

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO

INSTITUTO DE QUÍMICA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

DISSERTAÇÃO

Síntese e avaliação farmacológica de novas 3-(imidazo[1,2-*a*]piridinas)-cumarinas planejadas para o tratamento da Doença de Alzheimer

Larissa de Almeida Peixoto Ferreira

2021



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

**SÍNTESE E AVALIAÇÃO FARMACOLÓGICA DE NOVAS 3-
(IMIDAZO[1,2-*a*]PIRIDINAS)-CUMARINAS PLANEJADAS PARA O
TRATAMENTO DA DOENÇA DE ALZHEIMER**

LARISSA DE ALMEIDA PEIXOTO FERREIRA

Sob orientação do professor
Dr. Arthur Eugen Kümmerle

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

Seropédica, RJ
Abril de 2021

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

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

F383s Ferreira, Larissa de Almeida Peixoto, 1994-
Síntese e avaliação farmacológica de novas 3
(imidazo[1,2-a]piridinas)-cumarinas planejadas para o
tratamento da Doença de Alzheimer / Larissa de
Almeida Peixoto Ferreira. - Seropédica, 2021.
181 f.: il.

Orientador: Arthur Eugen Kümmerle.
Dissertação(Mestrado). -- Universidade Federal Rural
do Rio de Janeiro, Química, 2021.

1. Doença de Alzheimer. 2. Cumarinas. 3. Imidazo
piridinas. 4. Inibidores de AChE e BuChE. I.
Kümmerle, Arthur Eugen, 1979-, orient. II Universidade
Federal Rural do Rio de Janeiro. Química III. Título.

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

LARISSA DE ALMEIDA PEIXOTO FERREIRA

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

DISSERTAÇÃO APROVADA EM 16/04/2021

Conforme deliberação número 001/2020 da PROPPG, de 30/06/2020, tendo em vista a implementação de trabalho remoto e durante a vigência do período de suspensão das atividades acadêmicas presenciais, em virtude das medidas adotadas para reduzir a propagação da pandemia de Covid-19, nas versões finais das teses e dissertações as assinaturas originais dos membros da banca examinadora poderão ser substituídas por documento(s) com assinaturas eletrônicas. Estas devem ser feitas na própria folha de assinaturas, através do SIPAC, ou do Sistema Eletrônico de Informações (SEI) e neste caso a folha com a assinatura deve constar como anexo ao final da tese / dissertação.

Membros da banca:

Arthur Eugen Kummerle. Dr. UFRRJ
(Orientador)

Renata Barbosa Lacerda. Dr^a. UFRRJ

Maria Leticia de Castro Barbosa. Dr^a. UFRJ

Cedric Stephan Graebin. Dr. UFRRJ

Mariana Amaral Alves. Dr^a. University of Turku



Emitido em 16/04/2021

DELIBERAÇÃO Nº 122/2021 - PPGQ (12.28.01.00.00.60)

(Nº do Protocolo: NÃO PROTOCOLADO)

(Assinado digitalmente em 19/04/2021 09:29)

ARTHUR EUGEN KUMMERLE
PROFESSOR DO MAGISTERIO SUPERIOR
DQO (11.39.00.23)
Matrícula: 1700480

(Assinado digitalmente em 17/04/2021 13:18)

RENATA BARBOSA LACERDA
PROFESSOR DO MAGISTERIO SUPERIOR
DeptºCF (12.28.01.00.00.47)
Matrícula: 1979542

(Assinado digitalmente em 18/04/2021 10:04)

MARIA LETICIA DE CASTRO BARBOSA
ASSINANTE EXTERNO
CPF: 098.651.697-03

Para verificar a autenticidade deste documento entre em <https://sipac.ufrrj.br/documentos/> informando seu número:
122, ano: **2021**, tipo: **DELIBERAÇÃO**, data de emissão: **17/04/2021** e o código de verificação: **e08346961f**

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Alessandra e Alessandro, por todo apoio e incentivo a me dedicar aos estudos, e por sempre investirem na minha formação. Também por ser meu porto seguro, sempre me apoiando nas minhas escolhas.

À minhas irmãs Lizandra e Letícia, pelo apoio emocional.

Às amigas que construí durante esses anos na universidade que sempre estiveram comigo em todos os momentos.

Ao meu orientador, Dr Arthur Eugen Kummerle, por ser um exemplo a ser seguido e por ter me ajudado e me guiado no decorrer deste trabalho, me dando todo o suporte necessário.

Aos professores do programa de pós-graduação, pela dedicação em ensinar e sempre estarem dispostos a ajudar em qualquer momento que fosse necessário. Em especial a professora Rosane Nora que sempre se preocupou e prontificou a ajudar em qualquer situação.

Aos meus amigos do LaDMOL-QM que acompanharam de perto o desenvolvimento deste trabalho e sempre que necessário me auxiliaram. Em especial ao Lucas, Nathalia, Daiana, Luciana, Vitória, Marina, Felipe, Gleyton, Paula, Marcus e Bruno pelos momentos compartilhados, permeados por alegrias, ansiedade e companheirismo.

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) é uma doença neurodegenerativa progressiva que possui uma patogênese complexa, induzindo a perda de memória e distúrbios cognitivos, que geralmente se apresenta na terceira idade. As cumarinas e imidazopiridinas (IM) são classes de compostos com ampla atuação farmacológica e existem diversos estudos promissores relacionados ao tratamento da DA, atuando em vários alvos como acetilcolinesterase (AChE), butirilcolinesterase (BuChE), agregação de placas β -amilóides ($A\beta$) e entre outros. Assim, o objetivo geral deste trabalho é a síntese de novas 3-(imidazo[1,2-*a*]piridin-2-il)-cumarinas, com base em trocas clássicas de bioisosterismo de grupos 4-(dimetilamino)fenila por imidazopiridinas (IM) como possíveis inibidores de colinesterases para o tratamento da DA. A primeira série originou-se pela síntese das 3-(imidazo[1,2-*a*]piridinas)-cumarinas (**66a-d**) envolvendo 5 etapas reacionais: síntese das 3-acetil-cumarinas (**67a-c**) (rendimento de 70% a 90%) (etapa 1), α -bromação das 3-acetil-cumarinas (rendimento de 51 a 73%) (etapa 2), formação do núcleo da IM (etapa 3) (rendimento de 64 a 69%), alquilação das IMs com conversões de 74% a 88% (etapa 4) e, por fim, a etapa de aminação com a formação dos compostos finais (**66a-d**). A segunda série veio da síntese de 3-(imidazo[1,2-*a*]piridinas-9'-etilcarboxilato)-cumarinas, envolvendo etapas de condensação Knoevenagel para formação de compostos com núcleo cumarínico (**89**) (rendimento de 86%), *O*-alquilação (**93a-d**) (rendimentos de 30 a 74%), formação do núcleo das IMs (**102a-d**) (rendimentos de 42 a 74%) e aminação (**103a-d**) (rendimentos de 31% a 79%). *Screening* inicial a uma concentração fixa de 30 μ M, para dois compostos finais **66b** e **103b**, demonstrou uma inibição enzimática de aproximadamente 91,7% (AChE) / 92,4% (BuChE) e 98,1% (AChE) / 88,6%(BuChE), respectivamente. Além da atividade foram realizados estudos *in silico* de modelagem molecular e parâmetros ADME. Com base nesses resultados preliminares, novos compostos estão sendo sintetizados, e o CI_{50} e a cinética enzimática frente as colinesterases serão determinadas.

PALAVRAS-CHAVE: Doença de Alzheimer, Cumarinas, Imidazo-piridinas, Inibidores de AChE e BuChE

ABSTRACT

Alzheimer's disease (AD) is a progressive neurodegenerative disease that has complex pathogenesis, inducing memory loss and cognitive disorders, which usually present in old age. The coumarins and imidazopyridines (IM) are classes of compounds with wide pharmacological activity and several promising studies related to the treatment of AD acting on several targets such as acetylcholinesterase (AChE), butyrylcholinesterase (BuChE), aggregation of β -amyloid plaques ($A\beta$), and among others. Thus, the general objective of this work is the synthesis of new 3-(imidazo [1,2-a] pyridin-2-yl) -coumarins, based on classic bioisosterism of 4-(dimethylamino) phenyl groups by imidazopyridines (IM) as possible cholinesterase inhibitors for the treatment of AD. The first series is originated from the synthesis of 3-(imidazo [1,2-a] pyridines)-coumarins (**66a-d**) involving 5 reaction steps: synthesis of 3-acetyl-coumarins (**67a-c**) (yields 70 % to 90%) (step 1), α -bromination of 3-acetyl-coumarins (yields 51 to 73%) (step 2), formation of the IM nucleus (step 3) (64 to 69% yield), alkylation of the IMs with conversions of 74% to 88% (step 4) and, finally, the amination step with the formation of the final compounds (**66a-b**). The second series came from the synthesis of 3-(imidazo [1,2-a] pyridines-9'-ethylcarboxylate)-coumarins, involving Knoevenagel condensation steps to form compounds with coumarin nucleus (**89**) (86% yield), *O*-alkylation (**93a-d**) (yields from 30 to 74%), core formation of MIs (**102a-d**) (yields from 42 to 74%) and amination (**103a-d**) (yields from 31% to 79%). Initial screening at a fixed concentration of 30 μ M, for two final compounds **66b** and **103b**, showed an enzymatic inhibition of approximately 91.7% (AChE) / 92.4% (BuChE) and 98.1% (AChE) / 88, 6% (BuChE), respectively. In addition to the activity, *in silico* studies of molecular modeling and ADME parameters were carried out. Based on these preliminary results, new compounds are being synthesized, the IC_{50} and the enzymatic kinetics against cholinesterases will be determined.

KEYWORDS: Alzheimer's disease, Coumarins, Imidazo-pyridines, AChE and BuChE inhibitors.

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Psiquiatra alemão Alois Alzheimer (1) e Auguste Deter (2).	1
Figura 2. Agregação e deposição peptídeos β -amiloide (PS), a fosforilação da proteína Tau (ENF), e a atrofia do tecido cerebral são as principais causas da DA. Fonte: Alzheimer’s Disease Research, acesso em 28/04/2020.	3
Figura 3. Processamento da APP. Na via não amiloidogênica a APP é clivada pela enzima α -secretase e o peptídeo insolúvel é posteriormente clivado pela enzima γ -secretase. Na via amiloigênica a APP é clivada pela BACE-1 em que o peptídeo insolúvel é clivado pela γ -secretase, gerando peptídeos tóxicos.	6
Figura 4. Diferença entre um microtúbulo saudável e um microtúbulo na DA, no qual há formação de ENF que se agregam e depositam nos neurônios.	7
Figura 5. Representação biossintética da neurotransmissão da acetilcolina (adaptado de FERREIRA-VIEIRA et al., 2016).	9
Figura 6. Processo de excitotoxicidade em neurônios glutamatérgicos.	11
Figura 7. Dano mitocondrial na doença de Alzheimer (LUQUE-CONTRERAS et al., 2014)	13
Figura 8. Nos processos inflamatórios o aparecimento de uma lesão ocasiona a ativação da micróglia e dos astrócitos gerando uma série de elementos pró-inflamatórios como a ERRO, ERN, quimiocinas e citocinas que levam a morte neuronal. (Adaptado de MORALES, et al., 2014).	14
Figura 9. Medicamentos inibidores das colinesterases possuem como mecanismo de inibição o bloqueio do sítio catalítico das enzimas AChE e BuChE. A tacrina (1) é um inibidor reversível não competitivo para AChE e BuChE; a donepezila (2) é um inibidor reversível não competitivo altamente seletivo para AChE, a rivastigmina (3) trata-se de uma inibição irreversível pseudo-seletivo para AChE e BuChE; Já a galatamina (4) é um inibidor reversível competitivo e seletivo para AChE (ENGELHARDT et al., 2005).	18
Figura 10. Estrutura química da Memantina (5).	19
Figura 11. Tendência dos estudos de fase 3, 2017-2019, de acordo com as categorias relacionadas ao evento em ClinicalTrials.go (HUANG; CHAO, 2020).	22
Figura 12. Tendências dos ensaios de fase 1 e fase 2, 2017–2019, de acordo com as categorias relacionadas ao evento em ClinicalTrials.gov (HUANG; CHAO, 2020).	23
Figura 13. Estruturas químicas das subclasses de benzopironas: cumarinas (6) e flavonoides (7).	24

Figura 14. Estrutura química dos diferentes tipos de cumarinas: (6) Cumarina, (8) Piranocumarinas, (9) Furanocumarina, (10) Cumarinas com substituintes no anel pirona, (11) Cumarinas miscelâneas. (Adaptado de VERNUGOPALA; RASHMI; ODHAY, 2013)	24
Figura 15. Exemplos de cumarinas e suas aplicações farmacológicas (VERNUGOPALA; RASHMI; ODHAY, 2013).....	26
Figura 16. Isômeros da imidazopiridina.....	27
Figura 17. Estrutura dos fármacos disponíveis contendo núcleo imidazo[1,2-a]piridina.	28
Figura 18. Representação da análise cromatográfica por CCF para a identificação dos compostos 42a-d utilizando hexano/acetato 30% como fase móvel.....	36
Figura 19. Atribuição dos sinais que confirmam a presença do composto 42b nos espectros de RMN ¹ H (500MHz) em CDCl ₃ a 400 MHz.....	37
Figura 20. Representação da análise cromatográfica por CCF para a identificação dos compostos 59a-d utilizando diclorometano/metanol 10% como fase móvel.....	40
Figura 21. Sinais referente a confirmação da formação núcleo cumarínico do composto 59a no RMN ¹ H em CDCl ₃ a 400 MHz.....	41
Figura 22. Atribuição dos principais sinais do composto 3-acetil-7-aminoalcoxi-cumarina (57a) nos espectros de RMN ¹ H e ¹³ C em CDCl ₃	42
Figura 23. A figura mostra uma comparação no RMN ¹ H do intermediário da etapa anterior (59a) e o suposto produto (66a) indicando que não houve a formação do anel piridínico que é crucial para comprovação da reação.....	44
Figura 24. Atribuição dos principais sinais das 3-acetil -cumarinas (67a-c) nos espectros de RMN ¹ H e ¹³ C em CDCl ₃	47
Figura 25. Representação da análise cromatográfica por CCF para a identificação dos compostos 74a-c em diclorometano/metanol 10% como fase móvel.	48
Figura 26. Atribuição dos principais sinais das 3-(2-bromoacetil)-cumarinas (74a-c) nos espectros de RMN ¹ H e ¹³ C em DMSO.....	49
Figura 27. Representação da análise cromatográfica por CCF para a identificação dos compostos 77a-c em diclorometano/metanol 10% como fase móvel.....	50
Figura 28. Comparação dos principais sinais do núcleo da cumarina dos compostos 74a-c e do núcleo da IM dos compostos 77a-c	52
Figura 29. Representação da análise cromatográfica por CCF para a identificação dos compostos 78a-d em dicloro/metanol 10% como fase móvel.	53

Figura 30. Representação da análise cromatográfica por CCF para a identificação dos compostos 66a e 66b em diclorometano/metanol 10%.....	55
Figura 31. Atribuição do produto final 66a no RMN ¹ H em DMSO a 500 MHz, na faixa referente à comprovação da formação da cadeia aminoalcoxila.	68
Figura 32. Atribuição dos principais sinais do composto 7-hidroxi--β-cetoéster (89) nos espectros de RMN ¹ H e ¹³ C em DMSO-d ₆ a 500 MHz.	72
Figura 33. Comparação entre os espectros do composto 89 da reação anterior em DMSO a 500 MHz com o composto 93b em CDCl ₃ a 400 MHz para correlacionar a região de aromáticos em relação ao tautomerismo, mostrando que em CDCl ₃ a proporção da forma enol é maior	74
Figura 34. Atribuição dos principais sinais dos derivados 7- bromoalcoxi- β-cetoéster (93a-d).	75
Figura 35. Atribuição dos principais sinais dos derivados imidazo[1,2-a]piridinas-9'-etilcarboxilato.	77
Figura 36. Região do espectro de RMN ¹ H em DMSO a 500 MHz que comprova a formação do composto 103b , devido ao aparecimento de sinais referente ao grupo alquilamino formado	78
Figura 37. Estrutura química, atividade frente as enzimas AChE e BuChE e sobreposição da interação dos compostos 105a (amarelo) e 105d (azul) EeAChE obtido por ancorage molecular com a função Goldscore no programa Gold. As distâncias da ligação H (Å) são mostradas em amarelo. Figura gerada com PyMol 0,99 (adaptado de DE SOUZA et al., 2019).	81
Figura 38. Análise das principais interações moleculares entre o composto 66b e a cavidade enzimática da EeAChE obtido por ancorage molecular com a função Goldscore no programa Gold.Figura gerada com PyMol 0,99 (DeLano Scientific LLC).	82
Figura 39. Análise das principais interações moleculares entre o composto 103b e a cavidade enzimática da EeAChE obtido por ancoragem molecular com a função Goldscore no programa Gold. Figura gerada com PyMol 0,99 (DeLano Scientific LLC).	69
Figura 40. Método Boiled-egg para os compostos cumarínicos. (BBB) barreira hematocefálica, (HIA) absorção gastrointestinal, (PGP+) substrato da glicoproteína p, (PGP-) não é substrato da glicoproteína p.	70

INDICE DE ESQUEMAS

Esquema 1. Reações de Haber-Weiss e de Fenton.....	16
Esquema 2. Reação de condensação de Perkin.	25
Esquema 3. Reação de condensação de Pechmann.	25
Esquema 4. Reação de condensação de Knoevenagel.....	26
Esquema 5. Planejamento estrutural dos compostos 3-(imidazo[1,2-a]piridina)-7-aminoalcoxi-cumarinas.....	30
Esquema 6. Compostos finais da classe das 3-(imidazo[1,2-a]piridina)- 7-aminoalcoxi-cumarinas.....	31
Esquema 7. Análise retrossintética para obtenção de Imidazopiridinas cumarínicas (66a-d).....	32
Esquema 8. Rota sintética inicial de obtenção das 3-(imidazo[1,2-a])-7-aminoalcoxi-cumarinas (66a-d).	32
Esquema 9. Rota otimizada de obtenção das 3-(imidazo[1,2-a])-7-aminoalcoxi-cumarinas (66a-d).....	33
Esquema 10. Síntese dos derivados 4-bromoalcoxi-2-hidroxibenzaldeídos (42a-d).....	34
Esquema 11. Mecanismo proposto para a formação dos derivados 4-bromoalcoxi-2-hidroxibenzaldeídos (42a-d).....	35
Esquema 12. Síntese dos derivados 3-acetil-7-aminoalcoxi-cumarinas (59a-b).	37
Esquema 13. Mecanismo proposto para a formação dos intermediários 3-acetil-7-aminoalcoxi-cumarinas (59a-d).	39
Esquema 14. Síntese dos produtos finais 66a-d	42
Esquema 15. Esquemas de intermediários para a formação dos produtos finais 66a-d	43
Esquema 16. Análise retrossintética final da obtenção das IMs (66a-d).	45
Esquema 17. Síntese das 3-acetil-cumarinas (67a-c).	46
Esquema 18. Síntese das 3-(2-bromoacetil)-cumarinas (74a-c).....	47
Esquema 19. Mecanismo proposto para a formação das 3-(2-bromoacetil)-cumarinas (74a-c).	49
Esquema 20. Síntese das 3-(imidazo[1,2-a]piridinas)-cumarinas (77a-c).	49
Esquema 21. Esquemas de intermediários simplificado para a formação imidazo[1,2-a]piridinas (77a-c).	51
Esquema 22. Síntese das 3-(imidazo[1,2-a]piridinas)-7-bromoalcoxi-cumarinas (78a-b).....	52
Esquema 23. Síntese das 3-(imidazo[1,2-a]piridinas)-7-aminoalcoxi-cumarinas 66a-b	54
Esquema 24. Mecanismo proposto para formação dos compostos 66a-d	55

Esquema 25. Análise retrossintética para obtenção de 3-(imidazo[1,2- <i>a</i>]piridinas-9'-etilcarboxilato)-cumarinas (103a-d).....	57
Esquema 26. Síntese do 7-hidroxi- β -cetoéster (89).....	71
Esquema 27. Mecanismo proposto para formação do 7-hidroxi- β -cetoéster (89).	59
Esquema 28. Síntese dos compostos 93a-d	60
Esquema 29. Mecanismo proposto para formação dos compostos 93a-d	61
Esquema 30. Síntese da 3-(imidazo[1,2- <i>a</i>]piridinas-9'-etilcarboxilato)-7-bromoalcoxi-cumarinas (102a-d).	63
Esquema 31. Esquema de intermediários proposto para formação dos compostos 102a-d	64
Esquema 32. Síntese dos produtos finais 103a-d	65
Esquema 33. Reação ocorrida no ensaio espectrofotométrico de Ellman.....	67

INDICE DE TABELA

Tabela 1. Desenvolvimento de medicamentos para a DA.....	21
Tabela 2. Características físicas e rendimentos dos compostos 42(a-d)	34
Tabela 3. Características físicas e rendimentos dos compostos 67a-c	46
Tabela 4. Características físicas e rendimentos dos compostos 72a-c	48
Tabela 5. Características físicas e rendimentos dos compostos 77a-c	50
Tabela 6. Características físicas e rendimentos dos compostos 78a-b	53
Tabela 7. Características físicas e rendimentos dos compostos 66a-b	54
Tabela 8. Características físicas e rendimentos dos compostos 93(a-d)	60
Tabela 9. Características físicas e rendimentos dos compostos 102a-d	63
Tabela 10. Características físicas e rendimentos dos compostos 103a-d	65

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

AcCoA - Acetilcoenzima A

ACh – Acetilcolina

AChE - Acetilcolinesterase

AMPA - Alfa-amino-3-hidroxi-metil-5-4-isoxazolpropiónico

BACE 1 - Enzima β -secretase

BBB - barreira hematocefálica

BuChE - Butirilcolinesterase

CCF – Cromatografia em camada fina

CD₃Cl – Clorofórmio deuterado

ChAT - Acetiltransferase

CHT1 - Transportador de colina de alta afinidade

d – duplete

DA - Doença de Alzheimer

dd – duplo duplete

DMSO-*d*₆ – Dimetilsulfóxido deuterado

DTNB – Ácido 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzóico

EAATs - Transportadores de aminoácidos excitatórios

*Ee*AChE – Acetilcolinesterase de enguia elétrica

ENF - Emaranhados neurofibrilares

ERN - Espécie reativa de nitrogênio

ERO - Espécie reativa de oxigênio

FDA - *Food and Drug Administration*

FDG-PET - Tomografia por emissão de pósitron com fluorodesoxiglicose

HIA - absorção gastrointestinal passiva

I-AChE - Inibidores das colinesterases

IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística

IC₅₀ – Concentração inibitória média

IM – imidazospiridina

J – Constante de acoplamento

m – multiplete

NMDA - N-metil-D-aspartato

PET - Tomografia por emissão de pósitrons

PPA - Proteína precursora de amiloide

ppm – partes por milhão

PS - Placas Senis

PTau - Proteína Tau

RM - Ressonância magnética

RMN – Ressonância Magnética Nuclear

RMN ¹³C – Ressonância Magnética Nuclear de Carbono 13

RMN ¹H – Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio

s – simpleto

SCPD - Tratamento farmacológico dos sintomas comportamentais e psicológicos

sl – simpleto largo

SN₂ – Substituição Nucleofílica Bimolecular

SNC - Sistema nervoso central

SNP - Sistema nervoso periférico

SPECT - Tomografia computadorizada por emissão de fóton único

t – tripleto

TPSA - Área de superfície polar topológica

VAcHT - Transportador vesicular de acetilcolina

β-A - Peptídios β-amilóides

δ – deslocamento químico

λ – comprimento de onda

PTSA – ácido *p*-tolueno sulfônico

NBS – N-Bromosuccinimida

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
1.1. A doença de Alzheimer	1
1.2. Fisiopatologia da DA	2
1.3. Diagnóstico e sintomas	3
1.4. Marcadores neuropatológicos	4
1.4.1. Hipótese amiloide	5
1.4.2. Hiperfosforilação da pTau	6
1.4.3. Hipótese colinérgica	7
1.4.4. Neurotransmissão glutamatérgica	9
1.4.5. Estresse oxidativo	11
1.4.6. Disfunção mitocondrial	12
1.4.7. Neuroinflamação	14
1.4.8. Hipótese dos metais	15
1.5. Tratamento	16
1.5.1. Tratamento farmacológico do transtorno cognitivo	16
1.5.2. Tratamento farmacológico dos sintomas comportamentais e psicológicos (SCPD)....	19
1.5.3. Estratégias terapêuticas em ensaios clínicos	19
1.6. Cumarinas	23
1.7. Imidazopiridinas (IMs)	27
2. OBJETIVOS	29
2.1. Objetivos gerais	29
2.2. Objetivos específicos	29
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	30
3.1. Planejamento estrutural	30
3.2. Síntese dos derivados 3-(imidazo[1,2- <i>a</i>]piridinas)-7-aminoalcoxi -cumarinas	31
3.2.1. Planejamento sintético	31
3.2.2. Rotas de obtenção das 3-(imidazo[1,2- <i>a</i>])-7-aminoalcoxi-cumarinas	32
3.2.3. Reação de <i>O</i> -alquilação do 2,4-diidroxisalicilaldeído (36)	33
3.2.4. Síntese <i>one-pot</i> dos derivados 3-acetil-7-aminoalcoxi-cumarinas (59a-).	37

3.2.5. Síntese das 3-(imidazo[1,2- <i>a</i>]piridinas)-cumarinas.....	42
3.3.1. Planejamento sintético	45
3.3.2. Síntese das 3-acetil-cumarinas (67a-c).....	46
3.3.3. α -Bromação das 3-acetil-cumarinas (74a-c).....	47
3.3.4. Síntese das 3-(imidazo[1,2- <i>a</i>]piridinas)-cumarinas (77a-c)	49
3.3.5. Alquilação da 3-(imidazo[1,2- <i>a</i>]piridinas)-7-hidroxi-cumarina (77a)	52
3.3.6. Aminoação das 3-(imidazo[1,2- <i>a</i>]piridinas)-7-bromoalcoxi-cumarinas (78a-d).....	53
3.3.	56
3.4. Síntese de 3-(imidazo[1,2- <i>a</i>]piridinas-9'-etilcarboxilato)-7-aminoalcoxi-cumarinas	56
3.4.1. Planejamento sintético	56
3.4.2. Síntese do 7-hidroxi- β -cetoéster (89)	57
3.4.3. Síntese das 7-bromoalcoxi-3- β -cetoéster-cumarinas (93a-d).....	60
3.4.4. Síntese das 3-(imidazo[1,2- <i>a</i>]piridinas-9'-etilcarboxilato)-7 bromoalcoxi-cumarinas	63
3.5. Resultados dos ensaios de inibição enzimática frente a AChE e BuChE para os compostos obtidos.....	67
3.6. Estudo <i>in silico</i> para os compostos obtidos por modelagem molecular e avaliação dos parâmetros ADME.....	68
4. CONCLUSÃO	73
5. PERSPECTIVAS	74
6. PARTE EXPERIMENTAL.....	75
6.1. Síntese dos derivados 3-(imidazo[1,2- <i>a</i>]piridinas)-7-aminoalcoxi-cumarinas (66a-d)	76
6.1.1. Reação de O-alquilação do 2,4-diidroxisalicilaldeído (42a-d)	77
6.1.2. Síntese <i>one-pot</i> para 3-acetil-7-aminoalcoxi-cumarinas (59a-d).	79
6.2. Rota final de obtenção das 3-(imidazo[1,2- <i>a</i>]piridina)-cumarinas	79
6.2.1. Síntese das 3-acetil-cumarinas (72a-c).....	79
6.2.2. α -Bromação das 3-acetil-cumarinas (74a-c).....	81
6.2.3. Síntese das 3-(imidazo[1,2- <i>a</i>]piridinas)-cumarinas (77a-c)	83
6.2.4. Alquilação da 3-(imidazo[1,2- <i>a</i>]piridinas)-7-hidroxi-cumarina (77a).	84
6.2.5. Aminoação das 3-(imidazo[1,2- <i>a</i>]piridinas)-7-bromoalcoxi-cumarinas (78a-d).....	85
6.3. Síntese das 3-(imidazo[1,2- <i>a</i>]piridinas-9'-etilcarboxilato)-cumarinas.....	87
6.3.1. Síntese do 7-hidroxi- β -cetoéster (89)	87
6.3.2. Alquilação do 7-hidroxi- β -cetoéster (93a-d)	88

6.3.3. Síntese das 7-bromoalcoxi- 3-(imidazo[1,2- <i>a</i>]piridina-9-etilcarboxilato)-cumarinas (102a-d).....	91
6.3.4. Aminoação das 7-bromoalcoxi- 3-(imidazo[1,2- <i>a</i>]piridina-9-etilcarboxilato)-cumarinas (102a-d).....	93
6.4. Teste <i>in vitro</i> da atividade anticolinesterásica dos derivados 3-(imidazo[1,2- <i>a</i>]piridina)-cumarinas.....	96
6.5. Ensaios de interação enzimática <i>in silico</i> para os compostos finais 66b e 103b.....	96
7. REFERÊNCIAS	98
8. ANEXOS	107

1. INTRODUÇÃO

1.1. A doença de Alzheimer

A Doença de Alzheimer (DA) é um transtorno neurodegenerativo progressivo associado à perda profunda de memória e disfunção cognitiva, havendo o comprometimento progressivo das atividades de vida diária, apresentando uma variedade de sintomas neuropsiquiátricos e de alterações comportamentais, que geralmente se apresenta na terceira idade (VATANABE; MANZINE; COMINETTI, 2020; BRASIL, 2007). É considerada a causa mais comum de demência, representando cerca de 60 a 70% dos casos, com custo superior a 50 bilhões de dólares/ano (HARRISON, 2013). Entretanto, só o fato de um paciente apresentar déficit de memória não significa que seja portador da doença. Os outros sintomas associados à perda de memória é que costumam ajudar a estabelecer o diagnóstico clínico. Para complicar, muitos pacientes apresentam tipos mistos, ou seja, a doença de Alzheimer junto com a demência de corpúsculos de Lewy ou com a demência vascular (STAHL, 2014).

A DA foi assim denominada por Emil Kraepelin em 1915, em homenagem ao psiquiatra alemão Alois Alzheimer, o qual descreveu pela primeira vez a doença em 4 de novembro de 1906, baseando-se em sua paciente Auguste Deter (51 anos) (Figura 1) que desde 1901 possuía comprometimento cognitivo como perda de memória, alucinações, delírios (MOLLER; GRAEBER, 1998). Após seu falecimento em 8 de abril de 1906, Alzheimer identificou em seu cérebro acúmulo de placas amilóides, emaranhados neurofibrilares e alterações arterioscleróticas, sendo consideradas as principais características da doença (FERRI *et al.*, 2006).

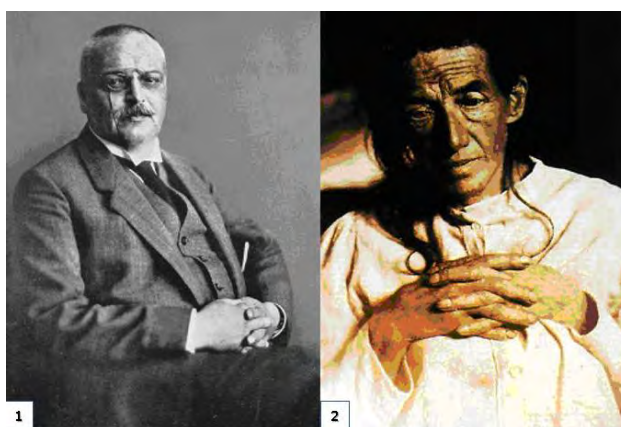


Figura 1. Psiquiatra alemão Alois Alzheimer (1) e Auguste Deter (2).

Segundo a Associação Internacional de Alzheimer (ADI, 2018), 50 milhões de pessoas em todo o mundo estão vivendo com demência e estima-se que haverá 152 milhões em 2050 com um custo de 1 trilhão de dólares. A DA afeta cerca de 10% dos indivíduos com mais de 65 anos

e cerca de 40% das pessoas com mais de 80 anos. Devido às mudanças significativas na expectativa de vida, estima-se que em 2050 o percentual da população com 65 anos ou mais de idade chegará a 25%, aumentando consideravelmente a prevalência da doença em razão do envelhecimento da população global (ELDER *et al.*, 2010)

No Brasil, de acordo com dados do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), há mais de 29 milhões de pessoas acima dos 60 anos. Acredita-se que quase 2 milhões de pessoas possuem algum tipo de demência, sendo que cerca de 40 a 60% delas são do tipo Alzheimer. No entanto, esses dados ainda são subestimados e difíceis de serem exatos, devido ao fato de que muitas pessoas não recebem diagnóstico correto, ou mesmo não chegam ao médico para um diagnóstico por causa de dificuldades financeiras e sociais (SBGG, 2019).

1.2. Fisiopatologia da DA

O conhecimento da fisiopatologia da DA é de extrema importância para o desenvolvimento de possíveis marcadores para o diagnóstico precoce e de novas abordagens terapêuticas que visam o tratamento da doença, e não apenas aos sintomas e suas manifestações clínicas, como ocorre atualmente (DE SÁ CAVALCANTI; ENGELHARDT, 2012). A presença de placas senis (PS), emaranhados neurofibrilares (ENF) e a perda de células neurais são as principais componentes da fisiopatologia da doença de Alzheimer (Figura 2) (BUERGER, 2006).

A progressão da doença leva à perda dos prolongamentos neuronais e comprometimento de seu entorno, à atrofia cerebral, com diminuição no peso e volume do cérebro (DE SÁ CAVALCANTI; ENGELHARDT, 2012). A perda sináptica e a morte neuronal são observadas nas regiões cerebrais responsáveis pelas funções cognitivas, incluindo o córtex cerebral, o hipocampo, o córtex entorrinal e o estriado ventral. Embora a atrofia do hipocampo e o aumento ventricular sejam observados com o envelhecimento normal, a progressão da perda de volume é significativamente mais rápida nos pacientes com doença de Alzheimer (SELKOE, 2001).

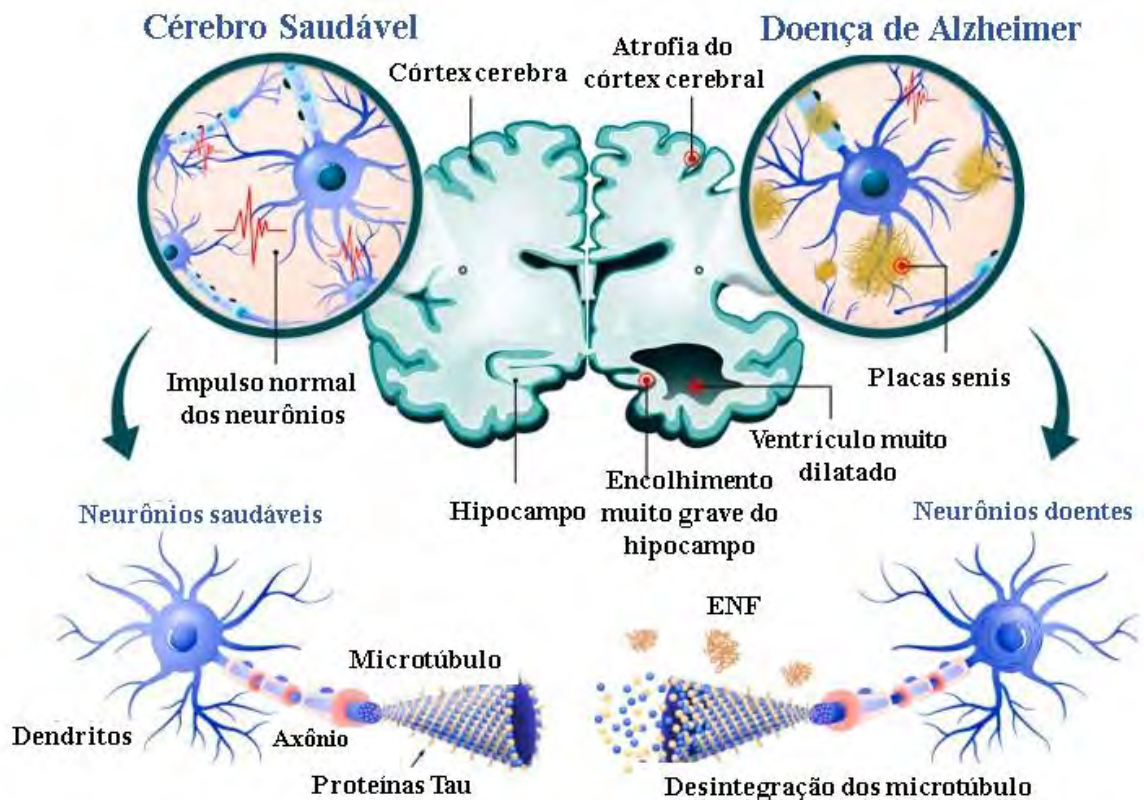


Figura 2. Agregação e deposição peptídeos β -amiloide (PS), a fosforilação da proteína Tau (ENF), e a atrofia do tecido cerebral são as principais causas da DA. Fonte: Alzheimer's Disease Research, acesso em 28/04/2020.

Também ocorre o comprometimento de núcleos colinérgicos e o excesso de atividade do glutamato (neurotransmissor excitatório) no córtex cerebral, que se relaciona com mecanismo de controle do cálcio neuronal, o que provoca uma hiperexcitabilidade neuronal e leva a célula à apoptose. Essas alterações de neurotransmissores constituem a base da atual terapêutica sintomática da doença, com o uso de anticolinesterásicos e de antagonista de receptores glutamatérgicos NMDA (HALLE *et al.*, 2008; HARDY, 2009).

1.3. Diagnóstico e sintomas

Antigamente a DA era diagnosticada provisoriamente através de exames neurológicos e neuropsicológicos. Atualmente, o diagnóstico está relacionado aos marcadores bioquímicos como os biomarcadores de amiloidose (acúmulo de amiloide) e biomarcadores de neurodegeneração relacionados aos níveis elevados de proteína Tau (pTau) no líquido cefalorraquidiano, os quais se acredita estarem associados a perda neuronal no cérebro de pacientes com DA. Esses biomarcadores podem ser identificados por tomografia por emissão de pósitrons (PET), tomografia computadorizada por emissão de fóton único (SPECT), tomografia por

emissão de pósitron com fluorodesoxiglicose (FDG-PET), ressonância magnética (RM) e de outras técnicas (STAHL, 2014; CHÉTELAT *et al.*, 2018).

A DA certamente tem um início muito mais precoce, talvez com manifestações subclínicas que ocorrem há décadas, antes do surgimento das claras alterações cognitivo-comportamentais da doença, com a evolução do quadro clínico. Diante disso, os critérios diagnósticos foram revisados e a doença passou a ser dividida em três estágios (STAHL, 2014; BRASIL, 2007):

- Estágio 1: Fase pré-sintomática, em que começa a se elevar os níveis de amiloide cerebral, é caracterizada por sintomas vagos e difusos, que se desenvolvem insidiosamente sendo o comprometimento da memória o sintoma mais proeminente e precoce, em especial a memória recente;
- Estágio 2: Início dos sintomas clínicos, associado ao déficit de memória e ao acometimento de outros domínios da cognição, como afasia (déficits de linguagem), agnosia (de reconhecimento), e apraxia (de função motora), entre outros. Estes sintomas parecem estar relacionados com o aumento da neurodegeneração;
- Estágio 3: Fase avançada ou estágio terminal, o déficit cognitivo é grave, há dificuldade para reconhecer pessoas e espaços familiares. É nessa fase que começa o tratamento da doença, sendo muito depois do verdadeiro início. A morte neuronal por apoptose, a perda sináptica e as modificações estruturais vão trazendo os sinais clínicos e a evolução inevitável e lenta da doença.

1.4. Marcadores neuropatológicos

Os marcadores neuropatológicos são um conjunto de fatores biológicos que podem ser medidos para indicar a presença ou ausência de uma doença, o risco de desenvolver uma doença ou progressão da doença. Assim como o nível de glicose no sangue é um biomarcador diabetes, a DA possui diversos marcadores biológicos que indicam sua presença e auxiliam no seu tratamento (ALZ, 2019).

Existem diversos biomarcadores que podem auxiliar um eventual tratamento ou busca por tratamentos para a DA, como por exemplo, a formação de oligômeros β -amilóides, hiperfosforilação da pTau, o déficit colinérgico, estresse oxidativo difundido no cérebro, neuroinflamação, desregulação de cálcio, deficiência e distribuição alterada das mitocôndrias, toxicidade sináptica e problemas na homeostase metálica, os quais serão discutidos adiante (DE SÁ CAVALCANTI; ENGELHARDT, 2012; DE FRANCO *et al.*, 2016).

1.4.1. Hipótese amiloide

A hipótese da cascata amiloide é considerada uma das principais bases biológicas provenientes de evidências patológicas da DA, mesmo que as deposições de amiloide possam ser também detectadas em pequenas quantidades em cérebros de idosos saudáveis. Esta teoria gira em torno da formação de placas amiloides tóxicas, devido ao processamento anormal da proteína precursora de amiloide (PPA) em formas tóxicas de peptídeos β -amilóides (β -A) (DE FRANCO *et al.*, 2016).

Primeiramente, é necessário entender o motivo da produção de peptídeos β -A. Estes quando produzidos de forma não tóxica possuem diversas propriedades como antioxidantes, regulação no transporte de colesterol e reparação dos vasos sanguíneos, protegendo contra lesões cerebrais. A forma dos peptídeos β -A gera oligômeros que se ligam a outras moléculas e geram placas de amiloides, pequenos agrupamentos que podem bloquear a sinalização entre as células nas sinapses. Em seguida ocorre uma série de eventos bioquímicos indesejáveis (inflamações, liberação de substâncias químicas tóxicas e outros), causando a hiperfosforilação de pTau e a conversão dos microtúbulos neuronais em emaranhados neurofibrilares que destroem o sistema de transporte das células, levando a morte difusa do neurônio (STAHL, 2014; ALZ, 2020).

A PPA produz peptídeos “não amiloidogênicos” (não tóxicos) e “amiloidogênicos” com auxílio de enzimas secretases. A via não tóxica ocorre através da clivagem da PPA pela enzima α -secretase formando um peptídeo solúvel α -PPA e um segundo peptídeo que permanece dentro da membrana até ser clivado pela enzima γ -secretase. Na via tóxica, a enzima β -secretase (BACE 1) efetua a clivagem da PPA um pouco mais distante da área onde ela sai da membrana, formando dois peptídeos: um fragmento solúvel β -PPA, e um fragmento terminal C (β -CTF), peptídeo menor que permanece inserido na membrana até ser clivado pela γ -secretase (Figura 3). Ocorre, então, a liberação de peptídeos tóxicos (β -A) de 40, 42 ou 43 aminoácidos, que são “amiloidogênicos”, sendo a forma β -A de 42 a mais abundante (SELKOE, 2001; DELANOGARE *et al.*, 2019; GADHAVE *et al.*, 2020).

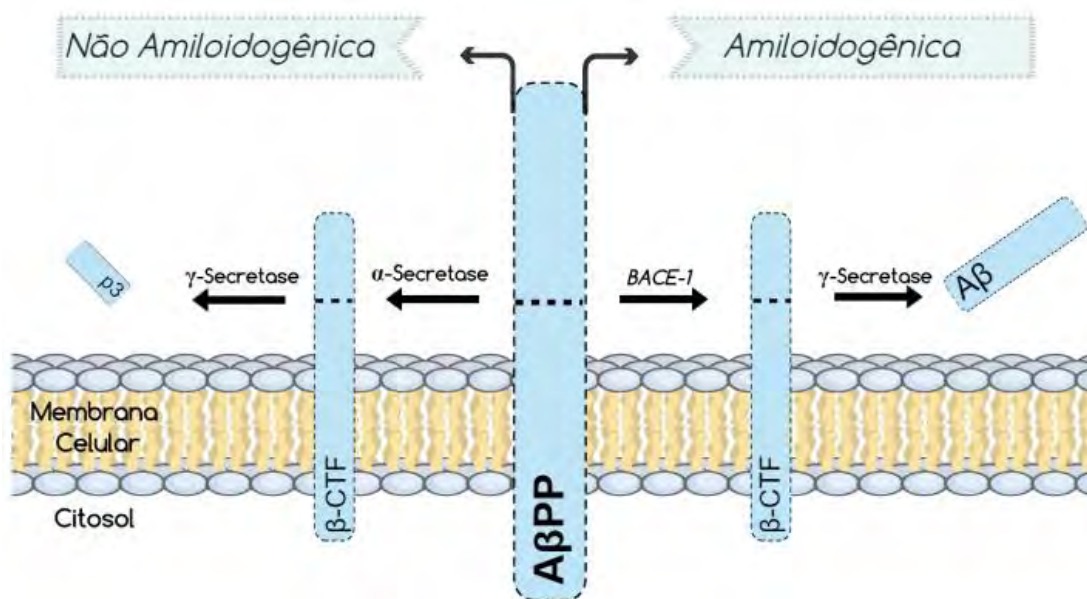


Figura 3. Processamento da APP. Na via não amiloidogênica a APP é clivada pela enzima α -secretase e o peptídeo insolúvel é posteriormente clivado pela enzima γ -secretase. Na via amiloidogênica a APP é clivada pela BACE-1 em que o peptídeo insolúvel é clivado pela γ -secretase, gerando peptídeos tóxicos (DELANOGARE et al.,2019).

1.4.2. Hiperfosforilação da pTau

A pTau é uma proteína estabilizadora que tem como função facilitar a polimerização da tubulina na célula, de maneira que se formem os microtúbulos presentes nos axônios e, portanto, é frequentemente usado como um marcador axonal (KITURA; ISHIGURO; HISANAGA, 2014). Em situações neurotóxicas como, por exemplo, a formação de placas de amiloides pela mobilização da micróglia, liberação de citocinas inflamatórias, desregulação do cálcio neuronal, ocorre um aumento intenso dos níveis de fosforilação da pTau no citosol neuronal. Quando isso ocorre ela se dissocia dos microtúbulos e se agrega sob a forma de filamentos helicoidais pareados insolúveis que dão origem aos ENF (Figura 4) (MORRIS *et al.*, 2011; DE SÁ CAVALCANTI; ENGELHARDT, 2012; BARAGE; SONAWANE, 2015).

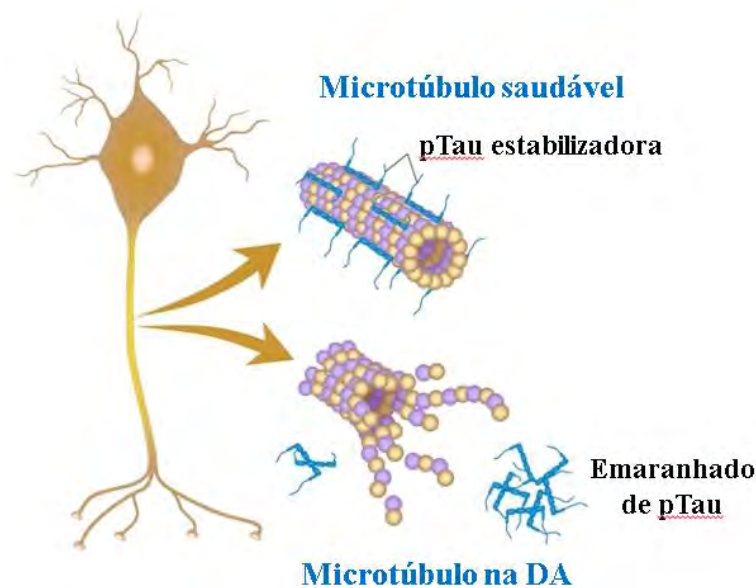


Figura 4. Diferença entre um microtúbulo saudável e um microtúbulo na DA, no qual há formação de ENF que se agregam e depositam nos neurônios (EUROPEAN COMMISSION, 2019).

Esses filamentos acumulados podem ser transmitidos de um neurônio para outro, comparável a uma infecção, causando alterações estruturais e funcionais que provocam a perda da sua morfologia, iniciando-se o processo de neurodegeneração. Nos estágios finais, os ENF atingem o neocórtex, onde memórias de longo prazo são armazenadas, ou seja, a sua formação gera alterações nas funções cognitivas que declinam na DA. Resumidamente, o acúmulo de PS formadas pelos agregados de amiloides geralmente precede o início clínico da DA e causa uma série de neurotoxicidades que levam a formação dos ENF provocando a perda neuronal e a perda sináptica, sendo responsáveis pela progressão do declínio cognitivo (DE SÁ CAVALCANTI; ENGELHARDT, 2012; BARAGE; SONAWANE, 2015; POHLKAMP, 2020).

1.4.3. Hipótese colinérgica

A hipótese colinérgica é uma teoria amplamente aceita, sendo a primeira e mais estudada teoria que descreve a fisiopatologia da doença de Alzheimer. O sistema colinérgico está envolvido em processos fisiológicos importantes relacionados à consciência, atenção, aprendizagem, memória e resposta ao estresse (WANG et al., 2016; CASTRO et al., 2017). Muitos estudos mostram que lesões neuronais, como por exemplo, a sua degeneração e perda de transmissão no hipocampo, córtex frontal, amígdala e outras regiões levam a problemas cognitivos e falhas nesses processos fisiológicos. Por outro lado, fatores que causam a facilidade

da transmissão da ação colinérgica com auxílio de inibidores colinesterases podem melhorar estes processos (FERREIRA-VIEIRA *et al.*, 2016).

A acetilcolina (ACh) foi o primeiro neurotransmissor a ser identificado por Henry Hallett Dale em 1914 (TODMAN, 2008), é considerada um mediador químico de sinapses no sistema nervoso central (SNC), sistema nervoso periférico (SNP) e na junção neuromuscular. A sua liberação ativa receptores promovendo a estimulação ou inibição dependendo do tipo de receptor e sua localização, constituindo assim, a neurotransmissão colinérgica (VENTURA *et al.*, 2010; FERREIRA-VIEIRA *et al.*, 2016).

A ACh é sintetizada no citosol dos neurônios pré-sinápticos a partir de dois precursores: a colina, proveniente de fontes alimentares e intraneuronais, e a acetilcoenzima A (AcCoA), formada a partir da glicose nas mitocôndrias dos neurônios (STAHL, 2014). Esses dois substratos interagem através da ação da enzima acetiltransferase (ChAT) localizada principalmente no citoplasma das terminações nervosas colinérgicas. Após a sua síntese a ACh é transportada para as vesículas sinápticas pelo transportador vesicular de acetilcolina (VAcHT). A despolarização, processo causado pela abertura de canais iônicos, promove a liberação da ACh para a fenda sináptica, onde é rapidamente hidrolisada pela enzima acetilcolinesterase (AChE), em acetato e colina, que é retomada no neurônio colinérgico pré-sináptico pelo transportador de colina de alta afinidade (CHT1). A ACh pode também se ligar a receptores muscarínicos e nicotínicos, levando a uma resposta estimulatória ou inibitória dependendo do tipo e função dos receptores (Figura 5) (VENTURA *et al.*, 2010; FERREIRA-VIEIRA *et al.*, 2016)

Atualmente existem descritos dois tipos de colinesterases, a AChE com alta afinidade para a ACh ligada à membrana neuronal e presentes em todas as sinapses colinérgicas; e a butirilcolinesterase (BuChE) também conhecida como “pseudocolinesterase” ou “colinesterase inespecífica” sintetizada no fígado com alta afinidade para a butirilcolina, presentes em todos os tecidos (VENTURA *et al.*, 2010). Ambas as enzimas convertem a ACh em colina, porém a metabolização ocorre de formas diferentes devido a diferentes codificações genéticas. AChE é mais seletiva para hidrolise da acetilcolina enquanto a BuChE é menos específica, fazendo parte do metabolismo de várias moléculas e peptídeos neuroativos (STAHL, 2014).

Em um cérebro saudável, a AChE responde por 80% da atividade neuronal, enquanto BuChE responde pelos 20% restantes. Já no caso da DA avançada, a atividade da AChE pode ser reduzida para 55-67% dos níveis normais em regiões cerebrais específicas, enquanto a atividade

BuChE aumenta. Essas alterações na proporção de AChE para BuChE em relação a progressão da doença muda o papel de apoio da BuChE na regulação da ACh, tornando uma enzima de crescente importância funcional. Há evidências também que a BuChE pode facilitar a formação de placas senis, e está associada ao acúmulo de placas amiloides (BIZZARRO *et al.*, 2010; GREIG *et al.* 2001). Devido a isso a regulação dos níveis de ACh a partir dessas enzimas também é de extrema importância no desenvolvimento e progressão da DA (VENTURA *et al.*, 2010).

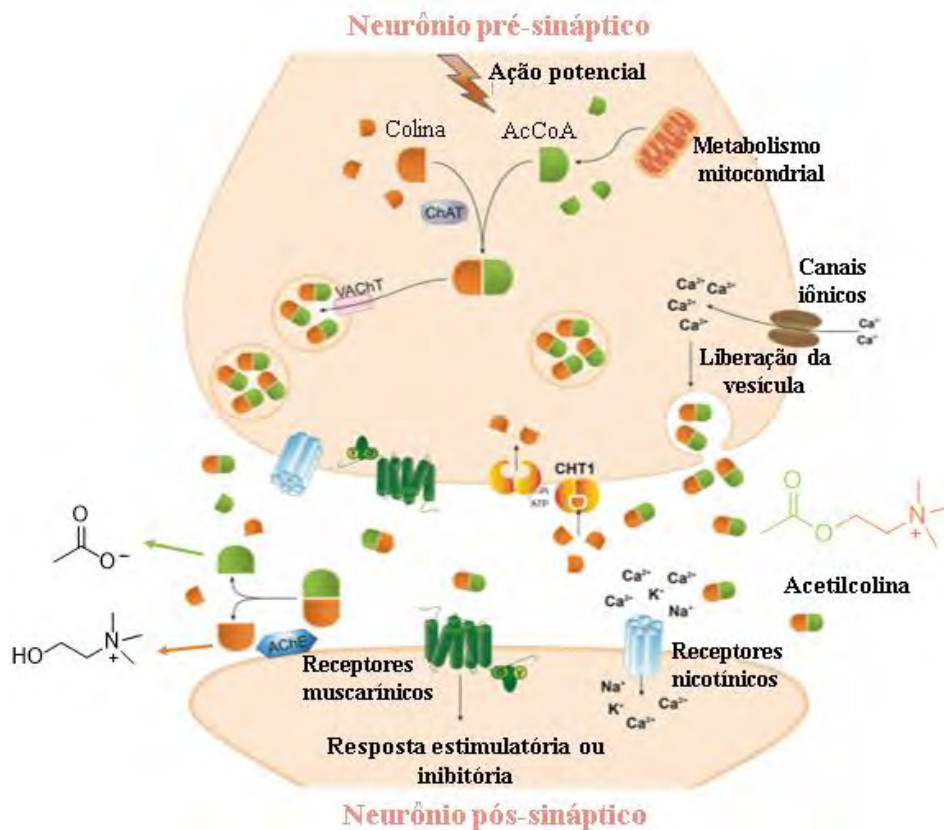


Figura 5. Representação biossintética da neurotransmissão da acetilcolina (adaptado de FERREIRA-VIEIRA *et al.*, 2016).

1.4.4. Neurotransmissão glutamatérgica

O glutamato é um aminoácido de maior abundância no SNC, atuando como um neurotransmissor excitatório. Os impulsos nervosos provocam sua liberação, auxiliando no desenvolvimento neural, na plasticidade sináptica, no aprendizado, na memória, além disso, desempenha um papel fundamental no mecanismo de algumas doenças neurodegenerativas como a DA e, devido a isso, surge estudos relacionados a DA na década de 80 (VALLI *et al.*, 2014; DE FALCO *et al.*, 2015).

A excitotoxicidade é caracterizada pela ativação excessiva dos receptores de glutamato devido a sua liberação intensa. Há controvérsia dos mecanismos que causam a excitotoxicidade e provavelmente ocorre por variados motivos, porém, inicialmente, a “hipótese de sobrecarga de cálcio” é uma das principais, em que, o intenso influxo de cálcio nos neurônios pré-sinápticos é responsável pela extensa exposição do glutamato (SZYDLOWSKA *et al.*, 2010; PINTO *et al.*, 2014)

Na cascata excitotóxica ilustrada na figura 6, é demonstrado que a intensiva liberação do glutamato produzido no neurônio pré-sináptico, assim como a liberação de co-agonistas (glicina ou *D*-serina) ativam seus receptores alfa-amino-3-hidroxi-metil-5-4-isoxazolpropiónico (AMPA), do tipo cainato, metabotrópicos (acoplados a proteína G) e, principalmente, os receptores de *N*-metil-*D*-aspartato (NMDA), promovendo a abertura de canais iônicos de forma intensiva, principalmente de cálcio. Os astrócitos presentes nas células da glia desempenham um papel importante no controle dos níveis de glutamato na fenda sináptica via absorção por transportadores de aminoácidos excitatórios (EAATs), porém, quando liberados de forma intensa é difícil manter o controle. O aumento intensivo de cálcio ativa diversas vias bioquímicas dentro da célula e pode gerar seu acúmulo na mitocôndria, o que pode desencadear aumento da produção de espécies reativas de oxigênio, o estresse oxidativo e a exocitose de mais neurotransmissores, que por sua vez, amplificam o fenômeno de excitotoxicidade, levando a morte celular por apoptose. Portanto, a excitotoxicidade favorece para que os processos neurodegenerativos sejam mantidos e amplificados (SZYDLOWSKA, *et al.*, 2010; PAULA-LIMA *et al.*, 2013; PINTO *et al.*, 2014).

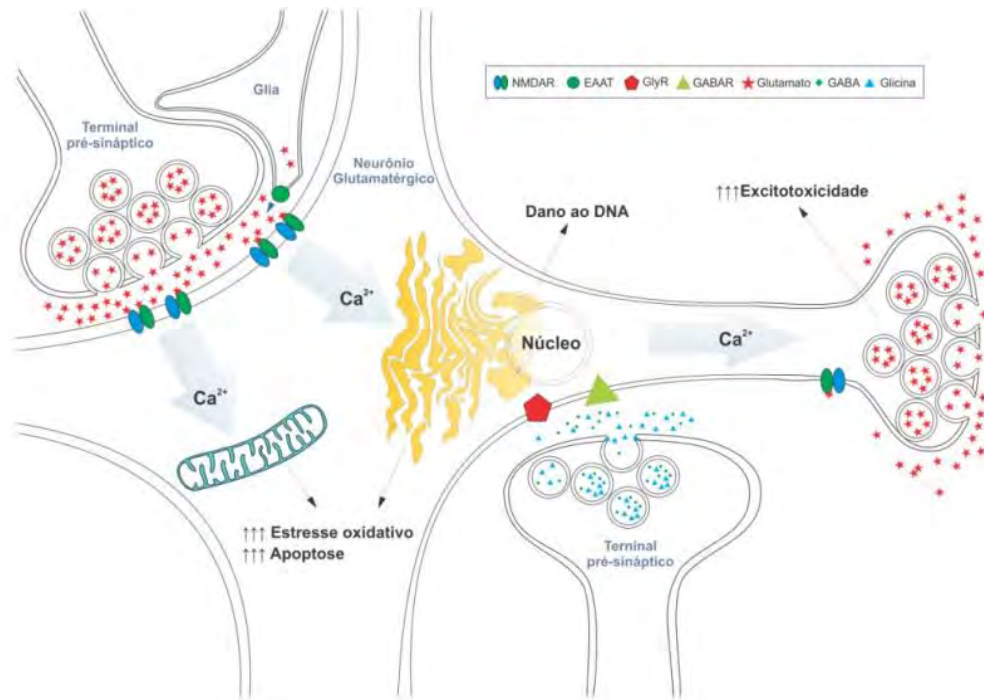


Figura 6. Processo de excitotoxicidade em neurônios glutamatérgicos.

1.4.5. Estresse oxidativo

A teoria sobre o estresse oxidativo e o envelhecimento foi primeiramente proposta em 1956 por Herman. A teoria tem como base os radicais livres, em que seus elétrons não emparelhados são muito reativos e instáveis e reagem com outras moléculas com intuito de obter seu emparelhamento (THAPA; CARROLL, 2017). Após perderem seus elétrons, estas moléculas se tornam instáveis e se convertem em radicais livres formando espécie reativa de oxigênio (ERO) e de nitrogênio (ERN), que são espécies nos quais seus elétrons livres são concentrados no oxigênio e no óxido nítrico, respectivamente. Essas espécies danificam proteínas celulares, lipídios, carboidratos, e ácidos nucleicos através do estresse oxidativo, contribuindo para a degeneração celular durante o envelhecimento (RITA *et al.*, 2009).

Os principais exemplos de radicais livres são: o superóxido ($O_2^{\cdot -}$), a hidroxila (OH^{\cdot}), o tiol (RS^{\cdot}), o triclorometil (CCl_3^{\cdot}) e o óxido nítrico (NO^{\cdot}). Os mediadores de reações com radicais livres são derivados de oxigênio e nitrogênio, como peróxido de hidrogênio (H_2O_2), ozônio (O_3), oxigênio singlete ($1O_2$), ácido hipocloroso ($HOCl$), ácido nitroso (HNO_2) e peroxinitrito ($ONOO^{\cdot}$) (THAPA *et al.*, 2017). Esses radicais geram substâncias de forma descontrolada e isso gera desequilíbrio na relação entre o sistema oxidante e as defesas antioxidantes do organismo que foram produzidas para controlar essas reações (GEMELLI *et al.*, 2013; RITA *et al.*, 2019).

Na DA, o estresse oxidativo se manifesta através da oxidação proteica, peroxidação lipídica, modificações oxidativas no DNA nuclear (nDNA) e mitocondrial (mDNA), na formação de espécies reativas de oxigênio e na formação de espécies tóxicas, tais como peróxidos, álcoois, aldeídos, carbonilas, cetonas (GEMELLI *et al.*, 2013). Estudos feitos em camundongos mostraram que o dano oxidativo ocorre primeiro no cérebro, após ocorre o acúmulo de β -A e outras características marcantes da DA (ANILA *et al.*, 2019).

A formação de peptídeos tóxicos (β -A) desenvolvem um papel importante no aumento do estresse oxidativo em portadores de DA. Na mitocôndria a proteína β -A reduz o potencial da membrana mitocondrial o que inibe a cadeia transportadora de elétrons, diminui a taxa respiratória e induz a liberação de espécies reativas, podendo causar neurotoxicidade por meio da produção direta dessas espécies reativas, através da interação da β -A com metais de transição (Cu^{2+} , Fe^{2+} e Zn^{2+}), favorecendo a ocorrência de apoptose (RITA *et al.*, 2009; GEMELLI, *et al.*, 2013). Observa-se também que a β -A se encontra fortemente relacionado ao dano oxidativo às membranas lipídicas, tornando-as mais hidrofílicas e alterando a função de transportadores, enzimas e receptores celulares localizados nessas membranas (ANILA *et al.*, 2019).

Uma vez que o estresse oxidativo tem um papel marcante na DA, muitos estudos têm sido muito bem descritos com foco na redução desse estresse através do consumo de antioxidantes para combater as ações citotóxicas das ERO e dos metais. Diante disso, estudos *in vitro* sugerem que os antioxidantes, incluindo as vitaminas C e E, podem prevenir a disfunção da pTau hiperfosforilada. Além disso, a vitamina E foi relacionada com menor taxa de morte neuronal induzida pela β -A em cultura de células hipocâmpais e corticais (RITA *et al.*, 2009).

1.4.6. Disfunção mitocondrial

Embora o cérebro represente 2% do peso corporal, ele utiliza aproximadamente 20% do consumo total de oxigênio basal do corpo, necessitando uma grande quantidade de energia proveniente em sua maioria das mitocôndrias. Nos neurônios, as mitocôndrias são geralmente encontradas nas sinapses e são fundamentais na produção de energia através de geração de ATP para estimular as neurotransmissões, a manutenção do nível homeostático de ERO e de cálcio, além de coordenar a morte celular por apoptose (MARUSZAK *et al.*, 2011; DE SÁ CAVALCANTI; ENGELHARDT, 2012)

A disfunção mitocondrial é uma das características de muitas doenças neurodegenerativas como a DA, mesmo antes do aparecimento de outros sinais e sintomas específicos. O papel das

mitocôndrias no envelhecimento e na neurodegeneração foi proposto pela primeira vez em 1972 por Harman. Nesta época o cálcio também era conhecido por apresentar um papel importante na DA, atuando como um mensageiro intracelular através de ligação a diferentes receptores que levam à ativação ou inibição de processos celulares importantes para a produção de energia. Por exemplo, a liberação de neurotransmissores como comentado anteriormente, estímulo da fosforilação oxidativa e o ciclo de Krebs para geração de ERO. O aumento de ERO nas mitocôndrias pode levar ao estresse oxidativo, causar danos às células e eventual morte por depleção de energia devido à interrupção da fosforilação oxidativa (LUQUE-CONTRERAS *et al.*, 2014; ANILA *et al.*, 2019).

De forma geral, a liberação excessiva de cálcio e problemas no mDNA danificam as mitocôndrias do complexo I e IV, causando uma série de disfunções que levam a produção ERO e esgotamento de ATP que causa disfunções dos canais iônicos dependentes de ATP, levando a alterações equilíbrio iônico do citosol. O aumento da ERO, por sua vez, leva à abertura do poro de transição da permeabilidade mitocondrial (MPTP), que aumenta o dano mitocondrial, permitindo a entrada de cálcio na matriz mitocondrial, agravando a cadeia de transporte de elétrons e ruptura da fosforilação oxidativa. Superprodução de ERO também causa danos à membrana devido à peroxidação lipídica e desencadeando processos que levam a morte celular (Figura 7) (VOLOBOUEVA *et al.*, 2011; LUQUE-CONTRERAS *et al.*, 2014)

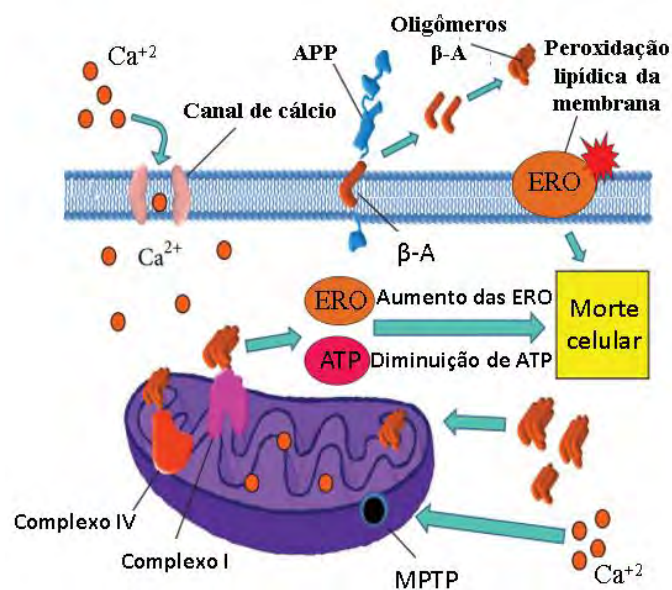


Figura 7. Dano mitocondrial na doença de Alzheimer (LUQUE-CONTRERAS *et al.*, 2014)

1.4.7. Neuroinflamação

A neuroinflamação é um termo usado para descrever a resposta inflamatória originada no SNC após o aparecimento de uma lesão. Neste processo há acúmulo de células da glia que é gerada devido a respostas imunológicas a partir de astrócitos e micróglia (MORALES *et al.*, 2014). Níveis elevados de β -A, formação de PS e ENF são algumas dessas lesões que desencadeiam os processos inflamatórios, havendo a ativação dessas células da glia e a geração de moléculas neurotóxicas, incluindo espécies ERO, ERN, quimiocinas e citocinas pró-inflamatórias levando a morte neuronal (Figura 8) (ZHAO; O'CONNOR, 2012).

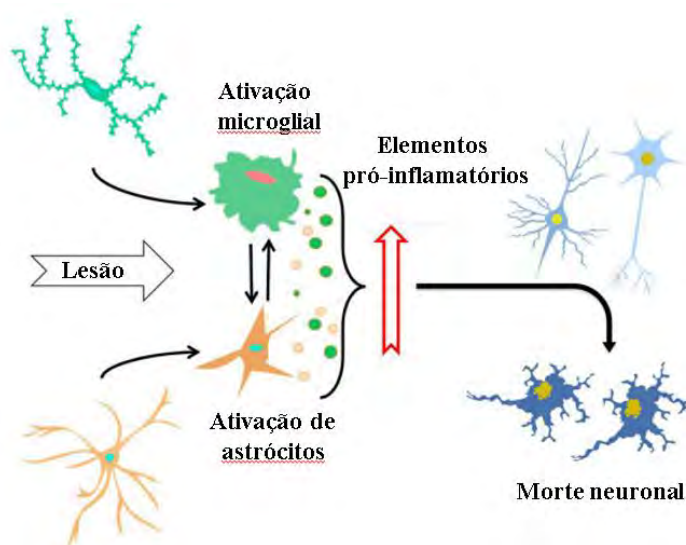


Figura 8. Nos processos inflamatórios o aparecimento de uma lesão ocasiona a ativação da micróglia e dos astrócitos gerando uma série de elementos pró-inflamatórios como a ERRO, ERN, quimiocinas e citocinas que levam a morte neuronal. (Adaptado de MORALES *et al.*, 2014).

As células da glia são fagócitos do SNC, ou seja, protegem o cérebro através da fagocitose de corpos estranhos, sendo responsável pela imunidade e é a primeira linha de defesa contra vários agentes patogênicos. Estas células estão presentes no cérebro, medula espinhal, retina e nervo ótico e é importante para a manutenção e elasticidade dos circuitos neuronais, contribuindo para a proteção e remodelação de sinapses. Essa ação protetora e remodeladora é mediada por liberação de fatores tróficos, que contribui para a formação da memória (MORALES *et al.*, 2014; HENAKA *et al.*, 2015).

Os astrócitos são células da glia mais comuns e constituem cerca de 25% do volume cerebral e estão relacionados à homeostase do SNC, desempenhando funções como: formação e

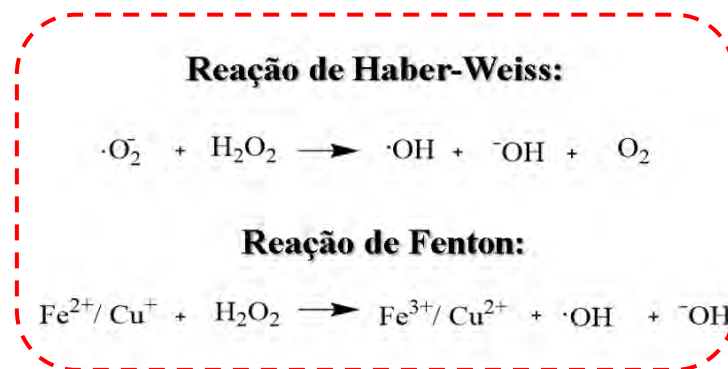
desenvolvimento de sinapses, formação e manutenção de barreira no cérebro, neurotransmissão, regulação metabólica, equilíbrio iônico, entre outros (MORALES *et al.*, 2014). As respostas patológicas dos astrócitos incluem reações complexas de astroglios que objetiva a neuroproteção e recuperação de neural lesionado. Ao lado da micróglia ativada, os astrócitos reativos se acumulam em torno de placas senis e são frequentemente vistos em tecidos humanos *post-mortem* em pacientes com DA (HENAKA *et al.*, 2015).

1.4.8. Hipótese dos metais

O equilíbrio dos metais no cérebro é importante para muitas funções fisiológicas no SNC. Os íons metálicos endógenos, como cobre, ferro e zinco são essenciais para desenvolvimento e manutenção de várias atividades enzimáticas, funções mitocondriais, neurotransmissão, estando envolvidos no processo de memória e aprendizagem. A homeostasia dos metais é controlada pelas células, porém, com a idade, pode haver uma desregulação e/ou acúmulo que leva à diversos processos neurodegenerativos (DUCE; BUSH, 2010; DE FALCO *et al.*, 2016).

A hipótese da cascata amiloide não é a única teoria que justifica a deposição de peptídeos tóxicos no cérebro na DA. Existem diversos fatores que contribuem para essa deposição, como por exemplo, a reação com íons metálicos que foi descoberta pela primeira vez em 1994. Estes íons têm interações fisiológicas importantes com proteínas na patologia da DA favorecendo, por exemplo, o aumento da toxicidade da agregação de β -A. Foi descoberto que a proteína β -A é uma metaloproteína que interage com alguns desses íons induzindo sua agregação (BUSH; TANZI., 2008).

Além disso, estes metais também são responsáveis pela indução de outros processos patológicos como a inflamação e o aumento do estresse oxidativo no cérebro, devido a sua capacidade de produzir EROs, como radicais hidroxila e peróxido de hidrogênio, além de ERNs, como o óxido nítrico, via reações de Haber-Weiss e de Fenton (Esquema 1). Os danos celulares causados pelas EROs e ERNs são extensos e fazem parte dos processos que levam a degeneração neuronal (BUSH 2013; HANE *et al.*, 2014; DE FALCO *et al.*, 2016).



Esquema 1. Reações de Haber-Weiss e de Fenton.

1.5. Tratamento

Existem diversas possíveis abordagens terapêuticas para o tratamento da DA, como o tratamento farmacológico para prevenir o declínio cognitivo, o tratamento sintomático com o propósito de restaurar parcial ou provisoriamente as capacidades cognitivas e a terapêutica específica com objetivo de reverter os processos patofisiológicos que conduzem à morte neuronal e à demência. Existe também a terapia complementar que visa tratamento de manifestações não cognitivas da demência como a depressão, psicose, agitação psicomotora, agressividade e distúrbio do sono (FORLENZA *et al.*, 2005).

Apesar de inúmeras tentativas para compreensão e tratamento da DA, as vias terapêuticas existentes estão longe de serem satisfatórias (KIHARA, *et al.*, 2004). Os medicamentos atualmente existentes atuam apenas no alívio temporário dos sintomas da DA e nenhum medicamento é capaz de parar ou reverter o progresso desta doença. A perda de neurônios e sinapse no cérebro é considerada a causa central dos sintomas na DA, por isso, os estudos de novas abordagens e de novas vias farmacológicas são importantes para compreender e tentar reverter esse progresso (DONG *et al.*, 2019)

1.5.1. Tratamento farmacológico do transtorno cognitivo

As características mais importantes da DA estão relacionadas a uma série de alterações genéticas, neurológicas e neurofisiológicas baseadas especificamente nas anormalidades relacionadas à redução da ACh, redução da atividade da colina-acetiltransferase, alteração no número e sensibilidade de receptores nicotínicos e muscarínicos cerebrais, entre outros fatores, que levam e facilitam diversos processos neurodegenerativos. Devido a isso, a abordagem farmacológica baseada na inibição da AChE tem se mostrado a mais eficaz dentre as disponíveis até o momento. Portanto, os inibidores das colinesterases (I-AChE) são os principais fármacos

que são hoje licenciados para o tratamento específico da DA (INOUYE *et al.*, 2004; FORLENZA *et al.*, 2005)

Os I-AChE foram identificados a partir da hipótese do déficit colinérgico comentado anteriormente e visam aumentar a disponibilidade sináptica da ACh. Esses inibidores retardam a degradação metabólica da acetilcolina através da inibição das suas principais enzimas catalíticas, a AChE e a BuChE, otimizando a disponibilidade deste substrato para a comunicação entre as células, com efeito sintomático discreto sobre a cognição e algumas vezes beneficiando algumas alterações não-cognitivas (FORLENZA *et al.*, 2005; DE FALCO *et al.*, 2015).

Existem hoje 3 medicamentos pertencentes a esta classe que foram aprovados pela Administração Federal de Alimentos e Medicamentos americana (FDA - do inglês, *Food and Drug Administration*) a tacrina **(1)**, donepezila **(2)**, rivastigmina**(3)** e galantamina **(4)** (Figura 9) (DONG *et al.*, 2019). O primeiro aprovado foi a tacrina **(1)** em 1993 como inibidor de AChE e BuChE para sintomas leves a moderados de DA. Porém, a sua hepatotoxicidade, sua eficácia incerta e ao advento de novos I-AChEs, este medicamento foi descontinuado nos EUA em 2013 (DO VALE *et al.*, 2011; DE FALCO *et al.*, 2015).

Em seguida surgiu a segunda geração de I-AChEs, a donepezila **(2)**, rivastigmina **(3)** e galantamina **(4)**, com propriedades farmacológicas semelhantes, muito embora algumas características farmacocinéticas e farmacodinâmicas os diferenciem entre si (FORLENZA *et al.*, 2005). Rivastigmina **(3)** e galantamina **(4)** provaram ter um efeito benéfico no tratamento de demência leve a moderada da DA, sendo que a rivastigmina **(3)** inibe tanto a AChE quanto a BuChE. A donepezila **(2)** é usada no tratamento de demência leve, moderada e grave (DO VALE *et al.*, 2011; FORLENZA, *et al.*, 2005; DE FALCO *et al.*, 2015). O uso desses medicamentos é geralmente acompanhado de efeitos adversos comuns, como náusea, vômito, diarreia, dores de cabeça e tontura (DONG *et al.*, 2019)

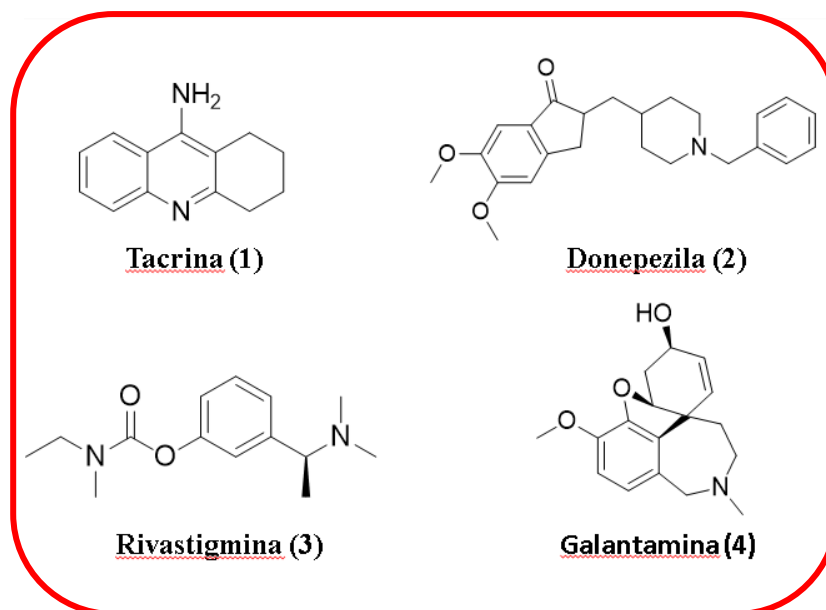


Figura 9. Medicamentos inibidores das colinesterases possuem como mecanismo de inibição o bloqueio do sítio catalítico das enzimas AChE e BuChE. A tacrina (1) é um inibidor reversível não competitivo para AChE e BuChE; a donepezila (2) é um inibidor reversível não competitivo altamente seletivo para ache, a rivastigmina (3) trata-se de uma inibição irreversível pseudo-seletivo para AChE e BuChE; Já a galatamina (4) é um inibidor reversível competitivo e seletivo para AChE (ENGELHARDT *et al.*, 2005).

Outro medicamento usado clinicamente é a memantina (5), um antagonista do receptor NMDA que é estimulado pelo glutamato, o principal neurotransmissor excitatório cerebral, e que está ligado às funções cognitivas e à memória. Esse neurotransmissor é estimulado pelo influxo de cálcio e sua liberação excessiva faz com que ele atue como uma excitotoxina, ocasionando a abertura de canais iônicos que quando liberado de forma excessiva causa diversos danos as células dos neurônios, assim como a apoptose (FORLENZA *et al.*, 2005; DONG *et al.*, 2019. Com isso, a memantina (5) trata os sintomas de DA moderada a severa regulando a atividade do glutamato através do bloqueio de um dos seus receptores apresentando efeitos colaterais mais comuns cefaleia, constipação, diarreia, tontura e sonolência (DO VALE *et al.*, 2011; DE FALCO *et al.*, 2015)

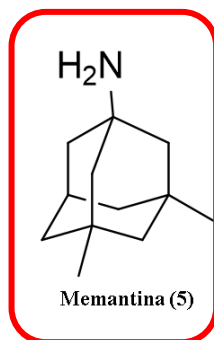


Figura 10. Estrutura química da Memantina (5).

1.5.2. Tratamento farmacológico dos sintomas comportamentais e psicológicos (SCPD)

SPCD descreve um conjunto de sintomas neuropsiquiátricos não cognitivos que podem ocorrer nas síndromes demenciais e são comuns em todas as etapas clínicas da DA, apresentando sintomas de psicose (38%), sintomas afetivos (59%, ansiedade e depressão), hiperatividade (64%, por exemplo, agitação, agressão, desinibição) e apatia (65%) e outros tipos de sintomas como distúrbios do sono, ansiedade, delírios, alucinações (DO VALE et al., 2011; YIANNOPOULOU; PAPAGEORGIU, 2013)

É necessária uma avaliação minuciosa de problemas clínicos (ex., infecções, constipação, dor), psiquiátricos (ex., depressão, ansiedade), ambientais (ex., UTI) ou psicossociais (ex., abandono, agressão, mudança de ambiente) para o uso de medicamentos, além da avaliação da interferência desses medicamentos sintomáticos e psicológicos com os medicamentos cognitivos já utilizados. Os antipsicóticos, por exemplo, são indicados apenas quando não há resposta ao tratamento com medidas não farmacológicas e otimização com I-AChEs e memantina. Além dos antipsicóticos são utilizados benzodiazepínicos, antidepressivos e anticonvulsivantes para esse dependendo dos tipos de sintomas apresentados (DO VALE, *et al.*, 2011).

1.5.3. Estratégias terapêuticas em ensaios clínicos

Apesar dos esforços e inúmeras pesquisas para o tratamento da DA, nenhuma das estratégias já existentes possuem a capacidade de interromper definitivamente os problemas cognitivos e a degeneração, apenas visam inibir os sintomas de demência por um período limitado. Dada a seriedade da doença e a prevalência de pacientes com DA, o desenvolvimento de terapias mais eficazes tornou-se urgente. Diante disso, novas estratégias de tratamento baseando-se nas hipóteses apresentadas vêm sendo desenvolvidas em ambientes acadêmicos e industriais, com o foco nas propriedades modificadoras da doença, o que representa um dos

maiores desafios atualmente (YIANNOPOULOU; PAPAGEORGIOU, 2013; FOLCH *et al.*, 2015; GODYŃ *et al.*, 2016).

A tabela 1 mostra alguns candidatos a fármacos que vêm sendo estudados ao longo dos últimos anos. Alguns já foram descontinuados, outros apresentam seus ensaios completados e baixa eficácia e alguns necessitam de mais estudos clínicos para comprovar a eficácia. Os estudos foram baseados nas hipóteses já apresentadas como a hipótese de amilóide, uma das mais importantes hipóteses, no qual, seu alvo terapêutico se baseia-se principalmente na inibição de enzimas de clivagem de amilóide, como β -secretase e γ -secretase; A terapia baseada na Ptau através de inibidores da sua hiperfosforilação e estabilizando microtúbulos (DONG *et al.*, 2019; HUANG *et al.*, 2020); o uso de antioxidantes na prevenção do estresse oxidativo (GALASKO *et al.*, 2012); o desenvolvimento de fármacos contra a alteração da homeostase dos íons metálicos através do desenvolvimento de compostos atenuantes de proteínas metálicas (MPAC) (LANNFELT, *et al.*, 2012); e o uso de anti-inflamatórios no combate à neuroinflamação (KUMAR, *et al.*, 2015)

Existem outras hipóteses que também não muito comentadas e estão sendo alvo de estudos no tratamento sintomático da DA, como os antagonistas de receptores serotonina (5-HT₆), baseando-se na ideia de que serotonina é um neurotransmissor que afeta indiretamente processos neurodegenerativos estando presente quase inteiramente no cérebro, especialmente em áreas responsáveis pela memória e função cognitiva. Outra hipótese terapêutica que também vem sendo analisada é com o uso de antagonista de receptores de histamina (H₃) também presente no cérebro, afetando a cognição cujo bloqueio leva ao aumento da liberação de acetilcolina, dopamina, GABA, noradrenalina e histamina na fenda sináptica, podendo melhorar indiretamente a transmissão colinérgica (GODYŃ *et al.*, 2016).

Tabela 1. Desenvolvimento de medicamentos para a DA.

Fármaco	CT	Mecanismo de ação	Fase	Status do recrutamento
Verubecestat	NCT01496170	Inibidor β -secretase	Fase I	Completo (2005-2011)
Atabecestat	NCT00890890	Inibidor β -secretase	Fase II	Encerrado (2009/2015)
Lanabecestat	NCT02245737 NCT02783573	Inibidor β -secretase	Fase I/III	Encerrado (2014/2019)
Elenbecestat	NCT02322021	Inibidor β -secretase	Fase II	Completo (2014/2020)
Semagacestat	NCT00594568 NCT00762411	Inibidor γ -secretase	Fase III	Completo (2009/2014)
Avagacestat	NCT00810147	Inibidor γ -secretase	Fase II	Completo (2002/2015)
Methylene Blue	NCT01303744	Tau	Fase III	Encerrado (2009/2016)
Epothilone D	NCT01966666	Estabilização de microtúbulos	Fase I	(Completo (2013/2020)
Tideglusib (NP031112)	NCT01350362	Inibidor de GSK-3 β^*	Fase II	Completo (2011/2012)
PBT-1	NCT00943748	MPAC	Fase II	Descontinuado
PBT2	NCT00471211	MPAC	Fase II/III	Descontinuado (2007/2008)
Vitamina E	NCT00117403	Antioxidante	Fase I	Completo (2005/2009)
Resveratrol	NCT01504854 CT01716637 CT00678431	Agente neuroprotetor	Fase II	Completo (2012/2016)
Celecoxibe	NCT00007189	Anti-inflamatório	Fase III	Completo (2000/2016)
ALZT-OP1	NCT02547818	Anti-inflamatório	Fase III	Incompleto (2015/2020)
Idalopirdine	NCT02006641	Antagonista do 5-HT6	Fase III	Completo (2013/2018)
RVT-101 (intepirdine)	NCT02586909	Antagonista 5-HT6	Fase II	Descontinuado (2015/2020)
ABT-28	NCT01018875	Antagonista H ₃	Fase II	Completo (2009/2018)
GSK239512	NCT01009255	Antagonista H ₃	Fase II	Completo (2009/2017)

*Glicogênio sintase cinase 3 β

Muitas das abordagens desenvolvidas estão relacionadas direta e indiretamente à redução da carga amiloide, isso ocorre porque a hipótese amiloide tem sido a explicação dominante para a patogênese da DA há décadas. No entanto, nos últimos anos existem poucos candidatos a fármacos em ensaios clínicos relacionados à hipótese amiloide em pacientes com a DA avançada, já que no consenso atual fármacos anti-amiloides não são eficazes e nem trazem benefícios para pacientes na fase tardia, diminuindo assim a busca de anti-amiloides desde 2018. Diminuiu também o investimento no desenvolvimento de fármacos para tratamento dos sintomas psicológicos comportamentais de demência (BPSD), visto que, existe um amplo leque de medicamentos já utilizados. Nos últimos anos houve um aumento nos estudos de fase III de compostos para neuroinflamação, neuroproteção e potencializadores de cognição como mostra a figura 11. Já nos testes clínicos em fase I e II (Figura 12) os focos dos estudos estão de forma diversificada (HUANG; CHAO, 2020).

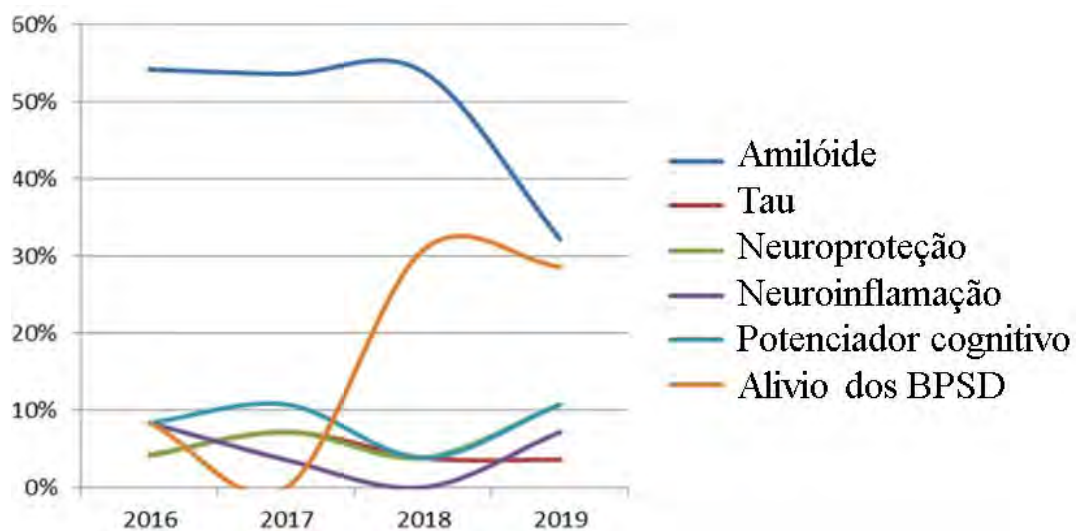


Figura 11. Tendência dos estudos de fase 3, 2017-2019, de acordo com as categorias relacionadas ao evento em ClinicalTrials.go (HUANG; CHAO, 2020).

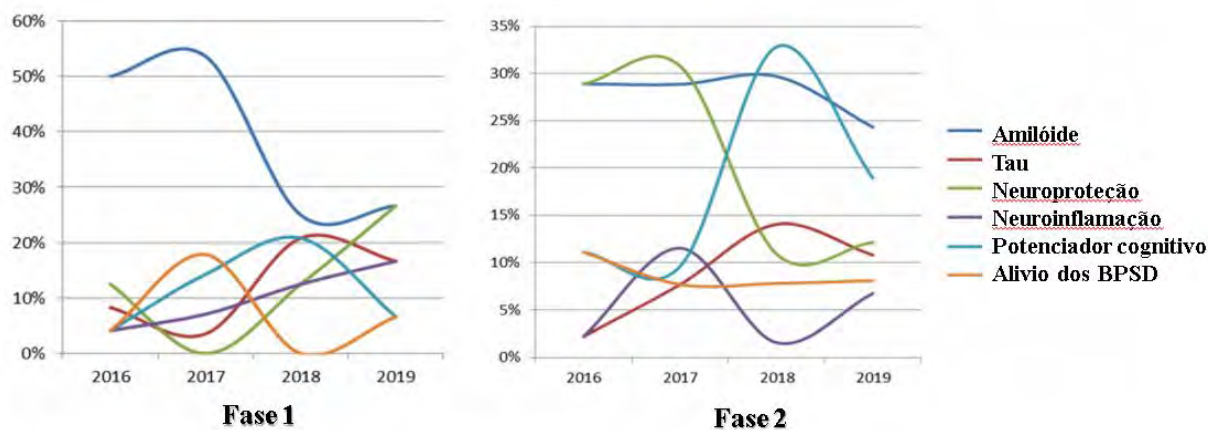


Figura 12. Tendências dos ensaios de fase 1 e fase 2, 2017–2019, de acordo com as categorias relacionadas ao evento em ClinicalTrials.gov (HUANG; CHAO, 2020).

O mais importante no tratamento da DA seria o diagnóstico precoce para facilitar a manutenção da memória e funções cognitivas. Existe também dificuldade do cuidador no tratamento do próprio paciente, pois esse tipo de doença geralmente requer combinações de medicamentos para alcançar melhores resultados, devido ao caráter multifatorial da patologia da DA, o que pode, as vezes, ser complexo para o paciente e o cuidador na administração desses medicamentos (DOS SANTOS *et al.*, 2018; AISEN *et al.*, 2020).

1.6. Cumarinas

Os compostos heterocíclicos, devido à sua variedade na natureza e funções relacionadas ao metabolismo celular, como por exemplo, sua atuação no material genético, possuem diversas aplicações e utilidades como fármacos e aplicações industriais (ROSA, 2014). Dentre estes compostos encontram-se as cumarinas, também conhecidas como cromenonas, que são lactonas do ácido hidroxicinâmico presentes em uma ampla variedade de metabólitos secundários de plantas. Podem ser produzidas por alguns tipos específicos de fungos e bactérias (PEREIRA *et al.*, 2018; FRANCO *et al.*, 2020). As cumarinas são classificadas como benzopironas, que são membros de uma família de compostos em que todas as estruturas químicas possuem um anel de benzeno ligado a um anel de pirona. As benzopironas podem ser subdivididas em benzo- α -pironas (**6**) (cumarinas) e o benzo- γ -pirona (**7**) (flavonoides) (Figura 12) (LACY; O’KENNEDY, 2004).

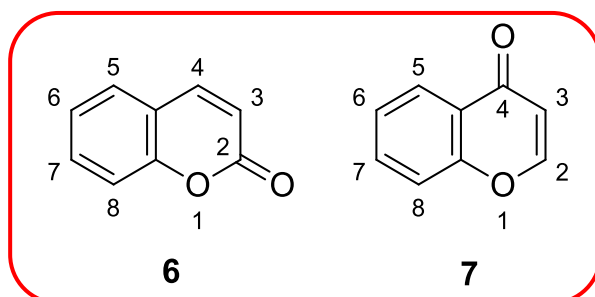


Figura 13. Estruturas químicas das subclasses de benzopironas: cumarinas (6) e flavonoides (7).

O nome cumarina é originado do tupi “kumarú” nome dado à árvore *Dipteryx odorata*, popular no norte do Brasil, de onde foram isoladas das suas sementes as primeiras cumarinas por Vogel em 1820 (MURRAY, 1978). Podem ser classificadas em: simples (6), furanocumarinas (8), piranocumarinas (9), cumarinas com substituintes no anel pirona (10) e cumarinas miscelâneas (11) (Figura 14) (VERNUGOPALA; RASHMI; ODHAY, 2013).

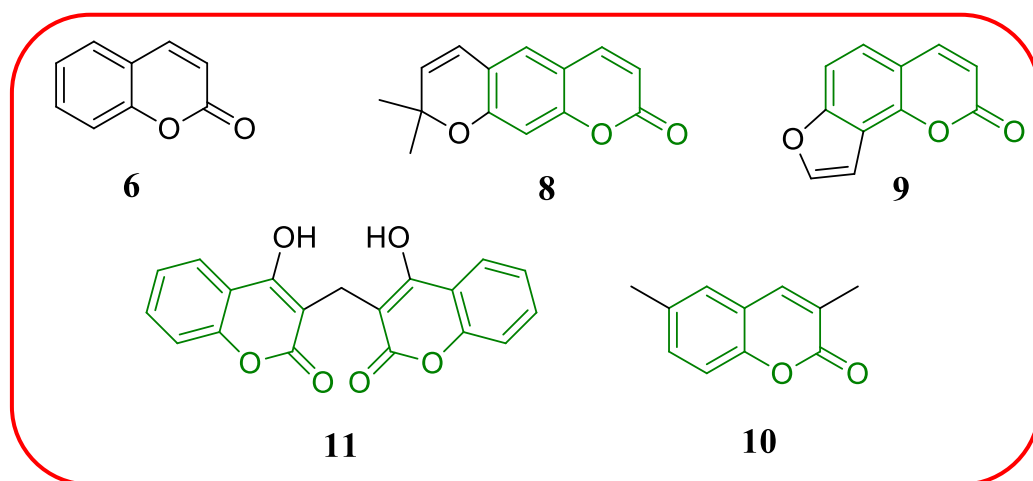
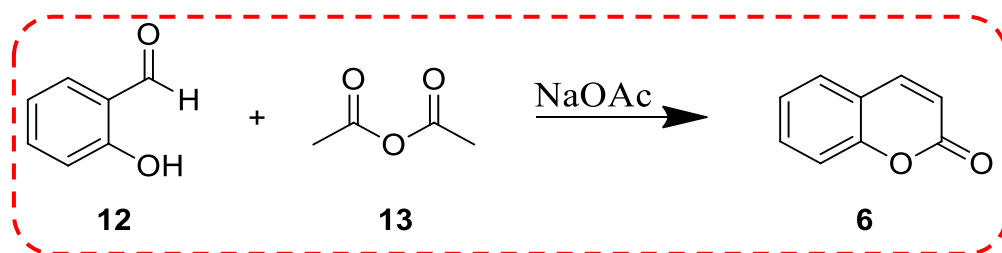


Figura 14. Estrutura química dos diferentes tipos de cumarinas: (6) Cumarina, (8) Piranocumarinas, (9) Furanocumarina, (10) Cumarinas com substituintes no anel pirona, (11) Cumarinas miscelâneas. (Adaptado de VERNUGOPALA; RASHMI; ODHAY, 2013)

Existem mais de 1300 cumarinas isoladas de plantas, bactérias e fungos obtidas através de sua rota biossintética a partir do ácido chiquímico ou pela via dos policetídeos (HUSSAIN; QAMAR ABBAS; REIGOSA, 2018). Também podem ser obtidas sinteticamente pelas reações de Perkin, Pechmann e de Knoevenagel. (PEREIRA *et al*, 2018).

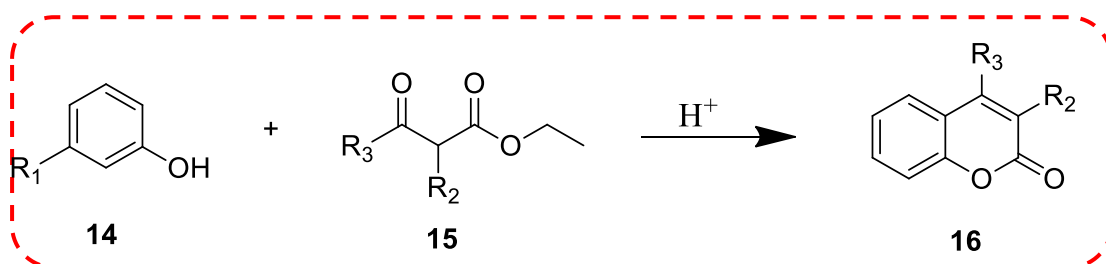
A reação de Perkin foi a primeira reação de condensação descrita envolvendo o núcleo cumarínico em 1868 (RABBANI, 2018). Como mostra o esquema 2, a reação de Perkin consiste na formação núcleo cumarínico (6) por condensação aldólica, de *orto*-hidroxibenzaldeído (12)

aromático e um anidrido ácido (**13**), na presença de um sal alcalino como catalisador (BORGES *et al.*, 2005).



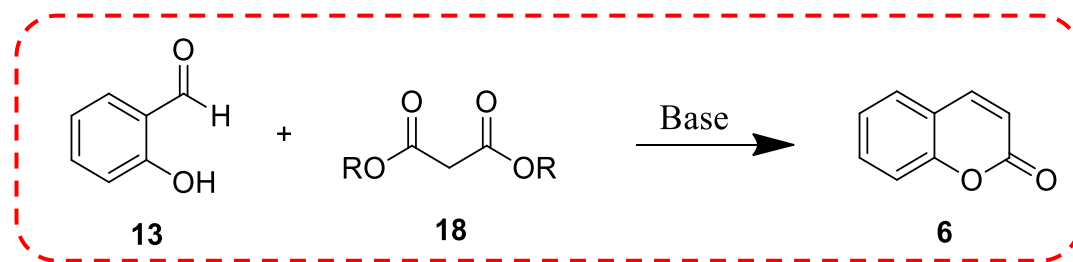
Esquema 2. Reação de condensação de Perkin.

Já a reação de Pechmann foi descrita pela primeira vez em 1883 como uma síntese eficiente de cumarinas (**16**), que consiste na condensação de um fenol (**14**) com β -ceto éster (**15**) na presença de um catalisador ácido como mostra o esquema 3 (MANHAS *et al.*, 2006). Essa rota sintética foi otimizada com reação livre de solvente, no micro-ondas, obtendo-se altos rendimentos e, diante disso, tem sido frequentemente usada para obter cumarinas e outras benzopironas com propriedades biológicas e para o uso industrial (BORGES *et al.*, 2005; MANHAS *et al.*, 2006).



Esquema 3. Reação de condensação de Pechmann.

A reação de Knoevenagel (Esquema 4) foi primeiramente publicada em 1894. A reação de condensação consiste na reação de um aldeído (**13**) com dietil malonato (**18**) na presença de amônia ou amina como catalisador como mostra o esquema 4 (TROST, 1992). A reação é catalisada por bases fracas ou pela combinação de aminas com ácido carboxílico ou ácido de Lewis.



Esquema 4. Reação de condensação de Knoevenagel.

Diante de suas propriedades farmacológicas, bioquímicas e terapêuticas, as cumarinas têm ganhado grande enfoque na química medicinal devido a sua atuação como antibióticos (19), antiparasitários (20), antifúngicos (21), anticoagulante (22), anti-inflamatórios (23), antibactericida (24) e outros (Figura 15) (PEREIRA *et al*, 2018; VERNUGOPALA; RASHMI; ODHAY, 2013) dentre outras propriedades como as relacionadas ao SNC, sendo alvo de pesquisa para o tratamento da DA e apresentando uma ampla quantidade de compostos com grande variabilidade de atividades biológicas (ANAND; SINGH)..

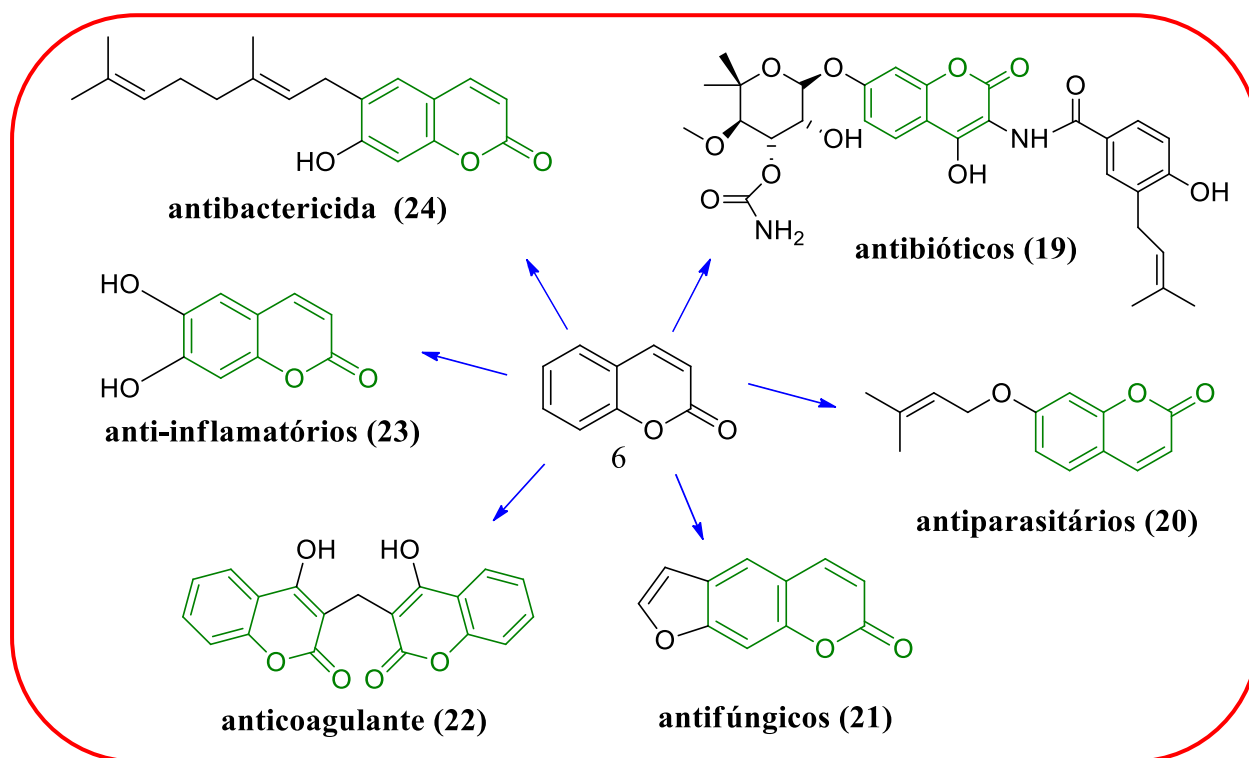


Figura 15. Exemplos de cumarinas e suas aplicações farmacológicas (VERNUGOPALA; RASHMI; ODHAY, 2013).

1.7. Imidazopiridinas (IMs)

A química dos heterocíclicos tem sido alvo de inúmeras pesquisas para projetar, sintetizar e explorar esqueletos com aplicações farmacêuticas (ROOPAN; PATIL; PALANIRAJA, 2015). O uso de heteroátomos nestes esqueletos, principalmente nitrogênio, apresenta um grande enfoque e diversas linhas de pesquisa, devido a suas inúmeras aplicações em várias disciplinas como medicina, química, organometálicos e ciência dos materiais (PERICHERLA et al, 2015). Dentro destes compostos encontram-se as imidazopiridinas (IMs), que são heterociclos nitrogenados que possuem um anel imidazol fundido com anel piridínico (HAJRA *et al.*, 2015).

São compostos que podem apresentar diferentes isômeros : imidazo[1,2-*a*]piridinas (Im[1,2-*a*]) (**25**), imidazo[1,5-*a*]piridinas (**26**), imidazo[4,5-*b*]piridinas (**27**), imidazo[4,5-*c*]piridinas (**28**), classificadas de acordo com a posição dos átomos de nitrogênio resultando em diferentes anéis de imidazol e piridina e cada um com suas características e propriedades físico-químicas sendo as Im[1,2-*a*] a forma mais conhecida (Figura 16) (VANDA; ZAJDEL; SOURAL, 2019). Estes compostos apresentam uma ampla aplicação farmacológica apresentando atividades como antibacteriana, anticâncer, antiviral, anti-inflamatória, antitumoral, antiparasitária, agentes antipiréticos, agentes antituberculares, analgésicos, no tratamento de hepatite C e HIV. Apresentam também novas utilidades como herbicidas e fungicidas (JADHAV et al., 2017; RAMEZANPOUR; BIGDELI; ROMINGER, 2019; MUZALEVSKIY et al., 2019; CHANGUNDA et al., 2020).

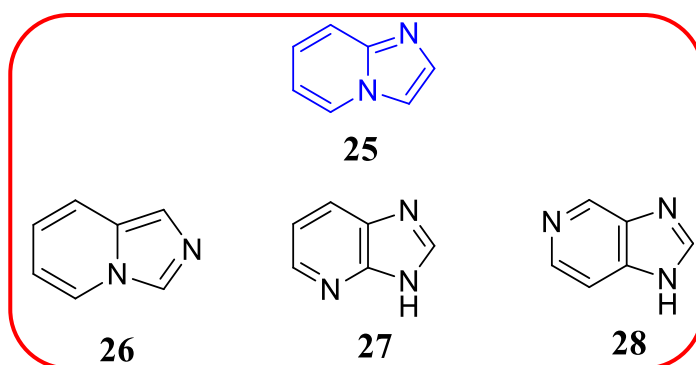


Figura 16. Isômeros da imidazopiridina.

Além de serem blocos de construção muito populares de diversas estruturas as Im[1,2-*a*] estão presente em uma série de compostos biologicamente ativos, incluindo produtos naturais e fármacos (Figura 17), por exemplo, saripidem (**29**) e necopidem (**30**) (ansiolíticos); zolpidem (**31**), que é um dos medicamentos mais populares para o tratamento de insônia; além da olprinona

(**32**) (agente cardiotônico), zolimidina (**33**) (gastroprotetor), miroprofeno (**34**) (analgésico e antiinflamatório não esteroidal) e ácido minodrônico (**35**) (osteoporose) (ADIYALA *et al.*, 2017; CHEN *et al.*, 2018; MUZALEVSKIY, *et al.*, 2019; KUSY; MANIUKIEWICZ; BŁAŻEWSKA, 2019).

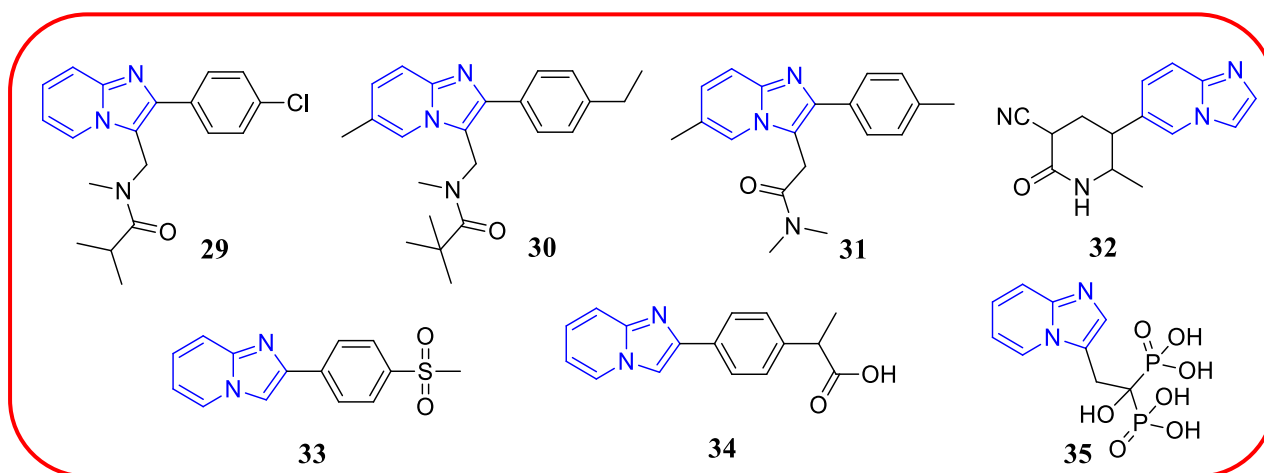


Figura 17. Estrutura dos fármacos disponíveis contendo núcleo imidazo[1,2-*a*]piridina.

As Ims[1,2-*a*] também são denominadas como não-benzodiazepinas pois apesar de serem estruturalmente diferentes dos benzodiazepínicos, suas propriedades farmacológicas são bastante semelhantes, atuando em vários distúrbios do sistema nervoso central (SNC) (ULLOORA *et al.*, 2013; PERICHERLA *et al.*, 2015), como por exemplo, antagonista de receptores de adenosina (LEFIN *et al.*, 2017), modulador de receptores GABA (MARCINKOWSKA *et al.*, 2017; YAKOUB *et al.*, 2018; TIKHONOVA *et al.*, 2020), inibidor de BACE 1 (AZIMI *et al.*, 2017; COIMBRA *et al.*, 2018), modulador de γ -secretase (SEKIOKA *et al.*, 2018; SEKIOKA *et al.*, 2020) e como inibidores de AChE (KWONG *et al.*, 2019) auxiliando no tratamento sintomático da DA (VANDA; ZAJDEL; SOURAL *et al.*, 2019; OKUMURA *et al.*, 2020).

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivos gerais

Baseado nas linhas de pesquisa de nosso laboratório (LaDMol-QM – Laboratório de Diversidade Molecular e Química Medicinal) que visa a identificação e caracterização de novos compostos com atividades farmacológica, objetivamos a síntese, e avaliação farmacológica de novos derivados heterocíclicos do tipo imidazopiridinas-cumarínicas como possíveis agentes inibidores das enzimas AChE, BuChE e agregação de peptídeos β -A.

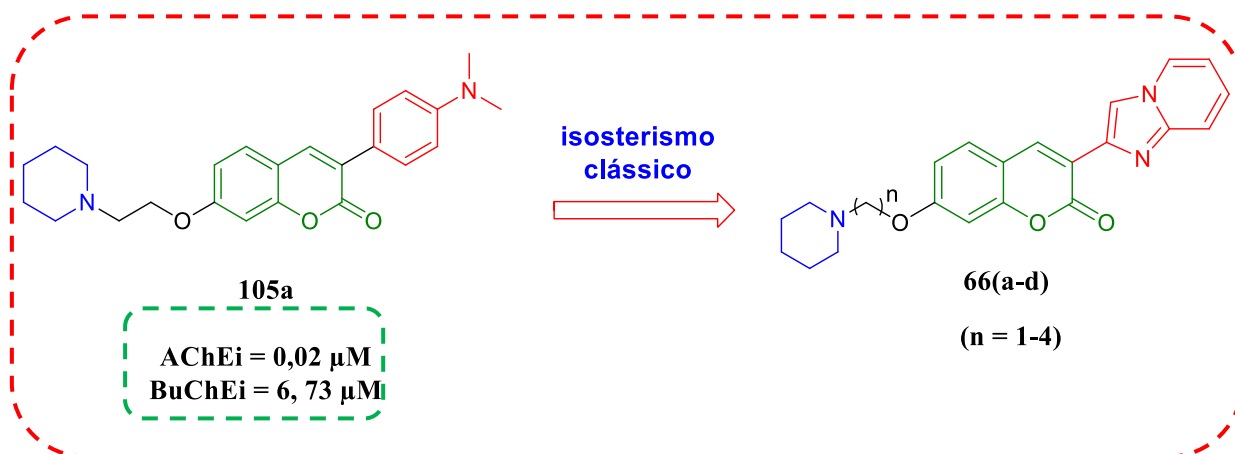
2.2. Objetivos específicos

- Síntese e purificação dos derivados de 3-(imidazo[1,2-*a*]piridinas)-cumarinas planejados;
- Síntese e purificação dos derivados de 3-(imidazo[1,2-*a*]piridinas-9'-etilcarboxilato)-cumarinas planejados
- Caracterização por métodos espectroscópicos de ressonância magnética nuclear de hidrogênio e carbono (RMN de ^1H e de ^{13}C) dos produtos sintetizados;
- Investigação por método teórico do perfil de interação dos derivados imidazopiridinas-cumarínicas com os biorreceptores alvos por modelagem molecular, através da técnica de *docking* molecular.
- Avaliação da atividade farmacológica dos compostos sintetizados frente a AChE e BuChE utilizando o método de Ellman.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

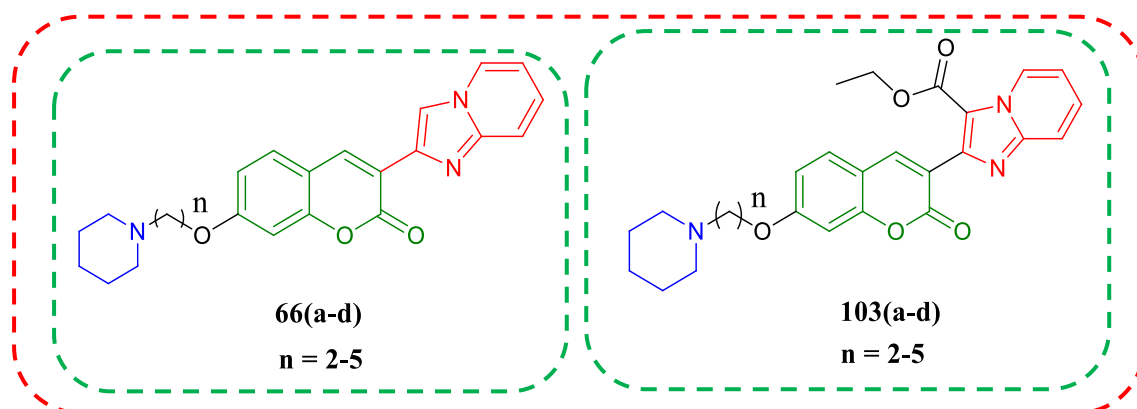
3.1. Planejamento estrutural

O planejamento dos novos derivados 3-(imidazo[1,2-*a*]piridina)-7-aminoalcoxi-cumarinas (**66a-d**) (Esquema 5) foi baseado em vários critérios relacionados a estudos recentemente feitos em nosso grupo de pesquisa. Primeiramente, o planejamento foi baseado na manutenção do núcleo cumarínico ligado ao grupo alquilamina cíclica, que tem se mostrado como farmacóforo em nossos compostos, dado que a atividade anticolinesterase tem sido atribuída a sua importante interação com o sítio catalítico aniônico (CAS) da AChE. O segundo fator foi a troca isotérmica clássica de aromáticos do grupo *N,N*-dimetilnilina (6 elétrons π) para imidazo[1,2-*a*]piridinas (8 elétrons π), a partir do composto **105a** que se mostrou um potente e seletivo inibidor da enzima AChE (DE SOUZA *et al.*, 2019). Por fim, a homologação referente a cadeia aminoalcoxila com diferentes carbonos espaçadores (2 a 5 carbonos) para avaliar a melhor interação da estrutura com a enzima. Importante destacar que estudos recentes do nosso grupo de pesquisa demonstraram que os heterociclos nitrogenados na posição 3 do núcleo cumarínico podem apresentar uma potente inibição enzimática, sendo um dos fatores responsáveis pela potente e seletiva atividade da série de 1,2,3-triazóis, com concentração inibitória 50% (CI₅₀) entre 0,006 e 4,79 μ M frente a AChE (NADUR, 2020).



Esquema 5. Planejamento estrutural dos compostos 3-(imidazo[1,2-*a*]piridina)-7-aminoalcoxi-cumarinas.

Por fim, foi planejado também alterações na posição três do anel da IM com a adição do éster com o objetivo de avaliar o perfil farmacológico de alterações nesta posição, visando futuras modificações e diversificação estruturais nessa posição (Esquema 6).



Esquema 6. Compostos finais da classe das 3-(imidazo[1,2-*a*]piridina)-7-aminoalcoxi-cumarinas.

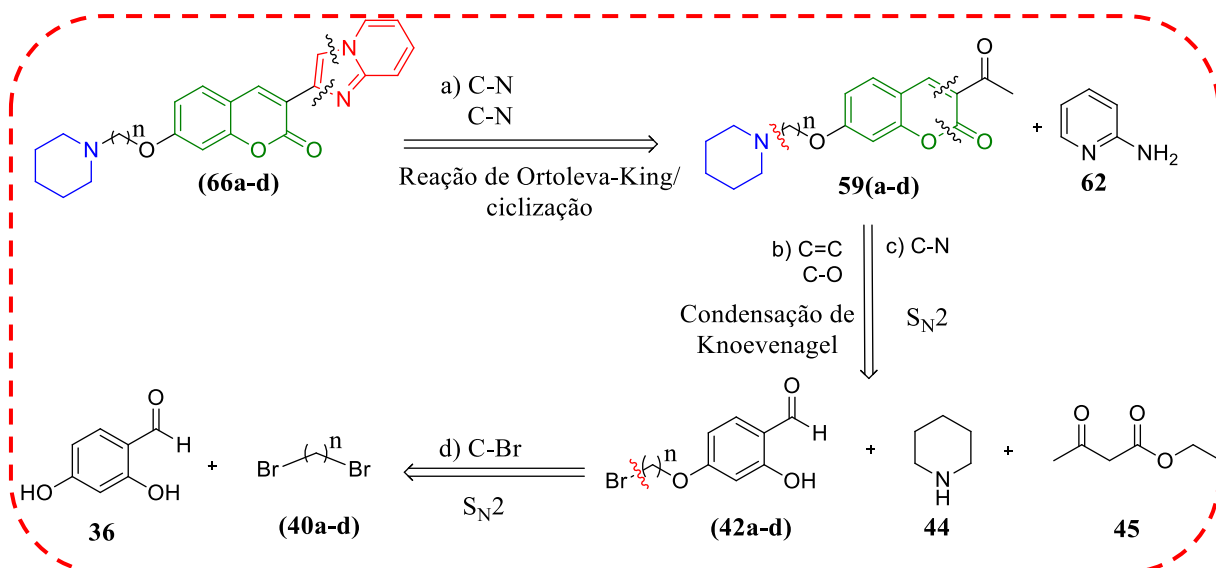
3.2. Síntese dos derivados 3-(imidazo[1,2-*a*]piridinas)-7-aminoalcoxi -cumarinas

3.2.1. Planejamento sintético

A síntese das 3-(imidazo[1,2-*a*]piridina)-7-aminoalcoxi-cumarinas foi planejada baseando-se em reações com o núcleo cumarínico visualizadas a partir da análise retrossintética apresentada no Esquema 7.

A retrossíntese mostra que por meio de duas desconexões C-N (etapas a), explorando uma reação de condensação de 2-aminopiridina e ceto-cumarinas (**59a-b**) a partir de uma reação de Ortoleva–King seguida de ciclização, foi possível identificar o nucleófilo 2-aminopiridina (**62**) (comercialmente adquirido) e o eletrófilo ceto-cumarina (**59a-d**) como intermediários chave na síntese das imidazopirinas finais **66a-d**.

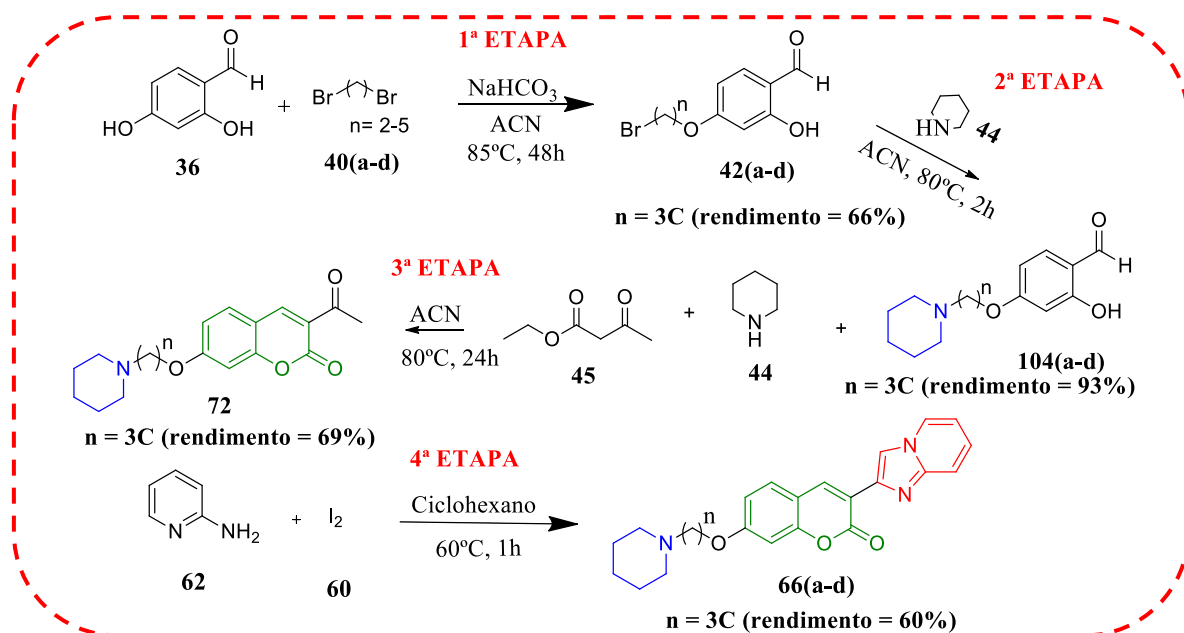
Por sua vez, a partir de duas desconexões C=C e C-O (etapa b) nas ceto-cumarinas, explorando uma reação de Knoevenagel seguida de ciclização intramolecular e uma desconexão C-N (etapa c) via reação do tipo substituição nucleofílica bimolecular (S_N2) foi possível identificar os reagentes acetoacetato de etila (**45**), piridina (**44**) e salicialdeídos alquilados (**42a-d**) para síntese das ceto-cumarinas. Por fim, através de uma desconexão C-Br (etapa d) via reação S_N2 foi obtido o reagente de partida 4-diidroxisalicialdeído (**36**) e dibromo alcanos (**40a-d**).



Esquema 7. Análise retrossintética para obtenção de Imidazopiridinas cumarínicas (**66a-d**).

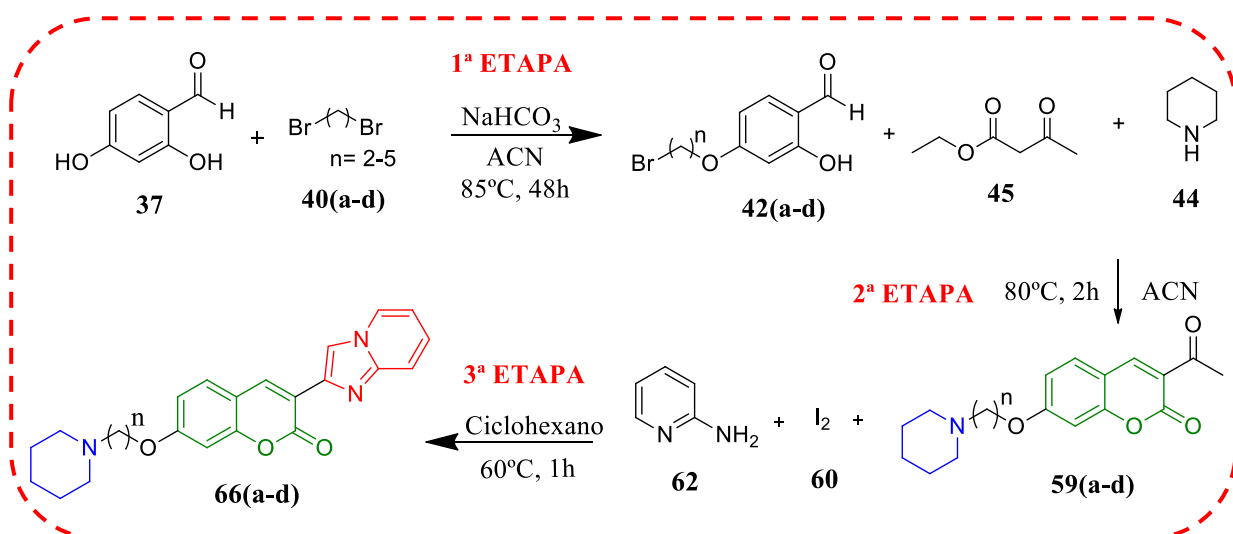
3.2.2. Rotas de obtenção das 3-(imidazo[1,2-a])-7-aminoalcoxi-cumarinas

As IMs foram inicialmente obtidas em nosso grupo de pesquisa pela rota representada abaixo a partir do composto **36**, no qual, até a obtenção do produto final, esta rota passa por quatro etapas reacionais envolvendo reações de *O*-alquilação (etapa 1), reação de aminação (etapa 2), reação de Knoevenagel (etapa 3) e por fim, reação de Ortleva–King seguida de ciclização (etapa 4), necessitando de purificação em todas as etapas pela técnica de cromatografias líquida de adsorção em coluna flash, Isolera Biotage, havendo gasto de tempo e solvente, nas etapas 2 e 3, representado pelo Esquema 8 (RIBEIRO, 2020).



Esquema 8. Rota sintética inicial de obtenção das 3-(imidazo[1,2-a])-7-aminoalcoxi-cumarinas (**66a-d**).

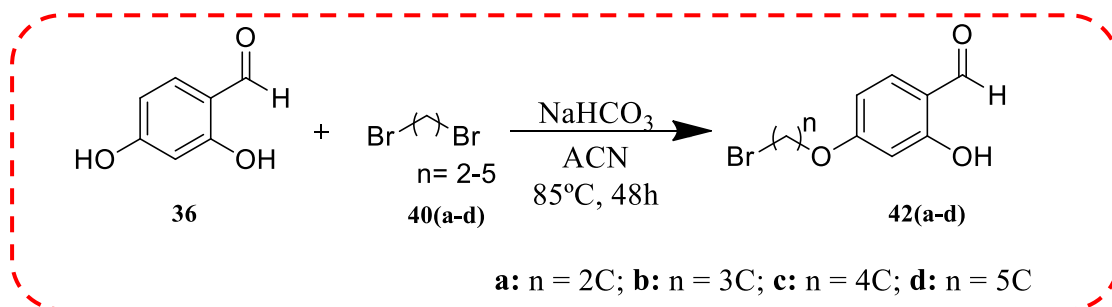
Diante disso, uma nova rota reacional foi proposta, sendo composta por 3 etapas reacionais: reação de *O*-alquilação (etapa 1), reação *one-pot* (etapa 2) e reação de Ortoleva–King seguida de ciclização (etapa 3) com o objetivo de diminuir as etapas reacionais, tempo de reação, evitar gastos de solvente com purificação (Esquema 9). Porém, apesar de redução nas etapas reacionais e tempo de reação essa rota também apresentou problemas que serão discutidos nos tópicos seguintes, como por exemplo, o baixo rendimento, dificuldade de purificação do produto na última etapa e o uso de cetonas ligadas ao grupo aminoalcoxila que indicam ser uma problemática para as reações finais.



Esquema 9. Rota otimizada de obtenção das 3-(imidazo[1,2-a])-7-aminoalcoxi-cumarinas (66a-d).

3.2.3. Reação de *O*-alquilação do 2,4-diidroxisalicilaldeído (36)

Os intermediários 4-bromoalcoxi-2-hidroxibenzaldeídos (42a-d) foram sintetizados através da reação de *O*-alquilação regioseletiva a partir do 2,4-dihidroxi-benzaldeído (36), dibromoalcanos (41a-d), bicarbonato de sódio em acetonitrila, a 85°C (Esquema 10) (adaptado de DE SOUZA et al., 2019). Foram obtidos compostos na forma de sólidos brancos e amarelados, com rendimentos na faixa de 55-66%, variando de acordo com o número de carbonos espaçadores e ponto de fusão entre 45°C- 75°C. Em relação ao composto 42d o sólido se liquefaz assim que foi transferido para o capilar, não sendo possível a medição do PF, pois com 4 carbonos espaçadores existe a dificuldade de manter o composto na forma sólida em temperatura ambiente (Tabela 2).



Esquema 10. Síntese dos derivados 4-bromoalcoxi-2-hidroxibenzaldeídos (**42a-d**).

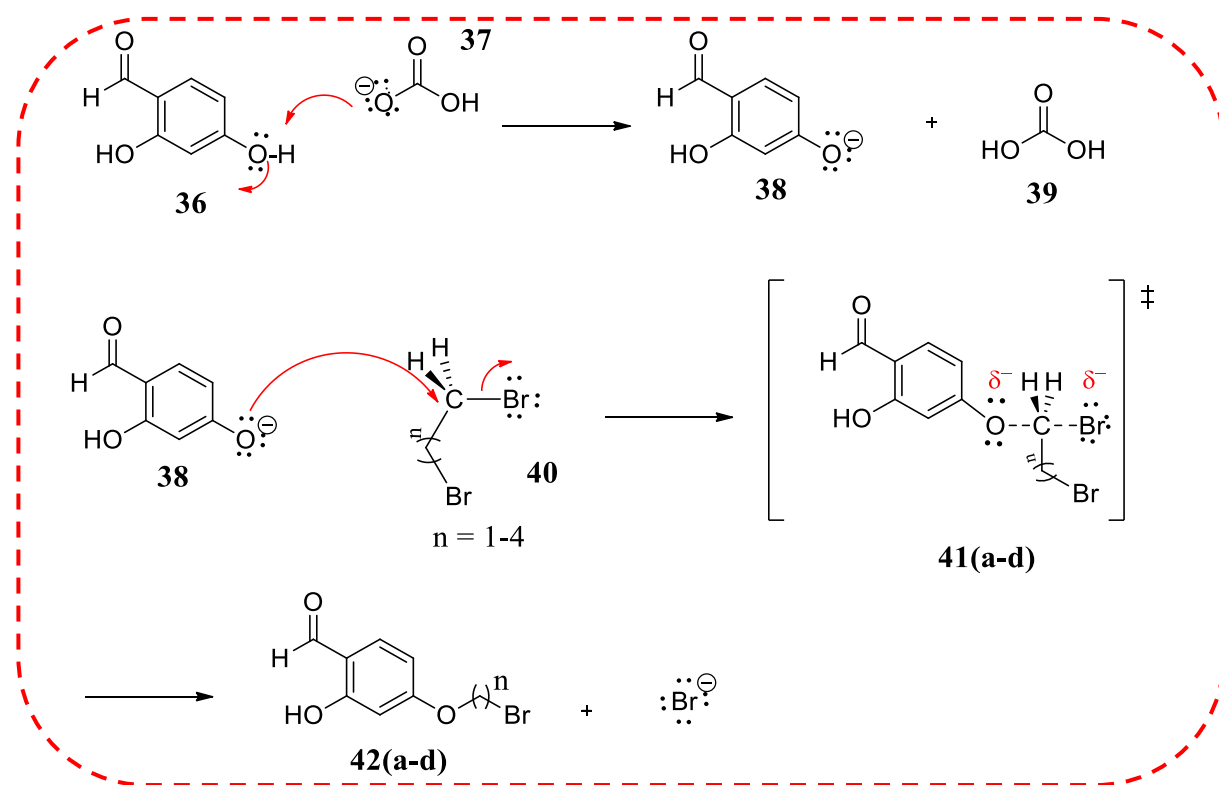
Tabela 2. Características físicas e rendimentos dos compostos **42(a-d)**.

n	Forma e cor	Rendimento	Ponto de Fusão (°C)
2	Sólido branco	66%	55°C
3	Sólido branco	66%	65-75°C
4	Sólido amarelado	65%	-
5	Sólido amarelado	55%	45°C

Esta reação ocorre mediante a uma substituição nucleofílica bimolecular (S_N2) dependente da concentração do reagente e nucleófilo. Alguns fatores são importantes para a eficiência da reação, como por exemplo, impedimento estérico, características do solvente e natureza do nucleófilo. Em relação ao impedimento, a reação com o dibromoetano (**41a**) costuma ser mais demorada, necessitando maior quantidade deste reagente, por haver maior impedimento estérico em comparação com os outros dibromoalcanos. A acetonitrila (ACN) trata-se de um solvente ideal para a reação já que, as reações de S_N2 funcionam melhor em solventes polares apróticos, pois devido a característica aniônica do nucleófilo, faz com que este seja fracamente solvatado por esse tipo de solvente o que facilita a sua interação com substrato, além de que este tipo de reação é melhor estabilizada por solventes polares, já que no estado de transição, o nucleófilo e o grupo abandonador são polares (CAREY & SUNDBERG, 2008).

Na proposta de mecanismo representado pelo Esquema 11, inicialmente ocorre a abstração do próton da hidroxila da posição para do 2,4-dihidroxibenzaldeído (**37**) pelo bicarbonato (**37**) formando o fenóxido (**38**) e ácido carbônico (**39**). Em seguida ocorre a S_N2 , no qual, o fenóxido atua como nucleófilo e realiza o ataque ao carbono ligado ao bromo (**40**). De maneira concertada, ocorre a formação da ligação nucleófilo-carbono, e rompimento da ligação

C-Br, representado pelo estado de transição (**41a-d**) até o brometo ser liberado e assim formar o composto 4-bromoalcoxi-2-hidroxibenzaldeído (**42a-d**).



Esquema 11. Mecanismo proposto para a formação dos derivados 4-bromoalcoxi-2-hidroxibenzaldeídos (**42a-d**).

A reação foi monitorada pela técnica de cromatografia em camada fina (CCF), com sílica como fase estacionária e hexano/acetato de etila 30% como eluente. Diante disso, foi observada a formação de um produto com caráter mais apolar comparado ao reagente de partida, 2,4-dihidroxibenzaldeído. O salicilaldeído por ter um caráter mais polar tem maior interação com a sílica através da ligação hidrogênio. Outra observação importante é que na maioria das alquilações há a formação de um subproduto minoritário em pequena quantidade, havendo a possibilidade de ser um produto de bis-alquilação (**43**), já que é possível a formação deste composto com baixo rendimento, segundo a literatura, para a síntese de dialdeídos e dicetonas intermediários utilizados para a síntese de macrocíclicos (BABU, 2015) e de derivados de quitosana (TIMUR; PASA; 2018), por exemplo. A hidroxila na posição *orto* do reagente, possui uma probabilidade muito baixa de reação já que existem muitos efeitos que atrapalham esta reação como ligação de hidrogênio com a carbonila, o uso de uma base fraca na reação, impedimento estérico, efeito indutivo o que dificulta a abstração do hidrogênio nessa posição para formação do fenóxido (Figura 18).

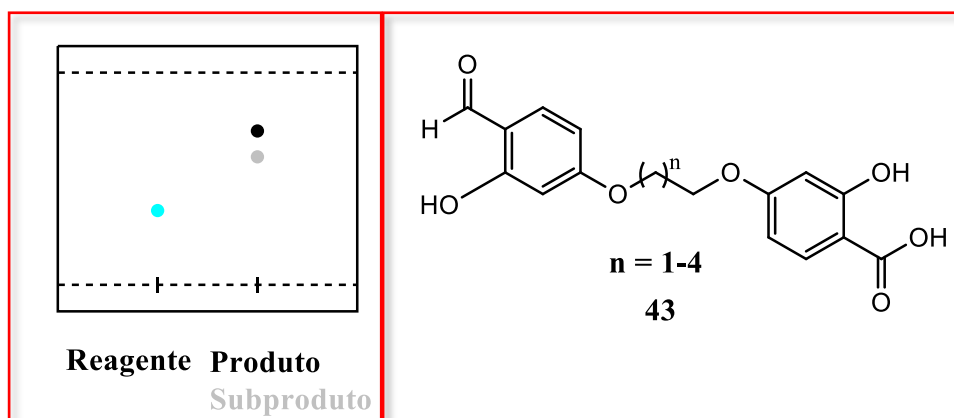


Figura 18. Representação da análise cromatográfica por CCF para a identificação dos compostos **42a-d** utilizando hexano/acetato 30% como fase móvel.

Inicialmente os produtos foram purificados pela técnica de cromatografias líquida de adsorção em coluna flash, Isolera Biotage. Porém foi observado que fazer a purificação por recristalização em metanol também era possível obter os produtos. Na recristalização, primeiro foi necessário a utilização de uma coluna filtrante utilizando hexano como eluente para eliminar o excesso de dibromo, que dificulta o processo de cristalização dos compostos. Em seguida foi feita recristalização com um eluente mais polar (hexano/acetato 10%, por exemplo) para extrair o produto. Com isso, foi possível obter os produtos em menos tempo e utilizando menor quantidade de solvente.

Para confirmação da formação dos derivados 4-bromoalcoxi-2-hidroxibenzaldeídos (**42a-d**) foram realizados experimentos de determinação estrutural como RMN ^1H e ^{13}C . A análise dos espectros confirmou a formação dos produtos. O principal indicativo da formação destes compostos no espectro de RMN ^1H foi a presença dos sinais de carbono na região de carbono sp^3 da cadeia do bromo alcoxi formada na posição 4 do anel do salicilaldeído. Os principais sinais formados na alquilação são: o tripleto com integração de 2 hidrogênios na região de δ 4,03-4,34 ppm, referente aos hidrogênios metilênicos ligados ao carbono oxigenado que no espectro de RMN ^{13}C esses sinais encontram-se na região de δ 66,02-68,36 ppm; os tripletos referentes aos hidrogênios metilênicos ligados ao bromo região de δ 3,45-3,66 ppm e no RMN ^{13}C δ 28,50-33,69 ppm. Com o aumento da cadeia alquílica, novos sinais, próximos de 2,00 ppm, referente metilenos mais blindados, aparecem no espectro destes compostos (anexo 1 ao 8). A diferença de deslocamento dos sinais dos metilenos está relacionada com a eletronegatividade dos substituintes, o oxigênio por ser mais eletronegativo que o bromo tem um maior efeito retirador de elétrons reduzindo a densidade eletrônica de valência ao redor dos prótons próximos a ele,

tornando os metilenos mais desblindados. Um exemplo dos sinais descritos acima está representado pelo espectro do **42b** na figura abaixo (Figura 19).

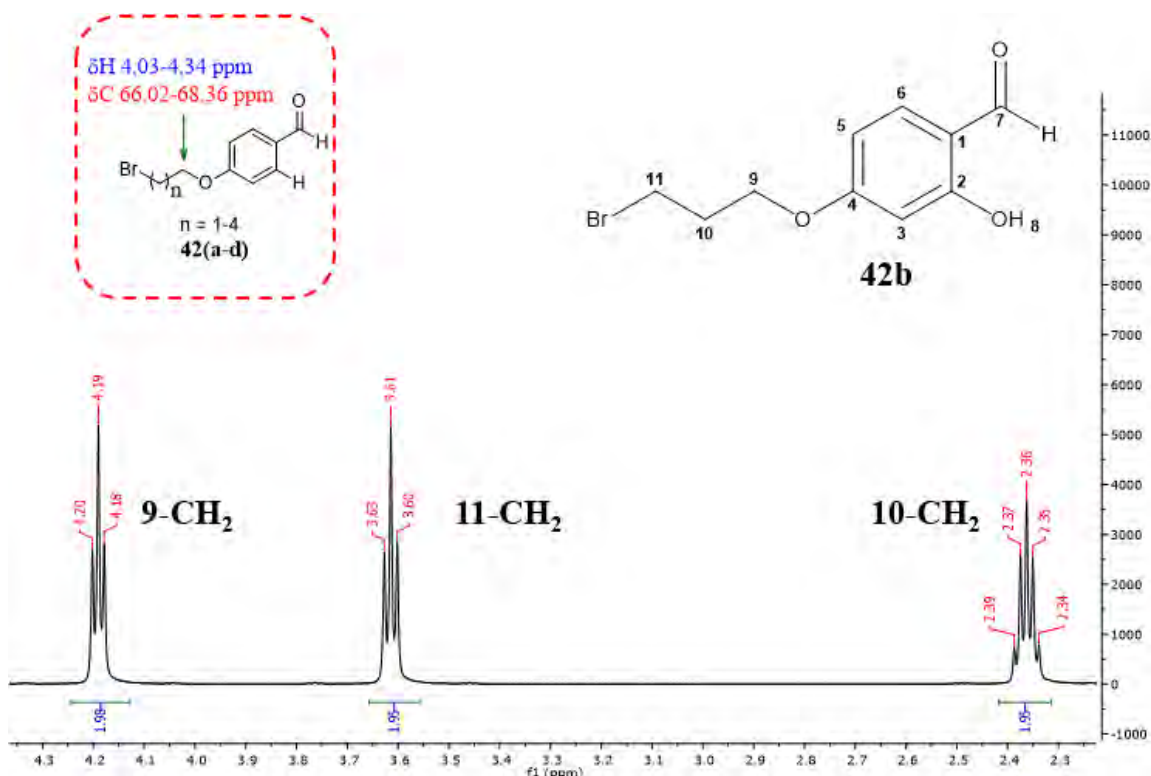
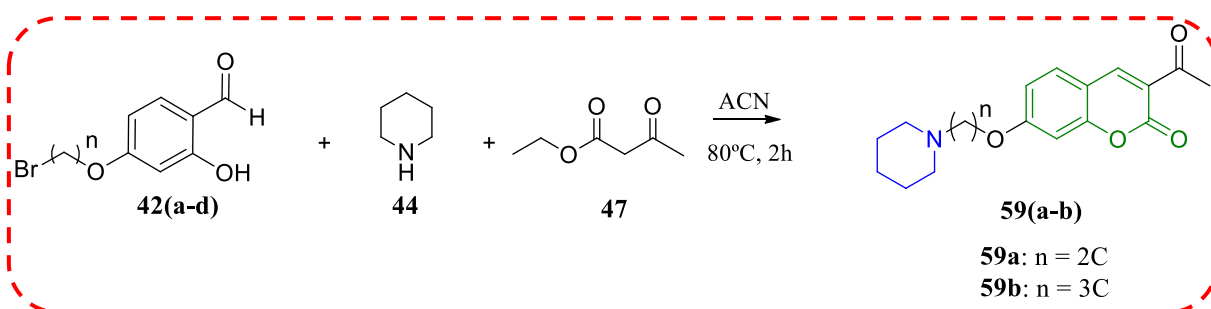


Figura 19. Atribuição dos sinais que confirmam a presença do composto **42b** nos espectros de RMN ^1H (500MHz) em CDCl_3 a 400 MHz.

3.2.4. Síntese *one-pot* dos derivados 3-acetil-7-aminoalcoxi-cumarinas (**59a**-).

A síntese dos intermediários 3-acetil-7-aminoalcoxi-cumarinas (**59a-d**) ocorreu pela reação *one-pot* a partir dos 4-bromoalcoxi-2-hidroxibenzaldeídos (**42a-d**), acetoacetato de etila (**45**), e piperidina (**44**), a 80°C (Esquema 1 Esquema 30. Síntese da 3-(imidazo[1,2-a]piridinas-9'-etilcarboxilato)-7-bromoalcoxi-cumarinas (**102a-d**). Foram obtidos, inicialmente, os compostos **59a** e **59b** na forma de sólido marrom com rendimento de 96% e 90%, respectivamente.

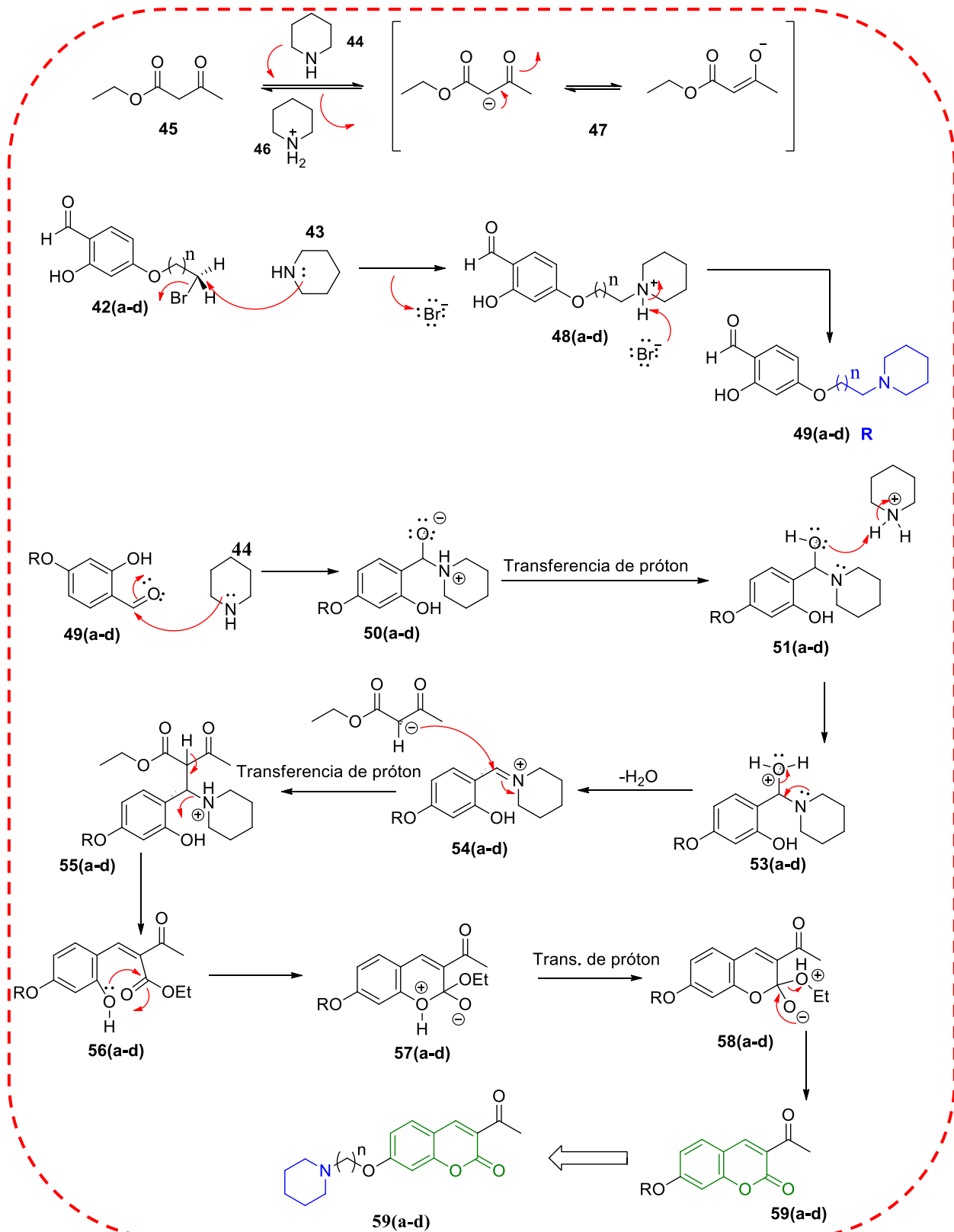


Esquema 12. Síntese dos derivados 3-acetil-7-aminoalcoxi-cumarinas (**59a-b**).

Esta reação trata-se de uma otimização sintética feita pelo nosso grupo de pesquisa a partir da reação de Knoevenagel seguida de ciclização intramolecular para a síntese de 3-cetocumarinas e a reação de S_N2 para a síntese de 7-aminoalcoxi-cumarínicos. A possibilidade de otimização ocorre devido a possibilidade de as duas reações ocorrerem no mesmo meio reacional, com a presença da piperidina, utilizada como catalisador em uma reação e reagente na outra. Assim foi possível a formação dos 7-alcoxi-amino-3-ceto-cumarinas (**59a-d**) a partir de uma reação *one-pot*, em que, ocorre ao mesmo tempo a formação do núcleo cumarínico através da reação de Knoevenagel e a formação do grupo aminoalcoxila devido ao excesso de piperidina no meio reacional.

Na proposta de mecanismo representado pelo Esquema 13 a piperidina atua como reagente na reação de S_N2 ocorrendo o ataque nucleofílico ao carbono ligado ao bromo e, de forma concertada, a ligação C-N se forma e a ligação C-Br se rompe até o brometo ser liberado e resultar na formação do intermediário protonado (**48a-d**). Em seguida, o brometo liberado abstrai o próton ligado ao nitrogênio, formando o intermediário (**49a-d**).

Já na reação de Knoevenagel, a piperidina (**44**) atua como catalisador, sendo responsável pela ativação do metileno estabilizado por ressonância (**47**) e também ocorre a formação do íon imínio (**54a-d**), em que a piperidina (**44**) ataca a carbonila do aldeído (**49a-d**) ocorrendo em seguida uma transferência de próton (**50a-d**) com o auxílio da base e a eliminação de uma molécula de água. Uma vez que o enolato e o íon imínio foram formados, a próxima etapa é o ataque nucleofílico do enolato (**47**) ao íon imínio (**54a-d**) formando o intermediário (**55a-d**), a formação deste intermediário é crucial para geração do núcleo cumarínico, pois a partir disso ocorre uma substituição nucleofílica acíclica intramolecular ao éster, em que primeiro ocorre o ataque no nucleófilo ao carbono eletrofílico da carbonila, formando um intermediário tetraédrico instável (**57a-d**) seguido de transferência de próton (**58a-d**) formando o produto final (**59a-d**).



Esquema 13. Mecanismo proposto para a formação dos intermediários 3-acetil-7-aminoalcoxi-cumarinas (**59a-d**).

A reação foi monitorada por CCF, com sílica como fase estacionária e diclorometano/metanol 10% como eluente. Diante disso, foi observada a formação de um produto com característica mais polar comparada ao reagente de partida **42a-d** (Figura 20). Os derivados 3-acetil-7-aminoalcoxi-cumarinas (**59a-d**), por terem um caráter mais polar, apresentam maior interação com a sílica através da ligação hidrogênio com o nitrogênio do grupo aminoalcoxila formado. Em algumas reações houve a formação de impurezas mais retidas que o produto desejado, mas que não causaram problemas na purificação e identificação. Ao final da reação o produto foi extraído em partição acetato/água.

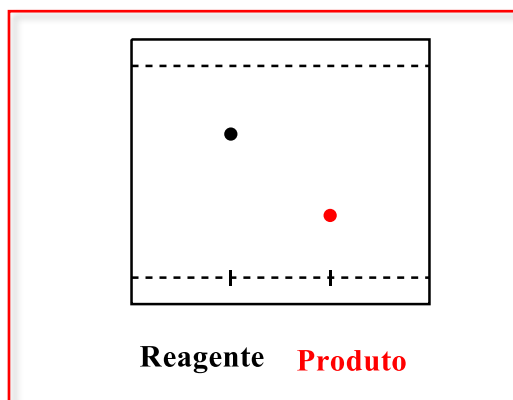


Figura 20. Representação da análise cromatográfica por CCF para a identificação dos compostos **59a-d** utilizando diclorometano/metanol 10% como fase móvel.

Para confirmação da formação dos derivados 3-acetil-7-aminoalcoxi-cumarinas (**59a-d**) foram realizados experimentos de determinação estrutural como RMN ^1H e ^{13}C . Neste caso, a discussão representativa da série será feita através da análise do espectro do composto **59a**. Alguns sinais característicos comprovam a formação do composto **59a**, no espectro de RMN ^1H , sendo uma das confirmações mais importantes, o aparecimento dos sinais do núcleo cumarínico (Figura 21), especificamente o sinal do hidrogênio da subunidade cromenona que é identificado pelos singletos em 8,49 ppm com integração referente a um hidrogênio, indicando a formação de uma ligação C=C que não existia nesta posição em nenhum dos reagentes de partida, com menor blindagem em relação aos outros hidrogênios do anel devido ao efeito de anisotropia gerada pelos elétrons π do carbono sp^2 e a proximidade da carbonila. Já no espectro de RMN ^{13}C o CH da cromenona oriundo da mesma ligação C=C encontra-se em 147,53 ppm.

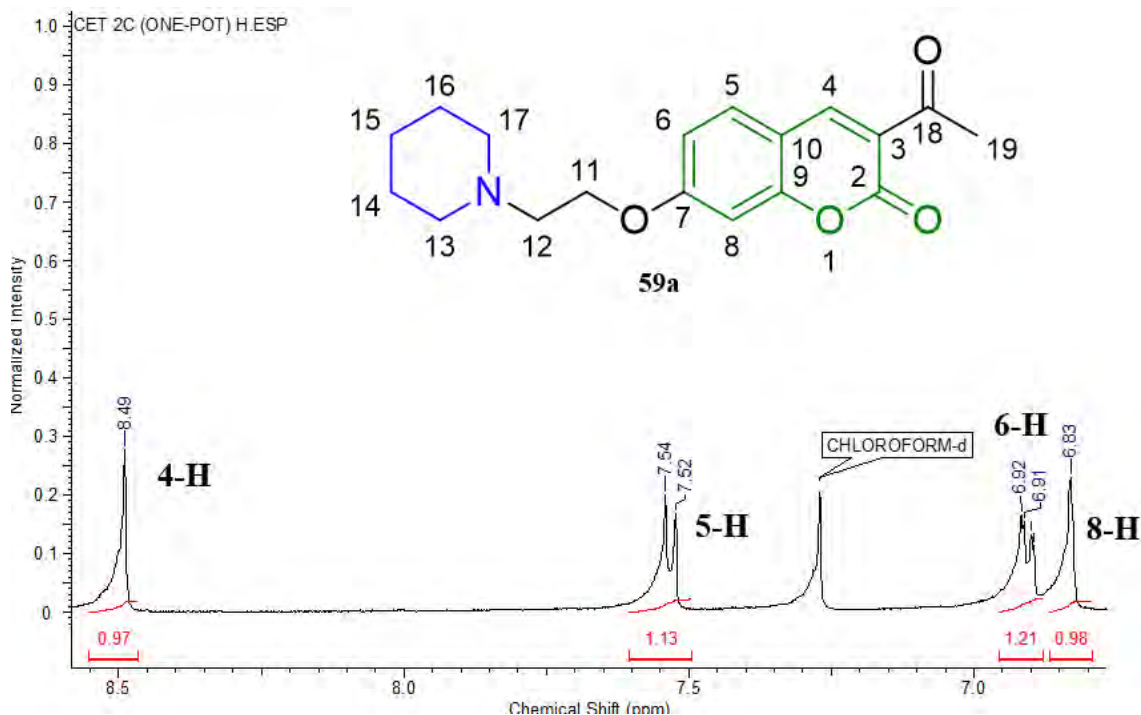


Figura 21. Sinais referente a confirmação da formação núcleo cumarínico do composto **59a** no RMN ^1H em CDCl_3 a 400 MHz.

Também foram observados os sinais de hidrogênio ligados ao carbono do anel piperidínico, dos quais se destacam os multipletos na faixa de $\delta = 1,47\text{-}2,52$ ppm (^1H) e no RMN de ^{13}C sinais na faixa de $\delta = 23,70\text{-}53,60$ ppm. Em alguns casos não foi possível identificar os hidrogênios de cada sinal do anel piperidínico já que podem assumir diferentes conformações referentes aos hidrogênios axiais e equatoriais (Figura 22). Porém a proporção das conformações depende do solvente, da temperatura para que estes sinais sejam visualizados, ou como no caso dos compostos **59a** e **59b**, possam deslocamentos químicos equivalentes. A carbonila de cetonas é um outro indicativo para confirmação da estrutura já que o sinal foi identificado próximo ao valor previsto na literatura em 195,28 ppm (^{13}C) (SILVERSTEIN, WEBSTER, KIEMLE, 2005) (Figura 22).

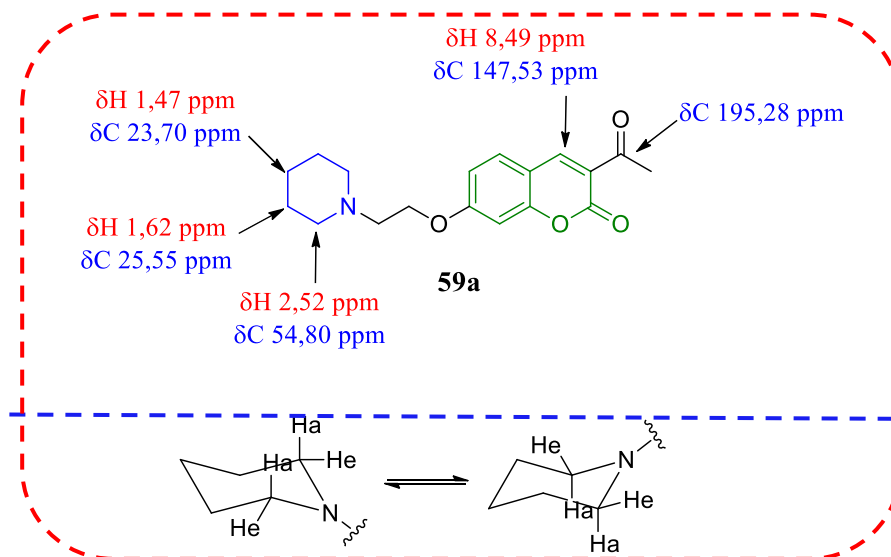
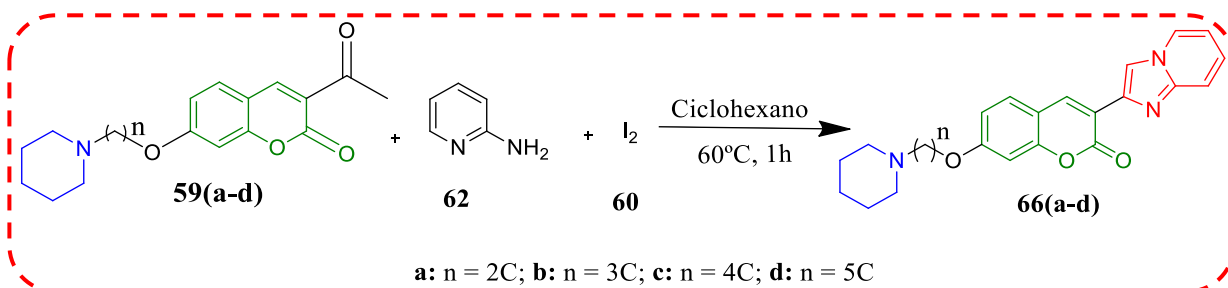


Figura 22. Atribuição dos principais sinais do composto 3-acetil-7-aminoalcoxi-cumarina (**57a**) nos espectros de RMN ^1H e ^{13}C em CDCl_3 .

3.2.5. Síntese das 3-(imidazo[1,2-*a*]piridinas)-cumarinas.

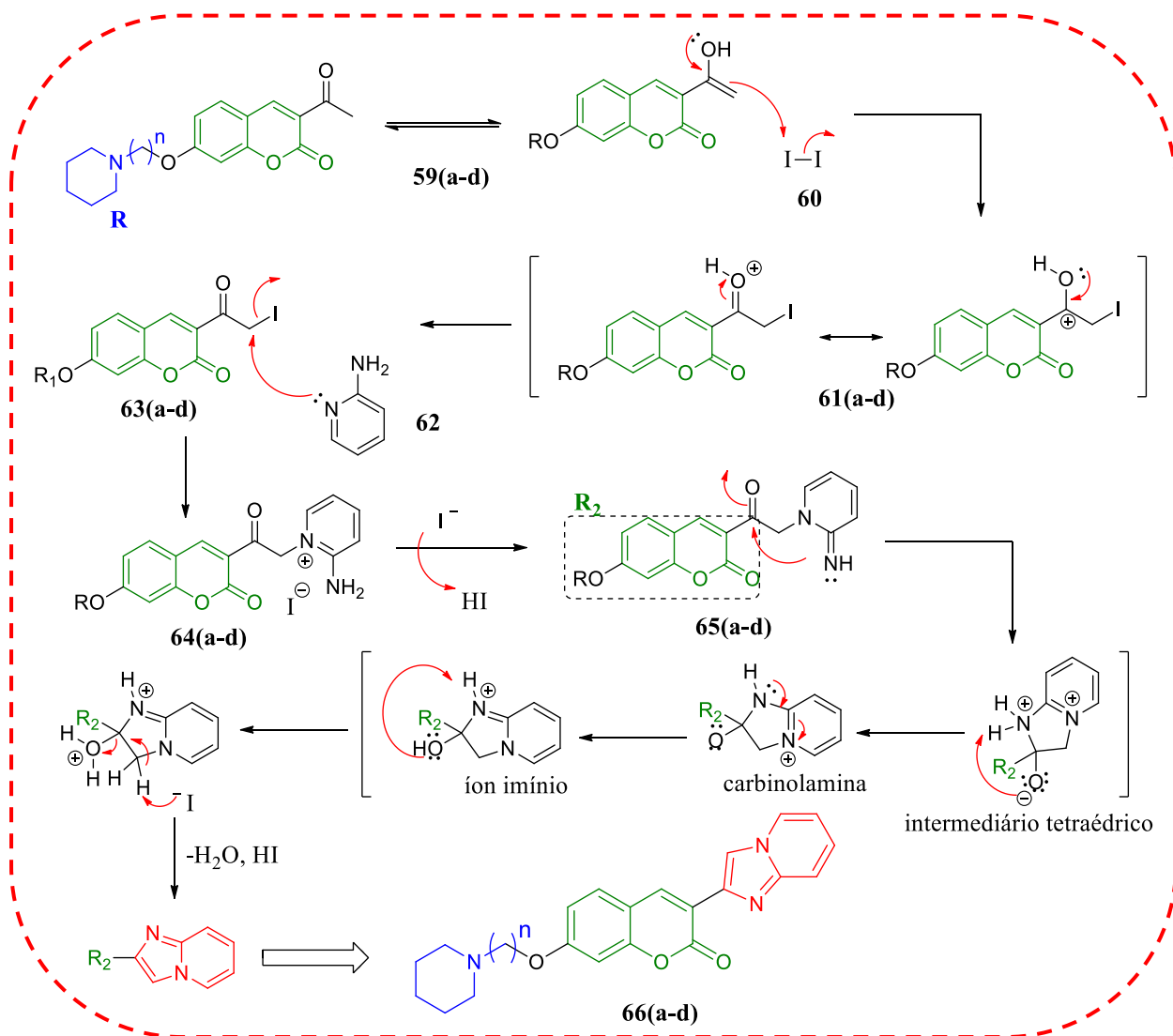
A síntese dos compostos **66(a-b)** foi planejada através da condensação da cetona na presença do iodo molecular (**60**) e 2-aminopiridina (**62**) em ciclohexano, a 60°C como mostra o Esquema 14.



Esquema 14. Síntese dos produtos finais **66a-d**.

A proposta de mecanismo representado pelo Esquema 15 ocorre através da condensação da cetona através da reação de Ortoleva–King seguida de ciclização (STASYUK et al, 2012) para formar um intermediário comum na síntese de IMs que é a formação da halocetonas seguida da reação de substituição nucleofílica com a 2-aminopiridina. Inicialmente ocorre a tautomerização da cetona (**59a-d**), ocorrendo o ataque do iodo molecular (**60**) para formar o intermediário importante para formação da imidazopiridina, a α -iodocetona (**63a-d**). Após sua formação ocorre o ataque da 2-aminopiridina (**62**) via $\text{S}_\text{N}2$ formando o intermediário na forma de sal piridínio (**64a-d**), que é isomerizado produzindo intermediário **65a-d** que, após uma

ciclização intramolecular pela adição nucleofílica acíclica da amina primária ligada ao anel piridínico, intermediários de ressonância, o intermediário tetraédrico, carbinolamina neutra e o íon imínio. Por fim, após uma transferência de próton e desidratação o produto final é formado **66(a-d)** (Adaptado de GHOSH et al., 2018).



Esquema 15. Esquemas de intermediários para a formação dos produtos finais **66a-d**.

A reação foi monitorada por CCF, em diclorometano/metanol 5%. Os produtos finais **66a** e **66b** apresentavam um fator de retenção próximo ao reagente de partida. Ao final da reação os produtos foram purificados por coluna cromatográfica em diclorometano/metanol 5% e, após a obtenção e secagem dos produtos, uma pequena quantidade foi separada para suas determinações estruturais em RMN ^1H e ^{13}C . Pelos dados dos espectros dos compostos a reação não levou aos produtos desejados pois na região de aromáticos havia apenas os sinais referentes aos hidrogênios

da cromenona e alguns sinais muito pequenos que indicariam uma pequena presença do anel imidazopiridina, como observado no espectro do composto **59a** (Figura 21). A Figura 23. A figura mostra uma comparação no RMN ^1H do intermediário da etapa anterior (**59a**) e o suposto produto (**66a**) indicando que não houve a formação do anel piridínico que é crucial para comprovação da reação. O sinal do hidrogênio *orto*-piridínico, por exemplo, é um dos principais indicativos que comprovam a ciclização e a formação do anel, não foi observado. Adicionalmente, no espectro de RMN ^{13}C , sinal referente a cetona na posição 3 do núcleo cumarínico foi encontrado em 194,93 (**66a**) e 195,28 (**66b**), demonstrando que ela se manteve sem ser transformada.

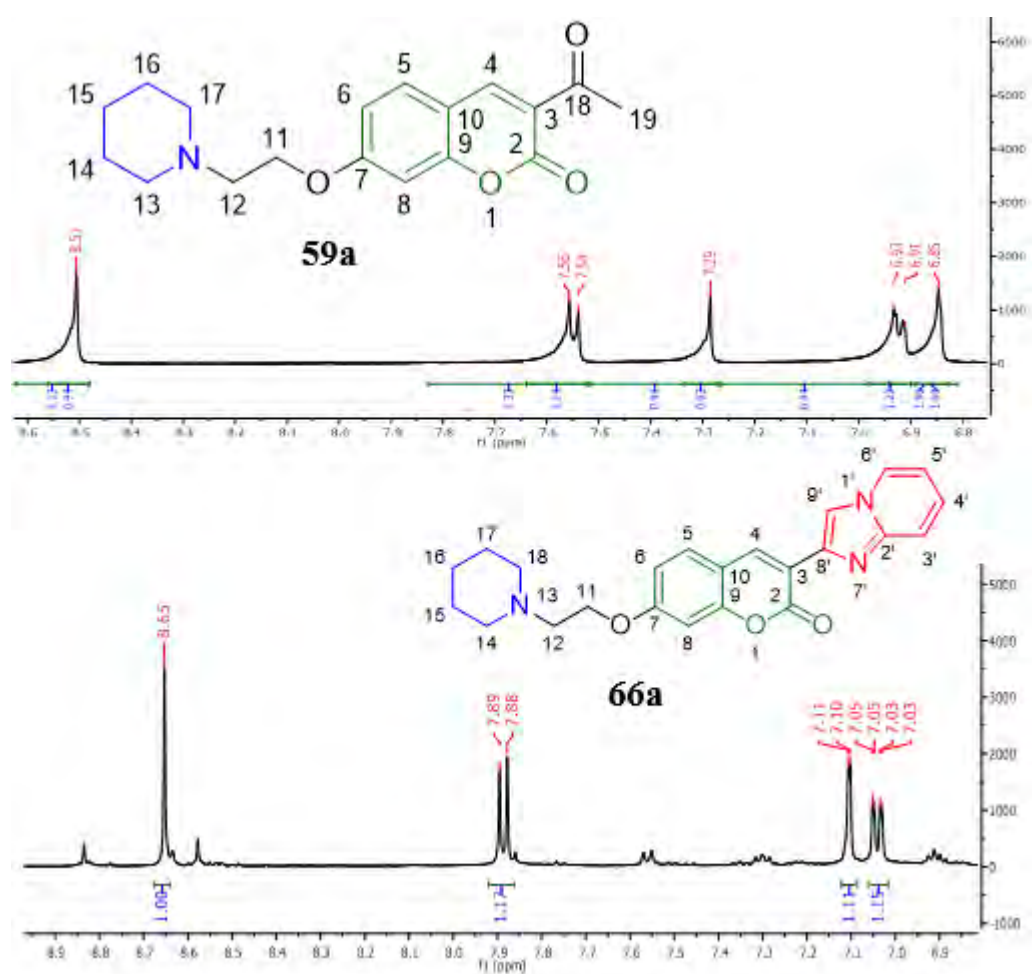


Figura 23. A figura mostra uma comparação no RMN ^1H do intermediário da etapa anterior (**59a**) e o suposto produto (**66a**) indicando que não houve a formação do anel piridínico que é crucial para comprovação da reação.

Um dos fatores que pode ter interferido de forma negativa para a reação foi o uso do ciclohexano como solvente, pois não foi possível a solubilização adequada dos reagentes no meio

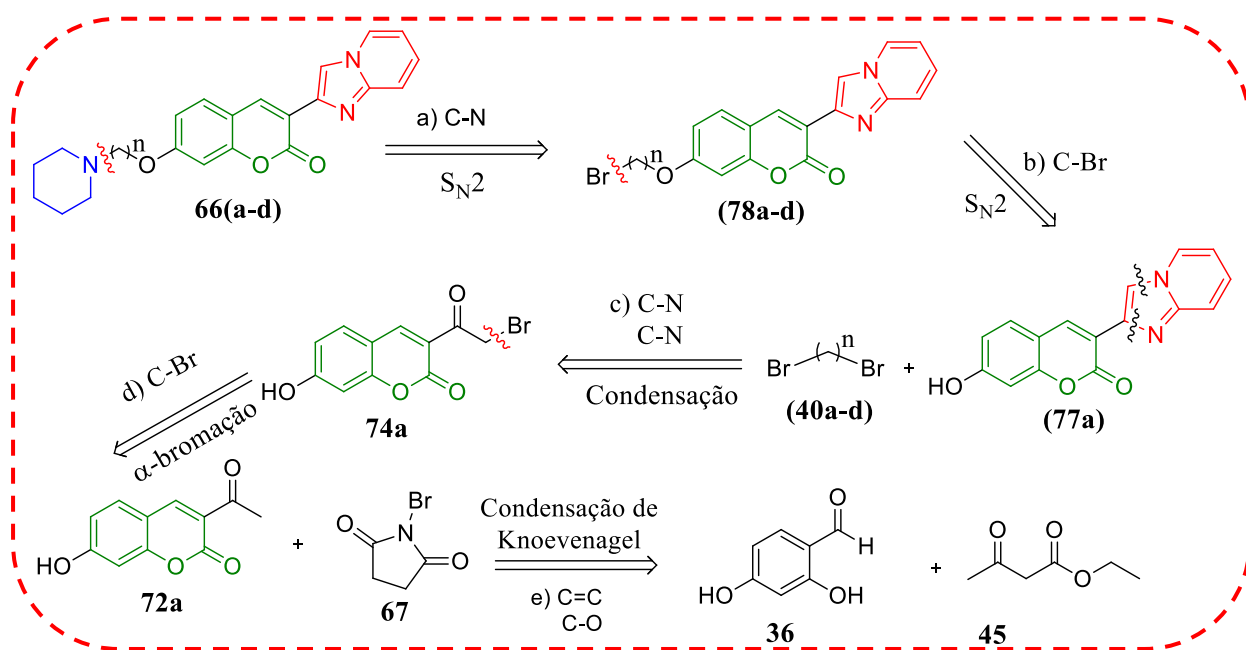
reacional com solvente. Adicionalmente, o tempo de reação pode não ter sido ideal para essa classe de moléculas.

3.3. Rota final de obtenção das IMs a partir de α -halocetonas.

3.3.1. Planejamento sintético

Diante dos problemas apresentados nas rotas anteriores, novos métodos sintéticos a partir das α -halocetonas foram idealizados para obtenção das IM (**66a-d**). A nova análise retrossintética mostra, primeiramente, a desconexão da ligação C-N (etapa a) via reação do tipo substituição nucleofílica bimolecular (S_N2) em que foi possível vislumbrar o intermediário **78a-d**. Em seguida, através de uma desconexão C-Br (etapas b), também via S_N2 , foi possível à identificação do composto **77a** e dibromos alcanos com diferentes espaçadores (**40a-d**). A próxima etapa (etapa c), através de duas desconexões C-N, explorando uma reação de condensação seguida de ciclização com a 2-aminopiridina, foi possível obter o intermediário chave para esta reação o composto **74a**.

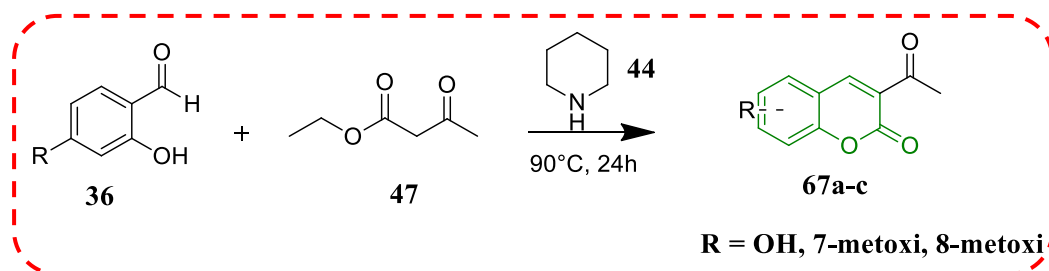
Por sua vez, pela desconexão C-Br (etapa d), via reação de α -bromação, foi identificado o 7-hidroxi-3-acetil-cumarina (**72a**) e agente de bromação *N*-bromossuccinimida (NBS) (**67**). Por fim, a partir de duas desconexões C=C e C-O (etapa e), explorando uma reação de Knoevenagel seguida de ciclização intramolecular, foi possível identificar os reagentes de partida, acetoacetato de etila (**45**) e salicilaldeído (**36**) como precursores para a síntese desse intermediário chave (Esquema 16).



Esquema 16. Análise retrossintética final da obtenção das IMs (**66a-d**).

3.3.2. Síntese das 3-acetil-cumarinas (67a-c)

A metodologia de obtenção das 3-acetil-cumarinas (**67a-c**) foi descrita por Pereira e colaboradores via reação de Knoevenagel, consistindo na reação entre um composto carbonílico e outro contendo um grupo metileno com hidrogênios ácidos, na presença de uma base fraca, resultando na formação de um aduto com uma ligação dupla carbono-carbono (DALESSANDRO et al., 2017). Essa reação ocorre a partir da reação com salicilaldeídos com diferentes grupos na posição 5 e 6 do anel, acetoacetato de etila (**47**) e uma base orgânica, utilizando etanol como solvente a 90°C obtendo produtos com rendimentos de 66 a 90% e PF de 205 a 238°C como mostra na tabela 3 (PERREIRA et al., 2016). Neste caso, foram utilizados três substituintes diferentes apenas para confirmação da rota até a formação do núcleo da IM, já que estes são de fácil obtenção e possuem características químicas similares aos produtos planejados (**Esquema 17**).



Esquema 17. Síntese das 3-acetil-cumarinas (**67a-c**).

Tabela 3. Características físicas e rendimentos dos compostos **67a-c**.

R	Forma e cor	Rendimento	Ponto de Fusão (°C)
7-OH (67a)	Sólido laranja escuro	70%	238°C
7-OMe (67b)	Sólido esverdeado	90%	205°C
8-OMe(67c)	Sólido esverdeado	83%	233°C

No mecanismo desta classe de moléculas, já apresentado acima o no Esquema 13, a piperidina atua como catalisador, sendo responsável pela ativação do metileno, havendo o ataque a carbonila do aldeído levando a formação do intermediário chave para geração do núcleo cumarínico e formação dos produtos **67a-c**.

As 3-acetil-cumarinas (**67a-c**) foram caracterizadas por RMN ^1H e ^{13}C apresentando sinais no espectro já discutidos anteriormente, confirmando a formação do núcleo cumarínico e a cetona na posição 3 do anel. No núcleo cumarínico é gerado um simpleto nos espectros de RMN ^1H na faixa de 8,51-8,62 ppm, com integração referente a um hidrogênio, correspondente

ao hidrogênio H4 da cromenona, que é o principal indicativo da formação da ligação C=C que não existia em nenhum dos reagentes. O espectro de RMN ^{13}C mostra um sinal referente ao CH da cromenona na faixa de 147,52-148,58 ppm. Já a formação da cetona é confirmada pelo sinal referente ao CH_3 na faixa de 2,51-2,72 ppm no RMN ^1H e a confirmação da presença da carbonila de cetona em RMN ^{13}C δ 194,67- 195,57 ppm (Figura 24).

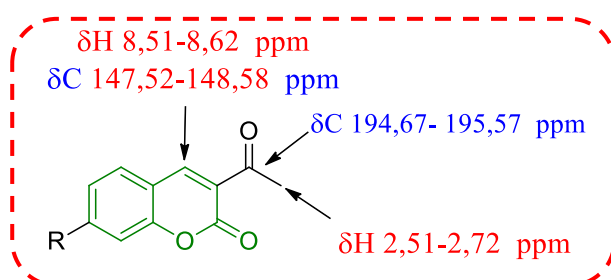
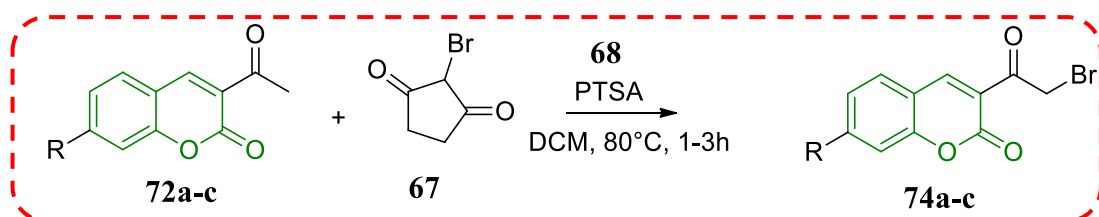


Figura 24. Atribuição dos principais sinais das 3-acetil -cumarinas (**67a-c**) nos espectros de RMN ^1H e ^{13}C em CDCl_3 .

3.3.3. α -Bromação das 3-acetil-cumarinas (**74a-c**).

A α -Bromação de grupos carbonílicos é um método muito utilizado na síntese orgânica para a formação de α -halocetonas, um intermediário muito utilizado em diversas metodologias, como na síntese de IM. O bromo molecular (Br_2) é um agente de bromação muito empregado para este método, porém seu uso gera alguns problemas reacionais relacionado sua alta reatividade, ocasionando reações não seletivas e algumas propriedades indesejáveis como irritação, toxicidade, corrosão e difícil de manuseio. Diante disto, foi utilizado o NBS (**67**) um reagente que também é muito popular e de fácil uso e seletividade (GUAN; AL-MISBA'A HUANG, 2014).



Esquema 18. Síntese das 3-(2-bromoacetil)-cumarinas (**74a-c**).

Os compostos **74a-c** foram obtidos através da reação de cetonas (**72a-c**) com NBS (**67**), na presença do ácido *p*-toluenosulfônico (PTSA) (**68**) como catalizador, em diclorometano a 80°C . O tempo de reação variou conforme a quantidade em massa da cetona utilizada (50-70 mg reage em 1h e acima de 100 entre 2 e 3 horas) (Esquema 18), formando um sólido de coloração amarelada ao final, com rendimentos de 51 a 73% e PF na faixa demonstrada na Tabela 4.

Tabela 4. Características físicas e rendimentos dos compostos **72a-c**.

R	Forma e cor	Rendimento	Ponto de Fusão (°C)
7-OH(74a)	Sólido amarelado	60%	140°C
7-OMe(74b)	Sólido amarelado	73%	200-210°C
8-OMe(74c)	Sólido amarelado	51%	215°C

A reação foi monitorada por CCF em diclorometano ou diclorometano/metanol 10% (Figura 25), dependendo do tipo de substituinte ligado a posição 7 do núcleo cumarínico (os substituintes 7-OMe e 8-Me utilizam diclorometano puro, e a hidroxila utiliza diclorometano/metanol 10%). Geralmente ocorre a formação de dois produtos com RF próximos como mostra a figura abaixo, porém, após a filtragem com diclorometano gelado o produto desejado, que também é o majoritário, é isolado.

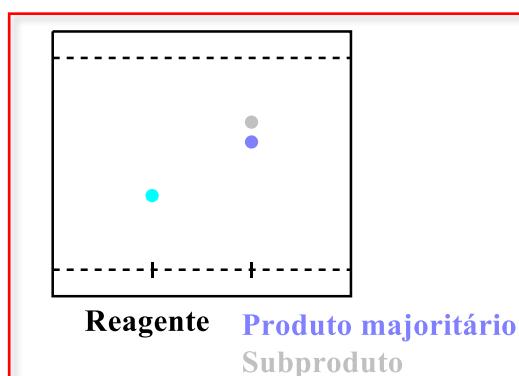


Figura 25. Representação da análise cromatográfica por CCF para a identificação dos compostos **74a-c** em diclorometano/metanol 10% como fase móvel.

Estes intermediários possuem fácil identificação estrutural. No espectro de RMN ^1H , apresentam um sinal referente ao metileno ligado à carbonila na faixa de 4,84-4,86 ppm, que neste caso se encontram mais desblindados do que normalmente (2,51-2,72 ppm). No RMN ^{13}C esse sinal encontra-se na faixa de 68,65-79,13 ppm (Figura 26).

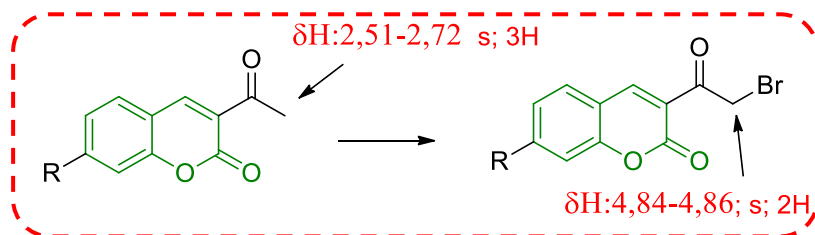
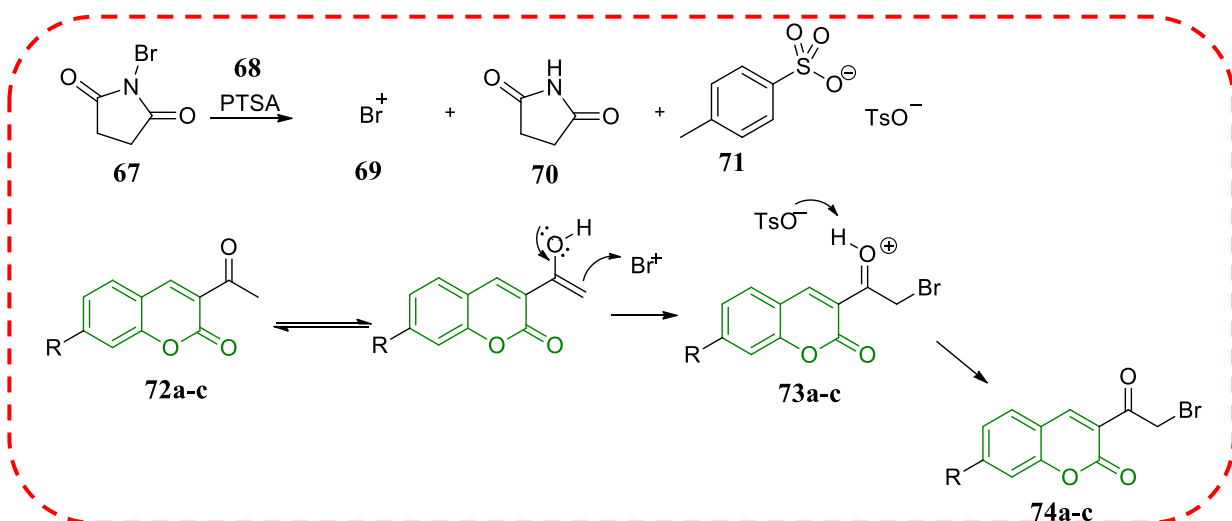


Figura 26. Atribuição dos principais sinais das 3-(2-bromoacetyl)-cumarinas (**74a-c**) nos espectros de RMN ^1H e ^{13}C em DMSO.

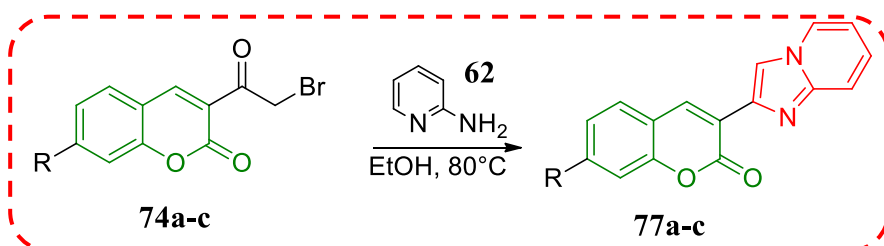
A reação de α -Bromação possui uma proposta de mecanismo simples. Inicialmente ocorre formação do Br^+ (**69**) e succinimida (**70**), pois a ligação N-Br é uma ligação relativamente fraca, o que leva a liberação de Br^+ lentamente para o meio. Em seguida ocorre a formação da ligação C-Br (**73a-c**) onde o bromo se liga a dupla estabelecida do equilíbrio ceto-enólico (**72a-c**), formando os compostos desejados **74a-c** (Esquema 19).



Esquema 19. Mecanismo proposto para a formação das 3-(2-bromoacetyl)-cumarinas (**74a-c**).

3.3.4. Síntese das 3-(imidazo[1,2-*a*]piridinas)-cumarinas (**77a-c**)

Os compostos **77a-c** fazem parte da segunda etapa da síntese clássica de IMs, no qual, os compostos **74a-c** reagem com a 2-aminopiridina (**62**) via $\text{S}_{\text{N}}2$ seguida ciclização intramolecular a 80°C em etanol (Esquema 20), formando sólidos alaranjados com rendimento de 63% a 69% e PF de 178°C a 210°C como mostra a Tabela 5 (adaptado de KUMMERLE, 2009).



Esquema 20. Síntese das 3-(imidazo[1,2-*a*]piridinas)-cumarinas (**77a-c**).

Tabela 5. Características físicas e rendimentos dos compostos **77a-c**.

R	Forma e cor	Rendimento	Ponto de Fusão (°C)
7-OH(77a)	Sólido alaranjado	69%	210°C
7-OMe(77b)	Sólido alaranjado	63%	199°C
8-OMe(77c)	Sólido alaranjado	64%	178°C

A reação foi monitorada por CCF, utilizando diclorometano/metanol 10% como fase móvel (Figura 27). Geralmente ocorre a formação de dois produtos com RF próximos como mostra a figura abaixo, porém, após a filtragem com etanol gelado o produto majoritário é isolado.

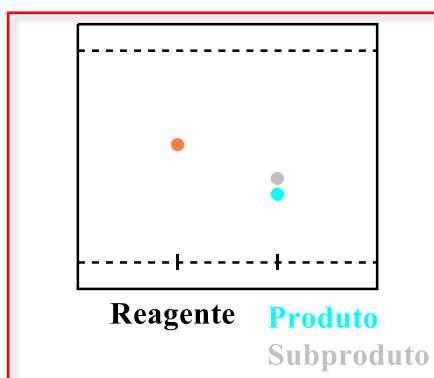
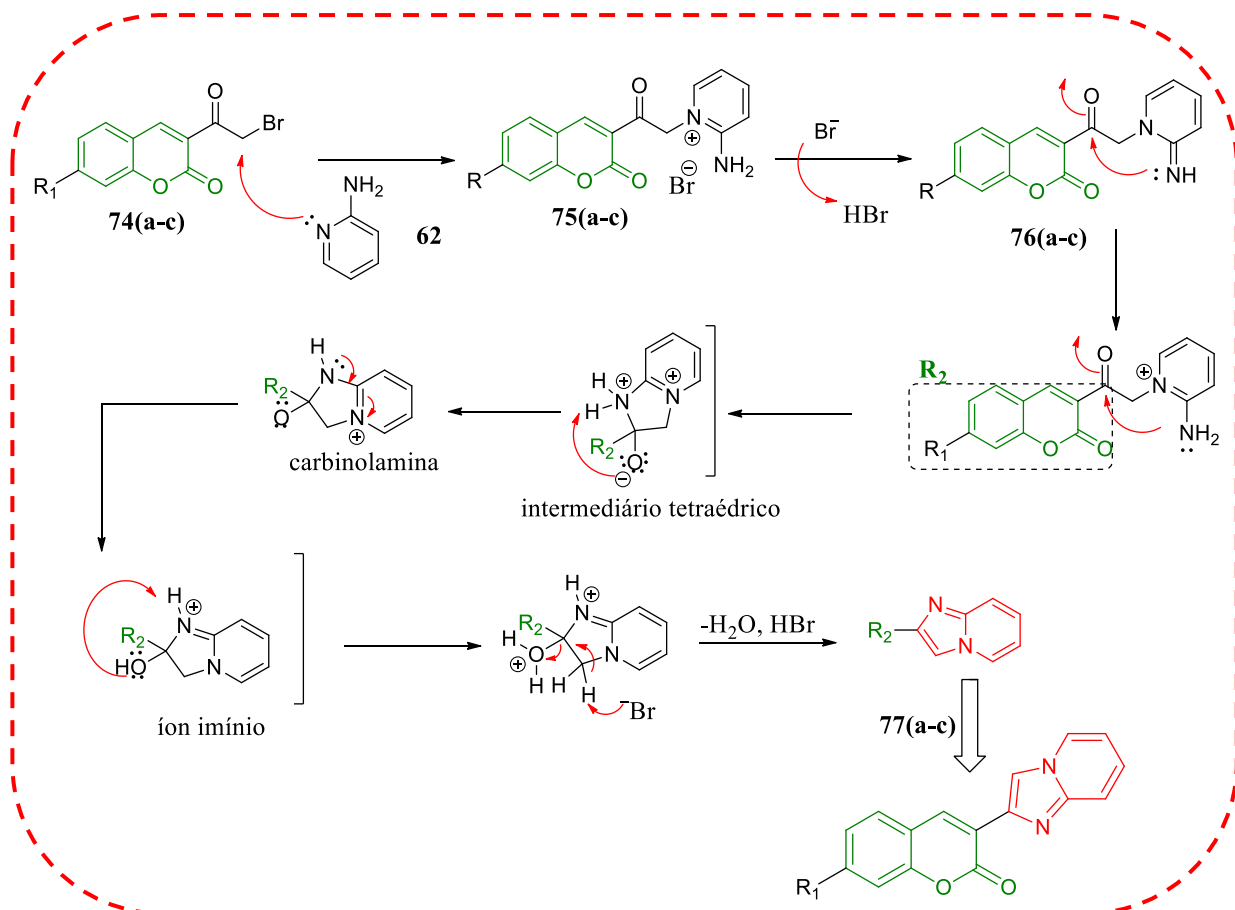


Figura 27. Representação da análise cromatográfica por CCF para a identificação dos compostos **77a-c** em diclorometano/metanol 10% como fase móvel.

Para a reação de obtenção destes compostos também foi apresentado acima como uma etapa final do mecanismo via *one-pot* no esquema 15, em que após a formação das α -halocetonas **74a-c** ocorria o ataque da 2-aminopiridina (**62**) via S_N2 formando o intermediário na forma de sal pirídinium (**75a-c**), produzindo intermediário desprotonado **76a-c** que, após uma ciclização intramolecular pela adição nucleofílica acíclica intramolecular forma o produto final **77(a-c)** (Esquema 22).



Esquema 21. Esquemas de intermediários simplificado para a formação imidazo[1,2-a]piridinas (**77a-c**).

Para confirmação da formação dos produtos (**77a-c**) foram realizados experimentos de determinação estrutural como RMN ^1H e ^{13}C . Na discussão já relatada anteriormente, referente a figura 23 da rota de otimização, o produto desejado foi confirmado com o aparecimento de um sinal mais desprotegido que o hidrogênio da cromenona na forma de simpleto na faixa de 8,76 a 9,17 ppm, referente ao hidrogênio na posição 9' do anel da IM, comprovando a ciclização de seu núcleo. Há também a formação de um duplete na faixa de 8,16 a 8,91, próximo ao hidrogênio da cromenona, referente a posição 6' do anel da IM. Esses sinais mais desprotegidos dos IM são devido à proximidade com o nitrogênio do anel heteroarômico, como mostra a Figura 28. Outros hidrogênios na faixa dos aromáticos também comprovam a formação de seu núcleo.

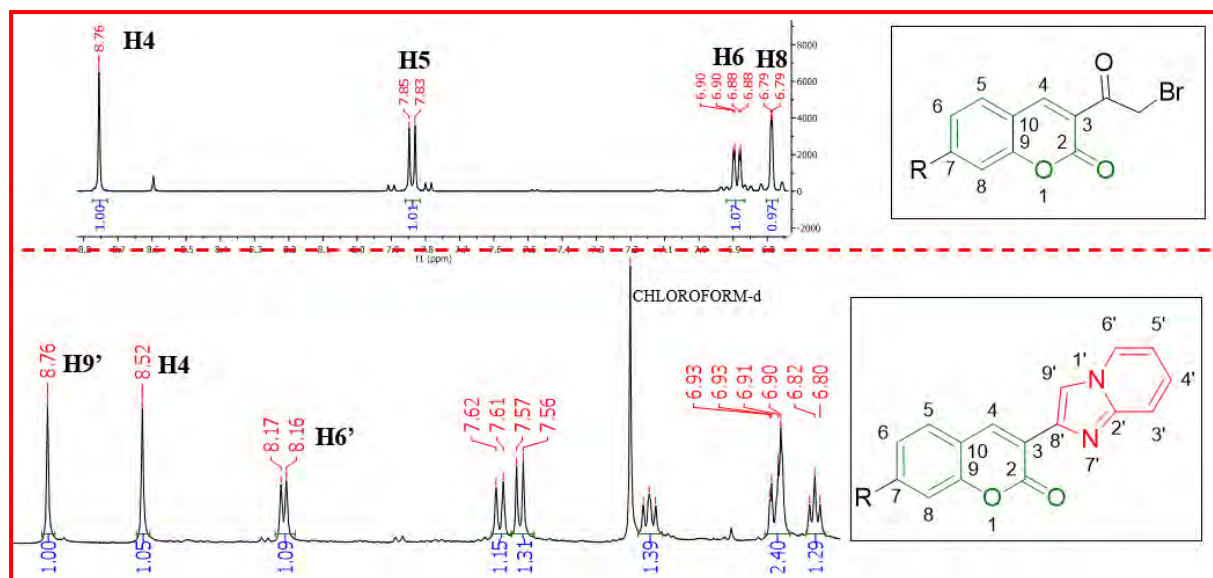
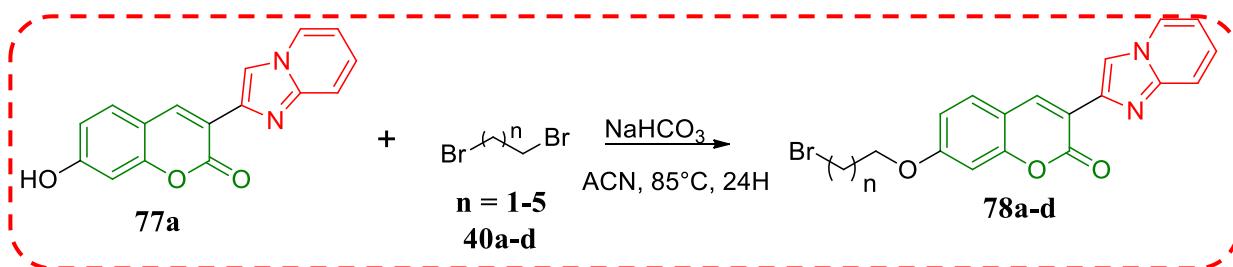


Figura 28. Comparação dos principais sinais do núcleo da cumarina dos compostos **74a-c** e do núcleo da IM dos compostos **77a-c**.

3.3.5. Alquilação da 3-(imidazo[1,2-a]piridinas)-7-hidroxi-cumarina (**77a**)

As 3-(imidazo[1,2-a]piridinas)-7-bromoalcoxi-cumarinas (**78a-d**) foram sintetizadas empregando o método previamente apresentado, a reação de *O*-alquilação a partir da 3-(imidazo[1,2-a]piridinas)-7-hidroxi-cumarinas (**77a**), dibromoalcanos (**40a-b**), bicarbonato de sódio em acetonitrila, a 85°C (Esquema 22) (adaptado de DE SOUZA et al., 2019). Estes compostos apresentavam sub-produtos muito próximos em termos de RF, o que gerou problemas nas etapas de purificação. Portanto, foram obtidos compostos sólidos com alguma impureza, sendo usado nestes casos um fator de conversão para a reação de 74% a 88% (Tabela 6).



Esquema 22. Síntese das 3-(imidazo[1,2-a]piridinas)-7-bromoalcoxi-cumarinas (**78a-d**)

Tabela 6. Características físicas e rendimentos dos compostos **78a-d**.

n	Forma e cor	fator de conversão
1 (78a)	Sólido alaranjado	74%
2 (78b)	Sólido alaranjado	88%
3 (78c)	Sólido alaranjado	80,64%
4(78d)	Sólido alaranjado	85,71%

O monitoramento desta reação é dado por CCF (Figura 29). Geralmente ocorre a formação de dois produtos com RF próximos como mostra a figura abaixo. Foram feitos testes com todos os carbonos espaçadores e todos possuíam ainda o reagente de partida com exceção do primeiro teste feito com o composto **78b** que obteve 100% de consumo do composto **77b**.

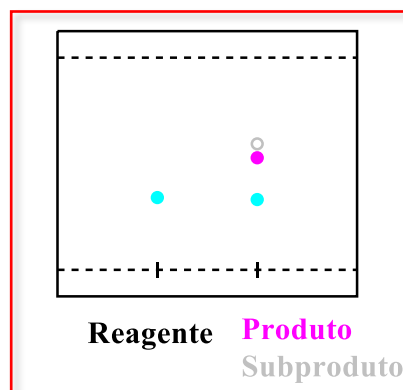
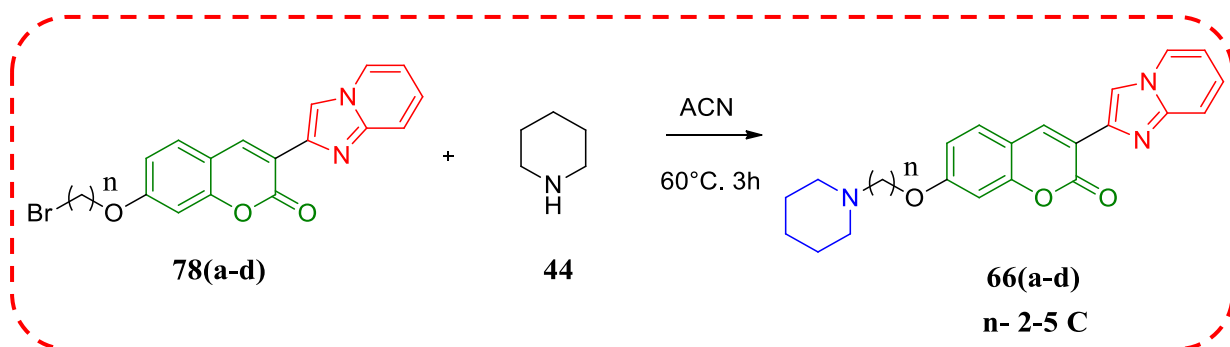


Figura 29. Representação da análise cromatográfica por CCF para a identificação dos compostos **78a-d** em dicloro/metanol 10% como fase móvel.

O mecanismo proposto e a caracterização desta metodologia já foram apresentados acima. A reação ocorre via S_N2 , em que o fenóxido formado atua como nucleófilo e realiza o ataque ao carbono ligado ao bromo.

3.3.6. Aminoação das 3-(imidazo[1,2-*a*]piridinas)-7-bromoalcoxi-cumarinas (**78a-d**)

Os compostos finais provenientes da aminoação da 3-(imidazo[1,2-*a*]piridinas)-7-bromoalcoxi-cumarinas foram sintetizados a partir da reação de S_N2 com a piperidina em ACN a 60°C baseando-se na metodologia descrita por De Souza e colaboradores (Esquema 23) (DE SOUZA et al., 2019). Foram obtidos compostos na forma de sólido marrom, com rendimentos globais relativos a duas etapas (alquilação e aminoação) de 20% a 62% (Tabela 7).

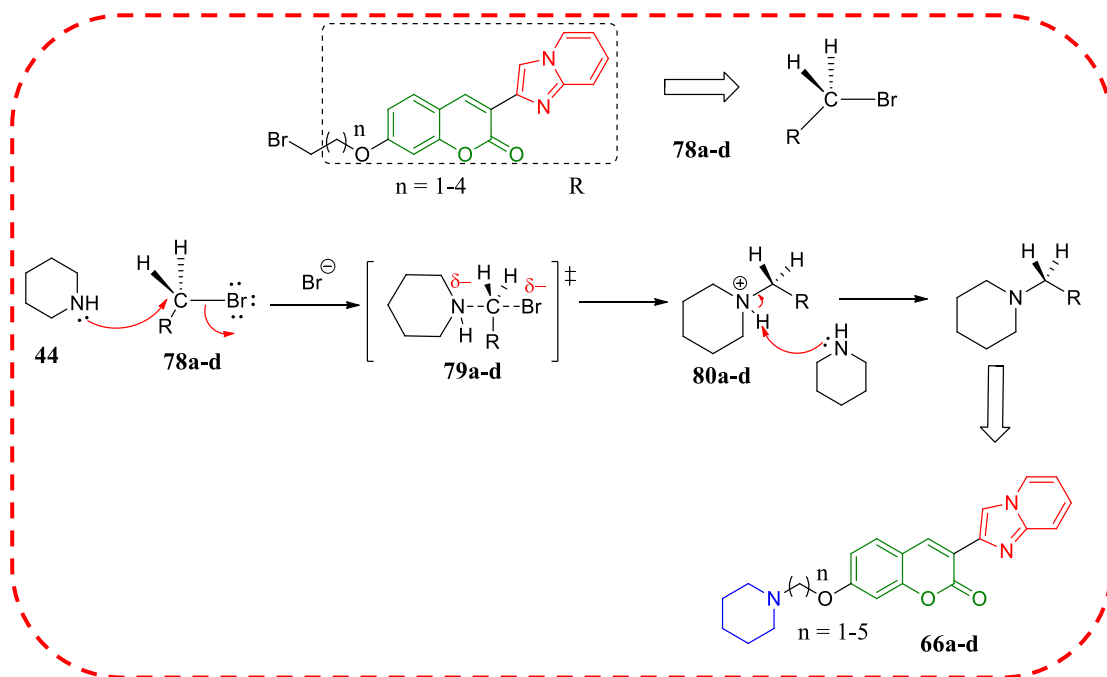


Esquema 23. Síntese das 3-(imidazo[1,2-*a*]piridinas)-7-aminoalcoxi-cumarinas **66a-d**.

Tabela 7. Características físicas e rendimentos dos compostos **66a-d**.

n	Forma e cor	Rendimento relativo
2 (66a)	sólido marrom	20%
3 (66b)	sólido marrom	62%
4 (66c)	sólido marrom	55%
5 (66d)	sólido marrom	44,33%

No Esquema 24, o mecanismo proposto mostra como etapa inicial a atuação da piperidina como nucleófilo, realizando o ataque nucleofílico ao carbono ligado ao bromo e, de forma concertada, ocorre a formação da ligação C-N e o rompimento C-Br representado pelo estado de transição (**79a-d**), até o brometo ser liberado e resultar na formação do intermediário protonado (**80a-d**). Em seguida, o brometo liberado abstrai o próton ligado ao nitrogênio, formando os compostos finais **66a-d**.



Esquema 24. Mecanismo proposto para formação dos compostos **66a-d**.

Esta reação também foi monitorada por CCF (Figura 30). Devido à reação ter ocorrido a partir de um reagente impuro (ainda com composto **77a**), na CCF aparecia tanto o sinal do produto formado como o sinal do composto **77a** que não reagiu. Diante disso foi feita uma coluna manual com diclorometano/metanol com gradiente de concentração (1 a 10%) para separar tanto o composto **77a** (utilizado para o cálculo da taxa de conversão), quanto o produto.

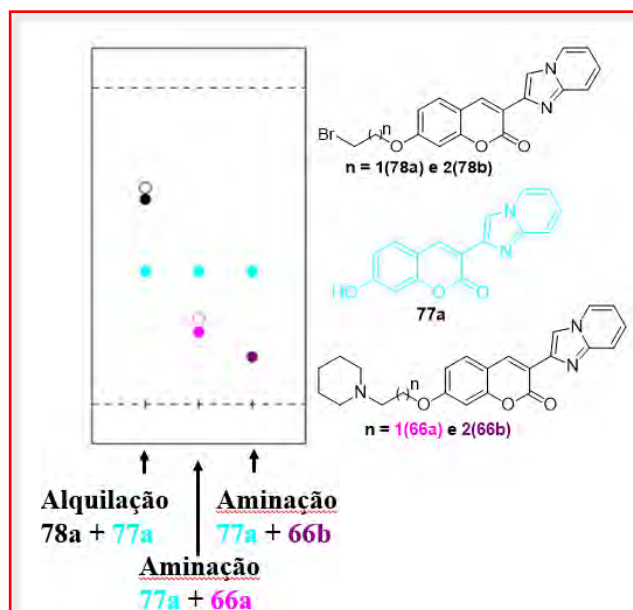


Figura 30. Representação da análise cromatográfica por CCF para a identificação dos compostos obtidos inicialmente **66a** e **66b** em diclorometano/metanol 10%.

A confirmação dos compostos **66a-d** é indicada nos espectros de RMN ^1H e RMN ^{13}C em anexo. A Figura 31, por exemplo, sinais importantes para identificação do composto **66a**, os metilenos da cadeia do substituinte aminoalcoxila. No espectro de RMN ^1H os sinais de comprovação do produto formado encontram-se na faixa de $\delta = 1,41\text{-}4,24$ ppm e no RMN ^{13}C estes sinais caem na faixa de $\delta = 23,95$ e $66,40$ ppm (Figura 31). Os hidrogênios metilênicos referente à amina cíclica, por exemplo, são claramente identificados apresentando certa simetria na sua classificação.

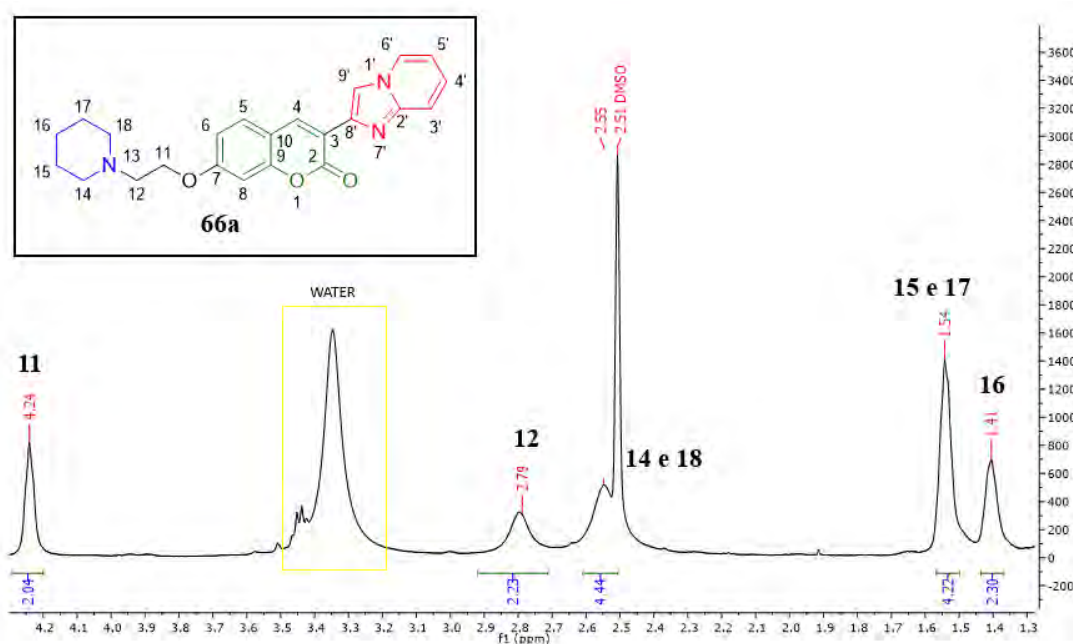


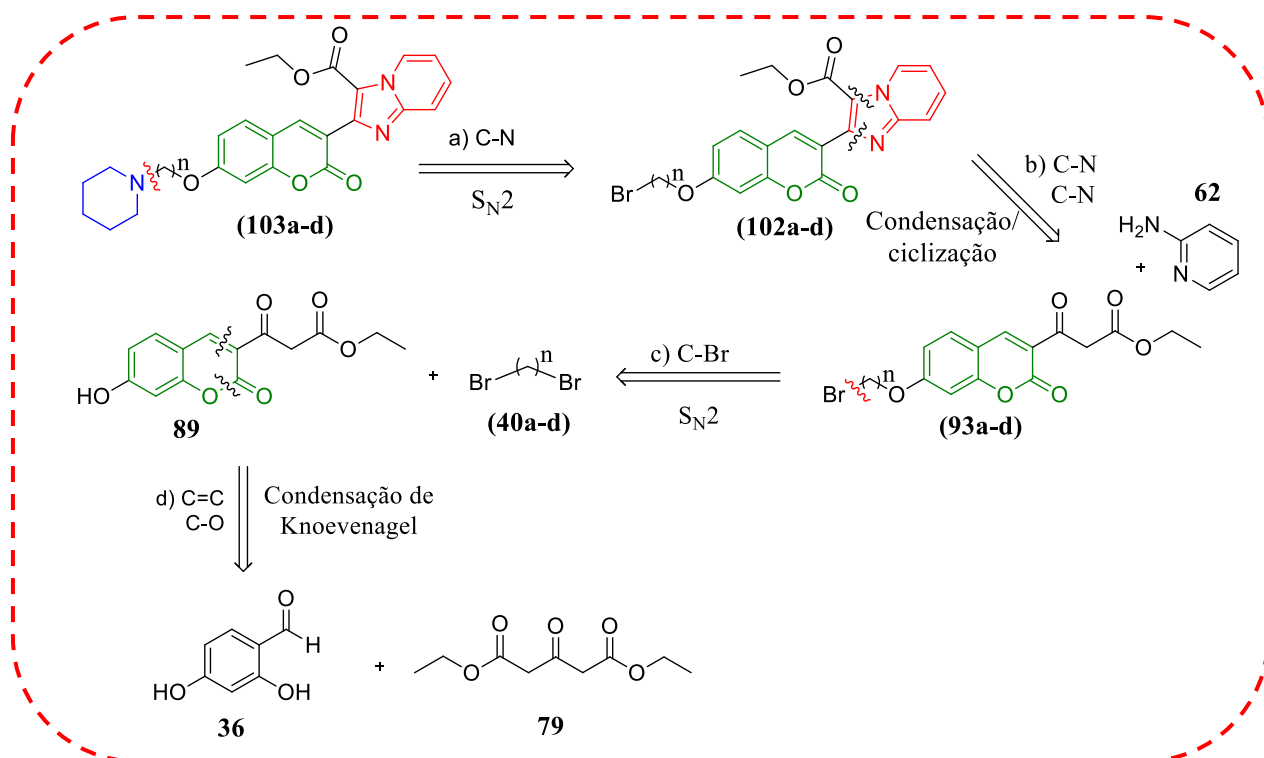
Figura 31. Atribuição do produto final **66a** no RMN ^1H em DMSO a 500 MHz, na faixa referente à comprovação da formação da cadeia aminoalcoxila.

3.3.. Síntese de 3-(imidazo[1,2-*a*]piridinas-9'-etilcarboxilato)-7-aminoalcoxi-cumarinas

3.4.1. Planejamento sintético

A síntese das 3-(imidazo[1,2-*a*]piridinas-9'-etilcarboxilato)-cumarinas foi planejada baseando-se em reações com o núcleo cumarínico a partir da análise retrossintética apresentada pelo Esquema 25. A retrossíntese inicialmente mostra que através de uma desconexão C-N (etapa a) via reação do tipo substituição nucleofílica bimolecular ($\text{S}_{\text{N}}2$) foi possível obter o intermediário **102a-d**. Em seguida através de duas desconexões C-N (etapas b), explorando uma reação de condensação seguida de ciclização, foi possível a identificação do nucleófilo 2-aminopiridina (**62**) e os eletrófilos β -cetoésteres (**93a-d**) como intermediários chave na síntese das imidazopiridinas finais **103a-d**.

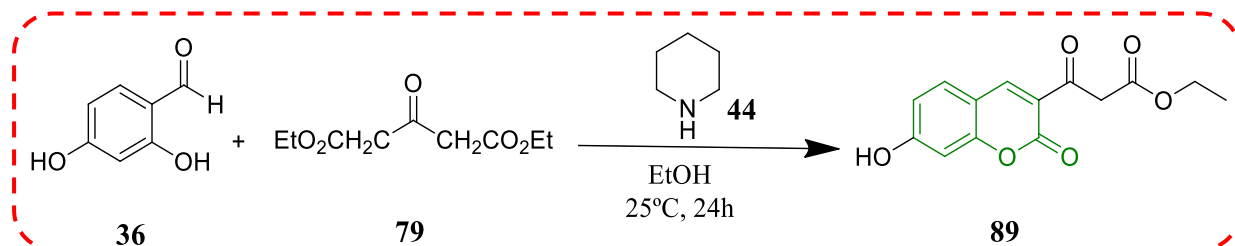
Por sua vez, pela desconexão C-Br (etapa d) via reação substituição nucleofílica bimolecular (S_N2), foi identificado o 7-hidroxi- β -cetoéster (**89**). Por fim, a partir de duas desconexões C=C e C-O (etapa c), explorando uma reação de Knoevenagel seguida de ciclização intramolecular, foi possível identificar os reagentes de partida, dietilacetoadicarboxilato de etila (**79**) e salicilaldeído (**36**) como precursores para a síntese desses intermediários chave.



Esquema 25. Análise retrossintética para obtenção de 3-(imidazo[1,2-a]piridinas-9'-etilcarboxilato)-cumarinas (**103a-d**).

3.4.2. Síntese do 7-hidroxi- β -cetoéster (**89**)

O 7-hidroxi- β -cetoéster (**89**) (Esquema 26) foi sintetizado, assim como as cetonas, pela condensação de Knoevenagel, a partir do dietilacetoadicarboxilato (**79**) e piperidina (**44**) à temperatura ambiente (VITÓRIO *et al.*, 2015). Foi obtido um composto na forma de um sólido amarelo, com rendimento de 86% e ponto de fusão de 143°C.

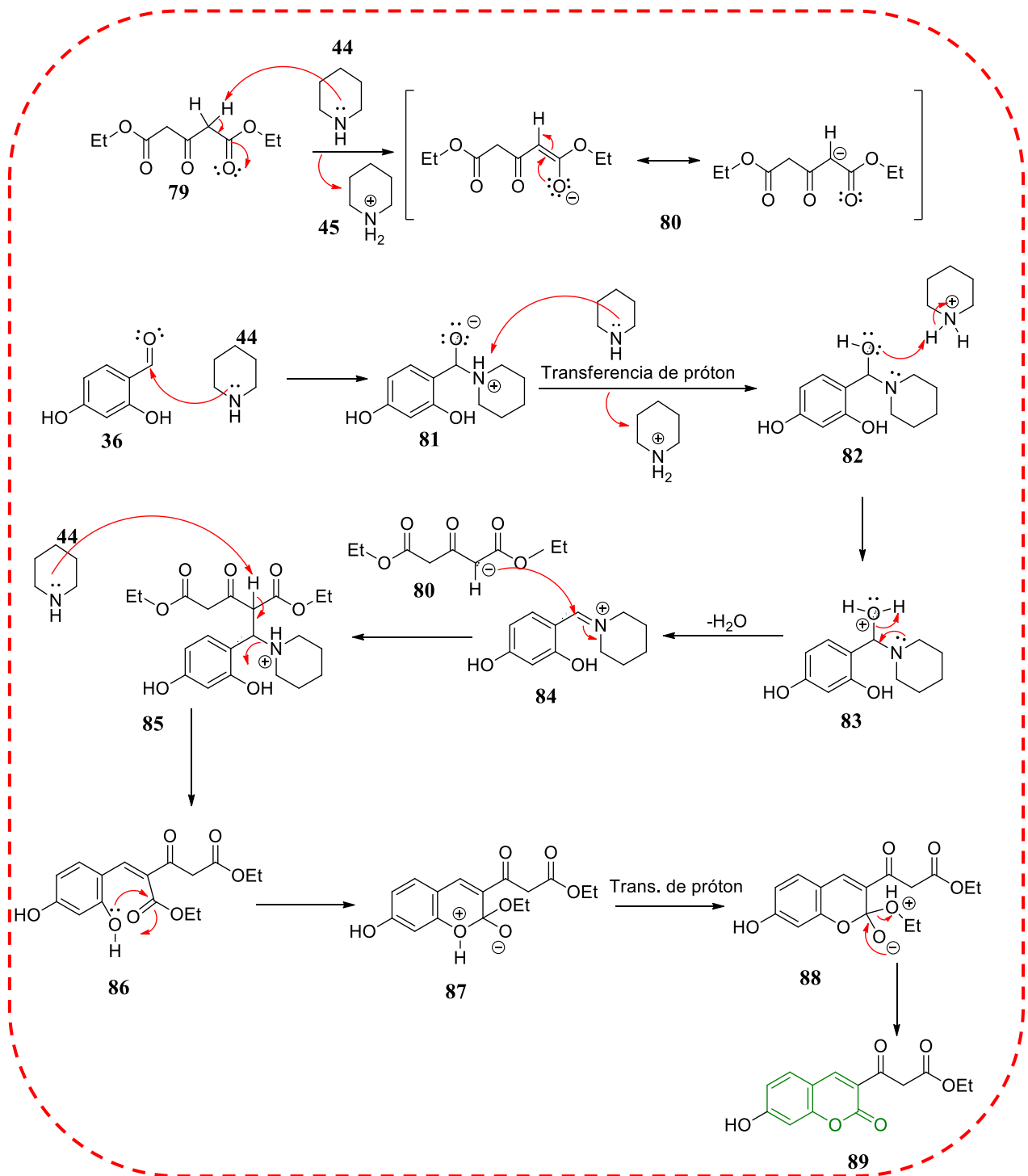


Esquema 26. Síntese do 7-hidroxi- β -cetoéster (**89**).

A primeira etapa do mecanismo da condensação de Knoevenagel (Esquema 27) ocorre pela ativação do metileno que é desprotonado pela piperidina (**44**), para dar um enolato estabilizado por ressonância (**80**), e a formação do íon imínio (**84**), gerado a partir do ataque da piperidina à carbonila do aldeído (**36**), seguida de transferência de próton com o auxílio da base e a eliminação de uma molécula de água.

Para confirmação da formação do intermediário 7-hidroxi- β -cetoéster (**89**) foi realizado experimento de determinação estrutural como RMN ^1H e ^{13}C em DMSO-*d*₆ (Figura 32). Alguns sinais característicos comprovam a formação desse composto como presença de um sinal simpleto em 8,71 ppm com integração referente a um hidrogênio, correspondendo ao hidrogênio da subunidade cromenona, que é o principal indicativo da formação de uma ligação C=C que não existia nesta posição em nenhum dos reagentes de partida. Ademais, seu deslocamento para campo mais baixo se destaca em relação aos outros sinais da cromemenona e é característico devido à proximidade de duas carbonilas. O deslocamento químico no espectro de RMN ^{13}C mostra um sinal referente a este CH em 149,29 ppm.

Também podemos destacar o sinal simpleto com integração para dois hidrogênios em 4,00 ppm, e nos espectros de RMN ^{13}C apresenta o sinal em 48,74 ppm, referente efeito de anisotropia no metileno alfa-dicarbonílico da subunidade ceto-éster, confirmando a obtenção do composto.



Esquema 27. Mecanismo proposto para formação do 7-hidroxi- β -cetoéster (89).

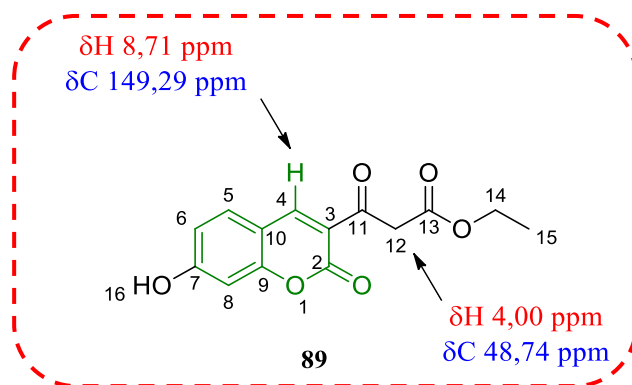
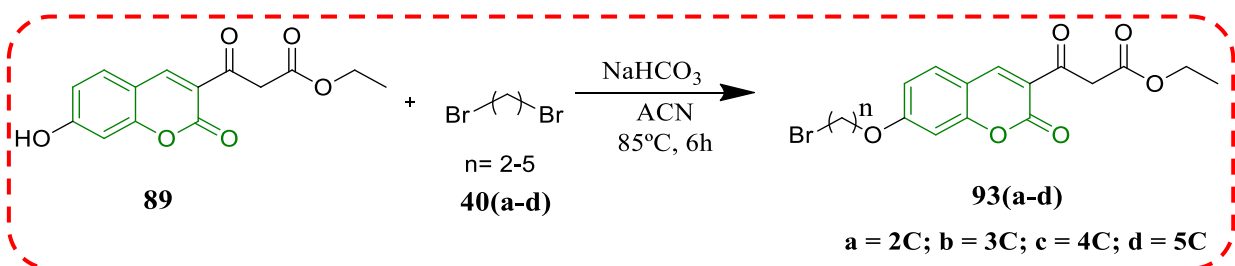


Figura 32. Atribuição dos principais sinais do composto 7-hidroxi- β -cetoéster (**89**) nos espectros de RMN ^1H e ^{13}C em $\text{DMSO-}d_6$ a 500 MHz.

3.4.3. Síntese das 7-bromoalcoxi-3- β -cetoéster-cumarinas (**93a-d**)

Os derivados 7-bromoalcoxi-3- β -cetoéster-cumarinas foram sintetizados através da reação de *O*-alquilação mediada por base já mencionada acima, a partir do 7-hidroxi- β -cetoéster (**89**), dibromoalcanos (**40a-d**), bicarbonato de sódio em acetonitrila, a 85°C (Esquema 28) (adaptado de DE SOUZA *et al.*, 2019). Foram obtidos compostos na forma de sólidos amarelos, com rendimentos na faixa de 51 a 74 %, variando de acordo com o número de carbonos espaçadores (Tabela 8).

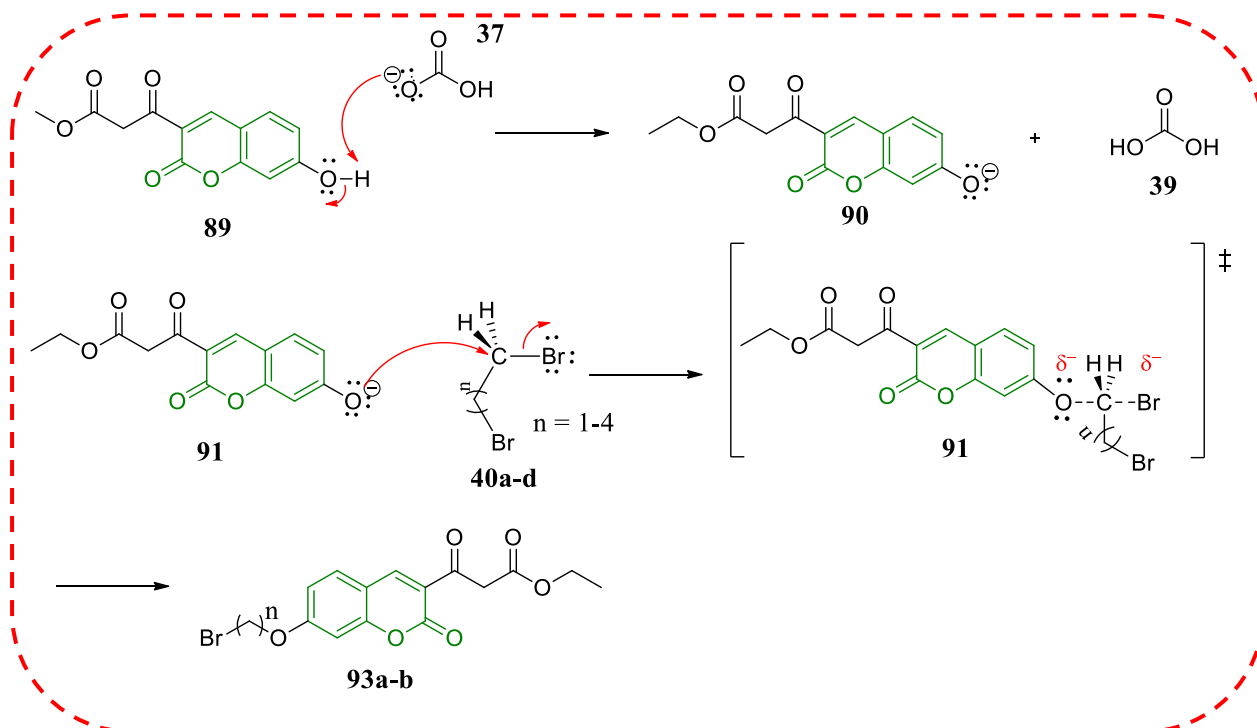


Esquema 28. Síntese dos compostos **93a-d**.

Tabela 8. Características físicas e rendimentos dos compostos **93(a-d)**.

n	Forma e cor	Rendimento	Ponto de Fusão (°C)
2 (93a)	Sólido amarelo	51%	135-140°C
3 (93b)	Sólido amarelo	74%	130-140°C
4 (93c)	Sólido amarelo	57%	145-150°C
5 (93d)	Sólido amarelo	55%	95°C

Na proposta de mecanismo (Esquema 29) já relatado, inicialmente ocorre a formação do fenóxido (**90**) e ácido carbônico (**39**). Em seguida ocorre a reação S_N2, no qual, o fenóxido atua como nucleófilo e realiza o ataque ao carbono ligado ao bromo (**40a-d**). De maneira concertada, ocorre a formação da ligação nucleófilo-carbono, e rompimento da ligação C-Br, representado pelo estado de transição (**91**), até o brometo ser liberado e assim formar o composto 7-bromoalcoxi- β-cetoéster (**93a-b**).



Esquema 29. Mecanismo proposto para formação dos compostos **93a-d**.

A alquilação dos β-cetoésteres foi confirmada pelos espectros de RMN ¹H e ¹³C dos compostos (**93a-d**) em CDCl₃, sendo necessário diferentes atribuições em relação ao metileno α-dicarbonílico, devido à interconversão gerada pelo tautomerismo ceto-enólico, podendo coexistir as duas espécies em equilíbrio ou em diferentes proporções. Existem vários fatores que influenciam o fenômeno do tautomerismo ceto-enólico que podem ser identificados pela espectrometria de RMN, como por exemplo, a temperatura, concentração e do solvente, a presença de substituintes em sua cadeia ou próximos que geram efeitos estéricos e indutivos que diminuem o percentual de uma forma ou de outra como também a característica (polaridade, prótico ou aprótico) dos solventes (SILVERSTEIN, WEBSTER, KIEMLE, 2005; LAURELLA, 2012). O DMSO que é um solvente polar aprótico que possui grande quantidade de água, o que dificulta interconversão da forma enol por favorecer ligações de hidrogênio intermolecular do solvente com a molécula. Já o CDCl₃, um solvente apolar aprótico que possui baixa quantidade de água, pode favorecer a presença da forma enol no meio.

No espectro de RMN ^1H dos compostos **93a-d** (anexos 35 a 42) alguns sinais encontram-se duplicados devido ao tautomerismo. Geralmente apresentam uma proporção referente a forma ceto e enol. No espectro representado abaixo mostra que o composto **93a**, por exemplo, possui uma proporção de 70% da forma ceto e 24% na forma enol, que é visto mais claramente na região de aromáticos (Figura 33). Alguns sinais importantes em relação ao tautomerismo são encontrados, como os hidrogênios metilênicos alfa-carbônicos com um sinal de singlete na em 4,10 ppm na forma ceto e em 6,62 ppm na forma enol, o tripleto com integração de 2 hidrogênios na região de δ 4,03-4,36 (Figura 34). Em relação a formação do produto desta etapa reacional pode ser confirmada pelos hidrogênios metilênicos ligados ao carbono oxigenado e os hidrogênios metilênicos ligados ao bromo na faixa de 3,38-3,63 ppm na forma de tripleto. Em relação ao espectro de RMN ^{13}C o sinal dos metilenos alfa-carbônicos encontra-se na faixa de 48,77 ppm (ceto) e na faixa de 92,43-92,77 ppm (enol), os hidrogênios metilênicos ligados ao carbono oxigenado encontram-se na região de 66,24-68,34 ppm e ligado ao bromo na faixa de 28,25-33,09.

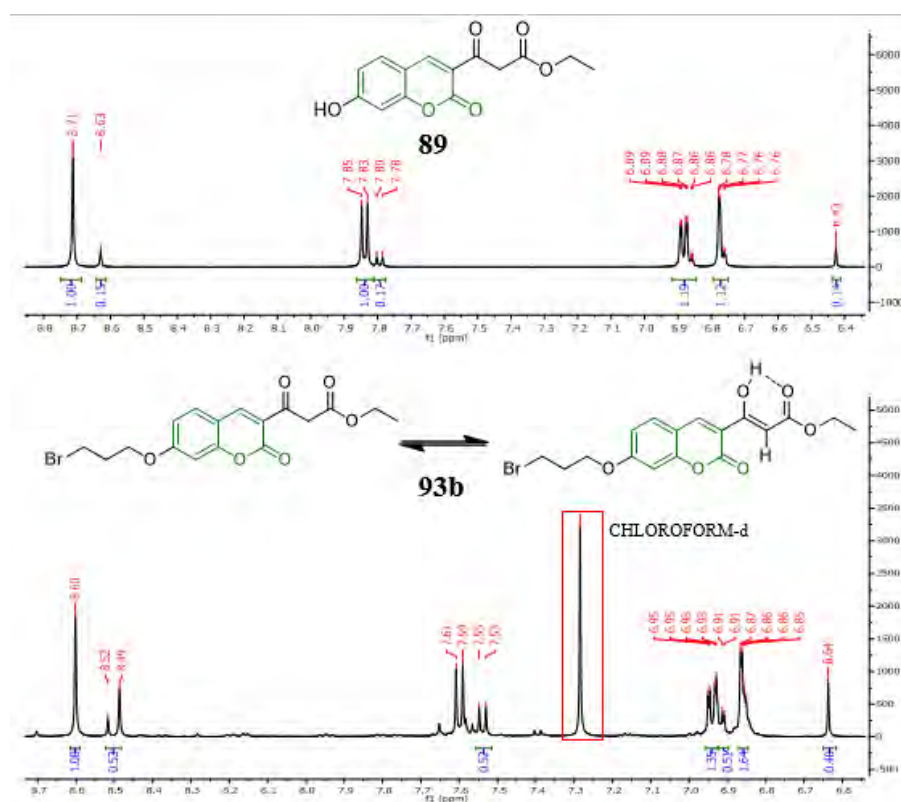


Figura 33. Comparação entre os espectros do composto **89** da reação anterior em DMSO a 500 MHz com o composto **93b** em CDCl_3 a 400 MHz, para correlacionar a região de aromáticos em relação ao tautomerismo, mostrando que em CDCl_3 a proporção da forma enol é maior.

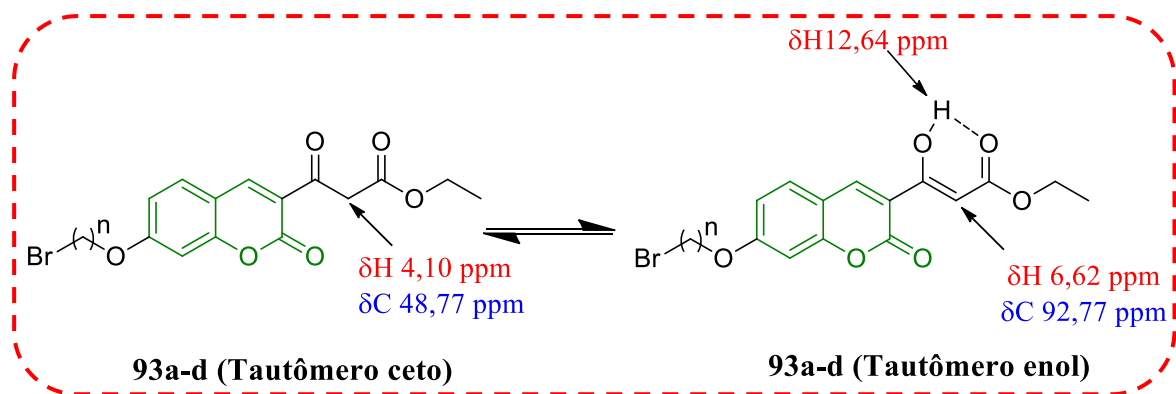
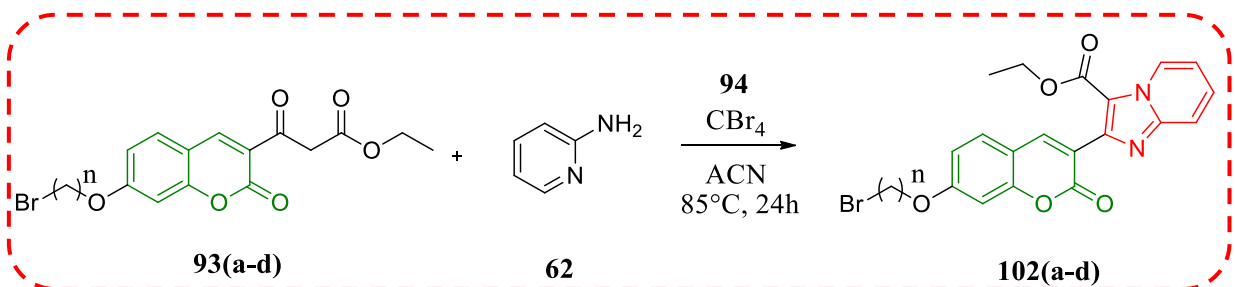


Figura 34. Atribuição dos principais sinais dos derivados 7- bromoalcoxi- β -cetoéster (**93a-d**).

3.4.4. Síntese das 3-(imidazo[1,2-*a*]piridinas-9'-etilcarboxilato)-7 bromoalcoxi-cumarinas

Os derivados 3- (imidazo[1,2-*a*]piridinas-9'-etilcarboxilato)-7bromoalcoxi-cumarinas foram sintetizados via *one-pot* pela condensação de compostos carbonílicos na presença do tetrabromometano, com a substituição nucleofílica da 2-aminopiridina, em ACN a 85°C (**Esquema 30**), originando os produtos apresentados na Tabela 9. Foram obtidos compostos na forma de sólido marrom, com rendimentos na faixa de 42 a 86 %.

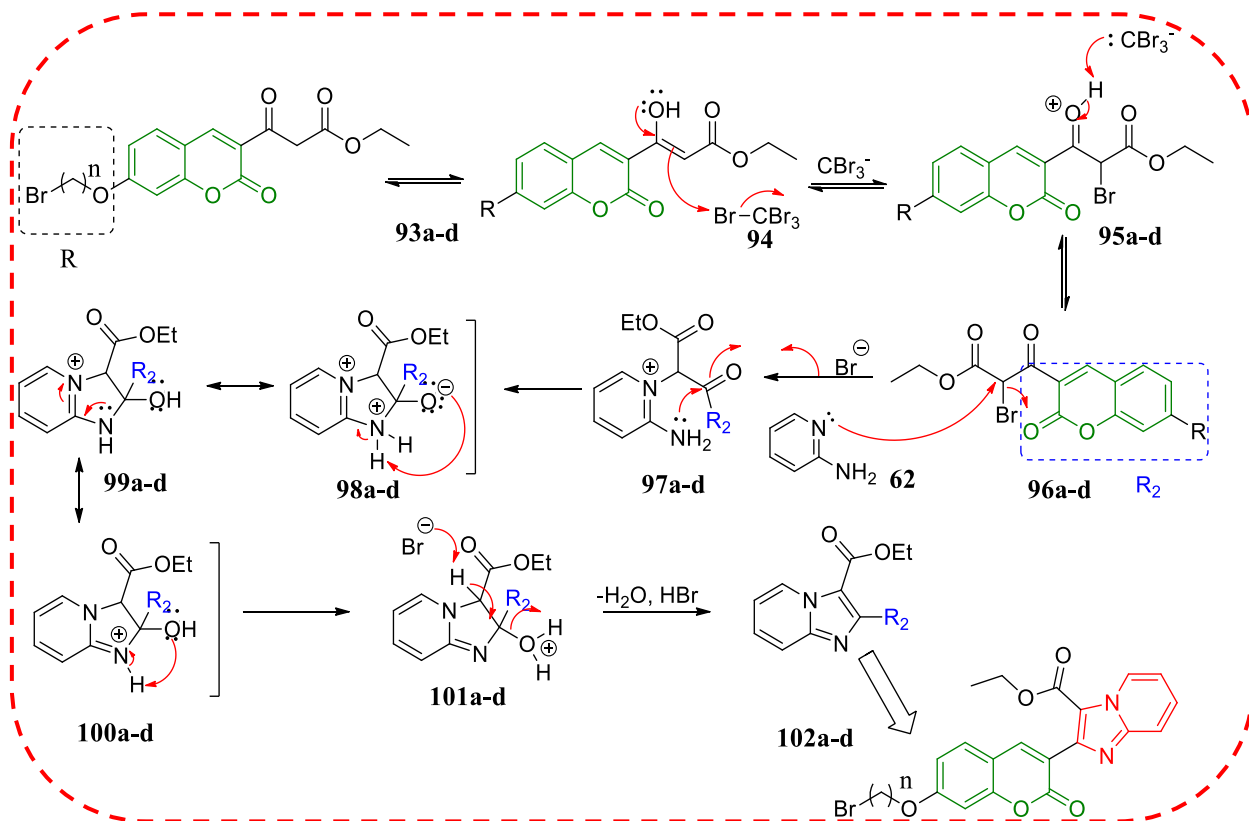


Esquema 30. Síntese da 3-(imidazo[1,2-*a*]piridinas-9'-etilcarboxilato)-7-bromoalcoxi-cumarinas (**102a-d**).

Tabela 9. Características físicas e rendimentos dos compostos **102a-d**.

n	Forma e cor	Rendimento	Ponto de Fusão (°C)
2 (102a)	Sólido marrom	54%	215
3(102b)	Sólido marrom	86%	187
4(102c)	Sólido marrom	42%	195
5(102d)	Sólido marrom	43%	177

Na proposta de mecanismo simplificado representado pelo Esquema 31, inicia-se com bromação, no qual ocorre à adição do bromo no carbono α -carbonílico aos derivados 7-bromoalcoxi- β -cetoéster (**93a-d**), em que é desprotonado pelo íon tribromometano, formando o intermediário (**96a-d**) que reage com a 2-aminopiridina (**62**) via S_N2 formando o intermediário (**97a-d**). Em seguida ocorre uma adição nucleofílica acíclica da amina primária ligada ao anel piridínico, através de um ataque nucleofílico ao carbono eletrofílico da cumarina formando o intermediário tetraédrico **98a-d**, seguido da transferência de prótons da amina para oxigênio da carbonila, formando os intermediários de ressonância, a carbinolamina neutra **99a-d** e o íon imínio **100a-d**. Por fim, após uma transferência de prótons para a hidroxila (**101a-d**), seguida da desidratação ocorre a formação da ligação dupla carbono-carbono do composto **102a-d**.



Esquema 31. Esquema de intermediários proposto para formação dos compostos **102a-d**.

A confirmação dos derivados obtidos **102a-d**, foi correlacionada aos derivados da etapa anterior, 7-bromoalcoxi- β -cetoéster. No espectro do composto **102b** não foi observado o sinal correspondente ao metileno alfa-dicarbonílico em 4,10 ppm, referente a subunidade do β -cetoéster. Houve o aparecimento de um sinal mais desprotegido que o hidrogênio da cromenona, em 9,34 ppm, referente ao hidrogênio *orto*-piridínico, o que comprovou a ciclização e formação do anel da IM, além do aparecimento de outros sinais no espectro de RMN como a carbonila de

éster proveniente também do anel da IM em 168 ppm e o surgimento de mais um metileno ligado ao oxigênio do éster em 4,30 ppm (^1H) e 66,15 ppm (^{13}C) (Figura 35).

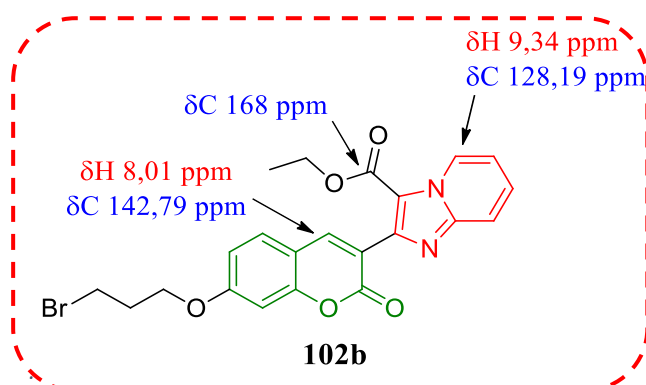
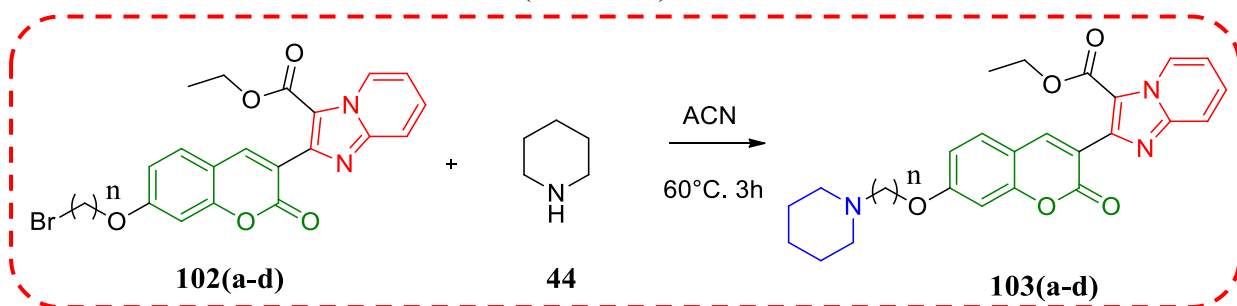


Figura 35. Atribuição dos principais sinais dos derivados imidazo[1,2-*a*]piridinas-9'-etilcarboxilato.

3.4.5. Aminoação da 3-(imidazo[1,2-*a*]piridinas-9'-etilcarboxilato)-7-bromoalcoxi-cumarinas

Os compostos finais provenientes da aminoação das 3-(imidazo[1,2-*a*]piridinas-9'-etilcarboxilato)-7-bromoalcoxi-cumarinas foram sintetizados através reação de $\text{S}_{\text{N}}2$ com a piperidina em ACN a 60°C baseando-se na metodologia descrita por De Souza e colaboradores (Esquema 32) (DE SOUZA et al., 2019). Foram obtidos compostos na forma de sólido marrom, com rendimentos na faixa de 31 a 79% (Tabela 10).



Esquema 32. Síntese dos produtos finais **103a-d**.

Tabela 10. Características físicas e rendimentos dos compostos **103a-d**

n	Forma e cor	Rendimento	Ponto de Fusão ($^\circ\text{C}$)
2	sólido marrom	31%	105
3	sólido marrom	61%	110-120
4	sólido marrom	59%	PD. 170-180
5	sólido marrom	79%	140

O mecanismo de aminação também já foi proposto anteriormente com a piperidina realizando o ataque nucleófilico ao carbono ligado ao bromo e, de forma concertada, ocorrendo a formação da ligação C-N e o rompimento C-Br para formar os compostos finais **89a-d**.

A confirmação dos compostos finais foi observada nos espectros de RMN ^1H pela presença dos sinais referente aos hidrogênios ligados a carbono do anel piperidínico. Como já discutido anteriormente, estes hidrogênios possuem diferentes conformações que faz com que sejam diastereotópicos dependendo de diversos fatores já apresentados e, como também podem cair no mesmo deslocamento químico, como no caso dos compostos **89a-d**. No espectro de RMN ^1H os sinais de comprovação do produto formado encontram-se na faixa de $\delta = 1,5\text{-}3,43$ ppm e no RMN ^{13}C estes sinais caem na faixa de $\delta = 20,23\text{-}52,82$ ppm. Na Figura 36, mostra os principais sinais de comprovação do produto formado, mostrando que os hidrogênios metilênicos ligados ao nitrogênio caem juntos ou próximos, alguns vezes estes sinais não são identificados devido à presença da água de DMSO que possui deslocamento próximo atrapalhando algumas vezes na interpretação destes sinais.

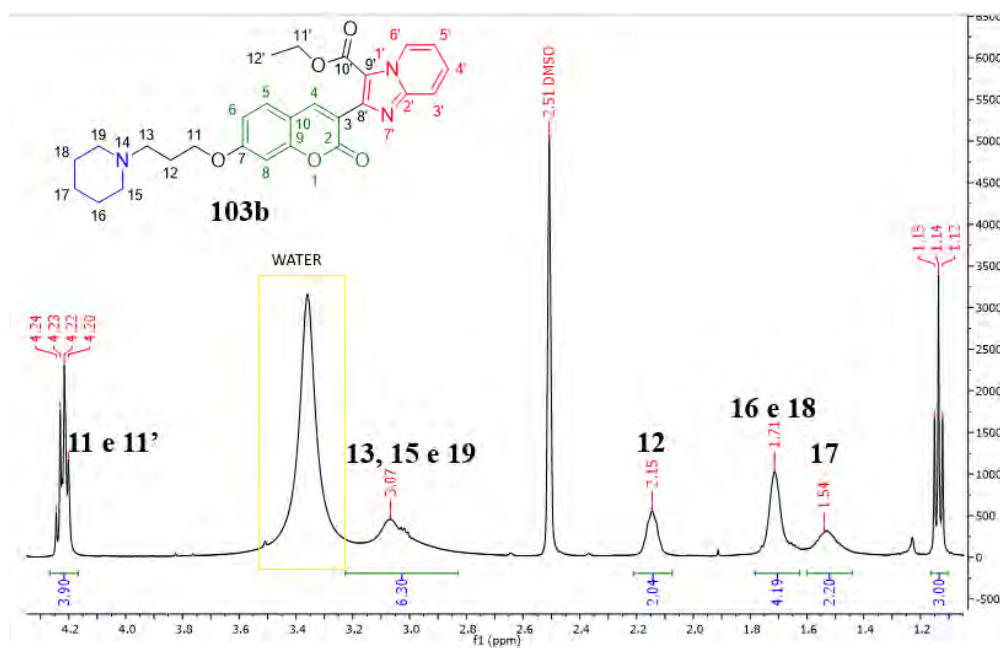
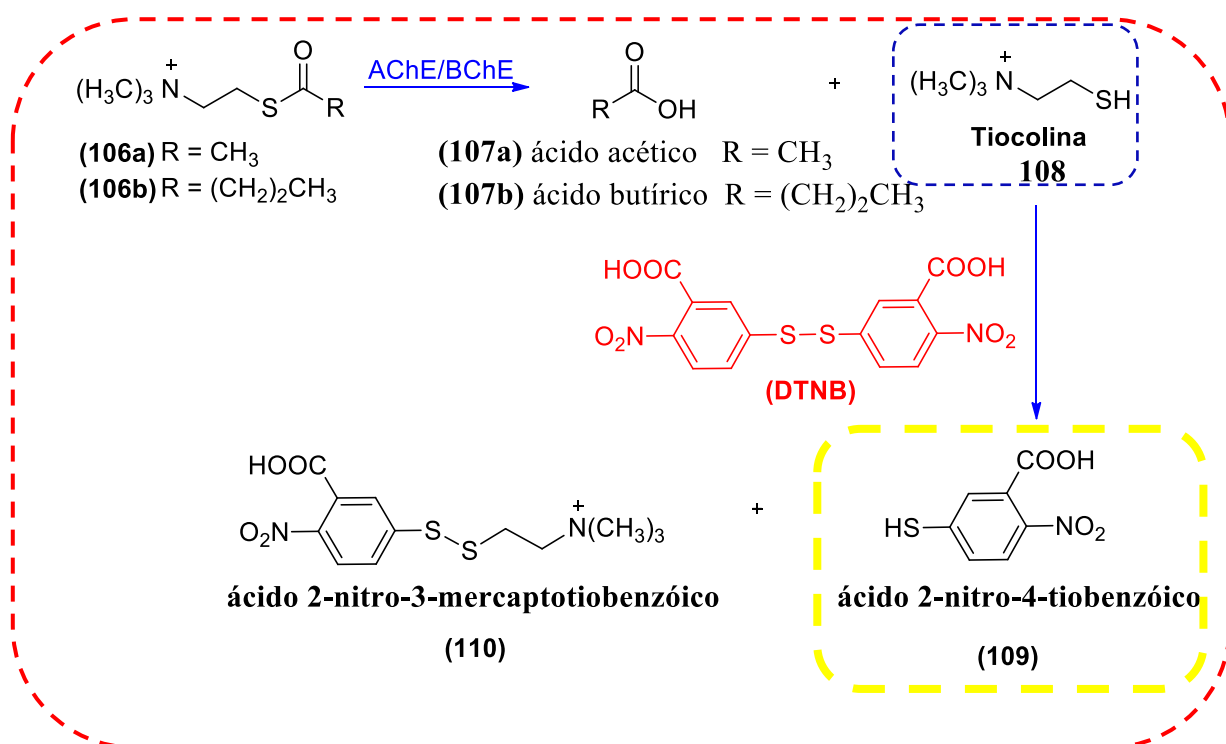


Figura 36. Região do espectro de RMN ^1H em DMSO a 500 MHz que comprova a formação do composto **103b**, devido ao aparecimento de sinais referente ao grupo alquilamino formado.

3.5. Resultados dos ensaios de inibição enzimática frente a AChE e BuChE para os compostos obtidos.

Foram realizados ensaios de atividade inibitória frente a AChE e BuChE para os produtos **66b** e **103b**, tendo em vista que resultados anteriores de nosso grupo indicaram que o espaçamento de 3 metilenos entre a núcleo cumarina e a piperidina seria o ideal para a atividade pretendida (DE SOUZA *et al.*, 2019). Os ensaios foram realizados através do método espectrofotométrico proposto por Ellman e colaboradores (1961), utilizando a donepezila (**2**) como referência. O ensaio consiste na clivagem enzimática da acetiltiocolina ou butiriltiocolina (**106a-b**) promovida pela AChE ou BuChE, respectivamente, obtendo ácido acético ou butírico (**107a-b**) e a tiocolina (**108**). O produto **108** é o marcador da atividade enzimática, que ao reagir com o DTNB, leva a formação do ácido 2-nitro-4-tiobenzóico (**109**) e do ácido 2-nitro-3-mercaptotiobenzóico (**110**). O produto **110** 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 33).



Esquema 33. Reação ocorrida no ensaio espectrofotométrico de Ellman.

Um *screening* inicial foi realizado a uma concentração fixa de 30 μM para avaliar a capacidade inibitória inicial dos produtos **66b** e **103b**. Diante disso foi obtido, como resultado para o composto **66b**, uma inibição de aproximadamente 98,1% (AChE) e 88,6% (BuChE),

enquanto o composto **103b** foi capaz de inibir aproximadamente 91,7% (AChE) e 92,4% (BuChE), mostrando que nessa concentração esses compostos possuem uma excelente eficácia de inibição frente à ambas as enzimas o que pode sugerir um baixo índice de seletividade. Os outros compostos estão sendo avaliados, assim como seus CI_{50} e cinética enzimática.

3.6. Estudo *in silico* para os compostos obtidos por modelagem molecular e avaliação dos parâmetros ADME.

As colinesterases, como comentado anteriormente, são enzimas serina hidrolase responsáveis pela hidrólise da ACh e BuCh. De modo geral, as estruturas das duas enzimas são similares, em que possuem um sítio catalítico (CAS) responsável pela hidrólise dos substratos e um sítio periférico (PAS). As diferenças mais expressivas entre as enzimas são a tríade catalítica Ser203, His447, Glu334 presente na AChE e Ser198, His438, Glu325 presente na BuChE; o sítio ativo da AChE possui resíduos aromáticos (Tyr72, Tyr124, Trp,286, Tyr337, Phe295, Phe297), já na BuChE estão presentes resíduos alifáticos (Asn68, Gln119, Ala277, Leu286, Val288, Ala328) que permite que a enzima tenha facilidade de formar complexos com resíduos mais volumosos. Diante disso, o estudo de ancoramento molecular é importante para avaliar o perfil de interação dos inibidores com a enzima (ROSENBERRY *et al.*, 2017; Li *et al.*, 2017; Li *et al.*, 2017).

Baseando-se em estudos já realizados em nosso grupo de pesquisa para avaliar o perfil de interação de nossos compostos cumarínicos frente as enzimas, foi realizado um estudo inicial de ancoramento molecular dos compostos **66b** e **103b** com o objetivo de fazer uma análise qualitativa do perfil de interação destes compostos com a enzima acetilcolinesterase de enguia elétrica (EeAChE), disponível no Protein Data Bank (PDB) de código 1C2B e resolução de 4,5 Å (BOURNE *et al.*, 1999). Foi utilizado a função GoldScore (JONES *et al.*, 1997) pois a mesma apresentou simultaneamente predição da posição de ligação do ligante com a enzima (menor valor de RMSD) e a maior pontuação de ancoramento.

Os compostos foram previamente tratados através da minimização de energia pelo método semi-empírico PM6. E em seguida foram ancorados no sítio ativo da EeAChE. E para validação do método foi realizado os experimentos de redocking do ligante bis-tacrina co-cristalizada com a enzima (PBD 2CMF). No processo de redocking é preciso ter um substrato co-cristalizado com a enzima para avaliar se o método criado prediz com as interações

experimentais observadas com a estrutura co-cristalizada, para isso é importante que a enzima com o substrato co-cristalizado no processo de redocking tenha a estrutura mais próxima possível da enzima utilizada no método. Como a enzima 1C2B não possui substrato co-cristalizado, foi utilizado a 2CMF que é a estrutura mais próxima com um substrato co-cristalizado.

Como já mencionado anteriormente o planejamento estrutural dos compostos (**66a-d** e **103a-d**) foi baseado a partir da troca isostérica com o composto **105a**, o composto mais ativo da série. Na figura 37 mostra a sobreposição da interação do composto **105a** com o composto **105d** (com 4 carbonos espaçadores na cadeia aminoalcoxila) pois possuem melhores interações com a enzima EeAChE baseando-se nas análises quantitativa (*scores*) e quantitativa (conformações estáveis). O composto **105a** é considerado um inibidor misto, pois faz interações importantes com o CAS e PAS da enzima EeAChE. O substituinte piperidinil faz interação cation- π com o resíduo de Trp86. Ambos os compostos, **105a** e **105d**, fazem interação π -stacking com Trp286. A presença de um menor espaçador na cadeia aminoalcoxila faz com que o composto **105a** apresente interações de hidrogênio do núcleo cumarínico com a Tyr337 e Phe295. Diante disso, nota-se que substituintes da cadeia aminoalcoxila com espaçadores mais curtos podem estar relacionados à sua maior ação inibitória sobre a enzima (DE SOUZA *et al.*, 2019).

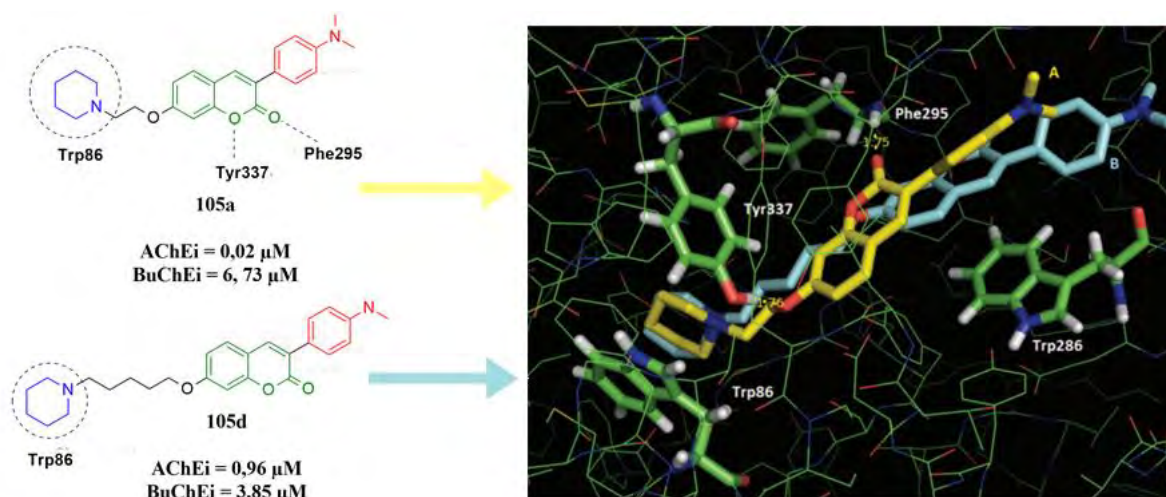


Figura 37. Estrutura química, atividade frente as enzimas AChE e BuChE e sobreposição da interação dos compostos **105a** (amarelo) e **105d** (azul) EeAChE obtido por ancoragem molecular com a função Goldscore no programa Gold. As distâncias da ligação H (Å) são mostradas em amarelo. Figura gerada com PyMol 0,99 (adaptado de DE SOUZA *et al.*, 2019).

As figuras 38 e 39 mostram as análises das poses através da avaliação de diferentes posições e interações geradas pelo mesmo método dos compostos acima (**105a-d**), em que foram

escolhidas aquelas as melhores *scores*, já que geralmente os seus maiores valores apresentam melhor interação do ligante com a proteína. Além da avaliação do perfil de interação do ligante já que esse experimento lança mão da mecânica molecular, é necessário a análise quantitativa identificando os melhores ângulos e tamanhos de ligação ideais.

Representado na Figura 38, o composto **66b** apresenta interações importantes com o CAS e PAS similar ao composto **105a**. O grupo alcoxi-amino na posição 7 do núcleo cumarínico também interage com o CAS, onde o grupo amina cíclica faz interação do tipo cátion- π com o resíduo Trp86, o oxigênio do grupo alcoxila faz ligação de hidrogênio com o resíduo Tyr337 enquanto a carbonila da cumarina faz ligação hidrogênio com resíduo Phe295. Já o heterociclo nitrogenado faz interações hidrofóbicas com a cavidade hidrofóbica dos aminoácidos no PAS.

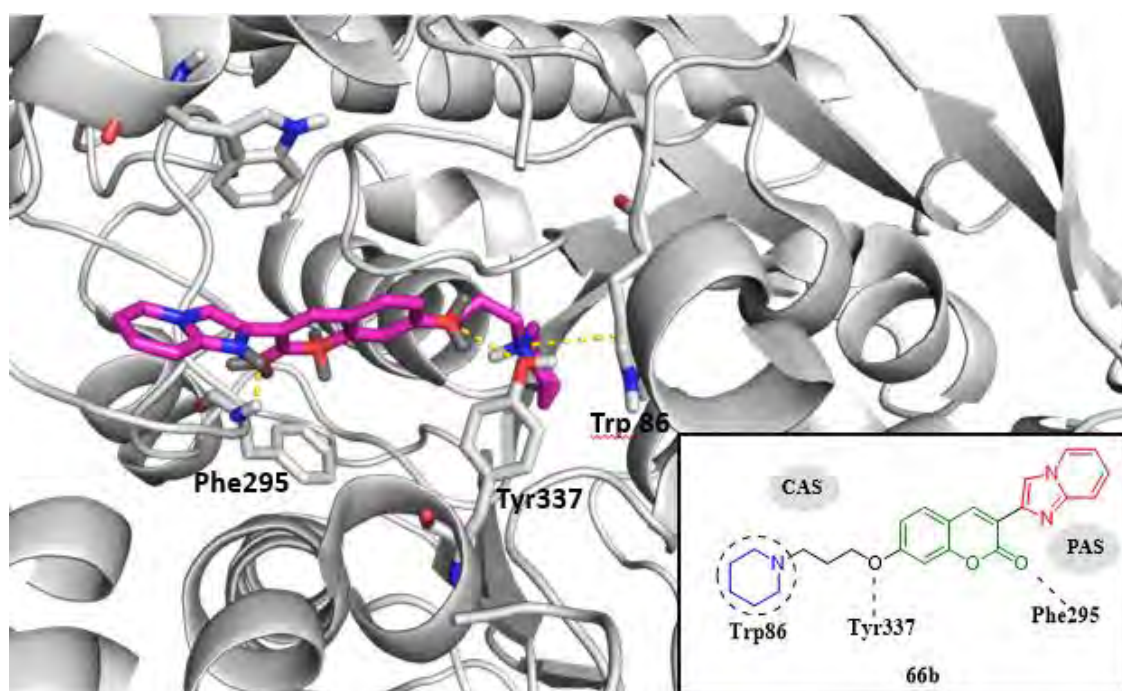


Figura 38. Análise das principais interações moleculares entre o composto **66b** e a cavidade enzimática da EeAChE obtido por ancoragem molecular com a função Goldscore no programa Gold. Figura gerada com PyMol 0,99 (DeLano Scientific LLC).

Em relação ao composto **103b** (Figura), este possui um perfil de interação oposta do que normalmente é observado nesta classe de compostos. A IM em vez de interagir com o PAS, se posiciona inversamente interagindo com o CAS, fazendo importantes interações com a Ser125 e 203 do tipo ligação de hidrogênio. Um fato importante desta interação é que a serina é o principal aminoácido responsável pela hidrólise do éster da ACh e neste caso está havendo justamente a interação com o grupo éster da IM. Já o grupo alcoxi-amino faz interações com o PAS.

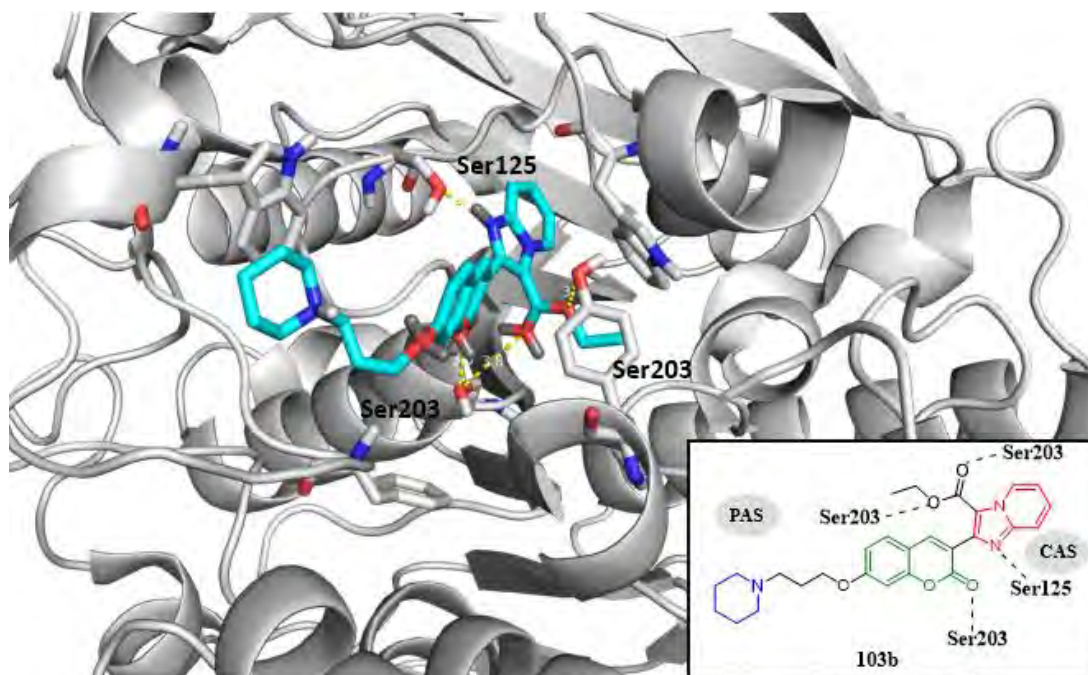


Figura 39. Análise das principais interações moleculares entre o composto **103b** e a cavidade enzimática da EeAChE obtido por ancoragem molecular com a função Goldscore no programa Gold. Figura gerada com PyMol 0,99 (DeLano Scientific LLC).

Por fim, também foi avaliado os parâmetros ADME (absorção, distribuição, metabolismo, eliminação) através da ferramenta da web SwissADME, um software disponível gratuitamente que gera uma previsão da absorção gastrointestinal e penetração cerebral (SNC) utilizando o método Boiled-Egg. Esse método baseia-se em dois parâmetros: a lipofilicidade das moléculas, avaliada a partir do coeficiente de partição (P) por um valor LogP calculado de acordo com o método Wildman-Crippen (WLogP) e sua polaridade, determinada através da área de superfície polar topológica (TPSA) (CHEDIK, *et al.*, 2017).

Além de uma boa atividade biológica um composto útil para o tratamento da DA deve ter propriedades farmacocinéticas favoráveis e baixa toxicidade (SAGLIK, *et al.*, 2020). Portanto, é necessário que o candidato a fármaco tenha propriedades físico-químicas adequadas para que tenham uma boa absorção gastrointestinal (HIA) e atravessarem a barreira hematoencefálica (BBB), são dois comportamentos farmacocinéticos cruciais para estimar em vários estágios dos processos de descoberta de fármacos (DAINA;ZOETE, 2016; MISHRA; DAHIMA,2019).

A BBB é responsável pela comunicação do sistema nervoso central e os tecidos periféricos, além disso é responsável pela limitação e regulação de troca de substâncias entre o sangue e o sistema nervoso central. Ou seja, serve como uma peneira ou filtro que apenas

moléculas com determinadas características podem penetrar com intuito de restringir a entrada de componentes neurotóxicos. Baseando-se na composição desta barreira, geralmente moléculas pequenas e com características lipofílicas possuem maior facilidade de permeação. Já as moléculas hidrofílicas essenciais (íons, glicose, aminoácidos e componentes de ácido nucléico) passam por canais especializados (ROJAS; RITTER; PIZZOL, 2011; CHAKRABORTY, *et al.*, 2017)

A Figura 40 mostra o gráfico em que avalia intuitivamente a HIA e BBB em função da posição das moléculas no referencial WLOGP versus TPSA. As IMs sem o éster (**66a-d**) possuem uma alta probabilidade de penetração gastrointestinal e penetração no cérebro. Já os compostos que possuem o grupo éster possuem uma alta probabilidade de absorção gastrointestinal e possuem uma menor probabilidade de atravessar a barreira hematocefálica.

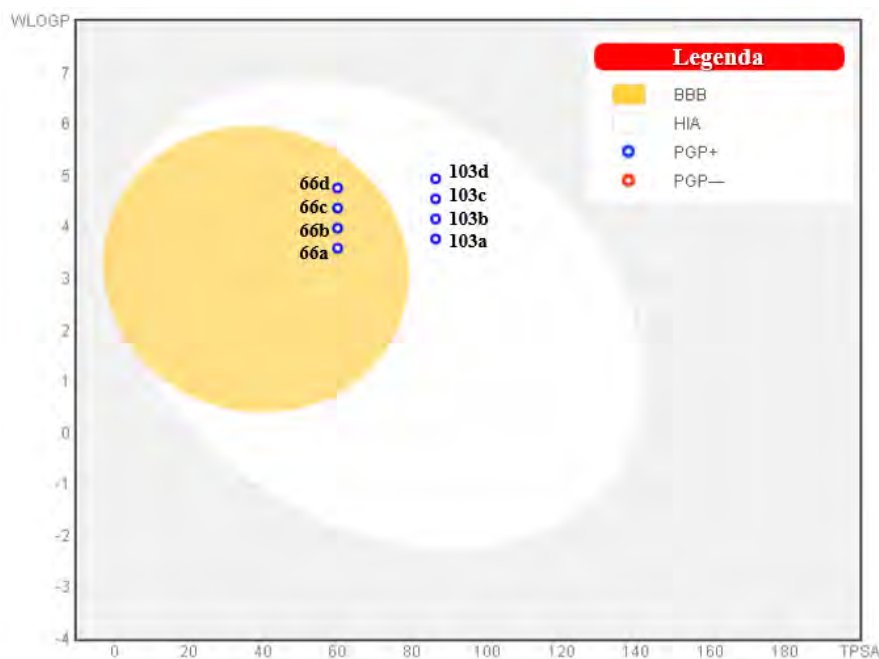


Figura 40. Método Boiled-egg para os compostos cumarínicos. (BBB) barreira hematocefálica, (HIA) absorção gastrointestinal, (PGP+) substrato da glicoproteína p, (PGP-) não é substrato da glicoproteína p.

O valor da TPSA dos compostos **66a-b** é de 59, 98 Å² e os compostos **103a-b** é de 86, 28 Å², a presença do grupo éster nos compostos **103a-b** é responsável pela sua maior TPSA devido a presença dos oxigênios, já que os cálculos de TPSA são baseados na soma das contribuições para a área de superfície molecular (geralmente de van der Waals) dos átomos polares tais como oxigênio, nitrogênio e seus hidrogênios anexados (PRASANNA; DOERKSEN, 2009). Isso faz

com que estes compostos (**103a-d**) tenham comportamento diferente, apesar da semelhança, que dificultam a impermeabilidade na membrana hematocefálica. Em relação ao log P, os compostos **66a-b** variaram de 3,50 a 4,49 enquanto os compostos **103a-b** de 3,94 a 4,81. Isso mostra que a questão de permeabilidade ou não destes compostos na BBB estaria mais implicada ao parâmetro de TPSA, o que pode ser modulado com futuras modificações estruturais na série **103a-b**.

4. CONCLUSÃO

A rota sintética da série 1, (imidazo[1,2-*a*]piridinas)-7-aminoalcoxi-cumarinas (**66a-d**), apresentou maior dificuldade na obtenção destes compostos. Foram necessárias várias adaptações sintéticas até chegarmos na rota final, já que as anteriores apresentaram problemas com reprodutibilidade (rota 1) e dificuldade de obtenção do produto final (rota de otimização).

Na rota final de obtenção destes compostos (**66a-d**), os intermediários foram obtidos com reduzido gasto de solventes durante as purificações, sendo necessário, porém, uma maior avaliação nas etapas de alquilação e aminação visando melhorar rendimento e pureza.

Já em relação a série 2, as (imidazo[1,2-*a*]piridinas-9'-etilcarboxilato)-7-aminoalcoxi-cumarinas (**103a-d**) foram obtidas através de rota com rendimentos de razoáveis a bons e de maneira bastante reprodutível.

Dois compostos finais inicialmente avaliados (**66b e 103b**) apresentaram atividade frente à AChE e BuChE, sendo inibidores eficazes e aparentemente não seletivos destas enzimas, confirmando o sucesso do planejamento estrutural. A partir da comprovação da atividade enzimática podemos afirmar que estes compostos se tratam de uma troca bioisostérica clássica em relação ao composto **105a** do planejamento inicial.

Em relação a avaliação *in silico* o composto **66b** apresentou um perfil de interação similar ao perfil de interação que os compostos cumarínicos do nosso grupo de pesquisa fazem, como é mostrado baseando-se no composto **105a** referente ao planejamento inicial. Em que, de forma geral, a cadeia aminoalcoxila interage com o resíduo de Trp86 no CAS e o núcleo cumarínico e seus substituintes aromáticos e heteroaromáticos fazem interações importantes no PAS. Já o composto **103b** apresentou um perfil de interação totalmente distinto destes compostos, a imidazopiridina na posição 7 do núcleo cumarínico que realiza interações importantes com o CAS.

Além da atividade enzimática, os compostos, baseados em estudos teóricos, parecem apresentar uma boa absorção gastrointestinal predita pela plataforma SwissADME, onde os compostos **66a-b** parecem ter uma melhor permeabilidade na membrana hematocefálica.

5. PERSPECTIVAS

Nas perspectivas para este trabalho, primeiramente, serão realizados a avaliação das atividades inibitórias, cinética enzimática de todos os compostos finais e avaliações teóricas dos perfis de interação dos produtos finais obtidos com os biorreceptores alvos por modelagem molecular para identificar a interferência do aumento da cadeia aminoalcoxila na atividade e das modificações realizadas no anel da IM. Assim como, a diferença do perfil de interação dos compostos da série 1 (**66a-d**) e série 2 (**103a-d**).

Por fim, serão submetidos a ensaios in vitro da agregação de placas β -amilóide de todos os compostos finais, visto que por se tratar de estruturas com anéis aromáticos e heteroaromáticos, podem ser capazes de afetar a fibrilação por desfavorecer o empilhamento $\pi\pi$ entre os peptídeos A β durante a polimerização.

6. PARTE EXPERIMENTAL

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

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

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). Como fase móvel, foram utilizadas as misturas solventes como hexano/acetato de etila, diclorometano/metanol com diferentes concentrações, de acordo com as propriedades físico-químicas de cada componente.

A determinação dos pontos de fusão foi realizada em aparelho Aaker modelo PFM - II.

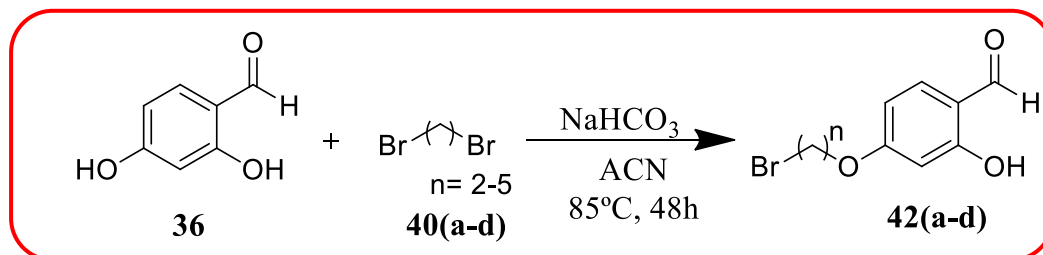
Os espectros de RMN¹H foram obtidos em aparelhos Bruker Avance-400 e Bruker Avance-500 (ICE-UFRRJ), operando a 400MHz e 500MHz, respectivamente. As amostras foram dissolvidas em CDCl₃ e DMSO-*d*₆, contendo tetrametilsilano (TMS) como referência interna e colocadas em tubos de 5 mm de diâmetro.

Os espectros de RMN¹³C foram obtidos operando a 400 MHz à 500 MHz, em aparelho Bruker Avance-400 e Bruker Avance-500 (ICE-UFRRJ), respectivamente, e as amostras foram dissolvidas em CDCl₃ e DMSO-*d*₆, contendo TMS como referência interna.

As áreas dos sinais foram obtidas por integração eletrônica e sua multiplicidade descrita com: s-singlete / sl- singlete largo / d-duplete / t-triplete / q-quarteto / m-multiplete / dd-duplo duplete.

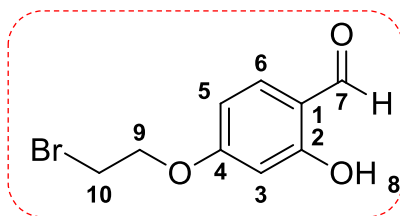
6.1. Síntese dos derivados 3-(imidazo[1,2-*a*]piridinas)-7aminoalcoxi-cumarinas (66a-d)

6.1.1. Reação de O-alkilação do 2,4-diidroxibenzalaldeído (42a-d)



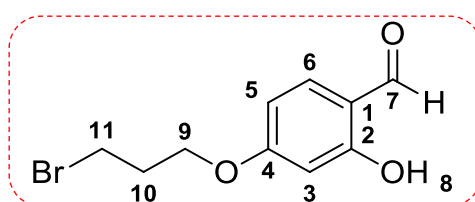
Em um tubo de reação de borossilicato (25 mL) foram solubilizados 2 mmol de 2,4-diidroxibenzalaldeído (**36**) em 10 mL de acetonitrila (ACN). Em seguida foram adicionados 4 mmol de dibromo alceno (**40a-d**) e 18 mmol de bicarbonato de sódio (NaHCO₃). Ao fim da adição, o tubo de reação foi selado e a mistura foi submetida a aquecimento sob agitação magnética a 85°C por 48h. A reação foi monitorada por CCF. A mistura reacional foi pastilhada e cromatografada em coluna de sílica gel (Isolera) e gradiente hexano/acetato de etila como eluente. A evaporação do solvente sob pressão reduzida levou aos produtos finais (**42a-d**).

4-(2-bromoetoxi)-2-hidroxibenzaldeído (42a)



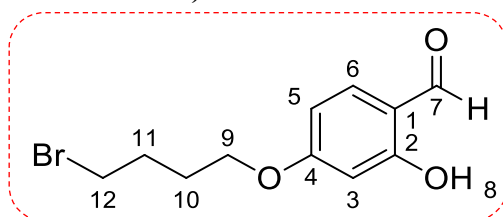
O composto **42a** foi obtido como um sólido branco em 66% de rendimento e com ponto de fusão de 55°C. **RMN ¹H (500 MHz) CDCl₃ / TMS (δ -ppm):** H₇ = 11,47(1H, s); H₈ = 9,73; H₆ = 7,45 (1H, dd, J³ = 8,8 Hz); H₅ = 6,58 (1H, dd, J³ = 8,8Hz, J⁴ = 2,0 Hz); H₃ = 6,43 (1H, d, J⁴ = 2,0 Hz); H₉ = 4,34 (2H, t); H₁₀ = 3,60 (2H, t). **RMN ¹³C (125 MHz) CDCl₃ / TMS (δ-ppm):** C₇ = 194,16; C₄ = 165,33; C₂ = 164,63; C₆ = 135,67; C₁ = 115,78; C₅ = 108,79; C₃ = 101,56; C₉ = 68,20; C₁₀ = 28,50.

4-(3-bromopropoxi)-2-hidroxibenzaldeído (42b)



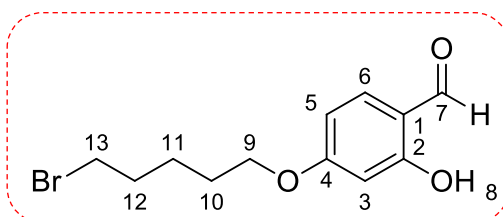
O composto **42b** foi obtido como um sólido branco em 66% de rendimento e com ponto de fusão de 65-75°C. **RMN ¹H (500 MHz) CDCl₃ / TMS (δ -ppm):** H₇ = 11,48 (1H, s); H₈ = 9,74; H₆ = 7,47 (1H, dd, J³ = 8,8 Hz); H₅ = 6,55 (1H, dd, J³ = 8,8Hz, J⁴ = 2,2 Hz); H₃ = 6,55 (1H, d, J⁴ = 2,2 Hz); H₉ = 4,19 (2H, t); H₁₁ = 3,61 (2H, t); H₁₅ = 2,36 (2H, m). **RMN ¹³C (125 MHz) CDCl₃ / TMS (δ-ppm):** C₇ = 194,65; C₄ = 166,07; C₂ = 164,69; C₆ = 135,56; C₁ = 115,55; C₅ = 108,77; C₃ = 101,50; C₉ = 66,02; C₁₁ = 32,14; C₁₀ = 29,72.

4-(4-bromobutoxi)-2-hidroxibenzaldeído (42c)



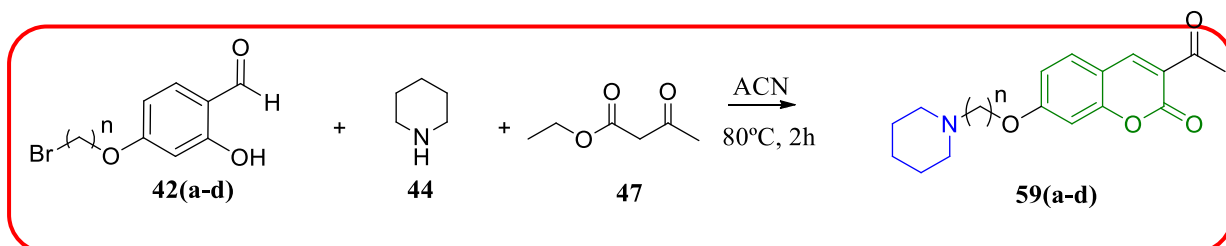
O composto **42C** foi obtido como um óleo amarelado em 65% de rendimento. **RMN ¹H (500 MHz) CDCl₃ / TMS (δ -ppm):** H₇ = 11,49 (1H, s); H₈ = 9,72; H₆ = 7,44 (1H, dd, J³ = 8,8 Hz); H₅ = 6,54 (1H, dd, J³ = 8,8Hz, J⁴ = 2,2 Hz); H₃ = 6,42 (1H, d, J⁴ = 2,2 Hz); H₉ = 4,06 (2H, t); H₁₂ = 3,49 (2H, t); H₁₀ = 2,05 (2H, q); H₁₁ = 1,98 (2H, q). **RMN ¹³C (125 MHz) CDCl₃ / TMS (δ-ppm):** C₇ = 194,35; C₄ = 166,03; C₂ = 164,45; C₆ = 135,26; C₁ = 115,13; C₅ = 108,62; C₃ = 101,05; C₉ = 67,34; C₁₂ = 33,15; C₁₁ = 27,55; C₁₀ = 29,72.

4-((5-bromopentil)oxi)-2-hidroxibenzaldeído (42d)



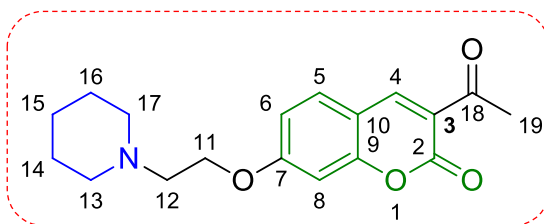
O composto **42d** foi obtido como um óleo amarelado em 55% de rendimento e com ponto de fusão de 45°C. **RMN ¹H (500 MHz) CDCl₃ / TMS (δ -ppm):** H₇ = 11,48 (1H, s); H₈ = 9,72; H₆ = 7,43 (1H, dd, J³ = 8,8 Hz); H₅ = 6,53 (1H, dd, J³ = 8,8Hz, J⁴ = 2,2 Hz); H₃ = 6,42 (1H, d, J⁴ = 2,2 Hz); H₉ = 4,03 (2H, t); H₁₃ = 3,45 (2H, t); H₁₀ = 1,95 (2H, q); H₁₂ = 1,85 (2H, q); H₁₁ = 1,64 (2H, q). **RMN ¹³C (125 MHz) CDCl₃ / TMS (δ-ppm):** C₇ = 194,59; C₄ = 166,45; C₂ = 164,75; C₆ = 135,48; C₁ = 114,69; C₅ = 108,94; C₃ = 101,28; C₉ = 68,36; C₁₃ = 33,69; C₁₀ = 32,57; C₁₂ = 28,34; C₁₁ = 24,52.

6.1.2. Síntese *one-pot* para 3-acetil-7-aminoalcoxi-cumarinas (59a-d).



Em um tubo de reação de borossilicato (25 mL) foram adicionados 0,4 mmol do salicialdeído alquilado (**42a-d**), em 11 mL de acetonitrila (ACN). Em seguida foram adicionados 0,4 mmol de etilacetoacetato (**47**) e 0,7 mmol de piperidina (**44**). Ao fim da adição, o tubo de reação foi selado e a mistura foi submetida a aquecimento sob agitação magnética a 80°C por 2h. A reação foi monitorada por CCF. Ao final da reação, o solvente foi evaporado, em seguida, foram adicionados acetato de etila e água a reação. Separou-se a fase orgânica, e extraiu-se a fase aquosa com acetato de etila (3 × 20 mL). Por fim, fase orgânica combinada foi seca com Na₂SO₄ e concentrada à vácuo, para fornecer os produtos finais (**59a-d**).

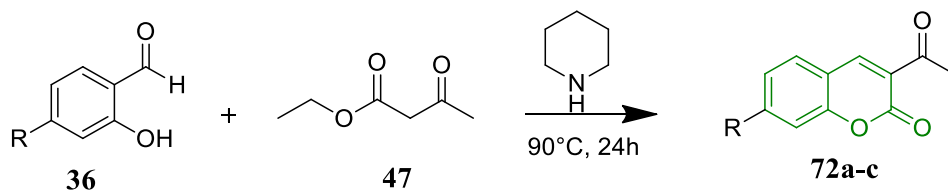
3-acetil-7-(2-(piperidin-1-il) etoxi) -2H-cromen-2-ona (59a)



RMN ¹H (500 MHz) CDCl₃ / TMS (δ -ppm): H₄ = 8,49 (1H, s); H₅ = 7,53 (1H, d, J³ = 8,8 Hz); H₆ = 6,9 (1H, dd, J³ 8,8 Hz. J⁴ = 2 Hz); H₈ = 6,83 (1H, d, J⁴ 2,2 Hz); H₁₁ = 4,19 (2H, t); H₁₂ = 2,81 (2H, t); H_{13/17} = 2,52 (4H, m); H_{14/16} = 1,62 (4H, t); H₁₅ = 1,47 (2H, m) (4H). **RMN ¹³C (125 MHz) CDCl₃ / TMS (δ -ppm):** C₁₈ = 195,28; C₂ = 169,29; C₇ = 159,50; C₉ = 157,44; C₄ = 143,53; C₅ = 131,85, C₆ = 113,98; C₈ = 100,64; C₁₁ = 66,67; C₁₂ = 57,18; C_{13/17} = 54,18; C_{14/16} = 25,55; C₁₉ = 30,32; C₁₅ = 23,70

6.2. Rota final de obtenção das 3-(imidazo[1,2-a]piridina)-cumarinas

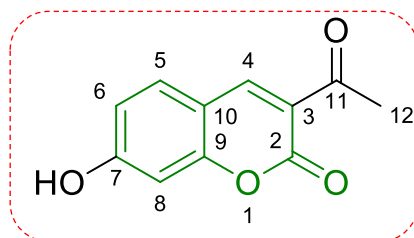
6.2.1. Síntese das 3-acetil-cumarinas (72a-c)



R = OH, 7-metoxi, 8-metoxi

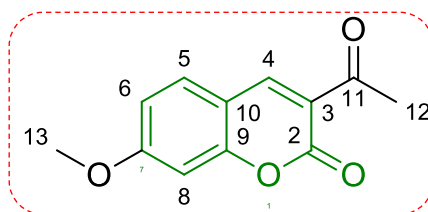
Em um tubo de reação de borosilicato (25 mL) foi solubilizado 14.48 mmol do salicilaldeído (**36**) em 40 mL de etanol, foram adicionados em seguida 14.48 mmol de acetoacetato de etila (**47**) e 2.17 mmol de piperidina (**44**). A solução foi mantida a 90°C por 24h. Ao fim da reação o sólido formado foi filtrado em etanol gelado, sem necessidade de purificação, formando o produto final (**72a-c**).

3-acetil-7-hidroxi-2*H*-cromen-2-ona (**72a**)



O composto **72a** foi obtido como um sólido marrom em 70% de rendimento e com ponto de fusão de 238°C. **RMN ¹H (500 MHz, DMSO-d₆) / TMS (δ-ppm):** H_{OH} = 11,30 (1H, s); H₄ = 8,58 (s, 1H); H₅ = 7,75 (d, J³ = 8.51Hz, 1H); H₆ = 6,83 (dd, J³ = 8.51Hz, J⁴ = 2,2Hz, 1H); H₈ = 6,79 (1H, s); H₁₃ = 2,51 (2H, s). **RMN ¹³C (125 MHz, DMSO-d₆) / TMS (δ-ppm):** C₁₂ = 195,15; C₂ = 165,28; C₉ = 159,60; C₄ = 148,32; C₅ = 113,16; C₁₀ = 119,27; C₆ = 114,93; C₃ = 111,05; C₈ = 102,25; C₁₃ = 30,56.

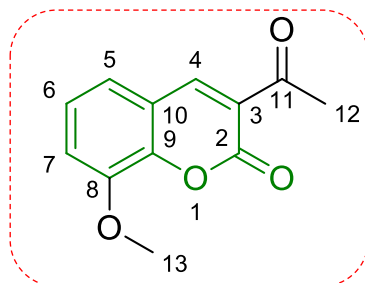
3-acetil-7-metoxi-2*H*-cromen-2-ona (**72b**)



O composto **72b** foi obtido como um sólido esverdeado em 90% de rendimento e com ponto de fusão de 205°C. **RMN ¹H (500 MHz, DMSO-d₆) / TMS (δ-ppm):** H₄ = 8,51 (1H,s); H₅ = 7,56 (d, J = 8.50Hz, 1H); H₆ = 6,92 (d, J = 8.51Hz, 1H); H₈ = 6.85 (1H,s); H₁₃ = 3,93 (3H,s); H₁₂ = 2,72 (3H,s). **RMN ¹³C (125 MHz, DMSO-d₆) / TMS (δ-ppm):** C₁₁ = 195,57; C_{2,7} = 158,90; C₉

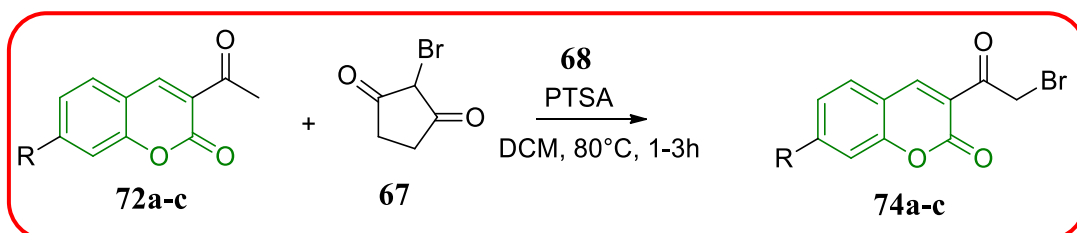
= 155,06; C₄ = 147,52; C₅ = 131,24; C₃ = 124,88; C₆ = 125,40; C₁₀ = 118,63; C₈ = 116,58; C₁₂ = 30,53.

3-acetil-8-metoxi-2H-cromen-2-ona (72c)



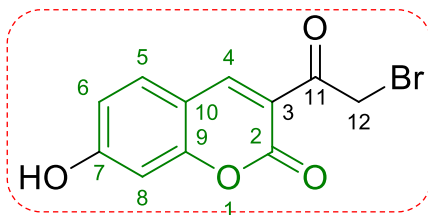
O composto **72c** foi obtido como um sólido amarelo em 83% de rendimento e com ponto de fusão de 233°C. **RMN ¹H (500 MHz, DMSO-d₆) / TMS (δ-ppm):** H₄ = 8,62 (s, 1H); H₅ = 7,48 (1H, d); H₆ = 7,34 (1H, t); H₇ = 1,30 (1H, d); H₁₃ = 3,93 (2H, s); H₁₂ = 2,59 (3H, s). **RMN ¹³C (125 MHz, DMSO-d₆) / TMS (δ-ppm):** C₁₂ = 194,67; C₂ = 157,63; C₄ = 146,67; C₉ = 145,69; C₈ = 143,38; C₅ = 124,31; C₁₀ = 123,95; C₆ = 124,31; C₃ = 111,05; C₆ = 121,11; C₁₀ = 118,20; C₇ = 115,86; C₁₃ = 29,52.

6.2.2. α-Bromação das 3-acetil-cumarinas (74a-c).



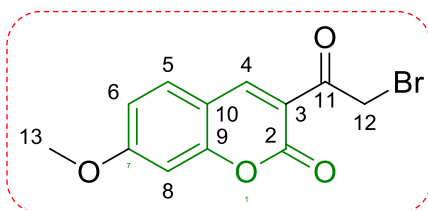
Em um tubo de reação de borossilicato (25 mL) foram adicionados 0,2 mmol de 3-acetil-cumarina (**72a-c**), NBS (**67**) (0,2 mmol, 1equiv), e PTSA (**68**) (0,02 mmol, 10 mol%) solubilizados em 2 mL de diclorometano, em seguida, o frasco foi selado e a mistura foi agitada e aquecida a 80°C na faixa de 1 a 3 horas, dependendo da quantidade de massa. O produto foi obtido na forma de sólido sob filtração a vácuo.

3- (2-bromoacetil) -7-hidroxi-2H-cromen-2-ona (74a)



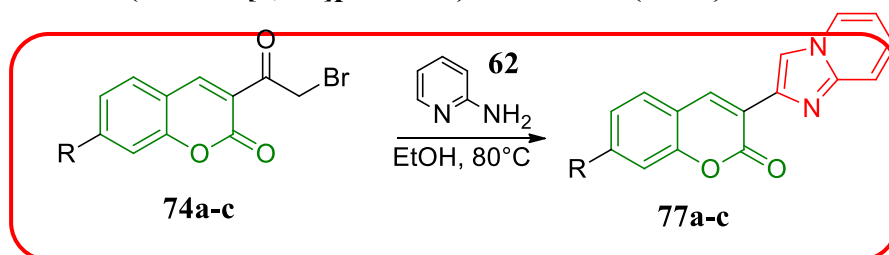
O composto **74a** foi obtido como um sólido amarelo em 60% de rendimento e com ponto de fusão de 140 °C. **RMN ¹H (500 MHz, DMSO-d₆) / TMS (δ-ppm):** H_{OH} = 11,30 (1H, s); H₄ = 8,76 (s, 1H); H₅ = 7,84 (d, J³ = 8.51Hz, 1H); H₆ = 6,89 (dd, J³ = 8.51Hz, J⁴ = 2,2Hz, 1H); H₈ = 6,79 (1H, d, J⁴ = 2,2Hz); H₁₂ = 4,84 (2H, s). **RMN ¹³C (125 MHz, DMSO-d₆) / TMS (δ-ppm):** C₁₂ = 188,59; C₂ = 165,87; C₉ = 159,13; C₄ = 149,13; C₅ = 132,96; C₁₀ = 118,50; C₆ = 114,32; C₃ = 112,53; C₈ = 100,84; C₁₂ = 79,13.

3- (2-bromoacetil) -7-metoxi-2H-cromen-2-ona (74b)



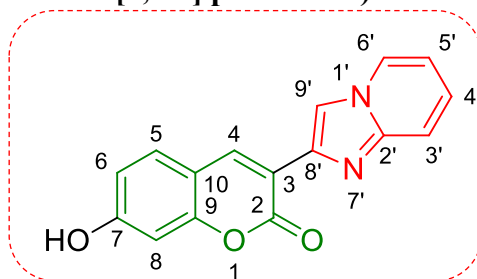
O composto **74b** foi obtido como um sólido amarelo em 73% de rendimento e com ponto de fusão de 200-210 °C. **RMN ¹H (500 MHz, DMSO-d₆) / TMS (δ-ppm):** H₄ = 8,81 (s, 1H); H₅ = 7,93 (d, J³ = 8.51Hz, 1H); H₈ = 7,06 (d, J = 8.51Hz, 1H); H₆ = 7,11 (s, 1H); H₁₃ = 4,86 (s, 2H); H₁₂ = 4,86 (s, 3H). **RMN ¹³C (125 MHz, DMSO-d₆) / TMS (δ-ppm):** C₁₂ = 188,59; C₂ = 165,87; C₉ = 159,13; C₄ = 149,13; C₅ = 132,96; C₁₀ = 118,50; C₆ = 114,32; C₃ = 112,53; C₈ = 100,84; C₁₃ = 68,56; C₁₁ = 56,59.

6.2.3. Síntese das 3-(imidazo[1,2-a]piridinas)-cumarinas (77a-c)



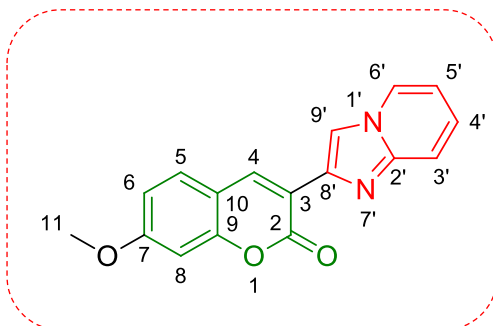
Em um tubo de reação de borossilicato (25 mL) foram adicionados 0,5 mmol de 3-(2-bromoacetil)-cumarina (74a-c) e 0,5 mmol de 2-aminopiridina (62) em 2 mL de etanol, em seguida, o frasco foi selado e a mistura foi agitada e aquecida a 80°C em 24h. Os produtos (77a-c) foram obtidos na forma de sólidos sob filtração a vácuo.

7-hidroxi-3-(imidazo[1,2-a]piridin-2-il)-2H-cromen-2-ona (77a)



O composto **77a** foi obtido como um sólido amarelo em 69% de rendimento e com ponto de fusão de 219°C. **RMN ¹H (500 MHz) CDCl₃ / TMS (δ-ppm):** H_{6'} = 8,91 (1H, d, J = 6,7Hz); H_{9'} = 8,82 (1H, s); H₄ = 8,73 (1H, s); H_{3'} = 7,87 (1H, d, J = 9Hz); H_{4'} = 7,82 (1H, t); H₅ = 7,71 (1H, d, J = 8,6Hz); H_{5'} = 7,39 (1H, t); H₆ = 6,92(2H, dd, J³ = 8,6 Hz, J⁴ = 2Hz); H₈ = 6,84 (1H, d, J⁴ = 2Hz). **RMN ¹³C (125 MHz) CDCl₃ / TMS (δ-ppm):** C₂ = 163,16; C₉ = 158,88; C₇ = 155,52; C₄ = 141,33; C_{5 e 6'} = 131,23; C_{9'} = 129,26; C_{4'} = 114,72; C_{3'} = 114,00; C_{4'} = 113; C₁₁ = 11,53; C_{6 e 8} = 102,56;

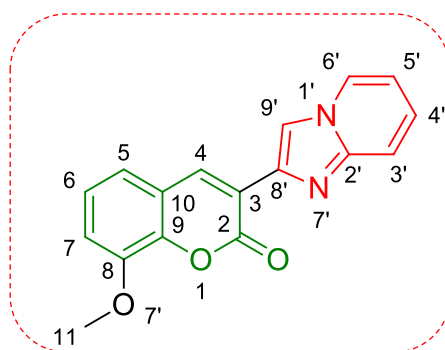
3-(imidazo[1,2-a]piridin-2-il)-7-metoxi-2H-cromen-2-ona (77b)



O composto **77b** foi obtido como um sólido amarelo em 63% de rendimento e com ponto de fusão de 199°C. **RMN ¹H (500 MHz) CDCl₃ / TMS (δ-ppm):** H_{9'} = 8,76 (1H, s); H₄ = 8,52

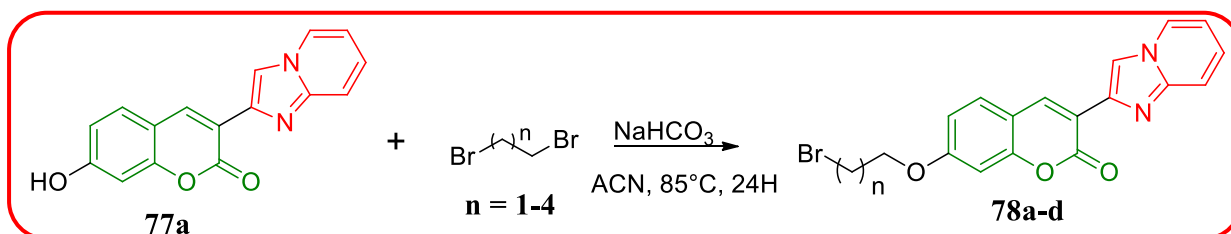
(1H, s); H_{6'} = 8,16 (1H, d, J = 6,7 Hz); H_{3'} = 7,61 (1H, d, J = 9 Hz); H₅ = 7,56 (1H, d, J = 8,6 Hz); H_{4'} = 7,23 (1H, t); H₆ = 6,90-6,93 (2H, dd, J³ = 8,6 Hz, J⁴ = 2Hz); H_{5'} = 6,81 (1H, t); H₁₁ = 3,92 (3H, s). **RMN ¹³C (125 MHz) CDCl₃ / TMS (δ-ppm):** C₂ = 162,70; C₉ = 160,29; C₇ = 157,92; C_{2'} = 147,83; C_{8'} = 138,63; C₄ = 138,42; C₅ = 129,27; C_{6'} = 126,10; C_{9'} = 125,56; C₁₀ = 117,62; C_{5'} = 116,95; C₆ = 113,79; 113,20; C_{4'} = 113,02; C_{5'} = 112,43; C₈ = 100,42; C₁₁ = 56,02.

3-(imidazo [1,2-a] piridin-2-il) -8-metoxi-2H-cromen-2-ona (77c)



O composto **77c** foi obtido como um sólido amarelo em 64% de rendimento e com ponto de fusão de 178°C. **RMN ¹H (500 MHz) CDCl₃ / TMS (δ-ppm):** H_{9'} = 9,17 (1H, s); H₄ = 8,68 (1H, s); H_{6'} = 8,27 (1H, d, J = 6,9 Hz); H_{3'} = 7,95 (1H, d, J = 9,0 Hz); H_{4'} = 7,49 (1H, t); H₅ = 7,89 (1H, d); H_{5'} = 7,37 (1H, d, J = 8 Hz); H₆ = 7,31 (1H, d, J = 8 Hz); H₇ = 7,16 (1H, d, J = 8Hz); H_{5'} = 7,06 (1H, t); H₁₁ = 4,03 (3H, s). **RMN ¹³C (125 MHz) CDCl₃ / TMS (δ-ppm):** C₂ = 168,12; C₉ = 163,61; C₈ = 158,83; C_{2'} = 146,94; C₄ = 140,60; C_{9'} = 126,59; C_{5 e 6'} = 124,75; C₆ = 120,50; C_{4'} = 114,51; C_{4' e 7} = 114,04; C₁₁ = 11,53; C_{6 e 8} = 102,56;

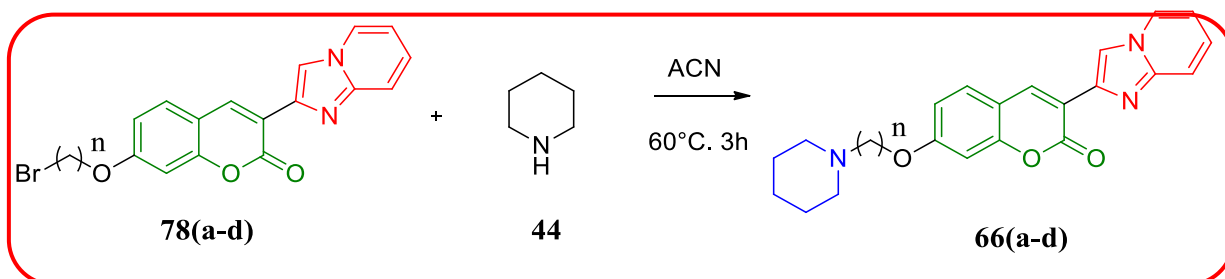
6.2.4. Alquilação da 3-(imidazo[1,2-a]piridinas)-7-hidroxi-cumarina (77a).



Em um tubo de reação de borossilicato (25 mL) foram solubilizados 2 mmol de 3-(imidazo[1,2-a]piridinas)-cumarina (**77a**) em 10 mL de acetonitrile (ACN). Em seguida foram adicionados 4 mmol de dibromo alceno (**40a-d**) e 18 mmol de bicarbonato de sódio (NaHCO₃). Ao fim da adição, o tubo de reação foi selado e a mistura foi submetida a aquecimento sob agitação magnética a 85°C por 6h. A reação foi monitorada por CCF. A mistura reacional foi

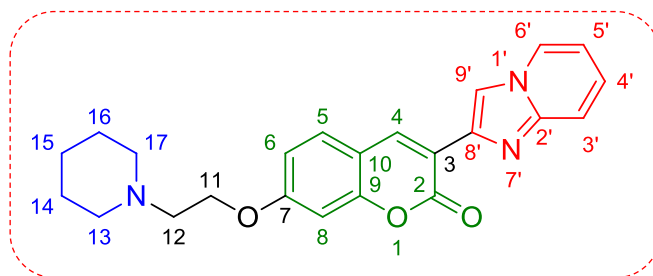
pastilhada e cromatografada em coluna de sílica gel (Isolera) e gradiente dicloro:metanol como eluente. A evaporação do solvente sob pressão reduzida levou aos produtos finais (**78a-d**).

6.2.5. Aminoação das 3-(imidazo[1,2-a]piridinas)-7-bromoalcoxi-cumarinas (**78a-d**).



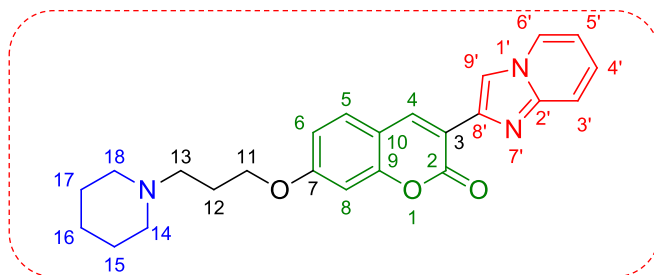
Em um tubo de reação de borossilicato (25 mL), foram adicionados 1,3 mmol 3-(imidazo[1,2-a]piridinas)-7-bromoalcoxi-cumarinas (**78a-d**), 2,6 mmol de piperidina (**44**) e 8 mL de acetonitrila (ACN). Após a adição dos reagentes, o tubo foi selado e a mistura foi submetida a agitação magnética e aquecimento a 60°C por 3h, monitorada por CCF. Por fim, a mistura reacional foi purificada no equipamento Isolera com fase estacionária sílica e fase móvel mistura de diclorometano: metanol em gradiente de concentração de 0-20% do solvente mais polar.

3- (imidazo [1,2-*a*] piridin-2-il) -7- (2- (piperidin-1-il) etoxi) -2*H*-cromen-2-ona (**66a**)



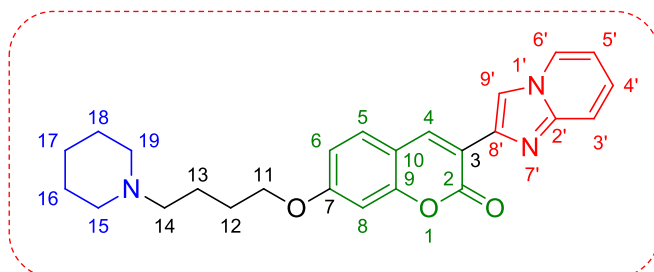
O composto **66a** foi obtido como um sólido marrom, com rendimento relativo de 20% e com ponto de decomposição de 235-240°C. **RMN ¹H (500 MHz) DMSO-*d*₆/ TMS (δ-ppm):** H_{9'} = 8,82 (1H, s); H_{6'} = 8,63 (1H, d, J³ = 6,6 Hz); H₄ = 8,57 (1H, s); H₅ = 7,84 (1H, d, J³ = 8,6 Hz); H_{3'} = 7,56 (1H, d, J³ = 9 Hz); H_{4'} = 7,27 (1H, t); H_{5'} = 7,29 (1H,t); H₆ = 7,02 (1H, d, J = 8,6 Hz); H₈ = 6,90 (1H, d, J⁴ = 2,0 Hz); H_{11/17} = 4,24 (4H, sl); H₁₂ = 2,27 (2H, sl); H_{13/17} = 2,55 (4H, sl); H_{14/16} = 1,54 (4H, sl); H₁₅ = 1,41 (2H, sl. **RMN ¹³C (125 MHz) DMSO-*d*₆/ TMS (δ-ppm):** C₂ = 161,96; C₉ = 159,68; C₇ = 154,84; C_{2'} = 144,74; C₄ = 138,74; C_{8'} = 138,34; C_{9'} = 130,41; C_{6'} = 127,81; C₅ = 126,29; C_{3'} = 116,66; C_{4'} = 113,82; C₆ = 113,26; C_{5'} = 112,59; C₈ = 101,35; C₁₁ = 66,40; C₁₂ = 56,49; C_{13/17} = 54,61; C_{14/16} = 25,57; C₁₅ = 23,95.

3- (imidazo [1,2-*a*] piridin-2-il) -7- (3- (piperidin-1-il) propoxi) -2*H*-cromen-2-ona (66b)



O composto **66b** foi obtido como um sólido marrom, com rendimento relativo de 62% e com ponto de decomposição de 245-259°C. **RMN ¹H (500 MHz) DMSO-*d*6/ TMS (δ-ppm):** H_{9'} = 8,86 (1H, s); H_{6'} = 8,64 (1H, d, J³ = 6,6 Hz); H₄ = 8,58 (1H, s); H₅ = 7,78 (1H, d, J³ = 8,6 Hz); H_{3'} = 7,56 (1H, d, J³ = 9 Hz); H_{4'} = 7,32 (1H, t); H_{5'} = 7,29 (1H,t); H₆ = 7,02 (1H, d, J = 8,6 Hz); H₈ = 6,92 (1H, t); H₁₁ = 4,21 (4H, sl); H₁₄ = 3,21(2H, sl); H₁₈ = 3,49 (4H, sl); H₁₃ = 2,91 (2H, sl); H₁₂ = 2,20 (2H, m); H_{15/16/17} = 1,61-1,85 (6H, m) (2H, sl. **RMN ¹³C (125 MHz) DMSO-*d*6/ TMS (δ-ppm):** C₂ = 161,72; C₉ = 159,65; C₇ = 154,82; C_{2'} = 144,77; C₄ = 138,73; C_{9/10} = 138,28; C_{6'} = 130,51; C₅ = 126,28; C_{3'} = 117,65; C_{4'} = 116,63; C₆ = 113,75; C₁₀ = 113,65; C_{5'} = 113,35; C₈ = 101,67; C₁₁ = 66,24; C₁₂ = 53,75; C_{14/18} = 52,69; C₁₆ = 23,74; C_{15/17} = 23,05; C₁₆ = 21,76.

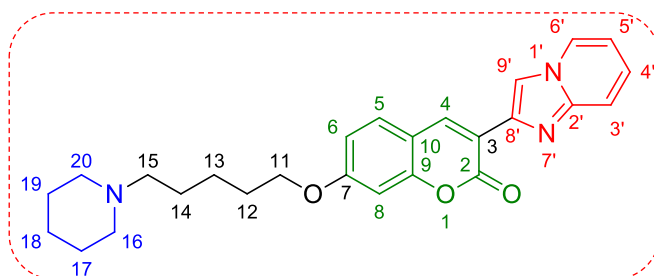
3- (imidazo [1,2-*a*] piridin-2-il) -7- (4- (piperidin-1-il) butoxi) -2*H*-cromen-2-ona (66c)



O composto **66c** foi obtido como um sólido marrom, com rendimento relativo de 55%. **RMN ¹H (500 MHz) DMSO-*d*6/ TMS (δ-ppm):** H_{9'} = 8,85 (1H, s); H_{6'} = 8,64 (1H, d, J³ = 6,6 Hz); H₄ = 8,58 (1H, s); H₅ = 7,87 (1H, d, J³ = 8,6 Hz); H_{3'} = 7,56 (1H, d, J³ = 9 Hz); H_{4'} = 7,32 (1H, t); H_{5'} = 7,29 (1H,t); H₆ = 7,02 (1H, d, J = 8,6 Hz); H₈ = 6,92 (1H, t); H₁₁ = 4,16 (4H, s); H₁₄ = 3,36(2H, s); H₁₉ = 3,07 (4H, m); H₁₅ = 2,86 (2H, sl); H_{12/13/16/17/18} = 1,64-1,81 (10H, m).

RMN ¹³C (125 MHz) DMSO-*d*6/ TMS (δ-ppm): C₂ = 162,05; C₉ = 159,68; C₇ = 154,91; C_{2'} = 144,77; C₄ = 138,73; C₉ = 138,34; C_{6'} = 130,47; C₅ = 127,83; C_{3'} = 126,33; C_{8'} = 117,51; C₃ = 117,51; C₆ = 116,67; C_{5'} = 113,67; C₁₀ = 113,45; C₈ = 101,10; C₁₁ = 68,18; C₁₄ = 56,18; C_{13/12} = 26,16; C_{16/18} = 23,36; C₁₇ = 20,83.

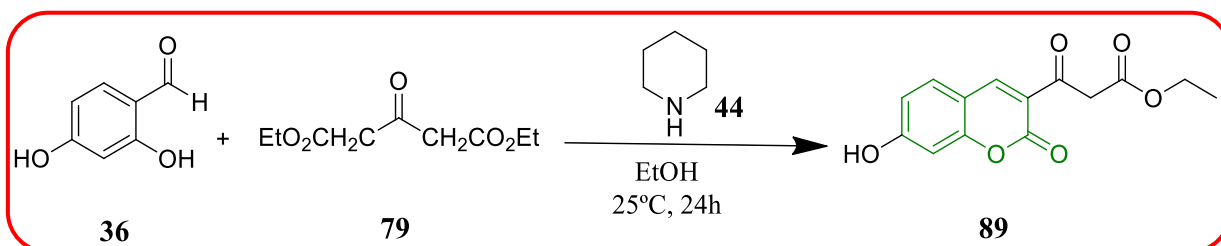
**3-(imidazo [1,2-*a*] piridin-2-il) -7 - ((5- (piperidin-1-il) pentil) oxi) -2*H*-cromen-2-ona
(66d)**



O composto **66d** foi obtido como um sólido marrom, com rendimento relativo de 44,3%. **RMN ¹H (500 MHz) DMSO-*d*6/ TMS (δ-ppm):** H_{9'} = 8,84 (1H, s); H_{6'} = 8,65 (1H, d, J³ = 6,6 Hz); H₄ = 8,58 (1H, s); H₅ = 7,86 (1H, d, J³ = 8,6 Hz); H_{3'} = 7,56 (1H, d, J³ = 9 Hz); H_{4'} = 7,30 (1H, t); H_{5'} = 7,07 (1H,s); H₆ = 7,01 (1H, d, J = 8,6 Hz); H₈ = 6,91 (1H, t); H₁₁ = 4,13 (4H, t); H_{15/16/20} = 2,92(6H, sl); H₁₉ = 3,07 (4H, m); H₁₅ = 2.86 (2H, sl); H₁₂ = 1,80 (2H, m); H_{14,17,19} = 1,70 (6H, sl); H_{13/18} = 1,44-1,49 (4H, m). **RMN ¹³C (125 MHz) DMSO-*d*6/ TMS (δ-ppm):** C₂ = 162,22; C₉ = 159,71; C₇ = 154,93; C_{2'} = 144,77; C₄ = 138,80; C₉ = 138,33; C_{6'} = 130,45; C₅ = 127,86; C_{3'} = 126,36; C_{8'} = 117,41; C₆ = 116,66; C_{5'} = 113,68; C₃ = 113,35; C₁₀ = 113,29; C₈ = 101,21; C₁₁ = 68,52; C₁₅ = 56,55; C_{16/20} = 52,78; C_{17/29} = 28,42; C₁₈ = 23,78; C₁₂ = 23,40; C₁₄ = 23,26; C₁₃ = 20,23.

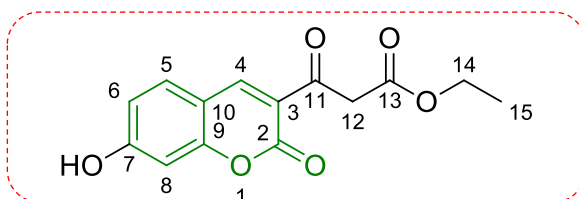
6.3. Síntese das 3-(imidazo[1,2*a*]piridinas-9'-etilcarboxilato)-cumarinas

6.3.1. Síntese do 7-hidroxi-β-cetoéster (89)



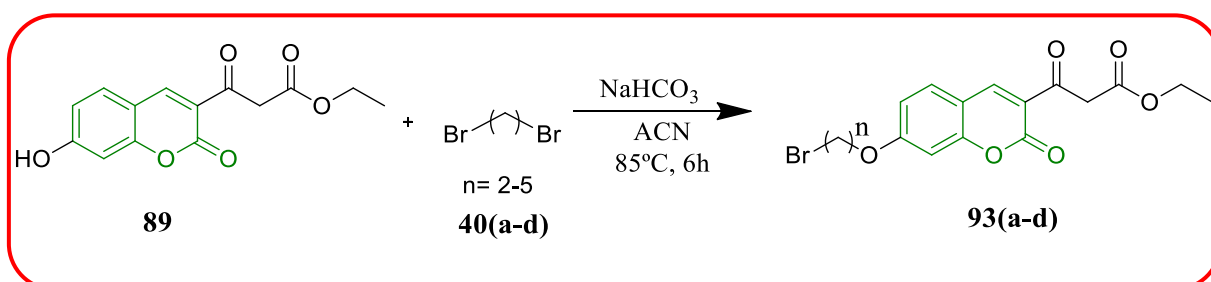
Em um tubo de reação de 10 mL, foram adicionados 3,10 mmol de 2,4 dihidroxissalicilaldeído (**36**) que foram solubilizados em 10 mL de Etanol. Em seguida adicionou-se 3,10 mmol de dietilacetoadicarboxilato de etila (**79**) e 0,77 mmol de piperidina (**44**) como catalisador. A mistura ficou sob agitação em temperatura ambiente por 24 h, o precipitado formado foi filtrado a vácuo com etanol gelado, sem necessidade de purificação, formando o produto final (**89**).

3- (7-hidroxi-2-oxo-2H-cromen-3-il) -3-oxopropanoato de etila (**89**)



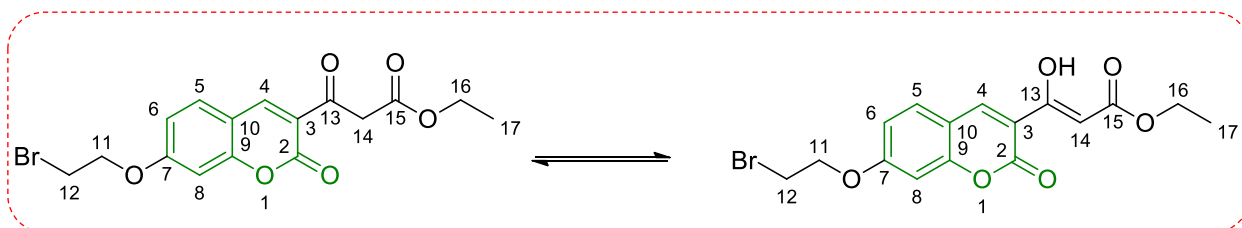
O composto **89** foi obtido como um sólido amarelo, com rendimento de 86% e ponto de fusão de 143°C. **RMN ¹H (500 MHz) DMSO-*d*₆ / TMS (δ-ppm):** H_{O-H} = 11,31 (1H, s); H₄ = 8,71 (1H, s); H₅ = 7,84 (1H, d, J 8,5 Hz); H₆ = 6,88 (1H, d, J 8,2 Hz); H₈ = 6,78 (1H, s); H₁₄ = 4,12 (2H, q); H₁₂ = 4,00 (2H, s); H₁₅ = 1,18 (3H, t). **RMN ¹³C (125 MHz) DMSO-*d*₆/ TMS (δ-ppm):** C₁₁ = 190,34; C₁₃ = 168,14; C₂ = 165,17; C₇ = 159,72; C₉ = 157,89; C₄ = 149,29; C₅ = 133,57; C₃ = 118,44; C₆ = 114,99; C₁₀ = 111,31; C₈ = 102,32; C₁₄ = 0,89; C₁₂ = 48,74; C₁₅ = 14,47.

6.3.2. Alquilação do 7-hidroxi- β-cetoéster (**93a-d**)



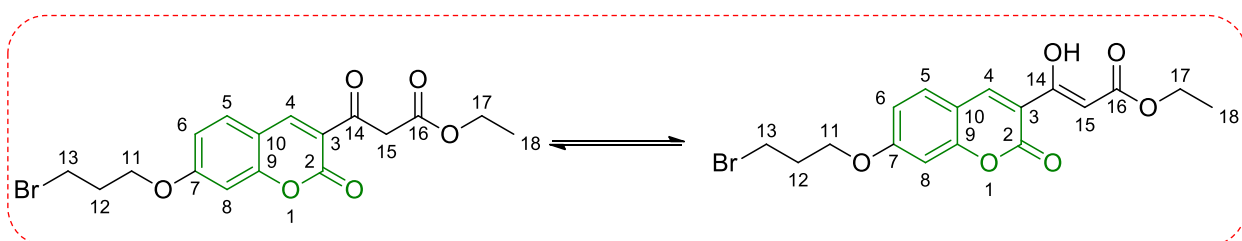
Em um tubo de reação de borossilicato (25 mL) foram solubilizados 2 mmol de 7-hidroxi-β-cetoéster (**89**) em 10 mL de acetonitrile (ACN). Em seguida foram adicionados 4 mmol de dibromo alceno (**40a-d**) e 18 mmol de bicarbonato de sódio (NaHCO₃). Ao fim da adição, o tubo de reação foi selado e a mistura foi submetida a aquecimento sob agitação magnética a 85°C por 6h. A reação foi monitorada por CCF. A mistura reacional foi pastilhada e cromatografada em coluna de sílica gel (Isolera) e gradiente hexano:acetato de etila como eluente. A evaporação do solvente sob pressão reduzida levou ao produto final (**93a-d**).

3-(7-(2-bromoetoxi)-2-oxo-2H-cromen-3-il)-3-oxopropanoato de etila (93a)



O composto **93a** foi obtido como um sólido amarelo claro, com rendimento de 51% e ponto de fusão 130-140°C. **RMN ¹H (500 MHz) CDCl₃/ TMS (δ-ppm):** H_{O-H} enol = 12,64 (1H, s); H₄ ceto = 8,59 (1H, s); H₄ enol = 8,49 (1H, s); H₅ ceto = 7,50 (1H, d, J³ = 8,8 Hz, J⁴ = 1,5 Hz); H₅ enol = 7,55 (1H, d, J³ = 8,8 Hz, J⁴ = 1,5 Hz), H₆ ceto/enol = 6,94 (1H, t); H₈ ceto/enol = 6,83 (1H, d); H₁₄ enol = 6,62 (1H, d); H₁₁ ceto/enol = 4,31- 4,41 (4H, m); H₁₄ ceto = 4,10 (2H, s); H₁₂ = 3,38 (2H, m); H₁₇ enol = 1,34 (3H, t); H₁₇ Ceto = 1,28 (3H, t). **RMN ¹³C (125 MHz) CDCl₃/ TMS (δ-ppm):** C₁₃ ceto = 196,34; C₁₃ enol = 173, 90; C₁₅ ceto/enol = 171,35; C₂ = 168,18; C₇ ceto/enol = 164,10; C₉ = 159,89; C₄ ceto = 148,76; C₄ enol = 147,85; C₅ ceto = 132,18; C₅ enol = 130,81; C₃ ceto/enol = 120,14, C₆ ceto/enol = 114,43; C₁₀ = 112,79; C₈ ceto/enol = 101,36; C₁₄ enol = 93,20; C₁₁ ceto/enol = 68,67; C₁₄ ceto = 48,77; C₁₂ ceto/enol = 28,25; C₁₈ ceto/enol = 14,35.

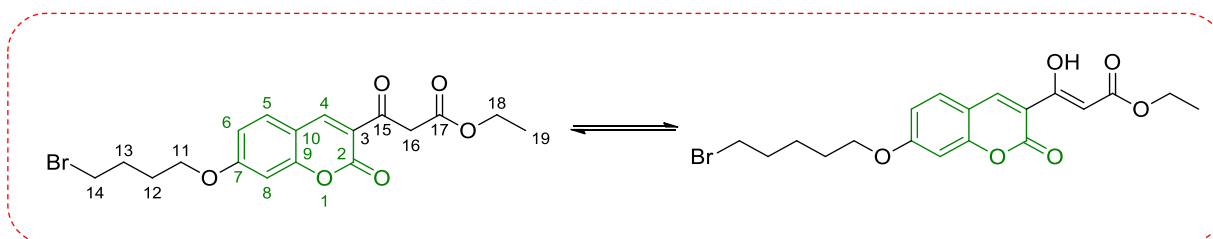
3-(7-(3-bromopropoxi)-2-oxo-2H-cromen-3-il)-3-oxopropanoato de etila (93b)



O composto **93b** foi obtido como um sólido amarelo claro, com rendimento de 74% e ponto de fusão 135-140°C. **RMN ¹H (500 MHz) CDCl₃/ TMS (δ-ppm):** H_{O-H} enol = 12,64 (1H, s); H₄ ceto = 8,59 (1H, s); H₄ enol = 8,57 (1H, s); H₅ ceto = 7,58 (1H, d, J³ = 8,8 Hz, J⁴ = 1,5 Hz); H₅ enol = 7,52 (1H, d, J³ = 8,8 Hz, J⁴ = 1,5 Hz), H₆ ceto/enol = 6,89-6,94 (1H, m); H₈ ceto/enol = 6,85 (1H, d); H₁₅ enol = 6,62 (1H, d); H₁₁ ceto/enol = 4,18- 4,30 (4H, m); H₁₅ ceto = 4,10 (2H, s); H₁₃ ceto/enol = 3,60-3,63 (2H, t); H₁₂ ceto/enol = 3,38 (2H, m); H₁₈ ceto/enol = 1,26-1,36 (3H, m). **RMN ¹³C (125 MHz) CDCl₃/ TMS (δ-ppm):** C₁₄ ceto = 190,17; C₁₄ enol = 173, 65; C₁₆ ceto/enol = 167,95; C₂ ceto/enol = 164,58; C₇ ceto/enol = 159,76; C₉ ceto/enol = 157,81; C₄ ceto = 148,63; C₄ enol = 148,63; C₅ ceto = 131,81; C₅ enol = 130,44; C₃ ceto/enol = 11,53, C₆ ceto =

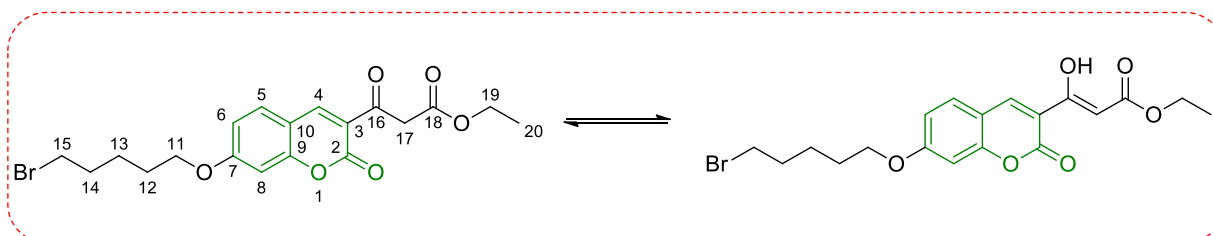
114,18; C₆ enol= 113,64; C₁₀ ceto/enol = 112,22; C₈ ceto/enol = 100,96; C₁₅ enol= 92,77; C₁₁ ceto= 66,24; C₁₁ enol= 66,04; C₁₅ ceto = 48,77; C₁₃ ceto/enol = 31,74; C₁₂ = 29,29; C₁₈ enol = 14,20; C₁₈ceto=14,08.

3-(7 - ((5-bromopentil) oxi) -2-oxo-2H-cromen-3-il) -3-oxopropanoato de etila (93c)



O composto **93c** foi obtido como um sólido amarelo claro, com rendimento de 57% e ponto de fusão 145-150°C. **RMN ¹H (500 MHz) CDCl₃/ TMS (δ-ppm):** H_{O-H} enol = 12,64 (1H, s); H₄ ceto = 8,53 (1H, s); H₄ enol= 8,47 (1H, s); H₅ ceto= 7,57 (1H, d, J³ = 8,8 Hz, J⁴ = 1,5 Hz); H₅ enol= 7,51 (1H, d, J³ = 8,8 Hz, J⁴ = 1,5 Hz), H₆ ceto = 6,90 (1H, dd); H₆ enol = 6,88 (1H, t); H₈ ceto = 6,81 (1H, d); H₈ enol = 6,80 (1H, t); H₁₆ enol = 6,62 (1H, d); H₁₁ ceto/enol = 4,19- 4,29 (2H, m); H₁₆ ceto = 4,10 (2H, s); H₁₄ ceto/enol = 3,50 (2H, m); H₁₂ ceto/enol = 2,06-2-11 (3H, m); H₁₃ ceto/enol = 2,00-2-05(3H, m); H₁₉ enol = 1,34 (1H, ; H₁₉ ceto = 1,28 (3H, t). **RMN ¹³C (125 MHz) CDCl₃/ TMS (δ-ppm):** C₁₄ceto = 190,17; C₁₄ enol= 173, 65; C₁₆ceto/enol = 167,95; C₂ ceto/enol = 164,58; C₇ ceto/enol = 159,76; C₉ ceto/enol = 157,81; C₄ ceto=148,63; C₄ enol=148,63; C₅ ceto= 131,81; C₅ enol= 130,44; C₃ ceto/enol=11,53, C₆ ceto= 114,18; C₆ enol= 113,64; C₁₀ ceto/enol = 112,22; C₈ ceto/enol = 100,96; C₁₅ enol= 92,77; C₁₁ ceto= 66,24; C₁₁ enol= 66,04; C₁₅ ceto = 48,77; C₁₃ ceto/enol = 31,74; C₁₂ = 29,29; C₁₈ enol = 14,20; C₁₈ceto=14,08.

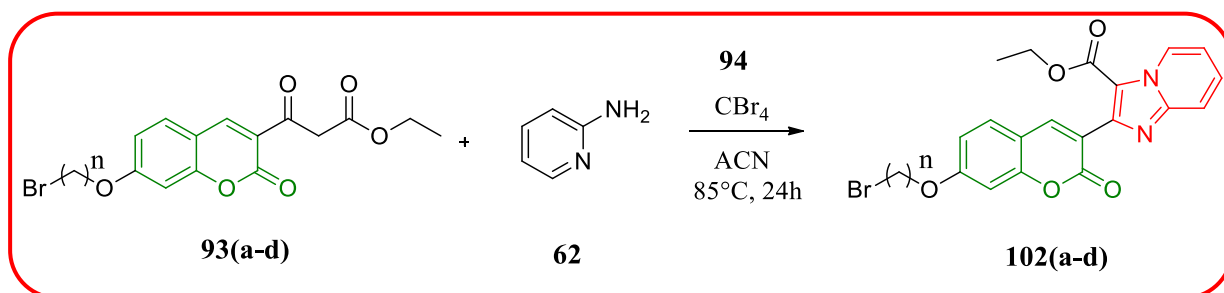
3-(7 - ((5-bromopentil) oxi) -2-oxo-2H-cromen-3-il) -3-oxopropanoato de etila (93d)



O composto **93d** foi obtido como um sólido amarelo claro, com rendimento de 55% e ponto de fusão 95°C. **RMN ¹H (500 MHz) CDCl₃/ TMS (δ-ppm):** H_{O-H} enol = 12,64 (1H, s); H₄ ceto = 8,59 (1H, s); H₄ enol= 8,47 (1H, s); H₅ ceto= 7,57 (1H, d, J³ = 8,8 Hz, J⁴ = 1,5 Hz); H₅

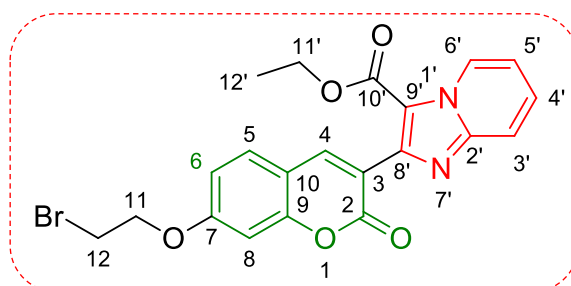
enol= 7,52 (1H, d, $J^3 = 8,8$ Hz, $J^4 = 1,5$ Hz), H_6 ceto = 6,90-6,92 (1H, dd); H enol = 6,88 (1H, t); H_8 ceto/enol = 6,81 (1H, d); H_{17} enol = 6,62 (1H, d); H_{11} ceto/enol = 4,19- 4,29 (2H, m); H_{17} ceto = 4,10 (2H, s); H_{19} ceto/enol = 4,05-4,09 (2H, s); H_{15} ceto/enol = 3,46 (3H, t); H_{12} ceto/enol = 1,96 (3H, m); H_{14} ceto/enol = 1,88 (3H, m); H_{13} ceto/enol = 1,66 (3H, m) ; H_{20} ceto = 1,34 (3H, t); H_{20} enol = 1,28 (3H, t). **RMN ^{13}C (125 MHz) $CDCl_3$ / TMS (δ -ppm):** C_{16} ceto = 189,94; C_{16} enol = 170,33; C_{18} ceto/enol = 167,73; C_2 ceto/enol = 164,76; C_7 ceto/enol = 163,69; C_9 ceto/enol = 157,66; C_4 ceto=148,48; C_4 enol=148,01; C_5 ceto= 131,49; C_5 enol= 130,12; C_3 ceto/enol =119,03, C_{14} ceto= 114,14; C_{14} enol= 113,60; C_{10} ceto/enol = 111,76; C_{17} enol = 92,43 92,77; C_{11} ceto/enol= 68,34; C_{19} ceto= 60,94; C_{19} enol= 60,30; C_{17} ceto = 48,52; C_{15} enol = 33,09; C_{12} ceto/enol = 27,78; C_{13} ceto/enol = 24,39; C_{20} ceto/enol =13,64.

6.3.3. Síntese das 7-bromoalcoxi- 3-(imidazo[1,2-a]piridina-9-etilcarboxilato)-cumarinas (102a-d)



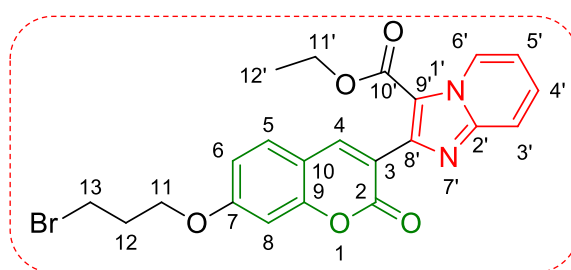
Em um tubo de reação de borosilicato (25 mL), foram adicionados 1,5 mmol de betacetoéster alquilado (**93a-d**) que foram solubilizados em 2 mL de acetonitrila, em seguida adicionou-se 1 mmol de tetrabromometano (**94**) e 0,5 mmol de 2-aminopiridina (**63**). A mistura reagiu em refluxo por 24h. A reação foi monitorada por CCF. A purificação dos compostos foi realizada a partir da técnica de cromatografias líquida de adsorção em coluna flash, Isolera Biotage. Como fase móvel, foram utilizadas mistura solventes hexano/acetato de etila 30%.

Etil-2-(7-(2-bromoetoxi)-2-oxo-2H-cromen-3-il)imidazo [1,2-a] piridina-3-carboxilato (102a)



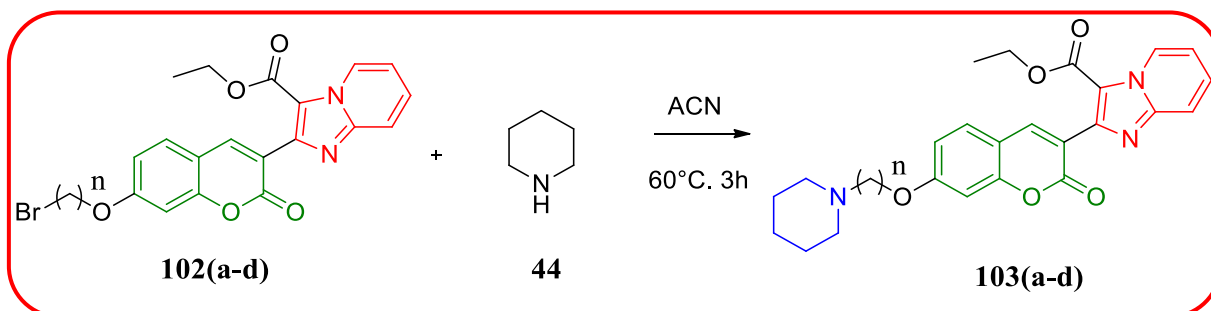
O composto **102a** foi obtido como um sólido marrom, com rendimento de 31% e ponto de fusão de 215°C. **RMN ¹H (500 MHz) CDCl₃/ TMS (δ-ppm):** H_{6'} = 9,35 (1H, d, J³ = 6,9); H₄ = 8,02 (1H, s); H_{3'} = 7,75 (1H, d, J³ = 9 Hz); H₅ = 7,50 (2H, d); H_{4'} = 7,10 (2H, t); H₆ = 6,93-6,95 (1H, dd); H₈ = 6,90 (2H, d); H₁₁ = 4,41 (2H, q); H_{11'} = 4,35 (2H, t); H₁₂ = 3,72 (2H, t); H_{12'} = 1,27 (3H, t). **RMN ¹³C (125 MHz) CDCl₃/ TMS (δ-ppm):** C_{10'} = 161,44; C₂ = 160,55; C₇ = 159,87; C₉ = 155,79; C_{2'} = 147,02; C_{9'} = 146,19; C₄ = 142,39; C₅ = 129,51; C_{6'} = 127,97; C₃ = 120,91; C_{4'} e ₆ = 117,57; C_{3'} e ₅ = 114,49; C_{5'} = 113,05; C₁₀ = 113,26; C₈ = 101,49; C_{11'} = 68,25; C₁₁ = 60,84; C₁₃ = 32,24; C₁₂ = 28,39; C_{12'} = 14,06.

Etil 2-(7-(3-bromopropoxi)-2-oxo-2H-cromen-3-il)-imidazo[1,2-a]piridina-3-carboxilato (102b)



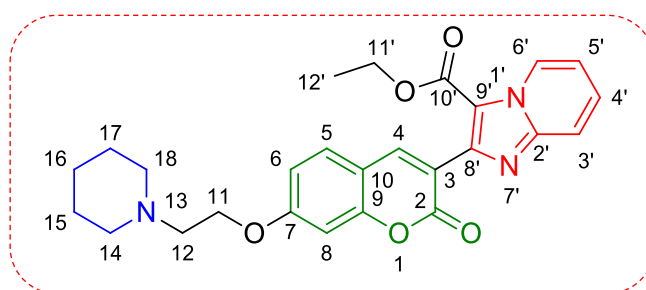
O composto **102b** foi obtido como um sólido marrom, com rendimento de 86% e ponto de fusão de 187°C. **RMN ¹H (500 MHz) CDCl₃/ TMS (δ-ppm):** H₆ = 9,34 (1H, d, J³ = 6,9); H₄ = 8,01 (1H, s); H₅ = 7,74 (1H, d, J³ = 8,8 Hz); H_{3'/4'} = 7,45-7,48 (2H, m); H_{5'} = 7,08 (1H, t); H_{6/8} = 6,89 (2H, m); H_{11'} = 4,34 (2H, q); H₁₁ = 4,22 (2H, t); H₁₃ = 3,64 (2H, t); H₁₂ = 2,39 (2H, q); H_{12'} = 1,26 (3H, t). **RMN ¹³C (125 MHz) CDCl₃/ TMS (δ-ppm):** C₁₀ = 162,34; C₂ = 160,82; C₇ = 160,23; C₉ = 156,10; C_{2'} = 147,24; C_{9'} = 146,51; C₄ = 142,74; C₅ = 129,62; C_{6'} = 128,19; C₃ = 120,79; C_{4'} = 117,48; C₆ = 114,69; C_{3'/5'} = 113,22; C₁₀ = 113,15; C₈ = 101,57; C_{11'} = 66,15; C₁₁ = 61,07; C₁₃ = 32,24; C₁₂ = 29,79; C_{12'} = 14,31.

6.3.4. Aminoação das 7-bromoalcoxi- 3-(imidazo[1,2-*a*]piridina-9-etilcarboxilato)-cumarinas (102a-d).



Em um tubo de reação de borosilicato (25 mL), foram adicionados 1,3 mmol da imidazo[1,2-*a*]piridinas-9'-etilcarboxilato (**86a-d**), 2,6 mmol de piperidina (**44**) e 8 mL de acetonitrila (ACN). Após a adição dos reagentes, o tubo foi selado e a mistura foi submetida a agitação magnética e aquecimento a 60°C por 3h, monitorada por CCF. Por fim, a mistura reacional foi purificada 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.

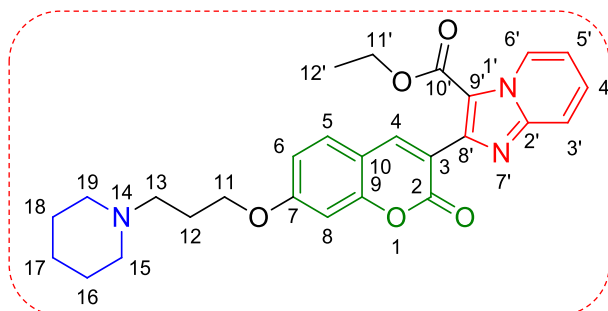
Etil-2-(2-oxo-7-(2-(piperidin-1-il)-etoxi)-2*H*-cromen-3-il)imidazo[1,2-*a*]piridina-3-carboxilato (**103a**)



O composto **103a** foi obtido como um sólido marrom, com rendimento de 31% e ponto de fusão de 105°C. **RMN ¹H (500 MHz) DMSO-*d*₆/ TMS (δ-ppm):** H_{6'} = 9,21 (1H, d, J³ = 6,9 Hz); H₄ = 8,27 (1H, s); H₅ = 7,82 (1H, d, J³ = 8,8 Hz); H_{3'} = 7,44 (1H, d, J³ = 8,8 Hz); H_{4'} = 7,62 (1H, dt, J³ = 8,8 Hz, J³ = 6,9 Hz, J⁴ = 1,3 Hz); H_{5'} = 7,28 (1H, dt, J³ = 6,9 Hz, J⁴ = 1,3 Hz); H₈ = 7,11 (1H, d, J⁴ = 2,2 Hz); H₆ = 1H, dd, J³ = 8,8 Hz, J⁴ = 2,2 Hz); H_{11/11'} = 4,22 (4H, m); H₁₂ = 2,73 (2H, sl); H_{14/18} = 2,50 (4H, m); H_{15/17} = 1,50 (4H, m); H₁₆ = 1,38 (2H, sl); H_{12'} = 1,13 (3H, t). **RMN ¹³C (125 MHz) DMSO-*d*₆/ TMS (δ-ppm):** C_{10'} = 162,16; C₂ = 159,92; C₇ = 159,29; C₉ = 155,34; C_{2'} = 146,05; C₄ = 143,02; C₅ = 130,03; C_{6'} = 128,63; C_{4'} = 127,45; C₃ = 119,33; C_{5'} =

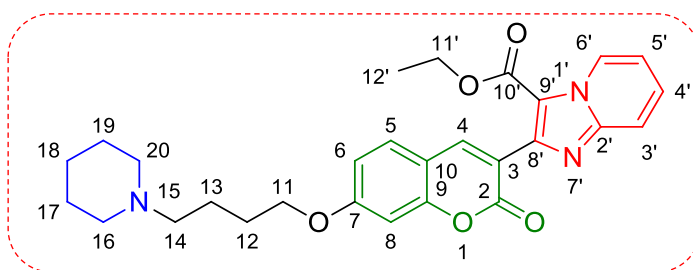
117,24; C_{3'} = 115,13; C₆ = 113,28; C_{8'} = 113,18; C₁₀ = 112,27; C₈ = 101,08; C_{11'} = 66,29; C₁₁ = 60,37; C₁₂ = 57,07; C_{14/18} = 54,29; C_{15/17} = 25,40; C₁₆ = 23,78; C_{12'} = 13,79.

Etil-2-(2-oxo-7-(3-(piperidin-1-il)-propoxi)-2H-cromen-3-il)imidazo[1,2-a]piridina-3-carboxilato (103b)



O composto **103b** foi obtido como um sólido marrom, com rendimento de 61% e ponto de fusão de 110-120°C. **RMN ¹H (500 MHz) DMSO-*d*₆/ TMS (δ-ppm):** H_{6'} = 9,21 (1H, d, J³ = 6,9 Hz); H₄ = 8,29 (1H, s); H₅ = 7,89 (1H, d, J³ = 8,8 Hz); H_{3'} = 7,75 (1H, d, J³ = 8,8 Hz); H_{4'} = 7,63 (1H, dt, J³ = 8,8 Hz, J³ = 6,9 Hz, J⁴ = 1,3 Hz); H_{5'} = 7,28 (1H, dt, J³ = 6,9 Hz, J⁴ = 1,3 Hz); H₈ = 7,11 (1H, d, J⁴ = 2,2 Hz); H₆ = 7,02 (1H, dd, J³ = 8,8 Hz, J⁴ = 2,2 Hz); H_{11/11'} = 4,21 (4H, m); H₁₂ = 2,73 (2H, sl); H_{13/15/19} = 3,03 (6H, m); H₁₂ = 2,13 (2H, m); H_{16/18} = 1,71 (4H, sl); H₁₇ = 1,51 (2H, sl); H_{12'} = 1,13 (3H, t). **RMN ¹³C (125 MHz) DMSO-*d*₆/ TMS (δ-ppm):** C_{10'} = 162,07; C₂ = 160,09; C₇ = 159,36; C₉ = 155,46; C_{2'} = 146,17; C₄ = 143,13; C₅ = 130,28; C_{6'} = 128,81; C_{4'} = 127,61; C₃ = 119,64; C_{5'} = 117,40; C_{3'} = 115,31; C₆ = 113,33; C_{8'} = 113,34; C₁₀ = 112,58; C₈ = 101,22; C_{11'} = 66,19; C₁₁ = 60,52; C_{12'} = 13,93.

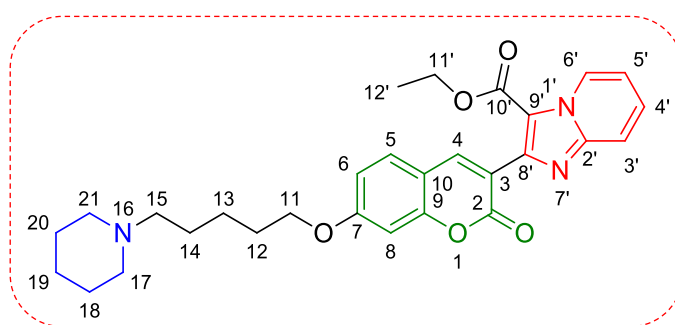
Etil-2-(2-oxo-7-(4-(piperidin-1-il)butoxi)-2H-cromen-3-il)imidazo [1,2-a] piridina-3-carboxilato (103c)



O composto **103c** foi obtido como um sólido marrom, com rendimento de 59% e ponto de decomposição entre 170-180°C. **RMN ¹H (500 MHz) DMSO-*d*₆/ TMS (δ-ppm):** H_{6'} = 9,21 (1H, d, J³ = 6,9 Hz); H₄ = 8,29 (1H, s); H₅ = 7,82 (1H, d, J³ = 8,8 Hz); H_{3'} = 7,77 (1H, d, J³ = 8,8 Hz); H_{4'} = 7,62 (1H, dt, J³ = 8,8 Hz, J³ = 6,9 Hz, J⁴ = 1,3 Hz); H_{5'} = 7,29 (1H, dt, J³ = 6,9 Hz, J⁴

= 1,3 Hz); H₈ = 7,11 (1H, d, J⁴ = 2,2 Hz); H₆ = 7,02 (1H, dd, J³ = 8,8 Hz, J⁴ = 2,2 Hz); H_{11/11'} = 4,21- 4,24 (4H, m); H₁₆ = 3,43 (2H, m); H₁₄ = 3,43 (2H, m); H₁₄ = 3,12 (2H, sl); H₂₀ = 2,88 (2H, sl); H_{12/13/17/18/119} = 1,80 (10H, m); H_{12'} = 1,13 (3H, t). **RMN ¹³C (125 MHz) DMSO-*d*₆/ TMS (δ-ppm):** C_{10'} = 162,11; C₂ = 159,93; C₇ = 159,22; C₉ = 155,34; C_{2'} = 146,03; C₄ = 143,11; C₅ = 130,11; C_{6'} = 128,86; C_{4'} = 127,45; C₃ = 119,38; C_{5'} = 117,23; C_{3'} = 115,15; C₆ = 113,18; cC_{10/8'} = 112,21; C₈ = 101,00; C_{11'} = 67,73; C₁₁ = 60,36; C₁₄ = 55,48; C_{16/20} = 52,08; C₁₂ = 25,63; C_{17/19} = 22,53; C_{13/18} = 20,23; C_{12'} = 13,77.

Etil- 2- (2-oxo-7-(5-(piperidin-1-il)pentil)oxi)-2*H*-cromen-3-il)imidazo[1,2-*a*]piridina-3-carboxilato (103d)



O composto **103d** foi obtido como um sólido marrom, com rendimento de 79% e ponto de fusão de 140°C. **RMN ¹H (500 MHz) DMSO-*d*₆/ TMS (δ-ppm):** H_{6'} = 9,21 (1H, d, J³ = 6,9 Hz); H₄ = 8,28 (1H, s); H₅ = 7,82 (1H, d, J³ = 8,8 Hz); H_{3'} = 7,75 (1H, d, J³ = 8,8 Hz); H_{4'} = 7,62 (1H, dt, J³ = 8,8 Hz, J³ = 6,9 Hz, J⁴ = 1,3 Hz); H_{5'} = 7,29 (1H, dt, J³ = 6,9 Hz, J⁴ = 1,3 Hz); H₈ = 7,09 (1H, d, J⁴ = 2,2 Hz); H₆ = 7,01 (1H, dd, J³ = 8,8 Hz, J⁴ = 2,2 Hz); H₁₁ = 4,21 (4H, m); H_{11'} = 4,13 (4H, t); H_{15/17/21} = 2,94-3,02 (6H, m); H₁₂ = 1,79 (2H, q); H_{13/14/19} = 1,63 – 1,72 (6H, m); H_{18/20} = 1,43- 1,57 (4H, m) H_{12'} = 1,13 (3H, t). **RMN ¹³C (125 MHz) DMSO-*d*₆/ TMS (δ-ppm):** C_{10'} = 162,44; C₂ = 160,10; C₇ = 159,40; C₉ = 155,52; C_{2'} = 146,21; C₄ = 143,18; C₅ = 130,25; C_{6'} = 128,80; C_{4'} = 127,6; C₃ = 119,45; C_{5'} = 117,39; C_{3'} = 115,30; C₆ = 113,33; C_{10/8'} = 112,39; C₈ = 101,09; C_{11'} = 68,37; C₁₁ = 60,52; C₁₇ = 56,22; C₂₁ = 52,48; C₁₂ = 43,86; C₁₂ = 28,12; C₁₄ = 23,06; C₁₉ = 20,94; C_{18/20} = 22,33; C₁₃ = 21,78; C_{12'} = 13,95.

6.4. Teste *in vitro* da atividade anticolinesterásica dos derivados 3-(imidazo[1,2-*a*]piridina)-cumarinas.

A determinação da atividade anticolinesterásica foi realizada 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 mistura DMSO:EtOH (7:3) (35 mM). Em uma placa de 96 poços de fundo plano foram adicionados 150 μ L de solução do composto inibidor (**66b**, **103b**; donepezila) em oito diferentes concentrações diluídas em série, as quais variaram de entre 50 - 0,008 μ M para AChE (fator de diluição = 2) e de 50 - 0,1 μ M para BuChE (fator de diluição = 2). O controle veículo (DMSO - concentração final 0,1% v / v para AChE e 0,1% v / v para BuChE), foi utilizado como referência (controle negativo). Em seguida, foram adicionados 60 μ L de ácido 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzóico (DTNB, reagente de Ellman) a 1,1 mM e 30 μ L de acetilcolinesterase isolada de cérebro de enguia elétrica (EeAChE) ou butirilcolinesterase isolada de soro equino (EqBuChE) 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 (BioRad) equipado com um filtro de luz de $\lambda = 415$ nm e esta medida foi usada como uma referência em branco. Após uma incubação de 10 minutos a 25°C, 24 μ 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.

6.5. Ensaios de interação enzimática *in silico* para os compostos finais **66b** e **103b**.

Primeiramente, ocorreu a montagem estrutural dos compostos **66b** e **103b** e realizado o cálculo de minimização energética. A escolha do cálculo foi feita através método semi-empírico Parameterization Method 6 (PM6) no programa Spartan Pro 14 (Wavefunction Inc.).

Após o cálculo para obtenção da angulação estrutural, foi realizado o estudo de ancoramento molecular entre os compostos e a enzima AChE de enguia elétrica (*Electrophorus electricus*) (EeAChE), com seus modelos estruturais disponíveis no Protein Data Bank (PDB). Em seguida, utilizando o programa GOLD 5.6 (CCDC Software Ltd., Cambridge, UK), foi realizado o estudo de *docking*, em que foi inicialmente identificado o sítio ativo de interação, já conhecido na literatura como ponto de referência. No qual, possui

um conjunto de resíduos de aminoácidos selecionados como local de ligação para a realização dos estudos de docking através de um raio de 15Å a partir do resíduo de Ser203.

Além disso, o experimento foi validado pelo processo de redocking para as diferentes funções de pontuação, sendo estas: ChemPLP, Goldscore, ASP e Chemscore. O teste preliminar foi realizado utilizando 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). A partir dos valores obtidos de RMSD de cada função, foi escolhida a função que melhor se aplica ao estudo, ou seja, com o menor valor.

Por fim, após o estudo de ancoramento, as pontuações obtidas através das posições apresentadas com valores adimensionais (*score*) geradas no programa GOLD foram feitas análises quantitativa (scores) e quantitativa (conformações mais estáveis) para avaliar o melhor perfil de interação dos compostos com a enzima.

7. REFERÊNCIAS

ADI. ALZHEIMER'S DISEASE INTERNATIONAL. World Alzheimer Report 2018: **The state of the art of dementia research: New frontiers**. Disponível em: <<https://www.alz.co.uk/research/world-report-2018>>. Acesso em: 27 de abril de 2020.

ADIYALA, Praveen Reddy et al. Visible Light Driven Coupling of 2-aminopyridines and α -Keto Vinyl Azides for the Synthesis of Imidazo [1, 2-a] pyridines and Their Cytotoxicity. **ChemistrySelect**, v. 2, n. 26, p. 8158-8161, 2017.

AISEN, P. S. et al. The Future of Anti-Amyloid Trials. **The Journal of Prevention of Alzheimer's Disease**, p. 1-6, 2020.

ALMEIDA, Osvaldo P. Tratamento da doença de Alzheimer: avaliação crítica sobre o uso de anticolinesterásicos. **Arquivos de Neuro-psiquiatria**, v. 56, n. 3B, p. 688-696, 1998.

ALZ .ALZ. ALZHEIMER'S ASSOCIATION. 2019 Alzheimer's disease facts and figures. **Alzheimer's & Dementia**, v. 15, n. 3, p. 321-387, 2019.

ANILA, V. et al. Mitochondrial Calcium Uniporter as a potential therapeutic strategy for Alzheimer's disease (AD). **Acta neuropsychiatrica**, p. 1-19, 2019..

AZIMI, Sara et al. Discovery of imidazopyridines containing isoindoline-1, 3-dione framework as a new class of BACE1 inhibitors: design, synthesis and SAR analysis. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 138, p. 729-737, 2017.

BABU, Srinivasarao Arulananda et al. Ring-closing metathesis reaction-based synthesis of new classes of polyether macrocyclic systems. **Tetrahedron**, v. 71, n. 40, p. 7758-7781, 2015.

BARAGE, S. H. & SONAWANE, K. D. Amyloid cascade hypothesis: Pathogenesis and therapeutic strategies in Alzheimer's disease. **Neuropeptides** 52, 1–18 (2015).

BORGES, F. et al. Simple coumarins and analogues in medicinal chemistry: occurrence, synthesis and biological activity. **Current medicinal chemistry**, v. 12, n. 8, p. 887-916, 2005.

BRASIL. Ministério da Saúde. Envelhecimento e saúde da pessoa idosa. Brasília: Cad Atenção Básica 2007. Disponível em: <<http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/abca19.pdf>>. Acesso em: 27 de abril de 2020.

BUERGER, Katharina et al. CSF phosphorylated tau protein correlates with neocortical neurofibrillary pathology in Alzheimer's disease. **Brain**, v. 129, n. 11, p. 3035-3041, 2006.

BUSH, Ashley I. The metal theory of Alzheimer's disease. **Journal of Alzheimer's Disease**, v. 33, n. s1, p. S277-S281, 2013

BUSH, Ashley I.; TANZI, Rudolph E. Therapeutics for Alzheimer's disease based on the metal hypothesis. **Neurotherapeutics**, v. 5, n. 3, p. 421-432, 2008.

CHANGUNDA, Charles RK et al. Efficient one-pot synthesis of functionalised imidazo [1, 2-a] pyridines and unexpected synthesis of novel tetracyclic derivatives by nucleophilic aromatic substitution. **RSC Advances**, v. 10, n. 14, p. 8104-8114, 2020.

CHEN, Zhengwang et al. Iron (III)-catalyzed synthesis of 3-arylimidazo [1, 2-a] pyridines from 2-aminopyridines and ynals. **Tetrahedron Letters**, v. 59, n. 7, p. 667-670, 2018.

CHÉTELAT, Gaël. Multimodal neuroimaging in Alzheimer's disease: early diagnosis, physiopathological mechanisms, and impact of lifestyle. **Journal of Alzheimer's Disease**. v. 64, n. s1, p. S199-S211, 2018.

COIMBRA, Judite RM et al. Highlights in BACE1 inhibitors for Alzheimer's disease treatment. **Frontiers in chemistry**, v. 6, p. 178, 2018.

DALESSANDRO, Ellen V. et al. Mechanism of the piperidine-catalyzed Knoevenagel condensation reaction in methanol: the role of iminium and Enolate ions. **The Journal of Physical Chemistry B**, v. 121, n. 20, p. 5300-5307, 2017.

DE FALCO, Anna et al. Doença de Alzheimer: hipóteses etiológicas e perspectivas de tratamento. **Quim. Nova**, v. 39, n. 1, p. 63-80, 2016.

DE SÁ CAVALCANTI, José Luiz; ENGELHARDT, Elias. Aspectos da fisiopatologia da doença de Alzheimer esporádica. **Rev Bras Neurol**, v. 48, n. 4, p. 21-29, 2012.

DE SOUZA, Gabriela Alves et al. Discovery of novel dual-active 3-(4-(dimethylamino) phenyl)-7-aminoalcoxy-coumarin as potent and selective acetylcholinesterase inhibitor and antioxidant. **Journal of enzyme inhibition and medicinal chemistry**, v. 34, n. 1, p. 631-637, 2019.

DELANOGARE, Eslen et al. Hipótese amiloide e o tratamento da doença de Alzheimer: revisão dos estudos clínicos realizados. 2019.

DO VALE, Francisco de Assis Carvalho et al. Tratamento da doença de Alzheimer. **Dementia & Neuropsychologia**, v. 5, n. 1, p. 34-48, 2011.

DONG, Yuan et al. Drug development for Alzheimer's disease: microglia induced neuroinflammation as a target?. **International journal of molecular sciences**, v. 20, n. 3, p. 558, 2019.

DOS SANTOS, Picanco et al. Alzheimer's disease: a review from the pathophysiology to diagnosis, new perspectives for pharmacological treatment. **Current medicinal chemistry**, v. 25, n. 26, p. 3141-3159, 2018.

DUCE, James A.; BUSH, Ashley I. Biological metals and Alzheimer's disease: implications for therapeutics and diagnostics. **Progress in neurobiology**, v. 92, n. 1, p. 1-18, 2010.

ELDER, Gregory A.; GAMA SOSA, Miguel A.; DE GASPERI, Rita. Transgenic mouse models of Alzheimer's disease. Mount Sinai Journal of Medicine: A Journal of Translational and Personalized Medicine: **A Journal of Translational and Personalized Medicine**, v. 77, n. 1, p. 69-81, 2010.

ENGELHARDT, Elias et al. Tratamento da Doença de Alzheimer: recomendações e sugestões do Departamento Científico de Neurologia Cognitiva e do Envelhecimento da Academia Brasileira de Neurologia. **Arquivos de Neuro-psiquiatria**, v. 63, n. 4, p. 1104-1112, 2005.

EUROPEAN COMMISSION (europa.eu). The breakdown of clumped tau proteins to cure Alzheimer's disease | REVERSING TAUOPATHY Project. CORDIS. Acessado em 08/01/2022.

FERRI, Cleusa P. et al. Global prevalence of dementia: a Delphi consensus study. *The lancet*, v. 366, n. 9503, p. 2112-2117, 2005. FERRI, Cleusa P. et al. Global prevalence of dementia: a Delphi consensus study. **The lancet**, v. 366, n. 9503, p. 2112-2117, 2005.

FORLENZA, Orestes V. Tratamento farmacológico da doença de Alzheimer. *Archives of Clinical Psychiatry (São Paulo)*, v. 32, n. 3, p. 137-148, 2005.

GADHAVE, Kundlik et al. The dark side of Alzheimer's disease: unstructured biology of proteins from the amyloid cascade signaling pathway. **Cellular and Molecular Life Sciences**, p. 1-46, 2020.

GALASKO, Douglas R. et al. Antioxidants for Alzheimer disease: a randomized clinical trial with cerebrospinal fluid biomarker measures. **Archives of neurology**, v. 69, n. 7, p. 836-841, 2012.

GEMELLI, Tanise et al. Estresse oxidativo como fator importante na fisiopatologia da Doença de Alzheimer. **Revista Brasileira Multidisciplinar**, v. 16, n. 1, p. 67-78, 2013.

GODYŃ, Justyna et al. Therapeutic strategies for Alzheimer's disease in clinical trials. **Pharmacological Reports**, v. 68, n. 1, p. 127-138, 2016.

GOULART, P. N. et al. Butirilcolinesterase-BuChE: um Potencial Alvo para o Desenvolvimento de Fármacos para o Tratamento da Doença de Alzheimer.

GREIG, Nigel H. et al. A new therapeutic target in Alzheimer's disease treatment: attention to butyrylcholinesterase. **Current medical research and opinion**, v. 17, n. 3, p. 159-165, 2001.

GUAN, Xiao-Yu; AL-MISBA'A, Zahra; HUANG, Kuo-Wei. Efficient and selective a-bromination of carbonyl compounds with N-bromosuccinimide under microwave. **Arabian Journal of Chemistry**. 2014

H FERREIRA-VIEIRA, Talita et al. Alzheimer's disease: targeting the cholinergic system. **Current neuropharmacology**, v. 14, n. 1, p. 101-115, 2016.

HAJRA, A.; BAGDI, A. K.; SANTRA, S.; MONIR, K. Synthesis of imidazo[1,2- a]pyridines: a decade update. **Chemical communications (Cambridge, England)**, v. 51, n. 9, p. 1555–75, 2015

HALLE A, Hornung V, Petzold GC et al. The NALP3 inflammasome is involved in innate immune response to amyloid-beta. **Nature Immunol.** 9 (8):857-865. 2008

HANE, Francis; LEONENKO, Zoya. Effect of metals on kinetic pathways of amyloid- β aggregation. **Biomolecules**, v. 4, n. 1, p. 101-116, 2014.

HARDY J. The amyloid hypothesis for Alzheimer's disease: a critical reappraisal. **J. Neurochem.** 110: 1129–1134. 2009

HUANG, Li-Kai; CHAO, Shu-Ping; HU, Chaur-Jong. Clinical trials of new drugs for Alzheimer disease. **Journal of Biomedical Science**, v. 27, n. 1, p. 1-13, 2020.

HUSSAIN, M. I.; QAMAR ABBAS, S.; REIGOSA, M. J. Activities and Novel Applications of Secondary Metabolite Coumarins. **Planta Daninha**, v. 36, 2018.

JADHAV, Santosh A. et al. Rapid and efficient one-pot microwave-assisted synthesis of 2-phenylimidazo [1, 2-a] pyridines and 2-phenylimidazo [1, 2-a] quinoline in water-PEG-400. **Synthetic Communications**, v. 47, n. 4, p. 285-290, 2017.

JOE, Elizabeth; RINGMAN, John M. Cognitive symptoms of Alzheimer's disease: clinical management and prevention. **BMJ**, v. 367, 2019.

KIMURA, T., ISHIGURO, K. & HISANAGA, S.-I. Physiological and pathological phosphorylation of tau by Cdk5. *Front. Mol. Neurosci.* 7, 65 (2014).

KRSTIC, Dimitrije; KNUESEL, Irene. Deciphering the mechanism underlying late-onset Alzheimer disease. **Nature Reviews Neurology**, v. 9, n. 1, p. 25, 2013.

KUMAR, Anil et al. A review on Alzheimer's disease pathophysiology and its management: an update. **Pharmacological reports**, v. 67, n. 2, p. 195-203, 2015.

KÜMMERLE, Arthur Eugen. Uma quimioteca de *n*-acilidrazonas (NAH): a influência da metila na modulação das propriedades analgésicas e anti-inflamatórias de novos candidatos a fármacos. 448f. Tese de doutorado – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2009.

KUSY, Damian; MANIUKIEWICZ, Waldemar; BŁAŻEWSKA, Katarzyna M. Microwave-assisted synthesis of 3-formyl substituted imidazo [1, 2-a] pyridines. **Tetrahedron Letters**, v. 60, n. 45, p. 151244, 2019.

KWONG, Huey Chong et al. Crystal correlation of heterocyclic imidazo [1, 2-a] pyridine analogues and their anticholinesterase potential evaluation. **Scientific reports**, v. 9, n. 1, p. 1-15, 2019.

LACY, A.; O'KENNEDY, R. Studies on coumarins and coumarin-related compounds to determine their therapeutic role in the treatment of cancer. **Current Pharmaceutical Design**, v. 10, p. 3797-3811. 2004.

LANNFELT, Lars et al. Safety, efficacy, and biomarker findings of PBT2 in targeting A β as a modifying therapy for Alzheimer's disease: a phase IIa, double-blind, randomised, placebo-controlled trial. **The Lancet Neurology**, v. 7, n. 9, p. 779-786, 2008.

LEFIN, Roslyn et al. Imidazo [1, 2- α] pyridines possess adenosine A1 receptor affinity for the potential treatment of cognition in neurological disorders. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 27, n. 17, p. 3963-3967, 2017.

LUQUE-CONTRERAS, Diana et al. Oxidative stress and metabolic syndrome: cause or consequence of Alzheimer's disease?. **Oxidative medicine and cellular longevity**, v. 2014, 2014.

MANHAS, Maghar S. et al. Microwave initiated reactions: Pechmann coumarin synthesis, Biginelli reaction, and acylation. **Tetrahedron letters**, v. 47, n. 14, p. 2423-2425, 2006.

MARCINKOWSKA, Monika et al. 3-Aminomethyl Derivatives of 2-Phenylimidazo [1, 2-a]-pyridine as Positive Allosteric Modulators of GABAA Receptor with Potential Antipsychotic Activity. **ACS Chemical Neuroscience**, v. 8, n. 6, p. 1291-1298, 2017.

MÖLLER, H.-J.; GRAEBER, M. B. The case described by Alois Alzheimer in 1911. **European archives of psychiatry and clinical neuroscience**, v. 248, n. 3, p. 111-122, 1998.

MORALES, Inelia et al. Neuroinflammation in the pathogenesis of Alzheimer's disease. A rational framework for the search of novel therapeutic approaches. Santiago, Chile: **Frontiers in Cellular Neuroscience**, 2014
HENEKA, Michael T. et al. Neuroinflammation in Alzheimer's disease. **The Lancet Neurology**, v. 14, n. 4, p. 388-405, 2015.

MORRIS, M., MAEDA, S., VOSSEL, K. & MUCKE, L. The many faces of tau. **Neuron** 70, 410–26 (2011).

MURRAY, R. D. H. Naturally Occurring Plant Coumarins. **New York: SpringerVerlag**, v. 1, p. 200-209, 1978.

MUZALEVSKIY, Vasiliy M. et al. Metal-Free Approach to Zolpidem, Alpidem and their Analogues via Amination of Dibromoalkenes Derived from Imidazopyridine and Imidazothiazole. **European Journal of Organic Chemistry**, v. 2019, n. 25, p. 4034-4042, 2019.

NADUR, Nathalia Fonseca. Síntese e avaliação farmacológica de novas 3-(1,2,3-triazol)-cumarinas planejadas para o tratamento da Doença de Alzheimer. 2020. 181f. Dissertação (Mestrado em química) – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2020.

NORDBERG, Agneta. Biological markers and the cholinergic hypothesis in Alzheimer's disease. **Acta Neurologica Scandinavica**, 1992.

OKUMURA, Yuki et al. Design, Synthesis, and Preliminary Evaluation of SPECT Probes for Imaging β -Amyloid in Alzheimer's Disease Affected Brain. **ACS chemical neuroscience**, v. 9, n. 6, p. 1503-1514, 2018.

PARNETTI, Lucilla. Clinical pharmacokinetics of drugs for Alzheimer's disease. **Clinical pharmacokinetics**, v. 29, n. 2, p. 110-129, 1995.

PERICHERLA, Kasiviswanadharaju et al. Recent developments in the synthesis of imidazo [1, 2-a] pyridines. **Synthesis**, v. 47, n. 07, p. 887-912, 2015.

RABBANI, G. A Concise Introduction of Perkin Reaction. **Org. Chem.: Curr. Res**, v. 7, n. 2.10, p. 4172, 2018.

RAMEZANPOUR, Sorour; BIGDELI, Zahra; ROMINGER, Frank. Saccharin as a new organocatalyzed: a fast, highly efficient and environmentally friendly protocol for synthesis of imidazo [1, 2- α] pyridine derivatives via a one-three component reaction. **Chemical Methodologies**, v. 4, n. 1, p. 87-97, 2019.

RIBEIRO, Felipe Vítório. Planejamento, síntese e avaliação antitumoral de derivados diidropirimidinonas e imidazopiridinas derivadas de 3-ceto-cumarinas substituídas. 2020. 252f. Tese (Doutorado em química) – Universidade Federal do Rural do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2020.

RITA, BÁRBARA; COZZOLINO, FRANCISCATO. Estresse oxidativo na Doença de Alzheimer: o papel das vitaminas C e E Oxidative stress in Alzheimer's disease: the role of vitamins C and E. **CEP**, v. 5508, p. 900, 2009.

ROJAS, Hugo; RITTER, Cristiane; PIZZOL, F. D. Mechanisms of dysfunction of the blood-brain barrier in critically ill patients: emphasis on the role of matrix metalloproteinases. **Rev Bras Ter Intensiva**, v. 23, n. 2, p. 222-7, 2011.

SBGG. Sociedade brasileira de geriatria e gerontologia. Disponível em: <<https://sbgg.org.br/em-dia-mundial-do-alzheimer-dados-ainda-sao-subestimados-apesar-de-avancos-no-diagnostico-e-tratamento-da-doenca/>>. Acesso em: 27 de abril de 2020.

SBGG. Sociedade brasileira de geriatria e gerontologia. Disponível em: <<https://sbgg.org.br/em-dia-mundial-do-alzheimer-dados-ainda-sao-subestimados-apesar-de-avancos-no-diagnostico-e-tratamento-da-doenca/>>. Acesso em: 27 de abril de 2020.

SEKIOKA, Ryuichi et al. Discovery of novel scaffolds for γ -secretase modulators without an arylimidazole moiety. **Bioorganic & medicinal chemistry**, v. 26, n. 2, p. 435-442, 2018.

SEKIOKA, Ryuichi et al. Optimization and biological evaluation of imidazopyridine derivatives as a novel scaffold for γ -secretase modulators with oral efficacy against cognitive deficits in Alzheimer's disease model mice. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, p. 115455, 2020.

SELKOE, Dennis J. Alzheimer's disease: genes, proteins, and therapy. **Physiological reviews**, v. 81, n. 2, p. 741-766, 2001

SERENIKI, Adriana; VITAL, Maria Aparecida Barbato Frazão. A doença de Alzheimer: aspectos fisiopatológicos e farmacológicos. **Revista de psiquiatria do Rio Grande do Sul**, v. 30, n. 1, p. 0-0, 2008.

SILVERSTEIN, R. M.; WEBSTER, F. X.; KIEMLE, D. J. Silverstein-Spectrometric Identification of Organic Compounds 7th ed. pdf. 2005.

STASYUK, Anton J. et al. Imidazo [1, 2-a] pyridines susceptible to excited state intramolecular proton transfer: one-pot synthesis via an Ortoleva–King reaction. **The Journal of organic chemistry**, v. 77, n. 13, p. 5552-5558, 2012.

SWERDLOW, Russell H.; KHAN, Shaharyar M. A “mitochondrial cascade hypothesis” for sporadic Alzheimer's disease. **Medical hypotheses**, v. 63, n. 1, p. 8-20, 2004.

THAPA, Arjun; CARROLL, Nick J. Dietary modulation of oxidative stress in Alzheimer's disease. **International journal of molecular sciences**, v. 18, n. 7, p. 1583, 2017.

TIKHONOVA, Tatyana A. et al. Development of 1, 3-thiazole analogues of imidazopyridines as potent positive allosteric modulators of GABAA receptors. **Bioorganic Chemistry**, v. 94, p. 103334, 2020.

TIMUR, Mahir; PA A, Ahmet. Synthesis, characterization, swelling, and metal uptake studies of aryl cross-linked chitosan hydrogels. **ACS omega**, v. 3, n. 12, p. 17416-17424, 2018.

TODMAN, Don. Henry Dale and the discovery of chemical synaptic transmission. **European neurology**, v. 60, n. 3, p. 162-164, 2008.

TROST, Barry M. (Ed.). Additions to C-X-Bonds. **Elsevier**, 1992.

VANDA, David; ZAJDEL, Paweł; SOURAL, Miroslav. Imidazopyridine-based selective and multifunctional ligands of biological targets associated with psychiatric and neurodegenerative diseases. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 181, p. 111569, 2019..

VATANABE, I. P.; MANZINE, P. R.; COMINETTI, M. R. Historic concepts of dementia and Alzheimer's disease: From ancient times to the present. **Revue neurologique**, v. 176, n. 3, p. 140-147, 2020.

VENTURA, Ana LM et al. Sistema colinérgico: revisitando receptores, regulação e a relação com a doença de Alzheimer, esquizofrenia, epilepsia e tabagismo. **Archives of Clinical Psychiatry (São Paulo)**, v. 37, n. 2, p. 66-72, 2010.

VERNUGOPALA, K. N.; RASHMI, V.; ODHAV, B. Review on natural coumarin lead compounds for their pharmacological activity. **Hindawi Publishing Corporation**, p.14, 2013.

VOLOBOUEVA, Ludmila A.; GIFFARD, Rona G. Inflammation, mitochondria, and the inhibition of adult neurogenesis. **Journal of neuroscience research**, v. 89, n. 12, p. 1989-1996, 2011.

WANG, Yali et al. Dual functional cholinesterase and MAO inhibitors for the treatment of Alzheimer's disease: synthesis, pharmacological analysis and molecular modeling of homoisoflavonoid derivatives. **Journal of enzyme inhibition and medicinal chemistry**, v. 31, n. 3, p. 389-397, 2016.

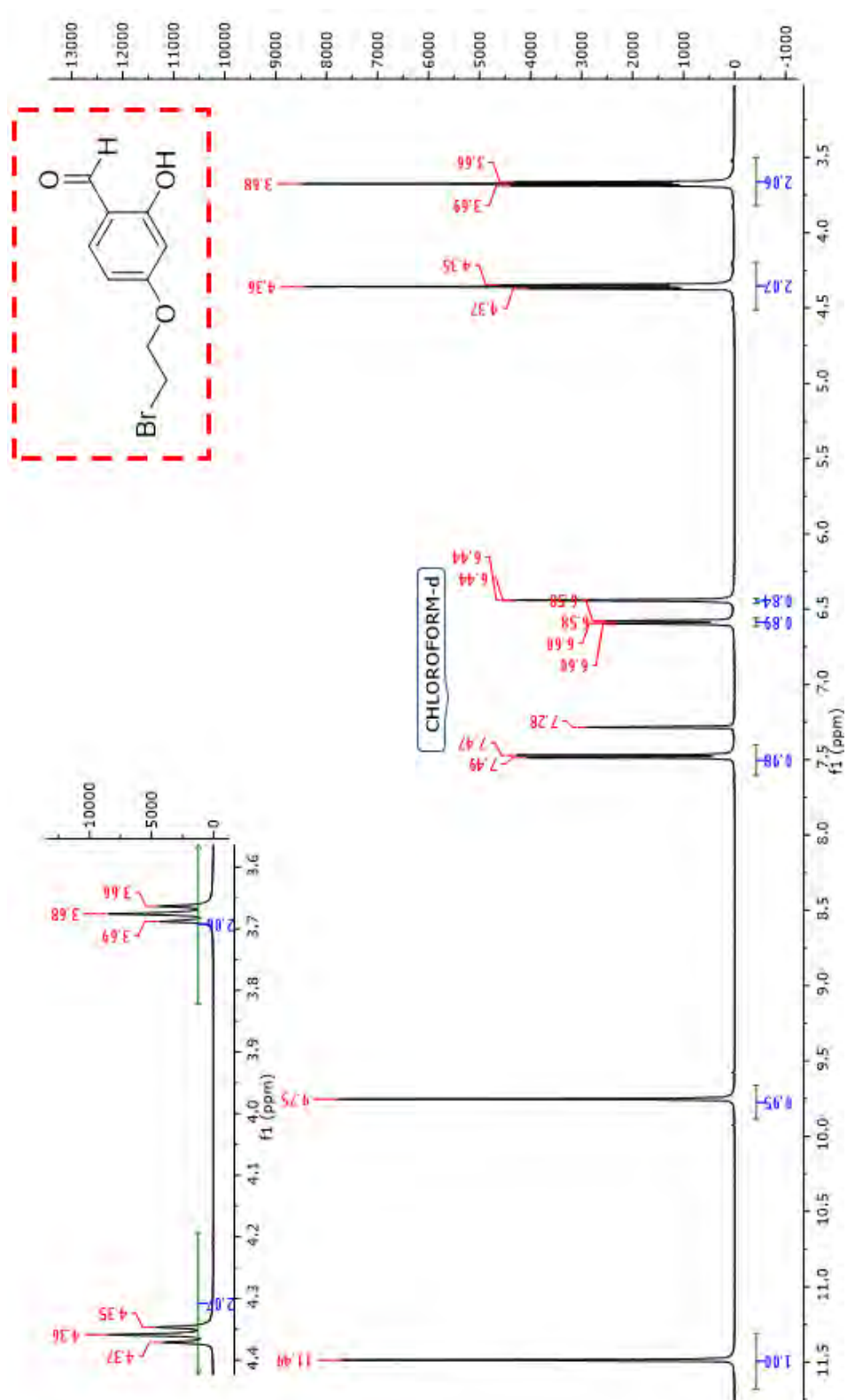
YAKOUB, Kirsten et al. Structure–Function Evaluation of Imidazopyridine Derivatives Selective for δ -Subunit-Containing γ -Aminobutyric Acid Type A (GABAA) Receptors. **Journal of medicinal chemistry**, v. 61, n. 5, p. 1951-1968, 2018.

YIANNOPOULOU, Konstantina G.; PAPAGEORGIU, Sokratis G. Current and future treatments for Alzheimer's disease. **Therapeutic advances in neurological disorders**, v. 6, n. 1, p. 19-33, 2013.

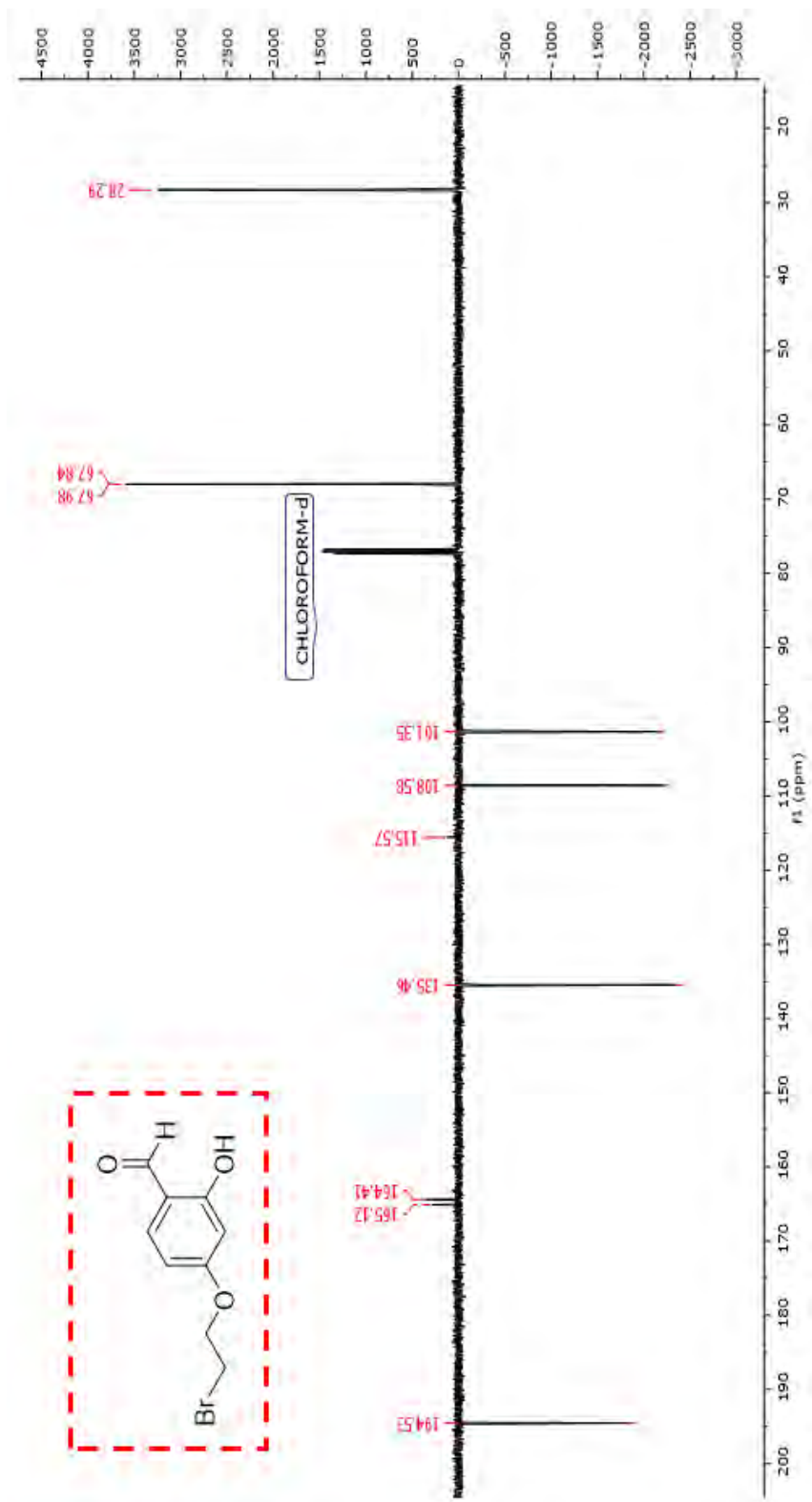
ZHAO, Jie; O'CONNOR, Tracy; VASSAR, Robert. The contribution of activated astrocytes to A β production: implications for Alzheimer's disease pathogenesis. **Journal of neuroinflammation**, v. 8, n. 1, p. 150, 2011.

8. ANEXOS

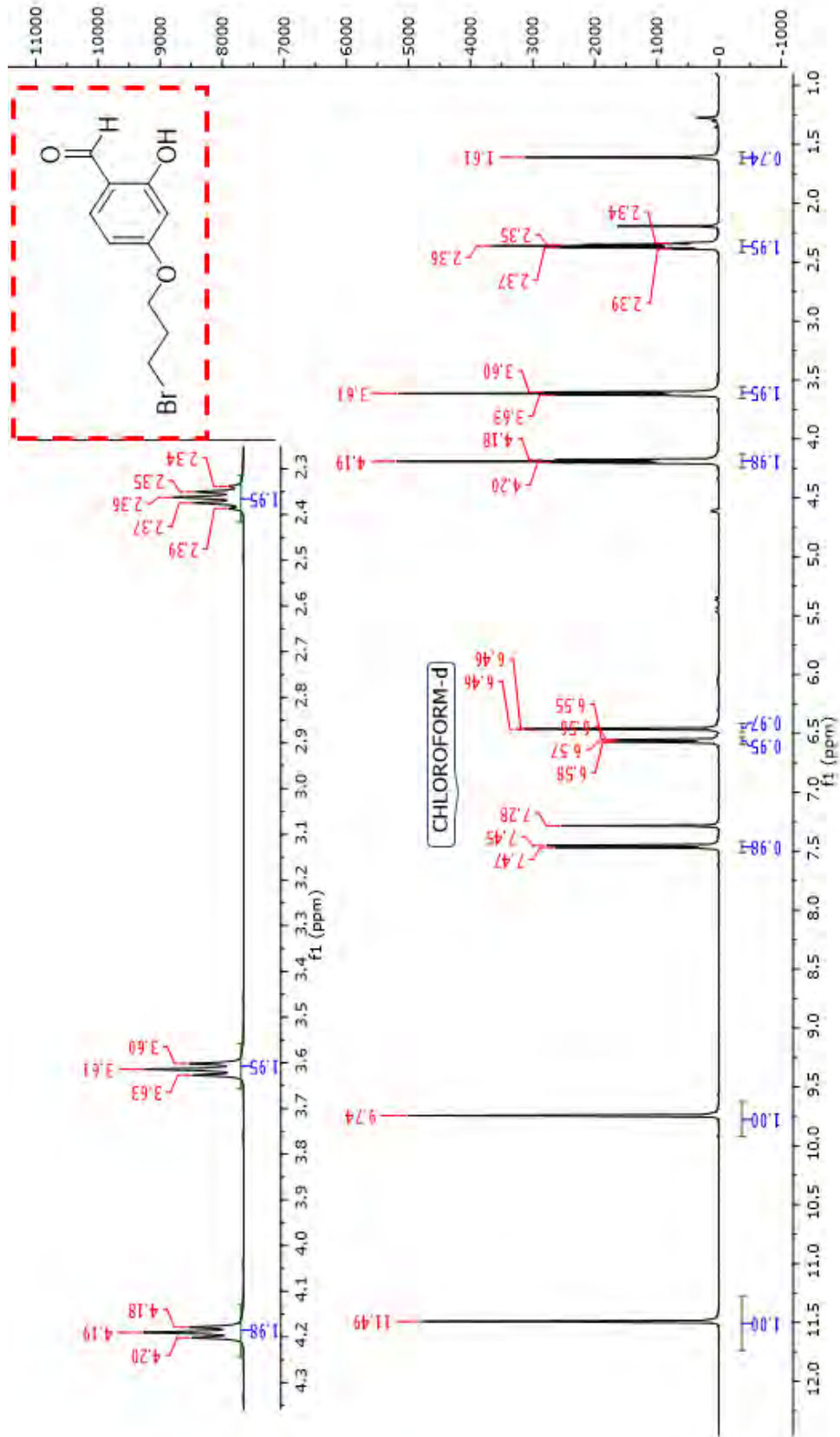
Anexo 1: Espectro de RMN ^1H do composto (42a) em CDCl_3 a 400 MHz



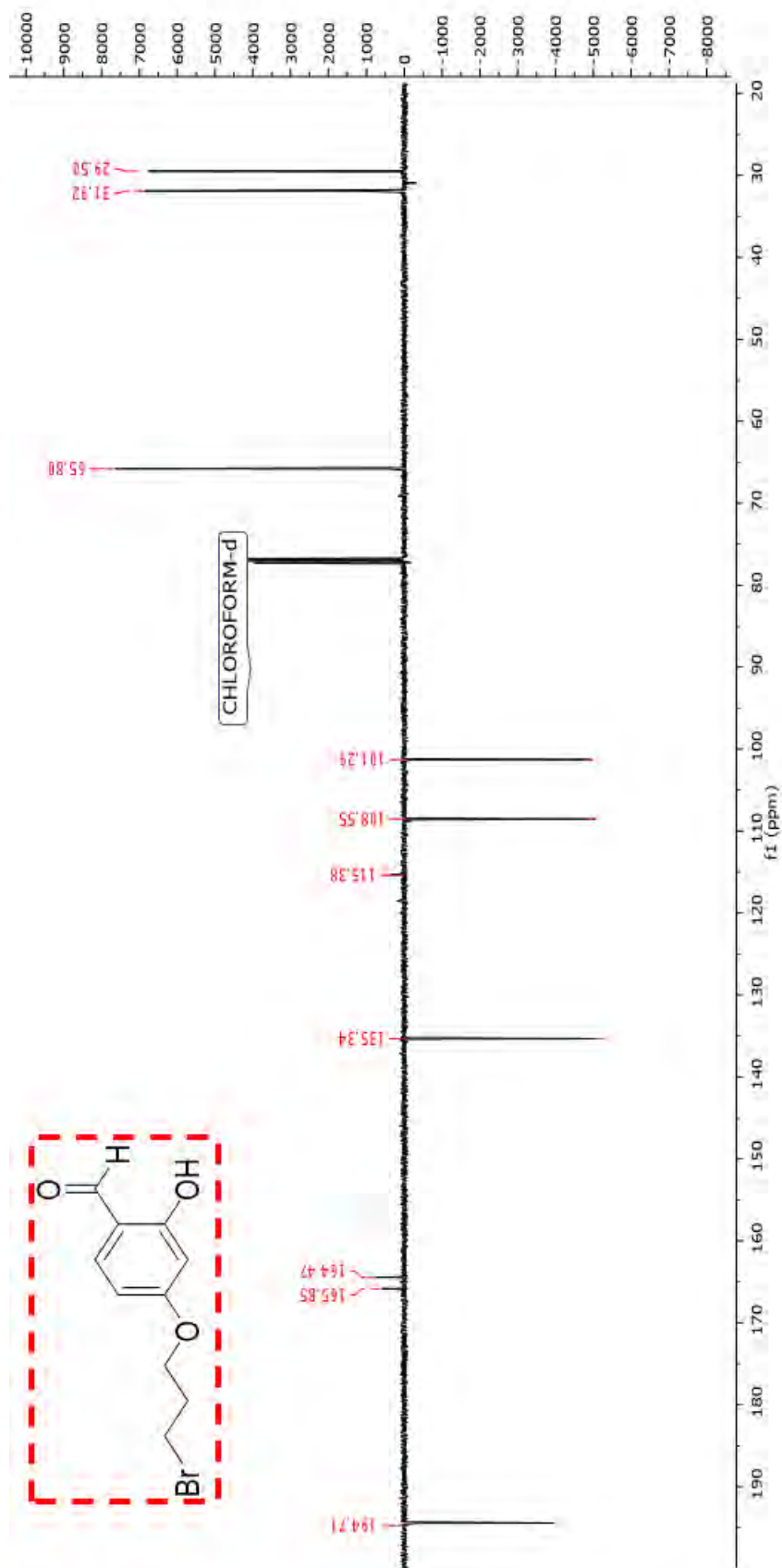
Anexo 2: Espectro de RMN ^{13}C do composto (42a) em CDCl_3 a 400 MHz



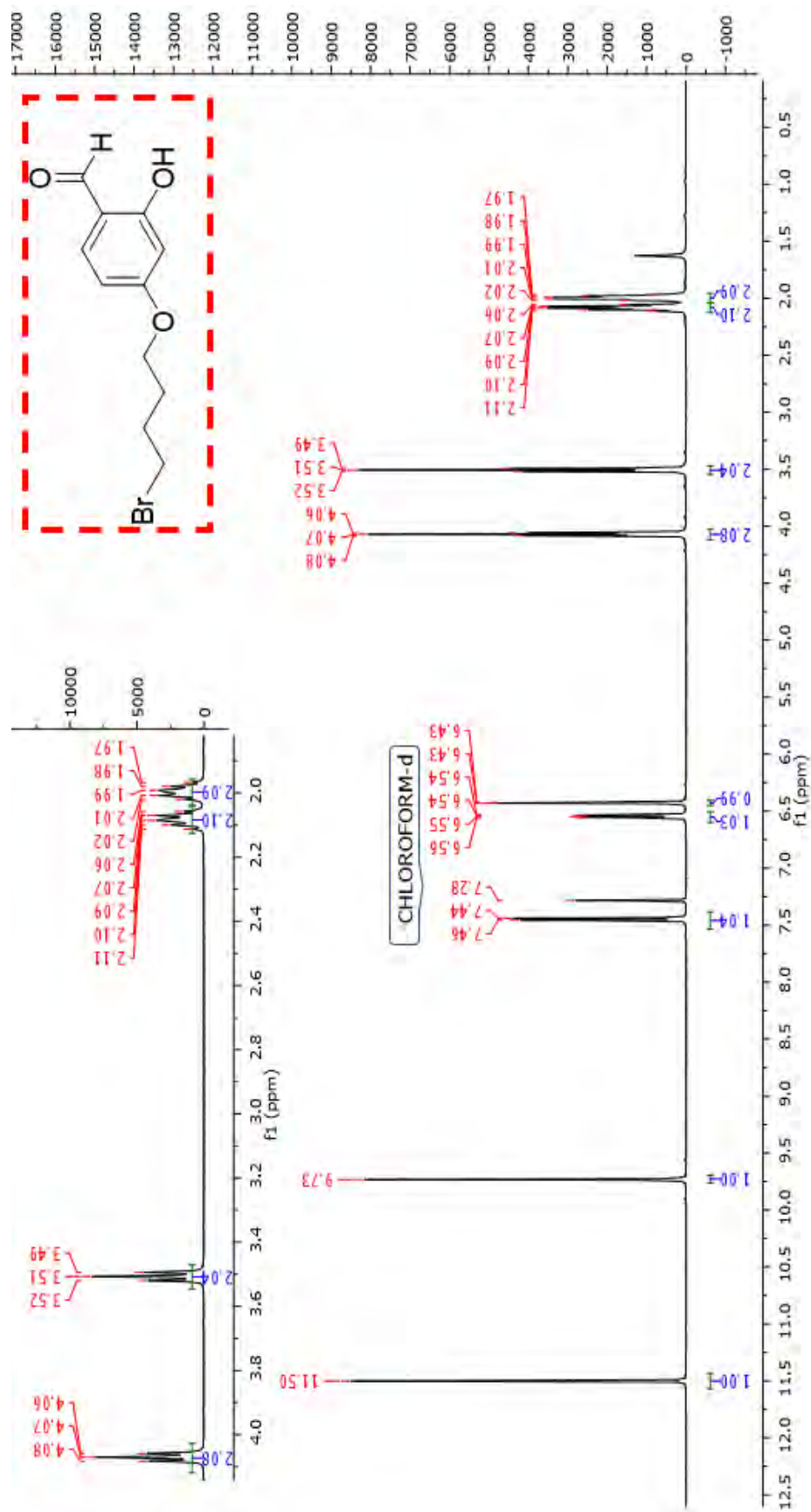
Anexo 3: Espectro de RMN ^1H do composto (42b) em CDCl_3 a 400 MHz



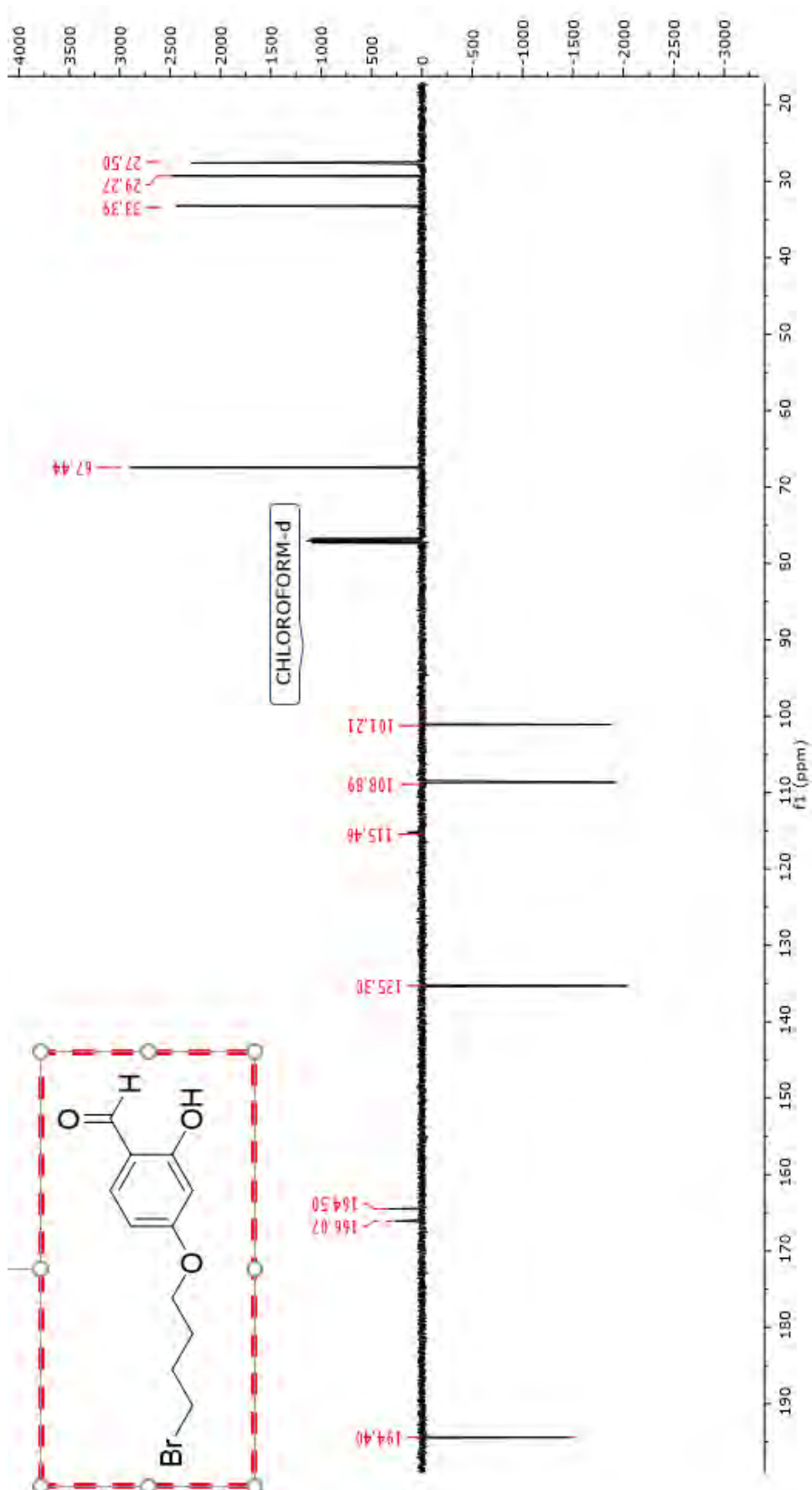
Anexo 4: Espectro de RMN ^{13}C do composto (42b) em CDCl_3 a 400 MHz



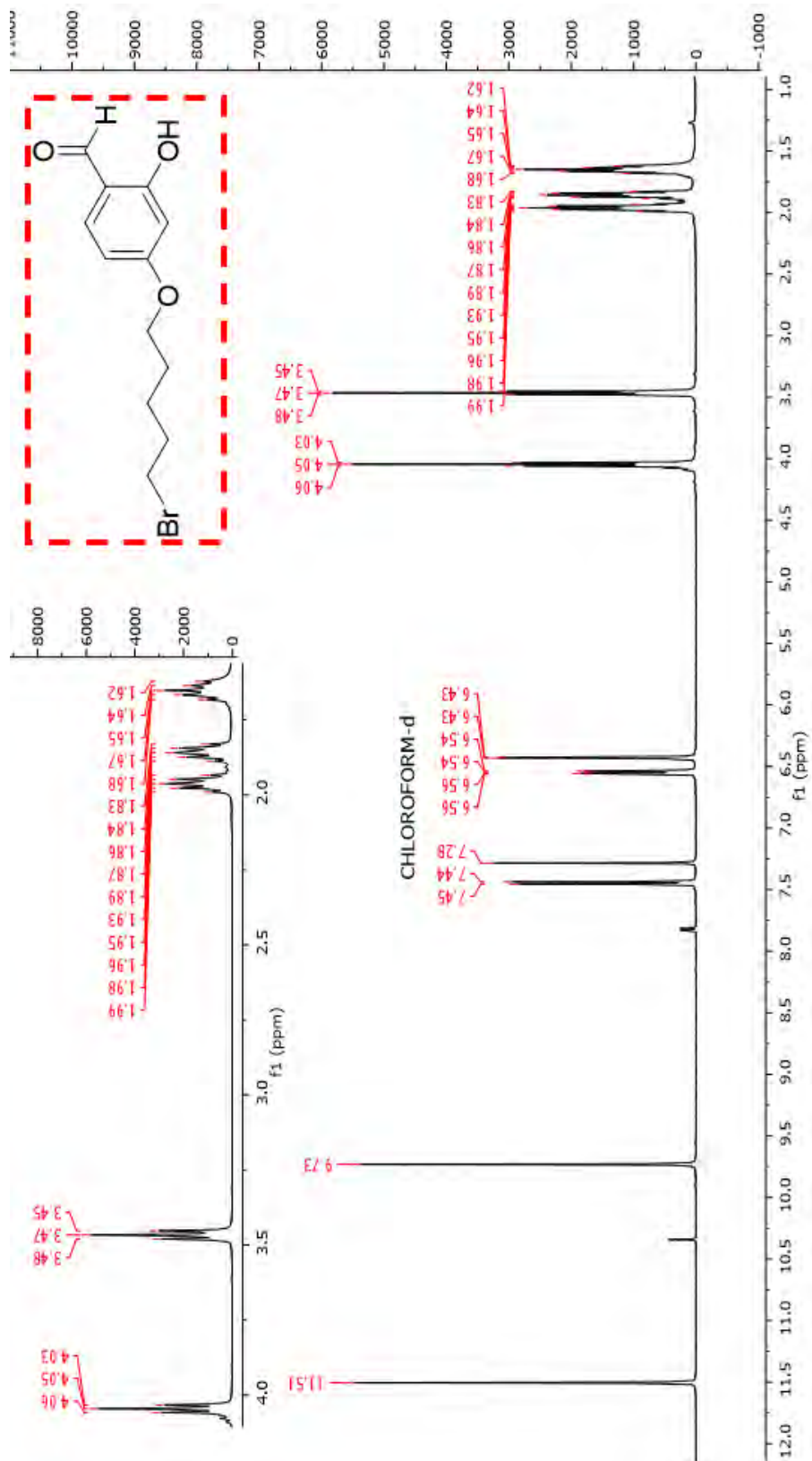
Anexo 5: Espectro de RMN ^1H do composto (42c) em CDCl_3 a 400 MHz



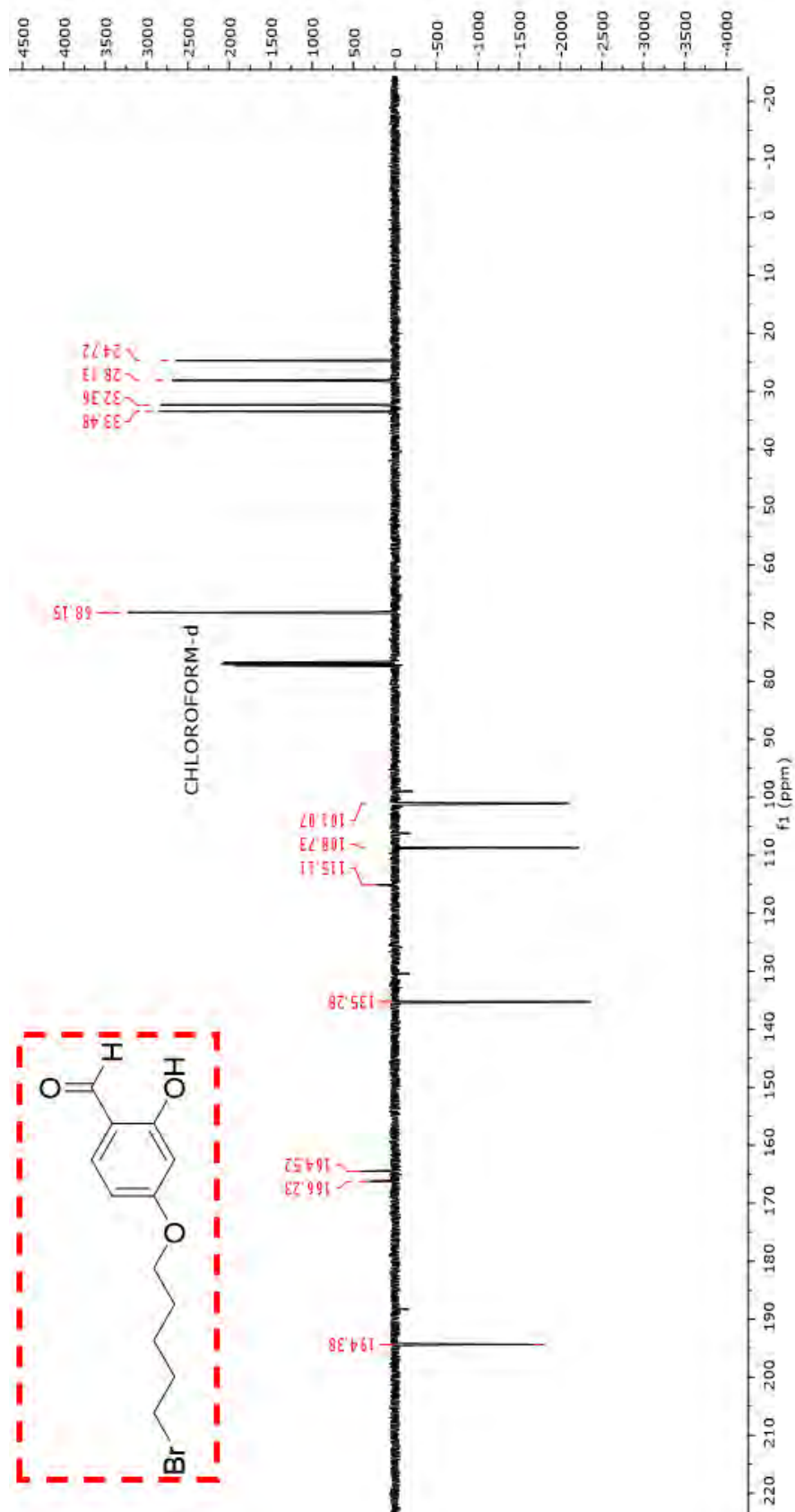
Anexo 6: Espectro de RMN ^{13}C do composto (42c) em CDCl_3 a 400 MHz



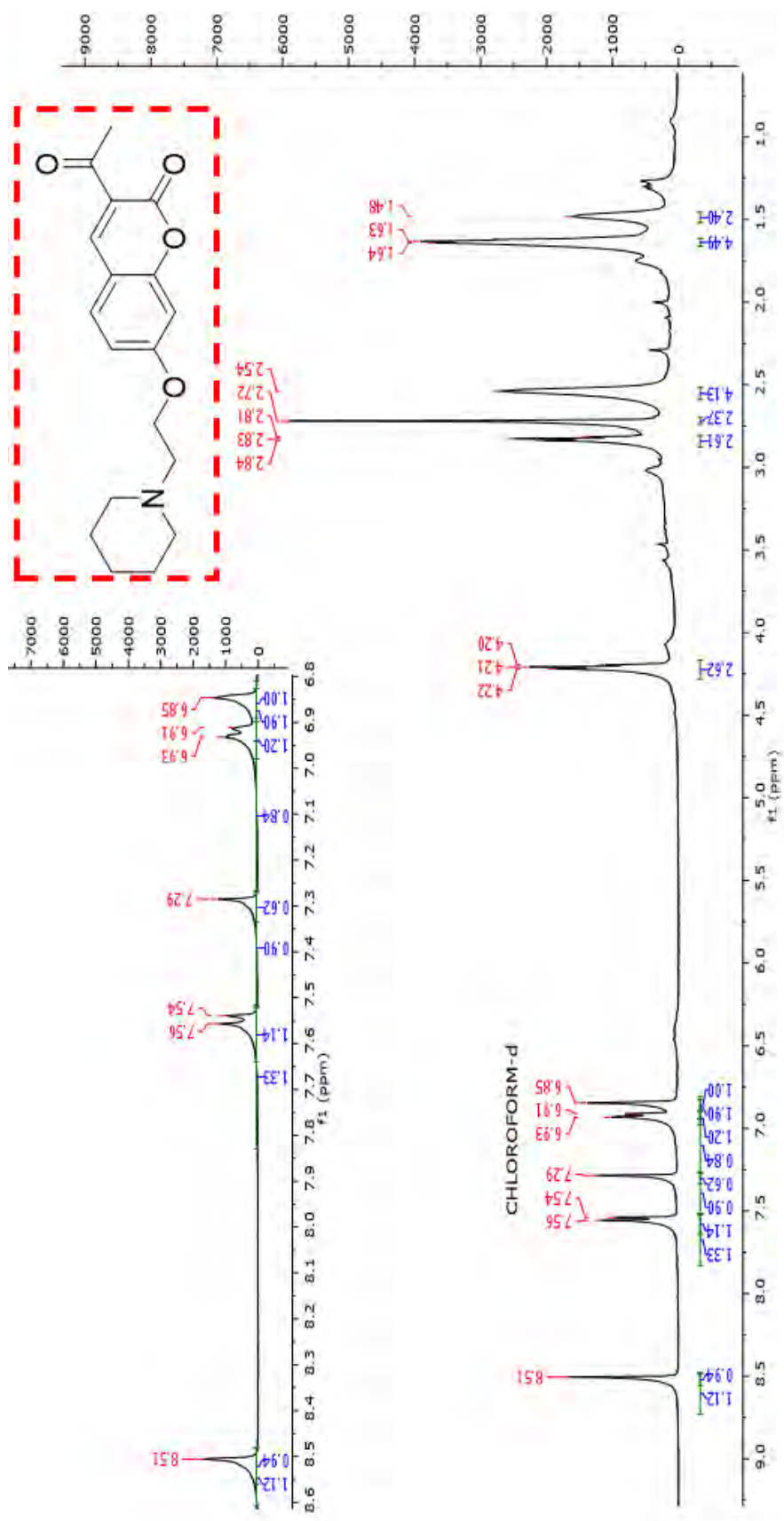
Anexo 7: Espectro de RMN ^1H do composto (42d) em CDCl_3 a 400 MHz



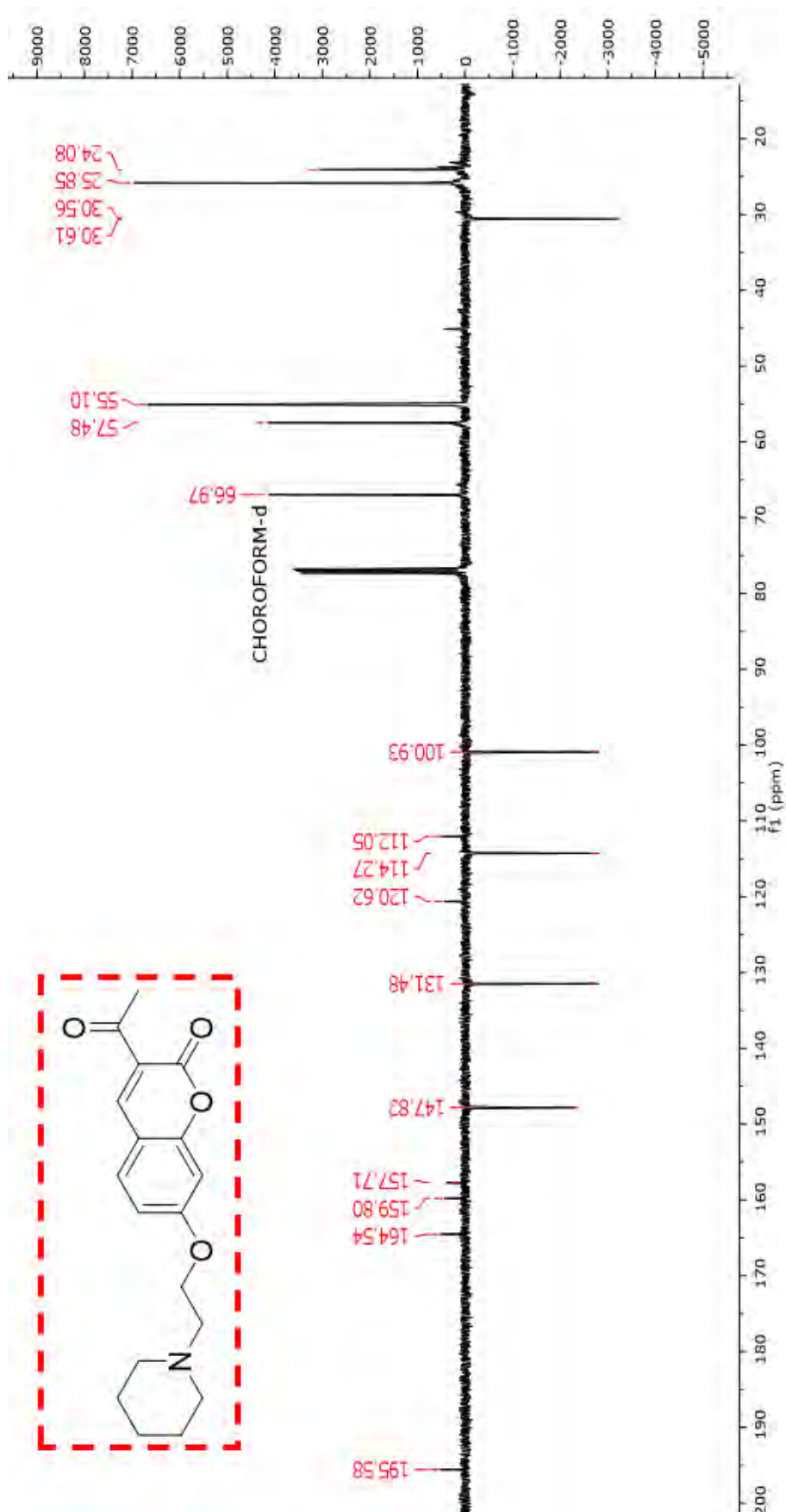
Anexo 8: Espectro de RMN ^{13}C do composto (42d) em CDCl_3 a 400 MHz



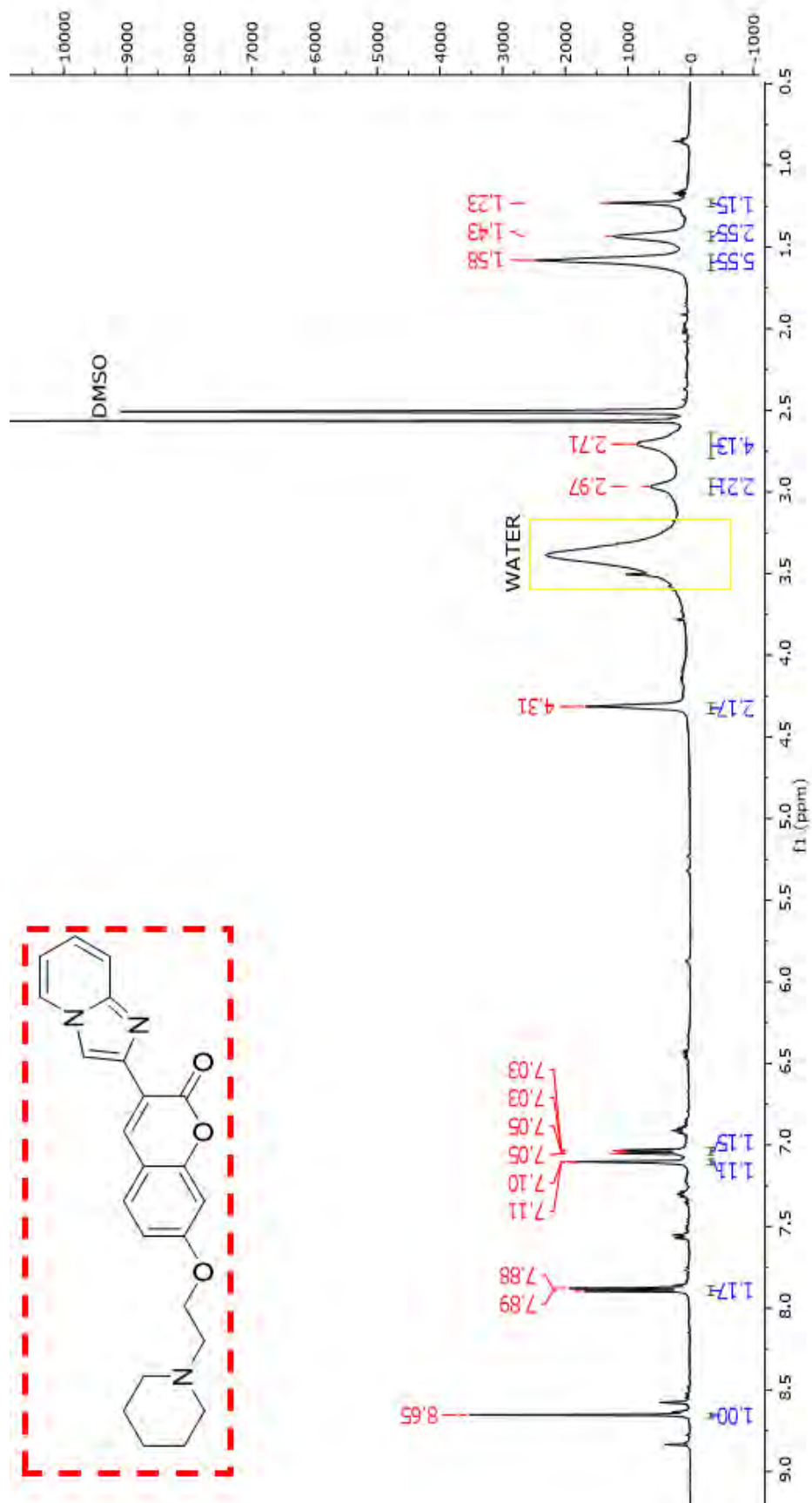
Anexo 9: Espectro de RMN ^1H do composto (59a) em CDCl_3 a 400 MHz



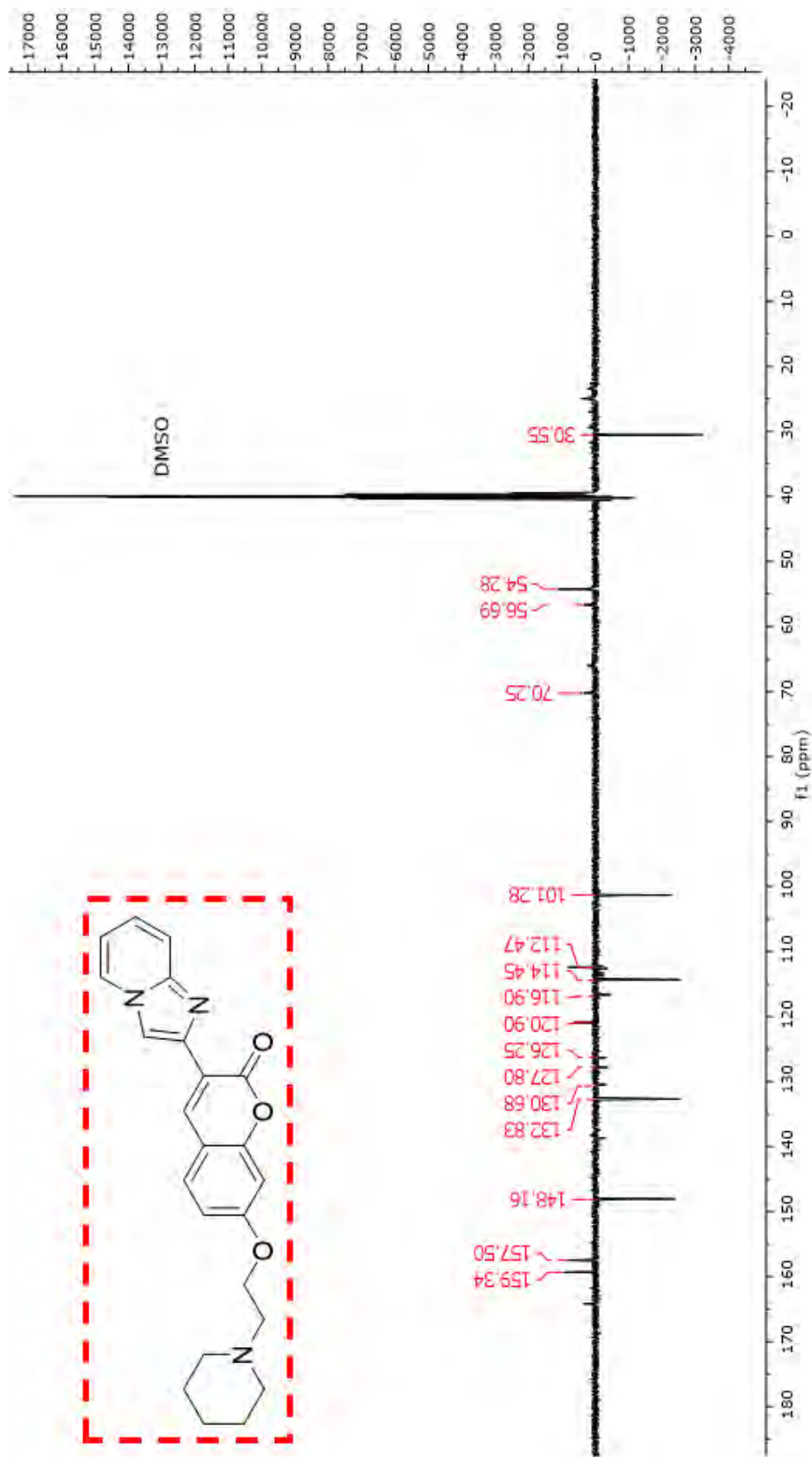
Anexo 10: Espectro de RMN ^{13}C do composto (59a) em CDCl_3 a 400 MHz



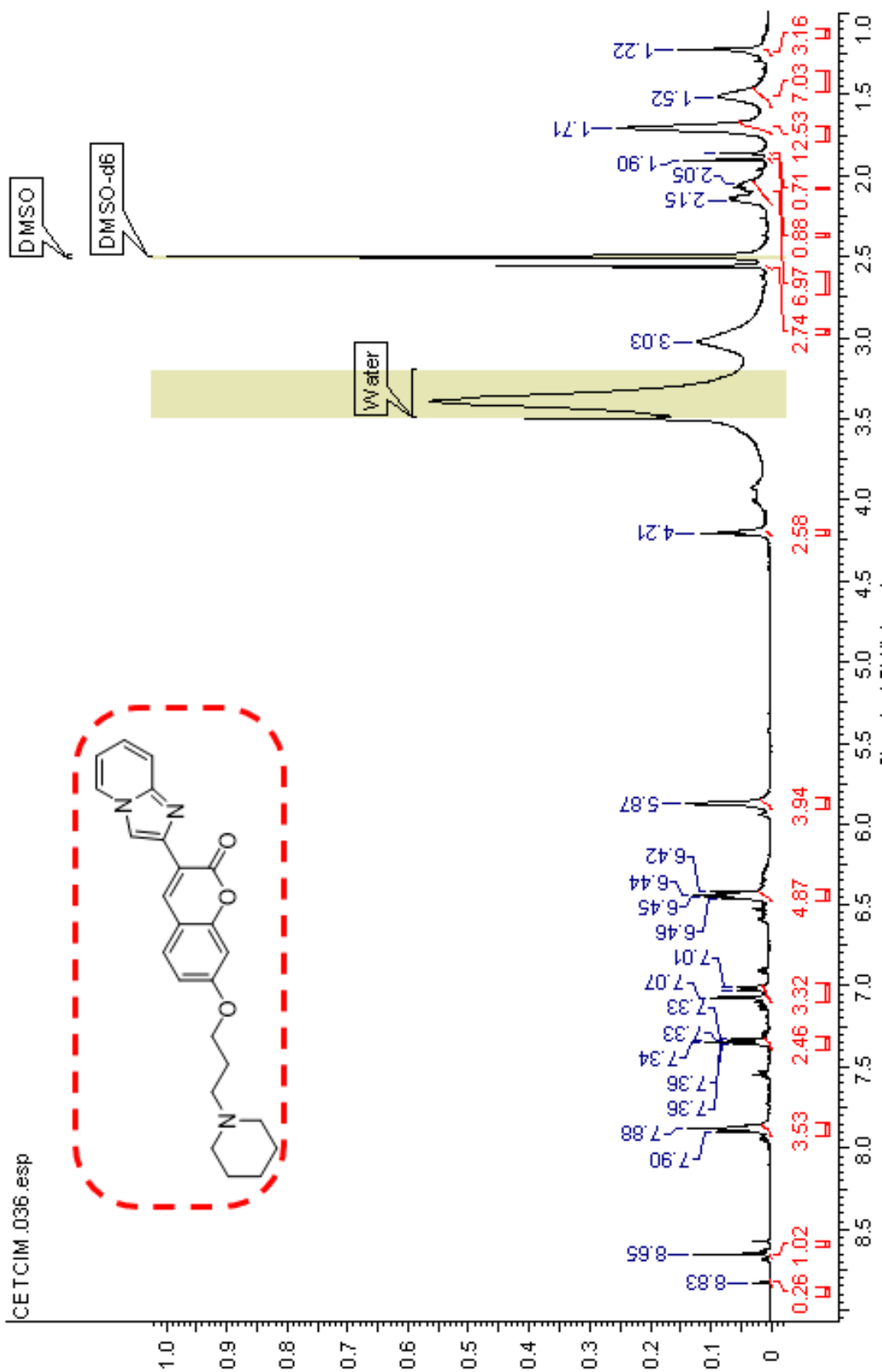
Anexo 11: Espectro de RMN ^1H do composto (66a) em $\text{DMSO-}d_6$ a 500 MHz



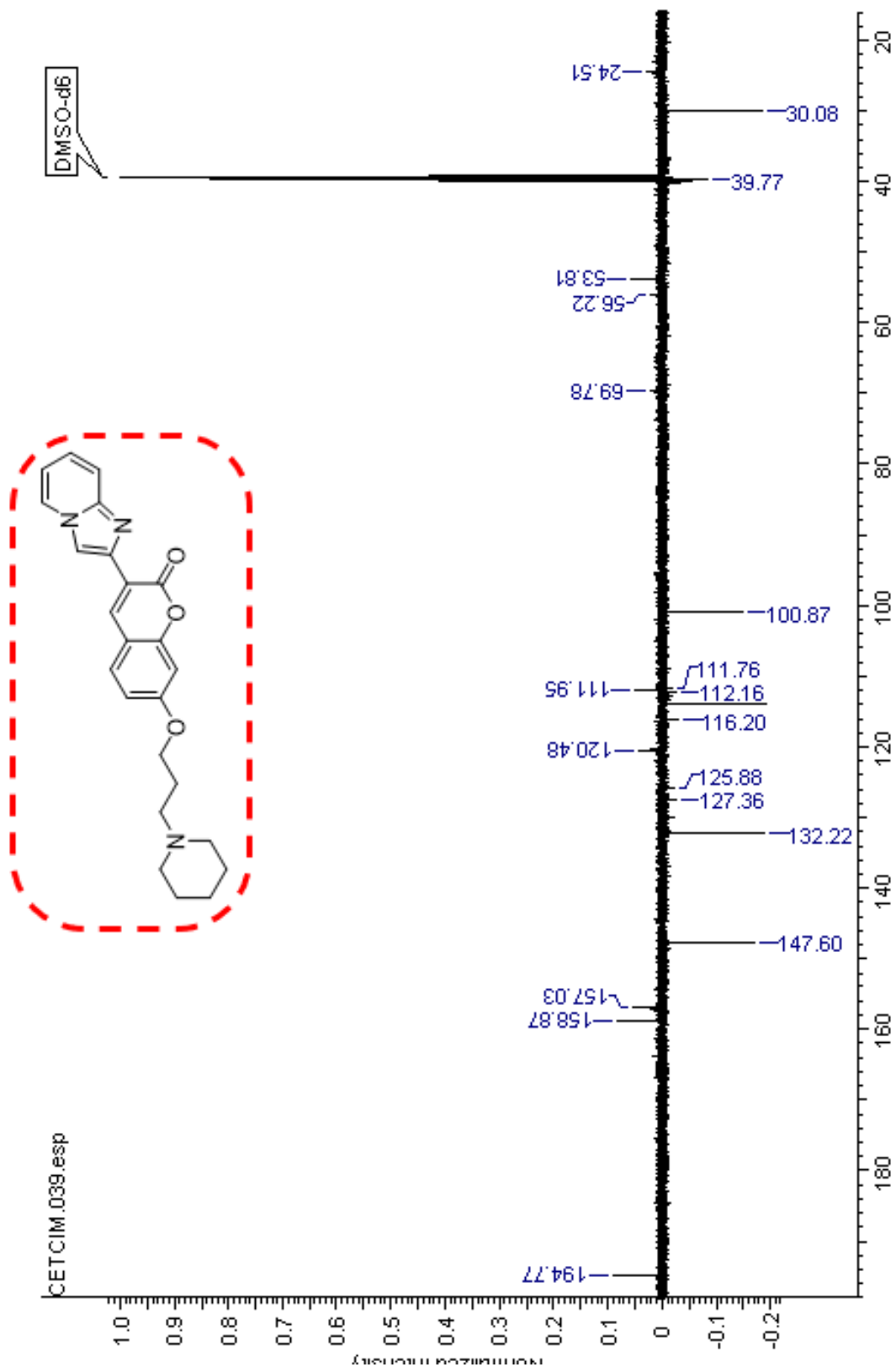
Anexo 12: Espectro de RMN ^{13}C do composto (66a) em DMSO-*d*₆ a 500 MHz



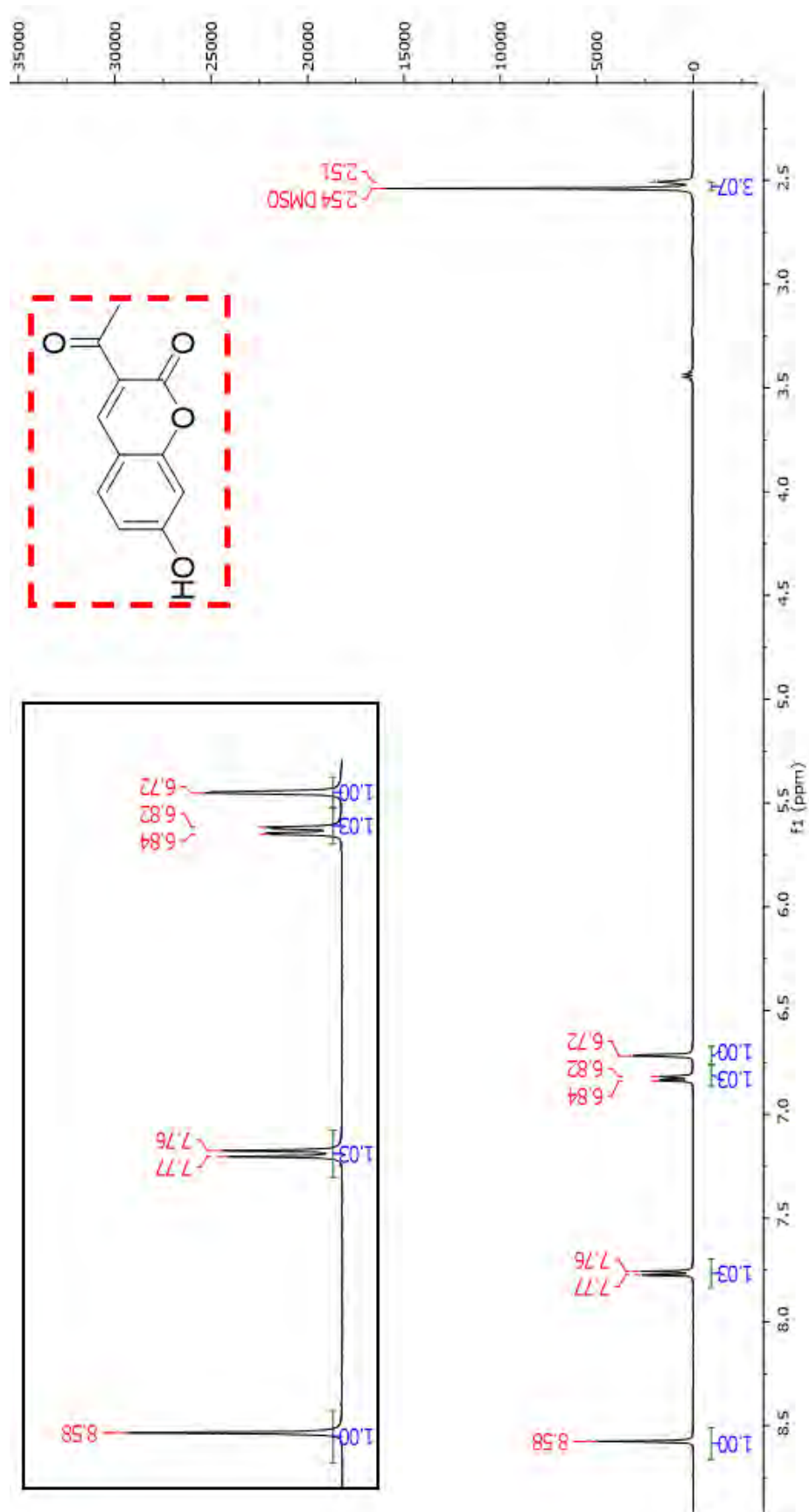
Anexo 13: Espectro de RMN ^1H do composto (66b) em DMSO- d_6 a 500 MHz



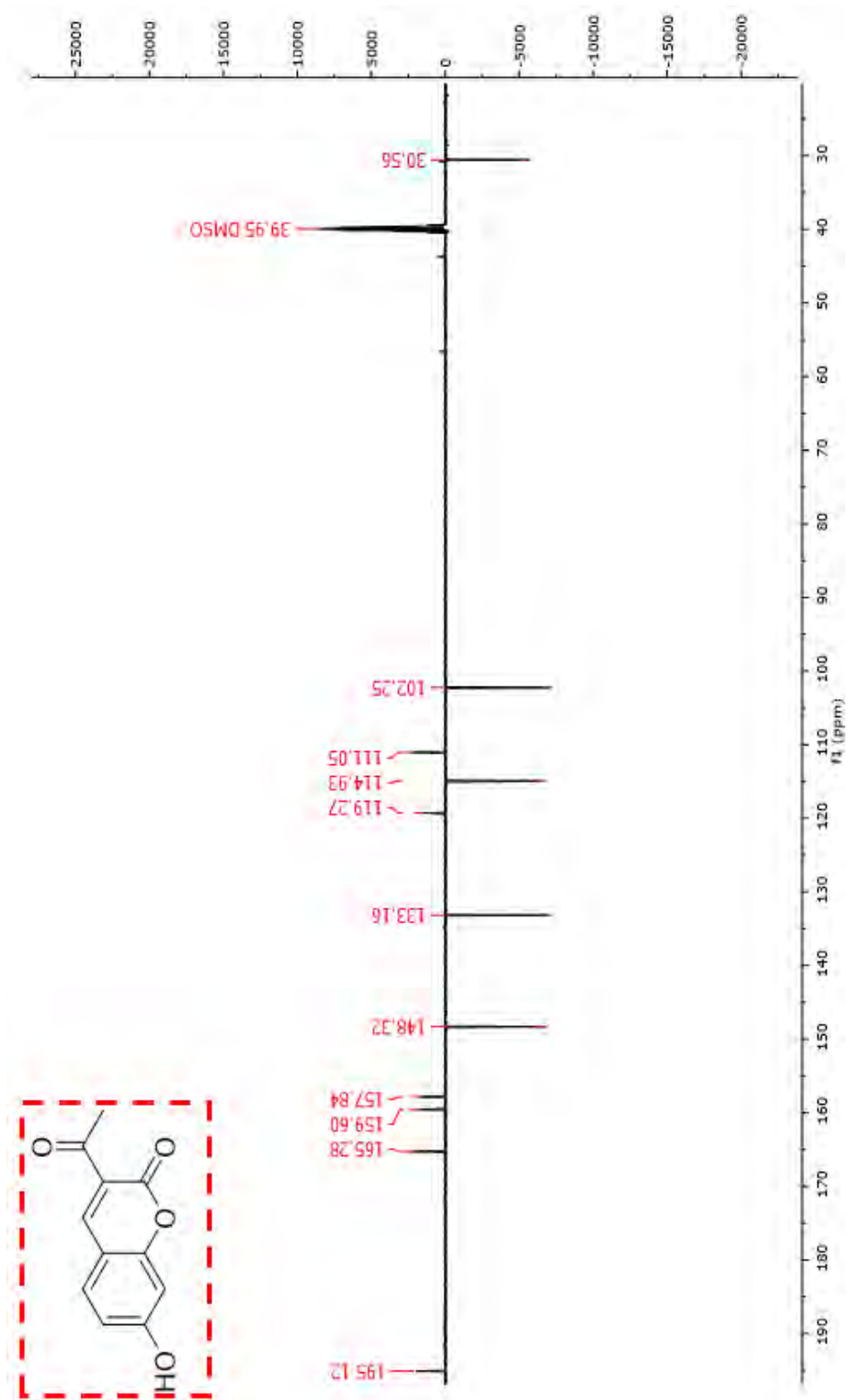
Anexo 14: Espectro de RMN ¹³C do composto (66b) em DMSO-*d*₆ a 500 MHz



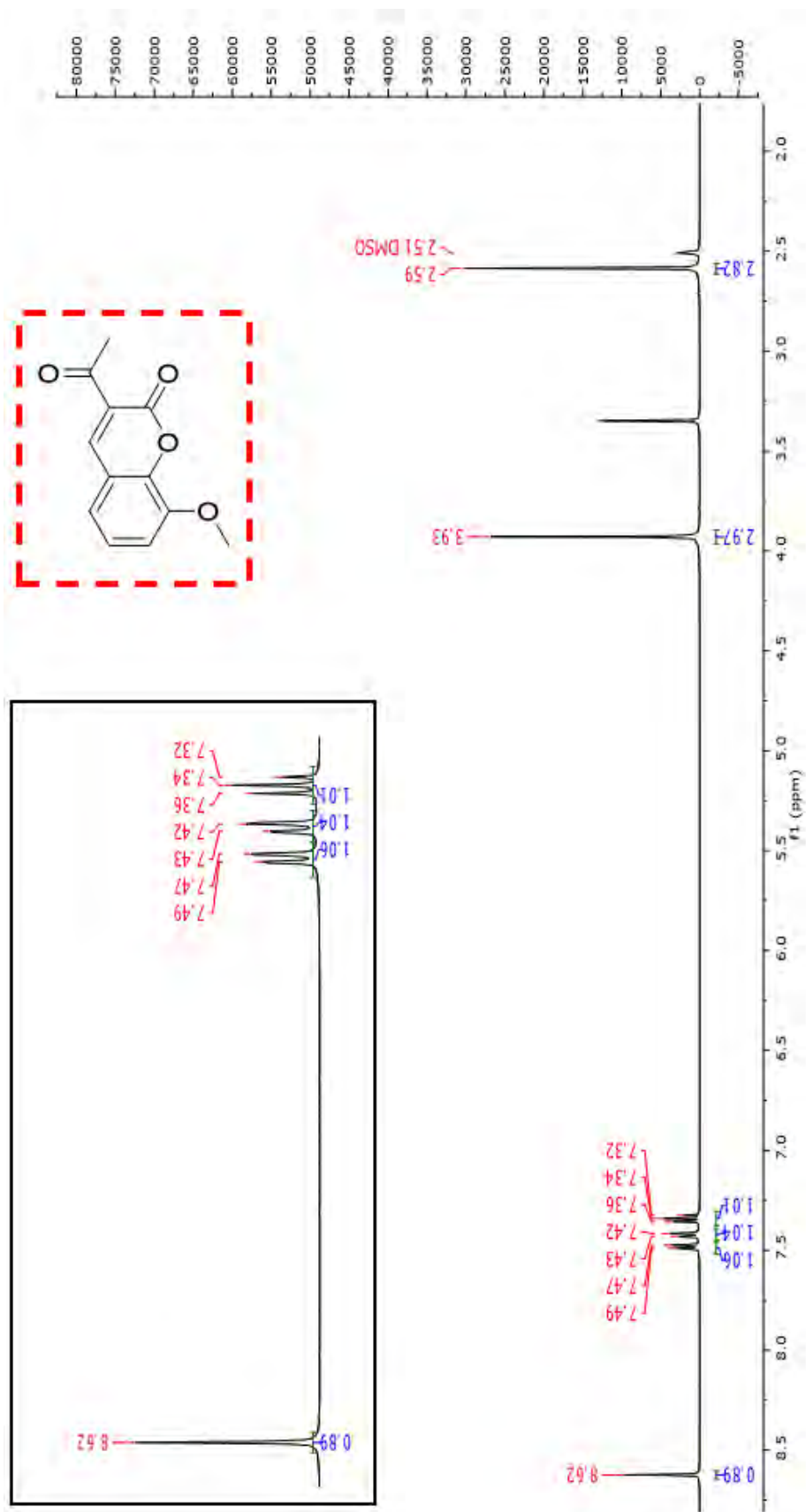
Anexo 15: Espectro de RMN ^1H do composto (72a) em DMSO-*d*₆ a 500 MHz.



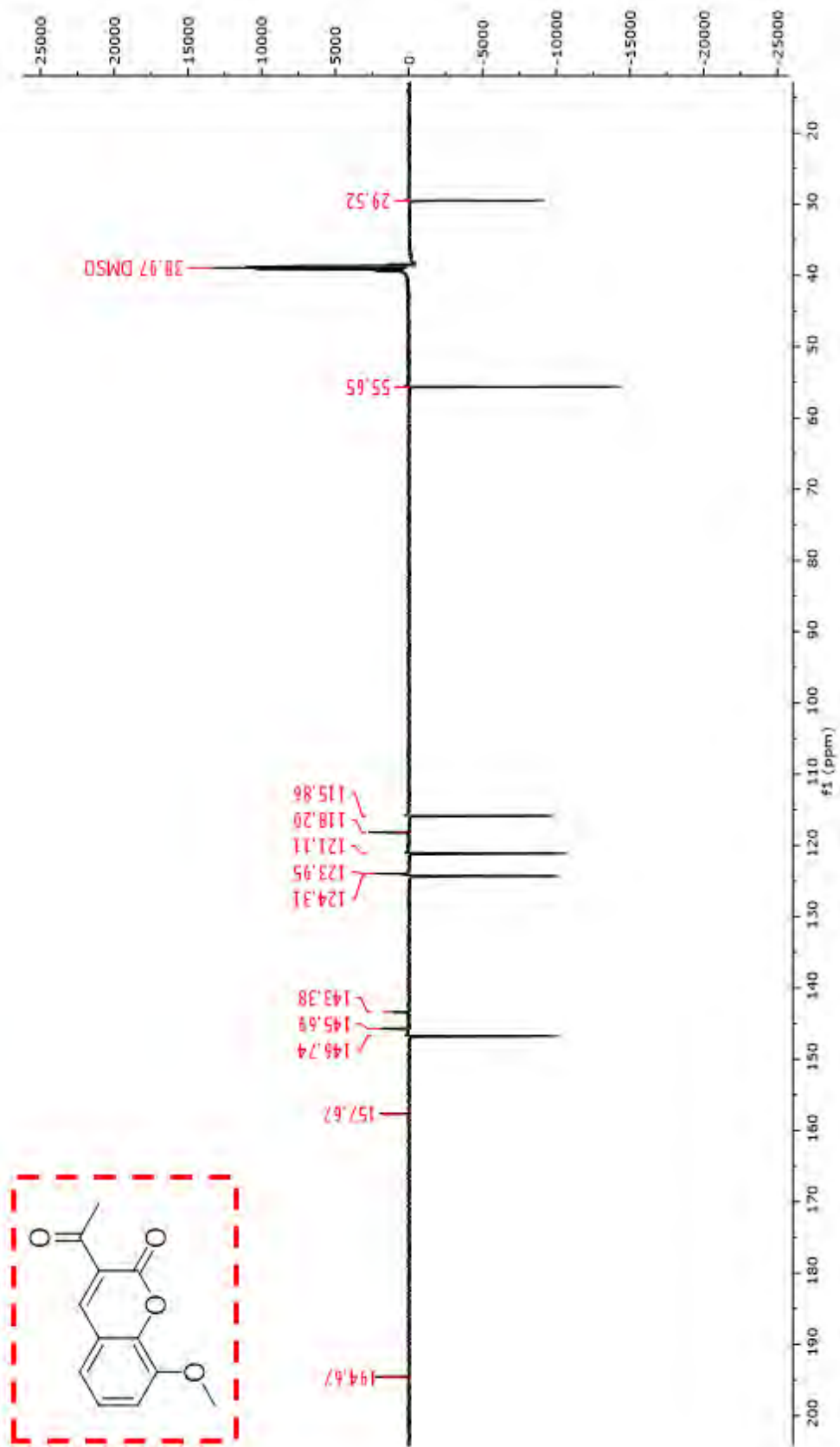
Anexo 16: Espectro de RMN ^{13}C do composto (72a) em $\text{DMSO-}d_6$ a 500 MHz.



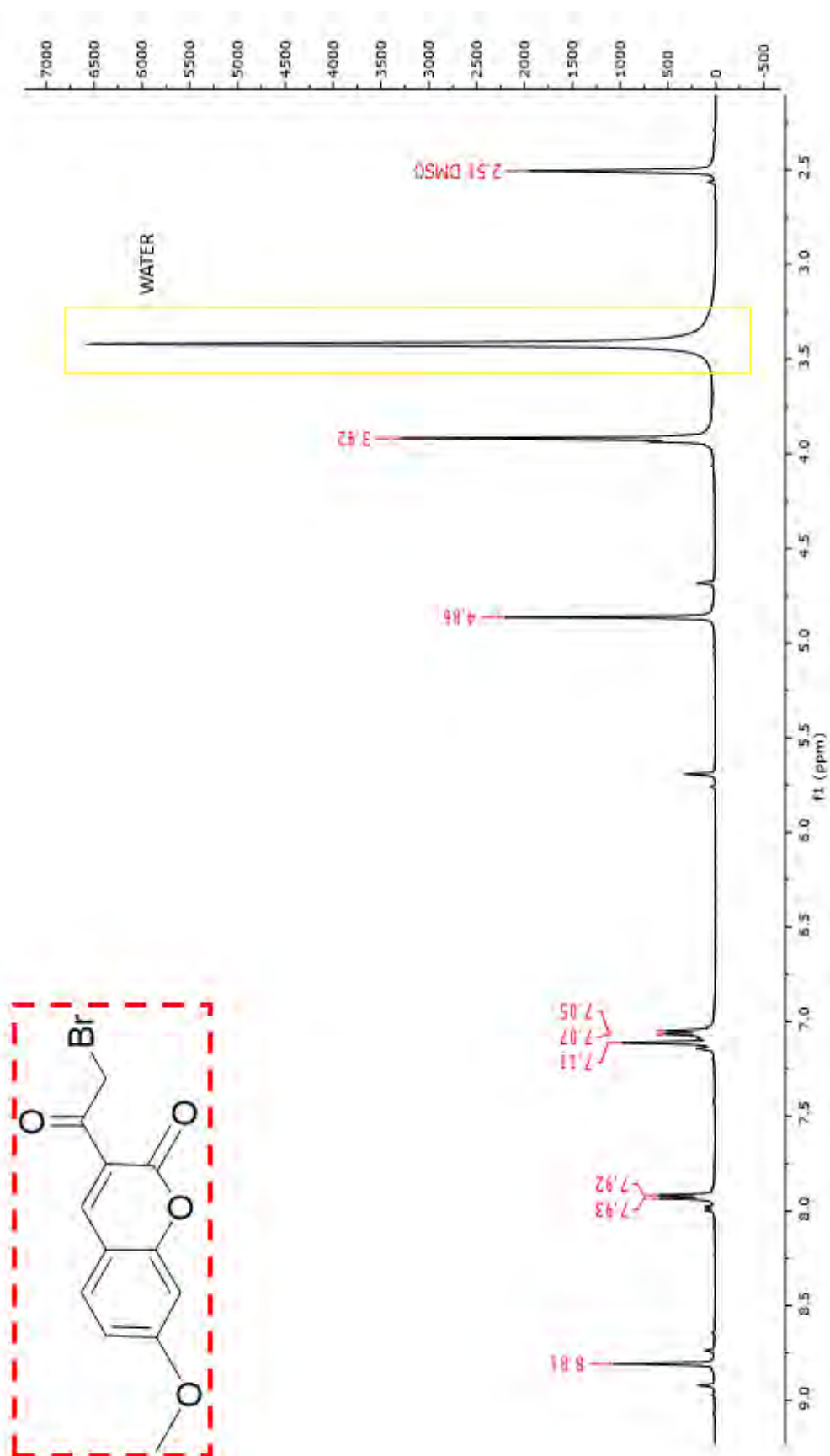
Anexo 17: Espectro de RMN ^1H do composto (72c) em DMSO- d_6 a 500 MHz.



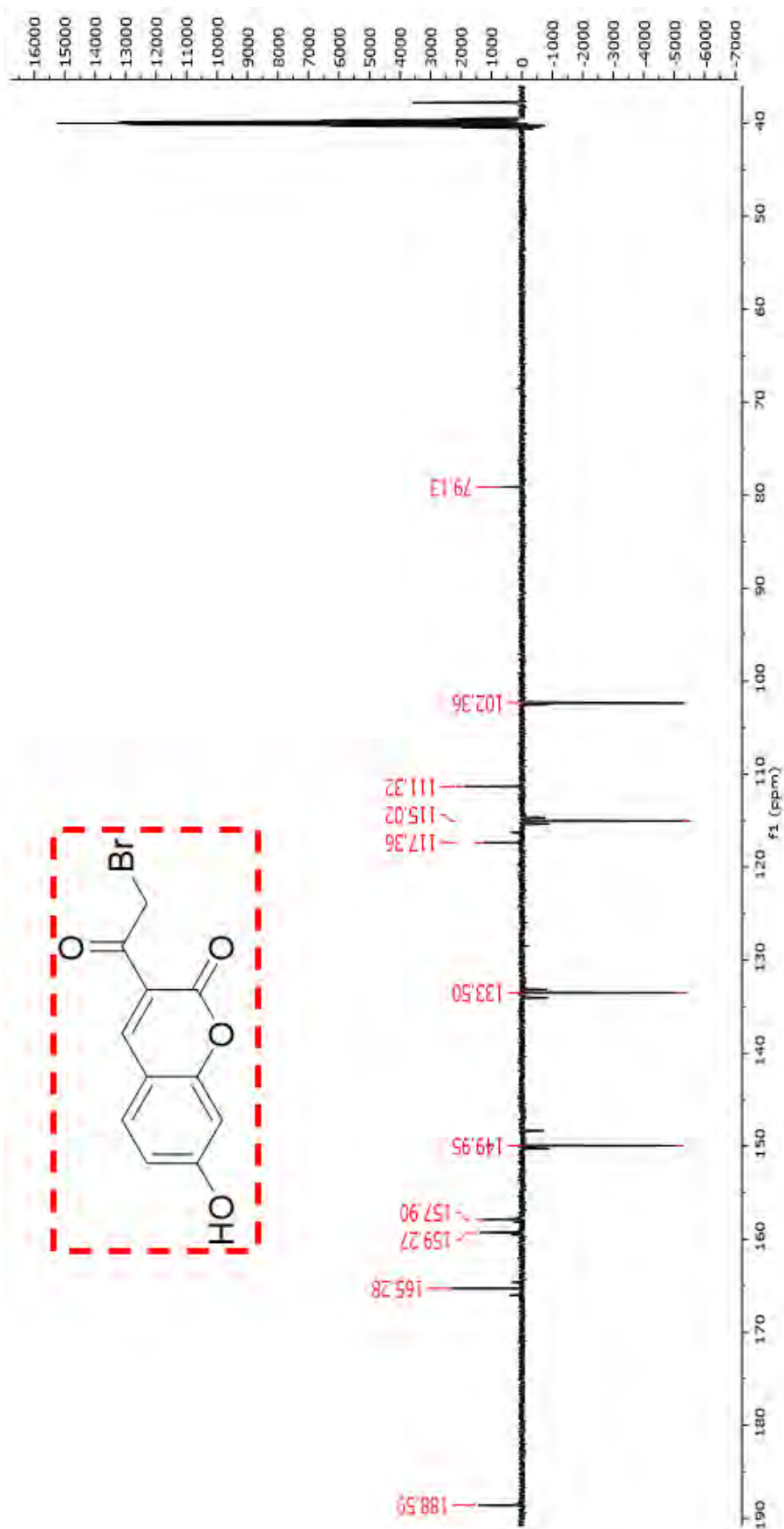
Anexo 18: Espectro de RMN ^{13}C do composto (72c) em DMSO- d_6 a 500 MHz.



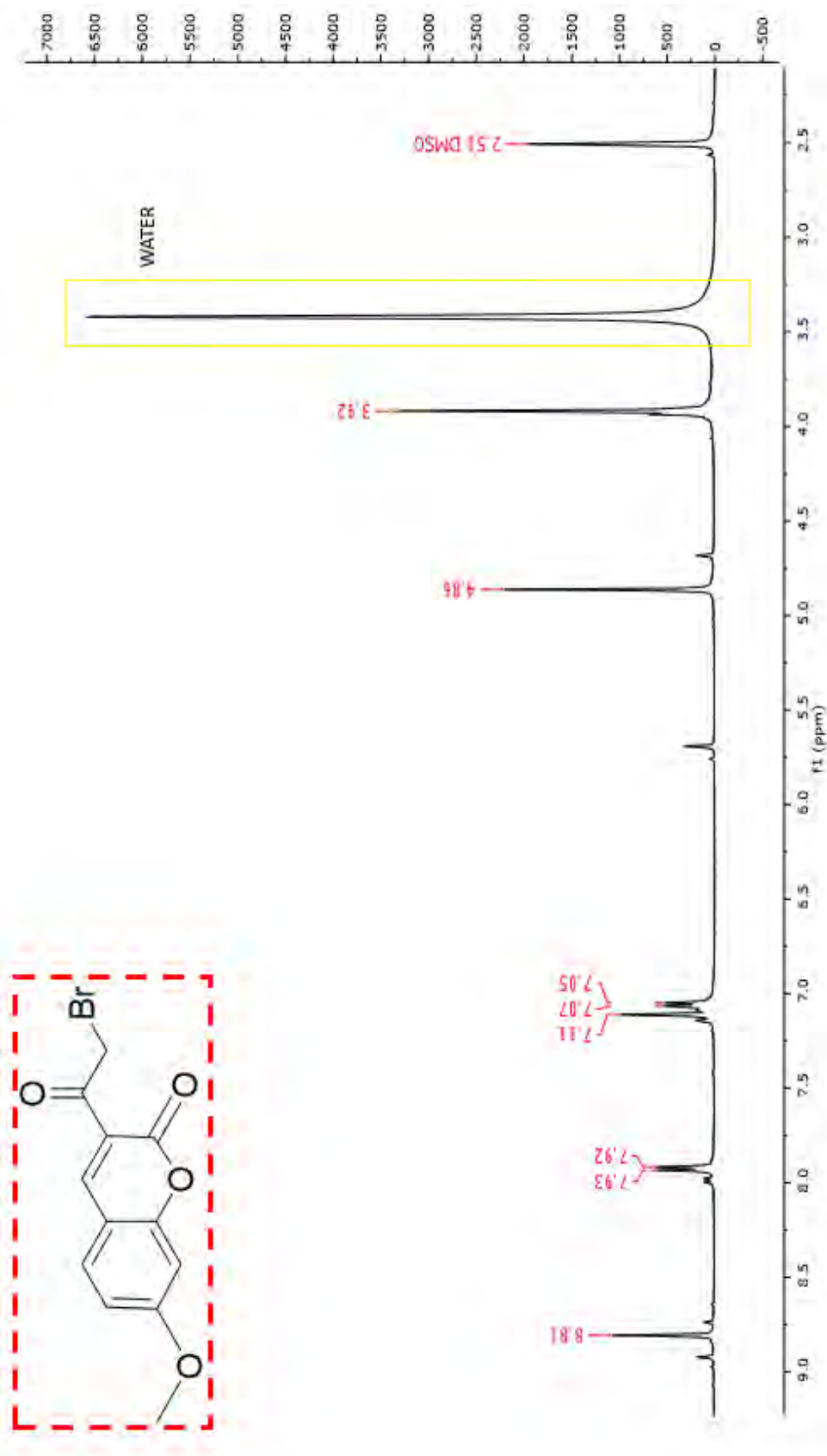
Anexo 19: Espectro de RMN ^1H do composto (74a) em DMSO- d_6 a 500 MHz.



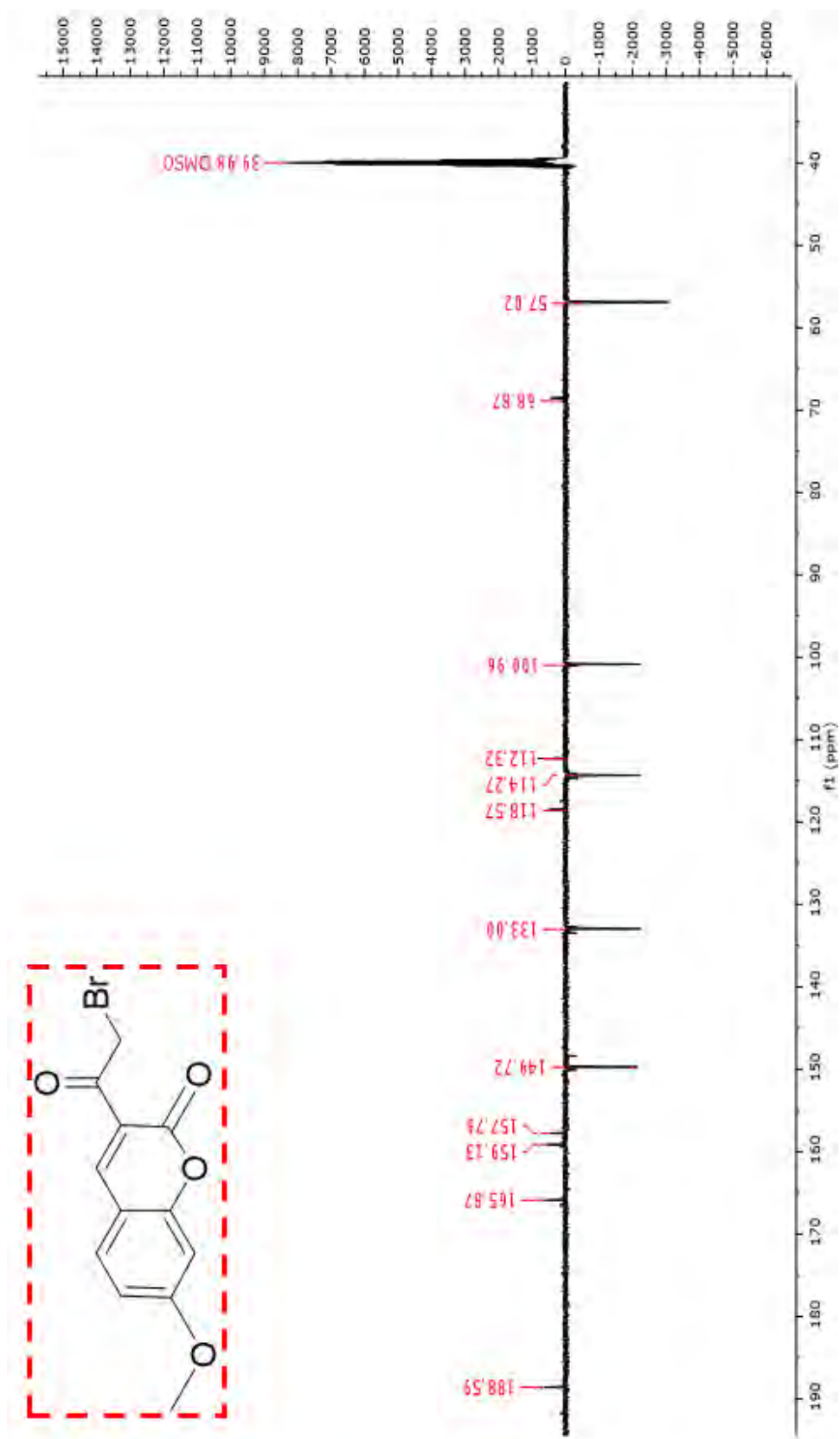
Anexo 20: Espectro de RMN ^{13}C do composto (74a) em $\text{DMSO-}d_6$ a 500 MHz.



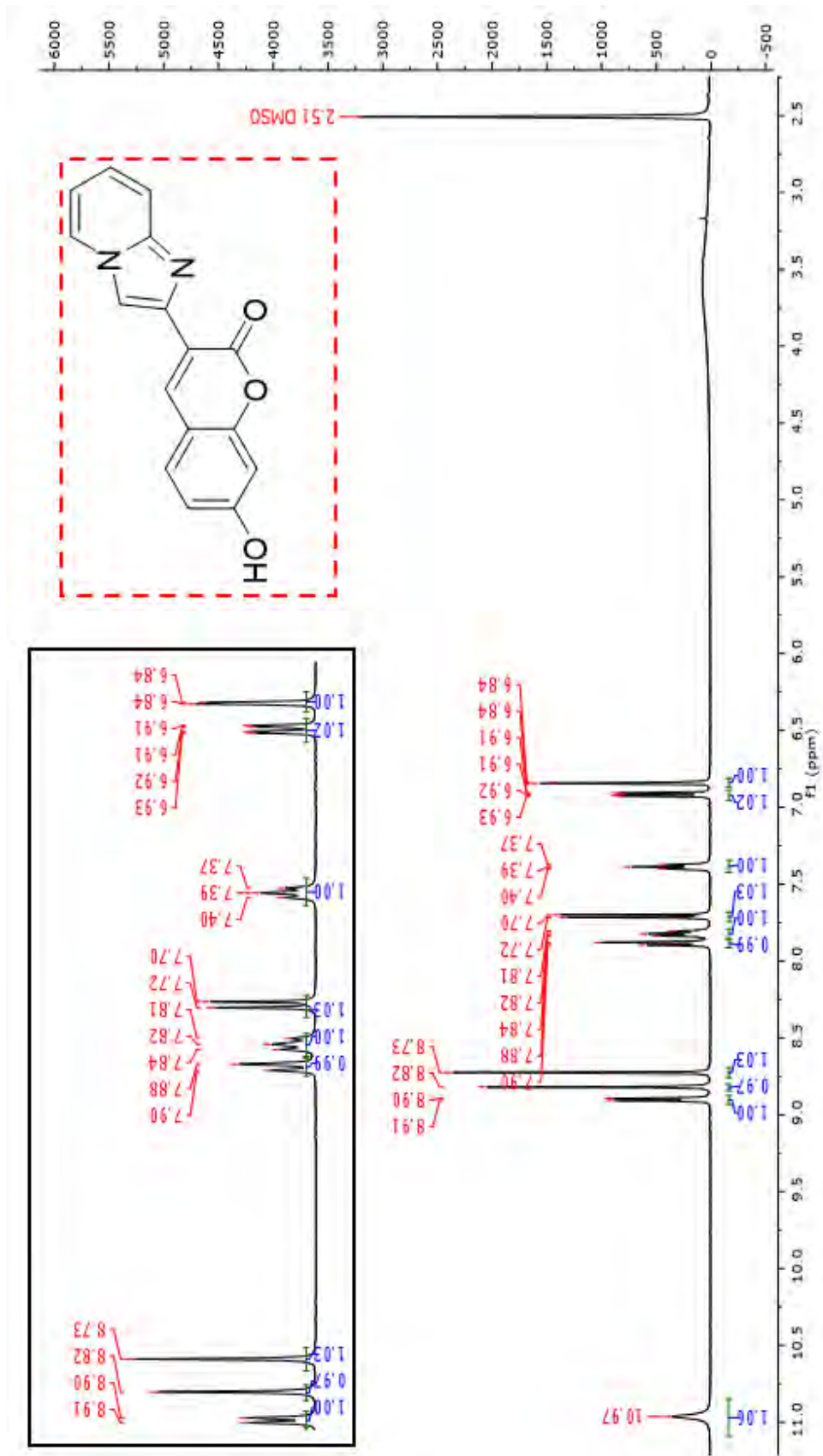
Anexo 21: Espectro de RMN ^1H do composto (74b) em DMSO- d_6 a 500 MHz.



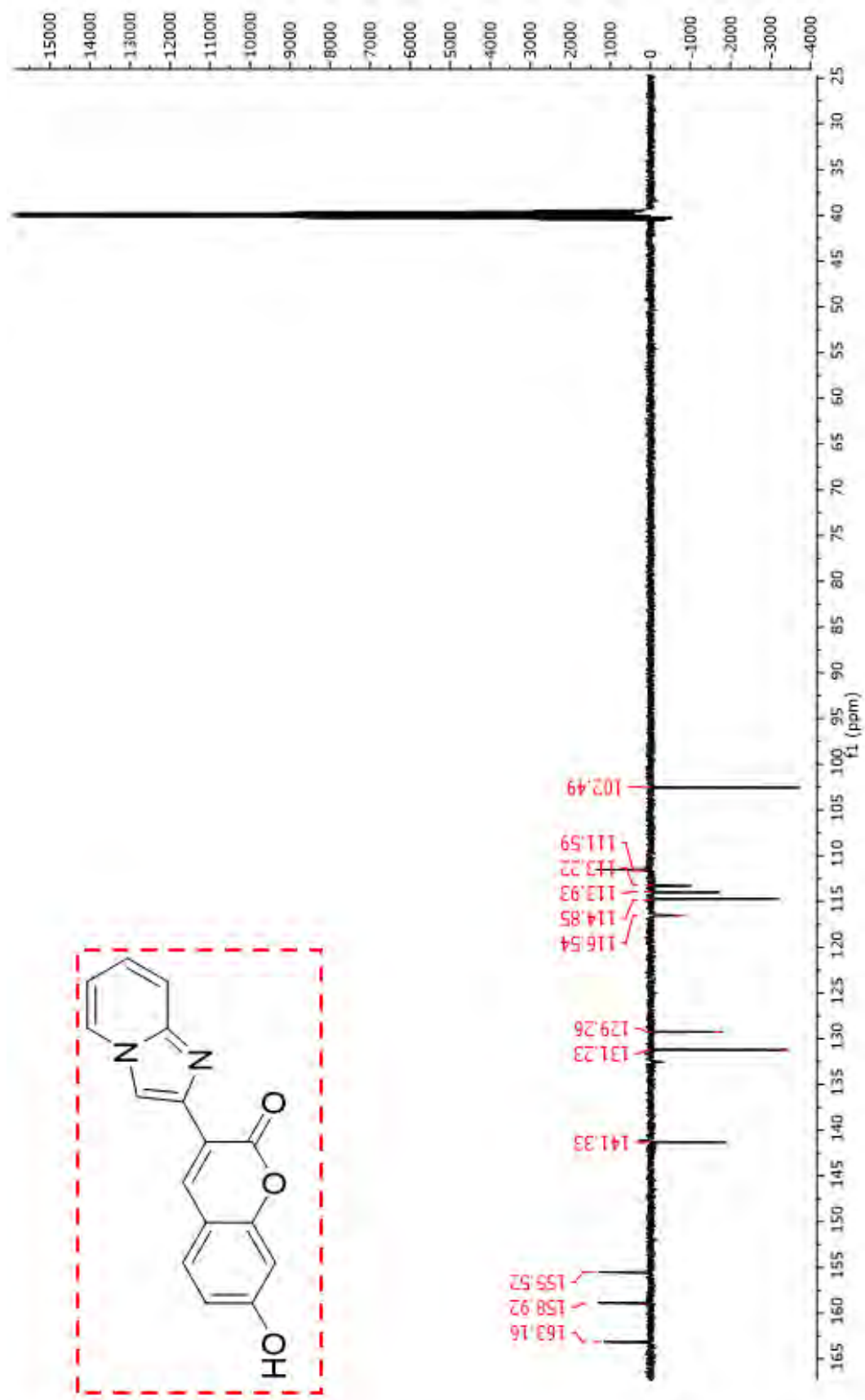
Anexo 22: Espectro de RMN ^{13}C do composto (74b) em $\text{DMSO-}d_6$ a 500 MHz.



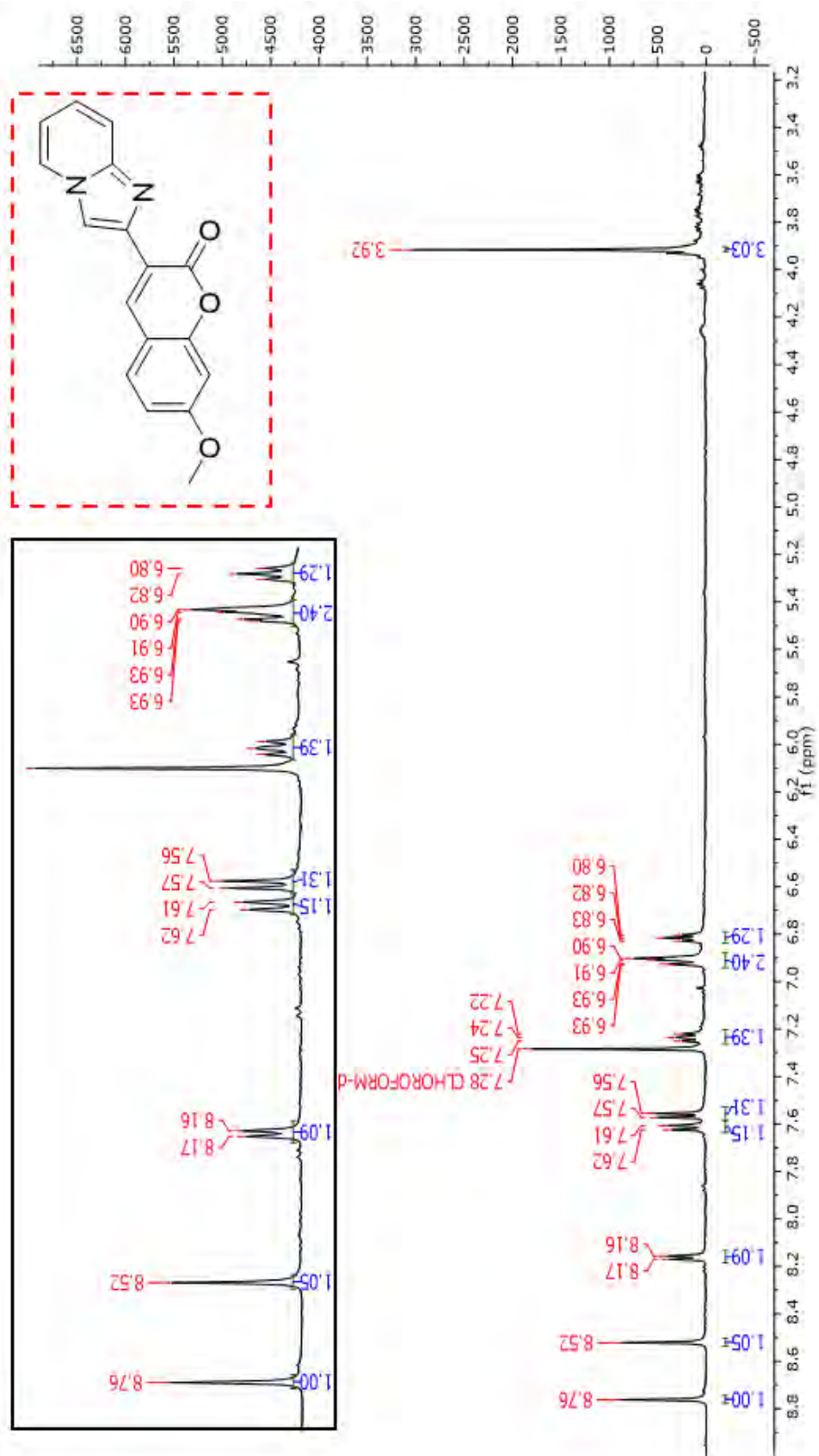
Anexo 23: Espectro de RMN ^1H do composto (77a) em DMSO- d_6 a 500 MHz.



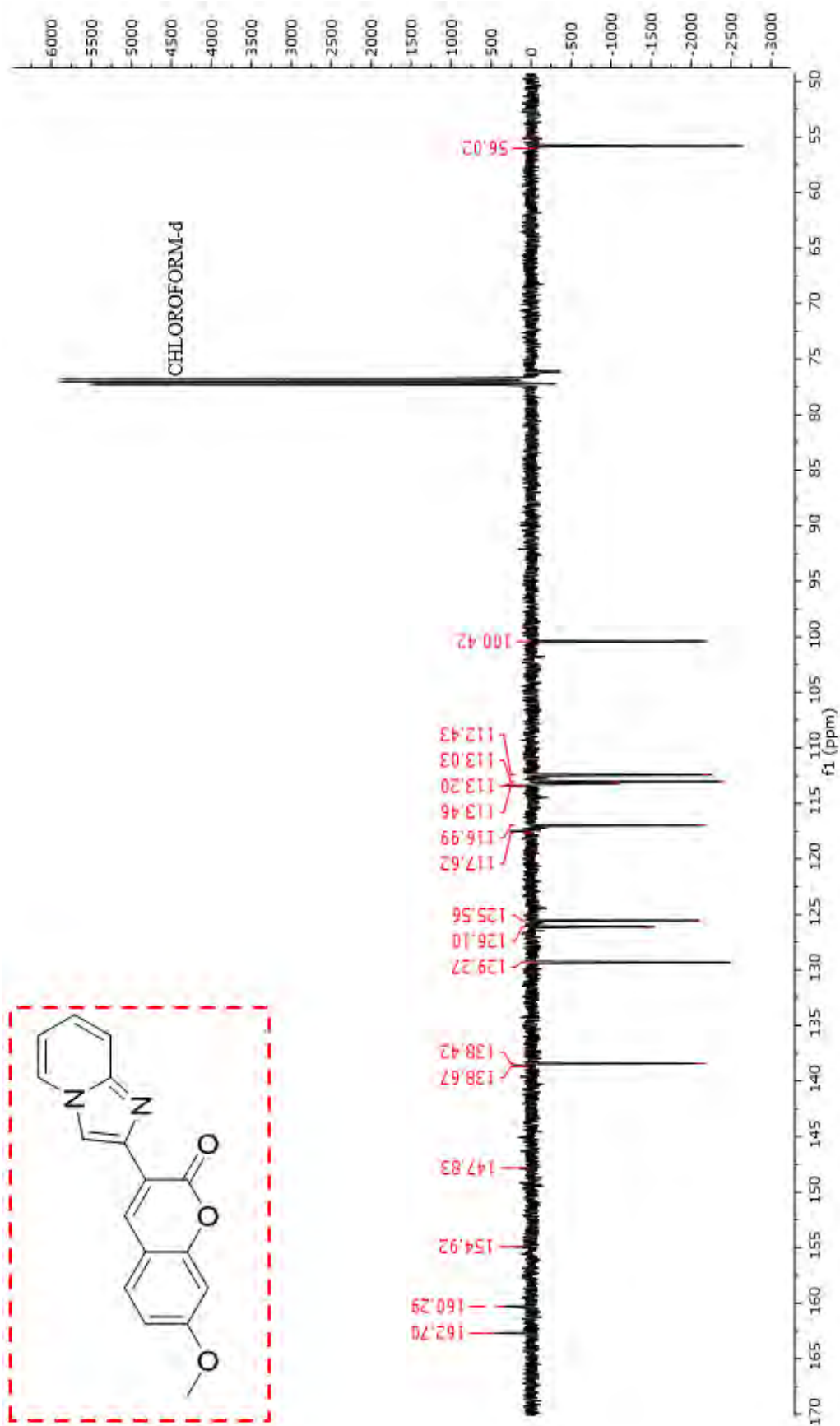
Anexo 24: Espectro de RMN ^{13}C do composto (77a) em DMSO- d_6 a 500 MHz.



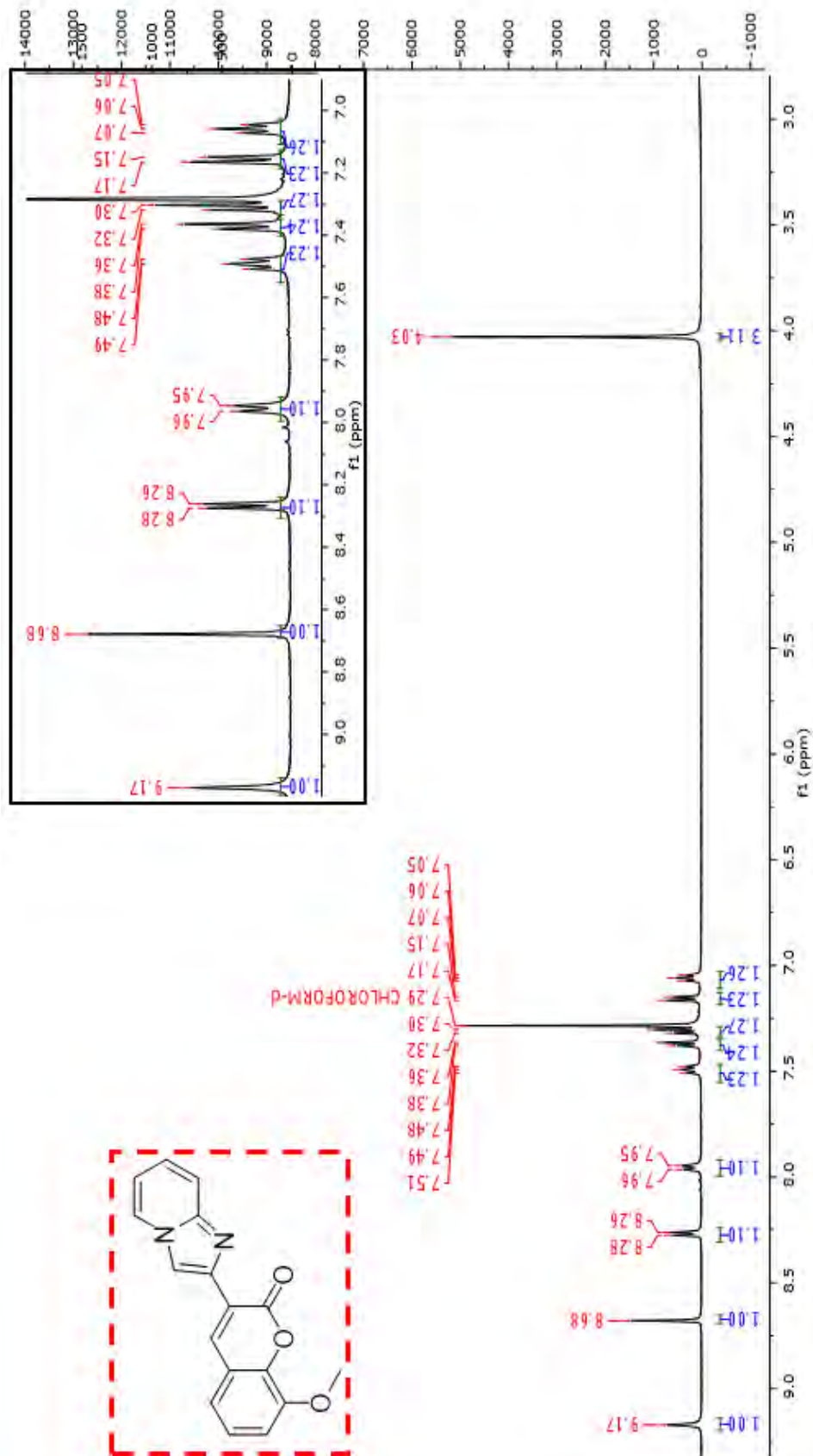
Anexo 25: Espectro de RMN ^1H do composto (77b) em DMSO- d_6 a 500 MHz.



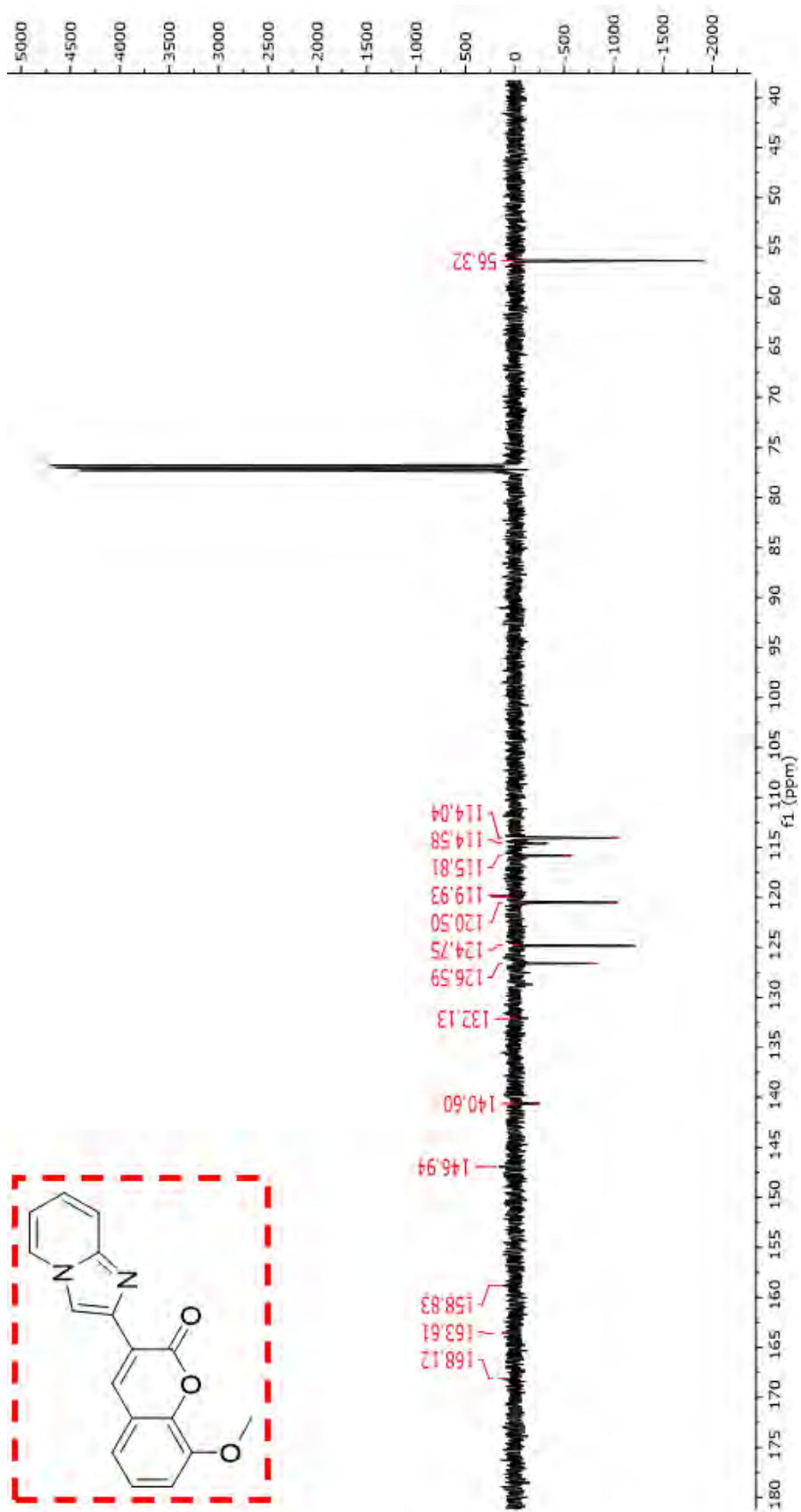
Anexo 26: Espectro de RMN ^{13}C do composto (77b) em $\text{DMSO-}d_6$ a 500 MHz.



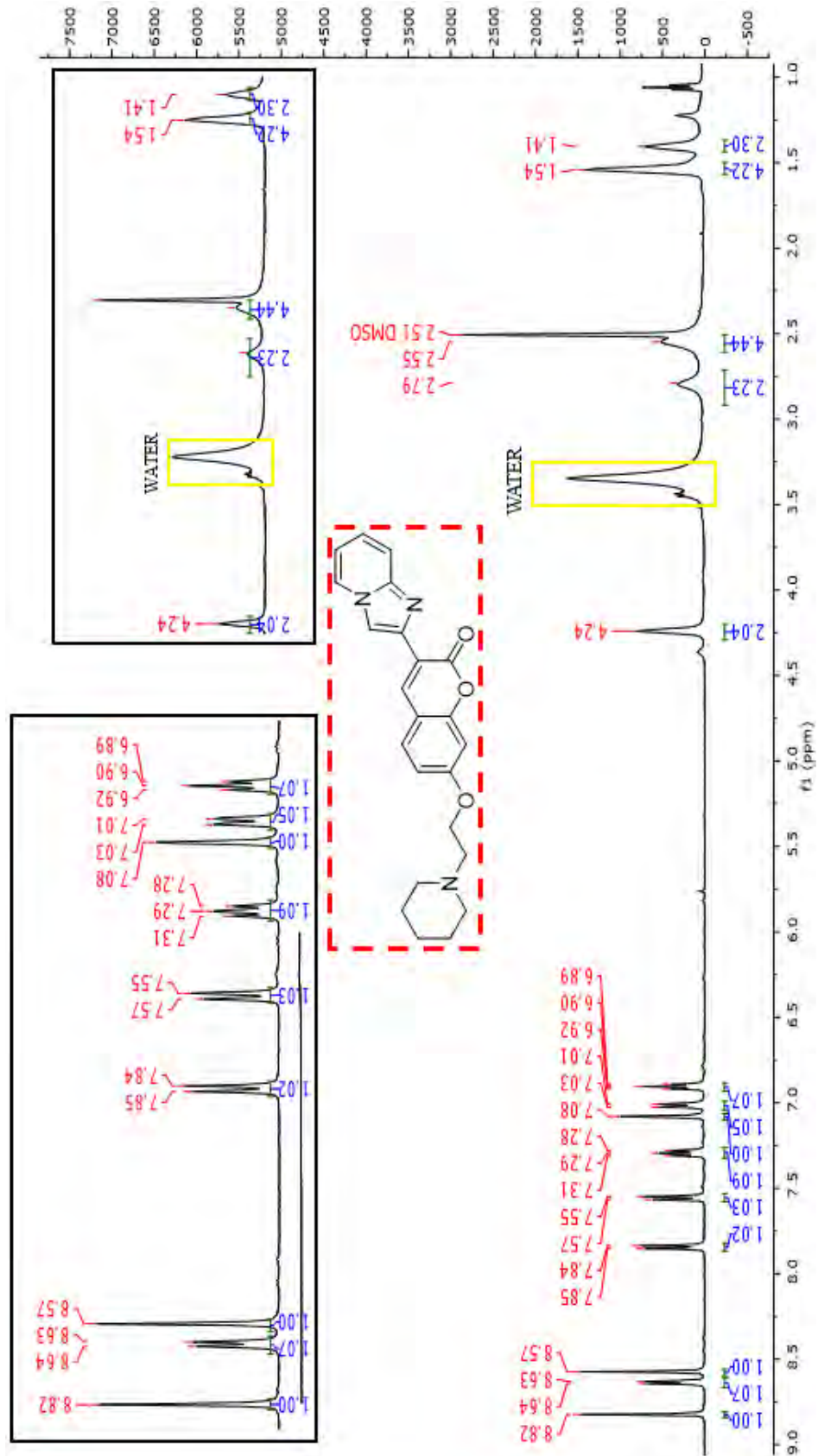
Anexo 27: Espectro de RMN ^1H do composto (77c) em $\text{DMSO-}d_6$ a 500 MHz.



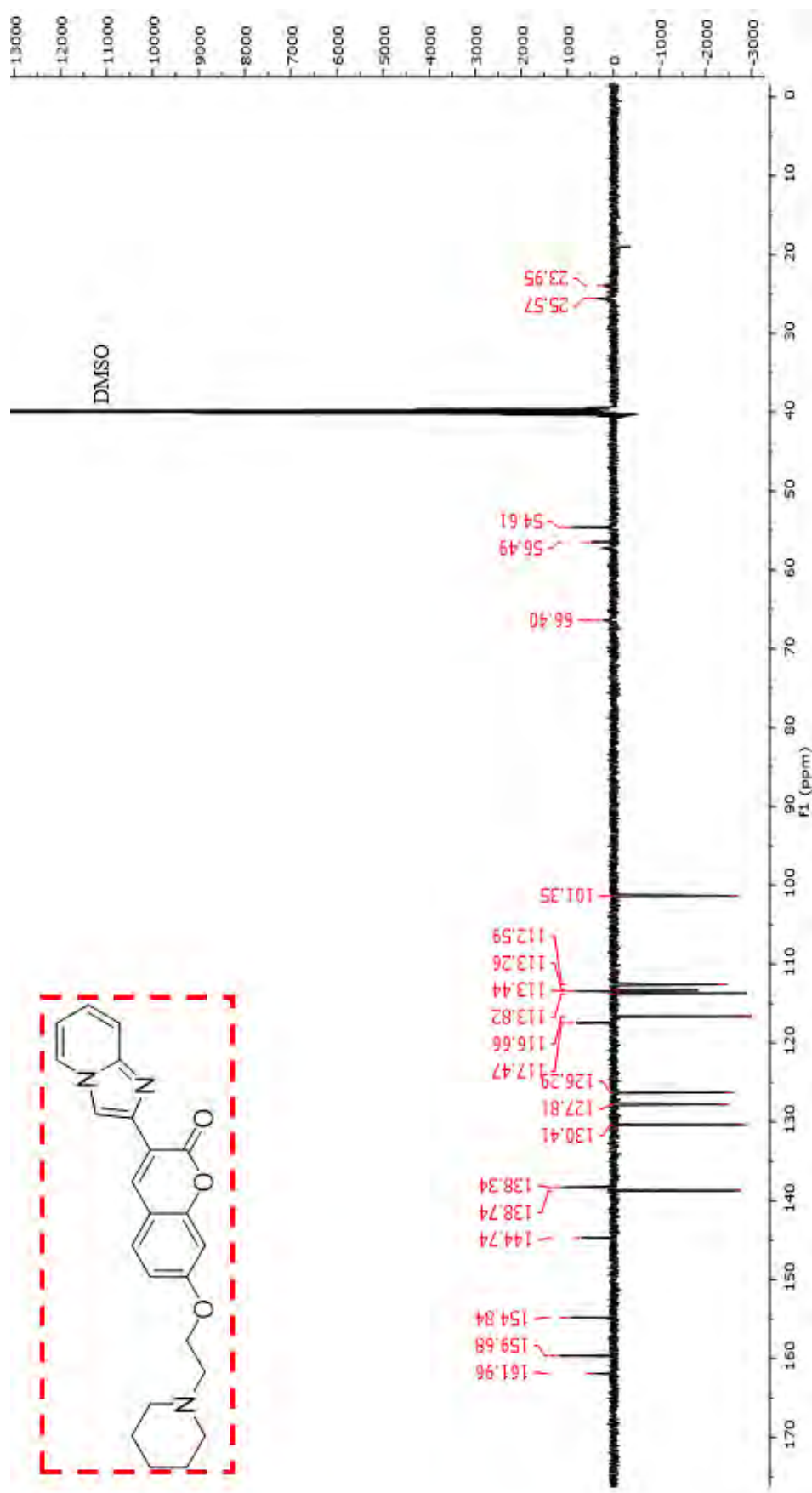
Anexo 28: Espectro de RMN ^{13}C do composto (77c) em $\text{DMSO-}d_6$ a 500 MHz.



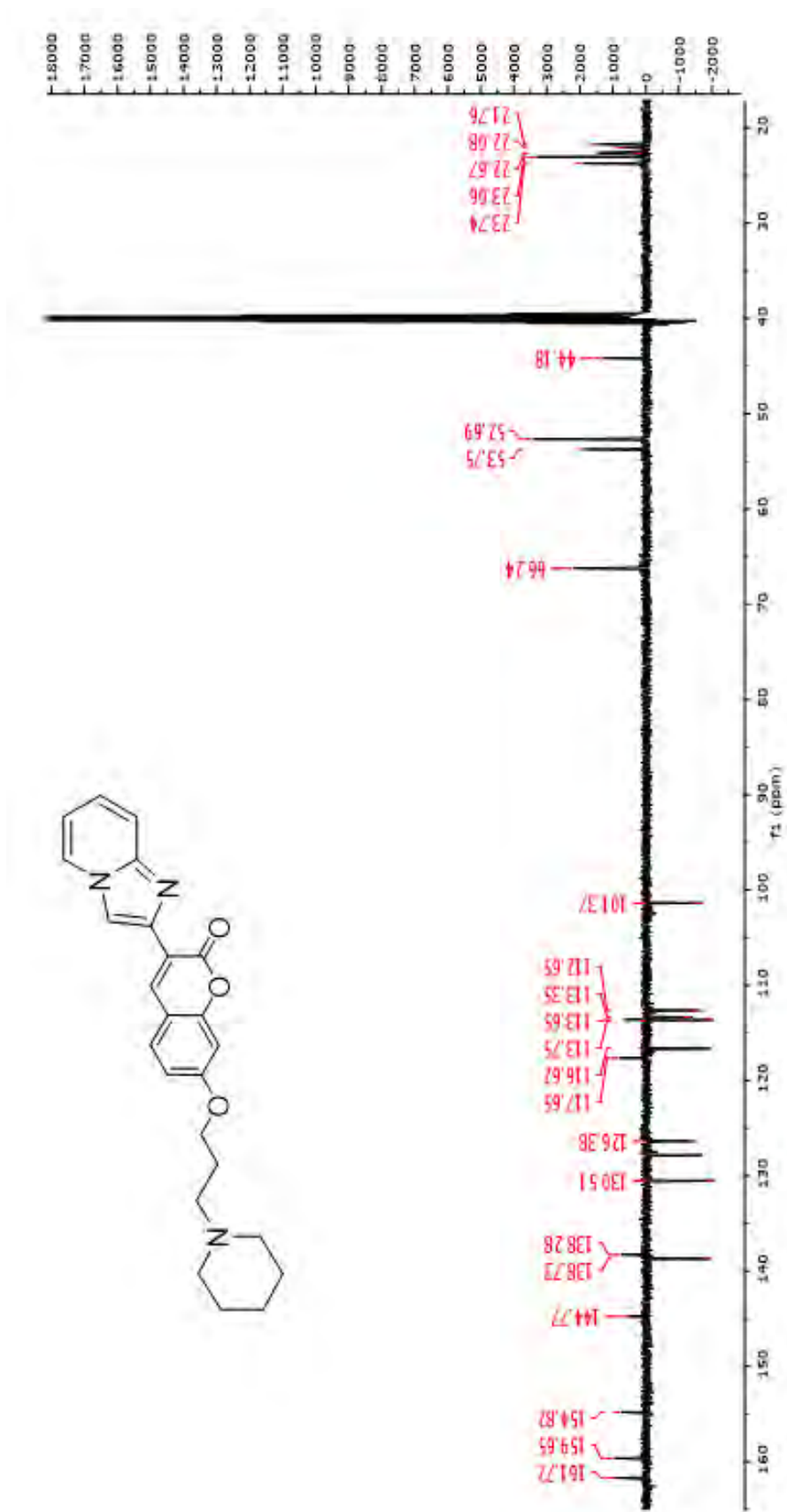
Anexo 29: Espectro de RMN ^1H do composto (66a) em DMSO- d_6 a 500 MHz.



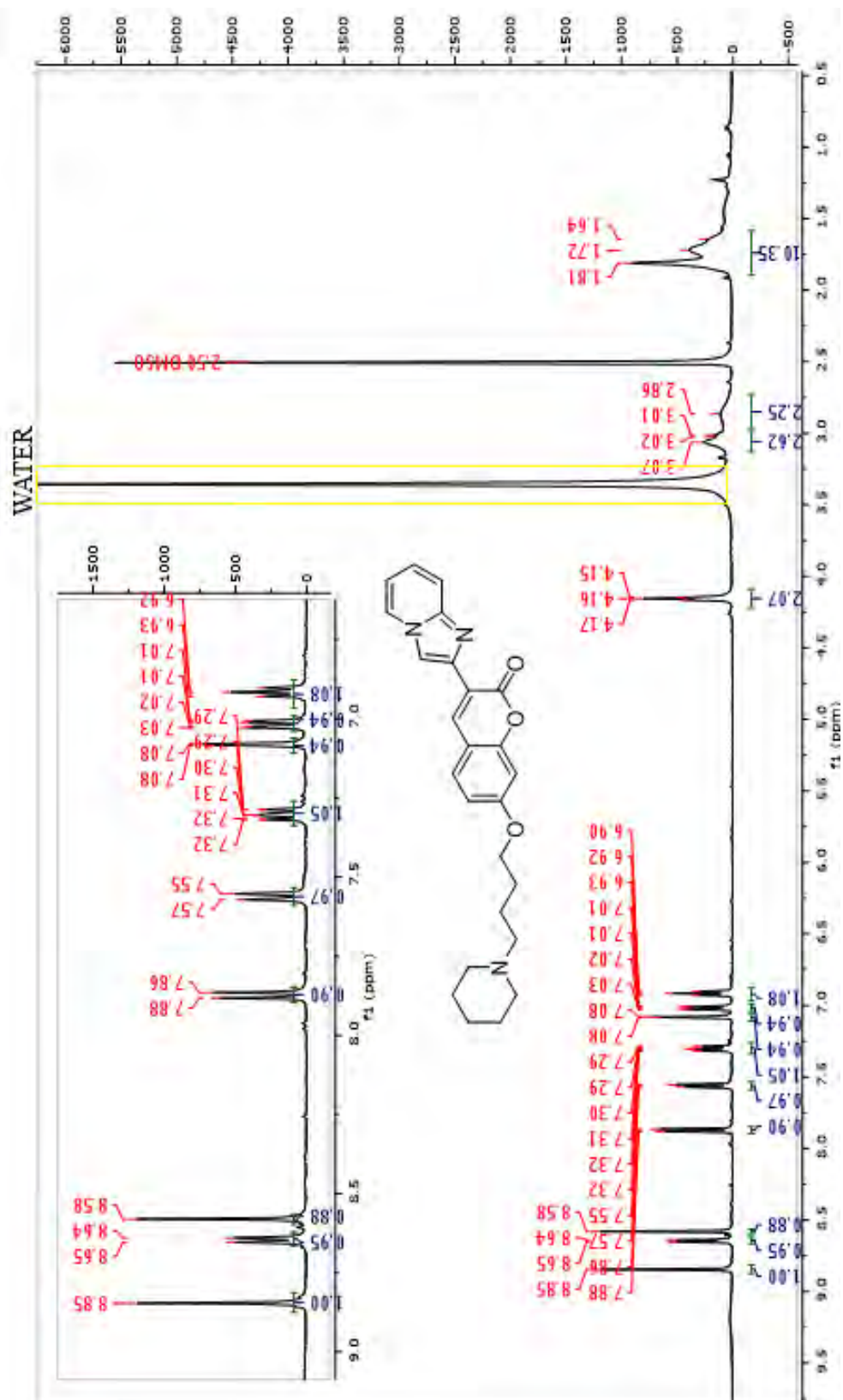
Anexo 30: Espectro de RMN ^{13}C do composto (66a) em DMSO- d_6 a 500 MHz.



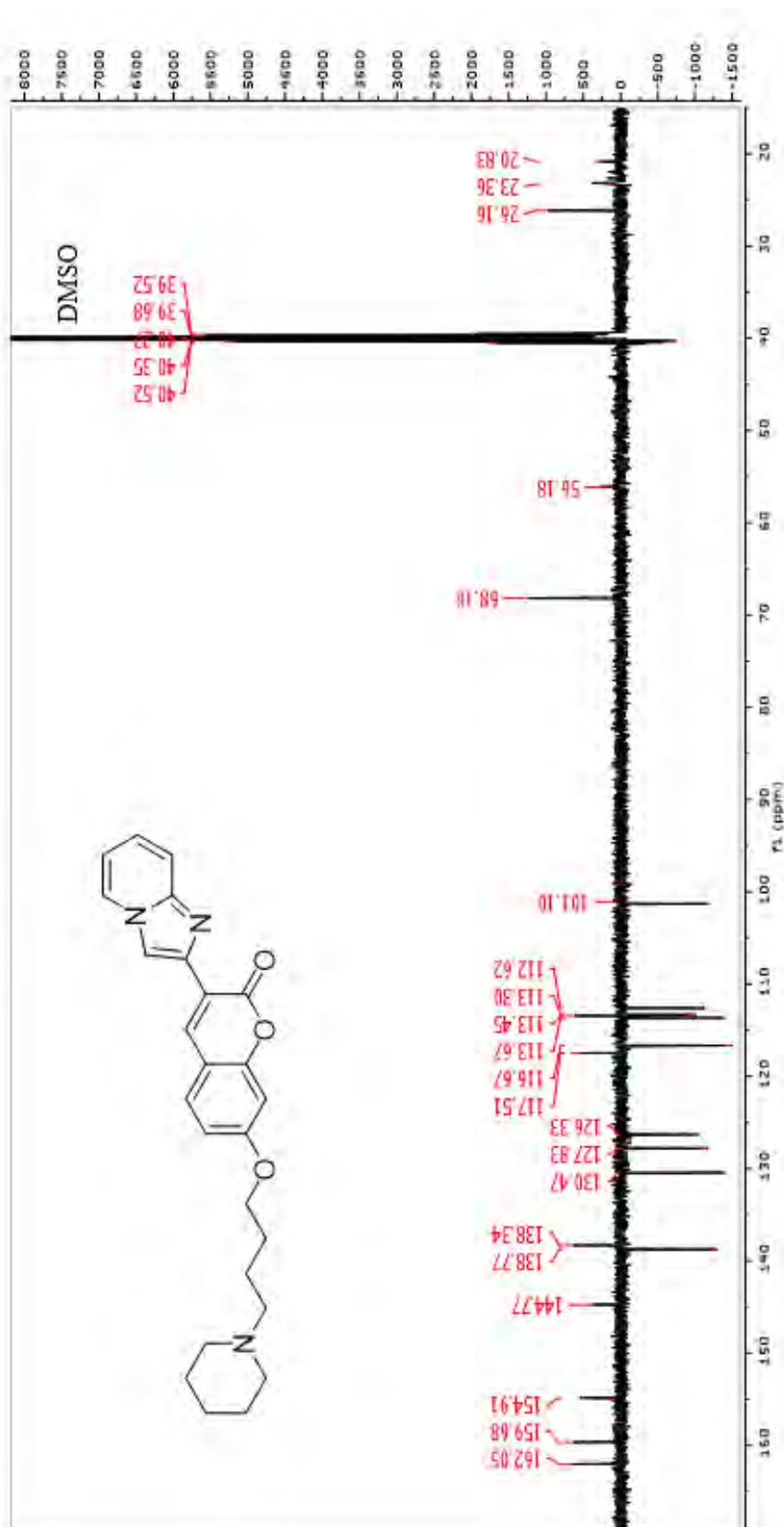
Anexo 32: Espectro de RMN ^{13}C do composto (66b) em $\text{DMSO-}d_6$ a 500 MHz.



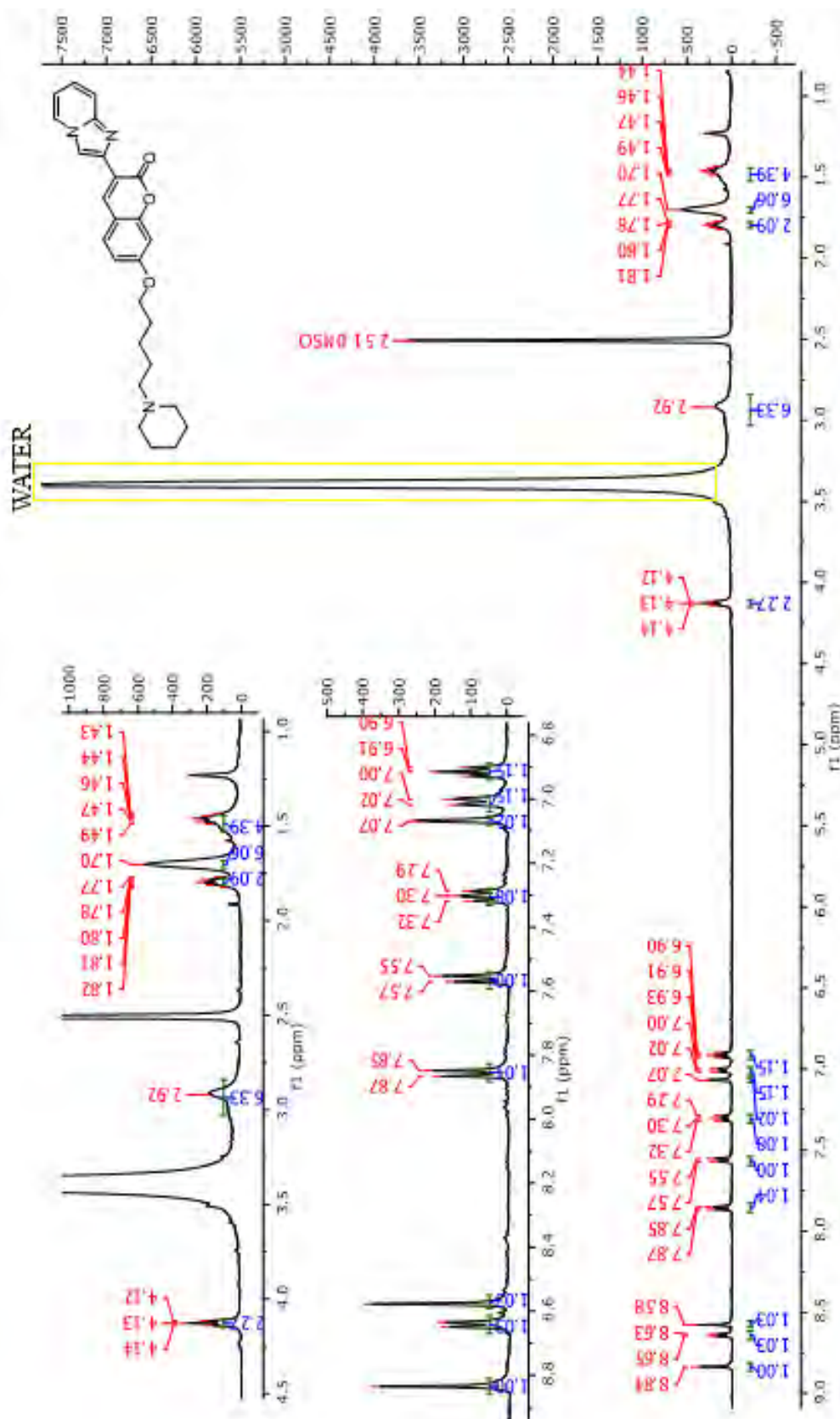
Anexo 33: Espectro de RMN ^1H do composto (66c) em $\text{DMSO-}d_6$ a 500 MHz.



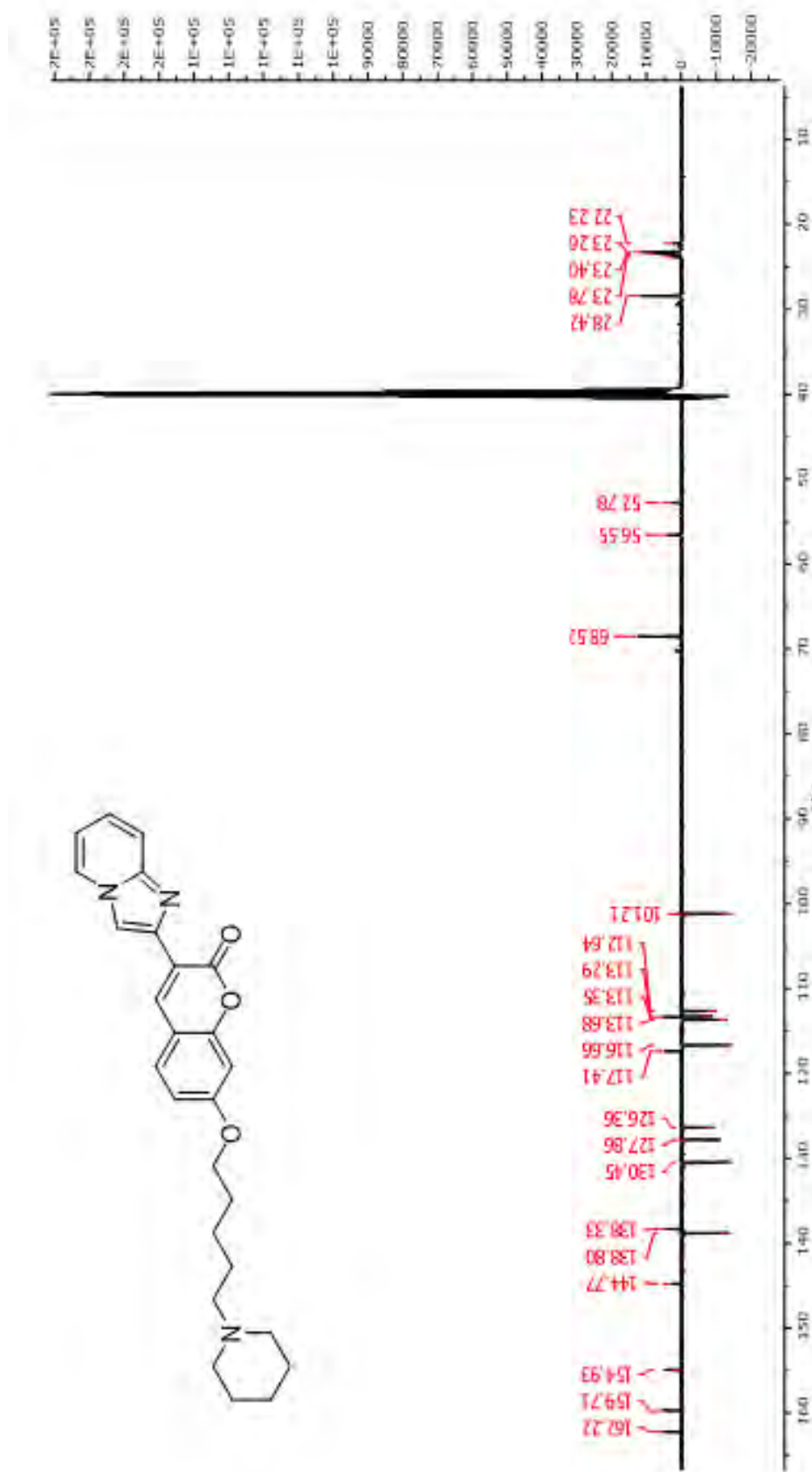
Anexo 34: Espectro de RMN ¹³C do composto (66c) em DMSO-*d*₆ a 500 MHz.



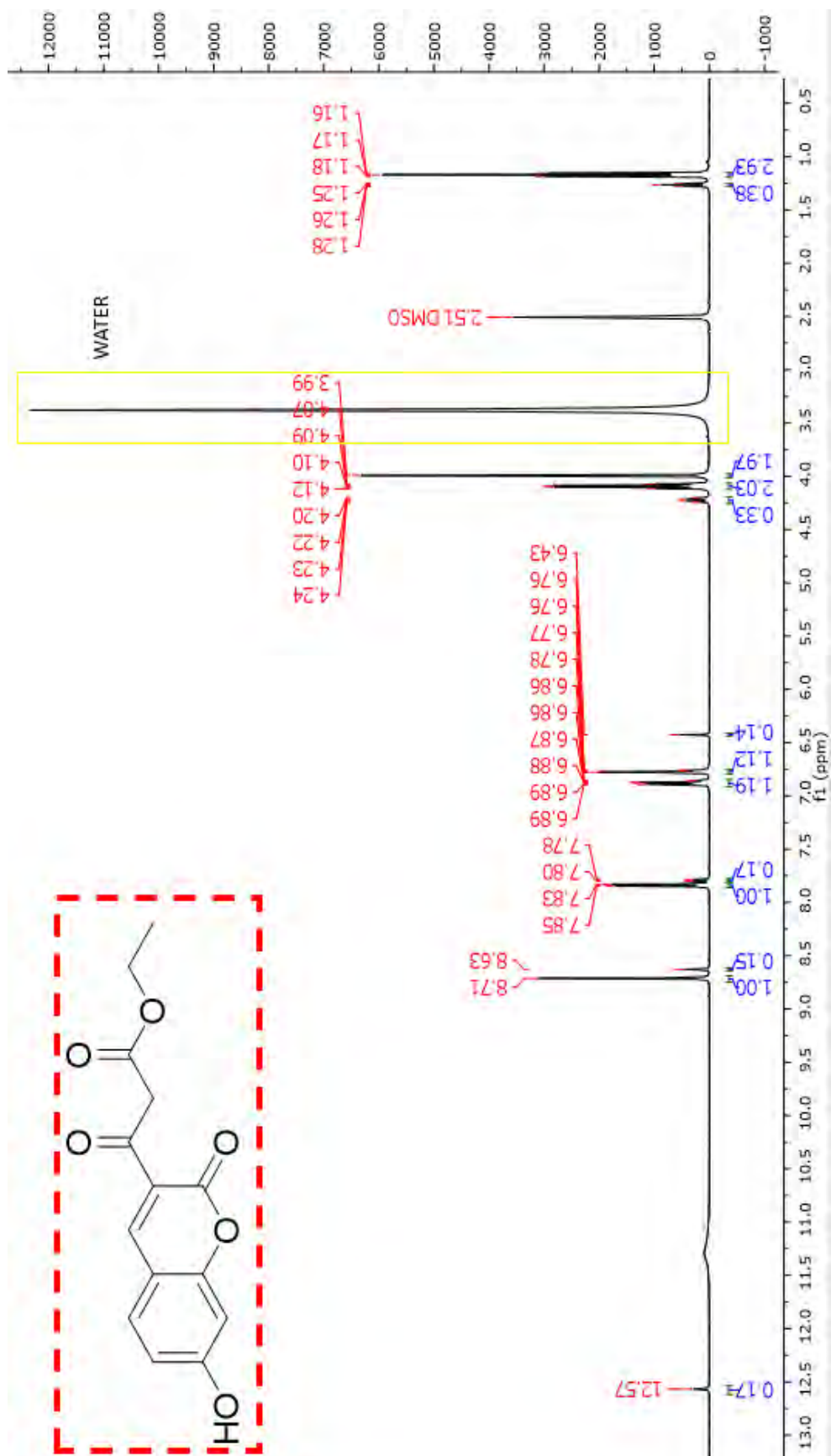
Anexo 35: Espectro de RMN ^1H do composto (66d) em DMSO- d_6 a 500 MHz.



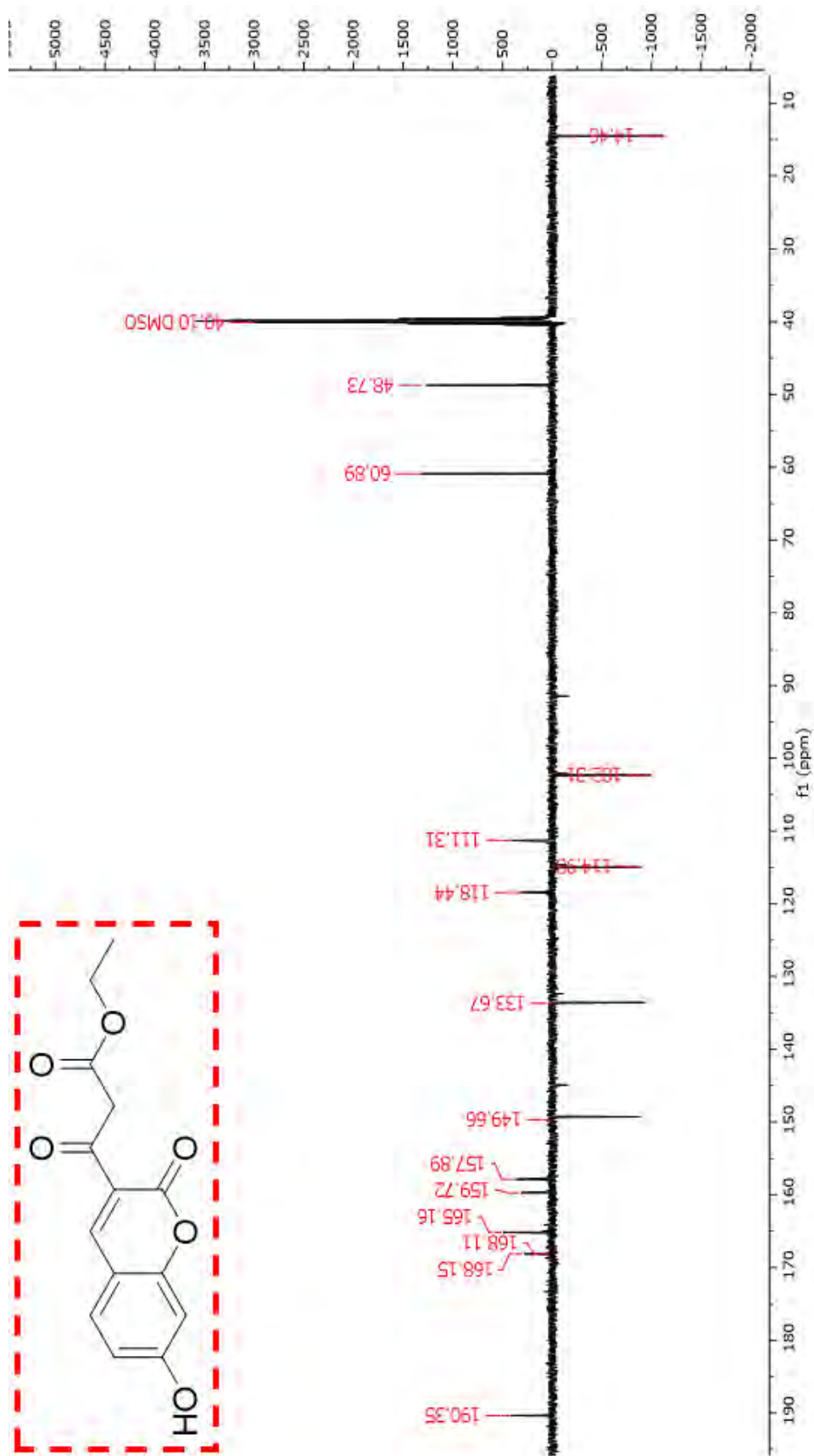
Anexo 36: Espectro de RMN ^{13}C do composto (66d) em $\text{DMSO-}d_6$ a 500 MHz.



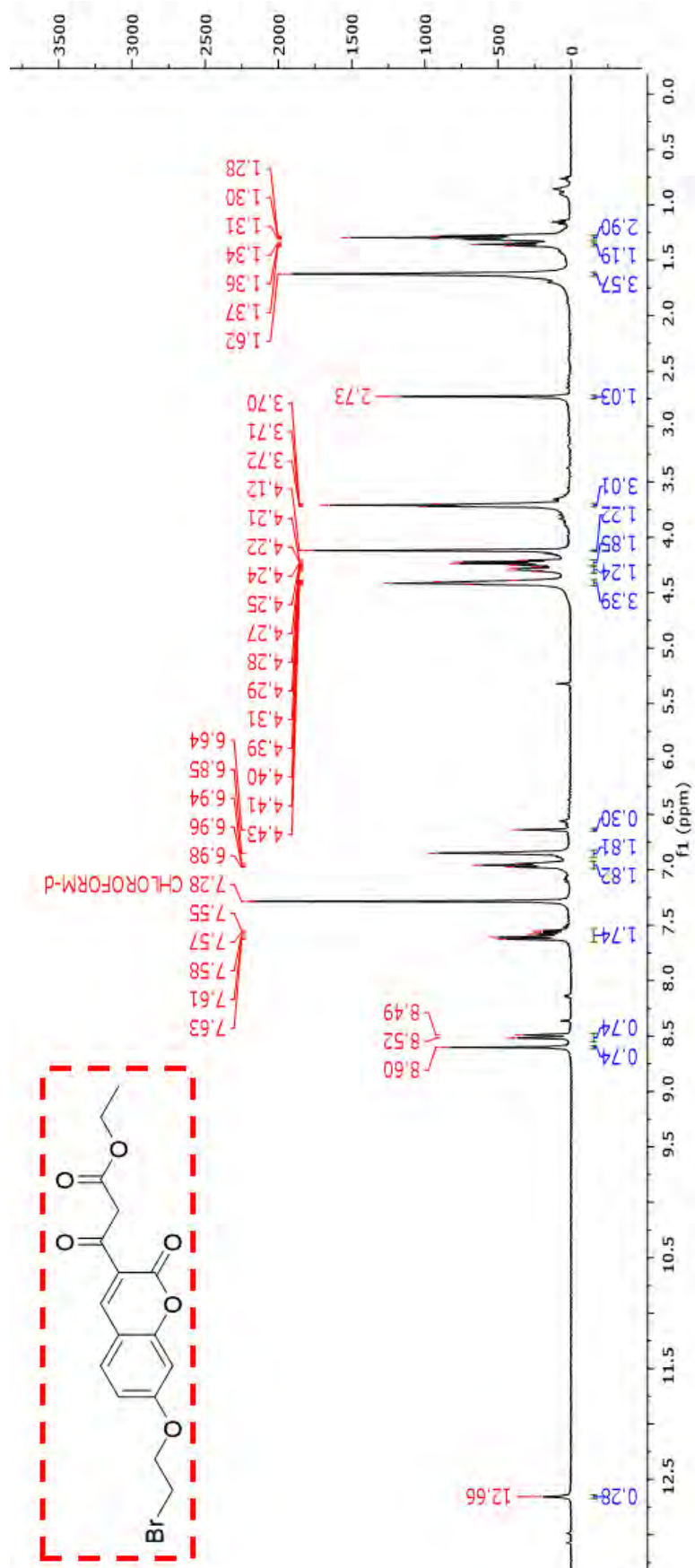
Anexo 37: Espectro de RMN ^1H do composto (89) em $\text{DMSO-}d_6$ a 500 MHz.



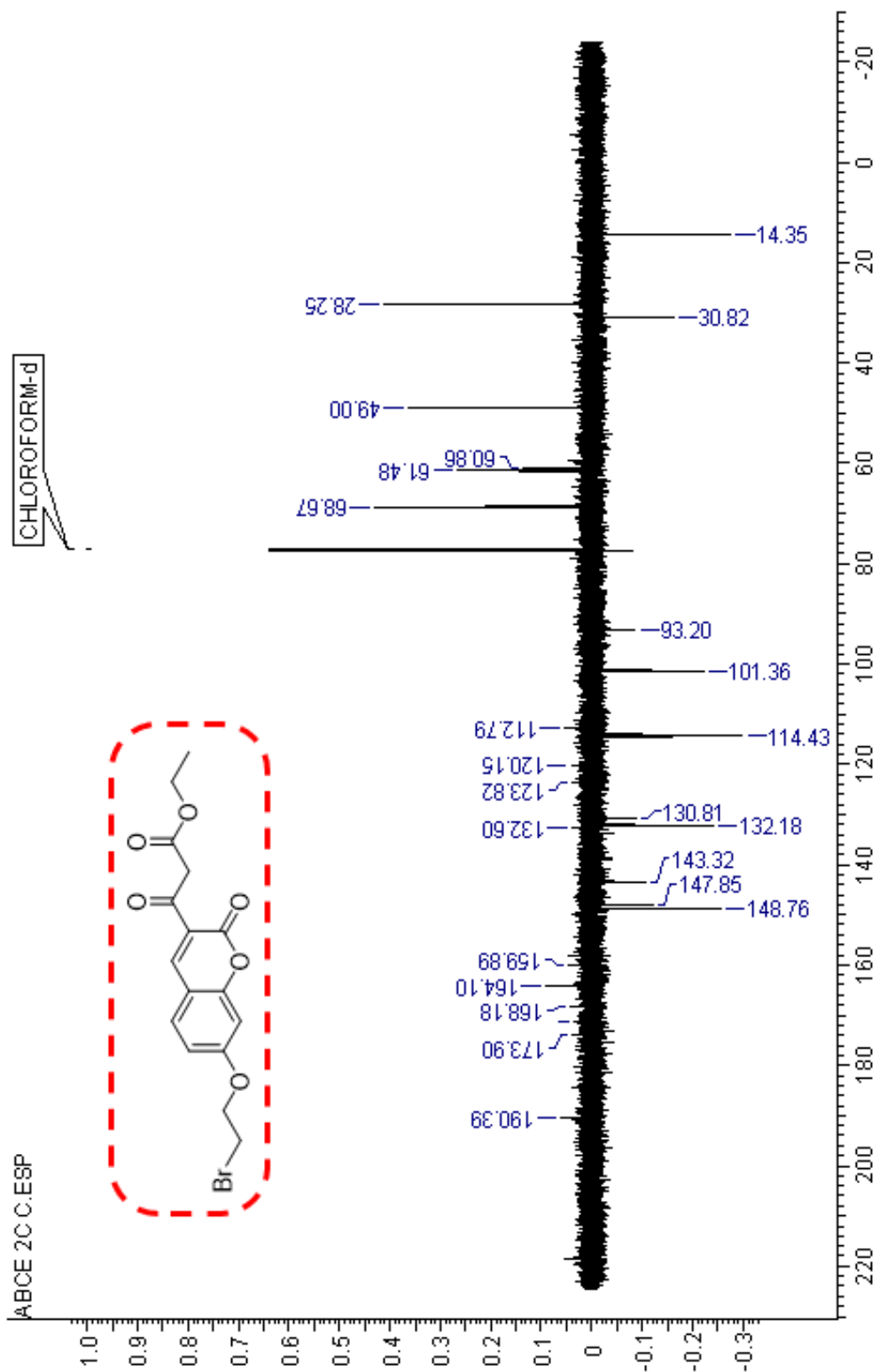
Anexo 38: Espectro de RMN ^{13}C do composto (89) em DMSO- d_6 a 500 MHz



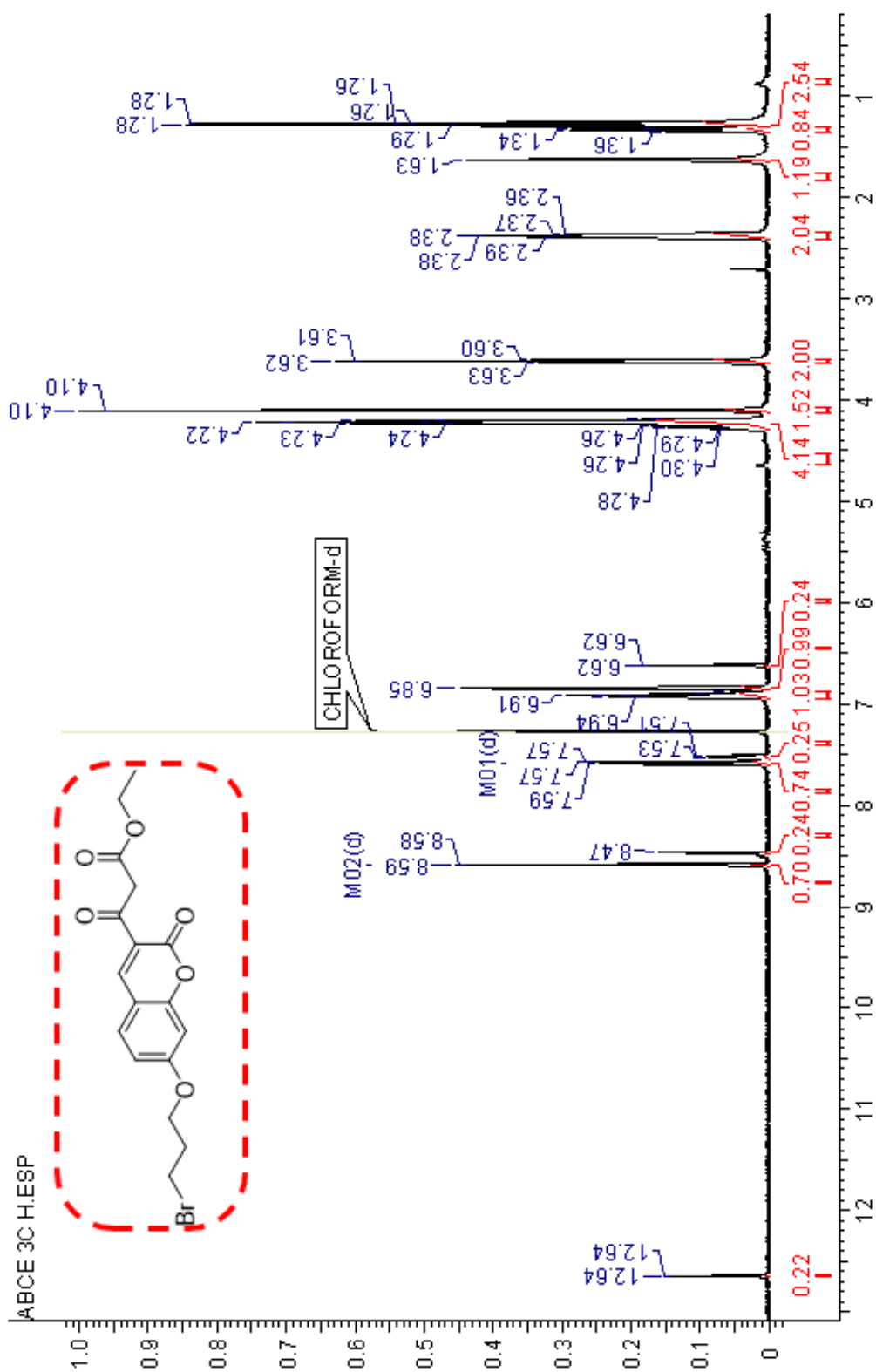
Anexo 39: Espectro de RMN ^1H do composto (93a) em CDCl_3 a 400 MHz



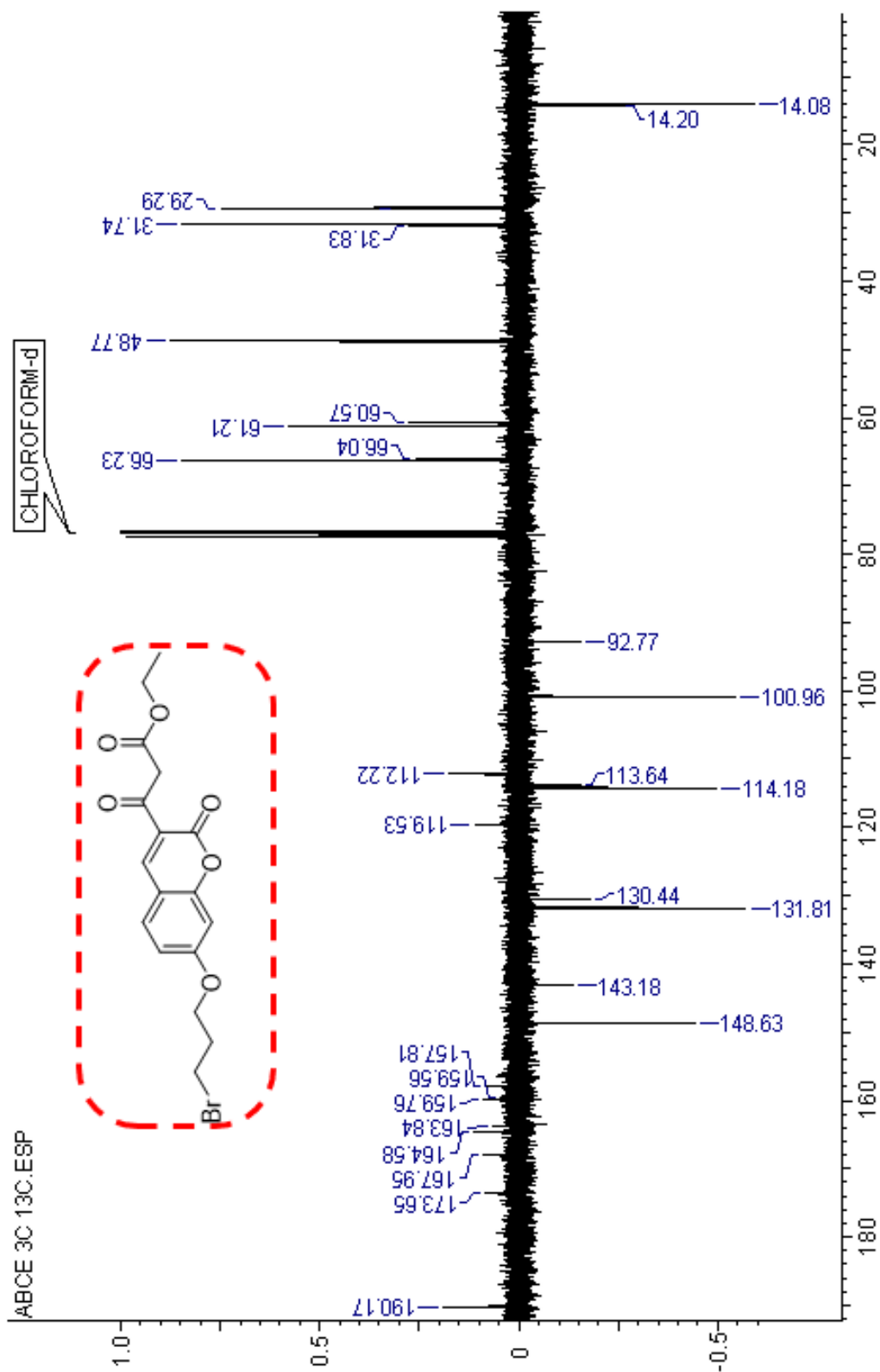
Anexo 40: Espectro de RMN ¹³C do composto (93a) em CDCl₃ a 400 MHz



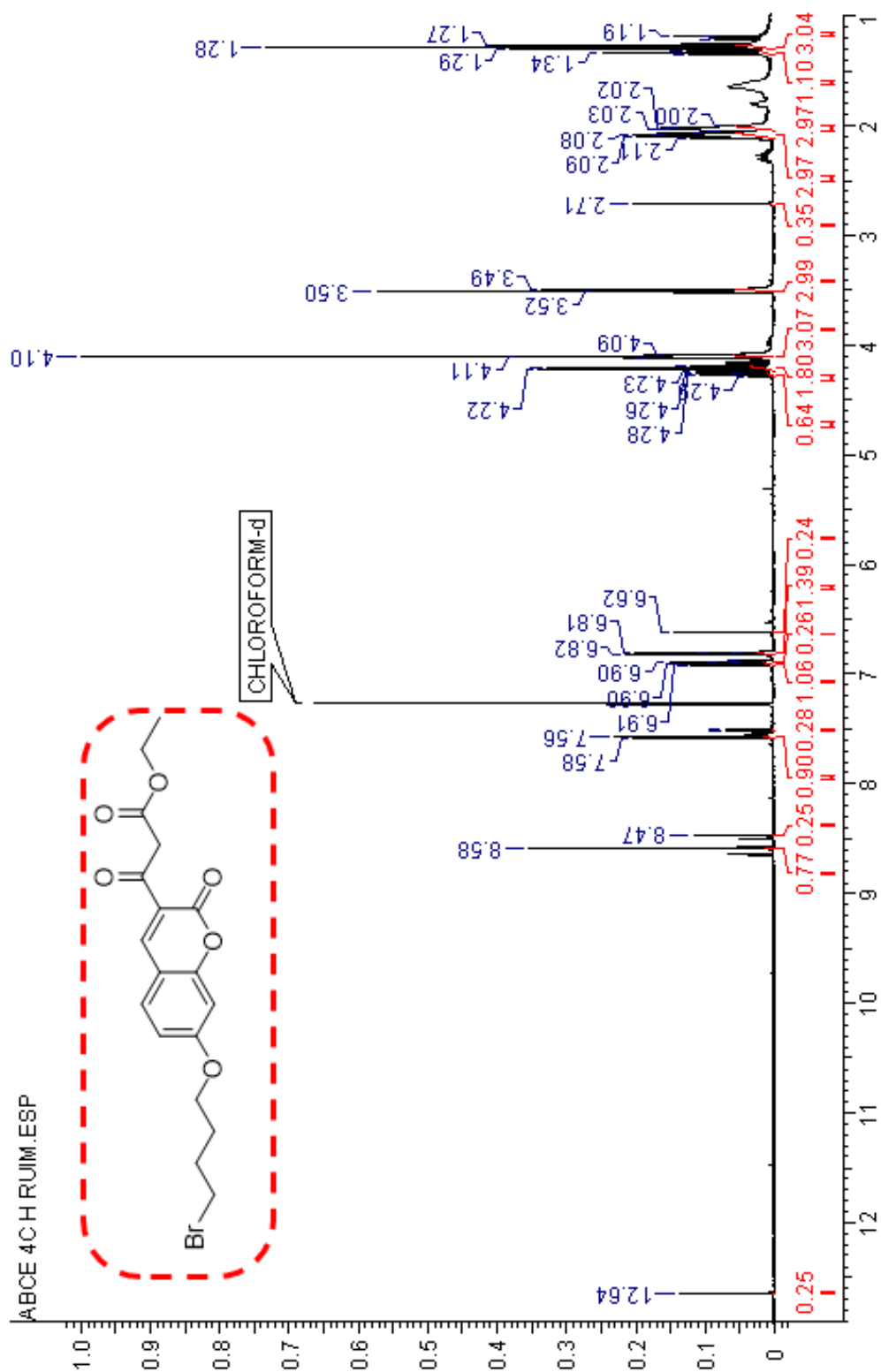
Anexo 41: Espectro de RMN ^1H do composto (93b) em CDCl_3 a 400 MHz



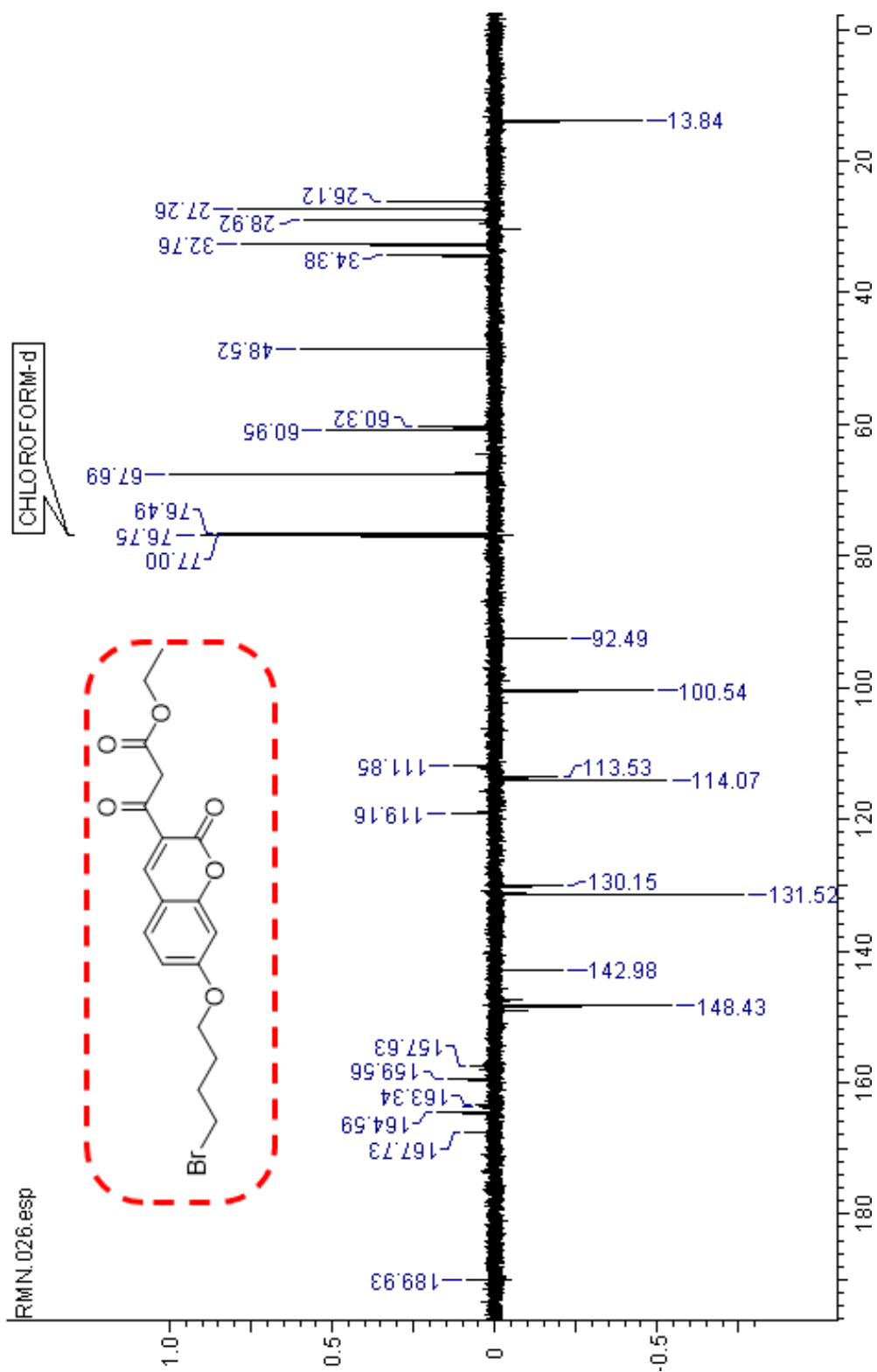
Anexo 42: Espectro de RMN ¹³C do composto (93b) em CDCl₃ a 400 MHz



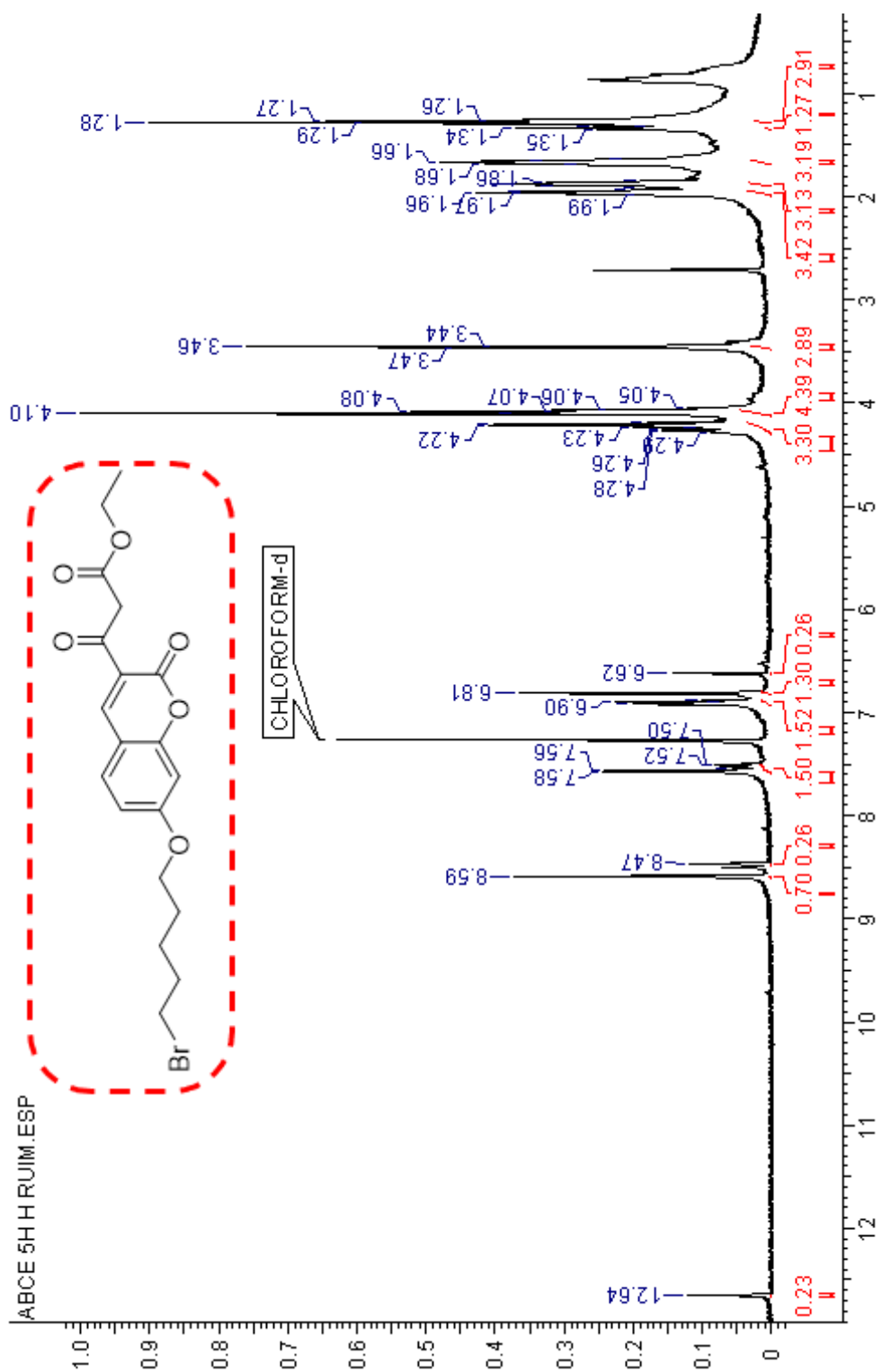
Anexo 43: Espectro de RMN ^1H do composto (93c) em CDCl_3 a 400 MHz



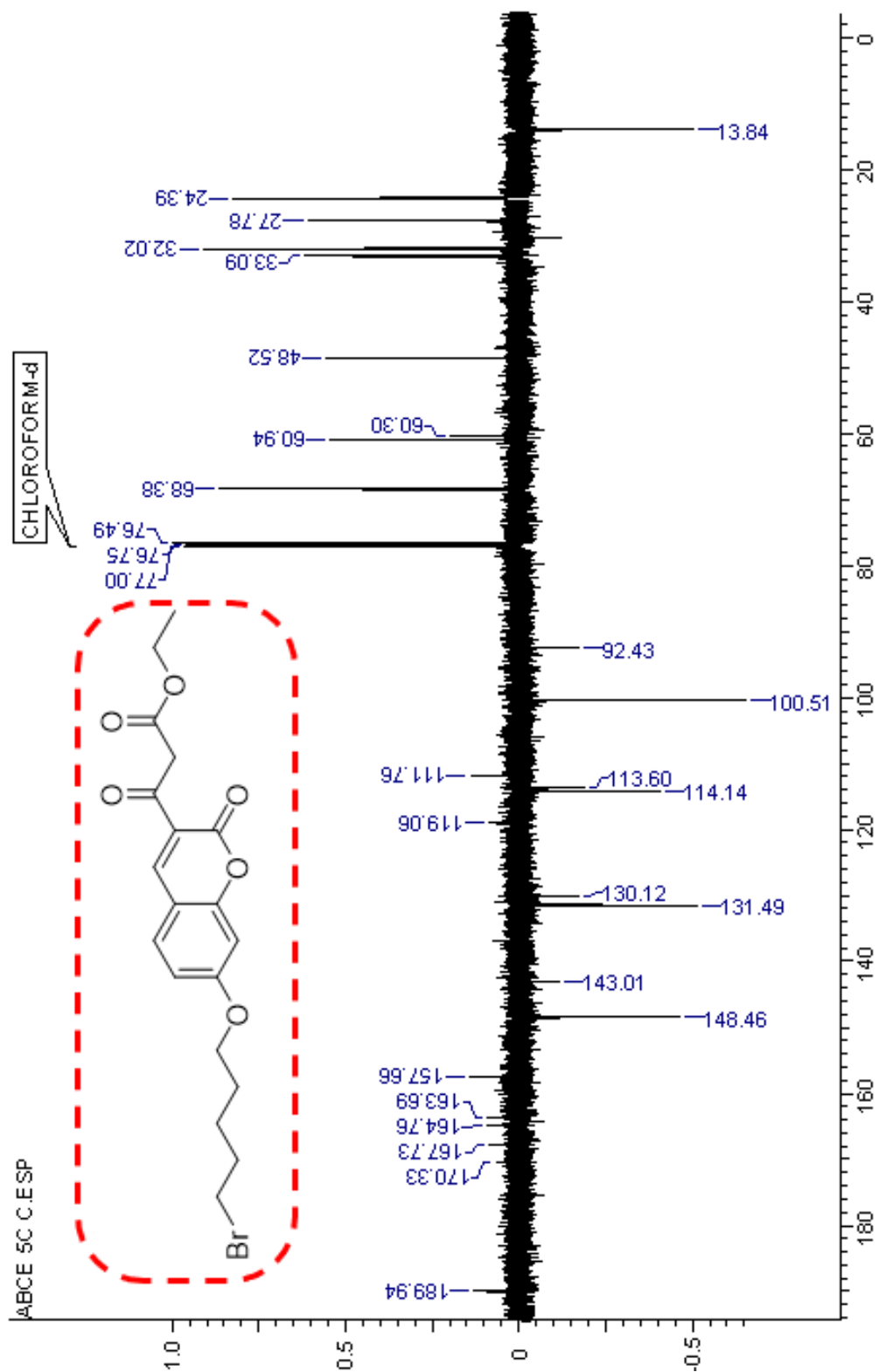
Anexo 44: Espectro de RMN ¹³C do composto (93c) em CDCl₃ a 400 MHz



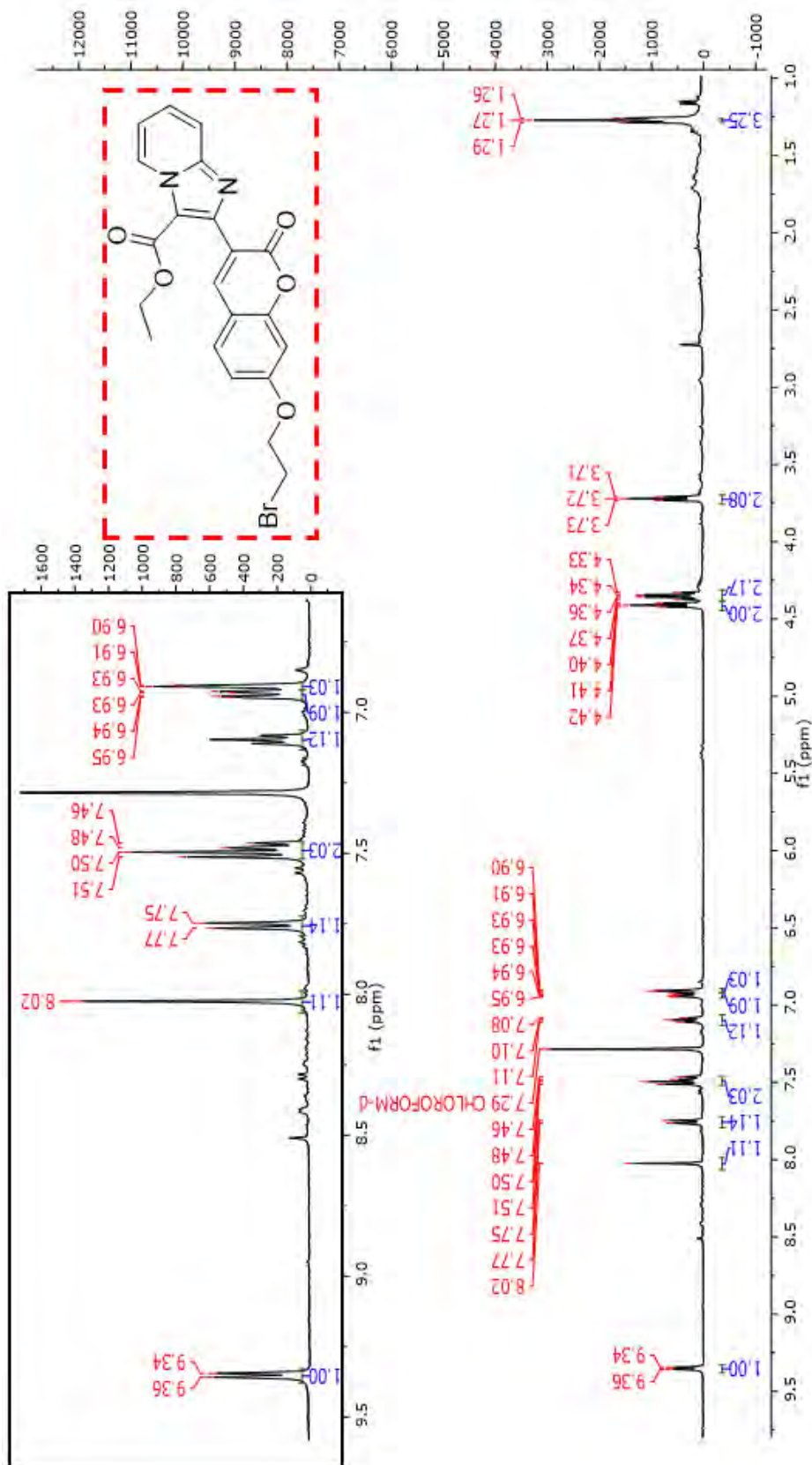
Anexo 45: Espectro de RMN ^1H do composto (93d) em CDCl_3 a 400 MHz



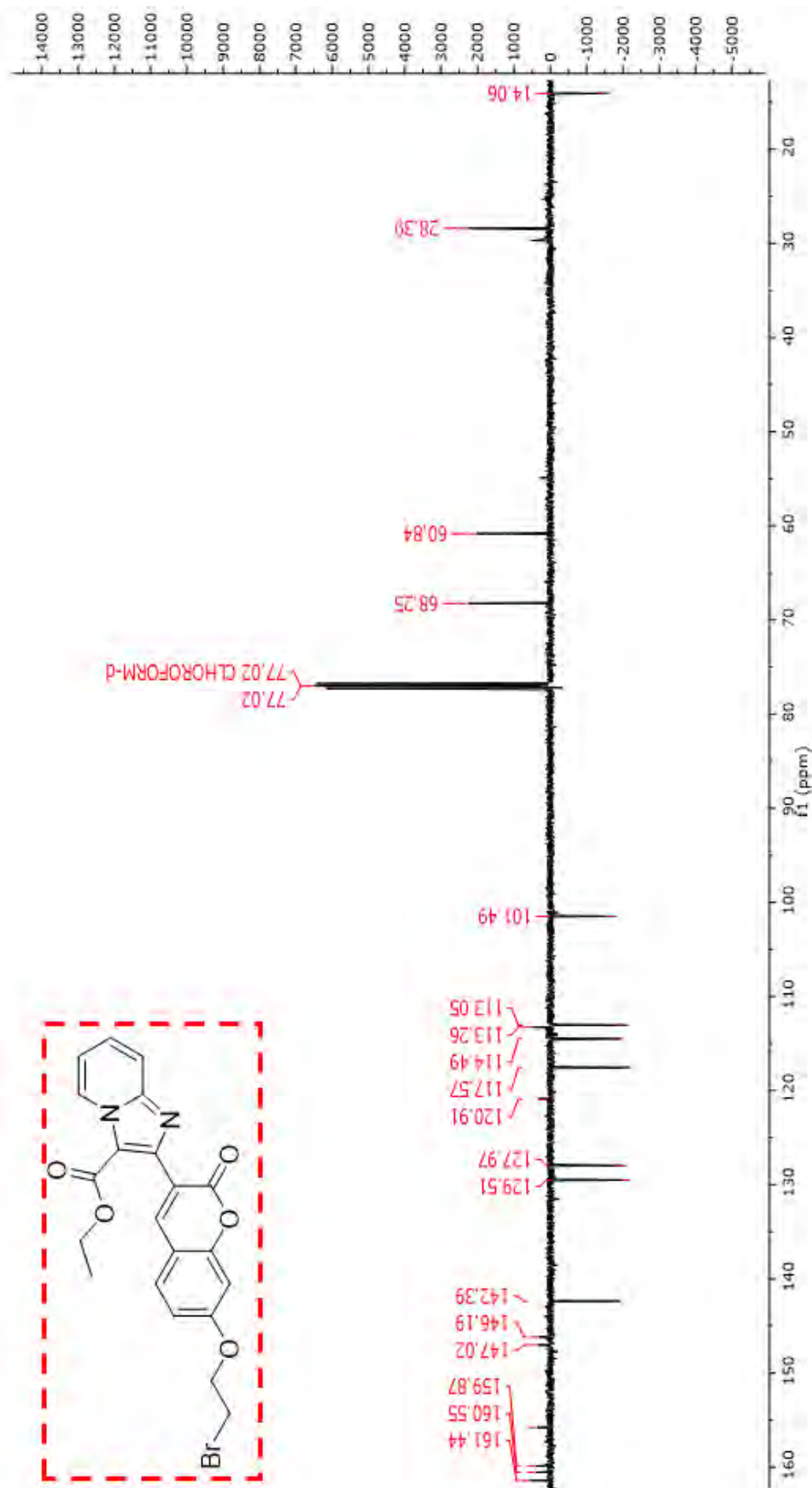
Anexo 46: Espectro de RMN ^{13}C do composto (93d) em CDCl_3 a 400 MHz



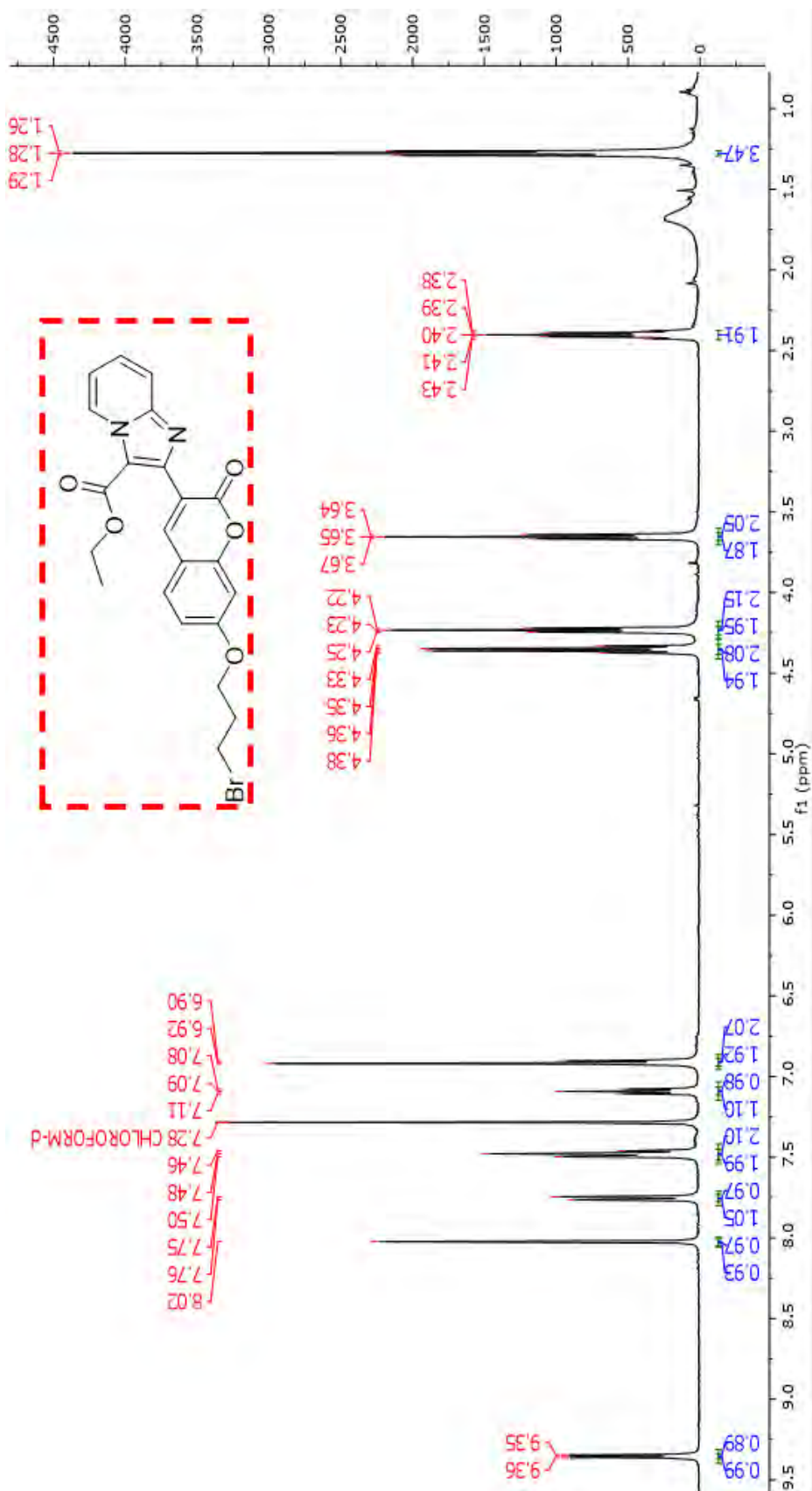
Anexo 47: Espectro de RMN ^1H do composto (102a) em CDCl_3 a 400 MHz



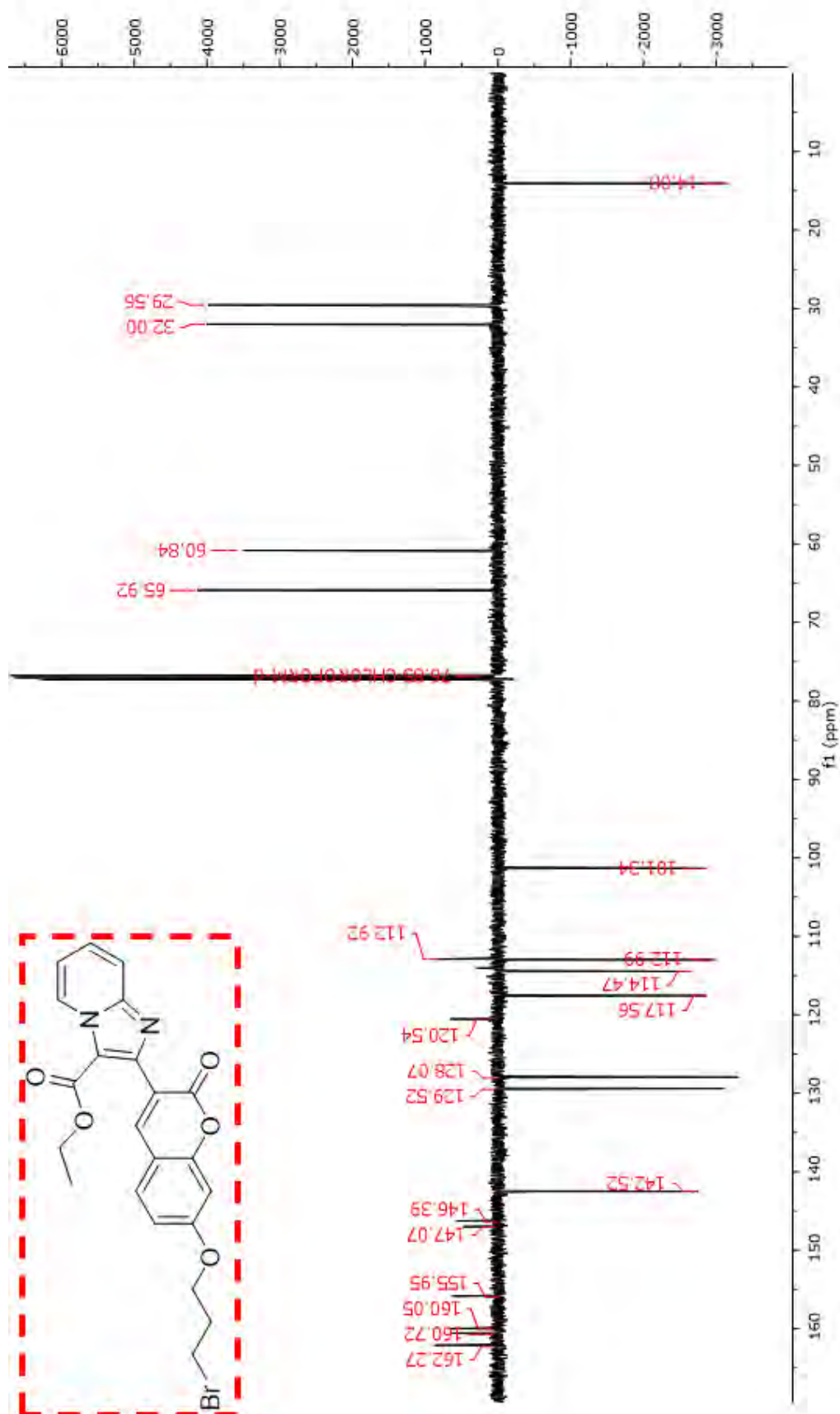
Anexo 48: Espectro de RMN ¹³C do composto (102a) em CDCl₃ a 400 MHz.



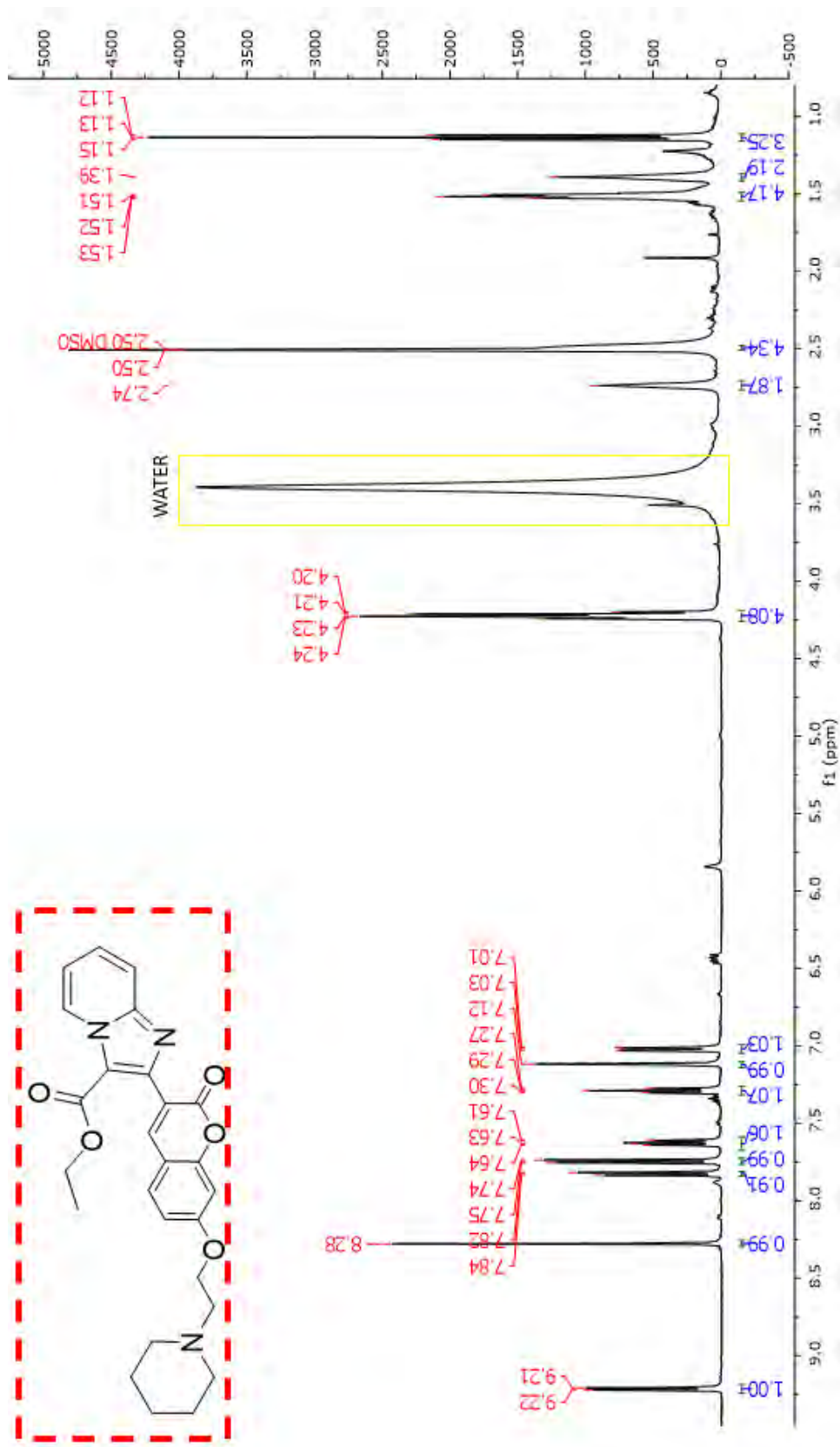
Anexo 49: Espectro de RMN ^1H do composto (102b) em CDCl_3 a 400 MHz.



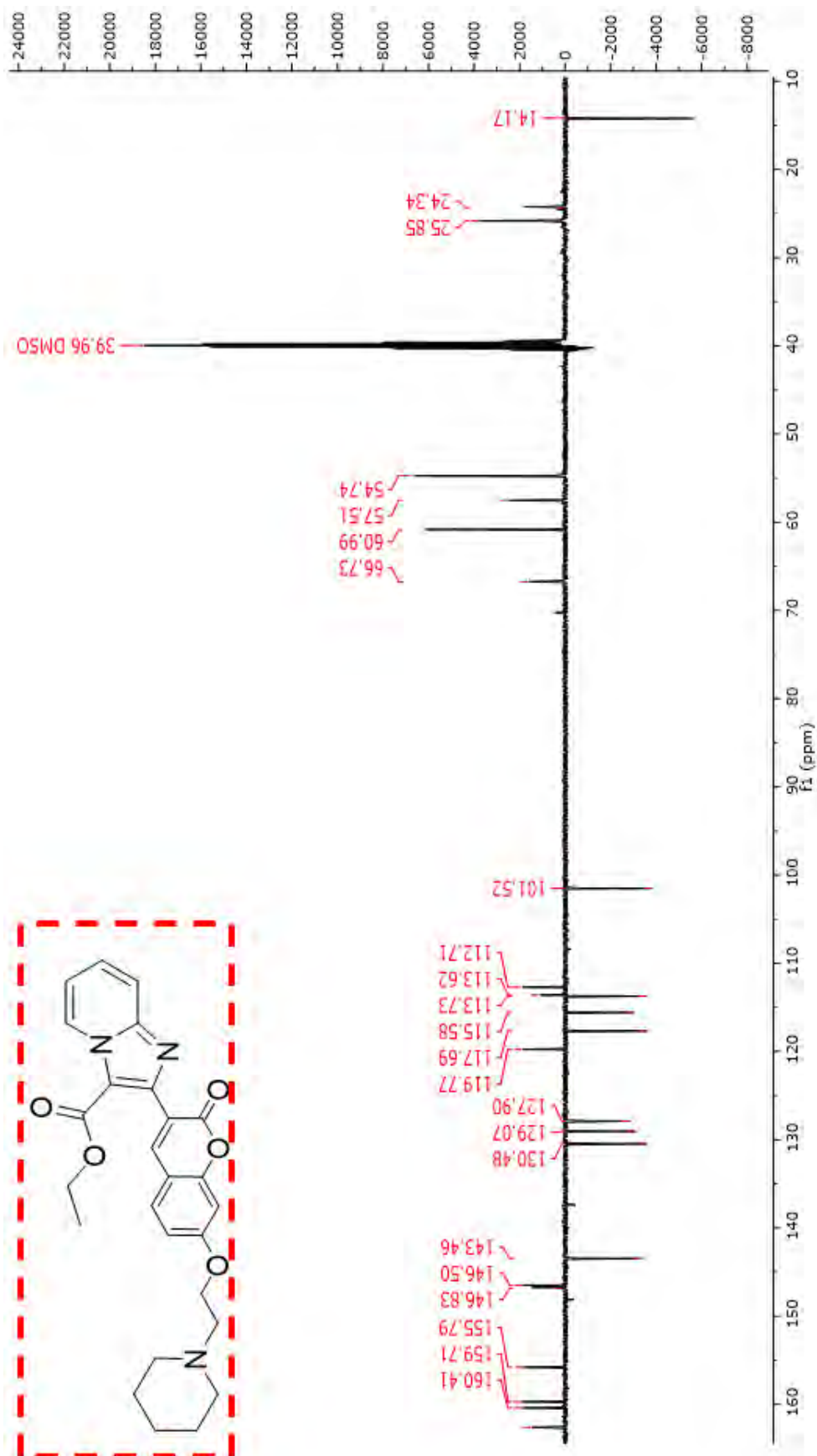
Anexo 50: Espectro de RMN ^{13}C do composto (102b) em CDCl_3 a 400 MHz



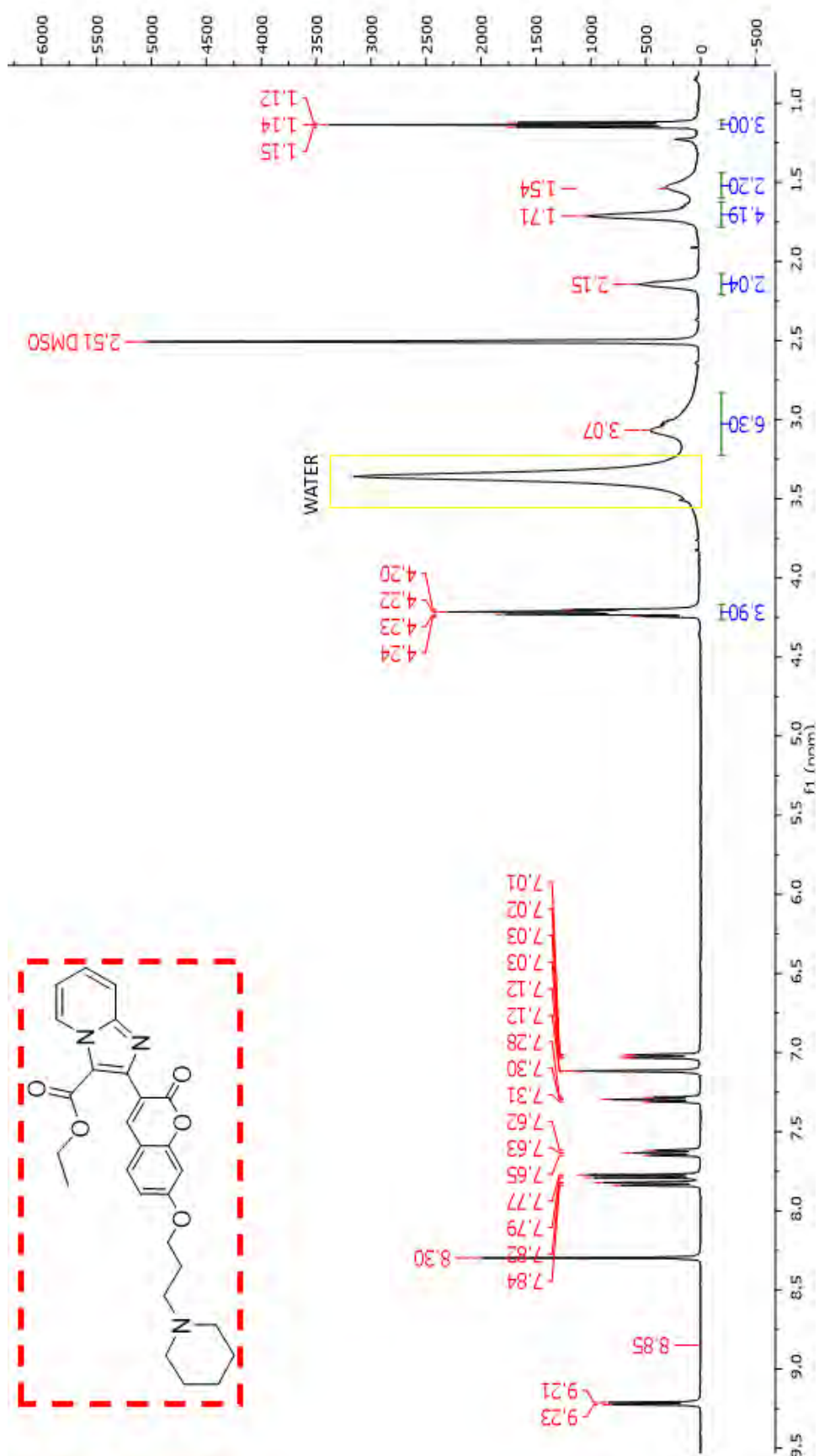
Anexo 51: Espectro de RMN ^1H do composto (103a) em CDCl_3 a 400 MHz



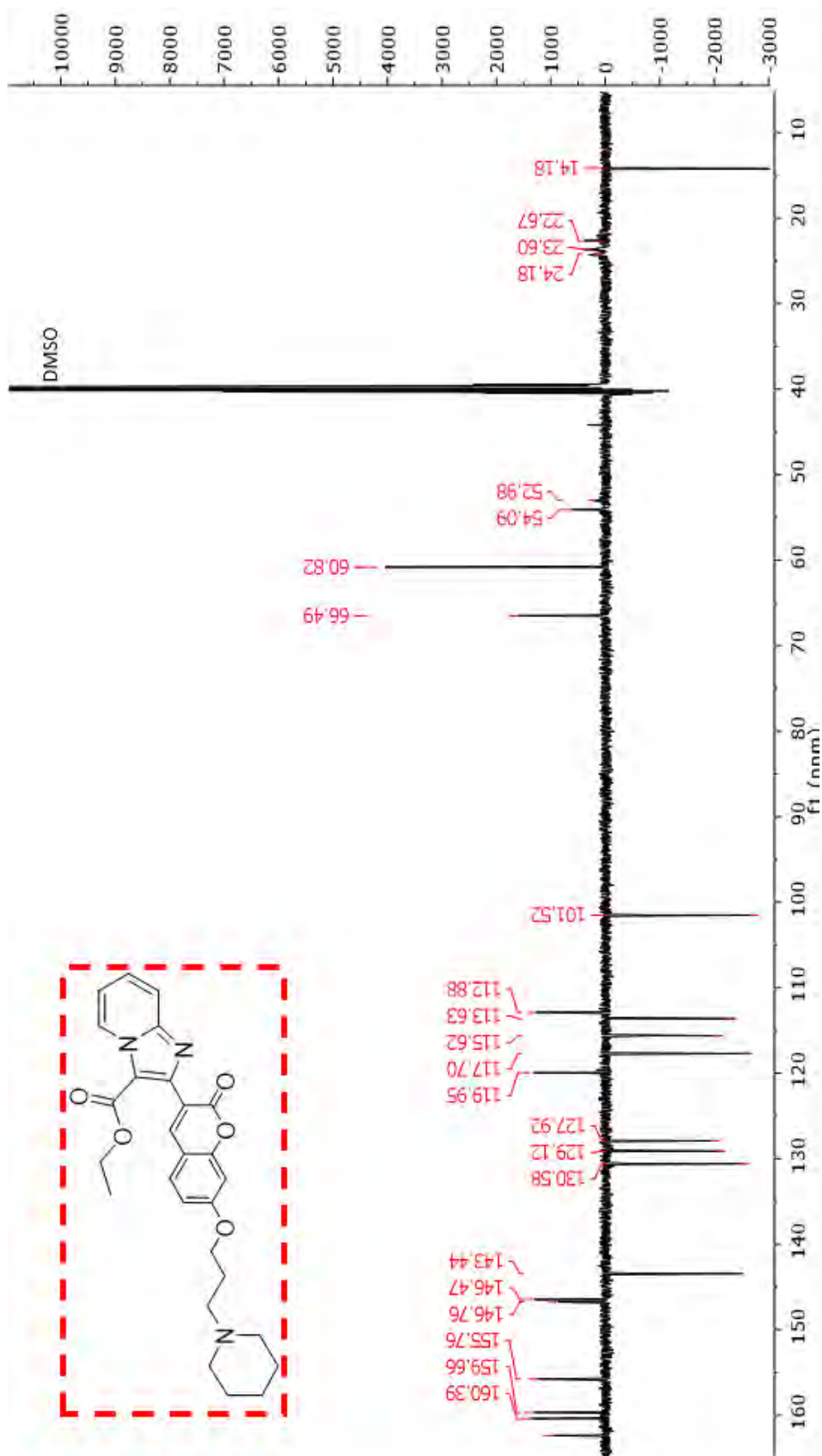
Anexo 52: Espectro de RMN ¹³C do composto (103a) em CDCl₃ a 400 MHz



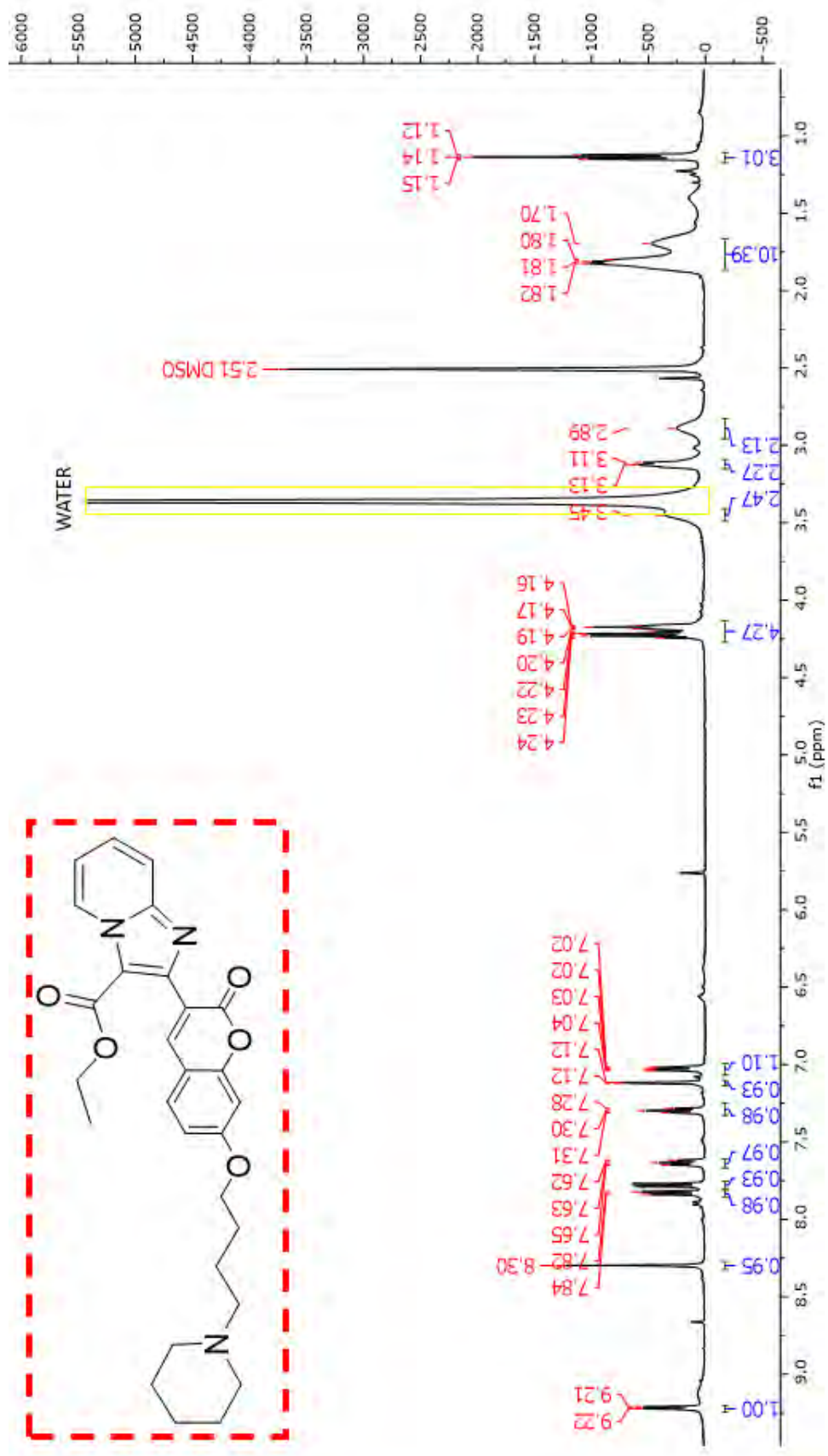
Anexo 53: Espectro de RMN ^1H do composto (103b) em CDCl_3 a 400 MHz



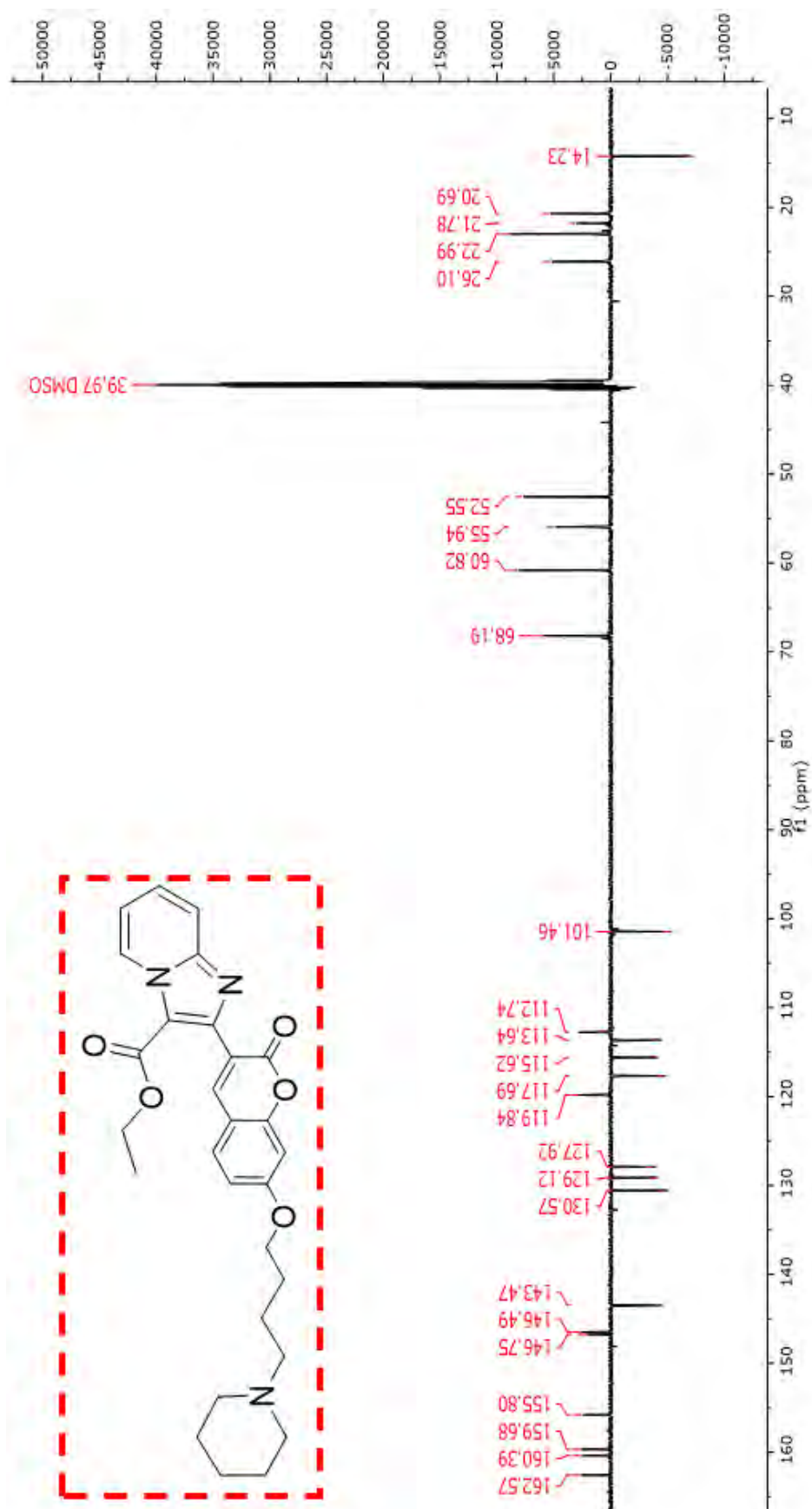
Anexo 54: Espectro de RMN ^{13}C do composto (103b) em CDCl_3 a 400 MHz



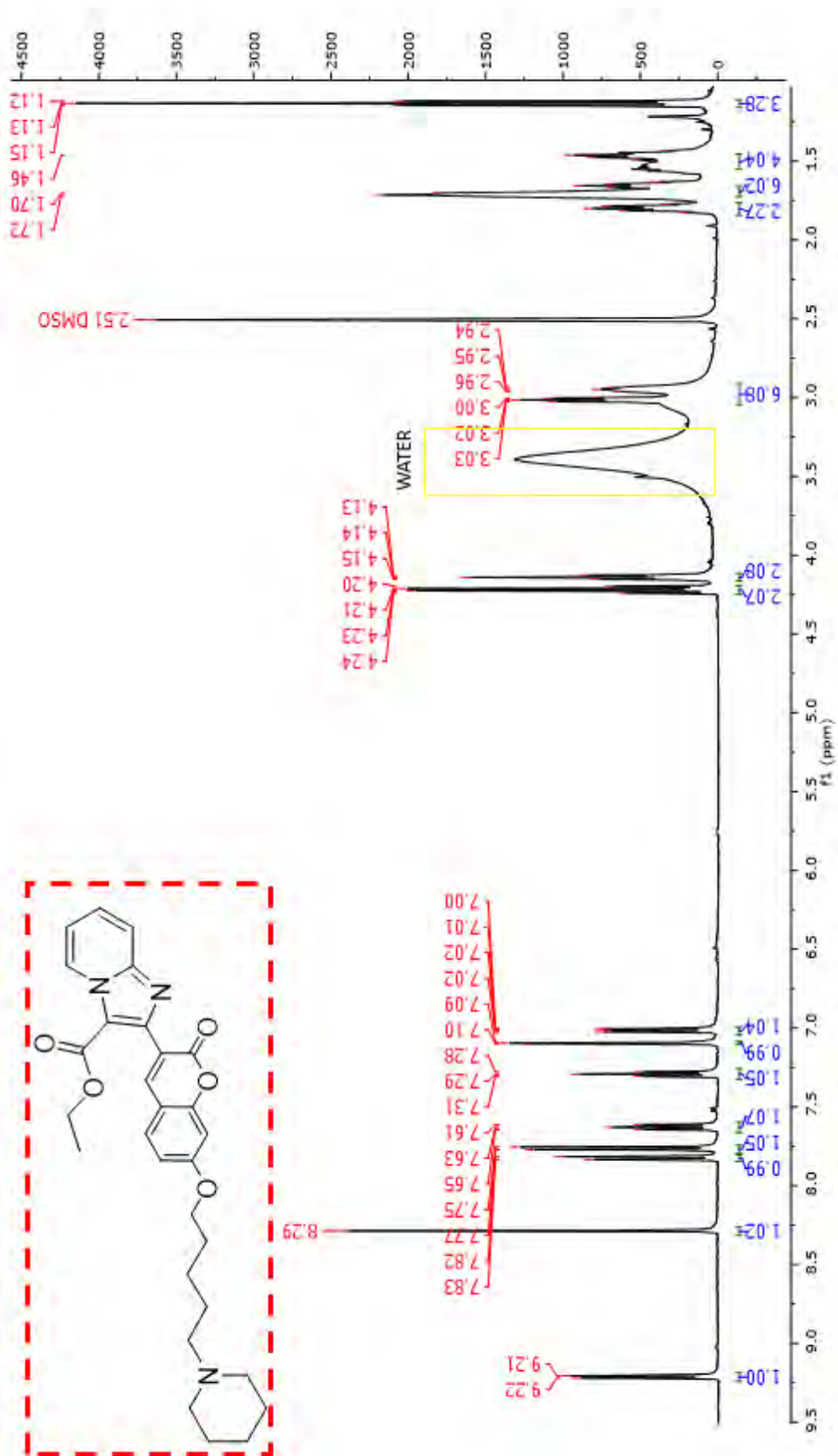
Anexo 55: Espectro de RMN ^1H do composto (103c) em CDCl_3 a 400 MHz



Anexo 56: Espectro de RMN ^{13}C do composto (103c) em CDCl_3 a 400 MHz



Anexo 57: Espectro de RMN ^1H do composto (103d) em CDCl_3 a 400 MHz



Anexo 58: Espectro de RMN ^{13}C do composto (103d) em CDCl_3 a 400 MHz

