

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

**DISSERTAÇÃO**

**Síntese de Compostos Alquilamino-Cumarínicos Planejados como  
Inibidores da Acetilcolinesterase e Agregação de Placas  $\beta$ -  
Amiloides para o Tratamento da Doença de Alzheimer**

**Gabriela Alves de Souza**

**2018**



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

**SÍNTESE DE COMPOSTOS ALQUILAMINO-CUMARÍNICOS PLANEJADOS  
COMO INIBIDORES DA ACETILCOLINESTERASE E AGREGAÇÃO DE PLACAS  
 $\beta$ -AMILOIDES PARA O TRATAMENTO DA DOENÇA DE ALZHEIMER**

**GABRIELA ALVES DE SOUZA**

*Sob a Orientação do Professor*

**Dr. Arthur Eugen Kümmerle**

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

Seropédica-RJ

Novembro de 2018

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

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

S719s Souza, Gabriela Alves de, 1992-  
Síntese de Compostos Alquilamino-Cumarínicos  
Planejados como Inibidores da Acetilcolinesterase e  
Agregação de Placas  $\beta$ -Amiloides para o Tratamento da  
Doença de Alzheimer / Gabriela Alves de Souza. -  
2018.  
167 f.

Orientador: Arthur Eugen Kümmerle.  
Dissertação (Mestrado). -- Universidade Federal Rural  
do Rio de Janeiro, Programa de Pós-Graduação em Química,  
2018.

1. Cumarina. 2. Doença de Alzheimer. 3. Inibidores  
de AChE. 4. Inibidores de agregação de placas  $A\beta$ .  
I. Kümmerle, Arthur Eugen, 1979-, orient. II  
Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro.  
Programa de Pós-Graduação em Química III. Título.

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

**GABRIELA ALVES DE SOUZA**

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

DISSERTAÇÃO APROVADA EM 21/11/2018

---

Prof. Dr. Arthur Eugen Kümmerle  
(IQ-UFRRJ)  
(Orientador)

---

Dra. Marina Amaral Alves  
(IQ-UFRJ)

---

Prof. Dr. Carlos Maurício Rabello de Sant'Anna  
(IQ-UFRRJ)

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus por ter me dado força, saúde e determinação para todos os desafios que surgiram ao longo do curso e do desenvolvimento deste trabalho.

À minha mãe, Isaura, que sempre foi tudo pra mim, minha melhor amiga e conselheira. Muito obrigada por todo amor, carinho, força e motivação que sempre me deu. Todo seu apoio foi fundamental para que eu chegasse até aqui.

Ao meu namorado, amigo e companheiro de vida, Paulo, por me inspirar todos os dias, por ter sido luz em meio a escuridão que apareceu no meu caminho, sem você este trabalho e a minha vida não teriam seguido. Seu amor, carinho, dedicação, motivação e apoio foram fundamentais para que este e outros dias felizes fossem possíveis. Palavras não são capazes de descrever nem mensurar o meu sentimento por você e tudo que representa na minha vida. Amo muito você!

Ao meu orientador, Arthur, sem o qual a realização deste trabalho não seria possível. Agradeço por compartilhar seus conhecimentos em Química Orgânica e Medicinal, que foram de grande importância para o meu crescimento profissional ao longo do curso. Agradeço também por toda paciência, conselhos e orientações.

Ao professor Marco Edilson Freire, por ter cedido gentilmente o fármaco donepezila.

À professora Débora Decotè, por ter me acolhido em seu laboratório, cedendo o espaço para a execução das análises enzimáticas.

Ao professor Carlos Maurício Rabello e à sua aluna de pós-doutorado Catarina de Nigris, pelas análises de modelagem molecular.

À professora Rosane Nora e ao seu aluno de mestrado Lucas Oliveira, pelas análises de atividade antioxidante. Agradeço à professora Rosane também pelas aulas e pelo suporte gentilmente prestado ao longo das diversas etapas da pesquisa e do curso de pós-graduação.

Aos técnicos do IQ-UFRRJ, em especial ao Maurício Matos pelo esmero na realização dos espectros de RMN.

À doutora Marina Amaral, do IQ-UFRJ, pelas análises de Espectrometria de Massas de Alta Resolução.

À professora Yraima Cordeiro, do DEFAR-UFRJ, pelas análises de citotoxicidade.

Aos meus amigos Isabela, Pedro e Esther por sempre estarem presentes nos melhores e piores momentos da minha vida. Obrigada por toda paciência, carinho, motivação e por terem

tornado essa caminhada mais leve, com todos os momentos de descontração e bom humor que tivemos.

Aos colegas e amigos dos laboratórios LadMol-QM, LabQMed e Laboratório de Imunologia e Virologia da UFRRJ, Nathalia, Thiago, Gabriel, Leonardo, Paula, Felipe, Sabrina, Daiana, Luciana, Lucas Caruso, Larissa Ferreira, Marina, Lorrainy, Gabriela, Larissa Castro, Lucas Oliveira, Camila, Carol e Renata cujas presenças e ajuda foram muito importantes ao longo destes dois anos.

Aos membros da banca por aceitarem o convite de ler e acrescentar em nosso trabalho.

À **CAPES** pela concessão da minha bolsa de estudos.

À **CAPES**, ao **CNPq** e à **FAPERJ** pelo auxílio financeiro para a execução deste e de outros projetos.

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

## RESUMO

A Doença de Alzheimer (DA) caracteriza-se por um distúrbio neurodegenerativo que provoca uma deterioração global, progressiva e irreversível de diversas funções cognitivas (memória, atenção, concentração, linguagem, pensamento, entre outras), dificultando a realização das atividades de vida diária. No que se diz respeito ao tratamento da DA, vem sendo apontado como de grande valia o uso de compostos híbridos com potencial inibidor para mais de um alvo, como a enzima acetilcolinesterase (AChE) e a agregação de placas  $\beta$ -Amiloides ( $A\beta$ ), devido à possibilidade de inibir simultaneamente dois ou mais fatores que contribuem para a instalação e evolução da doença. A AChE atua no controle dos níveis do neurotransmissor acetilcolina (ACh) na fenda sináptica, o qual está envolvido nos processos de aprendizagem e memória. A agregação de placas  $A\beta$  é uma das principais responsáveis pela morte neuronal. Desta forma, o objetivo deste trabalho foi sintetizar compostos cumarínicos análogos a protótipos alquilamino-indanonas, descritos como inibidores da enzima AChE e da agregação de placas  $A\beta$ . O planejamento das séries foi baseado: 1- na manutenção do grupamento alquilamino cíclico; 2- na troca do núcleo indanona pelo cumarínico, através do isosterismo não-clássico de expansão de anéis. Os compostos foram sintetizados em rendimentos de razoáveis a bons a partir das reações de: *O*-alquilação da 7-hidroxi-cumarina; bromação da posição 3 das 7-bromoalcoxi-cumarinas; aminação da cadeia alquílica das 3-bromo-7-bromoalcoxi-cumarinas; reação de acoplamento de Suzuki a partir das 3-bromo-7-aminoalcoxi-cumarinas; reação de acoplamento de Buchwald a partir da 3-bromo-7-aminoetoxi-cumarina. Os compostos obtidos foram purificados e, então, caracterizados por técnicas espectroscópicas (RMN  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$ ) e espectrometria de massas de alta resolução. Todos os compostos sintetizados foram capazes de inibir a AChE seletivamente frente à BChE, em que o composto mais ativo apresentou  $\text{CI}_{50} = 0,02 \mu\text{M}$  e seletividade de 337 (BChE  $\text{CI}_{50}/\text{AChE CI}_{50}$ ), perfil muito semelhante ao fármaco referência donepezila (AChE  $\text{CI}_{50} = 0,007 \mu\text{M}$  e seletividade de 341). Adicionalmente, os compostos mostraram perfil de inibição mista para ambas as colinesterases, o que foi corroborado por análises de *docking* molecular que demonstraram a interação dos compostos com os sítios catalítico (CAS) e periférico (PAS).

**PALAVRAS-CHAVE:** Cumarina, Doença de Alzheimer, Inibidores de AChE, Inibidores de agregação de placas  $A\beta$ .

## ABSTRACT

Alzheimer's disease (AD) is a neurodegenerative disorder that causes a general, progressive and irreversible deterioration of several cognitive functions (memory, attention, concentration, language, thought, among others), making it difficult to perform daily activities . . . The use of hybrid compounds for the treatment of AD with inhibitory potential for more than one target, such as the acetylcholinesterase enzyme (AChE) and the aggregation of  $\beta$ -amyloid plaques ( $A\beta$ ), is very promising, due to the possibility of inhibiting simultaneously two or more factors that contribute to the establishment and evolution of the disease. AChE modulates the levels of the neurotransmitter acetylcholine (ACh) in the synaptic cleft, factor that is involved in the learning and memory processes. The aggregation of  $A\beta$  plaques is one of the main causes for neuronal death. Thus, this work aims on the synthesis of coumarin compounds analogous to alkylamino-indanone prototypes, described as inhibitors for both AChE enzyme and  $A\beta$  plaques aggregation. The design of the series was based on: 1- the maintenance of the cyclic alkylamino group; 2- in the exchange of the indanone nucleus by the coumarin, through non-classical isosterism of ring expansion. The synthesis of compounds involved: O-alkylation of 7-hydroxycoumarin; bromination at the 3-position of the 7-bromoalkoxycoumarins; amination of the alkyl chain of 3-bromo-7-bromoalkoxycoumarins; Suzuki coupling reaction of the 3-bromo-7-aminoalkoxycoumarins; Buchwald coupling reaction of the 3-bromo-7-aminoethoxycoumarins; all reactions presented regular to good yields. After purification, the characterization of compounds by spectroscopic techniques ( $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  NMR) and high resolution mass spectrometry confirmed the products. All synthesized compounds were able to inhibit AChE selectively against BChE, in which the most active compound presented  $\text{IC}_{50} = 0,02 \mu\text{M}$  and selectivity of 337 ( $\text{BChE IC}_{50} / \text{AChE IC}_{50}$ ), acting very similarly to reference drug donepezil ( $\text{AChE IC}_{50} = 0,007 \mu\text{M}$  and selectivity of 341). Additionally, the compounds showed mixed inhibition profile for both cholinesterases, which was corroborated by molecular docking analyzes that demonstrated the interaction of the compounds with the catalytic (CAS) and peripheral (PAS) sites.

**KEY WORDS:** Coumarin, Alzheimer's Disease, AChE Inhibitors,  $A\beta$  Plate Aggregation Inhibitors.

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Foto do psiquiatra Alois Alzheimer.....	<b>1</b>
<b>Figura 2.</b> Representação da degradação neuronal através de corte frontal de cérebros saudáveis e de pacientes portadores da DA em estágio avançado. Destacando: A) O córtex cerebral em azul; B) O hipocampo circulado em branco; C) Os ventrículos circulados em branco .....	<b>3</b>
<b>Figura 3.</b> Fotos dos pesquisadores Henry Hallett Dale (à esquerda) e Otto Loewi (à direita), primeiros pesquisadores a identificar a acetilcolina ( <b>3</b> ) como um importante neurotransmissor .....	<b>4</b>
<b>Figura 4.</b> Representação do ciclo da acetilcolina nos neurônios – (1) síntese; (2) secreção; (3a) hidrólise; (3b) ligação no receptor; (4) colina sendo transportada para o terminal axônico .....	<b>5</b>
<b>Figura 5.</b> Formação dos peptídeos $A\beta$ seguida do seu acúmulo, levando à formação das placas $A\beta$ insolúveis em cérebros portadores da DA.....	<b>7</b>
<b>Figura 6.</b> Representação comparativa de neurônios saudáveis e de portadores da DA (com agregação de placas $A\beta$ ).....	<b>8</b>
<b>Figura 7.</b> Representação estrutural dos fármacos inibidores da AChE utilizados no tratamento da DA .....	<b>9</b>
<b>Figura 8.</b> Estrutura do fármaco memantina, inibidor de receptores NMDA.....	<b>10</b>
<b>Figura 9.</b> Representação estrutural de inibidores das enzimas $\gamma$ -secretase, $\beta$ -secretase e da agregação de placas $A\beta$ que atualmente se encontram em fase clínica para o tratamento da DA .....	<b>11</b>
<b>Figura 10.</b> Estrutura do fármaco nilvadipina, atualmente em fase III nos estudos clínicos para o tratamento da DA .....	<b>12</b>
<b>Figura 11.</b> Representação da estrutura básica de uma cumarina.....	<b>12</b>
<b>Figura 12.</b> Representação estrutural da tacrina ( <b>22</b> ) e da curcumina ( <b>23</b> ) .....	<b>15</b>
<b>Figura 13.</b> Representação estrutural dos compostos sintetizados no trabalho de Montanari e colaboradores ( <b>24a-26</b> ) e valores de $CI_{50}$ frente à <i>hAChE</i> e porcentagem inibitória frente à agregação de peptídeos $A\beta_{1-42}$ destes e do controle donepezila ( <b>4</b> ) .....	<b>16</b>
<b>Figura 14.</b> Representação estrutural dos compostos sintetizados no trabalho de Lan e colaboradores ( <b>27a-h</b> ) e valores de $CI_{50}$ frente à <i>EeAChE</i> e porcentagem de inibição frente à agregação de peptídeos $A\beta_{1-42}$ destes e dos controles: donepezila ( <b>4</b> ); e curcumina ( <b>23</b> ) .....	<b>17</b>

<b>Figura 15.</b> Representação estrutural dos compostos sintetizados no trabalho de Hiremathad, Chand e Keri ( <b>28a-h</b> ) e valores de $CI_{50}$ frente à <i>TcAChE</i> e porcentagem de inibição frente à agregação de peptídeos $A\beta_{1-42}$ destes e do controle, donepezila ( <b>23</b> ) .....	<b>18</b>
<b>Figura 16.</b> Representação da estrutura explorada no trabalho de Jiang e colaboradores .....	<b>19</b>
<b>Figura 17.</b> Representação estrutural dos compostos sintetizados no trabalho de Jiang e colaboradores ( <b>30-32c</b> ) e valores de $CI_{50}$ frente à <i>hAChE</i> e porcentagem de inibição frente à agregação de peptídeos $A\beta_{1-42}$ destes e dos controles: donepezila ( <b>4</b> ) e curcumina ( <b>23</b> ).....	<b>20</b>
<b>Figura 18.</b> Estrutura dos compostos <b>33</b> e <b>34</b> utilizados como protótipos no planejamento estrutural.....	<b>22</b>
<b>Figura 19.</b> Estrutura numerada da 7-hidroxi-cumarina ( <b>38</b> ) e multiplicidade dos sinais de $H_6$ (duplo duplete) e $H_8$ (duplete) .....	<b>48</b>
<b>Figura 20.</b> Efeito de ressonância entre a ligação dupla conjugada à carboxila do anel lactônico .....	<b>49</b>
<b>Figura 21.</b> Produto de bis-alkilação oriundo das reações da umbeliferona com dibromobutano e dibromopentano .....	<b>51</b>
<b>Figura 22.</b> Atribuição comparativa dos principais sinais dos compostos 7-bromoalcoxi-cumarínicos ( <b>40a-d</b> ) e 7-hidroxycumarina ( <b>38</b> ) nos espectros de RMN $^1H$ e $^{13}C$ .....	<b>52</b>
<b>Figura 23.</b> Atribuição comparativa dos principais sinais dos compostos 7-bromoalcoxi-cumarínicos ( <b>40a-d</b> ) e 3-bromo-7-bromoalcoxi-cumarínicos ( <b>42a-d</b> ) nos espectros de RMN $^1H$ e $^{13}C$ .....	<b>54</b>
<b>Figura 24.</b> Espectro de RMN $^1H$ do derivado 3-bromo-7-((3-piperidin-1-il)propoxi)-cumarina ( <b>44b</b> ).....	<b>57</b>
<b>Figura 25.</b> Estrutura dos confôrmeros do tipo cadeira (à esquerda) e cadeira invertida (à direita) do anel piperidínico .....	<b>58</b>
<b>Figura 26.</b> Espectro de RMN $^1H$ do derivado 3-fenil-7-((2-piperidin-1-il)etoxi)-cumarina ( <b>47a</b> ).....	<b>62</b>
<b>Figura 27.</b> Espectro de RMN $^1H$ do derivado 3-( <i>p</i> -( <i>N,N</i> )-dimetilnilina)-7-((3-piperidin-1-il)propoxi)-cumarina ( <b>48b</b> ) .....	<b>63</b>
<b>Figura 28.</b> Espectro de RMN $^1H$ do derivado 3-( <i>N</i> -anilino)-7-((2-piperidin-1-il)etoxi)-cumarina ( <b>50a</b> ) .....	<b>66</b>
<b>Figura 29.</b> Gráficos de Lineweaver-Burk da cinética de inibição em <i>EeAChE</i> (à esquerda) e <i>EqBChE</i> (à direita) do composto <b>48a</b> .....	<b>71</b>

**Figura 30.** Resultados dos estudos de *docking* dos compostos **44a**, **48b** e **48c** na AChE no programa GOLD 5.6. **A:** **44a** e **48a**; **B:** **48a** e **48c**. Código de cores vs. átomos: vermelho, oxigênio; azul, nitrogênio; branco, hidrogênio; verde, carbono; vinho, bromo. Figura gerada com PyMol 0.99 (DeLano Scientific LLC)..... **73**

**Figura 31.** Gráfico de barras da viabilidade celular para cada um dos compostos **44a-d**, **47a-c**, **48a-c** e **50a-c** a 10 e 50  $\mu\text{M}$  e donepezila a 50  $\mu\text{M}$ ..... **76**

## ÍNDICE DE ESQUEMAS

<b>Esquema 1.</b> Esquema reacional de Perkin .....	13
<b>Esquema 2.</b> Esquema reacional de Pechmann .....	14
<b>Esquema 3.</b> Esquema reacional de Knoevenagel.....	14
<b>Esquema 4.</b> Planejamento estrutural dos compostos alquilamino-cumarínicos com farmacóforo de inibição da AChE e placas $A\beta$ oriundos do protótipo <b>33</b> . <u>Azul</u> : farmacóforo responsável pela inibição da AChE; <u>Verde</u> : farmacóforo responsável pela inibição da agregação de placas $A\beta$ .....	23
<b>Esquema 5.</b> Análise retrossintética para obtenção dos compostos planejados .....	45
<b>Esquema 6.</b> Síntese da 7-hidroxicumarina ( <b>38</b> ) .....	46
<b>Esquema 7.</b> Formação <i>in situ</i> do ácido formilacético ( <b>51</b> ) a partir do ácido málico .....	46
<b>Esquema 8.</b> Esquema de intermediários proposto para formação da 7-hidroxicumarina ( <b>38</b> ) através da condensação de Pechmann.....	47
<b>Esquema 9.</b> Síntese dos derivados 7-bromoalcoxi-cumarínicos ( <b>40a-d</b> ).....	50
<b>Esquema 10.</b> Esquema de intermediários proposto para formação dos derivados 7-bromoalcoxi-cumarínicos ( <b>40a-d</b> ) .....	50
<b>Esquema 11.</b> Síntese dos derivados 3-bromo-7-bromoalcoxi-cumarínicos ( <b>42a-d</b> ).....	53
<b>Esquema 12.</b> Esquema de intermediários proposto para formação dos derivados 3-bromo-7-bromoalcoxi-cumarínicos ( <b>42a-d</b> ) .....	53
<b>Esquema 13.</b> Síntese dos derivados 3-bromo-7-aminoalcoxi-cumarínicos ( <b>44a-d</b> ) .....	55
<b>Esquema 14.</b> Esquema de intermediários proposto para formação dos derivados 3-bromo-7-aminoalcoxi-cumarínicos ( <b>44a-d</b> ) .....	56
<b>Esquema 15.</b> Síntese dos derivados 3-fenil-7-aminoalcoxi-cumarínicos ( <b>47a-c; 48a-c</b> ) .....	59
<b>Esquema 16.</b> Esquema de intermediários proposto para formação dos derivados 3-fenil-7-aminoalcoxi-cumarínicos ( <b>47a-c; 48a-c</b> ) .....	60
<b>Esquema 17.</b> Síntese dos derivados 3-( <i>N</i> -anilino)-7-aminoalcoxi-cumarínicos ( <b>50a-c</b> ) .....	64
<b>Esquema 18.</b> Esquema de intermediários proposto para formação dos derivados 3-( <i>N</i> -anilino)-7-aminoalcoxi-cumarínicos ( <b>50a-c</b> ) .....	65
<b>Esquema 19.</b> Reação ocorrida no ensaio de Ellman .....	67
<b>Esquema 20.</b> Esquema reacional entre o reagente FRAP e o composto antioxidante .....	74

## ÍNDICE DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Tempos de reação de alquilação da umbeliferona.....	<b>27</b>
<b>Tabela 2.</b> Tempos de reação de aminação dos derivados cumarínicos .....	<b>31</b>
<b>Tabela 3.</b> Concentrações dos inibidores utilizados nos ensaios de estudo do mecanismo de inibição enzimática.....	<b>42</b>
<b>Tabela 4.</b> Cores dos compostos obtidos, seus respectivos pontos de fusão e rendimentos obtidos para os compostos <b>40a-d</b> .....	<b>50</b>
<b>Tabela 5.</b> Pontos de fusão e rendimentos obtidos para os compostos <b>42a-d</b> .....	<b>52</b>
<b>Tabela 6.</b> Coloração, pontos de fusão e rendimentos obtidos para os compostos <b>44a-d</b> .....	<b>55</b>
<b>Tabela 7.</b> Coloração, pontos de fusão e rendimentos obtidos para os compostos <b>47a-c</b> e <b>48a-c</b> .....	<b>58</b>
<b>Tabela 8.</b> Pontos de fusão e rendimentos obtidos para os compostos <b>50a-c</b> .....	<b>64</b>
<b>Tabela 9.</b> Resultados obtidos nos ensaios inibição enzimática frente à EeAChE e EqBChE .....	<b>68</b>
<b>Tabela 10.</b> Parâmetros cinéticos de <b>44d</b> , <b>48a</b> e <b>50a</b> em AChE e BChE.....	<b>70</b>
<b>Tabela 11.</b> Resultados de <i>score</i> e os respectivos valores de CI <sub>50</sub> dos compostos avaliados .	<b>72</b>
<b>Tabela 12.</b> Atividade antioxidante dos compostos.....	<b>75</b>

## LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

- [S] – Concentração de substrato
- $\mu\text{M}$  – micromolar
- ACh – Acetilcolina
- AChE – Acetilcolinesterase
- ACTI – Iodeto de acetiltiocolina
- BChE – Butirilcolinesterase
- BCTI – Iodeto de butiriltiocolina
- BSA – Albumina Sérica Bovina
- CCD – Cromatografia em camada delgada
- $\text{CD}_3\text{Cl}$  – Clorofórmio deuterado
- $\text{CD}_3\text{OD}$  – Metanol deuterado
- d – duplete
- DA – Doença de Alzheimer
- dd – duplo duplete
- $\text{DMSO-}d_6$  – Dimetilsulfóxido deuterado
- DTNB – Ácido 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzóico
- Ee*AChE – Acetilcolinesterase de enguia elétrica
- EMAR – Espectrometria de massas de alta resolução
- Eq*BChE – Butirilcolinesterase de soro equino
- FDA – *Food and Drug Administration*
- h*AChE – Acetilcolinesterase de ser humano
- $\text{IC}_{50}$  – Concentração inibitória média
- IS – Índice de Seletividade
- J* – Constante de acoplamento
- $K_i$  – Constante de afinidade para inibição do tipo competitiva
- $K_i'$  – Constante de afinidade para inibição do tipo não-competitiva
- $K_m$  – Constante de Michaelis-Menten
- m – multiplete

m/z – razão massa-carga

PDB – Protein Data Bank

Ph – Fenila

pH – Potencial Hidrogeniônico

ppm – partes por milhão

q – quarteto

quint – quinteto

RMN – Ressonância Magnética Nuclear

RMN <sup>13</sup>C – Ressonância Magnética Nuclear de Carbono 13

RMN <sup>1</sup>H – Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio

s – simpleto

SEAr – Substituição Eletrofílica Aromática

sl – simpleto largo

S<sub>N</sub>2 – Substituição Nucleofílica Bimolecular

SNC – Sistema nervoso central

t – tripleto

TcAChE – Acetilcolinesterase de arraia elétrica

v – Velocidade

V<sub>máx</sub> – Velocidade máxima

Xantphos – 4,5-bis(difenilfosfino)-9,9-dimetilxanteno

δ – deslocamento químico

λ – comprimento de onda

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	<b>1</b>
1.1. Doença de Alzheimer.....	1
1.1.1. Histórico .....	1
1.1.1. Epidemiologia e fatores de risco.....	1
1.1.2. Patogênese .....	2
1.1.3. A importância da acetilcolina na DA.....	3
1.1.4. A agregação de placas $\beta$ -Amiloide em portadores da DA.....	6
1.1.5. Tratamento da DA na atualidade .....	8
1.2. Cumarinas e suas propriedades .....	12
1.2.1. Reação de Perkin .....	13
1.2.2. Reação de Pechmann .....	13
1.2.3. Reação de Knoevenagel.....	14
1.2.4. Uso de cumarinas na DA frente a inibição de acetilcolinesterase e formação de placas $\beta$ -Amiloide .....	14
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	<b>22</b>
2.1. Objetivos gerais .....	22
2.2. Objetivos específicos .....	22
2.2.1. Planejamento dos compostos .....	22
2.2.2. Síntese e caracterização dos compostos .....	24
2.2.3. Avaliação farmacológica .....	24
2.2.4. Modelagem molecular .....	24
<b>3. MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	<b>24</b>
3.1. Síntese da 7-hidroxicumarina ( <b>38</b> ).....	25
3.2. Reação de <i>O</i> -alquilação da 7-hidroxicumarina ( <b>40a-d</b> ) .....	26
3.3. Reação de bromação da posição 3 do núcleo cumarínico ( <b>42a-d</b> ) .....	29
3.4. Reação de aminação da cadeia alquílica ( <b>44a-d</b> ).....	31
3.5. Reação de acoplamento de Suzuki para obtenção dos derivados 3-fenil-7-aminoalcoxi-cumarínicos ( <b>47a-c; 48a-c</b> ) .....	34
3.6. Reação de acoplamento de Buchwald para obtenção dos derivados 3-( <i>N</i> -anilino)-7-aminoalcoxi-cumarínicos ( <b>50a-c</b> ) .....	38
3.7. Avaliação <i>in vitro</i> da atividade anticolinesterásica dos derivados cumarínicos .....	40

3.8. Estudo do mecanismo de inibição enzimática .....	41
3.9. Ensaios de interação enzimática <i>in silico</i> .....	42
3.10. Avaliação da atividade antioxidante pelo Método de Redução do Íon Férrico (FRAP) .....	43
3.11. Avaliação da toxidez sobre linhagem de células de neuroblastoma de camundongo (N2A).....	43
<b>4. RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	<b>44</b>
4.1. Planejamento sintético dos compostos .....	44
4.2. Síntese da 7-hidroxicumarina ( <b>38</b> ).....	45
4.3. Reação de <i>O</i> -alquilação da 7-hidroxicumarina ( <b>40a-d</b> ) .....	49
4.4. Reação de bromação da posição 3 do núcleo cumarínico ( <b>42a-d</b> ) .....	52
4.5. Reação de aminação da cadeia alquílica ( <b>44a-d</b> ).....	54
4.6. Reação de acoplamento de Suzuki para obtenção dos derivados 3-fenil-7-aminoalcoxi- cumarínicos ( <b>47a-c; 48a-c</b> ).....	58
4.7. Reação de acoplamento de Buchwald para obtenção dos derivados 3-( <i>N</i> -anilino)-7- aminoalcoxi-cumarínicos ( <b>50a-c</b> ) .....	64
4.8. Resultados de atividade inibitória dos compostos obtidos frente à AChE e BChE.....	67
4.9. Resultados dos ensaios do mecanismo de inibição enzimática .....	69
4.10. Resultados dos ensaios de interação enzimática <i>in silico</i> .....	71
4.11. Resultados de atividade antioxidante dos compostos .....	74
4.12. Resultados de toxidez sobre linhagem celular de neuroblastoma de camundongo (N2A) .....	75
<b>5. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS</b> .....	<b>76</b>
<b>6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	<b>78</b>
<b>7. ANEXOS</b> .....	<b>90</b>

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1. Doença de Alzheimer

#### 1.1.1. Histórico

Em 3 de novembro de 1906, o psiquiatra alemão Alois Alzheimer (**Figura 1**) descreveu pela primeira vez um quadro clínico característico de uma determinada doença neurodegenerativa que foi posteriormente nomeada de Doença de Alzheimer por Emil Kraepelin em 1915. Neste único caso, o de uma paciente com 51 anos, de nome Auguste Deter, Alzheimer descreveu as características clínicas típicas, como os distúrbios de memória e as imagens histopatológicas de corpos celulares do sistema nervoso central como a formação de placas amiloides e feixes densos de fibrila, que hoje sabemos ser as principais características da doença (KRAEPELIN, 1915).



**Figura 1.** Foto do psiquiatra Alois Alzheimer (Hospital do Coração, 2018).

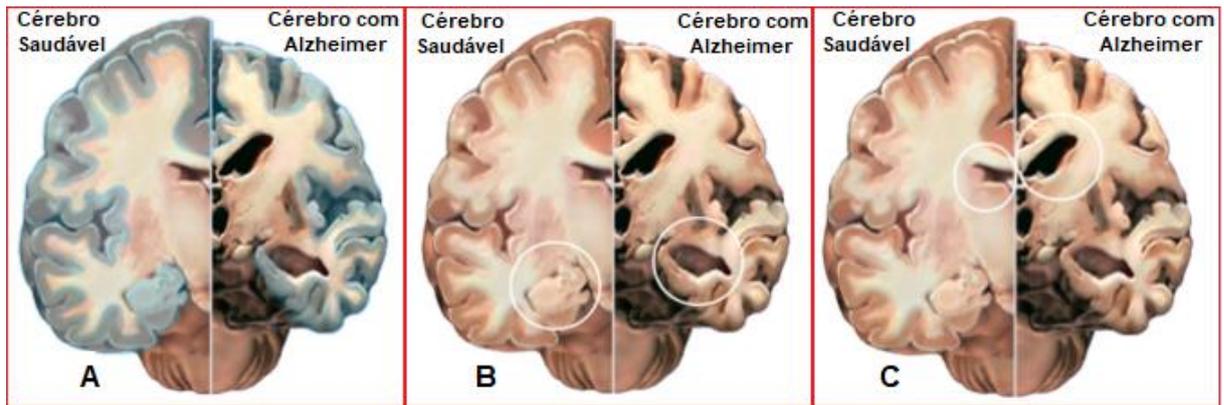
#### 1.1.2. Epidemiologia e fatores de risco

A doença de Alzheimer (DA) é a forma mais comum de demência, estando relacionada a 50-60% destes casos. A prevalência de demência é inferior a 1% em indivíduos com idade entre 60 e 64 anos, porém com o aumento da idade esse quadro muda de figura, mostrando um incremento percentual quase exponencial, de forma que em pessoas com 85 anos ou mais a incidência está entre 24% a 33%. Nos países em desenvolvimento não há muitos dados

representativos, contudo estima-se que cerca de 60% dos pacientes mundiais com demência vivam nestes países (FERRI et al., 2006). A Doença de Alzheimer, por ser muito comum, é um problema de saúde pública importante. Dados de 2016 indicam que mais de 47 milhões de pessoas tinham a doença. Estima-se que esse número deva duplicar a cada 20 anos, atingindo 75 milhões de pessoas em 2030 e 131 milhões em 2050, devido ao aumento previsto da expectativa de vida (PRINCE et al., 2016).

### 1.1.3. Patogênese

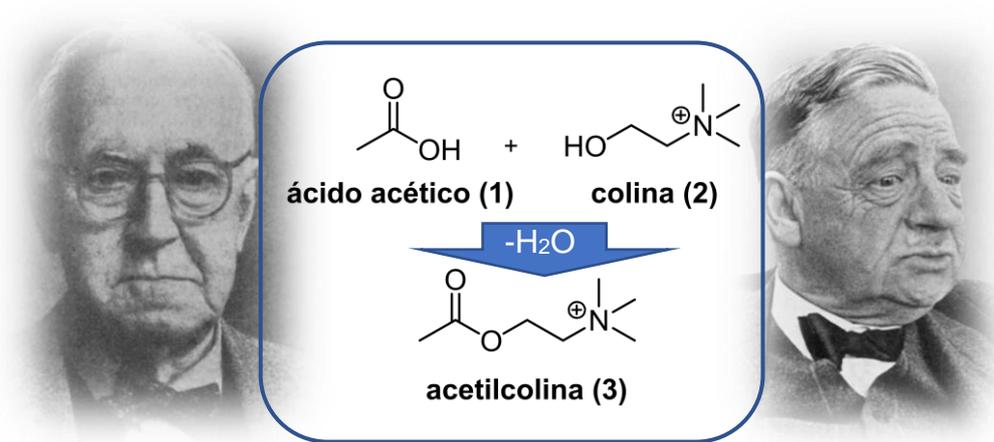
Mais do que o quadro descrito por Alois Alzheimer em 1906, hoje sabe-se que a DA é uma doença multifatorial com vários desbalanços fisiológicos que são prejudiciais ao paciente. No entanto, a maneira como esses fatores se originam e evoluem a ponto de prejudicar as funções neuronais continuam indefinidos. A nível microscópico, as lesões características da DA são placas senis (ou neuríticas) e emaranhados neurofibrilares nas estruturas do lobo temporal medial e áreas corticais do cérebro, juntamente com uma degeneração dos neurônios e das sinapses (KAPAKI et al., 2007). Vários mecanismos patogênicos que estão por trás dessas mudanças têm sido estudados, incluindo a agregação de placas  $\beta$ -Amiloide ( $A\beta$ ), hiperfosforilação de proteína tau – com a formação de emaranhados –, disfunção neurovascular e outros mecanismos, tais como alterações do ciclo celular, processos inflamatórios, estresse oxidativo e disfunção mitocondrial (KAPAKI et al., 2007; BUTTERFIELD; BOYD-KIMBALL, 2018). Na **Figura 2** temos uma representação comparativa entre um cérebro saudável e de um portador da DA em estágio avançado, na qual podemos observar a grande perda de tecido neuronal que leva a alteração de todo o cérebro de pacientes portadores da DA neste estágio. A imagem mostra um corte frontal onde podemos observar um encolhimento do córtex (em azul na **Figura 2-A**), danificando as regiões envolvidas com os pensamentos, planos e lembranças; um encolhimento grave no hipocampo (circulado na **Figura 2-B**), uma região do córtex que exerce papel importante na formação de novas lembranças; e um aumento nos ventrículos (circulado na **Figura 2-C**), espaços preenchidos por fluido dentro do cérebro.



**Figura 2.** Representação da degradação neuronal através de corte frontal de cérebros saudáveis e de pacientes portadores da DA em estágio avançado. Destacando: A) O córtex cerebral em azul; B) O hipocampo circulado em branco; C) Os ventrículos circulados em branco (Adaptado de alzheimer's association, 2018).

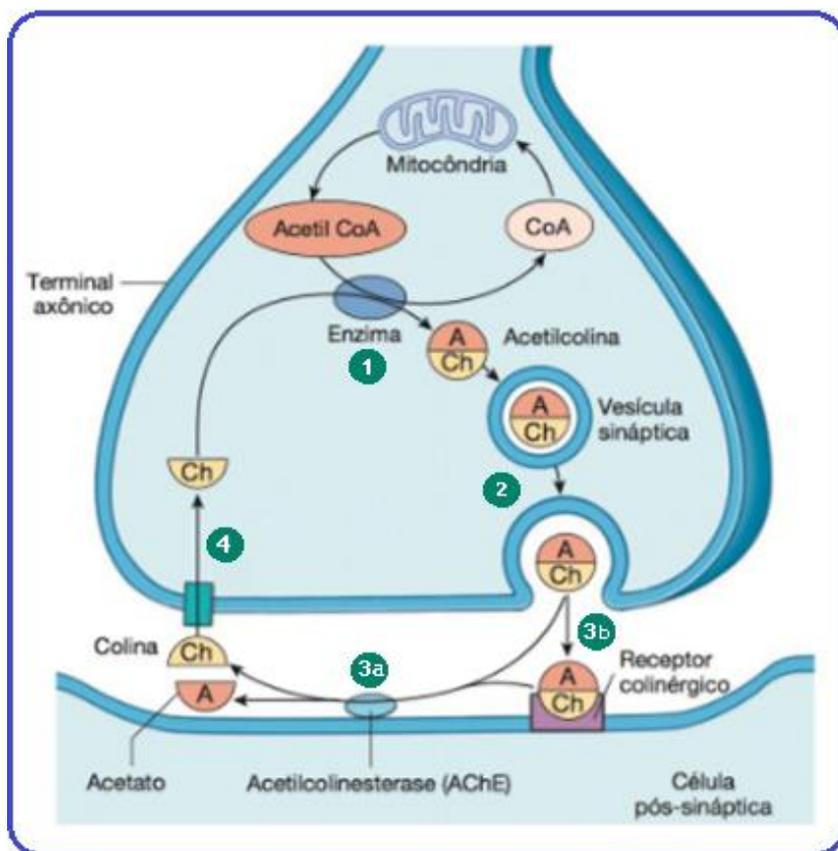
#### 1.1.4. A importância da acetilcolina na DA

A acetilcolina (ACh) foi identificada pela primeira vez em 1914 pelo médico e farmacologista Henry Hallett Dale (1875–1968) por suas ações no tecido cardíaco (DALE, 1914). Foi confirmada como um neurotransmissor pelo farmacologista e psico-biólogo Otto Loewi (1873–1961), que inicialmente deu o nome de Vagusstoff, porque era liberado pelo nervo vago, sendo o primeiro neurotransmissor a ser descoberto (LOEWI, 1936; DALE, 1937). Ambos receberam o Prêmio Nobel de Medicina em 1936 por seu trabalho. O nome atualmente utilizado, acetilcolina, é oriundo de sua estrutura química: um éster de ácido acético e colina (**Figura 3**). Partes do corpo que usam ou são afetadas pela acetilcolina são denominadas colinérgicas e substâncias que interferem na atividade da acetilcolina são chamadas anticolinérgicas (TIWARI et al., 2013).



**Figura 3.** Fotos dos pesquisadores Henry Hallett Dale (à esquerda) e Otto Loewi (à direita), primeiros pesquisadores a identificar a acetilcolina (3) como um importante neurotransmissor (HALPERN, 1969; DALE, 1962).

A ACh é o neurotransmissor encontrado na junção neuromuscular, em outras palavras, é a substância química que os neurônios motores do sistema nervoso liberam para ativar os músculos. Esta propriedade significa que os fármacos que afetam os sistemas colinérgicos podem ter efeitos muito perigosos, desde paralisia até convulsões. A acetilcolina também é utilizada como neurotransmissor no sistema nervoso autônomo (regula as funções corporais, como a frequência cardíaca, a digestão, a frequência respiratória, a resposta pupilar e a excitação sexual), como transmissor interno do sistema nervoso simpático (responsável por estimular a resposta de luta ou fuga do corpo, complementando o sistema nervoso parassimpático) ou como produto final liberado pelo sistema nervoso parassimpático (responsável pela estimulação de atividades que ocorrem quando o corpo está em repouso, especialmente após a ingestão de alimentos, e também por outras funções como a salivação, lacrimejamento, micção, digestão e defecação) (SMYTHIES; DE LANTREMANGE, 2016). A biossíntese da ACh se dá pela ação da enzima colina acetiltransferase (ChAT), sendo, em seguida, armazenada em vesículas para ser posteriormente secretada. Após sua secreção, ela pode seguir por dois caminhos, sendo eles sua ligação no receptor colinérgico ou sua degradação pela enzima acetilcolinesterase (AChE), gerando como produtos um íon acetato e um íon de colina (2). Posteriormente, a molécula de colina é transportada para o neurônio pré-sináptico, sendo então utilizada na síntese de uma nova molécula de ACh (**Figura 4**) (FRANCIS et al., 1999).



**Figura 4.** Representação do ciclo da acetilcolina nos neurônios – (1) síntese; (2) secreção; (3a) hidrólise; (3b) ligação no receptor; (4) colina sendo transportada para o terminal axônico (Adaptado de Arquivo BioQui, 2018).

No sistema nervoso central (SNC), como foi citado anteriormente, a ACh desempenha um papel importante no aprimoramento do estado de alerta quando acordamos, na manutenção da atenção, no aprendizado e na memória. Foi demonstrado que os danos ao sistema colinérgico (produtor de acetilcolina) no cérebro estão associados aos déficits de memória presentes na DA. Isso se dá porque os portadores desta doença apresentam níveis baixos de acetilcolina, devido a uma diminuição na concentração da ChAT no córtex e no hipocampo, assim como uma redução dos neurônios colinérgicos (KÁSA; RAKONCZAY; GULYA, 1997; JONES, 2005; HIMMELHEBER; SARTER; BRUNO, 2000; RIDLEY, *et al.*, 1984; FRANCIS *et al.*, 1999). Estudos realizados em macacos por Easton e colaboradores em 2002 mostraram que a interrupção do fornecimento de acetilcolina ao hipocampo e áreas corticais adjacentes provocou perda de memória nos animais comparável à amnésia anterógrada (deficiência em formar novas memórias) em humanos, se mostrando muito similar ao que ocorre com os pacientes portadores da DA (EASTON *et al.*, 2002).

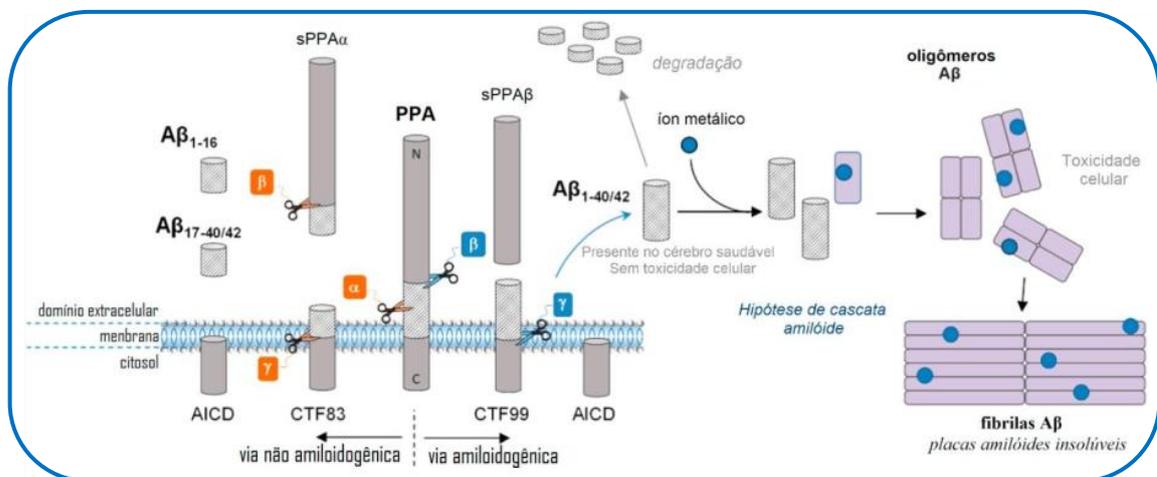
Outra enzima capaz de degradar o neurotransmissor ACh, ainda que em menores proporções, é a enzima butirilcolinesterase (BChE), também conhecida como pseudocolinesterase ou colinesterase plasmática. A BChE é produzida pelo fígado e está presente principalmente no plasma sanguíneo. Embora suas principais funções ainda não sejam conhecidas, estudos indicam que pacientes com baixa atividade de BChE, apresentam maiores riscos de morte decorrente de complicações cardiovasculares, indicando que a atividade desta enzima promove um efeito protetor em relação à mortalidade cardiovascular (CALDERON-MARGALIT et al., 2006; GOLIASCH, 2012; ASTORINO et al., 2017). Por outro lado, embora a ACh, no cérebro saudável, seja hidrolisada em menores proporções pela BChE, há evidências de que esta compensa a perda de AChE neuronal na DA avançada, assumindo a função da AChE. Estudos com camundongos geneticamente modificados, com desativação da AChE, mostraram que os mesmos não sofreram hiperativação colinérgica na ausência desta enzima, indicando que a hidrólise da ACh foi controlada pela BChE (MESULAM et al., 2002). Além deste, outros relatos mostram uma correlação positiva entre inibição seletiva da BChE, melhor desempenho cognitivo e aquisição de memória (FURUKAWA-HIBI et al., 2011; MAURICE et al., 2016). Dessa maneira, a inibição da BChE pode também constituir um alvo terapêutico para uso clínico na DA avançada, na qual os inibidores da AChE se mostram ineficientes.

#### **1.1.5. A agregação de placas $\beta$ -Amiloide em portadores da DA**

Sabe-se que portadores da DA possuem acúmulo de placas compostas por amiloides no entorno de suas células neuronais. Em última instância, o acúmulo destas placas leva à morte neuronal em regiões específicas do cérebro, como o córtex cerebral, o hipocampo, o córtex entorrinal e o estriado ventral, as quais são responsáveis pelas funções cognitivas (NALIVAEVA; TURNER, 2013).

O peptídeo  $\beta$ -Amiloide ( $A\beta$ ) é o principal componente destes depósitos extracelulares de amiloides no tecido cerebral de portadores de DA, estando presentes essencialmente na região do hipocampo. O peptídeo  $A\beta$  é gerado a partir da clivagem enzimática sequencial da proteína precursora de amiloide (PPA), havendo variação no comprimento do fragmento gerado, sendo ele de 39 a 42 aminoácidos (LUO; RODINA; CHIOPSIS, 2008). Embora não se conheça a principal função fisiológica da PPA, acredita-se que a mesma exerça um papel importante no desenvolvimento cerebral, na regulação da atividade da proteína G0, na plasticidade sináptica e na memória (NALIVAEVA; TURNER, 2013). O mecanismo de clivagem proteolítica da PPA pode ocorrer por duas vias, sendo elas a via não-amiloidogênica

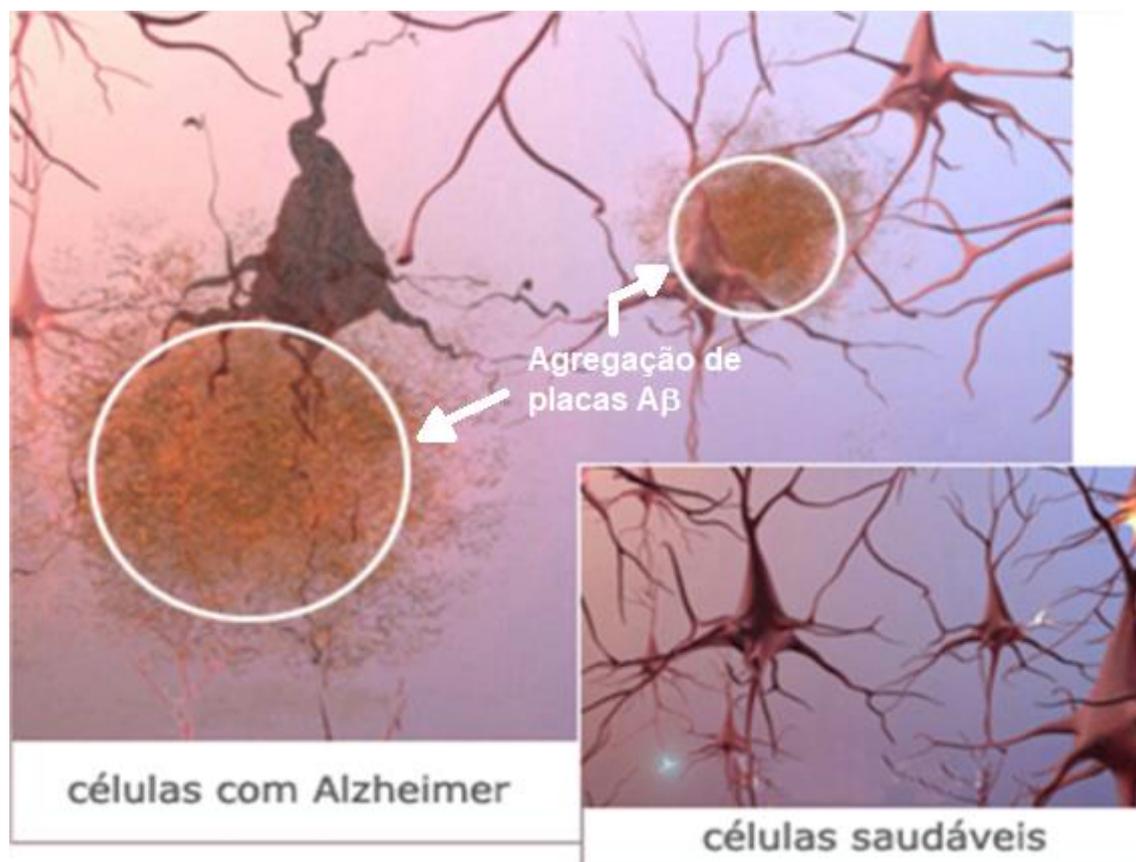
e a amiloidogênica. Em 1992, Hardy e Higgins publicaram o primeiro trabalho propondo a sequência de eventos denominada "hipótese da cascata amiloide", o qual postula que o peptídeo  $A\beta$  e/ou os produtos de clivagem da PPA, são neurotóxicos e podem levar à formação das placas senis, resultando em morte celular (HARDY; HIGGINS, 1992). Segundo essa hipótese, duas secretases, a  $\beta$ -secretase e a  $\gamma$ -secretase, clivam a PPA em diferentes lugares, originando fragmentos de peptídeo  $A\beta$  de diferentes tamanhos, em especial com 40 e 42 resíduos, sendo eles respectivamente os peptídeos  $A\beta_{1-40}$  e  $A\beta_{1-42}$  (LEVY et al., 1990; CHEIGNON et al., 2017). Embora o fragmento de  $A\beta_{1-40}$  seja o mais comum, atualmente considera-se que o fragmento de  $A\beta_{1-42}$ , o mais hidrofóbico, possui um maior potencial amiloidogênico, apesar de ambos serem capazes de se agregar e originar protofibrilas, fibrilas e, por fim, placas insolúveis (SOREGHAN; KOSMOSKI; GLABE, 1994; CHEIGNON et al., 2017). Em cérebros saudáveis o peptídeo  $A\beta$  também é formado, mas sofre uma degradação proteolítica por proteases de degradação de peptídeos  $A\beta$  ( $A\beta$ DPs), que são responsáveis por regular os níveis de peptídeos  $A\beta$  no cérebro (Figura 5), mostrando que no paciente com DA existe um desbalanço nesse processo natural (SAIDO; LEISSRING, 2012).



**Figura 5.** Formação dos peptídeos  $A\beta$  seguida do seu acúmulo, levando à formação das placas  $A\beta$  insolúveis em cérebros portadores da DA (Adaptado de CHEIGNON et al., 2017).

Na presença do peptídeo  $A\beta_{1-42}$ , a forma mais tóxica do mesmo, os neurônios do córtex e do hipocampo também sofrem modificações, resultando na indução de déficits cognitivos e de memória, mesmo sem ocorrer a morte neuronal (DANYSZ; PARSONS, 2012). Portanto, o acúmulo progressivo do peptídeo e a série de eventos amiloidogênicos que levam à formação das placas, verificado experimentalmente por meio da administração repetida de peptídeos  $A\beta$

em ratos, são considerados importantes mecanismos nas fases iniciais de perda da memória (YAMADA et al., 2005). Dessa forma, a produção de agregados de placas  $A\beta$  é considerada central na patologia da DA, ainda que estas deposições possam ser também detectadas em pequenas quantidades em cérebros de idosos saudáveis (**Figura 6**) (HARDY; HIGGINS, 1992).



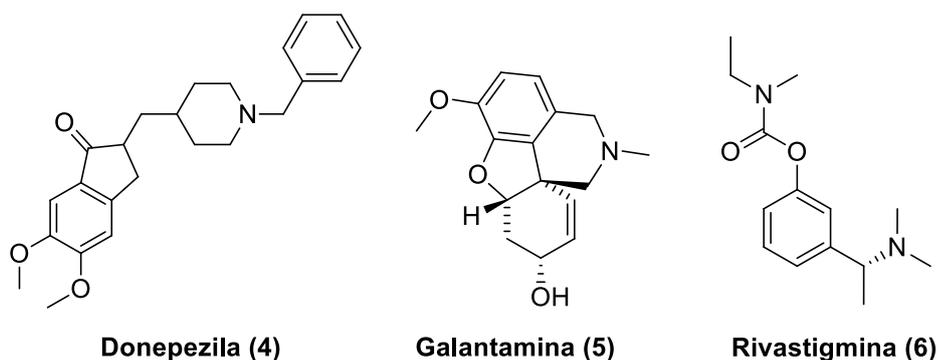
**Figura 6.** Representação comparativa de neurônios saudáveis e de portadores da DA (com agregação de placas  $A\beta$ ) (Adaptado de alzheimer's association, 2018).

### 1.1.6. Tratamento da DA na atualidade

O conhecimento dos distúrbios de neurotransmissores na DA tem guiado o desenvolvimento de fármacos com efeitos sobre os sintomas da doença, que são aprovados em muitos países. Estes fármacos atuam sobre o estado comportamental do paciente, mas não na cura da doença. Diversas abordagens terapêuticas são aplicadas no tratamento dos sintomas comportamentais como, agitação, depressão, alucinações e delírios, que são mais frequentes com a progressão da enfermidade. Além disso, avanços da pesquisa na patogênese molecular da DA também têm levado a novos fármacos como potenciais modificadores da doença, que agora vêm sendo utilizados em ensaios clínicos (FERRI et al., 2006; SALOMONE et al., 2012; FALCO et al., 2016; GODYŃ et al., 2016).

A hipótese colinérgica da DA afirma que a degeneração dos neurônios colinérgicos nos núcleos do prosencéfalo basal, provoca distúrbios nos terminais colinérgicos pré-sinápticos no hipocampo e no neocórtex, que são regiões de extrema importância para distúrbios de memória e outros sintomas cognitivos (TERRY; BUCCAFUSCO, 2003). Como resultado da neurodegeneração, a atividade de neurônios colinérgicos, aqueles que utilizam o neurotransmissor ACh, é reduzida. Uma abordagem terapêutica para melhorar a neurotransmissão colinérgica é aumentar a disponibilidade de ACh pela inibição da AChE, a enzima responsável pela hidrólise da acetilcolina na fenda sináptica (FERRI et al., 2006).

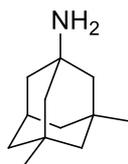
Os inibidores da AChE donepezila (4), rivastigmina (5) e galantamina (6) são aprovados para uso clínico na doença de Alzheimer (Figura 7). Galantamina (6) e donepezila (4) são inibidores seletivos da AChE, enquanto que a rivastigmina (5) inibe a AChE e também a butirilcolinesterase (BChE) com afinidades semelhantes.



**Figura 7.** Representação estrutural dos fármacos inibidores da AChE utilizados no tratamento da DA.

Outro fármaco utilizado, principalmente nos estágios mais avançados da doença, é a memantina (nome comercial: Namenda®) (7), que foi aprovado para uso clínico em 2003 (Figura 8). A abordagem terapêutica da memantina (7) segue a hipótese glutamatérgica, também conhecida como excito-tóxica. O glutamato, o principal neurotransmissor excitatório do sistema nervoso central, tem sua atividade mediada por receptores de três tipos, sendo um deles, o *N*-metil-*D*-Aspartato (NMDA). Segundo a hipótese glutamatérgica, em condições específicas, tais como, a alteração do metabolismo energético celular, ocorre uma excessiva ativação de receptores de NMDA. Uma vez que o glutamato alcance os receptores NMDA das células de superfície, pode ocorrer uma alteração na homeostase de cálcio, o levando a fluir livremente para dentro da célula, uma vez aumentada a concentração de cálcio no meio

intracelular, este pode provocar o processo de apoptose (degeneração e morte) neuronal. Portanto, a hipótese glutamatérgica postula que, essa excito-toxicidade glutamato-dependente possa constituir um dos mecanismos patogênicos necessários para a manutenção e amplificação do processo neurodegenerativo. Dessa forma, o fármaco memantina (**7**) age inibindo os receptores NMDA (FALCO et al., 2016).

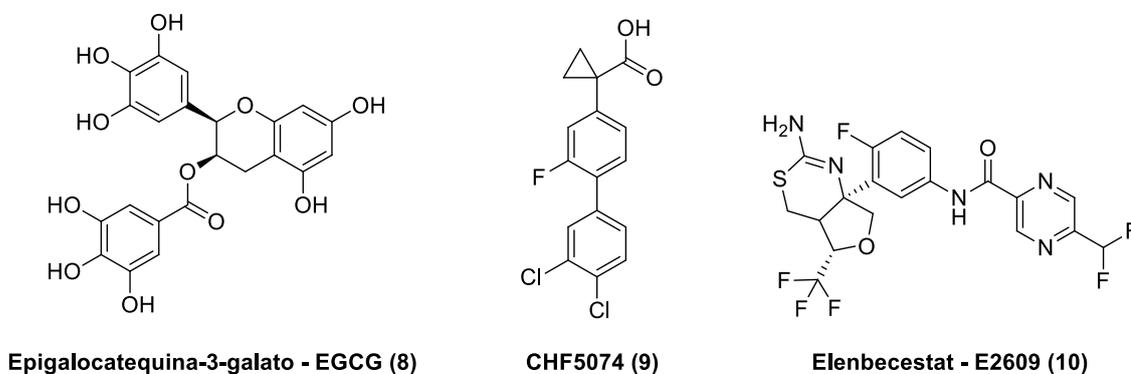


**Memantina (7)**

**Figura 8.** Estrutura do fármaco memantina, inibidor de receptores NMDA.

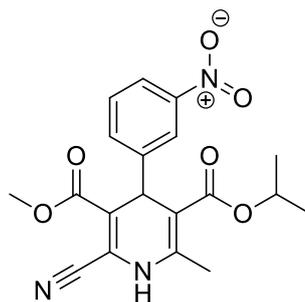
A hipótese da cascata amilóide afirma que a acumulação de placas  $A\beta$  no cérebro é o principal fator que impulsiona a patogênese da doença (HARDY, 2002; HARDY, 2009). Além disso, os depósitos de peptídeos  $A\beta$  infligem lesões oxidativas nos neurônios circundantes e provocam uma resposta inflamatória aguda, o que contribui para a neurodegeneração observada na DA (CASADESUS et al., 2007; SALOMONE et al., 2012). Embora ainda não haja nenhum fármaco aprovado para o tratamento da DA com essa abordagem terapêutica, existem candidatos a fármacos sendo estudados em fase clínica (FALCO et al., 2016; GODYŃ et al., 2016; LIU et al., 2017). Um exemplo disso é a Epigallocatequina-3-galato (EGCG) (**8**), um flavanol natural derivado do chá verde que apresenta múltiplas atividades neuroprotetoras. Em sua principal ação terapêutica no tratamento na DA, o EGCG liga-se ao peptídeo  $A\beta$ , inibindo a formação das placas senis. Atualmente ele se encontra na fase III dos ensaios clínicos para tratamento da DA (XICOTA et al., 2017). Dentro desse contexto amiloidogênico, outros alvos que passaram a ser explorados são as enzimas  $\beta$ - e  $\gamma$ -secretases, por desempenharem papel essencial na formação de agregados de peptídeos  $A\beta$  (GODYŃ et al., 2016; LIU et al., 2017). O composto CHF5074 (**9**), com uma formulação baseada na estrutura de *R*-flurbiprofeno, está sendo testado como um modulador de  $\gamma$ -secretase. O mesmo exibiu um perfil de segurança aceitável na fase I e está atualmente em fase II de testes clínicos. Ele mostrou ter efeitos no SNC dependentes da dose, sendo eles, bem tolerados e seguros em portadores de DA de leve a moderada (IMBIMBO et al., 2013). Outra substância em fase clínica é a Elenbecestat (E2609) (**10**). Esta atua como inibidora da enzima  $\beta$ -secretase e, nos estudos da fase II, mostrou-se capaz de provocar reduções consideráveis dos níveis do peptídeos  $A\beta$  cerebral, além de ter se revelado

segura e tolerável após 18 meses de tratamento. Atualmente a mesma encontra-se na fase III dos estudos clínicos. **(Figura 9)** (BERNIER et al., 2013; LYNCH et al., 2018).



**Figura 9.** Representação estrutural de inibidores da agregação de placas  $A\beta$  e das enzimas  $\gamma$ -secretase e  $\beta$ -secretase que atualmente se encontram em fase clínica para o tratamento da DA.

Além da busca por compostos inéditos, alguns fármacos já aprovados para tratar outras enfermidades podem ser reposicionados para o tratamento da DA, com diferentes abordagens terapêuticas, incluindo a inibição da formação de placas  $A\beta$  (GODYŃ et al., 2016). A nilvadipina (**11**, **Figura 10**), por exemplo, é um fármaco aprovado para o tratamento da hipertensão (com o nome comercial Nivadil®) e está na fase III dos estudos para o tratamento da DA. Observações clínicas revelaram sua influência positiva na cognição em pacientes tratados com a substância. No modelo de camundongo portador de DA, a nilvadipina (**11**) reduziu os níveis de peptídeo  $A\beta$  no cérebro e aumentou a depuração das placas  $A\beta$  através da barreira hematoencefálica. Devido a estes resultados promissores, a nilvadipina (**11**) foi introduzida em ensaios clínicos como um potencial fármaco anti-DA. Segundo o relato mais recente na literatura, ela está sendo submetida a um estudo europeu de fase III, controlado por placebo, com enfoque em pacientes portadores da DA de leve a moderada (LAWLOR et al., 2014).



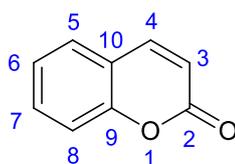
**Nilvadipina (11)**

**Figura 10.** Estrutura do fármaco nilvadipina, atualmente em fase III nos estudos clínicos para o tratamento da DA.

## 1.2. Cumarinas e suas propriedades

O estudo das cumarinas (**12**) foi iniciado há mais de dois séculos, sendo que o nome deste grupo químico amplamente encontrado na natureza deriva do nome da planta *Coumarouna Odorata*, ou *Dipteryx Odorata*, da qual foram isoladas pela primeira vez em 1820 por Vogel (BORGES et al., 2005; BOISDE; MEULY, 2007).

Cumarinas (**12**) são lactonas do ácido *orto*-hidroxi-cinâmico (**Figura 11**). Elas estão presentes em diversos vegetais, tais como, guaco (CARVALHO; MARTINS, 2004; AMARAL et al., 2009), castanha da índia (muito utilizada contra varizes) (MURI; DE MELLO; METSAVAHT, 2016), imburana, agrião, cumaru, canela, entre outros, e também estão presentes em algumas frutas como morango, cereja e damasco (RODRIGUES, 2005).



**Cumarina (12)**

**Figura 11.** Representação da estrutura básica de uma cumarina.

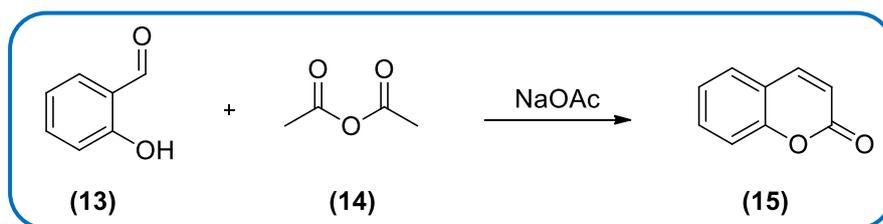
As cumarinas são alvo de contínuas investigações de interesse biológico devido às suas propriedades, tais como: anti-HIV (KUDO et al., 2013), anti-tuberculose (PATEL et al., 2013), anti-influenza (KHOMENKO et al., 2017), anti-DA (SUN et al., 2014), anti-inflamatório (GROVER et al., 2014), antimicrobiana (PATEL; KUMARI; PATEL, 2013), anticoagulante (LEI et al., 2015), anti-diabético (KHAN et al., 2014), entre outras (PEREIRA et al., 2018). Além de suas propriedades terapêuticas, elas possuem uma característica fotofísica interessante

que é a fluorescência. Isso se deve a seu sistema  $\pi$  conjugado, fazendo com que elas exibam forte fluorescência na região do UV-vis (visível) que as tornam apropriadas para uso como corantes, laser de corante, sondas e biomarcadores por fluorescência (KOVAC; NOVAC, 2002; PEREIRA et al., 2018).

Por conta de sua vasta aplicabilidade, diversos grupos de pesquisa vêm se dedicando no desenvolvimento de novas vias sintéticas e protocolos para executar mais facilmente a reação chave de ciclização do anel heterocíclico e sua derivatização regioseletiva. Dessa forma, tem-se aumentado o uso de tecnologias na sua síntese, a fim de diminuir os tempos de reação e facilitar a obtenção de seus derivados, como micro-ondas reacional, ultrassom, novos catalisadores, solventes mais “verdes” e reações livres de solvente (SYMEONIDIS et al., 2009; LAUFER; HAUSMANN; HÖLDERICH, 2003; FRÈRE et al., 2001). Os métodos clássicos e mais utilizados para obter os derivados cumarínicos são as reações de Perkin, Pechmann e Knoevenagel.

### 1.2.1 Reação de Perkin

As primeiras cumarinas foram sintetizadas em meados do século XIX, tendo como metodologia pioneira a famosa síntese de Perkin. Ela consiste na obtenção de cumarinas (**15**) pela condensação aldólica entre 2-hidroxibenzaldeído (**13**) e anidrido acético (**14**), em presença de um sal básico (**Esquema 1**) (MURRAY, 1995).

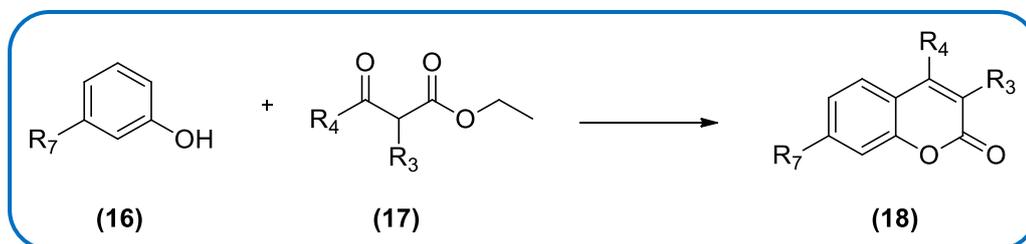


**Esquema 1.** Esquema reacional de Perkin.

### 1.2.2. Reação de Pechmann

A reação de Pechmann consiste na obtenção de cumarinas (**18**) a partir da condensação de fenóis (**16**) com  $\beta$ -cetoesteres (**17**), em presença de catálise ácida (**Esquema 2**). Esse protocolo de síntese foi amplamente utilizado para obtenção de cumarinas visando aplicações em química medicinal e na indústria (SYMEONIDIS et al., 2009). Com o objetivo de aumentar os rendimentos e reduzir o tempo reacional, diversos grupos de pesquisa têm se dedicado para otimização dos parâmetros reacionais. São exemplos de otimizações realizadas com sucesso, a

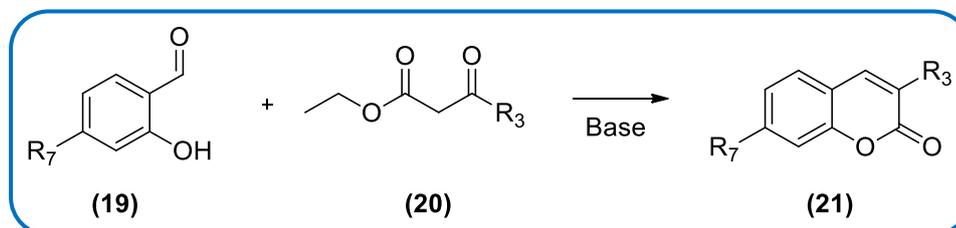
utilização de suporte sólido como catálise e de micro-ondas reacional (LAUFER; HAUSMANN; HÖLDERICH, 2003; FRÈRE et al., 2001).



**Esquema 2.** Esquema reacional de Pechmann.

### 1.2.3. Reação de Knoevenagel

A reação de Knoevenagel consiste na obtenção de cumarinas (21) a partir da condensação de aldeídos (19) com metilenos (20) ativados em presença de uma base branda como catalisador, que pode ser substituída, em alguns casos, por combinações de ácidos de Lewis ou ácidos carboxílicos com aminas (**Esquema 3**). Essa metodologia é amplamente utilizada na síntese derivados cumarínicos substituídos na posição R<sub>3</sub> e R<sub>7</sub> (TRKOVNIK; IVEZIC, 2000; PEREIRA et al., 2016).

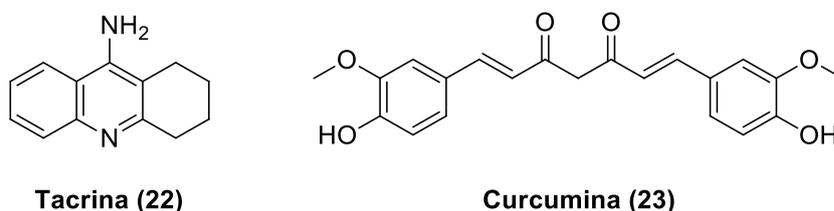


**Esquema 3.** Esquema reacional de Knoevenagel.

### 1.2.4. Uso de cumarinas na DA frente a inibição de acetilcolinesterase e formação de placas $\beta$ -Amiloide

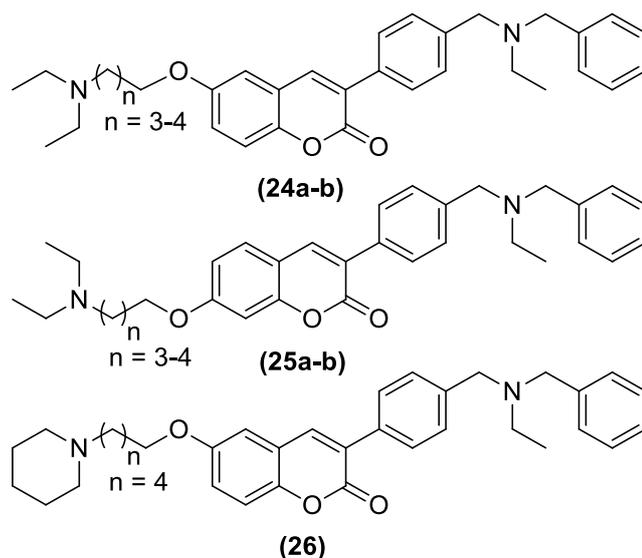
Nos últimos anos compostos contendo o núcleo cumarínico têm sido descritos na literatura como bons inibidores frente à AChE e até mesmo da agregação de placas A $\beta$ . Para fins de comparação das atividades frente a estes alvos, a literatura sempre lança mão do uso de compostos referências com reconhecidas atividades, sendo a donepezila (4), a galantamina (6) e a tacrina (22) os principais controles utilizados para o estudo da inibição da AChE e a curcumina (23) para a inibição da agregação de placas A $\beta$  (SUN et al., 2014). A tacrina (Cognex®) foi o primeiro medicamento aprovado para o tratamento da DA pela agência regulatória americana *US Food and Drug Administration* (FDA), contudo não é mais utilizada

devido à sua hepatotoxicidade (**Figura 12**) (FORLENZA, 2005). A curcumina é um produto natural derivado do açafrão, sua atividade frente à agregação de placas  $A\beta$  foi reportada pela primeira vez em 2001 por Lim e colaboradores (LIM et al., 2001).



**Figura 12.** Representação estrutural da tacrina (**22**) e da curcumina (**23**).

Em 2016, Montanari e colaboradores, desenvolveram um trabalho que visava a síntese de compostos cumarínicos com possível atividade inibitória, entre outras, frente à AChE e agregação de peptídeos  $A\beta_{1-42}$ . Os compostos foram sintetizados mantendo a substituição etil-dibenzilamínica na posição 3 da cumarina (farmacóforo responsável pela atividade inibitória da AChE e da formação de placas  $A\beta$ ) e variando o número de carbonos espaçadores na cadeia alcofílica – 4 e 5 metilenos – assim como a posição (6 ou 7 do núcleo cumarínico) à qual estes grupos se ligavam. Os resultados obtidos nos ensaios de inibição frente à AChE humana (*hAChE*) foram bastante promissores, enquanto frente à agregação de peptídeos  $A\beta_{1-42}$  foram obtidos bons resultados apenas para alguns compostos da série (**Figura 13**). Os compostos substituídos na posição 7 da cumarina (**25a** e **25b**) apresentaram os melhores resultados em ambos os alvos, sendo o composto **25a** o mais ativo frente à agregação de placas  $A\beta_{1-42}$ , apresentando uma inibição de 62% da agregação a 50  $\mu\text{M}$  e uma concentração inibitória de 50% da atividade enzimática ( $\text{CI}_{50}$ ) de 12,9 nM frente à *hAChE*. Já o composto **25b** foi o mais ativo frente a *hAChE*, apresentando um  $\text{CI}_{50} = 11,1$  nM e uma porcentagem inibitória de 59,2% da agregação de peptídeos  $A\beta_{1-42}$ . Adicionalmente, alguns dos demais compostos da série apresentaram bons resultados, principalmente frente à *hAChE*, como os compostos **24a**, **24b** e **26** (**Figura 13**) (MONTANARI et al., 2016).

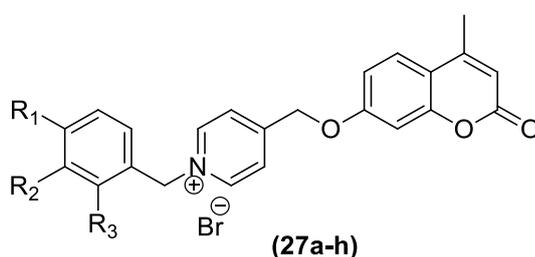


Compostos	n	<i>hAChE</i>	Inibição $A\beta_{1-42}$
		CI <sub>50</sub> (nM)	a 50 $\mu$ M (%)
<b>24a</b>	3	30,5	10,3
<b>24b</b>	4	11,7	56,4
<b>25a</b>	3	12,9	62,0
<b>25b</b>	4	11,1	59,2
<b>26</b>	4	27,3	15,4
<b>donepezila</b>	-	23,1	<10

**Figura 13.** Representação estrutural dos compostos sintetizados no trabalho de Montanari e colaboradores (**24a-26**) e valores de CI<sub>50</sub> frente à *hAChE* e porcentagem inibitória frente à agregação de peptídeos  $A\beta_{1-42}$  destes e do controle donepezila (**4**).

Em 2017, Lan e colaboradores desenvolveram um trabalho de planejamento e síntese de derivados cumarínicos híbridos (**27a-h**) como possíveis agentes multialvos para o tratamento da DA. Dentre estes alvos, estavam a inibição da AChE e da agregação de peptídeos  $A\beta_{1-42}$ , nos quais, inclusive, o grupo obteve resultados bastante promissores. A síntese dos compostos se deu variando a natureza e posição do grupo ligado ao anel benzílico. Os compostos mais ativos da série frente à agregação de peptídeos  $A\beta_{1-42}$  foram aqueles com benzilas substituídas com um átomo de bromo (**27f-h**), sendo **27h** o mais ativo, proporcionando 67,6% de inibição da agregação de peptídeos  $A\beta_{1-42}$  a 20  $\mu$ M, e um CI<sub>50</sub> = 217 nM frente à AChE de enguia elétrica (*EeAChE*). De forma geral, os compostos que apresentaram maior atividade inibitória frente à *EeAChE* foram aqueles em que o anel benzílico era *orto*-substituído, exceto quando o substituinte era o átomo de flúor, quando então o melhor resultado observado foi para o

substituinte em *para*. O composto **27c** foi o que se mostrou mais ativo frente à *EeAChE*, apresentando um  $CI_{50} = 35,4$  nM e uma atividade inibitória de 55,2% à 20  $\mu$ M frente à agregação de peptídeos  $A\beta_{1-42}$ . Nos ensaios de citotoxicidade, realizados em células de neuroblastoma, o composto **27d** não apresentou citotoxicidade à 100  $\mu$ M, sendo, portanto, o único composto que teve sua cinética de inibição frente à *EeAChE* estudada, sendo esta do tipo mista. Na **Figura 14** se encontram os compostos mais ativos da série sintetizada e seus respectivos valores de  $CI_{50}$  frente à *EeAChE* e porcentagem inibitória da agregação de peptídeos  $A\beta_{1-42}$ , bem como os controles utilizados (LAN et al., 2017).



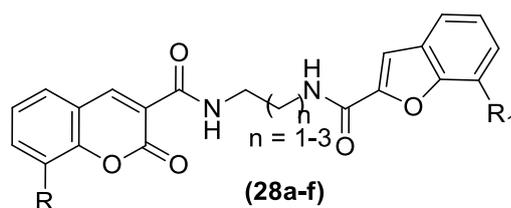
Compostos	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	<i>EeAChE</i> $CI_{50}$ (nM)	Inibição $A\beta_{1-42}$ a 20 $\mu$ M (%)
<b>27a</b>	H	H	F	65,3	53,7
<b>27b</b>	F	H	H	36,9	49,1
<b>27c</b>	H	H	CH <sub>3</sub>	35,4	55,2
<b>27d</b>	H	CH <sub>3</sub>	H	83,6	62,1
<b>27e</b>	CH <sub>3</sub>	H	H	250	58,5
<b>27f</b>	Br	H	H	78,1	63,7
<b>27g</b>	H	Br	H	128,6	62,7
<b>27h</b>	Br	H	H	217,5	67,6
<b>donepezila</b>	-	-	-	31,8	-
<b>curcumina</b>	-	-	-	-	65,2

**Figura 14.** Representação estrutural dos compostos sintetizados no trabalho de Lan e colaboradores (**27a-h**) e valores de  $CI_{50}$  frente à *EeAChE* e porcentagem de inibição frente à agregação de peptídeos  $A\beta_{1-42}$  destes e dos controles: donepezila (**4**); e curcumina (**23**).

Em 2018, Hiremathad, Chand e Keri desenvolveram um trabalho no qual foram sintetizados uma série de derivados cumarínicos visando, entre outras, suas possíveis atividades de inibição frente à AChE e a agregação de peptídeos  $A\beta_{1-42}$ , apresentando bons resultados em

ambos os alvos. Os compostos foram sintetizados variando-se o número de carbonos espaçadores ( $n= 1, 2$  e  $3$ ) e a natureza dos grupos  $R$  e  $R_1$  (**Figura 15**), sendo eles hidrogênio ( $H$ ) e metoxila ( $OCH_3$ ) em ambos os casos.

Dos compostos sintetizados com  $n = 1$  ou  $2$ , aqueles contendo  $R = R_1 = OCH_3$  obtiveram as melhores atividades inibitórias de agregação de peptídeos  $A\beta_{1-42}$ , sendo **28c** o composto mais ativo, inibindo em 72,1% da agregação a  $40 \mu M$  e apresentando um  $CI_{50} = 0,32 \mu M$  frente à  $AChE$  de arraia elétrica ( $TcAChE$ ). Entretanto, isso não foi observado nos compostos com  $n = 3$ , visto que o composto mais ativo desta série foi o **28e** ( $R = H$  e  $R_1 = OCH_3$ ), apresentando um  $CI_{50} = 0,27 \mu M$  frente à  $TcAChE$ , e 64,5% de inibição a  $40 \mu M$  frente à agregação de peptídeos  $A\beta_{1-42}$ . Na **Figura 15** encontram-se os compostos mais ativos da série com seus respectivos valores de  $CI_{50}$  frente à  $TcAChE$  e porcentagens inibitórias frente à agregação de placas  $A\beta$ , bem como o controle utilizado (HIREMATHAD; CHAND; KERI, 2018).

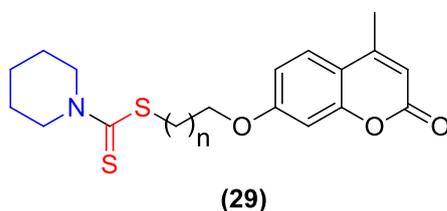


Compostos	n	R	R <sub>1</sub>	<i>TcAChE</i>	Inibição $A\beta_{1-42}$
				$CI_{50}$ ( $\mu M$ )	a $40 \mu M$ (%)
<b>28a</b>	1	$OCH_3$	$OCH_3$	0,27	64,5
<b>28b</b>	2	H	$OCH_3$	0,62	68,7
<b>28c</b>	2	$OCH_3$	$OCH_3$	0,32	72,1
<b>28d</b>	3	H	$OCH_3$	0,42	56,5
<b>28e</b>	3	$OCH_3$	H	0,18	44,5
<b>28f</b>	3	$OCH_3$	$OCH_3$	0,224	64,5
<b>donepezila</b>	-	-	-	0,031	-

**Figura 15.** Representação estrutural dos compostos sintetizados no trabalho de Hiremathad, Chand e Keri (**28a-h**) e valores de  $CI_{50}$  frente à  $TcAChE$  e porcentagem de inibição frente à agregação de peptídeos  $A\beta_{1-42}$  destes e do controle, donepezila (**23**).

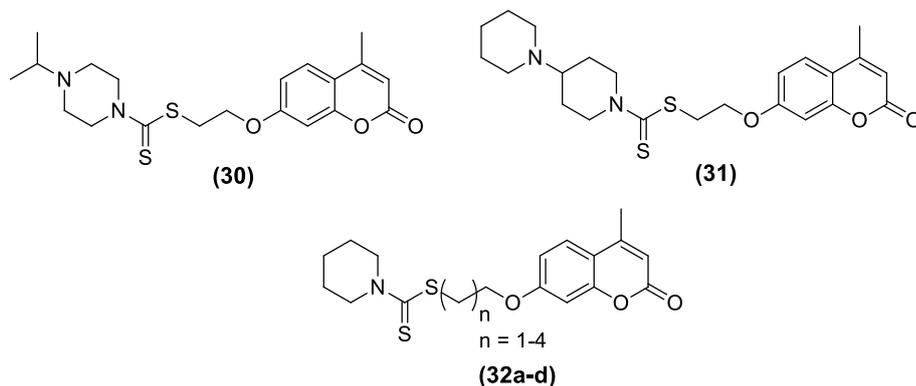
Em 2018, Jiang e colaboradores sintetizaram uma série de derivados cumarínicos planejados como inibidores da  $AChE$  e de agregação de peptídeos  $A\beta_{1-42}$ , no qual foram observados bons resultados, principalmente frente à  $AChE$ . A partir de um estudo inicial de

otimização estrutural, no qual variou-se a natureza dos grupos ligados ao grupo tioéster (em vermelho na **Figura 16**), elegeu-se o anel piperidínico (em azul na **Figura 16**) como grupo fixo, uma vez que este apresentou os resultados mais promissores frente à *hAChE* (mais potente) e à agregação de peptídeos  $A\beta_{1-42}$  (segundo mais potente) concomitantemente. Em um segundo momento, ampliou-se a série de derivados contendo o grupo piperidínico, variando-se o número de carbonos espaçadores presentes da cadeia alifática entre o grupo tioéster e o núcleo cumarínico (**Figura 16**). Os melhores resultados de inibição da *hAChE* e da agregação de peptídeos  $A\beta_{1-42}$  foram obtidos para os compostos que possuíam cadeia alifática de até 5 carbonos ( $n = 1-4$ ).



**Figura 16.** Representação da estrutura explorada no trabalho de Jiang e colaboradores.

Dentre os compostos sintetizados, os mais ativos se encontram na **Figura 17 (30-32d)** com seus respectivos valores de  $CI_{50}$  frente à *hAChE* e porcentagens inibitórias frente à agregação de peptídeos  $A\beta_{1-42}$ , bem como os controles utilizados. Tomando como base os grupos tioéster e cumarina, o aumento do número de carbonos espaçadores entre eles levou a uma melhora na atividade frente à ambos os alvos, que alcançou seu ponto ótimo com quatro carbonos espaçadores ( $n=3$ ) (**32c**). A derivatização da piperidina com grupos volumosos (**30-31**) levou a um decréscimo da atividade colinesterásica, demonstrando a importância deste grupo para a atividade híbrida. O composto **32c**, frente à *hAChE*, apresentou um  $CI_{50} = 0,027 \mu M$  e proporcionou 40,19% de inibição da agregação de placas  $A\beta$  a  $25 \mu M$ . O ensaio de citotoxicidade, realizado em células de neuroblastoma, e o estudo de cinética enzimática de inibição da *hAChE*, foram feitos apenas para o composto **32c**, nos quais, respectivamente, o composto não provocou morte celular significativa a  $50 \mu M$  e indicou que a inibição é do tipo mista. O composto **31** foi o mais ativo frente à agregação de placas  $A\beta$ , proporcionando 43,53% de inibição, e apresentando um  $CI_{50} = 1,16 \mu M$  frente à *hAChE* (JIANG et al., 2018).



Compostos	n	<i>h</i> AChE	Inibição $A\beta_{1-42}$ a
		CI <sub>50</sub> (nM)	25 $\mu$ M (%)
<b>30</b>	-	1,99	35,44
<b>31</b>	-	1,16	43,53
<b>32a</b>	1	0,47	37,88
<b>32b</b>	2	0,29	37,03
<b>32c</b>	3	0,027	40,19
<b>32d</b>	4	0,21	40,03
<b>donepezila</b>	-	0,041	-
<b>curcumina</b>	-	-	39,62

**Figura 17.** Representação estrutural dos compostos sintetizados no trabalho de Jiang e colaboradores (**30-32c**) e valores de CI<sub>50</sub> frente à *h*AChE e porcentagem de inibição frente à agregação de peptídeos  $A\beta_{1-42}$  destes e dos controles: donepezila (**4**) e curcumina (**23**).

Além dos relatos acima, diversas outras séries contendo o núcleo cumarínico foram descritas na literatura. Como exemplo, temos os derivados conjugados à tacrina sintetizados por Sun e colaboradores em 2014, dos quais os mais ativos frente à *h*AChE, apresentaram constante de afinidade ( $K_i$ ) de 16,7 a 66,1 nM e CI<sub>50</sub> de 5 a 66  $\mu$ M frente à agregação de peptídeos  $A\beta_{1-42}$  (SUN et al., 2014). Outro exemplo, são os derivados contendo dois núcleos 7-alcoxi-cumarínicos interligados sintetizados por Pisani e colaboradores em 2017, os quais foram planejados como inibidores da AChE e todos mostraram-se ativos, apresentando CI<sub>50</sub> de 0,059 a 9,90  $\mu$ M frente à *Ee*AChE (PISANI et al., 2017). Além destes, em 2018, Jalili-Baleh e colaboradores, sintetizaram uma série de derivados 3-fenil-cumarínicos planejados como multialvos para o tratamento da DA, estando a inibição da AChE e da agregação de placas  $A\beta$  entre eles. Os compostos mais ativos frente à AChE apresentaram CI<sub>50</sub> de 7,3 a 12,6  $\mu$ M e um dos compostos sintetizados apresentou 62,4% de inibição a 100  $\mu$ M frente à agregação de

peptídeo  $A\beta_{1-42}$  (JALILI-BALEH et al., 2018). Esses relatos demonstram a importância deste núcleo para as atividades inibitórias da AChE e da agregação do peptídeo  $A\beta_{1-42}$ , o que corrobora com a proposta dessa dissertação.

## 2. OBJETIVOS

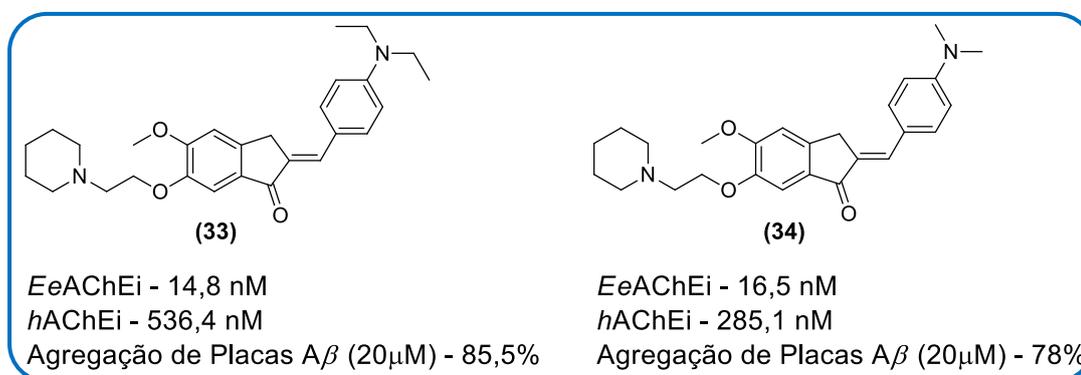
### 2.1. Objetivos gerais

Este trabalho tem como objetivos gerais o planejamento, síntese e avaliação farmacológica de novos derivados heterocíclicos do tipo alquilamino-cumarinas como possíveis agentes inibidores da enzima AChE e da agregação de placas  $A\beta$ . O planejamento estrutural tem como fundamento a construção de compostos híbridos simbióticos (VIEGAS et al., 2007) capazes de atuar inibindo simultaneamente dois alvos que contribuem para a instalação e manutenção da DA. Ademais, serão realizadas avaliações frente a modelos de inibição enzimática, *in vitro*, e teóricos de interação com os biorreceptores alvos por modelagem molecular que ajudarão a compreender melhor o modo de ação destes compostos e também o planejamento de futuros derivados.

### 2.2. Objetivos específicos

#### 2.2.1. Planejamento dos compostos

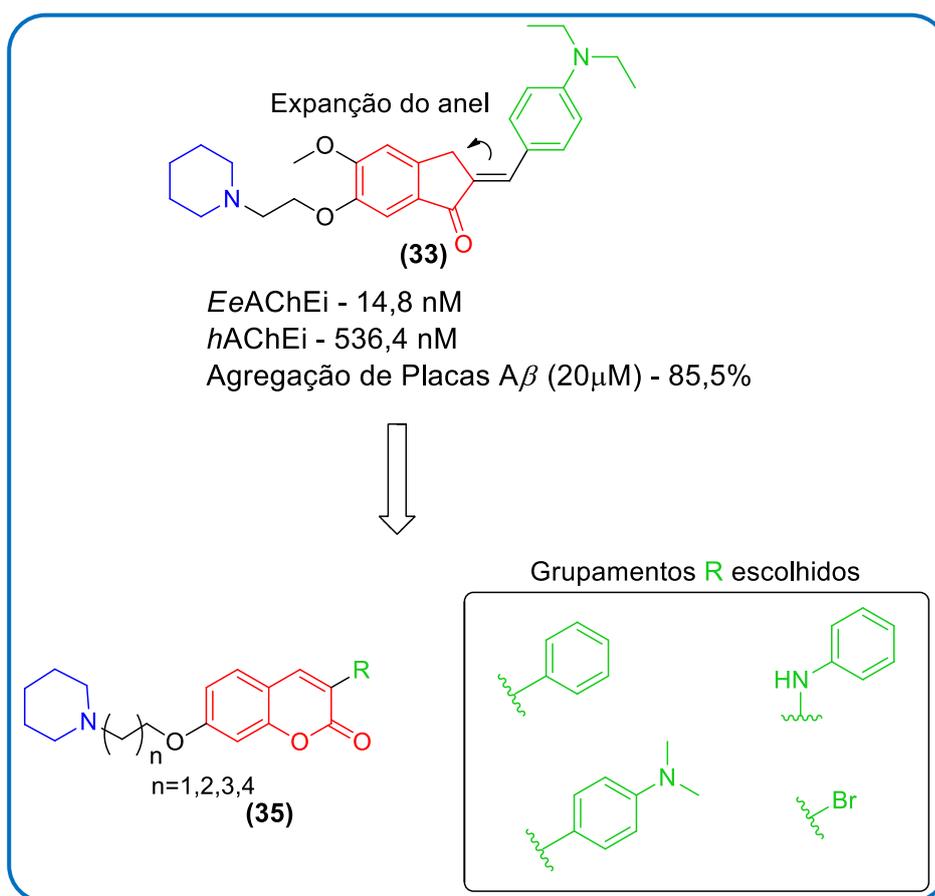
Recentemente, foram descritos na literatura compostos (**Figura 18**) contendo o núcleo alquilamino-indanona, responsáveis por inibir a enzima AChE e agregação de placas  $A\beta$ . Em dois de seus melhores resultados, as estruturas **(33)** e **(34)** apresentaram, respectivamente, valores de  $CI_{50}$  iguais a 14,8 e 16,5 nM de inibição frente à *EeAChE*, 285,1 e 536,4 nM frente à *hAChE* e porcentagens de inibição da agregação de placas  $A\beta$  de 85,5% e 78% à 20  $\mu$ M, respectivamente (HUANG et al., 2014).



**Figura 18.** Estrutura dos compostos **33** e **34** utilizados como protótipos no planejamento estrutural (Adaptado de HUANG et al., 2014).

O planejamento dos novos derivados alquilamino-cumarínicos (**35**; **Esquema 4**) propostos nessa dissertação foi baseado em requisitos estruturais presentes nestes inibidores alquilamino-indanona descritos acima (HUANG et al., 2014), assim como no amplo uso das cumarinas para estas atividades farmacológicas. O planejamento das séries foi baseado na: 1- manutenção do grupamento alquilamino cíclico, que é o responsável pela interação com o sítio catalítico catiônico da AChE; e 2- troca do núcleo indanona pelo cumarínico, através do isosterismo não-clássico de expansão de anéis, a fim de se investigar o seu potencial como constituinte estrutural para esta classe de compostos híbridos.

Adicionalmente, os grupos **R** escolhidos, indicados no **Esquema 4**, são essencialmente hidrofóbicos, visando interações com o sítio periférico da AChE, assim como com o peptídeo  $A\beta_{1-42}$ , uma vez que a inibição da agregação desses peptídeos muitas vezes passa por interações hidrofóbicas.



**Esquema 4.** Planejamento estrutural dos compostos alquilamino-cumarínicos com farmacóforo de inibição da AChE e placas  $A\beta$  oriundos do protótipo **33**. Azul: farmacóforo responsável pela inibição da AChE; Verde: farmacóforo responsável pela inibição da agregação de placas  $A\beta$ .

### **2.2.2. Síntese e caracterização dos compostos**

Uso da clássica síntese de Pechmann na construção do núcleo cumarínico e uso de técnicas atuais de derivatização deste pelo uso de reações de acoplamento cruzado de paládio. Caracterização dos compostos sintetizados por meio de técnicas de espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN) de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  e de espectrometria de massas de alta resolução (EMAR).

### **2.2.3. Avaliação farmacológica**

Investigação do perfil e da cinética de inibição dos compostos cumarínicos frente à AChE e BChE e potencial inibitório dos compostos frente à agregação de placas  $A\beta$ . Avaliação da atividade antioxidante e do perfil citotóxico dos compostos frente a linhagem de células mamíferas e determinação da correlação estrutura-atividade da série visando a proposição de novos análogos.

### **2.2.4. Modelagem Molecular**

Investigação teórica do perfil de interação dos derivados cumarínicos com os biorreceptores alvos por modelagem molecular através da técnica de “*docking* molecular” (atracamento molecular) e otimização dos resultados por métodos semi-empíricos.

## **3. MATERIAIS E MÉTODOS**

A fase orgânica das reações foi seca sob sulfato de sódio anidro, filtrada e o solvente foi evaporado à pressão reduzida em evaporador rotatório, modelo RV 10 digital e banho IKA, modelo HB 10 digital.

O acompanhamento das reações foi feito através da técnica de cromatografia em camada delgada (CCD), na qual foram utilizadas placas de alumínio Kieselgel 60 (HF-254, Merck) com 0,2 mm de espessura. A visualização das substâncias em CCD foi realizada em lâmpada ultravioleta (254 e 365 nm).

A purificação dos compostos foi realizada a partir da técnica de cromatografias líquida de adsorção em coluna (flash), Isolera Biotage, modelo ISO-4SV (ICE-UFRRJ). Para a confecção da pastilha, utilizou-se sílica gel 70-230 mesh (Merck). E como fase móvel, foram utilizadas as misturas solventes de acordo com as propriedades físico-químicas de cada composto.

Os espectros de RMN  $^1\text{H}$  foram obtidos em aparelhos Bruker Avance-500 e Bruker Avance-400 (ICE-UFRRJ), operando a 500 MHz e 400 MHz, respectivamente. As amostras foram dissolvidas em  $\text{CD}_3\text{OD}$ ,  $\text{CDCl}_3$  e  $\text{DMSO}-d_6$ , contendo tetrametilsilano (TMS) como referência interna e colocadas em tubos de 5 mm de diâmetro.

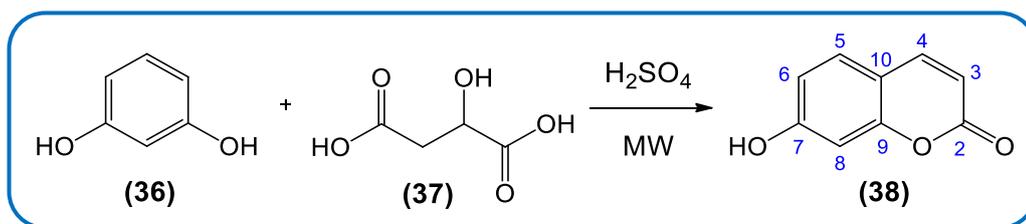
Os espectros de RMN  $^{13}\text{C}$  foram obtidos operando a 125 MHz e 100 MHz, em aparelho Bruker Avance-500 e Bruker Avance-400 (ICE-UFRRJ), respectivamente, e as amostras foram dissolvidas em  $\text{CD}_3\text{OD}$ ,  $\text{CDCl}_3$  e  $\text{DMSO}-d_6$ , contendo TMS como referência interna.

As áreas dos picos foram obtidas por integração eletrônica e sua multiplicidade descrita com: s-simpleto / sl-simpleto largo / d-duplete / dd-duplo duplete / t-triplete / q-quarteto / quint-quinteto / m-multipleto.

A análise de EMAR foi realizada usando um espectrômetro de massas de órbita quadrupolo Thermo Fisher Scientific QExactive <sup>TM</sup> usando ionização por *electrospray* (ESI). As soluções padrão dos compostos ( $1000 \text{ ng mL}^{-1}$ ) foram preparadas em água/metanol 7 : 3 com 0,1% de ácido fórmico e 5 mM de  $\text{NH}_4\text{CO}_2\text{H}$  (formato de amônio), e utilizadas por inserção direta.

Os pontos de fusão foram determinados em aparelho AAKER modelo PFM-II e os valores não foram corrigidos.

### 3.1. Síntese da 7-hidroxycumarina (38)

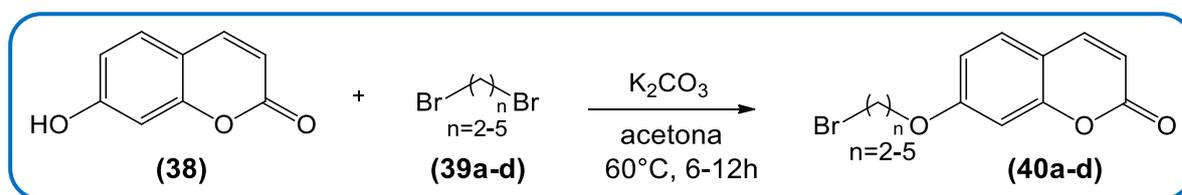


Em um erlemmeyer de 50 mL foram adicionados 20 mmol de resorcinol (36) pulverizado, 20 mmol de ácido málico (37) e 10 mL de ácido sulfúrico ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ ). Na saída do erlenmeyer foi colocado um funil de vidro invertido, a fim de canalizar a saída do gás liberado na reação e evitar projeções. Em um micro-ondas caseiro (Eletrolux, MEF28, 1140 W), a mistura foi irradiada no centro do prato, na potência 6 em 3 pulsos de 10 segundos. Logo após a irradiação, foram adicionados 5 mL de água quente e a reação mantida sob agitação. Em seguida, foi adicionado gelo picado dentro do erlenmeyer. Após o derretimento do gelo, o precipitado formado foi filtrado a vácuo e lavado com água gelada. Por fim, o produto foi

purificado no equipamento Isolera com fase estacionária gel de sílica e fase móvel mistura de hexano : acetato de etila em gradiente de concentração de 40 a 70% do solvente mais polar.

O composto **38** foi obtido como um sólido branco em 70% de rendimento após purificação. Ponto de fusão igual a 238°C (literatura: P.F. = 230°C). **RMN<sup>1</sup>H (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)**:  $\delta$  H<sub>3</sub> = 6,21 (d, *J* = 9,4 Hz, 1H); H<sub>4</sub> = 7,94 (d, *J* = 9,5 Hz, 1H); H<sub>5</sub> = 7,54 (d, *J* = 8,5 Hz, 1H), H<sub>6</sub> = 6,76 (dd, *J* = 8,5, 2,2 Hz, 1H); H<sub>8</sub> = 6,72 (d, *J* = 2,2 Hz, 1H); H<sub>OH</sub> = 10,60 (s, 1H). **RMN<sup>13</sup>C (125 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)**:  $\delta$  C<sub>2</sub> = 161,75; C<sub>3</sub> = 113,5; C<sub>4</sub> = 145,02; C<sub>5</sub> = 130,20; C<sub>6</sub> = 111,88; C<sub>7</sub> = 160,92; C<sub>8</sub> = 102,89; C<sub>9</sub> = 156,00; C<sub>10</sub> = 11,75.

### 3.2. Reação de *O*-alquilação da 7-hidroxycumarina (**40a-d**)

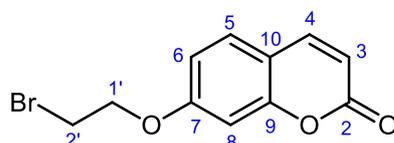


Em um bécher (25 mL) foram solubilizados 2,5 mmol de umbeliferona (**38**) em 8 mL de acetona (CH<sub>3</sub>COCH<sub>3</sub>). Em paralelo, foram adicionados a um tubo de reação de borosilicato (20 mL), 2 mL de acetona, 10-15 mmol do respectivo dibromoalcano (**39a-d**) e 5,0 mmol de carbonato de potássio (K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>). Em seguida, a mistura contida no tubo foi submetida a agitação magnética e adicionou-se gota a gota a solução de cumarina. Ao fim da adição, o tubo de reação foi selado e a mistura foi submetida a aquecimento a 60°C por 6-12h (**Tabela 1**), monitorada por CCD. Ao final da reação a acetona foi evaporada em rotaevaporador. O isolamento foi feito por partição com 50 mL de água destilada e 15 mL de acetato de etila (3 vezes). Ao final da partição a solução foi seca com sulfato de sódio (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) e, após ser filtrado, o solvente foi removido em rotaevaporador. Os respectivos produtos foram obtidos na forma de óleos que foram precipitados no próprio balão a partir da adição de 50 mL de hexano seguida de irradiação em banho de ultrassom por 10 minutos. Por fim, os produtos foram filtrados e deixados secar à temperatura ambiente.

**Tabela 1.** Tempos de reação de alquilação da umbeliferona.

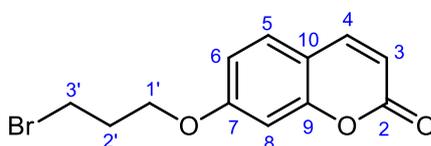
<b>n</b>	<b>Dibromoalcano (mmol)</b>	<b>Tempos de reação (h)</b>
2	15,0	12
3	12,5	10
4	10,0	6
5	10,0	6

**7-(2-bromoetoxi)-cumarina (40a)**



O composto **40a** foi obtido como um sólido amarelo claro em 75% de rendimento após purificação. Ponto de fusão igual a 132°C (informação indisponível na literatura). **RMN<sup>1</sup>H (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>):**  $\delta$  H<sub>4</sub> = 7,65 (d,  $J$  = 9,3 Hz, 1H); H<sub>5</sub> = 7,40 (d,  $J$  = 8,5 Hz, 1H); H<sub>6</sub> = 6,88 (dd,  $J$  = 8,4, 2,1 Hz, 1H); H<sub>8</sub> = 6,82 (d,  $J$  = 1,8 Hz, 1H); H<sub>3</sub> = 6,28 (d,  $J$  = 9,5 Hz, 1H); H<sub>1'</sub> = 4,36 (t,  $J$  = 6,1 Hz, 2H); H<sub>2'</sub> = 3,68 (t,  $J$  = 6,0 Hz, 2H). **RMN<sup>13</sup>C (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>):**  $\delta$  C<sub>2</sub> = 161,14; C<sub>7</sub> = 161,04; C<sub>9</sub> = 155,73; C<sub>4</sub> = 143,29; C<sub>5</sub> = 128,93; C<sub>3</sub> = 113,53; C<sub>10</sub> = 113,02; C<sub>6</sub> = 112,83; C<sub>8</sub> = 101,63; C<sub>1'</sub> = 68,15; C<sub>2'</sub> = 28,41.

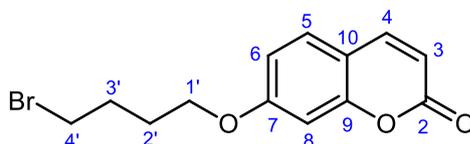
**7-(3-bromopropoxi)-cumarina (40b)**



O composto **40b** foi obtido como um sólido amarelo claro em 78% de rendimento após purificação. Ponto de fusão igual a 101°C (informação indisponível na literatura). **RMN<sup>1</sup>H (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>):**  $\delta$  H<sub>4</sub> = 7,64 (d,  $J$  = 9,5 Hz, 1H); H<sub>5</sub> = 7,38 (d,  $J$  = 8,5 Hz, 1H); H<sub>6</sub>/H<sub>8</sub> = 6,82-6,86 (m, 2H); H<sub>3</sub> = 6,26 (d,  $J$  = 9,3 Hz, 1H); H<sub>1'</sub> = 4,17 (t,  $J$  = 5,9 Hz, 2H); H<sub>3'</sub> = 3,61 (t,  $J$  = 6,3 Hz, 2H); H<sub>2'</sub> = 2,36 (quint,  $J$  = 6,1 Hz, 2H). **RMN<sup>13</sup>C (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>):**  $\delta$  C<sub>2</sub> =

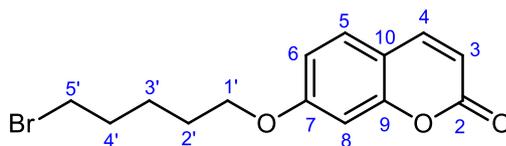
161,79; C<sub>7</sub> = 161,11; C<sub>9</sub> = 155,77; C<sub>4</sub> = 143,33; C<sub>5</sub> = 128,79; C<sub>10</sub> = 118,52; C<sub>3</sub> = 113,19; C<sub>6</sub> = 112,69; C<sub>8</sub> = 101,47; C<sub>1'</sub> = 65,80; C<sub>3'</sub> = 31,89; C<sub>1'</sub> = 29,54.

#### 7-(4-bromobutoxi)-cumarina (40c)



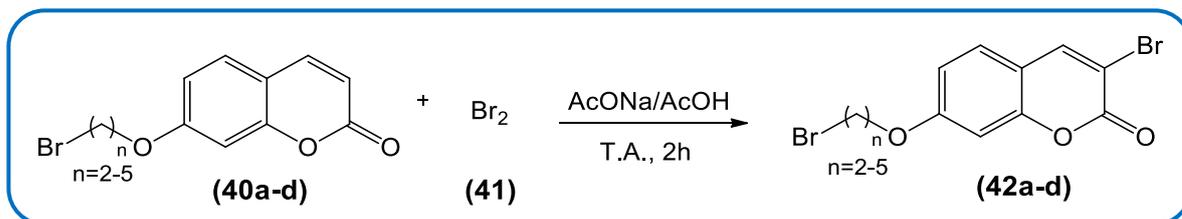
O composto **40c** foi obtido como um sólido amarelo claro em 70% de rendimento após purificação. Ponto de fusão igual a 65°C (informação indisponível na literatura). **RMN<sup>1</sup>H (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>):**  $\delta$  H<sub>4</sub> = 7,64 (d,  $J$  = 9,5 Hz, 1H); H<sub>5</sub> = 7,37 (d,  $J$  = 8,8 Hz, 1H); H<sub>6</sub> = 6,83 (dd,  $J$  = 8,5, 2,3 Hz, 1H); H<sub>8</sub> = 6,80 (d,  $J$  = 2,3 Hz, 1H); H<sub>3</sub> = 6,25 (d,  $J$  = 9,3 Hz, 1H); H<sub>1'</sub> = 4,06 (t,  $J$  = 5,9 Hz, 2H); H<sub>4'</sub> = 3,50 (t,  $J$  = 6,4 Hz, 2H); H<sub>2'</sub> = 2,05-2,12 (m, 2H); H<sub>3'</sub> = 1,96-2,02 (m, 2H). **RMN<sup>13</sup>C (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>):**  $\delta$  C<sub>2</sub> = 162,01; C<sub>7</sub> = 161,17; C<sub>9</sub> = 155,82; C<sub>4</sub> = 143,38; C<sub>5</sub> = 128,74; C<sub>3</sub> = 113,07; C<sub>6</sub> = 112,82; C<sub>10</sub> = 112,52; C<sub>8</sub> = 101,28; C<sub>1'</sub> = 67,48; C<sub>4'</sub> = 33,19; C<sub>2'</sub> = 29,25; C<sub>3'</sub> = 27,59.

#### 7-(5-bromopentoxi)-cumarina (40d)



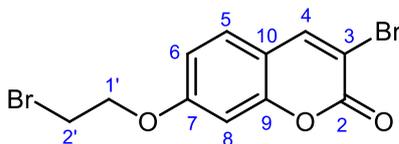
O composto **40d** foi obtido como um óleo laranja claro em 68% de rendimento após purificação. **RMN<sup>1</sup>H (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>):**  $\delta$  H<sub>4</sub> = 7,64 (d,  $J$  = 9,5 Hz, 1H); H<sub>5</sub> = 7,37 (d,  $J$  = 8,5 Hz, 1H); H<sub>6</sub> = 6,83 (dd,  $J$  = 8,7, 2,1 Hz, 1H); H<sub>8</sub> = 6,80 (sl, 1H); H<sub>3</sub> = 6,25 (d,  $J$  = 9,5 Hz, 1H); H<sub>1'</sub> = 4,03 (t,  $J$  = 6,1 Hz, 2H); H<sub>5'</sub> = 3,45 (t,  $J$  = 6,7 Hz, 2H); H<sub>2'</sub> = 1,92-1,99 (m, 2H); H<sub>4'</sub> = 1,82-1,89 (m, 2H); H<sub>3'</sub> = 1,61-1,69 (m, 2H). **RMN<sup>13</sup>C (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>):**  $\delta$  C<sub>2</sub> = 162,16; C<sub>7</sub> = 161,21; C<sub>9</sub> = 155,84; C<sub>4</sub> = 143,41; C<sub>5</sub> = 128,71; C<sub>3</sub> = 112,88; C<sub>6</sub> = 112,97; C<sub>10</sub> = 112,43; C<sub>8</sub> = 101,26; C<sub>1'</sub> = 68,16; C<sub>5'</sub> = 33,45; C<sub>2'</sub> = 32,32; C<sub>4'</sub> = 28,12; C<sub>3'</sub> = 24,68.

### 3.3. Reação de bromação da posição 3 do núcleo cumarínico (42a-d)



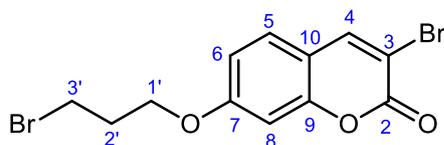
Em um tubo de reação de borossilicato (20 mL), foram adicionados 1,7 mmol do respectivo derivado *O*-alquil-cumarínico (40a-d), 2,1 mmol de bromo (41), 5,0 mmol de acetato de sódio (AcONa) e 8 mL de ácido acético glacial (AcOH). A reação foi submetida a agitação magnética a 25°C por 2h, monitorada por CCD. Ao final da reação, a mistura reacional foi adicionada a um bécher de 50 mL contendo gelo picado. Os respectivos produtos desejados (42a-d) precipitaram e após o derretimento do gelo, os mesmos foram filtrados a vácuo. Por fim, os produtos (42a-d) foram purificados no equipamento Isolera com fase estacionária gel de sílica e fase móvel mistura de hexano : diclorometano em gradiente de concentração de 50 a 90% do solvente mais polar.

#### 3-bromo-7-(2-bromoetoxi)-cumarina (42a)



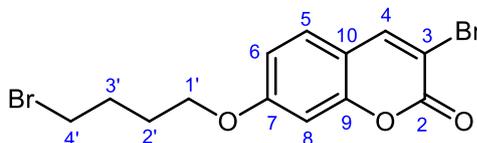
O composto 42a foi obtido como um sólido branco em 95% de rendimento após purificação. Ponto de fusão igual a 183°C (informação indisponível na literatura). **RMN<sup>1</sup>H (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>):**  $\delta$  H<sub>4</sub> = 8,55 (s, 1H); H<sub>5</sub> = 7,63 (d, *J* = 8,8 Hz, 1H); H<sub>8</sub> = 7,08 (d, *J* = 2,3 Hz, 1H); H<sub>6</sub> = 7,02 (dd, *J* = 8,8, 2,5 Hz, 1H); H<sub>1'</sub> = 4,44 (t, *J* = 6,0 Hz, 2H); H<sub>2'</sub> = 3,84 (t, *J* = 6,1 Hz, 2H). **RMN<sup>13</sup>C (100 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>):**  $\delta$  C<sub>2</sub> = 161,24; C<sub>7</sub> = 156,81; C<sub>9</sub> = 154,59; C<sub>4</sub> = 145,28; C<sub>5</sub> = 129,11; C<sub>6</sub> = 113,39; C<sub>3</sub> = 113,36; C<sub>10</sub> = 106,91; C<sub>8</sub> = 101,34; C<sub>1'</sub> = 68,50; C<sub>2'</sub> = 31,07.

### 3-bromo-7-(3-bromopropoxi)-cumarina (42b)



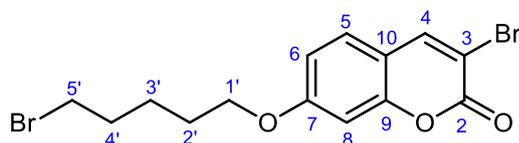
O composto **42b** foi obtido como um sólido branco em 97% de rendimento após purificação. Ponto de fusão igual a 120°C (informação indisponível na literatura). **RMN<sup>1</sup>H (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>):**  $\delta$  H<sub>4</sub> = 8,02 (s, 1H); H<sub>5</sub> = 7,36 (d,  $J$  = 8,8 Hz, 1H); H<sub>6</sub> = 6,88 (dd,  $J$  = 8,7, 2,4 Hz, 1H); H<sub>8</sub> = 6,83 (d,  $J$  = 2,3 Hz, 1H); H<sub>1'</sub> = 4,18 (t,  $J$  = 5,8 Hz, 2H); H<sub>3'</sub> = 3,61 (t,  $J$  = 6,3 Hz, 2H); H<sub>2'</sub> = 2,36 (quint,  $J$  = 6,1 Hz, 2H). **RMN<sup>13</sup>C (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>):**  $\delta$  C<sub>2</sub> = 162,01; C<sub>7</sub> = 157,39; C<sub>9</sub> = 154,95; C<sub>4</sub> = 144,36; C<sub>5</sub> = 128,13; C<sub>6</sub> = 113,34; C<sub>3</sub> = 113,19; C<sub>10</sub> = 107,85; C<sub>8</sub> = 101,38; C<sub>1'</sub> = 65,95; C<sub>3'</sub> = 31,84; C<sub>2'</sub> = 29,47.

### 3-bromo-7-(4-bromobutoxi)-cumarina (42c)



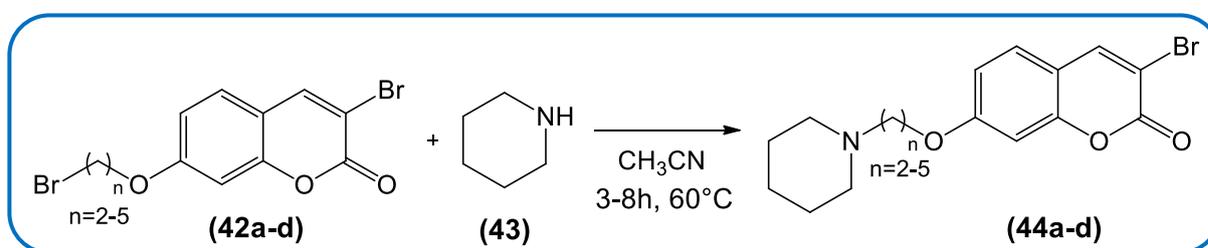
O composto **42c** foi obtido como um sólido branco em 98% de rendimento após purificação. Ponto de fusão igual a 120°C (informação indisponível na literatura). **RMN<sup>1</sup>H (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>):**  $\delta$  H<sub>4</sub> = 8,02 (s, 1H); H<sub>5</sub> = 7,35 (d,  $J$  = 8,8 Hz, 1H); H<sub>6</sub> = 6,86 (dd,  $J$  = 8,7, 2,4 Hz, 1H); H<sub>8</sub> = 6,80 (d,  $J$  = 2,3 Hz, 1H); H<sub>1'</sub> = 4,06 (t,  $J$  = 5,9 Hz, 2H); H<sub>4'</sub> = 3,50 (t,  $J$  = 6,4 Hz, 2H); H<sub>2'</sub> = 2,05-2,12 (m, 2H); H<sub>3'</sub> = 1,96-2,03 (m, 2H). **RMN<sup>13</sup>C (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>):**  $\delta$  C<sub>2</sub> = 162,22; C<sub>7</sub> = 157,45; C<sub>9</sub> = 155,00; C<sub>4</sub> = 144,41; C<sub>5</sub> = 128,08; C<sub>6</sub> = 113,47; C<sub>3</sub> = 113,02; C<sub>10</sub> = 107,70; C<sub>8</sub> = 101,17; C<sub>1'</sub> = 67,61; C<sub>4'</sub> = 33,15; C<sub>2'</sub> = 29,21; C<sub>3'</sub> = 27,56.

### 3-bromo-7-(5-bromopentoxi)-cumarina (42d)



O composto **42d** foi obtido como um sólido branco em 99% de rendimento após purificação. Ponto de fusão igual a 123°C (informação indisponível na literatura). **RMN<sup>1</sup>H (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>):**  $\delta$  H<sub>4</sub> = 8,02 (s, 1H); H<sub>5</sub> = 7,35 (d, *J* = 8,8 Hz, 1H); H<sub>6</sub> = 6,86 (dd, *J* = 8,7, 2,4 Hz, 1H); H<sub>8</sub> = 6,80 (d, *J* = 2,3 Hz, 1H); H<sub>1'</sub> = 4,03 (t, *J* = 6,3 Hz, 2H); H<sub>5'</sub> = 3,45 (t, *J* = 6,8 Hz, 2H); H<sub>2'</sub> = 1,92-1,99 (m, 2H); H<sub>4'</sub> = 1,83-1,90 (m, 2H); H<sub>3'</sub> = 1,61-1,69 (m, 2H). **RMN<sup>13</sup>C (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>):**  $\delta$  C<sub>2</sub> = 162,38; C<sub>7</sub> = 157,48; C<sub>9</sub> = 155,03; C<sub>4</sub> = 144,44; C<sub>5</sub> = 128,06; C<sub>6</sub> = 113,53; C<sub>3</sub> = 112,95; C<sub>10</sub> = 107,60; C<sub>8</sub> = 101,15; C<sub>1'</sub> = 68,32; C<sub>5'</sub> = 33,45; C<sub>2'</sub> = 32,30; C<sub>4'</sub> = 28,09; C<sub>3'</sub> = 24,68.

### 3.4. Reação de aminação da cadeia alquílica (44a-d)

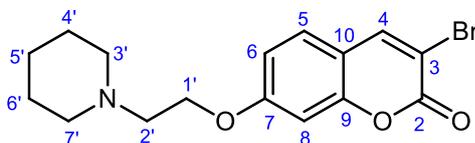


Em um tubo de reação de borosilicato (20 mL), foram adicionados 1,3 mmol do respectivo derivado 3-bromo-7-bromoalcoxi-cumarínico (**42a-d**), 3,9 mmol de piperidina (**43**) e 8 mL de acetonitrila (CH<sub>3</sub>CN). Após a adição dos reagentes, o tubo foi selado e a mistura foi submetida a agitação magnética e aquecimento a 60°C por 3-8h (**Tabela 2**), monitorada por CCD. Ao final da reação a acetonitrila foi evaporada em rotaevaporador. Por fim, os respectivos produtos (**44a-d**) foram purificados no equipamento Isolera com fase estacionária sílica e fase móvel mistura de diclorometano : metanol em gradiente de concentração de 0-25% do solvente mais polar.

**Tabela 2.** Tempos de reação de aminação dos derivados cumarínicos.

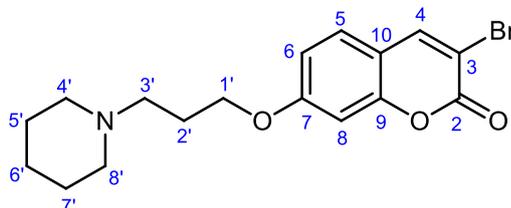
n	Tempos de reação (h)
2	8
3	5
4	3
5	3

### 3-bromo-7-((2-piperidin-1-il)etoxi)-cumarina (44a)



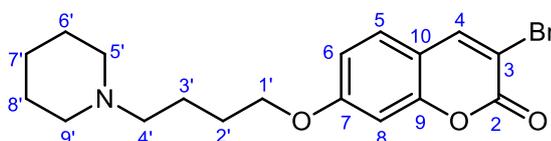
O composto **44a** foi obtido como um sólido laranja claro em 95% de rendimento após purificação. Ponto de fusão igual a 215°C (informação indisponível na literatura). **RMN<sup>1</sup>H (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>):**  $\delta$  H<sub>4</sub> = 8,57 (s, 1H); H<sub>5</sub> = 7,64 (d, *J* = 8,5 Hz, 1H); H<sub>8</sub> = 7,10 (sl, 1H); H<sub>6</sub> = 7,02 (dd, *J* = 8,7, 1,7 Hz, 1H); H<sub>1'</sub> = 4,34 (sl, 2H); H<sub>2'</sub>/ H<sub>3'</sub>/ H<sub>7'</sub> = 2,87-3,16 (m, 6H); H<sub>4'</sub>/ H<sub>6'</sub> = 1,64 (sl, 4H); H<sub>5'</sub> = 1,46 (sl, 2H). **RMN<sup>13</sup>C (125 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>):**  $\delta$  C<sub>2</sub> = 161,31; C<sub>7</sub> = 156,78; C<sub>9</sub> = 154,56; C<sub>4</sub> = 145,27; C<sub>5</sub> = 129,03; C<sub>6</sub> = 113,42; C<sub>3</sub> = 113,26; C<sub>10</sub> = 106,81; C<sub>8</sub> = 101,34; C<sub>1'</sub> = 53,45; C<sub>2'</sub>/ C<sub>3'</sub>/ C<sub>7'</sub> = 43,69; C<sub>4'</sub>/ C<sub>6'</sub> = 22,18; C<sub>5'</sub> = 21,61. EMAR (ESI) *m/z* calculado para C<sub>16</sub>H<sub>19</sub>BrNO<sub>3</sub> [M + H]<sup>+</sup> 552,0548 o valor encontrado foi 552,05390.

### 3-bromo-7-((3-piperidin-1-il)propoxi)-cumarina (44b)



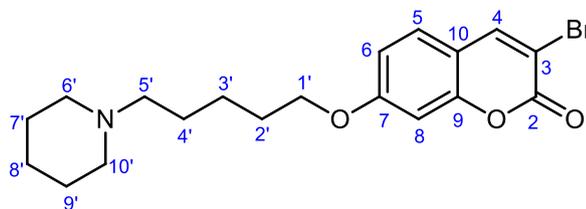
O composto **44b** foi obtido como um sólido laranja claro em 97% de rendimento após purificação. Ponto de fusão igual a 242°C (informação indisponível na literatura). **RMN<sup>1</sup>H (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>):**  $\delta$  H<sub>4</sub> = 8,01 (s, 1H); H<sub>5</sub> = 7,34 (d, *J* = 8,5 Hz, 1H); H<sub>6</sub> = 6,88 (dd, *J* = 8,8, 2,2 Hz, 1H); H<sub>8</sub> = 6,83 (d, *J* = 2,2 Hz, 1H); H<sub>1'</sub> = 4,21 (t, *J* = 5,7 Hz, 2H); H<sub>3'</sub>/ H<sub>4'</sub>/ H<sub>8'</sub> = 3,17 (t, *J* = 5,4 Hz, 2H); H<sub>3'/ H<sub>4'/ H<sub>8'</sub></sub> = 2,87 (t, *J* = 5,7 Hz, 2H); H<sub>3'/ H<sub>4'/ H<sub>8'</sub></sub> = 1,92-1,94 (m, 2H); H<sub>2'/ H<sub>5'/ H<sub>7'</sub></sub> = 1,63-1,70 (m, 6H); H<sub>6'</sub> = 1,47-1,48 (m, 2H). **RMN<sup>13</sup>C (125 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>):**  $\delta$  C<sub>2</sub> = 161,56; C<sub>7</sub> = 156,79; C<sub>9</sub> = 154,59; C<sub>4</sub> = 145,30; C<sub>5</sub> = 129,06; C<sub>6</sub> = 113,32; C<sub>3</sub> = 113,17; C<sub>10</sub> = 106,74; C<sub>8</sub> = 101,16; C<sub>1'</sub> = 65,84; C<sub>3'</sub> = 53,22; C<sub>4'/ C<sub>8'</sub></sub> = 52,18; C<sub>2'</sub> = 23,20; C<sub>5'/ C<sub>7'</sub></sub> = 22,55; C<sub>6'</sub> = 21,27. EMAR (ESI) *m/z* calculado para C<sub>17</sub>H<sub>21</sub>BrNO<sub>3</sub> [M + H]<sup>+</sup> 366,0705 o valor encontrado foi 366,07018.</sub></sub></sub>

### 3-bromo-7-((4-piperidin-1-il)butoxi)-cumarina (44c)



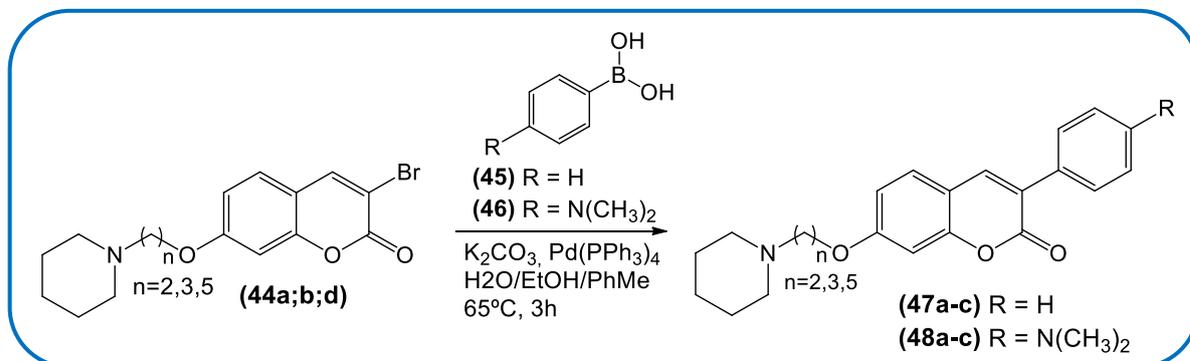
O composto **44c** foi obtido como um sólido laranja claro em 98% de rendimento após purificação. Ponto de fusão igual a 225°C (informação indisponível na literatura). **RMN<sup>1</sup>H (500 MHz, CDCl<sub>3</sub> / CD<sub>3</sub>OD):**  $\delta$  H<sub>4</sub> = 7,97 (s, 1H); H<sub>5</sub> = 7,29 (s, 1H); H<sub>6</sub> = 6,78 (dd,  $J$  = 8,7, 1,4 Hz, 1H); H<sub>8</sub> = 6,70 (sl, 1H); H<sub>1'</sub> = 3,97 (t,  $J$  = 5,8 Hz, 2H); H<sub>4'/</sub> H<sub>5'/</sub> H<sub>9'</sub> = 3,47-3,48 (m, 2H); H<sub>4'/</sub> H<sub>5'/</sub> H<sub>9'</sub> = 2,99-3,02 (m, 2H); H<sub>4'/</sub> H<sub>5'/</sub> H<sub>9'</sub> = 2,70 (sl, 2H); H<sub>2'/</sub> H<sub>3'/</sub> H<sub>6'/</sub> H<sub>7'/</sub> H<sub>8'</sub> = 1,78-2,04 (m, 10H). **RMN<sup>13</sup>C (125 MHz, CDCl<sub>3</sub> / CD<sub>3</sub>OD):**  $\delta$  C<sub>2</sub> = 161,95; C<sub>7</sub> = 157,75; C<sub>9</sub> = 154,64; C<sub>4</sub> = 144,69; C<sub>5</sub> = 128,18; C<sub>6</sub> = 113,21; C<sub>3</sub> = 113,03; C<sub>10</sub> = 107,16; C<sub>8</sub> = 101,12; C<sub>1'</sub> = 67,38; C<sub>4'</sub> = 56,64; C<sub>5'/</sub>C<sub>9'</sub> = 52,99; C<sub>2'</sub> = 25,94; C<sub>6'/</sub>C<sub>8'</sub> = 22,43; C<sub>3'</sub> = 21,51; EMAR (ESI)  $m/z$  calculado para C<sub>18</sub>H<sub>23</sub>BrNO<sub>3</sub> [M + H]<sup>+</sup> 380,0861 o valor encontrado foi 380,08518.

### 3-bromo-7-((5-piperidin-1-il)pentoxi)-cumarina (44d)



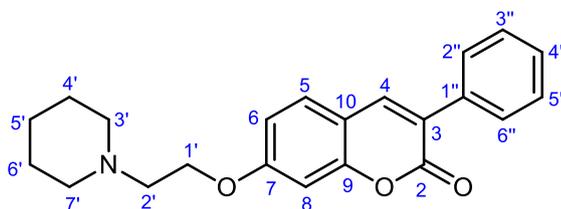
O composto **44d** foi obtido como um sólido amarelo claro em 99% de rendimento após purificação. Ponto de fusão igual a 176°C (informação indisponível na literatura). **RMN<sup>1</sup>H (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>):**  $\delta$  H<sub>NH</sub> = 9,11 (sl, 1H); H<sub>4</sub> = 8,56 (s, 1H); H<sub>5</sub> = 7,62 (d,  $J$  = 8,8 Hz, 1H); H<sub>8</sub> = 7,04 (d,  $J$  = 1,9 Hz, 1H); H<sub>6</sub> = 6,98 (dd,  $J$  = 8,5, 2,2 Hz, 1H); H<sub>1'</sub> = 4,10 (t,  $J$  = 6,3 Hz, 2H); H<sub>6'/</sub>H<sub>10'</sub> = 3,42 (sl, 2H); H<sub>5'</sub> = 3,02-3,05 (m, 2H); H<sub>6'/</sub>H<sub>10'</sub> = 2,85 (sl, 2H); H<sub>2'/</sub>H<sub>3'/</sub>H<sub>4'/</sub>H<sub>7'/</sub>H<sub>9'</sub> = 1,69-1,80 (m, 10H); H<sub>8'</sub> = 1,41-1,47 (m, 2H). **RMN<sup>13</sup>C (125 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>):**  $\delta$  C<sub>2</sub> = 162,02; C<sub>7</sub> = 156,83; C<sub>9</sub> = 154,66; C<sub>4</sub> = 143,37; C<sub>5</sub> = 128,75; C<sub>3</sub> = 112,93; C<sub>6</sub> = 112,84; C<sub>10</sub> = 106,47; C<sub>8</sub> = 101,32; C<sub>1'</sub> = 68,06; C<sub>5'</sub> = 55,64; C<sub>6'/</sub>C<sub>10'</sub> = 52,00; C<sub>2'</sub> = 27,83; C<sub>4'</sub> = 22,86; C<sub>7'/</sub>C<sub>9'</sub> = 22,62; C<sub>8'</sub> = 22,52; C<sub>3'</sub> = 21,35. EMAR (ESI)  $m/z$  calculado para C<sub>19</sub>H<sub>25</sub>BrNO<sub>3</sub> [M + H]<sup>+</sup> 394,1018 o valor encontrado foi 394,10079.

### 3.5. Reação de acoplamento de Suzuki para obtenção dos derivados 3-fenil-7-aminoalcoxi-cumarínicos (**47a-c**; **48a-c**)



Em um tubo de reação de borosilicato (5 mL), foram adicionados 0,14 mmol do respectivo derivado obtido na etapa de aminação (**44a;b;d**), 0,20 mmol de ácido fenilborônico adequadamente substituído (**45**; **46**) e 0,41 mmol de carbonato de potássio, que foram solubilizados em 4 mL de uma mistura dos solventes água : etanol : tolueno (2 : 1 : 1). Em seguida, o tubo foi fechado e a mistura foi degasada com gás nitrogênio por 10 minutos. Por fim, foi adicionado à mistura 0,01 mmol do catalisador Pd(PPh<sub>3</sub>)<sub>4</sub>. O tubo foi, então, selado e a mistura foi submetida a agitação magnética e aquecimento a 65°C por 3h, monitorada por CCD. Ao final da reação, a mistura de solventes foi evaporada em rotaevaporador. Por fim, os respectivos produtos (**47a-c**; **48a-c**) foram purificados no equipamento Isolera com fase estacionária sílica e fase móvel mistura de diclorometano : metanol em gradiente de concentração de 0-25% do solvente mais polar.

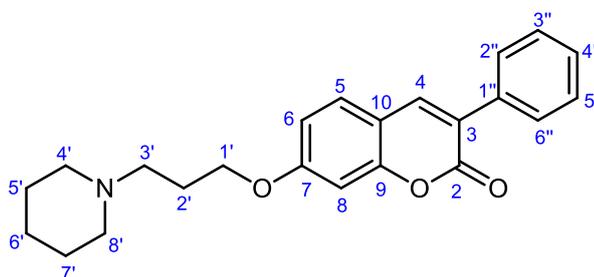
#### 3-fenil-7-((2-piperidin-1-il)etoxi)-cumarina (**47a**)



O composto **47a** foi obtido como um sólido amarelo claro em 75% de rendimento após purificação. Ponto de fusão igual a 90°C (informação indisponível na literatura). **RMN<sup>1</sup>H** (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>):  $\delta$  H<sub>4</sub> = 8,20 (s, 1H); H<sub>5</sub>/H<sub>2''</sub>/H<sub>6''</sub> = 7,67-7,71 (m, 3H); H<sub>3''</sub>/H<sub>5''</sub> = 7,45 (t, *J* = 7,4Hz, 2H); H<sub>4''</sub> = 7,39 (t, *J* = 7,4Hz, 1H); H<sub>8</sub> = 7,04 (sl, 1H); H<sub>6</sub> = 6,98 (dd, *J* = 8,5, 1,9

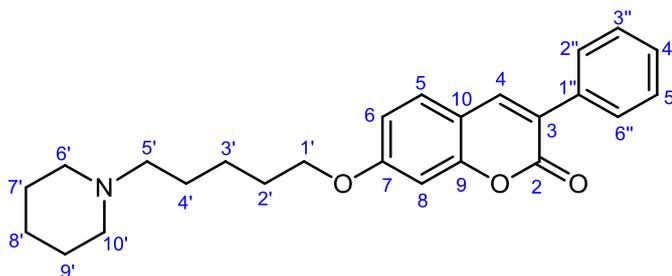
Hz, 5Hz, 1H);  $H_{1'}$  = 4,18 (t,  $J$  = 5,7 Hz, 2H);  $H_{2'}$  = 2,68 (t,  $J$  = 5,7 Hz, 2H);  $H_{3'}/H_{7'}$  = 2,43 (sl, 4H);  $H_{4'}/H_{6'}$  = 1,49-1,51 (m, 4H);  $H_{5'}$  = 1,37-1,38 (m, 2H). **RMN<sup>13</sup>C (125 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>):**  $\delta$   $C_2$  = 161,65;  $C_7$  = 159,99;  $C_9$  = 154,81;  $C_4$  = 140,87;  $C_{1''}$  = 134,95;  $C_5$  = 129,69;  $C_{2''}/C_{6''}$  = 128,32;  $C_{3''}/C_{5''}$  = 128,20;  $C_{4''}$  = 128,18;  $C_3$  = 123,14;  $C_6$  = 113,08;  $C_{10}$  = 113,02;  $C_8$  = 100,76;  $C_{1'}$  = 66,38;  $C_{2'}$  = 57,15;  $C_{3'}/C_{7'}$  = 54,37;  $C_{4'}/C_{6'}$  = 25,55;  $C_{5'}$  = 23,91. EMAR (ESI)  $m/z$  calculado para  $C_{22}H_{24}NO_3$   $[M + H]^+$  350,1756 o valor encontrado foi 350,17459.

### 3-fenil-7-((3-piperidin-1-il)propoxi)-cumarina (47b)



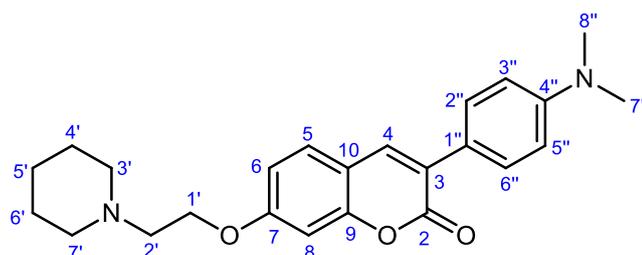
O composto **47b** foi obtido como um sólido amarelo claro em 75% de rendimento após purificação. Ponto de fusão igual a 117°C (informação indisponível na literatura). **RMN<sup>1</sup>H (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>):**  $\delta$   $H_4$  = 7,76 (s, 1H);  $H_{2''}/H_{6''}$  = 7,69-7,70 (m, 2H);  $H_5/H_{3''}/H_{5''}/H_{4''}$  = 7,39-7,46 (m, 4H);  $H_6/H_8$  = 6,86-6,87 (m, 2H);  $H_{1'}$  = 4,09 (sl, 2H);  $H_{3'}/H_{4'}/H_8$  = 2,47-2,55 (m, 6H);  $H_{2'}$  = 2,05-2,06 (m, 2H);  $H_{5'}/H_{7'}$  = 1,64 (sl, 4H);  $H_{6'}$  = 1,47 (sl, 2H). **RMN<sup>13</sup>C (125 MHz, CDCl<sub>3</sub>):**  $\delta$   $C_2$  = 162,04; ;  $C_7$  = 160,92;  $C_9$  = 155,27;  $C_4$  = 140,05;  $C_{1''}$  = 135,03;  $C_5$  = 128,78;  $C_{2''}/C_{6''}/C_{3''}/C_{5''}$  = 128,39;  $C_{4''}$  = 128,37;  $C_3$  = 124,67;  $C_{10}$  = 113,23;  $C_6$  = 113,07;  $C_8$  = 100,99;  $C_{1'}$  = 67,04;  $C_{3'}$  = 55,83;  $C_{4'}/C_{8'}$  = 54,53;  $C_{2'}$  = 26,37;  $C_{5'}/C_{7'}$  = 25,73;  $C_{6'}$  = 24,25. EMAR (ESI)  $m/z$  calculado para  $C_{23}H_{26}NO_3$   $[M + H]^+$  364,1913 o valor encontrado foi 364,19085.

### 3-fenil-7-((5-piperidin-1-il)pentoxi)-cumarina (47c)



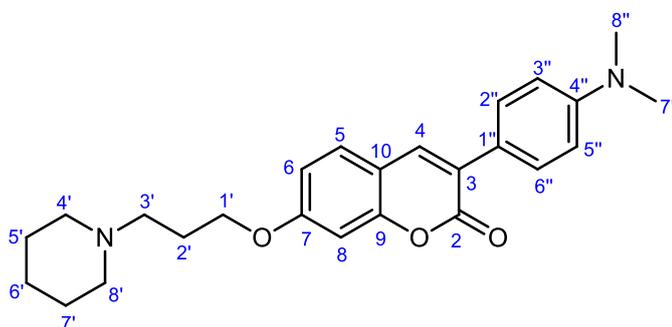
O composto **47c** foi obtido como um sólido amarelo claro em 80% de rendimento após purificação. Ponto de fusão igual a 198°C (informação indisponível na literatura). **RMN<sup>1</sup>H (500 MHz, CDCl<sub>3</sub> / CD<sub>3</sub>OD):**  $\delta$  H<sub>4</sub> = 7,44 (s, 1H); H<sub>5</sub> = 7,28 (m, 1H); H<sub>2''</sub>/ H<sub>3''</sub>/ H<sub>4''</sub>/ H<sub>5''</sub>/ H<sub>6''</sub> = 7,00-7,10 (m, 5H); H<sub>6</sub>/ H<sub>8</sub> = 6,47-6,51 (m, 2H); H<sub>1</sub>' = 3,68 (t, *J* = 5,5 Hz, 2H); H<sub>5</sub>'/ H<sub>6</sub>'/ H<sub>10</sub>' = 2,41-2,52 (m, 6H); H<sub>2</sub>'/ H<sub>4</sub>'/ H<sub>7</sub>'/ H<sub>9</sub>' = 1,43-1,48 (m, 8H); H<sub>3</sub>'/ H<sub>8</sub>' = 1,15-1,22 (m, 4H). **RMN<sup>13</sup>C (125 MHz, CDCl<sub>3</sub> / CD<sub>3</sub>OD):**  $\delta$  C<sub>2</sub> = 161,86; C<sub>7</sub> = 161,36; C<sub>9</sub> = 154,89; C<sub>4</sub> = 140,44; C<sub>1''</sub> = 134,63; C<sub>5</sub> = 128,81; C<sub>4''</sub> = 128,20; C<sub>2''</sub>/C<sub>6''</sub> = 128,13; C<sub>3''</sub>/C<sub>5''</sub> = 128,10; C<sub>3</sub> = 124,27; C<sub>10</sub> = 113,10; C<sub>6</sub> = 112,96; C<sub>8</sub> = 100,63; C<sub>1</sub>' = 67,87; C<sub>5</sub>' = 57,59; C<sub>6</sub>'/ C<sub>10</sub>' = 53,35; C<sub>2</sub>' = 28,27; C<sub>4</sub>' = 24,03; C<sub>7</sub>'/ C<sub>9</sub>' = 23,35; C<sub>8</sub>' = 23,30; C<sub>3</sub>' = 22,31. EMAR (ESI) *m/z* calculado para C<sub>25</sub>H<sub>30</sub>NO<sub>3</sub> [M + H]<sup>+</sup> 392,2226 o valor encontrado foi 392,22138.

### 3-(*p*-(*N,N*-dimetilanelina)-7-((2-piperidin-1-il)etoxi)-cumarina (48a)



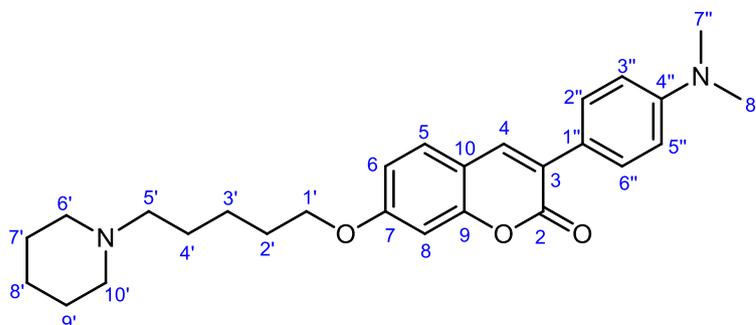
O composto **48a** foi obtido como um sólido verde em 70% de rendimento após purificação. Ponto de fusão igual a 140°C (informação indisponível na literatura). **RMN<sup>1</sup>H (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>):**  $\delta$  H<sub>4</sub> = 7,67 (s, 1H); H<sub>2''</sub>/H<sub>6''</sub> = 7,63 (d, *J* = 8,8 Hz, 2H); H<sub>5</sub> = 7,40 (d, *J* = 8,5 Hz, 1H); H<sub>6</sub>/ H<sub>8</sub> = 6,84-6,87 (m, 2H); H<sub>3''</sub>/H<sub>5''</sub> = 6,77 (d, *J* = 8,8 Hz, 2H); H<sub>1</sub>' = 4,20 (t, *J* = 5,8 Hz, 2H); H<sub>7''</sub>/H<sub>8''</sub> = 3,01 (s, 6H); H<sub>2</sub>' = 2,86 (t, *J* = 5,8 Hz, 2H); H<sub>3</sub>'/H<sub>7</sub>' = 2,59 (sl, 4H); H<sub>4</sub>'/H<sub>6</sub>' = 1,66 (q, *J* = 5,5 Hz, 4H); H<sub>5</sub>' = 1,48 (m, 2H). **RMN<sup>13</sup>C (125 MHz, CDCl<sub>3</sub>):**  $\delta$  C<sub>2</sub> = 161,58; C<sub>7</sub> = 161,17; C<sub>9</sub> = 154,86; C<sub>4''</sub> = 150,78; C<sub>4</sub> = 137,33; C<sub>2''</sub>/C<sub>6''</sub> = 129,41; C<sub>5</sub> = 128,57; C<sub>1''</sub> = 125,15; C<sub>3</sub> = 122,90; C<sub>10</sub> = 114,17; C<sub>6</sub> = 113,07; C<sub>3''</sub>/C<sub>5''</sub> = 112,27; C<sub>8</sub> = 101,32; C<sub>1</sub>' = 66,47; C<sub>2</sub>' = 57,75; C<sub>3</sub>'/C<sub>7</sub>' = 55,22; C<sub>7''</sub>/C<sub>8''</sub> = 40,63; C<sub>4</sub>'/C<sub>6</sub>' = 25,84; C<sub>5</sub>' = 24,17. EMAR (ESI) *m/z* calculado para C<sub>24</sub>H<sub>29</sub>N<sub>2</sub>O<sub>3</sub> [M + H]<sup>+</sup> 393,2178 o valor encontrado foi 393,21741.

### 3-(*p*-(*N,N*)-dimetililanilina)-7-((3-piperidin-1-il)propoxi)-cumarina (48b)



O composto **48b** foi obtido como um sólido amarelo fluorescente em 75% de rendimento após purificação. Ponto de fusão igual a 153°C (informação indisponível na literatura **RMN<sup>1</sup>H (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>):**  $\delta$  H<sub>4</sub> = 7,67 (s, 1H); H<sub>2''</sub>/H<sub>6''</sub> = 7,63 (d, *J* = 8,8 Hz, 2H); H<sub>5</sub> = 7,39 (d, *J* = 9,1 Hz, 1H); H<sub>6</sub>/H<sub>8</sub> = 6,83-6,85 (m, 2H); H<sub>3''</sub>/H<sub>5''</sub> = 6,77 (d, *J* = 8,8 Hz, 2H); H<sub>1'</sub> = 4,08 (t, *J* = 6,1 Hz, 2H); H<sub>7''</sub>/H<sub>8''</sub> = 3,01 (s, 6H); H<sub>3</sub>/H<sub>4</sub>/H<sub>8</sub> = 2,49-2,58 (m, 6H); H<sub>2'</sub> = 2,07 (q, *J* = 5,5 Hz, 2H); H<sub>5</sub>/H<sub>7</sub> = 1,65-1,67 (m, 4H); H<sub>6'</sub> = 1,48 (sl, 2H). **RMN<sup>13</sup>C (125 MHz, CDCl<sub>3</sub>):**  $\delta$  C<sub>2</sub> = 161,35; C<sub>7</sub> = 161,26; C<sub>9</sub> = 154,88; C<sub>4''</sub> = 150,52; C<sub>4</sub> = 137,13; C<sub>2''</sub>/C<sub>6''</sub> = 129,15; C<sub>5</sub> = 128,29; C<sub>1''</sub> = 124,78; C<sub>3</sub> = 122,70; C<sub>10</sub> = 113,76; C<sub>6</sub> = 112,76; C<sub>3''</sub>/C<sub>5''</sub> = 112,03; C<sub>8</sub> = 100,95; C<sub>1'</sub> = 66,90; C<sub>3'</sub> = 55,72; C<sub>4</sub>/C<sub>8</sub> = 54,55; C<sub>7''</sub>/C<sub>8''</sub> = 40,39; C<sub>2'</sub> = 26,31; C<sub>5</sub>/C<sub>7</sub> = 25,61; C<sub>6'</sub> = 24,17. EMAR (ESI) *m/z* calculado para C<sub>25</sub>H<sub>31</sub>N<sub>2</sub>O<sub>3</sub> [M + H]<sup>+</sup> 407,2335 o valor encontrado foi 407,23246.

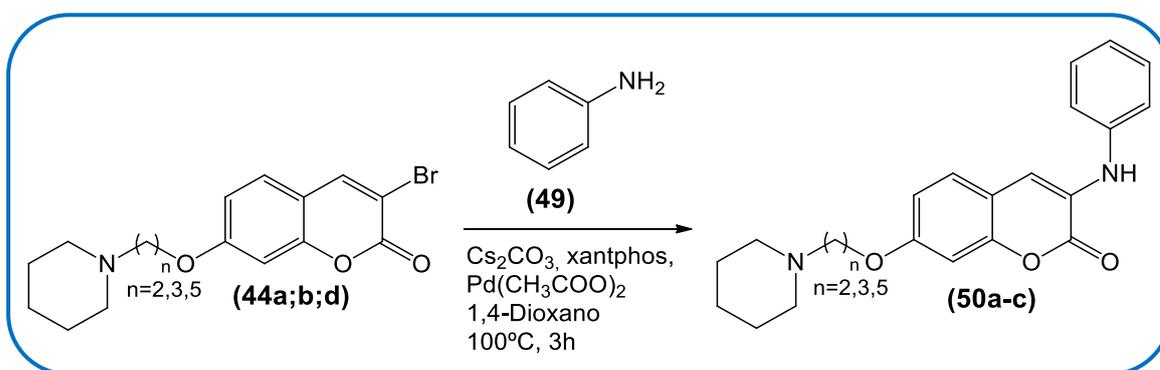
### 3-(*p*-(*N,N*)-dimetililanilina)-7-((5-piperidin-1-il)pentoxi)-cumarina (48c)



O composto **48c** foi obtido como um sólido amarelo fluorescente em 77% de rendimento após purificação. Ponto de fusão igual a 206°C (informação indisponível na literatura **RMN<sup>1</sup>H (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>):**  $\delta$  H<sub>4</sub> = 7,67 (s, 1H); H<sub>2''</sub>/H<sub>6''</sub> = 7,63 (d, *J* = 8,5 Hz, 2H); H<sub>5</sub> = 7,40 (d, *J* =

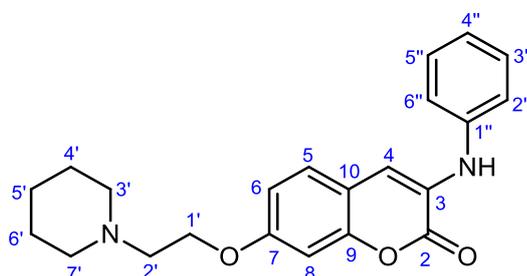
8,5 Hz, 1H); H<sub>6</sub>/H<sub>8</sub> = 6,81-6,84 (m, 2H); H<sub>3''</sub>/H<sub>5''</sub> = 6,77 (d, *J* = 8,8 Hz, 2H); H<sub>1'</sub> = 4,02 (t, *J* = 6,3 Hz, 2H); H<sub>7''</sub>/H<sub>8''</sub> = 3,00 (s, 6H); H<sub>5'</sub>/H<sub>6'</sub>/H<sub>10'</sub> = 2,61-2,72 (m, 6H); H<sub>2'</sub>/H<sub>4'</sub>/H<sub>7'</sub>/H<sub>9'</sub> = 1,79-1,89 (m, 8H); H<sub>3'</sub>/H<sub>8'</sub> = 1,50-1,56 (m, 4H). **RMN<sup>13</sup>C (125 MHz, CDCl<sub>3</sub>):** δ C<sub>2</sub> = 161,34; C<sub>7</sub> = 161,23; C<sub>9</sub> = 154,65; C<sub>4''</sub> = 150,51; C<sub>4</sub> = 137,14; C<sub>2''</sub>/C<sub>6''</sub> = 129,14; C<sub>5</sub> = 128,34; C<sub>1''</sub> = 124,75; C<sub>3</sub> = 122,66; C<sub>10</sub> = 113,74; C<sub>6</sub> = 112,71; C<sub>3''</sub>/C<sub>5''</sub> = 112,01; C<sub>8</sub> = 100,88; C<sub>1'</sub> = 68,09; C<sub>5'</sub> = 55,38; C<sub>6'/C<sub>10'</sub></sub> = 53,96; C<sub>7''/C<sub>8''</sub></sub> = 40,38; C<sub>2'</sub> = 28,27; C<sub>4'</sub> = 25,07; C<sub>7'/C<sub>9'</sub></sub> = 24,30; C<sub>8'</sub> = 23,85; C<sub>3'</sub> = 22,32. EMAR (ESI) *m/z* calculado para C<sub>27</sub>H<sub>35</sub>N<sub>2</sub>O<sub>3</sub> [M + H]<sup>+</sup> 435,2648 o valor encontrado foi 435,26382.

### 3.6. Reação de acoplamento de Buchwald para obtenção dos derivados 3-(N-anilino)-7-aminoalcoxi-cumarínicos (50a-c)



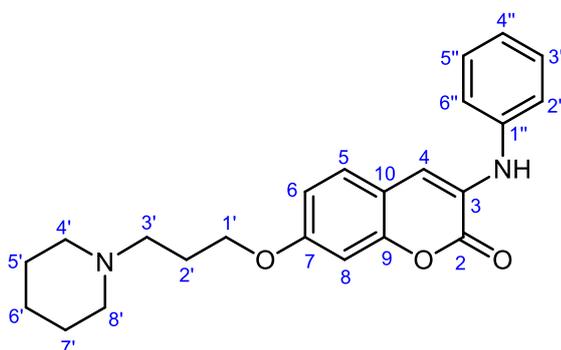
Em um tubo de reação de borossilicato (5 mL), foram adicionados 0,14 mmol do respectivo derivado obtido na etapa de aminação (44a;b;d), 0,21 mmol de Cs<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, 0,003 mmol de xantphos e 0,003 mmol de Pd(CH<sub>3</sub>COO)<sub>2</sub>. Em paralelo, em outro tubo de reação (10 mL), foram adicionados 0,17 mmol de anilina (49) e 4 mL de 1,4-Dioxano. Em seguida, os tubos foram fechados e as misturas foram degasadas com gás nitrogênio por 10 minutos. Após a degasagem, a mistura de anilina e dioxano foi retirada do tubo com uma seringa e adicionada ao tubo de reação contendo os demais reagentes. Por fim o tubo foi selado e a mistura foi submetida a aquecimento a 100°C e agitação magnética por 3h, monitorada por CCD. Ao final da reação, o dioxano foi evaporado em rotaevaporador e os respectivos produtos (50a-c) foram purificados no equipamento Isolera com fase estacionária sílica e fase móvel mistura de diclorometano : metanol em gradiente de concentração de 0-25% do solvente mais polar.

### 3-(*N*-anilino)-7-((2-piperidin-1-il)etoxi)-cumarina (50a)



O composto **50a** foi obtido como um sólido amarelo em 77% de rendimento após purificação. Ponto de fusão igual a 114°C (informação indisponível na literatura). **RMN<sup>1</sup>H (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>):**  $\delta$  H<sub>3''</sub>/H<sub>5''</sub> = 7,38 (t, *J* = 7,9 Hz, 2H); H<sub>4</sub>/H<sub>5</sub>/H<sub>2''</sub>/H<sub>6''</sub> = 7,19-7,23 (m, 4H); H<sub>4''</sub> = 7,08 (t, *J* = 7,4 Hz, 1H); H<sub>6</sub>/H<sub>8</sub> = 6,84-6,86 (m, 2H); H<sub>NH</sub> = 6,63 (sl, 1H); H<sub>1'</sub> = 4,14 (t, *J* = 6,0 Hz, 2H); H<sub>2'</sub> = 2,81 (t, *J* = 6,0 Hz, 2H); H<sub>3</sub>/H<sub>7</sub> = 2,53 (sl, 4H); H<sub>4</sub>/H<sub>6</sub> = 1,63 (q, *J* = 5,5 Hz, 4H); H<sub>5</sub> = 1,46-1,47 (m, 2H). **RMN<sup>13</sup>C (125 MHz, CDCl<sub>3</sub>):**  $\delta$  C<sub>2</sub> = 160,11; C<sub>7</sub> = 158,45; C<sub>9</sub> = 149,67; C<sub>10</sub> = 140,24; C<sub>3</sub>/C<sub>5</sub> = 129,57; C<sub>3</sub> = 127,00; C<sub>5</sub> = 126,31; C<sub>4</sub> = 122,92; C<sub>2</sub>/C<sub>6</sub> = 120,01; C<sub>10</sub> = 114,11; C<sub>4</sub> = 113,23; C<sub>6</sub> = 109,93; C<sub>8</sub> = 101,48; C<sub>1</sub> = 66,46; C<sub>2</sub> = 57,72; C<sub>3</sub>/C<sub>7</sub> = 55,07; C<sub>4</sub>/C<sub>6</sub> = 25,87; C<sub>5</sub> = 24,11. EMAR (ESI) *m/z* calculado para C<sub>22</sub>H<sub>25</sub>N<sub>2</sub>O<sub>3</sub> [M + H]<sup>+</sup> 365,1865 o valor encontrado foi 365,18552.

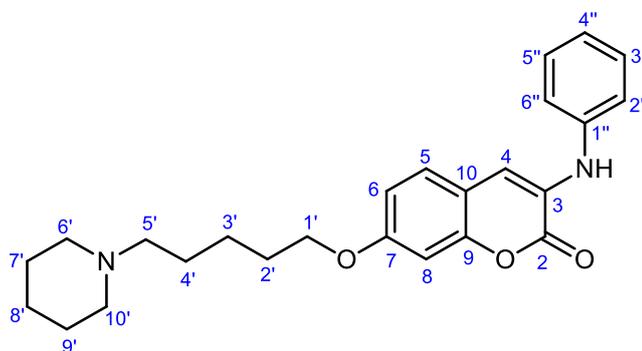
### 3-(*N*-anilino)-7-((3-piperidin-1-il)propoxi)-cumarina (50b)



O composto **50b** foi obtido como um sólido amarelo em 75% de rendimento após purificação. Ponto de fusão igual a 166°C (informação indisponível na literatura). **RMN<sup>1</sup>H (500 MHz, CDCl<sub>3</sub> / CD<sub>3</sub>OD):**  $\delta$  H<sub>3''</sub>/H<sub>5''</sub> = 7,31 (m, 2H); H<sub>4</sub>/H<sub>5</sub>/H<sub>2''</sub>/H<sub>6''</sub> = 7,11-7,16 (m, 4H); H<sub>4''</sub> = 6,96 (t, *J* = 8,4 Hz, 1H); H<sub>6</sub>/H<sub>8</sub>/H<sub>NH</sub> = 6,69-6,73 (m, 3H); H<sub>1'</sub> = 3,95 (t, *J* = 6,6 Hz, 2H);

$H_{3'}/H_{4'}/H_{8'} = 2,53-2,58$  (m, 6H);  $H_{2'} = 1,99$  (sl, 2H);  $H_{5'}/H_{7'} = 1,60$  (sl, 4H);  $H_{6'} = 1,42$  (sl, 2H). **RMN<sup>13</sup>C (125 MHz, CDCl<sub>3</sub> / CD<sub>3</sub>OD):**  $\delta$   $C_2 = 160,14$ ;  $C_7 = 158,14$ ;  $C_9 = 149,39$ ;  $C_{1''} = 139,98$ ;  $C_{3''}/C_{5''} = 129,30$ ;  $C_3 = 126,81$ ;  $C_5 = 126,27$ ;  $C_{4''} = 122,69$ ;  $C_{2''}/C_{6''} = 119,78$ ;  $C_{10} = 114,03$ ;  $C_4 = 112,84$ ;  $C_6 = 110,14$ ;  $C_8 = 101,07$ ;  $C_{1'} = 66,20$ ;  $C_{3'} = 55,43$ ;  $C_{4'}/C_{8'} = 53,94$ ;  $C_{2'} = 25,24$   $C_{5'}/C_{7'} = 24,40$ ;  $C_{6'} = 23,18$ . EMAR (ESI)  $m/z$  calculado para  $C_{23}H_{27}N_2O_3$   $[M + H]^+$  379,2017 o valor encontrado foi 379,20138.

### 3-(*N*-anilino)-7-((5-piperidin-1-il)pentoxi)-cumarina (50c)



O composto **50c** foi obtido como um sólido amarelo em 80% de rendimento após purificação. Ponto de fusão igual a 202°C (informação indisponível na literatura). **RMN<sup>1</sup>H (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>):**  $\delta$   $H_{3''}/H_{5''} = 7,38$  (t,  $J$  7,1 = 2H);  $H_4/H_5/H_{2''}/H_{6''} = 7,19-7,23$  (m, 4H);  $H_{4'} = 7,07$  (t,  $J = 6,9$  Hz, 1H);  $H_6/H_8 = 6,81-6,83$  (m, 2H);  $H_{NH} = 6,62$  (sl, 1H);  $H_{1'} = 3,99$  (t,  $J = 5,7$  Hz, 2H);  $H_{5'}/H_{6'}/H_{10'} = 2,78-2,91$  (m, 6H);  $H_{2'}/H_{4'}/H_{7'}/H_{9'} = 1,84-1,95$  (m, 8H);  $H_{8'} = 1,53-1,57$  (m, 2H);  $H_{3'} = 1,25$  (sl, 2H). **RMN<sup>13</sup>C (125 MHz, CDCl<sub>3</sub>):**  $\delta$   $C_2 = 160,09$ ;  $C_7 = 158,50$ ;  $C_9 = 149,86$ ;  $C_{1''} = 140,20$ ;  $C_{3''}/C_{5''} = 129,56$ ;  $C_3 = 126,96$ ;  $C_5 = 126,39$ ;  $C_{4''} = 122,92$ ;  $C_{2''}/C_{6''} = 119,99$ ;  $C_{10} = 114,05$ ;  $C_4 = 112,95$ ;  $C_6 = 110,95$ ;  $C_8 = 101,36$ ; ;  $C_{1'} = 67,86$ ;  $C_{5'} = 57,87$ ;  $C_{6'}/C_{10'} = 53,59$ ;  $C_{2'} = 28,60$ ;  $C_{4'} = 24,21$ ;  $C_{7'}/C_{9'} = 23,70$ ;  $C_{8'} = 23,40$ ;  $C_{3'} = 22,70$ . EMAR (ESI)  $m/z$  calculado para  $C_{25}H_{31}N_2O_3$   $[M + H]^+$  407,2335 o valor encontrado foi 407,23228.

### 3.7. Avaliação *in vitro* da atividade anticolinesterásica dos derivados cumarínicos

A atividade anticolinesterásica foi determinada de acordo com o método adaptado de Ellman (ELLMAN, 1961). Todas as soluções utilizadas nos ensaios foram preparadas em tampão tris-HCl 0,02 M (pH = 7,5, ajustado com solução 1 M de HCl ou NaOH) e as soluções estoque dos compostos foram preparadas em DMSO (50 mM). Em uma placa de 96 poços de fundo plano foram adicionados 150  $\mu$ L de solução do composto inibidor (**44a-d**; **47a-c**; **48a-c**;

**50a-c**; donepezila) em oito diferentes concentrações diluídas em série, as quais variaram de 100 - 0,00001  $\mu\text{M}$  para AChE (fator de diluição = 10) e de 400 - 0,1  $\mu\text{M}$  para BChE (fator de diluição = 4). O controle veículo (DMSO - concentração final 0,2% v / v para AChE e 0,8% v / v para BChE), foi utilizado como referência (controle negativo). Em seguida, foram adicionados 60  $\mu\text{L}$  de ácido 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzóico (DTNB, reagente de Ellman) a 1,1 mM e 30  $\mu\text{L}$  de acetilcolinesterase isolada de cérebro de enguia elétrica (EeAChE) ou butirilcolinesterase isolada de soro equino (EqBChE) a 0,20 U/mL na presença de 1 mg/mL de albumina sérica bovina (BSA). A absorbância foi então registrada utilizando um leitor de placas iMark (Bio-Rad) equipado com um filtro de luz de = 415 nm e esta medida foi usada como uma referência em branco. Após uma incubação de 10 minutos a 25°C, 24  $\mu\text{L}$  de solução do substrato iodeto de acetiltiocolina (ACTI) ou iodeto de S-butiltiocolina (BCTI) a 2,75 mM foram adicionados e a absorbância foi registrada após 5 minutos de incubação a 25°C a  $\lambda = 415$  nm por 3 vezes dentro de 60 segundos. A atividade enzimática foi calculada como porcentagem referente à média dos valores de absorbância medidos para o controle tratado com DMSO, descontada dos valores de referência em branco. Os ensaios foram realizados em triplicatas (para o cálculo do desvio-padrão) e os valores de  $\text{CI}_{50}$  foram calculados com auxílio do programa Graphpad Prism 7.0 utilizando o modelo de regressão não linear para a inibição dose-resposta.

### 3.8. Estudo do mecanismo de inibição enzimática

O estudo cinético foi realizado de acordo com o método adaptado de Ellman (ELLMAN, 1961). Todas as soluções utilizadas nos ensaios foram preparadas em tampão tris-HCl 0,02 M (pH = 7,5, ajustado com solução 1 M de HCl ou NaOH) e as soluções estoque dos compostos foram preparadas em DMSO (50 mM). Em uma placa de 96 poços de fundo plano foram adicionados 150  $\mu\text{L}$  de solução do composto inibidor (**44d**; **48a**; **50a**) em duas concentrações diferentes (**Tabela 3**) distribuídas em oito conjuntos de triplicatas cada. Oito conjuntos de triplicatas tratados com DMSO (concentração final 0,0004% v / v para AChE e 0,012% v / v para BChE), foram utilizados como controle negativo. A seguir, foram adicionados 60  $\mu\text{L}$  de ácido 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzóico (DTNB, reagente de Ellman) a 1,1 mM e 30  $\mu\text{L}$  de acetilcolinesterase isolada de cérebro de enguia elétrica (EeAChE) ou butirilcolinesterase isolada de soro equino (EqBChE) a 0,20 U / mL na presença de 1 mg / mL de albumina sérica bovina (BSA). A absorbância foi então registrada utilizando um leitor de placas iMark (Bio-Rad) equipado com um filtro de luz de = 415 nm e esta medida usada como uma referência em branco. Após 10 minutos de incubação a 25°C, 24  $\mu\text{L}$  de solução do substrato iodeto de

acetilcolina (ACTI) ou iodeto de S-butirilcolina (BCTI) em oito concentrações diluídas em série (fator = 1,3) de 2,75 - 0,44 mM (concentração final: 0,25 - 0,04 mM) foram adicionados aos respectivos poços e a absorbância registrada após incubação durante 10 minutos a 25°C a  $\lambda = 415$  nm. Os gráficos recíprocos de Lineweaver-Burk foram obtidos por plotagem de um gráfico de  $1 / \text{velocidade}$  versus  $1 / [\text{substrato}]$  para o controle negativo e duas concentrações diferentes de inibidor. A regressão linear de cada conjunto de dados mostra um comportamento convergente, de forma que a região na qual as curvas convergem determina o tipo de inibição observada. Os valores de  $K_i$ ,  $K_i'$  (constantes de inibição competitiva e não-competitiva respectivamente),  $K_m$  (constante de Michaelis-Menten) e  $V_{\text{máx}}$  (velocidade máxima) foram calculados com auxílio do programa Graphpad Prism 7.0 usando modelos de regressão não linear para cinética enzimática - inibição e cinética enzimática - substrato versus velocidade.

**Tabela 3.** Concentrações dos inibidores utilizados nos ensaios de estudo do mecanismo de inibição enzimática.

Composto	Concentração do inibidor ( $\mu\text{M}$ )		
	44d	48a	50a
AChE	0,10 e 0,20	0,01 e 0,03	0,04 e 0,06
BChE	2,00 e 5,00	3,00 e 6,00	10,00 e 15,00

### 3.9. Ensaios de interação enzimática *in silico*

Para os ensaios *in silico* de interação entre os inibidores e a enzima EeAChE foi utilizado o modelo disponível no *Protein Data Bank* (PDB) 1C2O (resolução cristalográfica de 4,2 Å) (BOURNE et al., 1999). Para a enzima EqBChE, que não possui estrutura cristalográfica disponível no PDB, foi construído um modelo tridimensional por homologia a partir da estrutura cristalográfica da BChE humana co-cristalizada com *N*-((1-(2,3-dihidro-1H-inden-2-il)piperidin-3-il)metil)-*N*-(2-metoxietil)-2-naft-amida (PDB 4TPK, 2,52 Å) (BRUS et al., 2014) utilizando o servidor *on line* Swiss-Model (BIASINI et al., 2014). O modelo homólogo e a estrutura de partida apresentaram identidade entre sequências de 90,40%, com uma cobertura de 0,95. A qualidade do modelo global e por resíduo foi verificada utilizando-se a função QMEAN (BENKERT et al., 2011).

O programa GOLD 5.6 (CCDC Software Ltd., Cambridge UK) foi utilizado para avaliar a capacidade de ligação dos inibidores aos sítios ativos das enzimas. Para isso, foi realizado um

teste preliminar da habilidade de docagem do programa utilizando-se o ligante dimérico bis-tacrina (*N,N'*-di-1,2,3,4-tetrahydroacridin-9-il-pentano-1,5-diamina). Uma vez que o modelo de EeAChE utilizado no ensaio não possui ligante co-cristalizado, os valores obtidos foram comparados com a enzima co-cristalizada com ligante bis-tacrina (PBD 2CMF) (RYDBERG et al., 2006).

O programa Spartan 14 (Wavefunction Inc.) foi utilizado para a construção e otimização dos modelos tridimensionais das estruturas químicas dos inibidores. Para tal, foi utilizado o método de cálculo semi-empírico PM6 (STEWART, 2007). O estudo de docagem para cada inibidor avaliado gerou diversas posições de ligação, de modo que a posição com a maior pontuação em cada caso foi utilizada para a análise da interação com os resíduos de aminoácidos. No programa GOLD as pontuações obtidas são apresentadas como valores adimensionais, os quais mensuram a aptidão do ligante em interagir com o centro da proteína, de modo que, maiores valores de pontuação representam as melhores conformações e orientações do ligante no biorreceptor.

### **3.10. Avaliação da atividade antioxidante pelo Método de Redução do Íon Férrico (FRAP)**

A solução de FRAP foi recém preparada misturando 25 mL de tampão acetato (0,30 M) a pH 3,6, 2,5 mL de cloreto férrico (20 mM) e 2,5 mL de 2,4,6-tri(2-piridil)-1,3,5-triazina (TPTZ) (10 mM). Num tubo de ensaio contendo 4,5 mL de reagente FRAP foram adicionados 0,5 mL de solução metanólica a 500  $\mu$ M do composto a ser testado (**44a-d**, **47a-c**, **47a-c** e **50a-c**). Após uma incubação de 10 minutos a 37°C, a absorbância foi registrada num espectrofotômetro a  $\lambda = 593$  nm utilizando metanol como referência em branco (JONES et al., 1997; SALGUEIRO; CASTRO, 2016). Obteve-se uma curva padrão traçando a leitura da absorbância após o tratamento com 10, 25, 30, 50, 75 e 100  $\mu$ M de quercetina e os resultados foram expressos em mmol de quercetina (Q) equivalente por mol de inibidor (mmol Q / mol), obtidos em triplicatas.

### **3.11. Avaliação da toxidez sobre linhagem de células de neuroblastoma de camundongo (N2A)**

Células de neuroblastoma humano da linhagem N2A (ATCC) foram cultivadas em meio DMEM completo suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) e 5% de penicilina a 37°C sob atmosfera contendo 5% CO<sub>2</sub>. O recolhimento das células para o experimento se deu

pelo tratamento com solução de tripsina-EDTA (1,25-0,185 mg/mL) a 37°C por 5 minutos seguido de adição de 5 mL de meio DMEM + 10% SFB e centrifugação a 1600 rpm por 6 minutos a 4°C. Após a remoção do sobrenadante, a concentração da suspensão de células foi ajustada para  $5,0 \times 10^5$  células/mL com meio DMEM + 10% SFB e semeadas em alíquotas de 100  $\mu$ L em uma placa de 96 poços ( $5,0 \times 10^4$  células/poço). Após incubação por 12 h a 37°C e 5% CO<sub>2</sub> para adesão, o meio de cultivo foi renovado e o tratamento com os compostos **44a-d**, **47a-c**, **48a-c**, **50a-c** e donepezila, pré-dissolvidos em DMSO a 50 mM, feito às concentrações finais de 50 e 10  $\mu$ M em triplicata. Controles negativo (sem tratamento), positivo (DMSO 20% v/v), veículo (DMSO 0,2% v/v) e branco (ausência de células) foram mantidos para comparação. A viabilidade celular foi verificada após 24 h de incubação a 37°C e 5% CO<sub>2</sub> pelo método de MTT (WANG et al, 2016). A médias dos valores de absorbância obtidos ( $\lambda = 570$  nm) foram convertidos em percentual de viabilidade celular relativa à média do controle não tratado descontados da média do controle branco. Os resultados de citotoxicidade são apresentados como médias dos valores encontrados em ao menos três experimentos independentes e as barras de erro são relativas aos valores de desvio padrão.

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1. Planejamento sintético dos compostos

A síntese da série de compostos planejados foi pensada com base na análise retrossintética detalhada no **Esquema 5**.

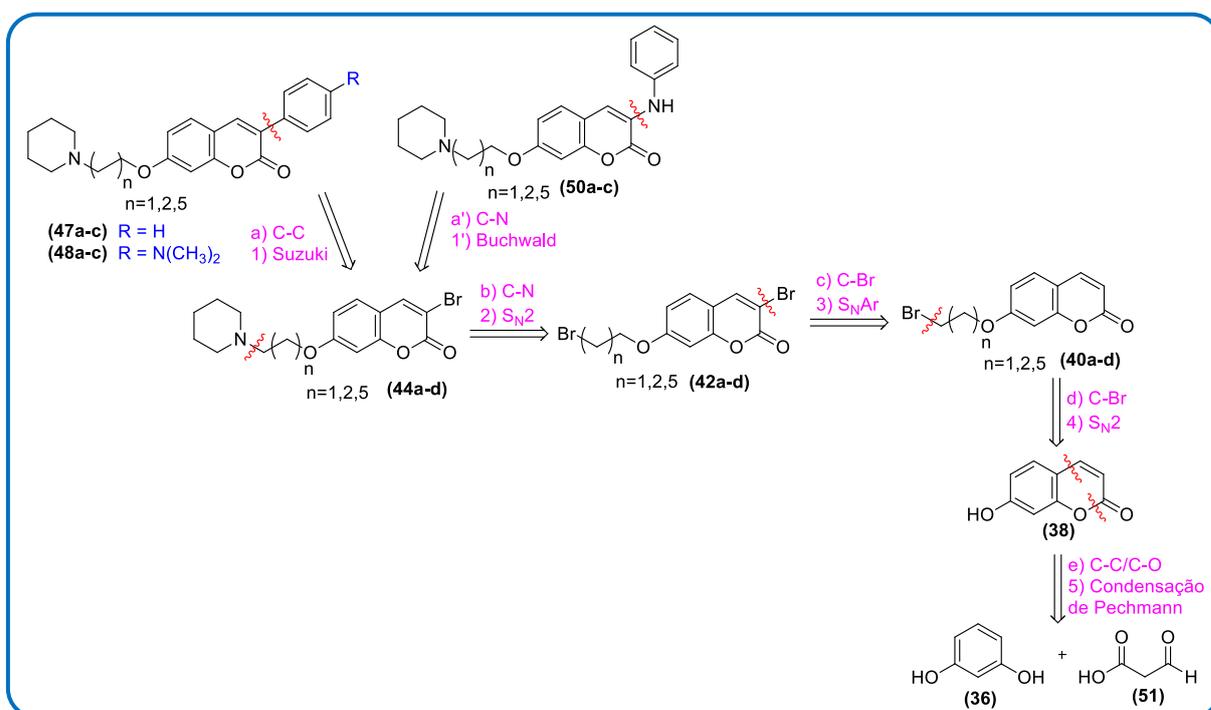
Inicialmente, por meio de uma desconexão C-C (etapa a), pôde-se observar que os compostos 3-fenil-7-aminoalcoxi-cumarínicos (**47a-c**; **48a-c**) têm como precursores os ácidos fenilborônicos (**45**; **46**), devidamente substituídos, e as 3-bromo-7-aminoalcoxi-cumarinas (**44a**; **b**; **d**), mediante uma reação de Suzuki. Em paralelo, uma desconexão C-N (etapa a'), apontou a anilina (**49**) e as 3-bromo-7-aminoalcoxi-cumarinas (**44a**; **b**; **d**) como precursores das 3-(*N*-anilino)-7-aminoalcoxi-cumarinas (**50a-c**), sendo essa etapa proporcionada por uma reação de Buchwald.

Através de uma desconexão C-N (etapa b), foi possível identificar a piperidina (**43**) e as 3-bromo-7-bromoalcoxi-cumarinas (**42a-d**) como precursoras das 3-bromo-7-aminoalcoxi-cumarinas (**44a-d**), mediante uma reação de substituição nucleofílica bimolecular (S<sub>N</sub>2).

A partir de uma desconexão C-Br (etapa c), identificaram-se o Bromo (**41**) e as 7-bromoalcoxi-cumarinas (**40a-d**) como precursores das 3-bromo-7-bromoalcoxi-cumarinas (**42a-d**), via reação do tipo substituição eletrofílica aromática ( $S_{EAr}$ ).

Por meio de uma desconexão C-Br (etapa d), observou-se que os compostos 7-bromoalcoxi-cumarínicos (**40a-d**) têm como precursores a 7-hidroxi-cumarina (**38**) e os respectivos dibromoalcanos (**39a-d**), através de uma reação de substituição nucleofílica bimolecular ( $S_{N2}$ ).

Por fim, uma desconexão C-C e C-O sobre a 7-hidroxi-cumarina (etapa e), aponta o resorcinol (**36**) e o ácido formilacético (**51**) como reagentes de partida, explorando a condensação de Pechmann. Entretanto, como o ácido formilacético é instável, indica-se a utilização do ácido málico (**37**), o qual é capaz de gerar o ácido formilacético “*in situ*”.

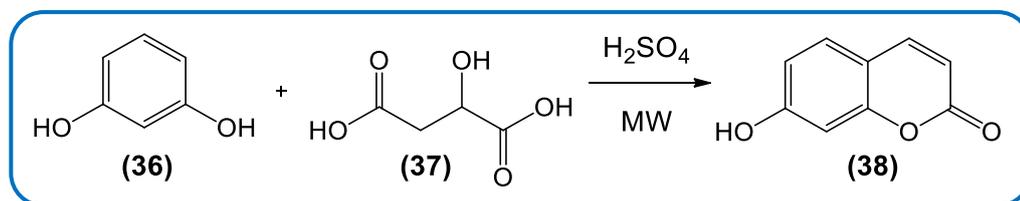


**Esquema 5.** Análise retrossintética para obtenção dos compostos planejados.

#### 4.2. Síntese da 7-hidroxycumarina (**38**)

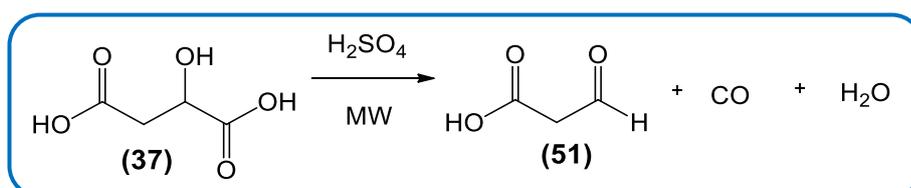
A síntese da 7-hidroxycumarina (**38**) foi realizada através da condensação de Pechmann (PECHMANN, 1884). Empregou-se a metodologia de síntese via irradiação de micro-ondas caseiro, desenvolvida pelo nosso grupo de trabalho (PEREIRA et al., 2018), como demonstrado no **Esquema 6**. Através desta, foi obtido um sólido branco com rendimento igual a 70% após purificação, com ponto de fusão igual a 238°C (literatura: P.F. = 230°C). A

metodologia convencional (por meio de aquecimento) não foi empregada, porque esta necessita de temperatura elevada, longo tempo reacional e resulta em baixos rendimentos.



**Esquema 6.** Síntese da 7-hidroxicumarina (38).

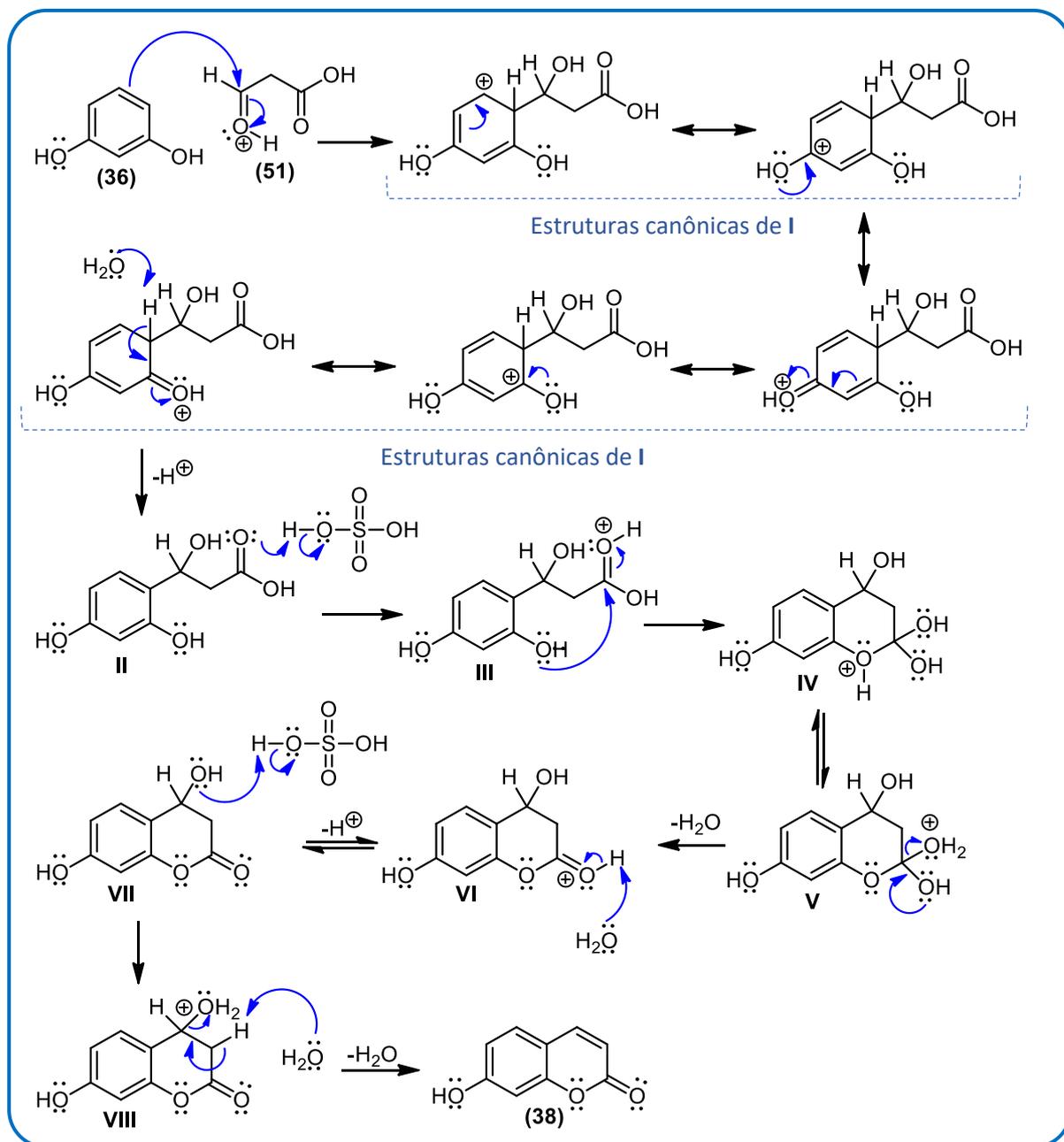
Para realizar esta condensação, foram utilizados resorcinol (36) e ácido málico (37) em meio de ácido sulfúrico, os quais foram irradiados na potência de 265 W e 30 segundos de reação, com 3 pulsos de 10 segundos no centro do prato (**Esquema 6**). Nesta reação, o ácido sulfúrico atua como catalisador e o ácido málico como um gerador *in situ* de ácido formilacético (47) (**Esquema 7**).



**Esquema 7.** Formação *in situ* do ácido formilacético (51) a partir do ácido málico.

O mecanismo proposto (**Esquema 8**) dá-se, inicialmente, com a formação *in situ* do ácido formilacético (51). Em seguida, ocorre uma substituição eletrofílica aromática ( $S_{EAr}$ ), através do ataque dos elétrons  $\pi$  do resorcinol (36) ao carbono carbonílico do ácido formilacético (51) - ativado pelo catalisador ácido (JOULE; MILLS, 2010). Neste momento há a quebra de aromaticidade, no entanto, o intermediário catiônico **I** (íon arênio) é estabilizado pelo efeito de ressonância. Seguidamente, uma base presente no meio abstrai o hidrogênio do íon arênio e, assim, os elétrons que faziam parte da ligação com o próton migram para anel, restabelecendo a aromaticidade (**II**). Posteriormente, o ácido protona o oxigênio carboxílico do intermediário **II**, tornando o carbono carboxílico mais suscetível ao ataque nucleofílico intramolecular (**III**). Subseqüentemente, o oxigênio do resorcinol ataca o carbono carboxílico parcialmente positivo, resultando no intermediário **IV** que se encontra em equilíbrio com sua forma protonada **V**. Então, **V** elimina água, visto que esta é considerada um bom grupo de saída – base fraca – seguida da formação do éster e abstração do hidrogênio da carbonila lactônica (**VI**). Por fim, a hidroxila do intermediário **VII** é protonada, levando ao intermediário

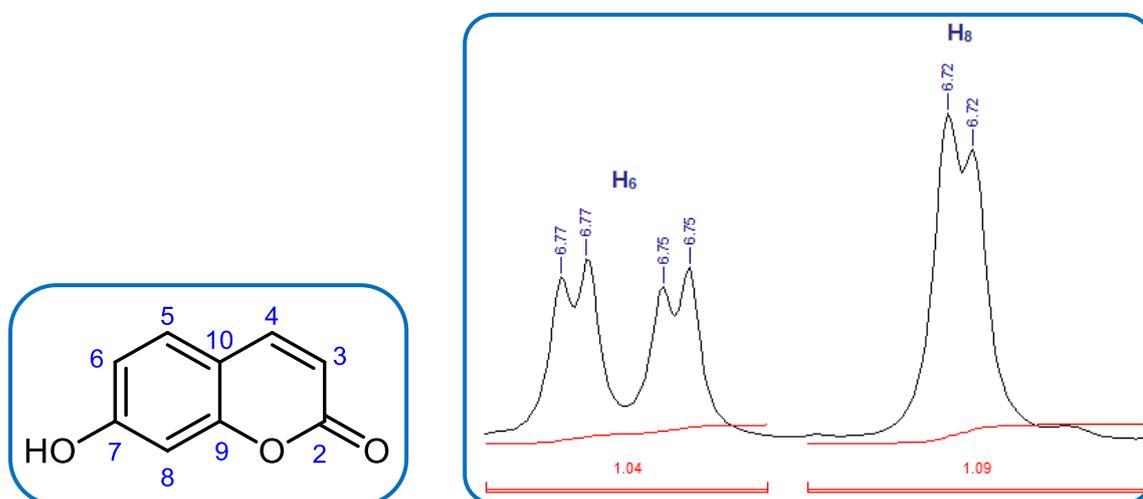
positivamente carregado **VIII**. Este, então, sofre a abstração do hidrogênio  $\alpha$  à carbonila, seguida da eliminação de água e conseqüente formação da ligação dupla, levando à formação da 7-hidroxi-cumarina (**38**).



**Esquema 8.** Esquema de intermediários proposto para formação da 7-hidroxycumarina (**38**) através da condensação de Pechmann (Adaptado de JOULE; MILLS, 2010).

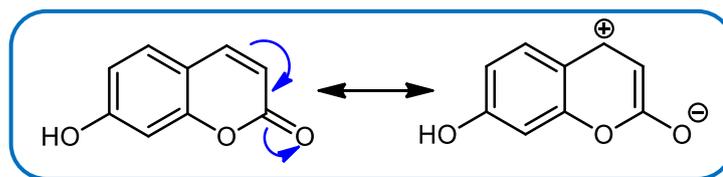
Para confirmar a formação da 7-hidroxi-cumarina (**38**) foram realizados experimentos de determinação estrutural de RMN  $^1H$  e  $^{13}C$ . No espectro de RMN  $^1H$ , alguns sinais característicos possibilitaram a comprovação da formação deste composto, como o sinal

simpleto em  $\delta$  10,61 (s, 1H), referente ao hidrogênio da hidroxila fenólica (H<sub>OH</sub>), e hidrogênios absorvendo na região característica de aromáticos:  $\delta$  7,54 (d,  $J = 8,5$  Hz, 1H),  $\delta$  6,76 (dd,  $J_1 = 8,5$  Hz,  $J_2 = 2,2$  Hz, 1H) e  $\delta$  6,72 (d,  $J = 2,2$  Hz, 1H), atribuídos respectivamente aos hidrogênios H<sub>5</sub>, H<sub>6</sub> e H<sub>8</sub>. Estas atribuições foram feitas levando-se em consideração a capacidade que o substituinte hidroxila possui em aumentar a densidade eletrônica do anel por efeito mesomérico, causando uma blindagem dos hidrogênios na posição *orto* em relação a ele, o que leva estes hidrogênios (H<sub>6</sub> e H<sub>8</sub>) a absorverem em menores frequências. A diferenciação entre eles foi possível através da multiplicidade dos sinais, isto é, o duplo duplete que foi atribuído ao H<sub>6</sub>, pois este acopla com H<sub>5</sub> ( $J^3$ ) e, a longa distância, com H<sub>8</sub> ( $J^5$ ) e o duplete ao H<sub>8</sub>, pois acopla apenas a longa distância com H<sub>6</sub> ( $J^5$ ) (**Figura 19**).



**Figura 19.** Estrutura numerada da 7-hidroxi-cumarina (**38**) e multiplicidade dos sinais de H<sub>6</sub> (duplo duplete) e H<sub>8</sub> (duplete).

Também foram observados sinais em  $\delta$  6,21 (d,  $J = 9,4$  Hz, 1H) e  $\delta$  7,94 (d,  $J = 9,5$  Hz, 1H) referentes aos deslocamentos químicos dos hidrogênios do anel lactônico (sistema carboxílico  $\alpha$ ,  $\beta$ -insaturado). Tais hidrogênios (H<sub>3</sub> e H<sub>4</sub>) encontram-se ligados a carbonos sp<sup>2</sup>, logo, são desblindados devido ao campo anisotrópico dos elétrons  $\pi$ . Ademais, a diferença entre os deslocamentos químicos destes hidrogênios pode ser explicada pelo efeito  $\beta$ -carboxílico de desproteção, causado pelo efeito mesomérico entre a ligação dupla C=C e a carboxila do anel (**Figura 20**).



**Figura 20.** Efeito de ressonância entre a ligação dupla conjugada à carboxila do anel lactônico.

No espectro de RMN  $^{13}\text{C}$ , a presença do sinal em  $\delta$  161,75 característico de carbono carboxílico foi um dos fatores mais importantes na confirmação da formação do produto desejado. Além disso, observou-se a presença de sinais característicos de anel aromático em:  $\delta$  160,92,  $\delta$  156,00,  $\delta$  111,75 (carbonos quaternários),  $\delta$  130,20,  $\delta$  111,88 e  $\delta$  102,89 (carbonos metínicos). Levando-se em consideração a capacidade que o oxigênio possui em retirar elétrons por efeito indutivo, por conta de sua alta eletronegatividade, os sinais em 160,92 e 156,00 ppm foram atribuídos aos carbonos quaternários  $\text{C}_7$  e  $\text{C}_9$ , respectivamente, visto que este efeito indutivo causa uma desblindagem do núcleo, levando estes carbonos a absorverem em frequências mais altas. Já os sinais em 111,88, 102,89 e 111,75 ppm foram atribuídos aos carbonos  $\text{C}_6$ ,  $\text{C}_8$  e  $\text{C}_{10}$ , respectivamente, por estarem em posição *orto* em relação ao substituinte hidroxila e/ou ao oxigênio lactônico e, conseqüentemente, serem blindados pelo efeito mesomérico positivo característico deste grupamento.

Os sinais presentes em  $\delta$  113,5 e  $\delta$  145,02 foram atribuídos aos carbonos  $\text{C}_3$  e  $\text{C}_4$ , respectivamente. Estes valores de deslocamento químico são característicos de carbono  $\text{sp}^2$ , que são desblindados devido ao campo anisotrópico dos elétrons  $\pi$ . Porém a diferença entre estes valores pode ser considerada como consequência do efeito  $\beta$ -carboxílico de desproteção, causado pelo efeito mesomérico entre a ligação dupla  $\text{C}=\text{C}$  e a carboxila do anel, como observado para os hidrogênios equivalentes (**Figura 20**).

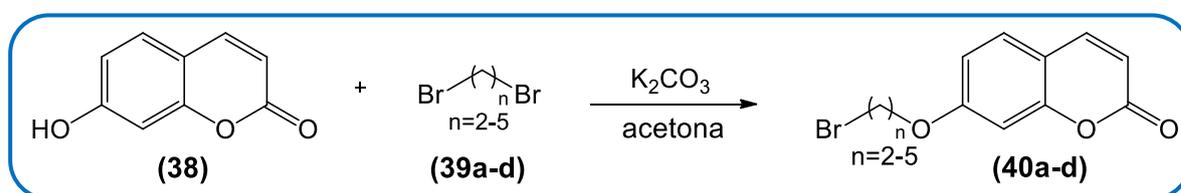
#### 4.3. Reação de *O*-alquilação da 7-hidroxicumarina (40a-d)

Os derivados 7-bromoalcoxi-cumarínicos (**40a-d**) foram sintetizado via reação de *O*-alquilação (**Esquema 9**), os quais foram obtidos nas formas de sólido e óleo de diferentes cores. Foram obtidos rendimentos entre 68-78%, variando de acordo com o número de carbonos espaçadores, e ponto de fusão de 65-132°C (não havendo relatos de P.F. na literatura para nenhum dos sólidos obtidos) (**Tabela 4**).

**Tabela 4.** Cores dos compostos obtidos, seus respectivos pontos de fusão e rendimentos obtidos para os compostos **40a-d**.

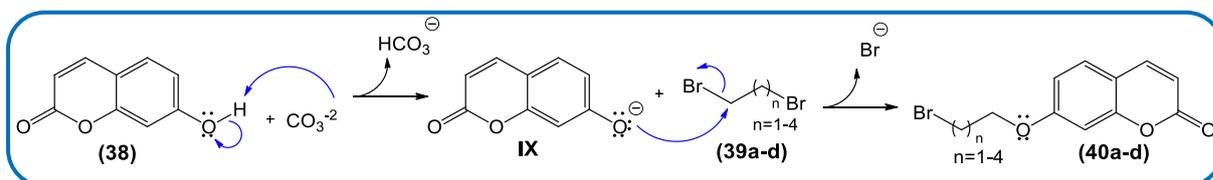
n	Ponto de Fusão (°C)	Forma e cor	Rendimento (%)
2	132-133	Sólido amarelo claro	75
3	101	Sólido amarelo claro	78
4	65	Sólido amarelo claro	70
5	-	Óleo laranja claro	68

A reação de *O*-alquilação foi realizada a partir da 7-hidroxi-cumarina (**38**), carbonato de potássio ( $K_2CO_3$ ) e dibromoalcanos (**39a-d**) em acetona, sob 60°C. (**Esquema 9**).



**Esquema 9.** Síntese das 7-bromoalcoxi-cumarinas (**40a-d**).

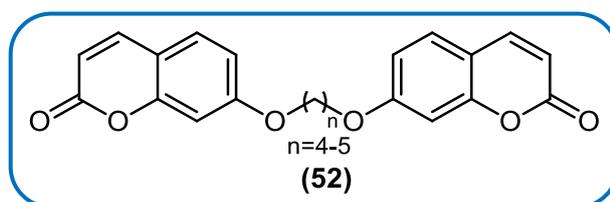
Esta reação passa por um mecanismo de substituição nucleofílica bimolecular ( $S_N2$ ), no qual, inicialmente o carbonato abstrai o próton da hidroxila fenólica da 7-hidroxi-cumarina (**38**), para que, assim, a umbeliferona tenha seu par de elétrons mais disponível para realização do ataque nucleofílico ao brometo de alquila, formando bicarbonato e a 7-oxicumarina (**IX**). Em seguida, ocorre uma  $S_N2$ , na qual a 7-oxicumarina formada atua como nucleófilo e ataca o carbono ligado ao bromo. De maneira concertada, a ligação nucleófilo-carbono vai se formando, enquanto a ligação C-Br vai se rompendo, até o brometo ser liberado e assim formar a 7-bromoalcoxi-cumarina (**40a-d**) (**Esquema 10**) (CAREY & SUNDBERG, 2008).



**Esquema 10.** Esquema de intermediários proposto para formação dos derivados 7-bromoalcoxi-cumarínicos (**40a-d**) (Adaptado de CAREY; SUNDBERG, 2007).

Por se tratar de um mecanismo de  $S_N2$ , o impedimento estérico é determinante para a eficiência do ataque nucleofílico. Desta forma, a reação com dibromoetano foi a mais demorada

e necessitou de uma maior quantidade deste reagente para ocorrer. Ao passo que as reações com dibromobutano e dibromopentano obtiveram menores rendimentos por haver um menor impedimento estérico, possibilitando, assim, um segundo ataque da umbeliferona, dando origem a um produto bis-alquilado (**52**, **Figura 21**). No acompanhamento por cromatografia em camada fina das reações com dibromobutano e dibromopentano, pôde-se observar a formação de um produto secundário mais apolar do que o produto desejado, o qual acredita-se ser o produto de bis-alquilação, visto que o mesmo não foi observado nas reações com dibromoetano e dibromopropano.



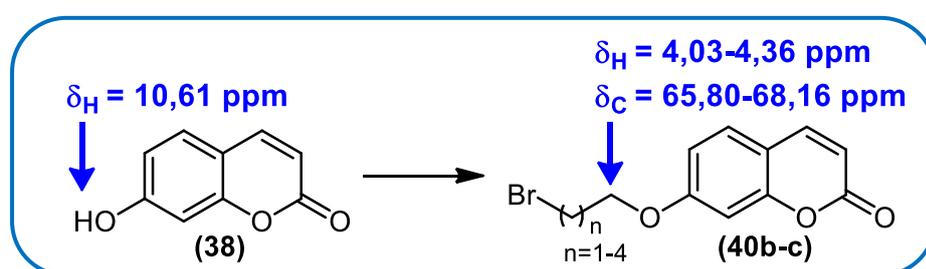
**Figura 21.** Produto de bis-alquilação oriundo das reações da umbeliferona com dibromobutano e dibromopentano.

Os produtos foram obtidos na forma de um óleo após a partição e evaporação do solvente, devido a presença de haleto de alquila, que foi adicionado em excesso na reação. Para a obtenção dos produtos na forma de um sólido, os mesmos foram precipitados em hexano, no balão em que foi evaporado o solvente da partição, a partir da imersão do mesmo em banho de ultrassom. O composto com 5 carbonos espaçadores não precipitou, sendo obtido na forma de um óleo de coloração laranja clara. Todos os sólidos obtidos, independentemente do número de espaçadores, tinham forma amorfa e apresentaram coloração amarela clara.

O acompanhamento da reação se deu através de análise por cromatografia em camada fina, com sílica como fase estacionária e hexano : acetato de etila 50% como eluente. Através desta, foi observada a formação de um produto com caráter mais apolar em relação ao reagente de partida (umbeliferona). Esse fato se explica pela melhor interação da hidroxila ácida da umbeliferona com a sílica, realizando ligações de hidrogênio, o que não ocorre nos respectivos produtos.

A fim de se confirmar a formação das 7-bromoalcoxi-cumarinas (**40a-d**) foram realizados experimentos de determinação estrutural de RMN  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  dos compostos sintetizados. Os principais indicativos da formação destes compostos no espectro de RMN  $^1\text{H}$  foram a presença dos sinais de hidrogênio na região de hidrogênio ligado a carbono  $\text{sp}^3$ , dos quais o mais característico foi a presença de um tripleto na região de  $\delta$  4,03-4,36 com integração

igual a dois, referente aos hidrogênios metilênicos ligados ao carbono oxigenado. No espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  o que evidenciou a formação dos produtos foi a presença dos sinais de carbono na região de carbono  $\text{sp}^3$ , dos quais o mais característico foi a presença de um sinal de carbono metilênico na região de  $\delta$  65,80-68,16, referente ao carbono ligado ao oxigênio presente na posição 7 da cumarina (**Figura 22**). Ademais, no espectro de RMN  $^1\text{H}$  não foi observado o sinal referente ao hidrogênio da hidroxila fenólica ( $\delta$  10,61) presente no reagente de partida (**38**), fato este que também corrobora para a confirmação da obtenção das 7-bromoalcoxi-cumarinas (**40a-d**).



**Figura 22.** Atribuição comparativa dos principais sinais dos compostos 7-bromoalcoxi-cumarínicos (**40a-d**) e 7-hidroxycumarina (**38**) nos espectros de RMN  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$ .

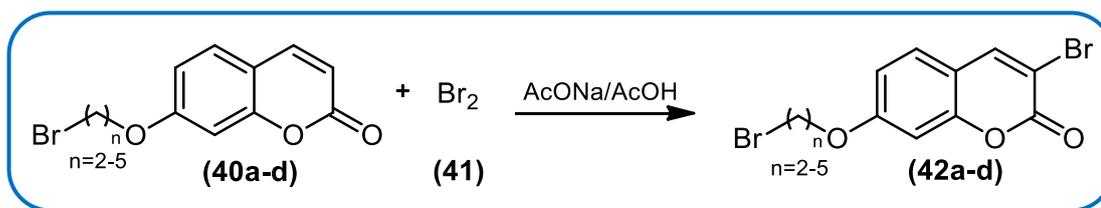
#### 4.4. Reação de bromação da posição 3 do núcleo cumarínico (**42a-d**)

Os derivados 3-bromo-7-bromoalcoxi-cumarínicos (**42a-d**) foram sintetizados via reação de bromação (**Esquema 10**), os quais foram obtidos nas formas de um sólido branco e amorfo. Os rendimentos variaram de 79-84% e os pontos de fusão de 120-183°C (não havendo relatos de P.F. na literatura para nenhum dos sólidos obtidos) (**Tabela 5**).

**Tabela 5.** Pontos de fusão e rendimentos obtidos para os compostos **42a-d**.

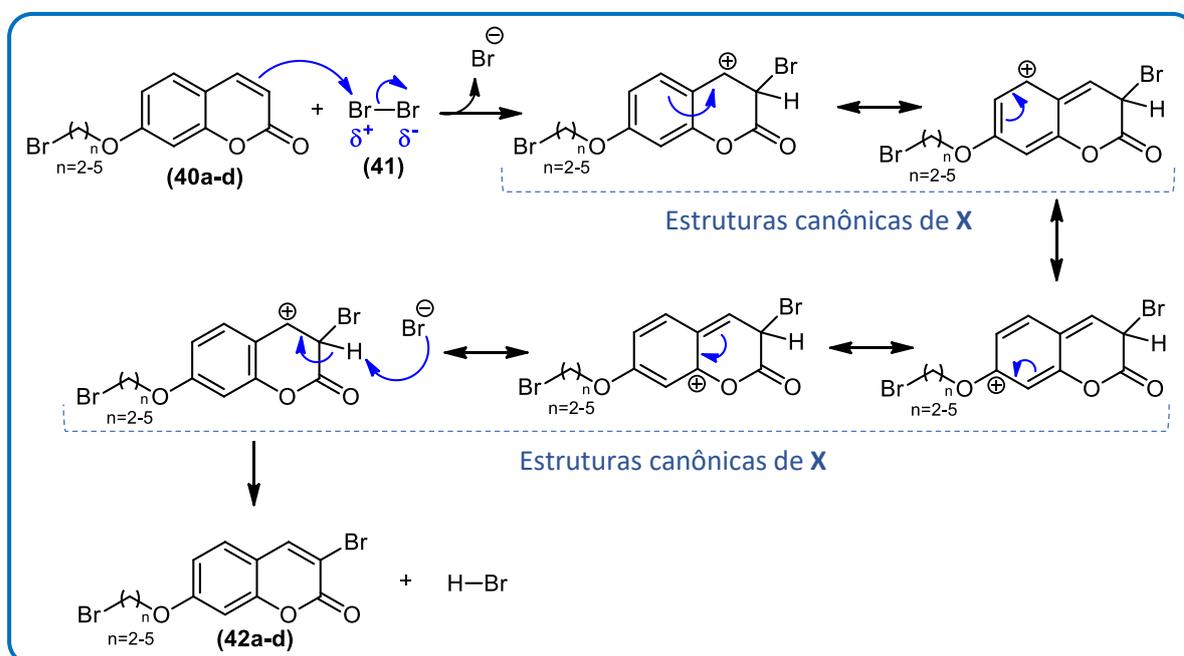
n	Ponto de Fusão (°C)	Rendimento (%)
2	182-183	84
3	120	80
4	120-121	83
5	123	79

A reação de bromação foi realizada a partir das respectivas 7-bromoalcoxi-cumarinas (**40a-d**) e do bromo (**41**) a 25°C em meio tamponado com acetato de sódio/ácido acético ( $\text{CH}_3\text{COONa}/\text{CH}_3\text{COOH}$ ) (**Esquema 11**).



**Esquema 11.** Síntese dos derivados 3-bromo-7-bromoalcoxi-cumarínicos (**42a-d**).

Esta reação segue o mesmo mecanismo de uma substituição eletrofílica aromática ( $S_{EAr}$ ), de forma que inicialmente ocorre um ataque nucleofílico dos elétrons  $\pi$  da dupla ligação  $\alpha,\beta$ -carboxílica, do anel lactônico, do respectivo composto **40a-d** ao bromo parcialmente positivo do  $\text{Br}_2$ , levando a formação de  $\text{Br}^-$  e do intermediário catiônico **X**, que é estabilizado pelo efeito de ressonância do anel vizinho. Seguidamente, o brometo ( $\text{Br}^-$ ) presente no meio abstrai o hidrogênio deste intermediário e, assim, os elétrons que faziam parte da ligação com o próton migram para anel, levando à formação dos respectivos produtos desejados (**42a-d**) e de ácido bromídrico ( $\text{HBr}$ ). Por ocorrer a formação de  $\text{HBr}$  como subproduto e este se tratar de um ácido forte, a reação é realizada em meio tamponado com  $\text{CH}_3\text{COONa/CH}_3\text{COOH}$ , a fim de se evitar uma possível abertura do anel lactônico do núcleo cumarínico (**Esquema 12**).



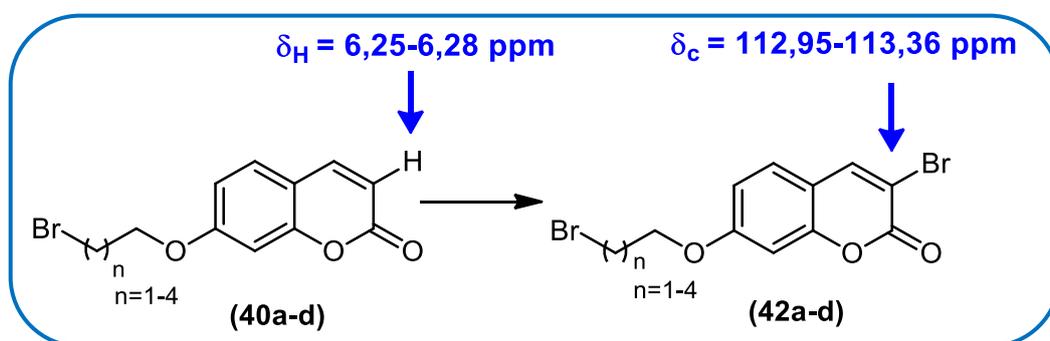
**Esquema 12.** Esquema de intermediários proposto para formação dos derivados 3-bromo-7-bromoalcoxi-cumarínicos (**42a-d**) (Adaptado de CLAYDEN et al., 2001).

O acompanhamento da reação se deu através de análise por cromatografia em camada fina, com sílica como fase estacionária e hexano : acetato de etila 50% como eluente. Pela

análise de camada fina foi possível observar a formação de um produto de caráter mais apolar em relação ao reagente de partida. Isso se deve ao fato do substituinte bromo, presente nos produtos, conferir um caráter mais apolar aos produtos.

Os produtos obtidos após a precipitação em gelo apresentaram cor alaranjada, provavelmente devido à presença de um pequeno excesso de Br<sub>2</sub> no meio reacional, e após a purificação em coluna cromatográfica, todos se apresentaram na forma de um sólido amorfo de coloração branca.

A fim de se confirmar a formação das 3-bromo-7-bromoalcoxi-cumarinas (**40a-d**) foram realizados experimentos de determinação estrutural de RMN <sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C dos compostos sintetizados. O principal indicativo da formação destes compostos no espectro de RMN <sup>1</sup>H é a ausência do sinal de hidrogênio na região de hidrogênio ligado a carbono sp<sup>2</sup> em δ 6,25-6,28 com integração igual a um, referente ao hidrogênio metínico ligado ao carbono α-carboxílico da lactona. No espectro de RMN <sup>13</sup>C o que evidenciou a formação dos produtos foi a mudança de fase do sinal de carbono na região de carbono sp<sup>2</sup> no DEPT-Q, em δ 112,95-113,36, referente ao carbono α-carboxílico da lactona (**Figura 23**).



**Figura 23.** Atribuição comparativa dos principais sinais dos compostos 7-bromoalcoxi-cumarínicos (**40a-d**) e 3-bromo-7-bromoalcoxi-cumarínicos (**42a-d**) nos espectros de RMN <sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C.

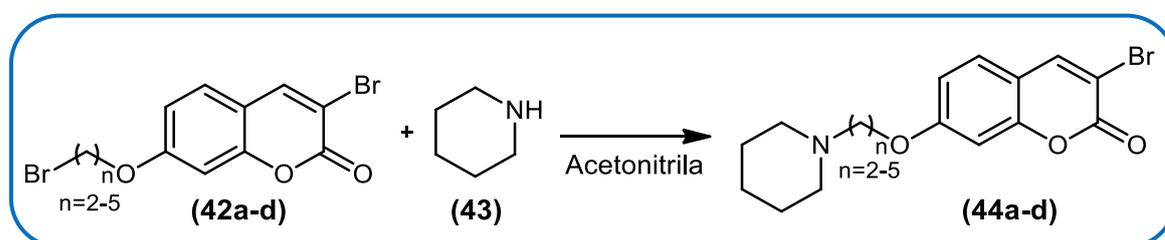
#### 4.5. Reação de aminação da cadeia alquílica (**44a-d**)

Os compostos 3-bromo-7-aminoalcoxi-cumarínicos (**44a-d**) foram sintetizados via reação de aminação, conforme demonstrado no **Esquema 13**, os quais foram obtidos nas formas de um sólido amorfo de diferentes cores. Os rendimentos variaram de 95-99% e os pontos de fusão de 120-183°C (não havendo relatos de P.F. na literatura para nenhum dos sólidos obtidos) (**Tabela 6**).

**Tabela 6.** Coloração, pontos de fusão e rendimentos obtidos para os compostos **44a-d**.

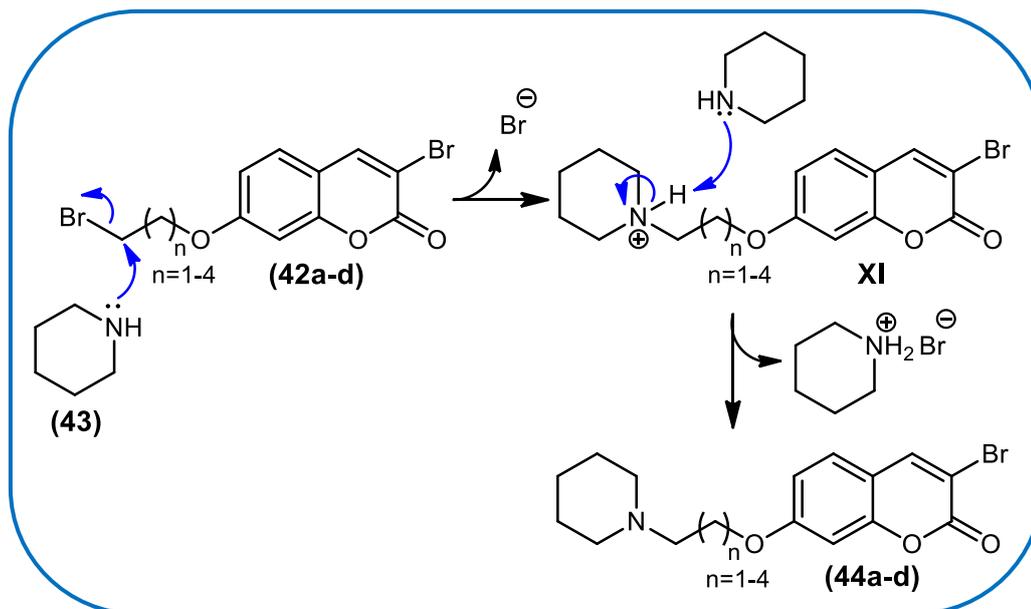
n	Coloração	Ponto de Fusão (°C)	Rendimento (%)
2	Laranja claro	215	95
3	Laranja claro	242	97
4	Laranja claro	225-226	98
5	Amarelo claro	176	99

Esta reação foi realizada a partir da piperidina (**43**) e dos respectivos derivados 3-bromo-7-bromoalcoxi-cumarínicos (**42a-d**) em acetonitrila, sob aquecimento a 60°C. (**Esquema 13**).



**Esquema 13.** Síntese dos derivados 3-bromo-7-aminoalcoxi-cumarínicos (**44a-d**).

Esta reação passa por um mecanismo de  $S_N2$ , no qual, a piperidina atua como nucleófilo, através dos elétrons não ligantes do nitrogênio, que promove um ataque nucleofílico ao carbono metilênico ligado ao bromo. De maneira concertada, a ligação nucleófilo-carbono se forma, enquanto a ligação C-Br se rompe, até o brometo ser liberado e assim formar o intermediário protonado **XI**. Em seguida, a piperidina abstrai o próton ligado ao nitrogênio, formando, assim, os respectivos compostos 3-bromo-7-aminoalcoxi-cumarínicos (**44a-d**) e, como subproduto, o sal brometo de piperidínio. Pelo fato da piperidina agir também como uma base nesta reação, a mesma foi adicionada em excesso ao meio (**Esquema 14**) (CLAYDEN et al., 2001).

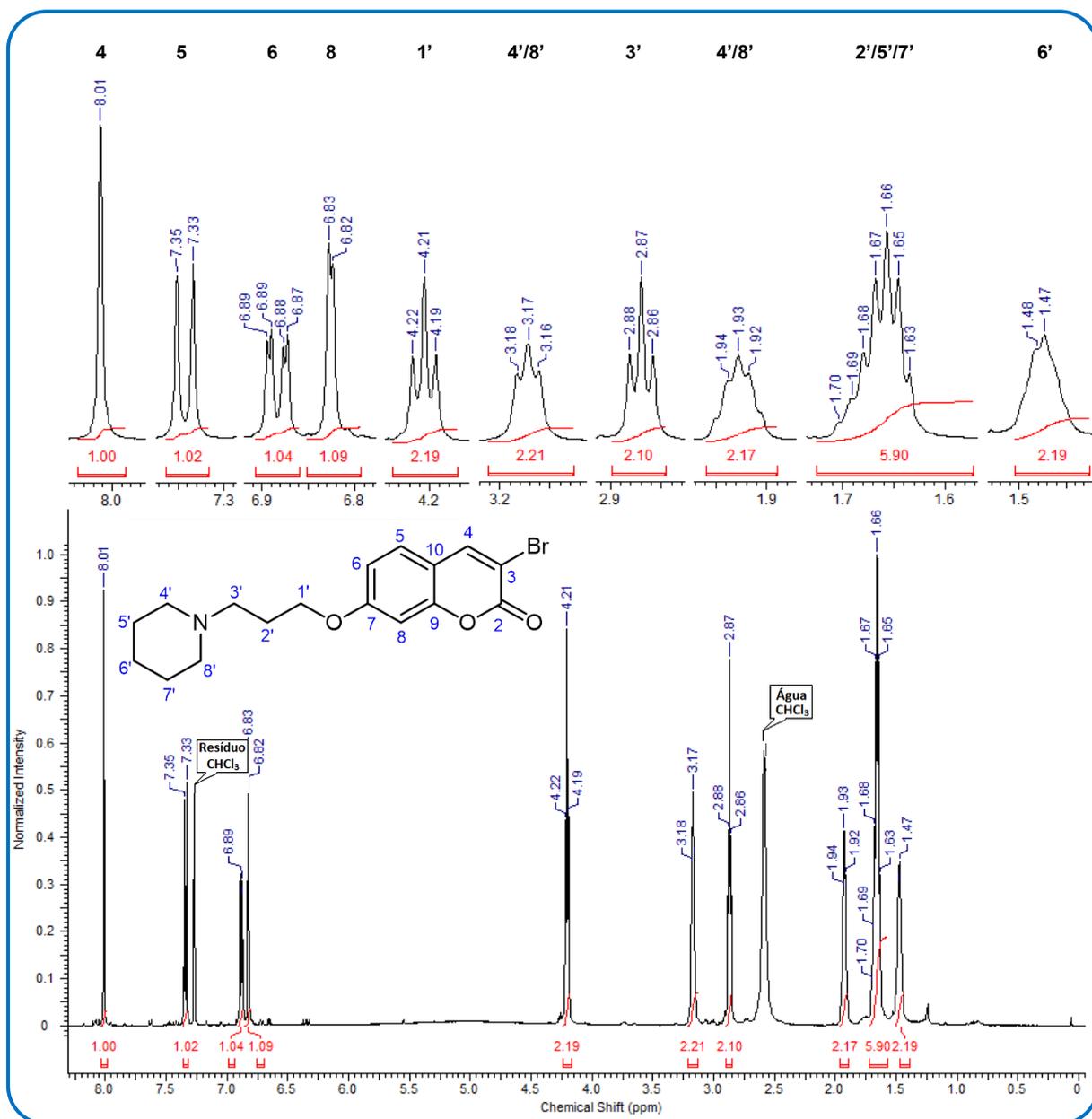


**Esquema 14.** Esquema de intermediários proposto para formação dos derivados 3-bromo-7-aminoalcoxi-cumarínicos (**44a-d**) (Adaptado de CLAYDEN et al., 2001).

Por se tratar de um mecanismo S<sub>N</sub>2, o impedimento estérico é determinante para a eficiência do ataque nucleofílico, pelas razões previamente explicadas no item 4.3. Desta forma, a reação com os derivados com menor número de carbonos espaçadores (**42a-b**) se deu de forma mais demorada e com menores rendimentos do que as demais (**42c-d**).

O acompanhamento da reação se deu através de análise por cromatografia em camada fina, com sílica como fase estacionária e diclorometano : metanol 10% como eluente. Através da análise em camada fina foi possível observar a formação de um produto de caráter mais polar em relação ao reagente de partida. Esse fato se explica pela melhor interação dos produtos com a sílica, devido à presença do nitrogênio que é capaz de realizar ligações de hidrogênio com a sílica, o que não ocorre nos respectivos reagentes.

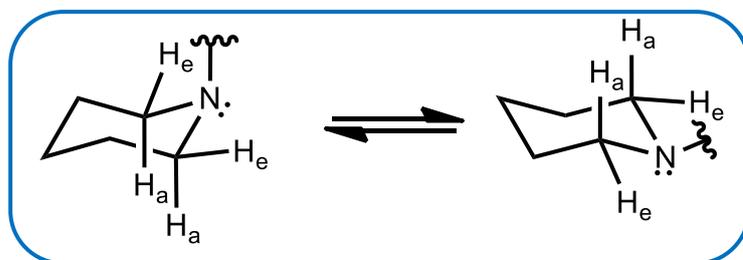
Os produtos obtidos foram confirmados através das técnicas de RMN <sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C e espectrometria de massas de alta resolução. O espectro de RMN <sup>1</sup>H para o derivado com cadeia espaçadora de 3 carbonos (**44b**) é mostrado de forma representativa aos demais derivados da série (**Figura 24**). As atribuições dos sinais aos hidrogênios localizados nas respectivas posições se encontram indicadas na própria figura por meio da numeração apresentada. Cabe salientar os sinais característicos do núcleo cumarínico: δ 8,01 (s, 1H); δ 7,34 (d, *J* = 8,5 Hz, 1H); δ 6,83 (d, *J* = 2,2 Hz, 1H); δ 6,88 (dd, *J*<sub>1</sub> = 8,5 Hz, *J*<sub>2</sub> = 2,2 Hz, 1H), bem como os sinais referentes à cadeia alquílica e ao anel piperidínico que confirmam a obtenção do produto: δ 4,20 (t, *J* = 5,7 Hz, 2H); δ 1,63-1,70 (m, 6H); δ 2,87 (t, *J* = 5,7 Hz, 2H); δ 3,16-3,18 (m, 2H); δ 1,92-1,94 (m, 2H); δ 1,47-1,48 (m, 2H).



**Figura 24.** Espectro de RMN  $^1\text{H}$  do derivado 3-bromo-7-((3-piperidin-1-il)propoxi)-cumarina (44b).

Os sinais multipletos em  $\delta$  3,16-3,18 e  $\delta$  1,92-1,94 foram atribuídos aos hidrogênios  $\text{H}_4$  e  $\text{H}_8$ , porém não há evidências o suficiente para que se possa afirmar a quais hidrogênios cada sinal se refere. Visto que a cadeia alquílica pode assumir diferentes conformações, e que a cadeia piperidínica assume conformações similares ao ciclohexano (**Figura 25**), acredita-se que esteja ocorrendo algum efeito de proteção e desproteção relacionado à posição desses hidrogênios em relação a algum ou alguns dos grupos presentes na molécula. Porém, por se desconhecer a causa desse efeito, não se pode afirmar se cada sinal se refere aos hidrogênios geminais, ou seja, aos hidrogênios ligados a um mesmo carbono, ou se cada sinal se refere a

uma conformação específica desses hidrogênios (axial e equatorial), sendo eles diastereotópicos. Na **Figura 25**, estão demonstradas as conformações do tipo cadeira e cadeira invertida do anel piperidínico, nas quais os hidrogênios axiais e equatoriais, em questão, estão representados como H<sub>a</sub> e H<sub>e</sub>, respectivamente.



**Figura 25.** Estrutura dos confôrmeros do tipo cadeira (à esquerda) e cadeira invertida (à direita) do anel piperidínico.

#### 4.6. Reação de acoplamento de Suzuki para obtenção dos derivados 3-fenil-7-aminoalcoxi-cumarínicos (**47a-c**; **48a-c**)

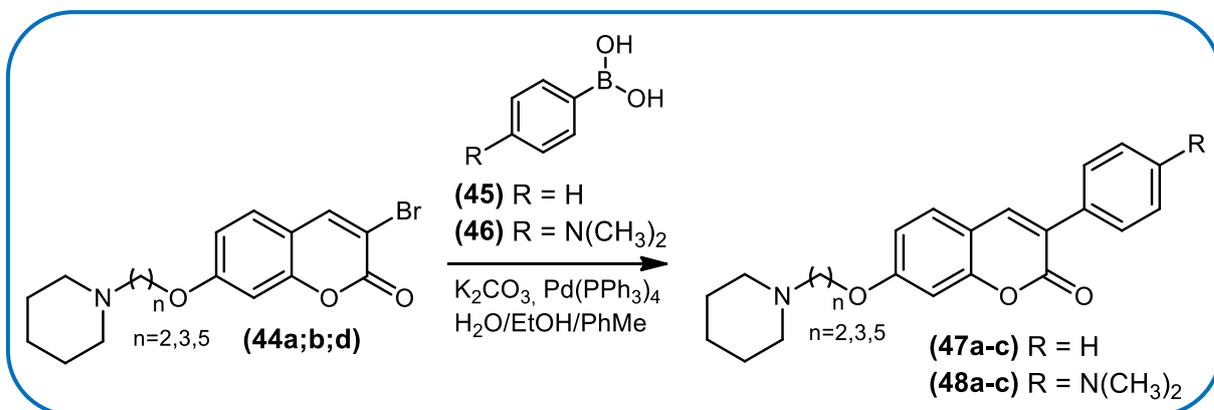
Os compostos 3-fenil-7-aminoalcoxi-cumarínicos (**47a-c**; **48a-c**) foram sintetizados via reação de acoplamento de Suzuki, conforme demonstrado no **Esquema 15**, os quais foram obtidos nas formas de um sólido amorfo de diferentes cores. Os rendimentos variaram de 70-75% e os pontos de fusão de 90-153°C (não havendo relatos de P.F. na literatura para nenhum dos sólidos obtidos) (**Tabela 7**).

**Tabela 7.** Coloração, pontos de fusão e rendimentos obtidos para os compostos **47a-c** e **48a-c**.

n	R	Coloração	Ponto de Fusão (°C)	Rendimento (%)
2	H	Amarela clara	90	75
3	H	Amarela clara	114-115	75
5	H	Amarela clara	198	80
2	N(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	Verde	140	70
3	N(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	Amarela fluorescente	153	75
5	N(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	Amarela fluorescente	206	77

Esta reação foi realizada a partir dos ácido fenilborônico devidamente substituídos (**45**; **46**) e dos respectivos derivados 3-bromo-7-aminoalcoxi-cumarínicos (**44a;b;d**) em uma

mistura de solventes (água : etanol : tolueno – 2 : 1 : 1), sob aquecimento à 60°C (**Esquema 15**).



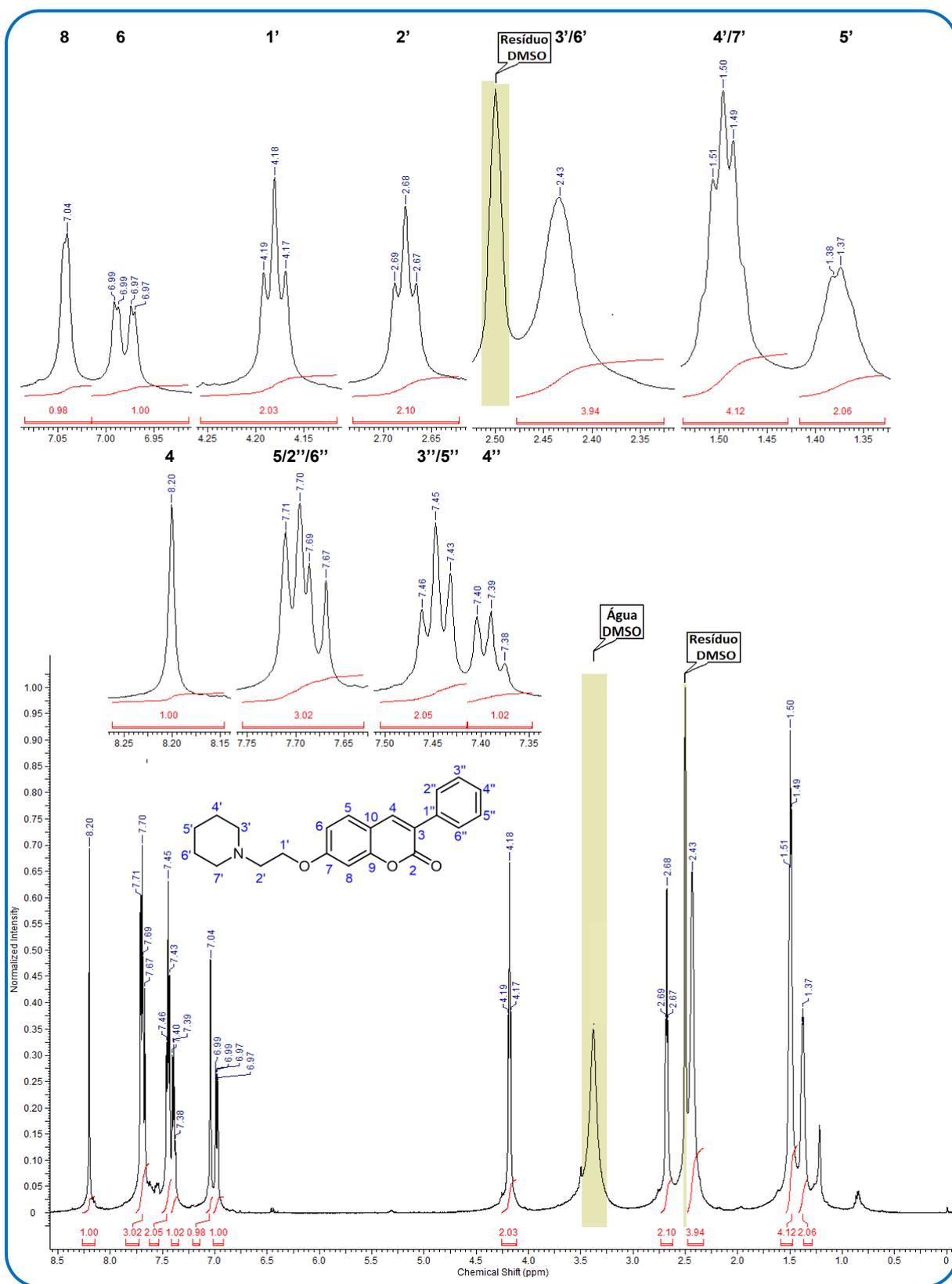
**Esquema 15.** Síntese dos derivados 3-fenil-7-aminoalcoxi-cumarínicos (**47a-c; 48a-c**).

O mecanismo da reação de Suzuki é melhor visualizado a partir da perspectiva do catalisador de paládio (**XII**). A reação inicia-se com o processo de adição oxidativa dos respectivos compostos **44a;b;d** ao paládio para formar a espécie de organopaládio **XIII**. Em seguida, a reação entre o intermediário **XIII** e o carbonato, dá origem ao intermediário **XIV**, que via transmetalção com o complexo de boronato (**XV; XVI**) (produzido pela reação do ácido fenilborônico (**45; 46**) com o carbonato) forma a espécie de organopaládio **XVIII**. Por fim, ocorre o processo de eliminação redutiva dos respectivos produtos desejados (**47a-c; 48a-c**), restaurando o catalisador de paládio original (**XII**), o qual completa o ciclo catalítico (**Esquema 16**).



meio da numeração apresentada. Cabe salientar que os sinais característicos do núcleo cumarínico se mantiveram, assim como os sinais referentes aos hidrogênios da cadeia alifática e aos do anel piperidínico.

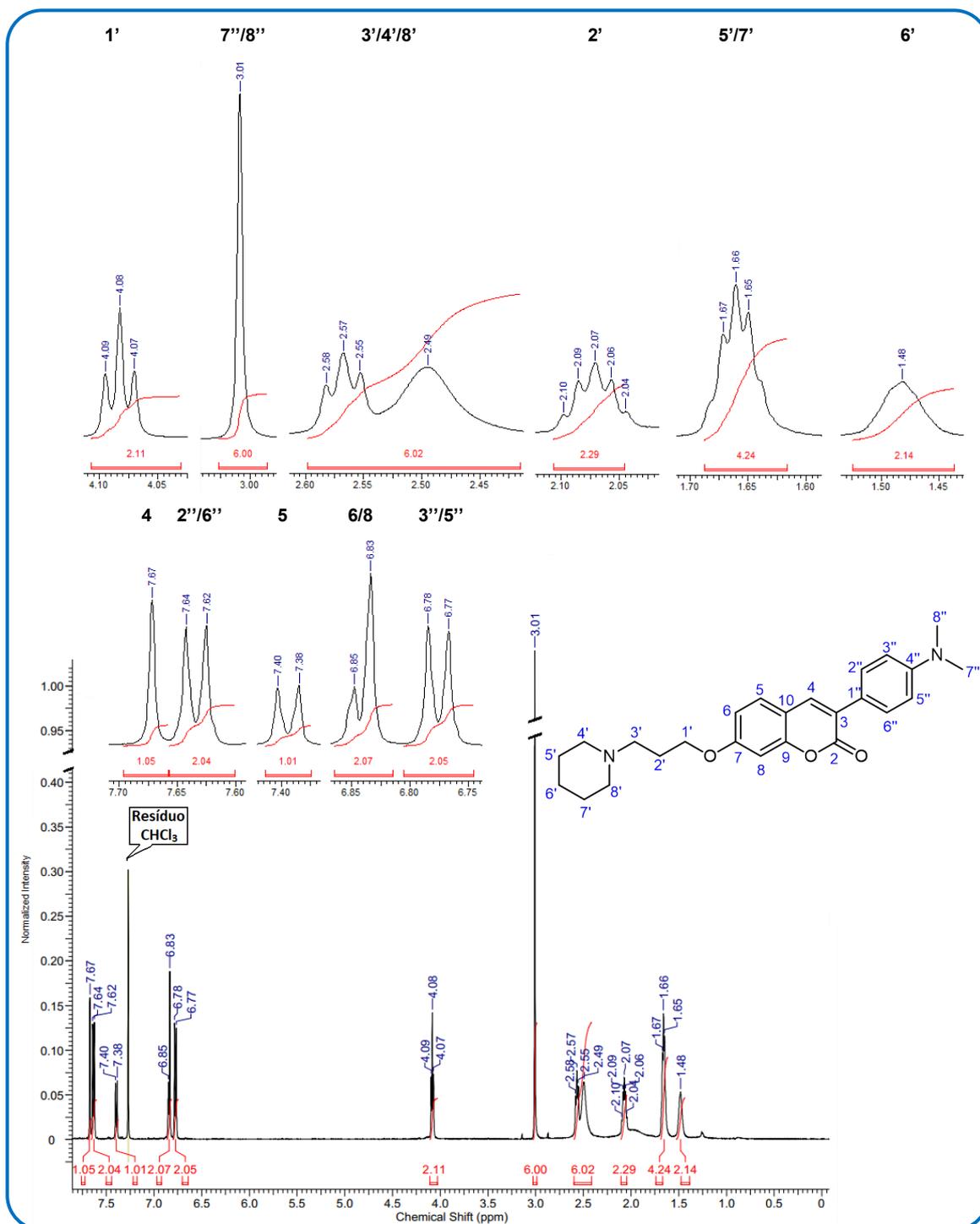
No espectro de RMN  $^1\text{H}$  do derivado **47a**, pôde-se observar o aparecimento de um multiplete referente aos hidrogênios ligados aos carbonos 2'' e 6'', os quais caíram na mesma região do hidrogênio ligado ao carbono 5 (do núcleo cumarínico):  $\delta$  7,68-7,72 (m, 3H). Pôde-se observar também o aparecimento de dois tripletos referentes aos demais hidrogênios ( $\text{H}_{3''}$ ,  $\text{H}_{5''}$  e  $\text{H}_{4''}$ ) do sistema aromático do substituinte fenil:  $\delta$  7,46 (t,  $J = 7,4\text{Hz}$ , 2H);  $\delta$  7,40 (t,  $J = 7,4\text{Hz}$ , 1H), o que corroborou para a confirmação da formação do produto desejado (**Figura 26**).



**Figura 26.** Espectro de RMN  $^1\text{H}$  do derivado 3-fenil-7-((2-piperidin-1-il)etoxi)-cumarina (47a).

No espectro de RMN  $^1\text{H}$  do derivado **48b**, pôde-se observar o aparecimento de dois dupletos na região de hidrogênio de sistema aromático com perfil de *para* substituição:  $\delta$  7,39

(d,  $J = 8\text{Hz}$ , 2H);  $\delta$  6,77 (d,  $J = 8\text{Hz}$ , 2H), e também o aparecimento de um simpleto com integração para 6 hidrogênios, referente aos hidrogênios das metilas do substituinte dimetilamino presente na fenila:  $\delta$  3,01 (s, 6H) (**Figura 27**).



**Figura 27.** Espectro de RMN  $^1\text{H}$  do derivado 3-(*p*-(*N,N*)-dimetilanelina)-7-((3-piperidin-1-il)proxi)-cumarina (**48b**).

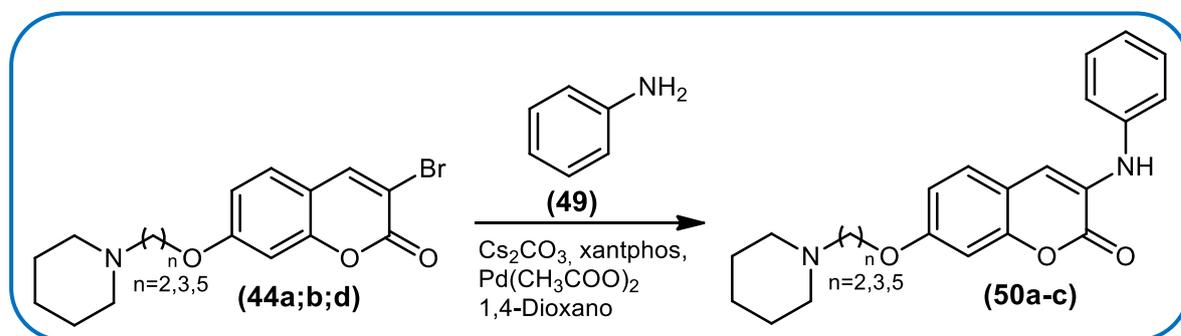
#### 4.7. Reação de acoplamento de Buchwald para obtenção dos derivados 3-(*N*-anilino)-7-aminoalcoxi-cumarínicos (**50a-c**)

Os compostos 3-(*N*-anilino)-7-aminoalcoxi-cumarínicos (**50a-c**) foram sintetizados via reação de acoplamento de Buchwald, sendo obtidos nas formas de sólidos amorfos de coloração amarela. Os rendimentos variaram de 75-80% e os pontos de fusão de 114-202°C, não havendo relatos de P.F. na literatura para nenhum dos sólidos obtidos (**Tabela 8**).

**Tabela 8.** Pontos de fusão e rendimentos obtidos para os compostos **50a-c**.

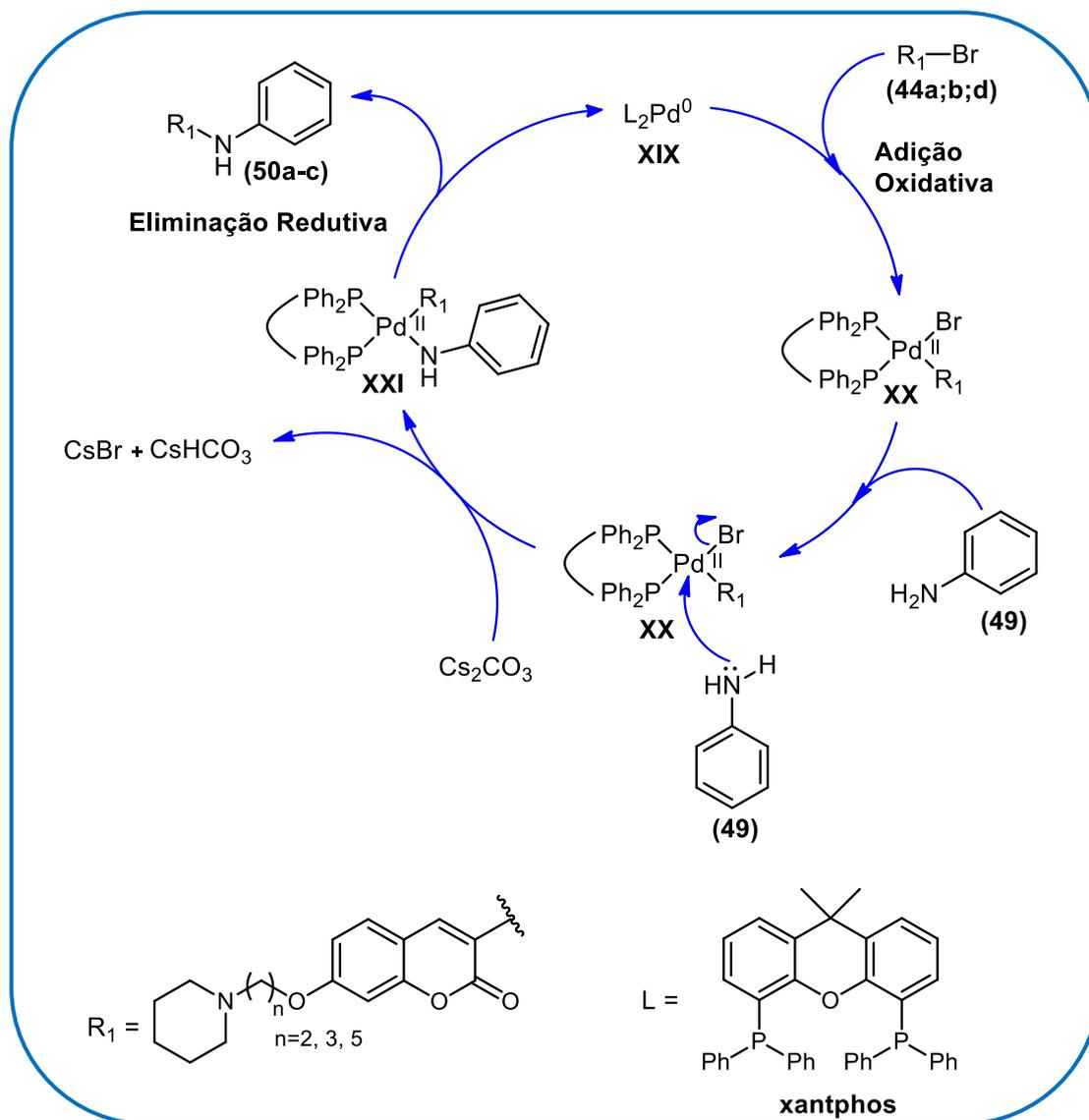
n	Ponto de Fusão (°C)	Rendimento (%)
2	114	77
3	166	75
5	202	80

Esta reação foi realizada a partir da anilina (**49**) e dos derivados 3-bromo-7-aminoalcoxi-cumarínicos (**44a;b;d**) em dioxano, sob aquecimento a 100°C (**Esquema 17**).



**Esquema 17.** Síntese dos derivados 3-(*N*-anilino)-7-aminoalcoxi-cumarínicos (**50a-c**).

Assim como na reação de Suzuki, o mecanismo é melhor visualizado a partir da perspectiva do catalisador de paládio (**XIX**). A reação inicia-se com o processo de adição oxidativa dos respectivos compostos 3-(*N*-anilino)-7-aminoalcoxi-cumarínicos (**44a;b;d**) ao paládio para formar a espécie de organopaládio **XX**. Em seguida, a reação entre o intermediário **XX** e anilina (**49**), catalisada pelo carbonato de céσιο ( $\text{Cs}_2\text{CO}_3$ ), dá origem ao intermediário **XXI**. Por fim, ocorre o processo de eliminação reductiva do produto desejado (**50a-c**), restaurando o catalisador de paládio original (**XIX**), o qual completa o ciclo catalítico (**Esquema 18**).

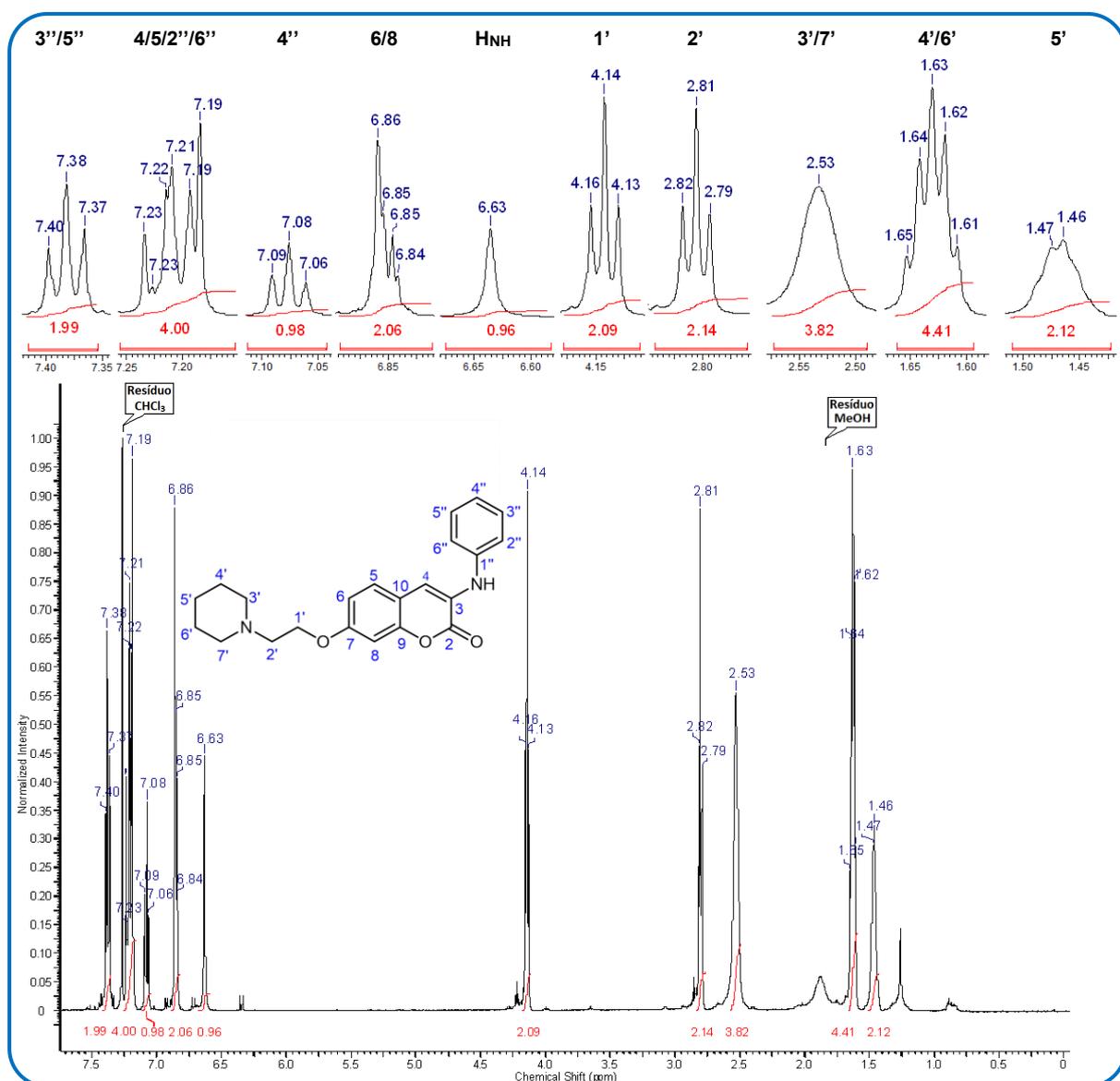


**Esquema 18.** Esquema de intermediários proposto para formação dos derivados 3-(*N*-anilino)-7-aminoalcoxi-cumarínicos (**50a-c**) (Adaptado de MUCI; BUCHWALD, 2002).

O acompanhamento da reação se deu através de análise por cromatografia em camada fina, com sílica como fase estacionária e dicloro/metanol 25% como eluente. Pôde-se observar a formação de um produto de polaridade semelhante à do reagente de partida, havendo diferença somente na coloração da fluorescência apresentada sob luz ultravioleta de  $\lambda = 365$  nm, a qual mudou de azul para amarela.

A obtenção desses derivados foi confirmada através das técnicas de RMN  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  e espectrometria de massas de alta resolução. O espectro de RMN  $^1\text{H}$  do derivado com cadeia espaçadora de 2 carbonos (**50a**), é mostrado na **figura 28** de forma representativa aos demais derivados da série. As atribuições dos sinais aos hidrogênios encontram-se localizados nas respectivas posições e indicadas na própria figura por meio da numeração apresentada. Pôde-

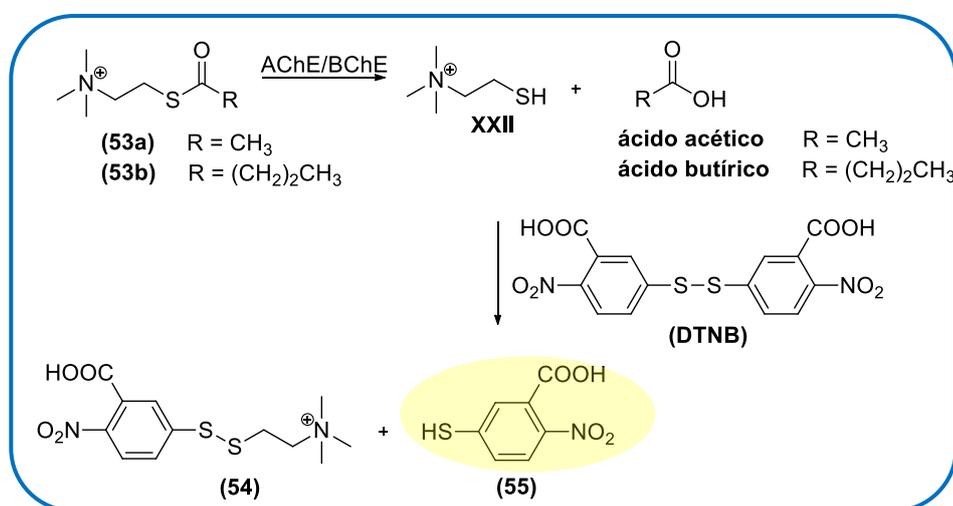
se observar que os sinais característicos do núcleo cumarínico se mantiveram, assim como os sinais referentes aos hidrogênios da cadeia alifática e aos do anel piperidínico. Observou-se a presença de dois tripletos em  $\delta$  7,38 (t,  $J = 7,9$  Hz, 2H) e  $\delta$  7,08 (t,  $J = 7,4$  Hz, 1H), referentes aos hidrogênios ligados aos carbonos 3'', 5'' e 4'', respectivamente. Também foi observada a presença de um multipletto referente aos hidrogênios ligados aos carbonos 2'' e 6'', os quais caíram na mesma região dos hidrogênios ligados aos carbonos 4 e 5 (do núcleo cumarínico) em  $\delta$  7,19 – 7,23 (m, 4H), e de um simpleto largo referente ao hidrogênio ligado ao nitrogênio ( $H_{NH}$ ) em  $\delta$  6,63 (sl, 1H).



**Figura 28.** Espectro de RMN  $^1H$  do derivado 3-(*N*-anilino)-7-((2-piperidin-1-il)etoxi)-cumarina (50a).

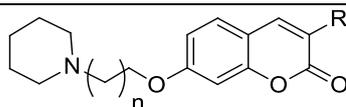
#### 4.8. Resultados de atividade inibitória dos compostos obtidos frente à AChE e BChE

Foram feitos os ensaios de inibição frente à AChE e BChE, utilizando o método de Ellman com os compostos **44a-d**, **47a-c**, **48a-c**, **50a-c** e com o fármaco donepezila. Este teste consiste na clivagem enzimática da acetiltiocolina ou butiriltiocolina (**53a-b**) promovida pela AChE ou BChE, respectivamente. Nele, adiciona-se o reagente DTNB, que em presença de tiocolina (**XXII**), produto da clivagem da acetiltiocolina ou da butiriltiocolina, reage formando os produtos **54** e **55**. Este último apresenta coloração amarela, a qual pode ser quantificada por medida da absorbância em um leitor de placas equipado com filtro de luz a  $\lambda = 415$  nm. Desta forma, a atividade da enzima é medida de maneira indireta por meio da reação do produto de clivagem enzimática com um reagente pró-cromofórico (**Esquema 19**).



**Esquema 19.** Reação ocorrida no ensaio de Ellman.

Todos os compostos testados foram potentes e seletivos quanto à capacidade de inibir a AChE. Nestes ensaios, o composto menos ativo foi o **48c**, o qual apresentou valor de  $CI_{50} = 0,96$   $\mu$ M e os mais ativos foram o **48a** e o **50a**, os quais apresentaram valores de  $CI_{50} = 0,02$   $\mu$ M e  $0,05$   $\mu$ M, respectivamente. Os respectivos resultados de  $CI_{50}$  obtidos nos ensaios de inibição frente às colinesterases encontram-se na **Tabela 9**.

**Tabela 9.** Resultados obtidos nos ensaios inibição enzimática frente à EeAChE e EqBChE.

Compostos	R	n	CI <sub>50</sub> (μM) ± DP <sup>a</sup>		IS <sup>d</sup>
			AChE <sup>b</sup>	BChE <sup>c</sup>	
<b>44a</b>	Br	1	0,18 ± 0,009	8,37 ± 0,167	47
<b>44b</b>	Br	2	0,37 ± 0,008	15,87 ± 0,007	43
<b>44c</b>	Br	3	0,55 ± 0,010	4,92 ± 0,095	9
<b>44d</b>	Br	4	0,15 ± 0,005	5,01 ± 0,253	33
<b>47a</b>	Fenila	1	0,14 ± 0,009	2,50 ± 0,177	18
<b>47b</b>	Fenila	2	0,24 ± 0,014	1,86 ± 0,024	8
<b>47c</b>	Fenila	4	0,45 ± 0,036	0,90 ± 0,001	2
<b>48a</b>	4-(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> N-Ph	1	0,02 ± 0,001	6,73 ± 0,040	337
<b>48b</b>	4-(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> N-Ph	2	0,33 ± 0,011	7,27 ± 0,273	22
<b>48c</b>	4-(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> N-Ph	4	0,96 ± 0,036	3,85 ± 0,190	4
<b>50a</b>	<i>N</i> -anilino	1	0,05 ± 0,002	11,07 ± 0,530	221
<b>50b</b>	<i>N</i> -anilino	2	0,30 ± 0,011	6,67 ± 0,103	22
<b>50c</b>	<i>N</i> -anilino	4	0,23 ± 0,010	1,94 ± 0,107	8
<b>donepezila</b>	-	-	0,007 ± 0,0002	2,39 ± 0,105	341

<sup>a</sup> Concentração necessária para inibir 50% da atividade colinesterásica, dados obtidos ± desvio padrão (DP) de triplicatas de ensaios independentes; <sup>b</sup> AChE de enguia elétrica;

<sup>c</sup> BChE de soro equino; <sup>d</sup> Índice de seletividade (IS) é dado como BChE CI<sub>50</sub>/AChE CI<sub>50</sub>.

Foi possível observar que, no geral os compostos que apresentaram os melhores resultados inibitórios frente à AChE foram aqueles em que o número de carbonos espaçadores entre o grupo piperidinila e o núcleo cumarínico é igual a 2. Com relação aos compostos com os substituintes bromo, fenil e *p*-(*N,N*)-dimetilanelilina na posição 3 do anel cumarínico (**44a-c**; **47a-c**; **48a-c**), pôde-se observar uma tendência decrescente da atividade conforme a cadeia alquílica aumenta de tamanho, conforme era esperado, uma vez que esse comportamento foi observado nos derivados do composto protótipo (**33**). Porém, o composto com substituinte bromo com 5 metilenos espaçadores (**44d**) apresentou um resultado inesperado de atividade inibitória, sendo o mais ativo da série com este substituinte. Outro composto que se destacou

por apresentar alta atividade inibitória, foi o **48a**, que apresentou atividades muito semelhantes ao composto protótipo, validando o planejamento da série cumarínica e o bioisosterismo não clássico entre as indanonas e as cumarinas. Além disso, este composto se destacou pelo índice de seletividade obtido entre as colinesterases (IS = 337), sendo muito similar ao do fármaco donepezila (IS = 341), o que faz dele um composto bastante promissor.

#### 4.9. Resultados dos ensaios do mecanismo de inibição enzimática

Os inibidores enzimáticos reversíveis podem atuar por diferentes mecanismos de inibição. Estes mecanismos são identificados pelo efeito que os inibidores produzem nas constantes cinéticas  $K_m$  e  $V_{máx}$ , que os classificam como inibidores competitivos, não-competitivos ou incompetitivos. A inibição competitiva é aquela em que o inibidor compete com o substrato pelo sítio catalítico da enzima, formando um complexo enzima-inibidor (EI) que é semelhante ao complexo enzima-substrato (ES). Para este tipo de inibição, observa-se um aumento dos valores de  $K_m$  enquanto  $V_{máx}$  se mantém constante. Já o inibidor não-competitivo liga-se a um sítio alostérico da enzima, ou seja, um sítio diferente do sítio ativo. Por mais que o substrato ainda possa se ligar ao complexo EI formando um complexo ternário enzima-substrato-inibidor (ESI), este complexo não é capaz de converter substrato em produto. Para este tipo de inibição, observa-se uma diminuição dos valores de  $V_{máx}$  enquanto  $K_m$  se mantém constante. Por fim, na inibição incompetitiva, o inibidor pode se ligar somente ao complexo ES e não à enzima livre e, portanto, o inibidor se liga a um sítio que é criado durante a alteração conformacional da enzima, promovida pela ligação ao substrato, formando o complexo ternário ESI. Neste caso, tanto  $K_m$  quanto  $V_{máx}$  são reduzidos na presença do inibidor.

Visando uma maior compreensão do tipo de inibição promovida pelos compostos testados frente às colinesterases, realizaram-se ensaios de cinética enzimática em ambas as enzimas para os dois compostos mais ativos frente à AChE, **48a** e **50a**, e para o composto **44d**, por ter apresentado uma atividade diferente da esperada, sendo o mais ativo da sua série (substituente bromo). Através dos valores de  $K_m$  e  $V_{máx}$  (**Tabela 10**) e do perfil do gráfico de Lineweaver–Burk, foi possível observar que o tipo de inibição promovida por todos os compostos testados é o tipo mista para ambas as enzimas. De maneira que os compostos inibidores são capazes de ligarem-se tanto ao sítio catalítico das enzimas (inibição competitiva) quanto ao sítio alostérico (inibição não-competitiva), atuando, assim, de duas maneiras diferentes. Desta forma, calcularam-se duas constantes de afinidade para cada um dos

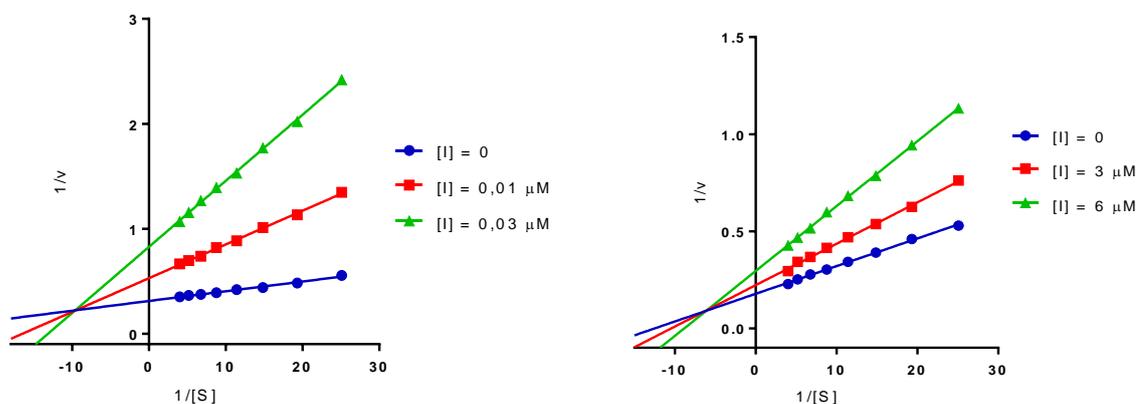
compostos em cada enzima, sendo eles  $K_i$  (inibição competitiva) e  $K_i'$  (inibição não-competitiva), conforme pode ser observado na **Tabela 10**.

**Tabela 10.** Parâmetros cinéticos de **44d**, **48a** e **50a** em AChE e BChE.

Concentração ( $\mu\text{M}$ )	$V_{\text{máx}} \pm \text{DP}^{\text{a}}$ ( $1 \times 10^3 \text{ nM/min}$ )	$K_m \pm \text{DP}^{\text{a}}$ ( $1 \times 10^3 \text{ nM}$ )	$K_i \pm \text{DP}^{\text{a}}$ ( $\text{nM}$ )	$K_i' \pm \text{DP}^{\text{a}}$ ( $\text{nM}$ )
<b>44d em AChE</b>				
0	$3,064 \pm 0,063$	$23,060 \pm 2,744$		
0,1	$2,209 \pm 0,060$	$48,083 \pm 2,189$	$21,273 \pm 0,816$	$157,350 \pm 4,674$
0,2	$1,752 \pm 0,198$	$81,645 \pm 7,743$		
<b>44d em BChE</b>				
0	$6,306 \pm 0,138$	$78,160 \pm 0,141$		
3	$5,791 \pm 0,185$	$97,903 \pm 0,309$	$2129 \pm 148$	$6621 \pm 322$
6	$4,669 \pm 0,229$	$114,500 \pm 1,061$		
<b>48a em AChE</b>				
0	$3,168 \pm 0,188$	$25,290 \pm 0,651$		
0,01	$1,762 \pm 0,128$	$56,185 \pm 3,910$	$1,610 \pm 0,066$	$10,499 \pm 0,438$
0,03	$1,254 \pm 0,043$	$76,095 \pm 1,025$		
<b>48a em BChE</b>				
0	$5,811 \pm 0,201$	$80,190 \pm 0,625$		
2	$4,837 \pm 0,399$	$109,483 \pm 5,504$	$2585 \pm 236$	$7376 \pm 558$
5	$3,224 \pm 0,284$	$112,827 \pm 1,961$		
<b>50a em AChE</b>				
0	$3,159 \pm 0,045$	$24,150 \pm 0,735$		
0,04	$1,939 \pm 0,003$	$47,300 \pm 0,431$	$3,03 \pm 0,018$	$12,705 \pm 0,312$
0,06	$1,417 \pm 0,015$	$65,630 \pm 1,245$		
<b>50a em BChE</b>				
0	$5,380 \pm 0,060$	$73,780 \pm 1,639$		
10	$3,119 \pm 0,079$	$125,400 \pm 1,473$	$2476 \pm 54,8$	$7744 \pm 168$
15	$2,106 \pm 0,105$	$136,050 \pm 0,778$		

<sup>a</sup> Desvio-padrão (DP) de triplicatas de ensaios independentes

Como foi dito, o perfil do gráfico de Lineweaver–Burk também é capaz de indicar o mecanismo de inibição. Isso é possível observando-se o comportamento das retas, que podem ser paralelas entre si (inibição incompetitiva) ou concorrentes (neste caso o que irá determinar o tipo de mecanismo será o local de interseção dessas retas). No caso da inibição ser do tipo competitiva, o ponto de interseção irá ocorrer na região positiva do eixo  $y$  ( $1/v$ ) e se o inibidor for não-competitivo, a interseção ocorrerá na região negativa do eixo  $x$  ( $1/[S]$ ). Na **Figura 29** pode-se observar os gráficos de Lineweaver–Burk do composto **48a** para AChE (à esquerda) e BChE (à direita), nos quais as retas se cruzam no segundo quadrante do sistema cartesiano, o que caracteriza este inibidor como do tipo misto. As concentrações utilizadas do composto para obtenção das curvas encontram-se nos gráficos representadas pelo símbolo  $[I]$ .



**Figura 29.** Gráficos de Lineweaver-Burk da cinética de inibição em EeAChE (à esquerda) e EqBChE (à direita) do composto **48a**.

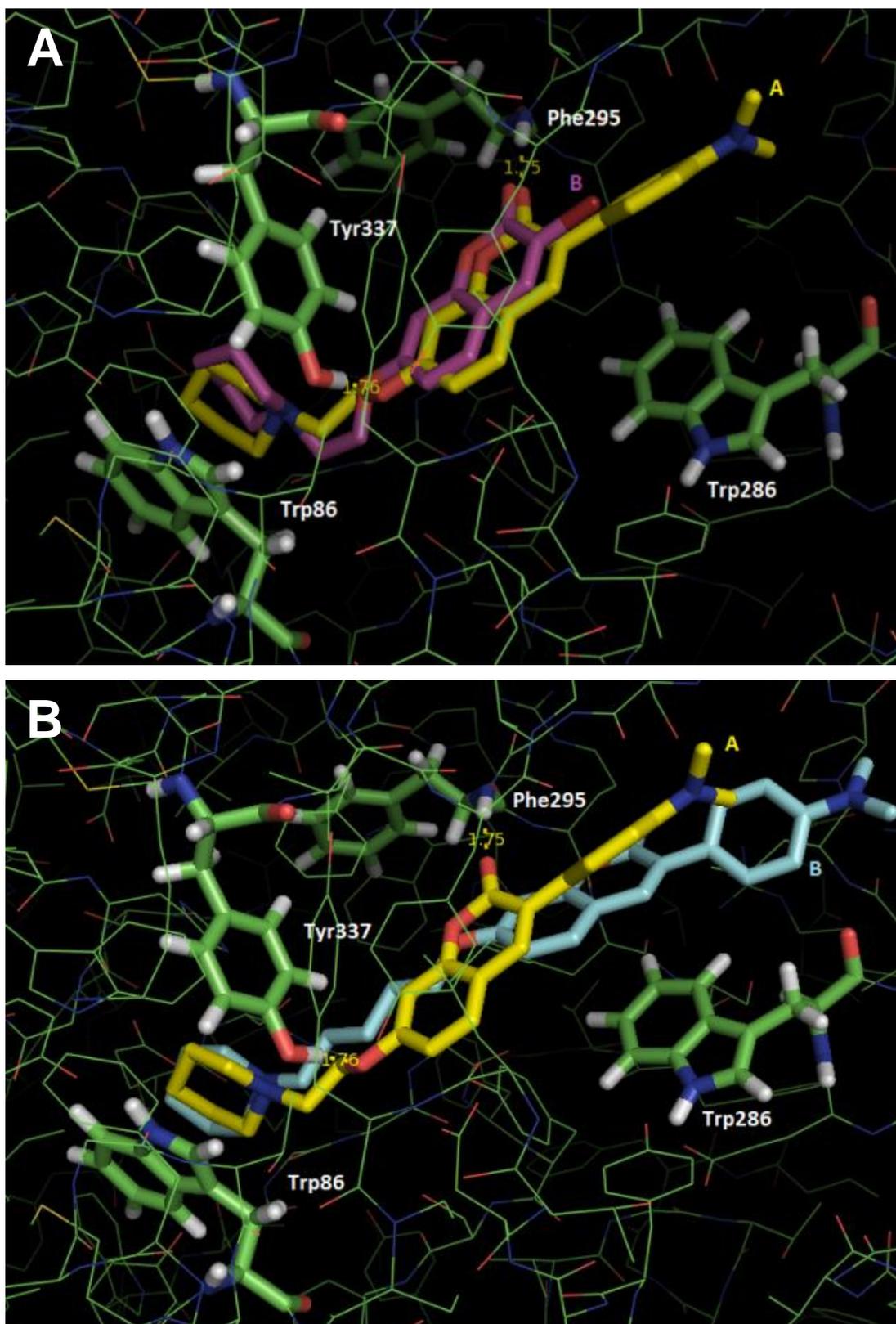
#### 4.10. Resultados dos ensaios de interação enzimática *in silico*

Todas as quatro funções disponíveis no programa GOLD 5.6 foram capazes de produzir posições de ligação de *bis*-tacrina (ligante co-cristalizado) com valores de RMSD inferiores a 1,00 Å nas enzimas avaliadas (EeAChE e EqBChE). No entanto, apenas a função GoldScore (JONES et al., 1997) apresentou simultaneamente para uma mesma posição de ligação o menor valor de RMSD e a maior pontuação de atracamento, sendo, por esse motivo, esta função escolhida para os procedimentos subsequentes de atracamento molecular. Os resultados obtidos para os compostos **44a**, **48a** e **48c** são apresentados na **Tabela 11**. Observou-se que as pontuações obtidas na avaliação *in silico* seguiram o perfil qualitativo das atividades observadas no ensaio enzimático *in vitro*.

**Tabela 11.** Resultados de *score* e os respectivos valores de  $CI_{50}$  dos compostos avaliados.

Inibidor	EeAChE		EqBChE	
	GoldScore	$CI_{50}$	GoldScore	$CI_{50}$
<b>44a</b>	64,9	$0,18 \pm 0,009$	57,6	$8,37 \pm 0,167$
<b>48a</b>	78,1	$0,02 \pm 0,001$	63,0	$6,73 \pm 0,040$
<b>48c</b>	71,4	$0,96 \pm 0,036$	67,9	$3,85 \pm 0,190$

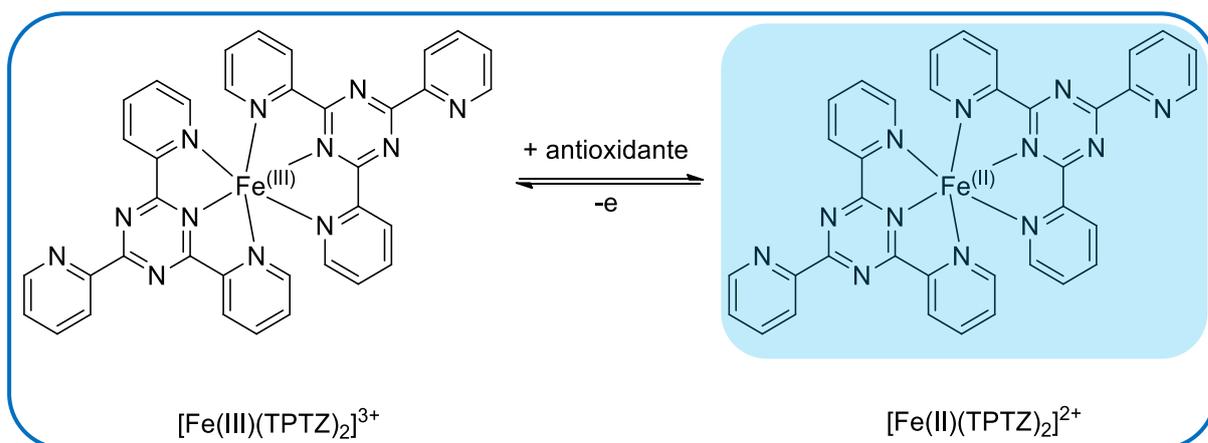
A análise das posições de ligação obtidas do estudo de *docking* mostrou que os inibidores foram capazes de ocupar, simultaneamente, os sítios ativo (CAS) e periférico (PAS), em concordância com os dados observados no estudo de cinética enzimática. No sítio ativo o grupo piperidinila protonado dos inibidores realiza interação do tipo cátion- $\pi$  com o resíduo Trp86. No sítio periférico, as moléculas apresentaram interação do tipo empilhamento- $\pi$  com o resíduo Trp286, no entanto essa interação se mostrou mais efetiva para **48c**, devido a uma maior proximidade do núcleo cumarínico com o resíduo de aminoácido. No caso de **44a** ocorrem somente interações hidrofóbicas fracas. Por outro lado, a menor cadeia espaçadora alquílica de **48a** permite que o núcleo cumarínico se posicione no canal do sítio ativo, realizando interações do tipo ligação de hidrogênio com o resíduo Tyr337 e o grupo peptídico do resíduo Phe295. Essas interações, devido à sua maior energia e pelo fato de não haver interação similar para o complexo enzima/**48c**, explicam a maior efetividade da interação de **48a** e a enzima EeAChE, fato esse que pode ser extrapolado para explicar também a maior atividade inibitória deste composto nos ensaios enzimáticos *in vitro*. A **Figura 30** apresenta as posições dos ligantes **44a**, **48a** e **48c** (em sobreposição) em relação aos sítios ativo e periférico da enzima EeAChE.



**Figura 30.** Resultados dos estudos de *docking* dos compostos **44a**, **48b** e **48c** na AChE no programa GOLD 5.6. **A:** **44a** e **48a**; **B:** **48a** e **48c**. Código de cores vs. átomos: vermelho, oxigênio; azul, nitrogênio; branco, hidrogênio; verde, carbono; vinho, bromo. Figura gerada com PyMol 0.99 (DeLano Scientific LLC).

#### 4.11. Resultados de atividade antioxidante dos compostos

Visando a hipótese do estresse oxidativo como uma das principais causas da morte de células nervosas (BUTTERFIELD; BOYD-KIMBALL, 2018), foram realizados ensaios de atividade antioxidante com o reagente FRAP (*ferric reducing ability of plasma*). Este ensaio consiste na capacidade de reduzir o complexo férrico via transferência de elétrons, ou seja, transferindo-se elétrons do composto ativo para o complexo. A capacidade antioxidante é quantificada pela intensidade da coloração azul, uma vez que, em pH ácido, reduzindo-se o complexo férrico à forma ferrosa ( $\text{Fe}^{2+}$ ), desenvolve-se uma cor azul intensa com um máximo de absorção a 593 nm (**Esquema 20**). Desta forma, quanto mais intensa for a cor, maior é a atividade antioxidante do composto testado. Neste ensaio é necessário o uso de um padrão de referência, pois o resultado é dado de maneira comparativa a este padrão. A quercetina foi o padrão utilizado neste trabalho por sua capacidade antioxidante e por haver outros trabalhos na literatura que a utilizam como padrão (MALHOTRA et al., 2016). Desta forma, os valores obtidos são equivalentes em mmol de quercetina por mol de amostra (mmol Q / mol).



**Esquema 20.** Esquema reacional entre o reagente FRAP e o composto antioxidante.

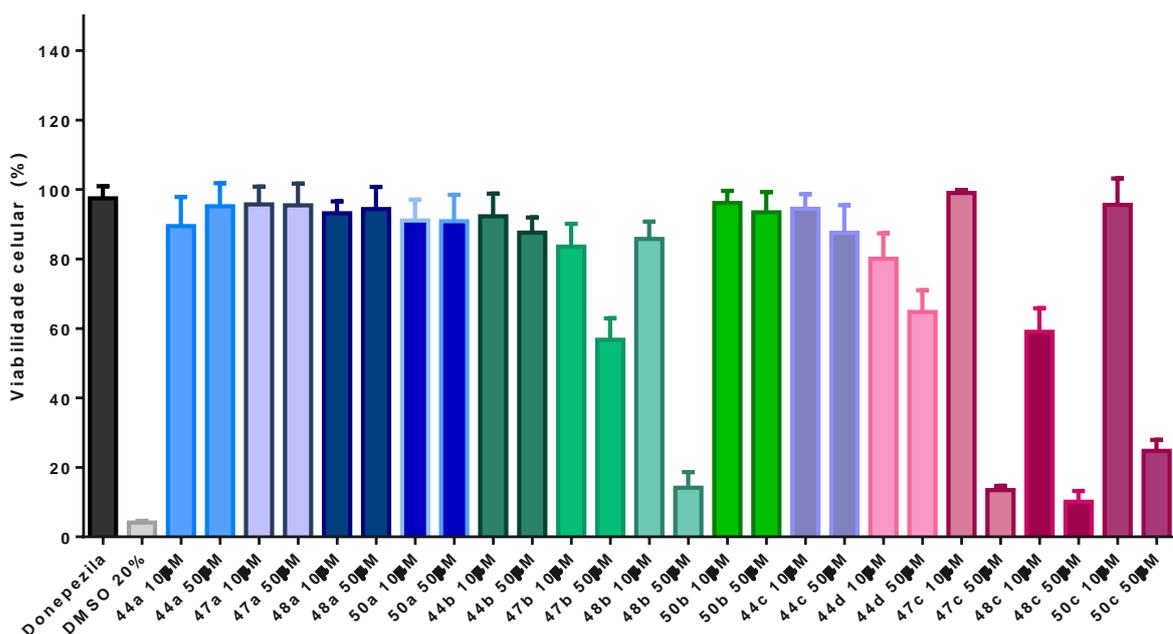
A avaliação antioxidante dos compostos cumarínicos mostrou que apenas as séries **48a-c** e **50a-c** apresentam atividade, cujos valores obtidos variaram entre 2,42 e 285,53 mmol Q / mol (**Tabela 12**). As séries **44a-d** e **47a-c** não apresentaram atividade, o que indica que o efeito antioxidante observado é oriundo das subunidades, *p*-(*N,N*)-dimetilnilina e *N*-anilino. Os resultados obtidos se mostraram promissores, visto que são superiores aos de outras 7-alcoxi-cumarinas descritas na literatura (MALHOTRA et al., 2016).

**Tabela 12.** Atividade antioxidante dos compostos.

Composto	Valor de FRAP (mmol Q/mol)
<b>48a</b>	7,49 ± 0,61
<b>48b</b>	2,42 ± 0,19
<b>48c</b>	2,77 ± 0,00
<b>50a</b>	101,96 ± 8,58
<b>50b</b>	285,53 ± 13,74
<b>50c</b>	278,40 ± 6,74

#### **4.12. Resultados de toxidez sobre linhagem celular de neuroblastoma de camundongo (N2A)**

Um dos aspectos mais importantes que compostos com aplicação medicinal devem apresentar é a especificidade. Em relação ao tratamento da DA, estes não só devem apresentar atividade nos alvos propostos, como também não podem apresentar citotoxicidade, ou seja, não devem ser nocivos às células. Para avaliarmos o perfil citotóxico dos compostos sintetizados, estes foram submetidos a ensaios de toxidez frente à uma linhagem celular de neuroblastoma de camundongo (N2A), linhagem escolhida por se tratar de um tipo celular neuronal. Nestes ensaios, as células foram incubadas por 24h juntamente com cada um dos compostos **44a-d**, **47a-c**, **48a-c** e **50a-c** a 10 e 50  $\mu$ M e donepezila a 50  $\mu$ M. Na **Figura 31** pode-se observar que os compostos mais ativos frente à AChE (**48a** e **50a**), assim como a grande maioria dos demais, apresentou um perfil citotóxico baixo com uma viabilidade celular acima de 90%, para **48a** e **50a**, e acima de 60%, para os demais, mesmo para a concentração mais elevada (50  $\mu$ M). No entanto, o composto com três carbonos espaçadores e substituinte *p*-(*N,N*)-dimetilanilina (**48b**) e quase todos os compostos com cinco carbonos espaçadores (**47c**, **48c** e **50c**), com exceção apenas do que possui o bromo como substituinte (**44d**), apresentaram uma toxidez elevada a 50  $\mu$ M, com uma viabilidade celular próxima de 20%. Desta forma, os resultados obtidos frente à N2A corroboraram os demais, indicando, mais uma vez, os compostos **48a** e **50a** como promissores candidatos a fármacos anti-DA.



**Figura 31.** Gráfico de barras da viabilidade celular para cada um dos compostos **44a-d**, **47a-c**, **48a-c** e **50a-c** a 10 e 50 µM e donepezila a 50 µM.

## 5. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

Os resultados obtidos a partir da síntese foram considerados satisfatórios, uma vez que as reações apresentaram alta pureza e bons rendimentos, de modo que os produtos obtidos (**44a-d**; **47a-c**; **48a-c**; **50a-c**) foram todos caracterizados por RMN  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  e por espectrometria de massas de alta resolução, confirmando sua estrutura química.

Os resultados dos ensaios de inibição da atividade enzimática *in vitro* revelaram que todos os compostos foram capazes de inibir seletivamente a AChE frente à BChE. Dentre os compostos da série, os mais ativos foram **48a** ( $\text{CI}_{50} = 0,02 \mu\text{M}$ ,  $\text{IS} = 337$ ) e **50a** ( $\text{CI}_{50} = 0,05 \mu\text{M}$ ,  $\text{IS} = 221$ ), sendo que o primeiro apresentou potência e seletividade similares ao do fármaco donepezila ( $\text{CI}_{50} = 0,007 \mu\text{M}$ ,  $\text{IS} = 341$ ). No geral, os resultados obtidos frente à AChE seguiram uma mesma tendência em relação aos derivados do protótipo (**33**), no que diz respeito ao número de carbonos espaçadores de 2, 3 e 5 carbonos. A hipótese de que a distância ótima entre o núcleo cumarínico e o grupo farmacofórico piperidinil seria a de 2 carbonos espaçadores foi confirmada, uma vez que os compostos **47a**, **48a** e **50a** foram os mais ativos de suas respectivas subséries. Através dos ensaios de modelagem molecular computacional, foi possível entender melhor as causas dessa tendência observada. O posicionamento do grupo piperidinil protonado no sítio catalítico por meio de interações cátion- $\pi$  foi comum a todos os derivados analisados. No entanto as interações entre os resíduos de aminoácidos do sítio

periférico do tipo ligação de hidrogênio com o átomo de oxigênio na posição 7 juntamente com interações do tipo empilhamento  $\pi$  com os anéis fenila ligados à posição 3 do núcleo cumarínico foram determinantes para uma melhor estabilização dos inibidores no sítio ativo, culminando em uma maior atividade inibitória *in vitro*. Adicionalmente, os compostos **48a** e **50a** apresentaram atividade antioxidante superior a de outras 7-alcoxi-cumarinas descritas na literatura, resultado interessante uma vez que diversos estudos associam o estresse oxidativo no cérebro com a evolução da DA.

O conjunto dos resultados, tanto de síntese quanto de atividade biológica, justifica a ampliação da série de derivados 7-aminoalcoxi-cumarínicos, especialmente a partir das estruturas de **48a** e **50a**, visando conhecer o efeito de diferentes grupos substituintes no anel fenílico ligado à posição 3 do grupo cumarínico. A otimização estrutural desses compostos pode resultar em derivados mais potentes, seletivos e com menor toxicidade a células mamíferas.

As perspectivas para este trabalho incluem ainda, realizar os ensaios de inibição *in vitro* da agregação de placas  $\beta$ -amilóide para todos os compostos planejados e ensaios *in vivo* de alteração comportamental em modelo de DA induzida em camundongos.

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALZHEIMER'S ASSOCIATION. **Dentro Do Cérebro: Uma Viagem Interativa**. Disponível em: <[https://www.alz.org/brain\\_portuguese/](https://www.alz.org/brain_portuguese/)>. Acesso em: 11 de mai. 2018.

AMARAL, M. D. P. H.; PIRESVIEIRA, F.; LEITE, M. N., DO AMARAL, L. H.; PINHEIRO, L. C.; FONSECA, B. G.; VAREJÃO, E. V. **Determinação do teor de cumarina no xarope de guaco armazenado em diferentes temperaturas**. *Brazilian Journal of pharmacognosy*, 19(2B), p. 607-611, 2009.

ARQUIVOBIOQUI. **Síntese e reciclagem da acetilcolina na sinapse**. Disponível em: <<http://arquivobioqui.blogspot.com/2015/11/sintese-e-reciclagem-da-acetilcolina-na.html>>. Acesso em: 11 de mai. 2018.

ASTORINO, T.; BAKER, J.; BROCK, S.; DALLECK, L.; GOULET, E.; GOTSHALL, R.; LIM, Y. A. **Reduction in Butyrylcholinesterase Activity and Cardiovascular Risk Factors in Obese Adolescents after 12-Weeks of High-Intensity Interval Training**. *Journal of Exercise Physiologyonline*, 20(3), p. 110-120, 2017.

BENKERT, P.; BIASINI, M.; SCHWEDE, T. **Toward the estimation of the absolute quality of individual protein structure models**. *Bioinformatics*, 27, p. 343-350, 2011.

BERNIER, F.; SATO, Y.; MATIJEVIC, M.; DESMOND, H.; MCGRATH, S.; BURNS, L.; KAPLOW, J.M.; ALBALA, B. **Clinical study of E2609, a novel BACE1 inhibitor, demonstrates target engagement and inhibition of BACE1 activity in CSF**. *Alzheimer's & Dementia: The Journal of the Alzheimer's Association*, 9(4), p. P886, 2013.

BIASINI, M.; BIENERT, S.; WATERHOUSE, A.; ARNOLD, K.; STUDER, G.; SCHMIDT, T.; KIEFER, F.; CASSARINO, T. G.; BERTONI, M.; BORDOLI, L.; SCHWEDE, T. **SWISS-MODEL: modelling protein tertiary and quaternary structure using evolutionary information**. *Nucleic Acids Research*, 42(W1), p. W252-W258, 2014.

BLENNOW, K.; HAMPEL, H.; WEINER, M.; ZETTERBERG, H. **Cerebrospinal fluid and plasma biomarkers in Alzheimer disease**. *Nature Reviews Neurology*, 6(3), p. 131-144, 2010.

BOISDE, P.M.; MEULY, W.C. **Coumarin**. *Encyclopedia of Chemical Technology*, 5, 2007.

BORGES, F.; ROLEIRA, F.; MILHAZES, N.; SANTANA, L.; URIARTE, E. **Simple coumarins and analogues in medicinal chemistry: occurrence, synthesis and biological activity.** *Current medicinal chemistry*, 12(8), p. 887-916, 2005.

BOURNE, Y.; GRASSI, J.; BOUGIS, P.E.; MARCHOT, P. **Conformational Flexibility of the Acetylcholinesterase Tetramer Suggested by X-ray Crystallography.** *Journal of Biological Chemistry*, 274(43), p. 30370-30376, 1999.

BRUS, B.; KOSAK, U.; TURK, S.; PISLAR, A.; COQUELLE, N.; KOS, J.; STOJAN, J.; COLLETIER, J.P.; GOBEC, S. **Discovery, biological evaluation, and crystal structure of a novel nanomolar selective butyrylcholinesterase inhibitor.** *Journal of Medicinal Chemistry*, 57, p. 8167-8179, 2014.

BUERGER, K.; EWERS, M.; PIRTTILÄ, T.; ZINKOWSKI, R.; ALAFUZOFF, I.; TEIPEL, S. J.; HAMPEL, H. **CSF phosphorylated tau protein correlates with neocortical neurofibrillary pathology in Alzheimer's disease.** *Brain*, 129(11), p. 3035-3041, 2006.

BUTTERFIELD, D. A.; BOYD-KIMBALL, D. **Oxidative stress, amyloid- $\beta$  peptide, and altered key molecular pathways in the pathogenesis and progression of Alzheimer's disease.** *Journal of Alzheimer's Disease*, 62(3), p. 1345-1367, 2018.

CALDERON-MARGALIT, R.; ADLER, B.; ABRAMSON, J. H.; GOFIN, J.; KARK, J. D. **Butyrylcholinesterase activity, cardiovascular risk factors, and mortality in middle-aged and elderly men and women in Jerusalem.** *Clinical chemistry*, 52(5), p. 845-852, 2006.

CAREY, F. A. SUNDBERG, R. J. **Advanced Organic Chemistry, Part A: Structure and Mechanisms**, 5<sup>a</sup> Ed., New York: *Springer*, 2008.

CARVALHO A.O.; MARTINS, J.L.S. **Determinação de cumarina em extrato fluido e tintura de guaco por espectrofotometria derivada de primeira ordem.** *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, 40(4), p. 481-486, 2004.

CASADESUS, G.; MOREIRA, P. I.; NUNOMURA, A.; SIEDLAK, S. L.; BLIGH-GLOVER, W.; BALRAJ, E.; PERRY, G. **Indices of metabolic dysfunction and oxidative stress.** *Neurochemical research*, 32(4-5), p. 717-722, 2007.

CHEIGNON, C.; TOMAS, M., BONNEFONT-ROUSSELOT, D.; FALLER, P.; HUREAU, C.; COLLIN, F. **Oxidative stress and the amyloid beta peptide in Alzheimer's Disease.** *Redox Biology*, 14, p. 450-464, 2017.

CLAYDEN, J.; GREEVES, N.; WARREN, S. **Organic Chemistry.** 2<sup>a</sup> Ed., New York: *Oxford University Press*, 2001.

Dados coletados pelo Centro de Referência do Idoso do HC/UFMG com base nas informações do DATASUS (Sistema de Informações Ambulatoriais do SUS - SIA/SUS), no ano de 2008, e pela Gerência de Medicamentos Excepcionais (Superintendência de Assistência Farmacêutica/SES/MG)

DALE, H. H. **The action of certain esters and ethers of choline, and their relation to muscarine.** *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 6(2), p. 147-190, 1914.

DALE, H. **Transmission of nervous effects by acetylcholine: Harvey lecture.** *Bulletin of the New York Academy of Medicine*, 13(7), p. 379, 1937.

DALE, H.H. **Otto Loewi, 1873-1961.** *Biographical Memoirs of Fellows of the Royal Society*, 8, p. 67-89, 1962.

DANYSZ, W.; PARSONS, C.G. **Alzheimer's disease,  $\beta$ -amyloid, glutamate, NMDA receptors and memantine—searching for the connections.** *British journal of pharmacology*, 167(2), p. 324-352, 2012.

EASTON, A.; RIDLEY, R. M.; BAKER, H. F.; GAFFAN, D. **Unilateral lesions of the cholinergic basal forebrain and fornix in one hemisphere and inferior temporal cortex in the opposite hemisphere produce severe learning impairments in rhesus monkeys.** *Cerebral Cortex*, 12(7), p. 729-736, 2002.

ELLMAN, G. L.; COURTNEY, K. D.; ANDRES, V.; FEATHERSTONE, R. M. **A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity.** *Biochemical pharmacology*, 7(2), p. 88-95, 1961.

FALCO, A.D.; CUKIERMAN, D.S.; HAUSER-DAVIS, R.A.; REY, N.A. **Alzheimer's disease: etiological hypotheses and treatment perspectives.** *Química Nova*, 39(1), p. 63-80, 2016.

FERRI, C. P.; PRINCE, M.; BRAYNE, C.; BRODATY, H.; FRATIGLIONI, L.; GANGULI, M.; JORM, A. **Global prevalence of dementia: a Delphi consensus study.** *The lancet*, 366(9503), p. 2112-2117, 2006.

FORLENZA, O.V. **Tratamento farmacológico da doença de Alzheimer.** *Revista de Psiquiatria Clínica*, 32(3), p. 137-148, 2005.

FRANCIS, P.T.; PALMER, A.M.; SNAPE, M.; WILCOCK, G.K. **The cholinergic hypothesis of Alzheimer's disease: a review of progress.** *Journal of Neurology, Neurosurgery, and Psychiatry*, 66(2), p. 137–147, 1999.

FRÈRE, S.; THIÉRY, V.; BESSON, T. **Microwave acceleration of the Pechmann reaction on graphite/montmorillonite K10: application to the preparation of 4-substituted 7-aminocoumarins.** *Tetrahedron Letters*, 42(15), p. 2791-2794., 2001.

FURUKAWA-HIBI, Y.; ALKAM, T.; NITTA, A.; MATSUYAMA, A.; MIZOGUCHI, H.; SUZUKI, K.; YAMADA, K. **Butyrylcholinesterase inhibitors ameliorate cognitive dysfunction induced by amyloid- $\beta$  peptide in mice.** *Behavioural brain research*, 225(1), p. 222-229, 2011.

GODYŃ, J.; JOŃCZYK, J.; PANEK, D.; MALAWSKA, B. **Therapeutic strategies for Alzheimer's disease in clinical trials.** *Pharmacological Reports*, 68(1), p. 127-138, 2016.

GOLIASCH, G.; HASCHEMI, A.; MARCULESCU, R.; ENDLER, G.; MAURER, G.; WAGNER, O.; NIESSNER, A. **Butyrylcholinesterase activity predicts long-term survival in patients with coronary artery disease.** *Clinical chemistry*, 58(6), p. 1055-1058, 2012.

GROVER, J.; KUMAR, V.; SOBHIA, M.E.; JACHAK, S.M. **Synthesis, biological evaluation and docking analysis of 3-methyl-1-phenylchromeno [4, 3-c] pyrazol-4 (1H)-ones as potential cyclooxygenase-2 (COX-2) inhibitors.** *Bioorganic & medicinal chemistry letters*, 24(19), p. 4638-4642, 2014.

HALPERN, B. **Obituary notice: Henry Hallet Dale.** *Revue française d'allergologie*, 9(2), p.117–119, 1969.

HARDY, J. **Testing times for the “amyloid cascade hypothesis”.** *Neurobiology of aging*, 23 (6), p. 1073-1074, 2002.

HARDY, J. **The amyloid hypothesis for Alzheimer’s disease: a critical reappraisal.** *Journal of neurochemistry*, 110(4), p. 1129-1134, 2009.

HARDY, J.A.; HIGGINS, G.A. **Alzheimer's disease: the amyloid cascade hypothesis.** *Science*, 256(5054), p. 184, 1992.

HIMMELHEBER, A.M.; SARTER, M.; BRUNO, J.P. **Increases in cortical acetylcholine release during sustained attention performance in rats.** *Cognitive Brain Research*, 9(3), p. 313–325, 2000.

HIREMATHAD, A.; CHAND, K.; KERI, R.S. **Development of Coumarin and Benzofuran Conjugated Hybrids as the Versatile Multi-targeted Compounds for the Treatment of Alzheimer's Disease.** *Chemical biology & drug design*, 2018.

HOSPITAL DO CORAÇÃO. **Quem Foi ALOIS ALZHEIMER.** Disponível em: <<http://hospitaldocoracao.com.br/artigos/quem-foi-alois-alzheimer/>>. Acesso em: 11 de mai. 2018.

HUANG, L.; MIAO, H.; SUN, Y.; MENG, F.; LI, X. **Discovery of indanone derivatives as multi-target-directed ligands against Alzheimer's disease.** *European journal of medicinal chemistry*, 87, p. 429-439, 2014.

IMBIMBO, B.P.; FRIGERIO, E.; BREDA, M.; FIORENTINI, F.; FERNANDEZ, M.; SIVILIA, S.; GIARDINO, L.; CALZÀ, L.; NORRIS, D.; CASULA, D.; SHENOUDA, M. **Pharmacokinetics and pharmacodynamics of CHF5074 after short-term administration in healthy subjects.** *Alzheimer Disease & Associated Disorders*, 27(3), p. 278-286, 2013.

JALILI-BALEH, L.; NADRI, H.; FOROOTANFAR, H.; SAMZADEH-KERMANI, A.; KÜÇÜKKILINÇ, T. T.; AYAZGOK, B.; BUKHARI, S. N. A. **Novel 3-phenylcoumarin–**

**lipoic acid conjugates as multi-functional agents for potential treatment of Alzheimer's disease.** *Bioorganic chemistry*, 79, p. 223-234, 2018.

JIANG, N.; HUANG, Q.; LIU, J.; LIANG, N.; LI, Q.; LI, Q.; XIE, S.S. **Design, synthesis and biological evaluation of new coumarin-dithiocarbamate hybrids as multifunctional agents for the treatment of Alzheimer's disease.** *European journal of medicinal chemistry*, 146, p. 287-298, 2018.

JONES, B.E. **From waking to sleeping: neuronal and chemical substrates.** *Trends in Pharmacological Sciences*, 26(11), p. 578–86, 2005.

JONES, G.; WILLETT, P.; GLEN, R. C.; LEACH, A. R.; TAYLOR, R. **Development and validation of a genetic algorithm for flexible docking.** *Journal of molecular biology*, 267(3), p. 727-748, 1997

JONES, G.; WILLETT, P.; GLEN, R.C.; LEACH, A.R.; TAYLOR, R. **Development and Validation of a Genetic Algorithm for Flexible Docking.** *Journal of Molecular Biology*, 267, p. 727-748, 1997.

JOULE, J. A.; MILLS, K. **Heterocyclic Chemistry.** 5<sup>a</sup> Ed., New Jersey: *Wiley-Blackwell*, 2010.

KAPAKI, E. N.; PARASKEVAS, G. P.; TZERAKIS, N. G.; SFAGOS, C.; SERETIS, A.; KARARIZOU, E.; VASSILOPOULOS, D. **Cerebrospinal fluid tau, phospho-tau<sub>181</sub> and  $\beta$ -amyloid<sub>1-42</sub> in idiopathic normal pressure hydrocephalus: a discrimination from Alzheimer's disease.** *European journal of neurology*, 14(2), p. 168-173, 2007.

KÁSA, P.; RAKONCZAY, Z.; GULYA, K. **The cholinergic system in Alzheimer's disease.** *Prog Neurobiol*, 52(6), p. 511–535, 1997.

KHAN, K.M.; RAHIM, F.; WADOOD, A.; KOSAR, N.; TAHA, M.; LALANI, S.; KHAN, A.; FAKHRI, M.I.; JUNAID, M.; REHMAN, W.; KHAN, M. **Synthesis and molecular docking studies of potent  $\alpha$ -glucosidase inhibitors based on biscoumarin skeleton.** *European journal of medicinal chemistry*, 81, p. 245-252, 2014.

KHOMENKO, T.M.; ZARUBAEV, V.V.; ORSHANSKAYA, I.R.; KADYROVA, R.A.; SANNIKOVA, V.A.; KORCHAGINA, D.V.; VOLCHO, K.P.; SALAKHUTDINOV, N.F.

**Anti-influenza activity of monoterpene-containing substituted coumarins.** *Bioorganic & medicinal chemistry letters*, 27(13), p. 2920-2925, 2017.

KOVAC, B.; NOVAK, I. **Electronic structure of coumarins.** *Spectrochimica Acta Part A*, 58(7), p. 1483-1488, 2002.

KRAEPELIN, E. (1910). **Psychiatrie: Ein Lehrbuch für Studierende und Ärzte, Klinische Psychiatrie [Psychiatry: a study book for students and doctors, clinical psychiatry].** 3<sup>a</sup> Ed., Leipzig: *Barth*, 1915.

KUDO, E.; TAURA, M.; MATSUDA, K.; SHIMAMOTO, M.; KARIYA, R.; GOTO, H.; HATTORI, S.; KIMURA, S.; OKADA, S. **Inhibition of HIV-1 replication by a tricyclic coumarin GUT-70 in acutely and chronically infected cells.** *Bioorganic & medicinal chemistry letters*, 23(3), p. 606-609, 2013.

LAN, J.S.; DING, Y.; LIU, Y.; KANG, P.; HOU, J.W.; ZHANG, X.Y.; XIE, S.S.; ZHANG, T. **Design, synthesis and biological evaluation of novel coumarin-N-benzyl pyridinium hybrids as multi-target agents for the treatment of Alzheimer's disease.** *European journal of medicinal chemistry*, 139, p. 48-59, 2017.

LANMAN, B.A. **8.5 Pechmann Coumarin Synthesis.** *Name Reactions in Heterocyclic Chemistry II*, 6, p. 454, 2011.

LAUFER, M.C.; HAUSMANN, H.; HÖLDERICH, W.F.J. **Synthesis of 7-hydroxycoumarins by Pechmann reaction using Nafion resin/silica nanocomposites as catalysts.** *Journal of Catalysis*, 218(2), p. 315-320, 2003.

LAWLOR, B.; KENNELLY, S.; O'DWYER, S.; CREGG, F.; WALSH, C.; COEN, R.; DALY, L. **NILVAD protocol: a European multicentre double-blind placebo-controlled trial of nilvadipine in mild-to-moderate Alzheimer's disease.** *BMJ = open*, 4(10), p. e006364, 2014.

LEI, L.; XUE, Y.B.; LIU, Z.; PENG, S.S.; HE, Y.; ZHANG, Y.; FANG, R.; WANG, J.P.; LUO, Z.W.; YAO, G.M.; ZHANG, J.W. **Coumarin derivatives from *Ainsliaea fragrans* and their anticoagulant activity.** *Scientific reports*, 5, p. 13544, 2015.

LEVY, E.; CARMAN, M. D.; FERNANDEZ-MADRID, I.J.; POWER, M.D.; LIEBERBURG, I.; VAN DUINEN, S.G.; FRANGIONE, B. **Mutation of the Alzheimer's disease amyloid gene in hereditary cerebral hemorrhage, Dutch type.** *Science*, 248(4959), p. 1124-1126, 1990.

LIM, G.P.; CHU, T.; YANG, F.; BEECH, W.; FRAUTSCHY, S.A.; COLE, G.M. **The curry spice curcumin reduces oxidative damage and amyloid pathology in an Alzheimer transgenic mouse.** *Journal of Neuroscience*, 21(21), p. 8370-8377, 2001.

LIU, Z.; ZHANG, A.; SUN, H.; HAN, Y.; KONG, L.; WANG, X. **Two decades of new drug discovery and development for Alzheimer's disease.** *RSC Advances*, 7(10), p. 6046-6058, 2017.

LOEWI, O. **Quantitative und qualitative Untersuchungen über den Sympathicusstoff.** *Pflüger's Archiv für die gesamte Physiologie des Menschen und der Tiere*, 237(1), p. 504-514, 1936.

LUO, W.; RODINA, A.; CHIOSIS, G. **Heat shock protein 90: translation from cancer to Alzheimer's disease treatment?** *BMC Neuroscience*, 9(2), p. S7, 2008.

LYNCH, S. Y.; KAPLOW, J.; ZHAO, J.; DHADDA, S.; LUTHMAN, J.; ALBALA, B. **Elenbecestat, E2609, a Bace inhibitor: Results from a phase-2 study in subjects with mild cognitive impairment and mild-to-moderate dementia due to Alzheimer's disease.** *Alzheimer's & Dementia: The Journal of the Alzheimer's Association*, 14(7), p. P1623, 2018.

MALHOTRA, S.; TAVAKKOLI, M.; EDRAKI, N.; MIRI, R.; SHARMA, S. K.; PRASAD, A. K.; FIRUZI, O. **Neuroprotective and Antioxidant Activities of 4-Methylcoumarins: Development of Structure–Activity Relationships.** *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 39(9), p. 1544-1548, 2016.

MAURICE, T.; STREHAIANO, M.; SIMÉON, N.; BERTRAND, C.; CHATONNET, A. **Learning performances and vulnerability to amyloid toxicity in the butyrylcholinesterase knockout mouse.** *Behavioural brain research*, 296, p. 351-360, 2016.

MESULAM, M. M.; GUILLOZET, A.; SHAW, P.; LEVEY, A.; DUYSSEN, E. G.; LOCKRIDGE, O. **Acetylcholinesterase knockouts establish central cholinergic pathways**

and can use butyrylcholinesterase to hydrolyze acetylcholine. *Neuroscience*, 110(4), p. 627-639, 2002.

MIYAURA, N.; SUZUKI, A. **Palladium-catalyzed cross-coupling reactions of organoboron compounds.** *Chemical reviews*, 95(7), p. 2457-2483, 1995

MONTANARI, S.; BARTOLINI, M.; NEVIANI, P.; BELLUTI, F.; GOBBI, S.; PRUCCOLI, L.; TAROZZI, A.; FALCHI, F.; ANDRISANO, V.; MISZTA, P.; CAVALLI, A. **Multitarget Strategy to Address Alzheimer's Disease: Design, Synthesis, Biological Evaluation, and Computational Studies of Coumarin-Based Derivatives.** *ChemMedChem*, 11(12), p. 1296-1308, 2016.

MUCI, A.R.; BUCHWALD, S.L. **Practical Palladium Catalysts for C-N and C-O Bond Formation.** *Topics in Curr. Chem.*, 219, p. 131–209, 2002.

MURI, E.M.F.; DE MELLO, M.M.S.; METSAVAHT, L. **Farmacologia de drogas vasoativas.** *Acta fisiátrica*, 17(1), p. 22-27, 2016.

MURRAY, R.D.H. **Coumarins.** *Natural Product Reports*, 12, p. 477-505, 1995.

NALIVAEVA, N.N.; TURNER, A.J. **The amyloid precursor protein: a biochemical enigma in brain development, function and disease.** *FEBS Letters*, 587(13), p. 2046-2054, 2013.

PATEL, D.; KUMARI, P.; PATEL, N.B. **In vitro antimicrobial and antimycobacterial activity of some chalcones and their derivatives.** *Medicinal Chemistry Research*, 22(2), p.726-744, 2013.

PATEL, R.V.; KUMARI, P.; RAJANI, D.P; CHIKHALIA, K.H. **Synthesis of coumarin-based 1, 3, 4-oxadiazol-2ylthio-N-phenyl/benzothiazolyl acetamides as antimicrobial and antituberculosis agents.** *Medicinal Chemistry Research*, 22(1), p.195-210, 2013.

PEREIRA, T. M.; VITÓRIO, F.; AMARAL, R. C.; ZANONI, K. P. S.; IHA, N. Y. M.; KUMMERLE, A. E. **Microwave-assisted synthesis and photophysical studies of novel fluorescent N-acylhydrazone and semicarbazone-7-OH-coumarin dyes.** *New Journal of Chemistry*, 40(10), p. 8846-8854, 2016.

PEREIRA, T.M.; FRANCO, D. P.; VITÓRIO, F.; AMARAL, R.C.; PONZONI, A.C.; KUMMERLE, A.E. **Microwave-assisted synthesis and pka determination of umbelliferone: an experiment for the undergraduate organic chemistry laboratory.** *Química Nova*, 41(10), p. 1205-1208, 2018.

PEREIRA, T.M.; FRANCO, D.P.; VITORIO, F.; KUMMERLE, A.E. **Coumarin Compounds in Medicinal Chemistry: Some Important Examples from the Last Year.** *Current topics in medicinal chemistry*, 18(2), p. 124-148, 2018.

PISANI, L.; CATTO, M.; DE PALMA, A.; FARINA, R.; CELLAMARE, S.; ALTOMARE, C. D. **Discovery of Potent Dual Binding Site Acetylcholinesterase Inhibitors via Homo- and Heterodimerization of Coumarin-based Moieties.** *ChemMedChem*, 12(16), p. 1349-1358, 2017.

PRINCE, M.; COMAS-HERRERA, A.; KNAPP, M.; GUERCHET, M.; KARAGIANNIDOU, M. **World Alzheimer report 2016: improving healthcare for people living with dementia: coverage, quality and costs now and in the future**, 2016.

RIDLEY, R.M.; BOWES, P.M.; BAKER, H.F.; CROW, T.J. **An involvement of acetylcholine in object discrimination learning and memory in the marmoset.** *Neuropsychologia*, 22(3), p. 253-263, 1984.

RODRIGUES, R.F. **Extração da cumarina a partir das sementes da emburana (*Torresea cearensis*) utilizando dióxido de carbono supercrítico.** Campinas/SP: Unicamp, 2005.

RYDBERG, E.H.; BRUMSHTEIN, B.; GREENBLATT, H.M.; WONG, D.M.; SHAYA, D.; WILLIAMS, L.D.; CARLIER, P.R.; PANG, Y.P.; SILMAN, I.; SUSSMAN, J.L. **Complexes of Alkylene-Linked Tacrine Dimers with *Torpedo californica* Acetylcholinesterase: Binding of Bis5-Tacrine Produces a Dramatic Rearrangement in the Active-Site Gorge.** *Journal of Medicinal Chemistry*, 49, p. 5491-5500, 2006.

SAIDO, T.; LEISSRING, M. A. **Proteolytic degradation of amyloid  $\beta$ -protein.** *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 2(6), p. a006379, 2012.

SALGUEIRO, F. B.; CASTRO, R. N. **Comparação entre a composição química e capacidade antioxidante de diferentes extratos de própolis verde.** *Química Nova*, 39(10), p. 1192-1199, 2016

SALOMONE, S.; CARACI, F.; LEGGIO, G. M.; FEDOTOVA, J.; DRAGO, F. **New pharmacological strategies for treatment of Alzheimer's disease: focus on disease modifying drugs.** *British journal of clinical pharmacology*, 73(4), p. 504-517, 2012.

SMYTHIES, J.; DE LANTREMANGE, M.O. **The nature and function of digital information compression mechanisms in the brain and in digital television technology.** *Frontiers in systems neuroscience*, 10, p. 40, 2016.

SOREGHAN, B.; KOSMOSKI, J.; GLABE, C. **Surfactant properties of Alzheimer's A beta peptides and the mechanism of amyloid aggregation.** *Journal of Biological Chemistry*, 269(46), p. 28551-28554, 1994.

STEWART, J.J.P. **Optimization of Parameters for Semiempirical Methods V: Modification of NDDO approximations and application to 70 elements.** *Journal of Molecular Modeling*, 13, p. 1173-1213, 2007.

SUN, Q.; PENG, D. Y.; YANG, S. G.; ZHU, X. L.; YANG, W. C.; YANG, G. F. **Syntheses of coumarin–tacrine hybrids as dual-site acetylcholinesterase inhibitors and their activity against butylcholinesterase, A $\beta$  aggregation, and  $\beta$ -secretase.** *Bioorganic & medicinal chemistry*, 22(17), p. 4784-4791, 2014.

SYMEONIDIS, T.; CHAMILOS, M.; LITINA, D. J. H.; KALLITSAKIS, M.; LITINAS, K. E. **Synthesis of hydroxycoumarins and hydroxybenzo[f]- or [h]coumarins as lipid peroxidation inhibitors.** *Bioorganic & medicinal chemistry letters*, 19(4), p. 1139–1142, 2009.

TERRY, A.V.; BUCCAFUSCO, J.J. **The cholinergic hypothesis of age and Alzheimer's disease-related cognitive deficits: recent challenges and their implications for novel drug development.** *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 306(3), p. 821-827, 2003.

TIWARI, P.; DWIVEDI, S.; SINGH, M. P.; MISHRA, R.; CHANDY, A. **Basic and modern concepts on cholinergic receptor: A review.** *Asian Pacific journal of tropical disease*, 3(5), p. 413-420, 2013.

TRKOVNIK, M.; IVEZIC, Z. J. **Syntheses of some new coumarin-quinolone carboxylic acids.** *Journal of Heterocyclic Chemistry*, 37(1), p. 137-141, 2000.

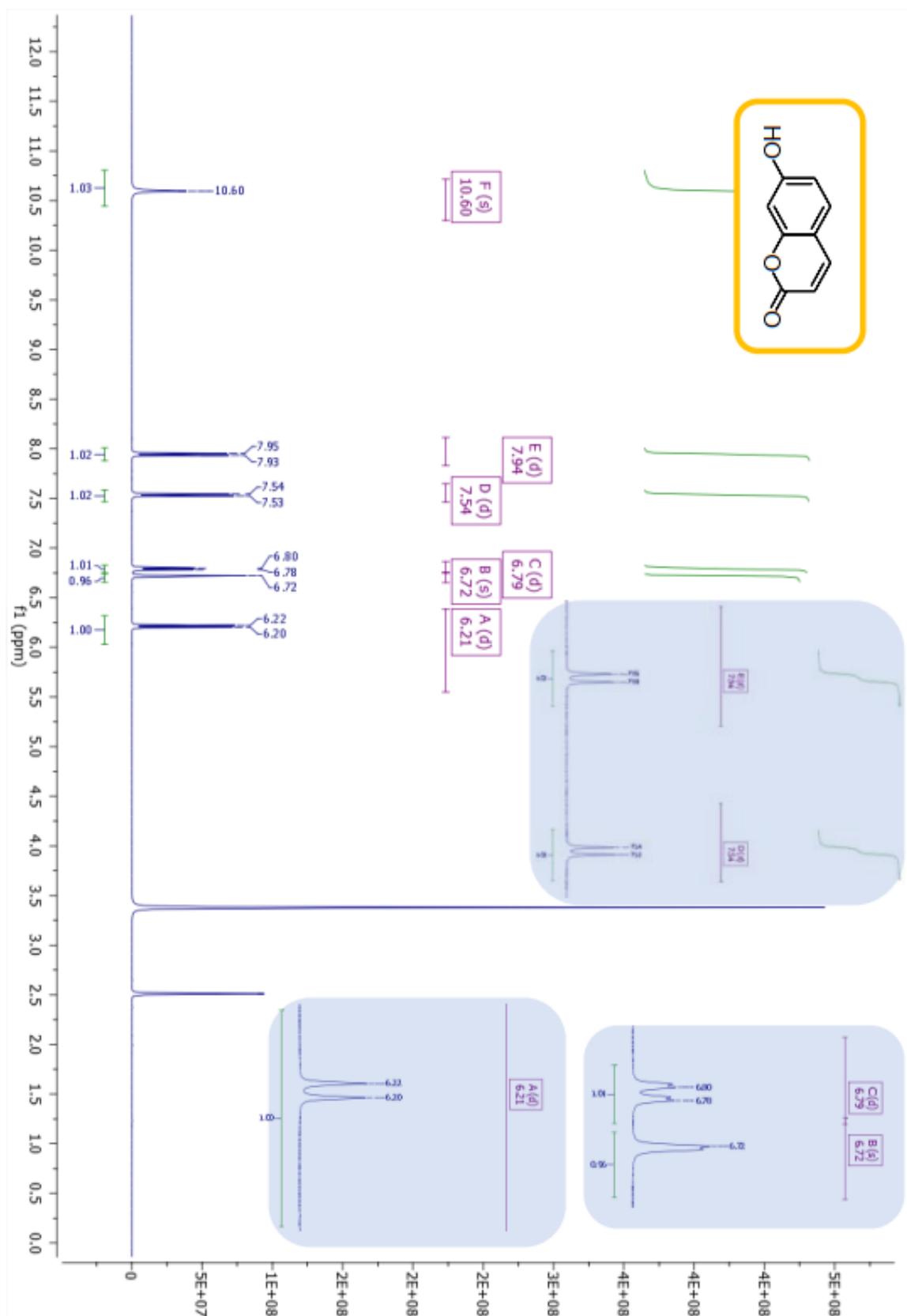
WANG, X., TIAN, J., YONG, K. T., ZHU, X., LIN, M. C. M., JIANG, W., LI, J., HUANG, Q. LIN, G. **Immunotoxicity assessment of CdSe/ZnS quantum dots in macrophages, lymphocytes and BALB/c mice.** *Journal of nanobiotechnology*, 14(1), p. 10, 2016.

XICOTA, L.; RODRÍGUEZ-MORATÓ, J.; DIERSSEN, M.; DE LA TORRE, R. **Potential role of (-)-epigallocatechin-3-gallate (EGCG) in the secondary prevention of Alzheimer disease.** *Current drug targets*, 18(2), p.174-195, 2017.

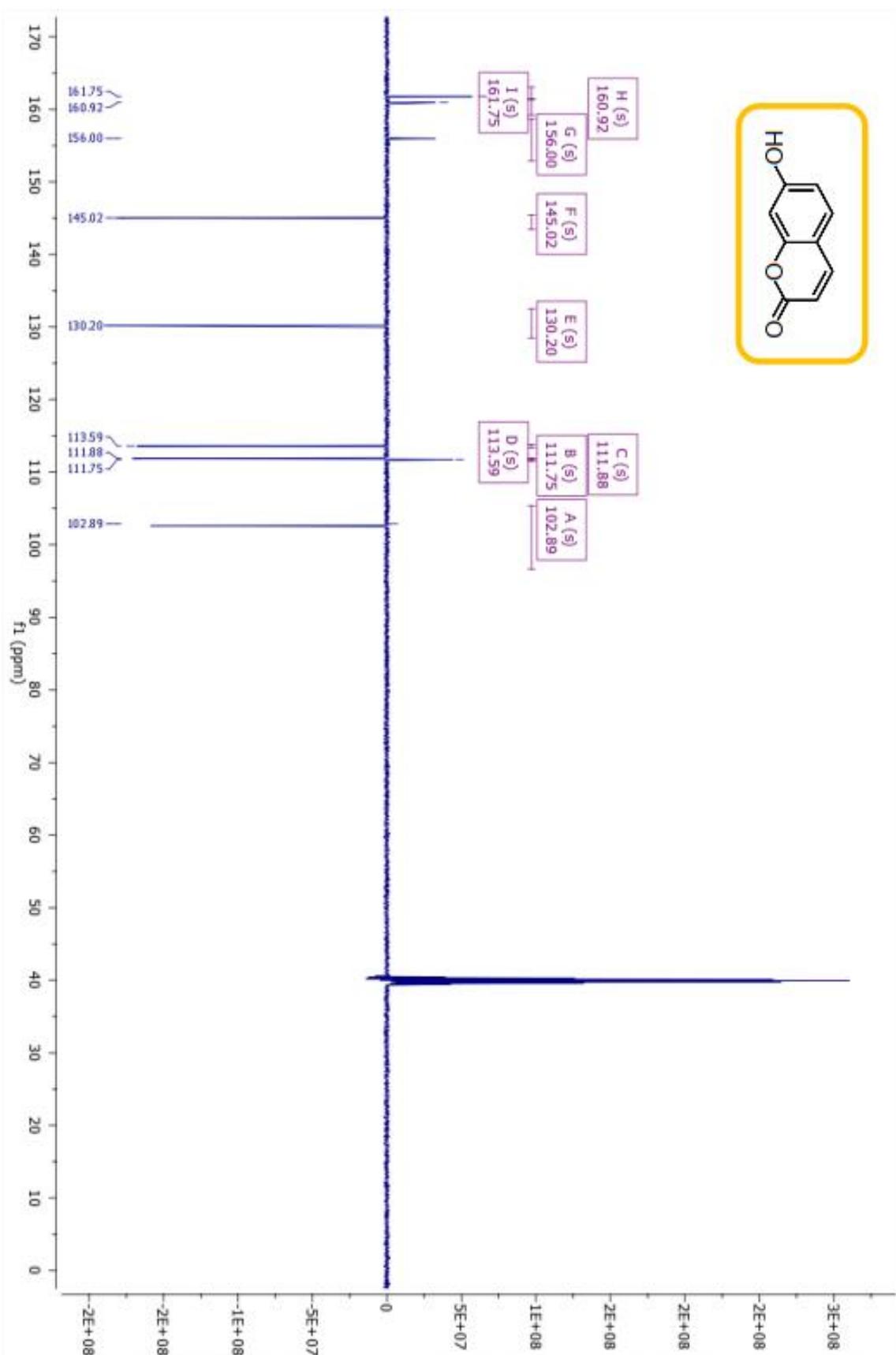
YAMADA, M.; CHIBA, T.; SASABE, J., NAWA, M., TAJIMA, H., NIIKURA, T.; NISHIMOTO, I. **Implanted cannula-mediated repetitive administration of A $\beta$ 25–35 into the mouse cerebral ventricle effectively impairs spatial working memory.** *Behavioural brain research*, 164(2), p. 139-146, 2005.

## 7. ANEXOS

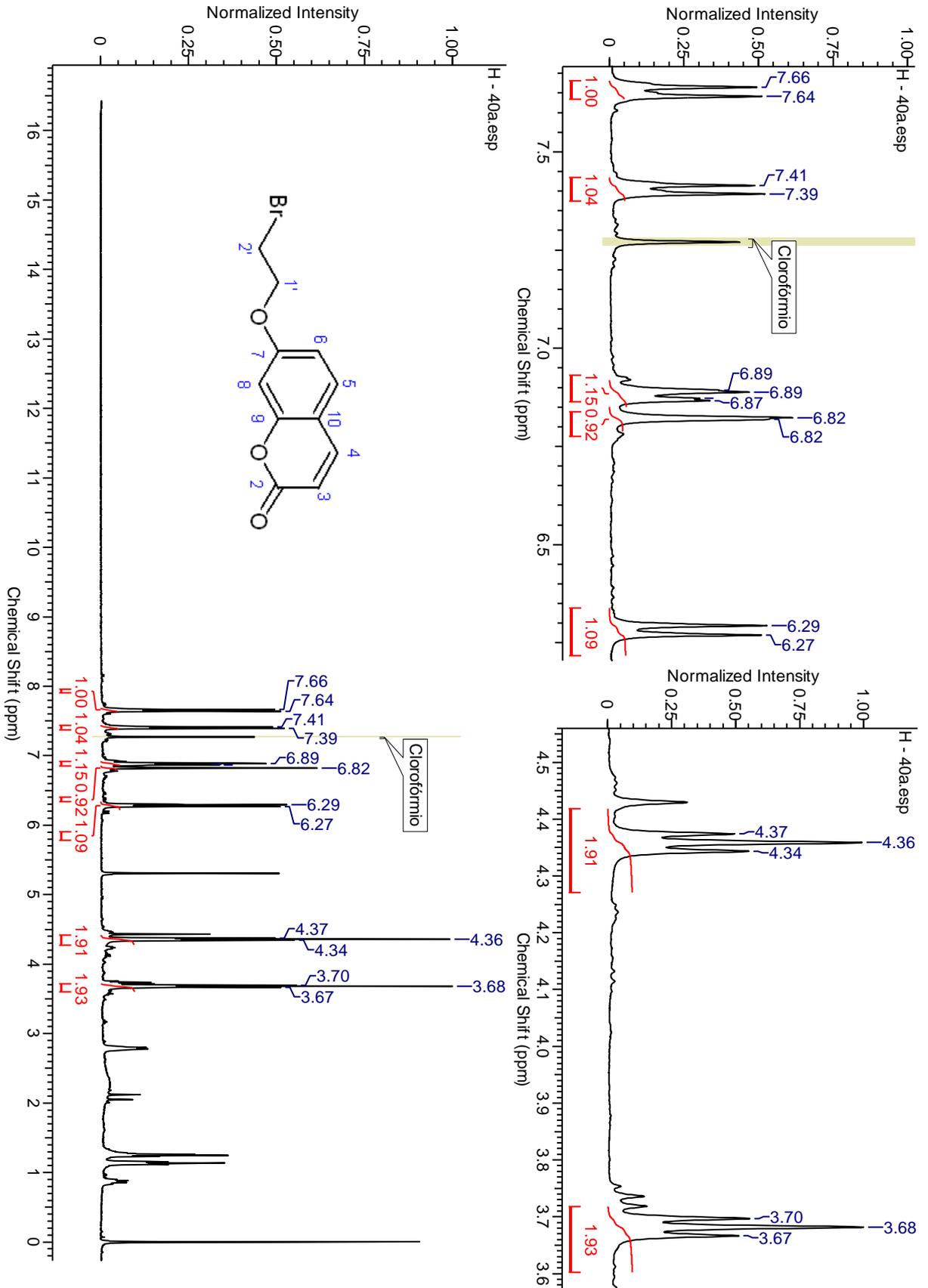
### Anexo 1. RMN $^1\text{H}$ (500 MHz) para 38



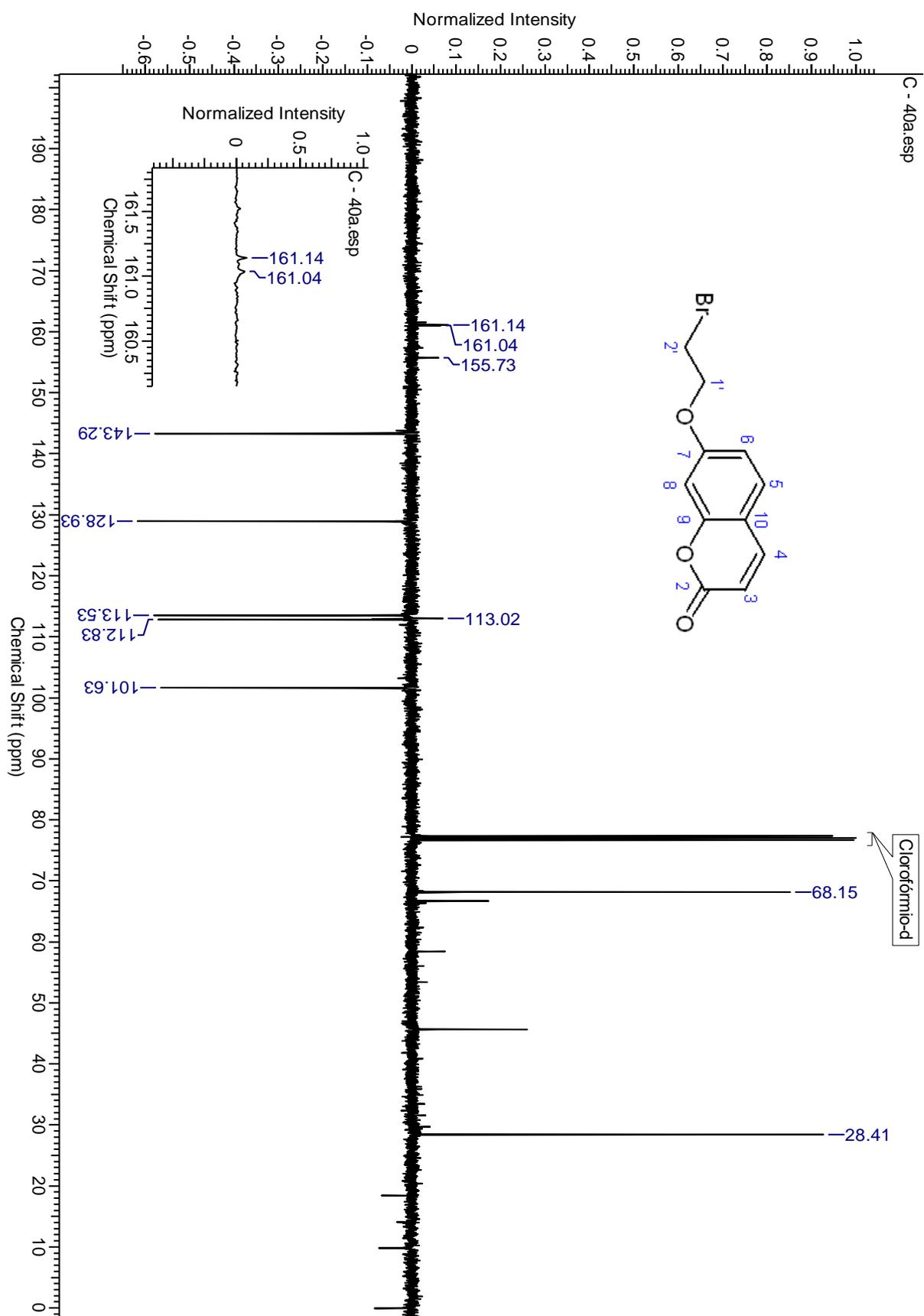
Anexo 2. RMN  $^{13}\text{C}$  (500 MHz) para 38



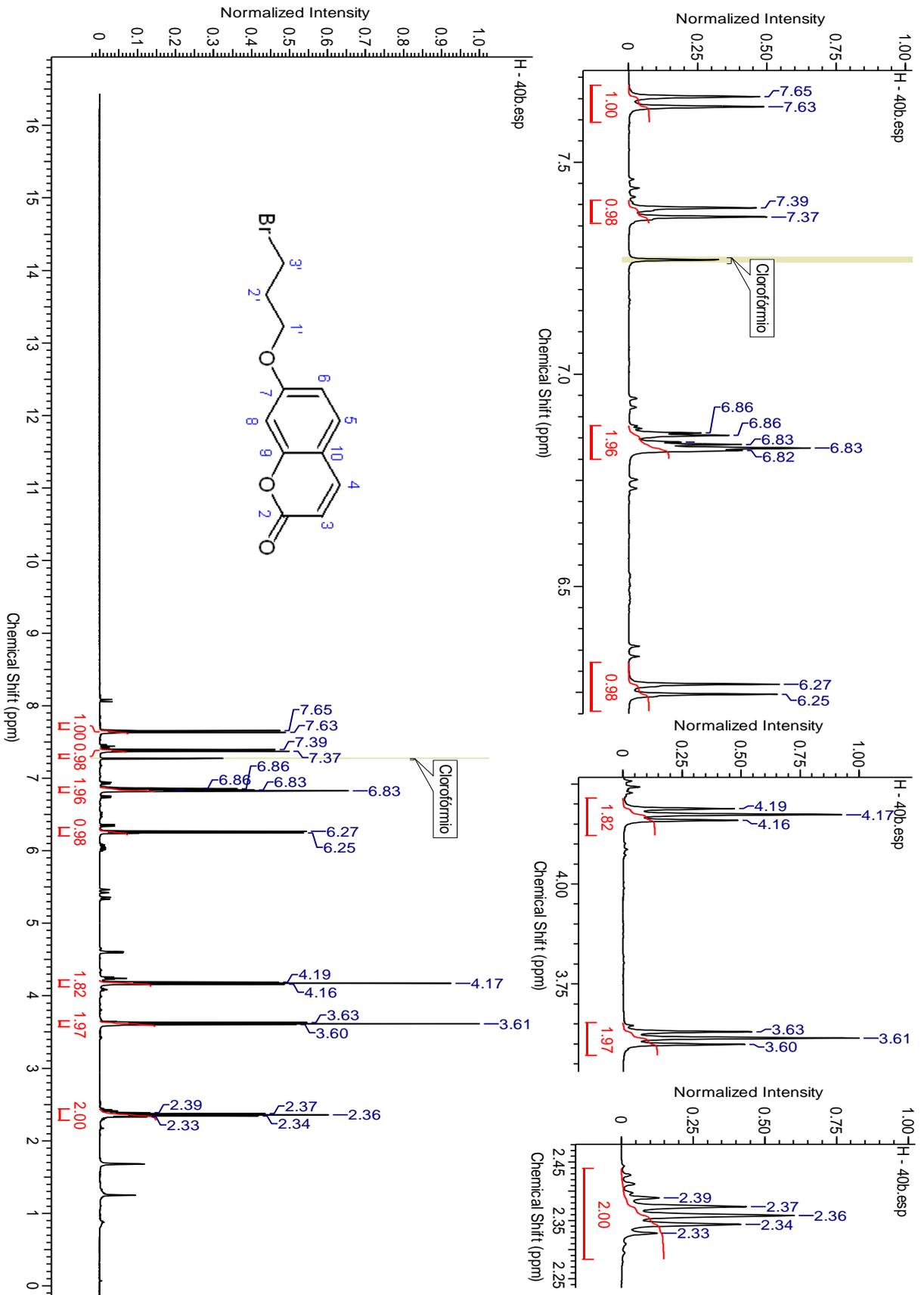
Anexo 3. RMN <sup>1</sup>H (400 MHz) para 40a



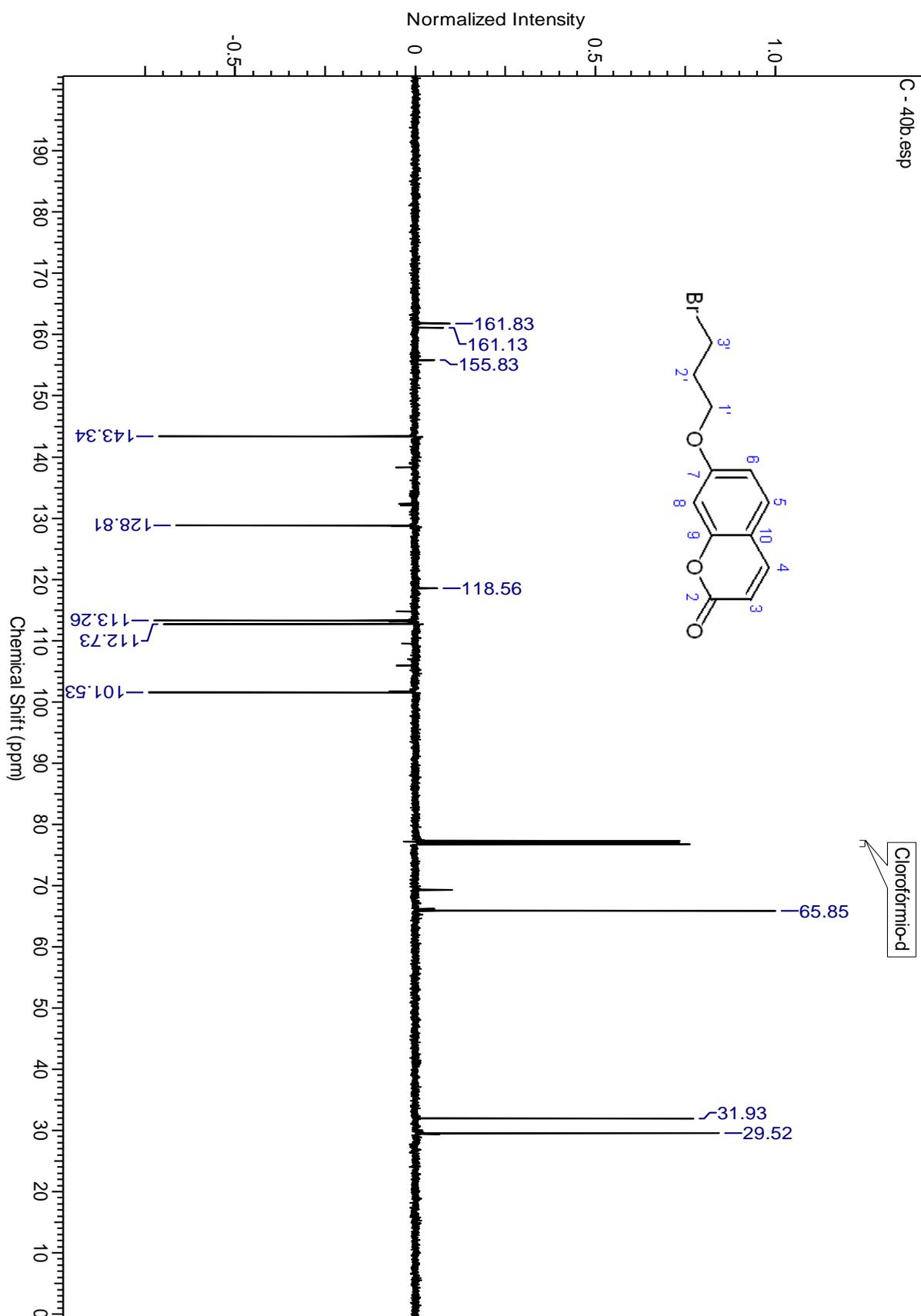
# Anexo 4. RMN <sup>13</sup>C (100 MHz) para 40a



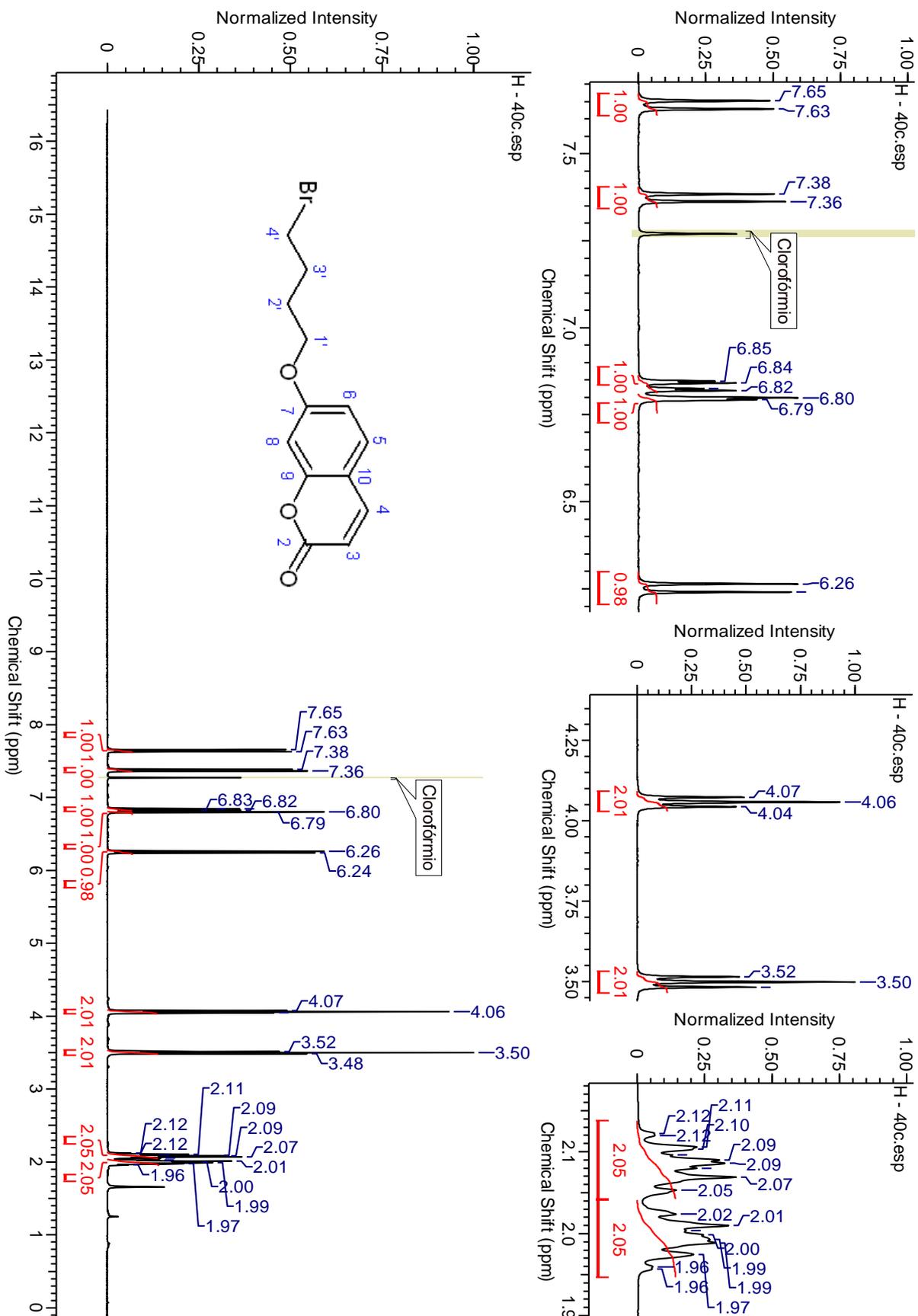
Anexo 5. RMN <sup>1</sup>H (400 MHz) para 40b



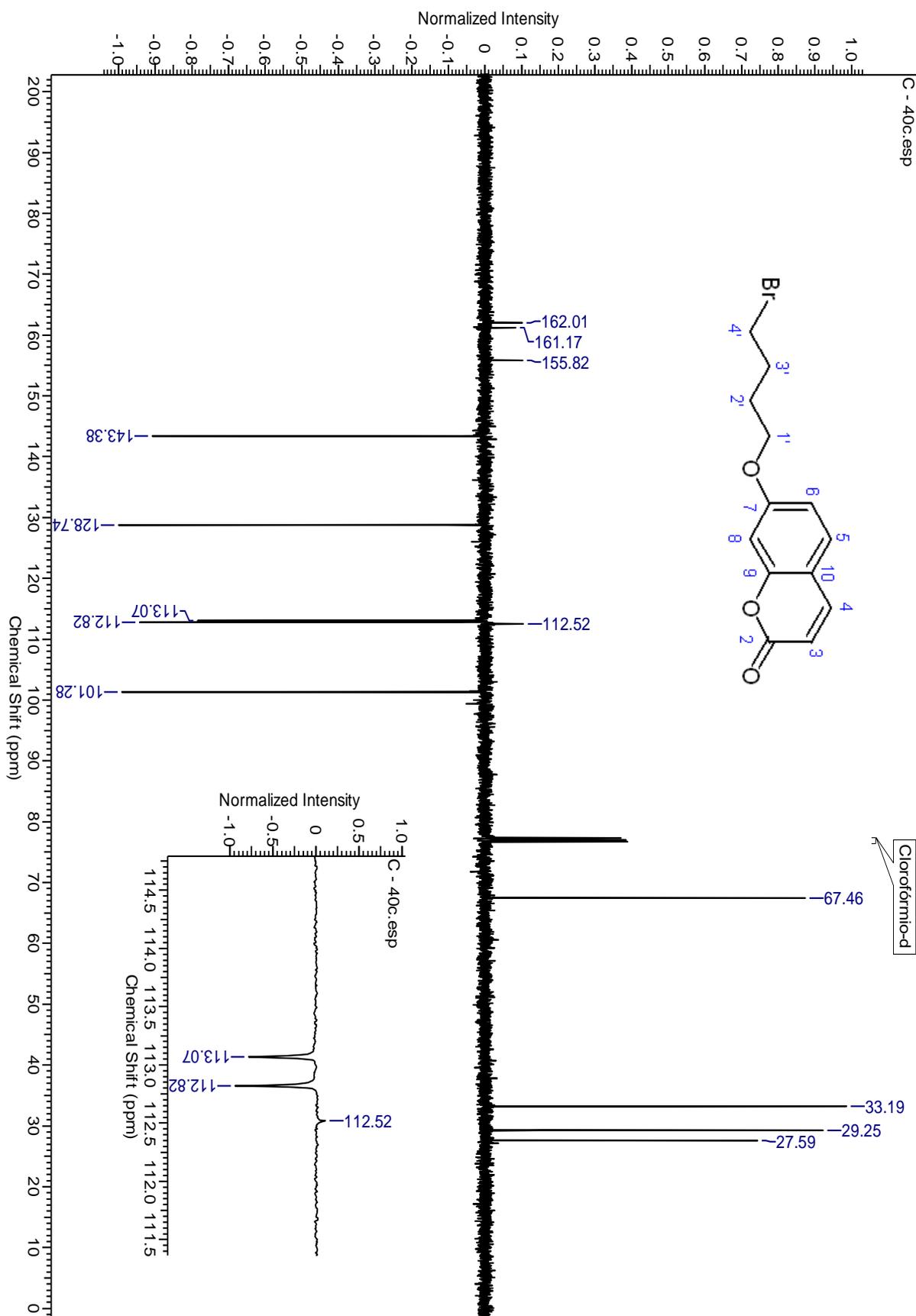
# Anexo 6. RMN <sup>13</sup>C (100 MHz) para 40b



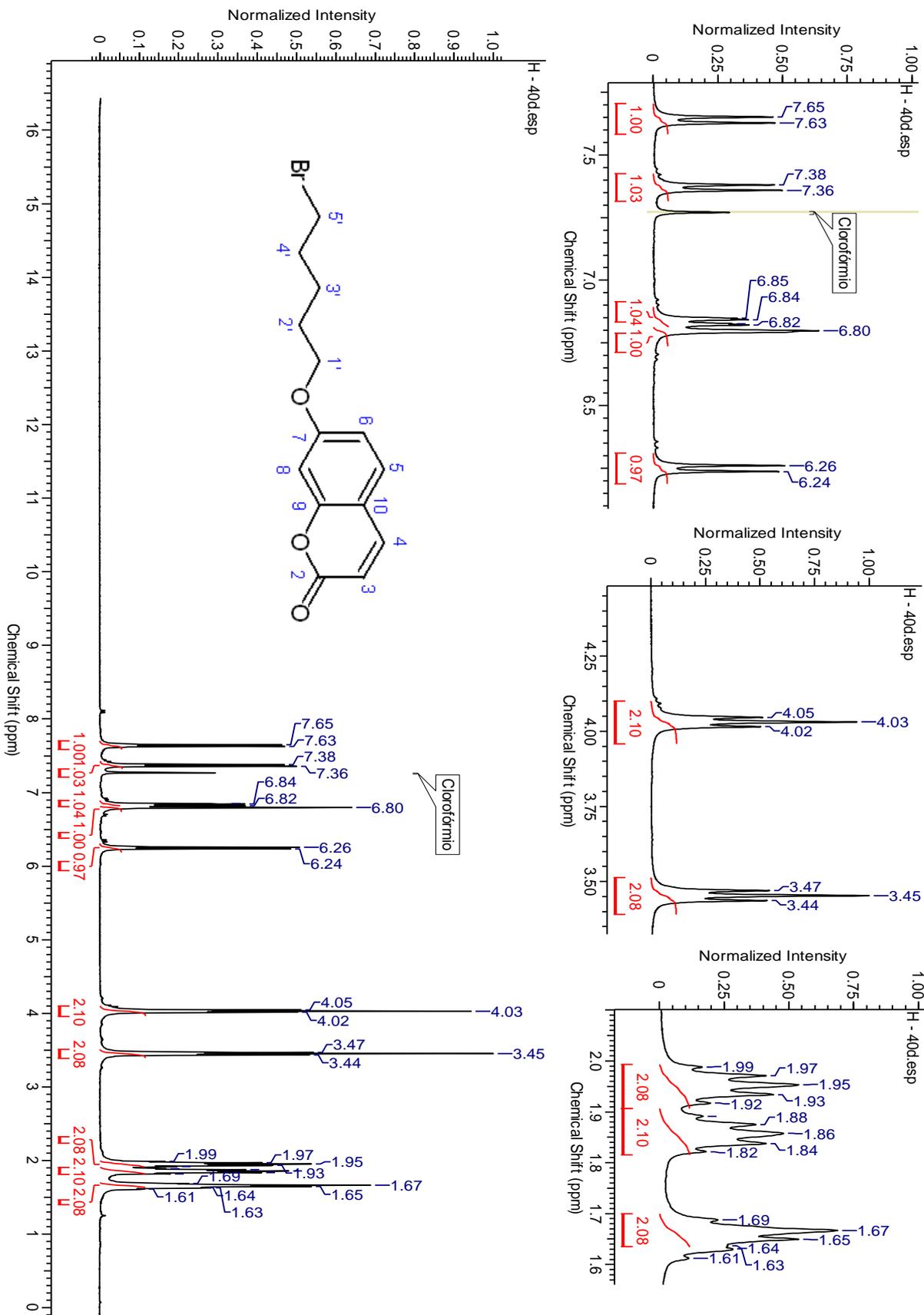
Anexo 7. RMN <sup>1</sup>H (400 MHz) para 40c



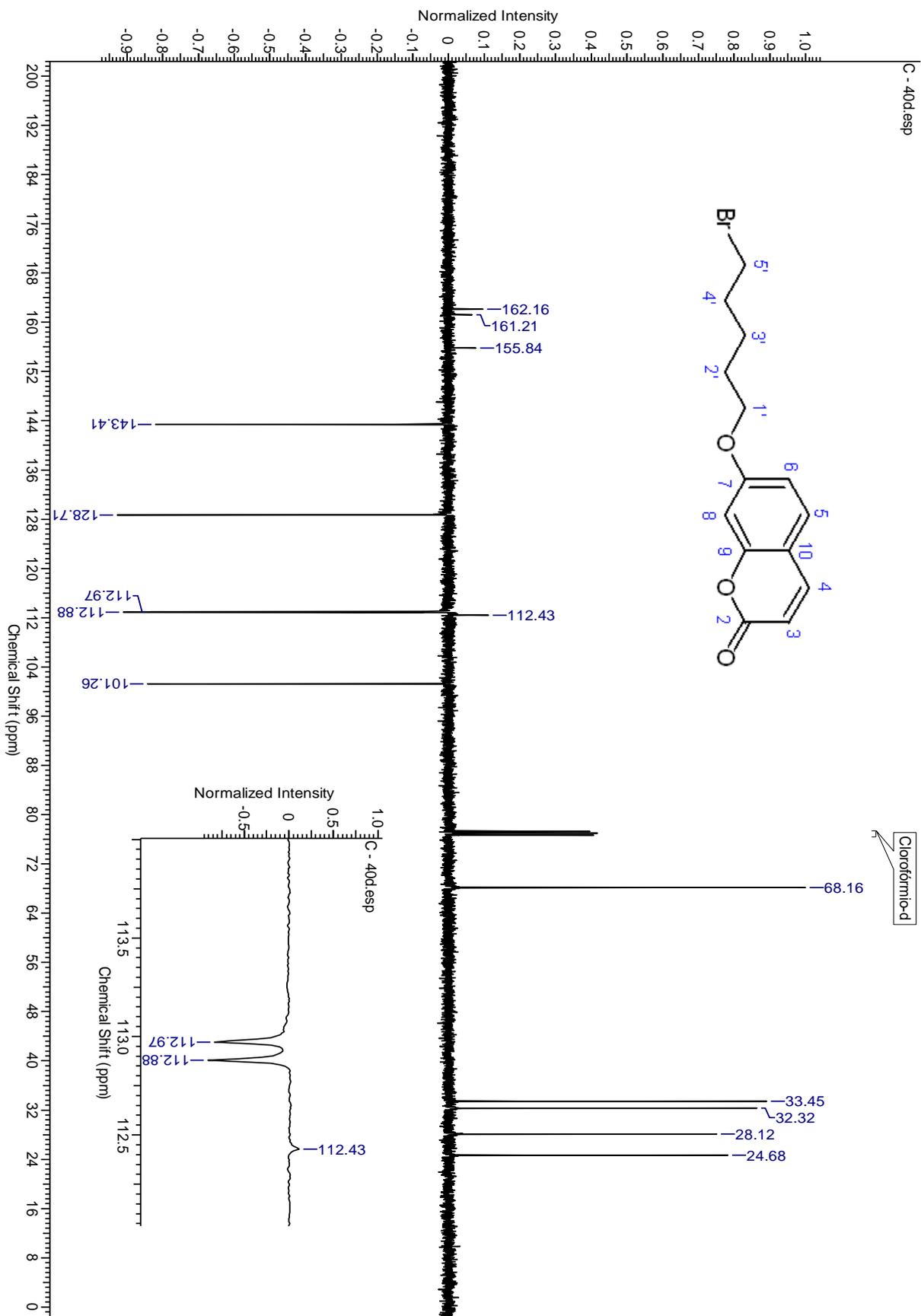
Anexo 8. RMN <sup>13</sup>C (100 MHz) para 40c



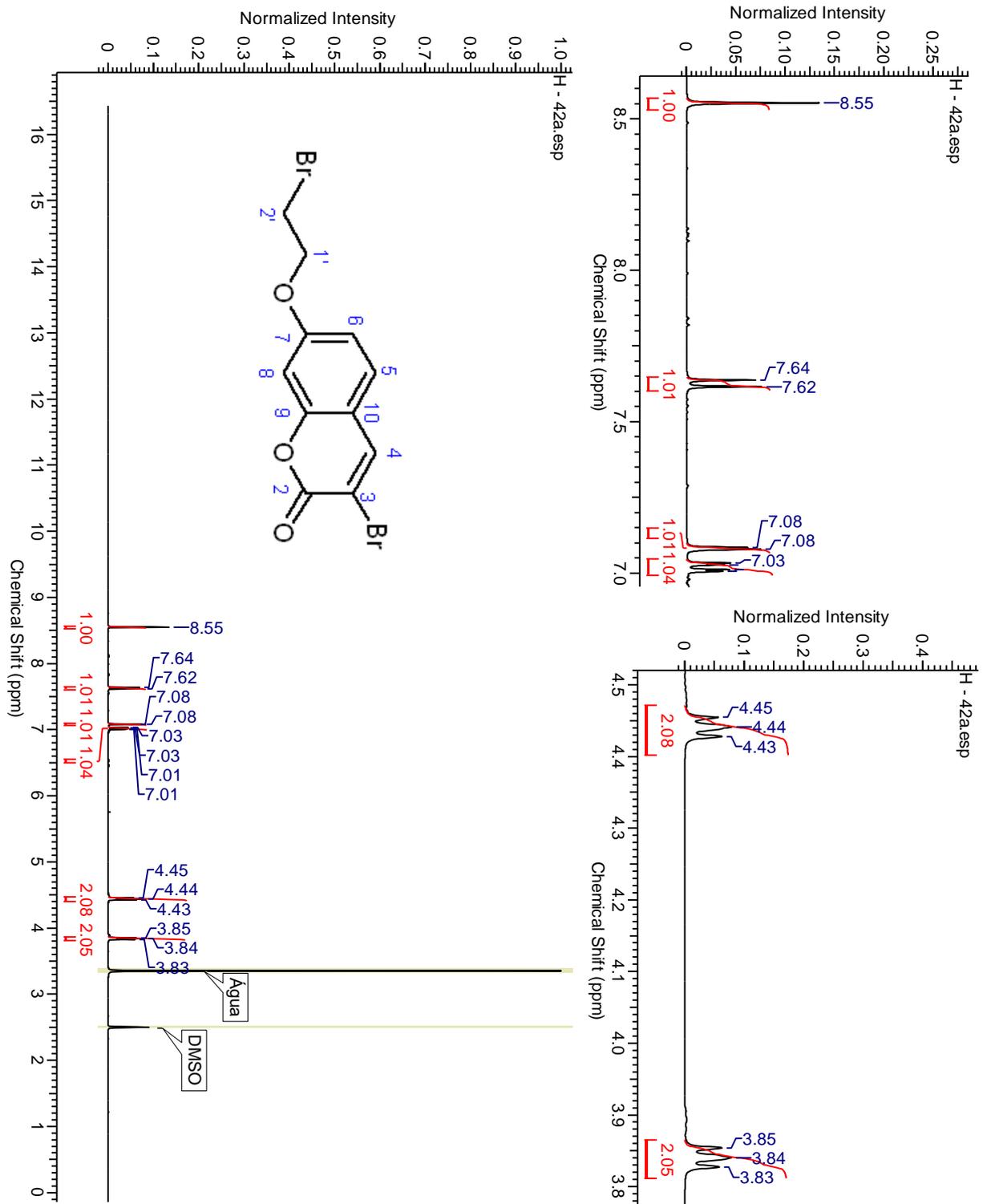
Anexo 9. RMN <sup>1</sup>H (400 MHz) para 40d



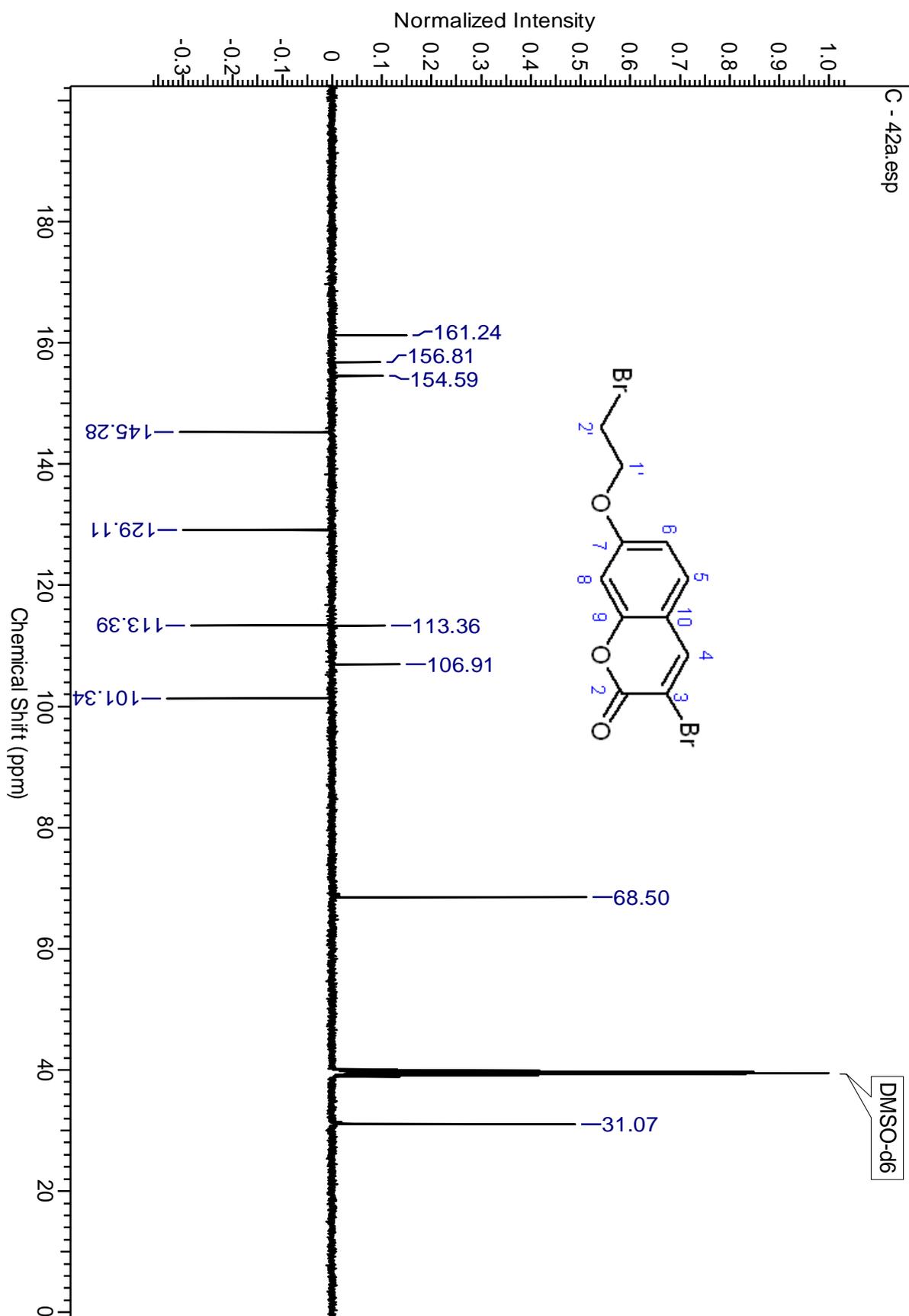
Anexo 10. RMN <sup>13</sup>C (100 MHz) para 40d



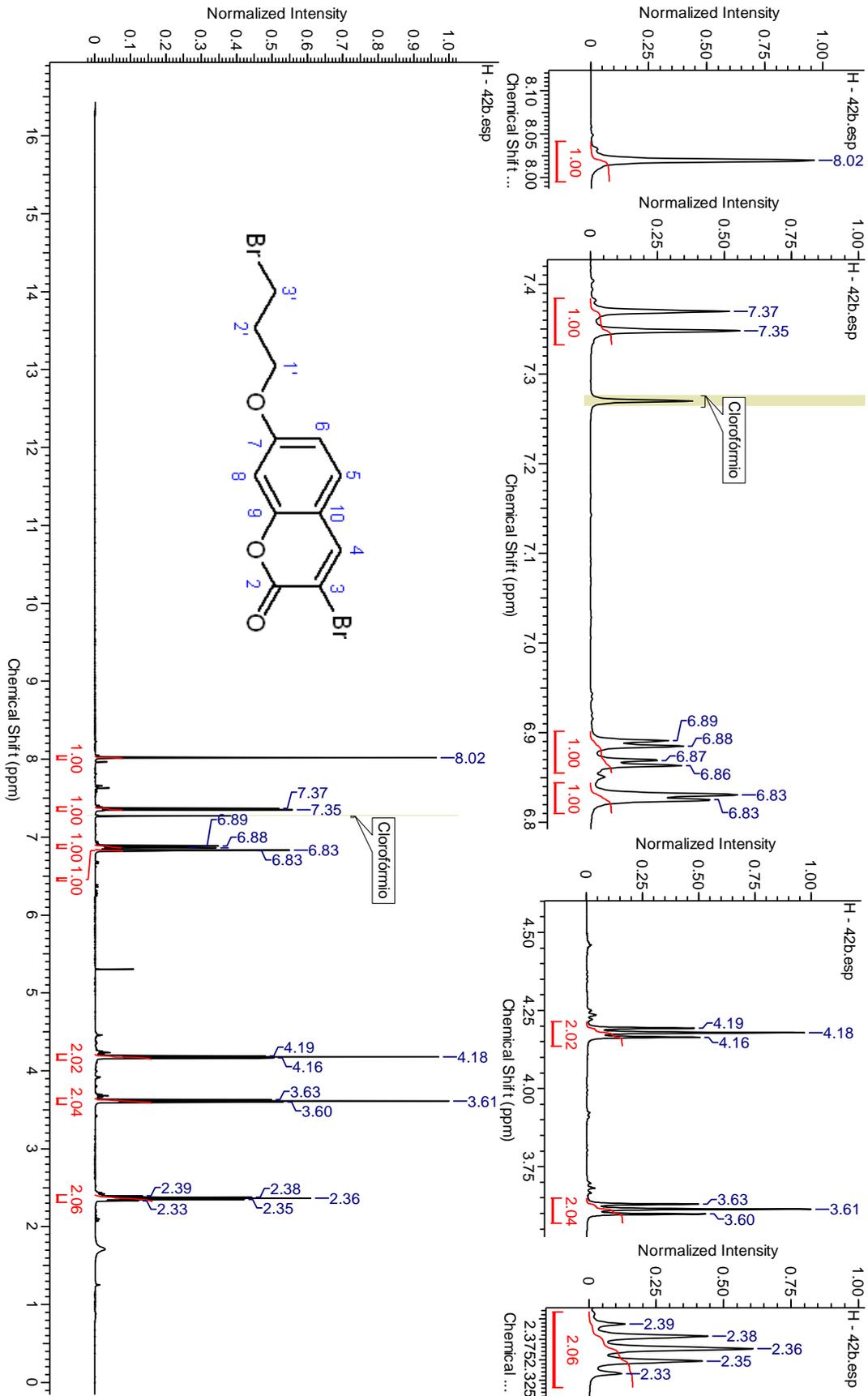
Anexo 11. RMN <sup>1</sup>H (400 MHz) para 42a



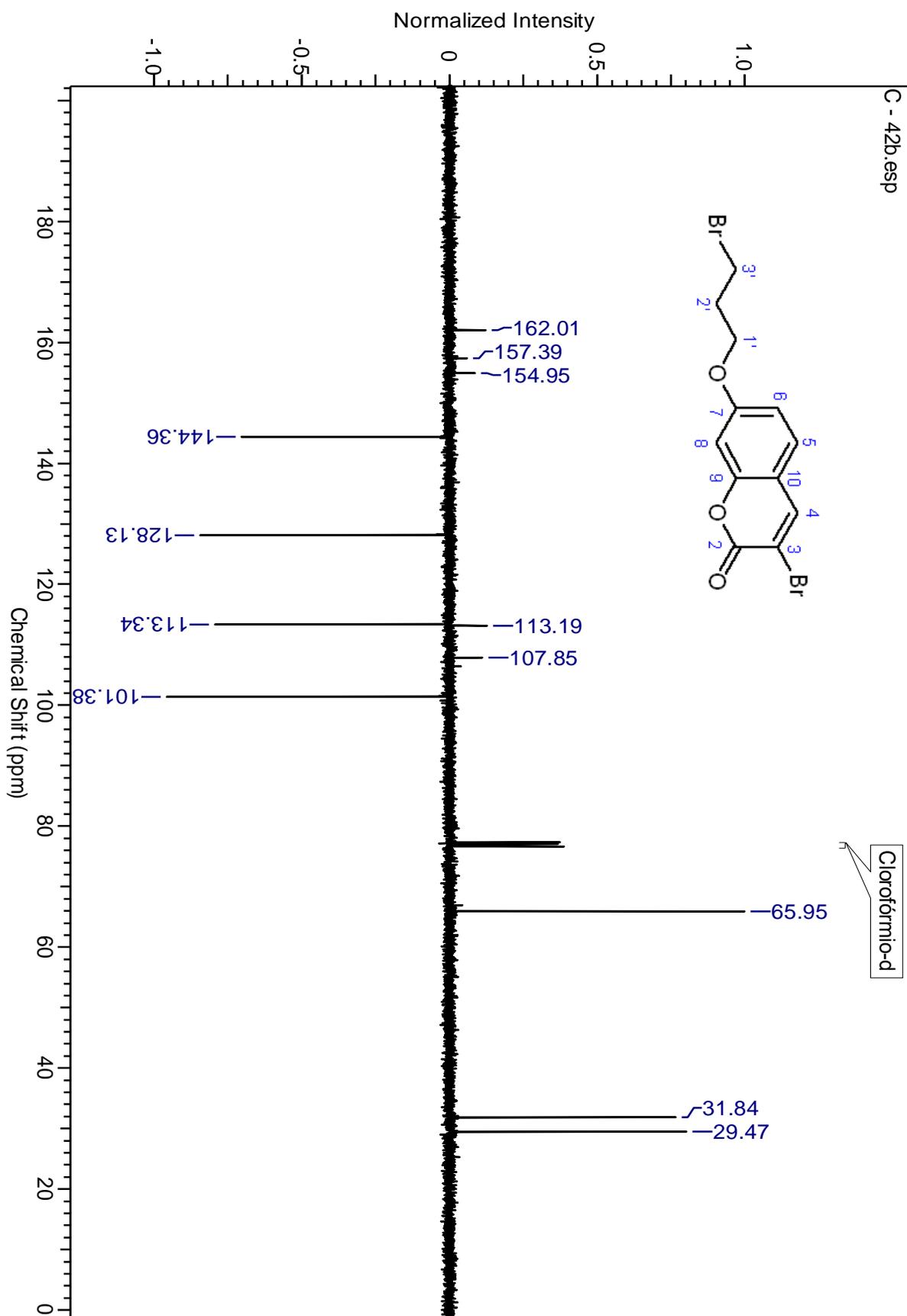
Anexo 12. RMN  $^{13}\text{C}$  (100 MHz) para 42a



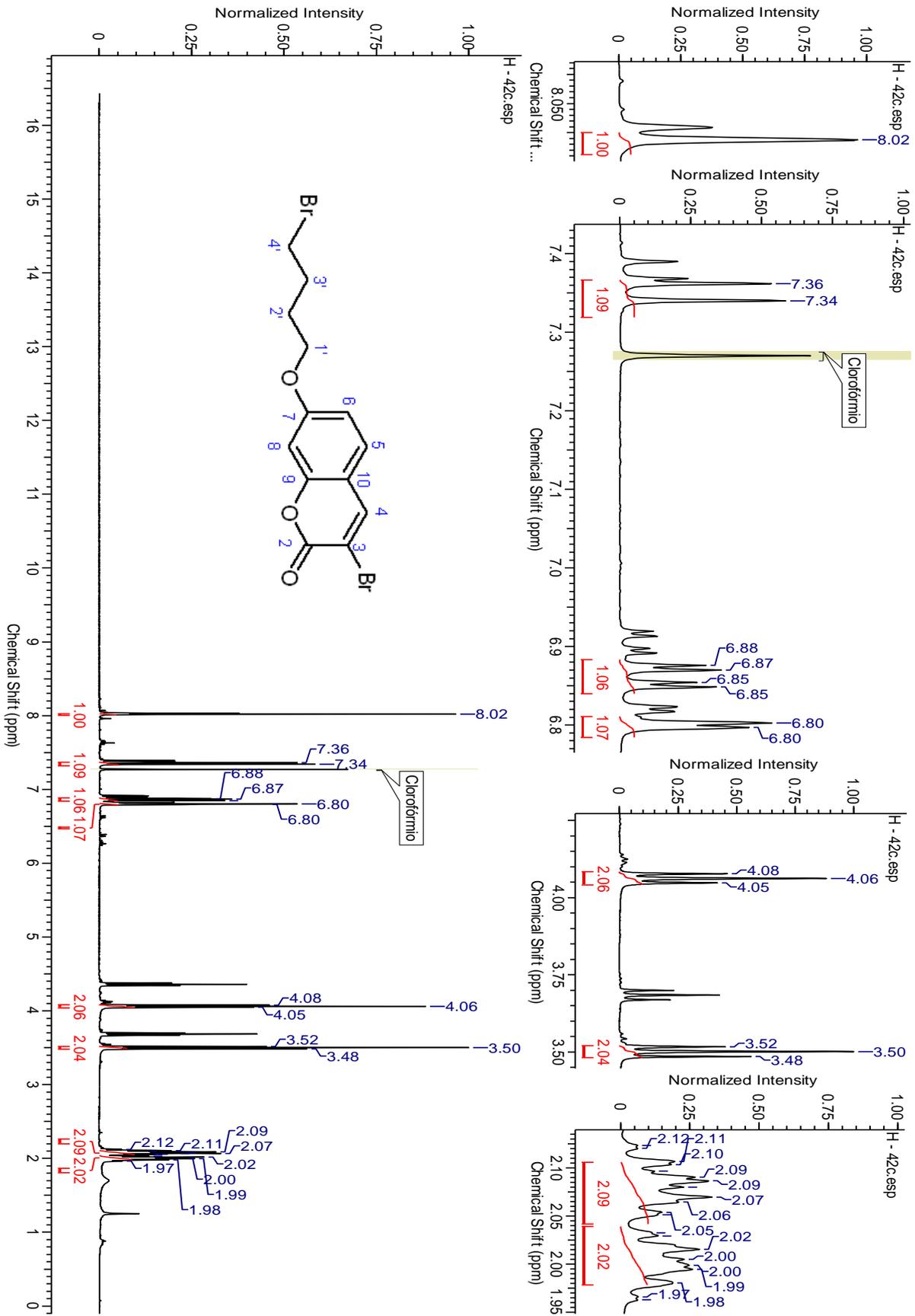
Anexo 13. RMN <sup>1</sup>H (400 MHz) para 42b



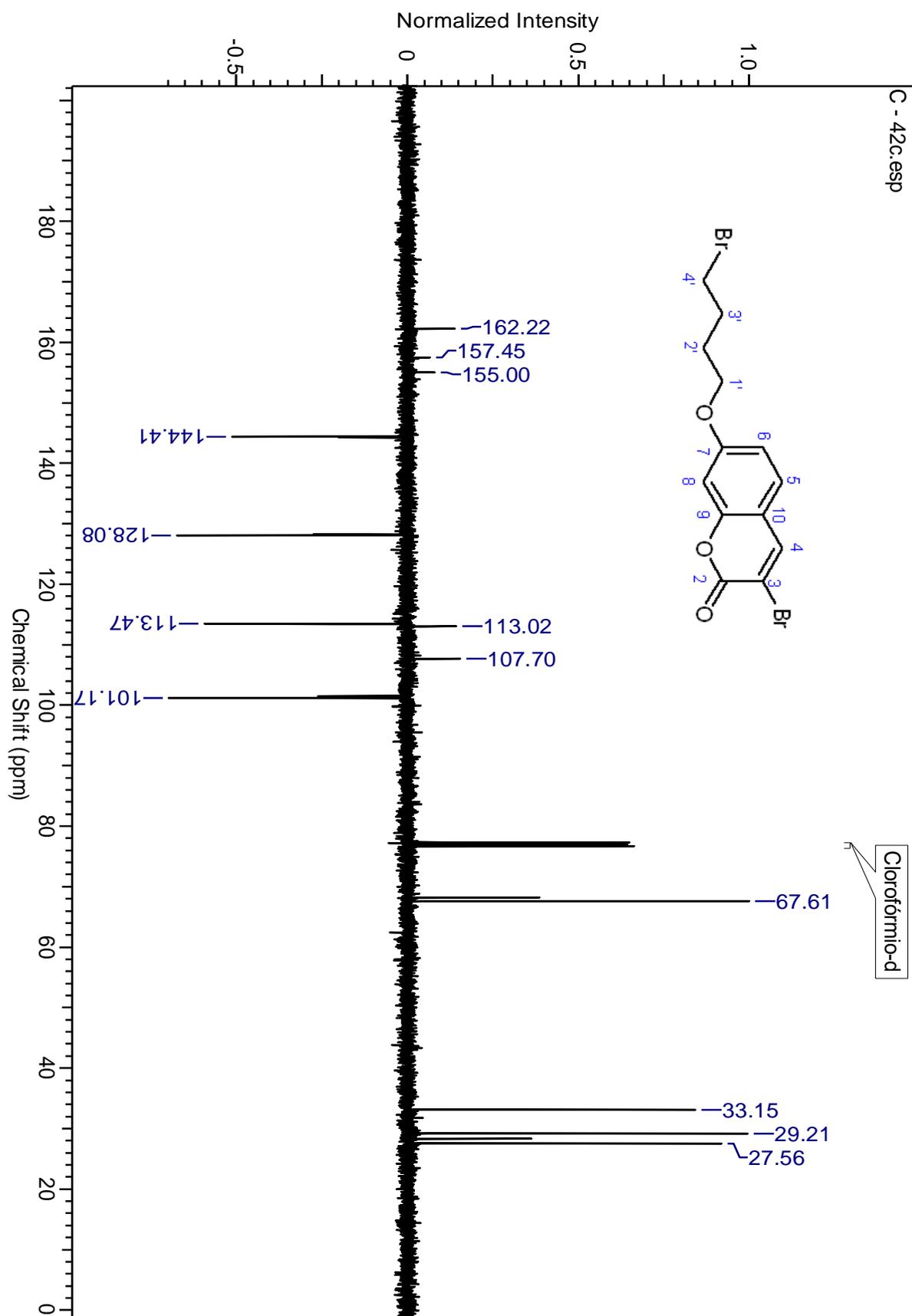
Anexo 14. RMN  $^{13}\text{C}$  (100 MHz) para 42b



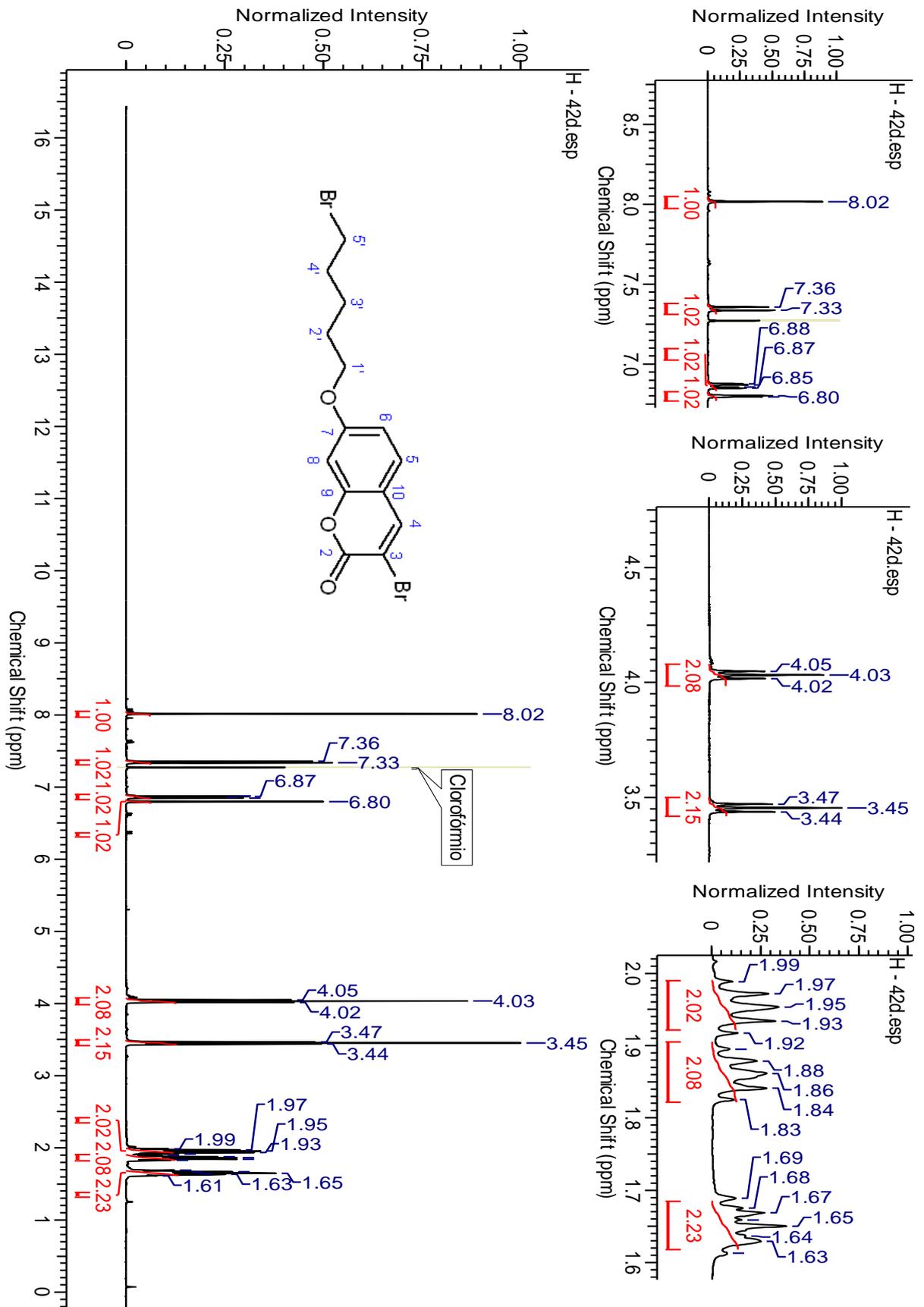
Anexo 15. RMN <sup>1</sup>H (400 MHz) para 42c



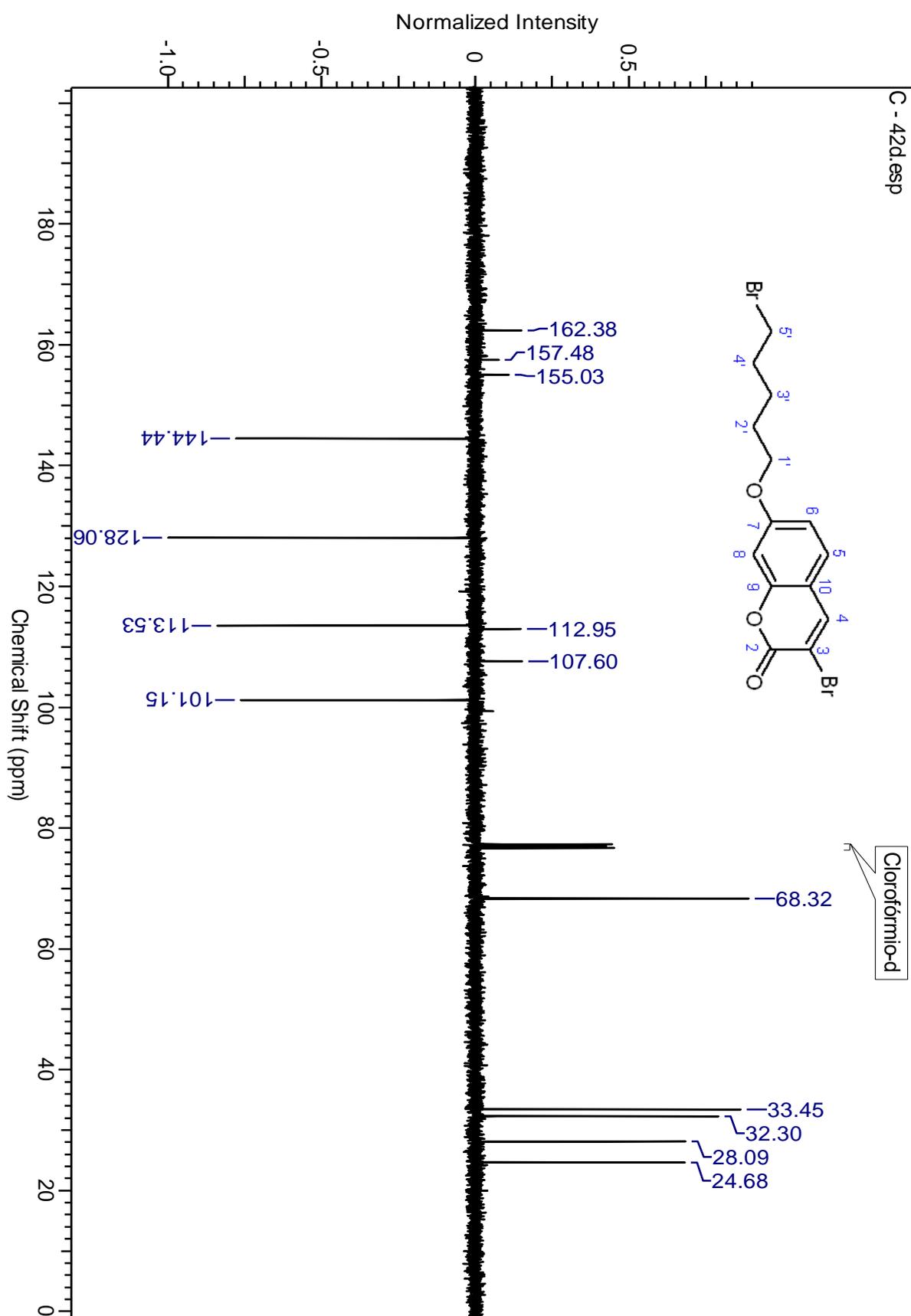
Anexo 16. RMN  $^{13}\text{C}$  (100 MHz) para 42c



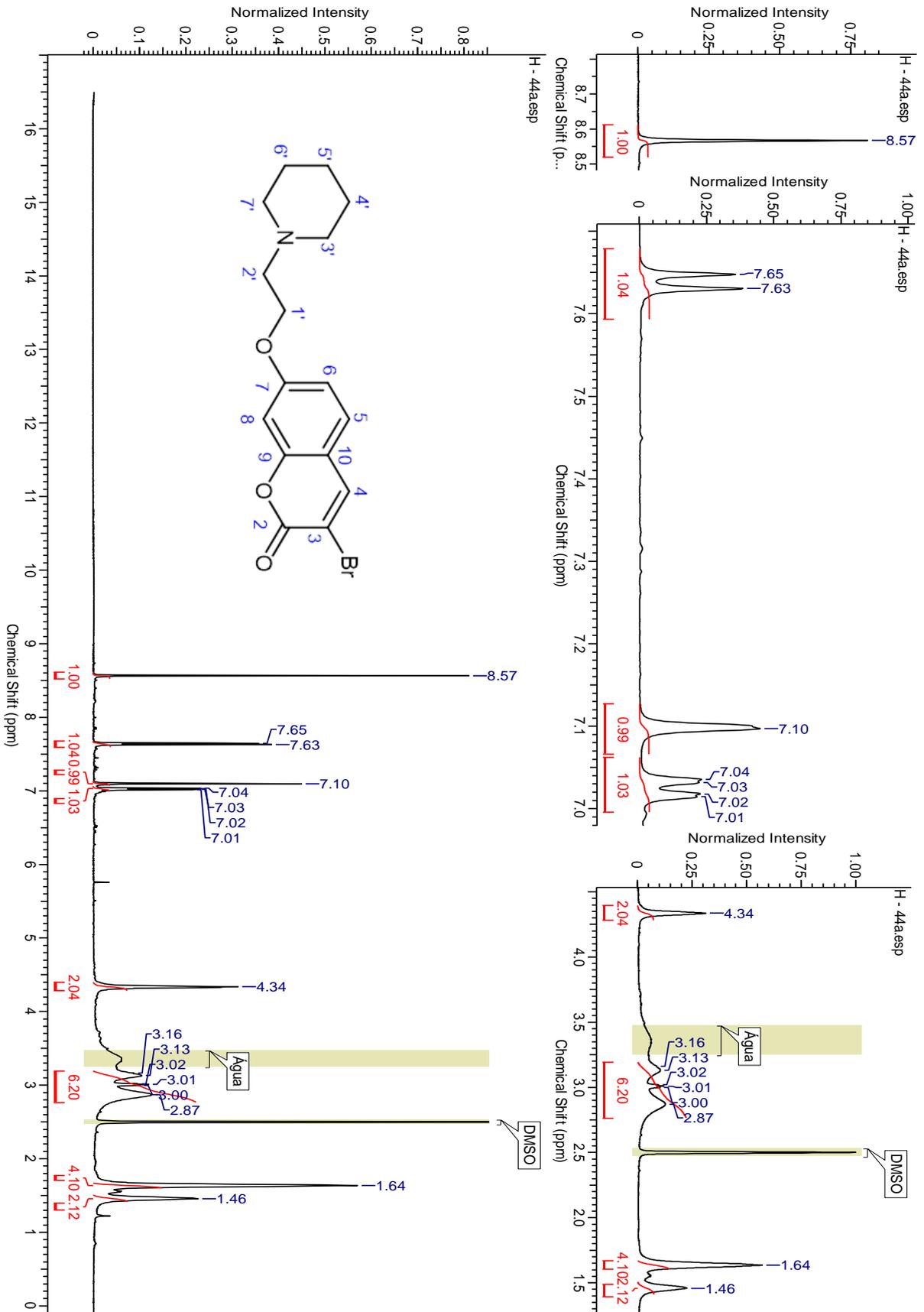
Anexo 17. RMN <sup>1</sup>H (400 MHz) para 42d



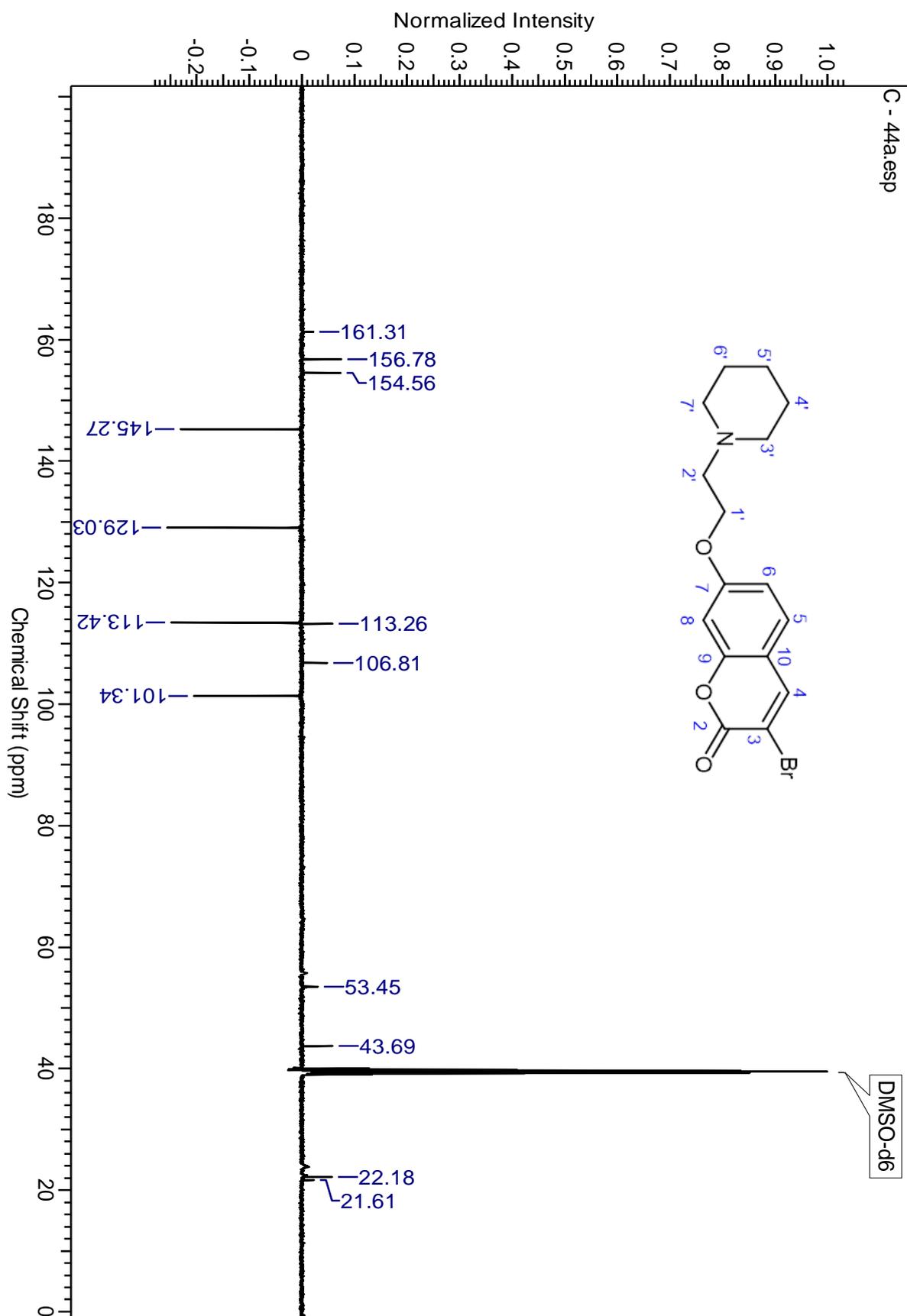
Anexo 18. RMN <sup>13</sup>C (100 MHz) para 42d



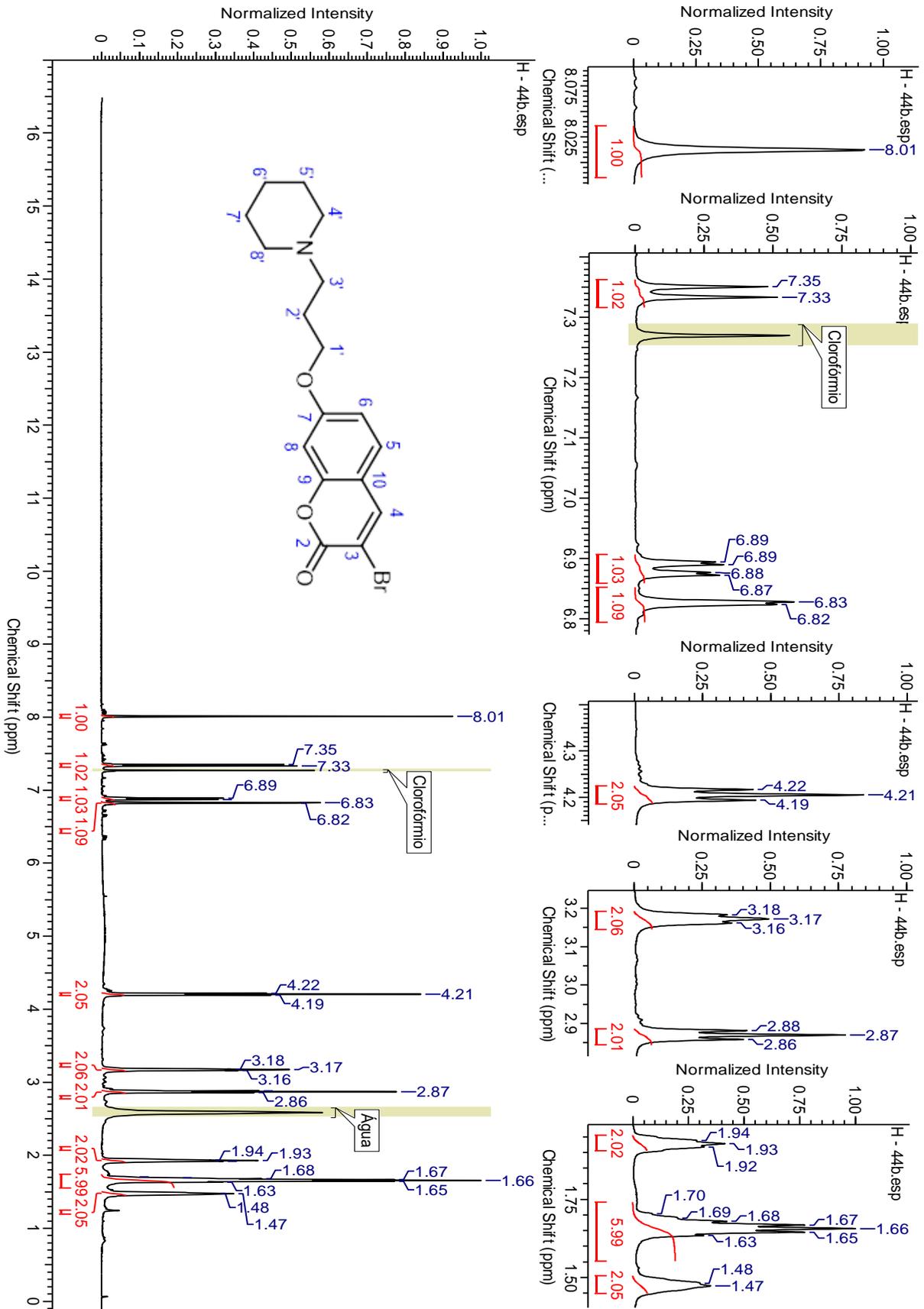
Anexo 19. RMN <sup>1</sup>H (500 MHz) para 44a



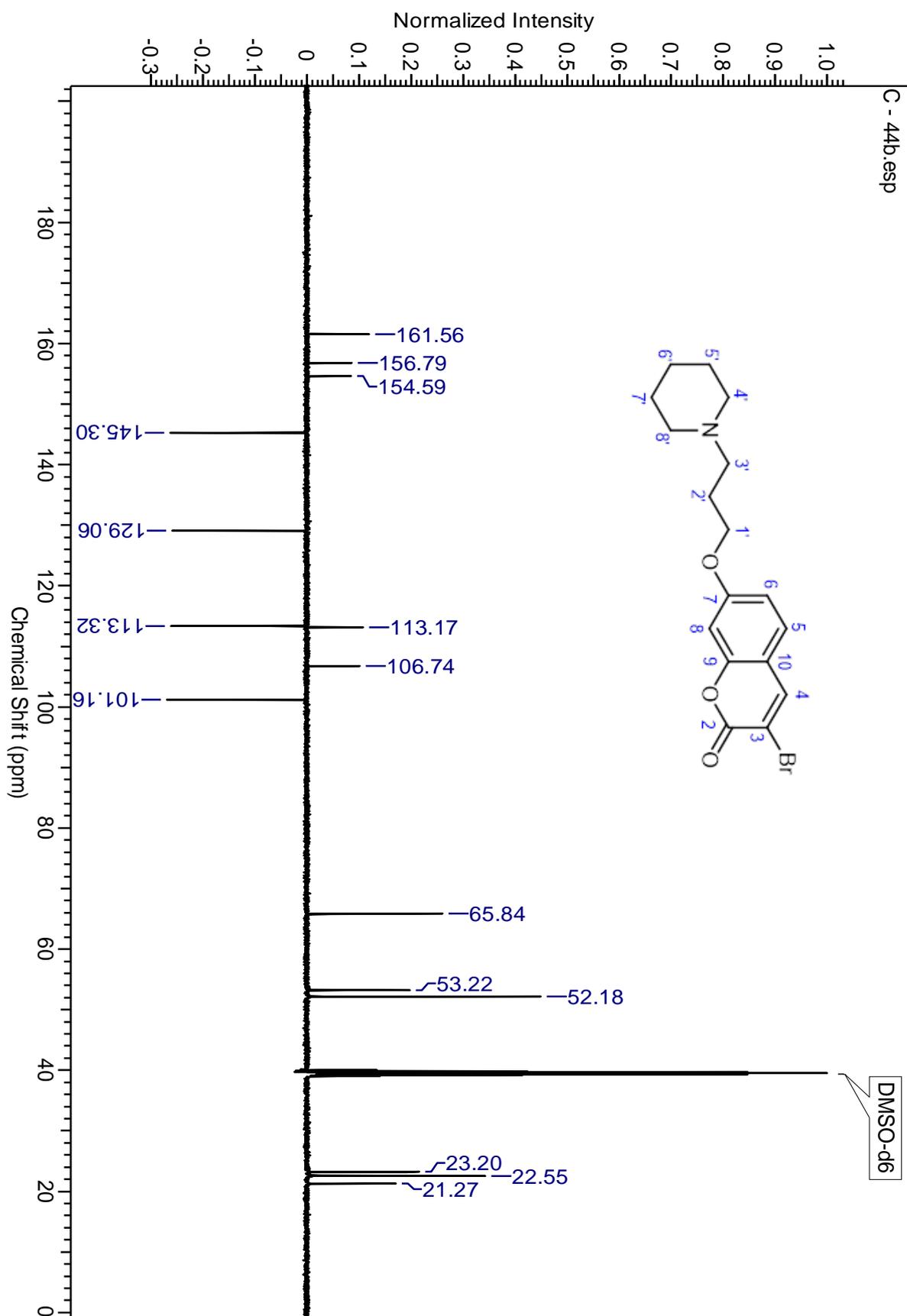
Anexo 20. RMN  $^{13}\text{C}$  (125 MHz) para 44a



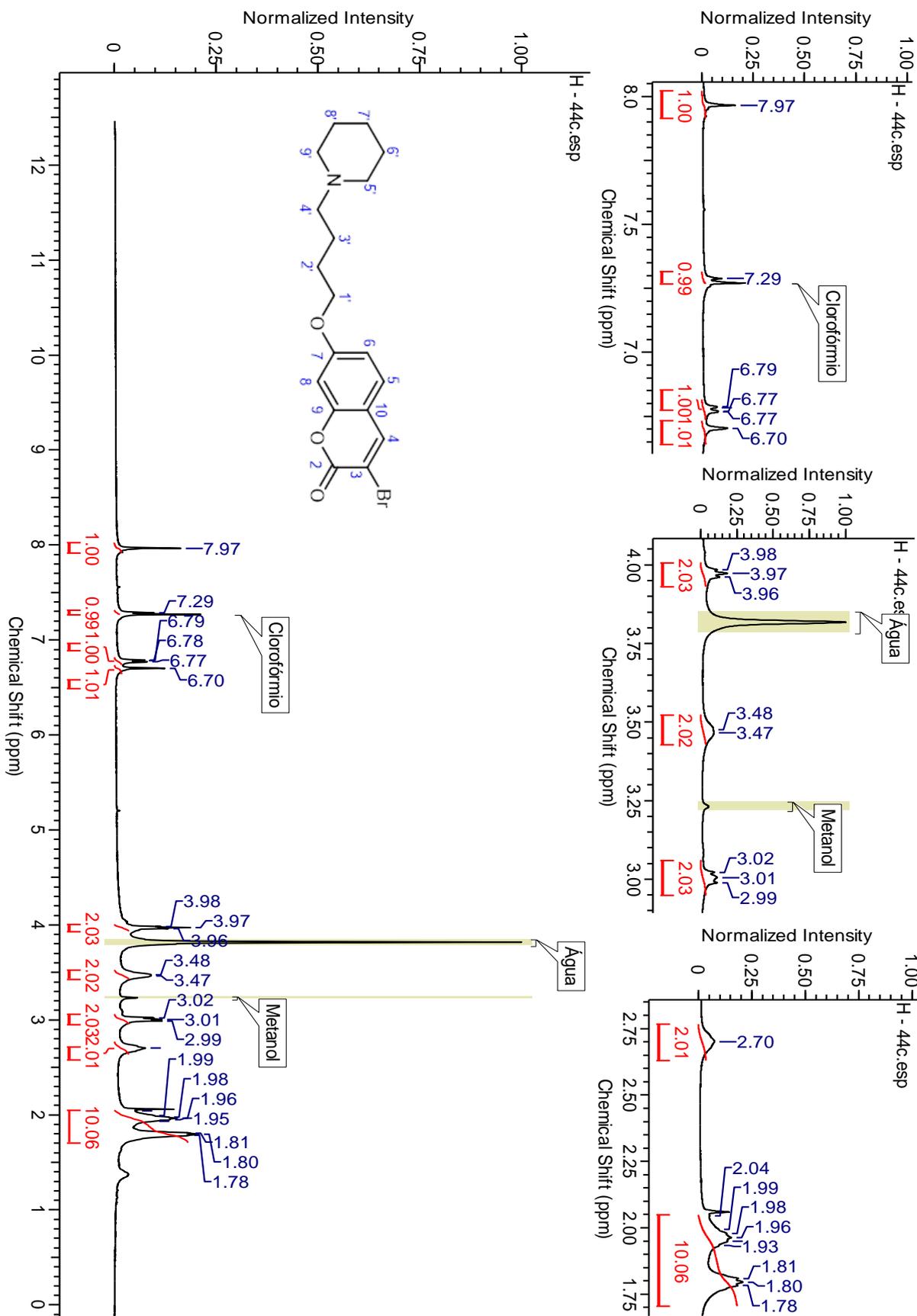
Anexo 21. RMN <sup>1</sup>H (500 MHz) para 44b



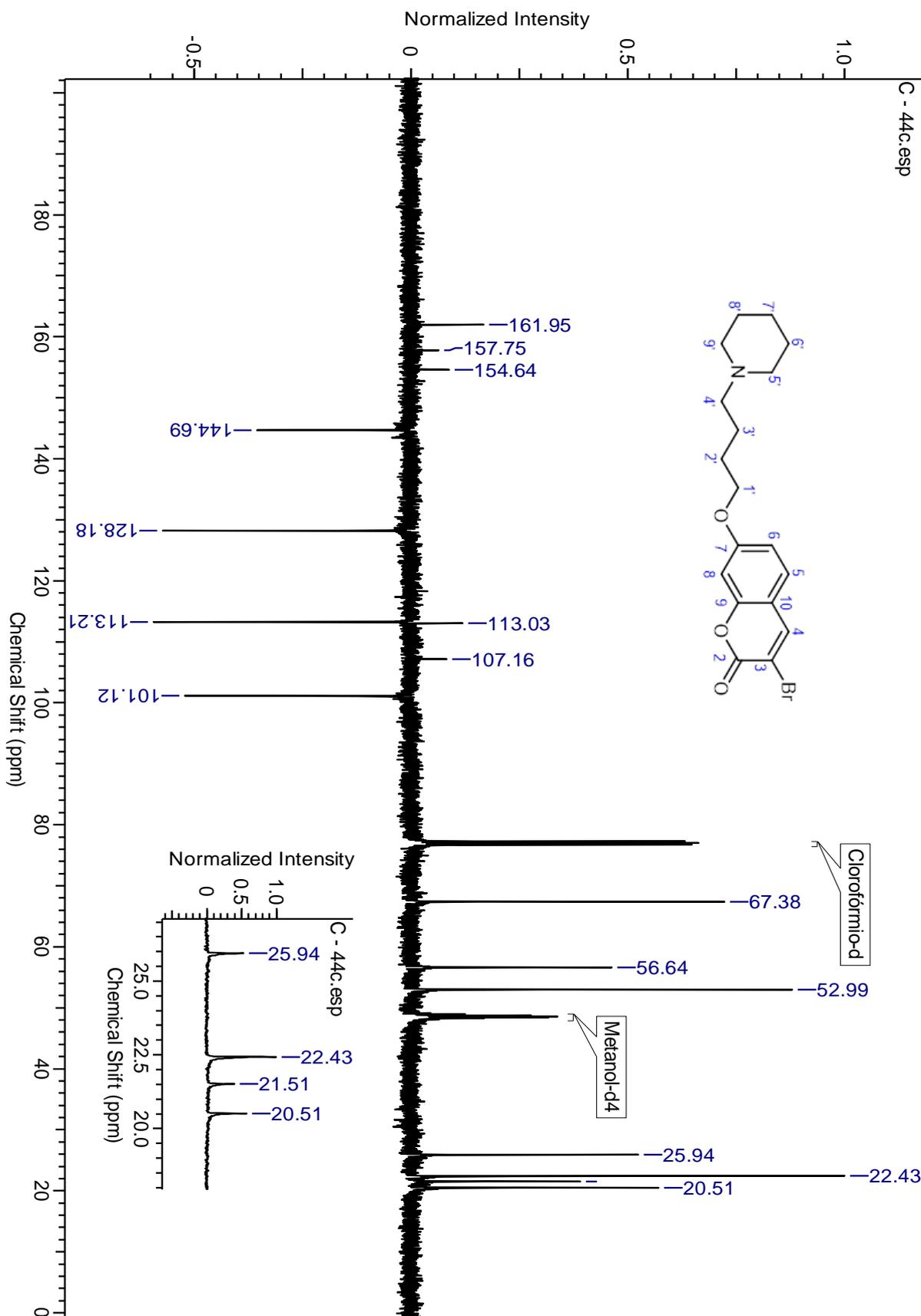
Anexo 22. RMN  $^{13}\text{C}$  (125 MHz) para 44b



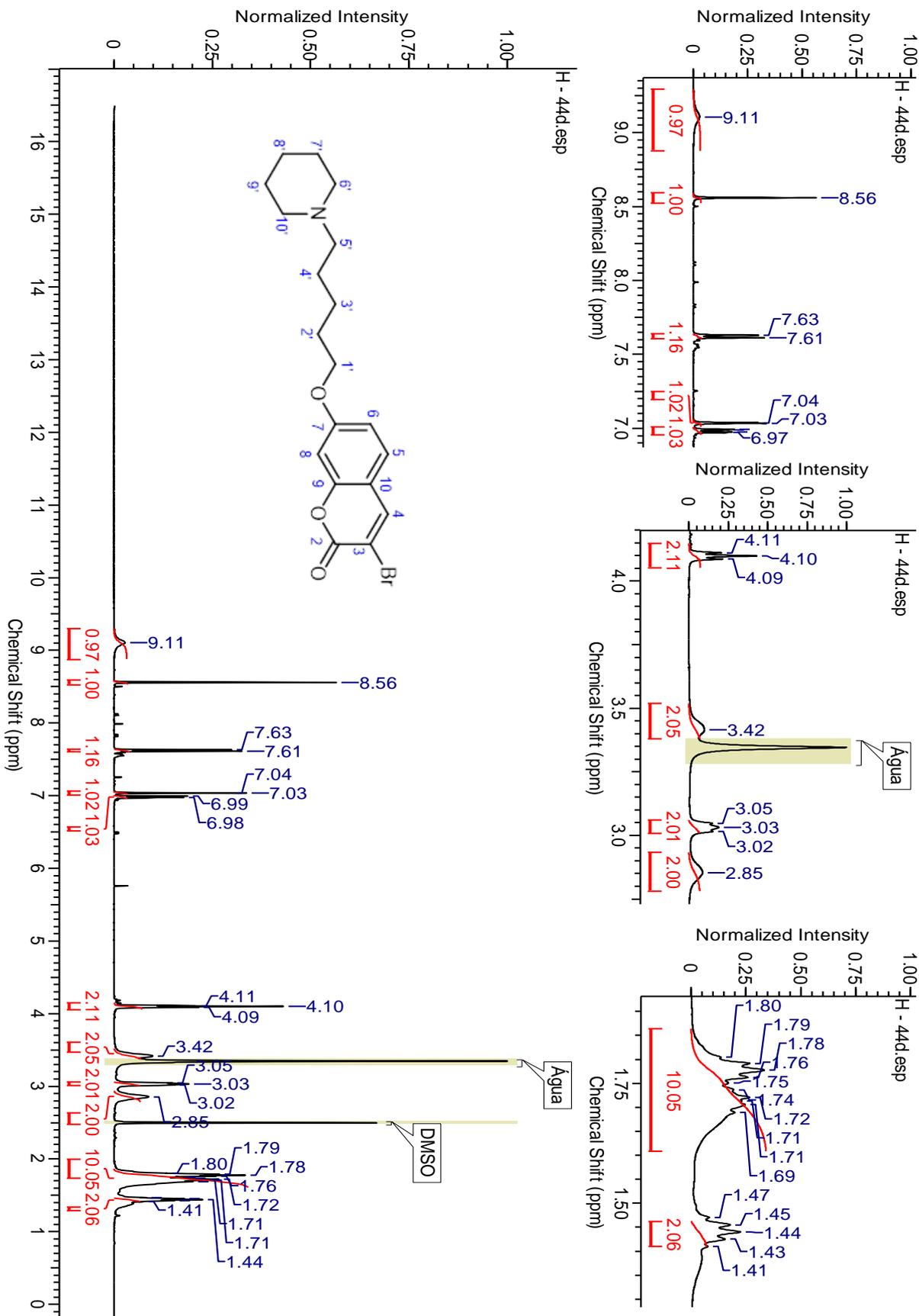
Anexo 23. RMN <sup>1</sup>H (500 MHz) para 44c



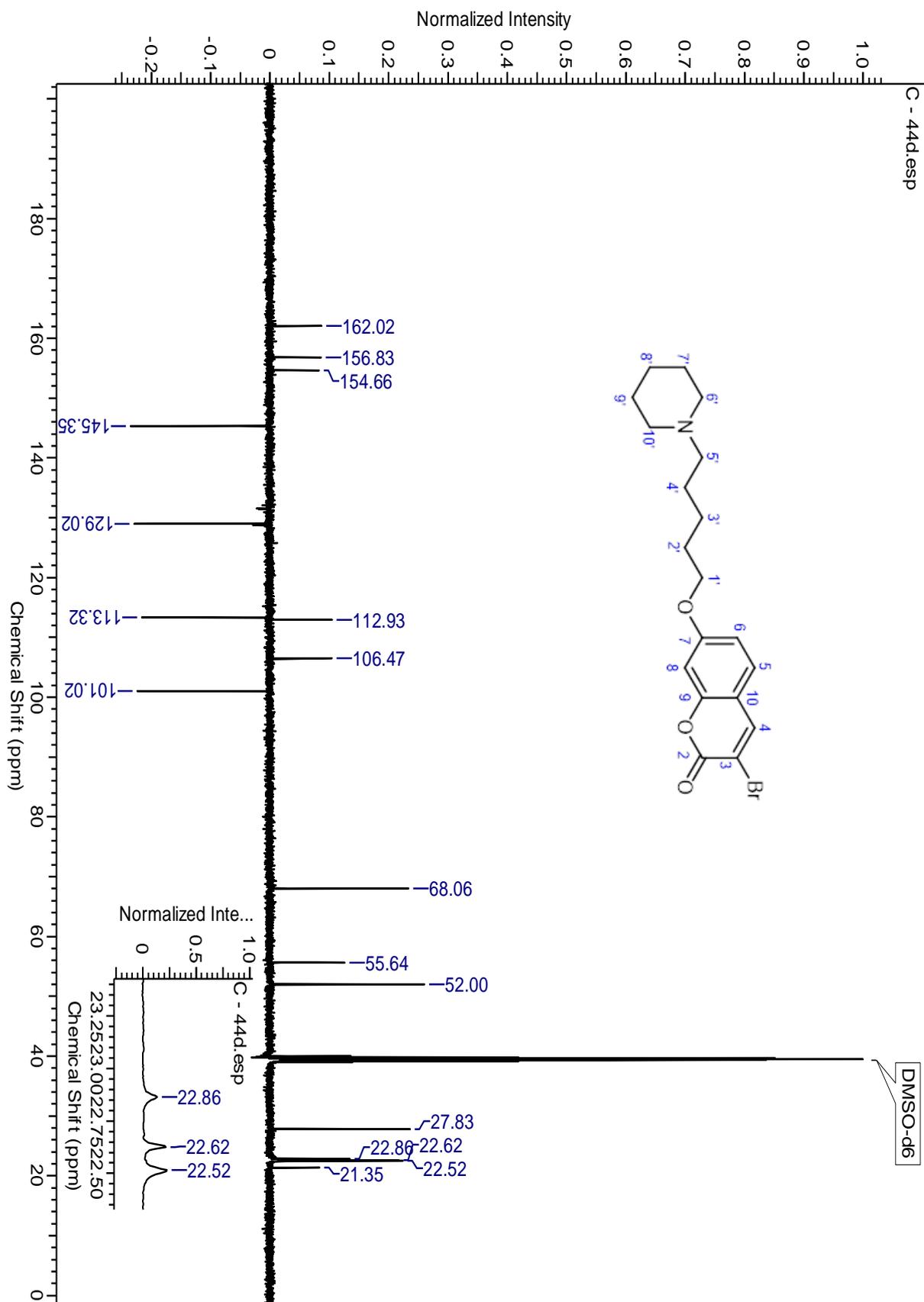
Anexo 24. RMN <sup>13</sup>C (125 MHz) para 44c



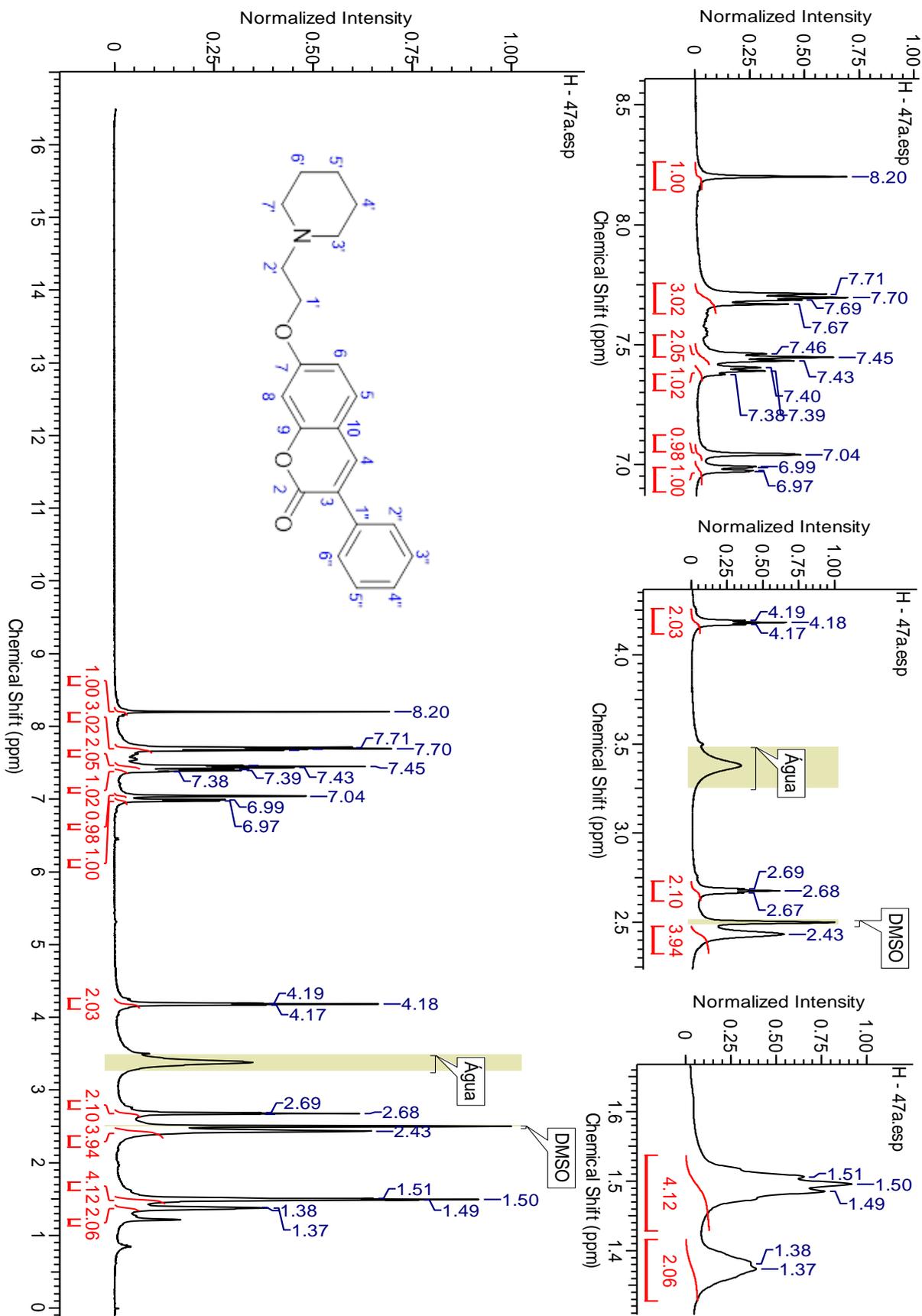
Anexo 25. RMN <sup>1</sup>H (500 MHz) para 44d



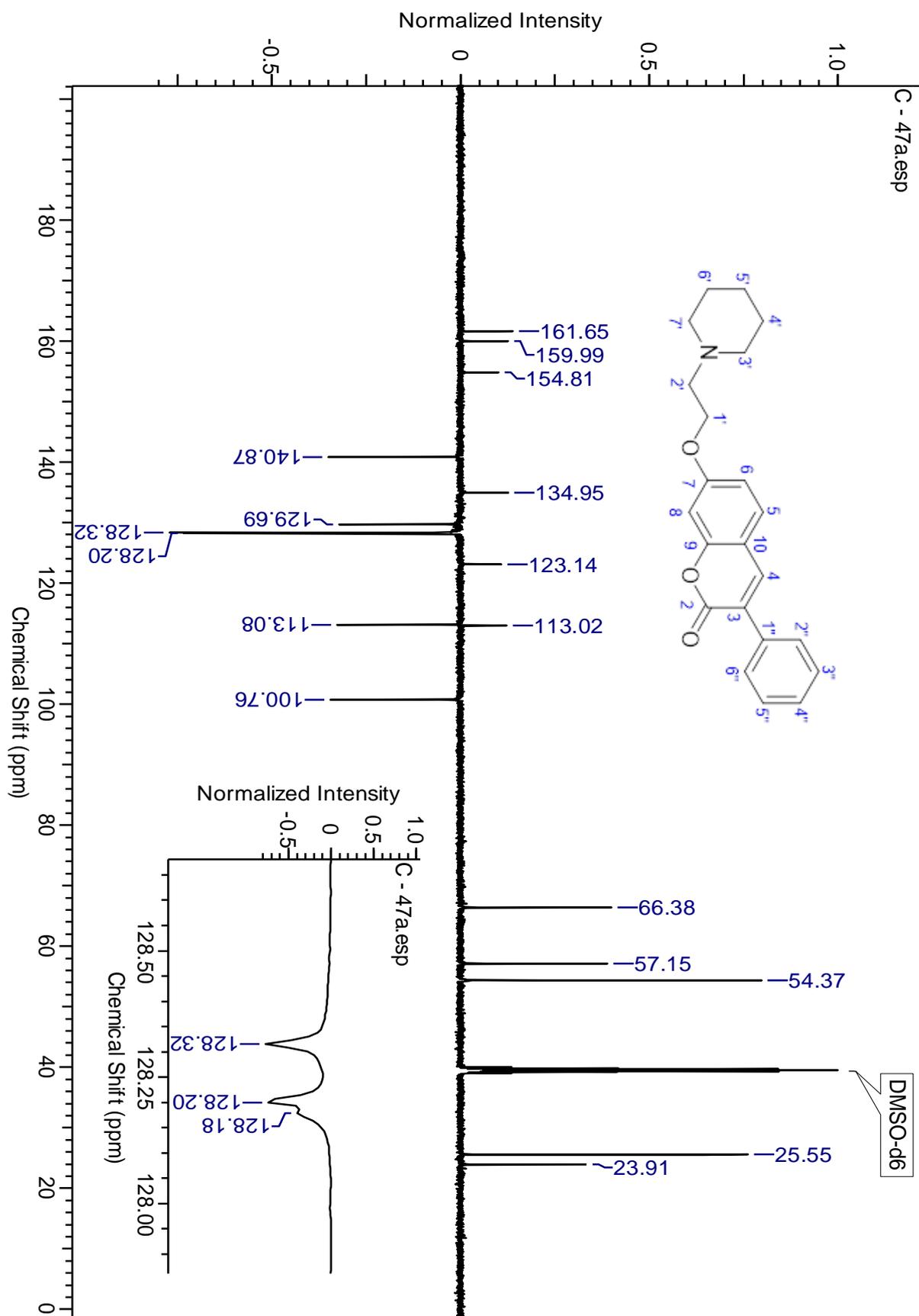
Anexo 26. RMN <sup>13</sup>C (125 MHz) para 44d



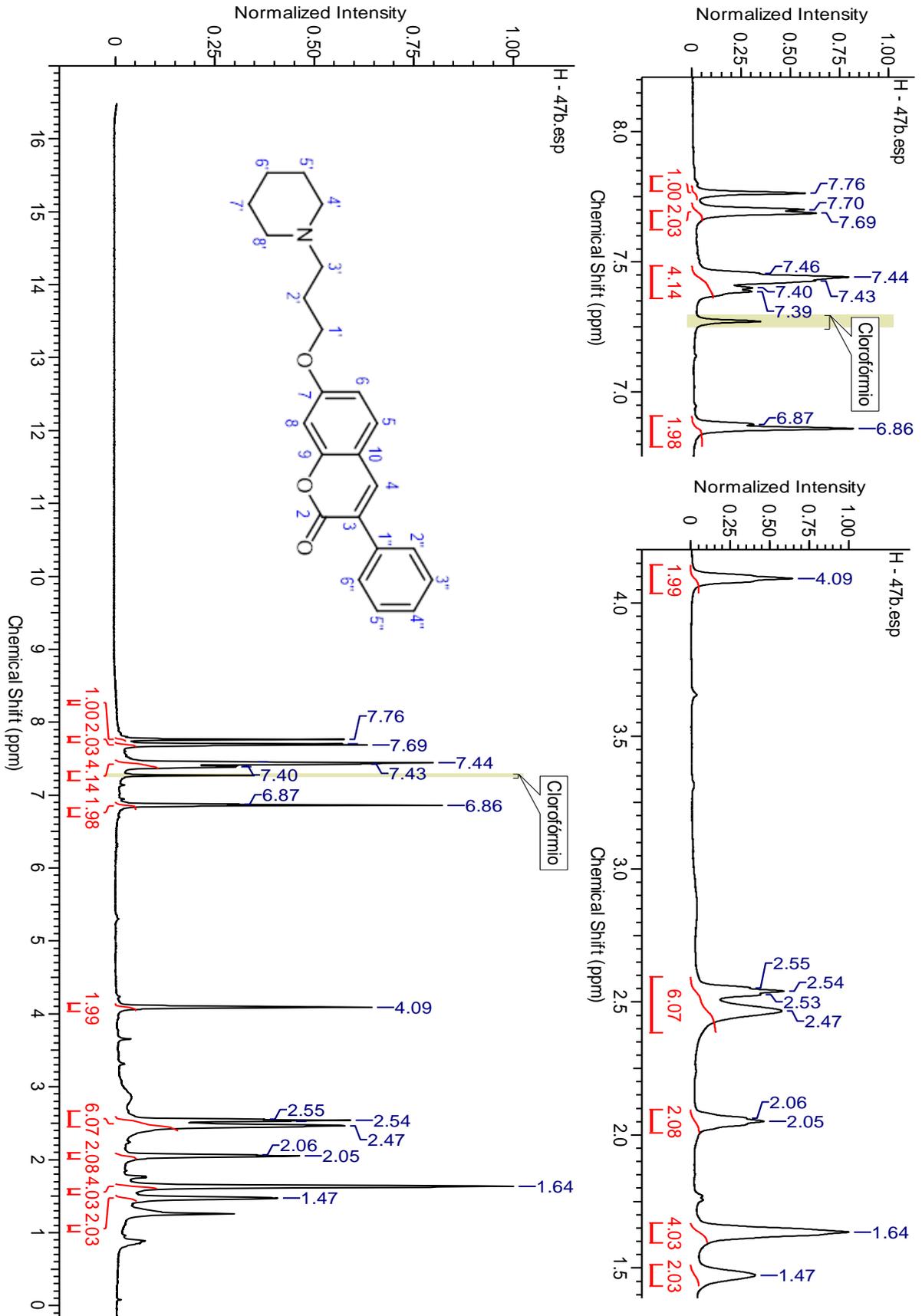
Anexo 27. RMN <sup>1</sup>H (500 MHz) para 47a



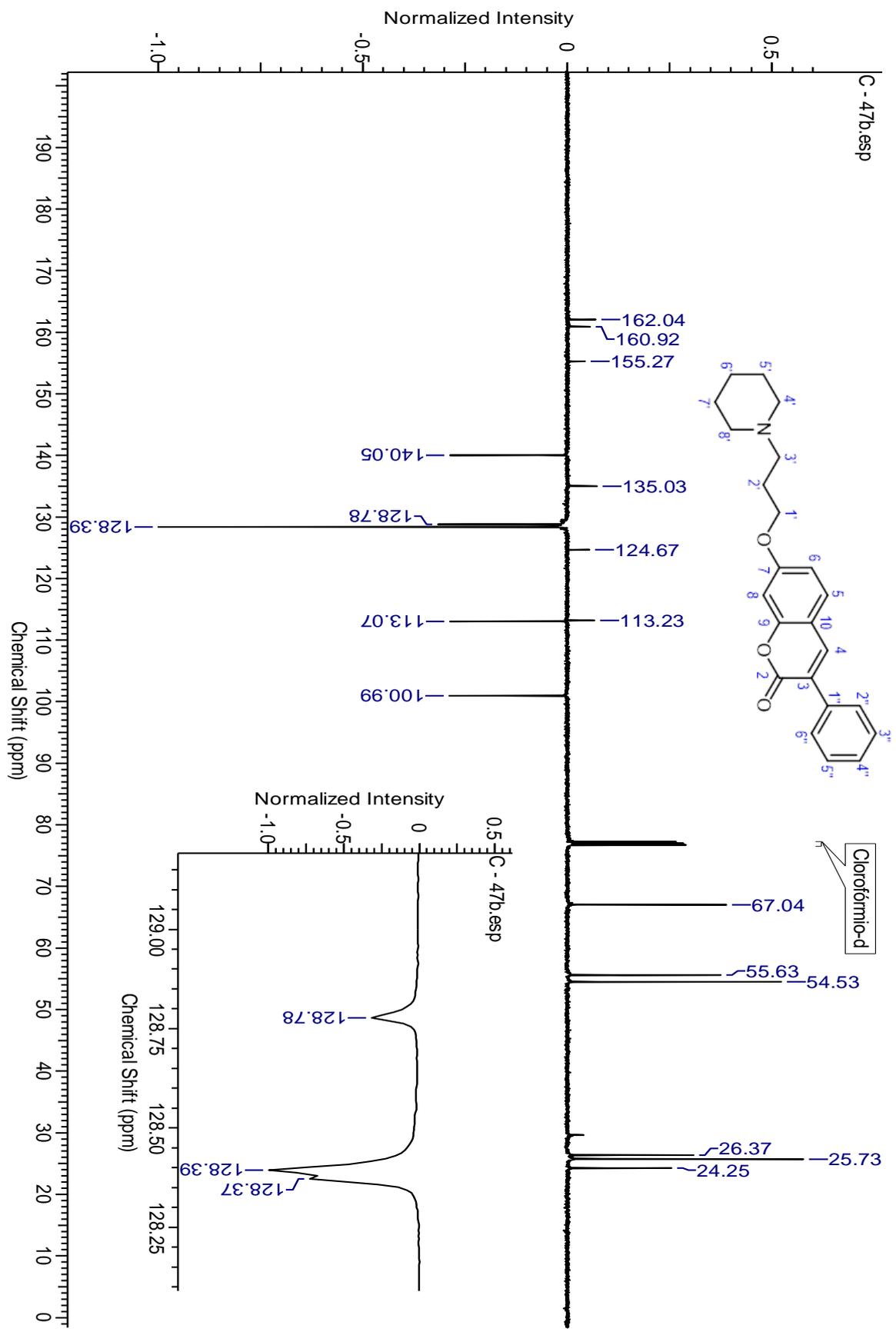
Anexo 28. RMN <sup>13</sup>C (125 MHz) para 47a



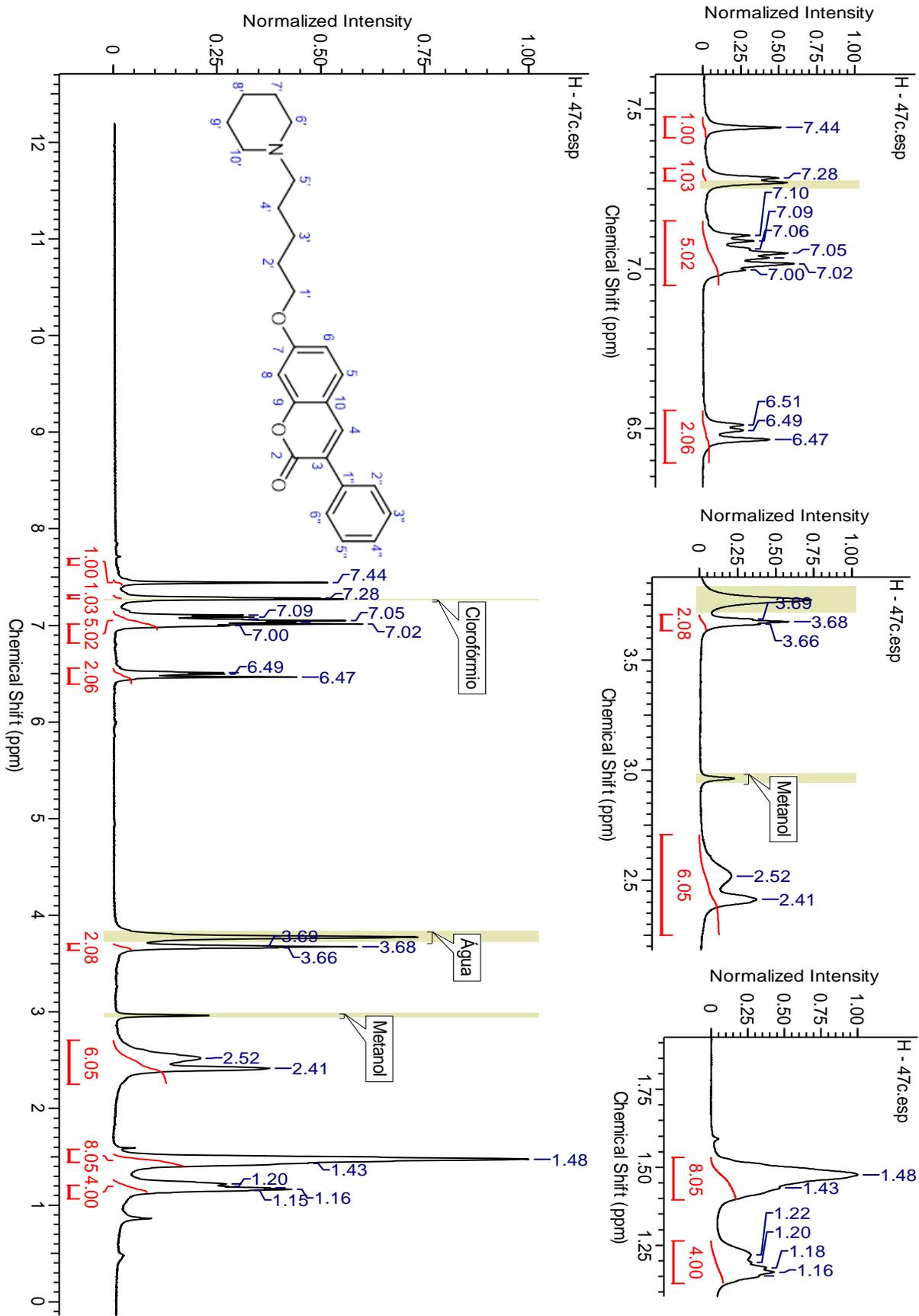
Anexo 29. RMN <sup>1</sup>H (500 MHz) para 47b



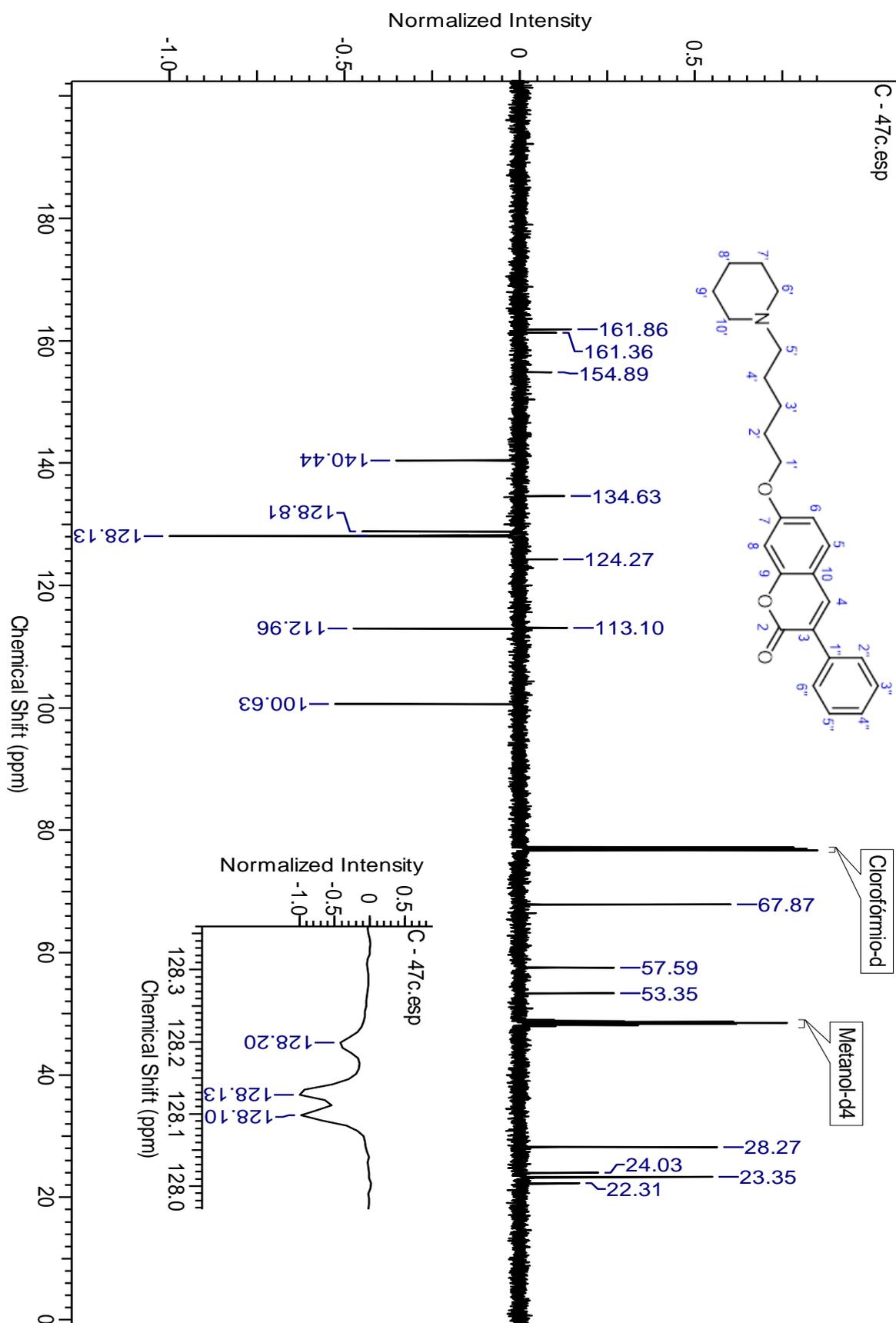
Anexo 30. RMN <sup>13</sup>C (125 MHz) para 47b



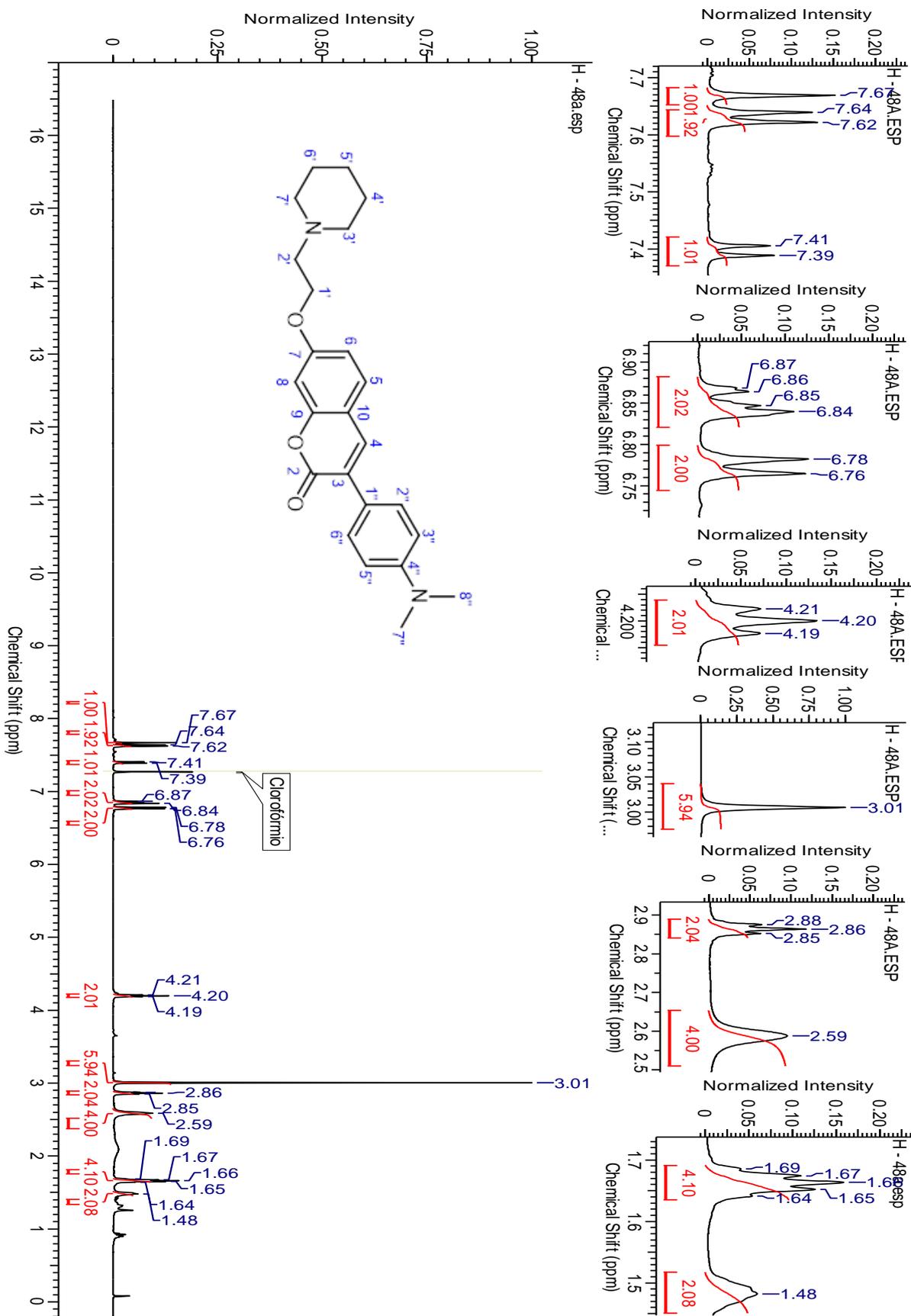
Anexo 31. RMN <sup>1</sup>H (500 MHz) para 47c



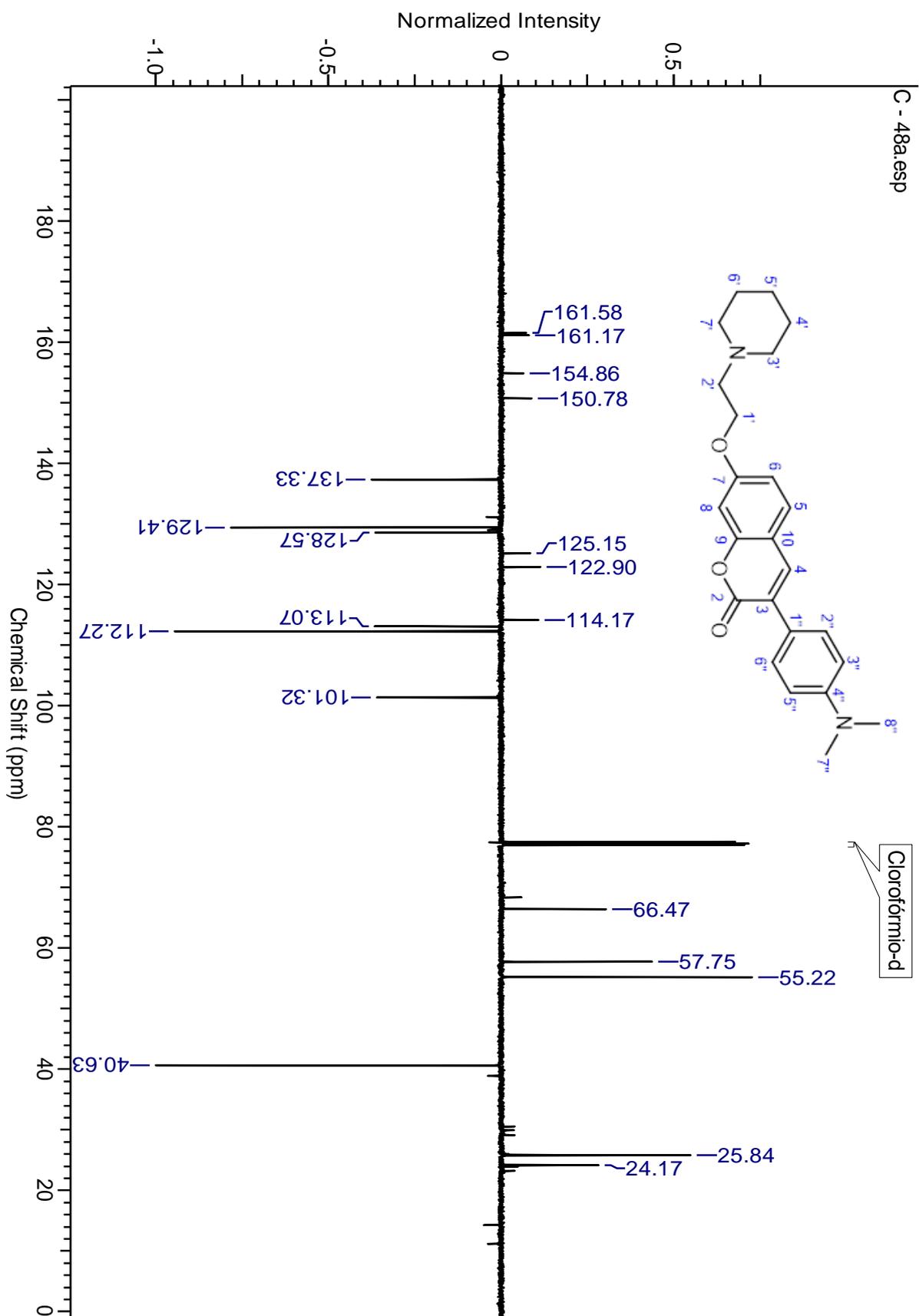
Anexo 32. RMN <sup>13</sup>C (125 MHz) para 47c



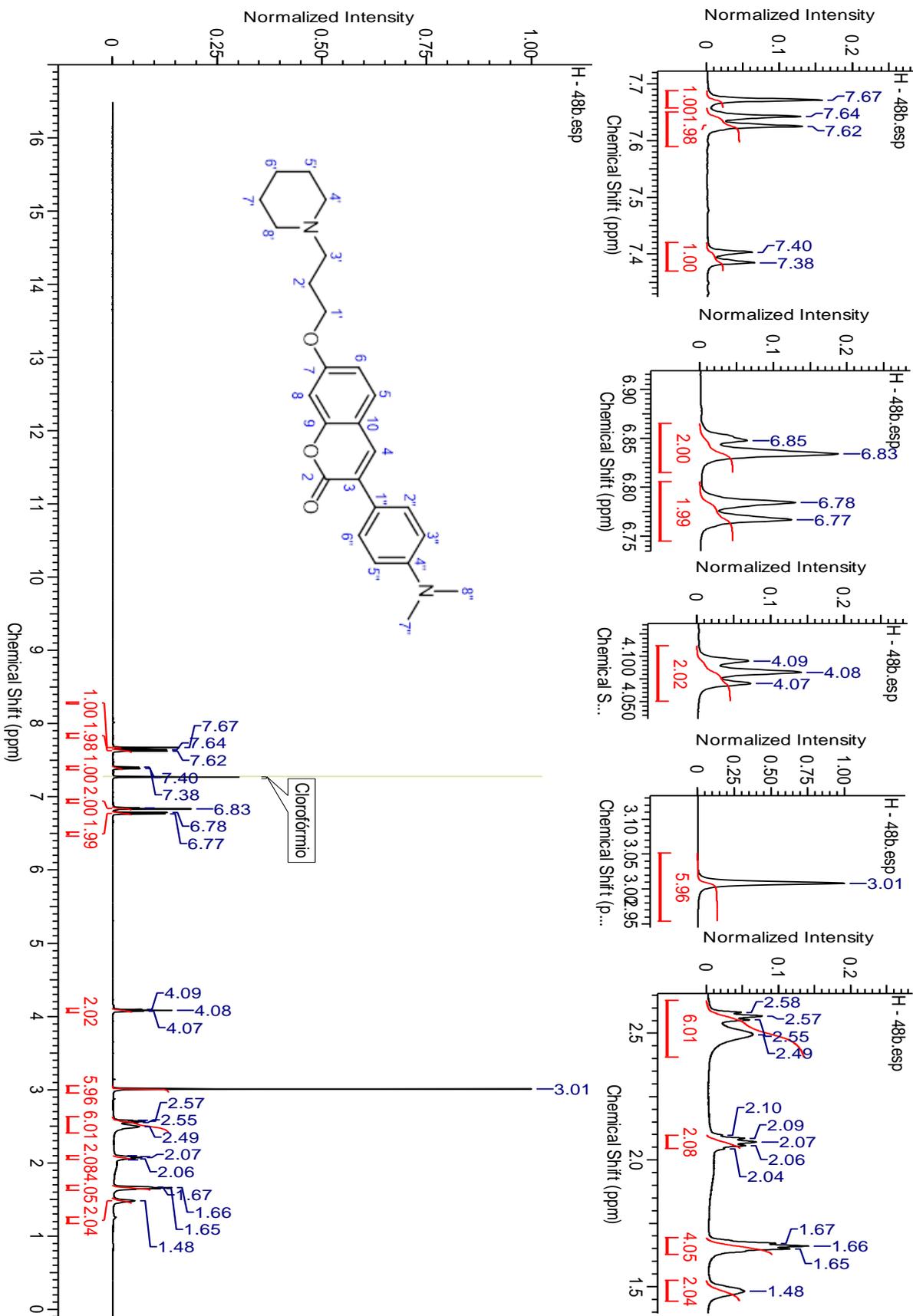
Anexo 33. RMN <sup>1</sup>H (500 MHz) para 48a



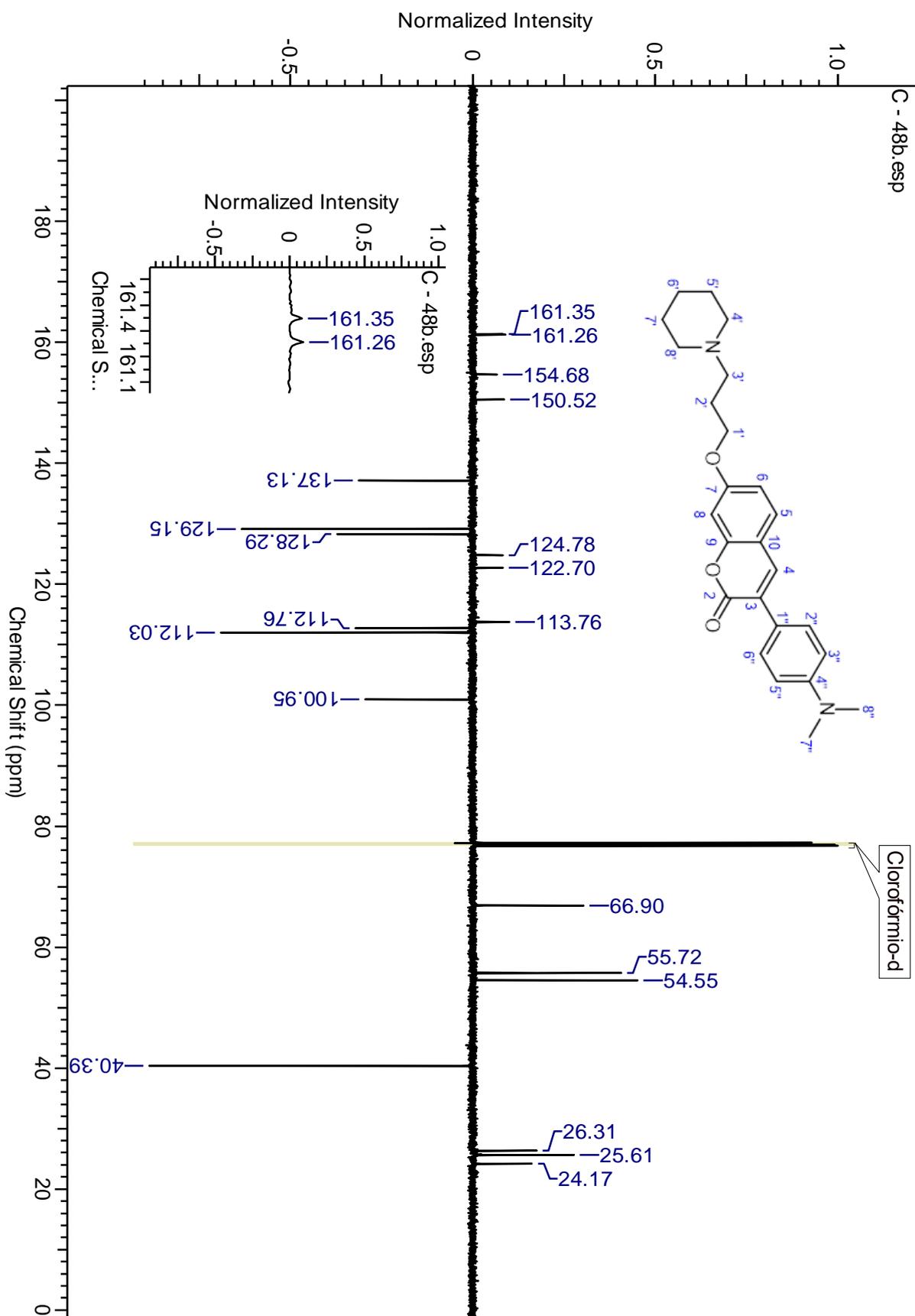
Anexo 34. RMN  $^{13}\text{C}$  (125 MHz) para 48a



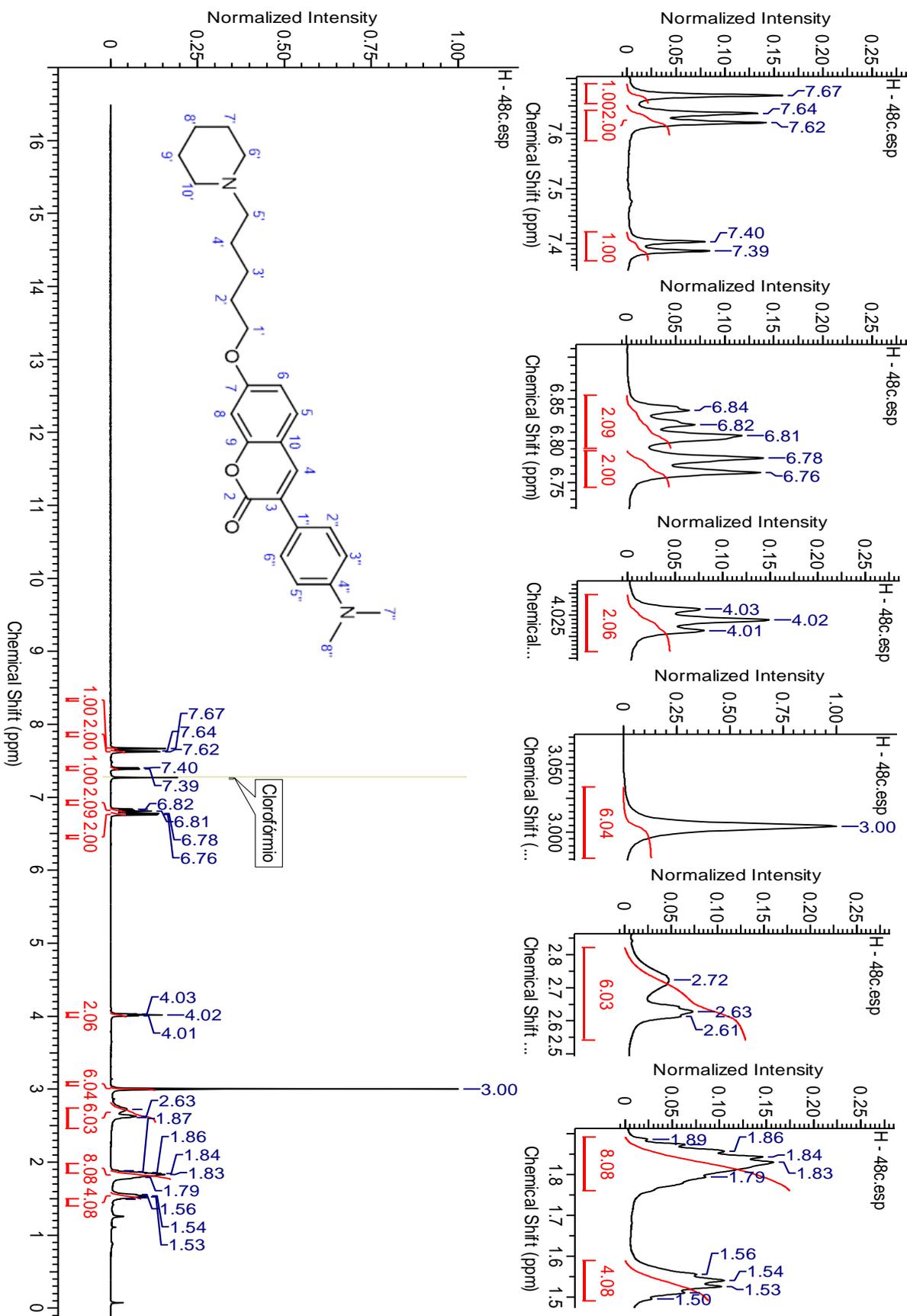
Anexo 35. RMN <sup>1</sup>H (500 MHz) para 48b



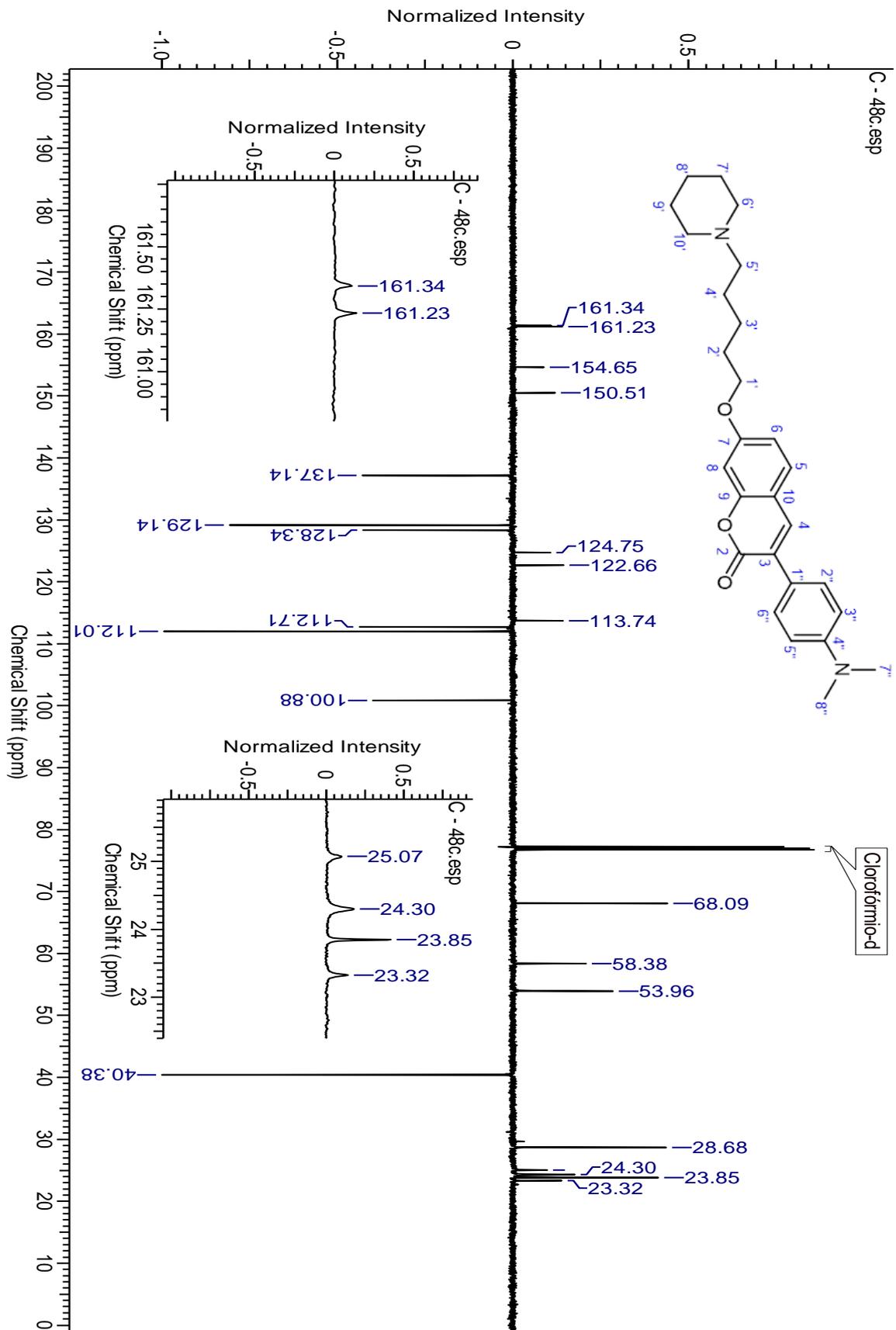
Anexo 36 RMN <sup>13</sup>C (125 MHz) para 48b



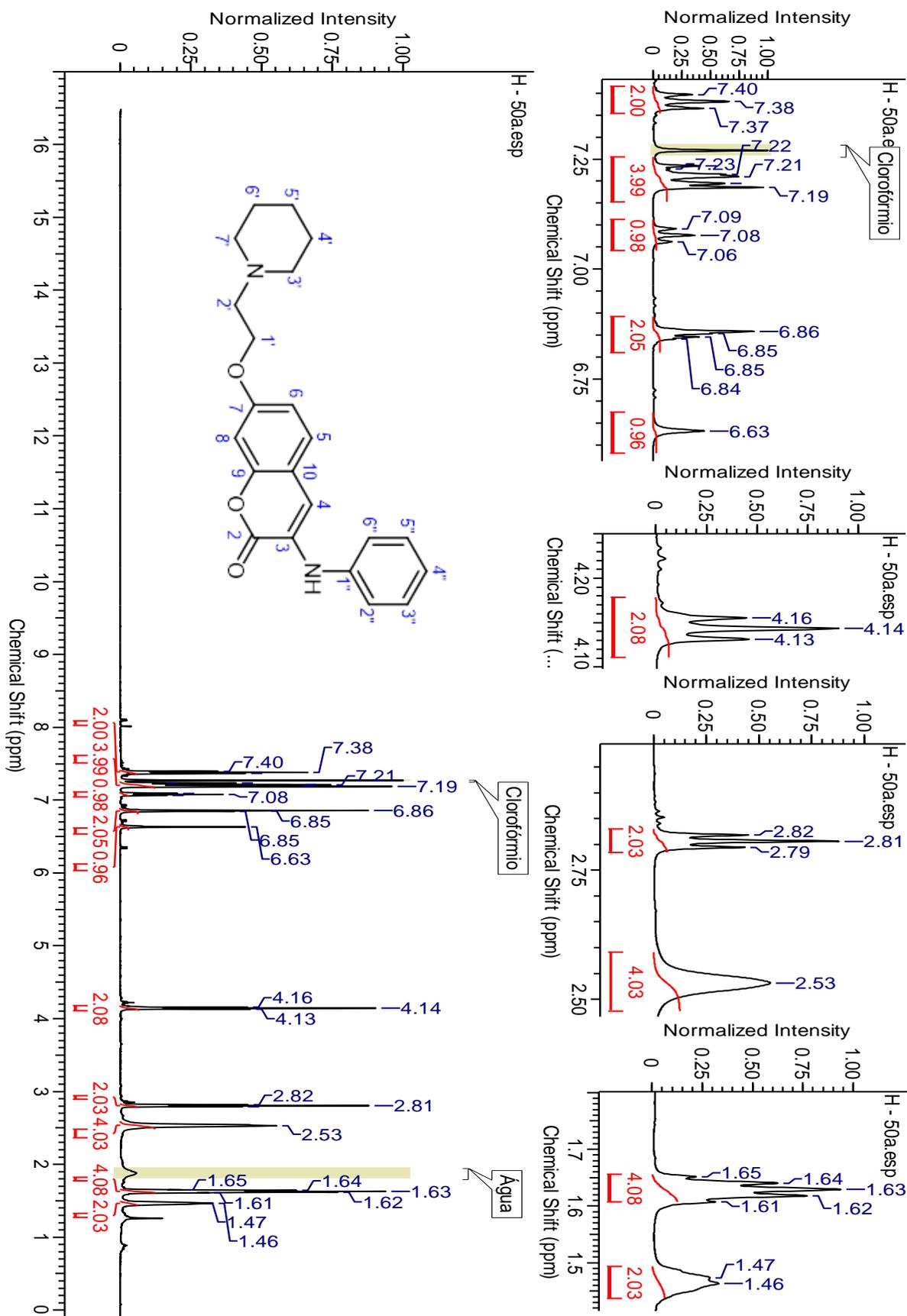
Anexo 37. RMN <sup>1</sup>H (500 MHz) para 48c



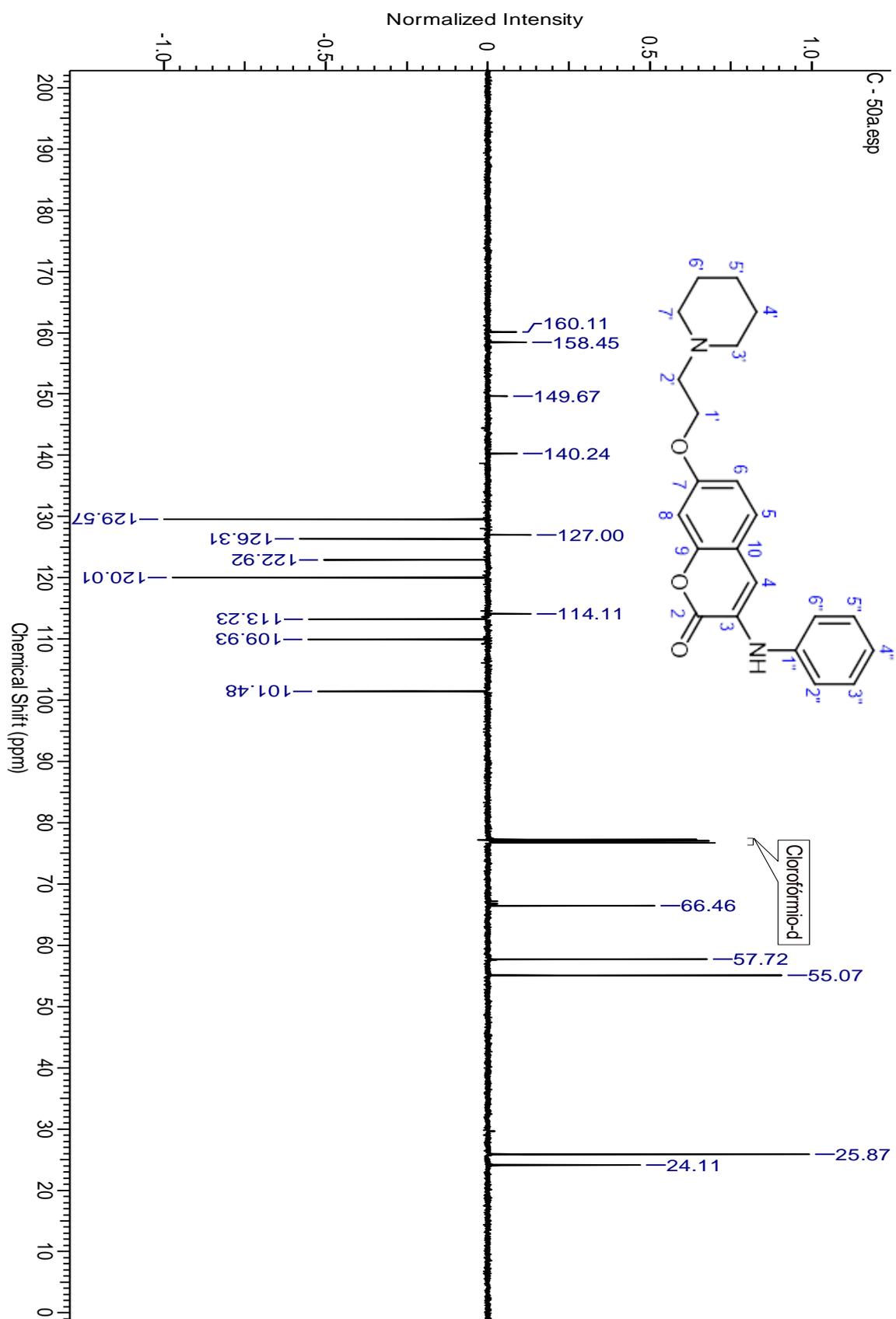
Anexo 38. RMN  $^{13}\text{C}$  (125 MHz) para 48c



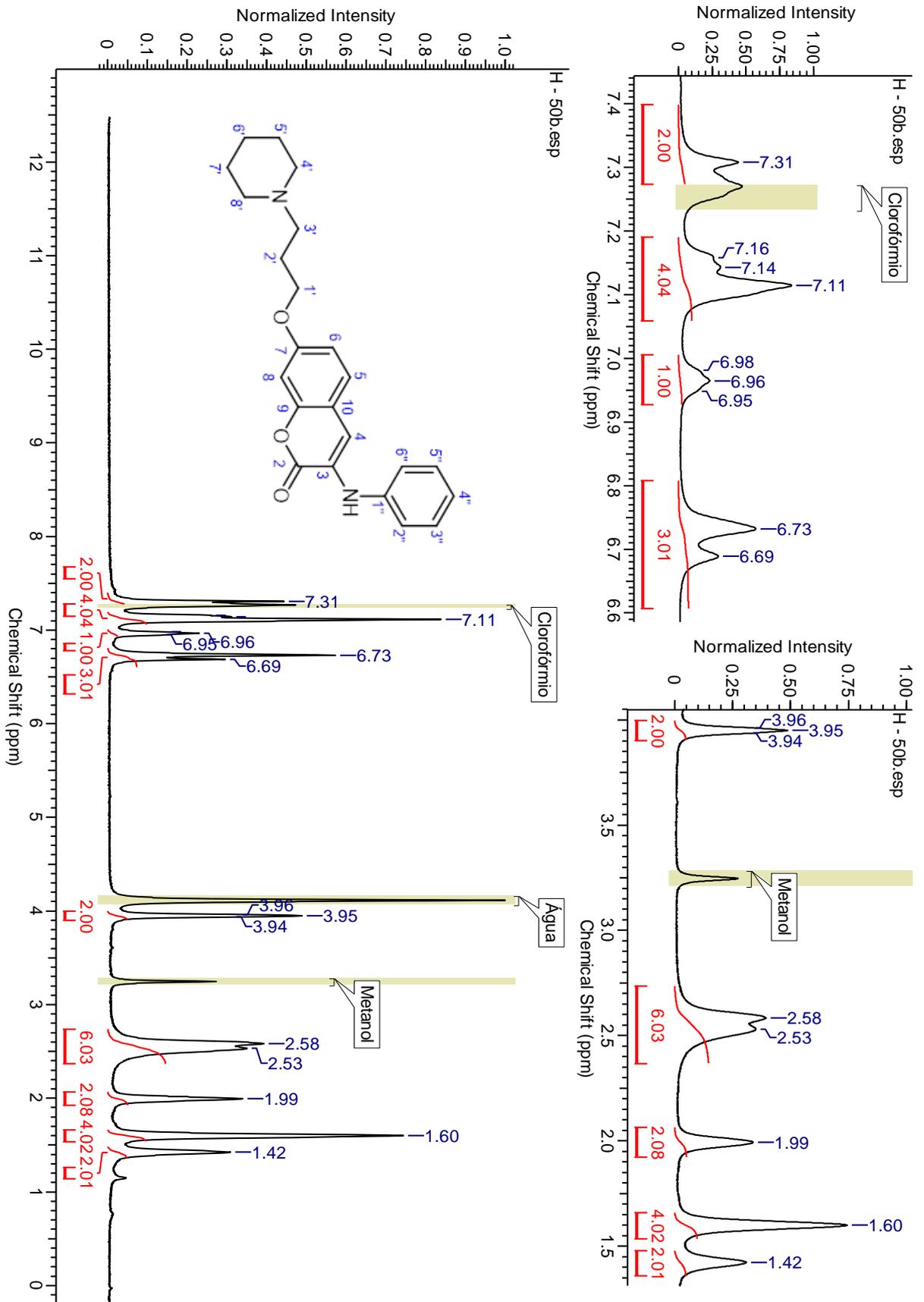
Anexo 39. RMN <sup>1</sup>H (500 MHz) para 50a



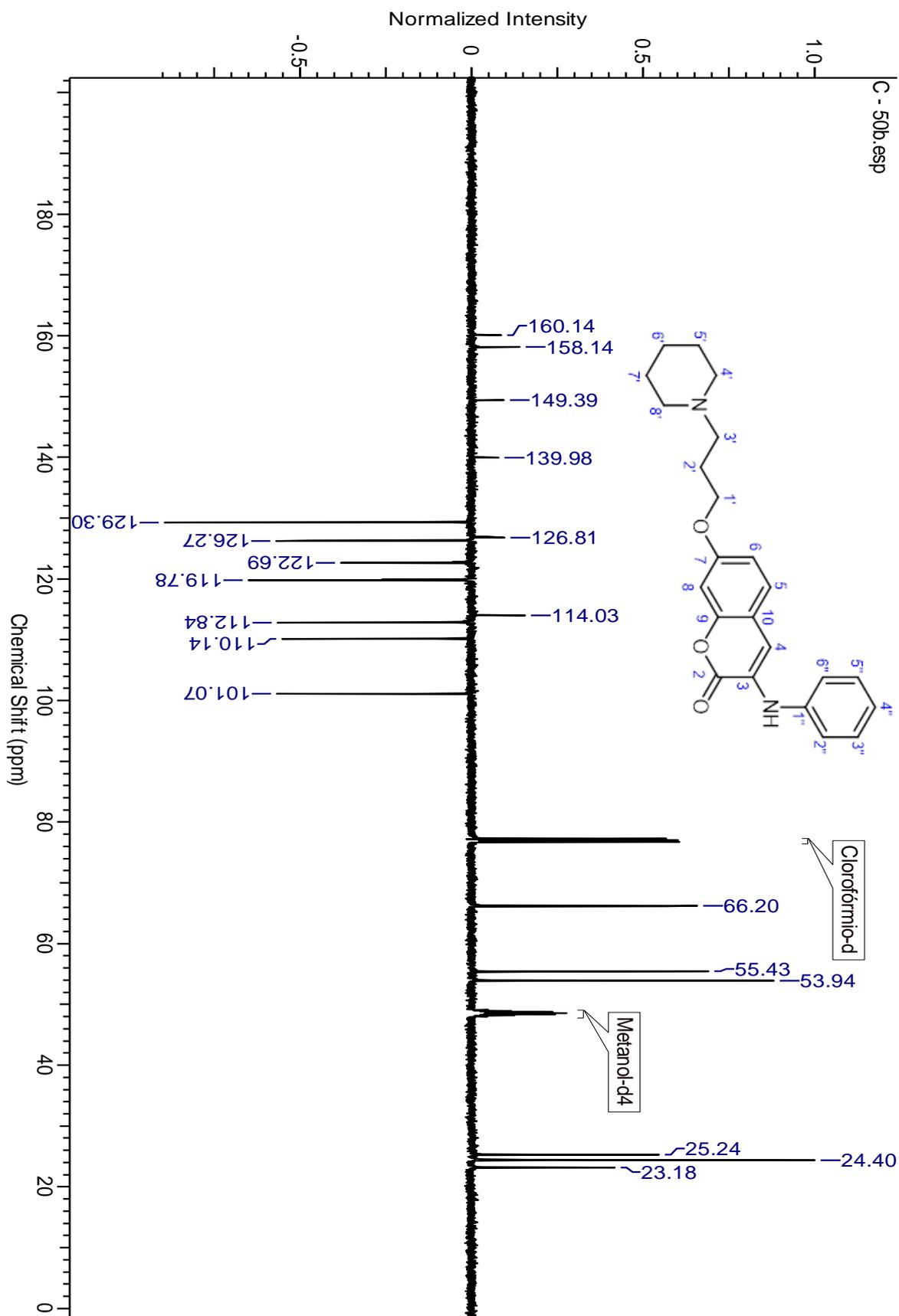
Anexo 40. RMN  $^{13}\text{C}$  (125 MHz) para 50a



Anexo 41. RMN <sup>1</sup>H (500 MHz) para 50b

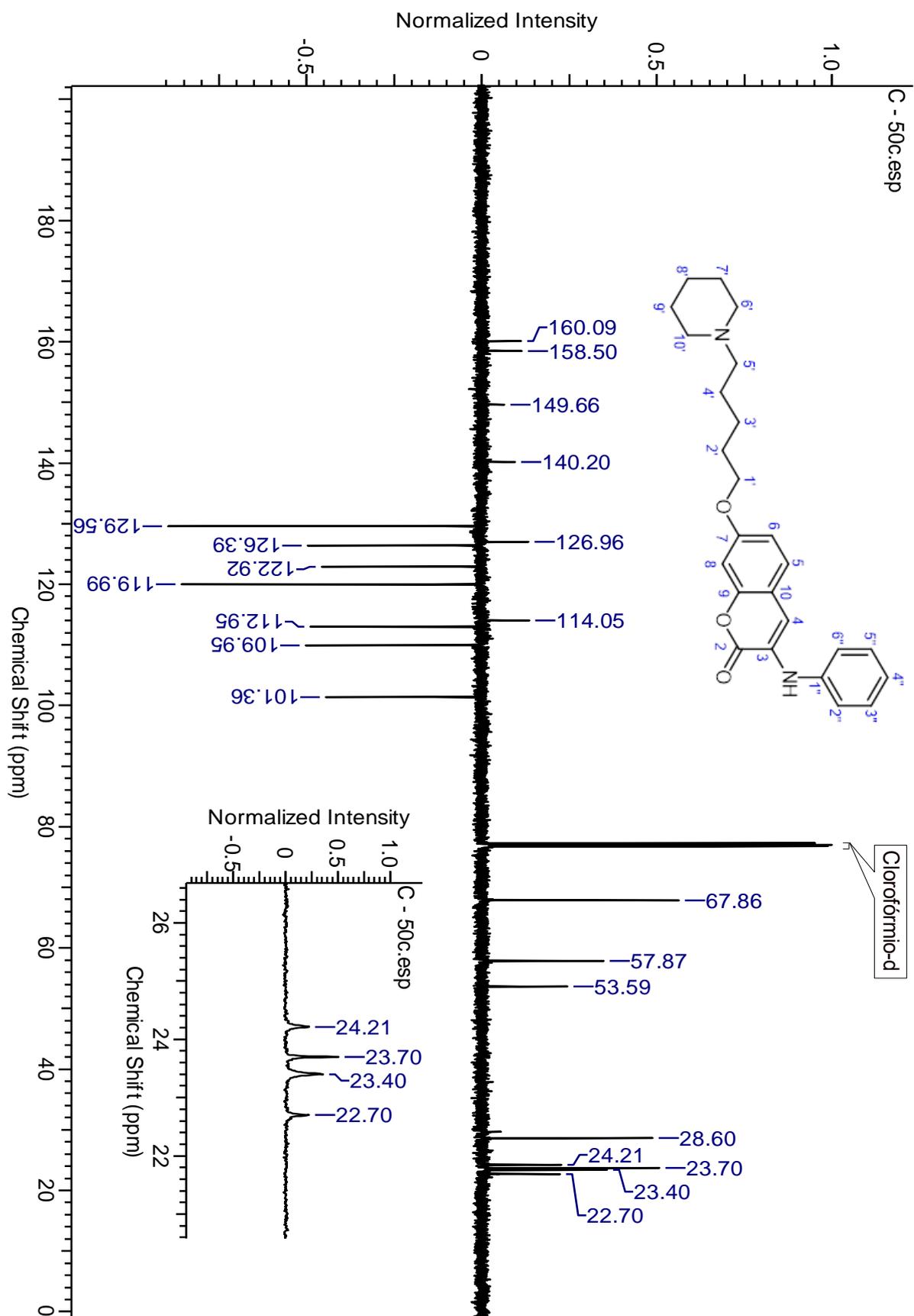


Anexo 42. RMN <sup>13</sup>C (125 MHz) para 50b

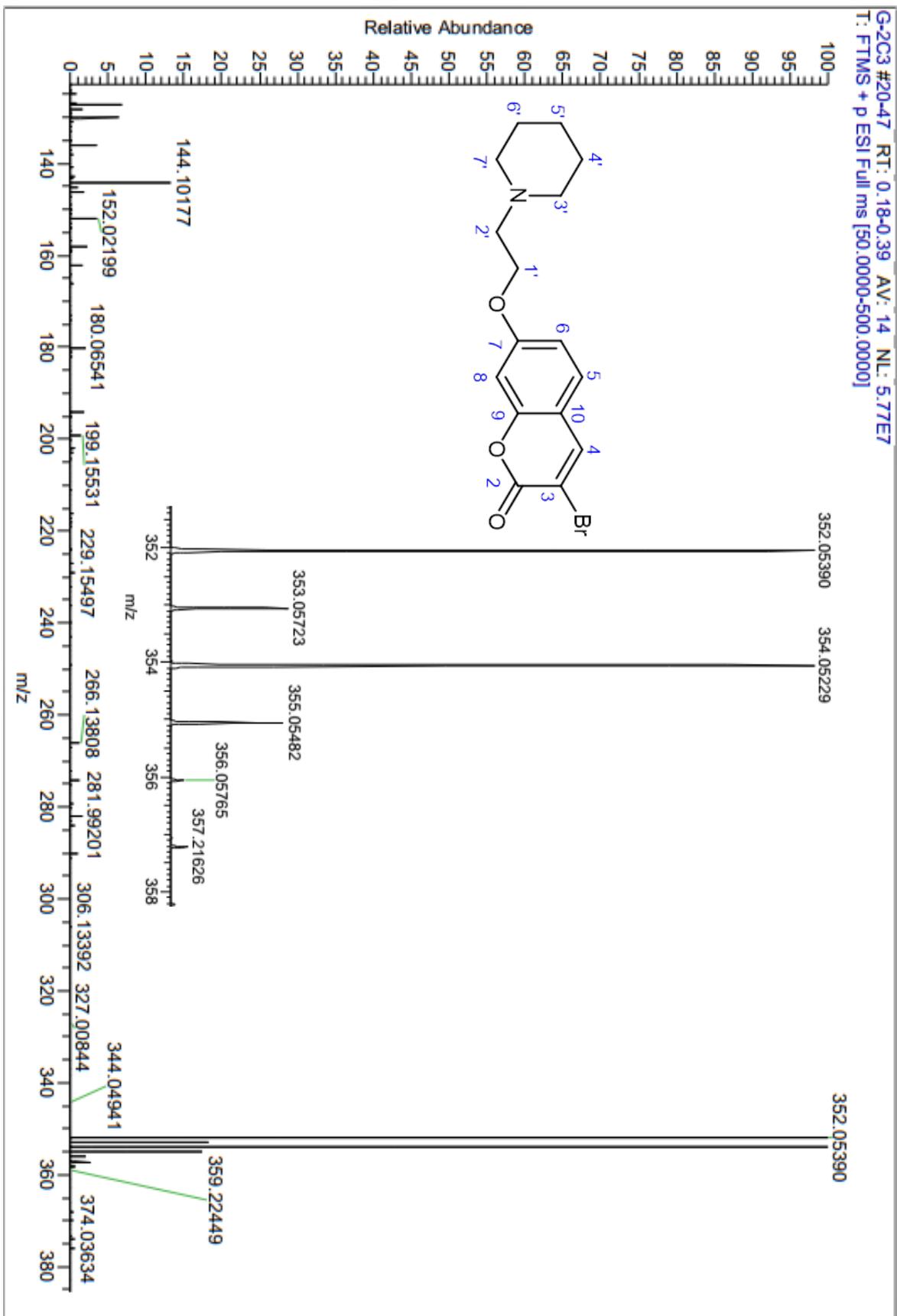




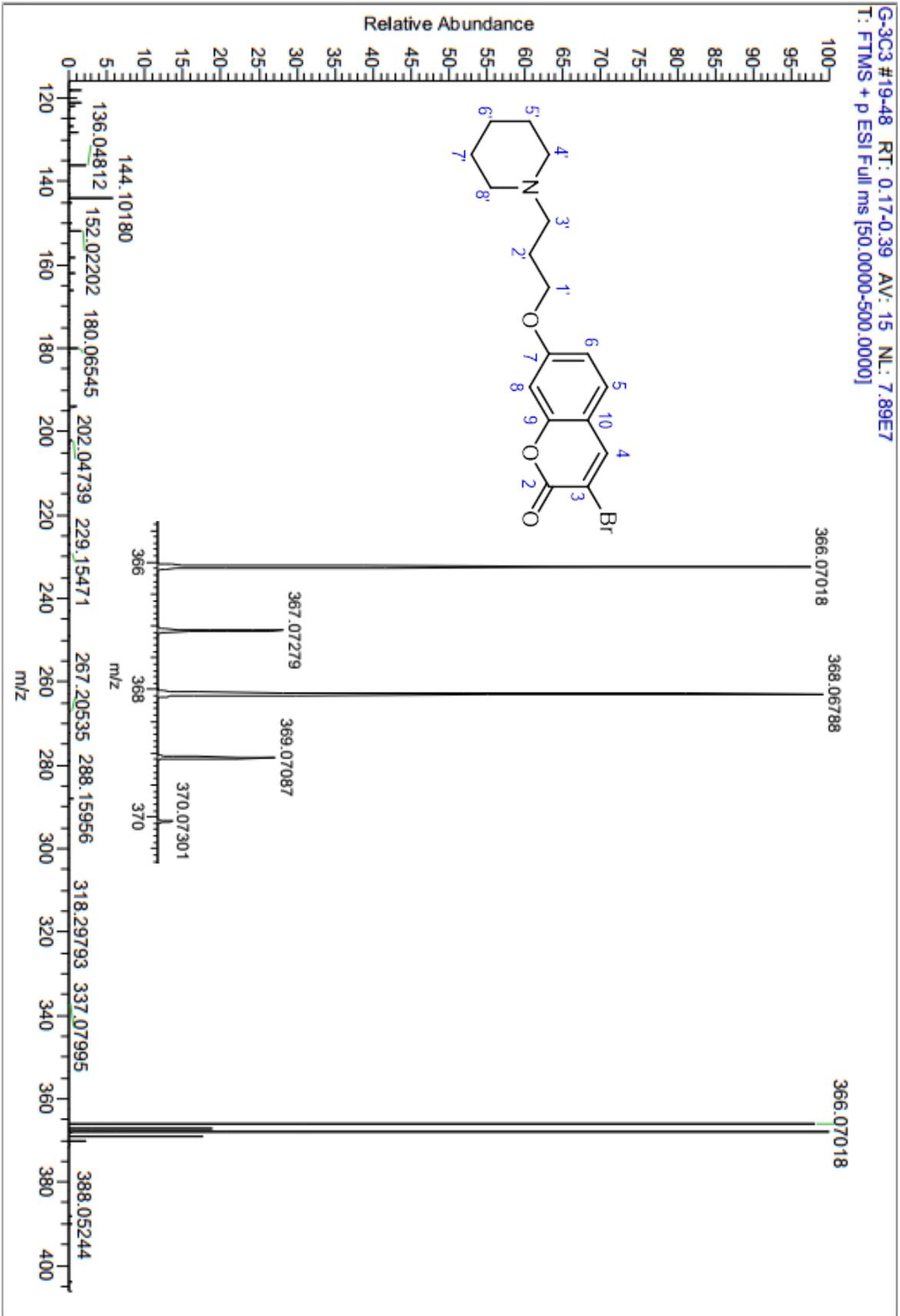
Anexo 44. RMN <sup>13</sup>C (125 MHz) para 50c



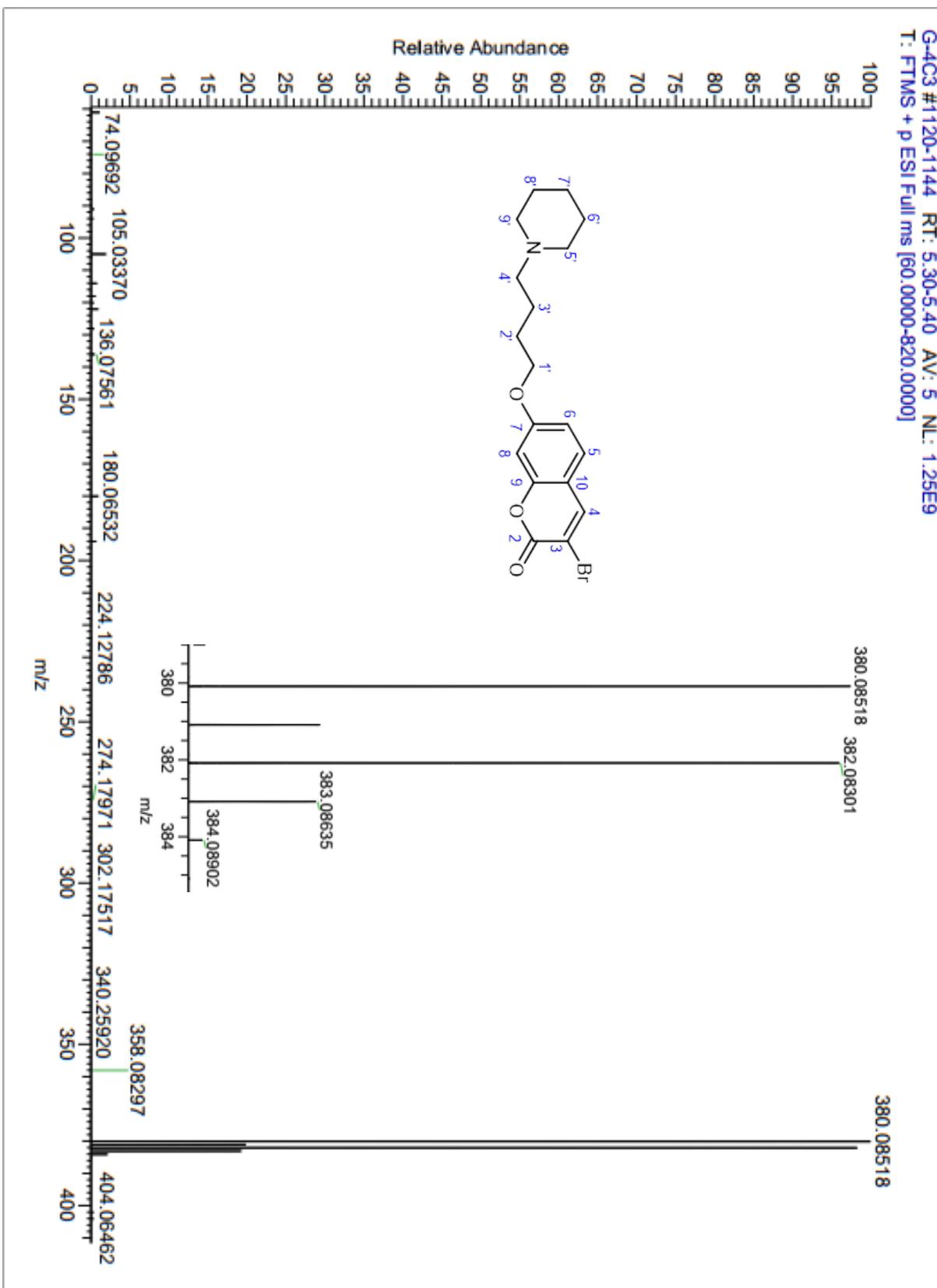
Anexo 45. EMAR para 44a



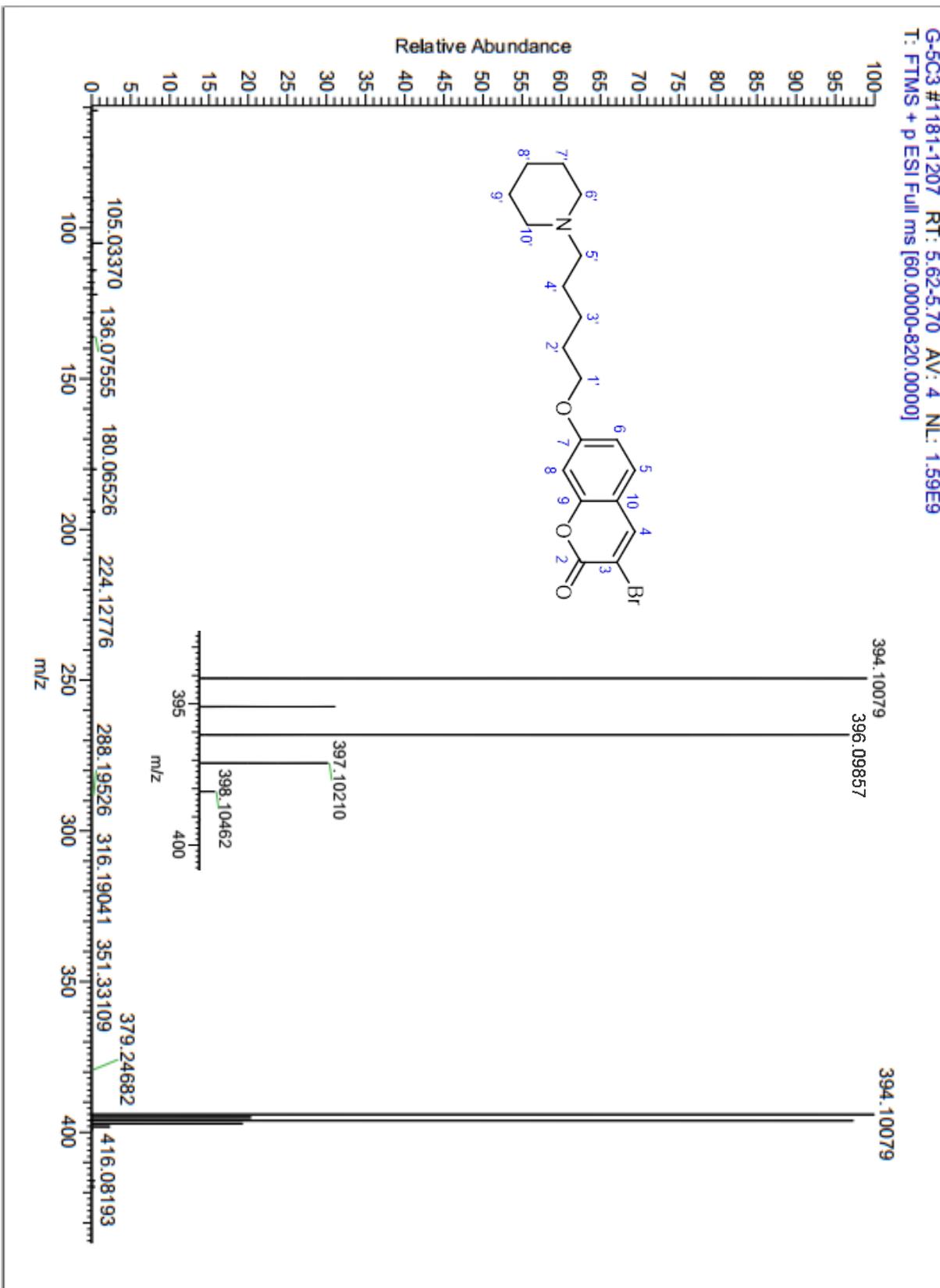
Anexo 46. EMAR para 44b



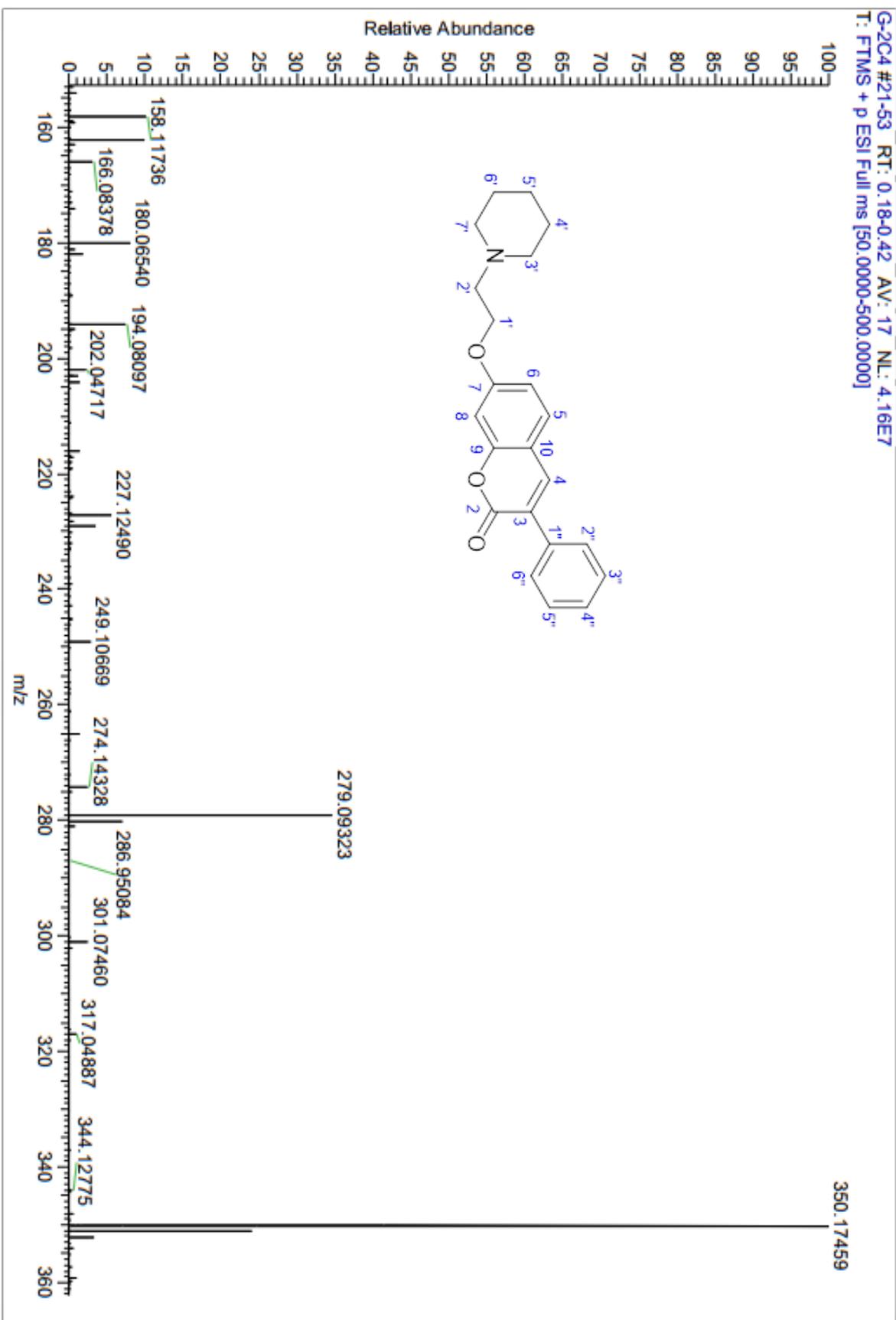
Anexo 47. EMAR para 44c



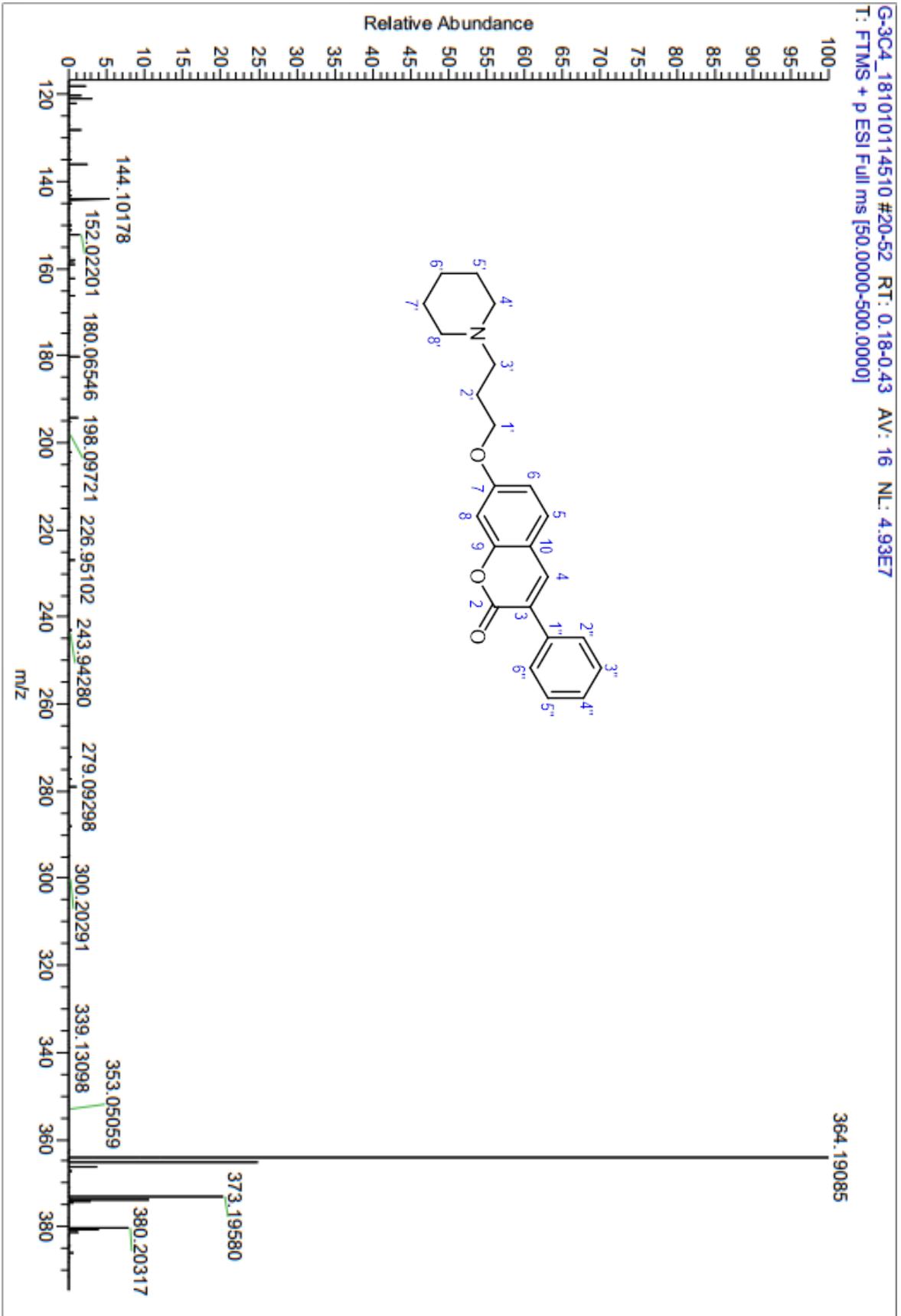
Anexo 48. EMAR para 44d



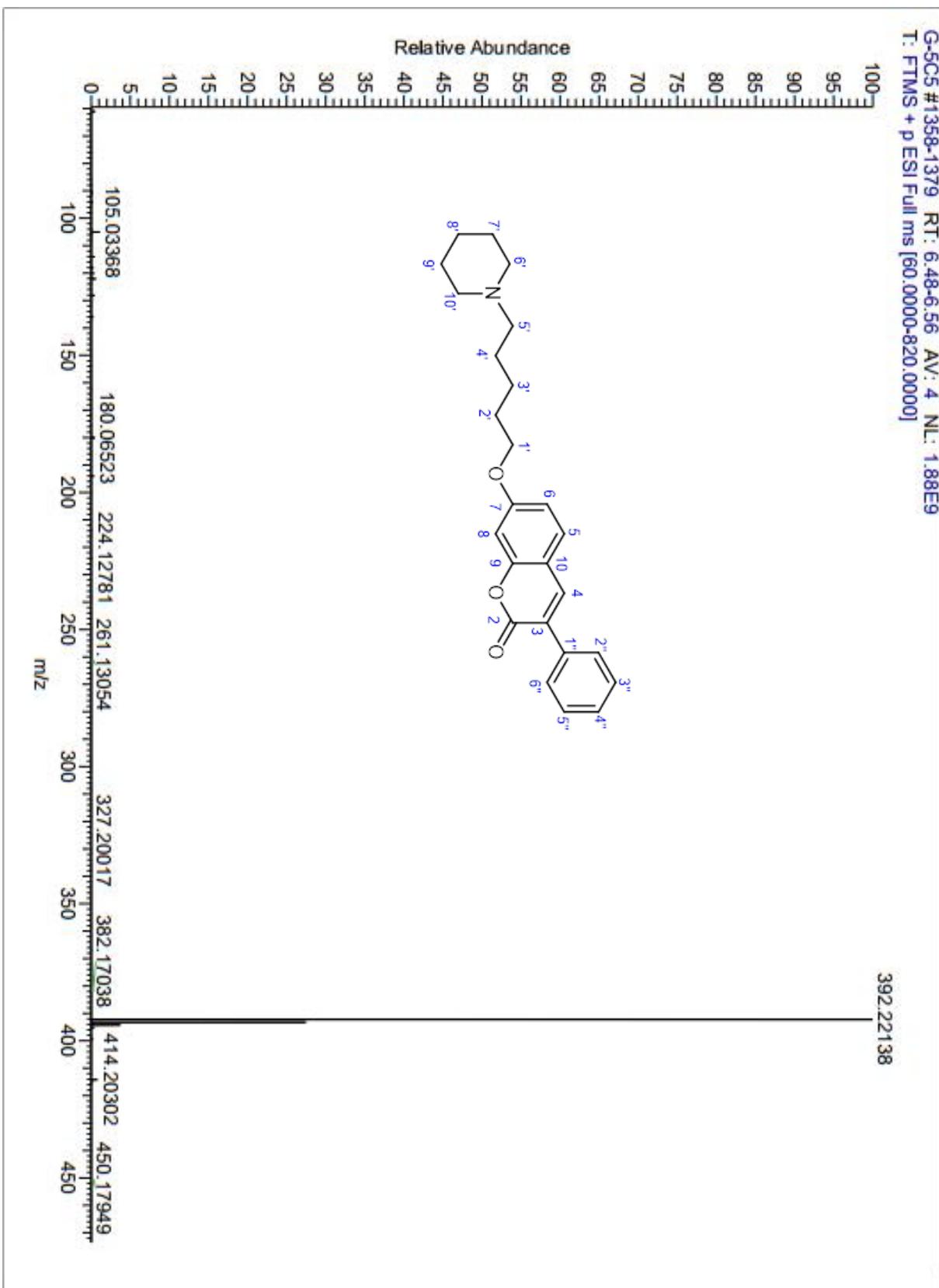
Anexo 49. EMAR para 47a



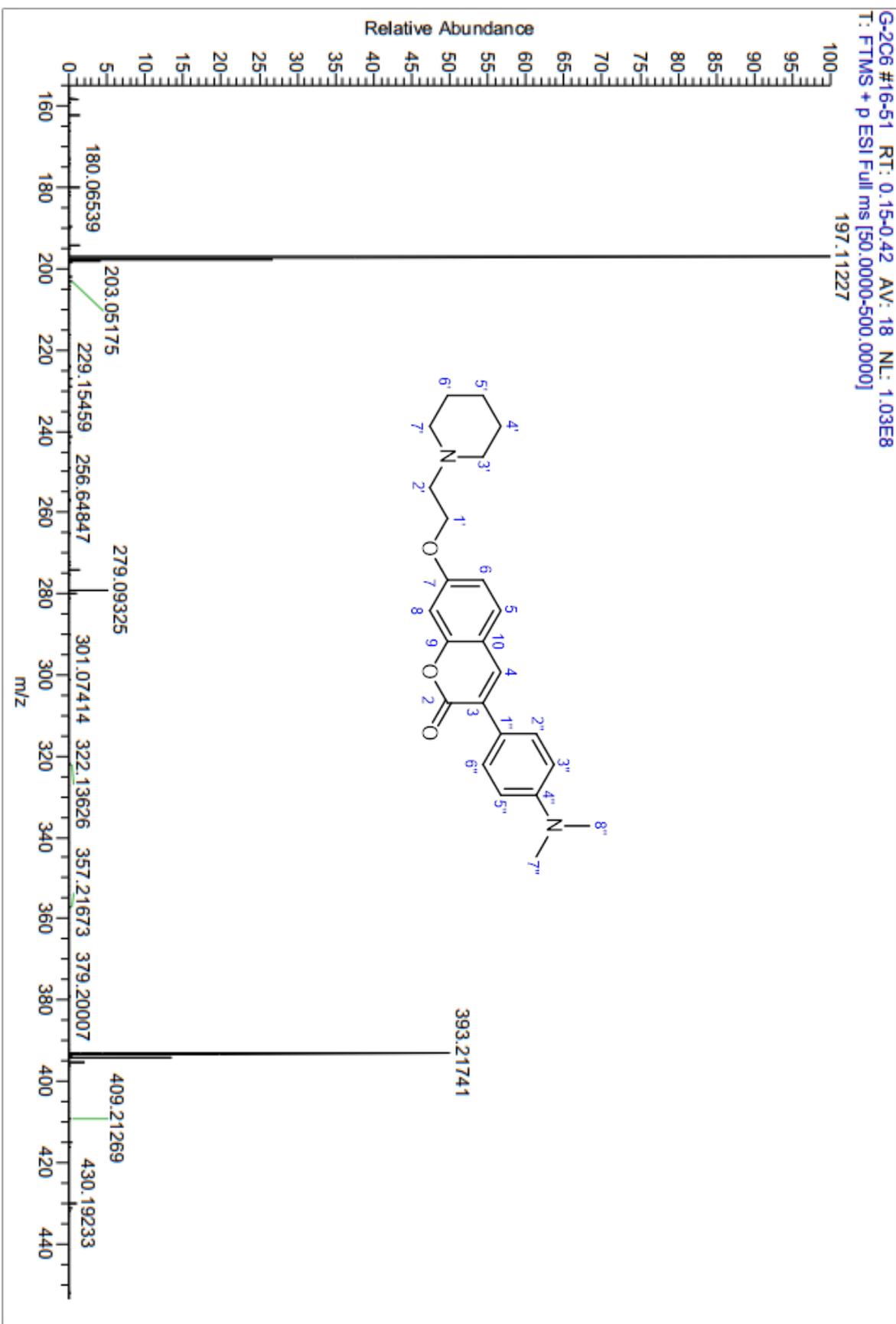
Anexo 50. EMAR para 47b



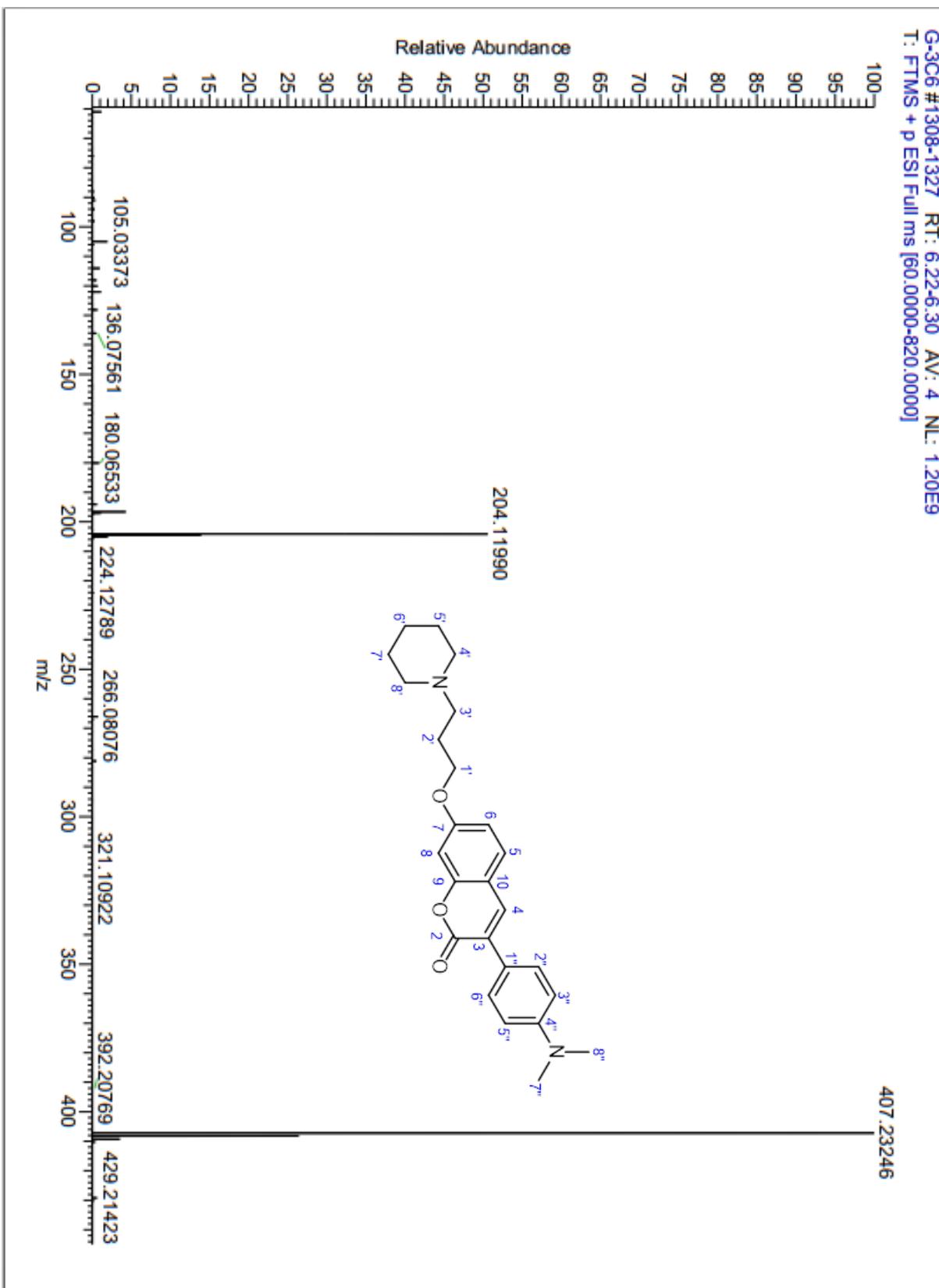
Anexo 51. EMAR para 47c



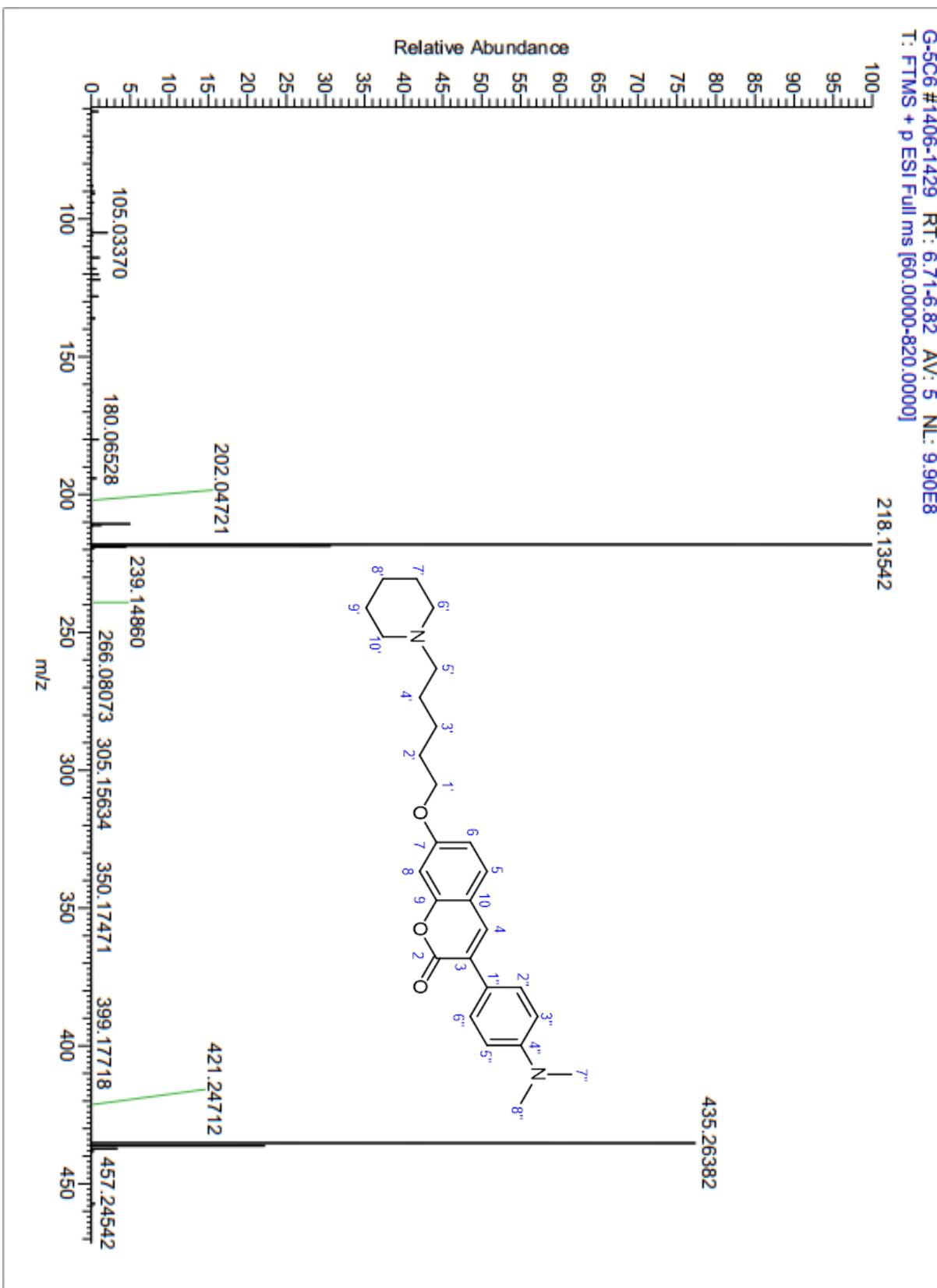
Anexo 52. EMAR para 48a



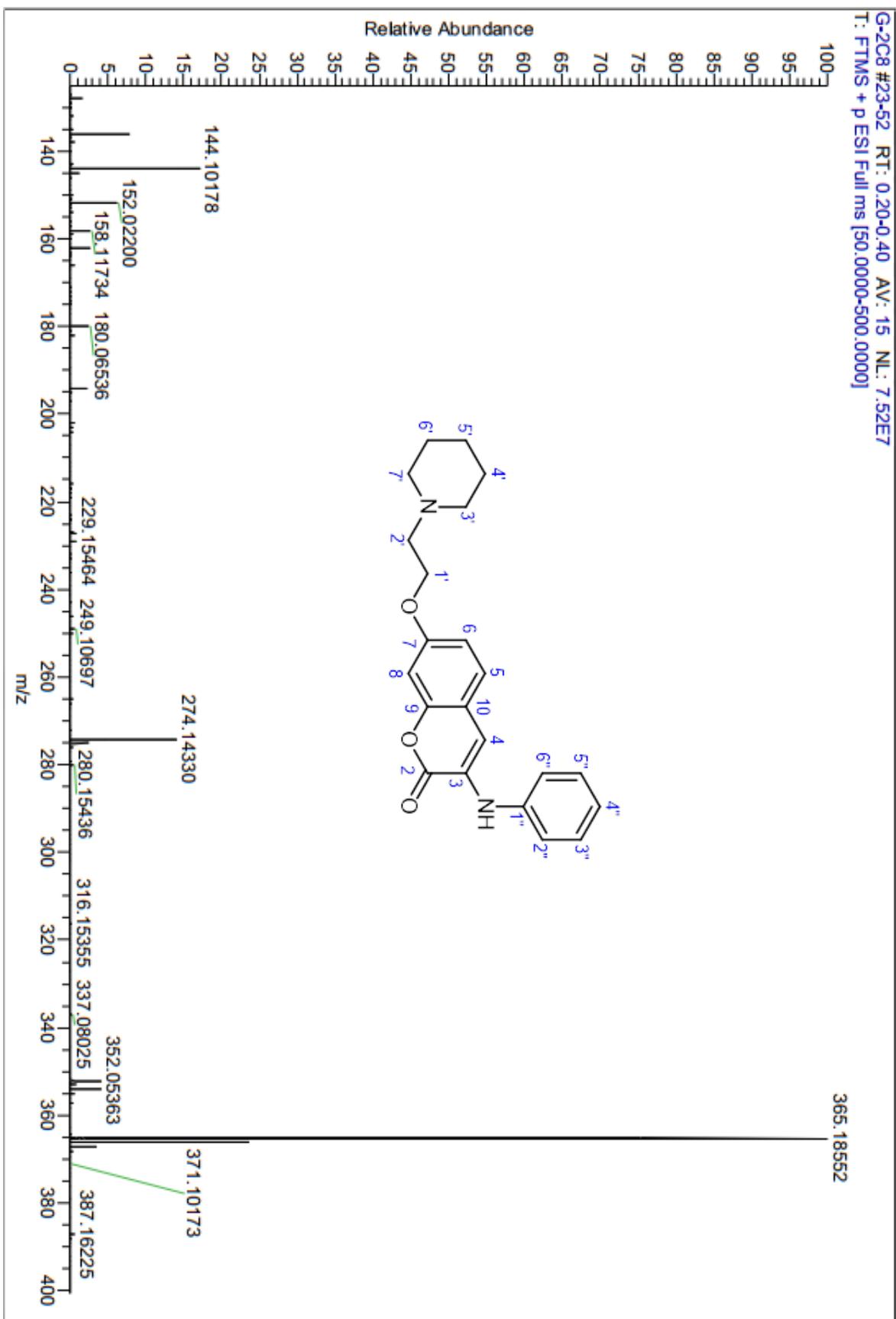
Anexo 53. EMAR para 48b



Anexo 54. EMAR para 48c

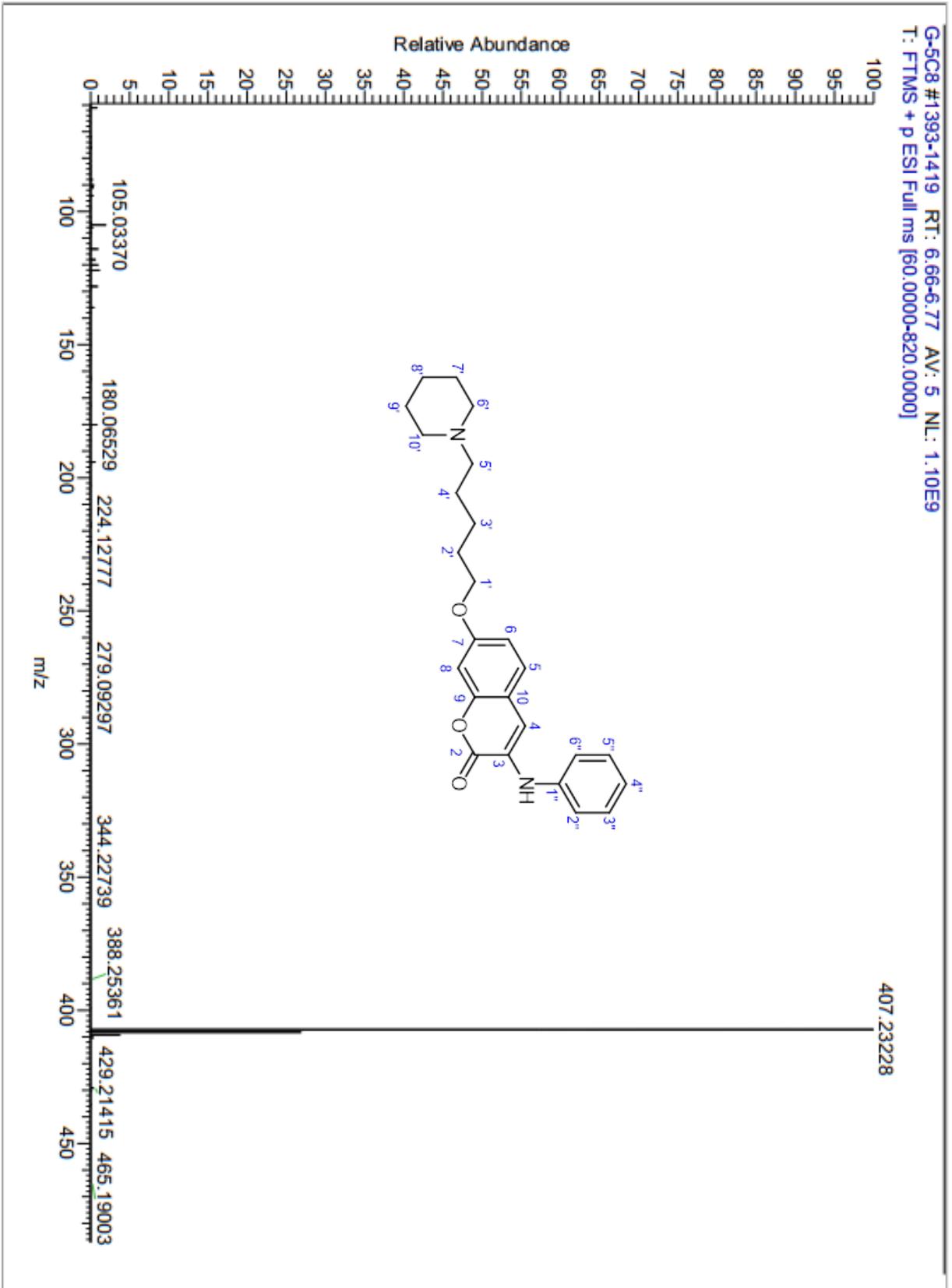


Anexo 55. EMAR para 50a

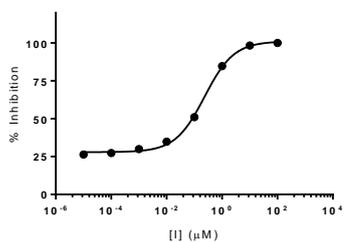




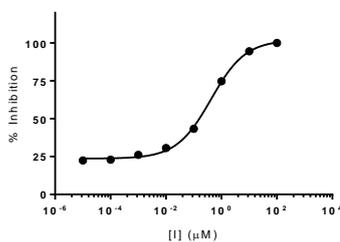
Anexo 57. EMAR para 50c



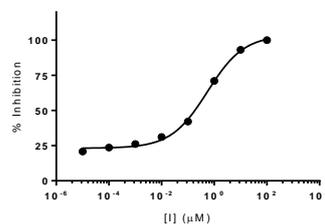
**Anexo 58.** Gráficos de porcentagem de inibição vs. concentração do inibidor para EeAChE



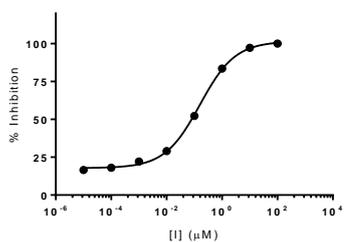
**44a**



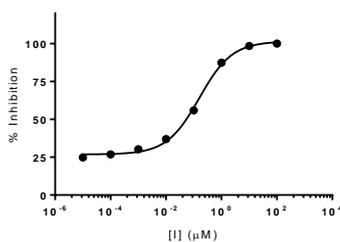
**44b**



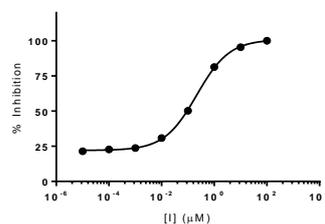
**44c**



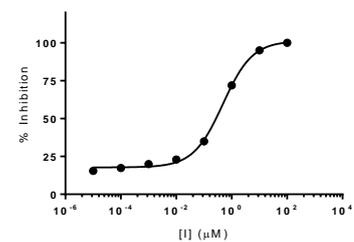
**44d**



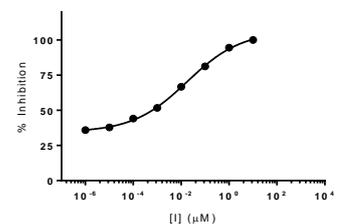
**47a**



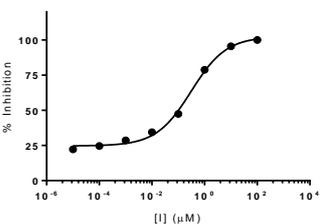
**47b**



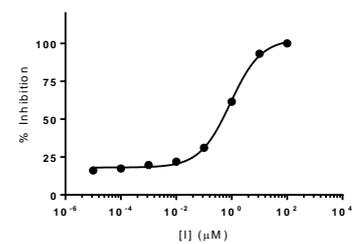
**47c**



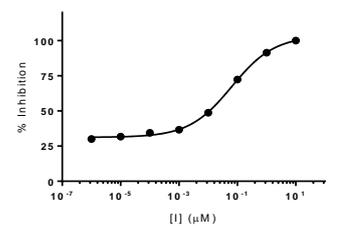
**48a**



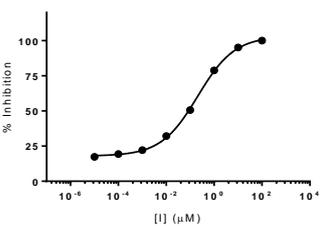
**48b**



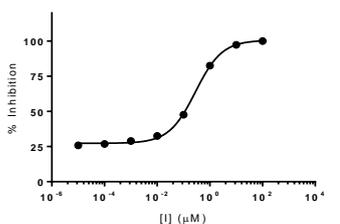
**48c**



**50a**

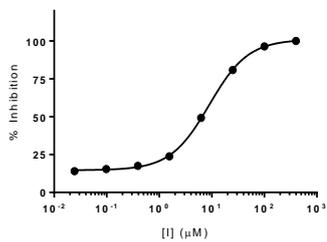


**50b**

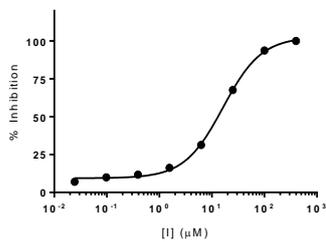


**50c**

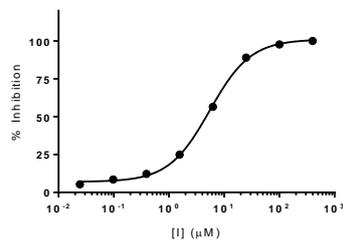
Anexo 59. Gráficos de porcentagem de inibição vs. concentração do inibidor para EqBChE



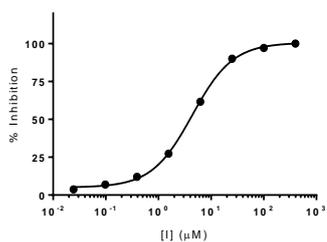
44a



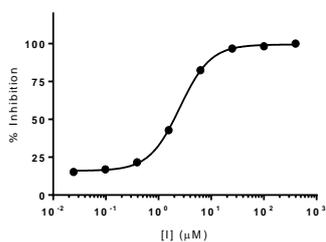
44b



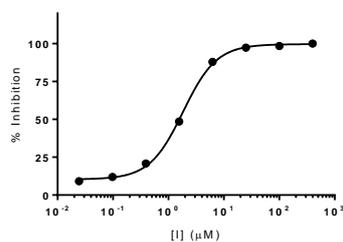
44c



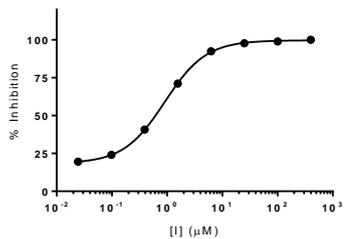
44d



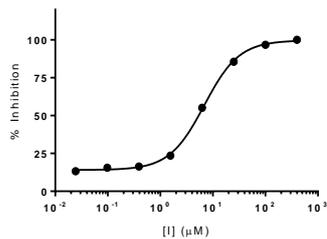
47a



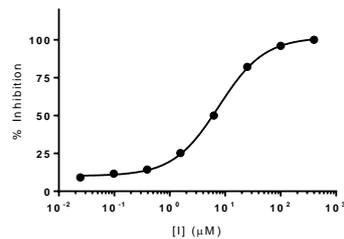
47b



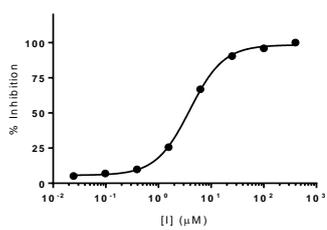
47c



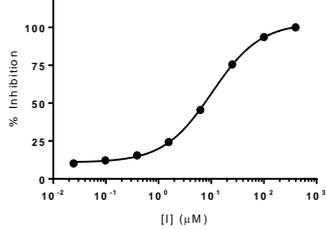
48a



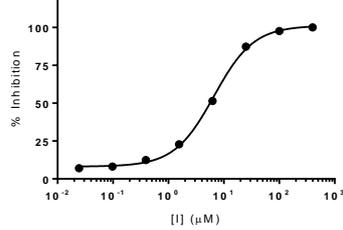
48b



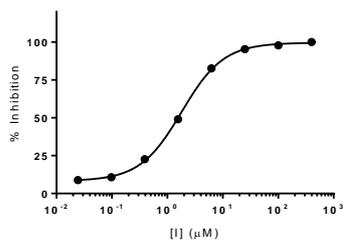
48c



50a

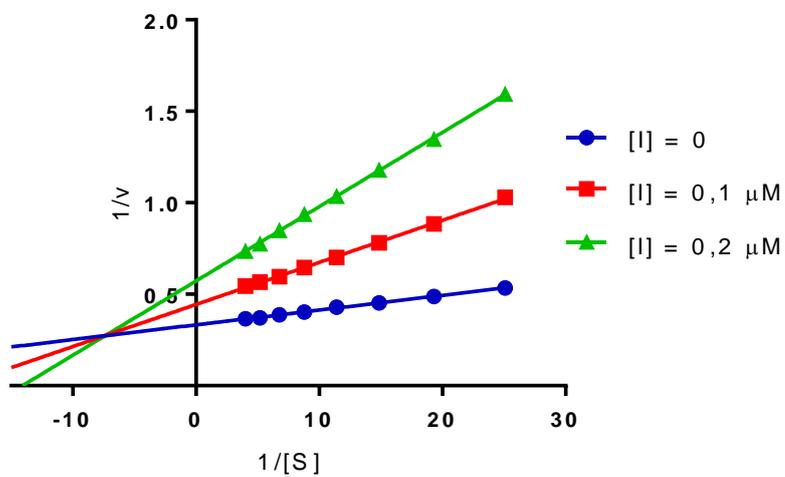


50b

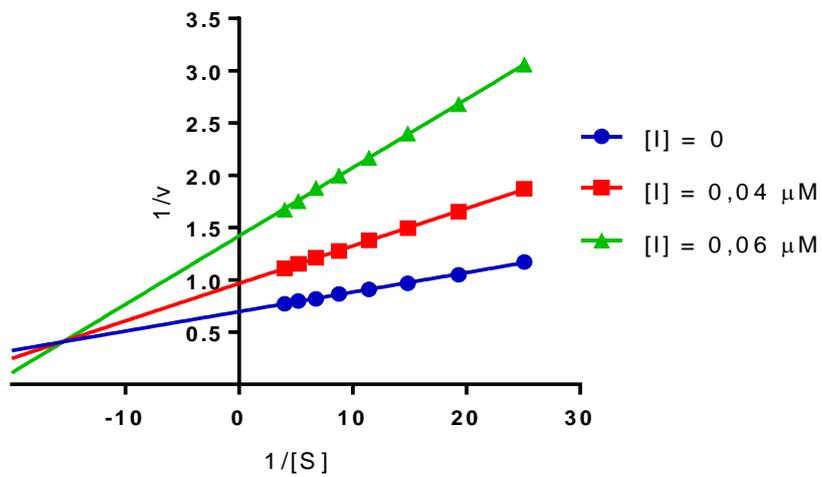


50c

Anexo 60. Gráficos de Lineweaver-Burk da cinética de inibição em EeAChE

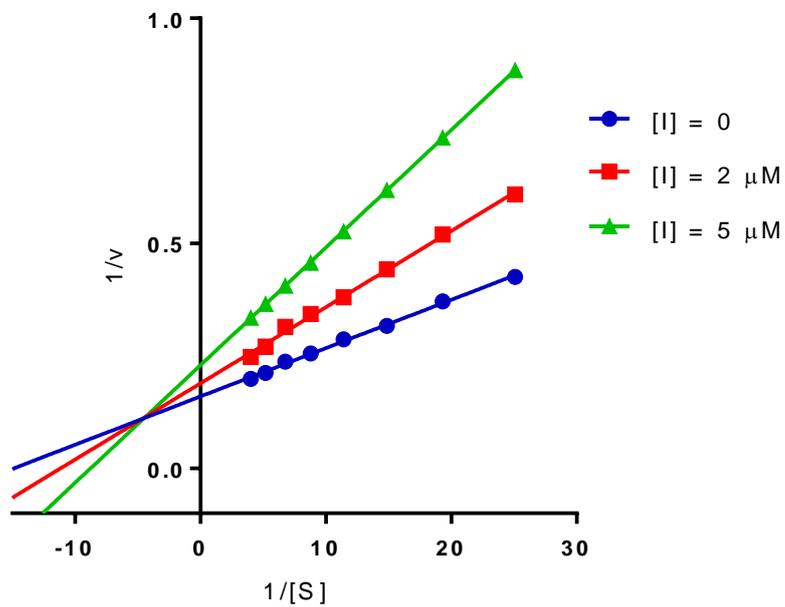


44d

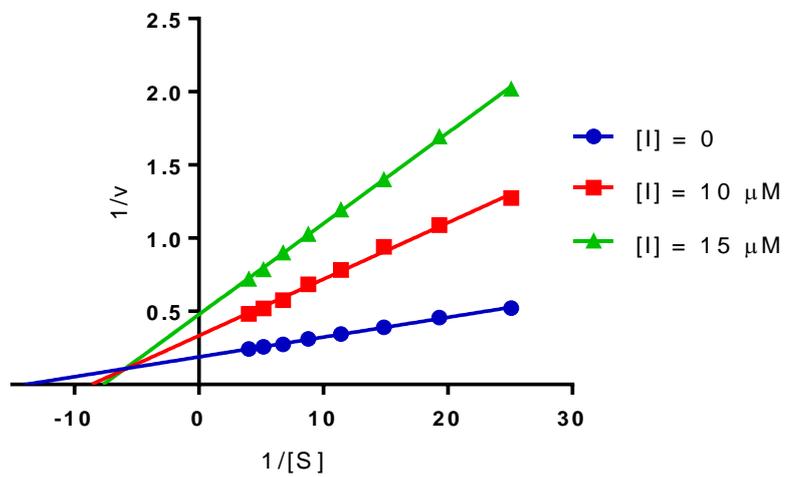


50a

Anexo 61. Gráficos de Lineweaver-Burk da cinética de inibição em EqBChE



44d



50a