



Serviço Público Federal
Ministério da Educação
Fundação Universidade Federal de Mato Grosso do Sul
Instituto de Química – INQUI
Programa de Pós-Graduação em Química - Mestrado



**SÍNTESE DE L-BETAÍNAS ESTERIFICADAS DERIVADAS DO L-
TRIPTOFANO E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE INIBITÓRIA SOBRE
ACETILCOLINESTERASE**

Amanda Dal'Ongaro Rodrigues

Orientador: Prof. Dr. Edson dos Anjos dos Santos

Co-orientador: Prof. Dr. Jeandre Augusto dos Santos Jaques

Campo Grande – MS
2019



Serviço Público Federal
Ministério da Educação
Fundação Universidade Federal de Mato Grosso do Sul
Instituto de Química – INQUI
Programa de Pós-Graduação em Química - Mestrado



SÍNTESE DE L-BETAÍNAS ESTERIFICADAS DERIVADAS DO L-TRIPTOFANO E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE INIBITÓRIA SOBRE ACETILCOLINESTERASE

Amanda Dal'Ongaro Rodrigues

Dissertação apresentada ao programa de pós-graduação em Química – Nível de Mestrado – da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul para obtenção do Título de Mestre em Química.

Orientador: Prof. Dr. Edson dos Anjos dos Santos

Co-orientador: Prof. Dr. Jeandre Augusto dos Santos Jaques

Campo Grande- MS
2019



**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA
MESTRADO E DOUTORADO**

TERMO DE DEFESA

(X) – Dissertação () – Tese () – Qualificação

ALUNA
AMANDA DAL'ONGARO RODRIGUES

TÍTULO DO TRABALHO
SÍNTESE DE L-BETAÍNAS ESTERIFICADAS DERIVADAS DO L-TRIPTOFANO E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE INIBITÓRIA SOBRE ACETILCOLINESTERASE

Defesa de Dissertação de Mestrado submetida à Comissão Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em Química – Nível de Mestrado e Doutorado (Resolução nº 23/2019) da Fundação Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, como parte dos requisitos necessários para titulação no curso.

COMISSÃO EXAMINADORA		
NOME	INSTITUIÇÃO DE ENSINO	ASSINATURA
Edson dos Anjos dos Santos	UFMS	
Dênis Pires de Lima	UFMS	
Roberto Ruller	UFMS	
Maria Rita Marques	UFMS	

Campo Grande, 28 de fevereiro de 2019.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, meu agradecimento a Deus, que me sustentou e me deu saúde e forças para desempenhar as tarefas propostas.

À minha mãe (Deise Cristina Dal'Ongaro) que diante de todas as minhas dificuldades me apoiou e confortou, principalmente cuidando das minhas filhas nos momentos de laboratório.

Às minhas filhas (Helena e Lavínia Dal'Ongaro Moreira), são as razões do meu viver e de força para que eu continue estudando e batalhando.

Ao meu pai (Leomar José Rodrigues) mesmo com à distância me ajudou e apoiou.

Ao meu irmão (Gustavo Dal'Ongaro Rodrigues), que esteve presente em todos os momentos e cuidou das minhas filhas.

Ao Gabriel Moreira Santos, pelo convívio e ajuda nos dias de estresse.

Ao Prof. Dr. Edson dos Anjos dos Santos pela orientação, oportunidade e pelas palavras que não me fizeram desistir nos momentos de dificuldade e principalmente no apoio com a gravidez. O meu mais sincero obrigada. Sou grata pelos ensinamentos e pela paciência.

Ao Prof. Dr. Jeandre Augusto dos Santos Jaques, pela co-orientação e oportunidade de desenvolver meu trabalho com os conhecimentos na área biológica, como abrir as portas do laboratório de bioquímica para estagiar.

Aos Professores Dr. Dênis Pires de Lima (INQUI – UFMS) e Dr. Roberto Ruller (INBIO – UFMS) por aceitarem o convite e contribuírem para a avaliação do meu trabalho, compondo a banca examinadora.

Aos amigos de laboratório Dhébora Albuquerque, Bruna de Barros, Arthur Montanholi, Murilo Yonekawa, Angela Akimi, Luciana, Diesey, Giovana pela companhia no dia a dia, pelas brincadeiras e descontrações nos momentos de trabalho, por dividir as frustrações dos experimentos e os medos das apresentações, pelos encontros, enfim, agradeço por termos compartilhado tantos momentos nesses anos de laboratório.

Aos colegas da bioquímica e do laboratório LP4, Ingrid Duarte, John Deivid, Larissa, Aline, Izabela, Ytallo, Daiane, Tairine, Vinícius, Rafael, Aline e Simone.

À Rejane G. D. Khodyuk que me ensinou e me ajudou com as apresentações e com as técnicas de RMN, além de proporcionar bons momentos de descontração e risadas.

À Prof. Dra. Maria Rita Marques (INBIO – UFMS) onde em alguns momentos de convivência me disse palavras incentivadoras e de acolhimento, que me fizeram seguir em frente em meio as dificuldades.

À técnica Luciana Ravaglia pelas análises dos compostos nos momentos de apuro e de férias, sou eternamente grata pela recepção.

Ao secretário da pós-graduação Seu Ademar Ferreira e secretário da graduação Ronaldo que sempre estavam dispostos a solucionar as dúvidas e aos momentos de bate-papo.

Aos familiares como meus avôs e avós (Otilia, Zeca, Glaci e João), minhas primas de São Paulo (Joana, Samantha e Juliana) e tias Rosa e Silvana, não poderia deixar de citar vocês que mesmo indiretamente estavam me desejando força, sabedoria e apoiando com palavras de carinho.

Aos órgãos de fomento pelas bolsas de estudo e apoio financeiro PROPP-UFMS, CNPq e à Fundect.

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

SUMÁRIO

ÍNDICE ESQUEMAS	VI
ÍNDICE DE ESPECTROS.....	VII
ÍNDICE DE FIGURAS.....	VIII
RESUMO	IX
ABSTRACT	X
ABREVIATURAS, ACRÔNIMOS E SÍMBOLOS	XI
1. INTRODUÇÃO	1
1.1. Sistema Colinérgico	2
1.2. Enzima colinesterase.....	4
1.3. Inibidores	6
1.4. Betaínas	7
2. OBJETIVOS	11
2.1. Objetivo Geral	11
2.2. Objetivos Específicos.....	11
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	12
3.1. Esterificação direta do L-Triptofano.....	12
3.2. Metilação dos ésteres	31
3.3. Atividade Biológica: Inibição do composto sobre a AChE	41
4. Parte Experimental.....	48
4.1. Material e Métodos.....	48
4.2. Sínteses	49
4.2.1. Procedimento Geral para Esterificação do L-Triptofano.....	49
4.2.2. Procedimento Geral para a Metilação dos Ésteres	49
4.3. Avaliação Biológica	50
4.3.1. Aspectos Éticos	50
4.3.2. Manejo de Animais	50
4.3.3. Ambientação e Condições Experimentais.....	51
4.3.4. Dissecação das Estruturas Encefálicas	51
4.3.5. Quantificação e Inibição da Atividade da Enzima Acetilcolinesterase	51
4.3.6. Quantificação do conteúdo proteico.....	52
4.4. Análise e Estatística.....	53
5. Conclusões.....	54
6. Perspectivas Futuras.....	55
7. Referências Bibliográficas	56

ÍNDICE ESQUEMAS

Esquema	Título	Página
Esquema 1	Esterificação direta do L-Triptofano 3a – 3i	12
Esquema 2	Metilação dos ésteres 4a – 4f	32
Esquema 3	Proposição de outra rota para obtenção de betaínas esterificadas.	34

ÍNDICE DE ESPECTROS

Espectro 1: Espectro de RMN de ^1H de 3a (300 MHz, em DMSO- d_6).....	15
Espectro 2: Espectro de RMN de ^{13}C de 3a (75 MHz, em DMSO- d_6).....	16
Espectro 3: Espectro de massas do composto 3a.....	16
Espectro 4: Espectro de RMN de ^1H de 3b (300 MHz, em DMSO- d_6).....	18
Espectro 5: Espectro de RMN de ^{13}C de 3b (75 MHz, em DMSO- d_6).....	19
Espectro 6: Espectro de massas do composto 3b.....	19
Espectro 7: Espectro de RMN de ^1H de 3c (300 MHz, em DMSO- d_6).....	21
Espectro 8: Espectro de RMN de ^{13}C de 3c (75 MHz, em DMSO- d_6).....	22
Espectro 9: Espectro de massas do composto 3c.....	22
Espectro 10: Espectro de RMN de ^1H de 3d (300 MHz, em DMSO- d_6).....	24
Espectro 11: Espectro de RMN de ^{13}C de 3d (75 MHz, em DMSO- d_6).....	25
Espectro 12: Espectro de massas do composto 3d.....	25
Espectro 13: Espectro de RMN de ^1H de 3e (300 MHz, em DMSO- d_6).....	27
Espectro 14: Espectro de RMN de ^{13}C de 3e (75 MHz, em DMSO- d_6).....	28
Espectro 15: Espectro de RMN de ^1H de 3f (300 MHz, em DMSO- d_6).....	30
Espectro 16: Espectro de RMN de ^{13}C de 3f (75 MHz, em DMSO- d_6).....	31
Espectro 17: Espectro de RMN de ^1H de 3b (300 MHz, em DMSO- d_6).....	33
Espectro 18: Espectro de RMN de ^1H de 4c (300 MHz, em DMSO- d_6).....	36
Espectro 19: Espectro de RMN de ^1H de 4d (300 MHz, em DMSO- d_6).....	38
Espectro 20: Espectro de massas do composto (4d).....	39 ³⁸
Espectro 21: Espectro de RMN de ^1H de 4e (300 MHz, em DMSO- d_6).....	40
Espectro 22: Ampliação do espectro de RMN de ^1H de 4e (300 MHz, em DMSO- d_6).....	41

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Processo de síntese e hidrólise da acetilcolina.....	3
Figura 2: Sinapse colinérgica.....	3
Figura 3: Resíduos dos aminoácidos formando a tríade catalítica.....	5
Figura 4: Características estruturais do sítio ativo da enzima AChE.....	5
Figura 5: Estruturas dos fármacos para tratamento da DA.....	6
Figura 6: Estrutura da Huperzina A.....	7
Figura 7: Inibidores da atividade da AChE contendo o grupo carbamato.....	7
Figura 8: Estrutura do L-Triptofano (1) e da L-hipaforina (2).....	8
Figura 9: Estrutura do L-triptofano e da Serotonina.....	9
Figura 10: Semelhança estrutural de protótipos inibidores com a ACh.....	9
Figura 11: Ésteres com fenóis p-substituídos, derivados do composto rodanina-3-ácido acético.....	10
Figura 12: Estruturas dos ésteres;.....	13
Figura 13: Estruturas das metilações;.....	34
Figura 14: Inibição da atividade da AChE <i>in vitro</i> encéfalo total.....	43
Figura 15: Inibição da atividade da AChE <i>in vitro</i> encéfalo total.....	44
Figura 16: Mecanismo para a hidrólise ácido-base de betaínas esterificadas.....	45
Figura 17: Esquema da hidrólise da ACh no sítio ativo da AChE.....	46
Figura 18: Compostos com seus substituintes e IC ₅₀	47
Figura 19: Estruturas dos ésteres derivados do ácido cinâmico.....	48

RESUMO

Doenças Neurodegenerativas (DN) causam destruição progressiva e irreversível de neurônios, presentes no sistema nervoso central (SNC). Uma das principais DN com maior incidência dentre os casos é a doença de Alzheimer (DA). A DA leva a deficiência de neurotransmissores, como a acetilcolina (ACh), responsável por estímulos nervosos. Apesar de não haver a cura para a DA, são utilizados como tratamento inibidores da enzima acetilcolinesterase (AChE), que impedem a hidrólise da ACh, aumentando os níveis da neurotransmissão colinérgica no encéfalo. Os fármacos utilizados para o tratamento da doença apresentam baixa disponibilidade e muitos efeitos colaterais. Diante deste fato, existe uma busca por estruturas promissoras para o desenvolvimento de novos fármacos que sejam mais específicos e apresentem menores efeitos tóxicos. Betaínas derivadas do aminoácido triptofano, como a L-hipaforina vem sendo investigadas por possuírem ação no SNC, como a indução ao sono em ratos e também por apresentarem atividade inibitória da acetilcolinesterase (AChE). Um grupo amino quaternário está presente na estrutura molecular da ACh, assim como em AChE, como a neostigmina, além disso, outra característica estrutural importante do neurotransmissor é a presença de um grupo éster, sendo o grupo que sofre ação direta da enzima AChE. Neste trabalho sintetizamos seis diferentes ésteres partindo do L-triptofano e três betaínas esterificadas e realizamos a avaliação de suas atividades de inibição sobre a AChE. Inicialmente, os ésteres através de reações de esterificação com álcoois de cadeias alquílicas, ramificadas, benzílica e cíclica na presença de cloreto de tionila, onde apresentaram rendimentos entre 52 a 77%, onde os compostos são relatados na literatura, mas não são conhecidos suas atividades anticolinesterásicas. Estes ésteres foram submetidos à reação de *N*-metilação na presença de iodeto de metila em meio básico para obtenção das betaínas esterificadas, nas quais apresentaram rendimentos entre 30 a 49%, estas betaínas não estão relatadas na literatura. Os ensaios da atividade inibitória da AChE foram realizados com amostras de encéfalo de ratos, onde apenas os ésteres etílico e *n*-butílico apresentaram atividade significativa de inibição da AChE, nas concentrações 0,1, 1, 10, 100 e 1000 μM e o éster isopropílico na concentração de 1000 μM , já as betaínas esterificadas não apresentaram inibição sobre a AChE. Os resultados mostram que os ésteres possuem um maior efeito inibitório quando comparado aos derivados trimetilados e podem auxiliar na elaboração de novos protótipos à fármacos para o tratamento da DA.

ABSTRACT

Neurodegenerative diseases (DN) cause progressive and irreversible destruction of neurons, present in the central nervous system (CNS). One of the major DNs with the highest incidence among the cases is Alzheimer's disease (AD). AD leads to deficiency of neurotransmitters, such as acetylcholine (ACh), responsible for nerve stimuli. Although there is no cure for AD, acetylcholinesterase enzyme (AChE) inhibitors, which prevent ACh hydrolysis, are used as a treatment, increasing levels of cholinergic neurotransmission in the brain. The drugs used to treat the disease have low availability and many side effects. Faced with this, there is a search for promising structures for the development of new drugs that are more specific and have lower toxic effects. Betaine derived from the amino acid tryptophan, such as L-hipaphorine, have been investigated for CNS action, such as sleep induction in rats and also for acetylcholinesterase (AChE) inhibitory activity. A quaternary amine group is present in the molecular structure of ACh, as well as in AChE, such as neostigmine; in addition, another important structural feature of the neurotransmitter is the presence of an ester group, the group being directly acting on the enzyme AChE. In this work we synthesized six different esters starting from L-tryptophan and three esterified betaines and performed the evaluation of their inhibition activities on AChE. Initially, the esters through esterification reactions with alkyl, branched, benzylic and cyclic chain alcohols in the presence of thionyl chloride, where yields range from 52 to 77%, where the compounds are reported in the literature but their activities are not known anticholinesterases. These esters were subjected to the *N*-methylation reaction in the presence of methyl iodide in a basic medium to obtain esterified betaines, in which yields were between 30 and 49%; these betaines are not reported in the literature. The AChE inhibitory activity assays were performed with rat brain samples, only the ethyl and n-butyl esters presented significant AChE inhibition activity at concentrations of 0.1, 1, 10, 100 and 1000 μ M and the isopropyl ester at the concentration of 1000 μ M, since the esterified betaines showed no inhibition on AChE. The results show that the esters have a greater inhibitory effect when compared to the trimethylated derivatives and can help in the elaboration of new prototypes to the drugs for the treatment of AD.

ABREVIATURAS, ACRÔNIMOS E SÍMBOLOS

δ	Deslocamento químico
μM	Micro molar
Å	Angstrom
Acetil-CoA	Acetil-coenzima A
ACh	Acetilcolina
AChE	Acetilcolinesterase
AChEis	Inibidores da enzima acetilcolinesterase
AcSCh	Acetilticolina
ANOVA	Análise de variância
Asp	Aspartato
BCh	Butirilcolina
BChE	Butirilcolinesterase
ccd	Cromatográficas em camada delgada
Ch	Colina
CH ₃ I	Iodo metano
ChAT	Colina-O-acetil-transferase
ChEIs	Colinesterases
CHT1	Colina de alta afinidade
d	Dupleto
DA	Doença de Alzheimer
dl	Dupleto largo
DMSO-d ₆	Dimetilsulfóxido deuterado
DN	Doença Neurodegenerativa
DTNB	Ácido 5,5'-ditiobis(2-nitrobenzóico)
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
hAChE	Acetilcolinesterase humana
HRMS-ESI	<i>High Resolution Mass Spectrometry by Electrospray ionization</i> (espectrometria de massas de alta resolução por ionização eletrospray)
Hz	Hertz
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
IC ₅₀	Inibição de 50 %
Iso-OMPA	Tetraisopropil pirofosforamida
J	Constante de acoplamento
m/z	Razão massa/carga
mAChRs	Receptores colinérgicos muscarínicos
mg	Miligrama

MHz	Megahertz
mL	Mililitros
mM	Milimolar
nAChRs	Receptores colinérgicos nicotínicos
NaHCO ₃	Bicarbonato de sódio
nm	Nanômetro
NTSB	5-sulfonatotiol-2-nitrobenzoato
ppm	Parte por milhão
RMN	Ressonância magnética nuclear
s	Simpleto
S.E.M	<i>Standard error of the mean</i> (Erro padrão da média)
Ser	Serina
SNC	Sistema nervoso central
t	Tripleto
t.a.	Temperatura ambiente
Thr	Treonina
TMS	Tetrametilsilano
TNB	Ânion 5-tio-2-nitrobenzoato
Trp	Triptofano
Tyr	Tirozina
vAChT	Transportadores vesiculares de acetilcolina

1. INTRODUÇÃO

Os novos estilos de vida e a exposição, ainda mais intensa, a fatores de risco próprios do mundo contemporâneo tem como consequência uma alteração no perfil de morbimortalidade diminuindo a ocorrência das doenças infectocontagiosas e colocando as doenças crônico-degenerativas como novo centro de atenção dos problemas de doença e morte da população brasileira (DA SILVA et al., 2014). As doenças neurodegenerativas (DN) são caracterizadas pela perda progressiva de neurônios e por alterações secundárias (ROBBINS & COTRAN, 2005). O Instituto Virtual de Doenças Neurodegenerativas do Rio de Janeiro (IVDN) menciona a doença de Alzheimer (DA) como exemplo de DN, pois possui características como perda neuronal seletiva, que é o comprometimento de um ou mais grupos de neurônios, enquanto outros grupos não são comprometidos. Segundo o IVDN, nestas doenças, o encéfalo apresenta atrofia com acúmulo de proteínas, e redução quantitativa de neurotransmissores que são moléculas necessárias para a comunicação entre as células, destacando-se a acetilcolina (ACh).

A ACh é um mediador químico no sistema nervoso central (SNC), no sistema nervoso periférico e também na junção neuromuscular, ou seja, é um neurotransmissor ubíquo, que constitui o sistema de neurotransmissão colinérgica. (KING, 2000).

A DA corresponde a 50 % dos casos de demência em idosos, com faixa etária de 60 a 65 anos, sendo a idade um dos maiores fatores de risco para o desenvolvimento de demência (BORGES OSÓRIO e ROBINSON, 2002). O aumento de casos da doença no Brasil é cada vez mais preocupante, pois dados do último censo demográfico realizado pelo IBGE apontam um aumento na expectativa de vida para os brasileiros de 74,6 em 2012 para 75,5 anos em 2015. No estado de Mato Grosso do Sul, segundo o IBGE, a expectativa de vida subiu de 73,8 anos de 2012 para 75,3 em 2015, estando próxima a média nacional (IBGE, 2015).

Em outro estudo de projeção do número de idosos acometidos pela DA com mais de 65 anos, foram obtidos valores significativos para a cidade de Campo Grande-MS, principalmente para a comunidade japonesa, devido à perspectiva de vida desta população, apresentando uma taxa bruta de 12,10 % em Campo Grande, enquanto que a média observada para os países da América Latina foi de 7,13 %. Além disso, diferenças expressivas também foram observadas nas taxas por sexo,

sendo de 11,4 % entre os homens e 12,6 % entre as mulheres, especificamente na comunidade japonesa de Campo Grande (BURLÁ et al., 2013).

A DA foi descrita por Alois Alzheimer em 1907, onde consiste em uma desordem neurodegenerativa com danos na estrutura do SNC, resultando em diversas alterações de funções, incluindo distúrbios na memória, no aprendizado, pensamento, orientação espacial, compreensão e linguagem, emoções, comportamentais com relação a outros indivíduos (DAWBARN, D, 1995). Uma vez que o indivíduo apresenta a DA, os danos neuronais continuam progredindo e assim evoluindo os sintomas, essa evolução dura cerca de 8 a 10 anos com identificação por níveis iniciais a graves (JUNIOR et al., 2004).

As causas dessa doença ainda não foram identificadas, mas existem hipóteses etiológicas para a ocorrência, como a deposição extracelular de peptídeos β -amilóides com formação de placas senis e formação intracelular de emaranhados neurofibrilares compostos pela proteína Tau. (MATTSON, 2004). Esta proteína tem como função estabilizar a polimerização da α,β -tubulina, que são proteínas formadoras de microtúbulos importantes no transporte vesicular de proteínas (SERENIKI, A.; VITAL 2008).

Nos neurônios doentes, a proteína Tau é hiperfosforilada, diminuindo a estabilidade dos dímeros da α,β -tubulina, ocasionando a degeneração dos microtúbulos, dessa forma ocorre uma cascata neurotóxica causando a apoptose celular (KUMAR; SINGH; EKAVALI, 2015; MATTSON, 2004; SILVA et al., 2014).

Existem outras hipóteses para o desenvolvimento da DA, como estresse oxidativo, presença de metais e aumento no influxo de cálcio (PETRONILHO et. al., 2011; HOLANDA et. al., 2008).

Existem outras características nos indivíduos com DA, como o atrofiamento cerebral que danifica regiões importantes com funções motoras, pensamentos e memória, reflexos e coordenação postural, emoções e aprendizados e cognição essas regiões danificadas são o córtex cerebral, o cerebelo, hipocampo e corpo estriado (GEORGE-HYSLOP, 2000).

1.1. Sistema Colinérgico

O sistema colinérgico é o sistema de neurotransmissão que envolve a ACh como mediador químico de sinapses, sendo constituído pela ACh, seus receptores e o aparato enzimático responsável pela síntese e degradação (Ventura, 2010).

A síntese da ACh ocorre a partir de acetil-coenzima A (Acetil-CoA) que está presente em todas as células e da colina proveniente da dieta e é entregue as células nervosas pela corrente sanguínea (**Figura 1**), através da atividade da enzima colina-O-acetil-transferase (ChAT) (SOREQ; SEIDMAN, 2001).

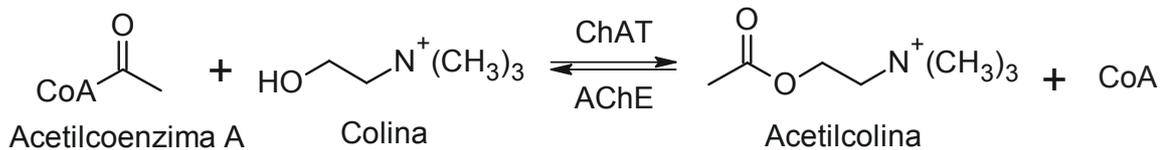


Figura 1: Processo de síntese e hidrólise da acetilcolina.

Após a síntese da ACh, é transportada por transportadores vesiculares (vAChT) é armazenada em vesículas sinápticas (**Figura 2**), a ACh é liberada na fenda sináptica, a ACh interage com os receptores colinérgicos muscarínicos (mAChRs) e nicotínicos (nAChRs) presentes nas membranas pré e pós-sináptica, e essa ação só cessa quando a ACh é hidrolisada em acetato e colina, pela enzima acetilcolinesterase (AChE) (FIFER, 2007).

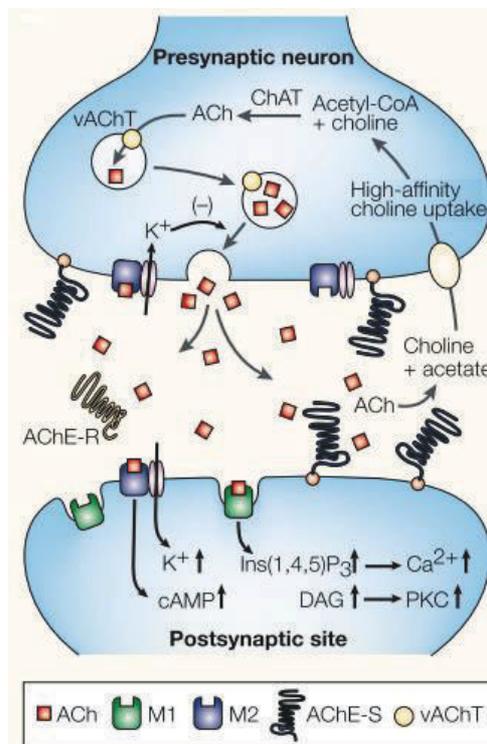


Figura 2: Sinapse colinérgica. Colina acetil-transferase (ChAT); transportador vesicular de acetilcolina (vAChT); AMP cíclico (cAMP); diacilglicerol (DAG); proteína cinase C (PKC); monômeros da AChE solúveis na fenda sináptica (AChE-R); tetrâmeros da AChE que estão ligados a junção neuromuscular (AChE-S); receptor muscarínico 1 (M1); receptor muscarínico 2 (M2); inositol-1,4,5-trisfosfato (Ins(1,4,5) P3) (Adaptada de SOREQ; SEIDMAN, 2001).

A hidrólise da ACh também pode ser catalisada por uma enzima relacionada à AChE a butirilcolinesterase (BChE; EC 3.1.1.8), mas esta possui menor especificidade pela ACh com relação a AChE (SOREQ; SEIDMAN, 2001).

1.2. Enzima colinesterase

As enzimas colinesterásicas podem ser monoméricas ou oligoméricas com peso molecular 70-80 kDa, estas agem em ésteres de colina e se diferenciam pela especificidade do substrato. A AChE hidrolisa ACh com maior velocidade e a BChE o substrato sintético da BCh (MOSSOULIÈ et.al., 1993).

A AChE é encontrada nos neurônios colinérgicos, sendo esta uma proteína alfa/beta que contém 537 aminoácidos e consiste de uma mistura de 12 folhas beta envolvida por 14 α -hélices, também se localiza nas sinapses colinérgicas e na junção neuromuscular (MASSOULIÈ et al., 1999). A AChE é composta por subunidades que se agrupam em estruturas oligoméricas e são divididas em duas classes: assimétrica (An) ou globular (Gn), baseada em sua estrutura quaternária, apesar de suas diferenças estruturais, as atividades nas subunidades são semelhantes (DELFINO et al., 2009; MASSOULIE, 1985; TAYLOR, 1994).

As formas globulares são compostas por monômeros (G_1), dímeros (G_2) ou tetrâmeros (G_4), os dímeros estão presentes em menor proporção no cérebro dos mamíferos (MASSOULI et al., 1998).

A isoforma G_1 é solúvel em tampão de baixa força iônica e está relacionada ao estresse crônico. A Isoforma G_4 desempenha papel na aprendizagem e desenvolvimento da memória, sendo estas isoformas presentes majoritariamente nos mamíferos e são as mais importantes para hidrólise da ACh. A G_4 é solúvel em solução detergente, pois se encontra ligada fortemente a membrana, por sequência de aminoácidos hidrofóbicos ou glicofosfolipídios (MASSOULIE et al., 1999; VASILOPOULOU et al., 2016).

O sítio catalítico da AChE é responsável pela hidrólise da ACh, sendo uma tríade catalítica composta pelos resíduos dos aminoácidos de serina (Ser), histidina (His) e glutamato (Glu) (**Figura 3**). A tríade não é o único componente do sítio ativo, mas é a principal região da catálise (FIFER, E. K., 2007).



Figura 3: Resíduos dos aminoácidos formando a tríade catalítica.

Outro componente presente no sítio ativo é chamado de sítio aniônico (*catalytic anionic site, CAS*), onde existe uma interação com a região catiônica da ACh e orienta o substrato para a hidrólise efetiva. Este sítio se encontra localizado em uma região chamada de “desfiladeiro do sítio ativo”, caracterizados por: (1) sítio de ligação da Ch, região de ligação da Ch após hidrólise com resíduos de triptofano (Trp) e grupos aniônicos; (2) sítio aniônico periférico (*peripheral anionic site, PAS*) que influencia na conformação do sítio ativo e na afinidade dos compostos ligados ao centro ativo; e (3) a região que se encontra a tríade catalítica que está envolvida diretamente na hidrólise da ACh, estes resultam na complexa dinâmica de reação que caracteriza a AChE (**Figura 4**) (DELFINO;et al., 2009; KIA et al., 2013; QUINN, 1987; SOREQ; SEIDMAN, 2001).

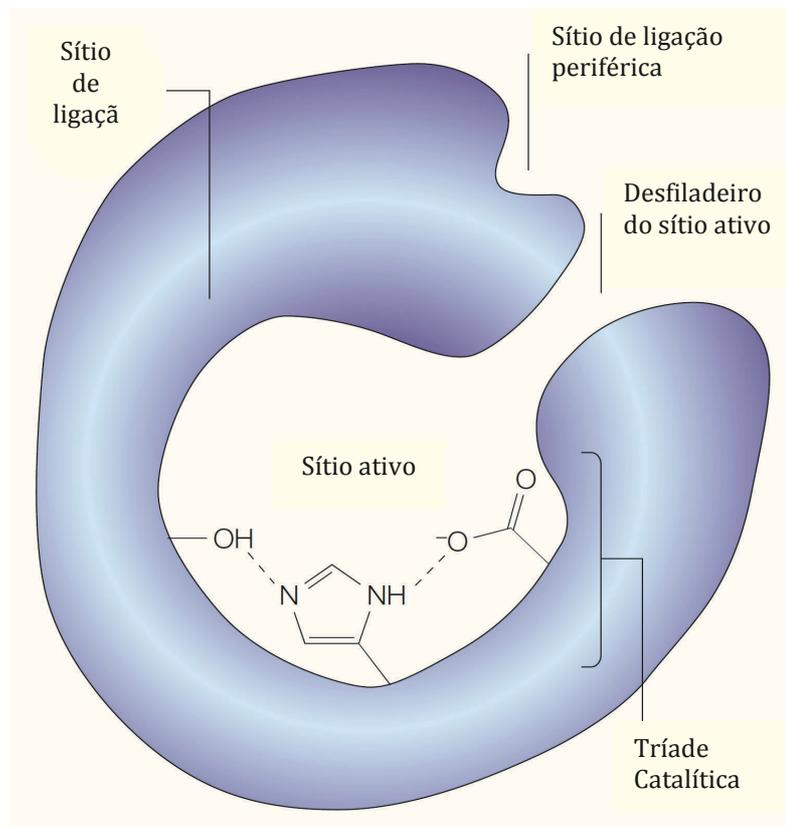


Figura 4: Características estruturais do sítio ativo da enzima AChE (Adaptado de SOREQ; SEIDMAN, 2001).

1.3. Inibidores

No contexto de DNs como a DA, os inibidores da enzima AChE (AChEi) são as principais drogas utilizadas para o seu tratamento. Esses inibidores se baseiam no déficit colinérgico que ocorre nestas doenças, e atuam aumentando a disponibilidade sináptica da ACh, ou seja, evitam a sua degradação principalmente através da inibição da enzima AChE. Com relação ao tratamento existem três desses inibidores aprovados pela *Food and Drug Administration* (FDA) dos Estados Unidos para o tratamento dessa doença: o donepezil, a galantamina e a rivastigmina (**Figura 5**) (SILVA et al., 2014). Embora a tacrina seja um dos primeiros AChEis aprovados para o tratamento de DA em 1993, sua prescrição tem sido evitada devido à elevada incidência de efeitos colaterais, incluindo a hepatotoxicidade (TAYEB et al., 2012). Todos os demais inibidores da acetilcolinesterase sofrem de deficiências, como a baixa biodisponibilidade, curta duração da ação biológica, efeitos terapêuticos estreitos e a alta toxicidade (KIA et al., 2013).

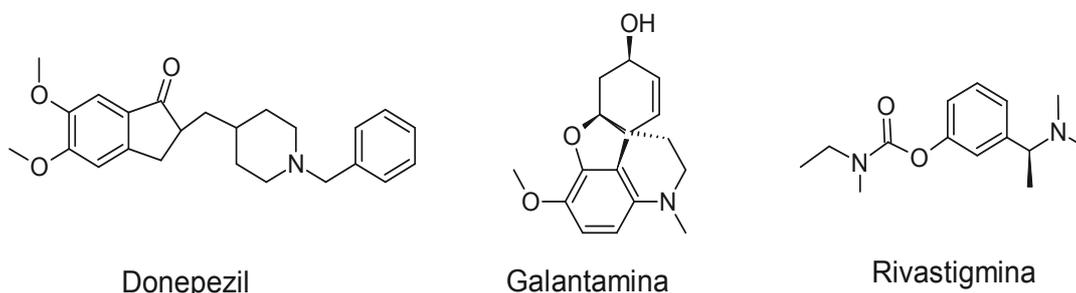
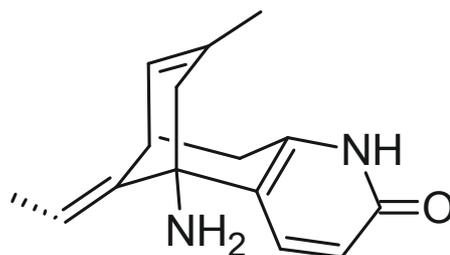


Figura 5: Estruturas dos fármacos para tratamento da DA.

Muitos AChEis são baseados em produtos naturais e os principais compostos são alcalóides (SILVA et al., 2014). Como exemplo de alcalóides a Huperzina A é isolado a partir de arbusto de musgo chinês (*Huperzia serrata*), possui efeito de neuroproteção (ZHANG; YAN; TANG, 2008), (**Figura 6**).



Huperzina A

Figura 6: Estrutura da Huperzina A.

O carbamato é outra classe de compostos que possui ação inibitória reversível da AChE, um produto natural pertencente a esta é a fisostigmina (**Figura 7**) proveniente da planta *Physostigma venenosum*, é utilizada para o tratamento da miastenia gravis agindo como inibidor da AChE, melhorando a transmissão dos impulsos nervosos (KRSTI et al., 2013; NAIR; HUNTER; CHB, 2004). A Miastenia gravis também é uma doença autoimune, onde o sistema imunológico cria anticorpos contra os receptores da ACh, esta que é liberada nas junções neuromusculares (CARVALHO et al., 2005). O grupo carbamato também é encontrado na estrutura química do iodeto de neostigmina, este composto apresenta inibição da atividade da AChE com um IC₅₀ de 18,8 µM (KRSTI et al., 2013; NAIR; HUNTER; CHB, 2004; YAMAZAKI et al., 2016; YU et al., 2010).

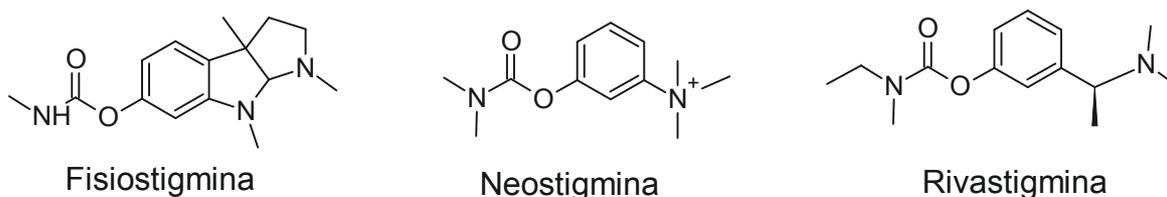


Figura 7: Inibidores da atividade da AChE contendo o grupo carbamato.

1.4. Betaínas

Uma das estruturas para o desenvolvimento de novos fármacos para o tratamento da DA são as L-betaínas, como a L-Hipaforina (**2**) derivadas do aminoácido L-Triptofano (**1**) (**Figura 8**), um aminoácido aromático, essencial que possui um anel indólico. A cadeia indólica é também o núcleo de um importante neurotransmissor, a serotonina, um neurotransmissor importante no processo

bioquímico do sono, do humor, atividade motora e funções cognitivas (LEHNINGER, 2011).

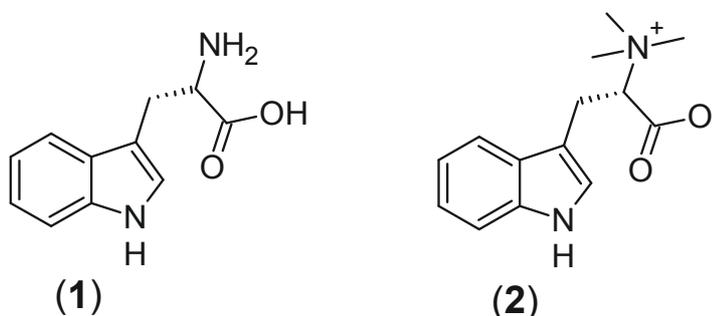


Figura 8: Estrutura do L-Triptofano (1) e da L-hipaforina (2).

A L-hipaforina (2) (**Figura 8**) também conhecida como betaína é um alcalóide indólico natural encontrado em plantas do gênero *Erythrina* (Leguminosae) (HE et al., 2015; IRANSHAHI et al., 2012; OZAWA et al., 2008).

Na região do Pantanal no estado de Mato Grosso do Sul (MS) existem duas espécies do gênero *Erythrina spp*: *Erythrina dominguezzi* Hassl. e *Erythrina fusca* Lourt. (Leguminosae-Faboideae) (SILVA; TOZZI, 2012; POTT et al., 1994; SILVA et al., 2012). Alguns estudos já existentes mostram a presença de alcalóides nessas espécies (DEREK et al., 1973; ITURRIAGA-VASQUEZ et al., 2010).

Estudos fitoquímicos apontaram a presença de vários alcalóides incluindo a Hipaforina na espécie *E. mulungu*, a medicina brasileira utiliza a casca da árvore “mulungu” para sedação e anticonvulsivante (BALBANI; SILVA; MONTOVANI, 2009).

A Hipaforina também está presente nas sementes e folhas de *E. velutina*, estudos com indução do sono em ratos mostram o alcalóide, com resposta a um aumento no movimento não rápido dos olhos (NREM) durante o sono, após a primeira hora de administração. Esta ação está relacionada à cascata bioenergética de neurotransmissores a partir do L-triptofano a serotonina (**Figura 9**) (OZAWA et al., 2008).

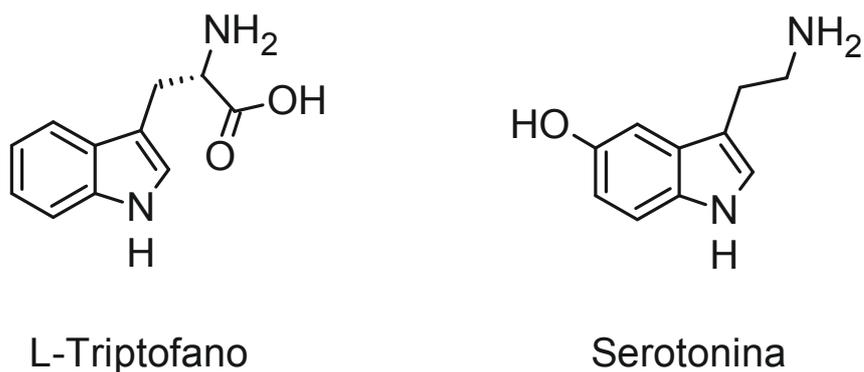


Figura 9: Estrutura do L-triptofano e da Serotonina.

Observando a estrutura da L-hipaforina (**2**) (**Figura 8**), podemos notar a presença de uma carboxila, e estudos envolvendo a esterificação de protótipos a inibidores da AChE, relataram um aumento na atividade inibitória (KRATKY et al., 2016). (**Figura 10**). A inserção do grupamento éster, possibilitaria uma maior aproximação estrutural do substrato da AChE, ou seja, a ACh (**Figura 1**) com os derivados esterificados, este grupo pode ser muito importante, pois mimetizaria o mecanismo que ocorre na hidrólise da ACh (**Figura 1**) e assim inibir a sua hidrólise.

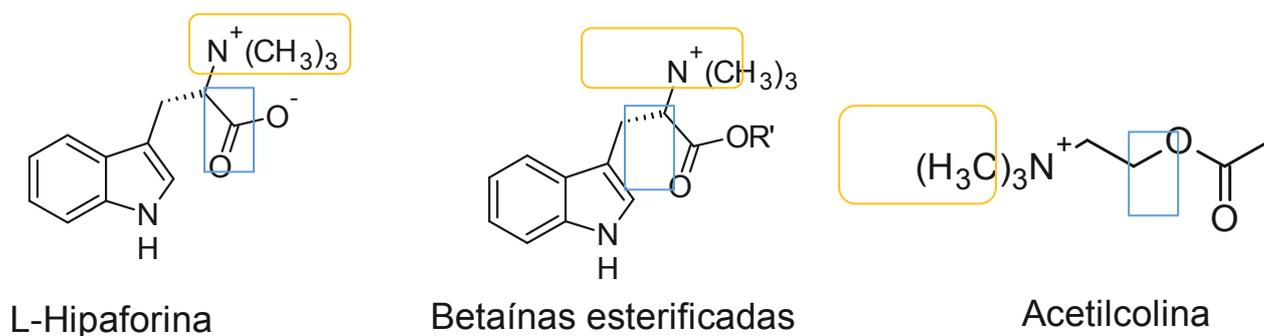


Figura 10: Semelhança estrutural de protótipos inibidores com a ACh. Destaque em amarelo grupo amônio quaternário e em verde o grupo carbonila.

Kratky (2016) sintetizou uma série de ésteres com fenóis *p*-substituídos, derivados do composto rodanina-3-ácido acético (**figura 11**), demonstrando melhor inibição da AChE com a inserção dos grupos quando comparados ao composto precursor.

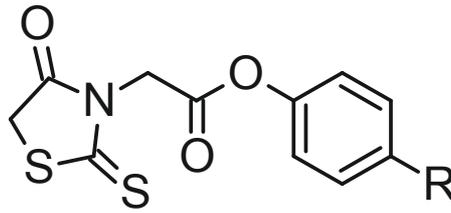


Figura 11: Ésteres com fenóis p-substituídos, derivados do composto rodanina-3-ácido acético. Kratky, 2016.

No entanto, não há dados avaliados sistematicamente sobre a atividade inibitória da AChE para ésteres derivados da L-Hipaforina, logo a necessidade de explorar a atividade biológica das L-betaínas sobre a ação inibitória da AChE inserindo diferentes substituintes nas modificações estruturais.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

Sintetizar L-betaínas esterificadas e avaliar o potencial como anticolinesterásicos para o tratamento da Doença de Alzheimer.

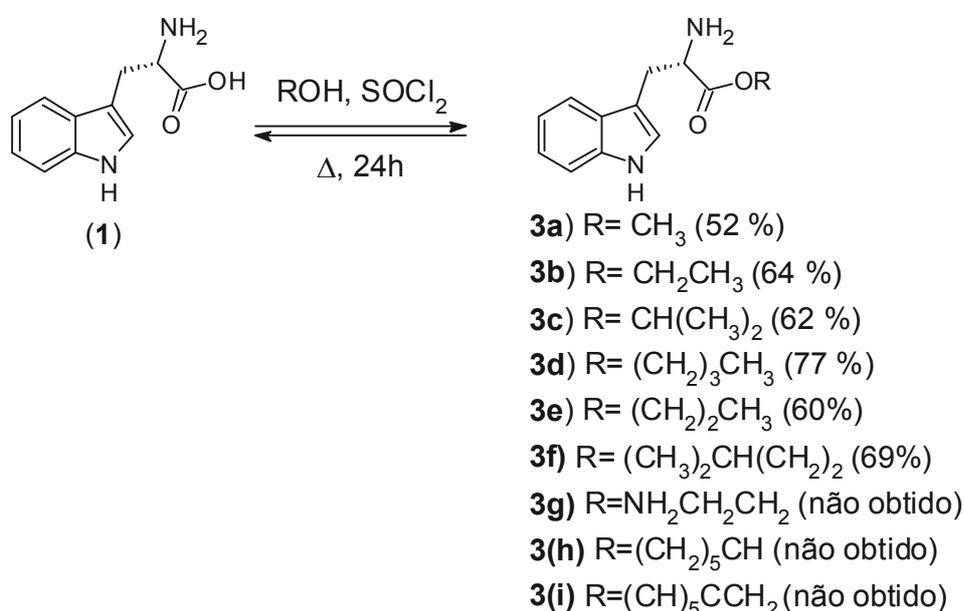
2.2. Objetivos Específicos

- Sintetizar diferentes ésteres da L-Triptofano;
- Preparar as L-betaínas a partir dos ésteres sintetizados;
- Realizar ensaios da atividade inibitória sobre a enzima AChE.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Esterificação direta do L-Triptofano

As esterificações do L-Triptofano foram realizadas de acordo com a metodologia de SONG (2014) e HOSANGADI (1996), que consiste no refluxo do ácido carboxílico com os álcoois correspondentes, na presença de cloreto de tionila (**Esquema 1**). O L-Triptofano foi adquirido comercialmente e os álcoois utilizados foram: metílico, etílico, isopropílico, n-butílico, propílico, isoamílico, ciclohexílico, benzílico e 2-aminoetilico.



Esquema 1 – Reação para preparação dos ésteres **3 (a-i)**.

Os ésteres que foram obtidos inicialmente (**Figura 12**) tiveram rendimentos brutos de 52 a 69 %. Estes compostos apresentaram aspecto oleoso de coloração castanho escuro. Suas estruturas foram identificadas através de análises espectroscópicas de RMN de ¹H e ¹³C. Os compostos **3g**, **3h** e **3i** não foram identificados, pois os álcoois 2-aminoetanol, ciclohexanol e benzílico respectivamente estavam com grande impureza, assim no monitoramento da reação através de placas ccd observou-se a formação de vários produtos e estes ao serem submetidos a uma separação por cromatografia preparativa não foram purificados devido a semelhança entre os fatores de retenção (RF). Assim, não foi possível

obter os ésteres purificados para identificação e continuação dos experimentos. Em outra tentativa, tentou-se a destilação simples dos álcoois 2-aminoetanol, ciclohexanol e do álcool benzílico para purifica-los, mas devido às altas temperaturas de ebulição dos álcoois os mesmos com a destilação não foram coletados mesmo com a aplicação do vácuo.

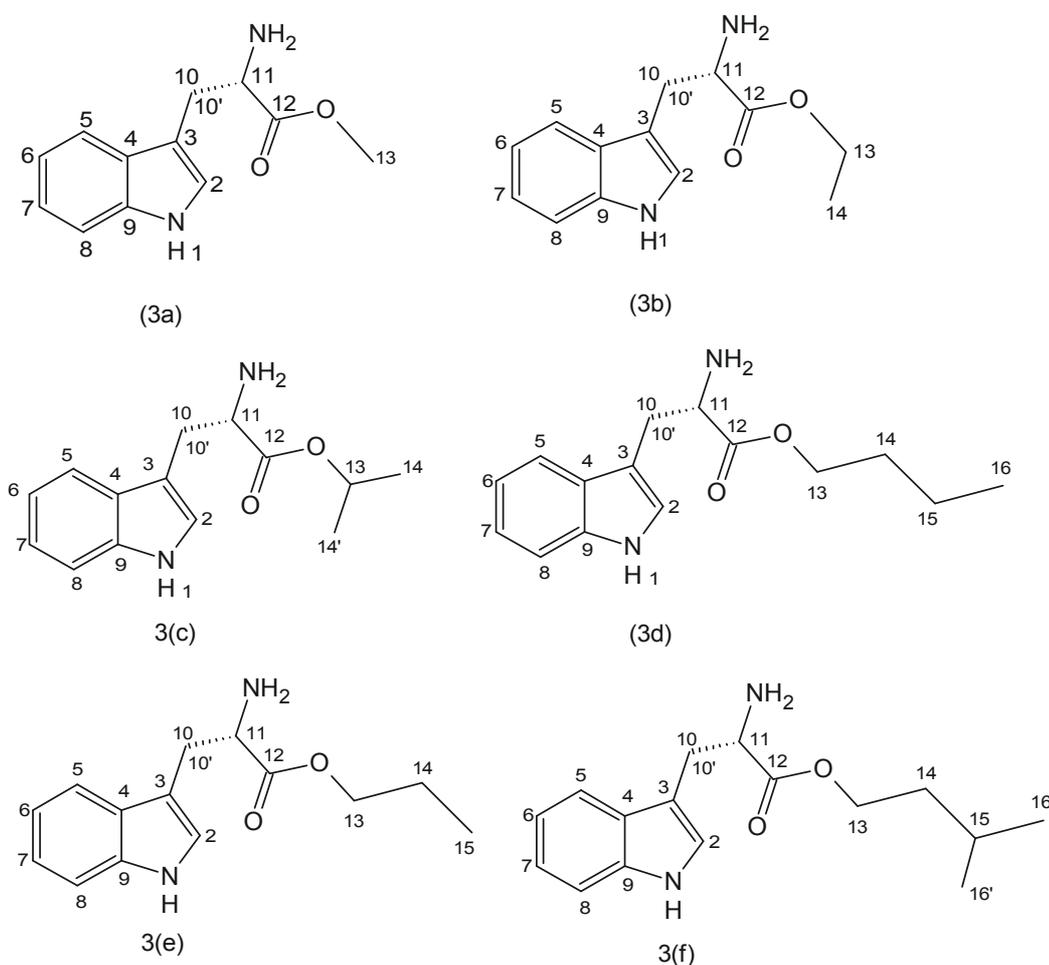


Figura 12: Estruturas dos ésteres; (2S)- 2-amino-3- (1H-indol-3-il) propanoato de metila (**3a**), (2S)- 2- amino- 3- (1H-indol-3-il) propanoato de etila (**3b**), (2S)- 2-amino-3- (1H-indol-3-il) propanoato de propano-2-ila (**3c**) e (2S)-2-amino-3- (1H-indol-3-il) propanoato de butila (**3d**), (2S)- 2-amino-3- (1H-indol-3-il) propanoato de propila (**3e**), (2S)- 2-amino-3- (1H-indol-3-il) propanoato de 3-metilbutila (**3f**).

A seguir são apresentados os dados referentes a identificação estrutural dos ésteres através dos espectros do RMN de ^1H e de ^{13}C , com seus respectivos deslocamentos químicos. Após a síntese dos ésteres, realizou-se a purificação para obtenção do produto puro, para prosseguir com a sequência de reações para

obtenção das betaínas. Os produtos **3a-3d** também foram identificados através da técnica de Espectrometria de Massas de Alta Resolução (HRMS).

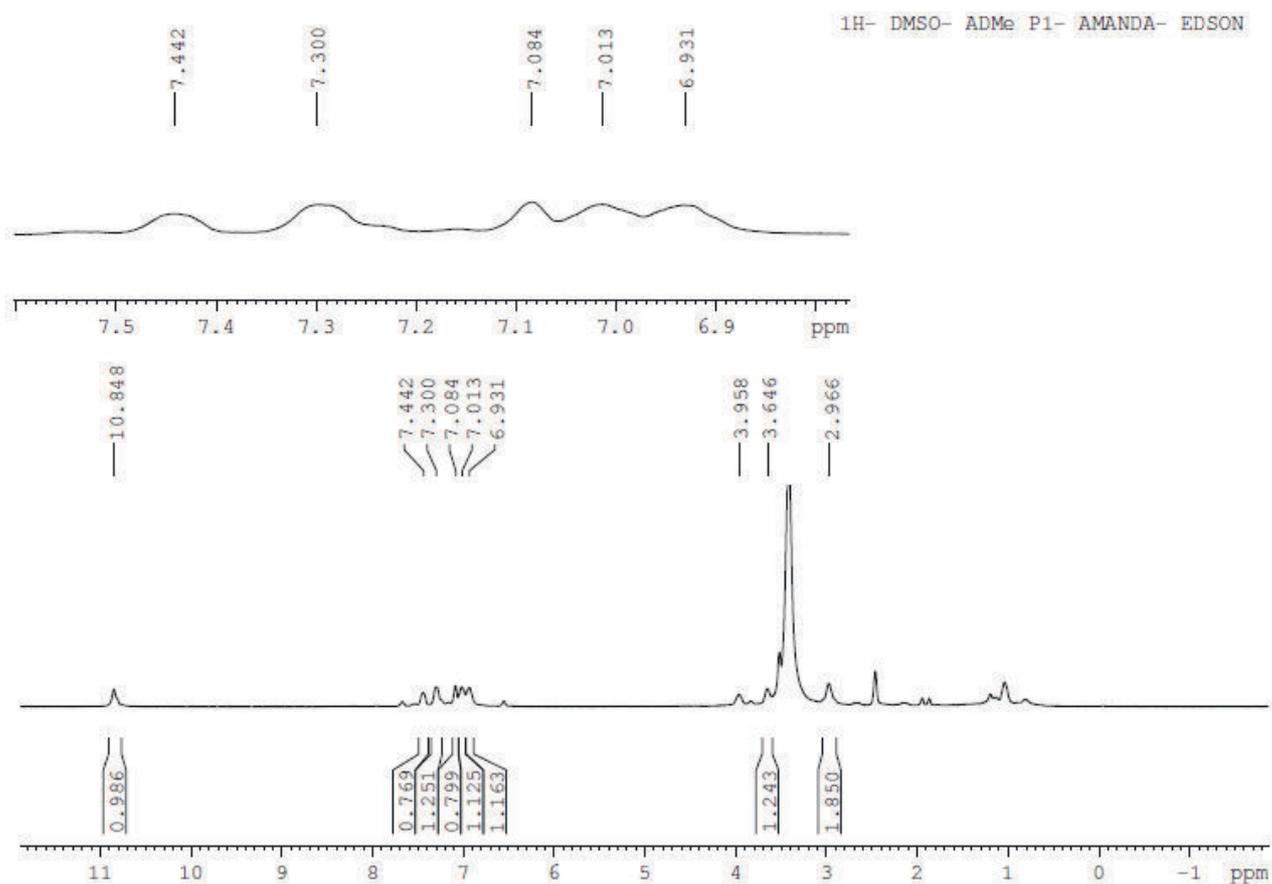
A **Tabela 1** mostra os dados espectrais de RMN de ^1H e ^{13}C do composto **(2S)-2-amino-3-(1H-indol-3-il) propanoato de metila (3a)** com seus respectivos deslocamentos químicos.

Tabela 1 - Valores de deslocamentos químicos (δ), expressos em ppm para o composto **3a** obtidos dos experimentos de RMN de ^1H e ^{13}C , em DMSO- d_6 .

Nº	RMN de ^1H δ (ppm)	RMN de ^{13}C δ (ppm)
1	10,84 s	-
2	7,08 s	124,2
3	-	109,8
4	-	127,7
5	7,44 m	118,6
6	6,93 m	118,7
7	7,01 m	121,3
8	7,29 m	111,8
9	-	136,5
10	2,96 m	30,6
11	3,64 m	55,3
12	-	174,8
13	3,95 s	60,5

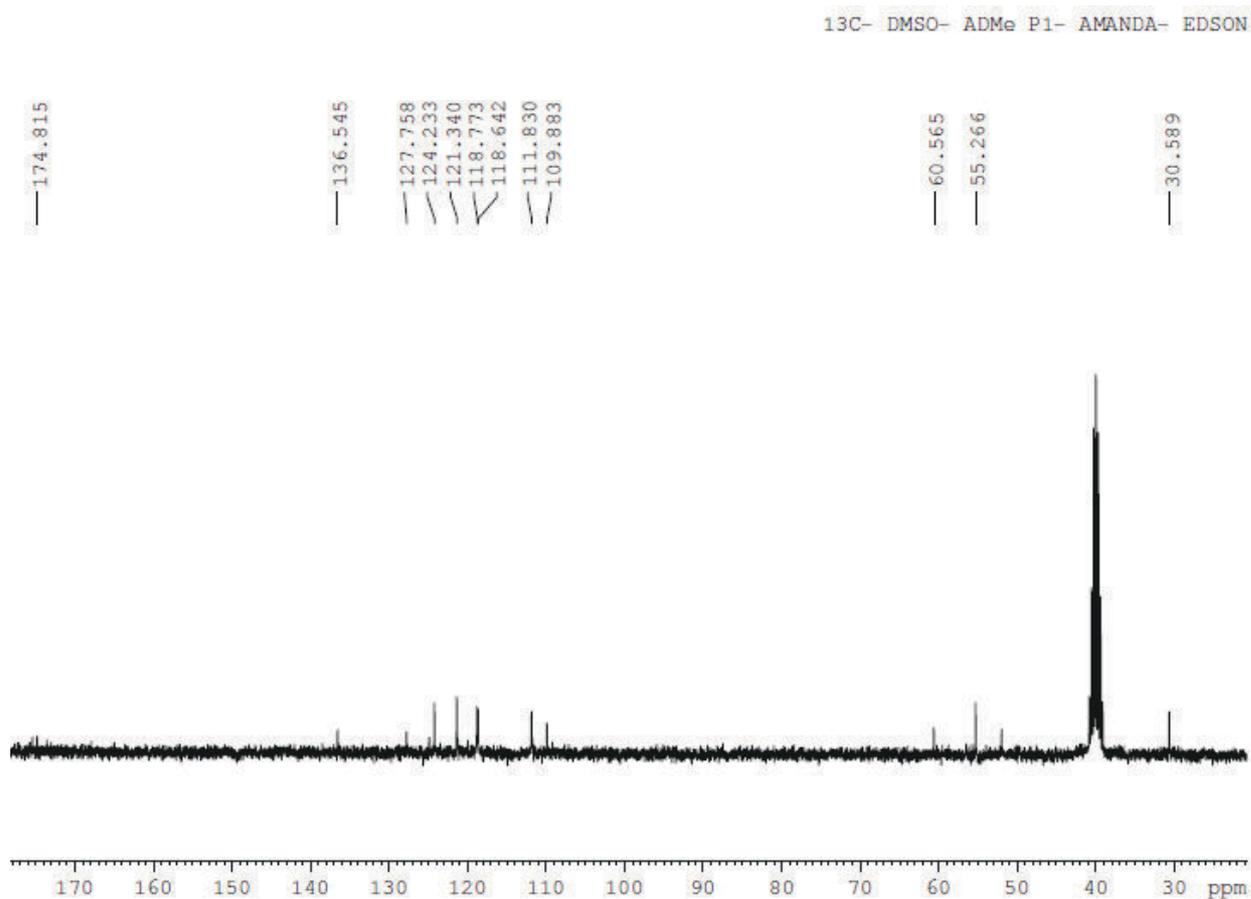
Pelo espectro de RMN de ^1H (**Espectro 1**) podemos confirmar a estrutura do composto **3a** no qual apresentaram-se: quatro sinais de hidrogênios aromáticos acoplados mutuamente em δ 7,44 (m, H-5), δ 7,29 (m, H-8), δ 6,93 (m, H-6), e δ 7,01 (m, H-7); um sinal de hidrogênio indólico como singlete em δ 7,08 (H-2); o

deslocamento químico em δ 3,64 (m, H-11), referente ao grupo metínico ligado ao nitrogênio; dois prótons em δ 2,96 (m, H-10), atribuído aos prótons dos hidrogênios metilênicos e o δ 3,95 (s, H-13) referente ao hidrogênio metílico.



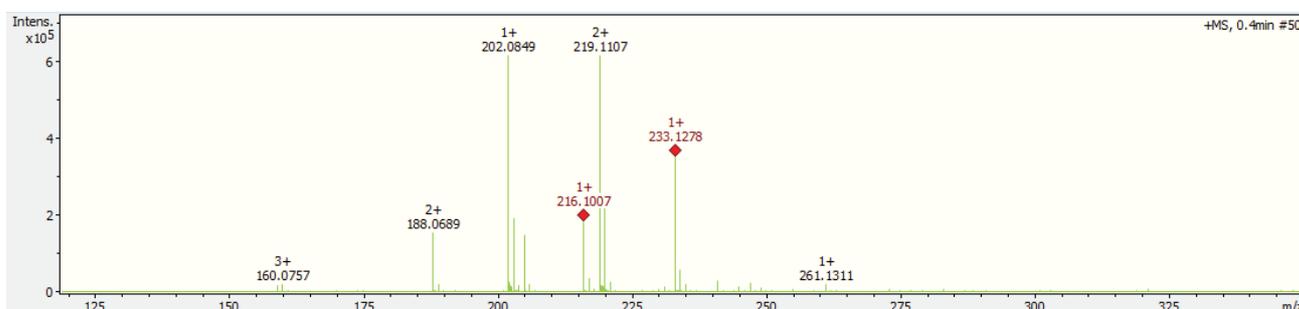
Espectro 1: Espectro de RMN de ^1H de **3a** (300 MHz, em DMSO-d_6).

O espectro de RMN de ^{13}C (**Espectro 2**) apresentou seis carbonos metínicos (δ 60,5, 111,8, 118,6, 118,7, 121,3 e 124,2) dois carbonos metilênicos (δ 30,6 e 60,5, C-10 e C-13), três carbonos quaternários (δ 109,8, 127,7, 136,5 para C-3, C-4 e C-9 respectivamente) e o carbono da carbonila (δ 174,8 C-12) e um carbono metílico δ 60,5 referente ao C-13.



Espectro 2: Espectro de RMN de ^{13}C de **3a** (75 MHz, em DMSO- d_6).

Pelo espectro de massas do composto **3a** pode-se confirmar formação a massa molecular do composto, devido ao íon protonado $[\text{M} + \text{H}]^+$ de m/z 219,1107 sugerindo assim a fórmula molecular $\text{C}_{12}\text{H}_{14}\text{N}_2\text{O}_2$ ($M = 218,1049$). Mas pode-se observar a formação de outros compostos no espectro como analisado no RMN as impurezas.



Espectro 3: Espectro de massas do composto **3a**. (Calculado: m/z : 219,1128 $[\text{M} + \text{H}]^+$, encontrado: 219,1107 $[\text{M} + \text{H}]^+$, $\Delta_m = 9,5$ ppm).

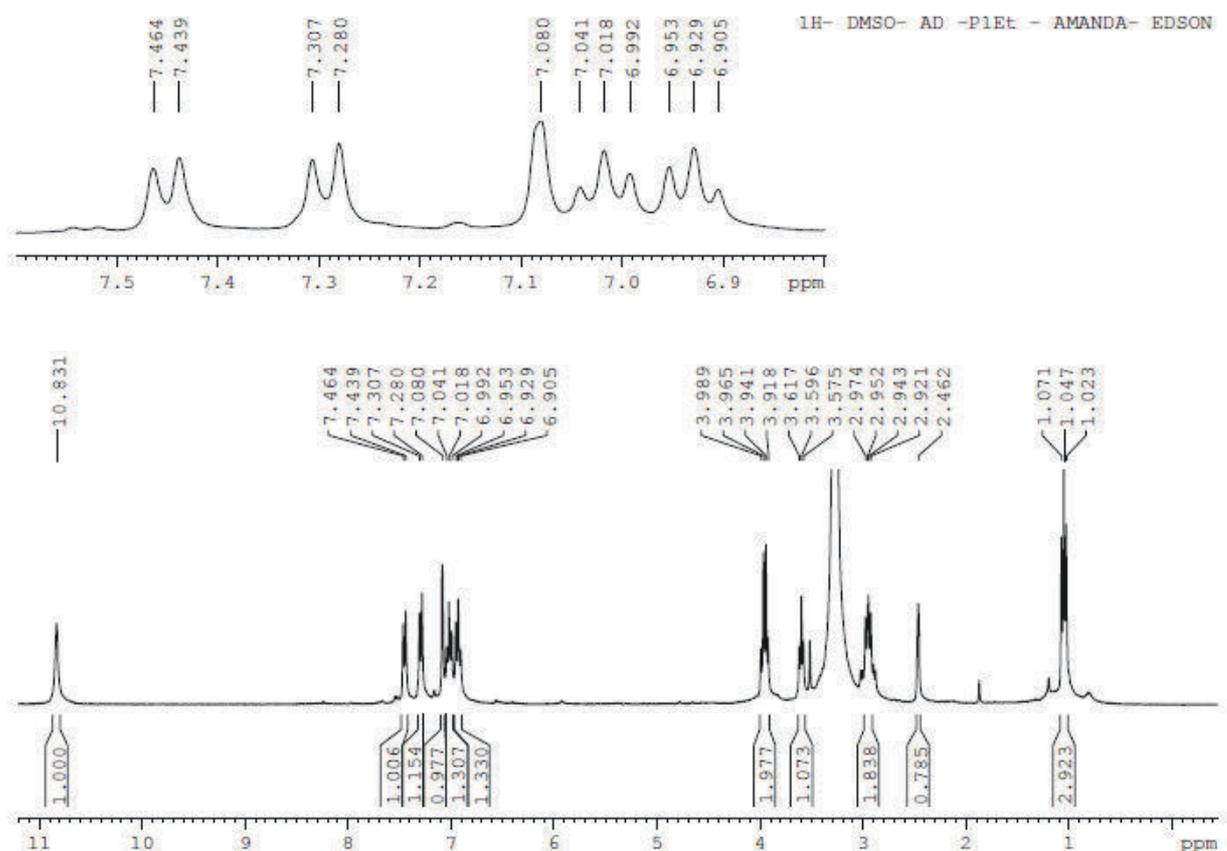
A **Tabela 2** mostra os dados espectrais de RMN de ^1H e ^{13}C do composto **(2S)-2-amino-3-(1H-indol-3-il)propanoato de etila (3b)** com seus respectivos deslocamentos químicos.

Tabela 2 - Valores de deslocamentos químicos (δ), expressos em ppm para o composto **3b** obtidos dos experimentos de RMN de ^1H e ^{13}C , em DMSO- d_6 .

Nº	RMN de ^1H δ (ppm)	RMN de ^{13}C δ (ppm)
1	10,84 s	-
2	7,08 s	124,1
3	-	110,1
4	-	127,8
5	7,45 d ($J=7,9$ Hz)	118,7
6	6,92 t ($J=7,9$ Hz)	118,7
7	7,01 t ($J=7,9$ Hz)	121,3
8	7,29 d ($J=7,9$ Hz)	111,7
9	-	136,5
10	2,95 m	30,9
11	3,59 t ($J=11,9$ Hz)	55,5
12	-	175,3
13	3,95 m	60,4
14	1,05 m	14,4

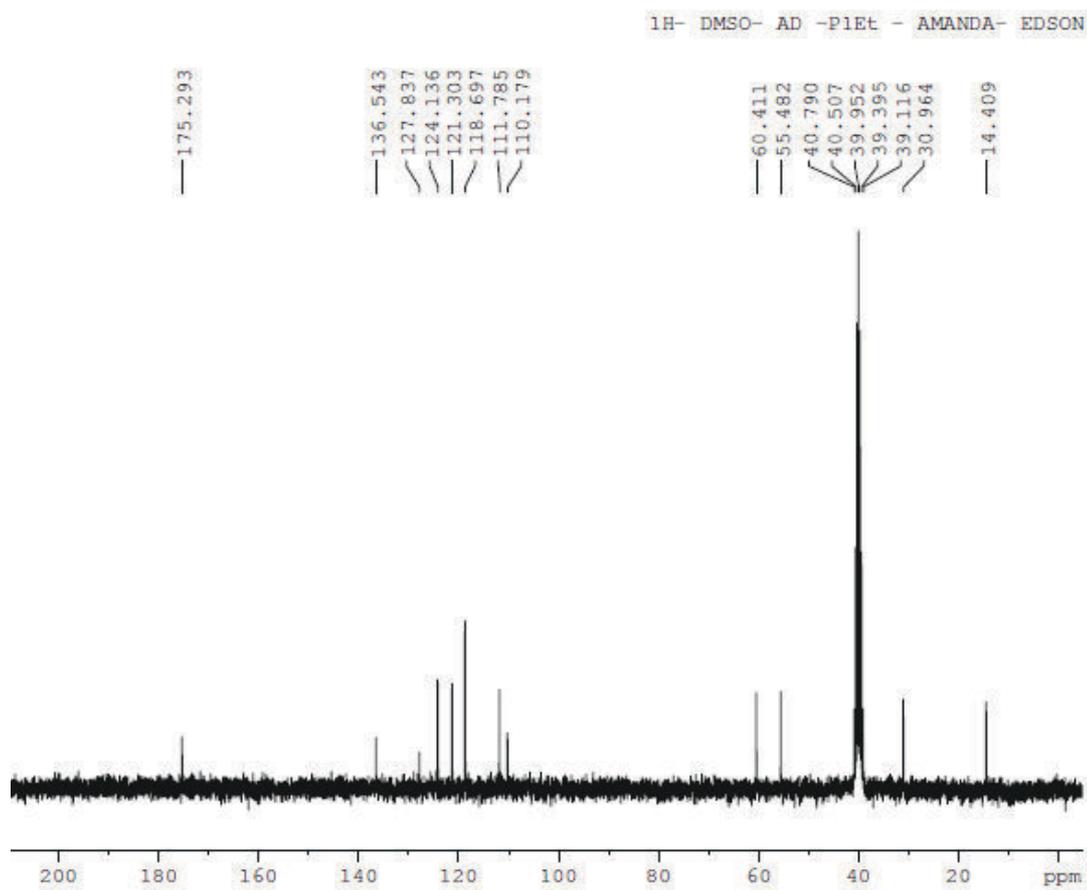
Pelo espectro de RMN de ^1H (**Espectro 4**) podemos confirmar a estrutura do composto **3b** no qual apresentaram-se: quatro sinais de hidrogênios aromáticos acoplados mutuamente em δ 7,45 (dl, $J=7,9$ Hz, H-5), δ 7,29 (dl, $J=7,9$ Hz, H-8), δ 6,92 (tl, $J=7,9$ Hz, H-6), e δ 7,01 (tl, $J=7,9$ Hz, H-7); um sinal de hidrogênio indólico como singleto em δ 7,08 (H-2); deslocamento químico em δ 3,59 (tl, $J=11,9$ Hz, H-

11), referente ao grupo metínico ligado ao nitrogênio; dois prótons em δ 2,95 (m, H-10) e em δ 3,95 (m, H-13), atribuído aos prótons dos hidrogênios metilênicos e com deslocamento químico δ 1,05 (m, H-14) referente aos prótons dos hidrogênios metílicos.



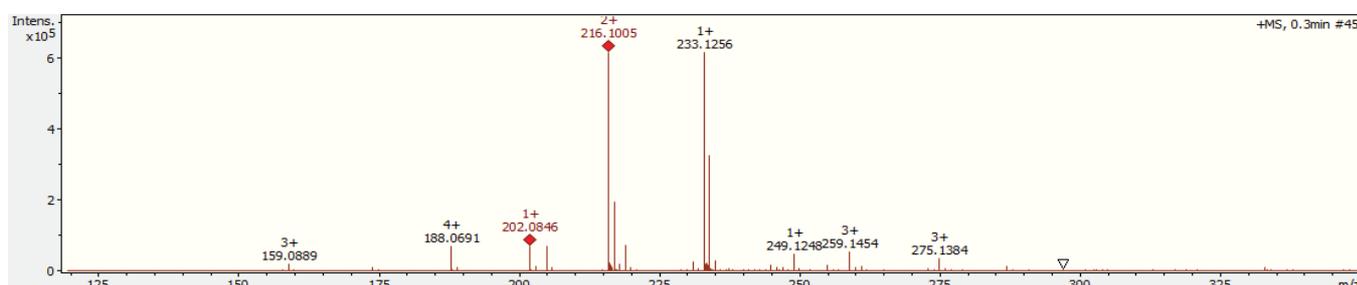
Espectro 4: Espectro de RMN de ^1H de **3b** (300 MHz, em DMSO- d_6).

O espectro de RMN de ^{13}C (**Espectro 3**) apresentou seis carbonos metínicos (δ 60,4, 111,7, 118,7, 118,7, 121,3 e 124,1) dois carbonos metilênicos (δ 30,9 e 55,4, C-10 e C-13), três carbonos quaternários (δ 110,1, 127,8, 136,5 para C-3, C-4 e C-9 respectivamente), um carbono metino (δ 14,4 C-14) e o carbono da carbonila (δ 175,3 C-12).



Espectro 5: Espectro de RMN de ^{13}C de **3b** (75 MHz, em DMSO- d_6).

Pelo espectro de massas do composto **3b** (**Espectro 6**) podemos confirmar a massa molecular do composto, devido ao íon protonado $[\text{M} + \text{H}]^+$ de m/z 233,1256 sugerindo assim a fórmula molecular $\text{C}_{13}\text{H}_{16}\text{N}_2\text{O}_2$ ($M=232,2783$).



Espectro 6: Espectro de massas do composto **3b**. (Calculado: m/z : 233,1284 $[\text{M} + \text{H}]^+$, encontrado: 233,1256 $[\text{M} + \text{H}]^+$, $\Delta_m = 12,0$ ppm).

A tabela 3 mostra os dados espectrais de RMN de ^1H e ^{13}C do composto **(2S)-2-amino-3-(1H-indol-3-il) propanoato de propano-2-ila (3c)** com seus respectivos

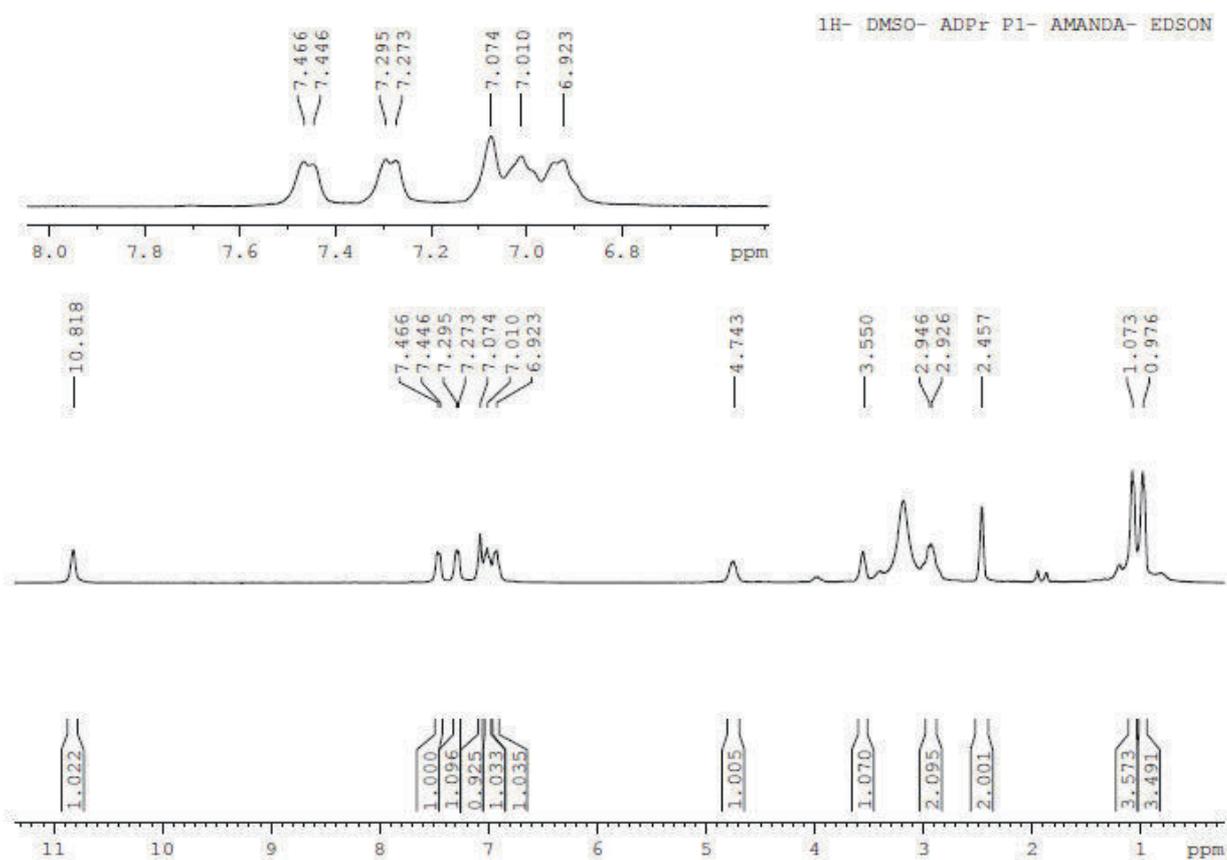
deslocamentos químicos.

Tabela 3 - Valores de deslocamentos químicos (δ), expressos em ppm para os composto **3c** obtido dos experimentos de RMN de ^1H e ^{13}C , em DMSO- d_6 .

Nº	RMN de ^1H δ (ppm)	RMN de ^{13}C δ (ppm)
1	10,81 s	-
2	7,07 s	124,1
3	-	110,2
4	-	127,9
5	7,45 d ($J=6,9$ Hz)	118,6
6	6,93	118,7
7	7,01 m	121,3
8	7,28 d ($J=6,9$ Hz)	111,7
9	-	136,5
10	2,92 m	31,0
11	3,55 m	55,6
12	-	174,8
13	4,75 m	67,4
14	1,08 s	21,7
14'	1,00 s	21,9

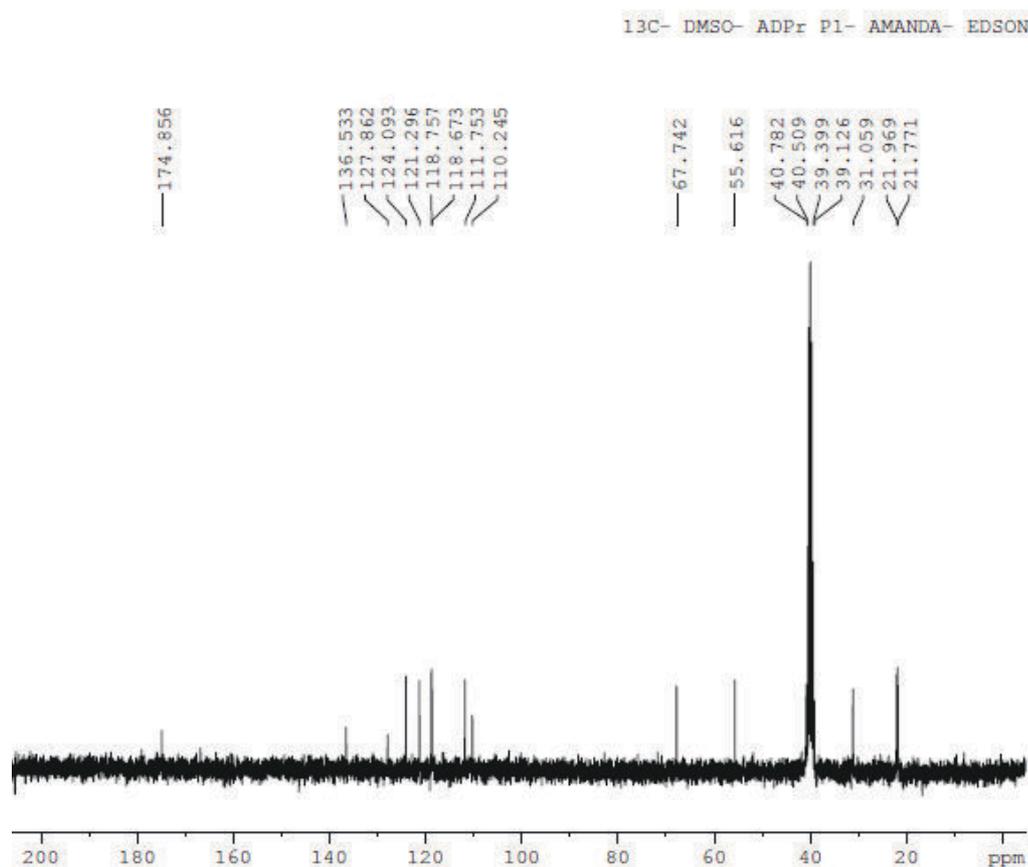
Pelo espectro de RMN de ^1H (**Espectro 7**) podemos confirmar a estrutura do composto **3c** no qual foram observados: quatro sinais de hidrogênios aromáticos acoplados mutuamente em δ 7,45 (d, $J= 6,9$ Hz, H-5), δ 7,28 (d, $J= 6,9$ Hz, H-8), δ 6,93 (m, H-6), e δ 7,01 (m, H-7); um sinal de hidrogênio indólico como singleto em δ 7,07 (H-2); deslocamento químico em δ 3,55 (m, H-11), referente ao grupo metínico ligado ao nitrogênio; dois prótons em δ 2,92 (m, H-10), atribuído aos prótons dos hidrogênios metilênicos e os sinais das metilas com deslocamento químico em δ

1,00 e 1,08 (s, H-14 e H-14' respectivamente).



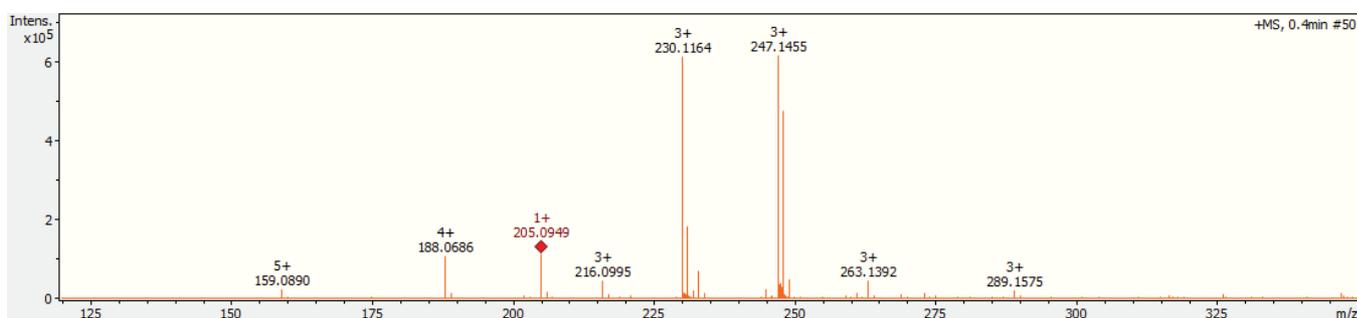
Espectro 7: Espectro de RMN de ¹H de **3c** (300 MHz, em DMSO-d₆).

O espectro de RMN de ¹³C (**Espectro 8**) apresentou sete carbonos metínicos (δ 55,6, 67,4, 111,7, 118,6, 118,7, 121,3 e 124,1) um carbono metilênico (δ 31,0 C-10), três carbonos quaternários (δ 110,2, 127,9, 136,5 para C-3, C-4 e C-9 respectivamente), dois carbonos metínicos (δ 21,9 C-14 e C-14') e o carbono da carbonila (δ 174,8 C-12).



Espectro 8: Espectro de RMN de ^{13}C de **3c** (75 MHz, em DMSO- d_6).

Pelo espectro de massas do composto **3c** (**Espectro 7**) podemos confirmar a massa molecular do composto, devido ao íon protonado $[\text{M} + \text{H}]^+$ de m/z 247,1455 sugerindo assim a fórmula molecular $\text{C}_{14}\text{H}_{18}\text{N}_2\text{O}_2$ ($M = 246,3049$).



Espectro 9: Espectro de massas do composto **3c**. (Calculado: m/z : 247,1441 $[\text{M} + \text{H}]^+$, encontrado: 247,1455 $[\text{M} + \text{H}]^+$, $\Delta_m = 5,6$ ppm).

A **Tabela 4** mostra os dados espectrais de RMN de ^1H e ^{13}C do composto **(2S)-2-amino-3-(1H-indol-3-il) propanoato de butila (3d)** com seus respectivos

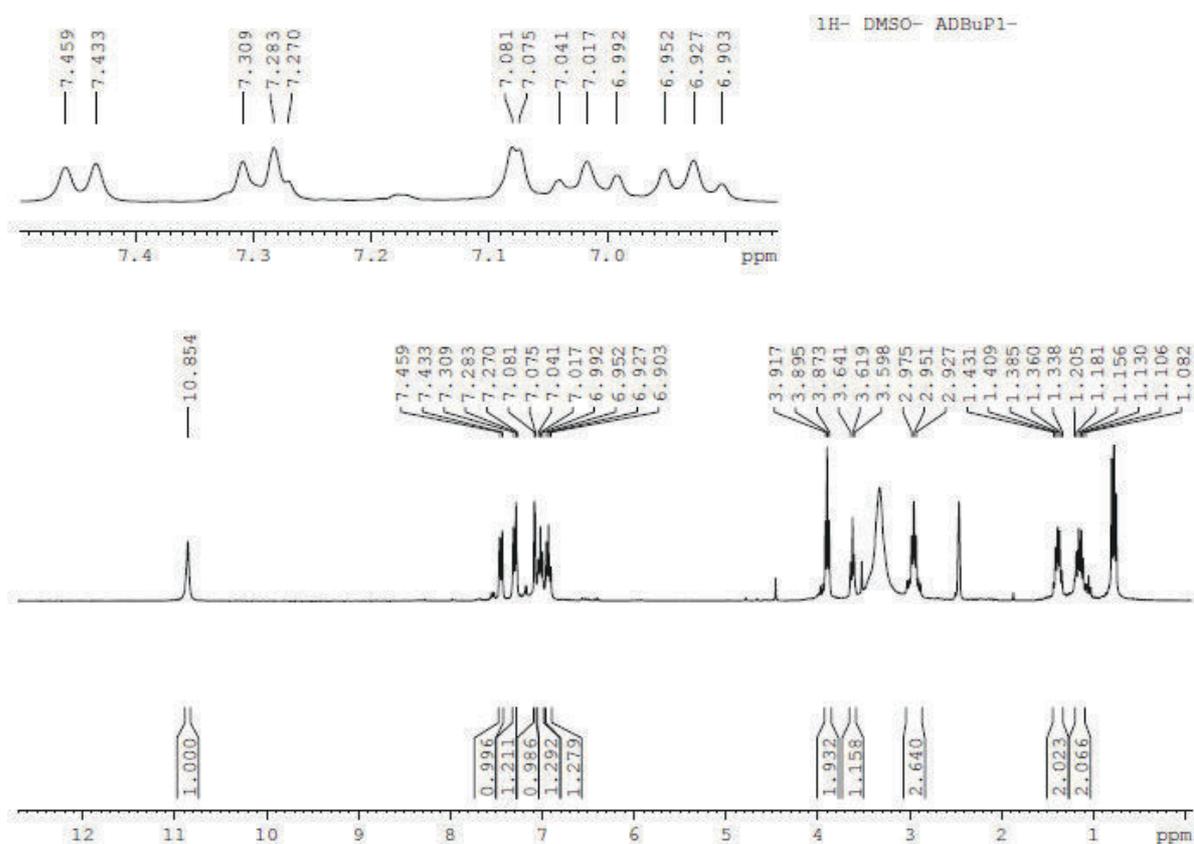
deslocamentos químicos.

Tabela 4 - Valores de deslocamentos químicos (δ), expressos em ppm para os composto **3d** obtido dos experimentos de RMN de ^1H e ^{13}C , em DMSO- d_6 .

Nº	RMN de ^1H δ (ppm)	RMN de ^{13}C δ (ppm)
1	10,85 s	-
2	7,08 s	126,8
3	-	110,1
4	-	127,8
5	7,45 d ($J=7,65$ Hz)	118,7
6	6,93 t ($J=7,65$ Hz)	121,3
7	7,01 t ($J=7,65$ Hz)	124,1
8	7,29 d ($J=7,65$ Hz)	111,8
9	-	136,6
10	2,95 m	31,0
11	3,62 m	55,5
12	-	175,3
13	3,90 m	64,1
14	1,38 m	30,5
15	1,14 m	18,9
16	1,08 m	13,9

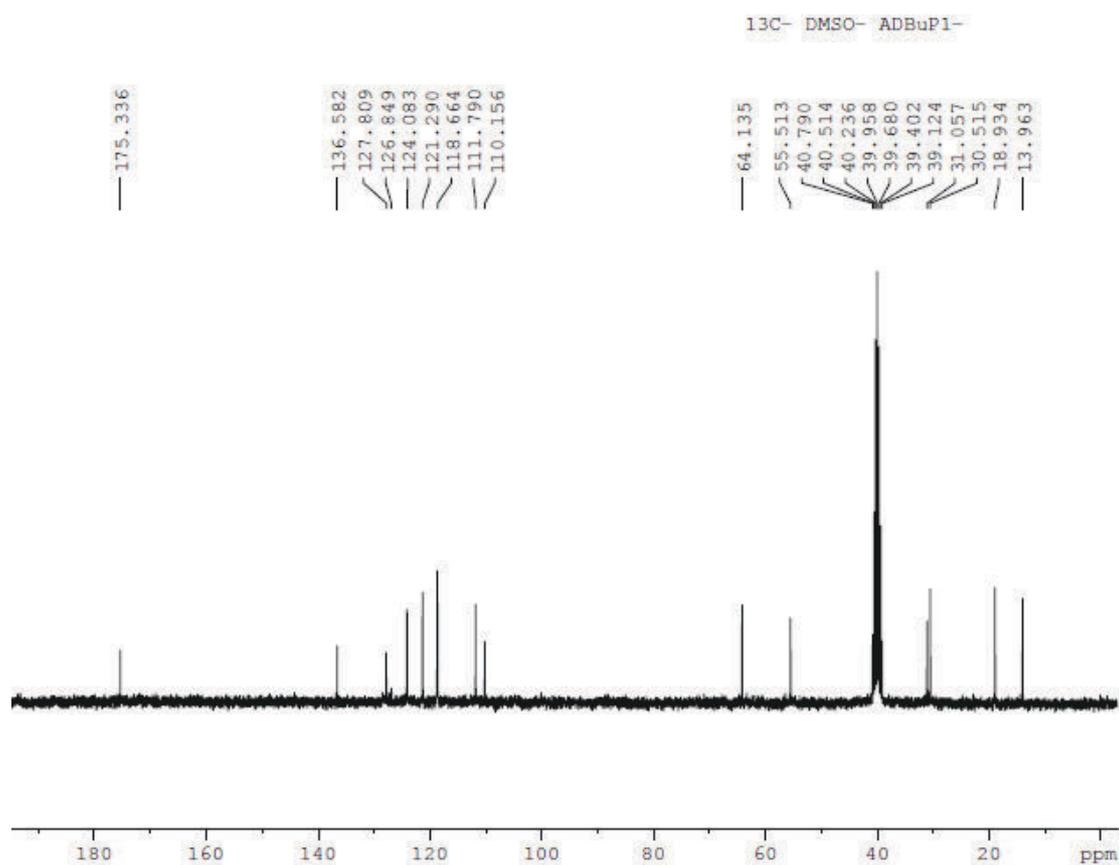
Pelo espectro de RMN de ^1H (**Espectro 10**) podemos confirmar a estrutura do composto **3d** no qual foram observados: quatro sinais de hidrogênios aromáticos acoplados mutuamente em δ 7,45 (d, $J=7,65$ Hz, H-5), δ 7,29 (d, $J=7,65$ Hz, H-8), δ 6,93 (t, $J=7,65$ Hz, H-6), e δ 7,01 (t, $J=7,65$ Hz, H-7); um sinal de hidrogênio

indólico como singlete em δ 7,08 (H-2); deslocamento químico em δ 3,62 (m, H-11), referente ao grupo metínico ligado ao nitrogênio; dois prótons em δ 2,95 (m, H-10), atribuído aos prótons o sinal dos hidrogênios metilênicos, como os hidrogênios metilênicos referentes ao deslocamento químico em δ 3,90 (m, H-13), 1,38 (m, H-14) e 1,14 (m, H-15) e os hidrogênios da metila com deslocamento químico de δ 1,08 (m, H-16).



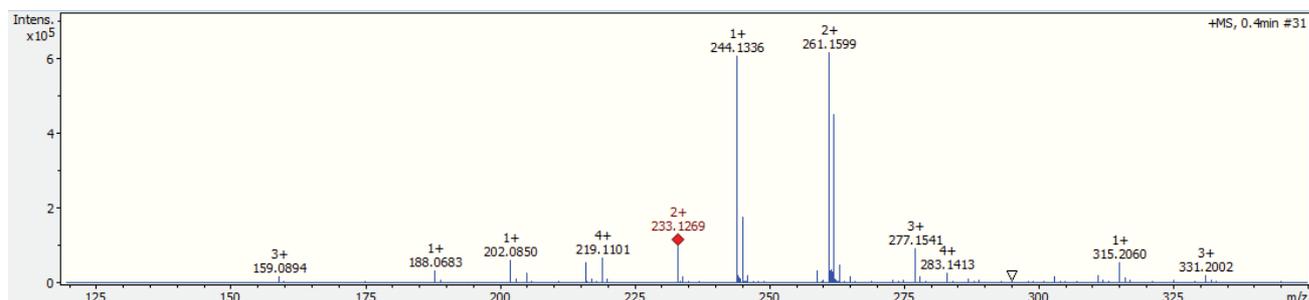
Espectro 10: Espectro de RMN de ^1H de **3d** (300 MHz, em DMSO-d_6).

O espectro de RMN de ^{13}C (**Espectro 11**) apresentou seis carbonos metínicos (δ 64,1, 111,8, 118,7, 121,3, 124,1 e 126,8) quatro carbonos metilênicos (δ 18,9, 30,5, 55,5, 31,0 referente aos C-15, C-14, C-13, C-10 respectivamente), três carbonos quaternários (δ 110,1, 127,8, 136,6 para C-3, C-4 e C-9 respectivamente), um carbono metino (δ 13,9 C-16) e o carbono da carbonila (δ 175,3 C-12).



Espectro 11: Espectro de RMN de ^{13}C de **3d** (75 MHz, em DMSO- d_6).

Pelo espectro de massas do composto **3d** (**Espectro 12**) podemos confirmar a massa molecular do composto, devido ao íon protonado $[\text{M} + \text{H}]^+$ de m/z 261,1599 sugerindo assim a fórmula molecular $\text{C}_{15}\text{H}_{20}\text{N}_2\text{O}_2$ ($M=260,3315$).



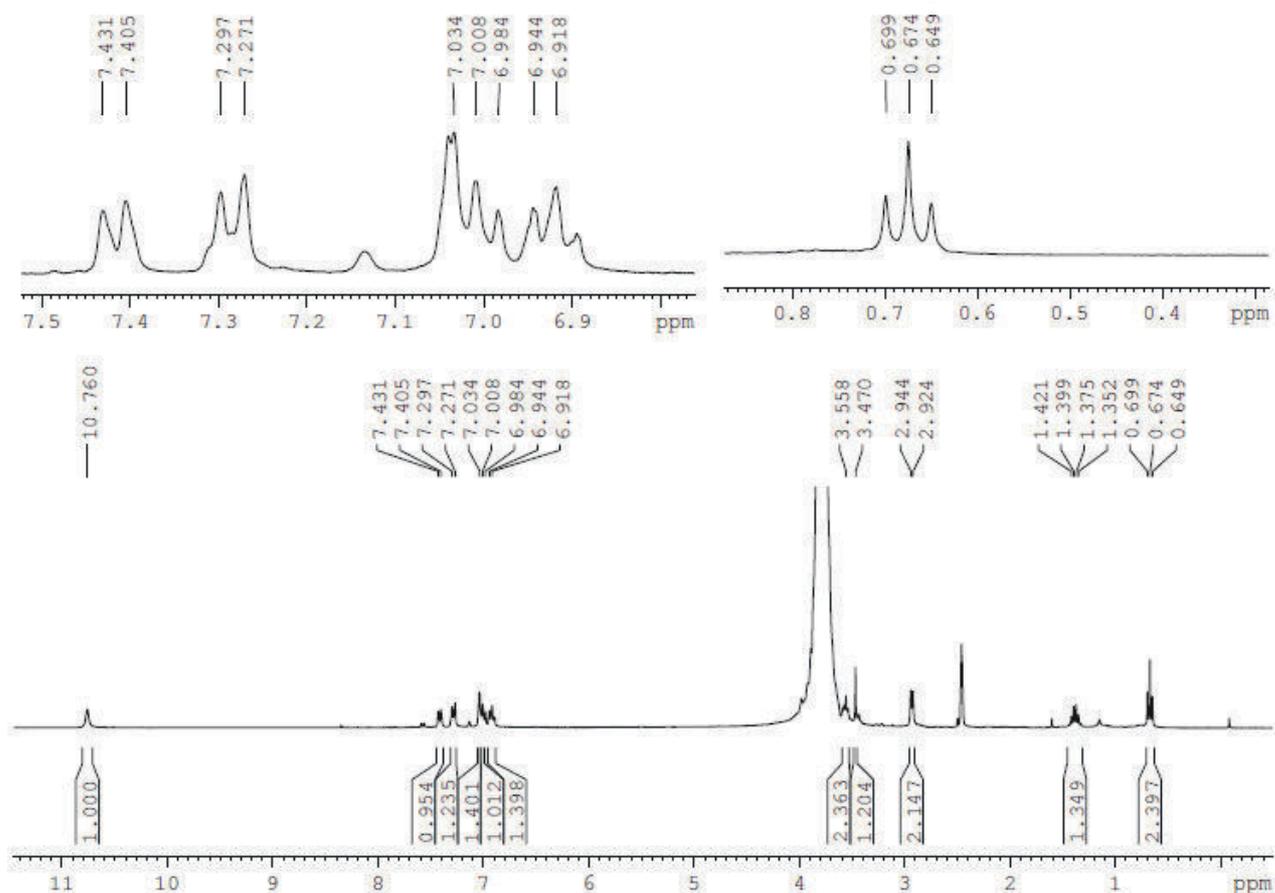
Espectro 12: Espectro de massas do composto **3d**. (Calculado: m/z : 261,1597 $[\text{M} + \text{H}]^+$, encontrado: 261,1599 $[\text{M} + \text{H}]^+$, $\Delta_m = 0,7$ ppm).

A **Tabela 5** mostra os dados espectrais de RMN de ^1H e ^{13}C do composto **(2S)-2-amino-3-(1H-indol-3-il) propanoato de propila (3e)** com seus respectivos deslocamentos químicos.

Tabela 5 - Valores de deslocamentos químicos (δ), expressos em ppm para os composto **3e** obtidos dos experimentos de RMN de ^1H e ^{13}C , em DMSO- d_6 .

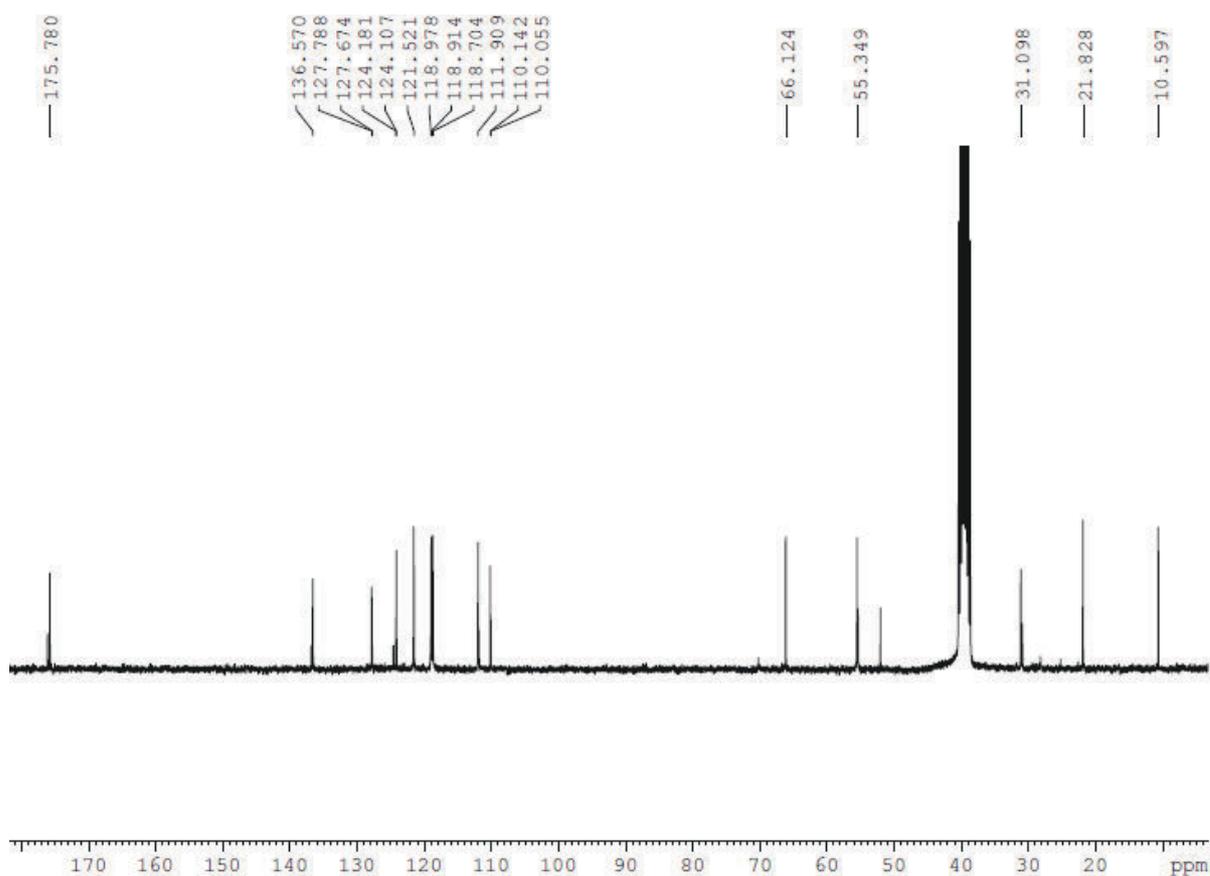
Nº	RMN de ^1H δ (ppm)	RMN de ^{13}C δ (ppm)
1	10,76 s	-
2	7,00 s	124,1
3	-	110,1
4	-	127,7
5	7,41 d ($J=7,8$ Hz)	118,7
6	6,92 t ($J=7,8$ Hz)	118,9
7	7,02 m	121,5
8	7,28 d ($J=7,8$ Hz)	111,9
9	-	136,5
10	2,93 dl ($J=13,1$ Hz)	31,0
11	3,47 m	55,3
12	-	175,7
13	3,56 m	66,1
14	1,38 m	21,8
15	0,67 m	10,6

Pelo espectro de RMN de ^1H (**Espectro 13**) podemos confirmar a estrutura do composto **3e** no qual foram observados: quatro sinais de hidrogênios aromáticos acoplados mutuamente em δ 7,41 (d, $J=7,8$ Hz, H-5), δ 7,28 (d, $J=7,8$ Hz, H-8), δ 6,92 (t, $J=7,8$ Hz, H-6), e δ 7,02 (m, H-7); um sinal de hidrogênio indólico como singleto em δ 7,00 (H-2); deslocamento químico em δ 3,47 (m, H-11), referente ao grupo metínico ligado ao nitrogênio; dois prótons em δ 2,93 (dl, $J=13,1$ Hz H-10) e mais dois prótons referentes ao δ 3,56 e 1,38 (m, H-13 e m, H-14 respectivamente) atribuídos aos prótons dos hidrogênios metilênicos e o sinal da metila com deslocamento químico em δ 0,67 (m, H-15).



Espectro 13: Espectro de RMN de ^1H de **3e** (300 MHz, em DMSO-d_6).

O espectro de RMN de ^{13}C (**Espectro 14**) apresentou seis carbonos metínicos (δ 55,3, 111,9, 118,7, 118,9, 121,5 e 124,1) três carbonos metilênicos (δ 21,8, 66,1, 31,0 referente aos C-14, C-13, C-10 respectivamente), três carbonos quaternários (δ 110,1, 127,7, 136,5 para C-3, C-4 e C-9 respectivamente), um carbono metílico (δ 10,6 C-15) e o carbono da carbonila (δ 175,7 C-12).



Espectro 14: Espectro de RMN de ^{13}C de **3e** (75 MHz, em DMSO-d_6).

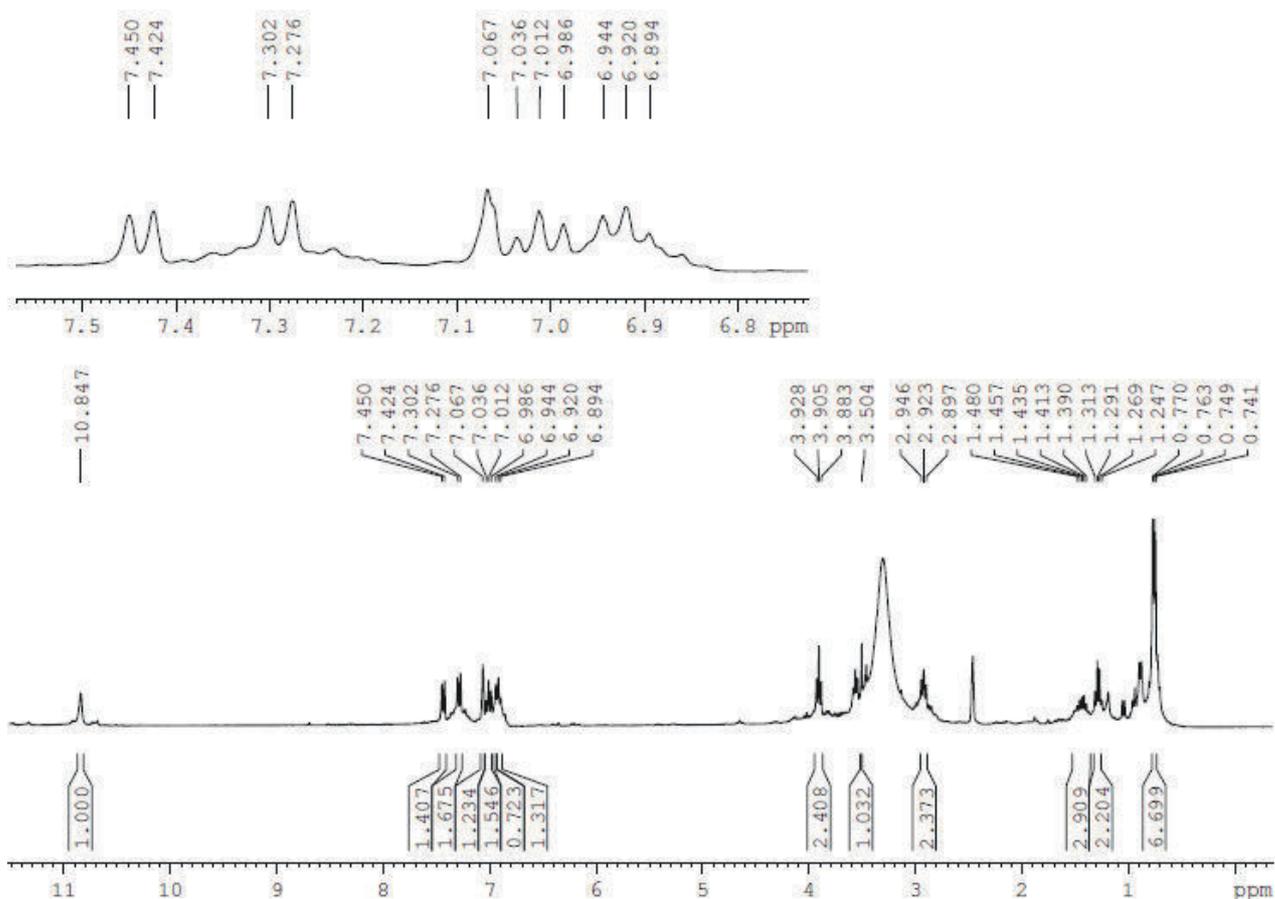
A **Tabela 6** mostra os dados espectrais de RMN de ^1H e ^{13}C do composto **(2S)- 2-amino-3- (1H-indol-3-il) propanoato de 3-metilbutila (3f)** com seus respectivos deslocamentos químicos.

Tabela 6 - Valores de deslocamentos químicos (δ), expressos em ppm para o composto **3f** obtidos dos experimentos de RMN de ^1H e ^{13}C , em DMSO- d_6 .

Nº	RMN de ^1H δ (ppm)	RMN de ^{13}C δ (ppm)
1	10,80 s	-
2	6,94 s	123,9
3	-	110,3
4	-	127,8
5	7,43 d ($J=7,7$ Hz)	118,6
6	6,92 t ($J=7,7$ Hz)	118,7
7	7,06 m	121,3
8	7,28 d ($J=7,7$ Hz)	111,7
9	-	136,5
10	2,92 m	31,4
11	3,50 m	55,7
12	-	175,7
13	3,90 m	62,7
14	1,28 m	24,8
15	1,42 m	11,4
16	0,75 m	22,6
16'	-	22,7

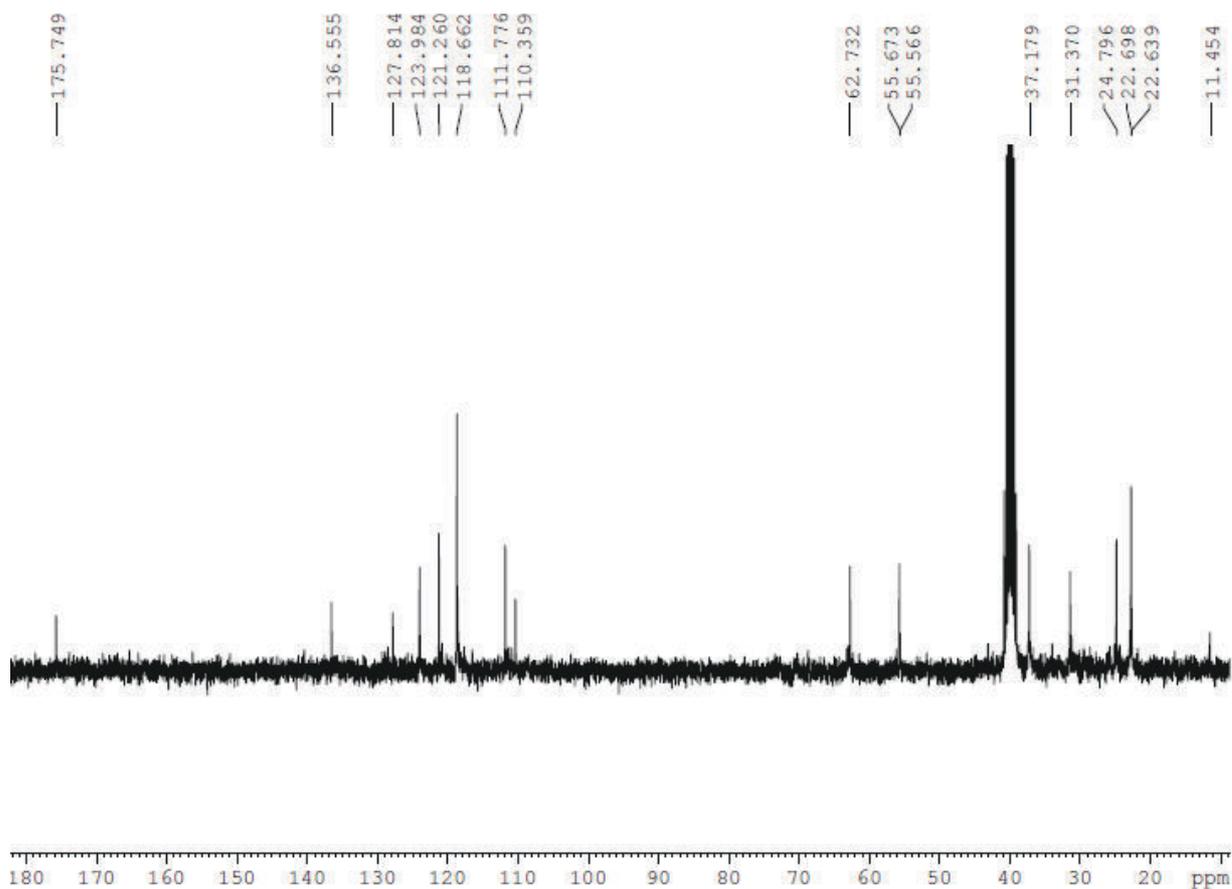
Pelo espectro de RMN de ^1H (**Espectro 15**) podemos confirmar a estrutura do composto **3f** no qual foram observados: quatro sinais de hidrogênios aromáticos acoplados mutuamente em δ 7,43 (d, $J=7,7$ Hz, H-5), δ 7,28 (d, $J=7,7$ Hz, H-8), δ 6,92 (t, $J=7,7$ Hz, H-6), e δ 7,06 (m, H-7); um sinal de hidrogênio indólico como singleto em δ 6,94 (H-2); deslocamento químico em δ 3,50 (m, H-11), referente ao grupo metínico ligado ao nitrogênio; dois prótons em δ 2,92 (m, H-10), atribuído aos

prótons os sinais dos hidrogênios metilênicos, como o deslocamento químico δ 1,28 e 3,90 referente aos hidrogênios (m, H-14 e m, H-13 respectivamente) e os sinais das metilas com deslocamento químico em δ 0,75 (m, H-16 e 16'), além do sinal do hidrogênio metínico com δ 1,42 (m, H-15).



Espectro 15: Espectro de RMN de ^1H de **3f** (300 MHz, em DMSO-d_6).

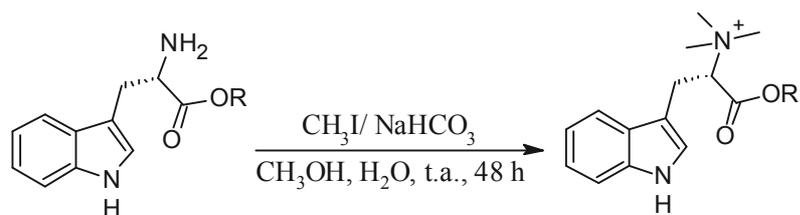
O espectro de RMN de ^{13}C (**Espectro 16**) apresentou sete carbonos metínicos (δ 11,4, 55,7, 111,7, 118,6, 118,7, 121,3 e 123,9) três carbonos metilênicos (δ 24,8, 62,7, 31,4 referente aos C-14, C-13, C-10, respectivamente), três carbonos quaternários (δ 110,3, 127,8, 136,5 para C-3, C-4 e C-9, respectivamente), dois carbonos metílicos (δ 22,6 e 22,7 C-16 e C-16', respectivamente) e o carbono da carbonila (δ 175,7 C-12).



Espectro 16: Espectro de RMN de ^{13}C de **3f** (75 MHz, em DMSO-d_6).

3.2. N-Metilação dos ésteres

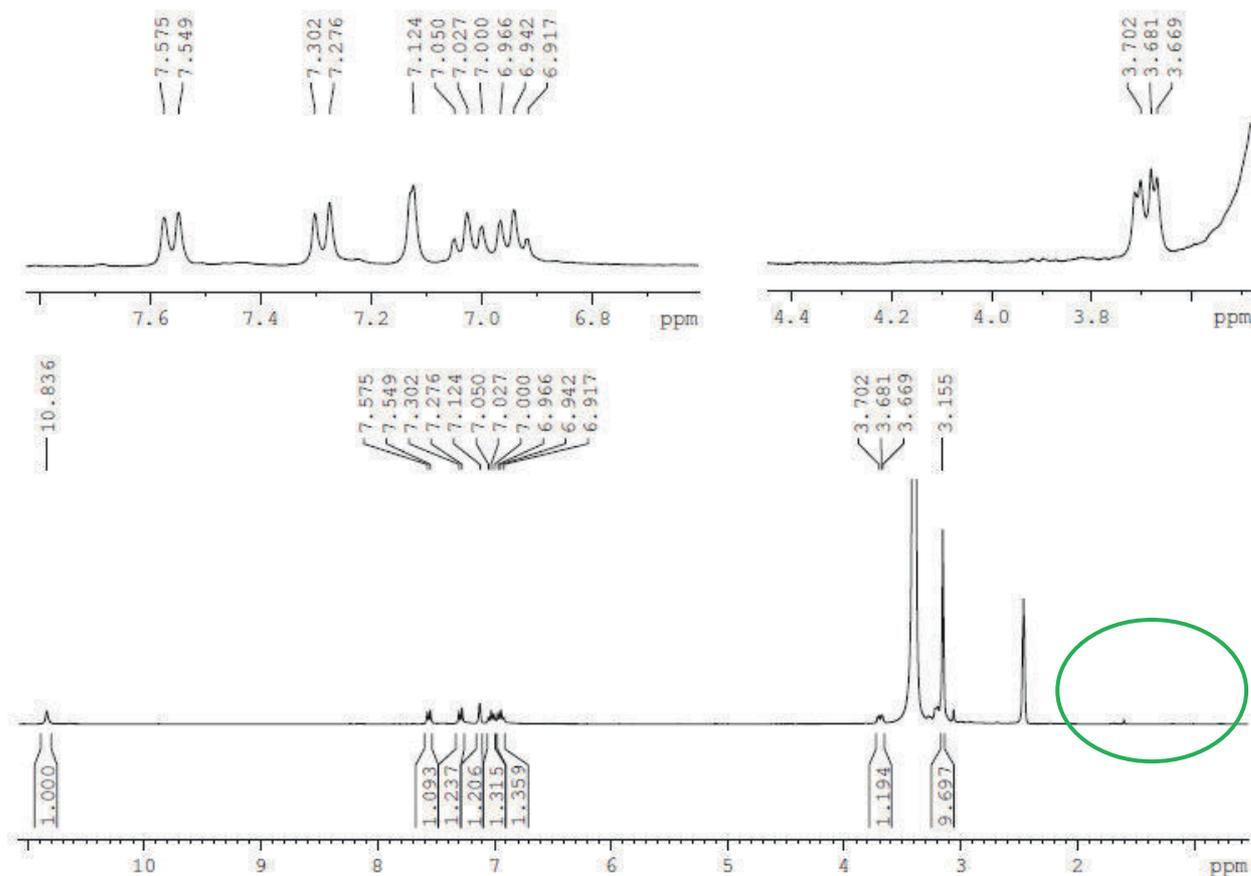
Após o processo de esterificação em meio ácido, foi realizado o processo de N-metilação dos ésteres **3a** a **3f**. A N-metilação dos ésteres **3a-3f** foi realizada conforme metodologia já descrita na literatura (CHARY et al., 2011), que consiste em uma reação de substituição nucleofílica, utilizando iodo metano (CH_3I) em meio básico a temperatura ambiente (t.a.), na presença de água e metanol (**Esquema 2**).



- | | |
|--|---|
| 3a) R= CH ₃ | 4a) R= CH ₃ (não obtido) |
| 3b) R= CH ₂ CH ₃ | 4b) R= CH ₂ CH ₃ (não obtido) |
| 3c) R= CH(CH ₃) ₂ | 4c) R= CH(CH ₃) ₂ (49%) |
| 3d) R= (CH ₂) ₃ CH ₃ | 4d) R= (CH ₂) ₃ CH ₃ (30%) |
| 3e) R= (CH ₂) ₂ CH ₃ | 4e) R= (CH ₂) ₂ CH ₃ (42%) |
| 3f) R=(CH ₃) ₂ CH(CH ₂) ₂ | 4f) R=(CH ₃) ₂ CH(CH ₂) ₂ (não obtido) |

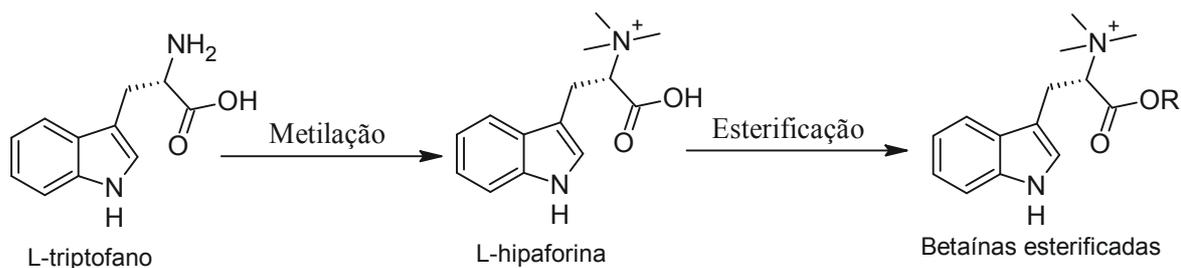
Esquema 2 - Reação de *N*-metilação dos ésteres **3a-3f**.

No entanto, na análise por RMN de ¹H dos produtos obtidos das reações com **3a**, **3b** e **3f**, constatou que houve a *N*-metilação, porém ocorreu a hidrólise do éster. Isso pode ser observado no **Espectro 17**, com o aparecimento de um singlete em 3,15 ppm com integral para 9H referentes aos hidrogênios das metilas e o desaparecimento dos sinais relativos ao éster etílico na região entre 1,00 e 2,00 ppm.



Espectro 17: Espectro de RMN de ^1H de **3b** (300 MHz, em DMSO-d_6).

A hidrólise dos ésteres pode ocorrer, pois a reação de esterificação é uma reação reversível e as condições em processos de purificação, armazenagem, estocagem ou em sínteses posteriores levam a hidrólise, onde a água presente nestes ambientes pode reagir com a carbonila do éster e hidrolisá-lo, podendo ser catalisada tanto por ácido quanto por meio básico (HIJAZIN et al, 2010). Acreditamos que como a reação de *N*-metilação ocorre em meio básico, a própria base desta reação tenha catalisado a hidrólise de alguns ésteres. Logo, a inversão das etapas de reação nestes casos poderá auxiliar na preparação destes éteres, ou seja, realizaríamos primeiro a reação de *N*-metilação e depois a esterificação (**Esquema 3**). Isso ainda pode resultar em maiores rendimentos devido ao efeito indutivo da carga positiva do nitrogênio catiônico que aumentaria a densidade de carga positiva na carbonila facilitando o ataque nucleofílico (STJERND AHL et al., 2003).



Esquema 3 – Proposição de outra rota para obtenção de betaínas esterificadas.

Contudo, as reações de metilação dos ésteres culminaram na obtenção dos compostos: (2*S*)-3-(1*H*-indol-3-il)-*N,N,N*-trimetil-1-oxo-1-[(propano-2-il)oxi]propano-2-amino (**4c**), (2*S*)-1-butoxi-3-(1*H*-indol-3-il)-*N,N,N*-trimetil-1-oxopropan-2-amina (**4d**), (2*S*)-3-(1*H*-indol-3-il)-*N,N,N*-trimetil-1-oxo-1-propoxipropan-2-amino (**4e**) com rendimento de 30% a 49% (**Figura 13**).

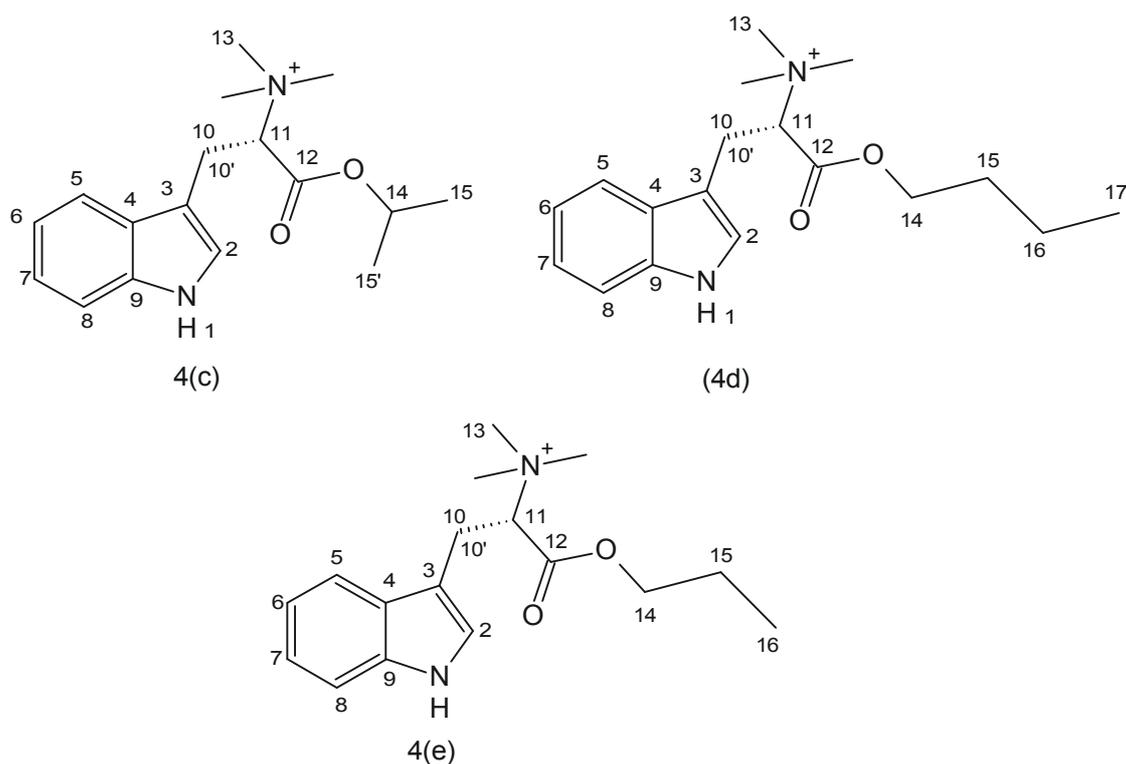


Figura 13: Estruturas das metilações: (2*S*)-3-(1*H*-indol-3-il)-*N,N,N*-trimetil-1-oxo-1-[(propano-2-il)oxi]propano-2-amino (**4c**), (2*S*)-1-butoxi-3-(1*H*-indol-3-il)-*N,N,N*-trimetil-1-oxopropan-2-amina (**4d**) e (2*S*)-3-(1*H*-indol-3-il)-*N,N,N*-trimetil-1-oxo-1-propoxipropan-2-amino (**4e**).

Os dados abaixo mostram os espectros do RMN de ^1H dos compostos sintetizados, com seus respectivos deslocamentos químicos. Estes compostos passaram pela etapa de purificação para obtenção dos produtos puros. Todas as betaínas foram identificadas através das técnicas de RMN de ^1H **4c-4e** e apenas o

composto **4d** foi identificado por Espectrometria de Massas HRMS ESI.

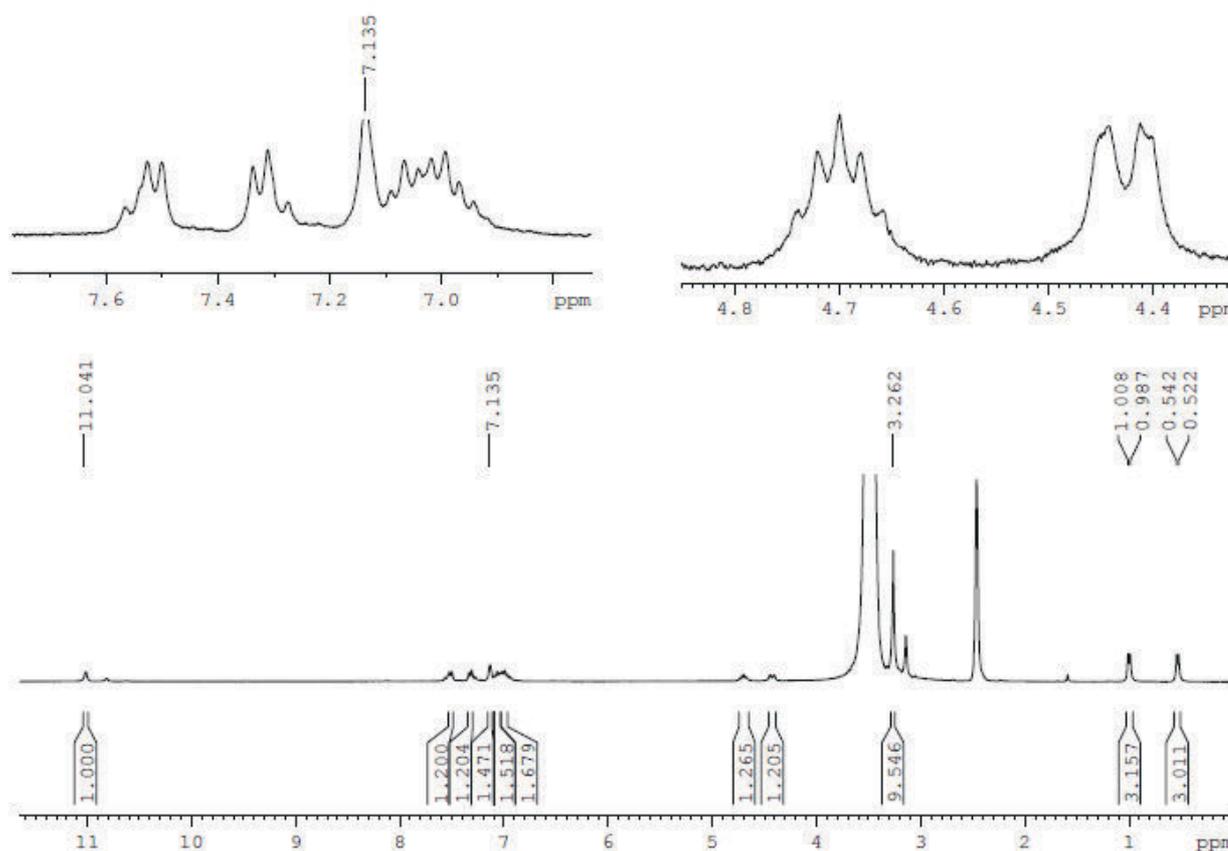
A **Tabela 7** mostra os dados espectrais de RMN de ^1H do composto (2*S*)-3-(1*H*-indol-3-il)-*N,N,N*-trimetil-1-oxo-1-[(propano-2-il)oxi]propano-2-amino (**4c**) com seus respectivos deslocamentos químicos.

Tabela 7 - Valores de deslocamentos químicos (δ), expressos em ppm para o composto **4c** obtidos dos experimentos de RMN de ^1H em DMSO- d_6 .

Nº	RMN de ^1H δ (ppm)
1	10,04 s
2	7,13 s
3	-
4	-
5	7,51 dl ($J=7,7$ Hz)
6	6,99 tl ($J=7,3$ Hz)
7	7,06 tl ($J=7,3$ Hz)
8	7,32 dl ($J=7,7$ Hz)
9	-
10	-
11	4,42 dl ($J=10,9$ Hz)
12	-
13	3,26 s
14	4,70 m
15	1,00 s
15'	0,53 s

Através do espectro de RMN de ^1H (**Espectro 18**) podemos observar a

estrutura do composto **4c** no qual se apresentaram: quatro sinais de hidrogênios aromáticos acoplados mutuamente em δ 7,51 (dl, $J=7,7$ Hz, H-5), δ 7,32 (dl, H-8), δ 6,99 (tl, $J=7,3$ Hz, H-6), e δ 7,06 (tl, $J=7,3$ Hz, H-7); um sinal de hidrogênio indólico como singleto em δ 7,13 (H-2); o deslocamento químico em δ 4,42 (dl, $J=10,9$ Hz, H-11), referente ao grupo metínico ligado ao nitrogênio; os dois prótons H-10 os sinais não apareceram no espectro com atribuição aos prótons dos metilênicos e o δ 4,70 (m, H-14) referente ao hidrogênio metínico, além dos hidrogênios metílicos com δ 1,00 e δ 0,53 (s, H-15 e H15'). Também foram identificados os hidrogênios ligados a amina quaternária com δ 3,26 (s, 9H-13).



Espectro 18: Espectro de RMN de ^1H de **4c** (300 MHz, em DMSO-d_6).

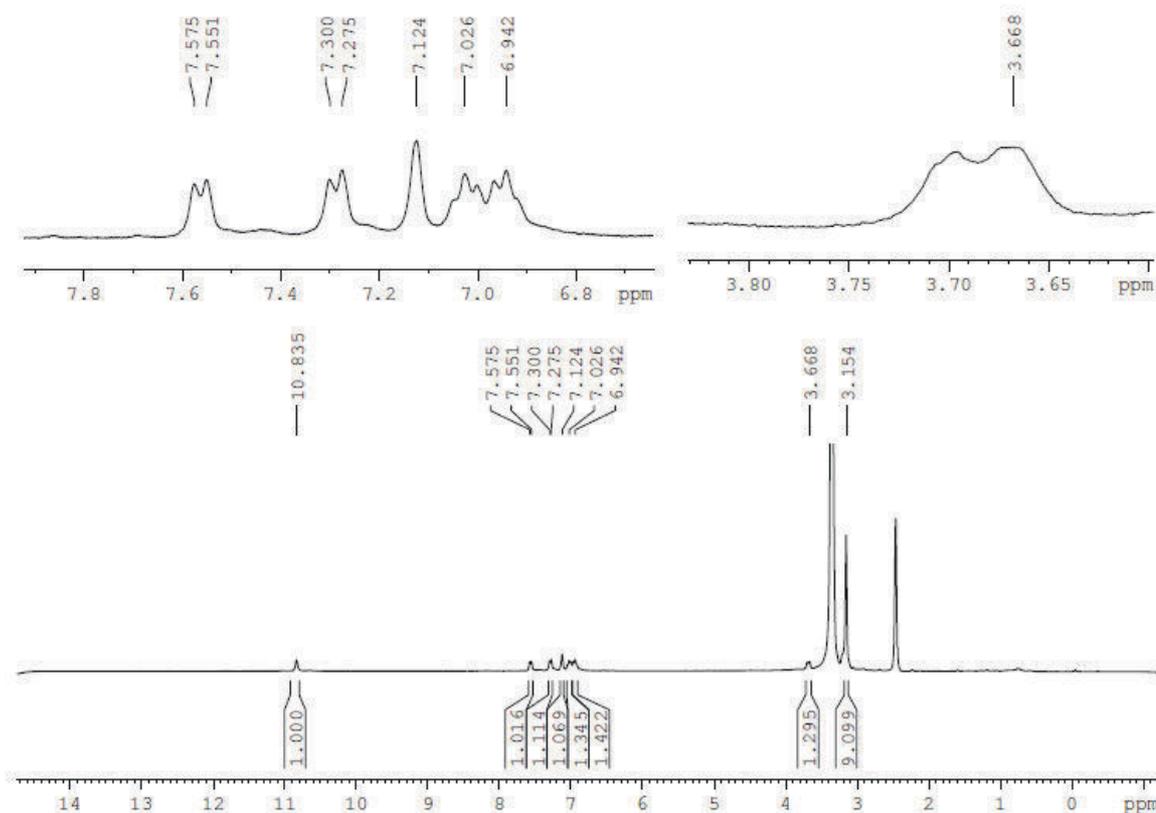
A **Tabela 8** mostra os dados espectrais de RMN de ^1H do composto (2S)-1-butoxi-3-(1H-indol-3-il)-N,N,N-trimetil-1-oxopropan-2-amina (**4d**) com seus respectivos deslocamentos químicos.

Tabela 8 - Valores de deslocamentos químicos (δ), expressos em ppm para o composto **4d** obtidos dos experimentos de RMN de ^1H em DMSO-d_6 .

Nº	RMN de ^1H δ (ppm)
1	10,83 s
2	7,12 s
3	-
4	-
5	7,56 dl ($J=7,5$ Hz)
6	6,94 m
7	7,02 m
8	7,29 dl ($J=7,5$ Hz)
9	-
10	-
11	3,66 m
12	-
13	3,15 s
14	3,72 m
15	1,59 m
16	1,18 m
17	0,75 m

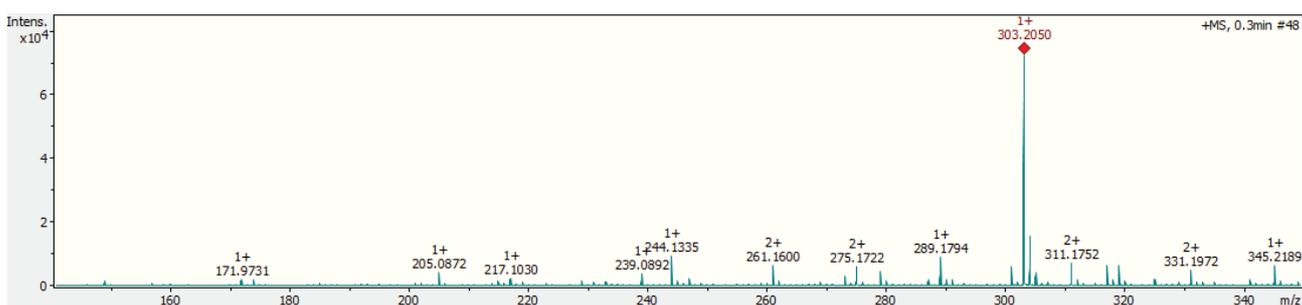
Pelo espectro de RMN de ^1H (**Espectro 19**) podemos observar a estrutura do composto **4d** no qual apresentaram-se: quatro sinais de hidrogênios aromáticos acoplados mutuamente em δ 7,56 (dl, $J=7,5$ Hz, H-5), δ 7,29 (dl, $J=7,5$ Hz H-8), δ 6,94 (m, H-6), e δ 7,02 (m, H-7); um sinal de hidrogênio indólico como singlete em δ 7,12 (H-2); o deslocamento químico em δ 3,66 (m, H-11), referente ao grupo

metínico ligado ao nitrogênio; os dois prótons H-10 não apareceram os sinais no espectro, o deslocamento dos hidrogênios metilênicos em δ 3,72 (m, H-14), como os deslocamentos em δ 1,59 (m, H-15), δ 1,18 (m, H-16) referente aos hidrogênios metilênicos e o metílico δ 0,75 (m, H-17). E os hidrogênios referentes aos hidrogênios ligados a amina quaternária com δ 3,15 (s, 9H-13).



Espectro 19: Espectro de RMN de ¹H de **4d** (300 MHz, em DMSO-d₆).

A formação do composto **4d** foi confirmada através de Espectrometria de Massas de Alta Resolução (HRMS-ESI). No **Espectro 20** pode-se observar a m/z 303,2050, aproximadamente igual a calculada de m/z 303,2061, assim podendo ser sugerido a fórmula molecular C₁₅H₂₀N₂O₂.



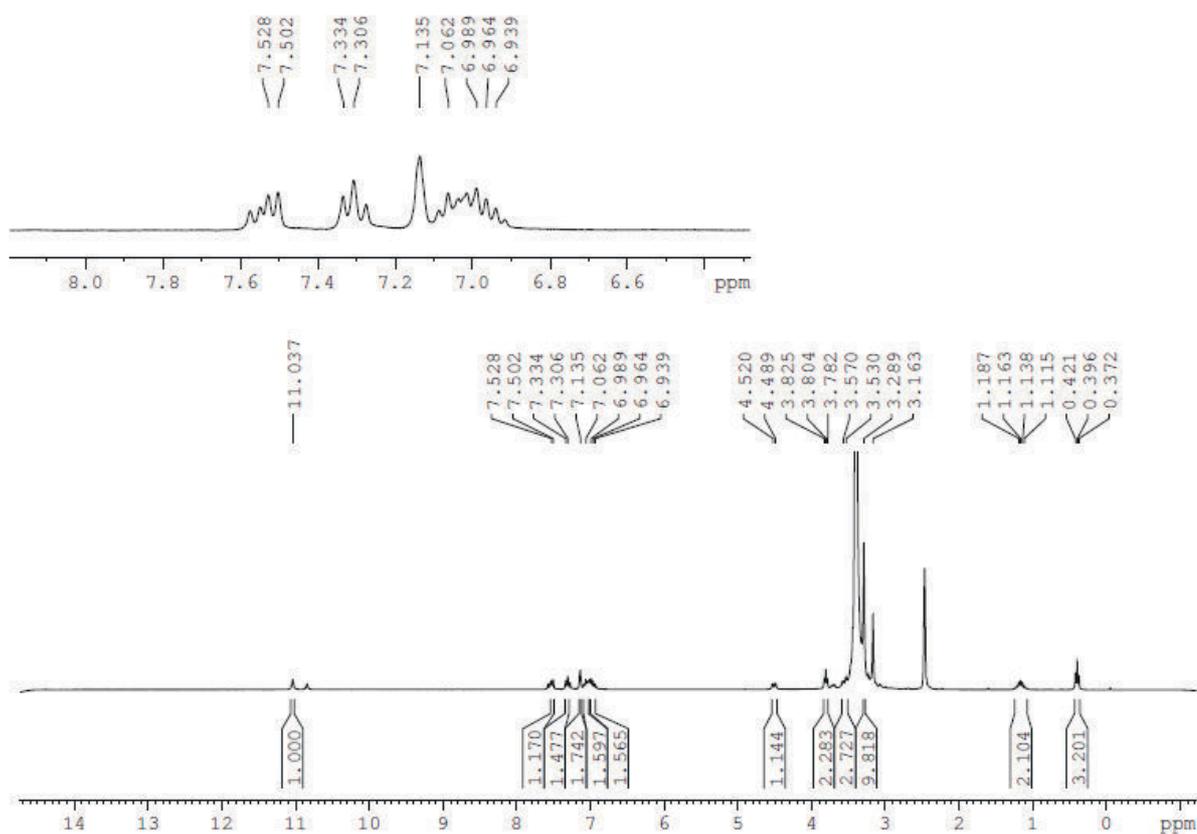
Espectro 20: Espectro de massas do composto (**4d**). (Calculado: m/z : 303,2061 $[M^+]$, encontrado: 303,2050 $[M^+]$, $\Delta m = 3,6$ ppm).

A **Tabela 9** mostra os dados espectrais de RMN de 1H do composto (2S)-3-(1H-indol-3-il)-*N,N,N*-trimetil-1-oxo-1-propoxipropan-2-amino (**4e**) com seus respectivos deslocamentos químicos.

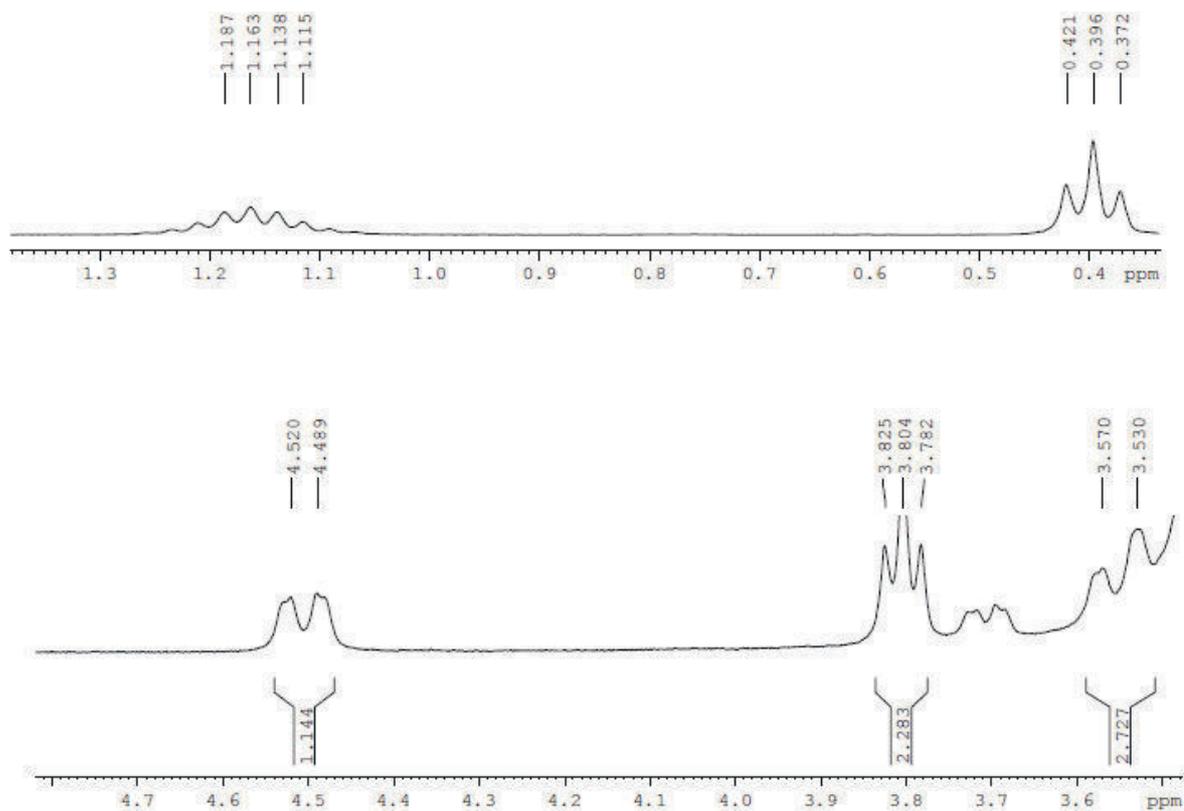
Tabela 9 - Valores de deslocamentos químicos (δ), expressos em ppm para o composto **4e** obtidos dos experimentos de RMN de 1H em DMSO- d_6 .

Nº	RMN de 1H δ (ppm)
1	11,03 s
2	7,13 s
3	-
4	-
5	7,51 d ($J=7,5$ Hz)
6	6,96 m
7	7,06 m
8	7,32 dl ($J=7,5$ Hz)
9	-
10	3,55 m
11	4,50 m
12	-
13	3,29 s
14	3,80 t ($J=6,5$ Hz)
15	1,16 m
16	0,40 t ($J=7,1$ Hz)

Através do espectro de RMN de ^1H (**Espectro 21**) podemos observar a estrutura do composto **4e** no qual se apresentaram: quatro sinais de hidrogênios aromáticos acoplados mutuamente em δ 7,51 (d, $J=7,5$ Hz, H-5), δ 7,32 (d, $J=7,5$ Hz, H-8), δ 6,96 (m, H-6), e δ 7,06 (m, H-7); um sinal de hidrogênio indólico como singleto em δ 7,13 (s, H-2); o deslocamento químico em δ 4,50 (m, H-11), referente ao grupo metínico ligado ao nitrogênio; dois prótons em δ 3,69 (m, H-10), como o δ 3,80 (t, $J=6,5$ Hz, H-14) e δ 1,16 (m, H-15) atribuídos aos prótons metilênicos, o δ 0,40 (t, $J=7,1$ Hz, H-16) corresponde ao hidrogênio metílico e o δ 3,29 (s, 9H-13) é referente aos hidrogênios metílicos ligados a amina quaternária.



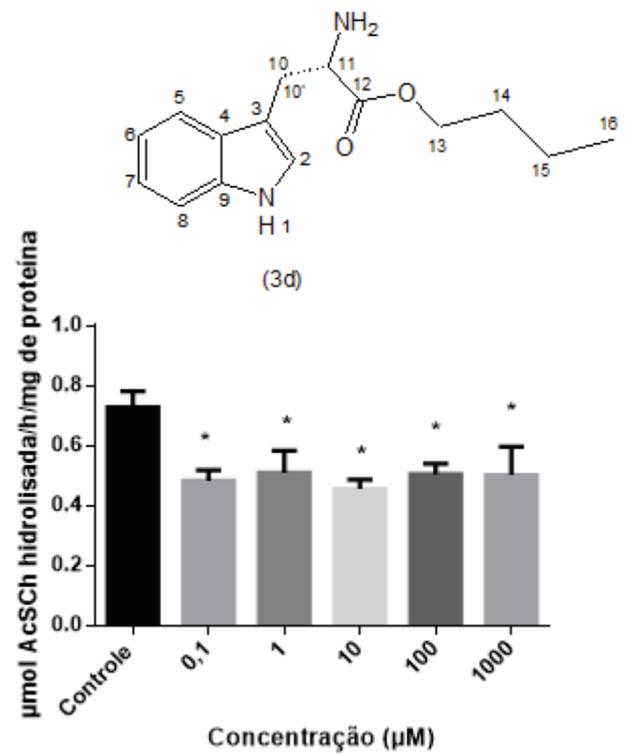
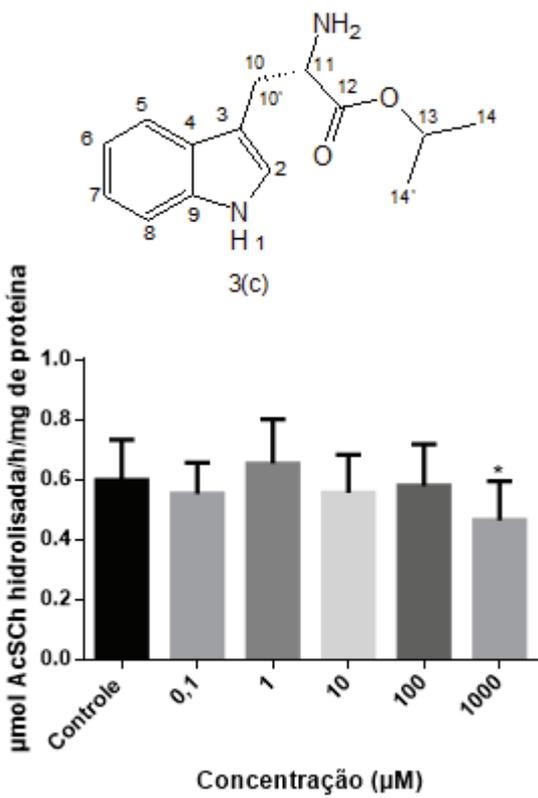
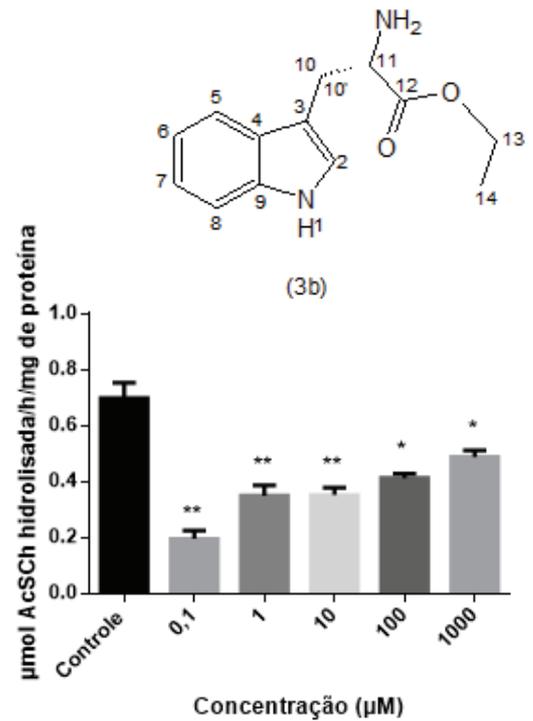
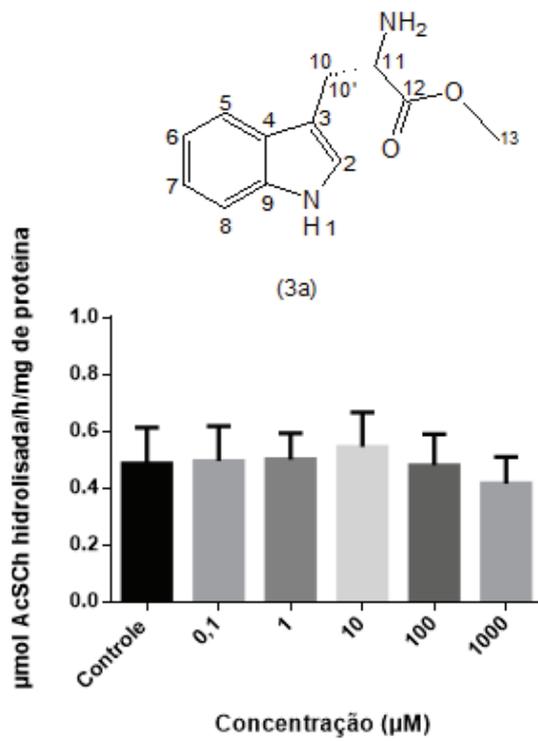
Espectro 21: Espectro de RMN de ^1H de **4e** (300 MHz, em DMSO-d_6).



Espectro 22: Ampliação do espectro de RMN de ¹H de **4e** (300 MHz, em DMSO-d₆).

3.3. Atividade Biológica: Inibição do composto sobre a AChE

Inicialmente, foram realizados os ensaios de inibição da atividade da AChE com os ésteres **3a–3f** e os resultados são mostrados na **Figura 14**.



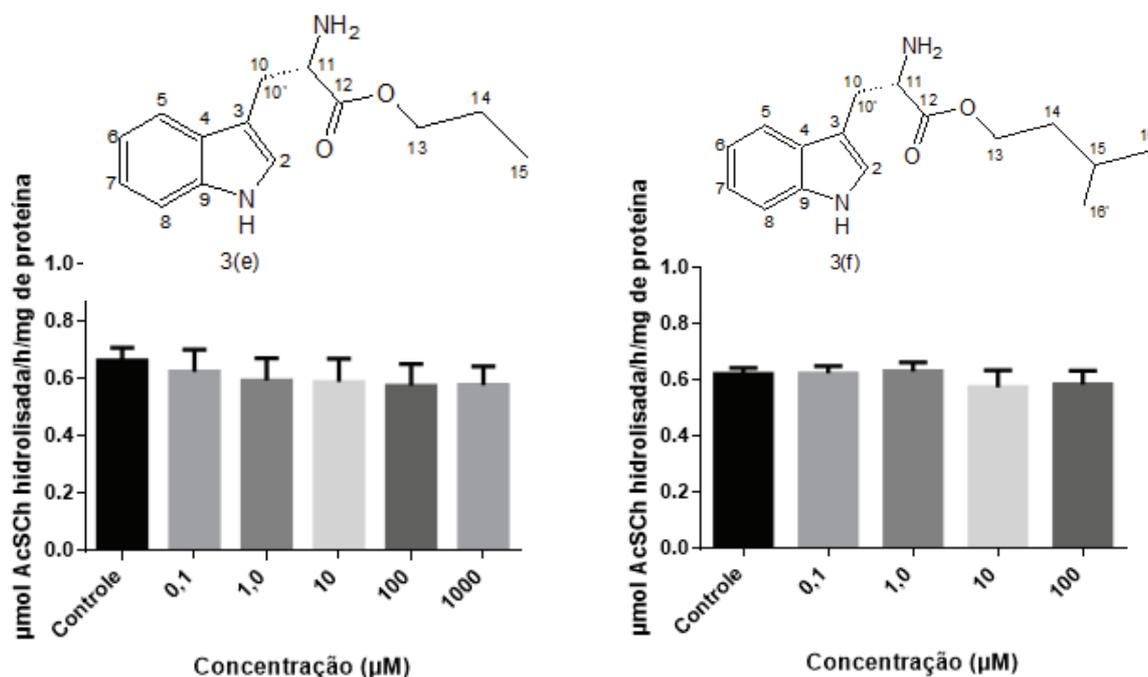


Figura 14: Inibição da atividade da AChE *in vitro* encéfalo total na presença de diferentes concentrações dos compostos **3a–3f** (0,1, 1,0, 10, 100 e 1000 µM); (n = 5). As diferenças entre os grupos foram consideradas significativas quando $p < 0,05$. Todos os dados foram expressos como média \pm S.E.M (erro padrão da média).

Os compostos esterificados foram testados nas amostras de encéfalo, onde os compostos **3a**, **3e** e **3f** não se mostraram ativos em nenhuma das concentrações testadas. Já o composto **3b** e **3d** apresentaram inibição em todas as concentrações testadas e, o composto **3c** inibiu atividade da enzima somente na maior concentração testada (1000 µM).

Foram realizados os ensaios da atividade biológica com as L-betaínas esterificadas **4c–4e** e os resultados são mostrados na **Figura 15**. Os compostos **4c–4e** não foram capazes de inibir atividade da AChE nas concentrações testadas quando comparadas a amostra controle.

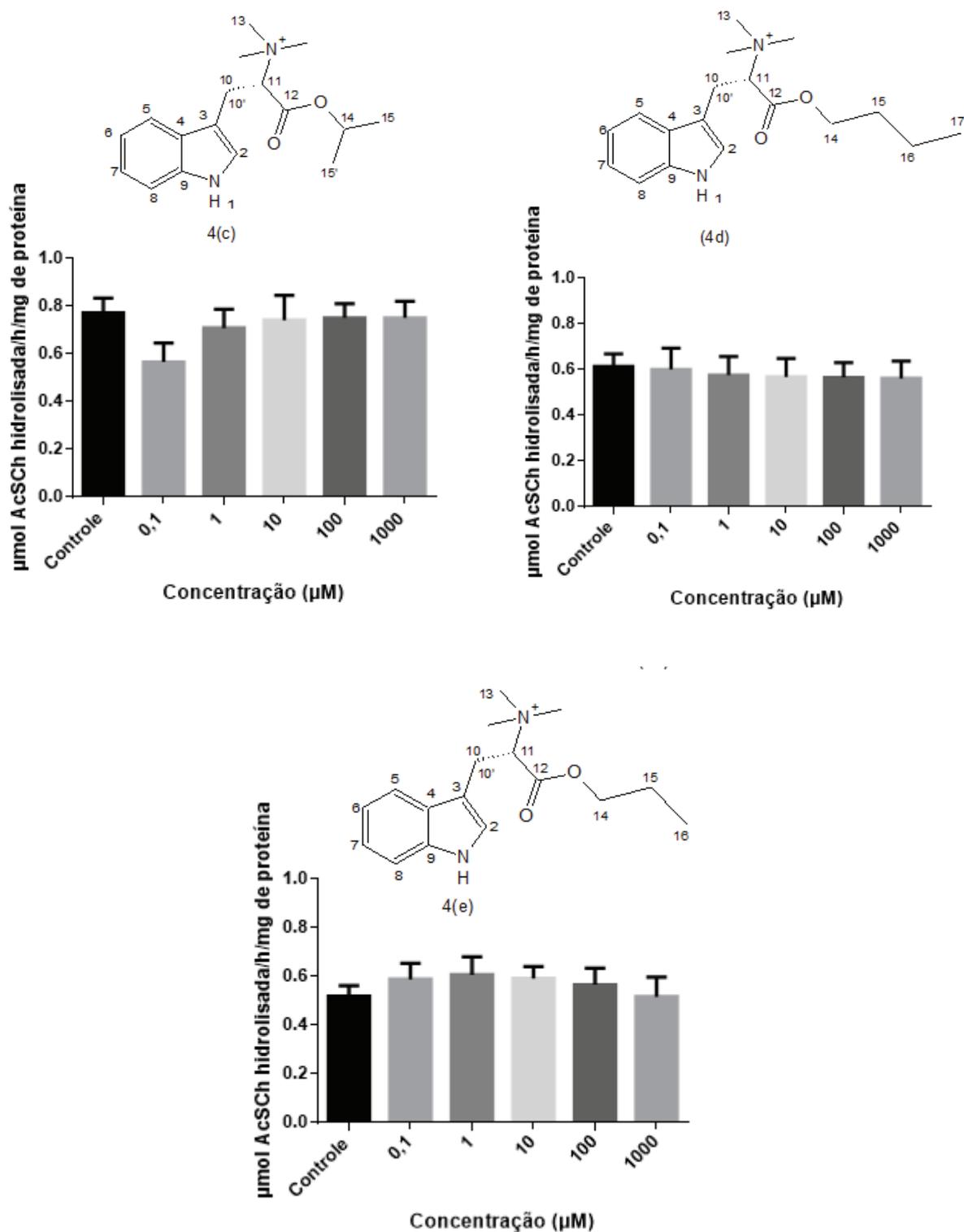


Figura 15: Inibição da atividade da AChE in vitro encéfalo total na presença de diferentes concentrações dos compostos **4c-4e** (0,1, 1,0, 10, 100 e 1000 μM); (n = 5). As diferenças entre os grupos foram consideradas significativas quando $p < 0,05$. Todos os dados foram expressos como média \pm S.E.M (erro padrão da média).

Quando comparamos as atividades de inibição dos ésteres **3c** e **3e** com os seus derivados *N*-metilados **4c** e **4e**, podemos verificar que não houve alteração em

relação a atividade, ou seja, a inserção de uma carga positiva no nitrogênio não contribuiu para o aumento e nem a diminuição da atividade nestes compostos. No entanto, quando realizamos a comparação entre os compostos **3d** e **4d**, podemos afirmar que a modificação do grupo NH_2 para um sal de amônio quaternário ($\text{N}^+(\text{CH}_3)_3$) ocasionou na inativação do composto. Isso foi diferente do que esperávamos, já que a presença de uma carga positiva na molécula poderia auxiliar na interação do inibidor com o sítio ativo da enzima, através de um resíduo de aminoácido aniônico (Glu) (KOMLOOVA, et al. 2010).

Porém, a inserção de uma carga positiva no nitrogênio na forma de um sal de amônio quaternário pode ter contribuído para a instabilidade da ligação éster das L-betaínas esterificadas, fazendo com essa hidrólise ocorresse antes da própria ligação do inibidor ao sítio ativo da enzima, isso pode ser sugerido, pois ésteres de betaínas que possuem um sal de amônio quaternário são mais facilmente hidrolisáveis comparados a ésteres sem a carga catiônica (STJERNDAHL, et al. 2003).

A hidrólise de uma ligação éster é influenciada por grupos doadores ou retiradores de elétrons adjacentes à carbonila, sais de amônio quaternário são fortemente retiradores de elétrons o que leva a uma diminuição da densidade de elétrons na ligação éster, favorecendo o ataque nucleofílico à carbonila (**Figura 16**), onde a repulsão de carga envolvendo o carbono carbonílico e a carga positiva localizada no nitrogênio é estabilizada pela formação de um enolato durante a catálise básica e desestabilizada por uma hidrólise em meio ácido (STJERNDAHL et al., 2003).

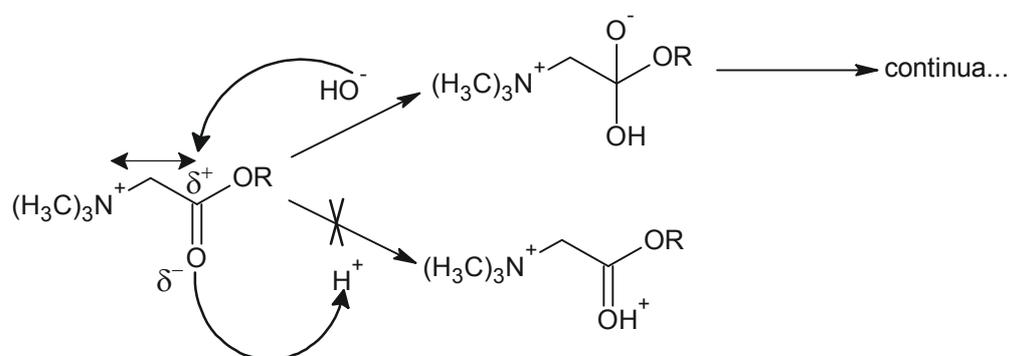


Figura 16: Mecanismo para a hidrólise ácido-base de betaínas esterificadas (STJERNDAHL et al., 2003)

Assim, a inserção dos grupamentos ésteres no L-triptofano, demonstrou que estes podem elevar o nível da atividade inibitória sobre a enzima AChE, resultados que foram observados, principalmente, com os ésteres etílico **3b** e butílico **3d**, pois poderiam ser hidrolisado pela enzima através de mecanismo semelhante que ocorre com a hidrólise da ACh (**Figura 17**) (KRATKY, 2016).

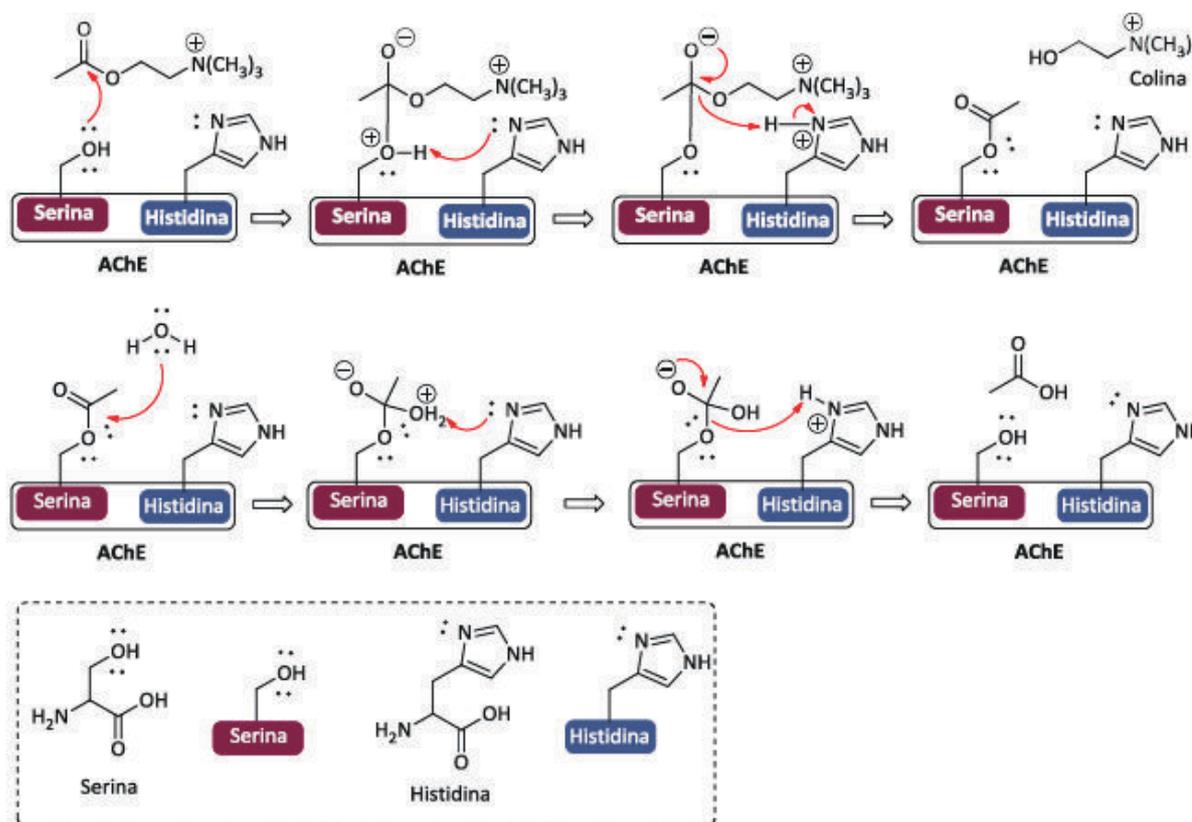
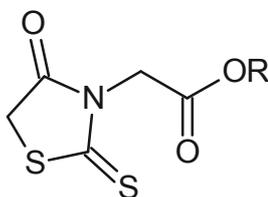


Figura 17: Esquema da hidrólise da ACh no sítio ativo da AChE. Adaptado de Fifer, E. K. (2007).

A hidrólise da ACh no sítio ativo da AChE (**Figura 17**) dependem dos resíduos de serina e histidina, onde um age como catalisador e o outro como nucleófilo. A serina atua como nucleófilo e a histidina tem papel importante na catálise, pois atua como um ácido, doando um próton para a colina da ACh, que é então liberada (FIFER, 2007). E ainda, a atividade dos ésteres **3b** e **3d** pode ter relação, principalmente, com a semelhança do tamanho da cadeia dos álcoois etílico e butílico com os neurotransmissores ACh e BCh (butirilcolina), sugerindo a atuação dos compostos **3b** e **3d** como inibidores que se ligam no mesmo sítio de ligação dos neurotransmissores na AChE e também na BChE (MEHROTRA, 1963). Estudos de *docking molecular* desses ésteres poderão auxiliar no entendimento de sua atuação no sítio ativo dessas enzimas.

Os compostos **3b** e **3d** apresentaram efeito anticolinesterásico, mas os seus IC_{50} (concentração que inibe 50% da atividade enzimática comparada ao controle enzimático) não foram obtidos, pois é necessário que haja um decaimento da atividade para que seja possível obter os resultados. Para obtenção desta concentração, estudos adicionais poderão ser realizados com novas faixas de concentrações. Estes compostos também poderão ser submetidos a ensaios anticolinesterásicos em regiões específicas do encéfalo, como córtex, cerebelo, hipocampo e cópula estriado. Estudos demonstram que a atividade da AChE pode variar em diferentes regiões do cérebro, como no estriado que possui maior atividade, devido a presença de neurônios colinérgicos intrínsecos densos (RANG,1996). Essa variação da atividade da AChE pode ocorrer de acordo com as isoformas apresentada na forma assimétrica de colágeno (An) e globular (Gn), A isoforma assimétrica são colágeno e são solúveis em tampão de alta concentração de sal (SANCHEZ-CHAVEZ 1995). A isoforma globular está presente no cérebro em diferentes subunidades de monômero G1, dímero G2 e tetrâmero G4 (MASSOULINE 1993). Essas alterações podem estar relacionadas a idade do cérebro de ratos machos e fêmeas. (DAS; et al., 2001) ao estresse que o cérebro é submetido (DAS et al., 2000).

Essa inibição pode ocorrer devido a interação dos grupos ésteres com o sítio ativo podendo ser diferente proporcionando a inibição da AChE. Assim como, onde no estudo de Kratky (2016) foi observado uma inibição da enzima sobre a AChE aproximadamente 10 μ M com relação ao composto de partida e a inserção dos grupamentos ésteres com substituintes (**Figura 18**).



R= H; $IC_{50} = 54,08 \pm 1,34 \mu$ M

R= fenil; $IC_{50} = 45,34 \pm 0,62 \mu$ M

R= 4-metil-fenil; $IC_{50} = 44,52 \pm 0,76 \mu$ M

R= NO_2 ; $IC_{50} = 24,05 \pm 0,28 \mu$ M

Figura 18: Compostos com seus substituintes e IC_{50} (KRATKY, 2016).

Além disso, a inserção do grupo nitro (NO₂) no anel aromático de seis membros nas Betaínas esterificados do triptofano pode ser uma alternativa para a potencialização da atividade, visto que, um derivado éster contendo um grupo nitro potencializou a atividade anticolinesterásica (**Figura 18**, R= NO₂, IC₅₀= 24,05±0,28 μM) em relação a seu análogo sem substituintes no anel aromático (**Figura 18**, R= H, IC₅₀= 54,08±1,34 μM). Além dos substituintes já citados grupos como (Cl, CF₃ e OCH₃) também podem auxiliar no incremento da atividade dos compostos anticolinesterásicos (**Figura 18**) (KRATKY et al., 2016).

Outros exemplos de ésteres que foram sintetizados e avaliados para a inibição da AChE foram os derivados do ácido cinâmico, estes apresentaram propriedades biológicas, como: antioxidantes, citoprotetor, proteção da agregação da proteína β-amiloide, inibição da colinesterase (TAKAO et al, 2017) (**Figura 19**). Estas estruturas não demonstraram atividade inibitória da AChE >10 μM, mas apresentaram inibição a atividade da BChE, as abordagens frente a inserção do grupo éster nas moléculas estão em desenvolvimento para potenciais inibidores da DA.

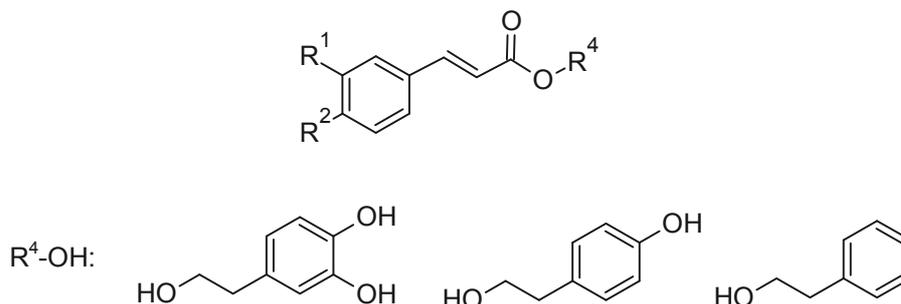


Figura 19: Estruturas dos ésteres derivados do ácido cinâmico (TAKAO et al., 2017).

4. PARTE EXPERIMENTAL

4.1. Material e Métodos

Foram realizadas análises cromatográficas em camada delgada (CCD), utilizando cromatofolhas de alumínio sílica gel 60 F₂₅₄ (Macharey-Nagel) e para revelação nas análises de CCD utilizou-se lâmpada ultravioleta (254nm). As purificações dos produtos foram realizadas em cromatografia em placa preparativa de sílica gel 60 F₂₅₄ (0,063 – 0,2mm). Os espectros de RMN de ¹H e de ¹³C foram realizados em equipamento 300 MHz e 75 MHz, aparelho da marca Bruker® AVANCE DPX-300 do Laboratório de Pesquisa de Ressonância Magnética Nuclear

do Instituto de Química – UFMS. Os deslocamentos químicos (δ) foram registrados em ppm e as constantes de acoplamento em hertz (Hz), o tetrametilsilano (TMS) foi usado como padrão de referência interno para deslocamento químico (δ) em soluções de DMSO- d_6 .

Os espectros de massas de alta resolução foram obtidos em modo de inserção direta, sendo analisado em espectrômetro de massa ESI – qTOF microTOF – Q III (Bruker Daltonics) no Laboratório de Produtos Naturais e Espectrometria de Massas do (FACFAN – UFMS), operado em modo positivo (120 – 1200Da). As análises espectrofotométricas foram utilizados o aparelho Genesys 10S UV-Vis e a leitora de placas SpectraMax® Plus³⁸⁴. O material enzimático foi separado em centrífuga refrigerada Sigma 4k15.

Os solventes utilizados nas reações foram de grau PA e tratados no laboratório quando necessário (PERRIN e ARMAREGO, 1988).

4.2. Sínteses

4.2.1. Procedimento Geral para Esterificação do L-Triptofano

Em um balão de fundo redondo, sob agitação, foram adicionados 1g de L-triptofano, 30 mL do álcool (metílico, etílico, isopropílico, n-butílico, propílico, isoamílico, 2-aminoetílico, benzílico e ciclohexanol) e 0,25 mL de cloreto de tionila (SOCl_2). A mistura reacional foi mantida em refluxo com agitação por no mínimo 12 h, sendo verificada a formação do produto por CCD. Após o término o álcool foi evaporado da reação no rotaevaporador. Em seguida, o resíduo foi lavado com água (H_2O), foi verificado o pH e ajustado para pH 10 com bicarbonato de sódio (NaHCO_3). Em capela, o resíduo foi lavado três vezes com acetato de etila e passado em funil de separação. A fase orgânica foi lavado com solução salina de cloreto de sódio (NaCl) e seco com sulfato de magnésio (Mg_2SO_4). Em seguida, a solução foi filtrada e levada para evaporação do acetato de etila no rotaevaporador. A formação dos ésteres foi confirmada através de análise de RMN ^1H e de ^{13}C e HRMS - ESI.

4.2.2. Procedimento Geral para a N-Metilação dos Ésteres

Em um balão de fundo redondo, sob agitação, foram adicionados 1 mM do

éster (**3a-3f**), 20 mL da solução de metanol/água v/v (1:1), 1 g de bicarbonato de sódio (NaHCO₃) e 1,5mL de iodo metano (CH₃I), por 24 h em temperatura ambiente (t.a.). Após esse período o metanol foi evaporado no rotaevaporador. Em seguida, o resíduo foi lavado duas vezes com clorofórmio e água. A solução novamente foi levada para evaporação da água. O produto obtido foi armazenado num dessecador. As reações foram acompanhadas por CCD (eluente: CHCl₃/CH₃OH 8:2), revelador luz UV 254 nm. A purificação dos produtos obtidos foi realizada em cromatografia de placa preparativa (eluente: CHCl₃/CH₃OH 8:2). A formação dos ésteres metilados foi confirmada através de análises de RMN de ¹H. Apenas o composto **3d** foi identificado por HRMS-ESI.

4.3. Avaliação Biológica

Os ensaios e procedimentos descritos a seguir foram realizados no Laboratório de Bioquímica Geral de Microrganismos do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde (INBIO) da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (UFMS).

4.3.1. Aspectos Éticos

O trabalho foi avaliado e aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFMS registrada com o n° 757/2016. A manipulação e cuidados com os animais foram realizados de acordo com a Lei n° 11.794, de 2008 (BRASIL. LEI N. 11.794 DE 8 DE OUTUBRO DE 2008. REGULAMENTA O INCISO VII DO §1º DO ART. 225 DA CONSTITUIÇÃO FEDERAL, 2008), e com a Diretriz Brasileira de Prática Para o Cuidado e a Utilização de Animais para Fins Científicos e Didáticos (DBPA)(CONCEA. CONSELHO NACIONAL DE CONTROLE DE EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL. MINISTÉRIO DA CIÊNCIA, 2013).

4.3.2. Animais

Os animais utilizados nos experimentos foram ratos Wistar (*Rattus norvegicus*) adultos (150-200 g) provenientes do Biotério da UFMS. Foram necessários 8 animais por composto, totalizando 16 animais para a execução do

projeto.

4.3.3. Ambientação e Condições Experimentais

Os animais foram mantidos no Biotério Central do INBIO/UFMS, em gaiolas coletivas de polipropileno (número máximo de 5 animais por gaiola; dimensões: 41 x 34 x 18 cm). O referido setor dispõe de salas com condições apropriadas para a experimentação com esta linhagem de animais, tais como temperatura controlada de 23 ± 2 °C e ciclo de 12 h claro/escuro (luzes acesas às 06:00 h). Os animais foram mantidos em boas condições de higiene e com acesso livre à água e ração padrão.

4.3.4. Dissecção das Estruturas Encefálicas

Os animais foram anestesiados com isoflurano da cristália e submetidos a toracotomia, 8 mL de sangue total foi coletado por punção do plexo de artérias hepáticas. Após a coleta, foi realizada a cisão da artéria aorta para a certificação da morte do animal.

Os ratos foram decapitados para a extração do encéfalo, este foi cuidadosamente removido e colocado sobre uma placa de Petri coberta com papel filtro umedecido em tampão Tris HCl 10 mM [pH 7,2]. O encéfalo foi lavado com tampão para minimizar a contaminação pela AChE sanguínea.

Em seguida, o encéfalo total foi reservado em tubos de ensaio com tampão Tris HCl 10 mM [pH 7,2] gelado, na proporção (1:10, massa:volume) que foram homogeneizados em Potter de vidro. Após a homogeneização das estruturas foram centrifugadas a 1000g (2500 rpm) por 15 min. O sobrenadante foi separado em microtubos e congelado imediatamente para ser usado no experimento de quantificação e inibição da AChE. Algumas amostras foram congeladas com encéfalo total.

4.3.5. Quantificação e Inibição da Atividade da Enzima Acetilcolinesterase

O sobrenadante do homogenato do encéfalo foi utilizado para o ensaio enzimático da atividade da AChE, determinada espectrofotometricamente através do

método de Ellman (1961) (ELLMAN, G L. COURTNEY, 1961), com modificações recentemente descritas por Dingova (2014) (DINGOVA et al., 2014).

A análise da atividade enzimática foi realizada em placas de 96 poços. Procedeu-se à análise da atividade enzimática, através da execução do seguinte procedimento experimental: misturou-se em cada poço da placa, 150 µl de tampão fosfato de potássio 100 mM (pH= 7,0), 50 µl de água destilada, 30 µL de solução contendo o composto analisado, 20 µl de material enzimático no qual foi deixado pré-incubando por 30 min. Após isso foi adicionado 30 µL de acetiltiocolina 10 mM para dar início à reação, no qual foi deixado incubando por 30 min.

Após esse tempo a reação foi parada pela adição de 20 µL de neostigmina (inibidor da AChEi) 51 mM e para revelação foi adicionado 20 µL de ácido 5,5-ditio-bis-(2-nitrobenzóico) (DTNB) 8,5 mM. Pois a hidrólise do iodeto de acetiltiocolina catalisado pela AChE ocorre a formação do ânion 5-tio-2-nitrobenzoato. Este ânion é formado pela reação do DTNB com as tiocolinas resultantes da hidrólise. As etapas foram realizadas em banho-maria 37 °C.

No final da reação, a concentração deste ânion pode ser determinada a 412 nm, recorrendo a um espectrofotômetro em temperatura ambiente. A atividade da AChE foi expressa em µmol de acetiltiocolina hidrolisada/hora/miligrama de proteína.

Os efeitos nos ésteres e betaínas sobre a atividade da AChE no encéfalo total foi investigado nas concentrações de 0,1, 1,0, 10, 100 e 1000 mM. Em caso do composto testado apresentar atividade anticolinesterásica, o próximo experimento seria a determinação do valor de IC₅₀, que representaria a concentração do composto necessária para inibir 50 % da atividade da AChE em cada região encefálica analisada. No entanto, este experimento ainda não foi realizado.

4.3.6. Quantificação do conteúdo proteico

O conteúdo proteico das amostras foi determinado de acordo com o método descrito por Bradford (1976) (BRADFORD, 1976), utilizando albumina bovina sérica como padrão. O conteúdo proteico de cada estrutura encefálica será mantido em uma faixa, pré-determinada: cerebelo (0,5 a 0,6 mg/mL), hipocampo (0,8 mg/mL), estriado (0,4 mg/mL) e córtex cerebral (0,6 a 0,8 mg/mL).

4.4. Análise e Estatística

Todas as variáveis foram testadas para normalidade de distribuição e homogeneidade das variâncias. Os resultados obtidos através dos ensaios enzimáticos *in vitro* serão analisados através da análise de variância de uma via (*one-way ANOVA*) seguida pelo teste *post hoc* de Dunnett, ou testes não paramétricos equivalentes. Os resultados serão considerados significativos quando $P \leq 0,05$.

5. CONCLUSÕES

Foram obtidos 6 ésteres a partir do L-Triptofano, com rendimentos que variam de 52 a 77%. E somente 3 ésteres *N*-metilados, provenientes dos álcoois isopropílico, *n*-butílico e propílico com rendimentos de 49, 30 e 42% respectivamente foram sintetizados.

O ensaio da atividade enzimática da inibição sobre a AChE foi testado com todos os compostos esterificados **3a – 3f** e *N*-metilados **4c–4e** no encéfalo. Os compostos **3b** e **3d** apresentaram atividade de inibição sobre a AChE em todas as concentrações testadas. O composto **3c** apresentou inibição na maior concentração testada de 1000 µM. Os compostos esterificados **3a – 3f** são conhecidos na literatura, porém, ainda não foram descritas as suas atividades anticolinesterásicas. Já os compostos *N*-metilados **4c-4e** são compostos inéditos, ou seja, os mesmos nunca foram relatados na literatura.

Os resultados dos testes demonstraram que a inserção de grupamentos ésteres (etílico e propílico) promoveram a inibição da atividade da AChE, e novos ensaios deverão ser realizados para o cálculo do IC₅₀. Possíveis inserções de diferentes grupos nos derivados dos ésteres do L-triptofano poderão ser realizadas, observando características bioisotéricas, podendo aumentar a ação inibitória destes ésteres. Logo, os ésteres **3b** e **3d** podem servir de protótipo para o desenvolvimento de potenciais novos fármacos para as avaliações biológicas frente ao tratamento de doenças neurodegenerativas como a DA.

6. PERSPECTIVAS FUTURAS

Mesmo com apresentação da inibição em algumas concentrações o IC_{50} não pode ser realizado, pois é necessário que haja um decaimento com relação as inibições para a obtenção do resultado, neste caso serão necessários novos testes da atividade enzimática, os compostos com inibição na concentração de 0,1 μ M como o **3b** e o **3d** as novas concentrações testadas serão 0,0005 μ M, 0,001 μ M, 0,05 μ M além das já testadas.

Os compostos que sofreram a reação de hidrólise **4a**, **4b** e **4f** serão novamente sintetizados, como os ésteres são mais instáveis nas reações de *N*-metilação em meio básico as próximas reações serão feitas inicialmente a *N*-metilação, seguidas da esterificação e submetidos aos testes biológicos.

Serão realizados estudos de *docking molecular* dos ésteres para verificar a interação com o sítio ativo da enzima.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ARAÚJO, C. R. M.; Santos, V. L. Dos A; Gonsalves, A. A. Acetilcolinesterase – AchE: Uma enzima de interesse farmacológico. **Ver.virtual Quim**, v. 8, n. 6, p.1818-1834, nov, 2016.

BORGES, O. M. R. E Robinson W. M. Genética Humana. São Paulo: Artmed, 2002. Disponível em: <http://www.unicruz.edu.br/seminario/artigos/saude/DOEN%C3%87AS%20NEURODEGENERATIVAS,%20ASPECTOS%20EPIDEMIOL%C3%93GICOS%20E%20GEN%C3%89TICOS.pdf>. Acesso em: 15 jul. 2017.

BURLÁ, C.; Camarano, A. A.; Kanso, S.; Fernandes, D.; Nunes, R. **Ciência & Saúde Coletiva**, n. 18, p. 2949-2956, 2013.

CARVALHO, A. S. R.; DA SILVA, A. V.; ORTENSI, F. M. F.; FONTES, S. V.; OLIVEIRA, A. S. B. Miastenia grave autoimune: aspectos clínicos e experimentais. **Neurociências**, v. 13, n. 3, p.138-144, jul/set, 2005.

CHARY, V. N.; Kumar, C. D.; Vairamani, M.; Prabhakar, S. Characterization of amino acid-derived betaines by electrospray ionization tandem mass spectrometry. **Journal of Mass Spectrometry**, n. 47, p. 79-88, nov, 2011.

COTRAN, Ramzi S.; Abbas, Abul K.; Fausto, Nelson; Robbins, Stanley, L.; Vinay, K.; Robbins e Cotran: **Patologia** - Bases patológicas das doenças. 7. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2005. p. 1592.

DA SILVA, A. P. R.; Noronha, C. P.; Silva, J. L. O.; Ferreira, J. M. O.; Oliveira, J. F. P.; Santos, M. O.; Rebelo, M. S.; Reis, R. S.; Da Silva, S. R. Estimativa 2014: Incidência de Câncer no Brasil / Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva, Coordenação de Prevenção e Vigilância. Rio de Janeiro (RJ): INCA, 2014. p.124.

DAS, A.; Kapoor, K.; Sayeepriyadarshini, A. T.; Dikshit, M.; Palit, G.; Nath, C.; Immobilization stress-induced changes in brain acetylcholinesterase activity and cognitive function in mice. **Pharmacological research: the official journal of the Italian Pharmacological Society**, v. 42, n. 3, p. 213–217, sep, 2000.

DAS, A.; Dikshit, M.; Nath, C. Profile of acetylcholinesterase in brain areas of male and female rats of adult and old age. **Life Sciences**, v. 68, n. 6041, p. 1545–1555, feb, 2001.

DAWBARN, D.; Allen S. J. Neurobiology of Alzheimer's disease. Molecular and cellular neurobiology. **Bios Sientific Publishers**, p.1-309, 1995.

DELFINO, R. T.; Ribeiro, T. S.; Figueroa-Villar, J. D. Organophosphorus compounds as chemical warfare agents: a review. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 20, n. 3, p. 407–428, São Paulo, 2009.

DINGOVA, D.; Leroy, J.; Check, A.; Garaj, V.; Krejci, E.; Hrabovska, A.; . Optimal detection of cholinesterase activity in biological samples: modifications to the

standard Ellman's assay. **Analytical Biochemistry**, v. 462, p.67-75, 2014.

DOHME, A. R. L., Cox, E. H. And Miller, E., **Journal American Chemical Society.**, v. 48, 1688, apud SILVERMAN, R.B. **The Organic Chemistry of Drug Design and Drug Action**, 1ª ed., Academic Press, Inc, Califórnia, v. 17, 1992 .

ELLMAN, G. L.; Courtney, K.D.; Andres, V. Jr.; Featherstone, R. M. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. **Biochemical Pharmacology**, v.7, n.2, p.88-95, 1961.

FIFER, E. K. Em *Foye's Principles of Medicinal Chemistry*, 6. Ed.; Lemke, T. L.; Williams, D. A., eds.; Lippincott Williams & Wilkins, cap. 12, 2007.

FURNISS, B. S., Hannaford, A. J., Smith, P. W. G. And Tatchell, A. R., **Vogel's Textbook of practical organic chemistry**, Longman Group UK Ltd, 5. ed., 1989.

GEORGE-HYSLOP, P. H. S. Alzheimer ' s. **Scientific American**, p. 77–83, 2000.

GOTTWALD, M. D.; Rozanski, R. I. Rivastigmine, a brain-region selective acetylcholinesterase inhibitor for treating Alzheimer's disease: review and current status. **Expert Opinion on Investigational Drugs**, v. 8, n. 10, p. 1673–1682, 1999.

HAMDAN, A. C. Avaliação neuropsicológica na doença de Alzheimer e no comprometimento cognitivo leve. **Psicologia Argumento**, v. 26, n. 54, p. 183-192, 2008.

HIJAZIN, C. A. H.; Simões, A. T.; Silveira, D. R. Hidrólise ácida, alcalina e enzimática. **Revista Atitude**. n.7. jan/jun, 2010. Disponível em: <https://www.tratamentodeagua.com.br/wp-content/uploads/2016/10/Hidr%C3%B3lise-%C3%A1cida-alcalina-e-enzim%C3%A1tica.pdf>.. Acessado em: 31 jan. 2019.

HOLANDA, M. M.A.; Marinho Segundo, L. M. B.; Medeiros, I. A.; da Silva, B. A. Papel dos canais iônicos na Doença de Alzheimer. **Revista neurociências**, v. 17, p. 141-145, abr, 2008.

HOSANGADI, D.B.; Dave, R.H. An efficient general method for esterification of aromatic carboxylic acids. **Tetrahedron Letters**, v. 37, n. 35, p. 6375-6378, 1996.

IBGE. Dados do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, divulgados no Diário Oficial União-Seção 1, Nº 232, p. 88, segunda-feira, 1 de dezembro de 2014. Disponível em: <http://pesquisa.in.gov.br/imprensa/jsp/visualiza/index.jsp?jornal=1&pagina=88&data=01/12/2014>. Acesso em: 03 jun. 2015.

Instituto Virtual de Doenças Neurodegenerativas do Rio de Janeiro,2012. Disponível em: < http://www.ivdn.ufrj.br/kb_ivdn_v01_00_index.htm>. Acesso em: 28 dez.2015.

JAQUES, J.A.S.; Rezer, J. F. P.; Carvalho, F. B.; Rosa, M. M.; Gutierrez, J. M.; Gonçalves, J. F.; Schmatz, R.; Bairros, A. V.; Mazzanti, C. M.; Rubin, M. A.; Schetinger, M. R. C.; Leal, D. B. R. **Physiology & Behavior**. v. 106, p. 664-669,

2012.

JUNIOR, C. V.; Bolzani, V. da S.; Furlan, M.; Fraga, C. A. M.; Barreiro, E. J. Produtos Naturais como Candidatos a Fármacos Úteis no tratamento do mal de Alzheimer. **Química Nova**, v. 27, n. 4, p.655 – 660, 2004.

KIA, Y.; Osman, H.; Kumar, R. S.; Murugaiyah, V.; Basiri, A.; Perumal, S.;Wahab, H. A.; Bing, C. S. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 2013, 21, 1696-1707.

KING, M.W. Neurotransmissores: Diversidade e Funções. Unicamp, 2000. Disponível em:

http://www.cerebromente.org.br/n12/fundamentos/neurotransmissores/nerves_p.html
. Acesso em: 03 jun. 2018.

KRATKY, M; Štěpánková, S.; Vorčáková, K.; Vinšová, J. Synthesis and *in vitro* evaluation of novel rhodanine derivatives as potential cholinesterase inhibitors. **Bioorganic Chemistry**, v. 68, p. 23-29, 2016.

KRSTI, D. Z.; Colovic, M. B.; Lazarevic-Pasti, T. D.; Bondzic, A. M.; Vasic, V. M. Acetylcholinesterase Inhibitors: Pharmacology and Toxicology. **Current Neuropharmacology**, v.11, n.3, p.315-335, 2013.

KUMAR, A.; Singh, A.; Ekaval, I. A review on Alzheimer's disease pathophysiology and its management: An update. **Pharmacological Reports**, v. 67, n. 2, p. 195–203, 2015.

Lehninger, A.L.; Nelson, D.L.; Cox, M.M. **Princípios de Bioquímica**. 2. ed. São Paulo: Sarvier, 2000, p. 839.

KOMLOOVA, M.; Musilek, K.; Dolezal, M.; Gunn-Moore, F.; Kuca, K. Structure-Activity Relationship of Quaternary Acetylcholinesterase Inhibitors – Outlook for Early Myasthenia Gravis Treatment Journal Name: **Current Medicinal Chemistry**, v. 17, 2010.

MASSOULIÉ, J.; Pezzementi, L.; Bom, S.; Krejci, E.; Legay, C.; Morel, N. Molecular and cellular biology of cholinesterases. **Progress in Neurobiology**, v. 41, p. 31 – 91, 1993.

MASSOULIÈ, J.; Anselmet, A.; Bon, S.; Krejci, E.; Legay, C.; Morel, N.; Simon, S. The polymorphism of acetylcholinesterase : post-translational processing , quaternary associations and localization. **Progress in Neurobiology**, v. 120, n, 14, p. 29–42, may, 1999.

MASSOULIÉ, J. The Origin of the Molecular Diversity and Functional Anchoring of Cholinesterases. **Neurosignals**, v. 11, p. 130 – 143, 2002.

MATTSON, M. P. Pathways towards and away from Alzheimer's disease. **Nature Publishing Group**, v. 430, p. 631 – 640, 2004.

MEHROTRA, K. N.; Dauterman, W. C. **Journal of Neurochemistry**, v. 10, p. 119-

123, 1963.

MULLER, F.; Dumez, Y.; Massoulie, J. Molecular forms and solubility of acetylcholinesterase during the embryonic development of rat and human brain. **Brain Research**, v. 331, n. 0006–8993 (Print), p. 295–302, 1985.

NAIR, V. P.; Hunter, J. M.; Chb, M. B. Anticholinesterases and anticholinergic drugs. **Continuing Education in Anaesthesia, Critical Care & Pain**, v. 4, n. 5, p. 164–168, 2004.

OZAWA, M.; Honda, K.; Nakai, I.; Kishida, A.; Ohsaki, A. Hypaphorine, an indole alkaloid from *Erythrina velutina*, induced sleep on normal mice. **Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters**, v. 18, n. 14, p. 3992–3994, 2008.

PERRIN, D. D.; Armarego, W. L. F. Purification of Laboratory Chemicals. 3.ed. New York, **Pergamon Press**, 1988. p. 207.

PETRONILHO, E.C.; Pinto, A. C.; Villar, J. D. F. Acetilcolinesterase: Alzheimer e guerra química. **Revista militar de Ciência e Tecnologia**, v. 28, p. 3-14, 2011.

RAKONCZAY, Z. Potencies and selectivities of inhibitors of acetylcholinesterase and its molecular forms in normal and alzheimer' s disease brain*. **Acta Biologica Hungarica**, v. 54, n. 2, p. 183–189, 2003.

STJERND AHL, M.; Lundberg, D.; Holmberg, K. Cap. 10. Cleavable Surfactants. Em: Novel Surfactants: Preparation Applications And Biodegradability, Second Edition, Revised And Expanded, Editor: Holmberg, K. 2nd Edition, Editora: CRC Press, v. 114, p. 317-328, 2003.

SERENIKI, A.; Vital, M. A. B. F. Alzheimer's disease: **patophysiological and pharmacological features**. Revista de Psiquiatria, RS. 2008; v.30, n.1, Supl, 2008.

SILVA, R. R.; Tozzi, A. M. G. D. A. *Papilionoideae* (Leguminosae) do Planalto Residual do Urucum, oeste do Pantanal do Mato Grosso do Sul, Brasil. **Hoehnea**, v. 39, n. 1, p. 39–83, 2012.

SILVA, T.; Reis, J.; Teixeira, J.; Borges, F. Alzheimer's disease, enzyme targets and drug discovery struggles: From natural products to drug prototypes. *Ageing Research Reviews*, v. 15, p. 116145, 2014.

SONG, H.; Liu, Y.; Liu, Y.; Huang, Y.; Li, Y.; Wang, Q. Design, synthesis, anti-TMV, fungicidal, and insecticidal activity evaluation of 1,2,3,4-tetrahydro- β -carbonile-3-carboxylic acid derivatives based on virus inhibitors of plant sources. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 24, p. 5228-5233, 2014.

SOREQ, H.; Seidman, S. Acetylcholinesterase — new roles for an old actor. v. 2, n. April, p. 294–302, 2001.

TAKAO, K.; Toda, K.; Saito, T.; Sugita, Y. Synthesis of Amide and Ester Derivatives of Cinnamic Acid and Its Analogs: Evaluation of Their Free Radical Scavenging and

Monoamine Oxidase and Cholinesterase Inhibitory Activities. **Chem. Pharm. Bull.** v.65, n.11, p.1020-1027, 2017.

TAYEB, H. O.; Yang, H. D.; Price, B. H.; Tarazi, F. I. *Pharmacology & Therapeutics*. v. 134, p. 8-25, 2012.

TAYLOR, P. The Cholinesterases. **Annual reviews Pharmacology Toxicology**, v. 266, n. 7, p. 4025–4028, 1994.

VENTURA, A. L. M.; Abreu, P. A.; Freitas, R. C. C.; Sathler, P. C.; Loureiro, N. Sistema colinérgico: revisitando receptores, regulação e a relação com a doença de Alzheimer, esquizofrenia, epilepsia e tabagismo. **Revista de Psiquiatria Clínica**, v. 37, n. 2, p. 66-72, 2010.

YONEKAWA, M. K. A., **Síntese da L-Hipaforina e D-Hipaforina e Avaliação da Atividade Inibitória sobre a Acetilcolinesterase**. 2018, 67 f. Dissertação (Mestrado em Química) – INQUI, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (UFMS), Campo Grande, MS. 2018.