

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

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

NOVAS QUINOLINAS ACILGUANIDÍNICAS PLANEJADAS COMO
INIBIDORES SELETIVOS DE BUTIRILCOLINESTERASE

MAYARA CARLA DOS SANTOS

2024



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

**NOVAS QUINOLINAS ACILGUANIDÍNICAS PLANEJADAS COMO
INIBIDORES SELETIVOS DE BUTIRILCOLINESTERASE**

MAYARA CARLA DOS SANTOS

Sob a Orientação dos Professores

Dr^a. Renata Barbosa Lacerda e Dr. Arthur Eugen Kümmerle

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

Seropédica-RJ

Abril de 2024

Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro
Biblioteca Central / Seção de Processamento Técnico

Ficha catalográfica elaborada
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

S237n Santos, Mayara Carla , 1992-
NOVAS QUINOLINAS ACILGUANIDÍNICAS PLANEJADAS COMO
INIBIDORES SELETIVOS DE BUTIRILCOLINESTERASE / Mayara
Carla Santos. - Seropédica, 2024.
116 f.

Orientadora: Dr^a Renata Barbosa Lacerda.
Coorientadora: Dr. Arthur Eugen Kümmerle.
Dissertação(Mestrado). -- Universidade Federal
Rural do Rio de Janeiro, PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
QUÍMICA , 2024.

1. Doença de Alzheimer. 2. Quinolinas. 3.
Acilguanidinas. 4. Inibidores de
butirilcolinesterase.. I. Lacerda, Dr^a Renata
Barbosa, 1980-, orient. II. Kümmerle, Dr. Arthur
Eugen, 1979-, coorient. III Universidade Federal
Rural do Rio de Janeiro. PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
QUÍMICA . IV. Título.

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

MAYARA CARLA DOS SANTOS

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

DISSERTAÇÃO APROVADA EM 26/04/2024

Renata Barbosa Lacerda Dr^a.UFRRJ (Orientadora)

Claudio Eduardo Rodrigues dos Santos Dr. UFRRJ

Marina Amaral Alves Dr^a. UFRJ



TERMO Nº 280/2024 - PPGQ (12.28.01.00.00.00.60)

(Nº do Protocolo: NÃO PROTOCOLADO)

(Assinado digitalmente em 26/04/2024 16:25)
CLAUDIO EDUARDO RODRIGUES DOS SANTOS
PROFESSOR DO MAGISTERIO SUPERIOR
DQO (11.39.00.23)
Matrícula: ###244#8

(Assinado digitalmente em 26/04/2024 13:44)
RENATA BARBOSA LACERDA
PROFESSOR DO MAGISTERIO SUPERIOR
DCFar (12.28.01.00.00.00.47)
Matrícula: ###795#2

(Assinado digitalmente em 02/05/2024 22:00)
MARINA AMARAL ALVES
ASSINANTE EXTERNO
CPF: ###.###.887-##

Visualize o documento original em <https://sipac.ufrrj.br/documentos/> informando seu número: **280**, ano: **2024**, tipo:
TERMO, data de emissão: **26/04/2024** e o código de verificação: **b41e01f17b**

Dedicatória

Dedico este trabalho e todas as minhas conquistas a quem dedicou toda confiança, investimento e sonhos em mim. Este trabalho é para você, pai. **(Em memória, João Carlos dos Santos)**. “Se eu vi mais longe, foi por estar sobre ombros de gigantes.”

(NEWTON)

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente ao meu pai, que sempre me proporcionou tudo que pôde para eu ser quem sou hoje, quem sempre me incentivou nos estudos e sempre desejou que eu chegasse até aqui, sei que de onde estiver está feliz e realizado com mais essa conquista.

Agradeço a minha mãe que sempre acreditou em mim, a minha irmã Silvania que sempre me apoiou nos momentos difíceis e me deu toda força que eu precisava e que não me deixou desistir. E a toda minha família pelo apoio e toda força nos momentos difíceis.

Agradeço ao meu namorado, Thiago, que me apoiou, aguentou meus momentos difíceis e me deu o combustível necessário na reta final.

Agradeço imensamente a minha orientadora Renata, por toda paciência, por todo ensinamento, por sempre acreditar que eu iria conseguir e que tudo iria dar certo mesmo quando eu mesmo não acreditava. Eu sou muito grata pelo tanto que eu pude aprender com você, por sua orientação e amizade.

Agradeço aos meus amigos que fiz nessa caminhada, especialmente ao Rafael, Bruna e Felipe. Que me ajudaram nas dificuldades encontradas e que me presentearam com o companheirismo e amizade durante este tempo.

Agradeço aos meus colegas de laboratório que muito contribuíram para este trabalho, especialmente, Nathalia, Lucas, Larissa e Gleyton. Obrigada, por toda ajuda, auxílio e trabalho de vocês. Sem vocês este trabalho não seria possível.

Agradeço a todos os meus professores, que sempre me ensinam tanto.

Agradeço a todos os meus amigos que sempre me incentivaram e apoiaram nessa jornada.

Agradeço ao órgão de fomento CNPQ pela bolsa de estudo que me possibilitou suporte financeiro e acadêmico ao longo da pós graduação.

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

RESUMO

A doença de Alzheimer (DA) é uma doença neurodegenerativa progressiva, caracterizada pela deficiência de neurônios colinérgicos intactos. A butirilcolinesterase (BuChE) e a acetilcolinesterase (AChE) são enzimas do sistema nervoso que catalisam a hidrólise da acetilcolina (ACh), diminuindo os níveis do neurotransmissor e finalizando a comunicação entre as células nervosas. A AChE é ainda o principal alvo terapêutico para o tratamento da DA, no entanto estudos sugerem importante papel da BuChE na hidrólise da ACh em estágios mais avançados da DA, sendo os inibidores seletivos de BuChE vislumbrados como potenciais candidatos para o tratamento desta doença. Este trabalho descreve uma nova série de acilguanidinas quinolínicas (**59-62A-D**; **63-66A-D**) planejadas como inibidores seletivos de BuChE. O planejamento estrutural se baseou nas acilguanidinas indólicas e bromopirrólicas descritas previamente por nosso grupo, as quais se mostraram inibidores seletivos de BuChE. Nos novos derivados o farmacóforo acilguanidina foi mantido e, através do bioisosterismo, propomos a troca do heterociclo principal pelo núcleo quinolínicó com diferentes padrões de substituição na posição *dois* do heterociclo central. A síntese dos compostos se baseou na obtenção dos intermediários-chave *terc*-butil((metiltio)(quinolina-4-carboxamido) metileno) carbamatos (**58a-d**) para posterior condensação com as aminas de interesse (**A-D**) e subsequente reação em meio ácido para remoção do grupo de proteção (*N*-Boc). Foram sintetizados 20 compostos originais, entre acilguanidinas protegidas (**59-62-A-D**) e desprotegidas (**63-66-A-D**), caracterizados por RMN¹H e RMN¹³C. As acilguanidinas desprotegidas fenil-quinolínicas (**64A-D**) foram identificadas como inibidores seletivos enzima BuChE (CI₅₀ entre 7 e 12 µM). As duas acilguanidinas com menores valores de CI₅₀ para inibição da BuChE (**64C-D**) foram avaliadas quanto ao seu perfil antioxidante no modelo do DPPH mas não apresentaram atividade na concentração utilizada (100µM). Estudos de ancoramento molecular possibilitaram a compreensão dos possíveis modos de interação dos compostos ativos com a BuChE e a predição *in silico* das propriedades ADME e *druglike* sugere que as novas acilguanidinas quinolínicas tem bom perfil farmacocinético.

Palavras chaves: doença de Alzheimer; quinolinas; acilguanidinas; inibidores de butirilcolinesterase.

ABSTRACT

Alzheimer's disease (AD) is a progressive neurodegenerative disease characterized by a deficiency of intact cholinergic neurons. Butyrylcholinesterase (BuChE) and acetylcholinesterase (AChE) are nervous system enzymes that catalyze the hydrolysis of acetylcholine (ACh), reducing neurotransmitter levels and ending communication between nerve cells. AChE is still the main therapeutic target for the treatment of AD, however studies suggest an important role for BuChE in the hydrolysis of ACh in more advanced stages of AD, with selective BuChE inhibitors being seen as potential candidates for the treatment of this disease. This work describes a new series of quinolinic acylguanidines (**59-62A-D**; **63-66A-D**) designed as selective inhibitors of BuChE. Structural design was based on the indole and bromopyrrolic acylguanidines previously described by our group, which were shown to be selective inhibitors of BuChE. In the new derivatives, the acylguanidine pharmacophore was maintained and, through bioisosterism, we propose the exchange of the main heterocycle for the quinoline nucleus with different substitution patterns in position *two* of the central heterocycle. The synthesis of the compounds was based on obtaining the key intermediates tert-butyl((methylthio)(quinoline-4-carboxamido) methylene) carbamates (**58a-d**) for subsequent condensation with the amines of interest (**A-D**) and subsequent reaction in an acidic medium to remove the protecting group (N-Boc). 20 original compounds were synthesized, including protected (**59-62-A-D**) and free acylguanidines (**63-66-A-D**), characterized by ^1H NMR and DEPTQ. The free phenyl-quinoline acylguanidines (**64A-D**) were identified as selective inhibitors of the BuChE enzyme (IC_{50} between 7 and 12 μM). The two acylguanidines with the lowest IC_{50} values for BuChE inhibition (**64C-D**) were evaluated for their antioxidant profile in the DPPH model, but showed no activity at tested concentration (110 μM). Molecular docking studies made it possible to understand the possible modes of interaction of active compounds with BuChE and in silico prediction of ADME and druglike properties suggests that the new quinolinic acylguanidines have a good pharmacokinetic profile.

Key words: Alzheimer's disease; quinolines; acylguanidines butyrylcholinesterase inhibitors.

LISTA DE FIGURAS E GRÁFICOS

FIGURAS

Figura 1 -	Processo de neurodegeneração progressiva que ocorre no cérebro de pessoas com DA-----	2
Figura 2 -	Ciclo da acetilcolina -----	3
Figura 3 -	O sítio ativo de acetilcolinesterase humana (hAChE) e butirilcolinesterase humana (hBChE) -----	5
Figura 4 -	Esquema dos mecanismos de processamento da proteína precursora do amiloide (APP): via não amiloidogênica e via amiloidogênica-----	7
Figura 5 -	Mecanismo de surgimento da Doença de Alzheimer a partir da clivagem da APP -----	8
Figura 6 -	Representação esquemática da atividade da tau em (a) condições fisiológicas que levam à estabilização da regulação dos microtúbulos e (b) situações patológicas que levam à <u>hiperfosforilação</u> e subsequente formação de emaranhados neurofibrilares. -----	9
Figura 7 -	Aducanumabe (6) com peptídeo A β mostrado em magenta-----	14
Figura 8 -	Fármacos comercializados que possuem o núcleo quinolínico---	15
Figura 9 -	Derivados quinolínicos com diferentes atividades farmacológicas-----	16
Figura 10 -	Derivados quinolínicos com atividade inibitória sobre AChE e/ou BuChE-----	17
Figura 11 -	Estrutura do grupo guanidina (31A-B) -----	17
Figura 12 -	Compostos contendo a subunidade guanidina-----	18

Figura 13 -	Acilguanidinas inibidoras de BACE-1-----	19
Figura 14 -	Visualização das interações intermoleculares entre os derivados acilguanidínicos 40 (A), 41 (B), e 42 (C) por cristalografia de raios-X com a BACE-1-----	19
Figura 15 -	Acilguanidinas inibidoras de Colinesterases-----	20
Figura 16 -	Interações entre guanidinas e o sítio ativo das colinesterases-----	21
Figura 17 -	Espectro de RMN ¹ H do ácido carboxílico 2-fenilquinolínico (57b) -----	38
Figura 18 -	Espectro de DEPTQ do ácido carboxílico 2-fenilquinolínico (57b) -----	38
Figura 19 -	Principais sinais observados nos espectros de RMN ¹ H dos ácidos carboxílicos (57a-d) quinolínicos sintetizados -----	39
Figura 20 -	<i>Espectro</i> de RMN ¹ H do intermediário chave 58a -----	41
Figura 21 -	<i>Espectro</i> de RMN ¹³ C (DEPTQ) do intermediário-chave 58 ^a ----	42
Figura 22 -	Espectro de RMN ¹ H da acilguanidina protegida 60A -----	43
Figura 23 -	Espectro de DEPTQ da acilguanidina protegida 60 ^a -----	43
Figura 24 -	Espectro de RMN ¹ H da acilguanidina desprotegida 64 ^a -----	47
Figura 25 -	Espectro de DEPTQ da acilguanidina desprotegida 64 ^a -----	48
Figura 26 -	Radar de biodisponibilidade das acilguanidinas 64D (A), 64A (B), 64B (C) e 64C (D) -----	53
Figura 27 -	A- Modelo BOILED-Egg para as acilguanidinas 64D (molécula 1), 64A (molécula 2), 64B (molécula 3) e 64C (molécula 4). B-	54

Modelo BOILED-Egg para as acilguanidinas 63D (molécula 1), 63C (molécula 2), 66D (molécula 3) e 66C (molécula 4). Área branca: absorção gastrointestinal; Área amarela: absorção gastrointestinal e penetração na barreira hemato-encefálica -----

Figura 28 - Imagem de *docking* mostrando uma acilguanidinas desprotegida (64) interagindo dentro da cavidade do sítio ativo da BuChe----- **55**

Figura 29 - *Docking* dos compostos 17d(A), 17a (B), 17b (C) e 17c (D) ---- **56**

GRÁFICOS

Gráfico 1 - Representação estatística da prevalência e previsão de demência em todo o mundo de 2017 a 2050 ----- **1**

LISTA DE TABELAS E ESQUEMAS

TABELAS

Tabela 1 -	Fármacos utilizados para o tratamento da DA-----	12

Tabela 2 -	Acilguanidinas protegidas, rendimentos reacionais e características físicas -----	45
Tabela 3 -	Acilguanidinas desprotegidas sintetizadas (63-66A-D), rendimentos reacionais e características físicas -----	48/49
Tabela 4 -	Atividade anticolinesterásica dos derivados acilguanidínicos desprotegida (63-66A-D). (Triagem in vitro realizada na concentração de 30µM) -----	51/52
Tabela 5 -	Propriedades farmacocinéticas das acilguanidinas quinolínicas sintetizadas -----	54

ESQUEMAS

Esquema 1 -	Reação de metilação da tioureia com iodeto de metila, por uma reação SN ₂ , para formação do sal 2-metil-isotiourônio -----	24

Esquema 2 -	Reação de monoproteção da amina, formando o <i>N-Boc-S</i> -metilisotioureia -----	24
Esquema 3 -	Reação de obtenção dos ácidos carboxílicos quinolínicos -----	25

Esquema 4 -	Reação de obtenção dos intermediários chave -----	26

Esquema 5 -	Reação de formação das acilguanidinas protegidas (59-62) ----	28

Esquema 6 -	Procedimento geral para desproteção das acilguanidinas desprotegida -----	30
Esquema 7 -	Relações estruturais entre os protótipos acilguanidínicos bromopirrólicos (67A) e indólicos (67B) e, os novos derivados	34

	quinolínicos planejados (63-66-A-D) -----	

Esquema 8 -	Proposta de rota sintética para obtenção dos compostos planejados. (Reagentes e condições a- CH ₃ I, MeOH, refluxo; b- Anidrido <i>BOC</i> , Et ₃ N, DCM, t.a; c- Acetona ou acetofenonas, KOH, EtOH/H ₂ O, 90°C; d- 1-SOCl ₂ , DMF, DCM, t.a/ 2-agente guanilante, Et ₃ N, DCM, t.a; e- amina, DCM, Et ₃ N, DIPEA, t.a; f-TFA/DCM, t.a.)-----	35
Esquema 9 -	(A)Obtenção do agente guanilante (54) e (B) proposta de formação de intermediários nesta etapa sintética.	36
Esquema 10 -	Síntese dos ácidos carbólicos quinolínicos (57a-d) -----	37

Esquema 11 -	Síntese dos intermediários-chave isometiltiouréias (58a-d) -----	40

Esquema 12 -	Esquema de intermediários proposto para a formação dos cloretos de ácido (H) e intermediários-chave (58a-d) -----	40
Esquema 13 -	Obtenção das acilguanidinas (59-62A-D) -----	43

Esquema 14 -	Síntese das acilguanidinas quinolínicas finais (63-66A-D) -----	46

Esquema 15 -	Esquema de intermediários proposto para a desproteção em meio ácido das acilguanidinas desprotegida (63-66A-D) -----	46

Esquema 16 -	Reações envolvidas no ensaio de Ellman -----	50

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

A β	Beta amiloide
ACTI	Iodeto de acetiltiocolina
ACh	Acetilcolina
AChE	Acetilcolinesterase
AChT	Colina acetiltransferase
ADME	Absorção, Distribuição, Metabolismo e Excreção
APS	Local da Bolsa Acila
APP	Proteína precursora de amiloide
ARIA	Anormalidades de imagem relacionadas a amiloide
ARIA-E	Anormalidades de imagem relacionadas a amiloide - edema
ARIA-H	Anormalidades de imagem relacionadas a amiloide - hemorragia
BACE-1	β -secretase
BCTI	Iodeto de butirilcolina
Boc	Ter-butilcarbonato
Boc ₂ O	Di-terc-butil-dicarbonato
BSA	Albumina sérica bovina
BuChE	Butirilcolinesterase
CCF	Cromatografia em Camada Fina
CAS	Sítio Aniônico Catalítico
CDCl ₃	Clorofórmio deuterado
CH ₂ Cl ₂	Diclorometano
CH ₃ I	Iodeto de metila
ChAT	Colina acetiltransferase
CI50	Concentração inibitória 50%
°C	Graus Celsius
DCM	Diclorometano
DEPTQ	Distorção de polarização aprimorada por transferência de quadripolo
DIPEA	N, N-Diisopropiletilamina
DNA-TopoII α	DNA-topoisomerase II alfa
DMF	Dimetilformamida
Docking	Acoplamento molecular
DTNB	Ácido 5,5'-ditiobis(2-nitrobenzóico)
E	Reagente de Vilsmeier
EeAChE	Acetilcolinesterase de enguia elétrica
EqBChE	Butirilcolinesterase isolada de soro equino
ES	Sítio Esterático
Et ₃ N	Trietilamina
EtOH	Etanol
g	Grama
Gold	Programa de ancoragem molecular
H	Hidrogênio
HCl	Ácido Clorídrico
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
KOH	Hidróxido de Potássio
MD	Dinâmica molecular
MeOH	Metanol

MHz	Megahertz
mM	Milimolar
mmol	Milimol
mL	Mililitro
mols	Moles
MTs	Microtubulos
μ M	Micromolar
Na ₂ SO ₄	Sulfato de sódio anidro
N-Boc	N-ter-butilcarbonato
NFTs	Emaranhados neurofibrilares intraneurais
nm	Nanômetros
one-pot	Expressão usada para descrever uma reação onde várias etapas ocorrem em um único recipiente ou reator, sem necessidade de isolamento intermediário dos produtos parciais.
PDB	Banco de Dados de Proteínas
PF	Ponto de Fusão
PM6	Método semi-empírico
PPM	Partes por milhão
Pymol	Software de visualização molecular
RMSD	Desvio Quadrático Médio da Raiz
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
RMN1H	Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio-1
RMN13C	Ressonância Magnética Nuclear de Carbono-13
SN2	Substituição Nucleofílica Bimolecular
SOCl ₂	Cloreto de tionila
TFA	Ácido Trifluoroacético
TLC	Cromatografia em Camada Delgada
TMS	Tetrametilsilano
λ	Comprimento de onda

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
1.1. A doença de Alzheimer	1
1.1.1. Hipótese colinérgica	3
1.1.2. Hipótese Beta amiloide.	6
1.1.3. A formação de emaranhados neurofibrilares intraneuronais (NFTS).	8
1.1.4. Hipótese dos metais.	10
1.1.5. Estresse Oxidativo.	10
1.1.6. Neuroinflamação.	11
1.1.7. Tratamentos para a doença de Alzheimer	11
1.2. O núcleo quinolíno na química medicinal.	14
1.3. Guanidinas e suas propriedades farmacológicas	17
2. OBJETIVOS	23
2.1. Objetivos Específicos	23
3. METODOLOGIA	23
3.1. Procedimentos sintéticos	23
3.1.1. Síntese do sal 2-metil-isotiorônio (53)	24
3.1.2. Reação de proteção da isometiltioureia	24
3.1.3. Procedimento geral de obtenção dos ácidos carboxílicos quinolínicos (57a-d)	25
3.1.4. Procedimento geral de obtenção dos intermediários chave (58a-d)	26
3.1.5. Metodologia geral de obtenção das acilguanidinas quinolínicas protegidas	28
3.1.6. Procedimento geral para obtenção das acilguanidinas desprotegidas.	31
3.2. Avaliação Farmacológica <i>in vitro</i>	33
4. RESULTADOS E DISCUSSÕES	34
4.1. Síntese do Agente Guanilante	36
4.2. Síntese dos Intermediários Chave Quinolínicos	37
4.4. Síntese das acilguanidinas desprotegidas.	46
4.5. Ensaios <i>In Vitro</i>	50
4.6. Estudo <i>in silico</i> das propriedades ADME dos novos derivados.	53
4.7. Estudo de interação enzimática <i>in silico</i> dos análogos acilguanidínicos.	58
5. CONCLUSÕES	61
6. REFERÊNCIAS.	62
7. ANEXO	67

1. INTRODUÇÃO

1.1. A doença de Alzheimer

A demência é caracterizada por um declínio na memória e no pensamento que afeta pelo menos dois domínios cognitivos. A doença de Alzheimer (DA) é a causa mais comum de demência, sendo classificada como doença de Alzheimer de início tardio (DAIT) após os 65 anos e início precoce (DAIP) antes dos 65 anos, embora menos comum. Cerca de 1-2% dos casos de DA são herdados de forma autossômica dominante, apresentando início precoce e progressão mais rápida. (JUSTIN M. LONG, 2020).

A demência devido à DA resulta em incapacidade progressiva ao longo do tempo, que afeta 50 milhões de indivíduos no mundo e em 2050 esse número irá triplicar, de acordo com o relatório da Alzheimer's Disease International (Gráfico 1). E de acordo com a Organização mundial da saúde o gasto investido, incluindo tratamentos médicos e não médicos, é cerca de 1.300 milhões de dólares. (TYLISZCZAK et al., 2023). No Brasil, de acordo com os dados do IBGE 2023, cerca de 1 milhão de indivíduos convivem com a doença.

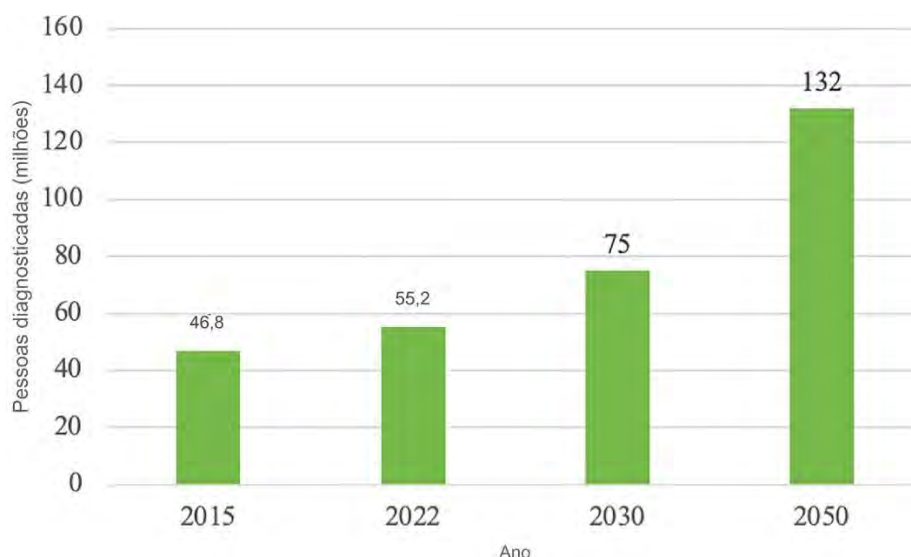


Gráfico 1- Representação estatística da prevalência e previsão de demência em todo o mundo de 2015 a 2050. O eixo y representa o número de pacientes diagnosticados com demência em milhões de pessoas. O eixo x representa quatro anos separados de censo; os anos de 2015 e 2022 registraram dados, enquanto os anos de 2030 e 2050 são previsões baseadas em informações da OMS. Prevê-se que a incidência da demência aumente quase três vezes até 2050 em comparação com 2015, como resultado do envelhecimento cada vez maior da população.(MOORE et al., 2023)

A deterioração da função colinérgica é uma das principais alterações observadas em pacientes com DA e acredita-se que a formação de placas de amiloide β ($A\beta$) e emaranhados neurofibrilares estejam relacionados ao comprometimento cognitivo característico da doença. Estudos *post-mortem* em pacientes com Alzheimer revelaram uma redução significativa, de até 70-80%, nos neurônios colinérgicos do prosencéfalo basal, juntamente com uma diminuição de 50-85% na atividade da enzima colina acetiltransferase (ChAT) no córtex cerebral e no hipocampo (Figura 1). (LIU et al., 2022)

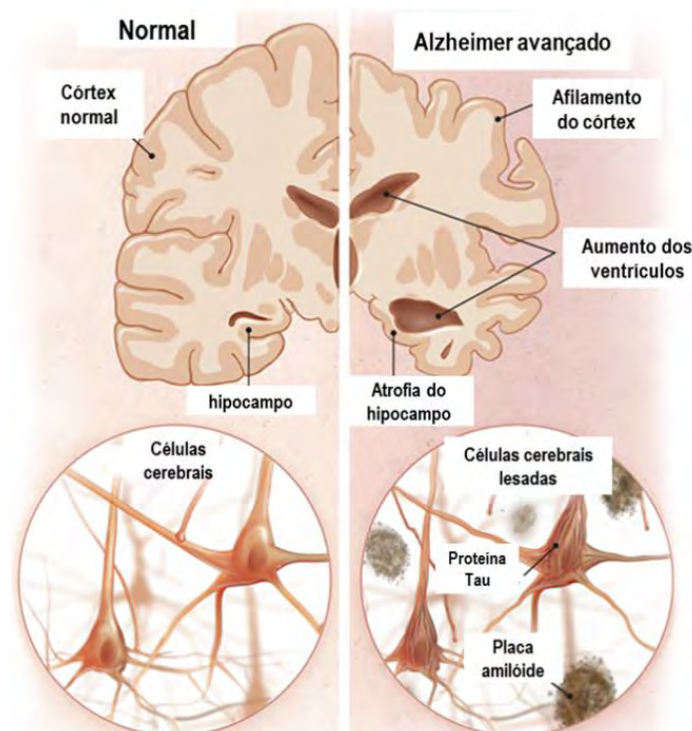


Figura 1- Processo de neurodegeneração progressiva que ocorre no cérebro de pessoas com DA. (Fonte: JIN J., 2015)

Além das hipóteses conhecidas e já descritas, existem também outros fatores exógenos e endógenos também conhecidos que podem levar ao desenvolvimento da doença, como idade, sexo e predisposição genética. Adicionalmente, o ambiente e o estilo de vida também têm influência significativa no avanço da DA. Entre os fatores ambientais, a exposição a alguns tipos de metais, como alumínio, mercúrio, chumbo, zinco e cádmio, é apontada como um fator de risco relevante para a DA. Isso se deve ao papel desses metais no acúmulo de proteínas, na indução de vias apoptóticas, na regulação do cálcio e na disfunção mitocondrial no cérebro. Além disso, condições de saúde e hábitos de vida, como

obesidade, diabetes, níveis elevados de colesterol, hipertensão e consumo de álcool, podem aumentar a propensão ao desenvolvimento da DA. (NADY et al., 2023)

1.1.1. Hipótese colinérgica

As colinesterases, acetilcolinesterase (AChE) e butirilcolinesterase (BuChE), são enzimas relacionadas, com mais de 54% de similaridade na sequência de aminoácidos e que se diferenciam pela especificidade pelo substrato ou ligantes. A AChE é responsável pela hidrólise da acetilcolina (ACh) (1) liberada na fenda sináptica e na junção neuromuscular em resposta ao potencial de ação do nervo. Ambas as colinesterases estão envolvidas em papéis independentes de suas funções catalíticas, como desenvolvimento e diferenciação celular (Figura 2). (NICOLET et al., 2003)

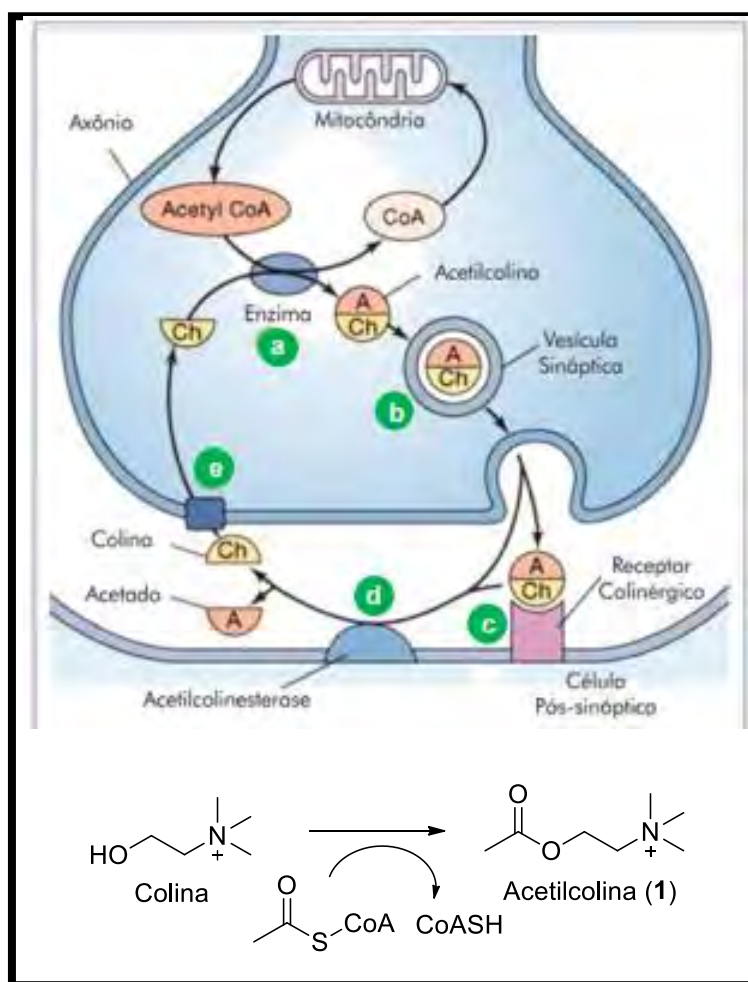


Figura 2- Ciclo da acetilcolina (SILVERTHORN, 2017)

A BuChE e AChE são as enzimas colinesterásicas encontradas no sistema nervoso e juntas catalisam a hidrólise da acetilcolina (ACh) (1), diminuindo os níveis do neurotransmissor e finalizando a comunicação entre as células nervosas. A diminuição nos níveis de ACh está relacionado com a diminuição da função cerebral e consequentemente a perda de habilidades intelectuais. O papel fisiológico do BuChE ainda não está elucidado, embora seja capaz de hidrolizar ACh (1) e outras acilcolinas, até agora nenhum substrato natural endógeno foi descrito para esta enzima. Como a BuChE é relativamente abundante no plasma (cerca de 3mg/litro), e é capaz de metabolizar grande número de compostos contendo éster, ela desempenha importantes funções farmacológicas e toxicológicas, como no metabolismo de xenobióticos. (MASSON et al., 2009)(GREIG et al., 2005)

A acetilcolinesterase (AChE), uma enzima do tipo serina hidrolase, desempenha um papel crucial na regulação da transmissão do sinal colinérgico no organismo. Sua função principal consiste em quebrar a acetilcolina, um neurotransmissor, em dois compostos inativos: colina e ácido acético. (TUZIMSKI T et al., 2022). Sua estrutura tridimensional revela vários sítios importantes para sua função catalítica. O sítio esterático (ES) contém a tríade serina-histidina-glutamato, responsável pela reação de hidrólise. O sítio aniônico periférico (PAS) auxilia na orientação dos substratos em direção ao sítio catalítico, enquanto o sítio aniônico catalítico (CAS) interage com o motivo catiônico dos substratos. A bolsa de oxiânion (OAS) estabiliza o estado de transição tetraédrico durante a hidrólise da ACh (1), e o local da bolsa acila (APS) diferencia AChE de BChE, determinando o tamanho do substrato a ser hidrolisado (Figura 3) (CAVALCANTE et al., 2020)

Logo, embora as enzimas AChE e BuChE sejam semelhantes, em ambas os aminoácidos (Ser, His, Glu) que compõem a tríade catalítica são conservados, as diferenças espaciais principalmente relacionadas à presença de resíduos aromáticos no sítio ativo da AChE (Tyr72, Tyr124, Tyr337, Phe295, Phe297) e resíduos alifáticos na BuChE (Asn72, Gln124, Ala337, Leu286, Val288), permitem que a BuChE acomode substratos mais volumosos (Figura 3).

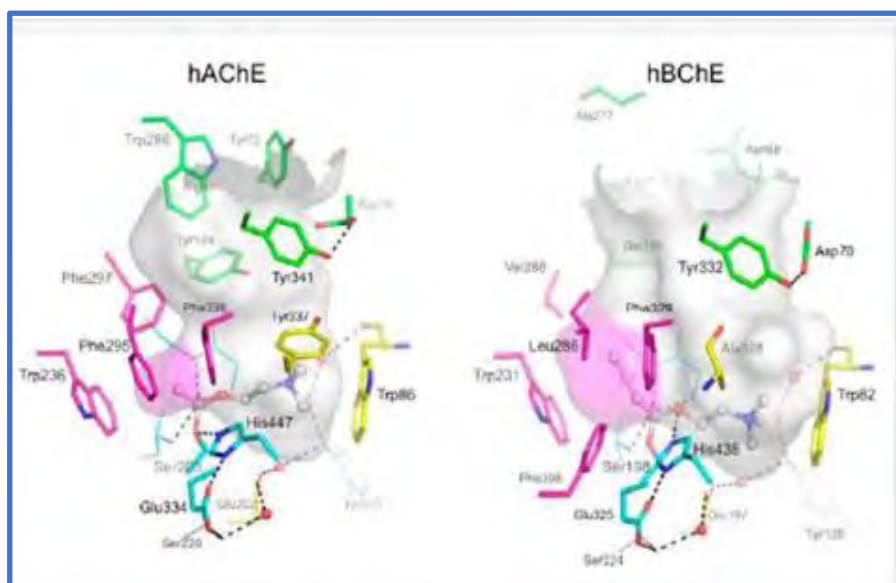


Figura 3- O sítio ativo de acetilcolinesterase humana (hAChE) e butirilcolinesterase humana (hBChE). Os resíduos estão representados: no PAS (em verde); na tríade catalítica (azul); no sítio de ligação de acila (em rosa); no sítio de ligação de colina (em amarelo) (MASSOULIÉ et al., 1993)

A AChE também interage com proteínas β -amilóides ($A\beta$ 1–42), relacionadas ao desenvolvimento da doença de Alzheimer (DA). A ligação da $A\beta$ à AChE promove a formação de placas senis, aumentando o metabolismo de $A\beta$ e contribuindo para a patologia da DA. (ARYA et al., 2021)

A butirilcolinesterase (BuChE), também conhecida como colinesterase plasmática, é uma serina hidrolase amplamente distribuída no corpo humano, com níveis mais altos no plasma e no fígado. Sua regulação e papel biológico, especialmente no sistema nervoso central, ainda são pouco compreendidos. Atua como uma defesa contra compostos tóxicos, protegendo a acetilcolinesterase nas sinapses. No cérebro, é expressa principalmente em células gliais, como astrócitos, e também está envolvida na neurotransmissão colinérgica. Entretanto, ela também se encontra em neurônios específicos, localizados principalmente na amígdala, hipocampo e tálamo. Sua presença em regiões específicas do cérebro sugere um papel na regulação do estado funcional das células, enquanto sua associação com placas amiloides e emaranhados neurofibrilares a relaciona à patogênese da doença de Alzheimer. (JASIECKI J. et al., 2021)

A butirilcolinesterase (BuChE) é uma enzima crucial na degradação da butirilcolina. Enquanto a acetilcolinesterase (AChE) predomina no cérebro saudável, a BuChE desempenha um papel secundário na regulação dos níveis de acetilcolina. No entanto, em condições como a doença de Alzheimer (DA), onde ocorre um declínio da

AChE, a BuChE pode compensar essa deficiência, mantendo as vias colinérgicas normais. (TUZIMSKI T. et al., 2022)

Em pacientes com DA, observa-se não apenas uma diminuição nos níveis de AChE, mas também um aumento significativo na expressão e atividade da BuChE (30 e 60%), como uma forma de compensação ao declínio da AChE. Então, embora a BuChE tenha menor afinidade pela acetilcolina se comparado a AChE, sua atividade parece ser crucial para o processo quando há presença de altos níveis de Ach. Desta forma a BuChE tem demonstrado ter um papel importante na hidrólise da acetilcolina em estágios mais avançados da DA, fazendo com que os inibidores seletivos desta enzima possam ser potenciais candidatos para o tratamento da DA. (GREIG et al., 2005)

1.1.2. Hipótese Beta amiloide.

A hipótese amiloide tem sido apontada como a causa principal da DA, pois acredita-se que este é o primeiro evento patológico que causa a morte neuronal. Ela consiste no depósito de certas formas anormais de uma substância chamada beta amiloide (β A), isto acontece porque ocorre um aumento na produção ou uma diminuição na eliminação dessas formas anormais. Quando esses peptídeos $A\beta$ se acumulam, eles se agrupam e formam placas $A\beta$. Essas placas ativam uma resposta anti-inflamatória, causando danos oxidativos nos neurônios e interrompendo as atividades normais de algumas proteínas, como a quinase e a fosfatase. Isso leva à fosforilação excessiva da proteína tau, que é responsável pela formação de emaranhados de fibras no cérebro. (TARAZI et al., 2017)(MAIA et al., 2019)

A substância β A é gerada a partir da proteína precursora de amiloide (PPA) por meio de uma clivagem em duas etapas. Primeiramente, a enzima β -secretase (BACE-1) cliva a PPA, produzindo um fragmento solúvel $sPPA\beta$ e o fragmento C99 de 99 aminoácidos. Em seguida, o C99 é processado pela γ -secretase, resultando na produção de peptídeos de diferentes comprimentos, com destaque para os peptídeos β A40 e β A42, sendo o último mais propenso à agregação e à formação de placas neuríticas. Assim, a maneira como as enzimas clivam a PPA influencia a quantidade total de beta amiloide (β A) produzida, o que é crucial para a compreensão e o desenvolvimento de tratamentos para a doença de Alzheimer. (MAIA et al., 2019)

Dentro da perspectiva da cascata amiloide, é proposto que o processamento do precursor da proteína amiloide (APP) ocorre por duas vias distintas: uma via não amiloide e outra amiloide (Figura 4). Na via não amiloide, a enzima α -secretase cliva o APP no

aminoácido 83 do seu extremo C-terminal, liberando o fragmento sAPP α para o meio extracelular e retendo o fragmento C-terminal de 83 aminoácidos (C83) na membrana. Posteriormente, o C83 é clivado pela enzima γ -secretase, gerando o peptídeo solúvel p3. Por outro lado, na via amiloide, o primeiro corte proteolítico é mediado pela enzima β -secretase, ocorrendo no aminoácido 99 do extremo C-terminal do APP. Isso resulta na liberação do fragmento sAPP β e na retenção do fragmento C99 na membrana. O C99 é então processado pela γ -secretase, produzindo peptídeos A β com comprimentos variáveis entre 37 e 49 aminoácidos, sendo o A β 40 o fragmento mais comum. Esses peptídeos A β têm a capacidade de se agregar em estruturas oligoméricas, levando à formação de placas senis. (RIUS-PÉREZ et al., 2018)

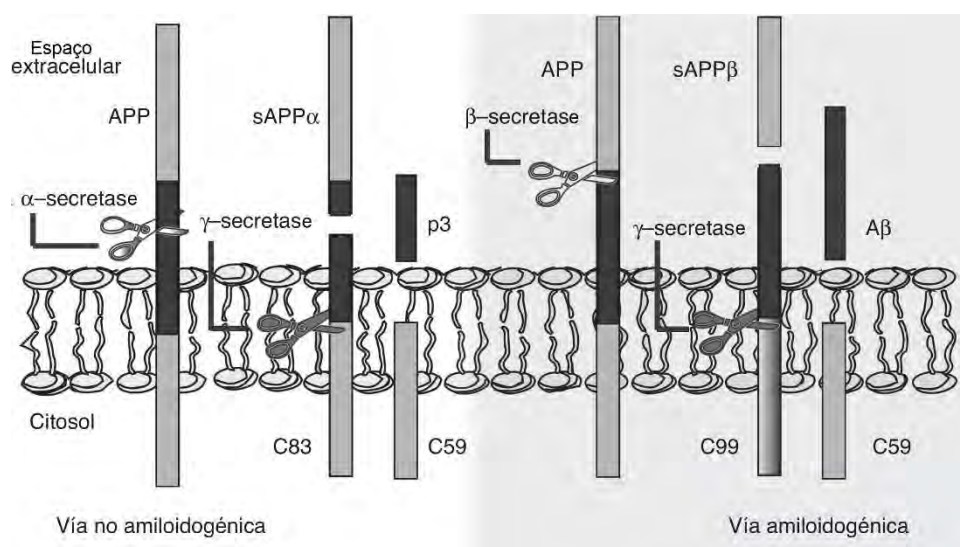


Figura 4- Esquema dos mecanismos de processamento da proteína precursora do amiloide (APP): via não amiloidogênica e via amiloidogênica. Esta última permite a geração do péptido β -amiloide (A β) e a formação de placas senis. (Adaptado de (RIUS-PÉREZ et al., 2018))

Diversas pesquisas têm fornecido evidências sobre o envolvimento da acetilcolinesterase (AChE) em um ciclo degenerativo que desempenha um papel importante na aceleração do desenvolvimento da Doença de Alzheimer (DA). Nesse ciclo, a AChE desempenha uma possível influência no processamento da proteína precursora de amiloide (PPA) e na produção de beta-amiloide (β A), por meio da regulação dos níveis da subunidade catalítica da enzima gama-secretase, conhecida como presenilina 1 (PS1). A interação entre a AChE e a PS1 pode levar a alterações na atividade da gama-secretase, afetando a clivagem da PPA e resultando em uma produção aumentada de β A, que é conhecida por formar as placas amiloides características da DA. Desta forma, uma estratégia estrutural onde se associa inibidores de BACE e de colinesterases podem

melhorar o déficit cognitivo elevando os níveis de Ach e impedir a formação de placas amiloides (Figura 5). (FERREIRA et al., 2021)

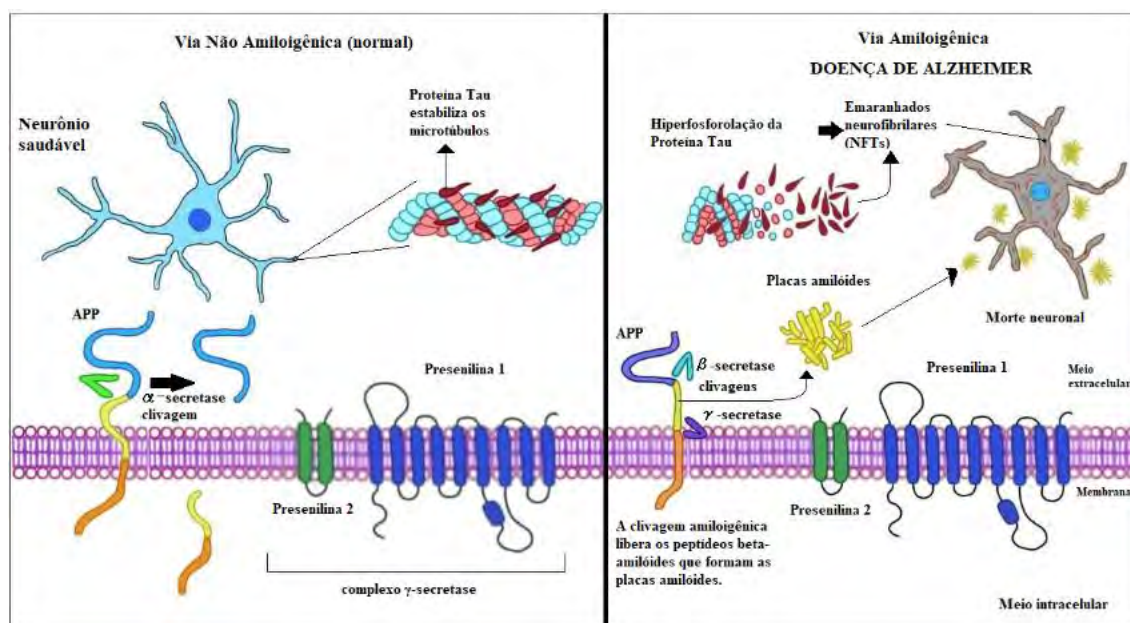


Figura 5- Mecanismo de surgimento da Doença de Alzheimer a partir da clivagem da APP.(RIBEIRO et al., 2021)

1.1.3. A formação de emaranhados neurofibrilares intraneuronais (NFTS).

A tau desempenha um papel vital na regulação e estabilização dos microtúbulos (MTs) do citoesqueleto e mitóticos, graças à sua interação direta com os dímeros de tubulina. Esta proteína, caracterizada por sua natureza intrinsecamente desordenada, é essencial para o desenvolvimento do axônio e para manter a integridade do citoesqueleto axonal, bem como o tráfego neuronal. Durante o processo que antecede a formação dos emaranhados, a tau sofre uma série de modificações pós-traducionais, como hiperfosforilação, acetilação, N-glicosilação e truncamento. Essas modificações distinguem a tau normal, encontrada em cérebros saudáveis, da tau envolvida em condições patológicas (Figura 6). (BITRA et al., 2023)

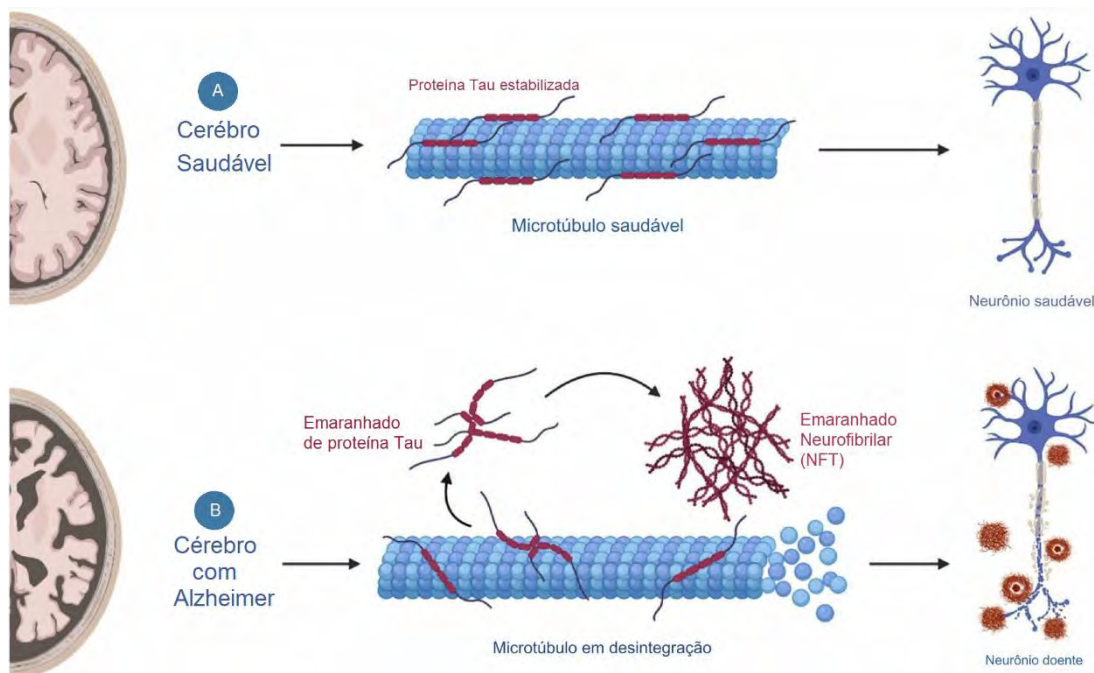


Figura 6- Representação esquemática da atividade da tau em (a) condições fisiológicas que levam à estabilização da regulação dos microtúbulos e (b) situações patológicas que levam à hiperfosforilação e subsequente formação de emaranhados neurofibrilares. (Adaptado de (BITRA et al., 2023))

A formação de emaranhados neurofibrilares intraneuronais (NFTs) é uma das características-chave na DA. Os NFTs são compostos por agregados anormais e altamente fosforilados da proteína tau, que se torna mal dobrada. Essas proteínas tau fosforiladas se desprendem dos microtúbulos e migram dos axônios para os compartimentos somatodendríticos, onde se organizam em protofibrilas e, em seguida, formam os NFTs. Além dos NFTs, também ocorre o acúmulo de proteínas tau na forma de placas neuríticas (NPs), que são constituídas por agregados de células gliais alteradas e processos celulares inchados de células nervosas. Essas NPs contêm massas de proteína tau anormal e estão associadas a depósitos de beta-amiloide ($A\beta$) no espaço extracelular adjacente. (SAROJA et al., 2022a)

Pacientes com doença de Alzheimer (DA) possuem quatro vezes mais proteínas tau anormais ou excessivamente fosforiladas, comprometendo a estabilidade dos microtúbulos e levando a aglomeração dessas proteínas. Isso prejudica a interação tau-microtúbulos, causando problemas na plasticidade sináptica e transporte inadequado de substâncias essenciais. Essas perturbações resultam em deficiências cognitivas associadas à DA. A

fosforilação anormal da tau ativa a catanina, agravando a montagem dos microtúbulos e contribuindo para o avanço da DA.(GHOLAMI A., 2023)

1.1.4. Hipótese dos metais.

Os íons metálicos, como ferro, cobre e zinco, desempenham papéis importantes na manutenção das funções cerebrais. Fisiologicamente, vestígios de metais mantêm a homeostase do microambiente de íons metálicos nos neurônios, enquanto a deposição ou distribuição errônea de íons metálicos em várias áreas do cérebro pode prejudicar essa homeostase, levando à ocorrência de doenças neurodegenerativas. A não homeostase de Fe^{2+} , Cu^{2+} e Zn^{2+} está intimamente relacionada à incidência de DA.(CHEN et al., 2023)

Os íons metálicos desencadeiam a formação de Espécies Reativas de Oxigênio (ERO) por meio de transições para estados oxidativos, resultando na ativação da disfunção mitocondrial e no acúmulo de ERO. Além disso, esses metais promovem a agregação de $\text{A}\beta$ ao se ligarem diretamente às proteínas $\text{A}\beta$. A $\text{A}\beta$ também pode passar por transformações oligoméricas, formando protofibrilas e fibrilas, o que ativa as mitocôndrias e contribui para uma maior produção de EROs. Em última análise, essas EROs causam danos a proteínas e biomoléculas no cérebro, aumentando assim o risco de desenvolvimento da Doença de Alzheimer (DA). (FASAE et al., 2021)

1.1.5. Estresse Oxidativo.

O estresse oxidativo ocorre quando há um desequilíbrio entre a capacidade do organismo em eliminar espécies reativas de oxigênio (ROS) por meio de antioxidantes e a capacidade de neutralizá-las. Naturalmente, o corpo gera ROS como parte de processos metabólicos regulares, mas fatores ambientais como radiação UV, poluição e estresse podem aumentar esses níveis. Níveis elevados de ROS têm o potencial de causar danos aos lipídios, proteínas e DNA das células, resultando em disfunção celular e eventual morte. (RAJ ARAN, 2023).A persistência do estresse oxidativo prolongado pode desencadear uma resposta inflamatória crônica, levando a maiores danos celulares.(ALQAHTANI et al., 2023)

Os antioxidantes desempenham um papel essencial na doença de Alzheimer, reagindo e neutralizando os radicais desprotegidos. Ao reduzirem a inflamação, alterarem as vias de sinalização e protegerem contra o estresse oxidativo, esses compostos mantêm o equilíbrio oxidativo intracelular. Mesmo em doses reduzidas, os antioxidantes conseguem

efetivamente diminuir a taxa de estresse oxidativo. São classificados conforme seu mecanismo de ação: primário e secundário. O primeiro elimina os radicais livres e inibe as reações em cadeia que levam ao estresse oxidativo, convertendo hidroperóxidos em formas estáveis. Os antioxidantes secundários contribuem para a renovação antioxidante, neutralizam íons metálicos e reduzem o oxigênio singlete. (KAMALJEET et al., 2024)

1.1.6. Neuroinflamação.

A presença de neuroinflamação é uma característica associada à Doença de Alzheimer (DA), sendo predominantemente mediada pela ativação das células da micróglia e dos astrócitos. Estas células gliais, enquanto componentes do sistema imunológico inato no Sistema Nervoso Central (SNC), desempenham um papel neuroprotetor, liberando citocinas inflamatórias para monitorar o ambiente fisiológico e proteger o SNC contra possíveis ameaças. No entanto, em situações de inflamação crônica, a ativação persistente das células gliais pode resultar em uma produção excessiva de fatores inflamatórios, levando ao comprometimento neuronal. (CHEN et al., 2023)

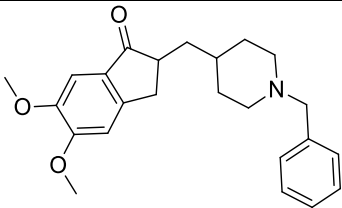
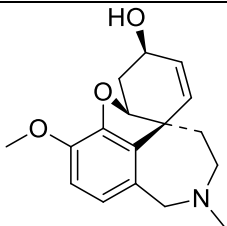
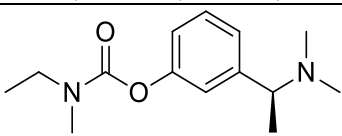
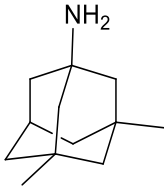
É interessante notar que a deposição de A β e a hiperfosforilação de tau podem diretamente estimular as células gliais a gerar fatores inflamatórios, evidenciando a importância da neuroinflamação na progressão da DA. As placas A β , constituídas por peptídeos mal dobrados, representam agregados extracelulares cuja depuração pela microglia é comprometida na doença de Alzheimer (DA), seja devido ao excesso de A β ou disfunções microgliais. Essa falha contribui para o acúmulo de formas tóxicas de A β , exacerbando a progressão da doença. A interação entre A β e a microglia desencadeia uma ativação caracterizada pela liberação de citocinas pró-inflamatórias, como TNF- α , IL-1 β e IL-6, ampliando o estado neuroinflamatório crônico, comprometendo a barreira hematoencefálica e potencializando o acúmulo de A β e a patologia da tau. Essa rede complexa de interações entre placas de A β , emaranhados de tau e ativação microglial sustenta a progressão da DA. (SAROJA et al., 2022b)

1.1.7. Tratamentos para a doença de Alzheimer

Atualmente, não há uma cura para a doença de Alzheimer (DA). Os tratamentos disponíveis são voltados para o alívio sintomático e não conseguem interromper a progressão da doença ou reverter a perda neuronal. Os medicamentos atualmente utilizados, como inibidores da colinesterase (donepezila (2) (1996), galantamina (3) (2001) e rivastigmina (4) (2000) e o antagonista NMDA (memantina, (5) 2003), oferecem

benefícios sintomáticos, como melhora da memória e capacidade funcional diária. Em 2021, foi aprovada a imunoterapia com aducanumabe (6), que é o único medicamento modificador da doença destinado a tratar a DA, visando a redução do acúmulo de placas de beta-amiloide (A β) (Tabela 1). (AL-GHRAIYBAH et al., 2022)

Tabela 1- Fármacos utilizados para o tratamento da DA (Adaptado de (ROUCHAN et al., 2022))

 <p>Donepezila (2) - Inibidor não competitivo reversível altamente seletivo da AChE. Náuseas, insônia, diarreia, fadiga, vômitos, câibras musculares, tonturas, miastenia, ansiedade, anorexia, rinite.</p>
 <p>Galantamina (3) - Inibidor seletivo, competitivo e reversível da AChE Perda de peso, vômito, náusea, anorexia, diarreia, tontura, tremor e dor abdominal.</p>
 <p>Rivastigmina (4) - Inibidor irreversível pseudo-seletivo de AChE e BChE Anorexia, náusea, tontura, vômito, diarreia, sonolência, dor abdominal, dor de cabeça, mal-estar, sudorese, fadiga, perda de peso.</p>
 <p>Memantina (5) - Atua como um antagonista do receptor NMDA de canal aberto Dor de cabeça, tontura, confusão, sonolência e alucinações infrequentes, diarreia</p>
<p style="text-align: center;">C 6472 H 10028 N 1740 O 2014 S 46 (Anticorpo monoclonal humano)</p> <p>Aducanumabe (6)- Atua contra o agregado Aβ e reduz as placas Aβ no cérebro ARIA, dor de cabeça, alterações na visão, tontura, confusão e náusea, inchaço dos lábios, boca, língua, face e urticária.</p>

Rivastigmina (4), classificada entre os inibidores de carbamato, atua na inibição de AChE e BChE. Por meio de uma ligação covalente, forma complexos com esterases, temporariamente inativando-as. Especificamente, interage com os sítios aniônicos e ésteres da AChE, resultando em um aumento global de ACh. Indicado para demência leve a intermediária associada à DA e DP idiopática, seu uso oral visa o tratamento sintomático. Efeitos adversos podem incluir distúrbios gastrointestinais, perda de peso, agravamento de sintomas extrapiramidais, reações alérgicas cutâneas, perturbações psiquiátricas, arritmias cardíacas e distúrbios vasculares. A eficácia da rivastigmina (4) é dose-dependente, podendo ser administrada por via oral ou através de adesivo transdérmico.(WALCZAK-NOWICKA et al., 2021)

Donepezila (2) é um medicamento da família *N*-benzilpiperidina, aprovado para o tratamento da DA em 1996. Trata-se de um inibidor da acetilcolinesterase (AChE) de ação prolongada, reversível, altamente seletivo e não competitivo, que não apresenta efeitos colaterais significativos e reduz consideravelmente os sintomas da DA. A dose recomendada de Donepezila (2) é de 5 mg por dia, podendo ser aumentada para 10 mg por dia após 4 semanas. A preparação de Donepezila (2) de liberação sustentada de 23 mg por dia é adequada para indivíduos com DA moderada a grave que tenham recebido previamente 10 mg por dia por pelo menos 3 meses. (ROUCHAN et al., 2022)

Galantamina (3), um alcaloide vegetal terciário originado de bulbos da família Amaryllidaceae, é classificado como um inibidor seletivo da AChE. Sua eficácia na inibição enzimática é dose-dependente, com uma seletividade significativa para AChE em relação à BChE. Com um amplo volume de distribuição, é recomendado para casos leves a moderados de doença de Alzheimer. Disponível em três dosagens distintas (8 mg/24 h, 16 mg/24 h e 24 mg/24 h), os efeitos colaterais se assemelham aos de outros inibidores da AChE, não comprometendo sua utilidade clínica. (WALCZAK-NOWICKA et al., 2021)

A memantina (5), derivada estruturalmente da amantadina, atua como um bloqueador não competitivo do receptor *N*-metil-D-aspartato (NMDA) de canal aberto. Sua estrutura química baseada no 1-aminoamadamantano confere semelhança à amantadina. Ao bloquear os receptores NMDA, responsáveis por canais catiônicos dependentes de voltagem, a memantina (5) evita superestimulação e reduz o influxo de cálcio nas células. O cálcio desempenha um papel crucial na patologia da demência, contribuindo para a excitotoxicidade e hiperfosforilação das proteínas tau. Apesar de bem tolerada por via oral,

a memantina pode causar efeitos colaterais como tontura, dor de cabeça, constipação, confusão, infecções urinárias, sonolência e agitação. Estudos randomizados têm demonstrado sua eficácia clínica. (SINGH et al., 2024)

Aducanumabe (6) (Figura 7), um anticorpo monoclonal anti-A β , reduz a formação de placas ao direcionar tanto as formas insolúveis quanto solúveis de A β . Entretanto, estudos clínicos demonstraram que através da depuração de A β ocorre a indução de ARIA (Anormalidades de imagem relacionada a amiloide), ARIA-E, identificada por ressonância magnética como derrame sulcal ou edema cerebral, e também ARIA-H, caracterizada por siderose superficial e microhemorragia. Esses efeitos foram observados em 41% dos pacientes que receberam aducanumabe (6) com uma dose alvo de 10 mg/kg. Desta maneira, apesar de demonstrar um tratamento favorável, ainda se trata de uma terapia que deve ser bem avaliada. (ROUCHAN et al., 2022)

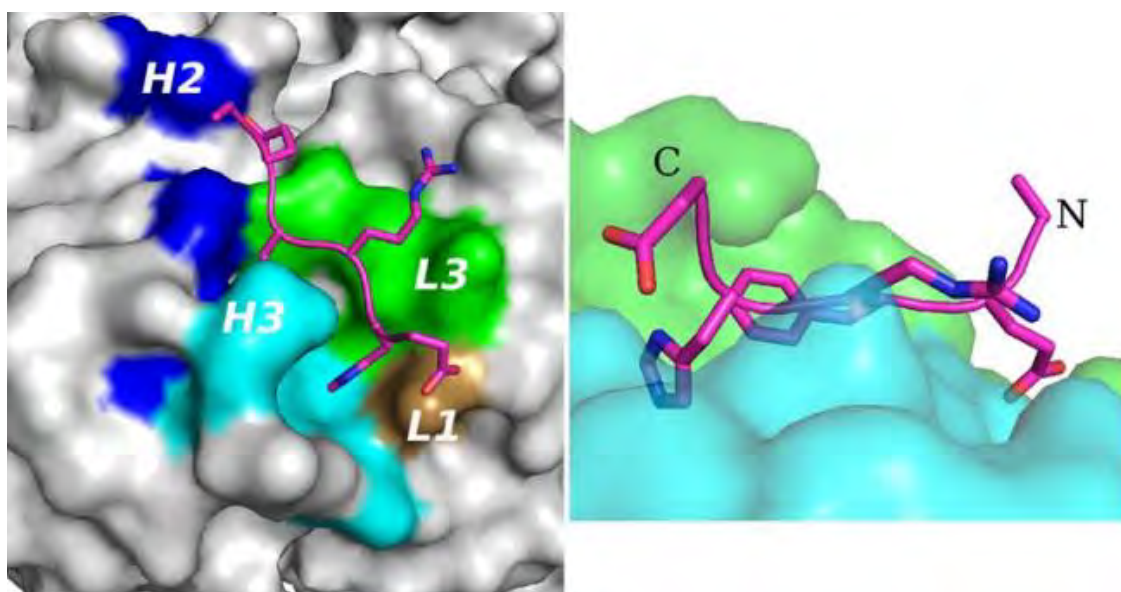


Figura 7- Aducanumabe (6) com peptídeo A β mostrado em magenta (Adaptado de (ARNDT et al., 2018))

1.2. O núcleo quinolínico na química medicinal.

A quinolina (7), também referida como benzopiridina ou 1-aza naftaleno, corresponde a uma fusão dos anéis benzeno e piridina, é uma base nitrogenada terciária amplamente reconhecida com a fórmula química C₉H₇N. É um líquido de odor forte, pouco miscível em água fria, mas completamente miscível em água quente e solúvel em solventes orgânicos. Possui propriedades higroscópicas e pode mudar de cor quando exposta à luz. Apresenta densidade de 1,093 g/mol, ponto de fusão de -15 °C e ponto de ebulição de 238

°C. (Olayinka O. Ajani et al., 2022) É um alcaloide encontrado em fontes naturais como plantas, animais e microorganismos.

Os derivados quinolínicos são muito importantes na química medicinal e fazem parte da estrutura de diversos fármacos disponíveis na terapêutica, como exemplo podemos citar os antimaláricos (cloroquina (8), quinina (9), primaquina (10), mefloquina (11), etc), antifúngicos – antibacterianos (fluoroquinolonas como ciprofloxacino (12)), anticancerígenos (topotecan (13), camptotecina (14) e levatinibe (15)), antiasmáticos (montelucaste (16), entre outros (Figura 8). (SONAWANE et al., 2023)

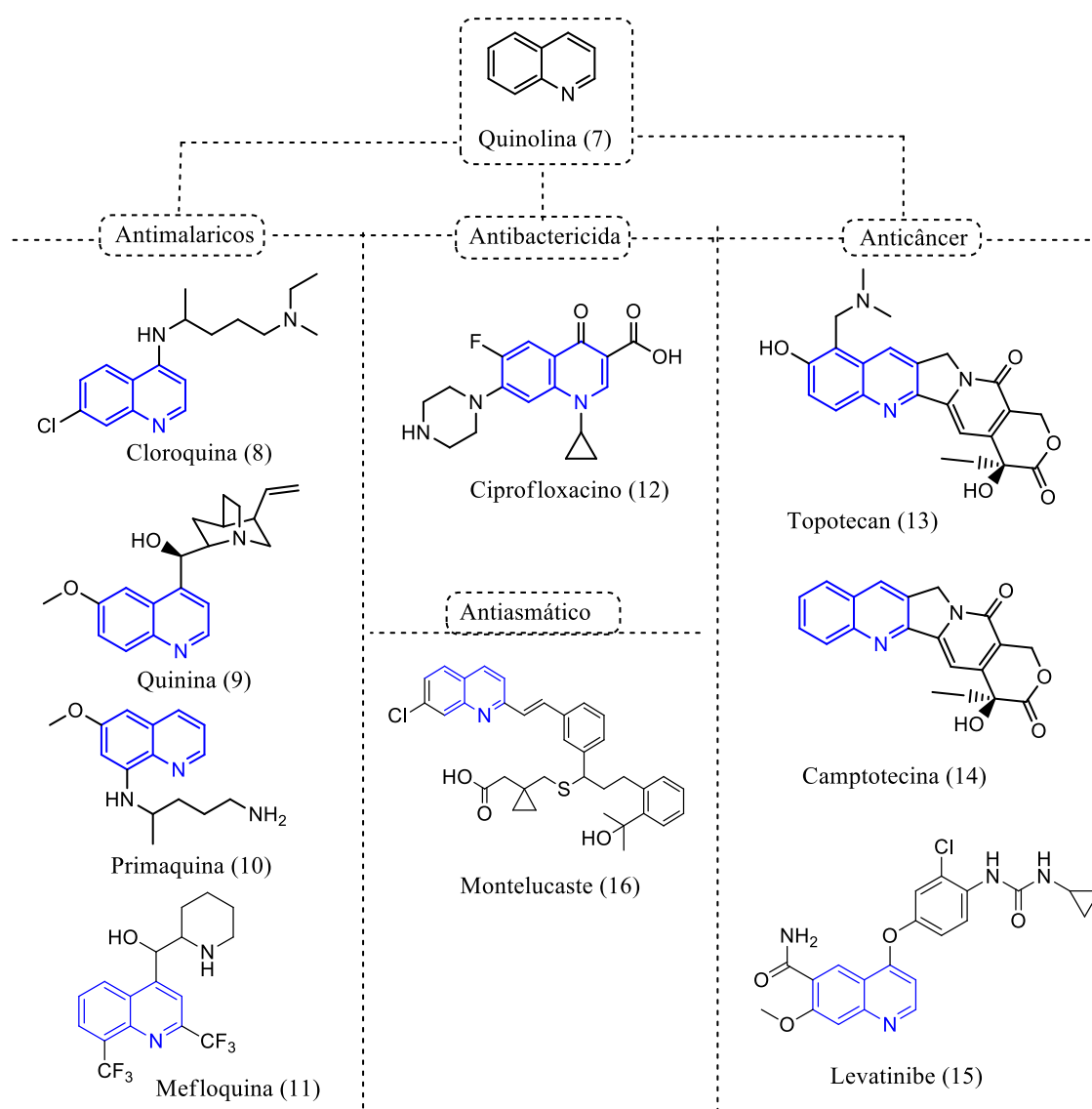


Figura 8- Fármacos comercializados que possuem o núcleo quinolínico. (Adaptado de (OLAYINKA et al., 2022)

Adicionalmente, o núcleo quinolínico pode ser considerado como uma estrutura privilegiada em Química Medicinal, visto que estão presentes em diversas substâncias tanto naturais quanto sintéticas. A versatilidade sintética deste núcleo permite a obtenção de derivados com grande variabilidade estrutural, o que tem levado ao desenvolvimento de compostos bioativos com diversas atividades farmacológicas, os quais são importantes candidatos a protótipos de novos fármacos de diversas classes como antibacterianos (17), antimaláricos (18), anticâncer (19), antituberculose (20), antileishmania (21), antifúngicos (22), anti-inflamatórios (23), analgésicos (24), etc (Figura 9). (MOHASSAB et al., 2024) (LIAO et al., 2018)

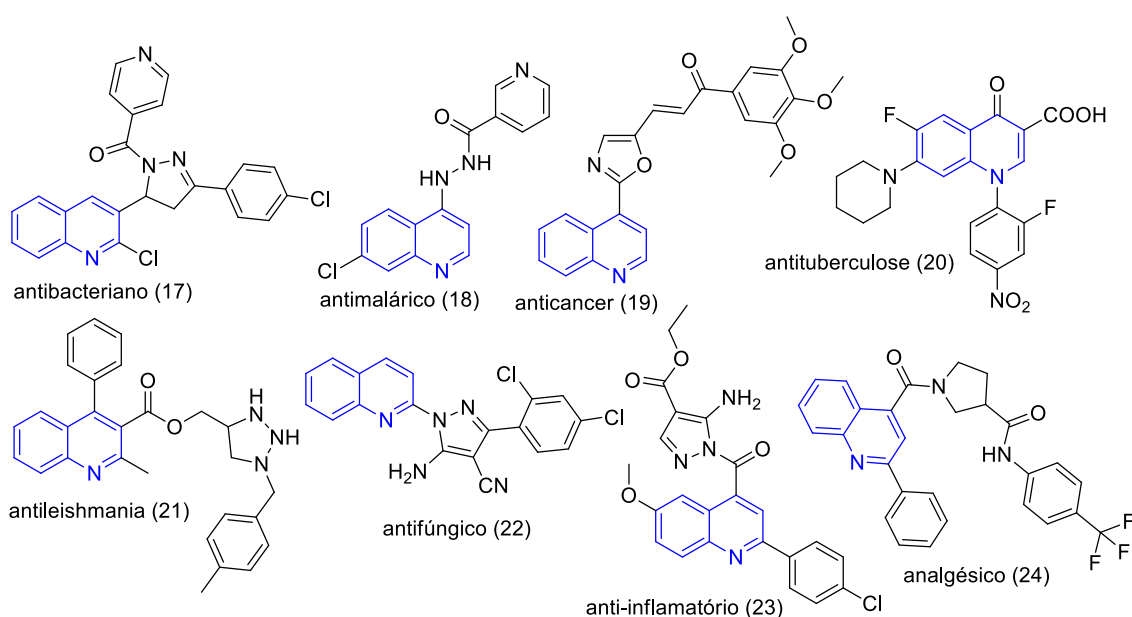


Figura 9- Derivados quinolínicos com diferentes atividades farmacológicas.

O núcleo quinolínico também vem se mostrando promissor para a pesquisa de novas moléculas como potenciais candidatos a protótipos de fármacos para o tratamento da DA. Dentre a diversidade de compostos bioativos encontrados, muitas pesquisas recentes identificaram compostos de quinolina e seus derivados como inibidores da acetilcolinesterase (AChE) e butirilcolinesterase (BuChE), além disso alguns também apresentam efeito neuroprotetor e inibição da agregação A β . Dentre estes derivados são descritos metóxi-quinolinas (25, 29 e 30), híbridos com a subunidade carbamato (26 e 27), carboxamidas (28) e morfolino-quinolinas (25 e 30) (Figura 10). (LI et al., 2023)

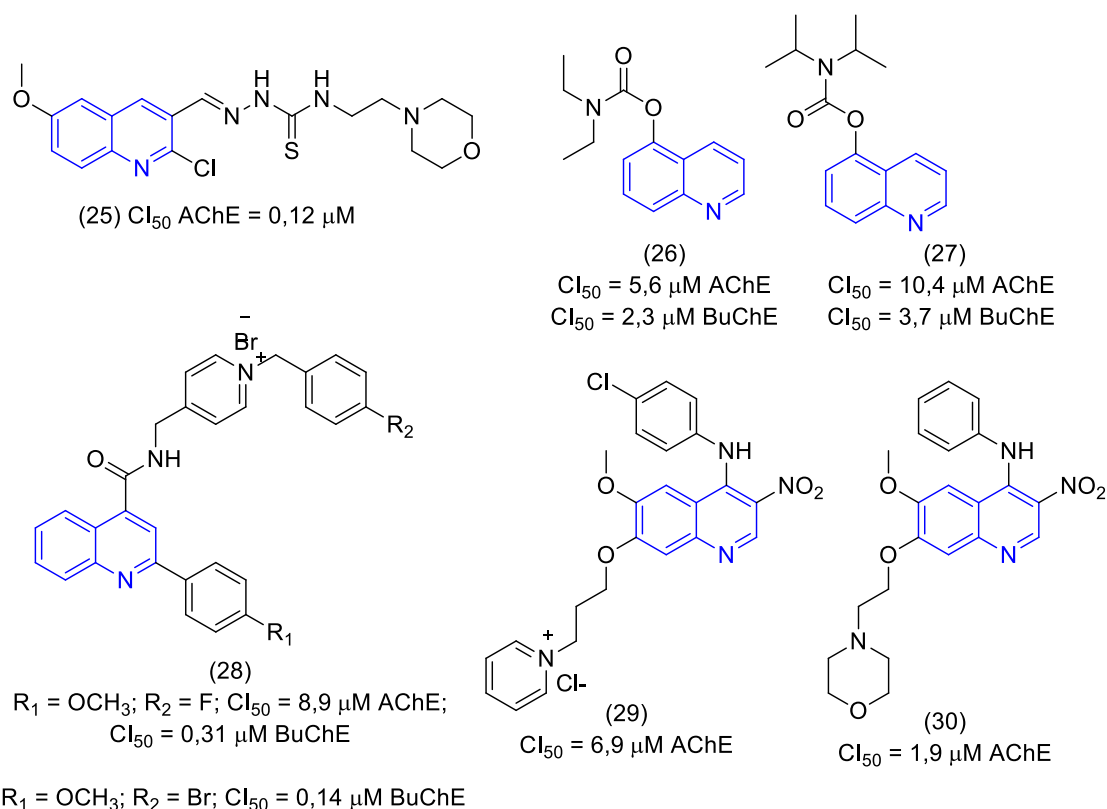


Figura 10- Derivados quinolínicos com atividade inibitória sobre AChE e/ou BuChE.

1.3. Guanidinas e suas propriedades farmacológicas

Guanidinas são moléculas orgânicas versáteis, com propriedades químicas e físico-químicas úteis na Química Medicinal e em diversos setores industriais. Sua estrutura (**31A-B**) (Figura 11) apresenta função amina e imina, conferindo-lhes características nucleofílicas e eletrofílicas simultâneas. A estabilidade da guanidina é evidenciada quando protonada, formando o cátion guanidínio por meio de formas de ressonância. Essa estabilidade é comparável à de compostos aromáticos. A deslocalização do par de elétrons livre do nitrogênio torna a guanidina um ligante eficaz em complexação de metais e interação com moléculas deficientes em elétrons. (GOMES et al., 2023)

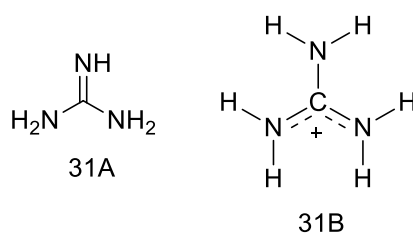


Figura 11- Estrutura do grupo guanidina (31A-B).

Moléculas orgânicas com a subunidade guanidínica são abundantes na natureza, presentes em compostos como o aminoácido arginina (32) e o neurotransmissor agmatina (33), além de diversos alcaloides naturais, como as toxinas tetrodotoxina (34) e saxitoxina (35). Nas últimas décadas, o interesse por moléculas sintéticas e fármacos com guanidina cresceu consideravelmente, encontrando aplicação na química farmacêutica, catálise, química supramolecular e materiais. O grupo guanidina é amplamente utilizado em moléculas com propriedades anti-inflamatórias, cardiovasculares, antidiabéticos e anti-hipertensivos, bem como em agentes antimicrobianos, como os antibióticos estreptomicina (36), trimetoprima (37), clorexidina (38) e o antimalárico proguanil (39) (Figura 12). (SEONG-HEUN et al., 2021)

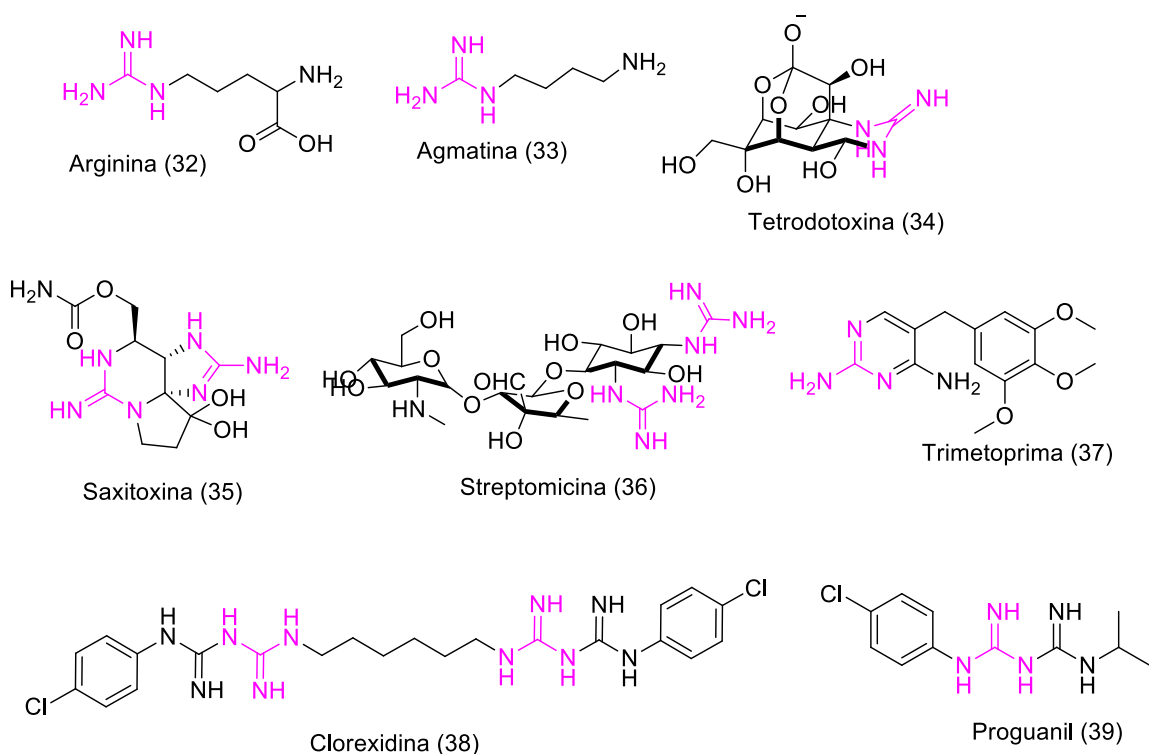


Figura 12- Compostos contendo a subunidade guanidina (32-39). (Adaptado de (SEONG-HEUN et al., 2021))

No contexto da DA, diferentes derivados acilguanidínicos tem sido descrito como inibidores de BACE-1 (Figura 13). Os estudos de Kandasamy Saravanan e Poomani Kumaradhas (2019) com dinâmica molecular (MD) demonstraram a estabilidade, flexibilidade e plausibilidade do modo de ligação do complexo acilguanidinas-BACE1 sob condições fisiológicas.(SARAVANAN et al., 2021)Adicionalmente, estudos de cristalografia de raios-X confirmaram o caráter farmacofórico da subunidade

acilguanidínica para a BACE-1, mostrando que esta subunidade faz importantes ligações de hidrogênio com os resíduos de Asp32 and Asp228 (Figura 14). (ZHU et al., 2013)

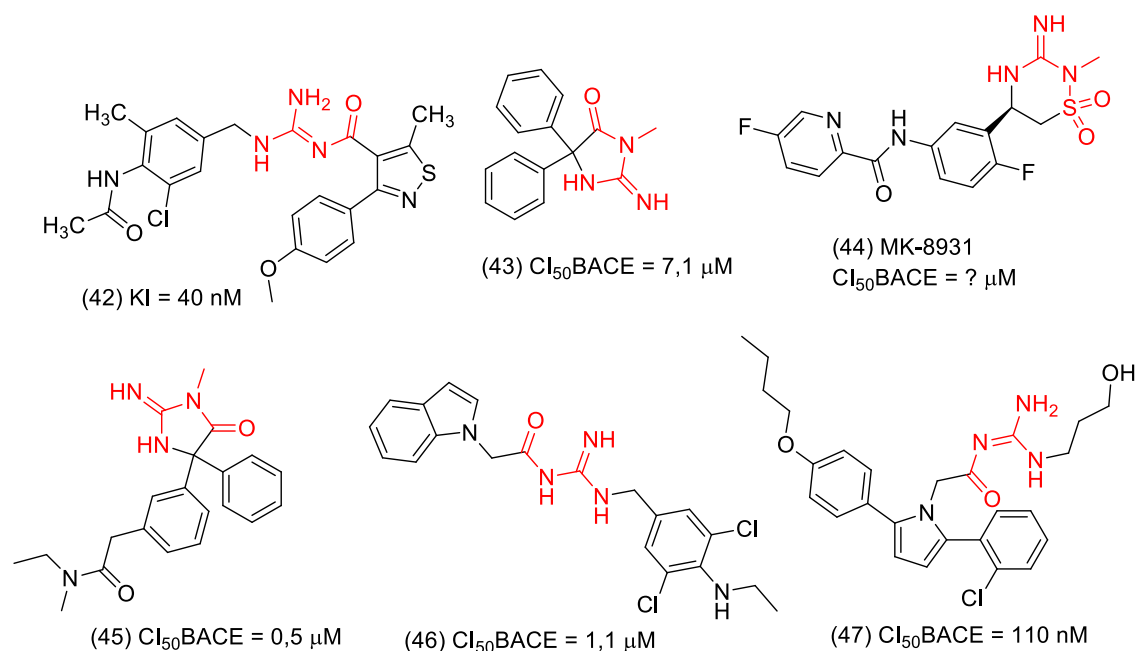


Figura 13- Acilguanidinas inibidoras de BACE-1 (42-47).

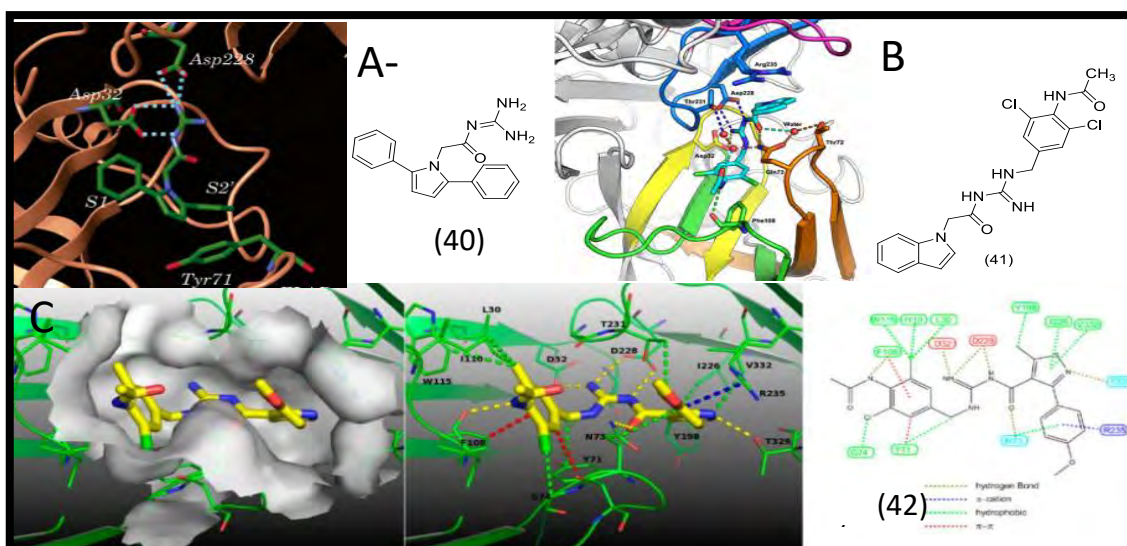


Figura 14- Visualização das interações intermoleculares entre os derivados acilguanidínicos 40 (A), 41 (B), e 42 (C) por cristalografia de raios-X com a BACE-1.

Além de inibidores de BACE-1, derivados guanidínicos e acilguanidínicos também tem sido desenvolvido como inibidores de colinesterases candidatos a fármacos para o

tratamento da DA. Estudos mostram que a presença do nitrogênio protonado nas guanidinas pode permitir a interação com o sítio ativo das colinesterases. (Rozengart, Basova, et al., 2003) De fato, algumas guanilhidrazonas descritas por Neto e colaboradores (2017) se mostraram capazes de inibir as colinesterases. Como exemplo podemos citar a guanilhidrazona **48**, que foi capaz de inibir a AChE com CI_{50} de 1,97 μ M fazendo interações com aminoácidos da tríade catalítica da acetilcolinesterase. Adicionalmente, acilguanidinas cíclicas (**49** e **50**) com diferentes padrões de substituição e contendo a subunidade carbamato se mostram potentes inibidores seletivos de BuChE (**49**) e AChE (**50**). A acilguanidínica indólica (**51**) foi identificada em nosso laboratório como um inibidor seletivo de BuChE (Figura 15).

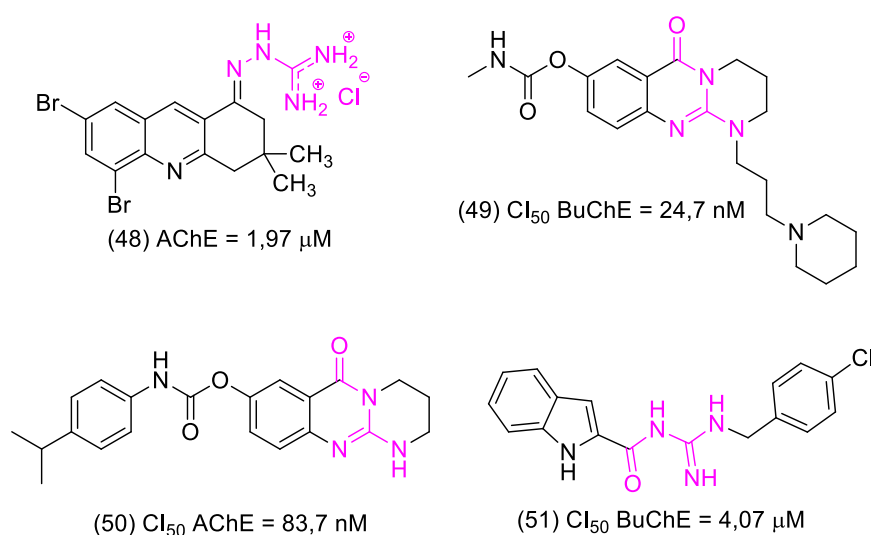


Figura 15- Acilguanidinas inibidoras de Colinesterases (**48-51**).

Estudos de *docking* realizados por Neto e colaboradores (2017) com a guanilhidrazona **48** e a AChE mostraram que a mesma interage com Phe330 e Trp84, importantes resíduos para estabilização do sítio ativo. Além de interagir com a tríade catalítica (Ser200–His440–Glu327). Os resultados mostraram também que o grupo catiônico guanidina interage com os resíduos Trp84, Glu199 e Gly441 no sítio aniônico da enzima (Figura 16).

1.4. Contextualização e trabalhos anteriores do grupo de pesquisa.

O desenvolvimento de novos compostos bioativos é fundamental na busca por terapias mais eficazes e específicas para o tratamento de diversas doenças. No contexto da doença de Alzheimer, a busca por inibidores seletivos da enzima acetilcolinesterase (AChE) e butirilcolinesterase (BuChE) tem sido uma área de intensa pesquisa devido ao papel dessas enzimas na progressão da doença.

Em uma investigação anterior, no trabalho de doutorado da discente Paula Goulart (2021), nosso grupo de pesquisa sintetizou e caracterizou 32 compostos, incluindo guanidinas e acilguanidinas, como análogos dos alcaloides marinhos oroidínicos. Estes compostos foram avaliados quanto à sua atividade inibitória contra as enzimas acetilcolinesterase (AChE) e butirilcolinesterase (BuChE). Os resultados revelaram que as acilguanidinas bromopirrólicas são inibidores seletivos de BuChE, com compostos específicos demonstrando mais de 80% de inibição da atividade BuChE. Estudos de docking molecular corroboraram esses achados, elucidando as interações moleculares chave desses compostos dentro do sítio ativo da BuChE.

Posteriormente, em um outro trabalho do nosso grupo, descrito na dissertação de mestrado da discente Letícia Bersot (2021), acilguanidinas indólicas foram identificadas como inibidores seletivos de BuChE. E, os estudos de *docking* com a enzima alvo demonstraram que os derivados interagem dentro da cavidade do sítio ativo através interações com os resíduos de aminoácidos Glutamato225, Serina226, Histidina466 e Triptofano110. Além de ligação de hidrogênio entre o NH indólico e o resíduo do aminoácido His466, interação entre o NH guanidínico e o resíduo do aminoácido Ser266, interação do carboxilato do resíduo de Glu225 com a guanidina protonada e a interação π - π entre o anel aromático da acilguanidina e o resíduo do aminoácido Try110 (Figura 16).

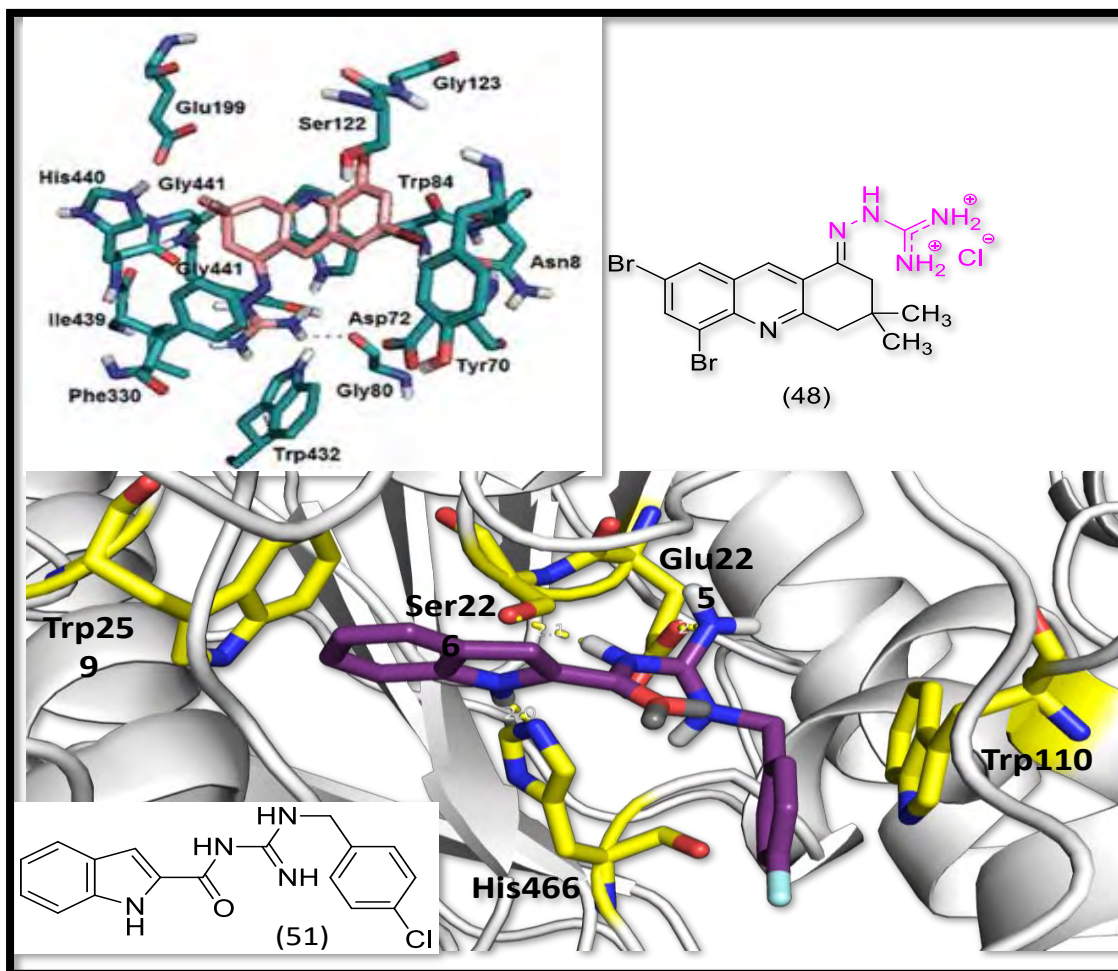


Figura 16- Interações entre guanidinas e o sítio ativo das colinesterases.

As acilguanidinas quinolínicas representam uma extensão das investigações anteriores do nosso grupo. Baseando-se nos resultados promissores obtidos com os compostos dibromopirrólicos e indólicos, optamos por manter o farmacóforo acilguanidina como elemento central e explorar o bioisosterismo para substituir o heterociclo principal pelo núcleo quinolínico.

Essa abordagem não apenas diversifica a química dos compostos estudados, mas também permite uma análise comparativa mais abrangente dos efeitos estruturais nas propriedades biológicas. Além disso, a introdução de diferentes padrões de substituição na posição dois do núcleo quinolínico e no nitrogênio imínico da acilguanidina adiciona uma dimensão adicional à variação estrutural, potencialmente otimizando a atividade farmacológica dos novos derivados.

Ao contextualizar nosso estudo dentro do cenário de pesquisa existente e destacar a continuidade das investigações anteriores, estamos fortalecendo a fundamentação

científica do nosso trabalho e ampliando o potencial de contribuição para o avanço no desenvolvimento de terapias para a doença de Alzheimer.

2. OBJETIVOS

Os objetivos gerais deste projeto consistem no planejamento estrutural, na síntese e avaliação farmacológica *in vitro* de novas séries de derivados acilguanidínicos-quinolínicos, Os novos derivados foram desenhados como candidatos a agentes inibidores seletivos de BuChE visando a obtenção de novos candidatos a protótipos de fármacos para o tratamento da DA. Adicionalmente, também pretendemos realizar estudos de modelagem molecular para auxiliar na compreensão dos possíveis modos de interação com a enzima alvo e relações estrutura-atividade, bem como previsão *in silico* do perfil farmacocinético e *druglike* dos compostos planejados, através da ferramenta gratuita da internet SwissADME. (DAINA et al.,2017)

2.1. Objetivos Específicos

- Síntese e caracterização estrutural (RMN de H^1 e C^{13} , ponto de fusão) de novas fenilquinolinas e metilquinolinas acilguanidínicas;
- Avaliação do perfil inibitório *in vitro* dos novos compostos sintetizados sobre as enzimas AChE e BuChE;
- *Docking* dos compostos planejados com a BuChE e/ou AChE;
- Previsão do perfil *druglikeness* com o *software* SwissADME;

3. METODOLOGIA

3.1. Procedimentos sintéticos

O acompanhamento das reações foi realizado por meio da técnica de cromatografia em camada fina analítica (CCFA), utilizando placas de alumínio revestidas com Kieselgel 60 (HF-254, Merck) com uma espessura de 0,2 mm. A detecção das substâncias na CCFA foi realizada utilizando uma lâmpada de ultravioleta ($\lambda = 254$ e 365 nm).

A fase orgânica das reações foi seca usando sulfato de sódio (Na_2SO_4) anidro, filtrada e a remoção dos solventes foi realizada sob vácuo em um evaporador rotatório, modelo RV 10 digital, com banho de aquecimento, modelo HB 10 digital.

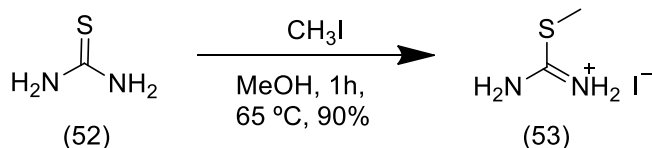
A purificação dos compostos foi realizada através da técnica de cromatografia líquida em coluna aberta ou recristalização em solventes apropriados. Para preparar a coluna, foi utilizado sílica gel com granulometria de 70-230 mesh (Merck). A fase móvel foi selecionada de acordo com as propriedades físico-químicas de cada composto.

Os espectros de RMN ^1H foram obtidos nos aparelhos Bruker Avance-500 e Bruker Avance-400 (ICE-UFRRJ), operando a 100 MHz e 125 MHz, respectivamente. As amostras são dissolvidas em CDCl_3 e DMSO-d_6 , contendo tetrametilsilano (TMS) como padrão interno, e colocadas em tubos de diâmetro 5 mm.

Os espectros de RMN ^{13}C foram obtidos nos aparelhos Bruker Avance-400 e Bruker Avance-500 (ICE-UFRRJ), operando a 400 MHz e 500 MHz, respectivamente. As amostras foram dissolvidas em CDCl_3 e DMSO-d_6 , contendo TMS como padrão interno. A quantificação dos picos foi realizada por integração eletrônica e sua multiplicidade é descrita como: s-singuleto / sl-singuleto largo / d-dublete / t-triplete / q-quarteto / m-multiplete / dd-dublo dublete.

3.1.1. Síntese do sal 2-metil-isotiourônio (53)

Em balão de vidro contendo tiouréia (52) (5 g; 0,065 mols) em metanol (100 ml), foi adicionado iodeto de metila (4,1 mL; 0,065 mols). A mistura foi aquecida a 65 °C por um período de 60-90 minutos. Em seguida, o metanol foi removido utilizando um evaporador rotativo sob vácuo, resultando em um resíduo sólido branco. O produto obtido foi transferido para um funil de Buchner e lavado com éter etílico gelado (5 vezes com 50 ml), também sob vácuo. O produto foi obtido como um sólido branco ou amarelo em 90% de rendimento e ponto de fusão 96-100°C (PF literatura = 117°C). (HICKEY et al., 2012)



Esquema 1: Reação de metilação da tioureia com iodeto de metila, por uma reação $\text{S}_\text{N}2$, para formação do sal 2-metil-isotiourônio.

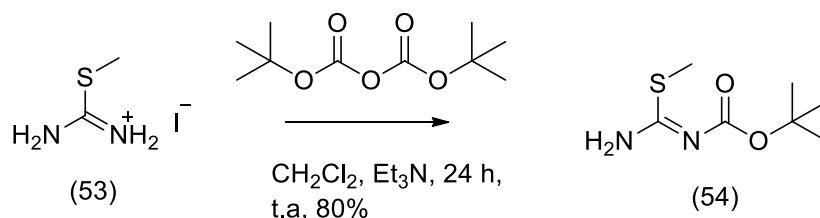
3.1.2. Reação de proteção da isometiltioureia

Em um balão de vidro, sob banho de gelo, contendo o sal de isometiltioureia (53) (4 g; 18,32 mmols) em diclorometano (20 mL) e Et_3N (2,556 mL; 18,32 mmols), é adicionada, de forma lenta e gota-a-gota, uma solução de di-*terc*-butil-dicarbonato

(anidrido Boc ou Boc₂O) (2 g; 9,16 mmols) em 10 mL de diclorometano. Após o término da adição o banho de gelo foi retirado e a reação foi agitada a temperatura ambiente durante cerca de 16h. O isolamento da reação é feito através de uma extração líquido-líquido, utilizando água destilada e diclorometano. A fase orgânica é separada, seca com sulfato de sódio anidro e evaporada em evaporador rotatório. O produto é obtido como um óleo transparente que, ao longo do tempo, solidifica-se formando um sólido branco com um odor forte e característico. O rendimento foi de 83%. (KATRITZKY et al.,2005)

RMN ¹H (100 MHz) CDCl₃ / TMS (δ-ppm): δ 7.28 (s, 1H), 2.45 (s, 3H), 1.51 (s, 9H).

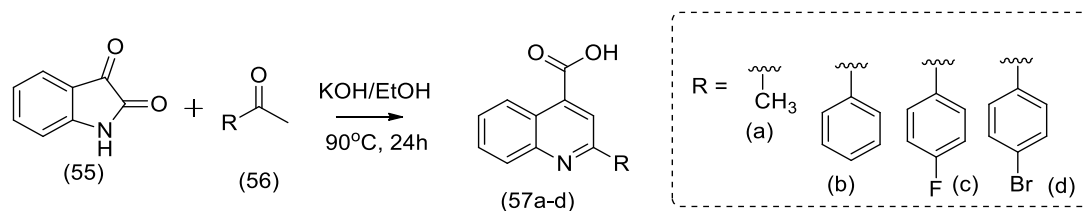
RMN ¹³C (100 MHz) CDCl₃ / TMS (δ-ppm): δ 171,7 (C=O); δ 160,9 (C=N); δ 78,1 (C(CH₃)₃); δ 28,2 (C(CH₃)₃); δ 13,1 (SCH₃).



Esquema 2: Reação de monoproteção da amina (53), formando o *N*-Boc-S-metilisotioureia (54).

3.1.3. Procedimento geral de obtenção dos ácidos carboxílicos quinolínicos (57a-d)

Em um tubo reacional de vidro adicionou-se 0,5 g (3,34mmol) da isatina (55), 2 equivalentes de KOH (13,59 mmol), 8 mL de etanol e 2 mL de água destilada. Em seguida adicionou-se a acetofenona, 1-(4-bromofenil) etanona, 1-(4-flúorfenil) etanona ou acetona (1 eq, 1eq, 1 eq e 24 eq, respectivamente) e a mistura ficou sob agitação a 90°C por 24h ou até o consumo dos reagentes ser evidenciado através de TLC. Deixou-se a mistura esfriar, o volume reacional foi reduzido em evaporador rotatório, adicionou-se gelo picado e gotejou-se uma solução de HCl a 20% enquanto acompanhava-se o pH, até pH 4,5. O precipitado formado foi filtrado e lavado com água destilada. O produto, após estar seco, foi lavado com diclorometano e seco a 40°C. Rendimento de 45-60% (SHVEKHGEIMER, 2004).(VERBANAC et al., 2016).



Esquema 3: Reação de obtenção dos ácidos carboxílicos quinolínicos (**57a-d**)

Ácido-2-metil-quinolínico-4-carboxílico (57a) (R = 55%)

RMN ¹H (100 MHz) DMSO / TMS (δ-ppm): 8.6 (d, J = 8.4 Hz, 1H), 8.0 (d, J = 8.4 Hz, 1H), 7.8 (s, 1H), 7.7 (t, J = 7.6 Hz, 1H), 7.6 (t, J = 7.6 Hz, 1H), 2.7 (s, 3H).

RMN ¹³C (100 MHz) DMSO / TMS (δ-ppm): 168.15, 159.15, 148.59, 136.94, 130.09, 129.3, 127.3, 125.7, 123.2, 123.1, 24.9.

Ácido-2-fenil-quinolínico-4-carboxílico (57b) (R = 45%)

RMN ¹H (100 MHz) DMSO / TMS (δ-ppm): 8.6 (d, J = 8.1 Hz, 1H), 8.4 (s, 1H), 8.30 (d, J = 7.1 Hz, 2H), 8.1 (d, J = 8.3 Hz, 1H), 7.8 (t, J = 7.1 Hz, 1H), 7.7 (dd, J = 11.8, 4.6 Hz, 1H), 7.5 (m, 3H).

RMN ¹³C (100 MHz) DMSO / TMS (δ-ppm): 168.0, 156.2, 148.8, 138.3, 138.1, 130.7, 130.4, 130.2, 129.4, 128.2, 127.6, 125.8, 123.9, 119.6.

Ácido-2-p-flúor-fenil-quinolínico-4-carboxílico (57c) (60%)

RMN ¹H (100 MHz) DMSO / TMS (δ-ppm): 8.6 (d, J = 8.4 Hz, 1H), 8.4 (s, 1H), 8.3 (dd, J = 8.6, 5.6 Hz, 2H), 8.1 (d, J = 8.4 Hz, 1H), 7.8 (t, J = 7.4 Hz, 1H), 7.6 (t, J = 7.5 Hz, 1H), 7.3 (t, J = 8.8 Hz, 2H).

RMN ¹³C (100 MHz) DMSO / TMS (δ-ppm): 168.1, 164.8, 162.8, 155.2, 148.7, 138.9, 134.8, 130.7, 130.1, 130.0, 129.9, 128.1, 125.9, 123.8, 119.1, 116.4, 116.2.

Ácido-2-p-bromo-fenil-quinolínico-4-carboxílico (57d) (50%)

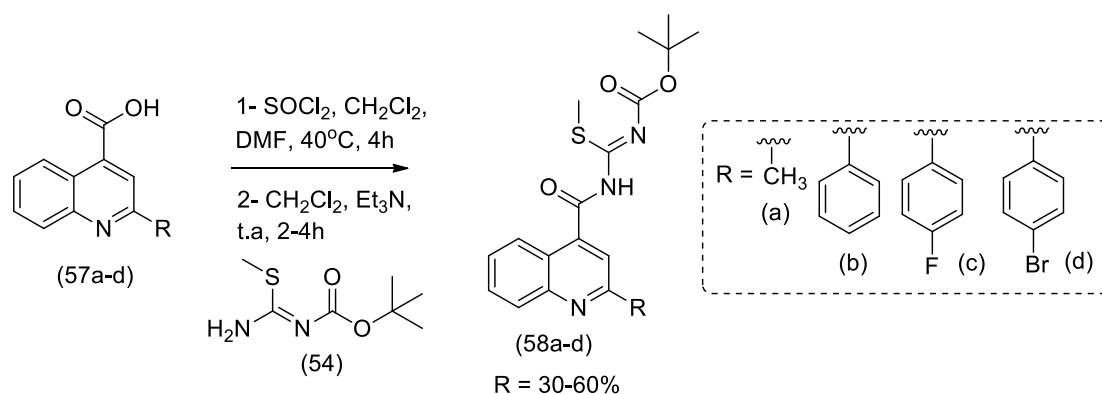
RMN ¹H (100 MHz) DMSO / TMS (δ-ppm): 8.6 (d, J = 8.1 Hz, 1H), 8.4 (s, 1H), 8.2 (d, J = 8.6 Hz, 2H), 8.1 (d, J = 8.3 Hz, 1H), 7.8 (t, J = 8.2 Hz, 1H), 7.7 (d, J = 8.6 Hz, 2H), 7.7 (t, J = 7.1 Hz, 1H).

RMN ¹³C (100 MHz) DMSO / TMS (δ-ppm): 168.0, 155.1, 148.7, 138.4, 137.4, 132.4, 130.86, 130.2, 129.7, 128.4, 125.8, 124.2, 124.0.

3.1.4. Procedimento geral de obtenção dos intermediários chave (58a-d)

A uma solução de ácido carboxílico quinolínico **57a-d** (2 mmol) em 10 mL de diclorometano (CH₂Cl₂), adicionou-se de 5 equivalentes de cloreto de tionila (SOCl₂) sob agitação. Em seguida, foram adicionadas duas gotas de dimetilformamida (DMF). A mistura foi agitada a 40°C de duas a quatro horas, quando a CCF indicou o consumo total

do ácido de partida. A mistura reacional foi evaporada sob vácuo. A *tert*-butil (amino(metiltio)metileno) carbamato (**54**) (2,01 mmol) é solubilizada em CH₂Cl₂ (10 mL) e trietilamina (1 mL). O cloreto de ácido obtido após evaporação da mistura reacional foi diluído em CH₂Cl₂ (10 mL) e adicionado gota a gota à solução anterior. A mistura foi continuamente agitada por cerca de duas horas à temperatura ambiente, ou até que os reagentes iniciais fossem totalmente consumidos. A mistura foi diluída com CH₂Cl₂ e lavada três vezes com água destilada. A fase orgânica foi seca utilizando sulfato de sódio anidro e, em seguida, evaporada sob vácuo. O produto foi purificado por meio de cromatografia em coluna, utilizando mistura hexano/acetato como solvente móvel e/ou recristalização em acetona. O produto é obtido como um sólido em rendimentos variáveis de 30-60%.



Esquema 4: Reação de obtenção dos intermediários chave (**58a-d**)

***Terc*-butil ((2-metilquinolina-4-carboxamido)(metiltio)metileno)carbamato (**58a**) (50%)**

RMN ¹H (100 MHz) CDCl₃ / TMS (δ-ppm): 12.5 (s, 1H), 8.7 (d, J = 7.9 Hz, 1H), 8.0 (d, J = 8.3 Hz, 1H), 7.9 (s, 1H), 7.7 (d, J = 6.6 Hz, 1H), 7.5 (t, J = 7.4 Hz, 1H), 2.8 (s, 3H), 1.5 (s, 9H).

RMN ¹³C (100 MHz) CDCl₃ / TMS (δ-ppm): 158.7, 129.4, 129.1, 126.6, 125.8, 123.3, 28.0, 15.0, 13.3.

***Terc*-butil ((2-fenilquinolina-4-carboxamido)(metiltio)metileno)carbamato (**58b**) (PF = 138-139°C) (R = 56%)**

RMN ¹H (100 MHz) CDCl₃ / TMS (δ-ppm): δ 12.5 (s, 1H), 8.8 (d, J = 8.5 Hz, 1H), 8.6 (s, 1H), 8.2 (d, J = 8.4 Hz, 1H), 8.1 (d, J = 7.5 Hz, 2H), 7.7 (t, J = 7.5 Hz, 1H), 7.6 (t, J = 7.6 Hz, 1H), 7.5 (dd, J = 17.1, 9.8 Hz, 2H), 7.4 (t, J = 7.2 Hz, 1H), 2.5 (s, 3H), 1.5 (s, 9H).

RMN ¹³C (100 MHz) CDCl₃ / TMS (δ-ppm): δ 177.1, 173.7, 156.8, 150.8, 149.4, 142.1, 139.2, 130.2, 129.6, 129.5, 128.9, 127.4, 127.3, 125.9, 124.3, 120.6, 84.1, 28.0, 15.2.

***Terc*-butil ((2-(4-flúor-fenil)quinolina-4-carboxamido)(metiltio)metileno)carbamato (58c) (PF = 159-162°C) (R = 60%)**

RMN ¹H (100 MHz) CDCl₃ / TMS (δ-ppm): δ 12.5 (s, 1H), 8.8 (d, J = 8.5 Hz, 1H), 8.5 (s, 1H), 8.1 (dd, J = 12.7, 8.0 Hz, 3H), 7.7 (t, J = 7.6 Hz, 1H), 7.6 (t, J = 7.6 Hz, 1H), 7.2 (t, J = 8.6 Hz, 2H), 2.5 (s, 3H), 1.5 (s, 9H).

RMN ¹³C (100 MHz) CDCl₃ / TMS (δ-ppm): δ 177.2, 173.9, 165.0, 163.0, 155.8, 150.9, 149.4, 142.5, 135.5, 130.2, 129.8, 129.4, 129.3, 127.5, 126.0, 124.3, 120.3, 116.1, 115.9, 84.2, 77.4, 77.1, 76.9, 28.1, 15.3.

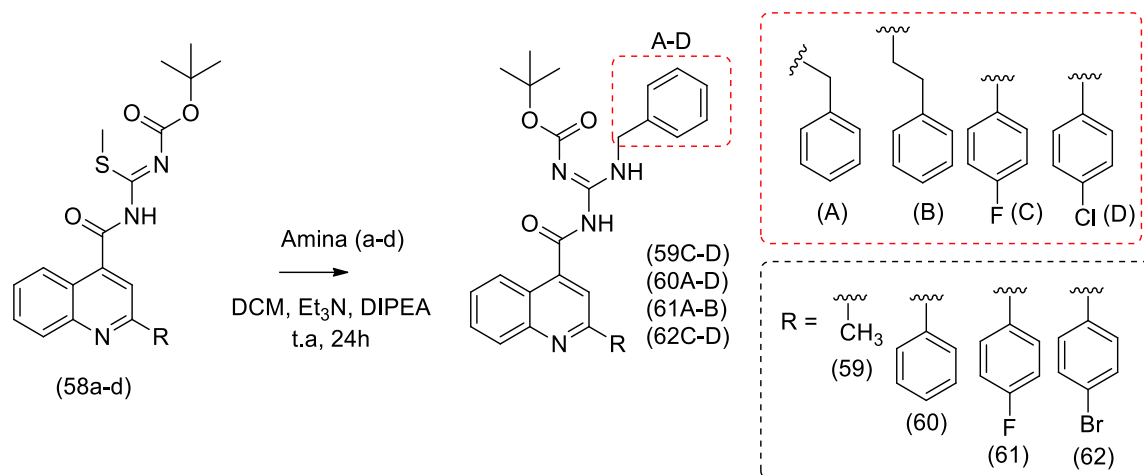
***Terc*-butil((2-(4-bromofenil)quinolina-4-carboxamido)(metiltio)metileno)carbamato (58d) (30%)**

RMN ¹H (100 MHz) CDCl₃ / TMS (δ-ppm): 12.5 (s, 1H), 8.8 (d, J = 8.5 Hz, 1H), 8.5 (s, 1H), 8.2 (d, J = 8.4 Hz, 1H), 8.0 (d, J = 8.4 Hz, 2H), 7.7 (t, J = 7.5 Hz, 1H), 7.6 (d, J = 8.4 Hz, 2H), 7.6 (t, J = 7.6 Hz, 1H), 2.5 (s, 3H), 1.5 (s, 0H).

RMN ¹³C (100 MHz) CDCl₃ / TMS (δ-ppm): 177.0, 173.8, 155.5, 150.8, 149.4, 142.5, 138.1, 132.1, 130.2, 129.7, 128.9, 127.5, 125.9, 124.3, 124.2, 120.0, 84.1, 28.1, 15.1.

3.1.5. Metodologia geral de obtenção das acilguanidinas quinolínicas protegidas

A uma solução do intermediário-chave (**58a-d**) (1 mmol) em 5 mL de CH₂Cl₂ em balão de vidro foram adicionados 1 equivalente de Et₃N e 1 equivalente de N, N-diisopropiletilamina (DIPEA), seguidos por 1.1 equivalentes da amina de interesse. A mistura reacional foi mantida à temperatura ambiente por 24 horas ou até consumo total do intermediário chave. O isolamento do produto foi realizado através de uma extração líquido-líquido utilizando água destilada e CH₂Cl₂. A fase orgânica foi seca com sulfato de sódio anidro e, posteriormente, evaporada sob vácuo. Para a purificação do produto, foi empregada uma coluna cromatográfica, utilizando gradiente de concentração diclorometano ou hexano/acetato de etila como fase móvel do eluente. (CARRILLO-HERMOSILLA et al., 2014)



Esquema 5: Reação de formação das acilguanidinas protegidas (59-62).

Acilguanidina 59C (R = 78%)

RMN ¹H (100 MHz) CDCl₃ / TMS (δ-ppm): 12.3 (s, 1H), 9.0 (s, 1H), 8.7 (d, J = 8.5 Hz, 1H), 8.0 (d, J = 8.4 Hz, 1H), 7.7 (s, 1H), 7.6 (t, J = 7.2 Hz, 1H), 7.4 (t, J = 7.6 Hz, 1H), 7.3 – 7.3 (m, 2H), 7.0 (t, J = 8.6 Hz, 2H), 4.7 (d, J = 5.7 Hz, 2H), 2.7 (s, 3H), 1.5 (s, 9H).

RMN ¹³C (100 MHz) CDCl₃ / TMS (δ-ppm): 179.1, 163.3, 158.5, 156.9, 153.3, 148.8, 143.6, 133.1, 129.4, 129.3, 129.1, 128.9, 126.1, 126.1, 122.2, 115.8, 115.6, 84.0, 44.5, 28.0, 25.3.

Acilguanidina 59D (R = 60%)

RMN ¹H (100 MHz) CDCl₃ / TMS (δ-ppm): 12.3 (s, 1H), 9.1 (s, 1H), 8.6 (d, J = 8.4 Hz, 1H), 8.0 (d, J = 8.4 Hz, 1H), 7.7 – 7.6 (m, 2H), 7.4 (t, J = 7.6 Hz, 1H), 7.3 (d, J = 8.4 Hz, 2H), 7.3 – 7.2 (m, 2H), 4.7 (d, J = 5.7 Hz, 2H), 2.7 (s, 3H), 1.5 (s, 9H).

RMN ¹³C (100 MHz) CDCl₃ / TMS (δ-ppm): 179.1, 158.8, 157.0, 153.3, 148.9, 143.7, 136.0, 133.9, 129.0, 126.1, 123.5, 122.2, 84.2, 44.5, 28.2, 13.5.

Acilguanidina 60A (R=90%)

RMN ¹H (100 MHz) CDCl₃ / TMS (δ-ppm): 12.4 (s, 1H), 9.1 (s, 1H), 8.7 (d, J = 7.9 Hz, 1H), 8.3 (s, 1H), 8.1 (d, J = 8.1 Hz, 1H), 8.1 (d, J = 8.5 Hz, 2H), 7.5 – 7.4 (m, 4H), 7.3 (d, J = 4.4 Hz, 4H), 1.5 (s, 9H).

RMN ¹³C (100 MHz) CDCl₃ / TMS (δ-ppm): 179.0, 156.9, 156.8, 153.4, 149.2, 144.2, 139.5, 137.2, 129.9, 129.3, 128.8, 127.7, 127.5, 126.7, 126.2, 124.4, 119.6, 83.9, 45.1, 28.0.

Acilguanidina 60B (R=92%)

RMN ¹H (100 MHz) CDCl₃ / TMS (δ-ppm): 12.3 (s, 1H), 8.8 (d, J = 8.5 Hz, 2H), 8.5 (s, 1H), 8.3 – 8.1 (m, 3H), 7.7 (t, J = 7.0 Hz, 1H), 7.6 – 7.4 (m, 5H), 7.2 (dd, J = 19.5, 6.0 Hz, 3H), 3.8 (dd, J = 13.8, 7.0 Hz, 2H), 3.0 (t, J = 7.5 Hz, 2H), 1.5 (s, 9H).

RMN ¹³C (100 MHz) CDCl₃ / TMS (δ-ppm): 178.9, 156.9, 153.3, 149.3, 144.4, 139.6, 138.3, 130.0, 129.3, 128.8, 128.7, 128.7, 127.5, 126.7, 126.7, 126.2, 119.7, 83.9, 42.9, 35.7, 28.1.

Acilguanidina 60C (R=90%)

RMN ¹H (100 MHz) CDCl₃ / TMS (δ-ppm): 9.1 (s, 1H), 8.7 (d, J = 8.4 Hz, 1H), 8.3 (s, 1H), 8.2 (d, J = 8.2 Hz, 1H), 8.1 (d, J = 7.3 Hz, 2H), 7.7 (t, J = 7.3 Hz, 1H), 7.5 (t, J = 7.1 Hz, 3H), 7.4 (s, 1H), 7.4 – 7.3(m, 2H), 7.0 (t, J = 8.6 Hz, 2H), 4.7 (d, J = 5.7 Hz, 2H), 1.5 (s, 9H).

RMN ¹³C (100 MHz) CDCl₃ / TMS (δ-ppm): 179.1, 163.2, 161.3, 156.9, 156.8, 153.4, 149.2, 144.2, 139.4, 133.0, 130.0, 129.3, 128.9, 127.5, 126.7, 126.1, 124.3, 119.5, 115.6, 84.0, 44.5, 28.2.

Acilguanidina 60D (R=97%)

RMN ¹H (100 MHz) CDCl₃ / TMS (δ-ppm): 12.2 (s, 1H), 9.4 (s, 1H), 8.6 (d, J = 8.4 Hz, 1H), 8.2 (s, 1H), 8.0 (t, J = 9.0 Hz, 3H), 7.7 (t, J = 7.2 Hz, 1H), 7.5 (d, J = 7.5 Hz, 4H), 7.4 (s, 3H), 4.6 (d, J = 6.0 Hz, 2H), 1.5 (s, 9H).

RMN ¹³C (100 MHz) CDCl₃ / TMS (δ-ppm): 177.9, 156.7, 156.0, 152.3, 148.9, 144.5, 138.6, 138.1, 131.9, 130.2, 130.2, 130.0, 129.4, 129.3, 128.8, 127.4, 126.5, 124.1, 118.9, 83.8, 44.3, 28.1.

Acilguanidina 61A (PF = 143-144°C) (R = 92%)

RMN ¹H (100 MHz) CDCl₃ / TMS (δ-ppm): 12.4 (s, 1H), 9.1 (s, 1H), 8.7 (d, J = 8.5 Hz, 1H), 8.3 (s, 1H), 8.2 – 8.0 (m, 3H), 7.7 (t, J = 7.6 Hz, 1H), 7.5 (t, J = 7.7 Hz, 1H), 7.3 (m, 5H), 7.1 (t, J = 8.6 Hz, 2H), 4.7 (d, J = 5.8 Hz, 2H), 1.5 (s, 9H).

RMN ¹³C (100 MHz) CDCl₃ / TMS (δ-ppm): 157.1, 155.8, 153.5, 137.4, 129.9, 129.6, 129.5, 129.4, 128.9, 127.8, 127.6, 126.9, 126.3, 124.4, 119.3, 115.9, 115.8, 84.1, 45.2, 28.2.

Acilguanidina 61B (PF = 145-146°C) (R = 97%)

RMN ¹H (100 MHz) CDCl₃ / TMS (δ-ppm): 12.35 (s, 1H), 8.95 – 8.77 (m, 2H), 8.42 (s, 1H), 8.27 – 8.09 (m, 3H), 7.74 (t, J = 7.5 Hz, 1H), 7.56 (t, J = 7.6 Hz, 1H), 7.37 – 7.02 (m, 7H), 3.81 (dd, J = 13.7, 6.8 Hz, 2H), 3.00 (t, J = 7.4 Hz, 2H), 1.55 (s, 9H).

RMN ¹³C (100 MHz) CDCl₃ / TMS (δ-ppm): 157.0, 155.7, 153.4, 138.4, 129.54, 128.8, 126.9, 126.8, 126.4, 124.5, 119.3, 116.0, 115.8, 83.9, 43.0, 35.8, 28.1.

Acilguanidina 62C (R=94%)

RMN ¹H (100 MHz) CDCl₃ / TMS (δ-ppm): 12.3 (s, 1H), 9.1 (s, 1H), 8.7 (d, J = 8.4 Hz, 1H), 8.2 (s, 1H), 8.1 (d, J = 8.4 Hz, 1H), 8.0 (d, J = 8.5 Hz, 2H), 7.7 (t, J = 8.1 Hz, 1H), 7.6 (d, J = 8.5 Hz, 2H), 7.5 (t, J = 7.6 Hz, 1H), 7.3 (m, 2H), 7.0 (t, J = 8.6 Hz, 2H), 4.7 (d, J = 5.8 Hz, 2H), 1.5 (s, 9H).

RMN ¹³C (100 MHz) CDCl₃ / TMS (δ-ppm): 178.9, 156.9, 155.4, 153.3, 149.2, 144.4, 138.3, 131.9, 130.0, 129.5, 129.2, 129.2, 129.0, 126.9, 126.1, 124.4, 123.9, 118.9, 115.8, 115.6, 84.2, 44.4, 28.0.

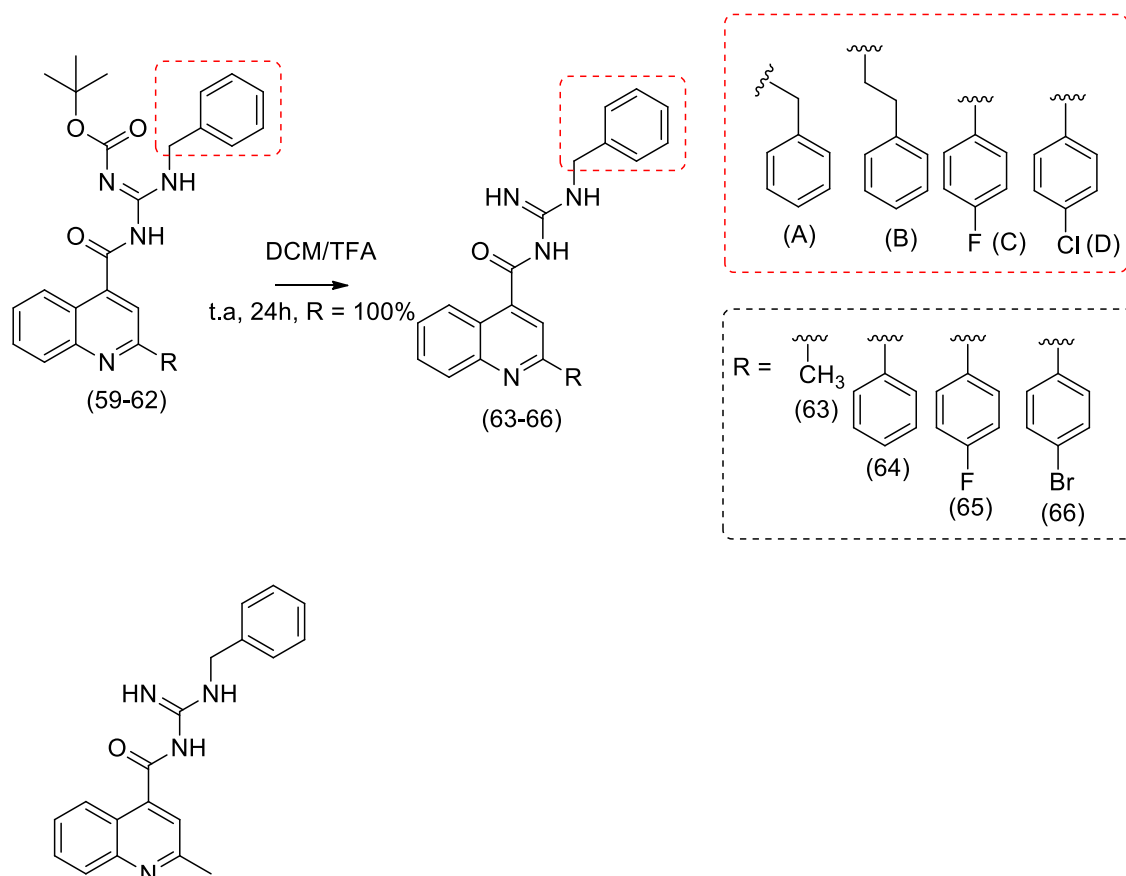
Acilguanidina 62D (R = 50%)

RMN ^1H (100 MHz) CDCl_3 / TMS (δ -ppm): 12.3 (s, 1H), 9.1 (s, 1H), 8.7 (d, J = 8.3 Hz, 1H), 8.25 (s, 1H), 8.1 (d, J = 8.5 Hz, 1H), 7.9 (d, J = 8.5 Hz, 2H), 7.7 (t, J = 7.6 Hz, 1H), 7.6 (d, J = 8.5 Hz, 2H), 7.5 (t, J = 7.2 Hz, 1H), 7.3 (d, J = 8.4 Hz, 2H), 7.2 (d, J = 8.4 Hz, 2H), 4.7 (d, J = 5.8 Hz, 2H), 1.5 (s, 9H).

RMN ^{13}C (100 MHz) CDCl_3 / TMS (δ -ppm): 179.1, 178.9, 157.0, 155.5, 153.4, 149.2, 144.4, 138.2, 135.8, 133.5, 131.9, 129.5, 129.0, 128.9, 128.8, 126.1, 124.4, 123.99, 118.9, 84.2, 44.5, 28.0.

3.1.6. Procedimento geral para obtenção das acilguanidinas desprotegidas.

A uma solução da acilguanidina protegida em diclorometano (5 ml) são adicionados 4 equivalentes de ácido trifluoracético (TFA). A mistura fica sob agitação à temperatura ambiente até o consumo total do reagente de partida (entre 24 e 48 horas). O produto é obtido em rendimento quantitativo evaporando-se a mistura reacional em pressão reduzida. (SANTOS et al., 2019)



Esquema 6: Procedimento geral para desproteção das acilguanidinas desprotegidas (63-66).

Acilguanidina desprotegida 63C

RMN ¹H (100 MHz) DMSO / TMS (δ-ppm): 9.6 (s, 1H), 9.1 (d, J = 45.0 Hz, 2H), 8.2 (d, J = 8.4 Hz, 1H), 8.0 (d, J = 8.4 Hz, 1H), 7.8 (t, J = 7.6 Hz, 1H), 7.8 (s, 1H), 7.7 (d, J = 7.3 Hz, 1H), 7.5 – 7.4 (m, 2H), 7.2 (t, J = 8.8 Hz, 3H), 4.6 (d, J = 6.0 Hz, 2H), 2.7 (s, 3H).

RMN ¹³C (100 MHz) DMSO / TMS (δ-ppm): 168.0, 158.9, 153.6, 131.2, 130.1, 128.4, 127.9, 125.3, 122.1, 121.5, 116.0, 115.8, 44.2, 24.7.

Acilguanidina desprotegida 64A

RMN ¹H (100 MHz) DMSO / TMS (δ-ppm): δ 9.6 (s, 1H), 9.2 (s, 1H), 9.1 (s, 1H), 8.4 (s, 1H), 8.3 (d, J = 7.3 Hz, 2H), 8.2 (d, J = 8.3 Hz, 1H), 8.2 (d, J = 8.4 Hz, 1H), 7.9 (t, J = 7.6 Hz, 1H), 7.7 (t, J = 7.6 Hz, 1H), 7.5 (dq, J = 14.2, 7.1 Hz, 3H), 7.5 – 7.4 (m, 4H), 7.3 (dd, J = 8.4, 5.7 Hz, 1H), 4.7 (d, J = 6.1 Hz, 2H).

RMN ¹³C (100 MHz) DMSO / TMS (δ-ppm): 167.7, 155.7, 153.1, 148.0, 139.1, 137.8, 135.7, 130.8, 130.3, 129.8, 129.0, 128.7, 128.0, 127.8, 127.4, 127.3, 124.8, 122.40, 118.0, 44.4.

Acilguanidina desprotegida 64B

RMN ¹H (100 MHz) DMSO / TMS (δ-ppm): 9.2 (t, J = 5.3 Hz, 1H), 9.1 (s, 1H), 8.9 (s, 1H), 8.4 (s, 1H), 8.3 (d, J = 7.2 Hz, 2H), 8.2 (t, J = 8.6 Hz, 2H), 7.9 (t, J = 7.7 Hz, 1H), 7.7 (t, J = 7.7 Hz, 1H), 7.5 (dq, J = 14.2, 7.0 Hz, 3H), 7.3 (d, J = 4.3 Hz, 4H), 7.2 (dd, J = 8.0, 4.3 Hz, 1H), 3.6 (dd, J = 14.2, 6.6 Hz, 2H), 2.9 (t, J = 7.5 Hz, 2H).

RMN ¹³C (100 MHz) DMSO / TMS (δ-ppm): 167.7, 155.7, 152.8, 148.0, 139.2, 137.9, 137.8, 130.8, 130.3, 129.8, 129.0, 128.9, 128.5, 128.0, 127.3, 126.7, 124.7, 122.3, 117.9, 42.6, 39.5, 33.6.

Acilguanidina desprotegida 64C

RMN ¹H (100 MHz) DMSO / TMS (δ-ppm): 12.4 (s, 1H), 9.7 (s, 1H), 9.1 (s, 2H), 8.4 (s, 1H), 8.3 (d, J = 7.3 Hz, 2H), 8.3 (d, J = 8.6 Hz, 1H), 8.2 (d, J = 8.4 Hz, 1H), 7.9 (t, J = 7.5 Hz, 1H), 7.7 (t, J = 7.5 Hz, 1H), 7.6 – 7.5 (m, 3H), 7.5 (dd, J = 7.8, 5.8 Hz, 2H), 7.2 (t, J = 8.8 Hz, 2H), 4.6 (d, J = 5.9 Hz, 2H).

RMN ¹³C (100 MHz) DMSO / TMS (δ-ppm): 168.2, 163.1, 161.2, 158.9, 156.2, 153.5, 148.4, 139.5, 138.2, 131.2, 130.7, 130.2, 130.1, 130.0, 129.4, 128.4, 127.7, 125.27, 122.8, 118.5, 116.0, 115.8, 44.1.

Acilguanidina desprotegida 64D

RMN ¹H (100 MHz) DMSO / TMS (δ-ppm): 9.5 (s, 1H), 9.2 (s, 1H), 8.8 (s, 1H), 8.3 (s, 1H), 8.2-8.1 (m, 4H), 7.9 (m, 1H), 7.7 (m, 1H), 7.6-7.5 (m, 3H), 7.4 (m, 4H), 4.6 (d, 2H).

Acilguanidina desprotegida 65A (PF = 183-185°C)

RMN ¹H (100 MHz) DMSO / TMS (δ-ppm): δ 9.9 (s, 1H), 9.2 (sl, 2H), 8.4 (s, 1H), 8.4 – 8.3 (m, 2H), 8.2 (d, J = 8.3 Hz, 1H), 8.1 (d, J = 8.4 Hz, 1H), 7.9 (t, J = 7.5 Hz, 1H), 7.7 (t, J = 7.5 Hz, 1H), 7.4 -7.3 (m, 7H), 4.7 (d, J = 5.5 Hz, 2H).

RMN ¹³C (100 MHz) DMSO / TMS (δ-ppm): 168.3, 164.9, 155.1, 153.7, 148.4, 139.5, 136.2, 134.8, 131.2, 130.1, 130.1, 130.0, 129.1, 128.4, 128.2, 127.8, 125.2, 122.7, 118.5, 116.4, 116.2, 44.8.

Acilguanidina desprotegida 65B (PF = 181-182°C)

RMN ¹H (100 MHz) DMSO / TMS (δ-ppm): δ 12.5 (s, 1H), 8.4 (s, 1H), 8.4 – 8.3 (m, 2H), 8.2 (d, J = 8.4 Hz, 1H), 8.1 (d, J = 8.4 Hz, 1H), 7.9 (t, J = 7.5 Hz, 1H), 7.7 (t, J = 7.5 Hz, 1H), 7.4 (t, J = 8.3 Hz, 2H), 7.3 (d, J = 12.8 Hz, 4H), 7.2 (s, 1H), 3.6 (d, J = 6.4 Hz, 2H), 2.9 (t, J = 7.2 Hz, 2H).

RMN ¹³C (100 MHz) DMSO / TMS (δ-ppm): δ 168.3, 164.9, 163.0, 155.1, 153.5, 148.3, 139.5, 138.3, 134.8, 131.2, 130.2, 130.1, 129.3, 128.9, 128.4, 127.0, 125.1, 122.7, 118.4, 116.4, 116.2, 43.0,

Acilguanidina desprotegida 66C

RMN ¹H (100 MHz) DMSO / TMS (δ-ppm): 9.7 (s, 1H), 9.1 (d, J = 23.0 Hz, 2H), 8.4 (s, 1H), 8.2 (d, J = 8.1 Hz, 3H), 8.2 (d, J = 8.3 Hz, 1H), 7.9 (t, J = 7.4 Hz, 1H), 7.8 (s, 2H), 7.7 (t, J = 7.5 Hz, 1H), 7.5 – 7.4 (m, 2H), 7.2 (t, J = 8.7 Hz, 2H), 4.6 (d, J = 5.9 Hz, 2H).

Acilguanidina desprotegida 66D

RMN ¹H (100 MHz) CDCl₃ / TMS (δ-ppm): 9.7 (s, 1H), 9.2 (s, 1H), 9.0 (s, 1H), 8.4 (s, 1H), 8.2 (d, J = 8.4 Hz, 3H), 8.2 (d, J = 8.4 Hz, 1H), 7.9 (t, J = 7.6 Hz, 1H), 7.8 (d, J = 8.5 Hz, 2H), 7.7 – 7.7 (m, 1H), 7.5 (dd, J = 18.3, 8.5 Hz, 4H), 4.6 (d, J = 6.1 Hz, 2H).

3.2. Avaliação Farmacológica *in vitro*

A atividade anticolinesterásica (AChE e BuChE) foi determinada de acordo com o método adaptado de Ellman (ELLMAN et al., 1961). Todas as soluções utilizadas nos ensaios foram preparadas em tampão tris-HCl 0,02 M (pH = 7,5) e as soluções estoque dos compostos foram preparadas em MeOH (20 μM). Em uma placa de 96 poços de fundo plano foram adicionadas soluções de tratamento com o composto inibidor em concentração final de 30μM. O controle veículo (MeOH - concentração final 0,15% v/v) foi utilizado como referência (controle negativo). Como controle positivo foi utilizado um composto de referência interno (AChE CI₅₀ = 0,606 μM; BuChE CI₅₀ = 2,625 μM). Foram adicionados ácido 5,5'-ditiobis-2- nitrobenzóico (DTNB) à acetilcolinesterase de enguia elétrica (EeAChE), ou à butirilcolinesterase isolada de soro equino (EqBChE), na presença de albumina sérica bovina (BSA). A absorbância foi registrada utilizando um leitor de placas iMark (Bio-Rad) equipado com um filtro de luz de = 415 nm e esta medida usada como uma referência em branco. Após incubação de 10 minutos à temperatura ambiente, iodeto de acetiltiocolina (ACTI ou iodeto de butirilcolina (BCTI) foi adicionado e a absorbância

foi registrada à temperatura ambiente a $\lambda = 415$ nm por 10 vezes com intervalos de 30 segundos a cada leitura. A atividade enzimática foi calculada como percentagem da média dos valores de absorbância medidos para o controle tratado com MeOH, descontada da média dos valores de referência em branco. Os ensaios foram realizados em triplicatas (para o cálculo do desvio-padrão). Os valores de inibição foram calculados com auxílio do programa Excel.

3.3. Estudos de Ancoramento Molecular com a BuChE

Para a realização do estudo de *docking* molecular entre os compostos da série de acilguanidinas e a enzima ecBuChE foi utilizado o modelo obtido por homologia disponível no banco de dados do Swiss-Model (<https://swissmodel.expasy.org/repository/uniprot/Q9N1N9>). A utilização de um modelo obtido por homologia é necessária pois só há disponível no Protein Data Bank dados referentes a butirilcolinesterase humana (hBuChE) e não da ecBuChE que foi utilizado nos ensaios enzimáticos de atividade biológica. O modelo por homologia foi obtido utilizando o template da enzima butirilcolinesterase humana (hBuCh2 – PDB ID 6I2T) (LEUNG et al., 2018) com identidade de sequência de 90,4%. (DE SOUZA et al., 2019; SANTOS et al., 2019)

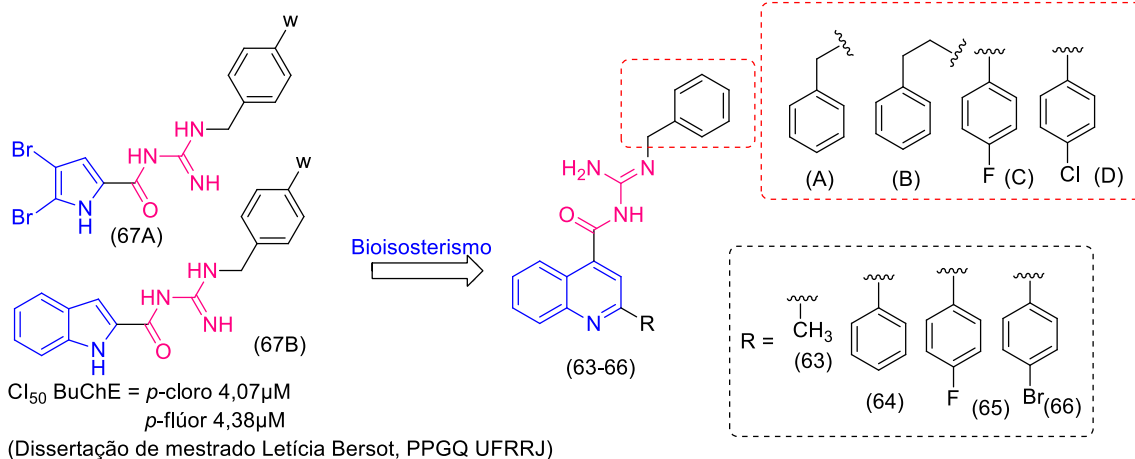
O estudo de *docking* molecular foi realizado utilizando o programa GOLD 5.6 (CCDC Software Ltd., Cambridge, UK) com a função GoldScore e os compostos a serem estudados foram previamente tratados, através da minimização de energia via método semiempírico PM6 (Spartan 14 V1.14 [Wavefunction, Inc]), considerando suas respectivas formas catiônicas, visto que em meio biológico (pH = 7,5), estes encontram-se protonados. Foi determinado um raio de exploração de 15Å em torno do átomo de oxigênio da cadeia lateral do resíduo de Ser226 e então os compostos foram ancorados para realização do *docking* molecular. (DE SOUZA et al., 2019; SANTOS et al., 2019)

4. RESULTADOS E DISCUSSÕES

O planejamento estrutural das novas acilguanidinas quinolinicas (**63-66**) se baseou nas acilguanidinas dibromopirrólicas (**67A**) e indólicas (**67B**) descritas previamente por nosso grupo de pesquisas, as quais se mostraram inibidores seletivos de BuChE. Nos novos derivados o farmacóforo acilguanidina foi mantido e, através do bioisosterismo, propomos a troca do heterociclo principal pelo núcleo quinolínico. Adicionalmente, para garantir a

variabilidade estrutural das séries propostas, foram explorados diferentes padrões de substituição na posição *dois* do núcleo quinolina (metil, fenil, *p*-bromofenil e *p*-fluorofenil) e no nitrogênio imínico da acilguanidina (benzil, fenetil, *p*-cloro-benzil e *p*-fluorbenzil) (Figura 17).(MATADA et al., 2021)(LIMA et al., 2012)

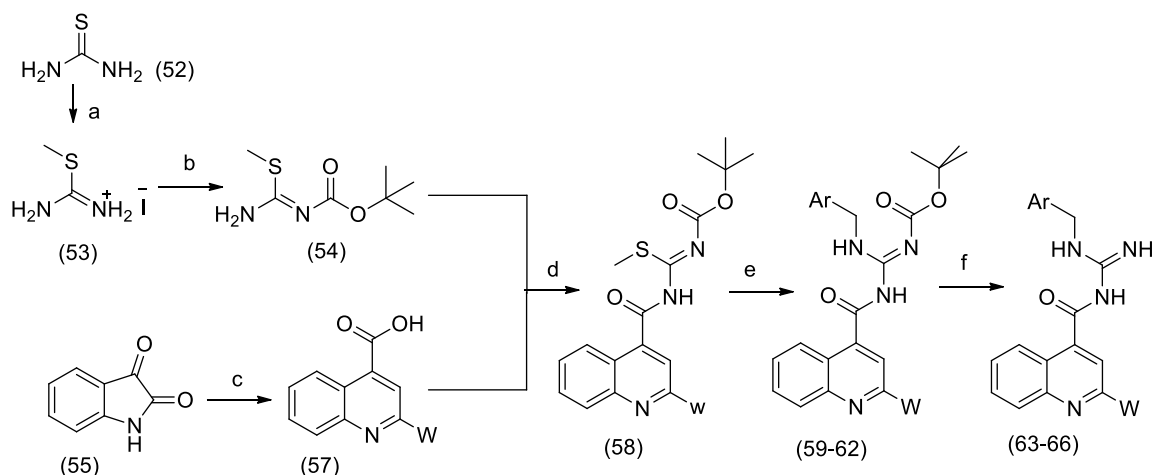
Cl₅₀ BuChE = benzil 3,7 μM / fenetil 2,8 μM
p-cloro 4,07μM / *p*-flúor 4,38μM
 (Tese de doutorado, Pala do N. Goulart, PPGQ UFRRJ)



Esquema 7- Relações estruturais entre os protótipos acilguanidínicos bromopirrólicos (**67A**) e indólicos (**67B**) e, os novos derivados quinolínicos planejados (**63-66-A-D**).

A estratégia sintética adotada se baseou em duas rotas lineares, de duas e uma etapa, respectivamente, que convergem para uma outra rota linear de três etapas. A primeira rota linear leva à síntese do agente guanilante (**54**), a partir do reagente comercial tiouréia (**52**). A primeira etapa desta rota consiste na metilação do enxofre da tiouréia (**52**) com iodeto de metila, uma reação de substituição nucleofílica de segunda ordem (S_N2) que leva à formação do sal da isometiltiouréia (**53**). A segunda etapa consiste na proteção de um dos nitrogênios da isometiltiouréia com anidrido-*Boc* (di-*tert*-butil-dicarbonato) para formação do primeiro bloco de construção, o agente guanilante isometiltiouréia-mono-*Boc* (**54**). Na segunda rota sintética linear os ácidos carboxílicos quinolínicos (**57a-d**) são formados a partir da isatina (**55**). Os ácidos carboxílicos quinolínicos (**57a-d**) reagem então com o agente guanilante (**54**), obtido anteriormente, convergindo para a formação dos intermediários-chave *tert*-butil ((metiltio)(quinolina-4-carboxamido)metileno)carbamatos (**58a-d**) em uma reação *one-pot* cuja primeira etapa é a formação do cloreto de ácido e posterior reação com a isometiltiouréia-mono-*boc*. De posse dos intermediários-chave (**58a-d**), as acilguanidinas planejadas podem ser obtidas em duas etapas, a primeira é a

reação dos intermediários-chave (**58a-d**) com as aminas de interesse e posterior reação de desproteção em meio ácido para remoção do grupo *Boc* (Esquema 7).



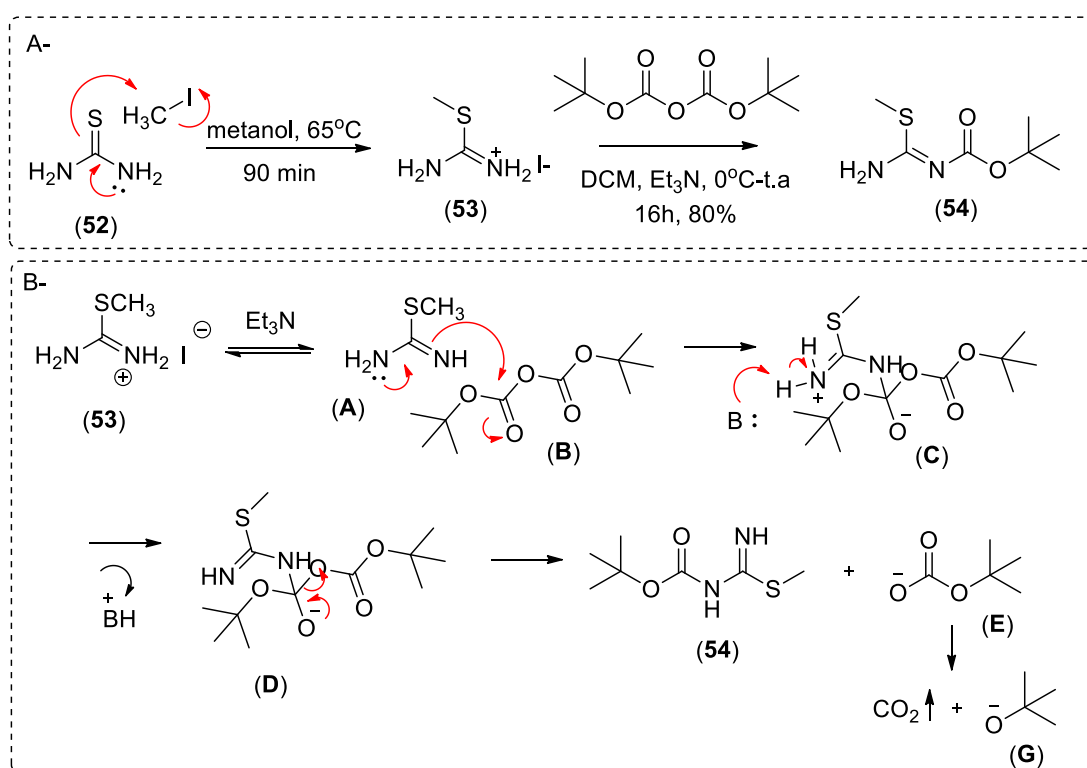
Esquema 8 - Proposta de rota sintética para obtenção dos compostos planejados. (Reagentes e condições a- CH_3I , MeOH, refluxo; b- Anidrido *boc*, Et_3N , DCM, t.a; c- Acetona ou acetofenonas, KOH, EtOH/ H_2O , 90°C ; d- 1-SOCl_2 , DMF, DCM, t.a/ 2-agente guanilante, Et_3N , DCM, t.a; e- amina, DCM, Et_3N , DIPEA, t.a; f-TFA/DCM, t.a.)

4.1. Síntese do Agente Guanilante

A síntese do agente guanilante (**54**) se iniciou com uma reação de metilação da tiouréia (**52**), com iodeto de metila em metanol, sob aquecimento, resultando na obtenção do sal isometiltiourônio (**53**) como um sólido de cor amarela ou branco com um rendimento de 90%. Essa reação segue o mecanismo de substituição nucleofílica bimolecular ($\text{S}_\text{N}2$), no qual o par de elétrons da ligação carbono-enxofre da tiouréia atacam o carbono eletrofílico do iodeto de metila. Como resultado, obtém-se o sal de iodo isometil tiourônio (Esquema 8A).

A segunda etapa é a reação de monoproteção do sal obtido anteriormente através de substituição nucleofílica acílica, na qual o par de elétrons livres de um dos nitrogênios da isometiltiouréia faz um ataque nucleofílico ao carbono carbonílico do anidrido *boc*, resultando na quebra da ligação $\text{C}=\text{O}$ e na formação de um intermediário tetraédrico. Posteriormente, ocorre a remoção de um hidrogênio do grupo amônio por uma base presente no meio, como a trietilamina. Devido à instabilidade do intermediário tetraédrico, ocorre a eliminação do íon carbonato, restabelecendo a ligação dupla e resultando na formação da 2-metil-isotioureia *N*-protegida (**54**). O carbonato de *tert*-butila liberado se decompõe em CO_2 (gás) e *tert*-butóxido (Esquema 8B).

Essa reação é realizada adicionando-se lentamente o anidrido *Boc* em diclorometano sobre um excesso do sal em um meio básico, sob banho de gelo. Esse procedimento garante a monoproteção e a obtenção do agente guanilante, que é um sólido branco com um rendimento de 83%. O mesmo foi caracterizado através de seus respectivos espectros de RMN¹H e DEPTQ, que mostram a presença dos hidrogênios da *terc*-butila do grupo *Boc* (1,51 ppm no RMN¹H e em 28,1 ppm no DEPTQ), da metila do enxofre (2,45ppm no RMN¹H e em 14 ppm no DEPTQ) e os sinais correspondentes ao carbono quaternário do grupo *terc*-butila e à carbonila, respectivamente, em 78,11 ppm e 160,98 ppm.

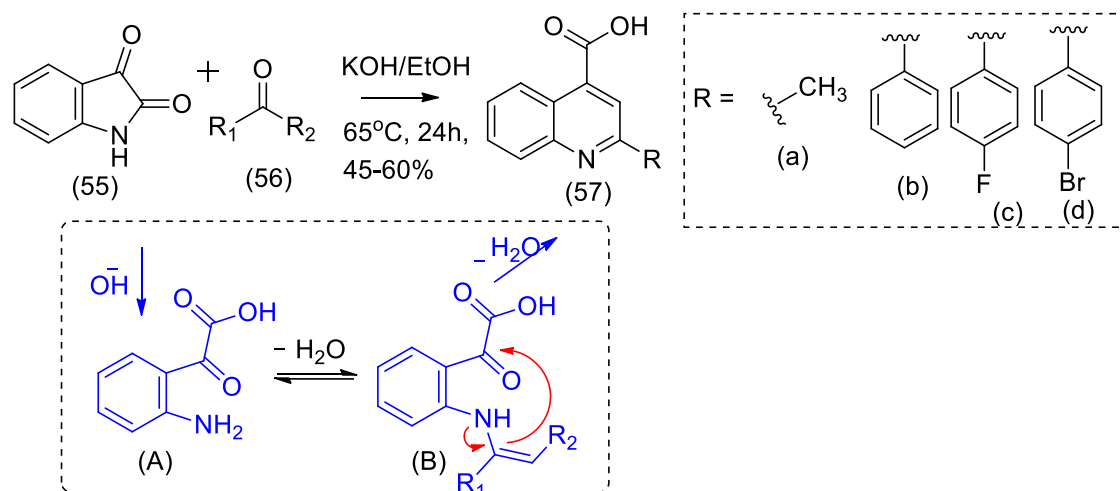


Esquema 9 - (A) Obtenção do agente guanilante (54) e (B) proposta de formação de intermediários nesta etapa sintética.

4.2. Síntese dos Intermediários Chave Quinolínicos

A primeira etapa para a obtenção dos intermediários chave quinolínicos (**58a-d**), necessários para a obtenção das acilguanidinas planejadas, se iniciou pela obtenção dos ácidos quinolínicos (**57a-d**) de interesse. Os ácidos foram obtidos a partir de reação da isatina (**55**) com diferentes cetonas na presença de hidróxido de potássio em etanol-água.

Esta reação é chamada de reação de Pfitzinger ou Pfitzinger-Borsche. Na reação da isatina (55) com hidróxido de potássio a amida é hidrolisada, o intermediário gerado reage com a cetona formando a enamina (B). Esta, por sua vez, cicliza e desidrata para gerar a quinolina de interesse (57a-d) em rendimento de 45-65% (LIAO et al., 2018). Os ácidos quinolínicos assim sintetizados foram caracterizados através de seus respectivos espectros de RMN¹H e DEPTQ. Os espectros de RMN¹H e DEPTQ do ácido carboxílico 2-fenilquinolínico (57b) estão mostrados nas figuras abaixo (Figura 17 e 18) como exemplo para a caracterização dos mesmos e os sinais observados nos ácidos carboxílicos sintetizados estão representados na figura 19.



Esquema 10- Síntese dos ácidos carboxílicos quinolínicos (57a-d).

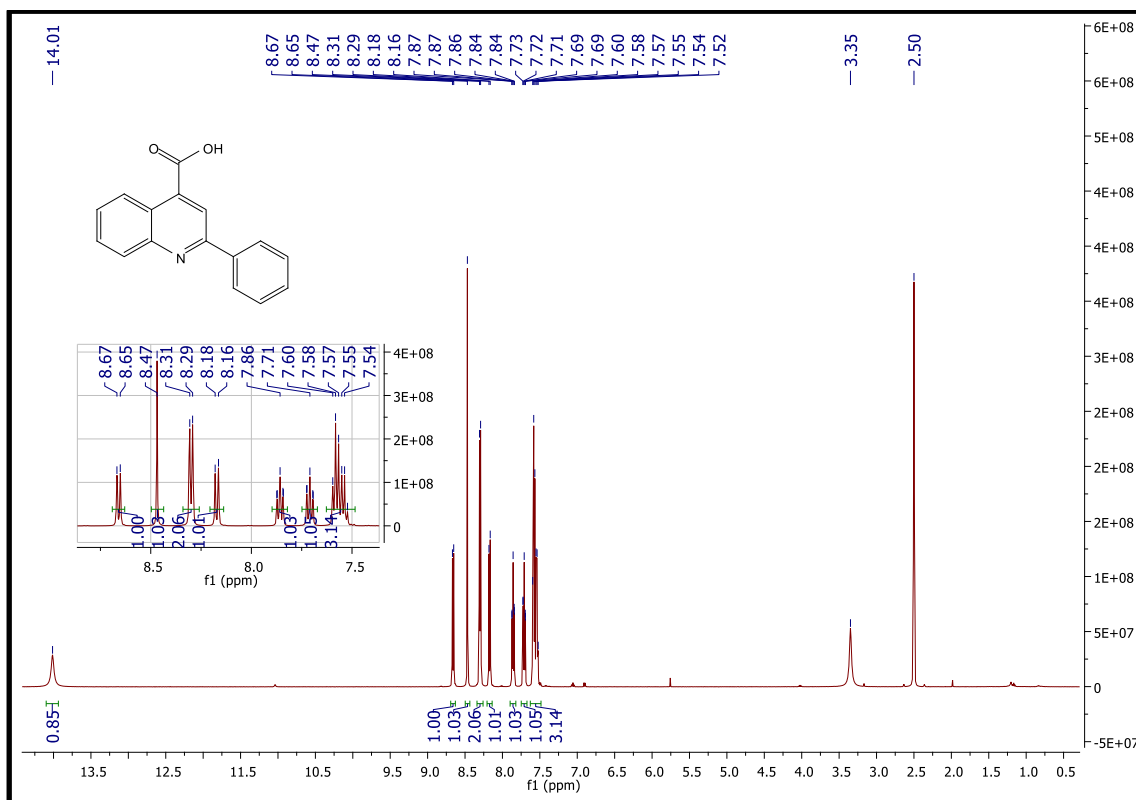


Figura 17. Espectro de RMN¹H do ácido carboxílico 2-fenilquinolínico (57b).

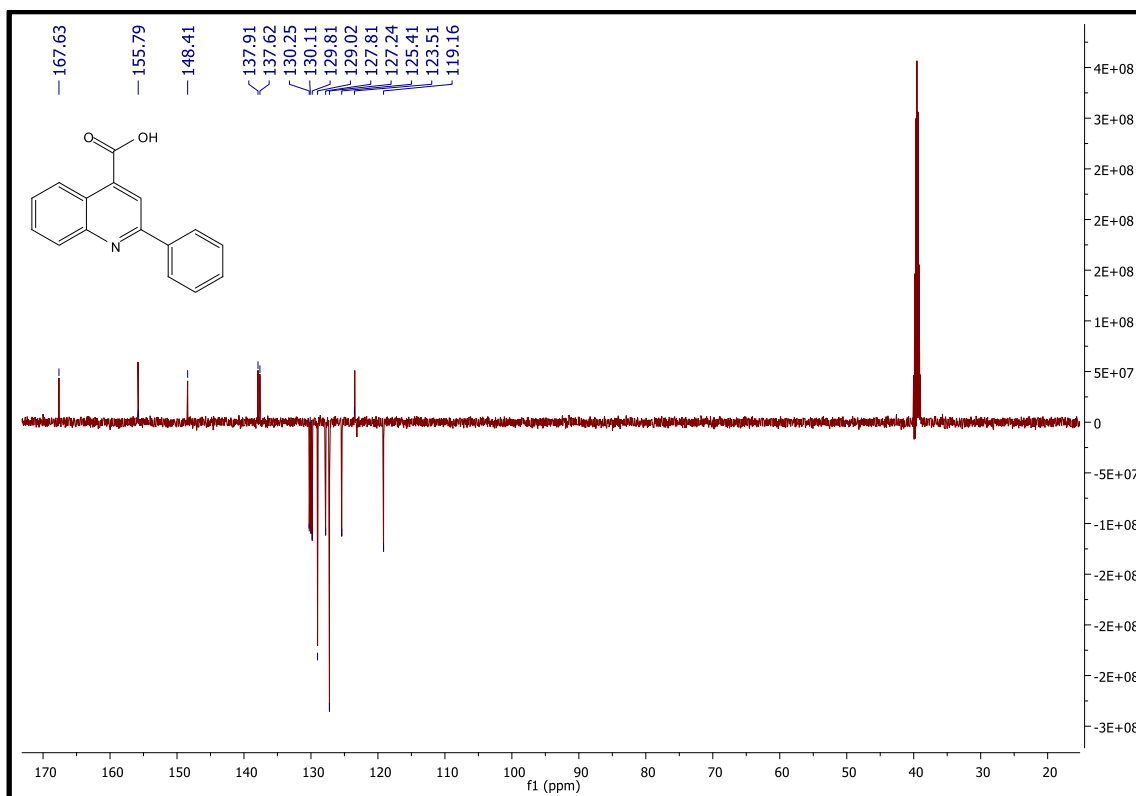


Figura 18. Espectro de DEPTQ do ácido carboxílico 2-fenilquinolínico (57b).

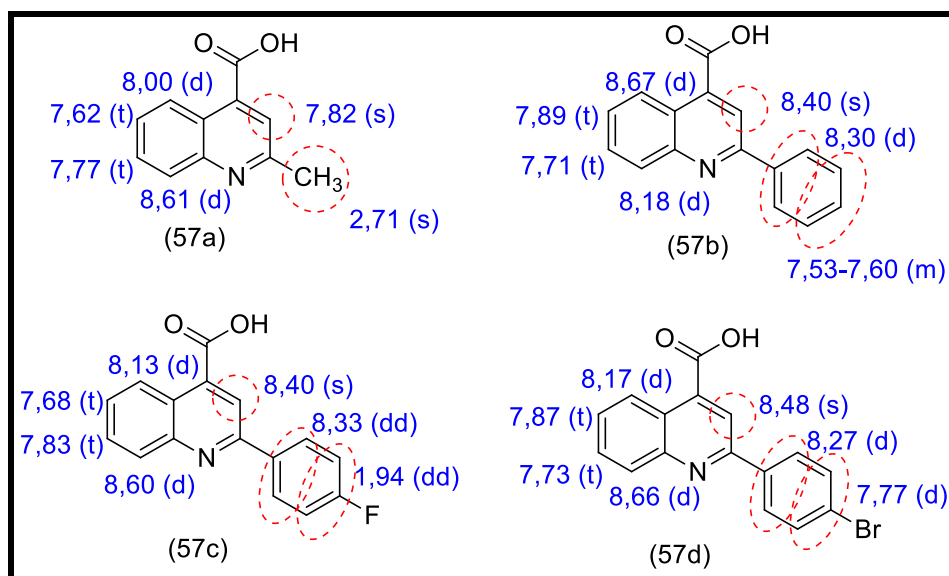
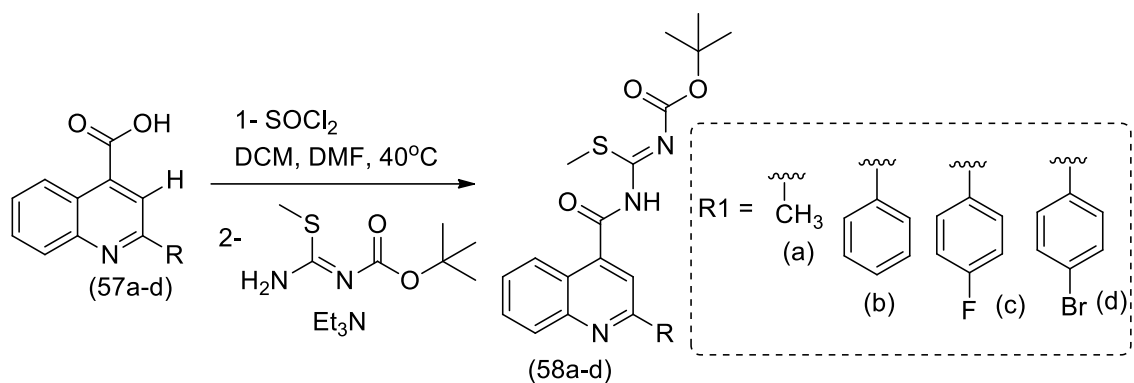
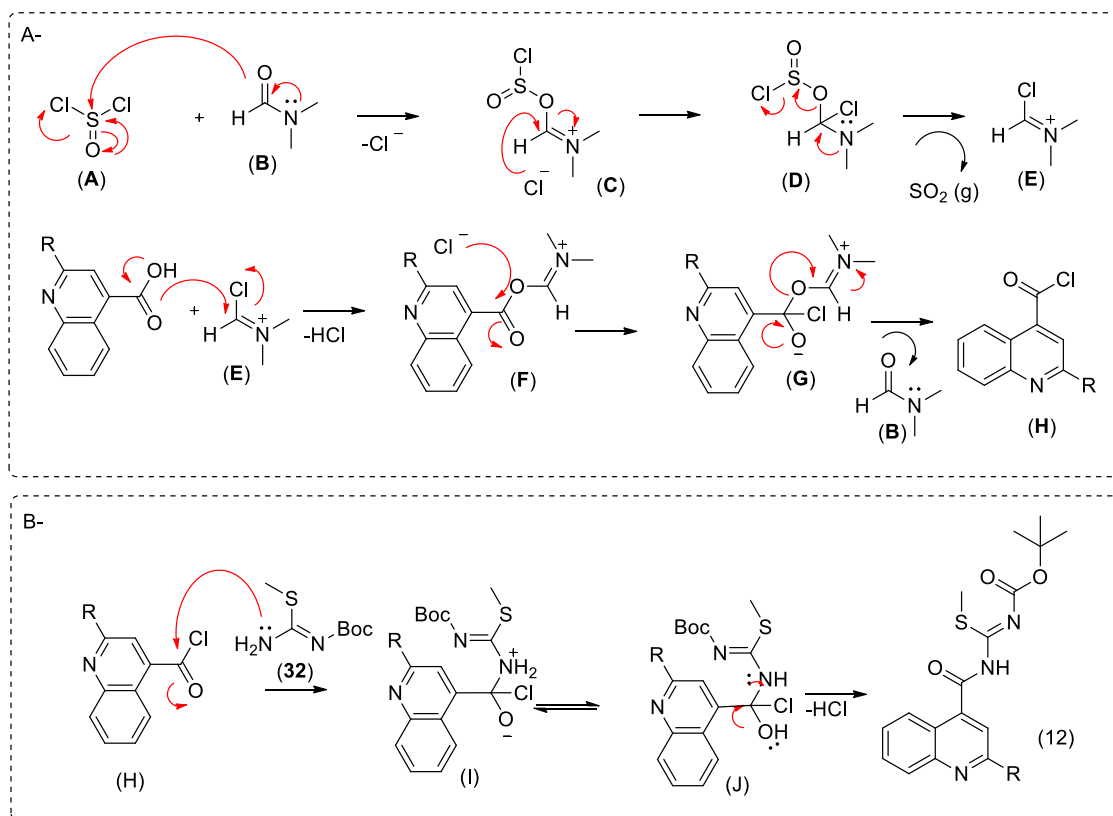


Figura 19. Principais sinais observados nos espectros de RMN^1H dos ácidos carboxílicos quinolínicos sintetizados (**57a-d**).

Os ácidos obtidos foram submetidos a reação com cloreto de tionila (SOCl_2) em diclorometano e DMF para a obtenção dos cloretos de ácido correspondentes e posterior reação com o intermediário isometiltiouréia monoprotetido (**54**) para fornecer os intermediários-chave de interesse (**58a-d**) (Esquema 10). Esta reação ocorre via a formação de um intermediário reativo conhecido como reagente de Vilsmeier (E), que atua como um eletrófilo e reage com o ácido carboxílico para formar o cloreto de ácido correspondente. Devido à sua alta reatividade, o cloreto de ácido formado reage com a amina (**54**) na presença de diclorometano e piridina (ou trietilamina). Essa reação ocorre por meio de uma substituição nucleofílica na carbonila, resultando na formação dos intermediários de interesse (**58a-d**) (Esquema 11). Após a evaporação do solvente, os intermediários foram submetidos à purificação utilizando a técnica de cromatografia líquida em coluna aberta e/ou recristalização em acetona, os rendimentos variaram entre 30-60%.



Esquema 11: Síntese dos intermediários-chave isometiltiouréias (**58a-d**)



Esquema 12: Esquema de intermediários proposto para a formação dos cloretos de ácido (**H**) e intermediários-chave (**58a-d**).

Os intermediários chave (**58a-d**) foram caracterizados por RMN^1H e DEPTQ. Tomando como exemplo o composto **58a**, no espectro de hidrogênio podemos observar a presença dos nove átomos de hidrogênio das metilas do grupo de proteção *Boc* como um único simpleto em 1,57 ppm, a metila do enxofre como um simpleto em 2,58 ppm, os dez hidrogênios dos núcleos aromáticos aparecem na região entre 7,48-8,88 ppm, entre eles o

CH da quinolina como um simpleto em 8,63 ppm, adicionalmente podemos observar NH da amida em 12,57 ppm (Figura 20). Os espectros dos demais intermediários-chave se diferenciam pela presença da metila (58a) do núcleo quinolínico em torno de 2,8 ppm ou dos dos hidrogênios das subunidades *p*-fluorofenila (58c) ou *p*-bromofenila (58d).

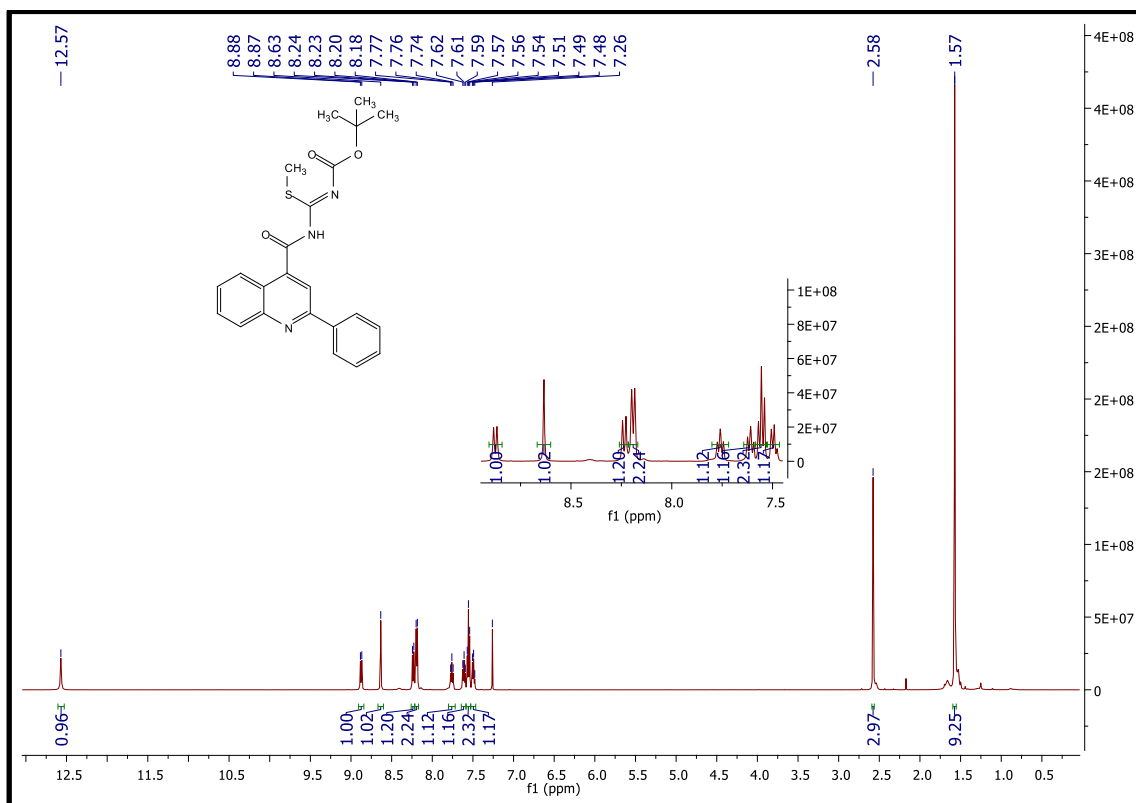


Figura 20- Espectro de RMN H^1 do intermediário chave **58a**.

O espectro de carbono (DEPTQ) (Figura 21) mostra o sinal das metilas da *tert*-butila (*Boc*) em 28,0 ppm, a metila do enxofre em 15,2 ppm, o carbono quaternário do grupo *tert*-butila em 84,1 ppm, os CH's aromáticos entre 156.8 e 120.7 ppm, além dos carbonos carbonílicos na região de 170 ppm.

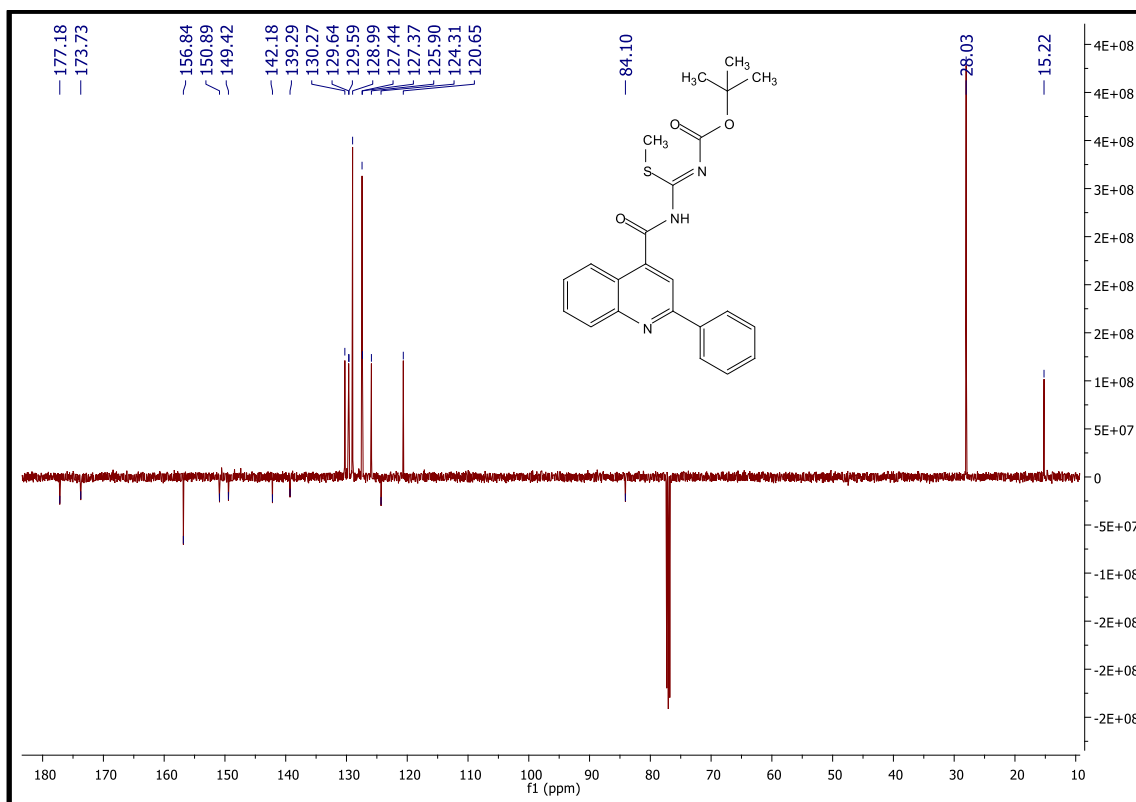
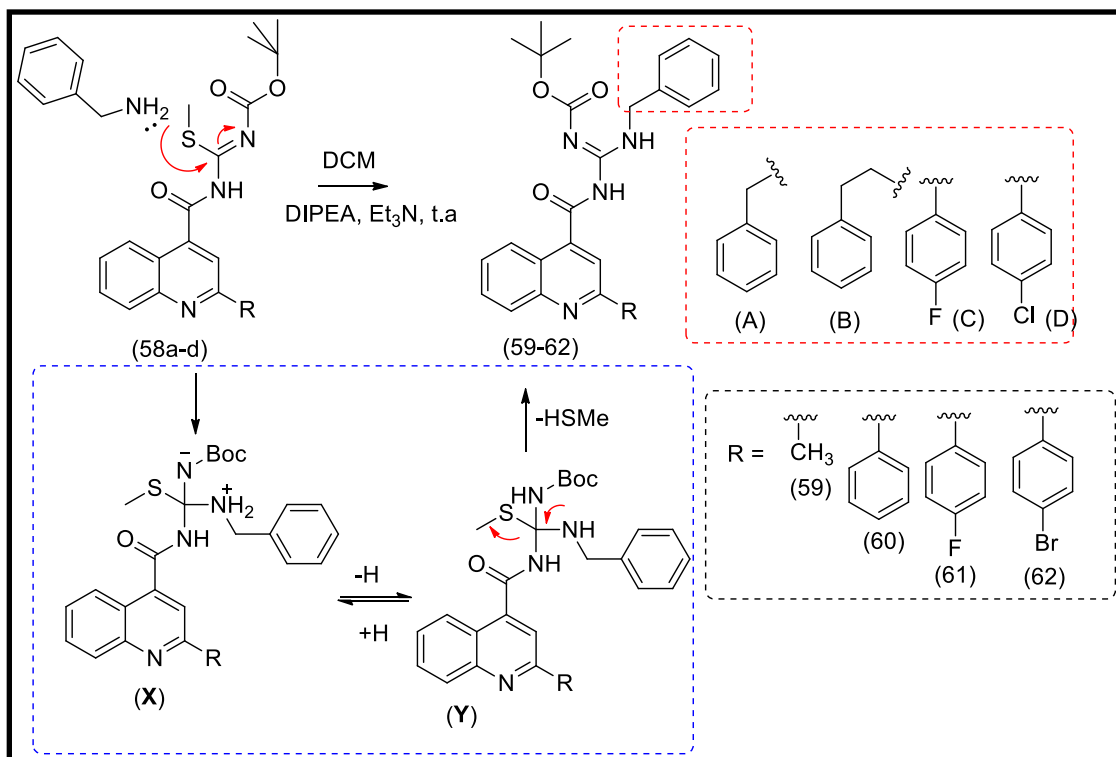


Figura 21- Espectro de RMN ^{13}C (DEPTQ) do intermediário-chave **58a**.

4.3. Síntese das acilguanidinas protegidas.

As acilguanidinas protegidas (**59-62A-D**) foram sintetizadas através da reação de condensação entre os intermediários **58a-d** com as benzilaminas (A, C, D) e fenetilamina (B) em diclorometano (CH_2Cl_2) e em meio básico, trietilamina (Et_3N) e diisopropiletilamina (DIPEA). Estas reações ocorrem através do ataque nucleofílico do nitrogênio da amina A-D (Esquema 10) ao carbono imínico eletrofílico do intermediário-chave (**58a-d**) formando um intermediário tetraédrico (X-Y) a partir do qual ocorre a restauração da dupla ligação imínica com a perda do grupo tiometila na forma de metanotiol (HSMe), de odor desagradável e característico perceptível ao longo da execução e isolamento das reações em questão (Esquema 13).



Esquema 13: Obtenção das acilguanidinas (59-62A-D)

As acilguanidinas (59-62A-D) foram caracterizadas através de seus espectros de RMN ¹H e DEPTQ. Esta classe de derivados tem como sinais de hidrogênio característicos as metilas do grupo de proteção *Boc*, que aparecem como um simpleto com integração de nove hidrogênios entre 1,5 ppm, os sinais de hidrogênio da amida em torno de 12 ppm, os hidrogênios ligados aos nitrogênios da função guanidina entre 8,5 e 9 ppm, e os metilenos espaçadores que separam o anel aromático e a função acilguanidina em torno de 4,8 ppm. Os sinais dos anéis aromáticos aparecem na região característica em torno de 7 ppm (Figura 22). Adicionalmente, é importante observarmos o desaparecimento do sinal correspondente à metila do grupo tiometila em 2,5 ppm, do intermediário chave anterior. No DEPTQ (Figura 23) observamos o sinal referente aos carbonos das metilas do grupo de proteção *Boc* em 28.1 ppm, o sinal do metileno espaçador em 45.2, o carbono quaternário do *Boc* em 83.9 ppm, além dos carbonos dos núcleos aromáticos entre 159 e 243ppm, além dos carbonos carbonílicos (179 e 157 ppm) e imínico (156 ppm).

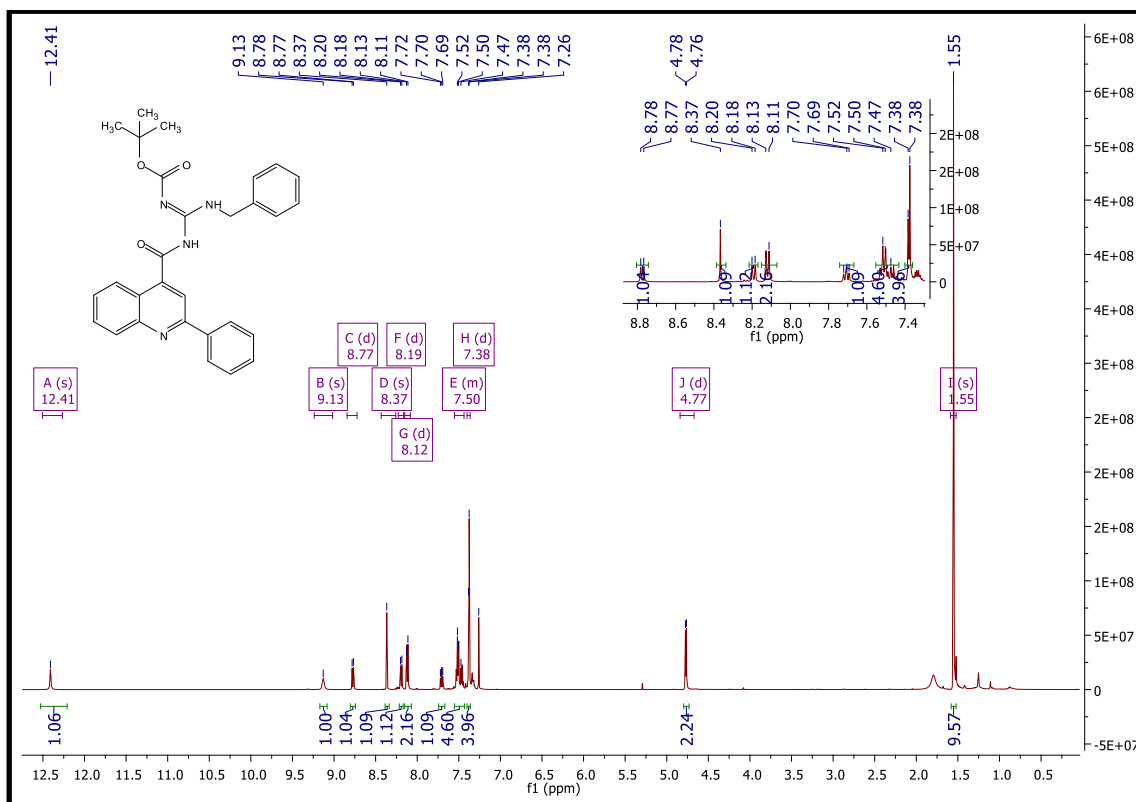


Figura 22- Espectro de RMN¹H da acilguanidina protegida **60A**

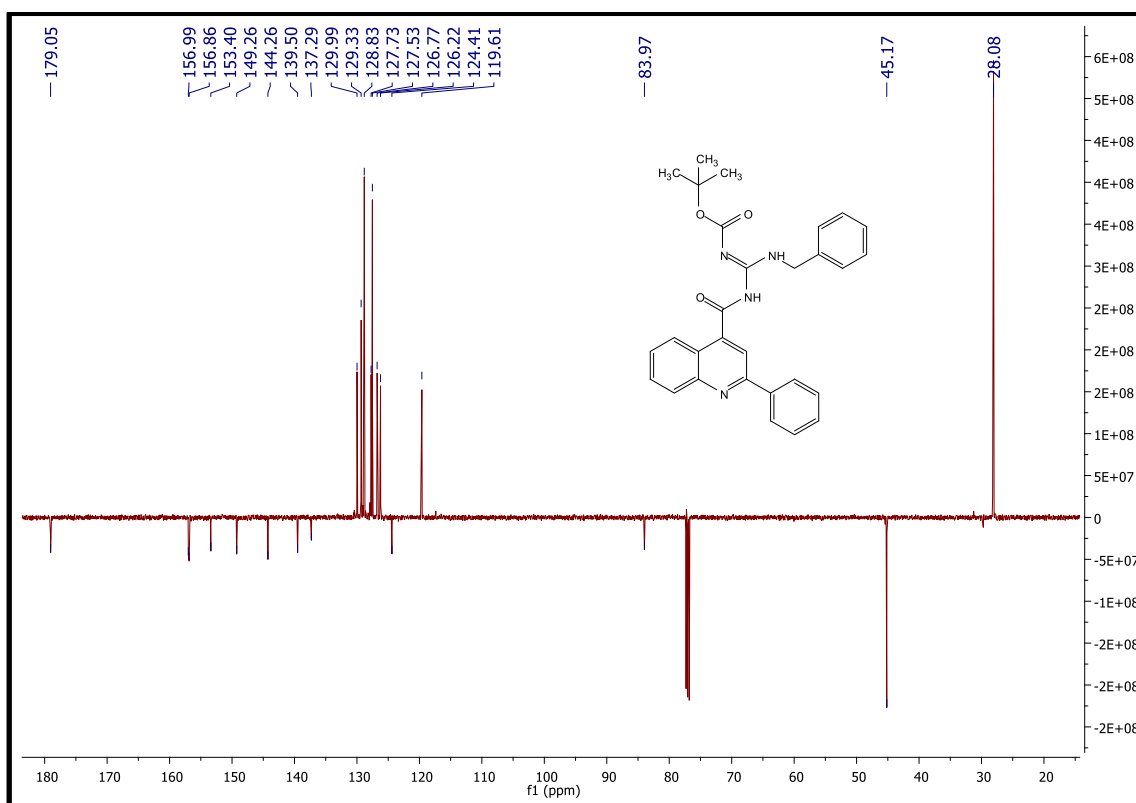
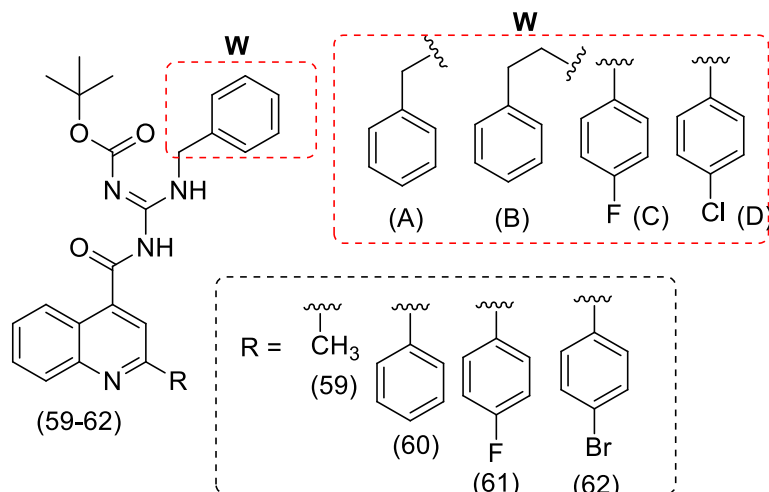


Figura 23- Espectro de DEPTQ da acilguanidina protegida **60A**

As acilguanininas protegidas (**59-62A-D**) foram obtidas como produtos sólidos em rendimentos que variaram de 50 a 97% e a Tabela 2 resume algumas características das mesmas.

Tabela 2: Acilguanidinas protegidas, rendimentos reacionais e características físicas.

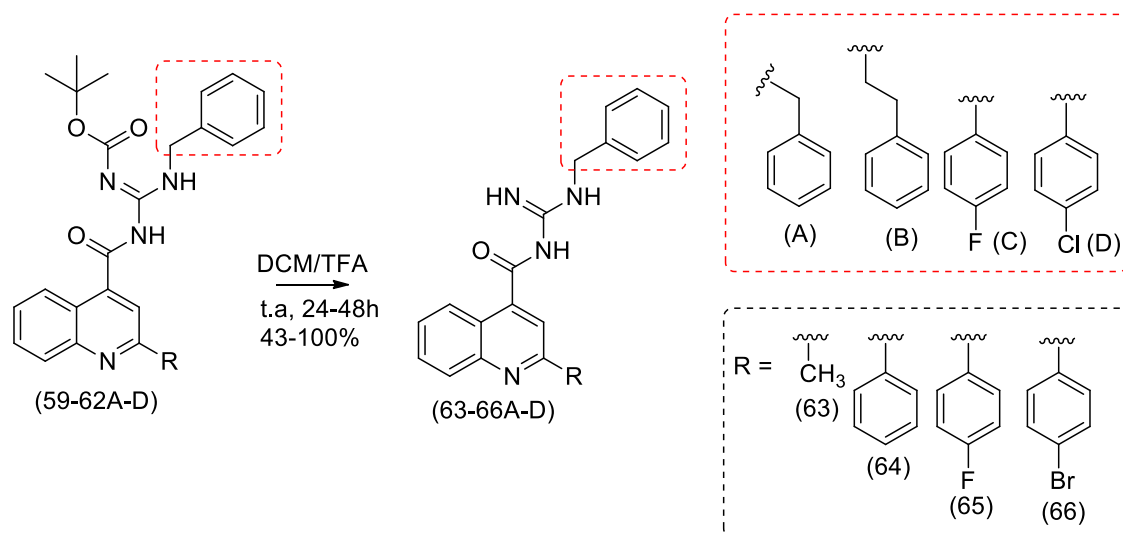


Derivado	R	W	R (%)	P.F. (°C)	Aspecto Físico
59C	<i>Metilquinolina</i>	<i>p</i> -flúor-benzil	48	97-98	Sólido castanho
59D	<i>Metilquinolina</i>	<i>p</i> -cloro-benzil	45	95-96	Sólido castanho
60A	<i>Fenil quinolina</i>	Benzil	60	-	Sólido castanho
60B	<i>Fenil quinolina</i>	Fenetil	65	131 - 132	Sólido castanho
60C	<i>Fenil quinolina</i>	<i>p</i> -flúor-benzil	76	153-154	Sólido castanho
60D	<i>Fenil quinolina</i>	<i>p</i> -cloro-benzil	88	-	Sólido castanho
61A	<i>p</i> -F-fenil quinolina	Benzil	92	143-144	Sólido branco
61B	<i>p</i> -F-fenil quinolina	Fenetil	97	145-146	Cristais amarelos
62C	<i>p</i> -Br-fenil quinolina	<i>p</i> -flúor-benzil	55	144-145	Sólido castanho
62D	<i>p</i> -Br-fenil quinolina	<i>p</i> -cloro-benzil	49	165-166	Sólido castanho

4.4. Síntese das acilguanidinas desprotegidas.

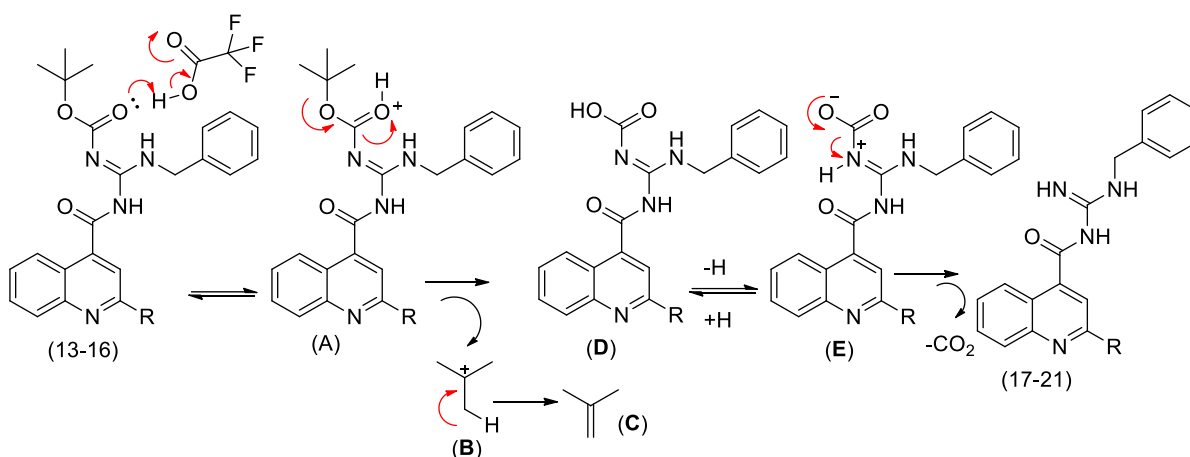
A última etapa da rota sintética consistiu na reação de retirada do grupo de proteção *Boc* em meio ácido para a obtenção das acilguanidinas desprotegidas correspondentes (**63-66A-D**) (Esquema 13). A reação foi realizada em ácido trifluoroacético (TFA) e diclorometano à temperatura ambiente durante 24- 48h, até a confirmação do consumo total da acilguanidina protegida de partida através das placas de cromatografia em camada fina analítica, levando à formação dos compostos finais desprotegidos como sólidos ou óleos

(Tabela 2), em rendimentos quantitativos, após uma etapa de isolamento consistindo apenas na remoção do TFA e do solvente utilizado sob vácuo.



Esquema 14- Síntese das acilguanidinas quinolínicas finais (**63-66A-D**)

A proposta de intermediários para esta reação está mostrada no esquema abaixo e, se inicia com a protonação do oxigênio da carbonila do grupo *Boc* e posterior rearranjo com a perda de 2-metilpropeno (C) e dióxido de carbono (CO_2) para a formação das acilguanidinas desprotegidas planejadas (**63-66A-D**) (Esquema 14).



Esquema 15: Esquema de intermediários proposto para a desproteção em meio ácido das acilguanidinas finais (**63-66A-D**).

Os principais sinais de hidrogênio que caracterizam as acilguanidinas desprotegidas são aqueles ligados aos nitrogênios guanidínicos, entre 9,7-9,1 ppm. Estes derivados também podem ser caracterizados pela presença dos sinais dos aromáticos entre 8,5-

Chemical structure: c1ccc(cc1)C2=NC3=CC=CC=C3C(=N2)C(=N)CNc4ccccc4

¹H NMR spectrum (DMSO-d₆) showing peaks from 4.69 to 9.69 ppm. The inset shows the aromatic region from 7.4 to 8.4 ppm.

Chemical shift (ppm): 9.69, 9.21, 9.10, 8.34, 8.32, 8.30, 8.29, 8.23, 8.21, 7.93, 7.92, 7.90, 7.77, 7.75, 7.74, 7.73, 7.63, 7.61, 7.60, 7.59, 7.57, 7.46, 7.45, 7.43, 7.39, 7.38, 7.37, 7.36, 4.69, 2.51.

Integration values: 0.91, 0.90, 0.96, 1.00, 1.95, 1.08, 1.00, 0.99, 0.99, 3.06, 3.83, 1.06, 1.87.

No espectro de DEPTQ da acilguanidina 64A (Figura 25), exemplificado abaixo, podemos observar a presença do carbono referente ao metileno espaçador em 44,4 ppm, além da ausência das metilas do grupo *Boc* que apareceriam em torno de 28 ppm, confirmando a desproteção, além dos carbonos dos aromáticos e os carbonos quaternários.

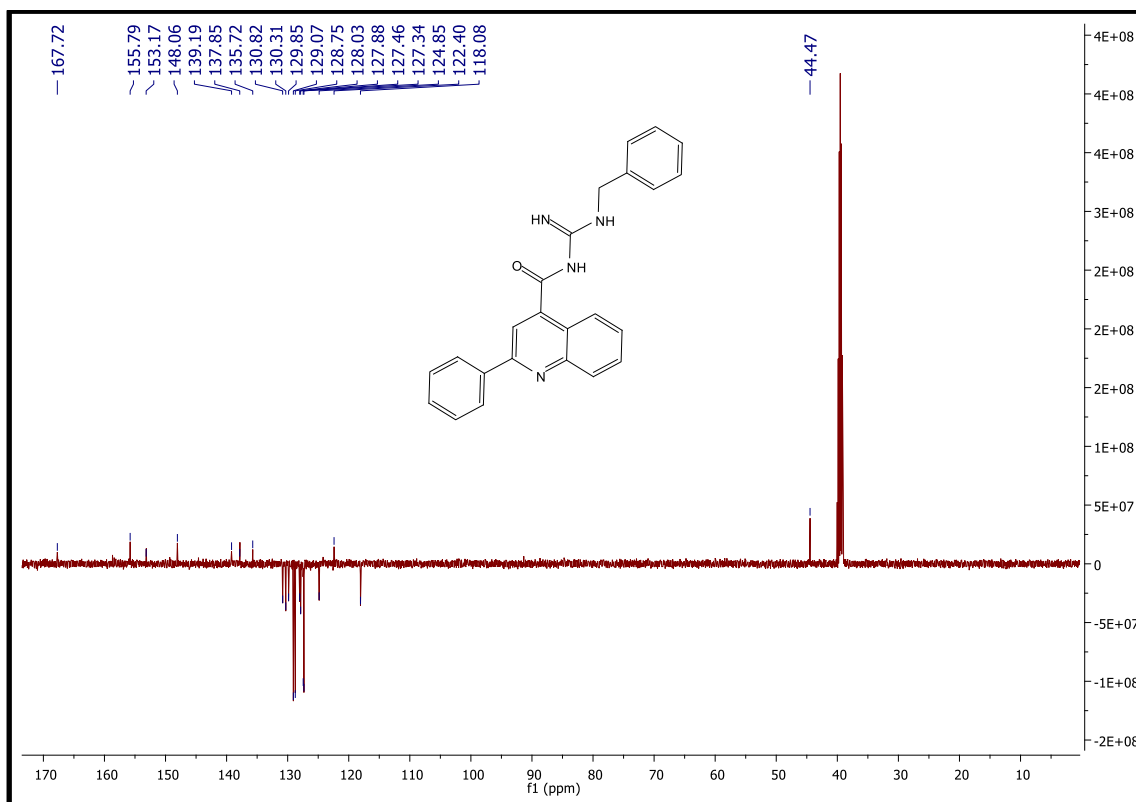
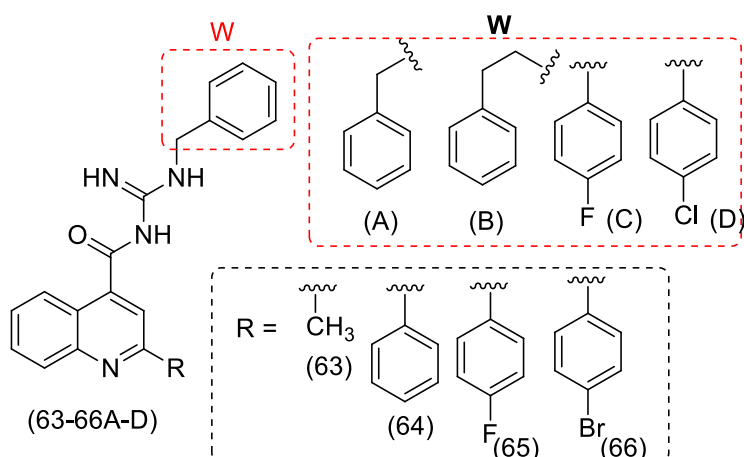


Figura 25- Espectro de DEPTQ da acilguanidina desprotegida **64A**.

A tabela abaixo resume as dez acilguanidinas desprotegidas sintetizadas, rendimentos reacionais e características físicas (Tabela 3).

Tabela 3: Acilguanidinas desprotegida sintetizadas (**63-66A-D**), rendimentos reacionais e características físicas.

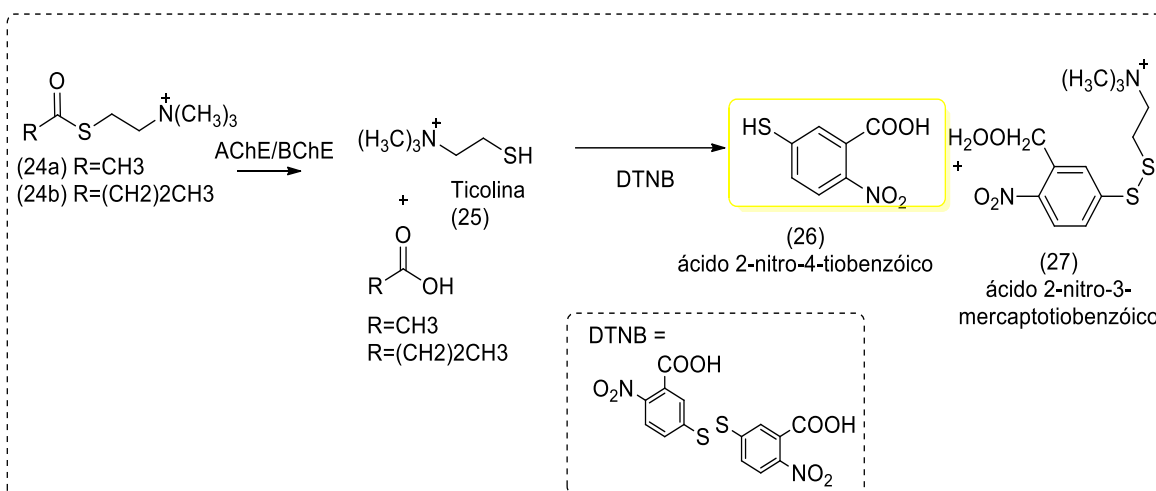


Derivado	R	W	R (%)	P.F. (°C)	Aspecto Físico
63C	<i>Metilquinolina</i>	<i>p</i> -flúor-benzil	100	-	Óleo castanho

63D	<i>Metilquinolina</i>	<i>p</i> -cloro-benzil	100	-	Óleo castanho
64A	<i>Fenil quinolina</i>	Benzil	100	-	Sólido castanho
64B	<i>Fenil quinolina</i>	Fenetil	100	-	Óleo castanho
64C	<i>Fenil quinolina</i>	<i>p</i> -flúor-benzil	100	120-121	Sólido castanho
64D	<i>Fenil quinolina</i>	<i>p</i> -cloro-benzil	100	-	Sólido castanho
65A	<i>p</i> -F-fenilquinolina	Benzil	100	183-185	Sólido amarelo
65B	<i>p</i> -F-fenilquinolina	Fenetil	100	181-182	Sólido amarelo
66C	<i>p</i> -Br-fenilquinolina	<i>p</i> -flúor-benzil	100	133-134	Sólido castanho
66D	<i>p</i> -Br-fenilquinolina	<i>p</i> -cloro-benzil	100	130-132	Sólido castanho

4.5. Ensaios *In Vitro*

De posse das acilguanidinas sintetizadas passamos para a etapa de avaliação *in vitro* das mesmas com relação à inibição das atividades das enzimas acetilcolinesterase (AChE) e butirilcolinesterase (BuChE). Inicialmente foi realizada uma triagem farmacológica dos compostos na concentração fixa de 30 μ M para avaliar o percentual de inibição das acilguanidinas sobre a atividade das enzimas AChE e BuChE através do método de Ellman. Esta metodologia consiste na clivagem enzimática da acetiltiocolina ou butiriltiocolina promovida pela AChE ou BChE, levando a formação de ácido acético ou butírico, respectivamente e tiocolina. Esta última é um marcador da atividade enzimática, que ao reagir com o Reagente de Ellman, o ácido 5,5-ditiobis(2-nitrobenzóico) (DTNB), leva a formação do ácido 2-nitro-4-tiobenzóico e do ácido 2-nitro-3-mercaptotiobenzóico. O produto ácido 2-nitro-4-tiobenzóico apresenta coloração amarela, a qual pode ser quantificada por medida da absorbância em um leitor de placas equipado com filtro de luz a $\lambda = 415$ nm. Desta forma, a atividade da enzima é medida de maneira indireta por meio da reação do produto de clivagem enzimática com um reagente pró-cromofórico (Esquema 16).



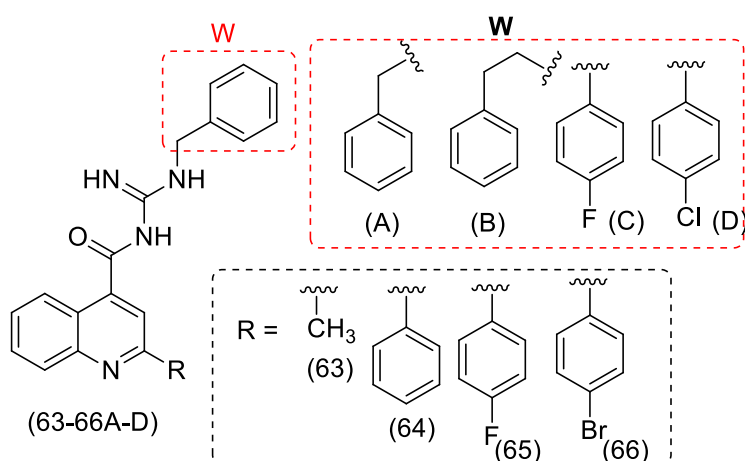
Esquema 16- Reações envolvidas no ensaio de Ellman.

As acilguanidinas 2-fenil-quinolínicas protegidas (**60A-D**) foram testadas para atividade anti-AChE e anti-BuChE na concentração de triagem (30 μ M) e demonstraram resultados de inibição inferiores a 50%, sugerindo, de maneira geral, que a presença do grupo *Boc* não favorece a inibição dessas enzimas. Trabalhos anteriores de nosso grupo de pesquisa, com acilguanidínicas bromopirrólicas e indólicas (resultados ainda não publicados) já haviam demonstrado que as acilguanidinas protegidas não inibem de forma significativa as enzimas AChE e BuChE, mostrando que o grupo acilguanidínico desprotegido é um importante grupo farmacofórico para interação principalmente com a BuChE. Logo, esses resultados estão de acordo com o que era esperado para esta série e, desta forma optamos por seguimos com a triagem farmacológica somente para os derivados acilguanidínicos desprotegidos (**63-66A-D**).

As acilguanidinas quinolínicas desprotegidas (**63-66A-D**) foram então submetidas à triagem farmacológica e todas se mostraram inibidores fracos de AChE, com inibição inferior a 40% na concentração teste utilizada, o que também corrobora resultados prévios obtidos pelo nosso grupo com acilguanidinas bromopirrólicas e indólicas. Com relação a atividade anti-BuChE as acilguanidinas 2-fenil-quinolínicas desprotegidas (**64A-D**) foram capazes de inibir em torno de 70% a atividade BuChE na concentração de triagem utilizada (30 μ M) e a para-f-fenilquinolina (65A) inibira 58% da atividade da BuChE (Tabela 4). As demais acilguanidinas desprotegidas (**63D-C-65B-66-A-D**) não inibiram de forma satisfatória a atividade BuChE na concentração testada.

Passando então para a determinação das potências de inibição da atividade BuChE dos derivados da série 2-fenil-quinolínica (64A-D) e do composto (65A) da série para-fenilquinolina. Os valores de CI₅₀ determinados variaram entre 7 e 12 μ M, com destaque para o composto 64B que apresentou um CI₅₀ de 7,14 μ M. Observa-se que os derivados 64A-D e 65A têm seletividade pela inibição da BuChE em detrimento da AChE, validando nosso planejamento estrutural. Quando comparados os compostos 65A e 65B, percebe-se que a substituição na acilguanidina com um grupo benzil é mais eficaz que com um grupo fenetil para a inibição da butirilcolinesterase. Além disso, um substituinte maior como o bromo interferiu na inibição da butirilcolinesterase, ao contrário do flúor, sugerindo que átomos maiores podem interferir negativamente na inibição enzimática. Vale ressaltar também a importância da presença do anel benzeno para a inibição, pois na série metilada não houve inibição significativa. Adicionalmente, esses resultados corroboram dados anteriores do nosso grupo de pesquisa que já haviam demonstrado que, além da acilguanidina desprotegida ser essencial para a atividade observada, a presença de flúor ou cloro na posição para resulta em melhor potência de inibição da BuChE.

Tabela 4: Atividade anticolinesterásica dos derivados acilguanidínicos desprotegida (**63-66A-D**). (Triagem in vitro realizada na concentração de 30 μ M).



Derivado	W	% de inibição AChE	CI ₅₀ (μ M)	% de inibição BuChE	CI ₅₀ (μ M)
63D	<i>p</i> -cloro-benzil	7,5	-	20,0	-
63C	<i>p</i> -flúor-benzil	29,1	-	18,4	-

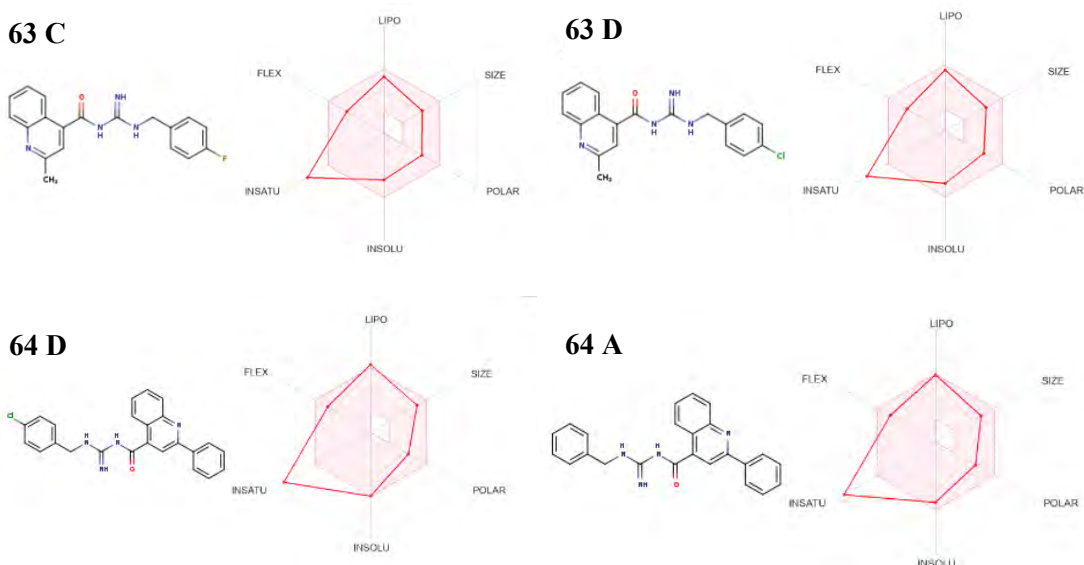
64A	benzil	9,1	-	77,6	10,08 ± 0,59
64B	fenetil	9,5	-	73,4	12,66 ± 0,62
64C	<i>p</i> -flúor-benzil	15,7	-	78,6	7,14 ± 0,38
64D	<i>p</i> -cloro-benzil	37,5	-	70,8	11,10 ± 0,51
65A	benzil	- 21,5	-	58,4	8,56 ± 0,39
65B	fenetil	- 17,5	-	44,1	-
66D	<i>p</i> -cloro-benzil	11,2	-	19,5	-
66C	<i>p</i> -flúor-benzil	15,3	-	36,3	-
Padrão	-	84,4	0,606	90,8	2,62

4.6. Estudo *in silico* das propriedades ADME dos novos derivados.

As propriedades físico-químicas das moléculas influenciam diretamente na sua ação biológica, por isso são também chamadas de propriedades biofarmacêuticas. Como exemplos de tais propriedades podemos citar a solubilidade, coeficientes de partição óleo/água, difusividade, grau de ionização, polimorfismo, etc. Estas propriedades são determinadas pela estrutura química das moléculas e vão influenciar as fases farmacêutica (dissolução) e farmacocinética (ADME), repercutindo diretamente na sua biodisponibilidade e no tempo de meia-vida do fármaco. Essas “propriedades químicas” são também conhecidas como *drug likeness* da micromolécula, ou seja, propriedades estruturais que produzem um perfil farmacocinético e toxicológico aceitáveis. A avaliação precoce das propriedades farmacocinéticas e físico-químicas de candidatos a protótipos é cada vez mais comum e baseia-se em propriedades moleculares, como polaridade (área de superfície polar (PSA)), número de anéis aromáticos, número de átomos pesados, lipofilicidade, massa molecular, número de centros quirais, número de doadores e aceptores de ligações de hidrogênio, e número de ligações rotacionáveis. Adicionalmente, também incluem propriedades como estabilidade metabólica, permeabilidade, transportadores, solubilidade, farmacocinética de base fisiológica e modelagem farmacocinética/farmacodinâmica. Neste contexto, com o objetivo de avaliarmos a *drugability*, farmacoabilidade, ou a *druglikeness*, das acilguanidinas planejadas e sintetizadas, as propriedades farmacocinéticas (ADME) foram avaliadas *in silico*. Utilizamos o SwissADME (<http://www.swissadme.ch>), uma ferramenta gratuita da internet que permite avaliar parâmetros farmacocinéticos de pequenas moléculas. São avaliados parâmetros como área de superfície polar topológica (TPSA), log P,

solubilidade, absorção intestinal humana (HIA), permeação da barreira hematoencefálica (BBB), etc. (Daina, Michielin e Zoete, 2017)

Analizando o perfil ADME (Tabela 5) para as acilguanidinas desprotegidas observamos que os resultados sugerem que todas devem ter biodisponibilidade oral, com a maioria dos parâmetros avaliados as colocando dentro da faixa rosa, faixa ótima, do radar de biodisponibilidade. Para exemplificar podemos observar os radares de biodisponibilidade para os derivados da série 2-fenil-quinolinas **64A-D** (Figura 26). O valor de TPSA calculado pelo SwissADME é o mesmo para todos os compostos, 77,87Å². Os valores de LogP variaram entre 3,20 e 5,05, com os derivados da série *p*-bromo-fenil-quinolínica sendo os mais lipofílicos devido à presença do átomo de bromo. Por esse motivo o derivado **66D** apresenta uma violação no seu perfil *druglikeness* para a regra dos cinco de Lipinski e Muegge (LogP>5). Todos os derivados são preditos com boa absorção gastrointestinal, nenhum é substrato para a proteína de efluxo do sistema nervoso central, glicoproteína P, e somente os derivados da série 2-metil-quinolina são preditos com possibilidade de atravessarem a barreira hematoencefálica (BHE) pelo modelo *BOILED-Egg* (Figura 27), o que é altamente desejável para candidatos a protótipos de fármacos para doenças que afetam o SNC. Adicionalmente a maioria dos derivados sintetizados apresentam bom perfil *druglikeness* de acordo com as regras de Lipinski, Veber e Egan.



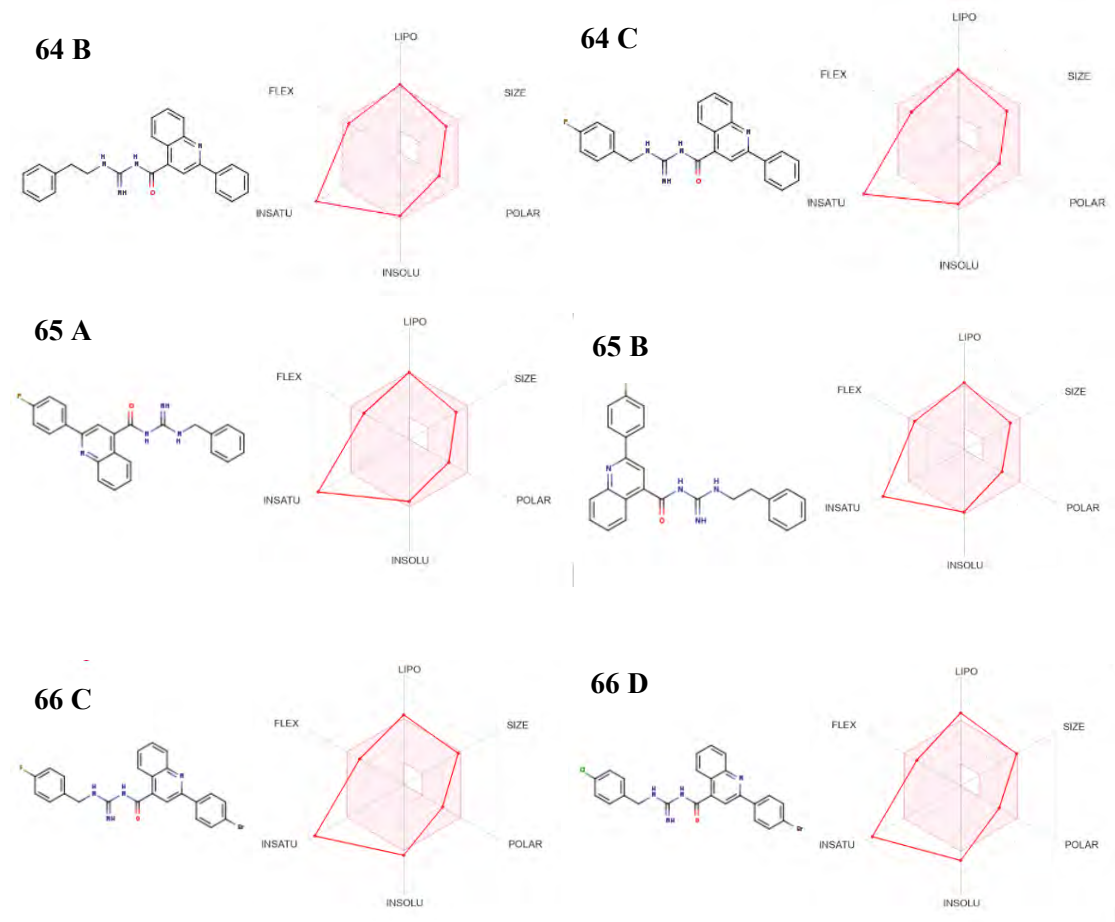
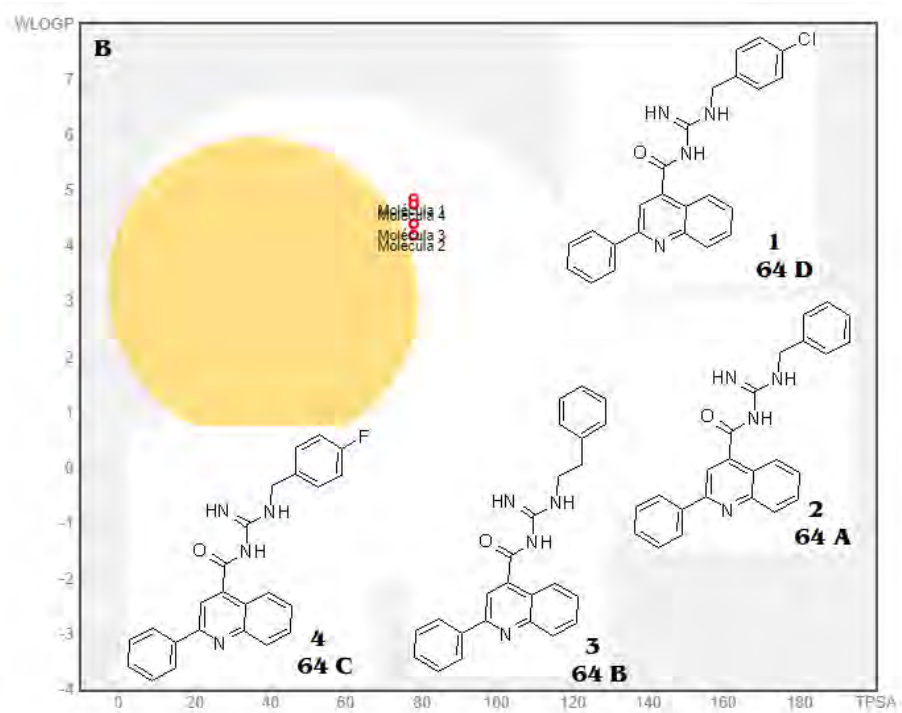
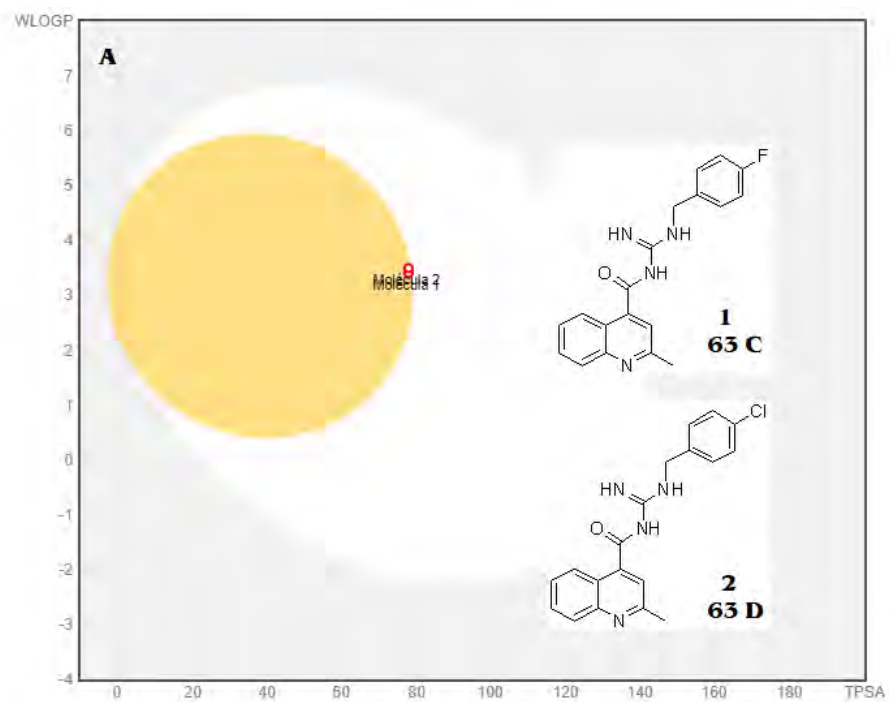


Figura 26: Radar de biodisponibilidade das acilguanidinas desprotegidas.



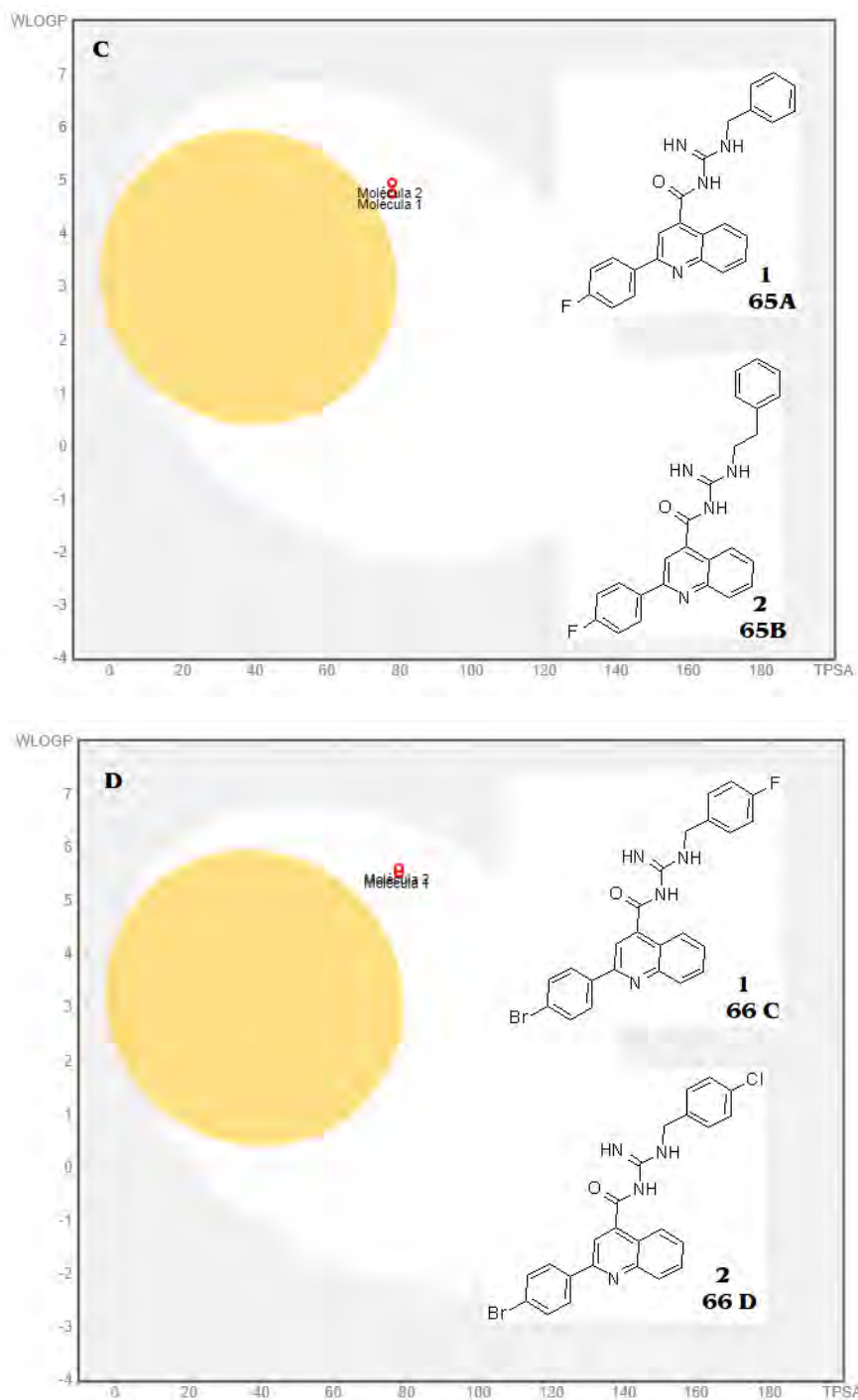


Figura 27: A- Modelo BOILED-Egg para as acilguanidinas 63C (molécula 1), 63D (molécula 2). B- Modelo BOILED-Egg para as acilguanidina desprotegidas 64D (molécula 1), 64A (molécula 2), 64B (molécula 3) e 64C (molécula 4). C - Modelo BOILED-Egg para as acilguanidina desprotegidas 65A (molécula 1), 65B (molécula 2). D- Modelo BOILED-Egg para as acilguanidina desprotegidas 66C (molécula 1) e 66D (molécula 2). Área branca: absorção gastrointestinal; Área amarela: absorção gastrointestinal e penetração na barreira hemato-encefálica.

Tabela 5: Propriedades farmacocinéticas das acilguanidinas quinolínicas sintetizadas.

Composto	logP	Absorção GI	Penetração BHE	Veber	Lipinski
63C	3,48	sim	sim	sim	sim
63D	3,20	sim	sim	sim	sim
64A	3,85	sim	não	sim	sim
64B	4,25	sim	não	sim	sim
64C	4,49	sim	não	sim	sim
64D	4,25	sim	não	sim	sim
65A	4,18	sim	não	sim	sim
65B	4,48	sim	não	sim	sim
66C	5,05	sim	não	sim	não
66D	4,73	sim	não	sim	não

4.7. Estudo de interação enzimática *in silico* dos análogos acilguanidínicos

As acilguanidinas 2-fenilquinolínicas (**64A-D**), identificadas como inibidoras seletivos de BuChE, foram submetidas a estudo de ancoramento molecular com a enzima-alvo a fim de compreendermos o possível modo de interação desta classe de derivados com a enzima. O ancoramento molecular com a BuChE mostrou que as acilguanidinas desprotegida (**64A-D**), de forma geral, interagem dentro da cavidade do sítio ativo (Figura 28) através de algumas interações principais com os resíduos de aminoácidos Aspartato98, Treonina 148, Serina226, Triptofano 259 e Tirosina360, mostrando que há um padrão de encaixe. Podemos observar que o par de elétrons do nitrogênio do anel quinolínico interage através de ligação hidrogênio da Serina 226, a guanidina protonada interage com os resíduos de aspartato 98 e Treonina 148, o NH da benzilamina interage com a Tirosina 360

e a fenila ligada diretamente à quinolina faz interação de empilhamento do tipo T com o resíduo de triptofano 259 (Figura 29). Essas descobertas evidenciam a especificidade e a eficácia dessas acilguanidinas como inibidores da BuChE, proporcionando insights valiosos para o desenvolvimento de novas terapias.

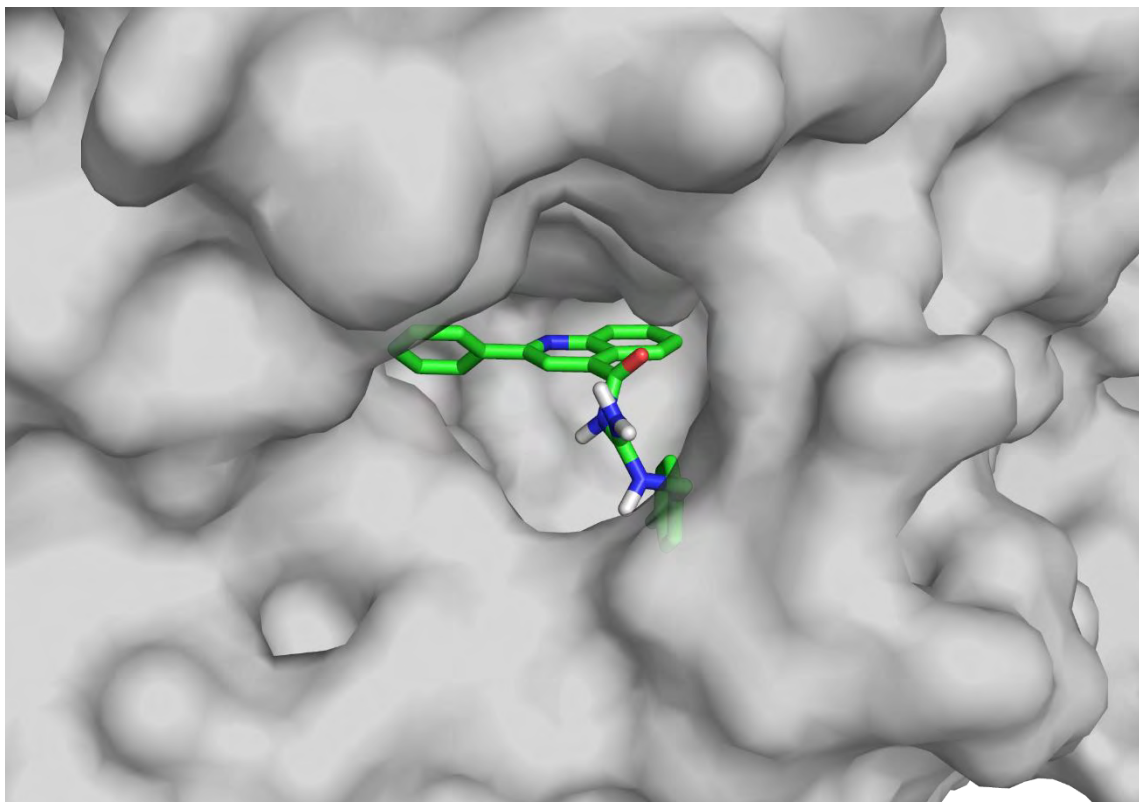


Figura 28: Imagem de *docking* mostrando uma acilguanidinas desprotegida (64) interagindo dentro da cavidade do sítio ativo da BuChE

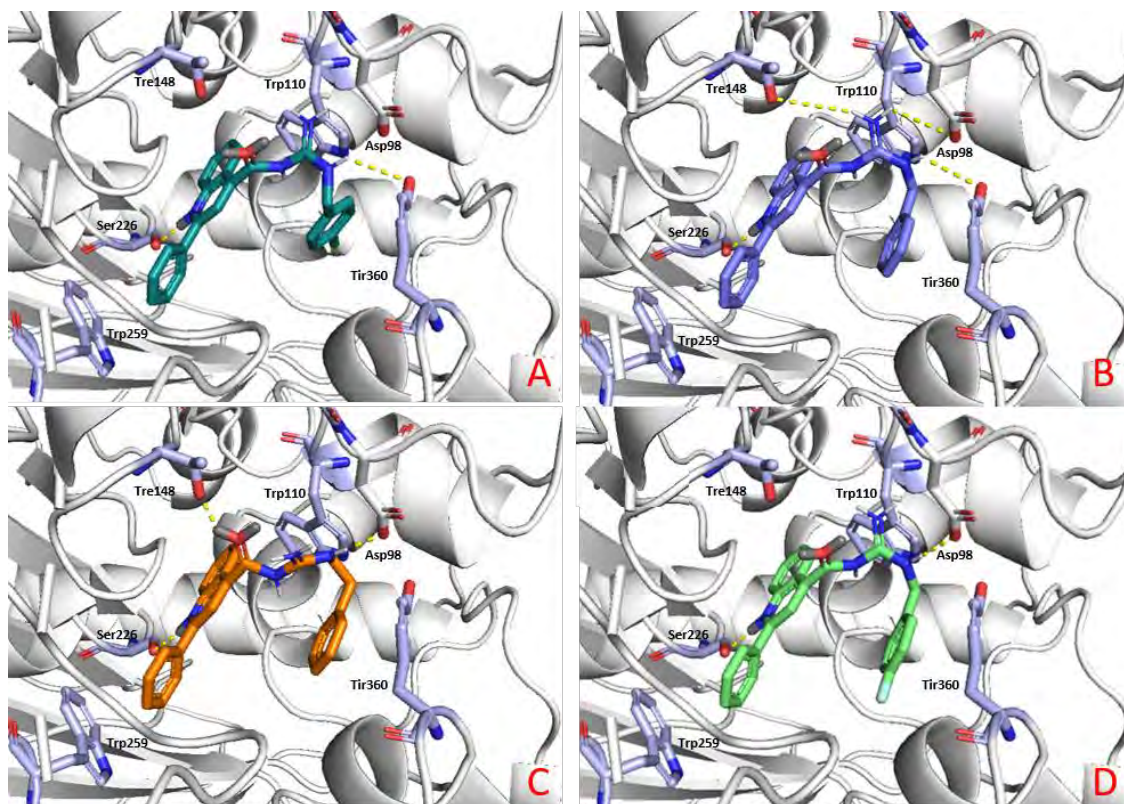


Figura 29: Comparação entre os dockings dos compostos 64A (B), 64C (A), 64B (C) e 64D (D).

5. CONCLUSÕES

Neste trabalho de dissertação de mestrado foram sintetizadas 20 novas acilguanidinas quinolínicas, incluindo compostos protegidos (com *Boc*) (**59-62A-D**) e desprotegidos (sem *Boc*) (**63-66A-D**), com uma estrutura química original variando-se os substituintes na posição *dois* do núcleo quinolínic e os substituintes ligados ao nitrogênio guanidínico. Os novos compostos sintetizados foram planejados de maneira racional usando estratégias clássicas da Química Medicinal como o bioisosterismo de anéis e a homologação. As metodologias sintéticas e de purificação empregadas mostraram-se satisfatórias, resultando em rendimentos de moderados a bons. Todos os compostos foram devidamente caracterizados por meio de técnicas de RMN ^1H e DEPTQ.

Os resultados obtidos permitiram a identificação de quatro acilguanidinas fenilquinolínicas (**64A-D**) e uma para-f-fenilquinolina (**65A**) como inibidores seletivos da enzima BuChE. Com valores de inibição entre 58 - 70% na concentração de 30 μM e CI_{50} entre 7-10 μM , com a acilguanidina contendo a subunidade *p*-fluorobenzila ligada à guanidina (**64C**) sendo o derivado mais potente. Esses resultados corroboram dados anteriores do nosso grupo de pesquisa, que demonstraram que, além da acilguanidina desprotegida ser essencial para a atividade observada, a presença de flúor ou cloro na posição para resulta em melhor potência de inibição da BuChE. Esses achados validam nosso planejamento estrutural e a seletividade dos derivados 64A-D e 65A pela inibição da BuChE em detrimento da AChE. Os estudos de ancoramento molecular demonstraram que essas acilguanidinas interagem no sítio ativo da BuChE, fazendo interações intermoleculares com importantes resíduos de aminoácidos, com o mesmo padrão de encaixe.

A avaliação das propriedades farmacocinéticas e *druglikeness* revelou que as moléculas propostas possuem características adequadas para serem consideradas como potenciais protótipos de fármacos. Existe uma alta probabilidade de que essas moléculas sejam bem absorvidas pelo trato gastrointestinal e atendam aos critérios estabelecidos por Lipinski, Veber e Egan para um perfil *druglike* adequado. Além disso, os estudos indicaram que as acilguanidinas desprotegida possuem um maior potencial de atravessar a barreira hematoencefálica, o que é desejável no contexto do tratamento da DA, em comparação com os análogos protegidos correspondentes.

Como perspectivas deste trabalho estão a realização de ensaios para atividade de complexação com metais para os compostos mais promissores, além de avaliação do perfil de atividade *in vivo*. Adicionalmente, devido às características farmacofóricas das acilguanidina também consideramos importante a avaliação das mesmas frente à BACE-1.

6. REFERÊNCIAS.

AJANI, O. O.; IYAYE, K. T.; ADEMOSUN, O. T. **Recent advances in chemistry and therapeutic potential of functionalized quinoline motifs - a review.** *RSC Advances* Royal Society of Chemistry, , 24 jun. 2022.

AL-GHRAIYBAH, N. F. et al. Glial Cell-Mediated Neuroinflammation in Alzheimer ' s Disease. **International Journal of Molecular Sciences**, p. 1–29, 2022.

ALI, R.; GUPTA, G. DAS; CHAWLA, P. A. Aducanumab: A new hope in Alzheimer's disease. **Health Sciences Review**, v. 4, p. 100039, set. 2022.

ALQAHTANI, T. et al. **Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in Alzheimer's disease, and Parkinson's disease, Huntington's disease and Amyotrophic Lateral Sclerosis -An updated review.** *Mitochondrion* Elsevier B.V., , 1 jul. 2023.

ARNDT, J. W. et al. Structural and kinetic basis for the selectivity of aducanumab for aggregated forms of amyloid- β . **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, 1 dez. 2018.

ARYA, A. et al. **Acetylcholinesterase inhibitory potential of various sesquiterpene analogues for alzheimer's disease therapy.** *Biomolecules* MDPI AG, , 1 mar. 2021.

BITRA, V. R. et al. **Tau trajectory in Alzheimer's disease: Evidence from the connectome-based computational models.** *Brain Research Bulletin* Elsevier Inc., , 15 out. 2023.

CARRILLO-HERMOSILLA, FERNANDO; ALONSO-MORENO, CARLOS; ANTIÑOLO, ANTONIO AND OTERO, ANTONIO. Guanidines: from classical approaches to efficient catalytic syntheses This review focuses on the metal-mediated catalytic addition of amines to carbodiimides as an atom-economical alternative to the classical synthesis of. 2014.

CAVALCANTE, S. F. DE A. et al. Acetylcholinesterase: The “Hub” for Neurodegenerative diseases and chemical weapons convention. **Biomolecules**, v. 10, n. 3, 1 mar. 2020.

CHEN, L. L. et al. **The metal ion hypothesis of Alzheimer's disease and the anti-neuroinflammatory effect of metal chelators.** *Bioorganic Chemistry* Academic Press Inc., , 1 fev. 2023.

DAINA, A.; MICHELIN, O.; ZOETE, V. SwissADME: A free web tool to evaluate pharmacokinetics, drug-likeness and medicinal chemistry friendliness of small molecules. **Scientific Reports**, v. 7, n. January, p. 1–13, 2017a.

DAINA, A.; MICHIELIN, O.; ZOETE, V. SwissADME: A free web tool to evaluate pharmacokinetics, drug-likeness and medicinal chemistry friendliness of small molecules. **Scientific Reports**, v. 7, n. January, p. 1–13, 2017b.

DE SOUZA, G. A. et al. Discovery of novel dual-active 3-(4-(dimethylamino)phenyl)-7-aminoalcoxy-coumarin as potent and selective acetylcholinesterase inhibitor and antioxidant. **Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry**, v. 34, n. 1, p. 631–637, 1 jan. 2019.

ELLMAN, G. L. et al. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. **Biochemical Pharmacology**, v. 7, n. 2, p. 88–95, 1961.

FASAE, K. D. et al. **Metallobiology and therapeutic chelation of biometals (copper, zinc and iron) in Alzheimer's disease: Limitations, and current and future perspectives.** **Journal of Trace Elements in Medicine and Biology** Elsevier GmbH, , 1 set. 2021.

FERREIRA, J. P. S. et al. Dual-target compounds for Alzheimer's disease: Natural and synthetic AChE and BACE-1 dual-inhibitors and their structure-activity relationship (SAR). **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 221, 2021.

GHOLAMI, A. **Alzheimer's disease: The role of proteins in formation, mechanisms, and new therapeutic approaches.** **Neuroscience Letters** Elsevier Ireland Ltd, , 20 nov. 2023.

GOMES, A. R. et al. **Synthetic and natural guanidine derivatives as antitumor and antimicrobial agents: A review.** **Bioorganic Chemistry** Academic Press Inc., , 1 set. 2023.

GREIG, N. H. et al. **Selective butyrylcholinesterase inhibition elevates brain acetylcholine, augments learning and lowers Alzheimer-amyloid peptide in rodent.** [s.l: s.n.]. Disponível em: <www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.0508575102>.

HELEM F. RIBEIRO; JÉSSICA SCARLET F. DOS SANTOS; JULYANNE N. DE SOUZA. Doença de Alzheimer de início precoce (DAIP): características neuropatológicas e variantes genéticas associadas. 2021.

HICKEY, S. M. et al. An optimised synthesis of 2-[2,3-Bis(tert -butoxycarbonyl)guanidino] ethylamine. **Synlett**, v. 23, n. 12, p. 1779–1782, 2012.

JASIECKI, J.; TARGOŃSKA, M.; WASĄG, B. **The role of butyrylcholinesterase and iron in the regulation of cholinergic network and cognitive dysfunction in alzheimer's disease pathogenesis.** **International Journal of Molecular Sciences** MDPI AG, , 2 fev. 2021.

JUSTIN M. LONG, D. M. H. Alzheimer Disease: An Update on Pathobiology and Treatment Strategies. **Physiology & behavior**, v. 176, n. 3, p. 139–148, 2020.

KAMALJEET et al. Emerging role of antioxidants in Alzheimer's disease: Insight into physiological, pathological mechanisms and management. **Pharmaceutical Science Advances**, v. 2, p. 100021, dez. 2024.

KATRITZKY, A. R.; ROGOVOY, B. V. Recent developments in guanylate agents. **Arkivoc**, v. 2005, n. 4, p. 49–87, 2005.

KIM, S. H.; SEMENYA, D.; CASTAGNOLO, D. **Antimicrobial drugs bearing guanidine moieties: A review**. **European Journal of Medicinal Chemistry** Elsevier Masson s.r.l., , 15 abr. 2021.

LEUNG, M. R. et al. Cryo-EM structure of the native butyrylcholinesterase tetramer reveals a dimer of dimers stabilized by a superhelical assembly. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 115, n. 52, p. 13270–13275, 26 dez. 2018.

LI, Z. H. et al. **SAR studies of quinoline and derivatives as potential treatments for Alzheimer's disease**. **Arabian Journal of Chemistry** Elsevier B.V., , 1 fev. 2023.

LIAO, C. et al. Phenylquinoline transient receptor potential vanilloid 1 antagonists for the treatment of pain: Discovery of 1-(2-phenylquinoline-4-carbonyl)-N-(4-(trifluoromethyl)phenyl)pyrrolidine-3-carboxamide. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, v. 26, n. 4, p. 845–854, 15 fev. 2018.

LIMA, L.; BARREIRO, E. Bioisosterism: A Useful Strategy for Molecular Modification and Drug Design. **Current Medicinal Chemistry**, v. 12, n. 1, p. 23–49, 2012.

LIU, W. et al. Chemical genetic activation of the cholinergic basal forebrain hippocampal circuit rescues memory loss in Alzheimer's disease. **Alzheimer's Research and Therapy**, v. 14, n. 1, p. 1–20, 2022.

MAIA, M. A.; SOUSA, E. BACE-1 and γ -secretase as therapeutic targets for Alzheimer's disease. **Pharmaceuticals**, v. 12, n. 1, p. 1–31, 2019.

MASSON, P. et al. **Meta-analyses in Prevention and Treatment of Urinary Tract Infections**. **Infectious Disease Clinics of North America**, jun. 2009.

MASSOULIÉ, J.; PZZEMENTI. MOLECULAR AND CELLULAR BIOLOGY OF CHOLINESTERASES. **Progress in Neurobiology**, v. Vol. 41, p. 31–91, 1993.

MATADA, B. S.; PATTANASHETTAR, R.; YERNALE, N. G. A comprehensive review on the biological interest of quinoline and its derivatives. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, v. 32, n. December 2020, p. 115973, 2021.

MOHASSAB, A. M. M. et al. Design and synthesis of new quinoline-ester/-amide derivatives as potent antiproliferative agent targeting EGFR and BRAFV600E kinases. **Journal of Molecular Structure**, v. 1297, 5 fev. 2024.

MOORE, K. B. E.; HUNG, T. J.; FORTIN, J. S. **Hyperphosphorylated tau (p-tau) and drug discovery in the context of Alzheimer's disease and related tauopathies**. **Drug Discovery Today** Elsevier Ltd, , 1 mar. 2023.

NADY, D. S.; BAKOWSKY, U.; FAHMY, S. A. **Recent advances in brain delivery of synthetic and natural nano therapeutics: Reviving hope for Alzheimer's disease patients**. **Journal of Drug Delivery Science and Technology** Editions de Sante, , 1 nov. 2023.

NICOLET, Y. et al. Crystal Structure of Human Butyrylcholinesterase and of Its Complexes with Substrate and Products. **Journal of Biological Chemistry**, v. 278, n. 42, p. 41141–41147, 17 out. 2003.

RAJ ARAN, K. The Aging Brain: Impact of Iron Metal in Neurotoxicity. **Biomedical Journal of Scientific & Technical Research**, v. 52, n. 3, 24 ago. 2023.

RIUS-PÉREZ, S. et al. **Vascular pathology: Cause or effect in Alzheimer disease?** **Neurologia** Spanish Society of Neurology, , 1 mar. 2018.

SABRINA NEVES SANTOS, GABRIELA ALVES DE SOUZA, T. M. P.; DAIANA PORTELLA FRANCO, CATARINA DE NIGRIS DEL CISTIA, C. M. R. S.; RENATA BARBOSA LACERDAAB AND ARTHUR EUGEN KÜMMERLE. **Regioselective microwave synthesis and derivatization of 1,5-diaryl-3-amino-1,2,4-triazoles and a study of their cholinesterase inhibition properties.** , 2019.

SANTOS, S. N. et al. Regioselective microwave synthesis and derivatization of 1,5-diaryl-3-amino-1,2,4-triazoles and a study of their cholinesterase inhibition properties. **RSC Advances**, v. 9, n. 35, p. 20356–20369, 2019.

SARAVANAN, K. et al. Binding studies of known molecules with acetylcholinesterase and bovine serum albumin: A comparative view. **Spectrochimica Acta - Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 259, 5 out. 2021.

SAROJA, S. R. et al. Differential expression of tau species and the association with cognitive decline and synaptic loss in Alzheimer's disease. **Alzheimer's and Dementia**, v. 18, n. 9, p. 1602–1615, 2022a.

SAROJA, S. R. et al. Differential expression of tau species and the association with cognitive decline and synaptic loss in Alzheimer's disease. **Alzheimer's and Dementia**, v. 18, n. 9, p. 1602–1615, 2022b.

SHVEKHGEIMER, M. G.-A. The Pfitzinger Reaction. **ChemInform**, v. 35, n. 48, p. 257–294, 2004.

SILVERTHORN, D. UNGLAUB. **Fisiologia Humana: Uma Abordagem Integrada**. 7th. ed. [s.l: s.n.].

SINGH, B. et al. **Alzheimer's disease current therapies, novel drug delivery systems and future directions for better disease management.** **Journal of Controlled Release** Elsevier B.V., , 1 mar. 2024.

SONAWANE, H. R. et al. **Versatile applications of transition metal incorporating quinoline Schiff base metal complexes: An overview.** **European Journal of Medicinal Chemistry** Elsevier Masson s.r.l., , 5 out. 2023.

TARAZI, H. et al. Design, synthesis and SAR analysis of potent BACE1 inhibitors: Possible lead drug candidates for Alzheimer's disease. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 125, p. 1213–1224, 2017.

TUZIMSKI, T.; PETRUCZYNIK, A. **Determination of Anti-Alzheimer's Disease Activity of Selected Plant Ingredients.** **Molecules** MDPI, , 1 maio 2022.

TYLISZCZAK, M. et al. **Does a pickle a day keep Alzheimer's away? Fermented food in Alzheimer's disease: A review.** *Experimental Gerontology* Elsevier Inc., , 1 dez. 2023.

VERBANAC, D. et al. Synthesis and evaluation of antibacterial and antioxidant activity of novel 2-phenyl-quinoline analogs derivatized at position 4 with aromatically substituted 4H-1,2,4-triazoles. **Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry**, v. 31, n. June, p. 104–110, 2016.

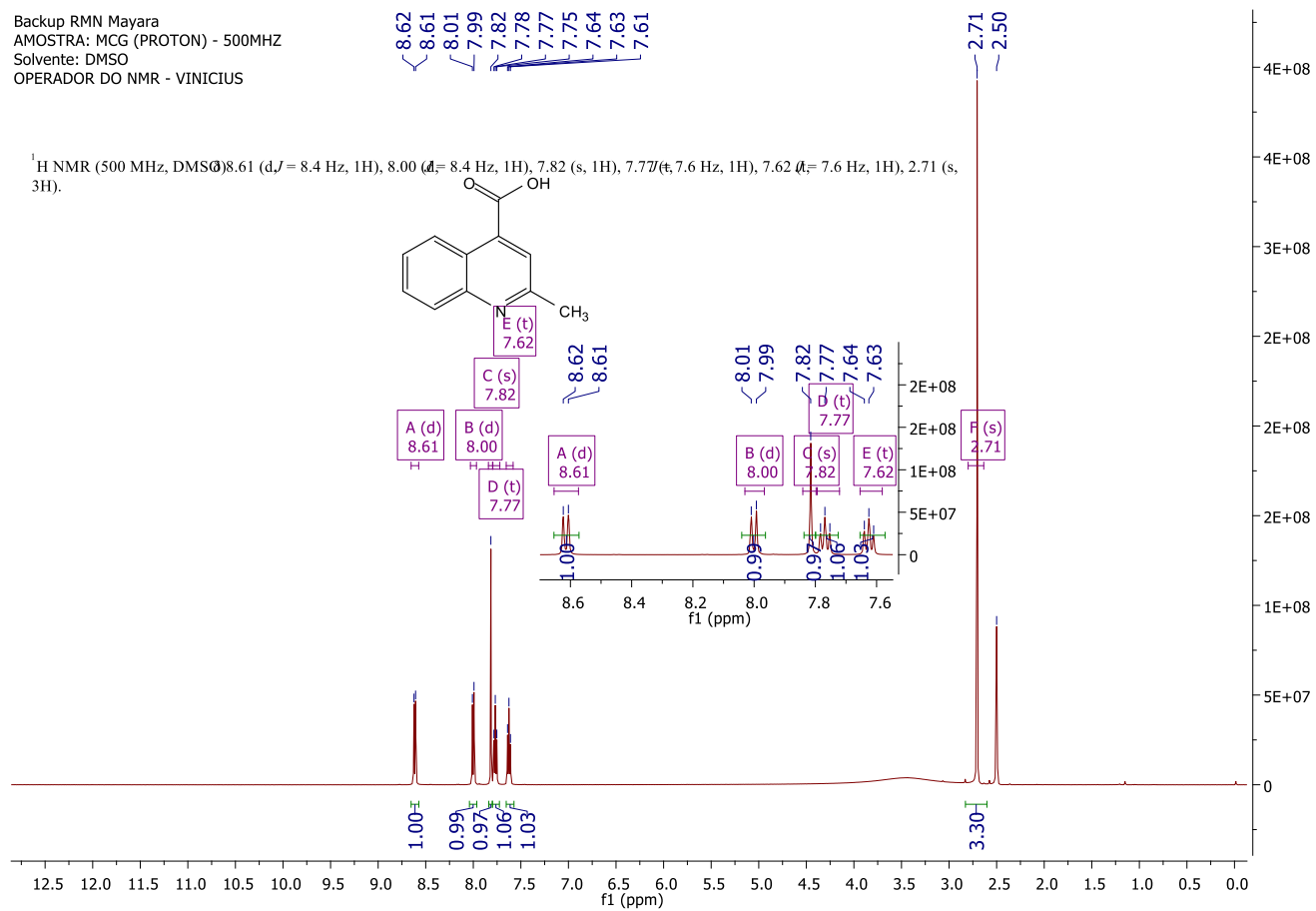
WALCZAK-NOWICKA, Ł. J.; HERBET, M. **Acetylcholinesterase inhibitors in the treatment of neurodegenerative diseases and the role of acetylcholinesterase in their pathogenesis.** *International Journal of Molecular Sciences* MDPI, , 1 set. 2021.

ZHU J, WU CF, LI X, et al. Synthesis, biological evaluation and molecular modeling of substituted 2-aminobenzimidazoles as novel inhibitors of acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase. **Bioorg Med Chem.** 2013;21(14):4218-4224.

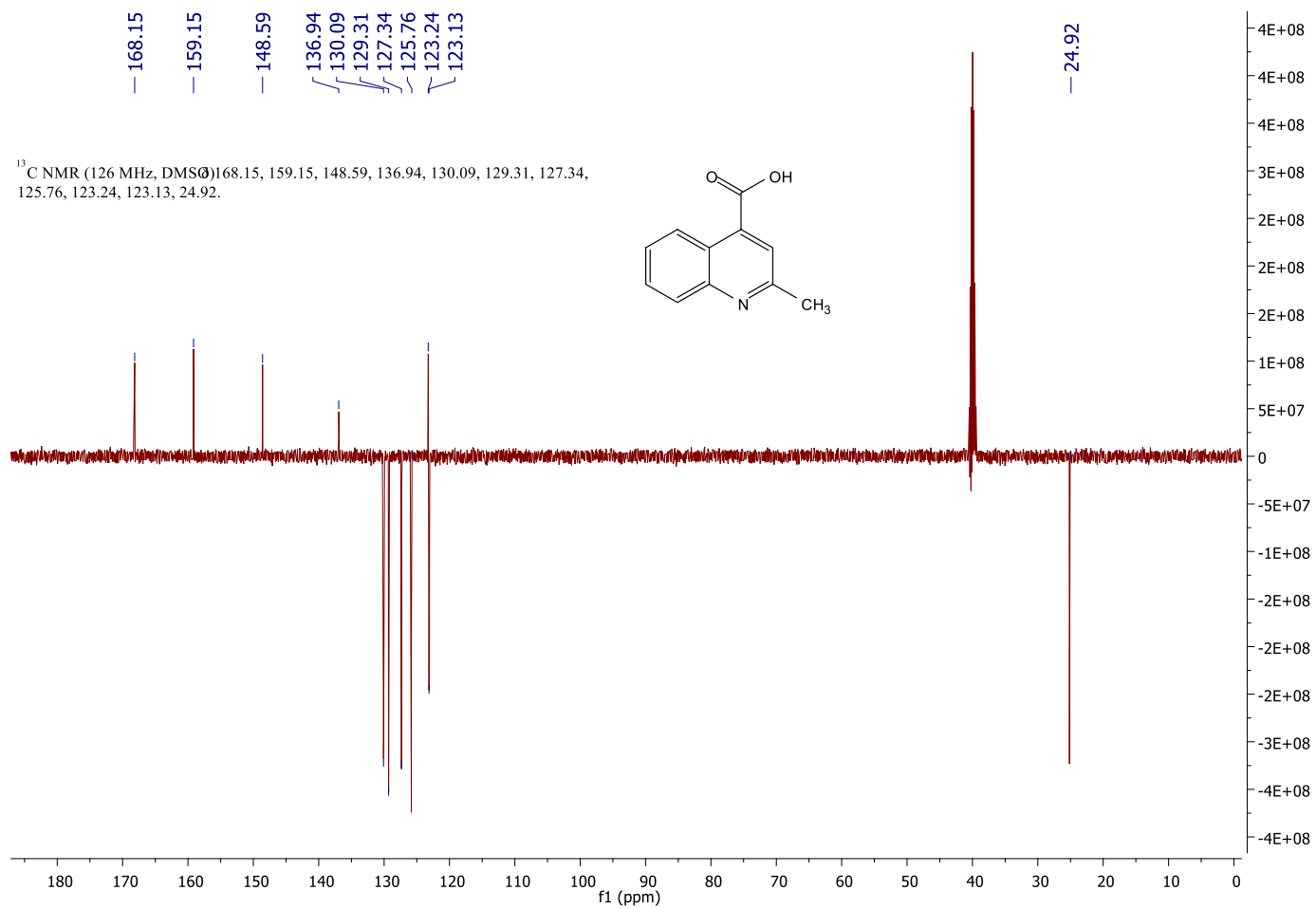
7. ANEXO

Backup RMN Mayara
AMOSTRA: MCG (PROTON) - 500MHZ
Solvente: DMSO
OPERADOR DO NMR - VINICIUS

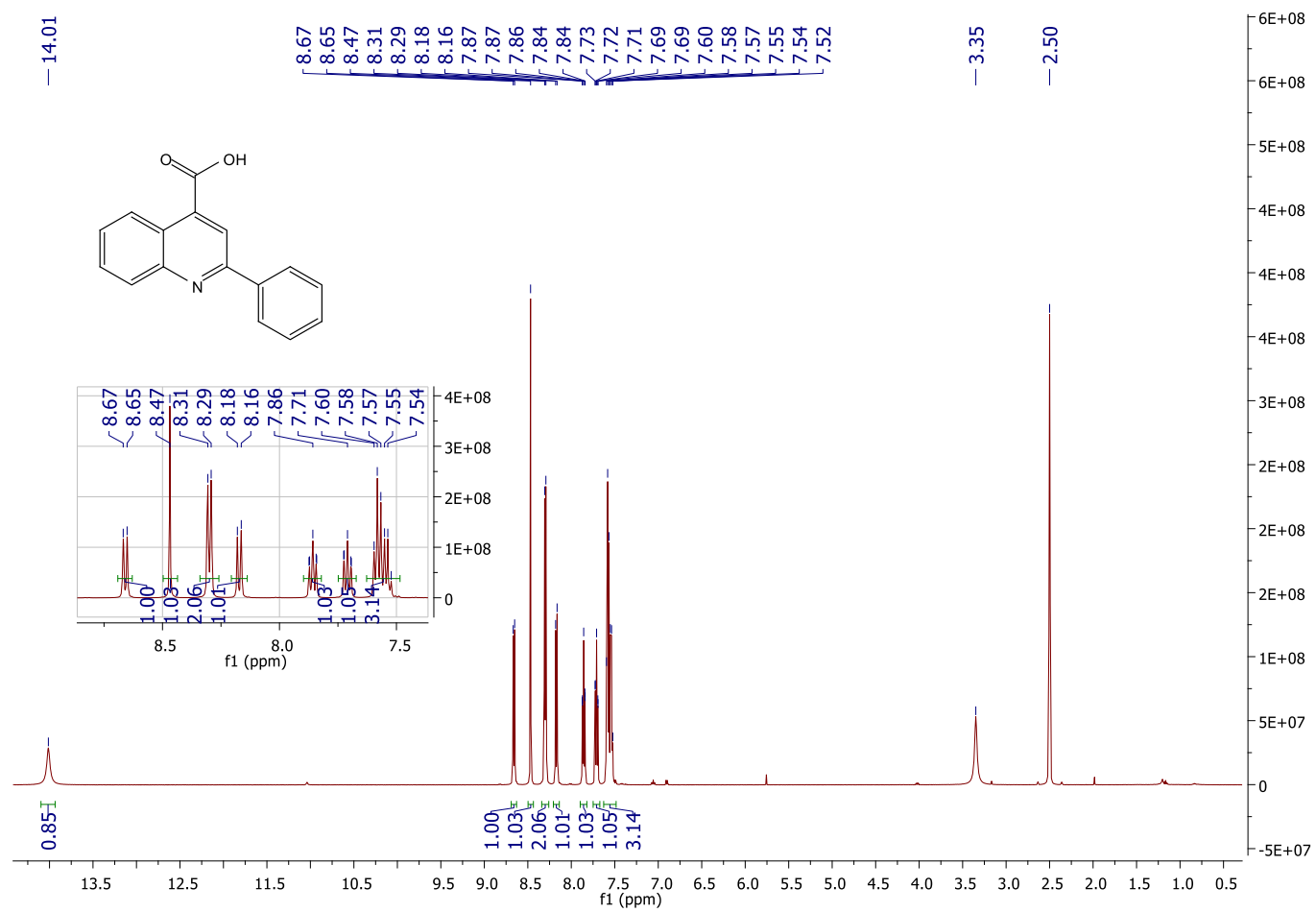
^1H NMR (500 MHz, DMSO) 8.61 (d, $J = 8.4$ Hz, 1H), 8.00 (d, $J = 8.4$ Hz, 1H), 7.82 (s, 1H), 7.77 (t, 7.6 Hz, 1H), 7.62 (t, 7.6 Hz, 1H), 2.71 (s, 3H).



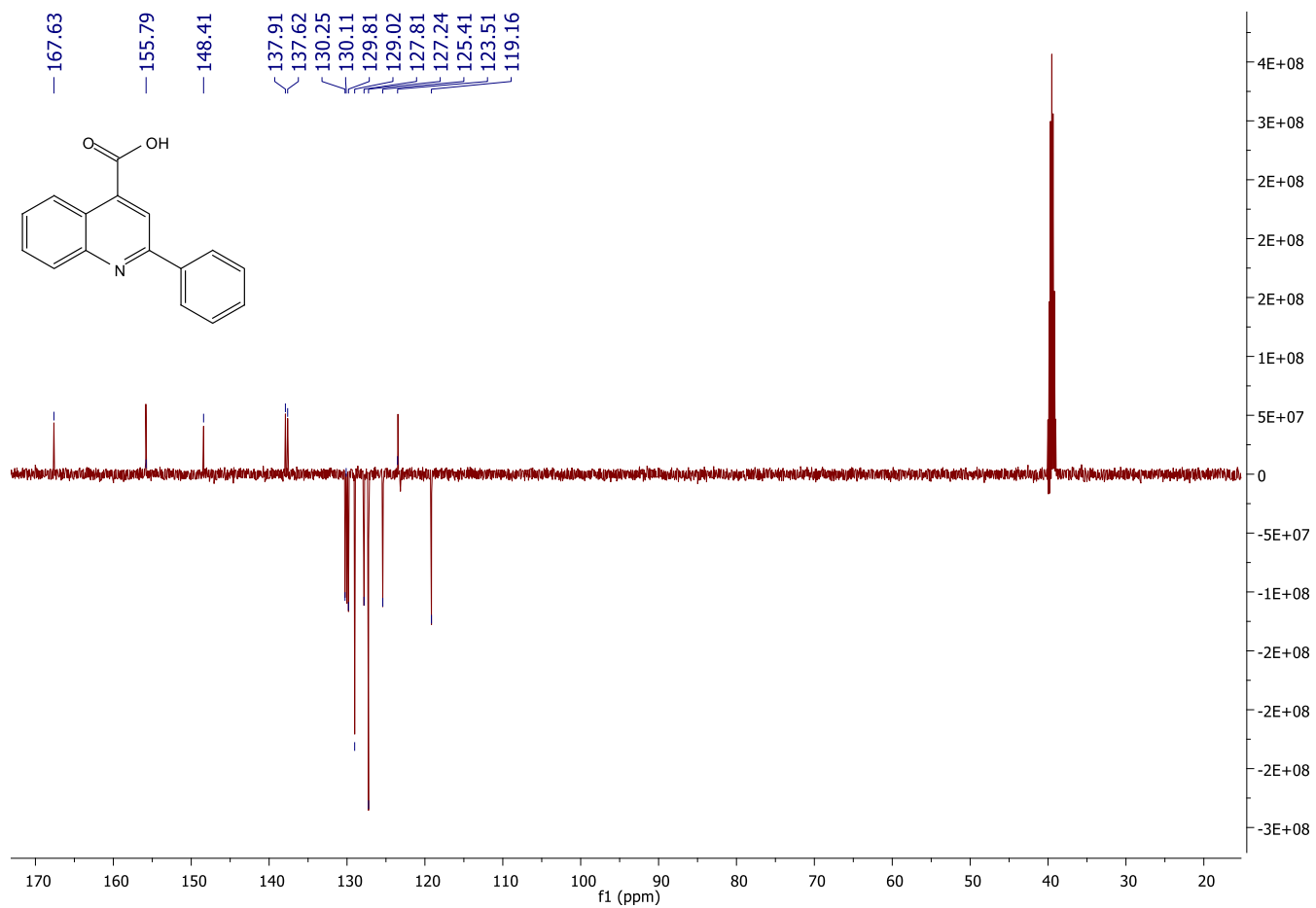
Anexo 1: Espectro de RMN ^1H do composto 57a em DMSO a 500 MHz



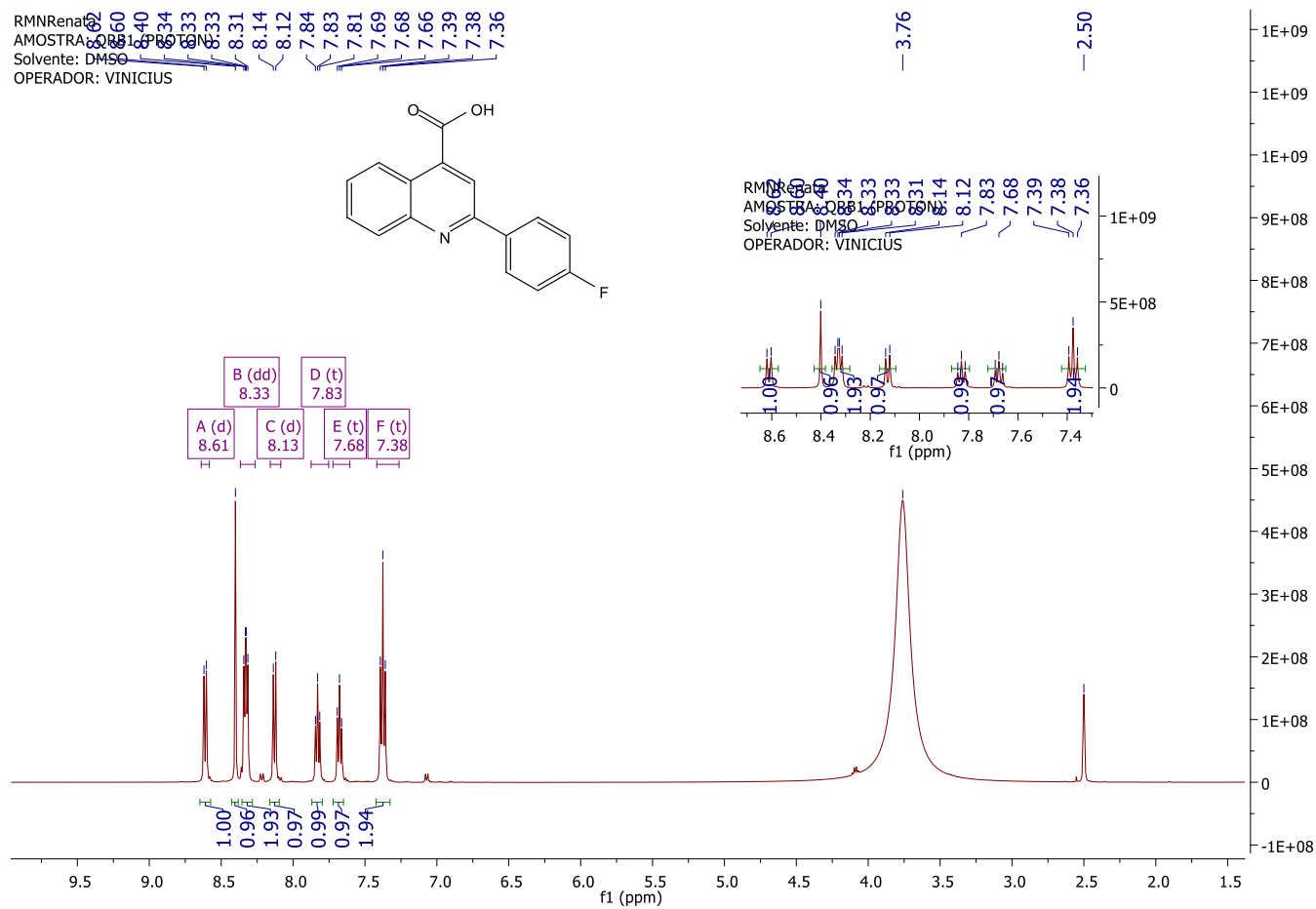
Anexo 2: Espectro de RMN ¹³C do composto 57a em DMSO a 500 MHz



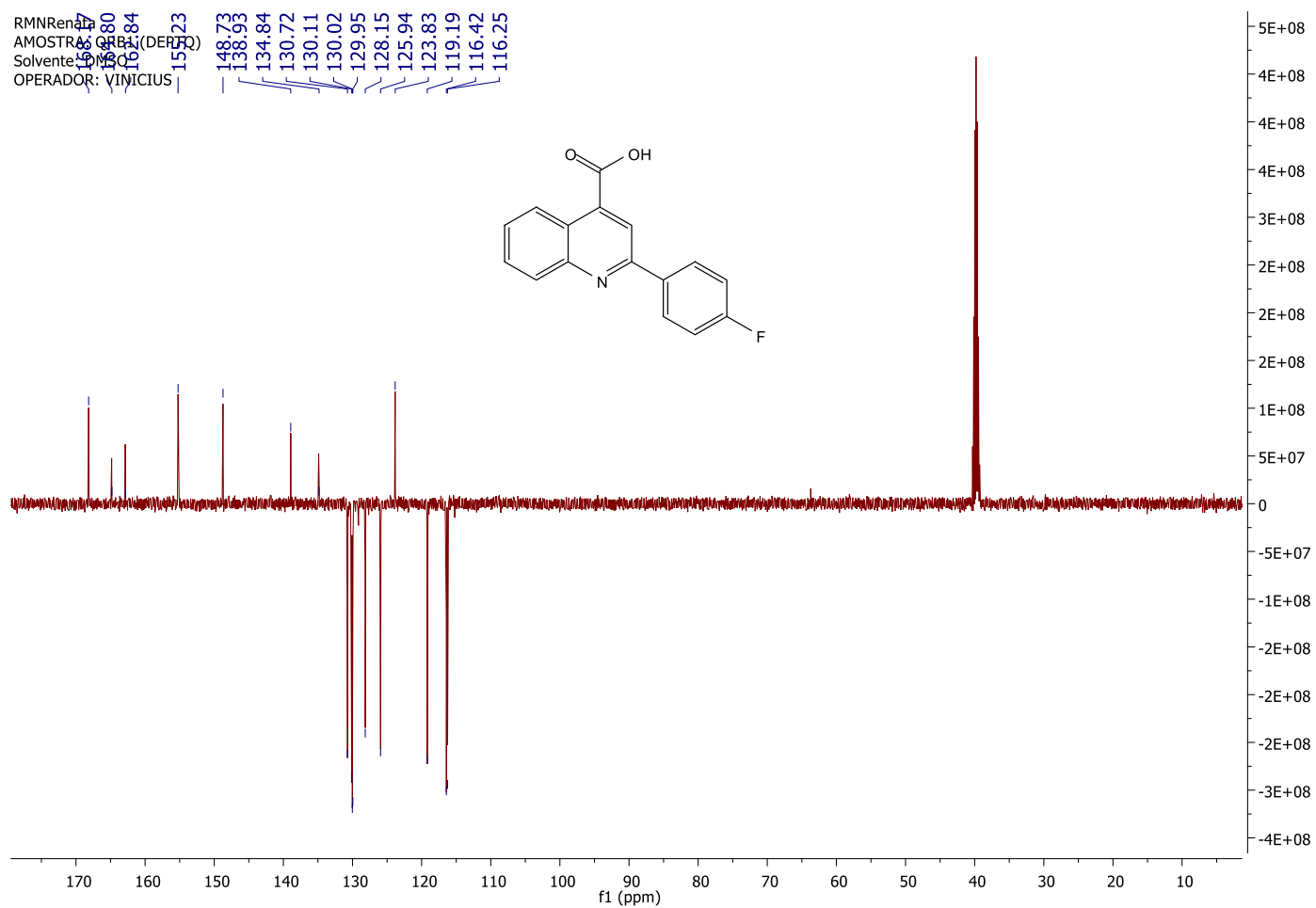
Anexo 3: Espectro de RMN ¹H do composto 57b em DMSO a 500 MHz



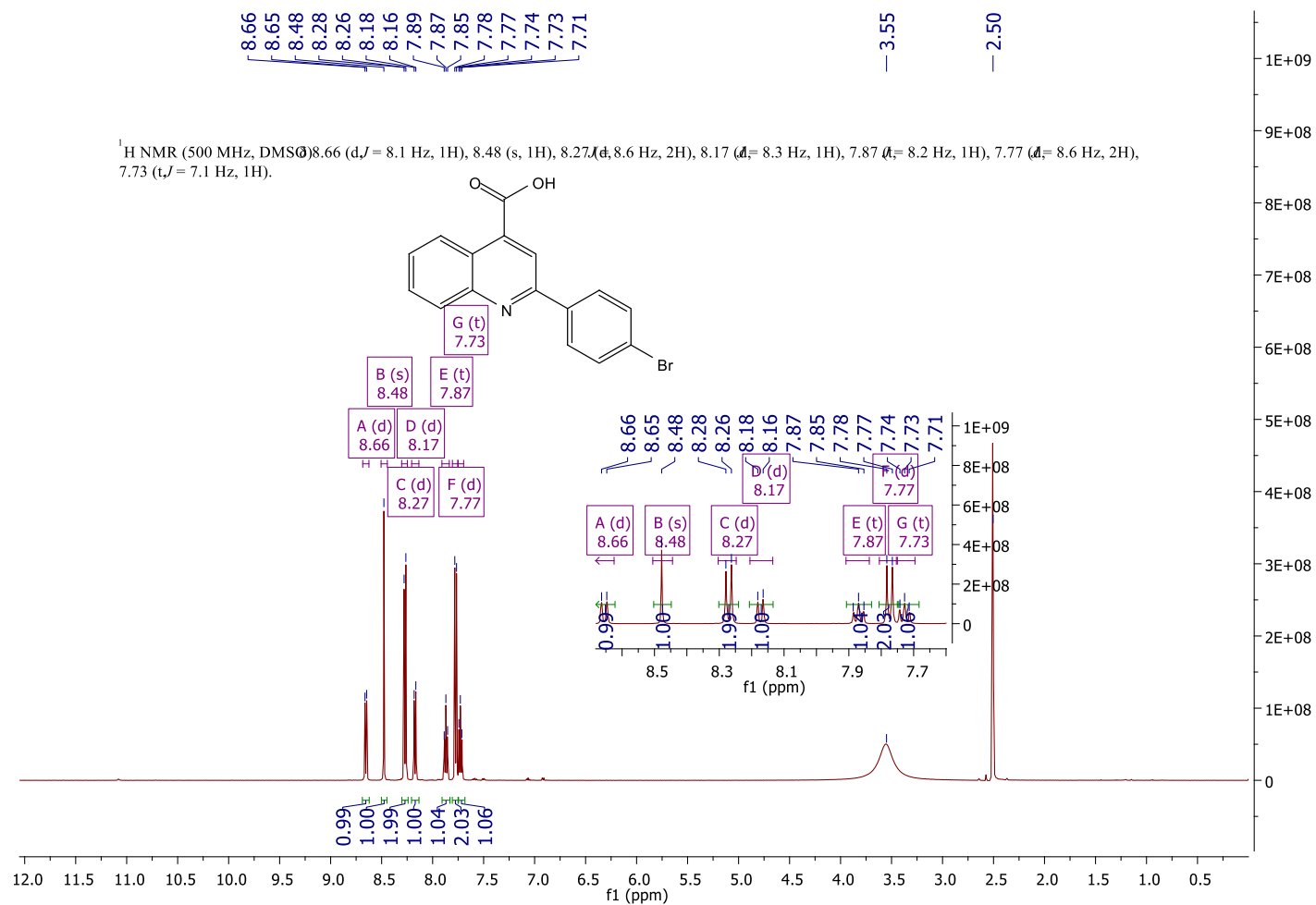
Anexo 4: Espectro de RMN ¹³C do composto 57b em DMSO a 500 MHz



Anexo 5: Espectro de RMN ^1H do composto 57c em DMSO a 500 MHz

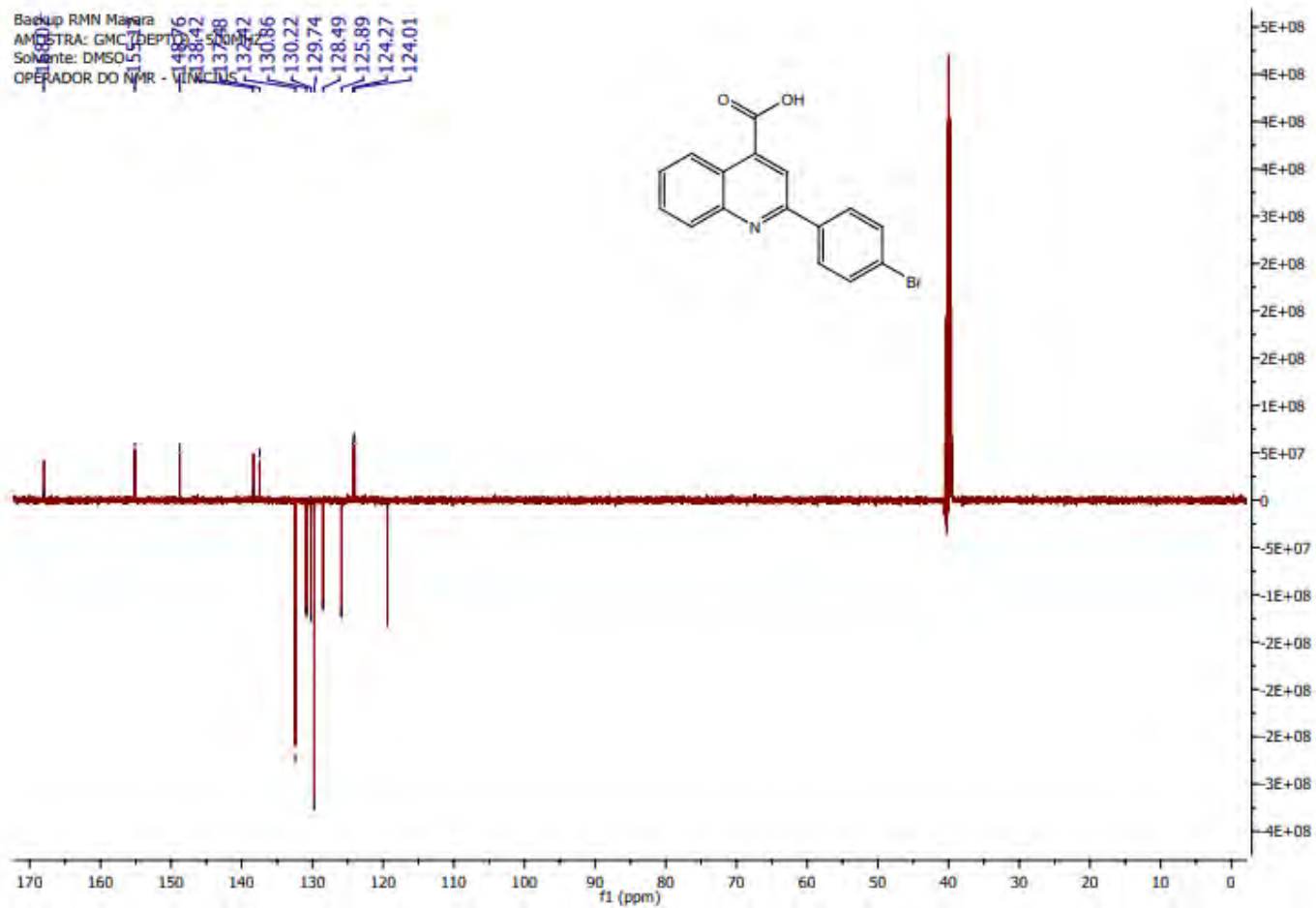


Anexo 6: Espectro de RMN ^{13}C do composto 57c em DMSO a 500 MHz



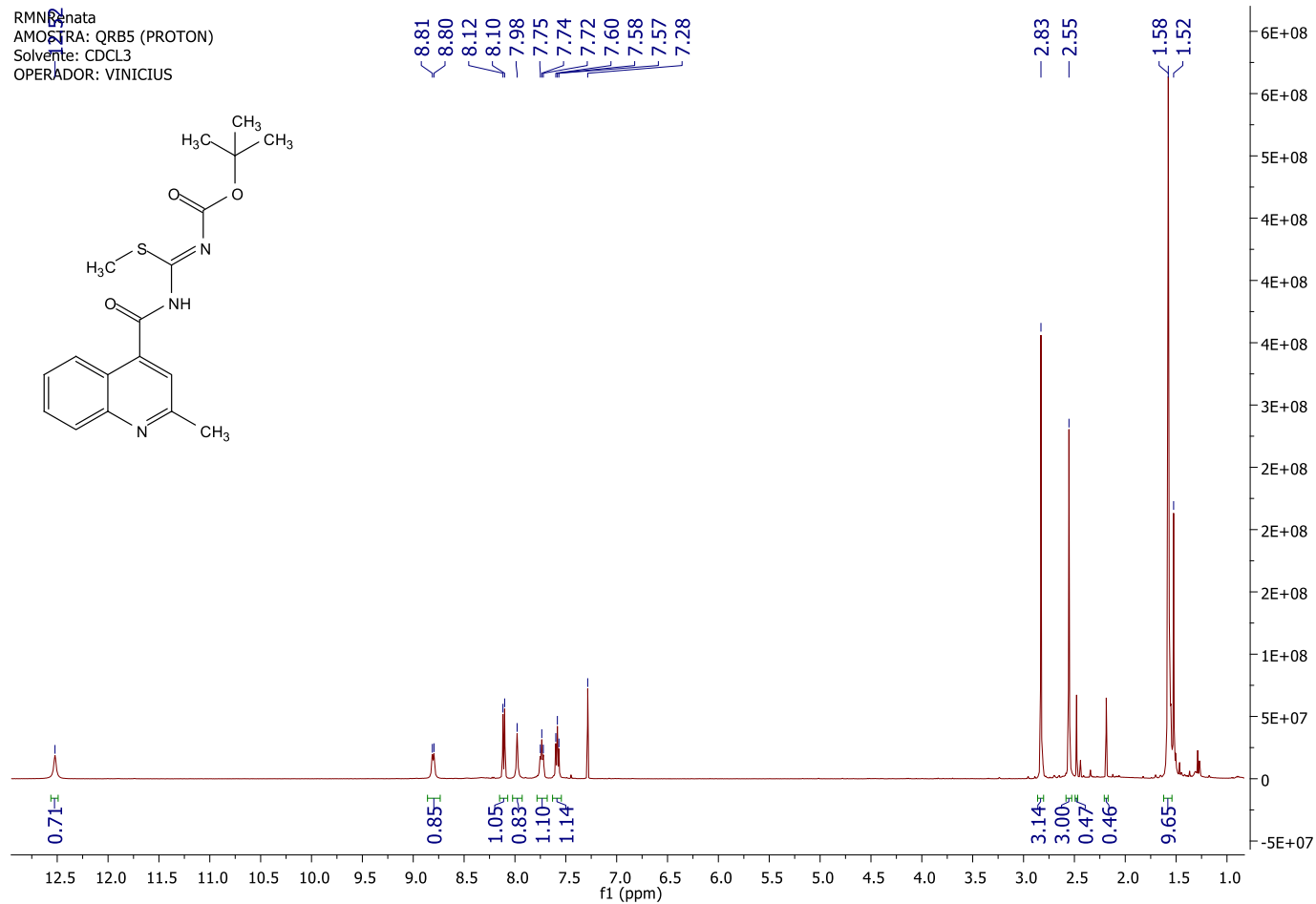
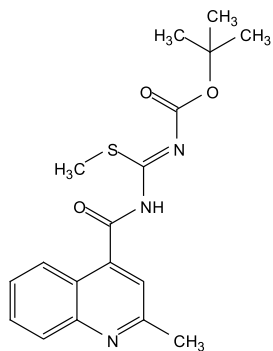
Anexo 7: Espectro de RMN ¹H do composto 57d em CDCl₃ a 500 MHz

Backup RMN Mayara
 AMSTR: GMC/DEPT-135
 Solvente: DMSO-d₆
 OPERADOR DO NMR - VINICIUS

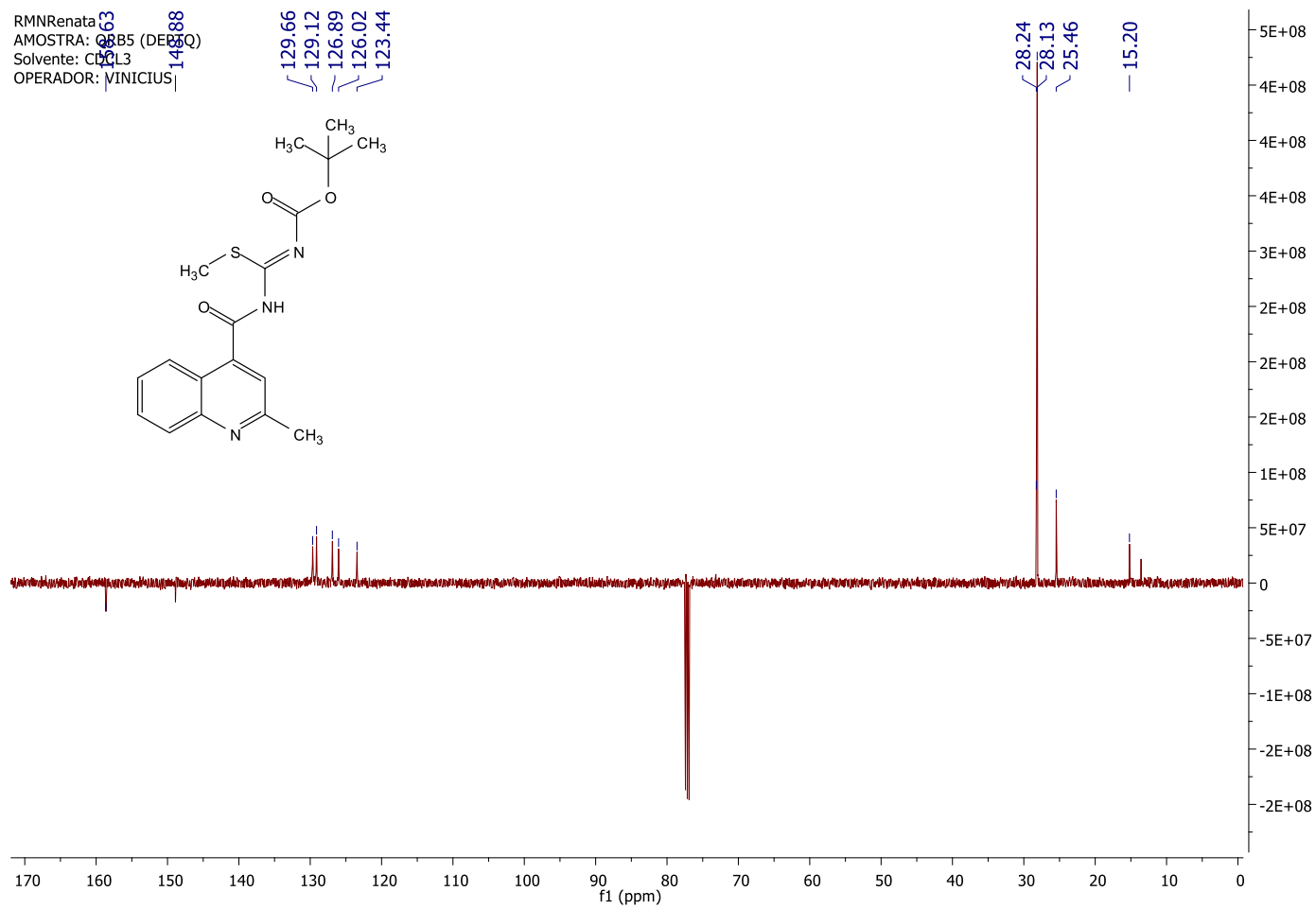


Anexo 8: Espectro de RMN ¹³C do composto 57d em CDCl₃ a 500 MHz

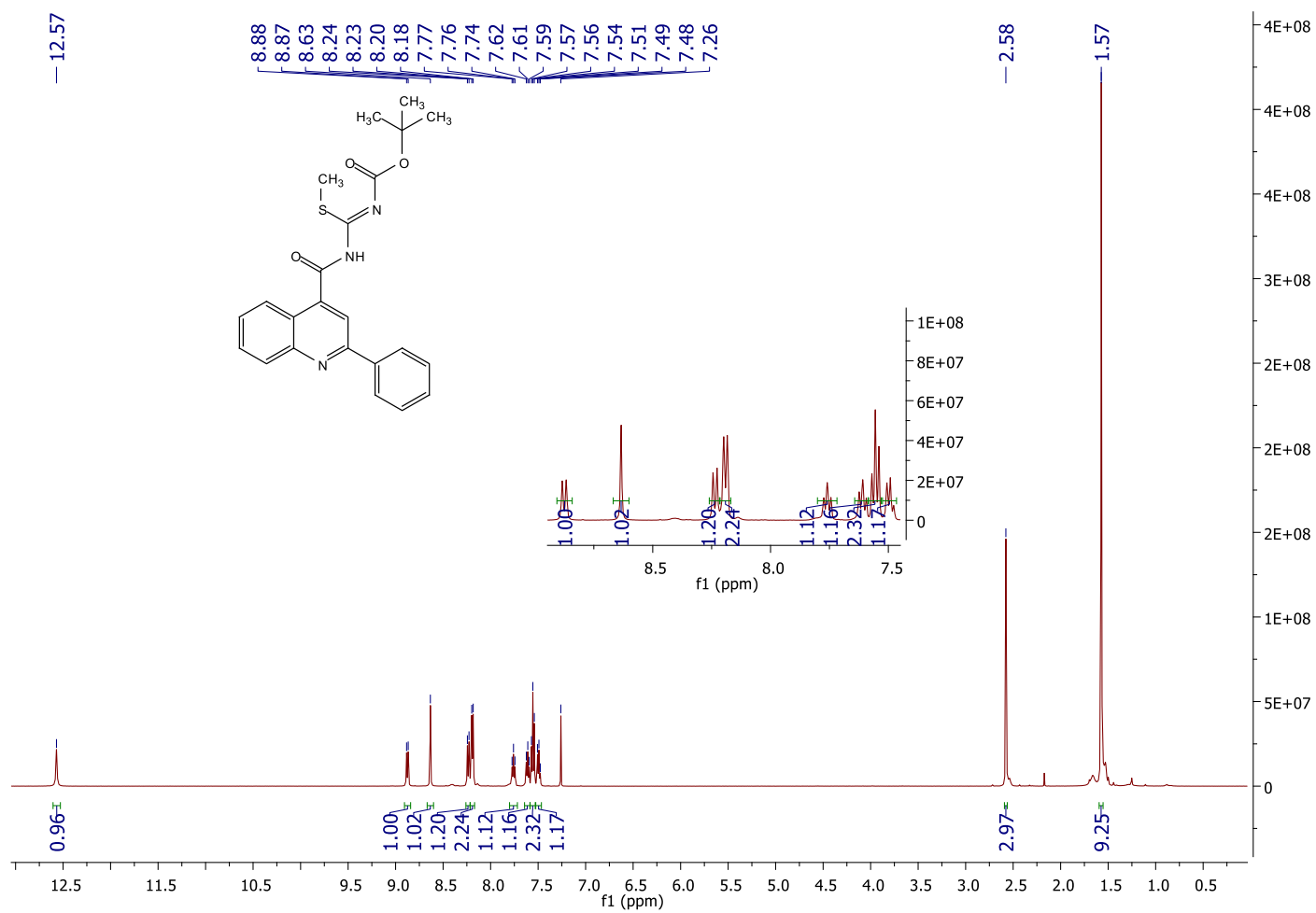
RMN 1H
 AMOSTRA: QRB5 (PROTON)
 Solvente: CDCl3
 OPERADOR: VINICIUS



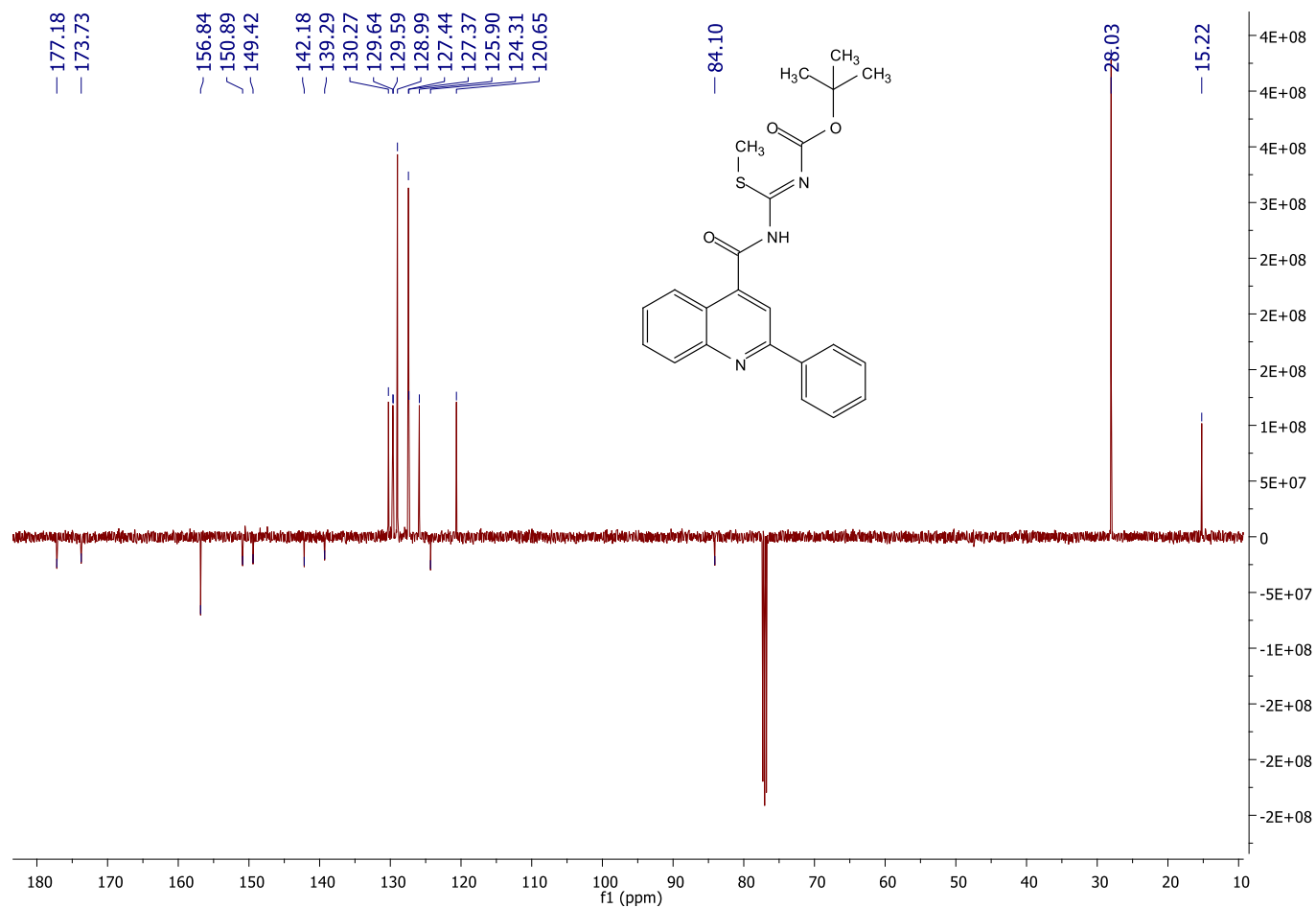
Anexo 9: Espectro de RMN ^1H do composto 58a em CDCl_3 a 500 MHz



Anexo 10: Espectro de RMN ¹³C do composto 58a em CDCl₃ a 500 MHz

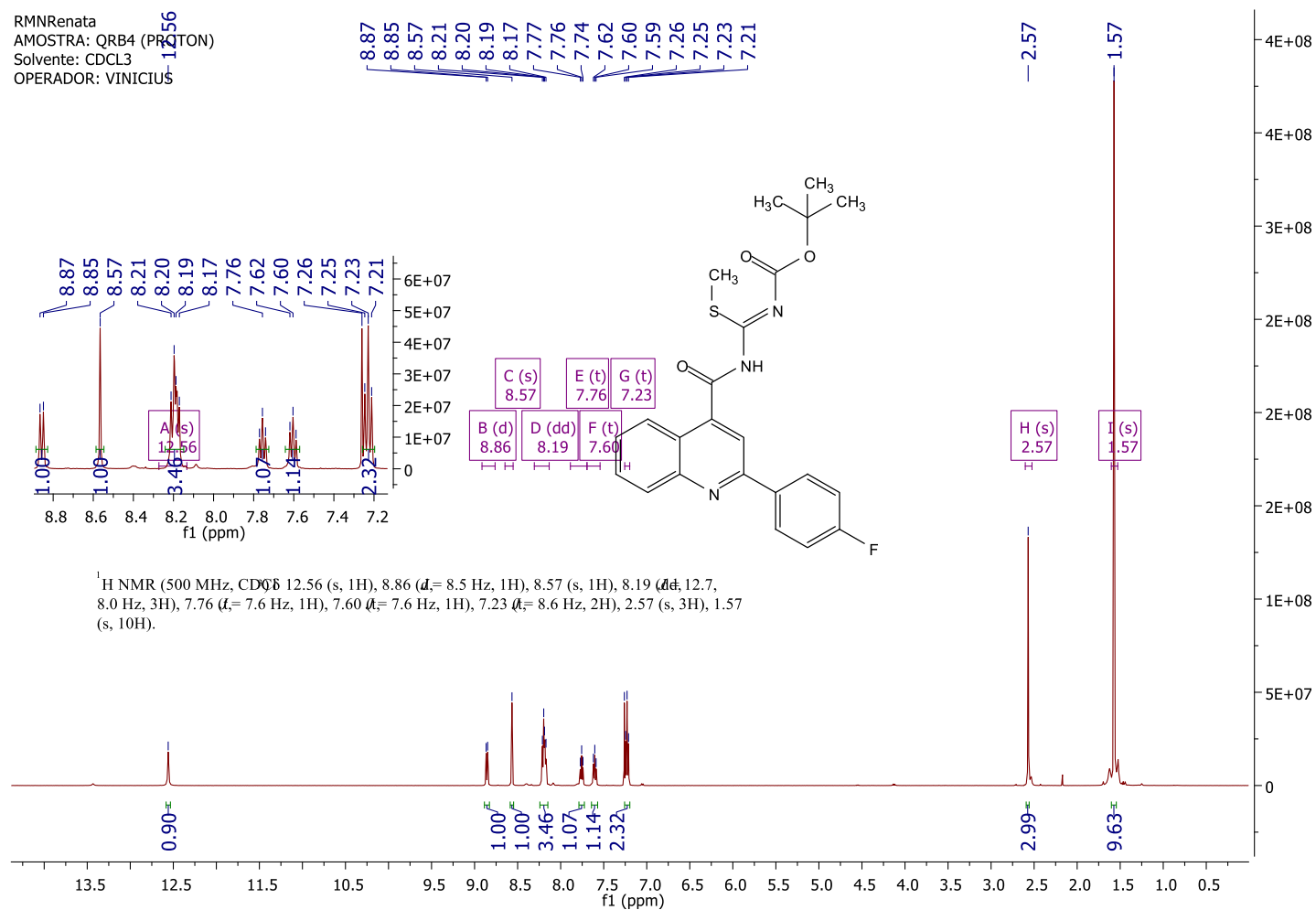


Anexo 11: Espectro de RMN ^1H do composto 58b em CDCl_3 a 500 MHz

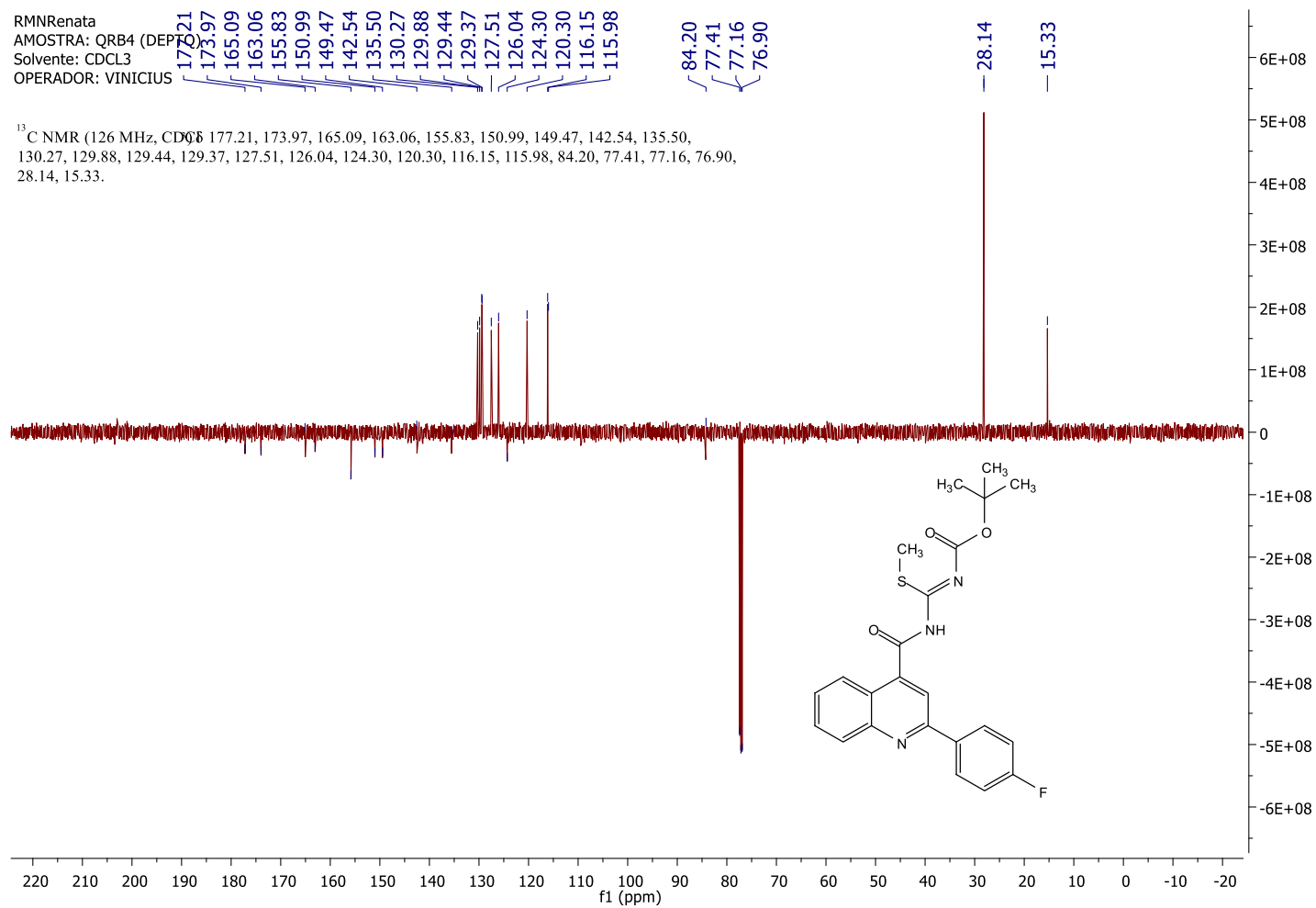


Anexo 12: Espectro de RMN ¹³C do composto 58b em CDCl₃ a 500 MHz

RMNRenata
 AMOSTRA: QRB4 (PRATON)
 Solvente: CDCl₃
 OPERADOR: VINICIUS

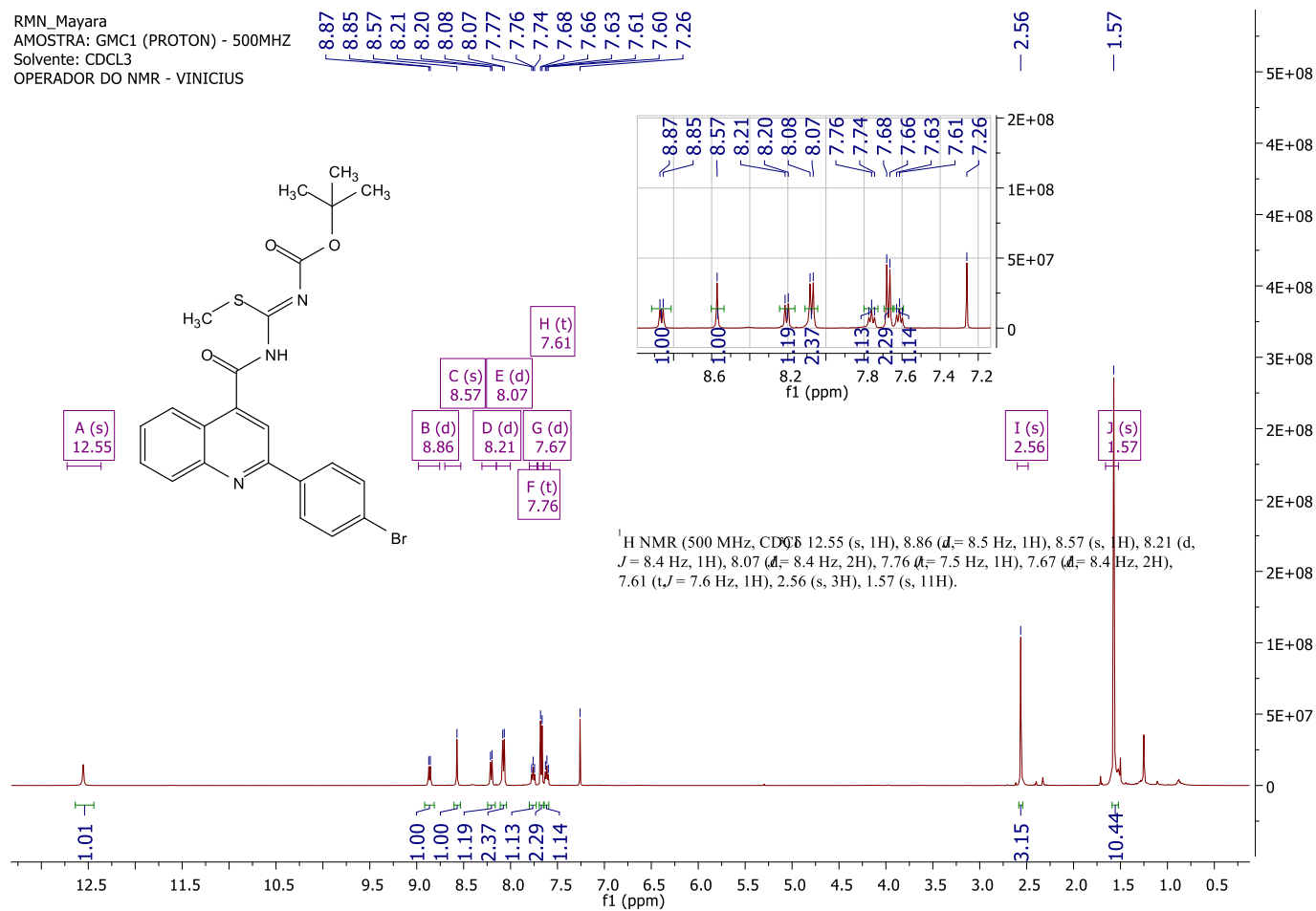


Anexo 13: Espectro de RMN ¹H do composto 58c em CDCl₃ a 500 MHz

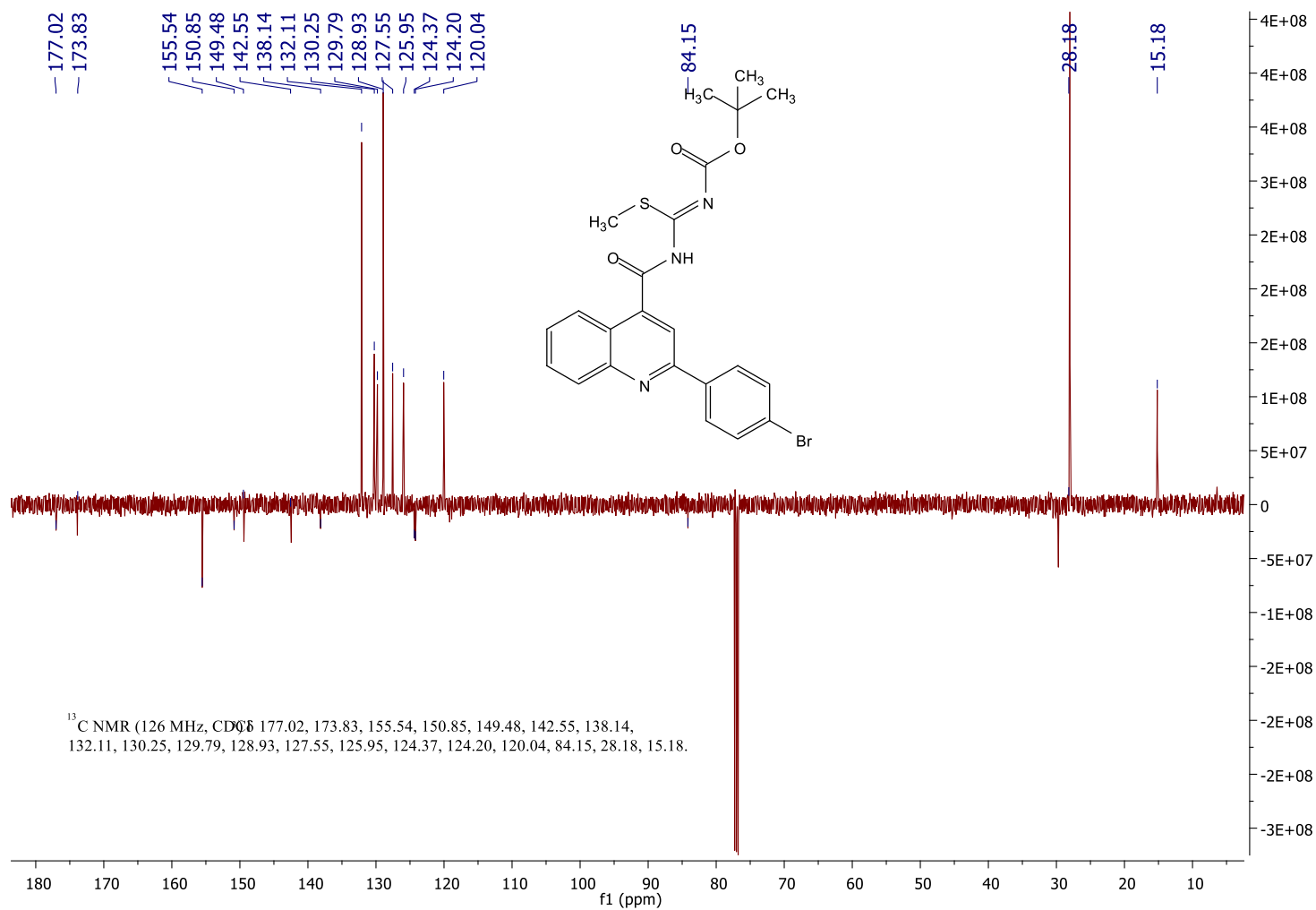


Anexo 14: Espectro de RMN ¹³C do composto 58c em CDCl₃ a 500 MHz

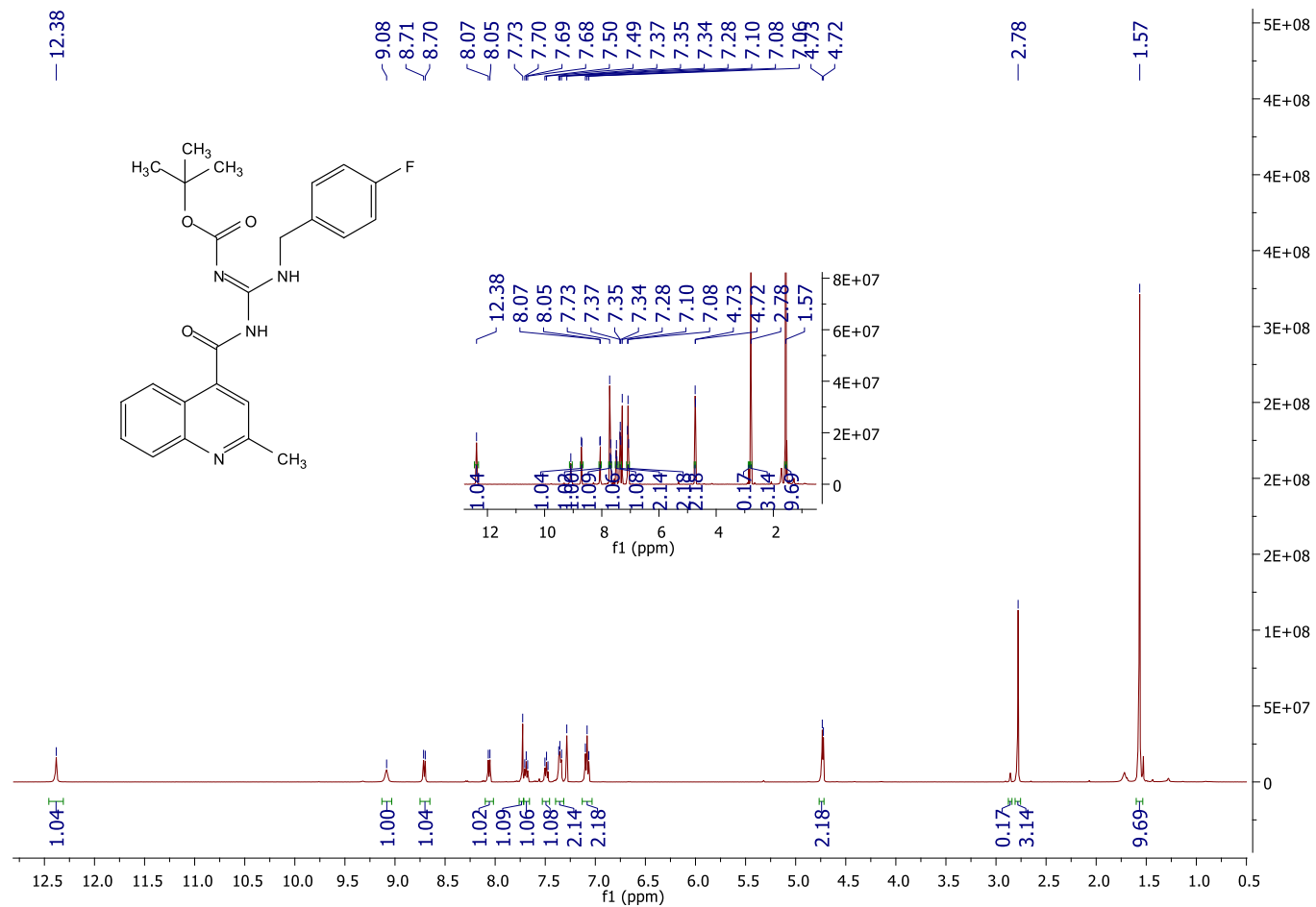
RMN_Mayara
 AMOSTRA: GMC1 (PROTON) - 500MHZ
 Solvente: CDCL3
 OPERADOR DO NMR - VINICIUS



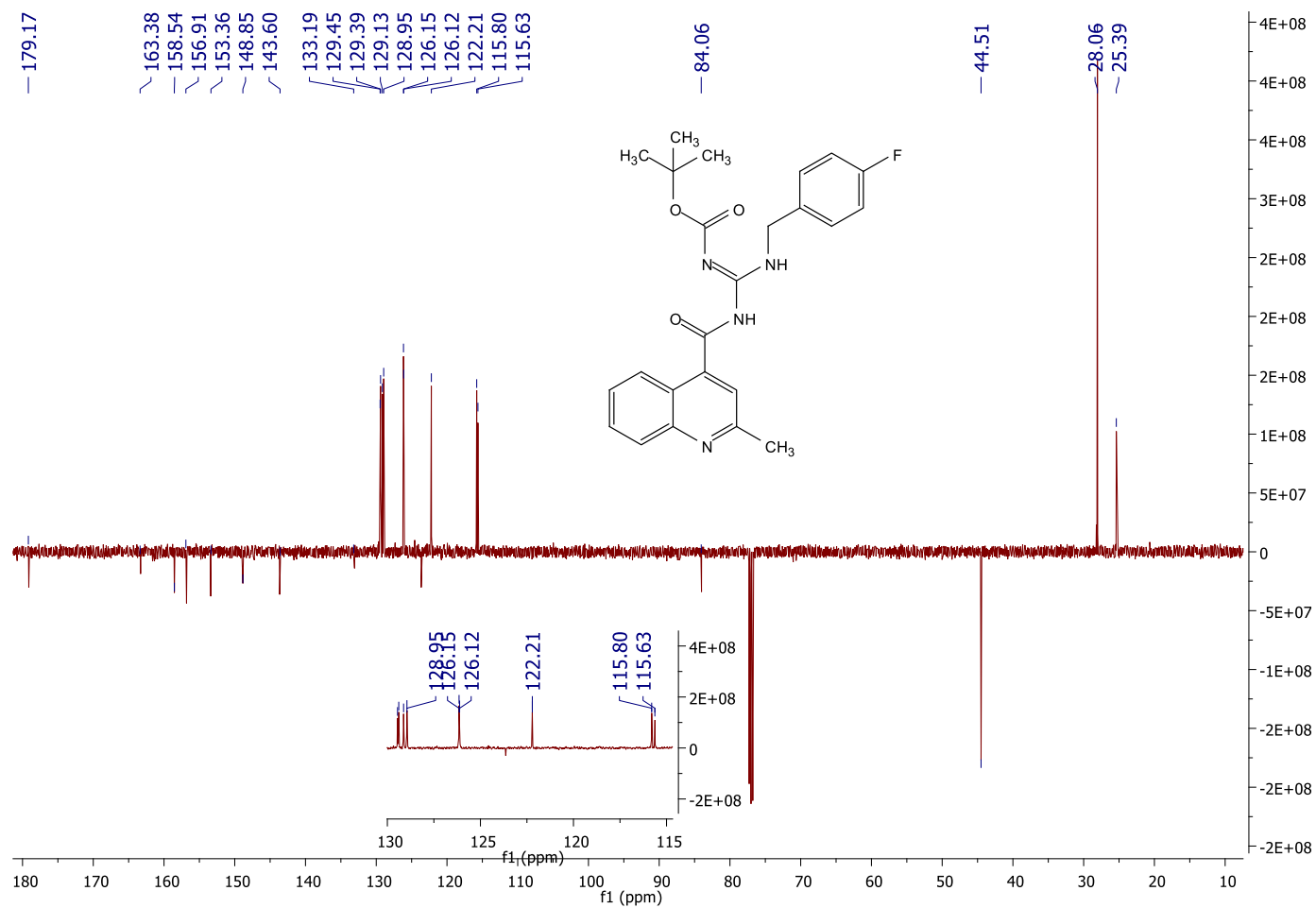
Anexo 15: Espectro de RMN ¹H do composto 58d em CDCl₃ a 500 MHz



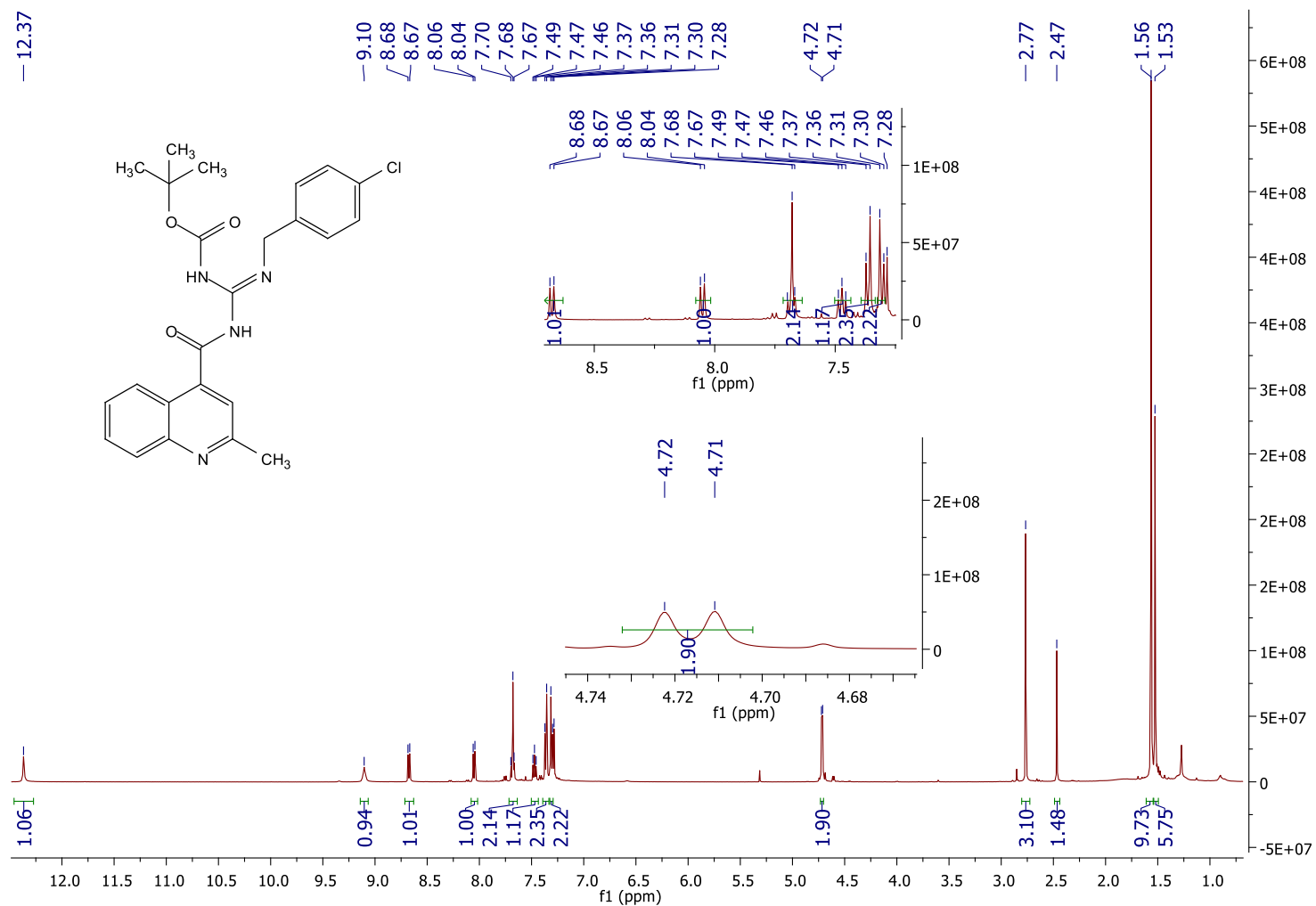
Anexo 16: Espectro de RMN ¹³C do composto 58d em CDCl₃ a 500 MHz



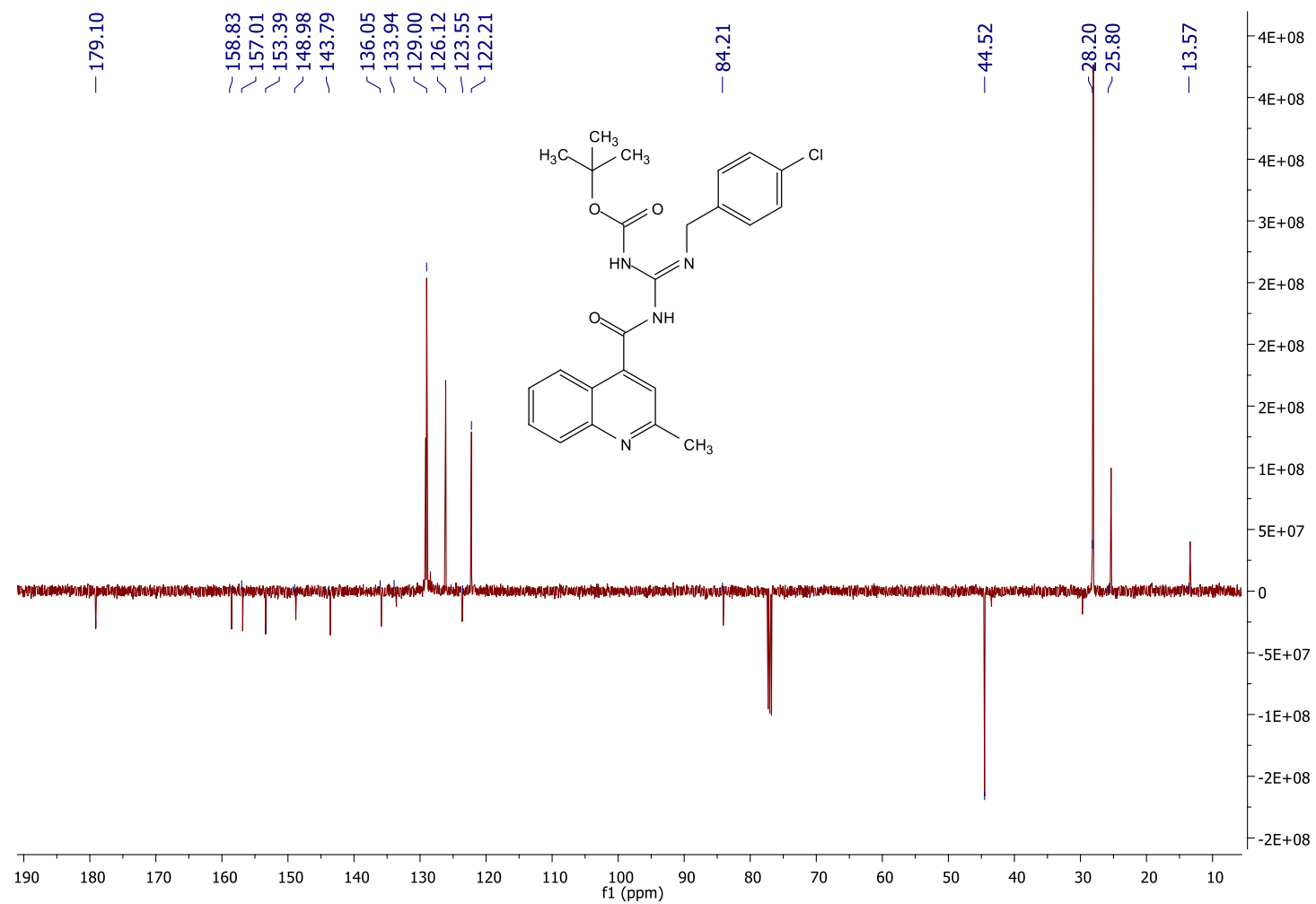
Anexo 17: Espectro de RMN ^1H do composto 59c em CDCl_3 a 500 MHz



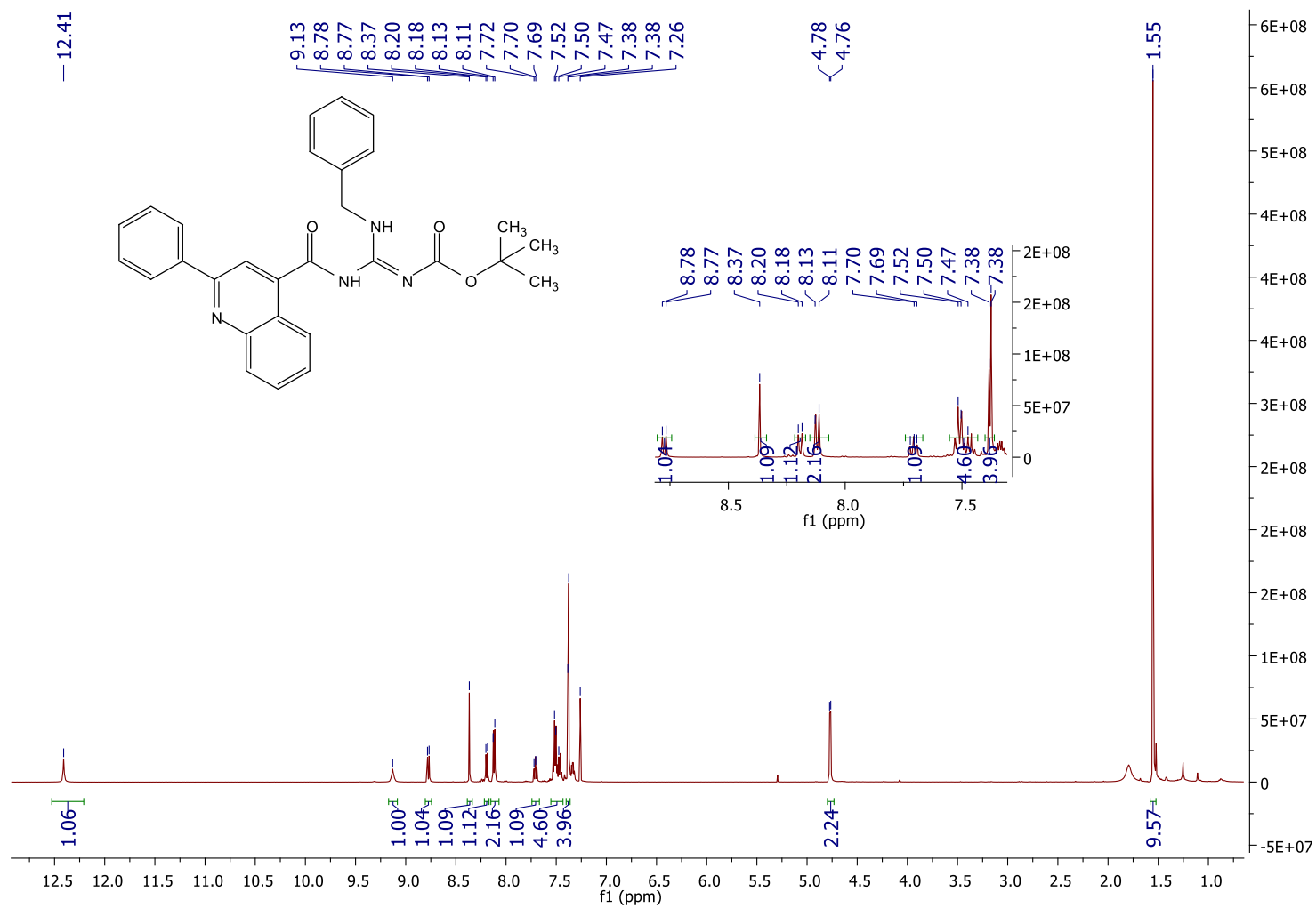
Anexo 18: Espectro de RMN ^{13}C do composto 59c em CDCl_3 a 500 MHz



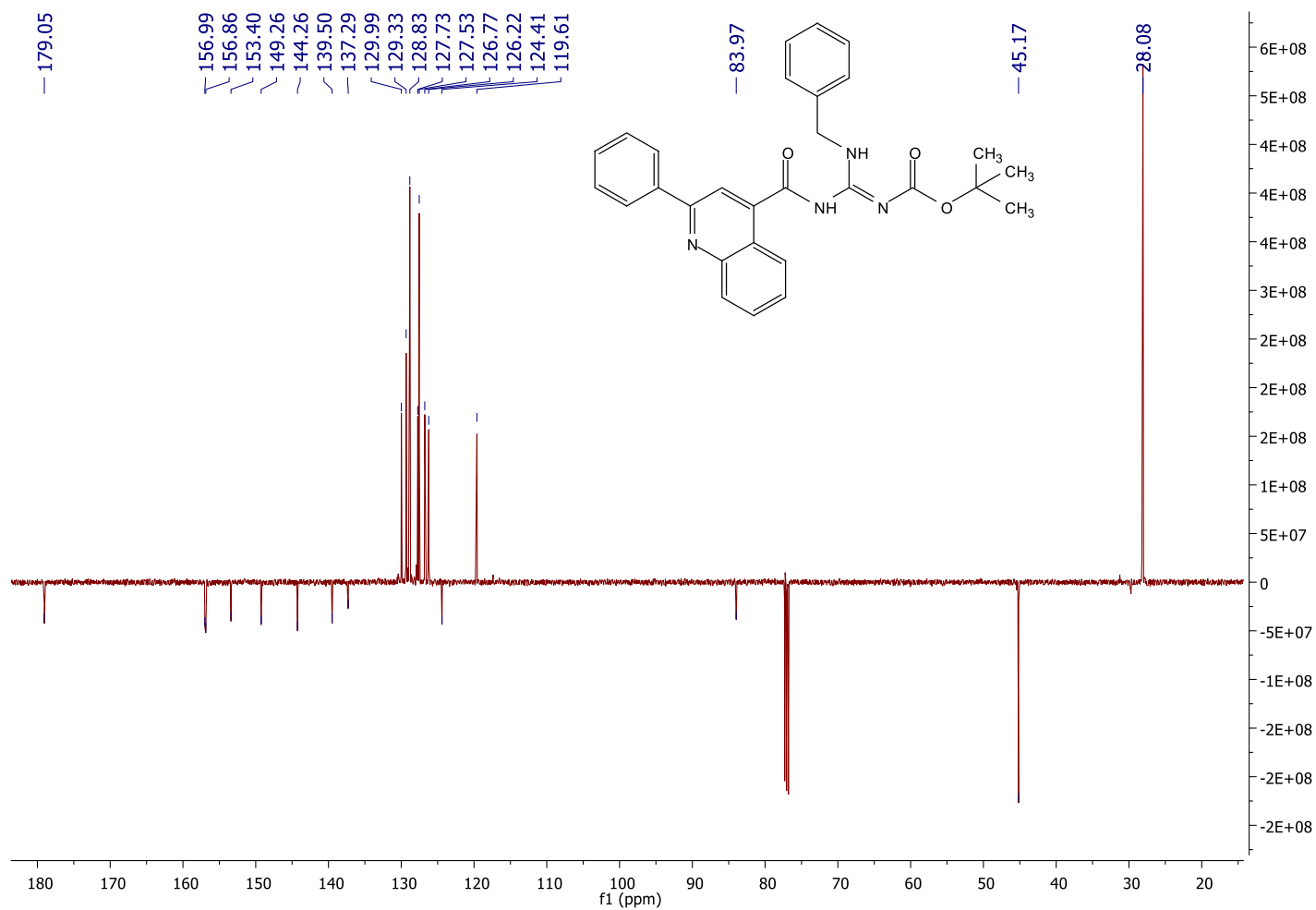
Anexo 19: Espectro de RMN ^1H do composto 59d em CDCl_3 a 500 MHz



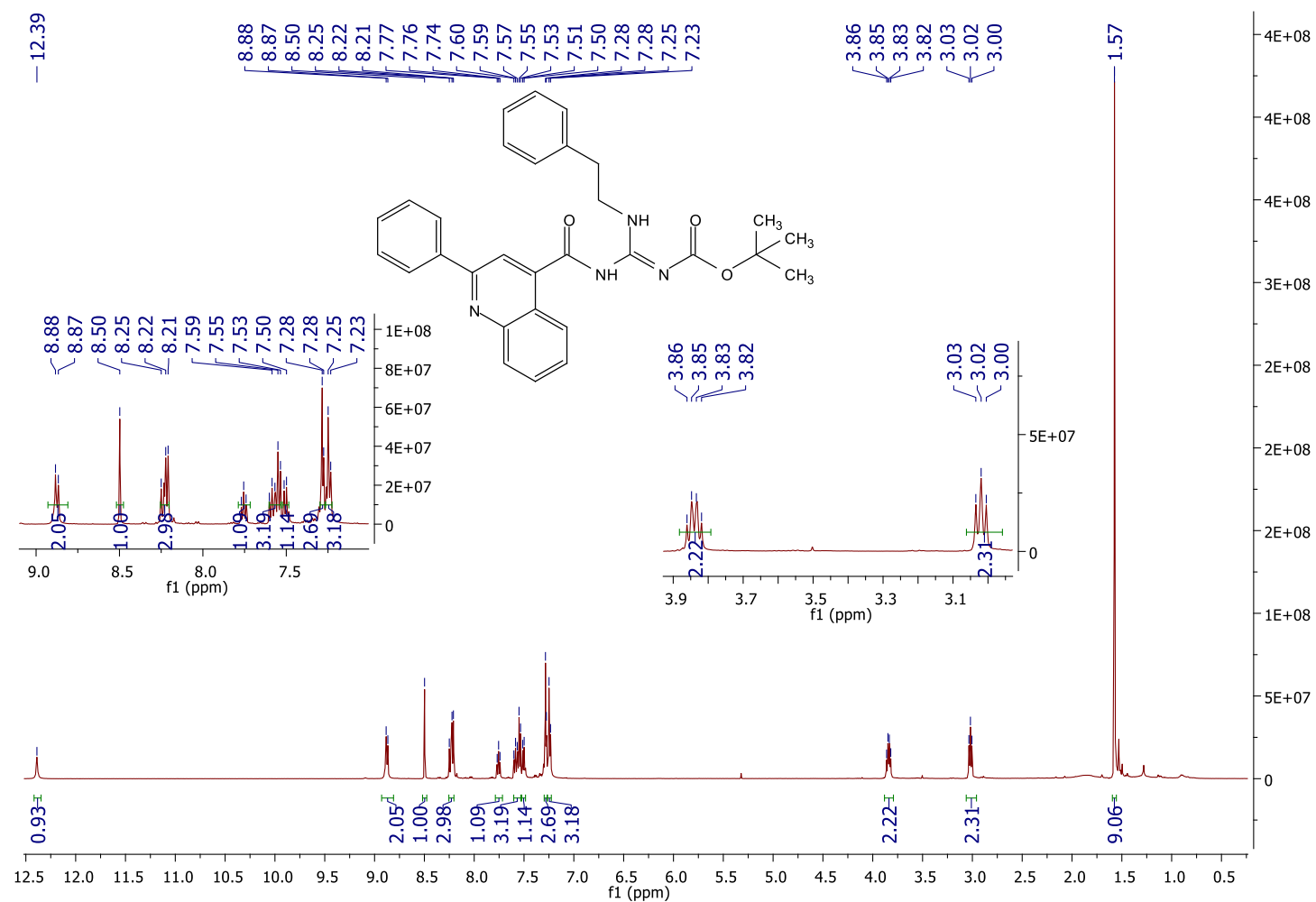
Anexo 20: Espectro de RMN ¹³C do composto 59d em CDCl₃ a 500 MHz



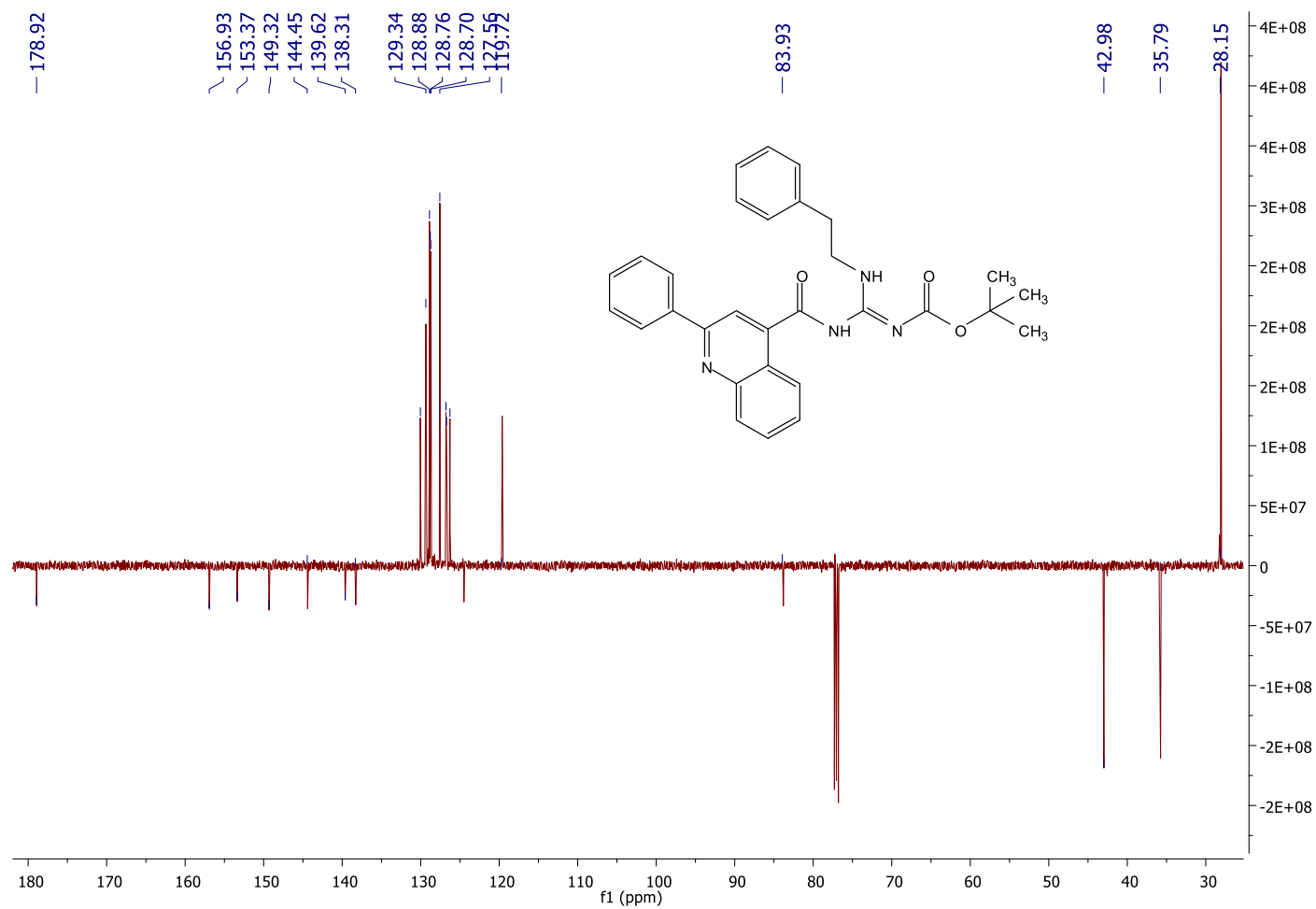
Anexo 21: Espectro de RMN ¹H do composto 60a em CDCl₃ a 500 MHz



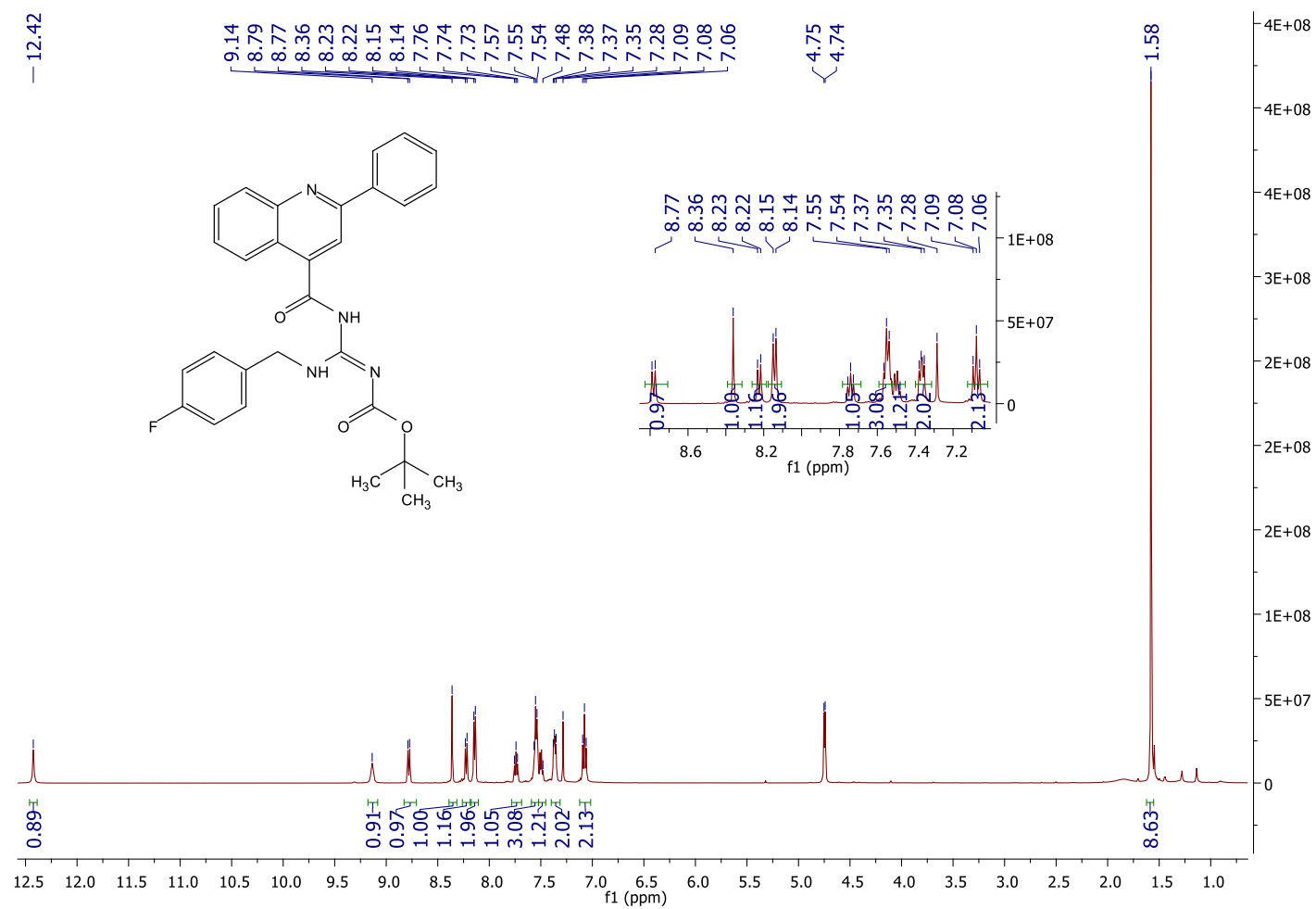
Anexo 22: Espectro de RMN ¹³C do composto 60a em CDCl₃ a 500 MHz



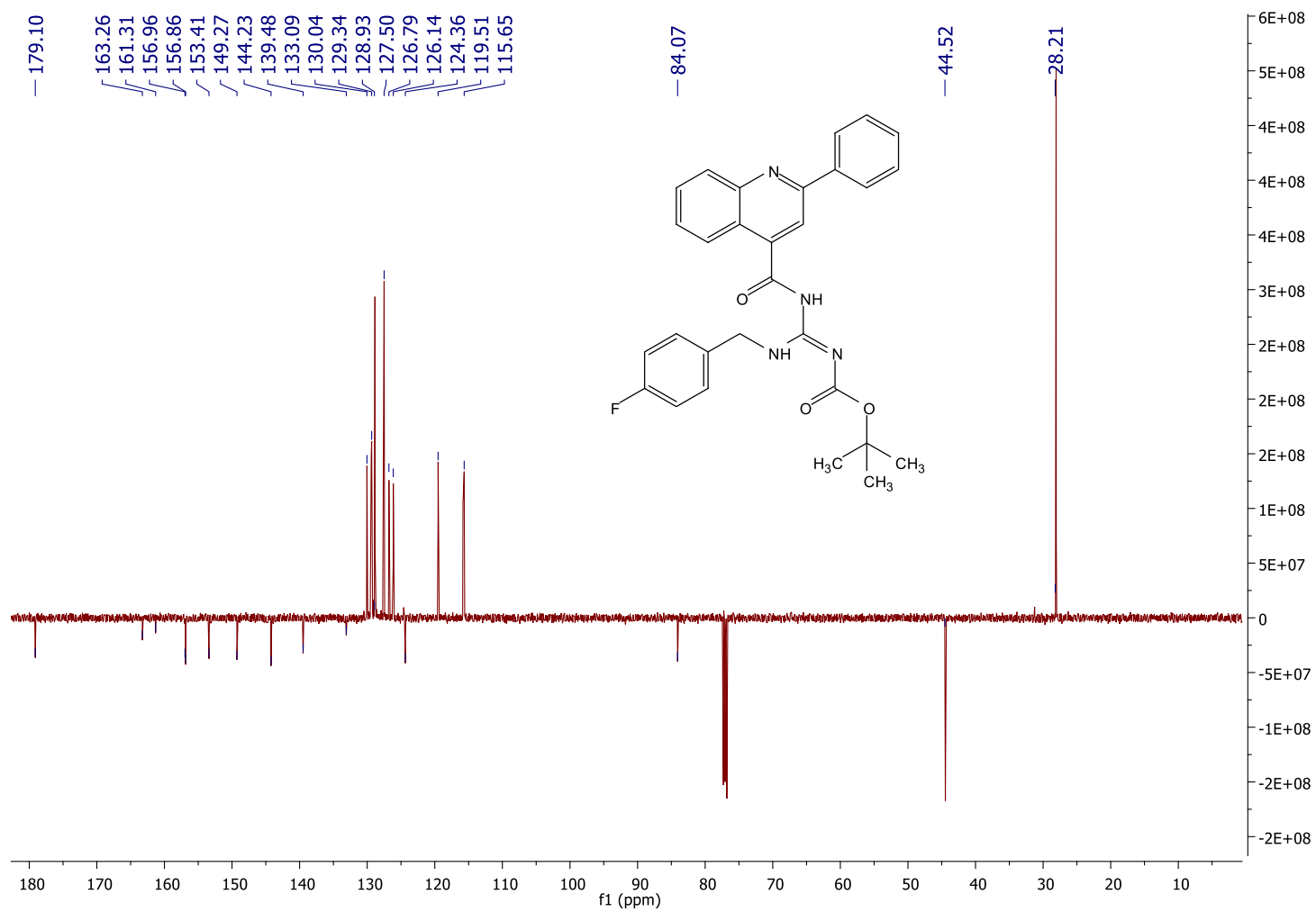
Anexo 23: Espectro de RMN ^1H do composto 60b em CDCl_3 a 500 MHz



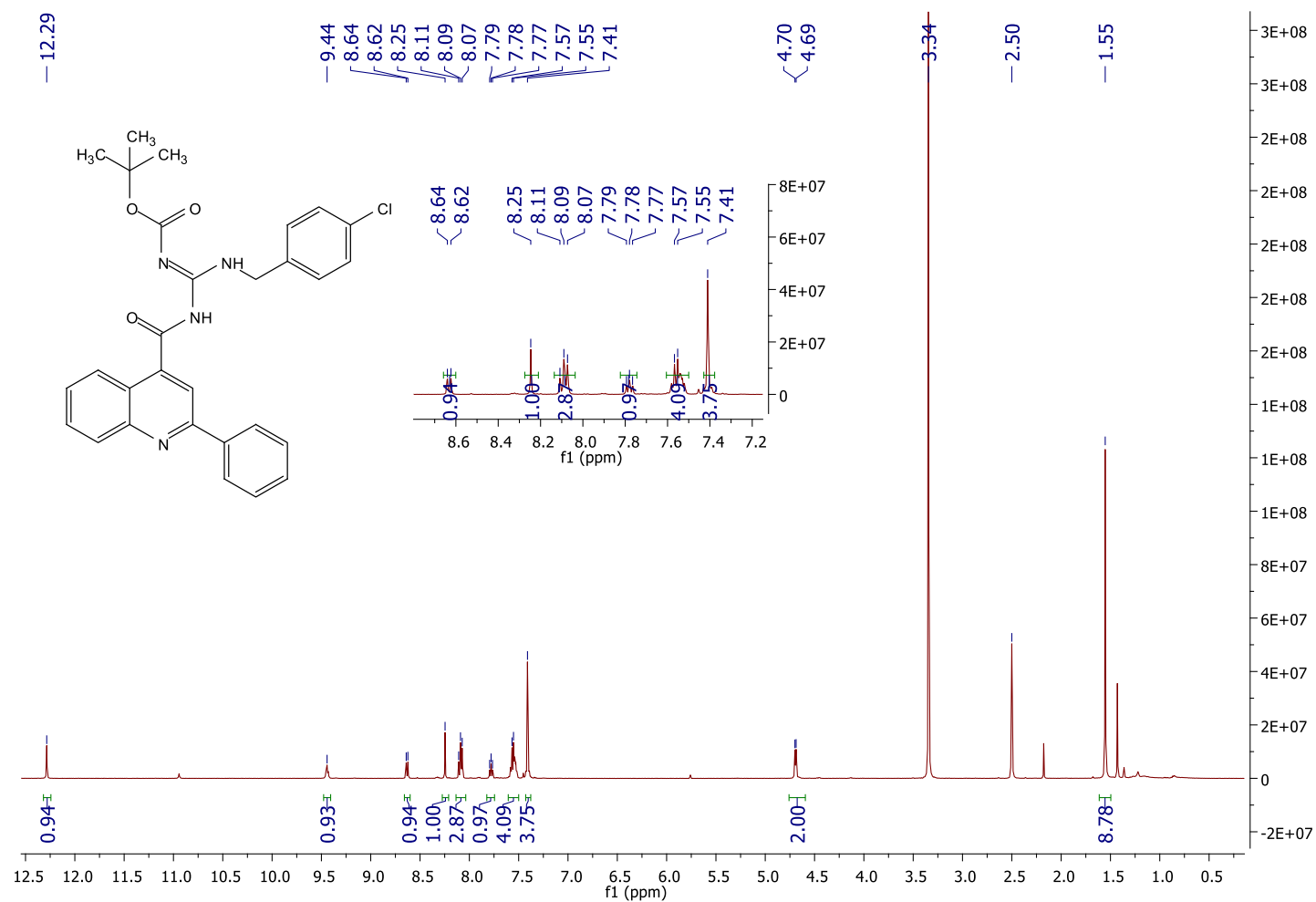
Anexo 24: Espectro de RMN ¹³C do composto 60b em CDCl₃ a 500 MHz



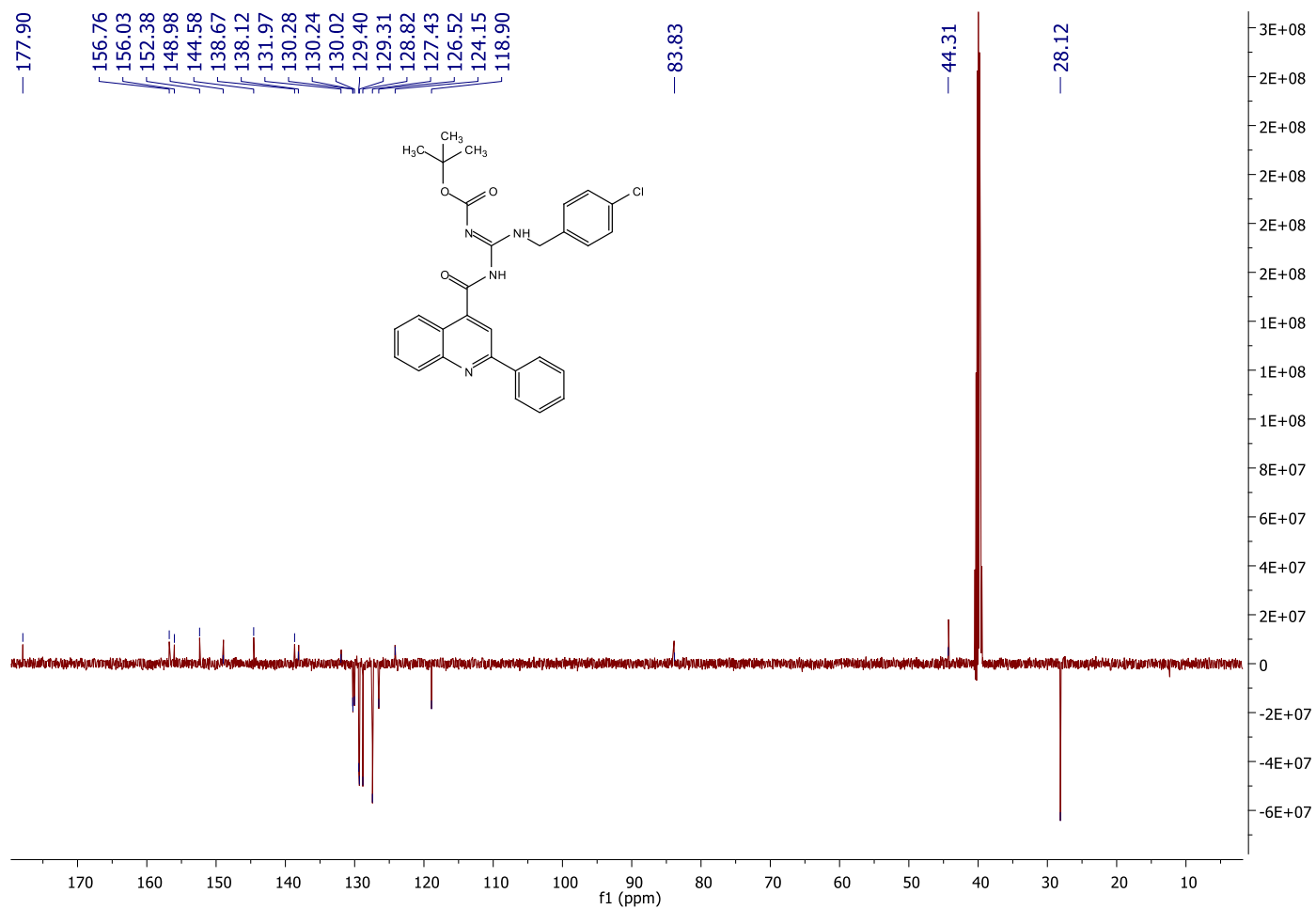
Anexo 25: Espectro de RMN ^1H do composto 60c em CDCl_3 a 500 MHz



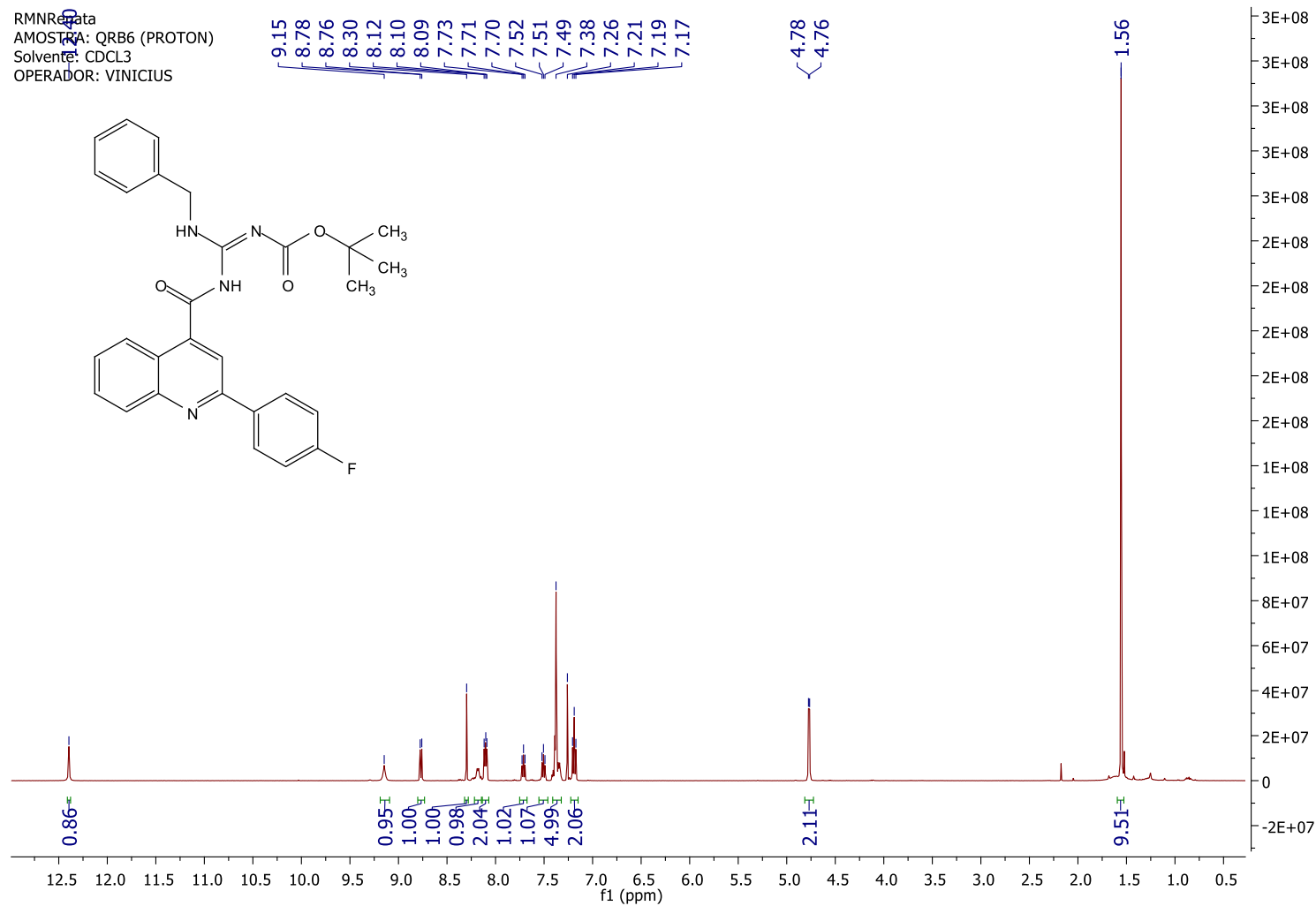
Anexo 26: Espectro de RMN ¹³C do composto 60c em CDCl₃ a 500 MHz



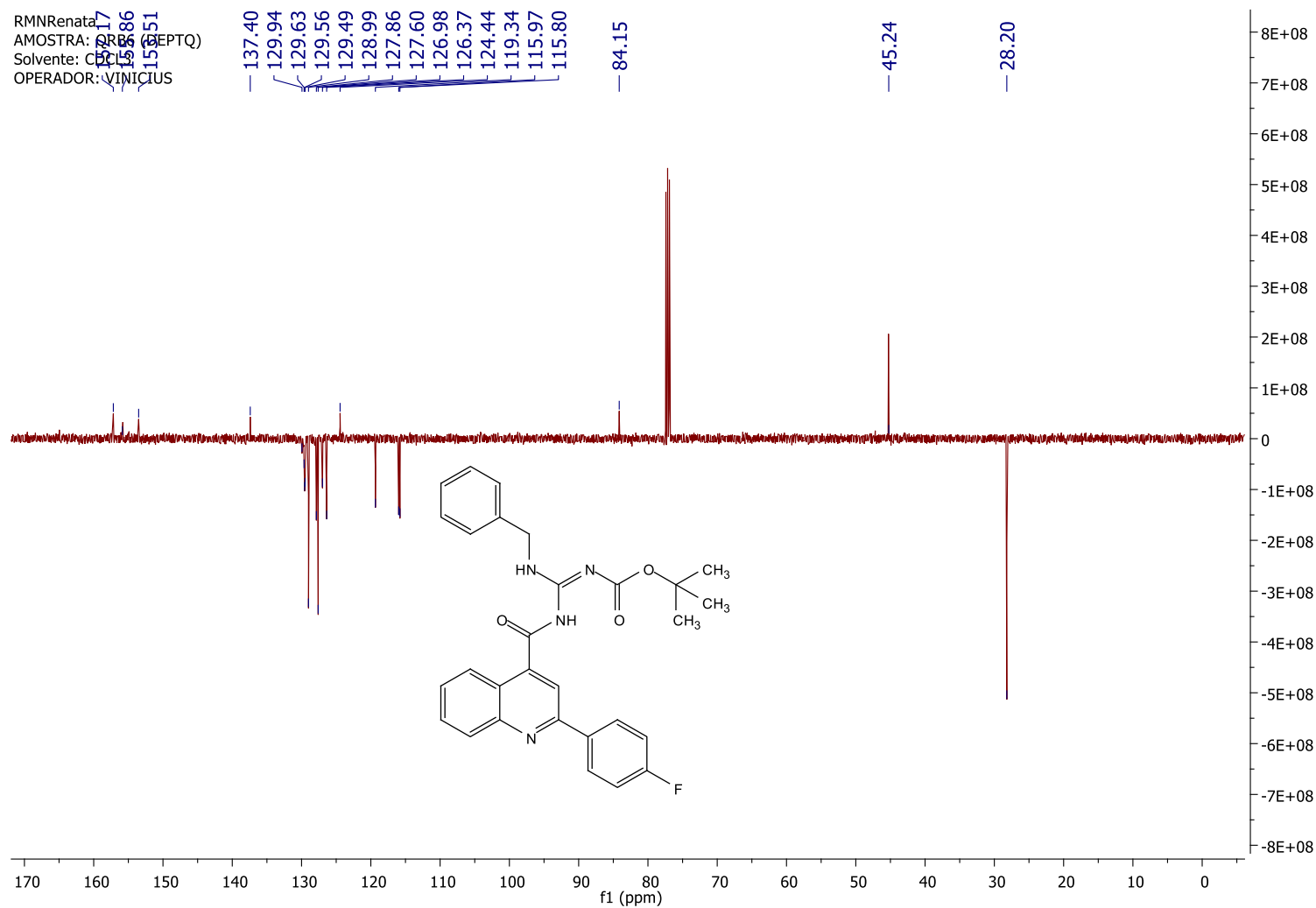
Anexo 27: Espectro de RMN ^1H do composto 60d em DMSO a 500 MHz



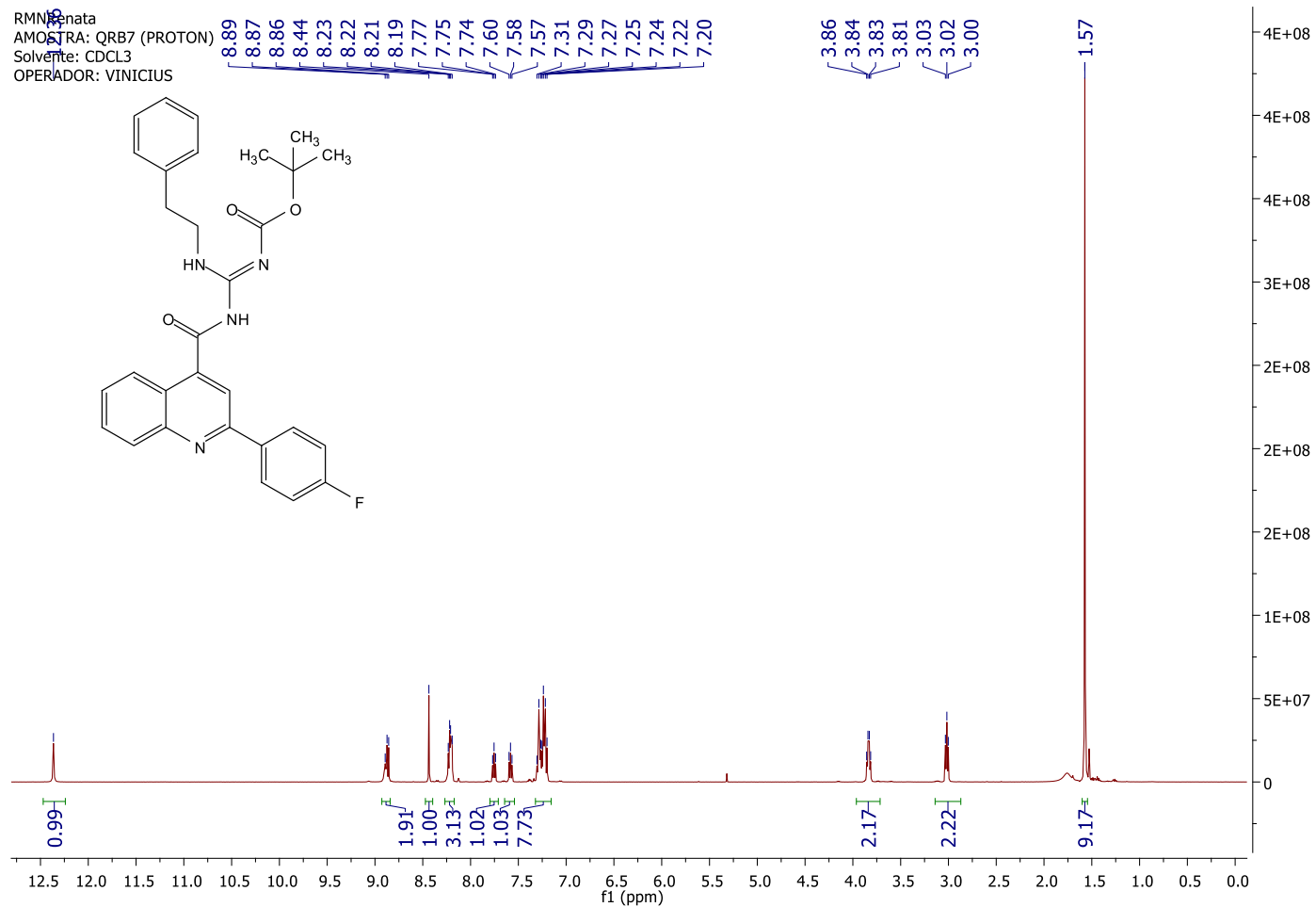
Anexo 28: Espectro de RMN ¹³C do composto 60d em DMSO a 500 MHz



Anexo 29: Espectro de RMN ^1H do composto 61a em DMSO a 500 MHz

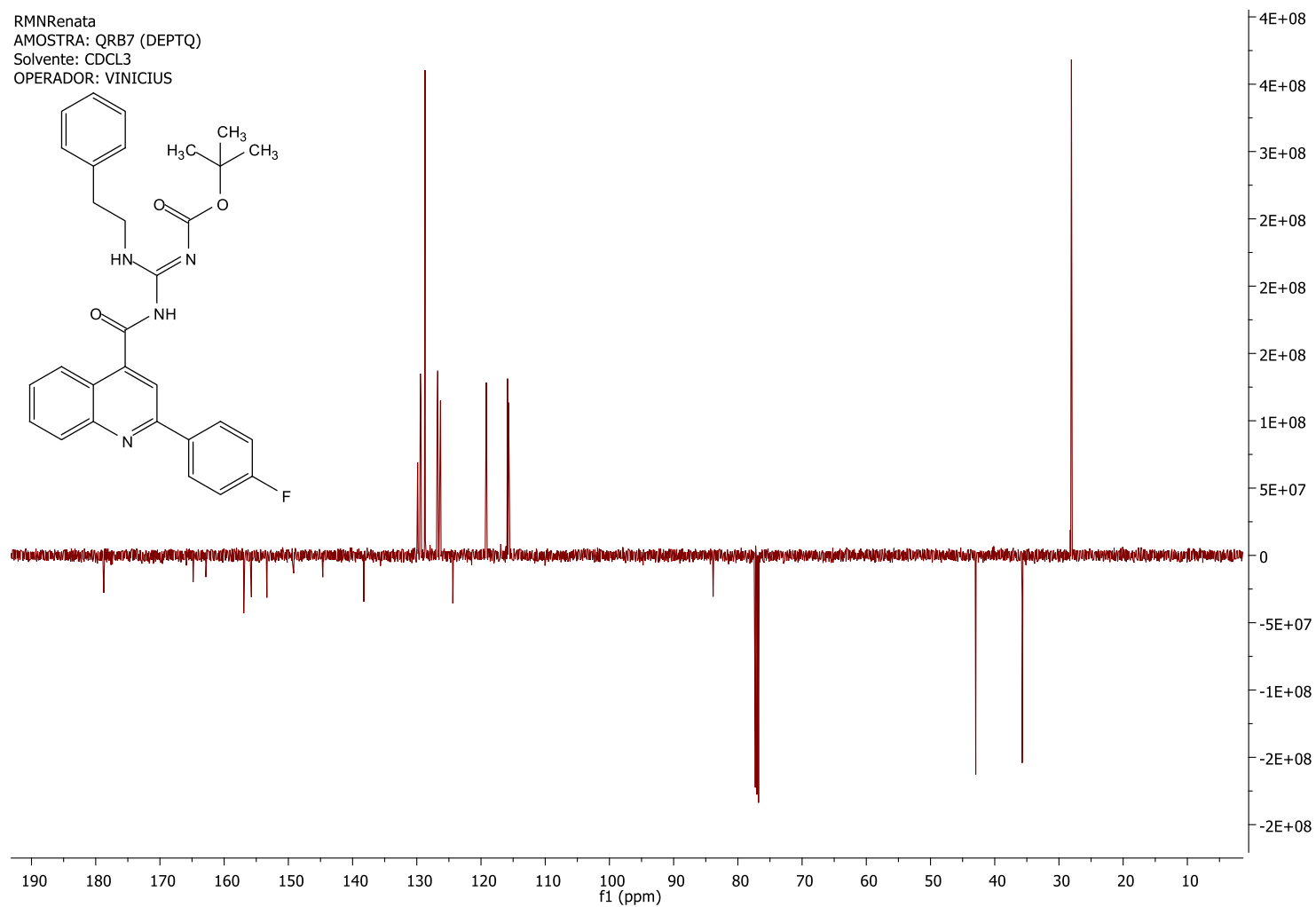


Anexo 30: Espectro de RMN ¹³C do composto 61a em DMSO a 500 MHz

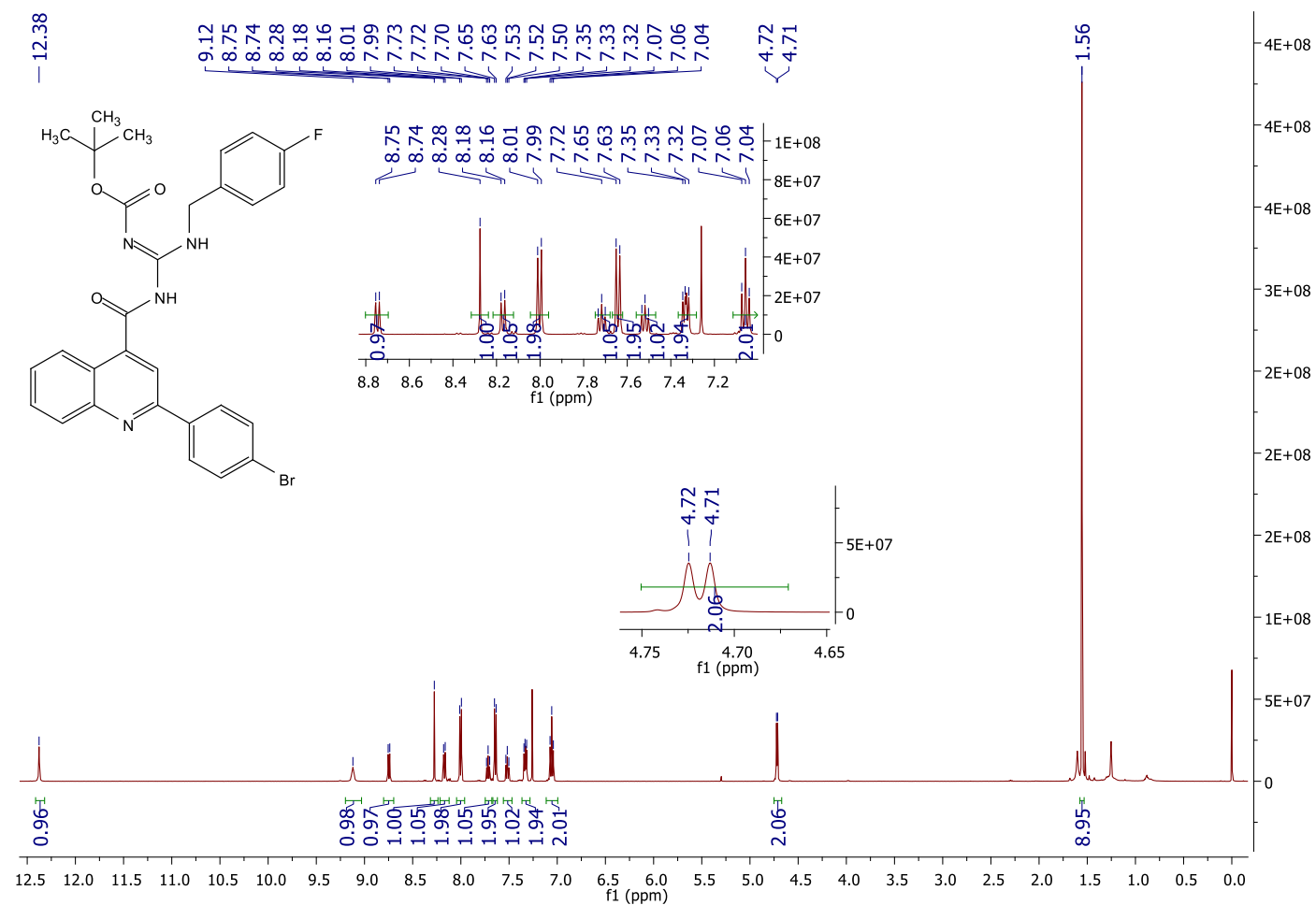


Anexo 31: Espectro de RMN ^1H do composto 61b em DMSO a 500 MHz

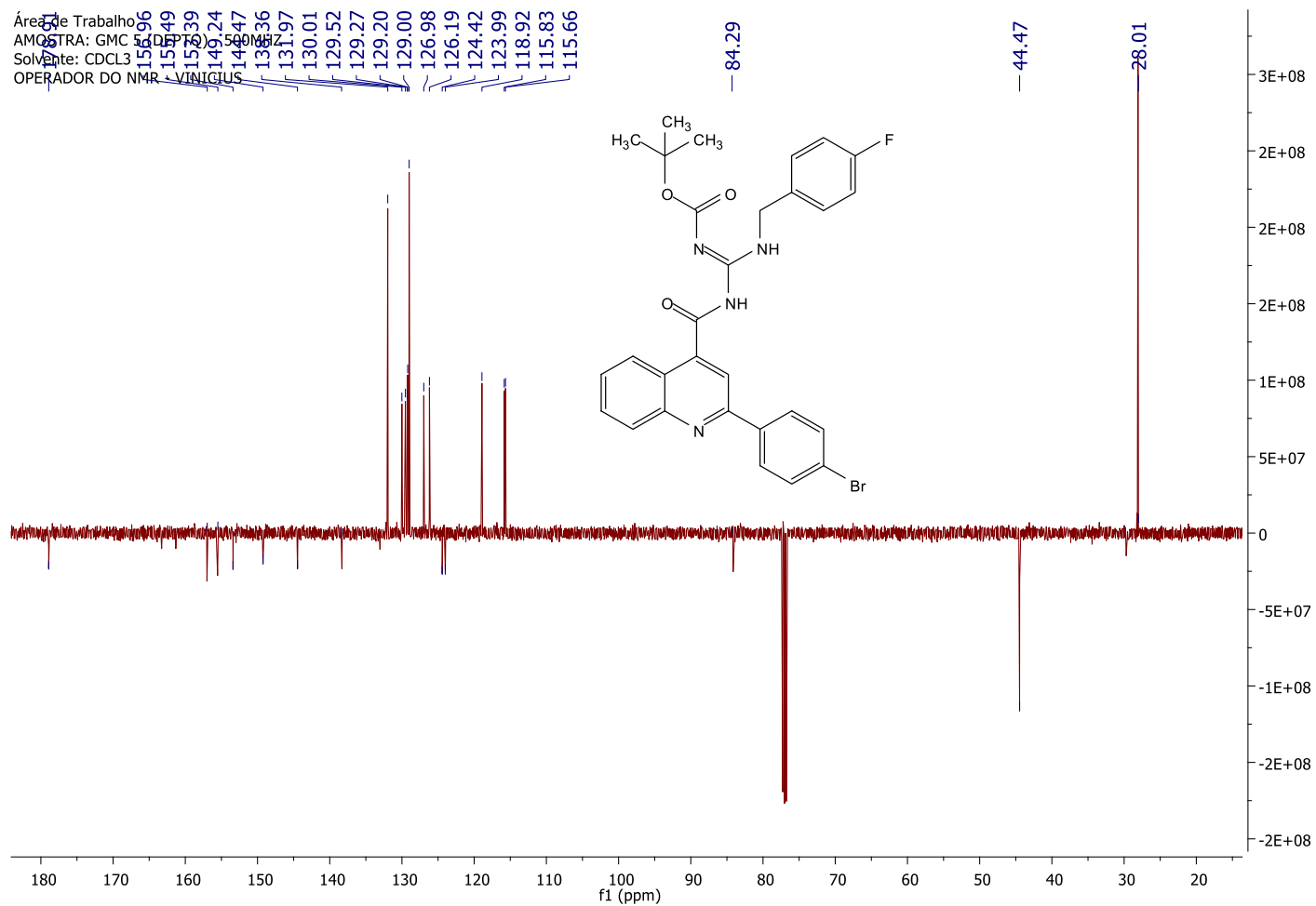
RMNRenata
 AMOSTRA: QRB7 (DEPTQ)
 Solvente: CDCL3
 OPERADOR: VINICIUS



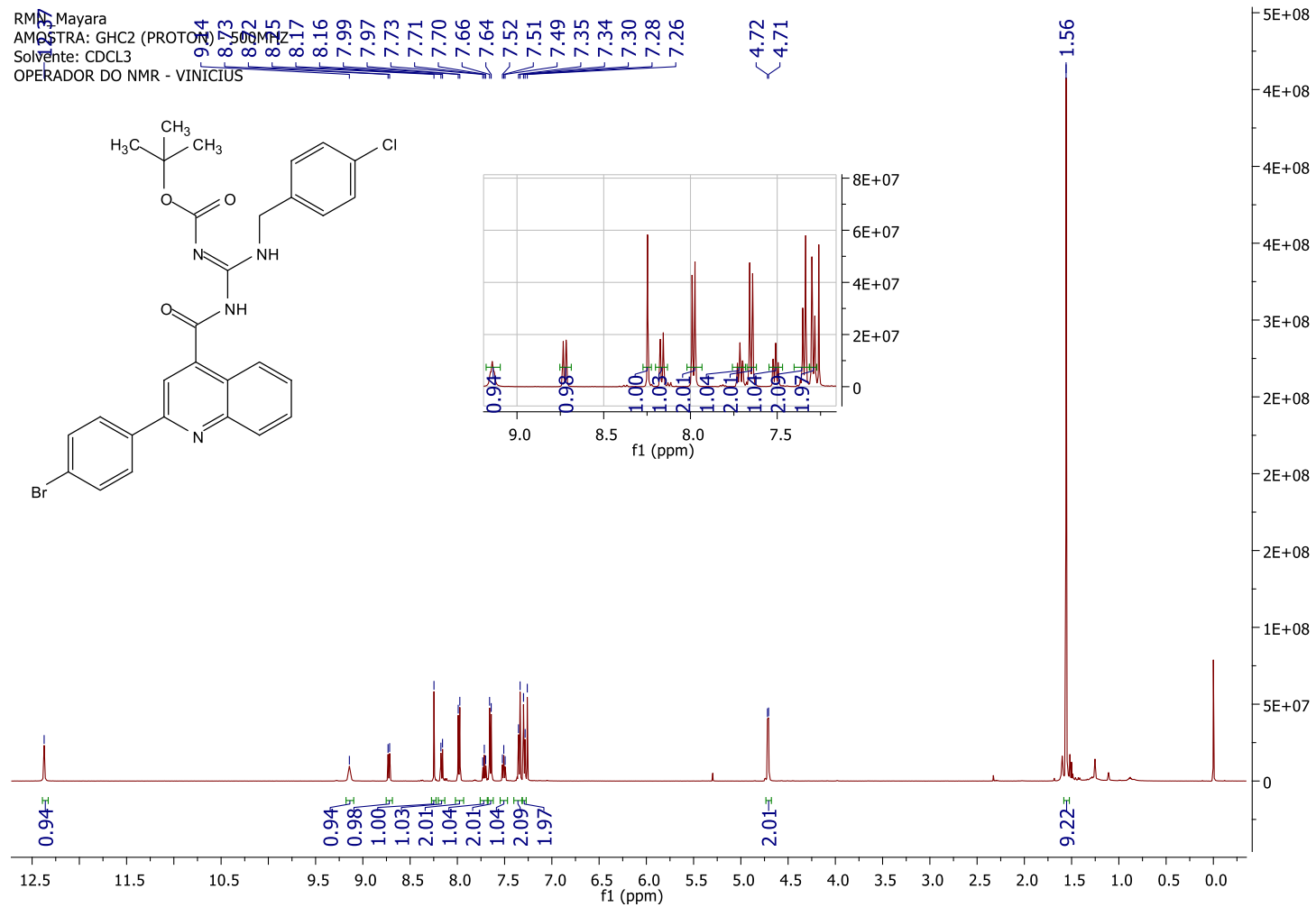
Anexo 32: Espectro de RMN ¹³C do composto 61b em DMSO a 500 MHz



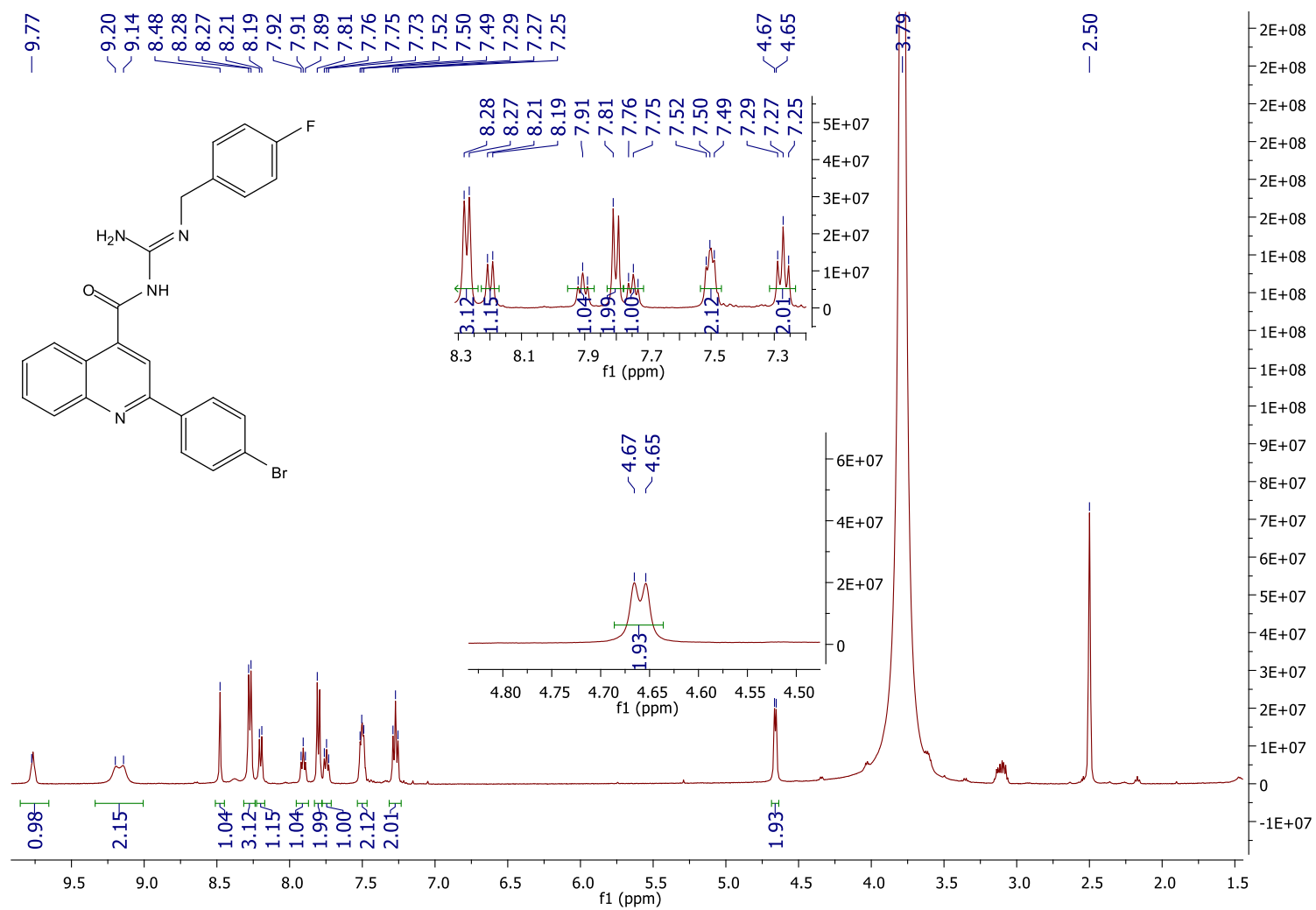
Anexo 33: Espectro de RMN ^1H do composto 62c em DMSO a 500 MHz



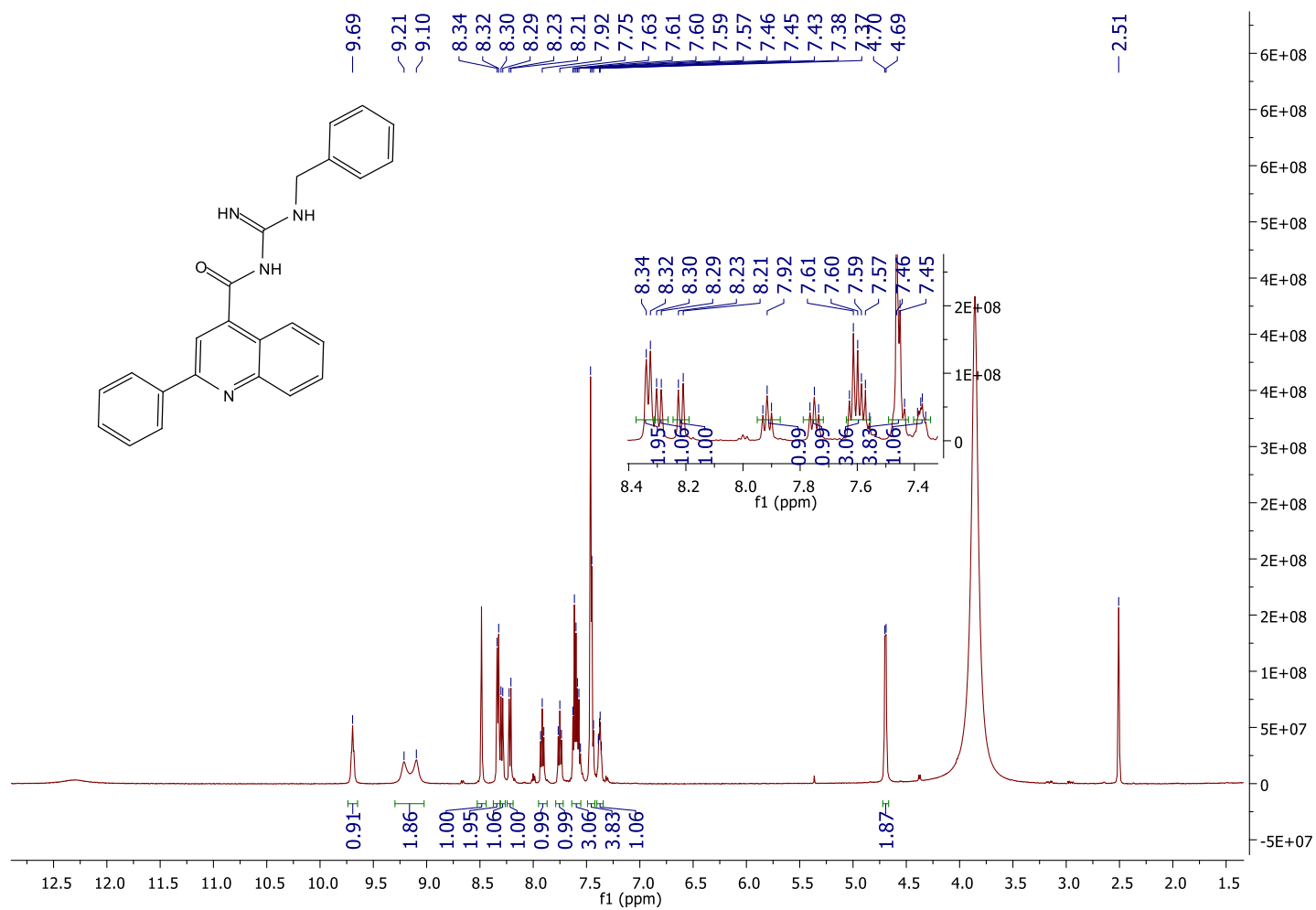
Anexo 34: Espectro de RMN ^{13}C do composto 62c em DMSO a 500 MHz



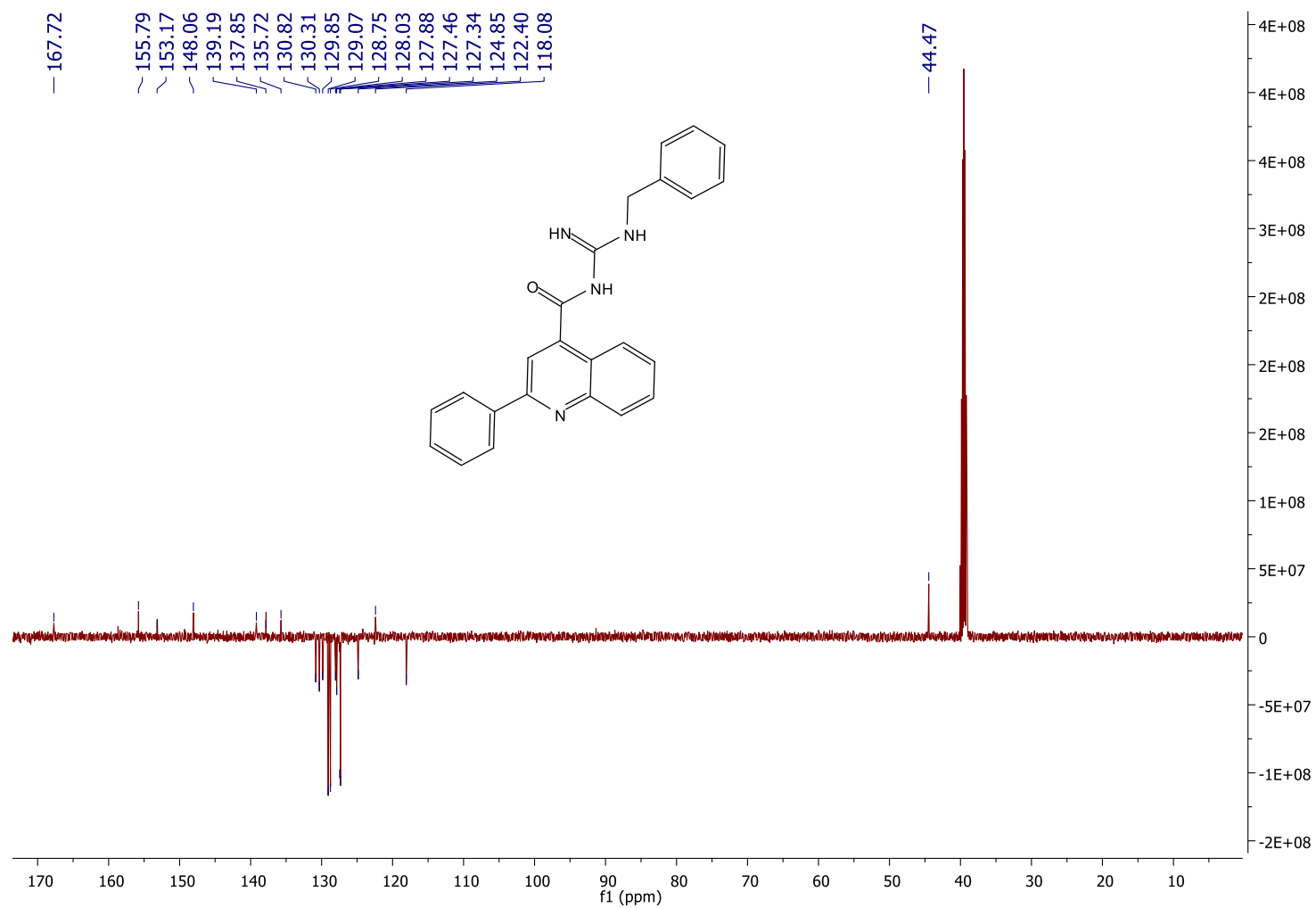
Anexo 35: Espectro de RMN ¹H do composto 62d em DMSO a 500 MHz



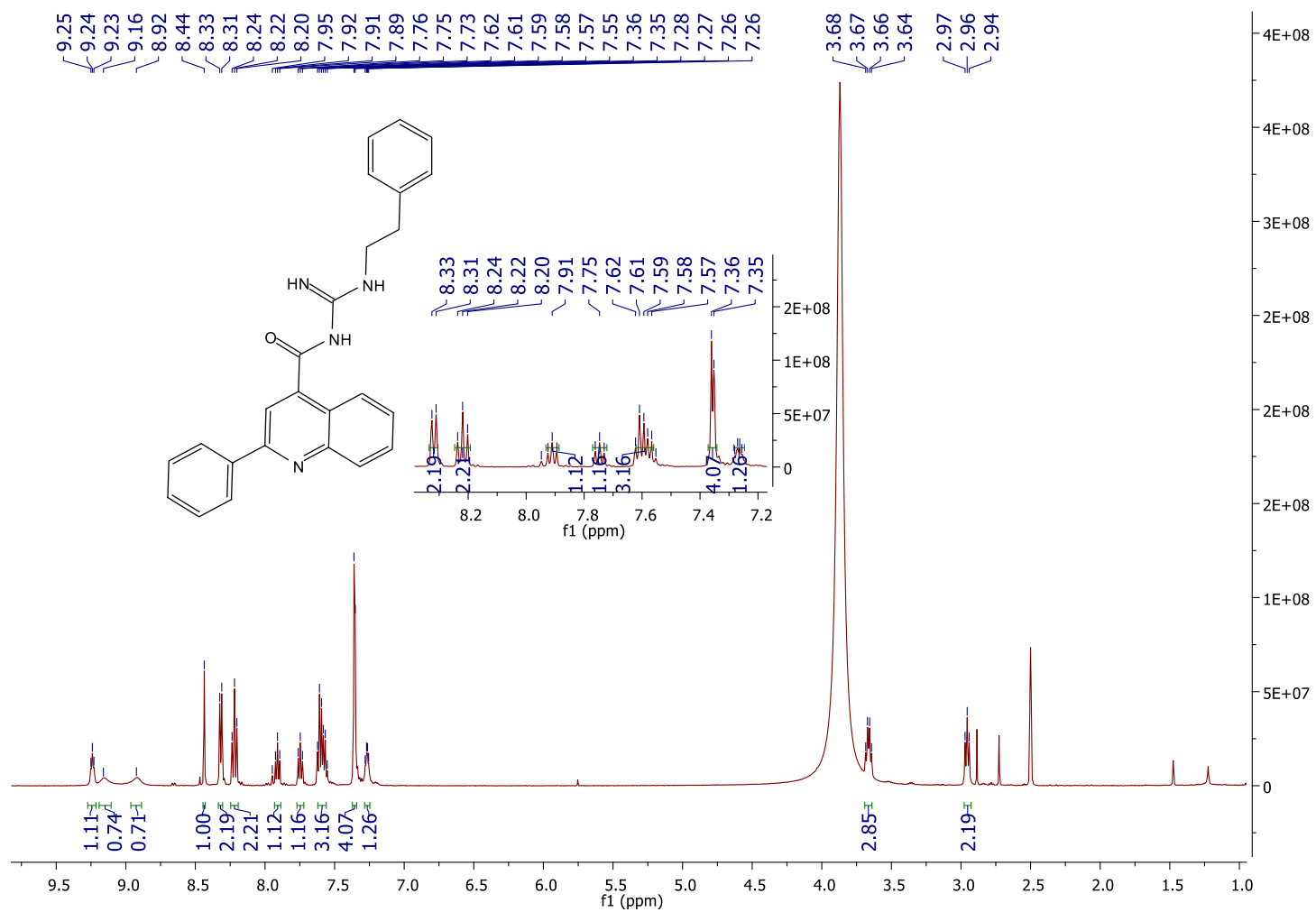
Anexo 36: Espectro de RMN ^{13}C do composto 62d em DMSO a 500 MHz



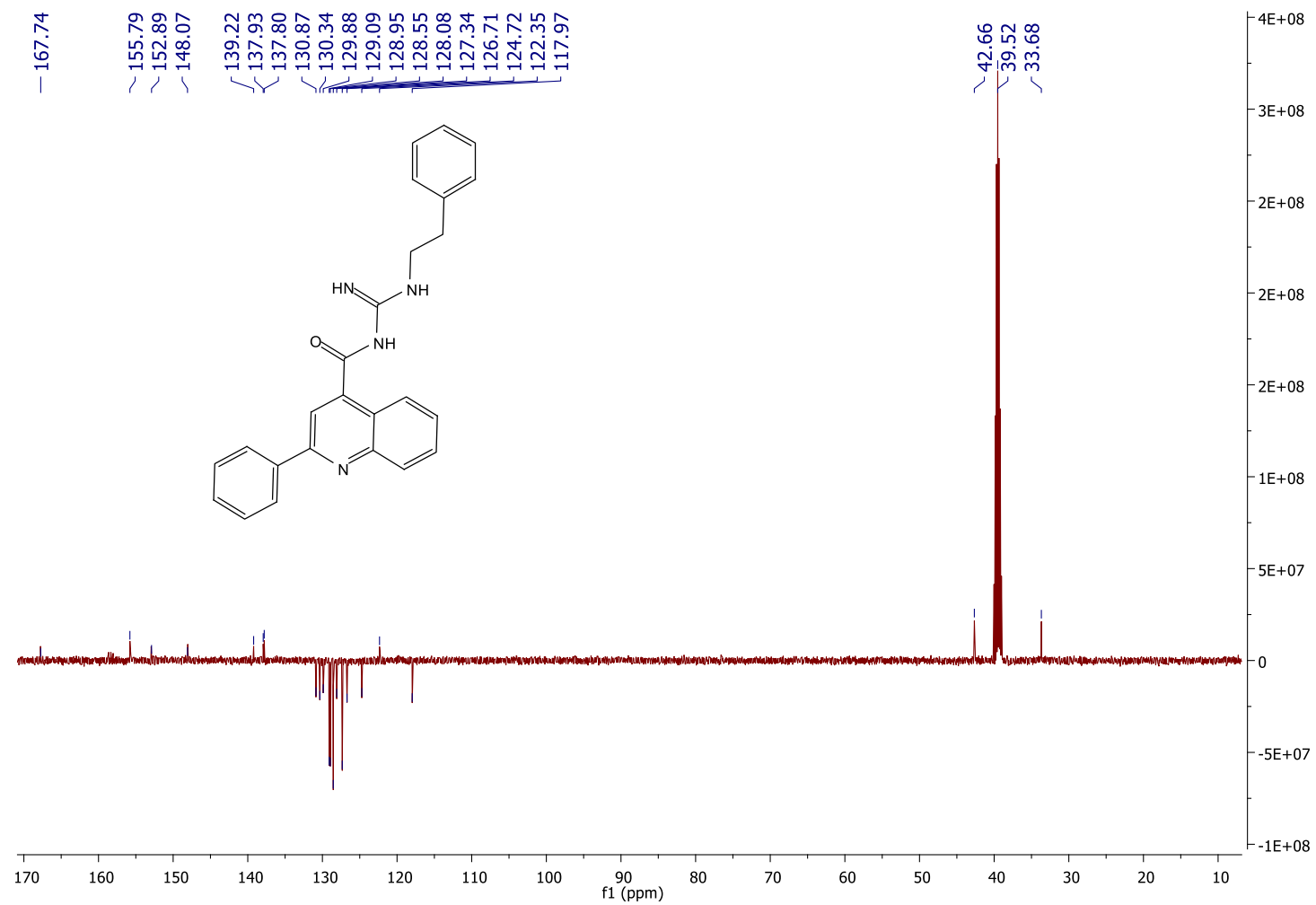
Anexo 37: Espectro de RMN ¹H do composto 64a em DMSO a 500 MHz



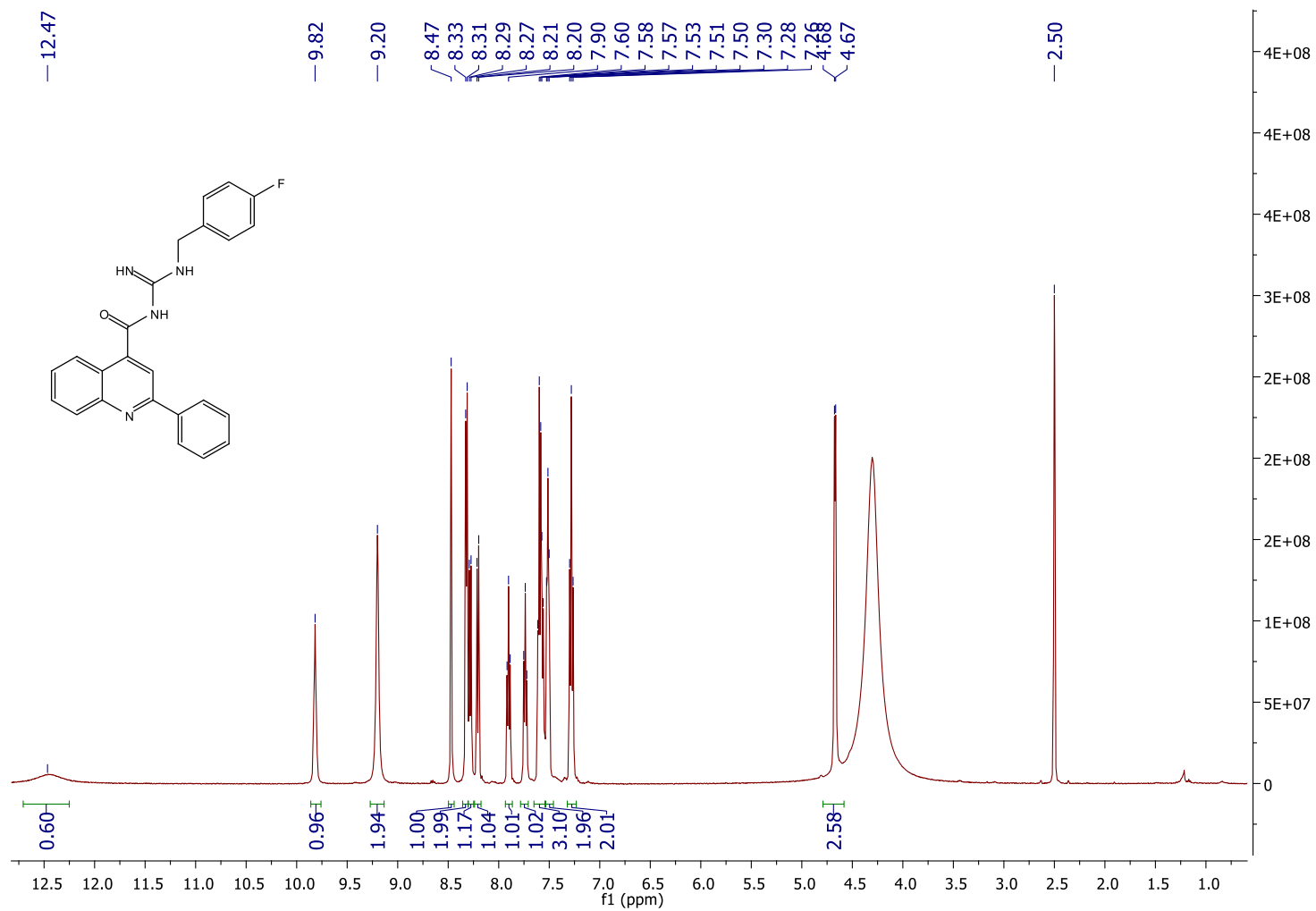
Anexo 38: Espectro de RMN ¹³C do composto 64a em DMSO a 500 MHz



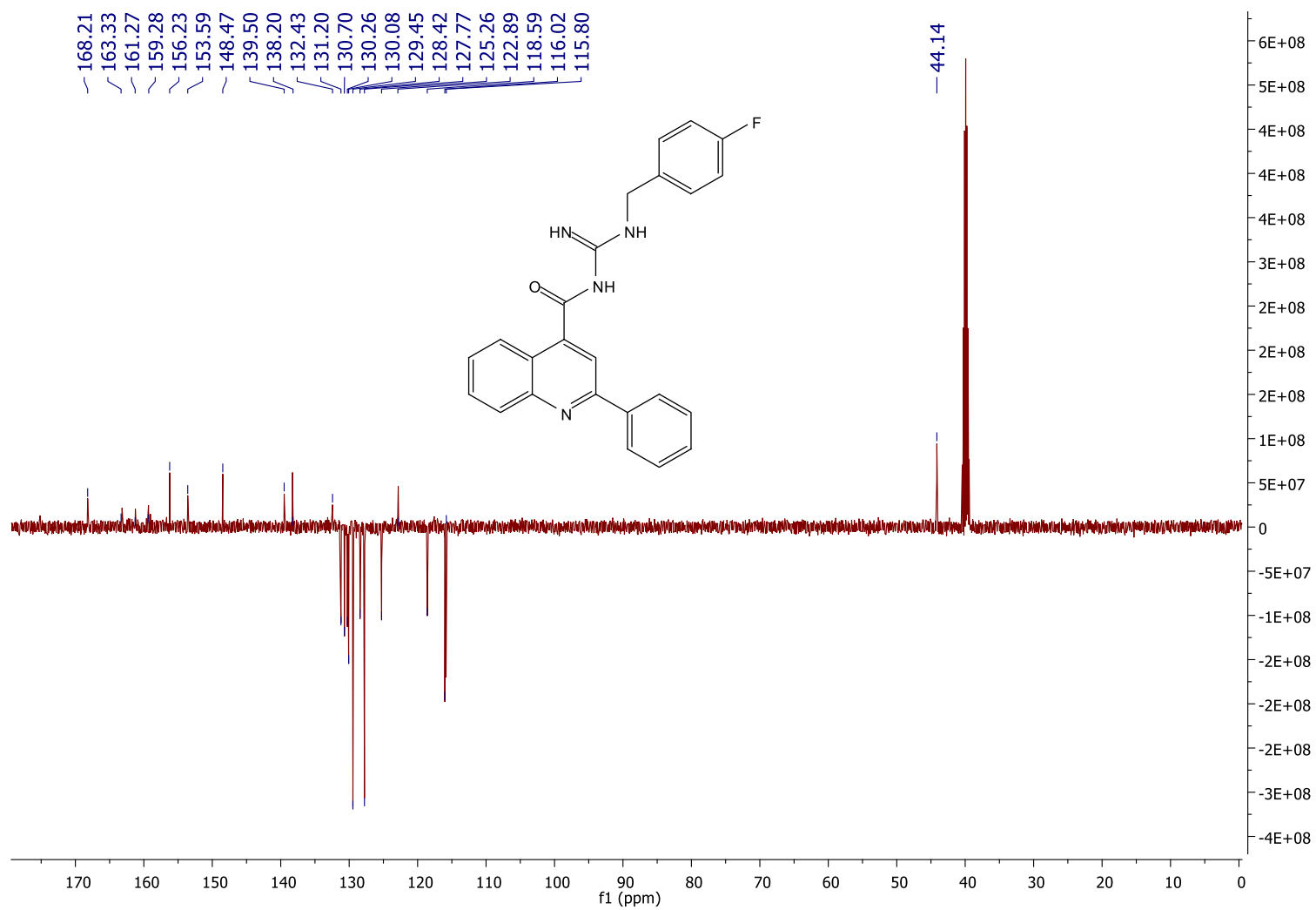
Anexo 39: Espectro de RMN ^1H do composto 64b em DMSO a 500 MHz



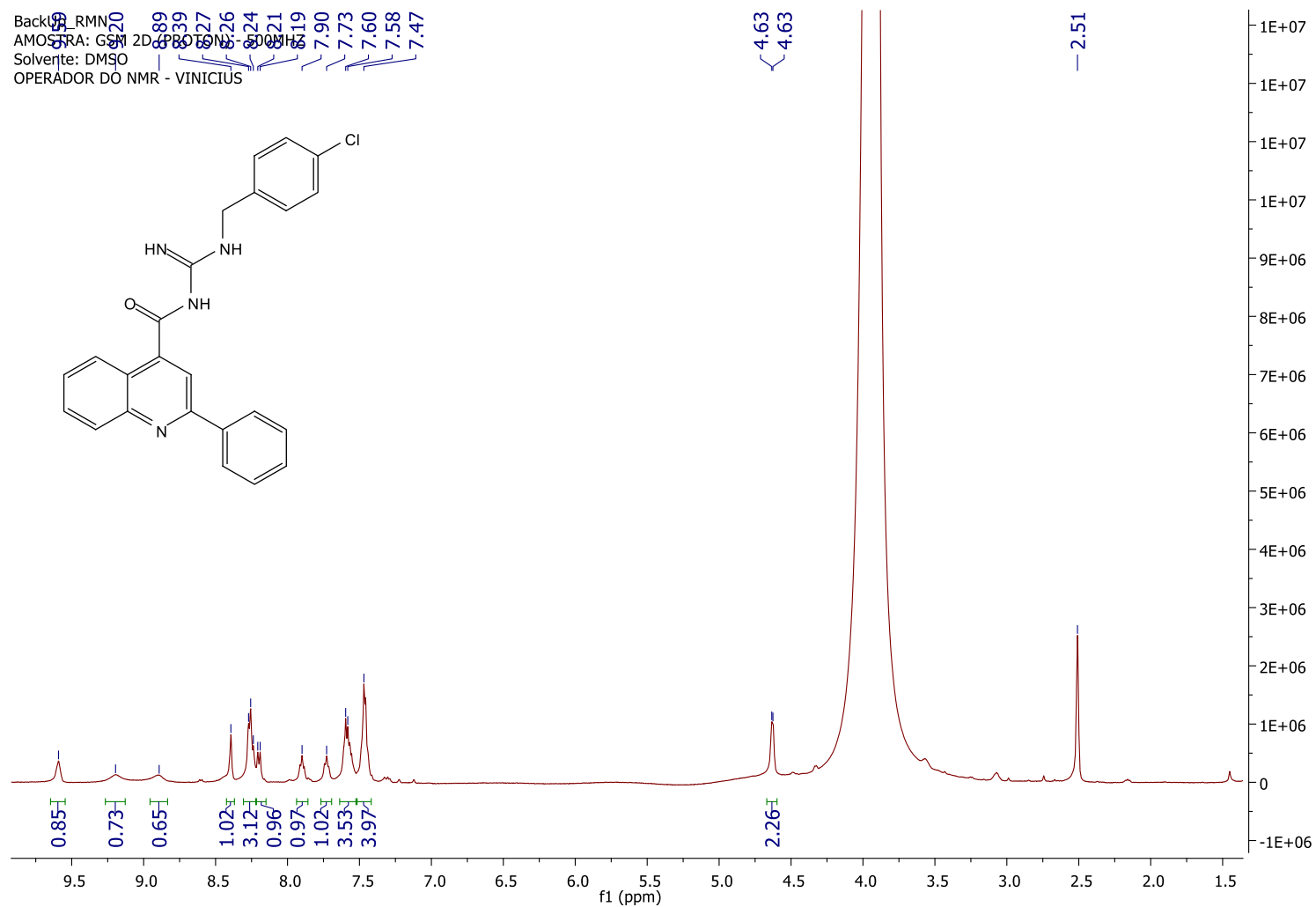
Anexo 40: Espectro de RMN ¹³C do composto 64b em DMSO a 500 MHz



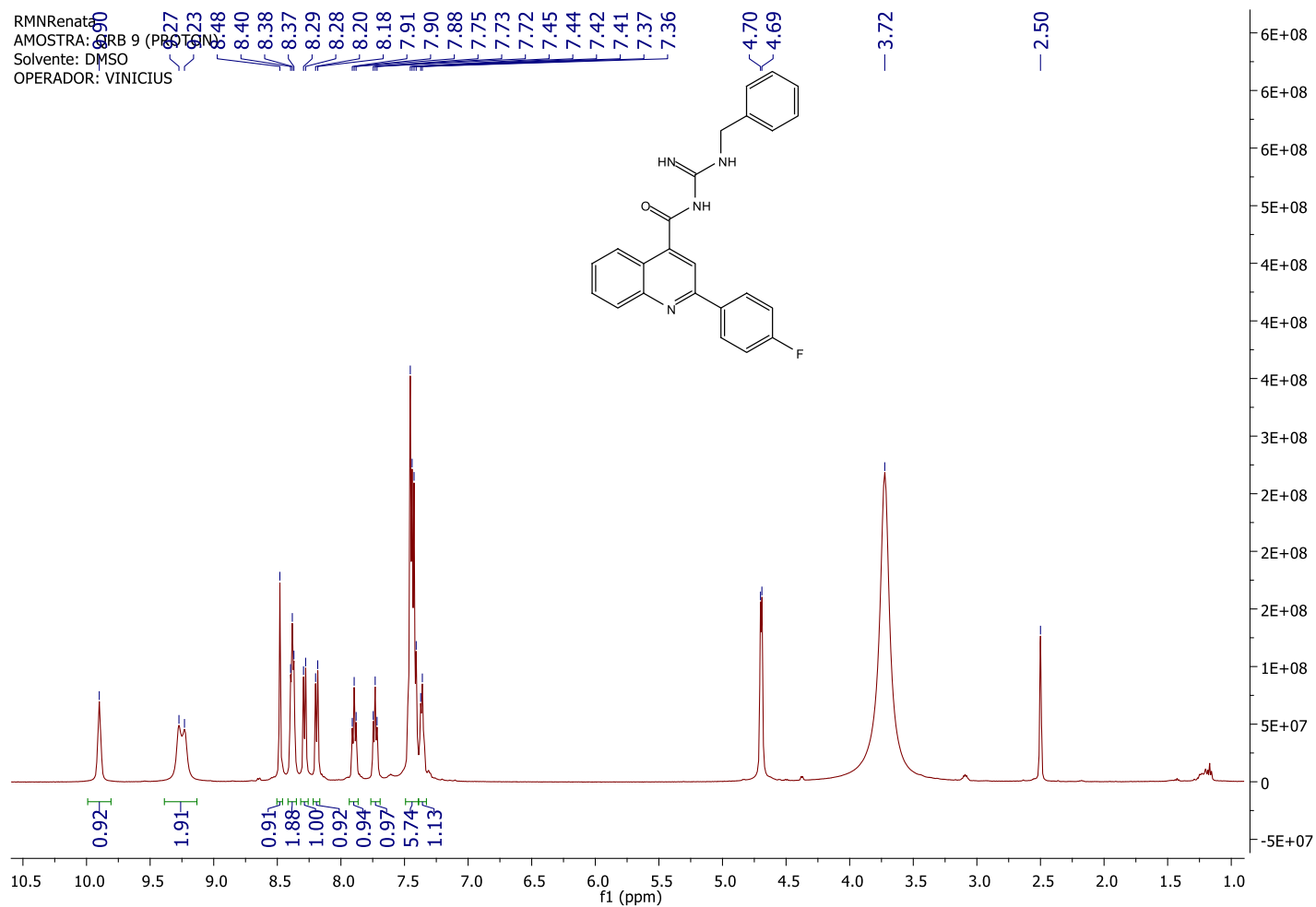
Anexo 41: Espectro de RMN ¹H do composto 64c em DMSO a 500 MHz



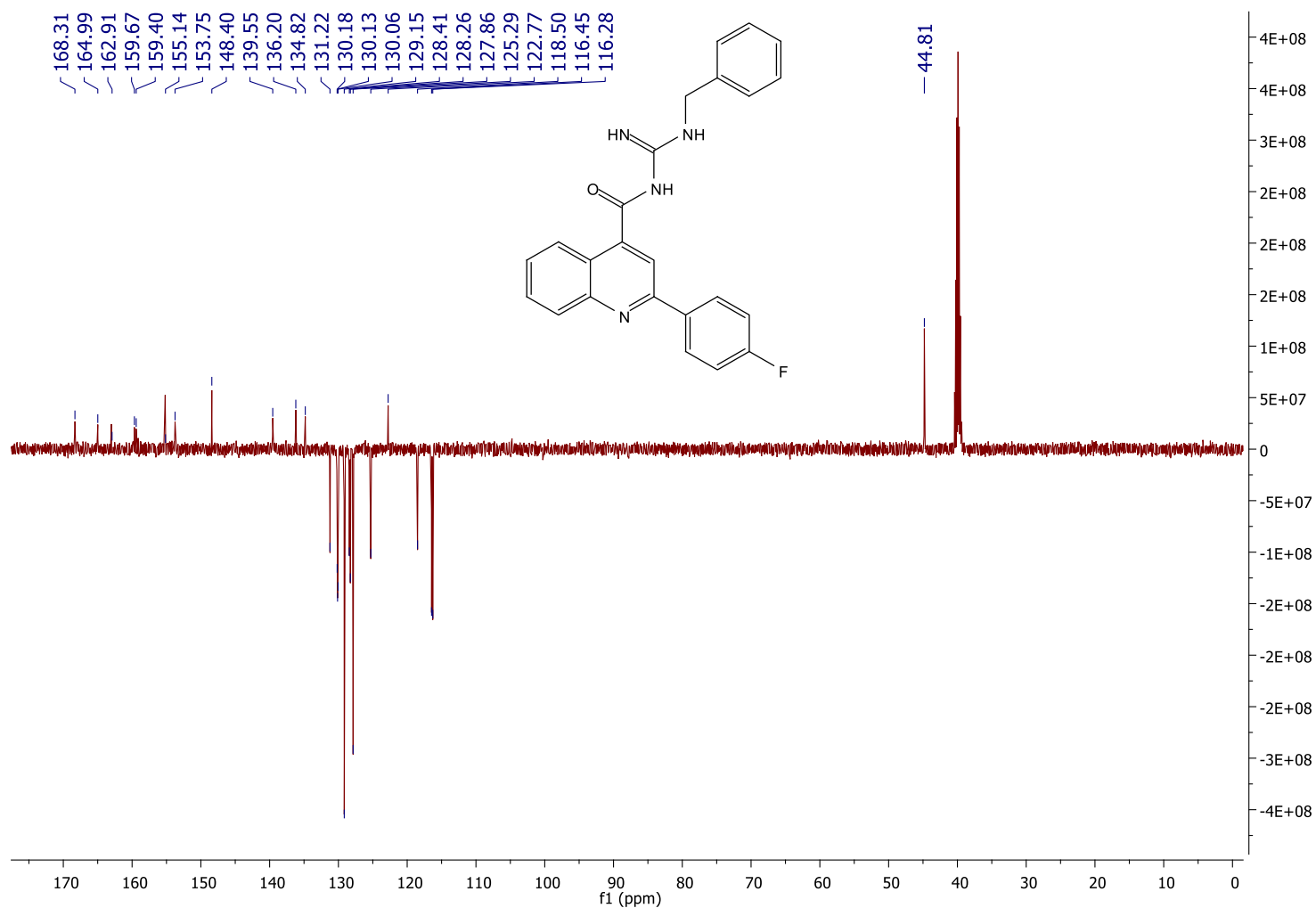
Anexo 42: Espectro de RMN ^{13}C do composto 64c em DMSO a 500 MHz



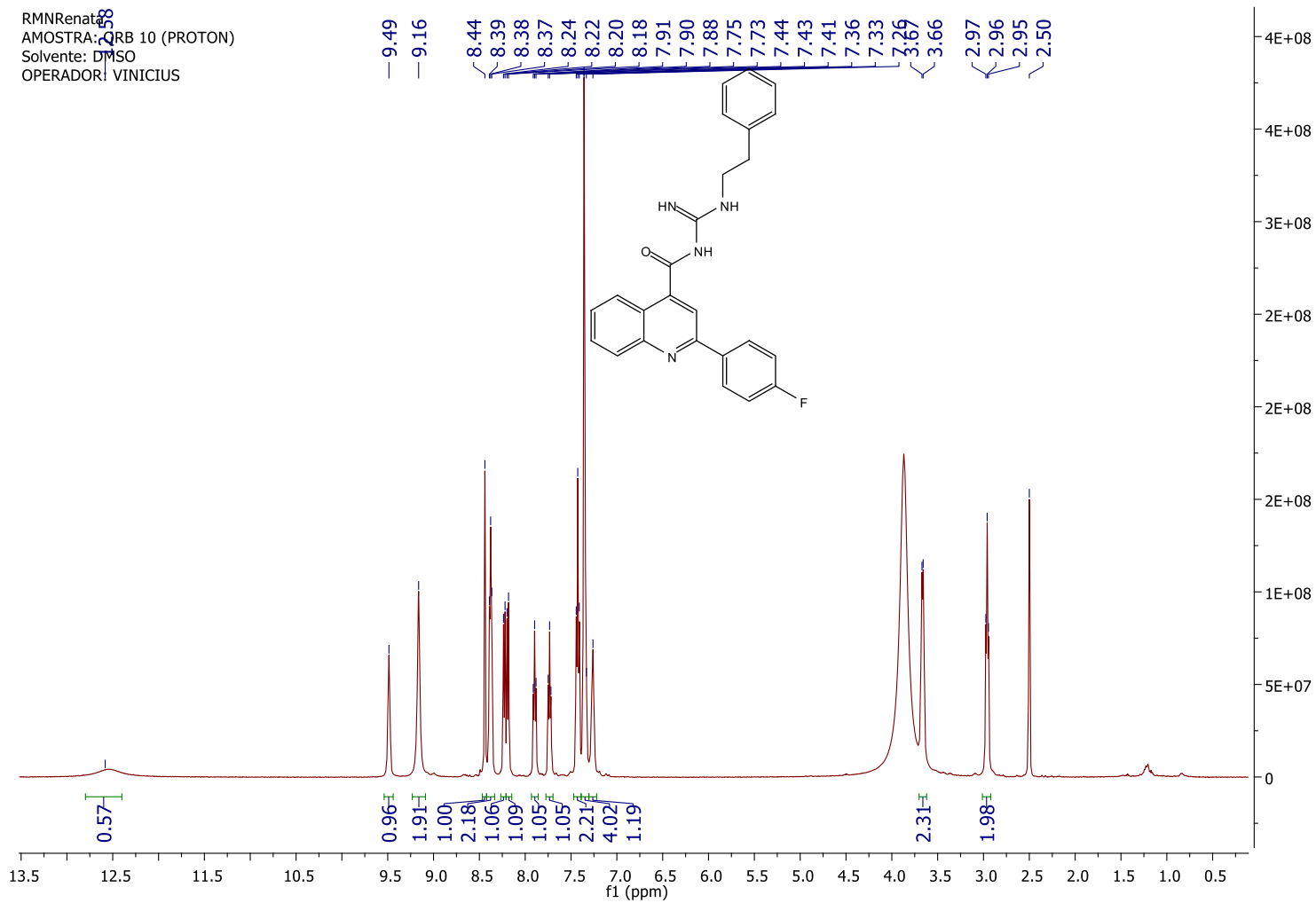
Anexo 43: Espectro de RMN ^1H do composto 64d em DMSO a 500 MHz



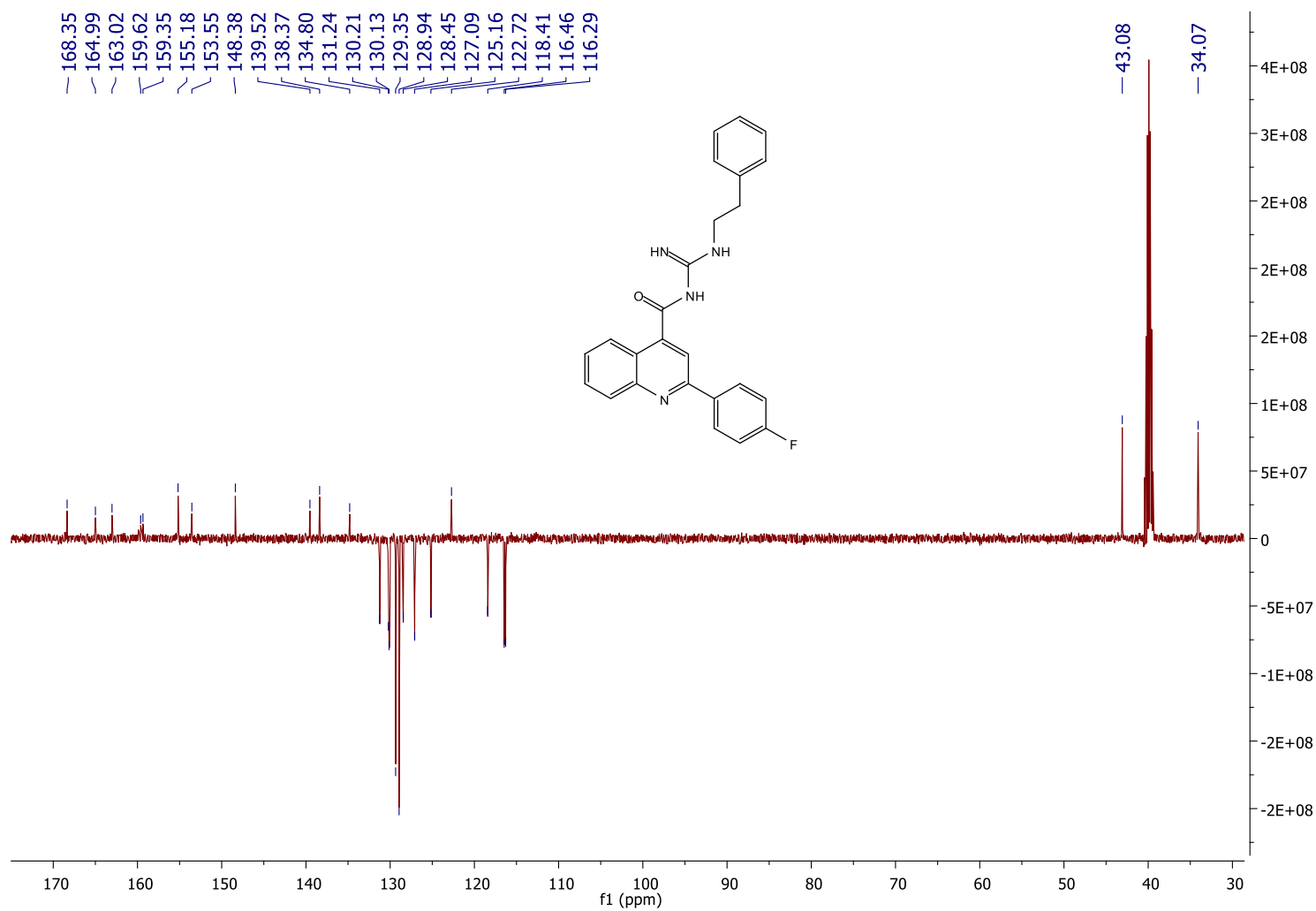
Anexo 44: Espectro de RMN ^1H do composto 65a em DMSO a 500 MHz



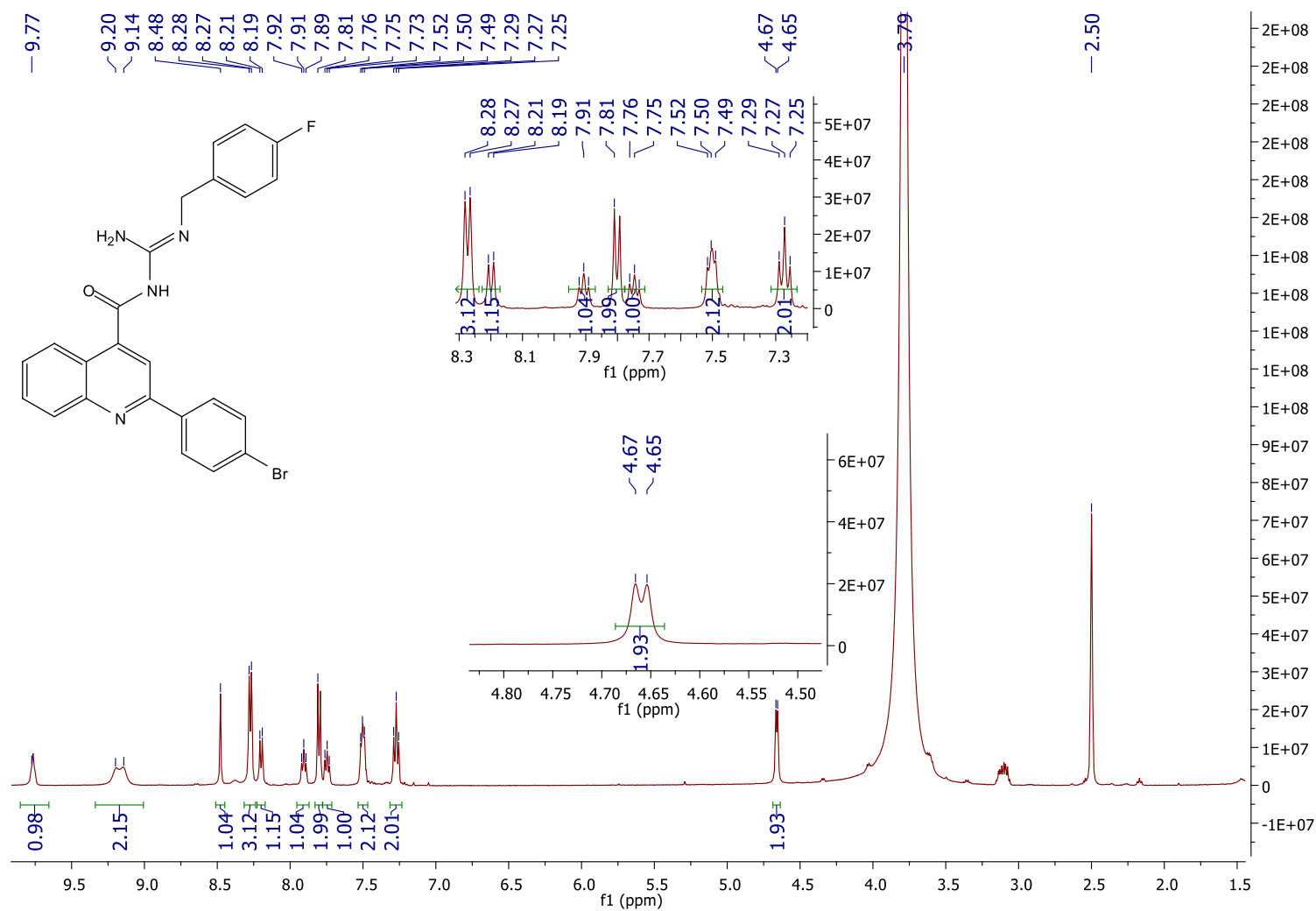
Anexo 45: Espectro de RMN ^{13}C do composto 65a em DMSO a 500 MHz



Anexo 46: Espectro de RMN ^1H do composto 65b em DMSO a 500 MHz

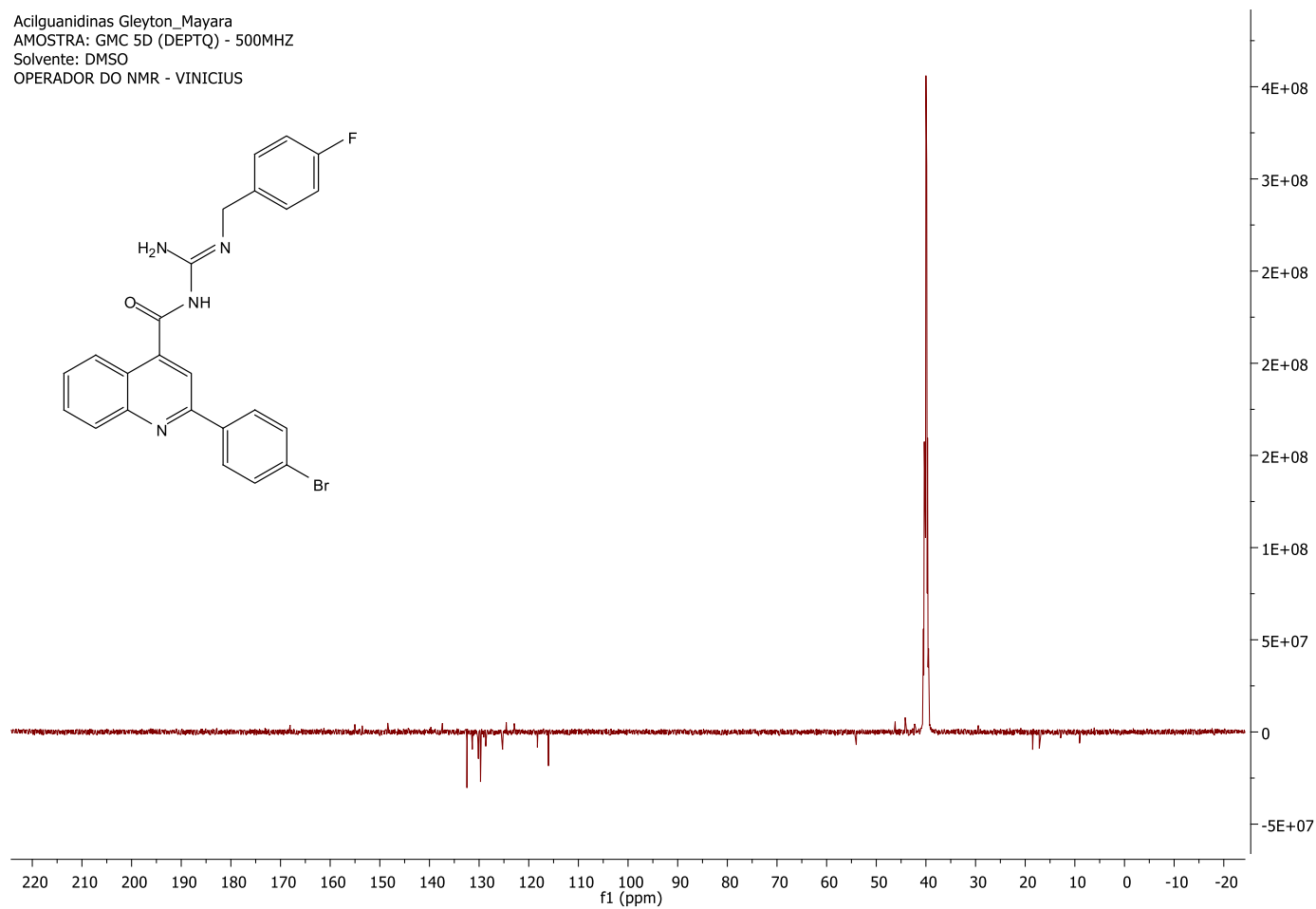


Anexo 47: Espectro de RMN ^{13}C do composto 65b em DMSO a 500 MHz

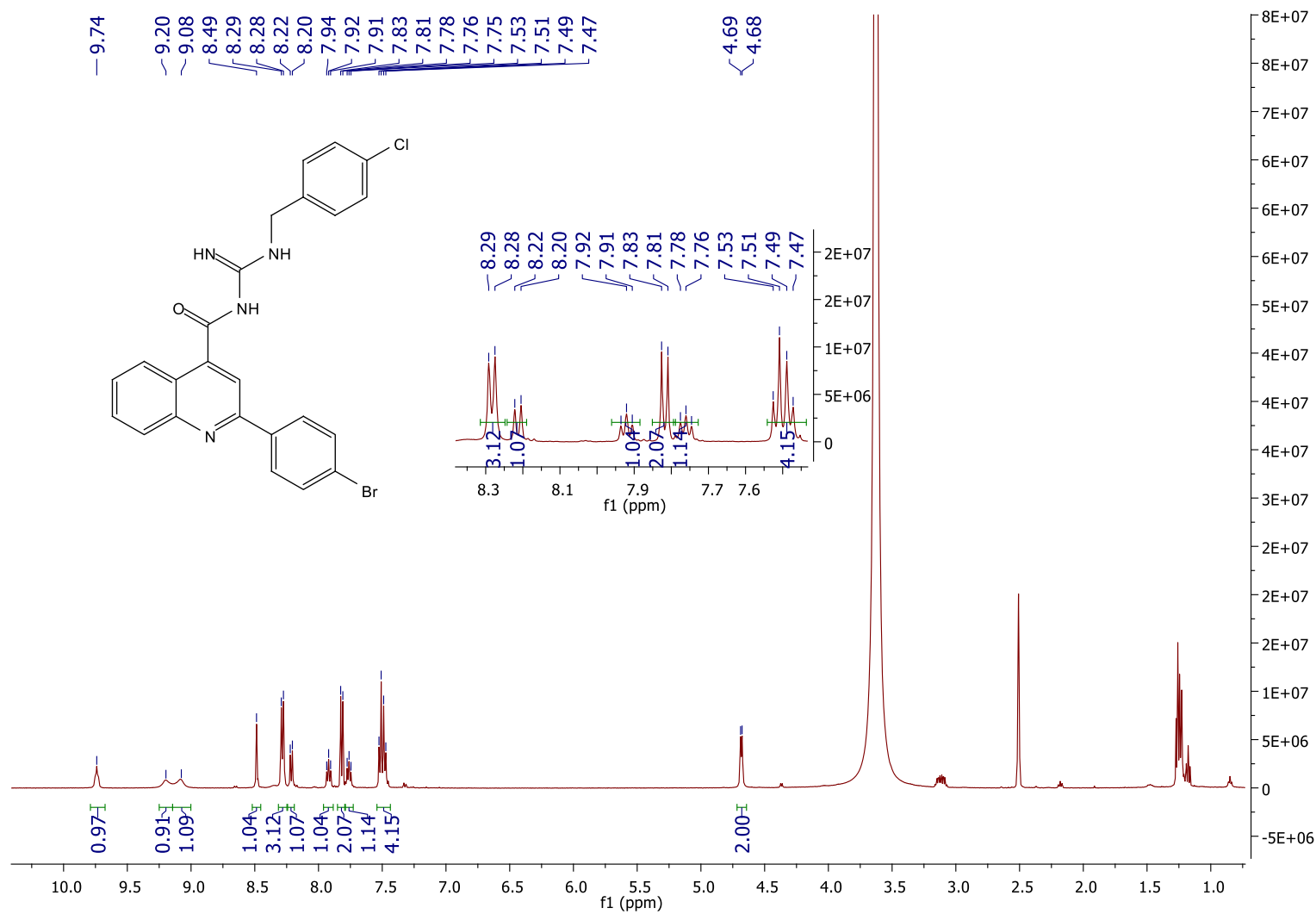


Anexo 48: Espectro de RMN ^1H do composto 66c em DMSO a 500 MHz

Acilguanidinas Gleyton_Mayara
AMOSTRA: GMC 5D (DEPTQ) - 500MHZ
Solvente: DMSO
OPERADOR DO NMR - VINICIUS



Anexo 49: Espectro de RMN ^{13}C do composto 66c em DMSO a 500 MHz



Anexo 50: Espectro de RMN ¹H do composto 66d em DMSO a 500 MHz