (7,3)	6,57	d (9,9)	115,0
NH	3,59	sl	-	3,53	sl	-	-	3,35	sl	-
OCH_3	-	-	-	-	-	-	-	3,73	sl	56,0

3.1.2. Síntese dos *trans*-3-arilaminocicloexanois (**2a-c**)

Para a obtenção dos *trans*-3-arilaminocicloexanois (**2a-c**) foi realizada a redução das 3-arilaminocicloexanonas (**1a-c**) com o redutor *N*-selectride⁸⁵ a baixa temperatura (-80°C) para o controle cinético da reação. Esta metodologia apresentou uma alta diastereoseletividade (~100%) que permitiu a obtenção de apenas um dos isômeros.

O mecanismo para a redução de derivados da cicloexanona com os trialquilboranos é bastante conhecido (Figura 23)⁸⁶. O metal se complexa ao oxigênio da carbonila e como o redutor é volumoso a transferência de hidreto se dá por ataque na direção equatorial, que é estericamente menos impedida. Assim, ocorre a formação do álcool *trans*, o estereoisômero menos estável. Os *trans*-3-arilaminocicloexanois (**2a-c**) foram purificados por recristalização, obtendo-se um rendimento médio de 81 % (Tabela 5).

Figura 23. Mecanismo de redução das 3-arilaminocicloexanonas com *N*-selectride.



A caracterização dos compostos foi realizada a partir da análise dos espectros de RMN de ¹H, ¹³C e HSQC (Anexos 10 a 18). Na Tabela 6 estão compilados os dados de deslocamento químico de ¹H e ¹³C e valores de constantes de acoplamento para estes compostos. Destaca-se a presença de **H**₁, na região de δ_H 4,13 a 4,17, assim como a ausência do sinal da carbonila na região de δ_c 210 e conseqüentemente o aparecimento de um sinal em torno de δ_c 67,0 a 67,3 correspondente a **C**₁.

3.1.3. Síntese dos *cis*-3-arilaminocicloexanois (**3a-c**)

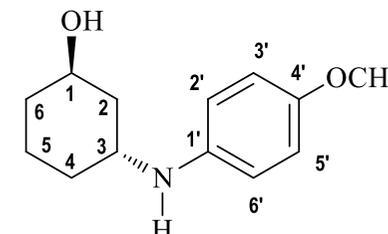
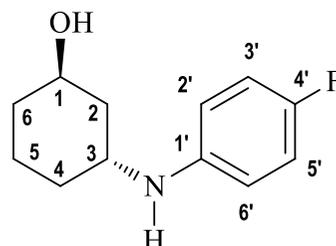
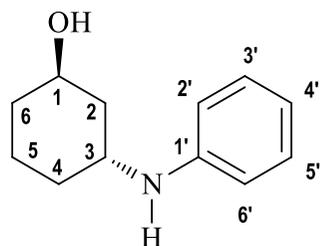
Com o objetivo de obter o estereoisomero *cis*, utilizou-se o borohidreto de sódio⁸⁷ (NaBH₄) como agente redutor. Hidretos poucos volumosos, como o NaBH₄ e o hidreto de lítio alumínio (LiAlH₄), preferem ataques axiais, gerando álcoois equatoriais com diastereoseletividade entre 72 a 96 %. A análise dos espectros de RMN de ¹H e de ¹³C e do mapa de contorno HSQC, mostrou que os álcoois (**3a-c**) foram obtidos como uma mistura dos isômeros *cis* e *trans*, na proporção de 75:25 respectivamente (Anexo 19 a 23). Esta proporção foi calculada através da integração dos sinais de cada isômero no espectro de RMN de ¹H (Anexos 19 a 21). Devido a inviabilidade de separação dos isômeros, os *cis*-3-arilaminocicloexanois (**3a-c**) não foram isolados, utilizando-se a mistura de isômeros na etapa seguinte. A Tabela 5 mostra os rendimentos reacionais para a obtenção dos *trans*-3-arilaminocicloexanois (**2a-c**) e *cis*-3-arilaminocicloexanois (**3a-c**).

Tabela 5. Rendimento reacional, aspecto físico e ponto de fusão dos *trans*-3-arilaminocicloexanois (**2a-c**) e *cis*-3-arilaminocicloexanois (**3a-c**).

Composto	Rendimento (%)	Aspecto físico	Ponto de fusão* (°C)
2a	72	sólido branco amorfo	58,4 – 58,6
2b	80	sólido marrom amorfo	71,2 – 73,5
2c	85	sólido branco amorfo	75,5 – 75,9
3a	84	líquido marrom	-
3b	75	líquido marrom	-
3c	80	líquido marrom	-

*Foi utilizado o ácido benzoico como padrão (p.f. 121,4 – 123,0 °C)

Tabela 6. Deslocamentos químicos de RMN de ^1H e ^{13}C (ppm) , constantes de acoplamento (Hz) e multiplicidade dos sinais para os *trans*-3-amilaminociclohexanois (**2a-c**) em CDCl_3 .



C/H	2a			2b				2c		
	$\delta^1\text{H}$	J (Hz)	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^1\text{H}$	J (Hz)	$\delta^{13}\text{C}$	J (Hz)	$\delta^1\text{H}$	J (Hz)	$\delta^{13}\text{C}$
1	4,15	m	67,3	4,17	m	67,0		4,13	m	67,2
2 ax	1,56	m	40,0	1,54	m	39,8		1,53	m	40,1
eq	1,99	m		2,00	m			1,97	m	
3	3,76	dddd (9,0; 9,0; 3,8; 3,8)	47,5	3,70	dddd (9,1; 9,1; 3,8; 3,8)	48,0		3,66	dddd (8,9; 8,9; 3,9; 3,9)	48,5
4 ax	1,27	m	32,4	1,29	m	32,3		1,25	m	32,5
eq	1,97	m		1,99	m			1,94	m	
5 ax	1,61	m	19,6	1,61	m	19,4		1,60	m	19,6
eq	1,80	m		1,79	m			1,76	m	
6 ax	1,62	m	33,5	1,64	m	33,2		1,62	m	33,5
eq	1,62	m		1,64	m			1,62	m	
1'	-	m	147,4	-	-	141,5	d (1,9)	-	m	141,5
2'	6,01	m	113,4	6,57	m	115,0	d (7,3)	6,59	d (9,9)	115,0
3'	7,16	m	129,5	6,87	m	115,1	d (22,3)	6,77	d (9,9)	115,1
4'	6,67	m	117,3	-	-	152,2	d (235,6)	-	-	152,2
5'	7,16	m	129,5	6,87	m	115,1	d (22,3)	6,77	d (9,9)	115,1
6'	6,01	m	113,4	6,57	m	115,0	d (7,3)	6,59	d (9,9)	115,0
NH	-	-	-	-	sl	-	-	-	-	-
OCH ₃	-	-	-	-	-	-	-	3,74	sl	56,0

3.1.4. Síntese dos *trans* e *cis*-*N,N*-dimetilcarbamatos de cicloexila 3-arilaminossustituídos (**4a-c**; **5a-c**)

Para a obtenção do carbamato *trans*-*N,N*-dimetilcarbamato de 3-fenilaminocicloexila (**4a**), inicialmente foram testadas algumas metodologias descritas na literatura (Tabela 7). A melhor condição obtida para o derivado **4a** encontra-se na entrada 3, onde utilizou-se o arilaminoálcool **3a** e hidreto de sódio⁴⁰ (NaH) para a preparação do correspondente alcóxido de modo a aumentar a reatividade frente ao cloreto de *N,N*-dimetilcarbamoila. Esta reação segue o mecanismo de substituição nucleofílica acíclica, onde o par de elétrons do oxigênio do alcóxido ataca o carbono carbonílico e elimina íons cloretos. Para que o produto seja obtido com sucesso, o meio reacional deve estar anidro, pois a água pode reagir com o hidreto de sódio utilizado na primeira parte da reação, competindo com a formação do alcóxido, como também pode hidrolisar o cloreto de *N,N*-dimetilcarbamoila formando o ácido carbâmico o qual não é estável e se decompõe em água e gás carbônico.⁸⁸

A metodologia (entrada 3, Tabela 7) foi aplicada para a obtenção dos demais carbamatos (**4b** e **4c** e **5a-c**)

Tabela 7. Condições reacionais para a obtenção do carbamato **4a**.

Entrada	Reagente/solvente	Temperatura	Tempo	Rendimento (%)
1	Piridina (1eq)/THF	refluxo	24h	- ^a
2	Piridina	80 °C	24h	- ^a
3	NaH/THF	refluxo	24h	36

^a Composto obtido com baixo rendimento e não purificado.

A purificação dos carbamatos (**4a-c**) e (**5a-c**) foi feita por eluição em coluna cromatográfica, utilizando hexano – acetato de etila em gradiente crescente de polaridade. Mesmo após inúmeras tentativas de separação, o *cis*-*N,N*-dimetilcarbamato de 3-fenilaminocicloexila (**5b**) foi obtido em mistura com o isômero *trans* (**4b**). Na Tabela 8 estão apresentados os rendimentos reacionais e as características dos compostos.

Tabela 8. Rendimento reacional, aspecto físico e ponto de fusão dos carbamatos (**4a-c**) e (**5a-c**).

Composto	Rendimento (%)	Aspecto físico	Ponto de fusão ^a (°C)
4a	36	líquido amarelo	-
4b	42	líquido marrom	-
4c	40	líquido marrom	-
5a	46	sólido cristalino	101,2 – 101,5
5b	30 ^b	líquido marrom	-
5c	42	líquido marrom	-

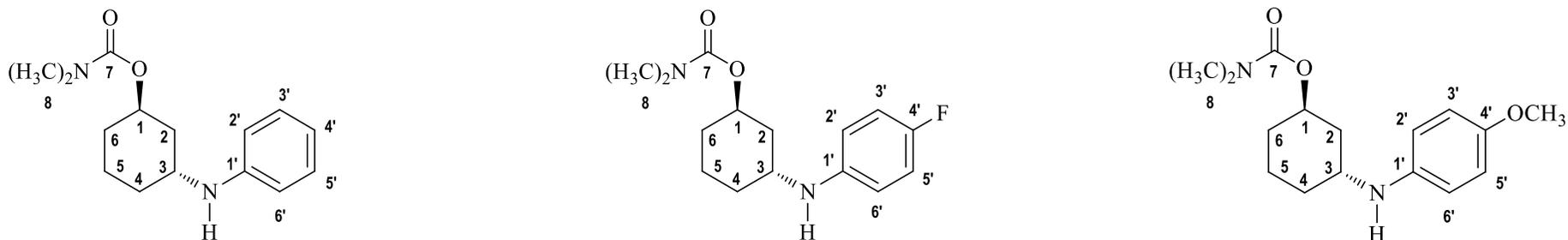
^a Foi utilizado o ácido benzoico como padrão (p.f. 121,4 – 123,0 °C) ^b Mistura de isômeros *cis* e *trans*.

A caracterização dos carbamatos (**4a-c**) e (**5a-c**) foi realizada a partir da análise dos espectros de RMN de ¹H, ¹³C e HSQC, anexados no final deste trabalho (Anexos 22 a 36). Nas Tabela 9 e 10 estão compilados os dados de deslocamento químico de ¹H e ¹³C e valores de constantes de acoplamento para estes compostos.

Os *trans*-*N,N*-dimetilcarbamato de cicloexila 3-amilaminossustituídos (**4a-c**) foram caracterizados pela desblindagem de **H**₁ δ_H (5,07 a 5,09) causada pela incorporação do grupo carbamato. A presença do grupo carbamato também pôde ser confirmada pelo sinal dos hidrogênios metílicos na região de δ_H 2,94 a 2,95 (s, 6H). Assim como para **H**₁, é possível observar no espectro de RMN de ¹³C a desblindagem do carbono **C**₁ que cai em torno de δ_c 71,0. Além disso, observa-se o aparecimento de um sinal de carbonila característico do grupo carbamato na região de δ_c 156,0 a 157,3. Através do mapa de contorno HSQC é possível correlacionar os hidrogênios metílicos com o carbono **C**₈ em δ_c 36,3.

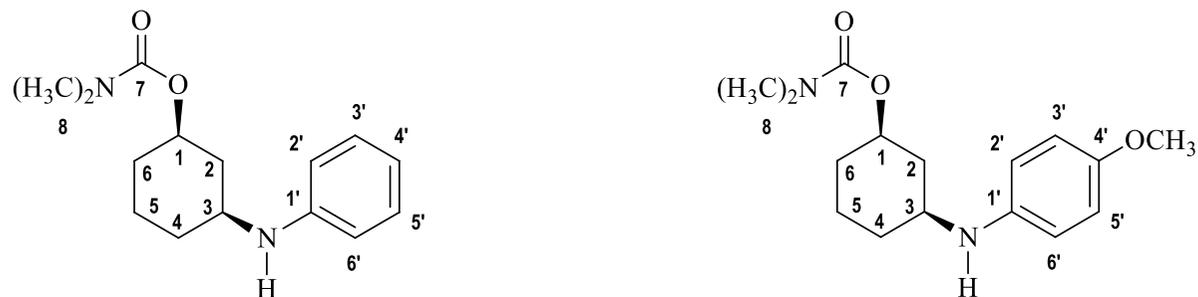
No espectro de RMN de ¹H dos *cis*-*N,N*-dimetilcarbamatos de cicloexila 3-amilaminossustituídos (**5a** e **5c**) observa-se os sinais de **H**₁ em δ_H 4,71 a 4,74 e **H**₃ em δ_H 3,30 a 3,41. A presença do grupo carbamato pôde ser confirmada pelo sinal dos hidrogênios metílicos em δ_H 2,89 a 2,90 (s, 6H). No espectro de RMN de ¹³C observa-se a presença de **C**₁ em torno de δ_c 71,0 a 72,3 e o sinal da carbonila característico do grupo carbamato na região de δ_c 155 a 156.

Tabela 9. Deslocamentos químicos de RMN de ^1H e ^{13}C (ppm), constantes de acoplamento (Hz) e multiplicidade dos sinais para os *trans*-*N,N*-dimetilcarbamatos de cicloexila 3-arylaminossustituídos (**4a-c**) em CDCl_3 .



	4a			4b				4c		
C/H	$\delta^1\text{H}$	J (Hz)	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^1\text{H}$	J (Hz)	$\delta^{13}\text{C}$	J (Hz)	$\delta^1\text{H}$	J (Hz)	$\delta^{13}\text{C}$
1	5,09	m	70,8	5,07	m	70,9		5,08	m	71,0
2 ax	1,41	m	37,5	1,43	m	39,5		1,43	m	37,8
eq	2,18	m		2,18	m			2,17	m	
3	3,63	dddd (10,1; 10,1; 3,8; 3,8)	47,9	3,54	dddd (10,0; 10,0; 3,8; 3,8)	48,7		3,54	dddd (10,0; 10,0; 3,8; 3,8)	49,0
4 ax	1,55	m	30,2	1,53	m	30,3		1,53	m	30,4
eq	1,80	m		1,81	m			1,79	m	
5 ax	1,68	m	20,0	1,66	m	20,2		1,67	m	20,2
eq	1,68	m		1,66	m			1,67	m	
6 ax	1,24	m	32,5	1,22	m	32,5		1,21	m	32,7
eq	2,04	m		2,03	m			2,06	m	
1'	-	m	147,4	-	-	143,6	d (1,9)	-	m	141,5
2'	6,58	M	113,0	6,50	m	114,1	d (7,3)	6,55		114,8
3'	7,16	M	129,5	6,86	m	116,0	d (22,3)	6,77	d (9,9)	115,2
4'	6,67	M	117,3	-	-	155,2	d (235,6)	-	-	152,2
5'	7,16	M	129,5	6,86	m	116,0	d (22,3)	6,77	d (9,9)	115,2
6'	6,58	M	113,0	6,50	m	114,1	d (7,3)	6,55	d (9,9)	114,8
7	-	-	156,0	-	-	157,3		-	-	157,3
8	2,95	S	36,3	2,94	s	36,3		2,94	s	36,3
NH	3,51	Sl	-	-	sl	-		-	-	-
OCH ₃	-	-	-	-	-	-		3,74	s	56,0

Tabela 10. Deslocamentos químicos de RMN de ^1H e ^{13}C (ppm), constantes de acoplamento (Hz) e multiplicidade dos sinais para os *cis*-*N,N*-dimetilcarbamatos de cicloexila 3-arilaminossustituídos (**5a** e **5c**) em CDCl_3 .



C/H	5a			5c		
	$\delta^1\text{H}$	J (Hz)	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^1\text{H}$	J (Hz)	$\delta^{13}\text{C}$
1	4,74	dddd (10,1; 10,1; 4,1; 4,1)	72,3	4,73	dddd (10,1; 10,1; 4,1; 4,1)	72,6
2 ax	1,25	m	38,8	1,23	m	39,6
eq	2,41	m		2,41	m	
3	3,41	dddd (10,5; 10,5; 3,8; 3,8)	50,4	3,32	dddd (10,5; 10,5; 3,8; 3,8)	51,8
4 ax	1,33	m	31,9	1,11	m	32,2
eq	2,02	m		2,03	m	
5 ax	1,36	m	21,4	1,38	m	21,8
eq	1,82	m		1,86	m	
6 ax	1,15	m	32,5	1,33	m	32,8
eq	2,02	m		2,03	m	
1'	-	m	147,1	-	m	141,5
2'	6,59	m	113,4	6,59	d (5,0)	115,3
3'	7,17	m	129,5	6,78	d (5,0)	115,2
4'	6,68	m	117,4	-	-	152,6
5'	7,17	m	129,5	6,78	d (5,0)	115,2
6'	6,59	m	113,4	6,59	d (5,0)	115,3
7	-	-	156,2	-	-	156,5
8	2,90	s	37,6	2,91	sl	35,9
NH	3,60	sl	-	-	-	-
OCH_3	-	-	-	3,76	s	56,2

3.1.5. Síntese dos cloridratos de *trans* e *cis*-*N,N*-dimetilcarbamatos de cicloexila 3-arilaminossustituídos (**6a-c**; **7a** e **7c**)

Para avaliar a atividade anticolinesterásica dos carbamatos, houve a necessidade de preparar os respectivos cloridratos de *N,N*-dimetilcarbamatos de 3-arilaminocicloexila (**6a-c**; **7a** e **7c**), de forma a aumentar a solubilidade em água. Os cloridratos foram obtidos com ótimos rendimentos (acima de 90%), sem a necessidade de purificação. É importante ressaltar que não foi preparado o cloridrato do composto **5b**, pois o mesmo não foi obtido puro (Tabela 11).

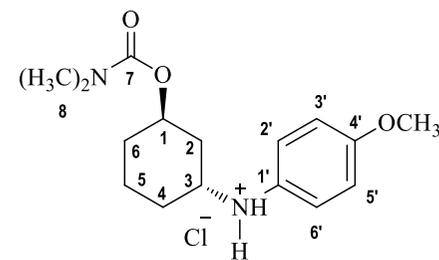
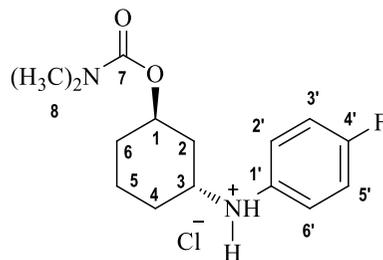
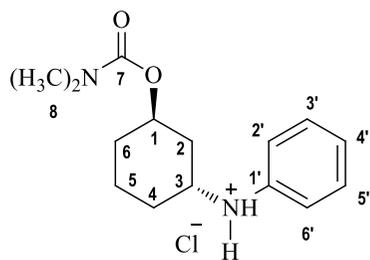
Tabela 11. Rendimento reacional, aspecto físico e ponto de fusão dos cloridratos (**6a-c**; **7a** e **7c**)

Composto*	Rendimento (%)	Aspecto físico
6a	91	sólido amarelo amorfo
6b	95	sólido verde amorfo
6c	92	sólido marrom amorfo
7a	96	sólido branco
7c	93	sólido marrom amorfo

*Não foi possível medir o ponto de fusão pois os compostos são muito higroscópicos.

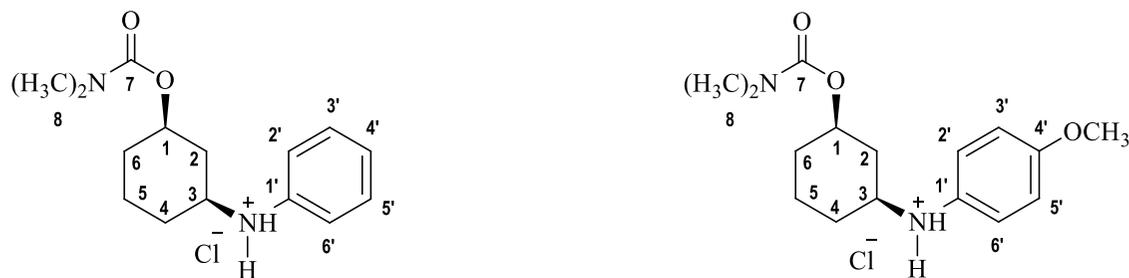
A obtenção dos cloridratos pode ser comprovada através dos espectros de RMN de ^1H e ^{13}C (Anexos 37 a 51). Nas Tabelas 12 e 13 estão compilados os dados de deslocamento químico de ^1H e ^{13}C e valores de constante de acoplamento. Destaca-se para estes compostos a desblindagem dos hidrogênios aromáticos e o aparecimento de um simpleto alargado em torno de δ_{H} 11,2 a 11,3 correspondente ao hidrogênio ácido. Para o composto neutro **5a** os hidrogênios do sistema aromático encontravam-se em δ_{H} 6,58 (m, 2H, H2'/H6'), 6,67 (m, 1H, H4') e 7,16 (m, 2H, H3'/H5'), já para o composto protonado estes hidrogênios podem ser observados em δ_{H} 7,55 (m, 3H, H2'/H4'/H6') e 7,39 (m, 2H, H3'/H5'). Os hidrogênios nas posições *orto* e *para* apresentam maior deslocamento químico devido à protonação do nitrogênio. Além disso, é possível observar a desblindagem de C_3 para os cloridratos em relação aos compostos neutros.

Tabela 12. Deslocamento químicos de RMN de ^1H e ^{13}C (ppm), constantes de acoplamento (Hz) e multiplicidade dos sinais para os cloridratos de *trans*-*N,N*-dimetilcarbamatos de cicloexila 3-arilaminossustituídos (**6a-c**) em CDCl_3 .



C/H	6^a			6^b				6^c		
	$\delta^1\text{H}$	J (Hz)	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^1\text{H}$	J (Hz)	$\delta^{13}\text{C}$	J (Hz)	$\delta^1\text{H}$	J (Hz)	$\delta^{13}\text{C}$
1	5,02	M	69,5	5,07	m	69,3		5,05	m	71,2
2 ax	1,83	M	33,2	1,83	m	33,1		1,81	m	36,4
eq	2,20	M		2,22	m			2,20	m	
3	3,52	M	58,9	3,48	m	59,3		3,46	m	55,5
4 ax	1,55	M	28,7	1,72	m	28,6		1,72	m	28,6
eq	1,79	M		2,23	m			2,26	m	
5 ax	1,59	M	19,3	1,54	m	19,3		1,61	m	21,1
eq	1,59	M		1,63	m			1,61	m	
6 ax	1,79	M	29,0	1,39	m	29,0		1,25	m	28,0
eq	2,21	M		2,21	m			1,83	m	
1'	-	M	133,8	-	m	129,5	d (1,9)	-	m	127,6
2'	7,39	M	130,0	7,09	m	117,1	d (7,3)	6,86	d (9,9)	114,9
3'	7,55	M	124,3	7,56	m	126,4	d (22,3)	7,47	d (9,9)	124,6
4'	7,39	M	129,4	-	m	162,8	d (235,6)	-	-	155,6
5'	7,55	M	124,3	7,56	m	126,4	d (22,3)	7,47	d (9,9)	114,6
6'	7,39	M	130,0	7,09	m	117,1	d (7,3)	6,86	d (9,9)	124,6
7	-	-	155,5	-	-	155,4		-	-	159,3
8	2,83	S	36,3	2,85	s	36,3		2,85	s	36,3
NH	11,3	Sl	-	11,3	sl	-	-	11,2	sl	-
OCH ₃	-	-	-	-	-	-	-	3,80	s	59,9

Tabela 13. Deslocamento químicos de RMN de ^1H e ^{13}C (ppm), constantes de acoplamento e multiplicidade dos sinais para os cloridratos de *cis*-*N,N*-dimetilcarbamatos de cicloexila 3-amilaminossustituídos (**7a** e **7c**) em CDCl_3 .



C/H	7a			7c		
	$\delta^1\text{H}$	J (Hz)	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^1\text{H}$	J (Hz)	$\delta^{13}\text{C}$
1	4,47	m	71,3	4,49	m	70,2
2 ax	1,75	m	40,6	1,71	m	33,6
eq	2,27	m		2,30	m	
3	3,29	m	60,5	3,22	m	54,5
4 ax	1,25	m	28,6	1,55	m	27,6
eq	2,23	m		2,26	m	
5 ax	1,23	m	21,7	1,26	m	20,1
eq	1,75	m		1,78	m	
6 ax	1,91	m	31,2	1,27	m	30,1
eq	1,91	m		1,96	m	
1'	-	m	134,0	-	m	125,9
2'	7,39	m	130,0	6,84	d (9,9)	123,6
3'	7,55	m	124,1	7,42	d (9,9)	113,9
4'	7,39	m	129,2	-	-	154,6
5'	7,55	m	124,1	7,42	d (9,9)	113,9
6'	7,39	m	130,0	6,84	d (9,9)	123,6
7	-	-	155,7	-	-	158,3
8	2,84	s	36,4	2,84	sl	35,3
NH	11,3	sl	-	-	-	-
OCH ₃	-	-	-	3,79	s	58,8

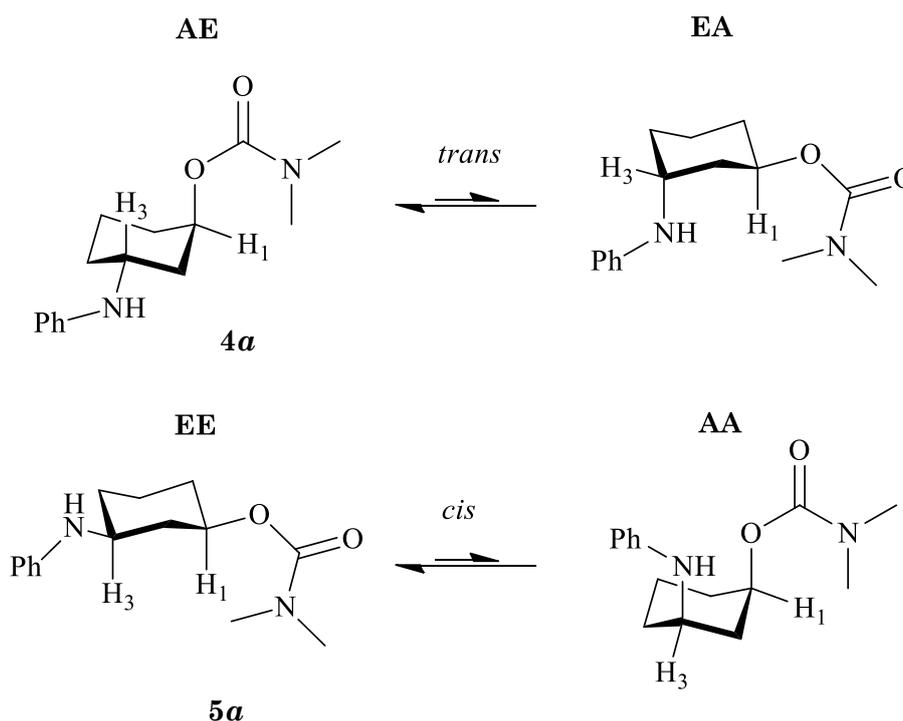
3.2. Análise conformacional para os *trans*-*N,N*-dimetilcarbamatos de cicloexila 3-amilaminossustituídos (**4a-c**) e *cis*-*N,N*-dimetilcarbamatos de cicloexila 3-amilaminossustituídos (**5a-c**).

3.2.1. Experimentos de RMN

Devido a similaridade dos dados, a discussão será feita apenas para os derivados *trans*-*N,N*-dimetilcarbamato de 3-fenilaminocicloexila (**4a**) (Anexos 22 a 24) e *cis*-*N,N*-dimetilcarbamato de 3-fenilaminocicloexila (**5a**) (Anexos 31 a 33) e pode ser estendida para os demais compostos de cada série.

Tendo em vista que cada carbamato nas séries *cis* e *trans* existem em equilíbrio entre confôrmeros (Figura 24) e que o valor de $W_{1/2}$ (largura do sinal a meia altura) observado a temperatura ambiente é uma média ponderada das respectivas constantes de acoplamento em cada confôrmero, pode-se determinar quais são os confôrmeros majoritários em cada uma das séries de isômeros (Figura 25).

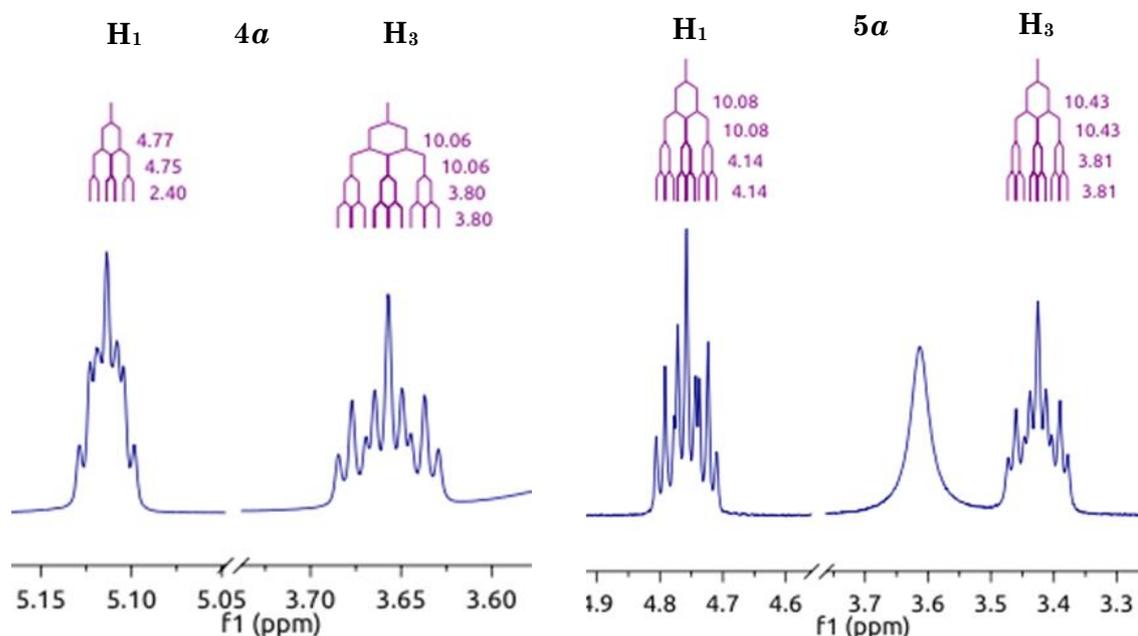
Figura 24. Equilíbrio conformacional dos isômeros *trans*-*N,N*-dimetilcarbamato de 3-fenilaminocicloexila (**4a**) e *cis*-*N,N*-dimetilcarbamato de 3-fenilaminocicloexila (**5a**).



Para os carbamatos da série *trans* (**4a-c**), **H**₁ apresenta valores de $W_{1/2}$ entre 15,4 a 16,0 Hz e constantes de acoplamento ${}^3J_{\text{H-H}}$ menores que 5,0 Hz, o que indica que o confôrmero dominante é aquele em que este hidrogênio encontra-se na posição equatorial e o grupo carbamato na posição axial. Para **H**₃ os valores de $W_{1/2}$ estão em torno de 25 Hz e este hidrogênio possui valores de ${}^3J_{\text{H-H}}$ maiores que 9,0 Hz, indicando que pelos menos um dos acoplamentos deve ser entre hidrogênios axiais, mostrando que o confôrmero **AE** apresenta maior contribuição no equilíbrio.

Para os carbamatos da série *cis* (**5a-c**), tanto **H**₁ quanto **H**₃ apresentam valores de $W_{1/2}$ em torno de 25 Hz, dois valores de ${}^3J_{\text{H-H}}$ maiores que 9,0 Hz e dois valores de ${}^3J_{\text{H-H}}$ menores que 5,0 Hz, o que sugere a presença de acoplamentos diaxiais e indica a preferência pelo confôrmero **EE**.

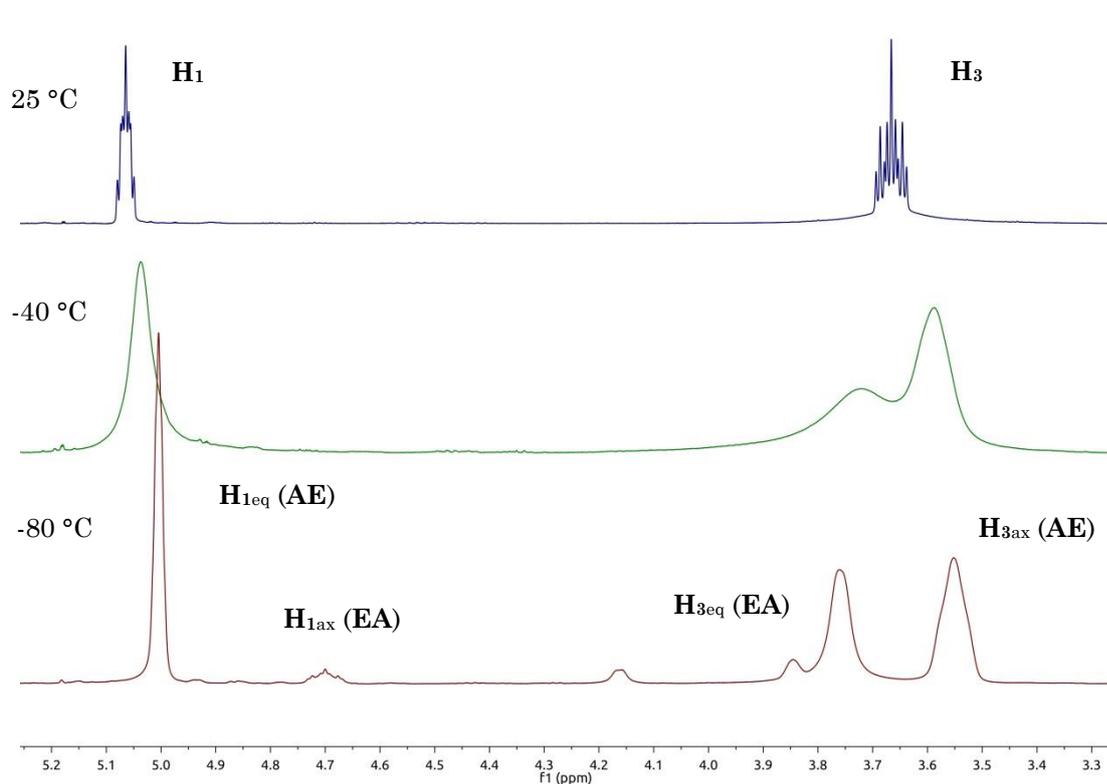
Figura 25. Expansão dos sinais de **H**₁ e **H**₃ dos compostos **4a** e **5a** em CDCl₃ a temperatura ambiente.



Para confirmar esses dados e determinar a proporção de cada confôrmero no equilíbrio conformacional, foram realizados experimentos de RMN a baixa temperatura em diferentes solventes (CD₂Cl₂, acetona-*d*₆ e metanol-*d*₄). Esses experimentos foram realizados apenas para um composto de cada série (**4a** e **5a**), pois analisando os espectros de RMN de ¹H à temperatura ambiente de seus

respectivos derivados, mostra que tanto os valores de $W_{1/2}$ e ${}^3J_{H-H}$ são semelhantes, sendo assim, podemos dizer que os substituintes do anel aromático não devem influenciar significativamente o equilíbrio conformacional. A Figura 26 mostra a expansão do RMN de 1H em diferentes temperaturas para os sinais de H_1 e H_3 do composto *trans*-*N,N*-dimetilcarbamato de 3-fenilaminocicloexila (**4a**) em CD_2Cl_2 . Foi possível observar uma separação bem resolvida dos sinais a $-80\text{ }^\circ C$ e as populações foram determinadas através da integração dos sinais de H_1 de cada confôrmero, já que este é o mais desblindado e não apresenta sobreposição. Os confôrmeros individuais foram identificados por suas constantes de acoplamento e seus deslocamentos químicos, sabendo que os hidrogênios equatoriais são mais desblindados que os hidrogênios axiais.⁸⁹

Figura 26. Expansão do RMN de 1H em diferentes temperaturas para o *trans*-*N,N*-dimetilcarbamato de 3-fenilaminocicloexila (**4a**) em CD_2Cl_2 .



No espectro de RMN de 1H em CD_2Cl_2 à $-80\text{ }^\circ C$ do composto **4a** foi possível observar dois sinais bem separados correspondentes a H_1 (um sinal para cada confôrmero), no entanto para H_3 o sinal do confôrmero minoritário está

sobreposto com o sinal do NH. O sinal que aparece em 5,06 ppm corresponde a um H₁ equatorial (geminal com o oxigênio), uma vez que é o mais desblindado e está resolvido, isto é, tem pequenas constantes de acoplamento devido ao arranjo de aproximadamente 60° em relação aos hidrogênios vicinais. O sinal de H₃, mais blindado e que possui a mesma integração de H₁, aparece em 3,62 ppm e em conjunto com H₁ identifica o confômero **AE**. Por uma análise semelhante, os sinais em 4,75 ppm e 3,80 ppm são atribuídos respectivamente a H₁ e H₃ do confômero **EA**.

A integração dos sinais de H₁, mostra a forte preferência pelo confômero **AE**. As porcentagens de cada confômero no equilíbrio para todos os solventes avaliados estão compiladas na Tabela 14. A partir desses dados pode-se dizer que o equilíbrio conformacional do *trans-N,N*-dimetilcarbamato de 3-fenilaminocicloexila (**4a**) não é influenciado significativamente pela polaridade do solvente.

Tabela 14. Populações de cada confômero do *trans-N,N*-dimetilcarbamato de 3-fenilaminocicloexila (**4a**) obtidas por RMN de ¹H a -80°C.

Confômeros	População (%)		
	Diclorometano	Acetona	Metanol
AE	91	89	92
EA	9	11	8

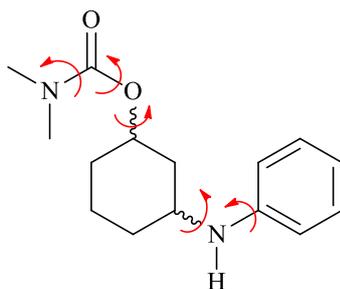
Para o isômero *cis-N,N*-dimetilcarbamato de 3-fenilaminocicloexila (**5a**), é possível observar no espectro de RMN de ¹H em CD₂Cl₂ os sinais correspondentes a H₁ axial e H₁ equatorial em 5,04 e 4,58 ppm, respectivamente. A integração dos dois sinais mostra que o confômero **EE** contribui com 95% da população no equilíbrio. Entretanto, no espectro de RMN de ¹H em acetona-*d*₆ e metanol-*d*₄, foi observado apenas um sinal referente a H₁, mostrando que nesses dois solventes a conformação com ambos os substituintes na posição equatorial, apresenta contribuição de 100% no equilíbrio conformacional.

3.2.2. Cálculos Teóricos

Paralelamente aos estudos por RMN, o equilíbrio conformacional dos compostos foi investigado por cálculos computacionais.

Primeiramente foram determinadas as estruturas de menor energia para cada composto (**4a** e **5a**), a partir dos cálculos de superfícies de energia potencial (SEP). Os ângulos diedros avaliados estão representados na Figura 27. Lembrando que cada um dos isômeros pode apresentar duas conformações possíveis, onde os substituintes estão nas posições axial-axial (**AA**) e equatorial-equatorial (**EE**) para os isômeros *cis* e, axial-equatorial (**AE**) e equatorial-axial (**EA**) para os isômeros *trans* (Figura 23).

Figura 27. Ângulos diedro avaliados para a obtenção das SEP.



As estruturas mais estáveis foram então otimizadas e os seus valores de energia foram usados para calcular a contribuição populacional de cada confôrmero no equilíbrio. Para esses cálculos utilizou-se a equação 5 na qual K é a constante de equilíbrio, n_1 e n_2 as frações molares de cada isômero, ΔE a diferença de energia entre os isômeros (em Kcal), R é a constante universal dos gases (1,98 cal/K.mol) e T é a temperatura absoluta (K).

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

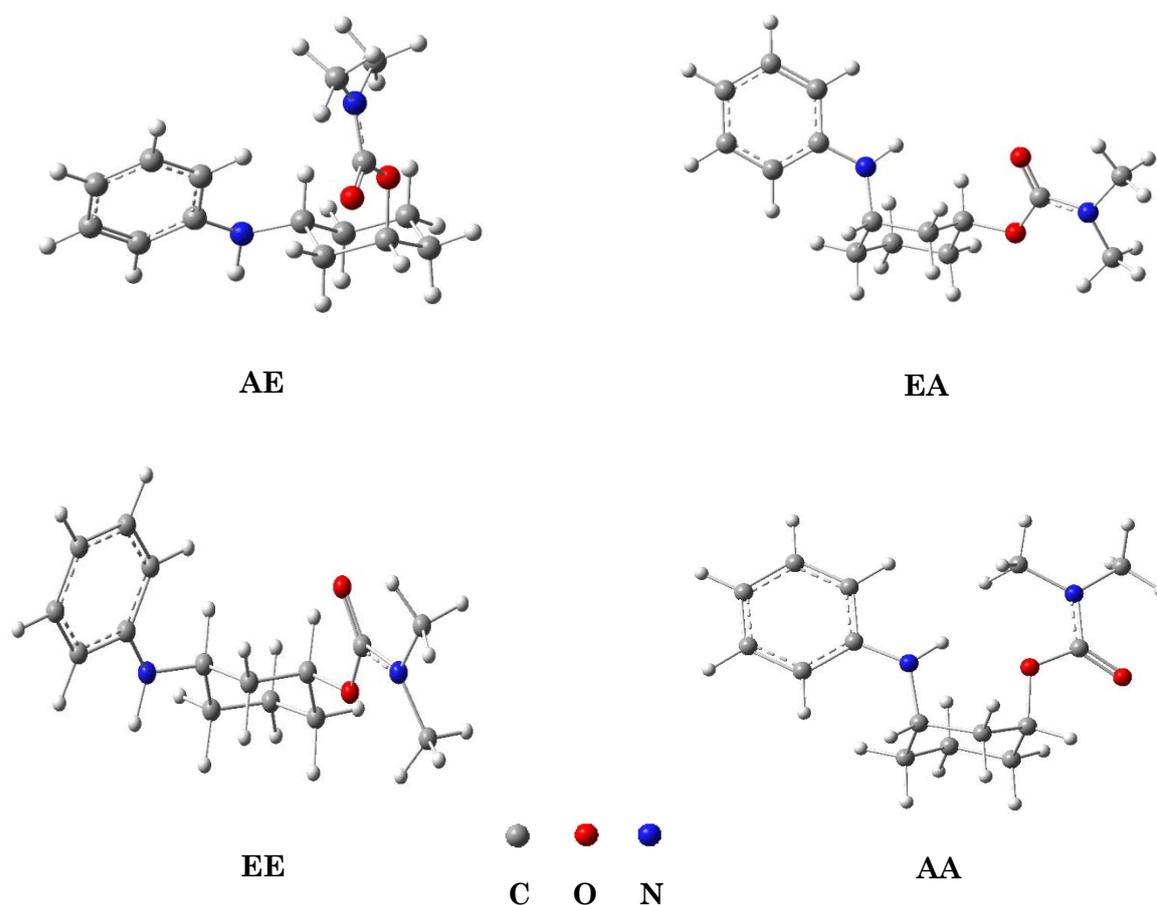
Equação 5

Os valores de energia, população e o momento de dipolo para cada composto (**4a** e **5a**) estão apresentados na Tabela 15 e na Figura 28 estão representadas as estruturas otimizadas dos carbamatos estudados.

Tabela 15. Valores de Energia, momento de dipolo, constante de equilíbrio conformacional e população obtidos no vácuo em M06-2X/6-311++G(d,p).

		E (Kcal/mol)	μ (D)	ΔE (Kcal/mol)	K	População (%)
4a	AE	-529833,04	2,88	0,000	0,223	82
	EA	-529832,16	3,83	0,884		18
5a	AA	-529833,33	0,72	0,000	0,261	79
	EE	-529832,53	4,01	0,791		21

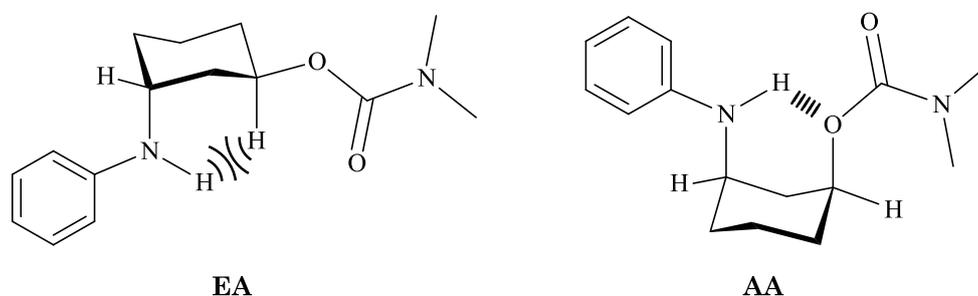
Figura 28. Estruturas otimizadas no nível de teoria M06-2X/6311++G(d,p) para o *cis*-*N,N*-dimetilcarbamato de cicloexila 3-fenilamino (**5a**) e o *trans*-*N,N*-dimetilcarbamato de cicloexila 3-fenilamino (**4a**).



Para o estereoisômero *trans* (**4a**), o confôrmero mais estável é o **AE**, onde o grupo carbamato está na posição axial e o grupo arilamino na posição equatorial. Esse resultado está de acordo com a literatura, pois a destabilização do

confômero **EA** é ocasionada pela presença do grupo volumoso (arilamino) na posição axial, que apresenta uma maior repulsão 1,3-diaxial com os hidrogênios axiais. Já para o isômero *cis* (**5a**) o confômero **AA** apresenta menor energia que o confômero **EE**. Essa preferência pode ser explicada pela ligação de hidrogênio intramolecular entre o átomo de oxigênio do grupo carbamato e o átomo de hidrogênio do grupo amino, que proporciona uma maior estabilidade a essa conformação (Figura 29).

Figura 29. Repulsão diaxial do confômero **EA** e interação intramolecular do confômero **AA**.



Comparando os dados obtidos a partir dos cálculos teóricos com os resultados experimentais, pode-se notar que estes são concordantes para o isômero *trans*, pois ambos apontam o confômero **AE** como majoritário no equilíbrio. Entretanto, há uma discrepância entre os resultados obtidos para o isômero *cis*. Os dados experimentais mostram que o confômero **EE** é majoritário, enquanto os cálculos apontam o confômero **AA** como o mais estável. Esta diferença pode ser decorrente dos cálculos terem sido feitos no vácuo, havendo a necessidade de realizá-los na presença de solvente para levar em conta os efeitos de solvatação que ocorrem experimentalmente.

Assim, foram realizados cálculos de solvatação, utilizando o nível de teoria M06-2X6-311++G(d,p) e o modelo de solvatação IEF-PCM, em clorofórmio, diclorometano, acetona e metanol para determinar a influência do solvente no equilíbrio conformacional destes compostos (Tabela 16). Pode-se observar que para a série *trans* houve uma diminuição na contribuição do confômero **EA** no

equilíbrio conformacional, deslocando ainda mais o equilíbrio para o confômero **AE**.

Tabela 16. Valores de Energia, momento de dipolo, constante de equilíbrio conformacional e população em diferentes solventes obtidos em M06-2X/6-311++G(d,p) e modelo de solvatação IEF-PCM.

Solvente	Composto	E (Kcal/mol)	μ (D)	ΔE (Kcal/mol)	K	População (%)
Clorofórmio ^a	4a	AE	-529842,46	2,88	0,000	92
		EA	-529841,04	3,88	1,416	
	5a	AA	-529842,14	1,13	0,000	61
		EE	-529841,89	5,30	0,254	39
Diclorometano ^b	4a	AE	-529844,57	4,02	0	93
		EA	-529843,00	5,34	1,568	
	5a	AA	-529844,18	1,28	0	56
		EE	-529844,05	5,61	0,133	44
Acetona ^b	4a	AE	-529846,21	4,19	0	95
		EA	-529844,44	5,54	1,768	
	5a	AA	-529845,67	1,41	0	51
		EE	-529845,66	5,85	0,009	49
Metanol ^b	4a	AE	-529846,69	4,25	0	96
		EA	-529844,89	5,61	1,801	
	5a	AA	-529846,13	1,46	0,035	48
		EE	-529846,17	5,92	0	52

^a População calculada a 25 °C e ^b População calculada a -80 °C.

Comparando os dados de solvatação para a série de isômeros *cis* observa-se que para todos os compostos a contribuição do confômero **EE** aumentou em relação aos cálculos realizados no vácuo. Entretanto, apenas em metanol o confômero **EE** apresentou maior contribuição no equilíbrio conformacional. Na tentativa de obter resultados mais precisos e que estivessem de acordo com dados obtidos a partir dos experimentos de RMND, optou-se por aumentar o conjunto de base, modificando as funções de polarização, utilizando o conjunto de base 6-311++G(2df,2p). Os resultados obtidos a partir desse nível de teoria mais alto estão descritos na Tabela 17.

Analisando os resultados para o nível de teoria M06-2X/6-311++G(2df,2p), pode-se observar que os valores obtidos para o isômero *trans* foram semelhantes aos obtidos com o conjunto de base menor, mostrando que o confômero **AE** é aquele que predomina no equilíbrio conformacional, o que está de acordo com os resultados obtidos experimentalmente. Deste modo, para esse isômero a mudança do conjunto de base, apesar de apresentar um custo computacional mais elevado, não alterou significativamente os resultados. Entretanto, para o isômero *cis* a utilização do conjunto de base maior, levou a uma melhora significativa nos resultados obtidos. Pode-se observar que para todos os solventes analisados, o confômero **EE** apresentou uma maior contribuição no equilíbrio que o confômero **AA**, com uma população conformacional entre 64 e 68%. Apesar dos espectros de RMN de ^1H a $-80\text{ }^\circ\text{C}$, mostrarem que o confômero **EE** apresenta uma contribuição de 95-100% no equilíbrio, os cálculos realizados com nível de teoria mais alto (M062X-6-311++G(2df,2p,)) reproduziu a tendência dos resultados obtidos experimentalmente.

Tabela 17. Valores de Energia, momento de dipolo, constante de equilíbrio conformacional e população em diferentes solventes obtidos em M06-2X/6-311++G(2df,2p) e modelo de solvatação IEF-PCM.

Solvente	Composto	E (Kcal/mol)	μ (D)	ΔE (Kcal/mol)	K	População (%)
Clorofórmio ^a	4a	AE	-529842,46	2,88	0,000	91
		EA	-529841,04	3,88	1,388	9
	5a	AA	-529842,14	1,13	0,000	41
		EE	-529841,89	5,30	0,224	59
Diclorometano ^b	4a	AE	-529876,27	4,12	0	99
		EA	-529874,63	5,47	1,635	1
	5a	AA	-529875,52	1,19	0,218	36
		EE	-529875,74	5,67	0	64
Acetona ^b	4a	AE	-529877,68	4,30	0	99
		EA	-529875,99	5,69	1,694	1
	5a	AA	-529876,94	1,31	0,280	32
		EE	-529877,22	5,92	0	68
Metanol ^b	4a	AE	-529878,14	4,36	0	99
		EA	-529876,42	5,76	1,726	1
	5a	AA	-529877,38	1,35	0,300	31
		EE	-529877,68	6,00	0	69

^a População calculada a 25 °C e ^b População calculada a -80 °C.

3.3. Determinação da Atividade Anticolinesterásica

Para avaliar a atividade anticolinesterásica dos carbamatos obtidos neste trabalho, foram realizados os ensaios enzimáticos utilizando o método de Ellman modificado.⁴² Como mencionado anteriormente este método exige que os compostos em estudo sejam solúveis em água, sendo assim os respectivos cloridratos de *N,N*-dimetilcarbamato de 3-arilaminocicloexila (**6a-6c**, **7a** e **7c**) foram utilizados nos ensaios. Vale ressaltar que por não ter sido possível obter o composto *cis-N,N*-dimetilcarbamato de 3-fenilaminocicloexila (**5b**) puro, os testes de atividade anticolinesterásica não foram realizados para este composto.

As análises foram realizadas em triplicata utilizando soluções estoque, com cinco concentrações diferentes dos compostos avaliados, (5,0; 10,0; 20,0; 50,0 e 100,0 mmol/L). Apenas para o composto **7a** foram utilizadas concentrações menores (3,7; 7,5; 15,0; 37,5 e 75,0 mmol/L), devido à sua baixa solubilidade em água. No entanto, não foi possível medir a atividade inibitória para a concentração de 75,0 mmol/L, pois após a incubação, observou-se a formação de precipitado na solução de análise.

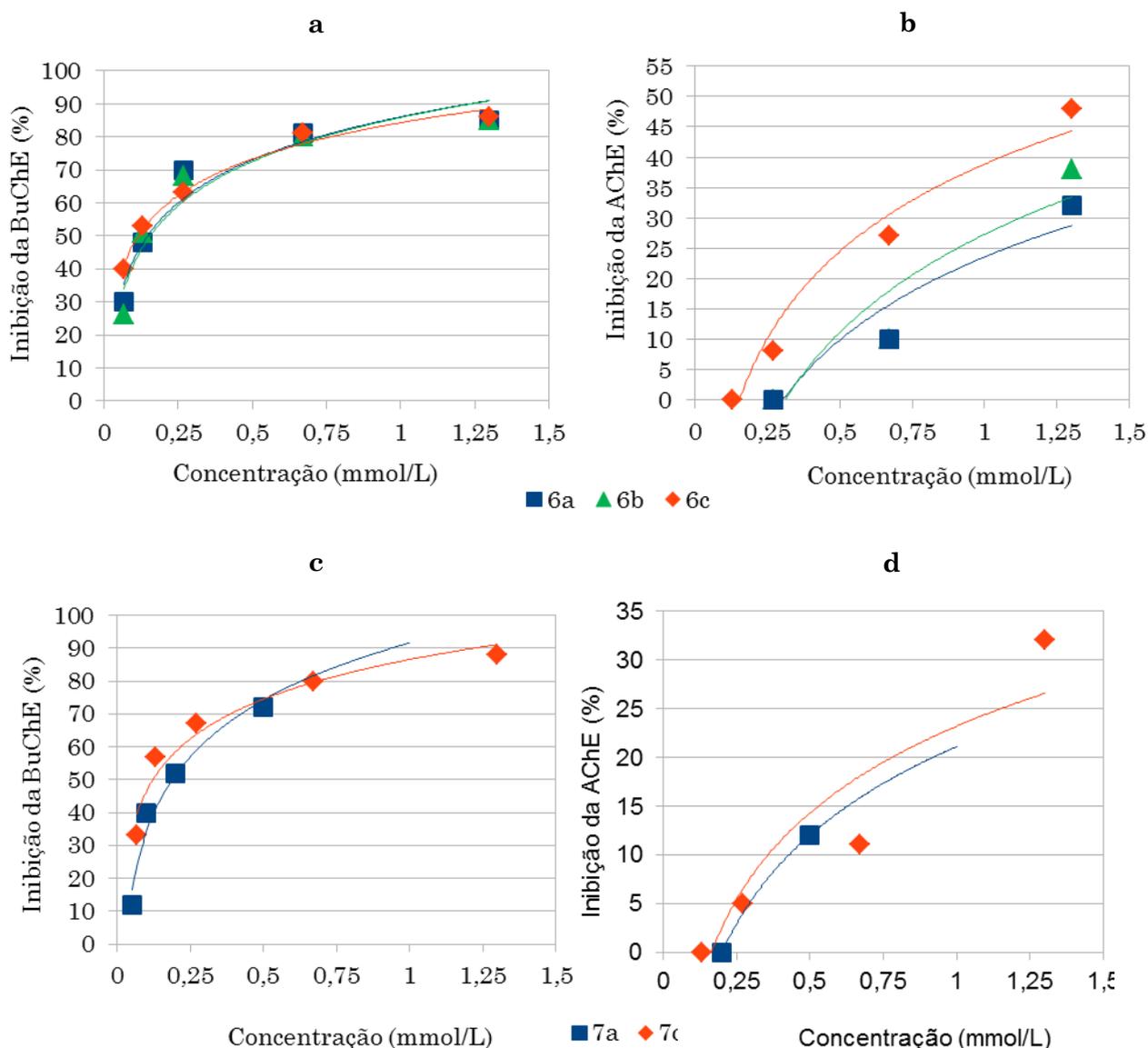
Como foram adicionados 40 µL das soluções estoque em 3 mL da mistura tampão/ sangue, as concentrações finais de análise foram 0,067; 0,13; 0,27; 0,67 e 1,30 mmol/L para os compostos (**6a-6c e 7c**) e 0,05; 0,10; 0,20; 0,50 e 1,00 mmol/L para o composto **7a**. O medicamento Exelon®, que contém a rivastigmina como princípio ativo, foi utilizado como controle.

Nestes experimentos foi possível determinar o potencial de inibição de cada composto testado contra as enzimas butirilcolinesterase (encontrada no plasma) e acetilcolinesterase (encontrada nos eritrócitos). Os resultados de inibição frente as enzimas BuChE e AChE são apresentados na Figura 30. Os valores de IC₅₀ (concentração dos compostos testados que inibe 50% da hidrólise do substrato) foram obtidos a partir das curvas de porcentagem de inibição *versus* concentração e estão apresentados na Tabela 18.

A análise da Figura 30a, mostra que os cloridratos de *trans-N,N*-dimetilcarbamatos de cicloexila 3-arilaminossustituídos (**6a-c**), apresentaram uma inibição máxima da atividade da BuChE em torno de 90% na concentração

de 1,3 mmol/L e para a menor concentração testada (0,067 mmol/L) o composto **6c** apresentou uma inibição de 40%, enquanto os compostos **6a** e **6b** apresentaram inibição de 30 e 25% respectivamente. A análise dos dados para esta série mostra que em concentrações mais altas os grupos substituintes não influenciam significativamente a inibição da atividade da enzima. Entretanto, em concentrações mais baixas, o derivado com o grupo metoxila (**6c**), apresenta uma ação inibitória 1,6 vezes maior que **6b** e 1,3 vezes maior que **6a**. Os valores de IC_{50} para estes compostos se encontram entre 0,11 a 0,14 mmol/L.

Figura 30. Efeito das concentrações dos cloridratos de *cis* e *trans* *N,N*-dimetilcarbamato de cicloexila 3-amilaminossustituídos (**6a – 6c**) e (**7a e 7c**) frente às enzimas BuChE (a e c) e AChE (b e d).



Observa-se que para os cloridratos da série *cis* (**7a** e **7c**), o composto **7c** apresentou uma inibição máxima da atividade frente à BuChE de 88% para a concentração de 1,3 mmol/L, sendo que para o composto **7a**, não foi possível medir a inibição para esta concentração devido a sua baixa solubilidade. A maior inibição da atividade da BuChE obtida para o composto **7a** foi de 72% para a concentração de 0,5 mmol/L. O derivado **7c** apresentou a maior capacidade inibitória, com valor de IC₅₀ de 0,12 mmol/L contra 0,18 mmol/L para o composto **7a**. Com base nesses dados é possível afirmar que não há diferença relevante na inibição da atividade da BuChE entre os isômeros *cis* e *trans* dos *N,N*-dimetilcarbamatos de 3-arilaminomonossustituídos.

Tabela 18. Valores de IC₅₀ e de inibição máxima dos compostos em estudo frente as enzimas AChE e BuChE.

Compounds		IC ₅₀ (mmol L ⁻¹)		Inhibition (%)		
				Minimum ^a	Maximum ^b	
X		AChE ^c	BuChE	BuChE	AChE	BuChE
H	6a	n.a.	0,14 (±0,01)	30	32	85
F	6b	n.a.	0,14 (±0,01)	25	38	85
OCH ₃	6c	n.a.	0,11 (±0,01)	40	48	86
H	7a	n.a.	0,18 (±0,06)	12	12	72
OCH ₃	7b	n.a.	0,11 (±0,01)	33	32	88
Rivastigmine		29 (µmol L ⁻¹)	0,32 (µmol L ⁻¹)	-	-	-

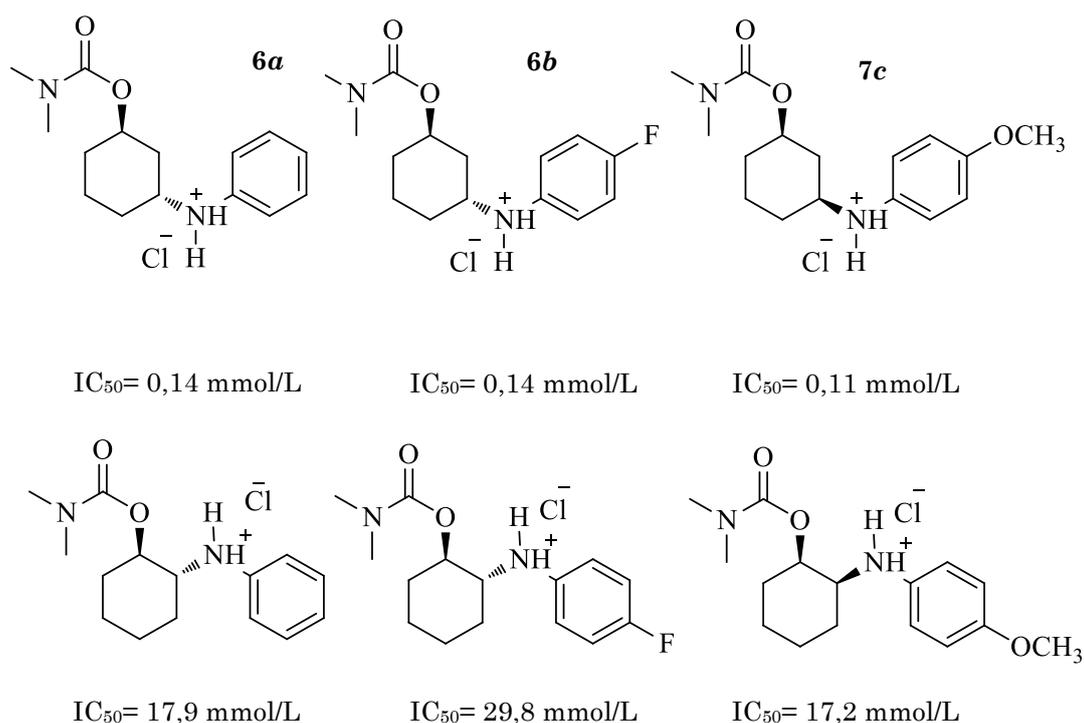
^a A concentração mínima avaliada foi de 0,067 mmol/L para os compostos **6a-c** e **7c** e de 0,05 mmol/L para o composto **7a**; ^b A concentração máxima avaliada foi de 1,3 mmol/L para os compostos **6a-c** e **7c** e de 0,5 mmol/L para o composto **7a**; ^c n.a.: não ativo

Em relação à inibição da colinesterase eritrocitária (AChE) todos os compostos seguiram a mesma tendência, não inibiram 50% da atividade enzimática nas concentrações analisadas. Para a série *trans*, o composto que

apresentou a maior inibição enzimática (48%) foi o derivado **6c**, enquanto para a série *cis* o composto **7c** apresentou a maior inibição (32%). Sendo assim, pode-se dizer que os compostos sintetizados apresentam maior afinidade pela enzima BuChE, pois estes foram seletivos para a inibição desta enzima, com valores de IC_{50} entre 0,11 e 0,18 mmol/L, sendo que na concentração máxima não inibiram 50% da atividade enzimática da AChE.

Em comparação com os resultados obtidos por nosso grupo de pesquisa para a série de isômeros *cis* e *trans* de *N,N*-dimetilcarbamatos de cicloexila 2-arilaminossustituídos,⁴⁰ que também se mostraram seletivos para a BuChE, observou-se que a série de *cis* e *trans* de *N,N*-dimetilcarbamatos de cicloexila 3-arilaminossustituídos apresentou uma expressiva melhora na inibição da atividade desta enzima. Os derivados **6a**, **6b** e **7c** foram mais ativos (IC_{50} de 0,14, 0,14 e 0,11 mmol/L) que os compostos correlatos testados anteriormente (IC_{50} de 17,9, 29,8 e 17,2 mmol/L) (Figura 31). Deste modo, pode-se afirmar que a mudança do grupo arilaminossustituído para a posição 3 do anel cicloexânico potencializou a atividade frente à BuChE.

Figura 31. Comparação entre os resultados obtidos para o grupo arilamino nas posições 2 e 3 do anel cicloexânico.



3.4. Estudos cinéticos de inibição das enzimas AChE e BuChE

O mecanismo de inibição dos compostos sintetizados foi investigado a partir do estudo cinético de inibição das enzimas AChE e BuChE isoladas, utilizando o método de Ellman modificado.⁴² Os experimentos foram realizados apenas para o composto **6c**, por este apresentar o maior potencial de inibição para ambas as enzimas, e utilizou-se uma concentração fixa (0,1 U/mL) da AChE e BuChE.

Para avaliar a atividade enzimática, foram utilizados substratos específicos para cada enzima. O substrato utilizado para os experimentos da AChE foi o iodeto de acetiltiocolina (ATCh) e para a BuChE foi o iodeto de butiriltiocolina (BuTCh). A fim de determinar os parâmetros cinéticos, foi necessário medir a velocidade inicial para diferentes concentrações de substrato, na ausência (100% da atividade enzimática) e na presença do inibidor. As Figuras 32 e 33 mostram o efeito da variação da concentração do substrato, na ausência de inibidor para as enzimas AChE e BuChE, respectivamente.

Figura 32. Efeito da concentração do substrato na atividade da AChE na ausência de inibidor.

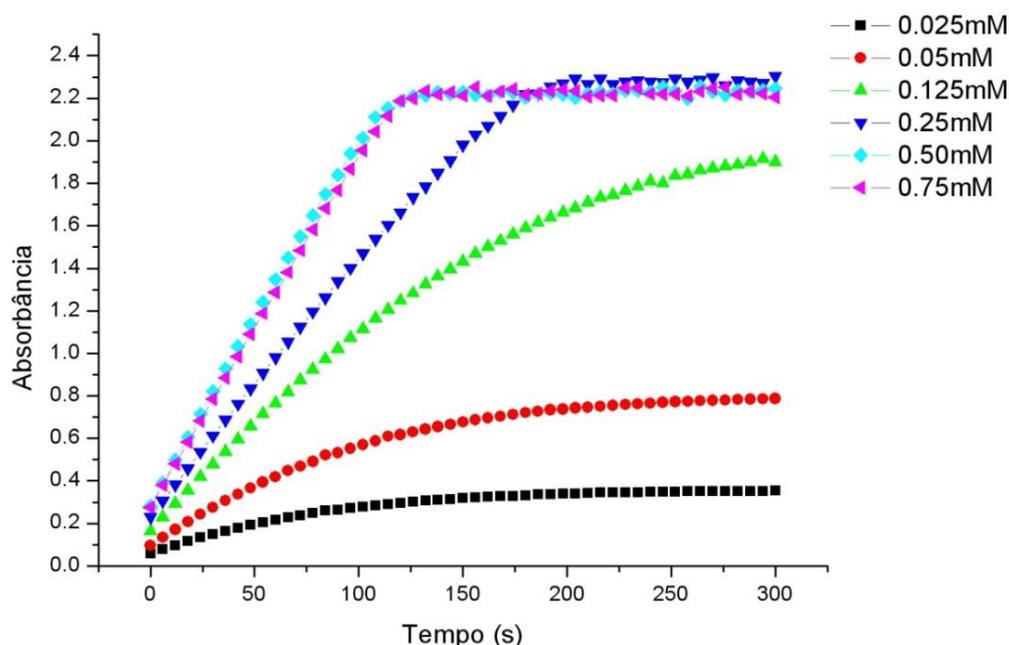
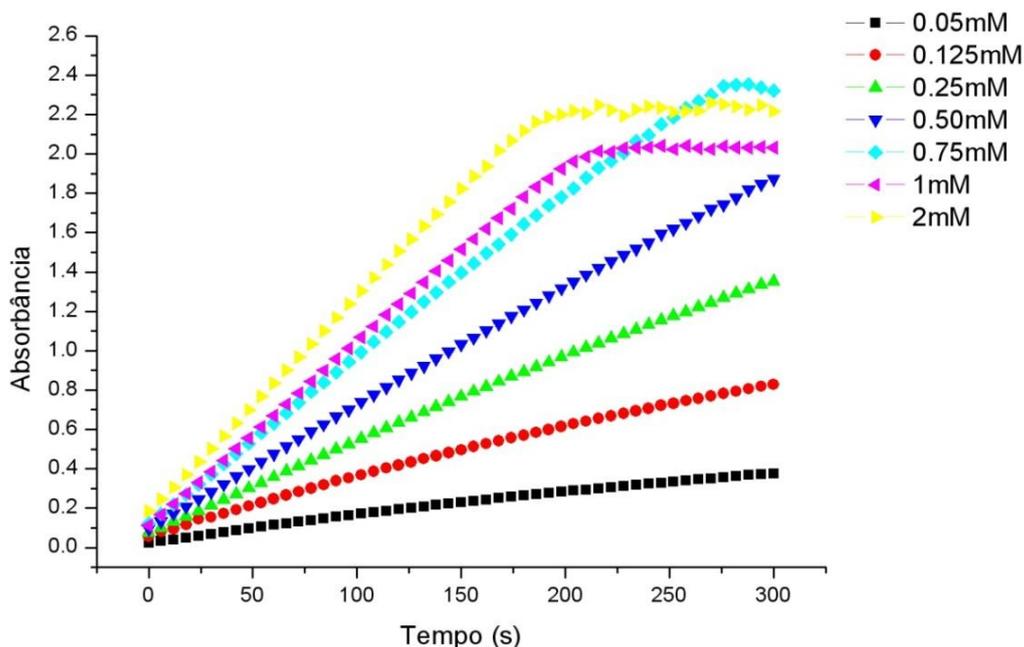


Figura 33. Efeito da concentração do substrato na atividade da BuChE na ausência de inibidor.



As curvas mostram que a velocidade da reação enzimática aumenta com a concentração do substrato. Em concentrações mais altas de substrato, a velocidade inicial tende a velocidade máxima, pois ocorre a saturação de todos os sítios ativos da enzima.

A tangente da curva de absorbância *versus* tempo fornece a velocidade inicial da reação enzimática em s^{-1} , para transformar a velocidade em $mol L^{-1}s^{-1}$ é necessário dividir este valor pelo coeficiente de extinção molar do ânion TNB $^{-}$ ($13600 mol L^{-1}cm^{-1}$). Com os valores de velocidade iniciais, foram construídas as curvas de Michaelis-Menten (Figuras 34 e 35).

Figura 34. Curva de Michaelis-Menten para a AChE na ausência e na presença do composto **6c** nas concentrações de 0,2 e 1 mM

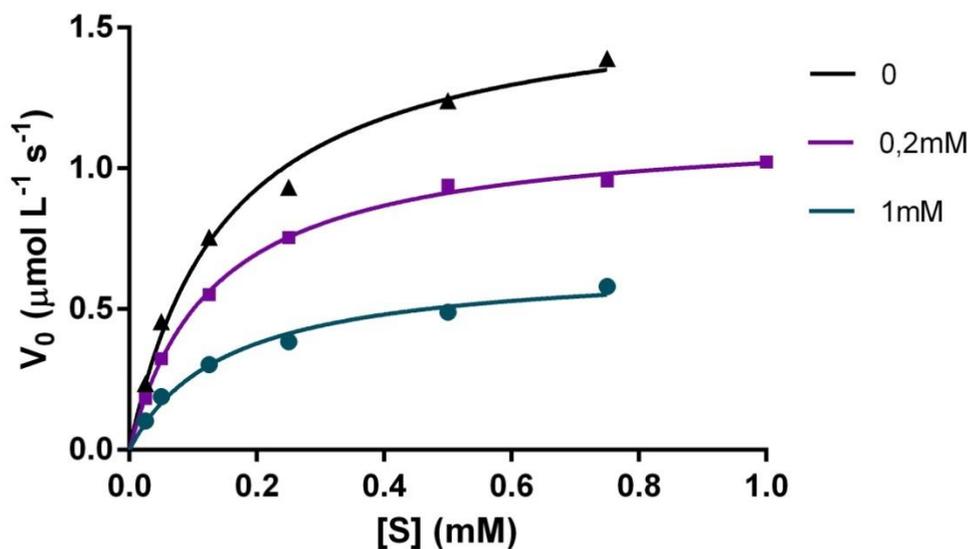
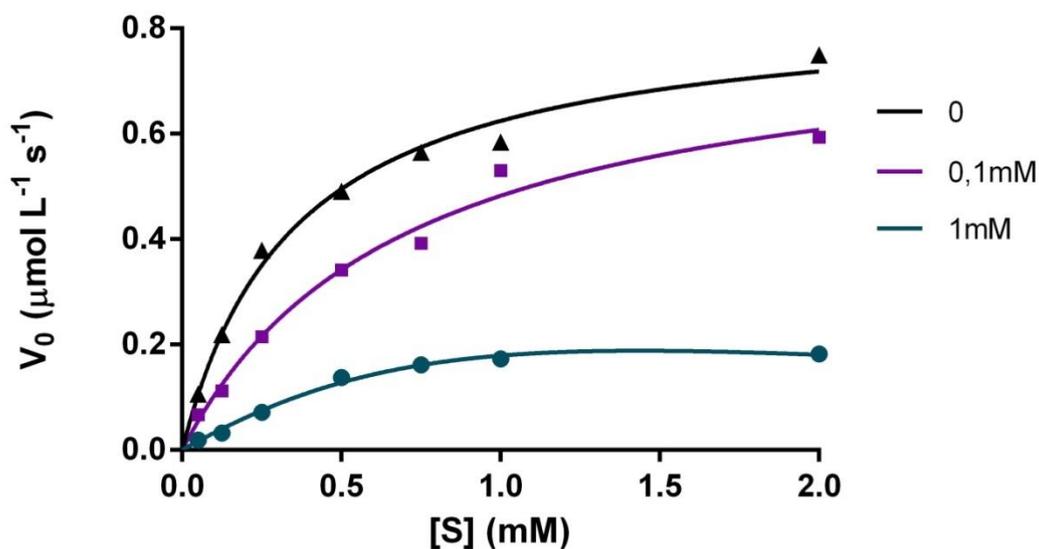


Figura 35. Curva de Michaelis-Menten para a BuChE na ausência e na presença do composto **6c** nas concentrações de 0,1 e 1 mM



Os resultados apresentados nas Figuras 33 e 34 mostram que a hidrólise do substrato pelas enzimas AChE e BuChE segue a cinética de Michaelis-Menten, tanto na ausência quanto na presença do inibidor (**6c**). Além disso, observa-se que a atividade das enzimas AChE e BuChE diminuiu com o aumento da concentração do inibidor.

Como em muitos casos não é possível determinar os valores de $V_{\text{máx}}$ a partir da curva de Michaelis-Menten, pois é difícil atingir experimentalmente a concentração de substrato necessária para estimar o valor de $V_{\text{máx}}$, pode-se obter os valores dessas constantes realizando a linearização da equação e construindo um gráfico de Lineweaver-Burk. Os parâmetros cinéticos (Tabela 19) foram determinados a partir dos gráficos de Lineweaver-Burk para a AChE e BuChE, que podem ser vistos nas Figuras 36 e 37, respectivamente.

Figura 36. Gráfico de Lineweaver-Burk para a AChE

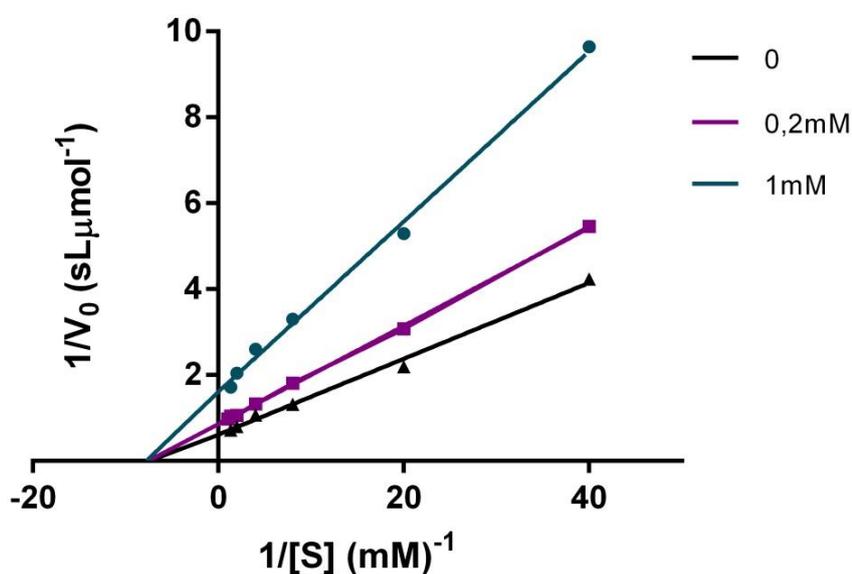


Figura 37. Gráfico de Lineweaver-Burk para a BuChE.

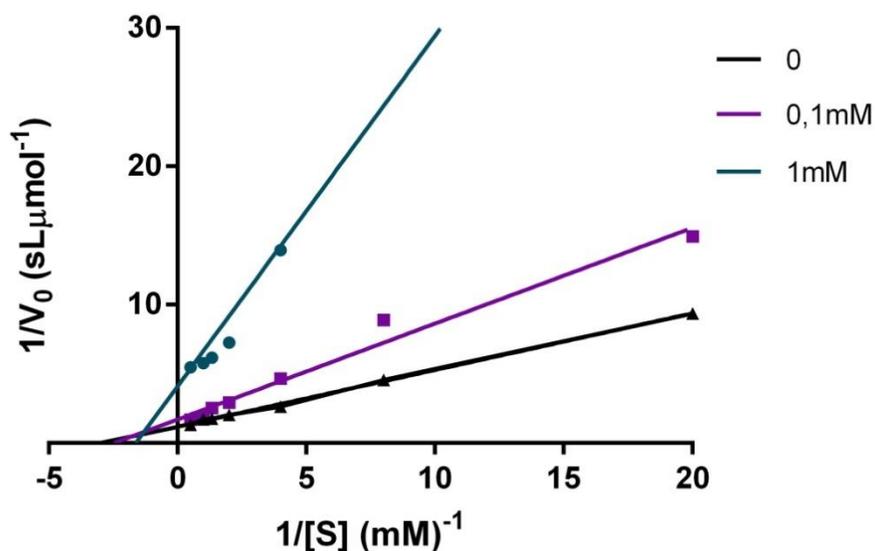


Tabela 19. Valores de K_m , $V_{m\acute{a}x}$ e K_i para as enzimas AChE e BuChE na ausência e na presença de inibidor.

	AChE			BuChE		
[I] (mmol L ⁻¹)	0	0,2	1	0	0,1	1
K_m (mmol L ⁻¹)	0,134	0,132	0,129	0,333	0,403	0,613
$V_{m\acute{a}x}$ (μmol L ⁻¹ s ⁻¹)	1,627	1,158	0,619	0,851	0,582	0,243

Avaliando os parâmetros cinéticos para a AChE, podemos observar que o valor de K_m praticamente não se alterou com o aumento da concentração do inibidor, diferente de $V_{m\acute{a}x}$ que foi reduzida. Deste modo, é possível inferir que a inibição causada pelo composto **6c** está relacionada a um processo reversível não competitivo para esta enzima. A partir do gráfico de Lineweaver-Burk pode-se ver claramente que as retas se cruzam no intercepto do eixo x ($-1/K_m$) indicando que o valor desta constante permaneceu inalterado (ver seção 2, pg 24-25). Nesse processo o inibidor e o substrato ligam-se a diferentes sítios na enzima, formando um complexo enzima-inibidor-substrato (EIS).

No entanto, para a BuChE, o aumento da concentração do inibidor afeta tanto K_m e $V_{m\acute{a}x}$. Analisando os valores dessas constantes, pode-se observar que com o aumento da concentração do inibidor $V_{m\acute{a}x}$ diminuiu, ao contrário de K_m que aumentou. Este comportamento indica que o composto em estudo apresenta um mecanismo de inibição misto, o que pode ser confirmado através do gráfico de Lineweaver-Burk. O inibidor misto apresenta comportamento de inibidor não competitivo e de inibidor incompetitivo, isto é, pode se ligar tanto a enzima quanto ao completo enzima-substrato. (ver seção 2, pg 25-26).

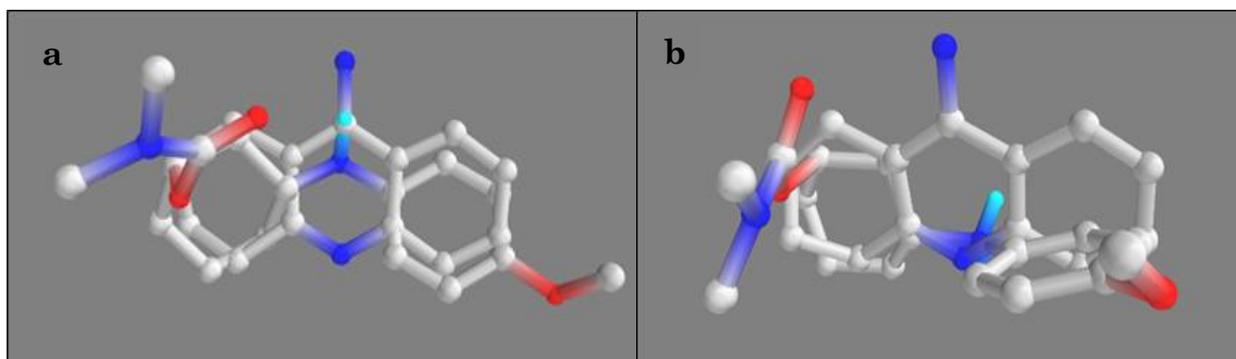
Os interceptos nos eixos x e y correspondem, respectivamente, aos valores de $-1/K_m$ e $1/V_{m\acute{a}x}$, e através dessas constantes é possível determinar a afinidade do inibidor com a enzima. Quanto maior for a afinidade do inibidor com a enzima, menor será a sua constante de inibição (K_i). Através do valor K_i , podemos comprovar que o composto em estudo apresenta uma maior afinidade para BuChE ($K_i= 0,21$ mmol L⁻¹) do que AChE ($K_i= 0,69$ mmol L⁻¹).

3.5. 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. O cloridrato de *trans*-*N,N*-dimetilcarbamato de 3-(4-metoxifenilamino)cicloexila (**6c**) que apresentou o melhor resultado experimental foi docado em ambas as enzimas e suas interações foram analisadas.

A Figura 38 mostra a sobreposição do composto **6c** com a tacrina que foi utilizada como padrão para a AChE (ID PDB: 1ACJ) e BuChE (ID PDB: 4BDS) respectivamente. É possível observar uma boa sobreposição entre o composto e a tacrina (inibidor não competitivo), indicando que ambos os inibidores são capazes de interagir com o mesmo sítio ativo das enzimas, porém com diferentes padrões de interação.

Figura 38. Sobreposição da tacrina com o cloridrato de *trans*-*N,N*-dimetilcarbamato de 3-(4-metoxifenilamino)cicloexila nas enzimas AChE (a) e BuChE (b)



Os resultados mostraram que o composto **6c** interage com o sítio aniônico periférico (PAS do inglês “*Peripheral Anionic Site*”) e com sítio ativo catalítico da BuChE (Figura 39a). No sítio ativo catalítico, ambos os átomos de hidrogênio do grupo amino protonado podem formar ligação de hidrogênio com o átomo de nitrogênio do His438 e o com átomo de oxigênio do Glu197 com uma distância de 1,6 e 1,8 Å, respectivamente. O nitrogênio positivamente carregado do ligante (**6c**) faz uma interação cátion- π com o anel imidazólico do His438. O grupo

carbamato é estabilizado por uma ligação de hidrogênio entre o oxigênio carbonílico e o NH do Trp82 com uma distância de 3,0 Å. Além disso, o anel cicloexânico é estabilizado por interações de van der Waals com o anel aromático do Trp82. É possível observar que o anel aromático do composto **6c** é cercado por anéis aromáticos dos resíduos Trp231, Phe398 e Phe329 formando interações do tipo *T-stacking*. Por fim, o grupo *N*-metil apresenta uma fraca interação com o Tyr332. No PAS da BuChE, Phe329 e Tyr332 são resíduos de aminoácidos importantes na ligação entre enzima-ligante.²⁵ Este modo de ligação está de acordo com o tipo misto de inibição que o composto **6c** apresentou experimentalmente, em que o ligante é capaz de interagir tanto com o sítio ativo catalítico quanto com o PAS.

As interações enzima-ligante foram identificadas utilizando o potencial de interação não covalente (NCI do inglês “*Non-Covalent Interactions*”), o qual define as regiões de interações atrativas ou repulsivas, bem como a sua força.⁹⁰ As interações enzima-ligante são mostradas pela análise NCI, onde são codificadas por cores: violeta para interações fortemente atrativas (ligações de hidrogênios), vermelho para as interações repulsivas (impedimentos estéricos) e verdes para interações fracas do tipo de van der Waals.⁹⁰ As superfícies (Figura 39b) de NCI indicam duas interações atrativas (discos violeta) correspondentes a forte de ligações de hidrogênio e várias interações intermoleculares de van der Waals (em verde) que ocupam uma ampla região do espaço. Interações fortemente repulsivas que deveriam aparecer em vermelho não foram observadas, mostrando que o ligante está bem estabilizado no sítio ativo da BuChE.

A orientação do composto **6c** com a AChE (Figura 40a) apresentou uma diferença significativa quando comparada a orientação do composto **6c** com a BuChE, deste modo, as interações entre o ligante e a AChE também são diferentes. O grupo carbamato não apresentou qualquer interação significativa com os resíduos de aminoácido da enzima. Os dois átomos de hidrogênio do grupo amino protonado formam uma ligação de hidrogênio, com o átomo de nitrogênio do Trp84 e com átomo de oxigênio do Gly441 com uma distância de 2,3 e 1,8 Å, respectivamente. O anel cicloexânico é estabilizado por interação de van der

Waals pelos anéis aromáticos do Trp84. Por último, o anel aromático de **6c** pode interagir com Tyr442 e Phe330 através de interações do tipo *T-stacking* e π - π *stacking*, respectivamente. A superfície de interação não covalente para a AChE (Figura 40b) está de acordo com o *docking* molecular.

Figura 39. (a) Modo de ligação de **6c** e BuChE. O ligante está apresentado em verde no modelo de bolas e varetas, e os resíduos são mostrados em varetas de cor cinza. (b) Superfície de interação não covalente (azul ao violeta fortemente atrativo, verde pouco atrativo, laranja ao vermelho repulsivo)

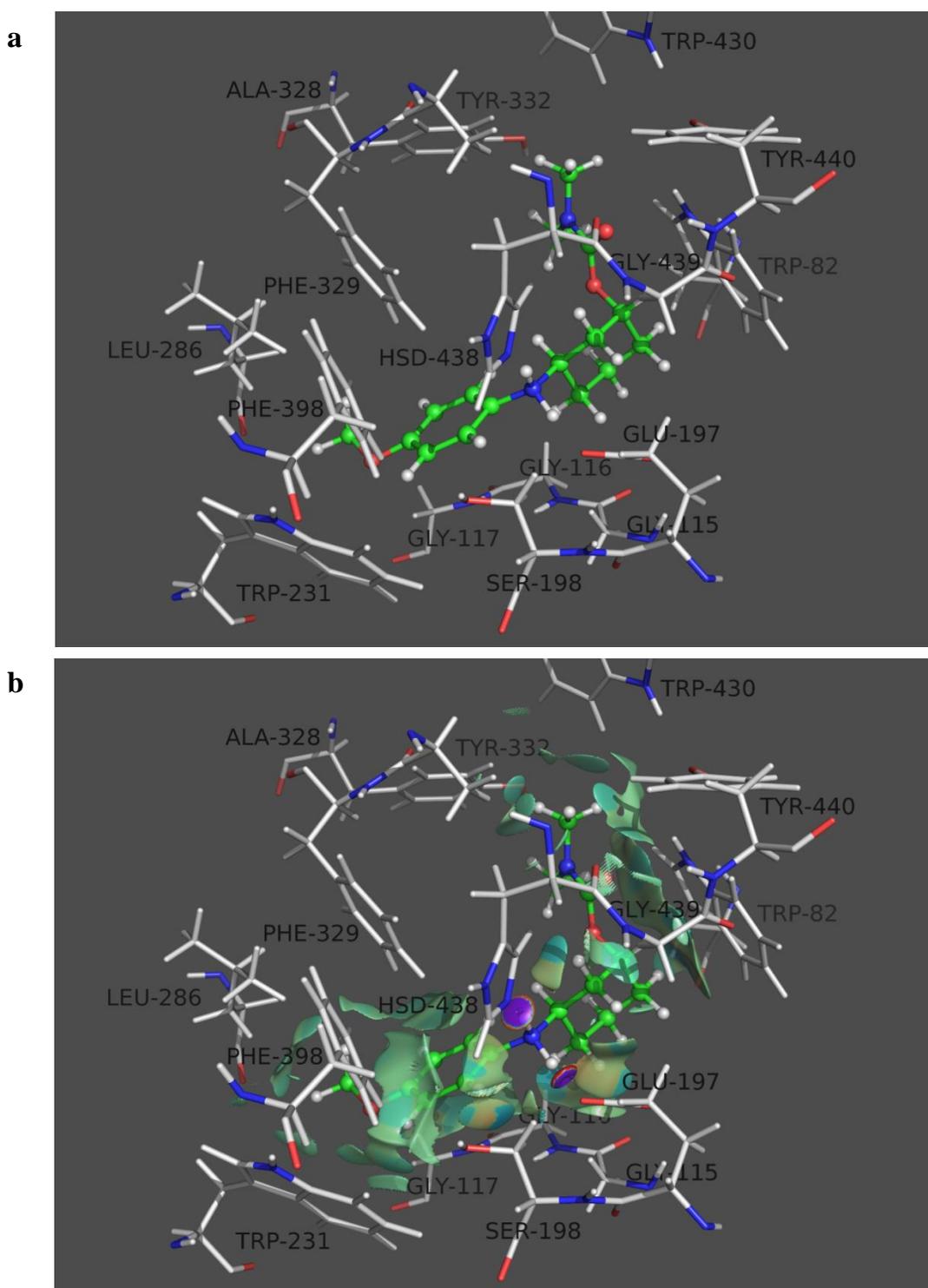
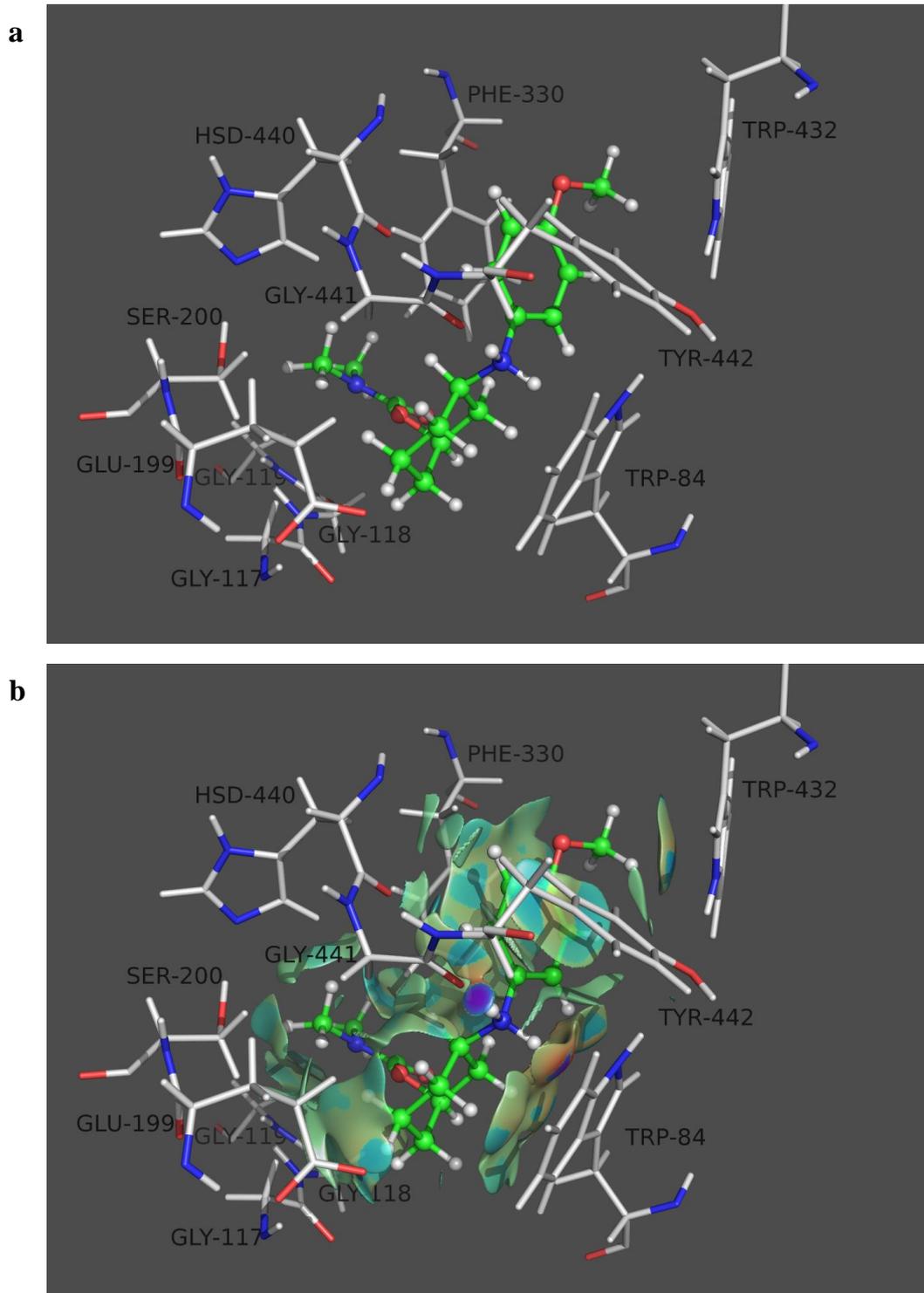


Figura 40. (a) Modo de ligação de **6c** e AChE. O ligante está apresentado em verde no modelo de bolas e varetas, e os resíduos são mostrados em varetas de cor cinza. (b) Superfície de interação não covalente (azul ao violeta fortemente atrativo, verde pouco atrativo, laranja ao vermelho repulsivo)



4

Conclusões

Os compostos inéditos das séries de isômeros *trans*-*N,N*-dimetilcarbamatos de cicloexila 3-amilaminossustituídos (**4a-c**) e *cis*-*N,N*-dimetilcarbamato de 3-amilaminossustituído (**5a** e **5c**) foram sintetizados e purificados com rendimentos satisfatórios, bem como seus respectivos cloridratos. O *cis*-*N,N*-dimetilcarbamato de 3-(4-fluorfenilaminossustituído (**5b**) também foi obtido, no entanto, não foi possível purificá-lo.

Em relação a análise conformacional, os resultados obtidos a partir dos experimentos de RMND mostraram que a mudança do solvente não interfere significativamente no equilíbrio conformacional dos carbamatos. Para o *trans*-*N,N*-dimetilcarbamato de 3-fenilaminocicloexila (**4a**) o confômero **AE** apresentou em média 90% da contribuição no equilíbrio conformacional. Esta preferência pode ser explicada pela desestabilização do confômero **EA** ocasionada pela presença do grupo volumoso (amilamino) na posição axial. Para o isômero *cis*-*N,N*-dimetilcarbamato de 3-fenilaminocicloexila (**5a**) o confômero diequatorial (**EE**) foi dominante no equilíbrio, sendo que nos solventes mais polares (acetona-*d*6 e metanol-*d*4) o confômero diaxial (**AA**) não foi observado. Deste modo, o equilíbrio conformacional para estes derivados 1,3-dissustituídos é determinado pelo efeito estérico 1,3 diaxial, que predomina sobre a estabilização causada pela ligação de hidrogênio intramolecular.

Os resultados obtidos a partir dos cálculos de solvatação para o isômero *trans*, utilizando os níveis de teoria M06-2X/6-311++G(d,p) e M06-2X/6-311++G(2df,2p), foram concordantes com os dados obtidos experimentalmente, pois ambos apontam o confômero **AE** como majoritário no equilíbrio. Assim, para esse estereoisômero não há diferença em utilizar um nível de teoria mais alto, pois o conjunto de base com um menor custo computacional consegue descrever bem os parâmetros da molécula. Entretanto, para o isômero *cis* somente os resultados dos cálculos no nível de teoria M06-2X/6-311++G(2df,2p) descreveram a tendência observada experimentalmente, mostrando que o confômero **EE** é majoritário no equilíbrio.

Os testes farmacológicos mostraram que os carbamatos estudados apresentaram uma ação inibitória dose-dependente sobre ambas as

colinesterases e que todos os compostos foram seletivos para a enzima BuChE, com valores de IC₅₀ entre 0,11 e 0,18 mmol/L. Os compostos **6c** e **7c** apresentaram a maior inibição frente à BuChE, mostrando que a presença do grupo metoxila potencializou a atividade anticolinesterásica e que não há diferença na inibição da atividade da enzima entre os isômeros *cis* e *trans*. De modo geral, os isômeros *cis* e *trans* de *N,N*-dimetilcarbamatos 3-arilaminossustituídos apresentaram uma melhora expressiva na inibição da atividade da BuChE, quando comparado a seus análogos 1,2-dissustituídos, indicando que a presença do grupo arilaminossustituído na posição 3 do anel cicloexânico potencializou a atividade frente à BuChE.

Os estudos cinéticos realizados para o inibidor mais ativo (**6c**) mostraram que a hidrólise dos substratos pelas colinesterases segue a cinética de Michaelis-Menten, tanto na ausência quanto na presença do inibidor. Para a AChE os resultados indicaram uma inibição do tipo não competitiva, enquanto que para a BuChE o composto atua como inibidor misto. Esta diferença no modo de inibição pode explicar a maior atividade dos carbamatos estudados frente a BuChE, pois o inibidor do tipo misto liga-se tanto a enzima livre quanto ao complexo ES.

Os cálculos de *docking* molecular mostraram padrões de interação diferentes nas enzimas AChE e BuChE. O composto **6c** interage com o sítio aniônico periférico e com o sítio ativo catalítico da BuChE, enquanto que na AChE, as interações ocorrem apenas no sítio ativo catalítico. Estes modos de ligação estão de acordo com os resultados obtidos experimentalmente. As superfícies de interações não covalentes foram concordantes com os cálculos de *docking* molecular, mostrando que o composto **6c** apresentou uma melhor estabilização no sítio ativo da BuChE do que no sítio ativo da AChE, confirmando a seletividade para a BuChE.

Os novos carbamatos de cicloexila 3-arilaminossustituídos são estruturas interessantes para o desenvolvimento de inibidores mais potentes e seletivos à BuChE.

5

Parte
Experimental

5.1. Preparação das 3-arilaminocicloexanonas (**1a-c**)

Em um balão de 50 mL, equipado com agitador magnético, foram adicionados 2 mL de cicloexen-2-ona (20 mmol), 1,8 mL de anilina (20 mmol) e 1,28 g (0,3 eq) de [DBU][Ac].⁸⁴ Manteve-se a reação sob agitação em temperatura ambiente durante 5 horas. Após esse período foi adicionado 5 mL de água destilada e 20 mL de acetato de etila à mistura reacional. A fase aquosa foi separada e armazenada para a recuperação do líquido iônico. À fase orgânica foi adicionado 10 mL de água e uma solução de NaOH (1 M), até pH 12. A fase orgânica foi separada da fase aquosa básica, lavada com uma solução de cloreto de sódio e seca com sulfato de sódio anidro. O solvente foi removido sob vácuo em um rotaevaporador. O produto foi purificado por recristalização utilizando hexano e acetato de etila. O sólido recristalizado foi lavado com hexano gelado e seco sob vácuo a temperatura ambiente. O mesmo procedimento foi realizado para os derivados **1b** e **1c**. Os rendimentos e as propriedades físicas dos compostos constam na Tabela 3 (seção 3, pg 45).

5.2. Preparação dos *trans*-3-arilaminocicloexanois (**2a-c**)

Em um balão de três bocas de 50 mL, previamente flambado, equipado com agitador magnético e atmosfera de nitrogênio, dissolveu-se 1,5 g (7,9 mmol) da 3-fenilaminocicloexanona (**1a**) em 30 mL de THF seco. A solução foi resfriada a -80 °C e em seguida adicionou-se 16 mL (16 mmol) de N-selectride⁸⁵ (1 M). A mistura foi mantida a baixa temperatura (-80 °C) por 4 horas.

Após este tempo deixou-se a mistura reacional atingir a temperatura ambiente e em seguida adicionou-se lentamente 3 mL de água, 9 mL de etanol, 6 mL de NaOH (6 M) e 9 mL de H₂O₂ (30%) todos gelados. Adicionou-se água destilada (20 mL) e extraiu-se com acetato de etila (3 x 30 mL). A fase orgânica foi seca com sulfato de sódio anidro, filtrada e o solvente foi removido em rotaevaporador. O produto formado foi armazenado no refrigerador para cristalização. A purificação do produto foi realizada por recristalização, utilizando hexano e acetato de etila. O produto recristalizado foi lavado com hexano gelado e

seco sob vácuo a temperatura ambiente. O mesmo procedimento foi realizado para os derivados **2b** e **2c**. Na Tabela 5 (seção 3 pg 50) estão compilados os rendimentos reacionais e as propriedades físicas de cada composto.

5.3. Preparação dos *cis*-3-amilaminocicloexanois (**3a-c**)

Em um balão de três bocas de 50 mL, previamente flambado, sob atmosfera de nitrogênio e com agitação magnética, foram dissolvidos 1,0 g (26 mmol) de NaBH₄⁸⁷ em 30 mL de THF seco. Em seguida, foram adicionados lentamente, 2,0 g (10,5 mmol) de 3-fenilaminocicloexanona (**1a**), mantendo-se o sistema em agitação por 48 horas à temperatura ambiente. Decorrido este período, adicionou-se lentamente uma solução de HCl a 1%, até a formação de um sal de coloração branca e extraiu-se o composto com acetato de etila (3 x 30 mL). A fase orgânica foi seca com sulfato de sódio anidro e o solvente removido sob vácuo em rotaevaporador. O mesmo procedimento foi realizado para os derivados **3b** e **3c**. Os rendimentos reacionais e as propriedades físicas de cada composto estão descritas na Tabela 5 (seção 3, pg 50).

5.4. Preparação dos *cis* e *trans*-*N,N*-dimetilcarbamatos de cicloexila 3-amilaminossustituídos (**4a-4c**; **5a** e **5c**)

Em um balão de três bocas de 50 mL, previamente flambado, equipado com condensador de refluxo, agitador magnético e atmosfera de nitrogênio adicionou-se 0,64 g (3,3 mmol) do *trans*-3-fenilaminocicloexanol (**2a**) em 30 mL de THF seco e então 0,16 g (6,7 mmol) de hidreto de sódio⁴⁰. A mistura reacional foi aquecida a 80 °C e mantida sob agitação por 8 horas. Após este período, foram adicionados lentamente 0,5 mL (5,4 mmol) de cloreto de *N,N*-dimetilcarbamoíla destilado, mantendo a reação sob refluxo por 16 horas.

Após atingir a temperatura ambiente, verteu-se a mistura reacional sob uma solução gelada de bicarbonato de sódio 1% e extraiu-se o produto com acetato de etila (3 x 30 mL). A fase orgânica foi lavada 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 sob vácuo em rotaevaporador. O produto obtido foi purificado por eluição em coluna cromatográfica, utilizando sílica gel 60 como fase estacionária e hexano – acetato de etila em gradiente crescente de polaridade como eluente. O mesmo procedimento foi realizado para os demais compostos e seus rendimentos e propriedades físicas constam na Tabela 8 (seção 3, pg 53)

5.5. Preparação dos cloridratos de *N,N*-dimetilcarbamatos de cicloexila 3-arilaminossustituídos (6a-6c; 7a e 7c)

Uma solução do *trans-N,N*-dimetilcarbamato de 3-arilaminocicloexila (**6a**) (300 mg) em diclorometano foi resfriada em banho de gelo (0-5 °C). A seguir, adicionou-se 0,5 mL de ácido clorídrico 37%, mantendo-se a solução sob agitação por 5 minutos. A solução foi seca com sulfato de sódio anidro e o solvente removido sob vácuo em rotaevaporador. O mesmo procedimento foi realizado para os demais compostos e na Tabela 11 (seção 3, pg 57) estão descritos os rendimentos e propriedades físicas.

5.6. Análises de RMN

Os espectros de RMN de ¹H, ¹³C e HSQC foram obtidos em um espectrômetro Varian, modelo Mercury Plus BB operando a 300 MHz para o núcleo de hidrogênio e 75 MHz para o núcleo de carbono e em um espectrômetro Bruker, modelo avance III HD operando a 500 MHz para o núcleo de hidrogênio e 125 MHz para o núcleo de carbono. As soluções foram preparadas a partir da diluição de 10 a 15 mg de amostra em 0,7 mL de CDCl₃ e a temperatura da probe foi mantida a 25 °C, utilizando tetrametilsilano como referência interna, sob condições típicas de operação.

5.7. Experimentos de RMND

Os experimentos de RMND foram realizados em um espectrômetro Bruker, modelo avance III HD operando a 500 MHz para o núcleo de hidrogênio e 125 MHz para o núcleo de carbono, acoplado a um sistema de evaporação de nitrogênio líquido para resfriamento da amostra. Os experimentos foram feitos em CD₂Cl₂, acetona-*d*6 e metanol-*d*4 e para cada mudança de temperatura esperou-se no mínimo 10 minutos, até que a amostra atingisse o equilíbrio térmico antes da aquisição. Os espectros de ¹H, ¹³C e HSQC foram adquiridos nas temperaturas de 25, 0, -20, -40, -60 e -80 °C.

5.8. Cálculos Teóricos

Os cálculos de estrutura eletrônica foram realizados com o pacote de programas Gaussian 09, revisão B.01⁹¹. Para todos os compostos, foram obtidas superfícies de energia potencial (através do giro de 360° 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 menor energia foram então otimizadas utilizando o funcional de densidade M06-2X aliado aos conjuntos de funções de base 6-311++G(d,p) e 6-311++G(2df,2p). Além da otimização em fase gasosa, os confôrmeros também foram otimizados na presença de solvente (clorofórmio, diclorometano, acetona e metanol) nos níveis de teoria M06-2X/6-311++G(d,p) e M06-2X/6-311++G(2df,2p) utilizando o modelo de solvatação IEF-PCM que descreve a cavidade molecular pelos raios de Bondi e considera explicitamente os hidrogênios. Todas as estruturas otimizadas foram caracterizadas como mínimos absolutos por meio de cálculos de frequências vibracionais.

5.9. Ensaios para avaliação da atividade anticolinesterásica

Os testes de avaliação da atividade anticolinesterásica foram realizados no Laboratório de Toxicologia do Departamento de Ciências Básicas e da Saúde da

Universidade Estadual de Maringá (UEM), sob a supervisão dos professores Miguel Machinski Jr e Simone A. G. Mossini. As atividades inibitórias das enzimas AChE e BuChE foram determinadas espectrofotometricamente, utilizando o Método de Ellman modificado⁴², pela medida das absorvâncias a 412 nm durante 5 minutos com um espectrofotômetro UV-VIS, SHIMADZU.

Para avaliar a inibição das colinesterases foram realizados testes em amostras de sangue humano, coletado do voluntário em jejum, utilizando na coleta de sangue heparina como anticoagulante. Uma parte da amostra foi usada para medir a inibição das enzimas totais (AChE e BuChE) e a outra parte foi submetido à centrifugação para separar o plasma das hemácias, obtendo apenas a BuChE. As amostras de sangue total foram armazenadas na geladeira à temperatura de 2° a 8° C por no máximo 48 horas e as amostras de plasma foram congeladas para maior durabilidade.

5.9.1. Preparação dos reagentes

Solução de fosfatodibásico de sódio 0,1 M (Reagente 1)

Adicionou-se 26,8 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 13,6 g de diidrogenofosfato de potássio (KH_2PO_4) em um balão volumétrico de 1000 mL e completou-se o volume com água destilada.

Tampão fosfato pH 7,0

Adicionou-se 150 mL do reagente 2 em 100 mL do reagente 1 e ajustou-se o pH para 7,0 com auxílio de pHmetro.

Tampão fosfato pH 8,0

Adicionou-se 150 mL do reagente 2 em 450 mL do reagente 1 e o pH foi ajustado para 8,0 com auxílio de pHmetro.

Solução de iodeto de acetiltiocolina 0,075 mol/L

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

Solução de ácido ditionitrobenzóico (DTNB) 10 mmol/L

Foram adicionados 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.

5.9.2. Solução estoque dos cloridratos *N,N*-dimetilcarbamato de cicloexila 3-arilaminossustituídos (6a-6c ; 7a e 7c)

Foram adicionados aproximadamente 60 mg (0,2 mmol) do cloridrato de *trans-N,N*-dimetilcarbamato de 3-fenilaminocicloexila (**6a**) em um balão volumétrico de 1 mL e completado o volume com água destilada. A partir desta solução (0,2 mol/L) foram realizadas diluições para obter as soluções estoques com concentrações de 100, 50, 20, 10 e 5 mmol/L. Este procedimento foi realizado para os demais compostos, exceto para o composto **7a** que foi utilizado 45 mg para preparar uma solução de 0,15 mol/L que foi diluída nas concentrações de 75; 37,5; 15; 7,5 e 3,75 mmol/L.

5.9.3. Determinação da atividade das colinesterases totais (AChE e BuChE)

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 homogeneização, 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 absorvância a 412 nm com as duas cubetas de referência. Na cubeta do compartimento amostra, adicionou-se 20 µL da solução de iodeto de acetilticolina, homogeneizou-se e realizou-se a leitura de absorvância a cada minuto, durante cinco minutos. Este último procedimento foi repetido para as outras duas cubetas restantes.

5.9.4. Determinação da atividade da butirilcolinesterase

Centrifugou-se 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 absorvância a 412 nm com as duas cubetas de referência. Na cubeta do compartimento amostra, adicionou-se 20 µL da solução de iodeto de acetilticolina homogeneizou-se e realizou-se a leitura de absorvância a cada minuto, durante cinco minutos. Este último procedimento foi repetido para as outras duas cubetas restantes.

5.10. Experimentos de Cinética Enzimática

Os estudos cinéticos de inibição das enzimas AChE e BuChE foram realizados a partir do método de Ellman⁴² usando AChE isolada de *Electrophorus electricus* (enguia) e BuChE de soro equino na concentração de 0,1 U/mL. As absorvâncias foram medidas a 412 nm em um espectrofotômetro UV-VIS, modelo Cary 50 de feixe simples.

Os testes foram feitos na ausência e na presença do inibidor nas concentrações de 0,2 mM e 1,0 mM para a AChE e 0,1 mM e 1,0 mM para a BuChE. As medidas de velocidade da hidrólise dos substratos, iodeto de acetiltiocolina e iodeto de butiriltiocolina, foram feitas nas seguintes concentrações finais: 0,025; 0,05; 0,125; 0,25; 0,50; 0,75; 1,0; e 2,0 mmol/L

5.10.1. Preparação dos reagentes

Solução de AChE (20 U/mL)

Foram adicionados 20 mL de tampão fosfato pH 8,0 no frasco da AChE do tipo VI-S extraída da *Electrophorus electricus* (enguia) com 500 U obtida da Sigma-Aldrich. Após a diluição da enzima, a solução foi transferida para um balão volumétrico de 25 mL e o volume completado com o mesmo tampão. Esta solução foi fracionada em 25 frascos contendo 1 mL da solução 20 U/mL e estes foram estocados à -20 °C.

Solução de BuChE (30 U/mL)

Dissolveu-se aproximadamente 5 mg da BuChE extraída do soro equino com 1200 U (59,2 g/U), obtida pela Sigma-Aldrich, em 5 mL de tampão fosfato 8,0. A solução foi transferida para um balão volumétrico de 10 mL e o volume completado com o mesmo tampão. A solução com concentração de 30 U/mL foi fracionada em 10 frascos contendo 1 mL cada e foram armazenados à -20 °C.

5.10.2. Determinação da velocidade da reação enzimática da AChE e BuChE com e sem presença do inibidor

Em uma cubeta foram adicionados 3 mL de tampão fosfato pH 8,0, 15 µL da solução 30 U/mL da AChE, 25 µL da solução 10 mmol/L de DTNB e então zerou-se o aparelho. Em seguida, foram adicionados na mesma cubeta 20 µL da solução 75 mmol/L de iodeto de acetiltiocolina (concentração final de 0,50 mmol/L) e mediu-se as absorbâncias a cada 6 segundos durante 5 minutos. Este

processo foi realizado para diferentes concentrações finais do substrato, de acordo com o quadro abaixo.

[S] solução estoque (mM)	7,5	7,5	7,5	75	75	75	75	75
Volume (μ L)	10	20	50	10	20	30	40	80
[S] final (mM)	0,025	0,05	0,125	0,25	0,50	0,75	1,0	2,0

Para determinar a influência do inibidor na velocidade da reação, adicionou-se 40 μ L de uma solução de 75 mmol/L do inibidor (concentração final de 1 mM) em um tubo de ensaio contendo 3 mL de tampão e 20 μ L da solução 30 U/mL da AChE, e incubou-se durante 10 min a temperatura de 30 °C. Após o tempo de incubação, transferiu-se esta solução para a cubeta, adicionou-se 20 μ L da solução 75 mmol/L de iodeto de acetiltiocolina (concentração final de 0,50 mmol/L) e mediu-se as absorbâncias a cada 6 segundos durante 5 minutos. Repetiu-se este procedimento para diferentes concentrações finais do iodeto de acetiltiocolina.

O mesmo procedimento foi realizado com uma concentração menor de inibidor (0,2 mmol/L). Neste caso, utilizou-se uma alíquota de 40 μ L da solução de 15 mmol/L do inibidor.

A medida da velocidade da reação enzimática da BuChE foi feita seguindo o mesmo procedimento descrito para a AChE, utilizando 15 μ L da solução 20 U/mL da enzima e concentrações de inibidor igual a 1,0 e 0,1 mmol/L.

Os dados obtidos foram utilizados para construir as curvas de velocidade *versus* concentração do substrato que foram transformadas no programa Prism Graph 06 em gráficos de Lineweaver-Burk.

5.11. *Docking* Molecular

O docking molecular foi realizado em colaboração com a doutoranda Mariane Cristovão Bagatin, com supervisão da professora doutora Gisele de Freitas Gauze Bandoch.

O protocolo de docagem foi estabelecido por estudos de *redocking* da tacrina nas estruturas cristalográficas 1ACJ e 4BDS retiradas do Protein Data Bank (PDB) utilizando o programa AutoDock v.4.2.3 implementado na interface gráfica do programa Pyrx 0.9⁹²

Este programa restringe os ângulos de torção da enzima, mas permite a flexibilidade do ligante testado. É importante destacar que algumas moléculas de água presentes em ambas as estruturas foram mantidas para ajudar na validação da metodologia.

Para o estudo de *redocking* da acetilcolinesterase utilizando a estrutura 1ACJ foi construído uma caixa de 40 x 40 x 40 Å centrada nas coordenadas X= 4.24, Y= 69.34 e Z= 65.15 com um espaçamento de grade de 0,375 Å. Já para a butirilcolinesterase utilizando a estrutura 4BDS foi construído uma caixa de 40 x 40 x 40 Å centrada nas coordenadas X= 132.5, Y= 116.0 e Z= 40.7 com um espaçamento de grade de 0,375 Å.

O algoritmo Genético Lamarckiano foi utilizado com um protocolo padrão, para ambos os estudos, com 10 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. As simulações de *redocking* foram repetidas quatro vezes e os resultados foram reproduzidos obtendo-se valores de RMSD abaixo de 0,5 Å.

A partir da validação da metodologia os compostos que apresentaram os melhores resultados experimentais, o cloridrato de *trans*- *N,N*-dimetilcarbamato de 3-(4-metoxifenilamino)cicloexila (**6c**) e o cloridrato de *cis*-*N,N*-dimetilcarbamato de 3-(4-metoxifenilamino)cicloexila (**7c**), foram docados em ambas as estruturas 1ACJ e 4BDS com o intuito de se analisar as possíveis interações enzima substrato. Estas estruturas foram desenhadas e otimizadas utilizando o programa Gaussian 09⁹¹.

6

Referências
Bibliográficas

1. Singh, M.; Kaur, M.; Kukreja, H.; Chugh, R.; Silakari, O.; Singh, D. *Eur. J. Med. Chem.* **2013**, *70*, 165–188.
2. Giusti, E.; Surdo, V. *Alzheimer: Cuidados Clínicos e Aconselhamento familiar: necessidades e tratamento psicológico da demência*; 1st ed.; Gryphus: Rio de Janeiro, **2010**.
3. Viegas, F. P. D.; Simões, M. C. R.; Rocha, M. D.; Castelli, M. R.; Moreira, M. S.; Viegas Junior, C. *Doença de Alzheimer : Caracterização , Evolução e Implicações do Processo Neuroinflamatório*; **2011**; Vol. 3.
4. Association, A. *Alzheimers. Dement.* **2014**.
5. Organization, W. H. *World Heal. Organ.* **2012**.
6. Yang, Y.; Cui, M. *Eur. J. Med. Chem.* **2014**, *87*, 703–721.
7. Arango-lasprilla, J. C.; Panyavin, I.; Perrin, P. B.; Snipes, D. J.; Arroyo-anllo, E. M. *Am. J. Alzheimer's Dis. Other Dementias* **2014**, *29*, 548–555.
8. Graeff, F. G.; Brandão, M. L. *Neurobiologia das Doenças Mentais*; 4th ed.; Lemos Editorial: São Paulo, **1997**.
9. Shah, R. S.; Lee, H.; Xiongwei, Z.; Perry, G.; Smith, M. A.; Castellani, R. J. *Biomed. Pharmacother.* **2008**, *62*, 199–207.
10. Rang, H. P.; Dale, M. M.; Ritter, J. M.; Flower, R. J.; Henderson, G. *Farmacologia*; 7th ed.; Elsevier: Rio de Janeiro, **2011**.
11. Lambert, K.; Kinsley, C. H. *Neurociência Clínica : as bases neurobiológicas da saúde*; Artmed.; Porto Alegre, **2006**.
12. Francis, P. T.; Palmer, A. M.; Snape, M.; Wilcock, G. K. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* **1999**, *66*, 137–147.
13. Dumas, J. a; Newhouse, P. a *Pharmacol. Biochem. Behav.* **2011**, *99*, 254–61.
14. Tasso, B.; Catto, M.; Nicolotti, O.; Novelli, F.; Tonelli, M.; Giangreco, I.; Pisani, L.; Sparatore, A.; Boido, V.; Carotti, A.; Sparatore, F. *Eur. J. Med. Chem.* **2011**, *46*, 2170–2184.
15. CNS Forum:
https://www.cnsforum.com/educationalresources/imagebank/dementia_cholingeric.

16. Dvir, H.; Silman, I.; Harel, M.; Rosenberry, T. L.; Sussman, J. L. *Chem. Biol. Interact.* **2010**, *187*, 10–22.
17. Harel, M.; Schalkt, I.; Bouett, F.; Goeldnert, M.; Hirtht, C.; Axelsen, P. H.; Silmanii, I.; Sussman, J. L. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1993**, *90*, 9031–9035.
18. Xu, Y.; Colletier, J.; Weik, M.; Jiang, H.; Moulton, J. *Biophys. J.* **2008**, *95*, 2500–2511.
19. Silman, I.; Sussman, J. L. *Chem. Biol. Interact.* **2008**, *175*, 3–10.
20. Bajda, M.; Wi, A.; Hebda, M.; Guzior, N. *Int. J. Mol. Sci.* **2013**, *14*, 5608–5632.
21. Kryger, G.; Silman, I.; Sussman, J. L. *J. Physiol.* **1998**, *92*, 191–194.
22. Dos Santos, V. M. R.; Donnici, C. L.; DaCosta, J. B. N.; Caixeiro, J. M. R. *Quim. Nova* **2007**, *30*, 159–170.
23. Johnson, G.; Moore, S. W. *Neurochem. Int.* **2012**.
24. Lane, R. M.; Potkin, S. G.; Enz, A. *Int. J. Neuropsychopharmacol.* **2005**, *9*, 101.
25. Macdonald, I. R.; Martin, E.; Rosenberry, T. L.; Darvesh, S. *Biochemistry* **2012**.
26. Darvesh, S.; Hopkins, D. A.; Geula, C. *Nat. Rev. Neurosci.* **2003**, *4*, 131–138.
27. Reid, G. A.; Chilukuri, N.; Darvesh, S. *Neuroscience* **2013**, *234*, 53–68.
28. Henrique, P.; Bertolucci, F. *Rev. Neurociências* **2000**, *8*, 11–14.
29. Forlenza, O. V. *Rev. Psiqu. Clín.* **2005**, *32*, 137–148.
30. Lima, D. A. *Rev. do Hosp. Univ. Pedro Ernesto* **2008**, *7*, 78–87.
31. Lilienfeld, S. *CNS Drug Rev.* **2002**, *8*, 159–176.
32. Darvesh, S.; Darvesh, K. V.; McDonald, R. S.; Mataija, D.; Walsh, R.; Mothana, S.; Lockridge, O.; Martin, E. *J. Med. Chem.* **2008**, *51*, 4200–4212.
33. Bartolucci, C.; Siotto, M.; E., G.; Amari, G.; Bolzoni, P. T.; Racchi, M.; Villetti, G.; Delcanale, M.; Lamba, D. *J. Med. Chem.* **2006**, 5051–5058.
34. Gareth, T. *Química Medicinal*; Guanabara Koogan: Rio de Janeiro, **2003**.

35. Pope, C.; Karanth, S.; Liu, J. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* **2005**, *19*, 433–446.
36. Francis, P. T.; Palmer, A. M.; Snape, M.; Wilcock, G. K. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* **1999**, *66*, 137–147.
37. Lin, M. C.; Hwang, M. T.; Chang, H. G.; Lin, C. S.; Lin, G. *J. Biochem. Mol. Toxic.* **2007**, *21*, 348–353.
38. Więckowska, A.; Bajda, M.; Guzior, N.; Malawska, B. *Eur. J. Med. Chem.* **2010**, *45*, 5602–5611.
39. 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.
40. Bagatin, M. C.; Cândido, A. A.; Pinheiro, G. M. S.; Höehr, N. F.; Machinski Júnior, M.; Mossini, S. A. G.; Basso, E. A.; Gauze, G. F. *J. Braz. Chem. Soc.* **2013**, *24*, 1798–1807.
41. Darras, F. H.; Kling, B.; Sawatzky, E.; Heilmann, J.; Decker, M. *Bioorg. Med. Chem.* **2014**, *22*, 5020–5034.
42. Ellman, G. L.; Courtney, K. D.; Andres, V.; Featherstone, R. M. *Biochem. Pharmacol.* **1961**, *7*, 88–95.
43. Resmi, H.; Taylan, E. *Turkish J. Biochem.* **2010**, *35*, 275–278.
44. Moran, L. A.; Horton, H. R.; Scrimgeour, K. G.; D., P. M. *Bioquímica*; 5th ed.; Person Education do Brasil: São Paulo, **2013**.
45. Harvey, R. A.; Ferrier, D. R. *Bioquímica Ilustrada*; 5th ed.; Artmed: Porto Alegre, **2012**.
46. Burlingham, B. T.; Widlanski, T. S. *J. Chem. Educ.* **2003**, *8*, 214–218.
47. Christensen, I. T.; Jørgensen, F. S. *J. Comput. Aided. Mol. Des.* **1997**, *11*, 385–394.
48. Eliel, E. L.; Wilen, S. H.; Mander, N. L. *Stereochemistry of Organic Compounds*; Wiley: New York, **1997**.
49. Cedran, J. C.; Santos, F. P.; Basso, E. A. *J. Phys. Chem. A* **2007**, *111*, 11701–11705.
50. Bocca, C. C.; Basso, E. A.; Fiorin, B. C.; Tormena, C. F.; Santos, F. P. *J. Phys. Chem. A* **2006**, *3*, 9438–9442.

51. Reichardt, C.; Welton, T. *Solvents and Solvent Effects in Organic Chemistry*; Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA: Weinheim, Germany, **2010**.
52. Ramos, J. J. M.; Dumont, L.; Stien, M. L.; Reisse, J. *J. Am. Chem. Soc.* **1980**, *102*, 4150–4154.
53. Conde, J. P.; Ramos, J. M. *J. Chem. Educ.* **1986**, *63*, 823.
54. De Oliveira, P. R.; Rittner, R. *J. Mol. Struct.* **2005**, *743*, 69–72.
55. Pavia, D. L.; Lampman, G. M.; Kriz, G. S.; Vyvyan, J. R. *Introdução à espectroscopia*; 4th ed.; Cengage Learning: São Paulo, **2012**.
56. Gil, V. M. S.; Geraldês, C. F. G. C. *Ressonância Magnética Nuclear-Fundamentos, métodos e aplicações*; Fundação Calouste Gulbenkian: Lisboa, **1987**.
57. Minch, M. J. *Concepts Magn. Reson.* **1994**, *6*, 41–56.
58. Sant'Anna, M. C. R. *Quim. Nova* **2002**, *25*, 505–512.
59. Andrade, C. H.; Henrique, G.; Trossini, G.; Ferreira, E. I. *Rev. Eletrônica Farmácia* **2010**, *VII*, 1–23.
60. Morgon, N. H.; Custódio, R. *Quim. Nova* **1995**, *18*, 44–55.
61. Young, D. *Computational Chemistry: A practical guide for applying Techniques to Real World Problems*; John Wiley: New York, **2001**.
62. Foresman, J. B.; Frisch, A. *Exploring Chemistry with Electronic Structure Methods*; 2nd ed.; Gaussian Inc: Pittsburg, **1996**.
63. Melo, U. Z. Análise conformacional de 3-halo-derivados da 2-pirrolidinona por espectroscopia de ressonância magnética nuclear e cálculos de estrutura eletrônica. Dissertação de Mestrado; UEM: Maringá, **2014**.
64. W. Kohn, A. D. Becke, R. G. Parr *J. Phys. Chem.* **1996**, *100*, 12974.
65. Freitas, L. C. G. *Quim. Nova* **1999**, *22*, 293.
66. Zhao, Y.; Truhlar, D. G. *Acc. Chem. Res.* **2008**, *41*, 157.
67. Zhao, Y.; Truhlar, D. G. *Theor. Chem. Acc.* **2007**, *120*, 215.
68. Lee, C.; Yang, W.; Parr, R. G. *Phys. Rev. B* **1988**, *37*, 785.
69. Minkin, V. I. (Ed.) *Pure. Appl. Chem.* **1999**, *71*, 1919–1981.

70. Jasien, P. G.; Stevens, W. J.; Krauss, M. *J. Mol. Struct.* **1986**, *139*, 197–206.
71. Shavitt, I. *Isr. J. Chem.* **1993**, *33*, 357–367.
72. Pontes, R. M. Barreiras Rotacionais Em Sistemas Amídicos. Estudo Experimental e Teórico de Congêneros de Carbamatos e Uréias, Tese de Doutorado; UEM: Maringá, **2006**.
73. Lengauer, T.; Rareyt, M. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **1996**, *6*, 402–406.
74. Kitchen, D. B.; Decornez, H.; Furr, J. R.; Bajorath, J. *J. Drug Discov.* **2004**, *3*, 935–949.
75. Zoete, V.; Grosdidier, A.; Michielin, O. *J. Cell. Mol. Med.* **2009**, *13*, 238–248.
76. Taylor, R. D.; Jewsbury, P. J.; Essex, J. W. *J. Comput. Aid. Mol. Des.* **2002**, *16*, 151–166.
77. Lee, K.; Lee, J. W. *Curr. Proteomics* **2008**, *5*, 10–19.
78. Azizi, N.; Saidi, M. R. *Tetrahedron* **2004**, *60*, 383–387.
79. Xu, L.; Li, L.; Xia, C. *Helv. Chim. Acta* **2004**, *87*, 1522–1526.
80. Ying, A.; Zheng, M.; Xu, H.; Qiu, F.; Ge, C. *Res. Chem. Intermed.* **2011**, *37*, 883–890.
81. Yang, L.; Xu, L.-W.; Zhou, W.; Li, L.; Xia, C.-G. *Tetrahedron Lett.* **2006**, *47*, 7723–7726.
82. Kumar, D.; Patel, G.; Mishra, B. G.; Varma, R. S. *Tetrahedron Lett.* **2008**, *49*, 6974–6976.
83. Ying, A.-G.; Liu, L.; Wu, G.-F.; Chen, G.; Chen, X.-Z.; Ye, W.-D. *Tetrahedron Lett.* **2009**, *50*, 1653–1657.
84. Ying, A.; Wang, L.; Deng, H.; Chen, J.; Chen, X.; Ye, W. *Arkivoc* **2009**, *2009*, 288–298.
85. Basso, E. A.; Abiko, L. A.; Gauze, G. F.; Pontes, R. M. *J. Org. Chem.* **2011**, *76*, 145–153.
86. Carey, F. A.; Sundberg, R. J. *Advanced Organic Chemistry Part B: Reactions and Synthesis*; 3rd ed.; Plenum Press: New York, **1990**.
87. Bocca, C. C.; Gauze, G. F.; Basso, E. A. *Chem. Phys. Lett.* **2005**, *413*, 434–439.

88. Solomons, G. T. W.; Fryhle, C. B. *Química Orgânica Volume 2*; 9th ed.; LTC: Rio de Janeiro, **2009**.
89. Basso, E. A.; Oliveira, P. R.; Caetano, J.; Schuquel, I. T. A. *J. Braz. Chem. Soc.* **2001**, *12*, 215–222.
90. Johnson, E. R.; Keinan, S.; Mori-Sánchez, P.; Contreras-García, J.; Cohen, A. J.; Yang, W. *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 6498–6506.
91. 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, J. 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**.
92. Zoete, V.; Cuendet, M. A.; Grosdidier, A.; Michielin, O. *J. Comput. Chem.* **2011**, *32*, 2359–2368.

ANEXOS

Índice de Anexos

Anexo 1. Espectro de RMN de ^1H a 300 MHz do 3-fenilaminocicloexanona (1a) em CDCl_3	01
Anexo 2. Espectro de RMN de ^{13}C a 75 MHz do 3-fenilaminocicloexanona (1a) em CDCl_3	02
Anexo 3. Mapa de contorno HSQC do 3-fenilaminocicloexanona (1a) em CDCl_3	03
Anexo 4. Espectro de RMN de ^1H a 300 MHz do 3-(4-fluorfenilamino)cicloexanona (1b) em CDCl_3	04
Anexo 5. Espectro de RMN de ^{13}C a 75 MHz do 3-(4-fluorfenilamino)cicloexanona (1b) em CDCl_3	05
Anexo 6. Mapa de contorno HSQC do 3-(4-fluorfenilamino)cicloexanona (1c) em CDCl_3	06
Anexo 7. Espectro de RMN de ^1H a 300 MHz do 3-(4-metoxifenilamino)cicloexanona (1c) em CDCl_3	07
Anexo 8. Espectro de RMN de ^{13}C a 75 MHz do 3-(4-metoxifenilamino)cicloexanona (1c) em CDCl_3	08
Anexo 9. Mapa de contorno HSQC do 3-(4-metoxifenilamino)cicloexanona (1c) em CDCl_3	09
Anexo 10. Espectro de RMN de ^1H a 300 MHz do <i>trans</i> -3-fenilaminocicloexanol (2a) em CDCl_3	10
Anexo 11. Espectro de RMN de ^{13}C a 75 MHz do <i>trans</i> -3-fenilaminocicloexanol (2a) em CDCl_3	11
Anexo 12. Mapa de contorno HSQC do <i>trans</i> -3-fenilaminocicloexanol (2a) em CDCl_3	12

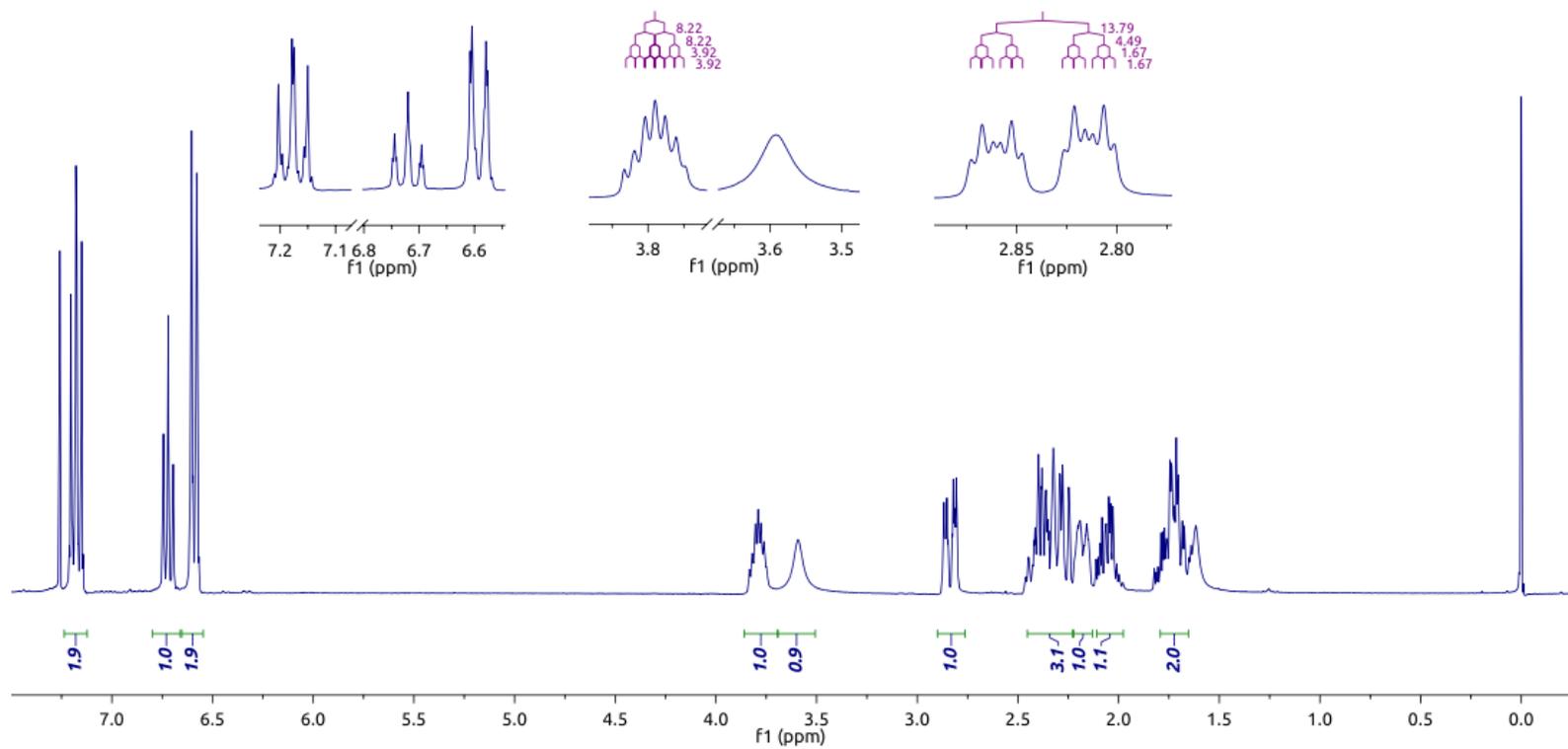
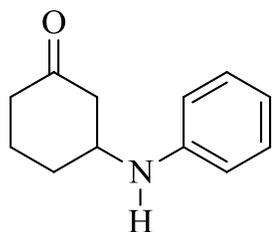
Anexo 13. Espectro de RMN de ^1H a 500 MHz do <i>trans</i> -3-(4-fluorfenilamino)cicloexanol (2b) em CDCl_3	13
Anexo 14. Espectro de RMN de ^{13}C a 125 MHz do <i>trans</i> -3-(4-fluorfenilamino)cicloexanol (2b) em CDCl_3	14
Anexo 15. Mapa de contorno HSQC do <i>trans</i> -3-(4-fluorfenilamino)cicloexanol (2b) em CDCl_3	15
Anexo 16. Espectro de RMN de ^1H a 300 MHz do <i>trans</i> -3-(4-metoxifenilamino)cicloexanol (2c) em CDCl_3	16
Anexo 17. Espectro de RMN de ^{13}C a 75 MHz do <i>trans</i> -3-(4-metoxifenilamino)cicloexanol (2c) em CDCl_3	17
Anexo 18. Mapa de contorno HSQC do <i>trans</i> -3-(4-metoxifenilamino)cicloexanol (2c) em CDCl_3	18
Anexo 19. Espectro de RMN de ^1H a 300 MHz da mistura dos isômeros <i>trans</i> -3-fenilaminocicloexanol (2a) e <i>cis</i> -3-fenilaminocicloexanol (3a) em CDCl_3	19
Anexo 20. Espectro de RMN de ^{13}C a 75 MHz da mistura dos isômeros <i>trans</i> -3-fenilaminocicloexanol (2a) e <i>cis</i> -3-fenilaminocicloexanol (3a) em CDCl_3	20
Anexo 21. Mapa de contorno HSQC da mistura dos isômeros <i>trans</i> -3-fenilaminocicloexanol (2a) e <i>cis</i> -3-fenilaminocicloexanol (3a) em CDCl_3	21
Anexo 22. Espectro de RMN de ^1H a 500 MHz do <i>trans</i> - <i>N,N</i> -dimetilcarbamato de 3-fenilaminocicloexila (4a) em CDCl_3	22
Anexo 23. Espectro de RMN de ^{13}C a 125 MHz do <i>trans</i> - <i>N,N</i> -dimetilcarbamato de 3-fenilaminocicloexila (4a) em CDCl_3	23
Anexo 24. Mapa de contorno HSQC do <i>trans</i> - <i>N,N</i> -dimetilcarbamato de 3-fenilaminocicloexila (4a) em CDCl_3	24

Anexo 25. Espectro de RMN de ^1H a 300 MHz do <i>trans-N,N</i> -dimetilcarbamato de 3-(4-fluorfenilamino)cicloexila (4b) em CDCl_3	25
Anexo 26. Espectro de RMN de ^{13}C a 75 MHz do <i>trans-N,N</i> -dimetilcarbamato de 3-(4-fluorfenilamino)cicloexila (4b) em CDCl_3	26
Anexo 27. Mapa de contorno HSQC do <i>trans-N,N</i> -dimetilcarbamato de 3-(4-fluorfenilamino)cicloexila (4b) em CDCl_3	27
Anexo 28. Espectro de RMN de ^1H a 300 MHz do <i>trans-N,N</i> -dimetilcarbamato de 3-(4-metoxifenilamino)cicloexila (4c) em CDCl_3	28
Anexo 29. Espectro de RMN de ^{13}C a 75 MHz do <i>trans-N,N</i> -dimetilcarbamato de 3-(4-metoxifenilamino)cicloexila (4c) em CDCl_3	29
Anexo 30. Mapa de contorno HSQC do <i>trans-N,N</i> -dimetilcarbamato de 3-(4-metoxifenilamino)cicloexila (4c) em CDCl_3	30
Anexo 31. Espectro de RMN de ^1H a 500 MHz do <i>cis-N,N</i> -dimetilcarbamato de 3-fenilaminocicloexila (5a) em CDCl_3	31
Anexo 32. Espectro de RMN de ^{13}C a 125 MHz do <i>cis-N,N</i> -dimetilcarbamato de 3-fenilaminocicloexila (5a) em CDCl_3	32
Anexo 33. Mapa de contorno HSQC do <i>cis-N,N</i> -dimetilcarbamato de 3-fenilaminocicloexila (5a) em CDCl_3	33
Anexo34. Espectro de RMN de ^1H a 300 MHz do <i>cis-N,N</i> -dimetilcarbamato de 3-(4-metoxifenilamino)cicloexila (5c) em CDCl_3	34
Anexo 35. Espectro de RMN de ^{13}C a 75 MHz do <i>cis-N,N</i> -dimetilcarbamato de 3-(4-metoxifenilamino)cicloexila (5c) em CDCl_3	35
Anexo 36. Mapa de contorno HSQC do <i>cis-N,N</i> -dimetilcarbamato de 3-(4-metoxifenilamino)cicloexila (5c) em CDCl_3	36

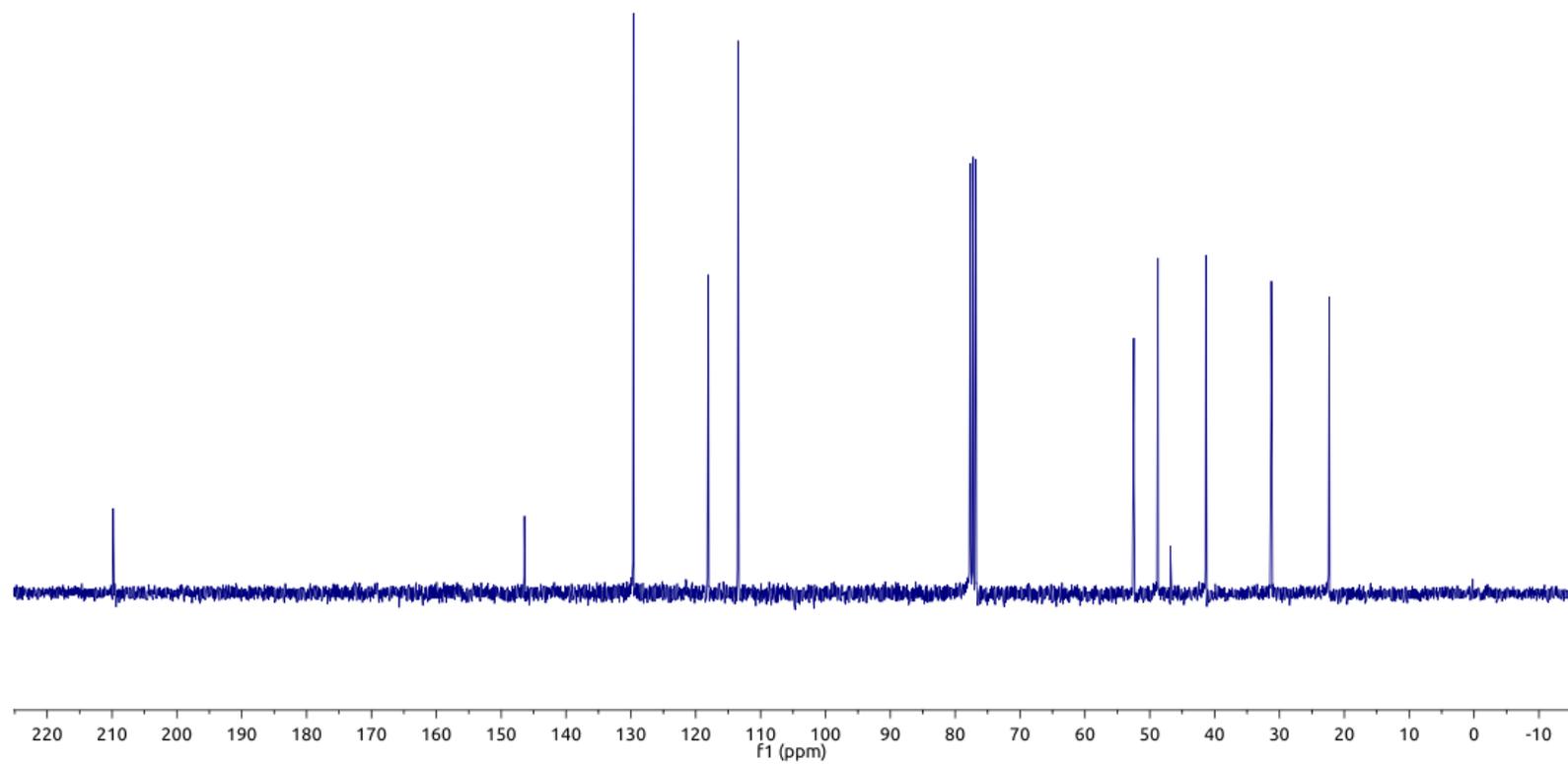
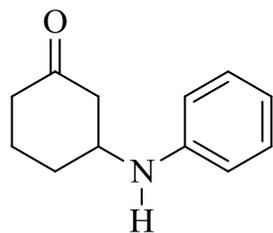
Anexo 37. Espectro de RMN de ^1H a 300 MHz do <i>Cloridrato de trans-N,N</i> -dimetilcarbamato de 3-fenilaminocicloexila (6a) em CDCl_3	37
Anexo 38. Espectro de RMN de ^{13}C a 75 MHz do <i>Cloridrato de trans-N,N</i> -dimetilcarbamato de 3-fenilaminocicloexila (6a) em CDCl_3	38
Anexo 39. Mapa de contorno HSQC do <i>Cloridrato de trans-N,N</i> -dimetilcarbamato de 3-fenilaminocicloexila (6a) em CDCl_3	39
Anexo 40. Espectro de RMN de ^1H a 300 MHz do <i>Cloridrato de trans-N,N</i> -dimetilcarbamato de 3-(4-fluorfenilamino)cicloexila (6b) em CDCl_3	40
Anexo 41. Espectro de RMN de ^{13}C a 75 MHz do <i>Cloridrato de trans-N,N</i> -dimetilcarbamato de 3-(4-fluorfenilamino)cicloexila (6b) em CDCl_3	41
Anexo 42. Mapa de contorno HSQC do <i>Cloridrato de trans-N,N</i> -dimetilcarbamato de 3-(4-fluorfenilamino)cicloexila (6b) em CDCl_3	42
Anexo 43. Espectro de RMN de ^1H a 300 MHz do <i>Cloridrato de trans-N,N</i> -dimetilcarbamato de 3-(4-metoxifenilamino)cicloexila (6c) em CDCl_3	43
Anexo 44. Espectro de RMN de ^{13}C a 75 MHz do <i>Cloridrato de trans-N,N</i> -dimetilcarbamato de 3-(4-metoxifenilamino)cicloexila (6c) em CDCl_3	44
Anexo 45. Mapa de contorno HSQC do <i>Cloridrato de trans-N,N</i> -dimetilcarbamato de 3-(4-metoxifenilamino)cicloexila (6c) em CDCl_3	45
Anexo 46. Espectro de RMN de ^1H a 300 MHz do <i>Cloridrato de cis-N,N</i> -dimetilcarbamato de 3-fenilaminocicloexila (7a) em CDCl_3	46
Anexo 47. Espectro de RMN de ^{13}C a 75 MHz do <i>Cloridrato de cis-N,N</i> -dimetilcarbamato de 3-fenilaminocicloexila (7a) em CDCl_3	47
Anexo 48. Mapa de contorno HSQC do <i>Cloridrato de trans-N,N</i> -dimetilcarbamato de 3-fenilaminocicloexila (7a) em CDCl_3	48

Anexo 49. Espectro de RMN de ^1H a 300 MHz do <i>Cloridrato de cis-N,N</i> -dimetilcarbamato de 3-(4-metoxifenilamino)cicloexila (7c) em CDCl_3	49
Anexo 50. Espectro de RMN de ^{13}C a 75 MHz do <i>Cloridrato de cis-N,N</i> -dimetilcarbamato de 3-(4-metoxifenilamino)cicloexila (7c) em CDCl_3	50
Anexo 51. Mapa de contorno HSQC do <i>Cloridrato de cis-N,N</i> -dimetilcarbamato de 3-(4-metoxifenilamino)cicloexila (7c) em CDCl_3	51

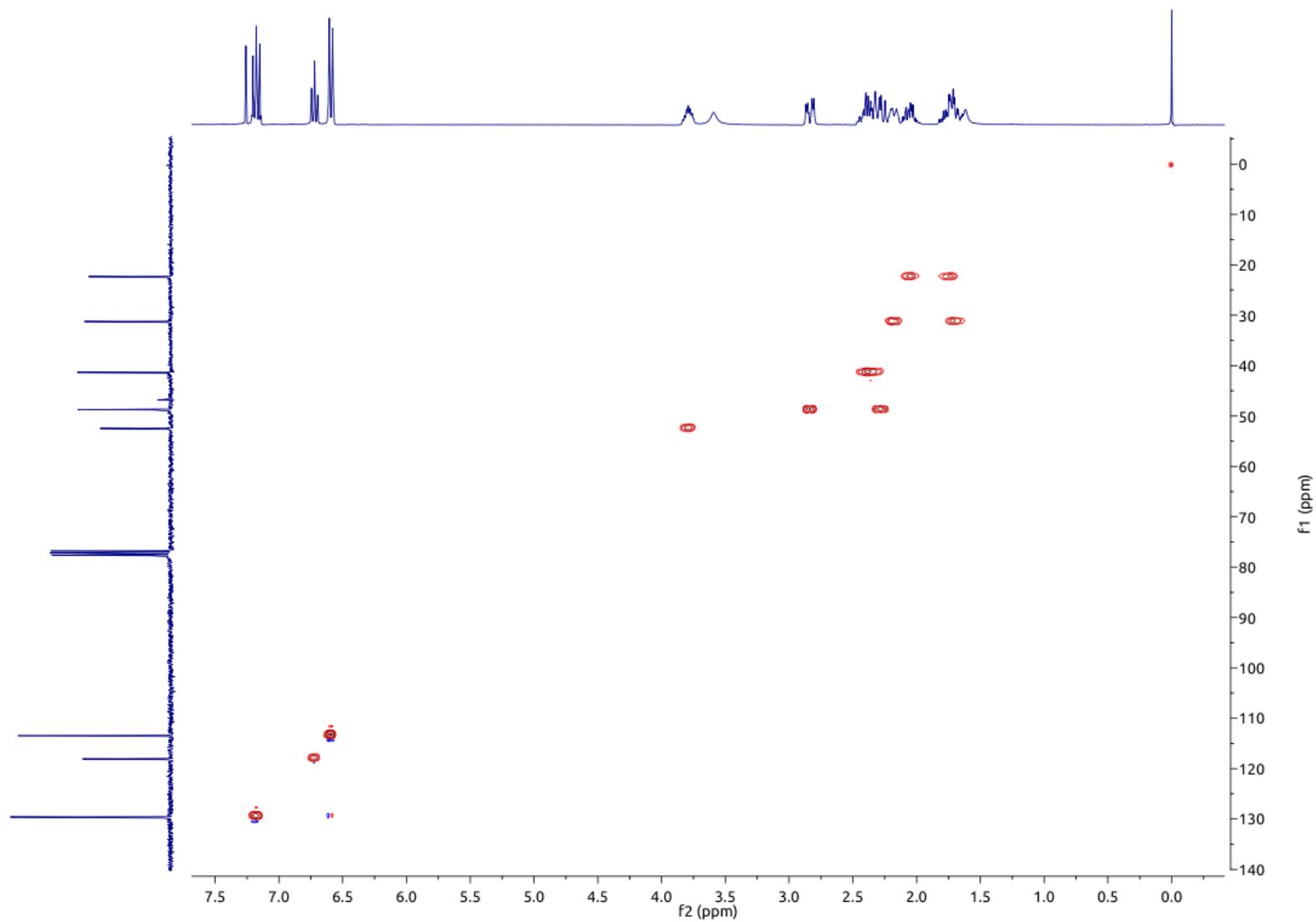
Anexo 1. Espectro de RMN de ^1H a 300 MHz do 3-fenilaminociclohexanona (**1a**) em CDCl_3 .



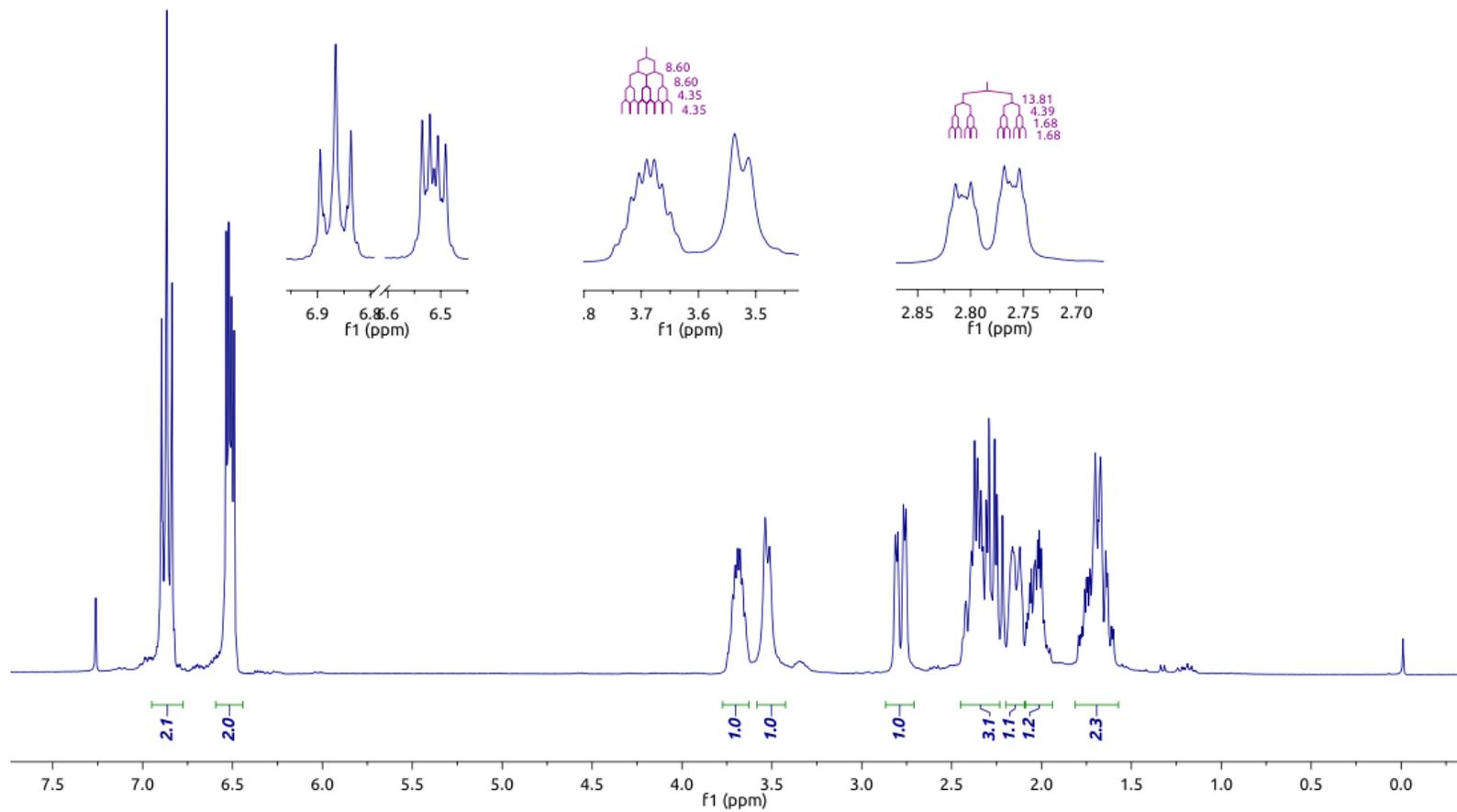
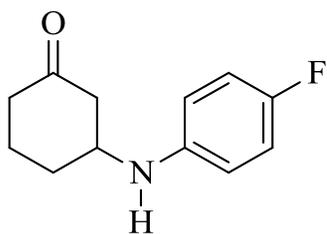
Anexo 2. Espectro de RMN de ^{13}C a 75 MHz do 3-fenilaminociclohexanona (**1a**) em CDCl_3 .



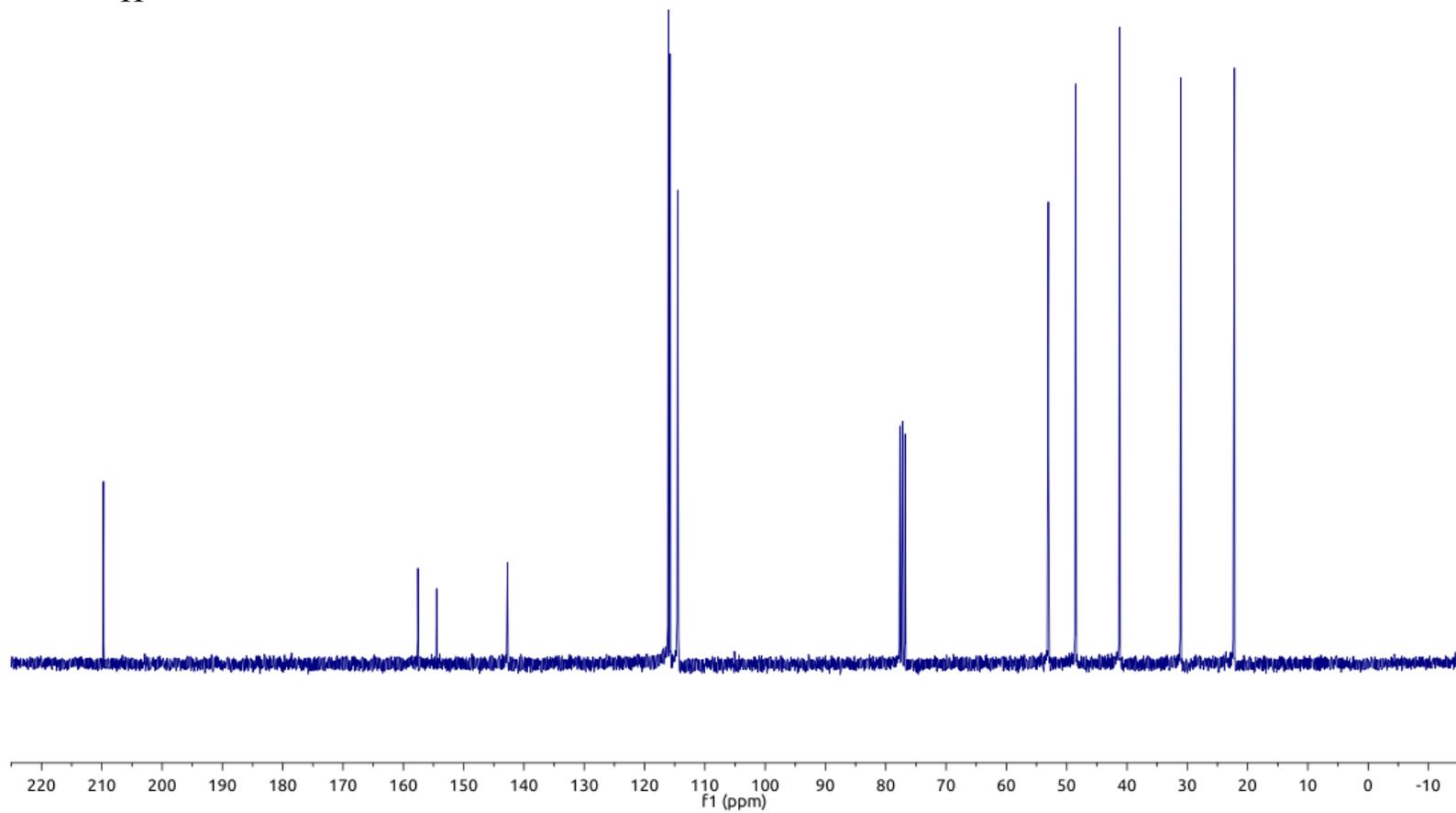
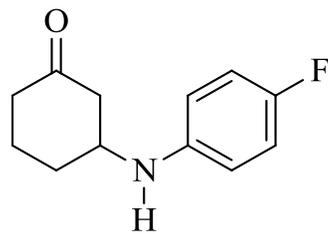
Anexo 3. Mapa de contorno HSQC do 3-fenilaminocicloexanona (**1a**) em CDCl₃.



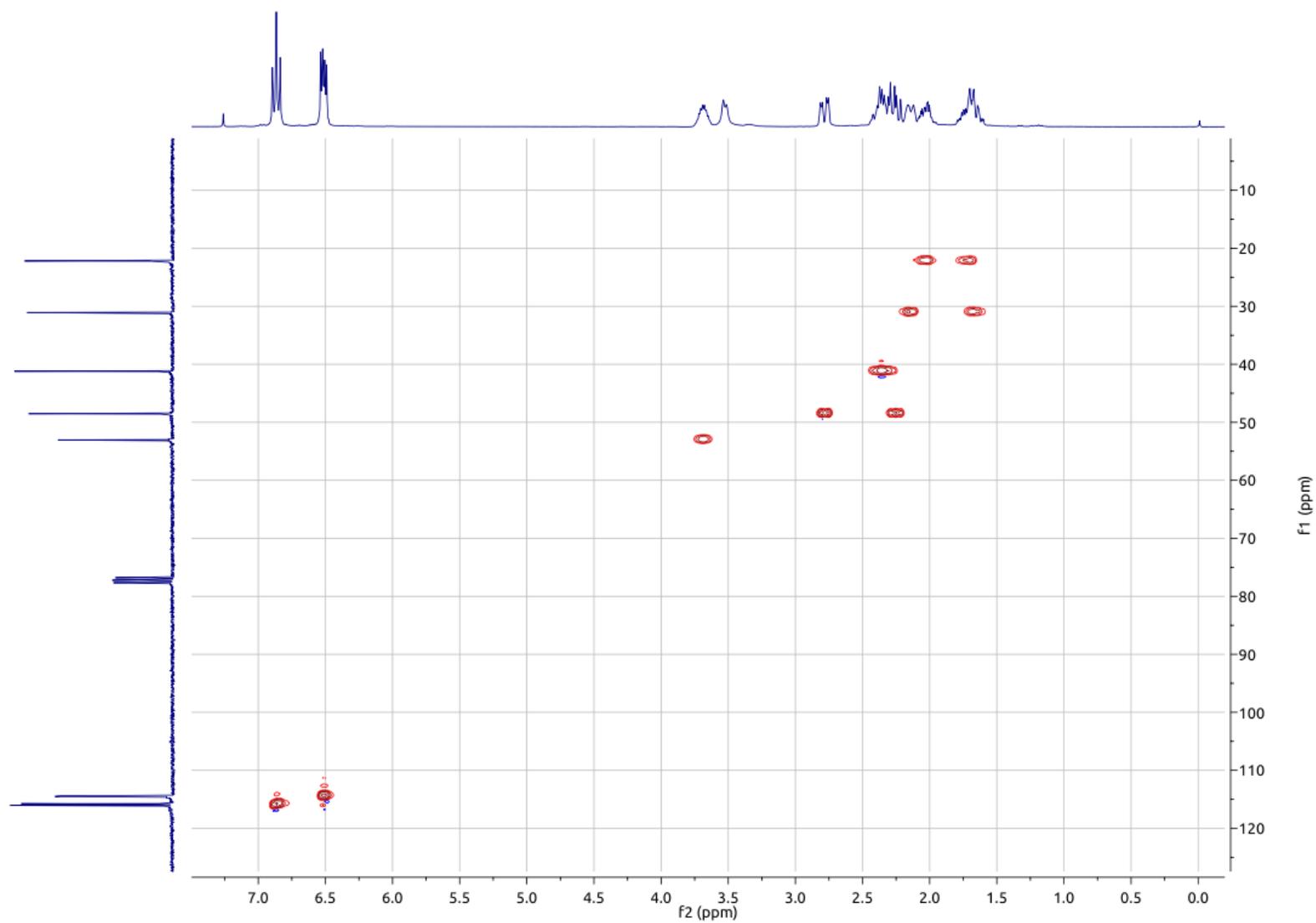
Anexo 4. Espectro de RMN de ^1H a 300 MHz do 3-(4-fluorfenilamino)ciclohexanona (**1b**) em CDCl_3 .



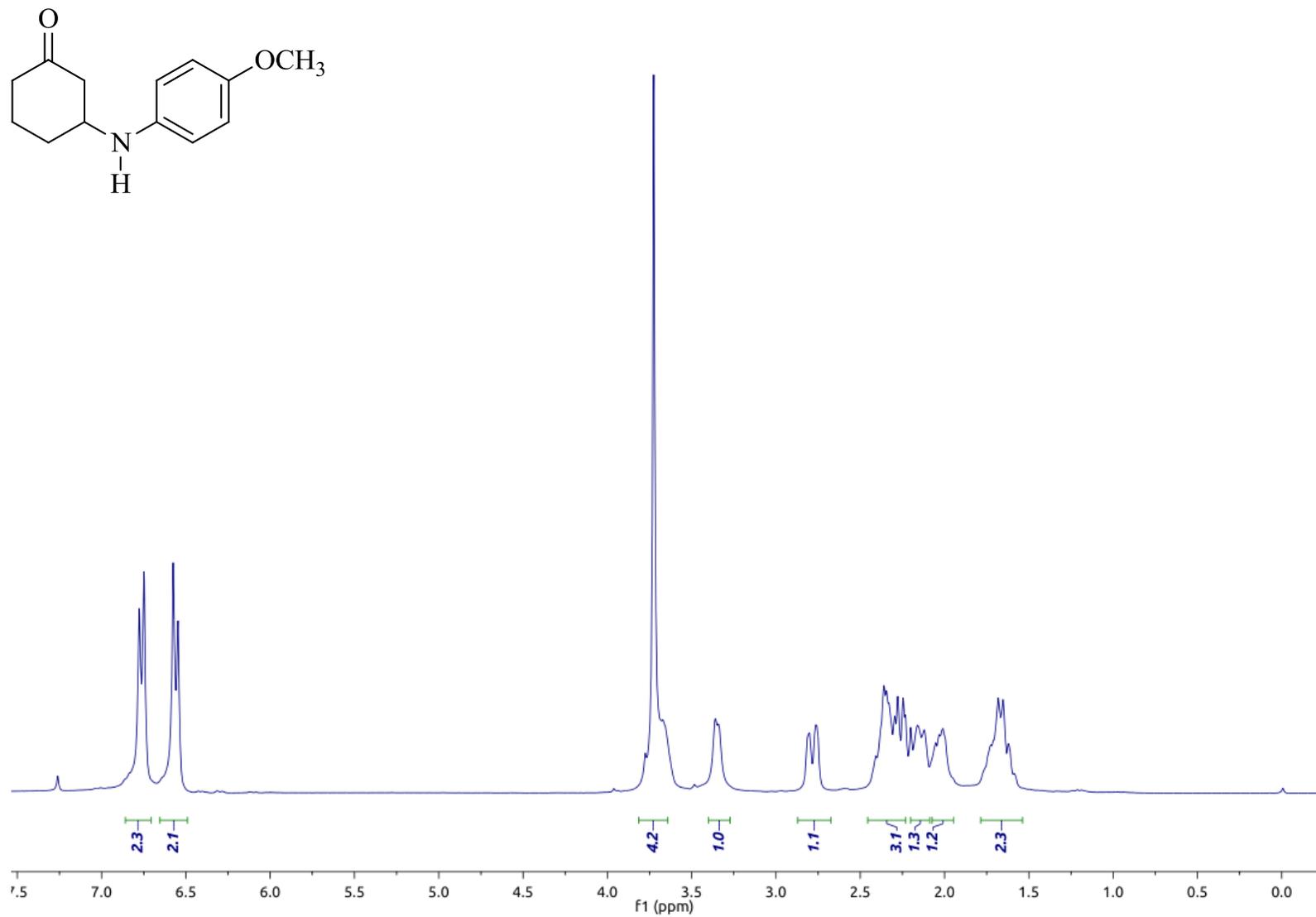
Anexo 5. Espectro de RMN de ^{13}C a 75 MHz do 3-(4-fluorfenilamino)cicloexanona (**1b**) em CDCl_3 .



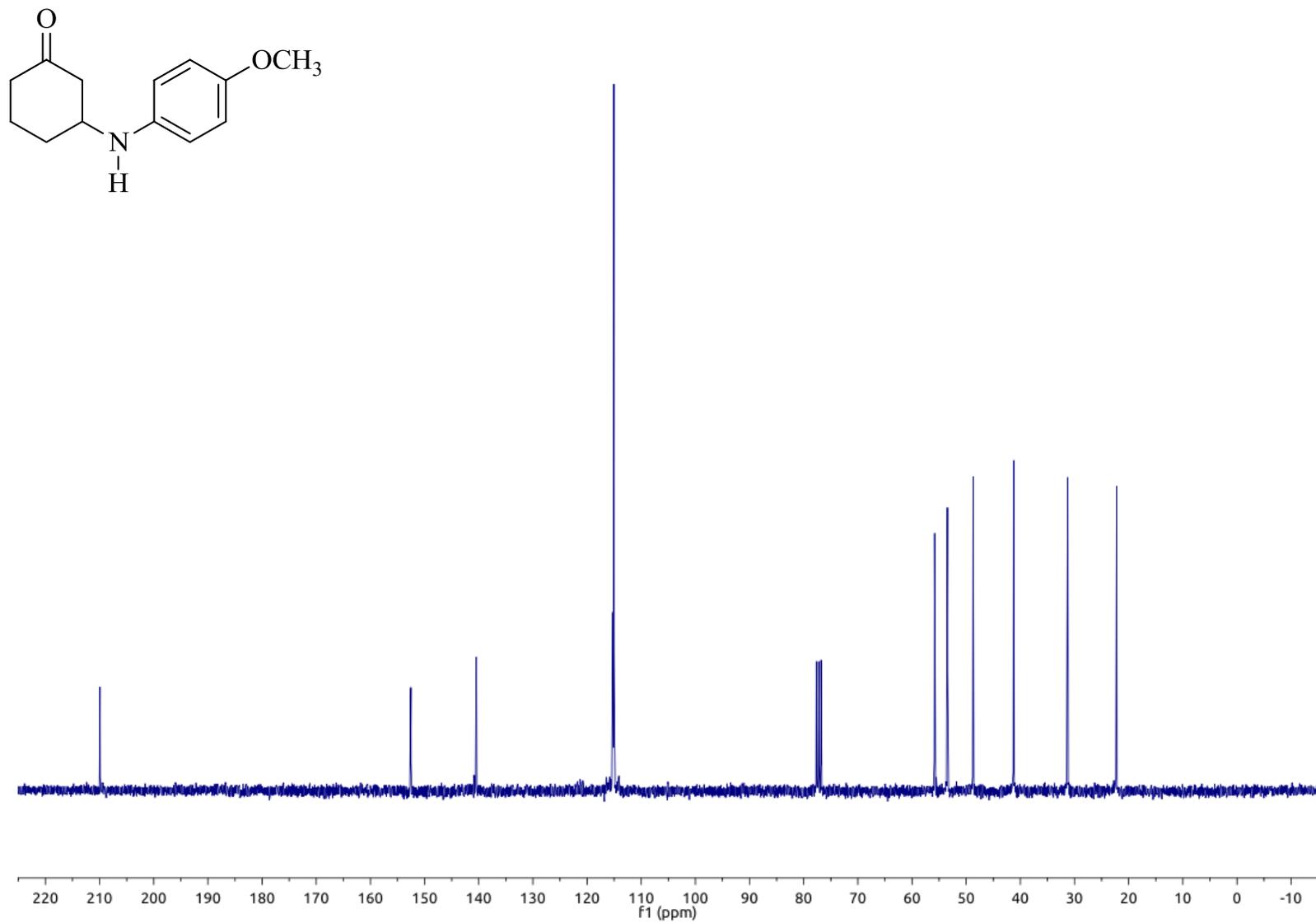
Anexo 6. Mapa de contorno HSQC do 3-(4-fluorfenilamino)cicloexanona (**1b**) em CDCl₃.



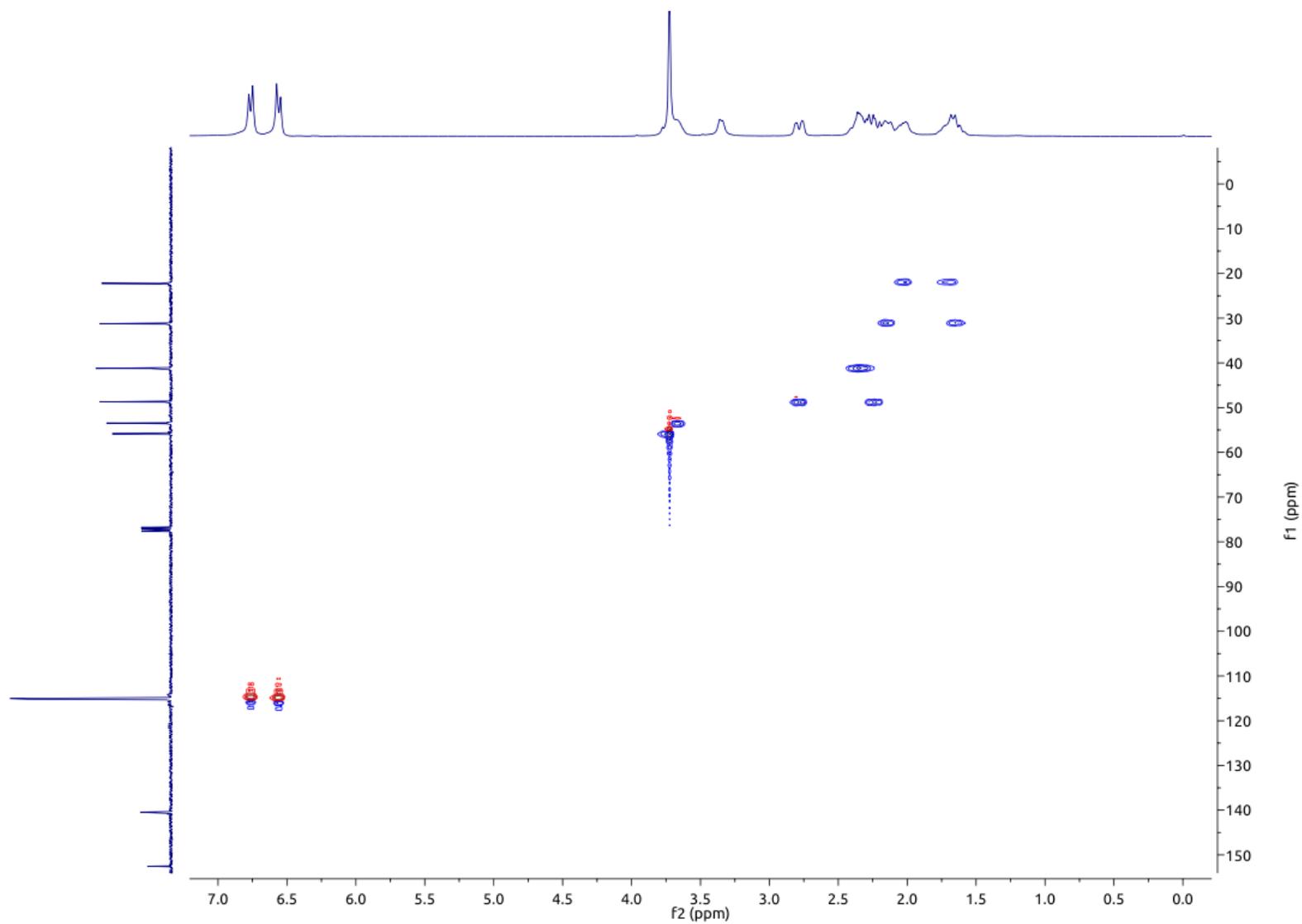
Anexo 7. Espectro de RMN de ^1H a 300 MHz do 3-(4-metoxifenilamino)cicloexanona (**1c**) em CDCl_3 .



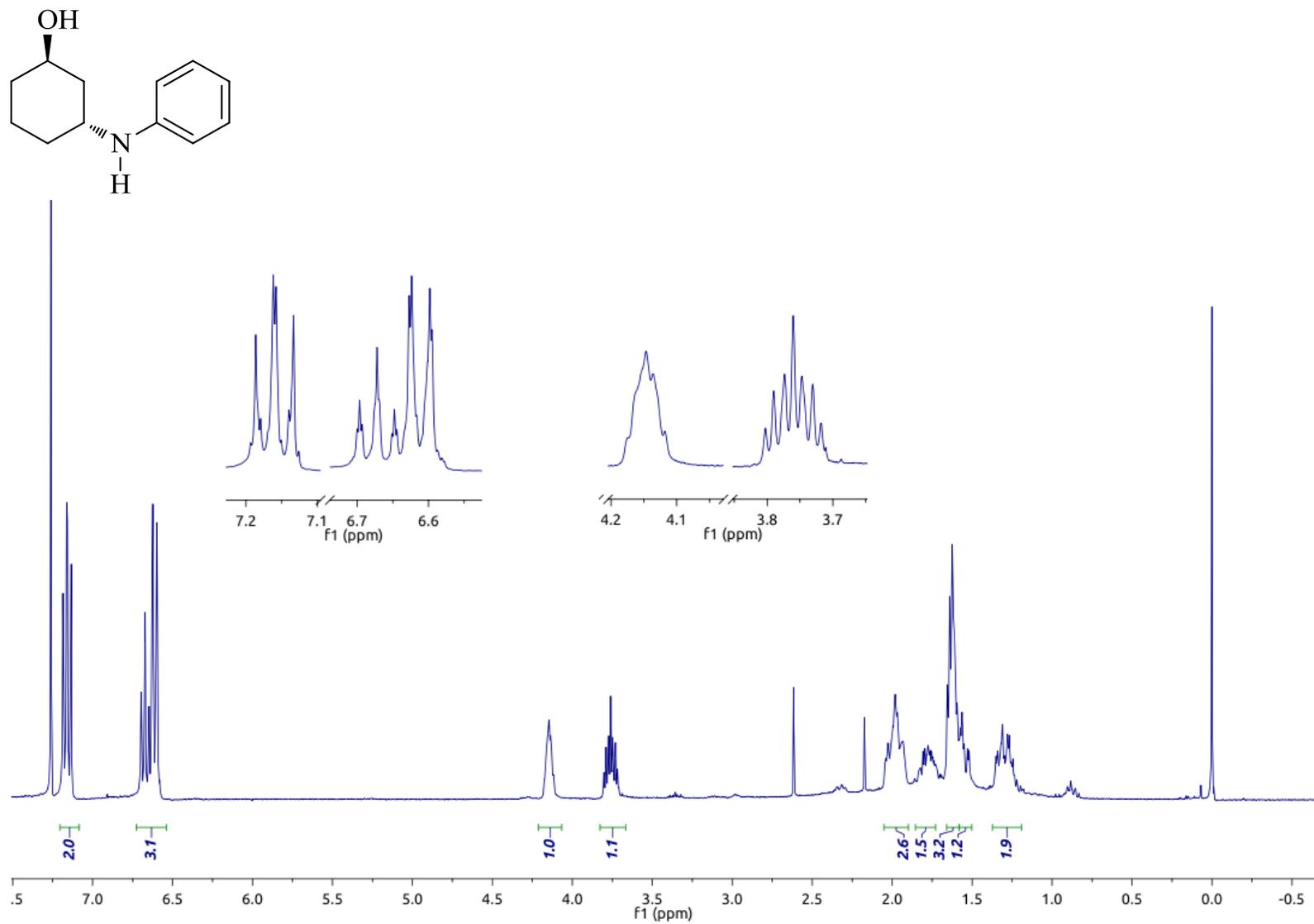
Anexo 8. Espectro de RMN de ^{13}C a 75 MHz do 3-(4-metoxifenilamino)ciclohexanona (**1c**) em CDCl_3 .



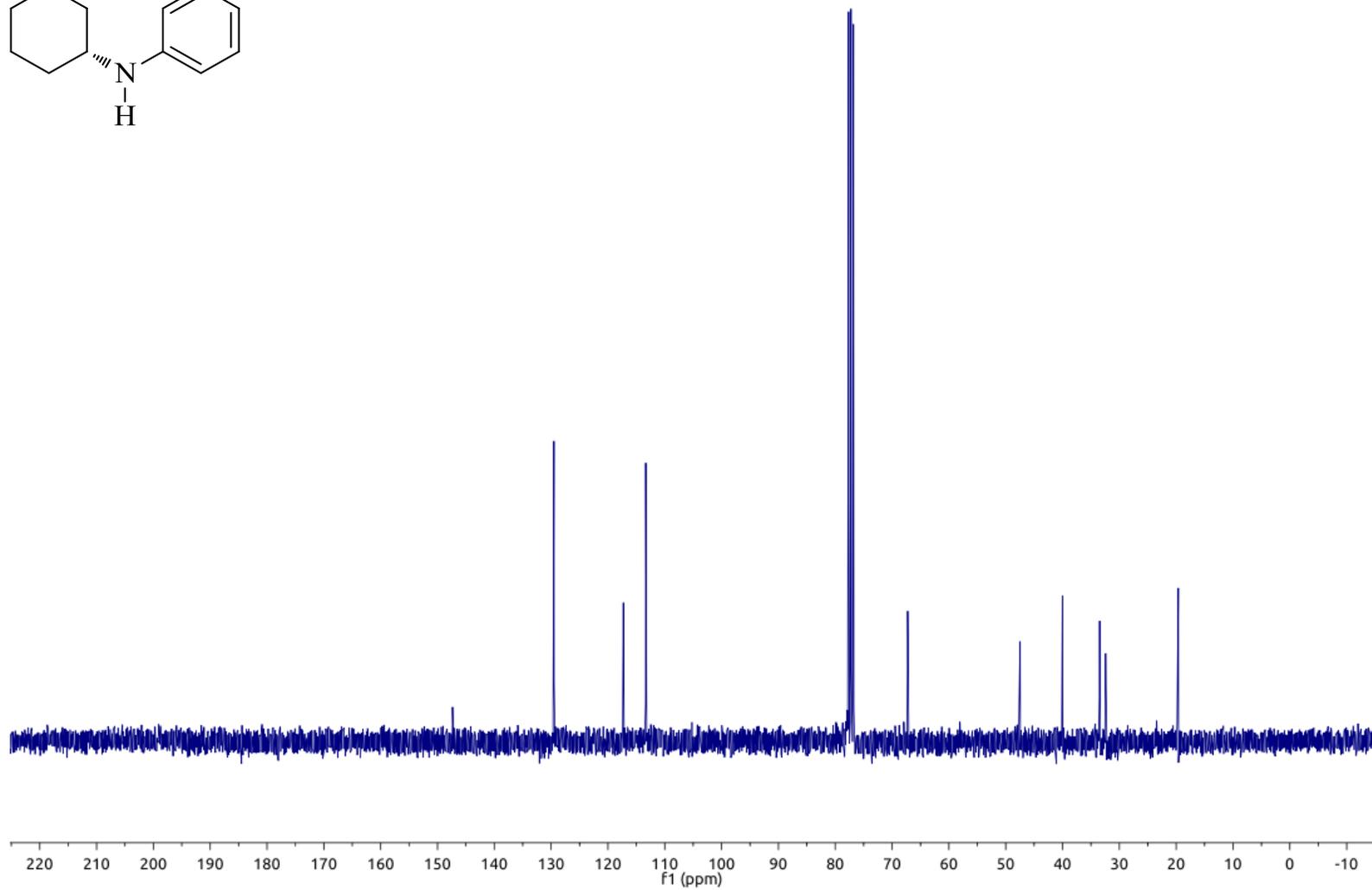
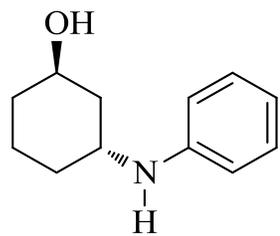
Anexo 9. Mapa de contorno HSQC do 3-(4-metoxifenilamino)ciclohexanona (**1c**) em CDCl_3 .



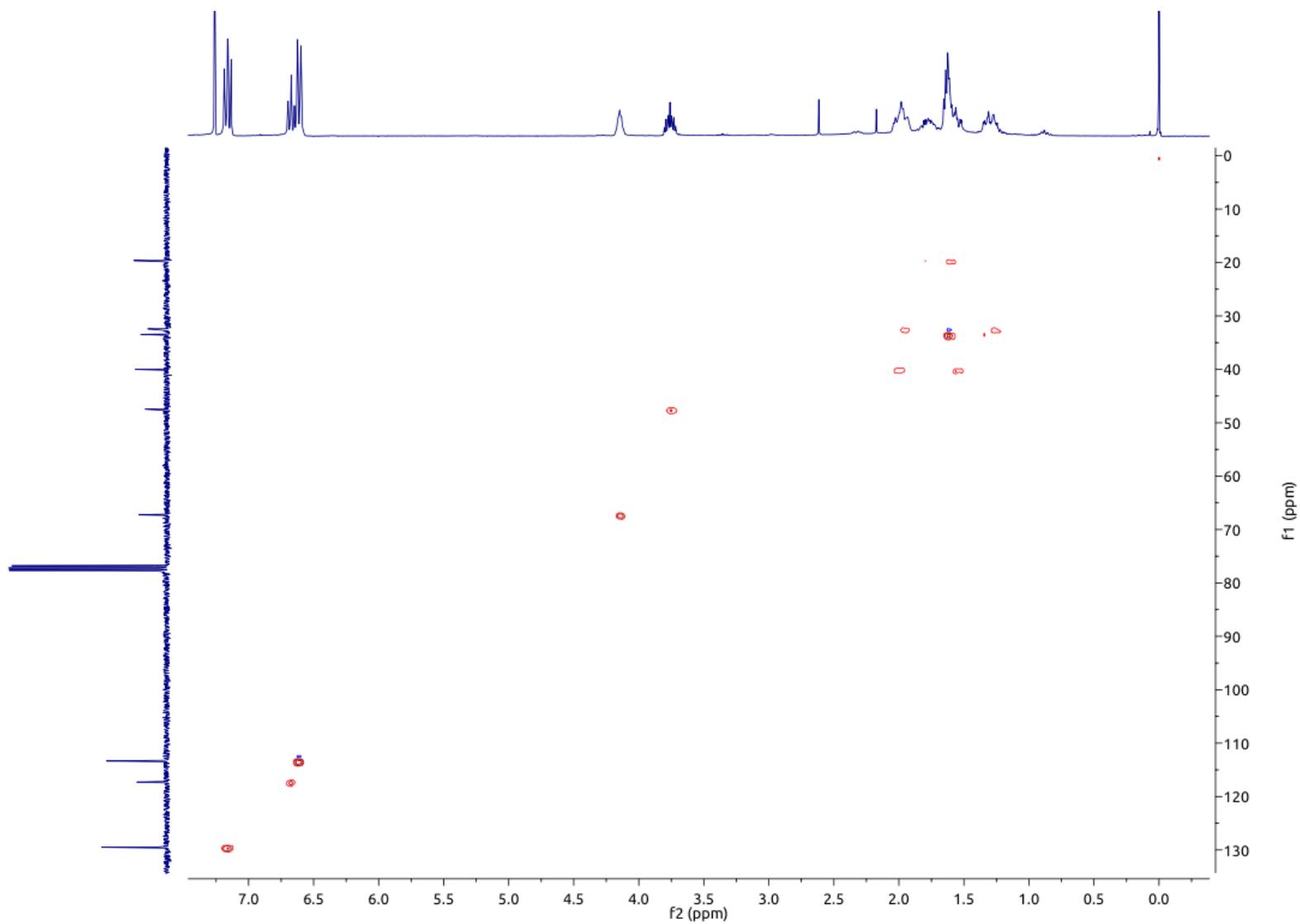
Anexo 10. Espectro de RMN de ^1H a 300 MHz do *trans*-3-fenilaminocicloexanol (**2a**) em CDCl_3



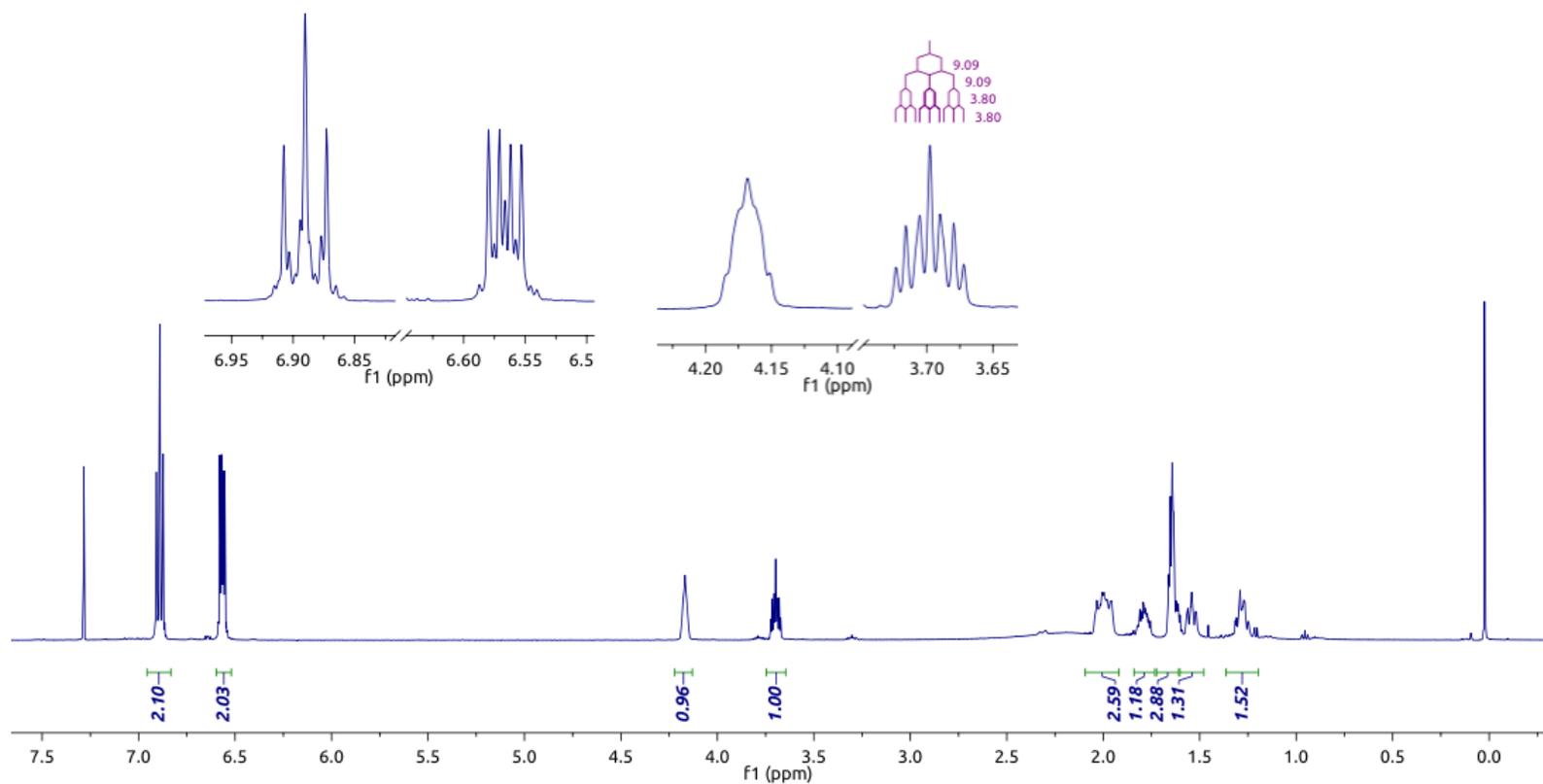
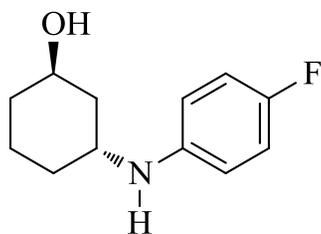
Anexo 11. Espectro de RMN de ^{13}C a 75 MHz do *trans*-3-fenilaminocicloexanol (**2a**) em CDCl_3 .



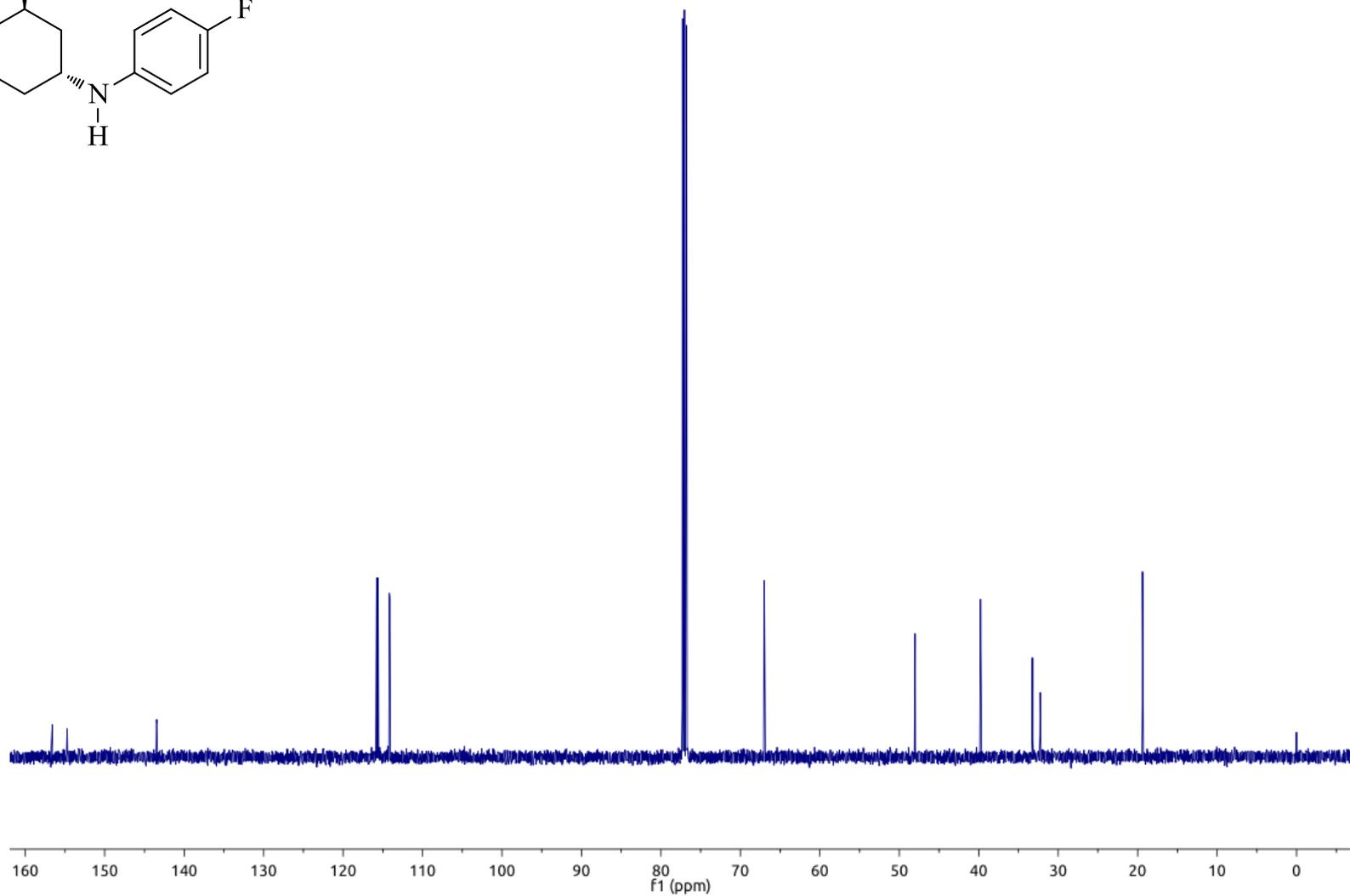
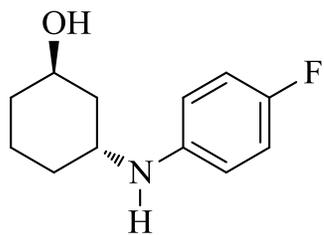
Anexo 12. Mapa de contorno HSQC do *trans*-3-fenilaminocicloexanol (**2a**) em CDCl₃.



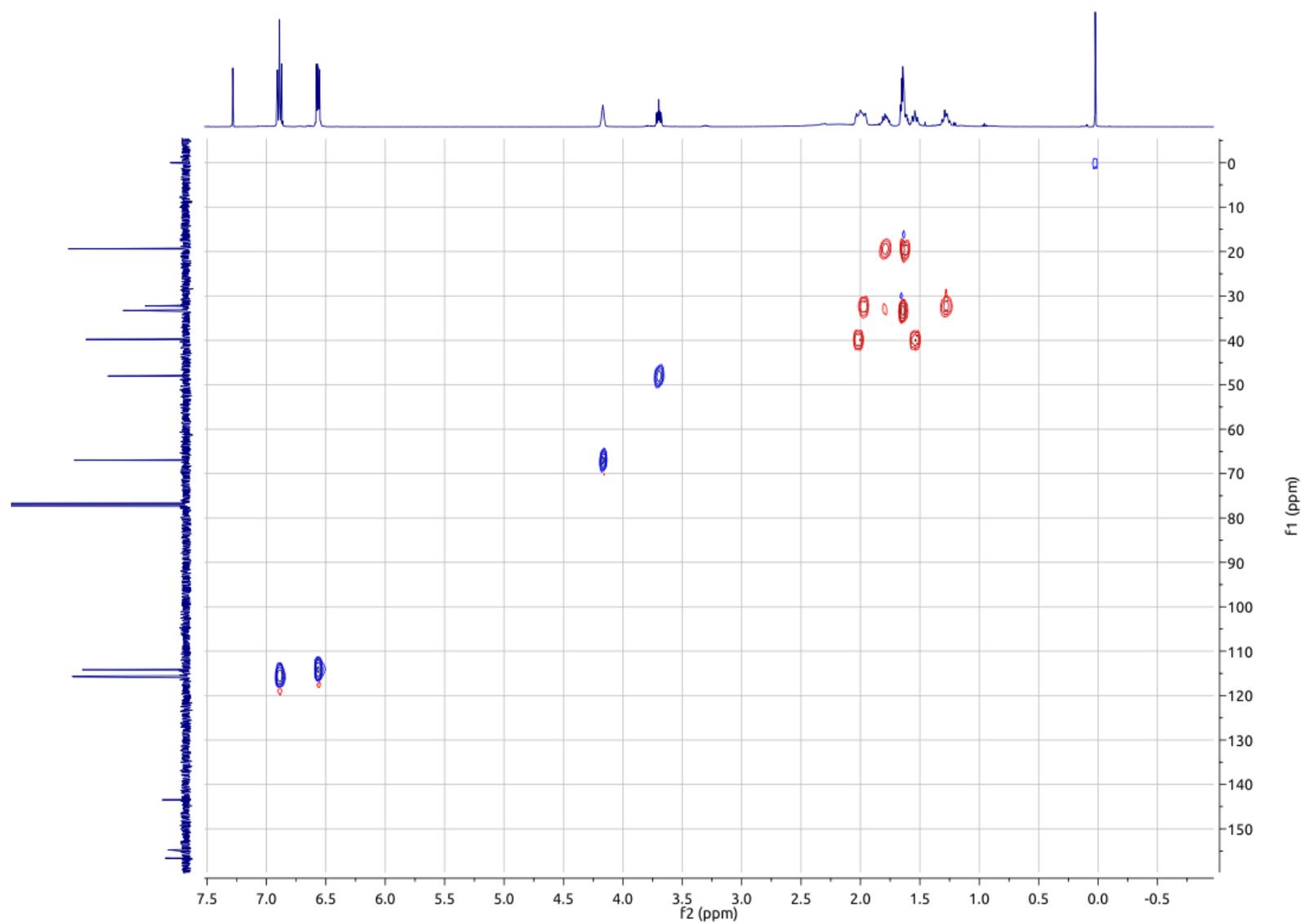
Anexo13. Espectro de RMN de ^1H a 500 MHz do *trans*-3-(4-fluorfenilamino)cicloexanol (**2b**) em CDCl_3 .



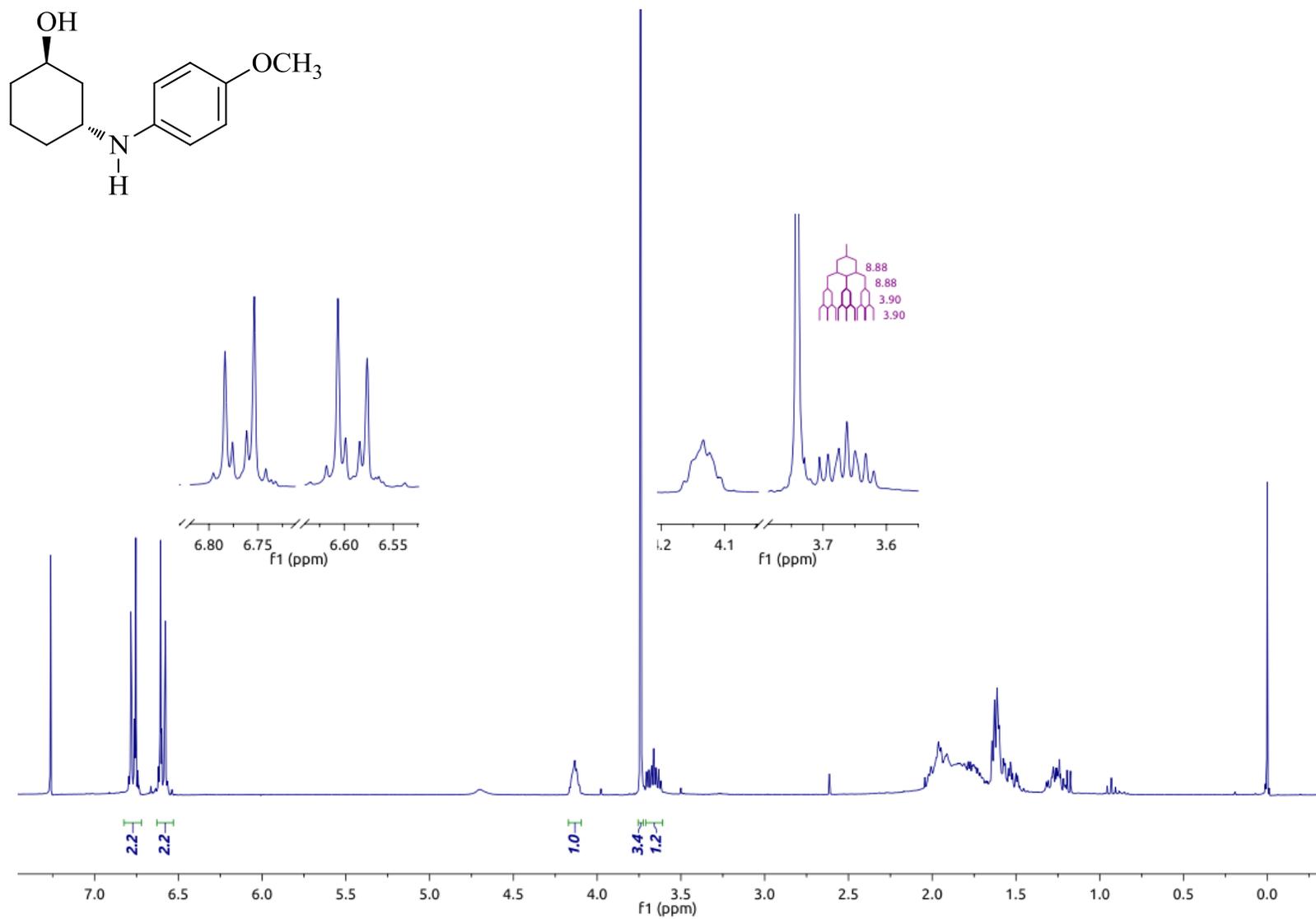
Anexo 14. Espectro de RMN de ^{13}C a 125 MHz do *trans*-3-(4-fluorfenilamino)cicloexanol (**2b**) em CDCl_3 .



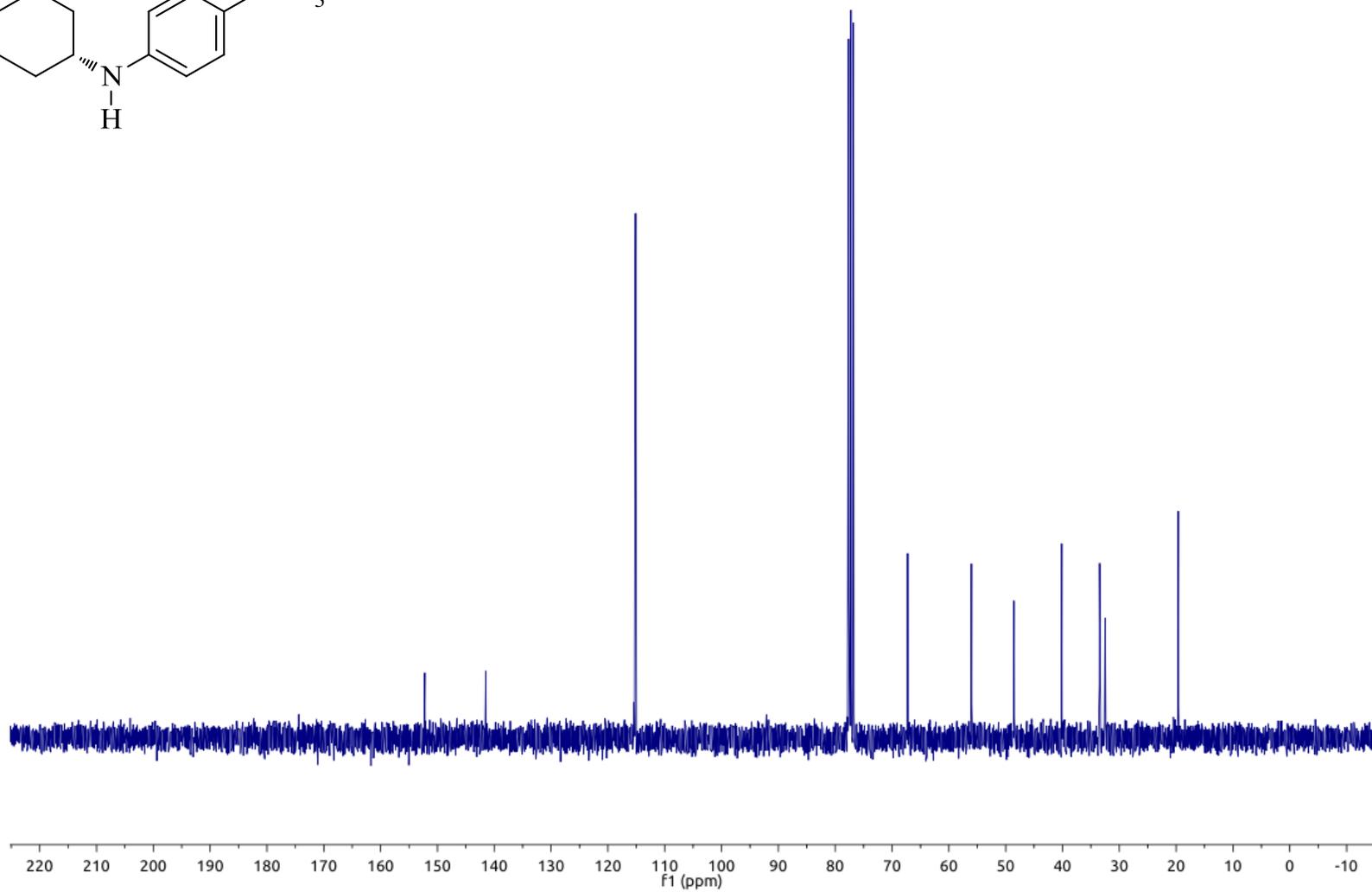
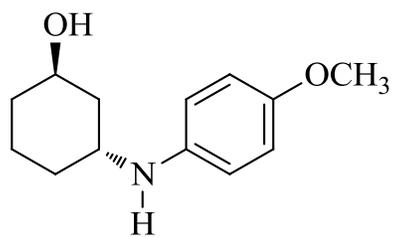
Anexo 15. Mapa de contorno HSQC do *trans*-3-(4-fluorfenilamino)cicloexanol (**2b**) em CDCl₃.



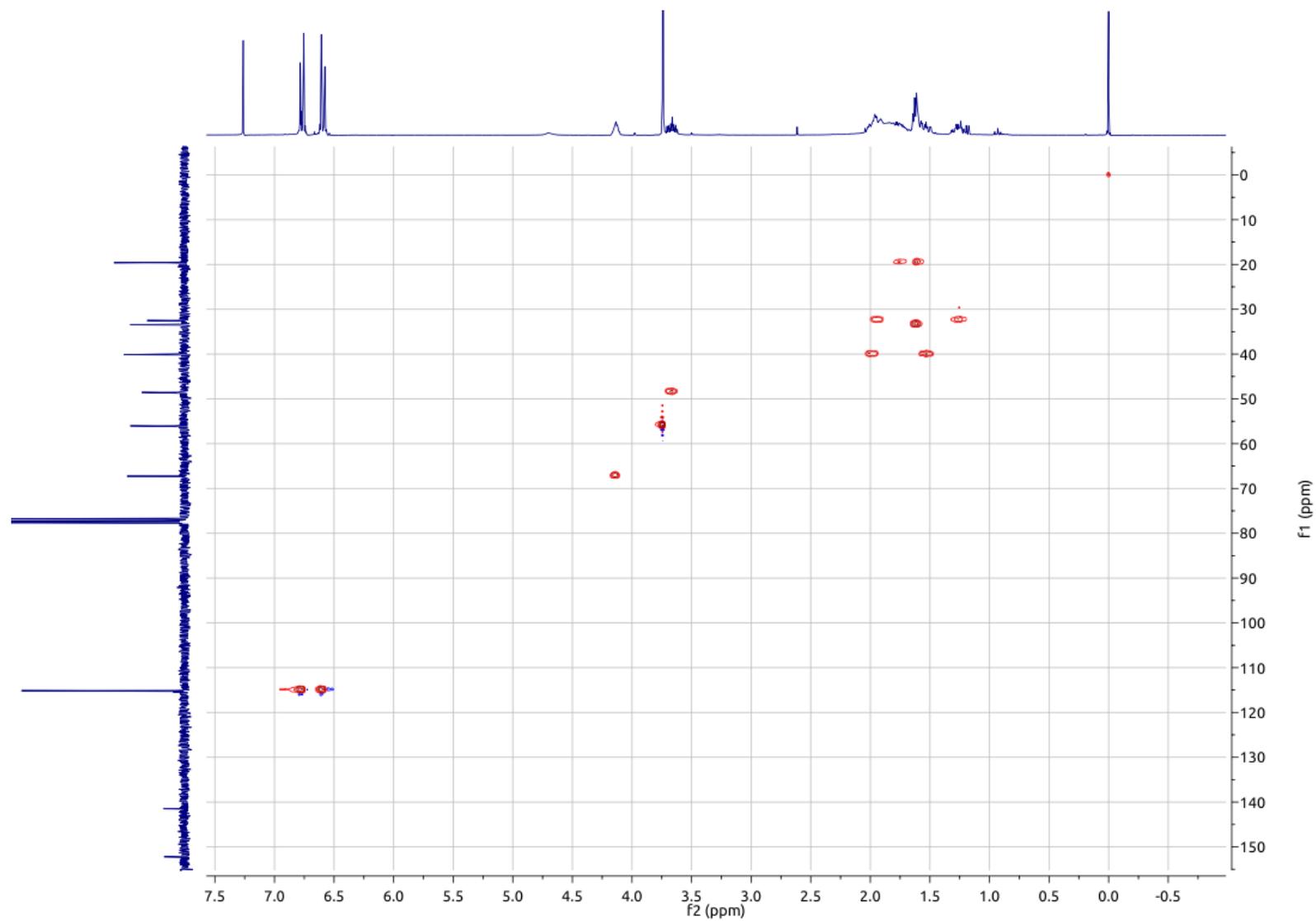
Anexo 16. Espectro de RMN de ^1H a 300 MHz do *trans*-3-(4-metoxifenilamino)cicloexanol (**2c**) em CDCl_3 .



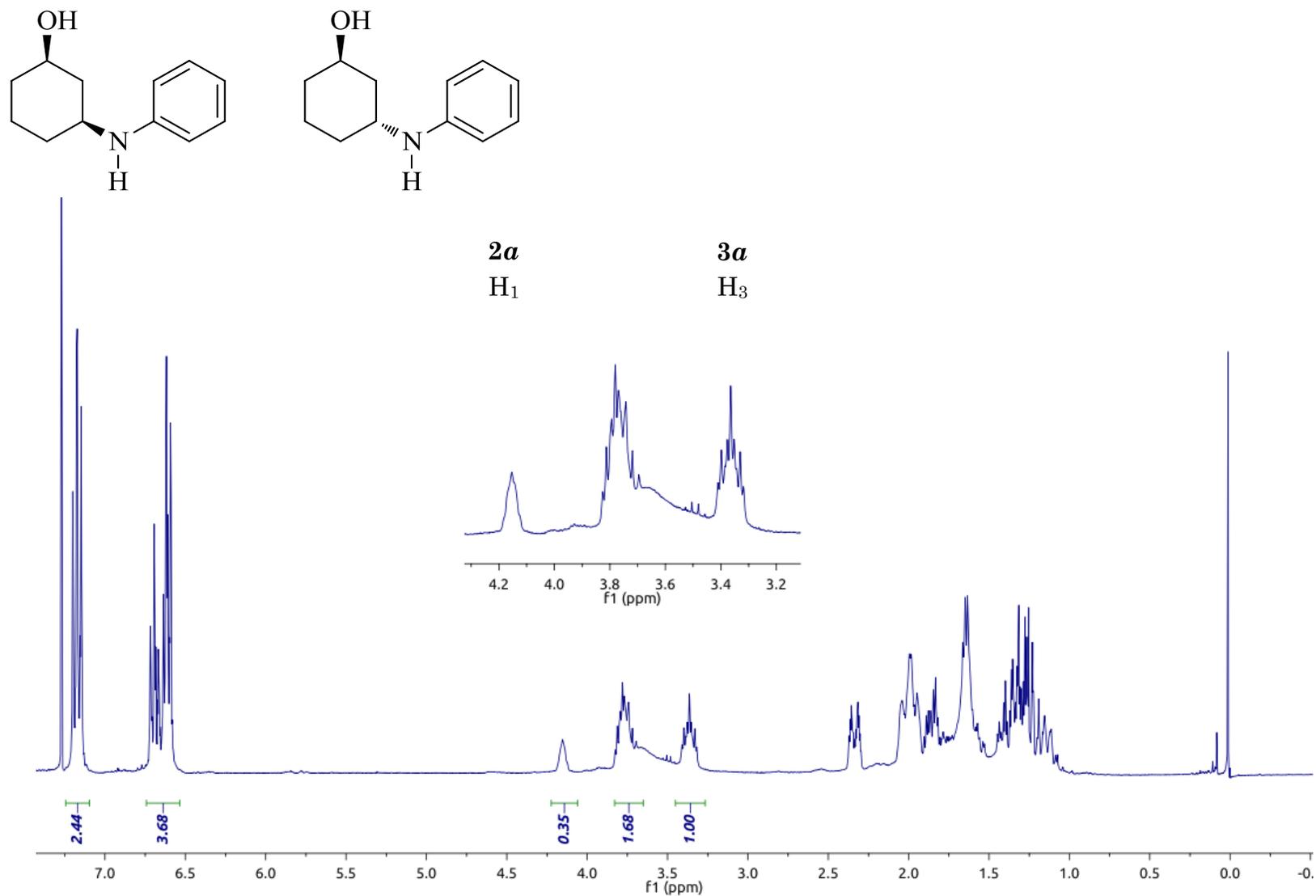
Anexo 17. Espectro de RMN de ^{13}C a 75 MHz do *trans*-3-(4-metoxifenilamino)cicloexanol (**2c**) em CDCl_3 .



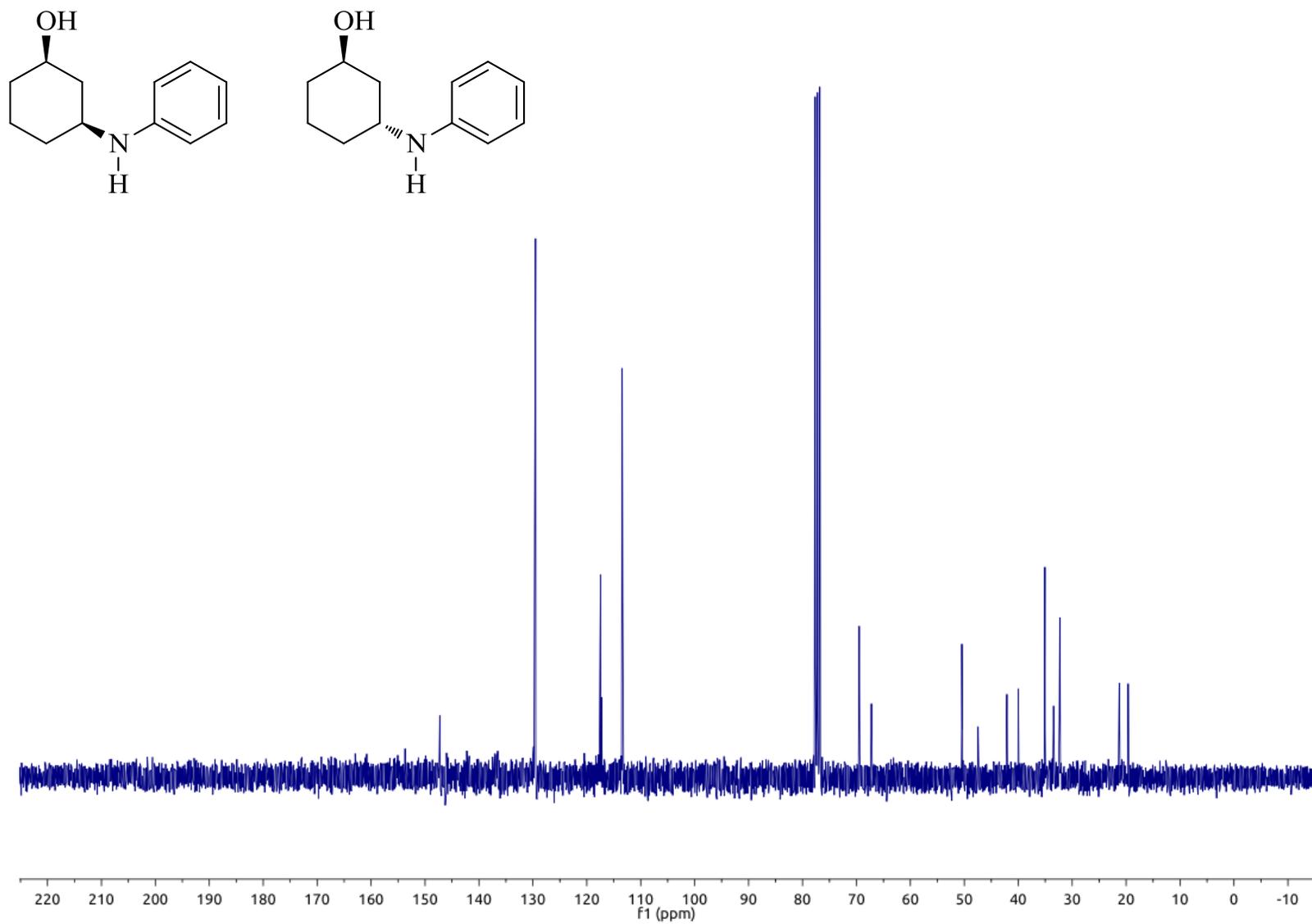
Anexo18. Mapa de contorno HSQC do *trans*-3-(4-metoxifenilamino)cicloexanol (**2c**) em CDCl₃.



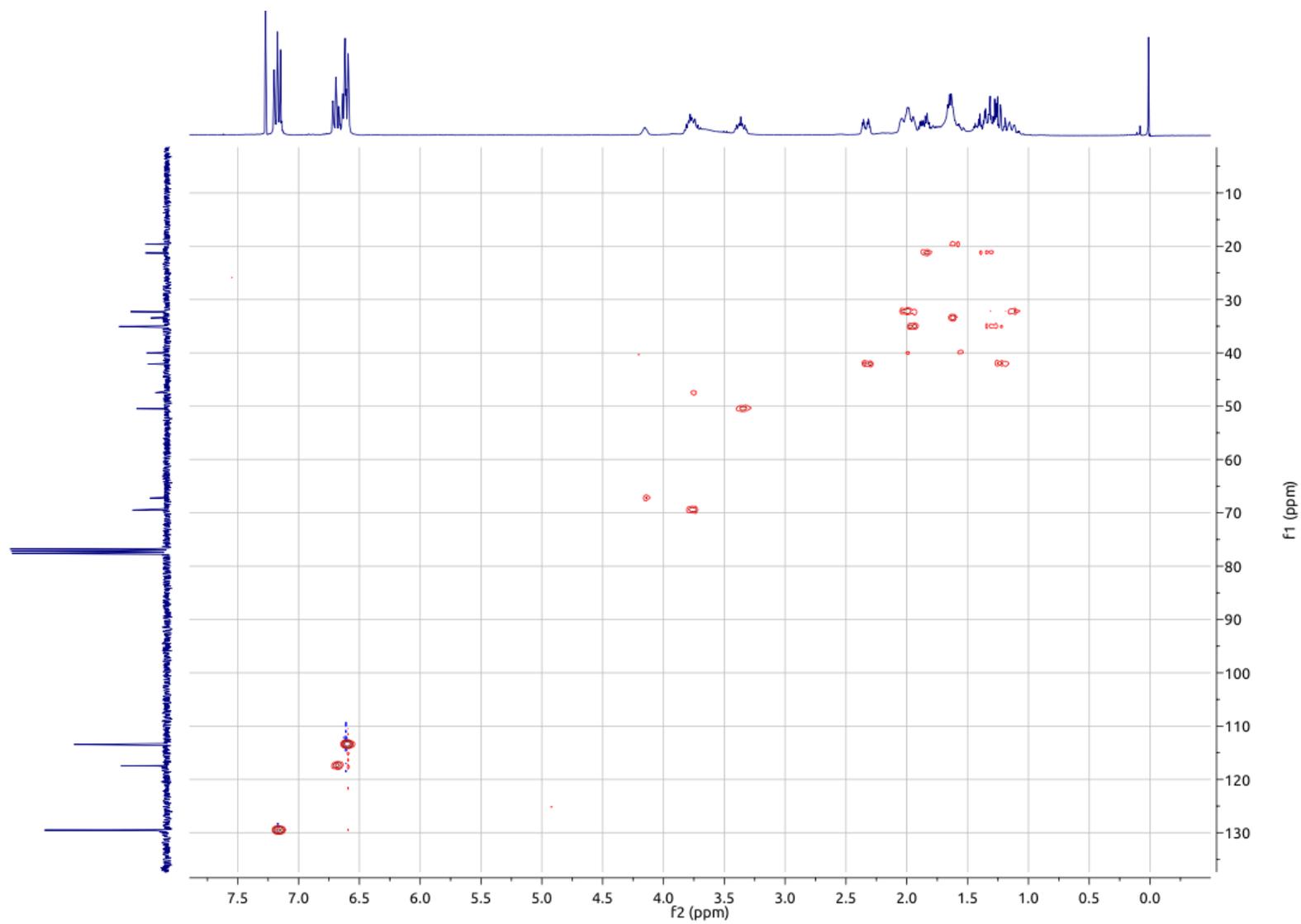
Anexo 19. Espectro de RMN de ^1H a 300 MHz da mistura dos isômeros *trans*-3-fenilaminocicloexanol (**2a**) e *cis*-3-fenilaminocicloexanol (**3a**) em CDCl_3 .



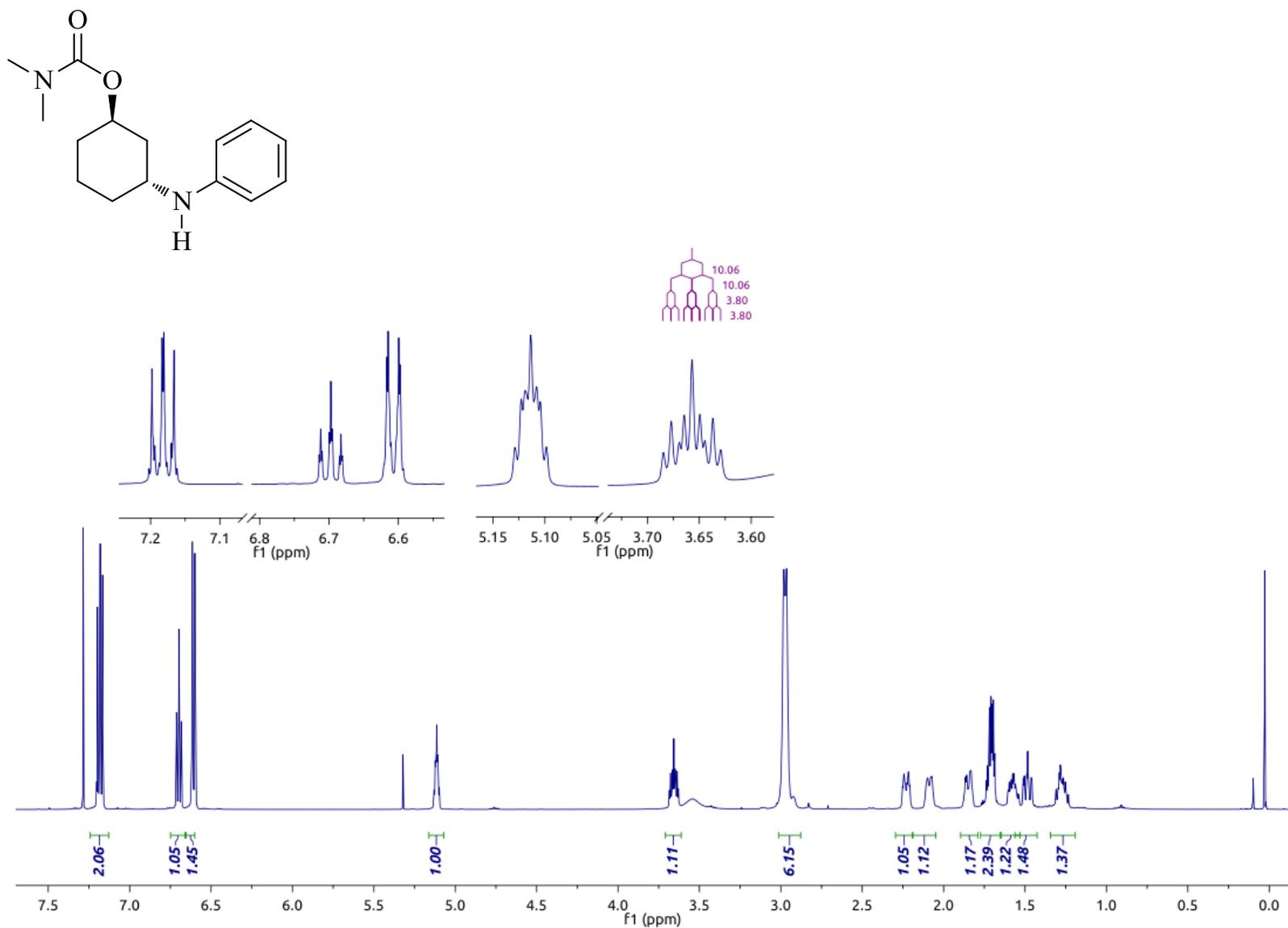
Anexo 20. Espectro de RMN de ^{13}C a 75 MHz da mistura dos isômeros *trans*-3-fenilaminocicloexanol (**2a**) e *cis*-3-fenilaminocicloexanol (**3a**) em CDCl_3 .



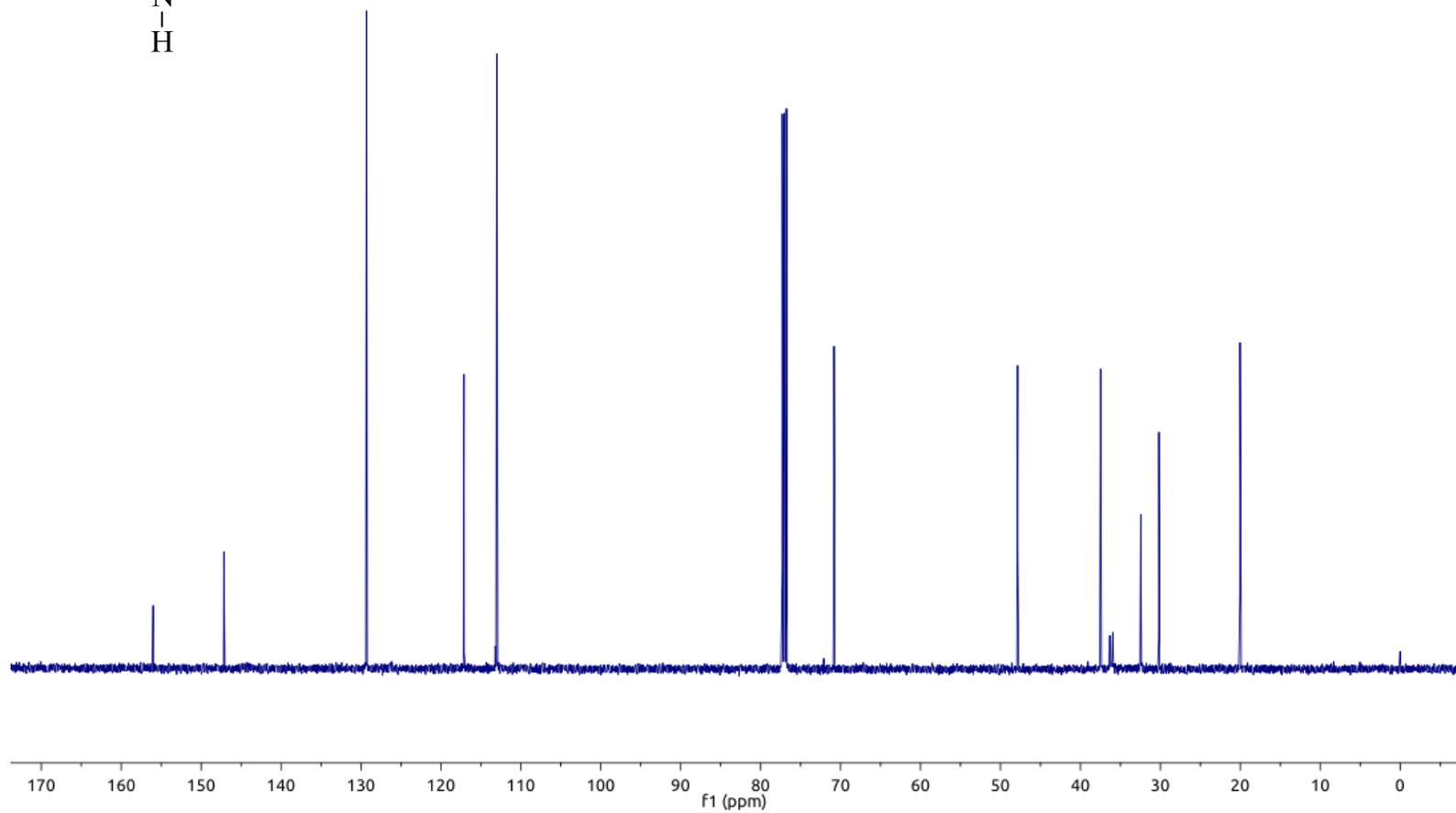
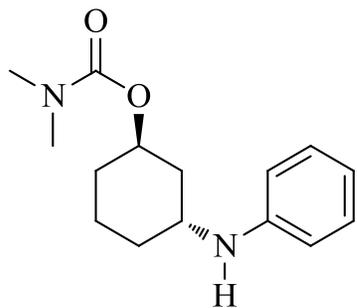
Anexo 21. Mapa de contorno HSQC da mistura dos isômeros *trans*-3-fenilaminocicloexanol (**2a**) e *cis*-3-fenilaminocicloexanol (**3a**) em CDCl₃.



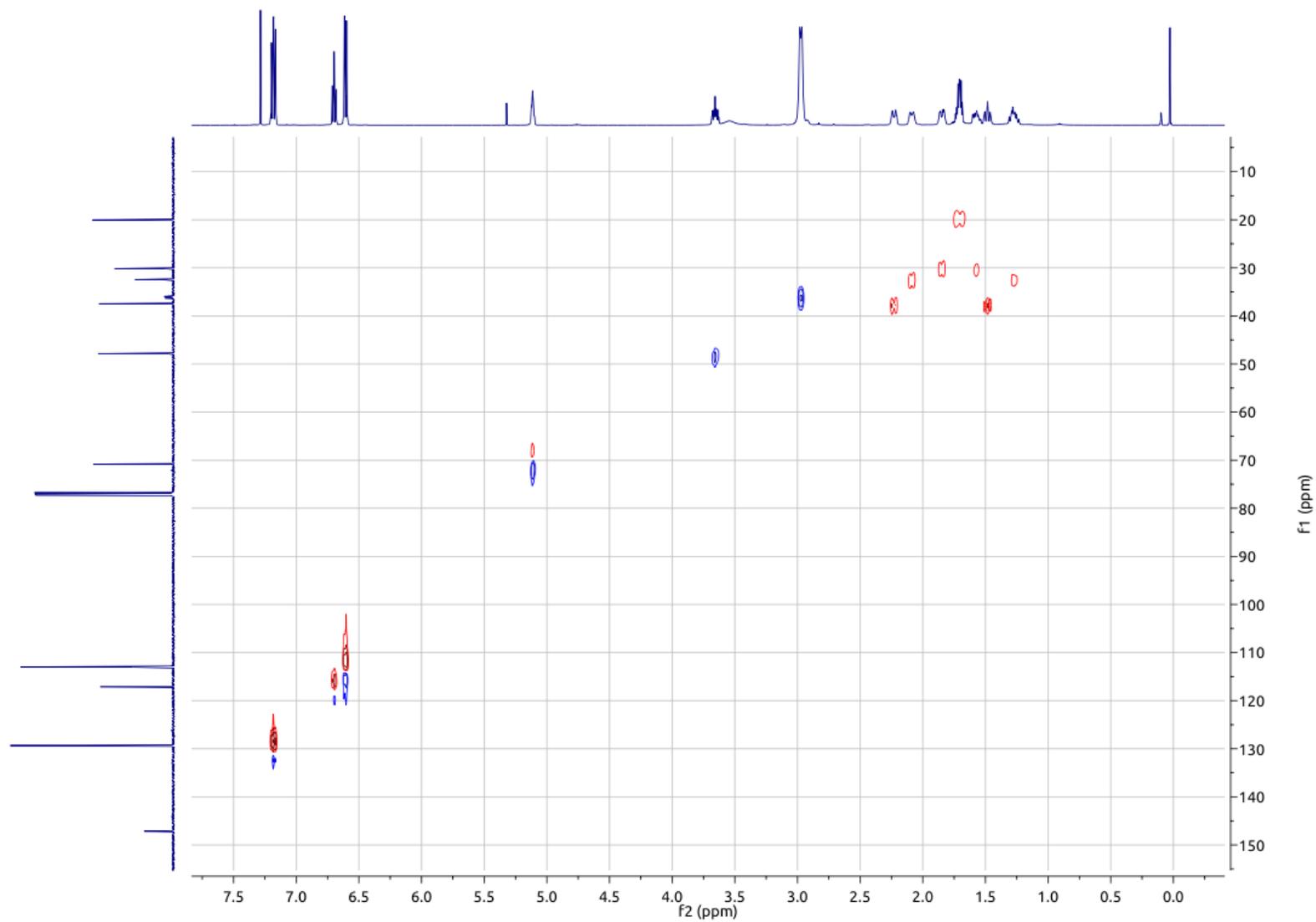
Anexo 22. Espectro de RMN de ^1H a 500 MHz do *trans*-*N,N*-dimetilcarbamato de 3-fenilaminocicloexila (**4a**) em CDCl_3 .



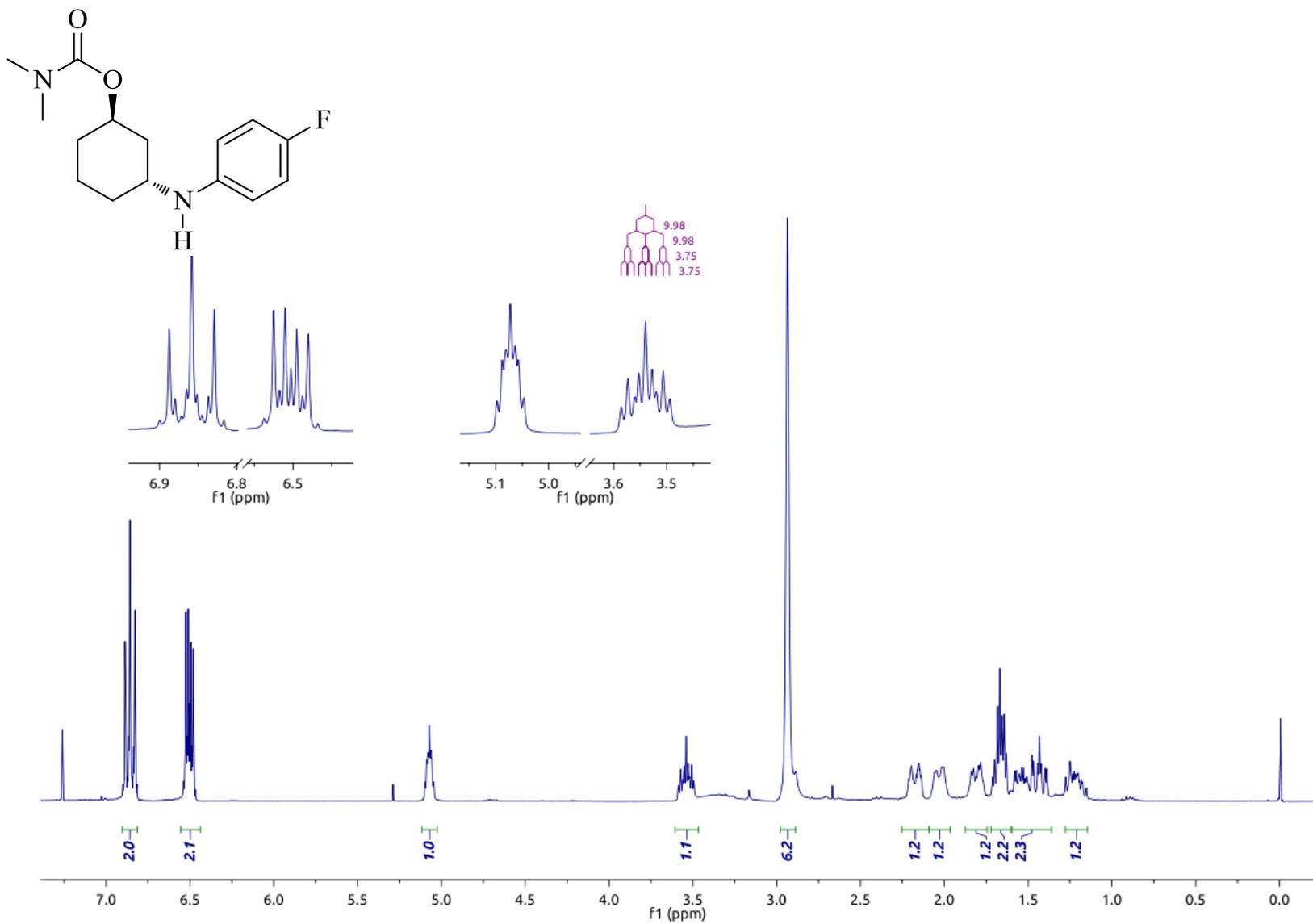
Anexo 23. Espectro de RMN de ^{13}C a 125 MHz do *trans*-*N,N*-dimetilcarbamato de 3-fenilaminocicloexila (**4a**) em CDCl_3 .



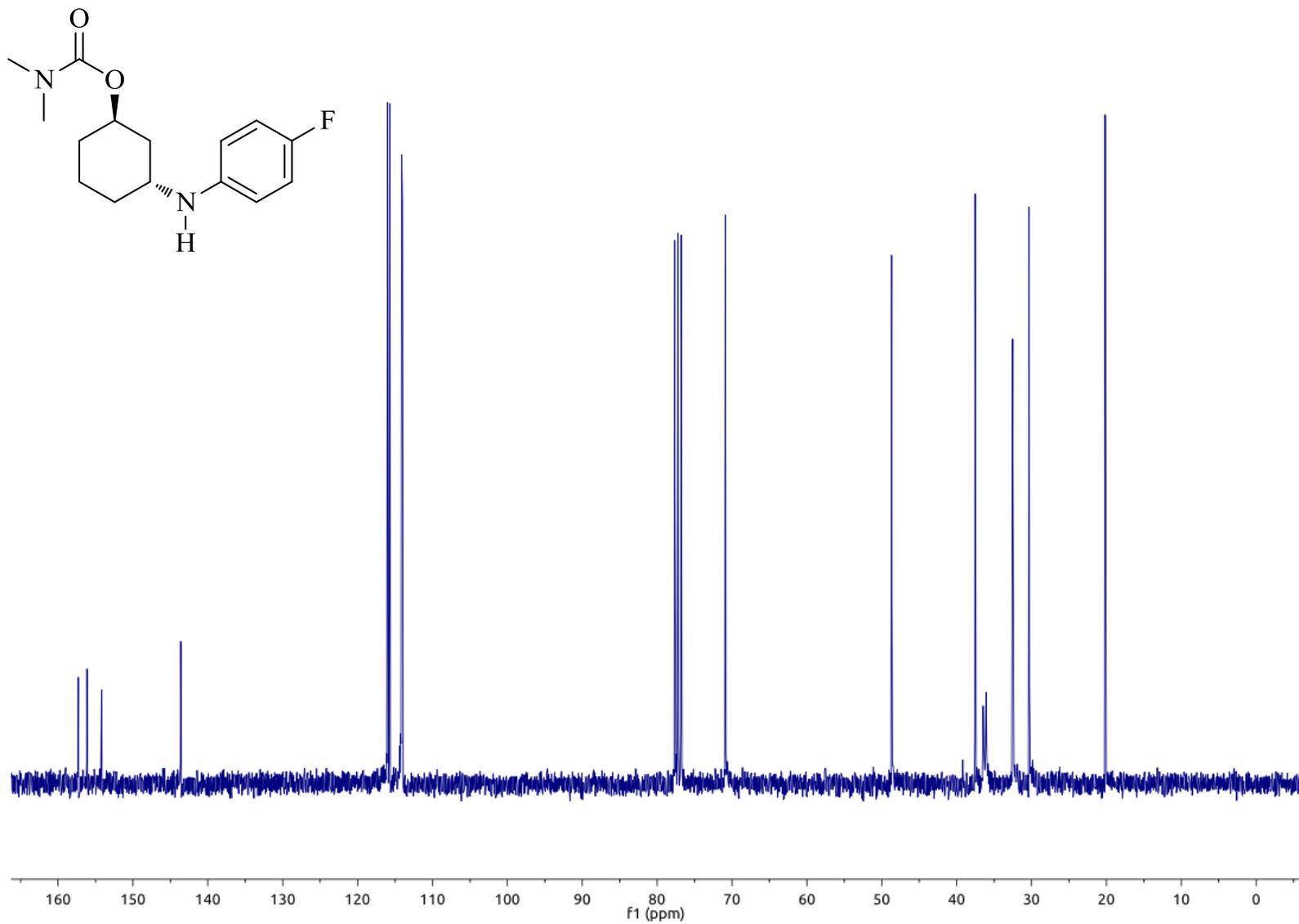
Anexo 24. Mapa de contorno HSQC do *trans*-*N,N*-dimetilcarbamato de 3-fenilaminocicloexila (**4a**) em CDCl₃.



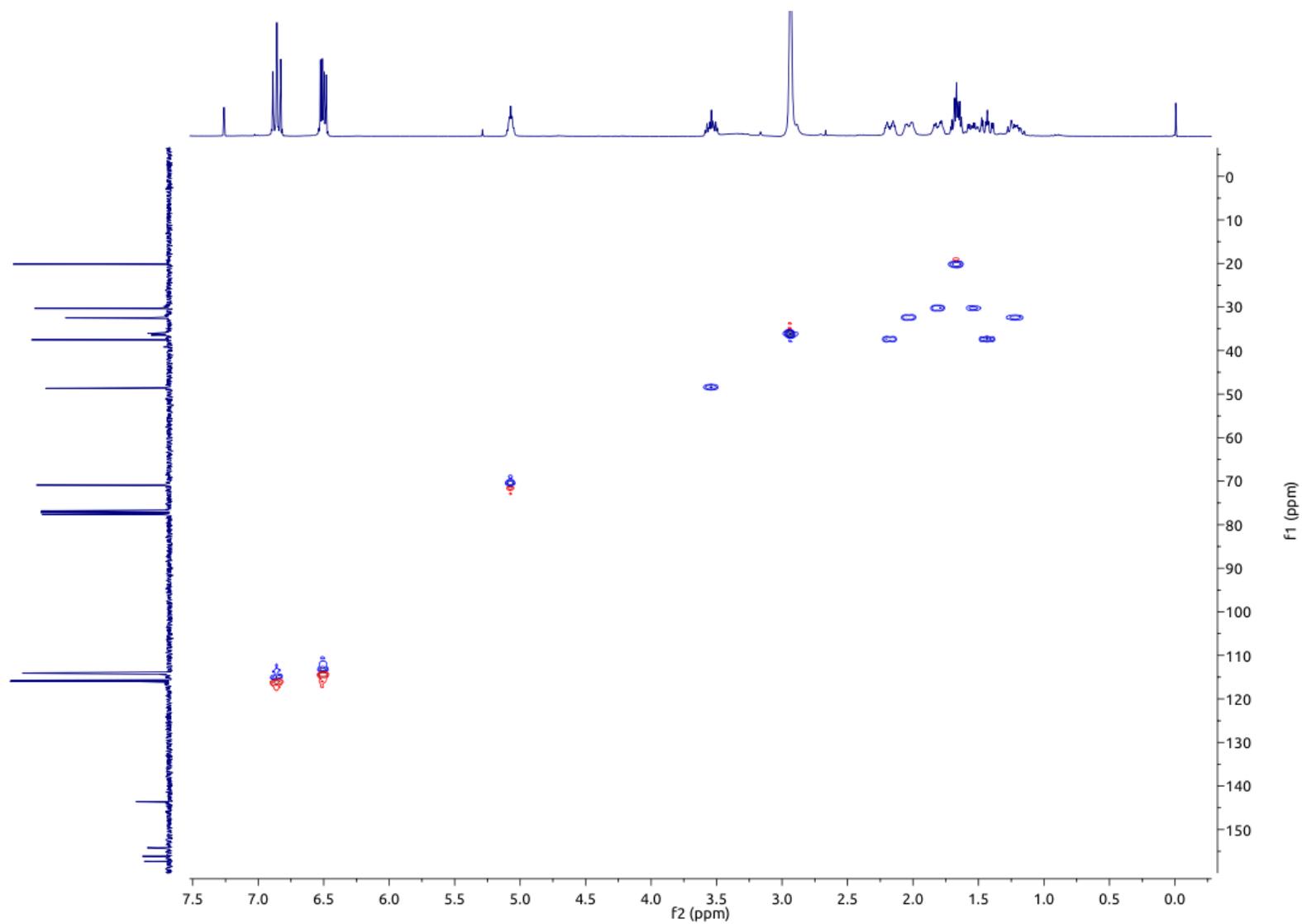
Anexo 25. Espectro de RMN de ^1H a 300 MHz do *trans*-*N,N*-dimetilcarbamato de 3-(4-fluorfenilamino)cicloexila (**4b**) em CDCl_3 .



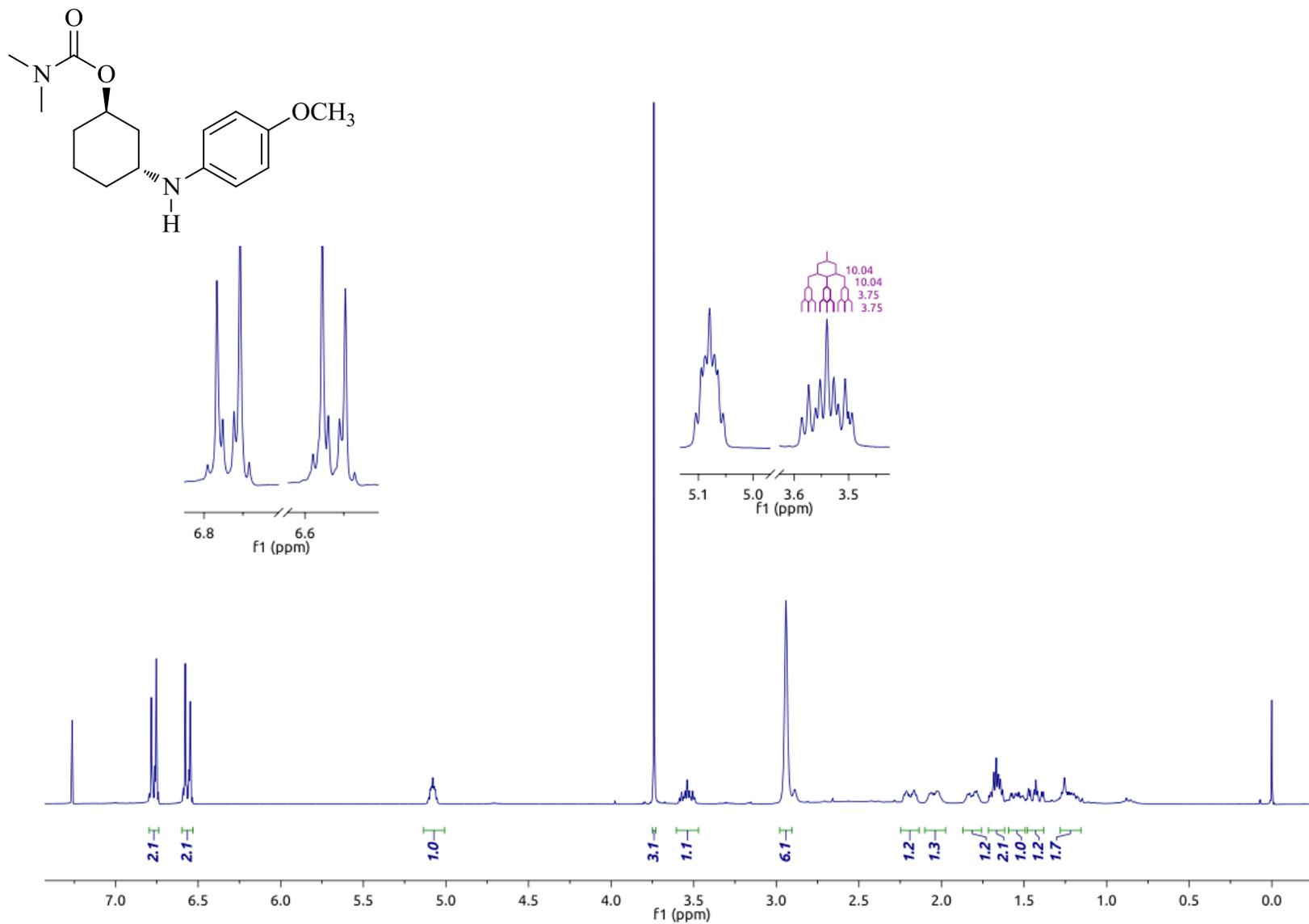
Anexo 26. Espectro de RMN de ^{13}C a 75 MHz do *trans*-*N,N*-dimetilcarbamato de 3-(4-fluorfenilamino)cicloexila (**4b**) em CDCl_3 .



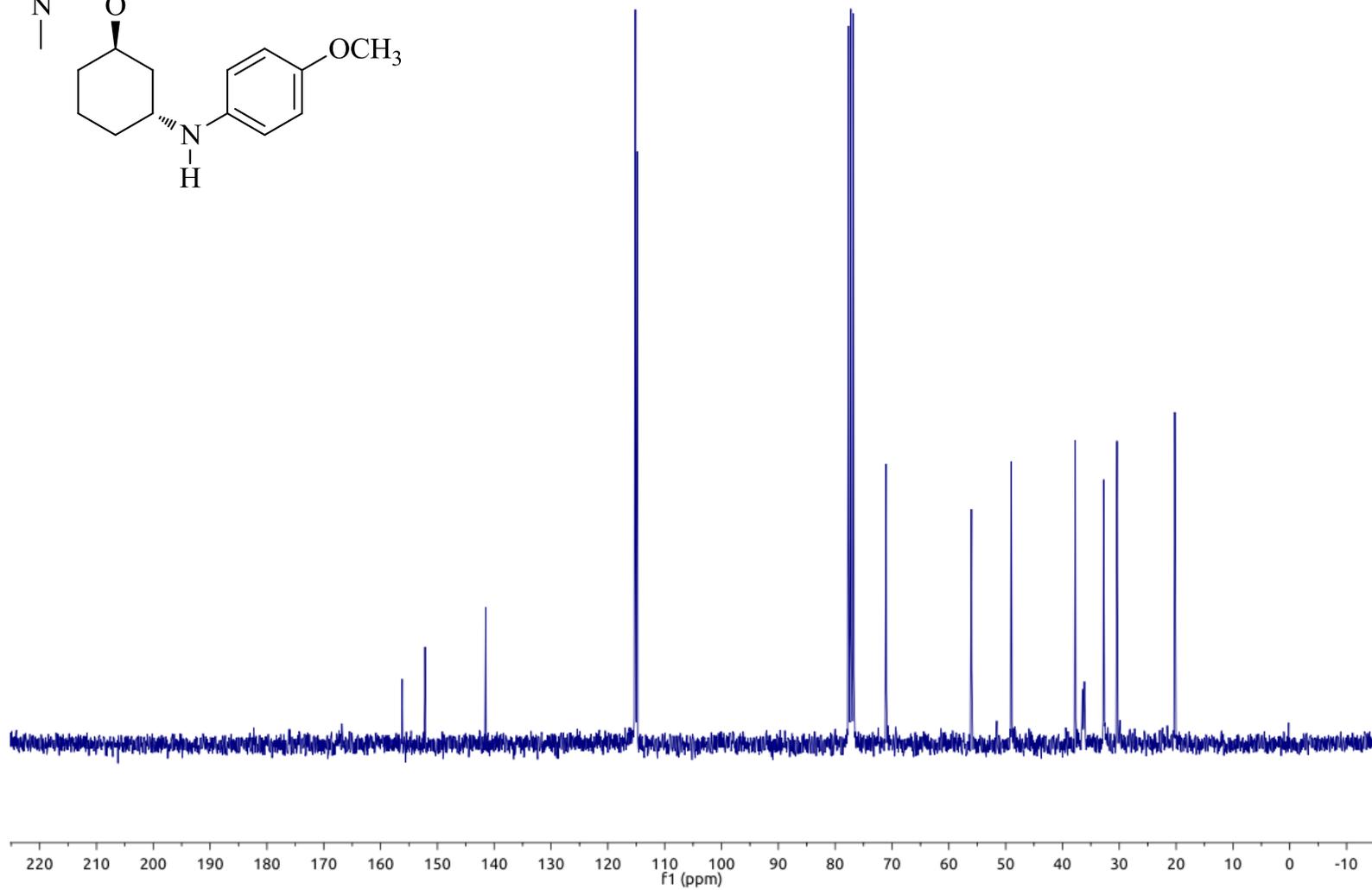
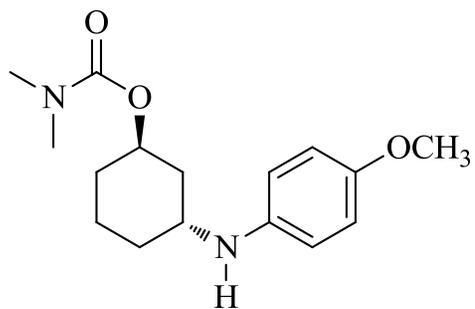
Anexo 27. Mapa de contorno HSQC do *trans*-*N,N*-dimetilcarbamato de 3-(4-fluorfenilamino)cicloexila (**4b**) em CDCl₃.



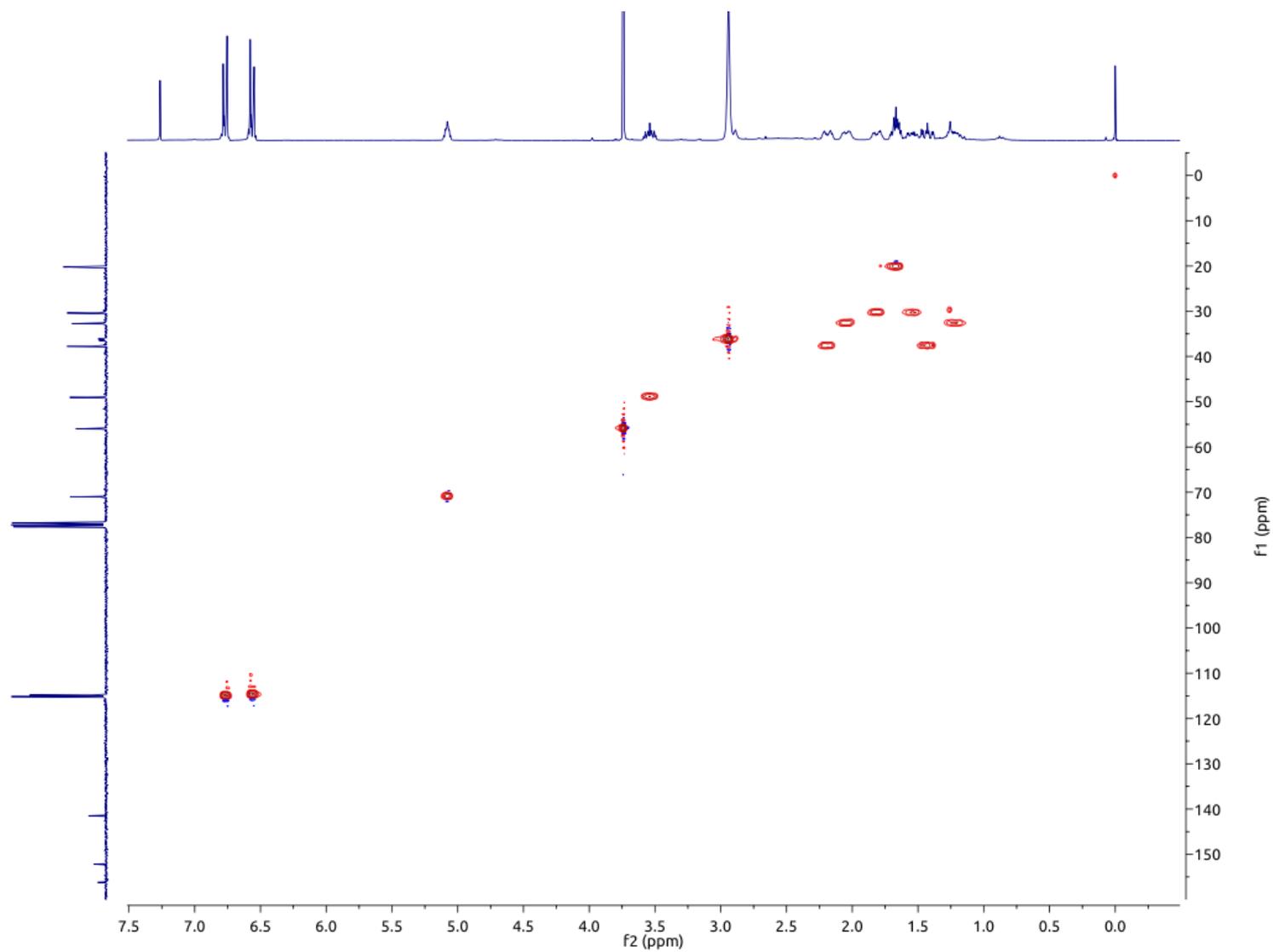
Anexo 28. Espectro de RMN de ^1H a 300 MHz do *trans*-*N,N*-dimetilcarbamato de 3-(4-metoxifenilamino)cicloexila (**4c**) em CDCl_3 .



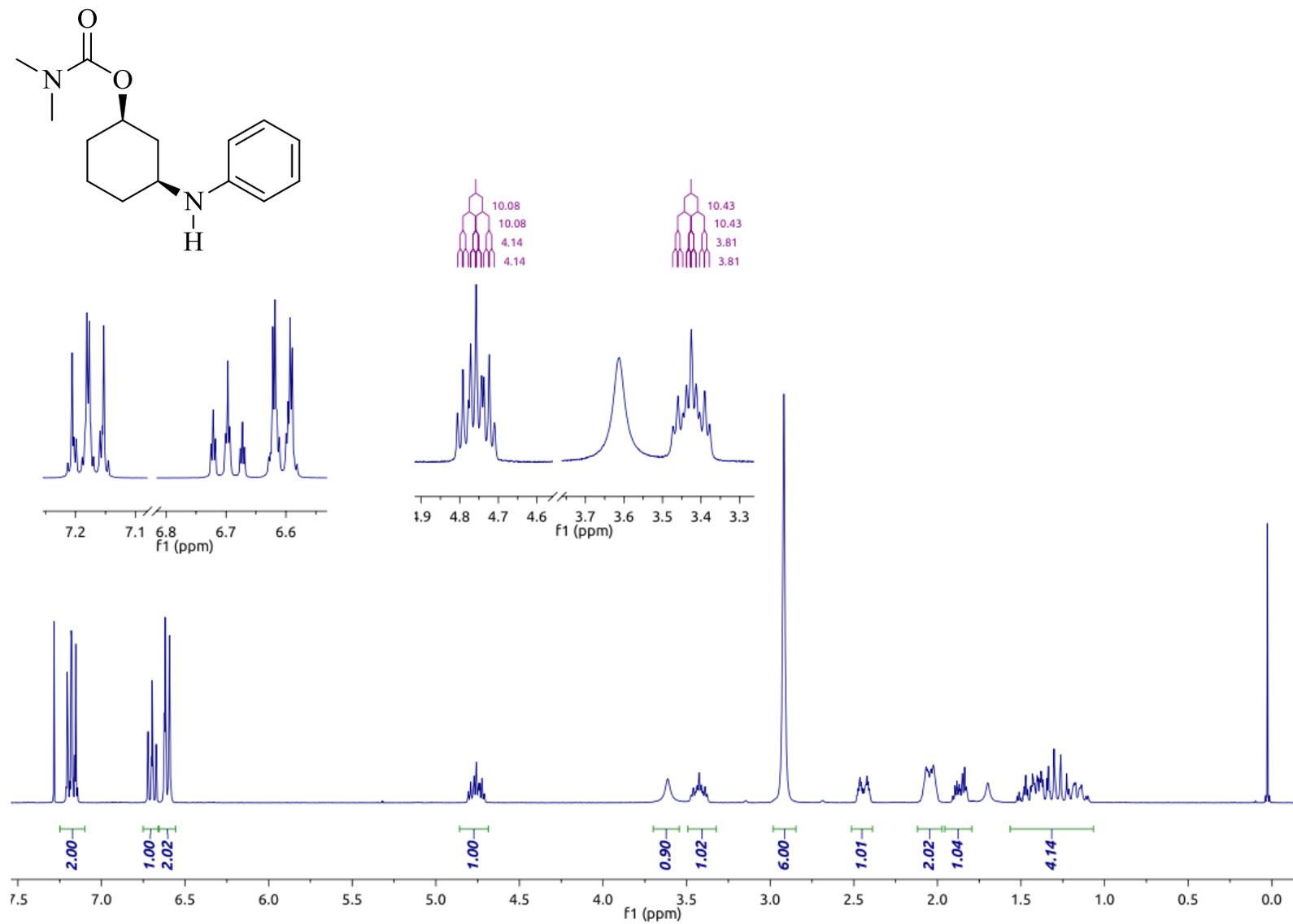
Anexo 29. Espectro de RMN de ^{13}C a 75 MHz do *trans*-*N,N*-dimetilcarbamato de 3-(4-metoxifenilamino)cicloexila (**4c**) em CDCl_3 .



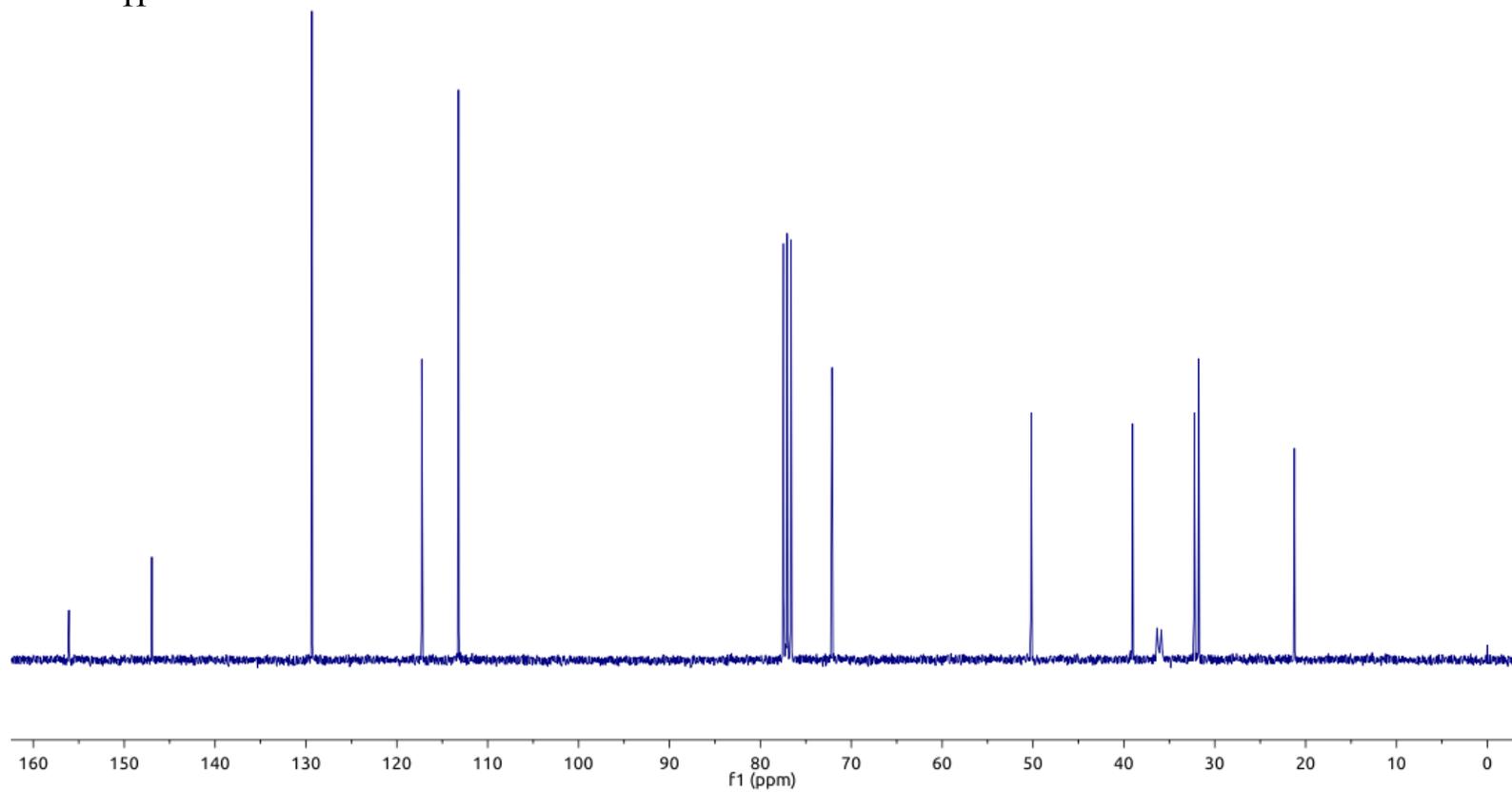
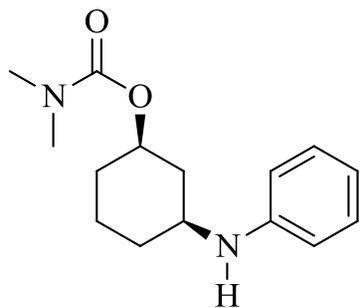
Anexo 30. Mapa de contorno HSQC do *trans*-*N,N*-dimetilcarbamato de 3-(4-metoxifenilamino)cicloexila (**4c**) em CDCl₃.



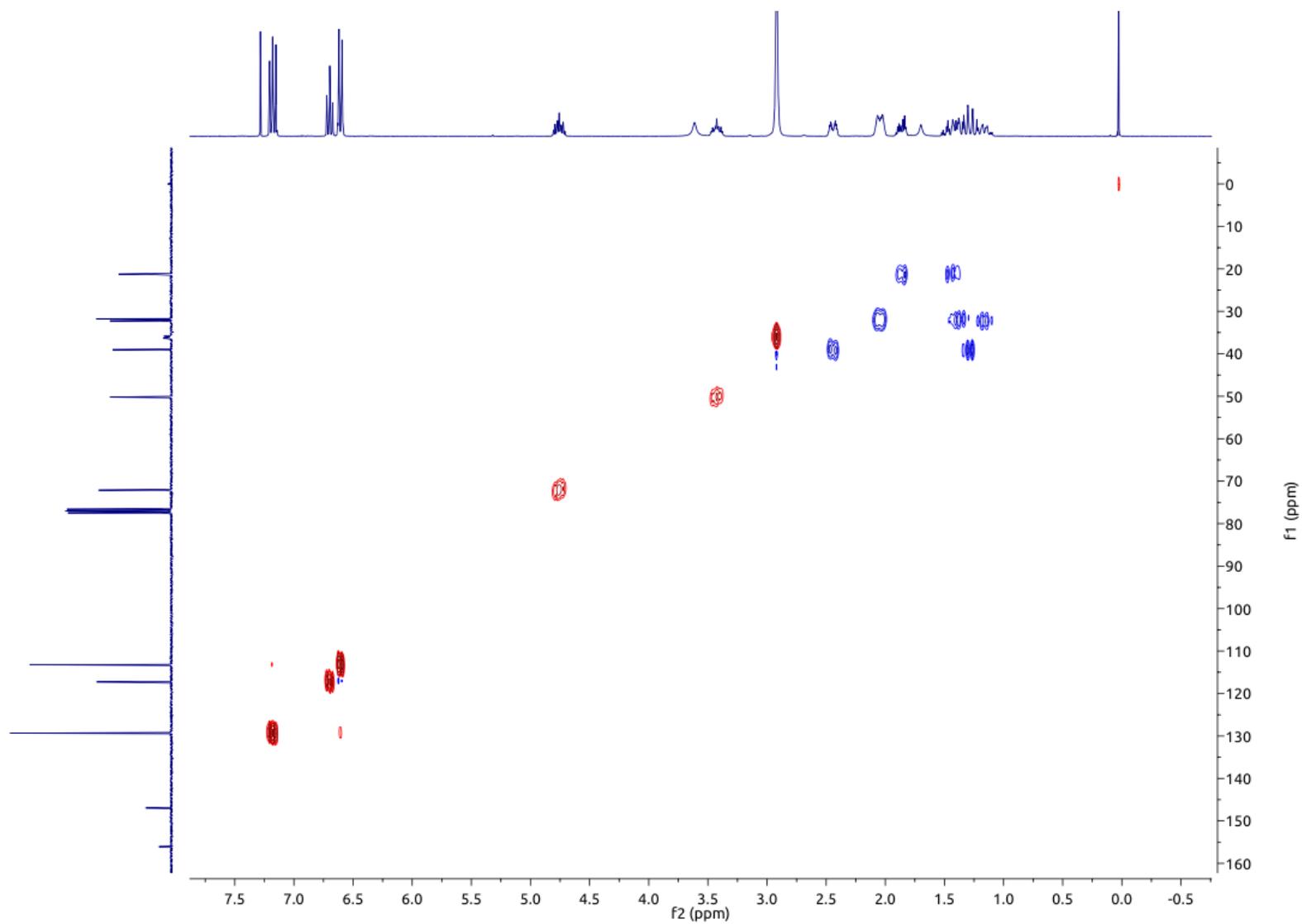
Anexo 31. Espectro de RMN de ^1H a 500 MHz do *cis*-*N,N*-dimetilcarbamato de 3-fenilaminocicloexila (**5a**) em CDCl_3 .



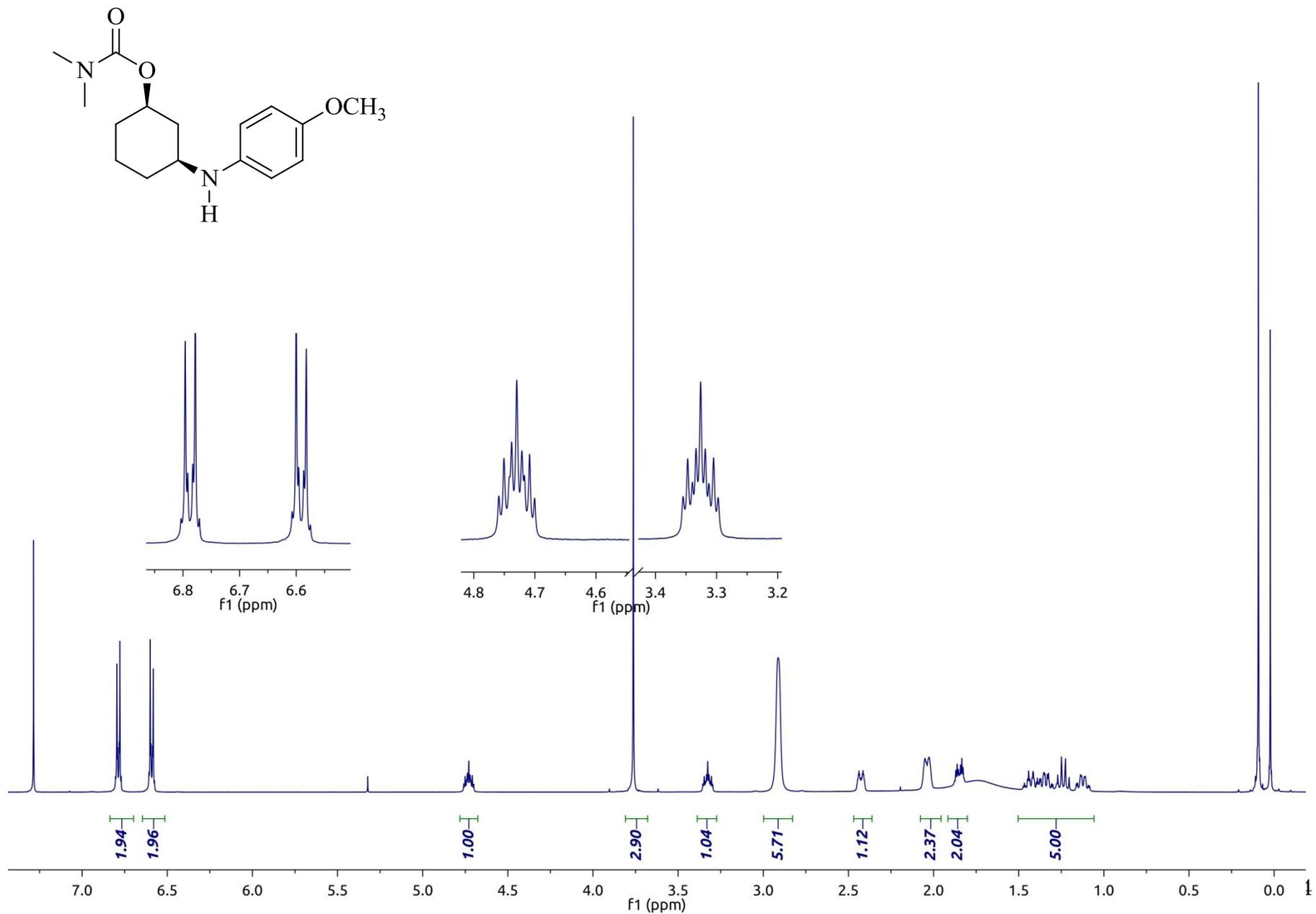
Anexo 32. Espectro de RMN de ^{13}C a 125 MHz do *cis*-*N,N*-dimetilcarbamato de 3-fenilaminocicloexila (**5a**) em CDCl_3 .



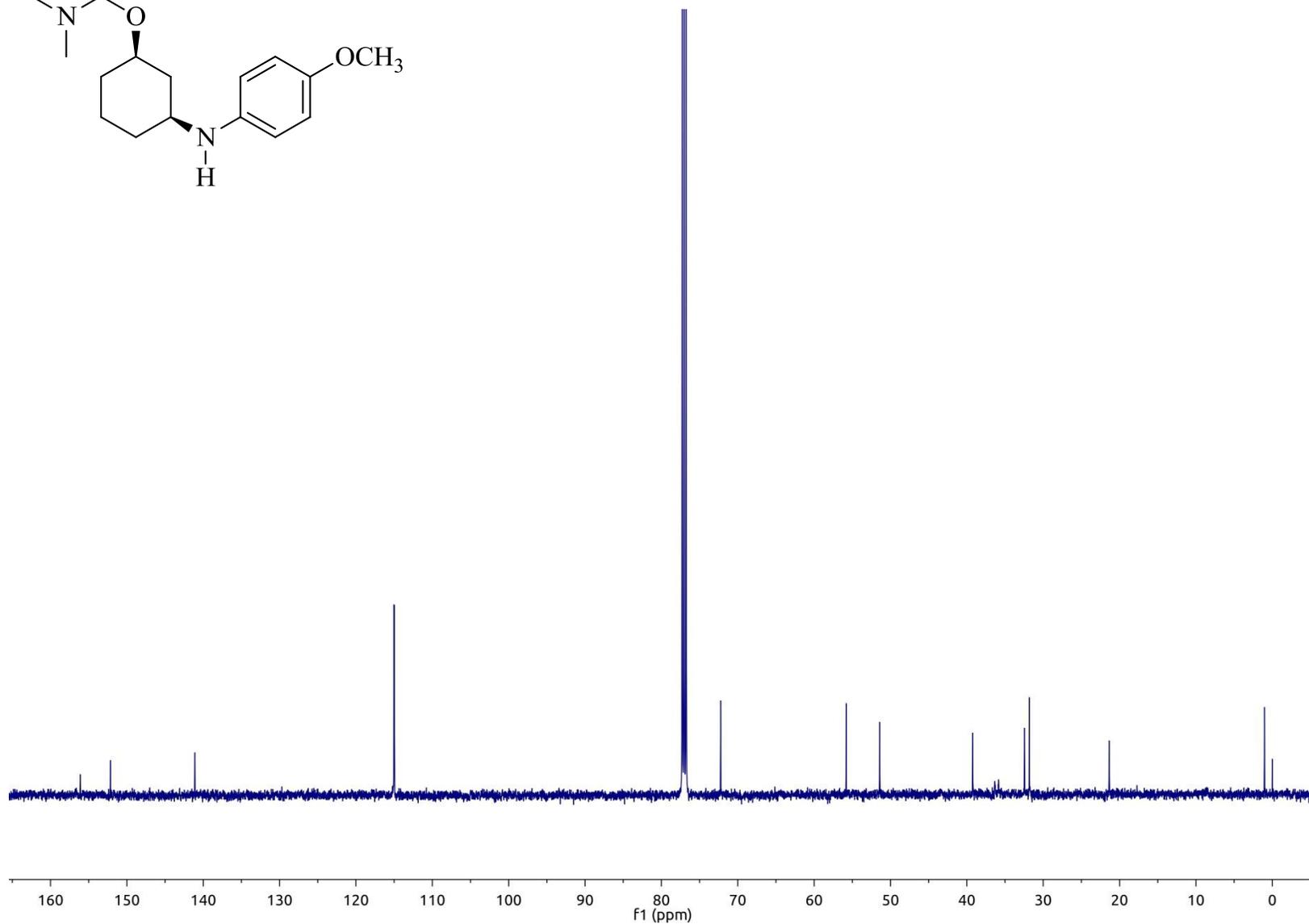
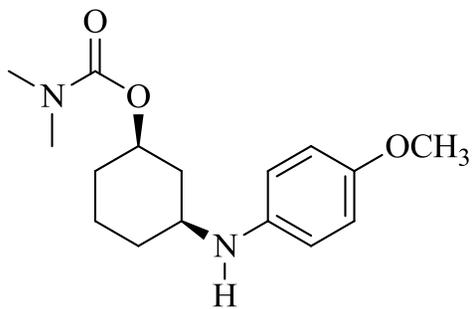
Anexo 33. Mapa de contorno HSQC do *cis*-*N,N*-dimetilcarbamato de 3-fenilaminocicloexila (**5a**) em CDCl₃.



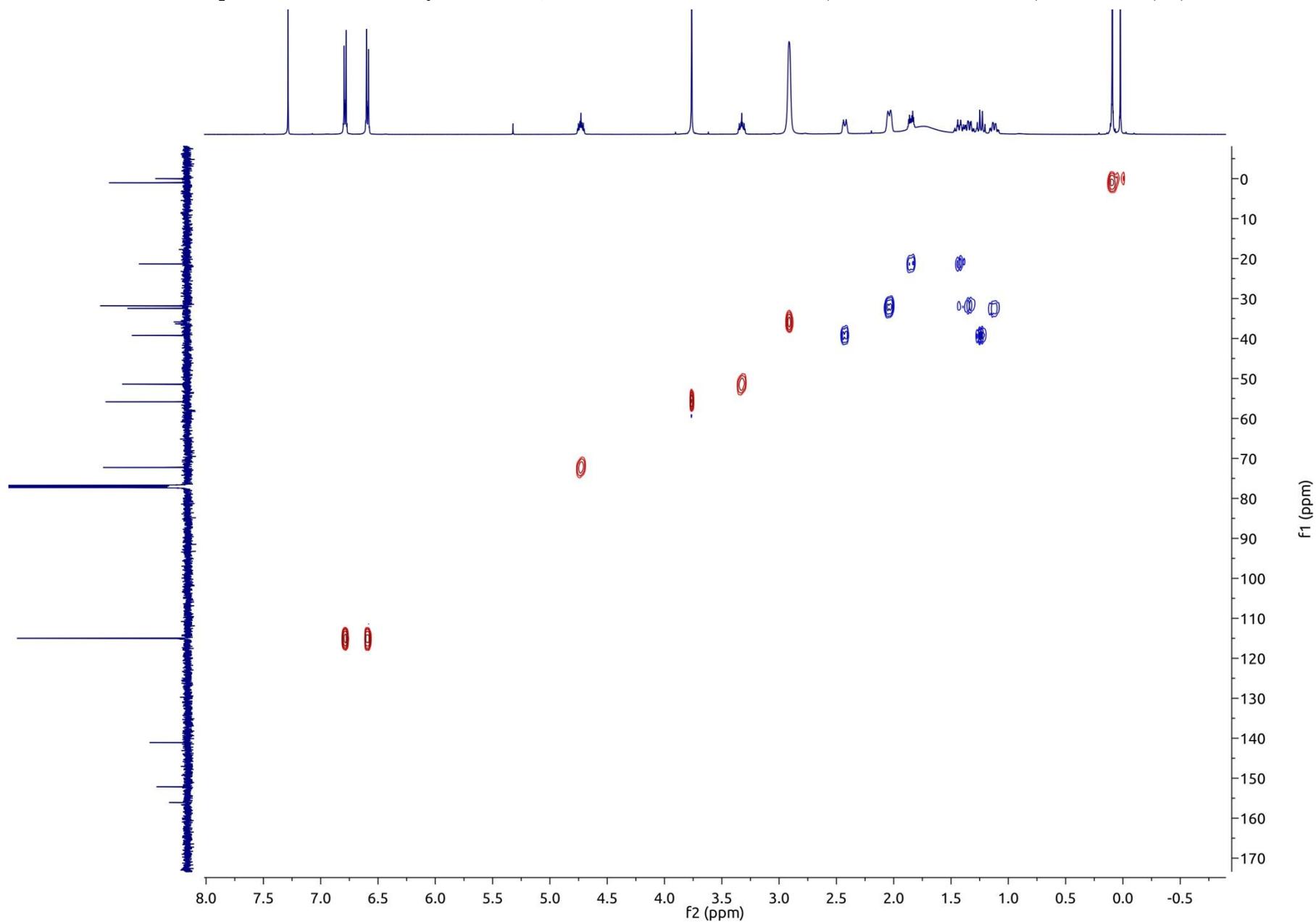
Anexo34. Espectro de RMN de ^1H a 300 MHz do *cis*-*N,N*-dimetilcarbamato de 3-(4-metoxifenilamino)cicloexila (**5c**) em CDCl_3 .



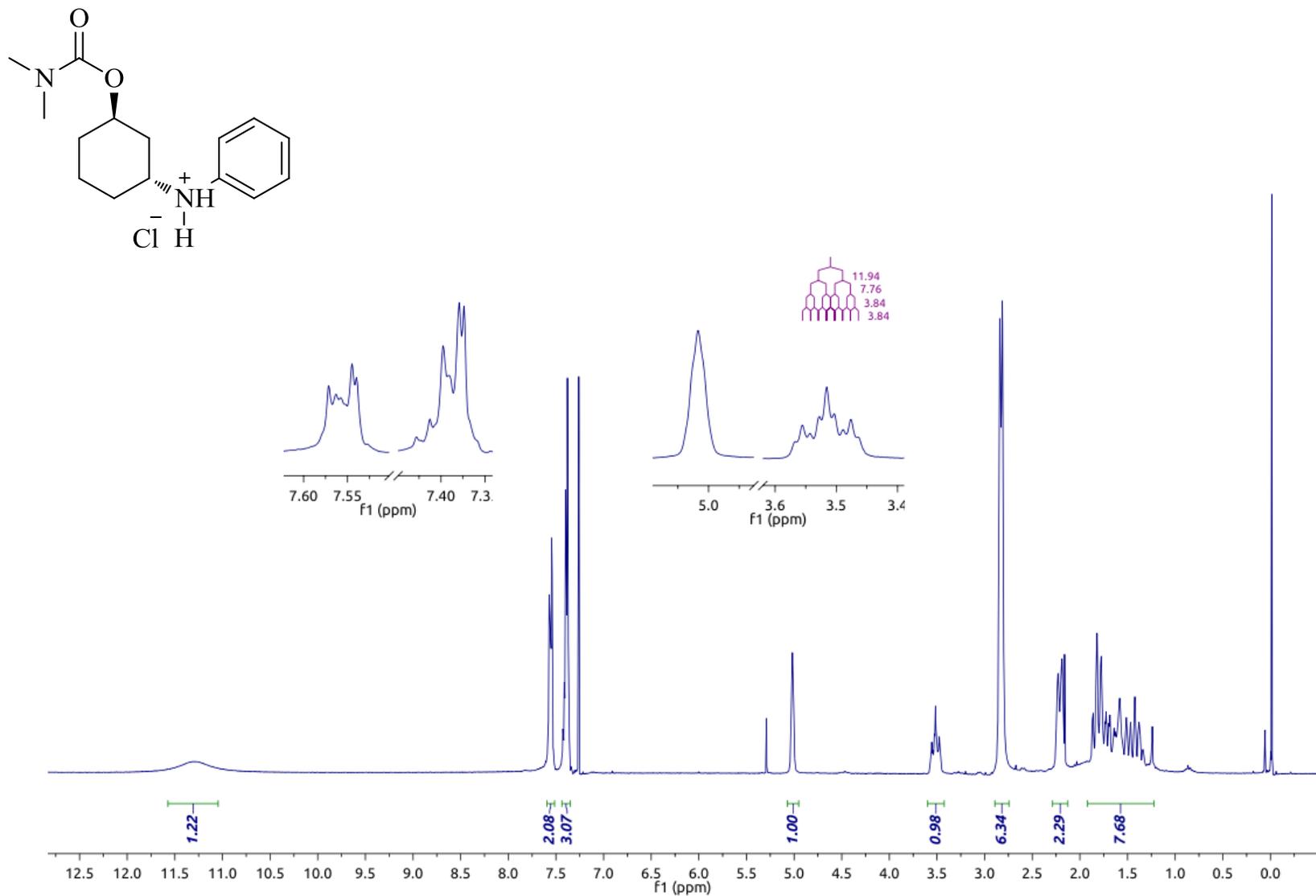
Anexo 35. Espectro de RMN de ^{13}C a 75 MHz do *cis*-*N,N*-dimetilcarbamato de 3-(4-metoxifenilamino)cicloexila (**5c**) em CDCl_3 .



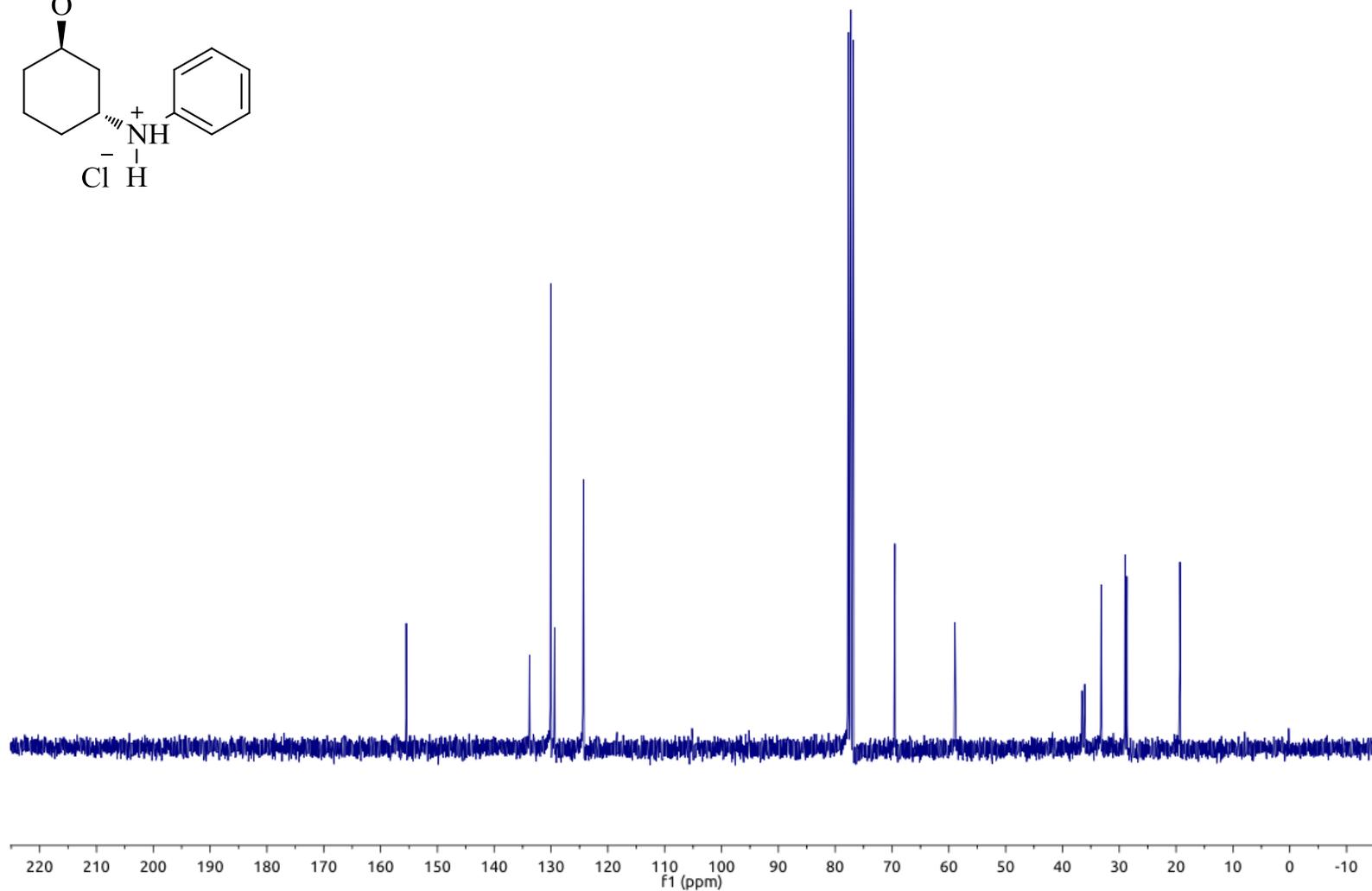
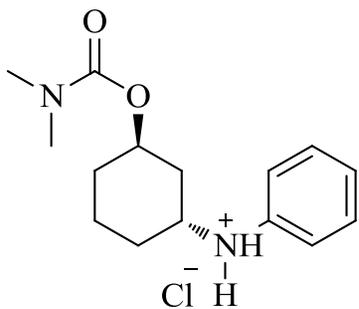
Anexo 36. Mapa de contorno HSQC do *cis*-*N,N*-dimetilcarbamato de 3-(4-metoxifenilamino)cicloexila (**5c**) em CDCl₃.



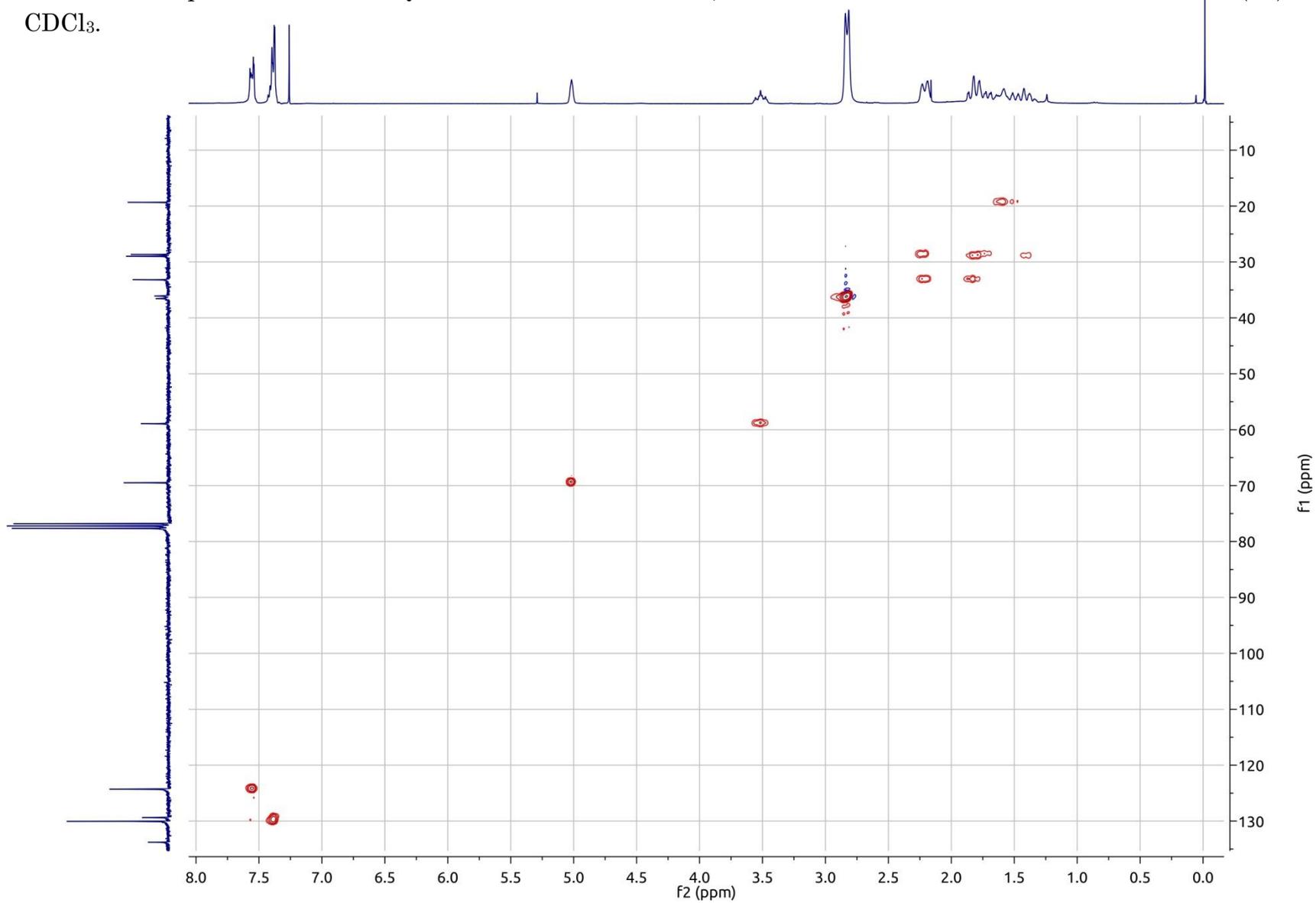
Anexo 37. Espectro de RMN de ^1H a 300 MHz do *Cloridrato de trans-N,N*-dimetilcarbamato de 3-fenilaminocicloexila (**6a**) em CDCl_3 .



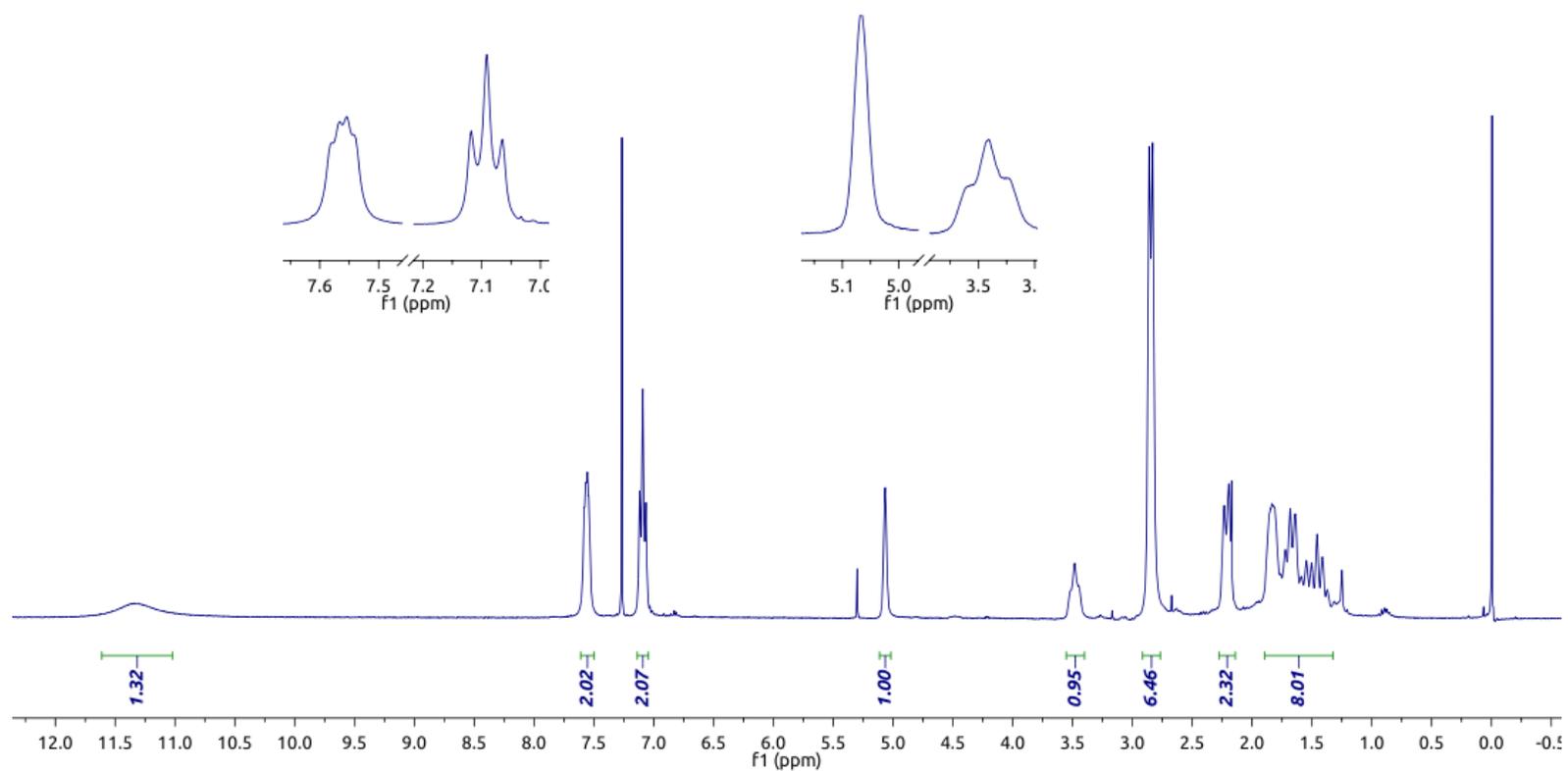
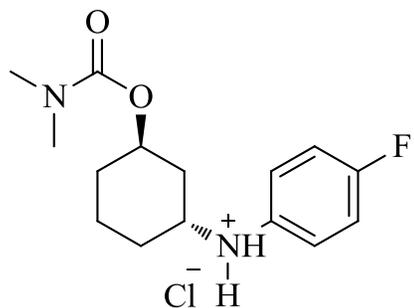
Anexo 38. Espectro de RMN de ^{13}C a 75 MHz do *Cloridrato de trans-N,N*-dimetilcarbamato de 3-fenilaminocicloexila (**6a**) em CDCl_3 .



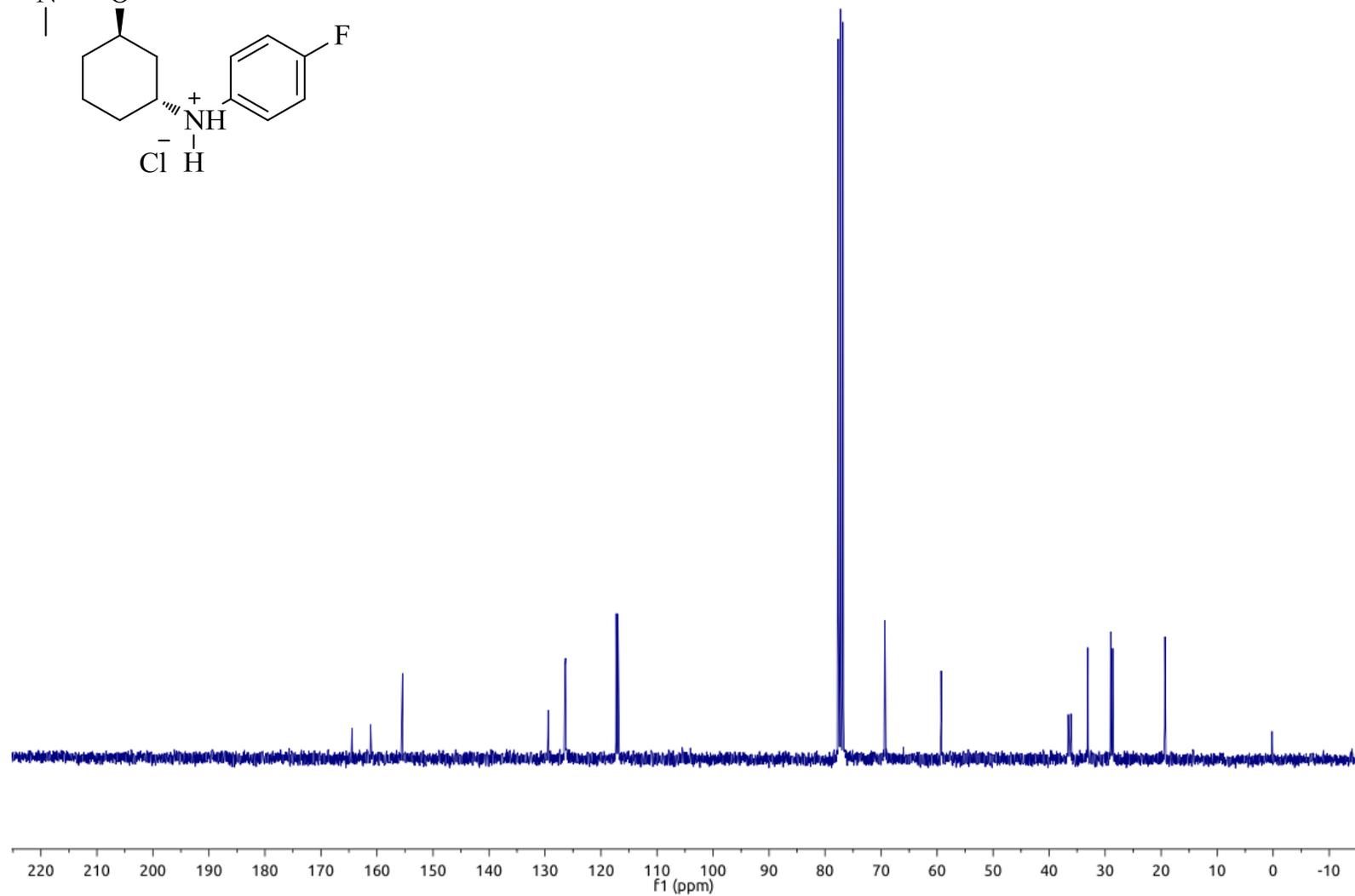
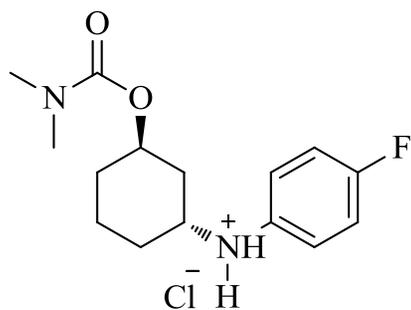
Anexo 39. Mapa de contorno HSQC do *Cloridrato de trans-N,N*-dimetilcarbamato de 3-fenilaminocicloexila (**6a**) em CDCl₃.



Anexo 40. Espectro de RMN de ^1H a 300 MHz do *Cloridrato de trans-N,N*-dimetilcarbamato de 3-(4-fluorfenilamino)cicloexila (**6b**) em CDCl_3 .

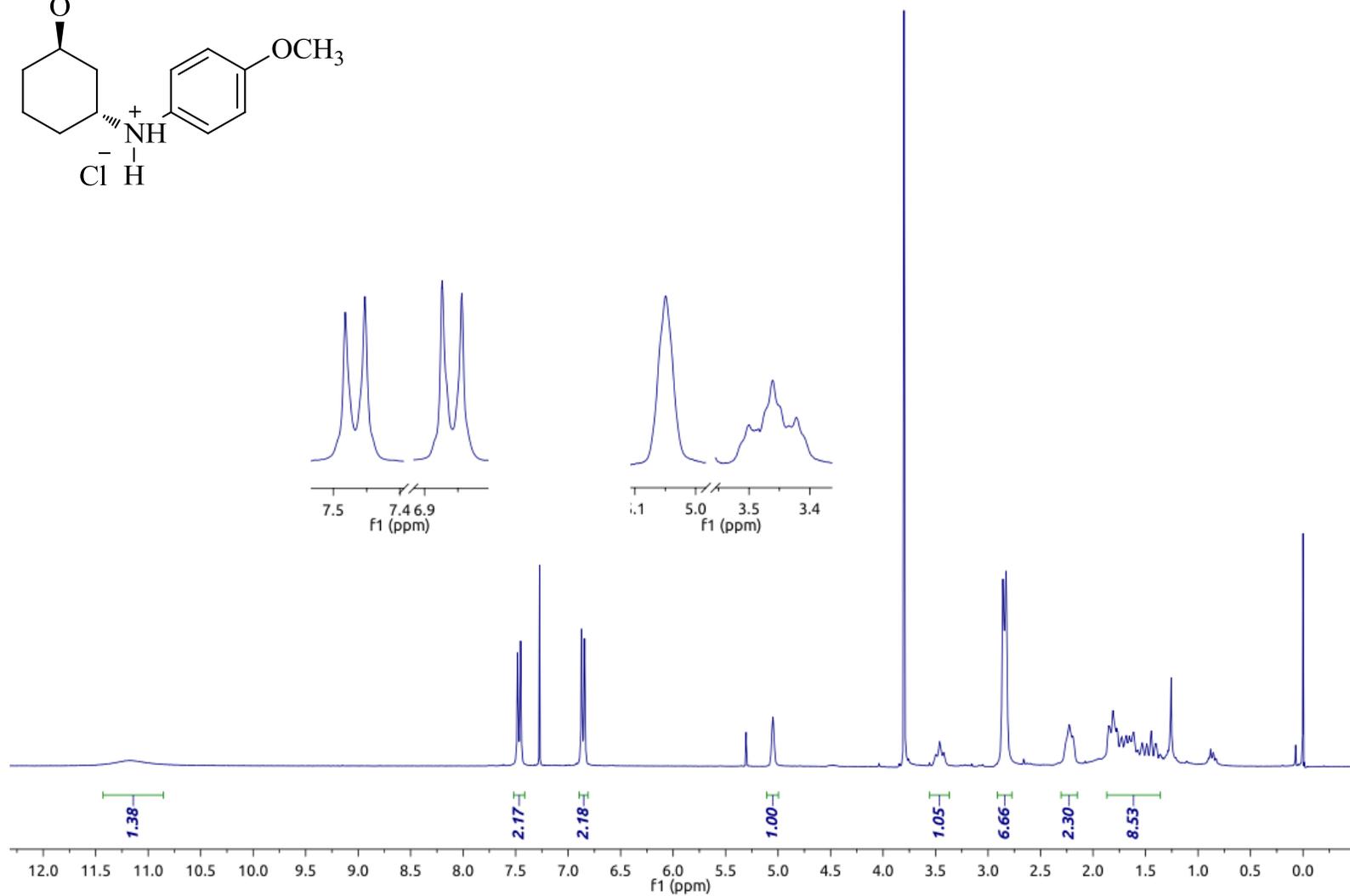
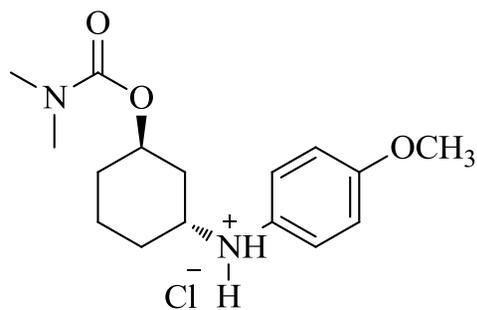


Anexo 41. Espectro de RMN de ^{13}C a 75 MHz do *Cloridrato de trans-N,N*-dimetilcarbamato de 3-(4-fluorfenilamino)cicloexila (**6b**) em CDCl_3 .

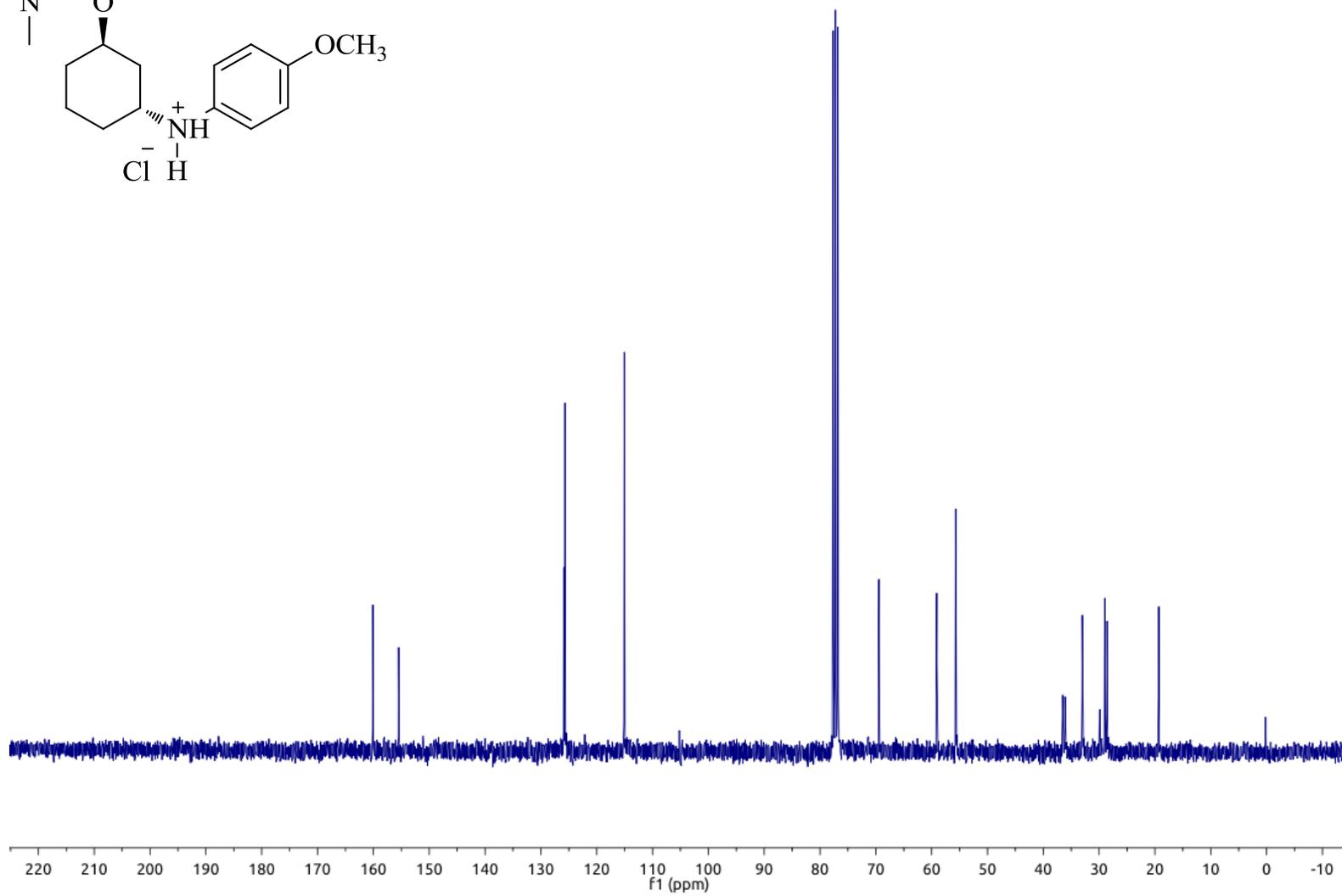
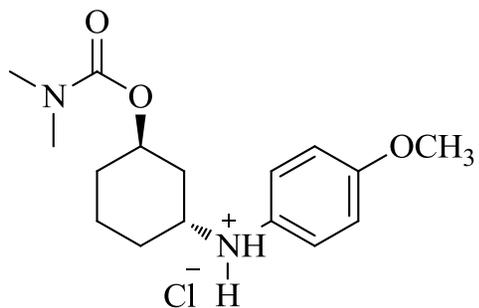


Anexo 42. Mapa de contorno HSQC do *Cloridrato de trans-N,N*-dimetilcarbamato de 3-(4-fluorfenilamino)cicloexila (**6b**) em CDCl₃.

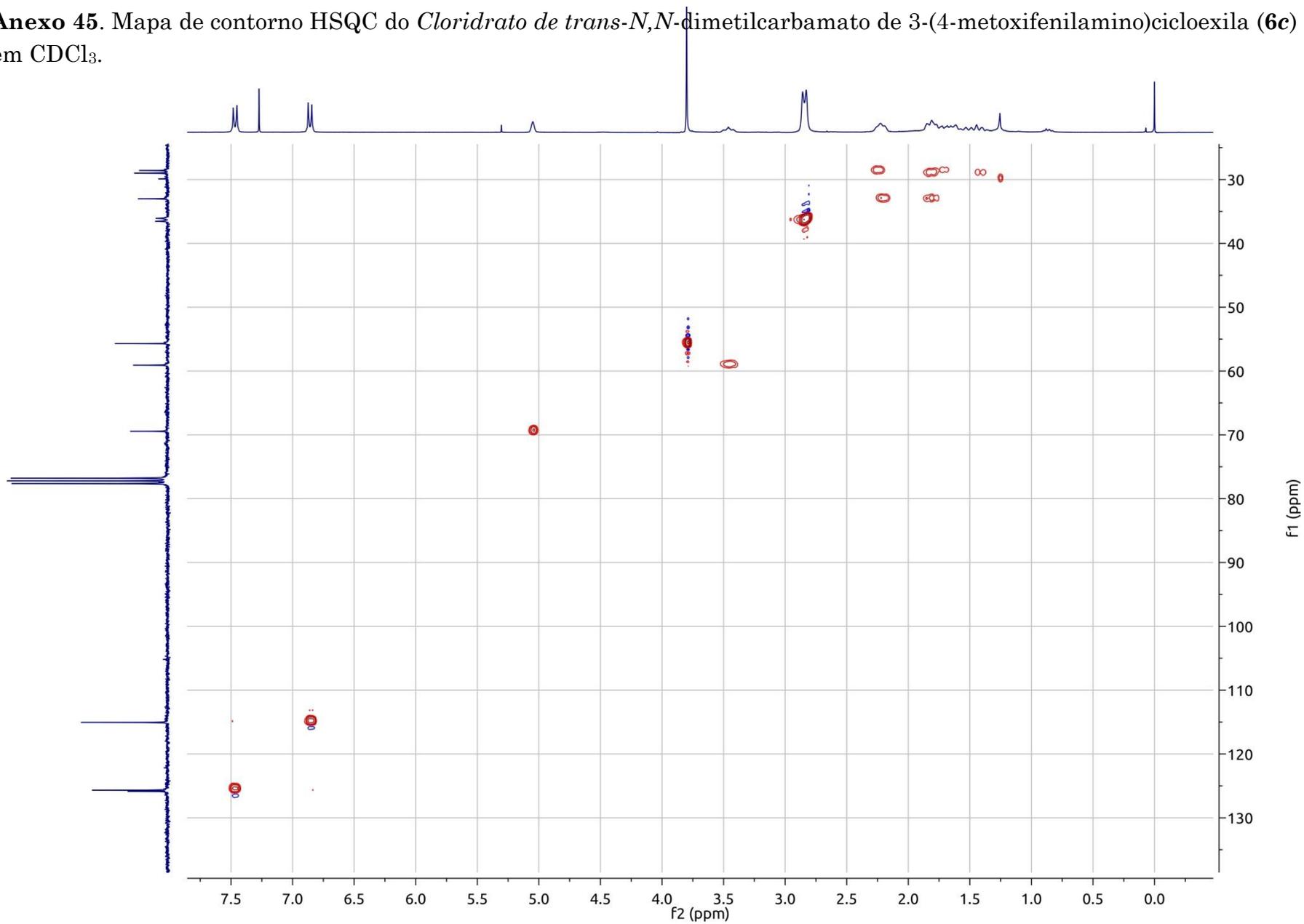
Anexo 43. Espectro de RMN de ^1H a 300 MHz do *Cloridrato de trans-N,N*-dimetilcarbamato de 3-(4-metoxifenilamino)cicloexila (**6c**) em CDCl_3 .



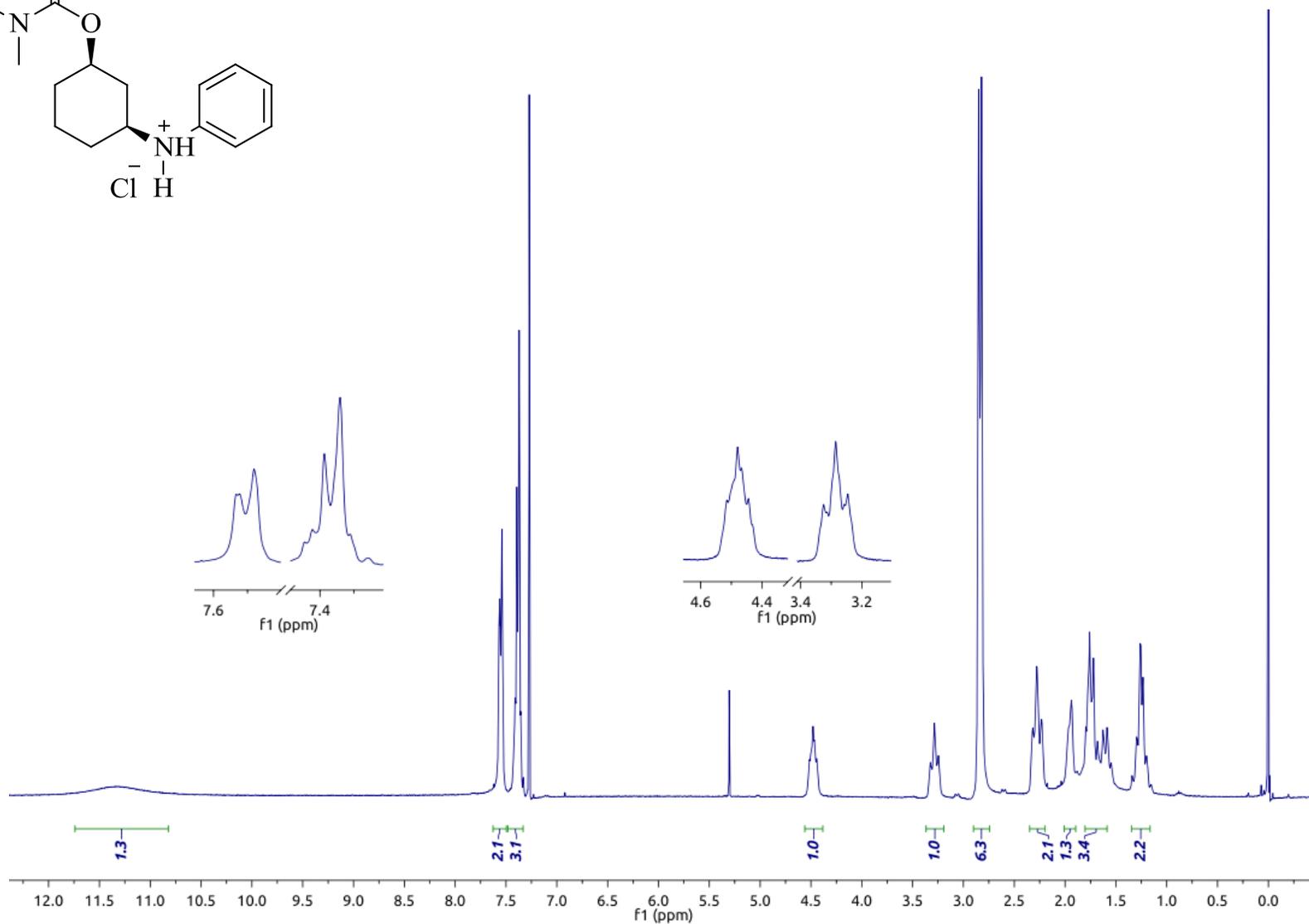
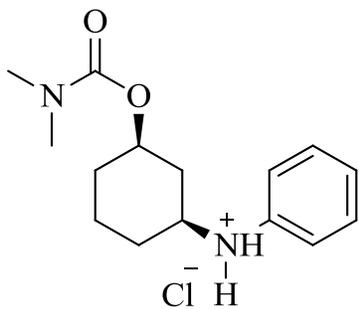
Anexo 44. Espectro de RMN de ^{13}C a 75 MHz do *Cloridrato de trans-N,N*-dimetilcarbamato de 3-(4-metoxifenilamino)cicloexila (**6c**) em CDCl_3 .



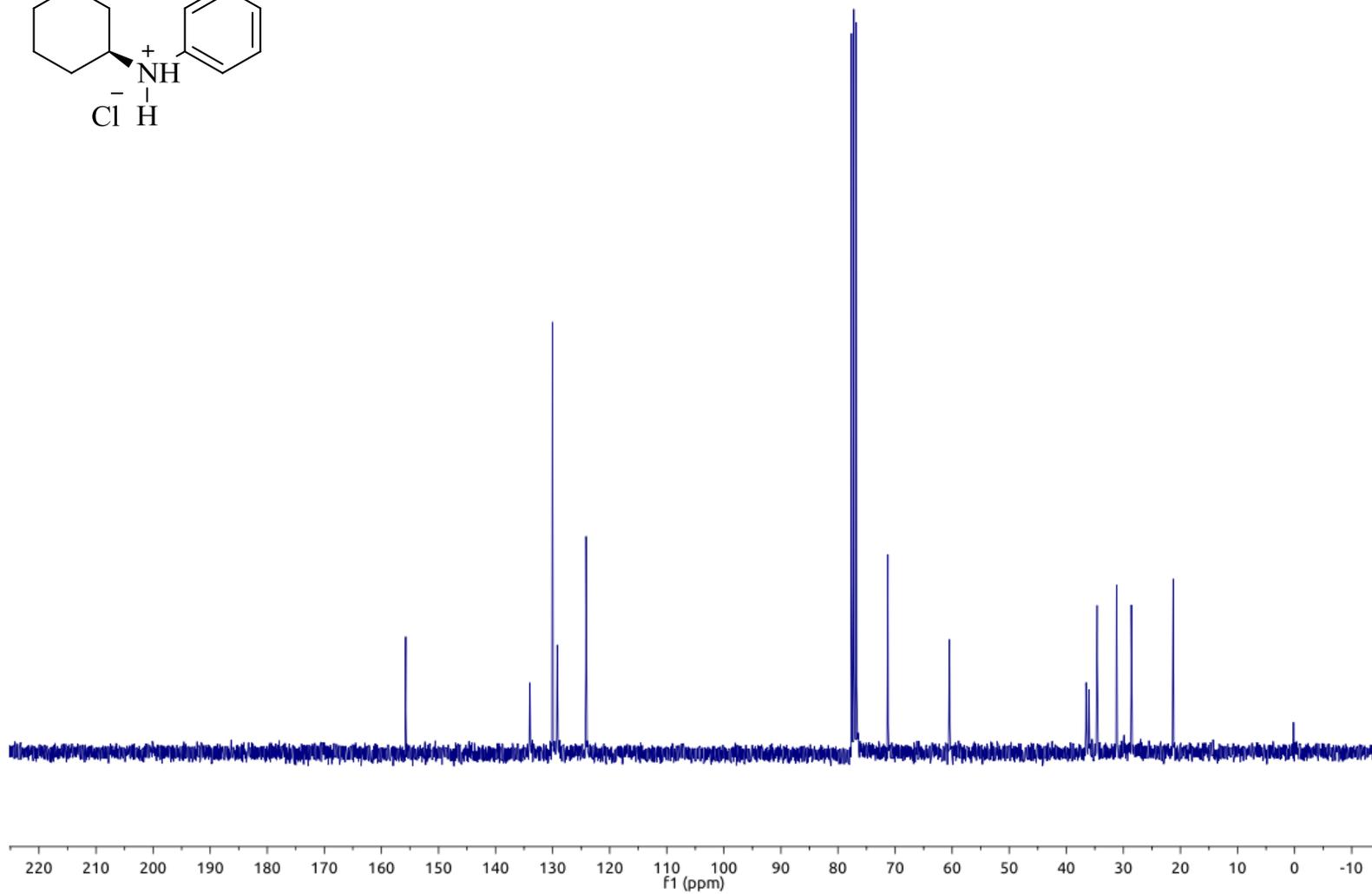
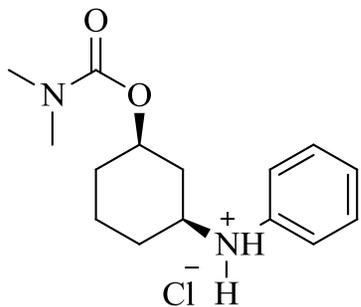
Anexo 45. Mapa de contorno HSQC do *Cloridrato de trans-N,N*-dimetilcarbamato de 3-(4-metoxifenilamino)cicloexila (**6c**) em CDCl₃.



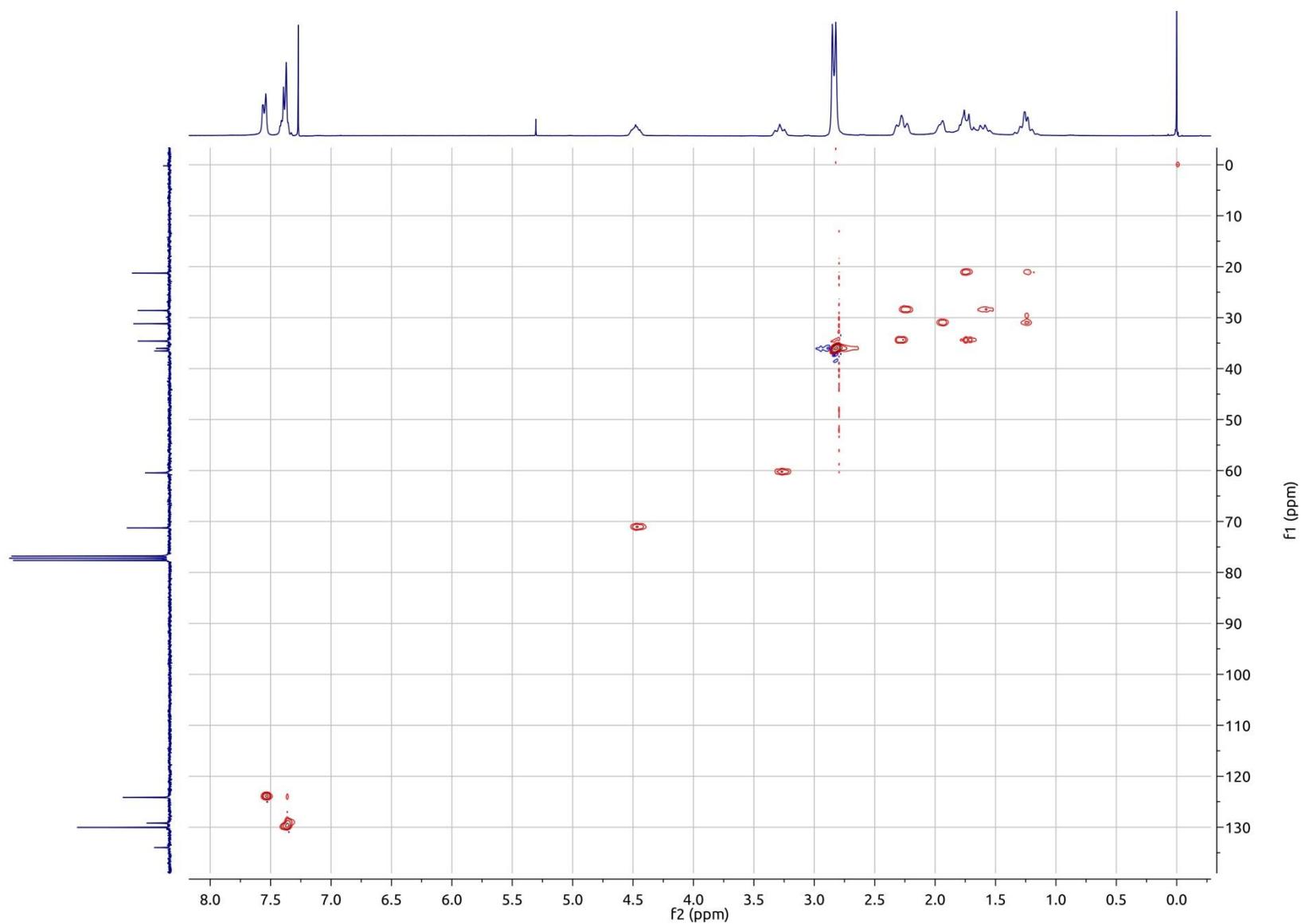
Anexo 46. Espectro de RMN de ^1H a 300 MHz do *Cloridrato de cis-N,N*-dimetilcarbamato de 3-fenilaminocicloexila (**7a**) em CDCl_3 .



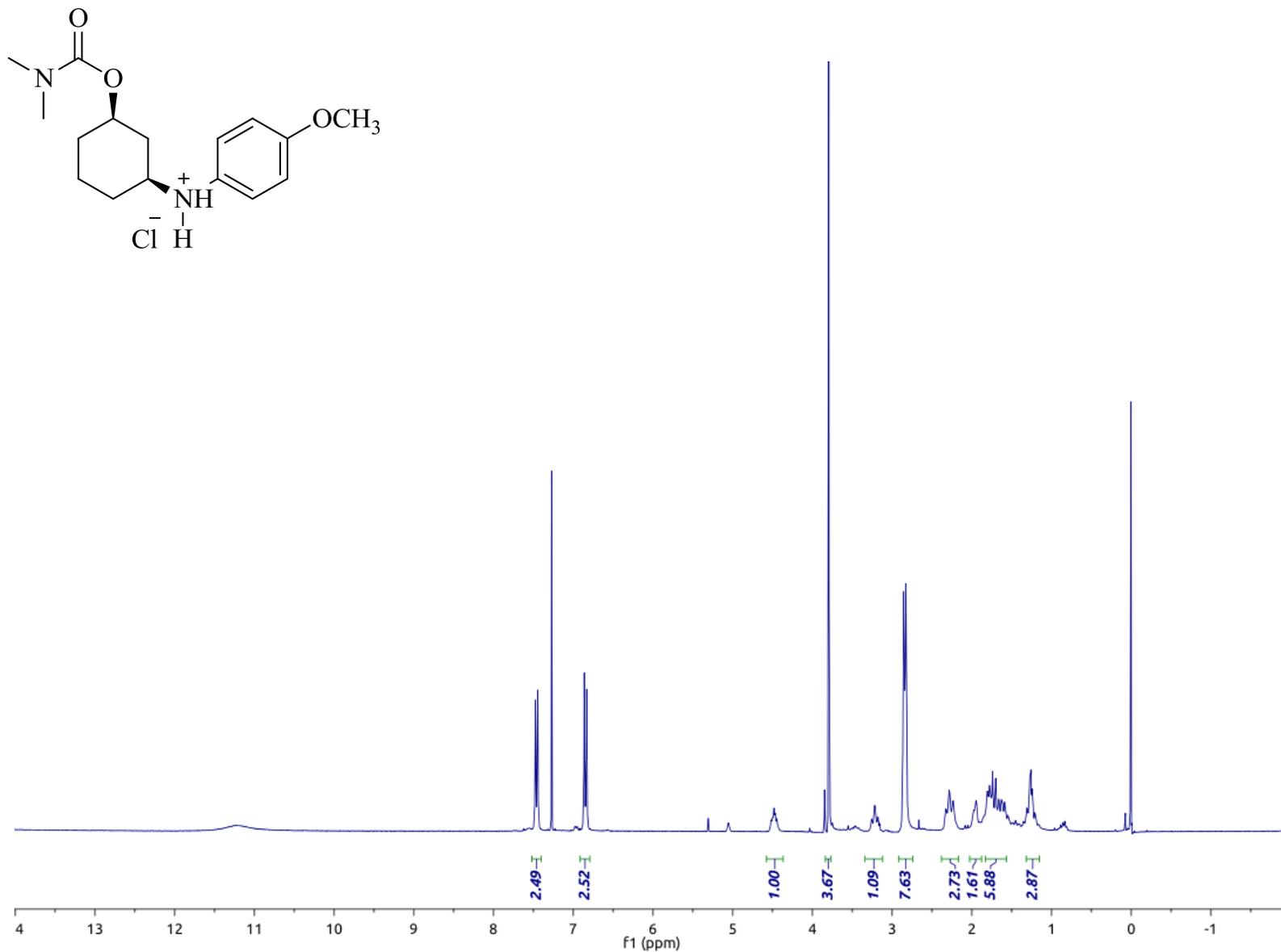
Anexo 47. Espectro de RMN de ^{13}C a 75 MHz do *Cloridrato de cis-N,N*-dimetilcarbamato de 3-fenilaminocicloexila (**7a**) em CDCl_3 .



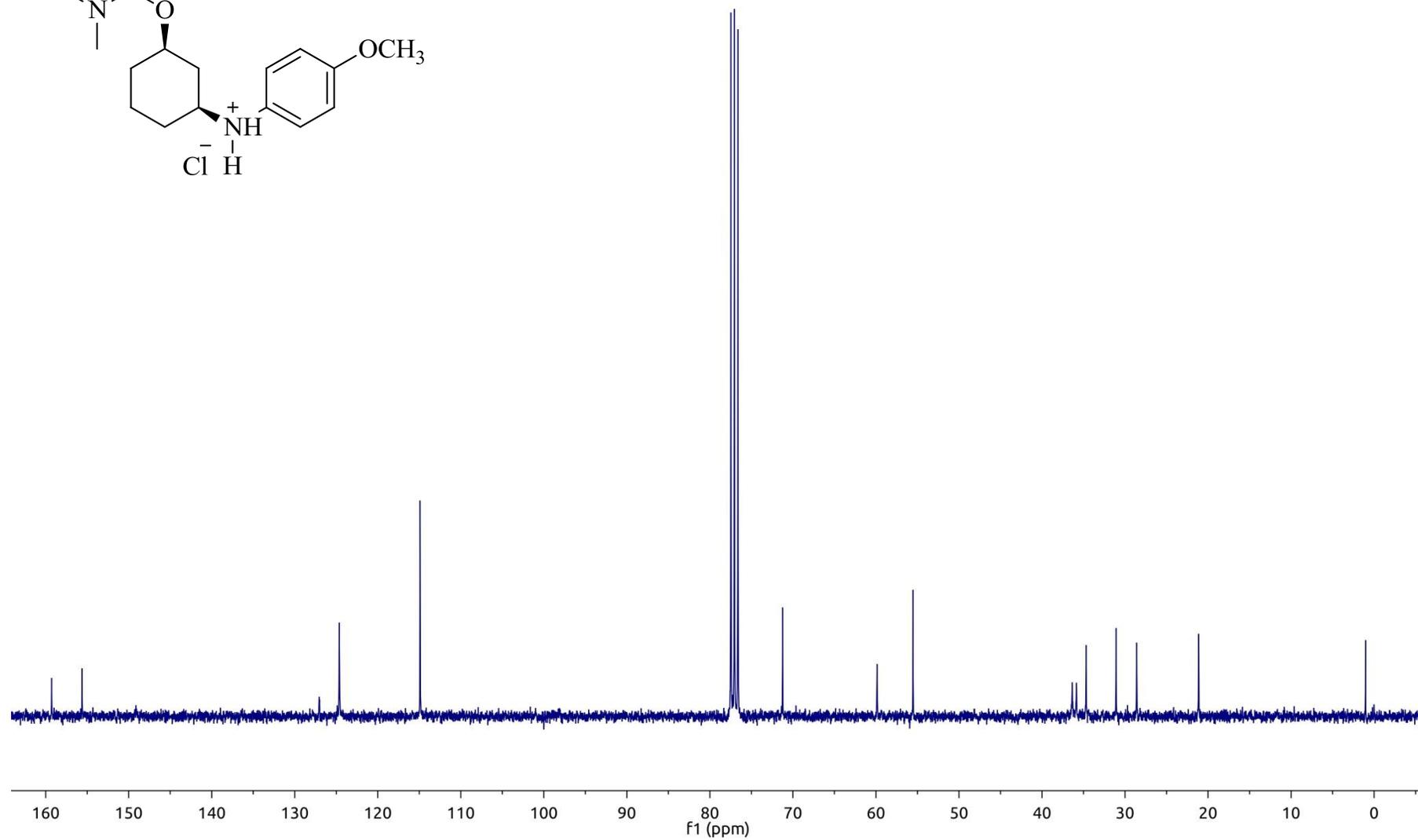
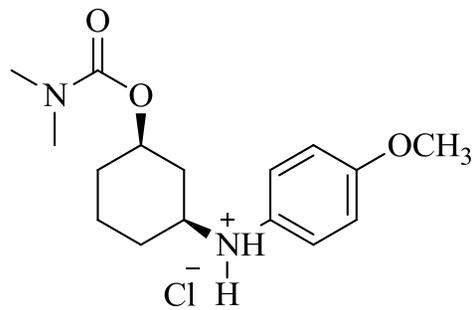
Anexo 48. Mapa de contorno HSQC do *Cloridrato de cis-N,N*-dimetilcarbamato de 3-fenilaminocicloexila (**7a**) em CDCl₃.



Anexo 49. Espectro de RMN de ^1H a 300 MHz do *Cloridrato de cis-N,N*-dimetilcarbamato de 3-(4-metoxifenilamino)cicloexila (**7c**) em CDCl_3 .



Anexo 50. Espectro de RMN de ^{13}C a 75 MHz do *Cloridrato de cis-N,N*-dimetilcarbamato de 3-(4-metoxifenilamino)cicloexila (**7c**) em CDCl_3 .



Anexo 51. Mapa de contorno HSQC do *Cloridrato de cis-N,N*-dimetilcarbamato de 3-(4-metoxifenilamino)cicloexila (**7c**) em CDCl₃.

