

UFRRJ
INSTITUTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

DISSERTAÇÃO

**SÍNTESE E AVALIAÇÃO FARMACOLÓGICA DE NOVOS DERIVADOS
CUMARINICOS HÍBRIDOS PLANEJADOS COMO PROTÓTIPOS DE
TERANÓSTICOS PARA A DOENÇA DE ALZHEIMER**

Thiago Moreira Pereira

2018



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

**SÍNTESE E AVALIAÇÃO FARMACOLÓGICA DE NOVOS DERIVADOS
CUMARINICOS HÍBRIDOS PLANEJADOS COMO PROTÓTIPOS DE
TERANÓSTICOS PARA A DOENÇA DE ALZHEIMER**

THIAGO MOREIRA PEREIRA

Sob a orientação do(a) professor(a)

Dr. Arthur Eugen Kümmerle

e Co-Orientação do professor

Dr. Fabio da Silva Miranda

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

Seropédica-RJ

Setembro de 2018

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

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

P436s Pereira, Thiago Moreira, 1990-
 Síntese e avaliação farmacológica de novos derivados
 cumarínicos híbridos planejados como protótipos de
 teranósticos para a doença de Alzheimer / Thiago
 Moreira Pereira. - 2018.
 160 f.

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

 1. Cumarina. 2. Fluorescência. 3. Híbridação. I.
 Kümmerle, Arthur Eugen, 1979-, orient. II. Miranda,
 Fábio da Silva, 1979-, coorient. III Universidade
 Federal Rural do Rio de Janeiro. Programa de Pós
 Graduação em Química. IV. Título.

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

THIAGO MOREIRA PEREIRA

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

DISSERTAÇÃO APROVADA EM 20/09/2018

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

Dr. Fernando de Carvalho da Silva (IQ-UFF)

Dr. Marco Edilson Freire Lima (IQ-UFRRJ)

“ i) Escolha o trabalho que você ama, e você nunca terá que trabalhar um dia sequer em sua vida”

Confucio

“i) Nunca desista do seu trabalho. O trabalho lhe dá sentido e propósito, e a vida é vazia sem isso.

iii) E se você for afortunado a ponto de encontrar o amor, lembre-se de que ele é raro e não o jogue fora.”

Stephen Hawking

À meus pais, que me concederam os ensinamentos mais preciosos, por me inspirarem e serem meu maior exemplo de vida.

A meus professores que me inspiram e que enriquecem o meu amor pela ciência

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela oportunidade de viver e compartilhar o dia-a-dia com pessoas maravilhosas.

Aos meus pais, Selma Maria Moreira e Remi Pereira pelo amor, carinho e por me ensinarem a importância do estudo e do trabalho duro. Ambos sempre fizeram de tudo para investir na minha formação pessoal e profissional.

Aos meus irmãos, Thaianne Pereira e Remi Cunha pelo incentivo e pelas longas conversas sobre a vida e aspirações futuras.

Aos meus familiares, Regina Rosa, Lara, Silma, Pedro, Celia, Carol, Claudio, Henrique.. pelo convívio familiar fraternal e saudável.

Ao meu orientador, Arthur Eugen Kummerle, primeiramente pela oportunidade de trabalhar com ele, por ter me ensinado muito sobre o valor da ciência e do trabalho duro, pela sua excelência profissional que é um exemplo a ser seguido, pela paciência e, sobretudo pela amizade.

Aos professores do programa da pós-graduação em Química, agradeço pelos cursos ministrados e pela transmissão de conhecimento. Em especial, aos professores Rosane Nora Castro, Marco Edilson Lima, Cedric Graebin, Renata Barbosa, Dari Cesarin, Amanda Neves e Carlos Mauricio por sempre estarem dispostos a ajudar.

Aos amigos de laboratório que sempre foram excelentes companheiros de trabalho em especial, Felipe, Gabriela, Luciana, Sabrina, Daiana, Pedro, Lucas, Gabriel, Leonardo e Natalia, pelos momentos compartilhados, pelas conversas agradáveis e muito divertidas e principalmente pelo ambiente de trabalho sempre prazeroso.

A CAPES, CNPQ, FAPERJ e a UFRRJ, pelo apoio financeiro e acadêmico para realização desta pesquisa.

RESUMO

A doença de Alzheimer (DA) é uma doença neurodegenerativa muito comum, sendo considerada a forma mais comum de demência. Dados da ONU indicam que devido ao aumento previsto da expectativa de vida da população mundial, o aumento do número de pessoas com demência crescerá, atingindo 82 milhões em 2030 e 152 milhões em 2050, portanto a DA é considerada um problema de saúde pública importante.

O conhecimento dos distúrbios tem levado ao desenvolvimento de fármacos com efeitos sintomáticos, os inibidores de colinesterases, aprovados em muitos países. Porém estes fármacos atuam apenas no estado comportamental e avanços da pesquisa na patogênese de DA também têm levado a protótipos potenciais modificadores da doença, como os complexantes de metais, que se encontram em fase clínica.

Outra abordagem crescente para a DA são os compostos teranósticos, que conciliam propriedades terapêuticas e diagnósticas, se apresentando em um único agente, com o objetivo de otimizar a eficácia da terapêutica medicamentosa.

Dentro do universo de compostos que possam atuar como sensores para diagnóstico, as cumarinas se mostram um excelente protótipo de teranóstico devido às propriedades de luminescência e ao grande número de atividades farmacológicas com viés de tratamento para a DA.

Neste contexto o objetivo deste trabalho compreendeu o planejamento de cumarinas fluorescentes híbridas, que possuíssem potencial aplicação como teranósticos para DA através da inibição da AChE e complexação a metais. Duas séries de cumarinas foram sintetizadas e caracterizadas. A primeira série de compostos (**CCM**), visando a avaliação das propriedades de fluorescência e de complexação das cumarinas propostas, foi sintetizada por dois protocolos de síntese distintos: um térmico e outro por irradiação micro-ondas, que elevou os rendimentos e à redução de 23h no tempo reacional. Cinco compostos foram selecionados e sua caracterização fotofísica em metanol e água foi realizada, mostrando comportamentos diferenciados de acordo com a polaridade do meio. Adicionalmente, conforme o planejado, dois compostos mostraram a capacidade de atuar como sonda de Zn^{2+} , sendo que o derivado de semicarbazona se mostrou útil como sonda de fluorescência também em meio aquoso.

A segunda série (**HM**), planejada com a hibridação entre o farmacóforo para inibição da AChE (piperidina) e complexação ao Zn^{2+} (semicarbazida) foi sintetizada em 4 etapas reacionais, e os compostos híbridos apresentaram excelentes valores de atividade inibitória frente à AChE (12,94nM-128,28nM) bem próximos ao fármaco donepezil (6,55nM). Um dos híbridos ainda foi avaliado quanto a capacidade de complexar a Zn^{2+} em $H_2O/MeOH$, validando a proposta deste trabalho de produzir híbridos moleculares que possam atuar como teranóstico para DA.

PALAVRAS-CHAVE: Cumarina, fluorescência, hibridação.

ABSTRACT

Alzheimer's disease (AD) is a very common neurodegenerative disease and is considered the most common form of dementia. Data from ONU indicate that due to the expected increase in the life expectancy of the world's population, the increase in the number of people with dementia will increase, reaching 82 million in 2030 and 152 million in 2050, so AD is considered a major public health problem.

The Knowledge of disorders has led to development of drugs with symptomatic effects, cholinesterase inhibitors, approved in many countries. However, these drugs only act in the behavioral state and research advances in the pathogenesis of AD have also led to potential disease-modifying prototypes, such as metal complexers, which are in the clinical phase.

Another increasing approach to AD is the theranostics compounds, which combine therapeutic and diagnostic properties, presenting in a single agent, in order to optimize the efficacy of drug therapy.

Within the universe of compounds that can act as sensors for diagnosis, coumarins proved to be an excellent prototype of theranostic due to the luminescence properties and the large number of pharmacological activities.

In this context, the objective of this work was to design hybrid fluorescence coumarins, which has potential application as theranostic for AD through the inhibition of AChE and complexation to metals. Two series of coumarins were synthesized and characterized. The first series of compounds (**CCM**), aiming the evaluation of the fluorescence and complexation properties of the coumarins proposed, was synthesized by two different synthetic protocols: conventional heating and by microwave irradiation, which increased the yields and the reduction of 23h in reaction time. Five compounds were selected and their photophysical characterization in methanol and water was performed, showing different behaviors according to the polarity of the medium. Additionally, as planned, some coumarins showed the ability to act as Zn^{2+} probe, and one of them, coumarin-semicarbazone, proved to be useful as fluorescence probe also in aqueous medium.

The second series (**HM**), planned with the hybridization between the pharmacophore for inhibition AChE (piperidine) and complexation to Zn^{2+} (semicarbazide) was synthesized in 4 reaction steps, demonstrating excellent values of inhibitory activity (12.94nM-128.28nM), closed to the available drug donepezil (6.55nM). One Hybrid was further evaluated for the ability to complex Zn^{2+} in H₂O/MeOH, validating the proposal of this work to produce molecular hybrids that could act as theranostic for AD.

KEY-WORDS: Coumarin, fluorescence, hybridization.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Representação da comparação de um cérebro em estado saudável e um cérebro com DA em estado avançado. Esta imagem mostra um corte transversal pela metade do cérebro	3
Figura 2: . Representação do ciclo da acetilcolina nos neurônios	4
Figura 3: Estruturas dos fármacos inibidores da AChE utilizados no tratamento da DA	5
Figura 4: Formação dos peptídeos $A\beta$ seguida do seu acúmulo, levando à formação das placas $A\beta$ insolúveis em cérebros portadores da DA	6
Figura 5: Compostos usados como inibidores da agregação β -amiloide.	7
Figura 6: . Formação de peptídeos β -amiloide pela clivagem da proteína precursora de amiloide (APP), formação de núcleos fibrilares ou agregados $A\beta$ induzidos por metais e sua evolução resultante em neurodegeneração.....	8
Figura 7: Estruturas de compostos derivados de 8-hidroxiquinolina quelantes a metais e capazes de passar pela barreira hematoencefálica	9
Figura 8: Estrutura química da TioflavinaT(ThT).....	10
Figura 9: Estrutura química da cumarina	10
Figura 10: Derivados de cumarinas usados clinicamente.....	15
Figura 11: Cumarinas inibidoras de AChE com substituintes feniol-piperazina	16
Figura 12: Sais de amônio quaternários inibidores da AChE (44-45); Derivado tetrazolobenzotiazólico inibidor de agregação de proteína β -amiloide (46)	17
Figura 13: Híbridos moleculares de cumarina com atividade frente a alvos envolvidos na DA .	18
Figura 14: Faixa da radiação eletromagnética.....	19
Figura 15: Uma visão simplista da excitação	20
Figura 16: Diagrama de Jablonski.....	22
Figura 17: Representação simplista da detecção da fluorescência.	24
Figura 18: Sobreposição dos espectros de absorção (cinza) e de emissão (laranja) da fluoresceína.....	24
Figura 19: Efeito solvatocrômico sobre a cumarina 50.....	25
Figura 20: Algumas classes de fluoróforos conhecidos..	27
Figura 21: (a) mecanismo envolvido na atuação da sonda (55). (b) Absorção celular de 55 sem a presença de Cu^{2+} (c) em presença de cobre (10 μM) em células de glioblastoma humano U87MG.....	28

Figura 22: (a) Derivado de cumarina como sonda de Cu^{2+} . (b) Mudanças colorimétricas observadas em solução água/DMSO de 56a (20 μM) após adição de 10 eq. de cátions. (c) Mudanças fluorimétricas observadas em solução água/DMSO de 56a (20 μM) após adição de 10 eq. de cátions..	29
Figura 23: Derivado de cumarina como sonda de Zn^{2+}	30
Figura 24: (A) Derivados de cumarinas como sondas de Zn^{2+} . (B) (a) Imagem confocal de células HepG2. (b) células incubadas com 58c (20mM) em $\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O}$ tampão, pH 7.4 por 10 min. (c) incubação de $\text{Zn}(\text{ClO}_4)$ (0.1 mM) por 6 min. (d) por 15 min..	31
Figura 25: Análise retrossintética para obtenção da série planejada CCM (59a-i).	35
Figura 26: Atribuição dos principais sinais dos compostos 3-acetil-7-hidroxi-cumarina (63) nos espectros de RMN ^1H e ^{13}C e IV.	38
Figura 27: Mecanismo proposto para a formação de N-acilidrazona.	46
Figura 28: Deslocamento típicos dos prótons das funções amida e imina de (tio)semicarbazona e N-acilidrazonas.	47
Figura 29: Espectro de RMN bidimensional NOESY para o composto 59d.	48
Figura 30: Espectro de RMN ^1H dos compostos 59d (A) e 59i (B) em DMSO a 298 K.	49
Figura 31: Cromatograma do composto 59i	50
Figura 32: Espectro de RMN ^1H do composto 59i em DMSO a 25°C e a 60°C.	50
Figura 33: Características espectrais de NAH-cumarinas 59d e 59i e estabilização do estado de transição dos rotâmeros da amida.	51
Figura 34: Espectro de absorção de 59b-e, i em água	52
Figura 35: Espectro de excitação (A) e espectro de emissão (B) em água a 298K.	53
Figura 36: Espectro de absorção em metanol a 298K	54
Figura 37: Espectro de emissão em metanol a 298K	55
Figura 38: Espectro de absorção de 68b em água após sucessivas adições de solução de NaOH a 298K.	56
Figura 39: Determinação do pKa de 59c considerando 412 nm e 351 nm.	56
Figura 40: Espectro de emissão de 59c em água a 298K.	57
Figura 41: Proposta de estados protonados de N-acilidrazonas e semicarbazona de 7-OH-cumarinas.	58
Figura 42: (a) Espectro de absorção e de emissão de 59a em metanol após adição de 0-1 equivalentes de Zn^{2+} . (b) Espectro de emissão em metanol de 59a após sucessivas adições de Zn^{2+}	59

Figura 43: (a) Espectro de absorção e de emissão de 59b em metanol após adição de 0-1 equivalentes de Zn^{2+} . (b) Espectro de emissão em metanol de 59b após sucessivas adições de Zn^{2+}	60
Figura 44: Espectro de emissão de 59a após adição de 1 eq. de sais de Zn^{2+} em metanol	61
Figura 45: Elucidação estrutural de 59a após adições sucessivas de acetato de zinco.....	62
Figura 46: Espectro de Massas de 59a após adição de acetato de zinco em metanol	63
Figura 47: Otimização da geometria encontrada para os estados fundamentais de excitados de 59a e Zn-59a.	64
Figura 48: Orbitais mais envolvidos nos processos emissivos.....	65
Figura 49: (a) Espectro de luminescência de 59a em água/metanol (70/30). (b) Espectro de luminescência de 59b em água/metanol (50/50)..	65
Figura 50: Análise retrossintética para obtenção dos híbridos planejados (serie HM)..	66
Figura 51: Atribuição dos principais sinais dos compostos 7-bromoalcoxi-cumarina (99a-b) nos espectros de RMN 1H e ^{13}C	69
Figura 52: Estrutura química dos compostos (98a-b).	71
Figura 53: Atribuição dos principais sinais das semicarbazonas (60a) nos espectros de RMN 1H e ^{13}C	72
Figura 54: Espectro de luminescência de 60b em água/metanol (50/50) após adições sequenciais de 0,1 equivalente de Zn^{2+}	75

LISTA DE ESQUEMAS

Esquema 1: Proposta da rota biossintética da cumarina e umbeliferona pela via do ácido chiquímico. PAL (fenilalanila amônia-liase); C2'H (cinamato 2'-hidroxilase); C4'H (cinamato 4'-hidroxilase)..	11
Esquema 2: Reação de Perkin	12
Esquema 3: Reação de Pechmann	13
Esquema 4: Síntese da umbeliferona.	13
Esquema 5: Reação de Knoevenagel.	14
Esquema 6: Planejamento estrutural dos compostos cumarínicos a partir da hibridação molecular das 7-OH cumarinas com os farmacóforos de inibição da AChE oriundos de 61	34
Esquema 7: (a) - Esquema Reacional. (b) - Esquema de intermediários proposto para a formação da 3-acetil-7-OH-cumarina.	37
Esquema 8: Esquema de intermediários de esterificação dos aldeídos (56c-h) proposto por Yamada (1992).	39
Esquema 9: Mecanismo de possível formação do fenoxi radical (78) e reação de oxidação de 56g descrita por Lai e Anderson (1997).	40
Esquema 10: Síntese e mecanismo de formação do 2-metilimidazo[1,2-a]piridino-3-ato de etila (66i).	41
Esquema 11: Reação de formação das hidrazidas chaves (62c-i).	42
Esquema 12: Representação do equilíbrio de espécies de N-acilidrazona-7-OH-cumarina.	56
Esquema 13: Mecanismo proposto para a detecção de zinco por 59a	61
Esquema 14: Esquema Reacional e mecanismo para a formação da 3-acetil-7-bromoalcoxi-cumarina	68
Esquema 15: Esquema Reacional para a formação dos intermediários 3-acetil-7-aminoalcoxi-cumarínicos (98a-b).	70
Esquema 16: Esquema reacional do ensaio de inibição de AChE	73

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Características das transições $\pi-\pi^*$ e $n-\pi^*$	21
Tabela 2: Características de alguns padrões utilizados na literatura para determinar rendimentos quânticos de fluorescência.....	26
Tabela 3: Rendimento sintético e propriedades físicas dos compostos sintetizados	43
Tabela 4: Otimização da síntese dos compostos 59a-i	44
Tabela 5: Parâmetros fotofísicos em água a 298 K.	53
Tabela 6: Parâmetros fotofísicos em água (pH = 3.0) a 298 K.....	58
Tabela 7: Rendimento sintético e propriedades físicas dos híbridos moleculares 60a-b sintetizados	71
Tabela 8: Resultados obtidos nos ensaios inibitórios dos compostos frente à EeAChE	73

LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

Abs- absorvância

AchE- acetilcolinesterase

Ar- aromático

CI- conversão intersistema

CI₅₀- concentração necessária para inibir 50% da atividade máxima (*in vitro*)

DMSO – dimetilsulfóxido

DNA – ácido desoxirribonucleico

DP- *Parkinson disease*

E- energia

F- fluorescência

FC- Frank-Condon

FDA - *Food and Drug Administration*

GI₅₀- concentração necessária para inibir 50% da proliferação celular

h- constante de Planck ($6,62607004 \times 10^{-34} \text{ m}^2 \text{ kg / s}$)

hAChE- acetilcolinesterase humana

H₂SO₄- ácido sulfúrico

HOMO – orbital molecular ocupado de mais alta energia (highest occupied molecular orbital)

HSP – proteína de choque térmico (*heat shock protein*)

Hz- hertz

INCA – Instituto Nacional do Câncer

ISC- cruzamento intersistema (*intersystem crossing*)

IV - infravermelho

J - constante de acoplamento

LUMO – orbital molecular não ocupado de mais baixa energia (*lowest unoccupied molecular orbital*)

MAO- monoaminoxidase

MeOH – metanol

μM- micromolar

nm- nanômetros

nM- nano molar

N- normal

Nu – nucleófilo

P- fosforescência

PAL- fenilalanina amônia liase

P.f.- ponto de fusão

pH- logaritmo negativo da concentração de H_3O^+

pKa – logaritmo negativo da constante de dissociação ácida (Ka)

ppm – partes por milhão

QSAR- Relação estrutura-atividade (*quantitative structure-activity relationship*)

RMN - ressonância magnética nuclear

RV- relaxação vibracional

S_n- estado singlete

SAR- Relação estrutura-atividade (*structure-activity relationship*)

T_n- estado triplete

TMS – tetrametilsilano

UV- ultravioleta

Φ- rendimento quântico

Φ_F- rendimento quântico de fluorescência

λ- comprimento de onda

ν– frequência

γ- gama

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	1
1.1 Histórico	1
1.2 Epidemiologia e fatores de risco	1
1.3 Patogênese	1
1.4 Tratamento.....	3
1.4.1 Tratamentos sintomáticos	3
1.4.1.1 Os inibidores da acetilcolinesterase (AChEi).....	3
1.4.1.2 Os inibidores da butirilcolinesterase (BuChE-i).....	5
1.4.2 Tratamento com efeitos potencialmente modificadores da doença.....	5
1.4.2.1 Inibidores da formação da placa β -amilóide	5
1.4.2.1.1 Intercalação dos Peptídeos β -amilóides.....	7
1.4.2.1.2 Inibição da AChE	7
1.4.2.1.3 Quelantes de metais específicos	8
1.4.3 Teranósticos na Doença de Alzheimer	9
1.5 Cumarinas.....	10
1.5.1 Biogênese	11
1.5.2 Síntese de Cumarinas simples	12
1.5.2.1 Reação de Perkin	12
1.5.2.2 Reação de Pechmann	13
1.5.2.3 Reação de Knoevenagel.....	14
1.5.3 Propriedades farmacológicas de cumarinas.....	14
1.5.3.1 Cumarinas como agentes terapêuticos na DA	16
1.6 O fenômeno fotofísico da fluorescência e suas aplicações.....	18
1.6.1 Aspectos teóricos para o estudo fotofísico	18
1.6.2 Radiação eletromagnética	18
1.6.3 Fenômeno da absorção	19
1.6.4 Diagrama de Jablonski	22
1.6.5 Fluorescência	23
1.6.5.1 Rendimento quântico de fluorescência.....	25
1.6.6 A fluorescência aplicada ao desenvolvimento de sondas ópticas	26
1.6.6.1 Cumarinas aplicadas como sondas ópticas de metais.....	27

1.6.6.1.1	Cumarinas como sondas de cobre	27
1.6.6.1.2	Cumarinas como sonda de zinco	29
2	OBJETIVOS	31
2.1	Objetivo geral	31
2.2	Objetivo específico	31
3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	32
3.1	Planejamento estrutural do compostos cumarinicos.....	32
3.2	Planejamento sintético da série CCM (59a-i).....	34
3.3	Síntese da 3-acetil-7-OH-cumarina (63).....	35
3.4	Síntese de Esteres	38
3.5	Síntese dos intermediários acilidrazinicos e obtenção das N-acilidrazonas-cumarinas	41
3.6	Propriedades fotofísicas.....	51
3.6.1	Análise do pKa da cumarina-N-acilidrazona 59c.....	55
3.6.2	Análise de 59a-b como complexante de Zn ²⁺ e sonda de fluorescência	58
3.6.2.1	Estudo teórico de 59a	63
3.6.2.2	Estudo da complexação de 59a-b frente a Zn ²⁺ em água	65
3.7	Planejamento sintético e obtenção dos híbridos moleculares (60a-b).....	66
3.8	Síntese dos intermediários 3-acetil-7-bromoalcoxi-cumarinas (99a-b).....	67
3.9	Síntese dos intermediários 3-acetil-7-aminoalcoxi-cumarinicos (98a-b).....	69
3.10	Obtenção das Semicarbazonas (60a-b).....	71
3.11	Propriedades farmacológicas	72
3.11.1	Atividade inibitória frente a AChE.....	72
4	CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS	75
5	EXPERIMENTAL	76
5.1	Metodologias sintéticas	76
5.1.1	Síntese dos benzoatos de metila (66c-h)	77
5.1.2	benzoato de metila	78
5.1.3	4-metoxi-benzoato de metila	78
5.1.4	4-cloro-benzoato de metila	78

5.1.5 3,4-dimetoxi-benzoato de metila	79
5.2 Síntese do 4-hidroxi-benzoato de metila	79
5.3 Síntese do 2-metil-imidazo[1,2-a]piridina-3-carboxilato de metila	79
5.4 Síntese das Acilidrazinas.	80
5.4.1 Benzoilidrazida.....	81
5.4.2 4-metoxi-benzoilidrazida.....	81
5.4.3 4-cloro-benzoilidrazida.....	81
5.4.4 4-hidroxi-benzoilidrazida	82
5.4.5 2-metil-imidazo[1,2-a]piridina-3-carboidrazida.....	82
5.5 Síntese da 3-acetil-7-OH-cumarina (63).....	82
5.6 Síntese das N-acilidrazonas, semicarbazona e tiosemicarbazona	83
5.6.1 Síntese utilizando aquecimento convencional.....	83
5.6.2 Síntese assistida por microondas	84
5.6.3 Tiosemicarbazona-7-OH-cumarina (59a).....	84
5.6.4 Semicarbazona-7-OH-cumarina (59b)	84
5.6.5 N-acilidrazona-7-OH-cumarina (59c)	85
5.6.6 N-acilidrazona-7-OH-cumarina (59d)	85
5.6.7 N-acilidrazona-7-OH-cumarina (59e)	86
5.6.8 N-acilidrazona-7-OH-cumarina (59f).....	86
5.6.9 N-acilidrazona-7-OH-cumarina (59g)	87
5.6.10 N-acilidrazona-7-OH-cumarina (59h)	87
5.6.11 N-acilidrazona-7-OH-cumarina (59i).....	88
5.7 Síntese dos intermediários 3-acetil-7-bromoalcoxicumarinas (99a-b)	88
5.7.1 3-acetil-7-(2-bromoetoxi)-cumarina.....	89
5.7.2 3-acetil-7-(3-bromopropoxi)-cumarina	89
5.8 Síntese de aminação das 3-acetil-bromoalcoxi-cumarinas (98a-b)	89
5.8.1 3-acetil-7-aminoalcoxicumarina (98a)	90
5.8.2 3-acetil-7-aminoalcoxicumarina (98b)	90
5.9 Obtenção das Semicarbazonas (60a-b)	90
5.9.1 Semicarbazona-cumarina (60a)	91
5.9.2 Semicarbazona-cumarina (60b)	91
5.10 Teste in vitro da atividade anticolinesterásica dos derivados cumarínicos	92

6 BIBLIOGRAFIA93

7 ANEXOS108

1.INTRODUÇÃO

1.1.Histórico

Alois Alzheimer foi o primeiro pesquisador a descrever um quadro clínico de uma doença neurodegenerativa, em 3 de novembro de 1906, posteriormente denominada Doença de Alzheimer (DA) por Emil Kraepelin (KRAEPELIN, 1910). Alzheimer descreveu, neste único caso, características clínicas típicas desta doença como a presença dos distúrbios de memória e das imagens histopatológicas de corpos celulares do sistema nervoso central como a formação de feixes densos de fibrila e de placas amiloides, que atualmente sabemos são as principais características da doença.

1.2.Epidemiologia e Fatores de Risco

Considerada atualmente como a forma mais comum de demência, a DA está relacionada a 60-70% dos casos. Entre os indivíduos com idade entre 60 e 64 anos a prevalência de demência é inferior a 1%, mostrando um incremento exponencial com o aumento da idade, de modo que em indivíduos com idade superior a 85 anos ou mais a incidência está entre 24% a 33% dos pacientes. Mesmo com dados representativos escassos, estima-se que cerca de 60% dos pacientes mundiais com demência vivam em países em desenvolvimento. A DA é muito comum e, portanto, é um problema de saúde pública importante. Dados recentes indicam que devido ao aumento previsto da expectativa de vida, o número total de pessoas com demência aumente até atingir 82 milhões em 2030 e 152 milhões em 2050 (OMS, 2018).

1.3.Patogênese

As lesões características da DA são a ocorrência de placas senis ou neuríticas e emaranhados neurofibrilares, nas estruturas do lobo temporal medial e áreas corticais do cérebro, juntamente com a degeneração dos neurônios e das sinapses. Muitos mecanismos patogênicos que estão envolvidos nessas mudanças estão sendo estudados, incluindo a hiperfosforilação da proteína tau com a formação de emaranhados fibrilares, a agregação A β com o desenvolvimento e a deposição de placas, disfunção neurovascular, além de outros mecanismos, tais como processos inflamatórios, estresse oxidativo, alterações do ciclo celular e disfunção mitocondrial (BLENNOW *et al.*, 2006).

O peptídeo A β é um fragmento de proteína gerado a partir de uma proteína precursora de amiloide (PPA) (LAU *et al.*, 2002). A PPA parece exercer papel importante na facilitação do crescimento neuronal, na sobrevivência da célula e na regulação da atividade da proteína G0, além de sua reconhecida função de adesão entre células e entre os neurônios e a matriz cerebral

(DOU *et al.*, 2003). Em um cérebro saudável, estes fragmentos de peptídeo A β são degradados e eliminados. Entretanto, na DA os fragmentos se acumulam para formar placas insolúveis de peptídeos A β (LAU *et al.*, 2002).

Outra característica da DA é a presença de filamentos neurofibrilares insolúveis que estão associados à proteína tau (PTau). Sugere-se que a formação destes filamentos seja resultante da ativação anormal de cinases essenciais, como MAP e GSK-3. Em condições normais, a PTau auxilia o crescimento dos microtúbulos, sendo necessária para estabilizá-los nos axônios (EVANS *et al.*, 2016). Na DA, no entanto, a PTau torna-se hiperfosforilada e desnaturada, o que resulta na sua dissociação dos microtúbulos, seguida da formação de filamentos neurofibrilares que se agregam e depositam. Assim, estes agregados podem agir como barreiras físicas aos microtúbulos, prejudicando o transporte de substâncias importantes entre os neurônios (EVANS *et al.*, 2006).

Todo esse processo de deposição de fibrilas, seguido de dano e morte celular, leva à neuroinflamação que ativa os astrócitos e micróglia que são encontrados em grandes quantidades próximos aos neurônios. As micróglia representam a primeira linha de defesa contra patógenos e danos cerebrais. Em caso de doenças neurodegenerativas, as micróglia se tornam ativadas, circundam células danificadas e mortas e as removem. As placas A β são potentes ativadores das micróglia, na presença destas placas, estas células liberam uma variedade de mediadores pró-inflamatórios, como citosinas, espécies reativas de oxigênio, fatores de complemento, espécies de radicais livres e óxido nítrico, os quais podem contribuir para disfunção e morte neuronal. Os astrócitos são importantes para a fagocitose, remoção e degradação de placas A β . No entanto, em condições de estresse oxidativo, o papel dos astrócitos pode não ser benéfico, pois uma vez acumulados em sítios de placas A β , estes estimulam a liberação de mediadores pró-inflamatórios, causando um prolongamento da neuroinflamação e contribuindo para a neurotoxicidade, criando um ciclo vicioso entre fagocitose e morte celular (ANSAR *et al.*, 2007).

Estes eventos ocorrem majoritariamente em regiões específicas do cérebro, como o córtex cerebral, o hipocampo, o córtex entorrinal e o estriado ventral, as quais são responsáveis pelas funções cognitivas (WHITESSELL *et al.*, 2005), o que acaba levando aos principais sintomas da DA como perda de memória, da linguagem, da razão e da habilidade de cuidar de si próprio.

A comparação entre um cérebro normal e após considerável degeneração celular em estágio avançado da DA evidencia o encolhimento do córtex cerebral, danificando regiões envolvidas com o pensamento e a memória. Este encolhimento é principalmente grave no hipocampo, uma região do córtex responsável pela formação de novas lembranças. Ademais, os ventrículos, que são espaços preenchidos por fluido dentro do cérebro se tornam maiores com a progressão da doença (figura 1) (ALZHEIMER'S ASSOCIATION, 2018).

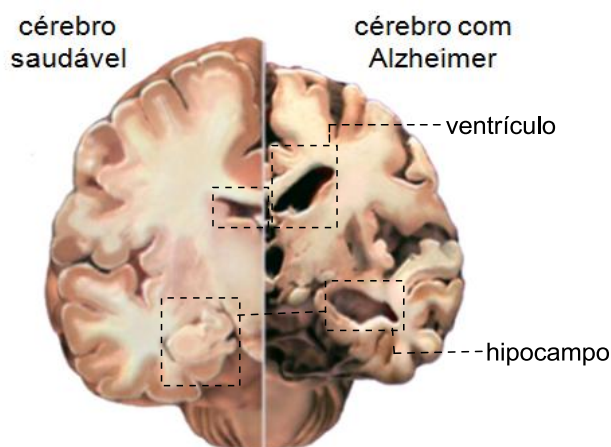


Figura 1. Representação da comparação de um cérebro em estado saudável e um cérebro com DA em estado avançado. Esta imagem mostra um corte transversal pela metade do cérebro (Adaptado de alzheimer's association, 2018).

1.4. Tratamento

O conhecimento dos distúrbios de neurotransmissores na DA tem levado ao desenvolvimento de fármacos com efeitos sintomáticos, que são aprovados em muitos países. Estes fármacos atuam sobre o estado comportamental do paciente, mas não necessariamente na cura da doença. Avanços da pesquisa na patogênese molecular da DA também têm levado a novos fármacos como potenciais modificadores da doença, que agora vêm sendo utilizados em ensaios clínicos como os inibidores da agregação de placas $A\beta$, anti-inflamatórios, complexantes de metais, inibidores das monoaminoxidases e antioxidantes (FALCO *et al.*, 2016, FERRI *et al.*, 2005).

1.4.1. Tratamentos Sintomáticos

1.4.1.1. Os inibidores da acetilcolinesterase (AChEi)

A hipótese colinérgica da DA afirma que a degeneração dos neurônios colinérgicos nos núcleos do prosencéfalo basal provoca distúrbios nos terminais colinérgicos pré-sinápticos no hipocampo e no neocórtex, que são regiões de extrema importância para distúrbios de memória e

outros sintomas cognitivos (TERRY E BUCCAFUSCO, 2003). Como resultado da neurodegeneração, a atividade de neurônios colinérgicos, aqueles que utilizam o neurotransmissor acetilcolina (ACh), é reduzida. Uma abordagem terapêutica para melhorar a neurotransmissão colinérgica é aumentar a disponibilidade de ACh pela inibição da AChE, a enzima que degrada a acetilcolina na fenda sináptica (FERRI *et al.*, 2005).

A acetilcolina (AChE) é sintetizada pela colina acetiltransferase (ChAT) a partir da ação da colina e da acetil CoA. Esta então é englobada pela vesícula sináptica e então liberada na fenda sináptica, onde é rapidamente metabolizada pela acetilcolinesterase (AChE), gerando como produtos um íon acetato e uma molécula de colina. Posteriormente, a molécula de colina é transportada de volta ao neurônio colinérgico pelos terminais axonais através de um transportador específico dependente de Na⁺ (transportador de colina), sendo utilizada para a síntese de uma nova molécula de ACh (figura 2).

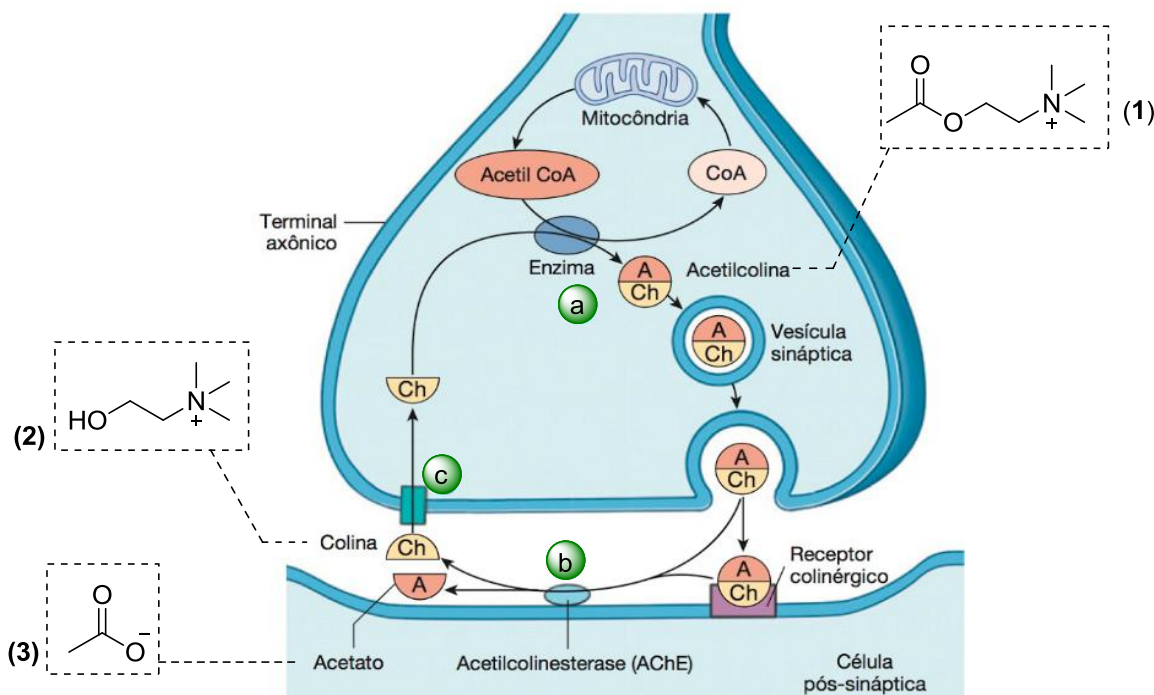


Figura 2. Representação do ciclo da acetilcolina nos neurônios (Adaptado de Arquivo Bioqui, 2018). (a) colina acetiltransferase (ChAT); (b) acetilcolinesterase (AChE); (c) transportador de colina.

Os inibidores da AChE donepezil (4), galantamina (5) e rivastigmina (6) foram aprovados para uso clínico na DA (Figura 3). Galantamina (5) e donepezil (4) são inibidores seletivos da AChE, enquanto que a rivastigmina (6) inibe a AChE e também a butirilcolinesterase (BuChE) com afinidades semelhantes.

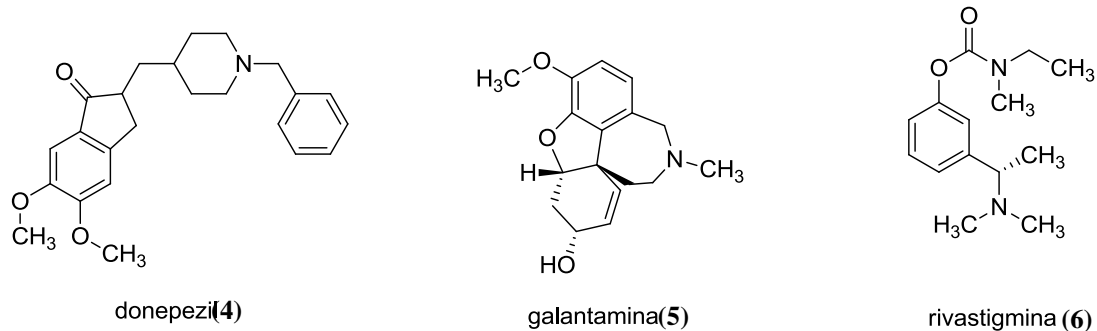


Figura 3. Estruturas dos fármacos inibidores da AChE utilizados no tratamento da DA.

1.4.1.2. Os inibidores da butirilcolinesterase (BuChE-i)

Estudos indicam que inibidores seletivos da butirilcolinesterase (BuChE-is) elevam os níveis extracelulares de ACh no cérebro melhorando o desempenho cognitivo em roedores (HARTMANN *et al.*, 2007) sem os clássicos efeitos colaterais adversos dos inibidores de acetilcolinesterase seletivos (AChE-is) ou pouco seletivos, tais como náusea e vômito. O donepezil (4) é o único produto comercial que é um inibidor seletivo da AChE enquanto que tanto rivastigmina quanto a galantamina são inibidores não seletivos. Assim sendo, todos os produtos comerciais produzem os efeitos colaterais adversos descritos acima.

1.4.2. Tratamento com Efeitos Potencialmente Modificadores da Doença

1.4.2.1. Inibidores da formação da placa β -amiloide

O peptídeo β -amilóide é um dos componentes principais das placas senis e emaranhados fibrilares que constituem uma das características neuro histopatológica da DA. Uma superprodução de peptídeo A β e sua posterior deposição em placas amilóides insolúveis em regiões específicas do cérebro, como o córtex cerebral e o hipocampo, responsáveis pelas funções cognitivas (NALIVAEVA e TURNER, 2013), podem representar a rota patológica chave desta doença. Assim, o peptídeo A β tornou-se um dos alvos principais para o desenvolvimento de terapias eficazes (GONG *et al.*, 2003).

O peptídeo A β é gerado a partir da clivagem enzimática sequencial da proteína precursora de amiloide (PPA). Embora não se conheça a principal função fisiológica da PPA, acredita-se que a mesma exerça um importante papel no desenvolvimento cerebral, na plasticidade sináptica e na memória (NALIVAEVA e TURNER, 2013). O mecanismo de clivagem proteolítica da PPA pode ocorrer por duas vias, a via não amiloidogênica e a

1.4.2.1.1. Intercalação dos Peptídeos β -amiloides

A região de interação entre as proteínas $A\beta$ é de aproximadamente 20 nm^2 , o que é muito maior do que a de uma micromolécula com a mesma proteína ($3\text{-}10 \text{ nm}^2$) (KESKIN *et al.*, 2008). Desta maneira, as micromoléculas que inibem a agregação β -amilóide precisam ser planejadas para se ligarem a importantes sub-regiões, tais como a sequência hidrofóbica central $A\beta_{16\text{-}21}$ (KLVFFA) ou os fragmentos C-terminais do peptídeo $A\beta_{42}$ (CTFs), a fim de fornecer impedimento estérico suficiente e evitar a agregação (HAN e HE, 2018). Normalmente, com esse intuito, são utilizados compostos com a presença de anéis aromáticos ligados a uma distância entre 0,8 e 1,6 nm (8-16Å) que afetam a fibrilação por desfavorecer o empilhamento π - π entre os peptídeos $A\beta$ durante a polimerização (KEPP, 2012; REINKE e GESTWICKI, 2007). Algumas moléculas orgânicas possuem essas características e são inibidoras da agregação β -amilóide tais como o corante orgânico vermelho do congo (7) e o produto natural curcumina (8) (LEE *et al.*, 2017).

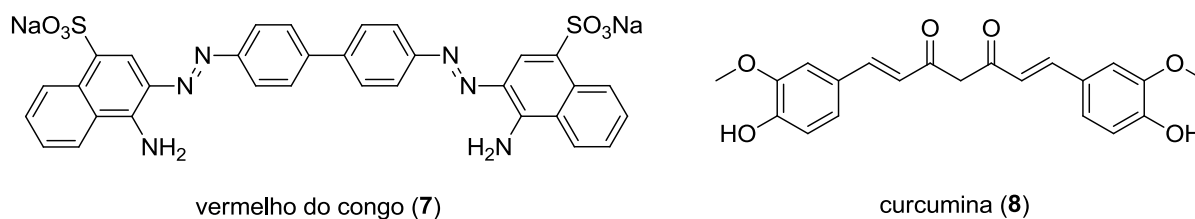


Figura 5. Compostos usados como inibidores da agregação β -amilóide.

1.4.2.1.2. Inibição da AChE:

A despeito da função descrita anteriormente, a AChE serve também como um importante cofator para a agregação do peptídeo $A\beta$, induzindo alterações conformacionais e bioquímicas em solução e acelerando sua fibrilogênese. Adicionalmente, os complexos AChE- $A\beta$ exibem uma neurotoxicidade consideravelmente maior em comparação com os peptídeos $A\beta$ livres (QUINN, 1987; ALVAREZ *et al.*, 1998). AChE associada ao peptídeo $A\beta$ também é capaz de acelerar sua agregação, levando a formação das fibrilas típicas da DA, aumentando sua neurotoxicidade (HAN e HE, 2018). Além disso, a atividade da AChE se encontra alterada no cérebro e no sangue dos pacientes com Alzheimer, uma vez que sua associação às placas amilóides altera suas propriedades enzimáticas e farmacológicas, além de aumentar sua resistência ao baixo pH, inibidores e excesso de substrato.

1.4.2.1.3. Quelantes de metais específicos

O desbalanço homeostático de biometais tais como alumínio, ferro, cobre e zinco no cérebro, seus papéis na formação de espécies reativas de oxigênio (ROS) e estresse oxidativo, e suas interações com a placa A β (figura 6) levando à produção de agregados tóxicos, têm sido demonstrado como fatores de grande contribuição para o desenvolvimento da patologia da DA. Os íons de cobre e zinco são conhecidos por acelerar a agregação de peptídeos A β levando a formação de placas senis (FALLER *et al.*, 2014). A complexação de metais (Cu, Fe e Zn) ao peptídeo A β e a toxicidade relacionada a este fenômeno estão no centro da hipótese metálica (SAVELIEFF *et al.*, 2013).

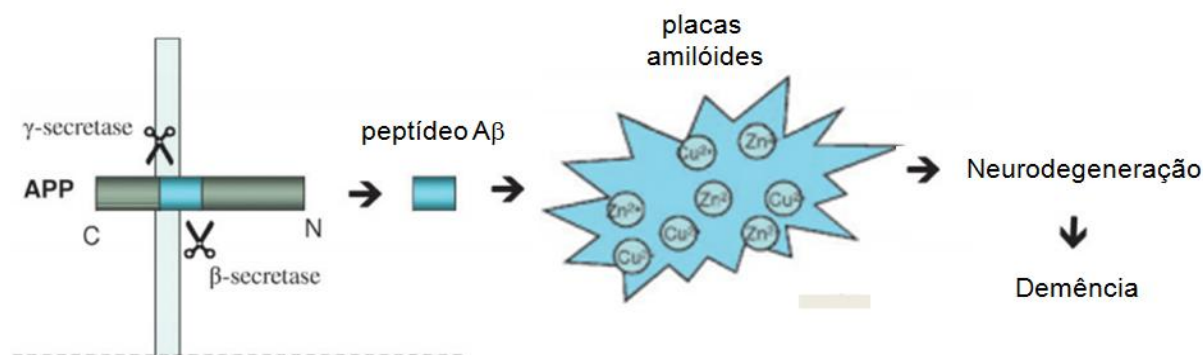


Figura 6. Formação de peptídeos β -amilóide pela clivagem da proteína precursora de amiloide (APP), formação de núcleos fibrilares ou agregados A β induzidos por metais e sua evolução resultante em neurodegeneração (Adaptado de TOUGU *et al.*, 2011).

O aumento da concentração de metais está também envolvido em processos inflamatórios potencialmente associados com as doenças neurodegenerativas. Quelantes de metais podem bloquear o estresse oxidativo relacionados com os metais, modular a formação de placas β -amilóides, ou de emaranhados neurofibrilares, bem como interferir com processos inflamatórios. Desta forma, a interrupção das interações peptídeo A β -metal usando micromoléculas quelantes planejadas adequadamente, tem sido uma área ativa de pesquisa. Nos últimos anos essa estratégia levou ao desenvolvimento de moléculas que têm como alvo a complexação ao Cu^{2+} e Zn^{2+} no complexo peptídeo A β - Cu^{2+} ou A β - Zn^{2+} , modulando a toxicidade induzida por metais (ROBERT *et al.*, 2015).

Estas características foram exploradas na síntese de quelantes derivados do clioquinol (9), um derivado da 8-hidroxiquinolina, e seus análogos (10-12) capazes de passar pela barreira hematoencefálica, levando à identificação de diversos compostos quelantes de metais dotados de atividade neuroprotetora - entre eles uma série de propargilaminas queladoras de ferro com ações

inibitórias sobre as monoamino-oxidases A e B (MAO A e B) (figura 7) (AVRAMOVICH-TIROSH *et al.*, 2007).

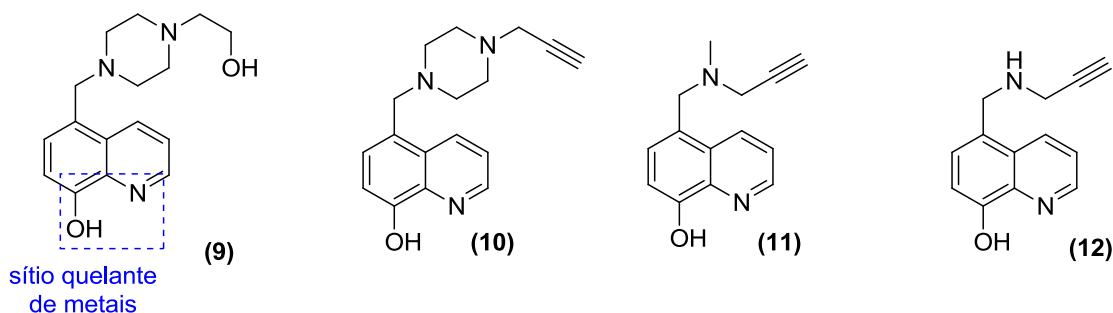


Figura 7. Estruturas de compostos derivados de 8-hidroxiquinolina quelantes a metais e capazes de passar pela barreira hematoencefálica.

1.4.3. Teranósticos na Doença de Alzheimer

A cooperação estreita entre a farmacocinética/dinâmica e disciplinas de imagem molecular originou um novo ramo do conhecimento, os teranósticos. Este termo foi cunhado para indicar que propriedades diagnósticas e terapêuticas se apresentavam concomitantes em um único agente, cujo o objetivo é otimizar a eficácia e segurança da terapia medicamentosa.

Exemplos de teranósticos têm sido relatados na literatura no tratamento do câncer, aterosclerose e neuropatias como o Alzheimer (STADERINI *et al.*, 2013). Como descrito, a DA apresenta depósitos de placas neuríticas, compostas de fibrilas de peptídeo A β , e fármacos que atuem inibindo sua formação são de grande utilidade. Entretanto, sua detecção precoce pode prevenir o avanço dos sintomas e a instalação da DA. Assim, compostos teranósticos que possam detectar e inibir a formação de placas A β podem ser de grande utilidade (STADERINI *et al.*, 2013).

Técnicas como tomografia por emissão de pósitrons (PET) e espectroscopia de fluorescência são empregadas para detectar agregados fibrilares. A PET é cara e limitada pela disponibilidade isotópica nas sondas. Por outro lado, muitos marcadores por fluorescência *in vitro* estão disponíveis, como o Vermelho do Congo (**7**) e a TioflavinaT (**13**), mas que não puderam traduzir-se em ferramentas clínicas devido à sua baixa especificidade, incapacidade de atravessar a barreira hematoencefálica e toxicidade.

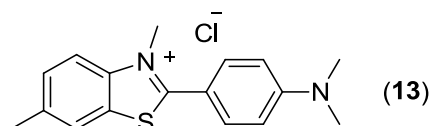


Figura 8. Estrutura química da TioflavinaT (ThT).

Portanto, há uma busca crescente por sensores de fluorescência com propriedades otimizadas que possam atuar como agentes teranósticos (STADERINI *et al.*, 2013). Nesse contexto as cumarinas se mostram como um excelente scaffold devido ao grande número de atividades farmacológicas atribuídas a este núcleo, além da presença constante, seja intrínseca ou após complexação a metais, de fluorescência nas mesmas (PEREIRA *et al.*, 2018).

1.5. Cumarinas

As cumarinas são heterociclos caracterizados como 1,2-benzopironas e compreendem um grupo de produtos naturais encontrados na natureza em uma grande variedade de plantas (KOSTOVA, 2006). O primeiro relato na literatura sobre o isolamento de cumarinas (figura 9) foi feito por Vogel em 1820 a partir de plantas da espécie *dipteryx odorata*, popularmente conhecida como cumaru. Após esse primeiro relato, muitos trabalhos foram publicados demonstrando o isolamento e síntese de cumarinas e análogos a partir de outras plantas (SOUZA *et al.*, 2016).

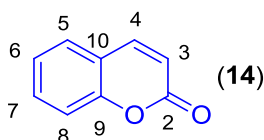


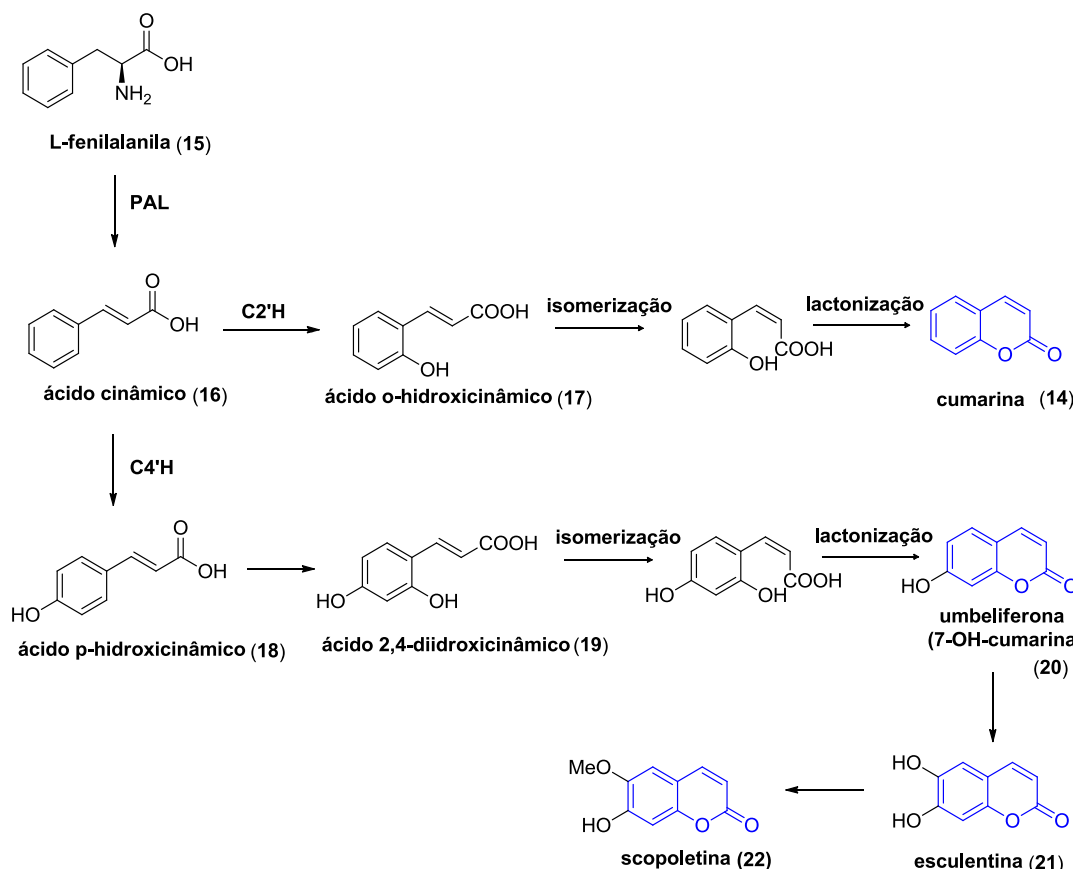
Figura 9. Estrutura química da cumarina.

As cumarinas compreendem uma importante classe de metabólitos secundários amplamente distribuídos no reino vegetal e encontrados em diversas partes de plantas, tanto em raízes como em flores e frutos. Diferentes espécies vegetais com hábitos bastante diversificados são capazes de biossintetizar cumarinas, como árvores, arbustos e ervas (RIBEIRO E KAPLAN, 2002).

Um número superior a 1300 cumarinas foram identificadas de fontes naturais, especialmente de plantas verdes (HOULT; PAYÁ, 1996, p. 713). Porém, a biossíntese de cumarinas não está restrita apenas a plantas, pois algumas espécies de fungos (*Armillariella tabescens*, *Fomitopsis officinalis*) e bactérias (*Streptomyces niveus*, *Escherichia coli*) são capazes de biossintetizar cumarinas (DEWICK 2002; COSTA *et al.*, 2016; YANG *et al.*, 2015).

1.5.1. Biogênese

A principal via de biossíntese de cumarinas ocorre pela rota do ácido chiquímico, via ácido cinâmico, através do metabolismo da fenilalanina (esquema 1). Nesta via, a L-fenilalanina sofre desaminação pela enzima fenilalanina amônio liase (PAL), produzindo o ácido trans-cinâmico. Em seguida, ocorre *orto/para* hidroxilação do ácido trans-cinâmico, realizada pelas enzimas cinamato 2'-hidroxilase (C2'H) e cinamato 4'-hidroxilase (C4'H), respectivamente, que geram o ácido 4-hidroxicinâmico, 2-hidroxicinâmico e 2,4-diidroxicinâmico, respectivamente. Após a hidroxilação, os ácidos cinâmicos sofrem isomerização E/Z da dupla ligação da cadeia lateral, seguida de lactonização. A partir desta biossíntese, podem ser obtidas cumarinas com outros substituintes adicionais de oxigênio ao anel da umbeliferona (20), como, por exemplo, a esculetina e scopoletina (esquema 1). A umbeliferona (20), esculetina (21) e scopoletina (22) são as cumarinas mais comuns na natureza (PEREIRA *et al.*, 2018).



Esquema 1. Proposta da rota biossintética da cumarina e umbeliferona pela via do ácido chiquímico.

PAL (fenilalanina amônia-liase); C2'H (cinamato 2'-hidroxilase); C4'H (cinamato 4'-hidroxilase)
(PEREIRA *et al.*, 2018).

As cumarinas possuem um importante efeito na fisiologia das plantas, atuando como antioxidante e inibidor enzimático. Essa classe de substâncias está envolvida no controle do crescimento das plantas, na respiração, fotossíntese e na defesa contra infecções (KOSTOVA, 2006).

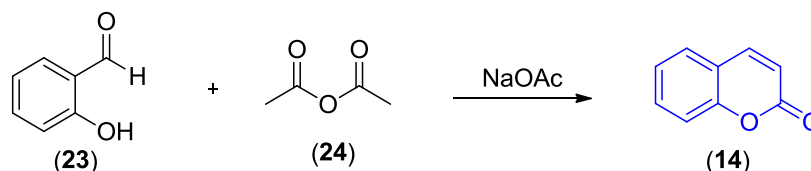
As interessantes propriedades biológicas das cumarinas fizeram com que esta classe de compostos despertasse a atenção para a síntese orgânica (MEDINA *et al.*, 2015), a qual possibilitaria a obtenção dos compostos conhecidos em maior escala e a obtenção de novos derivados com aplicações biológicas e industriais.

1.5.2. Síntese de cumarinas simples

1.5.2.1 Reação de Perkin

A história da síntese de cumarinas começou em meados do século XIX com a descoberta da famosa síntese por Perkin. As metodologias clássicas para obtenção de cumarinas são classificadas em reações de Perkin, Pechmann e Knoevenagel.

A reação de Perkin consiste na obtenção de cumarinas pela condensação aldólica de um aldeído *orto* (-OH) substituído (23) e um anidrido acético (24), em presença de um sal básico (esquema 2) (MURRAY, 1995).

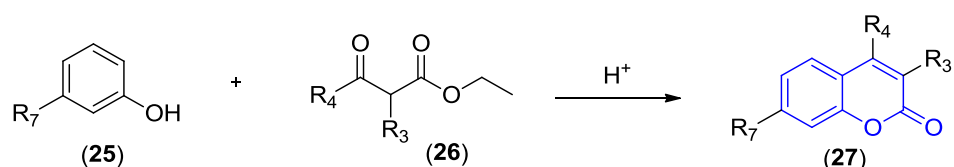


Esquema 2. Reação de Perkin.

Uma síntese de uma grande diversidade estrutural de cumarinas via reação de Perkin e mediada por um agente de acoplamento (T3P) foi reportada na literatura com bons rendimentos reacionais. O protocolo de síntese emprega, além do agente de acoplamento, salicilaldeídos ou 2-hidroxiarilcetonas e derivados de ácido acético, dando acesso a uma grande variedade de cumarinas substituídas. O protocolo de reação utiliza condições reacionais brandas e é capaz de tolerar grupos funcionais com maior sensibilidade (AUGUSTINE *et al.*, 2012).

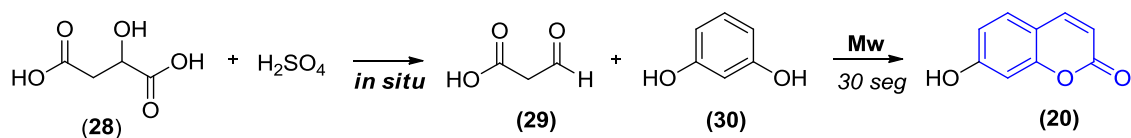
1.5.2.2. Reação de Pechmann

A reação de Pechmann consiste na obtenção de cumarinas (27) a partir da condensação de fenóis (25) com β -cetoesteres (26), em presença de catálise ácida (esquema 3). Esse protocolo de síntese foi amplamente utilizado para obtenção de cumarinas com propósitos biológicos e de interesse industrial (SYMEONIDIS *et al.*, 2009). Muitos esforços foram feitos para otimização dos parâmetros reacionais com o objetivo de aumentar os rendimentos e reduzir o tempo de reação. A utilização de micro-ondas reacional e suporte sólido como catalise foram otimizações realizadas com sucesso em muitos casos (LAUFER *et al.*, 2003; FRÈRE *et al.*, 2001).



Esquema 3. Reação de Pechmann.

Um exemplo clássico de cumarina amplamente empregada na literatura é a umbeliferona (7-OH-cumarina) (20), que é tradicionalmente sintetizada pela condensação de Pechmann (esquema 4) (SÁNCHEZ *et al.*, 2009). A metodologia de síntese tradicional deste composto utiliza resorcinol, ácido málico (28), ácido sulfúrico como catalisador e etanol como solvente em alta temperatura (90-120°), por aproximadamente 2-4 horas (BULUT E ERK, 1996). No entanto, Symeonidis e colaboradores sintetizaram um grande número de cumarinas com bons rendimentos reacionais, na grande maioria dos casos, utilizando micro-ondas reacional e em ausência de solvente (SYMEONIDIS *et al.*, 2009).

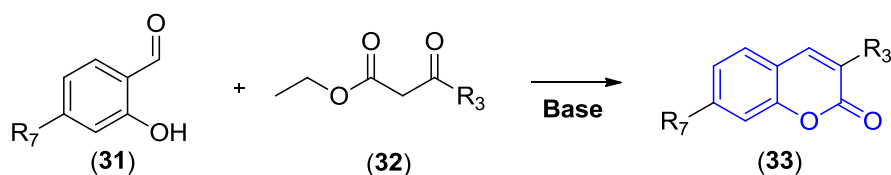


Esquema 4. Síntese da umbeliferona.

A reação ocorre basicamente em duas etapas: Na primeira etapa o ácido málico (28) reage com o ácido sulfúrico e gera ácido formilacético (29) *in situ*, que na etapa seguinte atuará como eletrófilo. A produção de ácido formilacético (29) gera liberação de H_2O e CO . Na etapa seguinte o ácido formilacético sofre ataque nucleofílico do resorcinol (30) gerando a umbeliferona (31) (PEREIRA *et al.*, 2018).

1.5.2.3 Reação de Knoevenagel

A reação de Knoevenagel consiste na condensação de aldeídos com metilenos ativados em presença de um catalisador levemente básico como amônia, ou em alguns casos combinações de ácidos carboxílicos ou de Lewis com aminas (esquema 5). Um grande número de derivados cumarínicos foram sintetizadas por esta metodologia, principalmente derivados substituídos na posição R₃ e R₇ (TRKOVNIK E IVEZI, 2000; PEREIRA *et. al.*, 2016).



Esquema 5. Reação de Knoevenagel.

A síntese do produto natural Isofraxidin (7-hidroxi-6,8-dimetoxicumarina) foi produzida por Rouessac e Leclerc a partir de um aldeído aromático (siringaldeído) e ácido de Meldrum em presença de um ácido de Lewis (ZnO), promovendo a reação de Knoevenagel. O ácido carboxílico formado sofreu descarboxilação em presença de Cobre (ROUESSAC e LECLERC, 1993).

Maggi e colaboradores propuseram a síntese do ácido cumarino-3-carboxílico por meio de uma reação de condensação de Knoevenagel, utilizando salicilaldeído e o ácido de Meldrum e empregando água como solvente (MAGGI *et al.*, 2001). A abordagem em química verde apresentou melhores resultados utilizando o aquecimento convencional com rendimentos reacionais de até 97% em comparação a utilização de um reator micro-ondas dedicado (10-30%) (CUNHA *et al.*, 2015).

Com o avanço dos métodos de síntese e da química medicinal, cada vez mais os químicos medicinais utilizam técnicas de desenvolvimento racional de fármacos, como o bioisosterismo, a hibridação molecular e a relação estrutura-atividade (QSAR) em modificações estruturais do núcleo cumarínico, com finalidades terapêuticas (BORGES *et al.*, 2005).

1.5.3 Propriedades farmacológicas das cumarinas

As cumarinas possuem grande contribuição na prevenção e tratamento de doenças devido à capacidade de exercer interações não covalentes (ligação de hidrogênio, interações

eletrostáticas, coordenação a metais, interações de Van de Waals etc.) com muitos sítios de interação no organismo, possuindo um amplo espectro de atividades biológicas como anticoagulante, antioxidante, anticâncer, antimicrobiana e antineurodegenerativa (PEREIRA *et al.*, 2018).

A Figura 10 exibe algumas estruturas de derivados cumarínicos que já foram clinicamente utilizados. Por exemplo, a Warfarina e a Fenprocumona são fármacos já registrados tanto pela ANVISA quanto pela FDA e são usados como agentes anticoagulantes principalmente no tratamento e prevenção de doenças tromboembólicas (FDA, 2018; ANVISA, 2018).

O novobiocin (**41**), também registrado pela FDA, é um 7-O-glicosídeo-cumarina de grande destaque. Esta molécula apresenta atividade antibiótica por ser um potente inibidor da DNA girase bacteriana e é isolada a partir da bactéria *Streptomyces niveus* (SANDHU *et al.*, 2014), além disso, o novobiocin foi identificado como o primeiro inibidor C-terminal Hsp90 junto a clorobiocina, a coumermicina, e outros derivados cumarínicos para uso como antitumorais (MARCUS *et al.*, 2000).

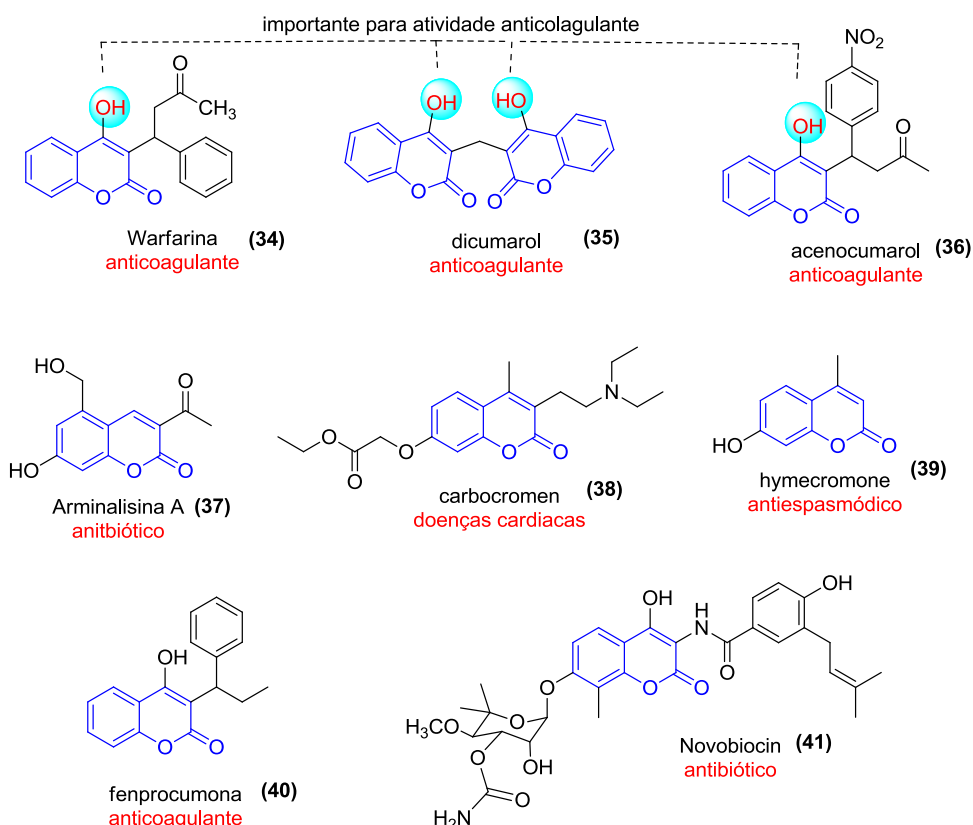


Figura 10. Derivados de cumarinas usados clinicamente (SANDHU *et al.*, 2014). O núcleo cumarínico está destacado em azul.

1.5.3.1 Cumarinas como agentes terapêuticos na DA

Na literatura, não são poucos os casos de uso das cumarinas com véis de tratamento da DA. O derivado de cumarina Ensaculina (**42**) é um conhecido inibidor de AChE, testado em fases clínicas na forma de cloridrato. Modificações estruturais no composto **42** geraram o composto **43** com promissora atividade inibitória para AChE ($CI_{50} = 4,5 \mu M$) em relação ao padrão donepezil (1) ($CI_{50} = 0,11 \mu M$) (ZHOU *et al.*, 2008). Estudos posteriores sugeriram que a presença de fenilpiperazina na posição C-4 da cumarina exerce uma contribuição positiva para a atividade biológica e que a distância entre o nitrogênio da piperazina e o carbono carboxílico da cumarina é um fator importante a ser considerado. A presença do anel piperazina se mostrou importante devido à interação do átomo de nitrogênio com o sítio catalítico da AChE (PENG *et al.*, 2013).

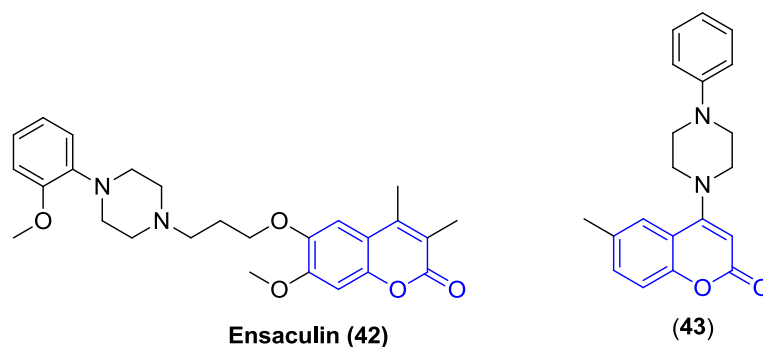


Figura 11. Cumarinas inibidoras de AChE com substituintes feniol-piperazina.

Os sais de amônio quaternário **44** e **45** apresentaram potentes atividades inibitórias frente a AChE, com valores de CI_{50} de 2,1 e 1,0 nM, respectivamente. Ambos os compostos apresentam alta afinidade e seletividade para AChE. A impressionante afinidade para AChE é resultante da forte interação com ambos os sítios dessa enzima, o periférico e o catalítico aniônico (LEONETTI *et al.*, 2008).

O derivado de cumarina funcionalizada com anel tetrazólico (**46**) demonstrou atividade inibitória de agregação de proteína β -amilóide e os estudos comparativos demonstraram a importância das subunidades estruturais tetrazola e benzotiazola, resultando em aumento da atividade inibitória, sendo capaz de interromper o crescimento de agregação proteica em múltiplos locais (SOTO-ORTEGA *et al.*, 2011).

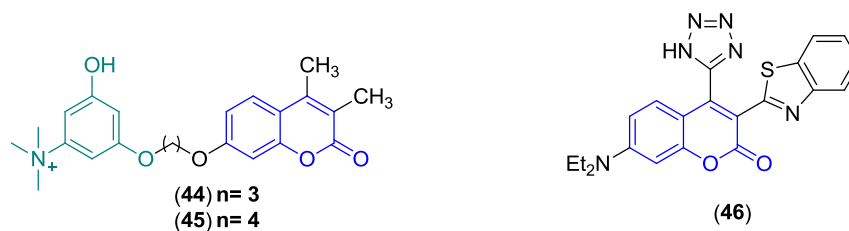


Figura 12. Sais de amônio quaternários inibidores da AChE (**44-45**); Derivado tetrazola-benzotiazólico inibidor de agregação de proteína β -amiloide (**46**).

Nos últimos anos, muitos pesquisadores estão direcionando esforços para a busca de novos tratamentos para DA, e a utilização da estratégia de múltiplos alvos terapêuticos em um único composto protótipo está se mostrando uma estratégia interessante para a descoberta de novos candidatos a fármacos (LEON *et al.*, 2013; PISANI *et al.*, 2011). Neste sentido, Hamulakova e colaboradores propuseram um híbrido molecular (**47**) contendo uma conhecida subunidade inibidora do sítio catalítico de AChE, a tetraidro-aminoacridina oriunda da tacrina, e um bloco cumarínico que interage no sítio periférico de AChE. O derivado heterodimérico 47 apresentou atividade inibitória para AChE 32 vezes maior que a tacrina, com $CI_{50} = 0,0154 \mu M$ (HAMULAKOVA *et al.*, 2014).

Xie e colaboradores sintetizaram uma série de híbridos de tacrina-cumarina como protótipos para o tratamento multifatorial da DA. A avaliação farmacológica foi feita frente à AChE e à MAO, com maior seletividade para MAO-B. O composto 48 apresentou a maior atividade inibitória para MAO-B com $CI_{50} = 0,24 \mu M$ e para hAChE com $CI_{50} = 16,1 nM$ (XIE *et al.*, 2015).

Lan e colaboradores propuseram a síntese de sais de amônio quaternários híbridos, inspirados no trabalho de Xie et al., utilizando um núcleo cumarínico, reconhecido inibidor de MAO-B, e um núcleo benzil-piridina que interage com a AChE no sítio catalítico (**49**). Os derivados demonstraram seletividade para AChE, sendo que para dois derivados $R = (3-F)$ e $R = (2-CH_3)$, a atividade inibitória foi de 24,9 e 25,9 nM, respectivamente, o que representou inibição 1,9 vezes superior ao padrão donepezil (LAN *et al.*, 2017).

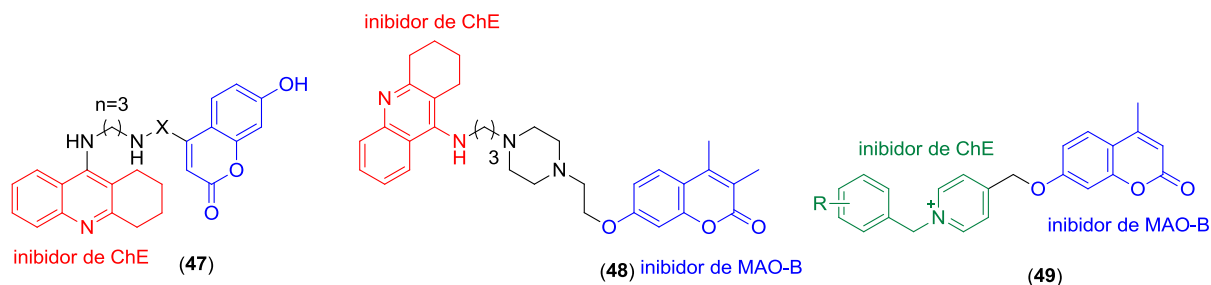


Figura 13. Híbridos moleculares de cumarina com atividade frente a alvos envolvidos na DA.

Além das bioatividades relacionadas às cumarinas, outra característica importante destes compostos é a emissão de fluorescência que estas apresentam. Como dito anteriormente, essa característica pode ser explorada no planejamento de compostos teranósticos, no que diz respeito a possibilidade de uso em diagnósticos. Desta forma, os próximos capítulos tratarão deste fenômeno e algumas aplicações do mesmo na descoberta de cumarinas como sondas óticas.

1.6 O Fenômeno fotofísico da fluorescência e suas aplicações

1.6.1 Aspectos teóricos para o estudo fotofísico

Quando ocorre a interação de luz com a matéria, um grande número de processos podem ocorrer. Caso não haja alterações estruturais na mesma, podemos considerar o processo como fotofísico. Porém, em caso de alguma mudança química ao final do processo, pode-se considerar que ocorreu um processo fotoquímico. O entendimento da fotofísica e da fotoquímica de um dado composto ou classe de compostos nos permite compreender e explorar várias de suas propriedades. Este entendimento passa pelo mapeamento das rotas de desativação dos estados excitados, permitindo explorar as características de interesse (ANSLYN e DOUGHERTY, 2006).

1.6.2 Radiação eletromagnética.

A energia da luz monocromática (a de um comprimento de onda) é proporcional à frequência (ν), e inversamente proporcional ao comprimento de onda (λ). Em outras palavras, quanto maior o comprimento de onda, menor será a energia. O comprimento de onda geralmente é representado em nanômetros (10^{-9}), porém, outra forma de medida comum é utilizar um recíproco do comprimento de onda, ν , geralmente mensurado em cm^{-1} ou número de onda (ANSLYN e DOUGHERTY, 2006).

$$E = hv \text{ com } v \text{ em } s^{-1} \text{ e } h = 6.63 \times 10^{-27} \quad (\text{Equação 1})$$

$$v = c/\lambda \quad (\text{Equação 2})$$

A fotoquímica está associada à excitação eletrônica, ou seja, a promoção de um elétron de um orbital para outro orbital de nível mais energético, permitindo a criação de um estado eletrônico excitado. A energia necessária para essas transições eletrônicas está na faixa do UV e do espectro visível (figura 14).

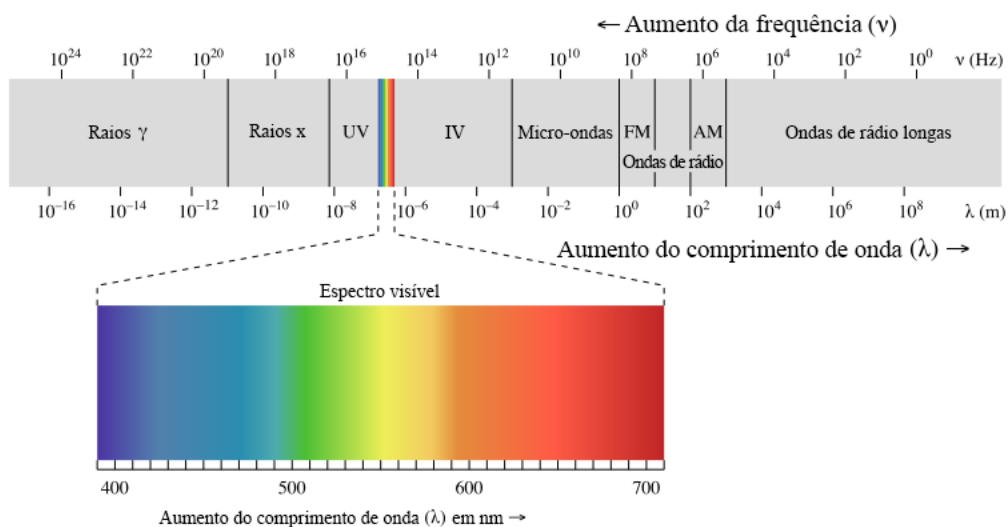


Figura 14. Faixa da radiação eletromagnética (KHANACADEMY, 2017)

Os raios X fornecem uma quantidade de energia tão elevada que possibilita a ejeção completa de elétrons de átomos e moléculas. À medida que passamos da radiação UV/Vis para comprimentos de onda mais longos, conseqüentemente para energias mais baixas, avançamos para a radiação infravermelha, que excita as vibrações nucleares (espectroscopia IV); radiação micro-ondas excitam precessões de elétrons em um campo magnético e alguns movimentos de torção de energia mais baixos; ondas de rádio excitam precessões nucleares em campo magnético (RMN). A energia na faixa do UV/Visível está dentro da faixa de energia capaz de quebrar ligações simples, não à toa, a fotoquímica está associada a essa faixa de radiação.

1.6.3 Fenômeno da absorção.

A absorção de um fóton de luz na faixa do UV/vis leva a um estado eletrônico excitado molecular. A molécula adquire um estado eletronicamente excitado quando um elétron é promovido de um orbital ligante para um antiligante. Para a maioria dos compostos orgânicos o orbital que perde o elétron é o HOMO ou um orbital próximo a ele em energia, enquanto que o

orbital que recebe o elétron é o LUMO (figura 15). O estado eletrônico excitado possui uma superfície de energia potencial que pode ser completamente diferente e que dita as conformações moleculares e possíveis reações químicas. Uma vez que existem muitos orbitais ligantes e antiligantes em moléculas orgânicas simples, existe, em teoria, um grande número de possíveis estados excitados e de superfícies de energia correspondentes para cada molécula. No entanto, normalmente apenas duas ou três superfícies de energia são consideradas para a discussão fotoquímica, já que a energia na faixa do UV/vis acessa somente algumas transições eletrônicas (ANSLYN e DOUGHERTY, 2006).

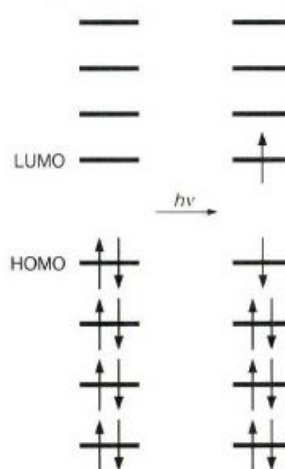


Figura 15. Uma visão simplista da excitação (ANSLYN e DOUGHERTY, 2006).

Os processos fotoquímicos e fotofísicos iniciam no estado fundamental de uma molécula. Na grande maioria das moléculas o estado fundamental é singlete (S_0), e de acordo com a lei de Stark-Einstein, uma molécula absorve luz suficiente para produzir uma única transição eletrônica, e a energia da luz absorvida deve combinar a diferença de energia entre o estado fundamental e algum estado excitado.

A transição eletrônica durante a absorção de S_0 para S_1 é essencialmente instantânea, ocorre entre 10^{-16} e 10^{-14} s. Nenhum processo em escala química pode competir com a absorção, já que apenas o movimento dos elétrons está envolvido (ANSLYN e DOUGHERTY, 2006).

Experimentalmente, a eficiência da absorção é expressa pelo coeficiente de extinção molar, ϵ , na lei de Lambert-Beer (equação 3). O quantificador $\log [I_0/I]$, ou A , é denominado densidade óptica ou absorvância da amostra. O coeficiente de extinção molar é a maneira mais conveniente de expressar a eficiência de absorção de luz e um gráfico de absorção em função do comprimento de onda é denominado normalmente de espectro de UV/vis.

$$\text{Log } [I_0/I] = A = \varepsilon bc \quad (\text{Equação 3})$$

I_0 = intensidade de luz incidente

I = intensidade de luz transmitida

b = caminho óptico (cm)

c = concentração (mol/L)

ε = coeficiente de extinção molar (L/mol·cm)

Quando um elétron é excitado de um orbital molecular π para um orbital π^* , existe agora um elétron no orbital original π e um elétron no orbital π^* . Essa transição eletrônica é chamada de transição $\pi-\pi^*$. Quando uma transição é proveniente de um orbital não-ligante (par de elétrons (n)) para um orbital antiligante π^* , a transição é denominada transição $n-\pi^*$.

Um grupo funcional ou combinação de grupos funcionais que absorvem luz na faixa do UV/vis é denominado como cromóforo. Existem dois tipos gerais de cromóforos, $\pi-\pi^*$ e $n-\pi^*$ e que diferem em muitas características (tabela 1). Quanto maior a extensão de conjugação do sistema π , maior será o comprimento de onda de absorção do sistema $\pi-\pi^*$.

Tabela 1. Características das transições $\pi-\pi^*$ e $n-\pi^*$.

$\pi-\pi^*$	$n-\pi^*$
“permitida” $\varepsilon > 10^3$	“proibida” $\varepsilon < 10^2$
Aumento de polaridade do solvente: aumento do comprimento de onda (deslocamento batocrômico)	Aumento de polaridade do solvente: redução do comprimento de onda (deslocamento hipsocrômico)
Reações típicas: Rearranjo pericíclico; cicloadição/cicloeliminação	Reações típicas: Abstração de átomos; adição radicalar; transferência de elétrons.

Em geral as transições $\pi-\pi^*$ ($\varepsilon > 10^3$) são mais intensas que as transições $n-\pi^*$ ($\varepsilon < 10^2$) e empiricamente as transições $\pi-\pi^*$ e $n-\pi^*$ podem ser distinguidas pela resposta apresentada com a mudança de polaridade do meio. O comprimento máximo de absorção (λ_{max}), assim como a intensidade de absorção, dependem do microambiente cromofórico. A solvatação pode influenciar na energia das transições eletrônicas e interações com receptores sintéticos ou naturais, podendo também provocar outros tipos de alterações. Quando o deslocamento do máximo de absorção é para menores e maiores comprimentos de onda, o mesmo é definido como

hipsocrômico e batocromico, respectivamente. Quando a intensidade de absorção aumenta ou diminui, o efeito na absorção é chamado de hiperocrômico e hipocrômico, respectivamente (ANSLYN e DOUGHERTY, 2006).

1.6.4 Diagrama de Jablonski

O diagrama de Jablonski foi proposto pela primeira vez em 1935 e em um diagrama típico, os estados eletrônicos singlete são geralmente representados por S_0 , S_1 e S_2 . Os subníveis denotados pelos números quânticos 0, 1, 2 representam os estados vibracionais, os quais são desativados por processos de relaxação vibracional (RV) (figura 16).

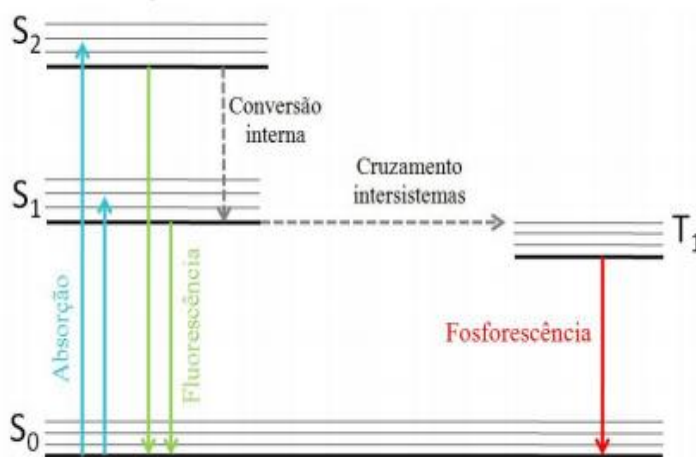


Figura 16. Diagrama de Jablonski (adaptado de KUPLICH, 2007).

Uma molécula excitada assume um estado de maior instabilidade energética em relação ao estado fundamental. Se a molécula não se rearranjar ou sofrer um processo químico, ela buscará perder energia para retornar ao estado fundamental (processo físico). De fato, existe um número de diferentes possibilidades físicas para a “desexcitação”, onde alguns processos poderão ser mais favorecidos, dependendo do tipo de molécula e da natureza dos estados excitados envolvidos. Esses caminhos são caracterizados por velocidades muito rápidas, e são comumente classificados em três categorias principais (GILBERT e BAGGOTT, 1991).

- Processos radiativos: envolvendo a “desexcitação” por emissão do excedente de energia sob a forma de radiação eletromagnética pela molécula excitada;
- Processos não-radiativos: onde os elétrons inicialmente em estados excitados são transferidos a outros estados de menor energia, sem que haja emissão de radiação eletromagnética

- Processos de supressão: onde a energia é transferida para outra espécie (aceptor)

Os processos radiativos são geralmente classificados como fenômenos de luminescência, que é formalmente dividida em duas categorias: fluorescência e fosforescência, dependendo da natureza do estado excitado. Em estados excitados singlete, o elétron que foi excitado, preserva a multiplicidade do estado fundamental. Assim, seu retorno ao estado fundamental tende a ocorrer rapidamente pela emissão de um fóton. Esse processo é chamado de fluorescência e seu tempo de vida é tipicamente da ordem de $1-10^2$ ns (TURRO, 1991; LAKOWICZ, 1999).

Já a fosforescência é a emissão da luz a partir de estados triplete excitados, onde o elétron no estado excitado muda de multiplicidade de spin, e passa a ter o mesmo spin do elétron remanescente no estado fundamental. Isto leva a transições com velocidades lentas e com tempos de vida que podem variar de milisegundos a segundos (LAKOWICZ, 1999).

É importante ressaltar que tanto a fluorescência quanto a fosforescência (levando-se em conta que o povoamento dos estados triplete ocorre pelo ISC (cruzamento intersistema) a partir do estado S_1) ocorrem usualmente a partir do estado S_1 . Isso porque a desativação de estados singlete superiores (S_2 , S_3 , etc) até S_1 , ocorre usualmente por via não-radiativa (conversão interna) e é extremamente rápida (TURRO, 1991; LAKOWICZ, 1999).

1.6.5 Fluorescência

As moléculas que exibem fluorescência são, ou possuem alguma subunidade estrutural denominada fluoróforo, análogo ao termo cromóforo, presente em moléculas que absorvem luz na faixa do UV/vis. Na maioria dos casos, os espectros de fluorescência são observados em maiores comprimentos de onda (menor energia) que o espectro de absorção e ambos exibem uma relação de imagem espelhada. (ANSLYN e DOUGHERTY, 2006).

O espectro de fluorescência é obtido pela irradiação da amostra em comprimentos de onda onde a molécula absorve luz, normalmente se irradia no comprimento de onda de máxima absorção (λ_{\max}), para obtenção do espectro de emissão com máxima intensidade. Os instrumentos utilizados para mensurar os espectros de emissão (relação comprimento de onda pela intensidade de emissão) são denominados de fluorímetros ou espectrofluorímetros (figura 17) (ANSLYN e DOUGHERTY, 2006).

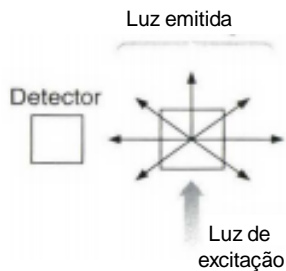


Figura 17. Representação simplista da detecção da fluorescência.

A intensidade de luz emitida (I_e) é relacionada com o caminho óptico (b), a concentração do fluoróforo (c), e o rendimento quântico de fluorescência (Φ_f) em cada comprimento de onda. No entanto, devido ao fluoróforo primeiramente absorver um fóton de luz, existe uma dependência da luz emitida após a irradiação inicial (I_0) e do coeficiente de extinção molar de absorção do fluoróforo (ϵ). Estes parâmetros podem ser representados por uma equação similar a equação de Lambert Beer para fluorescência (equação 4).

$$I_e = 2.3I_0 \epsilon \Phi_f bc \quad (\text{Equação 4})$$

A diferença entre o máximo da banda de absorção, com maior comprimento de onda, e o máximo da banda de emissão, com menor comprimento de onda, é chamado de deslocamento de Stokes (figura 18) e fornece informações sobre as mudanças na geometria molecular após a excitação e a influência exercida pelo meio solvente. Quanto maior o deslocamento de Stokes, maior será a diferença da geometria molecular entre as superfícies do estado fundamental e do estado excitado (ANSLYN e DOUGHERTY, 2006).

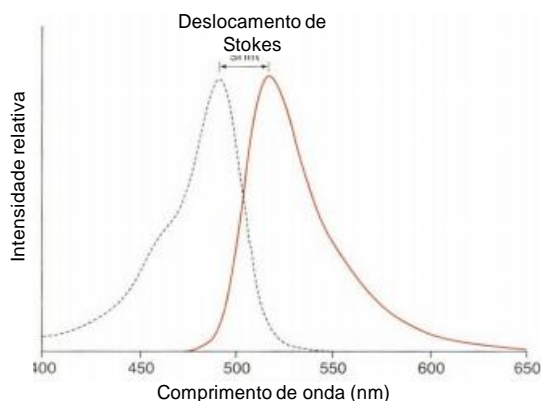


Figura 18. Sobreposição dos espectros de absorção (cinza) e de emissão (laranja) da fluoresceína (Adaptado de ANSLYN e DOUGHERTY, 2006).

A fluorescência é um processo rápido que exibe constante K_f na faixa de 10^8 - 10^5 s, fornecendo tempo de vida de fluorescência, ou tempo de vida radiativo, ($1/k_f = \tau_f$) na faixa de 10^8 - 10^{-5} s. A fluorescência é uma técnica altamente sensível ao meio. Muitos fluoróforos sofrem grandes deslocamentos no espectro de emissão e no tempo de vida em resposta a mudança de solvente. Esse efeito é conhecido como efeito solvatocrômico e possui muitas aplicações. Compostos que sofrem efeito solvatocrômico (figura 19) podem ser utilizados como sondas de polaridade em microambientes celulares, por exemplo:

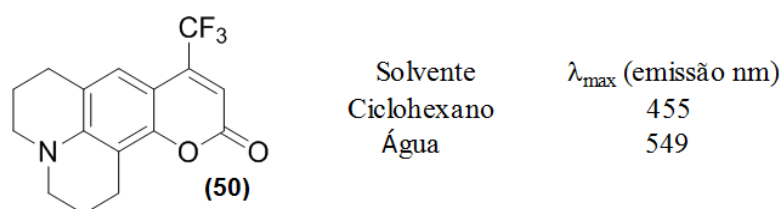


Figura 19. Efeito solvatocrômico sobre a cumarina **50**.

1.6.5.1 Rendimento Quântico de fluorescência

O rendimento quântico de fluorescência é um indicador que avalia a eficiência entre os fótons que foram absorvidos e os que foram emitidos por uma determinada molécula, e pode ser determinado principalmente de duas maneiras:

- Esfera de integração: A medida com esfera de integração utiliza superfícies espalhadoras de luz e solvente (branco) para calibrar o sistema detector/excitação.
- Utilizando padrão conhecido: É a principal metodologia utilizada e requer o uso de um padrão fluorescente cujas propriedades do espectro de emissão estejam intimamente relacionadas com a espécie desconhecida, ou seja, em faixas de emissões semelhantes (EATON *et al.*, 1988). A relação matemática entre padrão e amostra é dada pela equação 5, onde o subscrito p refere-se ao padrão utilizado, A e A_p são respectivamente as absorções da amostra e do padrão nos respectivos comprimentos de onda de excitação, F é a área sob a curva de emissão e n o índice de refração do solvente onde se encontra a amostra (n_p é índice de refração do solvente do padrão) (BECKER E MACANITA, 1994).

$$\Phi_f = \Phi_p \left(A_p F n^2 / A F_p n_p^2 \right) \quad \text{(Equação 5)}$$

A escolha do padrão segue geralmente a análise da região onde a espécie em estudo emite (tabela 2) (BECKER E MACANITA, 1994).

Tabela 2. Características de alguns padrões utilizados na literatura para determinar rendimentos quânticos de fluorescência (adaptado de BECKER E MACANITA, 1994).

Região	Composto	Solvente	Φ_f
270 – 300 nm	Benzeno	Ciclohexano	0.005 ± 0.02
300 – 380 nm	Triptofano	H ₂ O (pH 7.2)	0.14 ± 0.02
300 – 400 nm	Naftaleno	Ciclohexano	0.23 ± 0.02
315 – 480 nm	2-aminopiridínio	H ₂ SO ₄ 1N	0.6 ± 0.05
360 – 480 nm	Antraceno	Etanol	0.27 ± 0.03
400 – 500 nm	9,10-difenilantraceno	Ciclohexano	0.9 ± 0.02
400 – 600 nm	Bissulfato de quinino	H ₂ SO ₄ 1N	0.546
600 – 650 nm	Rodamina 101	Etanol	1.0 ± 0.02
600 – 650 nm	Violeta cresila	Metanol	0.54 ± 0.03

1.6.6 A fluorescência aplicada ao desenvolvimento de sondas ópticas

Nos últimos anos ocorreu um aumento significativo no uso da espectroscopia de fluorescência em sistemas bioquímicos. Esta técnica pode ser usada para determinar a sequência de DNA do genoma e para descobrir novos compostos a uma velocidade sem precedentes. Devido à alta sensibilidade de detecção por fluorescência, somado à dificuldade e o alto custo de manipulação de substâncias radioativas, existe uma tendência crescente na utilização da fluorescência como técnica analítica. Como exemplo, no campo da medicina, os imunoenaios enzimáticos (ELISA) e os imunoenaios de polarização de fluorescência, tornaram-se testes de diagnóstico padrão. Em biologia celular, o movimento e localização das substâncias intracelulares são monitorados por microscopia de fluorescência (LAKOWICZ, 1999).

As sondas de fluorescência são fundamentais para a aplicação da espectroscopia de fluorescência. As propriedades espectrais das sondas determinam as informações que podem ser obtidas nos experimentos, determina o comprimento de onda e a resolução do tempo de instrumentação. Muitas sondas de fluorescência estão disponíveis para diversos fins nas ciências biológicas, e suas subunidades fluorescentes (fluoróforos) podem ser grosseiramente divididos em duas classes principais, intrínsecos (ocorrem naturalmente) e extrínsecos (LAKOWICZ, 1999).

Podem ser considerados fluoróforos intrínsecos alguns aminoácidos aromáticos, como o triptofano (51), flavinas e clorofila. Dentro dessa categoria, também pode ser incluída a GFP (Green fluorescent protein), devido a sua propriedade fluorescente intrínseca. Os fluoróforos extrínsecos são, em geral, mas não exclusivamente, pequenas moléculas orgânicas que são adicionadas a amostras para conferir fluorescência quando não existe, ou alterar as propriedades espectrais da amostra. Entre as principais classes de fluoróforos utilizadas estão a fluoresceína (52), rodamina (53), cianina (54) e cumarinas (20, 50) (figura 20) (LAKOWICZ, 1999).

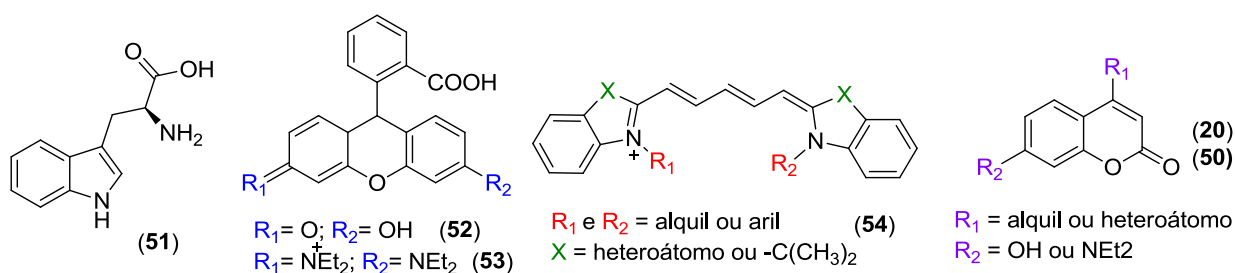


Figura 20. Algumas classes de fluoróforos conhecidos.

1.6.6.1 Cumarinas aplicadas como sondas ópticas de metais

Como dito anteriormente, os íons de cobre e zinco são conhecidos por acelerar a agregação de peptídeos A β levando a formação de placas senis e estão no centro da hipótese metálica. Assim, a complexação de metais como Cu²⁺ e Zn²⁺ poderia ser utilizada tanto na terapêutica da DA, assim como na detecção de possíveis depósitos desses metais em pacientes com esta doença, o que pode ser útil como uma ferramenta de diagnóstico.

1.6.6.1.1 Cumarinas como sondas de cobre

O Cobre é o terceiro metal de transição em maior quantidade no organismo e desempenha uma série de funções essenciais em muitos sistemas biológicos (ALPAT *et al.*, 2007). Esse metal é encontrado em uma série de proteínas e como um cofator em uma variedade de metaloenzimas (ZHANG *et al.*, 2013). Ademais, Cu²⁺ pode ser tolerado por humanos em concentrações relativamente grandes, porém sua deficiência e seu excesso podem levar a complicações no corpo humano (TUTULEA-ANASTASIU *et al.*, 2013).

Recentemente, You e colaboradores descreveram um derivado de cumarina (55) capaz de se complexar e detectar seletivamente Cu²⁺ com baixo limite de detecção em solução de água/acetonitrila. Devido a propriedade paramagnética, Cu²⁺ tem a propriedade de causar o

quench da emissão de fluorescência do ligante, conferindo um estado não-fluorescente (*turn-off*) ao complexo formado. Além de útil como agente de complexação, o complexo final formado demonstrou alta seletividade para detecção de Histidina e biotióis em células vivas e foi aplicada para a detecção de histidina em células (figura 21) (YOU *et al.*, 2014).

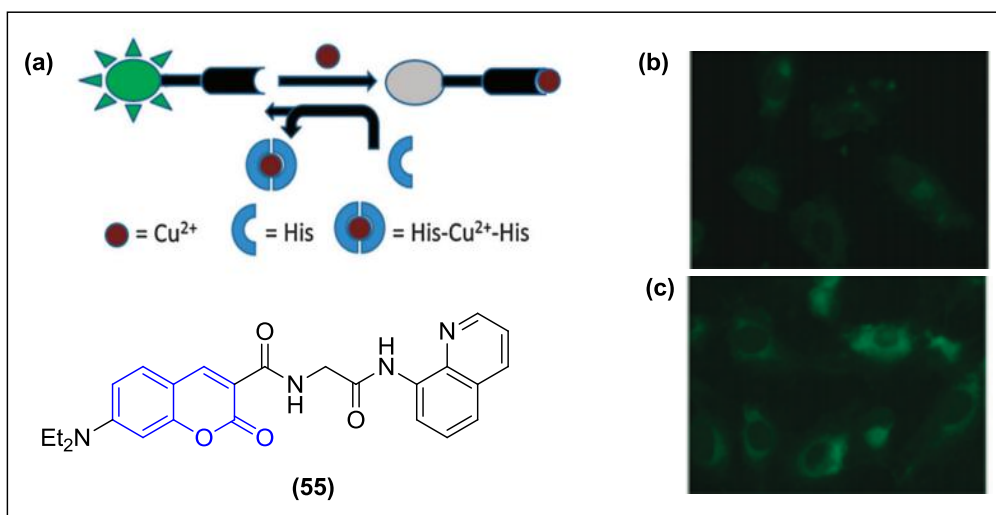


Figura 21. (a) mecanismo envolvido na atuação da sonda (55). (b) Absorção celular de 55 sem a presença de Cu²⁺ (c) em presença de cobre (10 μM) em células de glioblastoma humano U87MG (Adaptado de You *et al.*, 2014)

Helal e colaboradores desenvolveram um derivado de tiazolo-cumarina (56) como sonda fluorimétrica e colorimétrica para Cu²⁺ (figura 22). Após ensaios de complexação frente a diversos metais, o grupo comprovou que a nova sonda era altamente seletiva para supressão da emissão por fluorescência somente para Cu²⁺. A emissão pode ser retomada após adição do agente quelante EDTA, em um mecanismo do tipo *turn* “ON-OFF” (HELAL *et al.*, 2011).

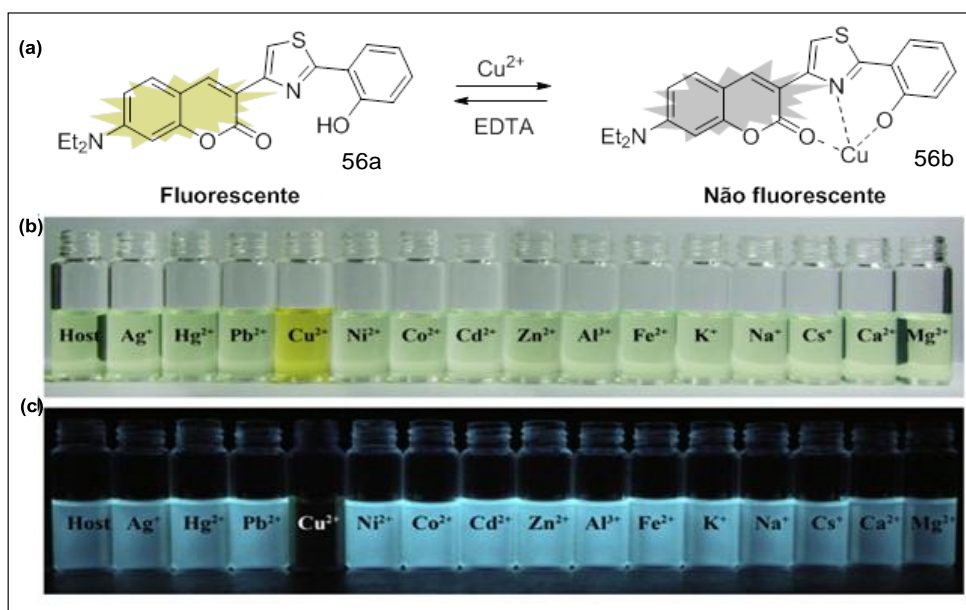


Figura 22. (a) Derivado de cumarina como sonda de Cu^{2+} . (b) Mudanças colorimétricas observadas em solução água/DMSO de **56a** ($20\mu\text{M}$) após adição de 10 eq. de cátions. (c) Mudanças fluorimétricas observadas em solução água/DMSO de **56a** ($20\mu\text{M}$) após adição de 10 eq. de cátions (Adaptado de HELAL *et al.*, 2011).

1.6.6.1.2 Cumarinas como sondas de zinco

O zinco é o segundo metal de transição em maior abundância no corpo humano e é considerado indispensável para os organismos vivos (HENS *et al.*, 2014). Zn^{2+} exerce influência em muitos processos celulares, incluindo proliferação, diferenciação, apoptose, transcrição, transmissão de sinais neurais e polimerização de microtubulos (XU *et al.*, 2011). Alterações na concentração de zinco podem estar relacionadas a desordens neuronais, podendo levar ao risco de doenças neurodegenerativas, como DA e Parkinson (FANG *et al.* 2013).

Buscando derivados cumarínicos capazes de identificar Zn^{2+} em solução, Wu e colaboradores reportaram um derivado de cumarina-hidrazona (**57a**) não-fluorescente e que contém um sítio de complexação a metais. O composto **57a** não exibe emissão por fluorescência devido à isomerização da ligação $\text{C}=\text{N}$ no estado excitado, no entanto, após adição de Zn^{2+} e restrições da isomerização e conformação da molécula, observou-se aumento significativo da emissão por fluorescência (WU *et al.*, 2007).

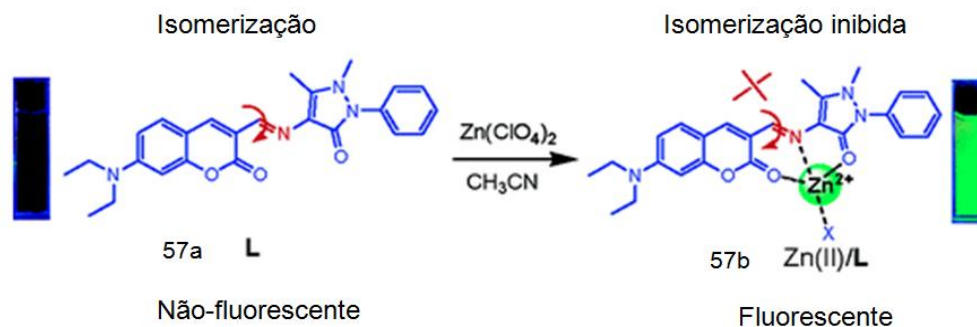


Figura 23. Derivado de cumarina como sonda de Zn^{2+} (Adaptado de WU *et al.*, 2007).

Outro derivado de cumarina (**58c**) descrito na literatura por Wu e colaboradores pode atuar como sonda de fluorescência altamente seletiva para Zn^{2+} em solução aquosa. O mecanismo de detecção é também baseado no controle da isomerização C=N em solução. Experimentalmente, foi possível observar que a incorporação do grupamento metila em **58c** promoveu aumento significativo da seletividade para detecção de Zn^{2+} em relação a **58a**. Ademais, o novo sensor foi utilizado em ensaio de imagem intracelular para detecção de Zn^{2+} em células HepG2 demonstrando boa funcionalidade (WU *et al.*, 2012).

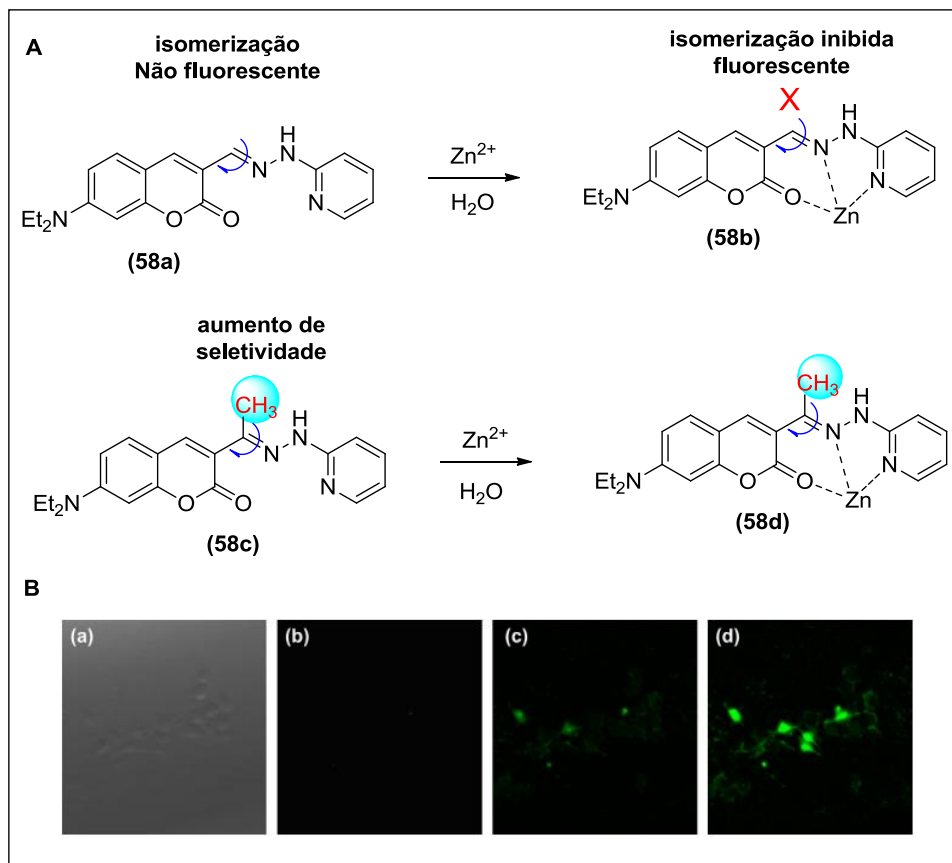


Figura 24. (A) Derivados de cumarinas como sondas de Zn^{2+} . (B) (a) Imagem confocal de células HepG2. (b) células incubadas com 58c (20mM) em $\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O}$ tampão, pH 7.4 por 10 min. (c) incubação de $\text{Zn}(\text{ClO}_4)_2$ (0.1 mM) por 6 min. (d) por 15 min (Adaptado de Wu *et al.*, 2012).

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

O objetivo geral deste trabalho compreende o planejamento de cumarinas fluorescentes híbridas, que possam eventualmente ser úteis no tratamento e detecção da DA, a síntese, total caracterização estrutural e de fluorescência através de técnicas espectroscópicas, avaliação como complexante de metais e avaliação da atividade farmacológica destes compostos.

2.2 Objetivo específico

- Planejamento estrutural dos compostos cumarínicos fluorescentes híbridos;

- Síntese e purificação dos derivados de cumarinas planejados;
- Caracterização por métodos espectroscópicos de infravermelho, ressonância magnética nuclear de hidrogênio e carbono (RMN de ^1H e de ^{13}C) e espectrometria de massa os produtos sintetizados;
- Realização de avaliação fotofísica dos compostos sintetizados e sua respectiva atuação como sonda de fluorescência;
- Avaliação quanto a capacidade dos compostos planejados complexarem metais envolvidos com a DA;
- Realização de avaliação farmacológica frente à inibição de acetilcolinesterase dos compostos planejados.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

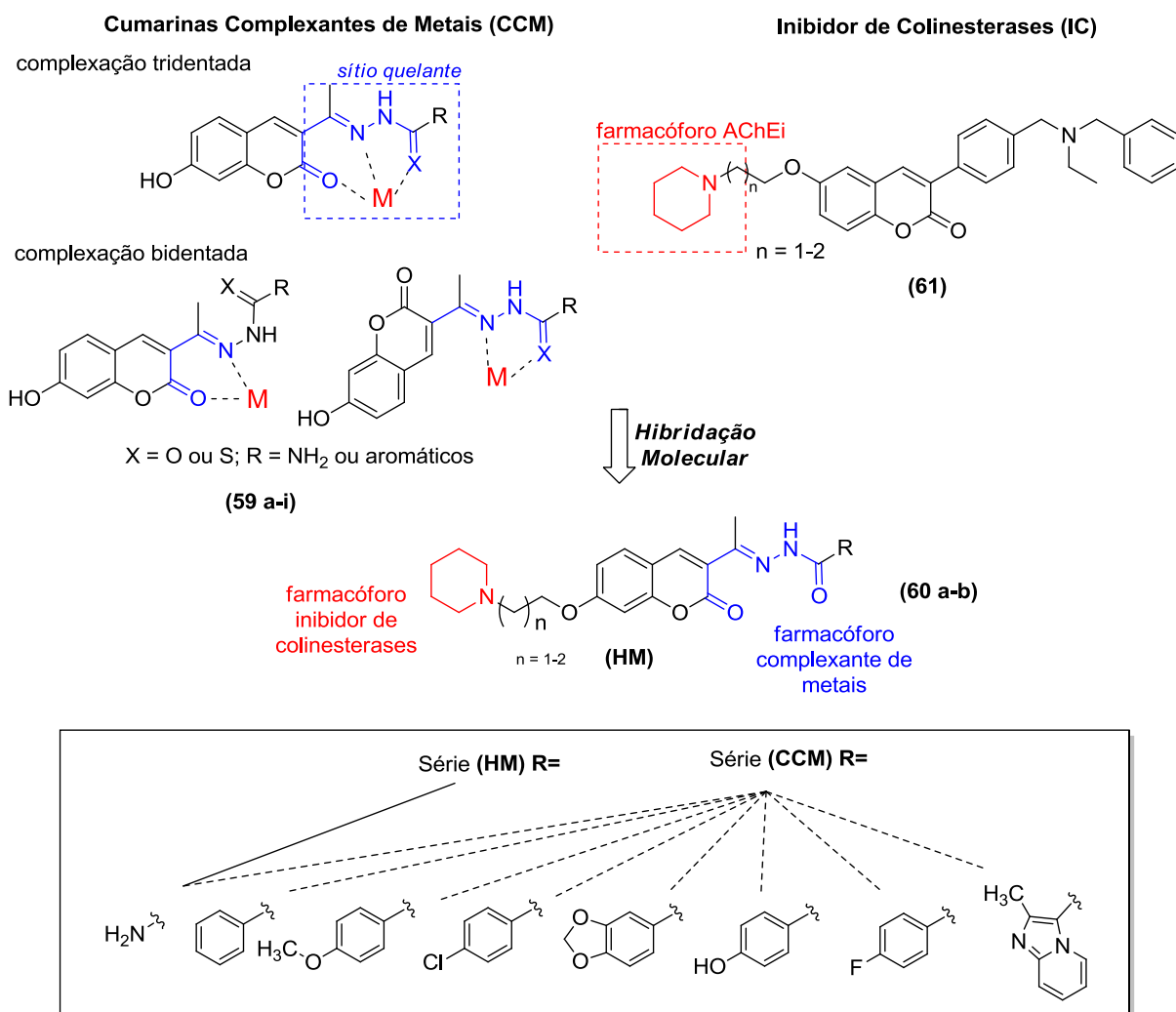
3.1 Planejamento estrutural dos compostos cumarínicos

O planejamento estrutural dos compostos cumarínicos foi dividida em duas partes:

Na primeira, foram planejadas as cumarinas-(tio)semicarbazonas ou cumarinas-*N*-acilidrazonas (**série CCM, 59a-i**), visando à obtenção de compostos com possível fluorescência oriunda do núcleo cumarínico e atividade complexante de metais, conforme representado no Esquema 6. A presença da base de Schiff nos novos derivados de cumarina possibilita a formação de um sítio de complexação a metais bi ou tridentado. Os substituintes em R foram escolhidos de modo a se variar as propriedades físico-químicas dos compostos e também a modular a reatividade sobre o sítio de complexação e sobre as características fotofísicas dos compostos. Foram escolhidos grupos doadores e aceptores de ligação hidrogênio, polares e doadores e retiradores de elétrons. Ligado diretamente a posição C-7 da cumarina, foi planejado o uso do substituinte: -OH, visando estudar o efeito da transferência interna de carga exercida por esse substituinte. Finalmente, na posição X, temos os substituintes oxigênio e enxofre, com intuito de verificar a influência e reatividade desses átomos frente a diferentes metais, uma vez que as características eletrônicas são bastante distintas.

A segunda parte do planejamento partiu do princípio de que os compostos (**série CCM, 59a-i**) apresentariam capacidade de complexar metais e poderiam apresentar fluorescência. A partir disto, planejou-se a hibridação molecular destes compostos iniciais com **61**, que são cumarinas com reconhecida inibição da AChE (MONTANARI *et al.*, 2016), originando a série HM (**60a-b**). Vale destacar que a hibridação molecular é uma estratégia de planejamento racional de novos ligantes ou protótipos de fármacos que tem como base o reconhecimento de subunidades farmacofóricas na estrutura molecular de dois ou mais conhecidos derivados bioativos, que por meio de uma fusão adequada, pode gerar estruturas híbridas que mantenham as características farmacológicas dos protótipos originais (VIEGAS-JUNIOR *et al.*, 2007).

A hibridação escolhida nesta série HM foi do tipo dimérica, onde os farmacóforos das atividades pretendidas são unidos por espaçadores alquílicos. Os inibidores da AChE ficam localizados no interior de uma fenda, onde se encontra o sítio catalítico. Esta fenda, no entanto, possui espaço suficiente para se explorar espaçadores como os propostos nesta hibridação, o que valida o uso desta estratégia.



Esquema 6. Planejamento estrutural dos compostos cumarínicos a partir da hibridação molecular das 7-hidroxi-cumarinas com os farmacóforos responsáveis pela inibição da AChE oriundos de IC.

3.2 Planejamento sintético da série CCM (59a-i)

A síntese da primeira série dos compostos cumarínicos *N*-acilidrazonas, semicarbazona e tiosemicarbazona (**59a-i**), planejados como complexante de metais, foi baseada na análise retrossintética ilustrada na figura 25. Na análise retrossintética, através da desconexão C=N (etapa a), foi possível identificar os precursores hidrazídicos (**62a-i**) e a 3-acetil-7-OH-cumarina (**63**) como compostos-chave para a síntese da série CCM (**59a-i**), explorando uma condensação ácido-catalisada. A partir de duas desconexões C=C (etapa b) e C-O (etapa c), explorando uma reação de Knoevenagel seguida de ciclização intramolecular, foi possível identificar os reagentes de partida, acetoacetato de etila (**65**) e 2,4-dihidroxibenzaldeído (**64**) para a síntese do composto 3-acetil-7-OH-cumarina (**63**).

Por sua vez, as hidrazidas (**62c-i**) têm como precursores seus ésteres correspondentes (**66c-i**) após interconversões de grupos funcionais (IGF) (etapa d), explorando a substituição nucleofílica à carbonila com hidrato de hidrazina.

Finalmente, os aldeídos (**67c-h**) foram identificados como materiais de partida para a construção da série, após IGF (etapa e), explorando reações de oxidação e esterificação. Ademais, a partir de duas desconexões C-N (etapa f, g), explorando uma reação de condensação, foi possível identificar o nucleófilo 2-aminopiridina (**68**) e o eletrófilo 2-cloro-acetato de etila (**69**) como reagentes de partida para a síntese da *N*-acilidrazona imidazolil[1,2-*a*]piridina (**59 i**).

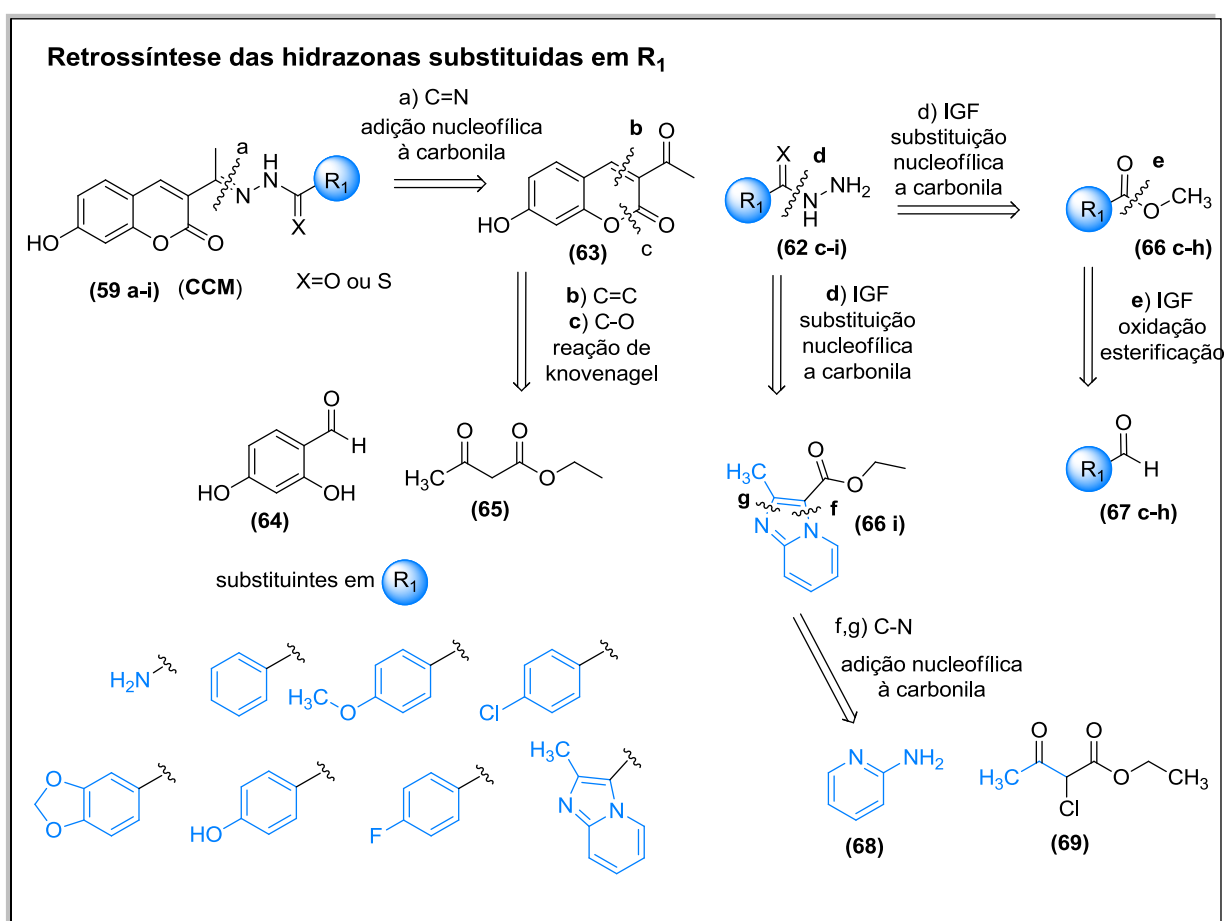


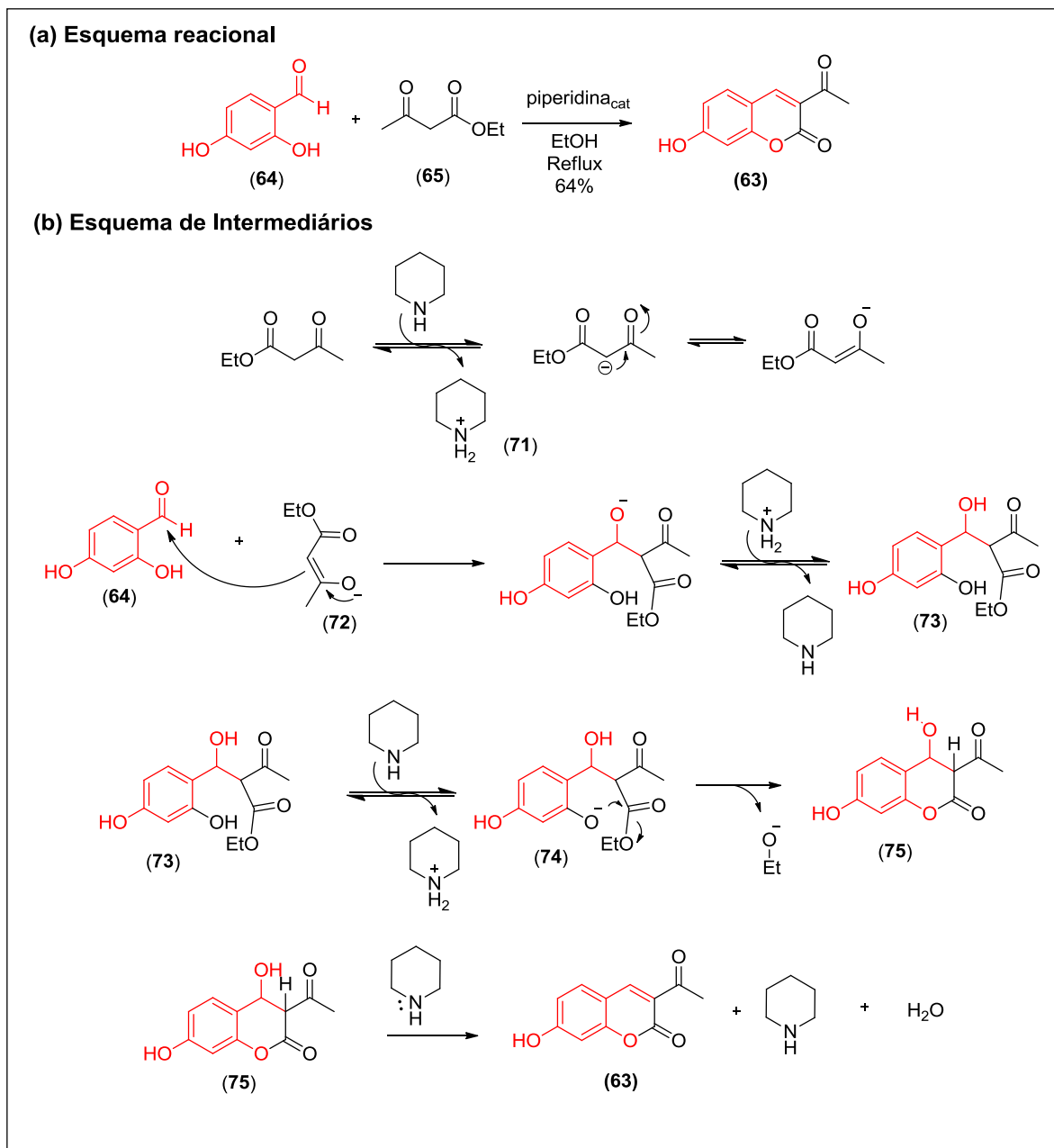
Figura 25. Análise retrossintética para obtenção da série planejada CCM (**59a-i**).

3.3 Síntese da 3-acetil-7-OH-cumarina (**63**)

A síntese da série CCM teve como início a obtenção da 3-acetil-7-OH-cumarina (**63**) a partir do 2,4-diidroxibenzaldeído (**64**) e acetoacetato de etila (**65**), com 64% de rendimento reacional após isolamento. Esta reação utiliza uma base orgânica como catalisador, etanol como

solvente e passa por um mecanismo em duas etapas: uma do tipo Knoevenagel e em seguida uma ciclização intramolecular (PEREIRA *et al.*, 2016).

O uso da base orgânica nesta reação se deve a necessidade de formação de um carbânion como intermediário (**72**), o que acontece na primeira etapa do mecanismo. Em seguida, este carbânion (**72**) atua como nucleófilo na segunda etapa reacional, atacando a carbonila do 4-OH-salicilaldeído (**64**) em uma reação de condensação aldólica. O uso da piperidina se dá, pois a mesma atua desprotonando o hidrogênio do carbono alfa-carbonílico do acetoacetato de etila na primeira etapa, assim como o fenol do salicilaldeído (**64**), levando ao seu fenóxido correspondente (**74**). Este fenóxido, na etapa seguinte do mecanismo, participa de uma reação de substituição nucleofílica acíclica intramolecular com o éster oriundo do aceto acetato de etila, seguida de uma desidratação que origina o núcleo cumarínico (**63**). A base normalmente é utilizada em quantidades catalíticas, pois a mesma deve participar de todas as etapas do mecanismo sendo sempre regenerada como demonstrado no esquema 7.



Esquema 7. (a) - Esquema Reacional. (b) – Esquema de intermediários de transição proposto para a formação da 3-acetil-7-OH-cumarina.

A 3-acetil-7-OH-cumarina (**63**) foi caracterizada por RMN ^1H e ^{13}C e IV. A análise dos espectros confirmou a formação do derivado cumarinico. A presença de um sinal simpleto em δ 8,57 ppm, com integração referente a um hidrogênio, correspondente ao hidrogênio H_4 da cromenona, que é o principal indicativo da formação da ligação $\text{C}=\text{C}$ que não existia em nenhum dos reagentes. O seu deslocamento para regiões de campo mais baixo é atribuída ao efeito anisotrópico criado pelos elétrons π do carbono sp^2 . O alto valor de deslocamento químico para um hidrogênio ligado a um carbono sp^2 pode ser explicado pelo efeito β carboxílico de

desproteção causada pelo efeito mesomérico entre a ligação dupla C=C e a carboxila do anel. O deslocamento químico no espectro de RMN ^{13}C mostra um sinal referente a C_4H em δ 148,5 ppm. Adicionalmente, podemos destacar os sinais de hidrogênio aromático H_6 (δ 6,84 ppm) e H_8 (δ 6,73 ppm) em região de maior blindagem, devido ao efeito da hidroxila em orto. O sinal referente a CH_3 em δ 2,54 ppm e a confirmação da presença da carbonila de cetona em RMN ^{13}C (δ 195,1 ppm) (figura 26).

Curiosamente, o sinal referente à hidroxila fenólica ligada a C_7 não foi observado em RMN ^1H (DMSO-d_6). No entanto, no espectro de IV foi observada uma banda larga em 3448 cm^{-1} (anexo), típica de estiramento O-H em fenóis.

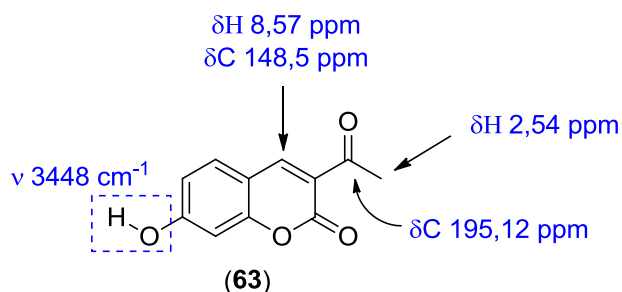
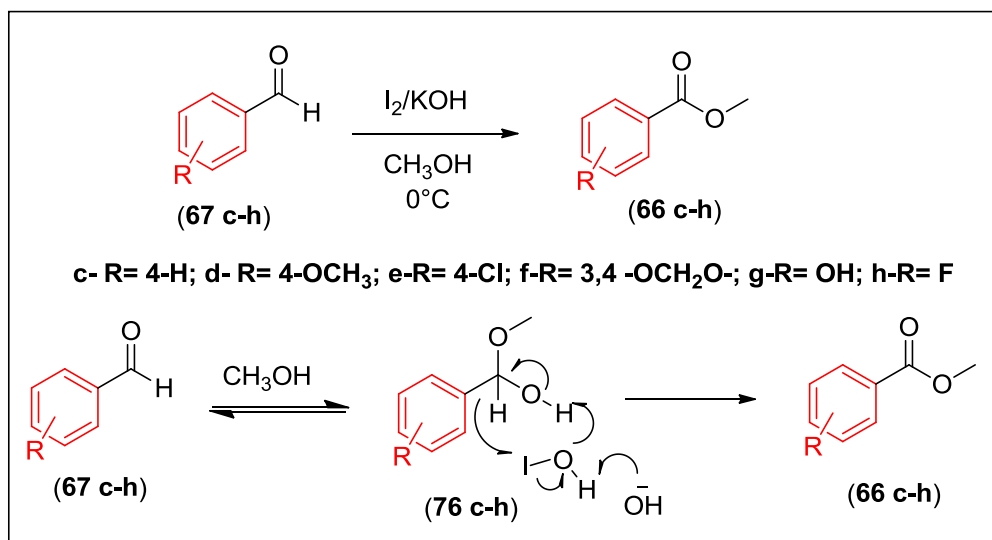


Figura 26. Atribuição dos principais sinais dos compostos 3-acetil-7-hidroxi-cumarina (**63**) nos espectros de RMN ^1H e ^{13}C e IV.

3.4 Síntese dos Esteres

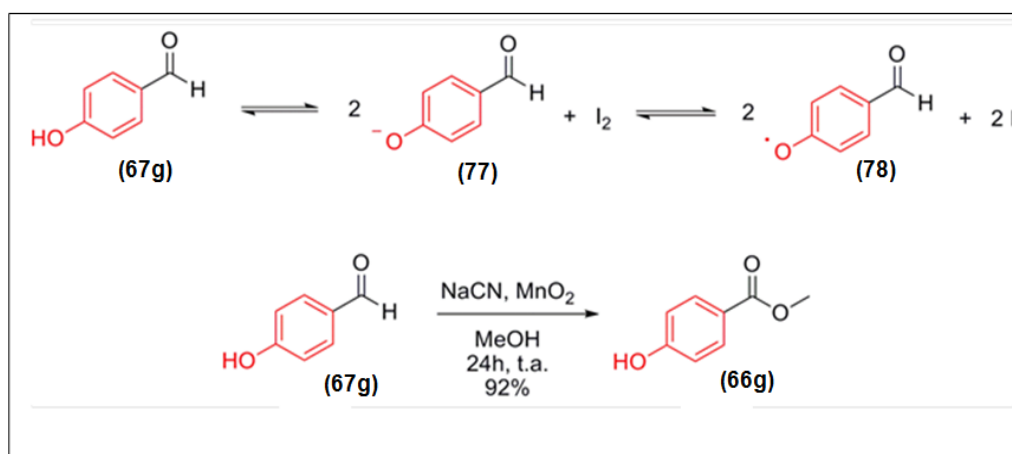
O emprego de metodologia “one-pot”, descrita por Yamada e colaboradores, nos permitiu obter os ésteres metílicos (**66c-h**), em 83-92% de rendimento, diretamente a partir dos precursores aldeídicos correspondentes (**67c-h**) (YAMADA *et al.*, 1992). Apesar desta metodologia, que explora o emprego sequencial de soluções metanólicas de iodo (I_2) e hidróxido de potássio (KOH) a $0\text{ }^\circ\text{C}$, não ter seu mecanismo completamente esclarecido, sabe-se que envolve a oxidação dos intermediários hemiacetais (**76c-h**) pelo ácido hipoiódoso (HIO) formado “*in situ*” (YAMADA *et al.*, 1992) (esquema 8).



Esquema 8. Esquema de intermediários de esterificação dos aldeídos (56 c-h) proposto por Yamada (1992).

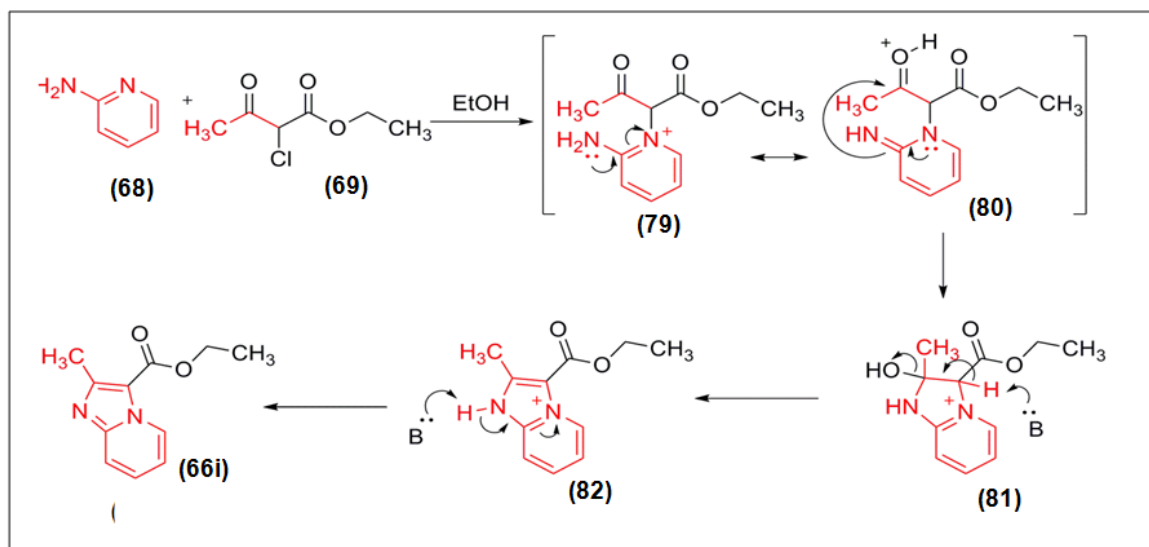
No entanto, a oxidação descrita por Yamada não foi capaz de gerar o éster **66g**, o *para*-hidroxibenzoato de metila (**66g**), a partir de seu aldeído correspondente (**67g**). Diferentemente dos aldeídos **67c-f, h**, a coloração acastanhada do meio reacional desaparecia quase que instantaneamente na presença de **67g**, indicando o total consumo do I₂, sem que houvesse formação do éster **66g** desejado. Uma possível explicação reside na presença da hidroxila fenólica em **67g** que, segundo Omura (OMURA, 1984), em solução de metanol contendo excesso de KOH pode gerar o fenolato correspondente (**77**) o qual é oxidado pelo I₂ ao radical fenoxi (**78**) (OMURA, 1984) (esquema 9).

Desta forma, o éster **66g** foi obtido a partir da metodologia de oxidação de aldeídos em meio metanólico de cianeto de sódio na presença de dióxido de manganês descrito por Lai e Anderson em 92% de rendimento (esquema 9) (LAI e ANDERSON, 1997).



Esquema 9. Mecanismo de possível formação do fenoxi radical (78) e reação de oxidação de 56g descrita por Lai e Anderson (1997).

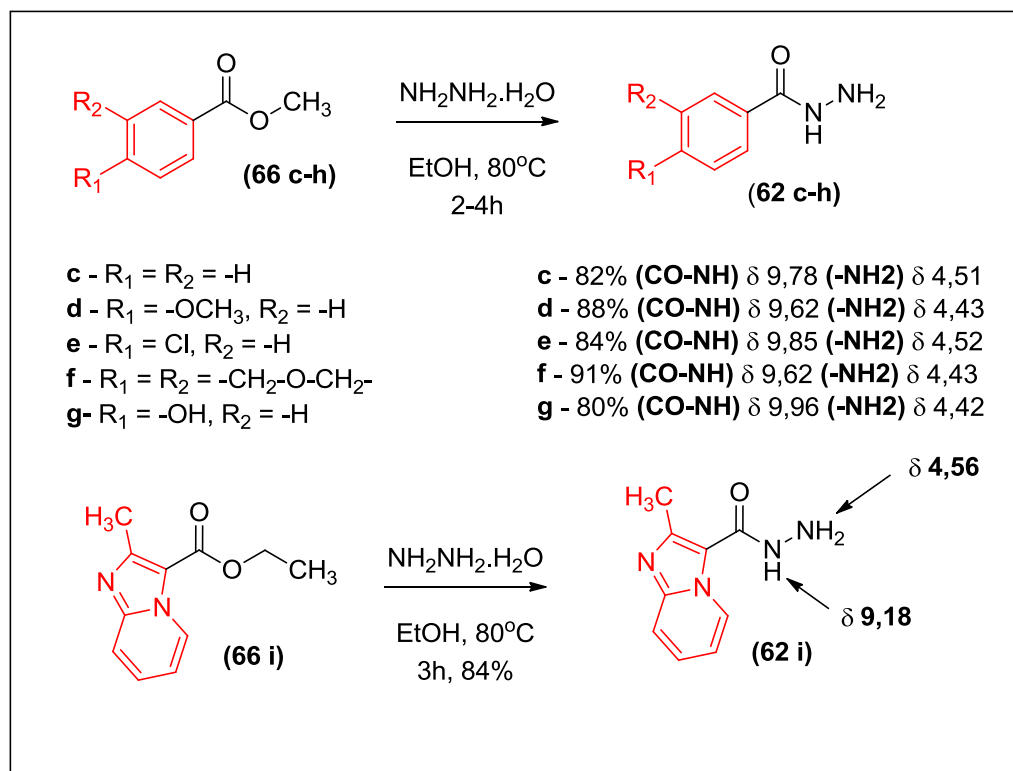
A obtenção do 2-metilimidazo[1,2-*a*]piridino-3-ato de etila (66i) foi possível através de uma condensação regioseletiva da 2-aminopiridina (68) com 2-cloro-acetoacetato de etila (69) em etanol a refluxo em 79% de rendimento (KAMINSKI *et al.*, 1985; RIBEIRO *et al.*, 1998) (esquema 10). Este processo sintético ocorre inicialmente por substituição nucleofílica do átomo de cloro pelo heteroátomo do anel piridínico, formando o intermediário piridínium (79), um sal estável devido ao efeito de ressonância da carga no anel aromático que sofre subsequente ciclização mediada pela formação de uma imina-enamina (80) via uma adição nucleofílica seletiva do grupo amina sobre a carbonila do grupo cetona (KAMINSKI *et al.*, 1985) (esquema 10). Este mecanismo parece razoável uma vez que estudos de RMN-¹H tempo-dependentes (SMAKULA HAND; PAUDLER, 1982), bem como cálculos *ab initio* teóricos (FOSSEY *et al.*, 1981) suportam a substituição inicial do átomo de cloro pelo nitrogênio piridínico.



Esquema 10. Síntese e mecanismo de formação do 2-metilimidazo[1,2-*a*]piridino-3-ato de etila (**66i**).

3.5 Síntese dos intermediários acilidrazínicos e obtenção das *N*-acilidrazonas-cumarinas.

Os derivados benzoilidrazínicos (**62c-h**) e imidazo[1,2-*a*]piridinilidrazínico (**62i**), eleitos como precursores-chave na síntese das *N*-acilidrazonas (**59c-i**), puderam ser obtidos em rendimentos de 78-91%, através da reação de substituição nucleofílica à carbonila dos ésteres metílicos (**66c-h**) pelo hidrato de hidrazina à 80%, à refluxo em etanol (esquema 11) (RIBEIRO *et al.*, 1998; LIMA *et al.*, 2000). A comparação dos espectros de RMN-¹H destes compostos (**62c-i**) com os dados descritos por Ribeiro e Lima (RIBEIRO *et al.*, 1998; LIMA *et al.*, 2000), permitiu-nos atribuir aos hidrogênios dos nitrogênios do grupamento hidrazida os dois sinais singletos variando de δ 9,96 - 9,62 (CO-NH-) e δ 4,52 - 4,42 (-NH₂) (esquema 11).

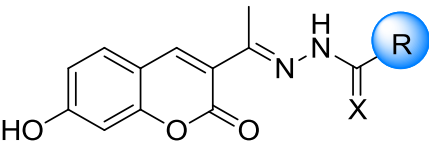


Esquema 11. Reação de formação das hidrazidas chaves (**62c-i**).

Após a obtenção dos intermediários-chave (**62c-i**), as (tio)semicarbazonas (**59a-b**) e *N*-acilidrazonas (**59c-i**) puderam ser sintetizadas através da condensação ácido catalisada de 3-acetil-7-OH-cumarina (**63**) (1,0 eq.) com tiosemicarbazida (**62a**), semicarbazida cloridrato (**62b**) e hidrazidas (**62c-h**) (1,05eq.) em etanol, utilizando ácido acético como catálise (tabela 3).

A síntese do primeiro bloco de compostos desejados **59a-i** foi realizada à 80°C durante 24 horas, utilizando tubo selado de borosilicato reforçado para evitar a evaporação. Embora os rendimentos reacionais tenham sido bons (70-88%), o monitoramento por cromatografia em camada fina indicou que o consumo da cetona (**63**), de forma considerável, somente foi observado após 24h.

Tabela 3. Rendimento sintético e propriedades físicas dos compostos sintetizados.

Estrutura	Código	Rendimento (%)	Pf.(°C)
	59a	89	231
	59b	88	225
	59c	69	225
	59d	78	235
	59e	87	255
	59f	82	249
	59g	70	266
	59h	83	290
	59i	72	240

Com o objetivo de reduzir o tempo reacional para obtenção dos compostos desejados (**59a-i**), o protocolo de síntese utilizando micro-ondas reacional foi utilizado (tabela 4). De fato, a síntese utilizando micro-ondas reacional se mostrou uma metodologia eficaz para obtenção de N-acilidrazonas a partir de cetonas simples, porém nunca fora testado com cetonas de cumarinas (NASCIMENTO-JUNIOR *et al.*, 2011).

A síntese em micro-ondas reacional (Biotage®) foi desenvolvida utilizando condições similares à metodologia em refluxo, ou seja, 1 gota de ácido acético em etanol à 80°C. Os compostos **59a-b** foram obtidos com excelentes rendimentos reacionais (92-93%), e em apenas 45 minutos. Não foi observado traços da cumarina de partida (**63**) nestas reações com a semicarbazona e tiosemicarbazona. Entretanto, para a obtenção das N-acilidrazonas (**59c-i**), através do uso de hidrazidas (**62c-i**), ainda era possível observar resíduo do precursor (**63**) ao final deste tempo. O aumento de temperatura foi então testado em tubo selado, no entanto, não

foram observadas diferenças com o aumento de temperatura para 100°C, enquanto à 150°C foram observadas degradações dos reagentes.

Portanto, uma nova condição foi desenvolvida utilizando três gotas de ácido acético, ao invés de apenas uma, com a reação à 80°C por 1 hora. Este conjunto de condições foi o mais efetivo na obtenção dos compostos desejados (**59a-i**), com rendimentos reacionais superiores e redução do tempo reacional em 20 horas, em comparação ao aquecimento convencional (tabela 4).

Tabela 4. Otimização da síntese dos compostos 59a-i.

Aquecimento convencional				Microondas		
Prod.	Tempo	Temp.(°C)	Rend.(%)	Tempo	Temp.(°C)	Rend.(%)
59a	20h	80	89 ^a	45 min	80	92 ^a
59b	20h	80	88 ^a	45 min	80	93 ^a
59c	24h	80	69 ^a	1 h	80/100	Nd ^{a,b}
59c	-	-	-	1 h	150	Nd ^{a,b}
59c	-	-	-	1 h	80	89 ^d
59c	24h	80	71 ^d	-	-	-
59d	24h	80	78 ^a	1 h	80	95 ^d
59e	24h	80	87 ^a	1 h	80	98 ^d
59f	24h	80	82 ^a	1 h	80	93 ^d
59g	24h	80	70 ^a	1 h	80	97 ^d
59h	24h	80	83 ^a	1 h	80	74 ^d
59h	-	-	-	1.5 h	80	85 ^d
59i	24h	80	72 ^a	1 h	80	82 ^d

a: uma gota de AcOH; b: não determinado devido a presença de reagentes; c: não determinado devido a degradação; d: três gotas de AcOH.

Em geral, as reações de condensação entre (tio)semicarbazidas ou hidrazidas e cetonas são sujeitas à catálise ácida e o seu mecanismo está exemplificado na figura 27. A primeira etapa consiste na protonação da cetona, levando a formação do íon oxônio (**83**). Na segunda etapa, ocorre um ataque nucleofílico da amina primária da hidrazida (**62a-i**) à carbonila ativada, gerando os intermediários hemiaminais *N*-protonados (**85**). Essa etapa envolve um processo bimolecular entropicamente desfavorável ($\Delta S_o < 0$) e que, do ponto de vista entálpico, também não favorece a formação espontânea dos produtos (figura 27) (COSTA *et al.*, 2003). Como consequência, a reação inversa (retroadição nucleofílica) ocorre em velocidade competitiva com

a adição nucleofílica, pois nessa etapa uma molécula neutra (derivado nitrogenado) funciona como grupo abandonador (espécies neutras são excelentes grupos abandonadores) (COSTA et al., 2003). Entretanto, a transferência rápida do próton do nitrogênio para o oxigênio (**84-86**), via solvente, embora termodinamicamente desfavorável (pois o nitrogênio é mais básico), permite a eliminação subsequente de uma molécula de água deslocando o equilíbrio na direção da formação dos produtos (figura 27) (COSTA *et al.*, 2003).

Dois íons imínicos podem ser formados (**89**) e (**90**), quando hidrazidas (**62**) são utilizadas como nucleófilos (isômeros geométricos) e a neutralização destes ocorre com perda do hidrogênio ligado ao nitrogênio, levando a possível formação de iminas diastereoisoméricas, apresentando a configuração relativa (*E*) (**91**) e (*Z*) (**92**) (figura 27) (COSTA, *et al.*, 2003). O conjunto de funções amida e imina presente em *N*-acilidrazonas e (tio)semicarbazonas possibilita a existência de confôrmeros sin/antiperiplanar sobre a ligação amídica CO-NH (PALLA, *et al.*, 1986).

A análise dos espectros de RMN ^1H e ^{13}C dos compostos sintetizados (**59a-i**) permitiu evidenciar para a maioria dos compostos a formação de um único diastereoisômero devido à presença de apenas um único sinal simpleto, em todos os espectros de RMN ^1H , referente à metila ($\text{N}=\text{C}-\underline{\text{CH}_3}$) ligada à imina, variando entre δ 2,12 e δ 2,32 (DMSO- d_6) (anexo 1). Da mesma forma, a observação dos espectros de ressonância de ^{13}C evidenciou a presença de somente um sinal referente ao carbono metílico variando entre δ 15,90 a δ 16,97 (DMSO- d_6) (Anexo 1).

De acordo com dados descritos na literatura por Palla e colaboradores, baseados em estudos de RMN de ^1H e ^{13}C de *N*-acilidrazonas (PALLA et al., 1982; PALLA, GERARDO *et al.*, 1986), a condensação ácido catalisada de hidrazidas com aldeídos e cetonas leva a formação preferencial de *N*-acilidrazonas com configuração diastereoisomérica (*E*) (Figura 27).

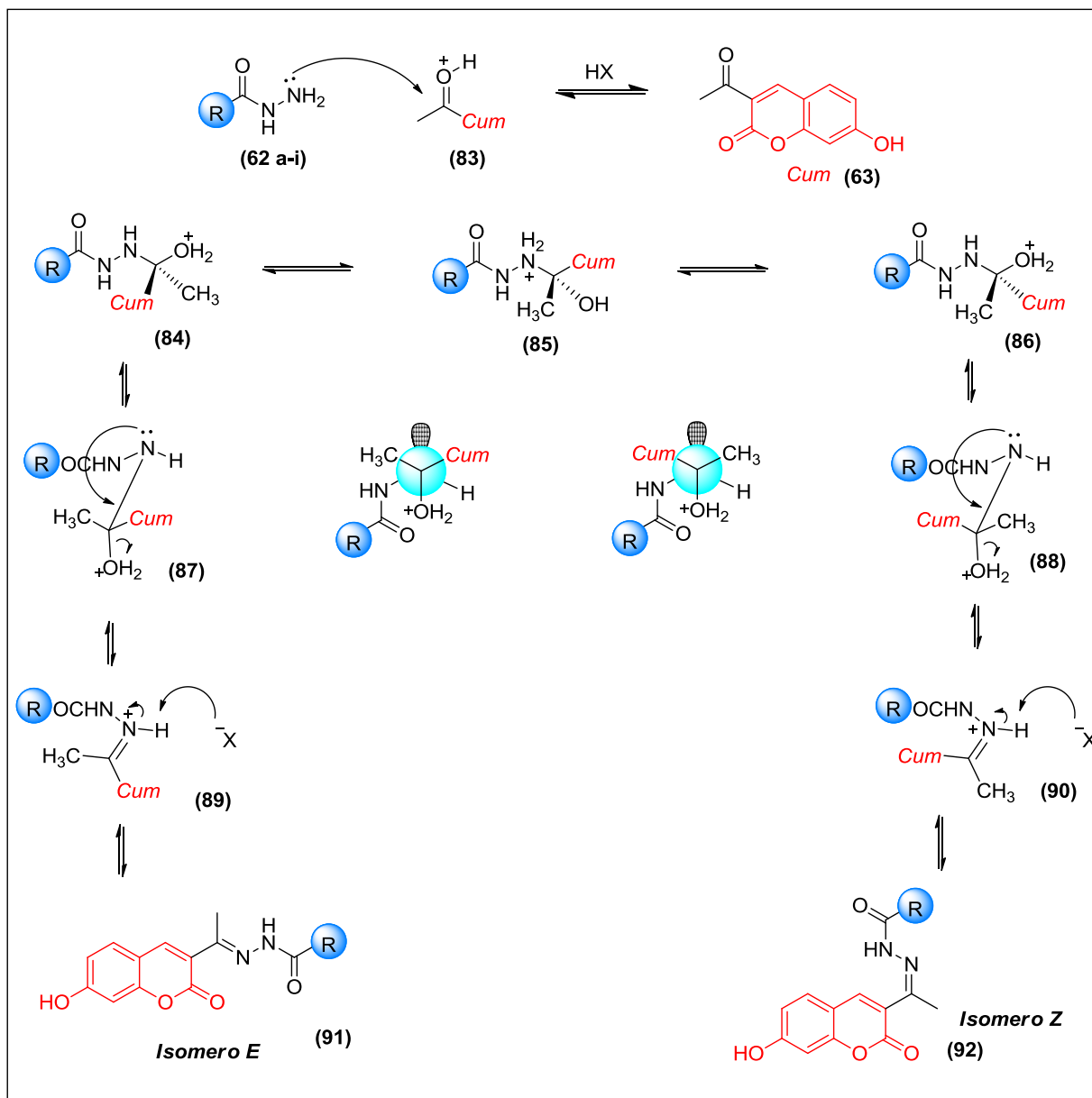


Figura 27. Mecanismo proposto para a formação de N-acilidrazona (Adaptado de COSTA *et al.*, 2003)

Os resultados de análise estrutural demonstraram também uma diferença de deslocamento químico entre os prótons da tioamida no composto (59a) (figura 28). Segundo Casas e colaboradores as tiosemicarbazonas apresentam grande deslocalização eletrônica e comprimentos de ligação C-N-C (1,32-1,35 Å) muito próximos aos observados para as duplas ligações C=C (1,20Å), enquanto na ligação C-S (1,68 Å) possui maior comprimento de ligação, indicando que o átomo de enxofre permite maior envolvimento das duas ligações C-N durante a deslocalização eletrônica (CASAS *et al.*, 2000; TENÓRIO *et al.*, 2005). Esse caráter parcialmente duplo da ligação C-N provoca uma rotação restrita da ligação C-NH₂, tornando, desta forma, os hidrogênios (-NH₂) diastereotópicos (figura 28). A caracterização de

tiosemicarbazona em temperaturas elevadas (~323K) foi realizado por Ferrari e colaboradores e mostraram a coalescência dos sinais de $-NH_2$ (FERRARI *et al.*, 1994). Por outro lado, os sinais referentes a $-NH_2$ na semicarbazona (**59b**) apresentaram um único sinal de deslocamento químico (δ 6,53).

A maioria dos sinais de deslocamento químico referentes ao anel cumarínico se mantiveram constantes na nova série de compostos sintetizada, independente do grupamento ligado em R, assim como o sinal referente a $-NH$ (figura 28).

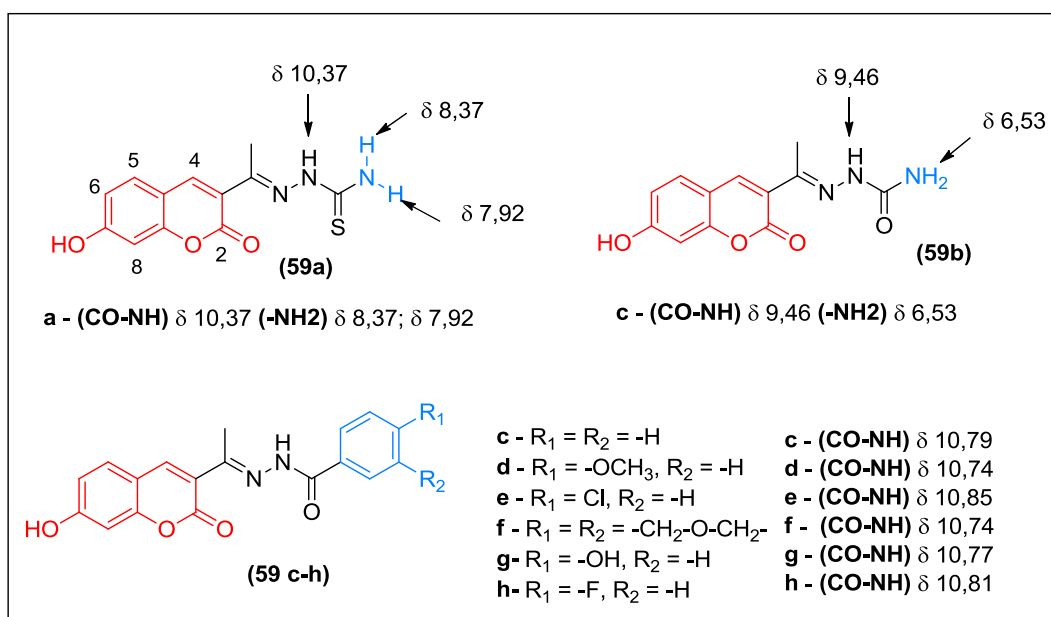


Figura 28. Deslocamento típicos dos prótons das funções amida e imina de (tio)semicarbazona e N-acilidrazonas.

Apesar dos resultados de RMN 1H e ^{13}C indicaram a formação de apenas um diastereoisômero, nos pareceu necessário a inequívoca elucidação da configuração deste diastereoisômero através de ensaios de RMN bidimensional NOESY (figura 29).

Núcleos de 1H que interagem entre si, não estando necessariamente acoplados, e a uma distância espacial de aproximadamente 5Å um do outro, resultam em picos cruzados que fornecem informações particularmente adequadas para o estudo de configuração molecular (figura 29) (PAVIA, 2010). É possível observar que o núcleo de 1H da ligação (N-H) em 59d é capaz de interagir espacialmente com os hidrogênios de CH₃ (**a**) e com os hidrogênios aromáticos (**b**) (figura 29). Portanto, é possível afirmar que a única configuração relativa que permite a interação espacial entre o hidrogênio de N-H e de CH₃ é a configuração relativa E.

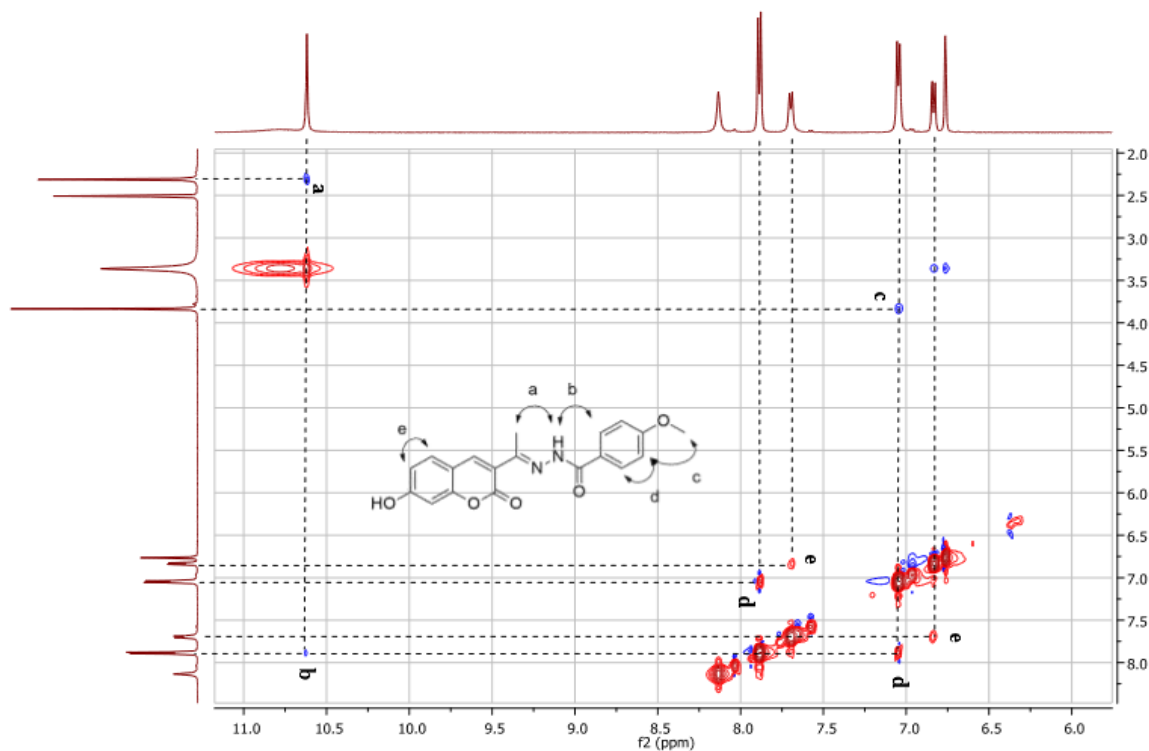


Figura 29. Espectro de RMN bidimensional NOESY para o composto 59d.

Apesar de a maioria dos compostos elucidados estruturalmente apresentarem-se como único isômero de configuração *E* (figura 26), o espectro de RMN de ^1H de **59i** apresentou duplicação dos sinais (figura 30), com proporção 4:1, que foi atribuída à presença de confôrmeros em solução. Segundo Lopes e colaboradores, o fenômeno de duplicação é atribuído a maior energia da barreira rotacional entre confôrmeros anti e sinperiplanar (CO-NH), que surge dos efeitos estéreo-eletrônicos do grupo imidazopiridina (figura 30) (LOPES *et al*, 2013).

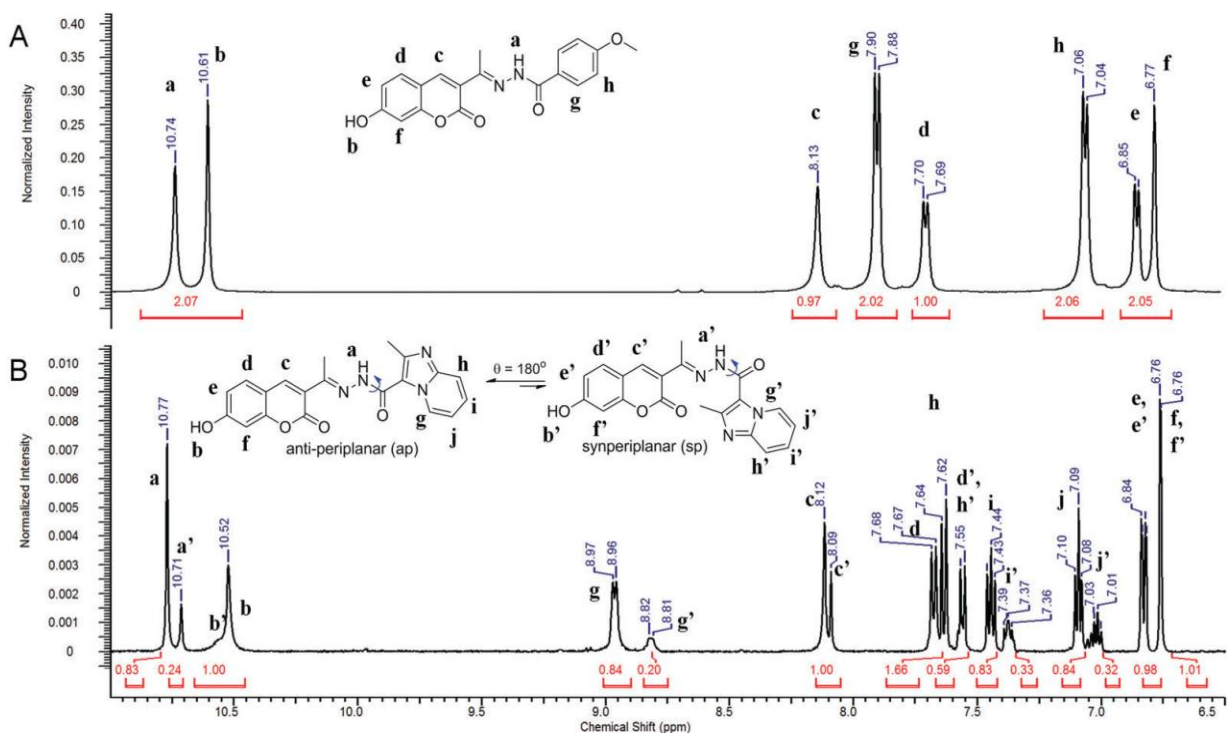


Figura 30. Espectro de RMN ¹H dos compostos **59d** (A) e **59i** (B) em DMSO a 298 K.

Outra possibilidade para duplicação de sinais do RMN de ¹H e ¹³C para **59i**, seria a presença de isômeros *E/Z*. No entanto, análise por HPLC (figura 31) demonstrou a presença de apenas um pico, como esperado para compostos com mudanças conformacionais, diferentemente do que ocorre com a presença de isômeros.

Baseado no trabalho de Quattropane e colaboradores, que descreveram a presença de conformeros para alquil *N*-acilidrazonas (figura 30), nós realizamos um ensaio dinâmico de RMN ¹H em DMSO-*d*₆ a 60 °C para determinar se a coalescência de sinais duplicados seria observada (figura 32). A coalescência parcial de alguns sinais, principalmente de CO-NH, foi observada. As mudanças foram reversíveis com o retorno da temperatura experimental para 20 °C, corroborando a hipótese da presença de conformeros: a energia necessária para superar mais rapidamente a barreira rotacional é atingida com o aumento da temperatura, levando a uma rápida conversão entre os confôrmeros (QUATTROPANI *et al.*, 2005).

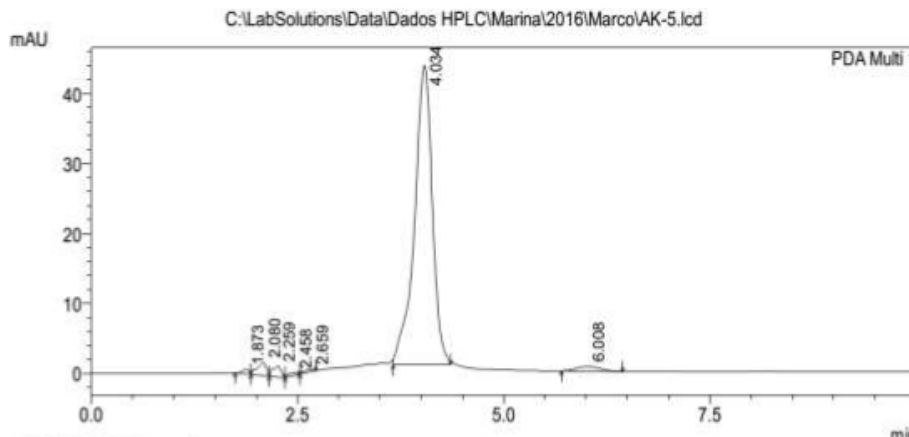


Figura 31. Cromatograma do composto **59i**.

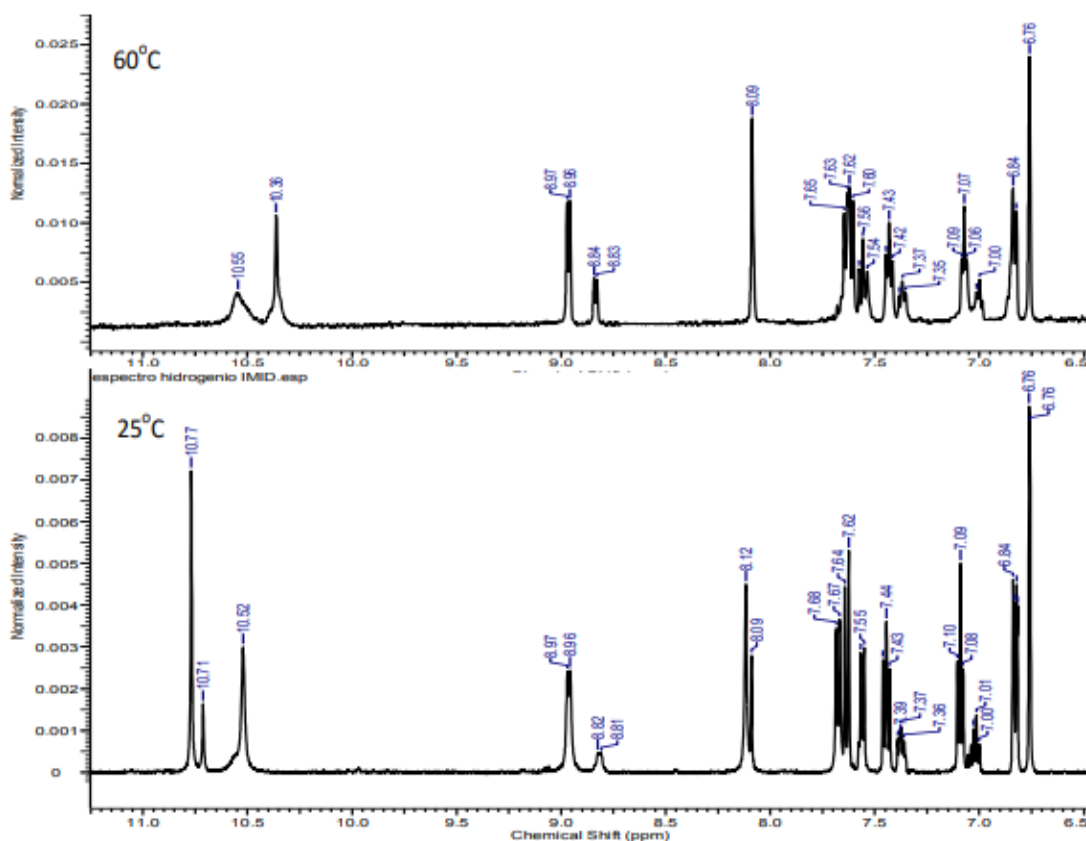


Figura 32. Espectros de RMN ^1H do composto **59i** em DMSO a 25°C e a 60°C.

Como proposta (figura 33), a interconversão entre os confôrmeros *sin* e *anti* pode ser atingida através do estado de transição (TS), onde o nitrogênio perde a conjugação com a carbonila, resultando em um átomo de nitrogênio piramidal com duas formas de ressonância A e B. Para a maioria dos compostos, os elétrons p de R podem coplanarizar com o orbital p de $\text{C}^+ - \text{O}^-$, o que estabiliza a ressonância (forma B1) (LOPES *et al.*, 2013). Esta menor barreira de energia leva a um equilíbrio térmico entre os confôrmeros *sin* e *anti* em solução, com a

observação de apenas um sinal em espectro de RMN ^1H . Por outro lado, para **59i**, a presença da metila em orto induz dificuldades de coplanarização, e a presença de um grupo fortemente retirador de densidade eletrônica (imidazopiridina), induz a desestabilização da ressonância (forma B2), aumentando a energia da barreira de rotacional (LOPES *et al.*, 2013).

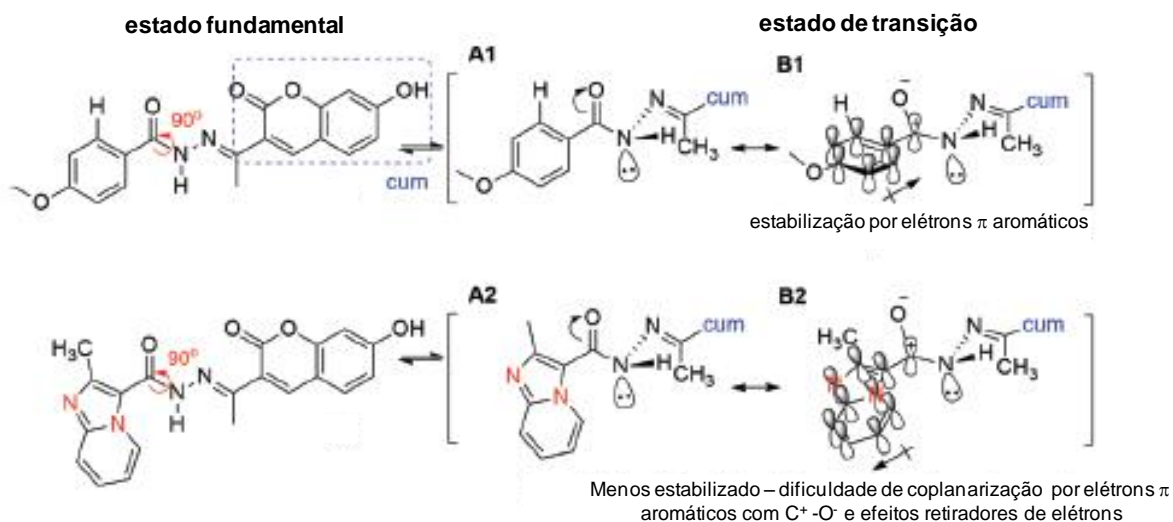


Figura 33. Características espectrais de NAH-cumarinas **59d** e **59i** e estabilização do estado de transição dos rotâmeros da amida.

Este fato reduz as taxas de interconversão entre os confôrmeros e inibe a dinâmica do equilíbrio, favorecendo a observação da duplicação dos sinais de RMN.

3.6 Propriedades fotofísicas.

Considerando os diferentes efeitos estéreo-eletrônicos, cinco compostos representativos foram selecionados **59b-e** e **59i** para determinar as características fotofísicas gerais destas cumarinas em água e metanol. Os outros compostos possuíam substituintes com propriedades eletrônicas similares aos investigados, por isso, as características fotofísicas dos mesmos não foram investigadas.

Os espectros de UV-vis dos compostos **59b-e** e **59i** em água a 298K (figura 34) exibiram uma banda característica em 350-357 nm, que representa as transições $\pi-\pi^*$ da 7-OH-cumarina. A inserção de um anel aromático ou heteroaromático na posição “R” levou a maiores coeficientes de extinção molar e ao deslocamento batocrômico da banda de absorção (357 nm) quando comparada a **59b**.

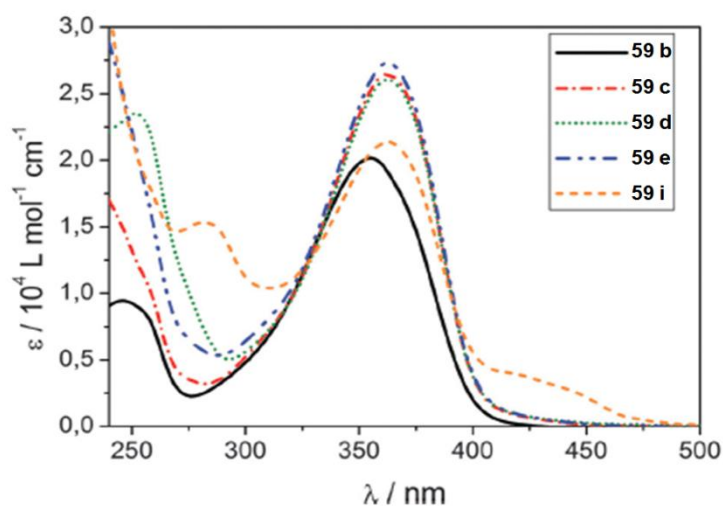


Figura 34. Espectro de absorção de **59b-e, i** em água a 298K.

Curiosamente, o composto **59i** exibiu duas bandas, uma em 357 nm, e outra em 425 nm. Este fenômeno foi atribuído à presença dos dois confôrmeros do grupo amida, com maior concentração do confôrmero antiperiplanar em solução, como demonstrado pelo RMN ^1H da figura 30. A banda em 425 nm pôde ser atribuída ao confôrmero sinperiplanar, baseado em estudos de amidas aromáticas e *N*-acilidrazonas similares relatadas na literatura (KUMMERLE *et al.*, 2009).

A excitação dos compostos **59b-e,i** de 250 a 410 nm em água a pH 4,9 (298K), levou a uma intensa emissão, com máximo em 456 nm. O espectro de emissão é a forma espelhada do espectro de excitação (figura 35), típico de transições $\pi-\pi^*$. O deslocamento de Stokes entre o máximo de excitação e o máximo de emissão é relativamente grande ($\Delta\lambda = 99$ nm), como observado para compostos similares na literatura (SOUMYA *et al.*, 2014). Além disso, a mudança do grupo “R” não teve influência nas energias de emissão e absorção dos compostos em água.

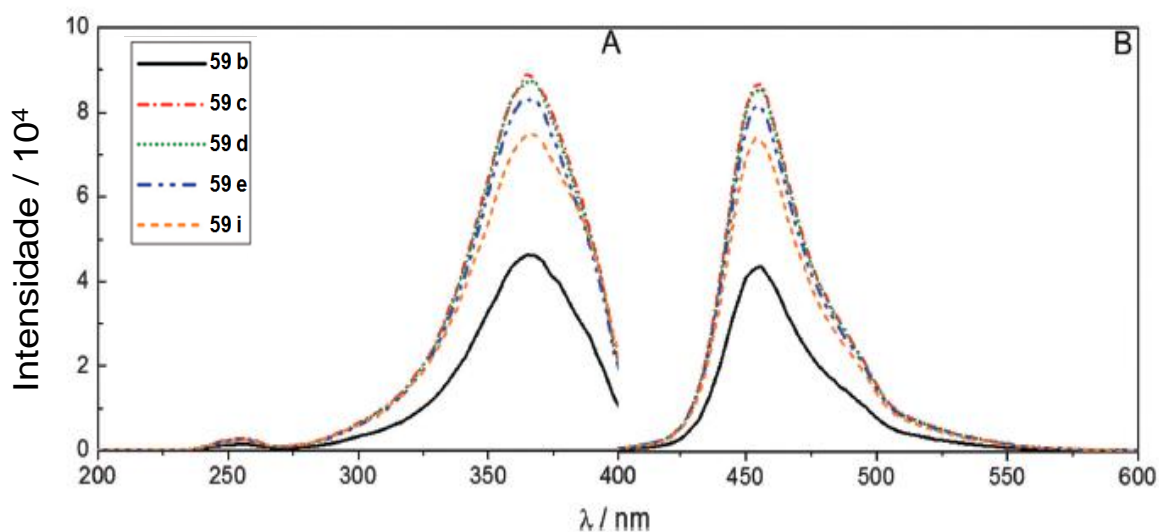


Figura 35. Espectro de excitação (A) e espectro de emissão (B) em água a 298K.

O rendimento quântico de fluorescência (Φ_F) variou de 0,130 para a semicarbazona (**59b**) à 0,244 para as *N*-acilidrazonas (**59c-e** e **59i**) (tabela 5). A presença da metila ligada à imina cria uma maior restrição conformacional para torção da ligação, reduzindo a possibilidade de isomerização, que causa a supressão das características luminescentes em séries semelhantes (WU et al., 2007). Os rendimentos quânticos de fluorescência relativamente altos, somados ao grande deslocamento de Stokes, tornam esses compostos promissores para aplicação como laser de corante.

Tabela 5. Parâmetros fotofísicos em água a 298 K (PEREIRA *et al.*, 2015)

Composto	Φ_F	τ /ns
59b	0,130	2,1
59c	0,244	2,3
59d	0,235	2,5
59e	0,234	2,4
59i	0,205	2,3
63 ^a	0,83	4,8

^a 3-acetil-7-OH-cumarina, utilizada como padrão secundário (VITÓRIO *et al.*, 2016).

Algumas mudanças nos espectros de absorção foram observadas com a alteração do meio aquoso $\epsilon = 80,1$, para o metanólico, $\epsilon = 32,27$. Em metanol (figura 36), ocorreu um aumento na região do espectro relacionada ao confôrmero *sinperiplanar* de **59i**, observada na região de

420 nm, enquanto que a banda em 357 nm exibe menor coeficiente de extinção molar do que em água. Estes fatos são atribuídos ao aumento da estabilidade do confôrmero *sinperiplanar* em solventes de menor polaridade, como relatado na literatura (LOPES *et al.*, 2013).

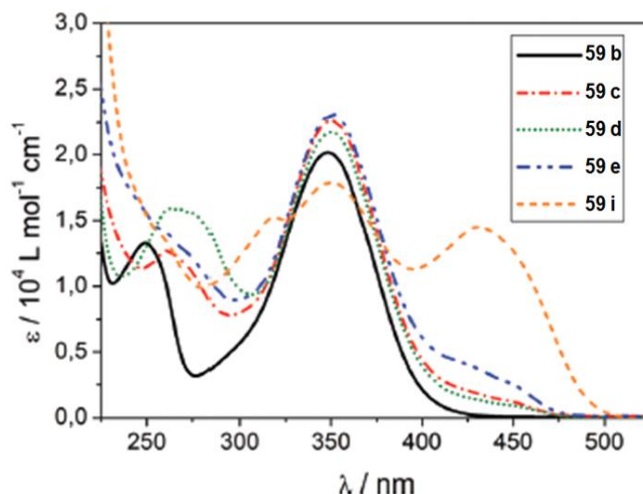


Figura 36. Espectro de absorção em metanol a 298K.

A excitação das *N*-acilidrazonas em metanol possibilitou a visualização da banda de emissão característica do confôrmero *sinperiplanar* para o composto **59i** em região de emissão verde-ciano (525 nm) (figura 37). O composto **59i** claramente responde a atuação do grupo retirador de densidade eletrônica, com maior deslocamento batocrômico (525 nm) que os demais (**59b-e**) (460-490 nm). O espectro de emissão de **59i** também exibe um pequeno ombro por volta de 490 nm atribuída ao confôrmero *antiperiplanar*, presente em menor concentração em solução. Em comparação, a emissão de **59b** em metanol (figura 37) é atribuída somente ao núcleo cumarínico, com um perfil espectral similar aos dos compostos em água e com máximo de emissão em torno de 456 nm.

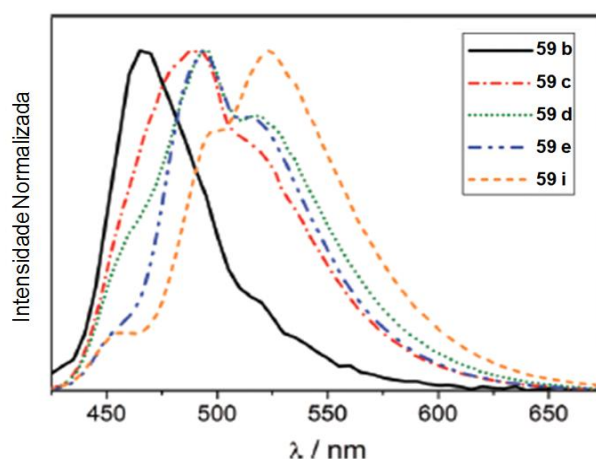


Figura 37. Espectro de emissão em metanol a 298K.

A possibilidade de observar diferentes prevalências de confôrmeros em solução, com significativas mudanças espectrais, de acordo com a modulação das propriedades eletrônicas dos grupos em R, estabelece uma estratégia promissora para o desenvolvimento de compostos que possam atuar como sensores de polaridade em microambientes celulares.

3.6.1 Análise do pKa da cumarina-*N*-acilidrazona **59c**.

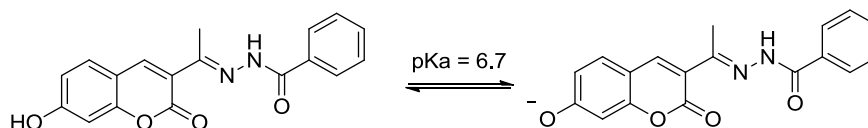
De acordo com trabalhos publicados na literatura (VITÓRIO et al., 2015; PEREIRA et al., 2018), mudanças espectrais em 7-OH-cumarinas na faixa de pH de 5 a 8 são associadas a desprotonação da hidroxila, o que acarreta aumento de transferência interna de carga ($\pi-\pi^*$) do oxigênio (O^-) para o núcleo cumarinico. Para determinar o valor de pH onde ocorre o equilíbrio entre espécies protonadas e desprotonadas (pKa), a *N*-acilidrazona **59c** foi selecionada como composto representativo. A estratégia para determinar o pKa apoiou-se em relacionar a equação de Henderson-Hasselback ($pH = pKa + \log[A^-]/[HÁ]$) e a equação de Lambert-Beer ($A = \epsilon lc$) como ferramenta matemática (equação 6).

$$pH = pKa + \log \frac{(A - A_f)}{(A_0 - A)} \quad \text{(Equação 6)}$$

Onde A = absorção da mistura; A_f = absorção final (espécie desprotonada); A_0 = absorção inicial (espécie protonada).

Após dissolução de **59c** em água, o espectro de UV-vis foi medido sequencialmente após sucessivas adições de solução diluída de hidróxido de sódio. A banda de absorção centrada em

350 nm em pH 5,1, sofre deslocamento hipocrômico, enquanto surge uma nova banda de absorção centrada em 410 nm, que sofre deslocamento hiperacrômico com o aumento da concentração de base em solução (figura 38). Ademais, após a titulação observou-se a formação de um ponto isobéstico bem definido em torno de 375 nm e um gráfico de pH *versus* $\log ((A - A_f)/(A_0 - A))$ definiu o valor de pKa como 6,7 (figura 39).



Esquema 12. Representação do equilíbrio de espécies de N-acilidrazona-7-OH-cumarina.

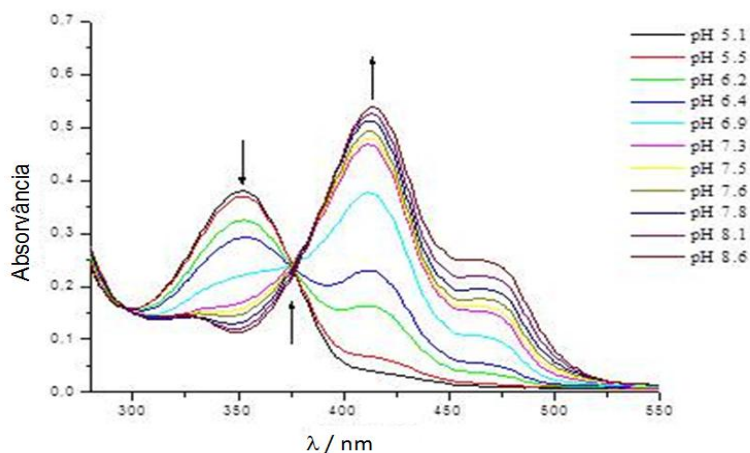


Figura 38. Espectro de absorção de 68b em água após sucessivas adições de solução de NaOH a 298K.

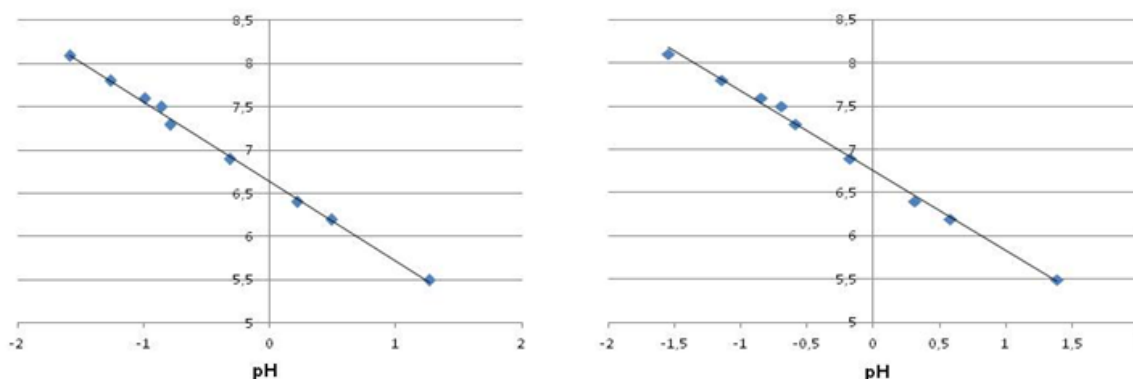


Figura 39. Determinação do pKa de 59c considerando 412 nm e 351 nm.

O espectro de fluorescência de **59c** foi medido antes e após as sucessivas adições de solução diluída de NaOH (figura 40). Inicialmente, em pH em torno de 5, a solução apresenta

baixa emissão por fluorescência. Após adições sucessivas de solução básica, foi possível observar um aumento pronunciado da intensidade de emissão atribuída a desprotonação da hidroxila do anel cumarínico. A solução foi irradiada em 410 nm, região de máxima absorção da espécie desprotonada, e o aumento crescente da banda de emissão por fluorescência observado com um máximo em 450 nm. O aumento da intensidade de emissão após as sucessivas adições de base é atribuída ao aumento do caráter ICT (transferência interna de carga), do oxigênio para o núcleo cumarínico, em um mecanismo de transferência de elétrons $\pi-\pi^*$, típica de 7-OH-cumarinas. (PEREIRA *et al.*, 2018).

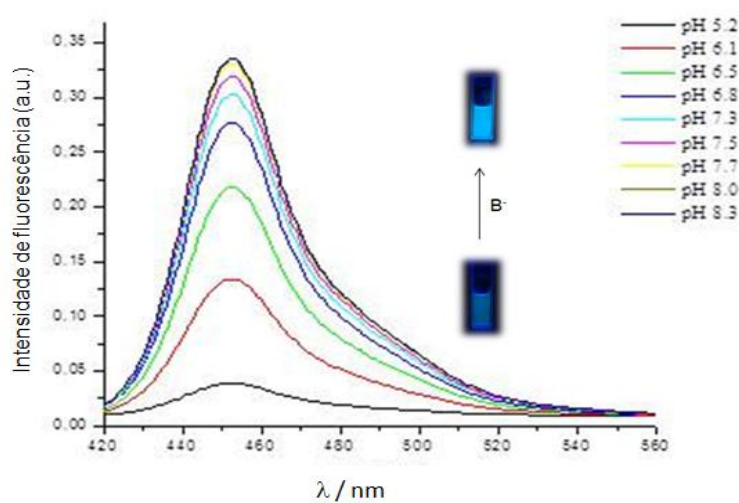


Figura 40. Espectro de emissão de **59c** em água a 298K.

Em contrapartida, a redução do pH da solução dos compostos sintetizados (**59a-i**) a valores abaixo de 4,5, resulta em perda das propriedades emissivas dos mesmos. Nós atribuímos este fenômeno à protonação no sítio básico da N-acilidrazona (figura 41), que acarreta em perda de conjugação do anel da cumarina com o fragmento de N-acilidrazona, levando ao aumento de perdas de energia por decaimento não-radiativo. Propusemos os possíveis estados moleculares protonados, considerando mudanças de configuração (**95**) e a possibilidade do surgimento de um novo anel de seis membros (**96-97**) considerando a ligação de hidrogênio intramolecular simultânea da imina e da carbonila da lactona (figura 41).

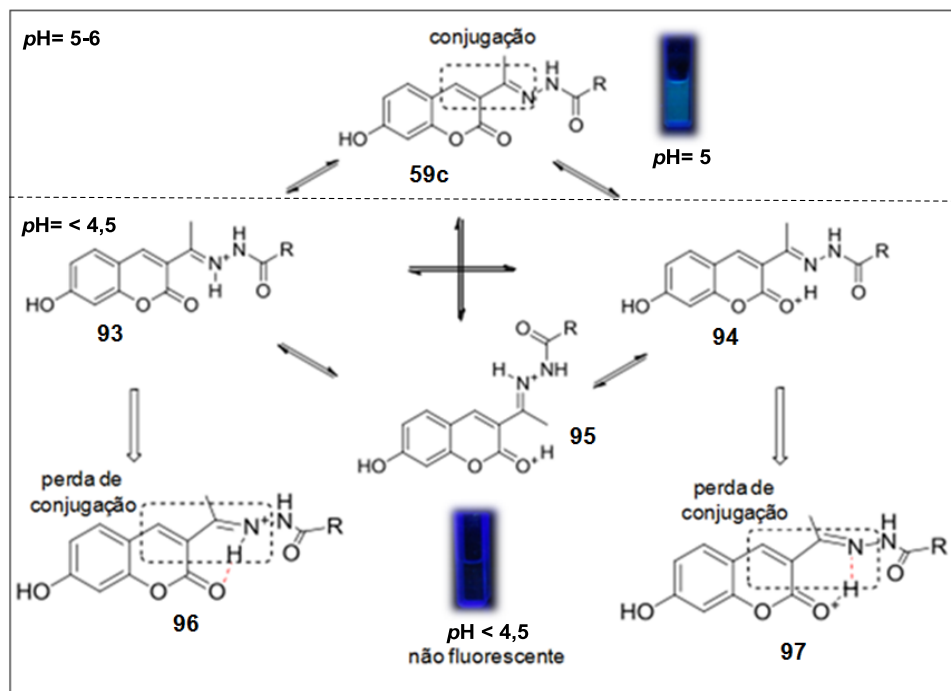


Figura 41. Proposta de estados protonados de N-acilidrazonas e semicarbazona de 7-OH-cumarinas.

O rendimento quântico de fluorescência dos compostos (**59b-e,i**) foi avaliado novamente, porém em pH = 3 (tabela 6). Os resultados demonstraram uma redução do rendimento quântico de 0,24 em pH = 4,9 para 0,068 em pH= 3 para o composto **59c**, em torno de 3,53 vezes menor após redução do pH. Levando em consideração que o rendimento quântico avalia a eficiência com a qual uma amostra converte a radiação absorvida em emissão por fluorescência, fica evidente com a redução do pH o surgimento de novas vias de perdas energéticas por decaimento não-radiativo.

Tabela 6. Parâmetros fotofísicos em água (pH = 3.0) a 298 K (PEREIRA *et al.*, 2016)

Composto	Φ_F
59b	0,048
59c	0,068
59d	0,068
59e	0,066
59i	0,066
63 ^a	0,83

^a. 3-acetil-7-OH-cumarina, utilizada como padrão secundário (VITÓRIO *et al.*, 2016).

A possibilidade de mudanças das propriedades espectrais dos compostos sintetizados em diferentes faixas de pHs tornam, os mesmos, candidatos promissores a sondas de pH aplicáveis em meio biológico, uma vez que muitas funções biológicas estão relacionadas a mudanças de pH intracelular (SRIVASTAVA *et al.*, 2007). Ademais, no pH do meio fisiológico (em torno de 7,6) os compostos se apresentaram em suas máximas intensidades de emissão, o que os validam como possíveis marcadores de estruturas celulares como as placas β -amiloides por exemplo.

3.6.2 Análise de **59a-b** como complexante de Zn^{2+} e sonda de fluorescência

Para validar os compostos como sondas de fluorescência e complexante de metais, os derivados **59a-b** foram selecionados e sua análise espectroscópica frente a Zn^{2+} foi determinada.

A análise espectroscópica de **59a-b** foi feita em metanol, que se mostrou o melhor solvente para caracterização fotofísica. O espectro de UV/vis de **59a** apresentou máximo de absorção em 355 nm e, após adição de concentrações crescentes de acetato de zinco, a banda com máximo em 355 nm diminuiu, enquanto que uma nova banda de absorção em 440 nm surgiu com um ponto isosbástico em 388 nm (figura 42a). A excitação do composto **59a** na faixa de 350 a 445 nm demonstrou quase nenhuma emissão por fluorescência. No entanto, após sucessivas adições de acetato de zinco, uma banda de emissão proeminente surgiu em 535 nm, mesmo para baixas concentrações de Zn^{2+} (0.1eq.), atribuída a formação do complexo Zn^{2+} -**59a** (figura 42b).

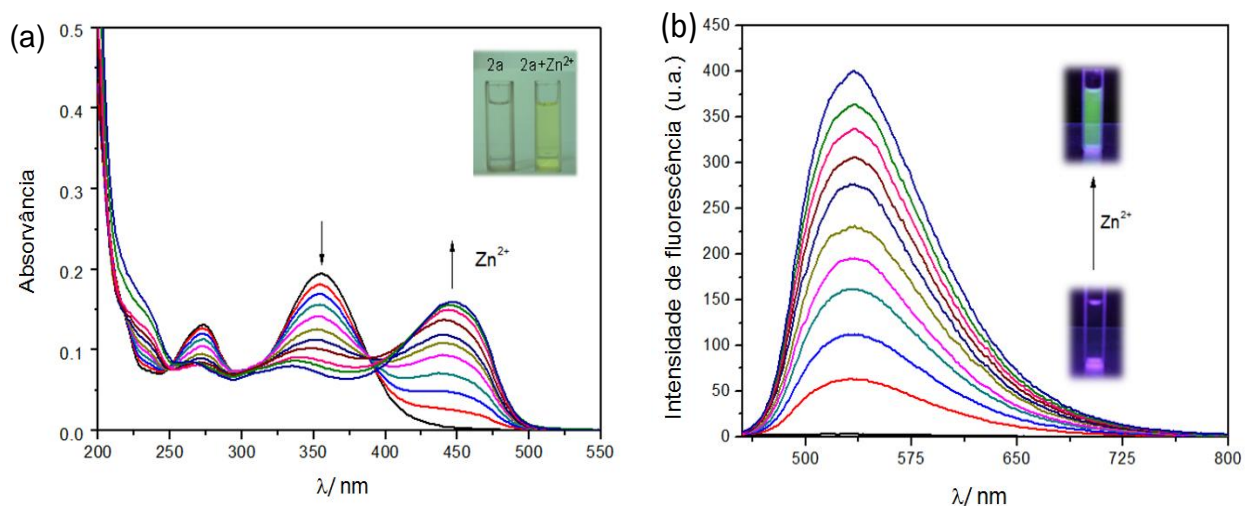


Figura 42. (a) Espectro de absorção e de emissão de **59a** em metanol após adição de 0-1 equivalentes de Zn^{2+} . (b) Espectro de emissão em metanol de **59a** após sucessivas adições de Zn^{2+} .

Já o espectro de UV/vis de **59b** apresentou máximo de absorção em 350 nm e, após adição de concentrações crescentes de acetato de zinco, a banda com máximo em 350 nm diminuiu, enquanto que uma nova banda de absorção em 436 nm surgiu com um ponto isosbástico em 375 nm (figura 43(a)). A excitação do composto **59b** na faixa de 350 a 436 nm demonstrou emissão por fluorescência como descrito na literatura (PEREIRA *et al.*, 2016). No entanto, após sucessivas adições de zinco, a banda de emissão centrada em 468 nm aumentou abruptamente de intensidade, mesmo para baixas concentrações de Zn^{2+} (0.1eq.), atribuída a formação do complexo Zn^{2+} -**59b** (figura 43).

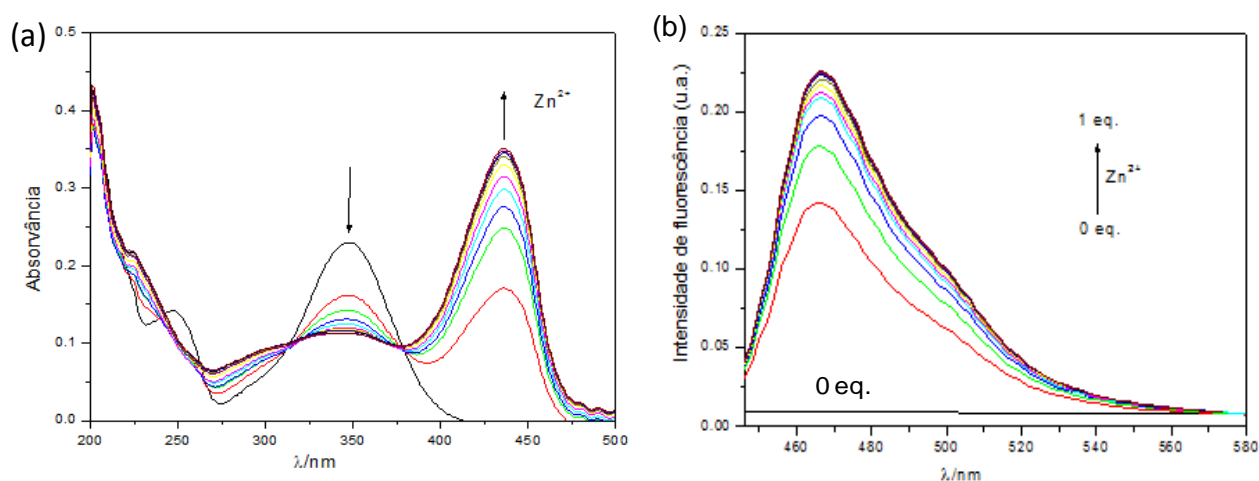


Figura 43. (a) Espectro de absorção e de emissão de **59b** em metanol após adição de 0-1 equivalentes de Zn^{2+} . (b) Espectro de emissão em metanol de **59b** após sucessivas adições de Zn^{2+} .

Comparativamente, o composto **59a** se mostrou uma sonda mais interessante que **59b** devido a ausência inicial de fluorescência, causada, provavelmente, por alguma transferência de carga do grupo tiosemicarbazona, como descrito na literatura (GOLDBERG *et al.*, 2010; GOLDBERG *et al.*, 2013), em compostos contendo átomos de enxofre, além de um baixo rendimento quântico de fluorescência ($\phi = 0,005$).

Curiosamente, observamos que a sonda **59a** mostrou um melhor perfil para detecção de Zn^{2+} utilizando acetato de zinco em comparação a outros sais. Após adição de 1eq. de cada sal de zinco, fica claro que o composto **59a** é mais seletivo para acetato de zinco do que para nitrato, cloreto e perclorato (figura 44) em comparação a **59b**. Baseado nestes resultados preliminares, decidimos realizar experimentos adicionais de caracterização do mecanismo envolvido no funcionamento da sonda utilizando o composto **59a**.

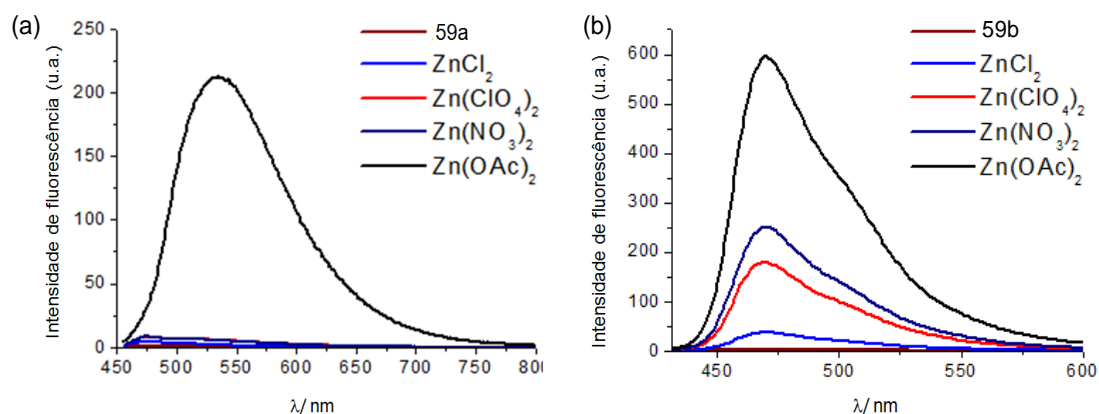
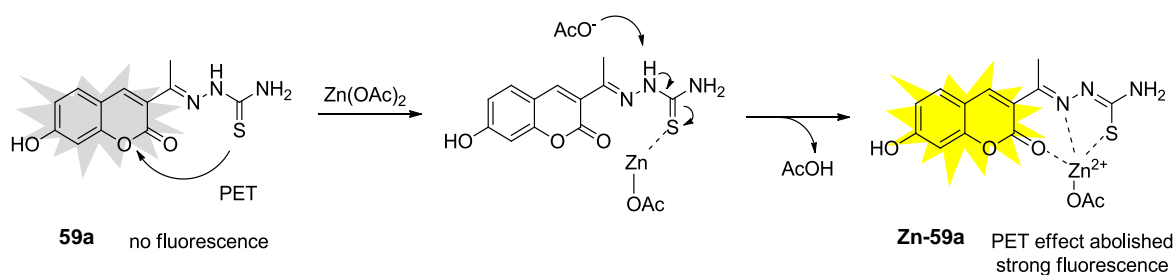


Figura 44. Espectro de emissão de **59a** após adição de 1 eq. de sais de Zn^{2+} em metanol a 298K.

A dependência do contra-íon no mecanismo da sonda é algo curioso. Com base no espectro de UV/Vis após adições sequenciais de acetato de zinco, supomos que a ligação do zinco ao enxofre favorece a desprotonação da fração de tiosemicarbazida pelo ânion acetato, estendendo a conjugação do sistema. De fato, o acetato é uma base mais forte em comparação ao nitrato, cloreto e perclorato, o que poderia explicar a seletividade na desprotonação de $=\text{N}-\underline{\text{NH}}-\text{C}=\text{S}-\text{Zn}$ (**59a**), permitindo a forma tautomérica $=\text{N}-\text{N}=\text{C}-\text{S}-\text{Zn}$ (Zn^{2+} -**59a**). Ademais, a adição de apenas NaOAc a solução de **59a** não exerce qualquer efeito, provando que **59a** não é uma sonda de acetato, que tem apenas um papel importante no mecanismo de desprotonação da tiosemicarbazida após complexação com zinco (esquema 13).



Esquema 13. Mecanismo proposto para a detecção de zinco por **59a**.

O espectro de RMN de ^1H de **59a** e após adições crescentes de $\text{Zn}(\text{OAc})_2$ (até 0,6eq.), confirmam a hipótese tautomérica e o modo de complexação (figura 45). A integração do próton da tiosemicarbazona ($=\text{N}-\underline{\text{NH}}-\text{C}=\text{S}$) reduziu devido ao efeito tautomérico. Além disso, o sinal corresponde a hidroxila fenólica do anel cumarínico ($\text{p}K_a = 6,7$) (PEREIRA *et al.*, 2016) mesmo após adições sucessivas de acetato de zinco, não apresentou modificações (figura 45).

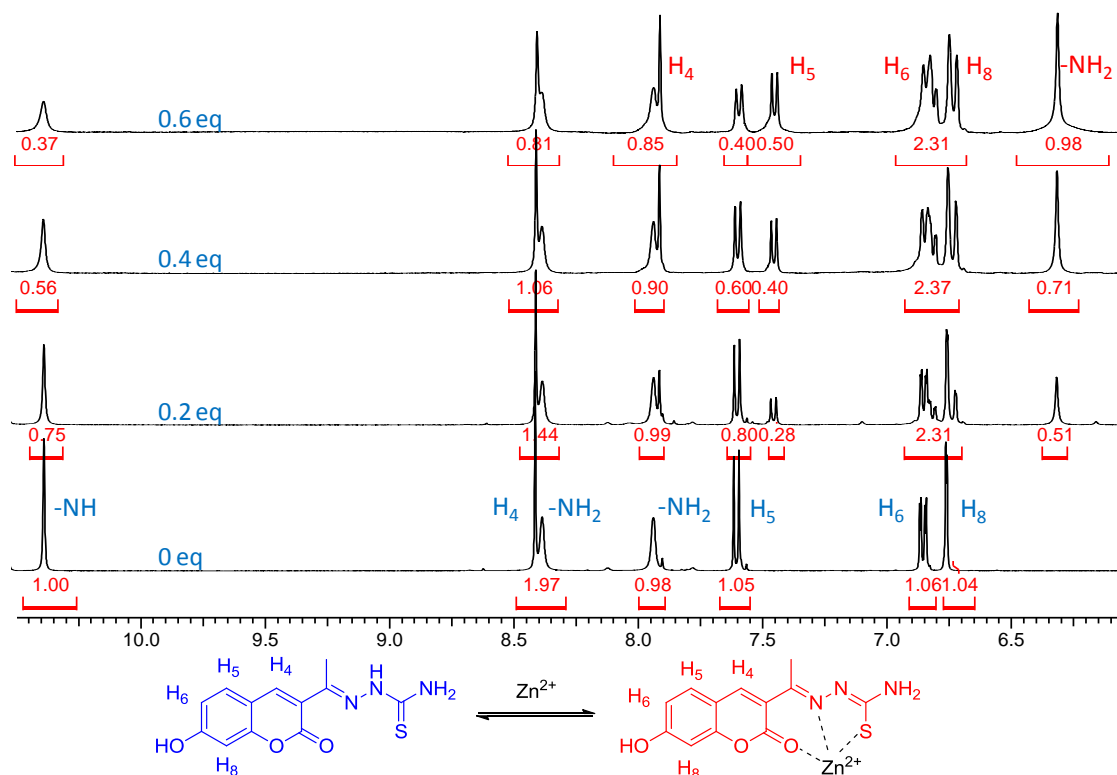


Figura 45. Elucidação estrutural de **59a** após adições sucessivas de acetato de zinco.

Alguns picos foram considerados mais deslocados como -NH_2 , -CH_3 , \mathbf{H}_4 e \mathbf{H}_5 , indicando o modo de complexação tridentada (figura 45). Novamente, podemos estabelecer que como os hidrogênios \mathbf{H}_6 e \mathbf{H}_8 mantiveram os mesmos deslocamentos químicos após a titulação, não houve alteração na hidroxila fenólica. Outra técnica analítica que evidenciou o efeito tautomérico de Zn-59a foi obtida a partir do espectro de massa, no qual, o pico com m/z 398.0 e seus isótopos, correspondem ao complexo Zn-59a-AcO (figura 30). Além disso, o espectro de massas também evidencia a estequiometria de complexação 1:1 (figura 46), a mesma observada pelo RMN ^1H (figura 45).

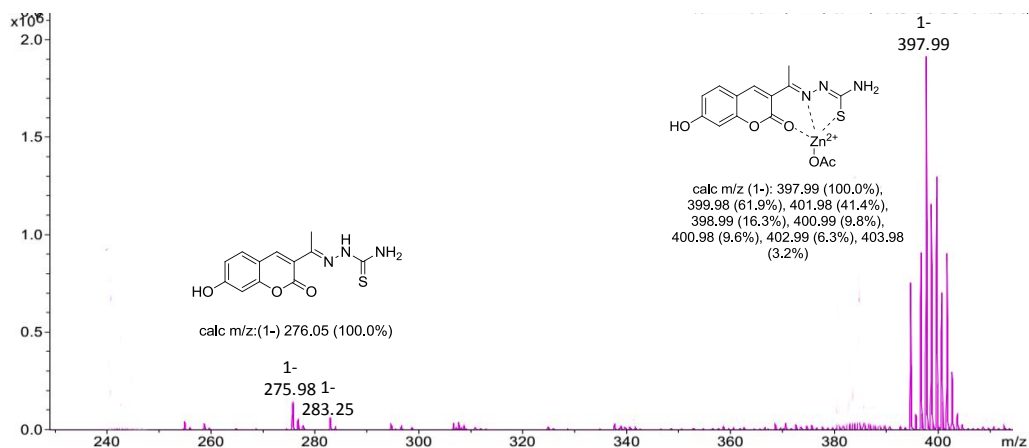


Figura 46. Espectro de Massas de 59a após adição de acetato de zinco em metanol.

3.6.2.1 Estudo teórico de 59a

Para uma investigação mais aprofundada, foram realizados cálculos funcionais de densidade (TDDFT), para descrever os estados excitados dos derivados **59a** e Zn-**59a** utilizando o funcional B3LYP e o programa Jaguar (JAGUAR, 2015). Os cálculos mostraram que o composto 59a não apresenta emissão considerável ($f=0.04$), em contraste com o complexo Zn-**59a** ($f=0.26$).

A boa correlação entre os valores teóricos e os encontrados experimentalmente foi assumido como uma indicação de que a descrição teórica compreendeu os principais efeitos envolvidos na fluorescência apresentada pelo composto Zn-**59a**.

A geometria otimizada encontrada para os estados singlete fundamental e excitado desse sistema estão relatados na figura 47.

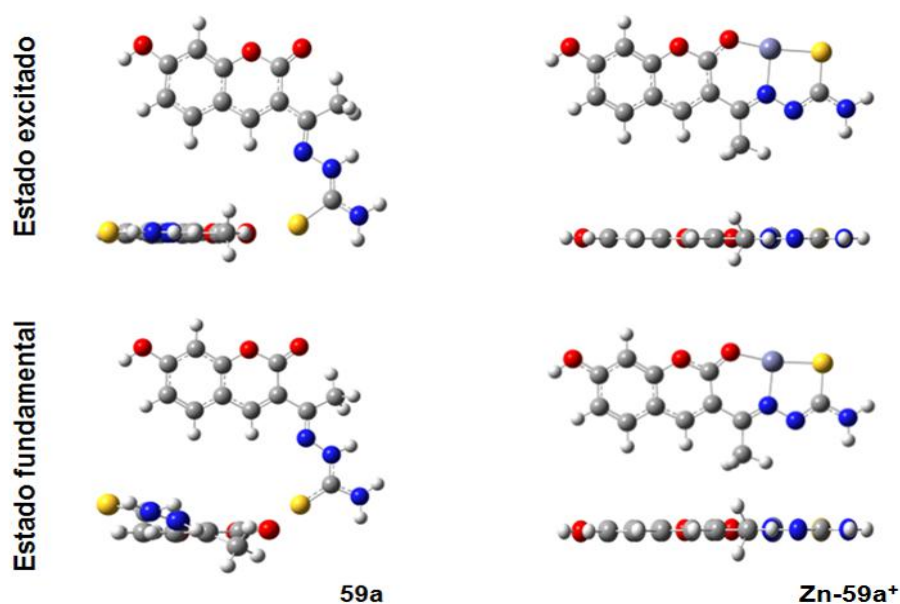


Figura 47. Otimização da geometria encontrada para os estados fundamentais de excitados de **59a** e Zn-**59a**.

O complexo **Zn-59a** tem todas as ligações duplas no mesmo plano, tanto no estado fundamental como no estado excitado, enquanto o composto **59a** tem a tiosemicarbazona e a cumarina em planos diferentes no estado fundamental. A complexação traz ambos os fragmentos para o mesmo plano, formando anéis planos de cinco e seis membros no estado fundamental (figura 47).

A investigação dos principais orbitais envolvidos no processo de emissão por fluorescência demonstrou que ocorre transferência de densidade eletrônica dos átomos de nitrogênio e enxofre da tiosemicarbazona para o fragmento de 7-OH-cumarina, em ambos os sistemas, durante a absorção, e da cumarina de volta para o fragmento de tiosemicarbazona, quando ocorre emissão (figura 48).

Pode-se notar também que os elétrons do átomo de Zn não estão diretamente envolvidos na emissão por fluorescência. Por outro lado, em **59a**, ocorre predominantemente transferência de elétrons envolvendo o átomo de enxofre da tiosemicarbazona (figura 48).

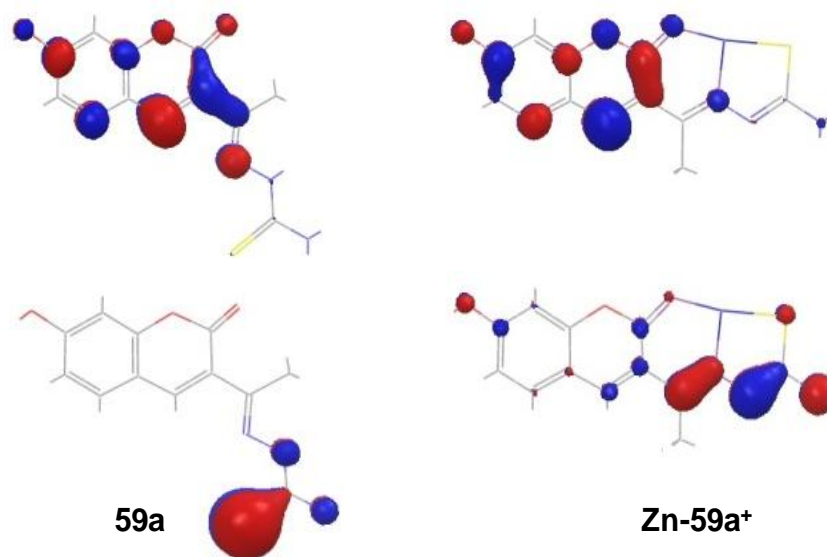


Figura 48. Orbitais mais envolvidos nos processos emissivos.

3.6.2.2 Estudo da complexação de 59a-b frente a Zn^{2+} em água

Com o propósito de aplicar os compostos **59a-b** em meio biológico, realizamos experimento de titulação de Zn^{2+} em meio aquoso. Curiosamente, o composto **59a** não demonstrou capacidade de atuar como sonda para detecção de zinco em solução aquosa (figura 49(a)), por outro lado, o composto **59b** demonstrou melhor perfil (figura 49(b)).

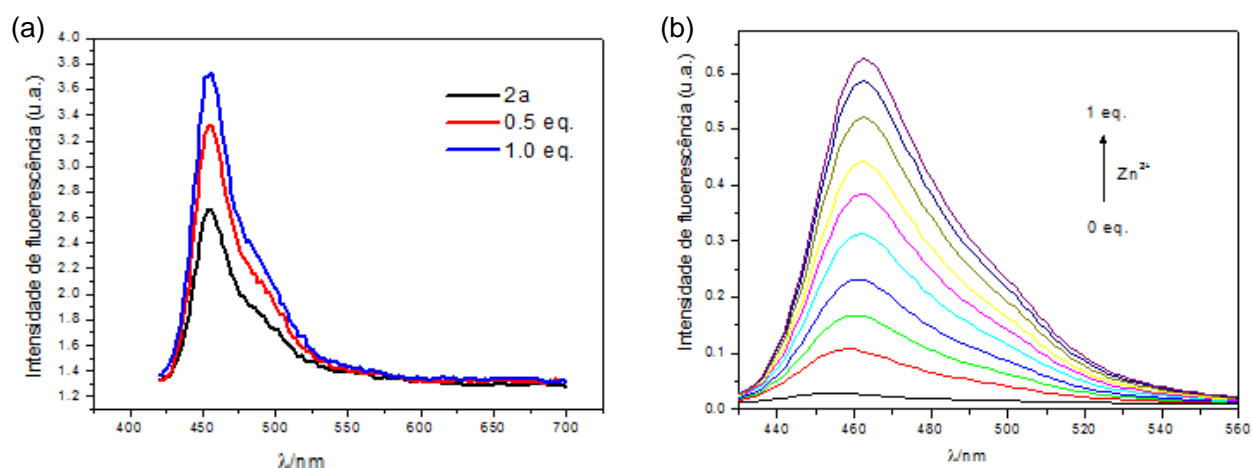


Figura 49. (a) Espectro de luminescência de **59a** em água/metanol (30/70) após adição de Zn^{2+} . (b) Espectro de luminescência de **59b** em água/metanol (50/50) após adições sequenciais de Zn^{2+} .

Devido à capacidade de apenas **59b** (uma semicarbaona) complexar a metais e atuar como sonda de fluorescência para Zn^{2+} em meio aquoso, decidimos, por ora, sintetizar os compostos híbridos (**60a-b**) utilizando apenas esse grupo funcional como

subunidade complexante, uma vez que nossos compostos são planejados para possuírem bioatividades e, então, exercerem as atividades pretendidas em meio aquoso.

3.7 Planejamento sintético e obtenção dos Híbridos moleculares (60a-b)

A síntese dos novos compostos híbridos (**60a-b**) utilizando cumarinas complexantes a metais com diferentes espaçadores alquílicos (ligados a 7-OH- do anel cumarínico) e conectados a subunidade farmacofórica piperidina foi baseada nas análises retrossintéticas ilustradas na figura 50.

Através das desconexões C=N (etapa a), foi possível identificar o precursor nucleofílico semicarbazida (**62b**) e o eletrófilo cumarínico (**98a-b**), como compostos chave para a síntese dos híbridos moleculares, explorando uma reação de condensação ácido-catalisada.

A partir da desconexão da ligação C-N (etapa b) (figura 50) foi possível identificar os materiais de partida para a formação da amina terciária, explorando uma reação de substituição nucleofílica (S_N2). Novamente explorando uma reação de substituição nucleofílica (S_N2), a partir da desconexão da ligação C-O (etapa c), foi possível identificar o derivado de cumarina (**63**), explorado como nucleófilo na reação de substituição nucleofílica (etapa d, e).

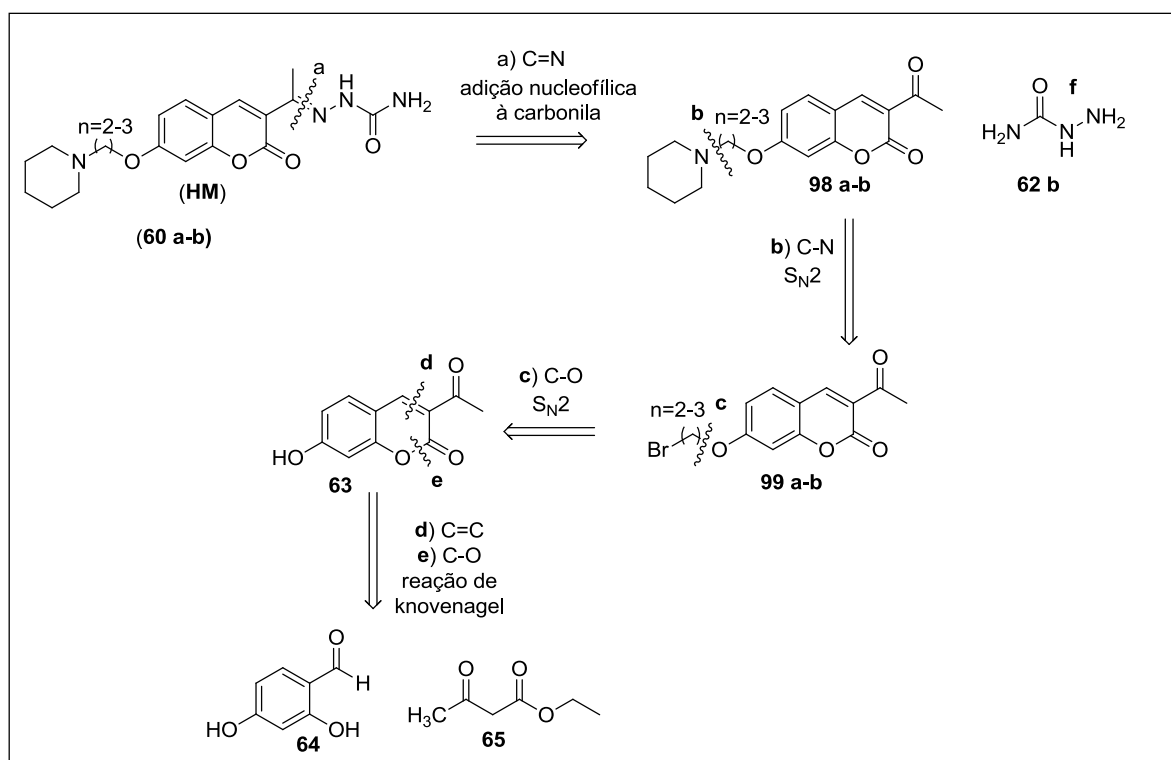


Figura 50. Análise retrossintética para obtenção dos híbridos planejados (serie HM).

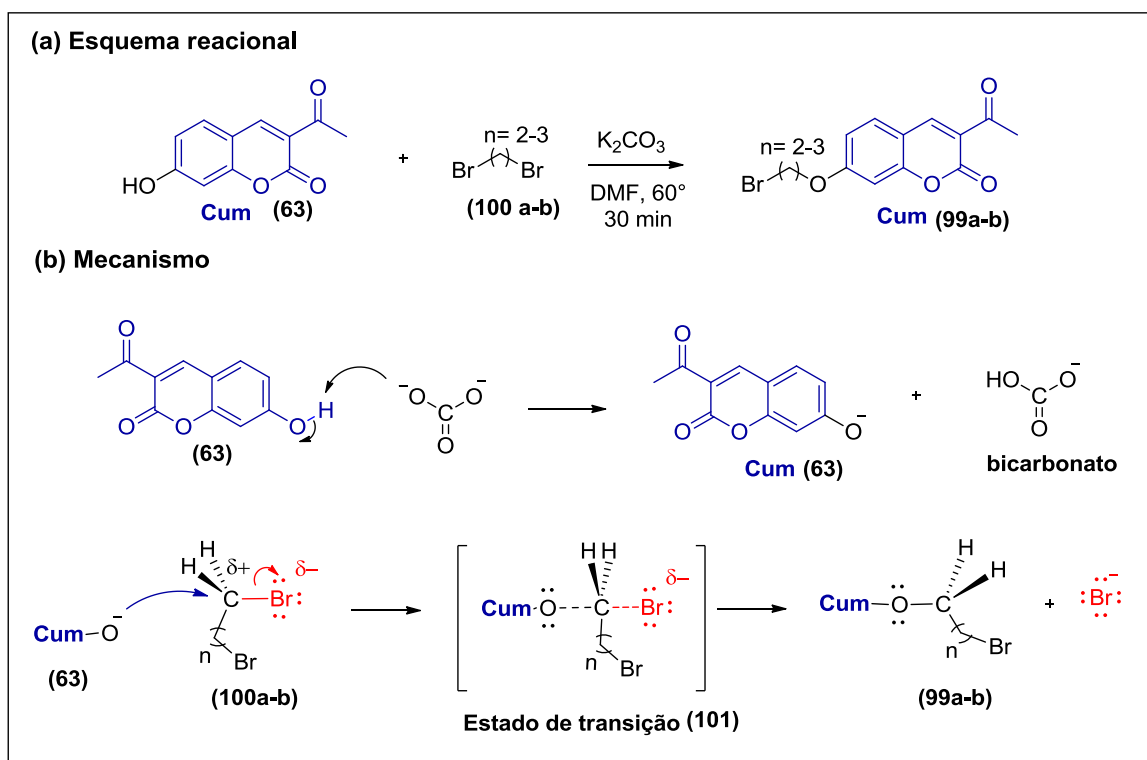
3.8 Síntese dos intermediários 3-acetil-7-bromoalcoxi-cumarinas (99a-b)

Os derivados 7-bromoalcoxi-cumarínicos (**99a-b**) foram sintetizados via reação de *O*-alquilação (esquema 14), seguindo o protocolo de reação descrito na literatura por Zhang e colaboradores, com rendimentos reacionais na faixa de 62-81%. A partir da 3-acetil-7-OH-cumarina (**63**), carbonato de potássio (K_2CO_3) e dibromoalcanos (**100a-b**) em DMF como solvente a 60°C (ZHANG *et al.*, 2016).

Esta reação ocorre via mecanismo de substituição nucleofílica (S_N2). Inicialmente, o carbonato de potássio abstrai o próton da hidroxila fenólica da 3-acetil-7-OH-cumarina (**63**), permitindo maior disponibilidade do par de elétrons livres da hidroxila para realizar ataque nucleofílico ao brometo de alquila, gerando bicarbonato e a 3-acetil-7-*O*⁻-cumarina. Em seguida, ocorre a substituição nucleofílica bimolecular (S_N2), onde o derivado de cumarina desprotonada atua como nucleófilo e ataca o carbono ligado ao bromo. O ataque ocorre em oposição à posição da ligação do grupo abandonador ao carbono que sofre o ataque pelo nucleófilo, gerando um estado de transição com geometria de bipirâmide de base trigonal. De maneira concertada, a ligação nucleófilo-carbono vai se formando, enquanto a ligação C-Br vai se rompendo, até a liberação do brometo, gerando as 7-bromoalcoxi-cumarina (**99a-b**) (esquema 14) (SOLOMONS, CAREY & SUNDBERG, 2008).

Por se tratar de um mecanismo de substituição nucleofílica bimolecular, o meio (solvente) e o impedimento estérico são determinantes para a eficiência do ataque nucleofílico. Baseado nesses preceitos, experimentalmente a reação mostrou-se extremamente seletiva para solventes polares e apróticos, em especial o DMF. As reações de substituição nucleofílica bimolecular são melhores estabilizadas por solventes polares, já que no estado de transição, o nucleófilo e o grupo abandonador são polares. A necessidade de o solvente ser aprótico ocorre já que o nucleófilo possui um sítio básico e poderia ser protonado, prejudicando o ataque nucleofílico (esquema 14) (CAREY & SUNDBERG, 2008).

Devido ao maior impedimento estérico do dibromoetano, as reações de ataque nucleofílico a este eletrófilo demandaram maior número de equivalentes molar de nucleófilo para ocorrer. Ao passo que as reações com dibromopropano possibilitaram um segundo ataque nucleofílico, dando origem a um produto de bis-aquilação.



Esquema 14. Esquema Reacional e mecanismo para a formação da 3-acetil-7-bromoalcoxi-cumarina
(Adaptado de SOLOMONS, 2008; CAREY, 2008).

Para determinar estruturalmente a formação das 7-bromoalcoxi-cumarinas (**99a-b**) foram realizados experimentos de determinação estrutural de RMN ^1H e ^{13}C dos compostos sintetizados (**99a-b**). Os principais indicativos da formação destes compostos no espectro de RMN ^1H foram a presença dos sinais de hidrogênio na região de hidrogênio ligado a carbono sp^3 , dos quais o mais característico foi a presença de um tripleto na região de $\delta = 4,49\text{-}4,52$ para **99a** e $\delta = 4,24\text{-}4,27$ para **99b** com integração igual a dois, referente aos hidrogênios metilênicos ligados ao carbono oxigenado. No espectro de RMN ^{13}C a formação dos produtos foi evidenciada pela presença dos sinais de carbono na região de carbono sp^3 , dos quais os mais característicos foram os sinais metilênicos na região de $\delta = 66,9\text{-}69,1$, referentes ao carbono ligado ao oxigênio presente na posição 7 da cumarina (figura 51).

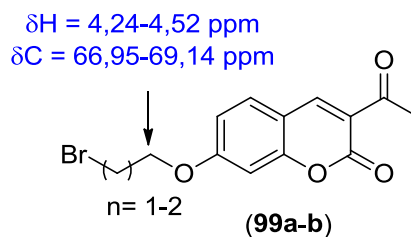


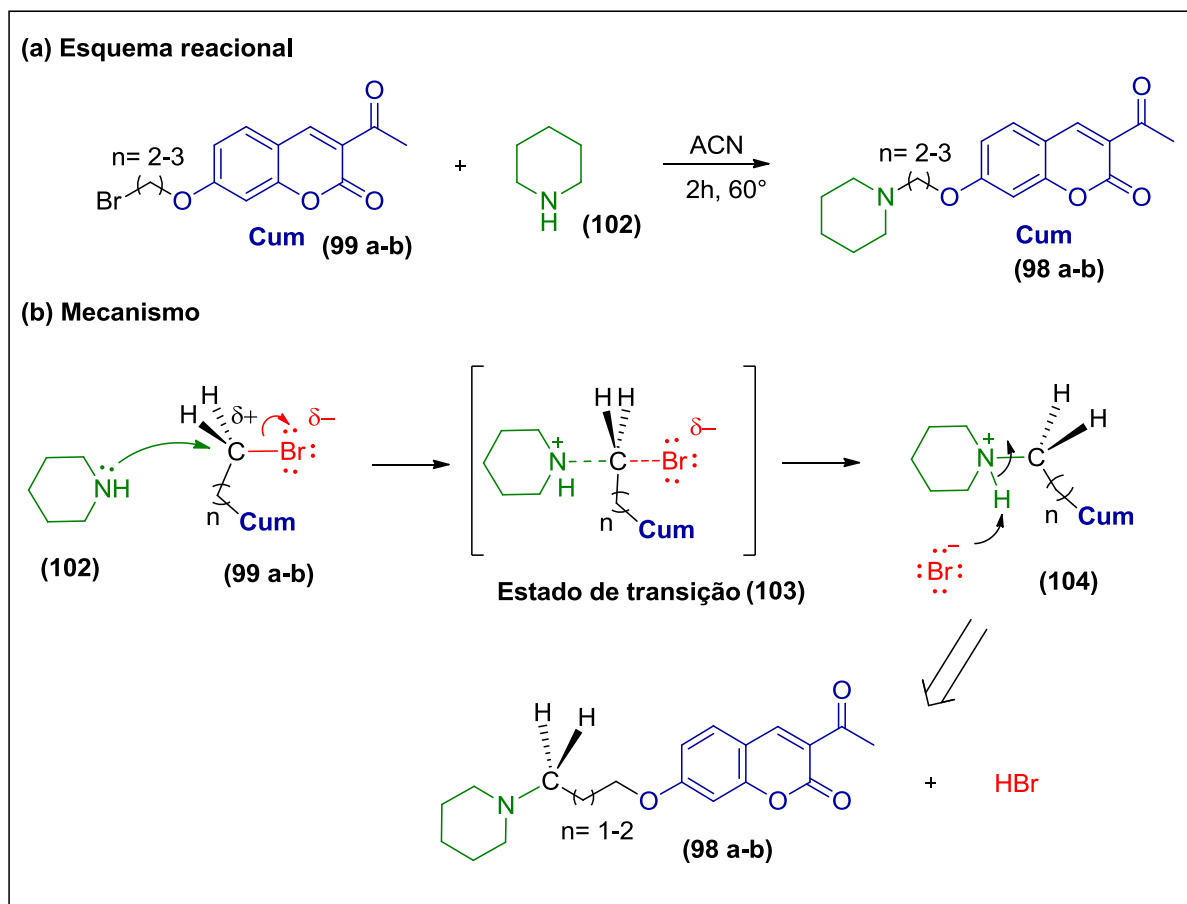
Figura 51. Atribuição dos principais sinais dos compostos 7-bromoalcoxi-cumarina (**99a-b**) nos espectros de RMN¹H e ¹³C.

3.9 Síntese dos intermediários 3-acetil-7-aminoalcoxi-cumarínicos (**98a-b**)

Os compostos 3-acetil-7-aminoalcoxi-cumarínicos (**98a-b**) foram sintetizados segundo a metodologia descrita por Joubert e colaboradores, com 72-74% de rendimento reacional, a partir da piperidina e dos respectivos derivados de 3-acetil-7-bromoalcoxicumarina, em acetonitrila como solvente e sob aquecimento a 60°C (esquema 15) (JOUBERT *et al.*, 2017).

Esta reação passa por um mecanismo de substituição nucleofílica bimolecular (S_N2), no qual a piperidina atua como nucleófilo e os derivados de coumarina (**99a-b**) como eletrófilo. Os elétrons não ligantes do nitrogênio promovem um ataque nucleofílico ao carbono ligado ao bromo e, de maneira concertada, a ligação nucleófilo-carbono se forma, enquanto a ligação C-Br se rompe, até o brometo ser liberado e resultar na formação do intermediário protonado (**104**). Em seguida, o brometo liberado abstrai o próton ligado ao nitrogênio, formando, assim, os respectivos compostos desejados (**98a-b**) e, como subproduto, HBr. A piperidina foi adicionada em excesso ao meio para agir também como base, a fim de neutralizar o HBr formado, evitando a protonação do nucleófilo (esquema 15) (CAREY & SUNDBERG, 2008; SOLOMONS, 2008).

Por se tratar de um mecanismo S_N2, o impedimento estérico exerce uma grande influencia durante o ataque nucleofílico, assim como na etapa anterior. Desta forma, a reação para obtenção dos derivados com espaçador de 2 carbonos (**98a**) demandou maior tempo reacional (3h) em comparação a obtenção do derivado com espaçador de 3 carbonos (**98b**) (2h).



Esquema 15. Esquema Reacional para a formação dos intermediários 3-acetil-7-aminoalcoxi-cumarinicos (**98a-b**) (Adaptado de SOLOMONS, 2008; CAREY, 2008).

Para determinar estruturalmente a formação das 3-acetil-7-aminoalcoxi-cumarinas (**98a-b**) foram realizados experimentos de determinação estrutural de RMN de ^1H e ^{13}C dos compostos sintetizados (**98a-b**).

O principal indicativo da formação destes compostos no espectro de RMN ^1H foi a presença dos sinais de hidrogênio ligados a carbono sp^3 do anel piperidínico, dos quais se destacam os multipletos na faixa de $\delta = 1,39\text{-}2,46$ (**98a**) e $\delta = 1,35\text{-}2,58$ (**98b**) com integração para 10 hidrogênios. No espectro de RMN ^{13}C a formação dos produtos foi evidenciada pela presença dos sinais de carbono na região de carbono sp^3 , dos quais os mais característicos foram os sinais metilênicos na região de $\delta = 24,3\text{-}67,1$ (**98a**) e $\delta = 24,1\text{-}67,4$ (**98b**), que evidenciou a presença de 5 e 6 metilenos com ambientes químicos distintos, respectivamente. Adicionalmente, é importante ressaltar que não há evidências o suficiente para afirmar a qual hidrogênio cada sinal se refere, já que a cadeia alquílica e o anel piperidínico podem assumir diferentes conformações (figura 52).

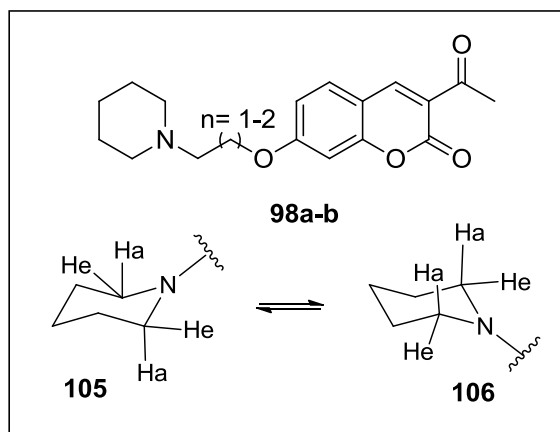


Figura 52. Estrutura química dos compostos (98a-b)

3.10 Obtenção das Semicarbazonas (60a-b)

Após obtenção dos intermediários-chave (59a-i), as semicarbazonas (60a-b) puderam ser sintetizadas através da condensação ácida catalisada das 3-acetil-7-aminoalcoxicumarinas (98a-b) (1,0 equivalente) à semicarzida cloridrato (62b) (1,2 equivalente), utilizando etanol como solvente.

O protocolo de síntese dos híbridos moleculares desejados (60a-b) foi desenvolvido em 80° durante 24 horas e utilizando tubo selado reforçado para evitar evaporação. O consumo dos intermediários-chave (98a-b) em sua totalidade foi monitorado por cromatografia em camada fina e somente observado após 20 horas de reação.

Tabela 7. Rendimento sintético e propriedades físicas dos híbridos moleculares 60 a-b sintetizados.

<i>Estrutura</i>	<i>Código</i>	<i>(n)</i>	<i>Rendimento(%)</i>	<i>Pf.(°C)</i>
	60a	2	64	220
	60b	3	78	205

Para determinar estruturalmente a formação das semicarbazonas foram realizados experimentos de determinação estrutural de RMN ^1H e ^{13}C dos compostos sintetizados (**60a-b**). Os principais indicativos da formação destes compostos no espectro de RMN ^1H foram a presença dos sinais de hidrogênio N-H ($\delta = 9,51$) típico de semicarbazonas em região de prótons desblindados, o sinal C₄-H ($\delta = 8,33-8,17$) de alta frequência, devido a efeitos anisotrópicos, típico de cumarinas, além da presença na região de hidrogênios ligado a carbono sp³ na região de $\delta_{\text{ppm}} = 4,22-4,57$ com integração igual a dois, referente aos hidrogênios metilênicos ligados ao carbono oxigenado (figura 54). Curiosamente, somente o composto **60a** apresentou sinal referente a protonação da amina terciária (-NH⁺), um singlete largo com deslocamento químico $\delta_{\text{ppm}} = 10,63$. No espectro de RMN ^{13}C a formação dos produtos foi evidenciada pela presença dos sinais de carbono na região de carbono sp³, onde os sinais mais característicos foram os metilênicos na região de $\delta_{\text{ppm}} = 63,4-65,4$, referentes ao carbono ligado ao oxigênio conectado a posição 7 da cumarina (figura 52), além da ausência do sinal típico de carbonila de cetona em $\delta = 195,2$ presente nos precursores reacionais (**98a-b**).

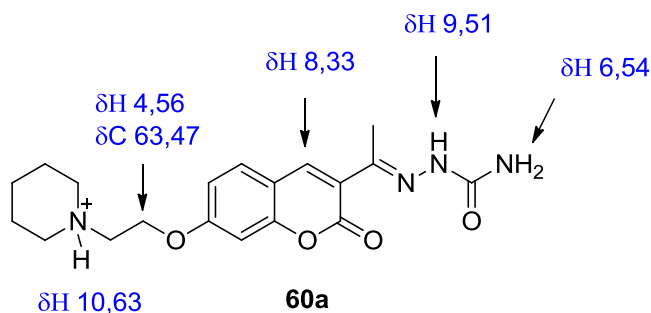
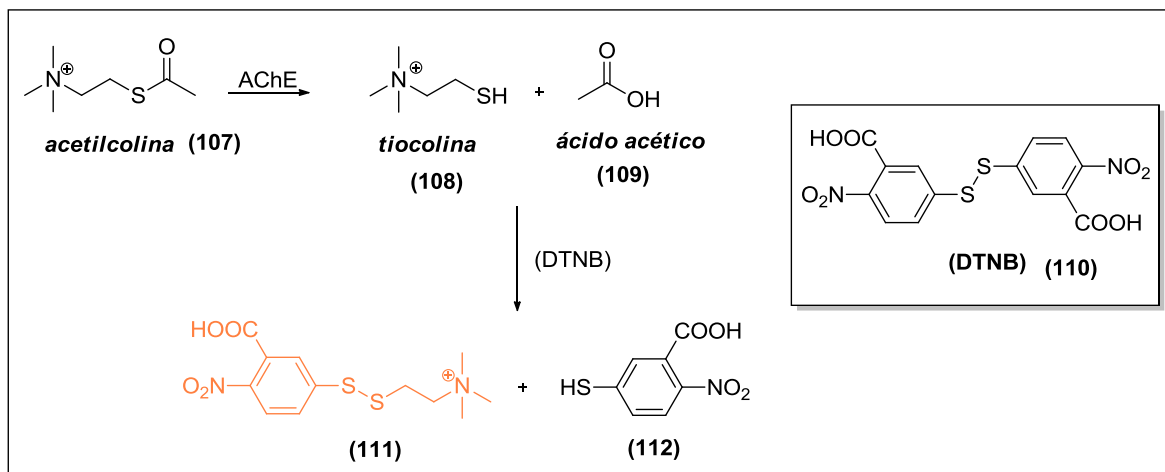


Figura 53: Atribuição dos principais sinais das semicarbazonas (**60a**) nos espectros de RMN ^1H e ^{13}C .

3.11 Propriedades farmacológicas.

3.11.1. Atividade inibitória frente à AChE e complexante de Zn²⁺

Os ensaios de inibição frente à AChE foram desenvolvidos segundo o metodologia de Ellman. Como a enzima acetilcolinesterase (AChE) atua clivando a enzima acetiltiocolina em tiocolina (**108**) e ácido acético (**109**), o reagente DTNB é adicionado durante o teste, já que o mesmo, em presença de tiocolina (**108**) reage, formando os produtos **111** e **112**. O produto **111** desta reação possui coloração amarela, a qual pode ser quantificada por medida de absorvância em aparelho de ELISA a 412 nm. Desta forma, a atividade enzimática pode ser mensurada de maneira indireta, por meio da reação de um dos produtos da clivagem da acetilcolina (**107**) com um reagente cromofórico (esquema 16).

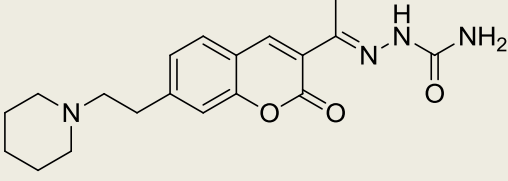
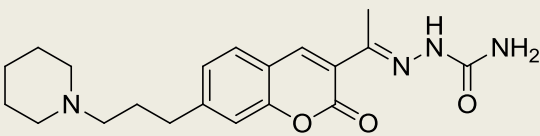
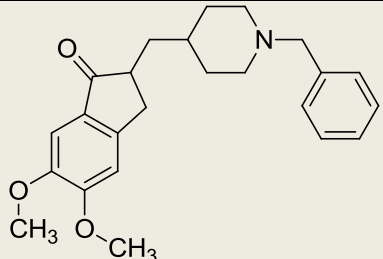


Esquema 16. Esquema reacional do ensaio de inibição de AChE.

Como forma de validação do planejamento estrutural, foram testados os produtos híbridos (**60a** e **60b**); as cetonas precursoras (**98a** e **98b**), que poderiam validar a importância farmacofórica do grupo piperidina ligado à cumarina; e a cumarina-semicarbazona (**59a**), que não contém a subunidade piperidínica. Os compostos testados que apresentavam a piperidina foram todos capazes de exercer atividade inibitória frente à AChE, validando a estratégia do seu uso na hibridação molecular. Os compostos **60a** ($CI_{50} = 32,77nM$) e **98a** ($CI_{50} = 12,94nM$) com espaçador de dois carbonos, apresentaram os resultados de atividade inibitória mais promissores, enquanto que o composto **59b** sem a presença da subunidade farmacofórica conhecida, apresentou valor de concentração inibitória insatisfatório ($CI_{50} > 100 \mu M$). Os resultados de CI_{50} obtidos no ensaio de inibição (tabela 8), foram obtidos utilizando a enzima AChE isolada de cérebro de enguia elétrica (EeAChE).

Tabela 8. Resultados obtidos nos ensaios inibitórios dos compostos frente à EeAChE.

Compostos	Código	CI_{50} frente à EeAChE (nM)
	98a	$12,94 \pm 0,49$
	98b	$77,3 \pm 6,80$

	60a	$32,77 \pm 2,87$
	60b	$128,28 \pm 5,75$
	4	$6,55 \pm 0,19$

Comparativamente ao fármaco referência cloridrato de donepezila ($CI_{50} = 6,55nM$), os compostos cumarínicos se mostraram bastante promissores com potências similares na inibição desta enzima. Percebemos também uma tendência de que os compostos com 2 metilenos espaçadores (**60a** e **98a**) se mostrassem mais potentes do que os com 3 metilenos (**60b** e **98b**), o que vai ao encontro do observado por Montanari e colaboradores (MONTANARI *et al.*, 2016).

Por fim, uma análise espectrofotométrica demonstrou que o composto **60b** foi capaz de se complexar ao Zn^{2+} , levando a aumento da intensidade de emissão por fluorescência após adições sequenciais de 0,1 equivalente de Zn^{2+} em solução 50/50 ($H_2O/MeOH$) (Figura 54).

Esses conjuntos de resultados demonstram os compostos **60a-b** como protótipos de candidato à agentes teranósticos: demonstra uma excelente potência de inibição da AChE e capacidade de complexar à Zn^{2+} apresentando fluorescência.

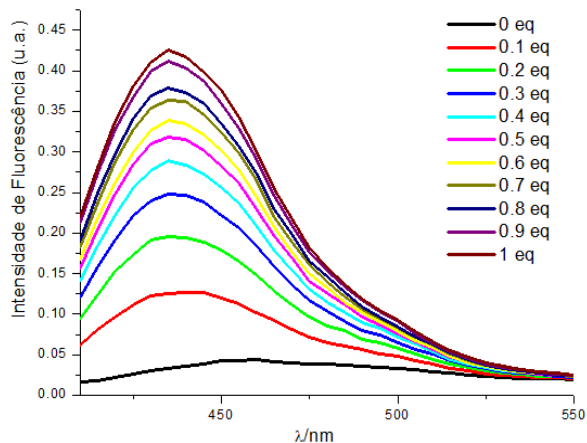
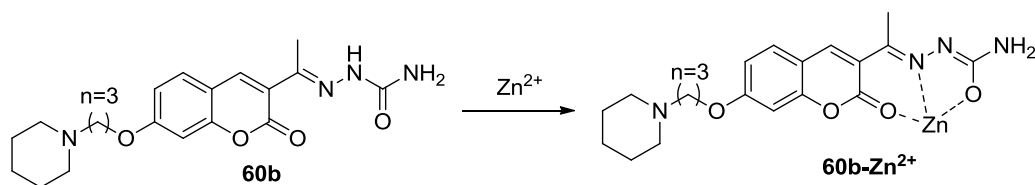


Figura 54. Espectro de luminescência de **60b** em água/metanol (50/50) após adições sequenciais de 0,1 equivalente de Zn^{2+} .

4. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

Esse trabalho demonstrou a síntese e caracterização de novos derivados de 7-OH-cumarinas da série **CCM**, utilizando dois protocolos distintos. O protocolo de síntese utilizando irradiação por microondas levou a maiores rendimentos reacionais e a uma considerável redução do tempo reacional, de 24 horas para 1 hora. Cinco compostos foram selecionados para caracterização das suas propriedades fotofísicas, e os mesmos demonstraram rendimentos quânticos de fluorescência em água superiores a outros derivados de cumarinas relatados na literatura (WU *et al.*, 2007), tornando estes compostos promissores candidatos a serem aplicados como sondas biológicas.

A modulação da atuação do grupo retirador de densidade eletrônica na posição “R” na série **CCM** demonstrou que pode levar a variações na estabilização do confôrmero sinperiplanar em metanol (solvente com menor polaridade), resultando em considerável deslocamento batocrômico de emissão em comparação aos outros compostos da série.

A análise dos compostos **59a-b** como sondas de fluorescências demonstrou boas propriedades para detecção de Zn^{2+} em solução, com aumento pronunciado da intensidade de emissão mediada pela complexação com Zn^{2+} e para **59a** de forma seletiva, pela força do contra íon (AcO^-). Esta nova sonda demonstrou excelente seletividade entre outros sais de zinco ($ZnCl_2$, $Zn(ClO_4)_2$ e $Zn(NO_3)_2$), assim como para outros cátions e ânions (anexo).

O modo de complexação foi totalmente elucidado por UV-Vis, RMN ^1H e espectro de Massa, e o mecanismo de tautomerização foi interpretado e corroborado pelos cálculos teóricos.

Ambas as sondas (**59a-b**) foram avaliadas quanto à capacidade de complexar a Zn^{2+} em água. Curiosamente, a sonda **59a** não foi capaz de atuar como sonda de fluorescência para Zn^{2+} em água (figura 49) como em metanol (figura 43), porém o composto **59b** se mostrou uma sonda eficiente para Zn^{2+} eficaz mesmo com a mudança de solvente. Os resultados de atividade farmacológica dos compostos protótipos **59a**, **58a-b** e **60a-b** frente a acetilcolinesterase, validaram o planejamento inicial da série **HM**, onde se faz necessária a presença da subunidade farmacofórica presente no análogo **61** com um espaçador de dois ou três carbonos para o anel cumarínico. Os resultados demonstraram a possibilidade de modificações estruturais ligadas a posição C-3 do anel cumarínico, como em **98a** e **60a**, o que viabiliza a obtenção de uma grande quimioteca de novos compostos protótipos inibidores de AChE.

O composto **60b** foi selecionado e validado como sonda de fluorescência após adições sequências de Zn^{+2} em água/metanol (50/50), validando o planejamento inicial de um novo híbrido molecular capaz de inibir AChE e complexar a Zn^{+2} em meio aquoso, podendo ser visto como um novo protótipo de teranóstico para DA.

5. EXPERIMENTAL

5.1 Metodologias sintéticas

Para a cromatografia em camada fina analítica (CCFA) foram utilizadas placas de alumínio Kieselgel 60 (Merck) com 0,2 mm de espessura. A visualização das substâncias em CCFA foi realizada em lâmpada ultravioleta (254-365nm).

Nas cromatografias de adsorção em coluna, utilizou-se gel de sílica 70-230 *mesh* (Merck) como fase estacionária e *n*-hexano e acetato de etila como fase móvel.

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 determinação dos pontos de fusão foi realizada em aparelho Aaker modelo PFM - II e os valores não foram corrigidos.

Os espectros de RMN ^1H foram obtidos em aparelhos Bruker Avance-500 e Bruker Avance-400 (ICE-UFRRJ), operando a 500MHz e 400MHz, respectivamente. As amostras foram dissolvidas em CDCl_3 e DMSO contendo tetrametilsilano (TMS) como referência interna e colocadas em tubos de 5 mm de diâmetro. Os espectros de RMN ^{13}C foram obtidos à 125 MHz e à 100MHz, em aparelho Bruker Avance-500 e Bruker Avance-400 (ICE-UFRRJ), respectivamente, e as amostras foram dissolvidas em CDCl_3 e DMSO contendo TMS como referência interna.

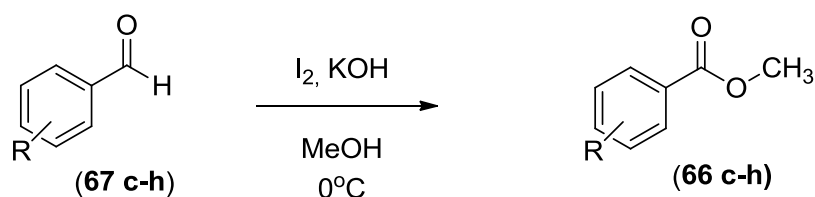
As áreas dos picos foram obtidas por integração eletrônica e sua multiplicidade descrita com: *s*-simpleto / *d*-dupleteo / *t*-tripleto / *q*-quadrupleto / *m*-multipleteo / *dd*-duplo dupleteo/ *sl* – simpleto largo.

Os espectros na região do infravermelho (IV) foram obtidos em espectrofotômetro Bruker 1600 FT (ICE-UFRRJ), utilizando-se pastilhas de brometo de potássio (KBr).

Os espectros de massas (EM) foram obtidos em espectrofotômetro Shimadzu (modelo CGMS-QP2010 Plus) acoplado a um cromatógrafo à gás (CG) (ICE-UFRRJ), utilizando acetona como solvente das amostras.

As reações foram realizadas em aparelho de microondas reacional (Biotage®) com padrão interno de temperatura.

5.1.1 Síntese dos benzoatos de metila (66 c-h) (YAMADA, S. *et al.*, 1992)

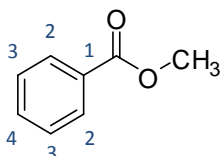


A uma solução de 13,0 mmol do respectivo aldeído (67c-h) em 170 mL de MeOH, mantida à 0°C , adicionou-se seguidamente, uma solução de 39,0 mmol de KOH em 170 mL de MeOH e uma solução de I_2 (16,9 mmol) em 170 mL de MeOH*. A reação foi acompanhada por cromatografia em camada fina e após *ca.* 2h foi evidenciado o total consumo do produto de partida (67). Ao meio reacional foram adicionadas pequenas porções de solução aquosa saturada de NaHSO_3 , até o total desaparecimento da coloração castanha. A purificação do produto foi

* As soluções metanólicas de KOH e I_2 devem ser adicionadas separadas e rapidamente pois o agente oxidante (HIO) gerado "*in situ*" não é estável e pode ser rapidamente convertido a KIO_3 . A reação já foi testada até 20 g dos aldeídos de partida, mantendo sua viabilidade e rendimentos.

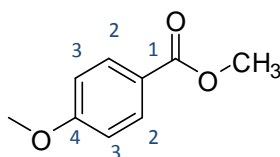
realizada por redução do volume de solvente por evaporação à pressão reduzida e subsequente precipitação em gelo seguida de filtração em funil de Büchner para os ésteres (**66b**, **66c**), ou por partição AcOEt (4 x 50 mL) e água (30 mL) levando, após secagem do produto ou evaporação da fase orgânica, aos ésteres desejados em rendimentos de 83 a 92%.

5.1.2 – benzoato de metila (**66c**) – óleo incolor



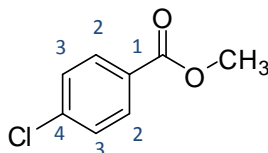
RMN-¹H (200 MHz) CDCl₃ / TMS (δ-ppm): 8,03 (d, 2H, H₂, J=7,7Hz); 7,65-7,23 (m, 3H, H₃, H₄); 3,90 (s, 3H, OCH₃). **RMN-¹³C (50 MHz) CDCl₃ / TMS (δ-ppm):** 167,0 (C=O); 132,9 (C₁); 130,3 (C₄); 129,6 (C₃); 128,4 (C₂); 52,0 (OCH₃). **I.V. Max. (filme) γ – cm⁻¹:** 1724 (C=O); 1279 (C-O); 710 (CH₃).

5.1.3 – 4-metoxi-benzoato de metila – sólido marrom, p.f. 50°C



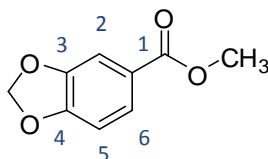
RMN-¹H (200 MHz) CDCl₃ / TMS (δ-ppm): 7,99 (d, 2H, H₂, J=8,2Hz); 6,91 (d, 2H, H₃, J=8,2Hz); 3,88 (s, CO-O-CH₃); 3,85 (s, Ar-O-CH₃). **RMN-¹³C (50 MHz) CDCl₃ / TMS (δ-ppm):** 166,8 (C=O); 163,5 (C₄); 131,6 (C₂); 122,7 (C₁); 113,7 (C₃); 55,4 (Ar-O-CH₃); 51,7 (CO-O-CH₃). **I.V. Max. (KBr) γ – cm⁻¹:** 1714 (C=O); 1289-1259 (C-O); 770 (CH₃).

5.1.4 – 4-cloro-benzoato de metila – sólido branco amarelado, p.f. 44°C



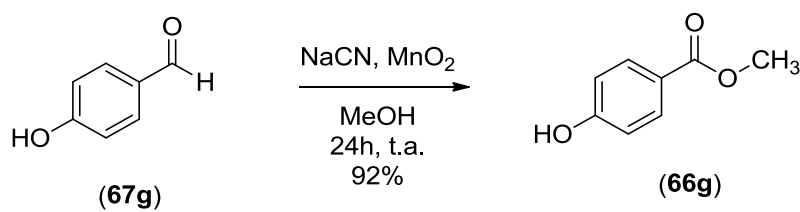
RMN-¹H (200 MHz) CDCl₃ / TMS (δ-ppm): 7,98 (d, 2H, H₂, J=8,6Hz); 7,42 (d, 2H, H₃, J=8,6Hz); 3,93 (s, O-CH₃). **RMN-¹³C (50 MHz) CDCl₃ / TMS (δ-ppm):** 166,5 (C=O); 139,8 (C₄); 131,5 (C₂); 128,9 (C₃, C₁); 52,5 (O-CH₃). **I.V. Max. (KBr) γ – cm⁻¹:** 1724 (C=O); 1290-1275 (C-O); 750 (CH₃).

5.1.5 – 3,4-dimetoxi-benzoato de metila – sólido branco, p.f. 53°C



RMN-¹H (200 MHz) CDCl₃ / TMS (δ-ppm): 7,62 (dd, H₆, J_{ax}=8,2Hz, J_{bx}=1,3Hz); 7,45 (d, H₂, J=1,3Hz); 6,83 (d, H₅, J=8,2Hz); 6,03 (s, O-CH₂-O); 3,87 (s, O-CH₃). **RMN-¹³C (50 MHz) CDCl₃ / TMS (δ-ppm):** 166,7 (C=O); 151,8 (C₄); 147,9 (C₃); 125,5 (C₆); 124,4 (C₁); 109,7 (C₂); 108,19 (C₅); 102,0 (O-CH₂-O); 52,3 (O-CH₃). **I.V. Max. (KBr) γ – cm⁻¹:** 1726 (C=O); 1295-1283 (C-O); 756 (CH₃).

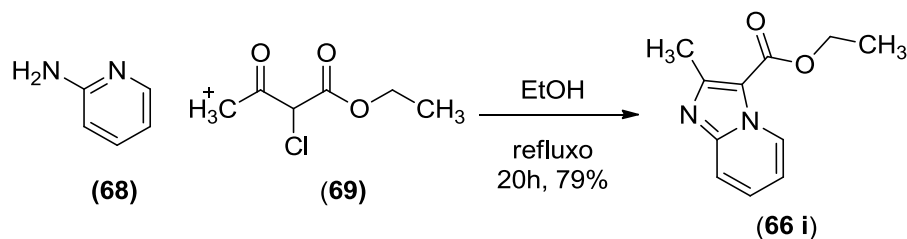
5.2 Síntese do 4-hidroxi-benzoato de metila (LAI; ANDERSON, W. K., 1997)



A uma solução de 3,0 mmol do 4-hidroxibenzaldeído (67g) em 30 mL de MeOH, foram adicionados 5 equivalentes (15 mmol) de NaCN em pó. Após 5 minutos, 15 equivalentes (45 mmol) de MnO₂ foi adicionado em pequenas porções. Após agitação a temperatura ambiente por 24h, a mistura foi diluída com 20 mL de CH₂Cl₂ e filtrado em Celite. O filtrado foi concentrado a pressão reduzida e o resíduo particionado em AcOEt (3 x 50 mL) e água (30 mL). A evaporação do solvente sob pressão reduzida levou ao 4-hidroxi-benzoato de metila (66g) em 92% de rendimento com um sólido branco. p.f.124°C.

RMN-¹H (200 MHz) CDCl₃ / TMS (δ-ppm): 7,80 (d, H₂, J=8,2Hz); 6,84 (d, H₃, J=8,2Hz); 3,77 (s, CO-O-CH₃). **RMN-¹³C (50 MHz) CDCl₃ / TMS (δ-ppm):** 165,8 (C=O); 161,8 (C₄); 131,2 (C₂); 120,0 (C₁); 115,1 (C₃); 51,3 (CO-O-CH₃). **I.V. Max. (KBr) γ – cm⁻¹:** 3288 (-OH); 1680 (C=O); 1281 (C-O); 772 (CH₃).

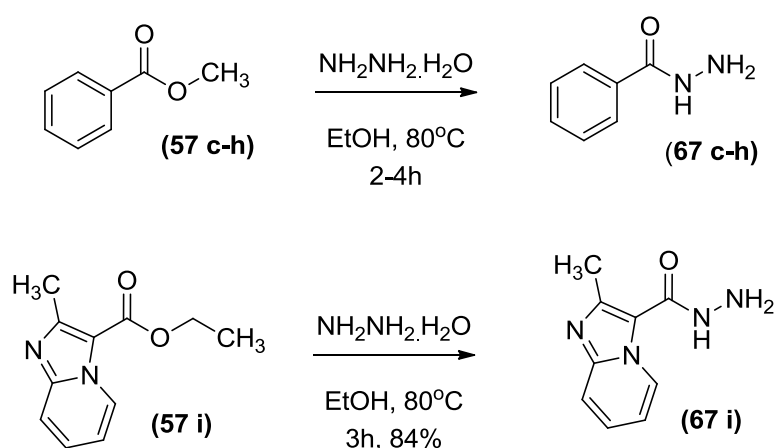
5.3 Síntese do 2-metil-imidazo[1,2-a]piridina-3-carboxilato de metila (RIBEIRO *et al.*, 1998)



Uma solução de 1g (10,6 mmol) de 2-aminopiridina (**68**) e 1,35 mL (1,6g, 9,75 mmol) de 2-cloroacetoacetato de etila (**69**) em 50 mL de EtOH, foi refluxada por 20h. O solvente foi removido sob pressão reduzida e o resíduo oleoso de cor marrom extraído por lavagens exaustivas com *n*-hexano a quente. As fases foram reunidas e evaporadas sob pressão reduzida, obtendo-se um sólido branco amorfo em 79% de rendimento. p.f. 43°C

RMN-¹H (300 MHz) CDCl₃ / TMS (δ-ppm): 9,29 (d, H₇, J=6,9Hz); 7,61 (d, H₄, J=9,0Hz); 7,36 (ddd, H₅, J=9,0Hz, 6,9Hz, 1,2Hz); 6,98 (dd, H₆, J=6,9Hz, 1,2Hz); 4,41 (q, 2H, O-CH₂-CH₃); 2,70 (s, 3H, Im-CH₃); 1,42 (t, 3H, OCH₂-CH₃). **RMN-¹³C (100 MHz) CDCl₃ / TMS (δ-ppm):** 161,7 (C=O); 153,0 (C₃); 147,1 (C₂); 128,2 (C₇); 127,8 (C₅); 116,9 (C₄); 113,8 (C₁); 112,8 (C₆); 60,5 (CO-O-CH₂-CH₃); 17,0 (-CH₃); 14,8 (CH₂-CH₃). **I.V. Max. (KBr) γ - cm⁻¹:** 1683 (C=O); 1223 (C-O); 762 (CH₃).

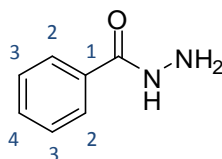
5.4 Síntese das Acilidrazinas (RIBEIRO *et al.*, 1998; LIMA *et al.*, 2000)



Em um balão de 50 mL foram colocados 15,0 mmol do éster metílico correspondentes, 10 mL de EtOH e 7,5 mL (150 mmol) de hidrato de hidrazina à 98%. Em seguida foi acoplado um condensador de refluxo e a mistura reacional foi mantida sob refluxo à 90°C até ser

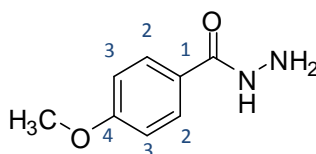
observado por cromatografia em camada fina o término da reação, *ca.* 2-4h. Após redução do volume final sob pressão reduzida, a solução resultante de 67f foi vertida sobre uma mistura de gelo picado e água levando a uma extensa precipitação de produtos brancos que foram subsequentemente filtrados e secos. Para os outros produtos, a solução resultante foi particionada em AcOEt (6 x 100 mL) e água (50 mL). A evaporação do solvente sob pressão reduzida levou a formação das benzoilidrazidas desejadas como sólidos brancos.

5.4.1 - Benzoilidrazida – sólido branco, p.f. 112°C



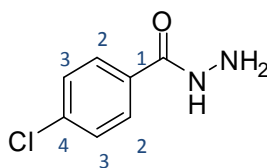
RMN-¹H (200 MHz) DMSO / TMS (δ-ppm): 9,78 (s, CO-NH); 7,83 (d, H₂, J=7,6Hz); 7,54-7,39 (m, 3H, H₃, H₄); 4,51 (s, NH-NH₂). **RMN-¹³C (50 MHz) DMSO / TMS (δ-ppm):** 165,9 (C=O); 133,3 (C₁); 131,0 (C₄); 128,3 (C₃); 126,9 (C₂). **I.V. Max. (KBr) γ – cm⁻¹:** 3299 (NH₂); 3186 (NH); 1616 (C=O); 1349 (C-O).

5.4.2 - 4-metoxi-benzoilidrazida – sólido branco, p.f. 136°C



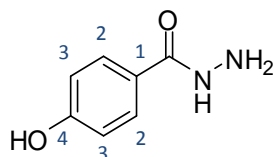
RMN-¹H (200 MHz) DMSO / TMS (δ-ppm): 9,62 (s, CO-NH); 7,82 (d, 2H, H₂, J=8,8Hz); 6,67 (d, 2H, H₃, J=8,8Hz); 4,43 (s, NH-NH₂); 3,79 (s, 3H, O-CH₃). **RMN-¹³C (50 MHz) DMSO / TMS (δ-ppm):** 165,6 (C=O); 161,4 (C₄); 128,7 (C₂); 125,5 (C₃); 113,5 (C₁). **I.V. Max. (KBr) γ – cm⁻¹:** 3316 (NH₂); 3183 (NH); 1623 (C=O); 1307-1256 (C-O).

5.4.3 - 4-cloro-benzoilidrazida – sólido branco, p.f. 131°C



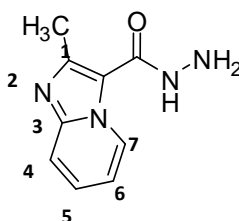
RMN-¹H (200 MHz) DMSO / TMS (δ-ppm): 9,85 (s, CO-NH); 7,84 (d, 2H, H₂, J=8,0Hz); 7,52 (d, 2H, H₃, J=8,0Hz); 4,52 (s, NH-NH₂). **RMN-¹³C (50 MHz) DMSO / TMS (δ-ppm):** 165,4 (C=O); 136,4 (C₄); 132,6 (C₁); 129,1 (C₂); 128,9 (C₃). **I.V. Max. (KBr) γ – cm⁻¹:** 3309 (NH₂); 3208 (NH); 1618 (C=O); 1348 (C-O).

5.4.4 – 4-hidroxi-benzoilidrazida – sólido branco, p.f.> 250°C



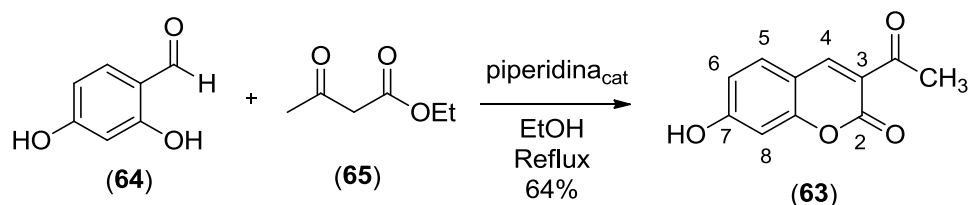
RMN-¹H (200 MHz) DMSO / TMS (δ-ppm): 9,96 (s, OH); 9,50 (s, CO-NH); 7,95 (d, 2H, H₂, J=8,0Hz); 7,32 (d, 2H, H₃, J=8,0Hz); 4,42 (s, NH-NH₂). **RMN-¹³C (50 MHz) DMSO / TMS (δ-ppm):** 165,5 (C=O); 160,5 (C₄); 129,4 (C₂); 125,5 (C₁); 110,0 (C₃). **I.V. Max. (KBr) γ – cm⁻¹:** 3428 (-OH); 3319, 3199 (N-H); 1622 (C=O); 1280 (C-O).

5.4.5 – 2-metil-imidazo[1,2-a]piridina-3-carboidrazida – sólido branco, p.f. 180°C



RMN-¹H (200 MHz) DMSO / TMS (δ-ppm): 9,18 (s, CO-NH); 8,94 (d, H₇, J=6,0Hz); 7,55 (d, H₄, J=8,0Hz); 7,36 (d, H₅, J=8,0Hz); 7,00 (dd, H₆, J=8,0Hz, 6,0Hz); 4,56 (s, NH-NH₂); 2,53 (s, 3H, -CH₃). **RMN-¹³C (50 MHz) DMSO / TMS (δ-ppm):** 161,9 (C=O); 145,6 (C₂); 145,5 (C₃); 127,4 (C₇); 126,9 (C₅); 116,7 (C₆); 115,4 (C₁); 113,33 (C₄); 16,0 (-CH₃). **I.V. Max. (KBr) γ – cm⁻¹:** 3290, 3218 (N-H); 1626 (C=O); 744 (N=C).

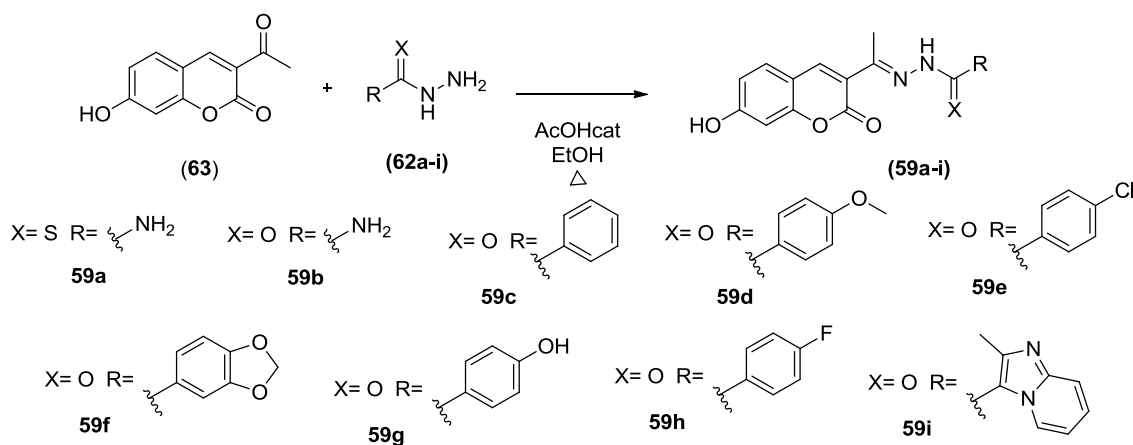
5.5 - Síntese da 3-acetil-7-OH-cumarina (63)



A uma solução de 14.48 mmol de 4-hidroxisalicilaldeído (**64**) (2.0 g) em 40 ml de etanol, foram adicionados 14.48 mmol de acetoacetato de etila (**65**) (1.85 ml) e 2.17 mmol de piperidina (215 μ L), em um balão volumétrico de 100 ml. A solução foi mantida a 90°C por 24h. Após esse período, a maior parte do solvente foi evaporado e o sólido formado foi filtrado para fornecer o produto **63**.

(1,887g, 64%). Mp 238°C. RMN ^1H (500 MHz, DMSO- d_6): δ 2,54 (s, 3H, -CH $_3$); 6.73 (s, 1H); 6,83-6,84 (d, J= 8.51Hz, 1H); 7,76-7,77 (d, J= 8.51Hz, 1H); 8,57 (s, 1H). RMN ^{13}C (125 MHz, DMSO- d_6): 30,6; 102,2; 111,1; 114,8; 119,4; 133,2; 148,4; 157,8; 159,6; 165,0; 195,1; MS (ESI-) m/z 204.0.

5.6 – Síntese das N-acilidrazonas, semicarbazona e tiosemicarbazona



5.6.1 – Síntese utilizando aquecimento convencional (AC)

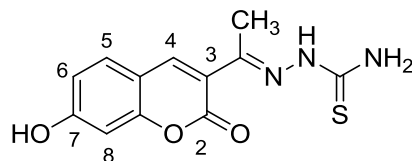
A uma solução de 0.48 mmol (100 mg) de 3-acetil-7-hidroxi-cumarina (**63**) em 2ml de etanol, foram adicionados 0.50 mmol das hidrazidas, semicarbazida e tiosemicarbazida (**62a-i**) correspondentes em um tubo selável de borossilicato, e então 2 gotas de ácido acético foram adicionadas. A reação foi mantida em agitação a 80°C por 24 h, após esse período, a solução foi

arrefecida até a temperatura ambiente e vertida em gelo. O sólido formado foi filtrado e lavado com pequenas porções de acetato de etila.

5.6.2 – Síntese assistida por microondas

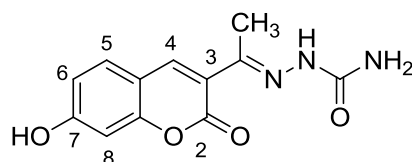
A uma solução de 0.48 mmol (100 mg) de 3-acetil-7-hidroxi-cumarina (**63**) em 4ml de etanol, foram adicionados 0.50 mmol das hidrazidas, semicarbazida e tiosemicarbazida (**62a-i**) correspondentes em um tubo de borosilicato, e então 3 gotas de ácido acético foram adicionadas. A reação foi irradiada a 80°C por 45 min (**59a-b**) ou 1h (**59c-i**), após esse período, a solução foi arrefecida até a temperatura ambiente e vertida em gelo. O sólido formado foi filtrado e lavado com pequenas porções de acetato de etila.

5.6.3 Tiosemicarbazona-7-OH-cumarina (**59a**)



Rendimento de 92%. Pf: 231°C. **RMN ¹H (500 MHz, DMSO-*d*₆)**: δ 2,24 (s, 3H); 6,74 (s, 1H); 6,82 – 6,84 (d, J = 8.5 Hz, 1H); 7,58 – 7,59 (d, J = 8.5Hz, 1H); 7,92 (s, 1H); 8,37 – 8,39 (m, 2H); 10,37 (s, 1H); 10,76 (s, 1H). **RMN ¹³C (125 MHz, DMSO-*d*₆)**: δ 16,55; 102,22; 111,89; 114,15; 121,48; 131,06; 143,12; 147,07; 155,97; 160,01; 162,36; 179,48. **MS (ESI-)**: m/z 275,8. Análise elemental calc. (%) for C₁₂H₁₁N₃O₃S: C 51,98; H 4,00; N 15,15; encontrado: C 52,03; H 4,06; N 15,11.

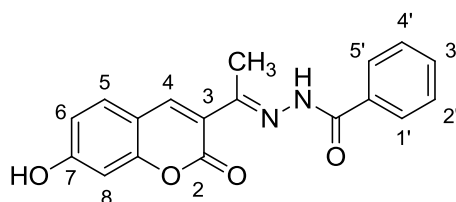
5.6.4 Semicarbazona-7-OH-cumarina (**59b**)



Rendimento de 88% (AC) ou 93% (MW). pf: 225°C. **IV (KBr)**: 3513 (O-H); 3403 (N-H); 2922; 2852; 1691 (C=O); 1623 (C=N); 1566 (C=C) cm⁻¹. **RMN ¹H (500 MHz, DMSO-*d*₆)**: δ 2,12 (s, 3H); 6,53 (s, 2H); 6,73 (s, 1H); 6,81- 6,83 (d, J = 8.5Hz, 1H); 7,58-7,60 (d, J = 8.5Hz, 1H); 8,24

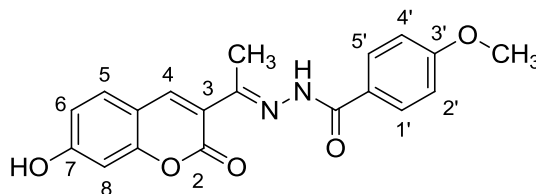
(s, 1H); 9,46 (s, 1H); 10,70 (s, 1H). **RMN ¹³C (125 MHz, DMSO-*d*₆)**: δ 15,9; 102,2; 112,0; 114,0; 122,2; 130,8; 142,1; 143,1; 155,8; 157,7; 160,2; 162,0. **MS (ESI-)**: m/z 260.1. Análise elementar calculada (%) for C₁₂H₁₁N₃O₄: C 55,17; H 4,24; N 16,09; encontrado: C 54,84; H 4,47; N 15,92.

5.6.5 N-acilidrazona-7-OH-cumarina (59c)



Rendimento de 69% (AC) or 89% (MW) yields. pf: 225°C. **IV (KBr)**: 3435 (O-H); 3058 (N-H); 2923; 2852; 1690 (C=O); 1602 (C=N); 1527 (C=C); 1456 (C=C) cm⁻¹. **RMN ¹H (500 MHz, DMSO-*d*₆)**: δ 2,30 (s, 3H); 6,77 (s, 1H); 6,83-6,85 (d, J= 8,4Hz, 1H); 7,51-7,54 (m, J= 6,7Hz, 2H); 7,58-7,60 (d, J= 5,7Hz, 1H); 7,71-7,70 (d, J=6,1Hz, 1H); 7,88-7,89 (d, J= 6,3Hz, 2H); 8,17 (s, 1H); 10,79 (s, 2H). **RMN ¹³C (125 MHz, DMSO-*d*₆)**: δ 16,9; 102,3; 111,7; 114,2; 122,5; 128,4; 128,8; 131,2; 132,1; 134,4; 142,8; 156,1; 160,1; 162,4. **MS (ESI-)**: m/z 321,1. Análise elementar calc. (%) for C₁₈H₁₄N₂O₄: C 67,07; H 4,38; N 8,69; encontrado: C 67,18; H 4,50; N 8,55.

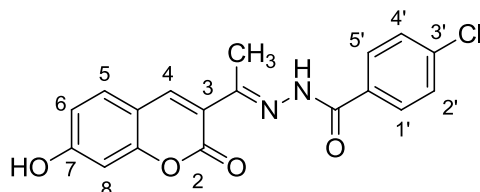
5.6.6 N-acilidrazona-7-OH-cumarina (59d)



Rendimento de 78% (AC) or 95% (MW) yields. Mp: 235°C. **IV (KBr)**: 3431 (O-H); 2922; 2852; 1704 (C=O); 1609 (C=N); 1527 (C=C); 1423 (C=C) cm⁻¹. **RMN ¹H (500 MHz, DMSO-*d*₆)**: δ 2,32 (s, 3H); 3,34 (s, 2H); 6,77 (s, 1H); 6,83-6,85 (d, J= 8,2Hz, 1H); 7,04-7,06 (d, J= 8,2Hz, 2H); 7,69-7,70 (d, J=8,20, 1H); 7,88-7,90 (d, J=8,20, 2H); 8.13 (s, 1H); 10.61 (s, 1H); 10.74 (s,1H). **RMN ¹³C (125 MHz, DMSO-*d*₆)**: δ 16,7; 55,9; 102,3; 111,7; 114,0; 114,1; 122,6;

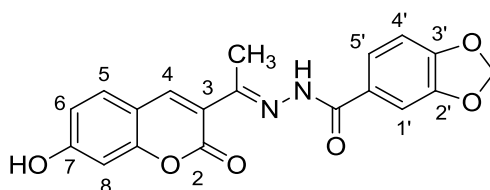
126,3; 131,1; 142,6; 156,0; 160,1; 162,4. **MS (ESI-):** m/z 351,1. Análise elementar calc. (%) for C₁₉H₁₆N₂O₅: C 64,77; H 4,58; N 7,95; encontrado: C 64,71; H 4,60; N 7,92.

5.6.7 N-acilidrazona-7-OH-cumarina (59 e)



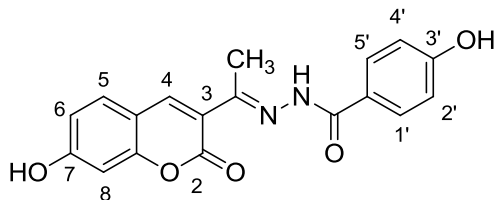
Rendimento de 87% (CH) or 98% (MW). pf: 255°C. **IV (KBr):** 3431 (O-H); 2921; 2852; 1704 (C=O); 1616 (C=N); 1528 (C=C); 1432 (C=C) cm⁻¹. **RMN ¹H (500 MHz, DMSO-*d*₆):** δ 2,32 (s, 3H); 6,77 (s, 1H); 6,83-6,85 (d, J= 8.5Hz, 1H); 7,59-7,61 (d, J= 5.7Hz, 2H); 7,71 (s, 1H); 7,91 (s, 2H); 8,17 (s, 1H); 10,78 (s, 1H); 10,85 (s, 1H). **RMN ¹³C (125 MHz, DMSO-*d*₆):** 17,0; 102,3; 111,7; 114,2; 122,4; 128,9; 130,4; 131,2; 142,9; 160,1; 162,5. **MS (ESI-):** m/z 355,1. Análise elementar calc. (%) for C₁₈H₁₃ClN₂O₄: C 60,60; H 3,67; N 7,85; encontrado: C 60,49; H 3,55; N 7,91.

5.6.8 N-acilidrazona-7-OH-cumarina (59 f)



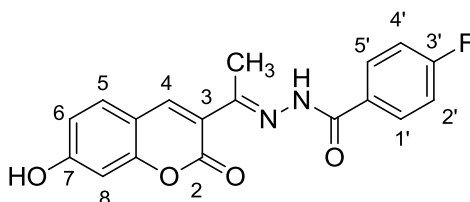
Rendimento de 82% (AC) ou 93% (MW). pf: 249°C. **IV (KBr):** 3440 (O-H); 2921; 1704 (C=O); 1616 (C=N); 1529; 1259 cm⁻¹. **RMN ¹H (500 MHz, DMSO-*d*₆):** 2,31 (s, 3H); 6,13 (s, 2H); 6,77 (s, 1H); 6,83-6,85 (d, J= 8.5Hz, 1H); 7,03-7,05 (d, J= 7.9Hz, 1H); 7,45 (s, 1H); 7,49-7,51 (d, J= 8.2Hz, 1H); 7,68-7,70 (d, J= 8.5Hz, 1H); 8,13 (s, 1H); 10,58 (s, 1H); 10,74 (s, 1H). **RMN ¹³C (125 MHz, DMSO-*d*₆):** 16,8; 102,2; 102,3; 108,4; 111,7; 114,2; 122,5; 128,1; 131,1; 142,7; 156,1; 160,1; 162,4. **MS (ESI-):** m/z 365,1. Análise elementar calc. (%) for C₁₉H₁₄N₂O₆: C 62,30; H 3,85; N 7,65; encontrado: C 61,98; H 3,99; N 7,60.

5.6.9 N-acilidrazona-7-OH-cumarina (59 g)



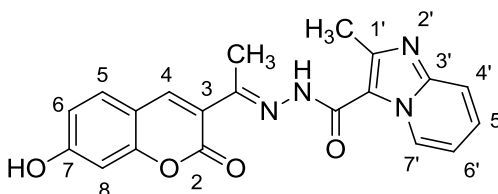
Rendimento de 70% (AC) or 97% (MW). pf 266°C. **IV (KBr):** 3434 (O-H); 3167 (O-H); 3064 (N-H); 2922; 2853; 1680 (C=O); 1598 (C=N); 1524 (C=C); 1462 (C=C) cm^{-1} . **RMN ^1H (500 MHz, DMSO- d_6):** δ 2,30 (s, 3H); 6,77 (s, 1H); 6,83-6,85 (d, 2H); 6,87 (s, 1H); 7,69-7,71 (d, J= 8.5Hz, 1H); 7,78-7,79 (d, J=8.5Hz, 2H); 8,13 (s, 1H); 10,12 (s, 1H); 10,52 (s, 1H); 10,77 (s, 1H). **RMN ^{13}C (125 MHz, DMSO- d_6):** δ 16,7; 102,3; 111,7; 114,1; 115,3; 122,6; 124,7; 113,1; 142,6; 156,0; 160,2; 162,4. **MS (ESI-):** m/z 337,1. Análise elementar calc. (%) for $\text{C}_{18}\text{H}_{14}\text{N}_2\text{O}_5$: C 63,90; H 4,17; N 8,28; encontrado: C 63,77; H 4,16; N 8,23.

5.6.10 N-acilidrazona-7-OH-cumarina (59 h)



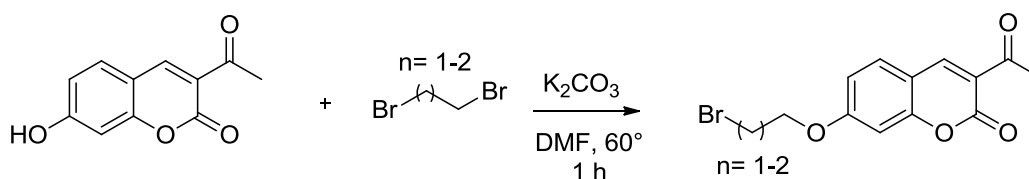
Rendimento de 83% (AC) ou 85% (MW – 1,5 h) yields. Mp: 290°C. **IV (KBr):** 3437 (O-H); 3048; 2926; 2849; 1693 (C=O); 1601 (C=N); 1532 (C=C); 1456 (C=C); 1345 (C-F) cm^{-1} . **^1H RMN (500 MHz, DMSO- d_6):** δ 2,32 (s, 3H); 6,77 (s, 1H); 6,83-6,85 (d, J= 8.5Hz, 1H); 7,36 (m, 2H); 7,70-7,71 (d, J= 6.6Hz, 1H); 7,97 (m, 2H); 8,16 (s, 1H); 10,81 (m, 2H). **^{13}C NMR (125 MHz, DMSO- d_6):** δ 16,9; 102,3; 111,7; 114,2; 115,7; 122,4; 130,8; 131,2; 142,8; 148,4; 156,1; 160,1; 162,4. **MS (ESI-):** m/z 339,1. Análise elementar calc. (%) for $\text{C}_{18}\text{H}_{13}\text{N}_2\text{O}_4$: C 63,53; H 3,85; N 8,23; encontrado: C 63,61; H 3,94; N 8,20.

5.6.11 N-acilidrazona-7-OH-cumarina (59 i)



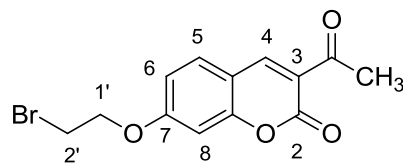
Rendimento de 72% (AC) ou 82% (MW). pf: 240°C. **IV (KBr)**: 3435 (O-H); 2922; 2853; 1698 (C=O); 1616 (C=N); 1585 (C=C); 1452 (C=C); 1232cm⁻¹. **RMN ¹H (500MHz DMSO-d₆)**: δ 2,32 (s,3H); 2,62 (s,2H); 6,77 (s, 1H); 6,83-6,85 (d, J= 8.5Hz, 1H); 7,09-7,12 (t, J= 6.9Hz, 1H); 7,44-7,46-7,47 (t, J= 7.9Hz, 1H); 7,56-7,58 (d, J= 8.8Hz, 1H); 7,64-7,65 (d, J= 8.8Hz, 1H); 7,68-7,69 (d, J= 8.5Hz, 1H); 8,13 (s, 1H); 10,53 (s, 1H); 10,78 (s, 1H). **MS (ESI-)**: m/z 375,1. Análise elementar calc. (%) for C₂₀H₁₆N₄O₄: C 63,82; H 4,28; N 14,89; encontrado: C 63,66; H 4,45; N 14,78.

5.7 Síntese dos intermediários 3-acetil-7-bromoalcoxicumarinas (99a-b)



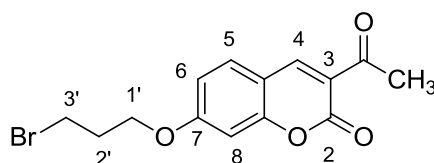
Em um bécher de 25 mL foram adicionados 1,47 mmol de 7-hidroxycumarina (**63**) e 4,40 mmol de carbonato de potássio (K₂CO₃) que foram solubilizados em 7 mL de DMF seco. Em um tubo de reação de borossilicato de 20 mL, foram adicionados 2 mL de DMF seco e 4,40-8,82 mmol de dibromoalcano (**100a-b**). Em seguida, a mistura no tubo foi submetida à agitação magnética e adicionou-se gota a gota a solução básica de cumarina. Ao término da adição, o tubo de reação foi selado e a mistura foi submetida a aquecimento a 60°C e monitorada por cromatografia em camada fina até total consumo dos reagentes de partida (**99a-b**). Ao final da reação, o solvente foi retirado em rotaevaporador e o isolamento foi realizado em coluna cromatográfica hexano/acetato de etila e gradiente de concentração de 0-30% do solvente mais polar.

5.7.1 3-acetil-7-(2-bromoetoxi)-cumarina



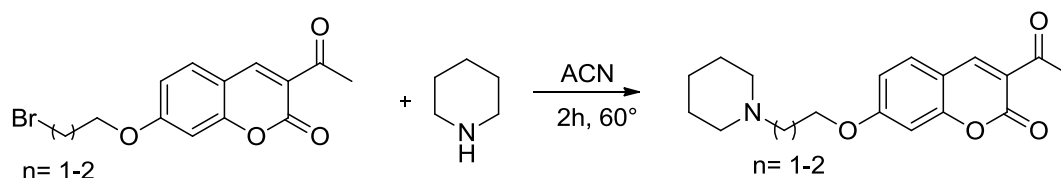
Rendimento de 81%. **RMN ¹H (400 MHz, DMSO-*d*₆):** δ 2,58 (s, 3H, CH₃); 3,83-3,95 (m, 2H, CH₂); 4,47-4,55 (t, 2H, CH₂); 7,0-7,15 (m, 2H, H₆ e H₈); 7,89-7,92 (d, 1H, H₅), 8,66 (s, 1H, H₄). **RMN ¹³C (100 MHz, DMSO-*d*₆):** δ 30,57 (CH₃); 31,39 (C₂); 69,14 (C₁); 101,39; 112,62; 114,24; 121,12; 132,79; 148,03; 157,46; 159,31; 163,80; 195,24 (C=O).

5.7.2 3-acetil-7-(3-bromopropoxi)-cumarina



Rendimento de 62%. **RMN ¹H (400 MHz, DMSO-*d*₆):** δ 2,29-2,32 (m, 2H, C₂); 2,58 (s, 3H, CH₃); 3,68-3,71 (m, 2H, C₃H); 4,24-4,27 (m, 2H, C₁H); ((7,04-7,05)(7,06-7,07) (dd, 1H, J₁ = 2,26 Hz, J₂ = 8,78 Hz, H₆)); 7,11 (d, 1H, J₁ = 2,26 Hz, H₈); 7,89-7,91 (d, 1H, H₅); 8,66 (s, 1H, H₄). **RMN ¹³C (100 MHz, DMSO-*d*₆):** δ 30,57 (CH₃); 31,40 (C₂); 31,98 (C₃); 66,95 (C₁); 101,24; 112,42; 114,21; 120,95; 132,75; 148,09; 157,54; 159,36; 164,33; 195,24 (C=O).

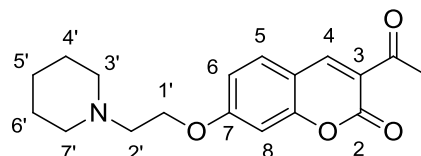
5.8 Síntese de aminação das 3-acetil-bromoalcoxi-cumarinas (98a-b)



Em um tubo de reação de 20 mL, foram adicionados 0,77-0,80 mmol dos respectivos derivados 3-acetil-7-bromoalcoxi-cumarínicos (**99a-b**), 2,31-2,41 mmol de piperidina (102) e 8 mL de acetonitrila (CH₃CN). Após a adição dos reagentes, o tubo foi selado e a mistura foi submetida à agitação magnética e aquecimento a 60°C por 3-8h. Ao final da reação a acetonitrila foi evaporada em rotaevaporador. Por fim, os respectivos produtos foram purificados por coluna

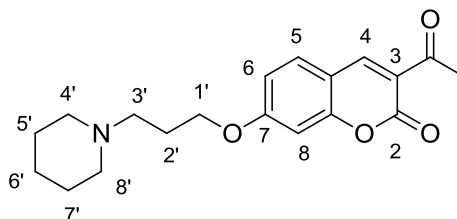
cromatográfica em diclorometano/metanol e gradiente de concentração de 0-25% do solvente mais polar.

5.8.1 3-acetil-7-aminoalcoxicumarina (98a)



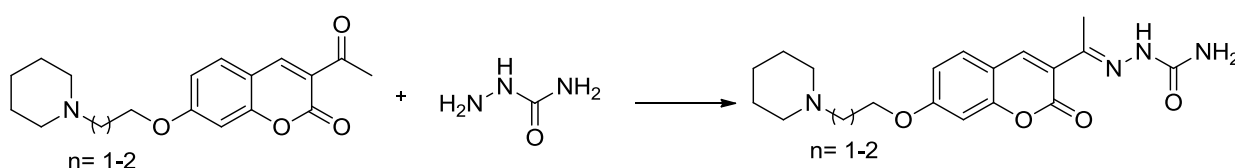
Rendimento de 61%. **RMN ¹H (400 MHz, DMSO-*d*₆):** δ 1,39-1,40 (m, 2H, CH₂); 1,48-1,54 (m, 4H); 2,40-2,46 (m, 4H); 2,58 (s, 3H, CH₃); 2,68-2,71 (t, 2H, C₂-H); 4,22-4,28 (t, 2H, C₁-H); ((7,02-7,03)(7,04-7,05) (dd, 1H, H₆)); 7,09 (s, 1H, H₈); 7,87-7,89 (d, 1H, H₅); 8,66 (s, 1H, H₄). **RMN ¹³C (100 MHz, DMSO-*d*₆):** δ 24,37; 26,01; 30,57 (CH₃); 54,81; 57,54; 67,17; 101,21; 112,24; 114,38; 120,75; 132,67; 148,14; 157,58; 159,41; 164,62; 195,23 (C=O).

5.8.2 3-acetil-7-aminoalcoxicumarina (98b)



Rendimento de 69%. **RMN ¹H (400 MHz, DMSO-*d*₆):** δ 1,35-1,47 (m, 2H); 1,47-1,63 (m, 4H); 1,94-1,97 (t, 2H); 2,58 (s, 3H, CH₃); 4,16-4,19 (t, 2H, C₁-H); 7,01-7,04 (dd, 1H, J= 8,53 Hz, H₆); 7,06-7,07 (d, 1H, H₈); 7,87-7,89 (d, 1H, J= 8,53 Hz, H₅); 8,66 (s, 1H, H₄). **RMN ¹³C (100 MHz, DMSO-*d*₆):** δ 24,13; 25,60; 26,03; 30,57; 54,27; 55,10; 67,46; 101,12; 112,24; 114,27; 120,76; 132,71; 148,13; 157,58; 159,38; 164,66; 195,22 (C=O).

5.9 Obtenção das (Tio)semicarbazonas (60a-b)



5.10 Teste *in vitro* da atividade anticolinesterásica dos derivados cumarínicos

Para a avaliação da atividade anticolinesterásica, as seguintes soluções foram preparadas: (a) tampão $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$ (PBS) 0.1 M pH 7.5; (b) tampão tris/HCl 0,02 M, pH 7.5 e contendo 1 mg/mL de albumina sérica bovina (BSA); (c) 5.5'-ditiobis-[2-nitrobenzoíco] (DTNB ou reagente de Ellman) 3.1 mM; (d) iodeto de acetiltiocolina (ACTI) 3.8 mM; (e) enzima acetilcolinesterase 0.32 U/mL; (f) solução de tratamento.

A uma placa de 96 poços, foram adicionados: 180 μL das soluções de tratamento com os compostos **59 b**, **98 a-b**, **60 b**, as quais foram diluídas de forma seriada com tampão PBS (a) com fator de diluição igual a 10; 180 μL do tampão PBS (a) aos poços destinados ao controle negativo e 210 μL aos poços destinados ao controle branco; 30 μL da enzima diluída em tampão tris/HCl (b) a todos os poços exceto aos destinados ao branco; 30 μL de DTNB diluído em tampão PBS (a) a todos os poços. Em seguida foi medida a absorbância do conteúdo da placa em aparelho de ELISA a $\lambda = 412$ nm, sendo esta leitura o branco da avaliação, visto que alguns compostos apresentam coloração amarelada. Seguidamente, foram adicionados 24 μL da solução de iodeto de acetiltiocolina dissolvido em água destilada. Após 10 minutos, foi medida a absorbância do conteúdo da placa novamente em aparelho de ELISA a $\lambda = 412$ nm (ELLMAN, 1961). Os ensaios para a avaliação da atividade anticolinesterásica foram realizados em triplicatas (para o cálculo do desvio-padrão) e em diferentes concentrações. As soluções estoque dos compostos testados foram preparadas em DMSO e as diluições foram feitas em tampão PBS (a). Levando-se em consideração que o DMSO poderia provocar uma possível inibição da enzima, sua atividade frente a enzima também foi avaliada para evitar que os resultados obtidos fossem superestimados. Essa avaliação foi feita com o DMSO nas mesmas concentrações em que se encontrou nas respectivas soluções de tratamento, sendo diluído em tampão PBS (b). Por ter sido notada uma atividade inibitória por parte do DMSO, o mesmo foi utilizado como controle negativo do experimento. As absorbâncias obtidas foram utilizadas para o cálculo da porcentagem de inibição, sendo a leitura do controle tratado com DMSO considerado como 100% de atividade enzimática. Assim, foram confeccionados os gráficos (concentração x porcentagem de inibição) e calculados os valores de CI_{50} (nM), com os respectivos desvios-padrão.

6. BIBLIOGRAFIA

ABDELHAFEZ, O.M.; AMIN, K.M.; BATRAN, R.Z.; MAHER, T.J.; NADA, S.A.; SETHUMADHAVAN, H. Synthesis, anticoagulant and PIVKA-II induced by new 4-hydroxycoumarin derivatives. **Bioorg. Med. Chem.**, v.18, p. 3371-3378, 2010.

ALPAT, S. K.; ALPAT, S.; KUTLU, B.; OZBAYRAK O.; BUYUKISIK, H. B. Development of biosorption-based algal biosensor for Cu(II) using *Tetraselmis chuii*. **Sens. Actuators, B**, v. 128, p. 273-278, 2007.

ALVAREZ, A.; ALARCÓN, R.; OPAZO, C.; CAMPOS, E.O.; MUÑOZ, F.J.; CALDERÓN, F.H.; DAJAS, F.; GENTRY, M.K.; DOCTOR, B.P.; DE MELLO, F.G.; INESTROSA, N.C. Stable complexes involving acetylcholinesterase and amyloid-beta peptide change the biochemical properties of the enzyme and increase the neurotoxicity of Alzheimer's fibrils. **J Neurosci.** v.18, p. 3213-23, 1998.

ALZHEIMER'S ASSOCIATION, Disponível em:
<https://www.alz.org/brain_portuguese/09.asp>, acessado em Agosto de 2018.

ANSAR, S.; BURLISON, J. A.; HADDEN, M. K.; MING, X.; KELLY, Y.; DESINO, E.; MICHAELIS, L. M.; BLAGG, B. S. J. A non-toxic Hsp90 inhibitor protects neurons from Ab-induced toxicity. **Bioorg. Med. Chem. Lett.** v. 17, p. 1984-1990, 2007

ANSLYN, E. V.; DOUGHERTY, D. A. Modern Physical Organic Chemistry. UCI books, 2006.

Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Disponível em:
<<https://consultas.anvisa.gov.br/#/medicamentos/q/?substancia=22353>>. Acessado em Janeiro de 2018.

ARAÚJO, C. R. M.; FILHO, C. A. L.; SANTOS, V. L. A.; MAIA, G. L. A.; GONSALVES, A. A. Desenvolvimento de fármacos por hibridação molecular: uma aula prática de química medicinal usando comprimidos de paracetamol e sulfadiazina e a ferramenta virtual. **Quim. Nova**, V. 38, N. 6, p. 868-873, 2015.

AUGUSTINE, J. K.; BOMBRUN, A.; RAMAPPA, B.; BOODAPPA, C. An efficient one-pot synthesis of coumarins mediated by propylphosphonic anhydride (T3P) via the Perkin condensation. **Tetrahedron Lett.**, v.53 p.4422–4425, 2012.

BARREIRO, E. J.; FRAGA, C. A. M.; MIRANDA, A. L. P.; RODRIGUES, C. R. A química medicinal de n-acilidrazonas: novos compostos-protótipos de fármacos analgésicos, anti-inflamatórios e anti-trombóticos. **Quim. Nova**, v. 25, N. 1, p. 129-148, 2002.

BASA P. N., A. BHOWMICK, L. M. HORN, A. G. Sykes, Zinc(II) Mediated Imine-Enamine Tautomerization, **Org. Lett.**, v. 14 p. 2698-2701, 2012.

BLENNOW, K.; DE LEON, M. J.; ZETTERBERG, H. Alzheimer's disease. **Lancet**, v. 368, p. 387-403, 2006.

BIOQUI, Disponível em <<http://arquivobioqui.blogspot.com/2015/11/sintese-e-reciclagem-da-acetilcolina-na.html>>, acessado em Agosto de 2018.

BULUT, M.; ERK, C. Improved Synthesis of Some Hydroxycoumarins. **Dyes Pigments**. v. 30, p. 99-104, 1996.

CASAS, J. S.; GARCIA-TASENDE, M. S.; SORDO, J. Main group metal complexes of semicarbazones and thiosemicarbazones. A structural review. **Coord. Chem. Rev.**, v. 209, p. 197-261, 2000.

CAREY, F. A.; SUNDBERG, R. J. *Advanced Organic Chemistry Part A: Structure and Mechanisms* 2008.

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

CITRON M. Alzheimer's disease: strategies for disease modification. **Nat. Rev. Drug Disc.**, v. 9, p. 387-98, 2010.

COSTA, P.; PILLI, R.; PINHEIRO, S.; VASCONCELLOS, M. Substâncias carboniladas e derivados 1ª ed., p.412, Porto Alegre: Artmed, 2003.

CUNHA, S.; IUNESA, C. E. M.; OLIVEIRA, C. C.; SANTANA, L. L. B. Síntese de ácidos cumarino-3-carboxílicos e sua aplicação na síntese total da aiapina, cumarina e umbeliferona. **Quim. Nova**, V. 38, N. 8, p. 1125-1131, 2015.

DEWICK, P. M. Medicinal natural products: a biosynthetic approach. Second edition. Jhon Wiley & Sons (2002).

DOUGLAS, C. J. Phenylpropanoid metabolism and lignin biosynthesis: from weeds to trees. **E. Science**, v. 1(6), p. 171-177, 1996.

ESTRADA, L. D., SOTO C. Disrupting beta-amyloid aggregation for Alzheimer disease treatment. **Curr. Top. Med. Chem.**, v.7(1), p. 115-26, 2007.

EVANS, C. G.; WISÉN S.; GESTWICKI J. E. Heat shock proteins 70 and 90 inhibit early stages of amyloid beta-(1-42) aggregation in vitro. **J. Biol. Chem.** v. 281(44), p. 33182-91, 2006.

DOU, F.; NETZER, W. J.; TANEMURA, K.; LI, F.; HARTL, F. U.; TAKASHIMA, A.; GOURAS, G. K., GREENGARD, P.; XU H. Chaperones increase association of tau protein with microtubules. **PNAS**, v. 100 (2), p. 721-726, 2003.

DU, L. P.; ZHANG, G. L.; MEI, D. Clinical evaluation and rational use of coumarin anticoagulants. **Eval Anal Drug-use Hosp China**, v. 8, p. 576-579, 2008.

EATON, D. F. Reference materials for fluorescence measurement. **Pure & Appl. Chem.**, v. 60, p. 1107-1114, 1988.

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

FALLER P.; HUREAU C.; LA PENNA G. Metal ions and intrinsically disordered proteins and peptides: from Cu/Zn amyloid- β to general principles. **Acc. Chem. Res.**, v. 47(8), p. 2252-2259, 2014.

FANG, X.; LI, H.; ZHAO, G.; FANG, X.; XU, J.; YANG, W. Blue fluorescent protein analogs as chemosensors for Zn²⁺. **Biosens. Bioelectron**, v. 42, p. 308-313, 2013.

Food and Drugs Administration. Disponível em:
<<https://www.accessdata.fda.gov/scripts/cder/daf/index.cfm?event=BasicSearch.process>>
Acessado em: 04/01/2018.

FERRI, C. P.; PRINCE, M.; BRAYNE, C.; BRODATY, H.; FRATIGLIONI, L.; GANGULI, M.; HALL, K.; HASEGAWA, K.; HENDRIE, H.; HUANG, Y.; JORM, A.; MATHERS, C.; MENEZES, P. R.; RIMMER, E.; SCAZUFCA, M. Global prevalence of dementia: a Delphi consensus study. **Lancet.**, v. 366(9503), p. 2112-2117, 2005.

FERRARI, M. B.; BONARDI, A.; FAVA, G. G.; PELIZZI, C.; TARASCONI, P. Synthesis, spectroscopic and structural characterization of methyl pyruvate- and pyridoxal-hydrazinopyruvoylthiosemicarbazones **Inorg. Chim. Acta**, v. 223, p. 77-86, 1994.

FONSECA, A.; REIS, J.; SILVA, T.; MATOS, M. J.; BAGETTA, D.; ORTUSO, F.; ALCARO, S.; URIARTE, E.; BORGES, F. Coumarin versus Chromone Monoamine Oxidase B Inhibitors: Quo Vadis?. **J. Med. Chem.** v. 60, p. 7206-7212, 2017.

FOSSEY, J.; LOUPY, A.; STRZELECKA, H. An *ab initio* study of protonation and alkylation of aminopyridine. **Tetrahedron**, v. 37, n. 10, p. 1935-1941, 1981.

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

GILBERT, A.; BAGGOTT, J. In *Essentials of Molecular Photochemistry*, Blackwell **Scientific Publications**, Oxford 1991.

GOLDBERG, J. M.; S. BATJARGAL; B. S. CHEN; E. J. PETERSSON. Thioamide Quenching of Fluorescent Probes through Photoinduced Electron Transfer: Mechanistic Studies and Applications, **J. Am. Chem. Soc.**, v. 135, p. 18651-18658, 2013.

GOLDBERG, J. M.; S. BATJARGAL; E. J. PETERSSON. Thioamides as Fluorescence Quenching Probes: Minimalist Chromophores To Monitor Protein Dynamics., **J. Am. Chem. Soc.** v. 132, p. 14718-14720, 2010.

GONG, Y.; CHANG, L.; VIOLA, K. L.; LACOR, P. N.; LAMBERT, M. P.; FINCH, C. E., KRAFFT, G. A., KLEIN, W. L. Alzheimer's disease-affected brain: presence of oligomeric A beta ligands (ADDLs) suggests a molecular basis for reversible memory loss. **Proc Natl Acad Sci USA**. v. 100(18), p. 10417-10422, 2003.

HARDY, J. A.; HIGGINS, G. A. Alzheimer's disease: the amyloid cascade hypothesis. **Science**, v. 256(5054), p. 184-185, 1992.

HARTMANN, J.; KIEWERT, C.; DUYSSEN, E. G.; LOCKRIDGE, O.; GREIG, N. H.; KLEIN, J. Excessive hippocampal acetylcholine levels in acetylcholinesterase-deficient mice are moderated by butyrylcholinesterase activity. **J. Neurochem.** V. 100(5), p. 1421-1429, 2007.

HAMULAKOVA, S.; JANOVEC, L.; HRABINOVA, M.; SPILOVSKA, K.; KORABECNY, J.; KRISTIAN, P.; KUCA, K.; IMRICH, J. Synthesis and Biological Evaluation of Novel Tacrine Derivatives and Tacrine–Coumarin Hybrids as Cholinesterase Inhibitors. **J. Med. Chem.**, v. 57, p. 7073–7084, 2014.

HAN, X.; HE, G. Toward a Rational Design to Regulate β -Amyloid Fibrillation for Alzheimer's Disease Treatment. **ACS Chem Neurosci**. v. 9(2), p. 198-210, 2018.

HARGREAVES, R. J. "It ain't over 'til it's over" a-the search for treatments and cures for Alzheimer's disease. **ACS Med Chem Lett.**, v. 3, p. 862-866, 2012.

HELAL, A.; RASHID, M. H. O.; CHOI, C. H.; KIM, H. S. Chromogenic and fluogenic sensing of Cu^{2+} based on coumarin. **Tetrahedron**, v. 67, p. 2794-2802, 2011.

HENS, A.; MAITY, A.; RAJAK, K. K. *N,N* coordinating schiff base ligand acting as a fluorescence sensor for zinc(II) and colorimetric sensor for copper(II), and zinc(II) in mixed aqueous media. **Inorg. Chim. Acta**, v. 423, p. 408-420, 2014.

HOU, J. T.; LIU, B. Y.; LI, K.; YU, K. K.; WU, M. B.; YU, X. Q. Two birds with one stone: Multifunctional and highly selective fluorescent probe for distinguishing Zn²⁺ from Cd²⁺ and selective recognition of sulfide anion. **Talanta**, v. 116, p. 434-440, 2013.

HOULT, J. R. S.; PAYÁ, M. Pharmacological and Biochemical Actions of Simple Coumarins: Natural Products with Therapeutic Potential. **General Pharmacology**, v. 27, n. 4, p. 713-722, 1996.

IARC. Globocan:Estimated Cancer Incidence, Mortality and Prevalence Worldwide in 2012. Disponível em < http://globocan.iarc.fr/Pages/fact_sheets_cancer.aspx > Acessado em abril de 2018.

JAGUAR, version 8.7, Schrödinger, LLC, New York, NY, 2015.

JALAL, S.; CHAND, K.; KATHURIA, A.; et al. Calreticulin transacetylase: a novel enzyme-mediated protein acetylation by acetoxy derivatives of 3-alkyl-4-methylcoumarins. **Bioorg. Chem.**, v. 40, p. 131-136, 2012.

JOUBERT, J.; FOKA, G. B.; REPSOLD, B. P.; OLIVER, D. W.; KAPP, E.; MALAN, S. F. Synthesis and evaluation of 7-substituted coumarin derivatives as multimodal monoamine oxidase-B and cholinesterase inhibitors for the treatment of Alzheimer's disease. **Eur. J. Med. Chem.**, v. 125, p. 853-864, 2017.

KAMINSKI, J. J.; *et al.* Antiulcer agents. 1. Gastric antisecretory and cytoprotective properties of substituted imidazo[1,2-*a*]pyridines. **J. Med. Chem.**, v. 28, n. 7, p. 876-892, 1985.

KEPP, K. P. Bioinorganic chemistry of Alzheimer's disease. **Chem. Rev.**, v. 112(10), p. 5193-239, 2012.

KESKIN, O.; GURSOY, A.; MA, B.; NUSSINOV, R. Principles of protein-protein interactions: what are the preferred ways for proteins to interact?. **Chem. Rev.**, v. 108(4), p. 1225-1244, 2008.

KHANACADEMY, Disponível em: <<https://pt.khanacademy.org/science/physics/light-waves/introduction-to-light-waves/a/light-and-the-electromagnetic-spectrum>>, acessado em Novembro de 2017.

KOSTOVA, I. Synthetic and Natural Coumarins as Antioxidants. **Mini-Rev. Med. Chem.**, v6, p. 365-374, 2006.

KRAEPELIN E. Psychiatrie. Ein Lehrbuch für Studierende und Ärzte II. Ed. Band Barth Verlag, Leipzig, 1910.

KUMMERLE, A. E.; RAIMUNDO, J. M.; LEAL, C. M.; SILVA, G. S.; BALLIANO, T. L.; PEREIRA, M. A.; DE SIMONE, C. A.; SUDO, R. T.; ZAPATA-SUDO G.; FRAGA C. A. M.; BARREIRO, E. J. Studies towards the identification of putative bioactive conformation of potent vasodilator arylidene *N*-acylhydrazone derivatives. **Eur. J. Med. Chem.**, v. 44, p. 4004-4009, 2009.

KUPLICH, M. D. Síntese de novos heterociclos benzazólicos fluorescentes e sua incorporação em matrizes de celulose. Dissertação, UFRGS 2007.

KUSUMA, B. R.; PETERSON, L. B.; ZHAO, H. P.; VIELHAUER, G.; HOLZBEIERLEIN, J.; BLAGG, B. S. J. Targeting the heat shock protein 90 dimer with dimeric inhibitors. **J. Med. Chem.**, v. 54, p. 6234-53, 2011.

LAI, G.; ANDERSON, W. K. A simplified procedure for the efficient conversion of aromatic aldehydes into esters. **Synth. Commun.**, v. 27, n. 7, p. 1281-1283, 1997.

LAU, L.F.; SCHACHTER, J. B.; SEYMOUR, P. A.; SANNER, M. A. Tau protein phosphorylation as a therapeutic target in Alzheimer's disease. **Curr. Top. Med. Chem.**, v. 2(4), p. 395-415, 2002.

LAKOWICZ, J. R. In Principles of Fluorescence Spectroscopy, 2^a ed., Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York 1999.

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

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

LEE, S. J.; NAM, E.; LEE, H. J.; SVELIEFF, M. G.; LIM, M. H. Towards an understanding of amyloid- β oligomers: characterization, toxicity mechanisms, and inhibitors. **Chem. Soc. Rev.** v. 46(2), p. 310-323, 2017.

LEONETTI, F.; CATTO, M.; NICOLOTTI, O.; ET AL. Homo- and hetero-bivalent edrophonium-like ammonium salts as highly potent, dual binding site AChE inhibitors. **Bioorg. Med. Chem.**, v. 16, p. 7450-7456, 2008.

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

LIMA, P. C.; *et al.* Synthesis and analgesic activity of novel *N*-acylarylhydrazones and isosters, derived from natural safrole. **Eur. J. Med. Chem.**, v. 35, n. 2, p. 187-203, 2000.

LOPES, A. B.; MIGUEZ E.; KUMMERLE A. E.; RUMJANEK, V. M.; FRAGA, C. A. M.; BARREIRO E. J., Characterization of Amide Bond Conformers for a Novel Heterocyclic Template of *N*-acylhydrazone Derivatives. **Molecules**, v. 18, p. 11683–11704, 2013.

MA, K.; THOMASON, L. A. M.; MCLAURIN J. Scyllo-inositol, preclinical, and clinical data for Alzheimer's disease. **Adv. Pharmacol.**, v. 64, p. 177-212, 2012.

MAGGI, R.; BIGI, F.; CARLONI, S.; MAZZACANI, A.; SARTORI, G. Uncatalysed reactions in water: Part 2. Preparation of 3-carboxycoumarins. **Green Chem.**, v. 3, p. 173-174, 2001.

MARCU, M. G.; SCHULTE, T. W.; NECKERS, L. Novobiocin and Related Coumarins and Depletion of Heat Shock Protein 90-Dependent Signaling Proteins. **J. Natl Cancer Inst.** v. 92, p. 242-248, 2000.

MARUYAMA, T.; OTAGIRI, M.; SCHULMAN, S. G.. Binding characteristics of coumarin anticoagulants to human α 1 acid glycoprotein and human serum albumin. **Intl. J. Pharm.**, v. 59, p. 137-143, 1990.

MASON, J. M.; KOKKONI, N., STOTT, K., DOIG, A. J. Design strategies for anti-amyloid agents. **Curr. Opin. Struct. Biol.**, v. 13(4), p. 526-32, 2003.

MEDINA, F. G.; MARRERO, J. G.; MACÍAS-ALONSO M.; GONZALES, M. C.; CÓRDOVA-GUERRERO, I.; GARCIA, A. G. T.; OSEGUEDA-ROBLES, S. Coumarin heretocyclic derivative: chemical synthesis and biological activity. **Nat. Prod. Rep.**, v. 32, p. 1472-1507. 2015.

MELO, J. S. S.; BECKER, R. S.; MACANITA, A. L. J. Photophysical Behavior of Coumarins as a Function of Substitution and Solvent: Experimental Evidence for the Existence of a Lowest Lying $1(n,\pi^*)$ State. **Phys. Chem.**, v. 98(24), p. 6054-6058, 1994.

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

MURRAY, R. D .H. Coumarins. **Nat. Prod. Rep.**, v. 12, p. 477-505, 1995.

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

NASCIMENTO-JUNIOR, N. M.; KUMMERLE, A. E.; BARREIRO, E. J.; FRAGA, C. A. M. **Molecules**, v. 16, p. 9274–9297, 2011.

OMS, Disponível em: <<http://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/dementia>>, acessado em Agosto de 2018.

OMS, Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs362/es/>>, acessado em novembro de 2017.

OMURA, K. Oxidation of phenols with iodine in alkaline methanol. **J. Org. Chem.**, v. 49, n. 17, p. 3046-3050, 1984.

OKAMOTO, I.; NABETA, M.; YAMAMOTO, M.; MIKAMI, M.; TAKEYA, T.; TAMURA, O. Solvent-dependent conformational switching of the aromatic *N*-methyl amides depending upon the acceptor properties of solvents. **Tetrahedron Lett.**, v. 47, p. 7143–7146, 2006.

PALLA, G.; PREDIERI, G.; DOMIANO, P. Conformational behaviour and E/Z isomerization of *N*-acyl and *N*-aroylhydrazones. **Tetrahedron**, v. 42, p. 3649–3654, 1986.

PARK, G. J.; LEE, M. M.; YOU, G. R.; CHOI, Y. W.; KIM, C. A turn-on and reversible fluorescence sensor with high affinity to Zn²⁺ in aqueous solution. **Tetrahedron Lett.**, v. 55, p. 2517-2522, 2014.

PAVIA, D. L.; LAMPMAN, G. M.; KRIZ, G. S.; VYVYAN, J. R. Introdução à Espectroscopia. 4^a edição.

PENG, X. M.; DAMU, G. L. V.; ZHOU, C. Current Developments of Coumarin Compounds in Medicinal Chemistry. **Curr. Pharm. Design**, v. 19, p. 3884-3930, 2013.

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

PEREIRA, T. M.; FRANCO, D. P.; VITÓRIO, F.; KUMMERLE, A. E. Coumarin Compounds in Medicinal Chemistry: Some Important Examples from the Last Years. **Curr. Top. Med. Chem.**, v. 18, p. 124-148, 2018.

PEREIRA, T. M.; FRANCO, D. P.; VITÓRIO, F.; AMARAL, R. C.; PONZONI, APARECIDA; KUMMERLE, A. E. Microwave-assisted synthesis and pka determination of umbelliferone: an experiment for the undergraduate organic chemistry laboratory. **Quim. nova**, 2018.

QUATTROPANI, A.; DORBAIS, J.; COVINI, D.; PITTET, P.-A.; COLOVRAY, V.; THOMAS, R.J.; COXHEAD, R.; HALAZY, S.; SCHEER, A.; MISSOTTEN, M.; *et al.* Discovery and development of a new class of potent, selective, orally active oxytocin receptor antagonists. **J. Med. Chem.**, v. 48, p. 7882–7905, 2005.

QU, L.; YIN, C.; HUO, F.; CHAO, J.; ZHANG, Y.; CHENG, F. A pyridoxal-based dual chemosensor for visual detection of copper ion and ratiometric fluorescent detection of zinc ion. **Sens. Actuators, B**, v. 191, p. 158-164, 2014.

QUINN, D. M. Acetylcholinesterase: enzyme structure, reaction dynamics, and virtual transition states. **Chem. Rev.**, v. 87(5), p. 955–979, 1987.

RANG, H. P.; DALE, M. M.; RITTER, J. M.; GARDNER, P. *Farmacologia*, 7^a Ed., Elsevier, 2012.

REINKE, A. A.; GESTWICKI, J. E. Structure-activity relationships of amyloid beta-aggregation inhibitors based on curcumin: influence of linker length and flexibility. **Chem. Biol. Drug Des.** v. 70(3), p. 206-215, 2007.

RIBEIRO, C. V. C.; KAPLAN, M. A. C. Tendências evolutivas de Famílias Produtoras de Cumarinas em Angiospermae. **Quím. Nova**, v. 25, n. 4, p. 533-538, 2002.

RIBEIRO, I. G.; *et al.* Synthesis and antinociceptive properties of new structurally planned imidazo[1,2-*a*]pyridine 3-acylarylhydrazone derivatives. **Eur. J. Med. Chem.**, v. 33, n. 3, p. 225-235, 1998.

ROUESSAC, F.; LECLERC, A. An Efficient Synthesis of Isofraxidin. **Synt. Commun.**, v. 23, p. 1147-1153, 1993.

ROBERT, A.; LIU, Y.; NGUYEN, M.; MEUNIER, B. Regulation of copper and iron homeostasis by metal chelators: a possible chemotherapy for Alzheimer's disease. **Acc. Chem. Res.**, v. 48(5), p. 1332-1339, 2015.

SAIDO, T.; LEISSRING, M. A. Proteolytic degradation of amyloid β -protein. **Cold Spring Harbor Perspect. Med.**, v. 2(6):a006379, 2012.

SALEEM, M.; LEE, K. H. Optical Sensor: a promising strategy for environmental and biomedical monitoring of ionic species. **RSC Adv.**, v. 5, p. 72150-72287, 2015.

SÁNCHEZ, C. G.; CASILDA, V. C.; MAYORAL, E. P.; ARANDA, R. M. M.; PEINADO, A. J. L.; BEJBLOVÁ, M.; CEJKA, J. Coumarins Preparation by Pechmann Reaction Under Ultrasound Irradiation. Synthesis of Hymecromone as Insecticide. **Intermediate Catal. Lett.**, v. 128, p. 318–322, 2009.

SANDHU, S.; BANSAL, Y.; SILAKARI, O.; BANSAL, G. Coumarin Hybrids as Novel Therapeutic Agents. **Bioorg. Med. Chem.**, v. 22, p. 3806-3814, 2014.

SAVELIEFF, M. G.; LEE, S.; LIU, Y.; LIM, M. H. Untangling amyloid- β , tau, and metals in Alzheimer's disease. **ACS Chem. Biol.** v. 8(5), p. 856-65, 2013.

SCIO, E. Coumarins isolated from *Kielmeyera genus* (Clusiaceae). **Bras. Farm.**, v. 85(1), p. 27-31, 2004.

SOLOMONS, T. W. G.; FRYHLE, C. B. Química Orgânica. v. 2, 2008.

SOUMYA, T. V.; THASNIM, P.; BAHULAYAN, D. Step-economic and cost effective synthesis of coumarin based blue emitting fluorescent dyes. **Tetrahedron Lett.**, v. 55, p. 4643–4647, 2014.

SOUZA, L. G.; RENNÓ, M. N.; FIGUEROA-VILLAR, J. D. Coumarins as cholinesterase inhibitors: a review. **Chem. Biol. Interact.** v. 254, p. 11-23, 2016.

SOTO-ORTEGA, D. D., MURPHY, B. P., GONZALEZ-VELASQUEZ, F. J., et al. Inhibition of amyloid- aggregation by coumarin analogs can be manipulated by functionalization of the aromatic center. **Bioorg. Med. Chem.**, v. 19, p. 2596-602, 2011.

SMAKULA HAND, E.; PAUDLER, W. W. Mechanism of the reaction of 2-haloketones with 2-aminopyridine. **Tetrahedron**, v. 38, n. 1, p. 49-55, 1982.

STADERINI, M.; AULIC, S.; BARTOLINI, M.; TRAN, H. N.; GONZALEZ-RUIZ, V.; PEREZ, D.; CABEZAS, N.; MARTINEZ, A.; MARTIN, M. A.; ANDRISANO, V.; LEGNAME, G.; MENENDEZ, J. C.; BOLOGNESI, M. L. **ACS Med. Chem. Lett.**, v. 4, p. 225-229, 2013.

SRIVASTAVA, J.; BARBER, D. L.; JACOBSON, M. P. Intracellular pH Sensors: Design Principles and Functional Significance. **PHYSIOLOGY**, v. 22, p. 30–39, 2007.

SYMEONIDIS, T.; CHAMILOS, M.; LITINA, D. J. H.; KALLITSAKIS, M.; LITINAS, K. E. Synthesis of hydroxycoumarins and hydroxybenzo[f]- or [h]coumarins as lipid peroxidation inhibitors. **Bioorg. Med. Chem. Lett.**, v. 19, p. 1139–1142, 2009.

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

TENÓRIO, R. P.; GÓES, A. J. S.; DE LIMA, J. G.; DE FARIA, A. R.; ALVES, A. J.; DE AQUINO, T. M.. Tiossemicarbazonas: métodos de obtenção, aplicações sintéticas e importância biológica. **Quím. Nova**, v. 28, n. 6, 2005.

TÔUGU, V.; TIIMANN, A.; PALUMAA, P. Interactions of Zn(II) and Cu(II) ions with Alzheimer's amyloid-beta peptide. Metal ion binding, contribution to fibrillization and toxicity. **Metallomics**, v. 3, p. 250–261, 2011.

TOROK, B.; DASGUPTA, S., TOROK, M. Chemistry of small molecule inhibitors in self-assembly of Alzheimer's disease related amyloidbeta peptide. **Curr. Bioact. Comp.**, v. 4, p. 159-74, 2008.

TRKOVNIK, M.; IVEZI, Z. J. Syntheses of some new coumarin-quinolone carboxylic acids. **J. Heterocyclic Chem.**, v. 37, p. 137-141, 2000.

TURRO, N. J. In *Modern Molecular Photochemistry*, University Science Books, USA 1991.

TUTULEA-ANASTASIU, M. D.; Wilson, D.; Del Valle, M.; Schreiner, C. M., Cretescu, I. A solid-contact ion selective electrode for copper(II) using a succinimide derivative as ionophore. **Sensors**. v. 13, p. 4367–4377, 2013.

VITORIO, F.; PEREIRA, T. M.; CASTRO, R. N.; GUEDES, G. P.; GRAEBIN, C. S.; KUMMERLE, A. E. Synthesis and mechanism of novel fluorescent coumarin–dihydropyrimidinone dyads obtained by the Biginelli multicomponent reaction. **New J. Chem.**, v. 39, p. 2323–2332, 2015.

WANG, H.; LU, X. M.; YAO, H.; FENG, J. K.; LIU, R. J. Research progress on application of coumarin and its derivatives. **Chem. Ind. Times**, v. 23, p. 40-43, 2009.

WHITESELL, L.; LINDQUIST, S. L. HSP90 and the chaperoning of cancer. **Nat. Rev. Cancer**. v. 5(10), p. 761-772, 2005.

WHO. Cancer: Factsheets. Disponível em
<<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/en/>> Acesso em: 04 de abril de 2015.

WU, J. S.; LIU, W. M.; ZHUANG, X. Q.; WANG, F.; WANG, P. F.; TAO, S. L.; ZHANG, X. H.; WU, S. K.; LEE, S. T. Fluorescence turn on of coumarin derivatives by metal cations: a new signaling mechanism based on C=N isomerization. **Org. Lett.**, v. 9(1), p. 33-36, 2007.

WU, J.; SHENG, R.; LIU, W.; WANG, P.; ZHANG, H.; MA, J. Fluorescent sensors based on controllable conformational change for discrimination of Zn²⁺ over Cd²⁺. **Tetrahedron**, v. 68, p. 5458-5463, 2012.

XIE, S. S.; WANG, X.; JIANG, N.; YU, W.; WANG, K.D.G.; LAN, J.S.; LI, Z.R.; KONG, L.Y. Multi-target tacrine-coumarin hybrids: Cholinesterase and monoamine oxidase B inhibitor properties against Alzheimer's disease. **Eur. J. Med. Chem.**, v. 95, p. 153-165, 2015.

XU, H.; MIAO, R.; FANG, Z.; ZHONG, X. Quantum dot-based "turn-on" fluorescent probe for detection of zinc and cadmium ions in aqueous media. **Anal. Chim. Acta.**, v. 687, p. 82-88, 2011.

YAMADA, S.; MORIZONO, D.; YAMAMOTO, K. Mild oxidation of aldehydes to the corresponding carboxylic acids and esters: alkaline iodine oxidation revisited. **Tetrahedron Lett.**, v. 33, n. 30, p. 4329-4332, 1992.

You, Q. H.; Lee, A. W. M.; Chan, W. H.; Zhu, X. M.; Leung, K. C. F. A coumarin-based fluorescent probe for recognition of Cu²⁺ and fast detection of histidine in hard-to transfect cells by a sensing ensemble approach. **Chem. Commun.**, v. 50, p. 6207-6210, 2014

ZHANG, G.; LI, Y.; XU, J.; ZHANG, C.; SHUANG, S.; DONG, C.; CHOI, M. M. F. Glutathione-protected fluorescent gold nanoclusters for sensitive and selective detection of Cu²⁺. **Sens. Actuators, B**, v. 183, p. 583-588, 2013.

ZHANG, S. Y.; FU, D. J.; SUN, H. H.; YUE, X. X.; LIU, Y. C.; ZHANG, Y. B.; LIU, H. M. Synthesis and bioactivity of novel coumarin derivatives. **Chem. Het. Comp.**, v. 52, p. 374-378, 2016.

ZHAO, H.; DONNELLY, A. C.; KUSUMA, B. R.; BRANDT, G. E. L.; BROWN, D.; RAJEWSKI, R. A.; VIELHAUER, G.; HOLZBEIERLEIN, J.; COHEN, M. S.; BLAGG, B. S. J. Engineering an Antibiotic to Fight Cancer: Optimization of the Novobiocin Scaffold to Produce Anti-proliferative Agents. **J. Med. Chem.**, v. 54, p. 3839-3853, 2011.

ZHOU, X.; WANG, X. B.; WANG, T.; KONG, L. Y. Design, synthesis, and acetylcholinesterase inhibitory activity of novel coumarin analogs. **Bioorg. Med. Chem.**, v. 16, p. 8011-8021, 2008.

ANEXO 1

(Espectros)

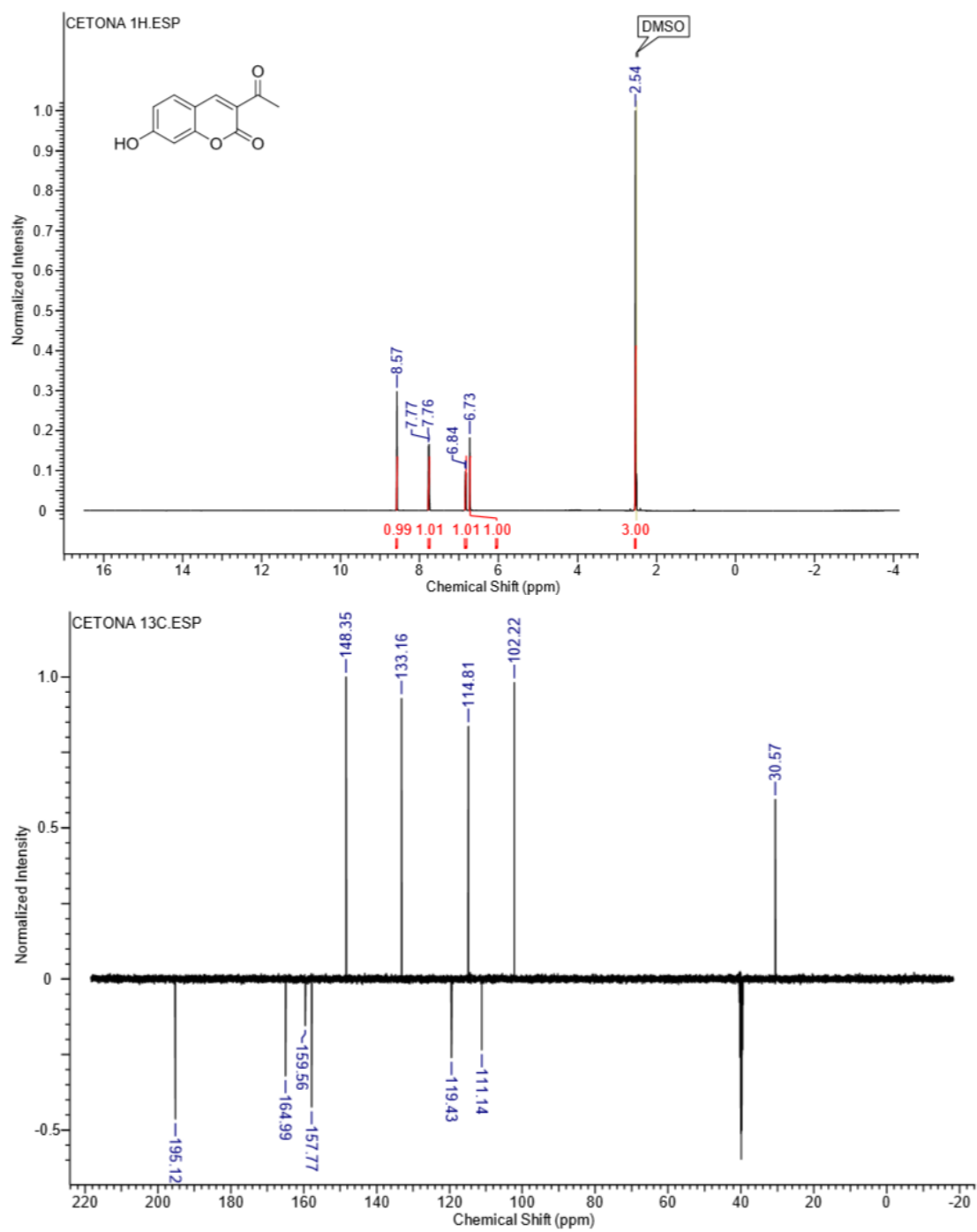


Fig S1. Espectros de RMN ^1H (500 MHz) e RMN ^{13}C (125 MHz) de **63** em DMSO- d_6 .

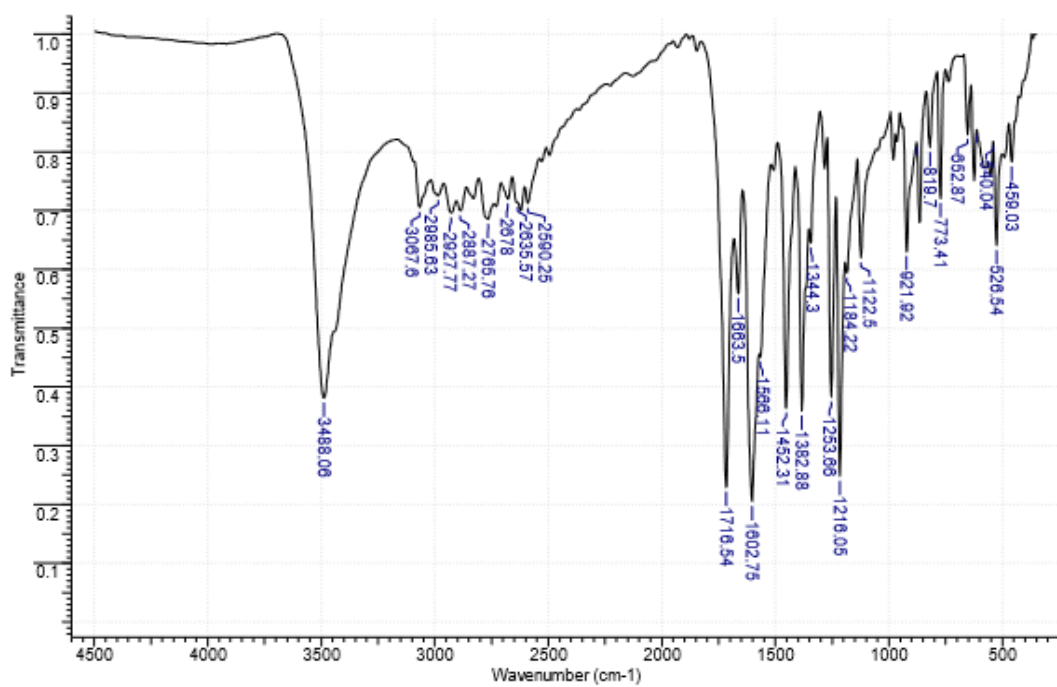


Fig S2. Espectros de IV de **63**.

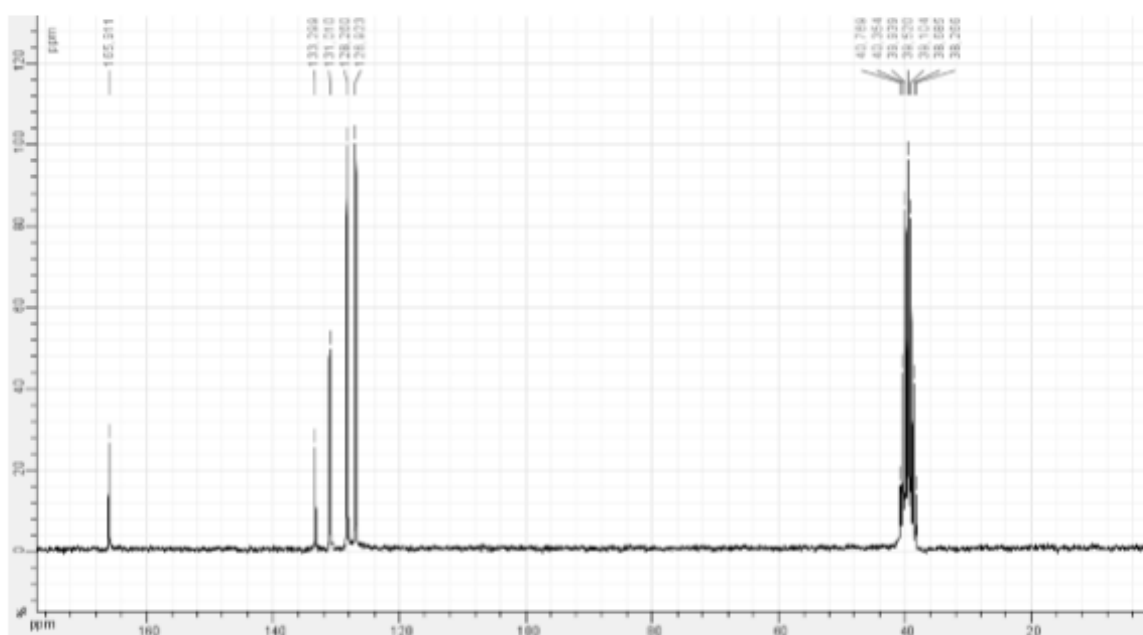
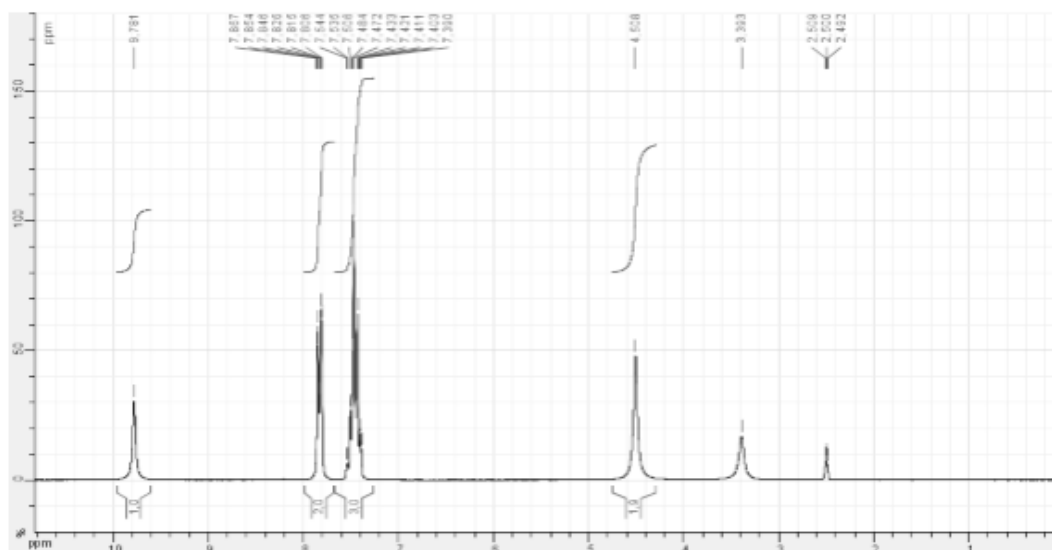
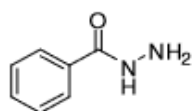


Fig S3. Espectros de RMN ^1H (200 MHz) e RMN ^{13}C (50 MHz) de **62c** em DMSO-d_6 .

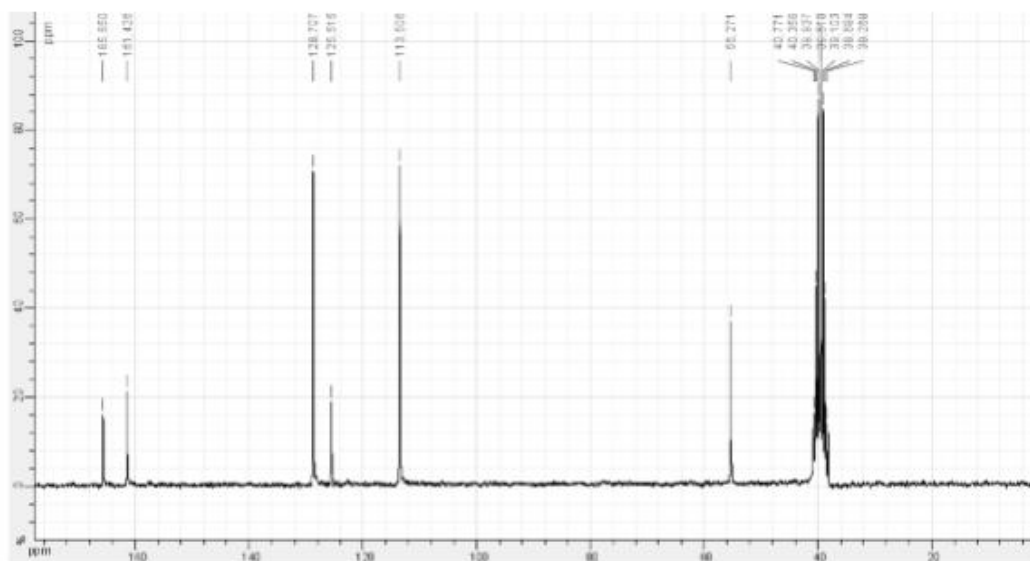
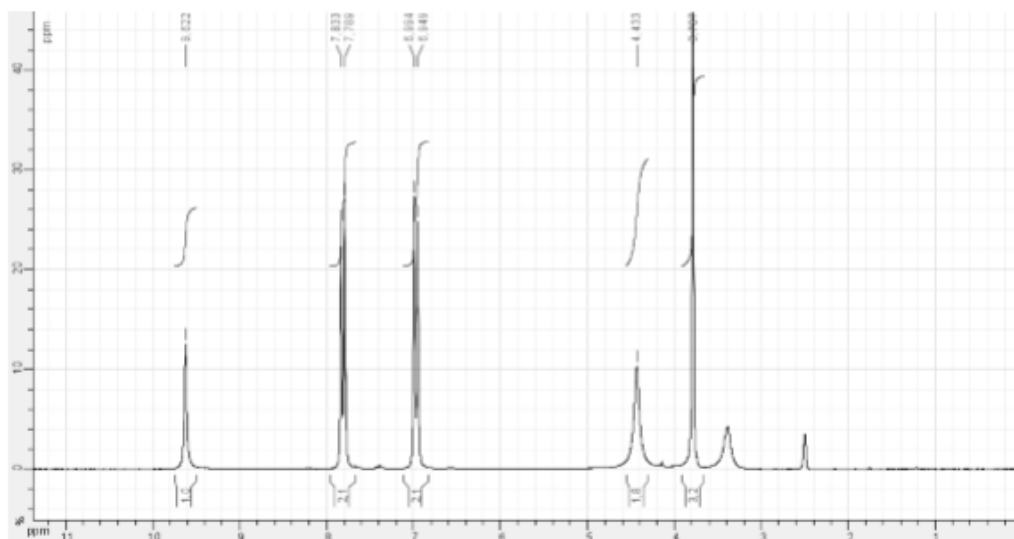
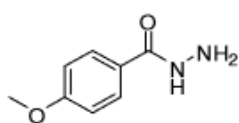


Fig S4. Espectros de RMN ^1H (200 MHz) e RMN ^{13}C (50 MHz) de **62d** em DMSO- d_6 .

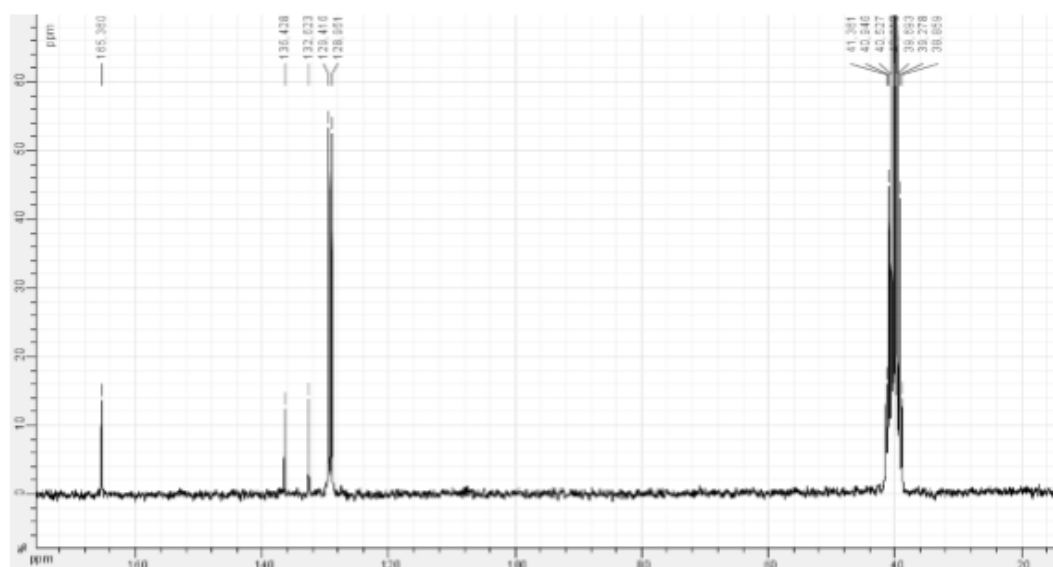
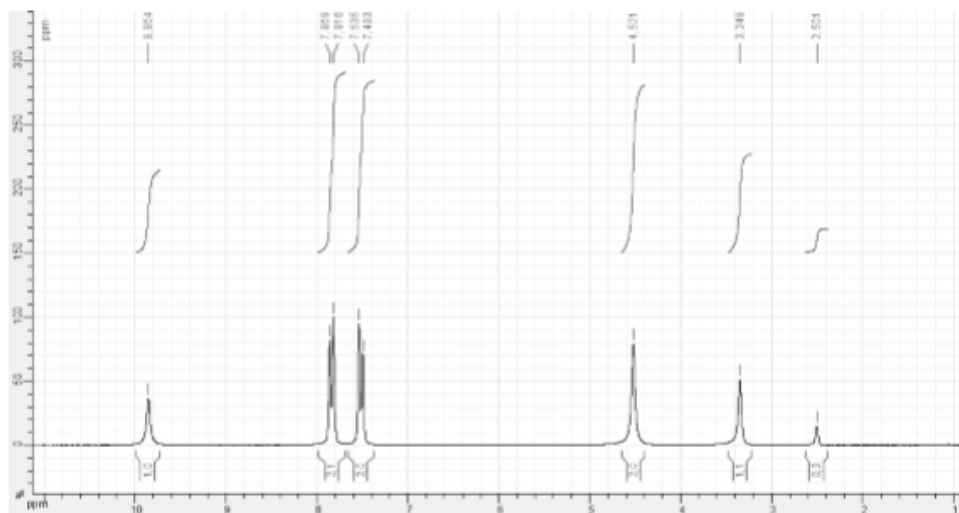
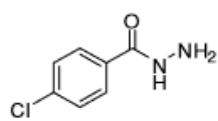


Fig S5. Espectros de RMN ^1H (200 MHz) e RMN ^{13}C (50 MHz) de **62e** em DMSO-d_6 .

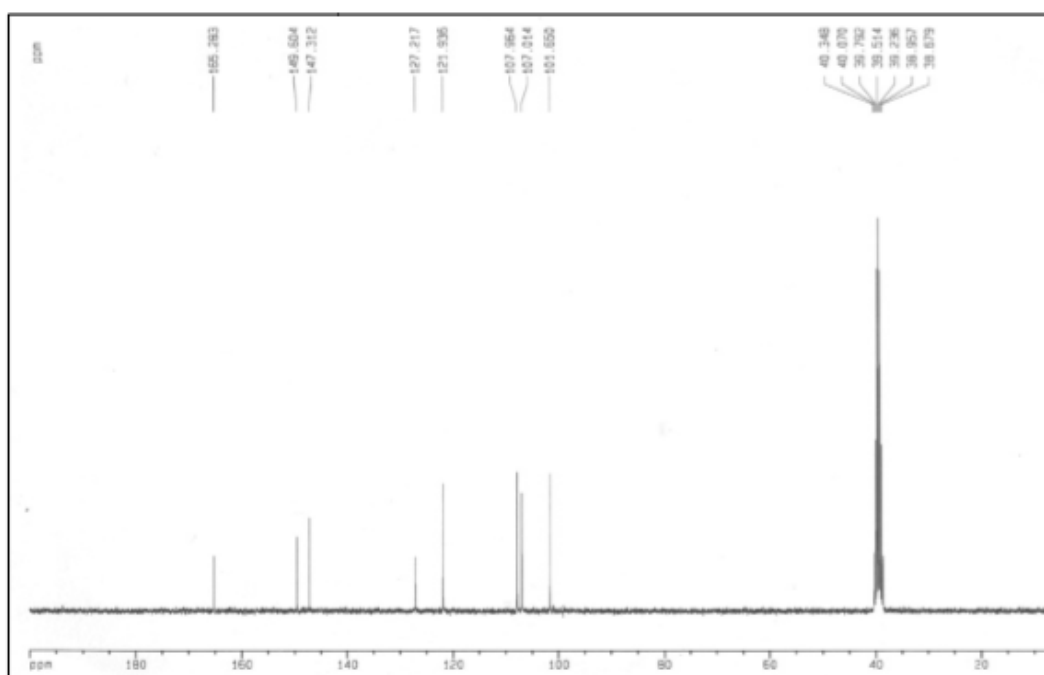
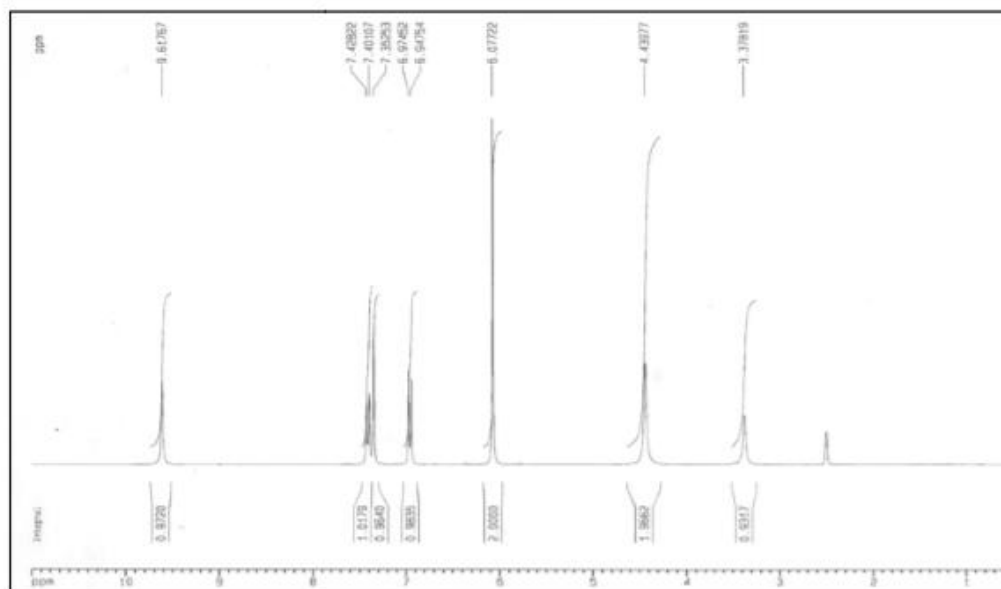
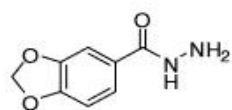


Fig S6. Espectros de RMN ¹H (200 MHz) e RMN ¹³C (50 MHz) de **62f** em DMSO-d₆.

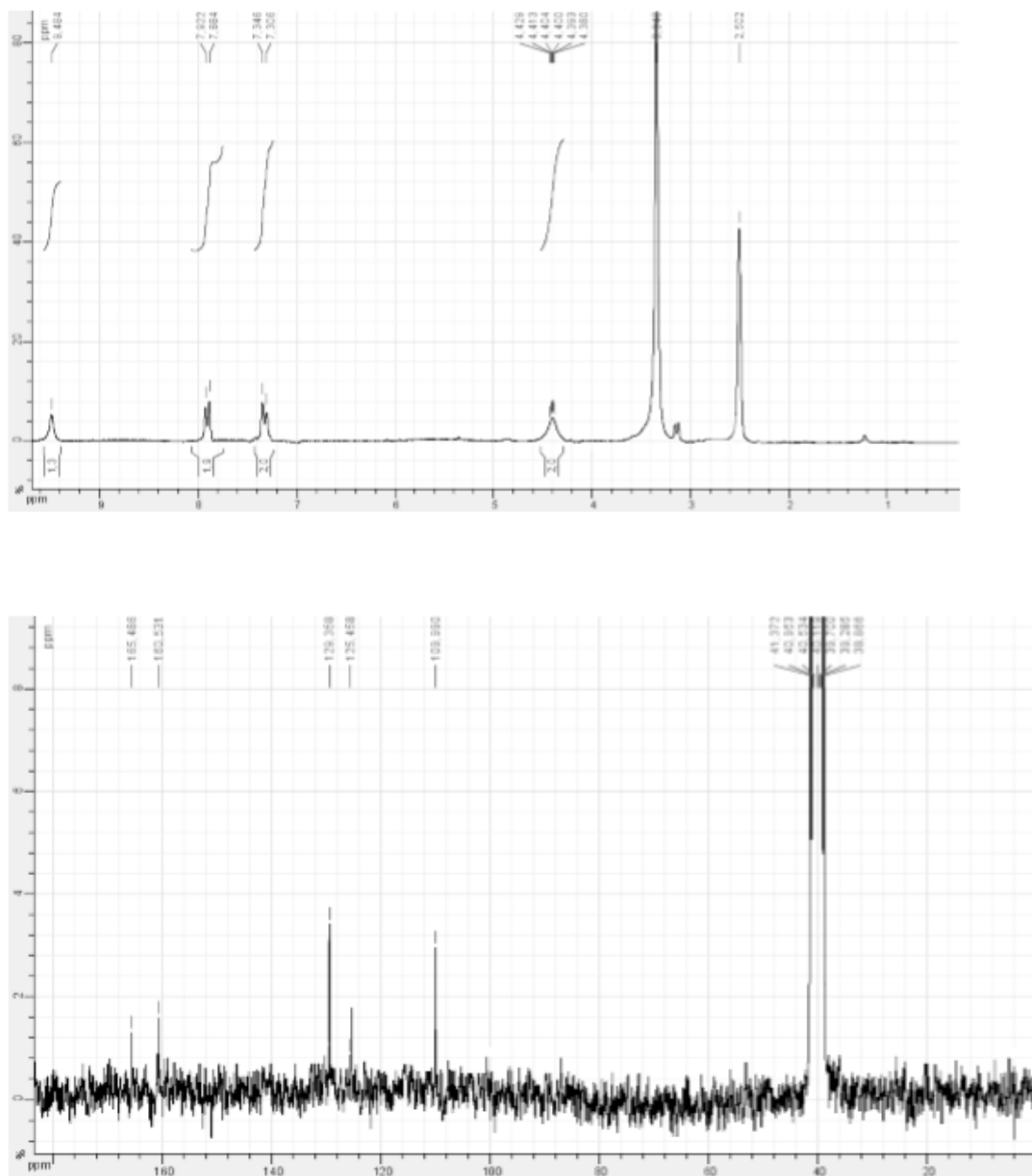
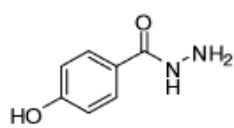


Fig S7. Espectros de RMN ¹H (200 MHz) e RMN ¹³C (50 MHz) de **62g** em DMSO-d₆.

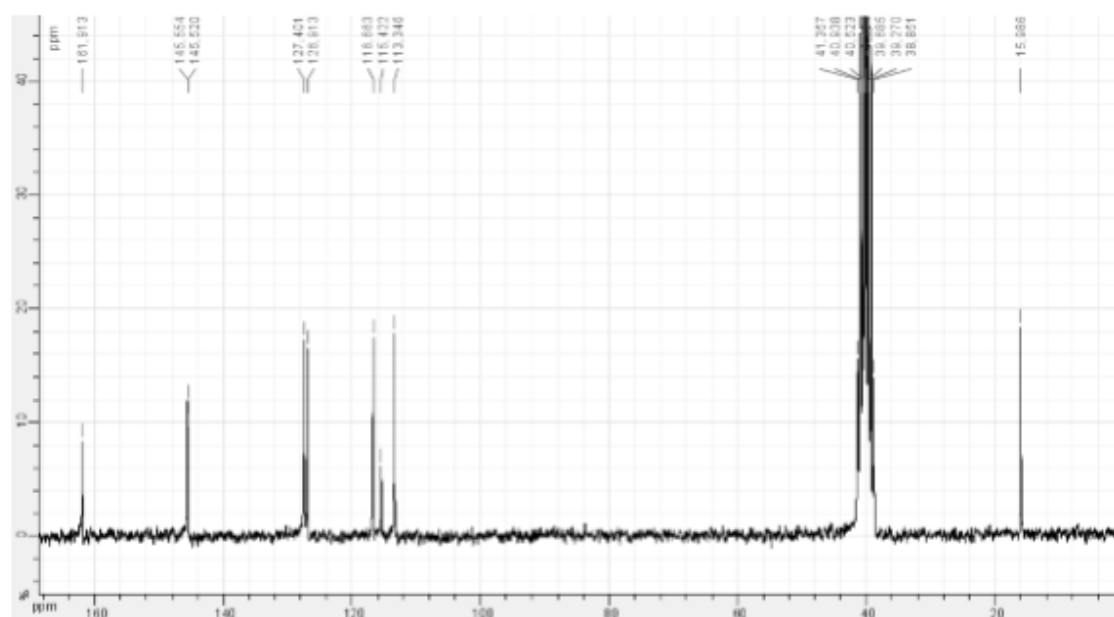
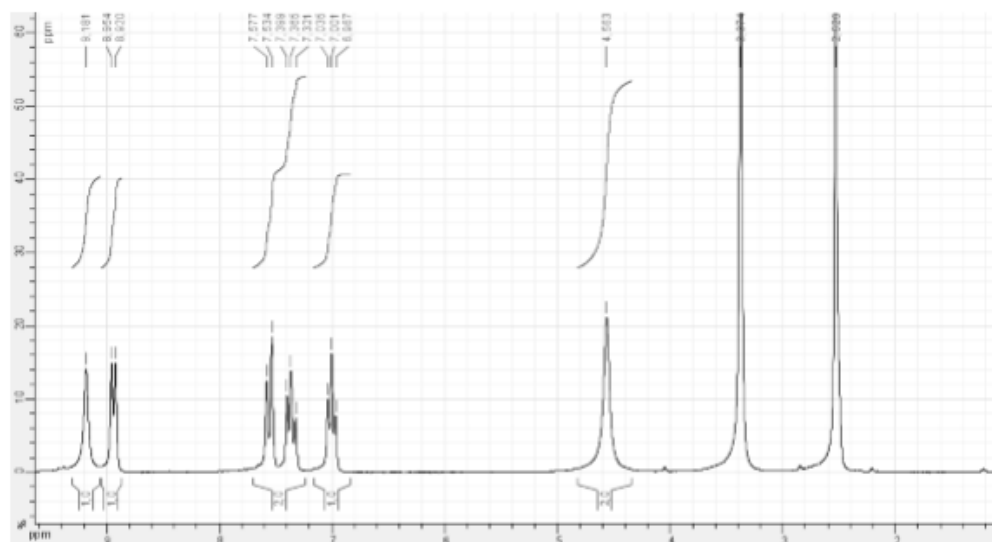
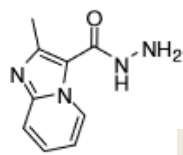


Fig S8. Espectros de RMN ^1H (200 MHz) e RMN ^{13}C (50 MHz) de **62i** em DMSO-d_6 .

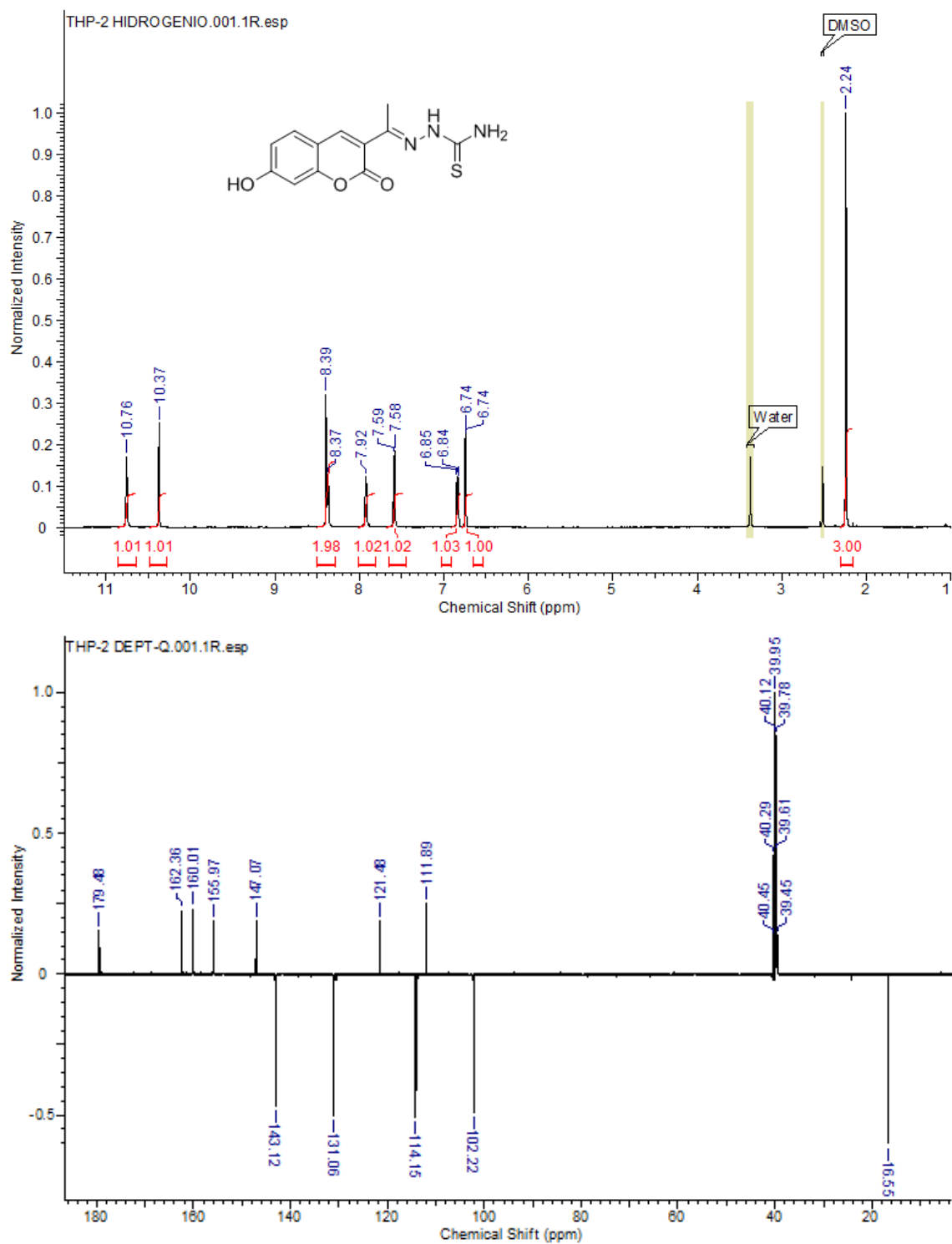


Fig S9. Espectros de RMN ^1H (500 MHz) e RMN ^{13}C (125 MHz) de **59a** em DMSO-d_6 .

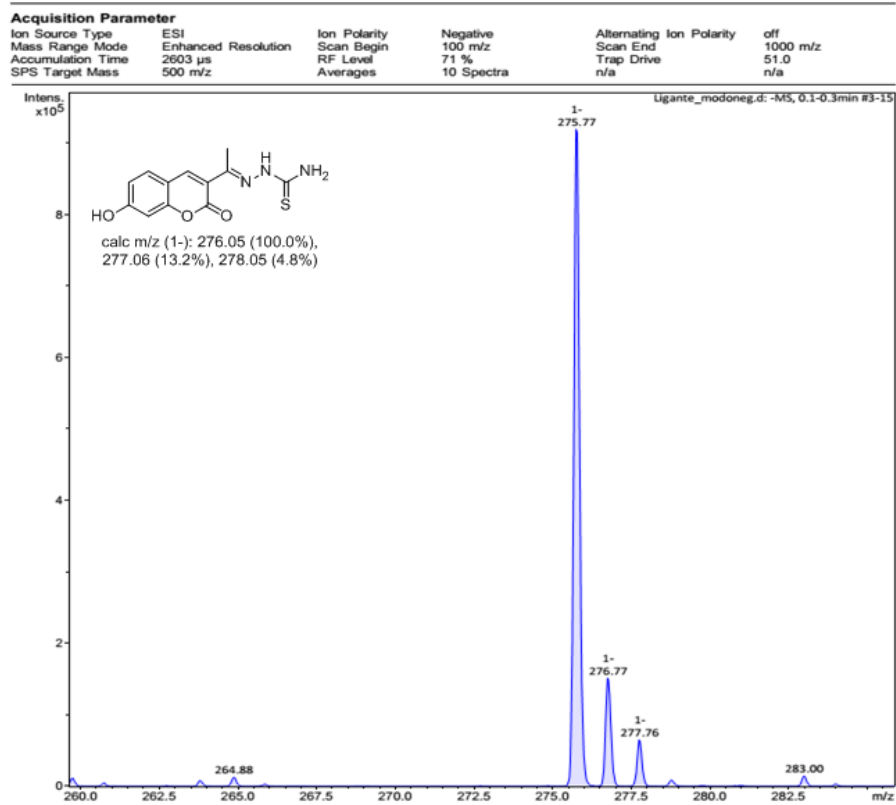


Fig S10. Espectro de MASSAS de **59a** in DMSO-d₆.

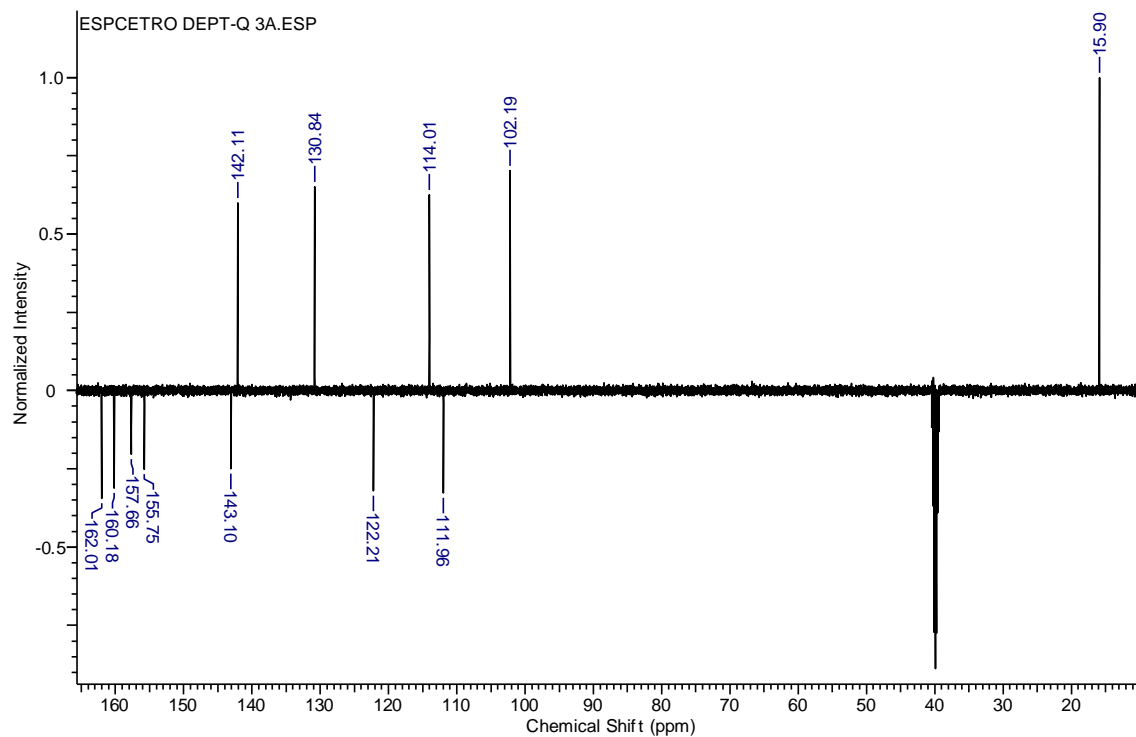
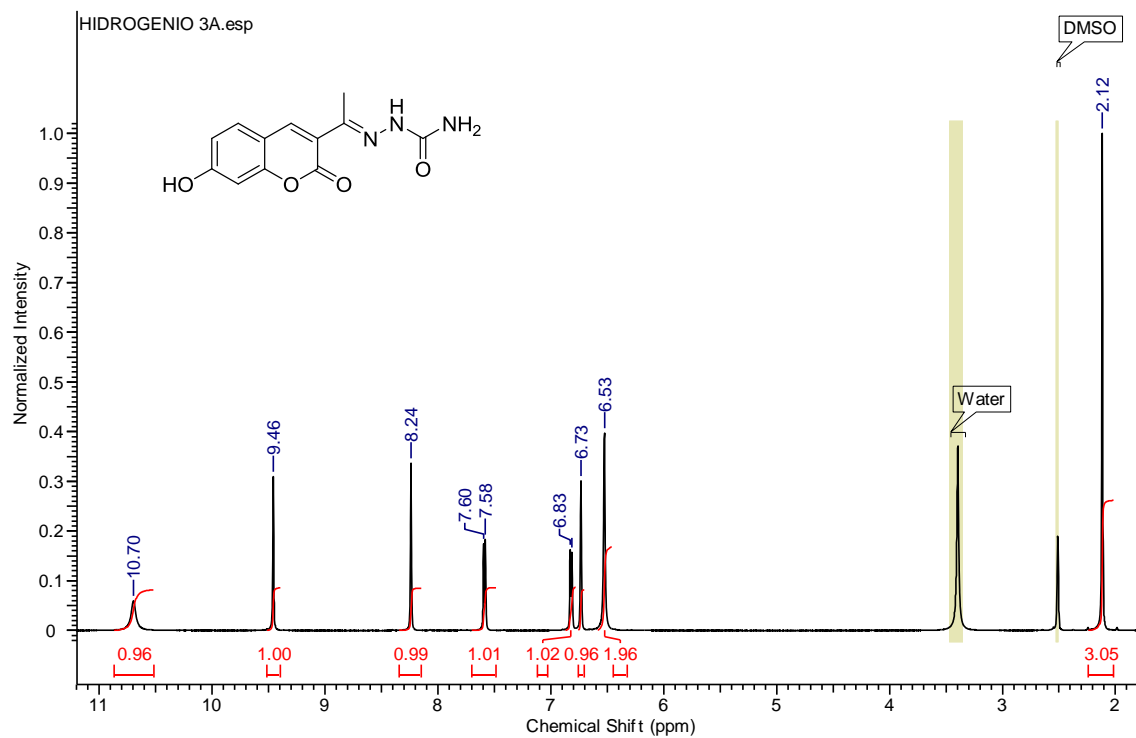


Fig S11. Espectros de RMN ^1H (500 MHz) e RMN ^{13}C (125 MHz) de **59b** em DMSO- d_6 .

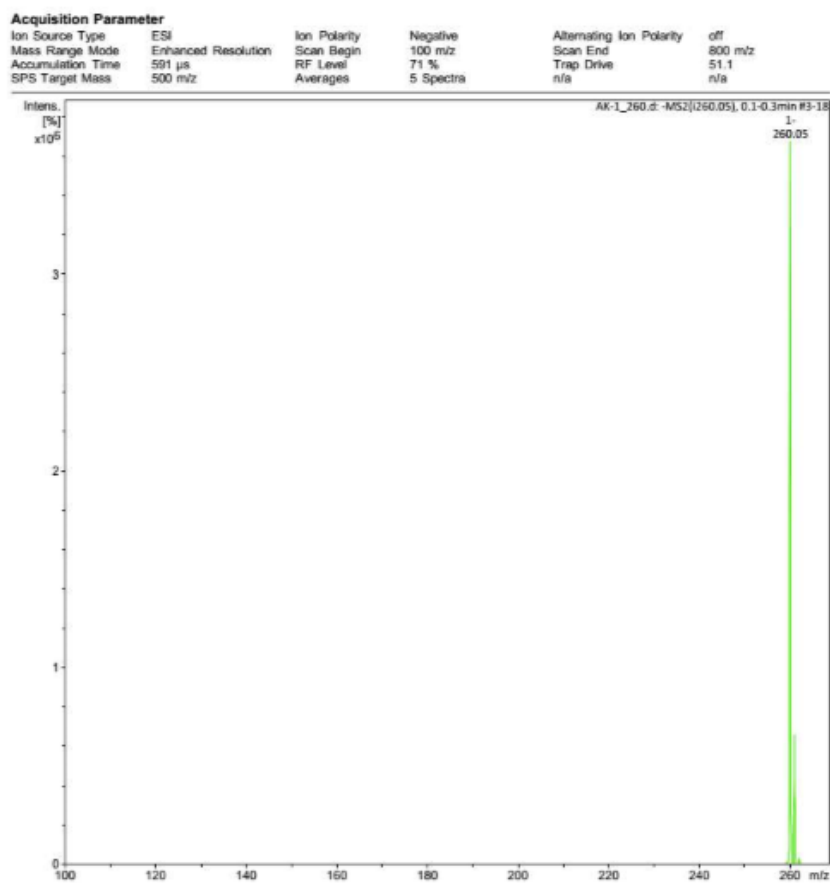
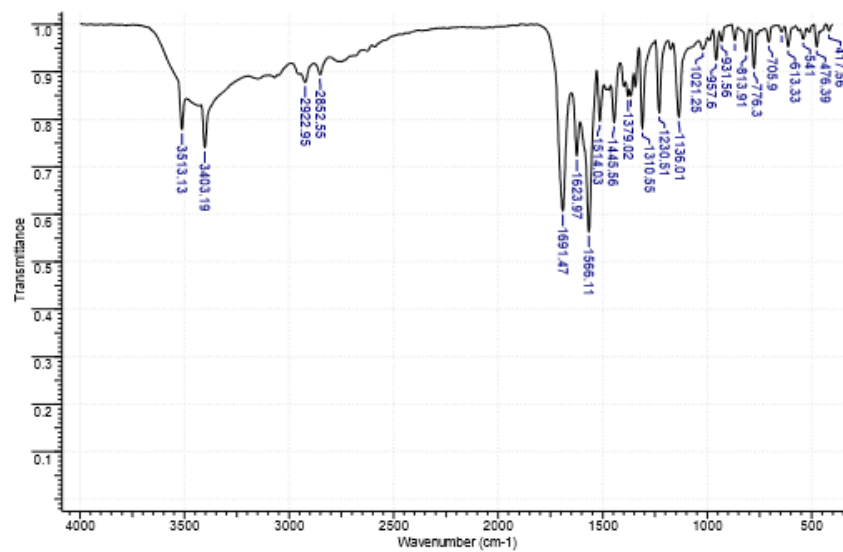


Fig S12. Espectros de IVe MASSAS de **59b**.

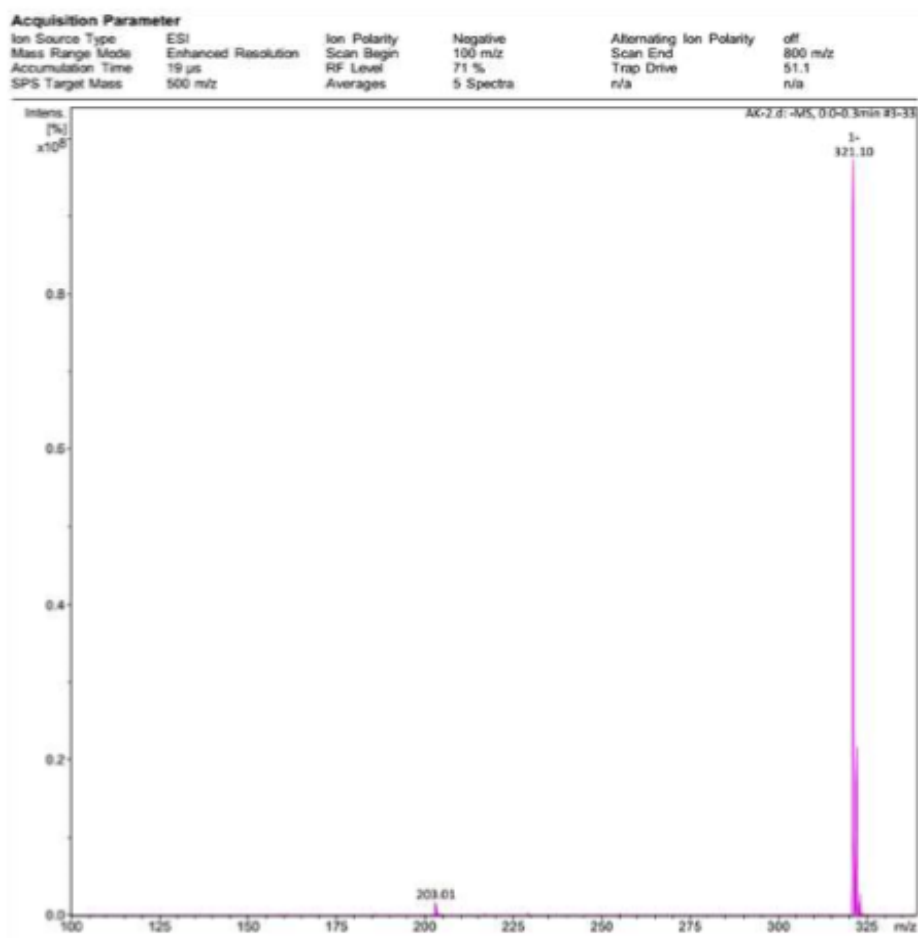
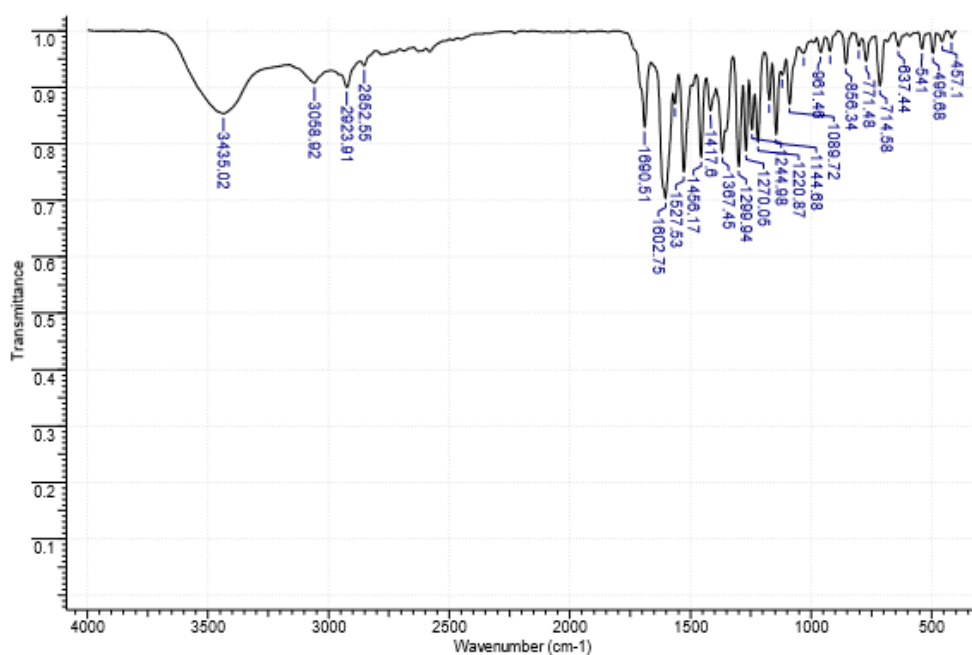


Fig S14. Espectros de **IV** e MASSAS de **59c**.

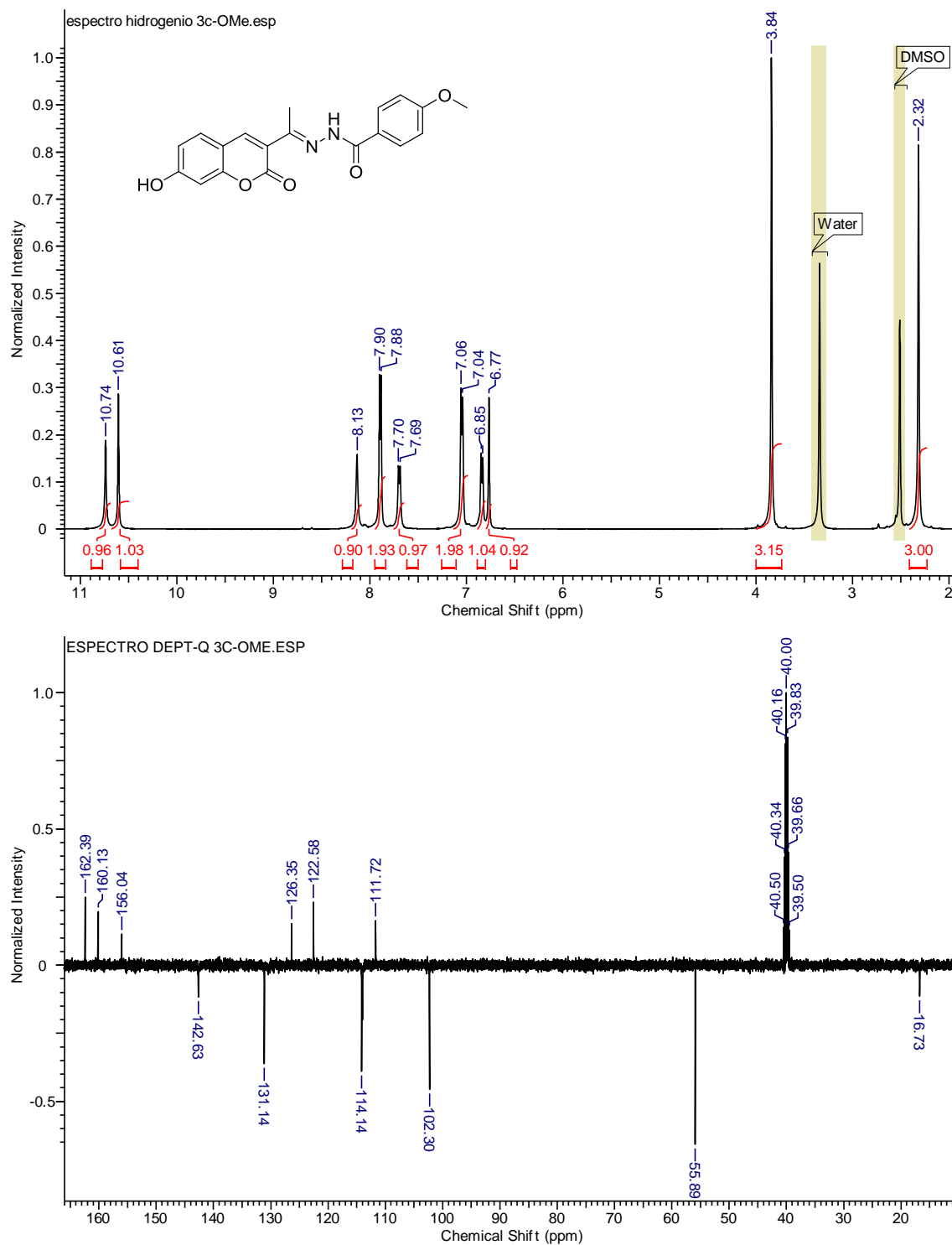


Fig S15. Espectros de RMN ^1H (500 MHz) e RMN ^{13}C (125 MHz) de **59d** em DMSO- d_6 .

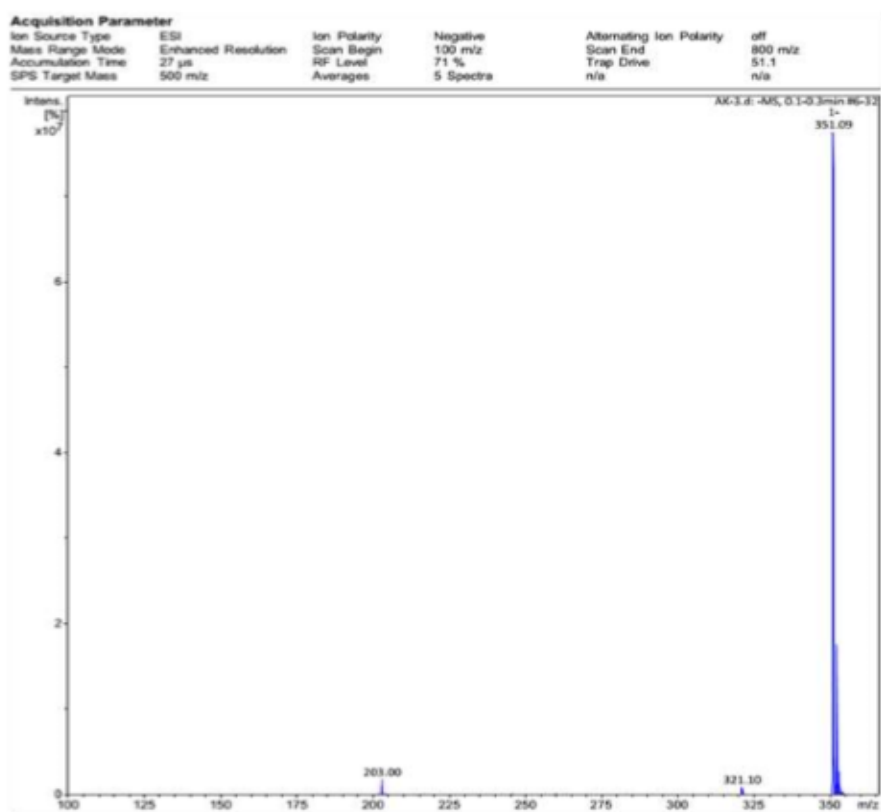
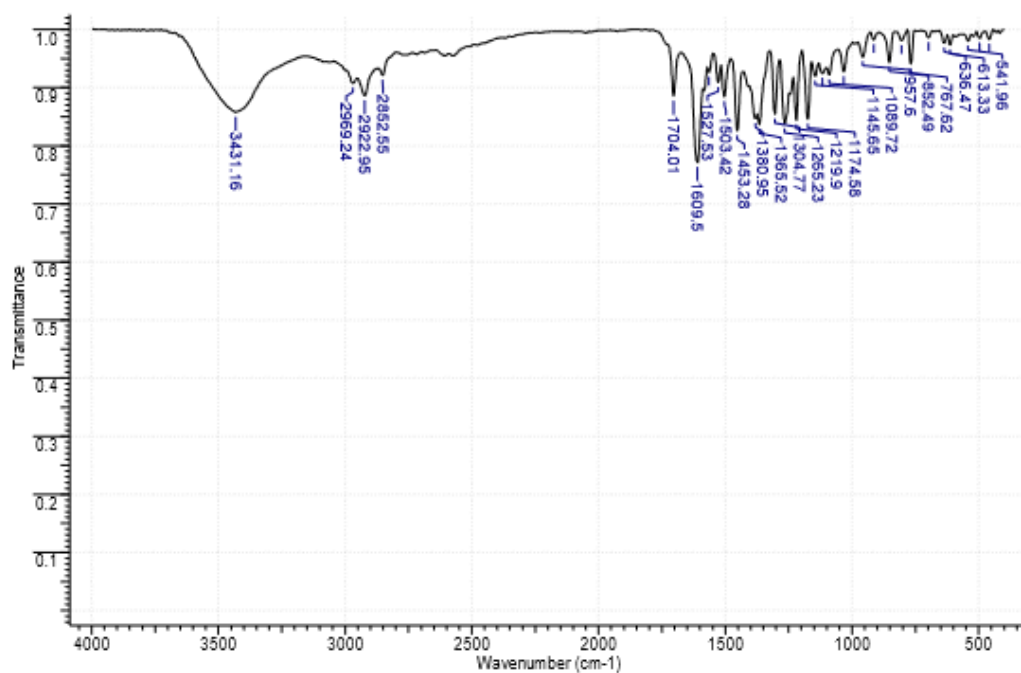


Fig S16. Espectros de IV e MASSAS de **59d**.

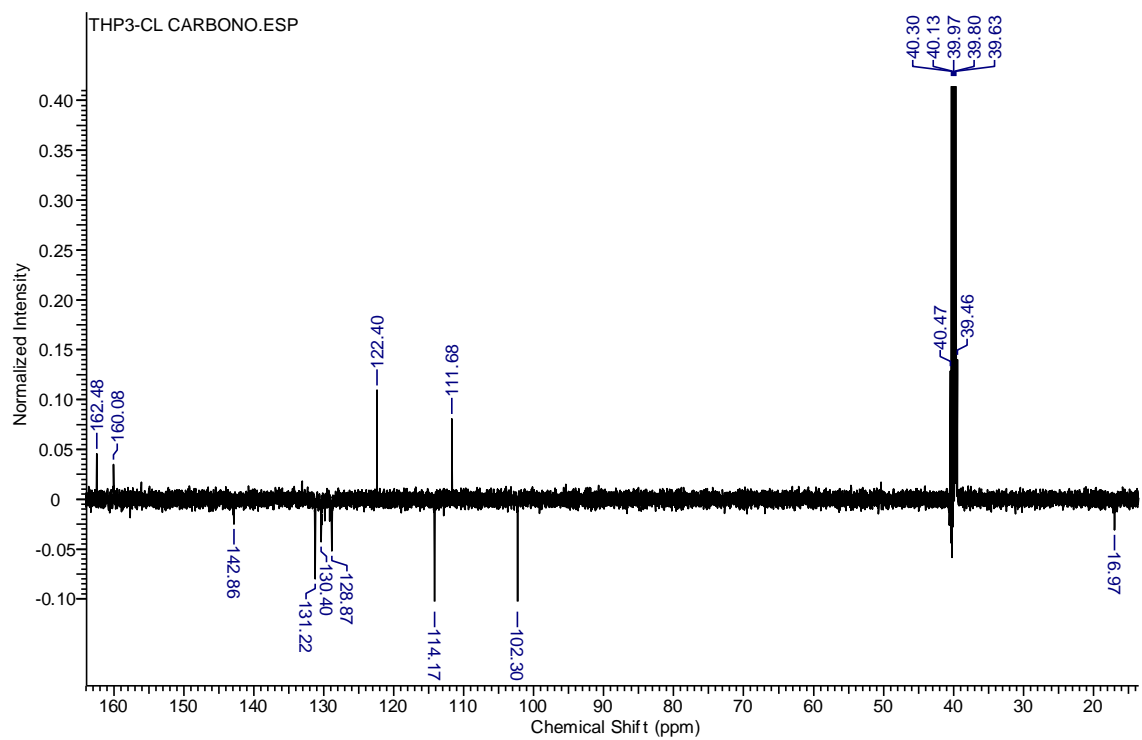
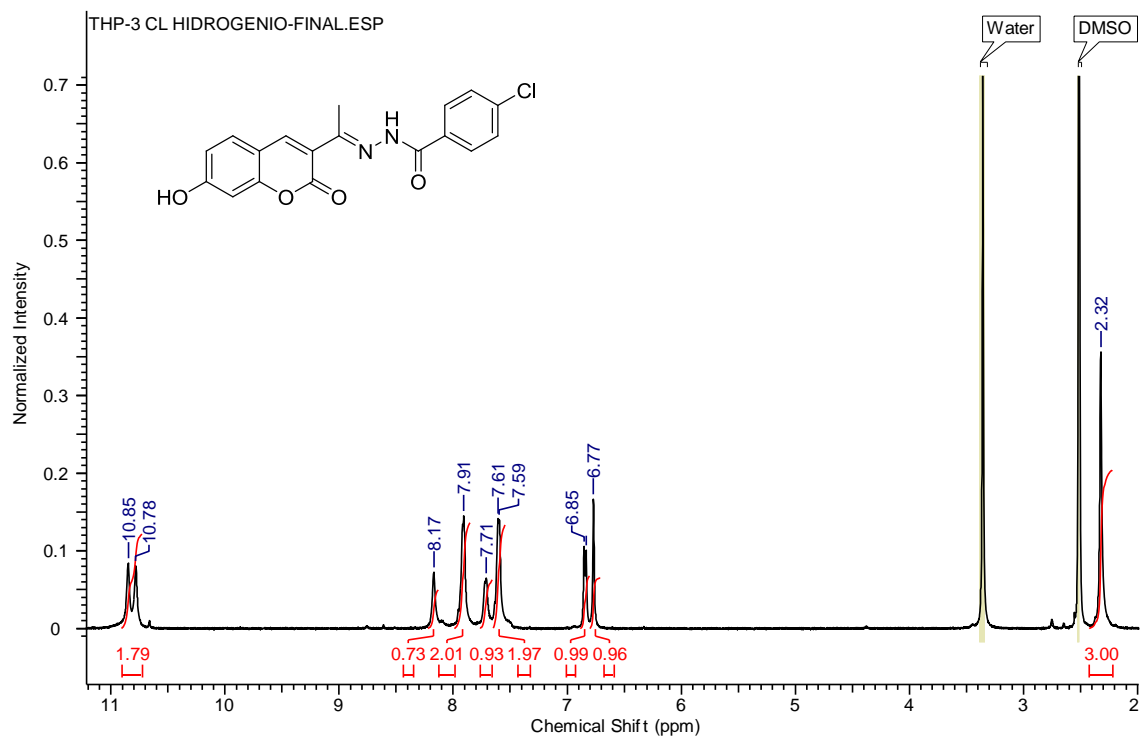


Fig S17. Espectros de RMN ^1H (500 MHz) e RMN ^{13}C (125 MHz) de **59e** em DMSO- d_6 .

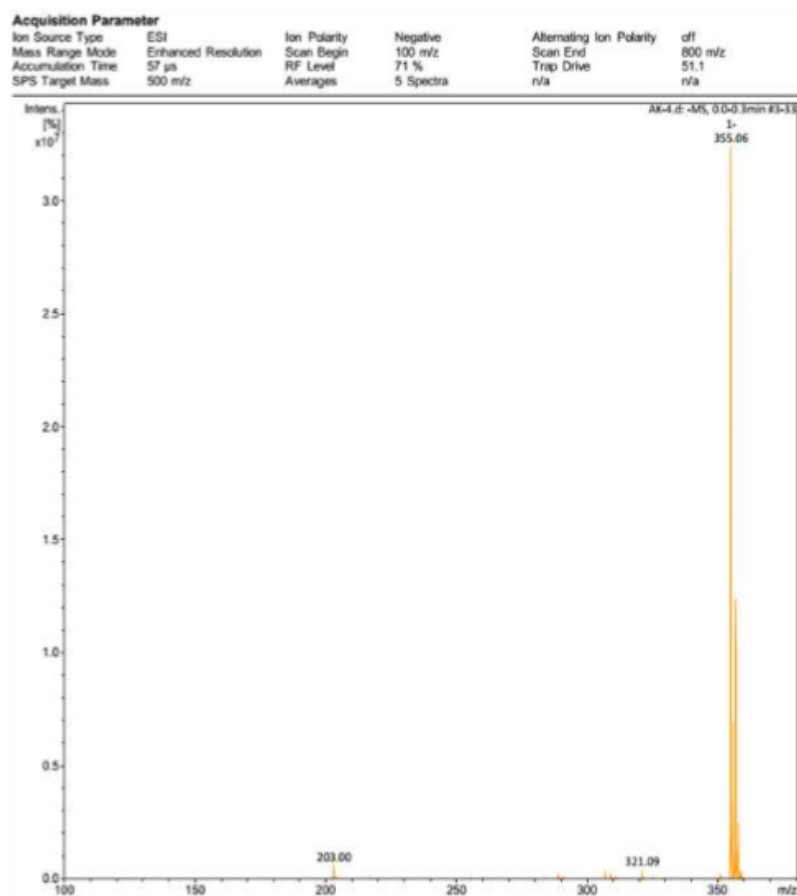
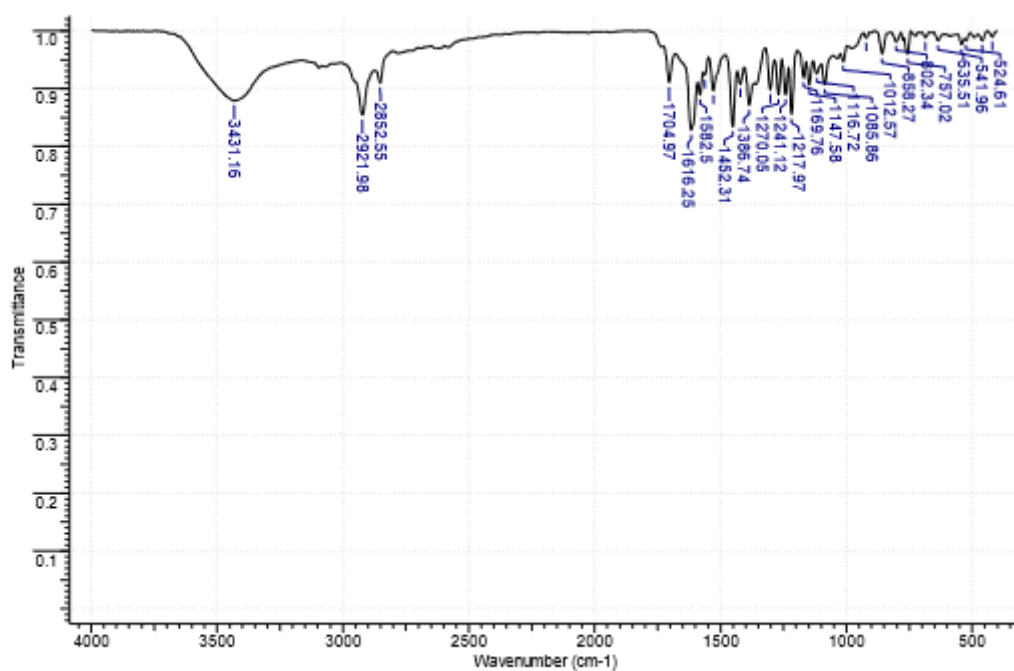


Fig S18. Espectros de **IV** e MASSAS de **59e**.

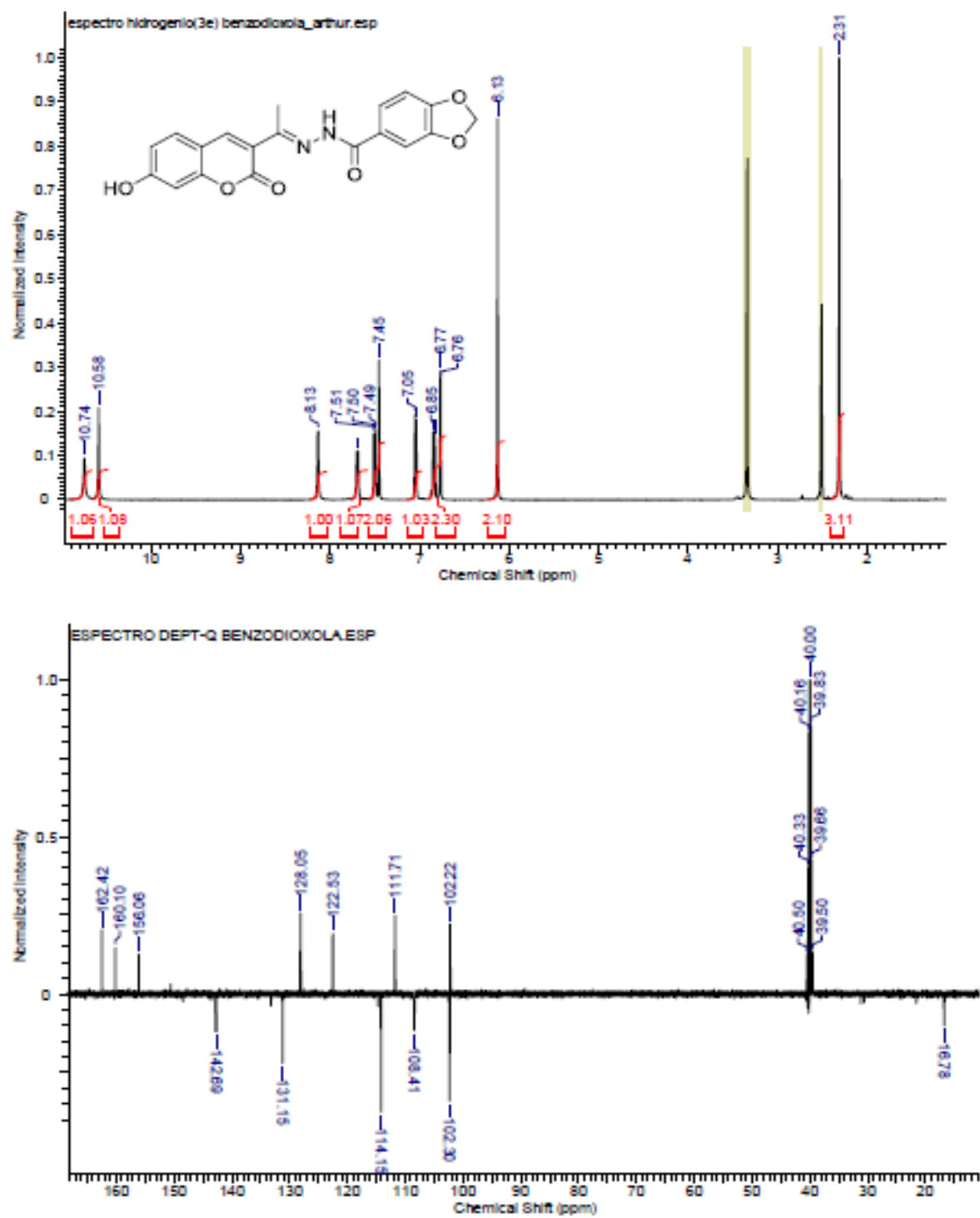


Fig S19. Espectros de RMN ^1H (500 MHz) e RMN ^{13}C (125 MHz) de **59f** em DMSO- d_6 .

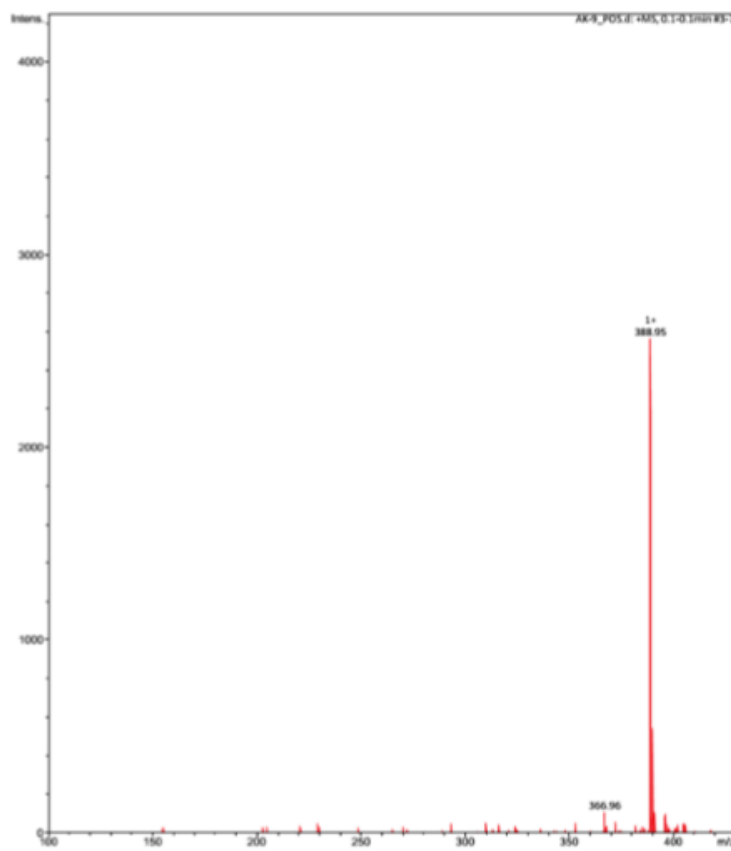
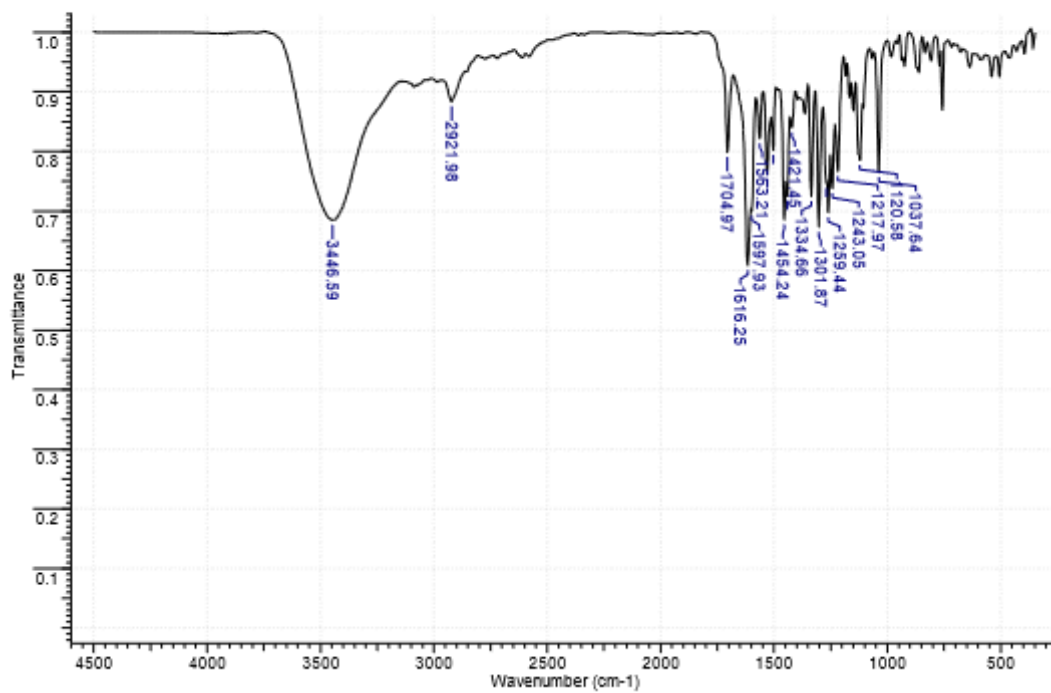


Fig S20. Espectros de **IV** e MASSAS de **59f**.

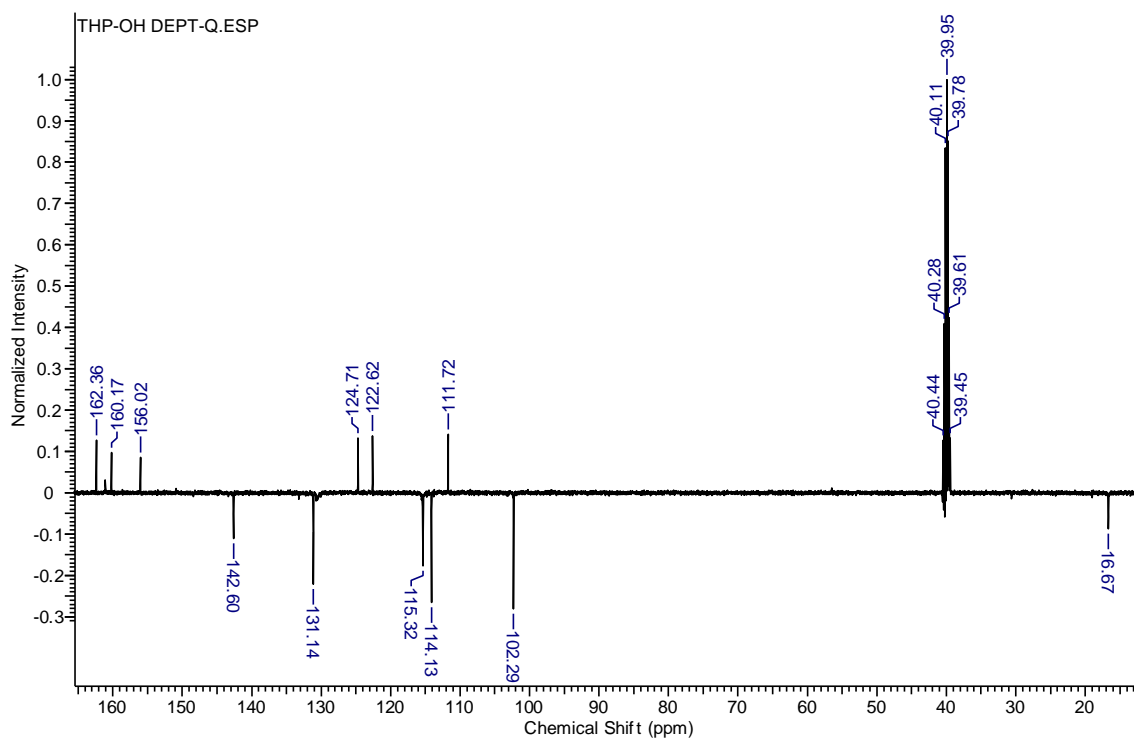
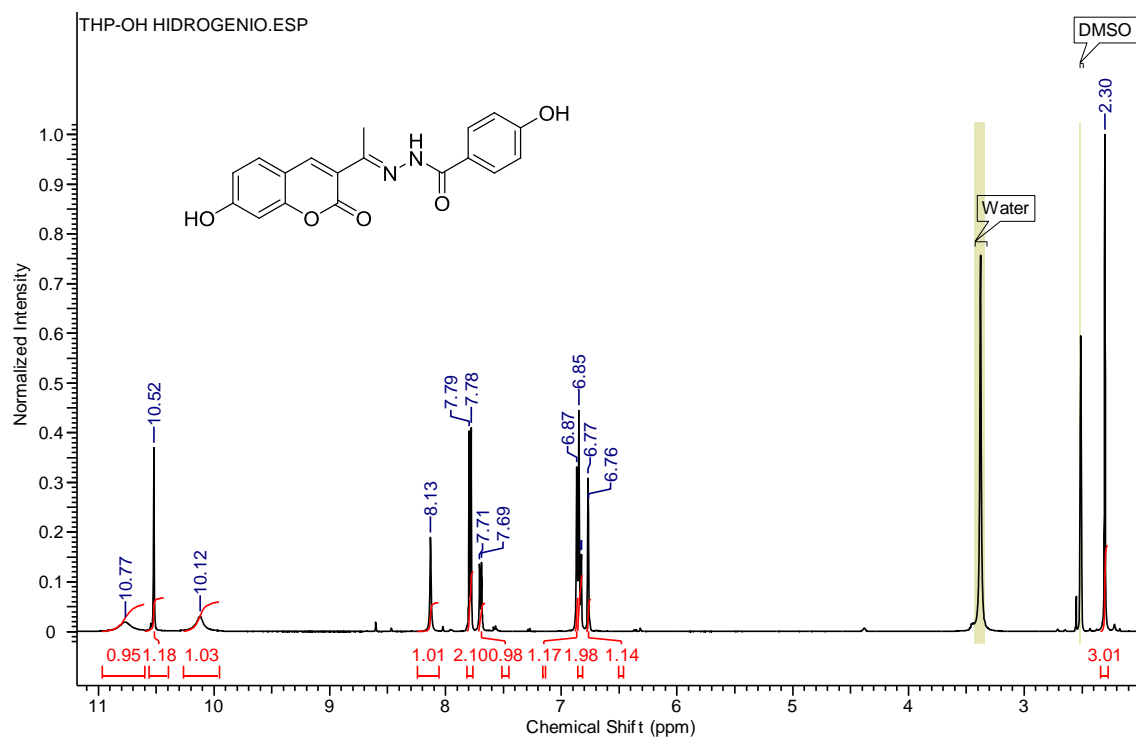


Fig S21. Espectros de RMN ^1H (500 MHz) e RMN ^{13}C (125 MHz) de **59g** em DMSO- d_6 .

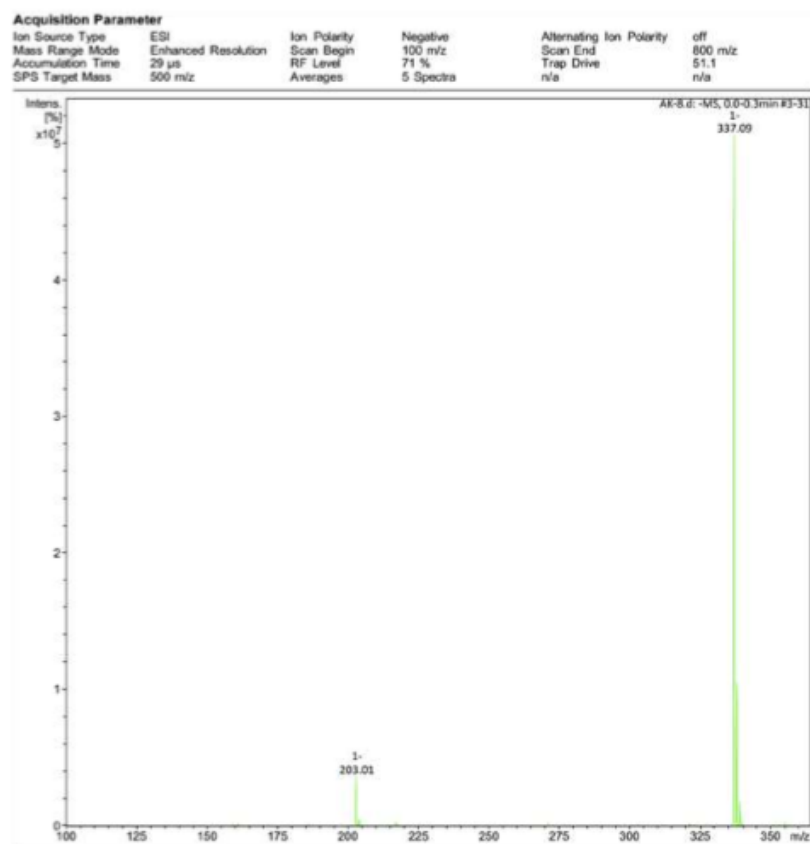
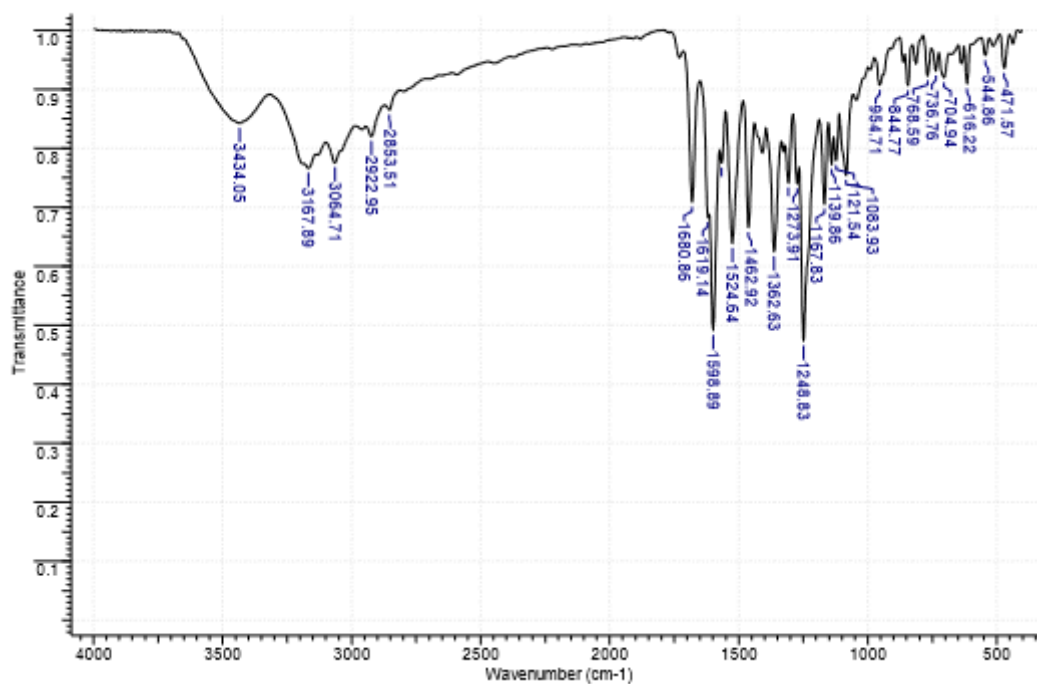


Fig S22. Espectros de IV e MASSAS de **59g**.

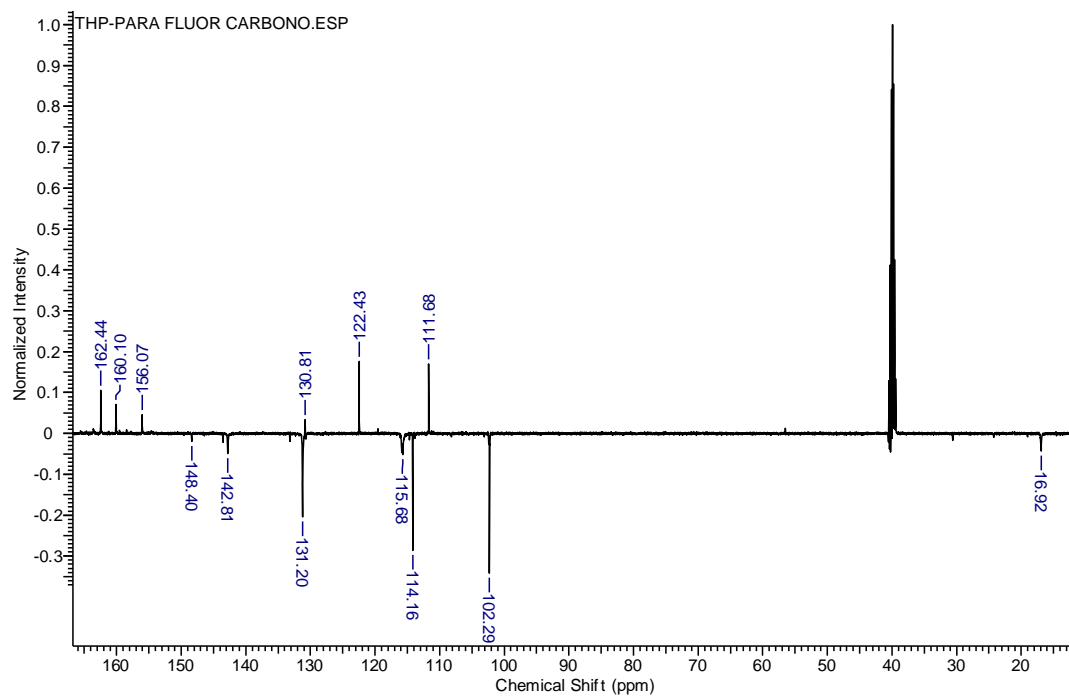
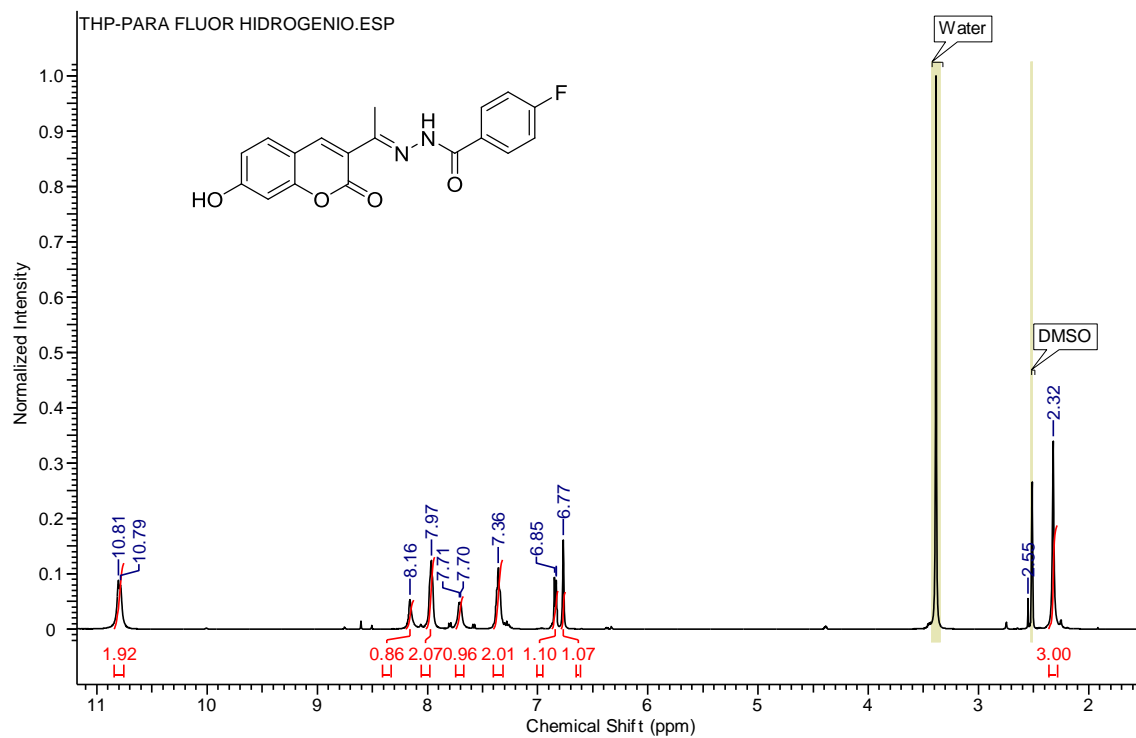


Fig S23. Espectros de RMN ^1H (500 MHz) e RMN ^{13}C (125 MHz) de **59h** em DMSO- d_6 .

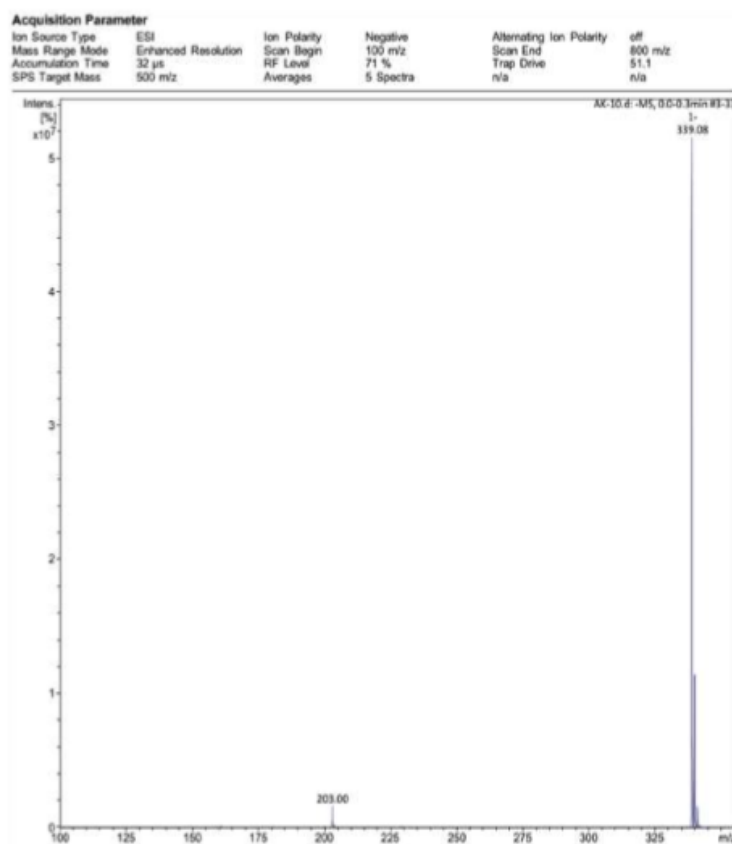
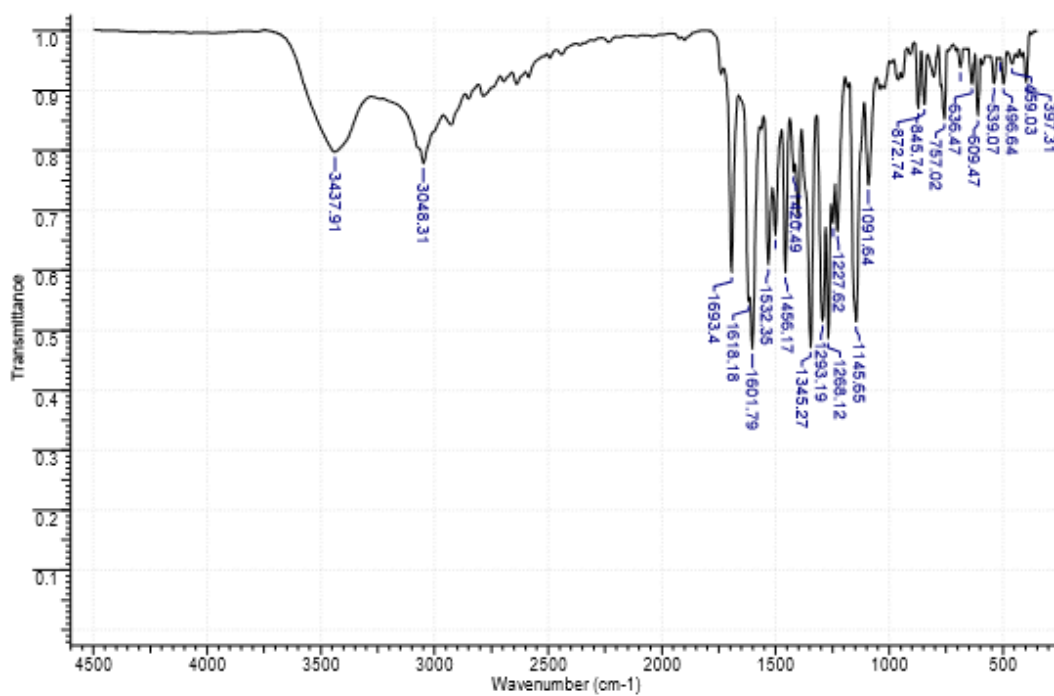


Fig S24. Espectros de IV e MASSAS de **59h**.

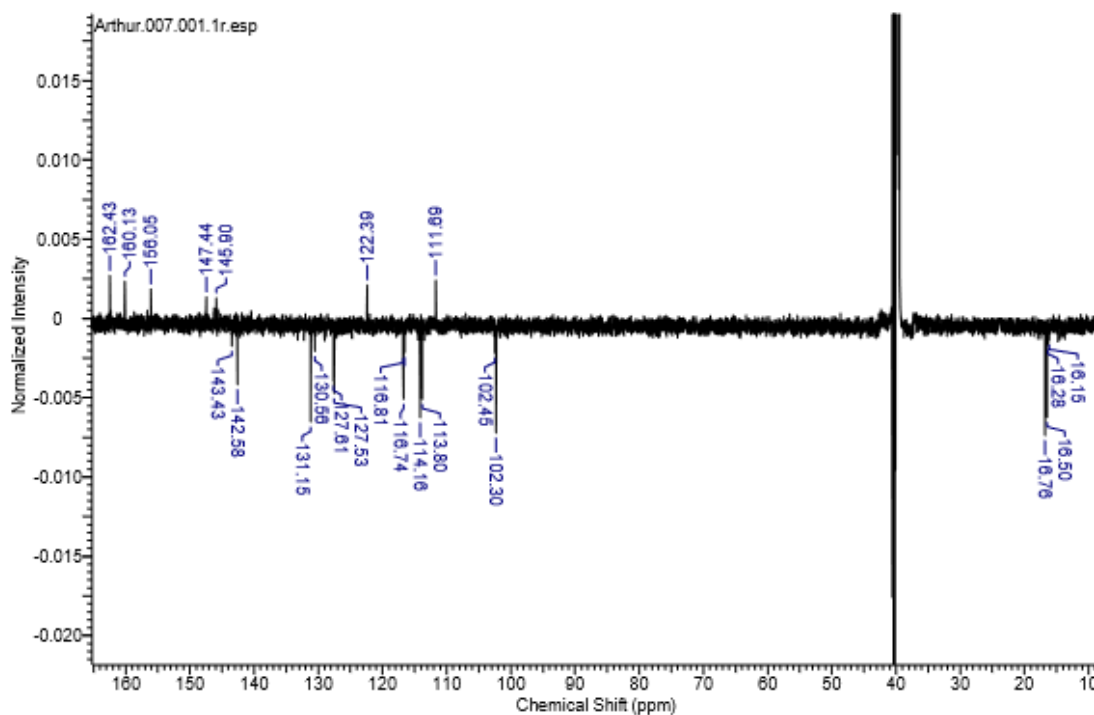
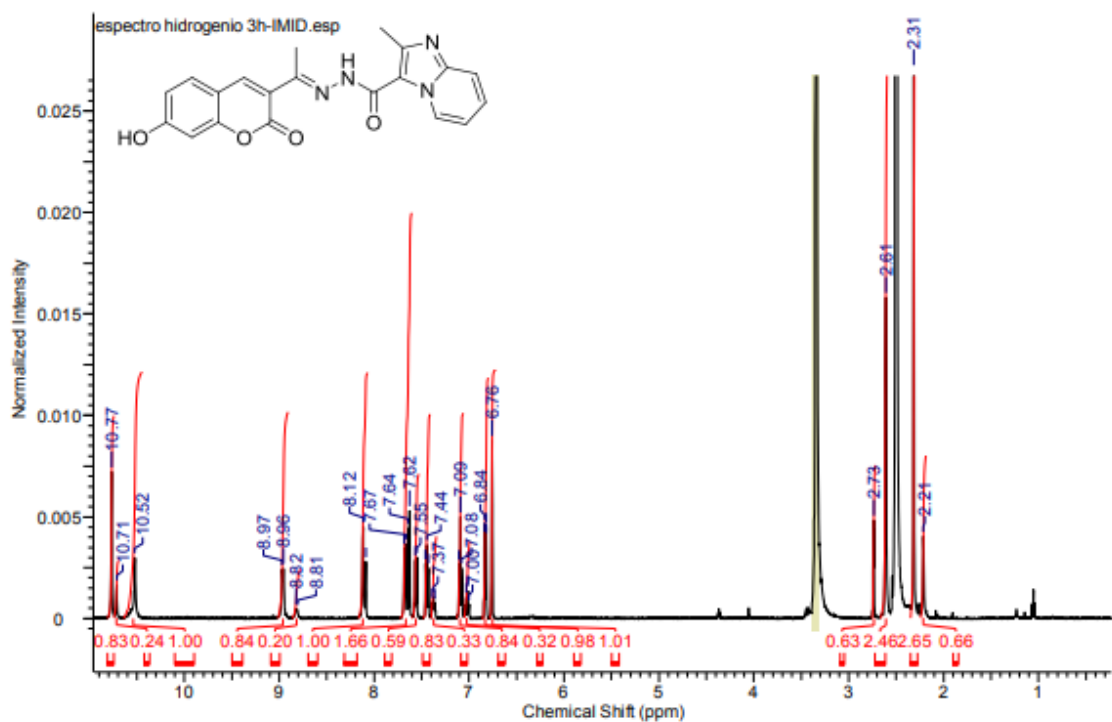
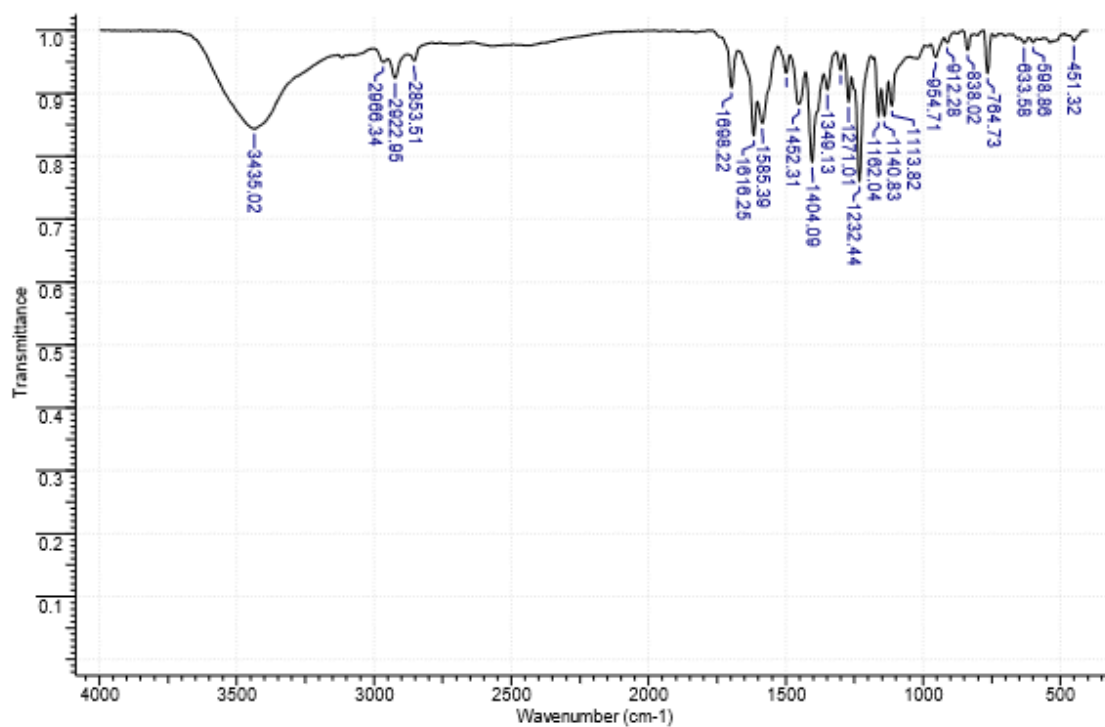


Fig S25. Espectros de RMN ^1H (500 MHz) e RMN ^{13}C (125 MHz) de **59i** em DMSO- d_6 .



Acquisition Parameter

Ion Source Type	ESI	Ion Polarity	Negative	Alternating Ion Polarity	off
Mass Range Mode	Enhanced Resolution	Scan Begin	100 m/z	Scan End	800 m/z
Accumulation Time	65 μ s	RF Level	71 %	Trap Drive	51.1
SPS Target Mass	500 m/z	Averages	5 Spectra		n/a

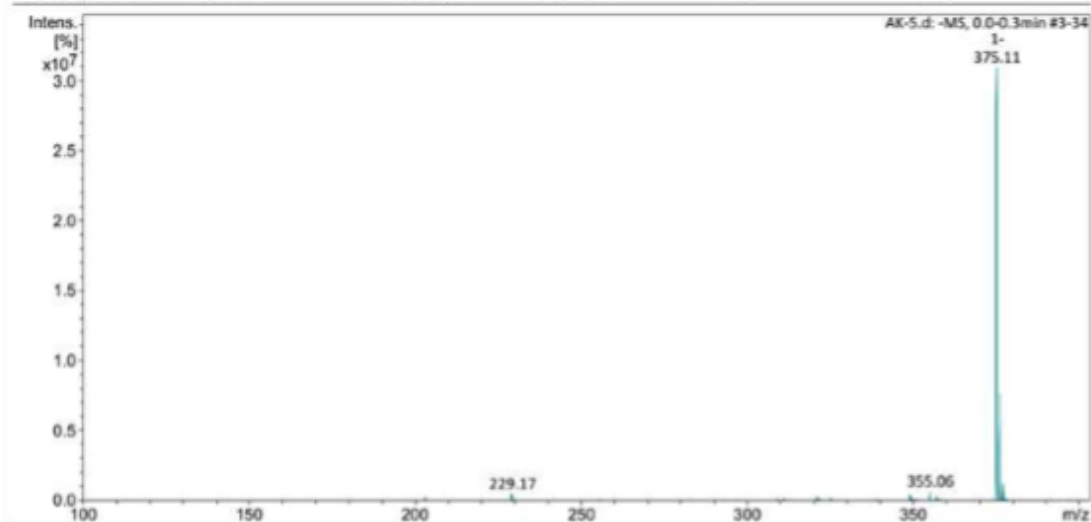


Fig S26. Espectros de IV e MASSAS de **59i**.

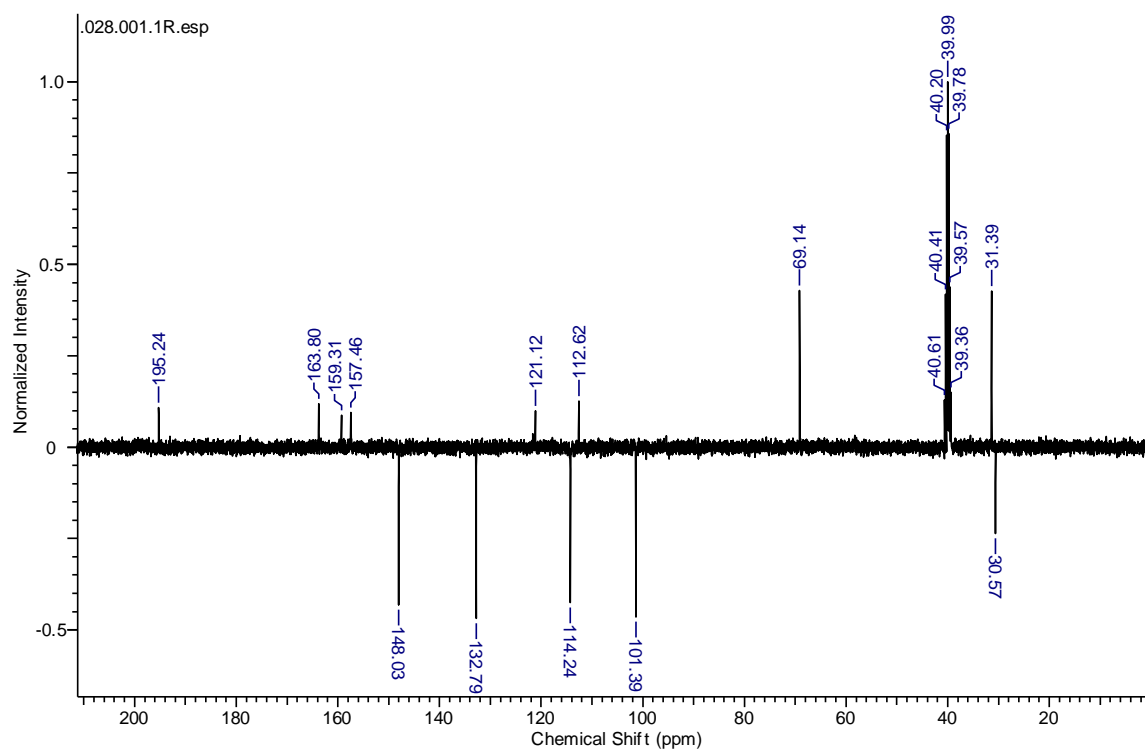
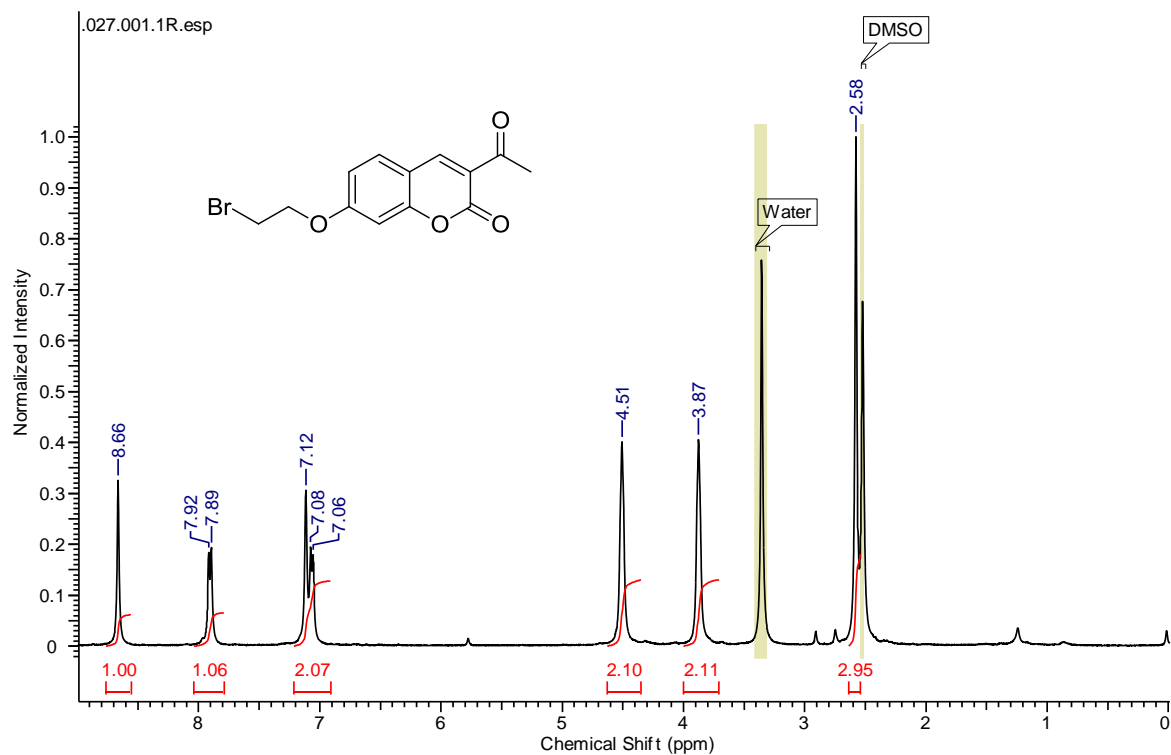


Fig S27. Espectros de RMN ^1H (400 MHz) e RMN ^{13}C (100 MHz) de **99a** em DMSO- d_6 .

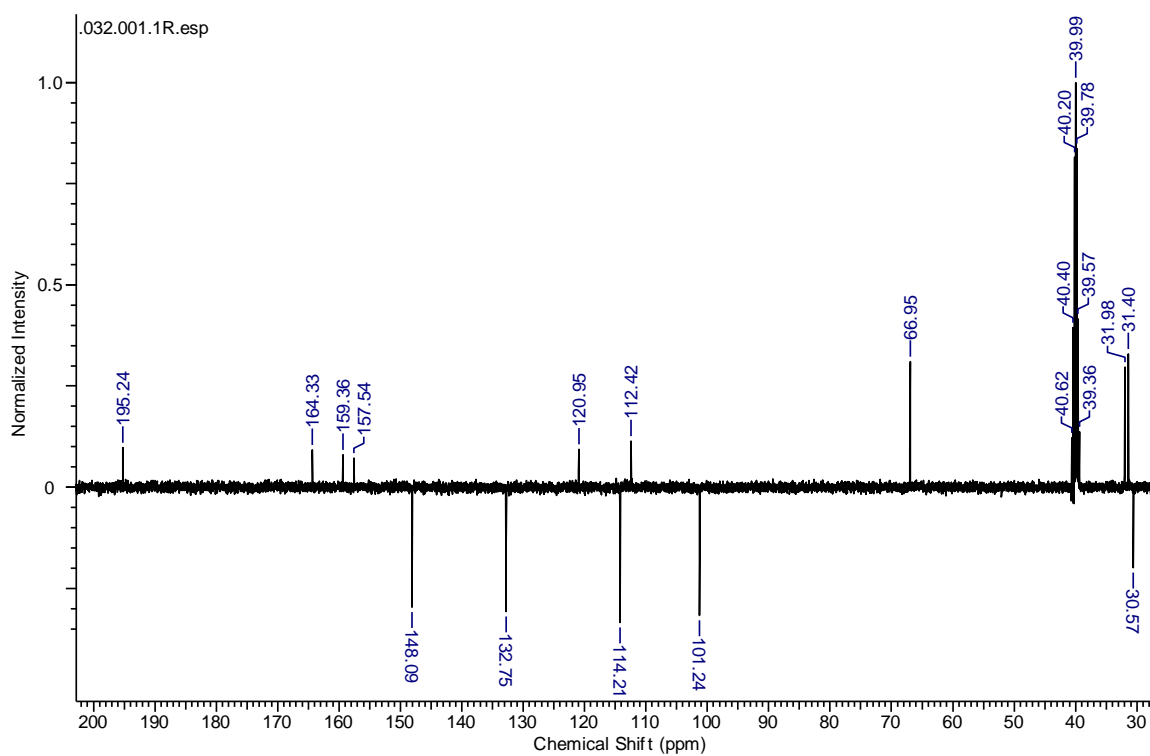
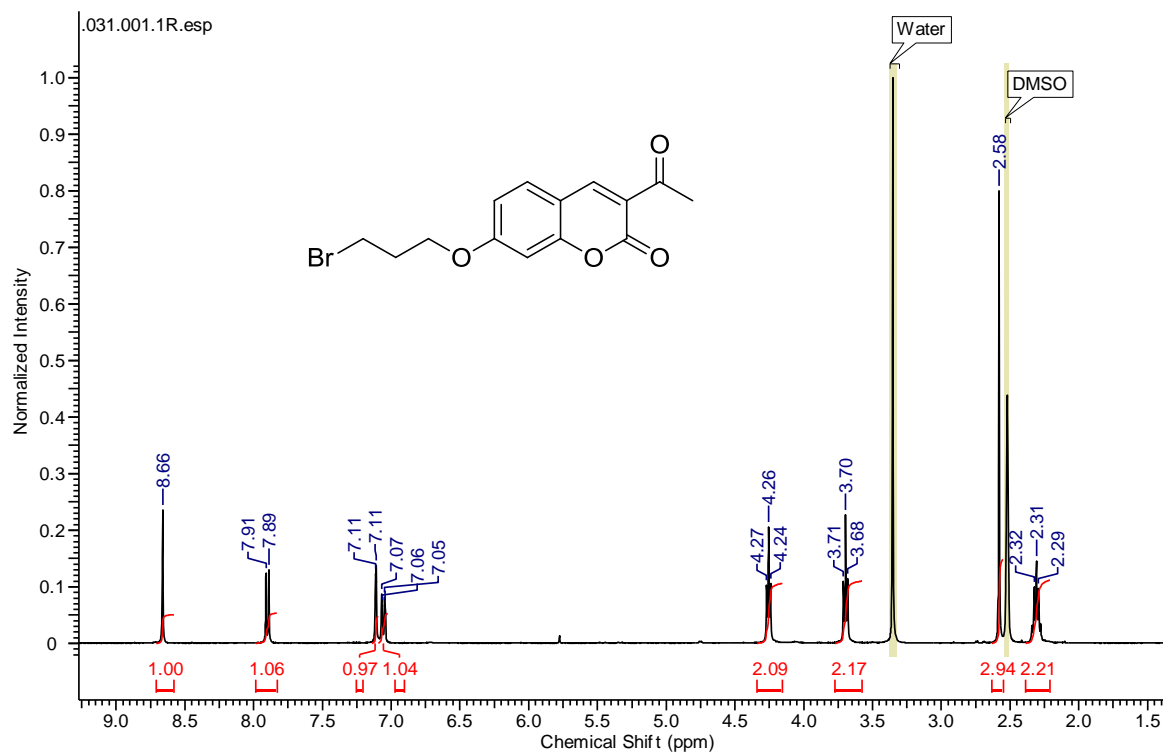


Fig S28. Espectros de RMN ^1H (400 MHz) e RMN ^{13}C (100 MHz) de **99b** em DMSO- d_6 .

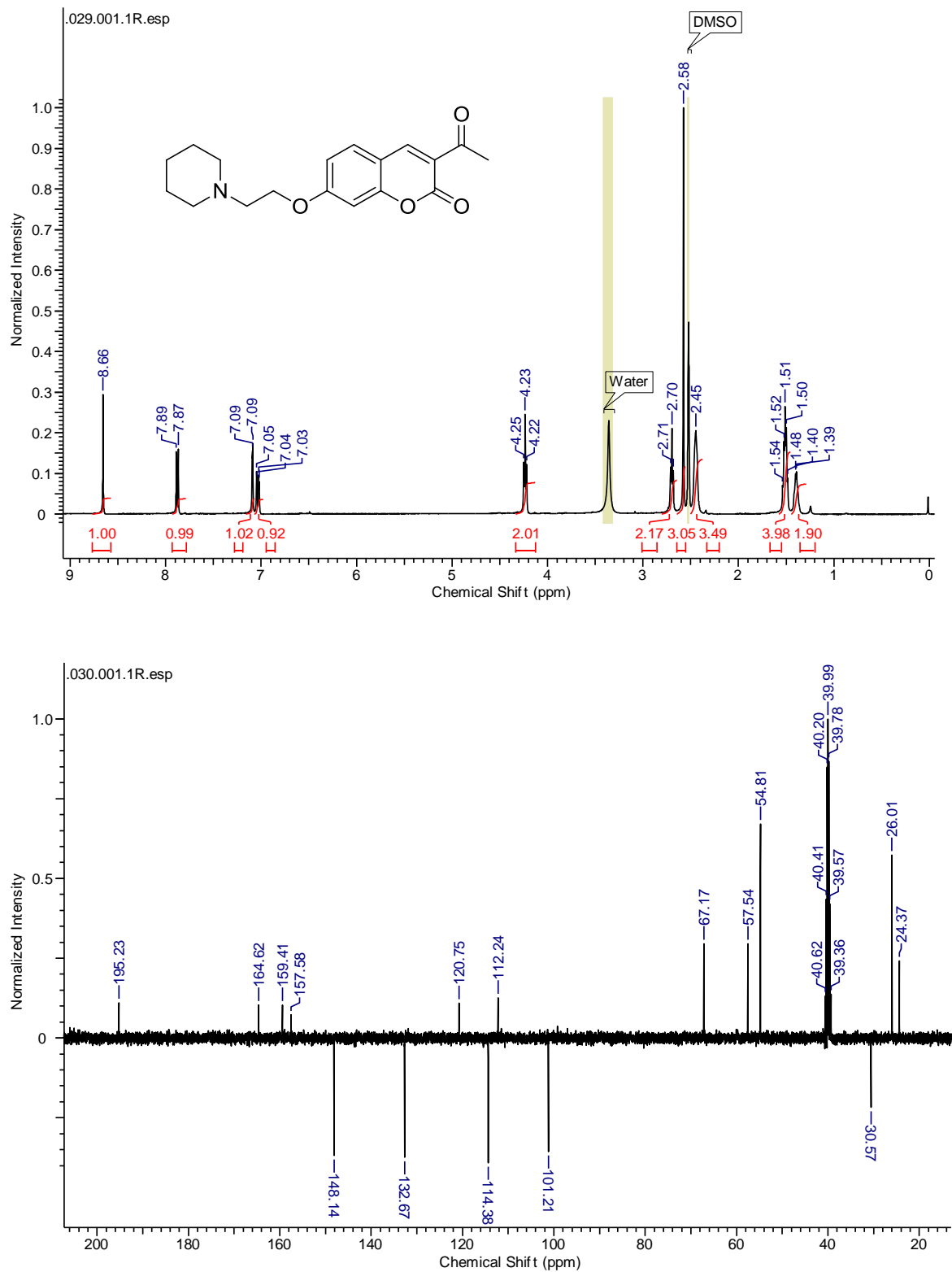


Fig S29. Espectros de RMN ¹H (400 MHz) e RMN ¹³C (100 MHz) de **98a** em DMSO-d₆.

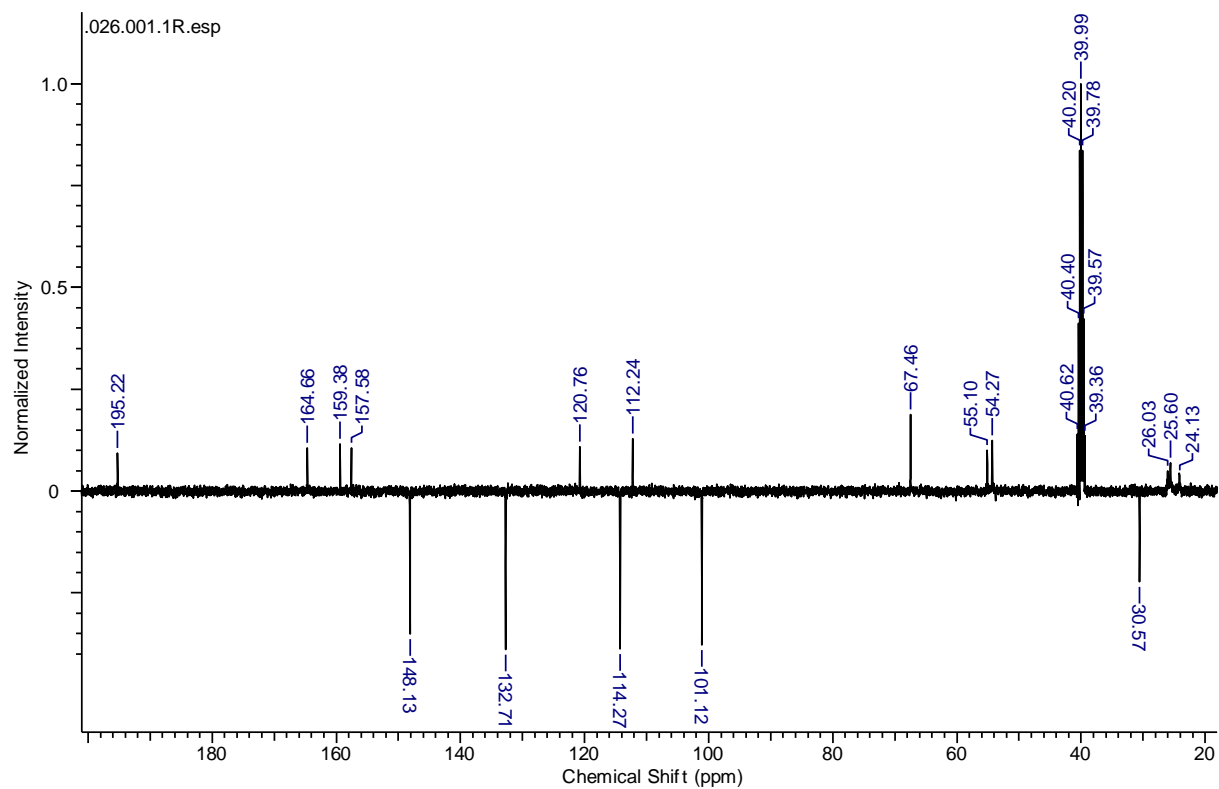
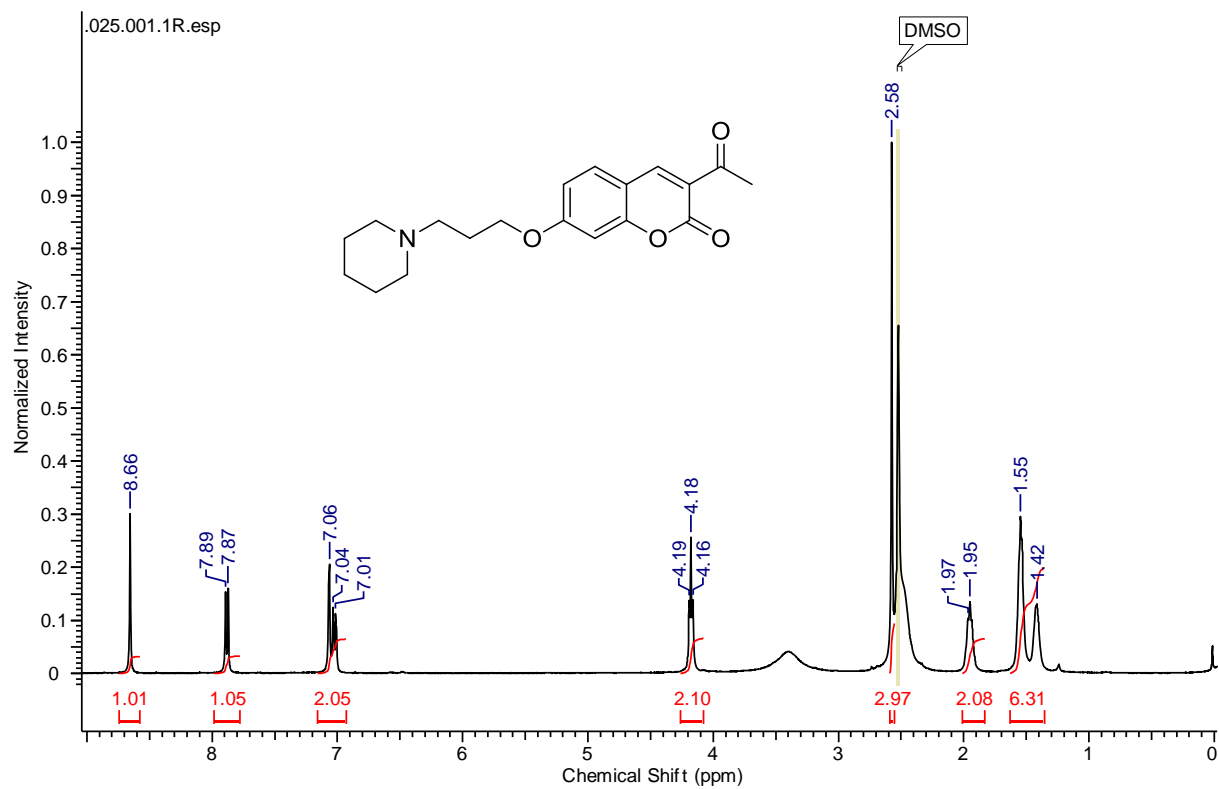


Fig S30. Espectros de RMN ^1H (400 MHz) e RMN ^{13}C (100 MHz) de **98b** em DMSO- d_6 .

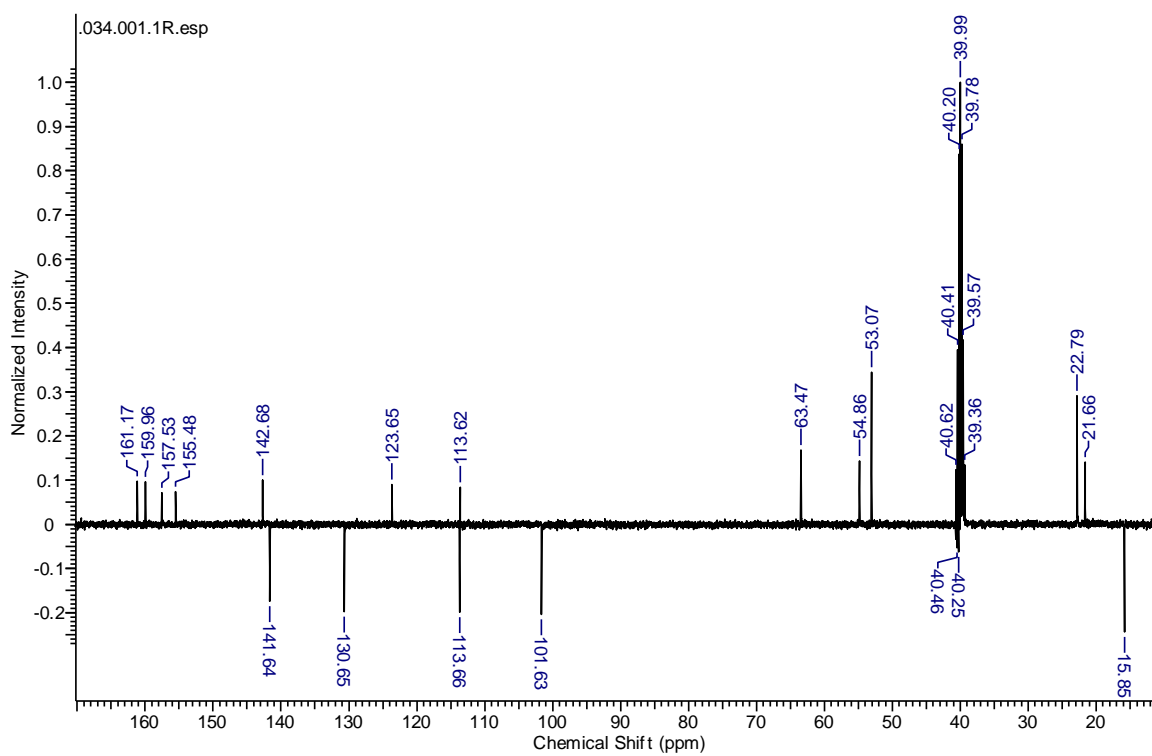
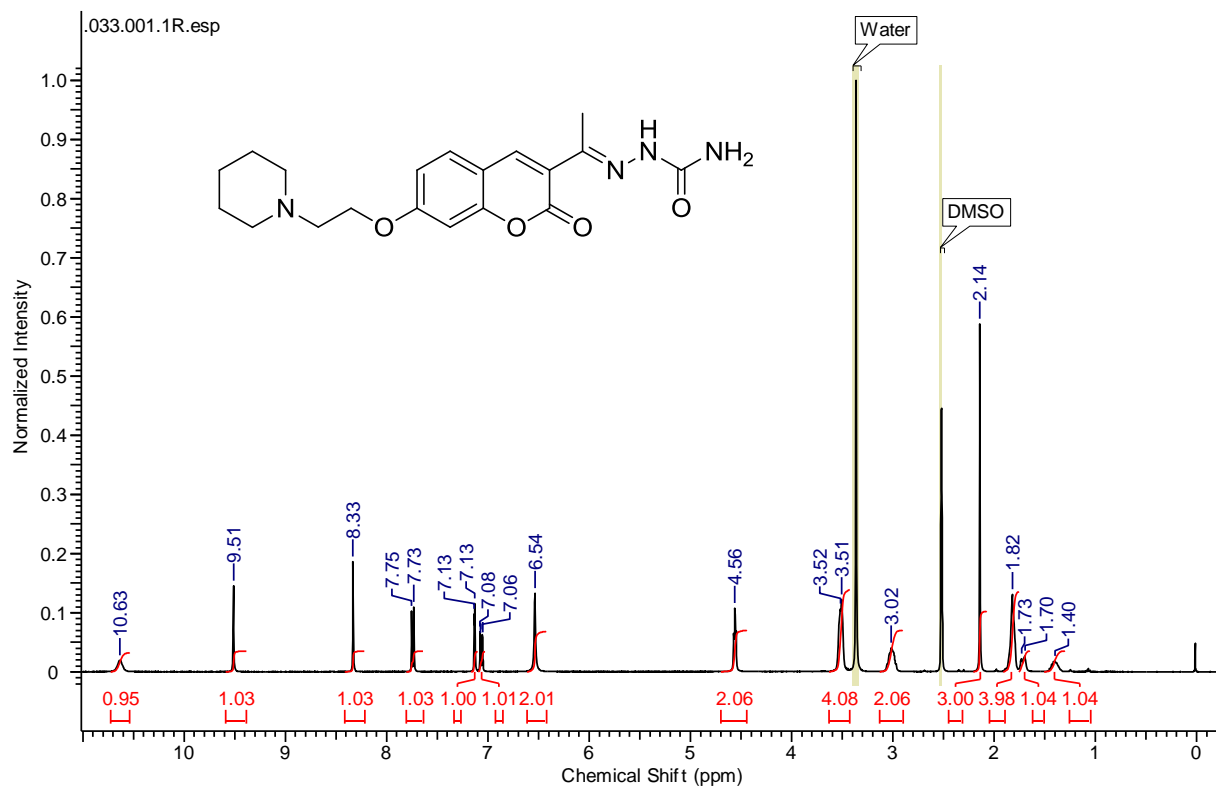


Fig S31. Espectros de RMN ^1H (400 MHz) e RMN ^{13}C (100 MHz) de **60a** em DMSO- d_6 .

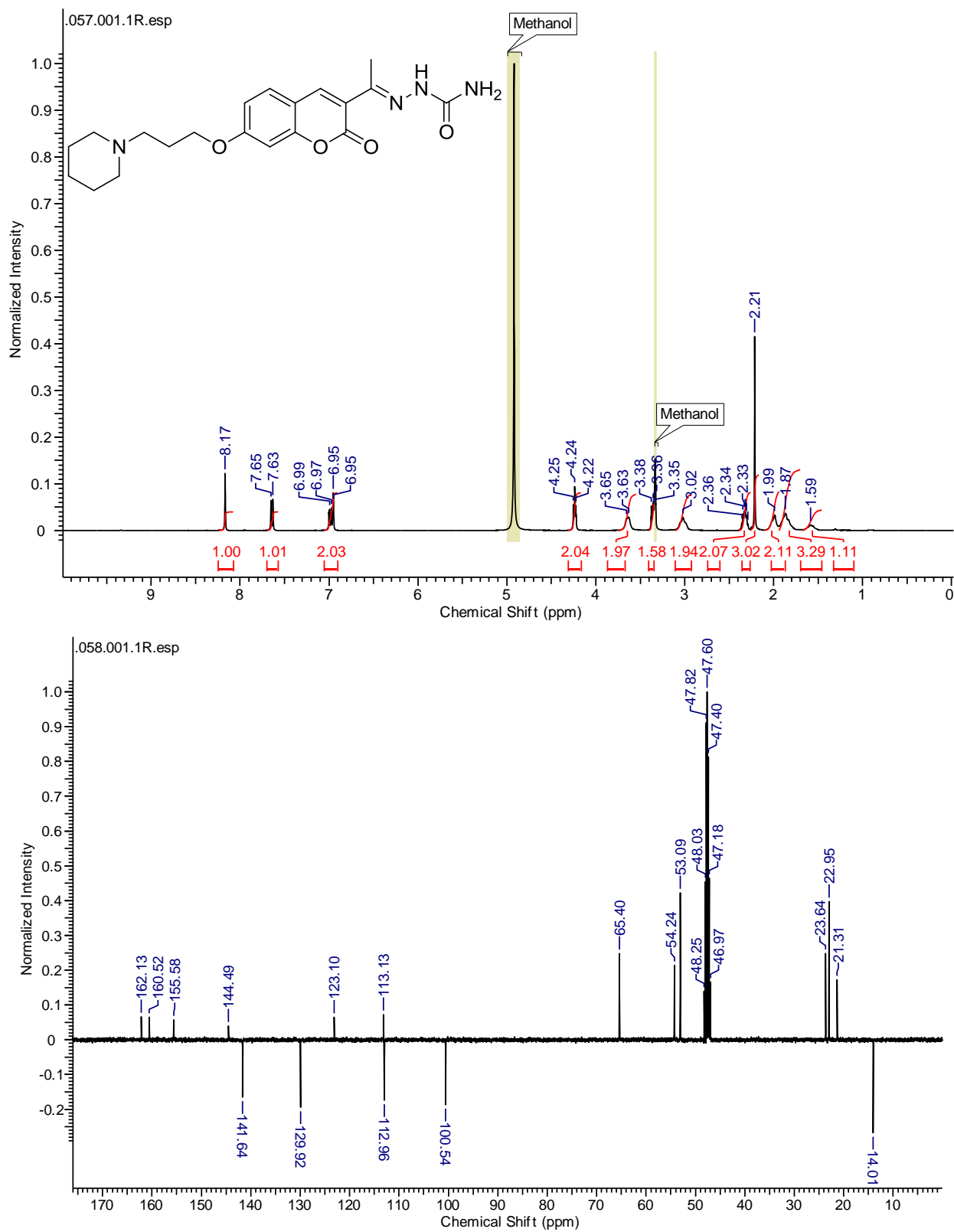


Fig S32. Espectros de RMN ¹H (400 MHz) e RMN ¹³C (100 MHz) de **60b** em MeOD.