



**LUCAS GELAIN MARTINS**

***METODOLOGIAS DE RMN DE  $^1\text{H}$  APLICADAS NA  
CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL E TERMODINÂMICA  
DE COMPLEXOS SUPRAMOLECULARES ORGÂNICOS***

**CAMPINAS**

**2014**





**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS  
INSTITUTO DE QUÍMICA**

**LUCAS GELAIN MARTINS**

***METODOLOGIAS DE RMN DE <sup>1</sup>H APLICADAS NA  
CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL E TERMODINÂMICA  
DE COMPLEXOS SUPRAMOLECULARES ORGÂNICOS***

**ORIENTADORA: PROFA. DRA. ANITA JOCELYNE MARSAIOLI**

**TESE DE DOUTORADO APRESENTADA AO INSTITUTO  
DE QUÍMICA DA UNICAMP PARA OBTENÇÃO DO  
TÍTULO DE DOUTOR EM CIÊNCIAS.**

**ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO FINAL DA TESE DEFENDIDA POR  
LUCAS GELAIN MARTINS, E ORIENTADA PELA PROFA. DRA. ANITA JOCELYNE  
MARSAIOLI.**

---

**Assinatura da Orientadora**

**CAMPINAS, 2014**

Ficha catalográfica  
Universidade Estadual de Campinas  
Biblioteca do Instituto de Química  
Simone Lucas Gonçalves de Oliveira - CRB 8/8144

M366m Martins, Lucas Gelain, 1984-  
Metodologias de RMN de 1H aplicadas na caracterização estrutural e termodinâmica de complexos supramoleculares orgânicos / Lucas Gelain Martins. – Campinas, SP : [s.n.], 2014.

Orientador: Anita Jocelyne Marsaioli.  
Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Química.

1. RMN de 1H. 2. Dapsona. 3. Carreadores de fármacos. 4. Acetilcolinesterase. 5. Inibidores enzimáticos. I. Marsaioli, Anita Jocelyne. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Química. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

**Título em outro idioma:** 1H NMR methodologies applied in the thermodynamic and structural characterization of organic supramolecular complexes

**Palavras-chave em inglês:**

1H NMR

Dapsone

Drug carriers

Acetylcholinesterase

Enzyme inhibitors

**Área de concentração:** Química Orgânica

**Titulação:** Doutor em Química

**Banca examinadora:**

Anita Jocelyne Marsaioli [Orientador]

Antonio Gilberto Ferreira

José Daniel Figueroa Villar

Cláudio Francisco Tormena

Roberto Rittner Neto

**Data de defesa:** 11-03-2014

**Programa de Pós-Graduação:** Química



*Dedico este trabalho à minha família,  
principalmente aos meus pais Dirceu e Rosi,  
pelo amor, incentivo e apoio incondicional.*



*Pedras no caminho*

*Posso ter defeitos, viver ansioso e ficar irritado algumas vezes,*

*Mas não esqueço de que minha vida*

*É a maior empresa do mundo...*

*E que posso evitar que ela vá à falência.*

*Ser feliz é reconhecer que vale a pena viver*

*Apesar de todos os desafios, incompreensões e períodos de crise.*

*Ser feliz é deixar de ser vítima dos problemas e*

*Se tornar um autor da própria história...*

*É atravessar desertos fora de si, mas ser capaz de encontrar*

*Um oásis no recôndito da sua alma...*

*É agradecer a Deus a cada manhã pelo milagre da vida.*

*Ser feliz é não ter medo dos próprios sentimentos.*

*É saber falar de si mesmo.*

*É ter coragem para ouvir um “Não”!!!*

*É ter segurança para receber uma crítica,*

*Mesmo que injusta...*

*Pedras no caminho?*

*Guardo todas, um dia vou construir um castelo...*

*Fernando Pessoa*



## *Agradecimentos*

*Ao Deus, por todas as oportunidades recebidas.*

*Aos meus pais, Rosi e Dirceu, que com muito esforço e dedicação me ajudaram a chegar até aqui.*

*A Prof. Dra. Anita J. Marsaioli, pela oportunidade de trabalhar no seu grupo de pesquisa, pelas várias portas abertas e pela amizade destes sete anos de trabalho juntos.*

*Ao Prof. Dr. Miquel Pons, pela recepção em seu laboratório em Barcelona, pela gentileza e pelas discussões científicas.*

*Aos colaboradores deste trabalho, Prof. Dra. Raquel M. Braga, Dra. Maria do Socorro S. Silva, Prof. Dr. Alexandre Araujo de Souza e Mônica do Amaral Silva Arrais, por todo o trabalho realizado em colaboração.*

*Ao Prof. Dr. Cláudio Francisco Tormena, pelas inúmeras vezes que me auxiliou junto aos equipamentos de RMN e por estar sempre disposto a ajudar.*

*Aos meus colegas de laboratório, Bruna, Célio, Lair, Michel, Thiago.*

*Aos colegas atuais e antigos do laboratório de RMN, Soninha, Paula, Anderson, Me. Gustavo, Dr. Tiago, Prof. Dr. Alvicler, pela companhia sempre agradável e pela presteza com que fazem a manutenção do laboratório.*

*À minha irmã, Thays e ao meu cunhado Thiago, pela amizade, amor e apoio em cada momento desta caminhada.*

*Aos técnicos do laboratório, Priscila e Ricardo, que mantêm o laboratório organizado.*

*Aos amigos do vôlei, Zeca, Rapha, Alexandre, Leo, Luiza, Thiago, Luiz, Bruno, Maia, Julia, Jonas, Thaiza, Felipe, todo pessoal da Lau e Leu, que sempre tornaram a vida em Campinas mais fácil e divertida.*

*Aos meus amigos Rosi, Marília, Lucas, Rodrigo, ManOel, Tiago, Lu, Juzinha, Dani, Danilo e Hipassia, que fazem da hora do almoço e do café um momento de descontração.*

*A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES, pela concessão da bolsa de estágio de doutorado sanduiche.*

*Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, pela bolsa de estudos de doutorado no país.*

*Aos funcionários do Instituto de Química, que direta ou indiretamente contribuiriam para a realização desse trabalho;*

*À UNICAMP e em especial Instituto de Química, por toda infraestrutura disponibilizada;*

*Muito Obrigado!*

## Curriculum Vitae

---

### Dados pessoais

**Nome:** Lucas Gelain Martins

**Nascimento:** 05/09/1984 - Taquarituba/SP – Brasil

**E-mails:** lgmartins1984@gmail.com

---

### Formação Acadêmica (Graduação e Pós-Graduação)

**2007 – 2009** Mestrado em Química

Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP, Campinas-SP, Brasil.

**Título:** Estudo da matabolômica de *Theobroma cacao* e de interações supramoleculares por RMN de  $^1\text{H}$ .

**Orientadora:** Profa. Dra. Anita Jocelyne Marsaioli.

**Bolsista do(a):** Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Capes.

**2003 – 2007** Graduação em Química (Bacharelado).

Universidade Estadual de Maringá, UEM, Maringa, Brasil.

**Título da monografia:** Interações de Orbitais e seus Efeitos no Acoplamento  $^3J_{\text{HH}}$  em halocicloexanos: Um Estudo Teórico e Experimental.

**Orientador:** Prof. Dr. Ernani Abicht Basso

**Bolsista :** Programa de Educação Tutorial - SESu/MEC – Período: 01/05/2004 a 31/01/2007.

---

### Produção Bibliográfica

#### Artigos completos publicados em periódicos

1. Milagre, C. D. F.; Ccabeça, L. F.; Martins, L. G.; Marsailoi, A. J. STD NMR Spectroscopy: a Case Study of Fosfomycin Binding Interactions in Living Bacterial Cells. *Journal of the Brazilian Chemical Society* 2011, 22, 286-291.
2. Lopes, T. I. B.; Martins, L. G.; Nagassaki, S.; Geloneze, B.; Marsaioli, A. J. Orlistat-Induced Modulation of Plasma Metabolites Independent of Weight Loss in Overweight Females. *Journal of Chemistry and Chemical Engineering* **2013**, 7, 547-555.

### **Artigo aceito para publicação**

1. Martins, L. G.; Arrais, M. A. S.; Souza, A. A.; Marsaioli, A. J. <sup>1</sup>H NMR studies of binary and ternary Dapsone supramolecular complexes with different drug carriers: EPC Liposome, SBE- $\beta$ -CD and  $\beta$ -CD. *Magnetic Resonance in Chemistry*.

### **Capítulos de Livros**

1. Pons, M.; Martins, L. G.; Garcia, J. NMR Spectroscopy in Solution. Em *Supramolecular Chemistry: from Molecules to Nanomaterials*. J.W. Steed; P.A. Gale. (Org.). John Wiley & Sons Ltd, Chichester, **2012**, 297-318.
2. Martins, L. G.; Figueiredo, I. M.; Cabeça, L. F.; Tasic, L.; Ramos, C. H. I.; Uso de Ressonância Magnética Nuclear de Alta Resolução para estudos de interações Receptores-Ligantes: Fundamentos, Métodos e Aplicações. Capítulo sob revisão.

## Resumo

### *Metodologias de RMN de $^1\text{H}$ aplicadas na caracterização estrutural e termodinâmica de complexos supramoleculares orgânicos*

Esta tese consiste no estudo de interações supramoleculares utilizando diferentes metodologias de Ressonância Magnética Nuclear de hidrogênio (RMN de  $^1\text{H}$ ), tais como ROESY 1D, RMN-DOSY e RMN-STD. Os sistemas supramoleculares foram abordados em dois casos de estudo diferentes. O Capítulo I tem como objeto de estudo interações do fármaco Dapsona com diferentes carreadores de fármacos ( $\beta$ -CD, SBE- $\beta$ -CD e lipossoma de EPC), com a finalidade de encontrar formulações nas quais a Dapsona seja mais solúvel. Os complexos binários e ternário formados foram caracterizados estruturalmente e as constantes de associação aparentes foram determinadas por medidas de difusão molecular. Foram observadas as formações dos complexos Dap/ $\beta$ -CD, Dap/SBE- $\beta$ -CD, Dap/EPC e o ternário Dap/ $\beta$ -CD/EPC, os quais contribuem para o aumento de solubilidade do fármaco. O objeto de estudo apresentado no Capítulo II é a inibição da enzima acetilcolinesterase por dois alcaloides, a Fisostigmina e a Crinina. Para determinação das constantes de dissociação aparentes foram utilizados os crescimentos iniciais das curvas de saturação obtidas por RMN-STD para construção das Isotermas de Langmuir. De acordo com os valores de constantes obtidos foi possível concluir que a AChE tem mais afinidade com a Fisostigmina do que com a Crinina.



## Abstract

### *<sup>1</sup>H NMR methodologies applied in the thermodynamic and structural characterization of organic supramolecular complexes*

This thesis consists of the supramolecular interactions study applying different Nuclear Magnetic Resonance methodologies (<sup>1</sup>H NMR) such as 1D ROESY, DOSY-NMR and STD-NMR. The supramolecular systems were addressed in two different case studies. In chapter I Dapsone solubility was the case study. To solve the solubility problem the interactions between Dapsone and various drug carriers ( $\beta$ -CD , SBE- $\beta$ -CD and EPC liposome ) were characterized in terms of the binary and ternary complexes structure using NMR method, such as 1D ROESY and STD-NMR and apparent association constants were determined by measuring molecular diffusion using DOSY-NMR. Dap/ $\beta$ -CD, Dap/SBE- $\beta$ -CD, Dap/EPC and Dap/ $\beta$ -CD/EPC complexes were observed and Dapsone water solubility was increased. The case study in Chapter II is the inhibition of acetylcholinesterase by two alkaloids, Physostigmine and Crinina. The apparent dissociation constants were determined using the initial growth saturation curves obtained by STD-NMR to construct the Langmuir isotherms. The constants showed that the AChE has more affinity for the Physostigmine than Crinine.



## Índice

Lista de Abreviaturas e Símbolos .....	xxiii
Lista de Figuras .....	xxv
Lista de Tabelas.....	xxxiii
Lista de Anexos .....	xxxv
<i>1 Introdução .....</i>	<i>3</i>
<i>1.1 Química supramolecular .....</i>	<i>3</i>
<i>1.2 Encapsulação de Fármacos .....</i>	<i>5</i>
<i>1.2.1 Ciclodextrinas .....</i>	<i>6</i>
<i>1.2.2 Lipossomas .....</i>	<i>9</i>
<i>1.2.3 Dapsona e seus complexos supramoleculares .....</i>	<i>12</i>
<i>1.3 Inibição enzimática.....</i>	<i>14</i>
<i>1.3.1 Acetilcolina, Acetilcolinesterase e Inibidores.....</i>	<i>16</i>
<i>1.4 RMN de <sup>1</sup>H aplicada a interações supramoleculares .....</i>	<i>19</i>
<i>1.4.1 Difusão Molecular por RMN.....</i>	<i>21</i>
<i>1.4.2 NOe e ROESY 1D.....</i>	<i>25</i>
<i>1.4.3 RMN-STD na obtenção de constantes de dissociação.....</i>	<i>28</i>
<i>2 Objetivos.....</i>	<i>33</i>
<i>CAPÍTULO I: CARACTERIZAÇÃO DE DAPSONA EM COMPLEXOS DE INCLUSÃO</i>	
<i>BINÁRIOS E TERNÁRIOS.....</i>	<i>35</i>
<i>1 Resultados e Discussão .....</i>	<i>37</i>
<i>1.1 Avaliação do complexo binário DAP/SBE-β-CD .....</i>	<i>37</i>
<i>1.2 Avaliação do complexo binário DAP/β-CD.....</i>	<i>42</i>
<i>1.3 Avaliação do complexo binário DAP/EPC .....</i>	<i>49</i>
<i>1.4 Avaliação do complexo ternário DAP/β-CD/EPC.....</i>	<i>52</i>
<i>2 Conclusão .....</i>	<i>57</i>

<i>CAPÍTULO II: DETERMINAÇÃO DE CONTANTES DE DISSOCIAÇÃO APARENTES DE ACETILCOLINESTERASE E INIBIDORES POR RMN-STD</i> .....	59
<i>1 Resultados e Discussão</i> .....	61
<i>1.1 Elucidação estrutural da Fisostigmina</i> .....	61
<i>1.2 Otimização do experimento de STD</i> .....	63
<i>1.3 Construção das curvas de saturação e isothermas de ligação para o sistema Fisostigmina/AChE</i> .....	65
<i>1.4 Elucidação estrutural da Crinina</i> .....	75
<i>1.5 Construção das curvas de saturação e isothermas de ligação para o sistema Crinina/AChE</i> .....	76
<i>2 Conclusão</i> .....	85
<i>PARTE EXPERIMENTAL</i> .....	87
<i>1 Parte experimental do Capítulo I</i> .....	89
<i>1.1 Preparação de amostras</i> .....	89
<i>1.1.1 Preparação de Tampão fosfato</i> .....	89
<i>1.1.2 Preparação dos lipossomas de 400 nm</i> .....	90
<i>1.1.3 O experimento de Job</i> .....	90
<i>1.1.4 Preparação do complexo Dap/SBE-β-CD</i> .....	91
<i>1.1.5 Preparação do complexo Dap/β-CD</i> .....	91
<i>1.1.6 Preparação do complexo Dap/EPC</i> .....	91
<i>1.1.7 Preparação do complexo Dap/β-CD /EPC</i> .....	92
<i>1.2 Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear</i> .....	92
<i>1.2.1 Os experimentos de RMN de <sup>1</sup>H</i> .....	93
<i>1.2.2 O experimento de ROESY 1D</i> .....	93
<i>1.2.3 O experimento de DOSY</i> .....	94
<i>1.2.4 O experimento de STD</i> .....	96
<i>2 Parte experimental do Capítulo II</i> .....	97

2.1	<i>Preparação de amostras</i> .....	97
2.2	<i>Titulação de AChE com Fisostigmina</i> .....	98
2.3	<i>Titulação de AChE com Crinina</i> .....	99
2.4	<i>Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear</i> .....	99
2.4.1	<i>O experimento de STD</i> .....	100
2.5	<i>Construção das curvas de saturação</i> .....	101
2.6	<i>Construção das Isotermas de Langmuir</i> .....	102
	<i>ANEXOS</i> .....	103



## Lista de Abreviaturas e Símbolos

$\tau_c$	tempo de correlação para reorientação molecular
$\omega_0$	frequência de Larmor
d1	tempo de espera entre os transientes
lb	<i>line broadening</i>
$T_1$	tempo de relaxação longitudinal
aq	tempo de aquisição
sw	largura da janela espectral
td	número de pontos de aquisição
si	número de pontos de processamento
ns	número de transientes
FID	<i>Free Induction Decay</i>
nOe	<i>nuclear Overhauser effect</i>
ROESY	<i>Rotating-Frame nuclear Overhauser effect spectroscopy</i>
STD	<i>Saturation Transfer Difference</i>
DOSY	<i>Diffusion Ordered Spectroscopy</i>
DMSO	dimetilsulfóxido
HDO	óxido de hidrogênio e deutério
BSA	<i>bovin serum albumin</i>
$\alpha$ -CD	$\alpha$ -ciclodextrina
$\beta$ -CD	$\beta$ -ciclodextrina
$\gamma$ -CD	$\gamma$ -ciclodextrina
SBE- $\beta$ -CD	SulfoButilEter- $\beta$ -ciclodextrina
EPC	<i>egg phosphatidilcoline</i>
Dap	Dapsona

Dap/ $\beta$ -CD	complexo binário formado por Dap e $\beta$ -CD
Dap/SBE- $\beta$ -CD	complexo binário formado por Dap e SBE- $\beta$ -CD
Dap/EPC	complexo binário formado por Dap e EPC
Dap/ $\beta$ -CD/EPC	complexo ternário formado por Dap, $\beta$ -CD e EPC
AChE	Acetilcolinesterase
$K_a$	constante de associação aparente
$K_d$	constante de dissociação aparente
STD-AF	fator de amplificação do STD
$k_{sat}$	constante de velocidade de saturação
STD-AF <sub>Max</sub>	fator de amplificação de STD máximo
STD-AF <sub>0</sub>	crescimento inicial da curva de saturação
TMSP- <i>d4</i>	Trimetilsililpropionato de sódio

## Lista de Figuras

- Figura 1.**  $\alpha$ -ciclodextrina (**1**,  $\alpha$ -CD, 6 unidades de glicose),  $\beta$ -ciclodextrina (**2**,  $\beta$ -CD, 7 unidades de glicose) e  $\gamma$ -ciclodextrina (**3**,  $\gamma$ -CD, 8 unidades de glicose). ..... 7
- Figura 2.** Estrutura (otimizada por método DFT, do inglês *Density Funtional Theory*, cedida pelo Me. Guilherme L. Alexandrino) da  $\beta$ -CD e representação simplista da ciclodextrina mostrando as dimensões da mesma em angstroms..... 8
- Figura 3.** Estruturas da 1-HP- $\beta$ -CD (**4**) e da SBE- $\beta$ -CD (**5**). ..... 8
- Figura 4.** Estrutura genérica de fosfatidilcolina (**6**). A cabeça polar composta pelos grupos fosfato e colina é direcionada para a interface com a água, empurrando as caudas apolares compostas pelos resíduos de aminoácidos para dentro das bicamadas lipídicas, dando assim as formas lamelares dos lipossomas. .... 10
- Figura 5.** Sessão transversal de um lipossoma unilamelar (UV) e sua representação estrutural minimalista, estruturas de MLV e MVL..... 11
- Figura 6.** Estrutura química da Dapsona e rota biossintética parcial da síntese de aminoácidos em bactérias e protozoários. O “x” vermelho indica a etapa da rota que é interrompida pela fármaco(inibição da diidropteroato sintetase). ..... 13
- Figura 7.** Estrutura da AChE com suas quatro unidades obtida por cristalografia de raio-x com destaque nos resíduos de aminoácidos que compõem a tríade catalítica. Abaixo reação de hidrolise da Acetilcolina. ... 17
- Figura 8.** Sequências de pulso Oneshot.  $\Delta$  é o tempo designado para permitir a difusão do sistema, enquanto que  $\tau$  é o tempo entre o pontos médios dos gradientes de campo pulsados em anti-fase dentro de um dado período para codificar a difusão. .... 23
- Figura 9.** Intensidade de nOe/rOe em função de  $\omega_0\tau_c$  para análise em equipamento de RMN operando a 11,75 T. .... 26

<b>Figura 10.</b> Sequencia de pulsos de RMN de $^1\text{H}$ para o experimento de ROESY 1D com ciclagem de fase. A sequênci	27
<b>Figura 11.</b> Estrutura da $\beta$ -CD evidenciando a unidade glicosídica formadora da ciclodextrina e seus hidrogênios internos H3 e H5, os quais geralmente são selecionados para serem irradiados em experimentos de ROESY 1D. ...	28
<b>Figura 12.</b> Representação esquemática do experimento de RMN-STD ( <i>on-resonance</i> ). Quando a proteína torna-se saturada, os ligantes que estão complexados a ela tornam-se saturados também devido ao fenômeno de difusão de <i>spin</i> .....	29
<b>Figura 13.</b> Sequência de pulsos para experimento de RMN-STD com eliminação do sinal de HDO por <i>excitation sculpting</i> . A sequênci é executada com ciclagem de fase e é composta pelos seguintes pulsos: P <sub>42</sub> (pulso seletivo de irradiação da proteína; fase: 0), P <sub>1</sub> (pulso duro de 90°; fase: 0 2), P <sub>29</sub> (trava de <i>spin</i> ; fase: 1 1 1 1 1 1 1 1 3 3 3 3 3 3 3 3), P <sub>40</sub> (pulso seletivo de 180° nos sinais de HDO; fase: 0 0 1 1), P <sub>2</sub> (pulso duro de 180°; fase: 2 2 3 3). <i>NBL</i> define a variação entre os experimentos <i>on-resonance</i> e <i>off-resonance</i> e L5 define o tempo de saturação da proteína.....	30
<b>Figura 14.</b> Gráfico de Job determinado para a complexação Dapsona (7) e SBE- $\beta$ -CD (5). As amostras foram preparadas em D <sub>2</sub> O, tampão fosfato pH = 7,0 e com concentração total de 2 mmol L <sup>-1</sup> . Os deslocamentos químicos de $^1\text{H}$ foram medidos a 298 K, na frequência de 400.1315 MHz. ....	37
<b>Figura 15.</b> ROESY 1D de amostra de Dapsona e SBE- $\beta$ -CD, trava de <i>spin</i> de 500ms e irradiação em Ha da Dapsona (D <sub>2</sub> O, tampão fosfato pH=7,0 e 400.1315 MHz para $^1\text{H}$ ) .....	39
<b>Figura 16.</b> ROESY 1D de amostra de Dapsona e SBE- $\beta$ -CD, trava de <i>spin</i> de 500ms e irradiação em Hb da Dapsona (D <sub>2</sub> O, tampão fosfato pH=7,0 e 400.1315 MHz para $^1\text{H}$ ). ....	40

<b>Figura 17.</b> Representação em 2D do experimento DOSY para o complexo Dap/SBE- $\beta$ -CD 298 K, 400,1315 MHz em D <sub>2</sub> O, com tampão fosfato pH = 7,0.....	41
<b>Figura 18.</b> Gráfico de Job determinado para a complexação Dapsona (7) e $\beta$ -CD (2). As amostras foram preparadas em D <sub>2</sub> O, tampão fosfato pH = 7,0 e com concentração total de 2 mmol L <sup>-1</sup> . Os deslocamentos químicos de <sup>1</sup> H foram medidos a 298 K, na frequência de 400.1315 MHz. ....	42
<b>Figura 19.</b> ROESY 1D de amostra de Dapsona e $\beta$ -CD, trava de <i>spin</i> de 500ms e irradiação em H3 da $\beta$ -CD (D <sub>2</sub> O, tampão fosfato pH=7,0 e 400.1315 MHz para <sup>1</sup> H). ....	43
<b>Figura 20.</b> ROESY 1D de amostra de Dapsona e $\beta$ -CD, trava de <i>spin</i> de 500ms e irradiação em H5 da $\beta$ -CD (D <sub>2</sub> O, tampão fosfato pH=7,0 e 400.1315 MHz para <sup>1</sup> H). ....	44
<b>Figura 21.</b> Dimensões da Dapsona cuja estrutura foi otimizada pelo programa Gaussian, empregando nível de teoria M062X – cc-pVDZ. ....	45
<b>Figura 22.</b> Propostas de modelos dos possíveis complexos binários Dap- $\beta$ -CD. A) Inserção total da Dapsona; B) inserção parcial pela face secundária; C) inserção parcial pela face primária. ....	46
<b>Figura 23.</b> Representação em 2D do experimento DOSY para o complexo Dap/ $\beta$ -CD 298 K, 400,1315 MHz em D <sub>2</sub> O, com tampão fosfato pH = 7,0..	48
<b>Figura 24.</b> RMN de <sup>1</sup> H (400,1315 MHz, a 298 K, pH =7,0 e 4,70 ppm D <sub>2</sub> O/HDO como referência) de Dapsona em lipossomas EPC (400 nm), (A) espectro STD-RMN <i>off-resonance</i> e (B) espectro de STD-RMN <i>off-resonance – on-resonance</i> . Acima: estrutura Dapsona e transferência de saturação relativa do lipossoma para Dapsona, acompanhando um possível arranjo para o complexo Dap/EPC.....	51
<b>Figura 25.</b> Representação em 2D do experimento DOSY para o complexo Dap/EPC 400 nm 298 K, 400,1315 MHz em D <sub>2</sub> O, com tampão fosfato pH = 7,0. ....	52
<b>Figura 26.</b> RMN de <sup>1</sup> H (400,1315 MHz, a 298 K, pH 7 e 4,70 ppm D <sub>2</sub> O/HDO como referência) do complexo ternário Dap/ $\beta$ -CD/EPC, (A)	

espectro de ressonância STD-RMN <i>off-resonance</i> e (B) Espectro de STD-RMN <i>off-resonance</i> – <i>on-resonance</i> .....	53
<b>Figura 27.</b> Modelo estrutural proposto para o complexo ternário Dap/ $\beta$ -CD/EPC.....	54
<b>Figura 28.</b> Representação em 2D do experimento DOSY para o complexo ternário Dap/ $\beta$ -CD/EPC 400 nm 298 K, 400,1315 MHz em D <sub>2</sub> O, com tampão fosfato pH = 7,0.....	55
<b>Figura 29.</b> Estrutura numerada da Fisostigmina ( <b>11</b> ), nome segundo a IUPAC: (3a <i>R</i> ,8a <i>S</i> )- 1,3a,8-trimetil- 1 <i>H</i> ,2 <i>H</i> ,3 <i>H</i> ,3a <i>H</i> ,8 <i>H</i> ,8a <i>H</i> - pirrolo [2,3- <i>b</i> ] indol-5-il <i>N</i> -metilcarbamato.....	62
<b>Figura 30.</b> Experimento de RMN-STD para o sistema cafeína/BSA (298K, 400,1315 MHz em D <sub>2</sub> O/DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> , com tampão fosfato pH=7,0). Em preto está apresentado um espectro de RMN de <sup>1</sup> H no qual é possível notar os sinais alargados relativos à BSA, em azul está o experimento de saturação <i>off-resonance</i> e em vermelho a diferença dos experimentos <i>off-resonance</i> e <i>on-resonance</i> . Nos experimentos de saturação nenhum sinal relativo à proteína foi observado.....	64
<b>Figura 31.</b> Experimento de RMN-STD para o sistema fisostigmina/Ach (298K, 400,1315 MHz em D <sub>2</sub> O/DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> , com tampão fosfato pH=6,0). Em azul experimento de saturação <i>off-resonance</i> e em preto a diferença dos experimentos <i>off-resonance</i> e <i>on-resonance</i> . Os sinais mais alargados em toda a janela espectral pertencem a AChE.....	64
<b>Figura 32.</b> Representação em 2D do experimento DOSY para o sistema Fisostigmina/Ach a 298 K, 400,1315 MHz em D <sub>2</sub> O/DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> , com tampão fosfato pH 6,0.....	65
<b>Figura 33.</b> Valores de STD-AF em função do tempo de saturação para amostras contendo 20 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de AChE e 0,26 $\text{mmol L}^{-1}$ de Fisostigmina. Cada curva foi construída para um dos átomos de hidrogênio selecionados da Fisostigmina. ....	67
<b>Figura 34.</b> Valores de STD-AF em função do tempo de saturação para amostras contendo 20 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de AChE e 0,34 $\text{mmol L}^{-1}$ de Fisostigmina.	

Cada curva foi construída para um dos átomos de hidrogênio selecionados da Fisostigmina. ....	67
<b>Figura 35.</b> Valores de STD-AF em função do tempo de saturação para amostras contendo 20 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de AChE e 0,42 $\text{mmol L}^{-1}$ de Fisostigmina. Cada curva foi construída para um dos átomos de hidrogênio selecionados da Fisostigmina. ....	68
<b>Figura 36.</b> Valores de STD-AF em função do tempo de saturação para amostras contendo 20 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de AChE e 0,49 $\text{mmol L}^{-1}$ de Fisostigmina. Cada curva foi construída para um dos átomos de hidrogênio selecionados da Fisostigmina. ....	68
<b>Figura 37.</b> Valores de STD-AF em função do tempo de saturação para amostras contendo 20 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de AChE e 0,57 $\text{mmol L}^{-1}$ de Fisostigmina. Cada curva foi construída para um dos átomos de hidrogênio selecionados da Fisostigmina. ....	69
<b>Figura 38.</b> Valores de STD-AF em função do tempo de saturação para amostras contendo 20 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de AChE e 0,64 $\text{mmol L}^{-1}$ de Fisostigmina. Cada curva foi construída para um dos átomos de hidrogênio selecionados da Fisostigmina. ....	69
<b>Figura 39.</b> Valores de STD-AF em função do tempo de saturação para amostras contendo 20 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de AChE e 0,98 $\text{mmol L}^{-1}$ de Fisostigmina. Cada curva foi construída para um dos átomos de hidrogênio selecionados da Fisostigmina. ....	70
<b>Figura 40.</b> Isotermas de ligação de Fisostigmina com AChE, construída com valores de STD-AF em função da concentração de Fisostigmina a partir de uma amostra de 20 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de AChE titulada com Fisostigmina. <b>1)</b> 0,75 s de saturação; <b>2)</b> 1,5 s de saturação; <b>3)</b> 2,25 s de saturação e <b>4)</b> 3 s de saturação. ....	72
<b>Figura 41.</b> (A) Isoterma de ligação de Fisostigmina com AChE, construída com valores de STD-AF <sub>0</sub> em função da concentração de Fisostigmina a partir de uma amostra de 20 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de AChE sendo titulada com Fisostigmina e (B) gráfico do duplo-recíproco para o mesmo sistema. ....	74
<b>Figura 42.</b> Estrutura numerada da Crinina ( <b>12</b> ). ....	76

<b>Figura 43.</b> Valores de STD-AF em função do tempo de saturação para amostras contendo 20 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de AChE e 0,29 $\text{mmol L}^{-1}$ de Crinina. Cada curva foi construída para um dos átomos de hidrogênio selecionados da Crinina.....	77
<b>Figura 44.</b> Valores de STD-AF em função do tempo de saturação para amostras contendo 20 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de AChE e 0,38 $\text{mmol L}^{-1}$ de Crinina. Cada curva foi construída para um dos átomos de hidrogênio selecionados da Crinina.....	78
<b>Figura 45.</b> Valores de STD-AF em função do tempo de saturação para amostras contendo 20 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de AChE e 0,46 $\text{mmol L}^{-1}$ de Crinina. Cada curva foi construída para um dos átomos de hidrogênio selecionados da Crinina.....	78
<b>Figura 46.</b> Valores de STD-AF em função do tempo de saturação para amostras contendo 20 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de AChE e 0,55 $\text{mmol L}^{-1}$ de Crinina. Cada curva foi construída para um dos átomos de hidrogênio selecionados da Crinina.....	79
<b>Figura 47.</b> Valores de STD-AF em função do tempo de saturação para amostras contendo 20 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de AChE e 0,63 $\text{mmol L}^{-1}$ de Crinina. Cada curva foi construída para um dos átomos de hidrogênio selecionados da Crinina.....	79
<b>Figura 48.</b> Valores de STD-AF em função do tempo de saturação para amostras contendo 20 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de AChE e 0,72 $\text{mmol L}^{-1}$ de Crinina. Cada curva foi construída para um dos átomos de hidrogênio selecionados da Crinina.....	80
<b>Figura 49.</b> Isoterma de ligação de Fisostigmina com AChE, construída com valores de STD-AF em função da concentração de Fisostigmina a partir de uma amostra de 20 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de AChE titulada com Crinina. <b>1)</b> 0,75 s de saturação; <b>2)</b> 1,5 s de saturação; <b>3)</b> 2,25 s de saturação e <b>4)</b> 3 s de saturação. ....	82
<b>Figura 50.</b> (A) Isoterma de ligação de Crinina com AChE, construída com valores de STD-AF <sub>0</sub> em função da concentração de Crinina a partir de uma	

amostra de  $20 \mu\text{mol L}^{-1}$  de AChE sendo titulada com Crinina e **(B)** gráfico do duplo-recíproco para o mesmo sistema.....83



## Lista de Tabelas

<b>Tabela 1.</b> Valores de tempo de relaxação longitudinal ( $T_1$ ) medidos para Dapsona (Dap) e SBE- $\beta$ -CD isolados, e para o complexo entre eles ( $D_2O$ , pH=7,0 tampão fosfato). Valores dados em segundos.....	39
<b>Tabela 2.</b> Coeficientes de difusão ( $D$ ) para Dapsona, SBE- $\beta$ -CD, complexo Dap/SBE- $\beta$ -CD, HDO e $K_a$ do complexo. ....	41
<b>Tabela 3.</b> Valores de tempo de relaxação longitudinal ( $T_1$ ) medidos para Dapsona (Dap) e $\beta$ -CD isolados, e para o complexo entre eles ( $D_2O$ , pH=7,00 tampão fosfato). Valores dados em segundos.....	45
<b>Tabela 4.</b> Coeficientes de difusão ( $D$ ) para Dapsona, $\beta$ -CD, complexo Dap/ $\beta$ -CD, HDO e $K_a$ do complexo.....	48
<b>Tabela 5.</b> Coeficientes de difusão ( $D$ ) para Dapsona, EPC 400 nm, complexo Dap/EPC, HDO e $K_{aT}$ do complexo. ....	50
<b>Tabela 6.</b> Coeficientes de difusão ( $D$ ) para Dapsona, EPC 400 nm, $\beta$ -CD, dos complexos binários e ternário com seus respectivos $K_a$ .....	56
<b>Tabela 7.</b> Atribuição dos sinais de RMN de $^1H$ e $^{13}C$ para a Fisostigmina (298 K, 400,1315 MHz em $D_2O$ , T <sub>PSA</sub> = 0 ppm, com tampão fosfato pH 6). .....	62
<b>Tabela 8.</b> Valores de ajuste das curvas de saturação para o sistema Fisostigmina/AChE. ....	71
<b>Tabela 9.</b> Constantes de dissociação aparentes determinadas para o sistema AChE/Fisostigmina, a 298 K, a partir de isotermas de ligação de Langmuir. .....	73
<b>Tabela 10.</b> Atribuição dos sinais de RMN de $^1H$ e $^{13}C$ para a Crinina (298 K, 400,1315 MHz em $D_2O$ , T <sub>PSA</sub> = 0 ppm, com tampão fosfato pH 6). ....	75
<b>Tabela 11.</b> Valores de ajuste das curvas de saturação para o sistema Crinina/AChE.....	81

<b>Tabela 12.</b> Constantes de dissociação aparentes determinadas para o sistema AChE/Crinina, a 298 K, a partir de isotermas de ligação de Langmuir. ....	84
<b>Tabela 13.</b> Concentrações de Dapsona (Dap) e Ciclodextrinas (SBE- $\beta$ -CD ou $\beta$ -CD) em amostras utilizadas para realização do experimento de Job. ...	91
<b>Tabela 14.</b> Condições experimentais de obtenção dos espectros de RMN de $^1\text{H}$ . ....	93
<b>Tabela 15.</b> Condições experimentais de obtenção dos espectros de ROESY 1D. ....	94
<b>Tabela 16.</b> Condições experimentais de obtenção dos espectros de DOSY. ....	96
<b>Tabela 17.</b> Condições experimentais de obtenção dos espectros de STD. ...	97
<b>Tabela 18.</b> Titulação de AChE com Fisostigmina. ....	98
<b>Tabela 19.</b> Titulação de AChE com Crinina. ....	99
<b>Tabela 20.</b> Condições experimentais de obtenção dos espectros de STD. ....	101

## Lista de Anexos

- Anexo 1.** RMN de  $^1\text{H}$  (400,1315 MHz, a 298 K, 10% acetona- $d_6$ , 100 mmol  $\text{L}^{-1}$  de tampão fosfato pH 7 e 0 ppm TPSA como referência) da  $\beta$ -CD..... 105
- Anexo 2.** RMN de  $^1\text{H}$  (400,1315 MHz, a 298 K, 10% acetona- $d_6$ , 100 mmol  $\text{L}^{-1}$  de tampão fosfato pH 7 e 0 ppm TPSA como referência) da Dapsona.. 105
- Anexo 3.** RMN de  $^1\text{H}$  (400,1315 MHz, a 298 K, 10% acetona- $d_6$ , 100 mmol  $\text{L}^{-1}$  de tampão fosfato pH 7 e 0 ppm TPSA como referência) da  $\beta$ -CD (1,6 mmol  $\text{L}^{-1}$ ) e Dapsona (0,4 mmol  $\text{L}^{-1}$ ). ..... 106
- Anexo 4.** RMN de  $^1\text{H}$  (400,1315 MHz, a 298 K, 10% acetona- $d_6$ , 100 mmol  $\text{L}^{-1}$  de tampão fosfato pH 7 e 0 ppm TPSA como referência) da  $\beta$ -CD (1,2 mmol  $\text{L}^{-1}$ ) e Dapsona (0,8 mmol  $\text{L}^{-1}$ ). ..... 106
- Anexo 5.** RMN de  $^1\text{H}$  (400,1315 MHz, a 298 K, 10% acetona- $d_6$ , 100 mmol  $\text{L}^{-1}$  de tampão fosfato pH 7 e 0 ppm TPSA como referência) da  $\beta$ -CD (1,0 mmol  $\text{L}^{-1}$ ) e Dapsona (1,0 mmol  $\text{L}^{-1}$ ). ..... 107
- Anexo 6.** RMN de  $^1\text{H}$  (400,1315 MHz, a 298 K, 10% acetona- $d_6$ , 100 mmol  $\text{L}^{-1}$  de tampão fosfato pH 7 e 0 ppm TPSA como referência) da  $\beta$ -CD (0,8 mmol  $\text{L}^{-1}$ ) e Dapsona (1,2 mmol  $\text{L}^{-1}$ ). ..... 107
- Anexo 7.** RMN de  $^1\text{H}$  (400,1315 MHz, a 298 K, 10% acetona- $d_6$ , 100 mmol  $\text{L}^{-1}$  de tampão fosfato pH 7 e 0 ppm TPSA como referência) da  $\beta$ -CD (0,4 mmol  $\text{L}^{-1}$ ) e Dapsona (1,6 mmol  $\text{L}^{-1}$ ). ..... 108
- Anexo 8.** RMN de  $^1\text{H}$  (400,1315 MHz, a 298 K, 10% acetona- $d_6$  pH 7 e 0 ppm TPSA como referência) da SBE- $\beta$ -CD. .... 108
- Anexo 9.** RMN de  $^1\text{H}$  (400,1315 MHz, a 298 K, 10% acetona- $d_6$ , 100 mmol  $\text{L}^{-1}$  de tampão fosfato pH 7 e 0 ppm TPSA como referência) da SBE- $\beta$ -CD (1,6 mmol  $\text{L}^{-1}$ ) e Dapsona (0,4 mmol  $\text{L}^{-1}$ ). ..... 109
- Anexo 10.** RMN de  $^1\text{H}$  (400,1315 MHz, a 298 K, 10% acetona- $d_6$ , 100 mmol  $\text{L}^{-1}$  de tampão fosfato pH 7 e 0 ppm TPSA como referência) da SBE- $\beta$ -CD (1,2 mmol  $\text{L}^{-1}$ ) e Dapsona (0,8 mmol  $\text{L}^{-1}$ ). ..... 109

<b>Anexo 11.</b> RMN de $^1\text{H}$ (400,1315 MHz, a 298 K, 10% acetona- $d_6$ , 100 mmol $\text{L}^{-1}$ de tampão fosfato pH 7 e 0 ppm TPSA como referência) da SBE- $\beta$ -CD (1,0 mmol $\text{L}^{-1}$ ) e Dapsona (1,0 mmol $\text{L}^{-1}$ ).....	110
<b>Anexo 12.</b> RMN de $^1\text{H}$ (400,1315 MHz, a 298 K, 10% acetona- $d_6$ 100 mmol $\text{L}^{-1}$ de tampão fosfato pH 7 e 0 ppm TPSA como referência) da SBE- $\beta$ -CD (0,8 mmol $\text{L}^{-1}$ ) e Dapsona (1,2 mmol $\text{L}^{-1}$ ).....	110
<b>Anexo 13.</b> RMN de $^1\text{H}$ (400,1315 MHz, a 298 K, 10% acetona- $d_6$ 100 mmol $\text{L}^{-1}$ de tampão fosfato pH=7 e 0 ppm TPSA como referência) da SBE- $\beta$ -CD (0,4 mmol $\text{L}^{-1}$ ) e Dapsona (1,6 mmol $\text{L}^{-1}$ ).....	111
<b>Anexo 14.</b> RMN de $^1\text{H}$ (400,1315 MHz, a 298 K, 100 mmol $\text{L}^{-1}$ de tampão fosfato pH=7 e 0 ppm TPSA como referência) de lipossomas de EPC 400 nm (5 mmol $\text{L}^{-1}$ ) e Dapsona (3 mmol $\text{L}^{-1}$ ).....	111
<b>Anexo 15.</b> RMN de $^1\text{H}$ (400,1315 MHz, a 298 K, 100 mmol $\text{L}^{-1}$ de tampão fosfato pH=7 e 0 ppm TPSA como referência) do complexo ternário: $\beta$ -CD (1,0 mmol $\text{L}^{-1}$ ), Dapsona (1,0 mmol $\text{L}^{-1}$ ) e lipossomas de EPC 400 nm (5 mmol $\text{L}^{-1}$ ).....	112
<b>Anexo 16.</b> ROESY 1D de amostra de Dapsona e $\beta$ -CD, trava de <i>spin</i> de 500ms e irradiação em H3 (3,90 ppm) da $\beta$ -CD ( $\text{D}_2\text{O}$ , 100 mmol $\text{L}^{-1}$ de tampão fosfato pH=7,0 e 400.1315 MHz para $^1\text{H}$ ). .....	112
<b>Anexo 17.</b> ROESY 1D de amostra de Dapsona e $\beta$ -CD, trava de <i>spin</i> de 500ms e irradiação em H5 (3,65 ppm) da $\beta$ -CD ( $\text{D}_2\text{O}$ , 100 mmol $\text{L}^{-1}$ de tampão fosfato pH=7,0 e 400.1315 MHz para $^1\text{H}$ ). .....	113
<b>Anexo 18.</b> ROESY 1D de amostra de Dapsona e SBE- $\beta$ -CD, trava de <i>spin</i> de 300ms e irradiação em Ha (7,61 ppm) da Dapsona ( $\text{D}_2\text{O}$ , 100 mmol $\text{L}^{-1}$ de tampão fosfato pH=7,0 e 400.1315 MHz para $^1\text{H}$ ). .....	113
<b>Anexo 19.</b> ROESY 1D de amostra de Dapsona e SBE- $\beta$ -CD, trava de <i>spin</i> de 300ms e irradiação em Hb (6,82 ppm) da Dapsona ( $\text{D}_2\text{O}$ , 100 mmol $\text{L}^{-1}$ de tampão fosfato pH=7,0 e 400.1315 MHz para $^1\text{H}$ ). .....	114
<b>Anexo 20.</b> ROESY 1D de amostra de Dapsona, $\beta$ -CD e lipossomas de EPC 400 nm, trava de <i>spin</i> de 500ms e irradiação em H3 (3,82 ppm) da $\beta$ -CD	

(D <sub>2</sub> O, 100 mmol L <sup>-1</sup> de tampão fosfato pH=7,0 e 400.1315 MHz para <sup>1</sup> H). .....	114
<b>Anexo 21.</b> ROESY 1D de amostra de Dapsona, β-CD e lipossomas de EPC 400 nm, trava de <i>spin</i> de 500ms e irradiação em H5 (3,60 ppm) da β-CD (D <sub>2</sub> O, 100 mmol L <sup>-1</sup> de tampão fosfato pH=7,0 e 400.1315 MHz para <sup>1</sup> H). .....	115
<b>Anexo 22.</b> RMN de <sup>1</sup> H (400,1315 MHz, a 298 K, 100 mmol L <sup>-1</sup> de tampão fosfato pH=7 e 4,70 ppm D <sub>2</sub> O/HDO como referência) do complexo binário Dap/EPC, (A) espectro de ressonância STD-RMN <i>off-resonance</i> , (B) Espectro de STD-RMN <i>on-resonance</i> e (C) diferença entre os espectros <i>on-resonance</i> e <i>off-resonance</i> . .....	115
<b>Anexo 23.</b> RMN de <sup>1</sup> H (600,1728 MHz, a 298 K, 100 mmol L <sup>-1</sup> de tampão fosfato pH=6,5 e 4,70 ppm HDO como referência) da Fisostigmina. ....	116
<b>Anexo 24.</b> RMN de <sup>13</sup> C (600,1728 MHz, a 298 K, 100 mmol L <sup>-1</sup> de tampão fosfato pH=6,5) da Fisostigmina. .....	116
<b>Anexo 25.</b> Mapa de contorno relativo ao experimento de correlação heteronuclear, HSQC, (600,1728 MHz, a 298 K, 100 mmol L <sup>-1</sup> de tampão fosfato pH=6,5 e 4,70 ppm HDO como referência) da Fisostigmina. ....	117
<b>Anexo 26.</b> Mapa de contorno relativo ao experimento de correlação heteronuclear, HMBC, (600,1728 MHz, a 298 K, 100 mmol L <sup>-1</sup> de tampão fosfato pH=6,5 e 4,70 ppm HDO como referência) da Fisostigmina. ....	117
<b>Anexo 27.</b> RMN de <sup>1</sup> H (400,1315 MHz, a 298 K, pH = 6,0 e 4,70 ppm D <sub>2</sub> O/HDO como referência) de AChE titulada com 0,26 mmol L <sup>-1</sup> de Fisostigmina, com tempo de saturação de 0,75 s. (A) espectro de ressonância STD-RMN <i>off-resonance</i> , (B) Espectro de STD-RMN <i>on-resonance</i> e (C) diferença entre os espectros <i>on-resonance</i> e <i>off-resonance</i> . .....	118
<b>Anexo 28.</b> RMN de <sup>1</sup> H (400,1315 MHz, a 298 K, pH = 6,0 e 4,70 ppm D <sub>2</sub> O/HDO como referência) de AChE titulada com 0,26 mmol L <sup>-1</sup> de Fisostigmina, com tempo de saturação de 1,50 s. (A) espectro de ressonância STD-RMN <i>off-resonance</i> , (B) Espectro de STD-RMN <i>on-resonance</i> e (C) diferença entre os espectros <i>on-resonance</i> e <i>off-resonance</i> . .....	118

**Anexo 29.** RMN de  $^1\text{H}$  (400,1315 MHz, a 298 K, pH = 6,0 e 4,70 ppm D<sub>2</sub>O/HDO como referência) de AChE titulada com 0,26 mmol L<sup>-1</sup> de Fisostigmina, com tempo de saturação de 2,25 s. (A) espectro de ressonância STD-RMN *off-resonance*, (B) Espectro de STD-RMN *on-resonance* e (C) diferença entre os espectros *on-resonance* e *off-resonance*..... 119

**Anexo 30.** RMN de  $^1\text{H}$  (400,1315 MHz, a 298 K, pH = 6,0 e 4,70 ppm D<sub>2</sub>O/HDO como referência) de AChE titulada com 0,26 mmol L<sup>-1</sup> de Fisostigmina, com tempo de saturação de 3,00 s. (A) espectro de ressonância STD-RMN *off-resonance*, (B) Espectro de STD-RMN *on-resonance* e (C) diferença entre os espectros *on-resonance* e *off-resonance*..... 119

**Anexo 31.** RMN de  $^1\text{H}$  (400,1315 MHz, a 298 K, pH = 6,0 e 4,70 ppm D<sub>2</sub>O/HDO como referência) de AChE titulada com 0,34 mmol L<sup>-1</sup> de Fisostigmina, com tempo de saturação de 0,75 s. (A) espectro de ressonância STD-RMN *off-resonance*, (B) Espectro de STD-RMN *on-resonance* e (C) diferença entre os espectros *on-resonance* e *off-resonance*..... 120

**Anexo 32.** RMN de  $^1\text{H}$  (400,1315 MHz, a 298 K, pH = 6,0 e 4,70 ppm D<sub>2</sub>O/HDO como referência) de AChE titulada com 0,34 mmol L<sup>-1</sup> de Fisostigmina, com tempo de saturação de 1,50 s. (A) espectro de ressonância STD-RMN *off-resonance*, (B) Espectro de STD-RMN *on-resonance* e (C) diferença entre os espectros *on-resonance* e *off-resonance*..... 120

**Anexo 33.** RMN de  $^1\text{H}$  (400,1315 MHz, a 298 K, pH = 6,0 e 4,70 ppm D<sub>2</sub>O/HDO como referência) de AChE titulada com 0,34 mmol L<sup>-1</sup> de Fisostigmina, com tempo de saturação de 2,25 s. (A) espectro de ressonância STD-RMN *off-resonance*, (B) Espectro de STD-RMN *on-resonance* e (C) diferença entre os espectros *on-resonance* e *off-resonance*..... 121

**Anexo 34.** RMN de  $^1\text{H}$  (400,1315 MHz, a 298 K, pH = 6,0 e 4,70 ppm D<sub>2</sub>O/HDO como referência) de AChE titulada com 0,34 mmol L<sup>-1</sup> de Fisostigmina, com tempo de saturação de 3,00 s. (A) espectro de ressonância STD-RMN *off-resonance*, (B) Espectro de STD-RMN *on-resonance* e (C) diferença entre os espectros *on-resonance* e *off-resonance*..... 121

**Anexo 35.** RMN de  $^1\text{H}$  (400,1315 MHz, a 298 K, pH = 6,0 e 4,70 ppm D<sub>2</sub>O/HDO como referência) de AChE titulada com 0,42 mmol L<sup>-1</sup> de Fisostigmina, com tempo de saturação de 0,75 s. (A) espectro de ressonância

STD-RMN <i>off-resonance</i> , (B) Espectro de STD-RMN <i>on-resonance</i> e (C) diferença entre os espectros <i>on-resonance</i> e <i>off-resonance</i> .....	122
<b>Anexo 36.</b> RMN de $^1\text{H}$ (400,1315 MHz, a 298 K, pH = 6,0 e 4,70 ppm D <sub>2</sub> O/HDO como referência) de AChE titulada com 0,42 mmol L <sup>-1</sup> de Fisostigmina, com tempo de saturação de 1,50 s. (A) espectro de ressonância STD-RMN <i>off-resonance</i> , (B) Espectro de STD-RMN <i>on-resonance</i> e (C) diferença entre os espectros <i>on-resonance</i> e <i>off-resonance</i> .....	122
<b>Anexo 37.</b> RMN de $^1\text{H}$ (400,1315 MHz, a 298 K, pH = 6,0 e 4,70 ppm D <sub>2</sub> O/HDO como referência) de AChE titulada com 0,42 mmol L <sup>-1</sup> de Fisostigmina, com tempo de saturação de 2,25 s. (A) espectro de ressonância STD-RMN <i>off-resonance</i> , (B) Espectro de STD-RMN <i>on-resonance</i> e (C) diferença entre os espectros <i>on-resonance</i> e <i>off-resonance</i> .....	123
<b>Anexo 38.</b> RMN de $^1\text{H}$ (400,1315 MHz, a 298 K, pH = 6,0 e 4,70 ppm D <sub>2</sub> O/HDO como referência) de AChE titulada com 0,42 mmol L <sup>-1</sup> de Fisostigmina, com tempo de saturação de 3,00 s. (A) espectro de ressonância STD-RMN <i>off-resonance</i> , (B) Espectro de STD-RMN <i>on-resonance</i> e (C) diferença entre os espectros <i>on-resonance</i> e <i>off-resonance</i> .....	123
<b>Anexo 39.</b> RMN de $^1\text{H}$ (400,1315 MHz, a 298 K, pH = 6,0 e 4,70 ppm D <sub>2</sub> O/HDO como referência) de AChE titulada com 0,49 mmol L <sup>-1</sup> de Fisostigmina, com tempo de saturação de 0,75 s. (A) espectro de ressonância STD-RMN <i>off-resonance</i> , (B) Espectro de STD-RMN <i>on-resonance</i> e (C) diferença entre os espectros <i>on-resonance</i> e <i>off-resonance</i> .....	124
<b>Anexo 40.</b> . RMN de $^1\text{H}$ (400,1315 MHz, a 298 K, pH = 6,0 e 4,70 ppm D <sub>2</sub> O/HDO como referência) de AChE titulada com 0,49 mmol L <sup>-1</sup> de Fisostigmina, com tempo de saturação de 1,50 s. (A) espectro de ressonância STD-RMN <i>off-resonance</i> , (B) Espectro de STD-RMN <i>on-resonance</i> e (C) diferença entre os espectros <i>on-resonance</i> e <i>off-resonance</i> .....	124
<b>Anexo 41.</b> . RMN de $^1\text{H}$ (400,1315 MHz, a 298 K, pH = 6,0 e 4,70 ppm D <sub>2</sub> O/HDO como referência) de AChE titulada com 0,49 mmol L <sup>-1</sup> de Fisostigmina, com tempo de saturação de 2,25 s. (A) espectro de ressonância STD-RMN <i>off-resonance</i> , (B) Espectro de STD-RMN <i>on-resonance</i> e (C) diferença entre os espectros <i>on-resonance</i> e <i>off-resonance</i> .....	125

**Anexo 42.** . RMN de  $^1\text{H}$  (400,1315 MHz, a 298 K, pH = 6,0 e 4,70 ppm D2O/HDO como referência) de AChE titulada com 0,49 mmol L<sup>-1</sup> de Fisostigmina, com tempo de saturação de 3,00 s. (A) espectro de ressonância STD-RMN *off-resonance*, (B) Espectro de STD-RMN *on-resonance* e (C) diferença entre os espectros *on-resonance* e *off-resonance*.....125

**Anexo 43.** . RMN de  $^1\text{H}$  (400,1315 MHz, a 298 K, pH = 6,0 e 4,70 ppm D2O/HDO como referência) de AChE titulada com 0,57 mmol L<sup>-1</sup> de Fisostigmina, com tempo de saturação de 0,75 s. (A) espectro de ressonância STD-RMN *off-resonance*, (B) Espectro de STD-RMN *on-resonance* e (C) diferença entre os espectros *on-resonance* e *off-resonance*.....126

**Anexo 44.** . RMN de  $^1\text{H}$  (400,1315 MHz, a 298 K, pH = 6,0 e 4,70 ppm D2O/HDO como referência) de AChE titulada com 0,57 mmol L<sup>-1</sup> de Fisostigmina, com tempo de saturação de 1,50 s. (A) espectro de ressonância STD-RMN *off-resonance*, (B) Espectro de STD-RMN *on-resonance* e (C) diferença entre os espectros *on-resonance* e *off-resonance*.....126

**Anexo 45.** RMN de  $^1\text{H}$  (400,1315 MHz, a 298 K, pH = 6,0 e 4,70 ppm D2O/HDO como referência) de AChE titulada com 0,57 mmol L<sup>-1</sup> de Fisostigmina, com tempo de saturação de 2,25 s. (A) espectro de ressonância STD-RMN *off-resonance*, (B) Espectro de STD-RMN *on-resonance* e (C) diferença entre os espectros *on-resonance* e *off-resonance*.....127

**Anexo 46.** RMN de  $^1\text{H}$  (400,1315 MHz, a 298 K, pH = 6,0 e 4,70 ppm D2O/HDO como referência) de AChE titulada com 0,57 mmol L<sup>-1</sup> de Fisostigmina, com tempo de saturação de 3,00 s. (A) espectro de ressonância STD-RMN *off-resonance*, (B) Espectro de STD-RMN *on-resonance* e (C) diferença entre os espectros *on-resonance* e *off-resonance*.....127

**Anexo 47.** RMN de  $^1\text{H}$  (400,1315 MHz, a 298 K, pH = 6,0 e 4,70 ppm D2O/HDO como referência) de AChE titulada com 0,64 mmol L<sup>-1</sup> de Fisostigmina, com tempo de saturação de 0,75 s. (A) espectro de ressonância STD-RMN *off-resonance*, (B) Espectro de STD-RMN *on-resonance* e (C) diferença entre os espectros *on-resonance* e *off-resonance*.....128

**Anexo 48.** RMN de  $^1\text{H}$  (400,1315 MHz, a 298 K, pH = 6,0 e 4,70 ppm D2O/HDO como referência) de AChE titulada com 0,64 mmol L<sup>-1</sup> de Fisostigmina, com tempo de saturação de 1,50 s. (A) espectro de ressonância

STD-RMN <i>off-resonance</i> , (B) Espectro de STD-RMN <i>on-resonance</i> e (C) diferença entre os espectros <i>on-resonance</i> e <i>off-resonance</i> .....	128
<b>Anexo 49.</b> RMN de $^1\text{H}$ (400,1315 MHz, a 298 K, pH = 6,0 e 4,70 ppm D <sub>2</sub> O/HDO como referência) de AChE titulada com 0,64 mmol L <sup>-1</sup> de Fisostigmina, com tempo de saturação de 2,25 s. (A) espectro de ressonância STD-RMN <i>off-resonance</i> , (B) Espectro de STD-RMN <i>on-resonance</i> e (C) diferença entre os espectros <i>on-resonance</i> e <i>off-resonance</i> .....	129
<b>Anexo 50.</b> RMN de $^1\text{H}$ (400,1315 MHz, a 298 K, pH = 6,0 e 4,70 ppm D <sub>2</sub> O/HDO como referência) de AChE titulada com 0,64 mmol L <sup>-1</sup> de Fisostigmina, com tempo de saturação de 3,00 s. (A) espectro de ressonância STD-RMN <i>off-resonance</i> , (B) Espectro de STD-RMN <i>on-resonance</i> e (C) diferença entre os espectros <i>on-resonance</i> e <i>off-resonance</i> .....	129
<b>Anexo 51.</b> RMN de $^1\text{H}$ (400,1315 MHz, a 298 K, pH = 6,0 e 4,70 ppm D <sub>2</sub> O/HDO como referência) de AChE titulada com 0,98 mmol L <sup>-1</sup> de Fisostigmina, com tempo de saturação de 0,75 s. (A) espectro de ressonância STD-RMN <i>off-resonance</i> , (B) Espectro de STD-RMN <i>on-resonance</i> e (C) diferença entre os espectros <i>on-resonance</i> e <i>off-resonance</i> .....	130
<b>Anexo 52.</b> RMN de $^1\text{H}$ (400,1315 MHz, a 298 K, pH = 6,0 e 4,70 ppm D <sub>2</sub> O/HDO como referência) de AChE titulada com 0,98 mmol L <sup>-1</sup> de Fisostigmina, com tempo de saturação de 1,50 s. (A) espectro de ressonância STD-RMN <i>off-resonance</i> , (B) Espectro de STD-RMN <i>on-resonance</i> e (C) diferença entre os espectros <i>on-resonance</i> e <i>off-resonance</i> .....	130
<b>Anexo 53.</b> RMN de $^1\text{H}$ (400,1315 MHz, a 298 K, pH = 6,0 e 4,70 ppm D <sub>2</sub> O/HDO como referência) de AChE titulada com 0,98 mmol L <sup>-1</sup> de Fisostigmina, com tempo de saturação de 2,25 s. (A) espectro de ressonância STD-RMN <i>off-resonance</i> , (B) Espectro de STD-RMN <i>on-resonance</i> e (C) diferença entre os espectros <i>on-resonance</i> e <i>off-resonance</i> .....	131
<b>Anexo 54.</b> RMN de $^1\text{H}$ (400,1315 MHz, a 298 K, pH = 6,0 e 4,70 ppm D <sub>2</sub> O/HDO como referência) de AChE titulada com 0,98 mmol L <sup>-1</sup> de Fisostigmina, com tempo de saturação de 3,00 s. (A) espectro de ressonância STD-RMN <i>off-resonance</i> , (B) Espectro de STD-RMN <i>on-resonance</i> e (C) diferença entre os espectros <i>on-resonance</i> e <i>off-resonance</i> .....	131

Anexo 55. RMN de $^1\text{H}$ (600,1728 MHz, a 298 K, 100 mmol L <sup>-1</sup> de tampão fosfato pH=6,5 e 4,70 ppm HDO como referência) da Crinina.....	132
Anexo 56. RMN de $^{13}\text{C}$ (600,1728 MHz, a 298 K, 100 mmol L <sup>-1</sup> de tampão fosfato pH=6,5) da Crinina. ....	132
<b>Anexo 57.</b> Mapa de contorno relativo ao experimento de correlação homonuclear, COSY, (600,1728 MHz, a 298 K, 100 mmol L <sup>-1</sup> de tampão fosfato pH=6 e 4,70 ppm HDO como referência) da Crinina.....	133
<b>Anexo 58.</b> Mapa de contorno relativo ao experimento de correlação heteronuclear, HSQC, (600,1728 MHz, a 298 K, 100 mmol L <sup>-1</sup> de tampão fosfato pH=6 e 4,70 ppm HDO como referência) da Crinina.....	133
<b>Anexo 59.</b> Mapa de contorno relativo ao experimento de correlação heteronuclear, HMBC, (600,1728 MHz, a 298 K, 100 mmol L <sup>-1</sup> de tampão fosfato pH=6 e 4,70 ppm HDO como referência) da Crinina.....	134
<b>Anexo 60.</b> RMN de $^1\text{H}$ (400,1315 MHz, a 298 K, pH = 6,0 e 4,70 ppm D <sub>2</sub> O/HDO como referência) de AChE titulada com 0,29 mmol L <sup>-1</sup> de Crinina, com tempo de saturação de 0,75 s. (A) espectro de ressonância STD-RMN <i>off-resonance</i> , (B) Espectro de STD-RMN <i>on-resonance</i> e (C) diferença entre os espectros <i>on-resonance</i> e <i>off-resonance</i> .....	134
<b>Anexo 61.</b> RMN de $^1\text{H}$ (400,1315 MHz, a 298 K, pH = 6,0 e 4,70 ppm D <sub>2</sub> O/HDO como referência) de AChE titulada com 0,29 mmol L <sup>-1</sup> de Crinina, com tempo de saturação de 1,50 s. (A) espectro de ressonância STD-RMN <i>off-resonance</i> , (B) Espectro de STD-RMN <i>on-resonance</i> e (C) diferença entre os espectros <i>on-resonance</i> e <i>off-resonance</i> .....	135
<b>Anexo 62.</b> RMN de $^1\text{H}$ (400,1315 MHz, a 298 K, pH = 6,0 e 4,70 ppm D <sub>2</sub> O/HDO como referência) de AChE titulada com 0,29 mmol L <sup>-1</sup> de Crinina, com tempo de saturação de 2,25 s. (A) espectro de ressonância STD-RMN <i>off-resonance</i> , (B) Espectro de STD-RMN <i>on-resonance</i> e (C) diferença entre os espectros <i>on-resonance</i> e <i>off-resonance</i> .....	135
<b>Anexo 63.</b> RMN de $^1\text{H}$ (400,1315 MHz, a 298 K, pH = 6,0 e 4,70 ppm D <sub>2</sub> O/HDO como referência) de AChE titulada com 0,29 mmol L <sup>-1</sup> de Crinina, com tempo de saturação de 3,00 s. (A) espectro de ressonância	

STD-RMN <i>off-resonance</i> , (B) Espectro de STD-RMN <i>on-resonance</i> e (C) diferença entre os espectros <i>on-resonance</i> e <i>off-resonance</i> .....	136
<b>Anexo 64.</b> RMN de $^1\text{H}$ (400,1315 MHz, a 298 K, pH = 6,0 e 4,70 ppm D <sub>2</sub> O/HDO como referência) de AChE titulada com 0,38 mmol L <sup>-1</sup> de Crinina, com tempo de saturação de 0,75 s. (A) espectro de ressonância STD-RMN <i>off-resonance</i> , (B) Espectro de STD-RMN <i>on-resonance</i> e (C) diferença entre os espectros <i>on-resonance</i> e <i>off-resonance</i> .....	136
<b>Anexo 65.</b> RMN de $^1\text{H}$ (400,1315 MHz, a 298 K, pH = 6,0 e 4,70 ppm D <sub>2</sub> O/HDO como referência) de AChE titulada com 0,38 mmol L <sup>-1</sup> de Crinina, com tempo de saturação de 1,50 s. (A) espectro de ressonância STD-RMN <i>off-resonance</i> , (B) Espectro de STD-RMN <i>on-resonance</i> e (C) diferença entre os espectros <i>on-resonance</i> e <i>off-resonance</i> .....	137
<b>Anexo 66.</b> RMN de $^1\text{H}$ (400,1315 MHz, a 298 K, pH = 6,0 e 4,70 ppm D <sub>2</sub> O/HDO como referência) de AChE titulada com 0,38 mmol L <sup>-1</sup> de Crinina, com tempo de saturação de 2,25 s. (A) espectro de ressonância STD-RMN <i>off-resonance</i> , (B) Espectro de STD-RMN <i>on-resonance</i> e (C) diferença entre os espectros <i>on-resonance</i> e <i>off-resonance</i> .....	137
<b>Anexo 67.</b> RMN de $^1\text{H}$ (400,1315 MHz, a 298 K, pH = 6,0 e 4,70 ppm D <sub>2</sub> O/HDO como referência) de AChE titulada com 0,38 mmol L <sup>-1</sup> de Crinina, com tempo de saturação de 3,00 s. (A) espectro de ressonância STD-RMN <i>off-resonance</i> , (B) Espectro de STD-RMN <i>on-resonance</i> e (C) diferença entre os espectros <i>on-resonance</i> e <i>off-resonance</i> .....	138
<b>Anexo 68.</b> RMN de $^1\text{H}$ (400,1315 MHz, a 298 K, pH = 6,0 e 4,70 ppm D <sub>2</sub> O/HDO como referência) de AChE titulada com 0,46 mmol L <sup>-1</sup> de Crinina, com tempo de saturação de 0,75 s. (A) espectro de ressonância STD-RMN <i>off-resonance</i> , (B) Espectro de STD-RMN <i>on-resonance</i> e (C) diferença entre os espectros <i>on-resonance</i> e <i>off-resonance</i> .....	138
<b>Anexo 69.</b> RMN de $^1\text{H}$ (400,1315 MHz, a 298 K, pH = 6,0 e 4,70 ppm D <sub>2</sub> O/HDO como referência) de AChE titulada com 0,46 mmol L <sup>-1</sup> de Crinina, com tempo de saturação de 1,50 s. (A) espectro de ressonância STD-RMN <i>off-resonance</i> , (B) Espectro de STD-RMN <i>on-resonance</i> e (C) diferença entre os espectros <i>on-resonance</i> e <i>off-resonance</i> .....	139

<b>Anexo 70.</b> RMN de $^1\text{H}$ (400,1315 MHz, a 298 K, pH = 6,0 e 4,70 ppm D2O/HDO como referência) de AChE titulada com 0,46 mmol L <sup>-1</sup> de Crinina, com tempo de saturação de 2,25 s. (A) espectro de ressonância STD-RMN <i>off-resonance</i> , (B) Espectro de STD-RMN <i>on-resonance</i> e (C) diferença entre os espectros <i>on-resonance</i> e <i>off-resonance</i> .....	139
<b>Anexo 71.</b> RMN de $^1\text{H}$ (400,1315 MHz, a 298 K, pH = 6,0 e 4,70 ppm D2O/HDO como referência) de AChE titulada com 0,46 mmol L <sup>-1</sup> de Crinina, com tempo de saturação de 3,00 s. (A) espectro de ressonância STD-RMN <i>off-resonance</i> , (B) Espectro de STD-RMN <i>on-resonance</i> e (C) diferença entre os espectros <i>on-resonance</i> e <i>off-resonance</i> .....	140
<b>Anexo 72.</b> RMN de $^1\text{H}$ (400,1315 MHz, a 298 K, pH = 6,0 e 4,70 ppm D2O/HDO como referência) de AChE titulada com 0,55 mmol L <sup>-1</sup> de Crinina, com tempo de saturação de 0,75 s. (A) espectro de ressonância STD-RMN <i>off-resonance</i> , (B) Espectro de STD-RMN <i>on-resonance</i> e (C) diferença entre os espectros <i>on-resonance</i> e <i>off-resonance</i> .....	140
<b>Anexo 73.</b> RMN de $^1\text{H}$ (400,1315 MHz, a 298 K, pH = 6,0 e 4,70 ppm D2O/HDO como referência) de AChE titulada com 0,55 mmol L <sup>-1</sup> de Crinina, com tempo de saturação de 1,50 s. (A) espectro de ressonância STD-RMN <i>off-resonance</i> , (B) Espectro de STD-RMN <i>on-resonance</i> e (C) diferença entre os espectros <i>on-resonance</i> e <i>off-resonance</i> .....	141
<b>Anexo 74.</b> RMN de $^1\text{H}$ (400,1315 MHz, a 298 K, pH = 6,0 e 4,70 ppm D2O/HDO como referência) de AChE titulada com 0,55 mmol L <sup>-1</sup> de Crinina, com tempo de saturação de 2,25 s. (A) espectro de ressonância STD-RMN <i>off-resonance</i> , (B) Espectro de STD-RMN <i>on-resonance</i> e (C) diferença entre os espectros <i>on-resonance</i> e <i>off-resonance</i> .....	141
<b>Anexo 75.</b> RMN de $^1\text{H}$ (400,1315 MHz, a 298 K, pH = 6,0 e 4,70 ppm D2O/HDO como referência) de AChE titulada com 0,55 mmol L <sup>-1</sup> de Crinina, com tempo de saturação de 3,00 s. (A) espectro de ressonância STD-RMN <i>off-resonance</i> , (B) Espectro de STD-RMN <i>on-resonance</i> e (C) diferença entre os espectros <i>on-resonance</i> e <i>off-resonance</i> .....	142
<b>Anexo 76.</b> RMN de $^1\text{H}$ (400,1315 MHz, a 298 K, pH = 6,0 e 4,70 ppm D2O/HDO como referência) de AChE titulada com 0,63 mmol L <sup>-1</sup> de Crinina, com tempo de saturação de 0,75 s. (A) espectro de ressonância	

STD-RMN <i>off-resonance</i> , (B) Espectro de STD-RMN <i>on-resonance</i> e (C) diferença entre os espectros <i>on-resonance</i> e <i>off-resonance</i> .....	142
<b>Anexo 77.</b> RMN de $^1\text{H}$ (400,1315 MHz, a 298 K, pH = 6,0 e 4,70 ppm D <sub>2</sub> O/HDO como referência) de AChE titulada com 0,63 mmol L <sup>-1</sup> de Crinina, com tempo de saturação de 1,50 s. (A) espectro de ressonância STD-RMN <i>off-resonance</i> , (B) Espectro de STD-RMN <i>on-resonance</i> e (C) diferença entre os espectros <i>on-resonance</i> e <i>off-resonance</i> .....	143
<b>Anexo 78.</b> RMN de $^1\text{H}$ (400,1315 MHz, a 298 K, pH = 6,0 e 4,70 ppm D <sub>2</sub> O/HDO como referência) de AChE titulada com 0,63 mmol L <sup>-1</sup> de Crinina, com tempo de saturação de 2,25 s. (A) espectro de ressonância STD-RMN <i>off-resonance</i> , (B) Espectro de STD-RMN <i>on-resonance</i> e (C) diferença entre os espectros <i>on-resonance</i> e <i>off-resonance</i> .....	143
<b>Anexo 79.</b> RMN de $^1\text{H}$ (400,1315 MHz, a 298 K, pH = 6,0 e 4,70 ppm D <sub>2</sub> O/HDO como referência) de AChE titulada com 0,63 mmol L <sup>-1</sup> de Crinina, com tempo de saturação de 3,00 s. (A) espectro de ressonância STD-RMN <i>off-resonance</i> , (B) Espectro de STD-RMN <i>on-resonance</i> e (C) diferença entre os espectros <i>on-resonance</i> e <i>off-resonance</i> .....	144
<b>Anexo 80.</b> RMN de $^1\text{H}$ (400,1315 MHz, a 298 K, pH = 6,0 e 4,70 ppm D <sub>2</sub> O/HDO como referência) de AChE titulada com 0,72 mmol L <sup>-1</sup> de Crinina, com tempo de saturação de 0,75 s. (A) espectro de ressonância STD-RMN <i>off-resonance</i> , (B) Espectro de STD-RMN <i>on-resonance</i> e (C) diferença entre os espectros <i>on-resonance</i> e <i>off-resonance</i> .....	144
<b>Anexo 81.</b> RMN de $^1\text{H}$ (400,1315 MHz, a 298 K, pH = 6,0 e 4,70 ppm D <sub>2</sub> O/HDO como referência) de AChE titulada com 0,72 mmol L <sup>-1</sup> de Crinina, com tempo de saturação de 1,50 s. (A) espectro de ressonância STD-RMN <i>off-resonance</i> , (B) Espectro de STD-RMN <i>on-resonance</i> e (C) diferença entre os espectros <i>on-resonance</i> e <i>off-resonance</i> .....	145
<b>Anexo 82.</b> RMN de $^1\text{H}$ (400,1315 MHz, a 298 K, pH = 6,0 e 4,70 ppm D <sub>2</sub> O/HDO como referência) de AChE titulada com 0,72 mmol L <sup>-1</sup> de Crinina, com tempo de saturação de 2,25 s. (A) espectro de ressonância STD-RMN <i>off-resonance</i> , (B) Espectro de STD-RMN <i>on-resonance</i> e (C) diferença entre os espectros <i>on-resonance</i> e <i>off-resonance</i> .....	145

**Anexo 83.** RMN de  $^1\text{H}$  (400,1315 MHz, a 298 K, pH = 6,0 e 4,70 ppm D<sub>2</sub>O/HDO como referência) de AChE titulada com 0,72 mmol L<sup>-1</sup> de Crinina, com tempo de saturação de 3,00 s. (A) espectro de ressonância STD-RMN *off-resonance*, (B) Espectro de STD-RMN *on-resonance* e (C) diferença entre os espectros *on-resonance* e *off-resonance*.....146

---

---

# *Introdução*

---

---



## 1 Introdução

### 1.1 Química supramolecular

Química supramolecular é uma terminologia que foi utilizada pela primeira vez em 1988 para descrever organizações moleculares complexas, formadas a partir das interações não covalentes de uma ou mais espécies químicas.<sup>1</sup> As interações intermoleculares presentes nestes agregados são as interações íon-íon, íon-dipolo, dipolo-dipolo, cátion- $\pi$ ,  $\pi$ - $\pi$ , Van der Waals, além de interações dirigidas por hidrofobicidade e solvofobicidade.<sup>2,3</sup> Esta ciência multidisciplinar envolve áreas tradicionais da química, como química orgânica e inorgânica, aplicadas à síntese e formação de agregados supramoleculares. De forma complementar a físico-química e a modelagem computacional auxiliam a melhor compreensão da estrutura e termodinâmica destes agregados.

Existem duas categorias distintas que abordam o conceito de química supramolecular e que diferem entre si apenas pela questão de tamanho das moléculas agregadas. A primeira categoria é denominada hóspede-hospedeiro (do inglês, *host-guest*) e refere-se às interações entre moléculas de tamanhos significativamente diferentes, na qual o hóspede (molécula menor) é envolvido pelo hospedeiro (molécula maior) resultando em interações intermoleculares que modificam algumas propriedades do hóspede como a solubilidade, a difusão molecular e os tempos de relaxação

---

1 Lehn, J. M. *Angew Chem. Int. Ed. Engl.* **1998**, 27, 89-112.

2 Steed, J. W.; Turner, D. R.; Wallace, K. J. *Core Concepts in Supramolecular Chemistry and Nanochemistry*. John Wiley & Sons, Ltd, **2007**, 1-27.

3 Diederich, F. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, 46, 68 - 69.

longitudinal e transversal dos *spins* nucleares envolvidos nas interações. Exemplos de sistemas que pertencem a essa categoria incluem a química de coordenação de metais e quelantes, complexos de inclusão de fármacos ou compostos orgânicos em cavidades hidrofóbicas como as das ciclodextrinas, calixarenos e cucurbiturils, e sistemas biológicos tais como enzimas/substratos e/ou inibidores.

A segunda categoria denominada auto- agrupamento (tradução do inglês, *self-assembly*) refere-se ao agrupamento de um ou mais tipos de moléculas de tamanho semelhantes. Neste caso, nenhuma espécie atua como hospedeiro e as moléculas formam aglomerados estruturalmente organizados por processos normalmente espontâneos. Exemplos destes sistemas incluem formação de micelas, lipossomas, sistemas biológicos como membranas e as estruturas essenciais à vida como o arranjo de dupla hélice do ácido desoxirribonucleico (DNA).<sup>2</sup>

Vários processos biológicos são mediados por interações supramoleculares e podem ser inibidos ou promovidos pelas interações das macromoléculas com moléculas pequenas (cofatores, ativadores e inibidores de massa molecular até 700 Da, aproximadamente). Eventualmente essas interações ocorrem de maneira desordenada, desregulando as vias metabólicas e tendo como consequência o aparecimento de doenças como Câncer<sup>4</sup>, Mal de Alzheimer<sup>5</sup>, entre outros. Estudos para conter estas disfunções nos processos biológicos incluem a busca por novos fármacos ou novas formulações para veicular fármacos já existentes e, portanto, se tornam motivadores para o desenvolvimento de pesquisa acadêmica no assunto.

---

4 Dorsam, R. T.; Gutkind, S. *Nature Rev.* 2007, 7, 79-94.

5 Hensley, K.; Carney, J. M.; Mattson, M. P.; Aksenova, M.; Harrus, M.; Wu, J. F.; Floyd, R. A.; Buterfield, D. A. *Proc. Nati. Acad. Sci.* 1994, 91, 3270-3274.

## 1.2 Encapsulação de Fármacos

A eficiência de um fármaco no tratamento terapêutico de qualquer enfermidade depende, além da sua atividade, da biodisponibilidade do mesmo no organismo a ser tratado. Vários fatores como a solubilidade, a capacidade de ser absorvido e a liberação controlada dos fármacos influenciam na biodisponibilidade dos mesmos.<sup>6</sup> Por este motivo as formulações farmacêuticas contêm excipientes que, além de ajudar na estabilidade do fármaco, auxiliam na absorção, na liberação controlada e em muitos casos aumentam a solubilidade dos fármacos em soluções aquosas. Estes fenômenos ocorrem devido à formação de agregados supramoleculares (complexos supramoleculares) tipo hóspede-hospedeiros ou de arranjos supramoleculares de auto-agrupamento entre os excipientes e o fármaco.

Alguns hospedeiros têm sido extensivamente testados para a encapsulação de fármacos e atuam tanto para o aumento da solubilidade como para a entrega controlada e estabilidade dos mesmos. Os hospedeiros mais estudados são os cucurbiturils<sup>7, 8, 9, 10, 11</sup>, as ciclodextrinas<sup>12, 13, 14, 15, 16, 17</sup> e os calixarenos.<sup>18, 19, 20, 21, 22, 23, 24</sup> Concomitantemente alguns arranjos

---

6 Anand, P.; Kunnumakkara, A. B.; Newman, R. A.; Aggarwal, B. B. *Mol. Pharmaceutics*, **2007**, 4, 807-818.

7 Jon S. Y.; Selvapalam N.; Oh D. H.; Kang J. K.; Kim S. Y.; Jeon Y. J.; Lee J. W.; and Kim K.. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, 125, 10186-10187.

8 Behrend, R.; Meyer, E.; Rusche, F. *Liebigs Ann. Chem.* **1905**, 339, 1-37.

9 Freeman, W. A.; Mock, W. L.; Shih, N. Y. *J. Am. Chem. Soc.* **1981**, 103, 7367-7368.

10 Day, A.; Arnold, A. P.; Blanch, R. J.; Snishall, B. *J. Org. Chem.* **2001**, 66, 8094.

11 Kim, K.; Selvapalam, N.; Ko, Y. H.; Park, K. M.; Kim, D. and Kim, J. *Chem. Soc. Rev.* **2007**, 36, 267-279.

12 Davis, M. E.; Brewster, M. E. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2004**, 3, 1023-1035.

13 Veiga, F.; Fernandes, C.; Teixeira, F. *Int. J. Pharm.* **2000**, 202, 165-171.

14 Zaki, N. M.; Mortada, N. D.; G. Awad, A. S.; ElHady, S. S. *Int. J. Pharm.* **2006**, 327, 97-103.

15 Dalmora, M. E.; Dalmora, S. L.; Oliveira, A. G. *Int. J. Pharm.* **2001**, 222, 45-55.

16 Uekama, K.; Hirayama, F.; Arima, H. *J. Incl. Phenom. Macrocycl. Chem.* **2006**, 56, 3-8.

17 Arante, L. M.; Scarelli, C.; Marsaioli, A. J.; de Paula, E.; Fernandes, S. A. *Magn. Reson. Chem.* **2009**, 47, 757-763.

18 Yang, W.; Otto, D. P.; Liebenberg, W.; Villiers, M. M. *Current Drug Discov. Technol.* **2008**, 5, 129-139.

supramoleculares, tais como liposomas<sup>25, 26</sup>, micelas<sup>27</sup>, nanopartículas lipídicas sólidas<sup>28, 29, 30</sup>, micropartículas<sup>31</sup> e nanopartículas<sup>32</sup> também têm sido testados com o intuito de aumentar a solubilidade, estabilidade e permeabilidade dos fármacos em membranas.

Apesar de existirem diversas classes de compostos capazes de interagir com fármacos mudando suas propriedades físico-químicas esta tese tem a intenção de explorar um pouco mais duas dessas classes: as ciclodextrinas e os lipossomas, por serem objetos de estudo deste trabalho.

### 1.2.1 Ciclodextrinas

As ciclodextrinas são oligossacarídeos cíclicos formados por unidades de glicose unidas por ligações glicosídicas do tipo  $\alpha(1\rightarrow4)$ . O número de moléculas de glicose é variável e resulta em diferentes ciclodextrinas com diferentes propriedades físico-químicas (**Figura 1**). Essas estruturas apresentam cavidades hidrofóbicas capazes de hospedar moléculas

---

19 Fernandes, S. A.; Cabeça, L. F.; Marsaioli, A. J.; de Paula, E. *NMR J. Incl. Phenom. Macrocycl. Chem.* **2007**, *57*, 395-401.

20 Millership, J. S. *J. Inc. Phenom. Macrocycl. Chem.* **2001**, *39*, 327-331.

21 Silva, E.; Valmalle, C.; Becchi, M.; Cuilleron, C. Y.; Coleman, A. W. *J. Incl. Phenom. Macrocycl. Chem.* **2003**, *46*, 65-69.

22 Yang, W. Z.; M. M. de Villiers, *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **2004**, *58*, 629-636.

23 Yang, W. Z.; Villiers, M. M. *J. Pharm. Pharmacol.* **2004**, *56*, 703-708.

24 Yang, W.; Otto, D. P.; Liebenberg, W.; Villiers, M. M. *Current Drug Discov. Technol.* **2008**, *5*, 129-139.

25 Cabeça, L. F.; Fernandes, S. A.; de Paula, E.; Marsaioli, A. J. *Magn. Res. Chem.* **2008**, *46*, 832-837.

26 Zhang, Y.-P.; Ceh, B. D. D. Lasic, *Liposomes in drug delivery, in Polymeric Biomaterials* (2nd edn) Marcel Dekker/ D. Severian: New York, **2002**, 783-785.

27 Kataoka, K.; Harada, A.; Nagasaki, Y. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2001**, *47*, 113-131.

28 Mehnert, W.; Mader, K. *Adv. Drug Delivery Rev.* **2001**, *47*, 165-196.

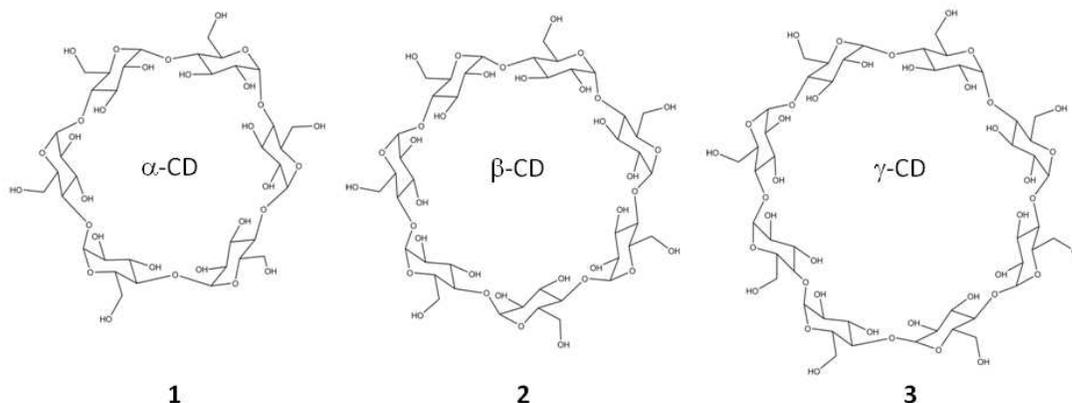
29 Muller, R. H.; Mehnert, W.; Lucks, J. S.; Schwarz, C.; zur Muhlen, A.; Weyhers, H.; Freitas, C.; Ruhl, D. *Eur. J. Pharmacol. Biopharmacol.* **1995**, *41*, 62-69.

30 Muller, R. H.; Mader, K.; Gohla, S. *Eur. J. Pharmacol. Biopharmacol.* **2000**, *50*, 161-177.

31 Kawaguchi, H. *Prog. Polym. Sci.* **2000**, *25*, 1171.

32 Alvarez-Roman, R.; Barre, G.; Guy, R. H.; Fessi, H. *Eur. J. Pharmacol. Biopharmacol.* **2001**, *52*, 191-195.

apolares.<sup>33</sup> Contudo, as hidroxilas primárias e secundárias conferem uma boa solubilidade em água, o que torna esta classe de compostos um alvo interessante para estudos de encapsulação de fármacos pouco solúveis em meio aquoso, melhorando a solubilidade, a estabilidade química e a biodisponibilidade do fármaco.<sup>34</sup>



**Figura 1.**  $\alpha$ -ciclodextrina (**1**,  $\alpha$ -CD, 6 unidades de glicose),  $\beta$ -ciclodextrina (**2**,  $\beta$ -CD, 7 unidades de glicose) e  $\gamma$ -ciclodextrina (**3**,  $\gamma$ -CD, 8 unidades de glicose).

Dentre as ciclodextrinas citadas, a  $\beta$ -CD é a mais acessível, mais barata e, portanto, a mais utilizada, apresentando massa molecular de 1135 g mol<sup>-1</sup> e dimensões adequadas para hospedar moléculas orgânicas em sua cavidade (**Figura 2**). Contudo, é a menos solúvel em água a 25°C (apenas 1,85 % m/v).<sup>35</sup> A baixa solubilidade é justificada pela presença de ligação de hidrogênio entre as hidroxilas secundárias, que estabiliza a  $\beta$ -CD numa estrutura mais rígida se comparada com as demais ciclodextrinas. Consequentemente a disponibilidade das hidroxilas secundárias para fazer ligação de hidrogênio com a água é menor, conferindo uma menor

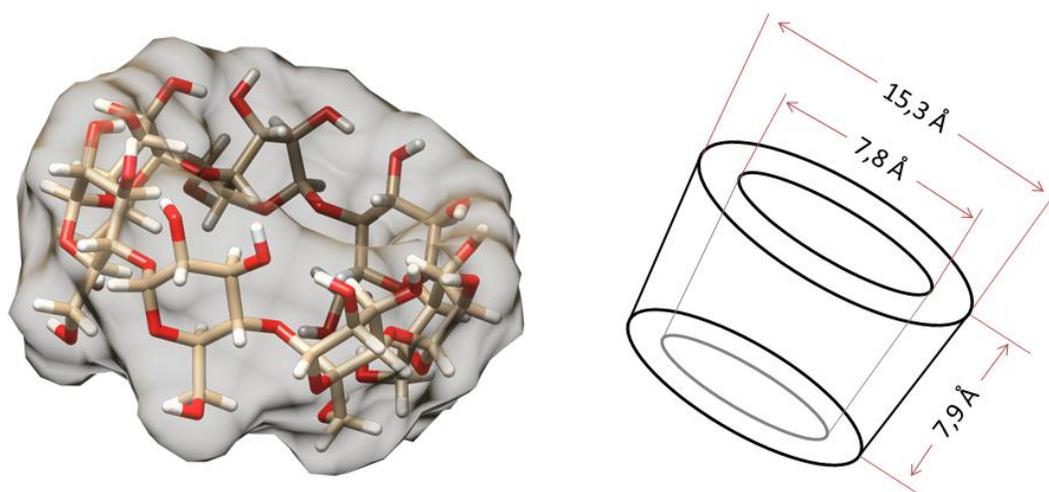
33 Dodjiuk, H. *Cyclodextrins and their Complexes: Chemistry, Analytical Methods, Applications*. Wiley-VCH, 2006.

34 Uekama, K. *Chem Pharm Bull* 2004, 52, 900-915.

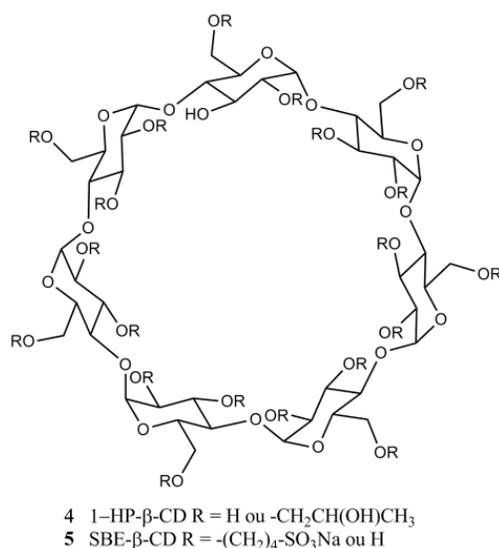
35 Martin Del Valle E. M. *Process Biochemistry*, 2004, 39, 1033-1046.

solubilidade. Ainda assim, essa solubilidade é suficiente para ser utilizada como excipiente em formulações farmacêuticas.

As hidroxilas nas faces primárias e secundárias  $\beta$ -CD permitem que ela seja derivatizada, apresentando uma gama infinita de derivados de mono ou poli-substituídos. Exemplos destes derivados são a 1-hidroxipropil- $\beta$ -CD (**4**, 1-HP- $\beta$ -CD) e a sulfobutileter- $\beta$ -CD (**5**, SBE- $\beta$ -CD), apresentadas na **Figura 3**.



**Figura 2.** Estrutura (otimizada por método DFT, do inglês *Density Funtional Theory*, cedida pelo Me. Guilherme L. Alexandrino) da  $\beta$ -CD e representação simplista da ciclodextrina mostrando as dimensões da mesma em angstroms.



**Figura 3.** Estruturas da 1-HP- $\beta$ -CD (**4**) e da SBE- $\beta$ -CD (**5**).

### 1.2.2 Lipossomas

Os lipossomas são agrupamentos supramoleculares que se formam espontaneamente e apresentam estruturas de vesículas constituídas por uma ou mais camadas de lipídios, as quais são espaçadas por compartimentos aquosos. Desta forma, um lipossoma apresenta ambientes hidrofóbicos (interior das bicamadas lipídicas) e ambientes hidrofílicos (compartimentos aquosos), sendo capaz de encapsular qualquer tipo de fármaco. São normalmente utilizados como carreadores e liberadores de fármacos, apresentando baixa toxicidade, e eficácia no auxílio de estabilidade de fármacos.<sup>36</sup> Embora inerte em organismos vivos, os lipossomas modificam as propriedades farmacocinéticas dos fármacos como qualquer excipiente.<sup>37, 38,</sup>  
<sup>39</sup> Os lipossomas são geralmente constituídos por fosfolipídios, sendo que as fosfatidilcolinas (**6**, exemplo na **Figura 4**) são as mais empregadas por apresentarem boa estabilidade frente à variação da força iônica e do pH no meio.<sup>40</sup> Esse comportamento é altamente desejável tendo em vista a variação desses parâmetros nos diferentes ambientes pelo qual o fármaco passa desde sua ingestão, absorção e metabolização.

---

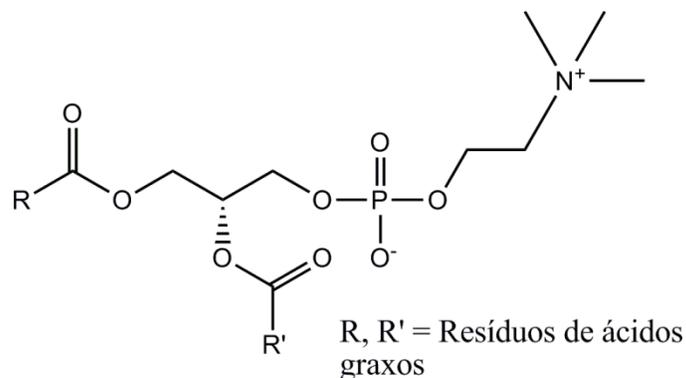
36 Nunez, M. M., A.; Soriano, V.; Podzamczar, D.; Gonzalez-Lahoz, J. *Aids* **2000**, *14*, 913-919.

37 Santos, N. C.; Castanho, M. A. R. B. *Quim. Nova* **2002**, *25*, 1181-1185.

38 Goniotaki, M.; Hatziantoniou, S.; Dimas, K.; Wagner, M.; Demetzos, C. *Anticancer Res.* **2004**, *24*, 3502-3503.

39 Puglia, C.; Trombetta, D.; Venuti, V.; Saija, A.; Bonina, F. *J. Pharm. Pharmacol.* **2004**, *56*, 1225-1232.

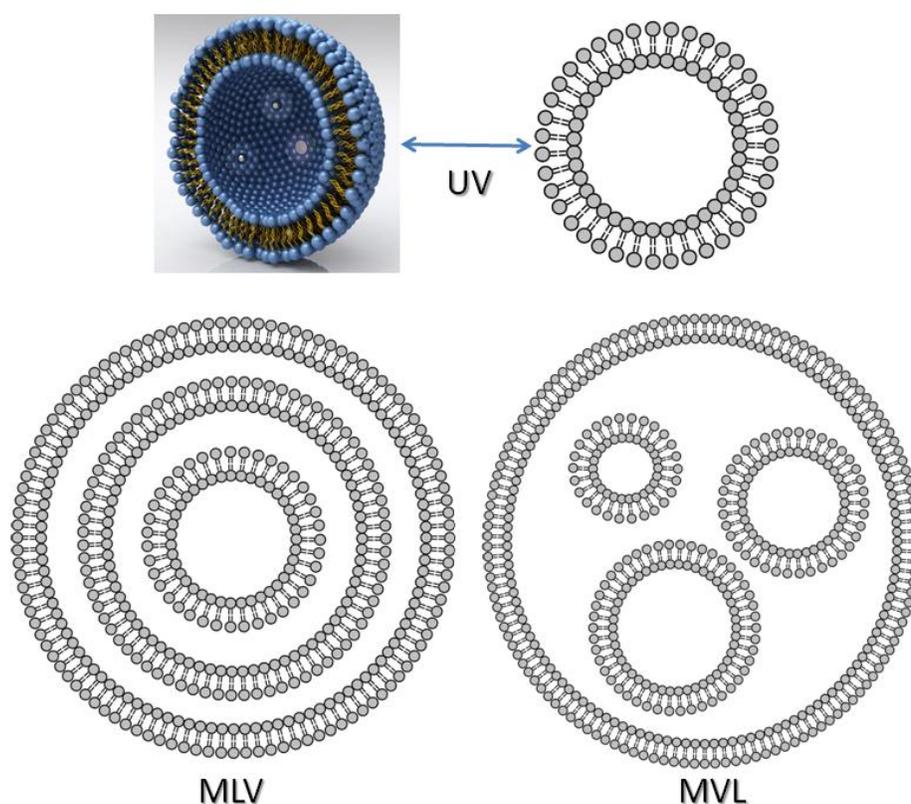
40 Batista, C. M.; de Carvalho, C. M. B.; Magalhães, N. S. S. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas* **2007**, *43*, 167-179.



**Figura 4.** Estrutura genérica de fosfatidilcolina (6). A cabeça polar composta pelos grupos fosfato e colina é direcionada para a interface com a água, empurrando as caudas apolares compostas pelos resíduos de aminoácidos para dentro das bicamadas lipídicas, dando assim as formas lamelares dos lipossomas.

As vesículas de lipossomas são classificadas de acordo com as estruturas formadas e o tamanho das mesmas. Embora representadas como esferas perfeitas as vesículas de lipossomas são completamente deformáveis e sofrem processo de troca dos lipídios das bicamadas de maneira dinâmica, semelhante ao que ocorre nas micelas. Na **Figura 5** está representada uma sessão transversal de um lipossoma unilamelar, evidenciando a estrutura tridimensional das vesículas. Contudo, a representação dos lipossomas no decorrer deste texto será feita de uma maneira minimalista, numa forma bidimensional, tornando mais prática a apresentação dos lipossomas e seus complexos supramoleculares. O tamanho dos lipossomas unilamelares pode variar de 20 a 1000 nm, sendo representados pela abreviatura UV (do inglês, *Unilamellar Vesicle*). Já os lipossomas multilamelares, conhecidos como MLV (do inglês, *Multilamellar Vesicle*) variam entre 400 e 3500 nm. Existe ainda a possibilidade de ocorrer varias vesículas inseridas dentro de um lipossoma unilamelar grande, o que recebe o nome de MVL (do inglês, *Multivesicular Liposome*).

Do ponto de vista operacional, a solubilização dos fosfolipídios em água gera, essencialmente, MLV. Vesículas unilamelares podem ser obtidas a partir das MLV por processos mecânicos como a utilização de ondas na frequência do ultrassom, ou por extrusão por membranas de policarbonato. O tamanho do UV obtido dependerá do tamanho do poro da membrana.<sup>37</sup> A estabilidade das vesículas formadas depende de atmosfera inerte ou uso de antioxidantes.<sup>41, 42</sup>



**Figura 5.** Sessão transversal de um lipossoma unilamelar (UV)<sup>43</sup> e sua representação estrutural minimalista, estruturas de MLV e MVL.

Apesar do alto custo e das limitações práticas para o uso de lipossomas como excipiente em formulações farmacêuticas, essa metodologia apresenta

41 Sharma, A.; Sharma, U. S. *Int. J. Pharm.* **1997**, *154*, 123-140.

42 Cacela, C.; Hinch, D. K. *Biophys. J.* **2006**, *90*, 2831-2842.

43 Retirado da página web <http://www.izon.com/media/webinars/> em 22/01/2014.

muitas vantagens como a versatilidade na forma de administração, a ausência de toxicidade e a alta capacidade de formar complexos de inclusão com qualquer tipo de fármacos, independente da estrutura química destes.<sup>36</sup> Existem diversas formulações farmacêuticas comerciais que utilizam lipossomas como excipiente e controlador de liberação de fármaco para o organismo, como no caso de vacinas.<sup>44, 45</sup>

### 1.2.3 Dapsona e seus complexos supramoleculares

A Dapsona {DAP (7), nome sistemático da IUPAC, 4-[(4-aminobenzeno)sulfonil]anilina, **Figura 6**} é um antibiótico que apresenta ação contra bactérias e protozoários e é utilizada há aproximadamente 50 anos no tratamento de doenças infecciosas tais como hanseníase causada por *Mycobacterium leprae*, pneumonia causada por *Pneumocystis carinii* e na profilaxia de malária causada por *Plasmodium vivax*. O mecanismo de ação frente às bactérias e protozoários é semelhante ao das sulfonamidas as quais inibem a síntese proteica, competindo com o ácido *p*-aminobenzóico pelo sítio ativo da diidropteroato sintetase (**Figura 6**). A ação anti-inflamatória não é bem conhecida, mas sabe-se que não está relacionada com a ação bactericida.<sup>46</sup> Dapsona é administrada isoladamente ou em combinação com outros fármacos, em doses de 25, 50 e 100 mg, e apresenta baixa solubilidade em água, sendo solúvel apenas em acetona.<sup>47</sup>

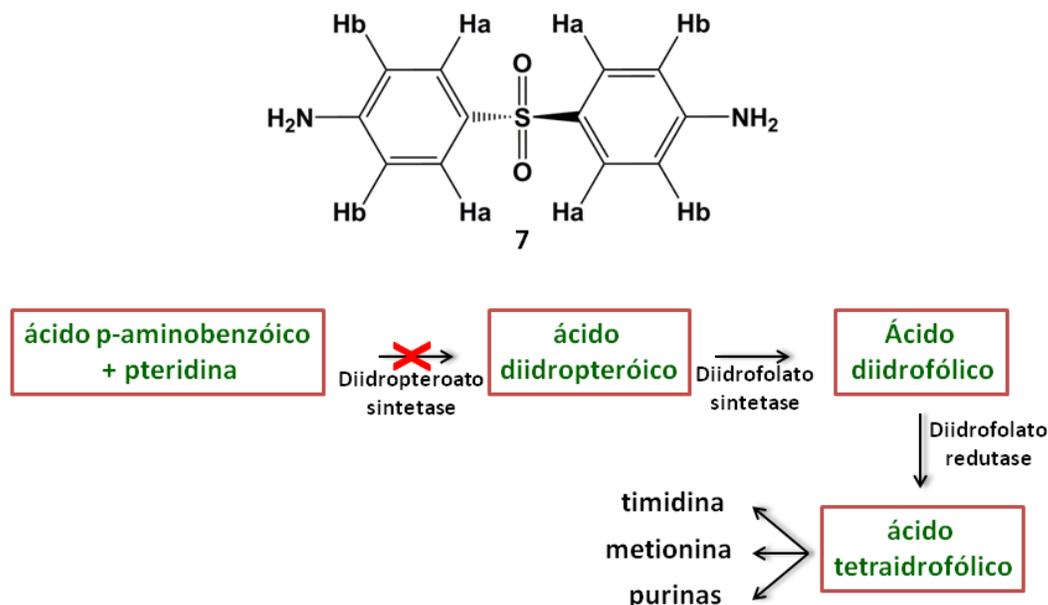
---

44 Mazumdar, T.; Anam, K.; Ali, N. *Vaccine* **2004**, *22*, 1162-1171.

45 Ben-Yehuda, A.; Joseph, A.; Barenholz, Y.; Zeira, E.; Even-Chen, S.; Louria-Hayon, I.; Babai, I.; Zakay-Rones, Z.; Greenbaum, E.; Galprin, I.; Gluck, R.; Zurbriggen, R.; Kedar, E. *Vaccine* **2003**, *21*, 3169-3178.

46 Grunwald, M.H., Amichai, B. *Int. J. Antimicrob. Agents* **1996**, *7*, 187-192.

47 Lindenberg, M., Kopp, S.E., Dressman, J.B. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **2004**, *58*, 265-278.



**Figura 6.** Estrutura química da Dapsona e rota biossintética parcial da síntese de aminoácidos em bactérias e protozoários. O “x” vermelho indica a etapa da rota que é interrompida pela fármaco (inibição da dihidropteroato sintetase).

O complexo de inclusão formado entre Dapsona e  $\beta$ -CD já foi estudado anteriormente. Parâmetros termodinâmicos, como a constante de associação aparente,  $K_a$ , foi determinada na presença e ausência de vários alcoóis lineares utilizando como ferramenta analítica a Espectrofluorimetria.<sup>48</sup> A estequiometria 1:1 do complexo DAP- $\beta$ -CD também já foi reportada na literatura<sup>49</sup> e alguns modelos estruturais foram propostos baseados na Espectroscopia de Emissão<sup>50</sup> e experimentos de Ressonância Magnética Nuclear.<sup>51,52</sup> Sistemas de complexos ternários envolvendo Dapsona, ciclodextrinas ( $\beta$ -CD e 1-HP- $\beta$ -CD) e polímeros

48 Ma, L.; Tang, B.; Chu, C. *Anal. Chim. Acta* **2002**, 469, 273-283.

49 Martins, M. H.; Calderini, A.; Pessine, F. B. T. *J. Incl. Phenom. Macrocycl. Chem.* **2012**, 74, 109-116.

50 Bhattacharya, P.; Sahoo, D.; Chakravorti, S. *Ind. Eng. Chem. Res.* **2011**, 50, 7815-7823.

51 Calderini, A.; Martins, M. H.; Pessine, F. B. T. *J. Incl. Phenom. Macrocycl. Chem.* **2013**, 75, 77-86.

52 Gregogi, I. H.; Tibola, A. P. O. V.; Barison, A.; Grandizoli, C. W. P. S.; Ferraz, H. G.; Rodrigues, L. N. *C. J. Incl. Phenom. Macrocycl. Chem.* **2012**, 73, 467-474.

(polivinilpirrolidona, K30, e hidroxipropilmetilcelulose, HPMC) foram investigados com o intuito de melhorar a solubilidade do fármaco.<sup>52</sup>

### 1.3 Inibição enzimática

As enzimas são catalisadores biológicos muito mais eficientes que os catalisadores não biológicos. Essa informação está baseada no alto grau de especificidade por seus substratos, na velocidade das reações catalisadas por elas e nas condições brandas em que atuam. Estas proteínas altamente especializadas são fundamentais para a manutenção da vida por atuarem no processo de metabolização de alimentos, obtenção de energia e sínteses de metabólitos importantes para manutenção e replicação celular, regulando processos biológicos e fornecendo moléculas para a construção da estrutura celular. Além disso, a síntese e degradação de neurotransmissores dependem de processos intermediados por enzimas.<sup>53</sup>

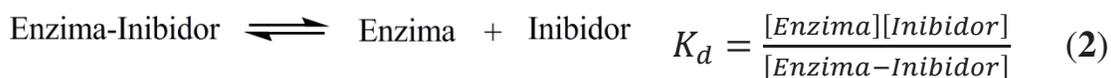
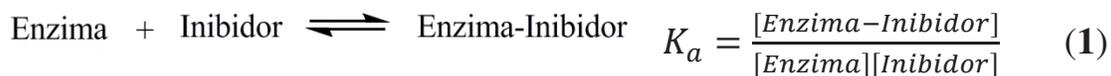
Uma forma indireta de interromper a vida de um organismo é inibir a ação de enzimas fundamentais para a manutenção da vida. Esse processo é denominado inibição enzimática, a qual pode ser reversível, com competição ou não com o substrato, ou irreversível. É exatamente assim que grande parte dos fármacos funciona. Todas as enfermidades causadas por micro-organismos são controladas pelo ataque direto ao organismo patogênico, inibindo alguma rota metabólica do mesmo. Isso é o que ocorre quando a Dapsona, citada anteriormente, é administrada para o tratamento de infecções causadas pelas bactérias *Mycobacterium leprae* e *Pneumocystis carinii*. O antibiótico impede a síntese proteica e, conseqüentemente, inibe a replicação celular.<sup>46</sup> Outro exemplo de inibição enzimática é a utilização da Fosfomicina

---

53 Nelson, D. L.; Cox, M. M. *Lejninger, Princípios de Bioquímica*. Sarvier, 3ª ed., 2000, 189-224.

cujos mecanismo de ação consiste na inativação irreversível da UDP - N - acetil - glucosamina - 3 - O - enolpiruviltransferase ( Mura ) no primeiro passo na biossíntese de peptidoglicano em *Streptococcus pneumoniae* e *Staphylococcus aureus*.<sup>54, 55, 56</sup> No entanto, não é apenas contra microorganismos que a inibição enzimática é utilizada para fins terapêuticos. Um exemplo clássico é o ácido acetilsalicílico (aspirina), que inibe a síntese de prostaglandinas, substância envolvida na produção da sensação da dor.<sup>53</sup>

A eficiência da inibição enzimática depende de parâmetros termodinâmicos intrínsecos da associação de cada enzima com seus inibidores, como constantes de associação ou dissociação aparentes ( $K_a$  ou  $K_d$ , respectivamente). Estes parâmetros fornecem informações indiretas a respeito da quantidade de complexo enzima-inibidor formada, conforme mostram as **Equações 1 e 2**.



Fica evidente a importância da obtenção dos valores de  $K_a$  e  $K_d$  para a avaliação da eficácia na inibição enzimática. A obtenção destes parâmetros pode servir como estudo inicial para avaliação de inibidores como possíveis novos fármacos.

54 Marquardt, J. L.; Brown, E. D.; Lane, W. S.; Haley, T. M.; Ichikawa, Y.; Wong, C. H.; Walsh, C. T.; *Biochemistry* **1994**, 33, 10646-10651.

55 Kim, D. H.; Lees, W. J.; Kempell, K. E.; Lane, W. S.; Duncan, K.; Wash, C. T.; *Biochemistry* **1996**, 35, 4923-4928.

56 Barbosa, M. D. F. S.; Yang, G.; Fang, J.; Kurilla, M. G.; Pompliano, D. L.; *Antimicrob. Agents Chemother.* **2002**, 46, 943-946.

### 1.3.1 Acetilcolina, Acetilcolinesterase e Inibidores

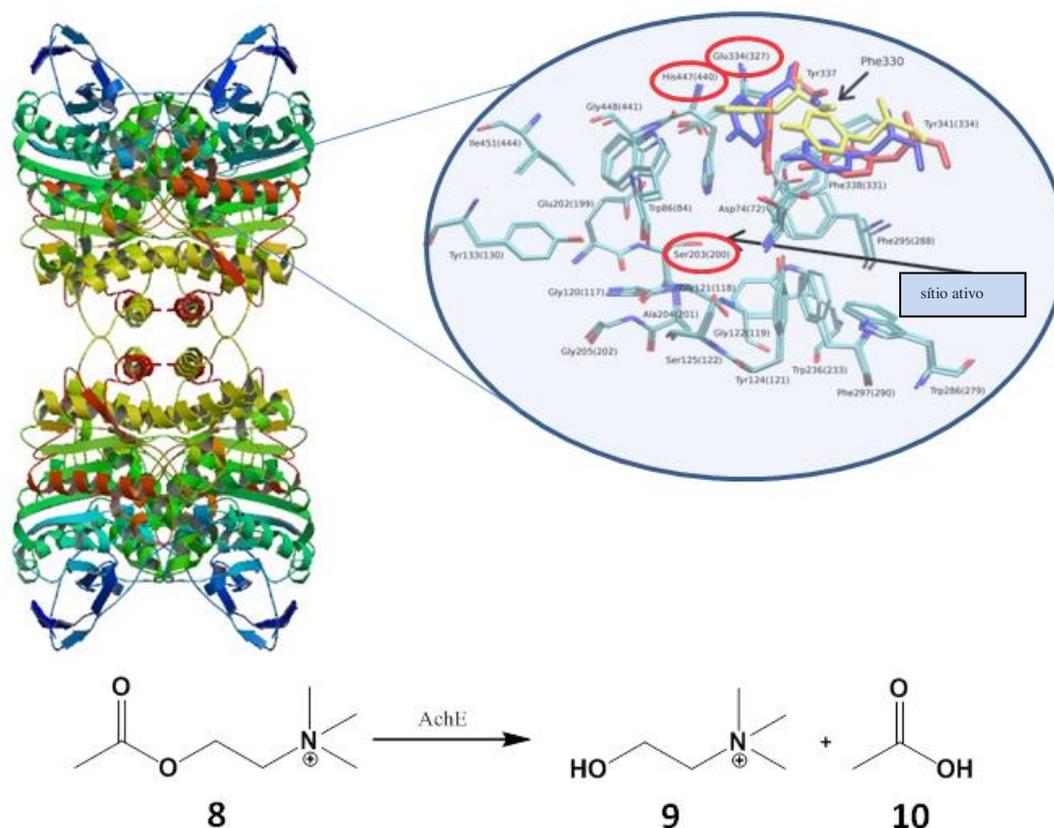
A acetilcolina é um neurotransmissor que atua na junção neuromuscular e nos sistemas nervosos, periférico e central, e é sintetizada pela enzima Colina-O-Acetil-Transferase (ChAT) a partir de acetil-coenzima-A e colina. A Acetilcolina interage com receptores colinérgicos muscarínicos e nicotínicos e é hidrolisada após cumprir seu papel biológico pela enzima Acetilcolinesterase (AChE) presente entre células nervosas e musculares.<sup>57</sup> A AChE (EC 3.1.1.7) atua em ésteres carboxílicos e apresenta um sítio ativo localizado ao final de um túnel de resíduos de aminoácidos, formado pela tríade catalítica composta pelos resíduos serina-histidina-glutamato (**Figura 7**).

A inibição dessa enzima é um dos tratamentos sintomáticos realizados em pacientes com Mal de Alzheimer ou Doença de Alzheimer, doença degenerativa que promove a perda de conexão entre os neurônios. A inibição de AChE permite que o nível de acetilcolina permaneça alto numa tentativa de restaurar a função colinérgica do paciente, melhorando a qualidade de vida e retardando o declínio cognitivo.<sup>58</sup>

---

57 Ventura, A. L. M., et al. *Rev Psiq Clín.* **2010**, 37, 66-72.

58 Bryne, G.J.A. *Australian Journal Hospital Pharmacy*, **1998**, 28, 261-266.



**Figura 7.** Estrutura da AChE<sup>59</sup> com suas quatro unidades obtida por cristalografia de raios com destaque nos resíduos de aminoácidos que compõem a tríade catalítica. Abaixo reação de hidrólise da Acetilcolina.

Existem vários tipos de inibidores de AChE (abreviados como AChEI) que podem ser reversíveis, pseudorreversíveis e irreversíveis, pertencentes as mais diversas classes de compostos, como organofosfatos, carbamatos, fenantrenos, entre outros. O mecanismo de ação dos organofosfatos, por exemplo, consiste na fosforilação do resíduo de aminoácido serina no sítio ativo da AChE.<sup>60</sup> Este fenômeno torna-se de interesse de saúde pública uma vez que agrotóxicos organofosforados são neurotóxicos para frente a humanos e animais quando mal administrados. Curiosamente, existem classes de compostos como as oximas que são capazes de inibir AChE e

<sup>59</sup> Retirado da página web <http://www.ncbr.muni.cz/group/lcc/acetylcholinesterase.html> em 17/01/2014.

<sup>60</sup> Mallender, W. D.; Szegetes, T.; Rosenberry, T. L. *J. Biol. Chem.* **1999**, 274, 8491-8499.

reativá-la em caso de inibição por compostos organofosforilados. Enquanto oximas neutras apresentam baixa capacidade de reativação de AChE<sup>61</sup>, algumas oximas catiônicas se mostraram bastante potentes.<sup>62</sup>

Outra classe de compostos bastante estudada frente à inibição de AChE é a classe dos carbamatos. Um dos compostos usados como referência para inibição de AChE é o alcaloide Fisostigmina (**11**), originalmente isolado de *Physostigma venenosum*, uma leguminosa nativa da África tropical. Esse composto exerce inibição reversível através da carbamilação do resíduo de serina presente no sítio ativo de AChE, entretanto, a aplicação clínica é limitada pelo curto tempo de ação do composto e outros análogos tem sido testados.<sup>63</sup> Análogos da neostigmina, outro carbamato com ação anticolinesterásica, foram recentemente sintetizados e estudados frente à inibição de AChE, e estudos de modelagem molecular (*Docking*) foram realizados possibilitando uma melhor compreensão da interação do inibidor com o sítio ativo da enzima.<sup>64</sup> Atualmente, o alcaloide Galantamina, extraído de plantas da família *Amaryllidaceae*, é administrado para o tratamento do Mal de Alzheimer em estágios leves e moderados. Outros alcaloides como Crinina (**12**) e Ambelina (**13**) também são isolados de plantas da mesma família.

---

61 Soares, C. F. C. X.; Vieira, A. A.; Delfino, R. T.; Figueroa-Villar, J. D. *Bioorg. Med. Chem.* **2013**, 21, 5923–5930.

62 Jun, D.; Musilova, L.; Musilek, K.; Kuca1, K. *Int. J. Mol. Sci.* **2011**, 12, 2077–2087.

63 Perola, E., Cellai, L., Lamba, D., Filocamo, L., Brufani, M. *Biochim. Biophys. Acta.* **1997**, 1343, 41-50.

64 Bocca, C. C.; Rittner, R.; Hoehr, N. F.; Pinheiro, G. M. S.; Abiko, L. A.; Basso, E. A. *J. Mol. Struct.* **2010**, 983, 194-199.

## 1.4 RMN de $^1\text{H}$ aplicada a interações supramoleculares

Existem diversas técnicas calorimétricas, espectrométricas e espectroscópicas capazes de sondar, direta ou indiretamente, as interações supramoleculares. Uma das técnicas espectroscópicas mais utilizadas para investigação de complexos supramoleculares é a ressonância magnética nuclear (RMN), sendo única na obtenção de informações a respeito da estrutura e dinâmica de complexos supramoleculares no nível atômico.

A maioria das metodologias de RMN aplicadas a sistemas supramoleculares orgânicos consistem na observação do núcleo de hidrogênio ( $^1\text{H}$ ) devido a sua abundância natural (99,98%) e alta razão magnetogírica ( $\gamma$ ). As interações do tipo hóspede-hospedeiro, por exemplo, modificam a esfera de solvatação dos hidrogênios da molécula hóspede ocasionando variação no deslocamento químico nos sinais de RMN da mesma. Além disso, ao associar-se com uma molécula de raio hidrodinâmico consideravelmente maior, a molécula hóspede modifica seu comportamento em solução adquirindo propriedades da molécula hospedeira, tal como tempo de correlação ( $\tau_c$ ), difusão molecular<sup>65, 66</sup> e relaxação dos *spins* nucleares. Tempos de correlação mais longos favorecem mecanismos de relaxação transversal ( $T_2^*$ ) o que resulta em alargamento do sinal de RMN de  $^1\text{H}$ . As análises de tais fenômenos dão indícios importantes a respeito de como as interações ocorrem.

Existem metodologias simples, como o método de Job<sup>67</sup>, a qual consiste na avaliação da variação de deslocamento químico dos ligantes

---

65 Morris, K. F.; Johnson, C. S. *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, *114*, 3139-3141.

66 Pelta, M. D.; Morris, G. A.; Stchedroff, M. J.; Hammond, S. J. *Magn. Reson. Chem.* **2002**, *40*, S147-S152.

67 Job, P. Formation and stability of inorganic complexes in solution. *Ann. Chim.* **1928**, *9*, 113-203.

frente à variação da razão ligante/macromolécula em um sistema de concentração total constante, fornecendo a estequiometria do complexo. Complexos de inclusão envolvendo ciclodextrinas, calixarenos, cucurbiturins, entre outros, podem ocorrer em diferentes estequiometrias e a metodologia de Job é uma das possibilidades para obtenção das mesmas. A difusão molecular e a relaxação dos *spins* nucleares dão informações indiretas a respeito da concentração do complexo supramolecular no equilíbrio e, portanto, possibilitam a determinação de constantes de dissociação aparentes ( $K_d$ ) e constantes de associação aparentes ( $K_a$ ), respectivamente. Do ponto de vista estrutural, a arquitetura de um complexo supramolecular pode ser elucidada com base na localização do hóspede dentro da cavidade ou sítio ativo do hospedeiro. Um fenômeno de RMN que depende da distância entre os hidrogênios do hóspede e os do hospedeiro é o efeito Overhauser nuclear (NOE, abreviação do inglês *Nuclear Overhauser Effect*). Sendo inversamente proporcional a distância entre os hidrogênios (hospede-hospedeiro) elevada à sexta potência, o NOE atua como uma sonda dando indícios da arquitetura do complexo formado.

Existem diversas técnicas de RMN de  $^1\text{H}$  que dependem diretamente do NOE de forma que a metodologia adequada depende do sistema a ser estudado. Algumas dessas metodologias são: *Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy* (1D-NOESY)<sup>68, 69, 70</sup>, que funciona muito bem para moléculas de alto e baixo peso molecular mas que não apresenta resultado observável para interações entre moléculas de peso molecular mediano (em torno de  $1000 \text{ g mol}^{-1}$ ); *Rotating-frame Overhauser Effect Spectroscopy* (1D-

---

68 Kessler, H.; Oschkinat, H.; Griesinger, C.; Bermel, W. *J. Magn. Reson.* **1986**, 70, 106-133.

69 Stonehouse, J.; Adell, P.; Keeler, J.; Shaka, A. J. *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, 116, 6037-6038.

70 Scott, K.; Stonehouse, J.; Keeler, J.; Hwang, T. L.; Shaka, A. J. *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, 117, 4199-4200.

ROESY)<sup>71, 72</sup>, menos sensível que a anterior mas que funciona bem com moléculas de peso molecular mediano e *Saturation Transfer Difference* (STD)<sup>73, 74, 75</sup>, a qual é ideal para moléculas de alto peso molecular (acima de 15000 g mol<sup>-1</sup>) e que apresentem o fenômeno de difusão de *spin*.

### 1.4.1 Difusão Molecular por RMN

A difusão molecular consiste no movimento das moléculas em um fluido (líquido ou gás) decorrente do movimento térmico de todos os componentes do meio. O coeficiente de difusão depende da viscosidade do meio, da temperatura e do tamanho das moléculas (raio hidrodinâmico).<sup>76</sup> Os coeficientes de difusão podem ser determinados por RMN através de experimentos de ecos de *spin* com gradiente de campo magnético pulsado (PFGSE). Neste tipo de experimento, quanto maior a difusão translacional da molécula (paralelo ao campo magnético B<sub>0</sub>) menores são as intensidades dos sinais de RMN de <sup>1</sup>H observados. A obtenção de espectros com diferentes amplitudes de gradientes de campo pulsados fornece uma curva de decaimento de intensidade de sinais de RMN de <sup>1</sup>H de cada componente da mistura. A partir dessas curvas são extraídos matematicamente os coeficientes de difusão.<sup>77, 78, 79</sup> Foi proposta uma forma de apresentação dos resultados, na qual um mapa de contorno pseudo-2D é gerado com os

71 Bax, A.; Davis, D. G. *J. Magn. Reson.* **1985**, 63, 207-213.

72 Hwang, T. L.; Shaka, A. J. *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, 114, 3157-3159.

73 Klein, J.; Meinecke, R.; Mayer, M.; Meyer, B. *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, 121, 5336-5337.

74 Mayer, M.; Meyer, B. *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, 123, 6108-6117.

75 Mayer, M.; Meyer, B. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1999**, 38, 1784-1788.

76 Marsaioli, A. J. et al. *Fundamentos e Aplicações de Ressonância Magnética Nuclear: Difusão Molecular por RMN*. AUREMN, **2009**.

77 Price, W. S. *Concepts Magn. Reson.* **1998**, 10, 197-237.

78 Price, W. S. *Concepts Magn. Reson.* **1997**, 9, 299-336.

79 Stejskal, E. O.; Tanner, J. E. *J. Chem. Phys.* **1965**, 42, 288-292.

deslocamentos químicos em F2 e os coeficientes de difusão em F1, denominada DOSY (do inglês, *Diffusion-Ordered SpectroscopY*). Este procedimento separa os sinais dos componentes de uma mistura de acordo com seus coeficientes de difusão.<sup>80</sup> A técnica de medidas de coeficientes de difusão tem sido aperfeiçoada e varias sequências de pulsos foram desenhadas para obtenção de DOSY em alta resolução (HR-DOSY).<sup>81</sup> Um avanço importante foi o desenvolvimento da sequência Oneshot<sup>82</sup> (**Figura 8**), a qual dispensa a necessidade de ciclagem de fase, necessária nas demais sequências de pulsos para eliminar imperfeições nos espectros. Conseqüentemente, é possível realizar medidas de difusão molecular com apenas um transiente, resultando em experimentos mais rápidos e com boa resolução nas duas dimensões (deslocamento químico e coeficiente de difusão). Além desta sequência, outra foi desenvolvida para observação de <sup>19</sup>F, o que elimina problemas de superposição de sinais em compostos fluorados.<sup>83</sup>

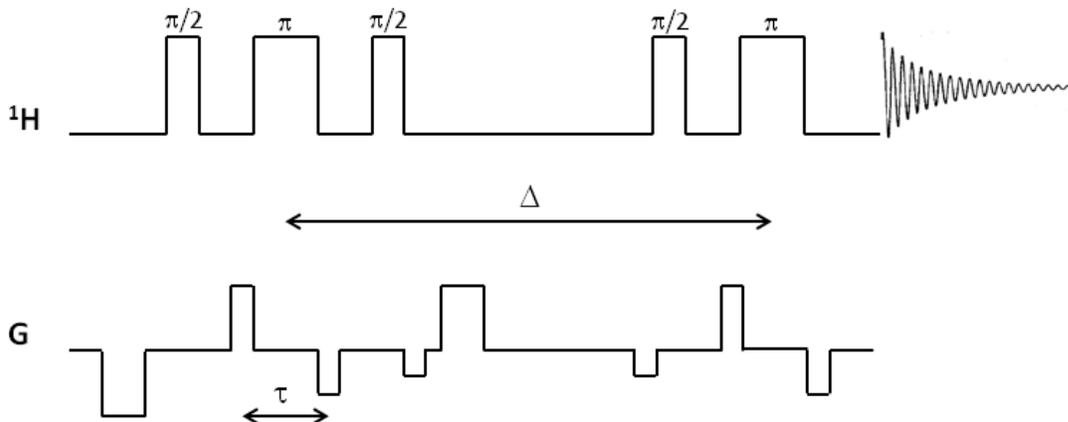
---

80 Morris, K. F.; Johnson, C. S. *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, 114, 3139-3141.

81 Pelta, M. D.; Barjat, H.; Morris, G. A.; Davis, A. L.; Hammond, S. J. *Magn. Reson. Chem.* **1998**, 26, 706-714.

82 Pelta, M. D.; Morris, G. A.; Stchedroff, M. J.; Hammon, S. J. *Magn. Reson. Chem.* **2002**, 40, S147-S152.

83 Dal Poggetto, G.; Favaro, D. C.; Nilsson, M.; Morris, G. A.; Tormena, C. F. *Magn. Reson. Chem.* **2014**. Online (DOI 10.1002/mrc.4047).



**Figura 8.** Sequências de pulso Oneshot.  $\Delta$  é o tempo designado para permitir a difusão do sistema, enquanto que  $\tau$  é o tempo entre o pontos médios dos gradientes de campo pulsados em anti-fase dentro de um dado período para codificar a difusão.

O coeficiente de difusão molecular de uma molécula pequena como um fármaco, por exemplo, varia quando esta está associada com um hospedeiro qualquer ou quando participa de agrupamentos supramoleculares como micelas ou lipossomas. Essa variação carrega consigo a informação a respeito da fração complexada do fármaco ( $f_{compl}$ ). O coeficiente de difusão observado ( $D_{obs}$ ) no experimento de eco de *spin* é uma média ponderada entres os coeficientes de difusão das substâncias livres ( $D_{livre}$ ) e complexadas ( $D_{compl}$ ), se o processo de complexação ocorrer de maneira rápida quando comparado com a frequência do equipamento utilizado (**Equação 3**).

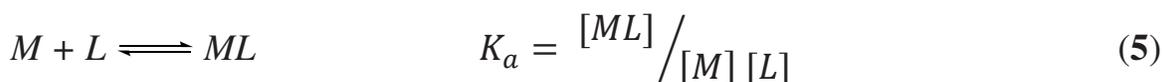
$$D_{obs} = f_{compl}D_{compl} + f_{livre}D_{livre} \quad (3)$$

Assumindo que os raios hidrodinâmicos do complexo e da macromolécula são iguais, temos que  $D_{compl} \cong D_M$  (na qual  $D_{compl}$  e  $D_M$  são os coeficientes de difusão do complexo e da macromolécula,

respectivamente). Considerando que para o ligante  $f_{livre} = 1 - f_{compl}$  (uma vez que a soma das frações livre e complexada totaliza 1) e fazendo as devidas substituições e rearranjos na **Equação 3**, obtemos a **Equação 4**, a qual fornece o valor da fração complexada ( $f_{compl}$ ).

$$f_{compl} = \frac{(D_{livre} - D_{obs})}{(D_{livre} - D_M)} \quad (4)$$

Análogo a **Equação 1** (sessão **1.3**), os valores de  $K_a$  entre fármacos e hospedeiros são obtidos a partir das concentrações das espécies no equilíbrio **Equação 5**. Como as medidas de difusão fornece, indiretamente, as frações de complexo no equilíbrio é plausível utilizá-las para a determinação de  $K_a$ .



No equilíbrio,  $[ML]$  corresponde a fração complexada ( $f_{compl}$ ), enquanto  $[L] = 1 - f_{compl}$ . Para complexos de estequiometria 1:1,  $[M] = [M]_i - [L]_i f_{compl}$  ( $[M]_i$  e  $[L]_i$  são as concentrações iniciais de macromolécula e ligante, respectivamente). A inserção de todas essas considerações na **Equação 5** resulta na **Equação 6**, a qual possibilita o cálculo de  $K_a$  em função de  $f_{compl}$ .<sup>84, 85</sup>

$$K_a = \frac{f_{compl}}{(1 - f_{compl})([M]_i - [L]_i f_{compl})} \quad (6)$$

84 Ryndén, R.; Carlfors, J.; Stilbs, P. *J. Incl. Phenom. Macrocycl. Chem.* **1983**, 1, 159-167.

85 Laverde, A.; da Conceicao, G. J. A.; Queiroz, S. C. N.; Fujiwara, F. Y.; Marsaioli, A. J. *Magn. Reson. Chem.* **2002**, 40, 433-442.

### 1.4.2 NOe e ROESY 1D

Conforme citado anteriormente, o nOe permite a realização de um mapeamento na interface de interação de complexos supramoleculares. Este efeito consiste na mudança da população de *spins* nucleares de uma espécie, por influência de outro *spin* nuclear dipolarmente acoplado ao primeiro. Este fenômeno é utilizado para avaliação de acoplamentos dipolares intra e intermoleculares desde meados do século passado.<sup>86, 87</sup> No entanto, a taxa de relaxação cruzada longitudinal se comporta de maneira diferente a taxa de relaxação cruzada transversal. A primeira tem dependência com o tempo de correlação ( $\tau_c$ ) e a frequência de Larmor do núcleo observado ( $\omega_0$ ).<sup>87</sup> Dessa maneira, em um dado momento a taxa de relaxação cruzada muda de sinal passando pelo 0. Se tomarmos como base um equipamento de RMN operando a 11,75 T, o produto  $\omega_0\tau_c$  será muito menor do que 1, para moléculas de baixo peso molecular (raio hidrodinâmico pequeno, moléculas <500 Da). Nessas circunstâncias os valores de nOes observados serão positivos. Em oposição, moléculas de alto peso molecular e, portanto, raio hidrodinâmico grande, apresentam  $\omega_0\tau_c$  muito maior do que 1. Como resultado, observam-se valores negativos de nOe.<sup>88, 89</sup> Contudo, existe uma faixa de peso molecular (entre 500 e 2000 Da, aproximadamente) para cujo produto  $\omega_0\tau_c \cong 1$ . Nessas condições o nOe é praticamente não observável. Em contrapartida, a taxa de relaxação cruzada transversal tem sempre o mesmo sinal, independente do produto  $\omega_0\tau_c$  (**Figura 9**). Neste caso, a metodologia recebeu o nome de

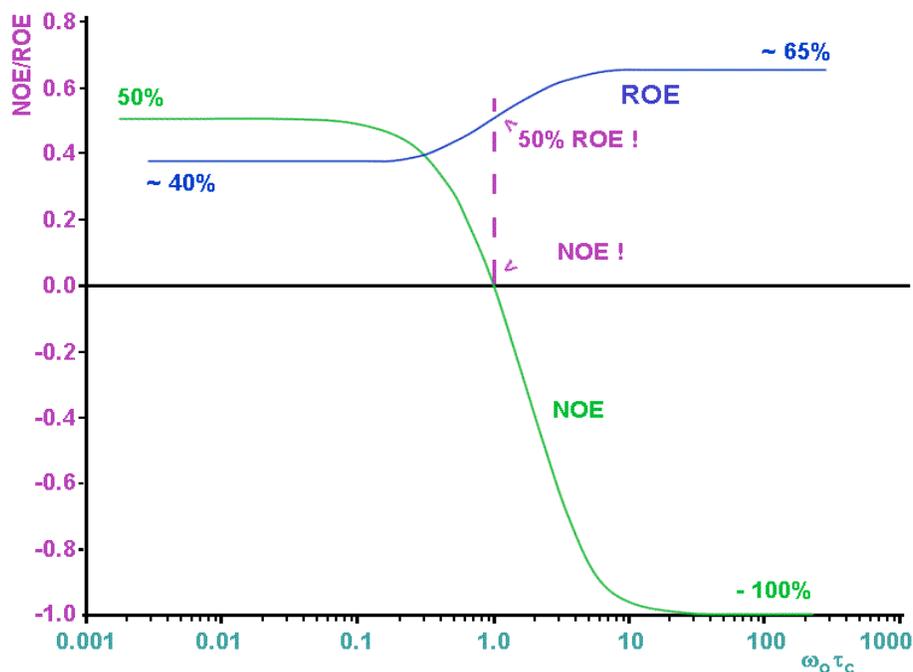
86 Solomon, I. *Phys. Rev.* **1955**, 99, 559-566.

87 Neuhaus, D.; Williamson, M. *The Nuclear Overhauser Effect in Structural and Conformational Analysis*. Wiley-VCH, New York, **1989**.

88 Gunther, H. *NMR Spectroscopy*. John Wiley & Sons, Chichester, **1994**.

89 Sanders, J. K. M.; Hunter, B. K. *Modern NMR Spectroscopy – A Guide for Chemists*. Oxford University Press Oxford, **1994**.

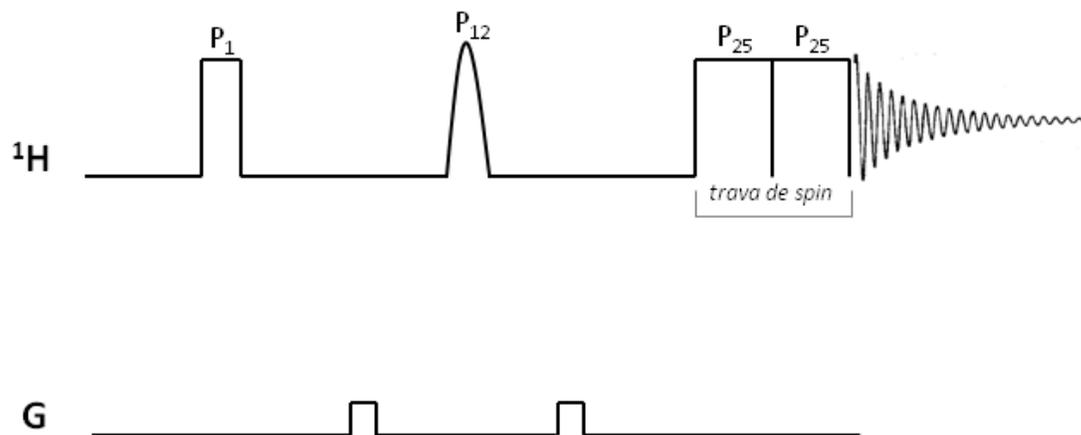
ROESY, conforme citado anteriormente, e a variação nas populações de *spins* são denominadas  $rOe$ .<sup>90, 71, 72</sup> Diversas sequências de pulsos foram desenhadas para a realização de experimentos ROESY, em 1 e 2 dimensões. A sequência de ROESY 1D, é composta por um pulso “duro” de  $90^\circ$  seguido de um pulso seletivo de  $180^\circ$ , o qual seleciona os *spins* atômicos que serão tomados como referência. Dessa forma, os *spins* selecionados pelo pulso seletivo ficam a  $180^\circ$  dos demais e são mantidos assim por uma trava de *spins* aplicada por tempo suficiente para que a transferência de ROE seja observada (**Figura 10**). A sequência em questão é executada com ciclagem de fases, de maneira a não necessitar de experimento de referência. O resultado obtido é um espectro que mostra apenas o sinal selecionado pelo pulso de  $180^\circ$  (que por convenção é processado com fase negativa) e sinais dos  $^1H$  acoplados dipolarmente com o  $^1H$  de referência.



**Figura 9.** Intensidade de  $nOe/rOe$  em função de  $\omega_0\tau_c$  para análise em equipamento de RMN operando a 11,75 T.<sup>91</sup>

90 Otter, A.; Kotovych, G. *Can. J. Chem.* **1988**, *66*, 1814-1820.

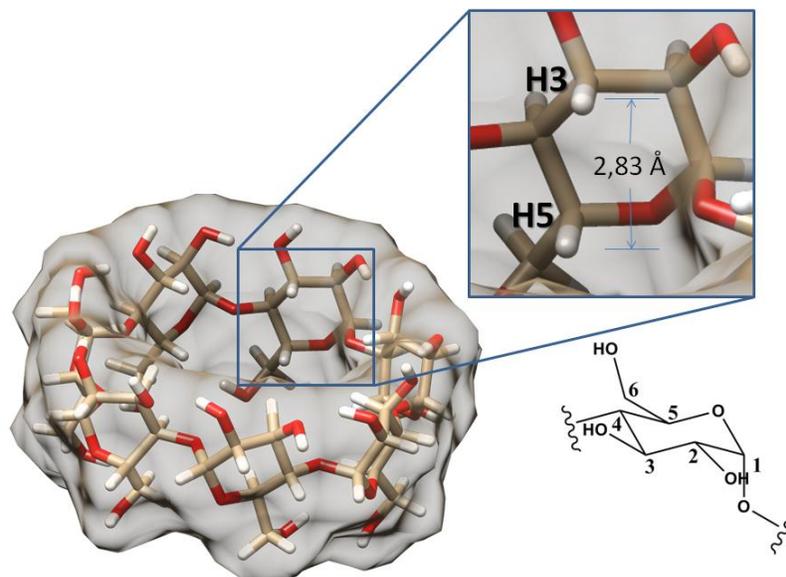
91 Figura adaptada retirada da página [http://nmr.chem.ualberta.ca/nmr\\_news/98-08.htm](http://nmr.chem.ualberta.ca/nmr_news/98-08.htm) em 23/01/2014.



**Figura 10.** Sequência de pulsos de RMN de  $^1\text{H}$  para o experimento de ROESY 1D com ciclagem de fase. A sequência é composta pelos pulsos:  $P_1$  (pulso duro de  $90^\circ$ ; fase: 0 2),  $P_{12}$  (pulso seletivo de  $180^\circ$ ; fases: 0 0 1 1 2 2 3 3),  $P_{25}$  (pulso de  $180^\circ$  para a trava de spins; o primeiro pulso tem fase 0 e o segundo fase 2) e gradientes de campo pulsados.

A observação de rOe depende da concentração do complexo formado e também do tempo de residência do fármaco dentro do hospedeiro. A intensidade do sinal observado é variável, mas geralmente é bem pouco intenso (menos de 10% em relação ao sinal do espectro de  $^1\text{H}$ ).<sup>92</sup> Outra exigência é que exista um  $^1\text{H}$  em uma das moléculas envolvidas que possa ser tomado como referência. Apenas para contextualizar com um exemplo mais visível, no caso das ciclodextrinas os  $^1\text{H}$  de referência estão dentro da cavidade hidrofobia e ficaram diretamente em contato com qualquer hospede que se aloje ali (**Figura 11**). Num eventual experimento de ROESY 1D avaliando as ciclodextrinas como hospedeiros serão estes  $^1\text{H}$  que serão seletivamente invertidos com o pulso seletivo de  $180^\circ$  (**Figura 10**).

92 Mo, H. P.; Pochapsky, T. C. *Prog. Nuc.Mag. Res.Sp.* **1997**, 30, 1-38.

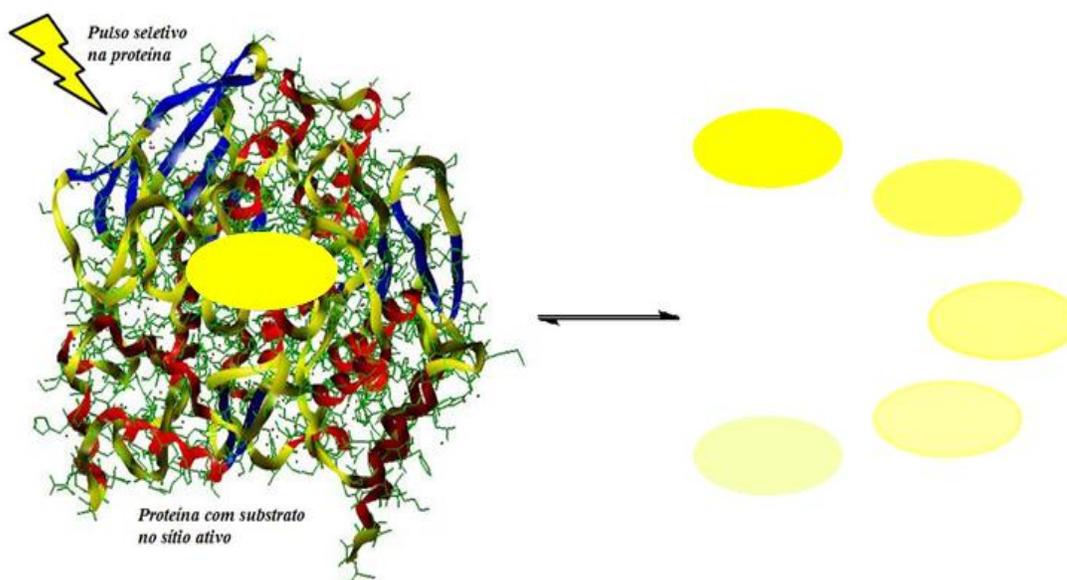


**Figura 11.** Estrutura da  $\beta$ -CD evidenciando a unidade glicosídica formadora da ciclodextrina e seus hidrogênios internos H3 e H5, os quais geralmente são selecionados para serem irradiados em experimentos de ROESY 1D.

#### 1.4.3 RMN-STD na obtenção de constantes de dissociação.

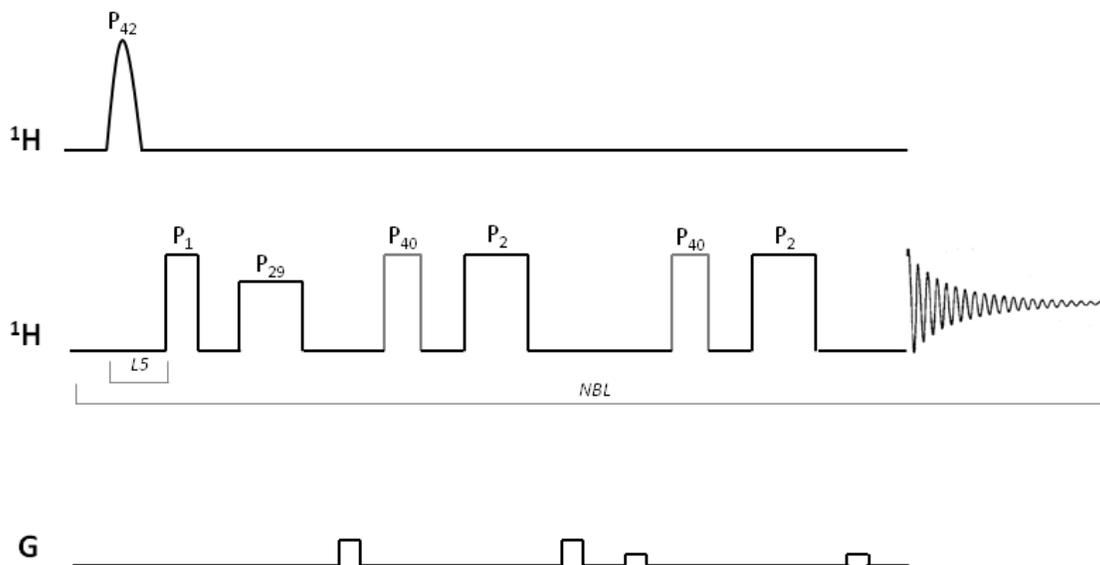
O experimento de RMN-STD (abreviação do inglês, *Saturation Transfer Difference*), o qual tem como base o fenômeno de nOe, foi desenhado especialmente para avaliação de sistemas proteínas-ligantes. Este experimento se resume na irradiação seletiva da proteína (*on-resonance*), a qual difunde a magnetização para todos os seus núcleos de hidrogênio via difusão de *spin* e a transfere para o ligante situado no sítio ativo através da relaxação cruzada. Um experimento controle é realizado com irradiação fora da janela espectral (*off-resonance*), onde nenhum sinal é saturado. Estes dois experimentos são subtraídos e o resultado observado é a variação da intensidade dos sinais dos ligantes que interagem com a proteína. Após deixar o sítio ativo da enzima, os *spins* nucleares do ligante saturado vão

relaxar, retornando ao estado não excitado e estão prontos para interagirem novamente com a proteína (**Figura 12**).



**Figura 12.** Representação esquemática do experimento de RMN-STD (*on-resonance*). Quando a proteína torna-se saturada, os ligantes que estão complexados a ela tornam-se saturados também devido ao fenômeno de difusão de *spin*.

Existem várias sequências de pulsos desenhadas para a realização de experimentos de RMN-STD que diferem entre si basicamente pelos blocos, usados ou não, para eliminação do sinal do solvente (HDO). A Sequência consiste em um pulso seletivo que irradia a proteína, seguido de um pulso duro de  $90^\circ$  com posterior trava de *spin*, a qual serve como tempo de mistura para que haja a transferência de NOE e como filtro  $T_2$  para eliminar os possíveis sinais provenientes da proteína, facilitando assim a observação do ligante. A **Figura 13** é um exemplo de sequência de pulsos de RMN-STD com eliminação do sinal de HDO com o bloco *excitation sculpting*.



**Figura 13.** Sequência de pulsos para experimento de RMN-STD com eliminação do sinal de HDO por *excitation sculpting*. A sequência é executada com ciclagem de fase e é composta pelos seguintes pulsos: P<sub>42</sub> (pulso seletivo de irradiação da proteína; fase: 0), P<sub>1</sub> (pulso duro de 90°; fase: 0 2), P<sub>29</sub> (trava de *spin*; fase: 1 1 1 1 1 1 1 1 3 3 3 3 3 3 3), P<sub>40</sub> (pulso seletivo de 180° nos sinais de HDO; fase: 0 0 1 1), P<sub>2</sub> (pulso duro de 180°; fase: 2 2 3 3). *NBL* define a variação entre os experimentos *on-resonance* e *off-resonance* e *L5* define o tempo de saturação da proteína.

O valor de STD corrigido pelo excesso de ligante em relação à concentração de proteína (fator de amplificação STD, STD-AF – **Equação 7**) fornece informações indiretas a respeito da concentração do complexo proteína/ligante. Portanto, resultados de experimentos de STD obtidos a partir da titulação de determinada proteína com um ligante podem ser aplicados na obtenção de constantes de dissociação aparentes ( $K_d$ ).

$$STD - AF = \frac{I_0 - I_{sat}}{I_0} \varepsilon \quad (7)$$

na qual  $I_0$  é a intensidade do sinal de RMN no experimento controle, sem irradiação da proteína,  $I_{sat}$  é a intensidade do sinal de RMN no experimento

de transferência de saturação com irradiação da proteína e  $\varepsilon$  é o excesso de ligante com relação a concentração de proteína.<sup>74, 93</sup>

A isoterma de ligação (isoterma de Langmuir, **Equação 8**), construída em função da concentração de ligante, fornece valores de  $K_D$  para um determinado sistema proteína/ligante. Contudo, alguns contrapontos são encontrados na utilização dessa metodologia. O primeiro deles está relacionado ao acúmulo de saturação de determinados *spins* nucleares de ligantes devido a processos de religação dos mesmos no sítio ativo da proteína. Esse efeito é pronunciado com o aumento do tempo de saturação da proteína, que permite várias reentradas da mesma molécula de ligante no sítio ativo. Outro revés é o fato de se obter valores diferentes de  $K_D$ , dependendo dos sinais de STD escolhidos para construir as isotermas de ligação.<sup>94, 95</sup>

$$STD - AF ([L]) = V_{m\acute{a}x} \frac{[L]}{[L] + K_d} \quad (8)$$

na qual  $[L]$  é a concentração de ligante.

Para contornar esses problemas uma metodologia foi proposta para determinação de  $K_d$  a partir de experimentos de competição nos quais uma amostra de proteína contendo o ligante de interesse é titulada com outro ligante de referência que tenha  $K_d$  previamente determinado por outra metodologia nas mesmas condições experimentais.<sup>74</sup> Contudo, além de problemas como superposição de sinais, a necessidade de um ligante de

93 Lepre, C. A.; Moore, J. M.; Peng, J. W. *Chem. Ver.* **2004**, 104, 3641-3675.

94 Pickhardt, M.; Larbig, G.; Khlistunova, I.; Coksezen, A.; Meyer, B.; Mandelkow, E. M.; Schmidt, B.; Mandelkow, E. *Biochemistry* **2007**, 46, 10016-10023.

95 Neffe, A. T.; Bilang, M.; Gruneberg, I.; Meyer, B. *J. Med. Chem.* **2007**, 50, 3482-3488.

referência com  $K_d$  previamente determinado limita significativamente as aplicações dessa metodologia. Todos esses problemas que envolvem os estudos de afinidade entre ligantes e proteínas utilizando RMN-STD podem ser contornados quando se utiliza a isoterma de ligação substituindo-se STD-AF, obtido a partir de um dado tempo de saturação, pelas taxas de crescimento iniciais (STD-AF<sub>0</sub>) da curva de saturação, as quais são construídas em função do tempo de saturação, de acordo com a **Equação 9**.<sup>96</sup>

$$STD - AF(t_{sat}) = STD - AF_{m\acute{a}x}(1 - e^{-k_{sat}t_{sat}}) \quad (9)$$

na qual  $t_{sat}$  é o tempo de saturação,  $STD-AF_{m\acute{a}x}$  é o platô da curva e  $k_{sat}$  é uma taxa constante de saturação, diretamente relacionada com a relaxação longitudinal seletiva de cada próton do ligante e demonstra o quão rápido o platô de cada curva é atingido. A inclinação STD-AF<sub>0</sub> é obtida da **Equação 10**.

$$STD - AF_0 = STD - AF_{m\acute{a}x}k_{sat}. \quad (10)$$

---

96 Ângulo, J.; Enríquez-Navaz, P. M.; Nieto, P. M. *Chem, Eur. J.* **2010**, 16, 7803-7812.

---

## 2 Objetivos

O objetivo desta tese é avaliar as interações supramoleculares em termos de estrutura e constantes termodinâmicas. Para isso o trabalho foi dividido em dois capítulos.

No Capítulo I (Caracterização de Dapsona em complexos de inclusão binários e ternários) são apresentados os complexos de Dapsona (Dap) com  $\beta$ -ciclodextrina ( $\beta$ -CD), sulfobutileter- $\beta$ -ciclodextrina (SBE- $\beta$ -CD) e lipossomas de fosfatidilcolina de ovo (EPC), a fim de melhorar a solubilidade do fármaco em água. Esse estudo visa compreender a arquitetura, a estequiometria e as constantes de associação aparentes dos complexos formados, utilizando diferentes técnicas de RMN de  $^1\text{H}$ . Além dos complexos binários relacionados acima, também é de interesse de estudo desse trabalho a avaliação e caracterização completa do complexo ternário Dapsona/ $\beta$ -CD/lipossoma EPC, visando potencializar ainda mais o aumento de solubilidade do fármaco.

No Capítulo II (Determinação de constantes de dissociação aparentes de acetilcolinesterase e inibidores por RMN-STD) foram determinadas as constantes de dissociação aparentes  $K_d$  entre a enzima acetilcolinesterase (AChE) isolada de *Electrophorus electricus* (Sigma-Aldrich) e os alcaloides Fisostigmina (**11**) e Crinina (**12**). Para isso foi aplicada a isoterma de ligação de Langmuir construída a partir da inclinação das curvas de saturação (obtidas em experimentos de diferença de transferência de Saturação - abreviação do Inglês, STD) em função da concentração dos alcaloides.



---

---

*CAPÍTULO I: CARACTERIZAÇÃO DE DAPSONA EM  
COMPLEXOS DE INCLUSÃO BINÁRIOS E TERNÁRIOS*

---

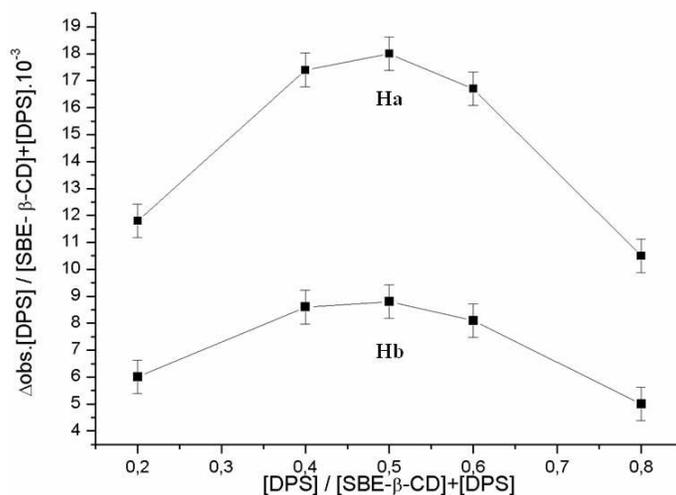
---



## 1 Resultados e Discussão

### 1.1 Avaliação do complexo binário DAP/SBE- $\beta$ -CD

De acordo com a variação de deslocamento químico dos  $^1\text{H}$  da Dapsona representados no gráfico de Job (**Figura 14**), a estequiometria do complexo DAP/SBE- $\beta$ -CD é 1:1, dado o ponto máximo do gráfico em  $x=0,5$ . Os espectros de  $^1\text{H}$  foram adquiridos com resolução média de  $6,25 \cdot 10^{-4}$  ppm e a resolução digital média dos espectros processados foi de  $1,25 \cdot 10^{-3}$  ppm. Isso implica em um erro de  $\pm 6,25 \cdot 10^{-4}$  ppm. Conforme visto na **Figura 14**, este erro é muito pequeno se comparado com as variações de deslocamento químico observadas, o que não interfere no resultado de estequiometria obtido para o complexo em questão.



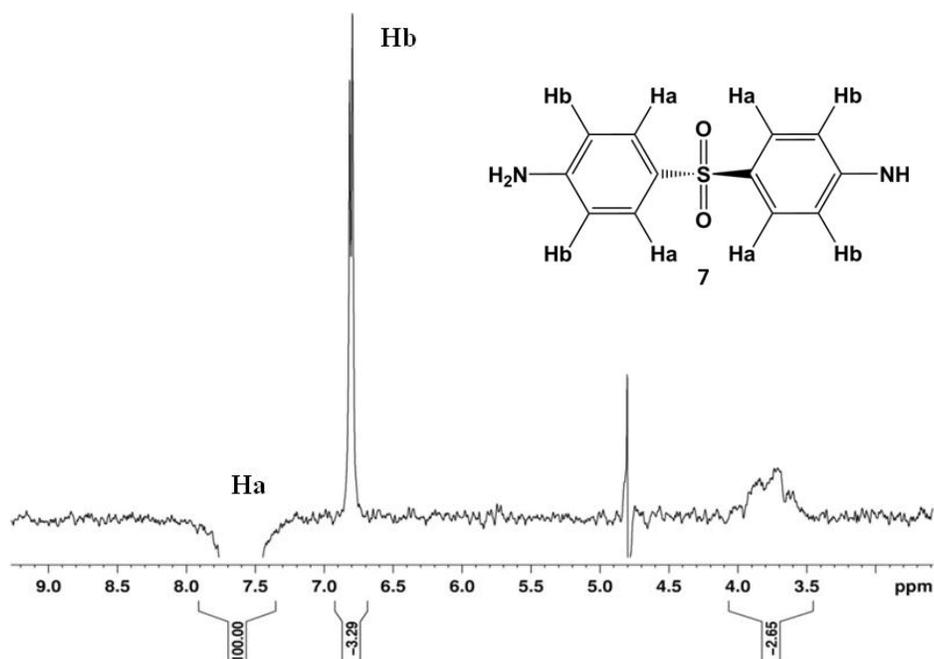
**Figura 14.** Gráfico de Job determinado para a complexação Dapsona (7) e SBE- $\beta$ -CD (5). As amostras foram preparadas em  $\text{D}_2\text{O}$ , tampão fosfato pH = 7,0 e com concentração total de  $2 \text{ mmol L}^{-1}$ . Os deslocamentos químicos de  $^1\text{H}$  foram medidos a 298 K, na frequência de 400.1315 MHz.

A verificação estrutural de complexos de inclusão com ciclodextrinas normalmente é realizada através da irradiação seletiva de H3 e H5 da

ciclodextrina em experimento de ROESY 1D. Contudo, o espectro de RMN de  $^1\text{H}$  da SBE- $\beta$ -CD não tem dispersão suficiente para que estes hidrogênios sejam assinalados e selecionados para o experimento. A alternativa é irradiar os  $^1\text{H}$  da Dap e observar as variações na região espectral onde os  $^1\text{H}$  da SBE- $\beta$ -CD se encontram.

A **Figura 15** apresenta um espectro de ROESY 1D para o sistema Dap e SBE- $\beta$ -CD com irradiação do Ha do antibiótico. É possível notar que alguns sinais da SBE- $\beta$ -CD apareceram no espectro, mas a falta de resolução destes torna impossível determinar a quais hidrogênios eles correspondem. Embora o experimento mostre que existe interação entre as moléculas avaliadas, não é possível saber se tal interação é proveniente do complexo de inclusão (interação com H3 e H5 da SBE- $\beta$ -CD) ou se a interação é superficial com a ciclodextrina (com H1, H4 e H6). O mesmo efeito pode ser observado quando a irradiação ocorre no hidrogênio Hb da Dapsona, como é visto na **Figura 16**. Ainda que seja possível identificar algum tipo de interação entre Dapsona e SBE- $\beta$ -CD por experimentos de ROESY 1D, nenhum modelo de complexo pode ser proposto devido a falta de dados detalhados.

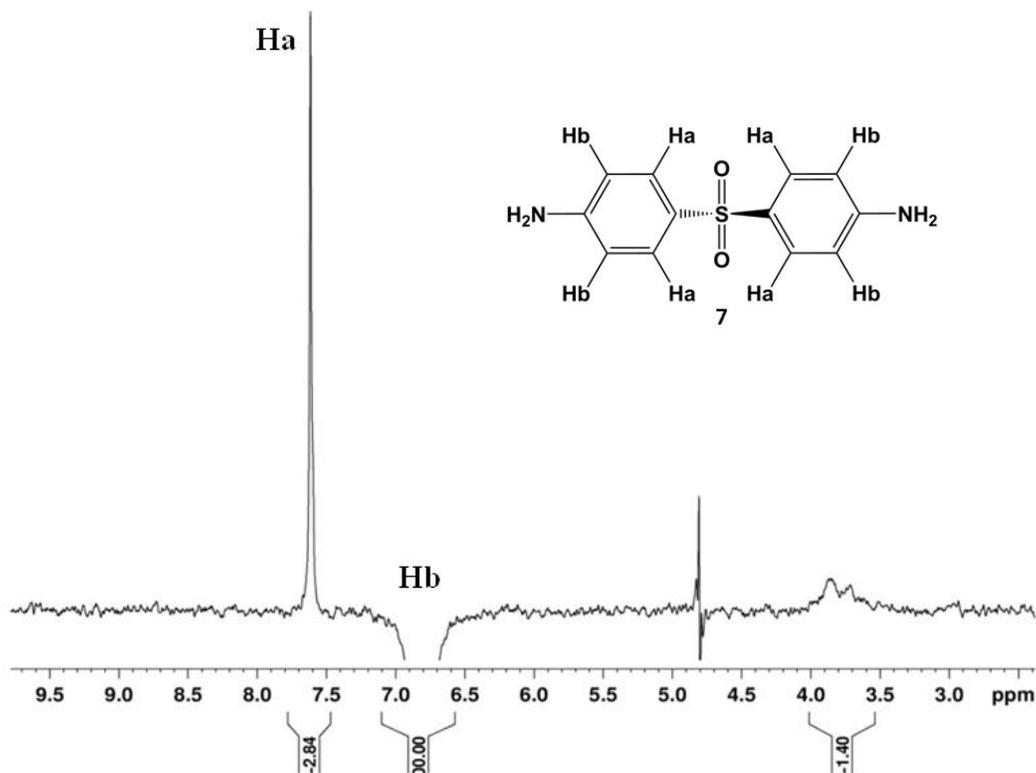
Os valores dos tempos de relaxação longitudinais ( $T_1$ ) também indicam a existência de complexação entre a Dapsona e a SBE- $\beta$ -CD, como pode ser observado na **Tabela 1**, sinalizando que a formação do complexo é bastante favorecida.



**Figura 15.** ROESY 1D de amostra de Dapsona e SBE- $\beta$ -CD, trava de *spin* de 500ms e irradiação em Ha da Dapsona ( $D_2O$ , tampão fosfato pH=7,0 e 400.1315 MHz para  $^1H$ )

**Tabela 1.** Valores de tempo de relaxação longitudinal ( $T_1$ ) medidos para Dapsona (Dap) e SBE- $\beta$ -CD isolados, e para o complexo entre eles ( $D_2O$ , pH=7,0 tampão fosfato). Valores dados em segundos.

Sinais Dap	$T_1$ 400 MHz (isolados)	$T_1$ 400 MHz (complexos)	$\Delta$ 400
Ha	2,843	1,592	1,251
Hb	3,292	1,851	1,441



**Figura 16.** ROESY 1D de amostra de Dapsona e SBE- $\beta$ -CD, trava de *spin* de 500ms e irradiação em Hb da Dapsona ( $D_2O$ , tampão fosfato pH=7,0 e 400.1315 MHz para  $^1H$ ).

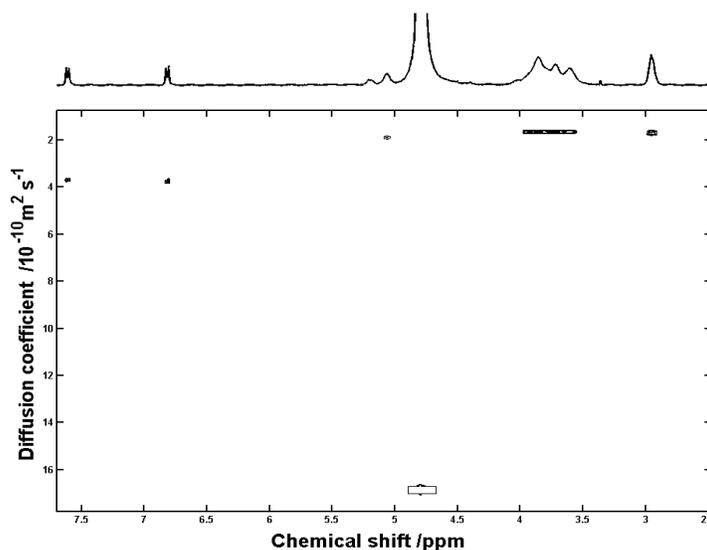
Adicionalmente, na **Tabela 2** encontram-se os coeficientes de difusão molecular ( $D$ ) das espécies isoladas e da mistura, além da fração molar do complexo formado e de  $K_a$  calculado. Nota-se que a variação de coeficiente de difusão da Dapsona é muito superior a variação dos coeficientes de difusão da SBE- $\beta$ -CD e de HDO. Este fator é um indício de que a variação de  $D$  ocorre devido à complexação e não a qualquer efeito de obstrução que possa ocorrer na amostra.

**Tabela 2.** Coeficientes de difusão ( $D$ ) para Dapsona, SBE- $\beta$ -CD, complexo Dap/SBE- $\beta$ -CD, HDO e  $K_a$  do complexo.

Complexo	Composto	$D$ ( $10^{-10} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$ )	$D$ HDO ( $10^{-10} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$ )	fração molar $f$	$K_a$ ( $\text{L mol}^{-1}$ )
-	Dap	$5,24 \pm 0,06$	$16,68 \pm 0,09$	-	-
-	SBE- $\beta$ - CD	$1,68 \pm 0,02$	$16,10 \pm 0,03$	-	-
Dap em SBE- $\beta$ - CD	Dap	$4,30 \pm 0,06$	$17,07 \pm 0,04$	0,1694	246
	SBE- $\beta$ - CD	$1,75 \pm 0,08$	$17,07 \pm 0,04$	-	-

Fração molar complexada  $f = \frac{D_{Dap} - D_{complex}}{D_{Dap} - D_{macro\ mol}}$  e constante de associação aparente do complexo  $Ka = \frac{f}{(1-f)([macro\ molecula] - f[Dap])}$

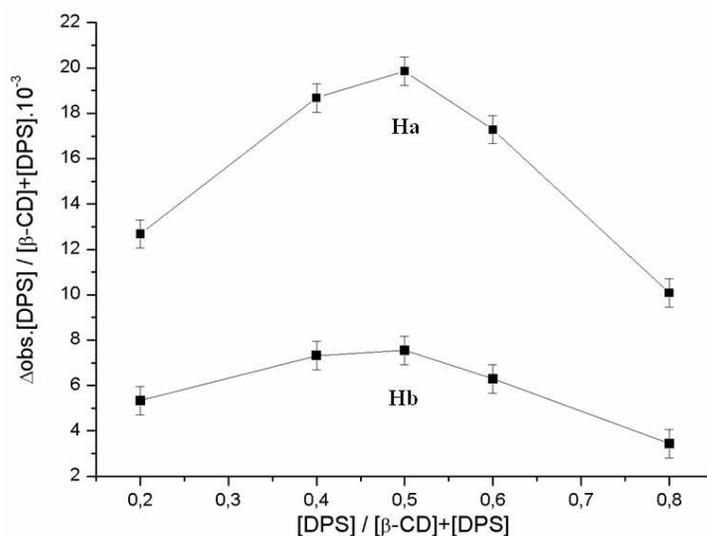
O experimento DOSY do complexo Dap/SBE- $\beta$ -CD está representado na **Figura 17**. Os DOSYs referentes às moléculas isoladas serão representados no Anexo I.



**Figura 17.** Representação em 2D do experimento DOSY para o complexo Dap/SBE- $\beta$ -CD 298 K, 400,1315 MHz em D<sub>2</sub>O, com tampão fosfato pH = 7,0.

## 1.2 Avaliação do complexo binário DAP/ $\beta$ -CD

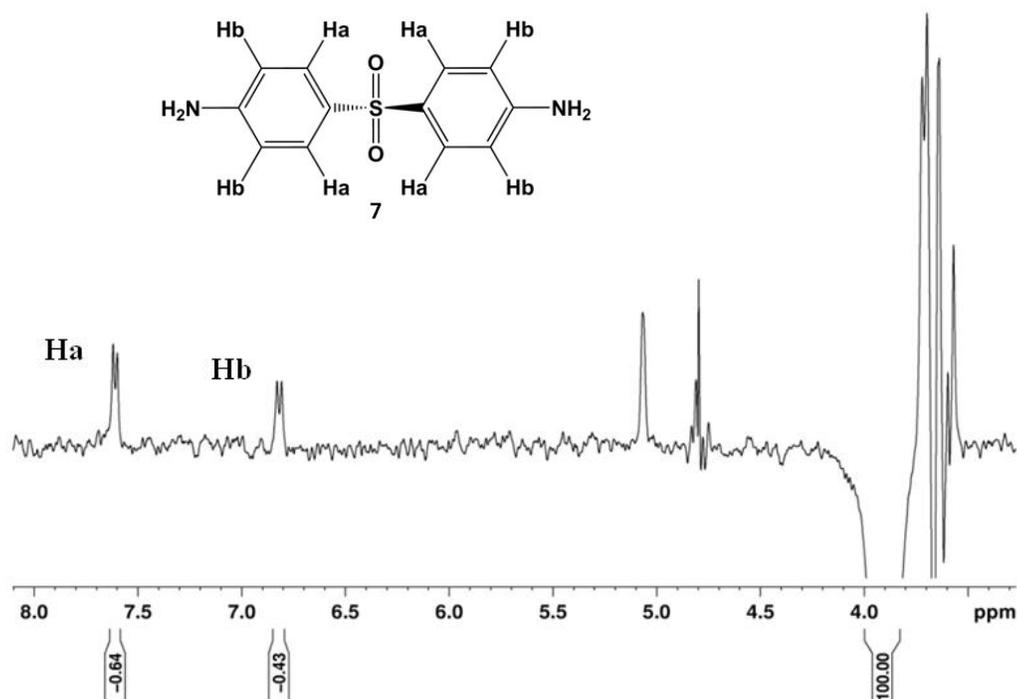
Análogo ao realizado para Dap e SBE- $\beta$ -CD, a complexação de Dap e  $\beta$ -CD também foi submetida ao estudo de estequiometria avaliando a variação de deslocamento químico e exatamente o mesmo resultado foi obtido, mostrando que o complexo Dap/ $\beta$ -CD também ocorre numa estequiometria 1:1 e que o erro embutido na resolução do experimento não foi significativo **Figura 18**.



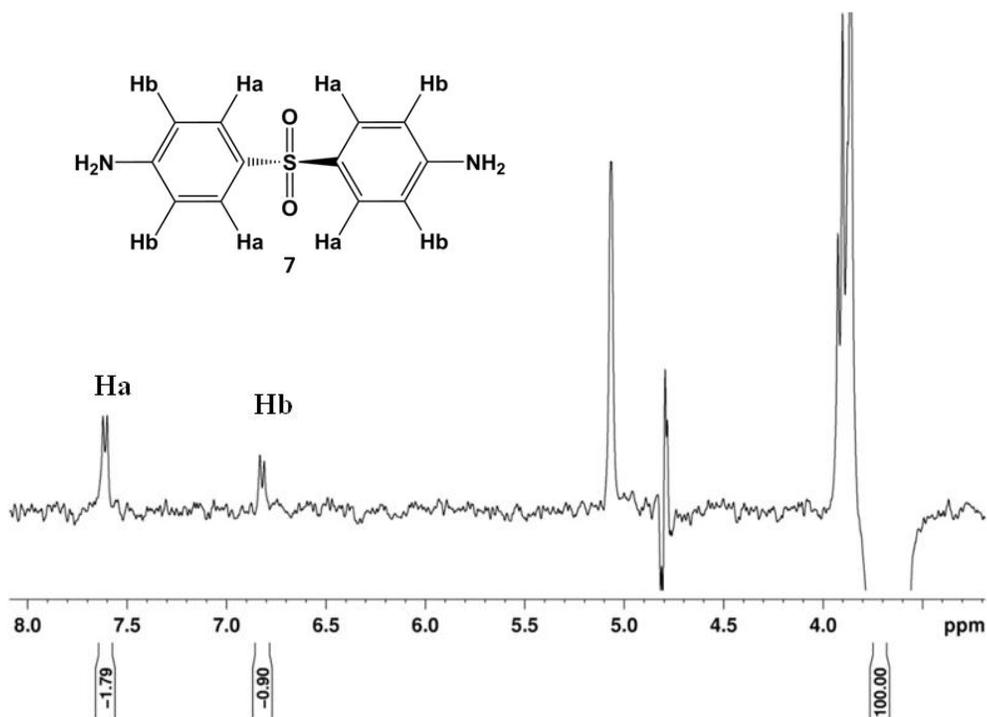
**Figura 18.** Gráfico de Job determinado para a complexação Dapsona (7) e  $\beta$ -CD (2). As amostras foram preparadas em  $D_2O$ , tampão fosfato pH = 7,0 e com concentração total de  $2 \text{ mmol L}^{-1}$ . Os deslocamentos químicos de  $^1H$  foram medidos a 298 K, na frequência de 400.1315 MHz.

A arquitetura do complexo formado foi proposta com base nos experimentos de ROESY 1D realizados com irradiação seletiva dos  $^1H$  H3 e H5 da  $\beta$ -CD. Para o experimento realizado irradiando H3 (**Figura 19**) pode-se notar que Ha da Dapsona apresenta sinal maior em relação a Hb, o que significa que a população de *spins* desse núcleo sofreu maior modificação que a população de *spins* de Hb. Isso está diretamente relacionado com a

distância que o núcleo está do local da irradiação, visto que o efeito rOe é inversamente proporcional à distância entre os núcleos avaliados. No caso da irradiação de H5 (**Figura 20**) Ha também apresenta maior variação nas populações de *spins* se comparado com Hb. Adicionalmente, os dois sinais da Dapsona apresentam maior modificação nas populações de *spins* quando há irradiação é realizada na frequência de H5 se comparada com a irradiação de H3.



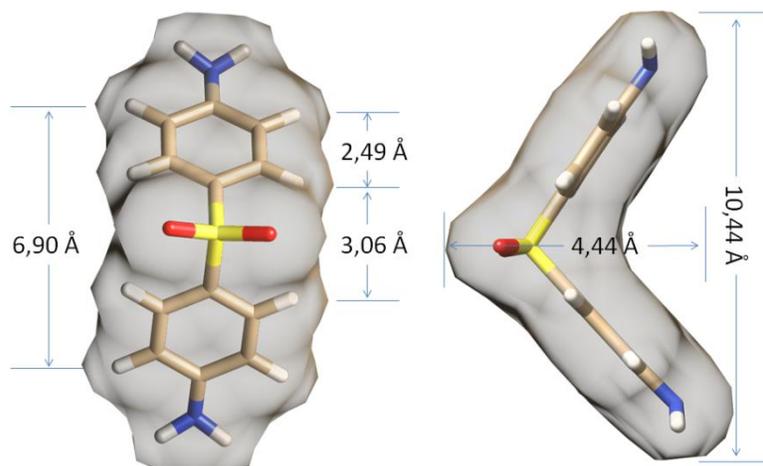
**Figura 19.** ROESY 1D de amostra de Dapsona e  $\beta$ -CD, trava de *spin* de 500ms e irradiação em H3 da  $\beta$ -CD ( $D_2O$ , tampão fosfato pH=7,0 e 400.1315 MHz para  $^1H$ ).



**Figura 20.** ROESY 1D de amostra de Dapsona e  $\beta$ -CD, trava de *spin* de 500ms e irradiação em H5 da  $\beta$ -CD ( $D_2O$ , tampão fosfato pH=7,0 e 400.1315 MHz para  $^1H$ ).

Com bases nos valores de rOe observados não é possível sugerir apenas um modelo para o complexo binário Dap- $\beta$ -CD. A estrutura da Dapsona foi otimizada pelo Prof. Dr. Cláudio Francisco Tormena, utilizando o programa Gaussian com o nível de teoria M062X – cc-pVDZ. A avaliação das dimensões da molécula de Dapsona (**Figura 21**) e a comparação com as dimensões da cavidade da  $\beta$ -CD (ver introdução, sessão 1.4.2, **Figura 11**) mostram que a formação do complexo binário de inclusão total é perfeitamente possível. Contudo, além de uma possibilidade de inserção total existem duas possibilidades de inserção parcial da Dapsona na cavidade da  $\beta$ -CD, como visto na **Figura 22**. Nos modelos de complexos foi adotada uma versão minimalista para a representação da  $\beta$ -CD, que torna muito mais simples a visualização dos complexos formados. Contudo, tomou-se o

cuidado de manter as proporções da cavidade da ciclodextrina para que a escala de tamanho das moléculas fossem respeitadas.

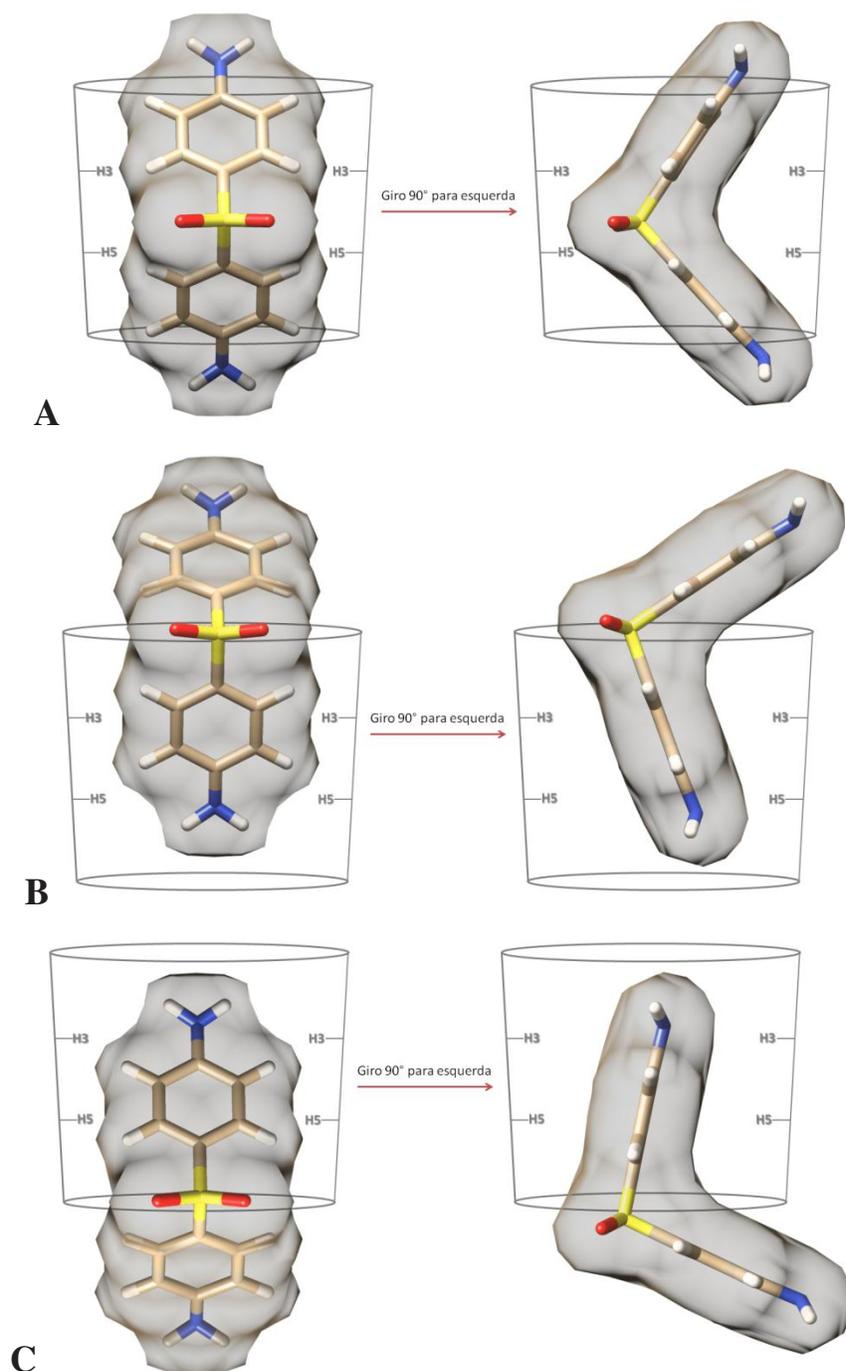


**Figura 21.** Dimensões da Dapsona cuja estrutura foi otimizada pelo programa Gaussian, empregando nível de teoria M062X – cc-pVDZ.

A variação dos valores de  $T_1$  medidos em dois campos diferentes, 9,4 e 7,0 T, também confirma a formação dos complexos binários de Dap e  $\beta$ -CD (**Tabela 3**). O fato de que os diferentes complexos binários sugeridos anteriormente coexistam em solução faz com que a variação de  $T_1$  seja consequência da contribuição de todas as espécies de complexos presentes.

**Tabela 3.** Valores de tempo de relaxação longitudinal ( $T_1$ ) medidos para Dapsona (Dap) e  $\beta$ -CD isolados, e para o complexo entre eles ( $D_2O$ , pH=7,00 tampão fosfato). Valores dados em segundos.

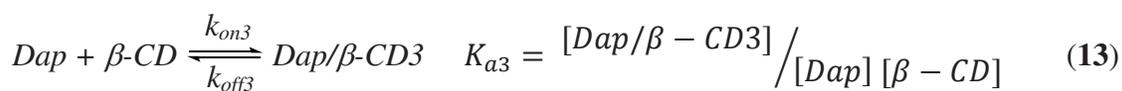
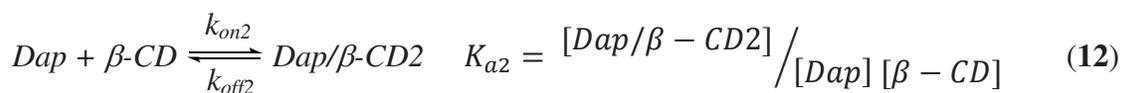
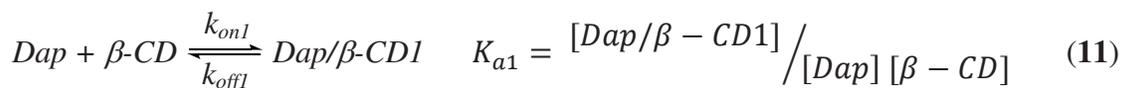
Sinais	$T_1$ 300 MHz (isolados)	$T_1$ 300 MHz (complexos)	$\Delta$ 300	$T_1$ 400 MHz (isolados)	$T_1$ 400 MHz (complexos)	$\Delta$ 400
Ha	2,796	1,425	1,371	2,843	1,812	1,031
Hb	3,222	1,803	1,419	3,292	2,197	1,095



**Figura 22.** Propostas de modelos dos possíveis complexos binários Dap- $\beta$ -CD. **A)** Inserção total da Dapsona; **B)** inserção parcial pela face secundária; **C)** inserção parcial pela face primária.

A presença de vários complexos binários no sistema tem implicações diretas com relação às medidas de propriedades termodinâmicas. O equilíbrio químico que envolve a formação dos complexos é, na verdade, a soma dos equilíbrios de formação de cada um dos complexos, como mostrado nas **Equações 11, 12, 13 e 14**. Devido às velocidades de formação dos complexos serem rápidas para a escala de RMN, não existe a possibilidade de observar cada complexo separadamente e, portanto, não é possível determinar os valores de  $K_{a1}$ ,  $K_{a2}$  e  $K_{a3}$ .

A constante de associação aparente determinada a partir das variações nos coeficientes de difusão molecular obtidos por RMN-DOSY representa a formação de todos os complexos formados (**Tabela 4**).



$$K_{aT} = \frac{[Dap/\beta - CD1][Dap/\beta - CD2][Dap/\beta - CD3]}{[Dap]^3 [\beta - CD]^3} \quad (14)$$

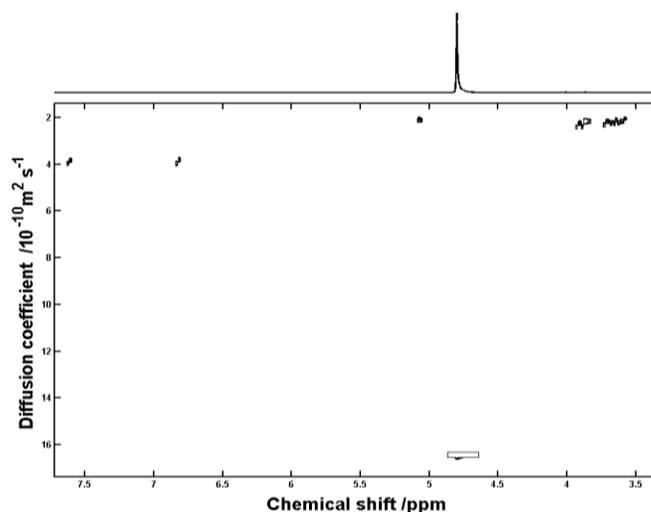
**Tabela 4.** Coeficientes de difusão ( $D$ ) para Dapsona,  $\beta$ -CD, complexo Dap/ $\beta$ -CD, HDO e  $K_a$  do complexo.

Complexo	Composto	$D$ ( $10^{-10} \text{ m}^2\text{s}^{-1}$ )	$D$ HDO ( $10^{-10} \text{ m}^2\text{s}^{-1}$ )	fração molar $f$	$K_a$ ( $\text{L mol}^{-1}$ )
-	Dap	$5,24 \pm 0,06$	$16,68 \pm 0,09$	-	-
-	$\beta$ -CD	$2,12 \pm 0,01$	$16,27 \pm 0,02$	-	-
Dap em $\beta$ -CD	Dap	$3,87 \pm 0,03$	$16,37 \pm 0,02$	0,4391	1396
	$\beta$ -CD	$2,14 \pm 0,04$	$16,37 \pm 0,02$	-	-

Fração molar complexada  $f = \frac{D_{Dap} - D_{complex}}{D_{Dap} - D_{macro mol}}$  e constante de associação aparente do complexo

$$K_a = \frac{f}{(1-f)([macro molecula] - f[Dap])}$$

O experimento DOSY do complexo Dap/ $\beta$ -CD está representado na **Figura 23**. Os DOSYs referentes às moléculas isoladas serão representados no Anexo I.

**Figura 23.** Representação em 2D do experimento DOSY para o complexo Dap/ $\beta$ -CD 298 K, 400,1315 MHz em  $D_2O$ , com tampão fosfato pH = 7,0.

Novamente é possível concluir que não ocorre efeito de obstrução significativo avaliando a variação de  $D$  do HDO. Esse fator é importante quando se determina fração de um complexo formado avaliando variações nos coeficientes de difusão das espécies envolvidas.

### 1.3 Avaliação do complexo binário DAP/EPC

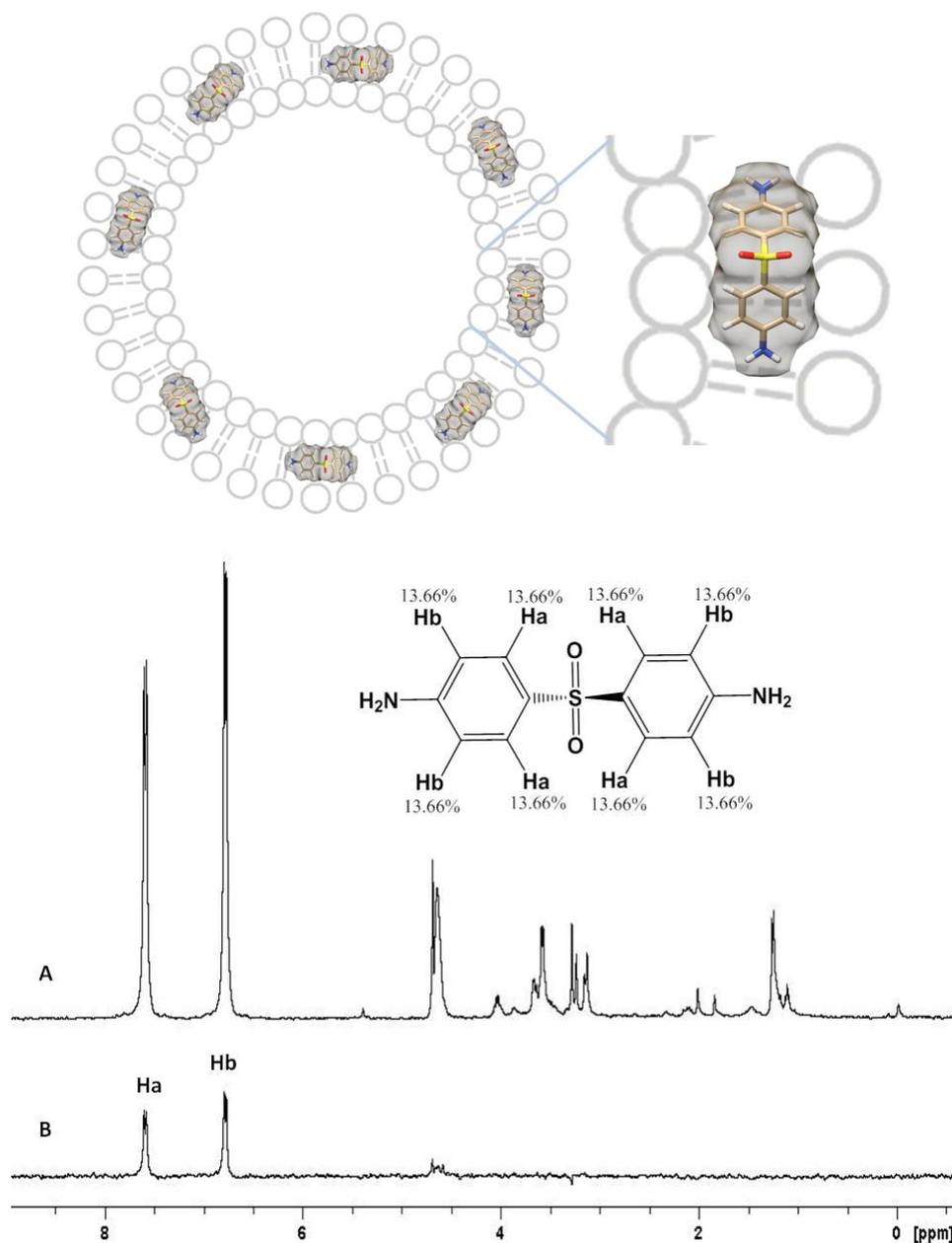
O lipossoma de fosfatidilcolina de ovo de 400 nm (EPC, do inglês *egg phosphatidylcholine*) se mostrou muito eficaz no aumento da solubilidade da Dapsona triplicando a carga de fármaco solúvel na formulação. Contudo, algumas dificuldades surgem quando se trabalha com interações entre fármacos e lipossomas. Com a ausência de sítios de interações específicos a estequiometria dos complexos formados é variada, sendo possível que varias moléculas de fármaco sejam inseridas na bicamada lipídica de um único lipossoma. Outro contratempo também relacionado com a ausência de um sítio específico de interação é que não existem sinais adequados para serem irradiados no experimento de ROESY 1D a fim de avaliar a estrutura do complexo formado entre o fármaco e o lipossoma. Tão pouco é possível irradiar os sinais do fármaco, como foi feito com a Dapsona na ocasião da complexação com SBE- $\beta$ -CD. Isso se deve ao fato de que o lipossoma apresenta sinais muito alargados devido ao curto tempo de relaxação de seus *spins* nucleares, impossibilitando a observação dos mesmos. No entanto arranjos supramoleculares com essas características apresentam um fenômeno muito peculiar, denominado difusão de *spin*, o qual permite que o experimento de STD seja utilizado para o mapeamento do complexo formado com um fármaco. A formação o complexo binário Dap/EPC foi confirmada por RMN de  $^1\text{H}$ -STD, revelando que a transferência de magnetização do

lipossoma para a Dapsona ocorre de maneira homogênea entre os hidrogênios Ha e Hb, o que nos leva a acreditar que a Dapsona está completamente inserida na bicamada lipídica do lipossoma de forma a receber a mesma quantidade de magnetização do lipossoma via relaxação cruzada (**Figura 24**). Embora este sistema seja dinâmico, ocorrendo troca de EPC e moléculas de Dapsona o tempo todo na estrutura do lipossoma, existe um valor de  $K_a$  para a associação de Dap com EPC 400 nm, que foi determinada também pela variação de coeficiente de difusão do fármaco na formulação com o lipossoma. A **Tabela 5** contém os valores de  $D$  e  $K_a$  para este sistema. Novamente percebe-se uma variação muito pequena nos coeficientes de difusão de HDO, eliminando a possibilidade de que as variações dos coeficientes de difusão da Dapsona sejam decorrentes de efeito de obstrução do meio.

**Tabela 5.** Coeficientes de difusão ( $D$ ) para Dapsona, EPC 400 nm, complexo Dap/EPC, HDO e  $K_a$  do complexo.

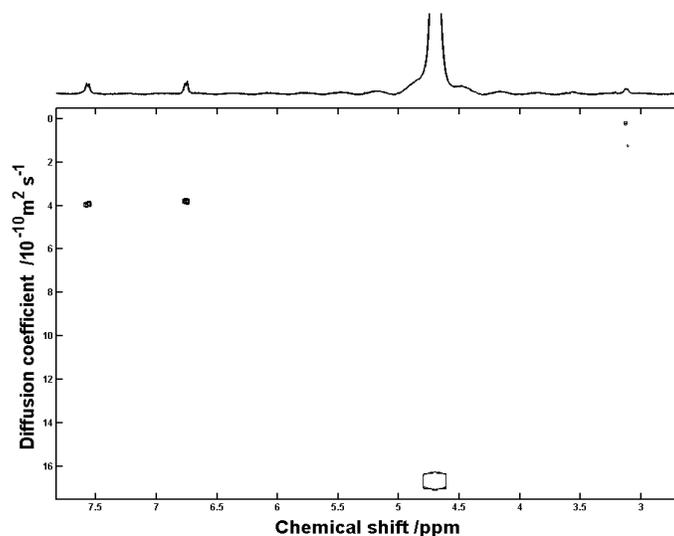
Complexo	Composto	$D$ ( $10^{-10} \text{ m}^2\text{s}^{-1}$ )	$D$ HDO ( $10^{-10} \text{ m}^2\text{s}^{-1}$ )	fração molar $f$	$K_a$ ( $\text{L mol}^{-1}$ )
-	Dap	$5,24 \pm 0,06$	$16,68 \pm 0,09$	-	-
-	EPC	$0,75 \pm 0,08$	$16,86 \pm 0,20$	-	-
Dap em EPC	Dap	$4,00 \pm 0,06$	$16,83 \pm 0,10$	0,2831	84
	EPC	$0,86 \pm 0,08$	$16,83 \pm 0,10$	-	-

Fração molar complexada  $f = \frac{D_{Dap} - D_{complex}}{D_{Dap} - D_{macro mol}}$  e constante de associação aparente do complexo  $Ka = \frac{f}{(1-f)([macro molecula] - f[Dap])}$



**Figura 24.** RMN de  $^1\text{H}$  (400,1315 MHz, a 298 K, pH =7,0 e 4,70 ppm  $\text{D}_2\text{O}/\text{HDO}$  como referência) de Dapsona em lipossomas EPC (400 nm), (A) espectro STD-RMN *off-resonance* e (B) espectro de STD-RMN *off-resonance - on-resonance*. Acima: estrutura Dapsona e transferência de saturação do lipossoma para Dapsona, acompanhando um possível arranjo para o complexo Dap/EPC.

O experimento DOSY do complexo Dap/EPC está representado na **Figura 25**. Os DOSYs referentes às moléculas isoladas serão representados no Anexo I.

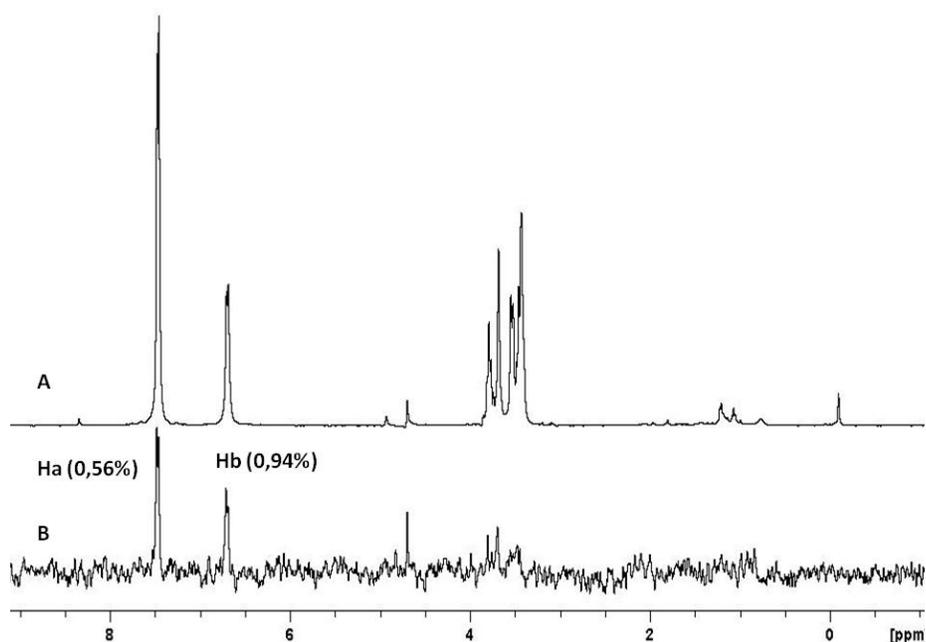


**Figura 25.** Representação em 2D do experimento DOSY para o complexo Dap/EPC 400 nm 298 K, 400,1315 MHz em D<sub>2</sub>O, com tampão fosfato pH = 7,0.

#### 1.4 Avaliação do complexo ternário DAP/ $\beta$ -CD/EPC

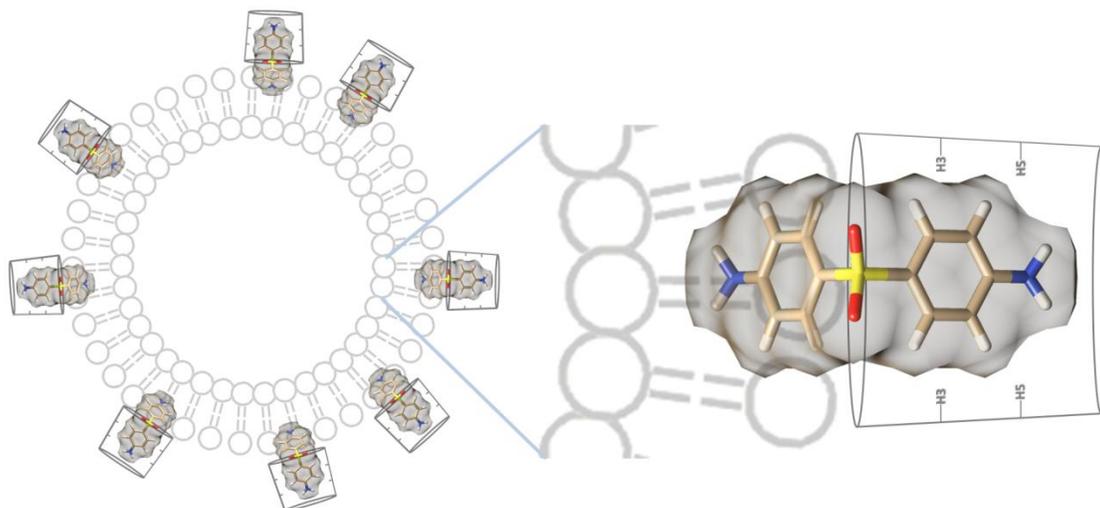
O complexo binário Dap/EPC se mostrou muito promissor no aumento da solubilidade do fármaco e levantou o questionamento sobre a possível formação de um complexo ternário que pudesse potencializar ainda mais a solubilidade de Dapsona em água. O sistema ternário contendo Dapsona, EPC e  $\beta$ -CD foi preparado de duas formas diferentes, adicionando-se  $\beta$ -CD ao sistema binário Dap/EPC e EPC ao sistema binário Dap/ $\beta$ -CD. Ambas as misturas ficaram em repouso até que atingissem o equilíbrio e apresentaram exatamente o mesmo comportamento frente aos experimentos realizados. A mistura ternária (Dap,  $\beta$ -CD e EPC) foi monitorada pelos experimentos de ROESY 1D, irradiando H3 e H5 da  $\beta$ -CD, observando-se rOe apenas a partir da irradiação de H3 frente a Ha e Hb da Dapsona (Ha = 1,70% e Hb = 0,78%). A ausência de sinal durante a irradiação de H5 significa que a estrutura do complexo binário Dap/ $\beta$ -CD mudou na presença de lipossomas de 400 nm. Mais precisamente, os resultados sugerem que a Dapsona esteja

sendo removida parcialmente da cavidade da  $\beta$ -CD. Essa remoção é comprovada pelo experimento de RMN  $^1\text{H}$ -STD da mistura ternária, no qual pode-se observar a transferência de magnetização menor e assimétrica se comparado com o experimento realizado para o sistema binário Dapsona-EPC (Hb apresenta maior variação de intensidade de sinal em comparação com Ha, 0,94 e 0,56%, respectivamente). Na **Figura 26** esta apresentado o espectro de RMN-STD *off-resonance* para o sistema ternário em questão e a diferença dos espectros *on* e *off-resonance*, onde é possível notar inclusive uma pequena transferência de saturação do lipossoma de EPC para a  $\beta$ -CD, nos sinais presentes entre 3 e 4 ppm. Esse é um grande indício da formação do complexo ternário Dap/ $\beta$ -CD/EPC. Além disso, a transferência heterogênea de saturação do lipossoma para a Dapsona implica necessariamente em que os hidrogênios Ha e Hb da Dapsona estão inseridos de maneiras diferentes na bicamada lipídica do lipossoma.



**Figura 26.** RMN de  $^1\text{H}$  (400,1315 MHz, a 298 K, pH 7 e 4,70 ppm D<sub>2</sub>O/HDO como referência) do complexo ternário Dap/ $\beta$ -CD/EPC, (A) espectro de ressonância STD-RMN *off-resonance* e (B) Espectro de STD-RMN *off-resonance* – *on-resonance*.

Com base no sinal proveniente do fenômeno rOe obtidos nos experimentos de ROESY 1D e das variações de intensidade de sinal observadas nos experimentos de STD-RMN foi proposto um modelo para o complexo ternário, como mostrado na **Figura 27**.

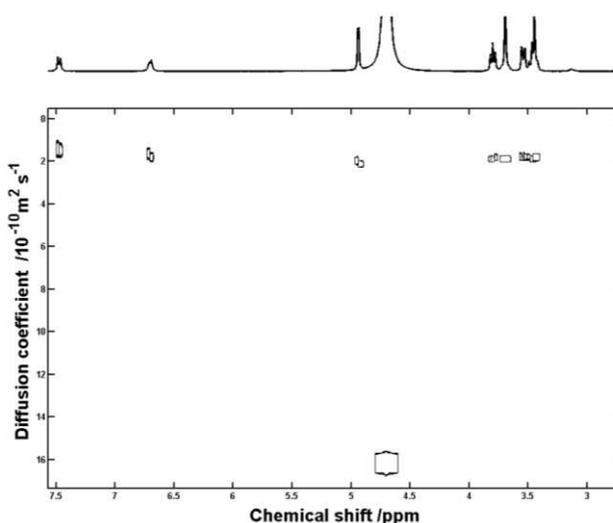


**Figura 27.** Modelo estrutural proposto para o complexo ternário Dap/ $\beta$ -CD/EPC.

O experimento DOSY do complexo Dap/ $\beta$ -CD/EPC está representado na **Figura 28**. Os DOSYs referentes às moléculas isoladas serão representados no Anexo I. Curiosamente, observou-se que o coeficiente de difusão da Dapsona variou muito mais no sistema ternário do que em qualquer dos sistemas binários discutidos anteriormente. Os coeficientes de difusão da Dapsona diminuíram de  $5.24 \times 10^{-10} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$  (livre),  $3.87 \times 10^{-10} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$  e  $4.00 \times 10^{-10} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$  (Dap / $\beta$ -CD, e Dap/EPC) para  $1.75 \times 10^{-10} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$  (Dap/ $\beta$ -CD /EPC) um valor próximo do coeficiente de difusão da  $\beta$ -CD, o que indica que a fração molar de Dapsona livre em solução é muito pequena e pode ser desprezada. Em outras palavras, a fração de Dapsona complexado com  $\beta$ -CD

é aproximadamente igual a 1 [para Dapsona no sistema ternário  $D_{\text{obs}} = x D_{\text{free}} + (1-x) D_{\text{comp}}$ .  $x \rightarrow 0$ ].

Portanto, o sistema ternário pode ser racionalizado como mistura de duas entidades, uma delas sendo o complexo binário Dap/ $\beta$ -CD e a outra o lipossoma EPC, as quais estão em equilíbrio com o complexo ternário Dap/ $\beta$ -CD/EPC (**Equação 15**). É evidente, portanto, a formação do complexo ternário e a constante de associação aparente  $K_a$  foi calculada tomando como base os valores de coeficientes de difusão do complexo binário Dap/ $\beta$ -CD e do lipossomas de EPC. Os valores estão apresentados na **Tabela 6**. Tendo em consideração que a constante de associação aparente foi calculada utilizando a concentração de EPC e não das vesículas de lipossomas de EPC, pode-se concluir que a afinidade do lipossoma por Dapsona é elevada, o que corrobora com a solubilidade do fármaco neste sistema.



**Figura 28.** Representação em 2D do experimento DOSY para o complexo ternário Dap/ $\beta$ -CD/EPC 400 nm 298 K, 400,1315 MHz em  $D_2O$ , com tampão fosfato pH = 7,0.

**Tabela 6.** Coeficientes de difusão ( $D$ ) para Dapsona, EPC 400 nm,  $\beta$ -CD, dos complexos binários e ternário com seus respectivos  $K_a$ .

Complexo	Composto	$D$ ( $10^{-10} \text{ m}^2\text{s}^{-1}$ )	$D$ HDO ( $10^{-10} \text{ m}^2\text{s}^{-1}$ )	fração molar $f$	$K_{aT}$ ( $\text{L mol}^{-1}$ )
-	Dap	$5,24 \pm 0,06$	$16,68 \pm 0,09$	-	-
-	$\beta$ -CD	$2,12 \pm 0,01$	$16,27 \pm 0,02$	-	-
-	EPC	$0,75 \pm 0,08$	$16,86 \pm 0,20$	-	-
Dap em EPC	Dap	$4,00 \pm 0,06$	$16,83 \pm 0,10$	0,2831	84
	EPC	$0,86 \pm 0,08$	$16,83 \pm 0,10$	-	-
Dap/ $\beta$ -CD em EPC	Dap/ $\beta$ -CD	$2,01 \pm 0,06$	$16,17 \pm 0,23$	0,0828	18
	Dap	$1,75 \pm 0,10$	$16,17 \pm 0,23$	-	-
	EPC	$0,57 \pm 0,05$	$16,17 \pm 0,23$	-	-

Fração molar complexada  $f = \frac{D_{Dap} - D_{complex}}{D_{Dap} - D_{macro mol}}$  e constante de associação aparente do complexo  $K_a = \frac{f}{(1-f)([macro\ molecula] - f[Dap])}$

Como ocorrido em todos os demais experimentos de DOSY realizados para as formulações binárias e ternárias de Dapsona, as variações nos coeficientes de difusão de HDO apresentadas na **Tabela 6** são muito pequenas se comparadas com as variações sofridas pela Dapsona. Este é um indicativo de que mesmo no sistema ternário o efeito de obstrução causado pelas macromoléculas pode ser desprezado.

## 2 Conclusão

Diferentes carreadores de fármacos foram testados frente à Dapsona a fim de melhorar a solubilidade da fármaco em soluções aquosas, revelando que  $\beta$ -CD, SBE- $\beta$ -CD e lipossoma de EPC de 400 nm resultaram em complexo de inclusão, aumentando a solubilidade da fármaco em tampão fosfato. Foi possível observar também que em sistema ternário o lipossoma modifica a interação da Dapsona com a  $\beta$ -CD, potencializando ainda mais a inclusão da fármaco e formando o complexo ternário Dap/ $\beta$ -CD/EPC, o que aumenta significativamente a solubilidade da fármaco em água abrindo um leque de possibilidade de uma nova formulação farmacêutica líquida, a qual facilitaria o tratamento de diversas doenças que tem como princípio ativo a Dapsona, principalmente em caso de tratamento pediátrico. Finalmente, os experimentos ROESY 1D, STD-RMN e DOSY-RMN foram ferramentas de capacidade única para revelar a nível atômico as arquiteturas de complexos binários e ternários e determinação de constantes de associação ( $K_a$  Dap/ $\beta$ -CD = 1396 L mol<sup>-1</sup>,  $K_a$  Dap/SBE- $\beta$ -CD = 246 L mol<sup>-1</sup>,  $K_a$  Dap/EPC = 84 L mol<sup>-1</sup> e  $K_a$  Dap/ $\beta$ -CD/EPC = 18 L mol<sup>-1</sup>). O efeito de obstrução causado pela  $\beta$ -CD pode ser desprezado de acordo com a variação do coeficiente de difusão de H<sub>2</sub>O. No caso de lipossoma de EPC o efeito de obstrução esperado foi maior devido ao tamanho dos arranjos moleculares formados (400 nm), contudo, devido à concentração de tais arranjos o efeito de obstrução se mostrou ainda menor com relação à  $\beta$ -CD.



---

---

*CAPÍTULO II: DETERMINAÇÃO DE CONTANTES DE DISSOCIAÇÃO APARENTES DE ACETILCOLINESTERASE E INIBIDORES POR RMN-STD*

---

---



## 1 Resultados e Discussão

Estudos de transferência de saturação a fim de elucidar o mapa do epitopo de interação em Fisostigmina e AChE já foram realizados.<sup>97</sup> Contudo, além de propósitos diferentes, as condições experimentais realizadas neste trabalho são diferentes daquelas utilizadas anteriormente. A condição ótima de atuação da AChE é 37°C e pH = 7.4. Entretanto, tais condições são inadequadas para estudos com os alcaloides em questão, visto a facilidade com a qual o grupo carbamato da Fisostigmina é hidrolisado e a baixa solubilidade da Crinina em pHs altos. A limitação referente à solubilidade dos compostos impedem a realização de experimentos de titulação nas concentrações adequadas a pH=8. Portanto, a condição experimental foi definida como sendo pH=6 e 25°C, com quantidade máxima de DMSO de 15%, de forma que a Fisostigmina e a Crinina sejam solúveis o suficiente para a realização dos experimentos e a AChE continue estável.

### 1.1 Elucidação estrutural da Fisostigmina

Experimentos de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$ , uni e bidimensionais (gHSQC e gHMBC) foram realizados nas condições experimentais citadas acima com o intuito de que nenhum equívoco seja cometido nas escolhas dos sinais utilizados para a construção das isotermas e as atribuições dos sinais de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  da Fisostigmina (**11**, **Figura 29**) estão dispostas na **Tabela 7**. Os sinais relativos aos hidrogênios 4, 6, 7, 9, 11 e CONMe foram

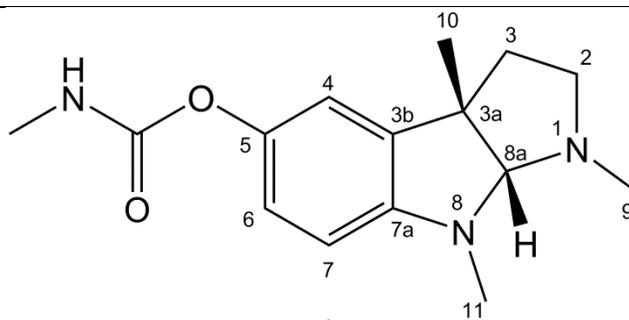
---

97 Martins, L. G. Dissertação de Mestrado. Unicamp, 2009.

escolhidos para as construções das isotermas. As metilas 11 e 9 foram diferenciadas a partir de correlações observadas no experimento gHMBC.

**Tabela 7.** Atribuição dos sinais de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  para a Fisostigmina (298 K, 400,1315 MHz em  $\text{D}_2\text{O}$ , TPSA = 0 ppm, com tampão fosfato pH 6).

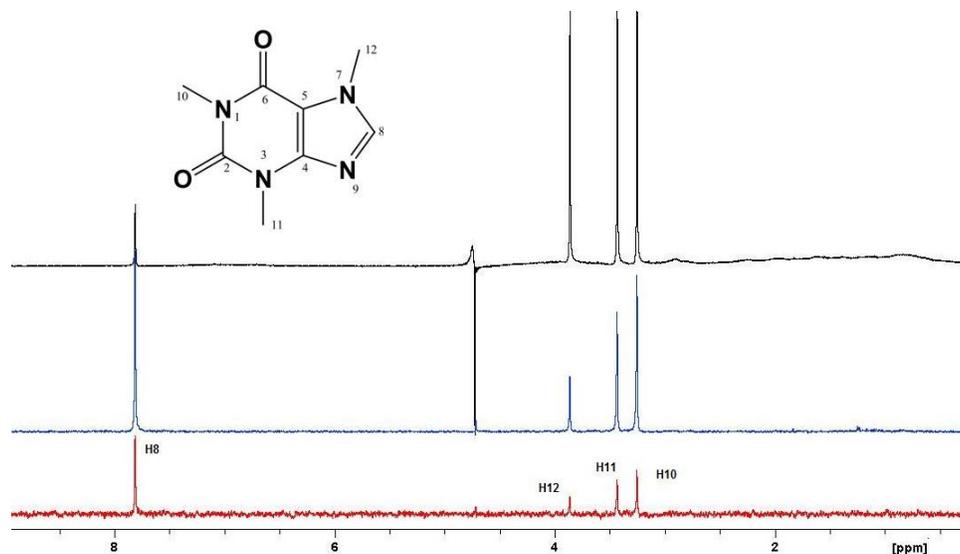
Sinais	$\delta$ de $^1\text{H}$ em ppm (multiplicidade e constante de acoplamento)	$\delta$ de $^{13}\text{C}$ em ppm
2	2,90 (m) e 3,29 (m)	52,5
3	2,25 (m)	37,2
3a	-	52,9
3b	-	135,6
4	6,91 (d, 2,3 Hz)	116,8
5	-	144,0
6	6,87 (dd, 2,3 e 8,5 Hz)	121,9
7	6,58 (d, 8,5 Hz)	108,1
7a	-	147,3
8a	4,90 (s)	97,6
9	2,78 (s)	36,2
10	1,39 (s)	25,0
11	3,02 (s)	35,5
C=O	-	158,4
NMe(carbamato)	2,69 (s)	26,8



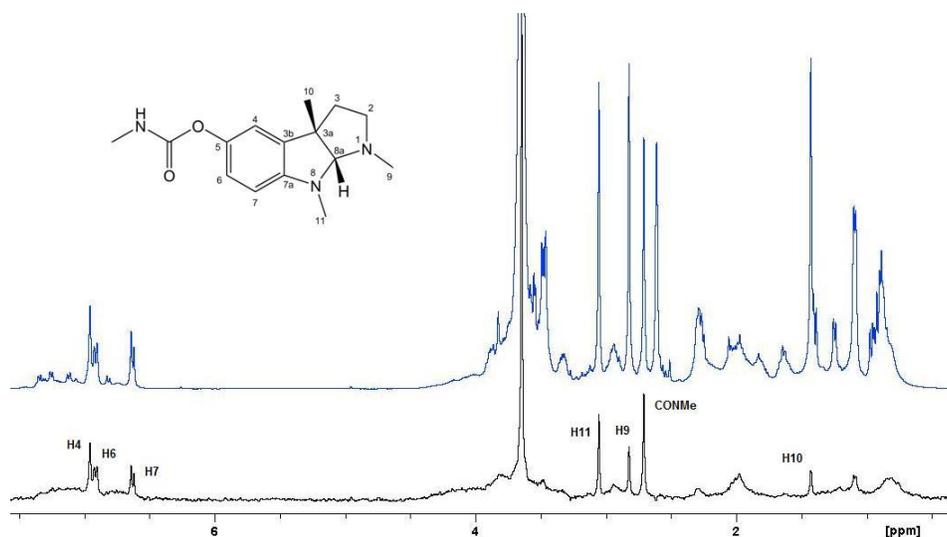
**Figura 29.** Estrutura numerada da Fisostigmina (**11**), nome segundo a IUPAC: (3a*R*,8a*S*)-1,3a,8-trimetil-1*H*,2*H*,3*H*,3a*H*,8*H*,8a*H*-pirrolo [2,3-*b*] indol-5-il *N*-metilcarbamato.

## 1.2 Otimização do experimento de STD

Em princípio testes de saturação foram realizados, na ausência de AChE, para verificar se a potência e o local de irradiação não produziram nenhum tipo de saturação dos sinais da Fisostigmina, o que é considerado um resultado falso positivo. Observou-se que irradiando em 0 ppm, com pulsos de 50 ms e  $5,41 \times 10^{-5}$  Watts de potência durante até 3 segundos nenhum sinal da Fisostigmina sofreu saturação na ausência de AChE. Para eliminação do sinal de proteína um sistema padrão formado por cafeína e BSA (albumina do sono bovino) foi utilizado com o intuito de calibrar a duração da trava de *spin*. Conforme observado na **Figura 30**, com 50 ms de trava de *spin* os sinais da BSA foram totalmente eliminados. No caso de eliminação de sinais de AChE alguns problemas foram encontrados. Mesmo quando o valor da trava de *spin* foi fixado em 50 ms (tempo suficiente para que uma proteína de 280 kDa seja eliminada por relaxação transversal, considerando a proteína bem enovelada) alguns sinais foram observados no espectro de RMN-STD (**Figura 31**). O aumento do tempo de trava de *spin* refletiu em transferência de saturação do tipo *Waterlogsy* e ainda assim não resultou na eliminação dos sinais. Embora alargados, os sinais presentes no espectro não condizem com sinais relativos a uma proteína de 280 kDa (devido ao longo tempo de correlação essas moléculas apresentam uma relaxação transversal muito rápida, o que resulta em alargamento muito pronunciado dos sinais).

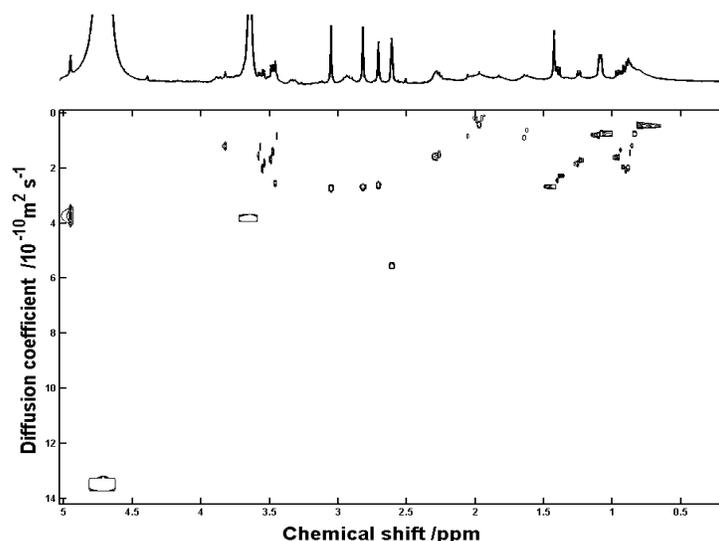


**Figura 30.** Experimento de RMN-STD para o sistema cafeína/BSA (298K, 400,1315 MHz em  $D_2O/DMSO-d_6$ , com tampão fosfato pH=7,0). Em preto está apresentado um espectro de RMN de  $^1H$  no qual é possível notar os sinais alargados relativos à BSA, em azul está o experimento de saturação *off-resonance* e em vermelho a diferença dos experimentos *off-resonance* e *on-resonance*. Nos experimentos de saturação nenhum sinal relativo à proteína foi observado.



**Figura 31.** Experimento de RMN-STD para o sistema fisostigmina/AChE (298K, 400,1315 MHz em  $D_2O/DMSO-d_6$ , com tampão fosfato pH=6,0). Em azul experimento de saturação *off-resonance* e em preto a diferença dos experimentos *off-resonance* e *on-resonance*. Os sinais mais alargados em toda a janela espectral pertencem a AChE.

A difusão molecular de proteínas é bastante dificultada devido ao tamanho das moléculas e no caso de uma proteína de 280 kDa espera-se obter um valor de coeficientes de difusão bem pequenos. Contudo, os vários sinais alargados do espectro apresentaram valores de coeficientes de difusão semelhantes aos da Fisostigmina, conforme pode ser visto na **Figura 32**. Provavelmente estes sinais pertencem a aminoácidos ou peptídeos pequenos. Tais resultados desqualificam a hipótese de que a trava de *spin* não estivesse funcionando bem e permitiram que os experimentos de RMN-STD fossem realizados.

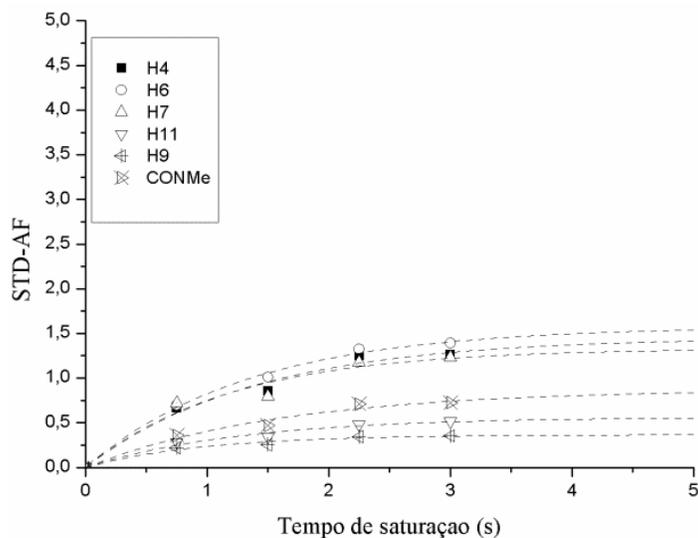


**Figura 32.** Representação em 2D do experimento DOSY para o sistema Fisostigmina/Ach a 298 K, 400,1315 MHz em D<sub>2</sub>O/DMSO-*d*<sub>6</sub>, com tampão fosfato pH 6,0.

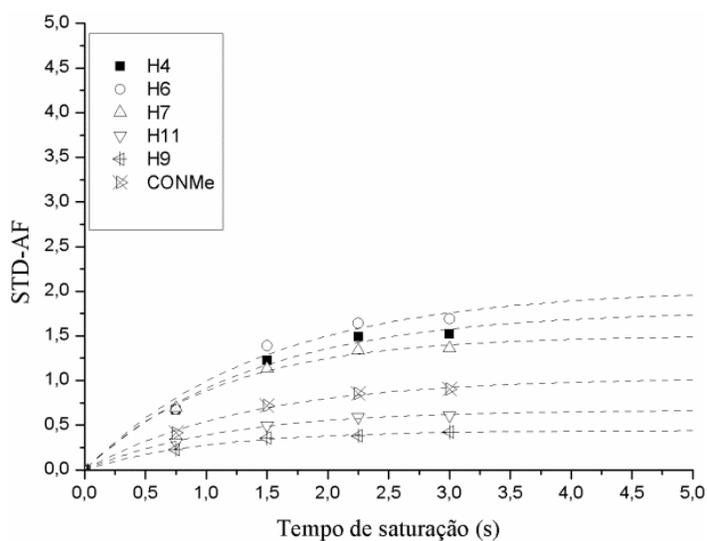
### 1.3 Construção das curvas de saturação e isotermas de ligação para o sistema Fisostigmina/AChE

As curvas de saturação foram construídas com quatro tempos de saturação diferentes (0,75, 1,5, 2,25 e 3 segundos) para sete concentrações diferentes de Fisostigmina (0,26, 0,34, 0,42, 0,49, 0,57, 0,64 e 0,98 mmol L<sup>-1</sup>

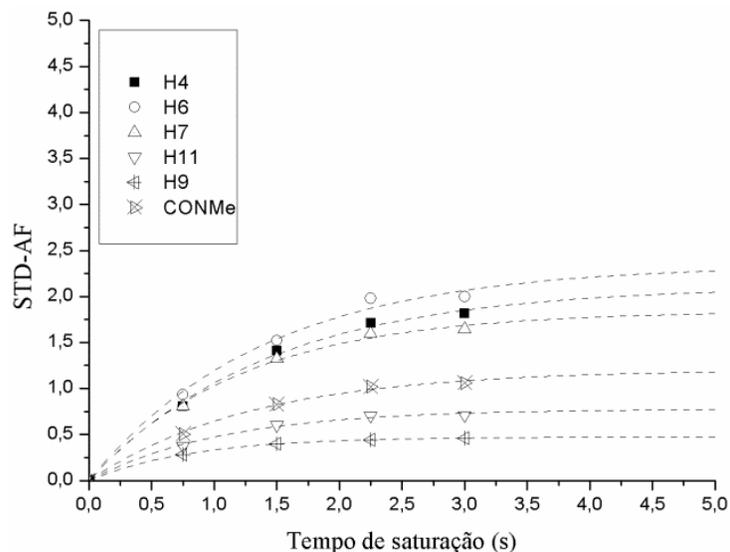
<sup>1</sup>) até que os platôs fossem atingidos (**Figuras 33 a 39**). Já nas primeiras curvas de saturação foi possível observar comportamentos distintos entre os hidrogênios aromáticos e os grupos metilas ligados a átomos de nitrogênio. Estes últimos atingiram o platô rapidamente, mostrando uma capacidade inferior de armazenamento de magnetização proveniente da proteína. Isso está diretamente relacionado com a relaxação seletiva de cada núcleo de hidrogênio, a qual pode ser afetada pelo momento quadrupolar elétrico gerado pelos átomos de nitrogênio. Os valores de tempos de religação, STD- $AF_{máx}$ ,  $k_{sat}$  e STD- $AF_0$  estão apresentados na **Tabela 8**. Os valores de STD- $AF_{máx}$  representam a quantidade máxima de saturação que cada hidrogênio é capaz de acumular. Isso significa que quando atingida, a quantidade de saturação expressa como STD-AF não é alterada com o aumento do tempo de saturação. A velocidade com que este platô é alcançado é dada pela constante de saturação  $k_{sat}$ , a qual é dependente da relaxação longitudinal seletiva de cada núcleo de hidrogênio da molécula. Esta constante representa o acúmulo de saturação dos *spins* nucleares e o seu inverso indica a velocidade em que ocorre o processo de religação da Fisostigmina no sítio ativo da AChE. O tempo de religação define quantos segundos são necessários para que a mesma molécula de Fisostigmina retorne ao sítio ativo da AChE.



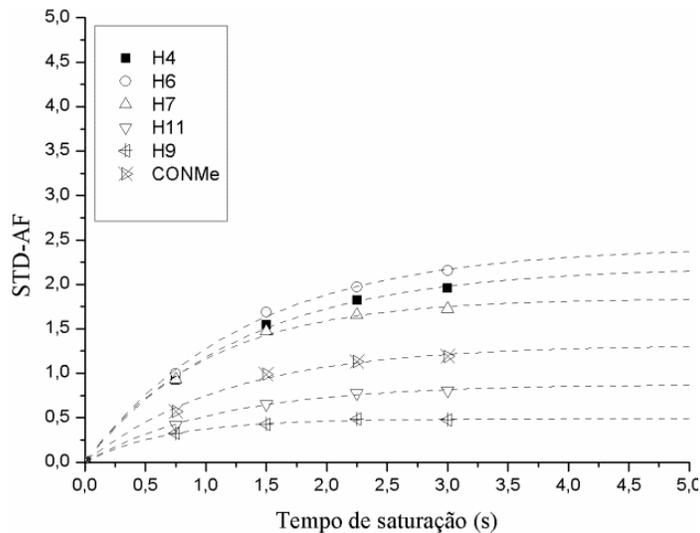
**Figura 33.** Valores de STD-AF em função do tempo de saturação para amostras contendo  $20 \mu\text{mol L}^{-1}$  de AChE e  $0,26 \text{ mmol L}^{-1}$  de Fisostigmina. Cada curva foi construída para um dos átomos de hidrogênio selecionados da Fisostigmina.



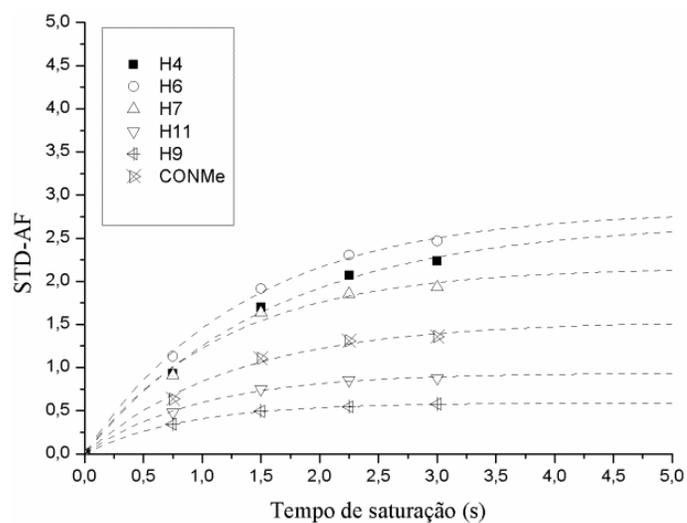
**Figura 34.** Valores de STD-AF em função do tempo de saturação para amostras contendo  $20 \mu\text{mol L}^{-1}$  de AChE e  $0,34 \text{ mmol L}^{-1}$  de Fisostigmina. Cada curva foi construída para um dos átomos de hidrogênio selecionados da Fisostigmina.



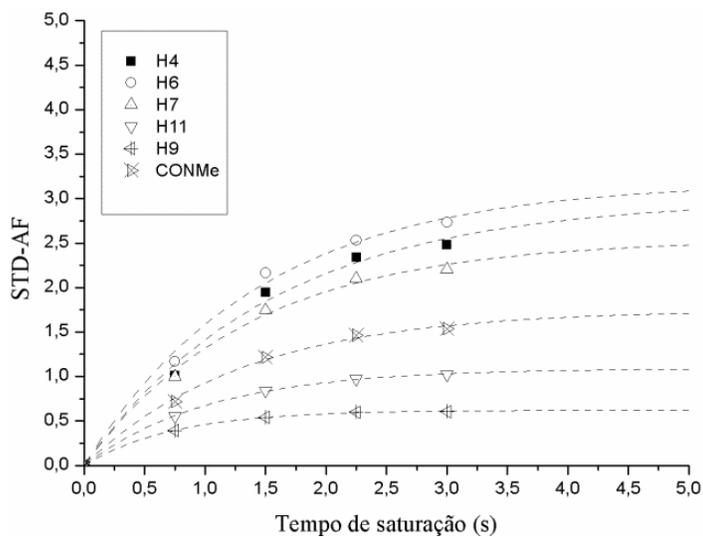
**Figura 35.** Valores de STD-AF em função do tempo de saturação para amostras contendo  $20 \mu\text{mol L}^{-1}$  de AChE e  $0,42 \text{ mmol L}^{-1}$  de Fisostigmina. Cada curva foi construída para um dos átomos de hidrogênio selecionados da Fisostigmina.



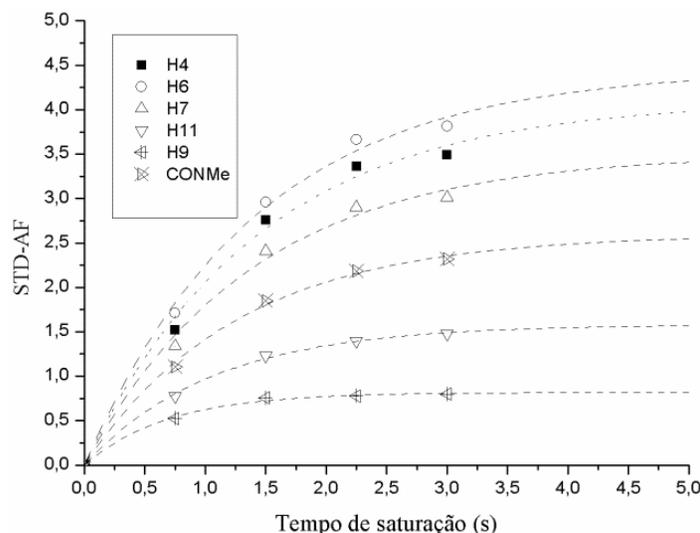
**Figura 36.** Valores de STD-AF em função do tempo de saturação para amostras contendo  $20 \mu\text{mol L}^{-1}$  de AChE e  $0,49 \text{ mmol L}^{-1}$  de Fisostigmina. Cada curva foi construída para um dos átomos de hidrogênio selecionados da Fisostigmina.



**Figura 37.** Valores de STD-AF em função do tempo de saturação para amostras contendo  $20 \mu\text{mol L}^{-1}$  de AChE e  $0,57 \text{ mmol L}^{-1}$  de Fisostigmina. Cada curva foi construída para um dos átomos de hidrogênio selecionados da Fisostigmina.



**Figura 38.** Valores de STD-AF em função do tempo de saturação para amostras contendo  $20 \mu\text{mol L}^{-1}$  de AChE e  $0,64 \text{ mmol L}^{-1}$  de Fisostigmina. Cada curva foi construída para um dos átomos de hidrogênio selecionados da Fisostigmina.

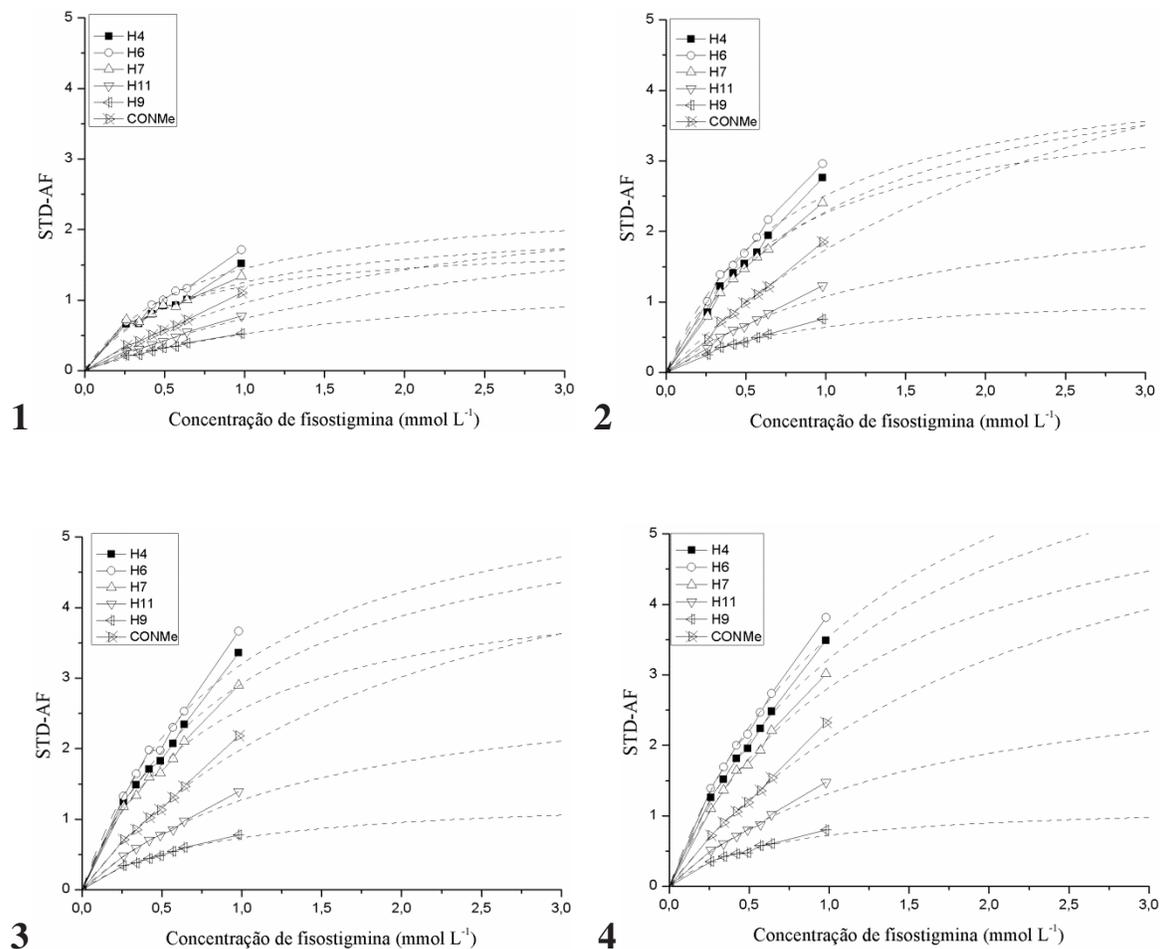


**Figura 39.** Valores de STD-AF em função do tempo de saturação para amostras contendo  $20 \mu\text{mol L}^{-1}$  de AChE e  $0,98 \text{ mmol L}^{-1}$  de Fisostigmina. Cada curva foi construída para um dos átomos de hidrogênio selecionados da Fisostigmina.

Este processo de religação prejudica o acúmulo de saturação dos *spins* nucleares dando a falsa ideia de que a afinidade da proteína pelo ligante é menor. No caso do sistema Fisostigmina/AChE (**Tabela 8**), praticamente todos os valores de tempos de religação são superiores a 1 segundo. Isso significa que ao utilizar tempos de saturação maiores que 1 segundo os processos de religação começam a ocorrer e os valores de constantes de dissociação aparentes  $K_d$  calculados pela Isoterma de Langmuir são superestimados. Outro problema encontrado na construção da isoterma é a perda do sítio específico de interação devido ao alto excesso de ligante na amostra. Nessa situação a Fisostigmina começa a interagir em outros pontos da proteína fazendo com que os valores de STD-AF não se adequem à curva (**Figura 40**). É o caso dos valores de STD-AF obtidos para amostra contendo  $0,98 \text{ mmol L}^{-1}$  de Fisostigmina e, portanto, tais valores não foram utilizados para os cálculos de  $K_d$ .

**Tabela 8.** Valores de ajuste das curvas de saturação para o sistema Fisostigmina/AChE.

Concentração Fisostigmina (mmol L <sup>-1</sup> )	Hidrogênios avaliados	STD-AF <sub>máx</sub>	$k_{sat}$ (s <sup>-1</sup> )	Tempo de religação (s)	STD-AF <sub>0</sub> STDA-F <sub>0</sub> =STD-AF, $k_{sat}$
0,26	H4	1,45 ± 0,18	0,72 ± 0,20	1,39	1,05 ± 0,27
	H6	1,57 ± 0,08	0,74 ± 0,09	1,35	1,17 ± 0,12
	H7	1,33 ± 0,19	0,83 ± 0,29	1,20	1,11 ± 0,35
	H11	0,56 ± 0,06	0,77 ± 0,21	1,30	0,44 ± 0,22
	H9	0,36 ± 0,03	1,02 ± 0,25	0,98	0,38 ± 0,25
	CONMe	0,87 ± 0,13	0,62 ± 0,19	1,61	0,54 ± 0,24
0,34	H4	1,78 ± 0,14	0,72 ± 0,13	1,39	1,28 ± 0,20
	H6	2,03 ± 0,25	0,67 ± 0,17	1,49	1,37 ± 0,30
	H7	1,50 ± 0,06	0,89 ± 0,09	1,12	1,33 ± 0,11
	H11	0,67 ± 0,02	0,87 ± 0,08	1,15	0,58 ± 0,08
	H9	0,44 ± 0,01	0,99 ± 0,10	1,01	0,44 ± 0,10
	CONMe	1,03 ± 0,04	0,74 ± 0,08	1,35	0,77 ± 0,09
0,42	H4	2,11 ± 0,11	0,70 ± 0,08	1,43	1,47 ± 0,13
	H6	2,34 ± 0,16	0,71 ± 0,11	1,41	1,67 ± 0,20
	H7	1,84 ± 0,07	0,82 ± 0,08	1,22	1,51 ± 0,11
	H11	0,78 ± 0,03	0,94 ± 0,10	1,28	0,73 ± 0,11
	H9	0,47 ± 0,01	1,21 ± 0,02	0,82	0,57 ± 0,02
	CONMe	1,20 ± 0,05	0,77 ± 0,07	1,30	0,92 ± 0,09
0,49	H4	2,20 ± 0,07	0,77 ± 0,06	1,30	1,69 ± 0,09
	H6	2,43 ± 0,08	0,75 ± 0,06	1,33	1,82 ± 0,10
	H7	1,84 ± 0,05	0,99 ± 0,07	1,01	1,83 ± 0,09
	H11	0,88 ± 0,02	0,89 ± 0,05	1,12	0,78 ± 0,06
	H9	0,49 ± 0,01	1,45 ± 0,10	0,69	0,71 ± 0,10
	CONMe	1,32 ± 0,07	0,84 ± 0,10	1,19	1,10 ± 0,12
0,57	H4	2,69 ± 0,17	0,63 ± 0,08	1,59	1,69 ± 0,19
	H6	2,82 ± 0,10	0,72 ± 0,06	1,39	2,05 ± 0,11
	H7	2,16 ± 0,14	0,83 ± 0,14	1,20	1,80 ± 0,20
	H11	0,94 ± 0,03	1,01 ± 0,08	1,06	0,95 ± 0,08
	H9	0,59 ± 0,01	1,17 ± 0,03	1,69	0,69 ± 0,03
	CONMe	1,54 ± 0,08	0,79 ± 0,11	1,27	1,21 ± 0,14
0,64	H4	2,99 ± 0,27	0,64 ± 0,12	1,56	1,91 ± 0,30
	H6	3,19 ± 0,22	0,69 ± 0,10	1,45	2,19 ± 0,24
	H7	2,54 ± 0,13	0,73 ± 0,09	1,37	1,86 ± 0,16
	H11	1,09 ± 0,01	0,96 ± 0,03	1,04	1,05 ± 0,03
	H9	0,62 ± 0,01	1,35 ± 0,04	0,74	0,84 ± 0,03
	CONMe	1,75 ± 0,07	0,76 ± 0,07	1,32	1,33 ± 0,10
0,98	H4	4,10 ± 0,30	0,67 ± 0,11	1,49	2,86 ± 0,32
	H6	4,46 ± 0,26	0,70 ± 0,09	1,43	3,13 ± 0,27
	H7	3,50 ± 0,24	0,72 ± 0,11	1,39	2,53 ± 0,26
	H11	1,58 ± 0,03	0,94 ± 0,06	1,06	1,49 ± 0,07
	H9	0,82 ± 0,02	1,45 ± 0,12	0,69	1,18 ± 0,13
	CONMe	2,60 ± 0,09	0,79 ± 0,06	1,27	2,05 ± 0,11



**Figura 40.** Isotermas de ligação de Fisostigmina com AChE, construída com valores de STD-AF em função da concentração de Fisostigmina a partir de uma amostra de 20  $\mu\text{mol L}^{-1}$  de AChE titulada com Fisostigmina. **1)** 0,75 s de saturação; **2)** 1,5 s de saturação; **3)** 2,25 s de saturação e **4)** 3 s de saturação.

Adicionalmente, a determinação de  $K_d$  utilizando tempos de saturação menores que 1 segundo podem apresentar erros significativos devido à baixa intensidade de sinal obtida nos experimentos de RMN-STD. Torna-se, portanto, indispensável a construção das isotermas utilizando os valores de  $\text{STD-AF}_0$ , nos quais o fator de religação é eliminado com a utilização da inclinação inicial de cada curva de saturação.

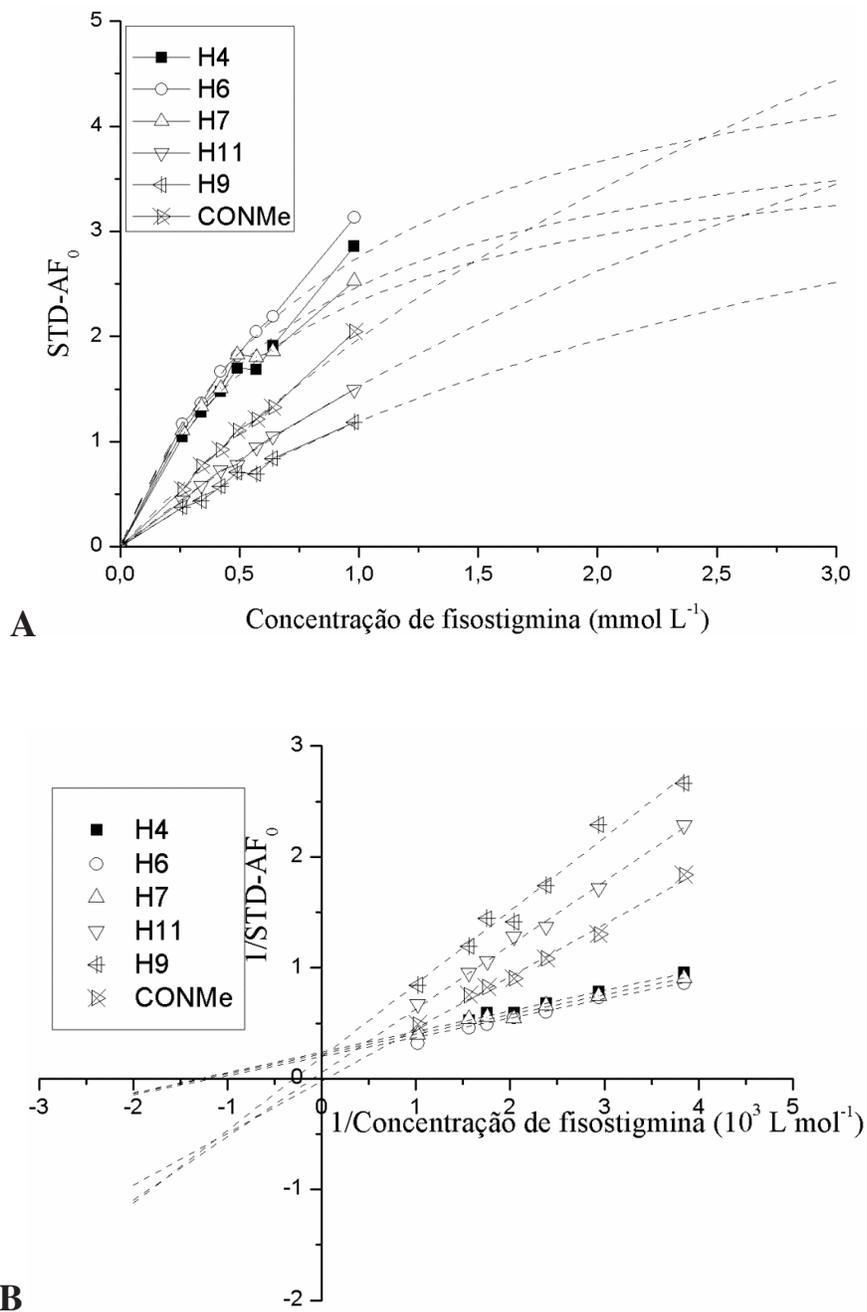
Os valores de  $K_d$  obtidos a partir da isoterma construída com valores de  $\text{STD-AF}_0$  em função da concentração de Fisostigmina (**Figura 41, Tabela 9**)

apresentaram valores semelhantes para os hidrogênios aromáticos do ligante, os quais se assemelham aos valores obtidos a partir da isoterma construída com valores de STD-AF determinados em experimentos com tempo de saturação de 0,75 segundos. Isso está completamente de acordo com o esperado visto que os tempos de religação, em sua maioria, são superiores a 0,75 segundos. Já os valores de  $K_d$  determinados a partir de isotermas cujos valores de STD-AF foram obtidos em experimentos de RMN-STD realizados com tempos de saturação maiores (1,5, 2,25 e 3 segundos) se mostraram superestimados, inferindo que a afinidade da enzima pelo alcaloide fosse menor.

**Tabela 9.** Constantes de dissociação aparentes determinadas para o sistema AChE/Fisostigmina, a 298 K, a partir de isotermas de ligação de Langmuir.

Isotermas	Tempo de saturação (s)	$K_d$ ( $\mu\text{mol L}^{-1}$ )					
		H4	H6	H7	H11	H9	CONMe
<b>1</b>	0,75	705,8	683,9	535,3	2636,9	1738,3	1956,9
<b>2</b>	1,50	777,4	795,2	1097,3	1466,8	779,4	3080,5
<b>3</b>	2,25	976,1	932,5	792,1	1460,1	832,0	2081,9
<b>4</b>	3,00	1347,0	1309,0	863,5	1495,9	1640,2	2311,3
<b>A</b>	STF-AF <sub>0</sub>	731,2	972,2	762,2	5140,6	3771,6	4936,2

Em contrapartida, os valores de  $K_d$  determinados para os hidrogênios alifáticos (metilas ligadas a átomos de nitrogênio) foram superestimados e indicam que os efeitos de relaxação quadrupolar gerados pelos núcleos de nitrogênio afetam a saturação destes hidrogênios. Esse efeito é melhor visualizado no gráfico do duplo-recíproco (**Figura 41B**) no qual todas as curvas referentes aos hidrogênios aromáticos praticamente convergem no eixo das abscissas enquanto que as curvas referentes aos hidrogênios alifáticos apresentam comportamento diferenciado.



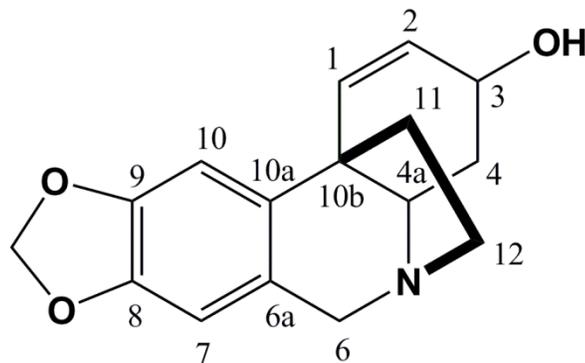
**Figura 41.** (A) Isoterma de ligação de Fisostigmina com AChE, construída com valores de  $STD-AF_0$  em função da concentração de Fisostigmina a partir de uma amostra de  $20\ \mu mol\ L^{-1}$  de AChE sendo titulada com Fisostigmina e (B) gráfico do duplo-recíproco para o mesmo sistema.

### 1.4 Elucidação estrutural da Crinina

Assim como realizado para Fisostigmina, experimentos de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$ , uni e bidimensionais (gHSQC, gCOSY e gHMBC) foram feitos nas mesmas condições experimentais para a Crinina (**Figura 42** e **Tabela 10**). Os sinais relativos aos hidrogênios 1, 2, 7, 10, e  $\text{CH}_2\text{O}_2$  foram escolhidos para as construções das isotermas.

**Tabela 10.** Atribuição dos sinais de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  para a Crinina (298 K, 400,1315 MHz em  $\text{D}_2\text{O}$ , TPSA = 0 ppm, com tampão fosfato pH 6).

Sinais	$\delta$ de $^1\text{H}$ em ppm (multiplicidade e constante de acoplamento)	$\delta$ de $^{13}\text{C}$ em ppm
1	6,57 (d, 10,1 Hz)	128,7
2	6,01 (dd, 10,1 e 4,1 Hz)	127,7
3	4,39 (m)	61,7
4	2,22 (m) e 1,97 (td, 13,5 e 4,3 Hz)	29,3
4a	3,85 (m)	64,1
6	4,77 (d, 15,9) e 4,30 (d, 15,9)	58,8
6a	-	119,6
7	6,75 (s)	107,5
8	-	146,0
9	-	147,0
10	7,07 (s)	103,8
10a	-	135,0
10b	-	44,6
11	2,33 (m) e 2,20 (m)	40,7
12	3,84 (m) e 3,36 (m)	52,5
$\text{CH}_2\text{O}_2$	5,96 e 5,95	101,6

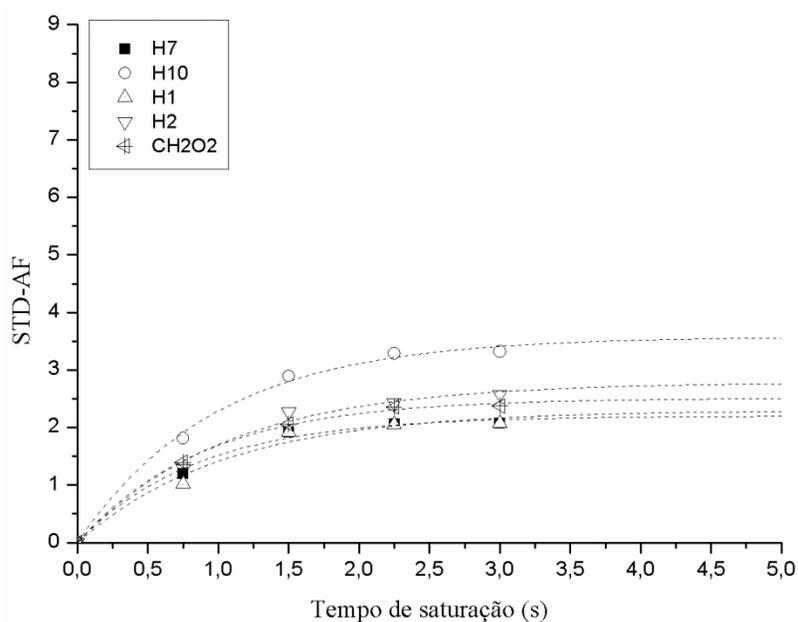


**Figura 42.** Estrutura numerada da Crinina (**12**).

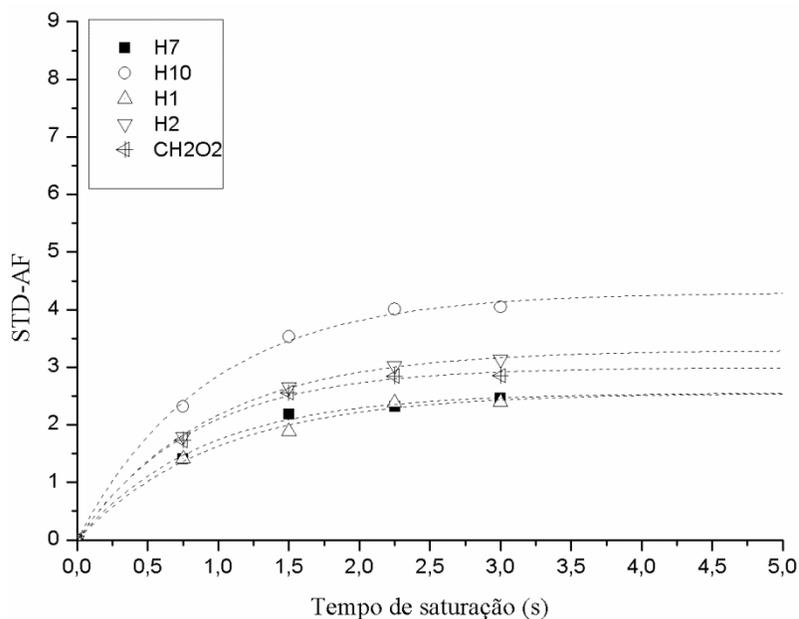
### 1.5 Construção das curvas de saturação e isotermas de ligação para o sistema Crinina/AChE

As curvas de saturação da Crinina foram construídas com quatro tempos de saturação diferentes (0,75, 1,5, 2,25 e 3 segundos) para seis concentrações diferentes do alcalóide (0,29, 0,38, 0,46, 0,55, 0,63, e 0,72 mmol L<sup>-1</sup>) até que os platôs das curvas fossem atingidos (**Figuras 43 a 48**). Foi possível observar que com exceção de H10, todos os demais hidrogênios analisados tiveram o mesmo comportamento com relação a saturação e mesmo em concentrações mais altas (0,98 mmol L<sup>-1</sup>) o platô foi atingido indicando que o máximo de saturação foi alcançado. Os valores de tempos de religação, STD-AF<sub>máx</sub>,  $k_{sat}$  e STD-AF<sub>0</sub> estão apresentados na **Tabela 11**. Os valores de STD-AF<sub>máx</sub> para a interação Crinina/AChE são maiores quando comparados com os valores obtidos para Fisostigmina. Isso sugere que o tempo de residência da Crinina no sítio ativo de AChE é menor do que o tempo de residência da Fisostigmina no mesmo sítio ativo. Dessa forma, num mesmo tempo de experimento mais moléculas de Crinina conseguem acessar o sítio ativo da enzima, e portanto, mais moléculas recebem saturação

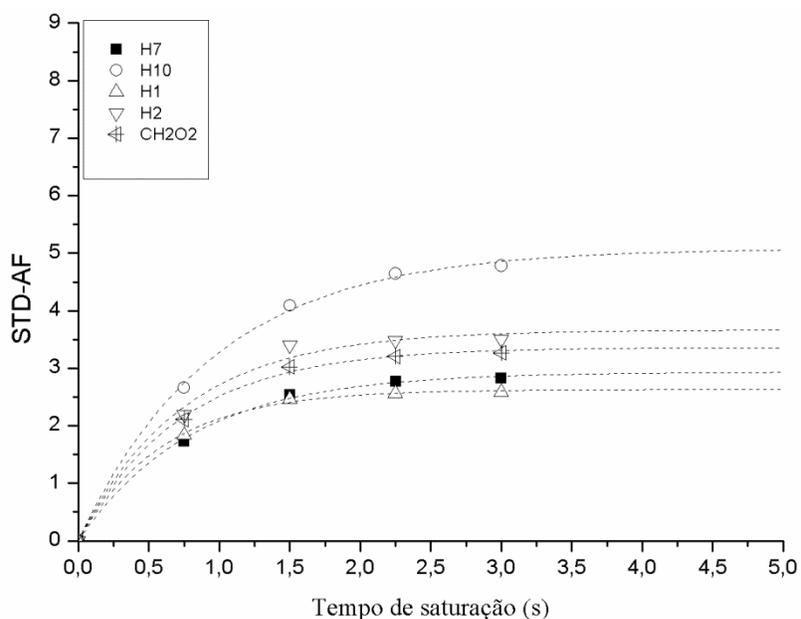
proveniente de AChE. Outro parâmetro que reforça esta suposição é a velocidade com que este platô é alcançado, a qual é definida como constante de saturação  $k_{sat}$ . Os valores de  $k_{sat}$  observados na **Tabela 11** são menores do que os observados na **Tabela 8**. Isto significa que a Crinina leva menos tempo para se religar ao sítio ativo da AChE. A alta velocidade de religação implica em baixa afinidade da enzima pelo inibidor, e conseqüentemente, maiores valores de  $K_d$ .



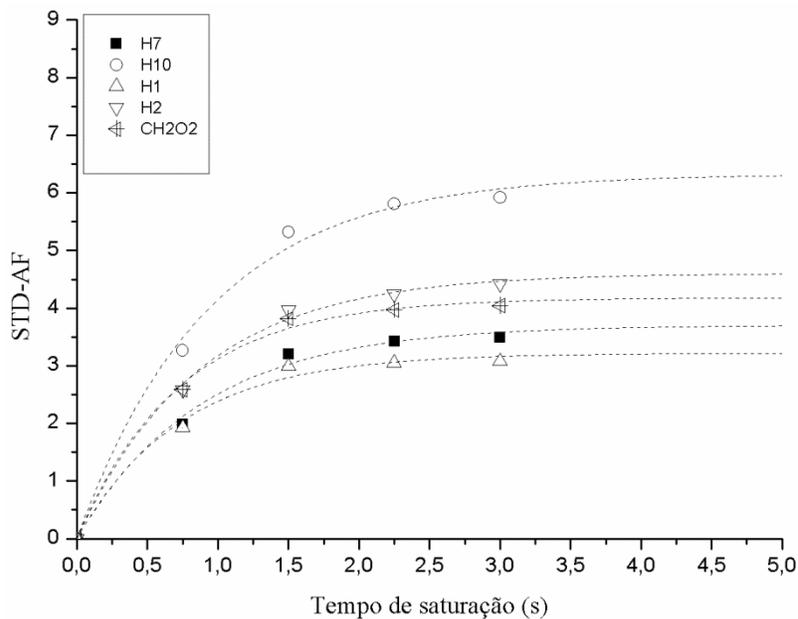
**Figura 43.** Valores de STD-AF em função do tempo de saturação para amostras contendo  $20 \mu\text{mol L}^{-1}$  de AChE e  $0,29 \text{ mmol L}^{-1}$  de Crinina. Cada curva foi construída para um dos átomos de hidrogênio selecionados da Crinina.



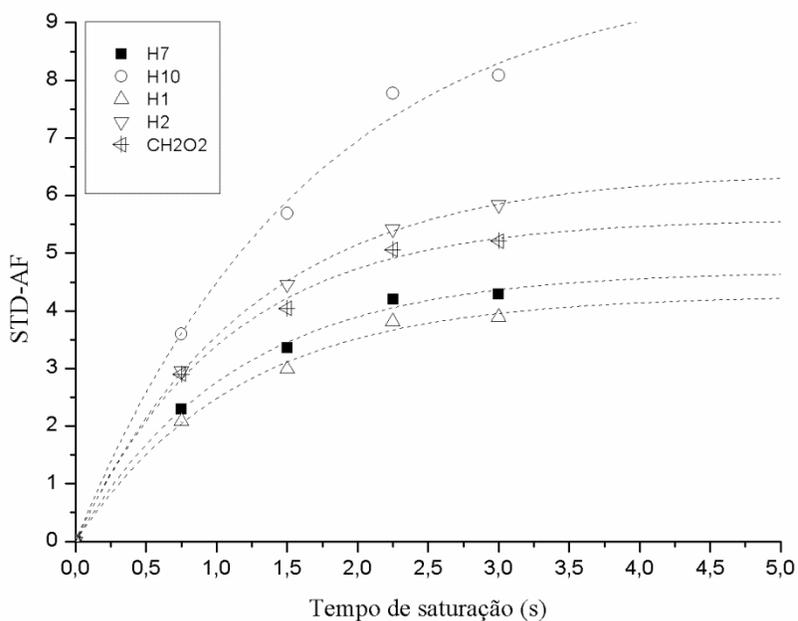
**Figura 44.** Valores de STD-AF em função do tempo de saturação para amostras contendo  $20 \mu\text{mol L}^{-1}$  de AChE e  $0,38 \text{ mmol L}^{-1}$  de Crinina. Cada curva foi construída para um dos átomos de hidrogênio selecionados da Crinina.



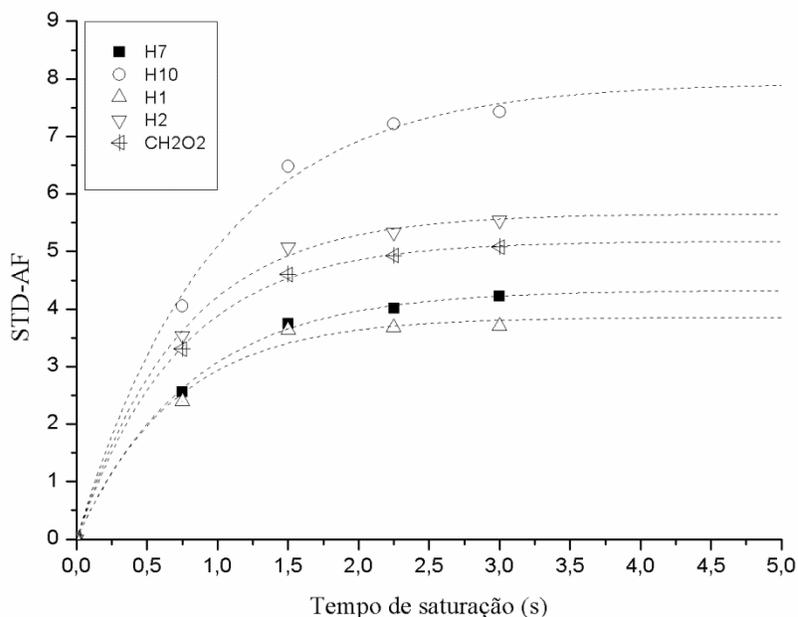
**Figura 45.** Valores de STD-AF em função do tempo de saturação para amostras contendo  $20 \mu\text{mol L}^{-1}$  de AChE e  $0,46 \text{ mmol L}^{-1}$  de Crinina. Cada curva foi construída para um dos átomos de hidrogênio selecionados da Crinina.



**Figura 46.** Valores de STD-AF em função do tempo de saturação para amostras contendo  $20 \mu\text{mol L}^{-1}$  de AChE e  $0,55 \text{ mmol L}^{-1}$  de Crinina. Cada curva foi construída para um dos átomos de hidrogênio selecionados da Crinina.



**Figura 47.** Valores de STD-AF em função do tempo de saturação para amostras contendo  $20 \mu\text{mol L}^{-1}$  de AChE e  $0,63 \text{ mmol L}^{-1}$  de Crinina. Cada curva foi construída para um dos átomos de hidrogênio selecionados da Crinina.

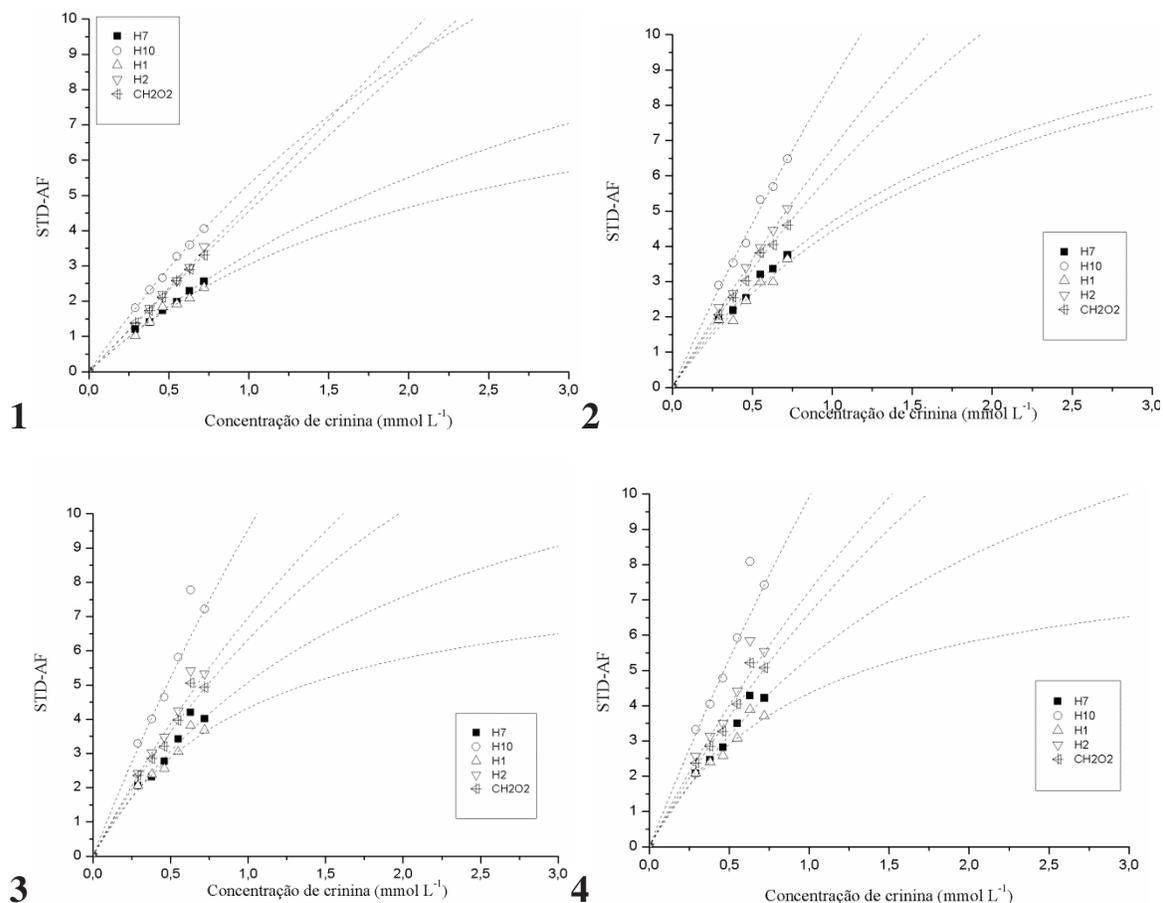


**Figura 48.** Valores de STD-AF em função do tempo de saturação para amostras contendo  $20 \mu\text{mol L}^{-1}$  de AChE e  $0,72 \text{ mmol L}^{-1}$  de Crinina. Cada curva foi construída para um dos átomos de hidrogênio selecionados da Crinina.

As isotermas de Langmuir foram construídas utilizando os valores de STD-AF obtidos nos experimentos de RMN-STD (**Figura 49**) e também utilizando os valores de inclinações iniciais das curvas de saturação,  $\text{STD-AF}_0$ , obtidos nas curvas de saturação citadas acima (**Figura 50**). É possível perceber que embora as curvas de saturação tenham alcançado os platôs e que a transferência de saturação de AChE para Crinina tenha sido efetiva, as concentrações selecionadas não foram altas suficientes para que as isotermas alcançassem o platô. Em contrapartida, a concentração de  $0,72 \text{ mmol L}^{-1}$  já está no limite para a Crinina neste sistema de solventes. A partir desta concentração o alcalóide começa a precipitar e a concentração real no meio passa a ser desconhecida, inviabilizando a realização de experimentos de titulação.

**Tabela 11.** Valores de ajuste das curvas de saturação para o sistema Crinina/AChE

Concentração Crinina (mmol L <sup>-1</sup> )	<sup>1</sup> H avaliados	STD-AF <sub>máx</sub>	$k_{sat}$ (s <sup>-1</sup> )	Tempo de religação (s)	STD-AF <sub>0</sub> STDA-F <sub>0</sub> =STD- AF, $k_{sat}$
0,29	H7	2,20 ± 0,09	1,16 ± 0,16	0,86	2,56 ± 0,18
	H10	3,58 ± 0,14	1,02 ± 0,11	0,98	3,64 ± 0,18
	H1	2,30 ± 0,21	0,95 ± 0,24	1,05	2,19 ± 0,31
	H2	2,78 ± 0,17	0,94 ± 0,16	1,06	2,63 ± 0,24
	CH <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	2,51 ± 0,05	1,12 ± 0,08	0,90	2,80 ± 0,09
0,38	H7	2,55 ± 0,08	1,14 ± 0,11	0,88	2,91 ± 0,14
	H10	4,30 ± 0,11	1,09 ± 0,09	0,92	4,68 ± 0,14
	H1	2,55 ± 0,12	1,02 ± 0,13	0,98	2,59 ± 0,18
	H2	3,30 ± 0,04	1,07 ± 0,04	0,93	3,54 ± 0,05
	CH <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	3,00 ± 0,07	1,20 ± 0,09	0,83	3,61 ± 0,11
0,46	H7	2,93 ± 0,05	1,24 ± 0,07	0,81	3,64 ± 0,09
	H10	5,08 ± 0,11	1,04 ± 0,07	0,97	5,26 ± 0,13
	H1	2,63 ± 0,03	1,65 ± 0,09	0,61	4,34 ± 0,09
	H2	3,66 ± 0,16	1,35 ± 0,21	0,74	4,94 ± 0,26
	CH <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	3,36 ± 0,06	1,37 ± 0,09	0,73	4,62 ± 0,11
0,55	H7	3,70 ± 0,16	1,13 ± 0,15	0,88	4,19 ± 0,22
	H10	6,33 ± 0,27	1,07 ± 0,14	0,94	6,75 ± 0,31
	H1	3,22 ± 0,14	1,35 ± 0,21	0,74	4,35 ± 0,25
	H2	4,60 ± 0,13	1,17 ± 0,11	0,85	5,39 ± 0,17
	CH <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	4,18 ± 0,12	1,37 ± 0,14	0,73	5,74 ± 0,18
0,63	H7	4,69 ± 0,17	0,89 ± 0,09	1,13	4,16 ± 0,20
	H10	9,91 ± 0,83	0,60 ± 0,10	1,65	5,99 ± 0,84
	H1	4,27 ± 0,19	0,87 ± 0,10	1,15	3,71 ± 0,22
	H2	6,41 ± 0,08	0,81 ± 0,02	1,23	5,21 ± 0,08
	CH <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	5,60 ± 0,21	0,93 ± 0,09	1,07	5,22 ± 0,23
0,72	H7	4,33 ± 0,07	1,24 ± 0,07	0,81	5,36 ± 0,10
	H10	7,93 ± 0,27	1,03 ± 0,10	0,97	8,16 ± 0,29
	H1	3,86 ± 0,16	1,43 ± 0,22	0,70	5,50 ± 0,27
	H2	5,66 ± 0,10	1,36 ± 0,09	0,73	7,70 ± 0,14
	CH <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	5,18 ± 0,05	1,38 ± 0,05	0,72	7,17 ± 0,07

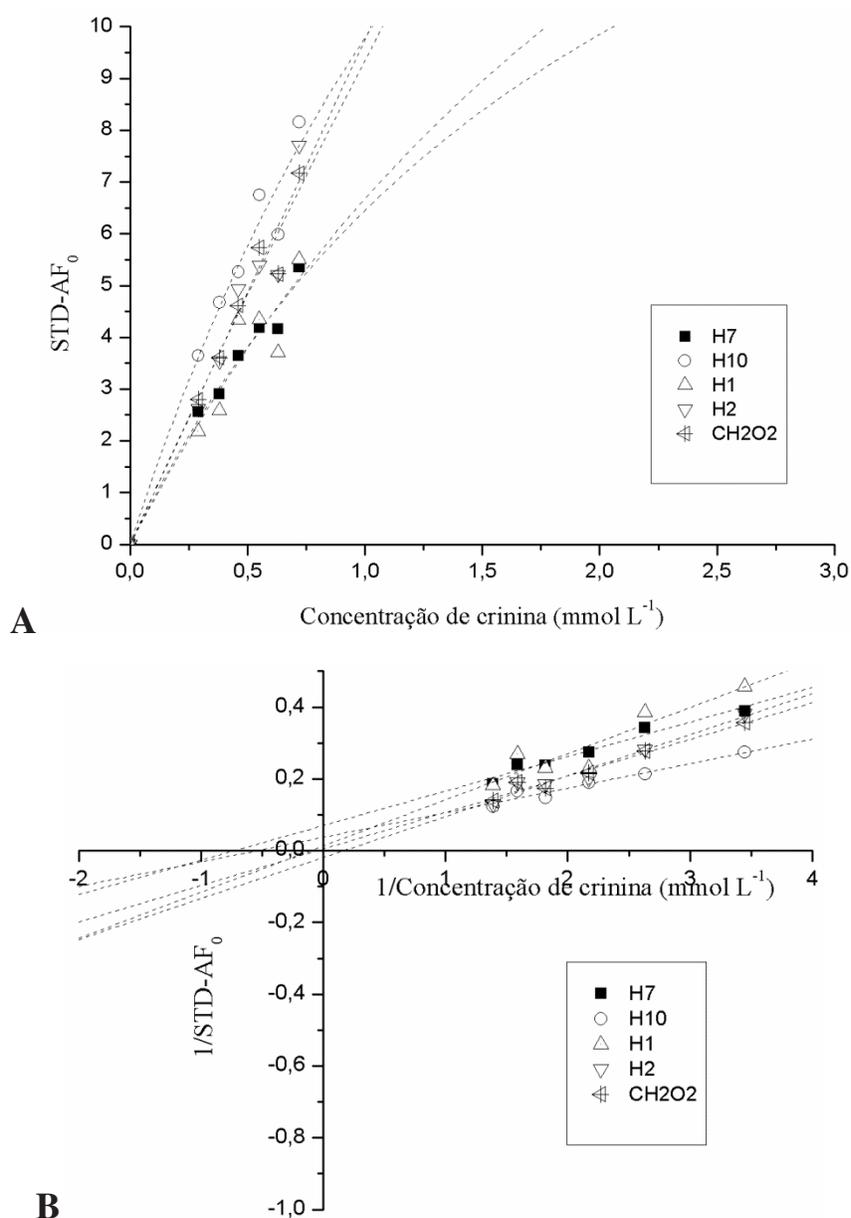


**Figura 49.** Isotherma de ligação de Fisostigmina com AChE, construída com valores de STD-AF em função da concentração de Fisostigmina a partir de uma amostra de  $20 \mu\text{mol L}^{-1}$  de AChE titulada com Crinina. **1)** 0,75 s de saturação; **2)** 1,5 s de saturação; **3)** 2,25 s de saturação e **4)** 3 s de saturação.

Como consequência da má definição dos pontos nas isothermas, tem-se a obtenção de constantes de dissociação aparentes,  $K_d$ , com um erro embutido devido às imprecisões nos ajustes das curvas. Os valores de  $K_d$  determinados para a associação entre Crinina e AChE estão apresentados na **Tabela 12**. Os valores exorbitantes determinados para a associação entre Fisostigmina e AChE não são encontrados para o sistema em questão. Isso reforça a hipótese de que o efeito quadrupolar elétrico dos átomos de

nitrogênio da molécula de Fisostigmina atrapalhe no processo de transferência de saturação.

Os valores de  $K_d$  observados para o sistema Crinina AChE são maiores do que os observados para Fisostigmina AChE, o que corrobora com os resultados de  $STD-AF_{max}$  e  $k_{sat}$ .



**Figura 50.** (A) Isotherma de ligação de Crinina com AChE, construída com valores de  $STD-AF_0$  em função da concentração de Crinina a partir de uma amostra de  $20\ \mu mol L^{-1}$

de AChE sendo titulada com Crinina e **(B)** gráfico do duplo-recíproco para o mesmo sistema.

**Tabela 12.** Constantes de dissociação aparentes determinadas para o sistema AChE/Crinina, a 298 K, a partir de isotermas de ligação de Langmuir.

Isotermas	Tempo de saturação (s)	$K_d$ ( $\mu\text{mol L}^{-1}$ )				
		H7	H10	H1	H2	CH2O2
<b>1</b>	0,75	3749,9	4045,8	2301,9	-	-
<b>2</b>	1,50	1883,0	6467,9	1987,4	6583,7	4454,7
<b>3</b>	2,25	1937,3	4853,9	1007,2	3971,1	2945,97
<b>4</b>	3,00	2307,2	6371,7	999,1	4205,9	3910,9
<b>A</b>	STF-AF <sub>0</sub>	2227,9	2293,8	3208,7	-	-

---

## 2 Conclusão

Através da utilização da Isoterma de ligação de Langmuir construída com as inclinações das curvas de saturação (STD-AF<sub>0</sub>) em função da concentração de ligante foi possível avaliar a afinidade de AChE por Fisostigmina (**11**) e Crinina (**12**), obtendo-se valores de constantes de dissociação aparentes ( $K_d$  ficou definido entre os valores de 731 e 972  $\mu\text{mol L}^{-1}$  para Fisostigmina e entre 2227,9 e 3208,7  $\mu\text{mol L}^{-1}$  para Crinina). Este resultado indica que a AChE tem maior afinidade pela Fisostigmina do que pela Crinina.

Notou-se que os tempos de religação dos alcalóides no sítio ativo da AChE, durante o experimento de STD, são relativamente curtos, o que justifica a metodologia escolhida. A escolha dos hidrogênios da Fisostigmina a serem utilizados para a obtenção de  $K_d$  foi apropriada. Isso fica evidente quando o gráfico de duplo-recíproco é avaliado. As curvas relativas aos hidrogênios aromáticos convergem sobre o eixo das abscissas, indicando que os valores de  $K_d$  para as 3 curvas são muito próximos, o que não acontece nas curvas relativas aos hidrogênios alifáticos. No caso da Crinina, nenhuma variação exorbitante de valor de  $K_d$  foi observada, contudo os valores de  $k_{\text{sat}}$  mostraram que este sistema sofre mais com os processos de religação dos inibidores no sítio ativo da enzima e a utilização das inclinações iniciais das curvas de saturação se faz necessário para obter maior confiabilidade nos valores de constantes obtidos. Adicionalmente, os valores de  $K_d$  obtidos para os dois alcalóides permitiram observar que a afinidade de AChE é maior com a. Apesar da metodologia escolhida ter fornecido os valores de  $K_d$  para a inibição de AChE, entende-se que compostos mais solúveis são desejáveis para a aplicação desta metodologia de forma que as isotermas de Langmuir

fiquem melhor definidas e conseqüentemente, diminuem-se os erros nas determinações de constantes.

---

---

*PARTE EXPERIMENTAL*

---

---



## 1 Parte experimental do Capítulo I

### 1.1 Preparação de amostras

Todas as amostras utilizadas para os estudos de encapsulação neste capítulo foram preparadas com substâncias comerciais, exceto pela Dapsona e SBE- $\beta$ -CD, que são provenientes do Núcleo de Tecnologia Farmacêutica da Universidade Federal do Piauí. Os sais  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  e  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , utilizados para preparação do tampão, são provenientes da marca *Merck*<sup>®</sup>, enquanto que o  $\beta$ -CD e o EPC são provenientes da marca *Sigma-Aldrich*<sup>®</sup>. O solvente deuterado ( $\text{D}_2\text{O}$ ) foi adquirido da Cambridge Isotope Laboratories, Inc<sup>®</sup>.

#### 1.1.1 Preparação de Tampão fosfato

O tampão fosfato foi preparado a partir de duas soluções padrões de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  e  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  previamente preparadas em  $\text{D}_2\text{O}$  com 0,05% de  $\text{NaN}_3$  para evitar qualquer contaminação do tampão. Os pHs das soluções estoques foram confirmados com pHmetro Quimis<sup>®</sup>, equipado com um eletrodo de Ag/AgCl, previamente calibrado. Para atingir pH = 7,0, o tampão fosfato foi preparado a partir da mistura das duas soluções estoques de maneira que tivesse 39 mmol L<sup>-1</sup> de  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  e 61 mmol L<sup>-1</sup> de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , totalizando 100 mmol L<sup>-1</sup> de sais. Este tampão foi utilizado para a preparação de todas as amostras que constam neste capítulo.

### 1.1.2 Preparação dos lipossomas de 400 nm

A preparação dos lipossomas teve início com a obtenção de um filme de fosfatidilcolina de ovo (EPC) a partir da evaporação de uma solução estoque previamente preparada em  $\text{CDCl}_3$ . Após evaporação total do solvente, o filme de EPC é deixado sob vácuo durante 2 horas para eliminar traços do solvente. Este filme foi então ressuspendido em tampão fosfato ( $100 \text{ mmol L}^{-1}$ ,  $\text{pH} = 7,0$ , preparado em  $\text{D}_2\text{O}$ ), resultando numa solução com concentração final de EPC de  $5 \text{ mmol L}^{-1}$ . Este processo produziu vesículas multilamelares grandes (MLV). Para obtenção de lipossomas de 400 nm as vesículas grandes foram extrusadas numa microextrusora manual equipada com membrana de policarbonato da marca Nucleopore®, cujo poro mede 400 nm de diâmetro. A extrusão foi realizada em 12 ciclos para garantir que o máximo de vesículas de 400 nm fossem formadas.

### 1.1.3 O experimento de Job

Para realização do experimento de Job para determinação de estequiometria do complexo Dap/SBE- $\beta$ -CD foram preparadas soluções estoques de Dap e SBE- $\beta$ -CD a  $2 \text{ mmol L}^{-1}$  ( $\text{D}_2\text{O}$ ,  $100 \text{ mmol L}^{-1}$  de tampão fosfato  $\text{pH} = 7,0$ , 10% de acetona- $d_6$  e TPSA como referência interna a 0 ppm). A partir das soluções estoques foram preparadas cinco soluções cujas concentrações de Dap e SBE- $\beta$ -CD variaram, mas a concentração total da solução permaneceu em  $2 \text{ mmol L}^{-1}$ . As proporções entre os componentes da mistura estão apresentados na **Tabela 13**. O mesmo procedimento de preparação de amostras foi realizado para o sistema Dap/ $\beta$ -CD.

**Tabela 13.** Concentrações de Dapsona (Dap) e Ciclodextrinas (SBE-  $\beta$ -CD ou  $\beta$ -CD) em amostras utilizadas para realização do experimento de Job.

Solução	Concentração Dap (mmol L <sup>-1</sup> )	Concentração da ciclodextrina (mmol L <sup>-1</sup> )
1	0,4	1,6
2	0,8	1,2
3	1,0	1,0
4	1,2	0,8
5	1,6	0,4

#### *1.1.4 Preparação do complexo Dap/SBE- $\beta$ -CD*

Todos os experimentos de caracterização do complexo Dap/SBE- $\beta$ -CD foram realizados a partir de amostra preparada em D<sub>2</sub>O, 100 mmol L<sup>-1</sup> de tampão fosfato pH = 7,0, com concentrações equimolares de Dapsona e SBE- $\beta$ -CD (1 mmol L<sup>-1</sup>). A amostra foi mantida sob agitação leve durante 12 horas para que o equilíbrio fosse atingido.

#### *1.1.5 Preparação do complexo Dap/ $\beta$ -CD*

O complexo Dap/ $\beta$ -CD foi preparado exatamente da mesma forma que o complexo Dap/SBE- $\beta$ -CD (D<sub>2</sub>O, 100 mmol L<sup>-1</sup> de tampão fosfato pH = 7,0), também com concentrações equimolares de Dapsona e  $\beta$ -CD (1 mmol L<sup>-1</sup>). A fim de atingir o equilíbrio termodinâmico a amostra foi mantida sob agitação leve durante 12 horas.

#### *1.1.6 Preparação do complexo Dap/EPC*

O complexo Dap/EPC foi preparado a partir da solubilização de Dapsona em 700  $\mu\text{L}$  de solução de lipossomas de 400 nm previamente preparada (5  $\text{mmol L}^{-1}$  de lipídeos), totalizando 1  $\text{mmol L}^{-1}$  de Dapsona em solução. Essa solução foi utilizada para a caracterização do complexo Dap/EPC. A amostra foi mantida em repouso por 12 horas para que o equilíbrio fosse atingido.

### *1.1.7 Preparação do complexo Dap/ $\beta$ -CD /EPC*

O complexo ternário Dap/ $\beta$ -CD/EPC foi preparado de duas formas diferentes com a finalidade de garantir que o equilíbrio termodinâmico fosse atingido. A primeira forma de preparação consta da solubilização de  $\beta$ -CD em uma solução contendo Dap/EPC previamente preparada. A outra forma de preparação consta da evaporação do complexo Dap/ $\beta$ -CD e posterior solubilização em solução de lipossomas de 400 nm. As soluções foram mantidas em repouso por 12 horas e constatou-se que ambas haviam atingido o equilíbrio. As concentrações finais destas soluções foram: 5  $\text{mmol L}^{-1}$  de EPC, 1  $\text{mmol L}^{-1}$  de  $\beta$ -CD e 1  $\text{mmol L}^{-1}$  de Dap.

## *1.2 Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear*

Todos os experimentos deste capítulo foram realizados em espectrômetro de RMN Bruker Avance400, operando a 9,4 T (frequência para o núcleo  $^1\text{H}$  de 400,1315 MHz), equipado com sonda de 5 mm para detecção inversa, com gradiente de campo pulsado (PH TBI 600S3 H/C-BB-D-05 Z). O núcleo de Deutério (D) foi utilizado como referência para o *lock*

(trava do campo) e para o ajuste do *Shimming* (homogeneidade do campo magnético local). Todos os experimentos foram realizados a 25°C.

### 1.2.1 Os experimentos de RMN de $^1\text{H}$

Os espectros de RMN de  $^1\text{H}$  foram adquiridos com pulsos de 30°. O pulso de 90° foi calibrado para cada amostra utilizando o comando *pulsecal sn*. As condições experimentais estão apresentadas na **Tabela 14**. Os *FIDs* foram processados utilizando o *software* Topspin 3.1 da Bruker e os gráficos de Job foram construídos com auxílio do *software* OriginPro 8.

**Tabela 14.** Condições experimentais de obtenção dos espectros de RMN de  $^1\text{H}$ .

Parâmetros	Dap/ $\beta$ -CD	Dap/SBE- $\beta$ -CD	Dap/EPC	Dap/ $\beta$ -CD/EPC
Janela espectral (sw)	4 kHz	4 kHz	8 kHz	8 kHz
Pontos de aquisição (td)	16 k	8 k	16 k	32 k
Pontos de processamento (si)	32 k	32 k	32 k	32 k
Tempo de aquisição (aq)	1,67 s	0,93 s	1 s	2 s
Tempo de espera (d1)	3 s	3 s	3 s	2 s
Numero de transientes (ns)	32	32	256	64
lb	0,5 Hz	0,5 Hz	0,5 Hz	0,3 Hz
Resolução espectral	0,53 Hz	0,30 Hz	0,50 Hz	0,25 Hz

### 1.2.2 O experimento de ROESY 1D

Os experimentos de ROESY 1D foram obtidos a partir da sequência selrogp.2 disponível nos equipamentos de RMN Bruker. O pulso seletivo de 180° foi calibrado para cada experimento sendo que a forma de pulso

utilizada foi Gaus1\_180r.1000. Todas as calibrações foram testadas com a sequência selgpc para garantir que a seletividade desejada tivesse sido alcançada. A trava de *spin* foi calibrada para cada um dos complexos estudados. Os experimentos foram realizados com irradiação seletiva dos hidrogênios internos da  $\beta$ -CD (H3, 3,90 ppm e H5,3,65 ppm) e no caso do complexo com SBE- $\beta$ -CD os hidrogênios da Dapsona foram irradiados (Ha, 7,61 ppm e Hb 6,82 ppm). As condições experimentais estão apresentadas na **Tabela 15**.

**Tabela 15.** Condições experimentais de obtenção dos espectros de ROESY 1D.

Parâmetros	Dap/ $\beta$ -CD	Dap/ $\beta$ -CD/EPC	Dap/SBE- $\beta$ -CD
Janela espectral (sw)	4 kHz	8 kHz	8 kHz
Pontos de aquisição (td)	16 k	16 k	32 k
Pontos de processamento (si)	32 k	32 k	32 k
Tempo de aquisição (aq)	1,71 s	1 s	2 s
Tempo de espera (d1)	2 s	5 s	4 s
Numero de transientes (ns)	1024	2048	2048
lb	4 Hz	3 Hz	4 Hz
Resolução espectral	0,29 Hz	0,50 Hz	0,24 Hz
Trava de <i>spin</i>	500 ms	500 ms	300 ms

### 1.2.3 O experimento de DOSY

Os experimentos de DOSY foram obtidos através da sequência de pulsos Oneshot. As amplitudes dos pulsos de gradiente foram definidas de forma que atenuassem cerca de 80 a 90% do sinal de RMN de  $^1\text{H}$  para os gradientes de maior amplitude. Em todos os experimentos as amplitudes dos gradientes variaram de  $0,017 \text{ T m}^{-1}$  a  $0,272 \text{ T m}^{-1}$ . Foram executados 16

experimentos com amplitudes de pulso de gradientes diferentes para cada transiente. O processamento foi realizado pelo programa DOSYtoolbox.<sup>98</sup> Em todos os processamentos foram aplicadas correções de linha de base de segunda ordem. Os experimentos de medidas de coeficientes de difusão não foram realizados em duplicata e, portanto, não há desvio padrão para ser apresentando. Os erros listados junto com as medidas de coeficientes de difusão são decorrentes do ajuste matemático das curvas de decaimento exponencial provenientes da difusão molecular de cada espécie. Os coeficientes de difusão apresentados correspondem à média aritmética dos valores de coeficientes obtidos para cada  $^1\text{H}$  de uma mesma espécie. As condições experimentais estão apresentadas na **Tabela 16** para todos os complexos estudados.

---

98 Nilsson, M. *J. Magn. Reson.* **2009**, 200, 296-302.

**Tabela 16.** Condições experimentais de obtenção dos espectros de DOSY.

Parâmetros	Dap/ $\beta$ -CD	Dap/ $\beta$ -CD/EPC	Dap/SBE- $\beta$ -CD	Dap/EPC
Janela espectral (sw)	4 kHz	8 kHz	4 kHz	8 kHz
Pontos de aquisição (td)	32 k	32 k	16 k	32 k
Pontos de processamento (si)	32 k	32 k	16 k	32 k
Tempo de aquisição (aq)	3,4 s	2 s	2 s	2 s
Tempo de espera (d1)	5 s	5 s	5 s	5 s
Numero de transientes (ns)	8	160	8	128
Tempo de difusão (D20)	100 ms	60 ms	80 ms	60 ms
D16	200 $\mu$ s	200 $\mu$ s	200 $\mu$ s	200 $\mu$ s
P30	1500 $\mu$ s	1500 $\mu$ s	1500 $\mu$ s	1500 $\mu$ s
Pontos processamento na dimensão da difusão	256	256	256	256

#### 1.2.4 O experimento de STD

Os experimentos de STD *on-resonance* foram realizados com irradiação seletiva dos sinais de lipossoma em -0,5 ppm. Os experimentos *off-resonance* foram realizados com irradiação seletiva fora da janela espectral, em 30 ppm. A sequencia utilizada para obtenção destes espectros foi a `stdiffgp.19` que suprime o sinal residual do HDO com WATERGATE. Os espectros foram processados com o comando *splitser* para separa os FIDs dos experimentos *on* e *off-resonance*. Em seguida estes FIDs foram subtraídos dando origem ao espectro de diferença de transferência de saturação. As fases PHC0 e PHC1 foram ajustadas para o espectro de

referência (*off-resonance*) e aplicadas aos demais espectros. As intensidades dos picos deste espectro foram comparadas as intensidades do espectro *off-resonance* para calcular a quantidade de nOe observado. Os detalhes experimentais estão apresentados na **Tabela 17**.

**Tabela 17.** Condições experimentais de obtenção dos espectros de STD.

Parâmetros	Dap/EPC e Dap/ $\beta$ -CD/EPC
Janela espectral (sw)	8 kHz
Pontos de aquisição (td)	16 k
Pontos de processamento (si)	32 k
Tempo de aquisição (aq)	1 s
Tempo de espera (d1)	3 s
Numero de Transientes (ns)	1024
lb	3 Hz
Tempo de saturação	2 s
Trava de <i>spin</i>	50 ms
Pulso seletivo de saturação	Gauss, 50 ms, 0,1 mW

## 2 Parte experimental do Capítulo II

### 2.1 Preparação de amostras

Todas as amostras utilizadas para os estudos de inibição de AChE neste capítulo foram preparadas com enzima e Fisostigmina comerciais provenientes da marca *Sigma-Aldrich*<sup>®</sup>. Os sais Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> e NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, utilizados para preparação do tampão, são provenientes da marca *Merck*<sup>®</sup>, enquanto que o solvente deuterado (D<sub>2</sub>O) foi adquirido da Cambridge Isotope Laboratories, Inc<sup>®</sup>. A Crinina foi isolada de uma planta híbrida da

família Amarilydacea pela Dra. Maria do Socorro Souza da Silva, durante a realização de sua tese de doutorado orientada pela Profa. Dra. Raquel Marques Braga.

## 2.2 Titulação de AChE com Fisostigmina

A AChE foi preparada numa concentração inicial de  $21,3 \mu\text{mol L}^{-1}$ , em solução tampão fosfato  $100 \text{ mmol L}^{-1}$  preparada em  $\text{D}_2\text{O}$  e  $\text{pH} = 6,0$ . Esta amostra foi titulada com uma solução padrão de Fisostigmina preparada em  $\text{DMSO-}d_6$  numa concentração de  $6 \text{ mmol L}^{-1}$ . As concentrações finais de AChE e Fisostigmina estão apresentadas na **Tabela 18**.

A amostra para caracterização estrutural da Fisostigmina foi preparada no mesmo tampão que a enzima, contendo 15% de  $\text{DMSO-}d_6$  para que o alcaloide pudesse ser solubilizado.

**Tabela 18.** Titulação de AChE com Fisostigmina.

Amostras	Concentração de AChE ( $\mu\text{mol L}^{-1}$ )	Concentração de Fisostigmina ( $\text{mmol L}^{-1}$ )
1	20,4	0,26
2	20,1	0,34
3	19,8	0,42
4	19,6	0,49
5	19,3	0,57
6	19,0	0,64
7	17,9	0,98

### 2.3 Titulação de AChE com Crinina

A AChE foi preparada numa concentração inicial de  $21,3 \mu\text{mol L}^{-1}$ , em solução tampão fosfato  $100 \text{ mmol L}^{-1}$  preparada em  $\text{D}_2\text{O}$  e  $\text{pH} = 6,0$ . Esta amostra foi titulada com uma solução padrão de Crinina preparada em  $\text{DMSO-}d_6$  numa concentração de  $6,7 \text{ mmol L}^{-1}$ . As concentrações finais de AChE e Crinina estão apresentadas na **Tabela 19**.

A amostra para caracterização estrutural da Crinina foi preparada no mesmo tampão que a enzima, contendo 15% de  $\text{DMSO-}d_6$  para que o alcaloide pudesse ser solubilizado.

**Tabela 19.** Titulação de AChE com Crinina.

Amostras	Concentração de AChE ( $\mu\text{mol L}^{-1}$ )	Concentração de Crinina ( $\text{mmol L}^{-1}$ )
1	20,4	0,29
2	20,1	0,38
3	19,8	0,46
4	19,6	0,55
5	19,3	0,63
6	19,0	0,72

### 2.4 Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear

Os experimentos de STD deste capítulo foram realizados em espectrômetro de RMN Bruker Avance400, operando a 9,4 T (frequência para o núcleo  $^1\text{H}$  de 400,1315 MHz), equipado com sonda de 5 mm para detecção indireta, com gradiente de campo pulsado (PH TBI 600S3 H/C-BB-D-05 Z). O núcleo de Deutério (D) foi utilizado como referência para o *lock* (trava do campo) e para o ajuste do *Shimming* (homogeneidade do campo magnético).

Os experimentos de caracterização estrutural da Fisostigmina e da Crinina foram realizados em espectrômetro de RMN Bruker Avance600, operando a 14,1 T (frequência para o núcleo  $^1\text{H}$  de 600,1728 MHz), equipado com sonda de 5 mm para detecção indireta, com gradiente de campo pulsado (PH TBI 600S3 H/C-BB-D-05 Z). Todos os experimentos foram realizados a 25°C.

#### 2.4.1 O experimento de STD

Os experimentos de STD *on-resonance* foram realizados com irradiação seletiva dos sinais da proteína em -0,5 ppm. Os experimentos *off-resonance* foram realizados com irradiação seletiva fora da janela espectral, em 30 ppm. A sequência utilizada para obtenção destes espectros foi a *stddiffesgp*.<sup>3</sup> que suprime o sinal residual do HDO por *excitation sculpting*. Os espectros foram processados com o comando *splitser* para separar os FIDs dos experimentos *on* e *off-resonance*. Em seguida estes FIDs foram subtraídos dando origem ao espectro de diferença de transferência de saturação. As fases PHC0 e PHC1 foram ajustadas para o espectro de referência (*off-resonance*) e aplicadas aos demais espectros. As intensidades dos picos deste espectro foram comparadas as intensidades do espectro *off-resonance* para calcular a quantidade de nOe observado. Os detalhes experimentais estão apresentados na **Tabela 20**.

**Tabela 20.** Condições experimentais de obtenção dos espectros de STD.

Parâmetros	Dap/EPC e Dap/ $\beta$ -CD/EPC
Janela espectral (sw)	8 kHz
Pontos de aquisição (td)	16 k
Pontos de processamento	32 k
Tempo de aquisição (aq)	1,14 s
Tempo de espera (d1)	3 s
Numero de Transientes (ns)	2048
lb	3 Hz
Tempo de saturação	Variável (0,75, 1,50, 2,25 e 3,00 s)
Trava de <i>spin</i>	50 ms
Pulso seletivo de saturação	Gaus1.1000, 50 ms, 0,1 mW
Pulso seletivo <i>excitation sculpting</i>	Squa100.1000, 2 ms, 28,63 W

## 2.5 Construção das curvas de saturação

As curvas de saturação foram construídas a partir dos valores de STD obtidos e corrigidos pelo excesso de ligante (STD-AF) em função do tempo de saturação. Os gráficos foram gerados pelo programa OriginPro 8 e as curvas foram ajustadas segundo equação exponencial denominada BoxLucas1. Esta equação é análoga a **Equação 9**, descrita na introdução desta tese. Este ajuste exponencial forneceu os valores de  $STD-AF_{max}$  e  $k_{sat}$ , ambos utilizados para cálculo de  $STD-AF_0$ .

## 2.6 Construção das Isotermas de Langmuir

As isotermas de Langmuir foram construídas usando os valores de STD-AF e os valores de STD-AF<sub>0</sub> fornecidos pelas curvas de saturação, em função da concentração dos ligantes. Os gráficos foram gerados pelo programa OriginPro 8 e as curvas foram ajustadas segunda uma função sigmoidal denominada *Hill*. Esta função é análoga a **Equação 8**, descrita na introdução desta tese. O ajuste matemático forneceu os valores de  $K_d$  para os sistemas analisados.

---

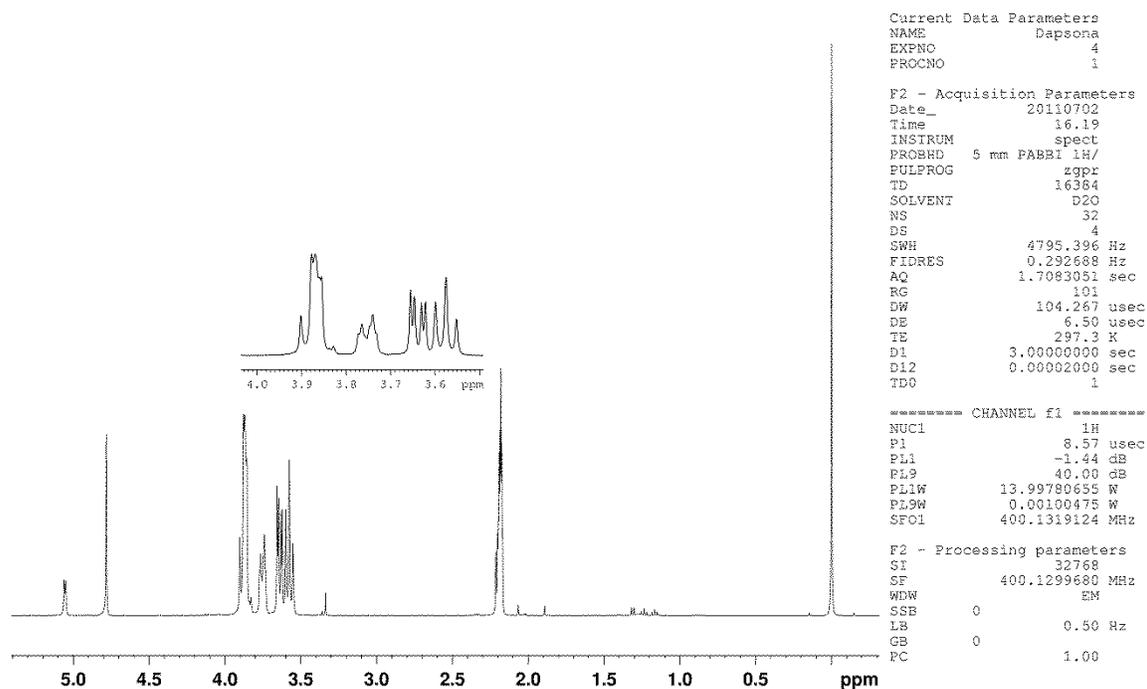
---

*ANEXOS*

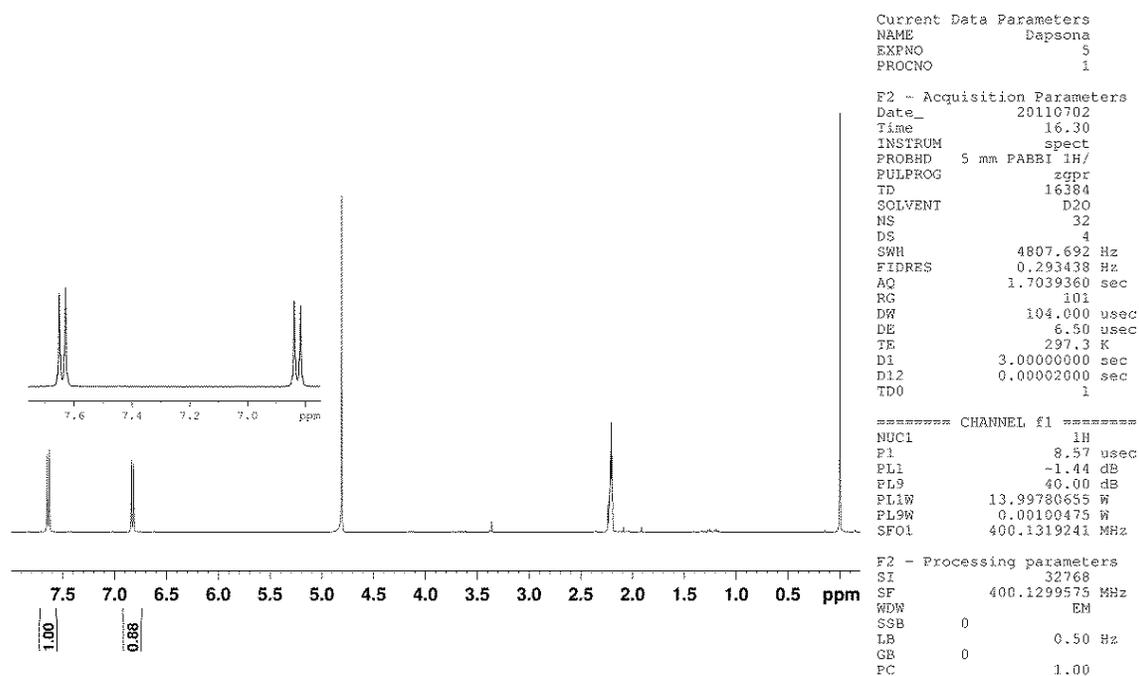
---

---

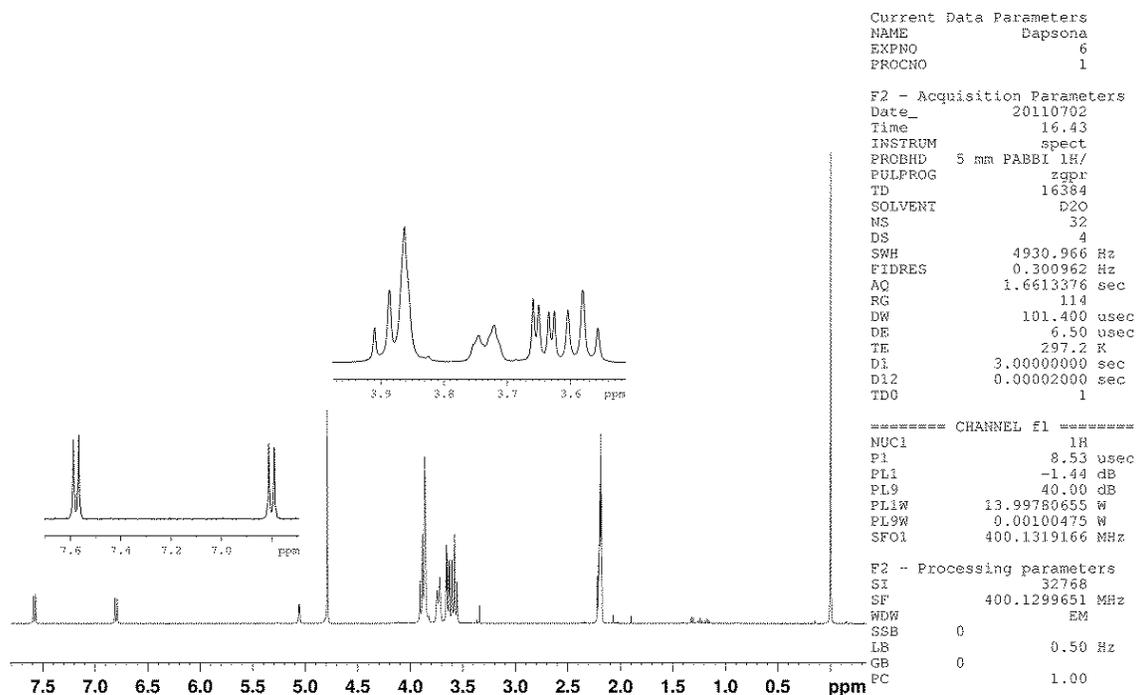




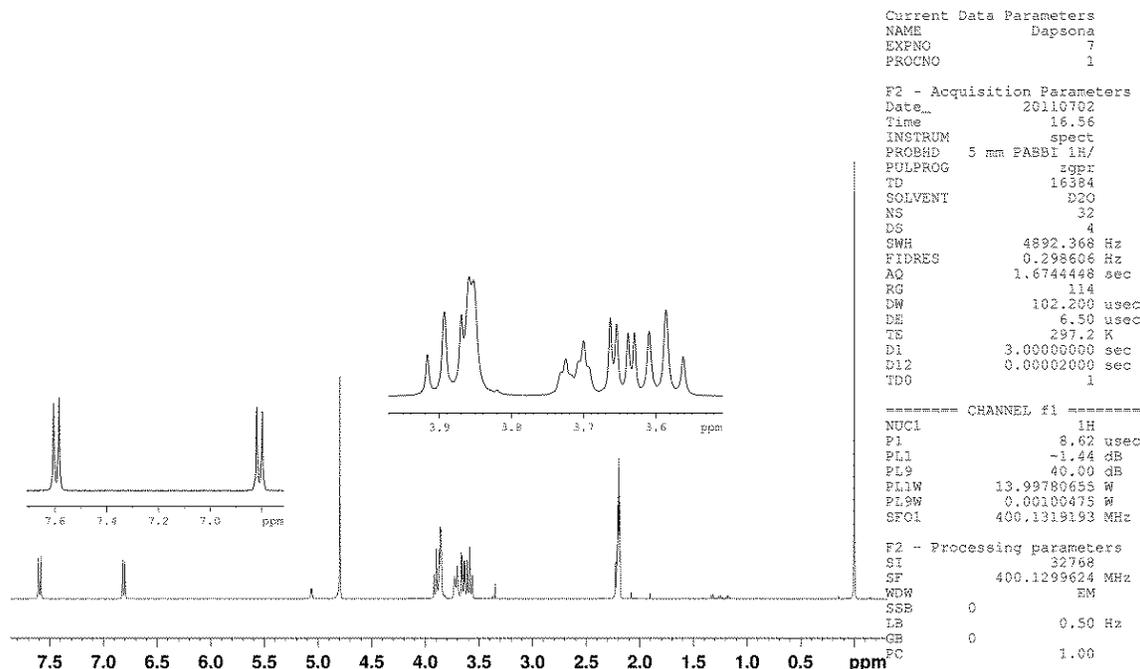
**Anexo 1.** RMN de  $^1\text{H}$  (400,1315 MHz, a 298 K, 10% acetona- $d_6$ , 100 mmol  $\text{L}^{-1}$  de tampão fosfato pH 7 e 0 ppm TPSA como referência) da  $\beta$ -CD.



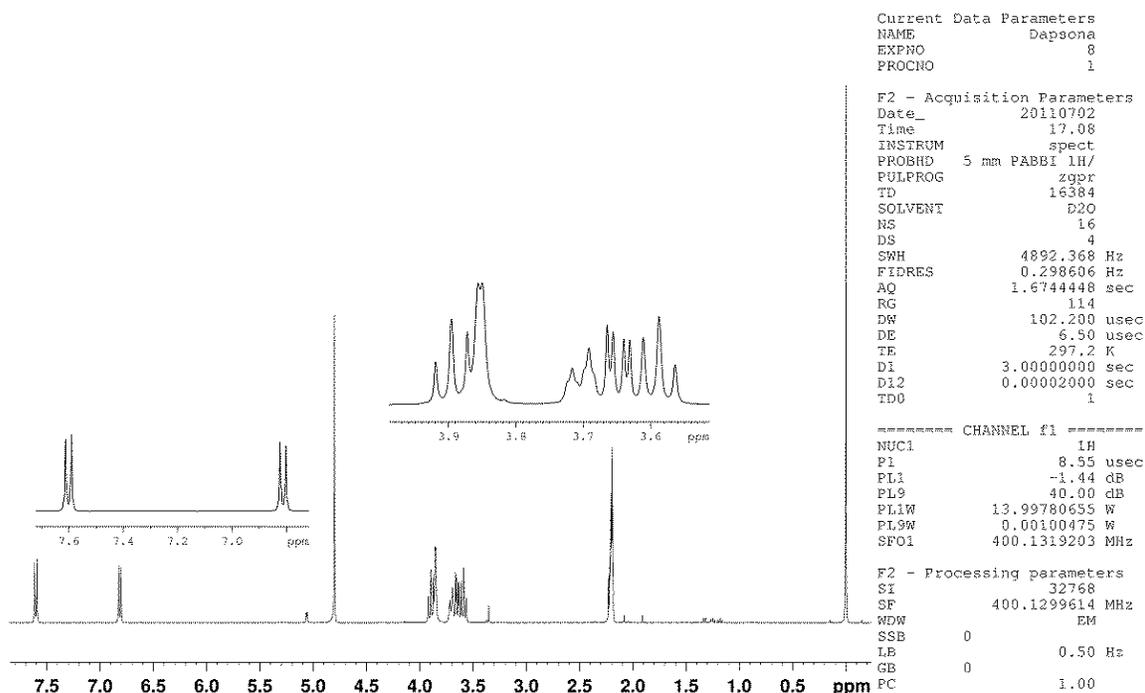
**Anexo 2.** RMN de  $^1\text{H}$  (400,1315 MHz, a 298 K, 10% acetona- $d_6$ , 100 mmol  $\text{L}^{-1}$  de tampão fosfato pH 7 e 0 ppm TPSA como referência) da Dapsona.



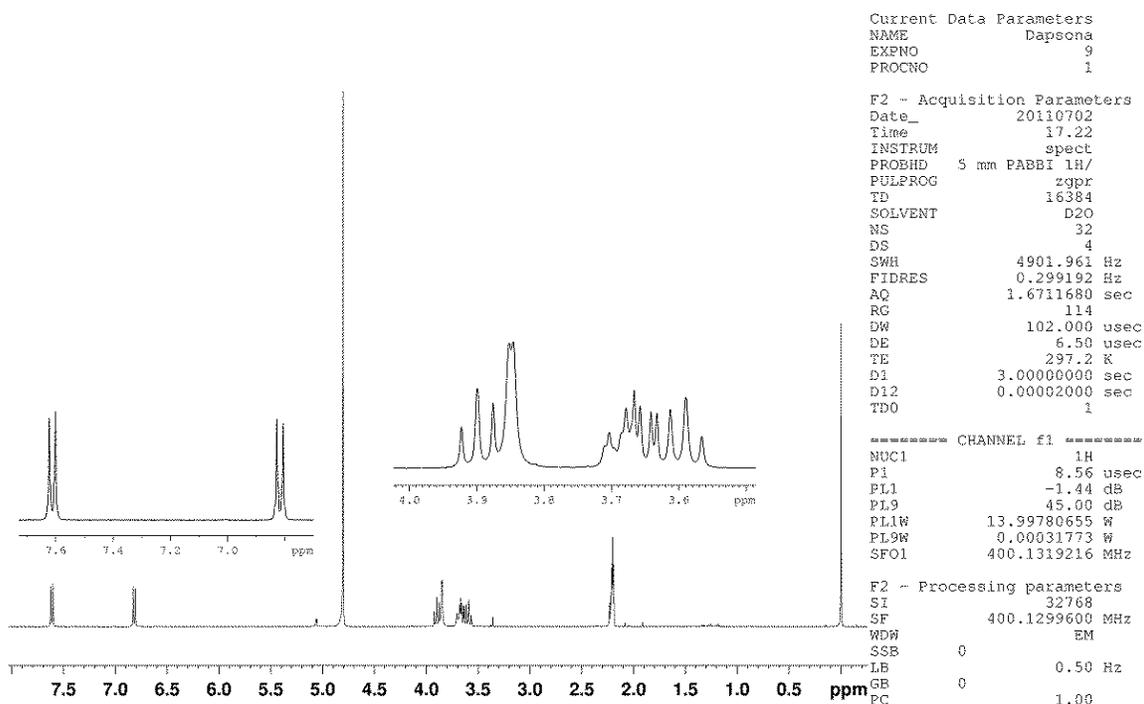
**Anexo 3.** RMN de  $^1\text{H}$  (400,1315 MHz, a 298 K, 10% acetona- $d_6$ , 100 mmol  $\text{L}^{-1}$  de tampão fosfato pH 7 e 0 ppm TPSA como referência) da  $\beta$ -CD (1,6 mmol  $\text{L}^{-1}$ ) e Dapsona (0,4 mmol  $\text{L}^{-1}$ ).



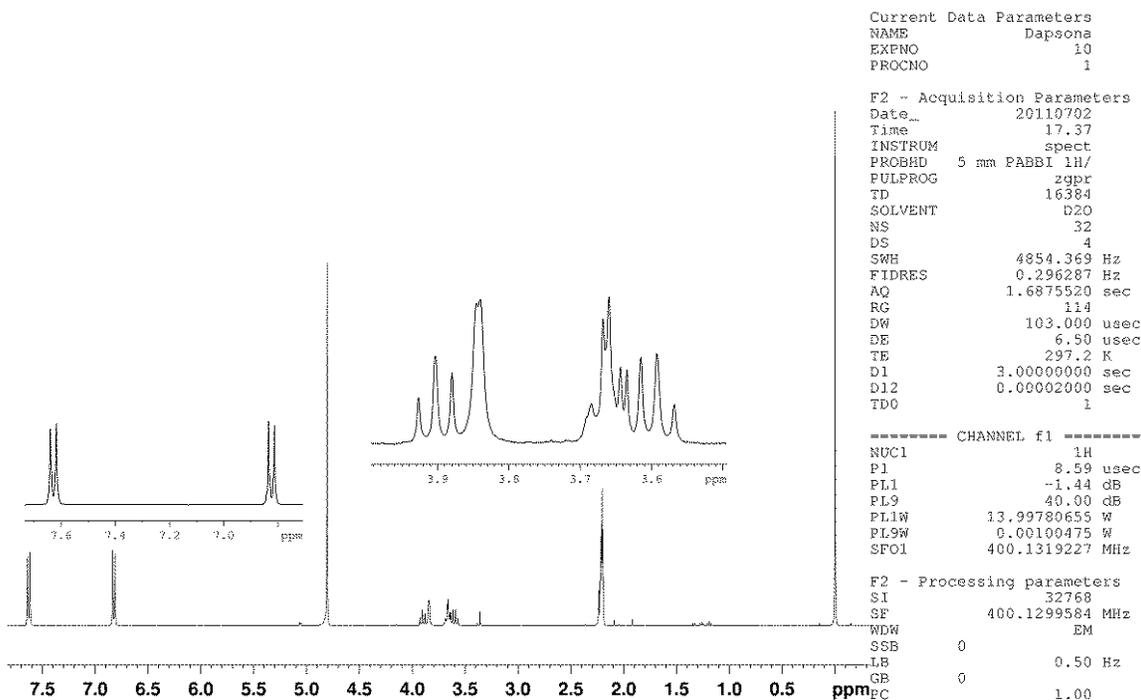
**Anexo 4.** RMN de  $^1\text{H}$  (400,1315 MHz, a 298 K, 10% acetona- $d_6$ , 100 mmol  $\text{L}^{-1}$  de tampão fosfato pH 7 e 0 ppm TPSA como referência) da  $\beta$ -CD (1,2 mmol  $\text{L}^{-1}$ ) e Dapsona (0,8 mmol  $\text{L}^{-1}$ ).



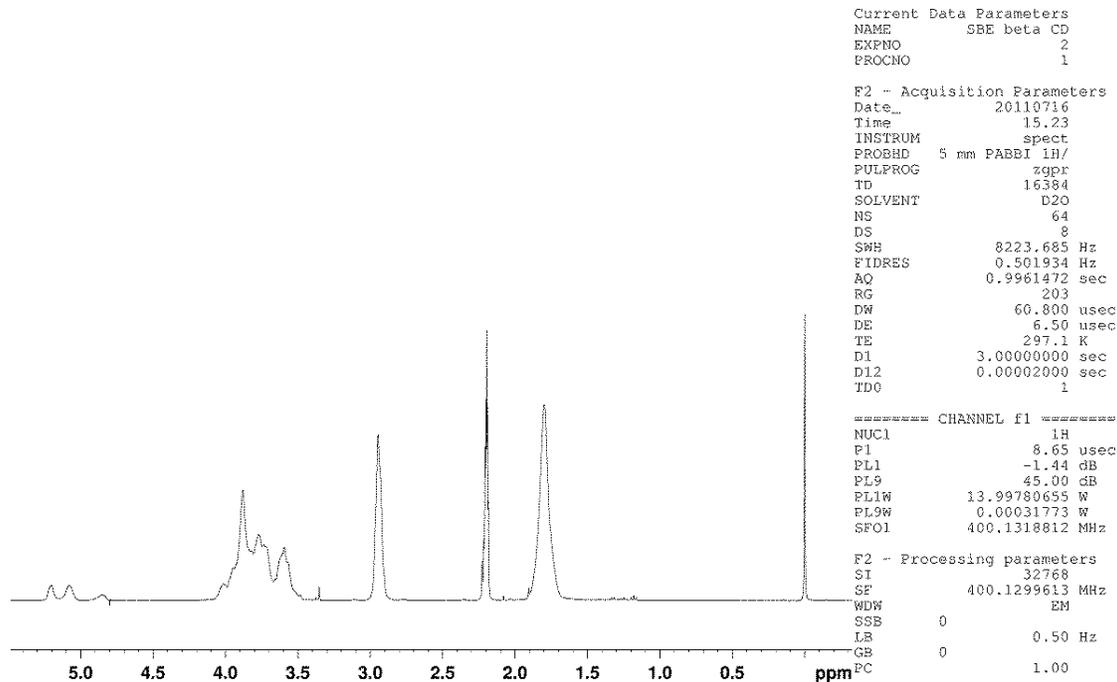
**Anexo 5.** RMN de  $^1\text{H}$  (400,1315 MHz, a 298 K, 10% acetona- $d_6$ , 100 mmol  $\text{L}^{-1}$  de tampão fosfato pH 7 e 0 ppm TPSA como referência) da  $\beta$ -CD (1,0 mmol  $\text{L}^{-1}$ ) e Dapsona (1,0 mmol  $\text{L}^{-1}$ ).



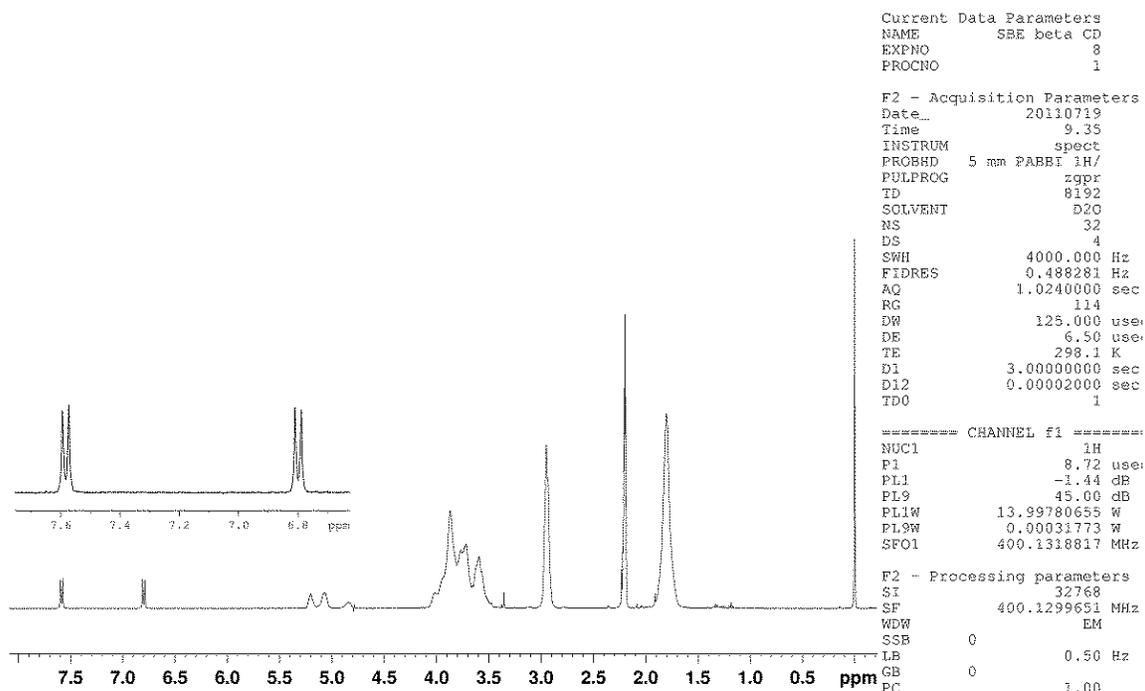
**Anexo 6.** RMN de  $^1\text{H}$  (400,1315 MHz, a 298 K, 10% acetona- $d_6$ , 100 mmol  $\text{L}^{-1}$  de tampão fosfato pH 7 e 0 ppm TPSA como referência) da  $\beta$ -CD (0,8 mmol  $\text{L}^{-1}$ ) e Dapsona (1,2 mmol  $\text{L}^{-1}$ ).



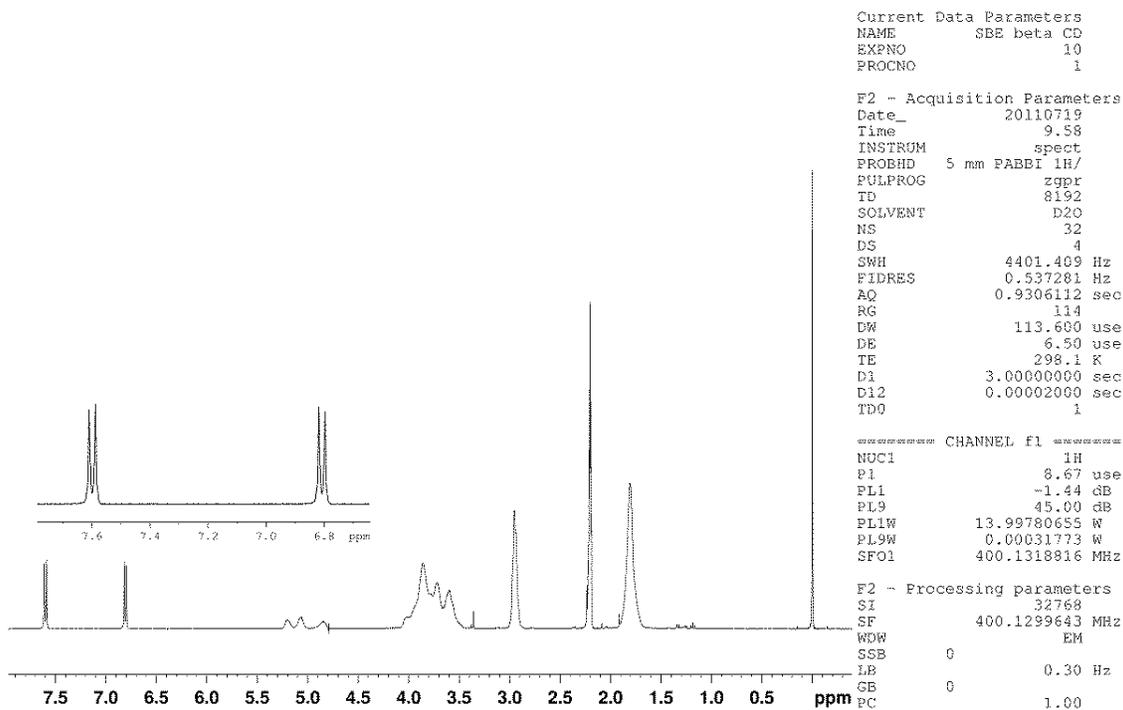
**Anexo 7.** RMN de  $^1\text{H}$  (400,1315 MHz, a 298 K, 10% acetona- $d_6$ , 100 mmol  $\text{L}^{-1}$  de tampão fosfato pH 7 e 0 ppm TPSA como referência) da  $\beta$ -CD (0,4 mmol  $\text{L}^{-1}$ ) e Dapsona (1,6 mmol  $\text{L}^{-1}$ ).



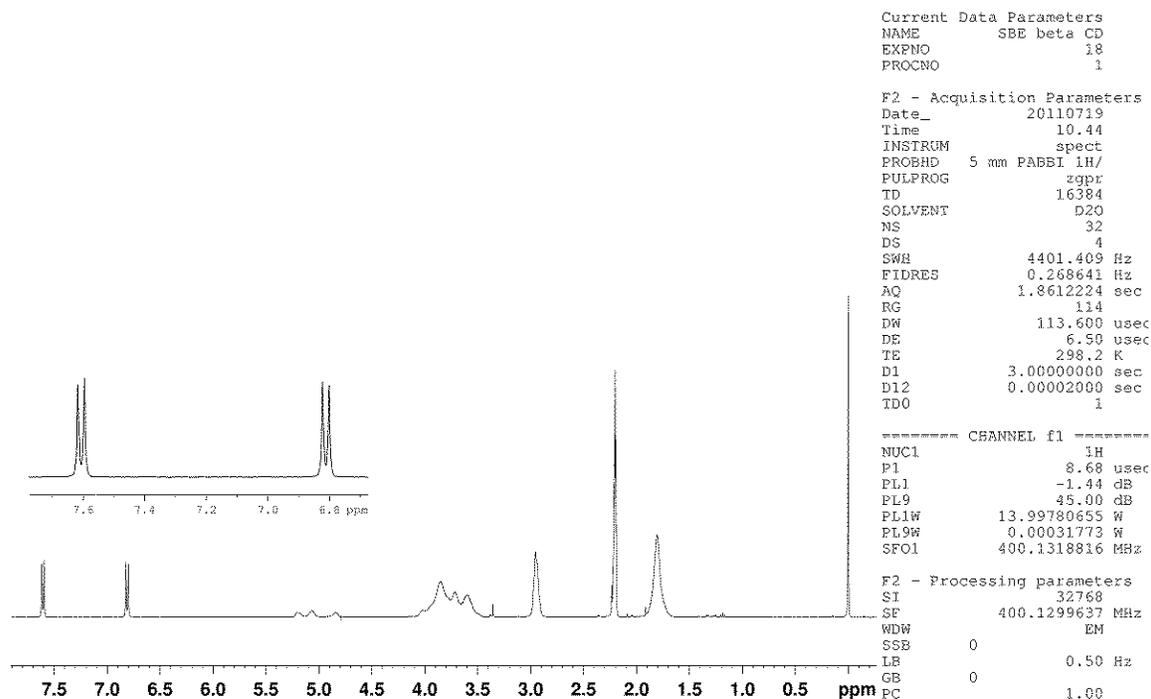
**Anexo 8.** RMN de  $^1\text{H}$  (400,1315 MHz, a 298 K, 10% acetona- $d_6$  pH 7 e 0 ppm TPSA como referência) da SBE- $\beta$ -CD.



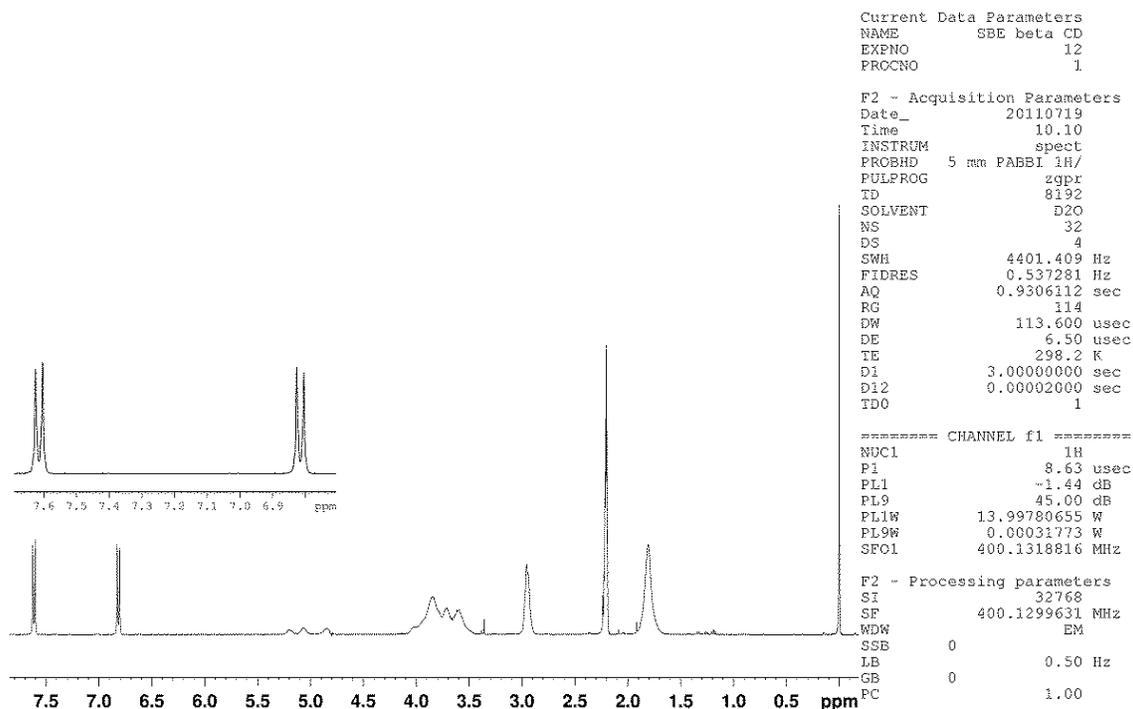
**Anexo 9.** RMN de  $^1\text{H}$  (400,1315 MHz, a 298 K, 10% acetona- $d_6$ , 100 mmol  $\text{L}^{-1}$  de tampão fosfato pH 7 e 0 ppm TPSA como referência) da SBE- $\beta$ -CD (1,6 mmol  $\text{L}^{-1}$ ) e Dapsone (0,4 mmol  $\text{L}^{-1}$ ).



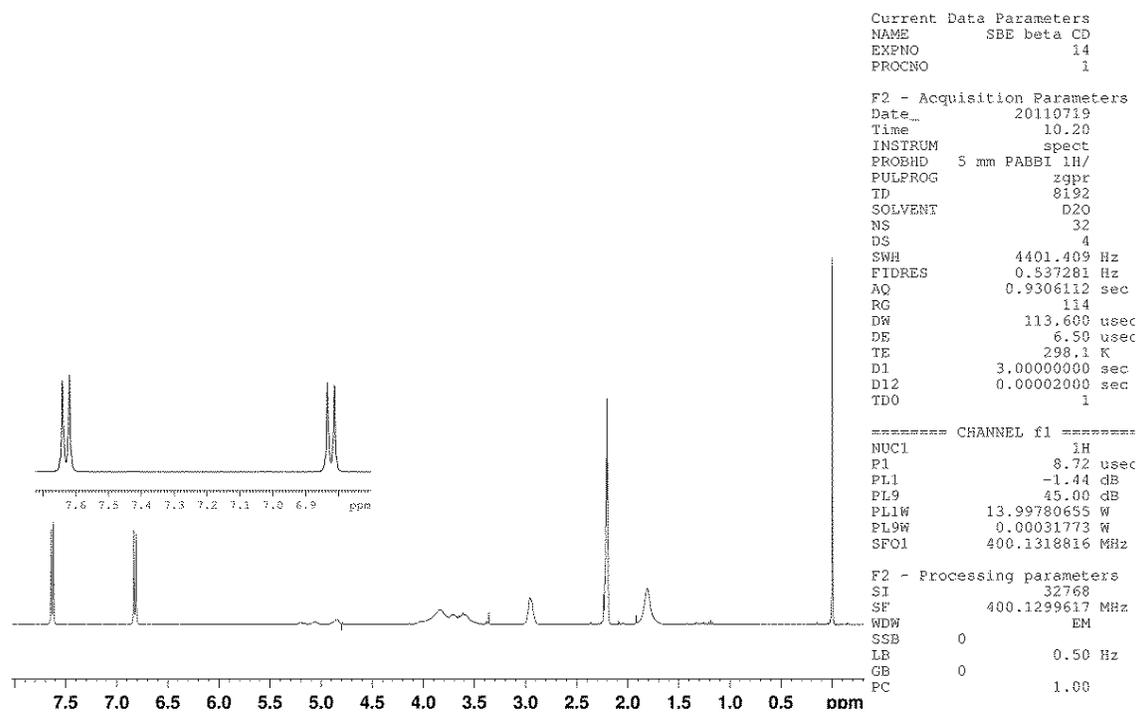
**Anexo 10.** RMN de  $^1\text{H}$  (400,1315 MHz, a 298 K, 10% acetona- $d_6$ , 100 mmol  $\text{L}^{-1}$  de tampão fosfato pH 7 e 0 ppm TPSA como referência) da SBE- $\beta$ -CD (1,2 mmol  $\text{L}^{-1}$ ) e Dapsone (0,8 mmol  $\text{L}^{-1}$ ).



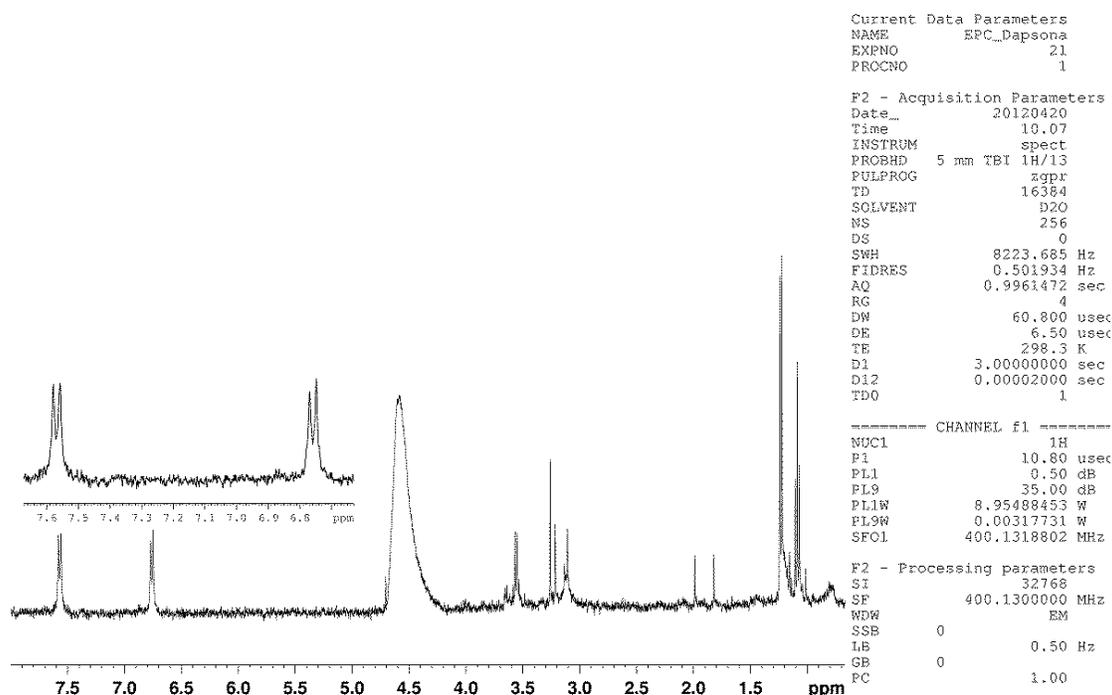
**Anexo 11.** RMN de  $^1\text{H}$  (400,1315 MHz, a 298 K, 10% acetona- $d_6$ , 100 mmol  $\text{L}^{-1}$  de tampão fosfato pH 7 e 0 ppm TPSA como referência) da SBE- $\beta$ -CD (1,0 mmol  $\text{L}^{-1}$ ) e Dapsona (1,0 mmol  $\text{L}^{-1}$ ).



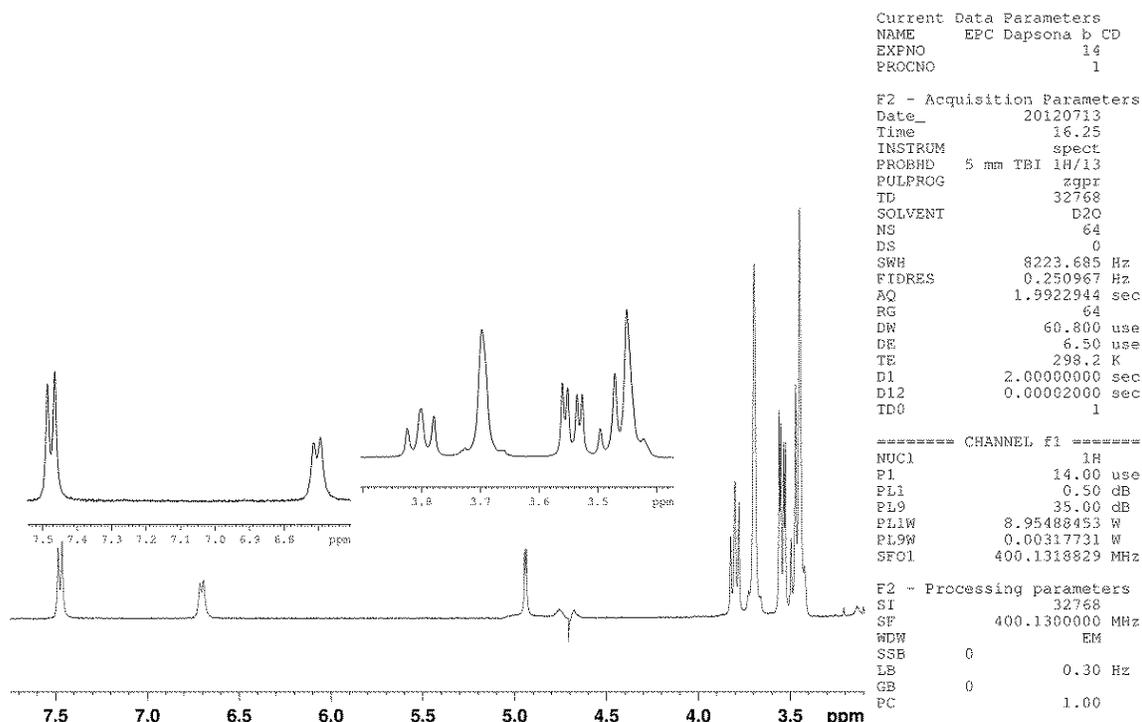
**Anexo 12.** RMN de  $^1\text{H}$  (400,1315 MHz, a 298 K, 10% acetona- $d_6$ , 100 mmol  $\text{L}^{-1}$  de tampão fosfato pH 7 e 0 ppm TPSA como referência) da SBE- $\beta$ -CD (0,8 mmol  $\text{L}^{-1}$ ) e Dapsona (1,2 mmol  $\text{L}^{-1}$ ).



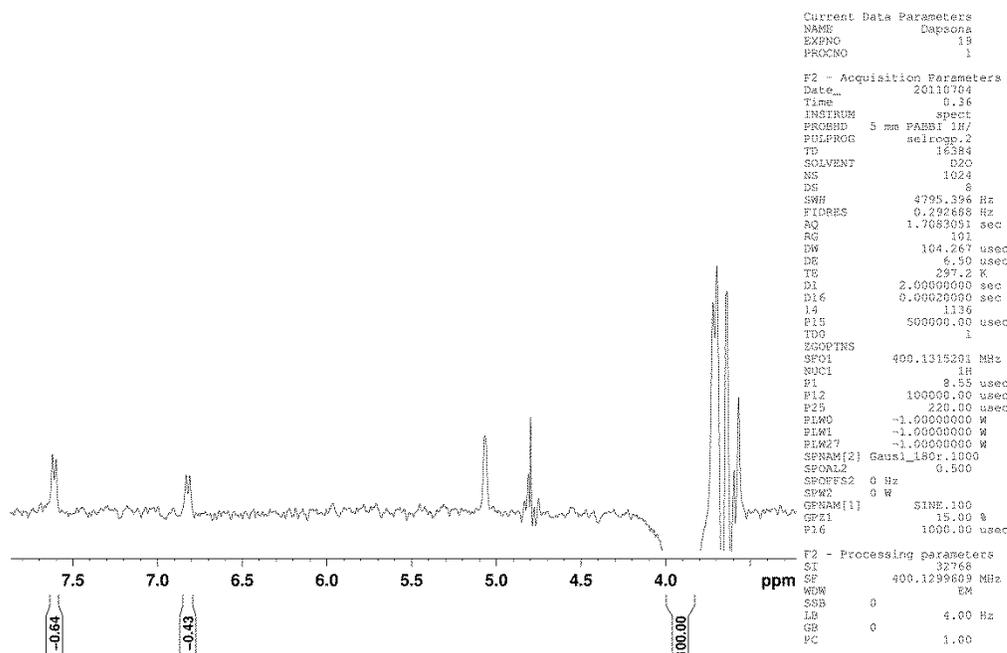
**Anexo 13.** RMN de  $^1\text{H}$  (400,1315 MHz, a 298 K, 10% acetona- $d_6$  100 mmol  $\text{L}^{-1}$  de tampão fosfato pH=7 e 0 ppm TPSA como referência) da SBE- $\beta$ -CD (0,4 mmol  $\text{L}^{-1}$ ) e Dapsone (1,6 mmol  $\text{L}^{-1}$ ).



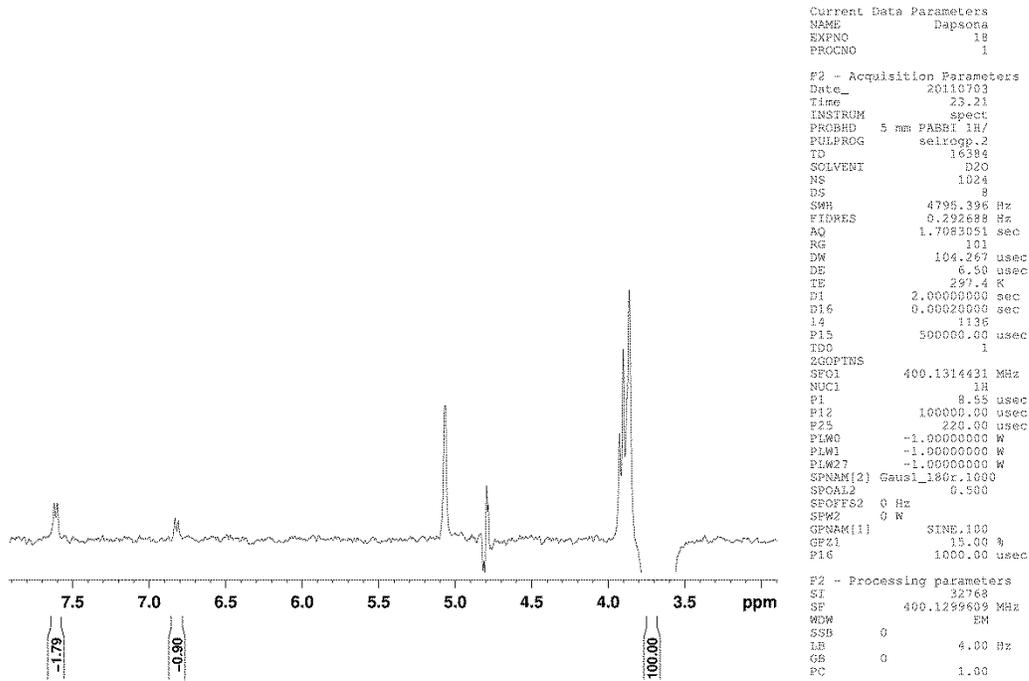
**Anexo 14.** RMN de  $^1\text{H}$  (400,1315 MHz, a 298 K, 100 mmol  $\text{L}^{-1}$  de tampão fosfato pH=7 e 0 ppm TPSA como referência) de lipossomas de EPC 400 nm (5 mmol  $\text{L}^{-1}$ ) e Dapsone (3 mmol  $\text{L}^{-1}$ ).



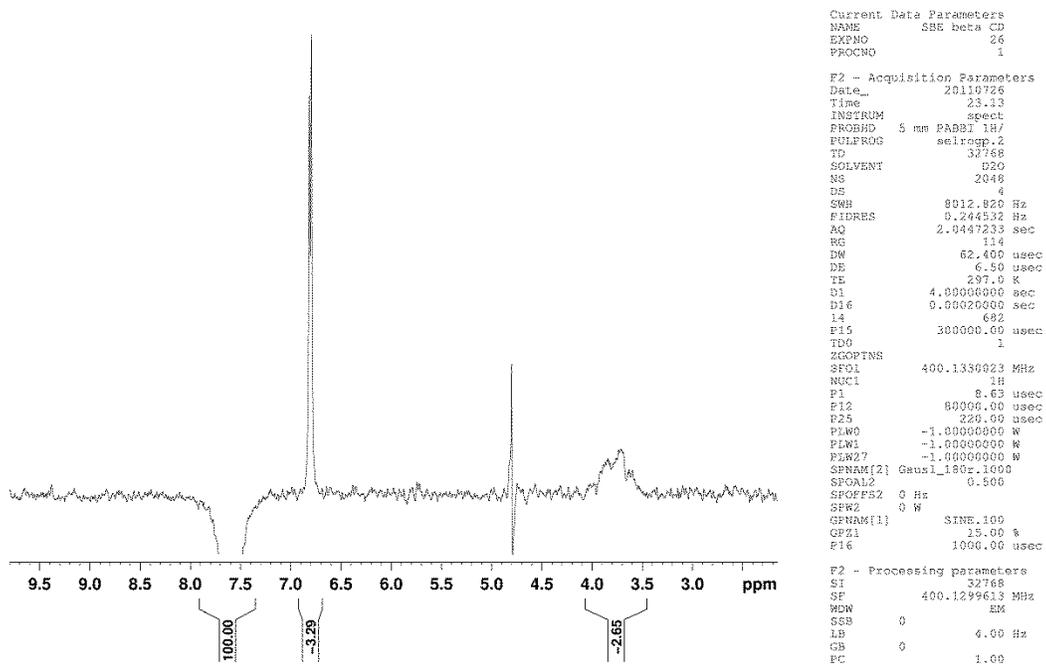
**Anexo 15.** RMN de  $^1\text{H}$  (400,1315 MHz, a 298 K, 100 mmol  $\text{L}^{-1}$  de tampão fosfato pH=7 e 0 ppm TPSA como referência) do complexo ternário:  $\beta$ -CD (1,0 mmol  $\text{L}^{-1}$ ), Dapsona (1,0 mmol  $\text{L}^{-1}$ ) e lipossomas de EPC 400 nm (5 mmol  $\text{L}^{-1}$ ).



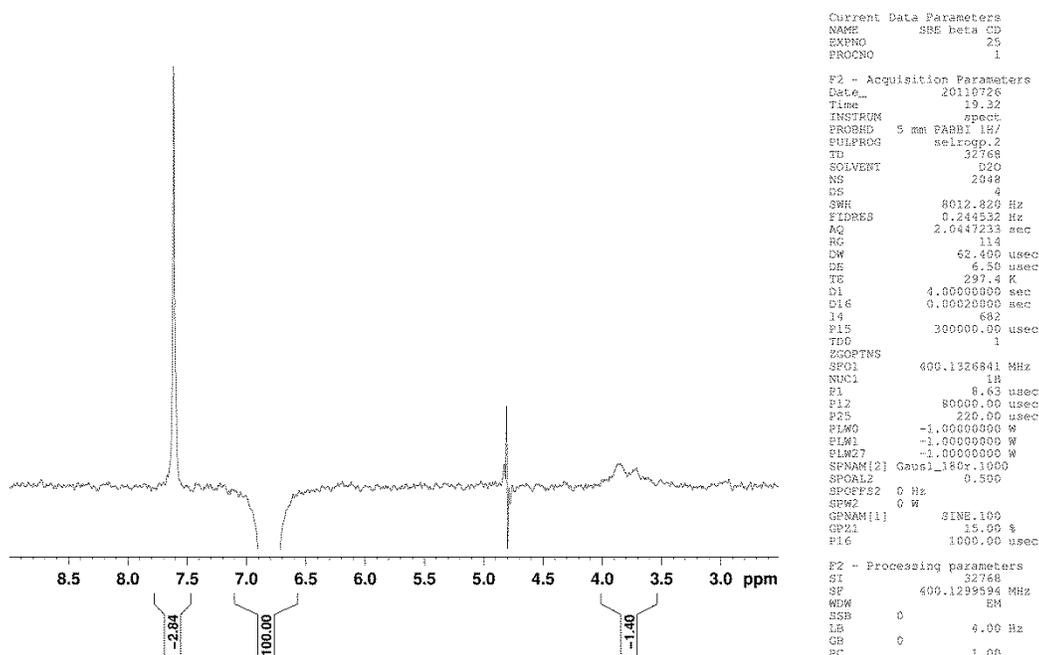
**Anexo 16.** ROESY 1D de amostra de Dapsona e  $\beta$ -CD, trava de *spin* de 500ms e irradiação em H3 (3,90 ppm) da  $\beta$ -CD ( $\text{D}_2\text{O}$ , 100 mmol  $\text{L}^{-1}$  de tampão fosfato pH=7,0 e 400.1315 MHz para  $^1\text{H}$ ).



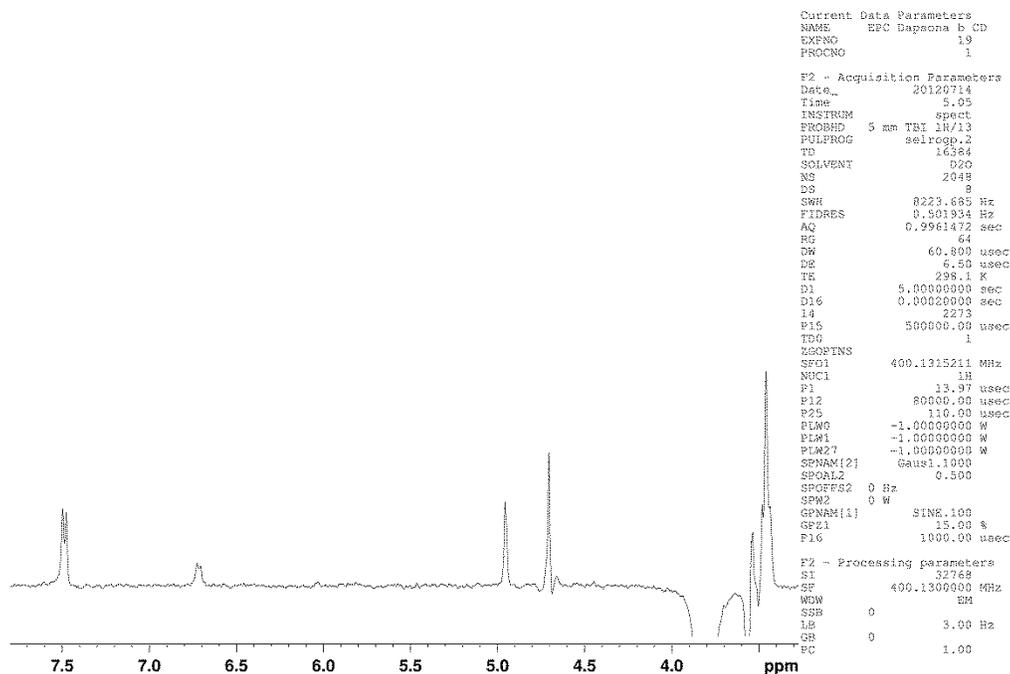
**Anexo 17.** ROESY 1D de amostra de Dapsona e  $\beta$ -CD, trava de *spin* de 500ms e irradiação em H5 (3,65 ppm) da  $\beta$ -CD ( $D_2O$ , 100 mmol  $L^{-1}$  de tampão fosfato pH=7,0 e 400.1315 MHz para  $^1H$ ).



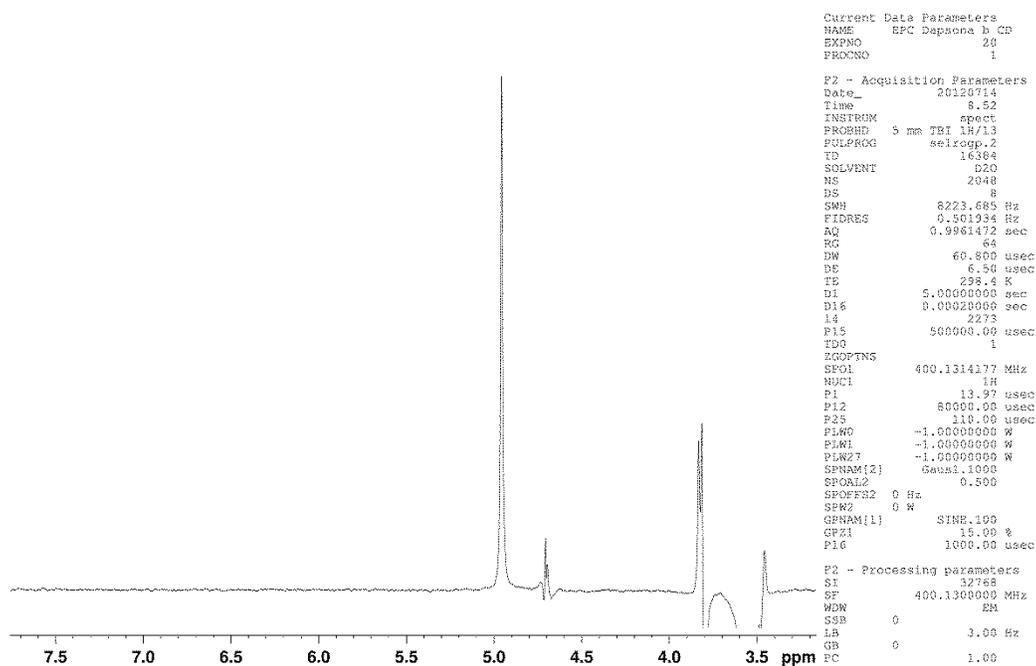
**Anexo 18.** ROESY 1D de amostra de Dapsona e SBE- $\beta$ -CD, trava de *spin* de 300ms e irradiação em Ha (7,61 ppm) da Dapsona ( $D_2O$ , 100 mmol  $L^{-1}$  de tampão fosfato pH=7,0 e 400.1315 MHz para  $^1H$ ).



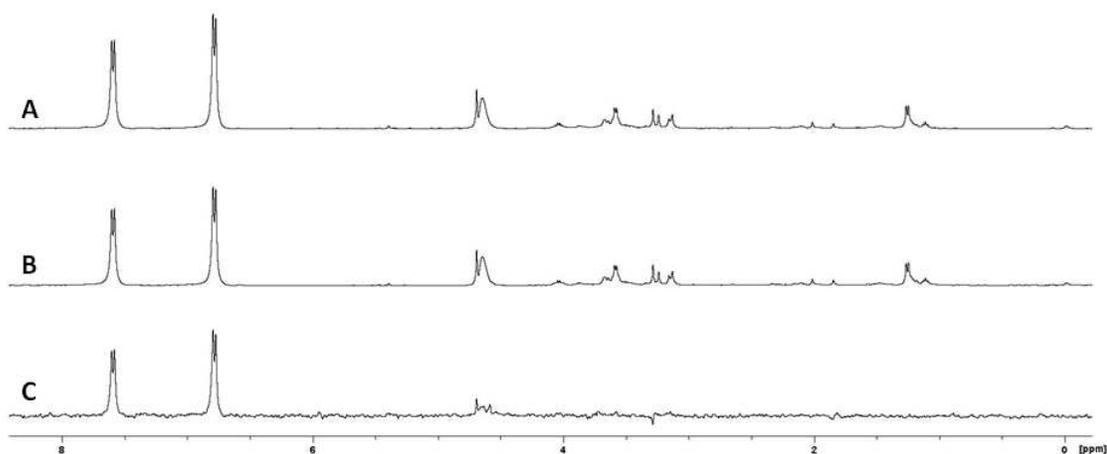
**Anexo 19.** ROESY 1D de amostra de Dapsona e SBE- $\beta$ -CD, trava de *spin* de 300ms e irradiação em H $\beta$  (6,82 ppm) da Dapsona ( $D_2O$ , 100 mmol L $^{-1}$  de tampão fosfato pH=7,0 e 400.1315 MHz para  $^1H$ ).



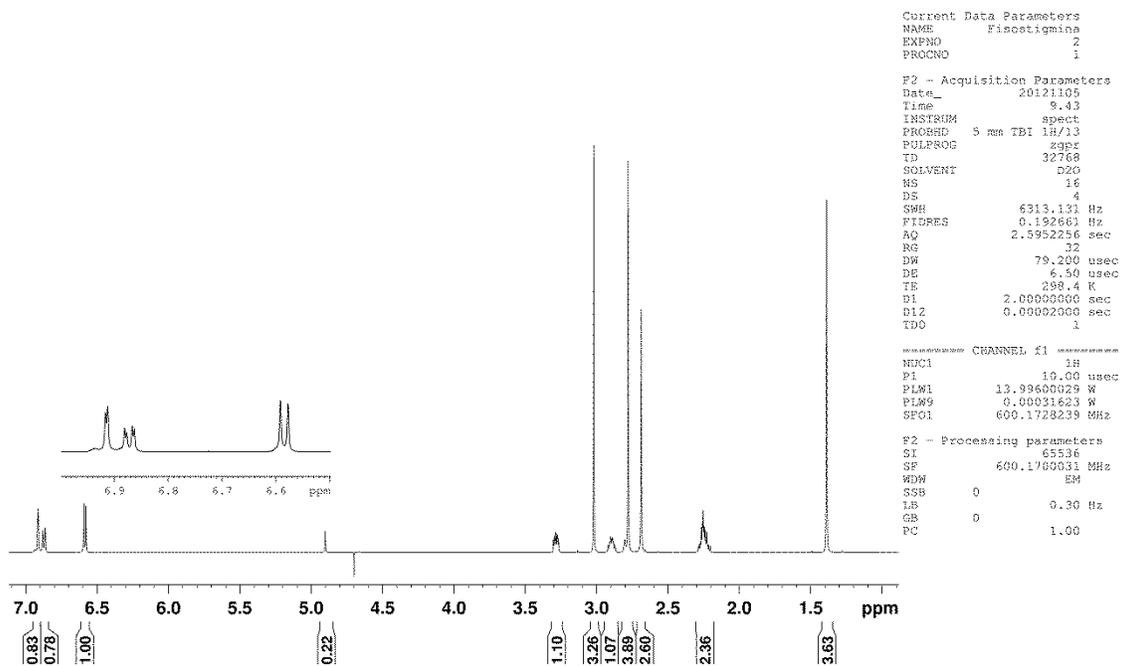
**Anexo 20.** ROESY 1D de amostra de Dapsona,  $\beta$ -CD e lipossomas de EPC 400 nm, trava de *spin* de 500ms e irradiação em H $\beta$  (3,82 ppm) da  $\beta$ -CD ( $D_2O$ , 100 mmol L $^{-1}$  de tampão fosfato pH=7,0 e 400.1315 MHz para  $^1H$ ).



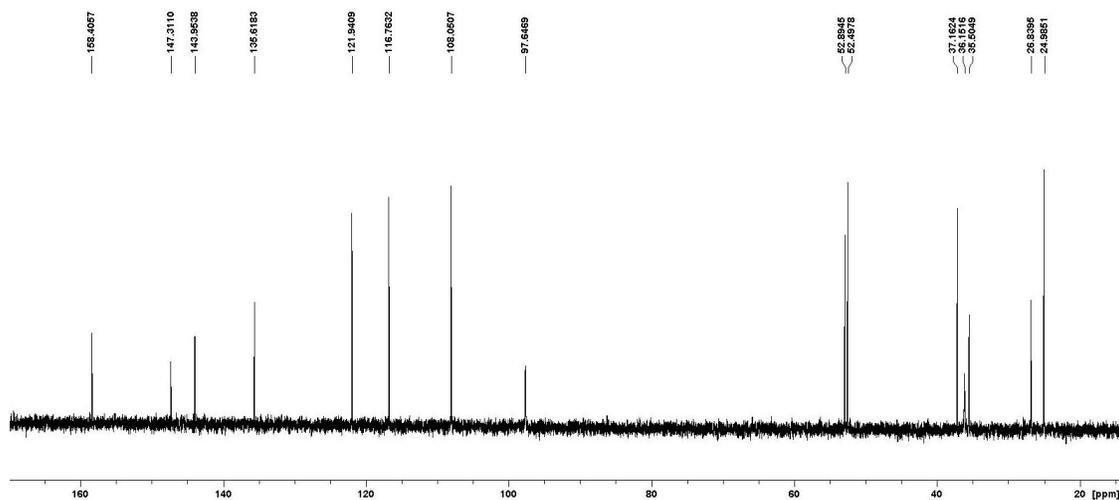
**Anexo 21.** ROESY 1D de amostra de Dapsona,  $\beta$ -CD e lipossomas de EPC 400 nm, trava de *spin* de 500ms e irradiação em H5 (3,60 ppm) da  $\beta$ -CD ( $D_2O$ , 100 mmol  $L^{-1}$  de tampão fosfato pH=7,0 e 400.1315 MHz para  $^1H$ ).



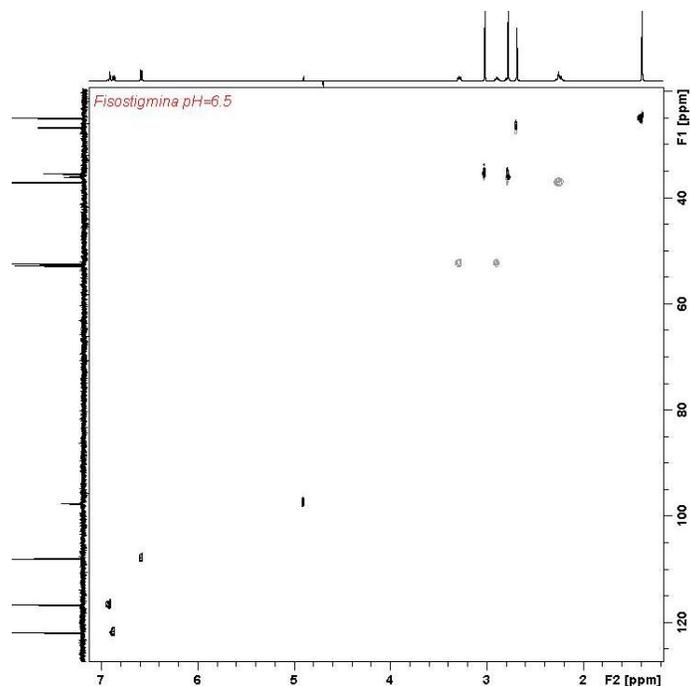
**Anexo 22.** RMN de  $^1H$  (400,1315 MHz, a 298 K, 100 mmol  $L^{-1}$  de tampão fosfato pH=7 e 4,70 ppm  $D_2O/HDO$  como referência) do complexo binário Dap/EPC, (A) espectro de ressonância STD-RMN *off-resonance*, (B) Espectro de STD-RMN *on-resonance* e (C) diferença entre os espectros *on-resonance* e *off-resonance*.



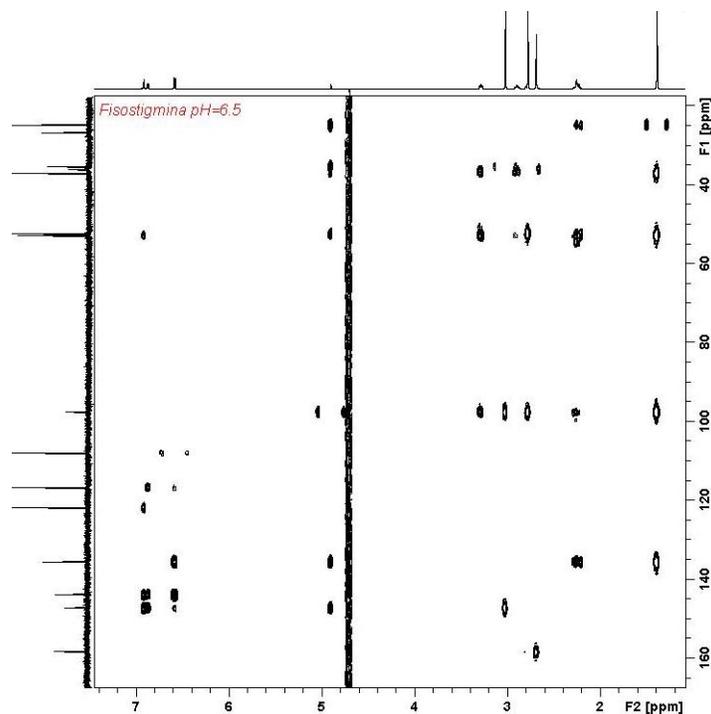
**Anexo 23.** RMN de  $^1\text{H}$  (600,1728 MHz, a 298 K, 100 mmol  $\text{L}^{-1}$  de tampão fosfato pH=6,5 e 4,70 ppm HDO como referência) da Fisostigmina.



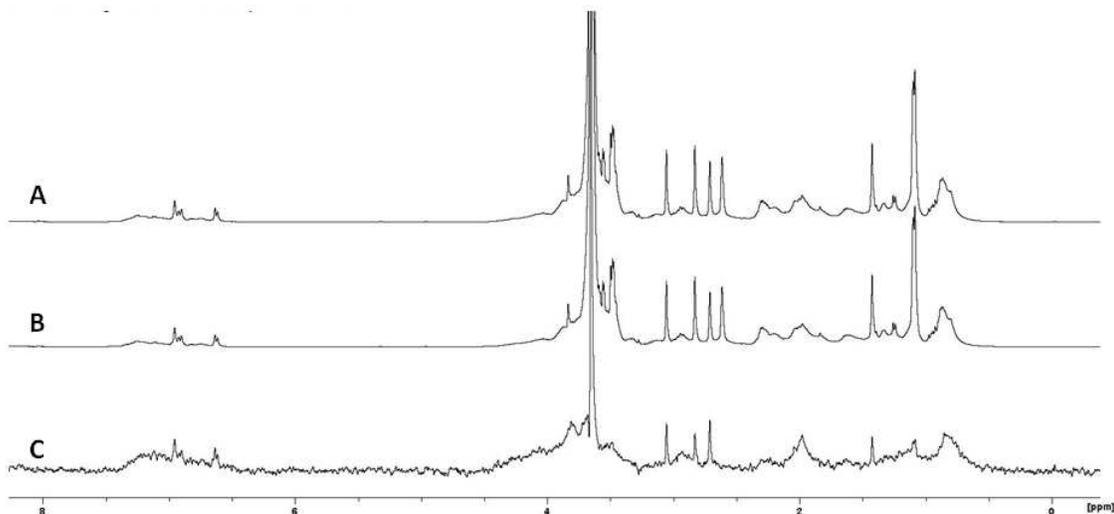
**Anexo 24.** RMN de  $^{13}\text{C}$  (150,9279 MHz, a 298 K, 100 mmol  $\text{L}^{-1}$  de tampão fosfato pH=6,5) da Fisostigmina.



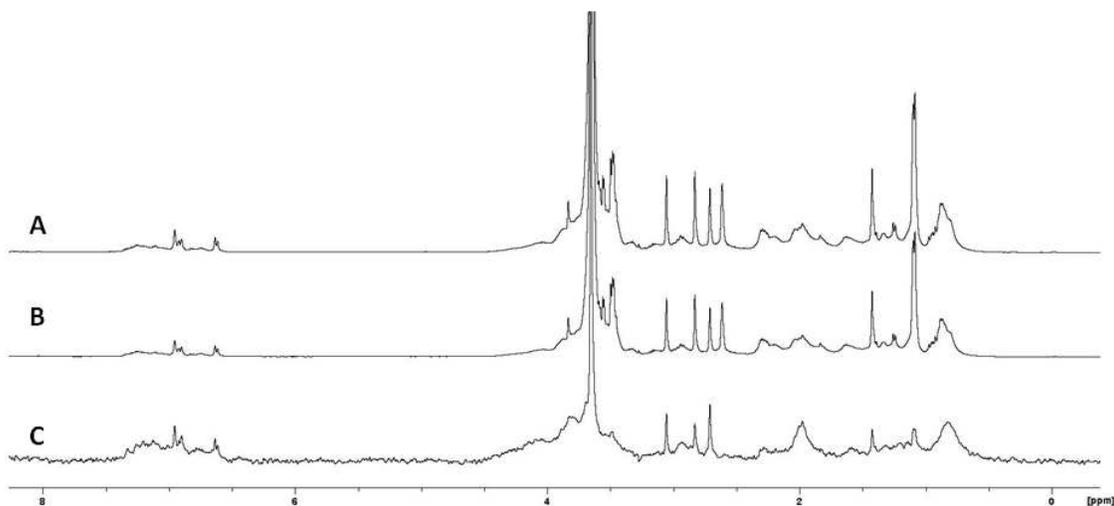
**Anexo 25.** Mapa de contorno relativo ao experimento de correlação heteronuclear, HSQC, (600,1728 MHz, a 298 K, 100 mmol L<sup>-1</sup> de tampão fosfato pH=6,5 e 4,70 ppm HDO como referência) da Fisostigmina.



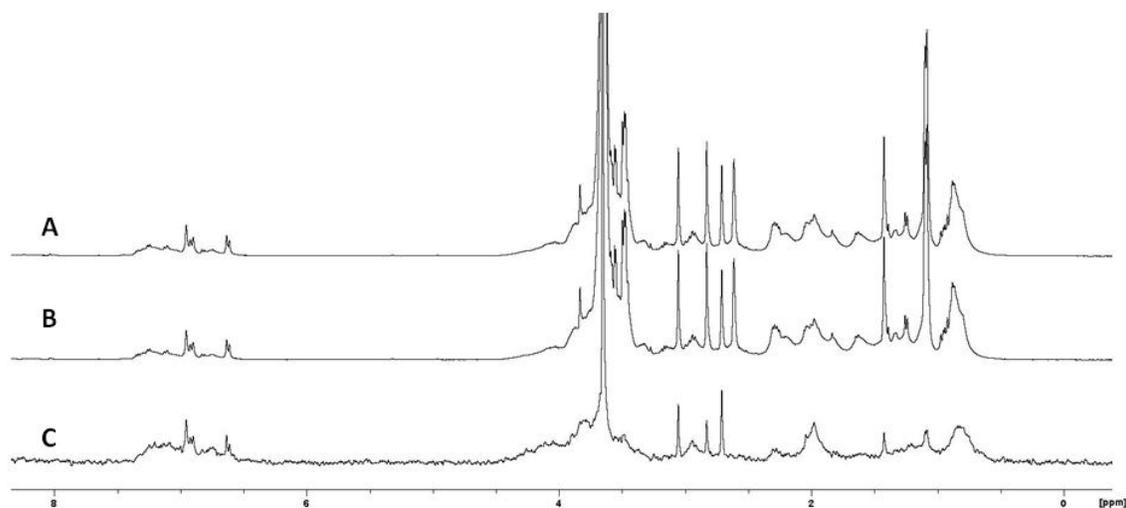
**Anexo 26.** Mapa de contorno relativo ao experimento de correlação heteronuclear, HMBC, (600,1728 MHz, a 298 K, 100 mmol L<sup>-1</sup> de tampão fosfato pH=6,5 e 4,70 ppm HDO como referência) da Fisostigmina.



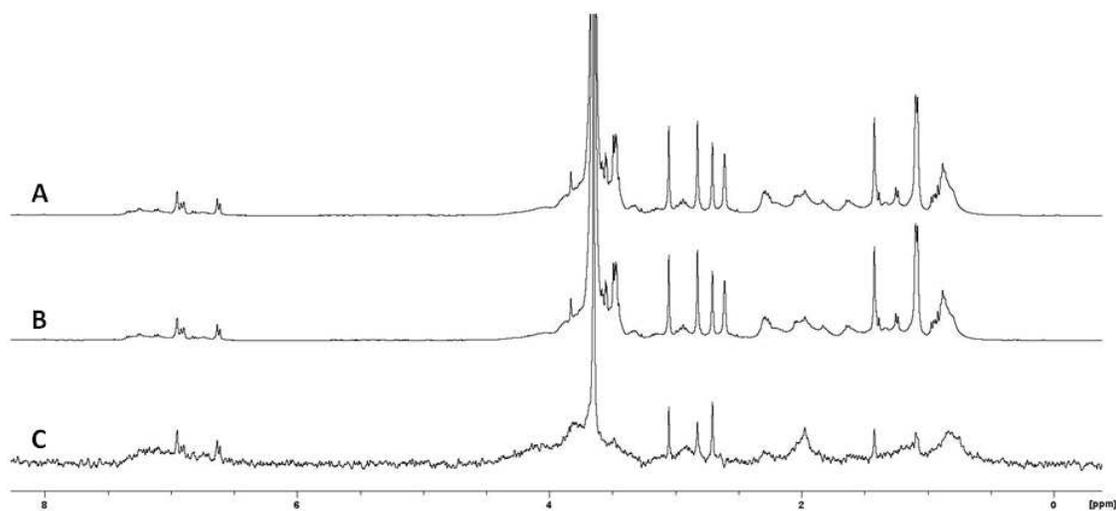
**Anexo 27.** RMN de <sup>1</sup>H (400,1315 MHz, a 298 K, pH = 6,0 e 4,70 ppm D<sub>2</sub>O/HDO como referência) de AChE titulada com 0,26 mmol L<sup>-1</sup> de Fisostigmina, com tempo de saturação de 0,75 s. (A) espectro de ressonância STD-RMN *off-resonance*, (B) Espectro de STD-RMN *on-resonance* e (C) diferença entre os espectros *on-resonance* e *off-resonance*.



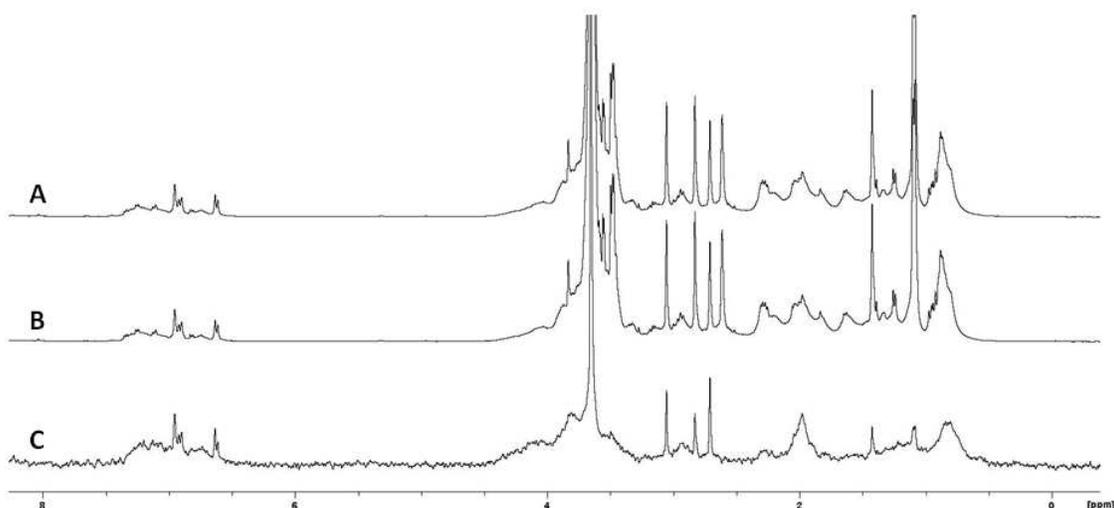
**Anexo 28.** RMN de <sup>1</sup>H (400,1315 MHz, a 298 K, pH = 6,0 e 4,70 ppm D<sub>2</sub>O/HDO como referência) de AChE titulada com 0,26 mmol L<sup>-1</sup> de Fisostigmina, com tempo de saturação de 1,50 s. (A) espectro de ressonância STD-RMN *off-resonance*, (B) Espectro de STD-RMN *on-resonance* e (C) diferença entre os espectros *on-resonance* e *off-resonance*.



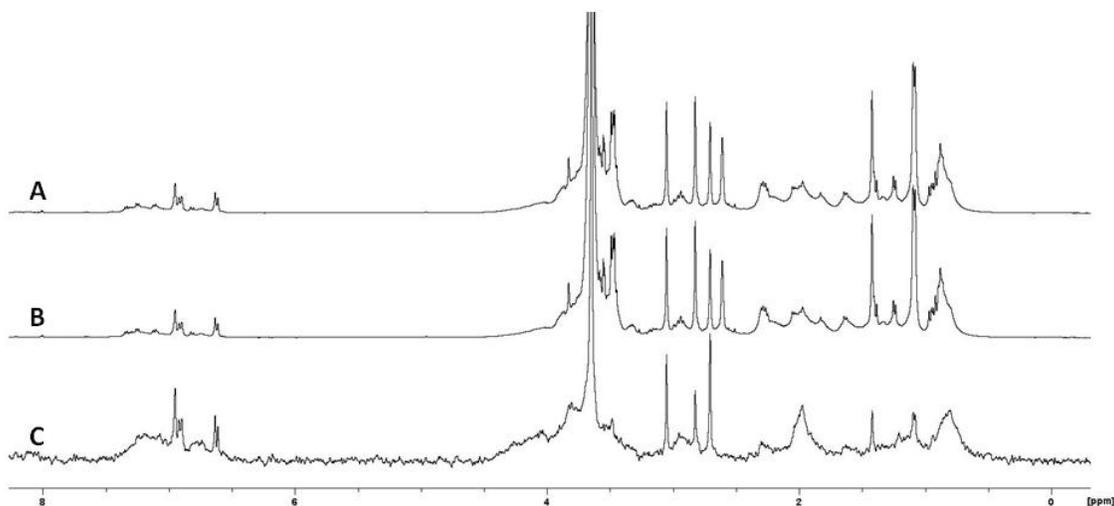
**Anexo 29.** RMN de <sup>1</sup>H (400,1315 MHz, a 298 K, pH = 6,0 e 4,70 ppm D<sub>2</sub>O/HDO como referência) de AChE titulada com 0,26 mmol L<sup>-1</sup> de Fisostigmina, com tempo de saturação de 2,25 s. (A) espectro de ressonância STD-RMN *off-resonance*, (B) Espectro de STD-RMN *on-resonance* e (C) diferença entre os espectros *on-resonance* e *off-resonance*.



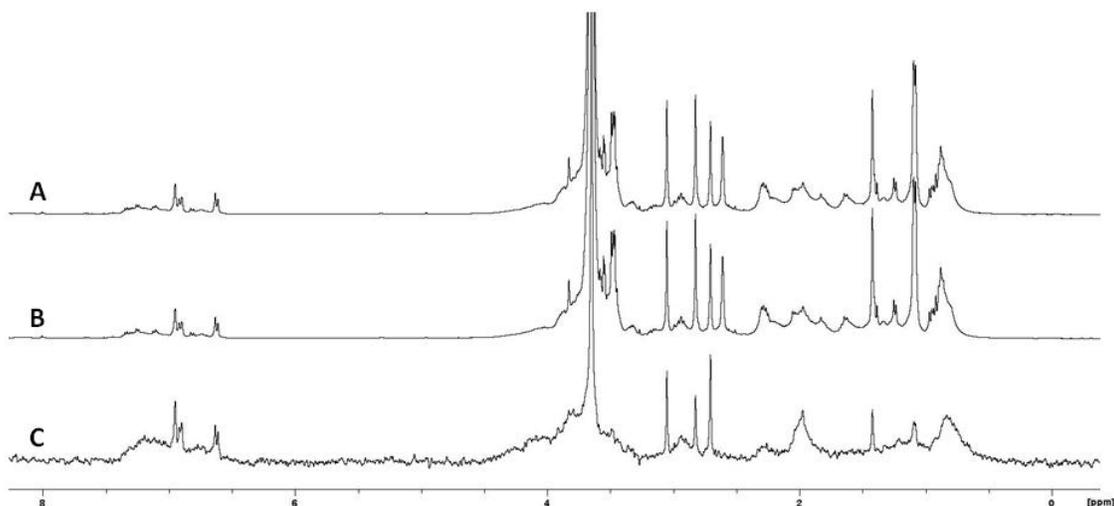
**Anexo 30.** RMN de <sup>1</sup>H (400,1315 MHz, a 298 K, pH = 6,0 e 4,70 ppm D<sub>2</sub>O/HDO como referência) de AChE titulada com 0,26 mmol L<sup>-1</sup> de Fisostigmina, com tempo de saturação de 3,00 s. (A) espectro de ressonância STD-RMN *off-resonance*, (B) Espectro de STD-RMN *on-resonance* e (C) diferença entre os espectros *on-resonance* e *off-resonance*.



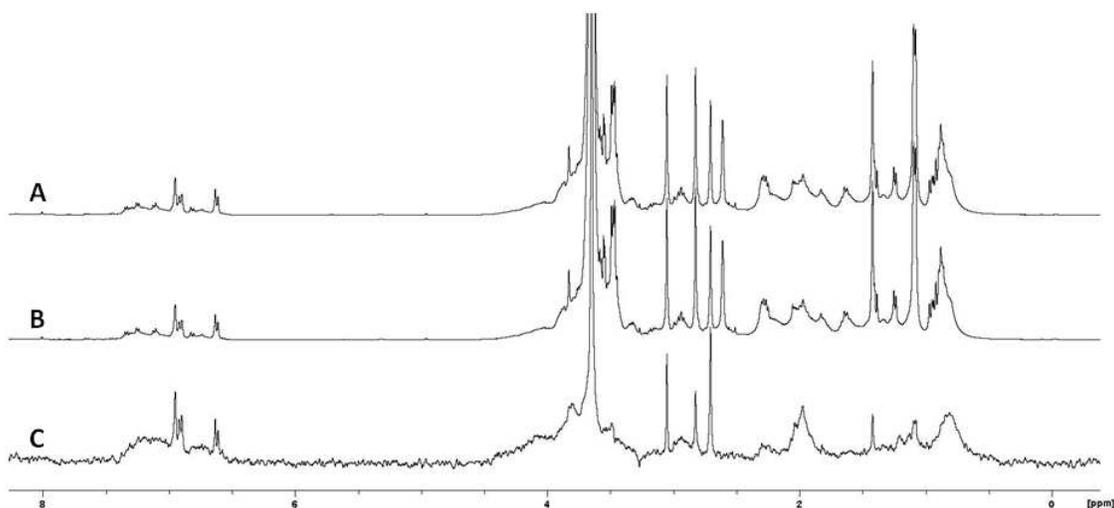
**Anexo 31.** RMN de  $^1\text{H}$  (400,1315 MHz, a 298 K, pH = 6,0 e 4,70 ppm D<sub>2</sub>O/HDO como referência) de AChE titulada com 0,34 mmol L<sup>-1</sup> de Fisostigmina, com tempo de saturação de 0,75 s. (A) espectro de ressonância STD-RMN *off-resonance*, (B) Espectro de STD-RMN *on-resonance* e (C) diferença entre os espectros *on-resonance* e *off-resonance*.



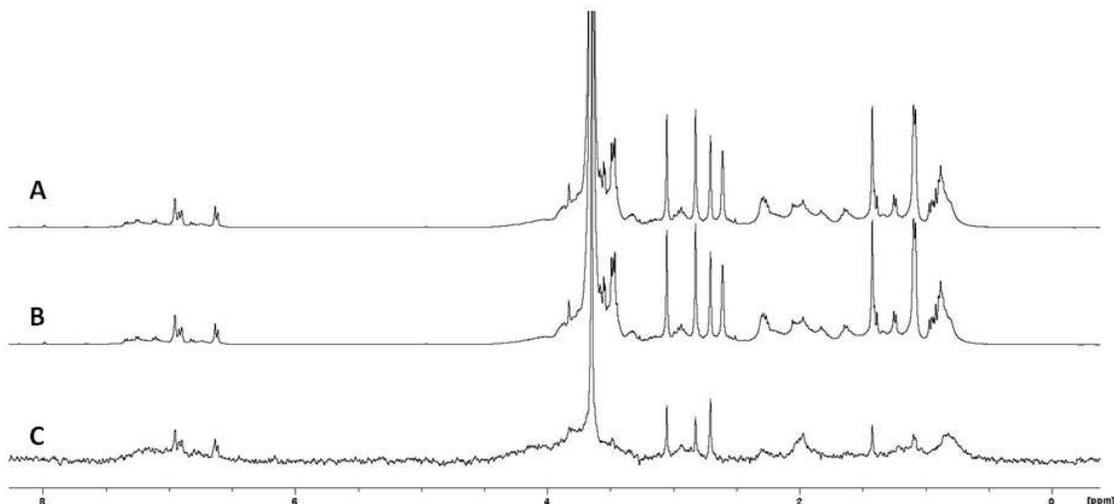
**Anexo 32.** RMN de  $^1\text{H}$  (400,1315 MHz, a 298 K, pH = 6,0 e 4,70 ppm D<sub>2</sub>O/HDO como referência) de AChE titulada com 0,34 mmol L<sup>-1</sup> de Fisostigmina, com tempo de saturação de 1,50 s. (A) espectro de ressonância STD-RMN *off-resonance*, (B) Espectro de STD-RMN *on-resonance* e (C) diferença entre os espectros *on-resonance* e *off-resonance*.



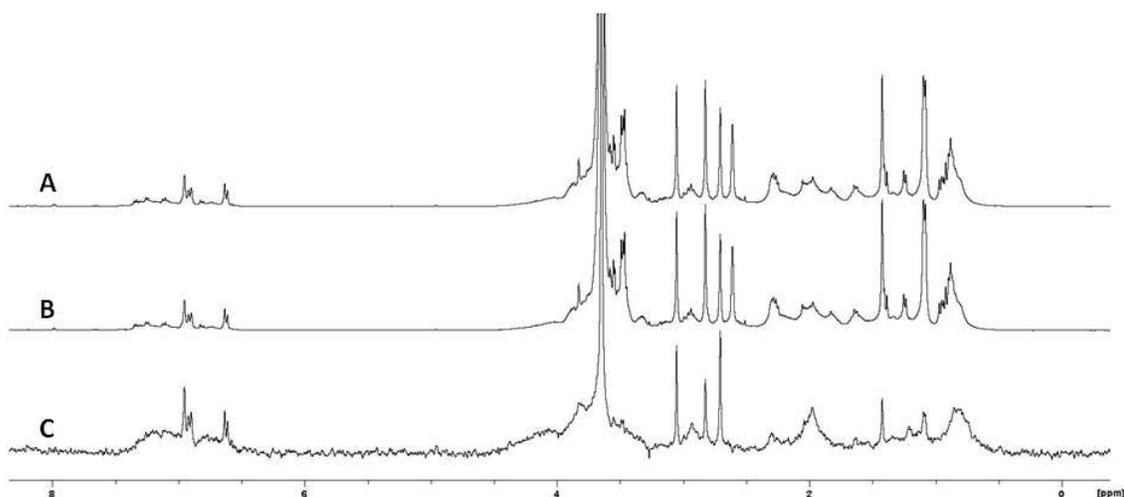
**Anexo 33.** RMN de  $^1\text{H}$  (400,1315 MHz, a 298 K, pH = 6,0 e 4,70 ppm D<sub>2</sub>O/HDO como referência) de AChE titulada com 0,34 mmol L<sup>-1</sup> de Fisostigmina, com tempo de saturação de 2,25 s. (A) espectro de ressonância STD-RMN *off-resonance*, (B) Espectro de STD-RMN *on-resonance* e (C) diferença entre os espectros *on-resonance* e *off-resonance*.



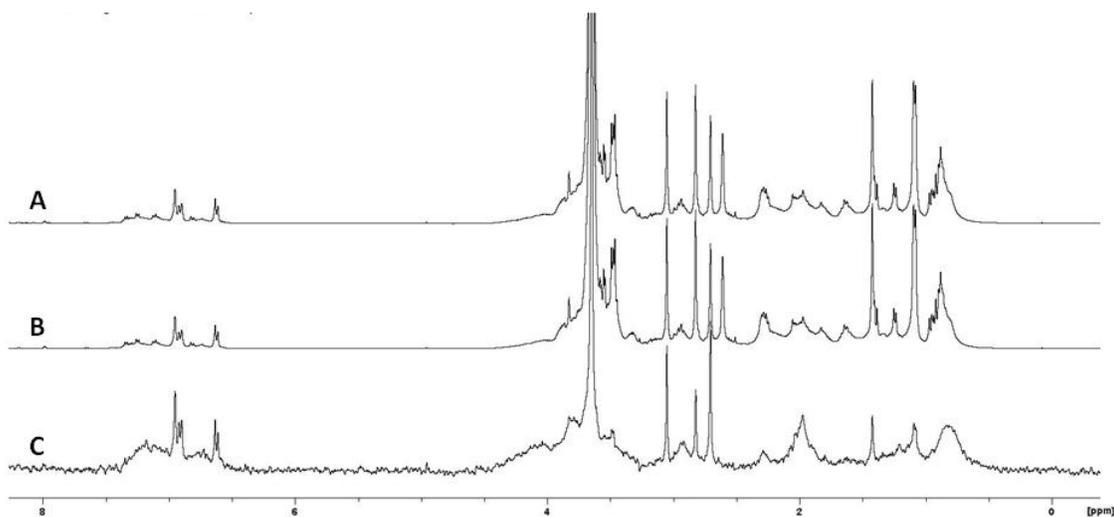
**Anexo 34.** RMN de  $^1\text{H}$  (400,1315 MHz, a 298 K, pH = 6,0 e 4,70 ppm D<sub>2</sub>O/HDO como referência) de AChE titulada com 0,34 mmol L<sup>-1</sup> de Fisostigmina, com tempo de saturação de 3,00 s. (A) espectro de ressonância STD-RMN *off-resonance*, (B) Espectro de STD-RMN *on-resonance* e (C) diferença entre os espectros *on-resonance* e *off-resonance*.



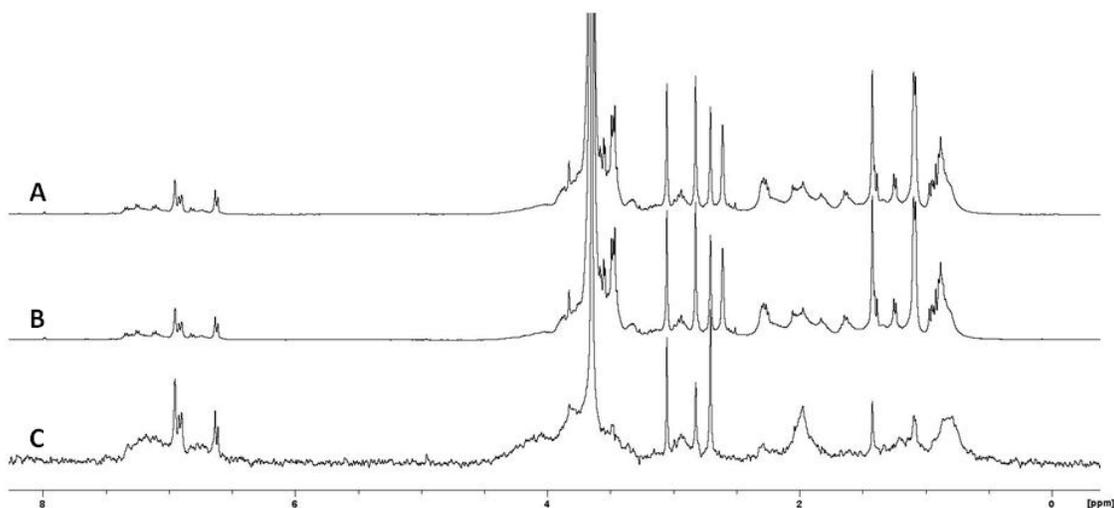
**Anexo 35.** RMN de  $^1\text{H}$  (400,1315 MHz, a 298 K, pH = 6,0 e 4,70 ppm D<sub>2</sub>O/HDO como referência) de AChE titulada com 0,42 mmol L<sup>-1</sup> de Fisostigmina, com tempo de saturação de 0,75 s. (A) espectro de ressonância STD-RMN *off-resonance*, (B) Espectro de STD-RMN *on-resonance* e (C) diferença entre os espectros *on-resonance* e *off-resonance*.



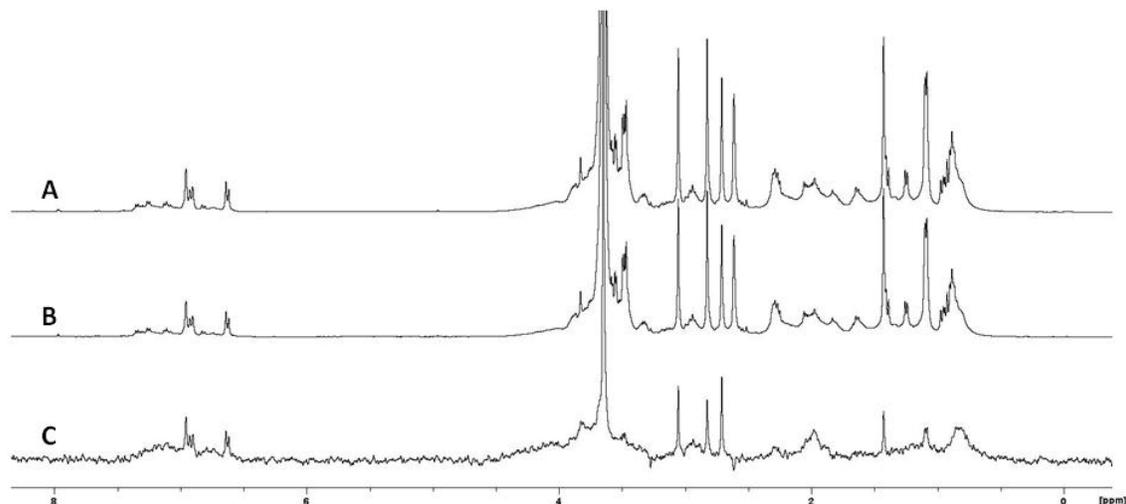
**Anexo 36.** RMN de  $^1\text{H}$  (400,1315 MHz, a 298 K, pH = 6,0 e 4,70 ppm D<sub>2</sub>O/HDO como referência) de AChE titulada com 0,42 mmol L<sup>-1</sup> de Fisostigmina, com tempo de saturação de 1,50 s. (A) espectro de ressonância STD-RMN *off-resonance*, (B) Espectro de STD-RMN *on-resonance* e (C) diferença entre os espectros *on-resonance* e *off-resonance*.



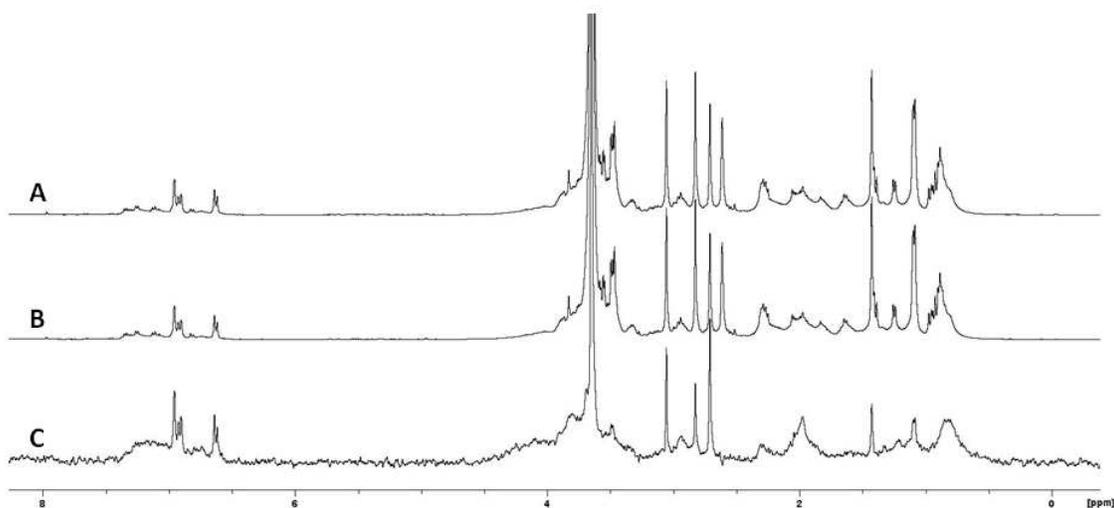
**Anexo 37.** RMN de <sup>1</sup>H (400,1315 MHz, a 298 K, pH = 6,0 e 4,70 ppm D<sub>2</sub>O/HDO como referência) de AChE titulada com 0,42 mmol L<sup>-1</sup> de Fisostigmina, com tempo de saturação de 2,25 s. (A) espectro de ressonância STD-RMN *off-resonance*, (B) Espectro de STD-RMN *on-resonance* e (C) diferença entre os espectros *on-resonance* e *off-resonance*.



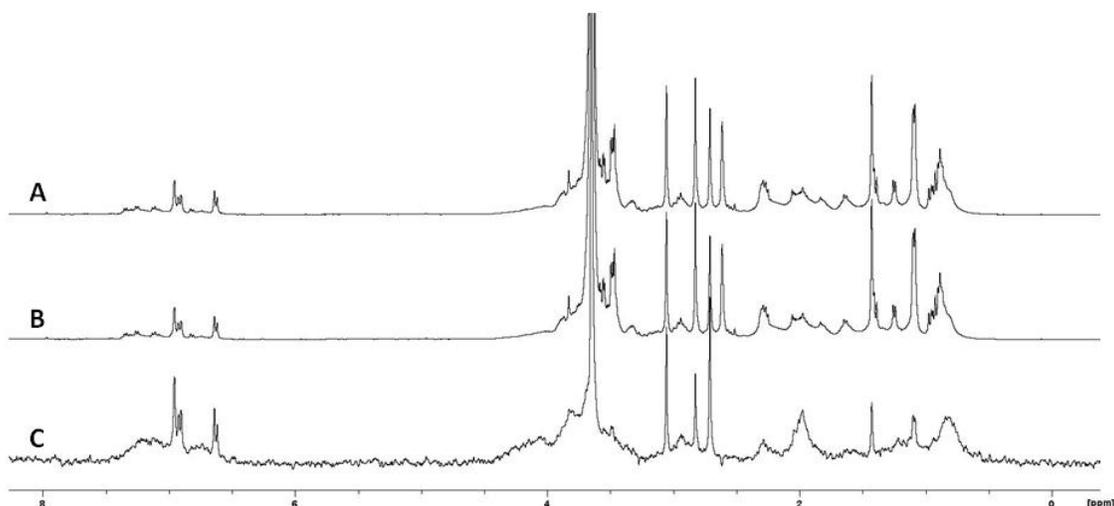
**Anexo 38.** RMN de <sup>1</sup>H (400,1315 MHz, a 298 K, pH = 6,0 e 4,70 ppm D<sub>2</sub>O/HDO como referência) de AChE titulada com 0,42 mmol L<sup>-1</sup> de Fisostigmina, com tempo de saturação de 3,00 s. (A) espectro de ressonância STD-RMN *off-resonance*, (B) Espectro de STD-RMN *on-resonance* e (C) diferença entre os espectros *on-resonance* e *off-resonance*.



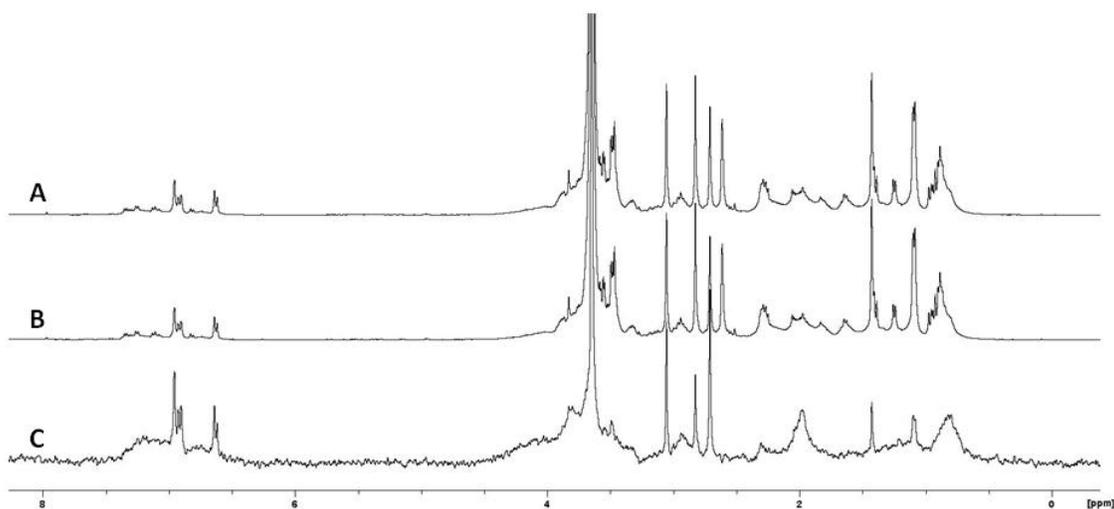
**Anexo 39.** RMN de  $^1\text{H}$  (400,1315 MHz, a 298 K, pH = 6,0 e 4,70 ppm D<sub>2</sub>O/HDO como referência) de AChE titulada com 0,49 mmol L<sup>-1</sup> de Fisostigmina, com tempo de saturação de 0,75 s. (A) espectro de ressonância STD-RMN *off-resonance*, (B) Espectro de STD-RMN *on-resonance* e (C) diferença entre os espectros *on-resonance* e *off-resonance*.



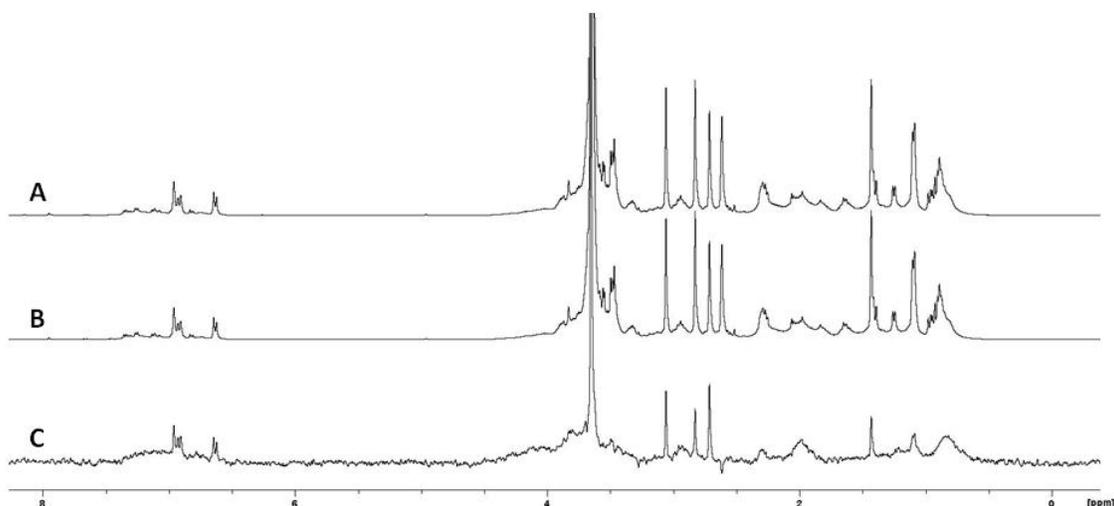
**Anexo 40.** . RMN de  $^1\text{H}$  (400,1315 MHz, a 298 K, pH = 6,0 e 4,70 ppm D<sub>2</sub>O/HDO como referência) de AChE titulada com 0,49 mmol L<sup>-1</sup> de Fisostigmina, com tempo de saturação de 1,50 s. (A) espectro de ressonância STD-RMN *off-resonance*, (B) Espectro de STD-RMN *on-resonance* e (C) diferença entre os espectros *on-resonance* e *off-resonance*.



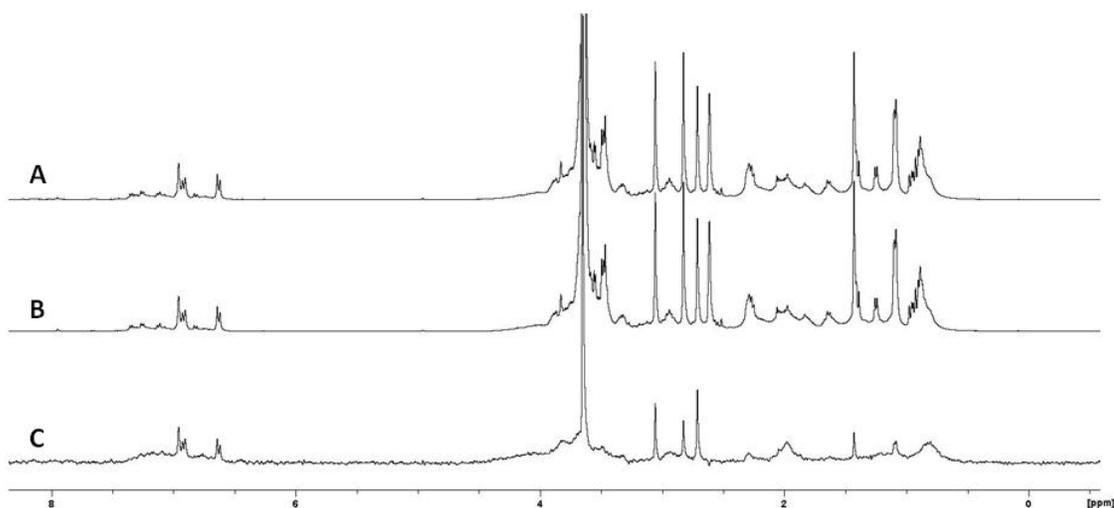
**Anexo 41.** . RMN de <sup>1</sup>H (400,1315 MHz, a 298 K, pH = 6,0 e 4,70 ppm D<sub>2</sub>O/HDO como referência) de AChE titulada com 0,49 mmol L<sup>-1</sup> de Fisostigmina, com tempo de saturação de 2,25 s. (A) espectro de ressonância STD-RMN *off-resonance*, (B) Espectro de STD-RMN *on-resonance* e (C) diferença entre os espectros *on-resonance* e *off-resonance*.



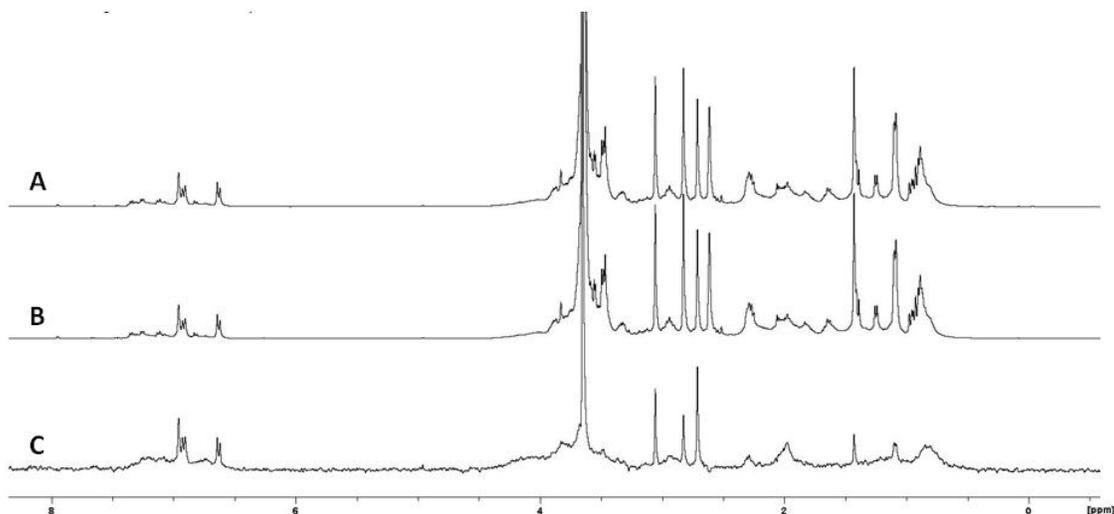
**Anexo 42.** . RMN de <sup>1</sup>H (400,1315 MHz, a 298 K, pH = 6,0 e 4,70 ppm D<sub>2</sub>O/HDO como referência) de AChE titulada com 0,49 mmol L<sup>-1</sup> de Fisostigmina, com tempo de saturação de 3,00 s. (A) espectro de ressonância STD-RMN *off-resonance*, (B) Espectro de STD-RMN *on-resonance* e (C) diferença entre os espectros *on-resonance* e *off-resonance*.



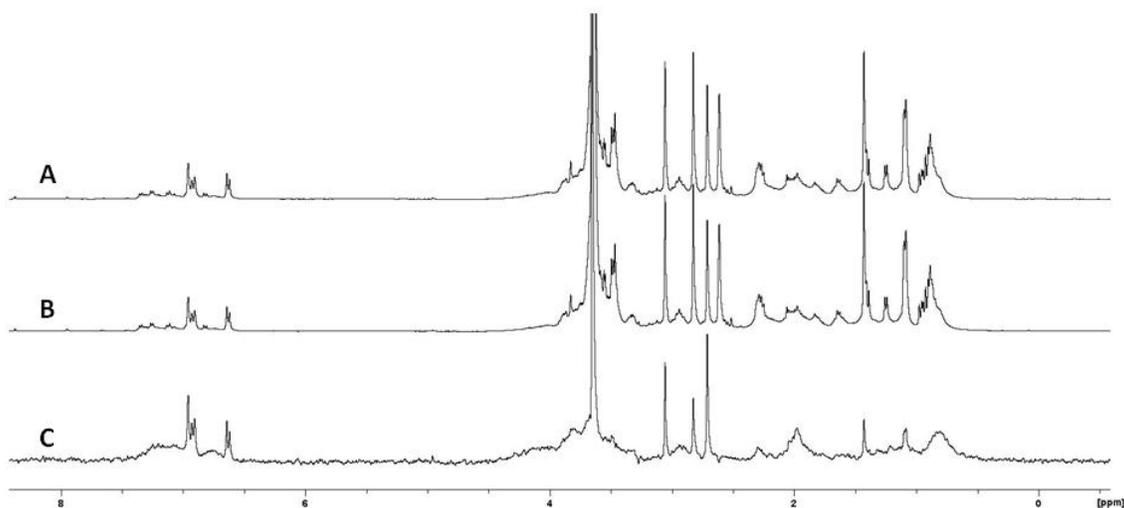
**Anexo 43.** . RMN de  $^1\text{H}$  (400,1315 MHz, a 298 K, pH = 6,0 e 4,70 ppm D<sub>2</sub>O/HDO como referência) de AChE titulada com 0,57 mmol L<sup>-1</sup> de Fisostigmina, com tempo de saturação de 0,75 s. (A) espectro de ressonância STD-RMN *off-resonance*, (B) Espectro de STD-RMN *on-resonance* e (C) diferença entre os espectros *on-resonance* e *off-resonance*.



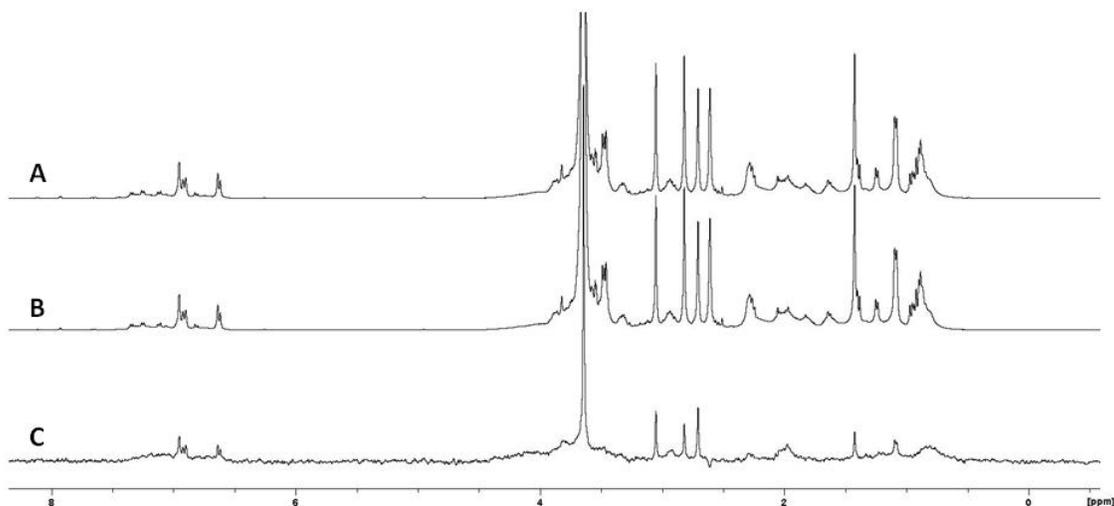
**Anexo 44.** . RMN de  $^1\text{H}$  (400,1315 MHz, a 298 K, pH = 6,0 e 4,70 ppm D<sub>2</sub>O/HDO como referência) de AChE titulada com 0,57 mmol L<sup>-1</sup> de Fisostigmina, com tempo de saturação de 1,50 s. (A) espectro de ressonância STD-RMN *off-resonance*, (B) Espectro de STD-RMN *on-resonance* e (C) diferença entre os espectros *on-resonance* e *off-resonance*.



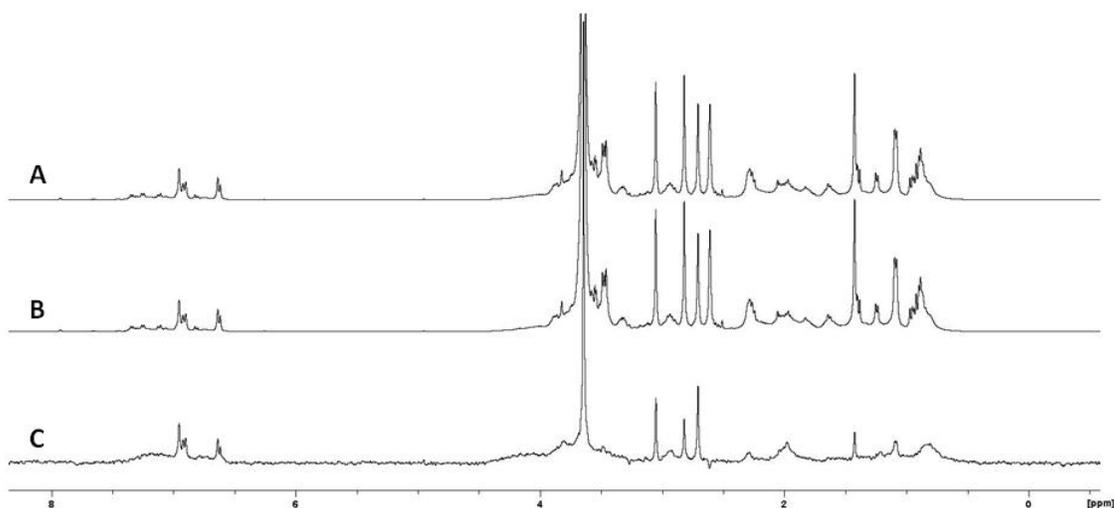
**Anexo 45.** RMN de <sup>1</sup>H (400,1315 MHz, a 298 K, pH = 6,0 e 4,70 ppm D<sub>2</sub>O/HDO como referência) de AChE titulada com 0,57 mmol L<sup>-1</sup> de Fisostigmina, com tempo de saturação de 2,25 s. (A) espectro de ressonância STD-RMN *off-resonance*, (B) Espectro de STD-RMN *on-resonance* e (C) diferença entre os espectros *on-resonance* e *off-resonance*.



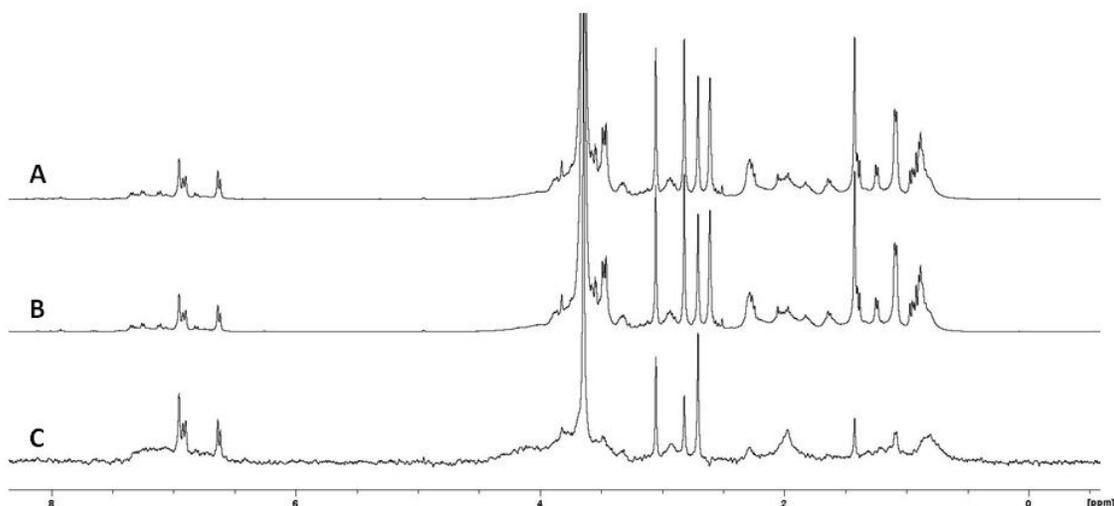
**Anexo 46.** RMN de <sup>1</sup>H (400,1315 MHz, a 298 K, pH = 6,0 e 4,70 ppm D<sub>2</sub>O/HDO como referência) de AChE titulada com 0,57 mmol L<sup>-1</sup> de Fisostigmina, com tempo de saturação de 3,00 s. (A) espectro de ressonância STD-RMN *off-resonance*, (B) Espectro de STD-RMN *on-resonance* e (C) diferença entre os espectros *on-resonance* e *off-resonance*.



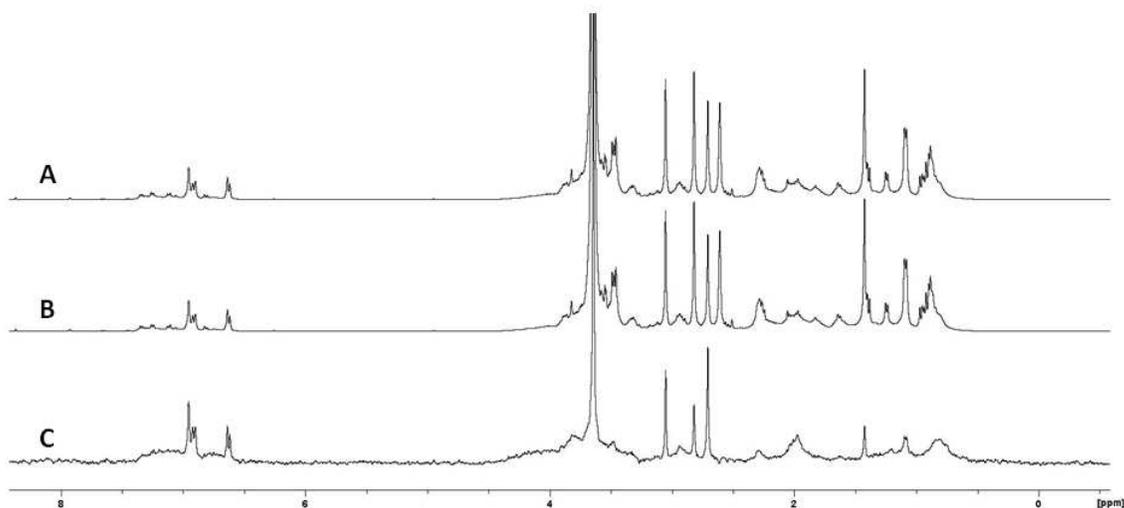
**Anexo 47.** RMN de <sup>1</sup>H (400,1315 MHz, a 298 K, pH = 6,0 e 4,70 ppm D<sub>2</sub>O/HDO como referência) de AChE titulada com 0,64 mmol L<sup>-1</sup> de Fisostigmina, com tempo de saturação de 0,75 s. (A) espectro de ressonância STD-RMN *off-resonance*, (B) Espectro de STD-RMN *on-resonance* e (C) diferença entre os espectros *on-resonance* e *off-resonance*.



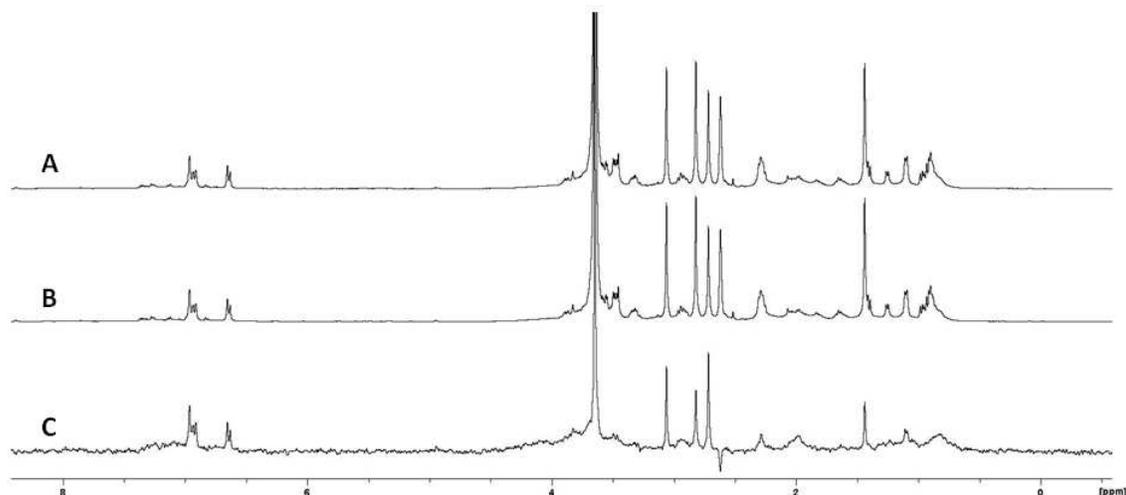
**Anexo 48.** RMN de <sup>1</sup>H (400,1315 MHz, a 298 K, pH = 6,0 e 4,70 ppm D<sub>2</sub>O/HDO como referência) de AChE titulada com 0,64 mmol L<sup>-1</sup> de Fisostigmina, com tempo de saturação de 1,50 s. (A) espectro de ressonância STD-RMN *off-resonance*, (B) Espectro de STD-RMN *on-resonance* e (C) diferença entre os espectros *on-resonance* e *off-resonance*.



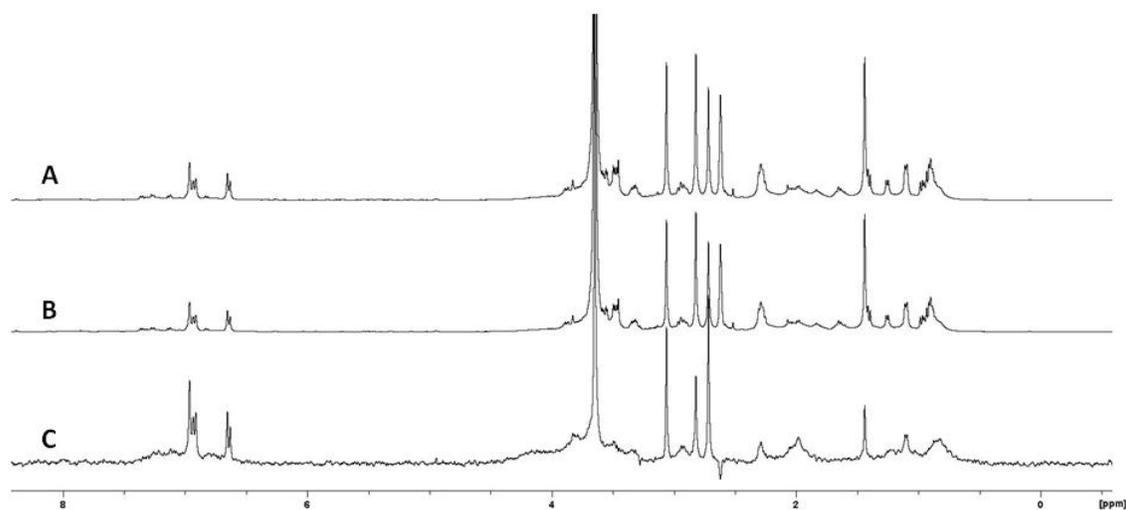
**Anexo 49.** RMN de  $^1\text{H}$  (400,1315 MHz, a 298 K, pH = 6,0 e 4,70 ppm D<sub>2</sub>O/HDO como referência) de AChE titulada com 0,64 mmol L<sup>-1</sup> de Fisostigmina, com tempo de saturação de 2,25 s. (A) espectro de ressonância STD-RMN *off-resonance*, (B) Espectro de STD-RMN *on-resonance* e (C) diferença entre os espectros *on-resonance* e *off-resonance*.



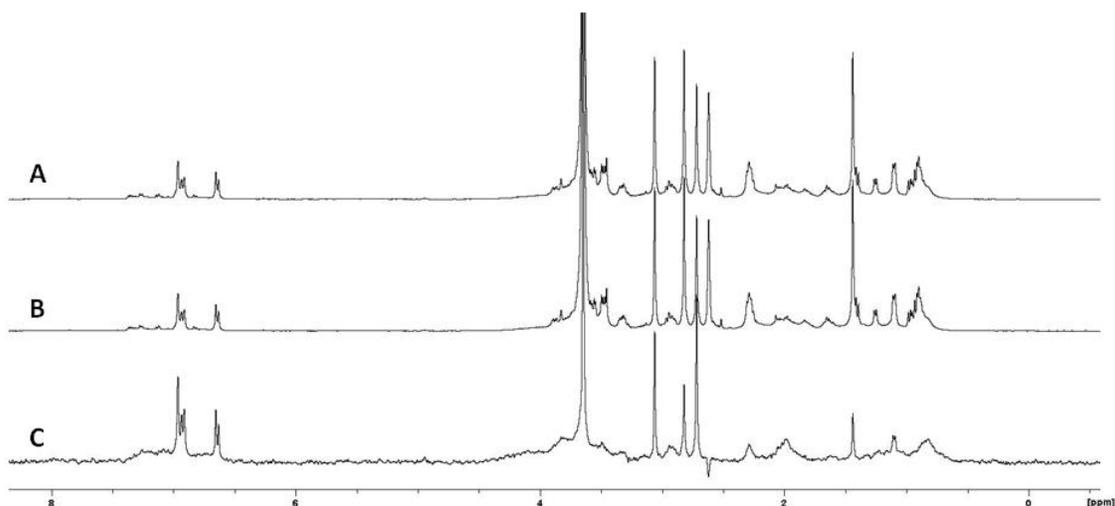
**Anexo 50.** RMN de  $^1\text{H}$  (400,1315 MHz, a 298 K, pH = 6,0 e 4,70 ppm D<sub>2</sub>O/HDO como referência) de AChE titulada com 0,64 mmol L<sup>-1</sup> de Fisostigmina, com tempo de saturação de 3,00 s. (A) espectro de ressonância STD-RMN *off-resonance*, (B) Espectro de STD-RMN *on-resonance* e (C) diferença entre os espectros *on-resonance* e *off-resonance*.



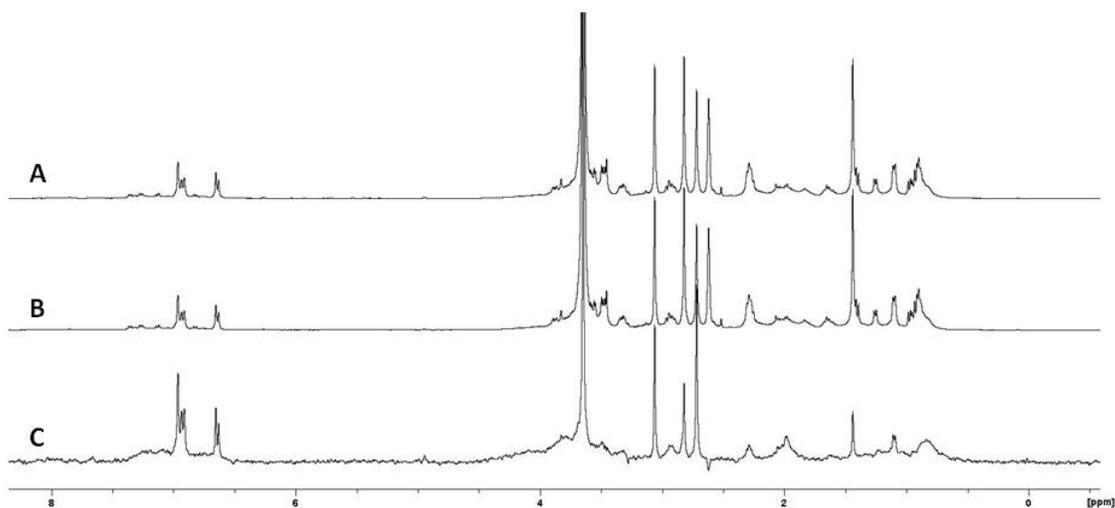
**Anexo 51.** RMN de  $^1\text{H}$  (400,1315 MHz, a 298 K, pH = 6,0 e 4,70 ppm D<sub>2</sub>O/HDO como referência) de AChE titulada com 0,98 mmol L<sup>-1</sup> de Fisostigmina, com tempo de saturação de 0,75 s. (A) espectro de ressonância STD-RMN *off-resonance*, (B) Espectro de STD-RMN *on-resonance* e (C) diferença entre os espectros *on-resonance* e *off-resonance*.



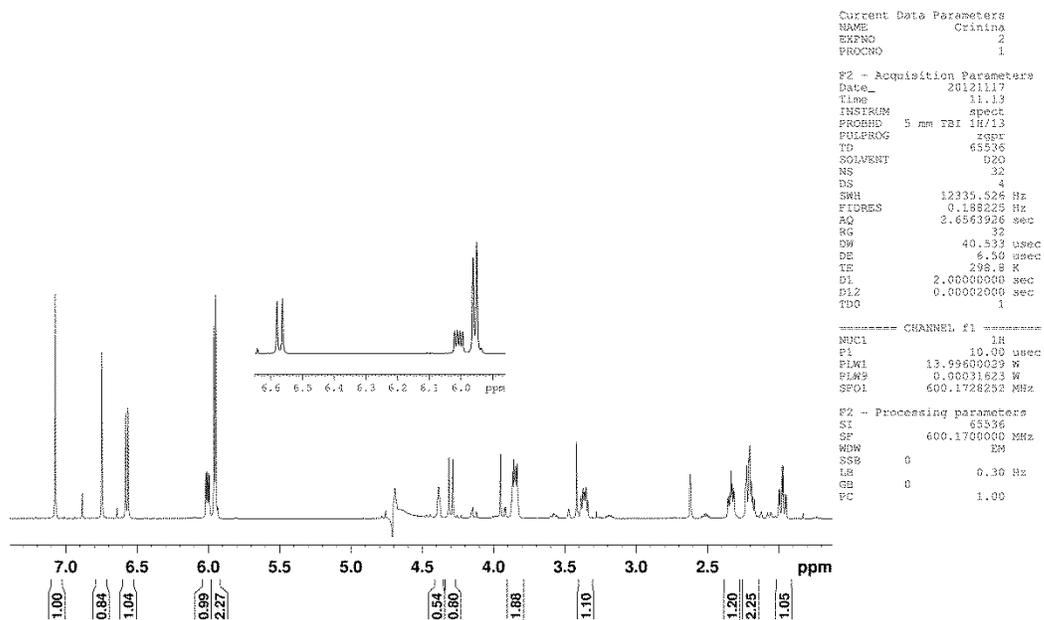
**Anexo 52.** RMN de  $^1\text{H}$  (400,1315 MHz, a 298 K, pH = 6,0 e 4,70 ppm D<sub>2</sub>O/HDO como referência) de AChE titulada com 0,98 mmol L<sup>-1</sup> de Fisostigmina, com tempo de saturação de 1,50 s. (A) espectro de ressonância STD-RMN *off-resonance*, (B) Espectro de STD-RMN *on-resonance* e (C) diferença entre os espectros *on-resonance* e *off-resonance*.



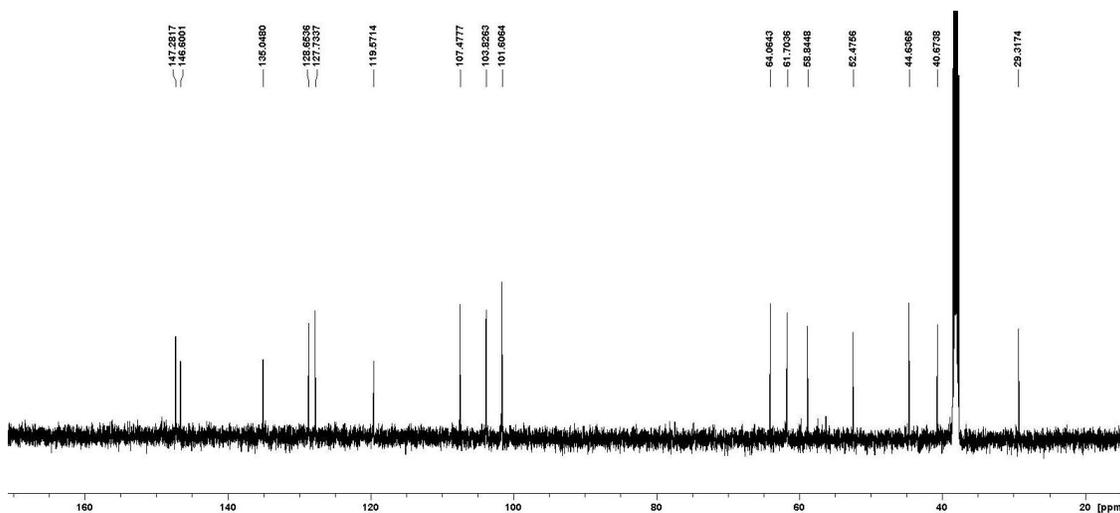
**Anexo 53.** RMN de <sup>1</sup>H (400,1315 MHz, a 298 K, pH = 6,0 e 4,70 ppm D<sub>2</sub>O/HDO como referência) de AChE titulada com 0,98 mmol L<sup>-1</sup> de Fisostigmina, com tempo de saturação de 2,25 s. (A) espectro de ressonância STD-RMN *off-resonance*, (B) Espectro de STD-RMN *on-resonance* e (C) diferença entre os espectros *on-resonance* e *off-resonance*.



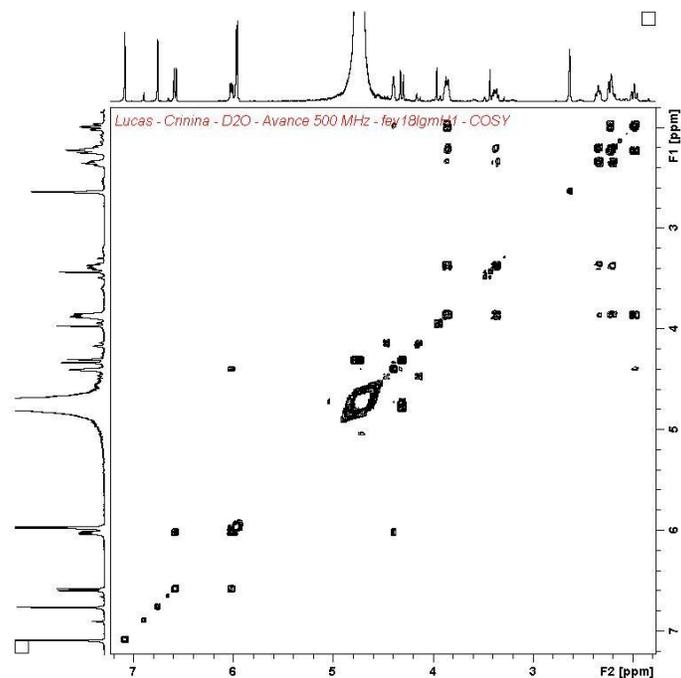
**Anexo 54.** RMN de <sup>1</sup>H (400,1315 MHz, a 298 K, pH = 6,0 e 4,70 ppm D<sub>2</sub>O/HDO como referência) de AChE titulada com 0,98 mmol L<sup>-1</sup> de Fisostigmina, com tempo de saturação de 3,00 s. (A) espectro de ressonância STD-RMN *off-resonance*, (B) Espectro de STD-RMN *on-resonance* e (C) diferença entre os espectros *on-resonance* e *off-resonance*.



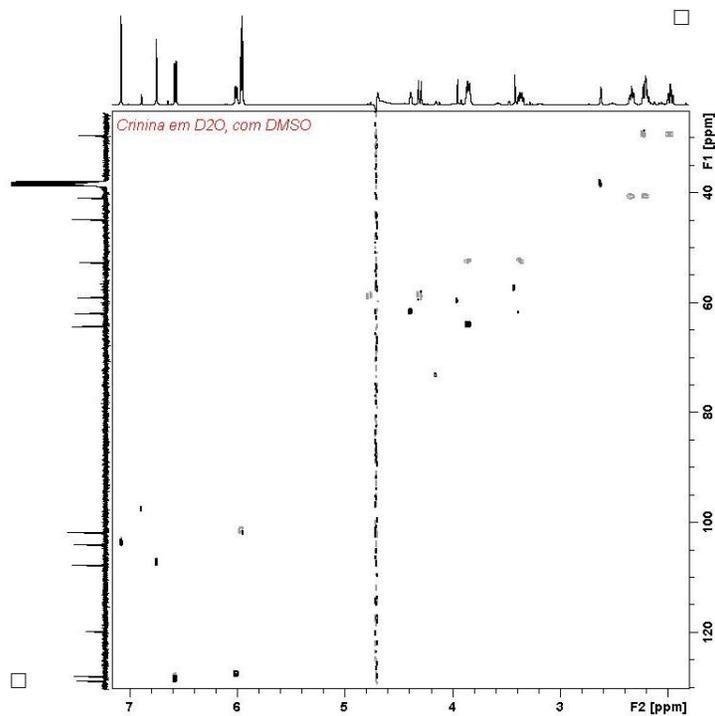
Anexo 55. RMN de  $^1\text{H}$  (600,1728 MHz, a 298 K, 100 mmol L $^{-1}$  de tampão fosfato pH=6,5 e 4,70 ppm HDO como referência) da Crinia.



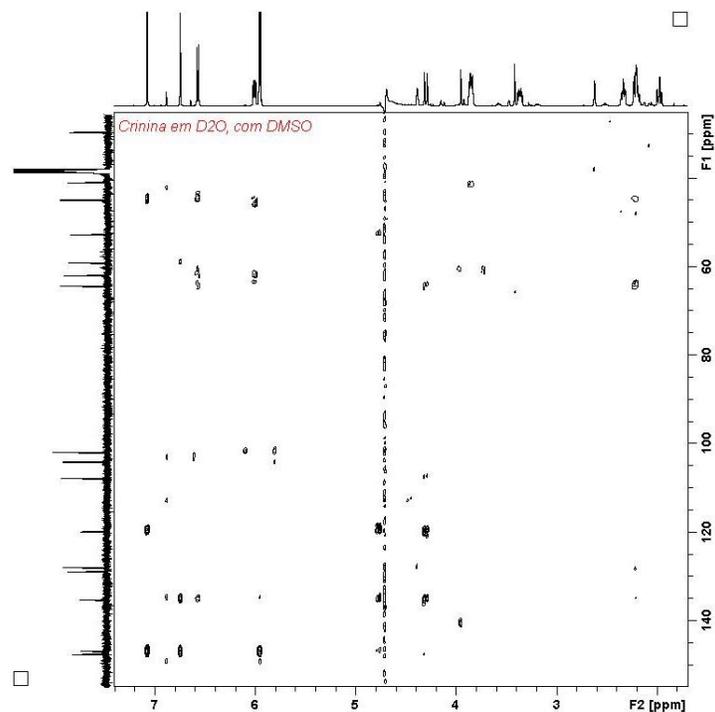
Anexo 56. RMN de  $^{13}\text{C}$  (150,9279 MHz, a 298 K, 100 mmol L $^{-1}$  de tampão fosfato pH=6,5) da Crinia.



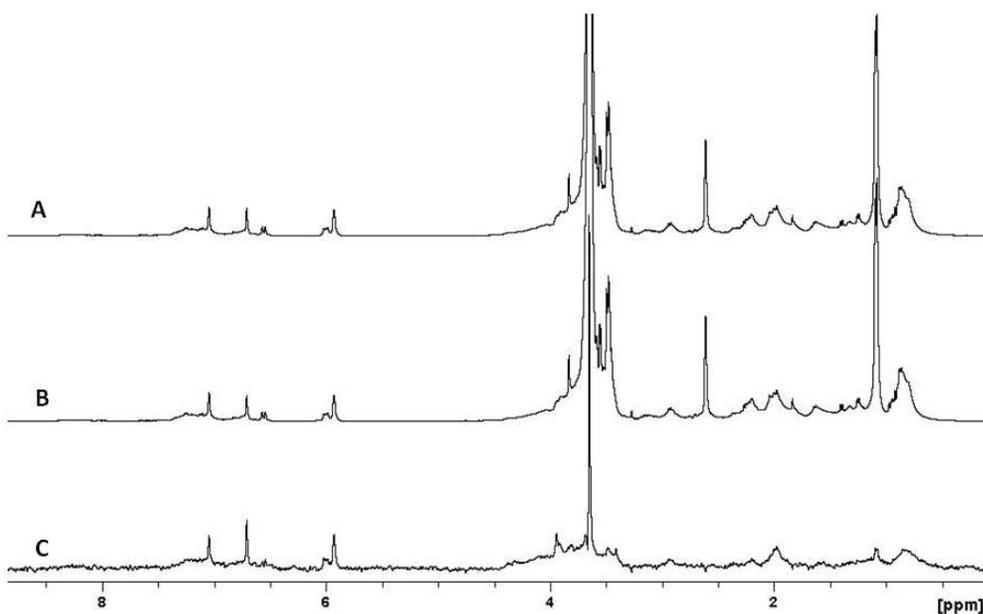
**Anexo 57.** Mapa de contorno relativo ao experimento de correlação homonuclear, COSY, (600,1728 MHz, a 298 K, 100 mmol L<sup>-1</sup> de tampão fosfato pH=6 e 4,70 ppm HDO como referência) da Crinina.



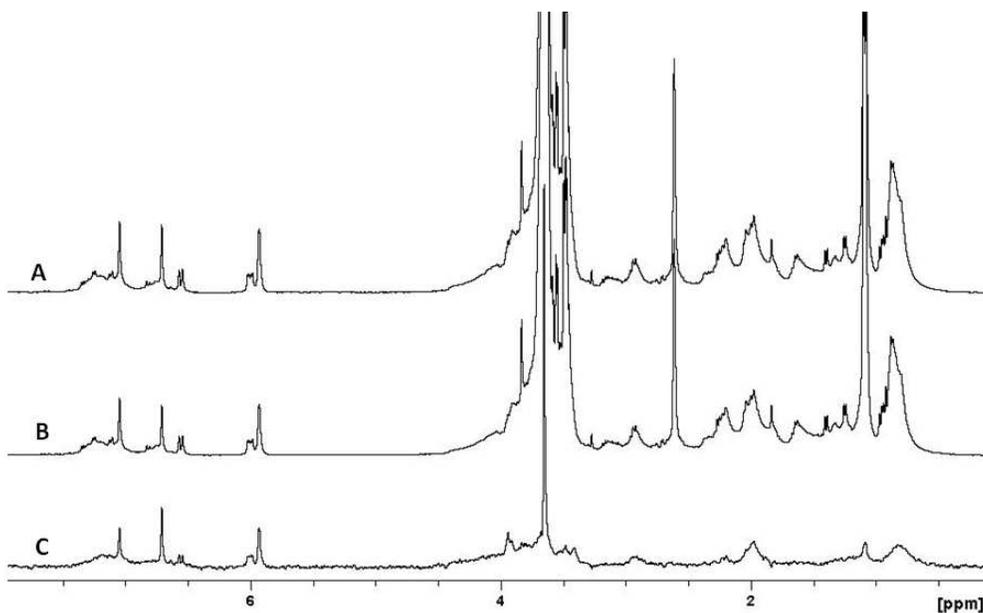
**Anexo 58.** Mapa de contorno relativo ao experimento de correlação heteronuclear, HSQC, (600,1728 MHz, a 298 K, 100 mmol L<sup>-1</sup> de tampão fosfato pH=6 e 4,70 ppm HDO como referência) da Crinina.



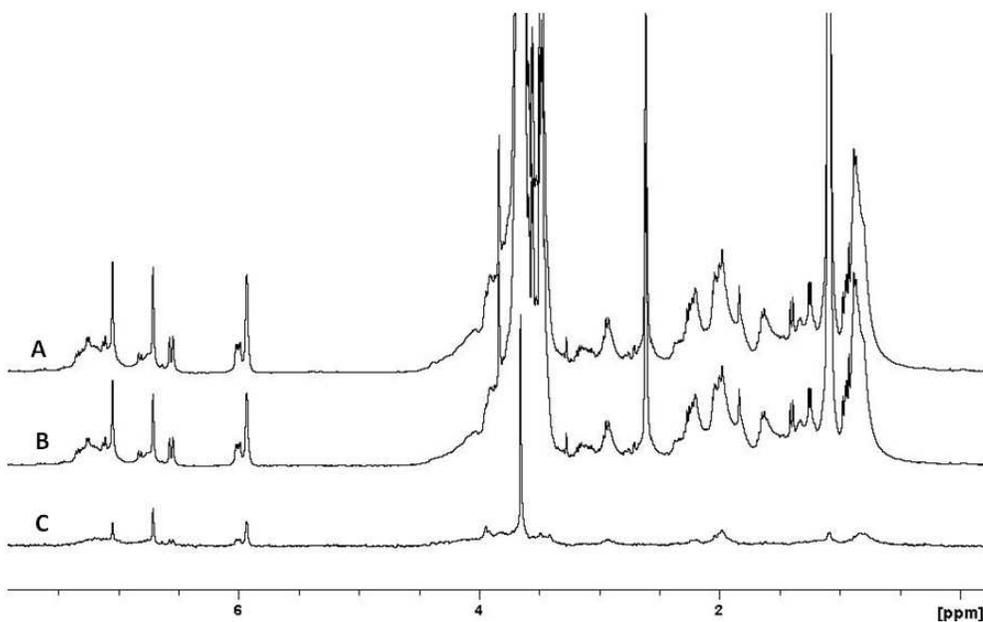
**Anexo 59.** Mapa de contorno relativo ao experimento de correlação heteronuclear, HMBC, (600,1728 MHz, a 298 K, 100 mmol L<sup>-1</sup> de tampão fosfato pH=6 e 4,70 ppm HDO como referência) da Crinia.



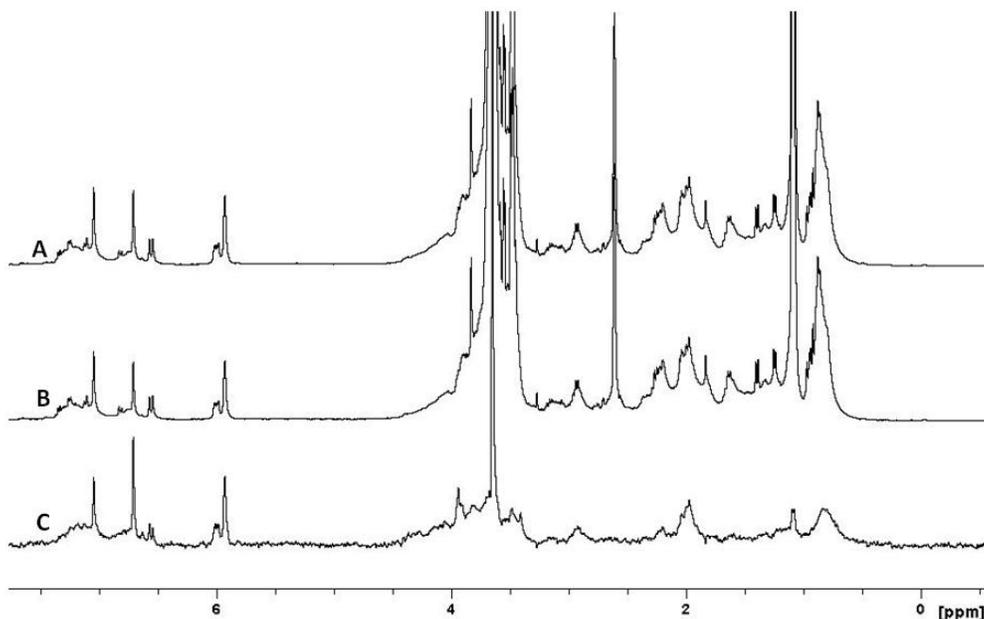
**Anexo 60.** RMN de <sup>1</sup>H (400,1315 MHz, a 298 K, pH = 6,0 e 4,70 ppm D<sub>2</sub>O/HDO como referência) de AChE titulada com 0,29 mmol L<sup>-1</sup> de Crinia, com tempo de saturação de 0,75 s. (A) espectro de ressonância STD-RMN *off-resonance*, (B) Espectro de STD-RMN *on-resonance* e (C) diferença entre os espectros *on-resonance* e *off-resonance*.



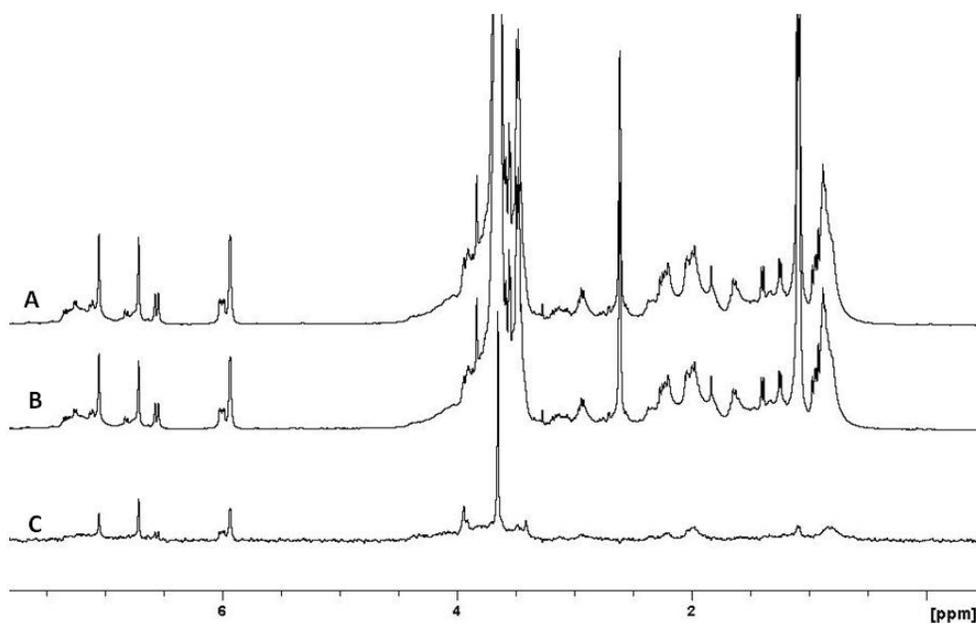
**Anexo 61.** RMN de <sup>1</sup>H (400,1315 MHz, a 298 K, pH = 6,0 e 4,70 ppm D<sub>2</sub>O/HDO como referência) de AChE titulada com 0,29 mmol L<sup>-1</sup> de Crinina, com tempo de saturação de 1,50 s. (A) espectro de ressonância STD-RMN *off-resonance*, (B) Espectro de STD-RMN *on-resonance* e (C) diferença entre os espectros *on-resonance* e *off-resonance*.



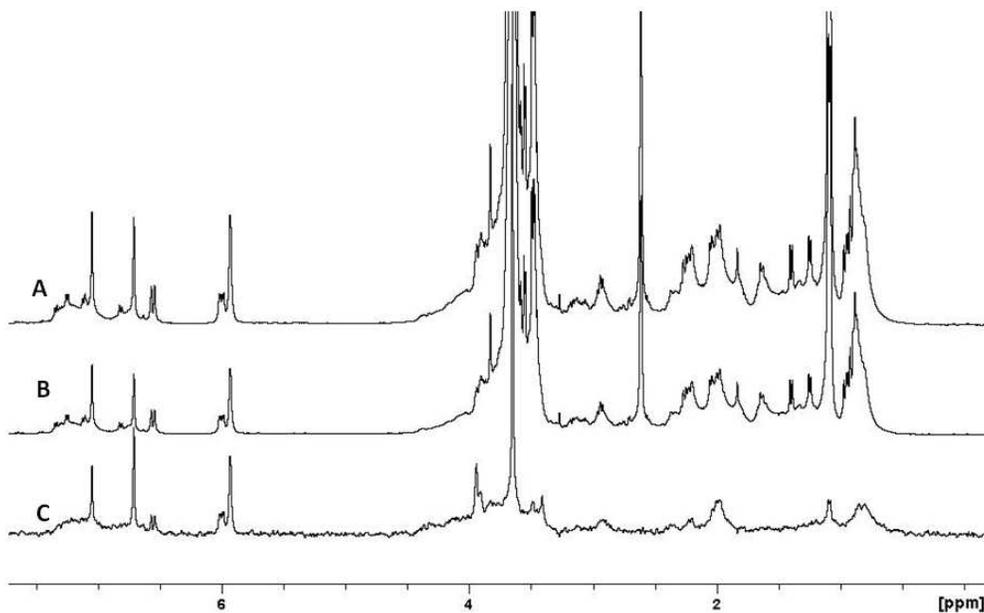
**Anexo 62.** RMN de <sup>1</sup>H (400,1315 MHz, a 298 K, pH = 6,0 e 4,70 ppm D<sub>2</sub>O/HDO como referência) de AChE titulada com 0,29 mmol L<sup>-1</sup> de Crinina, com tempo de saturação de 2,25 s. (A) espectro de ressonância STD-RMN *off-resonance*, (B) Espectro de STD-RMN *on-resonance* e (C) diferença entre os espectros *on-resonance* e *off-resonance*.



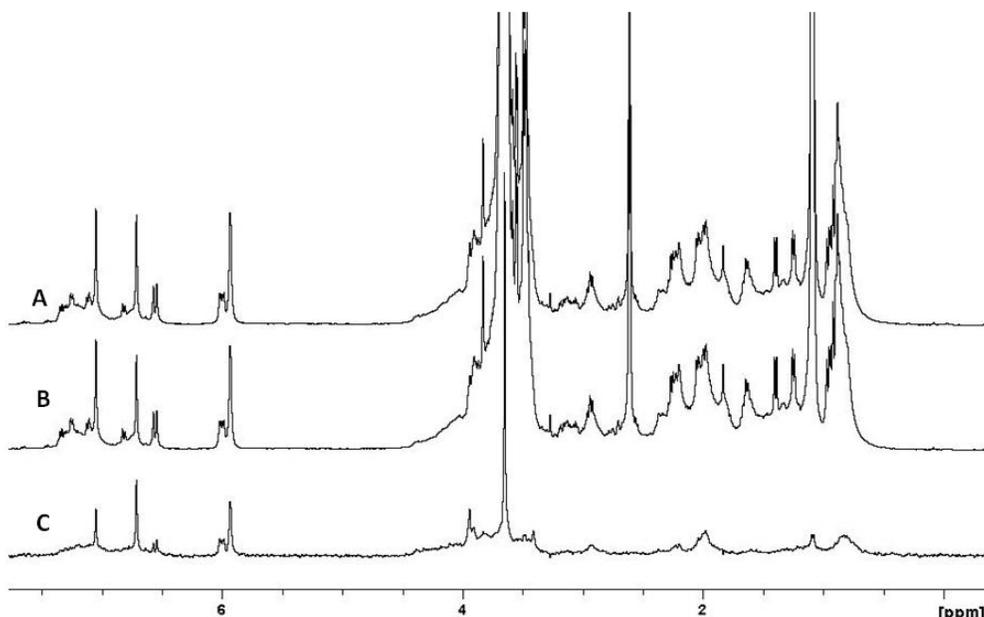
**Anexo 63.** RMN de  $^1\text{H}$  (400,1315 MHz, a 298 K, pH = 6,0 e 4,70 ppm D<sub>2</sub>O/HDO como referência) de AChE titulada com 0,29 mmol L<sup>-1</sup> de Crinina, com tempo de saturação de 3,00 s. (A) espectro de ressonância STD-RMN *off-resonance*, (B) Espectro de STD-RMN *on-resonance* e (C) diferença entre os espectros *on-resonance* e *off-resonance*.



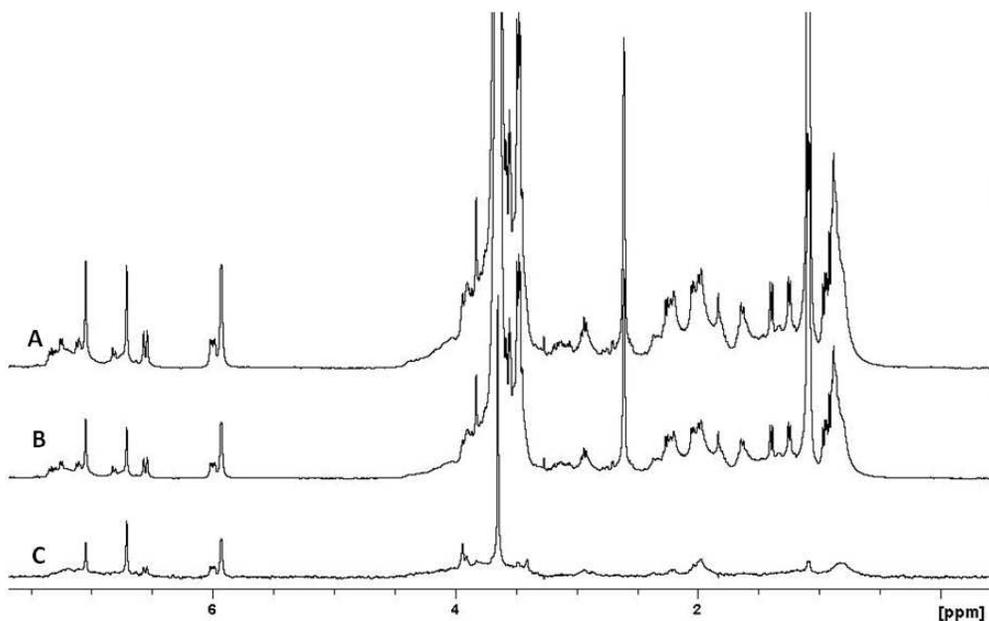
**Anexo 64.** RMN de  $^1\text{H}$  (400,1315 MHz, a 298 K, pH = 6,0 e 4,70 ppm D<sub>2</sub>O/HDO como referência) de AChE titulada com 0,38 mmol L<sup>-1</sup> de Crinina, com tempo de saturação de 0,75 s. (A) espectro de ressonância STD-RMN *off-resonance*, (B) Espectro de STD-RMN *on-resonance* e (C) diferença entre os espectros *on-resonance* e *off-resonance*.



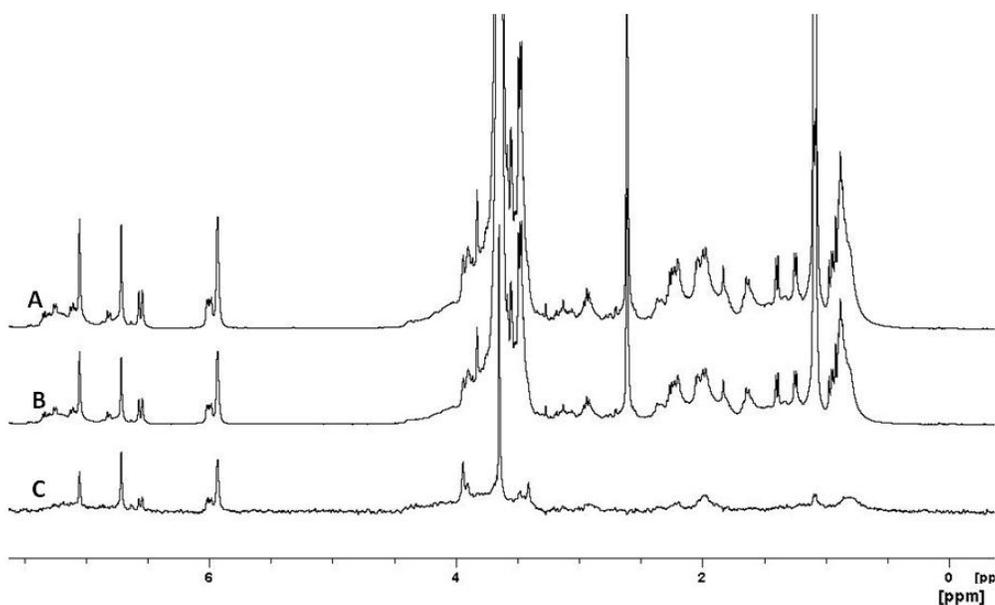
**Anexo 65.** RMN de  $^1\text{H}$  (400,1315 MHz, a 298 K, pH = 6,0 e 4,70 ppm D<sub>2</sub>O/HDO como referência) de AChE titulada com 0,38 mmol L<sup>-1</sup> de Crinina, com tempo de saturação de 1,50 s. (A) espectro de ressonância STD-RMN *off-resonance*, (B) Espectro de STD-RMN *on-resonance* e (C) diferença entre os espectros *on-resonance* e *off-resonance*.



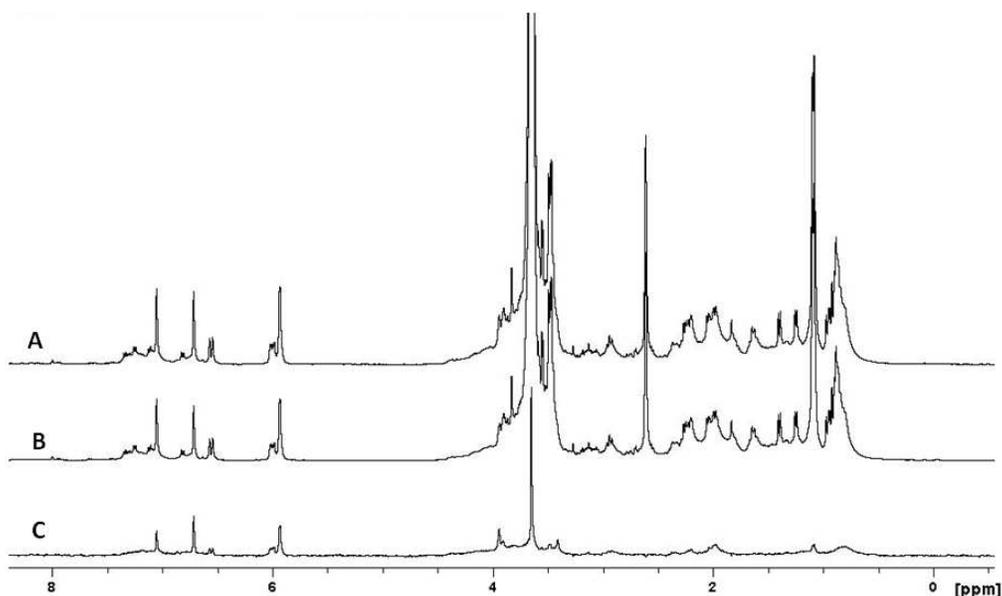
**Anexo 66.** RMN de  $^1\text{H}$  (400,1315 MHz, a 298 K, pH = 6,0 e 4,70 ppm D<sub>2</sub>O/HDO como referência) de AChE titulada com 0,38 mmol L<sup>-1</sup> de Crinina, com tempo de saturação de 2,25 s. (A) espectro de ressonância STD-RMN *off-resonance*, (B) Espectro de STD-RMN *on-resonance* e (C) diferença entre os espectros *on-resonance* e *off-resonance*.



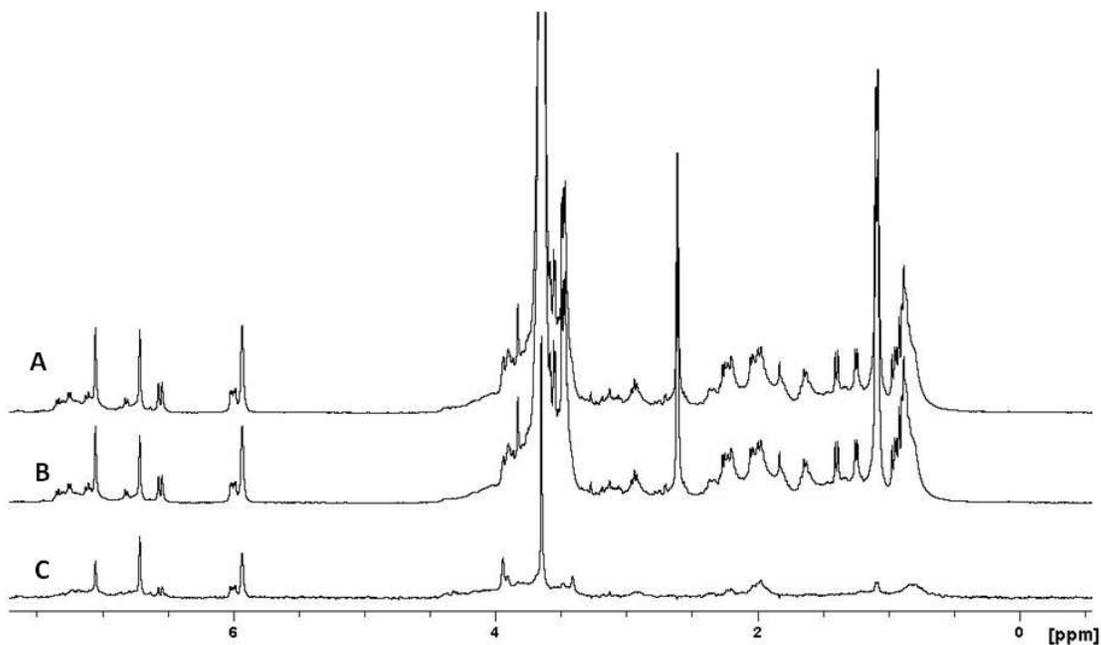
**Anexo 67.** RMN de  $^1\text{H}$  (400,1315 MHz, a 298 K, pH = 6,0 e 4,70 ppm D<sub>2</sub>O/HDO como referência) de AChE titulada com 0,38 mmol L<sup>-1</sup> de Crinina, com tempo de saturação de 3,00 s. (A) espectro de ressonância STD-RMN *off-resonance*, (B) Espectro de STD-RMN *on-resonance* e (C) diferença entre os espectros *on-resonance* e *off-resonance*.



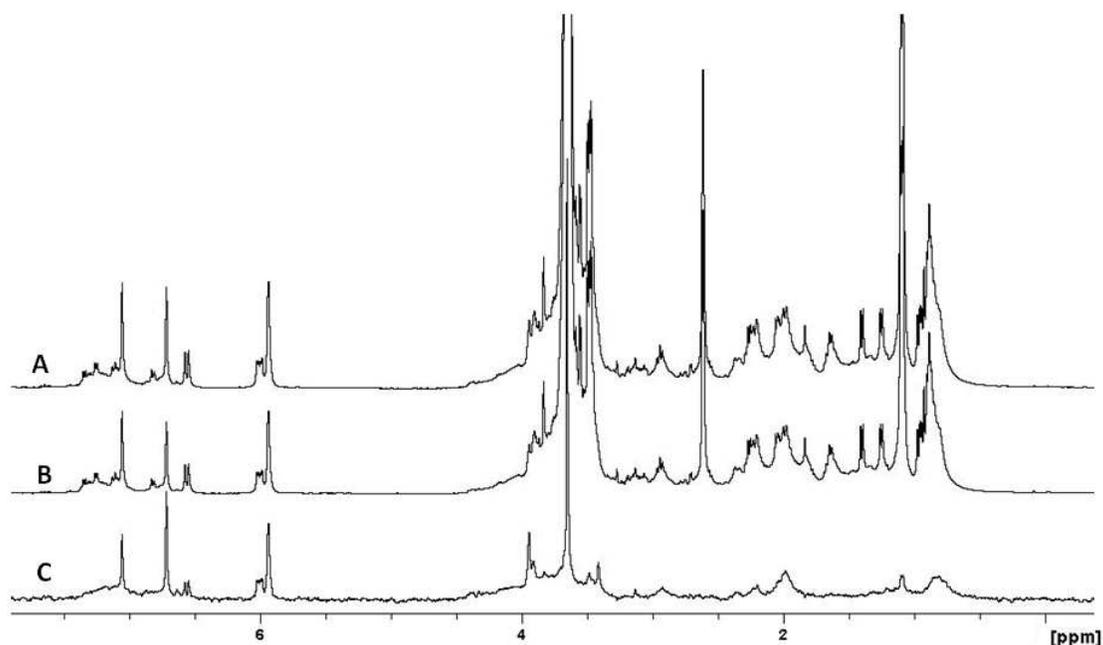
**Anexo 68.** RMN de  $^1\text{H}$  (400,1315 MHz, a 298 K, pH = 6,0 e 4,70 ppm D<sub>2</sub>O/HDO como referência) de AChE titulada com 0,46 mmol L<sup>-1</sup> de Crinina, com tempo de saturação de 0,75 s. (A) espectro de ressonância STD-RMN *off-resonance*, (B) Espectro de STD-RMN *on-resonance* e (C) diferença entre os espectros *on-resonance* e *off-resonance*.



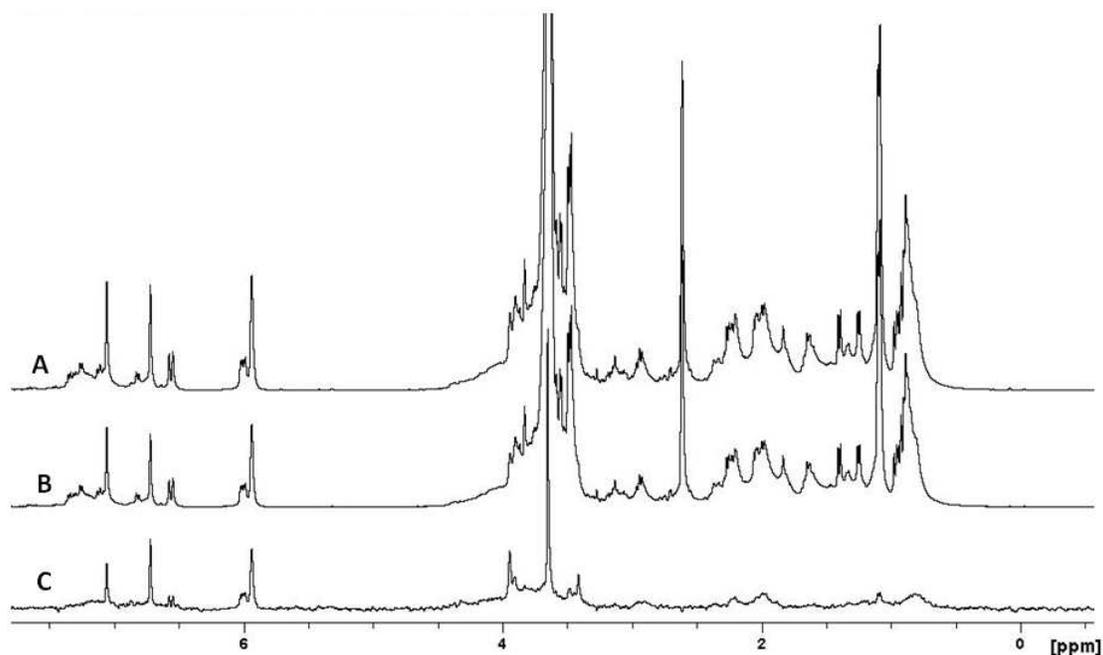
**Anexo 69.** RMN de  $^1\text{H}$  (400,1315 MHz, a 298 K, pH = 6,0 e 4,70 ppm D<sub>2</sub>O/HDO como referência) de AChE titulada com 0,46 mmol L<sup>-1</sup> de Crinina, com tempo de saturação de 1,50 s. (A) espectro de ressonância STD-RMN *off-resonance*, (B) Espectro de STD-RMN *on-resonance* e (C) diferença entre os espectros *on-resonance* e *off-resonance*.



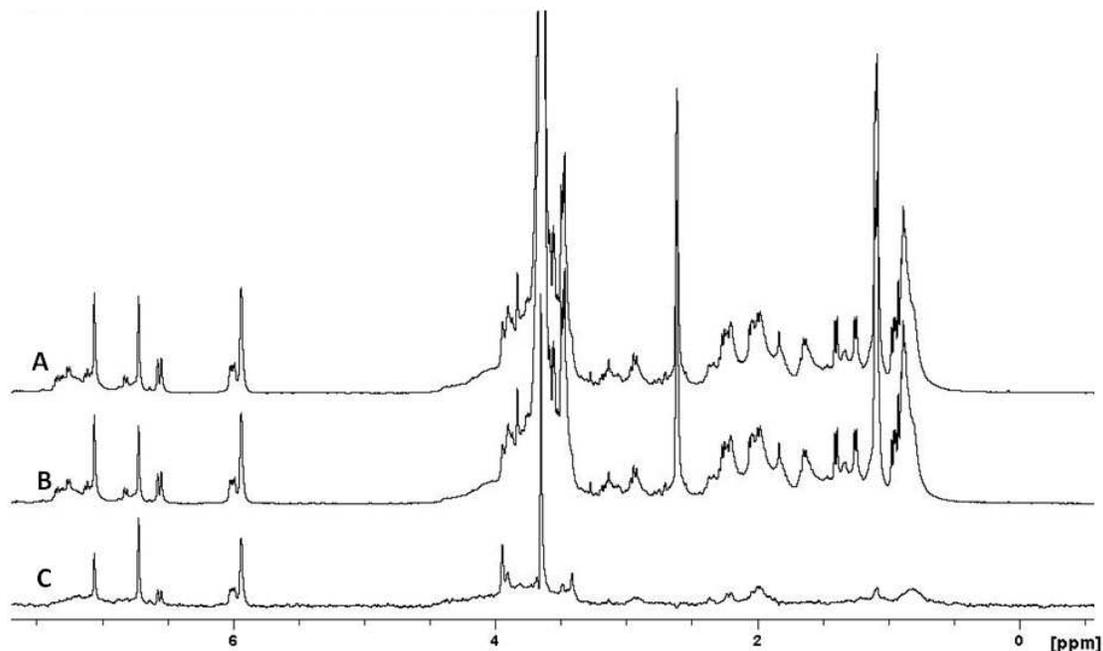
**Anexo 70.** RMN de  $^1\text{H}$  (400,1315 MHz, a 298 K, pH = 6,0 e 4,70 ppm D<sub>2</sub>O/HDO como referência) de AChE titulada com 0,46 mmol L<sup>-1</sup> de Crinina, com tempo de saturação de 2,25 s. (A) espectro de ressonância STD-RMN *off-resonance*, (B) Espectro de STD-RMN *on-resonance* e (C) diferença entre os espectros *on-resonance* e *off-resonance*.



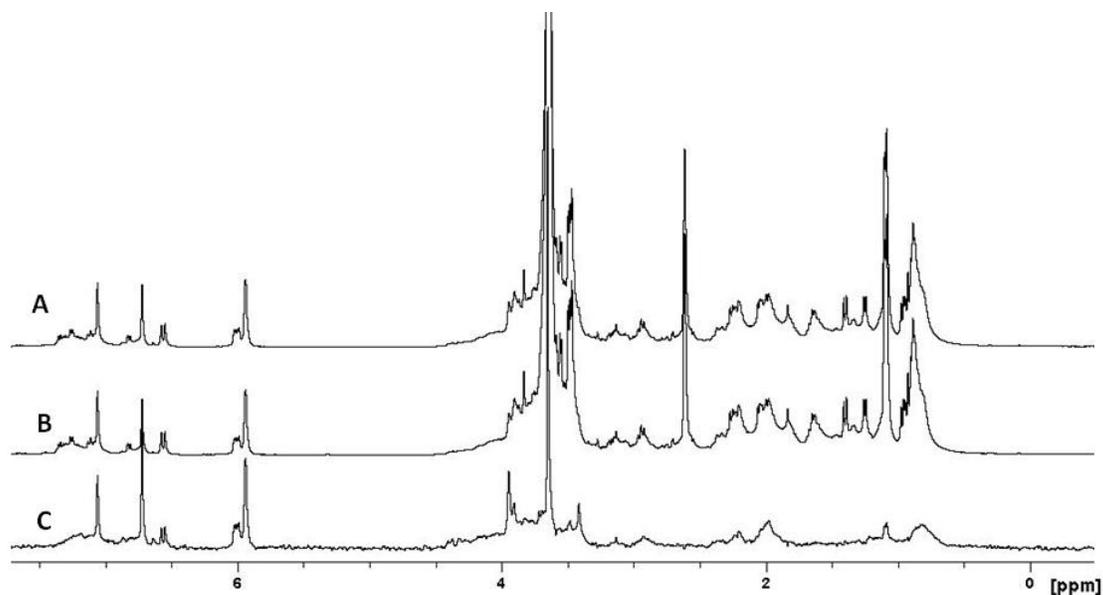
**Anexo 71.** RMN de  $^1\text{H}$  (400,1315 MHz, a 298 K, pH = 6,0 e 4,70 ppm D<sub>2</sub>O/HDO como referência) de AChE titulada com 0,46 mmol L<sup>-1</sup> de Crinina, com tempo de saturação de 3,00 s. (A) espectro de ressonância STD-RMN *off-resonance*, (B) Espectro de STD-RMN *on-resonance* e (C) diferença entre os espectros *on-resonance* e *off-resonance*.



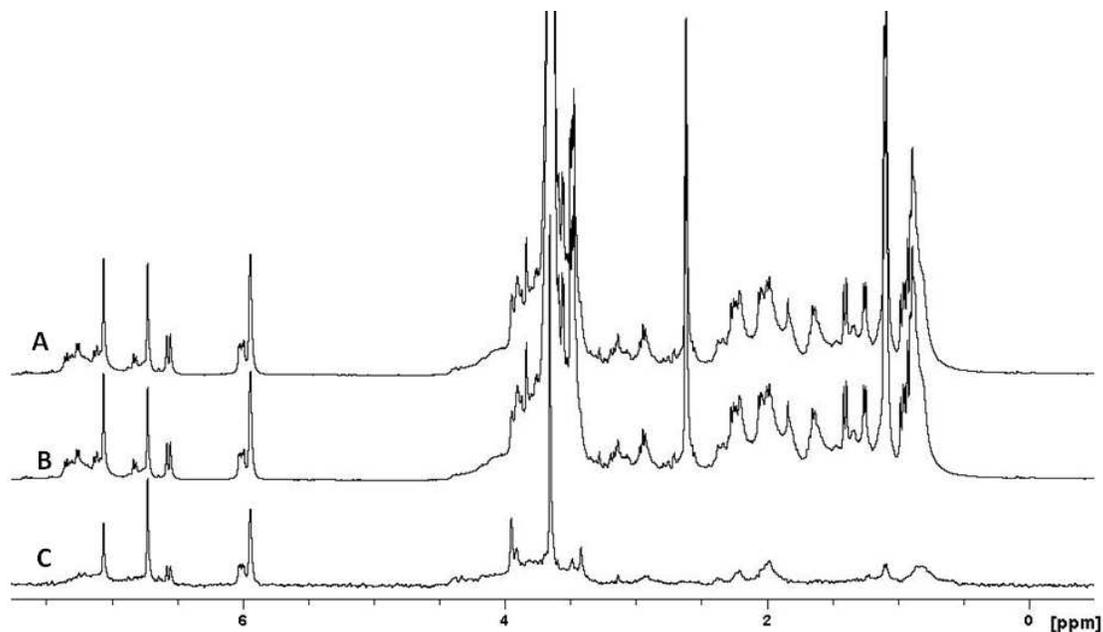
**Anexo 72.** RMN de  $^1\text{H}$  (400,1315 MHz, a 298 K, pH = 6,0 e 4,70 ppm D<sub>2</sub>O/HDO como referência) de AChE titulada com 0,55 mmol L<sup>-1</sup> de Crinina, com tempo de saturação de 0,75 s. (A) espectro de ressonância STD-RMN *off-resonance*, (B) Espectro de STD-RMN *on-resonance* e (C) diferença entre os espectros *on-resonance* e *off-resonance*.



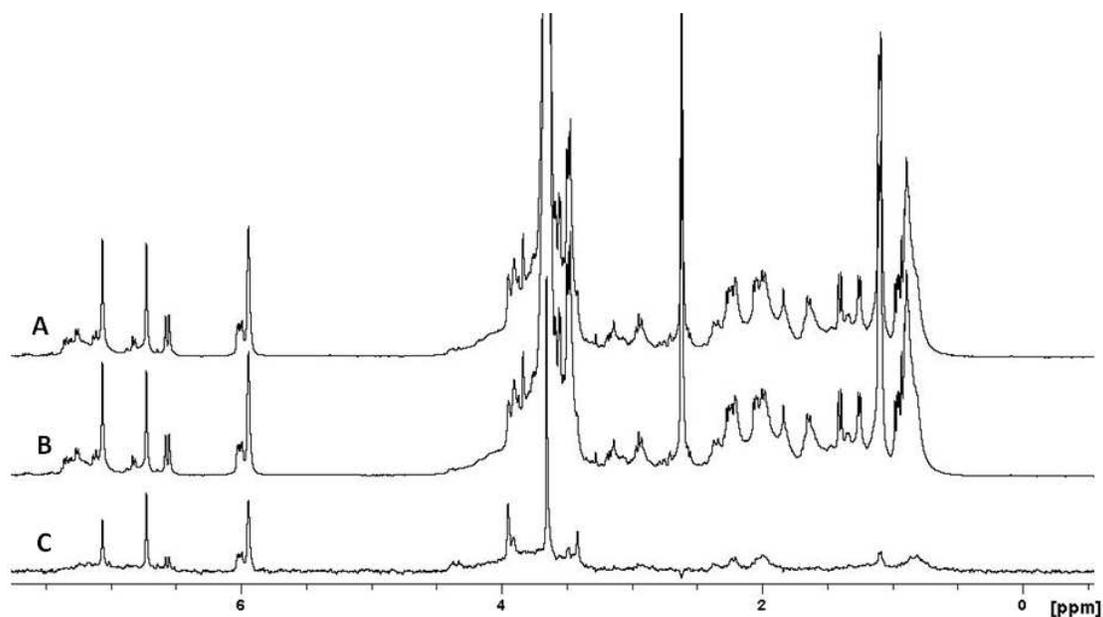
**Anexo 73.** RMN de  $^1\text{H}$  (400,1315 MHz, a 298 K, pH = 6,0 e 4,70 ppm D<sub>2</sub>O/HDO como referência) de AChE titulada com 0,55 mmol L<sup>-1</sup> de Crinina, com tempo de saturação de 1,50 s. (A) espectro de ressonância STD-RMN *off-resonance*, (B) Espectro de STD-RMN *on-resonance* e (C) diferença entre os espectros *on-resonance* e *off-resonance*.



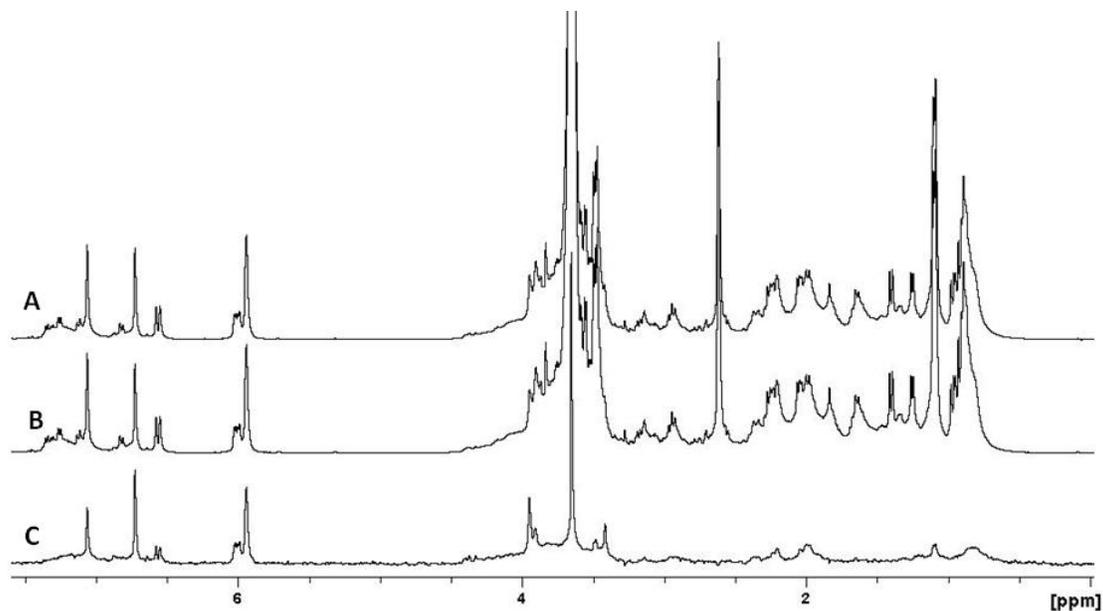
**Anexo 74.** RMN de  $^1\text{H}$  (400,1315 MHz, a 298 K, pH = 6,0 e 4,70 ppm D<sub>2</sub>O/HDO como referência) de AChE titulada com 0,55 mmol L<sup>-1</sup> de Crinina, com tempo de saturação de 2,25 s. (A) espectro de ressonância STD-RMN *off-resonance*, (B) Espectro de STD-RMN *on-resonance* e (C) diferença entre os espectros *on-resonance* e *off-resonance*.



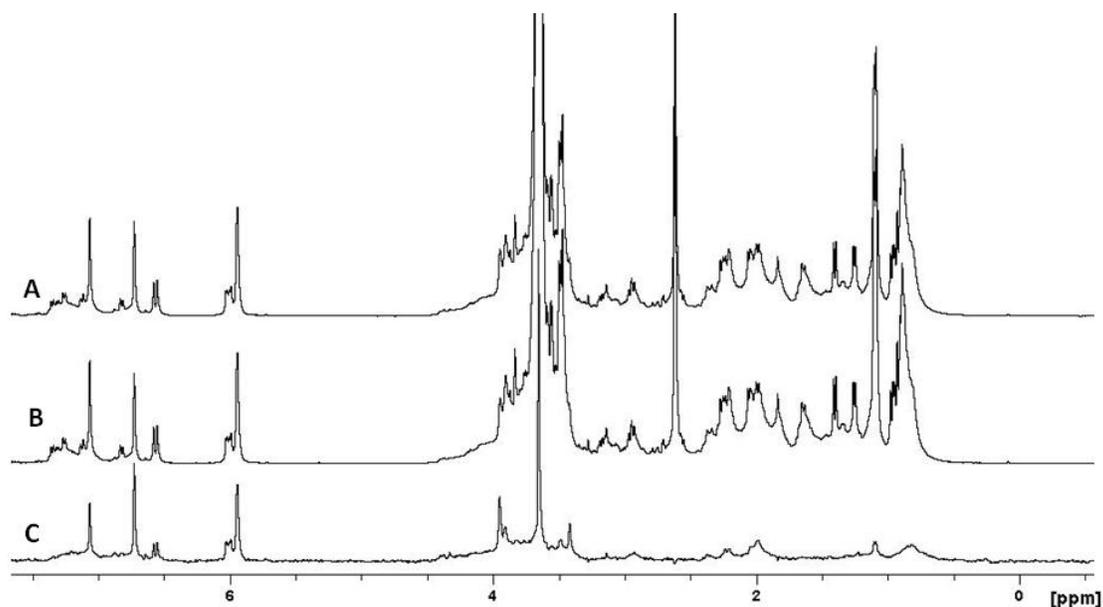
**Anexo 75.** RMN de  $^1\text{H}$  (400,1315 MHz, a 298 K, pH = 6,0 e 4,70 ppm D<sub>2</sub>O/HDO como referência) de AChE titulada com 0,55 mmol L<sup>-1</sup> de Crinina, com tempo de saturação de 3,00 s. (A) espectro de ressonância STD-RMN *off-resonance*, (B) Espectro de STD-RMN *on-resonance* e (C) diferença entre os espectros *on-resonance* e *off-resonance*.



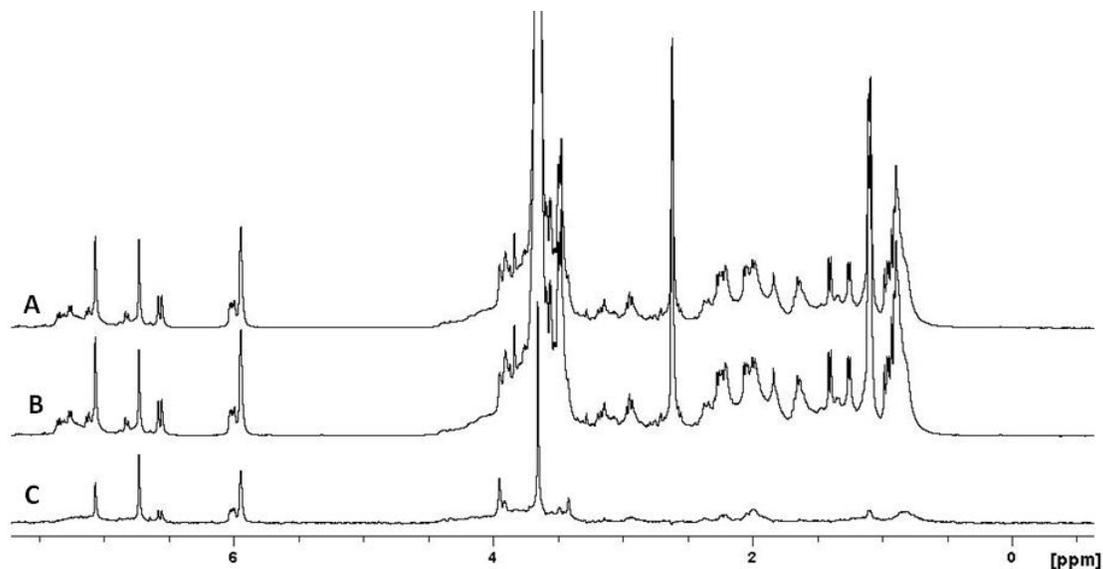
**Anexo 76.** RMN de  $^1\text{H}$  (400,1315 MHz, a 298 K, pH = 6,0 e 4,70 ppm D<sub>2</sub>O/HDO como referência) de AChE titulada com 0,63 mmol L<sup>-1</sup> de Crinina, com tempo de saturação de 0,75 s. (A) espectro de ressonância STD-RMN *off-resonance*, (B) Espectro de STD-RMN *on-resonance* e (C) diferença entre os espectros *on-resonance* e *off-resonance*.



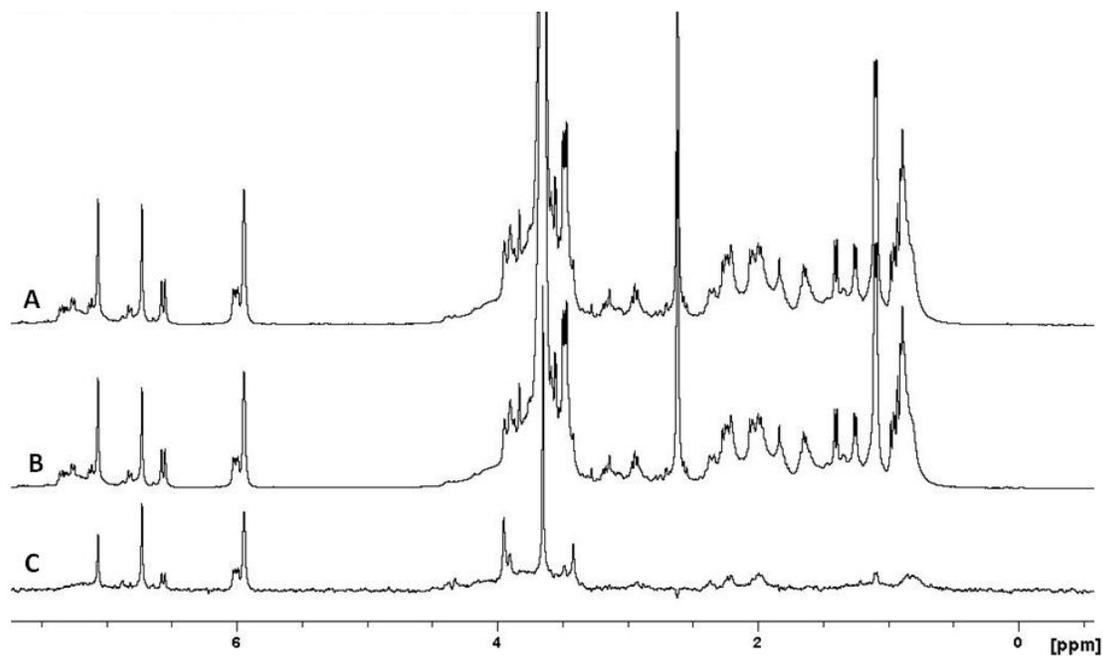
**Anexo 77.** RMN de  $^1\text{H}$  (400,1315 MHz, a 298 K, pH = 6,0 e 4,70 ppm D<sub>2</sub>O/HDO como referência) de AChE titulada com 0,63 mmol L<sup>-1</sup> de Crinina, com tempo de saturação de 1,50 s. (A) espectro de ressonância STD-RMN *off-resonance*, (B) Espectro de STD-RMN *on-resonance* e (C) diferença entre os espectros *on-resonance* e *off-resonance*.



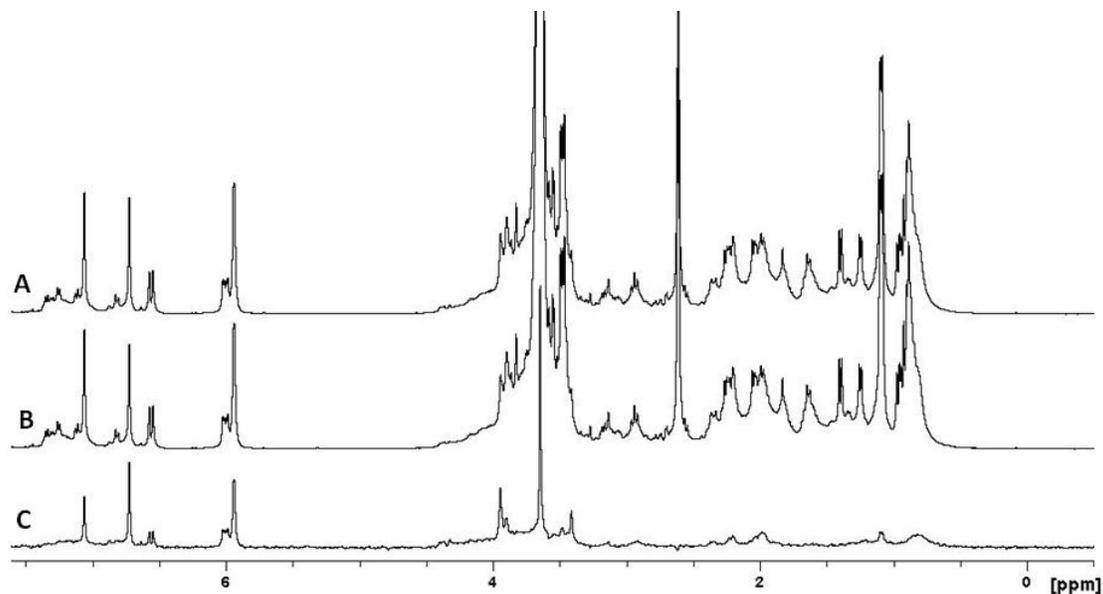
**Anexo 78.** RMN de  $^1\text{H}$  (400,1315 MHz, a 298 K, pH = 6,0 e 4,70 ppm D<sub>2</sub>O/HDO como referência) de AChE titulada com 0,63 mmol L<sup>-1</sup> de Crinina, com tempo de saturação de 2,25 s. (A) espectro de ressonância STD-RMN *off-resonance*, (B) Espectro de STD-RMN *on-resonance* e (C) diferença entre os espectros *on-resonance* e *off-resonance*.



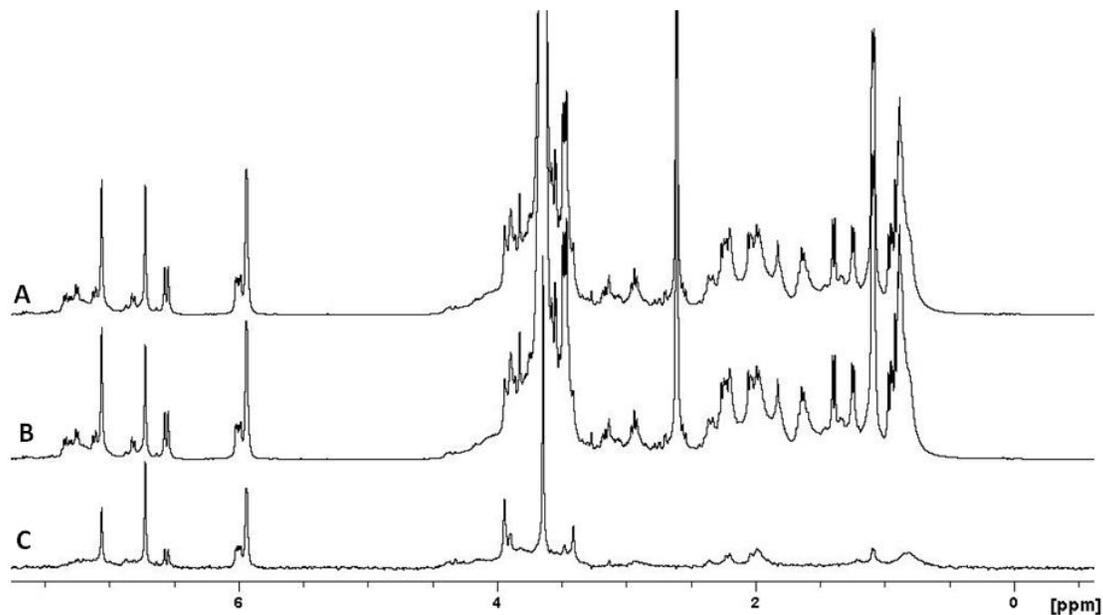
**Anexo 79.** RMN de  $^1\text{H}$  (400,1315 MHz, a 298 K, pH = 6,0 e 4,70 ppm D<sub>2</sub>O/HDO como referência) de AChE titulada com 0,63 mmol L<sup>-1</sup> de Crinina, com tempo de saturação de 3,00 s. (A) espectro de ressonância STD-RMN *off-resonance*, (B) Espectro de STD-RMN *on-resonance* e (C) diferença entre os espectros *on-resonance* e *off-resonance*.



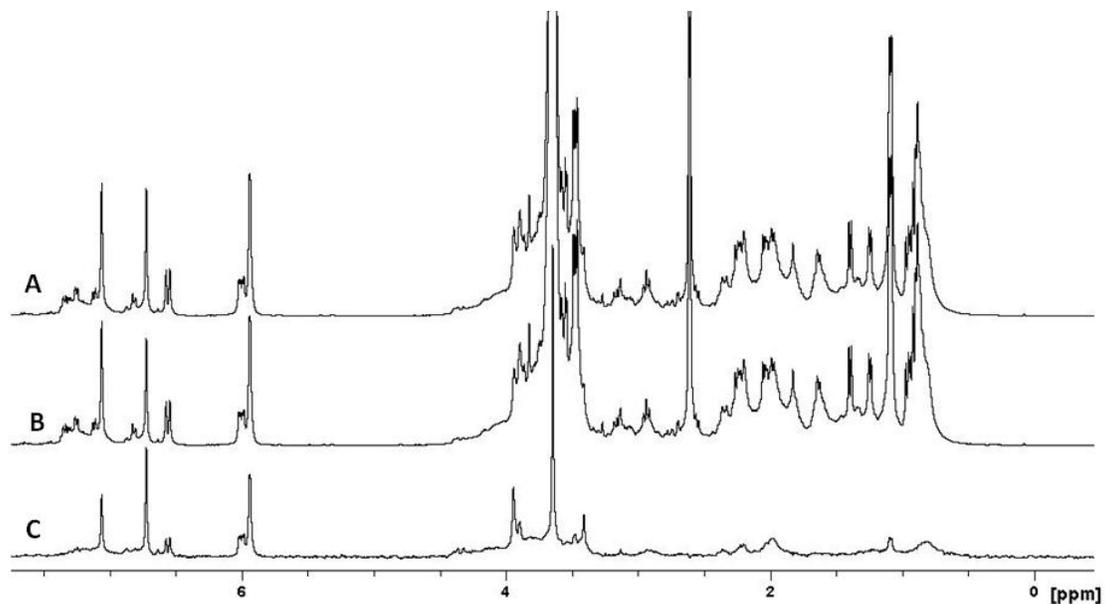
**Anexo 80.** RMN de  $^1\text{H}$  (400,1315 MHz, a 298 K, pH = 6,0 e 4,70 ppm D<sub>2</sub>O/HDO como referência) de AChE titulada com 0,72 mmol L<sup>-1</sup> de Crinina, com tempo de saturação de 0,75 s. (A) espectro de ressonância STD-RMN *off-resonance*, (B) Espectro de STD-RMN *on-resonance* e (C) diferença entre os espectros *on-resonance* e *off-resonance*.



**Anexo 81.** RMN de  $^1\text{H}$  (400,1315 MHz, a 298 K, pH = 6,0 e 4,70 ppm D<sub>2</sub>O/HDO como referência) de AChE titulada com 0,72 mmol L<sup>-1</sup> de Crinina, com tempo de saturação de 1,50 s. (A) espectro de ressonância STD-RMN *off-resonance*, (B) Espectro de STD-RMN *on-resonance* e (C) diferença entre os espectros *on-resonance* e *off-resonance*.



**Anexo 82.** RMN de  $^1\text{H}$  (400,1315 MHz, a 298 K, pH = 6,0 e 4,70 ppm D<sub>2</sub>O/HDO como referência) de AChE titulada com 0,72 mmol L<sup>-1</sup> de Crinina, com tempo de saturação de 2,25 s. (A) espectro de ressonância STD-RMN *off-resonance*, (B) Espectro de STD-RMN *on-resonance* e (C) diferença entre os espectros *on-resonance* e *off-resonance*.



**Anexo 83.** RMN de  $^1\text{H}$  (400,1315 MHz, a 298 K, pH = 6,0 e 4,70 ppm D<sub>2</sub>O/HDO como referência) de AChE titulada com 0,72 mmol L<sup>-1</sup> de Crinina, com tempo de saturação de 3,00 s. (A) espectro de ressonância STD-RMN *off-resonance*, (B) Espectro de STD-RMN *on-resonance* e (C) diferença entre os espectros *on-resonance* e *off-resonance*.