



---

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

Faculdade de Ciências Médicas

SÍNTESES DE COMPOSTOS COM POTENCIAL  
ATIVIDADE ANTICOLINESTERÁSICA

Glaucia Melina Squizato Pinheiro

Campinas, 2011



---

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

Faculdade de Ciências Médicas

# SÍNTESES DE COMPOSTOS COM POTENCIAL ATIVIDADE ANTICOLINESTERÁSICA

Glauca Melina Squizato Pinheiro

Tese de Mestrado apresentada à  
Pós-Graduação da Faculdade de  
Ciências Médicas da  
Universidade de Campinas –  
UNICAMP para obtenção de título  
de Mestre em Ciências Médicas,  
área de concentração em  
Ciências Biomédicas. Sob orientação  
da Profa. Dra. Nelci Fenalti Höehr.

Campinas, 2011.

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA POR  
ROSANA EVANGELISTA PODEROSO – CRB8/6652  
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS UNICAMP**

P655s Pinheiro, Glaucia Melina Squizato, 1985 -  
Sínteses de compostos com potencial atividade  
anticolinesterásica. / Glaucia Melina Squizato Pinheiro. --  
Campinas, SP : [s.n.], 2011.

Orientador : Nelci Fenalti Höehr  
Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual de  
Campinas, Faculdade de Ciências Médicas.

1. Síntese. 2. Carbamatos. 3. Ressonância  
magnética nuclear. 4. Inibidores da colinesterase. I.  
Höer, Nelci Fenalti. II. Universidade Estadual de  
Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

**Título em inglês:** Synthesis of compounds with potential anticholinesterase activity

**Palavra-chave em inglês:**

Synthesis

Carbamates

Nuclear magnetic resonance

Cholinesterase inhibitors

**Área de concentração:** Ciências Biomédicas

**Titulação:** Mestre em Ciências Médicas

**Banca examinadora:**

Nelci Fenalti Höer [Orientador]

Maria Ester Pereira

Patricia Moriel

**Data da defesa:** 01-07-2011

**Programa de Pós-Graduação:** Faculdade de Ciências Médicas

---

**Banca examinadora da Dissertação de Mestrado**  
**Glauca Melina Squizzato Pinheiro**

---

---

Orientadora: Profa. Dra. Nelci Fenalti Hoehr  
Co-Orientador: Prof. Dr. Roberto Rittner Neto

---

---

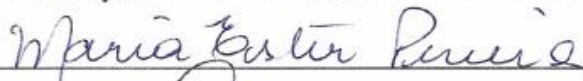
**Membros:**

---

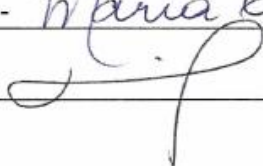
1. Profa. Dra. Nelci Fenalti Hoehr -



2. Profa. Dra. Maria Ester Pereira -



3. Profa. Dra. Patrícia Moriel -



Curso de pós-graduação em Ciências Médicas da Faculdade de Ciências Médicas da  
Universidade Estadual de Campinas.

---

**Data: 01/07/2011**

---



“Os problemas significativos que enfrentamos não podem ser resolvidos no mesmo nível de pensamento em que estávamos quando os criamos.”

Albert Einstein



Agradeço especialmente ao Prof. Dr. Roberto Rittner por ter me convidado a vir para UNICAMP, por ter cedido espaço em seu laboratório e todos os materiais necessários para o desenvolvimento desse projeto, e por sempre me orientar com dedicação e carinho.





## Dedicatória

A minha mãe, meu pai, meus irmãos, Glauco e Clara, e ao Francisco, por sempre me apoiarem e me incentivarem a realizar meus sonhos.

Ao Lucas por estar sempre ao meu lado, por me compreender, me apoiar, pela companhia, paciência e amor.

Ao Cláudio, a Cintia e Thaís, por serem mais que amigos, serem minha família, sempre atenciosas e compreensivos.



## **Agradecimentos**

À Deus por toda força e fé ao longo dessa caminhada.

A toda a minha família por sempre me apoiar e compreender meus sonhos.

À Profa. Dra. Nelci Fenalti Höehr pela orientação e pela amizade surgida nesse período.

Aos Profs. Drs. Roberto Rittner e Cláudio Francisco Tormena, pela orientação, por permitirem que eu desenvolvesse meu projeto no LFQO e pela amizade.

A todos os amigos do LFQO – Denize, Thaís, Lucas, Chicão, Caio, Michele, Rodrigo, Thetha, Karen e Cleverson, pelos conhecimentos compartilhados, pelas boas horas de descontração, por todas as piadas, por agüentarem minhas lágrimas, enfim, por serem verdadeiros amigos.

Ao Lucas, que mais que um namorado sempre foi um grande amigo.

Ao Prof. Dr. Ernani Abicht Basso, pelos três anos de orientação durante a iniciação científica, por ter me ensinado a progredir sozinha, pela amizade e ensinamento.

A todos do grupo LLO, especialmente a Aline, André e ao Thiago pelo ensinamento e pela sincera amizade.

As amigas, Rebeca, Tati, Malu, Poly, Natália, Juliana, Sabrina que mesmo longe se fizeram presentes.

Aos farmacêuticos do CCI-UNICAMP, Paula, Rafael e Sueli, por me ensinarem a realizar os testes biológicos e pela amizade.

Ao pessoal do Laboratório de RMN, Anderson, Paula e Sônia.

Ao pessoal da secretaria do DPC, Regina, Ana Paula e Marcinha por sempre me auxiliarem com as documentações.

A todos que de forma direta ou indireta contribuíram para a realização deste trabalho.

A FAPESP pelo apoio financeiro para a compra de materiais permanentes e de consumo, em especial ao aparelho de RMN de 600 MHz.

Ao CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico), pelo apoio financeiro e pela bolsa concedida.



# Índice

1. INTRODUÇÃO .....	30
1.1. Colinesterases .....	31
1.2. Anticolinesterásicos .....	34
1.3. Receptores da Acetilcolina .....	37
1.4. Fármacos .....	38
1.4.1. Piridostigmina .....	38
1.5. Cálculos Teóricos .....	39
1.6. Ressonância Magnética Nuclear (RMN) .....	41
1.6.1. RMN em Duas Dimensões (RMN 2D) .....	42
1.7. Método de Ellman .....	43
2. OBJETIVOS .....	46
OBJETIVO GERAL .....	46
OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	46
3. MATERIAIS E MÉTODOS .....	48
3.1. Sínteses .....	48
3.1.1. Sínteses dos intermediários comuns as duas rotas .....	49
3.1.2. Sínteses dos derivados da piridostigminas – rota A .....	52
3.1.3. Sínteses dos derivados do Edrofônio – rota B .....	54
3.2. Instrumentação .....	55
3.2.1. Instrumentação geral .....	55
3.2.2. Espectrometria de IV .....	55
3.2.3. Ressonância Magnética Nuclear .....	55
3.2.4. Método de Ellman modificado <sup>59</sup> .....	56
3.2.5. Procedimento do Método de Ellman modificado .....	56
4. Aspectos Computacionais .....	62
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	64
5.1. Sínteses dos intermediários comuns as duas rotas .....	64
5.1.1. Sínteses dos derivados da piridostigminas – rota A .....	69
5.1.2. Sínteses dos derivados do Edrofônio – rota B .....	72
5.2. Cálculos Teóricos .....	74
5.3. Método de Ellman .....	80
6. Conclusões .....	86
7. Referências Bibliográficas .....	90



## Índice de Figuras

Figura 1. Ciclo Metabólico da acetilcolina. (modificado de Remião, 2010) <sup>11</sup> .....	32
Figura 2. Hidrólise da acetilcolina. <sup>10</sup> .....	33
Figura 3. Derivados do Precursor da Neostigmina. ....	36
Figura 4. Estrutura química da piridostigmina. ....	38
Figura 5. Estrutura química do edrofônio.....	39
Figura 6. Curva de energia potencial em nível teórico HF/6-31G para o composto VIIA.....	75
Figura 7. Visualização das conformações mais estáveis para o derivado sem substituinte.....	76
Figura 8. Interação da acetilcolina com a enzima colinesterase .....	78





## Índice de Esquemas

Esquema 1. Agentes anticolinesterásicos "reversíveis" empregados clinicamente. <sup>14</sup> .....	34
Esquema 2. Geometria de alguns agentes colinomiméticos. <sup>28</sup> .....	37
Esquema 3. Síntese dos derivados da piridostigmina e do edrofônio. ....	49
Esquema 4. Mecanismo de reação para obtenção dos Brometos de <i>N</i> -acetonil- <i>N,N</i> -dimetil- <i>N</i> -fenacilamônio <i>p</i> -substituídos III. ....	50
Esquema 5. Obtenção dos brometos 2,6-tetraidro- <i>N,N</i> -dimetil-3-oxo-5-fenilpiridínio <i>p</i> -substituídos IV. ....	51



## Índice de Tabelas

Tabela 1. Diluição da curva de calibração.....	57
Tabela 2. Rendimentos experimentais, propriedades físicas e análise elementar para os brometos de <i>N</i> -acetoni- <i>N,N</i> -dimetil- <i>N</i> -fenacilamônio <i>p</i> -substituídos III.....	64
Tabela 3. Dados de IV e RMN de <sup>1</sup> H para os brometos de <i>N</i> -acetoni- <i>N,N</i> -dimetil- <i>N</i> -fenacilamônio <i>p</i> -substituídos III.....	65
Tabela 4. Dados de RMN de <sup>13</sup> C para os brometos de <i>N</i> -acetoni- <i>N,N</i> -dimetil- <i>N</i> -fenacilamônio <i>p</i> -substituídos III.....	65
Tabela 5. Rendimentos experimentais propriedades físicas e análise elementar para os brometos de 2,6-tetraidro- <i>N,N</i> -dimetil-3-oxo-5-fenilpiridínio <i>p</i> -substituídos IV. ....	66
Tabela 6. Dados espectroscópicos no infravermelho para os brometos de 2,6-tetraidro- <i>N,N</i> -dimetil-3-oxo-5-fenilpiridínio <i>p</i> -substituídos IV.....	67
Tabela 7. Deslocamentos químicos de RMN de <sup>1</sup> H e <sup>13</sup> C, multiplicidades $\delta$ (ppm), correlações <sup>1</sup> H- <sup>1</sup> H e <sup>1</sup> H- <sup>13</sup> C em g-HMBC e g-HSQC para os compostos IV em D <sub>2</sub> O.....	67
Tabela 8. Dados espectroscópicos para os brometos de 3-hidróxi-1-metil-5-fenilpiridínio <i>p</i> -substituídos VA. ....	70
Tabela 9. Dados espectroscópicos para brometo 1-metil-3-óxido-5-fenilpiridínio <i>p</i> -substituídos VIA.....	71
<b>Tabela 10.</b> Dados espectroscópicos para o brometo de <i>N,N</i> -dimetilcarbamato de <i>N</i> '-metilpiridínio <b>VIIA</b> . ....	72
Tabela 11. Rendimentos experimentais propriedades físicas e análise elementar para os brometos de 2,6-tetraidro- <i>N,N</i> -dimetil-3-hidroxi-5-fenilpiridínio VB.....	73
Tabela 12. Deslocamentos químicos de RMN de <sup>1</sup> H e <sup>13</sup> C, correlações <sup>1</sup> H- <sup>13</sup> C em g-HSQC para o brometo de 2,6-tetraidro- <i>N,N</i> -dimetil-3-hidroxi-5-fenilpiridínio VB em D <sub>2</sub> O.....	74
Tabela 13. Energia de otimização para os confôrmeros A, B e C para os brometos de <i>N,N</i> -dimetilcarbamato de <i>N</i> '-metilpiridínio <i>p</i> -substituídos VIIA em nível de teoria B3LYP/cc-pVDZ.....	76

Tabela 14. Distância entre os átomos N---O ( $r_{N...O}$ ) nos confôrmeros A, B e C para os brometos de *N,N*-dimetilcarbamato de *N*<sup>2</sup>-metilpiridínio *p*-substituído VIIA.....78

Tabela 15. Valores de referência da atividade anticolinesterásica em doadores saudáveis.....80

## Índice de Gráficos

Gráfico 1. Curva de Calibração. ....	57
Gráfico 2. Atividade colinesterásica total, plasmática e eritrocitária do edrofônio em diversas concentrações. ....	81
Gráfico 3. Atividade colinesterásica total do edrofônio e do composto VB em diversas concentrações.....	82
Gráfico 4. Atividade colinesterásica plasmática do edrofônio e do composto VB em diversas concentrações.....	83
Gráfico 5. Atividade colinesterásica eritrocitária do edrofônio e do composto VB em diversas concentrações. ....	84



## **Lista de Abreviaturas**

A – acetato

Acetil-CoA – acetil coenzima-A

ACh – acetilcolina

Ch - colina

ChE – colinesterase

CoA – coenzima-A

COSY – correlation spectroscopy

HMBC – Heteronuclear Multiple Bond Correlation

HSQC - Heteronuclear Single Quantum Coherence

I – spin

IV – infravermelho

J – constante de acoplamento

Me – metila

mL – mililitro

mmol – milimol

MHz – megahertz

MPE – mapa de potencial eletrostático

NBO – orbitais naturais de ligação

ppm – parte por milhão

RMN – ressonância magnética nuclear

RMN 1D – ressonância magnética nuclear – uma dimensão

RMN 2D - ressonância magnética nuclear – duas dimensões

rpm – rotações por minutos

RY – orbitais de Rydberg

Scan – superfície de energia potencial

Sn2 – substituição nucleofílica bimolecular

TFD – teoria do funcional de densidade

UI – unidades internacionais





## RESUMO

Este trabalho descreve um estudo teórico-experimental envolvendo derivados da Piridostigmina e do Edrofônio, que possuem ação como inibidores da enzima acetilcolinesterase. Os anticolinesterásicos são utilizados como medicamento para o tratamento do Mal de Alzheimer.

Primeiramente foram sintetizados os derivados da Piridostigmina (brometo de *N,N*-dimetilcarbamato de *N'*-metilpiridínio), com substituintes no carbono 5 do anel piridínico: fenila, *p*-metoxifenila, *p*-nitrofenila, *p*-clorofenila, e um derivado do Edrofônio (brometo de 2,6-tetraidro-*N,N*-dimetil-3-hidroxi-5-fenilpiridínio).

O procedimento proposto envolveu como intermediários os 2,6-tetraidro-*N,N*-dimetil-3-oxo-5-fenilpiridínio *p*-substituídos, com estrutura de sal interno (cargas negativa e positiva no oxigênio e nitrogênio, respectivamente).

Todos os compostos tiveram suas propriedades físico-químicas (ponto de fusão, análise elementar) e espectroscópicas (RMN e IV) analisadas, tanto para os sais cíclicos intermediários como para os produtos finais. Através de cálculos teóricos analisamos as geometrias moleculares e densidades de carga dos compostos finais.

Investigamos também as propriedades biológicas referentes à atividade anticolinesterásica do derivado do Edrofônio determinada através do Método de Ellman modificado. Neste teste observamos que este composto possui uma atividade anticolinesterásica superior ao fármaco comercial, sendo que, o fármaco comercial inibiu 62,9% a atividade enzimática total, contra 100% de inibição do composto, ambos na concentração de 0,1 mol / L.



## ABSTRACT

This project describes a theoretical and experimental study involving pyridostigmine and edrophonium derivatives, which can be used as inhibitors of the acetylcholinesterase enzyme. The anticholinesterase agents are used as medicine for the treatment of Alzheimer's disease.

Firstly pyridostigmine (*N,N*-dimethylcarbamate *N'*-methyl-5-phenyl-pyridinium bromides) derivatives (phenyl, *p*-nitrophenyl, *p*-chlorophenyl, *p*-methoxyphenyl) and 2,6-tetrahydro-*N,N*-dimethyl-3-hydroxy-5-phenylpyridine bromide (edrophonium derivative) were prepared.

All compounds were characterized from their physicochemical (melting point, elemental analysis) and a spectroscopic property (NMR and IR) for both cyclic salts intermediates and the final products. Through theoretical calculations it has been assessed molecular geometries and charge densities of the final compounds.

It has also been investigated the biological properties related to the activity of anticholinesterase edrophonium derivative, which was accessed from modified Ellman method. It has been found that edrophonium derivative present anticholinesterase activity much higher than the commercially available drug. From our results, while commercial drug inhibit 62.9% of the total enzyme activity, edrophonium derivative inhibit 100%, both at the same concentration ( $0.1 \text{ mol L}^{-1}$ ).



# INTRODUÇÃO

## 1. INTRODUÇÃO

Nos países em desenvolvimento, nos últimos anos, aumentou o interesse na produção e industrialização de medicamentos e na assistência farmacêutica de modo governamental e na sociedade. Algumas razões podem justificar o incremento dessa visibilidade, o desenvolvimento tecnológico é uma delas.<sup>1</sup>

Nas últimas décadas, tem-se ampliado a abrangência do medicamento, de modo que, hoje, existem produtos para quase todas as doenças. Além disso, os medicamentos são cada vez mais seguros e eficazes contribuindo para aumentar a expectativa e qualidade de vida. Por isso, são apontados como um importante indicador de qualidade dos serviços de saúde.

O setor farmacêutico brasileiro tem passado por importantes transformações, nos últimos quarenta anos, foram criados a Central de Medicamentos (CEME), a regulamentação do Sistema Único de Saúde (SUS), a aprovação da Política Nacional de Medicamentos (PNM), a criação da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), a Lei dos Genéricos e, mais recentemente, a realização da Conferência Nacional de Medicamentos e Assistência Farmacêutica, a criação do Departamento de Assistência Farmacêutica e Insumos Estratégicos (DAF), e a aprovação da Política Nacional de Assistência Farmacêutica.<sup>2</sup>

O setor produtivo brasileiro que envolve a indústria de produtos farmacêuticos, medicinais e veterinários movimenta anualmente recursos da ordem de US\$ 10 bilhões, sendo hoje a 4<sup>a</sup> indústria farmacêutica mundial em volume de produção, atrás dos Estados Unidos, França e Itália.<sup>3</sup>

Entretanto, o consumo *per capita* é um dos mais baixos do mundo (US\$ 17/ano), e mesmo do ponto de vista absoluto é muito baixo quando comparado ao Japão ou mesmo à Coreia do Sul. Esse baixo consumo está intimamente ligado aos preços elevados, de um mercado nas mãos de grupos estrangeiros, que controlam inclusive as matérias primas e os intermediários sintéticos.<sup>4</sup>

Economistas brasileiros calculam que o gasto *per capita* do brasileiro com remédios em 2011 será de R\$ 337.<sup>5</sup> Lembrando que 70% das famílias brasileiras vivem apenas com um salário mínimo.<sup>6</sup>

A reversão deste quadro só será possível com a formação de recursos humanos e desenvolvimento de processos por grupos nacionais, através de uma forte intervenção do Estado, com linhas de atuação nos diversos segmentos envolvidos. Cabe lembrar que “fármacos não são descobertos por organizações, mas por pessoas altamente capazes, com forte motivação, usualmente trabalhando em pequenas equipes interdisciplinares”.<sup>4</sup> Exemplo clássico é a descoberta do captopril, hipotensor isolado do veneno da jararaca (Sérgio Ferreira, Ribeirão Preto), hoje patenteadado e produzido pela Squibb.

A organização internacional humanitária *Médicos Sem Fronteiras*, entre outras, vem apontando a necessidade de institucionalizar mecanismos que levem os produtores a desenvolver pesquisas para o desenvolvimento de novos medicamentos. Para isso, é imprescindível a intervenção do Estado no fomento e na gestão de novos medicamentos eficazes e seguros para doenças que atingem ou ameaçam milhões de pessoas.<sup>5</sup>

A crescente demanda de novos fármacos, tanto do ponto de vista terapêutico quanto ao seu aspecto sócio-econômico<sup>7</sup> e no caso do Brasil, de desenvolvimento e liberação dos grupos multinacionais, vem demonstrando a enorme importância do engajamento de equipes de Institutos de Pesquisa e de Universidades nessa área, ainda incipiente no país.

## **1.1. Colinesterases**

Existem dois tipos de colinesterases: acetilcolinesterase ou colinesterase verdadeira, existente nas hemácias, no tecido nervoso e nos músculos estriados, sendo esta a de maior importância na hidrólise da acetilcolina; e a pseudocolinesterase ou butirilcolinesterase, presente em quase todos os tecidos, principalmente no fígado, no plasma, pâncreas e no intestino delgado e em menor concentração no sistema nervoso central e periférico.<sup>8</sup>

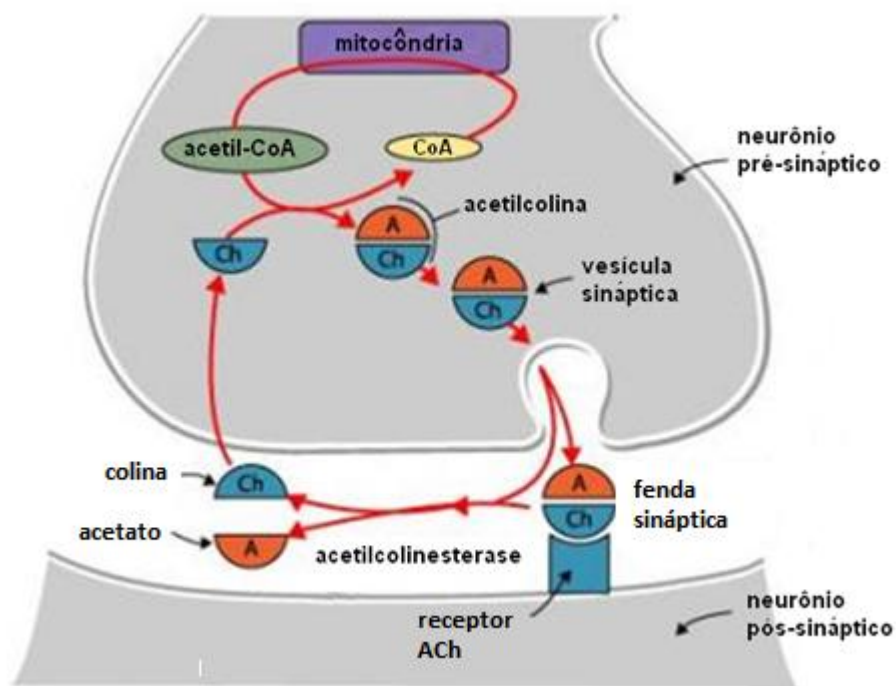


A butirilcolinesterase (BuChE) é inibida antes da acetilcolinesterase, sendo, portanto, indicador biológico da exposição a inseticidas organofosforados.<sup>9</sup> A BuChE é uma glicoproteína tetramérica de subunidades idênticas tem identidade de seqüência com 53% de acetilcolinesterase.<sup>9</sup>

A BuChE é de grande importância farmacológica e toxicológica, hidrolisa ésteres, que contêm compostos, como a cocaína e succinilcolina.<sup>9</sup>

A acetilcolinesterase (AChE) é a enzima responsável pela hidrólise da acetilcolina. Esta se encontra presente nas sinapses (terminações nervosas), servindo como mediadora química da transmissão de impulsos nervosos através de fibras pré-ganglionares parassimpáticas e pós-ganglionares simpáticas.<sup>8</sup>

A colinesterase sanguínea hidrolisa a acetilcolina quase instantaneamente, inativando-a, à medida que ela vai sendo sintetizada. Essa reação química (Figura 1) dá origem à colina e ao ácido acético, ambos inofensivos para organismo em baixas concentrações.<sup>10</sup>

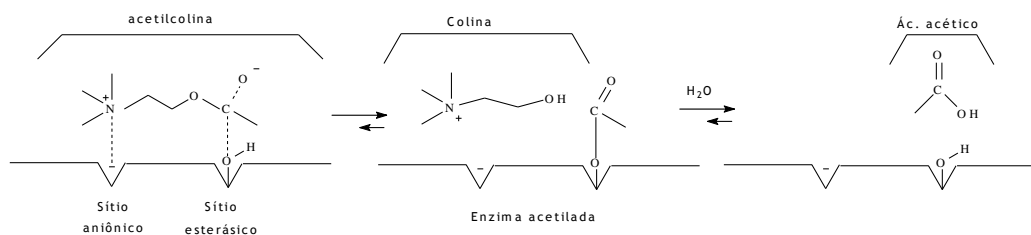


**Figura 1.** Ciclo Metabólico da acetilcolina. (modificado de Remião, 2010)<sup>11</sup>

A = acetato, Ch = colina, CoA = coenzima-A, ACh = acetilcolina.

De acordo com estudos realizados<sup>12</sup> sobre o mecanismo de ação da enzima (acetilcolinesterase) e da acetilcolina, concluiu-se que existem duas regiões ativas na superfície da enzima; um centro esterásico contendo um grupo hidroxila do aminoácido serina, um grupo hidroxila da tirosina e um grupo básico (nitrogênio imidazólico do aminoácido histidina) e um centro aniônico contendo, provavelmente, a carboxila dos ácidos glutâmicos ou aspárticos.

Quando a acetilcolina sofre hidrólise (Figura 2) o centro aniônico da acetilcolinesterase atrai o nitrogênio quaternário positivo da molécula de acetilcolina, fixando o substrato para que o centro esterásico possa exercer sua ação hidrolítica. Ocorre então a interação enzima-substrato por meio de forças eletrostáticas, interações dipolo-dipolo, hidrofóbicas, hidrogênio e forças de Van der Waals.<sup>12</sup> Posteriormente, ocorre a liberação da colina, seguida da inclusão de uma molécula de água no complexo, liberando o ácido acético e a enzima regenerada, em altíssima velocidade.<sup>13</sup>



**Figura 2.** Hidrólise da acetilcolina.<sup>10</sup>

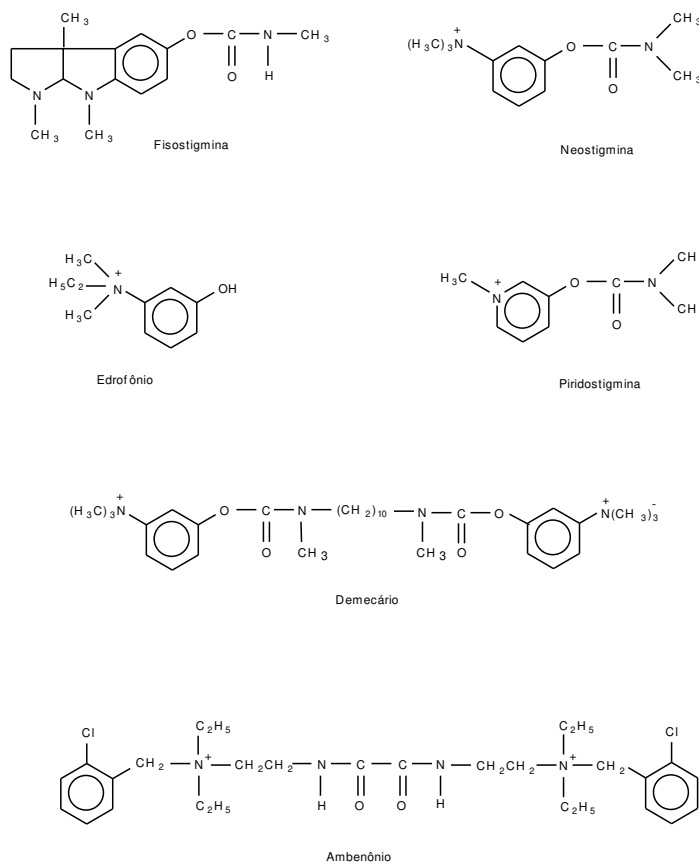
Certas substâncias têm a propriedade de inibir estas enzimas como os carbamatos, organofosforados, entre outros, que tanto inibem a colinesterase plasmática como a eritrocitária.<sup>9</sup>

Fármacos como a fisostigmina e neostigmina são inibidores potenciais da acetilcolinesterase, estes compostos possuem uma ligação carbamil-éster que facilmente sofrem hidrólises, porém num processo mais lento que no caso da acetilcolina.<sup>14</sup>

## 1.2. Anticolinesterásicos

Os anticolinesterásicos constituem um grupo importante de fármacos (Esquema I), tendo larga utilização em hospitais. O seu uso iniciou-se em 1887 no tratamento de glaucoma por Laqueur, que utilizou a fisostigmina, isolada do feijão calabar (*Physostigma venenosum* Balfour), e durante mais de cem anos teve aplicação restrita aos casos de glaucoma, de *myasthenia gravis* e de doenças do trato gastrointestinal.<sup>14</sup>

Tendo-se em vista a ampla distribuição dos neurônios colinérgicos, não é surpreendente que os agentes anticolinesterásicos tenham extensa aplicação como agentes tóxicos na forma de inseticidas agrícolas e armas químicas como “gases dos nervos”.<sup>15</sup>



**Esquema 1.** Agentes anticolinesterásicos "reversíveis" empregados clinicamente.<sup>14</sup>

Os carbamatos (Fisostigmina, Neostigmina, Piridostigmina) são utilizados no controle e combate a pragas, como: acaricidas, nematicidas e fungicidas. São ainda utilizados no controle de parasitas em fruticultura, horticultura, em grãos armazenados e na saúde pública. A exposição a estes compostos é um problema que pode atingir boa parte da sociedade, desde grupos mais expostos (operários, formuladores, aplicadores), até a população em geral, pelo uso doméstico destes produtos, pelo uso inadequado ou pelo consumo de alimentos contaminados.<sup>15</sup>

Estes compostos podem entrar no organismo através de inalação, ingestão e absorção percutânea. As vias respiratórias e cutâneas são as principais nas exposições industriais, na fabricação, durante a sua formulação, aplicação agrícola ou no controle de vetores.<sup>15</sup>

Há diferenças nas taxas de absorção entre os vários tipos de compostos, mas todos podem levar a quadros de intoxicação. Após absorvidos, os carbamatos são rapidamente distribuídos por todos os tecidos. As máximas concentrações são encontradas no fígado e rins. Os compostos mais lipofílicos podem alcançar concentrações significativas no tecido nervoso.<sup>16</sup> O uso abusivo de agrotóxicos deu origem à criação de centros de controle de intoxicações, que utilizam rotineiramente salicilato de eserina na dosagem da atividade da acetilcolinesterase.

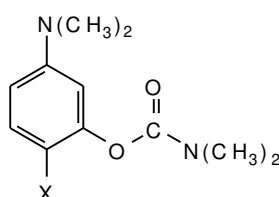
O maior interesse na busca de novos anticolinesterásicos se deve às descobertas da atividade desses fármacos no tratamento da doença de Parkinson e do mal de Alzheimer.<sup>17</sup>

A Rivastigmina por exemplo, é um carbamato inibidor da AChE, que promove o aumento da concentração de ACh nas sinapses colinérgicas do SNC. Esse fármaco é usado no tratamento de pacientes com doença de Alzheimer (DA) em mais de 70 países incluindo o Brasil.<sup>18</sup>

A DA tem assumido proporções avassaladoras, sendo responsável pelo óbito de uma em cada quatro pessoas idosas nos EUA. No Brasil esta patologia cresceu quase seis vezes na última década. Um levantamento feito pela Academia Brasileira de Neurologia (ABN) mostrou que, de 1999 a 2008, o número de vítimas no país saltou 486%, de 1.343 para 7.882.

Assim, inúmeros autores têm procurado utilizar nesses tratamentos os anticolinesterásicos já conhecidos em estudos clínicos,<sup>19,20</sup> bem como os compostos sintetizados (p. ex. rivastigmina<sup>18</sup>, indanona-benzilpiperidinas<sup>21</sup> e 8-carbafisostigmina<sup>22</sup>).

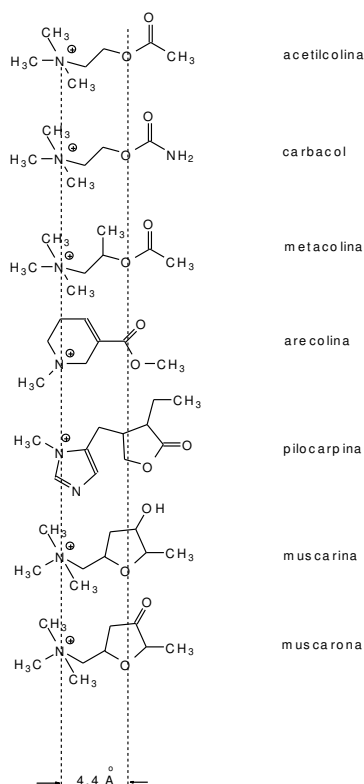
Estudos de derivados do precursor do metilsulfato de neostigmina [Figura 3, com diferentes substituintes] realizados em nosso laboratório<sup>23-28</sup> têm demonstrado que a simples presença de um substituinte é suficiente para afetar significativamente algumas propriedades físico-químicas e biológicas desses compostos.<sup>29</sup>



X= H, Cl, Br, I, Me, OMe, C(O)CH<sub>3</sub> e NO<sub>2</sub>

**Figura 3.** Derivados do Precursor da Neostigmina.

Estudos sobre fármacos colinomiméticos indicam que a geometria molecular desempenha um papel importante na atividade biológica desses compostos (Esquema 2).<sup>30</sup> Relações do tipo “QSAR” demonstraram a importância dos efeitos estereo-eletrônicos na atividade biológica<sup>30</sup> e analisam a importância da conformação e da geometria molecular<sup>31,32</sup> no caso de anticolinesterásicos (Esquema 2). Modelos de interação enzima-fármaco, no caso da acetilcolinesterase, foram propostos com base em estudos fisiológicos.<sup>33</sup> Outros anticolinesterásicos, compostos organofosforados, foram recentemente estudados em nosso laboratório.<sup>34</sup>



**Esquema 2.** Geometria de alguns agentes colinomiméticos.<sup>28</sup>

### 1.3. Receptores da Acetilcolina

A acetilcolina ativa dois tipos de receptores: muscarínicos e nicotínicos. Os muscarínicos encontram-se em todas as células efectoras estimuladas pelos neurônios pós-ganglionares. Os nicotínicos encontram-se nas membranas dos neurônios pós-ganglionares simpáticos e parassimpáticos e nas membranas das fibras musculares esqueléticas. O conhecimento destes dois tipos diferentes de receptores tem particular importância porque drogas específicas são frequentemente usadas na prática médica, estimulando ou bloqueando um desses dois tipos de receptores.<sup>30</sup>

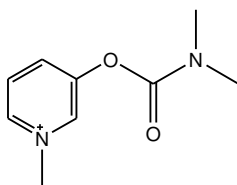
## 1.4. Fármacos

Os agentes anticolinesterásicos podem produzir potencialmente os seguintes efeitos: ações colinomiméticas do tipo muscarínico nos órgãos efetores autônomos; estimulação seguida de depressão ou paralisia, de todos os gânglios autônomos e músculos esqueléticos (ação nicotínica); estimulação com depressão subsequente, de centros colinoceptivos no sistema nervoso central.<sup>35</sup>

### 1.4.1. Piridostigmina

É um agente colinérgico indireto (anticolinesterásico), possuindo aplicação terapêutica em doenças como glaucoma, retenção urinária e *myastenia gravis*.<sup>36</sup> No entanto, não existem estudos recentes na literatura sobre suas propriedades físico-químicas, e principalmente sobre suas propriedades espectroscópicas, e menos sobre seus derivados.

Entretanto, a importância dos efeitos estereo-eletrônicos na interação enzima-substrato no caso da acetilcolinesterase, indica a necessidade do estudo de derivados apropriados da piridostigmina (Figura 4).

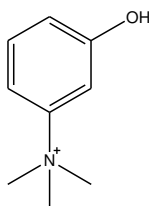


**Figura 4.** Estrutura química da piridostigmina.

### 1.4.2. Edrofônio

É um medicamento que atua como inibidor da colinesterase. Aproveitando seu curto tempo de ação (aproximadamente 10 minutos), o edrofônio é muito utilizado para o diagnóstico de debilidade muscular em pessoas com miastenia gravis e para distinguir de uma crise colinérgica.<sup>37</sup> Na miastenia gravis, o paciente não é capaz de produzir

estimulação suficiente dos receptores nicotínicos, assim, o edrofônio permitirá que a concentração de acetilcolina torne-se suficiente para reduzir a debilidade muscular.<sup>37</sup>



**Figura 5.** Estrutura química do edrofônio.

## 1.5. Cálculos Teóricos

Estudos clássicos de relação estrutura-atividade (QSAR) exigiam a síntese de diversos análogos e a realização de sucessivos testes de atividade biológica. Após décadas de investigações de QSAR, foi possível estabelecer algumas generalizações sobre a influência de mudanças estruturais específicas nos efeitos biológicos, incluindo o tamanho e formato da cadeia carbônica, a natureza e o grau de substituição e a estereoquímica dos compostos.<sup>38</sup>

A disponibilidade de programas computacionais de química e os bancos de dados em rede são, atualmente, ferramentas fundamentais para a descoberta e planejamento de fármacos. Estas informações permitem uma análise rápida da atividade biológica *versus* propriedades físico-químicas de uma série de moléculas de interesse.<sup>39</sup>

Os modelos estruturais facilitam o entendimento e a visualização de estruturas moleculares. Atualmente existem diversos programas que servem para este propósito. A química computacional simula estruturas e reações químicas numericamente, baseando-se nas leis da física.<sup>40</sup>

Cálculos computacionais realizados para uma molécula simples, podem fornecer informações sobre a geometria mais estável, comprimentos de ligação e ângulos diedros. Barreiras de rotação interna sobre uma ligação simples, frequências vibracionais, distribuição eletrônica, potenciais de ionização, afinidades eletrônicas, momentos de dipolo, constantes de acoplamento, dentre outras.<sup>40</sup>



Os cálculos computacionais se subdividem em vários métodos, cálculos semi-empíricos, *ab initio*, e os cálculos baseados na teoria do funcional de densidade (TFD). A TFD vem recentemente se tornando muito popular, pois inclui alguns efeitos de correlação eletrônica com um custo computacional muito menor que os métodos *ab initio* correlacionados tais como MP2 e CC.<sup>41</sup>

Uma metodologia em cálculos computacionais, que vem sendo amplamente empregada e com grande sucesso é a investigação dos orbitais naturais de ligação,<sup>41</sup> os quais podem fornecer dados importantes a respeito dos efeitos eletrônicos envolvidos em um sistema molecular. Os NBOs são orbitais localizados na molécula, ou seja, orbitais existentes entre determinadas ligações diferentemente dos orbitais moleculares, os quais se estendem por toda a molécula. A análise dos dados fornecidos pelos cálculos de NBO é centrada no caráter doador-receptor existente entre os diversos tipos de orbitais: sigma ligante ( $\sigma$ ), sigma anti-ligante ( $\sigma^*$ ), pi ligante ( $\pi$ ), pi anti-ligante ( $\pi^*$ ), pares de elétrons livres (NL), além de outros de menor importância tais como os orbitais de Rydberg (RY) e os orbitais que envolvem elétrons mais internos (CR).<sup>42</sup>

Outra metodologia em cálculos computacionais são os mapas de potencial eletrostático, através destes é possível racionalizar tendências em estruturas moleculares, estabilidade, reatividade química e seletividade.<sup>43</sup>

Os mapas de potencial mostram claramente o efeito do grupo doador e do grupo retirador de densidade eletrônica nos anéis benzênico, por exemplo. Estes constituem a mais comum e mais importante ferramenta dentre os modelos gráficos (mapas de LUMO, de potencial de ionização, potencial de polarização, dentre outros).<sup>43</sup>

É importante enfatizar que o potencial eletrostático é uma propriedade física real, e observável, o qual pode ser determinado experimentalmente, por técnicas de difração de raios X,<sup>44</sup> assim como computacionalmente.

## 1.6. Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

A RMN é a mais poderosa técnica espectroscópica no estudo de aspectos estruturais e dinâmicos de moléculas orgânicas em solução. Uma técnica que pode ser usada para estudar as propriedades físicas, químicas e biológicas da matéria. Embora as propriedades químicas de um átomo dependam da estrutura de seus elétrons, as propriedades físicas dependem do seu núcleo, que é responsável por quase a totalidade da massa do átomo.<sup>45,46</sup>

A técnica de RMN se aplica ao estudo de núcleos com momento angular de spin nuclear não nulo. Estes núcleos se comportam como pequenos ímãs. A aplicação de um campo magnético, afeta a população dos níveis de energia que surgem com a aplicação do campo magnético. O campo magnético induz uma rede de magnetização na direção do campo magnético, sendo a magnetização macroscópica detectada em RMN.

O princípio da espectroscopia de RMN é observar a magnetização macroscópica e as frequências a ela associada para cada núcleo que compõe a rede de magnetização, essa observação só é possível com a aplicação de pulso de radiofrequência o que possibilita a manipulação da orientação da rede de magnetização macroscópica em relação a orientação do campo magnético. A frequência de ressonância de cada núcleo de hidrogênio, por exemplo, presente na amostra depende do ambiente químico, ou seja depende da densidade eletrônica ao redor de cada hidrogênio que compõe a molécula em estudo, sendo que cada hidrogênio quimicamente não equivalente vai apresentar uma frequência no espectros de RMN.<sup>46</sup>

Embora uma variedade de mais de 300 diferentes tipos de núcleos possuam momento angular, apenas um seletivo grupo tem utilidade em RMN. Dentre esses:  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ ,  $^{15}\text{N}$ ,  $^{31}\text{P}$ ,  $^{19}\text{F}$ , pois apresentam número de Spin ( $I = \frac{1}{2}$ ).<sup>47</sup>

De todos os átomos, o Hidrogênio é o mais simples, pois ele possui apenas um próton. Ele é o mais importante átomo para a RMN, sobretudo em humanos, ele corresponde a mais de dois terços do número de átomos encontrados em nosso corpo. Além de sua abundância nos sistemas biológicos, 99.98 % dos núcleos de hidrogênio presentes numa molécula são magnéticos ( $I = \frac{1}{2}$ ), sendo estes passíveis de serem observados na RMN, o que o torna extremamente sensível ( $5,87 \times 10^3$ ) a RMN.<sup>48</sup>

São comuns os experimentos de RMN em uma dimensão (1D) de  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  e DEPT de um determinado composto, mesmo que estas duas últimas exijam um tempo de medida muito grande devido a baixa sensibilidade inerente do núcleo de  $^{13}\text{C}$  (mil vezes menor que a sensibilidade do  $^1\text{H}$ ). À parte das possíveis dificuldades experimentais, está comprovado, através dos anos, que os dados de deslocamentos químicos de  $^{13}\text{C}$  são importantes ferramentas em uma determinação estrutural.<sup>49-54</sup>

### 1.6.1. RMN em Duas Dimensões (RMN 2D)

Proposto inicialmente por Jeener, a técnica de RMN em duas dimensões (2D), podendo ser homo ( $^1\text{H}, ^1\text{H}$ ) ou heteronucleares ( $^1\text{H}, ^{13}\text{C}$ ).<sup>49-55</sup>

As técnicas 2D permitem correlacionar hidrogênios e/ou carbonos que possuam alguma relação escalar ( $^nJ_{\text{H,H}}$ ,  $^nJ_{\text{C,H}}$ ,  $^nJ_{\text{C,C}}$ )<sup>54-56</sup> ou espacial (H,H- ou H,C-NOE)<sup>50,51,53,57</sup> entre si. Desta forma é possível fazer um mapeamento estrutural mais preciso do que utilizando somente as técnicas 1D e dados de possíveis compostos similares da literatura, principalmente na análise de estruturas mais complexas.

As técnicas de RMN 2D utilizadas neste trabalho são: COSY, HSQC e HMBC.

**COSY (Homocuclear Correlation Spectroscopy)** – com esta técnica pode-se estabelecer as correlações entre os hidrogênios que estão acoplados por  $^{2-3}J_{\text{H,H}}$  (acoplamentos geminais e vicinais, mensuráveis no espectro 1D) e assim discernir a multiplicidade dos sinais observados no espectro de RMN  $^1\text{H}$ .<sup>49-56</sup>

**HSQC (Heteronuclear Single Quantum Coherence)** – possível detectar núcleos pouco sensíveis (ex.:  $^{13}\text{C}$ ), de forma indireta, através da troca de informações (transferência de magnetização) entre o núcleo pouco sensível ( $^{13}\text{C}$  e/ou  $^{15}\text{N}$ ) e um núcleo mais sensível ( $^1\text{H}$ ,  $^{19}\text{F}$  e/ou  $^{31}\text{P}$ ), sendo que a detecção é feita na frequência do núcleo mais sensível o qual possui as informações do núcleo menos sensível que foram transferidas para ele.<sup>56</sup>

**HMBC (Heteronuclear Multiple Quantum Coherence)** – esta sequência é otimizada para acoplamentos a longa distância, entre hidrogênio e carbono ( $^2J_{\text{CH}}$ ,  $^3J_{\text{CH}}$ , e algumas

vezes  $^4J_{CH}$ ). Também é muito útil na detecção indireta de carbonos quaternários. Esta técnica é muito utilizada para análise de carboidratos e proteínas, e em RMN de  $^{15}N$ .<sup>57</sup>

## 1.7. Método de Ellman

Vários métodos têm sido desenvolvidos (eletrometria, pH-stat, radiometria e colorimetria) proporcionando ensaios sensíveis e específicos para a determinação da atividade da AChE em toxicologia clínica e experimental. No entanto, o uso rotineiro desses procedimentos é muitas vezes dificultado pela laboriosa preparação da amostra, tempo de medição de comprimento, especificidade insuficiente de substratos e distúrbios pela matriz da amostra.<sup>58</sup>

O método espectrofotométrico de Ellman é geralmente preferido pelos profissionais de saúde.<sup>58</sup>

O princípio do método baseia-se na hidrólise de um substrato éster da tiocolina (acetilcolina) pela enzima presente no plasma, ou nos eritrócitos, liberando tiocolina. Esta, ao reagir com o ácido 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzóico (DTNB), produz um composto colorido que absorve luz em 412 nm. Trata-se de um método rápido e sensível, que pode ser realizado com segurança nas frações do sangue.<sup>59</sup>

Como amostras, utilizam-se rotineiramente plasma, soro, eritrócitos e sangue total, sendo que a medida é realizada em função da presença do ácido formado, da tiocolina e da colina como produtos da reação.<sup>59</sup>

Este método não necessita de temperatura controlada, apresenta tamponamento de fosfato (pH 8,0) e apresenta uma relação direta entre atividade enzimática e a leitura espectrofotométrica, ou seja, o aumento da absorvância é diretamente proporcional a atividade da enzima, de acordo com a lei de Lambert-Beer.<sup>59</sup>



# OBJETIVOS

## 2. OBJETIVOS

### OBJETIVO GERAL

Sintetizar novos compostos com potencial atividade anticolinesterásica, derivados da Piridostigmina (brometo de *N,N*-dimetilcarbamato de *N'*-metilpiridínio - **VIIA**), com substituintes no carbono 5 do anel piridínico: fenila, *p*-metoxifenila, *p*-nitrofenila, *p*-clorofenila, e derivado do Edrofônio (brometo de 2,6-tetraidro-*N,N*-dimetil-3-hidroxi-5-fenilpiridínio – **VB**), e estudar suas propriedades físico-químicas e biológicas.

### OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Estudar as propriedades físico-químicas (dados de deslocamento químico, ponto de fusão, análise elementar) e espectroscópicas (Infravermelho, RMN 1D -  $^1\text{H}$  e de  $^{13}\text{C}$  e RMN 2D – gHSQC e gHMBC) de todos os intermediários e dos produtos finais.

Realizar cálculos de orbitais moleculares, para a determinação das densidades de carga.

Investigar a atividade anticolinesterásica do derivado do Edrofônio pelo Método de Ellman.

# MATERIAIS E MÉTODOS

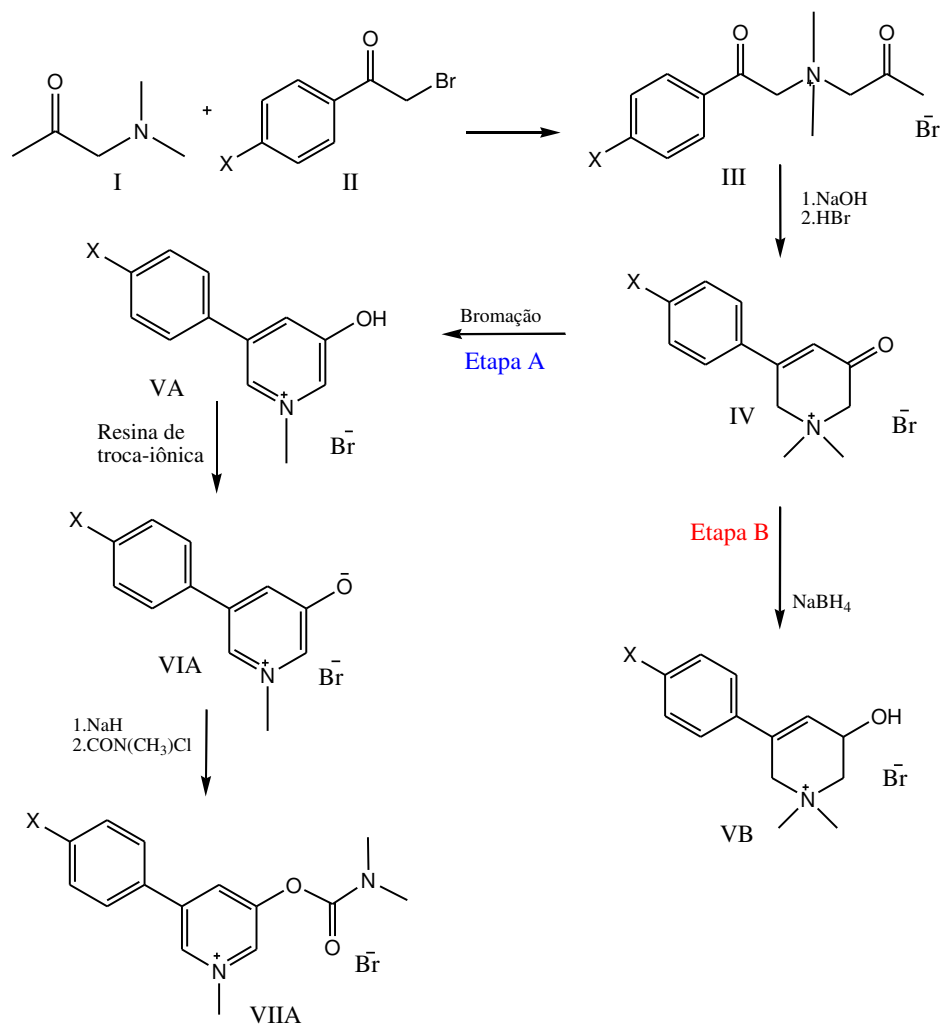


### 3. MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1. Sínteses

Para a síntese dos compostos seguimos a rota proposta no Esquema 3, a partir dos sais de amônio quaternários cíclicos seguimos dois caminhos: A, para obtenção dos derivados da piridostigmina e B para obtenção do derivado do edrofônio.

Para a primeira etapa utilizamos dimetilaminoacetona **I** e acetofenonas *p*-substituídas **II**, para a obtenção dos intermediários, brometos de fenacila *p*-substituídos **III** (sais de amônio quaternários), e dos reagentes para a ciclização desses sais para se obter os compostos **IV** (sais quaternários cíclicos), cuja aromatização conduz aos sais de piridínio **VA**.



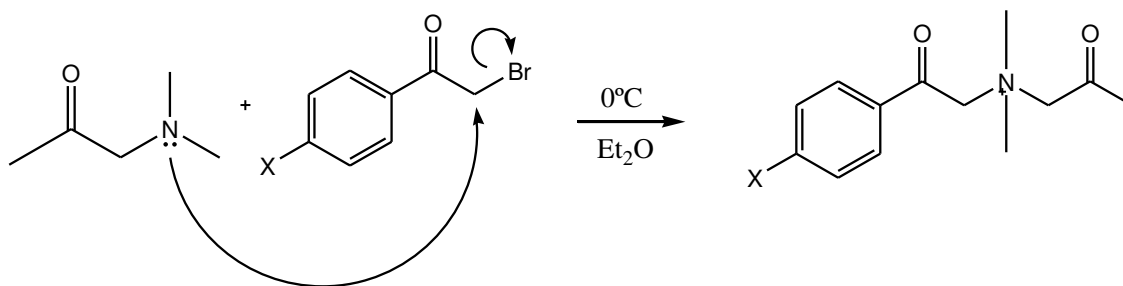
**Esquema 3.** Síntese dos derivados da piridostigmina e do edrofônio.

### 3.1.1 Sínteses dos intermediários comuns as duas rotas

- Brometos de *N*-acetonil-*N,N*-dimetil-*N*-fenacilamônio *p*-substituídos (III)

As reações seguem o mecanismo de  $S_N2$  alifática onde a dimetilaminoacetona atua como nucleófilo neutro (Esquema 4).

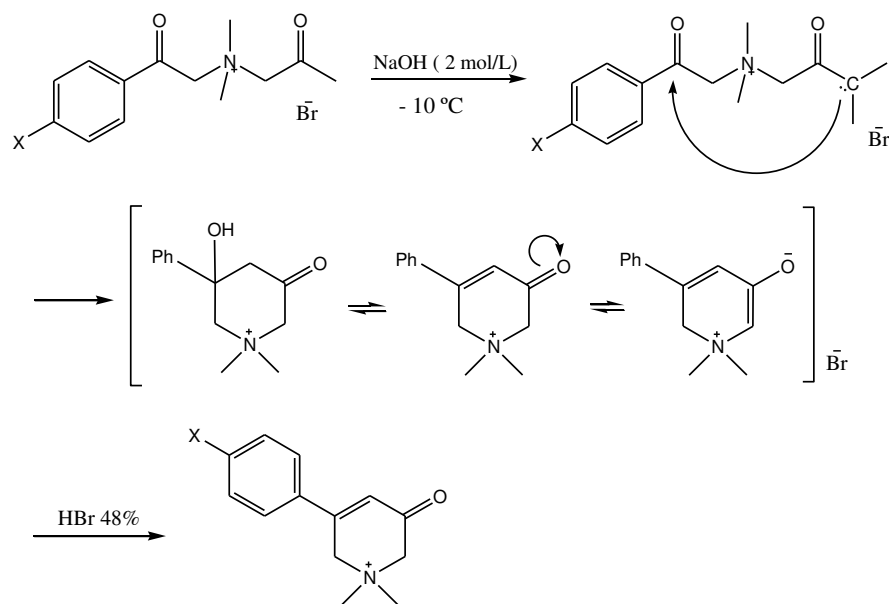
Em um balão de 50 mL de 1 boca, equipado com agitador magnético, foram adicionados 1,00 g (0,01 mol) de dimetilaminoacetona (Aldrich), cerca de 2,00 g (0,01 mol) dos respectivos brometos de fenacila e 10 mL de éter etílico (Tedia) anidro. A adição foi realizada à  $0^\circ\text{C}$ , e a reação mantida sob agitação constante por 7 horas à temperatura ambiente. Os produtos foram recristalizados em meio de etanol-éter etílico (Synth-Tedia), filtrado e os solventes evaporados em rotaevaporador. Obtendo para o composto sem substituinte 2,86 g (0,009 mol) de um sólido branco com rendimento de 95%; para o composto de substituinte- $\text{NO}_2$  1,23 g (0,004 mol) de um sólido amarelo com rendimento de 50%; para o substituinte- $\text{OMe}$  1,83 g (0,006 mol) de um sólido amarelado com rendimento de 70%, e para o substituinte- $\text{Cl}$  1,28 g (0,004 mol) de um sólido amarelo intenso com rendimento de 50%. Os resultados obtidos estão descritos nas Tabelas 2 e 3.



**Esquema 4.** Mecanismo de reação para obtenção dos Brometos de *N*-acetoni-*N,N*-dimetil-*N*-fenacilamônio *p*-substituídos **III**.

- **Brometos de 2,6-tetraidro-*N,N*-dimetil-3-oxo-5-fenilpiridínio *p*-substituídos **IV**.**

O mecanismo desta reação é semelhante a uma condensação aldólica intramolecular, uma vez que o carbono metílico  $\alpha$  à carbonila alifática do brometo liga-se ao carbono vizinho ao anel aromático, formando um anel de seis membros.



**Esquema 5.** Obtenção dos brometos 2,6-tetraidro-*N,N*-dimetil-3-oxo-5-fenilpiridínio *p*-substituídos **IV**.

Em um balão de 50 mL de 1 boca, equipado com agitador magnético, foram adicionados cerca de 3,00 g (0,01 mol) dos brometos de *N*-acetoni-*N,N*-dimetil-*N*-fenacilamônio *p*-substituídos e 1 mL de solução de NaOH (Vetec) (2 mol L<sup>-1</sup>), a reação foi mantida sob agitação constante durante 24 horas à -10° C. Após tempo reacional, neutralizou-se com 0,5 mL de HBr (Ecibra) 48%, controlando o pH com papel indicador, observando a formação de um precipitado. Os produtos foram recristalizados em meio de etanol-éter etílico, filtrados e os solventes evaporados em rotaevaporador. Obtendo para o composto sem substituinte 1,83 g (0,006 mol) de um sólido branco com rendimento de 65%, para o

substituinte-OMe 1,73 g (0,006 mol) de um sólido amarelado com rendimento de 61%, para o substituinte-NO<sub>2</sub> 0,71 g (0,002 mol) de um sólido marrom com rendimento de 25% e para o substituinte-Cl 1,42 g (0,004 mol) de um sólido amarelo com rendimento de 50%. Os resultados obtidos estão descritos nas Tabelas 5 e 6. Foram realizados experimentos de RMN 2D, com a finalidade de atribuir corretamente todos os sinais (Tabela 7).

### 3.1.2. Sínteses dos derivados da piridostigminas – rota A

- **Brometos de 3-hidróxi-*N*-metil-5-fenilpiridínio *p*-substituídos VA**

Em um balão de 125 mL de 3 bocas, equipado com agitador magnético, funil de adição e condensador de refluxo, foram adicionados 0,24 g (0,001 mol) do brometo de 2,6-tetrahidro-*N,N*-dimetil-3-oxo-5-fenilpiridínio solubilizado em 10 mL de metanol (Synth), 0,5 mL de Br<sub>2</sub> (Aldrich) e 0,30 g perbrometo de piridínio (Aldrich) (0,001 mol), a reação foi mantida sob agitação constante por 30 min., à 0°C. Após tempo reacional o solvente foi evaporado em rotaevaporador, e o sólido obtido foi aquecido à 200-205° C por 15 min. Após esfriar, adicionou-se 2 mL de metanol e aqueceu-se até solubilizar todo o resíduo. O produto foi extraído com éter etílico (3 x 20 mL), a fase orgânica foi seca com sulfato de magnésio (Synth) anidro e o solvente evaporado em rotaevaporador. Obtendo 0,21 g (0,7 mmol) de um sólido pastoso marrom escuro com 91% de rendimento, porém o composto encontra-se impuro.

Esta reação foi realizada apenas com o composto sem substituinte. Os resultados obtidos estão apresentados na Tabela 8.

- **Brometo de *N*-metil-3-óxido-5-fenilpiridínio *p*-substituídos VIA**

Em uma coluna cromatográfica, contendo 20,0 g de resina de troca-iônica Amberlite IRA-400 (Aldrich), previamente tratada com 100 mL de uma solução de NaOH 10%, adicionamos 0,5 g (0,002 mol) do brometo de 3-hidróxi-*N*-metil-5-fenilpiridínio e como eluente utilizamos uma mistura contendo 700 mL de H<sub>2</sub>O e 250 mL de etanol, adicionamos a mistura eluente até que o pH medido com papel indicador, fosse básico.

O solvente foi evaporado em evaporador rotatório, e o produto obtido foi recristalizado em meio de clorofórmio-éter etílico (Synth-Tedia). Obtendo 0,075 g (0,3 mmol) de um sólido marrom com rendimento de 15%, impuro.

Esta reação foi realizada apenas com o composto não substituído. Dados de RMN estão apresentados na Tabela 9.

- **Brometo de *N,N*-dimetilcarbamato de *N*'-metilpiridínio *p*-substituídos VIIA**

Em um balão de 125 mL de 3 bocas, equipado com agitador magnético, funil de adição, condensador de refluxo, atmosfera de nitrogênio (N<sub>2</sub>), adicionamos 0,5 g (0,0015 mol) do *N*-metil-3-óxido-5-fenilpiridínio solubilizado em 3,0 mL de tetraidrofurano (Fisher Scientific), e 0,16 g (0,0015 mol) do cloreto de dimetilcarbamoíla (Aldrich), a reação foi mantida sob agitação constante, à 80° C por 8h. O produto final foi extraído com éter etílico e solução saturada de bicarbonato de sódio (Synth) gelada, a fase orgânica foi seca com

sulfato de magnésio anidro e o solvente evaporado em rotaevaporador. Obtendo 0,25 g (0,7 mmol) de um sólido marrom com rendimento de 40%, impuro.

Esta reação foi realizada apenas com o composto não substituído. Dados de RMN estão apresentados na Tabela 10.

### 3.1.3. Sínteses dos derivados do Edrofônio – rota B

- **Brometo de 2,6-tetraidro-*N,N*-dimetil-3-hidroxi-5-fenilpiridínio *p*-substituído VB.**

Em um balão de 125 mL de 3 bocas, equipado com agitador magnético, funil de adição, condensador de refluxo, adicionamos 0,2 g (0,7 mmol) do brometo de 2,6-tetraidro-*N,N*-dimetil-3-oxo-5-fenilpiridínio solubilizado em 8 mL de metanol. Lentamente adicionou-se 0,1g ( 0,002 mol) de NaBH<sub>4</sub> (Acros), a reação foi mantida sob agitação constante, por 30 min. à temperatura ambiente.

Após tempo reacional adicionou-se 2 mL de H<sub>2</sub>O e deixou-se reagir por 30 min à 90°C. Desligou-se o aquecimento, e deixou-se reagir por 20 h à temperatura ambiente. Após tempo reacional adicionou-se gotas de HCl (Ecibra) ( aproximadamente 0,5 mL) até que não houvesse mais desprendimento de gases. O produto reacional foi recristalizado em meio de etanol-éter, filtrado, e o solvente evaporado em rotaevaporador.

Obtendo 0,16 g (0,5 mmol) de um sólido branco com rendimento de 80%. Esta reação foi realizada apenas com o composto não substituído e os resultados e dados de RMN estão apresentados nas Tabelas 11e 12.

## **3.2. Instrumentação**

### **3.2.1. Instrumentação geral**

Para todos os compostos sintetizados com alto grau de pureza foi realizada análise elementar no aparelho Perkin-Elmer 2400 CHN.

As medidas de ponto de fusão foram determinadas em nosso laboratório no aparelho da Thomas/Scientific.

### **3.2.2. Espectrometria de IV**

Os experimentos de Infravermelho foram obtidos no equipamento FTIR marca Shimadzu modelo IRPrestige-21, com software IRsolution para controle do equipamento em pastilhas de KBr.

Parâmetros de aquisição:

Fonte de radiação de alta intensidade, composto por bloco cerâmico refrigerado a ar.

Modo de medição: absorbância

Número de scans: 32

Resolução: 4 cm<sup>-1</sup>

Faixa comprimento de onda: 400-4000 cm<sup>-1</sup>

### **3.2.3. Ressonância Magnética Nuclear**

Os espectros de RMN 1D foram realizados no equipamento Bruker 250 MHz operando em 250,13 MHz para <sup>1</sup>H e 62,90 MHz para <sup>13</sup>C.



Para os RMN 2D utilizou-se equipamentos Bruker 300 MHz operando em 300,1 MHz para  $^1\text{H}$  e 75,4 MHz para  $^{13}\text{C}$  e Bruker 400 MHz operando em 400,13 MHz para  $^1\text{H}$  e 100,61 MHz para  $^{13}\text{C}$ . Os parâmetros de aquisição estão descritos nos espectros em anexo.

### **3.2.4. Método de Ellman modificado**<sup>59</sup>

Os ensaios enzimáticos foram realizados nos laboratórios do Centro de Controle de Intoxicações (CCI – HC da FCM-UNICAMP), através do método de Ellman. Os Equipamentos utilizados foram: Balança analítica; Espectrofotômetro; pHmetro. Os reagentes utilizados foram: NaCl 0,01 mol/L (Merck);  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  0,03 mol/L (Synth);  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0,002 mol/L (Merck); NaOH 0,1 mol/L (Ecibra); HCl 0,1 mol/L (Merck); Iodeto de propioniltiocolina 0,005 mol/L (Sigma); Salicilato de eserina 0,0005 mol/L (Sigma); L-cisteína 0,0004 mol/L (Riedel); DTNB 0,0025 mol/L (Sigma).

### **3.2.5. Procedimento do Método de Ellman modificado**

A amostra utilizada foi sangue total coletado a qualquer hora do dia sem necessidade de preparação especial do paciente. A coleta foi feita em tubo ou seringa heparinizado, com volume médio de 1,0 mL. A amostra foi acondicionada em temperatura de 2 à 8°C, estável por no máximo 48 horas.

Antes de avaliar as amostras de pacientes é necessário fazer uma curva de calibração, que devido aos reagentes utilizados, tem durabilidade de 24h.

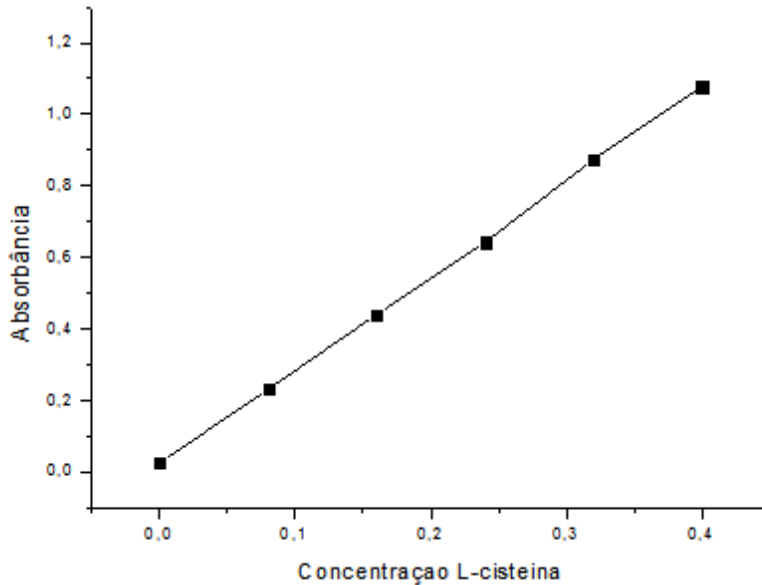
Para a Curva de Calibração preparam-se os calibradores em tubo de ensaio conforme a tabela 1, pipetando primeiro o tampão DTNB e a água destilada e por último a solução de L-cisteína, pois esta se decompõe rapidamente. Efetuam-se imediatamente as leituras das absorvâncias em espectrofotômetro contra água destilada, em comprimento de onda de 420 nm. E finalmente, calcula-se a equação da reta e o coeficiente de determinação através do software EXCEL. A curva de calibração será aceita se o coeficiente de

correlação ( $r^2$ ) for maior ou igual a 0,98.

As limitações e/ou interferentes do teste são: sangue hemolisado ou coagulado, e sangue coletado com outros anticoagulantes que não a heparina.

**Tabela 1.** Diluição da curva de calibração.

Conc. ( $\mu$ Moles/mL)	Sol. L-cisteína ( $\mu$ L)	Água destil. ( $\mu$ L)	Tampão DTNB ( $\mu$ L)
0	-	500	2.000
0,08	100	400	2.000
0,16	200	300	2.000
0,24	300	200	2.000
0,32	400	100	2.000
0,40	500	-	2.000



**Gráfico 1.** Curva de calibração

### Procedimento Padrão:

- Identificar 4 tubos para cada amostra: T, TB, P e PB;
- Adicionar 20 mL da solução de DTNB em erlenmeyer de 125 mL;
- Adicionar 20  $\mu$ L de sangue total, homogeneizar e pipetar 4 mL nos tubos T e TB;
- Centrifugar o restante a 3000 rpm por 5 minutos;
- Pipetar 4 mL do sobrenadante nos tubos P e PB;
- Adicionar 50  $\mu$ L da solução de salicilato de eserina nos tubos PB e TB e homogeneizar.
- Pré-incubar colocando os tubos em banho de água a 30°C por 5 min.;
- Adicionar 1 mL da solução de substrato em todos os tubos e incubar a 30°C por 10 minutos;
- Adicionar 50  $\mu$ L da solução de salicilato de eserina nos tubos P e T;
- Centrifugar os tubos T e TB por 5 minutos à 3000 rpm;
- Medir as absorvâncias dos tubos PB e P e dos sobrenadantes dos tubos T e TB no espectrofotômetro em 405 nm contra água destilada.

### Procedimento para avaliar atividade colinesterásica do composto em estudo:

- Identificar 6 tubos para cada amostra: T, TB, P, PB, Tcomp e Pcomp.
- Adicionar 20 mL da solução de DTNB em erlenmeyer de 125 mL;
- Adicionar 20  $\mu$ L de sangue total, homogeneizar e pipetar 4 mL nos tubos T, TB e Tcomp.;
- Centrifugar o restante a 3000 rpm por 5 minutos;
- Pipetar 4 mL do sobrenadante nos tubos P, PB e Pcomp.;
- Adicionar 50  $\mu$ L da solução de salicilato de eserina nos tubos PB e TB e 50  $\mu$ L do composto em teste nos tubos Pcomp e Tcomp e homogeneizar.
- Pré-incubar colocando os tubos em banho de água a 30°C por 10 min.;
- Adicionar 1 mL da solução de substrato em todos os tubos e incubar a 30°C por 10 minutos;
- Adicionar 50  $\mu$ L da solução de salicilato de eserina nos tubos P, T, Pcomp e Tcomp.;

- Centrifugar os tubos T, TB e Tcomp. por 5 minutos à 3000 rpm;
- Medir as absorvâncias de todos os tubos no espectrofotômetro em 405 nm contra água destilada.

### Cálculos

- Subtrair os respectivos brancos TB e PB das leituras de absorvâncias dos tubos T e P.
- Calcular a concentração do substrato hidrolisado através da equação da reta.
- Converter a concentração do substrato hidrolisado em atividade enzimática (UI/mL) multiplicando por 25.

$$\text{UI / mL} = C (\mu\text{moles / mL}) \times 1000 / 4 \text{ mL} \times 10 \text{ min} = C (\mu\text{moles / mL}) \times 25$$

$$\text{Atividade ChE Eritrocitária} = \text{Atividade ChE total} - \text{Atividade ChE plasmática.}$$



# ASPECTOS COMPUTACIONAIS

## 4. Aspectos Computacionais

O laboratório dispõe de micro-computadores, com alto desempenho na realização de cálculos teóricos equipados com o programa Gaussian03. Detalhes de nossa utilização desses cálculos se encontram em publicações recentes.<sup>60,61</sup>

Os estudos teóricos foram realizados apenas para os compostos finais, ou seja, para os brometos de *N,N*-dimetilcarbamato de *N*<sup>7</sup>-metilpiridínio *p*-substituídos **VIIA** e para os Brometo de 2,6-tetraidro-*N,N*-dimetil-3-hidroxi-5-fenilpiridínio **VB** e Brometo de 2,4,6-hexaidro-*N,N*-dimetil-3-hidroxi-5-fenilpiridínio **VIB**.

Realizou-se cálculos teóricos incluindo a construção de superfícies de energia potencial (SCAN em B3LYP/6-31G) em relação ao movimento dos substituintes, as otimizações (B3LYP/6-311+G(d,p)) de geometria para se determinar as preferências conformacionais e os mapas de potenciais (HF/6-31 G).

## RESULTADOS E DISCUSSÕES



## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1. Sínteses dos intermediários comuns as duas rotas

- **Brometos de *N*-acetonil-*N,N*-dimetil-*N*-fenacilamônio *p*-substituídos III**

Nesta etapa cuidamos apenas para que não houvesse nenhum resíduo de água ou solventes práticos, pois estes favoreceriam a formação de formas enólicas, conduzindo a produtos indesejados. Os resultados estão apresentados nas Tabelas 2, 3 e 4, e os espectros de RMN de  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  e Infravermelho estão em anexos.

**Tabela 2.** Rendimentos experimentais, propriedades físicas e análise elementar para os brometos de *N*-acetonil-*N,N*-dimetil-*N*-fenacilamônio *p*-substituídos III.

Substituinte	Ponto de Fusão (°C)	Rendimento Médio (%)	Fórmula Molecular	Análise Elementar %	
				Calc.	Exper.
H	155-157	95	$\text{C}_{13}\text{H}_{18}\text{NO}_2\text{Br}$	C=52,0	52,3
				H=6,00	6,05
				N=4,67	4,69
MeO	159-161	70	$\text{C}_{14}\text{H}_{20}\text{NO}_3\text{Br}$	C=50,9	50,5
				H=6,06	6,02
				N=4,24	4,21
NO <sub>2</sub>	162-166	50	$\text{C}_{13}\text{H}_{17}\text{N}_2\text{O}_4\text{Br}$	C=45,2	45,4
				H=4,93	5,06
				N=8,11	8,25
Cl	166-171	50	$\text{C}_{13}\text{H}_{17}\text{NO}_2\text{BrCl}$	C=46,6	46,7
				H=5,08	4,58
				N=4,18	3,99

**Tabela 3.** Dados de IV e RMN de  $^1\text{H}$  para os brometos de *N*-acetoni-*N,N*-dimetil-*N*-fenacilamônio *p*-substituídos **III**.

X	Infravermelho $\text{cm}^{-1}$		RMN de $^1\text{H}$ em $\text{CDCl}_3$ (ppm)							
	$\nu_{\text{C}=\text{O}(\text{C}7)}$ e $\nu_{\text{C}=\text{O}(\text{C}10)}$		H-1	H-2,6	H-3,5	H-8	H-9	H-11	H-12	
H	1694	1727	7,64	7,49	8,01	5,57	5,94	2,27	3,79	-
MeO	1677	1739	-	6,95	8,01	5,79	5,53	2,28	3,78	3,87
$\text{NO}_2$	1698	1737	-	8,23	8,37	5,65	4,95	1,95	3,52	-
Cl	1694	1723	-	7,49	8,03	5,98	5,55	2,32	3,82	-

**Tabela 4.** Dados de RMN de  $^{13}\text{C}$  para os brometos de *N*-acetoni-*N,N*-dimetil-*N*-fenacilamônio *p*-substituídos **III**.

X	RMN de $^{13}\text{C}$ em $\text{CDCl}_3$ (ppm)										
	C-1	C-2,6	C-3,5	C-4	C-7	C-8	C-9	C-10	C-11	C-12	C-X
H	135,2	128,4	129,2	133,9	191,4	66,2	69,1	200,2	28,9	52,4	-
MeO	165,4	114,4	131,0	126,9	189,4	65,8	69,1	200,2	28,8	52,5	55,7
$\text{NO}_2$	151,2	124,1	129,4	138,7	190,5	66,7	68,8	199,9	28,2	53,2	-
Cl	142,4	129,6	130,0	132,6	190,9	66,6	69,5	200,1	29,2	52,8	-

- Brometos de 2,6-tetraidro-*N,N*-dimetil-3-oxo-5-fenilpiridínio *p*-substituídos **IV**

Esta reação ocorre quando adicionamos base (NaOH) ao meio reacional, e esta retira o H $\alpha$  à carbonila, assim o carbono com carga negativa liga-se ao carbono vizinho ao anel aromático, formando um anel de seis membros, produto mais estável, o qual desejavamos. Este produto só se formava em baixas temperaturas, portanto, a temperatura durante o tempo reacional foi cuidadosamente controlada.

Os compostos com substituintes H e Cl reagiram à -10°C, e os com substituintes OMe e NO<sub>2</sub> necessitaram de temperaturas menores, -30°C e -50°C, respectivamente.

Os resultados estão apresentados nas Tabelas 5,6 e 7, e os espectros de RMN de <sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C e Infravermelho estão em anexos.

**Tabela 5.** Rendimentos experimentais propriedades físicas e análise elementar para os brometos de 2,6-tetraidro-*N,N*-dimetil-3-oxo-5-fenilpiridínio *p*-substituídos **IV**.

Substituinte	Ponto de Fusão (°C)	Rendimento Médio (%)	Fórmula Molecular	Análise Elementar %	
				Calcul.	Experim.
H	198-199	65	C <sub>13</sub> H <sub>16</sub> NOBr	C = 53,3	54,7
				H = 5,93	5,30
				N = 5,18	4,99
MeO	198-200	61	C <sub>14</sub> H <sub>18</sub> NO <sub>2</sub> Br	C = 52,0	53,4
				H = 6,00	5,90
				N = 4,67	4,70
NO <sub>2</sub>	210-215	25	C <sub>13</sub> H <sub>15</sub> N <sub>2</sub> O <sub>3</sub> Br	C = 45,7	47,9
				H = 4,76	4,90
				N = 8,88	8,32
Cl	215-218	50	C <sub>13</sub> H <sub>15</sub> NOBrCl	C = 47,3	49,5
				H = 4,93	4,82
				N = 4,59	4,72

**Tabela 6.** Dados espectroscópicos no infravermelho para os brometos de 2,6-tetraidro-*N,N*-dimetil-3-oxo-5-fenilpiridínio *p*-substituídos **IV**.

Substituinte	IV (cm <sup>-1</sup> ) $\nu_{C=O}$
H	1659
OMe	1650
NO <sub>2</sub>	1618
Cl	1674

**Tabela 7.** Deslocamentos químicos de RMN de <sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C, multiplicidades  $\delta$  (ppm), correlações <sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H e <sup>1</sup>H-<sup>13</sup>C em g-HMBC e g-HSQC para os compostos **IV** em D<sub>2</sub>O.

a) X = H, b) X = OMe, c) X = NO<sub>2</sub>, d) X = Cl.

a)

C	$\delta(^{13}\text{C})$ (ppm)	$\delta(^1\text{H})$ (ppm)	Multip.	gHMBC	gHSQC
2	61,5	4,30(2H)	s	H-4,13	H-2
3	189,3	-	-	H-2,6,13	-
4	121,7	6,73(1H)	s	H-6	H-4
5	152,6	-	-	H-6,8/12,13	-
6	66,6	4,89(2H)	s	H-4,13	H-6
7	133,2	-	-	H-4,6,8/12,9/11	-
8/12	129,5	7,59(2H)	m	H-10,9/12	H-8/12
9/11	126,9	7,49(2H)	m	C-10, 8/12	H-9/11
10	132,5	7,49(1H)	s	C-8/12,9/11	H-10
13	53,8	3,41(6H)	s	C-2,6	H-13

b)

C	$\delta(^{13}\text{C})$ (ppm)	$\delta(^1\text{H})$ (ppm)	Multip	gHMBC	gHSQC
2	66,2	4,32(2H)	s	H-6,13	H-2
3	189,1	-	-	H-2,4	-
4	119,6	6,78(1H)	s	H-6	H-4
5	125,7	-	-	H-4,9/11	-
6	61,4	4,93(2H)	s	H-2,13	H-6
7	152,5	-	-	H-8/12	-
8/12	115,1	7,67(2H)	m	H-5,9/11,10	H-8/12
9/11	129,2	7,07(2H)	m	H-7,8/12,10	H-9/11
10	162,8	-	-	H-X	-
13	55,8	3,45(6H)	s	H-2,6	H-13
X	57,6	3.86(3H)	s	H-10	H-X

c)

C	$\delta(^{13}\text{C})$ (ppm)	$\delta(^1\text{H})$ (ppm)	Multip	gHMBC	gHSQC
2	69,0	4,45(2H)	s	H-6,13	H-2
3	191,5	-	-	H-2,6,13	-
4	127,3	7,01(1H)	s	H-6	H-4
5	153,0	-	-	H-6,8/12	-
6	64,3	5,06(2H)	s	H-2,13	H-6
7	142,5	-	-	H-4,6,9/11	-
8/12	130,6	7,91(2H)	m	H-6,10,9/11	H-8/12
9/11	127,1	8,37(2H)	m	H-9/11,10	H-9/11
10	152,0	-	-	H-6,8/12,9/11	-
13	56,9	3,53(6H)	s	H-2,6	H-13

d)

C	$\delta(^{13}\text{C})$ (ppm)	$\delta(^1\text{H})$ (ppm)	Multip	gHMBC	gHSQC
2	68,9	4,48(2H)	s	H-6,13	H-2
3	191,7	-	-	H-2	-
4	124,6	6,85(1H)	s	H-6	H-4
5	134,4	-	-	H-4,6	-
6	63,9	5,05(2H)	s	H-13	H-6
7	154,2	-	-	H-6, 8/12	-
8/12	131,0	7,47(2H)	m	H-4,9/11,10	H-8/12
9/11	132,2	7,65(2H)	m	H-8/12,10	H-9/11
10	140,3	-	-	H-8/12,9/11	-
13	56,6	3,56(6H)	s	H-2,6	H-13

### 5.1.1. Sínteses dos derivados da piridostigminas – rota A

- **Brometos de 3-hidróxi-*N*-metil-5-fenilpiridínio *p*-substituídos VA**

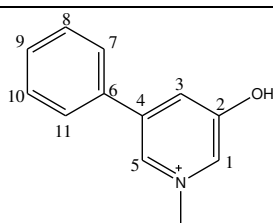
Na reação de retirada de um grupo metila e subsequente aromatização do anel piridínio realizou uma reação à 200°C, o que gerou vários resíduos indesejados, pois a alta temperatura carbonizava os reagentes, impossibilitando a purificação do composto obtido. Tentamos extrair o produto com éter etílico, clorofórmio e com vários outros solventes orgânicos, porém não obtivemos sucesso. Tentamos ainda realizar extração líquido-líquido, mas ainda restaram impurezas.

Optamos então por adicionar benzoato de etila antes do aquecimento, com a finalidade de diminuir a degradação dos reagentes, pois dessa forma aqueceríamos o produto em solução, porém o éster adicionado contaminou o produto.

Por não conseguirmos purificar o produto desta etapa reacional, tivemos problemas até a finalização da rota sintética.

Devido à grande impureza do composto obtido, não foi possível realizar medida de ponto de fusão, análise elementar, e atribuir o espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$ . Como o composto apresentava hidrogênios quimicamente diferentes, foi possível identificá-lo apenas por RMN de  $^1\text{H}$  (Tabela 8). O espectro de RMN de  $^1\text{H}$  está apresentado em anexo.

**Tabela 8.** Dados espectroscópicos para os brometos de 3-hidróxi-1-metil-5-fenilpiridínio *p*-substituídos **VA**.



Substituinte	RMN de $^1\text{H}$ em $\text{CDCl}_3$ (ppm)							
	H-9	H-8/10	H-7/11	H-5	H-3	H-1	OH	$\text{NCH}_3$
H	7,79	7,62	7,68	7,81	8,17	8,46	8,76	4,52

- **Brometo de *N*-metil-3-óxido-5-fenilpiridínio *p*-substituídos **VIA****

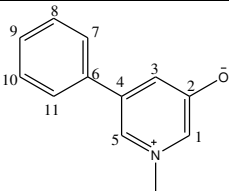
Para retirar o próton do grupo hidroxila, passamos o produto **VA** em uma resina de troca-iônica Amberlite IRA-400 - básica, previamente tratada com uma solução de NaOH 10%. Procedimento de fácil execução, porém deixava impurezas no produto.

Lembrando que o reagente desta etapa é o produto da reação anterior (composto **VA**), ou seja, já estava impuro.

Como o produto obtido era sólido, recristalizamos em meio de clorofórmio-éter etílico para purificá-lo. Ainda assim, o composto permaneceu impuro.

Novamente, devido à grande impureza do composto obtido, não foi possível realizar medida de ponto de fusão, análise elementar, e atribuir o espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$ . Realizamos apenas RMN de  $^1\text{H}$  (Tabela 9), cujo espectro está apresentado em anexo.

**Tabela 9.** Dados espectroscópicos para brometo 1-metil-3-óxido-5-fenilpiridínio *p*-substituídos **VIA**.

							
RMN de $^1\text{H}$ em $\text{D}_2\text{O}$ (ppm)							
Substituinte	H-9	H-8/10	H-7/11	H-5	H-3	H-1	$\text{NCH}_3$
H	7,80	7,85	7,76	7,85	7,88	8,18	4,38

- **Brometo de *N,N*-dimetilcarbamato de *N'*-metilpiridínio *p*-substituídos **VIIA****

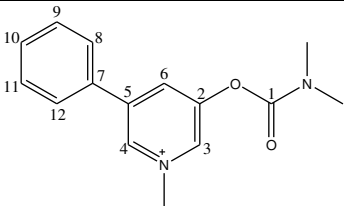
Com o objetivo de eliminar a etapa anterior (resina de troca-iônica), tentamos retirar o próton do grupo hidroxila adicionando ao reagente de partida  $\text{Na}^\circ$  ou  $\text{NaH}$ , porém a reação não ocorreu como prevíamos, pois como ambas as bases são fortes retiraram tanto o hidrogênio do grupo  $\text{OH}$ , bem como atacaram o anel piridínio, tentamos então com  $\text{NaHCO}_3$ , mas a força dessa base não foi suficiente para retirar o hidrogênio do grupo hidroxila. Procedemos então à reação de carbamoilação com o composto **VIA** impuro.

O produto foi extraído com éter etílico, porém estava impuro. A cada etapa reacional aumentava a porcentagem de impurezas. Tentamos vários procedimentos de purificação: recristalização, extração líquido-líquido, filtração, porém não obtivemos sucesso.



Com este composto também não foi possível realizar medida de ponto de fusão, análise elementar, e atribuir o espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$ . Realizamos apenas RMN de  $^1\text{H}$  (Tabela 10), que está apresentado em anexo.

**Tabela 10.** Dados espectroscópicos para o brometo de *N,N*-dimetilcarbamato de *N*'-metilpiridínio **VIIA**.

							
RMN de $^1\text{H}$ em $\text{CDCl}_3$ (ppm)							
Substituente	H-9/10/11	H-8/12	H-3	H-4	H-6	NCH <sub>3</sub>	
	N(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>						
H	7,38	7,43	8,67	7,71	8,42	4,64	3,39

### 5.1.2. Sínteses dos derivados do Edrofônio - rota B

Devido à dificuldade em aromatizar o anel piridínico (composto **VA**), e também em purificá-lo, resolvemos modificar um pouco a rota sintética e fazer redução do composto **IV**. Ao reduzi-lo, obtemos um composto derivado do fármaco edrofônio que, segundo a literatura<sup>35</sup>, apresenta atividade anticolinesterásica, sendo muito utilizado em hospitais da rede pública.

- **Brometo de 2,6-tetraidro-*N,N*-dimetil-3-hidroxi-5-fenilpiridínio *p*-substituído VB**

Existem vários agentes redutores eficazes para redução de cetonas a alcoóis, utilizamos NaBH<sub>4</sub>, um agente redutor capaz de reduzir aldeídos e cetonas, assim como os mais reativos derivados de ácidos carboxílicos, cloretos de acila e tio-ésteres, o uso deste redutor em condições reacionais mais suaves não irá reduzir ésteres, amidas, ou ácidos carboxílicos.

Por ser considerado um agente redutor fraco, quando colocamos em meio reacional com o composto **IV** (cetona) ocorreu apenas a redução do grupo carbonílico.

Os resultados e dados de RMN estão apresentados nas Tabelas 11 e 12.

**Tabela 11.** Rendimentos experimentais propriedades físicas e análise elementar para os brometos de 2,6-tetraidro-*N,N*-dimetil-3-hidroxi-5-fenilpiridínio **VB**.

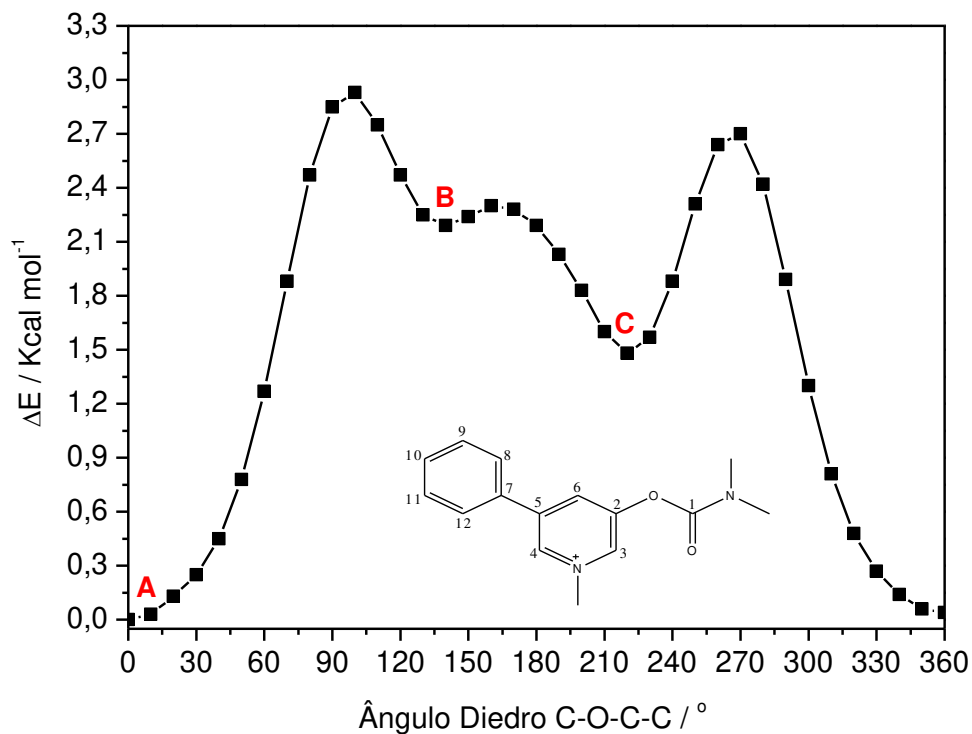
Substituinte	Ponto de Fusão (°C)	Rendimento Médio (%)	Fórmula Molecular	Análise Elementar %		IV (cm <sup>-1</sup> ) ν <sub>OH</sub>
				Calc.	Exper.	
H	223-226	80	C <sub>13</sub> H <sub>17</sub> NOBr	C=55,1	52,3	3229
				H=6,00	6,05	
				N=4,95	4,69	

**Tabela 12.** Deslocamentos químicos de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$ , correlações  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  em g-HSQC para o brometo de 2,6-tetraidro-*N,N*-dimetil-3-hidroxi-5-fenilpiridínio **VB** em  $\text{D}_2\text{O}$ .

C	$\delta(^1\text{H})$ (ppm)	$\delta(^{13}\text{C})$ (ppm)	gHSQC
1	3,69	63,7	H-1
1'	3,48	-	-
2	4,79	61,1	H-2
3	6,34	122,7	H-3
4	-	131,9	-
5	4,36	61,9	H-5
5'	4,25	-	-
6	-	136,1	-
7/11	7,39	129,1	H-7/11
8/10	7,39	125,8	H-8/10
9	7,39	129,3	H-9
$\text{N}(\text{CH}_3)_2$	3,24	53,1	H-( $\text{CH}_3$ ) <sub>2</sub>

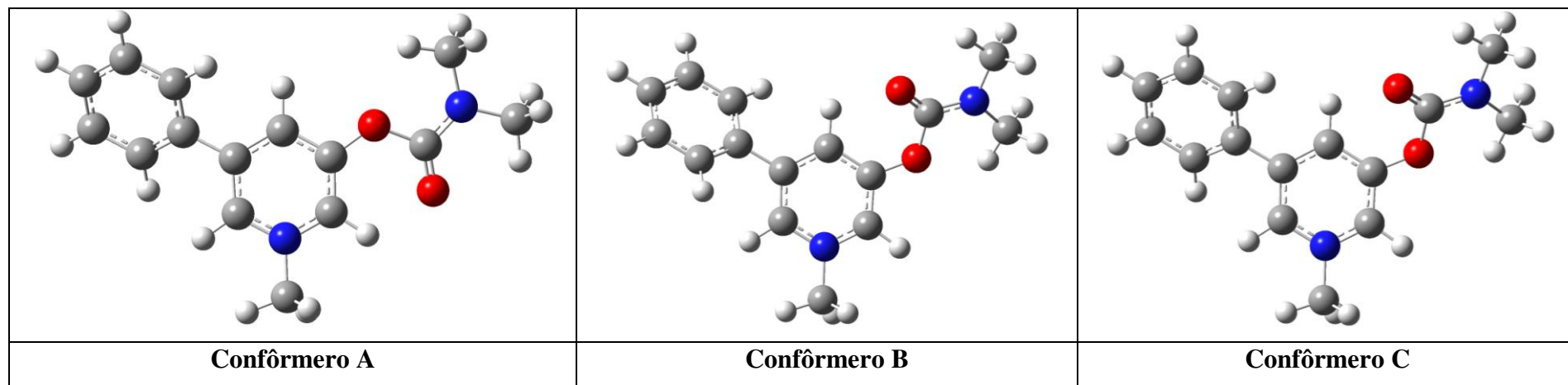
## 5.2. Cálculos Teóricos

Com a finalidade de investigar a conformação preferencial e a influência do substituinte, realizamos cálculos teóricos para a construção de curva de energia potencial 1D (Scan), variando o ângulo diedro  $\text{C}_1\text{-O-C}_2\text{-C}_3$  de  $0^\circ$  a  $360^\circ$ , otimizando a geometria da molécula a cada  $10^\circ$ , em nível teórico HF/6-31G. Obtemos assim um gráfico de energia em função do ângulo diedro, como mostra a Figura 8, para o brometo de *N,N*-dimetilcarbamato de *N'*-metilpiridínio **VIIA**.



**Figura 6.** Curva de energia potencial em nível teórico HF/6-31G para o composto **VIIA**.

Podemos avaliar pela Figura 8 que o composto **VIIA** apresenta três confôrmeros (Figura 9) de menor energia (A, B e C). Seleccionamos os mínimos na curva de energia potencial e sendo as geometrias e energias dessas conformações re-otimizadas em nível de teoria mais refinado, B3LYP/cc-pVDZ, com isso foi possível obter o comportamento conformacional para os compostos em estudo (Tabela 13).



**Figura 7.** Visualização das conformações mais estáveis para o derivado sem substituinte.

**Tabela 13.** Energia de otimização para os confômeros A, B e C para os brometos de *N,N*-dimetilcarbamato de *N*<sup>2</sup>-metilpiridínio *p*-substituídos **VIIA** em nível de teoria B3LYP/cc-pVDZ.

Substituinte	H		Cl		OMe		NO <sub>2</sub>	
	E (a.u.) <sup>a</sup>	ΔE <sup>b</sup>	E (a.u.)	ΔE <sup>b</sup>	E (a.u.)	ΔE <sup>b</sup>	E (a.u.)	ΔE <sup>b</sup>
<b>A</b>	-841,63339	0,00	-1301,24743	0,00	-956,16601	0,00	-1046,14239	0,00
<b>B</b>	-841,63091	1,56	-1301,24508	1,47	-956,16358	1,53	-1046,14013	1,42
<b>C</b>	-841,63179	1,01	-1301,24602	0,88	-956,16434	1,05	-1046,14106	0,83

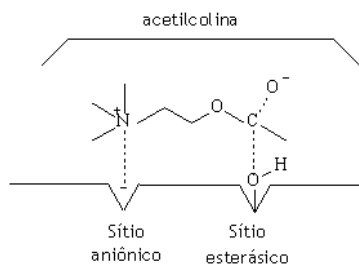
<sup>a</sup>1 a.u. = 627,51 Kcal mol<sup>-1</sup>; <sup>b</sup> Kcal mol<sup>-1</sup>

Através dos valores listados na Tabela 13 podemos observar que a conformação preferencial para todos os compostos (confômero A) possui o grupo carbonila do fragmento carbamato do mesmo lado do nitrogênio piridínico, enquanto que as outras duas conformações o grupo carbonila se encontra numa relação oposta ao nitrogênio piridínico. Podemos observar também que para todos os compostos a diferença de energia entre as conformações não sofrem grandes variações, ou seja, os substituintes (OMe, NO<sub>2</sub> e Cl) no anel aromático não exercem influência no comportamento conformacional das moléculas em estudo. Indicando que para o composto apresentar atividade biológica a presença desses substituintes não é significativo.

Outra informação importante que podemos obter dos cálculos é a relação geométrica entre os grupos responsáveis pela interação enzima-fármaco (nitrogênio piridínico e oxigênio carbonílico), sendo para fins dos nossos estudos essa enzima é a acetilcolinesterase, portanto os compostos em estudo são possíveis inibidores dessa enzima.

Além dos derivados carbamatos os quais foram estudados somente de forma teórica, o mesmo não ocorreu para o composto **VB**, o qual foi sintetizado, purificado, sua estrutura foi atribuída de forma inequívoca e sua atividade anticolinesterásica foi avaliada segundo o método de Ellman. Como mencionado anteriormente e relatado na literatura<sup>28</sup> os grupos responsáveis pela interação da acetilcolinesterase com o fármaco são: o nitrogênio do anel piridínio, e o oxigênio do carbamato ou do álcool. Sendo assim, quanto mais positivo estiver o nitrogênio piridínico, e quando mais negativo estiver ambos os oxigênios, mais eficaz será a interação do composto com a enzima de interesse.

Segundo a literatura,<sup>28</sup> a interação enzima-receptor será efetiva se a distância entre o nitrogênio e o oxigênio do carbamato for no máximo 4,4 Å, sendo que valores próximos a 4,4 Å são tidos como ideais. Por isso medimos essas distâncias nos confômeros preferenciais (Tabela 14). A interação da acetilcolina com a enzima está ilustrada na Figura 10.



**Figura 8.** Interação da acetilcolina com a enzima colinesterase.

**Tabela 14.** Distância entre os átomos N---O ( $r_{N...O}$ ) nos confôrmeros A, B e C para os brometos de *N,N*-dimetilcarbamato de *N*'-metilpiridínio *p*-substituído **VIIA**.

Confôrmeros			
Substituintes	A ( $r_{N...O}$ )	B ( $r_{N...O}$ )	C ( $r_{N...O}$ )
H	3,983	4,931	4,890
OMe	3,982	4,927	4,893
NO <sub>2</sub>	3,971	4,937	4,883
Cl	3,974	4,928	4,887

Podemos observar (Tabela 14) que para todos os derivados **VIIA** dentro da mesma conformação, a distância entre o nitrogênio e o oxigênio ( $r_{N...O}$ ) é aproximadamente a mesma, observamos também que em nenhuma das conformações a distância  $r_{N...O}$  é próxima daquela tida como adequada (até 4,4 Å) para a melhor interação enzima-receptor. Porém, pode ser observado que no caso do confôrmero A a distância média  $r_{N...O}$  é 0,422 Å menor que o valor de referência (4,4 Å), enquanto que a conformação B apresenta uma distância média 0,531 Å maior que o valor de referência e para a forma C esse valor é de

0,488 Å. Com base nesses valores podemos supor que a conformação A deve interagir como maior efetividade do que as conformações B e C. Esse resultado é muito interessante pois a conformação A é a mais estável dentre as três formas possíveis (Tabela 13), estando presente no equilíbrio conformação com 80 % da população em fase isolada.

Essas suposições são corroboradas pelos resultados tanto teóricos como experimentais para o derivado **VB** do edrofônio, para o qual foi observado atividade anticolinesterásica *in vitro* e os valores calculados de distância  $r_{N...O}$  é da ordem de 3.125 Å, o que reforça a teoria que valores de distância  $r_{N...O}$  menores que o ideal (4,4 Å) também interagem com a enzima.

Para melhor avaliação se existe mudança da densidade de carga nos átomos de nitrogênio e oxigênio responsáveis pela interação enzima-receptor foram realizados cálculos para obter as cargas desses átomos, empregando dois diferentes métodos, cargas de Mulliken e cargas naturais NBO. Os resultados para todos os confôrmeros e para todos os derivados mostraram valores muito próximos de densidade de carga sobre o nitrogênio e o oxigênio, indicando que os substituintes ligados ao anel aromático não exercem influência na distribuição da densidade de carga nos sítios de interações do substrato.

A ausência de efeito do grupo substituinte no anel aromático é observada para todos os parâmetros teóricos analisados nesse estudo, tais como diferença de energia entre os confôrmeros (Tabela 13), semelhança na distância interatômica ( $r_{N...O}$ ) (Tabela 14) e na densidade de carga sobre os átomos de nitrogênio e oxigênio.



### 5.3. Método de Ellman

Realizamos testes biológicos apenas com o composto que conseguimos obter puro, portanto, apenas com o derivado do edrofônio, composto **VB**. Para verificar a possível atividade anticolinesterásica optamos pela metodologia de Ellman.

Normalmente temos quantidades significativas da enzima acetilcolinesterase em nosso organismo. Segundo a literatura os valores de referência para paciente não exposto são:

Colinesterase Total: 4,5 - 7,0 UI/mL

Colinesterase Plasmática: 1,5 - 3,5 UI/mL

Colinesterase Eritrocitária: 2,6 - 4,1 UI/mL

Analisamos então, algumas pessoas saudáveis para sabermos se os valores médios destas enzimas no organismo condiziam com a literatura, valores médios estão descritos na Tabela 15, todas as análises foram realizadas em triplicata. As amostras utilizadas eram provenientes de material de descarte do Laboratório do Centro de Controle de Intoxicações – HC / UNICAMP, aprovados pelo comitê de ética, parecer do CEP: n° 496/2010.

**Tabela 15.** Valores de referência da atividade colinesterásica em doadores saudáveis.

Doadores saudáveis	ChE Total UI/mL	ChE Plasmática UI/mL	ChE Eritrocitária UI/mL
A	5,0	2,2	2,8
B	6,0	2,1	3,9
C	5,4	2,0	3,4
D	5,8	2,3	3,5
E	6,1	2,6	3,5

Primeiramente realizamos o teste padrão, utilizando Neostigmina para inibir a atividade colinesterásica, obtendo, por exemplo, para o paciente A os seguintes valores:

Colinesterase Total: 0,0 UI/mL

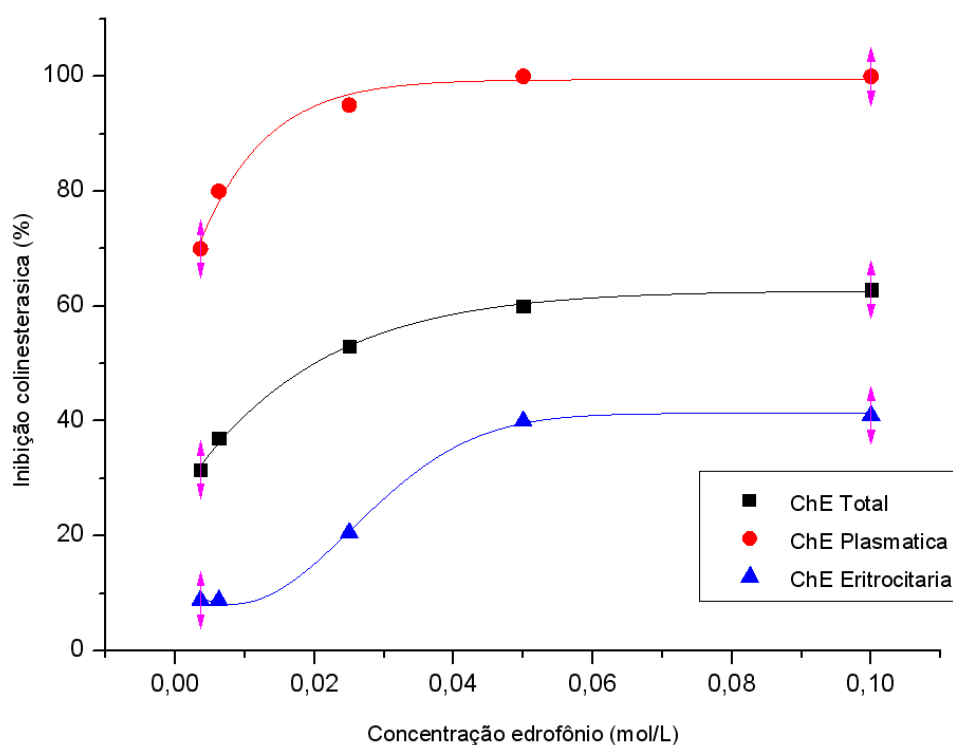
Colinesterase Plasmática: 0,0 UI/mL

Colinesterase Eritrocitária: 0,0 UI/mL

Para efeito de comparação e para nos certificarmos de que o teste não funcionaria apenas com compostos cujo grupo funcional fosse carbamatos, mas também com alcoóis, realizamos o teste adicionando edrofônio no lugar da neostigmina. Usualmente utiliza-se 50  $\mu$ L de neostigmina na concentração de 0,1 mol/L.

Realizamos testes com variadas concentrações de edrofônio e pelo Gráfico 2 verificamos que este fármaco não é tão eficaz quanto a neostigmina, pois na mesma concentração inibiu no máximo 62,9%, realizamos o teste em triplicata e este se reproduziu.

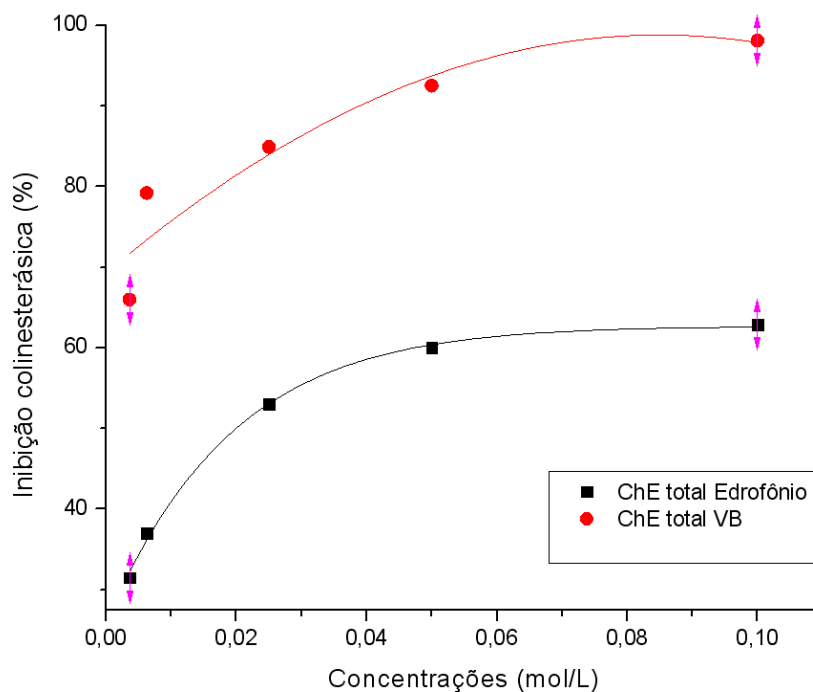
Como o composto em estudo é derivado do edrofônio, realizamos os testes comparando-o com o edrofônio, mas finalizando as reações com neostigmina, pois tínhamos certeza que esta inibia 100%.



**Gráfico 2.** Atividade colinesterásica total, plasmática e eritrocitária do edrofônio em diversas concentrações.

Com o método padronizado, começamos a testar o composto em estudo, ou seja, ao invés de finalizarmos a reação enzimática com a neostigmina, finalizamos-a com o composto **VB**, a fim de pesquisar se este seria capaz de inibir a enzima em questão. Todos os testes foram realizados em triplicata, e sempre comparados com o fármaco comercial edrofônio.

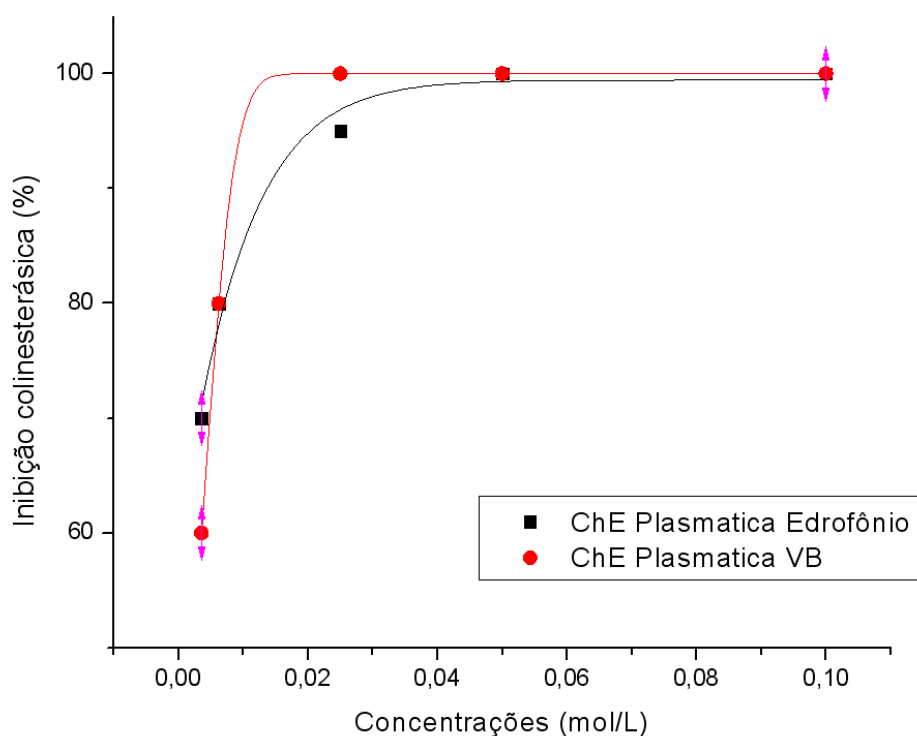
Primeiramente analisamos a inibição colinesterásica total, apresentada no Gráfico 2, e observamos que, o composto estudado apresenta melhor atividade de inibição comparado ao fármaco comercial, o composto inibe aproximadamente 100% na concentração de 0,1 mol/L, enquanto o edrofônio na mesma concentração inibe apenas 62,9 %.



**Gráfico 3.** Atividade colinesterásica total do edrofônio e do composto VB em diversas concentrações.

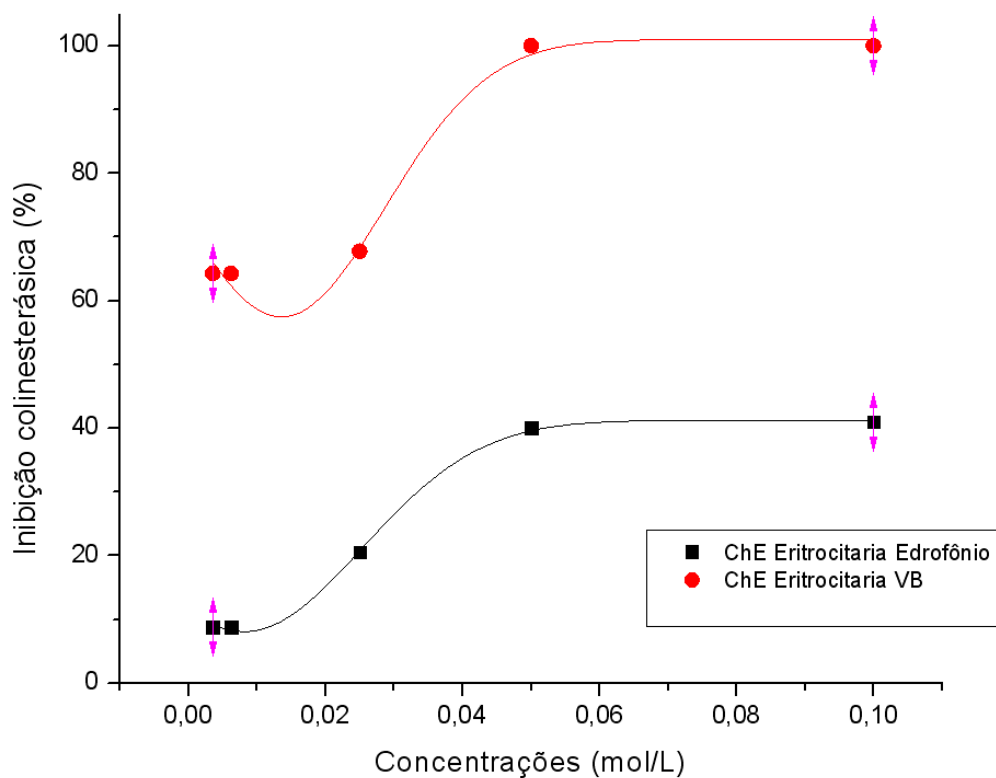
Entretanto 0,1 mol / L é considerado uma alta concentração podendo apresentar toxicidade ao paciente, mesmo assim, o composto em estudo, em menores concentrações, 0,05 mol/L apresenta atividade anticolinesterásica acima de 80%, sendo portanto, excelente candidato a anticolinesterásico.

Quando analisamos a atividade anticolinesterásica plasmática, Gráfico 3, observamos que o composto **VB** apresenta praticamente o mesmo comportamento que o fármaco comercial, em menores concentrações, 0,025 mol/L, inibem 100% a enzima butirilcolinesterase.



**Gráfico 4.** Atividade colinesterásica plasmática do edrofônio e do composto VB em diversas concentrações.

Avaliamos ainda a inibição da acetilcolinesterase, ou seja, colinesterase eritrocitária, e observamos novamente que o composto apresenta melhor atividade comparada ao fármaco comercial. Este conseguiu inibir 100% a enzima em uma concentração de 0,05 mol/L, já o edrofônio na concentração de 0,1 mol/L inibiu no máximo 40%.



**Gráfico 5.** Atividade colinesterásica eritrocitária do edrofônio e do composto VB em diversas concentrações.

## CONCLUSÕES

## 6. Conclusões

De acordo com as sínteses realizadas, observamos que os compostos **III**, foram facilmente preparados, sendo que o composto de substituinte Cl só se formou na ausência de luz, e o de substituinte NO<sub>2</sub> necessitou de temperaturas ainda menores para reagir.

Os espectros de RMN se mostraram uma importante ferramenta para a elucidação estrutural dos compostos estudados. Através desta técnica foi possível observar um sensível efeito dos substituintes nos deslocamentos químicos de <sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C para cada um dos derivados sintetizados.

Como não conseguimos obter o composto puro pela rota A, modificamos a rota sintética e tentamos outros derivados com possível atividade anticolinesterásica. A partir do composto **IV**, realizamos redução da carbonila e obtivemos assim um álcool com estrutura química semelhante ao fármaco comercial edrofônio, cuja atividade anticolinesterásica foi testada segundo método de Ellman.

Pelos resultados da inibição colinesterásica total, podemos observar que, o composto estudado apresenta melhor atividade de inibição comparada ao edrofônio. Avaliando a inibição colinesterásica plasmática, concluímos que, o composto **VB** apresenta praticamente o mesmo comportamento que o fármaco comercial, e através dos resultados de inibição colinesterásica eritrocitária, observamos que, o composto apresentou melhor atividade.

Pelos cálculos teóricos podemos observar que a conformação preferencial para todos os compostos (confôrmero A) possui o grupo carbonila do fragmento carbamato do mesmo lado do nitrogênio piridínico, enquanto que as outras duas conformações o grupo carbonila se encontra numa relação oposta ao nitrogênio piridínico. E que os substituintes (OMe, NO<sub>2</sub> e Cl) no anel aromático não exercem influência no comportamento

conformacional das moléculas em estudo. Indicando que para o composto apresentar atividade biológica a presença desses substituintes não é significativo.

Com base nos resultados teóricos podemos supor que a conformação A deve interagir como maior efetividade do que as conformações B e C. Esse resultado é muito interessante, pois a conformação A é a mais estável dentre as três formas possíveis, estando presente no equilíbrio conformação com 80 % da população em fase isolada.

Essas suposições são corroboradas pelos resultados tanto teóricos como experimentais para o derivado **VB** do edrofônio, para o qual foi observado atividade anticolinesterásica *in vitro* e os valores calculados de distância  $r_{N...O}$  é da ordem de 3.125 Å, o que reforça a teoria que valores de distância  $r_{N...O}$  menores que o ideal (4,4 Å) também interagem com a enzima.

Após sínteses e testes realizados, concluímos que o composto **VB** conseguiu inibir ambas as enzimas em concentrações menores que o composto atualmente utilizado, sendo, portanto, um ótimo candidato a anticolinesterásico.





## REFERÊNCIAS

## 7. Referências Bibliográficas

1. Oliveira, E.; Labra, M.; Bermudez, J. *Caderno de Saúde Pública*, Rio de Janeiro, 22, 2379, (2006).
2. Portela, A.S.; Leal, A.A.F.; Werner, R.P.B.; Simões, M.O.S.; Medeiros, A.C.D. *Revista de Ciências Farmacêuticas Básica Aplicada*, 31, 09, (2010).
3. [www.cbme.ifsc.usp.br/inovacao/panorama.php](http://www.cbme.ifsc.usp.br/inovacao/panorama.php) acessado em 07/04/2011.
4. Cagnin, M.A.H. *Revista Brasileira de Tecnologia*, 18, 10 (1987).
5. Médicos Sem Fronteiras. Desequilíbrio fatal: a crise em pesquisa e desenvolvimento de drogas para doenças negligenciadas; (2001).
6. [www.noticias.bol.uol.com.br](http://www.noticias.bol.uol.com.br) acessado em 07/04/2011.
7. [www.cartacapital.com.br](http://www.cartacapital.com.br) acessado em 07/04/2011.
8. Lourenço, J. *Nootrópicos*, 18, (2009).
9. Mehrani, H. *Process Biochemistry*, 39, 877, (2004).
10. Larini, L. *Toxicologia*, 2º Ed., Manolei, São Paulo, 41, 148, (1993).
11. Remião, F. *Toxicologia Mecanística*, Faculdade de Farmácia do Porto, Portugal, (2010).
12. Zanini, A.C.; Olga, S. *Farmacologia Aplicada*, Ateneu, São Paulo, 84, 167, (1994).
13. Wilson, I.B.; Hatch, M.A.; Ginsburg, S. *Journal Biology Chemistry*, 235, 2312, (1960).
14. Taylor, P. *In Goodman and Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics*, Macmillan: New York, Cap. 6, (1985).
15. Vieira, R.J.; Bucarechi, F.; Ricard, G.V.F. *Toxicologia dos Agroquímicos*, UNICAMP / CYANAMID; (1991).
16. Davis, K.L.; Mohs, R.C. *American Journal Psychiatry*, 139, 1421, (1982).
17. Mohanakumar, K.P.; Mitra, N.; Ganguly D. K. *Neuroscience Letters*, 120, 91, (1990).
18. Araújo, C.R.M.; Santana, C.S.T.; Silva, F.A.S.; Silva, W.C.; Lopes, C.B.; Silva, A.A.; e Imbroisi, D.O. Avanços sintéticos na obtenção de aminocarbamato, possível anticolinérgico, a partir do líquido da castanha de caju, Universidade Federal de Alagoas, (2008).
19. Xuereb, J.H.; Perry, E.K.; Candy, J M.; Bonham, J.R.; Perry, R.H.; Marshall, E. *Journal Neurology Sciences*, 99, 185, (1990).
20. Cardozo, M.G.; Kawai, T.; Imura, Y.; Sugimoto, H.; Yamanishi, Y.; Hopfinger, A.J. *Journal Medicinal Chemistry*, 35, 590, (1992).
21. Chen, Y.L.; Hedberg, K., *Bioorganic Medicinal Chemistry Letters*, 1, 4, (1991).

22. Sowell, J.W.; Tang, Y.; Valli, M.J.; Jr, J.M.C.; Visher, L.A.; Vaughan, C.M.; Kosh, J.W. *Journal Medicinal Chemistry*, 35, 1102 (1992).
23. Barbarini, J. E.; Rittner, R.; Höehr, N.F.; Suwinski, J. *Biorganic Chemistry*, 25, 37, (1997).
24. Rittner, R.; Barbarini, J.E. *Canadian Journal Analytical Sciences and Spectroscopy*, 43, 14, (1998).
25. Rittner, R.; Barbarini, J.E.; Höehr, N.F. *Canadian Journal Analytical Sciences and Spectroscopy*, 44, 180, (1999).
26. Rittner, R.; Barbarini, J.E. *Canadian Journal Analytical Sciences and Spectroscopy*, 45, 60, (2000).
27. Rittner, R.; Höehr, N.F.; Barbarini, J.E. *Pharmazie*, 56, 181, (2001).
28. Höehr, N. F. *Tese de Doutorado*, Instituto de Química, UNICAMP (1993).
29. Abdel-Aal, Y.A.I. *Biochemistry Pharmaceutical*, 26, 2187 (1977).
30. Banerjee, S.; Lien, E.J. *Pharmaceutical Research*, 7, 746 (1990).
31. Magee, P.S. *Quantitative Structure-Activity Relationships*, 9, 202 (1990).
32. Gearhart, J.M.; Jepson, G.W.; III, H.J.C.; Andersen, M.E.; Conolly, R.B. *Toxicology Applied Pharmaceutical*, 106, 295 (1990).
33. Sega, E.M.; Reis, A.K.C.A.; Rittner, R.; Olivato, P.R.; Carvalho, J.E.; Castilho, R.F.; Höehr, N.F. *Clinica Chimica Acta*, 389, 177, (2008).
34. Breyer-Pfaff, U. *Clinical Pharmacology & Therapeutics*, 37, 495 (1985).
35. Brenner, G.M. *Pharmacology*, Philadelphia, PA: W.B. Saunders Company, (2000).
36. Thomas, G. *Medicinal Chemistry: An Introduction*, Wiley: Chichester, (2000).
37. Wermuth, G.; Ganellin, C.R.; Lindberg, P.; Mitscher, L.A. *Pure and Applied Chemistry*, 70, 1129, (1998).
38. Grant G.H.; Richards W.G. *Computational Chemistry*, Ed., Oxford University Press Inc., New York, (1995).
39. Weinhold F.; Landis C.R. *Chemistry Education: Research and Practice in Europe*. Vol. 2. No 2, (2001).
40. Wiectzycoski, F.; Basso, E.A. *Journal Molecular Structure*, 657, 191, (2003).
41. Hehre W.J. *A Guide to Molecular Mechanics and Quantum Chemical Calculations*, Wavefunction Inc., Irvine, CA., USA, (2003).
42. Politzer, P.; Truhlar, D.G. *Chemical Application of Atomic and Molecular Electrostatic Potentials*, Plenum Press: New York, (1981).

43. Villar, J.D.F. *Aspectos Quânticos da Ressonância Magnética Nuclear*, RJ, (2000).
44. Donoso, J.P. *Ressonância Magnética Nuclear*, Instituto de Física de São Carlos – IFSC.
45. Gil, V.M.S.; Geraldês, C.F.G.C. *Ressonância Magnética Nuclear*, 1<sup>a</sup> edição, Lisboa, (1987).
46. Simpson, J.H. *Organic Structure Determination*, Massachusetts Institute of Technology Cambridge, Massachusetts, (2008).
47. Croasmun, W.R.; Carlson, R.M.K. *Two- Dimensional NMR Spectroscopy*; VCH, New York, (1994).
48. Sanders, J.K.M.; Constable, E.C.; Hunter, B.K. *Modern NMR Spectroscopy*, Oxford, New York, (1989).
49. Derome, A.E.; *Modern NMR Techniques for Chemistry Research*; Pergamon; Oxford, (1987).
50. Oschkinat, H.; Müller, T.; Dieckmann, T.; *Angewandte Chemie, Int. Ed. Engl.*, 33, 277, (1994).
51. Braum, S.; Kalinowski, H.O.; Berger, S. *100 and More Basic NMR Experiments*; VCH; Weinheim, (1996).
52. Breitmaier, E.; Voelter, W. *Carbon-13 NMR Spectroscopy*, Weinheim, (1987).
53. Silverstein, R.M.; Bassler, G.C.; Morrill, T.C. *Spectrometric Identification of Organic Compounds*, New York, (1995).
54. Barfield, M.; Chakrabarti, B. *Chemical Reviews*, 69, 757, (1969).
55. Sanders, J.K.M.; Mersh, J.D. *Progress in Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy*, 15, 353, (1983).
56. Friebolin, H. *Basic one and two-dimensional NMR spectroscopy*, 2 ed., Weinheim: VCH, (1993).
57. Bax, A., Summers, M.F. *Journal of the American Chemical Society*, 108, 2093, (1986).
58. Worek, F.; Mast, U.; Kiderlen, D.; Diepold, C.; Eyer, P. *Clinica Chimica Acta*, 288, 73, (1999).
59. Ellman, G.L.; Courtney, K.D.; Andres, V.; Featherstone, R.M., *Biochemical Pharmacology*, 7, 88 (1961).
60. Contreras, R.H.; Gotelli, G.; Ducati, L.C. ; Barbosa, T.M. ; Tormena, C.F. *The Journal of Physical Chemistry.*, 114, 1044, (2010).
61. Vilcachagua, J.D.; Ducati, L.C.; Rittner, R.; Contreras, R.H.; Tormena, C.F. *The Journal of Physical Chemistry.*, 115, 1272, (2011)

ANEXOS



CEP, 22/06/10  
(Grupo III)

**PARECER CEP:** Nº 496/2010 (Este nº deve ser citado nas correspondências referente a este projeto).  
**CAAE:** 0380.0.146.000-10

### **I - IDENTIFICAÇÃO:**

**PROJETO: “ESTUDOS DAS PROPRIEDADES BIOLÓGICAS DE COMPOSTOS COM POTENCIAL ATIVIDADE ANTICOLINESTERÁSICA: CARBAMATOS DERIVADOS DA PIRIDINA”.**

**PESQUISADOR RESPONSÁVEL:** Gláucia Melina Squizato Pinheiro

**INSTITUIÇÃO:** Hospital das Clínicas/UNICAMP

**APRESENTAÇÃO AO CEP:** 05/06/2010

**APRESENTAR RELATÓRIO EM:** 22/06/11 (O formulário encontra-se no *site* acima).

### **II - OBJETIVOS**

Síntese de carbamatos derivados da piridostigmina e investigação quanto à sua atividade anticolinesterásica e dose letal.

### **III - SUMÁRIO**

Estudo monocêntrico em que serão efetuadas sínteses de compostos e avaliação de suas propriedades físico-químicas bem como atividade anticolinesterásica e dose letal, através de estudos espectroscópicos, RMN, cálculos de densidade de carga e ensaios biológicos. A determinação da dose letal e a medida da inibição da atividade da acetilcolinesterase serão efetuadas pelo método de Ellman e também utilizando enzima de eritrócitos bovinos. Os testes biológicos envolvem também material biológico humano a ser obtido de sangue de descarte, não envolvendo pacientes.

### **IV - COMENTÁRIOS DOS RELATORES**

Projeto encontra-se muito bem estruturado e detalhado. Foi apresentado o orçamento do projeto de pesquisa, bem como solicitação de dispensa do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, devidamente justificada.

## V - PARECER DO CEP

O Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP, após acatar os pareceres dos membros-relatores previamente designados para o presente caso e atendendo todos os dispositivos das Resoluções 196/96 e complementares, resolve aprovar sem restrições o Protocolo de Pesquisa, a dispensa do Termo do Consentimento Livre e Esclarecido, bem como todos os anexos incluídos na pesquisa supracitada.

O conteúdo e as conclusões aqui apresentados são de responsabilidade exclusiva do CEP/FCM/UNICAMP e não representam a opinião da Universidade Estadual de Campinas nem a comprometem.

## VI - INFORMAÇÕES COMPLEMENTARES

O sujeito da pesquisa tem a liberdade de recusar-se a participar ou de retirar seu consentimento em qualquer fase da pesquisa, sem penalização alguma e sem prejuízo ao seu cuidado (Res. CNS 196/96 – Item IV.1.f) e deve receber uma cópia do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, na íntegra, por ele assinado (Item IV.2.d).

Pesquisador deve desenvolver a pesquisa conforme delineada no protocolo aprovado e descontinuar o estudo somente após análise das razões da descontinuidade pelo CEP que o aprovou (Res. CNS Item III.1.z), exceto quando perceber risco ou dano não previsto ao sujeito participante ou quando constatar a superioridade do regime oferecido a um dos grupos de pesquisa (Item V.3.).

O CEP deve ser informado de todos os efeitos adversos ou fatos relevantes que alterem o curso normal do estudo (Res. CNS Item V.4.). É papel do pesquisador assegurar medidas imediatas adequadas frente a evento adverso grave ocorrido (mesmo que tenha sido em outro centro) e enviar notificação ao CEP e à Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA – junto com seu posicionamento.

Eventuais modificações ou emendas ao protocolo devem ser apresentadas ao CEP de forma clara e sucinta, identificando a parte do protocolo a ser modificada e suas justificativas. Em caso de projeto do Grupo I ou II apresentados anteriormente à ANVISA, o pesquisador ou patrocinador deve enviá-las também à mesma junto com o parecer aprovatório do CEP, para serem juntadas ao protocolo inicial (Res. 251/97, Item III.2.e).

Relatórios parciais e final devem ser apresentados ao CEP, de acordo com os prazos estabelecidos na Resolução CNS-MS 196/96.

## VII – DATA DA REUNIÃO.

Homologado na VI Reunião Ordinária do CEP/FCM, em 22 de junho de 2010.

  
**Prof. Dr. Carlos Eduardo Steiner**  
PRESIDENTE do COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA  
FCM/UNICAMP





## Trends in Organic Chemistry

### Complete assignment of $^1\text{H}$ and $^{13}\text{C}$ NMR spectra of some *p*-substituted 1,2,3,6-tetrahydro-5-phenyl-1,1-dimethyl-3-oxo-pyridinium bromides

Glaucia M.S. Pinheiro,<sup>1</sup> Roberto Rittner,<sup>2</sup> Francisco P. Santos,<sup>2</sup> Claudio F. Tormena<sup>2</sup> and Nelci F. Höehr<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of Clinical Pathology, Faculty of Medical Sciences, State University of Campinas, POB 6111, 13083-970, Campinas, SP, Brazil

<sup>2</sup>Physical Organic Chemistry Laboratory, Chemistry Institute, State University of Campinas, Caixa Postal 6154, 13084-971, Campinas, SP, Brazil

#### ABSTRACT

Some 1,2,3,6-tetrahydro-5-(4'-substituted)phenyl-1,1-dimethyl-3-oxo-pyridinium bromides were synthesized from the commercially available *p*-substituted phenacyl bromides and *N,N*-dimethyl-aminoacetone. The acetophenones were converted in the corresponding phenacyl bromides, which by treatment with *N,N*-dimethylaminoacetone gave nitrogen quaternary salts, which were turned in the 3-oxopyridinium bromides using sodium hydroxide, followed treatment with hydro-bromidric acid, in good yields. All compounds were fully characterized by  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  NMR spectral data and elemental analysis. The main goal for the synthesis of these intermediates is their further application in the synthesis of pyridostigmine derivatives, since pyridostigmine itself is widely used in the treatment of *myasthenia gravis*, and of Parkinson's and Alzheimer's diseases due to its AChE activity.

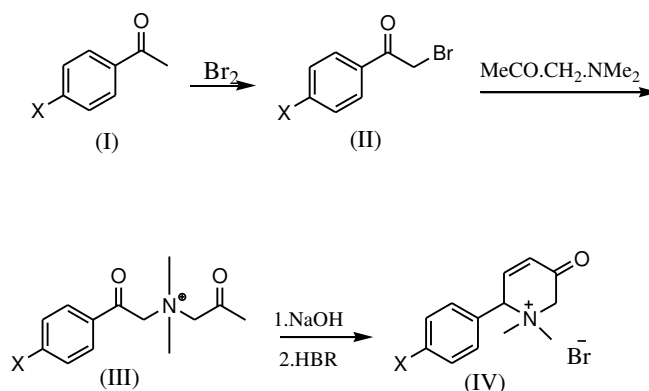
**KEYWORDS:** 3-oxo-pyridinium bromides, pyridostigmine precursors, AChE inhibitors.

#### INTRODUCTION

The behaviour exhibited by a given drug, involving its interactions with proteins and enzymes in the organism, is related to its physicochemical properties such as molecular geometry, electronic and steric effects [1-3].

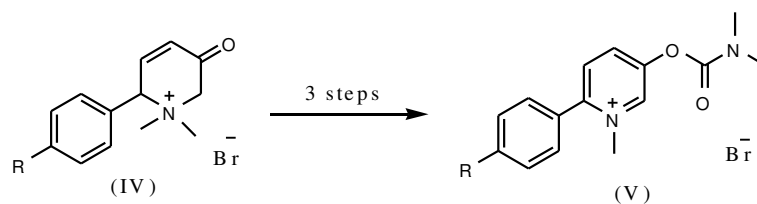
Pyridine derivatives are widely used as drugs. A typical example is pyridostigmine bromide, which has been used for a long time in the treatment of *myasthenia gravis*, and of Parkinson's and Alzheimer's diseases [1]. Several carbamates as derivatives of neostigmine [4,5] and of pyridostigmine [6] have been synthesized and their anticholinesterasic activities analyzed. Neostigmine derivatives as well as their intermediates have been fully characterized by their NMR spectral data [7-9]. NMR data for some phenacyl bromides and for their quaternary salts, have also been reported [10,11].

Thus, this paper describes the synthesis of some 1,2,3,6-tetrahydro-5-phenyl-1,1-dimethyl-3-oxo-pyridinium bromides through the reactions presented in Scheme 1.



**Scheme 1** – Synthesis of 3-oxo-pyridinium derivatives.

It is also presented a comprehensive study of MR data for all compounds described in this paper. They were recently synthesized and their NMR data were assigned using 2D HSQC and HMBC experiments. These 3-oxo-pyridinium bromides (IV) are important intermediates in the synthesis of pyridostigmine derivatives (V) (Scheme 2).



**Scheme 2** – Synthesis of pyridostigmine derivatives.

## EXPERIMENTAL SECTION

### General Procedures

Melting points were determined on a Fisher Scientific apparatus. IR spectra were recorded on a Perkin-Elmer FTIR-1600 or FTIR 1605. Elemental analyses were carried out on a Perkin-Elmer 2400 CHN standard analyzer.

$^1\text{H}$  NMR and  $^{13}\text{C}$  NMR spectra were recorded on a Bruker DPX-250 spectrometer operating at 250.13 MHz and 62.90 MHz, respectively, at 21°C, using  $\text{CDCl}_3$  and  $\text{D}_2\text{O}$  as solvents and referenced to TMS. The chemical shifts assignments were made using the 2D gHSQC [12] and gHMBC [13] experiments to distinguish both methylene protons and the corresponding carbon atoms. These experiments were performed on a Bruker AvanceIII-300 spectrometer operating at 300 MHz for  $^1\text{H}$  at 298 K,

### Compounds

#### ***N*-acetyl-*N,N*-dimethyl-*N*-(4-substituted) phenacylamonium bromides (III).**

A solution of the *p*-substituted phenacyl bromide (II) (0.01 mol) in diethyl ether (10 mL) was added, dropwise, *N,N*-dimethylaminoacetone (0.01 mol). The mixture was stirred at 0 °C for 7 h. The solvent was evaporated under reduced pressure and the solid residue was extracted with hot water and filtered and dried under reduced pressure to yield the quaternary salt.

#### ***N*-acetyl-*N,N*-dimethyl-*N*-phenacylamonium bromide (IIIa).**

Yield 95 %, m.p. 155-157 °C (Lit. [14] 155 °C). (Found: C, 52.3; H, 6.1; N, 4.7.  $\text{C}_{13}\text{H}_{18}\text{NO}_2\text{Br}$  requires C, 52.0; H, 6.0; N, 4.7%).

#### ***N*-acetyl-*N,N*-dimethyl-*N*-(4-methoxy) phenacylamonium bromide (IIIb).**

Yield 70 %, m.p. 159-161 °C (Lit. [14] 145-146 °C). (Found: C, 50.5; H, 6.0; N, 4.2.  $\text{C}_{14}\text{H}_{20}\text{NO}_3\text{Br}$  requires C, 50.9; H, 6.1; N, 4.2%).

#### ***N*-acetyl-*N,N*-dimethyl-*N*-(4-nitro) phenacylamonium bromide (IIIc).**

Yield 50 %, m.p. 162-166 °C (Lit. [14] 163-165 °C). (Found: C, 45.4; H, 5.1; N, 8.2.  $\text{C}_{13}\text{H}_{17}\text{N}_2\text{O}_4\text{Br}$  requires C, 45.2; H, 4.9; N, 8.1%).

***N*-acetyl-*N,N*-dimethyl-*N*-(4-chloro) phenacylamonium bromide (IIIId).**

Yield 50 %, m.p. 166-171 °C. (Found: C, 46.6; H, 5.1; N, 4.2. C<sub>13</sub>H<sub>17</sub>NO<sub>2</sub>BrCl requires C, 46.6; H, 5.1; N, 4.2%).

***N*-acetyl-*N,N*-dimethyl-*N*-(4-bromo) phenacylamonium bromide (IIIe).**

Yield 81 %, m.p. 182-185 °C. (Found: C, 40.3; H, 4.4; N, 3.2. C<sub>13</sub>H<sub>17</sub>NO<sub>2</sub>Br<sub>2</sub> requires C, 41.2; H, 4.5; N, 3.7%).

**1,2,3,6-tetrahydro-5-(4'-substituted)phenyl-1,1-dimethyl-3-oxo-pyridinium bromides (IV)**

*N*-acetyl-*N,N*-dimethyl-*N*-phenacylamonium bromides (III). (0.01 mol) was added, under stirring, to a solution of NaOH (2 mol L<sup>-1</sup>) and the mixture was maintained at -10 °C for 24 h. After this time, it was added 1 mL of HBr 48 %, the precipitate was filtered and recrystallized with ethanol-diethyl ether solution giving the product IV.

**1,2,3,6-tetrahydro-5-phenyl-1,1-dimethyl-3-oxo-pyridinium bromide (IVa)**

Yield 65 %, m.p. 198-199 °C (Lit. [15] 199-200 °C). (Found: C, 54.7; H, 5.3; N, 4.9. C<sub>13</sub>H<sub>16</sub>NOBr requires C, 53.3; H, 5.9; N, 5.2%).

**1,2,3,6-tetrahydro-5-(4'-methoxy)phenyl-1,1-dimethyl-3-oxo-pyridinium bromide (IVb)**

Yield 61 %, m.p. 198-200 °C (Lit. [15] 199-200 °C). (Found: C, 53.4; H, 5.9; N, 4.7. C<sub>14</sub>H<sub>18</sub>NO<sub>2</sub>Br requires C, 52.0; H, 6.0; N, 4.6%).

**1,2,3,6-tetrahydro-5-(4'-nitro)phenyl-1,1-dimethyl-3-oxo-pyridinium bromide (IVc)**

Yield 25 %, m.p. 210-215 °C (Lit. [15] 195-197 °C); (Found: C, 47.9; H, 4.9; N, 8.3. C<sub>13</sub>H<sub>15</sub>N<sub>2</sub>O<sub>3</sub>Br requires C, 45.7; H, 4.7; N, 8.9%).

**1,2,3,6-tetrahydro-5-(4'-chloro)phenyl-1,1-dimethyl-3-oxo-pyridinium bromide (IVd)**

Yield 50 %, m.p. 215-218 °C. (Found: C, 49.5; H, 4.8; N, 4.7. C<sub>13</sub>H<sub>15</sub>NOBrCl requires C, 47.3; H, 4.9; N, 4.6%).

**1,2,3,6-tetrahydro-5-(4'-bromo)phenyl-1,1-dimethyl-3-oxo-pyridinium bromide (IVe)**

Yield 62 %, m.p. 212-213 °C. (Found: C, 42.7; H, 4.2; N, 3.9. C<sub>13</sub>H<sub>15</sub>NOBr<sub>2</sub> requires C, 43.2; H, 4.1; N, 3.8%).

## Results and Discussion

Although the *p*-substituted phenacyl bromides (II) were commercially available, they were prepared whenever necessary from the corresponding *p*-substituted acetophenones (I) (Scheme 1). The reaction of

the *N,N*-dimethylaminoacetone, also commercially available, with the phenacyl bromides yielded the quaternary salts, the *N*-acetyl-*N,N*-dimethyl-*N*-(4-substituted)phenacyl-amonium bromides (**III**). In the following step these quaternary salts were converted to the cyclic pyridinium derivatives (**IV**), which were obtained in good yields (Scheme 1).

The corresponding data for the synthesized compounds, *i.e.* their melting points and elemental analyses were included in the Experimental Section. Infrared data for both carbonyl groups and <sup>1</sup>H NMR data for the quaternary salts (**III**) are given in Table 1. The corresponding data for the pyridinium derivatives (**IV**), are presented, in Table 2 and the <sup>13</sup>C NMR data for the later compounds in Table 3, both in CDCl<sub>3</sub>. The aromatic carbon atom signals were assigned by comparison with empirically calculated values [16].

The carbonyl carbon chemical shift was almost independent on the substituent at the aromatic ring, changing in the range 189.1 to 191.7 ppm.

**Table 1.** Infrared data and <sup>1</sup>H NMR chemical shifts for *p*-substituted *N*-acetyl-*N,N*-dimethyl-*N*-phenacylamonium bromides (**III**).

Substituent	IR cm <sup>-1</sup>		<sup>1</sup> H NMR in CDCl <sub>3</sub> (ppm)							
	ν <sub>C=O(C7)</sub>	ν <sub>C=O(C10)</sub>	H-1	H-2,6	H-3,5	H-8	H-9	H-11	H-12	H-X
H	1694	1727	7.59	7.44	7.97	5.51	5.89	2.21	3.73	-
MeO	1677	1739	-	6.95	8.05	5.78	5.53	2.28	3.80	3.87
NO <sub>2</sub>	1698	1737	-	8.23	8.37	5.65	4.95	1.95	3.52	-
Cl	1694	1723	-	7.47	8.02	5.98	5.55	2.31	3.81	-
Br	1680	1710	-	7.21	7.41	4.95	4.60	1.80	3.10	-

However, these compounds were not very soluble in CDCl<sub>3</sub> to allow a more careful and unequivocal assignment and to avoid the superposition of some signals. Therefore, the spectra for compounds **IVa** to **IVd** were also recorded in D<sub>2</sub>O for some 2D experiments. The data for these experiments are presented in Tables 4-7, which show the information for the chemical shifts assignments. These results allowed a definite assignment for the methylene hydrogen and carbon atoms, which were apart by only *ca.* 0.6 ppm and 4 ppm, respectively, and there were no models which could be used for comparison. However, it is

interesting to note that their chemical shifts are very similar to their precursors and are in the same order ( $\delta_{C-2} > \delta_{C-6}$ ) [11].

The chemical shift data of the spectra in D<sub>2</sub>O are in close agreement with the corresponding data in CDCl<sub>3</sub>.

**Table 2.** Infrared data and <sup>1</sup>H NMR chemical shifts for p-substituted 1,2,3,6-tetrahydro-5-phenyl-1,1-dimethyl-3-oxo-pyridinium bromides (IV).

Substituent	IR cm <sup>-1</sup> ν <sub>C=O</sub>	<sup>1</sup> H NMR in D <sub>2</sub> O (ppm)					
		H-8/12	H-9/11	H-2	H-6	H-4	N(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>
H	1659	7.65	7.65	4.60	5.10	7.05	3.65
MeO	1650	7.90	7.35	4.18	5.08	7.20	3.80
NO <sub>2</sub>	1618	8.29	7.73	4.40	5.00	6.90	3.50
Cl	1674	7.70	7.90	4.54	5.18	7.16	3.50
Br	1670	7.35	7.60	4.35	4.90	6.08	3.50

## CONCLUSION

In this paper, it was described a synthetic route to some interesting 3-oxopyridinium bromides derivatives, in very good yields, which are important precursors for pyridostigmine derivatives. The compounds described here were fully characterized through their physical and spectroscopic properties.

## ACKNOWLEDGEMENTS

The authors are grateful to Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) for financial support of this research, and to CNPq for a scholarship (to G.M.S.P.) and for fellowships (to R.R. and N.F.H.).

## REFERENCES

1. Recanatini, M., Cavalli, A., Hansch, C. 1997, *Chem. Biol. Interact.*, **105**, 199-228.
2. Abdel-Aal, Y. A. 1977, *Biochem. Pharmacol.*, **26**, 2187-2189.
3. Cardozo, M. G., Kawai, T., Iimura, Y., Sugimoto, H., Yamanashi, Y., Hopfinger, A. J. 1992, *J. Med. Chem.*, **35**, 584-589.
4. Barbarini, J. E., Höehr, N. F., Rittner, R., Suwinski, J. 1997, *Bioorg. Chem.*, **25**, 37-41.
5. Rittner, R., Höehr, N. F., Barbarini, J. E. *Pharmazie*. 2001, **56**, 181-182.
6. Santos, C. D. 1995, MSc Thesis. Chemistry Institute, State University of Campinas, Campinas, SP.
7. Rittner, R., Barbarini, J. E. *Can. J. Anal. Sci. Spectrosc.* 1998, **43**, 14-18.
8. Rittner, R., Barbarini, J. E., Höehr, N. F. 1999, *Can. J. Anal. Sci. Spectrosc.*, **44**, 180-186.
9. Rittner, R., Barbarini, J. E. 2000, *Can. J. Anal. Sci. Spectrosc.*, **45**, 60-65.
10. Fujiwara, F. Y., Rittner, R., Freire, H. R. 1984, *Org. Magn. Reson.*, **22**, 199-199.
11. Grandjean, J., Laszlo, P., Canto, E. L., Rittner, R. 1989, *Magn. Reson. Chem.*, **27**, 1104-1105.
12. Bodenhausen G., Ruben, D. J., 1980, *Chem. Phys. Lett.*, **69**: 185.
13. Wilker, W., Leibfritz, D., Kerssebaum, R. Bermel, W., 1993, *Magn. Reson. Chem.*, **31**, 287.
14. Freire, A. Ph D Thesis, 1982, Universidade Estadual de São Paulo.
15. Dennis, N., Katritzky, A. R., Rittner, R., 1976, *J. Chem. Soc. Perkin Trans 1.*, 2329-2334.
16. Breitmaier, E; Voelter, W. 1987, *Carbon-13 NMR Spectroscopy*; VCH: Weinheim, Germany, p. 319-320.





File # 1 : H

Mode = 2 (Mid-IR)

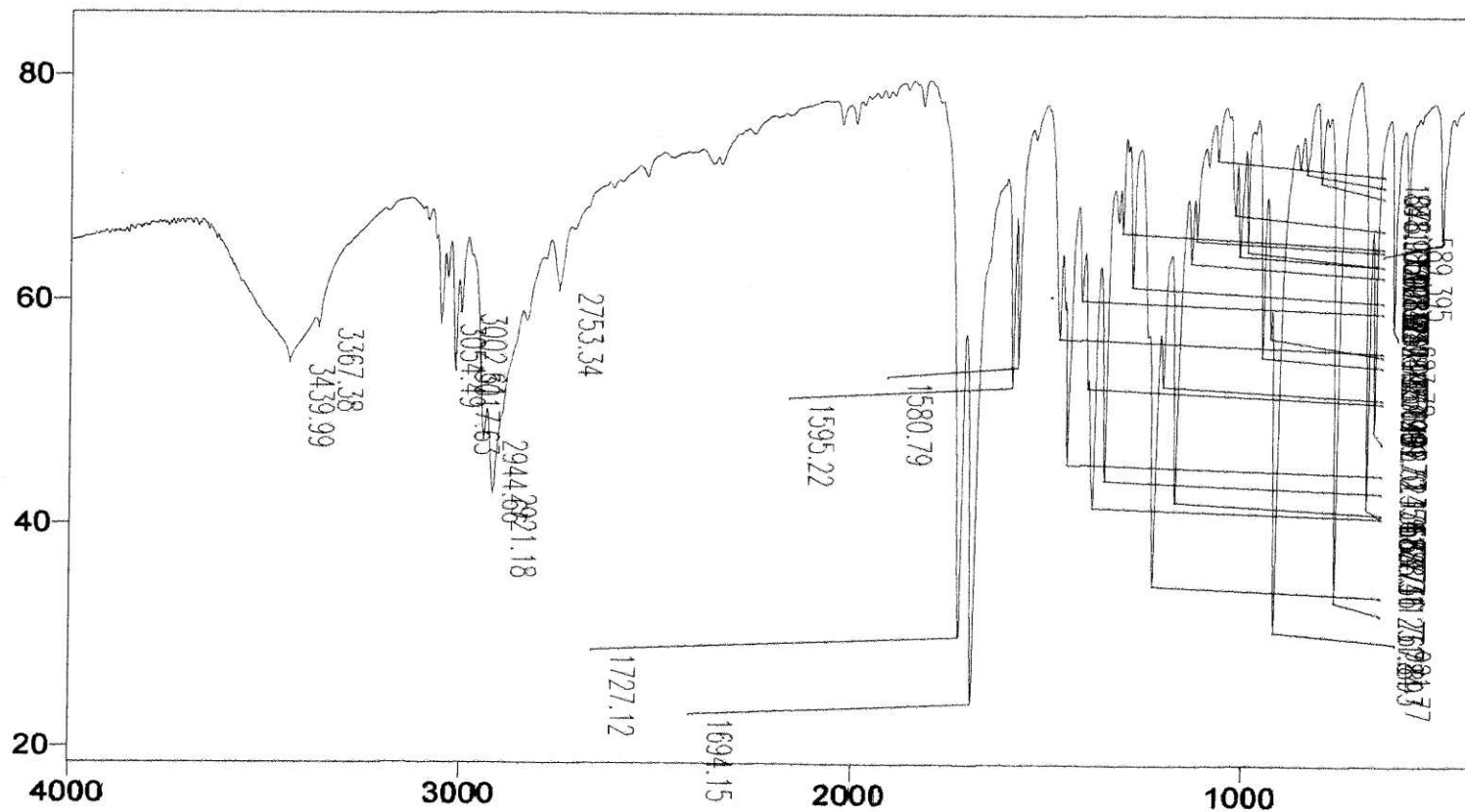
8/30/10 2:49 PM

Sample Description: KBr Glauca

Scans = 16

Res = 4 cm<sup>-1</sup> 22 scans/min

Apod = Cosine



Anexo 1. Espectro no Infravermelho pra o brometo de *N*-acetoniil-*N,N*-dimetil-*N*-fenacilamônio (III).

File # 2 : MEO

Mode = 2 (Mid-IR)

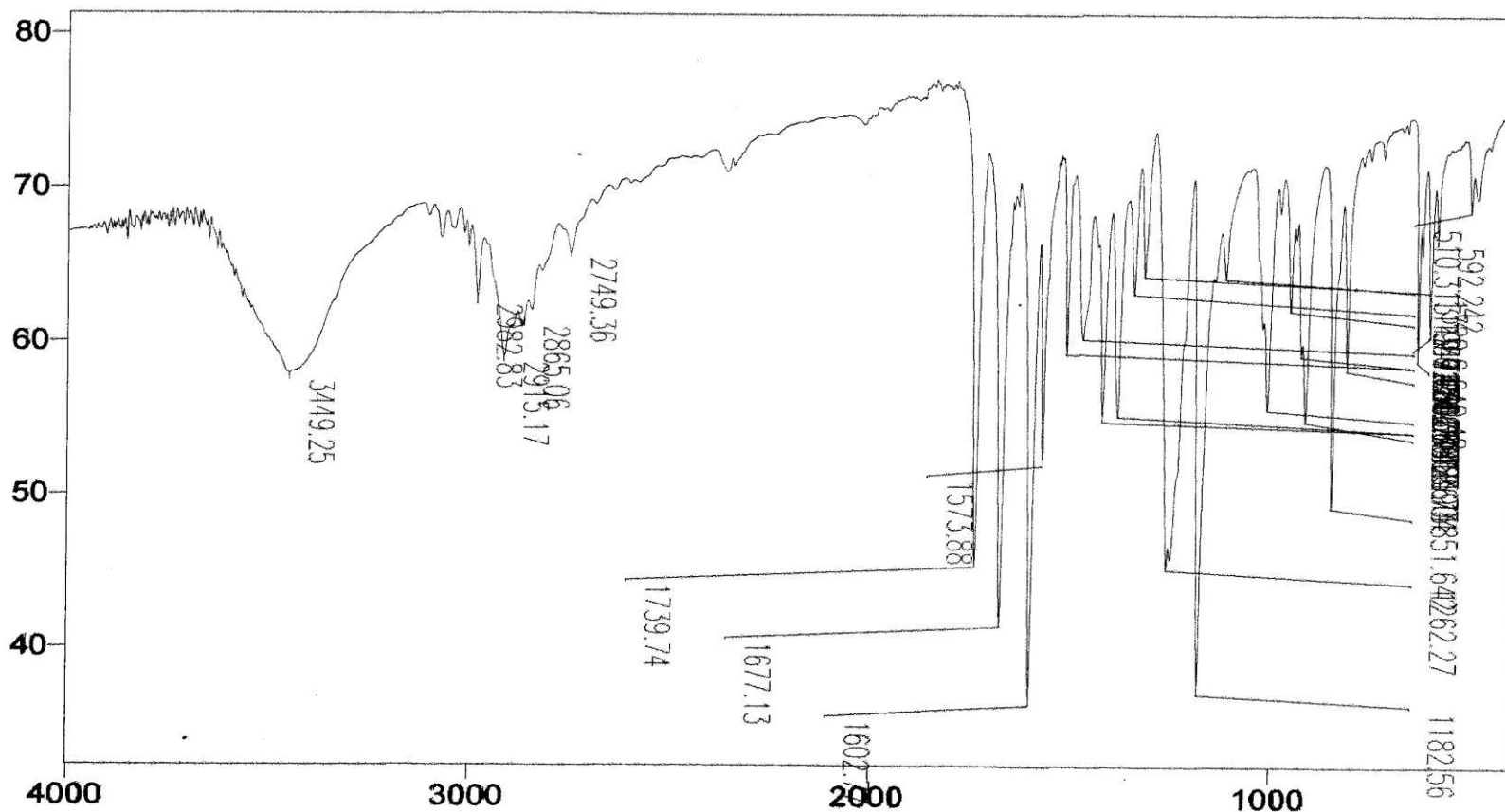
8/30/10 2:46 PM

Sample Description: KBr Glauca

Scans = 16

Res = 4 cm<sup>-1</sup> 19 scans/min

Apod = Cosine



Anexo 2. Espectro no Infravermelho pra o brometo de *p*-metoxi *N*-acetoni-*N,N*-dimetil-*N*-fenacilamônio (III).

File # 3 : NO2

Mode = 2 (Mid-IR)

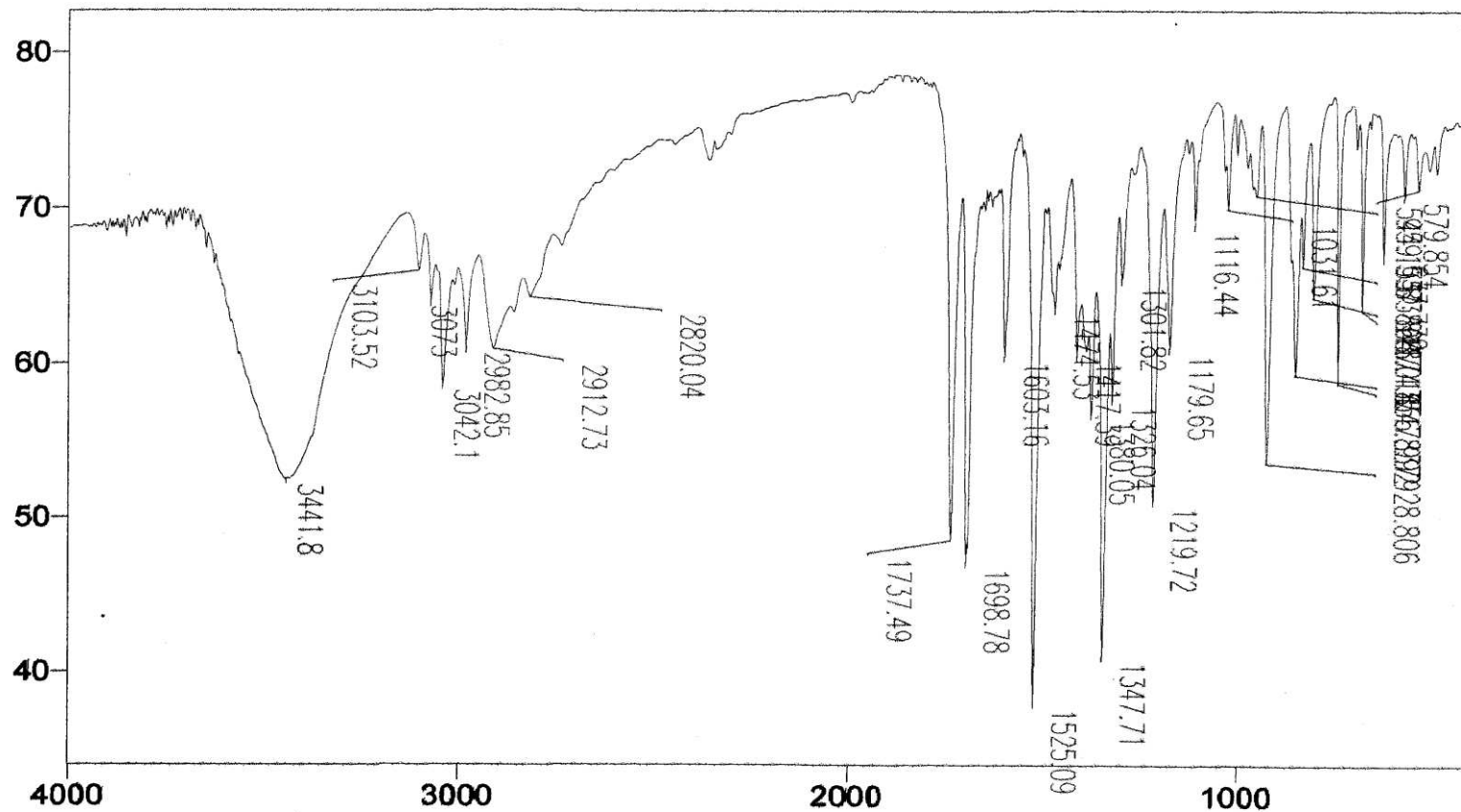
8/30/10 2:43 PM

Sample Description: KBr Glauca

Scans = 16

Res = 4 cm<sup>-1</sup> 20 scans/min

Apod = Cosine



Anexo 3. Espectro no Infravermelho pra o brometo de *p*-nitro *N*-acetonil-*N,N*-dimetil-*N*-fenacilamônio (III).

File # 1 : CL

Mode = 2 (Mid-IR)

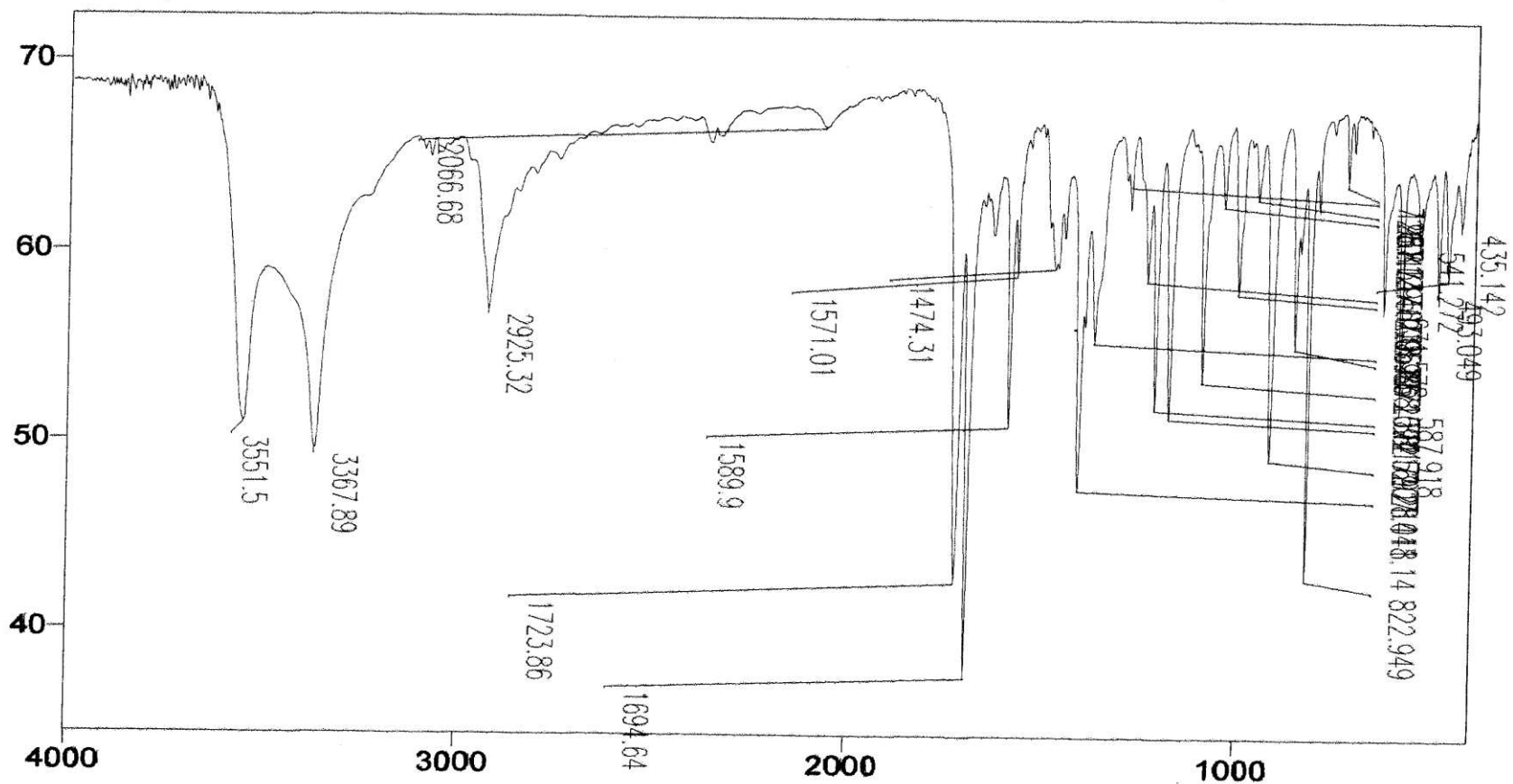
8/30/10 2:37 PM

Sample Description: KBr

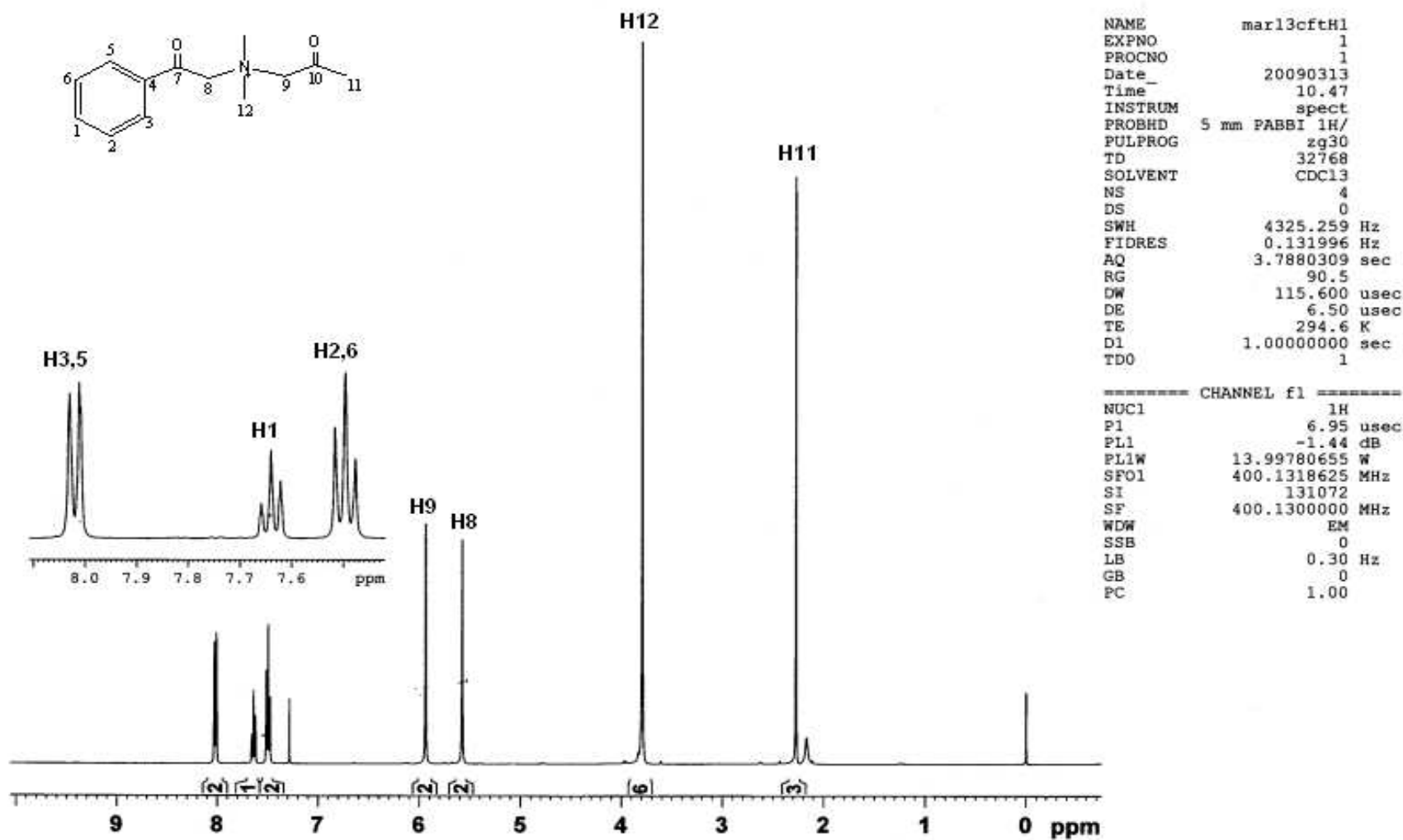
Scans = 16

Res = 4 cm<sup>-1</sup> 22 scans/min

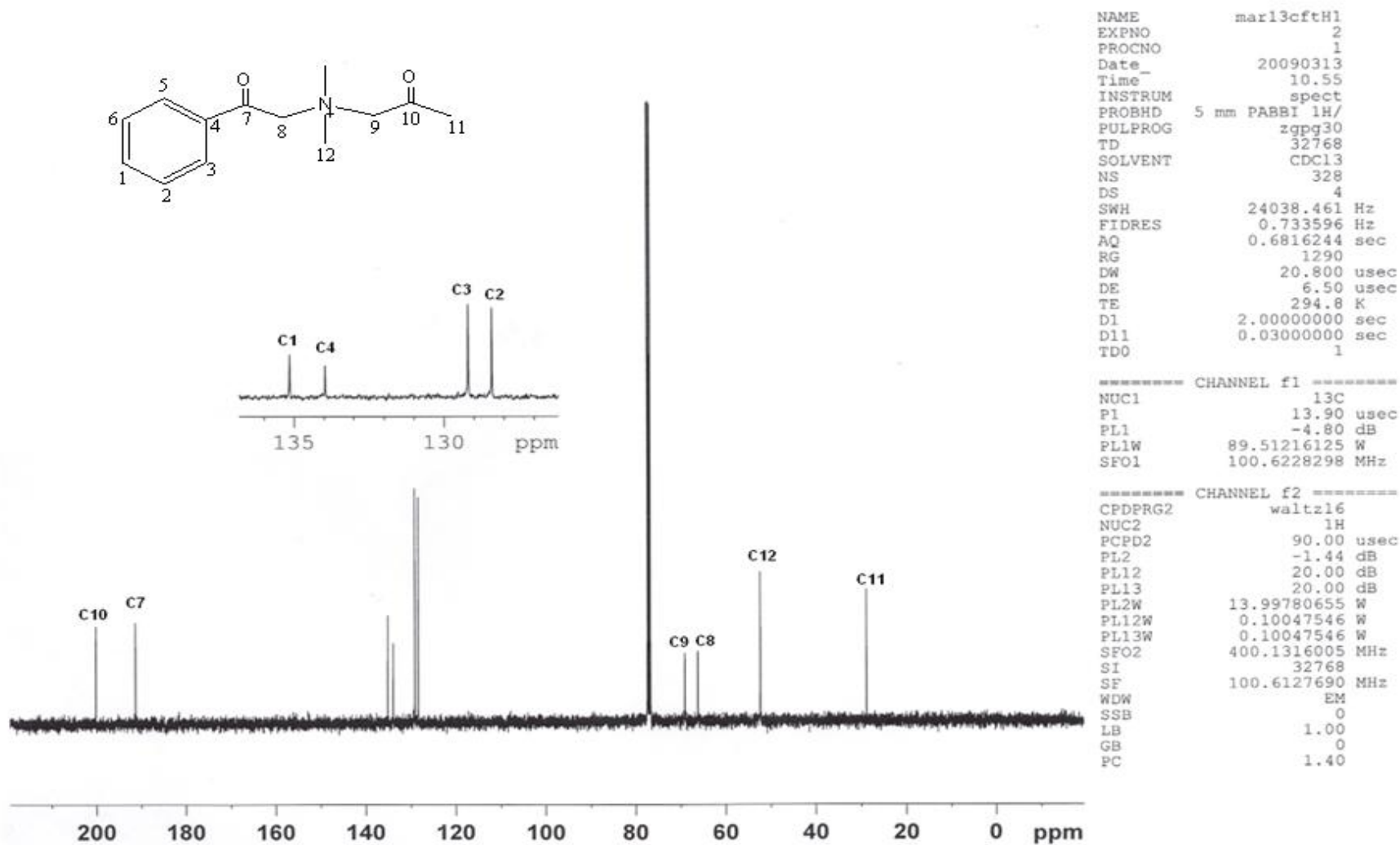
Apod = Cosine



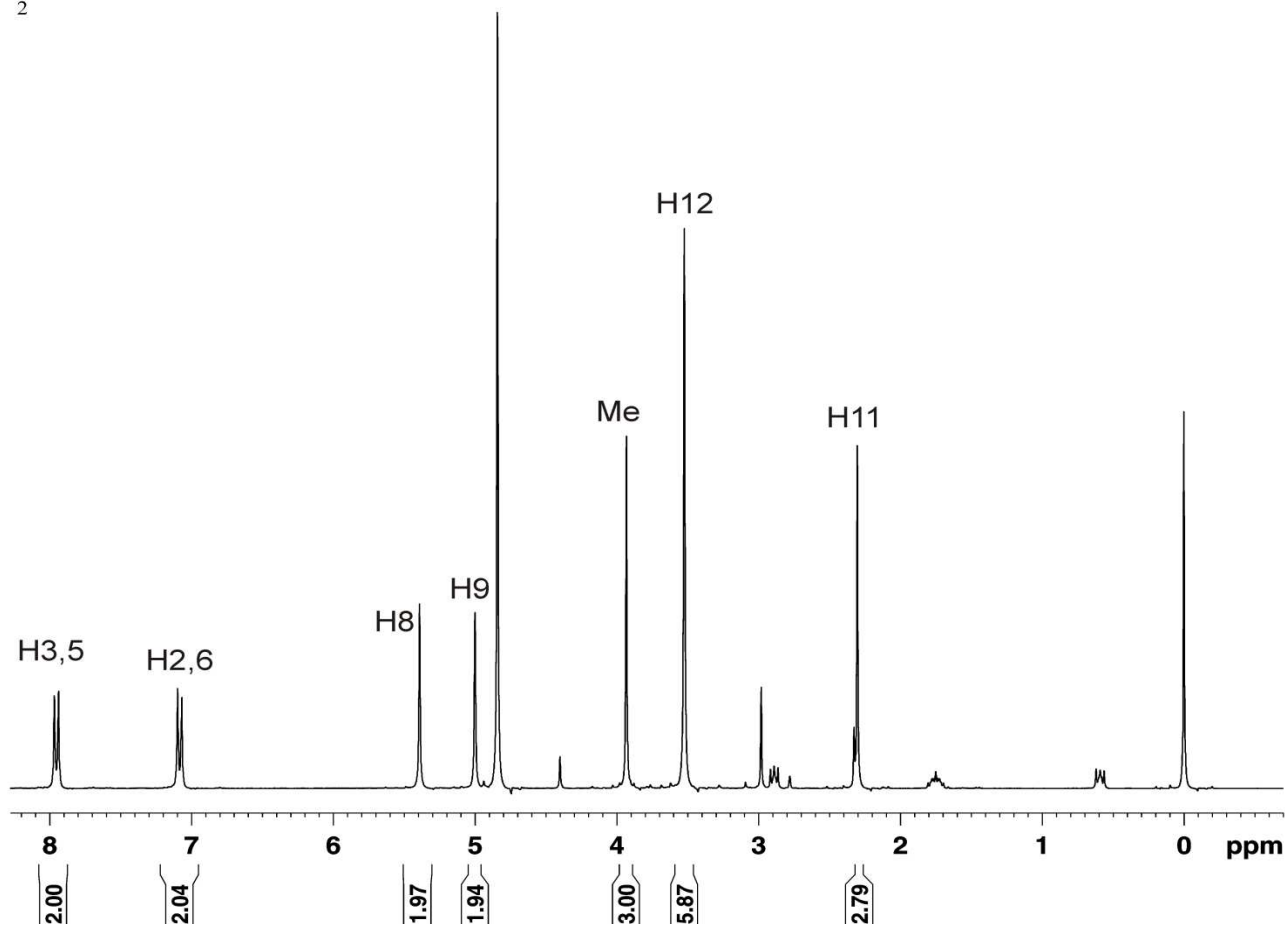
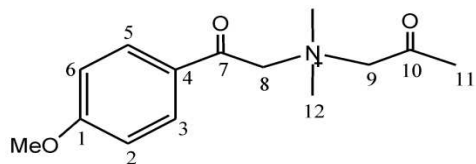
Anexo 4. Espectro no Infravermelho pra o brometo de *p*-cloro *N*-acetoni-*N,N*-dimetil-*N*-fenacilamônio (III).



Anexo 5. Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  para o brometo de *N*-acetil-*N,N*-dimetil-*N*-fenacilamônio (III).



Anexo 6. Espectro de RMN de <sup>13</sup>C para o brometo de *N*-acetonil-*N,N*-dimetil-*N*-fenacilamônio (III).



Current Data Parameters  
 NAME fevl0gspH7  
 EXPNO 1  
 PROCNO 1

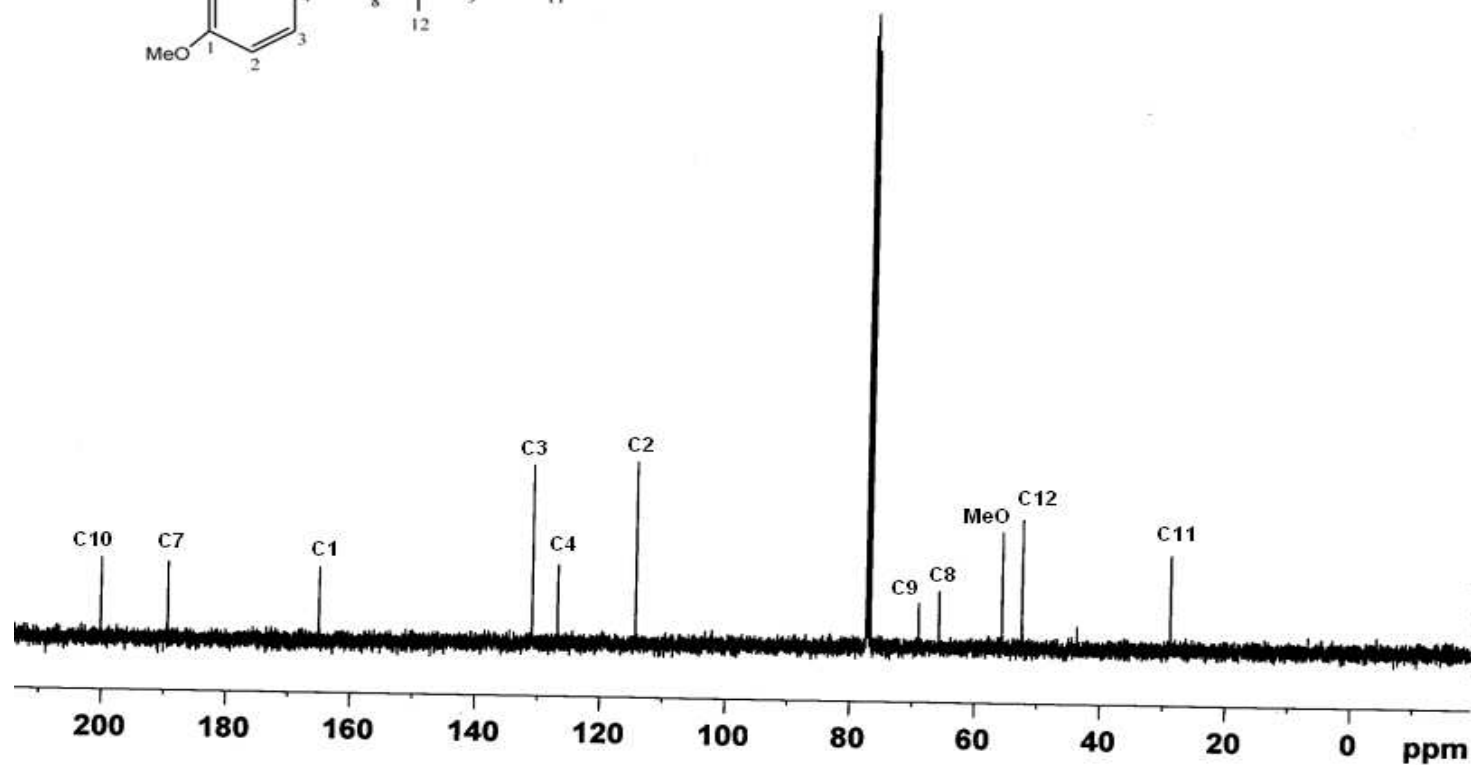
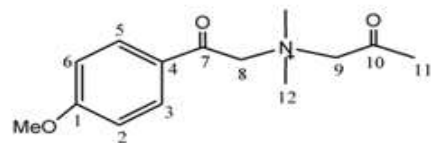
F2 - Acquisition Parameters  
 Date\_ 20100210  
 Time 17.57  
 INSTRUM spect  
 PROBHD 5 mm PABBI 1H/  
 PULPROG zg30  
 TD 32768  
 SOLVENT D2O  
 NS 1  
 DS 0  
 SWH 6188.119 Hz  
 FIDRES 0.188846 Hz  
 AQ 2.6477044 sec  
 RG 45.2  
 DW 80.800 usec  
 DE 6.50 usec  
 TE 673.2 K  
 D1 1.00000000 sec  
 TD0 1

==== CHANNEL f1 =====  
 NUC1 1H  
 P1 8.50 usec  
 PL1 1.00 dB  
 PL1W 9.77678490 W  
 SFO1 300.1318542 MHz

F2 - Processing parameters  
 SI 32768  
 SF 300.1299549 MHz  
 WDW EM  
 SSB 0  
 LB 0.30 Hz  
 GB 0  
 PC 1.00

Anexo 7. Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  para o brometo de *p*-metoxi *N*-acetil-*N,N*-dimetil-*N*-fenacilamônio (III).





```

NAME          mar13cftH2
EXPNO         2
PROCNO        1
Date_         20090313
Time          11.19
INSTRUM       spect
PROBHD        5 mm PABBI 1H/
PULPROG       zgpg30
TD            32768
SOLVENT       CDC13
NS            224
DS            0
SWH           24038.461 Hz
FIDRES        0.733596 Hz
AQ            0.6816244 sec
RG            2050
DW            20.800 usec
DE            6.50 usec
TE            294.8 K
D1            2.00000000 sec
D11           0.03000000 sec
TD0           1

```

```

===== CHANNEL f1 =====
NUC1          13C
P1            13.90 usec
PL1           -4.80 dB
PL1W          89.51216125 W
SFO1          100.6228298 MHz

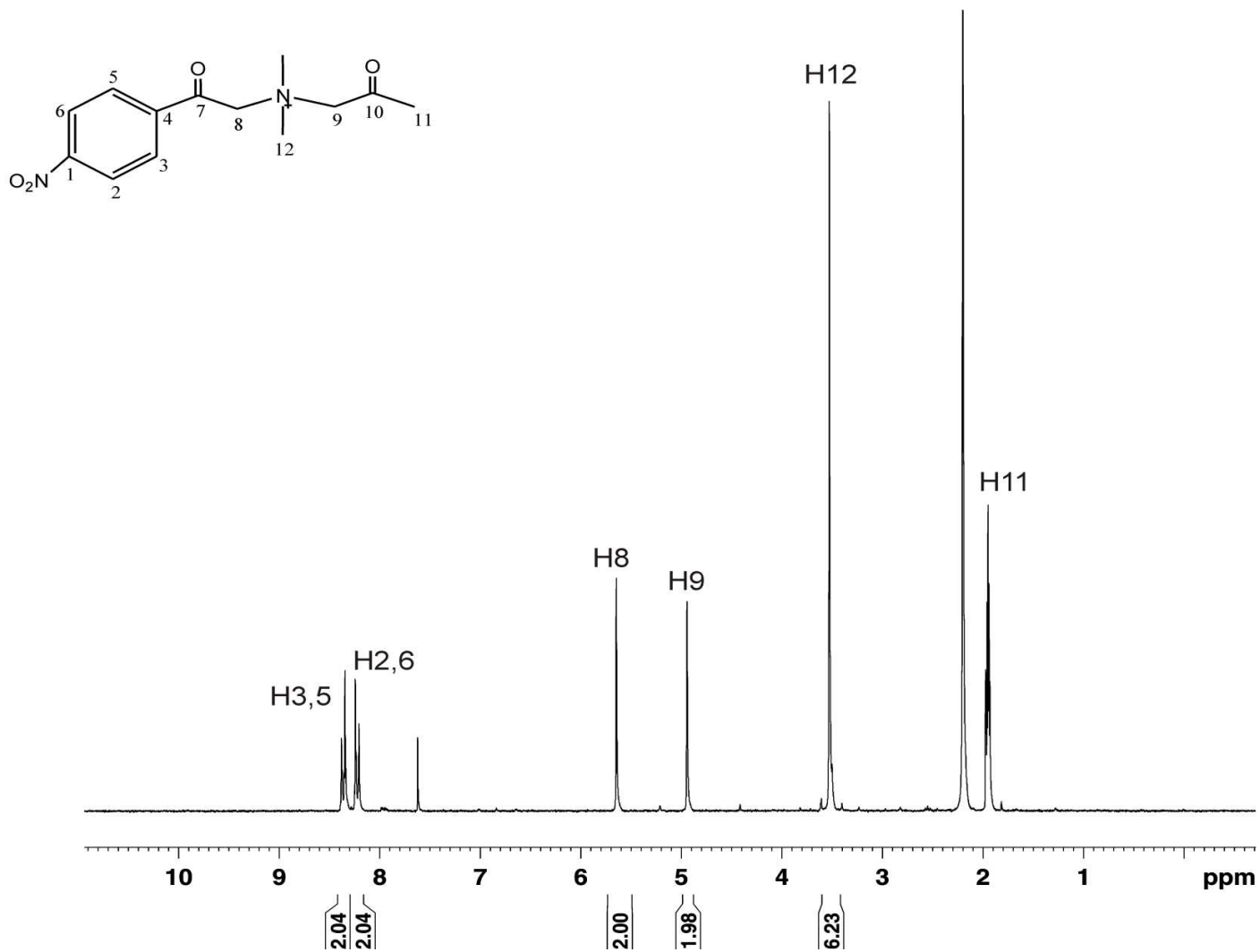
```

```

===== CHANNEL f2 =====
CPDPRG2       waltz16
NUC2          1H
PCPD2         90.00 usec
PL2           -1.44 dB
PL12          20.00 dB
PL13          20.00 dB
PL2W          13.99780655 W
PL12W         0.10047546 W
PL13W         0.10047546 W
SFO2          400.1316005 MHz
SI            32768
SF            100.6127690 MHz
WDW           EM
SSB           0
LB            1.00 Hz
GB            0
PC            1.40

```

Anexo 8. Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  para o brometo de *p*-metoxi *N*-acetil-*N,N*-dimetil-*N*-fenilacetamônio (III).



```

Current Data Parameters
NAME      jul17rrnH3
EXPNO     1
PROCNO    1

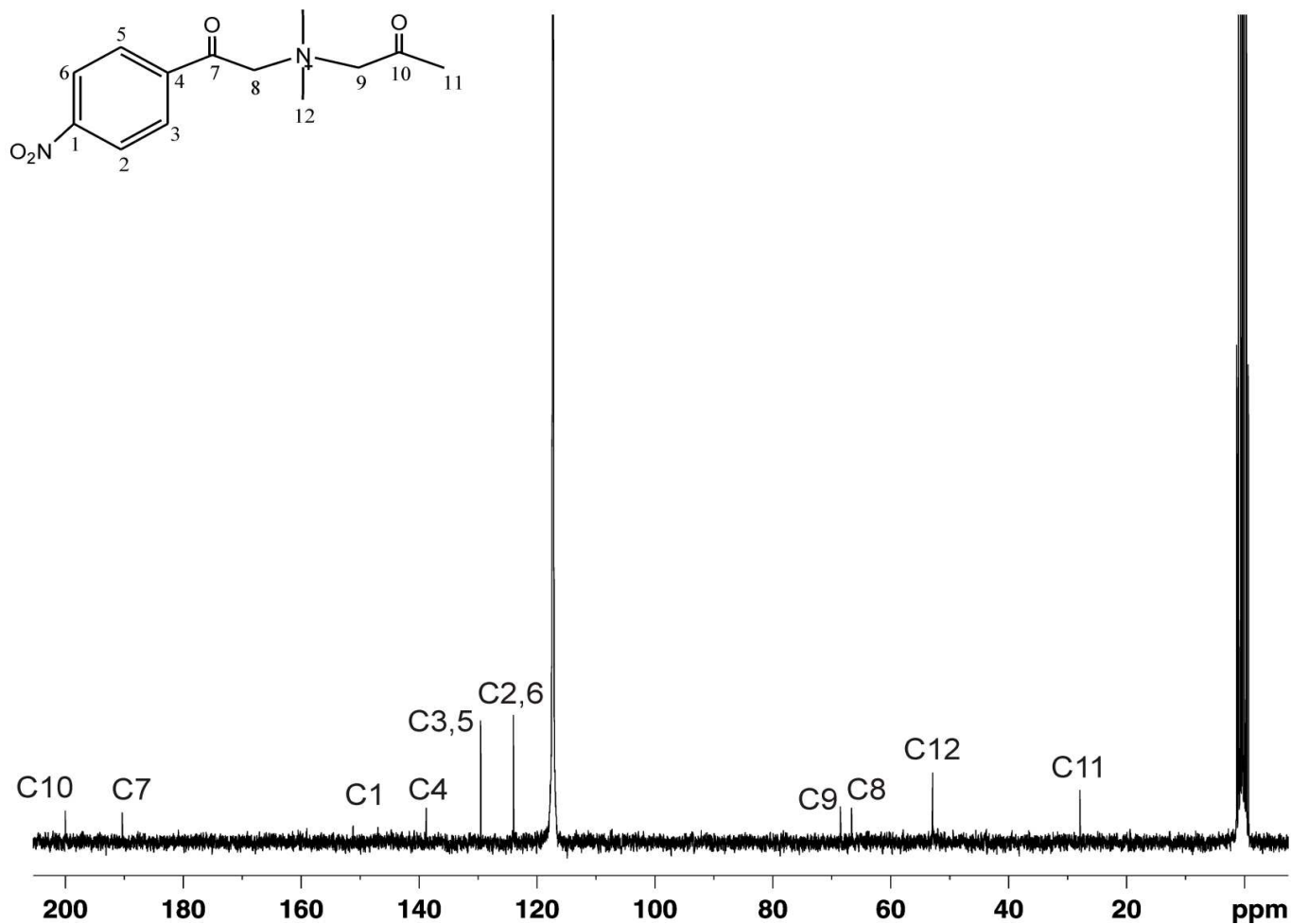
F2 - Acquisition Parameters
Date_     20090717
Time      10.29
INSTRUM   spect
PROBHD    5 mm QNP 1H/13
PULPROG   zg30
TD         32768
SOLVENT   CD3CN
NS         8
DS         0
SWH        2913.753 Hz
FIDRES     0.088921 Hz
AQ         5.6230388 sec
RG         2298.8
DW         171.600 usec
DE         6.00 usec
TE         300.0 K
D1         1.00000000 sec
TD0        1

===== CHANNEL f1 =====
NUC1       1H
P1         13.00 usec
PL1        -6.00 dB
SFO1       250.1312785 MHz

F2 - Processing parameters
SI         32768
SF         250.1300000 MHz
WDW        EM
SSB        0
LB         0.30 Hz
GB         0
PC         1.00

```

Anexo 9. Espectro de RMN de <sup>1</sup>H para o brometo de p-nitro *N*-acetonil-*N,N*-dimetil-*N*-fenacilamônio (III).



Current Data Parameters  
 NAME jul17rrnH3  
 EXPNO 2  
 PROCNO 1

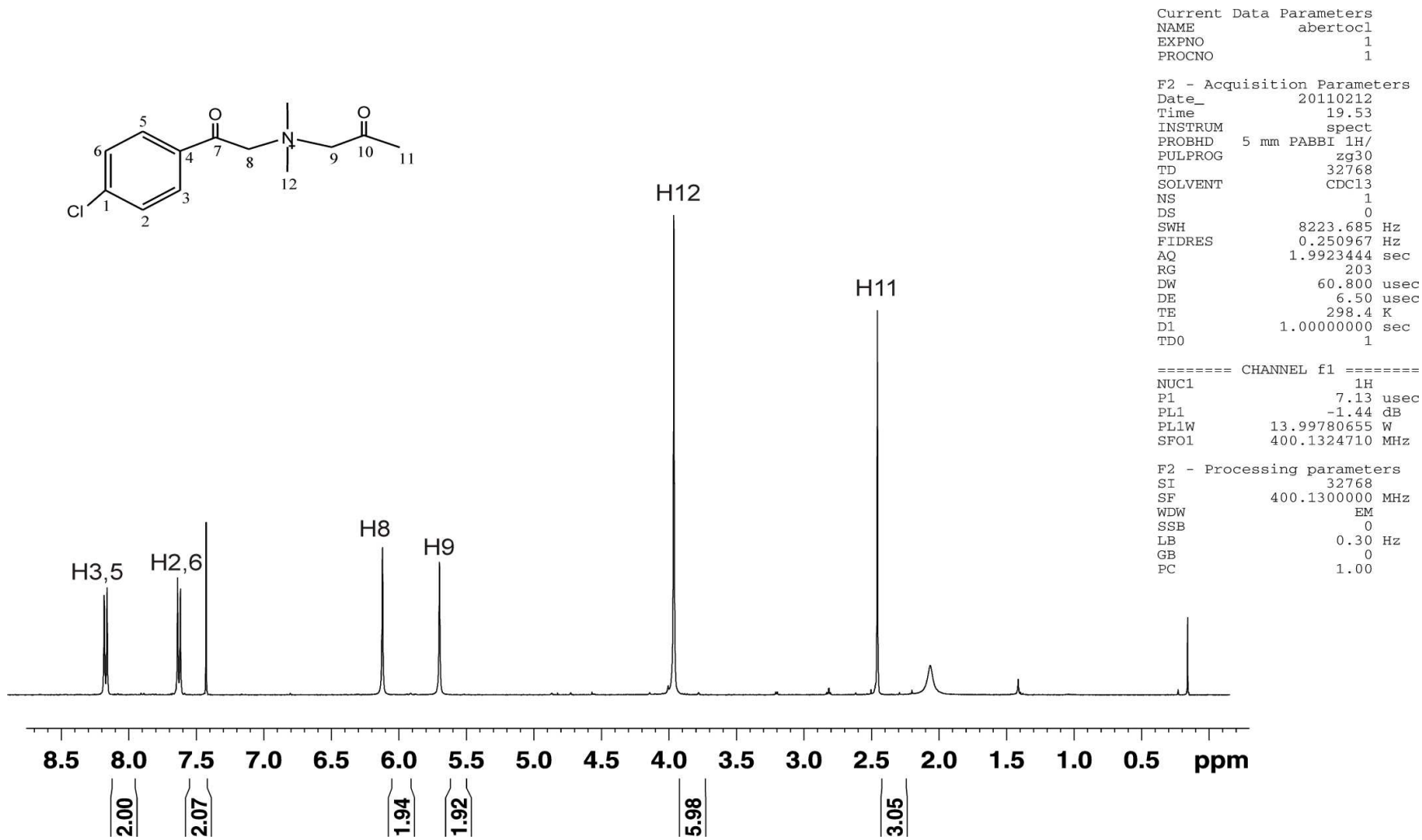
F2 - Acquisition Parameters  
 Date\_ 20090717  
 Time 10.42  
 INSTRUM spect  
 PROBHD 5 mm QNP 1H/13  
 PULPROG zgpg30  
 TD 32768  
 SOLVENT CD3CN  
 NS 2003  
 DS 0  
 SWH 15060.241 Hz  
 FIDRES 0.459602 Hz  
 AQ 1.0879476 sec  
 RG 574.7  
 DW 33.200 usec  
 DE 6.00 usec  
 TE 300.0 K  
 D1 2.00000000 sec  
 d11 0.03000000 sec  
 DELTA 1.89999998 sec  
 TD0 1

==== CHANNEL f1 =====  
 NUC1 13C  
 P1 10.00 usec  
 PL1 0.00 dB  
 SFO1 62.9015280 MHz

==== CHANNEL f2 =====  
 CPDPRG2 waltz16  
 NUC2 1H  
 PCPD2 100.00 usec  
 PL2 -6.00 dB  
 PL12 18.00 dB  
 PL13 18.00 dB  
 SFO2 250.1310005 MHz

F2 - Processing parameters  
 SI 32768  
 SF 62.8952390 MHz  
 WDW EM  
 SSB 0  
 LB 1.00 Hz  
 GB 0  
 PC 1.40

Anexo 10. Espectro de RMN de <sup>13</sup>C para o brometo de *p*-nitro-*N*-acetil-*N,N*-dimetil-*N*-fenacilamônio (III).



Anexo 11. Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  para o brometo de *p*-cloro *N*-acetil-*N,N*-dimetil-*N*-fenacilamônio (III).

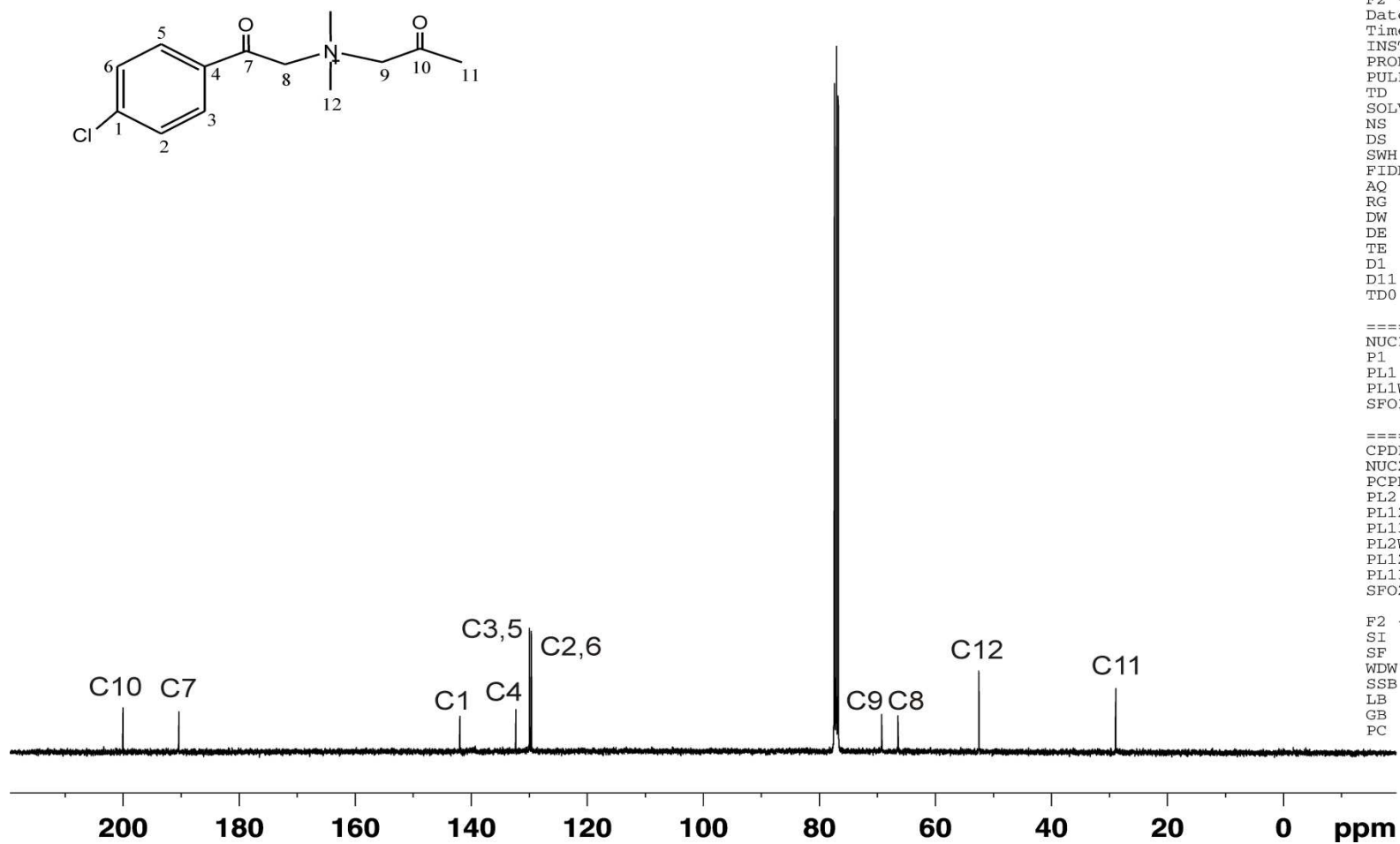
Current Data Parameters  
NAME abertocl  
EXPNO 2  
PROCNO 1

F2 - Acquisition Parameters  
Date\_ 20110212  
Time 19.56  
INSTRUM spect  
PROBHD 5 mm PABBI 1H/  
PULPROG zgpg30  
TD 32768  
SOLVENT CDCl3  
NS 4096  
DS 4  
SWH 24038.461 Hz  
FIDRES 0.733596 Hz  
AQ 0.6816244 sec  
RG 203  
DW 20.800 usec  
DE 6.50 usec  
TE 298.6 K  
D1 2.00000000 sec  
D11 0.03000000 sec  
TD0 1

==== CHANNEL f1 =====  
NUC1 13C  
P1 14.75 usec  
PL1 -4.80 dB  
PL1W 89.51216125 W  
SFO1 100.6228293 MHz

==== CHANNEL f2 =====  
CPDPRG2 waltz16  
NUC2 1H  
PCPD2 80.00 usec  
PL2 -1.44 dB  
PL12 19.25 dB  
PL13 19.24 dB  
PL2W 13.99780655 W  
PL12W 0.11941531 W  
PL13W 0.11969059 W  
SFO2 400.1316005 MHz

F2 - Processing parameters  
SI 32768  
SF 100.6127671 MHz  
WDW EM  
SSB 0  
LB 1.00 Hz  
GB 0  
PC 1.40



Anexo 12. Espectro de RMN de <sup>13</sup>C para o brometo de *p*-cloro *N*-acetil-*N,N*-dimetil-*N*-fenacilamônio (III).

File # 1 : INTERH

Mode = 2 (Mid-IR)

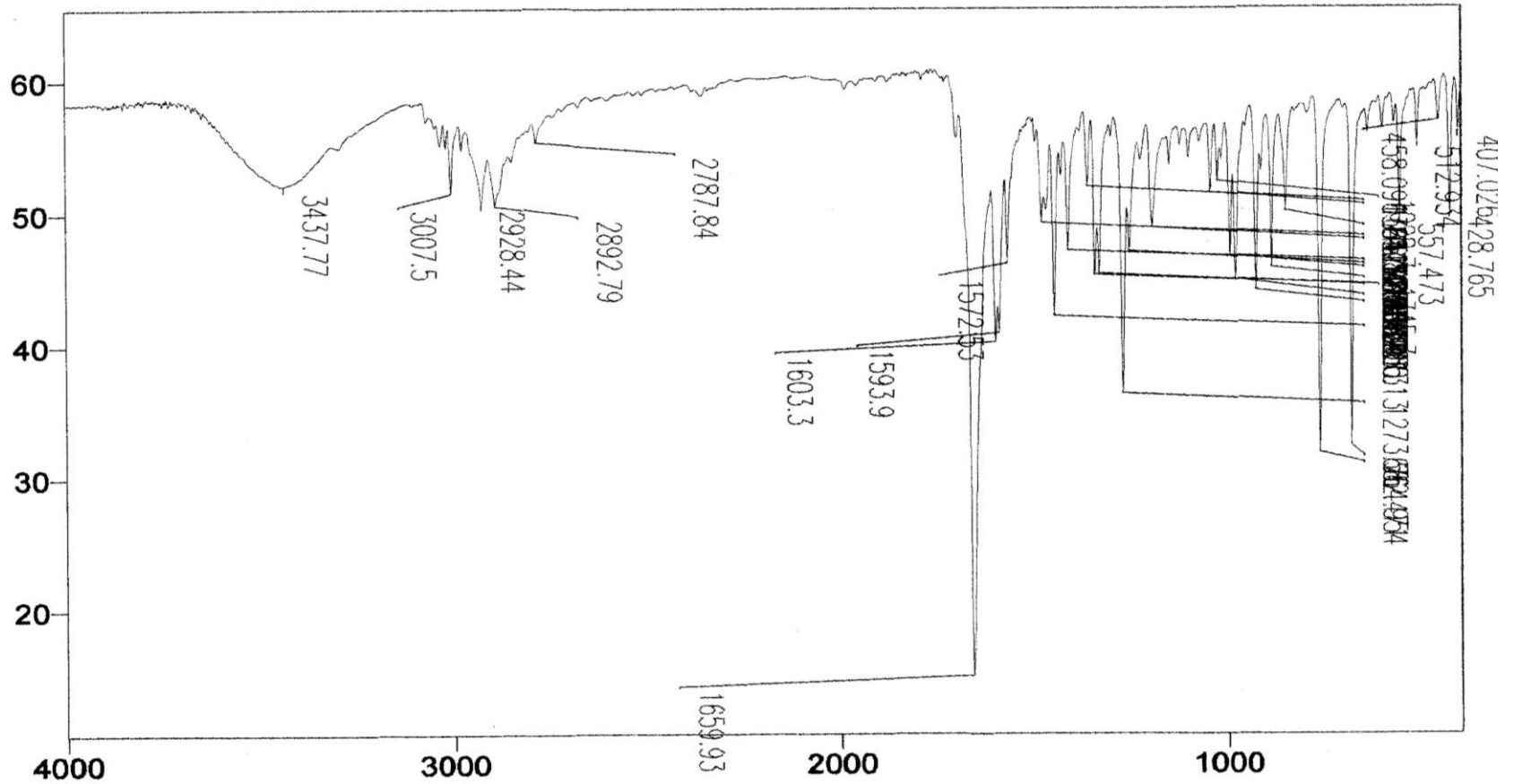
8/20/10 9:50 AM

Sample Description: Glauca KBr

Res = 4 cm<sup>-1</sup> 22 scans/min

Apod = Cosine

Scans = 16



Anexo 13. Espectro no Infravermelho para o brometo de 2,6-tetraidro-*N,N*-dimetil-3-oxo-5-fenilpiridínio (IV).

File # 1 : INTERMEO

Mode = 2 (Mid-IR)

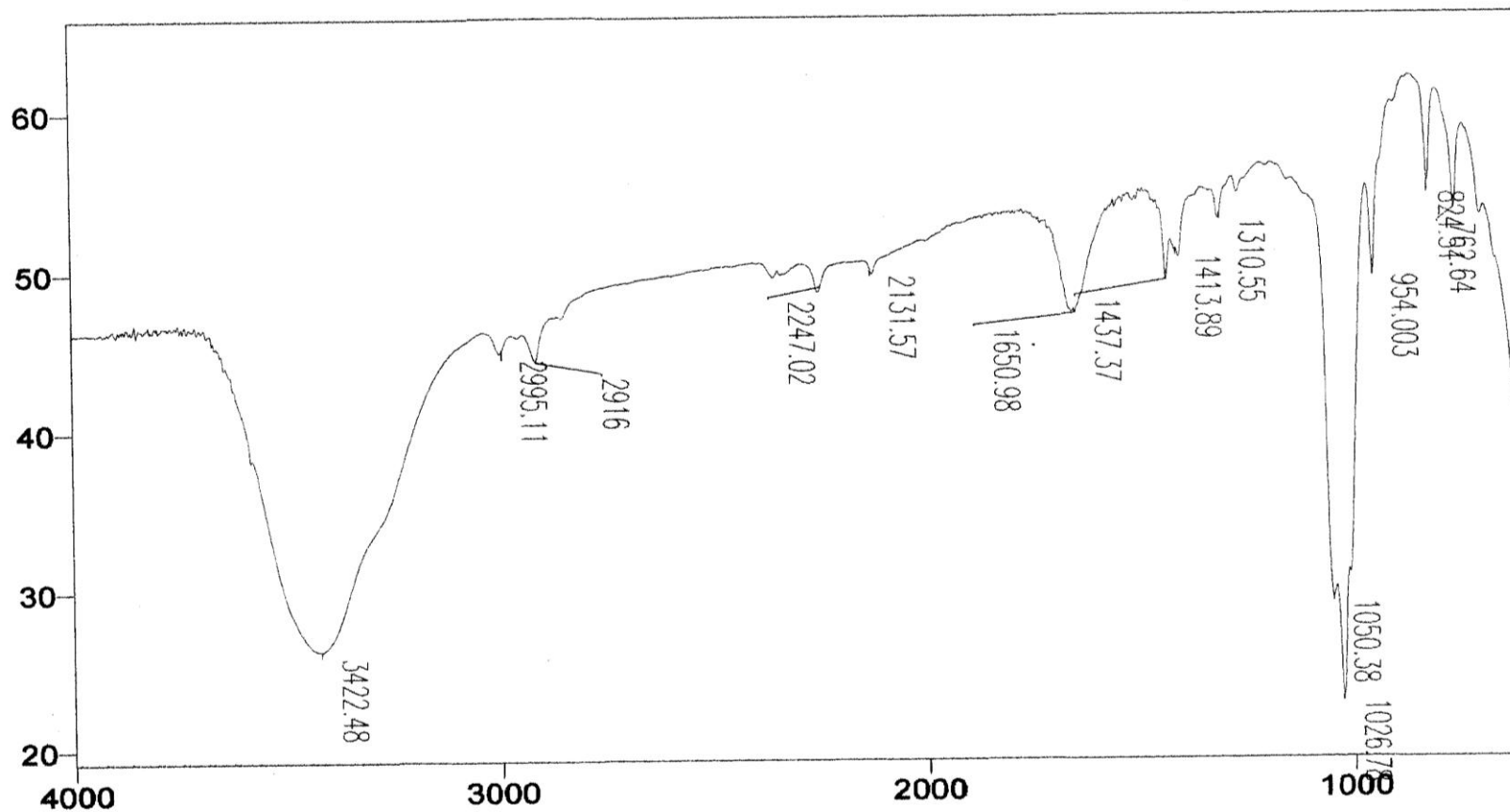
8/20/10 8:39 AM

Sample Description: Glaucia filme

Res = 4 cm<sup>-1</sup> 22 scans/min

Apod = Cosine

Scans = 16



Anexo 14. Espectro no Infravermelho para o brometo de *p*-metoxi 2,6-tetraidro-*N,N*-dimetil-3-oxo-5-fenilpiridínio (IV).

File # 1 : INTERNO2

Mode = 2 (Mid-IR)

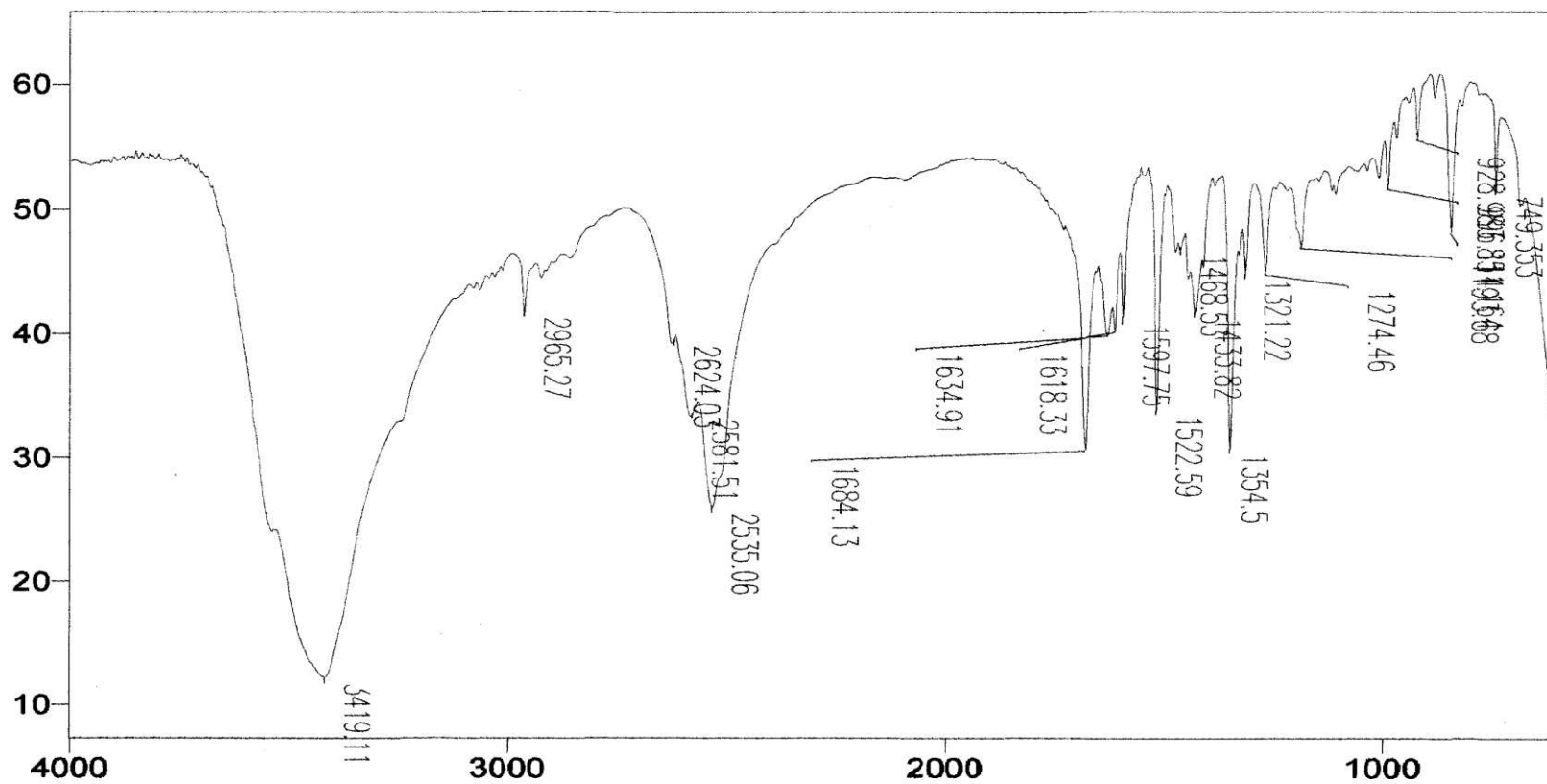
8/20/10 9:30 AM

Sample Description: Glaucia filme

Scans = 16

Res = 4 cm<sup>-1</sup> 20 scans/min

Apod = Cosine



Anexo 15. Espectro no Infravermelho para o brometo de *p*-nitro 2,6-tetraidro-*N,N*-dimetil-3-oxo-5-fenilpiridínio (IV).



File # 1 : INTERCL

Mode = 2 (Mid-IR)

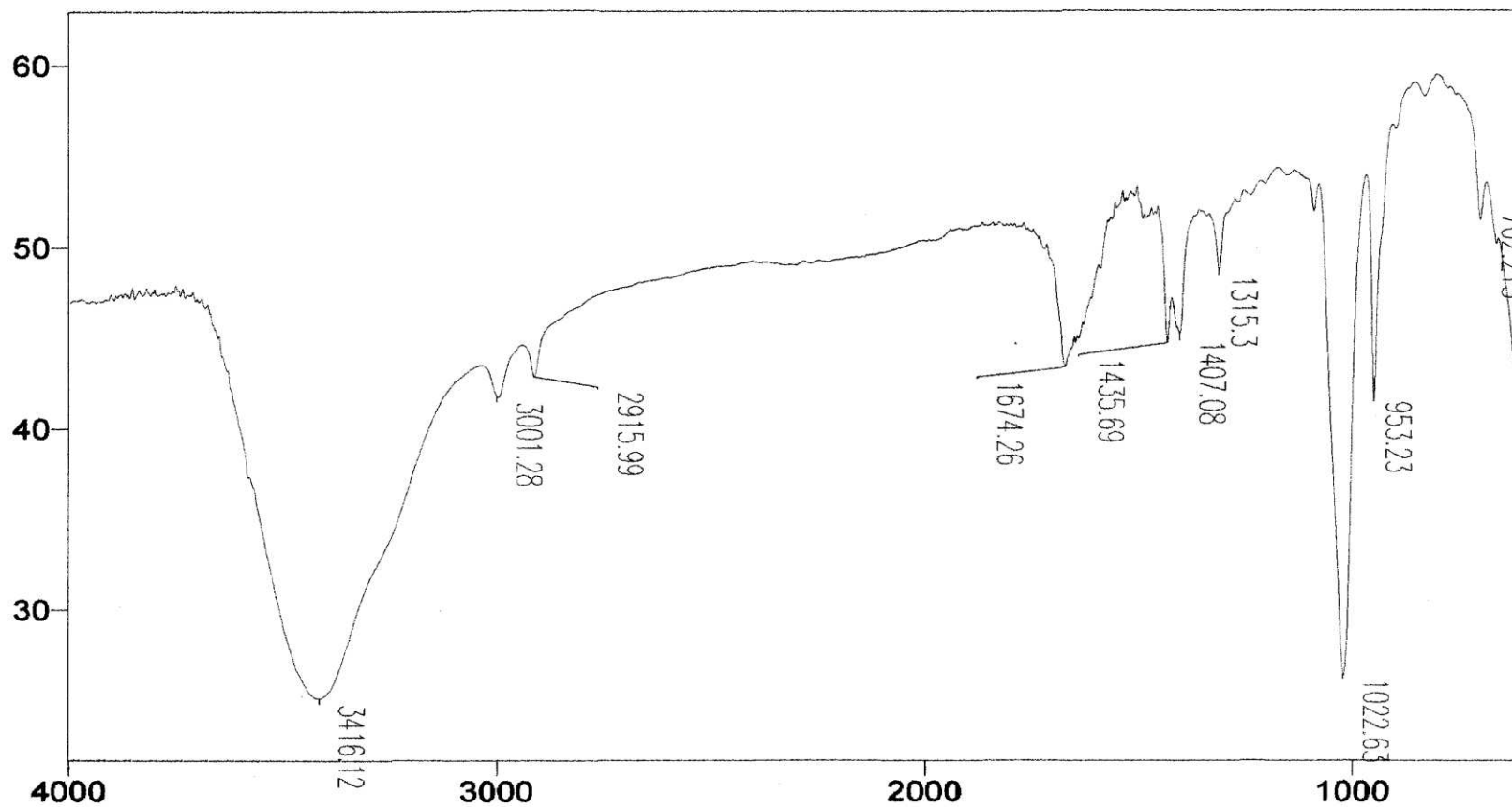
8/20/10 9:19 AM

Sample Description: Glaucia filme

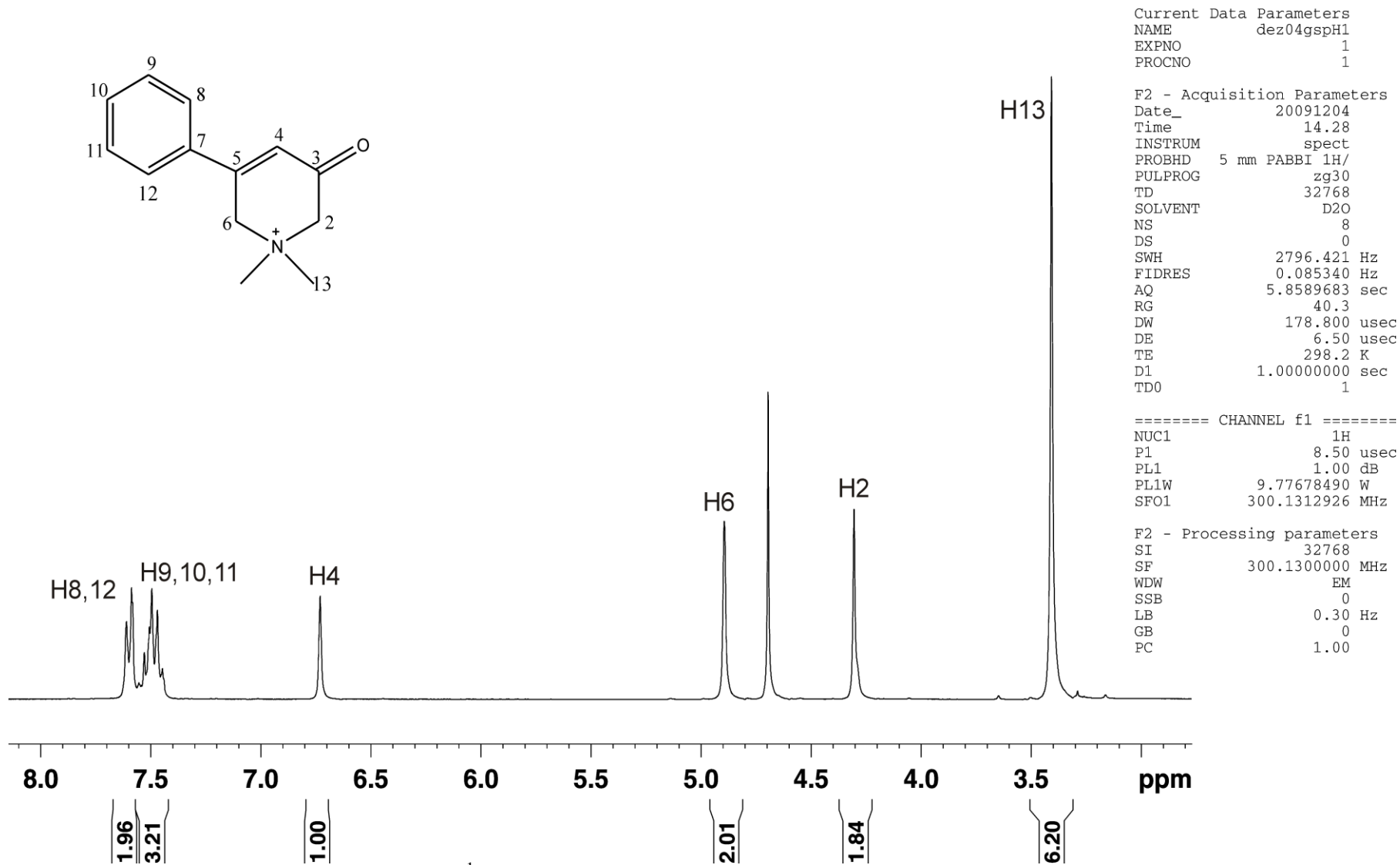
Scans = 16

Res = 4 cm<sup>-1</sup> 22 scans/min

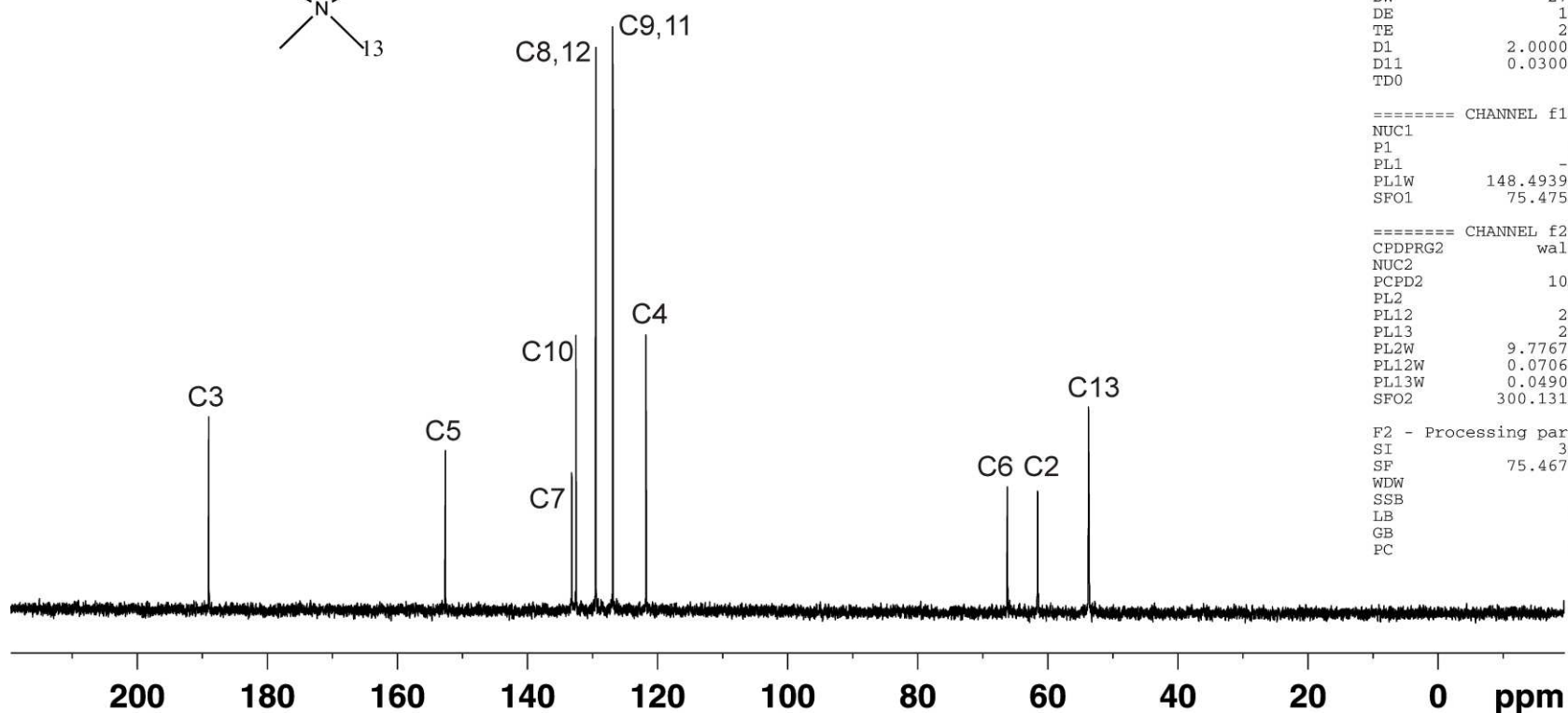
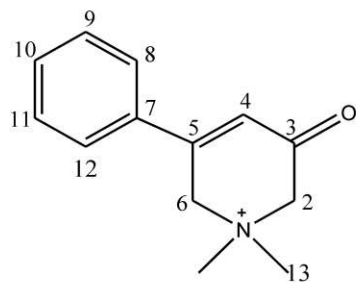
Apod = Cosine



Anexo 16. Espectro no Infravermelho para o brometo de *p*-cloro 2,6-tetraidro-*N,N*-dimetil-3-oxo-5-fenilpiridínio (IV).



Anexo 17. Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  para o brometo de 2,6-tetraidro-*N,N*-dimetil-3-oxo-5-fenilpiridíno (IV).



Current Data Parameters  
 NAME dez04gspH1  
 EXPNO 2  
 PROCNO 1

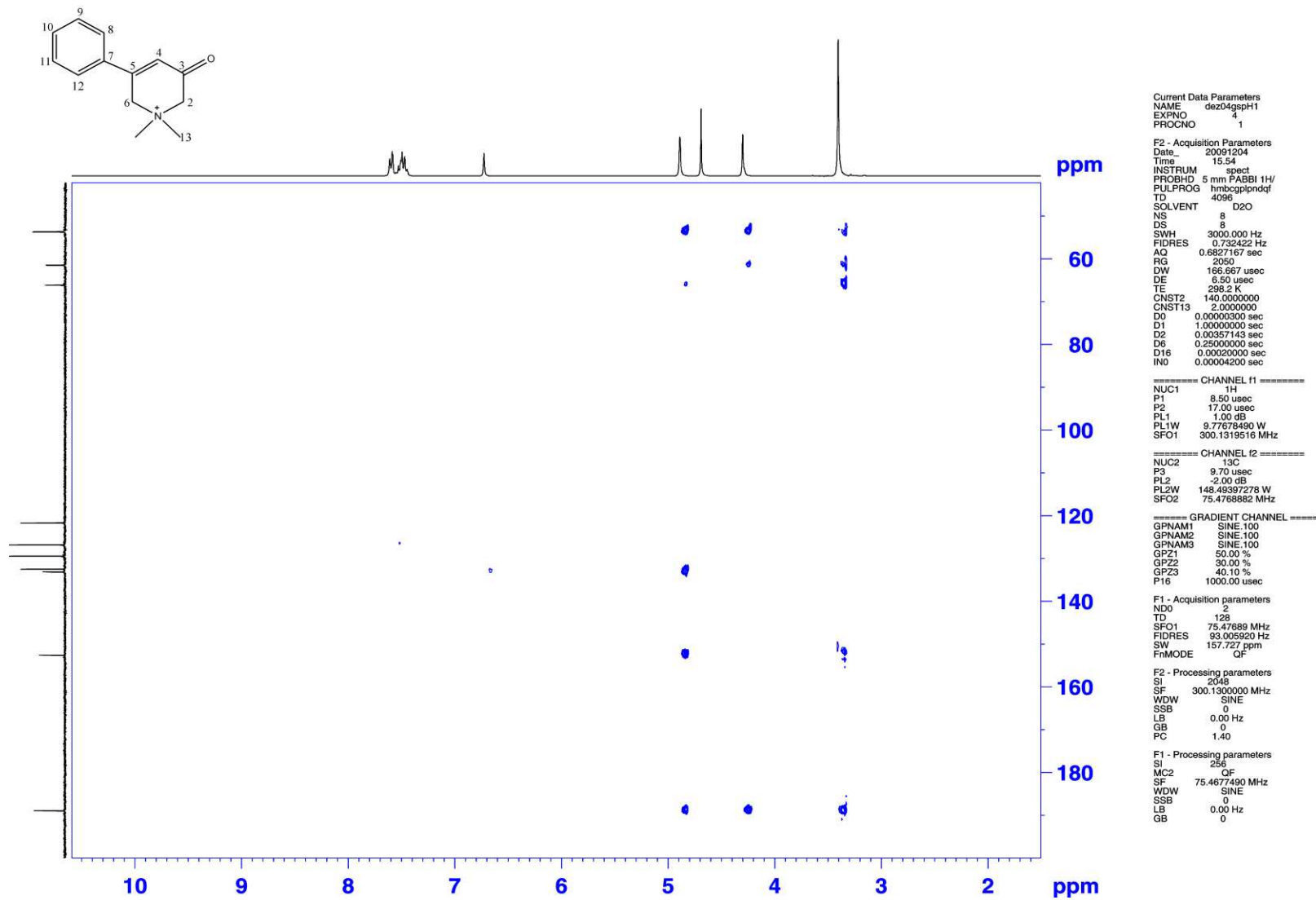
F2 - Acquisition Parameters  
 Date\_ 20091204  
 Time 14.31  
 INSTRUM spect  
 PROBHD 5 mm PABBI 1H/  
 PULPROG zgpg30  
 TD 32768  
 SOLVENT D2O  
 NS 256  
 DS 0  
 SWH 18028.846 Hz  
 FIDRES 0.550197 Hz  
 AQ 0.9088159 sec  
 RG 256  
 DW 27.733 usec  
 DE 10.00 usec  
 TE 298.2 K  
 D1 2.00000000 sec  
 D11 0.03000000 sec  
 TD0 1

==== CHANNEL f1 =====  
 NUC1 13C  
 P1 9.00 usec  
 PL1 -2.00 dB  
 PL1W 148.49397278 W  
 SFO1 75.4752953 MHz

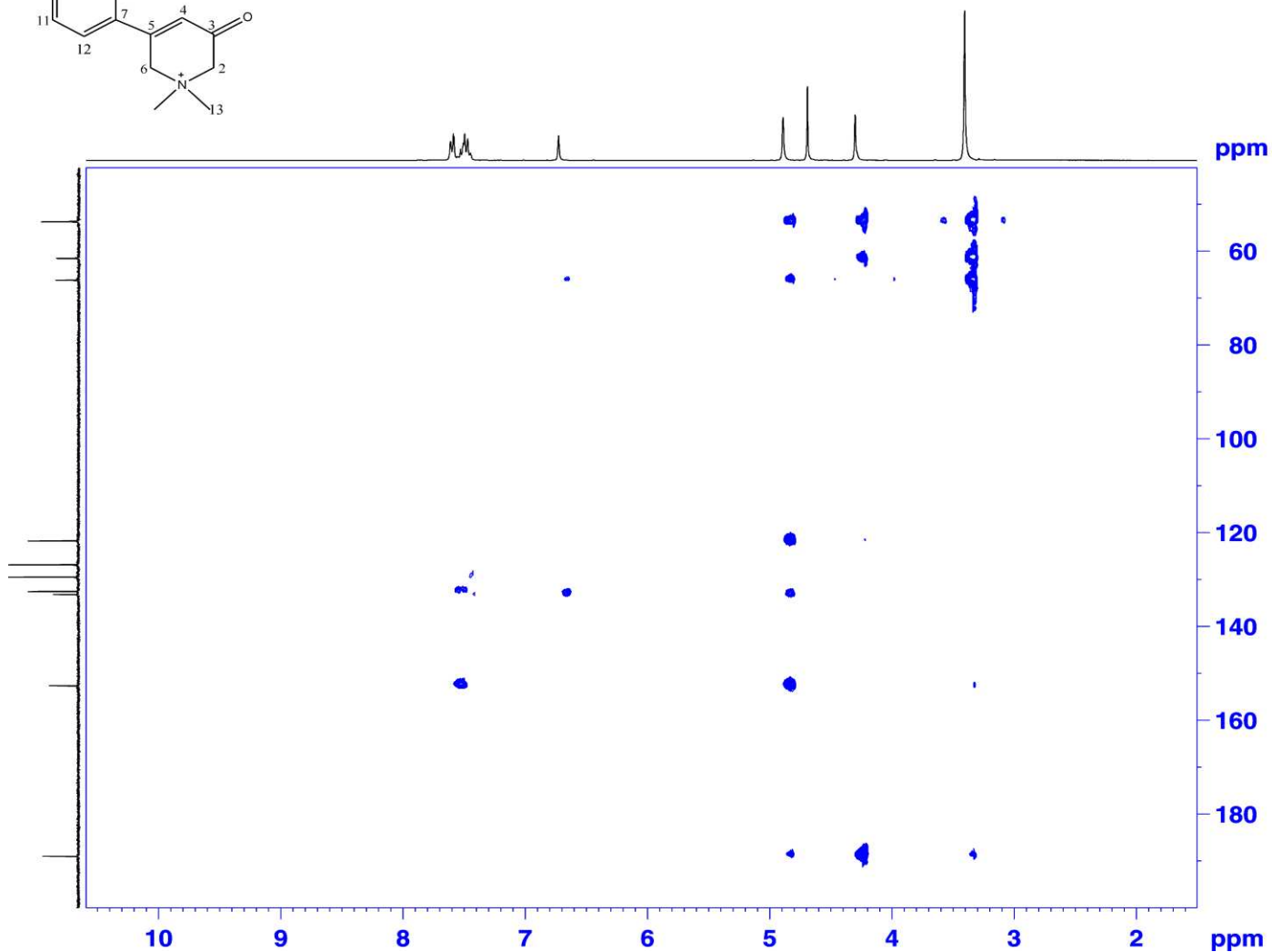
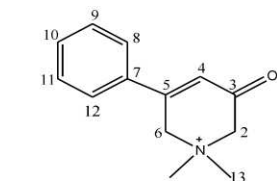
==== CHANNEL f2 =====  
 CPDPRG2 waltz16  
 NUC2 1H  
 PCPD2 100.00 usec  
 PL2 1.00 dB  
 PL12 22.41 dB  
 PL13 24.00 dB  
 PL2W 9.77678490 W  
 PL12W 0.07066365 W  
 PL13W 0.04900000 W  
 SFO2 300.1312005 MHz

F2 - Processing parameters  
 SI 32768  
 SF 75.4677490 MHz  
 WDW EM  
 SSB 0  
 LB 1.00 Hz  
 GB 0  
 PC 1.40

Anexo 18. Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  para o brometo de 2,6-tetraidro-*N,N*-dimetil-3-oxo-5-fenilpiridínio (IV).



Anexo 19. Mapa de contorno HMBC  $^1J_{CH} = 2$ , para o brometo de 2,6-tetraidro-*N,N*-dimetil-3-oxo-5-fenilpiridínio (IV).



```

Current Data Parameters
NAME      dez04gspH1
EXPNO    5
PROCNO   1

F2 - Acquisition Parameters
Date_    20091204
Time     16.28
INSTRUM  spect
PROBHD   5 mm F4BBI 1H/
PULPROG  hmbcgp1pdqf
TD        4096
SOLVENT  D2O
NS        8
DS        8
SWH       3000.000 Hz
FIDRES    0.732422 Hz
AQ        0.6827167 sec
RG        2050
DW        166.967 usec
DE        6.50 usec
TE        293.3 K
CNST2    140.000000
CNST13   5.000000
DO        0.00000300 sec
D1        1.00000000 sec
D2        0.00357143 sec
D6        0.10000000 sec
D16       0.00020000 sec
INO       0.000420 sec

===== CHANNEL f1 =====
NUC1      1H
P1        8.50 usec
P2        17.00 usec
PL1       1.00 dB
PL1W      9.77678490 W
SFO1      300.1319516 MHz

===== CHANNEL f2 =====
NUC2      13C
P3        9.70 usec
PL2       -2.00 dB
PL2W      148.49397278 W
SFO2      75.4768882 MHz

===== GRADIENT CHANNEL =====
GPNAM1    SINE,100
GPNAM2    SINE,100
GPNAM3    SINE,100
GPZ1      50.00 %
GPZ2      30.00 %
GPZ3      40.10 %
P16       1000.00 usec

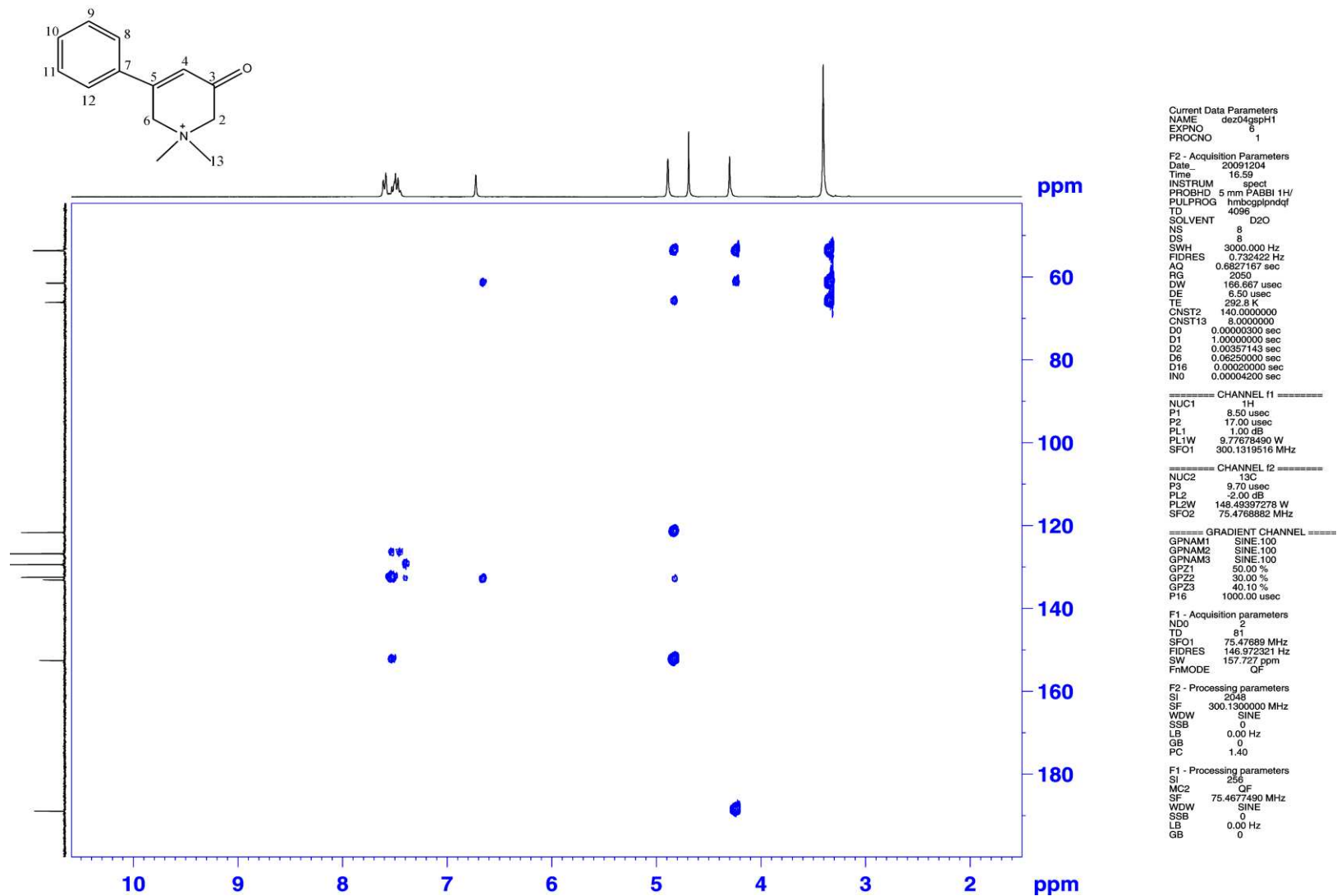
F1 - Acquisition parameters
ND0       2
TD        128
SFO1      75.47689 MHz
FIDRES    93.005920 Hz
SW        157.727 ppm
FnMODE    QF

F2 - Processing parameters
SI        2548
SF        300.1300000 MHz
WDW       SINE
SSB       0
LB        0.00 Hz
GB        0
PC        1.40

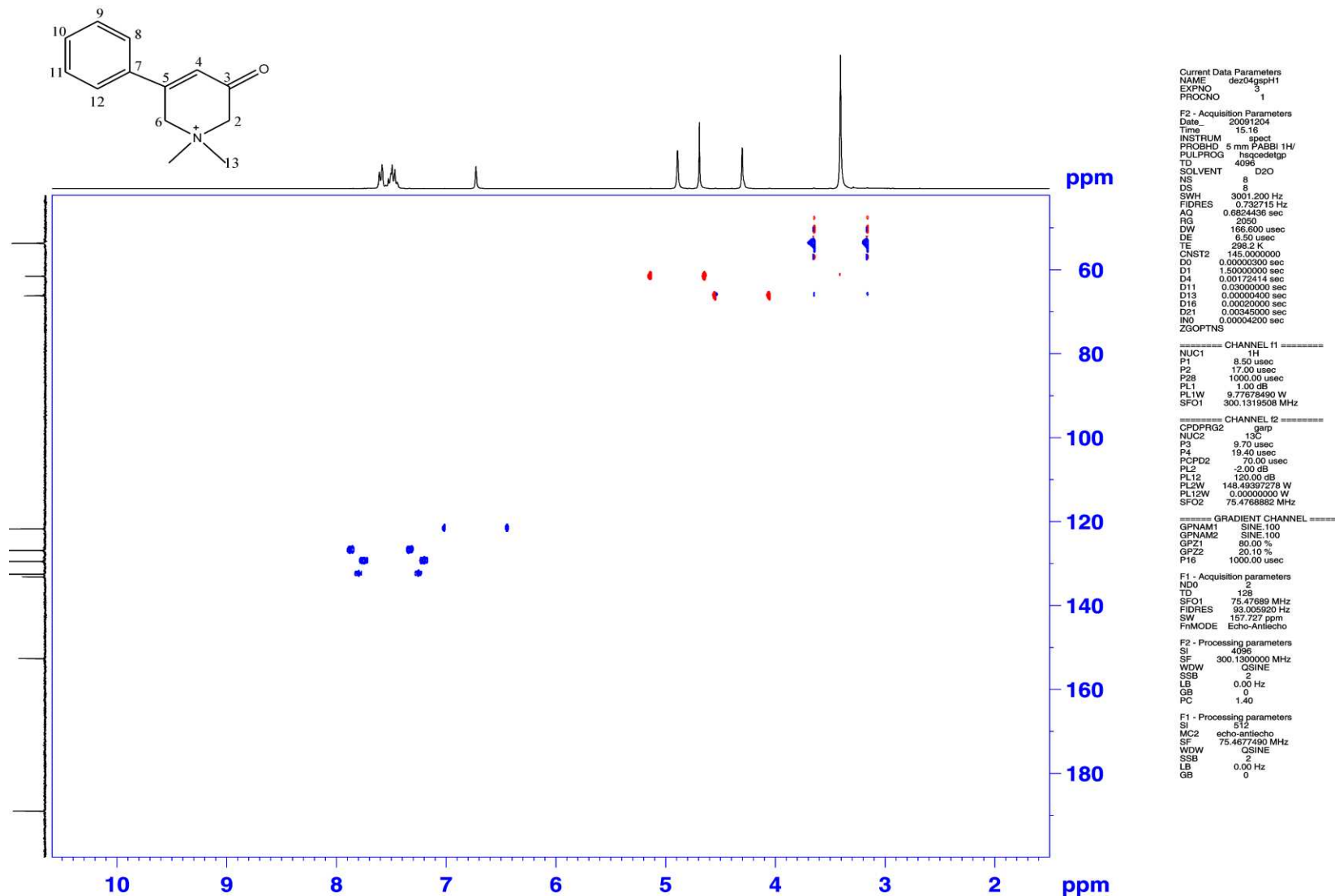
F1 - Processing parameters
SI        256
MC2       QF
SF        75.4677490 MHz
WDW       SINE
SSB       0
LB        0.00 Hz
GB        0

```

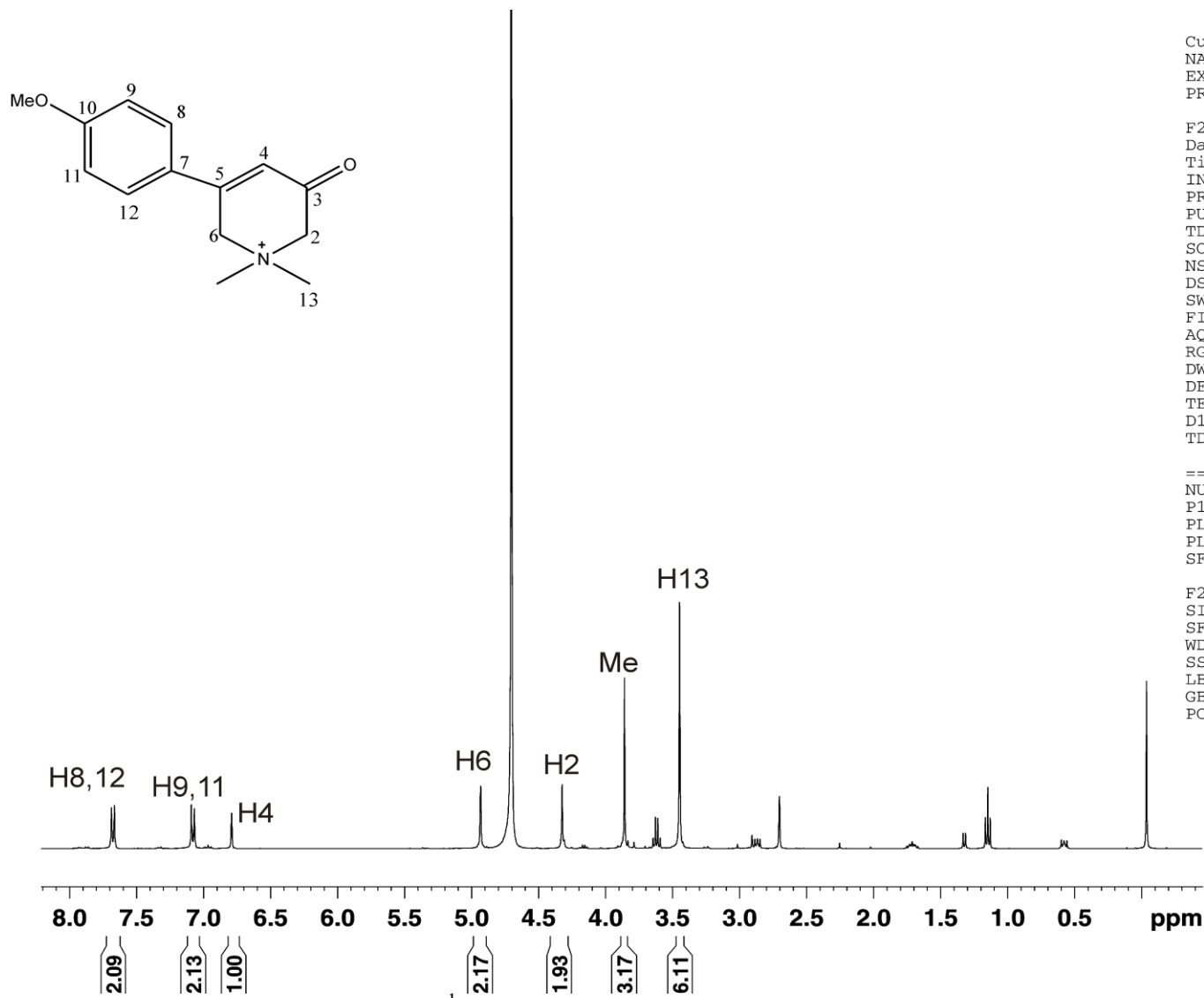
Anexo 20. Mapa de contorno HMBC  $^nJ_{CH} = 5$ , para o brometo de 2,6-tetraidro-*N,N*-dimetil-3-oxo-5-fenilpiridínio (IV).



Anexo 21. Mapa de contorno HMBC  $^nJ_{CH} = 8$ , para o brometo de 2,6-tetraidro-*N,N*-dimetil-3-oxo-5-fenilpiridínio (IV).



Anexo 22. Mapa de contorno HSQC, para o brometo de 2,6-tetraidro-N,N-dimetil-3-oxo-5-fenilpiridínio (IV).



```

Current Data Parameters
NAME      metoxi_artigo
EXPNO     1
PROCNO    1

F2 - Acquisition Parameters
Date_     20101112
Time      23.10
INSTRUM   spect
PROBHD    5 mm PABBO BB-
PULPROG   zg30
TD         32768
SOLVENT   D2O
NS         8
DS         0
SWH        8223.685 Hz
FIDRES     0.250967 Hz
AQ         1.9923444 sec
RG         80.6
DW         60.800 usec
DE         6.50 usec
TE         297.9 K
D1         1.00000000 sec
TD0        1

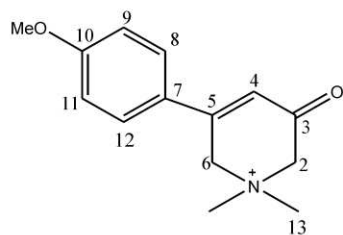
===== CHANNEL f1 =====
NUC1       1H
P1         8.90 usec
PL1        -5.00 dB
PL1W       31.77312851 W
SFO1       400.1324710 MHz

F2 - Processing parameters
SI         32768
SF         400.1300000 MHz
WDW        EM
SSB        0
LB         0.30 Hz
GB         0
PC         1.00

```

Anexo 23. Espectro de RMN de <sup>1</sup>H para o brometo de 2,6-tetraidro-*N,N*-dimetil-3-oxo-5-*p*-metoxi-fenilpiridínio (IV).





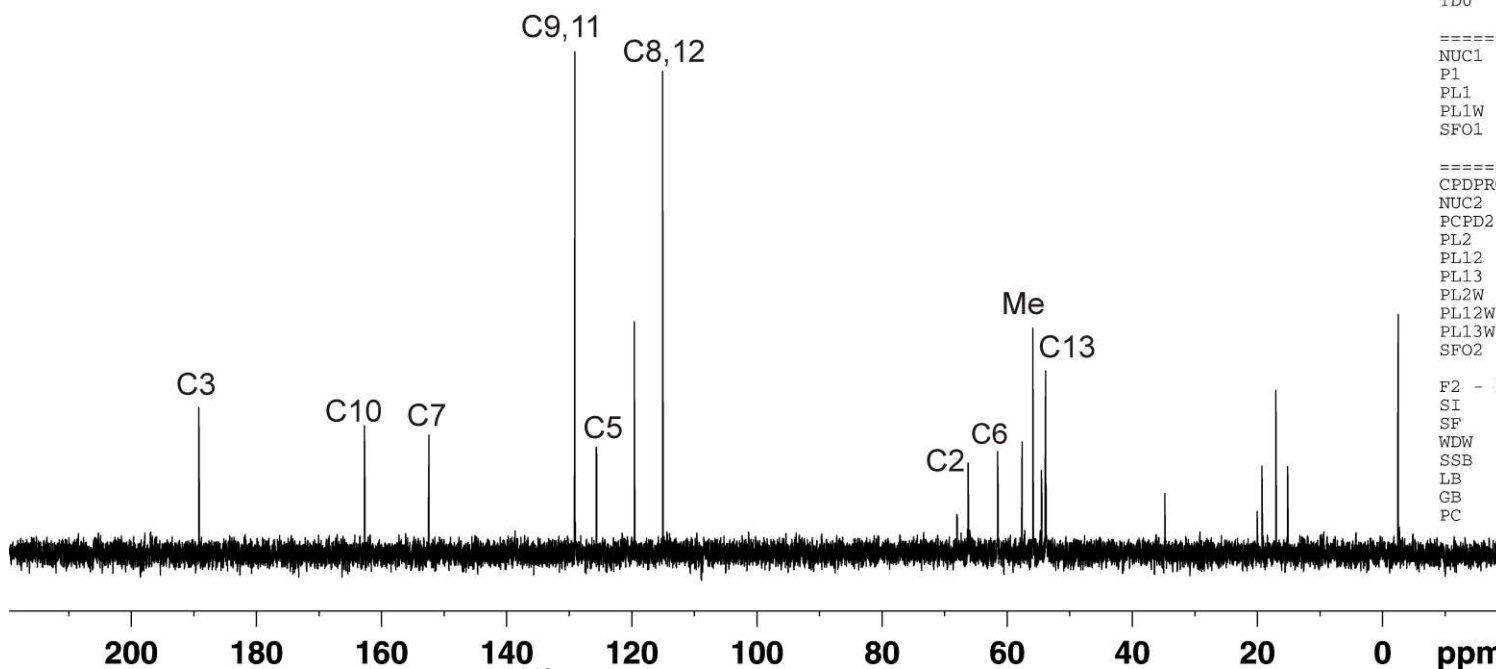
Current Data Parameters  
 NAME metoxi\_artigo  
 EXPNO 2  
 PROCNO 1

F2 - Acquisition Parameters  
 Date\_ 20101113  
 Time 0.20  
 INSTRUM spect  
 PROBHD 5 mm PABBO BB-  
 PULPROG zgpg30  
 TD 32768  
 SOLVENT D2O  
 NS 1024  
 DS 4  
 SWH 24038.461 Hz  
 FIDRES 0.733596 Hz  
 AQ 0.6816244 sec  
 RG 80.6  
 DW 20.800 usec  
 DE 6.50 usec  
 TE 299.4 K  
 D1 2.00000000 sec  
 D11 0.03000000 sec  
 TDO 1

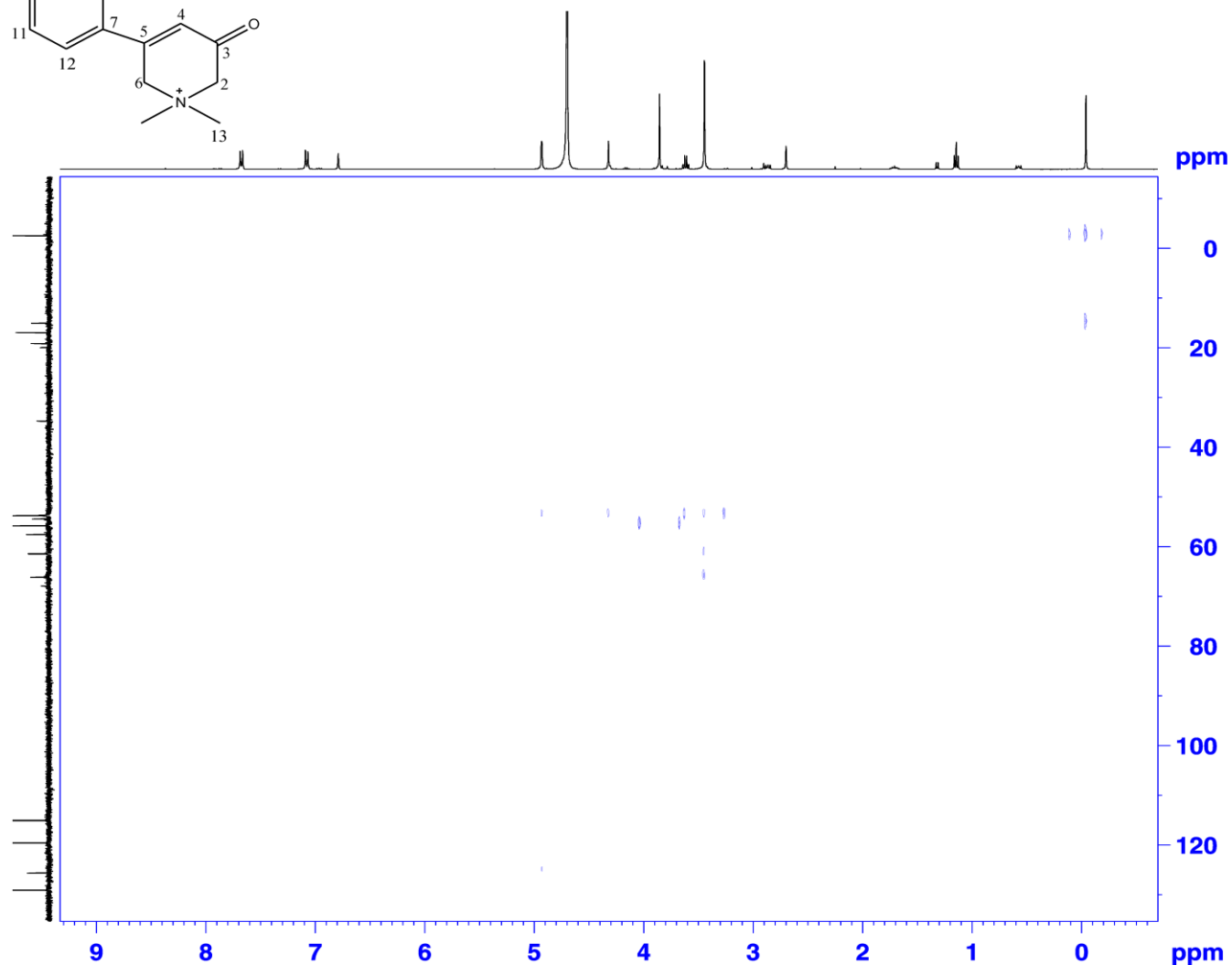
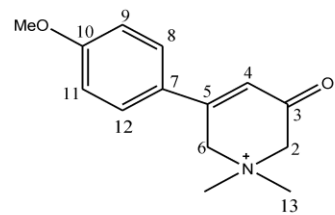
===== CHANNEL f1 =====  
 NUC1 13C  
 P1 8.50 usec  
 PL1 -4.00 dB  
 PL1W 74.45296478 W  
 SFO1 100.6228293 MHz

===== CHANNEL f2 =====  
 CPDPRG2 waltz16  
 NUC2 1H  
 PCPD2 100.00 usec  
 PL2 -5.00 dB  
 PL12 16.01 dB  
 PL13 12.91 dB  
 PL2W 31.77312851 W  
 PL12W 0.25180247 W  
 PL13W 0.51411468 W  
 SFO2 400.1316005 MHz

F2 - Processing parameters  
 SI 32768  
 SF 100.6127671 MHz  
 WDW EM  
 SSB 0  
 LB 1.00 Hz  
 GB 0  
 PC 1.40



Anexo 24. Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  para o brometo de 2,6-tetraidro-*N,N*-dimetil-3-oxo-5-*p*-metoxi-fenilpiridínio (IV).



```

Current Data Parameters
NAME      metoxi_artigo
EXPNO    4
PROCNO   1

F2 - Acquisition Parameters
Date_    20101113
Time     0.47
INSTRUM  spect
PROBHD   5 mm PABBO BB-
PULPROG  hmbcgpndqf
TD       4096
SOLVENT  D2O
NS       8
DS       16
SWH      4012.841 Hz
FIDRES   0.976698 Hz
AQ       0.5104116 sec
RG       80.6
DW       124.600 usec
DE       6.50 usec
TE       298.8 K
CNST13   2.0000000
D0       0.00000300 sec
D1       1.00000000 sec
D6       0.25000000 sec
D16      0.00025000 sec
INO      0.00002080 sec

===== CHANNEL f1 =====
NUC1     1H
P1       8.90 usec
P2       17.80 usec
PL1      -5.00 dB
PL1W     31.77312851 W
SFO1     400.1317276 MHz

===== CHANNEL f2 =====
NUC2     13C
P3       8.50 usec
P4       17.80 usec
PL2      -4.00 dB
PL2W     74.45296478 W
SFO2     100.6143695 MHz

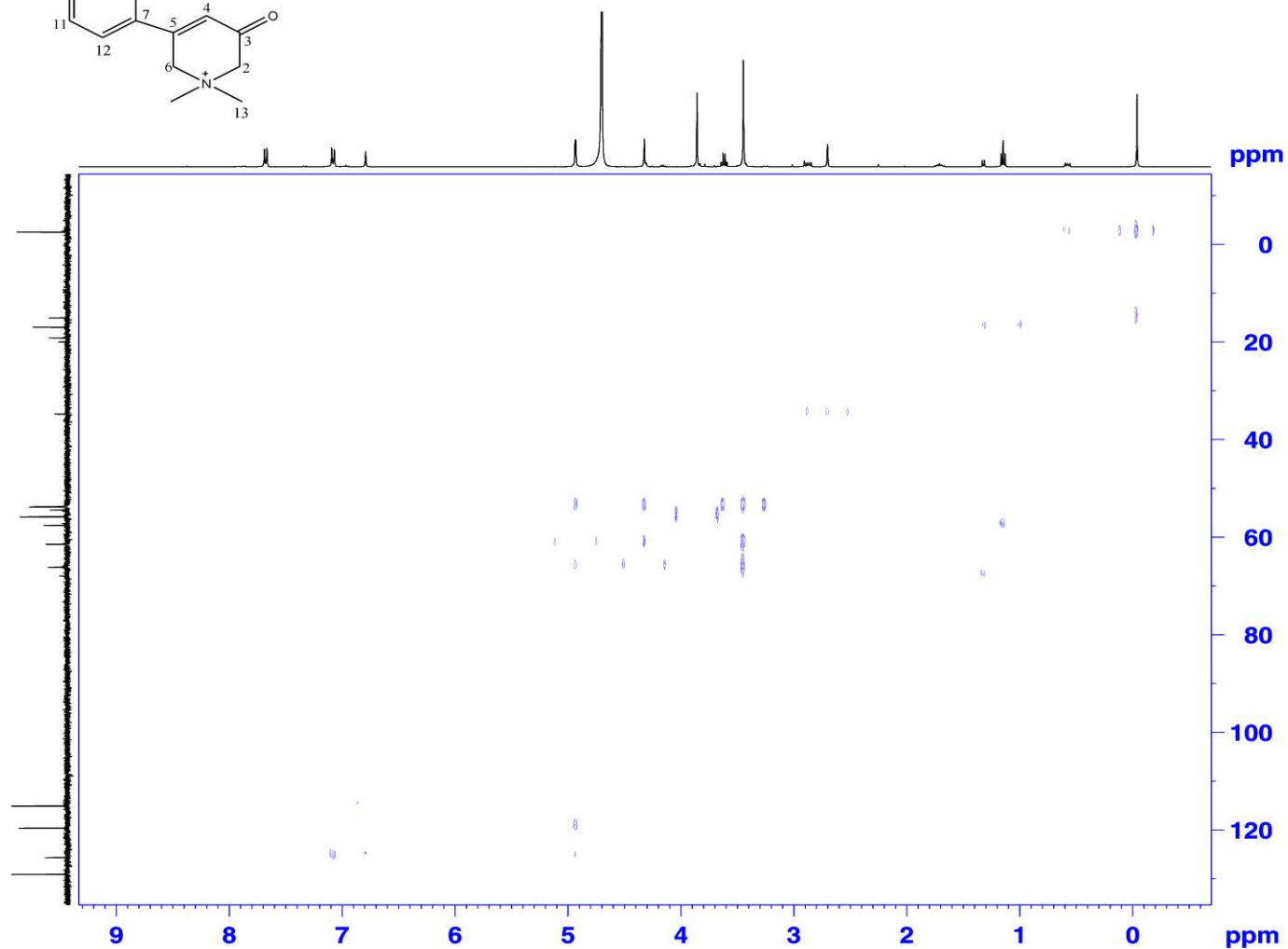
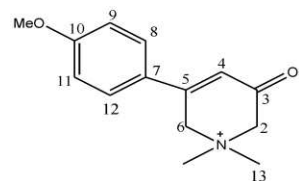
===== GRADIENT CHANNEL =====
GPNAM1   SINE.100
GPNAM2   SINE.100
GPNAM3   SINE.100
GPZ1     50.00 %
GPZ2     30.00 %
GPZ3     40.10 %
P16      1000.00 usec

F1 - Acquisition parameters
ND0      2
TD       128
SFO1     100.6144 MHz
FIDRES   187.784698 Hz
SW       238.897 ppm
FnMODE   QF

F2 - Processing parameters
SI       2048
SF       400.1300000 MHz
WDW      SINE
SSB      0
LB       0.00 Hz
GB       0
PC       1.40

F1 - Processing parameters
SI       256
MC2      QF
SF       100.6127690 MHz
WDW      SINE
SSB      0
LB       0.00 Hz
GB       0
  
```

Anexo 25. Mapa de contorno HMBC  $^1J_{CH} = 2$ , para o brometo de 2,6-tetraidro-*N,N*-dimetil-3-oxo-5- *p*-metoxi-fenilpiridínio (IV).



Current Data Parameters  
 NAME metoxi\_artigo  
 EXPNO 5  
 PROCNO 1

F2 - Acquisition Parameters  
 Date\_ 20101113  
 Time 1.18  
 INSTRUM spect  
 PROBHD 5 mm FAPBO BB-  
 PULPROG hmcgprndqf  
 TD 4096  
 SOLVENT D2O  
 NS 8  
 DS 16  
 SWH 4012.841 Hz  
 FIDRES 0.379698 Hz  
 AQ 0.5104116 sec  
 RG 80.6  
 DW 124.600 usec  
 DE 6.50 usec  
 TE 297.9 K  
 CNST13 5.0000000  
 D0 0.0000000 sec  
 D1 1.0000000 sec  
 D6 0.1000000 sec  
 D16 0.0002500 sec  
 IN0 0.00002080 sec

===== CHANNEL f1 =====  
 NUC1 1H  
 P1 8.90 usec  
 P2 17.80 usec  
 PL1 -5.00 dB  
 PL1W 31.77312851 W  
 SFO1 400.1317276 MHz

===== CHANNEL f2 =====  
 NUC2 13C  
 P3 8.50 usec  
 PL2 -4.00 dB  
 PL2W 74.45296478 W  
 SFO2 100.6143695 MHz

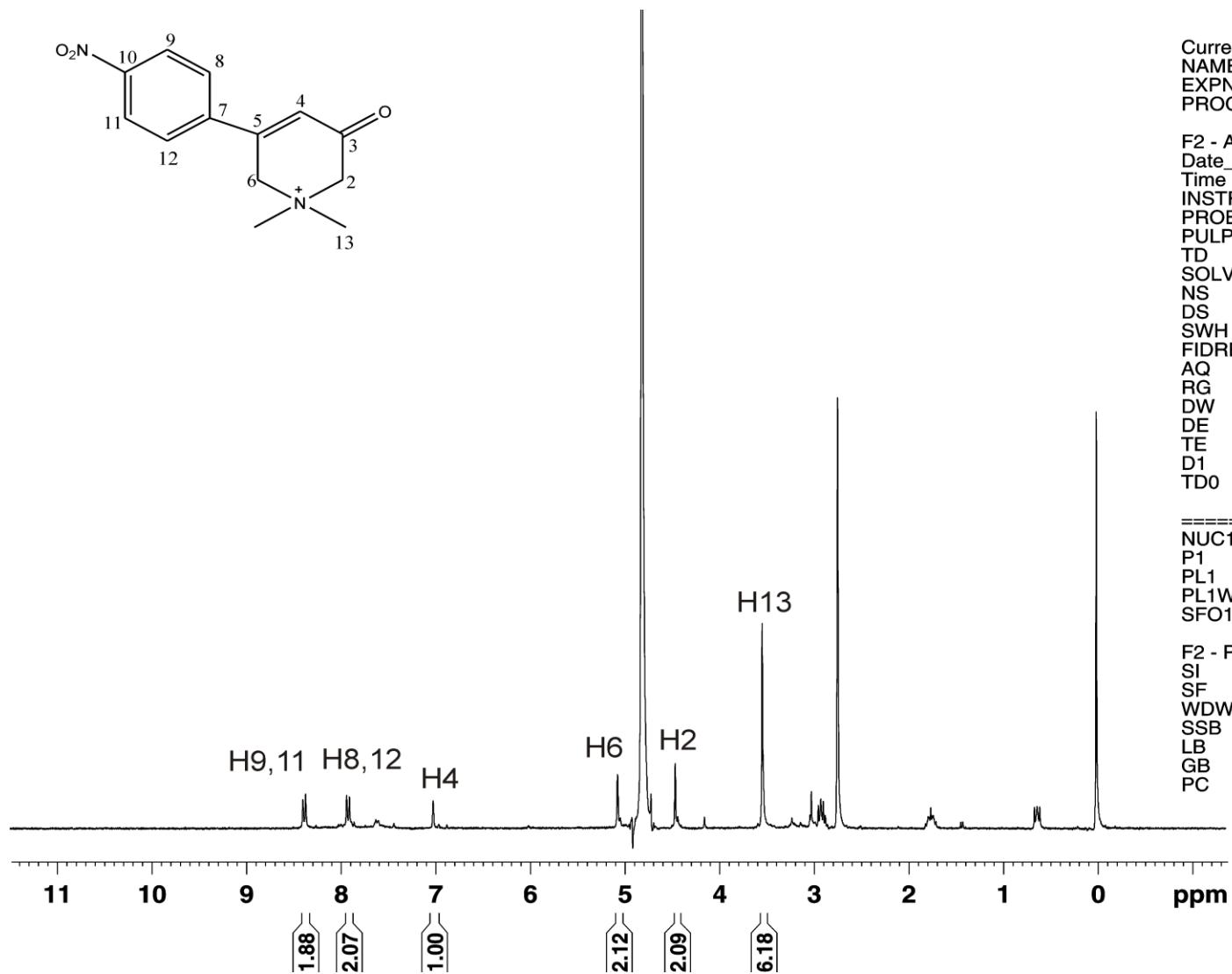
===== GRADIENT CHANNEL =====  
 GPNAM1 SINE.100  
 GPNAM2 SINE.100  
 GPNAM3 SINE.100  
 GPZ1 50.00 %  
 GPZ2 30.00 %  
 GPZ3 40.10 %  
 P16 1000.00 usec

F1 - Acquisition parameters  
 ND0 2  
 TD 128  
 SFO1 100.6144 MHz  
 FIDRES 187.784698 Hz  
 SW 238.897 ppm  
 FhMODE QF

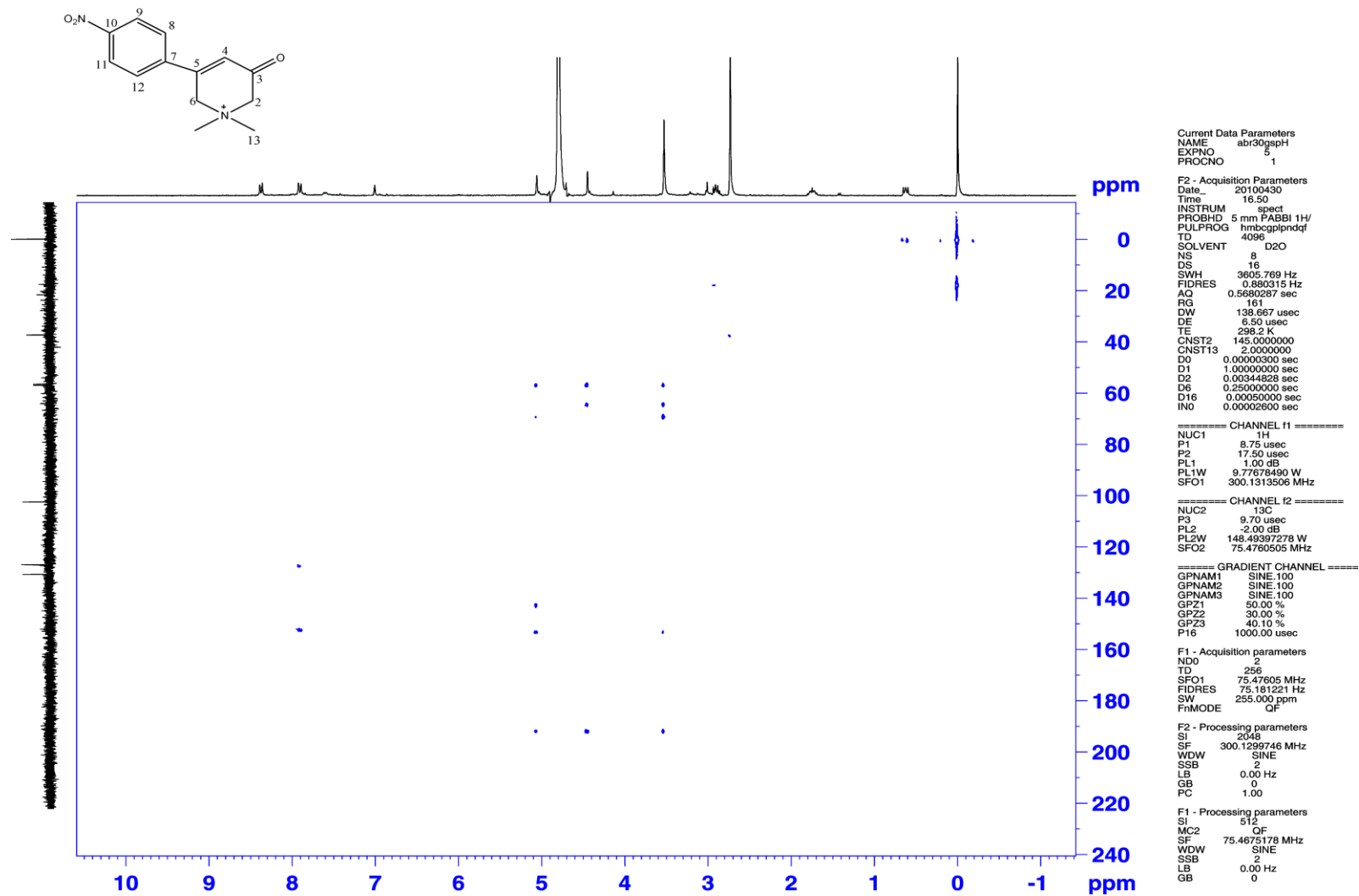
F2 - Processing parameters  
 SI 2048  
 SF 400.1300000 MHz  
 WDW SINE  
 SSB 0  
 LB 0.00 Hz  
 GB 0  
 PC 1.40

F1 - Processing parameters  
 SI 256  
 MC2 QF  
 SF 100.6127690 MHz  
 WDW SINE  
 SSB 0  
 LB 0.00 Hz  
 GB 0

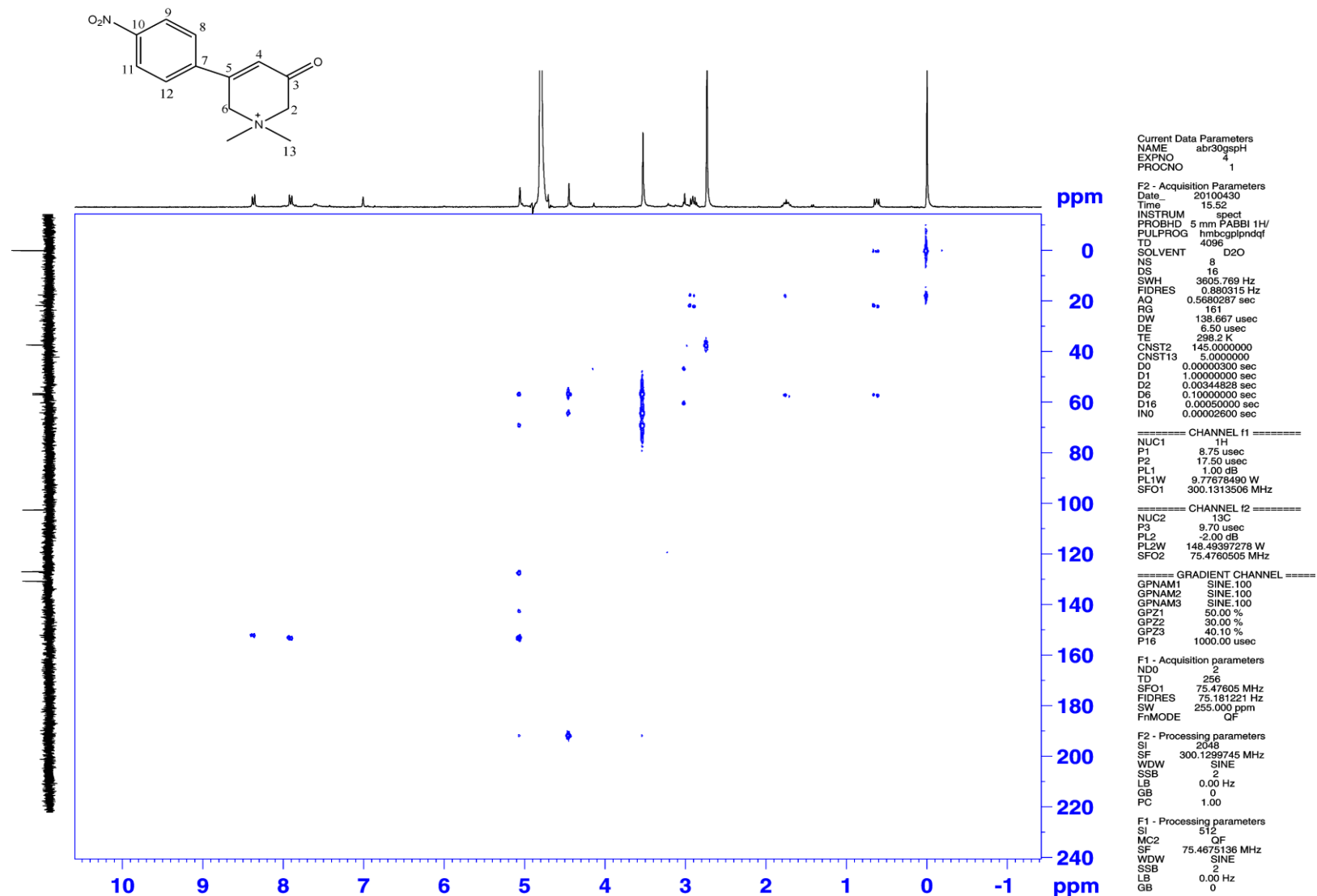
Anexo 26. Mapa de contorno HMBC  $^nJ_{CH} = 5$ , para o brometo de 2,6-tetraidro-*N,N*-dimetil-3-oxo-5- *p*-metoxi-fenilpiridínio (IV).



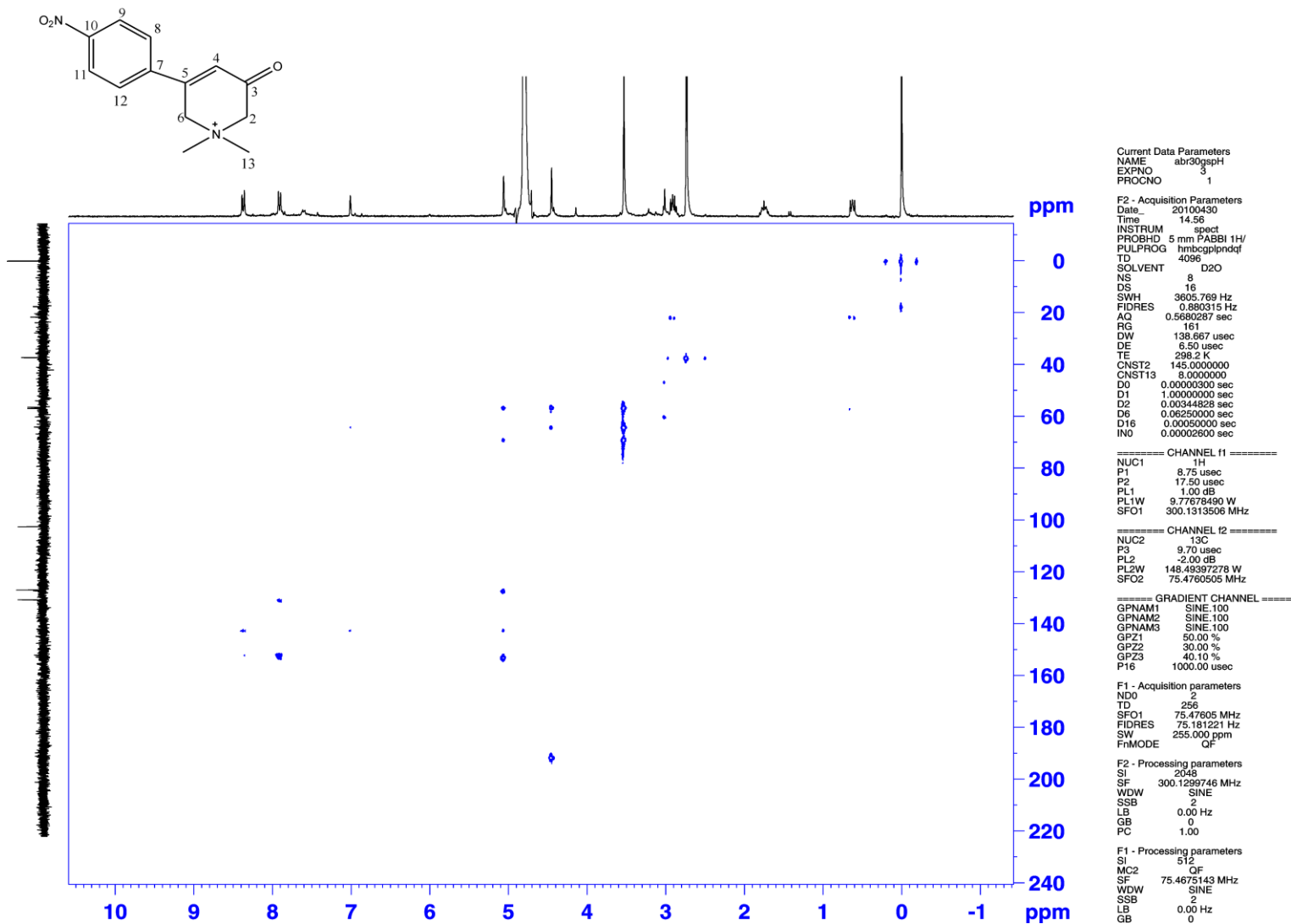
Anexo 27. Mapa de contorno HSQC, para o brometo de 2,6-tetraidro-*N,N*-dimetil-3-oxo-5-*p*-metoxi-fenilpiridínio (IV).



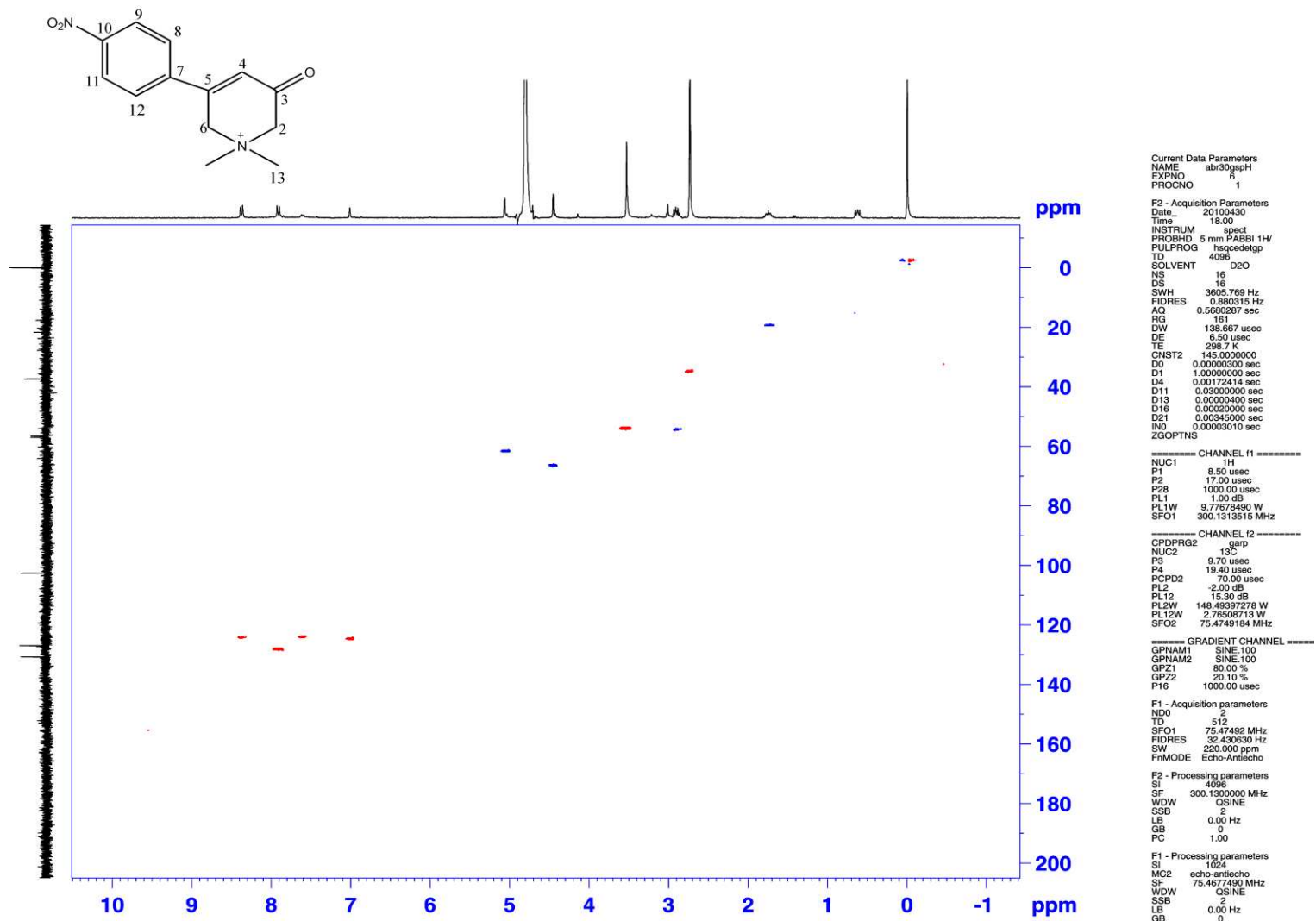
Anexo 28. Espectro de RMN de <sup>13</sup>C, para o brometo de 2,6-tetraidro-*N,N*-dimetil-3-oxo-5-*p*-nitro-fenilpiridínio (IV).



Anexo 29. Mapa de contorno HMBC  $^nJ_{CH} = 5$ , para o brometo de 2,6-tetraidro-*N,N*-dimetil-3-oxo-5-*p*-nitro-fenilpiridínio (IV).

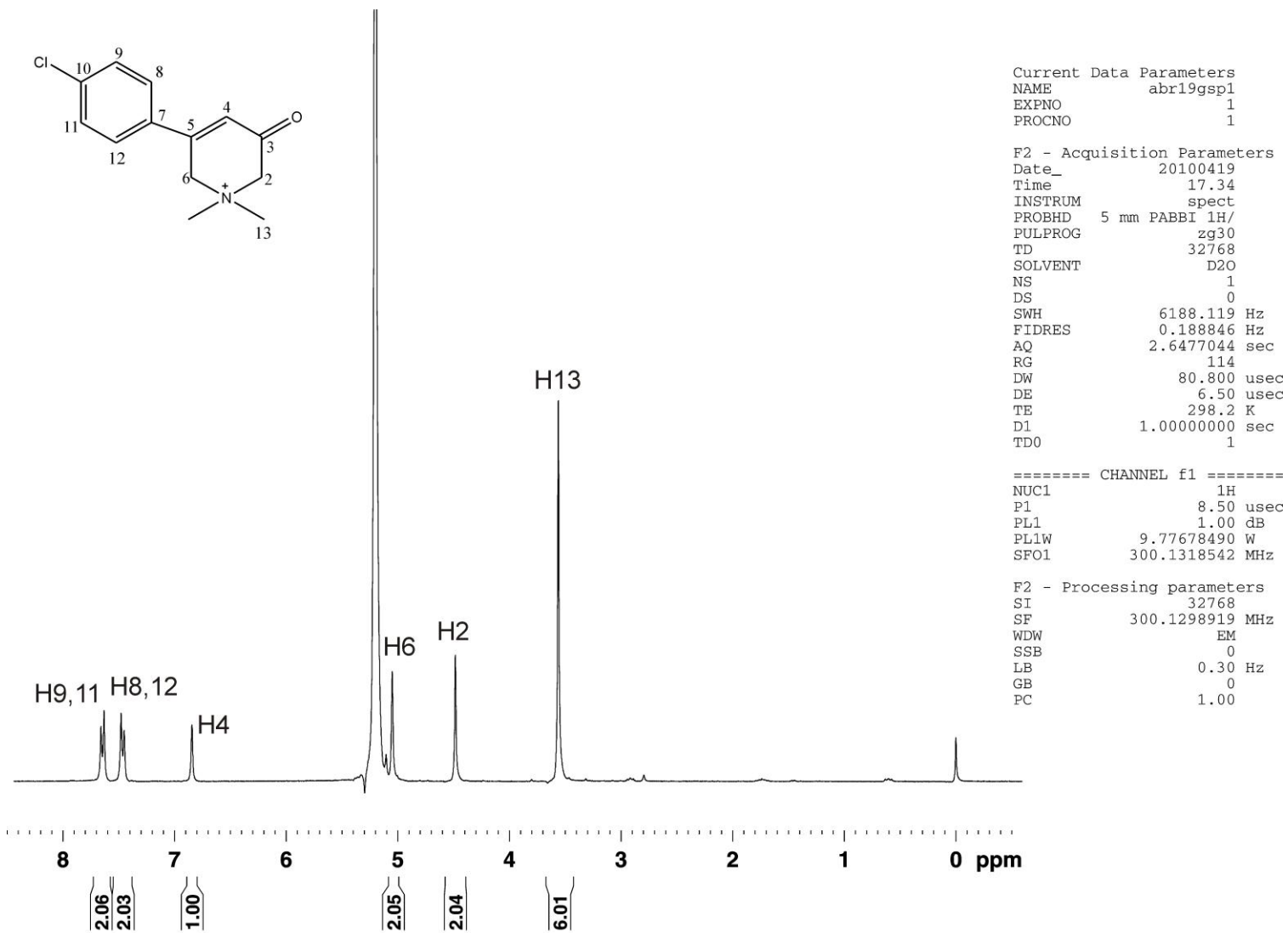


Anexo 30. Mapa de contorno HMBC  $^nJ_{CH} = 8$ , para o brometo de 2,6-tetraidro-*N,N*-dimetil-3-oxo-5-*p*-nitro-fenilpiridínio (IV).

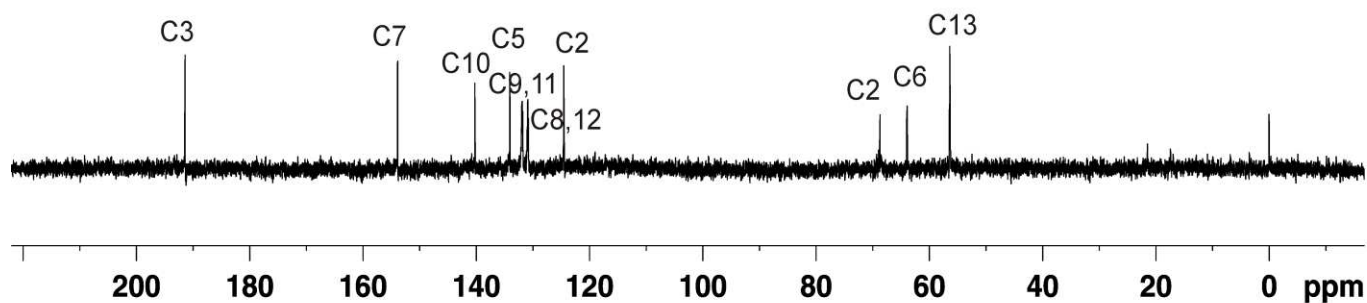
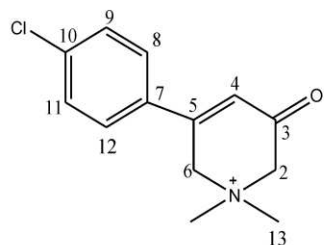


Anexo 31. Mapa de contorno HSQC, para o brometo de 2,6-tetraidro-*N,N*-dimetil-3-oxo-5-*p*-nitro-fenilpiridíno (IV).





**Anexo 32.** Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  para o brometo de 2,6-tetraidro-*N,N*-dimetil-3-oxo-5-*p*-cloro-fenilpiridínio (IV).



Current Data Parameters  
 NAME abr19gsp1  
 EXPNO 7  
 PROCNO 1

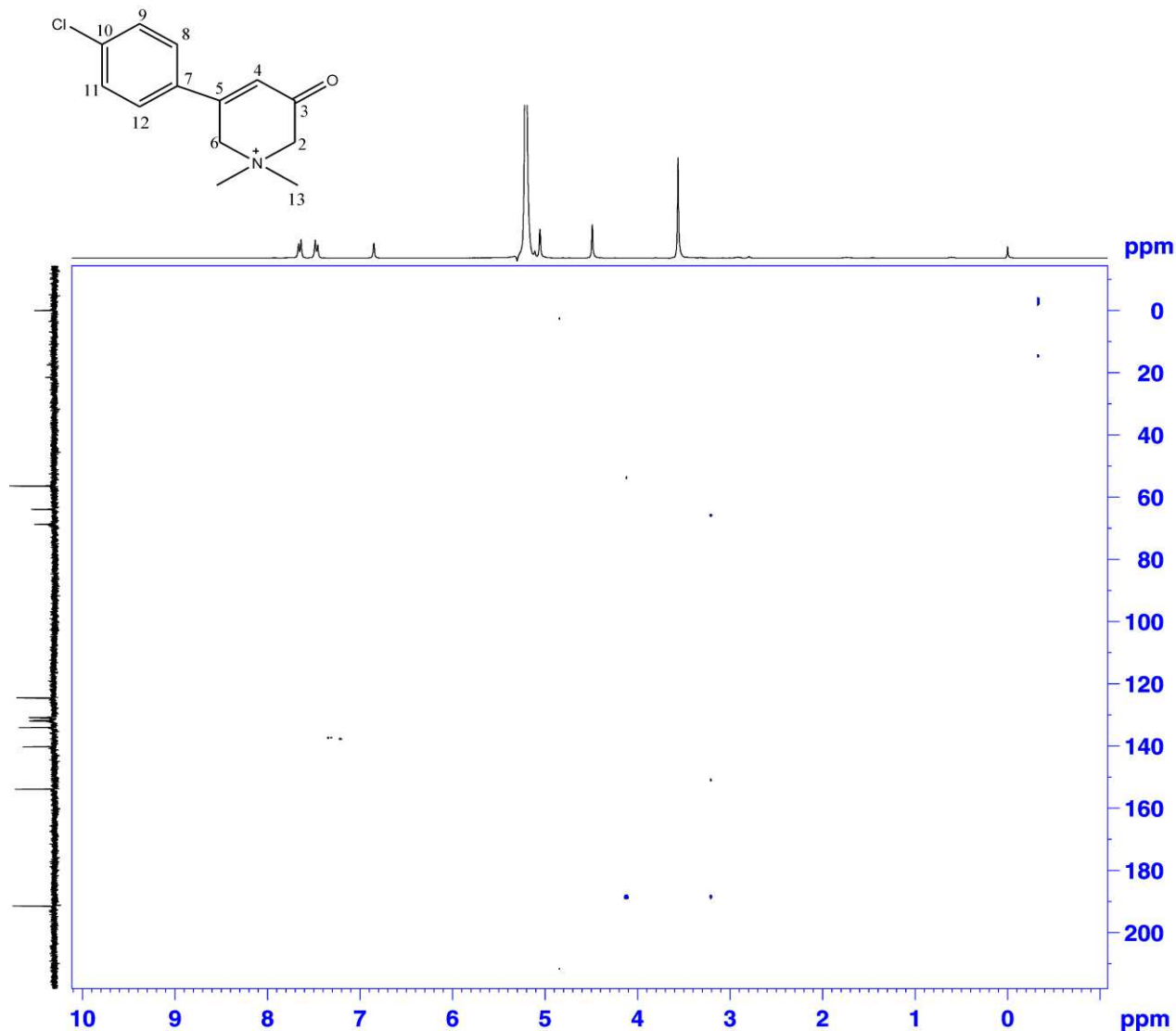
F2 - Acquisition Parameters  
 Date\_ 20100420  
 Time 8.15  
 INSTRUM spect  
 PROBHD 5 mm PABBI 1H/  
 PULPROG zgpg30  
 TD 32768  
 SOLVENT D2O  
 NS 6144  
 DS 0  
 SWH 18028.846 Hz  
 FIDRES 0.550197 Hz  
 AQ 0.9088159 sec  
 RG 16  
 DW 27.733 usec  
 DE 6.50 usec  
 TE 298.2 K  
 D1 2.0000000 sec  
 D11 0.0300000 sec  
 TD0 1

===== CHANNEL f1 =====  
 NUC1 13C  
 P1 9.00 usec  
 PL1 -2.00 dB  
 PL1W 148.49397278 W  
 SFO1 75.4752944 MHz

===== CHANNEL f2 =====  
 CPDPRG2 waltz16  
 NUC2 1H  
 PCPD2 100.00 usec  
 PL2 1.00 dB  
 PL12 22.31 dB  
 PL13 24.00 dB  
 PL2W 9.77678490 W  
 PL12W 0.07230963 W  
 PL13W 0.04900000 W  
 SFO2 300.1312005 MHz

F2 - Processing parameters  
 SI 32768  
 SF 75.4675500 MHz  
 WDW EM  
 SSB 0  
 LB 1.00 Hz  
 GB 0  
 PC 1.00

Anexo 33. Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  para o brometo de 2,6-tetraidro-*N,N*-dimetil-3-oxo-5-*p*-cloro-fenilpiridínio (IV).



```

Current Data Parameters
NAME      abr19gsp1
EXPNO     5
PROCNO    1

F2 - Acquisition Parameters
Date_     20100419
Time      22:56
INSTRUM   spect
PROBHD    5 mm PABBI 1H/
PULPROG   hmbcgpndqf
TD         4096
SOLVENT   D2O
NS         8
DS         16
SWH        3360.215 Hz
FIDRES     0.820365 Hz
AQ         0.6095348 sec
RG         114
DW         148.800 usec
DE         6.50 usec
TE         298.2 K
CNST2     145.0000000
CNST13    2.0000000
D0         0.00000000 sec
D1         1.00000000 sec
D2         0.00344828 sec
D6         0.25000000 sec
D16        0.00050000 sec
INO        0.00002785 sec

===== CHANNEL f1 =====
NUC1       1H
P1         8.75 usec
P2         17.50 usec
PL1        1.00 dB
PL1W       9.77678490 W
SFO1       300.1313555 MHz

===== CHANNEL f2 =====
NUC2       13C
P3         9.70 usec
PL2        -2.00 dB
PL2W       148.49397278 W
SFO2       75.4752203 MHz

===== GRADIENT CHANNEL =====
GPNAM1    SINE.100
GPNAM2    SINE.100
GPNAM3    SINE.100
GPZ1      50.00 %
GPZ2      30.00 %
GPZ3      40.10 %
P16       1000.00 usec

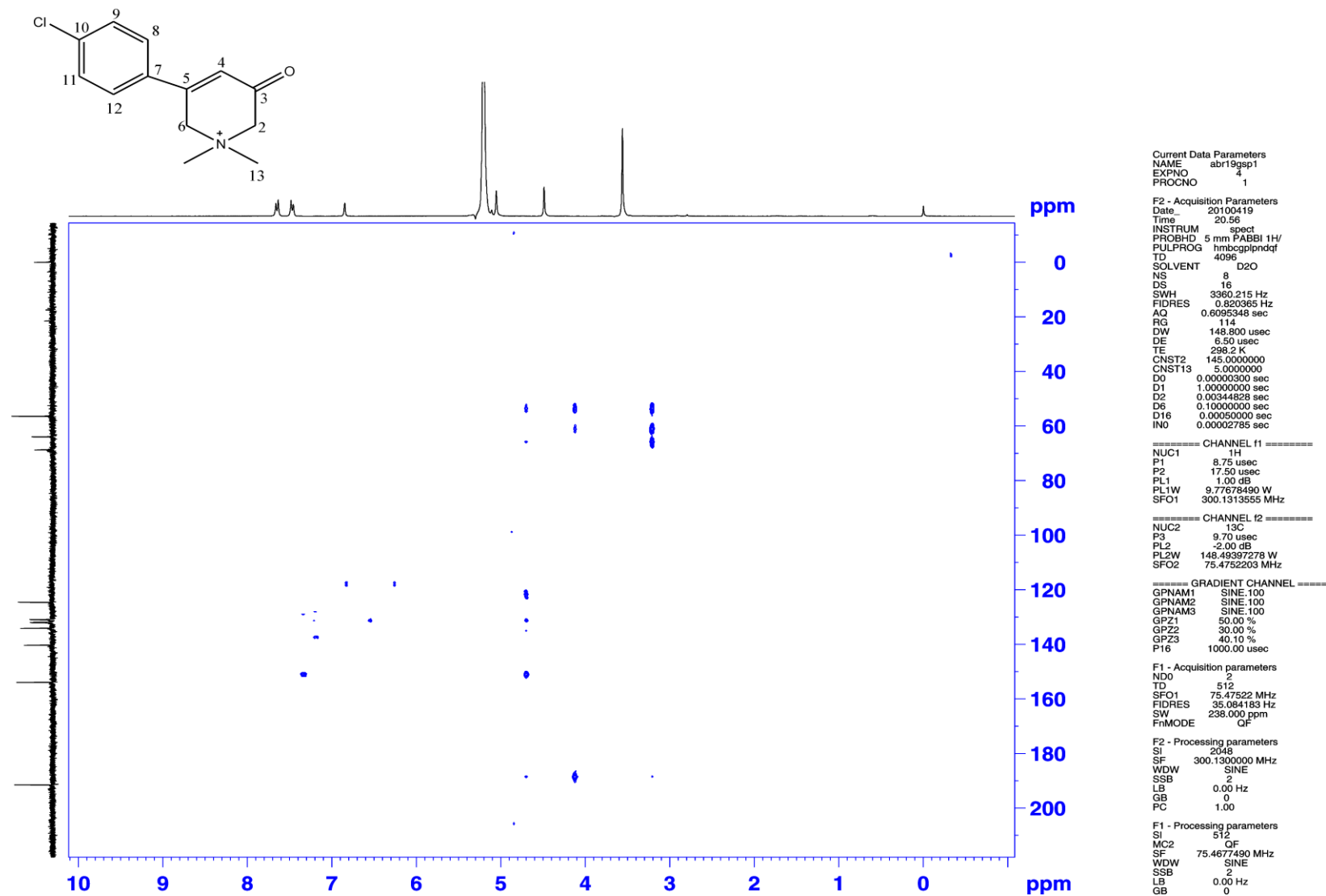
F1 - Acquisition parameters
ND0        2
TD          512
SFO1       75.47522 MHz
FIDRES     35.084183 Hz
SW         238.000 ppm
FnMODE     QF

F2 - Processing parameters
SI         2048
SF         300.1300000 MHz
WDW        SINE
SSB        2
LB         0.00 Hz
GB         0
PC         1.00

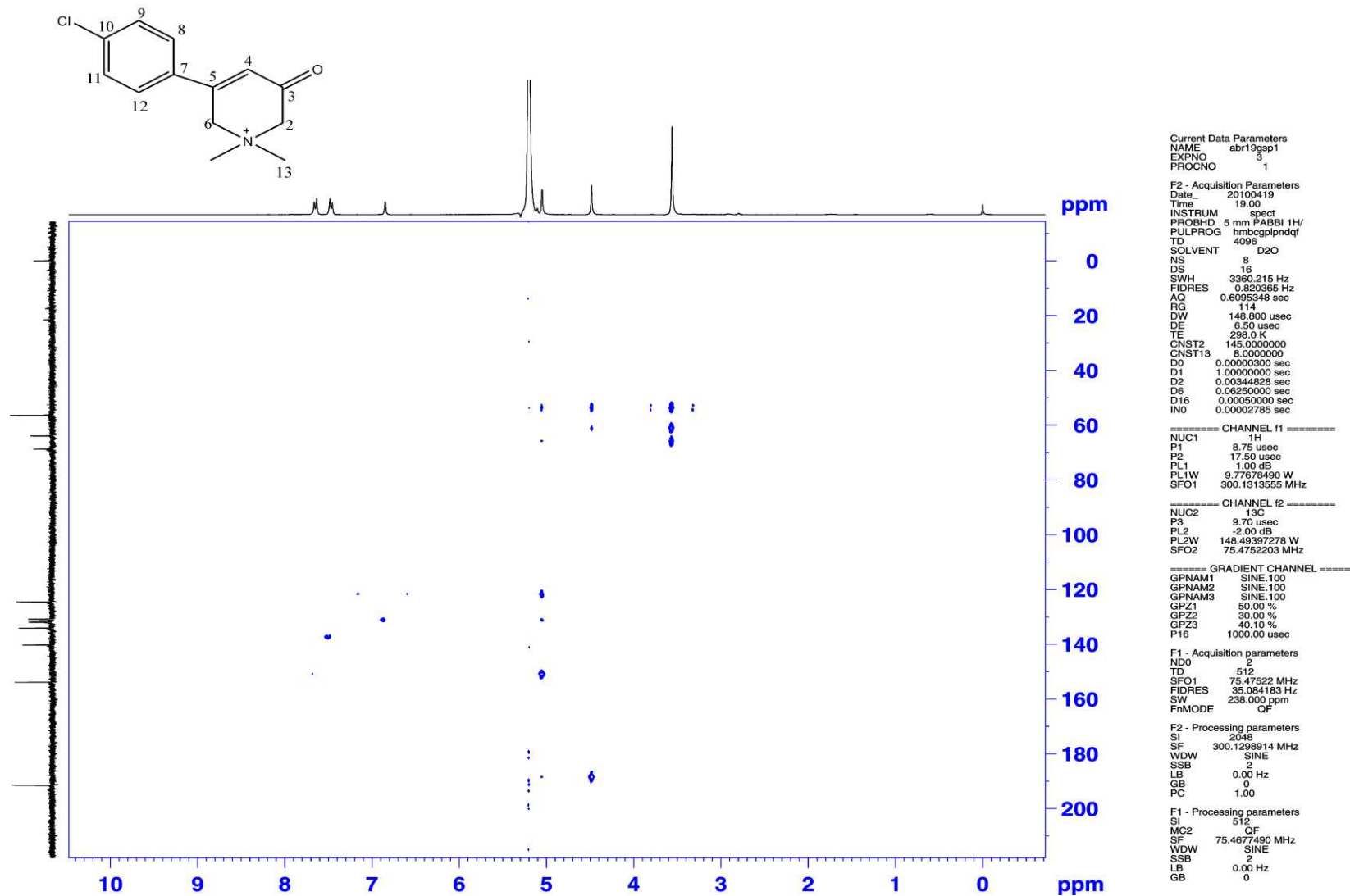
F1 - Processing parameters
SI         512
MC2        QF
SF         75.4677490 MHz
WDW        SINE
SSB        2
LB         0.00 Hz
GB         0

```

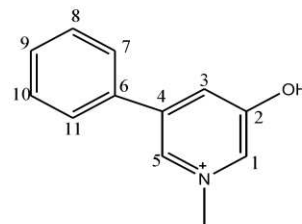
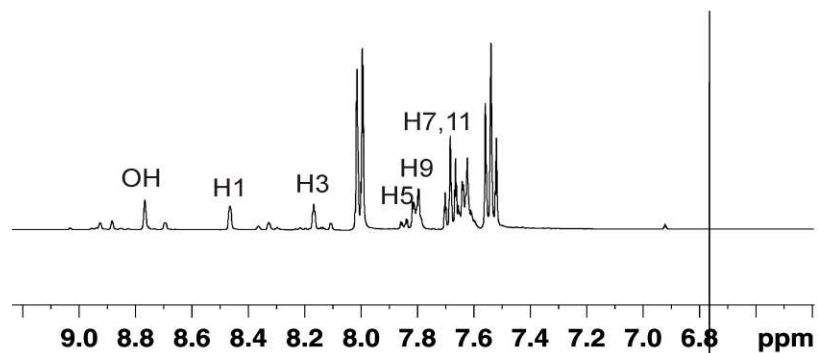
Anexo 34. Mapa de contorno HMBC  ${}^nJ_{CH} = 2$  para o brometo de 2,6-tetraidro-*N,N*-dimetil-3-oxo-5-*p*-cloro-fenilpiridínio (IV).



Anexo 35. Mapa de contorno HMBC  ${}^nJ_{CH} = 5$  para o brometo de 2,6-tetraidro-*N,N*-dimetil-3-oxo-5-*p*-cloro-fenilpiridínio (IV).



Anexo 36. Mapa de contorno HMBC  $^nJ_{CH} = 8$  para o brometo de 2,6-tetraidro-*N,N*-dimetil-3-oxo-5-*p*-cloro-fenilpiridínio (IV).

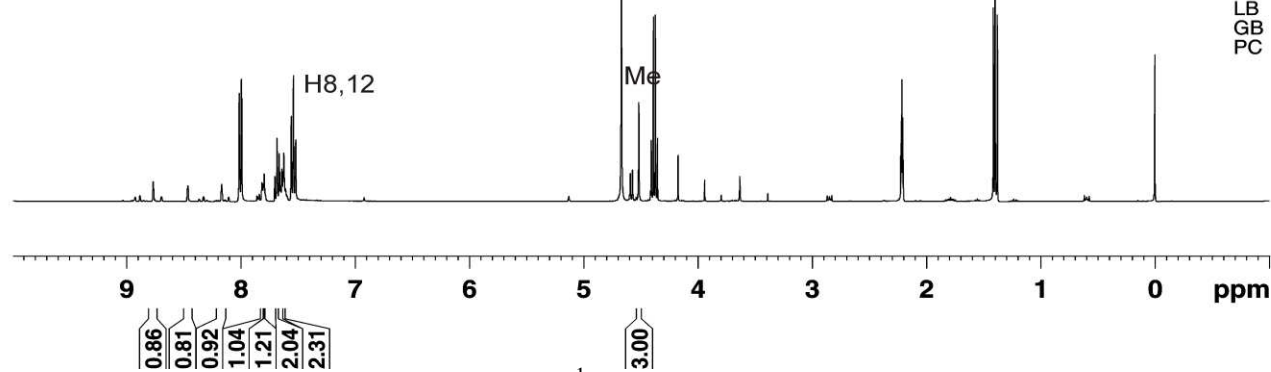


Current Data Parameters  
 NAME demetil-91  
 EXPNO 1  
 PROCNO 1

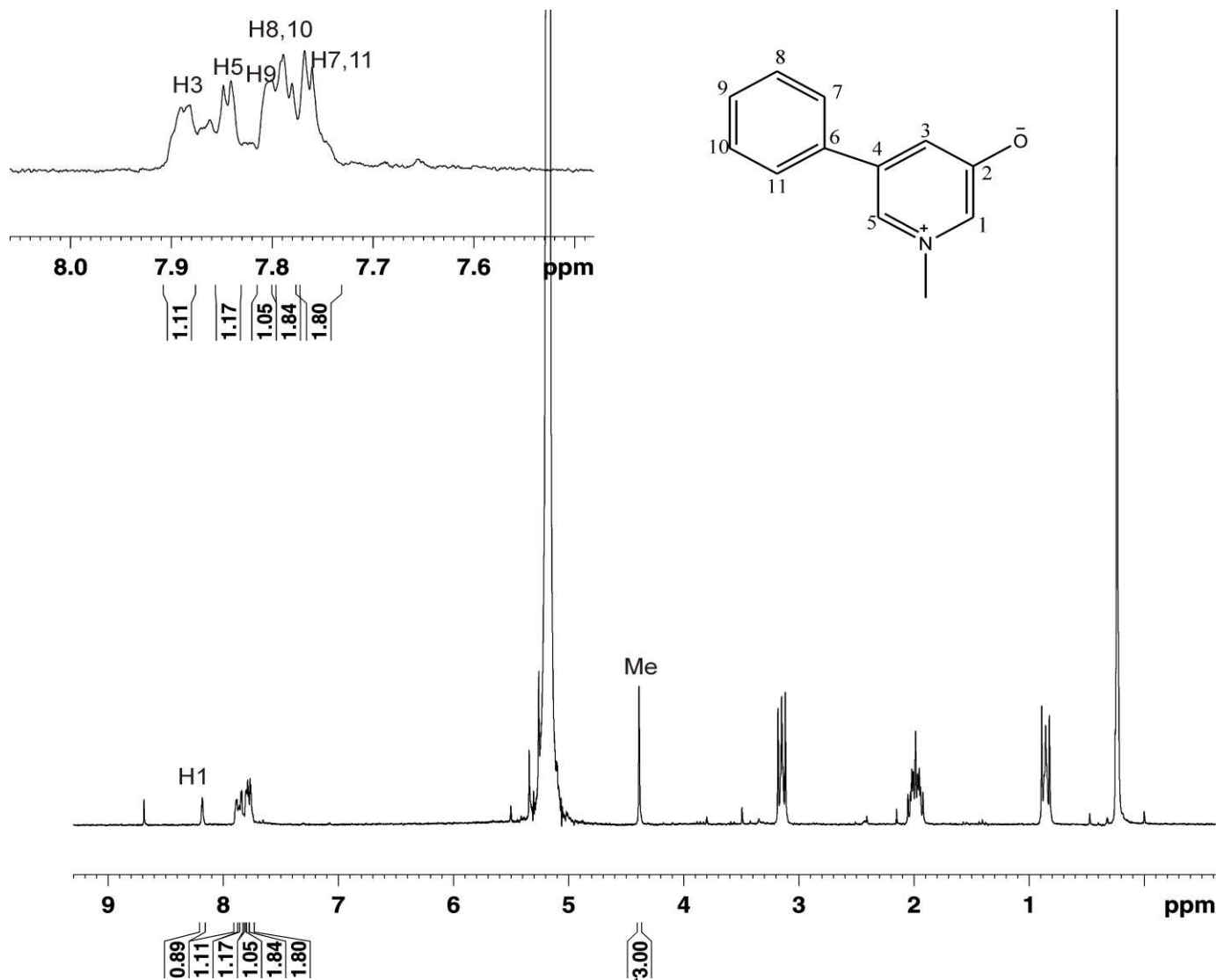
F2 - Acquisition Parameters  
 Date\_ 20100612  
 Time 15.21  
 INSTRUM spect  
 PROBHD 5 mm PABBI 1H/  
 PULPROG zg30  
 TD 32768  
 SOLVENT Acetone  
 NS 8  
 DS 0  
 SWH 4401.409 Hz  
 FIDRES 0.134320 Hz  
 AQ 3.7224948 sec  
 RG 80.6  
 DW 113.600 usec  
 DE 6.50 usec  
 TE 298.9 K  
 D1 1.00000000 sec  
 TD0 1

===== CHANNEL f1 =====  
 NUC1 1H  
 P1 7.25 usec  
 PL1 -1.44 dB  
 PL1W 13.99780655 W  
 SFO1 400.1317407 MHz

F2 - Processing parameters  
 SI 131072  
 SF 400.1299424 MHz  
 WDW EM  
 SSB 0  
 LB 0.30 Hz  
 GB 0  
 PC 1.00



Anexo 37. Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  para o brometo 3-hidróxi-1-metil-5-fenilpiridínio (VA).



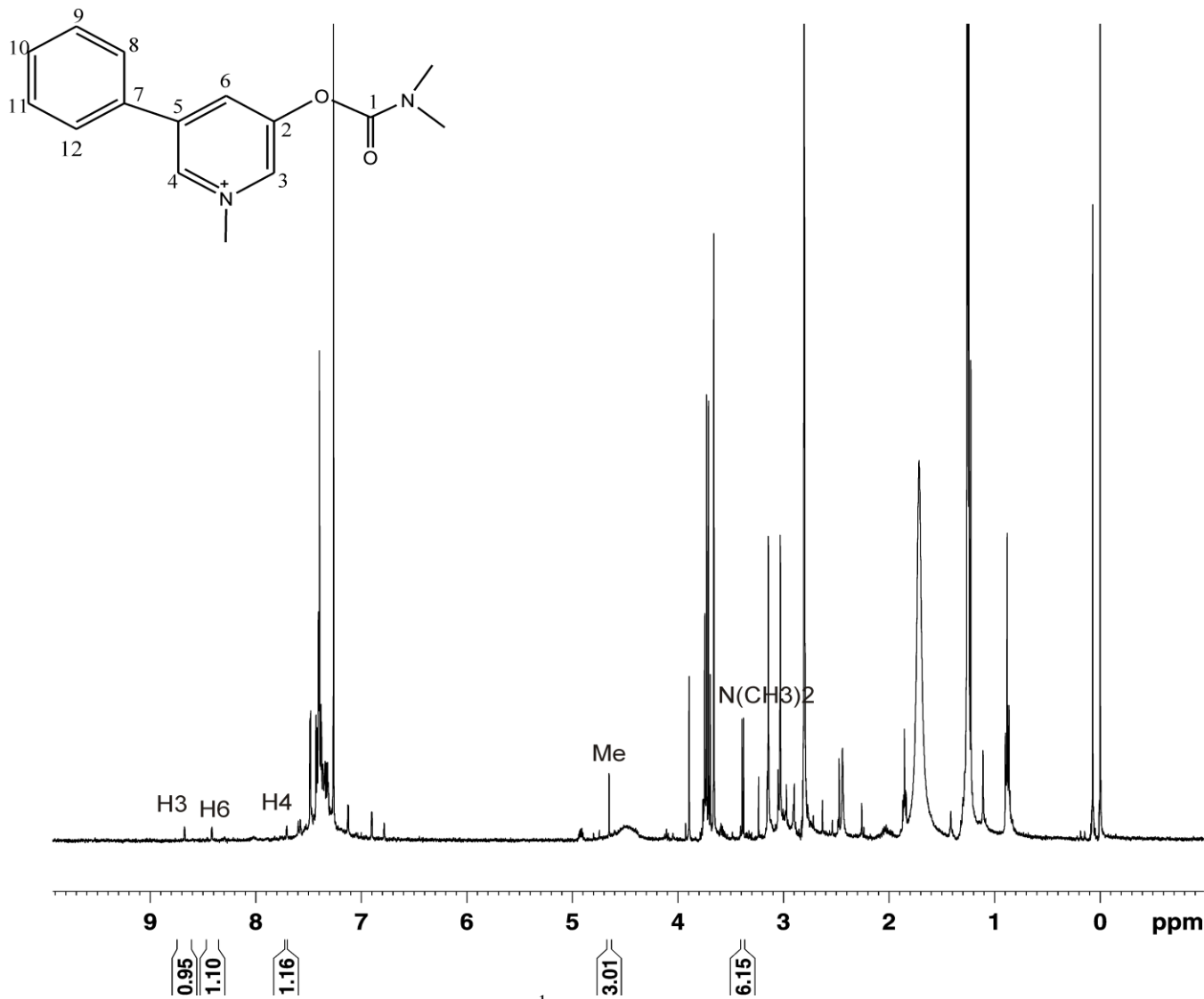
Current Data Parameters  
 NAME fev25gspH1  
 EXPNO 1  
 PROCNO 1

F2 - Acquisition Parameters  
 Date\_ 20100225  
 Time 9.16  
 INSTRUM spect  
 PROBHD 5 mm QNP 1H/13  
 PULPROG zg30  
 TD 32768  
 SOLVENT D2O  
 NS 32  
 DS 0  
 SWH 5175.983 Hz  
 FIDRES 0.157958 Hz  
 AQ 3.1654389 sec  
 RG 256  
 DW 96.600 usec  
 DE 6.00 usec  
 TE 300.0 K  
 D1 1.00000000 sec  
 TD0 1

===== CHANNEL f1 =====  
 NUC1 1H  
 P1 13.00 usec  
 PL1 -6.00 dB  
 SFO1 250.1315447 MHz

F2 - Processing parameters  
 SI 131072  
 SF 250.1305206 MHz  
 WDW EM  
 SSB 0  
 LB 0.30 Hz  
 GB 0  
 PC 1.00

Anexo 38. Espectro de RMN de <sup>1</sup>H para o brometo 1-metil-3-óxido-5-fenilpiridínio (VIA).



Current Data Parameters  
 NAME jul15gspH  
 EXPNO 1  
 PROCNO 1

F2 - Acquisition Parameters  
 Date\_ 20100715  
 Time 15.59  
 INSTRUM spect  
 PROBHD 5 mm PABBI 1H/  
 PULPROG zg30  
 TD 32768  
 SOLVENT CDCl3  
 NS 1  
 DS 0  
 SWH 8223.685 Hz  
 FIDRES 0.250967 Hz  
 AQ 1.9923444 sec  
 RG 45.2  
 DW 60.800 usec  
 DE 6.50 usec  
 TE 298.4 K  
 D1 1.0000000 sec  
 TD0 1

===== CHANNEL f1 =====  
 NUC1 1H  
 P1 7.25 usec  
 PL1 -1.44 dB  
 PL1W 13.99780655 W  
 SFO1 400.1324710 MHz

F2 - Processing parameters  
 SI 32768  
 SF 400.1300076 MHz  
 WDW EM  
 SSB 0  
 LB 0.30 Hz  
 GB 0  
 PC 1.00

Anexo 39. Espectro de RMN de <sup>1</sup>H para o brometo de *N,N*-dimetilcarbamato de *N*<sup>2</sup>-metilpiridínio (VIIA).



File # 1 : ALCOOLBR

Mode = 2 (Mid-IR)

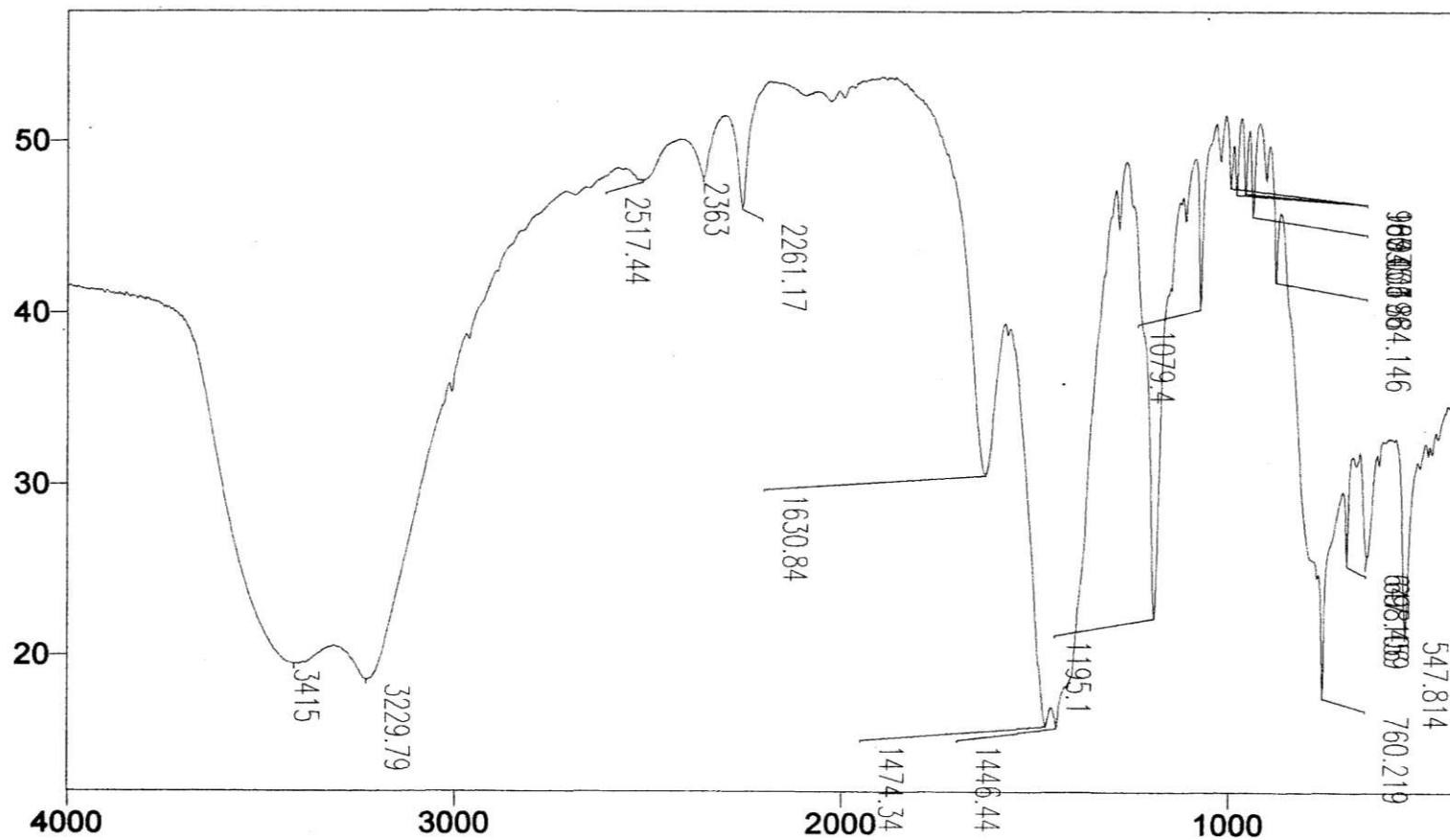
12/1/10 9:55 AM

Sample Description: Glauca KBr

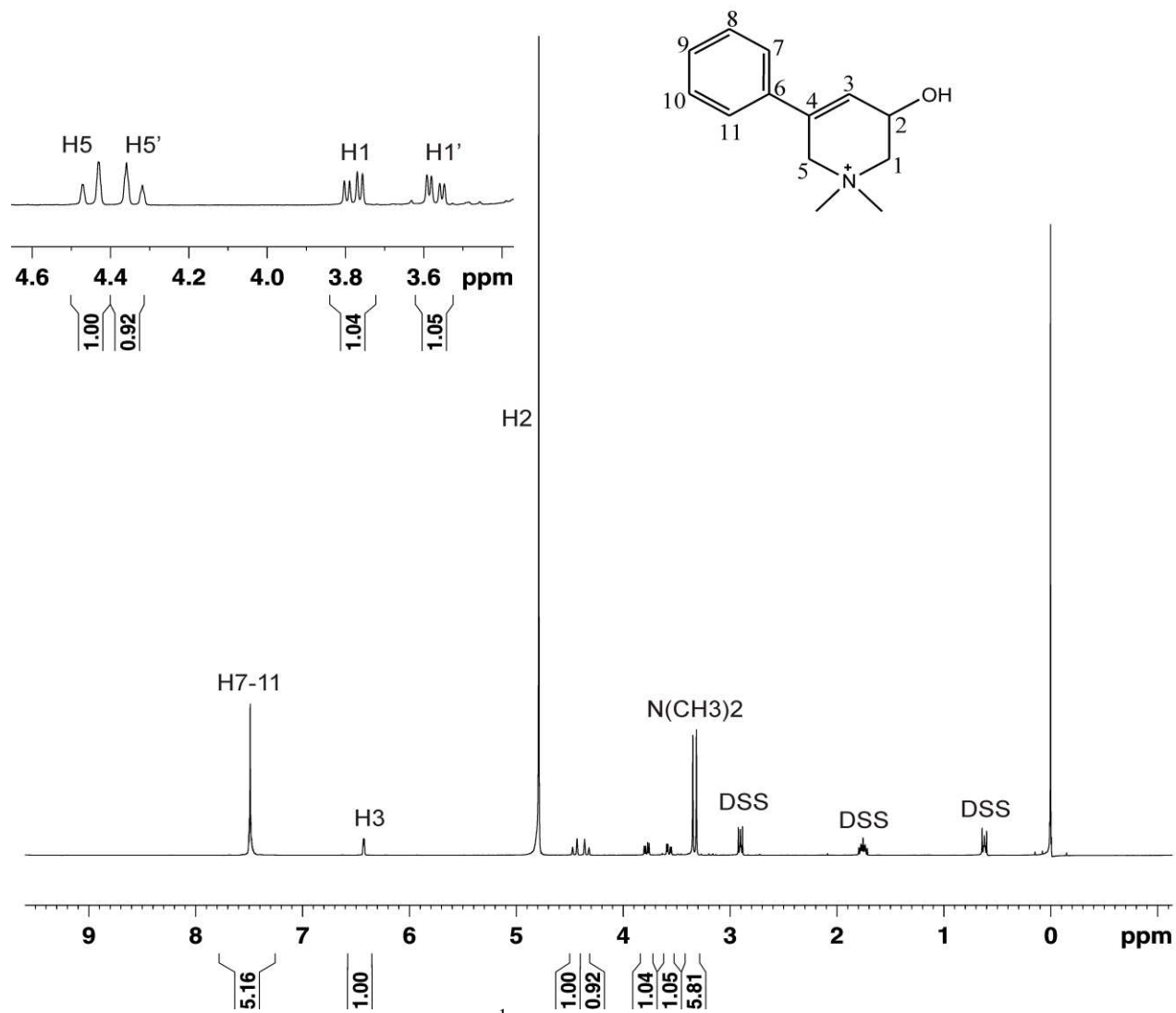
Scans = 16

Res = 4 cm<sup>-1</sup> 21 scans/min

Apod = Cosine



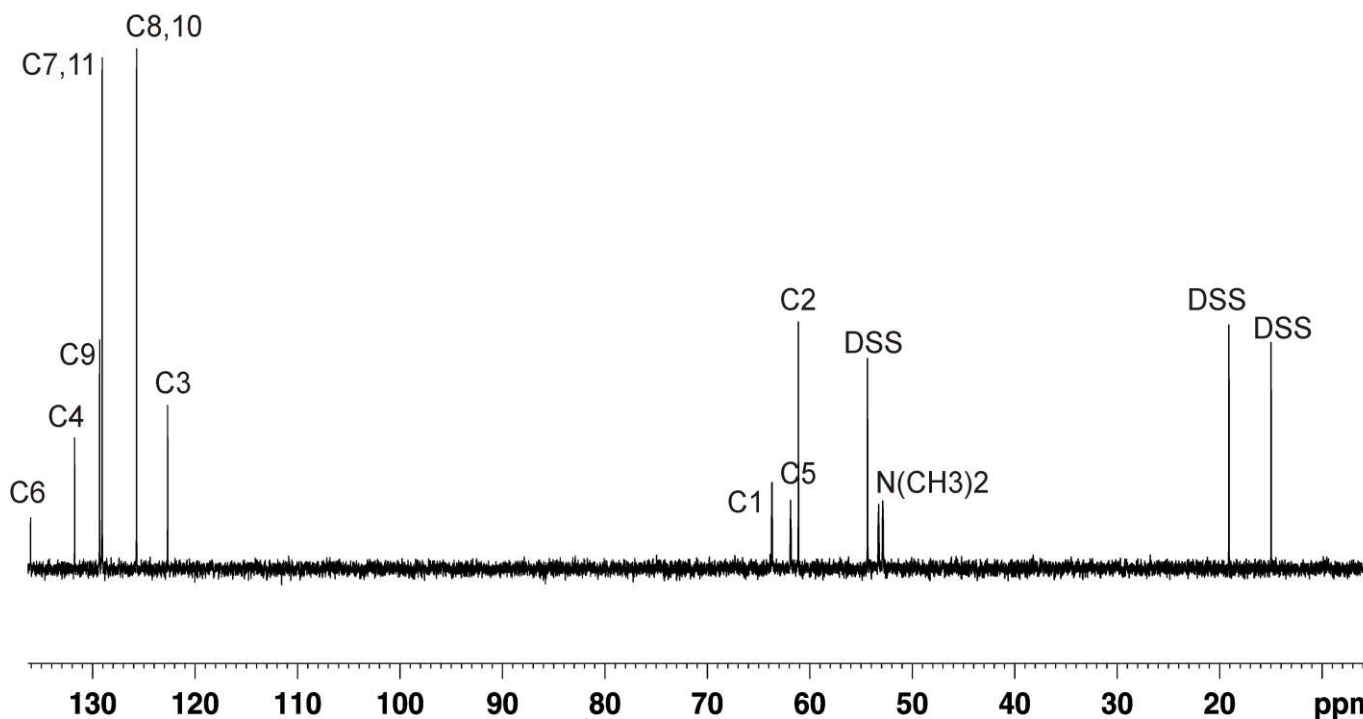
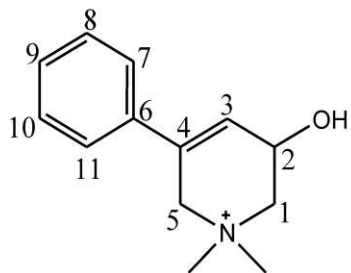
Anexo 40. Espectro de Infra-vermelho o brometo de 2,6-tetraidro-*N,N*-dimetil-3-hidroxi-5-fenilpiridínio (VB).



NAME reducao\_b\_115  
 EXPNO 1  
 PROCNO 1  
 Date\_ 20101008  
 Time 18.09  
 INSTRUM spect  
 PROBHD 5 mm PABBO BB-  
 PULPROG zg30  
 TD 32768  
 SOLVENT D2O  
 NS 8  
 DS 0  
 SWH 4295.533 Hz  
 FIDRES 0.131089 Hz  
 AQ 3.8142452 sec  
 RG 101  
 DW 116.400 usec  
 DE 6.50 usec  
 TE 298.2 K  
 D1 1.00000000 sec  
 TD0 1

===== CHANNEL f1 =====  
 NUC1 1H  
 P1 8.90 usec  
 PL1 -5.00 dB  
 PL1W 31.77312851 W  
 SFO1 400.1316569 MHz  
 SI 32768  
 SF 400.1299646 MHz  
 WDW EM  
 SSB 0  
 LB 0.30 Hz  
 GB 0  
 PC 1.00

Anexo 41. Espectro de RMN de <sup>1</sup>H para o brometo de 2,6-tetraidro-*N,N*-dimetil-3-hidroxi-5-fenilpiridínio (VB).



```

NAME   reducao_b_115
EXPNO   2
PROCNO   1
Date_   20101008
Time    20.21
INSTRUM spect
PROBHD  5 mm PABBO BB-
PULPROG zgpg30
TD       32768
SOLVENT  D2O
NS       2048
DS       4
SWH      13227.514 Hz
FIDRES   0.403672 Hz
AQ        1.2386804 sec
RG        203
DW        37.800 usec
DE         6.50 usec
TE        298.7 K
D1        2.00000000 sec
D11       0.03000000 sec
TD0       1

```

```

===== CHANNEL f1 =====
NUC1     13C
P1        8.50 usec
PL1       -4.00 dB
PL1W      74.45296478 W
SFO1     100.6198697 MHz

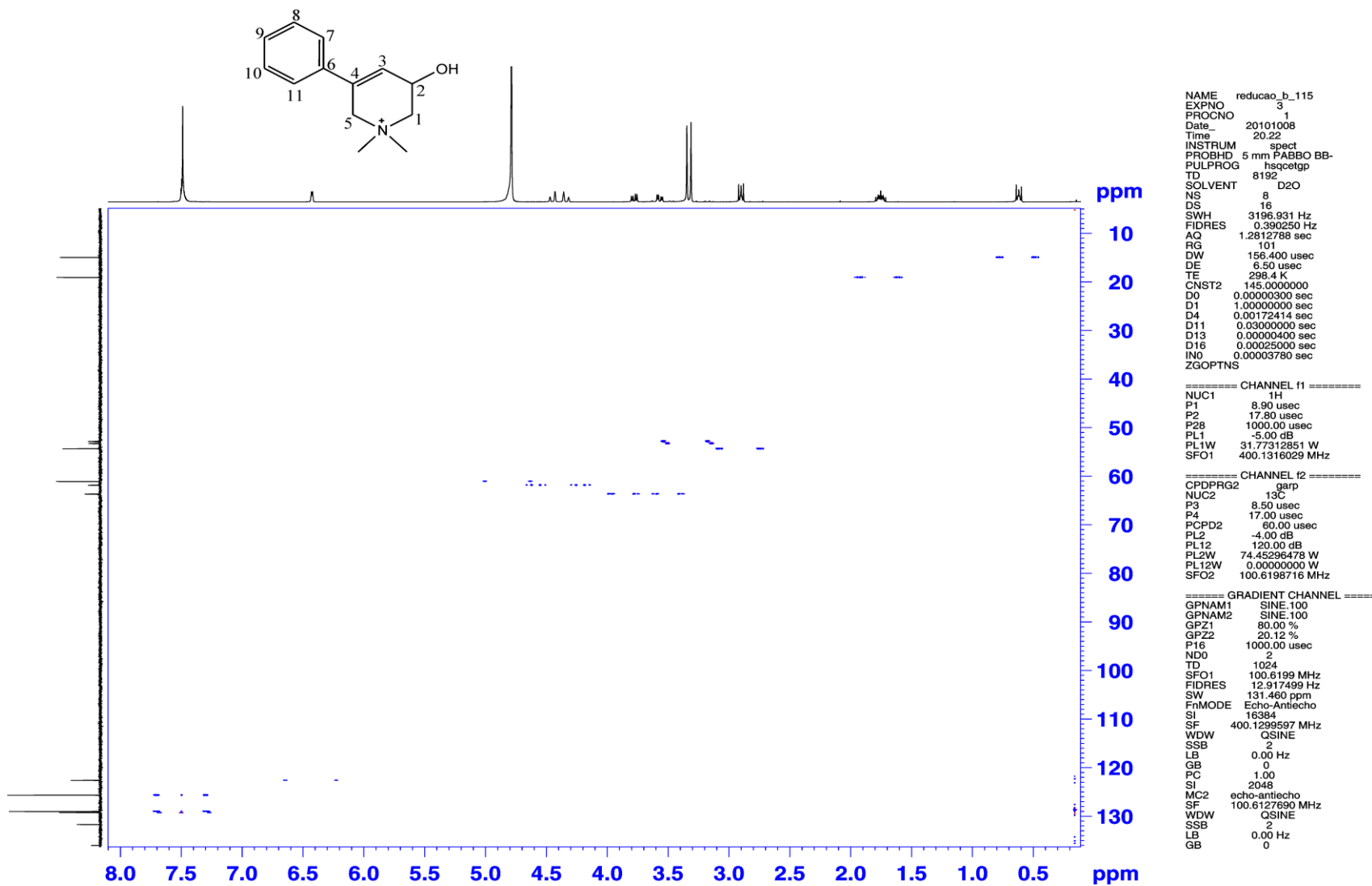
```

```

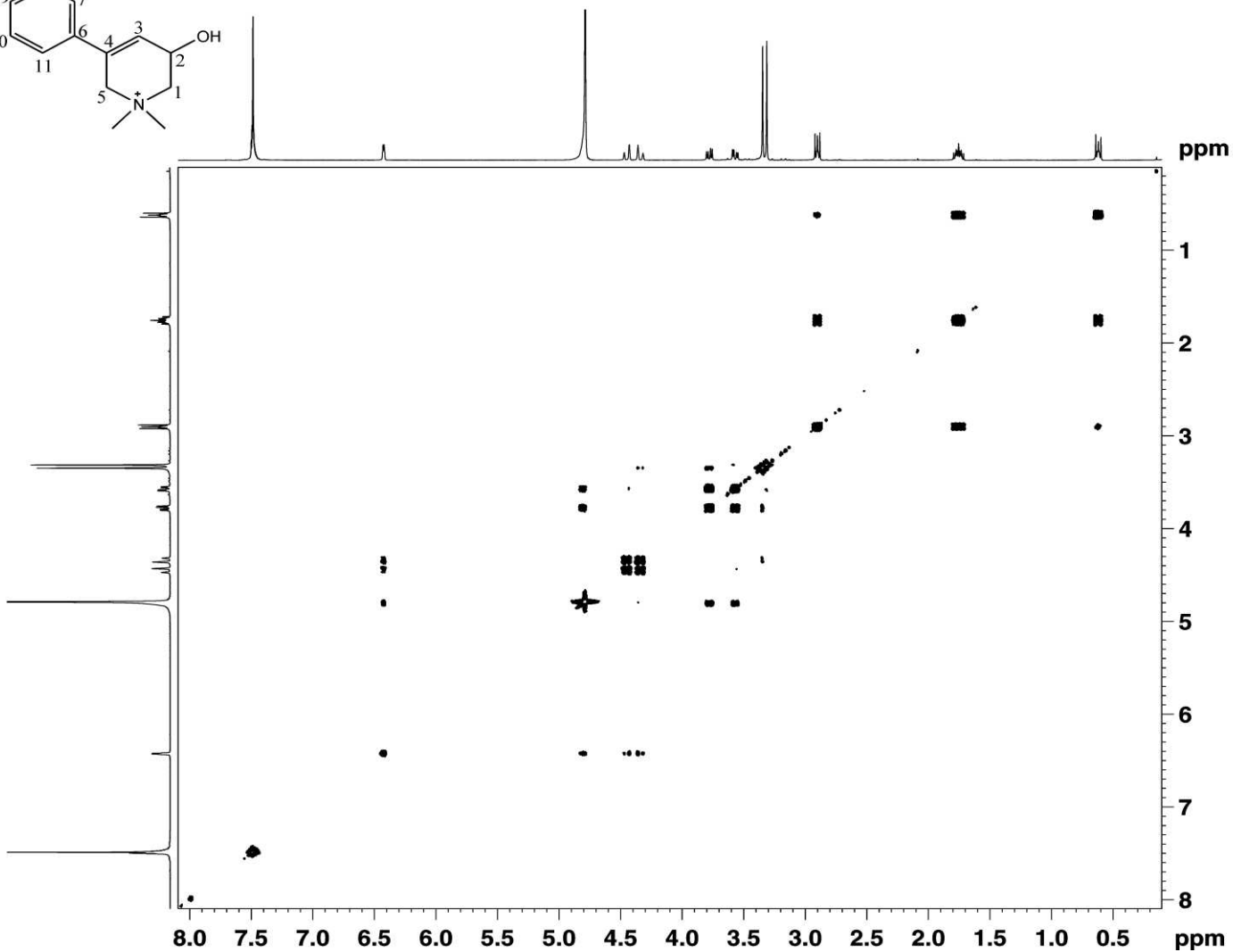
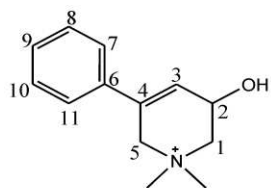
===== CHANNEL f2 =====
CPDPRG2  waltz16
NUC2      1H
PCPD2    100.00 usec
PL2       -5.00 dB
PL12      16.01 dB
PL13      12.91 dB
PL2W      31.77312851 W
PL12W     0.25180247 W
PL13W     0.51411468 W
SFO2     400.1316005 MHz
SI        32768
SF        100.6127671 MHz
WDW       EM
SSB       0
LB        1.00 Hz
GB        0
PC        1.40

```

Anexo 42. Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  para o brometo de 2,6-tetraidro-*N,N*-dimetil-3-hidroxi-5-fenilpiridínio (VB).



Anexo 43. Mapa de contorno HSQC para o brometo de 2,6-tetraidro-*N,N*-dimetil-3-hidroxi-5-fenilpiridínio (VB).



```

NAME   reducao_b_115
EXPNO   4
PROCNO   1
Date_   20101009
Time    1.39
INSTRUM spect
PROBHD  5 mm PABBO BB-
PULPROG cosygpgf
TD      4096
SOLVENT D2O
NS      8
DS      16
SWH     3196.931 Hz
FIDRES  0.780501 Hz
AQ      0.6406644 sec
RG      101
DW      156.400 usec
DE      6.50 usec
TE      298.3 K
D0      0.00000300 sec
D1      1.48689198 sec
D13     0.00000400 sec
D16     0.00025000 sec
IN0     0.00031280 sec

```

```

===== CHANNEL f1 =====
NUC1    1H
P0      8.90 usec
P1      8.90 usec
PL1     -5.00 dB
PL1W    31.77312851 W
SFO1    400.1316029 MHz

```

```

===== GRADIENT CHANNEL =
GPNAM1  SINE.100
GPZ1    10.00 %
P16     1000.00 usec
ND0     1
TD      512
SFO1    400.1316 MHz
FIDRES  6.244007 Hz
SW      7.990 ppm
FnMODE  QF
SI      8192
SF      400.1299626 MHz
WDW     SINE
SSB     0
LB      0.00 Hz
GB      0
PC      1.40
SI      512
MC2     QF
SF      400.1299619 MHz
WDW     SINE
SSB     0
LB      0.00 Hz
GB      0

```

Anexo 44. Mapa de contorno COSY para o brometo de 2,6-tetraidro-*N,N*-dimetil-3-hidroxi-5-fenilpiridínio (VB).

