

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

DISSERTAÇÃO

**Síntese e avaliação farmacológica de novas 3-(1,2,3-triazol)-
cumarinas planejadas para o tratamento da Doença de Alzheimer**

Nathalia Fonseca Nadur

2020



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

**SÍNTESE E AVALIAÇÃO FARMACOLÓGICA DE NOVAS 3-(1,2,3-
TRIAZOL)-CUMARINAS PLANEJADAS PARA O TRATAMENTO DA
DOENÇA DE ALZHEIMER**

NATHALIA FONSECA NADUR

Sob orientação do professor
Dr. Arthur Eugen Kümmerle

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

Seropédica, RJ
Fevereiro de 2020

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

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

N126s Nadur, Nathalia Fonseca, 1995-
Síntese e avaliação farmacológica de novas 3-(1,2,3
triazol)-cumarinas planejadas para o tratamento da
Doença de Alzheimer / Nathalia Fonseca Nadur. -
Seropédica, 2020.
181 f.: il.

Orientador: Arthur Eugen Kümmerle.
Dissertação(Mestrado). -- Universidade Federal Rural
do Rio de Janeiro, Química, 2020.

1. Alzheimer. 2. Cumarinas. 3. Inibidores de
colinesterásicos. 4. Inibidores de agregação de placas
?-amilóide. I. Kümmerle, Arthur Eugen, 1979-, orient. II
Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Química
III. Título.

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

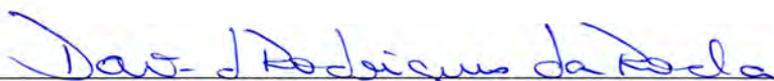
NATHALIA FONSECA NADUR

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

DISSERTAÇÃO APROVADA EM 05/02/2020



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



Prof. Dr. David Rodrigues da Rocha
(IQ-UFF)



Prof. Dr. Cedric Stephan Graebin
(IQ-UFRRJ)

AGRADECIMENTOS

Agradeço á Deus, que iluminou meu caminho e minha vida nesta jornada difícil me permitindo chegar até aqui.

Aos meus pais, Ana e Carlos Nadur, por sempre me incentivarem a me dedicar aos estudos, por me apoiarem nas minhas escolhas e por sempre me darem suporte no que fosse necessário para que eu pudesse concluir essa jornada.

Aos meus queridos irmãos Rodrigo e Letícia, por todo o incentivo e torcida.

As minhas amigas de republica Elaine, Stella, Gabriela e Sara por tornarem minha vida longe de casa mais divertida e suportável.

Ao meu orientador, Prof^o Dr. Arthur Eugen Kümmerle, por todo ensinamento, dedicação e orientação no decorrer desse trabalho e também por toda paciência, compreensão e incentivos nos momentos difíceis.

Aos professores do programa de pós-graduação, pela dedicação em ensinar. Em especial, a professora Rosane Nora Castro, pela ajuda sempre disponível.

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

A meus amigos do LaDMol-QM que acompanharam de perto o desenvolvimento deste trabalho e sempre que necessário me auxiliaram. Em especial, a Daiana, Luciana, Sabrina, Larissa, Lucas, Marina, Vitória, Gabriela, Thiago, Paula, Gleyton, Marcus, Bruno e Julieta pelos momentos compartilhados, permeados por alegrias, ansiedade e companheirismo.

Agradeço os professores membros da banca, por aceitarem dedicar parte de seu tempo para contribuição com este trabalho.

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

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

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

RESUMO

A Doença de Alzheimer (DA) caracteriza-se por ser um distúrbio neurodegenerativo progressivo e irreversível de memória e outras funções cognitivas, afetando o funcionamento ocupacional e social. O uso de compostos híbridos com potencial inibidor para mais de um alvo, como a enzima acetilcolinesterase (AChE) e a agregação de placas β -Amiloides ($A\beta$), vem sendo apontado como de grande valia para o tratamento da DA devido à possibilidade de inibir simultaneamente alvos que contribuem para a instalação e manutenção da doença. A AChE atua no controle dos níveis do neurotransmissor acetilcolina (ACh) na fenda sináptica, o qual está envolvido nos processos de aprendizagem e memória. A agregação de placas $A\beta$ é uma das principais responsáveis pela morte neuronal. Estudos recentes publicados pelo nosso grupo de pesquisa (LaDMol-QM) demonstraram o núcleo alquilamino-cumarina como um potencial inibidor da enzima AChE e agregação de placas $A\beta$. Esses resultados inspiraram a série planejada dos novos derivados 3-(1,2,3-triazol)-cumarínicos propostos nesse trabalho, baseando-se em requisitos estruturais presentes nestes inibidores alquilamino-cumarínicos, onde se propôs a avaliação de diferentes grupamentos alquilamino cíclico, a avaliação de diferentes tamanhos de cadeia alquílica entre o grupamento alquilamino e o núcleo cumarínico, a adição do grupamento 1,2,3-triazol com diferentes substituintes. Os compostos foram sintetizados em rendimentos de razoáveis a bons a partir das reações de: síntese da 7-hidroxycumarina, *O*-alquilação da 7-hidroxycumarina com uma série de dibrometos com diferentes tamanhos de cadeia, a bromação da posição 3 do núcleo cumarínico das 7-bromoalcoxi-cumarina, reação de acoplamento cruzado de Sonogashira a partir das 3-bromo-7-bromoalcoxi-cumarina, desproteção do grupamento trimetilsilila da 7-bromoalcoxi-3-((trimetilsilil)etenil)-cumarina, reação de cicloadição 1,3-dipolar catalisada por cobre (CuAAc), utilizando 3-etenil-7-bromoalcoxi-cumarina e azidas aromáticas, aminação da cadeia alquílica das 3-(1*H*-1,2,3-triazol-4- R_1)-7-(aminoalcoxi)-cumarina. Os compostos obtidos foram purificados e, então, caracterizados por técnicas espectroscópicas (RMN 1H e ^{13}C). Todos os compostos sintetizados foram capazes de inibir a AChE, ensaiados e apresentaram valores de CI_{50} variando de 0,006 a 4,79 μM .

PALAVRAS-CHAVE: Alzheimer, Cumarinas, Inibidores de colinesterásicos, Inibidores de agregação de placas β -amilóide.

ABSTRACT

Alzheimer's Disease (AD) is a progressive and irreversible neurodegenerative disorder, which affects memory and other cognitive functions, also affecting occupational and social aspects. Using hybrid compounds with inhibition potential to multiple targets, like acetylcholinesterase enzyme (AChE) and β -amyloid peptides plaques aggregation ($A\beta$), has been observed as a high value objective for AD treatment due to possibility to inhibit simultaneously different targets that contribute to installation and maintenance of the disease. AChE acts controlling levels of the neurotransmitter acetylcholine (ACh) in synaptic cleft, that plays a role in the processes of learning and memory developing. The aggregation of $A\beta$ plaques is one of the main responsible for neuronal death. Recent published studies by our research group (LaDMol-QM) revealed the alkylamino-coumarin nucleus as a potential inhibitor of AChE and $A\beta$ plaques aggregation. These results inspired a planned developing serie of new 3-(1,2,3-triazole)-coumarin derivatives purposed in this paper, based in structural aspects existent in those alkylamino-coumarin inhibitors, where it was purposed an evaluation of different cyclic alkylamino groups, also the evaluation of different sizes of alkyl chain between the alkylamino group and coumarin group, the addition of 1,2,3-triazole group with different substituents. The compounds were synthesized in yields reasonable to good from reactions of: synthesis of 7-hydroxycoumarin, *O*-alkylation of 7-hydroxycoumarin with a dibromides serie with different chain sizes, bromation of position 3 of coumarin nucleus of the 7-bromoalkoxy-coumarin, reaction of Sonogashira's cross-coupling from 3-bromo-7-bromoalkoxy-coumarin, deprotection of trimethylsilyl group of 7-bromoalkoxy-3-((trimethylsilyl)ethenyl)-coumarin, reaction of 1,3-dipolar cycloaddition copper catalyzed (CuAAC), using 3-ethenyl-7-bromo-alkoxy-coumarin and aromatic azides, amination of alkyl chain of 3-(1H-1,2,3-triazol-4, R_1)-7-(aminoalkoxy)-coumarin. The compounds were purified and then characterized by spectroscopic techniques (NMR 1H e ^{13}C). As a result, all synthesized compounds were able to inhibit AChE, based on assays and presented IC_{50} values from 0,006 to 4,79 μM .

KEY WORDS: Alzheimer, Coumarins, Cholinesterase inhibitors, β -Amyloid plaques aggregation inhibitors

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Formação dos peptídeos A β seguida do seu acúmulo para formar placas insolúveis de A β em cérebros portadores da DA (Adaptado de CHEIGNON et al., 2017).	3
Figura 2. Representação comparativa de neurônios saudáveis e de portadores da DA (com agregação de placas A β) (Adaptado de Alzheimer's Association, 2018).	4
Figura 3. Hiperfosforilação da P τ que causa dissociação dos microtúbulos, levando à formação de agregados de tau solúveis que, em última instância, formam emaranhados neurofibrilares que se agregam e depositam (Adaptado de CITRON, 2010).	5
Figura 4. Representação do ciclo da acetilcolina nos neurônios (Adaptado de Arquivo Bioqui, 2018). (a) colina acetiltransferase (ChAT); (b) acetilcolinesterase (AChE); (c) transportador de colina.	6
Figura 5. Mecanismos patológicos envolvidos na disfunção mitocondrial na DA (Adaptado de GODOY et al., 2014).	8
Figura 6. Comparação entre um cérebro saudável e um portador da DA (ALZHEIMER'S ASSOCIATION, 2017).	11
Figura 7. Inibidores da enzima acetilcolinesterase (AChE) aprovados para o tratamento de DA.	12
Figura 8. Estrutura do fármaco memantina, inibidor de receptores NMDA.	12
Figura 9. Representação estrutural de inibidores das enzimas β -secretase e da agregação de placas A β , que atualmente se encontram em fase clínica para o tratamento da DA.	13
Figura 10. Representação estrutural de compostos que atualmente se encontram em fase clínica para o tratamento da DA.	15
Figura 11. Representação da estrutura básica de uma cumarina.	15
Figura 12. Isômero 1,2,3-triazol e 1,2,4-triazol.	18
Figura 13. Mecanismo de reação de cicloadição 1,3-dipolar térmica.	19
Figura 14. Estrutura dos compostos 26, 27 e 28 utilizados como protótipos no planejamento estrutural.	22
Figura 15. Estrutura numerada da 7-hidroxi-cumarina (39) e multiplicidade dos sinais de H ₆ (duplo duplete) e H ₈ (duplete).	28
Figura 16. Efeito de ressonância entre a ligação dupla conjugada à carboxila do anel.	29
Figura 17. Produto de bis-alquilação oriundo das reações da umbeliferona com dibromobutano e dibromopentano.	31

Figura 18. Atribuição comparativa dos principais sinais dos compostos 7-bromoalcoxicumarínicos (38a-d) e 7-hidroxicumarina (39) nos espectros de RMN ^1H e ^{13}C .	32
Figura 19. Atribuição comparativa dos principais sinais dos compostos 7-bromoalcoxi-cumarínicos (38a-d) e 3-(bromo)-7-(bromoalcoxi)-cumarínicos (36a-d) nos espectros de RMN ^1H e ^{13}C .	35
Figura 20. Atribuição comparativa dos principais sinais dos compostos 7-(bromoalcoxi)-3-((trimetilsilil)etenil)-cumarínicos (45a-d) e 7-(bromoalcoxi)-3-(etenil)-cumarínicos (31a-e) nos espectros de RMN ^1H e ^{13}C .	45
Figura 21. Atribuição comparativa dos principais sinais dos compostos 3-(1 <i>H</i> -1,2,3-triazol-4- R_1)-7-(bromoalcoxi)-cumarinas (31a-e) e 3-(1 <i>H</i> -1,2,3-triazol-4- R_1)-7-(aminoalcoxi)-cumarinas (29a-k) nos espectros de RMN ^1H e ^{13}C .	49
Figura 22. Gráficos de Lineweaver-Burk da cinética de inibição em EeAChE (à esquerda) e EqBChE (à direita) do composto 29a.	55
Figura 23. Gráficos de Lineweaver-Burk da cinética de inibição em EeAChE (à esquerda) e EqBChE (à direita) do composto 29k.	55
Figura 24. Análise das principais interações moleculares entre o composto 29a, destaque em verde, e a cavidade enzimática da AChE. Figura gerada com PyMol 0.99 (DeLano Scientific LLC).	57
Figura 25. Análise das principais interações moleculares entre o composto 29b, destaque em laranja, e a cavidade enzimática da AChE, com sobreposição ao composto 29a, destaque em verde. Figura gerada com PyMol 0.99 (DeLano Scientific LLC).	58
Figura 26. Análise das principais interações moleculares entre o composto 29c, destaque em azul, e a cavidade enzimática da AChE, com sobreposição ao composto 29a, destaque em verde. Figura gerada com PyMol 0.99 (DeLano Scientific LLC).	59
Figura 27. Análise das principais interações moleculares entre o composto 29d, destaque em roxo, e a cavidade enzimática da AChE, com sobreposição ao composto 29a, destaque em verde. Figura gerada com PyMol 0.99 (DeLano Scientific LLC).	59
Figura 28. A) Análise da cavidade de acesso ao sítio catalítico da AChE com o composto 29a (verde) e 29e (rosa) ancorado. B) Análise das principais interações moleculares entre o composto 29e, destaque em rosa, e a cavidade enzimática da AChE, com sobreposição ao composto 29a, destaque em verde. Figura gerada com PyMol 0.99 (DeLano Scientific LLC).	60

Figura 29. Análise das principais interações moleculares entre o composto 29j, destaque em dourado, e a cavidade enzimática da AChE. Figura gerada com PyMol 0.99 (DeLano Scientific LLC).	61
Figura 30. Análise das principais interações moleculares entre o composto 29i, destaque em rosa, e a cavidade enzimática da AChE, com sobreposição ao composto 29j, destaque em verde. Figura gerada com PyMol 0.99 (DeLano Scientific LLC).	62
Figura 31. Análise das principais interações moleculares entre o composto 29k, destaque em ciano, e a cavidade enzimática da AChE. Figura gerada com PyMol 0.99 (DeLano Scientific LLC).	63
Figura 32. A) Análise das principais interações moleculares entre o composto 29k, destaque em ciano, e a cavidade enzimática da AChE, com sobreposição ao composto 29a, destaque em verde. B) Análise da superfície de Van der Waals com o composto 29a (verde) ancorado. C) Análise da superfície de Van der Waals com o composto 29k (ciano) ancorado. Figura gerada com PyMol 0.99 (DeLano Scientific LLC).	64

INDICE DE ESQUEMAS

Esquema 1. Esquema reacional de Perkin.	16
Esquema 2. Esquema reacional de Pechmann.	17
Esquema 3. Esquema reacional de Knoevenagel.	17
Esquema 4. Planejamento estrutural dos compostos 3-(1,2,3-triazol)-cumarínicos com farmacóforo de inibição da AChE e placas A β oriundos dos protótipos 26. Azul: farmacóforo responsável pela inibição da AChE; Vinho: farmacóforo responsável pela inibição da agregação de placas A β ;	23
Esquema 5. Análise retrossintética para obtenção dos compostos planejados.	25
Esquema 6. Síntese da 7-hidroxycumarina (39).	26
Esquema 7. Formação <i>in situ</i> do ácido formilacético (42) a partir do ácido málico.	26
Esquema 8. Esquema de intermediários proposto para formação da 7-hidroxycumarina (39) através da condensação de Pechmann (Adaptado de JOULE; MILLS, 2010).	27
Esquema 9. Síntese das 7-bromoalcoxi-cumarinas (38a-d).	30
Esquema 10. Esquema de intermediários proposto para formação dos derivados 7-bromoalcoxi-cumarínicos (38a-d) (Adaptado de CAREY; SUNDBERG, 2007).	31
Esquema 11. Síntese dos derivados 3-(bromo)-7-(bromoalcoxi)-cumarínicos (36a-d).	33
Esquema 12. Esquema de intermediários proposto para formação dos derivados 3-bromo-7-bromoalcoxi-cumarínicos (36a-d) (Adaptado de CLAYDEN et al., 2001).	34
Esquema 13. Síntese dos derivados 7-(bromoalcoxi)-3-((trimetilsilil)etenil)-cumarinas (45a-d).	36
Esquema 14. Esquema de intermediário proposto para reação acoplamento de Sonogashira para obtenção de 7-(bromoalcoxi)-3-((trimetilsilil)etenil)-cumarinas (45a-d) (Adaptado de SONOGASHIRA et al., 2002).	37
Esquema 15. Síntese dos derivados 7-(bromoalcoxi)-3-(etenil)-cumarínicos (39a-d).	39
Esquema 16. Esquema de intermediário proposto para a obtenção das 7-(bromoalcoxi)-3-(etenil)-cumarina (33a-d) (Adaptado de CLAYDEN et al., 2001).	40
Esquema 17. Síntese da azida (32a).	40
Esquema 18. Esquema de intermediários proposto para a formação do HONO (51) <i>in situ</i> (CLAYDEN et al., 2001).	41
Esquema 19. Esquema de intermediários proposto para a formação de sais diazônios (53) (CLAYDEN et al., 2001).	41

Esquema 20. Esquema de intermediários proposto para a obtenção da azida (41a) a partir do sal diazônico (Adaptado de BUTLER et al., 1998).....	42
Esquema 21. Síntese da azida (32b).	42
Esquema 22. Esquema de intermediários proposto para a obtenção da azida (32b) (Adaptado de SMITH & MARCH, 2007).....	42
Esquema 23. Síntese de 3-(1 <i>H</i> -1,2,3-triazol-4- R_1)-7-(bromoalcoxi)-cumarínicos (31a-e).....	43
Esquema 24. Mecanismo da CuAAC envolvendo ambos os complexos mono e bis acetilato de Cu(I) XIX e XX respectivamente, proposto para a obtenção dos compostos 3-(1 <i>H</i> -1,2,3-triazol-4- R_1)-7-(bromoalcoxi)-cumarínicos (31a-e) (Adaptado de BERTRAND et al., 2015).	44
Esquema 25. Síntese dos derivados 3-(1 <i>H</i> -1,2,3-triazol-4- R_1)-7-(aminoalcoxi)-cumarinas (29a-k).	46
Esquema 26. Esquema de intermediários proposto para formação dos derivados 3-(1 <i>H</i> -1,2,3-triazol-4- R_1)-7-(aminoalcoxi)-cumarinas (29a-k) (Adaptado de CLAYDEN et al., 2001). ...	48
Esquema 27. Reação ocorrida no ensaio de Ellman.....	50

INDICE DE TABELAS

Tabela 1. Características físicas, pontos de fusão e rendimentos dos compostos 7-bromoalcoxi-cumarínicos (38a-d).	30
Tabela 2. Características físicas, pontos de fusão e rendimentos dos compostos 3-(bromo)-7-(bromoalcoxi)-cumarínicos (36a-d).....	33
Tabela 3. Características físicas e rendimentos dos compostos 7-(bromoalcoxi)-3-((trimetilsilil)etenil)-cumarinas (45a-d).....	35
Tabela 4. Características físicas e rendimentos dos compostos 7-(bromoalcoxi)-3-(etenil)-cumarínicos (33a-d).....	39
Tabela 5. Características físicas e rendimento da síntese 3-(1 <i>H</i> -1,2,3-triazol-4- <i>R</i> ₁)-7-(bromoalcoxi)-cumarínicos (31a-e).....	43
Tabela 6. Características físicas, rendimentos obtidos para os compostos 29a-k.	47
Tabela 7. Resultados obtidos nos ensaios inibição enzimática frente à EeAChE e EqBChE. .	51
Tabela 8. Parâmetros cinéticos de 29a e 29k em AChE e BChE.	54
Tabela 9. Resultados de <i>score</i> e os respectivos valores de <i>CI</i> ₅₀ dos compostos avaliados.	56
Tabela 10. Quantidade de dibromoalcano (38a-d) utilizado nas reações de alquilação e tempos de reação.	69
Tabela 11. Quantidades de reagentes utilizados nas reações de bromação.	71
Tabela 12. Concentrações dos inibidores utilizados nos ensaios de estudo do mecanismo de inibição enzimática.	89

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

[S] – Concentração de substrato

ACh – Acetilcolina

AChE – Acetilcolinesterase

ACTI – Iodeto de acetiltiocolina

A β – beta-amiloide

A β DPs – degradação proteolítica por proteases degradantes de A β

ATP – trifosfato de adenosina

BACE1 – beta secretase 1

BChE – Butirilcolinesterase

BCTI – Iodeto de butiriltiocolina

BSA – Albumina Sérica Bovina

CCDA – Cromatografia em camada delgada analítica

CD₃Cl – Clorofórmio deuterado

CD₃OD – Metanol deuterado

ChAT – enzima colina acetiltransferase

CuAAC – reação de cicloadição 1,3-dipolar catalisada por Cobre (I)

DA – Doença de Alzheimer

DMSO-*d*6 – Dimetilsulfóxido deuterado

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

*Ee*AChE – Acetilcolinesterase de enguia elétrica

*Eq*BChE – Butirilcolinesterase de soro equino

ERO – espécies reativas de oxigênio

ERN – espécies reativas de nitrogênio

FDA – *Food and Drug Administration*

*h*AChE – Acetilcolinesterase de ser humano

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

IC₅₀ – Concentração inibitória média

IS – Índice de Seletividade

J – Constante de acoplamento

*K*_i – Constante de afinidade para inibição do tipo competitiva

*K*_i' – Constante de afinidade para inibição do tipo não-competitiva

K_m – Constante de Michaelis-Menten

LUMO - orbital molecular não ocupado de mais baixa energia (*Lowest inoccupied molecular orbital*)

NMDA – N-metil D-Aspartato

PDB – Protein Data Bank

Ph – Fenila

pH – Potencial Hidrogeniônico

PPA – Proteína Percussora da Amiloide

ppm – partes por milhão

Ptau – proteína Tau

RMN – Ressonância Magnética Nuclear

RMN ^{13}C – Ressonância Magnética Nuclear de Carbono 13

RMN ^1H – Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio

RuAAC - - reação de cicloadição 1,3-dipolar catalisada por Rutênio

SEAr – Substituição Eletrofílica Aromática

SN_2 – Substituição Nucleofílica Bimolecular

SNC – Sistema nervoso central

v – Velocidade

V_{max} – Velocidade máxima

δ – deslocamento químico

λ – comprimento de onda

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
1.1 Doença de Alzheimer	1
1.2 Marcadores Bioquímicos	2
1.2.1 Hipótese amiloide	2
1.2.2 Hipótese da Proteína Tau	4
1.2.3 Hipótese Colinérgica	5
1.2.4 Hipótese do estresse oxidativo	7
1.2.5 Hipótese dos metais	7
1.2.6 Hipótese mitocondrial	8
1.2.7 Hipótese da neuroinflamação	9
1.2.8 Hipótese Glutamatérgica	10
1.2.9 Morte neuronal	10
1.3 Tratamento da doença de Alzheimer	11
1.3.1 Tratamento sintomático	11
1.3.2 Tratamento com Efeitos Potencialmente Modificadores da Doença	12
1.4 Cumarinas e suas propriedades	15
1.4.1 Reação de Perkin	16
1.4.2 Reação de Pechmann	16
1.4.3 Reação de Knoevenagel	17
1.5 Triazol e suas propriedades	17
1.5.1 Síntese de 1,2,3-triazol via cicloadição 1,3-dipolar	18
2. OBJETIVOS	21
2.1. Objetivos gerais	21
2.2. Objetivos específicos	21
2.3. Planejamento Estrutural dos compostos 3-(1,2,3-triazol)-cumarinas	21
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	24
3.1. Planejamento sintético dos compostos	24
3.2 Síntese da 7-hidroxicumarina (39)	25
3.2. Reação de <i>O</i>-alquilação da 7-hidroxicumarina (38a-d)	29
3.3. Reação de bromação na posição 3 do núcleo cumarínico (36a-d)	32
3.4. Síntese de 7-(bromoalcoxi)-3-((trimetilsilil)etenil)-cumarinas (45a-d)	35

3.5.	Síntese de 7-(bromoalcoxi)-3-(etenil)-cumarinas (33a-d)	38
3.6.	Síntese das azidas (32a-b)	40
3.7.	Síntese de 3-(1 <i>H</i> -1,2,3-triazol-4- <i>R</i> ₁)-7-(bromoalcoxi)-cumarínicos (31a-e)	43
3.8.	Síntese das 3-(1 <i>H</i> -1,2,3-triazol-4- <i>R</i> ₁)-7-(aminoalcoxi)-cumarinas (29a-k)	46
3.9.	Resultados de atividade inibitória dos compostos obtidos frente à AChE e BChE.....	50
3.10.	Resultados dos ensaios do mecanismo de inibição enzimática.....	52
3.11.	Resultados dos ensaios de interação enzimática <i>in silico</i>	56
4.	CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS	65
5.	METODOLOGIA	67
5.1.	Síntese da 7-hidroxycumarina (39)	67
5.2.	<i>O</i> -Alquilação da 7-hidroxycumarina (38a-d)	68
5.3.	Bromação da posição 3 do núcleo cumarínico (36a-d)	71
5.4.	Síntese da 7-(bromoalcoxi)-3-((trimetilsilil)etenil)-cumarinas (45a-d)	73
5.5.	Síntese de 3-(etenil)-(7-bromoalcoxi)-cumarinas (33a-d)	76
5.6.	Síntese das azidas (32a-b)	76
5.7.	Síntese de 3-(1 <i>H</i> -1,2,3-triazol-4- <i>R</i> ₁)-7-bromoalcoxi-cumarínicos (31a-e).....	77
5.8.	Síntese da 3-(1 <i>H</i> -1,2,3-triazol-4- <i>R</i> ₁)-7-(aminoalcoxi)-cumarinas (29a-k)	80
5.9.	Teste <i>in vitro</i> da atividade anticolinesterásica dos derivados cumarínicos	87
5.10.	Estudo do mecanismo de inibição enzimática	88
5.11.	Ensaios de interação enzimática <i>in silico</i>	89
6.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	90
7.	ANEXOS	108

1. INTRODUÇÃO

1.1 Doença de Alzheimer

A doença de Alzheimer (DA) é assim denominada por sugestão de Emil Kraepelin em referência ao médico alemão Alois Alzheimer (KRAEPELIN, 1915), que desde 1901 vinha documentando em detalhes os sintomas e o progresso da degeneração mental em uma paciente de 51 anos de nome Auguste Deter. Após sua morte, o exame anatômico revelou uma atrofia difusa de todo o cérebro e alterações características nas suas estruturas internas, como a formação de placas amiloides e feixes densos de fibrila, que atualmente sabemos que são as principais características da doença (MÖLLER, 1998). Alzheimer então publicou esse caso de demência pré-senil em 1907, onde pela primeira vez, foram descritas alterações nos emaranhados neurofibrilares (CAIXETA, 2012).

A doença de Alzheimer (DA) é uma forma de demência, representando o caso mais frequente entre as doenças neurodegenerativas, estando relacionada a 50-60% destes casos. (ALZHEIMER'S DISEASE INTERNATIONAL, 2019). Com o incontestável aumento da população idosa no Brasil e no mundo, a incidência de doenças crônicas e cognitivas, como o Alzheimer, cresce significativamente. O número de casos de demência aumenta expressivamente com a idade, de modo que em pessoas de 60 a 64 anos a prevalência de demência é inferior a 1% dos indivíduos, porém a partir dos 65 anos, a probabilidade de desenvolver a doença duplica a cada cinco anos, de modo que em pessoas com 85 anos ou mais a incidência está entre 24% a 33% dos pacientes (FERRI et al., 2006). Alguns dados publicados em 2016 relatavam que mais de 47 milhões de pessoas possuem algum tipo de demência. A estimativa é que nos próximos 20 anos esse número deve duplicar, atingindo 82 milhões de pessoas em 2030 e 152 milhões em 2050, devido ao aumento previsto da expectativa de vida (PRINCE et al., 2016; WHO, 2019).

A DA é uma doença degenerativa e progressiva, de aparecimento insidioso, em que há deterioração das funções cognitivas de modo superior ao que seria esperado pelo envelhecimento normal. Ela compromete a memória, orientação, capacidade de julgamento, compreensão, aprendizagem, linguagem, raciocínio e a capacidade de realizar atividades cotidianas, além, de causar diretamente, grandes impactos na vida dos cuidadores e familiares dos portadores desta síndrome (WHO, 2019).

Embora tenha sido descoberta há bastante tempo, foi nos últimos 30 anos que a doença recebeu maior enfoque, surgindo uma série de conceitos relacionados à evolução da doença e métodos terapêuticos, permitindo diagnósticos mais precoces, mesmo permanecendo

desconhecida a ordem exata das alterações que ocorrem no cérebro para desencadear a doença (CAIXETA, 2012).

1.2 Marcadores Bioquímicos

A DA é uma doença multifatorial, ou seja, causada pela interação de múltiplos mecanismos patogênicos. No entanto, a forma como se originam e como esses fatores contribuem para prejudicar as funções neuronais e a manutenção da doença, continuam indefinidos. Observações a nível microscópico permitiram identificar nas estruturas do lobo temporal medial e áreas corticais do cérebro, que as lesões características de DA são a ocorrência de placas senis (ou neurítica) e emaranhados neurofibrilares, juntamente com a degeneração dos neurônios e das sinapses. Dentre os diversos mecanismos patogênicos que estão envolvidos nessas mudanças, os que possuem maior enfoque incluem a deposição β -amiloide ($A\beta$) composta por peptídeos e a deposição de placas; emaranhados neurofibrilares intracelulares associados à hiperfosforização da proteína *Tau* (PTau); a proeminente neuroinflamação de células gliais próximas; disfunção neurovascular, estresse oxidativo, alterações do ciclo celular, disfunção mitocondrial, disfunção colinérgica, perda sináptica e morte neuronal específica (LUO; RODINA; CHIOSIS, 2008). No entanto nenhuma dessas hipóteses é capaz de explicar de forma independente as condições patológicas observadas na DA (RAJASEKHAR; GOVINDARAJU, 2018).

1.2.1 Hipótese amiloide

Dentre as hipóteses, a amiloídica é a mais aceita e está intimamente correlacionada com os sintomas da doença da DA que abrangem todas as hipóteses da doença, fazendo com que as placas amiloides sejam consideradas os biomarcadores ideais para o desenvolvimento de um diagnóstico precoce da DA (RAJASEKHAR; GOVINDARAJU, 2018). O peptídeo β -amiloide ($A\beta$) é o principal componente dos depósitos de amiloide extracelular do cérebro de portadores de DA e estão particularmente presentes na região do hipocampo, córtex cerebral, córtex entorrinal e o estriado ventral, as quais são responsáveis pelas funções cognitivas, e é gerado a partir da clivagem enzimática sequencial da proteína percussora de amiloide (PPA), havendo variação no comprimento do fragmento gerado, sendo ele de 39 a 42 aminoácidos (LUO; RODINA; CHIOSIS, 2008). Embora não se possa dizer com clareza a função fisiológica da PPA, ela parece exercer um papel importante no desenvolvimento do cérebro, na regulação da atividade da proteína G_0 , na memória e na plasticidade sináptica

(NALIVAEVA; TURNER, 2013). O mecanismo de clivagem proteolítica da PPA pode ocorrer por duas vias, a via não amiloidogênica e a via amiloidogênica. Segundo a hipótese de cascata amiloide, os peptídeos A β seriam o produto de uma via secundária do metabolismo do PPA, que possui neurotoxicidade e podem gerar a produção de placas senis, resultando em morte celular (HARDY e HIGGINS, 1992). Segundo essa hipótese, duas secretases, a β -secretase e a γ -secretase, clivam a PPA em diferentes lugares, originando fragmentos de peptídeos A β de diferentes tamanhos, principalmente com 40 e 42 resíduos (LEVY et al., 1990; CHEIGNON et al., 2017), onde o peptídeo A β_{1-40} teria a capacidade de interagir com íons metálicos presentes no cérebro e formar oligômeros e, em seguida, as fibrilas, encontradas nas placas amiloides (Figura 1). Embora o fragmento de A β_{1-40} seja o mais comum, atualmente é considerado que o fragmento A β_{1-42} , mais hidrofóbico, possua maior potencial amiloidogênico, apesar de ambos serem capazes de agregar e originar fibrilas e placas insolúveis (CHEIGNON et al., 2017).

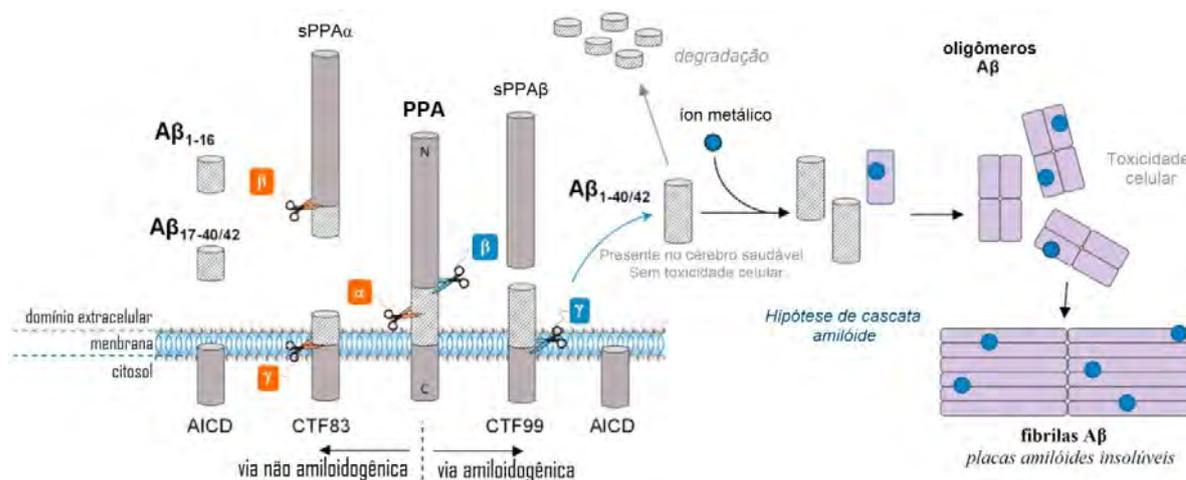


Figura 1. Formação dos peptídeos A β seguida do seu acúmulo para formar placas insolúveis de A β em cérebros portadores da DA (Adaptado de CHEIGNON et al., 2017).

No cérebro saudável a A β sofre uma degradação proteolítica por proteases degradantes de A β (A β DPs), responsável por regular os níveis de A β no cérebro (SAIDO; LEISSRING, 2012). Entretanto, na DA os fragmentos se acumulam para formar placas insolúveis de A β (Figura 2). (CHEIGNON et al., 2017).

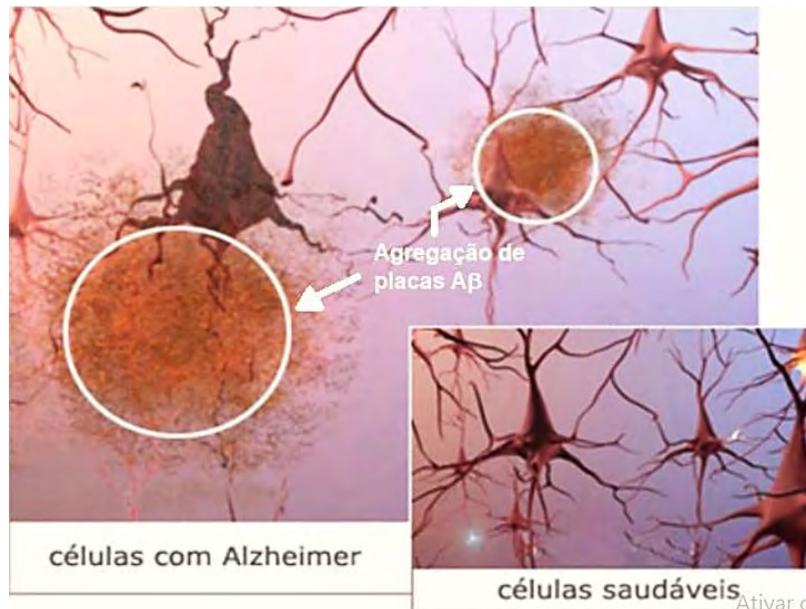


Figura 2. Representação comparativa de neurônios saudáveis e de portadores da DA (com agregação de placas A β) (Adaptado de Alzheimer's Association, 2018).

1.2.2 Hipótese da Proteína Tau

A hipótese da Tau na DA tem sua base patológica na hiperfosforilação da proteína Tau (PTau) que leva à desintegração de microtúbulos e a subsequente agregação intracelular de PTau para formar emaranhados neurofibrilares intracelulares (ENF) (RAJASEKHAR; GOVINDARAJU, 2018). A proteína Tau está associada ao microtúbulo (MAP), e atua modulando a estabilidade dos microtúbulos, em especial os microtúbulos axonais, já que a proteína tau é predominantemente encontrada nos axônios dos neurônios, sendo sua fosforilação fundamental para a estabilidade da função desses neurônios. No entanto, em portadores de DA, observa-se uma fosforilação descontrolada levando a desintegração dos microtúbulos, que formam os filamentos que se agregam intracelularmente, formando filamentos helicoidais emparelhados, que se depositam e atuam como barreiras físicas ao transporte axonal, prejudicando a transmissão sináptica (Figura 3) (LUO; RODINA; CHIOSIS, 2008; GOEDERT, 2004).

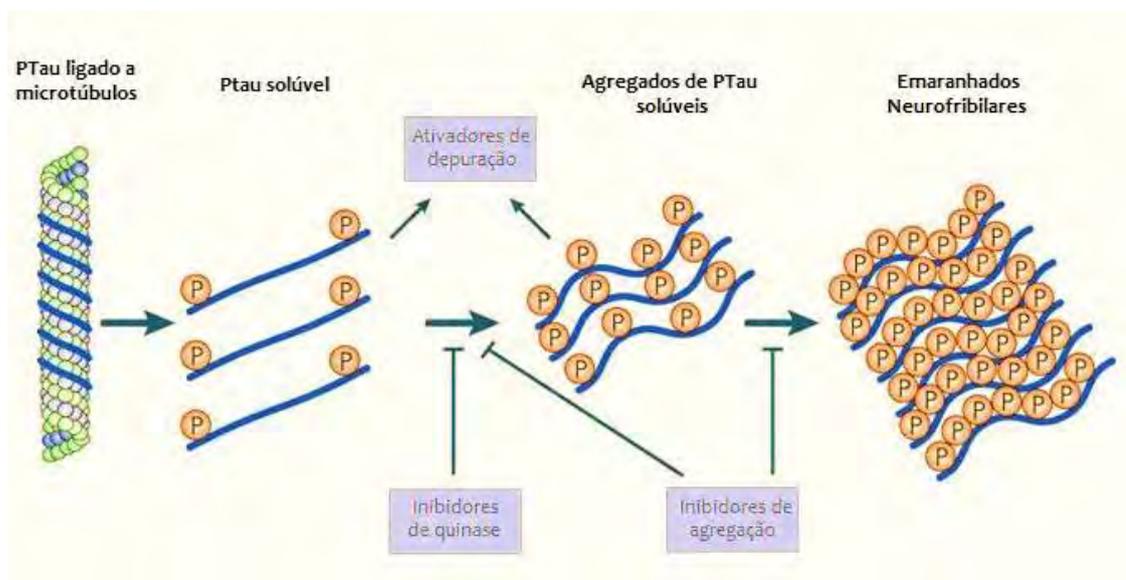


Figura 3. Hiperfosforilação da P τ que causa dissociação dos microtúbulos, levando à formação de agregados de tau solúveis que, em última instância, formam emaranhados neurofibrilares que se agregam e depositam (Adaptado de CITRON, 2010).

1.2.3 Hipótese Colinérgica

Em nível molecular, a hipótese colinérgica foi a primeira e mais estudada abordagem que descreve a fisiopatologia da DA. É definida como um processo degenerativo primário capaz de danificar seletivamente grupos de neurônios colinérgicos no hipocampo e no neocórtex, causados pela degeneração dos neurônios colinérgicos nos núcleos do prosencéfalo basal. As regiões do hipocampo e neocórtex desempenham papéis funcionais importantes na consciência, atenção, aprendizagem, memória e outros processos cognitivos. (SANABRIA et al., 2018; TERRY; BUCCAFUSCO, 2003). Como consequência da neurodegeneração, é observada redução da atividade de neurônios colinérgicos, aqueles que utilizam o neurotransmissor ACh. Essa hipótese levou ao desenvolvimento de uma abordagem terapêutica baseada em inibidores da acetilcolinesterase (*iAChE*) capazes de restabelecer a função colinérgica pelo bloqueio da acetilcolinesterase (AChE), que é a enzima responsável pela hidrólise da acetilcolina na fenda sináptica, aumentando consequentemente a disponibilidade do neurotransmissor ACh. (FERRI et al., 2006).

A biossíntese da ACh (**1**) se dá pela ação da enzima colina acetiltransferase (ChAT), a partir da ação da colina e da acetil CoA, sendo então mantida armazenada em vesículas sinápticas antes de ser liberada na fenda sináptica. Após sua liberação, a ACh pode seguir por duas vias, ou se ligando ao receptor colinérgico no neurônio pró-sináptico ou ser degradada pela enzima acetilcolinesterase (AChE), gerando como produtos um íon acetato (**3**) e um íon

de colina (2). Uma vez degradada, a molécula de colina é transportada para o neurônio pré-sináptico, pelos terminais axonais através de um transportador específico dependente de Na^+ (transportador de colina), sendo então utilizada na síntese de uma nova molécula de ACh (Figura 4) (FRANCIS et al., 1999).

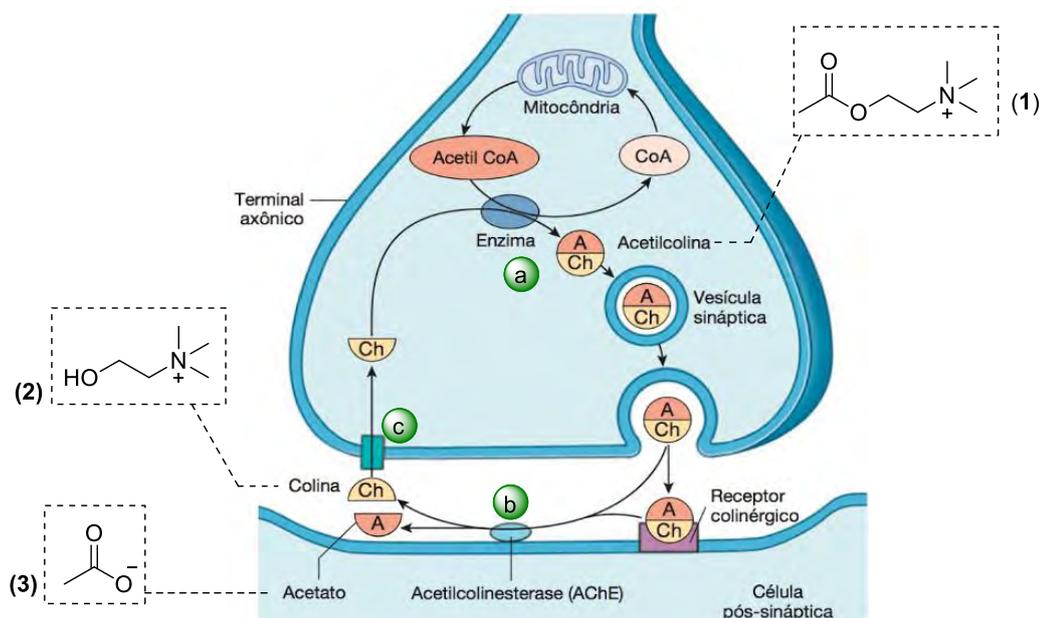


Figura 4. Representação do ciclo da acetilcolina nos neurônios (Adaptado de Arquivo Bioqui, 2018). (a) colina acetiltransferase (ChAT); (b) acetilcolinesterase (AChE); (c) transportador de colina.

A enzima butirilcolinesterase (BChE) é outra enzima capaz de degradar o neurotransmissor ACh, porém em menores proporções em relação a AChE. Em um cérebro de adultos saudáveis, a AChE é responsável por 80% da atividade das colinesterases (ChE), com o BChE sendo responsável pelo restante (JING et al., 2018). A BChE, também conhecida como pseudocolinesterase ou colinesterase plasmática, é produzida pelo fígado e está presente principalmente no plasma sanguíneo (ASTORINO et al., 2017).

Pesquisas indicam que a quantidade de AChE no cérebro diminui com a progressão da DA. No entanto, a atividade enzimática da BChE permanece inalterada ou até aumenta, e pode compensar a perda de AChE. Estudos com camundongos geneticamente modificados, com desativação da AChE, mostraram que os mesmos não sofreram hiperativação colinérgica na ausência desta enzima, indicando que a hidrólise da ACh foi controlada pela BChE (MESULAM et al., 2002). Além deste, outros relatos mostram uma correlação positiva entre inibição seletiva da BChE, melhor desempenho cognitivo e aquisição de memória (FURUKAWA-HIBI et al., 2011; MAURICE et al., 2016). Portanto, a inibição da atividade

da BChE pode ser benéfica como uma abordagem curativa da DA, sendo esta colinesterase considerada um potencial alvo terapêutico na DA avançada (JING et al., 2018).

A AChE não está envolvida apenas com o controle dos níveis de ACh, ela também serve como um importante cofator para a agregação do peptídeo A β , induzindo alterações conformacionais e bioquímicas em solução e acelerando sua fibrilogênese. Adicionalmente, os complexos AChE-A β exibem uma neurotoxicidade consideravelmente maior em comparação com os peptídeos A β livres (QUINN, 1987; ALVAREZ et al., 1998), além também de serem capazes de acelerar sua agregação, levando a formação das fibrilas típicas da DA (HAN;HE, 2018).

1.2.4 Hipótese do estresse oxidativo

O oxigênio é fundamental para o funcionamento de todas as células vivas do nosso organismo (UTTARA et al., 2009), assim como as espécies reativas de oxigênio (ERO) e de nitrogênio (ERN) quando possuem geração e homeostase controlada, desempenham um papel central na sinalização celular e na luta contra infecções (SIES, 2015). Entretanto, quando ocorre o desequilíbrio entre a homeostase pró-oxidante / antioxidante, o aumento da geração de ERO/ERN e radicais livres provocam estresse e danos oxidativos nas células (UTTARA et al., 2009). Como o cérebro possui um maior consumo de oxigênio em relação aos demais órgãos do corpo, ele se torna altamente vulnerável ao estresse oxidativo, que ocasiona ações danosas às funções fisiológicas normais e posteriormente a morte neuronal (RAJASEKHAR; GOVINDARAJU, 2018).

Nas condições fisiopatológicas da DA é muito comum observar níveis elevados de ERO, e várias vias são responsáveis por induzir essas condições celulares altamente desfavoráveis, de modo a estar intrinsecamente correlacionado as outras hipóteses da DA, como agregação A β , metais e disfunção mitocondrial (RAJASEKHAR; GOVINDARAJU, 2018).

1.2.5 Hipótese dos metais

A hipótese dos metais na DA baseia-se na instabilidade homeostática de íons metálicos (Cu, Fe, Zn e Al) observada no cérebro de portadores de DA (RAJASEKHAR; GOVINDARAJU, 2018). As altas concentrações desses biometais no cérebro promovem suas interações com a placa A β levando à produção de agregados tóxicos. 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). Assim os metais redox-ativos ligados a A β , como Cu-A β e Fe-A β , demonstraram estabilizar as formas oligoméricas dos peptídeos A β (LEE et al., 2017), além de estarem diretamente envolvidos na formação de espécies reativas de oxigênio (ERO), o que resulta em estresse oxidativo que leva a morte neuronal (SAVELIEFF et al., 2013).

1.2.6 Hipótese mitocondrial

Já a hipótese mitocondrial é baseada na disfunção mitocondrial, onde se observa a redução do ATP, que prejudica as atividades das enzimas da cadeia de transporte de elétrons (CTE), geração de espécies reativas de oxigênio (ERO), redução do DNA mitocondrial (mtDNA) e liberação da caspase 3 (WU; CHENG; JIANG, 2019). As mitocôndrias exercem varias funções essenciais para o funcionamento celular, como a produção de energia derivada de nutrientes através da fosforilação oxidativa aeróbica (OXPHOS), homeostase do cálcio, produção e eliminação de íons livres, plasticidade sináptica e apoptose (HALLIWELL E GUTTERIDGE, 2015). Desta forma, como os neurônios necessitam de muita energia e possuem capacidade glicolítica limitada, a disfunção mitocondrial provoca efeitos nocivos para o desenvolvimento dos neurônios (WU; CHENG; JIANG, 2019).

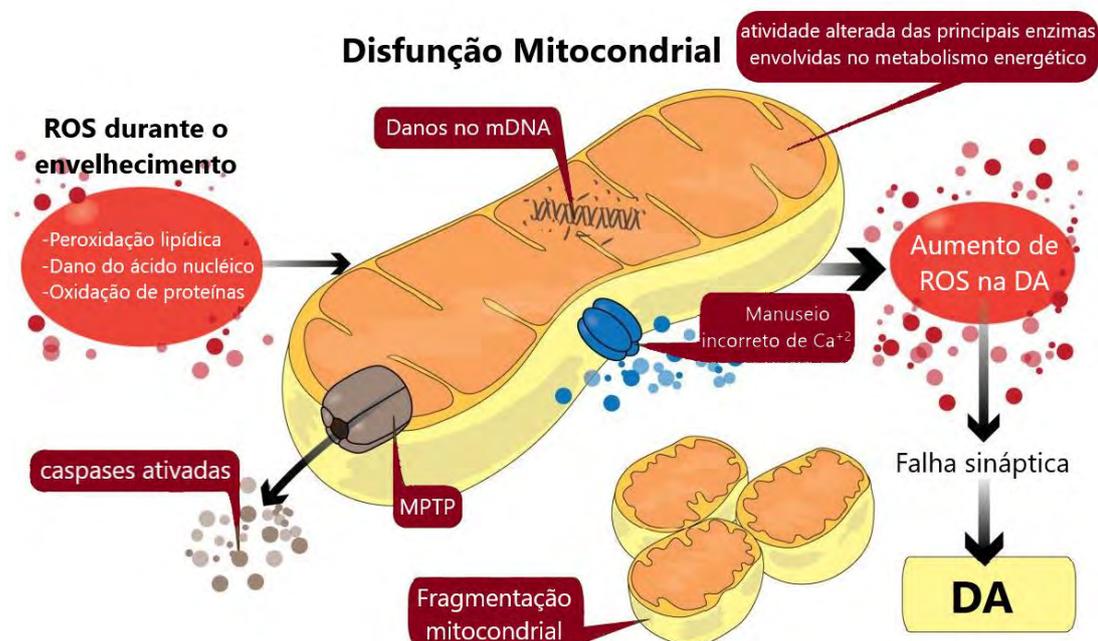


Figura 5. Mecanismos patológicos envolvidos na disfunção mitocondrial na DA (Adaptado de GODOY et al., 2014).

A correlação entre a disfunção mitocondrial e o estresse oxidativo surge a partir da alta dependência da OXPHOS para suprir as necessidades energéticas dos neurônios, já que OXPHOS é uma importante fonte de radicais livres endógenos tóxicos, como o peróxido de

hidrogênio (H_2O_2), radical hidroxil (HO^{\bullet}) e radicais superóxido ($O_2^{\bullet-}$). Como na disfunção mitocondrial temos a interrupção da CTE, os elétrons se acumulam e se envolvem em uma série de reações que indiretamente levam a um aumento de radicais livres. Deste modo, o excesso de radicais livres se sobrepõe a capacidade neuronal de neutralizá-las, promovendo o estresse oxidativo e assim o dano neuronal. Essas espécies reativas geradas pelas mitocôndrias ainda atuam em diversos alvos celulares, incluindo os próprios componentes mitocôndriais (lipídios, proteínas e DNA) (MOREIRA et al., 2010). Outra correlação proposta é entre a disfunção mitocondrial e a PTau, onde já foi demonstrado que a superexpressão e a deposição de seus agregados prejudicam a função mitocondrial, sobretudo através da diminuição da produção de ATP e do aumento do estresse oxidativo, o que leva à disfunção sináptica na DA (CHENG; BAI, 2018).

1.2.7 Hipótese da neuroinflamação

A neuroinflamação é oriunda da resposta de determinadas células especializadas no cérebro, como das células microgliais e os astrócitos (PARIHAR; HEMNANI, 2004), e atuam como mecanismo de defesa natural contra os agentes patogênicos invasores ou nocivos, de modo a iniciar sua degradação e eliminação (KNEZEVIC; MIZRAHI, 2018). No entanto, sua ativação pode ter efeitos prejudiciais no caso das doenças neurodegenerativas, onde se torna responsável pela remoção das células danificadas ou mortas (ROGERS; LUE, 2001). Acredita-se que na DA os depósitos amiloides (placas senis e emaranhados neurobrilares) e neurônios danificados ou mortos ativam a micróglia, que começa a produzir mediadores pró-inflamatórios como citocinas, quimiocinas, espécies reativas de oxigênio (ERO) e radicais livres tóxicos, os quais induzem a micróglia aos seus processos de eliminação através de fagocitose e secreção de enzimas proteolíticas que degradam as células neuronais, o que contribui para a morte neuronal (KNEZEVIC; MIZRAHI, 2018).

Os astrócitos são células gliais que produzem uma série de citocinas pró-inflamatórias as quais atuam como reguladoras dos processos inflamatórios do sistema nervoso central (SNC), sendo importante para a fagocitose e remoção de placas $A\beta$ (MARTIN-JIMÉNEZ et al, 2016). No entanto, sob condições de estresse oxidativo ocorre a perda de suas funções homeostáticas normais, o que leva a uma acúmulo dos astrócitos em sítios de placas $A\beta$, que intensifica a liberação dos reguladores pró-inflamatórios, levando a aumento das funções tóxicas e causando um prolongamento da neuroinflamação (BROWN; BAL-PRICE, 2003).

1.2.8 Hipótese Glutamatérgica

De acordo com essa hipótese, também conhecida como excito-tóxica, a excitotoxicidade glutamato-dependente pode constituir um dos mecanismos patogênicos necessários para a manutenção e amplificação do processo neurodegenerativo (GREENAMYRE; YOUNG, 1989). O neurotransmissor glutamato, que é o principal neurotransmissor excitatório do sistema nervoso central, tem sua atividade mediada por receptores de três tipos: de *N*-metil-d-Aspartato (NMDA), do ácido α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolepropiónico (AMPA) e de cianeto. Segundo a hipótese glutamatérgica, em condições específicas, tais como, a alteração do metabolismo energético celular, ocorre uma excessiva ativação de receptores de NMDA. Uma vez que o glutamato alcance os receptores NMDA das células de superfície, pode ocorrer uma alteração na homeostase de cálcio, o levando a fluir livremente para dentro da célula, uma vez aumentada a concentração de cálcio no meio intracelular, este pode provocar o processo de apoptose (degeneração e morte) neuronal (MÖBIUS; STÖFFLER, 2002). E uma vez que o glutamato liberado ative os receptores de AMPA e de cianeto, promoveria uma despolarização da célula por meio da entrada de íons Na^+ e Ca^{2+} . A despolarização parcial da membrana plasmática provocada pela a entrada desses íons leva a remoção do bloqueio promovido pelos íons Mg^{2+} dentro do canal do receptor de NMDA, que culmina na entrada de mais Ca^{2+} e Na^+ no neurônio, contribuindo para a sua excitabilidade (BARNARD, 1997).

1.2.9 Morte neuronal

A morte neuronal é um evento presente nos portadores da DA e ocorre nas regiões específicas do cérebro que são afetadas pelos eventos descritos (Figura 6). Essas regiões são as responsáveis pelas funções cognitivas e abrangem o córtex cerebral, o hipocampo, o córtex entorrinal e o estriado ventral (SELKOE, 2001).

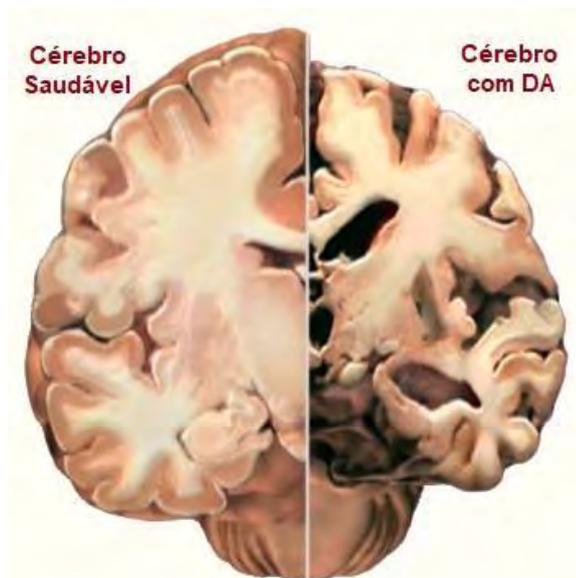


Figura 6. Comparação entre um cérebro saudável e um portador da DA (ALZHEIMER'S ASSOCIATION, 2017).

1.3 Tratamento da doença de Alzheimer

As pesquisas voltadas a entender os mecanismos patológicos e o desenvolvimento de fármacos para a doença de Alzheimer vêm aumentando nas últimas décadas. No entanto, atualmente, os fármacos disponíveis no mercado se baseiam somente no controle dos sintomas, ou seja, não diminuem ou param as alterações cerebrais que causam a DA. Diversas abordagens terapêuticas são aplicadas no tratamento dos sintomas comportamentais como, agitação, depressão, alucinações e delírios, que são mais frequentes com a progressão da doença (RANG et al., 2012). Avanços da pesquisa na patogênese molecular da DA também têm levado a novos candidatos a fármacos como potenciais modificadores da doença, que agora vêm sendo utilizado em ensaios clínicos (FERRI et al., 2006).

1.3.1 Tratamento sintomático

Atualmente, os inibidores da colinesterase, como a Tacrina (4), Rivastigmina (5), Donepezila (6) e Galantamina (7) (Figura 7) e um antagonista do receptor NMDA, a Memantina (8) são os únicos fármacos aprovados para o tratamento da DA.

A abordagem terapêutica para melhorar a neurotransmissão colinérgica é baseada no aumento da disponibilidade de ACh pela inibição da AChE, a enzima que degrada a acetilcolina na fenda sináptica (FERRI et al., 2005). Dos inibidores de AChE destacados (Figura 7), a Tacrina (4) foi o primeiro inibidor reversível utilizado para tratamento de DA apresentando, no entanto, uma alta hepatotoxicidade, o que vem fazendo com que a síntese de

derivados da Tacrina (**4**) seja o alvo de muitas pesquisas, na tentativa de diminuir a toxicidade, sem perder atividade como *iAChE*. A Rivastigmina (**5**) não é muito seletiva, de modo que inibe com afinidades muito semelhantes tanto a AChE quanto a BChE, já a Donepezila (**6**) e Galantamina (**7**) são inibidores seletivos de AChE, mas ainda possuem efeitos adversos associados (LIU et al., 2017).

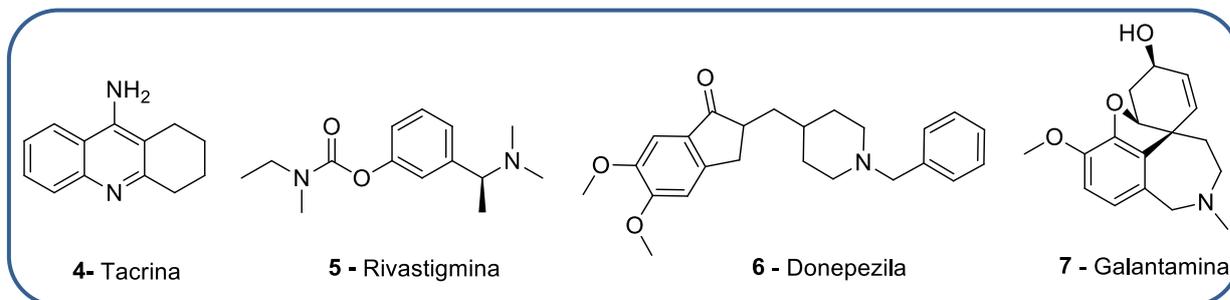


Figura 7. Inibidores da enzima acetilcolinesterase (AChE) aprovados para o tratamento de DA.

O outro fármaco utilizado, a memantina (**8**) (Figura 8), que foi aprovado para uso clínico em 2003 e é prescrito principalmente para estágios mais avançados da doença. A abordagem terapêutica da memantina (**8**) segue a hipótese glutamatérgica e age inibindo os receptores NMDA (FALCO et al., 2016).

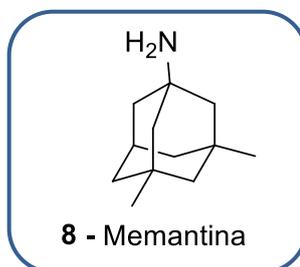


Figura 8. Estrutura do fármaco memantina, inibidor de receptores NMDA.

1.3.2 Tratamento com Efeitos Potencialmente Modificadores da Doença

Atualmente, não existe nenhum fármaco aprovado que atue sob essa abordagem terapêutica para o tratamento de DA, porém, existem alguns candidatos a fármacos em fase clínica (LIU et al., 2017).

Dentro do contexto amiloidogênico alguns dos alvos explorados são as enzimas β - e γ -secretases, por desempenharem papel essencial na formação de agregados de peptídeos A β (GODYŃ et al., 2016; LIU et al., 2017). Um exemplo disso é o Umibecestat (CNP520) (**9**) (Figura 9), desenvolvido pela empresa farmacêutica Novartis, que é um inibidor de BACE1. BACE1 é a enzima de clivagem da proteína precursora β -amiloide 1, que é uma proteína transmembranar de tipo 1, sendo a enzima com atividade β -secretase (VASSAR et al., 1999).

Ao inibir a BACE1, o CNP520 bloquearia a via amiloidogênica na sua iniciação, interrompendo potencialmente todos os processos subsequentes, em particular a produção de peptídeos A β potencialmente tóxicos (NEUMANN et al., 2018). Recentemente, o CNP520 foi descontinuado após o teste clínico fase II/III.

Vale ressaltar que outros compostos inibidores de BACE1 vêm sendo descontinuados nas fases clínicas, como por exemplo, o Elenbecestat (E2609) (**10**) e o Verubecestat (MK-8931) (**11**). Os motivos variam entre não apresentarem efetiva diminuição dos níveis de A β no cérebro dos pacientes e por darem origem a efeitos adversos graves, que incluem mielinização reduzida dos neurônios, distúrbios na homeostase da glicose e hepatotoxicidade (RAJENDRAN et al., 2008), isso porque a β -secretase desempenha um papel vital na melhoria da plasticidade sináptica e no desempenho cognitivo (VENUGOPAL et al., 2008).

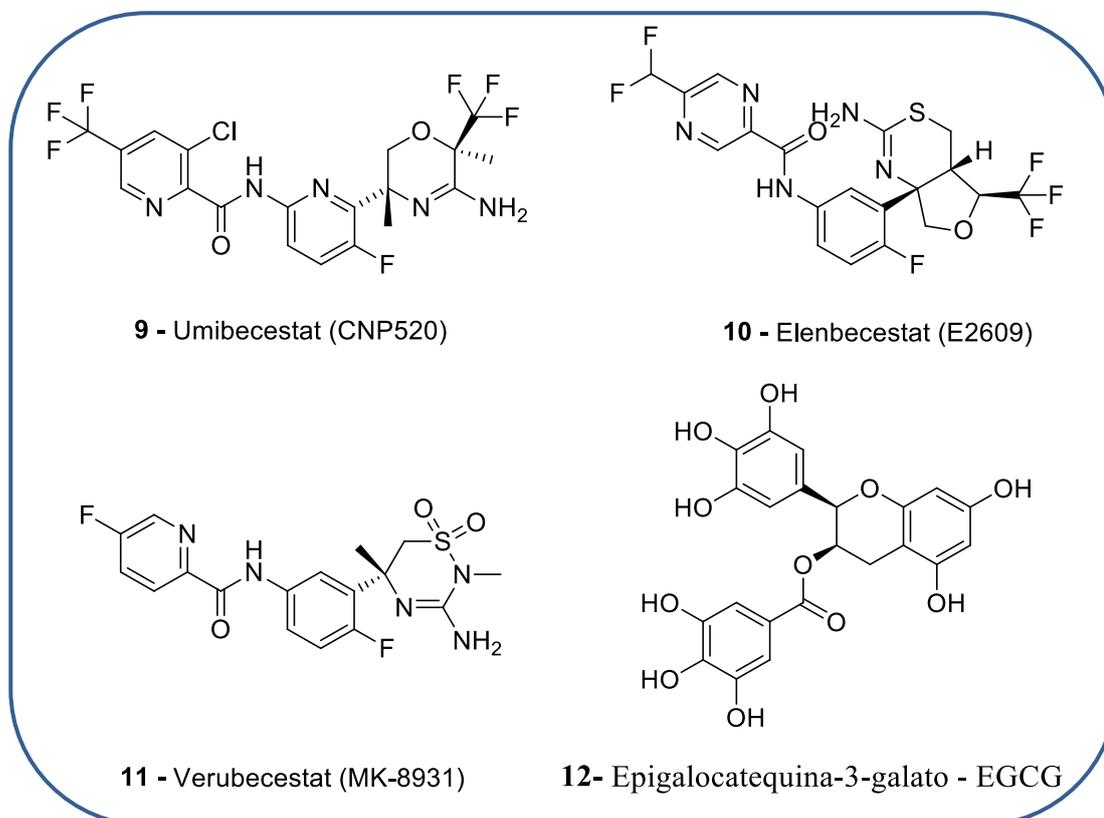


Figura 9. Representação estrutural de inibidores das enzimas β -secretase e da agregação de placas A β , que atualmente se encontram em fase clínica para o tratamento da DA.

Paradoxalmente, os peptídeos A β também estão presentes desde nosso nascimento e são continuamente produzidos ao longo da vida. Assim, os alvos mais diretos na terapia anti-A β seriam a redução da produção deste peptídeo através da inibição das β - e γ -secretase como descrito acima (GAO; PIMPLIKAR, 2001; YANG et al., 2003). Entretanto, as questões de segurança têm sido a razão primordial da falha desta classe nos estudos clínicos, porque a γ -

secretase tem muitos substratos fisiologicamente essenciais, sendo inevitáveis os efeitos colaterais como a diferenciação de linfócitos e a alteração da estrutura de células intestinais (VAN ES et al., 2005). A inibição da β -secretase não deveria ter o mesmo risco de toxicidade. No entanto, a concepção de inibidores da β -secretase tem sido um desafio, pois esta contém um grande sítio catalítico. Inibidores desta enzima são muito volumosos atrapalhando a permeabilidade na barreira hematoencefálica (CITRON, 2010).

Outra proposta terapêutica seriam as multialvos como o caso da Epigallocatequina-3-galato (EGCG) (**12**) (Figura 9), um flavanol natural derivado do chá verde que apresenta múltiplas atividades neuroprotetoras. A proposta terapêutica neste caso é que o EGCG liga-se ao peptídeo A β , inibindo a formação das placas senis. Atualmente ele se encontra na fase III dos ensaios clínicos para tratamento da DA, além de fase II para o tratamento da Síndrome de Down e fase III para tratamento de Atrofia de Múltiplos Sistemas (XICOTA et al., 2017).

Abordagens de associação terapêutica (mais de um princípio ativo em um único medicamento) também vêm sendo estudadas, sendo uma delas a terapia combinada usando os fármacos ibuprofeno e a cromolina para a formulação do ALZT-OP1 (**13**) para o tratamento da DA (Figura 10). O ibuprofeno é um medicamento anti-inflamatório não esteróide (suprime a liberação de citocinas) que demonstrou ter um efeito significativo na DA. A cromolina mostrou ser capaz de inibir tanto *in vitro* quanto *in vivo* a agregação do monômero A β para formar oligômeros e fibrilas (HORI et al., 2015). O ALZT-OP1 encontra-se em fase III dos ensaios clínicos.

Os inibidores da agregação da P τ também constituem uma abordagem para o tratamento de DA. O LMTX (**14**) é um inibidor da agregação de proteínas tau de segunda geração para o tratamento da DA e demência frontotemporal (CONGDON et al., 2012) (Figura 10). É uma formulação de substituição para o Rember®, que foi a primeira formulação patenteada e purificada de cloreto de metiltionínio (MTC). O LMTX e Rember são formas purificadas do azul de metileno que é amplamente utilizado na África para o tratamento da malária, bem como para a metahemoglobinemia e outras condições (RIHA et al., 2011). Eles compartilham o mesmo modo de ação, mas o LMTX foi projetado como uma forma estabilizada e reduzida de MTC para melhorar a absorção, biodisponibilidade e tolerabilidade do medicamento (WILCOCK et al., 2018). Atualmente se encontra em fase III para DA e fase III para demência frontotemporal.

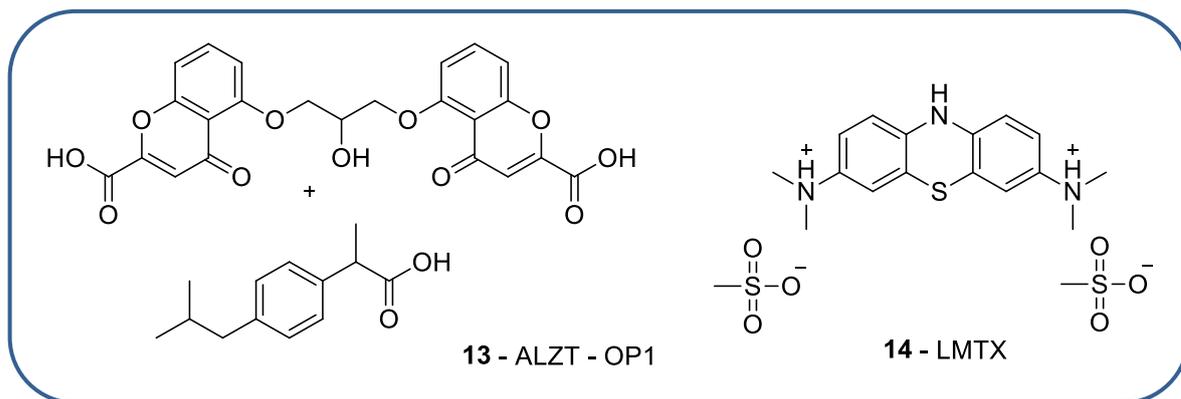


Figura 10. Representação estrutural de compostos que atualmente se encontram em fase clínica para o tratamento da DA.

1.4 Cumarinas e suas propriedades

Isoladas pela primeira vez em 1820 por Vogel, as cumarinas (**15**) estão presentes em diversos vegetais, tais como: guaco (CARVALHO; MARTINS, 2004; AMARAL et al., 2009), castanha da Índia (muito utilizada contra varizes) (MURI; DE MELLO; METSAVAHT, 2016), cumaru, canela, imburana, agrião, entre outros, e também estão presentes em algumas frutas como morango, cereja e damasco (RODRIGUES, 2005). Cumarinas (**15**) são lactonas do ácido *orto*-hidroxi-cinâmico (Figura 11) e o nome desse grupo químico deriva do nome da planta *Coumarouna odorata* ou *Dipteryx odorata*, da qual foi isolada pela primeira vez (BORGES et al., 2005; BOISDE; MEULY, 2007).

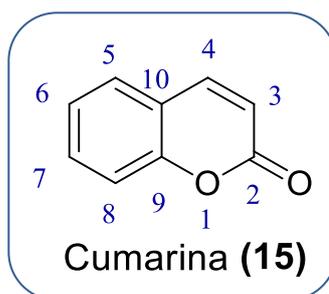


Figura 11. Representação da estrutura básica de uma cumarina.

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, tais como árvores, arbustos e ervas (RIBEIRO E KAPLAN, 2002).

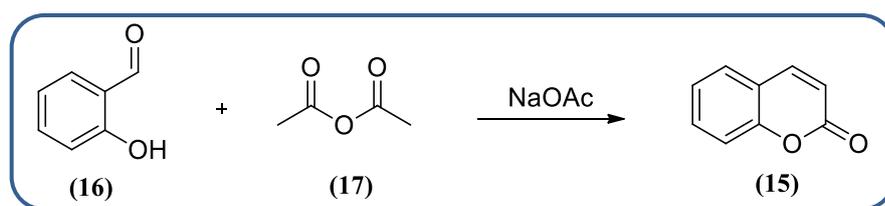
Do ponto de vista biológico, as cumarinas são amplamente investigadas devido a grande gama de atividades farmacológicas relevantes demonstradas, tais como: anti-

inflamatório (GROVER et al.,2014), antimicrobiana (PATEL; KUMARI; PATEL, 2013), anticoagulante (LEI et al., 2015), anti-HIV (KUDO et al.,2013), anti-DA (SUN et al., 2014), anti-tuberculose (PATEL et al., 2013), anti-influenza (KHOMENKO et al., 2017), anti-diabético (KHAN et al., 2014), entre outras (PEREIRA et al., 2018). Além disso, possuem aplicabilidades como corantes, laser de corante, sondas e biomarcadores por fluorescência, isso devido a sua forte fluorescência na região do UV-vis (visível), devido a seu sistema π conjugado (KOVAC; NOVAK, 2002; PEREIRA et al., 2018).

Ao passo que o interesse pela classe química cumarina aumentava, novas vias sintéticas aperfeiçoadas para a obtenção da cumarina foram desenvolvidas por diversos grupos de pesquisas. Dessa forma, tem-se aumentado o uso de tecnologias na sua síntese, a fim de diminuir os tempos de reação e facilitar a obtenção de seus derivados, como micro-ondas reacional, ultrassom, novos catalisadores, solventes mais verdes e reações livres de solvente (SYMEONIDIS et al., 2009; LAUFER; HAUSMANN; HÖLDERICH, 2003; FRÈRE et al., 2001). Os métodos clássicos e mais utilizados para obter os derivados cumarínicos são as reações de Perkin, Pechmann e Knoevenagel.

1.4.1 Reação de Perkin

Foi a primeira metodologia utilizada para a obtenção das cumarinas por via sintética, em meados do século XIX. A reação consiste em uma condensação aldólica de aldeído *orto* (OH) substituído (16) e um anidrido acético (17), em presença de um sal básico, levando assim a obtenção das cumarinas (Esquema 1) (MURRAY, 1995).

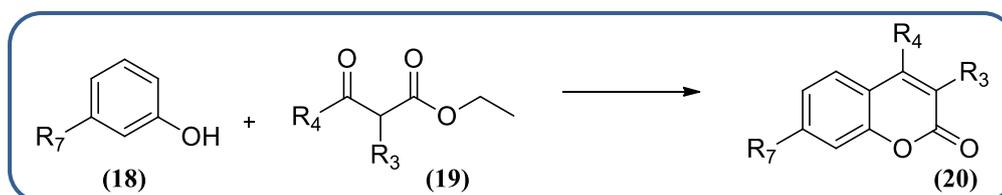


Esquema 1. Esquema reacional de Perkin.

1.4.2 Reação de Pechmann

Consiste na condensação de fenóis (18) com β -cetoesteres (19) em presença de catálise ácida, levando assim a formação das cumarinas (Esquema 2). Esse protocolo de síntese foi amplamente utilizado para obtenção de cumarinas visando aplicações em química medicinal e na indústria (SYMEONIDIS et al., 2009). Muitos grupos de pesquisa se dedicam na otimização da reação de Pechmann visando alcançar melhores rendimentos e otimização dos parâmetros reacionais. São exemplos de otimizações realizadas com sucesso, a utilização de

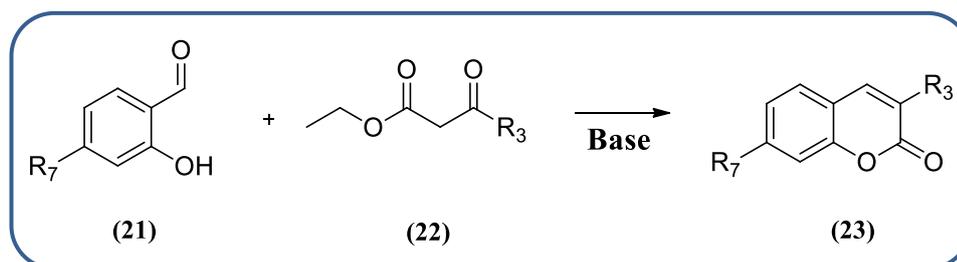
suporte sólido como catálise e de micro-ondas reacional (LAUFER; HAUSMANN; HÖLDERICH, 2003; FRÈRE et al., 2001).



Esquema 2. Esquema reacional de Pechmann.

1.4.3 Reação de Knoevenagel

Consiste na condensação de aldeídos (21) com metilenos (22) ativados em presença de uma base branda como catalisador, que pode ser substituída, em alguns casos, por combinações de ácidos de Lewis ou ácidos carboxílicos com aminas, levando a formação das cumarinas (23) (Esquema 3). Essa metodologia é amplamente utilizada na síntese derivados cumarínicos substituídos na posição R₃ e R₇ (TRKOVNIK; IVEZIC, 2000; PEREIRA et al., 2016).



Esquema 3. Esquema reacional de Knoevenagel.

1.5 Triazol e suas propriedades

Com uma ampla variedade química, os compostos heterocíclicos de cinco membros estão diretamente associados ao tratamento de diversas doenças (FERREIRA et al., 2013), constituindo um dos ramos mais estudados na química medicinal (BOZOROV et al., 2019). A bioatividade desses heterocíclicos está correlacionada aos heteroátomos que os constituem, podendo ser nitrogênio, oxigênio, enxofre e outros. Eles podem ser os responsáveis pelas interações com o alvo, além de influenciar o metabolismo e farmacocinética. Destacam-se entre eles os azóis, heterocíclicos de nitrogênio com cinco membros, devido a sua abundância e popularidade nos contextos químico e biológico nas últimas décadas (BOZOROV et al., 2019).

Os triazóis são anéis de cinco membros com três átomos de nitrogênio que pertencem à classe dos azóis (FERREIRA et al., 2013). Sua estrutura é constituída por um anel di-insaturado de cinco membros, ao qual três átomos são de nitrogênio e dois átomos de

carbono, apresentando dois isômeros, o 1,2,3-triazol e o 1,2,4-triazol (Figura 12) (KHARB et al., 2011).

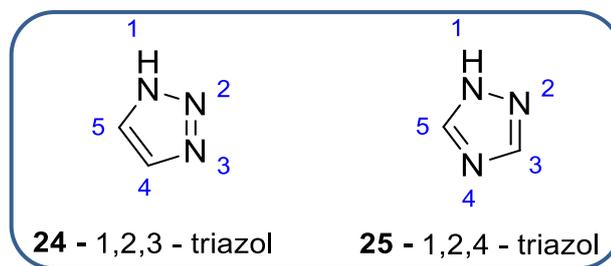


Figura 12. Isômero 1,2,3-triazol e 1,2,4-triazol.

Os triazóis compõem o núcleo mais conhecido e importante dentre os heterocíclicos, pois estão presentes em uma gama de medicamentos, muitas vezes como componente estrutural central, apresentando atividade como antimicrobiano (CHEN et al., 2000), anti-inflamatório (BANU et al., 1999), analgésico (HAFEZ et al., 2005), antiepilético (GUAN et al., 2007), antiviral (JOHNS et al., 2009), antineoplásico (PASSANNANTI et al., 1998), anti-hipertensivo (SHALINI et al., 2011), antimalárico (GUJJAR et al., 2009), anestésico local (BANU et al., 1999), antiproliferativo (MANFREDINI et al., 2000), anticâncer (DURAN et al., 2002), anti-histamínico (ZHOU et al., 2009), antitubercular (MI et al., 2007), antidiabéticos (ZHOU et al., 2010), entre outros.

1.5.1 Síntese de 1,2,3-triazol via cicloadição 1,3-dipolar

Dentre os heterocíclicos que contem nitrogênio, o anel 1,2,3-triazol vem cada vez mais recebendo destaque devido a possibilidade de seu uso em diferentes seguimentos, sendo muito utilizada para o desenvolvimento de novos fármacos devido as atividades farmacológicas relevantes desempenhada por essa classe e como ligante de blocos nas abordagens de hibridação molecular (AGALAVE et al., 2011), mas também sendo utilizada como ligantes, na ativação de C-H e como precursores de carbeno (FOKIN et al., 2012).

Os 1,2,3-triazóis são considerados ácidos fracos ($pK_a=9,40$) e bases ($pK_aH=1,17$) fracas, ou seja, possuem comportamento anfótero. Sua síntese pode ser realizada de diferentes modos, entretanto, a reação de cicloadição 1,3-dipolar é o método mais importante para a síntese de 1,2,3-triazóis a partir de azidas e alcinos (BUILLA et al., 2011).

A reação de cicloadição 1,3-dipolar foi observada pela primeira vez por Arthur Michael em 1893 (MICHAEL, 1893), porém, só teve seu mecanismo elucidado em 1967, através dos estudos desenvolvidos de Rolf Huisgen (HUISGEN et al., 1967).

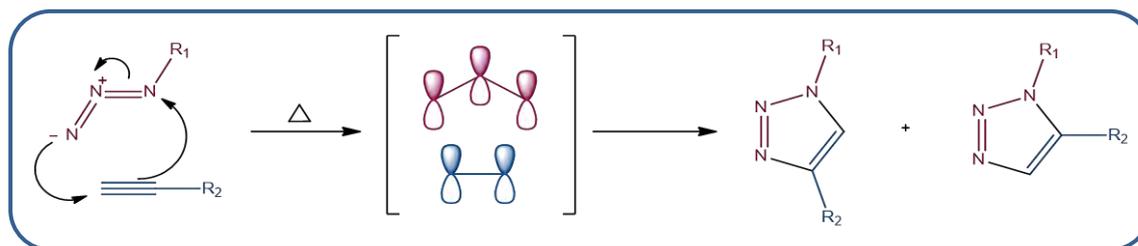


Figura 13. Mecanismo de reação de cicloadição 1,3-dipolar térmica.

Tradicionalmente, a síntese dos 1,2,3-triazóis era realizada via cicloadição de Huisgen [3 +2], entre alcinos e azidas orgânicas que na maioria das vezes resultava em uma mistura de regioisômeros 1,4 e 1,5 dissustituídos, sendo pequena a taxa de sucesso ao tentar de separar esses regioisômeros por cromatografia, além de serem longos os tempos reacionais (NORRIS et al., 1996; TALEKAR E WIGHTMAN, 1997).

O mecanismo proposto por Huisgen apresentava problemas relacionados à alta energia de ativação necessária para que a reação ocorresse, o que levava a necessidade de altas temperaturas e longo tempo de reação, que culminava em rendimentos insatisfatórios (DE OLIVEIRA FREITAS, 2011). Além disso, como as diferenças de energia entre os orbitais de fronteira HOMO e LUMO de azidas e alcinos são de proporções similares, interações ocorrem, simultaneamente, entre dipoloHOMO e dipoloLUMO, produzindo misturas regioisoméricas de triazóis quando utilizado alcinos assimétricos (HOWELL et al., 2001).

Entretanto, com os avanços das pesquisas de diferentes grupos, foram propostas as reações de cicloadição 1,3-dipolar catalisada (AAC) entre azidas e alcinos, podendo ser consideradas reações de *Click Chemistry* (MELDAL et al., 2002; SHARPLESS et al., 2002). Essas reações apresentam uma série de benefícios, entre elas, um aumento significativo na velocidade de reação na ordem de 7 vezes, além de permitir com facilidade a obtenção de 1,2,3-triazóis regioespecíficos. De modo que a reação de cicloadição 1,3-dipolar catalisada por cobre (I) (CuAAC), leva excepcionalmente ao 1,4-regioisômero (KUMAR et al., 2009). E quando a reação é catalisada por rutênio (RuAAC) fornece principalmente o 1,5-regioisômero (TAKASU et al., 2010).

O uso do catalisador agregou diversos benefícios à reação de cicloadição 1,3-dipolar, já que transformou o mecanismo concertado em varias etapas sequenciais rápidas, que incluem intermediários polares que são os responsáveis por proporcionar a formação exclusiva do regioisômero, tudo isso com a utilização de condições muito mais brandas, já que supera a barreira cinética presente na cicloadição 1,3-dipolar puramente térmica de Huisgen, o que implicou na obtenção de rendimentos bastante satisfatórios. Trouxe ainda a possibilidade de utilização de diversos solventes, incluindo a água, que além de ser um

solvente benigno, universal e de boa capacidade de absorção do calor gerado na reação, tem implicações ambientais positivas (MELDAL et al., 2002; SHARPLESS et al., 2002; RODIONOV et al., 2005; BOCK et al., 2006; DÖHLER et al., 2017). Por essas vantagens, a reação de cicloadição 1,3-dipolar catalisada por Cu a partir de azidas orgânicas e alcinos terminais (CuAAC) é considerada uma reação “*Click Chemistry*”.

O conceito *Click* foi idealizado pelos cientistas Kolb, Finn e Sharpless em 2001 com o objetivo desenvolver um conjunto expansível de blocos que fossem modulares e seletivos, para serem capazes de superar problemas relacionado a síntese de moléculas complexas.

Conforme o que foi proposto pelos autores, as reações de *Click Chemistry* devem ser um processo sintético modular, de amplo alcance, eficiente, rápido e fácil (KOLB et al., 2001).

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivos gerais

Esse trabalho tem como objetivos o planejamento, a síntese e avaliação farmacológica dos novos composto híbridos simbióticos¹ 3-(1,2,3-triazol)-cumarínicos como possíveis agentes inibidores da enzima AChE e da agregação de placas A β , capazes de atuarem inibindo simultaneamente alvos que contribuem para a instalação e manutenção da DA.

2.2. Objetivos específicos

- Obtenção dos derivados de 3-(1,2,3-triazol)-cumarinas planejados;
- Investigação do perfil e da cinética de inibição dos compostos cumarínicos frente à AChE e de inibição dos compostos frente à agregação de placas A β ;
- Investigação teórica do perfil de interação dos derivados cumarínicos com os biorreceptores alvos por modelagem molecular, através da técnica de “*docking* molecular” (atracamento molecular).

2.3. Planejamento Estrutural dos compostos 3-(1,2,3-triazol)-cumarinas

Conforme demonstrado em estudos publicados em 2014, o núcleo alquilamino-indanona apresentou-se como um potencial inibidor da enzima AChE e da agregação de placas A β . Dentre os resultados obtidos nesses estudos, destacam-se os compostos **(26)** e **(27)** que apresentaram, respectivamente, valores de CI₅₀ iguais a 14,8 e 16,5 nM de inibição frente à AChE e porcentagens de inibição da agregação de placas A β de 85,5% e 83,3% à 20 μ M, respectivamente (Figura 14) (HUANG et al., 2014).

Recentemente, nosso grupo de trabalho (LaDMol-QM), publicou estudos demonstrando o núcleo alquilamino-cumarínico como um potencial inibidor da enzima AChE e da agregação de placas A β , a partir da troca do núcleo indanona pelo cumarínico, através do isosterismo não-clássico de expansão de anéis. Dentre os resultados obtidos nesses estudos, destaca-se o composto **(28)** que apresentou valores de CI₅₀ iguais a 20nM de inibição frente à

Simbióticos: são empregados como estratégia terapêutica em doenças multifatoriais, onde o agente simbiótico atua em no mínimo dois alvos biológicos distintos, pertencentes a diferentes janelas bioquímicas, porém, envolvidos em uma mesma resposta fisiopatológica (MANSSOUR FRAGA; BARREIRO, 2008).

AChE e seletividade (CI_{50} BChE/AChE = 354), bastante semelhante à referência ao fármaco donepezila **(6)** (CI_{50} = 6 nM; CI_{50} BChE/AChE = 365), apresentando também propriedades antioxidantes, baixa citotoxicidade e boas propriedades preditas de ADMET (Figura 14) (DE SOUZA et al., 2019).

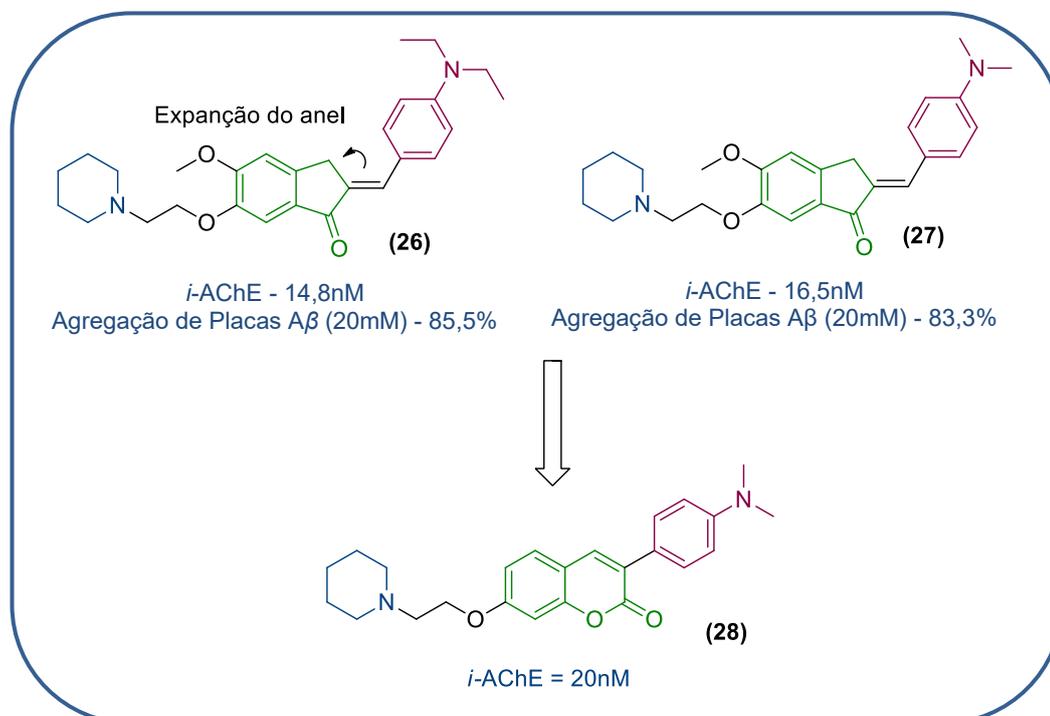
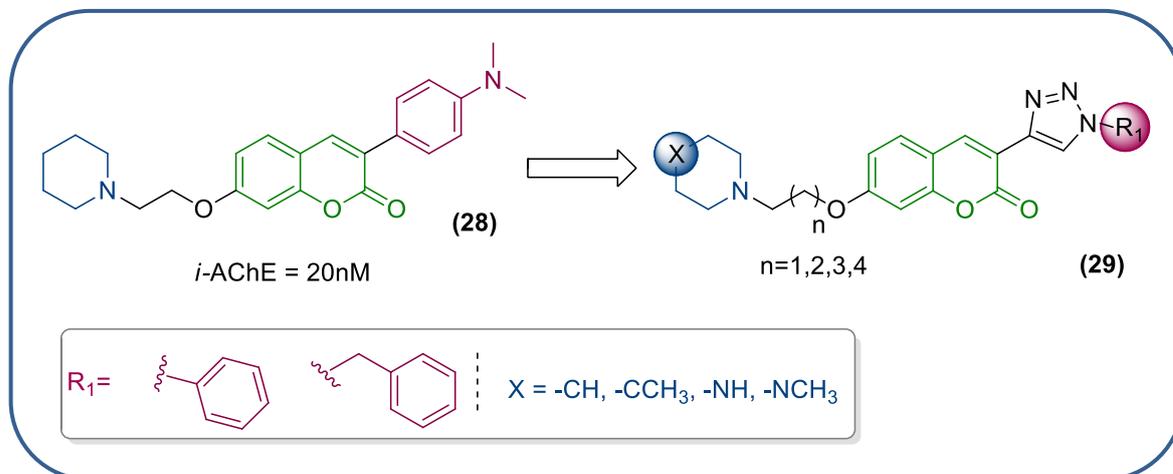


Figura 14. Estrutura dos compostos **26**, **27** e **28** utilizados como protótipos no planejamento estrutural.

O planejamento dos novos derivados 3-(1,2,3-triazol)-cumarínicos (**29**; Esquema 4), propostos neste trabalho, foi baseado em requisitos estruturais presentes nestes inibidores alquilamino-cumarínicos descritos acima (DE SOUZA et al., 2019). O planejamento da série foi baseado na:

- i. Manutenção do grupamento alquilamino cíclico, que é o responsável pela interação com o sítio catalítico aniônico da AChE, porém variando a amina cíclica visando melhorar as interações nessa região da enzima.
- ii. Substituição do anel aromático pelo grupamento 1,2,3-triazol, através de um bioisosterismo, visando melhorar as interações no sítio periférico da AChE. Os grupos **R₁** escolhidos serão essencialmente hidrofóbicos, visando interações com o sítio periférico da AChE. Além disso, esses grupos hidrofóbicos podem ser responsáveis pela inibição da agregação do peptídeo A β ₁₋₄₂, como foi na série indanônica original. Será estudado também a influência de uma maior liberdade conformacional no sistema

triazólico através da introdução de um metileno entre o triazol e o substituinte aromático ligado a este.



Esquema 4. Planejamento estrutural dos compostos 3-(1,2,3-triazol)-cumarínicos com farmacóforo de inibição da AChE e placas A β oriundos dos protótipos **26**. Azul: farmacóforo responsável pela inibição da AChE; Vinho: farmacóforo responsável pela inibição da agregação de placas A β ;

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Planejamento sintético dos compostos

A síntese da série de compostos (**29a-k**) foi planejada com base na análise retrosintética detalhada no Esquema 5.

Inicialmente, através de uma desconexão C-N (etapa a), foi possível identificar as aminas cíclicas (**30a-d**) e as 3-(1*H*-1,2,3-triazol- R_1)-7-bromoalcoxi-cumarina (**31a-e**) como precursoras das 3-(1*H*-1,2,3-triazol- R_1)-7-aminoalcoxi-cumarinas (**29a-k**), por meio de uma reação de substituição nucleofílica bimolecular (S_N2).

Através de duas desconexões C-N (etapa b), foi possível identificar que os compostos 3-(1*H*-1,2,3-triazol- R_1)-7-bromoalcoxi-cumarina (**31a-e**) tem com precursores as azidas (**32a-b**) e o 3-etenil-7-bromoalcoxi-cumarina (**33a-d**), sendo essa etapa proporcionada pela reação de cicloadição de alcino-azida catalisada por cobre(I), da sigla do inglês CuAAC.

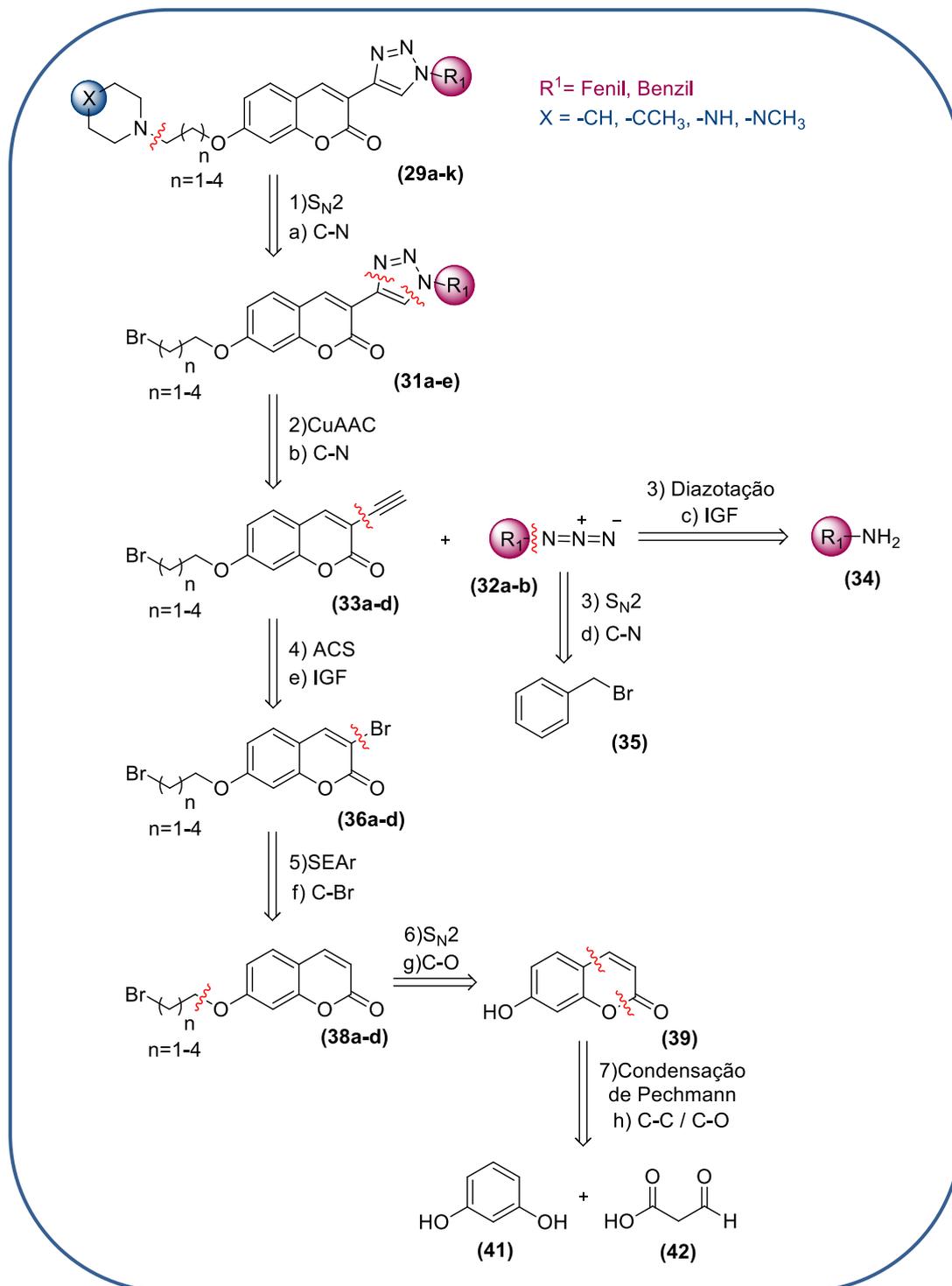
A partir de uma interconversão de grupos funcionais (IGF) (etapa c), foi possível observar a amina aromática (**34**) como precursoras da respectiva azida (**32a**), a qual foi obtida via reação de diazotação e por meio de uma desconexão C-N (etapa d), foi possível identificar o brometo de benzila (**35**) como precursor da benzil-azida (**32b**), mediante uma reação de substituição nucleofílica bimolecular (S_N2).

Após interconversões de grupos funcionais (IGF) (etapa e), verificou-se os compostos 3-bromo-7-bromoalcoxi-cumarina (**36a-d**) como precursores das 3-etenil-7-bromoalcoxi-cumarina (**33a-d**), por intermédio da reação de acoplamento cruzado de Sonogashira (ACS). Contudo, devido a impossibilidade de realizar tal reação utilizando acetileno, por se tratar de uma gás inflamável com alta periculosidade, a reação pode ser realizada a partir de acetileno protegido com trimetilsilano, sendo necessário posterior etapa de desproteção do alcino.

Por intermédio de uma desconexão C-Br (etapa f), foi possível identificar o bromo molecular (**37**) e as 7-bromoalcoxi-cumarinas (**38a-d**) como precursores das 3-bromo-7-bromoalcoxi-cumarinas (**36a-d**), via reação do tipo substituição eletrofílica aromática (S_EAr).

Através de uma desconexão C-O (etapa g), foi possível identificar os compostos 7-hidroxicumarina (**39**) e os dibromoalcanos (**40a-d**) como precursores dos respectivos compostos 7-bromoalcoxi-cumarínicos (**38a-d**) mediante uma reação de substituição nucleofílica bimolecular (S_N2).

Por fim, uma desconexão C-C e C-O sobre a 7-hidroxicumarina (etapa h), sugere o resorcinol (**41**) e o ácido formilacético (**42**) como reagentes de partida, explorando a condensação de Pechmann. Porém, devido a instabilidade do ácido formilacético, recomenda-se sua formação “*in situ*” a partir do ácido málico (**43**).

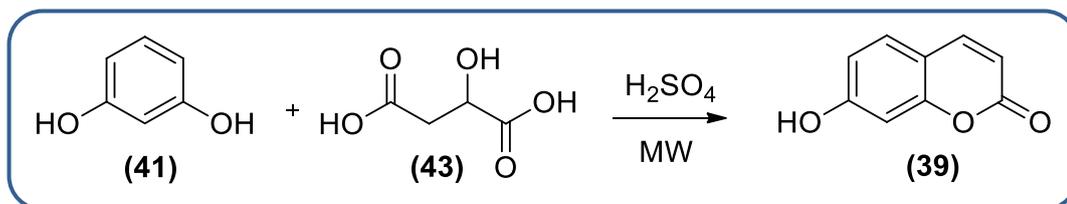


Esquema 5. Análise retróssintética para obtenção dos compostos planejados.

3.2 Síntese da 7-hidroxycumarina (39)

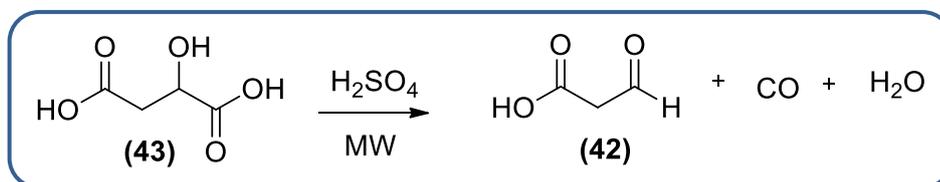
A síntese do composto 7-hidroxycumarina (**39**) foi realizada através da condensação de Pechmann (PECHMANN, 1884). No entanto, não se optou pelo uso da metodologia convencional, a qual se faz uso de aquecimento por convecção, visto que esta necessita de

temperatura elevada, longo tempo reacional e resulta em baixos rendimentos. Assim sendo, foi empregada a metodologia de síntese via irradiação de micro-ondas caseiro, desenvolvida pelo nosso grupo de trabalho (PEREIRA et al., 2018), como demonstrado no Esquema 6. Através desta, foi obtido um sólido laranja, que após a etapa de purificação por cromatografia, resultou em um sólido branco com rendimento igual a 70%, com ponto de fusão igual a 235°C (literatura: P.F. =230 °C).



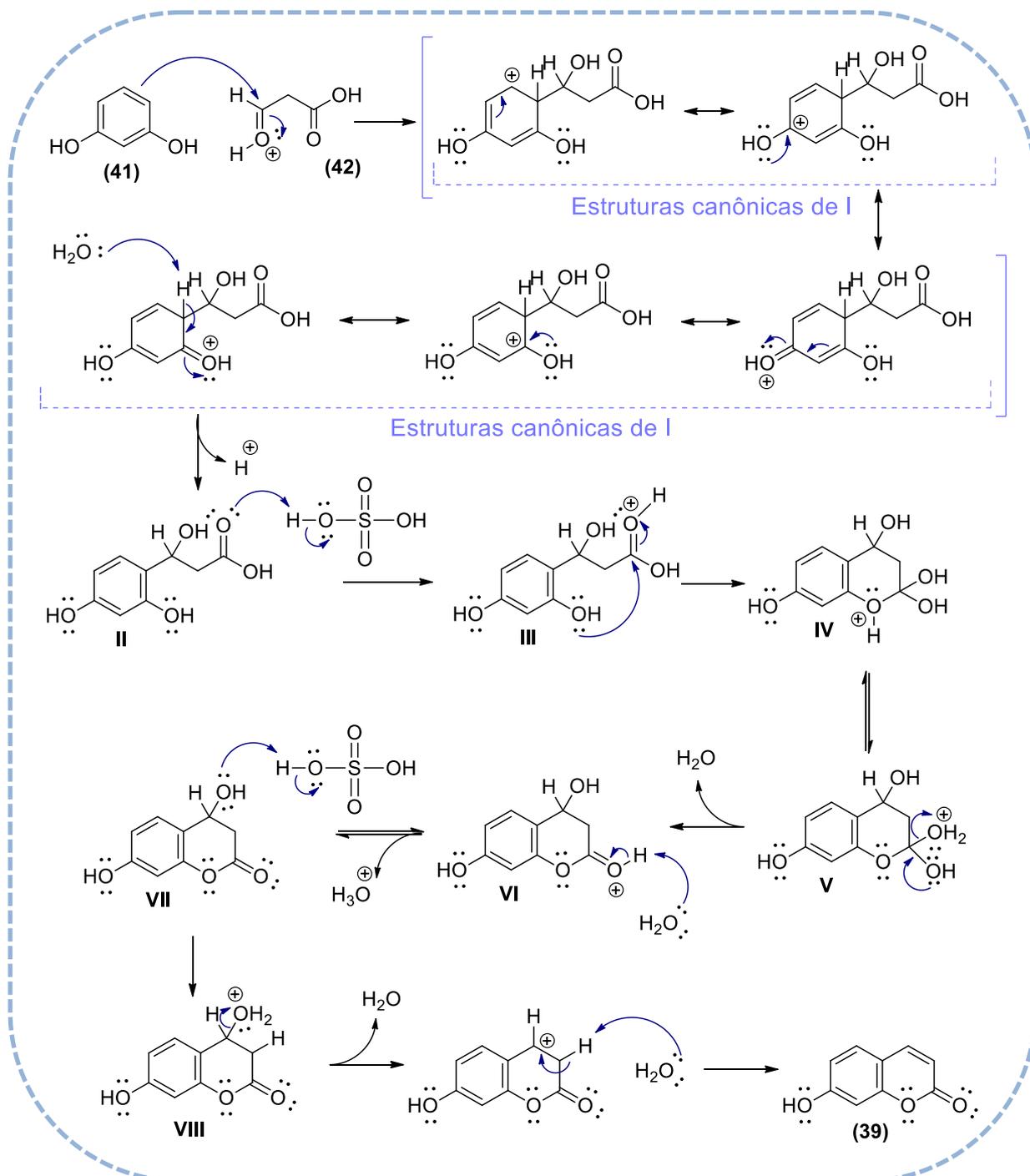
Esquema 6. Síntese da 7-hidroxycumarina (39).

Nesta condensação, foram utilizados resorcinol (41) e ácido málico (43) em meio de ácido sulfúrico, os quais foram irradiados na potência de 265 W e 30 segundos de reação, com 3 pulsos de 10 segundos no centro do prato (Esquema 6). O ácido sulfúrico atua nessa reação como catalisador e o ácido málico como um gerador *in situ* de ácido formilacético (42) (Esquema 7).



Esquema 7. Formação *in situ* do ácido formilacético (42) a partir do ácido málico.

O mecanismo proposto para a formação da 7-hidroxycumarina (39) (Esquema 8) se inicia com a formação *in situ* do ácido formilacético (42). Posteriormente, prossegue uma substituição eletrofílica aromática (SEAr), por intermédio do ataque dos elétrons π do resorcinol (41) ao carbono carbonílico do ácido formilacético (42) - ativado pelo catalisador ácido (Joule; Mills, 2010). Neste instante há a quebra de aromaticidade onde, contudo, o intermediário catiônico I (íon arênio) formado é estabilizado pelo efeito de ressonância. Em seguida, uma base presente no meio abstrai o hidrogênio do íon arênio e, assim, os elétrons que faziam parte da ligação com o próton migram para anel, restabelecendo a aromaticidade (II). Posteriormente, o ácido protona o oxigênio carboxílico do intermediário II, tornando o carbono carboxílico mais suscetível ao ataque nucleofílico intramolecular (III).



Esquema 8. Esquema de intermediários proposto para formação da 7-hidroxycumarina (39) através da condensação de Pechmann (Adaptado de JOULE; MILLS, 2010).

Subsequentemente, o oxigênio do resorcinol ataca o carbono carboxílico parcialmente positivo, resultando no intermediário IV que se encontra em equilíbrio com sua forma protonada V. Então, V elimina água, visto que esta é considerada um bom grupo de saída – base fraca – seguida da formação do éster e abstração do hidrogênio da carbonila lactônica (VI). Por fim, a hidroxila do intermediário VII é protonada, levando ao intermediário

positivamente carregado **VIII**. O meio ácido então favorece a eliminação (E_1) da água, levando a formação do carbocátion e em seguida ocorre a abstração do hidrogênio α à carbonila e conseqüente formação da ligação dupla, levando à formação da 7-hidroxicumarina (**39**).

A confirmação da formação da 7-hidroxicumarina (**39**) foi realizada a partir de experimentos de determinação estrutural de RMN ^1H e ^{13}C (Anexo 1 e 2). No espectro de RMN ^1H , foi possível observar alguns sinais característicos que possibilitaram a comprovação da formação deste composto, como o hidrogênio da hidroxila fenólica (H_{OH}) observado como o sinal simpleto em δ 10,61 (s, 1H) e hidrogênios absorvendo na região característica de aromáticos: δ 7,54 (d, $J = 8,5$ Hz, 1H), δ 6,76 (dd, $J_1 = 8,5$ Hz, $J_2 = 2,2$ Hz, 1H) e δ 6,72 (d, $J = 2,2$ Hz, 1H), atribuídos respectivamente aos hidrogênios H_5 , H_6 e H_8 . Tais atribuições foram feitas baseada no efeito mesomérico promovido pelo substituinte hidroxila que leva a um aumento da densidade eletrônica do anel, ocasionando uma blindagem dos hidrogênios na posição *orto* em relação a ele, o que leva estes hidrogênios (H_6 e H_8) a absorverem em menores frequências. A diferenciação entre eles foi possível através da multiplicidade dos sinais, isto é, o duplo duplete que foi atribuído ao H_6 , pois este acopla com H_5 (J_3) e, a longa distância, com H_8 (J_5) e o duplete ao H_8 , pois acopla apenas a longa distância com H_6 (J_5) (Figura 15).

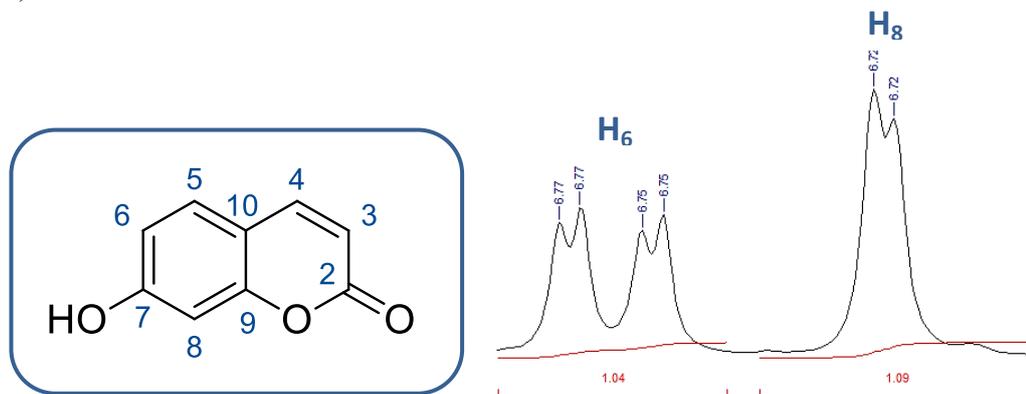


Figura 15. Estrutura numerada da 7-hidroxi-cumarina (**39**) e multiplicidade dos sinais de H_6 (duplo duplete) e H_8 (duplete).

Os sinais referentes aos hidrogênios do anel lactônico (sistema carboxílico α , β -insaturado) foram observados com deslocamento químicos em δ 6,21 (d, $J = 9,4$ Hz, 1H) e δ 7,94 (d, $J = 9,5$ Hz, 1H). Esses hidrogênios (H_3 e H_4) absorvem em frequências maiores devido ao campo anisotrópico dos elétrons π dos carbonos sp^2 ao qual estão ligados. Além disso, a diferença entre os deslocamentos químicos destes hidrogênios pode ser explicada pelo

efeito β - carboxílico de desproteção, causado pelo efeito mesomérico entre a ligação dupla C=C e a carboxila do anel (Figura 16).

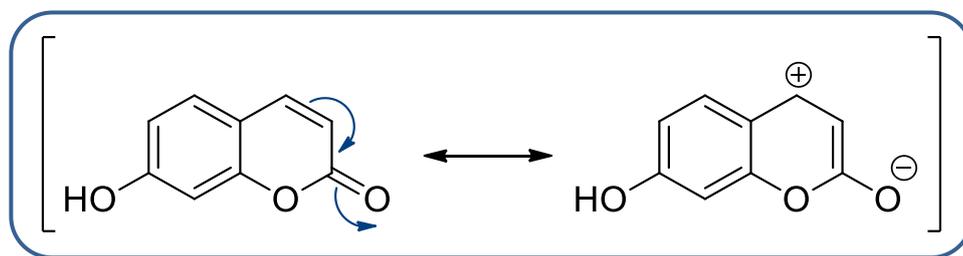


Figura 16. Efeito de ressonância entre a ligação dupla conjugada à carboxila do anel.

No espectro de RMN ^{13}C um dos fatores cruciais para a confirmação da formação da 7-hidroxycumarina (**39**) foi a presença do sinal em δ 161,75 característico de carbono carboxílico. Ademais observou-se a presença de sinais característicos de anel aromático em: δ 160,92, δ 156,00, δ 111,75 (carbonos quaternários), δ 130,20, δ 111,88 e δ 102,89 (carbonos metínicos). Levando-se em consideração a capacidade que o oxigênio possui em retirar elétrons por efeito indutivo, por conta de sua alta eletronegatividade, os sinais em 160,92 e 156,00 ppm foram atribuídos aos carbonos quaternários C_7 e C_9 , respectivamente, visto que este efeito indutivo causa uma desblindagem do núcleo, levando estes carbonos a absorverem em frequências mais altas. Já os sinais em 111,88, 102,89 e 111,75 ppm foram atribuídos aos carbonos C_6 , C_8 e C_{10} , respectivamente, por estarem em posição *orto* em relação ao substituinte hidroxila e/ou ao oxigênio lactônico e, conseqüentemente, serem blindados pelo efeito mesomérico positivo característico deste grupamento. Os sinais presentes em δ 113,5 e δ 145,02 ppm foram atribuídos aos carbonos C_3 e C_4 , respectivamente. Estes valores de deslocamento químico são característicos de carbono sp^2 , que são desblindados devido ao campo anisotrópico dos elétrons π . Porém a diferença entre estes valores pode ser considerada como consequência do efeito β -carboxílico de desproteção, causado pelo efeito mesomérico entre a ligação dupla C=C e a carboxila do anel, como observado para os hidrogênios equivalentes (Figura 16).

3.2. Reação de *O*-alquilação da 7-hidroxycumarina (**38a-d**)

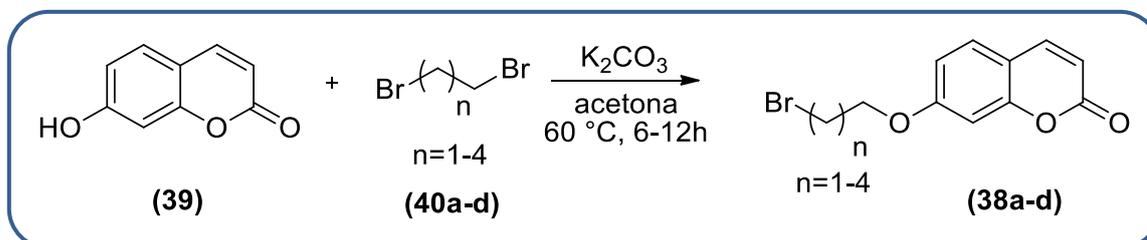
A síntese dos compostos 7-bromoalcoxi-cumarínicos (**38a-d**) se deu via reação de *O*-alquilação (Esquema 9), e os produtos obtidos se apresentaram sob a forma de sólido ou óleo com diferentes colorações. Seus rendimentos variaram entre 46-71%, de acordo com o

número de carbonos espaçadores, e ponto de fusão de 63-133 °C (não havendo relatos de P.F. na literatura para nenhum dos sólidos obtidos) (Tabela 1).

Tabela 1. Características físicas, pontos de fusão e rendimentos dos compostos 7-bromoalcoxi-cumarínicos (**38a-d**).

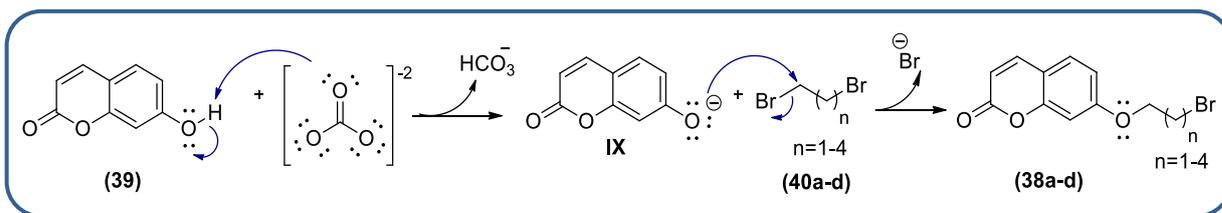
Composto	n	Características físicas	P.F °C	Rendimento (%)
38a	1	Sólido branco	132-133	46
38b	2	Sólido branco	99-103	57
38c	3	Sólido amarelo claro	63-67	64
38d	4	Óleo marrom	-	71

A reação de *O*-alquilação (Síntese de Williamson) foi realizada a partir da 7-hidroxycumarina (**39**), carbonato de potássio (K₂CO₃) e dibromoalcanos (**40a-d**) em acetona, sob 60 °C (Esquema 9).



Esquema 9. Síntese das 7-bromoalcoxi-cumarinas (**38a-d**).

O mecanismo proposto para essa reação inicia-se com a abstração do próton da hidroxila fenólica pelo carbonato (CO₃²⁻), formando a 7-oxicumarina (**IX**) e um bicarbonato (HCO₃⁻). Em seguida, ocorre uma substituição nucleofílica bimolecular (S_N2), na qual a 7-oxicumarina formada atua como nucleófilo e ataca o carbono ligado ao bromo. De maneira concertada, a ligação nucleófilo-carbono vai se formando, enquanto a ligação C-Br vai se rompendo, até o brometo ser liberado e assim formar a 7-bromoalcoxi-cumarina (**38a-d**) (Esquema 10 **Erro! Fonte de referência não encontrada.**) (CAREY & SUNDBERG, 2008).



Esquema 10. Esquema de intermediários proposto para formação dos derivados 7-bromoalcoxi-cumarínicos **(38a-d)** (Adaptado de CAREY; SUNDBERG, 2007).

Por se tratar de um mecanismo de S_N2, o impedimento estérico é determinante para a eficiência do ataque nucleofílico. Desta forma, a reação com dibromoetano foi a mais demorada e necessitou de uma maior quantidade deste reagente para ocorrer. Ao passo que o rendimento das reações com dibromobutano e dibromopentano não foram tão altos exatamente por haver um menor impedimento estérico, possibilitando assim, um segundo ataque da 7-hidroxycumarina **(39)**, dando origem a um produto bis-alquilado **(44)**, Figura 17). No acompanhamento por cromatografia em camada fina das reações com dibromobutano e dibromopentano, pôde-se observar a formação de um produto secundário com um índice de refração (R_f) maior do que o produto desejado, o qual se acredita ser o produto de bis-alquilação, visto que o mesmo não foi observado nas reações com dibromoetano e dibromopropano.

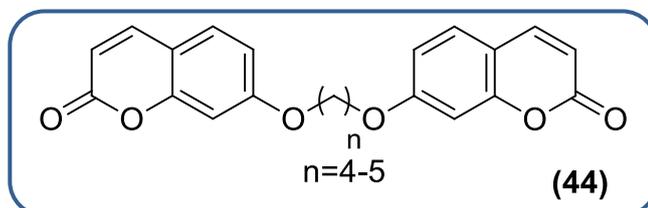


Figura 17. Produto de bis-alquilação oriundo das reações da umbeliferona com dibromobutano e dibromopentano.

Após a evaporação do solvente todos os produtos estavam sob a forma de óleo devido à presença do haleto de alquila, que foi adicionado em excesso na reação. Para a remoção do haleto de alquila e demais impureza presente foi realizada purificação por coluna cromatográfica utilizando equipamento de cromatografia flash automatizada Isolera[®]. Após a purificação, os compostos foram obtidos como sólidos amorfos e óleo com coloração variada.

O acompanhamento da reação se deu através de análise por cromatografia em camada fina, com sílica como fase estacionária e hexano: acetato de etila 50% como eluente. Através desta, foi observada a formação de um produto com R_f maior em relação ao reagente de partida (7-hidroxycumarina **(39)**). Esse fato se explica pela melhor interação da hidroxila ácida

da umbeliferona com a sílica, realizando ligações de hidrogênio, o que não ocorre nos respectivos produtos.

A fim de se confirmar a formação das 7-bromoalcoxi-cumarinas (**38a-d**) foram realizados experimentos de determinação estrutural de RMN ^1H e ^{13}C dos compostos sintetizados (Anexos 3 a 10). 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 δ 4,03-4,36 com integração igual a dois, referente aos hidrogênios metilênicos ligados ao carbono oxigenado. No espectro de RMN ^{13}C o que evidenciou a formação dos produtos foi a presença dos sinais de carbono na região de carbono sp^3 , dos quais o mais característico foi a presença de um sinal de carbono metilênico na região de δ 65,80-68,16, referente ao carbono ligado ao oxigênio presente na posição 7 da cumarina (Figura 18). Ademais, no espectro de RMN ^1H não foi observado o sinal referente ao hidrogênio da hidroxila fenólica (δ 10,61) presente no reagente de partida (**39**), fato este que também corrobora para a confirmação da obtenção das 7-bromoalcoxi-cumarinas (**38a-d**).

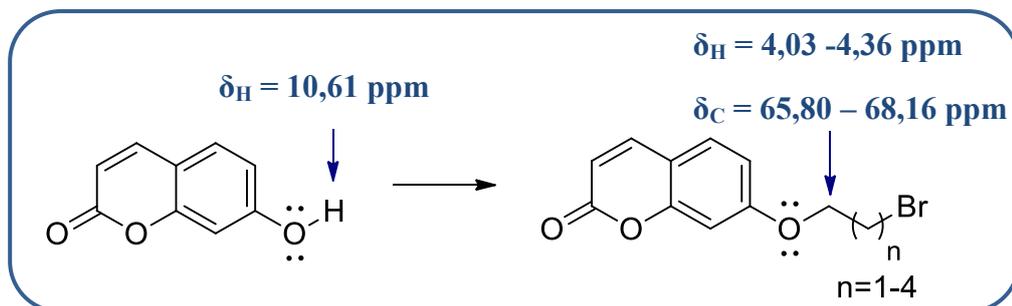


Figura 18. Atribuição comparativa dos principais sinais dos compostos 7-bromoalcoxicumarínicos (**38a-d**) e 7-hidroxycumarina (**39**) nos espectros de RMN ^1H e ^{13}C

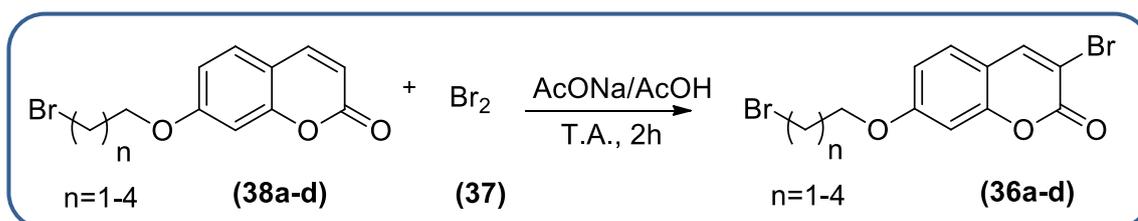
3.3. Reação de bromação na posição 3 do núcleo cumarínico (**36a-d**)

Para a síntese dos compostos 3-bromo-7-bromoalcoxi-cumarínicos (**36a-d**) foi realizada uma reação de bromação (Esquema 11), da qual se obteve os produtos sob a forma de um sólido amorfo com diferentes colorações. Os rendimentos variaram de 83-93% e os pontos de fusão de 120-183°C (não havendo relatos de P.F. na literatura para nenhum dos sólidos obtidos) (Tabela 2).

Tabela 2. Características físicas, pontos de fusão e rendimentos dos compostos 3-(bromo)-7-(bromoalcoxi)-cumarínicos (**36a-d**).

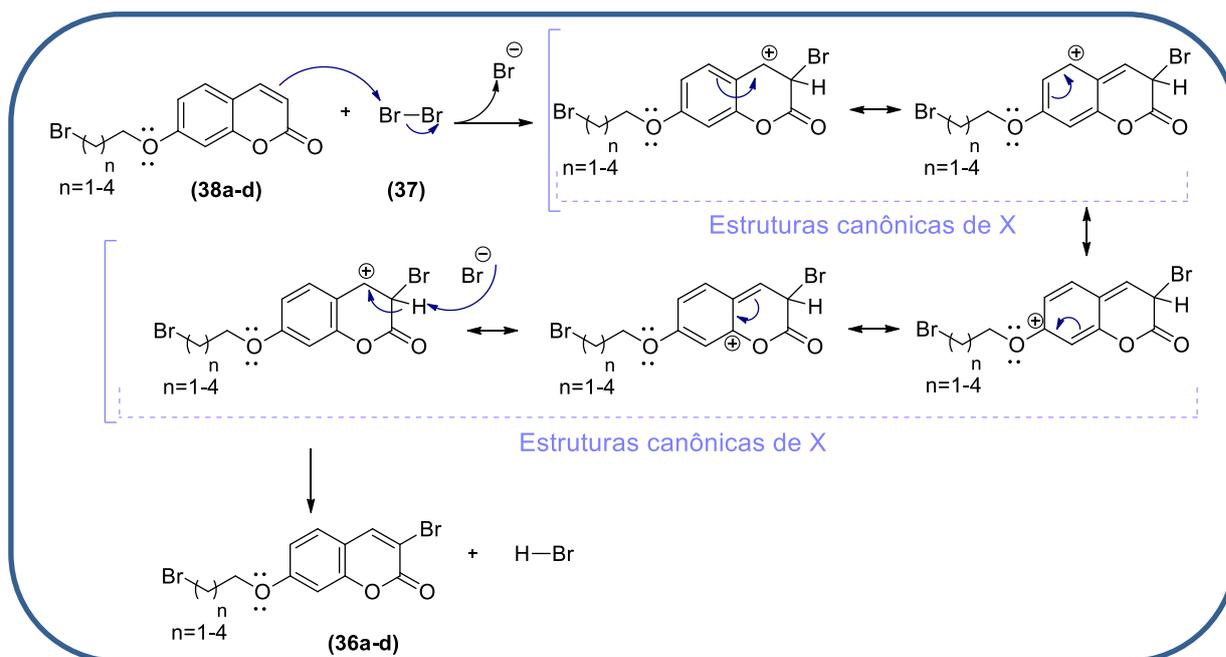
Composto	n	Características físicas	P.F °C	Rendimento (%)
36a	1	Sólido alaranjado	182-183	87
36b	2	Sólido alaranjado claro	118-121	93
36c	3	Sólido alaranjado	120-121	87
36d	4	Sólido alaranjado	121-124	83

A reação de bromação consistiu na reação entre as 7-bromoalcoxi-cumarinas (**38a-d**) e o bromo (**37**) a 25°C em meio tamponado com acetato de sódio/ácido acético (CH₃COONa/CH₃COOH) (Esquema 11).



Esquema 11. Síntese dos derivados 3-(bromo)-7-(bromoalcoxi)-cumarínicos (**36a-d**).

O mecanismo proposto para essa reação segue por uma substituição eletrofílica aromática (S_EAr), de forma que inicialmente ocorre um ataque nucleofílico dos elétrons π da dupla ligação α,β-carboxílica, do anel lactônico, do respectivo composto **38a-d** ao bromo parcialmente positivo do Br₂, levando a formação de Br⁻ e do intermediário catiônico **X**, que é estabilizado pelo efeito de ressonância do anel vizinho. Seguidamente, o brometo (Br⁻) presente no meio abstrai o hidrogênio deste intermediário e, assim, os elétrons que faziam parte da ligação com o próton migram para anel, levando à formação dos respectivos produtos desejados (**36a-d**) e de ácido bromídrico (HBr). Por ocorrer a formação de HBr como subproduto e este se tratar de um ácido forte, a reação é realizada em meio tamponado com CH₃COONa/CH₃COOH, a fim de se evitar uma possível abertura do anel lactônico do núcleo cumarínico (Esquema 12).



Esquema 12. Esquema de intermediários proposto para formação dos derivados 3-bromo-7-bromoalcoxi-cumarínicos (**36a-d**) (Adaptado de CLAYDEN et al., 2001).

O monitoramento reacional se deu através de CCDA com sílica como fase estacionária e hexano: acetato de etila 50% como eluente, onde foi possível observar a formação de um produto com R_f maior em relação ao reagente de partida. Isso se deve ao fato do substituinte bromo, presente nos produtos, ter uma interação mais fraca com a sílica. Os produtos obtidos após a precipitação em gelo apresentaram cor alaranjada, provavelmente devido à presença de um pequeno excesso de Br_2 no meio reacional.

Para confirmar a formação das 3-(bromo)-7-(bromoalcoxi)-cumarinas (**36a-d**) foram realizados experimentos de determinação estrutural como RMN ^1H e ^{13}C (Anexos 11 a 18). A principal evidência da formação destes compostos no espectro de RMN ^1H é a ausência do sinal de hidrogênio referente ao hidrogênio metínico ligado ao carbono α -carboxílico da lactona, que nos compostos (**38a-d**) se observava na região de hidrogênio ligado a carbono sp^2 com deslocamento variando entre 6,25 - 6,28 ppm e integração igual a um. No espectro de RMN ^{13}C o que evidenciou a formação dos produtos foi a mudança de fase do sinal de carbono na região de carbono sp^2 no DEPT-Q, variando entre 112,95 - 113,36 ppm, referente ao carbono α -carboxílico da lactona (Figura 19).

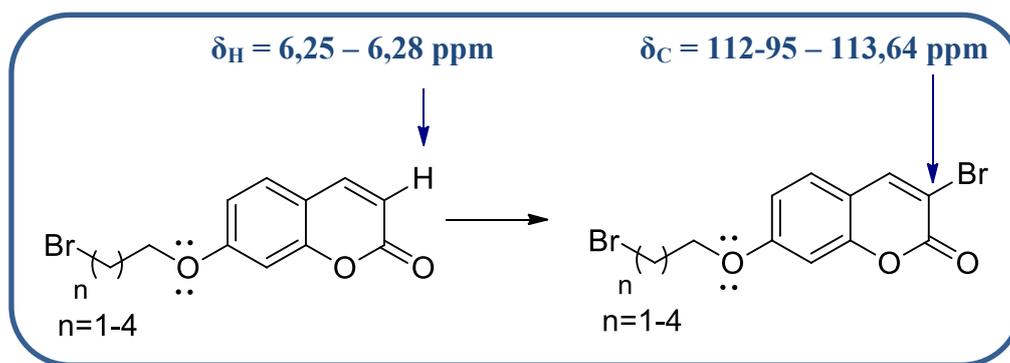


Figura 19. Atribuição comparativa dos principais sinais dos compostos 7-bromoalcoxi-cumarínicos (**38a-d**) e 3-(bromo)-7-(bromoalcoxi)-cumarínicos (**36a-d**) nos espectros de RMN ^1H e ^{13}C .

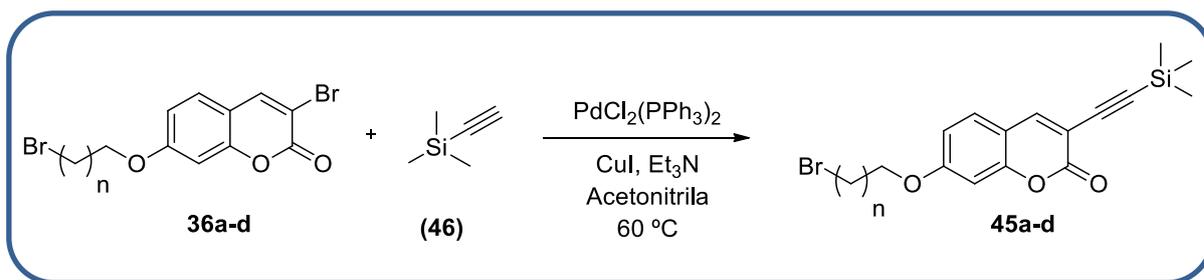
3.4. Síntese de 7-(bromoalcoxi)-3-((trimetilsilil)etenil)-cumarinas (**45a-d**)

A síntese dos compostos inéditos 7-(bromoalcoxi)-3-((trimetilsilil)etenil)-cumarina (**45a-d**) foi realizada por meio da reação de acoplamento cruzamento de Sonogashira (Esquema 13), da qual se obteve os produtos sob a forma de um sólido amorfo com diferentes colorações. Os rendimentos variaram de 54-66% (Tabela 3).

Tabela 3. Características físicas e rendimentos dos compostos 7-(bromoalcoxi)-3-((trimetilsilil)etenil)-cumarinas (**45a-d**).

Composto	n	Características físicas	PF°C	Rendimento (%)
45a	1	Sólido bege	156 – 159	54
45b	2	Sólido âmbar	105 – 110	59
45c	3	Sólido amarelo claro	141 – 143	64
45d	4	Sólido amarelo	74 - 76	66

A reação de acoplamento cruzado Sonogashira se deu a partir da 3-(bromo)-7-(bromoalcoxi)-cumarina (**36a-d**), cloreto de bis(trifenilfosfina)paládio(II), iodeto de cobre, trietilamina e trimetilsililacetileno (TMS-A) (**46**) em acetonitrila à 60 °C (YEE et al., 2006) (Esquema 13).



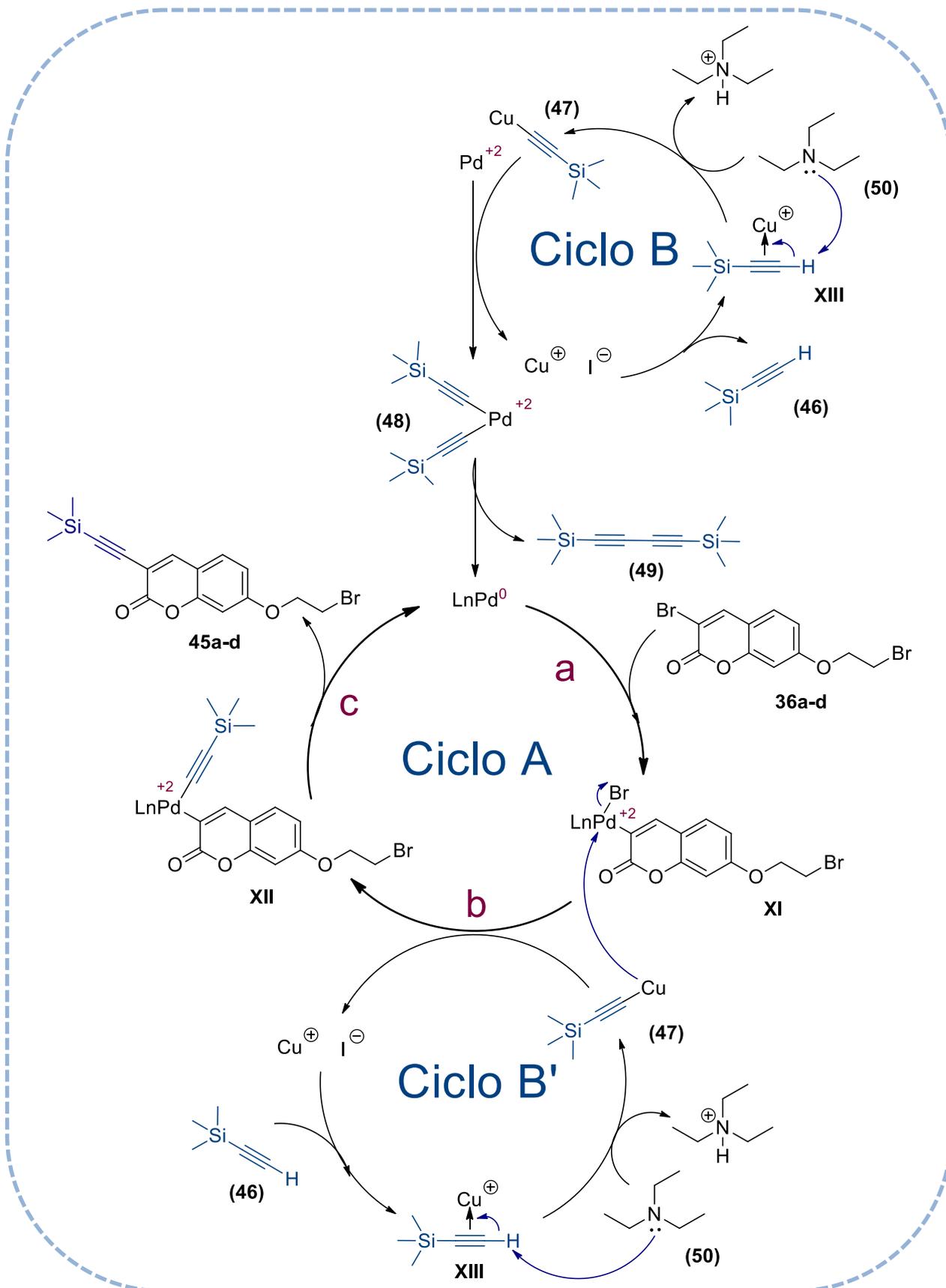
Esquema 13. Síntese dos derivados 7-(bromoalcoxi)-3-((trimetilsilil)etenil)-cumarinas (**45a-d**).

Essa etapa reacional se faz necessário para que a subsequente obtenção das 7-(bromoalcoxi)-3-(etenil)-cumarina (**33a-d**) tornar-se possível e segura, já que outra via de obtenção faria uso de acetileno como bloco de construção de dois carbonos, entretanto, não é recomendado a sua manipulação por se tratar de um gás explosivo. Dessa forma, optou-se pelo uso do TMS-A (**46**), um líquido destilável facilmente manipulado como substituto do acetileno. Conseqüentemente, para se obter os compostos **33a-d** desejados, os compostos **45a-d** obtidos necessitaram ser desprotegidos na etapa seguinte. Também é importante destacar que o solvente originalmente utilizado na literatura, DMF, foi alterado por outro solvente aprótico, acetonitrila, para facilitar a evaporação do solvente ao fim da reação, visto que a acetonitrila (PE= 82 °C) é evaporada mais facilmente que o DMF (PE= 153 °C).

Segundo SONOGASHIRA e colaboradores, a reação de acoplamento cruzado de Sonogashira consiste em uma eficiente ferramenta sintética que permite a construção de ligações Csp²-Csp, possibilitando a obtenção de compostos acetilênicos dissubstituídos. Podendo-se então dizer que se trata de um acoplamento cruzado entre haletos de vinila ou arila com acetilenos terminais, utilizando complexos de paládio (0) como catalisador e co-catalisado por sais de cobre (I) na presença de uma base (SONOGASHIRA et al., 1975).

Ainda não foi completamente elucidado o mecanismo da reação de acoplamento de Sonogashira, assim como a estrutura da espécie catalítica ativa e o exato envolvimento do CuI como catalisador (SONOGASHIRA et al., 1975). Entretanto, o mecanismo mais aceito combina três ciclos catalíticos (A, B e B'), envolvendo os processos de adição oxidativa e eliminação reductiva (Esquema 14) (SONOGASHIRA et al., 2002).

Inicialmente temos a reação do complexo PdCl₂(PPh₃)₂ com dois equivalentes do acetileno de cobre (**47**), proveniente do ciclo B, que leva a formação do bis(trifenilfosfina)dialquinil de paládio(II) (**48**). Este, por sua vez, sofre eliminação reductiva resultando na formação do 1,3-butadiino (**49**) e da espécie catalítica ativa, bis-trifenilfosfina



Esquema 14. Esquema de intermediário proposto para reação acoplamento de Sonogashira para obtenção de 7-(bromoalcoxi)-3-((trimetilsilil)etenil)-cumarinas (**45a-d**) (Adaptado de SONOGASHIRA et al., 2002).

de paládio(0) (Pd(PPh₃)₂). Já o ciclo catalítico do paládio (A), tem início com a adição oxidativa da 3-(bromo)-7-(bromoalcoxi)-cumarina (**36a-d**), (etapa a), que leva a formação do intermediário de paládio (II) (**XI**). Subsequentemente, este intermediário sofre transmetalização (etapa b) com o acetileto de cobre, proveniente do ciclo B', o que resulta no intermediário (**XII**). Finalmente, a partir da eliminação redutiva (etapa c), temos a formação do composto 7-(bromoalcoxi)-3-((trimetilsilil)etenil)-cumarina (**45a-d**), e o catalisador de paládio, Pd(PPh₃)₂, é regenerado (SONOGASHIRA et al., 2002).

A formação do acetileto de cobre (**47**) ocorre através da catálise de cobre na presença da base, Et₃N (**50**) (ciclo B e B'). O início dos ciclos catalíticos propostos ocorre a partir da interação entre o Cu(I) e a ligação tripla do TMS-acetileno (**46**), promovendo a formação do complexo (**XII**). Devido às propriedades eletropositivas do cobre, que possibilitam a estabilização da carga negativa, observa-se nesse complexo que hidrogênio ligado ao carbono *sp* torna-se mais ácido, possibilitando a desprotonação deste complexo pela Et₃N (**50**), resultando na formação do acetileto de cobre (**47**) (KURT, 2005).

Para confirmar a formação das 7-(bromoalcoxi)-3-((trimetilsilil)etenil)-cumarinas (**45a-d**) foram realizados experimentos de determinação estrutural como RMN ¹H e ¹³C (Anexos 19 e 26). Alguns sinais característicos possibilitaram a comprovação da formação deste composto, como os sinais referentes à presença das metilas ligadas ao silício no espectro de RMN ¹³C (0,04 – 0,46 ppm) e no espectro de RMN ¹H se apresentando como um simpleto integrando 9 hidrogênios (entre 0,27 – 0,29 ppm), estes valores encontram-se em campo mais baixos porque o Si possui características eletropositivas, blindando assim as metilas. Também no espectro RMN ¹³C foram observados sinais referentes a carbonos quaternários C₁₁ e C₁₂, entre 98,12 a 101,30 ppm, correspondendo aos carbonos da ligação tripla. Além disso, é visível tanto no RMN ¹H quanto ao de ¹³C, que os sinais referentes ao núcleo cumarínico e a cadeia alifática presente no composto se mantiveram, tendo pouca ou nenhuma alteração após a reação de acoplamento de Sonogashira, indicando assim que não houve degradação do composto.

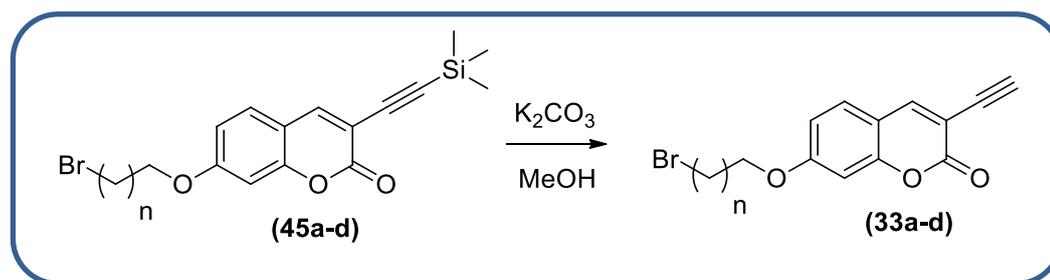
3.5. Síntese de 7-(bromoalcoxi)-3-(etenil)-cumarinas (**33a-d**)

Os compostos 7-(bromoalcoxi)-3-(etenil)-cumarinas (**33a-d**) foram sintetizados a partir de uma reação S_N2 de desproteção dos acetilenos protegidos com o grupamento trimetilsilila com carbonato de potássio em metanol (GAO et al.,2013) (Esquema 15), onde se

obteve os produtos sob a forma de um sólido amorfo com diferentes colorações. Os rendimentos variaram de 83-93% (Tabela 4).

Tabela 4. Características físicas e rendimentos dos compostos 7-(bromoalcoxi)-3-(etenil)-cumarínicos (**33a-d**).

Composto	n	Características físicas	Rendimento (%)
33a	1	Sólido marrom	87
33b	2	Sólido marrom claro	93
33c	3	Sólido alaranjado	87
33d	4	Sólido alaranjado	83

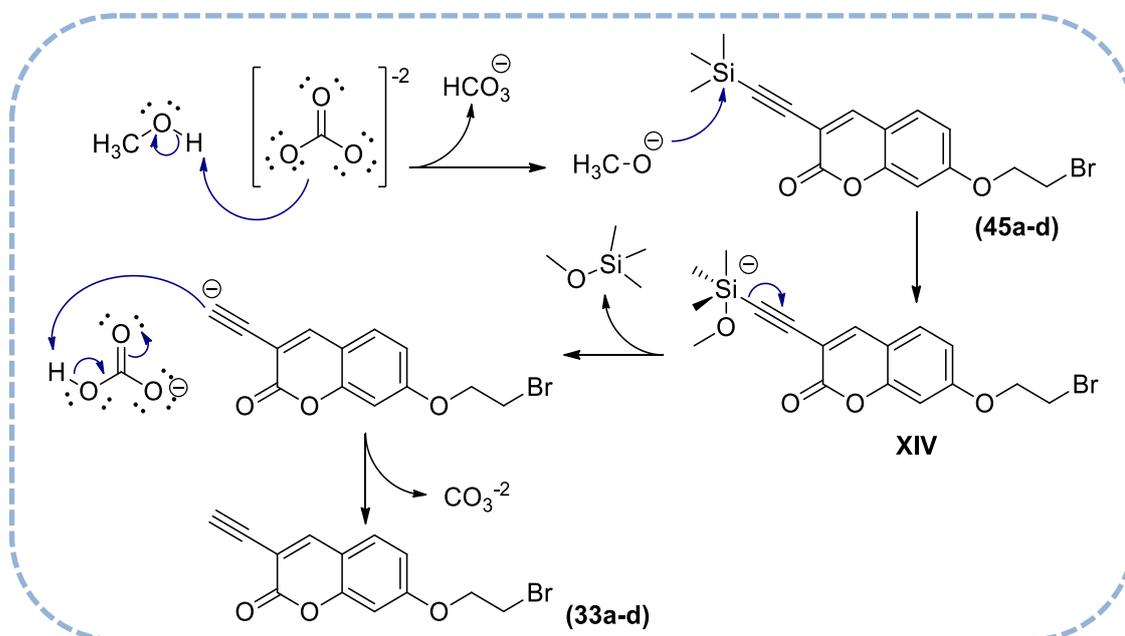


Esquema 15. Síntese dos derivados 7-(bromoalcoxi)-3-(etenil)-cumarínicos (**33a-d**).

A reação foi monitorada por CCDA, permitindo-se observar que os compostos de partida foram totalmente consumidos e um composto com um menor R_f foi formado. Essa diminuição do R_f é explicado pela retirada do grupamento trimetilsilila, cujas metilas diminuam a interação do composto com a fase estacionária.

O mecanismo proposto se inicia com uma reação ácido-base, onde há a abstração do próton do metanol pelo carbonato (CO₃⁻²), formando o ânion metoxila e um bicarbonato (HCO₃⁻), sendo estabelecido um equilíbrio entre os reagentes e os produtos formados (K_{eq}= 3,7 x 10⁻⁵ a 298 K). Sabendo que os grupamentos trimetilsilila são eletrófilos duros, espera-se que estes reajam rapidamente com nucleófilos duros, como oxigênio. Deste modo, o metoxilato ataca o silício formando um intermediário de geometria bipirâmide trigonal (**XIV**), no qual o silício está pentacoordenado e carregado negativamente. Os menores efeitos estéricos promovidos pelas longas ligações entre Si-C, tornam o ataque mais fácil.

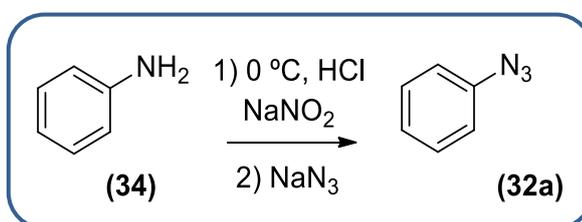
Subsequentemente, ocorre a liberação do ânion acetilênico, já que este é um bom grupo abandonador. Enfim, o ânion acetilênico abstrai um próton do bicarbonato, formando o composto 7-(bromoalcoxi)-3-(etenil)-cumarina **33a-d** (Esquema 16) (CLAYDEN *et al*, 2001).



Esquema 16. Esquema de intermediário proposto para a obtenção das 7-(bromoalcoxi)-3-(etenil)-cumarina (**33a-d**) (Adaptado de CLAYDEN *et al.*, 2001).

3.6. Síntese das azidas (**32a-b**)

A azida (**32a**) foi obtida por meio da reação entre o respectivo íon diazônico e azida de sódio. A síntese deste íon prosseguiu-se via reação de diazotação a partir da anilina (**34**), nitrito de sódio e ácido clorídrico em temperatura igual a 0 °C (Esquema 17) (CHENG *et al.*, 2012). A azida foi obtida como óleo alaranjado e rendimento de 79%.

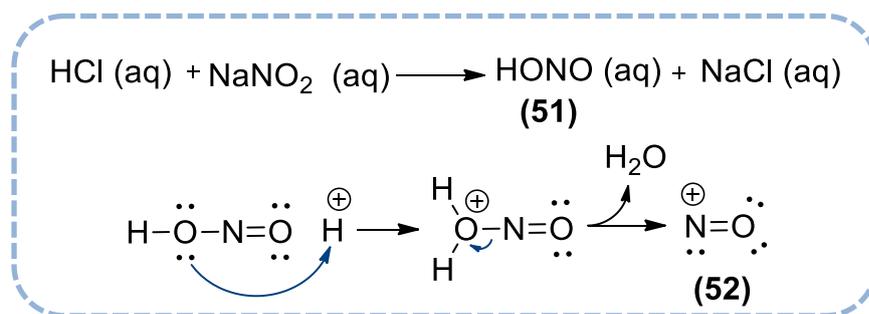


Esquema 17. Síntese da azida (**32a**).

A reação de diazotação que resulta na formação do sal diazônio baseia-se no tratamento de aminas primárias com ácido nitroso (HONO). Devido à instabilidade do íon diazônio à temperatura ambiente, podendo levar a sua decomposição com liberação N₂, houve um rigoroso controle das condições reacionais mantendo-se a temperatura na faixa de 0 à 5

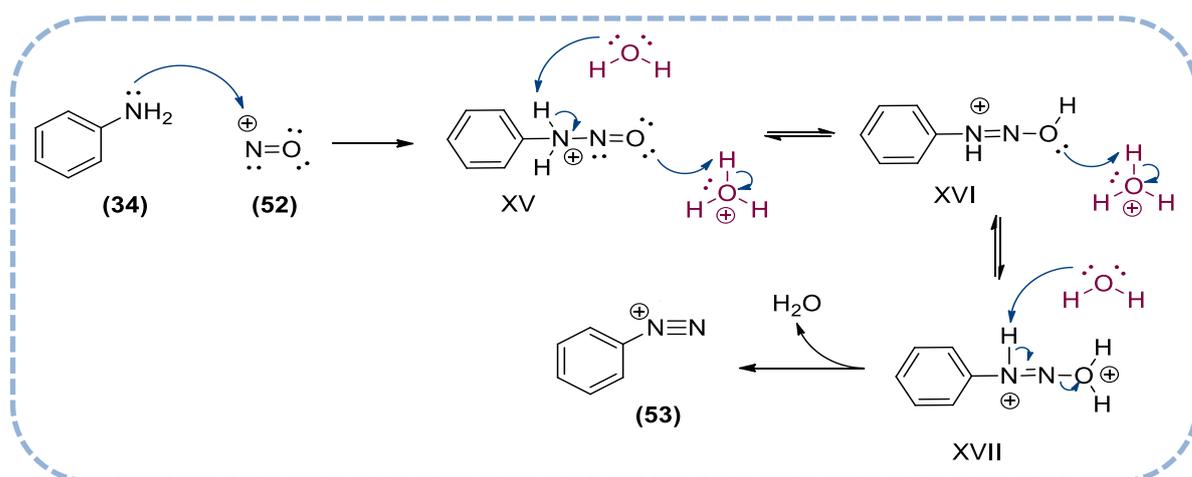
°C, que é a faixa na qual este íon tem uma certa estabilidade em solução aquosa (CLAYDEN et al., 2001). Ainda por conta da instabilidade do íon diazônio, optou-se por não isolar o sal e seguir imediatamente na síntese da azida.

O mecanismo da diazotação inicia-se com a reação entre NaNO_2 e HCl que leva a formação *in situ* do HONO (**51**), que por sua vez, dissocia-se para produzir o íon nitrosônio (**52**, Esquema 18) (CLAYDEN et al., 2001).



Esquema 18. Esquema de intermediários proposto para a formação do HONO (**51**) *in situ* (CLAYDEN et al., 2001).

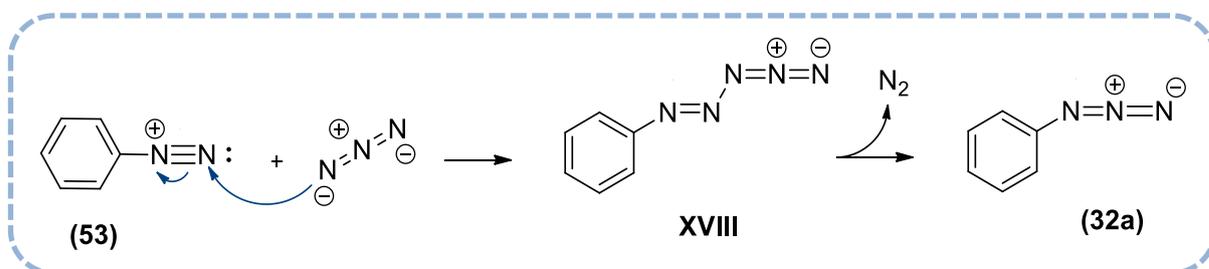
Posteriormente, íon NO^+ (**52**) sofre ataque do par de elétrons do nitrogênio da amina (**34**), levando a formação do íon *N*-nitrosamônio instável (**XV**), que por sua vez perde um próton, seguida da eliminação de água, resultando no diazoidróxido (**XVI**). Este na presença de ácido é protonado (**XVII**) e, em seguida, perde água para formar o íon diazônio (**53**) (Esquema 19) (CLAYDEN et al., 2001).



Esquema 19. Esquema de intermediários proposto para a formação de sais diazônios (**53**) (CLAYDEN et al, 2001).

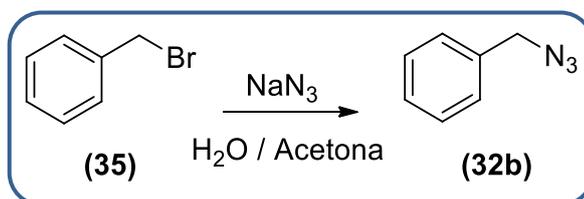
No que diz respeito a etapa subsequente, a natureza dos intermediários tem sido objeto de discussão desde a sua descoberta. Entretanto, estabeleceu-se um consenso no qual a azida atua como nucleófilo, atacando o íon de arenodiazônio, eletrófilo fraco, resultando na

formação do intermediário penta nitrogenado (**XVIII**). Em seguida, após a eliminação de uma molécula de nitrogênio, se obtém a azida (**32a**) (Esquema 20). Estudos espectroscópicos de RMN ^1H estabeleceram a existência das três formas isoméricas do intermediário (**XVII**), ou seja, a (Z, E), (E, E) e (E, Z), sendo o isômero (Z, E) o mais favorável (BUTLER et al., 1998).



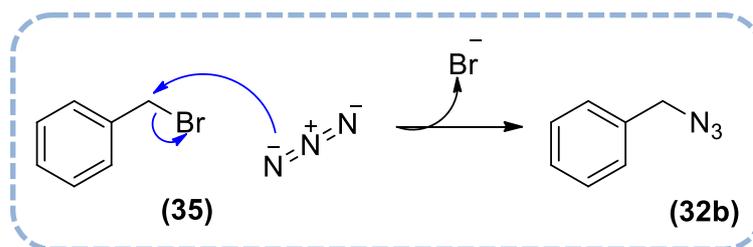
Esquema 20. Esquema de intermediários proposto para a obtenção da azida (**41a**) a partir do sal diazônico (Adaptado de BUTLER et al., 1998).

Em contrapartida, a benzil azida (**32b**) foi obtida a partir azida de sódio e o brometo de benzila (**35**) via reação de substituição nucleofílica ($\text{S}_{\text{N}}2$) em uma mistura de água/acetona (Esquema 21) (HONG et al., 2013). A benzil azida (**32b**) foi obtida como óleo de coloração amarela e rendimento igual a 90%.



Esquema 21. Síntese da azida (**32b**).

O mecanismo proposto para a síntese da benzil azida (**32b**) é via reação de substituição nucleofílica bimolecular ($\text{S}_{\text{N}}2$) (Esquema 22) (SMITH & MARCH, 2007). Inicialmente, a azida atua como nucleófilo, atacando o carbono ligado ao brometo de benzila (**35**). Concertadamente, a ligação *N*-carbono vai se formando, enquanto a ligação C-Br vai se rompendo, até o brometo, bom grupo de saída, ser eliminado e assim formar a benzil azida (**32b**).

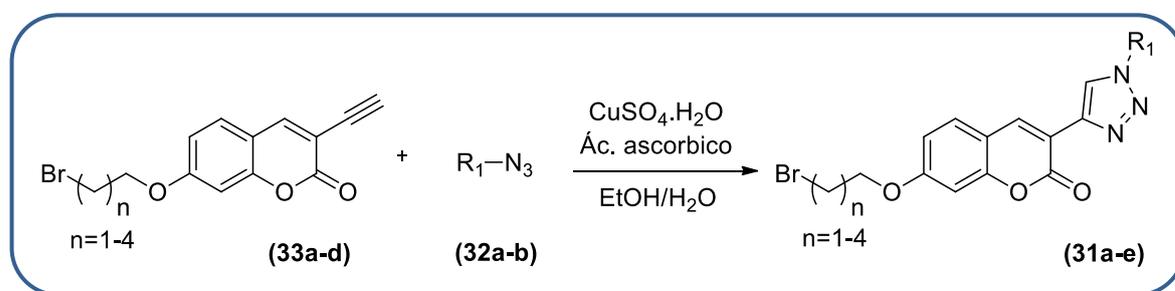


Esquema 22. Esquema de intermediários proposto para a obtenção da azida (**32b**) (Adaptado de SMITH & MARCH, 2007).

A caracterização das azidas sintetizadas não foi realizada, visto que a instabilidade descrita para essas substâncias impossibilitaria que as análises fossem realizadas antes de sua degradação.

3.7. Síntese de 3-(1*H*-1,2,3-triazol-4- R_1)-7-(bromoalcoxi)-cumarínicos (31a-e)

A síntese dos compostos inéditos 3-(1*H*-1,2,3-triazol-4- R_1)-7-(bromoalcoxi)-cumarínicos (31a-e) ocorreram via reação “*Click Chemistry*”, que consistiu em uma cicloadição catalisada por Cu(I) em EtOH:H₂O entre o alcino terminal da 3-(etenil)-7-(bromoalcoxi)-cumarina (33a-d) e as azidas orgânicas (32a-b), levando a formação regioespecífica do 1,2,3-triazol-1,4-dissubstituído (Esquema 23). Os compostos obtidos possuem as atribuições descritas na Tabela 5.



Esquema 23. Síntese de 3-(1*H*-1,2,3-triazol-4- R_1)-7-(bromoalcoxi)-cumarínicos (31a-e).

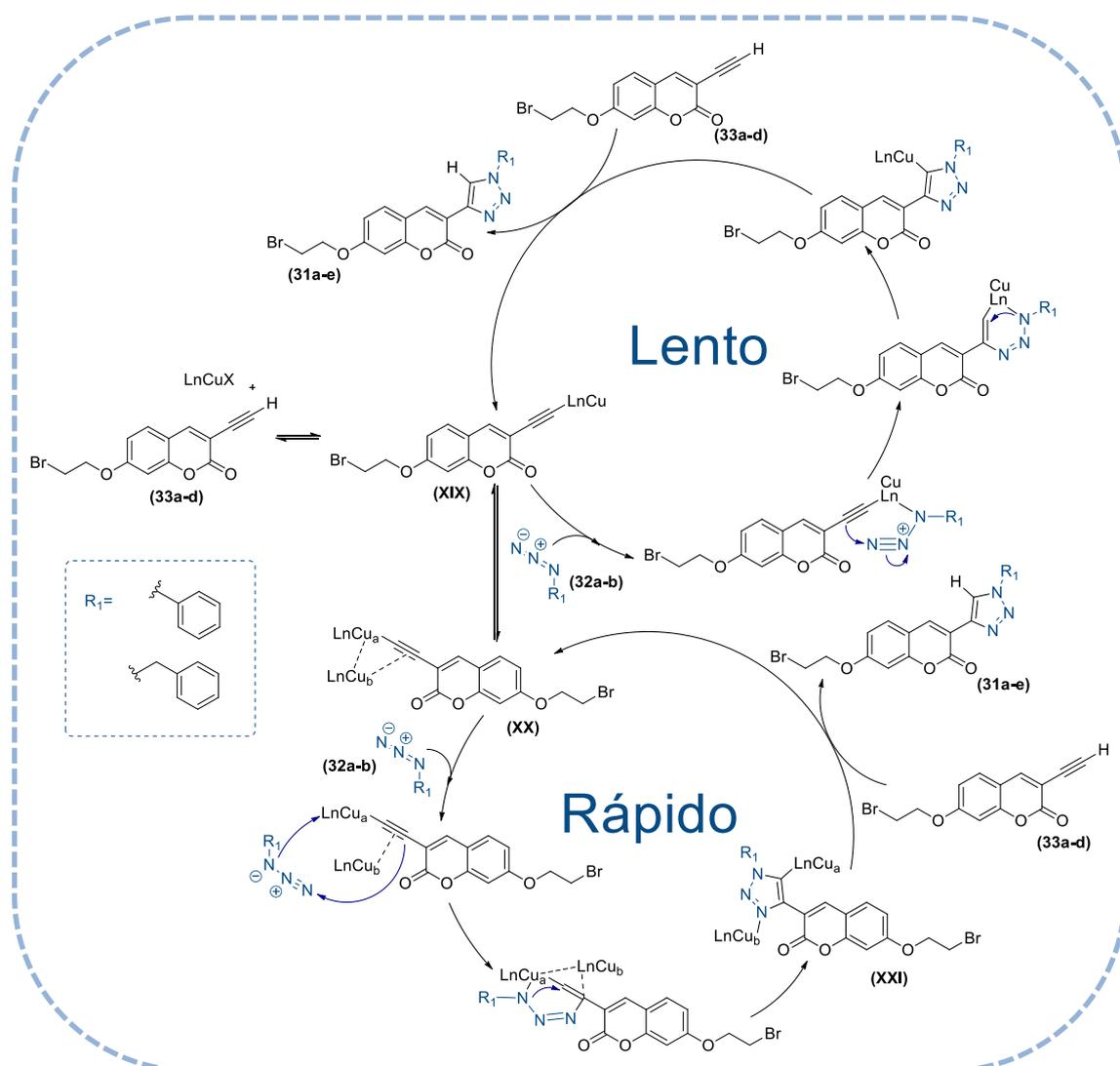
Tabela 5. Características físicas e rendimento da síntese 3-(1*H*-1,2,3-triazol-4- R_1)-7-(bromoalcoxi)-cumarínicos (31a-e).

Composto	R_1	N	Características físicas	PF°C	Rendimento (%)
31a	-Fenil	1	Sólido marrom claro	220 – 225 ^d	61
31b	-Fenil	2	Sólido marrom claro	190 – 195 ^d	66
31c	-Fenil	3	Sólido marrom claro	173 - 175 ^d	79
31d	-Fenil	4	Sólido marrom claro	174 - 175 ^d	73
31e	-Benzil	1	Óleo marrom	-	57

^d Ponto de degradação

Alguns mecanismos foram propostos para descrever a reação CuAAC, sinônimo perfeito do conceito “Click Chemistry”. Inicialmente, foi postulado por HEIN e FOKIN o envolvimento de complexos de Cu(I) mononuclear, baseado em cálculos teóricos de funcional de densidade. Entretanto, progressos nos estudos sugeriram a participação de complexos de Cu(I) dinucleares, onde foi assegurado que o complexo de acetileno de Cu dinuclear corresponde a espécie catalítica ativa, levando a proposta de um novo mecanismo (HEIN; FOKIN, 2010; WORRELL; MALIK; FOKIN, 2013).

Em 2015, Bertrand e colaboradores, publicaram um estudo no qual relatam o isolamento dos complexos de mono e bis acetileno de Cu(I) (**XIX** e **XX** respectivamente) e



Esquema 24. Mecanismo da CuAAC envolvendo ambos os complexos mono e bis acetileno de Cu(I) **XIX** e **XX** respectivamente, proposto para a obtenção dos compostos 3-(1*H*-1,2,3-triazol-4-*R*₁)-7-(bromoalcoxi)-cumarínicos (**31a-e**) (Adaptado de BERTRAND et al., 2015).

demonstram que ambas as espécies são ativas no ciclo catalítico da CuAAC, entretanto, observam que apenas o complexo dinuclear está envolvido na via cineticamente mais favorecida (Esquema 24). Ademais, relatam o isolamento de um complexo de triazóila de Cu dinuclear nunca descrito (**XXI**). A partir disso, os autores ainda propuseram que é o próton proveniente do alcino que inicia a desmetalização de **XXI**, regenerando assim o acetileno de Cu(I) dinuclear **XXI** e tornando o complexos de LnCu(I)X desnecessário para recomeçar o ciclo catalítico (BERTRAND et al., 2015).

Para confirmar a formação dos compostos 3-(1*H*-1,2,3-triazol-4-*R*₁)-7-(bromoalcoxi)-cumarínicos (**31a-e**) foram realizados experimentos de determinação estrutural como RMN ¹H e ¹³C (Anexos 27 e 36). Alguns sinais característicos possibilitaram a comprovação da formação deste composto, como no RMN ¹H o simpleto integrado para um hidrogênio referente ao H₁₂ variando entre 8,62 – 8,81 ppm. Esse sinal corresponde ao hidrogênio do 1,2,3-triazol, formado após a reação *Click Chemistry*. No RMN ¹³C é visível a diferença no deslocamento do C₁₂, que no composto **45a-d** era um carbono *sp* ligado a trimetilsilila e após a formação do heterociclo em **31a-e**, é um carbono *sp*² ligado a um nitrogênio do anel triazólico e com deslocamento variando entre 121,21 – 123,22 ppm. O carbono *sp* C₁₁ também sofreu mudança no deslocamento devido à formação do triazol, apresentando um deslocamento variando entre 130,56 – 136,94 ppm (Figura 20).

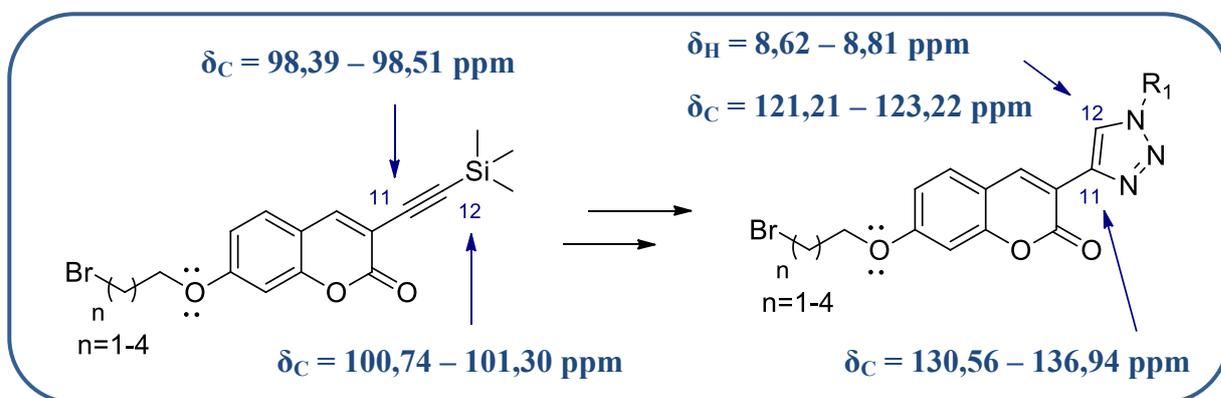


Figura 20. Atribuição comparativa dos principais sinais dos compostos 7-(bromoalcoxi)-3-((trimetilsilil)etenil)-cumarínicos (**45a-d**) e 7-(bromoalcoxi)-3-(etenil)-cumarínicos (**31a-e**) nos espectros de RMN ¹H e ¹³C.

Outros novos sinais são observados devido à inserção do anel aromático, onde é possível visualizar no RMN ¹H um multipletto integrado para 4 hidrogênios variando entre 7,31 – 7,58 ppm referentes aos hidrogênio *orto* e *meta*, enquanto o hidrogênio em *para* possui deslocamento entre 7,25 – 7,47 ppm, e é visto como um tripleto com 1 hidrogênio. No RMN

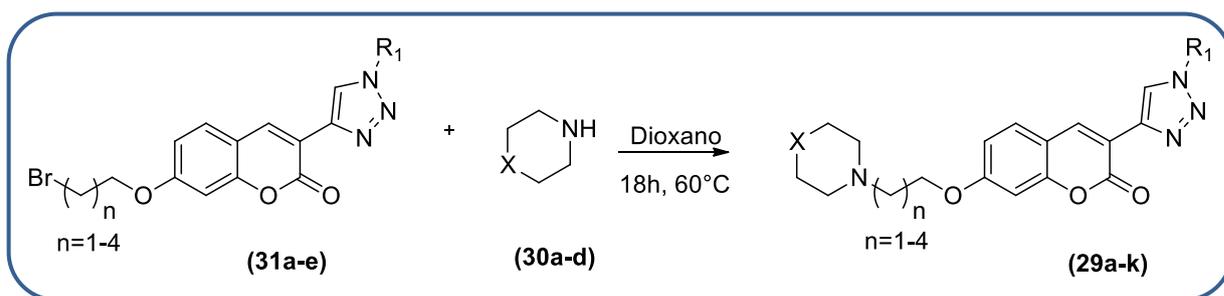
^{13}C os sinais característicos de aromáticos também puderam ser observados, carbonos em *orto* e *meta* com deslocamento variando entre 120,45 – 127,68 ppm e 128,77 – 129,84 ppm, respectivamente, e carbono em *para* variando entre 128,45 – 129,70 ppm. O carbono quaternário também pode ser identificado com deslocamento variando entre 136,93 – 141,63 ppm.

Para o composto **31e** ainda é possível observar o sinal referente ao metileno benzílico, onde é possível visualizar no RMN ^1H um simpleto integrado para 2 hidrogênios em 5,52 ppm, esses hidrogênios são muito desblindados devido ao ambiente químico ao qual se encontra, sendo vizinho de um anel aromático e do nitrogênio do triazol. No RMN ^{13}C seu deslocamento é em 53,96 ppm.

Além disso, é visível tanto no RMN ^1H quanto ao de ^{13}C , que os sinais referentes ao núcleo cumarínico e da cadeia alifática presentes no composto se mantiveram, tendo pouca ou nenhuma alteração após a reação *Click Chemistry*, indicando assim que não houve degradação do composto.

3.8. Síntese das 3-(1*H*-1,2,3-triazol-4- R_1)-7-(aminoalcoxi)-cumarinas (**29a-k**)

Os compostos inéditos 3-(1*H*-1,2,3-triazol-4- R_1)-7-(aminoalcoxi)-cumarinas (**29a-k**) foram sintetizados via reação de aminação, conforme demonstrado no Esquema 25, os quais foram obtidos nas formas de um sólido amorfo e óleo de diferentes cores. Os rendimentos variaram de 40-86 % (Tabela 6).



Esquema 25. Síntese dos derivados 3-(1*H*-1,2,3-triazol-4- R_1)-7-(aminoalcoxi)-cumarinas (**29a-k**).

Esta reação foi realizada a partir das aminas cíclicas (**30a-d**) e dos respectivos derivados 3-(1*H*-1,2,3-triazol-4- R_1)-7-(bromoalcoxi)-cumarínicos (**31a-e**) em dioxano, sob aquecimento a 60 °C (Esquema 25).

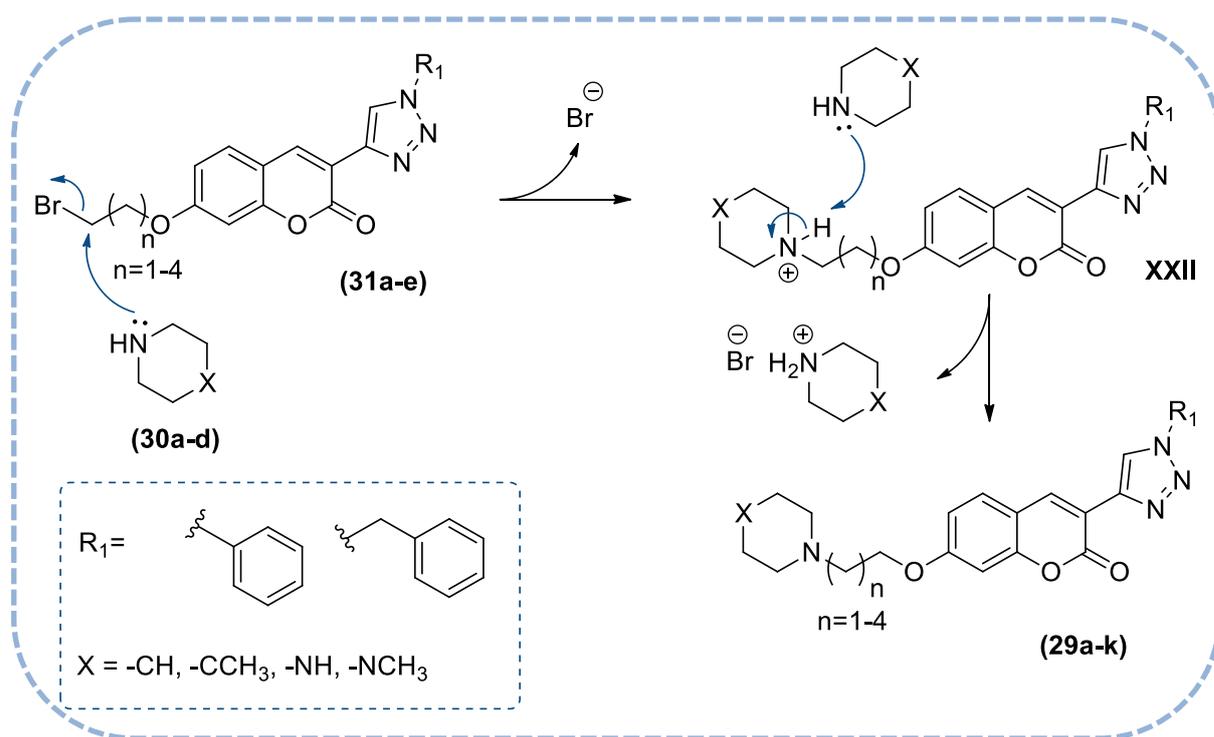
Tabela 6. Características físicas, rendimentos obtidos para os compostos **29a-k**.

n=1-4

Composto	R ₁	X	n	Características físicas	PF °C	Rendimento (%)
29a	Fenil	-CH ₂	1	Sólido marrom	173 - 178	53
29b	Fenil	-CH ₂	2	Sólido âmbar	244 – 251 ^d	63
29c	Fenil	-CH ₂	3	Sólido amarelo	186 -193	69
29d	Fenil	-CH ₂	4	Sólido amarelo	247-280	76
29e	Fenil	-CCH ₃	1	Sólido marrom claro	148 – 150	52
29f	Fenil	-CCH ₃	2	Sólido bege	160 – 164	73
29g	Fenil	-CCH ₃	3	Sólido bege	222 – 226 ^d	86
29h	Fenil	-CCH ₃	4	Sólido branco	163 - 165	64
29i	Fenil	-NCH ₃	1	Óleo marrom claro	-	64
29j	Fenil	-NH	1	Óleo marrom escuro	-	60
29k	Benzil	-CH ₂	1	Óleo marrom	-	40

^d Ponto de degradação.

O mecanismo proposto para a síntese dos compostos **29a-k** (Esquema 26) inicia-se pela reação de substituição nucleofílica (S_N2), no qual a amina cíclica atua como nucleófilo, através dos elétrons não ligantes do nitrogênio, que promove um ataque nucleofílico ao carbono metilênico ligado ao bromo. De maneira concertada, a ligação nucleófilo-carbono se forma, enquanto a ligação C-Br se rompe, até o brometo ser liberado e assim formar o intermediário protonado **XXII**. Em seguida, amina cíclica abstrai o próton ligado ao nitrogênio, formando, assim, os respectivos 3-(1*H*-1,2,3-triazol-4-*R*₁)-7-(aminoalcoxi)-cumarina (**29a-k**) e, como subproduto, o sal brometo de amino. Pelo fato da amina cíclica agir também como uma base nesta reação, a mesma foi adicionada em excesso ao meio (Esquema 26) (CLAYDEN et al., 2001).



Esquema 26. Esquema de intermediários proposto para formação dos derivados 3-(1H-1,2,3-triazol-4-R₁)-7-(aminoalcoxi)-cumarinas (**29a-k**) (Adaptado de CLAYDEN et al., 2001).

Visto que o mecanismo é uma S_N2, o impedimento estérico é determinante para a eficiência do ataque nucleofílico. Assim, a reação com os derivados com menor número de carbonos espaçadores (**29a-b;e-f; i-k**) se deu de forma mais demorada e com menores rendimentos do que as demais (**29c-d;g-h**). O acompanhamento da reação se deu através de análise por cromatografia em camada fina, com sílica como fase estacionária e dois eluentes, hexano:acetato de etila 30% para observar o consumo do reagente (**31a-e**) e diclorometano: metanol 10% que permite observar a formação de um produto de caráter mais polar em relação ao reagente de partida. O fator de retenção observado se explica pela melhor interação dos produtos com a sílica, devido à presença do nitrogênio que é capaz de realizar ligações de hidrogênio com a sílica, o que não ocorre nos respectivos reagentes.

Para confirmar a formação dos compostos 3-(1H-1,2,3-triazol-4-R₁)-7-(aminoalcoxi)-cumarinas (**29a-k**) foram realizados experimentos de determinação estrutural como RMN ¹H e ¹³C (Anexos 37 à 58). Alguns sinais característicos possibilitaram a comprovação da formação deste composto, como no RMN ¹³C o sinal referente ao CH₂ do carbono *sp*³ vizinho ao nitrogênio, com deslocamento variando 55,48 – 65,66 ppm. Esse sinal é importante porque representa uma mudança relativamente alta de deslocamento químico no sentido campo alto,

em relação aos compostos (**31a-e**), onde esse carbono CH_2 de carbono sp^3 era vizinho ao bromo (Figura 21).

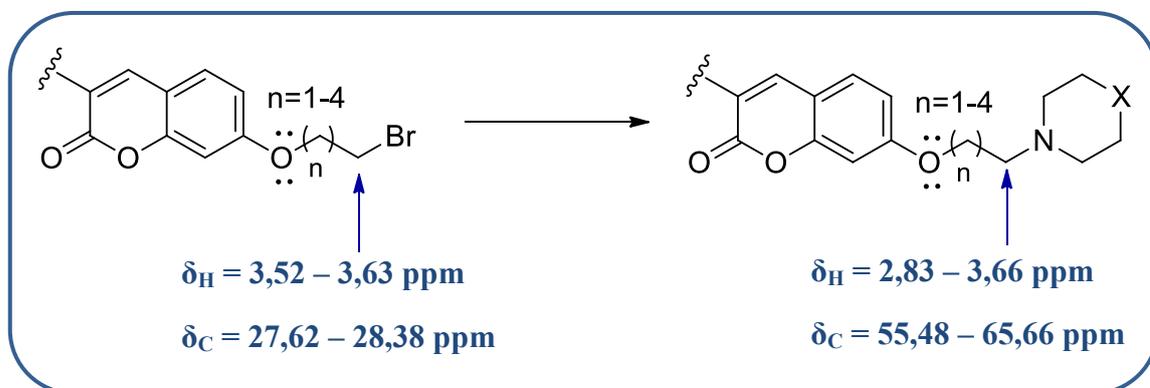


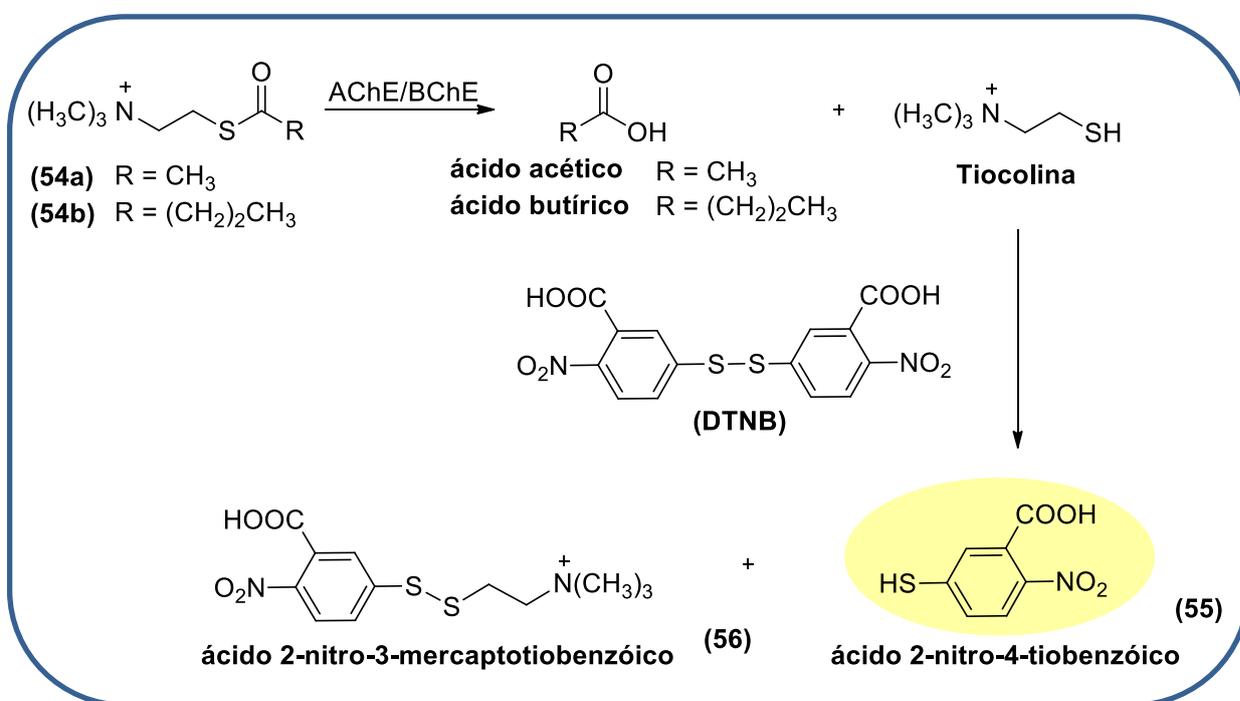
Figura 21. Atribuição comparativa dos principais sinais dos compostos 3-(1*H*-1,2,3-triazol-4- R_1)-7-(bromoalcoxi)-cumarinas (**31a-e**) e 3-(1*H*-1,2,3-triazol-4- R_1)-7-(aminoalcoxi)-cumarinas (**29a-k**) nos espectros de RMN 1H e ^{13}C .

Os sinais referentes as aminas cíclicas que corroboram para a confirmação da obtenção dos compostos no RMN 1H foram obtidos na maior parte dos espectros como simpletos largos e mascarados pelo sinal da H_2O . Entretanto, ao analisar os espectros de RMN ^{13}C podemos identificar os sinais referentes ao grupamento piperidínico para os compostos **29a-h**; **29k**: δ 53,64 – 54,87; δ 22,53 – 29,64; δ 22,63 – 23,68 e para o grupamento piperazínico nos composto **29i-j**: δ 54,77– 56,42; δ 45,81 – 53,65;

Além disso, é visível tanto no RMN 1H quanto ao de ^{13}C , que os sinais referentes ao núcleo cumarínico e demais grupos funcionais presentes no composto se mantiveram, tendo pouca ou nenhuma alteração após a reação de aminação, indicando assim que não houve degradação do composto.

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

Os ensaios realizados para determinar a atividade inibitória frente à AChE e BChE dos compostos **29a-k**, foram realizados utilizando o método de Ellman (ELLMAN, 1961) e tendo como composto de referência a donepezila. O ensaio consiste na clivagem enzimática da acetiltiocolina ou butiriltiocolina (**54a-b**) promovida pela AChE ou BChE, respectivamente. Um dos produtos dessa clivagem é a tiocolina, que é o marcador da atividade enzimática, que ao reagir com o DTNB, leva a formação do ácido 2-nitro-4-tiobenzóico (**55**) e do ácido 2-nitro-3-mercaptopiobenzóico (**56**). O produto **55** apresenta coloração amarela, a qual pode ser quantificada por medida da absorvância em um leitor de placas equipado com filtro de luz a $\lambda = 415$ nm. Desta forma, a atividade da enzima é medida de maneira indireta por meio da reação do produto de clivagem enzimática com um reagente pró-cromofórico (Esquema 27).



Esquema 27. Reação ocorrida no ensaio de Ellman.

Todos os compostos testados se mostraram capazes de inibir a AChE, tendo alguns deles apresentado grande potência e seletividade. Dos compostos ensaiados, o que se mostrou menos ativo foi o **29d**, o qual apresentou valor de $CI_{50} = 4,79 \mu M$ e os mais ativos foram os compostos **29a** e **29k**, os quais apresentaram valor de $CI_{50} = 0,05 \mu M$ e $CI_{50} = 0,006 \mu M$, respectivamente. Os respectivos resultados de CI_{50} obtidos nos ensaios de inibição frente às colinesterases encontram-se na Tabela 7.

Tabela 7. Resultados obtidos nos ensaios inibição enzimática frente à EeAChE e EqBChE.

Compostos	R ₁	X	n	CI ₅₀ (μM) ± DP ^a		IS ^d
				AChE ^b	BChE ^c	
29a	Fenil	-CH ₂	1	0,05 ± 0,002	8,66 ± 0,153	173
29b	Fenil	-CH ₂	2	1,33 ± 0,045	3,97 ± 0,094	3,0
29c	Fenil	-CH ₂	3	1,11 ± 0,010	2,41 ± 0,029	2,2
29d	Fenil	-CH ₂	4	4,79 ± 0,289	3,54 ± 0,081	0,7
29e	Fenil	-CCH ₃	1	1,69 ± 0,075	11,13 ± 0,848	6,6
29f	Fenil	-CCH ₃	2	2,94 ± 0,141	4,14 ± 0,115	1,4
29g	Fenil	-CCH ₃	3	1,31 ± 0,044	2,18 ± 0,009	1,7
29h	Fenil	-CCH ₃	4	1,42 ± 0,111	1,88 ± 0,100	1,3
29i	Fenil	-NCH ₃	1	3,16 ± 0,076	9,84 ± 0,862	3,1
29j	Fenil	-NH	1	1,06 ± 0,074	8,14 ± 0,132	7,7
29k	Benzil	-CH ₂	1	0,006 ± 0,0006	3,79 ± 0,365	632
Donepezila	-	-	-	0,007 ± 0,0002	2,39 ± 0,105	341

^aConcentração necessária para inibir 50% da atividade colinesterásica, dados obtidos ± desvio padrão (DP) de triplicatas de ensaios independentes; ^b AChE de enguia elétrica; ^c BChE de soro equino; ^d Índice de seletividade (IS) é dado como BChE CI₅₀/AChE CI₅₀.

A partir dos resultados obtidos podemos observar que dentre os compostos **29a-d**, os compostos que apresentaram melhores potenciais de inibição frente à AChE são aqueles com menor número de carbonos espaçadores entre o grupo piperidinila e o núcleo cumarínico. De modo a se estabelecer uma tendência decrescente da atividade conforme a cadeia alquílica aumenta de tamanho, conforme era esperado, uma vez que esse comportamento foi observado nos derivados do composto protótipo (**28**).

Interessante salientar a inversão dessa tendência para os compostos **29b** e **29c**, respectivamente, 3 e 4 carbonos de espaçadores. Este resultado pode representar uma tendência de uma curva serrilhada à medida que a cadeia espaçadora de carbono aumenta. Às vezes, esse perfil pode ser observado em uma série homóloga, alternando variações de atividade de acordo com o número de carbonos par ou ímpar. Curiosamente, variações alternadas ou serrilhadas da atividade inibitória da AChE também foram observadas na literatura para análogos do donepezila (SUGIMOTO et al., 1995).

Ao observarmos agora os compostos com o substituinte metila na posição 4 da piperidina (**29e-h**), nota-se que não se obteve uma melhora na atividade de inibição frente aos derivados respectivos com a piperidina não substituída, como exceção dos derivados com 5 carbonos de espaçadores, onde se observou uma melhora na atividade inibidora.

Em relação os derivados piperazínicos, o composto **29j** demonstrou diminuição da potência de inibição frente à AChE em relação ao seu análogo **29a** e o composto **29i** revelou-se um dos compostos com menor potencia de inibição da serie.

Dois compostos se destacaram por apresentar excelente potência inibitória, o **29a** e o **29k**, que apresentaram atividades na mesma ordem de grandeza do composto protótipo, validando o planejamento. Além de ser o mais ativo, o composto **29k** se destacou pelo índice de seletividade obtido entre as colinesterases (IS = 632). Demonstrando assim equipotente, mas bem mais seletivo que o fármaco donepezila (**6**).

3.10. Resultados dos ensaios do mecanismo de inibição enzimática

Os inibidores enzimáticos são moléculas que atuam diminuindo ou interrompendo a catalise de reações enzimáticas. Os inibidores enzimáticos podem ser divididos em duas classes: os inibidores reversíveis e os inibidores irreversíveis. Os inibidores reversíveis podem ser classificados de acordo com o seu mecanismo de inibição, como inibidores competitivos, não-competitivos ou incompetitivos e são identificados pelo efeito que produzem nas constantes cinéticas K_m e $V_{máx}$. A inibição competitiva é aquela em que o inibidor compete com o substrato pelo sítio catalítico da enzima, de forma que à medida que o inibidor ocupa o sitio ativo formando um complexo enzima-inibidor (EI), ele impede a formação complexo enzima-substrato (ES). Essa competição se torna possível devido à semelhança estrutural entre o inibidor e o substrato. Para este tipo de inibição, observa-se um aumento dos valores de K_m enquanto $V_{máx}$ se mantém constante. Já o inibidor não-competitivo liga-se a um sítio alostérico da enzima, ou seja, um sítio diferente do sítio ativo. Por mais que o substrato ainda possa se ligar ao complexo EI formando um complexo ternário enzima-substrato-inibidor

(ESI), este complexo não é capaz de converter substrato em produto. Para este tipo de inibição, observa-se uma diminuição dos valores de $V_{\text{máx}}$ enquanto K_m se mantém constante. Por fim, na inibição incompetitiva, o inibidor pode se ligar somente ao complexo ES e não à enzima livre e, portanto, o inibidor se liga a um sítio que é criado durante a alteração conformacional da enzima, promovida pela ligação ao substrato, formando o complexo ternário ESI. Neste caso, tanto K_m quanto $V_{\text{máx}}$ são reduzidos na presença do inibidor (NELSON, 2018).

Afim de determinação qual tipo de inibição promovida pelos compostos testados frente às colinesterases, realizaram-se ensaios de cinética enzimática em ambas as enzimas para o composto **29a** e **29k** devido a boa atividade apresentada frente à AChE. A partir dos valores de K_m e $V_{\text{máx}}$ (Tabela 8) e do perfil do gráfico de Lineweaver–Burk, foi possível observar que o tipo de inibição promovida pelo composto testado é o tipo mista para ambas as enzimas.

Sendo assim os compostos inibidores são capazes de ligarem-se tanto ao sítio catalítico das enzimas (inibição competitiva) quanto ao sítio alostérico (inibição não-competitiva), atuando, assim, de duas maneiras diferentes. Desta forma, calcula-se duas constantes de afinidade para o composto em cada enzima, sendo eles K_i (inibição competitiva) e K_i' (inibição não-competitiva), conforme pode ser observado na Tabela 8.

A partir dos valores dessas constantes de afinidade podemos inferir algumas constatações. Primeiramente, para o composto **29a** podemos observar que a constante de inibição competitiva (K_i) foi 1112 vezes maior para BChE ($K_i = 3502 \mu\text{M}$) em comparação com a AChE ($K_i = 3,15 \mu\text{M}$). Enquanto a constante de inibição não-competitiva (K_i') foi 2148 vezes maior para BChE ($K_i' = 9174 \mu\text{M}$) em comparação com a AChE ($K_i' = 14,27 \mu\text{M}$). A grande diferença entre as enzimas tanto para a inibição do tipo competitiva quanto para a não-competitiva nos indica que a maior atividade em AChE está correlaciona tanto com o sítio catalítico quanto o sítio alostérico, embora as interações com o sítio alostérico tenham desempenhado um papel mais proeminente para a o aumento da seletividade. Ainda, que a alta atividade inibitória do composto **29a** frente à AChE deve-se majoritariamente as interações na sítio catalítico.

Tabela 8. Parâmetros cinéticos de **29a** e **29k** em AChE e BChE.

Concentração (μM)	$V_{\text{máx}} \pm \text{DP}$ ($1 \times 10^3 \text{ nM/min}$)	$K_m \pm \text{DP}$ ($1 \times 10^3 \text{ nM}$)	$K_i \text{ (nM)} \pm \text{DP}^a$	$K_i' \text{ (nM)} \pm \text{DP}^b$
29a em AChE				
0	$6,10 \pm 0,088$	$40,38 \pm 1,566$		
0,02	$2,78 \pm 0,044$	$70,30 \pm 1,529$	$3,15 \pm 0,143$	$14,27 \pm 0,592$
0,06	$2,06 \pm 0,031$	$102,10 \pm 0,115$		
29a em BChE				
0	$13,92 \pm 0,093$	$85,46 \pm 0,826$		
4	$11,69 \pm 0,201$	$113,07 \pm 0,833$	$3502 \pm 64,9$	9174 ± 163
8	$8,24 \pm 0,212$	$157,53 \pm 1,485$		
29k em AChE				
0	$8,50 \pm 0,1743$	$92,19 \pm 6,8207$		
0,005	$4,45 \pm 0,02231$	$92,78 \pm 9,2653$	$1,682 \pm$	$4,780 \pm$
0,007	$3,19 \pm 0,0981$	$93,73 \pm 7,0155$	$0,038$	$0,0106$
29k em BChE				
0	$4,51 \pm 0,1648$	$88,72 \pm 7,6123$		
2,8	$3,62 \pm 0,1358$	$234,43 \pm 16,1506$	980 ± 24	2670 ± 67
4,8	$3,40 \pm 0,0349$	$354,67 \pm 19,2448$		

^a Constante de afinidade para inibição competitiva; ^b Constante de afinidade para inibição não-competitiva; Dados obtidos \pm desvio padrão (DP) de triplicatas de ensaios independentes.

Já para o composto **29k**, quando comparamos as constantes de inibição competitiva e não-competitiva entre as enzimas, observa-se que elas foram aproximadamente 550 vezes maiores para BChE ($K_i = 980 \mu\text{M}$; $K_i' = 2670 \mu\text{M}$) em comparação com a AChE ($K_i = 1,682 \mu\text{M}$; $K_i' = 4,780 \mu\text{M}$), mostrando que a maior atividade em AChE está correlacionada tanto com o sitio catalítico quanto o sitio alostérico. Vale ainda ressaltar que nesse composto (**29k**), frente à AChE, os valores de K_i e K_i' demonstraram ser significativamente baixos e relativamente próximos (K_i' apenas 2,86 vezes maior que K_i), o que o difere do composto **29a** (K_i' 4,53 vezes maior que K_i). Isto indica que o maior ganho de potência apresentado por **29k** está sim correlacionado a uma melhor interação com o sitio catalítico, mas principalmente a uma melhor interação com o sitio alostérico.

Por fim, a variabilidade dos valores de K_i e K_i' entre AChE e a BChE corroboram com os dados obtidos pela atividade de inibição, onde o índice de seletividade entre as colinesterases é alto.

O perfil do gráfico de Lineweaver–Burk também é capaz de indicar o mecanismo de inibição. Para essa análise, deve-se observar o comportamento das retas, que podem ser paralelas entre si (inibição incompetitiva) ou concorrentes (neste caso o que irá determinar o tipo de mecanismo será o local de interseção dessas retas). No caso da inibição ser do tipo competitiva, o ponto de interseção irá ocorrer na região positiva do eixo y ($1/v$) e se o inibidor for não-competitivo, a interseção ocorrerá na região negativa do eixo x ($1/[S]$).

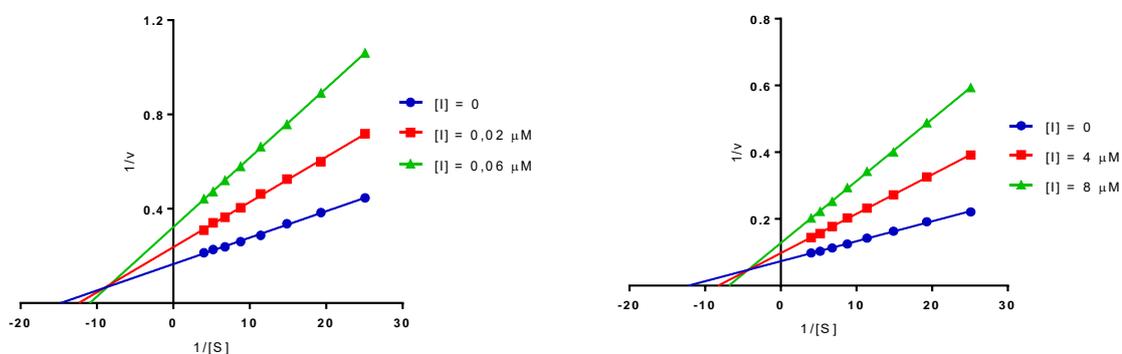


Figura 22. Gráficos de Lineweaver-Burk da cinética de inibição em EeAChE (à esquerda) e EqBChE (à direita) do composto **29a**.

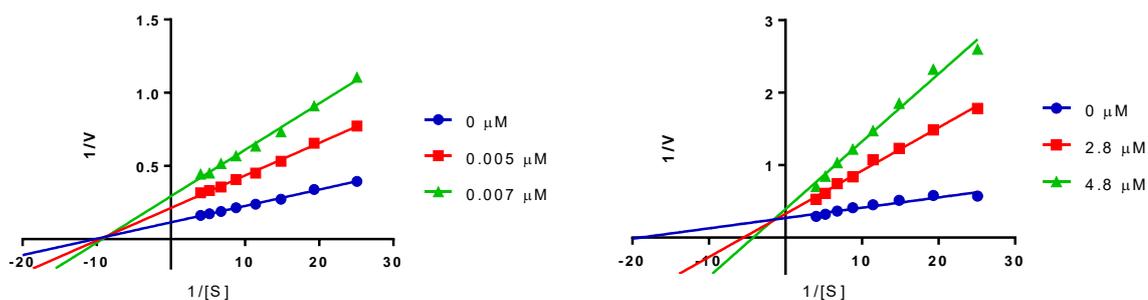


Figura 23. Gráficos de Lineweaver-Burk da cinética de inibição em EeAChE (à esquerda) e EqBChE (à direita) do composto **29k**.

Nas figuras acima pode-se observar os gráficos de Lineweaver–Burk do composto **29a** e **29k** para AChE (à esquerda) e BChE (à direita), nos quais as retas se cruzam no segundo quadrante do sistema cartesiano, o que caracteriza este inibidor como do tipo misto. As concentrações utilizadas do composto para obtenção das curvas encontram-se nos gráficos representadas pelo símbolo $[I]$.

3.11. Resultados dos ensaios de interação enzimática *in silico*

Para a realização do estudo de ancoramento molecular (*docking*) entre os compostos e a enzima EeAChE foi utilizado o modelo disponível no *Protein Data Bank* (PDB) de código 1CB2 e resolução de 4,5 Å (BOURNE et al., 1999). Como a enzima 1CB2 não possui substrato co-cristalizado, a escolha da melhor função pelo programa GOLD 5.6 foi realizada a partir do *redocking* com a enzima co-cristalizada com o ligante bis-tacrina (PDB 2CMF) onde observou-se que todas as quatro funções disponíveis foram capazes de produzir posições de ligação da *bis-tacrina* (ligante co-cristalizado) com valores de RMSD inferiores a 1,00 Å nas enzimas avaliadas (EeAChE). Entretanto, apenas a função GoldScore (JONES et al., 1997) apresentou simultaneamente para uma mesma posição de ligação o menor valor de RMSD e a maior pontuação de atracamento, sendo, por esse motivo, esta função escolhida para os procedimentos subsequentes de atracamento molecular (SANTOS et al., 2019; DE SOUZA et al., 2019). Os resultados obtidos para os compostos **29a-k** são apresentados na Tabela 9.

Tabela 9. Resultados de *score* e os respectivos valores de CI₅₀ dos compostos avaliados.

Inibidor	EeAChE		
	GoldScore	GoldScore Pose ^a	CI ₅₀
29a	80,42	80,42	0,05 ± 0,002
29b	74,51	74,51	1,33 ± 0,045
29c	88,09	77,83	1,11 ± 0,010
29d	87,70	66,75	4,79 ± 0,289
29e	76,62	76,62	1,69 ± 0,075
29f	79,63	76,22	2,94 ± 0,141
29g	84,96	79,94	1,31 ± 0,044
29h	75,45	72,71	1,42 ± 0,111
29i	82,46	82,46	3,16 ± 0,076
29j	87,90	87,90	1,06 ± 0,074
29k	82,01	82,01	0,006 ± 0,0006

^a valores selecionados após análise visual.

Normalmente, os maiores valores de *score* refletem uma melhor interação do ligante com a proteína, entretanto, após a análise de todas as soluções geradas pelo programa GOLD

5.6, observou-se que nem sempre o maior valor representava de fato a pose correta, pois esse experimento lança mão da mecânica molecular, logo busca por melhores interações ainda que em detrimento aos ângulos e tamanhos de ligação aceitáveis, esse problema seria contornado ao ser utilizado experimentos baseados em cálculos semi-empíricos.

Baseado na análise das poses de ligação obtidas a partir do estudo de *docking* mostrou que os inibidores foram capazes de ocupar, simultaneamente, o sítio ativo (CAS) e periférico (PAS), em concordância com os dados observados no estudo de cinética enzimática. No sítio ativo o grupamento amino cíclico protonado dos inibidores realiza interação do tipo cátion- π com o resíduo Trp86. Além disso, a menor cadeia espaçadora alquílica de **29a** permite que o núcleo cumarínico se posicione no canal do sítio ativo, realizando interações do tipo ligação de hidrogênio com o resíduo Tyr337 (2,3 Å) e o grupo peptídico do resíduo Phe295 (1,3; 1,4 Å). Estas três interações parecem importantes para a atividade de compostos do tipo alcoxi-amino-cumarinas como as descritas nessa dissertação, pois as mesmas foram observadas para o protótipo **28**. Adicionalmente, no sítio periférico é possível observar que o triazol está realizando interações hidrofóbicas com a cavidade hidrofóbica dos aminoácidos (Figura 24).

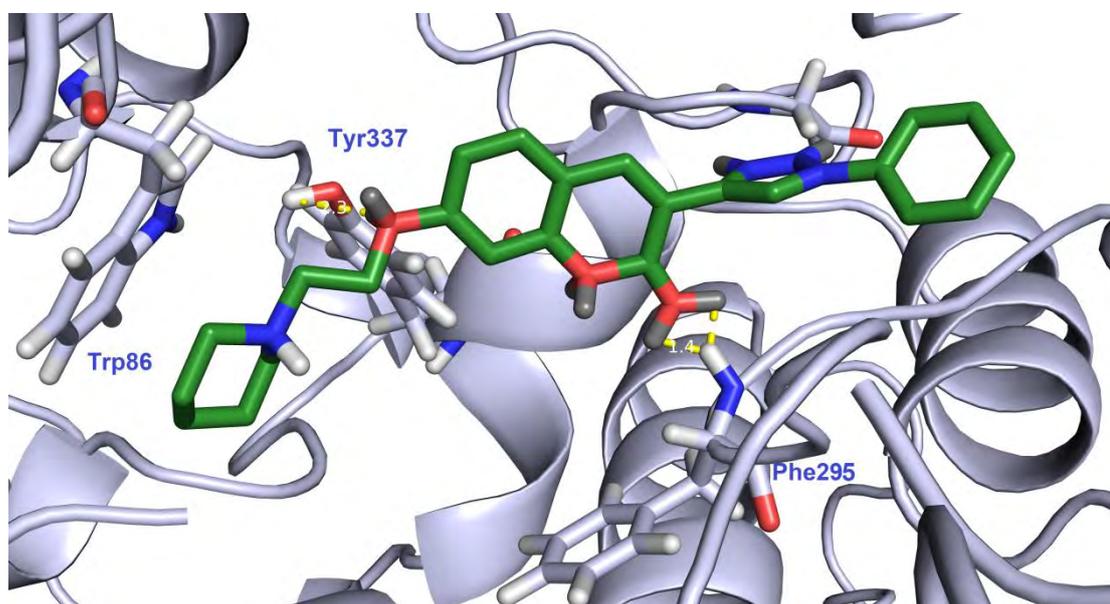


Figura 24. Análise das principais interações moleculares entre o composto **29a**, destaque em verde, e a cavidade enzimática da AChE. Figura gerada com PyMol 0.99 (DeLano Scientific LLC).

Ao variar o tamanho da cadeia alifática, observou-se a manutenção da importante interação do tipo cátion- π com o resíduo Trp86 no sítio catalítico para todos os compostos. Entretanto, em **29b** vemos um aumento da distância de interação com o resíduo Tyr337 (3,8

Å) e com o resíduo Phe295 (2,0 Å), que leva a uma menor energia de interação e corrobora com a diminuição da potência de inibição desse composto observado no ensaio *in vitro* (Figura 25).

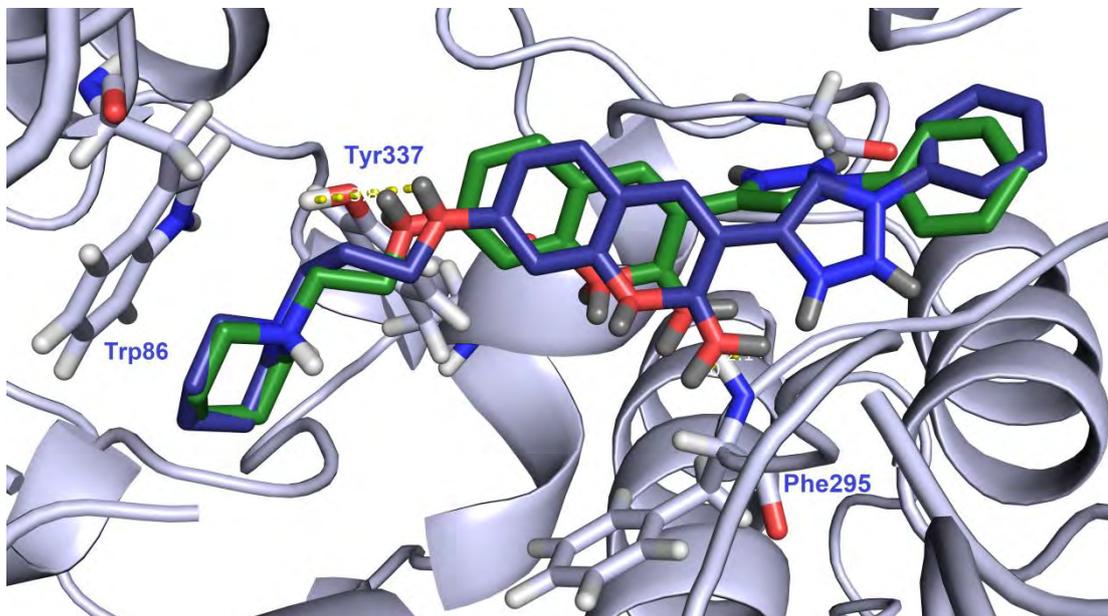


Figura 25. Análise das principais interações moleculares entre o composto **29b**, destaque em laranja, e a cavidade enzimática da AChE, com sobreposição ao composto **29a**, destaque em verde. Figura gerada com PyMol 0.99 (DeLano Scientific LLC).

Para o **29c** podemos observar um leve dobramento da cadeia alquílica, forçando a interação de hidrogênio com o resíduo Tyr341 (1,50 Å), o que leva a perda da interação com Phe295 e o direciona para a busca de outras interações, como as interações de hidrogênio com o resíduo de Trp285 (2,3; 2,6 Å), o que justifica a maior potência de inibição *in vitro* de **29c** em relação à **29b**, mas ainda menor do que a observada em **29a** (Figura 26). Já para **29d** observamos a perda de todas as interações de hidrogênios devido à longa cadeia de carbono, condizendo com o observado no ensaio *in vitro* (Figura 27).

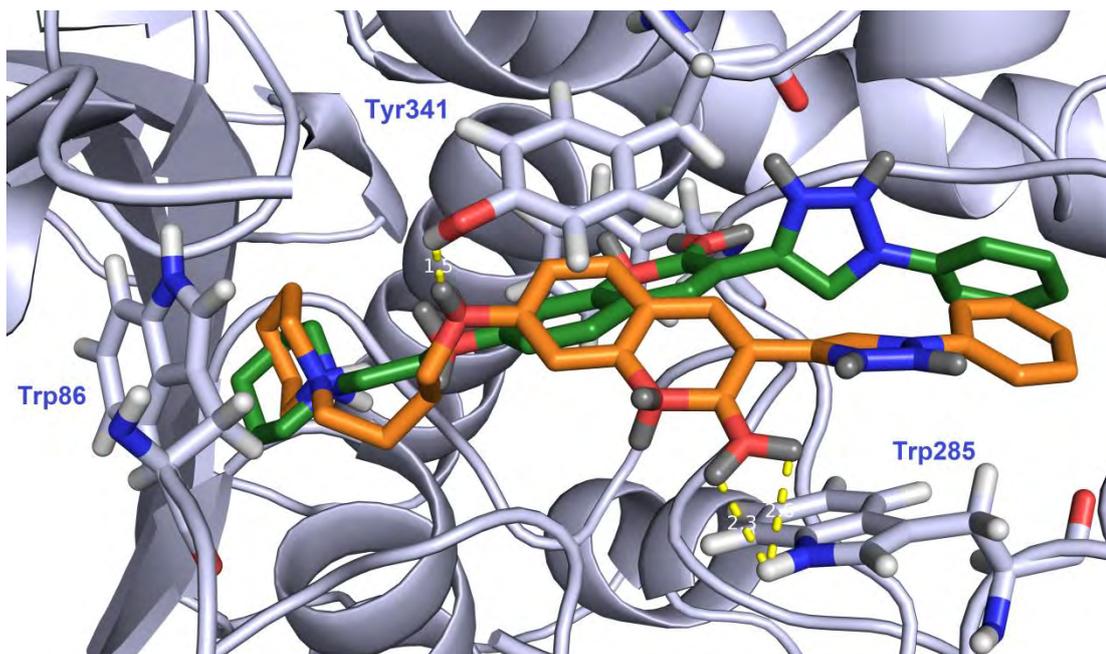


Figura 26. Análise das principais interações moleculares entre o composto **29c**, destaque em azul, e a cavidade enzimática da AChE, com sobreposição ao composto **29a**, destaque em verde. Figura gerada com PyMol 0.99 (DeLano Scientific LLC).

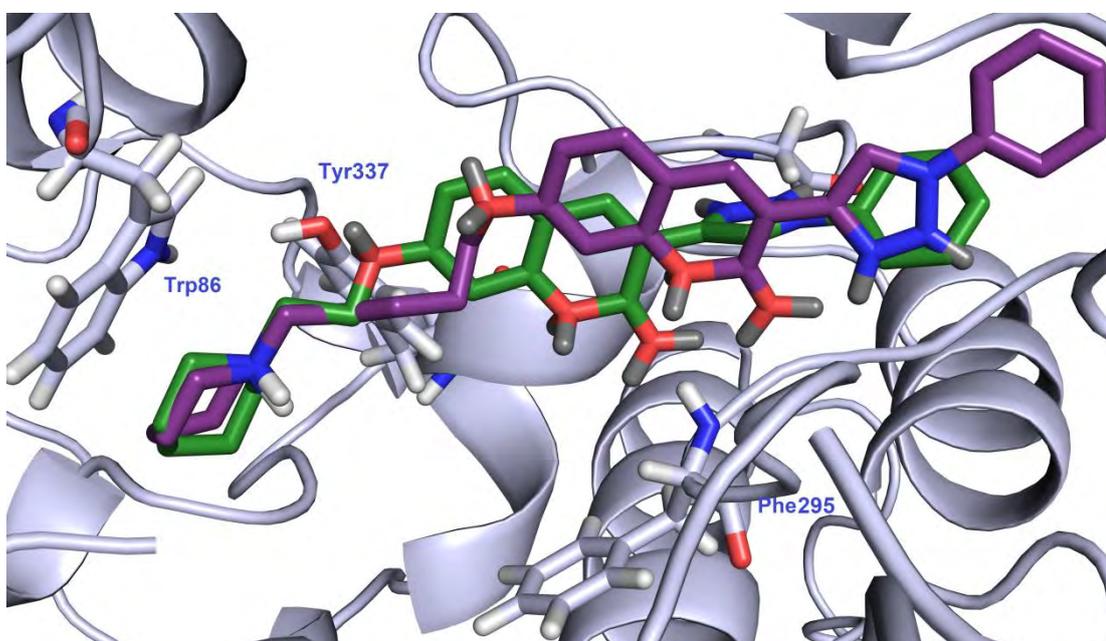


Figura 27. Análise das principais interações moleculares entre o composto **29d**, destaque em roxo, e a cavidade enzimática da AChE, com sobreposição ao composto **29a**, destaque em verde. Figura gerada com PyMol 0.99 (DeLano Scientific LLC).

Ao analisar os compostos **29e-h**, que possuem uma metila na posição 4 do anel piperidínico, percebe-se que ocorre um deslocamento em relação ao Trp86, onde a interação do tipo cátion- π está ocorrendo de forma descentralizada. Esse deslocamento se dá pelo limite estérico presente na cavidade do sítio catalítico (Figura 28, A).

Dessa forma, a adição de um grupo volumoso na extremidade farmacofórica do inibidor leva a um deslocamento de todo o grupamento. Em relação às outras interações, em **29e** é observada pouca alteração em relação à distância das interações observada em **29a** indicando assim que o deslocamento do cátion foi o que levou as menores atividades vistas nos ensaios *in vitro* (Figura 28, B). Essa tendência é observada para todos os demais compostos metilpiperidínicos (**29f-h**) em relação aos respectivos compostos piperidínicos (**29b-d**) de mesmo tamanho de cadeia carbônica.

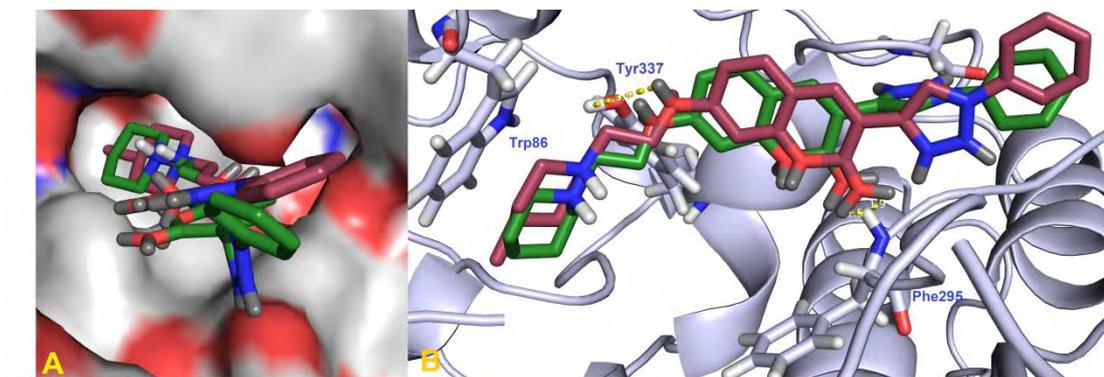


Figura 28. A) Análise da cavidade de acesso ao sítio catalítico da AChE com o composto **29a** (verde) e **29e** (rosa) ancorado. B) Análise das principais interações moleculares entre o composto **29e**, destaque em rosa, e a cavidade enzimática da AChE, com sobreposição ao composto **29a**, destaque em verde. Figura gerada com PyMol 0.99 (DeLano Scientific LLC).

A análise das posições de ligação obtidas do estudo de *docking* para o inibidor **29j** indicou interação do tipo cátion- π com o resíduo Trp86 no sítio ativo pelo grupamento piperazínico protonado, além de interações de hidrogênio com resíduo Glu202 pelo NH da piperazina. Ademais, de forma semelhante ao inibidor **29a**, o núcleo cumarínico está posicionado no canal do sítio ativo, realizando interações do tipo ligação de hidrogênio com o resíduo Tyr337 (2,3 Å) e o grupo peptídico do resíduo Phe295 (1,1; 1,4 Å). E no sítio periférico o triazol está realizando interações hidrofóbicas com a cavidade hidrofóbica dos aminoácidos (Figura 29).

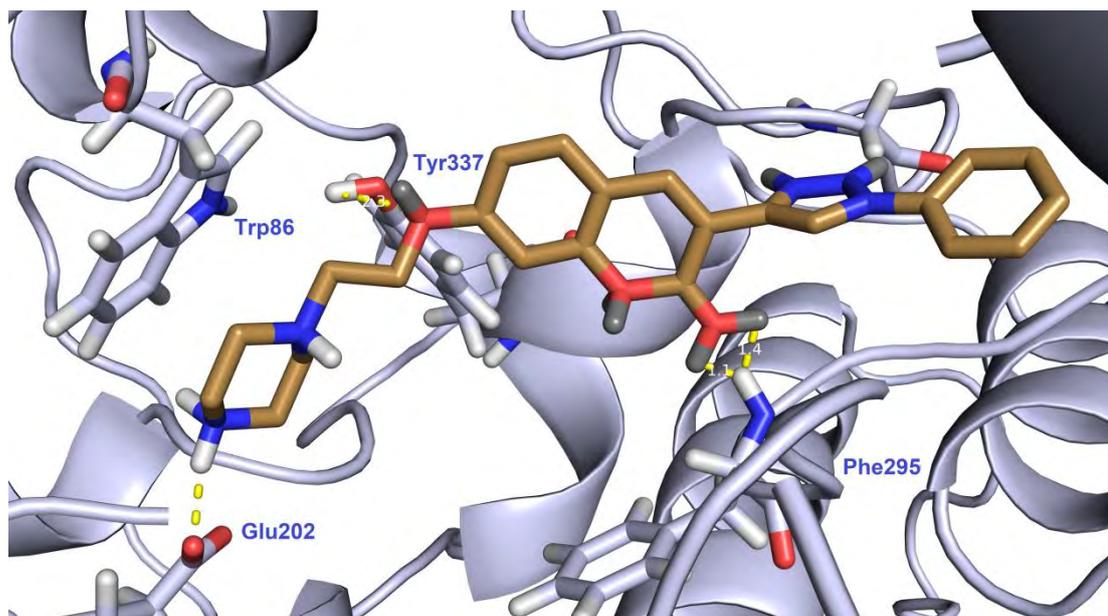


Figura 29. Análise das principais interações moleculares entre o composto **29j**, destaque em dourado, e a cavidade enzimática da AChE. Figura gerada com PyMol 0.99 (DeLano Scientific LLC).

Entretanto, a alta pontuação obtida na avaliação *in silico* para esse composto não condiz com o perfil qualitativo da atividade observada no ensaio enzimático *in vitro*. Por se tratar de um modelo teórico estático, os dois nitrogênios da piperazinas estão protonados ao mesmo tempo. No entanto, a probabilidade que a molécula seja dicatiônica deve ser pequena, sendo o mais provável que a molécula esteja na forma moncatiônica com um equilíbrio catiônico entre os diferentes nitrogênios da piperazina. Sendo assim, quando o cátion está sob o nitrogênio terciário da piperazina, esse se comporta exatamente como o inibidor **29a** sem nenhuma nova interação que leve a um aumento na energia; e quando o cátion está sob o NH da piperazina, ele fará uma interação com o Glu202, mas perderá a principal interação do tipo cátion- π com o resíduo Trp86, o que resultará em uma diminuição da atividade.

Ao analisar o composto **29i**, que possui uma metila na posição 4 do anel piperazínico, percebe-se que ocorre novamente um deslocamento em relação ao Trp86, onde a interação do tipo cátion- π acaba ocorrendo de forma descentralizada, levando a um deslocamento de todo o grupamento de modo semelhante ao observado para os composto **29e-h** (Figura 30).

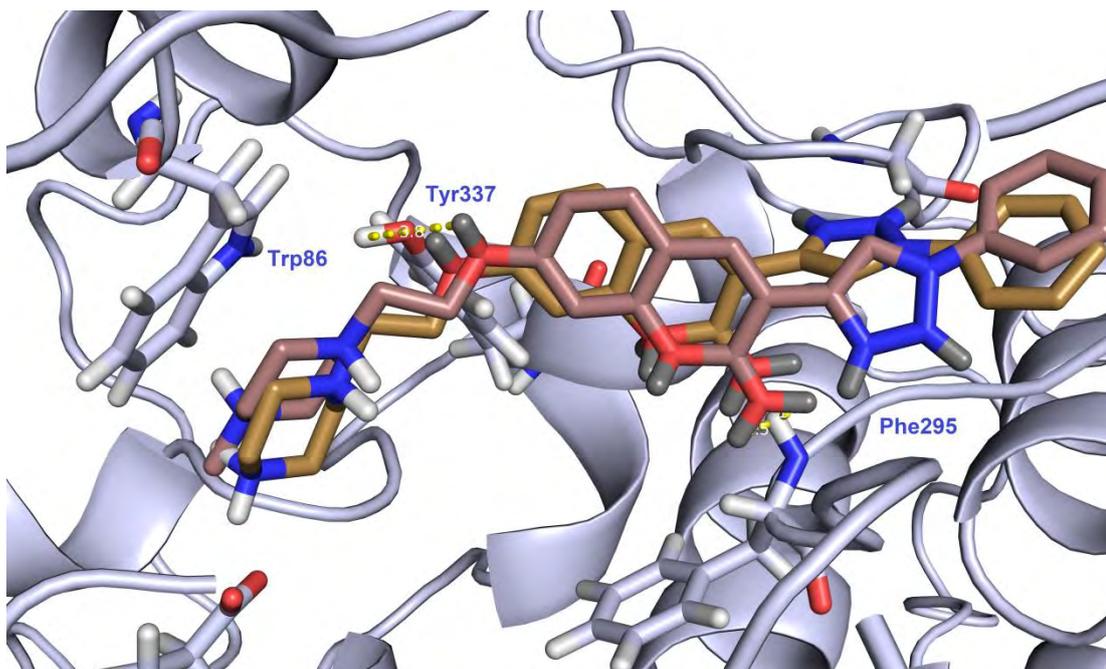


Figura 30. Análise das principais interações moleculares entre o composto **29i**, destaque em rosa, e a cavidade enzimática da AChE, com sobreposição ao composto **29j**, destaque em verde. Figura gerada com PyMol 0.99 (DeLano Scientific LLC).

Por fim, a análise das poses de ligação obtidas do estudo de *docking* para o inibidor **29k** indicou interação do tipo cátion- π com o resíduo Trp86 no sítio ativo pelo grupamento piperidínico protonado, além do núcleo cumarínico estar posicionado no canal do sítio ativo, realizando interações do tipo ligação de hidrogênio com o resíduo Tyr337 (2,5 Å) e o grupo peptídico do resíduo Phe295 (1,5; 1,9 Å). Já no sítio periférico, os pares de elétrons do triazol passaram a atuar como aceptores de ligação de hidrogênio com os resíduos Arg296 (2,4 Å) e Ser293 (2,2 Å) (Figura 31).

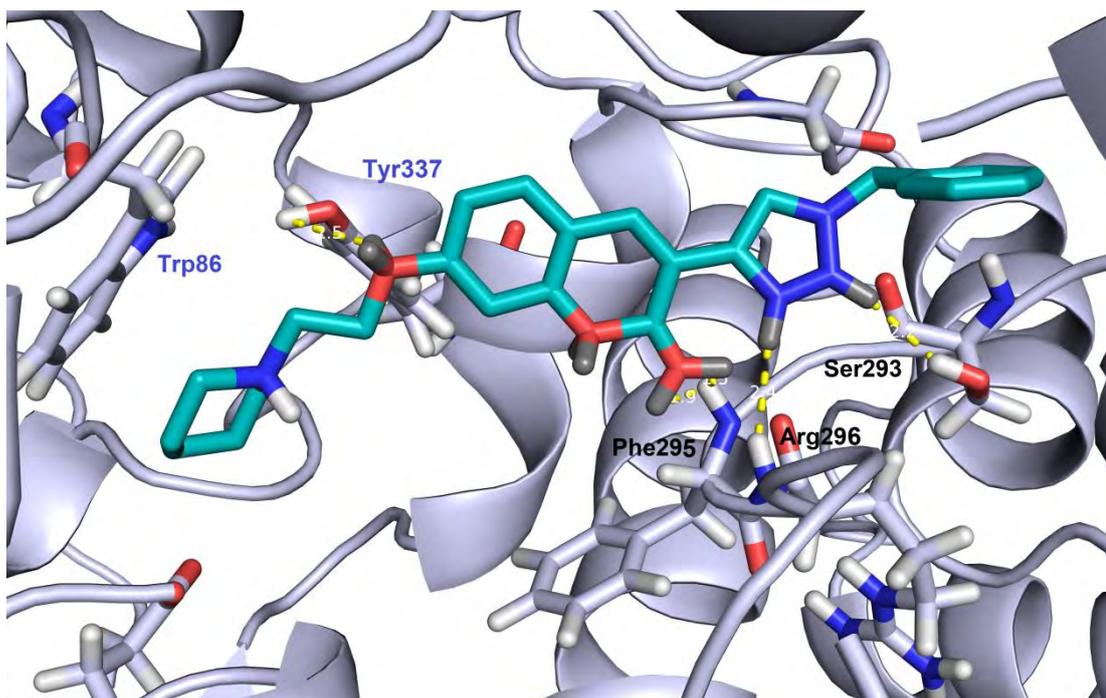


Figura 31. Análise das principais interações moleculares entre o composto **29k**, destaque em ciano, e a cavidade enzimática da AChE. Figura gerada com PyMol 0.99 (DeLano Scientific LLC).

Ao analisarmos a sobreposição entre o composto **29k** e **29a** (Figura 32, A), observa-se que as interações no sítio catalítico são mantidas enquanto as interações no sítio alostérico sofreram modificações. Quando avaliamos sob a perspectiva da superfície de Van der Waals, fica claro que no composto **29a**, o triazol está direcionado no limite da cavidade (Figura 31, B - i), com liberdade conformacional restrita pelo impedimento estérico da fenila dentro do sítio alostérico (Figura 32, B - ii). Já no composto **29k**, o carbono sp^3 da benzila dá ao triazol uma maior liberdade conformacional para que ele se direcione e realize interações de hidrogênio com o resíduo Arg296 e Ser293, além de direcionar o anel aromático a uma posição propícia para futuras derivatizações e exploração do sítio alostérico (Figura 32, C). Esses dados condizem com os resultados obtidos nos ensaios *in vitro*, onde podemos concluir que parte do aumento da potência de inibição do composto **29k** provavelmente está correlacionado com as duas interações de hidrogênio adicionais do triazol no sítio alostérico.

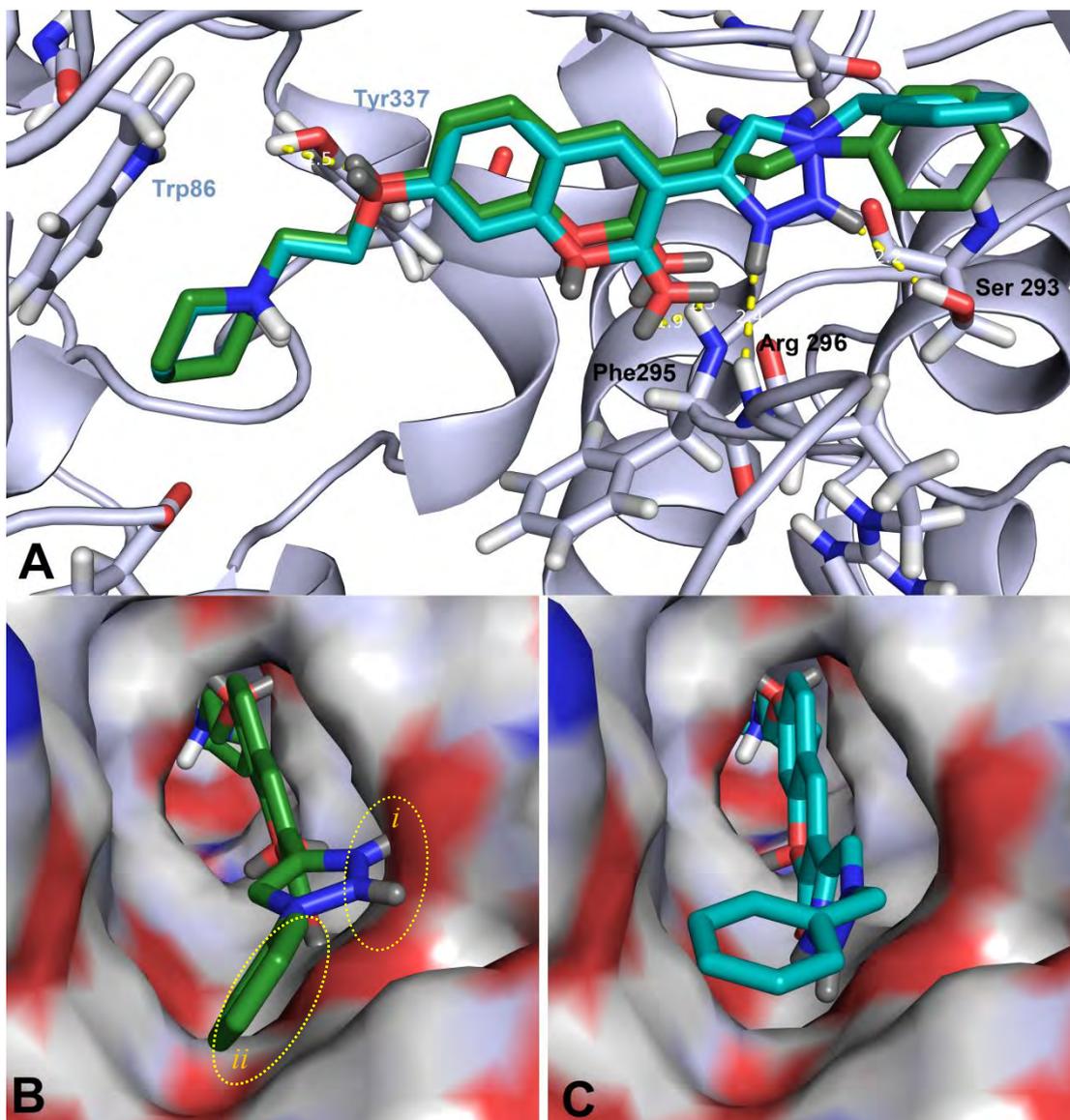


Figura 32. A) Análise das principais interações moleculares entre o composto **29k**, destaque em ciano, e a cavidade enzimática da AChE, com sobreposição ao composto **29a**, destaque em verde. B) Análise da superfície de Van der Waals com o composto **29a** (verde) ancorado. C) Análise da superfície de Van der Waals com o composto **29k** (ciano) ancorado. Figura gerada com PyMol 0.99 (DeLano Scientific LLC).

4. CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS

As metodologias sintéticas e de purificação propostas para a síntese da série híbrida das novas 3-(1,2,3-triazol)-cumarinas (**29a-k**) estruturalmente planejada a partir do protótipo **28** se mostraram satisfatórias, apresentando rendimentos de razoáveis a bons.

Os ensaios de inibição enzimática das colinesterases pelos compostos **29a-k** demonstraram que o planejamento a partir de **28** foi adequado. Os resultados indicaram que todos os compostos foram capazes de inibir a AChE de forma seletiva em relação à BChE, onde os compostos que demonstraram serem os mais ativos também são os que apresentaram maior seletividade. Dentre os compostos da série, os mais ativos foram **29a** ($CI_{50} = 0,05 \mu\text{M}$, $IS = 173$) e **29k** ($CI_{50} = 0,006 \mu\text{M}$, $IS = 632$), sendo que o último apresentou uma potência similar e seletividade maior ao do fármaco donepezila ($CI_{50} = 0,007 \mu\text{M}$, $IS = 341$), caracterizando **29k** como um novo protótipo para inibidores seletivos de AChE.

No geral, os resultados obtidos frente à AChE seguiram uma mesma tendência em relação aos derivados do protótipo **28**, no que diz respeito ao número de carbonos espaçadores de 2 e 3 carbonos.

Através da comparação dos ensaios *in vitro* e *in silico* pôde-se confirmar que o número de espaçadores ideal para se obter uma distância ótima entre o núcleo cumarínico e grupamento amino cíclico seria a de 2 carbonos, visto a atividade dos compostos **29a**, **29j** e **29k**. Também foi possível entender a importância do grupamento piperidinila protonado posicionado no sítio catalítico para fazer interações cátion- π com o Trp86 e como a perda dessa interação pela adição de grupos volumosos nas aminas cíclicas leva a diminuição da atividade. Outras interações que se demonstraram importantes para uma melhor potência de inibição foram as interações do tipo ligação de hidrogênio com o resíduo Tyr337 e o grupo peptídico do resíduo Phe295.

Além disso, foi possível visualizar como a adição de um espaçador entre o triazol e o anel aromático resulta em uma maior liberdade conformacional do triazol, permitindo novas interações de hidrogênio no sítio periférico, que resultaram em um aumento da potência de inibição, visto no composto **29k**. Ademais, essa liberdade conformacional permitiu o posicionamento do anel aromático na extremidade da cavidade de acesso da AChE, que abre precedentes para futuras derivatizações visando mais interações com o sítio alostérico.

As perspectivas para este trabalho incluem ainda, realizar os ensaios de inibição *in vitro* da agregação de placas β -amilóide para todos os compostos planejados, exploração de

substituintes nos sistemas aromáticos ligados ao triazol e ensaios *in vivo* de alteração comportamental em modelo de DA induzida em camundongos.

5. METODOLOGIA

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

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

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

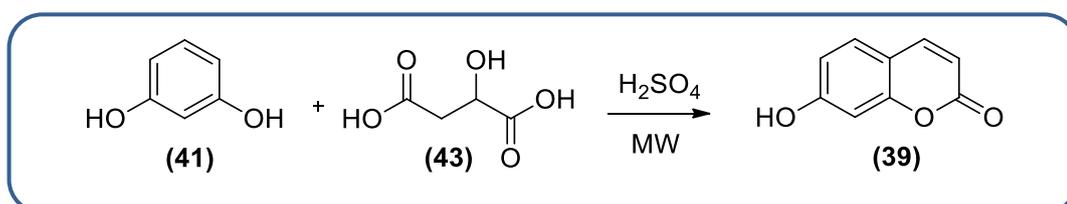
Os espectros de RMN¹H foram obtidos em aparelhos Bruker Avance-500 e Bruker Avance-400 (IQ -UFRRJ), operando a 500MHz e 400MHz, respectivamente. As amostras foram dissolvidas em CDCl₃ e DMSO-d₆, contendo tetrametilsilano (TMS) como referência interna e colocadas em tubos de 5 mm de diâmetro. Os espectros de RMN¹³C foram obtidos operando a 125 MHz e à 100MHz, em aparelho Bruker Avance-500 e Bruker Avance-400 (IQ -UFRRJ), respectivamente, e as amostras foram dissolvidas em CDCl₃ e DMSO-d₆, contendo TMS como referência interna.

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

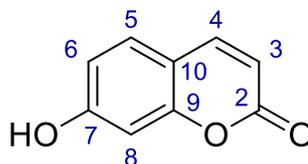
Os espectros na região do infravermelho (IV) foram obtidos em espectrofotômetro Bruker 1600 FT (IQ -UFRRJ), utilizando-se pastilhas de brometo de potássio (KBr).⁷¹

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

5.1. Síntese da 7-hidroxicumarina (39)

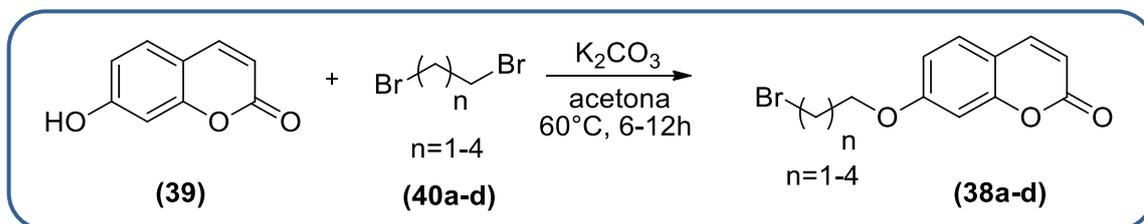


Em um erlenmeyer de 200 mL foram adicionados 19,98 mmol de resorcinol (**41**) pulverizado, 20,14 mmol de ácido málico (**43**) e 5,45 mL de ácido sulfúrico (H₂SO₄). Na saída do erlenmeyer foi colocado um funil de vidro, a fim de canalizar a saída do gás liberado na reação e evitar projeções. Em um micro-ondas caseiro, a mistura foi irradiada no centro do prato, em potência 6 durante 10 segundo por 3 pulsos. Logo após a irradiação, foram adicionados 5 mL de água quente, e agitou-se a mistura. Em seguida, foi colocado gelo picado dentro do erlenmeyer. Após o derretimento do gelo, o precipitado formado foi filtrado a vácuo. Por fim, o produto foi purificado no equipamento Isolera com fase estacionária sílica e fase móvel mistura de hexano:acetato de etila em gradiente de concentração de 40 a 70% do solvente mais polar.



O composto **39** foi obtido como um sólido branco em 70% de rendimento. Ponto de fusão igual a 235°C (literatura: P.F. = 230°C). **RMN¹H (500 MHz) DMSO-d₆/ TMS (δ-ppm)**: H₃ = 6,21 (d, *J* = 9,4 Hz, 1H); H₈ = 6,72 (d, *J* = 2,2 Hz, 1H); H₆ = 6,76 (dd, *J*₁ = 8,5 Hz, *J*₂ = 2,2 Hz, 1H); H₅ = 7,54 (d, *J* = 8,5 Hz, 1H); H₄ = 7,94 (d, *J* = 9,5 Hz, 1H); H_{OH} = 10,60 (s, 1H). **RMN¹³C (125 MHz) DMSO-d₆/ TMS (δ-ppm)**: C₈ = 102,89; C₁₀ = 111,75; C₆ = 111,88; C₃ = 113,50; C₅ = 130,20; C₄ = 145,02; C₉ = 156,00; C₇ = 160,92; C₂ = 161,75. **I.V. Max. (KBr) γ – cm⁻¹**: 3083,03(C_{sp²}-H); 3169,82 (C-OH); 2924,89(C_{sp³}-H); 1681,83 (C=O).

5.2. O-Alquilação da 7-hidroxicumarina (38a-d)



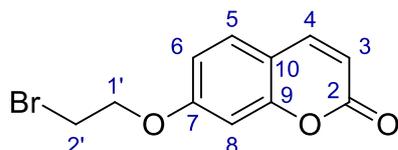
Em um bécher de 25 mL foram adicionados 1,85 mmol de 7-hidroxicumarina (**39**) e 3,7 mmol de carbonato de potássio (K₂CO₃) que foram solubilizados em 7 mL de acetona (CH₃COCH₃). Em um tubo de reação de 25 mL, foram adicionados 2 mL de acetona e 7,4-9,3 mmol de dibromoalcano (**40a-d**). Sob agitação constante, foi adicionada gota a gota a solução contendo a cumarina e o carbonato à solução do dibromoalcano. Ao fim da adição, o tubo de

reação foi selado e a mistura foi submetida a aquecimento a 60°C por 6-12h (Tabela 10). Ao final da reação a acetona foi evaporada em rotaevaporador. A purificação foi no equipamento Isolera com fase estacionária sílica e fase móvel mistura de hexano:acetato de etila em gradiente de concentração de 40 a 70% do solvente mais polar.

Tabela 10. Quantidade de dibromoalcano (**38a-d**) utilizado nas reações de alquilação e tempos de reação.

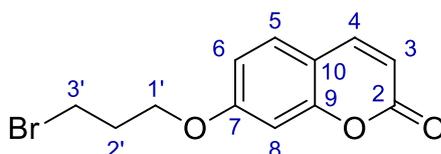
n	Dibromoalcano (mmol)	Tempo de reação (h)
2	9,3	12
3	7,4	10
4	7,4	6
5	7,4	6

7-(2-bromoetoxi)-cumarina (**38a**)



O composto **38a** foi obtido como um sólido amarelo claro em 46% de rendimento após purificação. Ponto de fusão igual a 132°C (informação indisponível na literatura). **RMN ¹H (400 MHz) CDCl₃/ TMS (δ-ppm):** H_{2'} = 3,68 (t, *J* = 6,0 Hz, 2H); H_{1'} = 4,36 (t, *J* = 6,1 Hz, 2H); H₃ = 6,28 (d, *J* = 9,5 Hz, 1H); H₈ = 6,82 (d, *J* = 1,8 Hz, 1H); H₆ = 6,88 (dd, *J*₁ = 8,4, *J*₂ = 2,1 Hz, 1H); H₅ = 7,40 (d, *J* = 8,5 Hz, 1H); H₄ = 7,65 (d, *J* = 9,3 Hz, 1H). **RMN ¹³C (100 MHz) CDCl₃/ TMS (δ-ppm):** C_{2'} = 28,41; C_{1'} = 68,15; C₈ = 101,63; C₆ = 112,83; C₁₀ = 113,02; C₃ = 113,53; C₅ = 128,93; C₄ = 143,29; C₉ = 155,73; C₇ = 161,04; C₂ = 161,14.

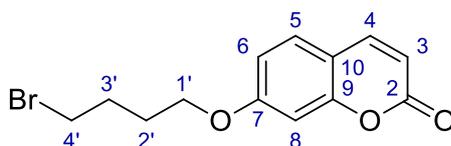
7-(3-bromopropoxi)-cumarina (**38b**)



O composto **38b** foi obtido como um sólido amarelo claro em 57% de rendimento. Ponto de fusão igual a 101°C (informação indisponível na literatura). **RMN ¹H (500 MHz)**

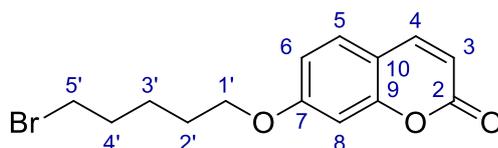
CDCl₃/ TMS (δ-ppm): H_{2'} = 2,37 (q, *J* = 6,1 Hz, 2H); H_{3'} = 3,62 (t, *J* = 6,5 Hz, 2H); H_{1'} = 4,18 (t, *J* = 5,8 Hz, 2H); H₃ = 6,27 (d, *J* = 9,5 Hz, 1H); H₆/H₈ = 6,84-6,88 (m, 2H); H₄ = 7,39 (d, *J* = 9,5 Hz, 1H); H₅ = 7,65 (d, *J* = 8,5 Hz, 1H). **RMN ¹³C (125 MHz) CDCl₃/ TMS (δ-ppm):** C_{2'} = 29,52; C_{3'} = 31,93; C_{1'} = 65,85; C₈ = 101,53; C₆ = 112,73; C₃ = 113,26; C₁₀ = 118,56; C₅ = 128,81; C₄ = 143,34; C₉ = 155,83; C₇ = 161,13; C₂ = 161,83.

7-(4-bromobutoxi)-cumarina (38c)



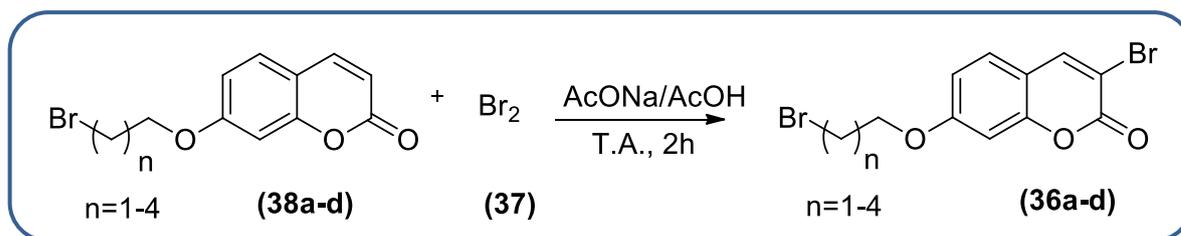
O composto **38c** foi obtido como um sólido amarelo claro em 64% de rendimento. Ponto de fusão igual a 65°C (informação indisponível na literatura). **RMN ¹H (500 MHz) CDCl₃/ TMS (δ-ppm):** H_{3'} = 1,97-2,02 (m, 2H); H_{2'} = 2,06-2,12 (m, 2H); H_{4'} = 3,49-3,51 (m, 2H); H_{1'} = 4,05-4,08 (m, 2H); H₄ = 6,25-6,28 (m, 1H); H₈ = 6,80 (sl, 1H); H₆ = 6,84 (dd, *J*₁ = 8,5 Hz, *J*₂ = 2,2 Hz, 1H); H₅ = 7,37-7,39 (m, 1H); H₃ = 7,63-7,66 (m, 1H). **RMN ¹³C (125 MHz) CDCl₃/ TMS (δ-ppm):** C_{3'} = 27,62; C_{2'} = 29,27; C_{4'} = 33,15; C_{1'} = 67,49; C₈ = 101,32; C₁₀ = 112,55; C₆ = 112,84; C₃ = 113,11; C₅ = 128,75; C₄ = 143,37; C₉ = 155,86; C₇ = 161,17; C₂ = 162,04.

7-(5-bromopentoxi)-cumarina (38d)



O composto **38d** foi obtido como um óleo laranja claro em 71% de rendimento após purificação. **RMN ¹H (400 MHz) CDCl₃/ TMS (δ-ppm):** H_{3'} = 1,61-1,69 (m, 2H); H_{4'} = 1,82-1,89 (m, 2H); H_{2'} = 1,92-1,99 (m, 2H); H_{5'} = 3,45 (t, *J* = 6,7 Hz, 2H); H_{1'} = 4,03 (t, *J* = 6,1 Hz, 2H); H₃ = 6,25 (d, *J* = 9,5 Hz, 1H); H₈ = 6,80 (sl, 1H); H₆ = 6,83 (dd, *J*₁ = 8,7 Hz, *J*₂ = 2,1 Hz, 1H); H₅ = 7,37 (d, *J* = 8,5 Hz, 1H); H₄ = 7,64 (d, *J* = 9,5 Hz, 1H). **RMN ¹³C (100MHz) CDCl₃/ TMS (δ-ppm):** C_{3'} = 24,68; C_{4'} = 28,12; C_{2'} = 32,32; C_{5'} = 33,45; C_{1'} = 68,16; C₈ = 101,26; C₁₀ = 112,43; C₃ = 112,88; C₆ = 112,97; C₅ = 128,71; C₄ = 143,41; C₉ = 155,84; C₇ = 161,21; C₂ = 162,16.

5.3. Bromação da posição 3 do núcleo cumarínico (36a-d)

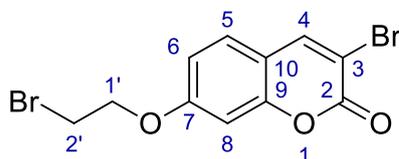


Em um tubo de reação de 25 mL, foram adicionados 0,96-1,12 mmol dos respectivos derivados *O*-alquilcumarínicos (**38a-d**), 1,24-1,43 mmol de bromo (**37**), 2,89-3,46 mmol de acetato de sódio (AcONa) e 8 mL de ácido acético glacial (AcOH) (Tabela 11). A mistura foi submetida à agitação magnética a temperatura ambiente por 2h. Ao final da reação, a mistura reacional foi adicionada a um bécher de 50 mL contendo gelo picado. Os respectivos produtos desejados (**36a-d**) precipitaram e após o derretimento do gelo, os mesmos foram filtrados a vácuo.

Tabela 11. Quantidades de reagentes utilizados nas reações de bromação.

n	Derivado <i>O</i> -alquilcumarínico (mmol)	Br ₂ (mmol)	AcONa (mmol)
2	1,12	1,43	3,46
3	1,06	1,36	3,18
4	1,01	1,30	3,03
5	0,96	1,24	2,89

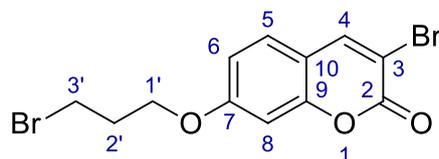
3-(bromo)-7-(2-bromoetoxi)-cumarina (36a)



O composto **36a** foi obtido como um sólido rosa em 87% de rendimento. Ponto de fusão igual a 183°C (informação indisponível na literatura). **RMN ¹H (400 MHz) DMSO-*d*₆/TMS (δ-ppm):** H_{2'} = 3,84 (t, *J* = 6,1 Hz, 2H); H_{1'} = 4,44 (t, *J* = 6,0 Hz, 2H); H₆ = 7,02 (dd, *J* = 8,8, 2,5 Hz, 1H); H₈ = 7,08 (d, *J* = 2,3 Hz, 1H); H₅ = 7,63 (d, *J* = 8,8 Hz, 1H); H₄ = 8,55 (s, 1H). **RMN ¹³C (100 MHz) DMSO-*d*₆/TMS (δ-ppm):** C_{2'} = 31,07; C_{1'} = 68,50; C₈ =

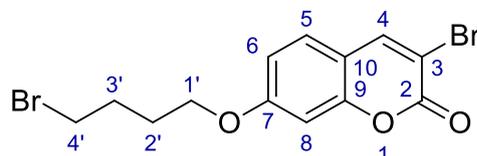
101,34; C₁₀ = 106,91; C₃ = 113,36; C₆ = 113,39; C₅ = 129,11; C₄ = 145,28; C₉ = 154,59; C₇ = 156,81; C₂ = 161,24.

3-(bromo)-7-(3-bromopropoxi)-cumarina (36b)



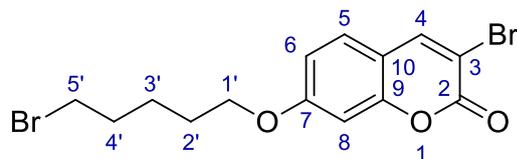
O composto **36b** foi obtido como um sólido rosa claro em 93% de rendimento. Ponto de fusão igual a 120°C (informação indisponível na literatura). **RMN ¹H (400 MHz) CDCl₃/ TMS (δ-ppm)**: H_{2'} = 2,36 (quint, *J* = 6,1 Hz, 2H); H_{3'} = 3,61 (t, *J* = 6,3 Hz, 2H), H_{1'} = 4,18 (t, *J* = 5,8 Hz, 2H); H₈ = 6,83 (d, *J* = 2,3 Hz, 1H); H₆ = 6,88 (dd, *J*₁ = 8,7 Hz, *J*₂ = 2,4 Hz, 1H); H₅ = 7,36 (d, *J* = 8,8 Hz, 1H); H₄ = 8,02 (s, 1H). **RMN ¹³C (100 MHz) CDCl₃/ TMS (δ-ppm)**: C_{2'} = 29,47; C_{3'} = 31,84; C_{1'} = 65,95; C₈ = 101,38; C₁₀ = 107,85; C₃ = 113,19; C₆ = 113,34; C₅ = 128,13; C₄ = 144,36; C₉ = 154,95; C₇ = 157,39; C₂ = 162,01.

3-(bromo)-7-(4-bromobutoxi)-cumarina (36c)



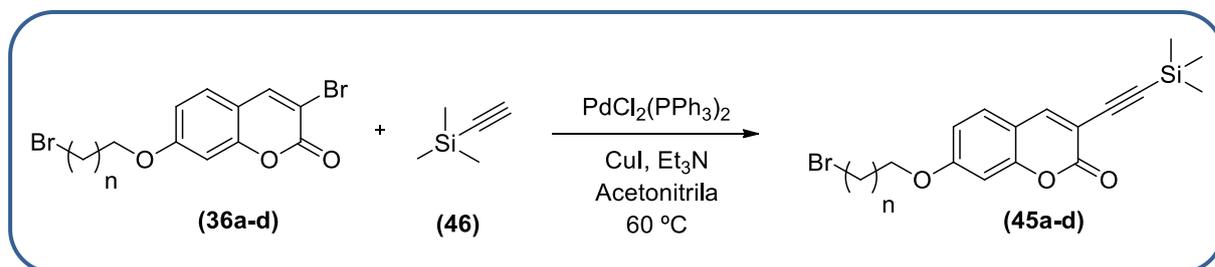
O composto **36c** foi obtido como um sólido rosa em 87% de rendimento. Ponto de fusão igual a 120°C (informação indisponível na literatura). **RMN ¹H (400 MHz) CDCl₃/ TMS (δ-ppm)**: H_{3'} = 1,96-2,03 (m, 2H); H_{2'} = 2,05-2,12 (m, 2H); H_{4'} = 3,50 (t, *J* = 6,4 Hz, 2H); H_{1'} = 4,06 (t, *J* = 5,9 Hz, 2H); H₈ = 6,80 (d, *J* = 2,3 Hz, 1H); H₆ = 6,86 (dd, *J*₁ = 8,7 Hz, *J*₂ = 2,4 Hz, 1H); H₅ = 7,35 (d, *J* = 8,8 Hz, 1H); H₄ = 8,02 (s, 1H); **RMN ¹³C (100 MHz) CDCl₃/ TMS (δ-ppm)**: C_{3'} = 27,56; C_{2'} = 29,21; C_{4'} = 33,15; C_{1'} = 67,61; C₈ = 101,17; C₁₀ = 107,70; C₃ = 113,02; C₆ = 113,47; C₅ = 128,08; C₄ = 144,41; C₉ = 155,00; C₇ = 157,45; C₂ = 162,22.

3-(bromo)-7-(5-bromopentoxi)-cumarina (36d)



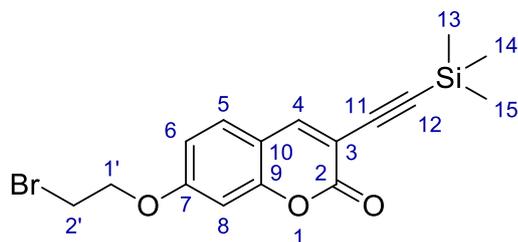
O composto **36d** foi obtido como um sólido rosa em 83% de rendimento. Ponto de fusão igual a 123°C (informação indisponível na literatura). **RMN ¹H (400 MHz) CDCl₃/TMS (δ-ppm):** H_{3'} = 1,61-1,69 (m, 2H); H_{4'} = 1,83-1,90 (m, 2H); H_{2'} = 1,92-1,99 (m, 2H); H_{5'} = 3,45 (t, *J* = 6,8 Hz, 2H); H_{1'} = 4,03 (t, *J* = 6,3 Hz, 2H); H₈ = 6,80 (d, *J* = 2,3 Hz, 1H); H₆ = 6,86 (dd, *J*₁ = 8,7 Hz, *J*₂ = 2,4 Hz, 1H); H₅ = 7,35 (d, *J* = 8,8 Hz, 1H); H₄ = 8,02 (s, 1H). **RMN ¹³C (100 MHz) CDCl₃/TMS (δ-ppm):** C_{3'} = 24,68; C_{4'} = 28,09; C_{2'} = 32,30; C_{5'} = 33,45; C_{1'} = 68,32; C₈ = 101,15; C₁₀ = 107,60; C₃ = 112,95; C₆ = 113,53; C₅ = 128,06; C₄ = 144,44; C₉ = 155,03; C₇ = 157,48; C₂ = 162,38.

5.4. Síntese da 7-(bromoalcoxi)-3-((trimetilsilil)etenil)-cumarinas (45a-d)



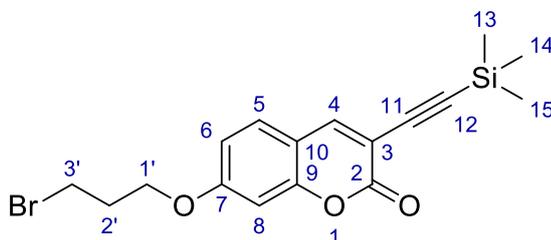
Em um tubo de reação, foram adicionados 3 mmol dos derivados 3-bromo-7-bromoalcoxi-cumarina (**36a-d**), 0,12 mmol de CuI, 0,14 mmol de PdCl₂(PPh₃)₂ e 6 mmol de trietilamina que foram solubilizados em 30 mL de acetonitrila. Em seguida, o tubo foi selado e quando a temperatura alcançou os 60 °C, a solução teve sua atmosfera trocada por gás inerte (N₂) e então se adicionou 4,95 mmol de TMS-A (**46**). A reação ficou sob agitação por 2 horas. Ao fim da reação, a solução foi filtrada em funil sinterizado com Celite e lavado com acetato de etila. Por fim, o solvente foi evaporado. Os produtos obtidos **45a-d** foram purificado em coluna cromatográfica flash, no equipamento Isolela, utilizando como fase estacionária gel de sílica e fase móvel mistura de hexano:acetato de etila 10-30%.

7-(2-bromoetoxi)-3-((trimetilsilil)etenil)-cumarina (45a)



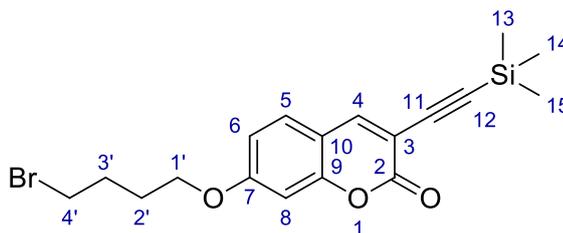
O composto **45a** foi obtido como um sólido bege em 54% de rendimento. Ponto de fusão igual a 157°C (informação indisponível na literatura). **RMN ¹H (500 MHz) CDCl₃ / TMS (δ-ppm):** H_{13/14/15} = 0,29 (s, 9H); H_{2'} = 3,69 (t, *J* = 6,00 Hz, 2H); H_{1'} = 4,37 (t, *J* = 6,00 Hz, 2H); H₈ = 6,82 (d, *J* = 1,9 Hz, 1H); H₆ = 6,9 (dd, *J* = 8,7, 2,5 Hz, 1H); H₅ = 7,39 (d, *J* = 8,5, 1H); H₄ = 7,87 (s, 1H). **RMN ¹³C (125 MHz) CDCl₃ / TMS (δ-ppm):** C_{13/14/15} = 0,04; C_{2'} = 28,52; C_{1'} = 68,49; C₁₁ = 98,51; C₁₂ = 101,30; C₈ = 101,76; C₁₀ = 109,87; C₃ = 113,17; C₆ = 113,64; C₅ = 129,17; C₄ = 146,13; C₉ = 155,44; C₇ = 159,78; C₂ = 161,87.

7-(3-bromopropoxi)-3-((trimetilsilil)etenil)-cumarina (45b)



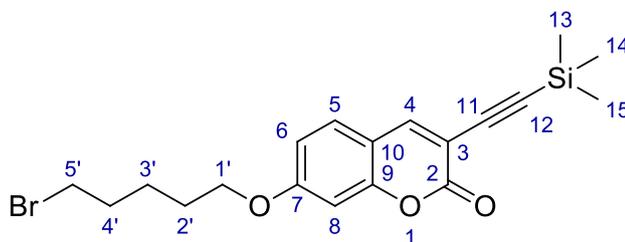
O composto **45b** foi obtido como um sólido marrom claro em 62% de rendimento. Ponto de fusão igual a 107°C (informação indisponível na literatura). **RMN ¹H (500 MHz) CDCl₃ / TMS (δ-ppm):** H_{13/14/15} = 0,27 (s, 9H); H_{2'} = 2,36 (m, *J* = 6,0 Hz, 2H); H_{3'} = 3,61 (t, *J* = 6,1 Hz, 2H); H_{1'} = 4,18 (t, *J* = 5,7 Hz, 2H); H₈ = 6,82 (d, *J* = 1,9 Hz, 1H); H₆ = 6,86 (dd, *J* = 8,6, 2,0 Hz, 1H); H₅ = 7,36 (d, *J* = 8,5, 1H); H₄ = 7,85 (s, 1H). **RMN ¹³C (125 MHz) CDCl₃ / TMS (δ-ppm):** C_{13/14/15} = 0,46; C_{2'} = 29,16; C_{3'} = 31,63; C_{1'} = 65,72; C₁₁ = 98,12; C₁₂ = 100,56; C₈ = 101,15; C₁₀ = 109,02; C₃ = 112,34; C₆ = 113,04; C₅ = 128,54; C₄ = 145,74; C₉ = 155,03; C₇ = 159,36; C₂ = 162,06.

7-(4-bromobutoxi)-3-((trimetilsilil)etenil)-cumarina (45c)



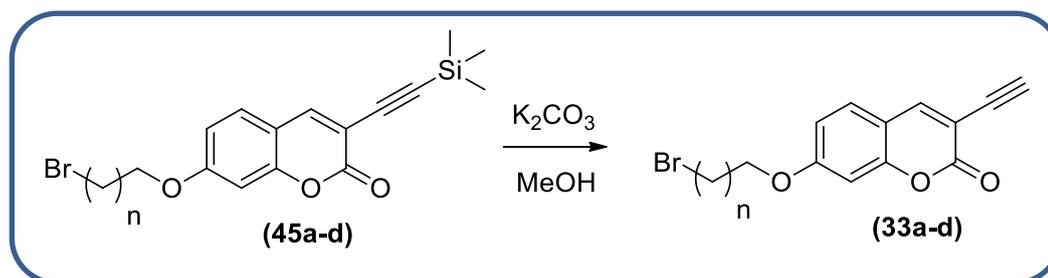
O composto **45c** foi obtido como um sólido amarelo claro em 64% de rendimento. Ponto de fusão igual a 142°C (informação indisponível na literatura). **RMN ¹H (500 MHz) CDCl₃ / TMS (δ-ppm):** H_{13/14/15} = 0,28 (s, 9H); H_{2'} = 2,02 – 2,07 (m, 2H); H_{3'} = 2,07 – 2,12 (m, *J* = 6,5 Hz, 2H); H_{4'} = 3,51 (t, *J* = 6,5 Hz, 2H); H_{1'} = 4,08 (t, *J* = 5,7 Hz, 2H); H₈ = 6,80 (d, *J* = 2 Hz, 1H); H₆ = 6,86 (dd, *J*₁ = 8,7, *J*₂ = 2 Hz, 1H); H₅ = 7,36 (d, *J* = 8,5, 1H); H₄ = 7,87 (s, 1H). **RMN ¹³C (125 MHz) CDCl₃ / TMS (δ-ppm):** C_{13/14/15} = 0,21; C_{2'} = 27,58; C_{3'} = 29,24; C_{4'} = 33,12; C_{1'} = 67,62; C₁₁ = 98,39; C₁₂ = 100,74; C₈ = 101,18; C₁₀ = 109,09; C₃ = 112,41; C₆ = 113,45; C₅ = 128,76; C₄ = 146,08; C₉ = 155,31; C₇ = 159,71; C₂ = 162,55.

7-(2-bromopentoxi)-3-((trimetilsilil)etenil)-cumarina (45d)



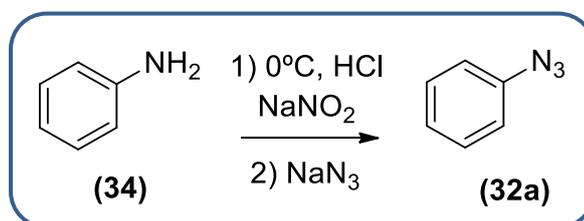
O composto **45d** foi obtido como um sólido marrom claro em 71% de rendimento. Ponto de fusão igual a 75°C (informação indisponível na literatura). **RMN ¹H (500 MHz) CDCl₃ / TMS (δ-ppm):** H_{13/14/15} = 0,27 (s, 9H); H_{3'} = 1,63 - 1,68 (m, 2H); H_{2'} = 1,86 (m, 2H); H_{4'} = 1,95 (m, 2H); H_{5'} = 3,45 (t, *J* = 6,60 Hz, 2H); H_{1'} = 4,03 (t, *J* = 6,30 Hz, 2H); H₈ = 6,78 (d, *J* = 2,2 Hz, 1H); H₆ = 6,84 (dd, *J*₁ = 8,7, *J*₂ = 2,4 Hz, 1H); H₅ = 7,34 (d, *J* = 8,5, 1H); H₄ = 7,85 (s, 1H). **RMN ¹³C (125 MHz) CDCl₃ / TMS (δ-ppm):** C_{13/14/15} = 0,20; C_{3'} = 24,70; C_{2'} = 28,12; C_{4'} = 32,33; C_{5'} = 33,39; C_{1'} = 68,32; C₁₁ = 98,45; C₁₂ = 100,68; C₈ = 101,17; C₁₀ = 109,02; C₃ = 112,35; C₆ = 113,51; C₅ = 128,73; C₄ = 146,10; C₉ = 155,36; C₇ = 159,74; C₂ = 162,72.

5.5. Síntese de 3-(etenil)-(7-bromoalcoxi)-cumarinas (33a-d)

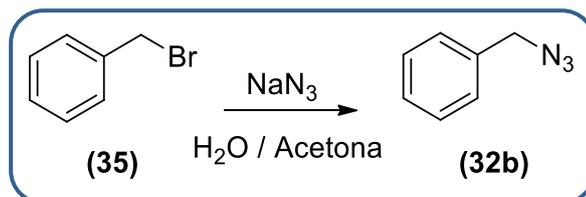


Em um tubo de reação foi solubilizado 1 mmol de 7-(bromoalcoxi)-3-((trimetilsilil)etenil)-cumarina (**45a-d**) em 15 mL de metanol, e em seguida foram adicionados 1,53 mmol de K_2CO_3 . A reação foi mantida sob agitação a temperatura ambiente por 30 minutos. Após este período, o solvente foi evaporado, em seguida, foram adicionados acetato de etila e água ao resíduo. Separou-se a fase orgânica, e extraiu-se a fase aquosa com acetato de etila (3×15 mL). Por fim, fase orgânica combinada foi seca com Na_2SO_4 e concentrada à vácuo, para fornecer o composto **33a-d**.

5.6. Síntese das azidas (32a-b)

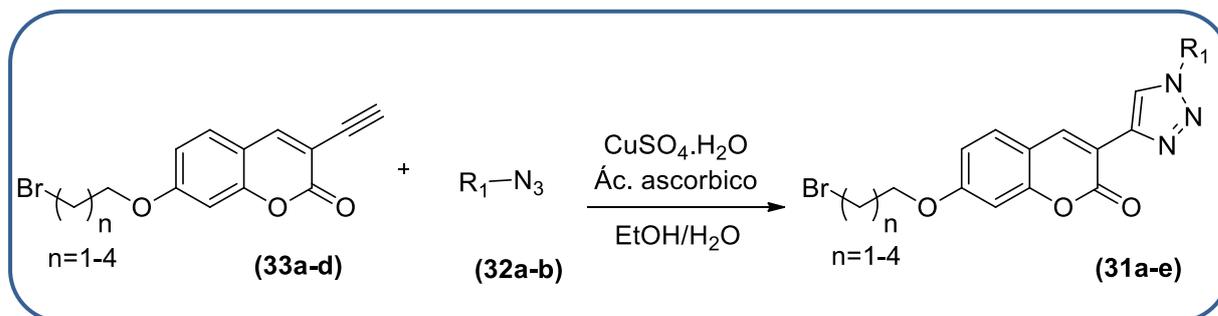


Em um tubo de reação, preparou-se uma solução com 5,4 mmol de arilamina (**34**), 10 mL de acetato de etila e 1,25 mL de água. Em seguida resfriou-se a solução até $0^\circ C$ e adicionou-se 3 mL de ácido clorídrico concentrado. A reação seguiu em agitação magnética durante 10 minutos. Em um béquer de 25 mL foram dissolvidos 9,2 mmol de $NaNO_2$ em 2 mL de água que foram adicionados na reação por 3 minutos. Após a completa adição, a reação foi mantida sob agitação e temperatura igual a $0^\circ C$ durante 30 minutos. Em seguida, foi adicionada uma solução previamente preparada de 9,2 mmol de NaN_3 em 2 mL de água por 5 minutos. A reação foi mantida sob agitação durante 1 hora, deixando a temperatura aumentar gradativamente, até a temperatura ambiente. A reação foi diluída com água (12,5 mL) e extraída com acetato de etila ($2 \times 12,5$ mL). Finalmente, a fase orgânica combinada foi lavada com solução de hidróxido de sódio 0,1 M (12,5 mL) e, posteriormente, com água. A fase orgânica foi seca com Na_2SO_4 anidro e concentrada sob vácuo, para fornecer a azida **32a**.



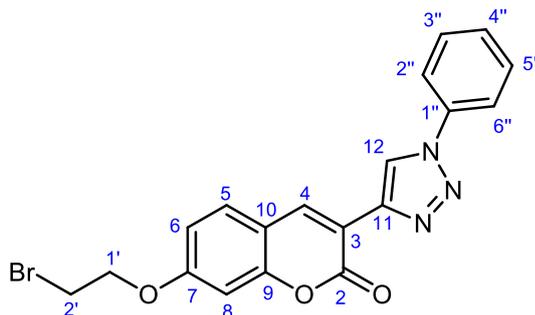
Outra metodologia foi empregada para a síntese da benzil azida **32b**, na qual em uma solução de 1,75 mmol de brometo de benzila (**35**) em água/acetona (1:3), foi adicionado 3,50 mmol de NaN_3 . A reação foi mantida em agitação durante 30 minutos à temperatura ambiente. Ao fim da reação, a mistura reacional foi extraída com diclorometano e lavada com água. A fase orgânica foi seca com Na_2SO_4 anidro e concentrada sob vácuo, para fornecer a azida **32b**.

5.7. Síntese de 3-(1*H*-1,2,3-triazol-4- R_1)-7-bromoalcoxi-cumarínicos (**31a-e**)



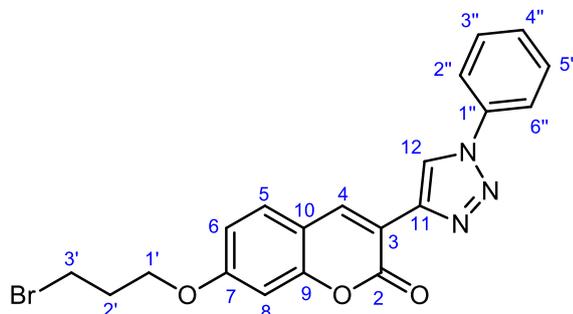
Em um tubo de reação de 25 mL foram solubilizados 1 mmol de 3-(etenil)-7-(bromoalcoxi)-cumarina (**33a-d**) e 1,3 mmol de arilazida (**32a-b**) em água e etanol (v/v= 1:1, mL). Em seguida foi adicionado uma solução previamente preparada de 0,2 mmol de ascorbato de sódio dissolvido em 2 mL de água. Seguido pela adição de outra solução previamente preparada de 0,05 mmol de CuSO_4 .pentahidratado 7.5 % CuSO_4 em 2 mL de água. A reação foi agitada vigorosamente durante 24 horas, no escuro e em temperatura ambiente. Ao término da reação, o etanol foi removido à vácuo e o resíduo foi vertido em gelo. O sólido foi filtrado á vácuo e lavado com água gelada. Os produtos obtidos (**31a-e**) foram purificados em coluna cromatográfica flash no equipamento Isolera, com fase estacionaria de sílica em gel e utilizando como fase móvel mistura de hexano:acetato de etila em gradiente de concentração de 40-70% do solvente mais polar.

3-(1*H*-1,2,3-triazol-4-fenil)-7-(2-bromoetoxi)-cumarina (31a)



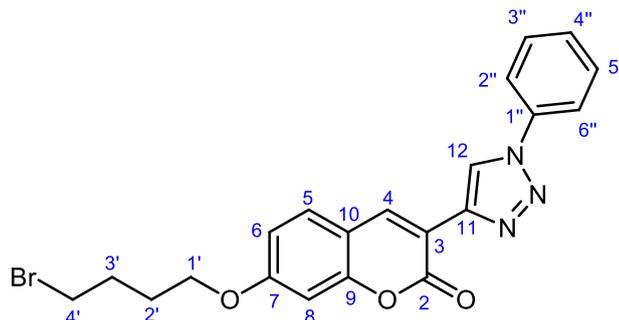
O composto **31a** foi obtido como um sólido marrom claro em 61% de rendimento. Ponto de degradação igual a 223°C (informação indisponível na literatura). **RMN¹H (500 MHz) CDCl₃ / TMS (δ-ppm)**: H_{2'} = 3,63 (m, 2H); H_{1'} = 4,32 (m, 2H); H₈ = 6,82 (s, 1H); H₆ = 6,89 (d, *J* = 8,2 Hz, 1H); H_{4''} = 7,40 (t, 1H); H_{2''}/ H_{3''}/ H_{5''}/ H_{6''} = 7,48 - 7,53 (m, 4H); H₅ = 7,77 (d, *J* = 7,3 Hz, 1H); H₄ = 8,71 (s, 1H); H₁₂ = 8,74 (s, 1H). **RMN¹³C (125 MHz) CDCl₃ / TMS (δ-ppm)**: C_{2'} = 28,38; C_{1'} = 68,29; C₈ = 101,43; C₆ = 113,49; C₁₀ = 114,83; C_{2''}/C_{6''} = 120,55; C₁₂ = 121,37; C₅ = 128,87; C_{4''} = 129,70; C_{3''}/C_{5''} = 129,84; C₁₁ = 130,56; C_{1''} = 136,93; C₄ = 146,51; C₉ = 158,39; C₇ = 159,78; C₂ = 160,52.

3-(1*H*-1,2,3-triazol-4-fenil)-7-(2-bromopropoxi)-cumarina (31b)



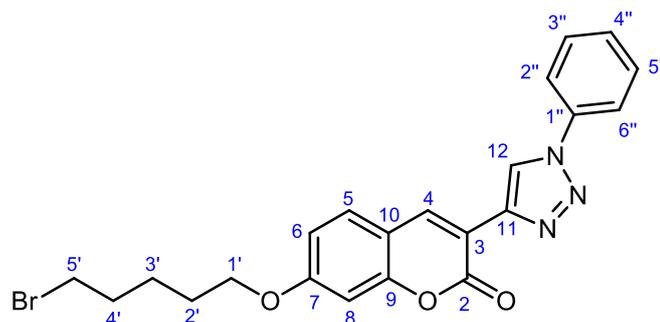
O composto **31b** foi obtido como um sólido marrom em 63% de rendimento. Ponto de degradação igual a 193°C (informação indisponível na literatura). **RMN¹H (500 MHz) CDCl₃ / TMS (δ-ppm)**: H_{3'} = 2,40 (m, 2H); H_{2'} = 3,65 (t, 2H); H_{1'} = 4,32 (t, 2H); H₈ = 6,93 (s, 1H); H₆ = 6,95 (d, *J* = 8,8 Hz, 1H); H_{4''} = 7,49 (t, 1H); H₅ = 7,85 (d, *J* = 7,6 Hz, 1H); H_{2''}/ H_{3''}/ H_{5''}/ H_{6''} = 7,98 (m, 4H); H₁₂ = 8,80 (s, 1H); H₄ = 8,83 (s, 1H). **RMN¹³C (125 MHz) CDCl₃ / TMS (δ-ppm)**: C_{2'} = 29,27; C_{3'} = 31,69; C_{1'} = 65,69; C₈ = 100,96; C₁₀ = 112,87; C₆ = 113,17; C₃ = 114,33; C_{2''}/C_{6''} = 120,21; C₁₂ = 121,01; C₅ = 128,54; C_{4''} = 129,28; C_{3''}/C_{5''} = 129,52; C_{1''} = 136,70; C₄ = 137,77; C₉ = 156,90; C₇ = 159,58; C₂ = 161,74.

3-(1*H*-1,2,3-triazol-4-fenil)-7-(4-bromobutoxi)-cumarina (31c)



O composto **31c** foi obtido como um sólido marrom claro em 79% de rendimento. Ponto de degradação igual a 174°C (informação indisponível na literatura). **RMN¹H (500 MHz) CDCl₃ / TMS (δ-ppm)**: H_{3'} = 2,04 – 2,08 (m, 2H); H_{2'} = 2,08 – 2,14 (m, 2H); H_{4'} = 3,52 (t, *J* = 6,3 Hz, 2H); H_{1'} = 4,1 (t, *J* 5,7 Hz 2H); H₈ = 6,88 (sl, 1H); H₆ = 6,92 (d, *J* = 8,8 Hz, 1H); H_{4''} = 7,47 (t, *J* = 7,3 Hz, 1H); H_{2''/H_{3''/H_{5''/H_{6''}}} = 7,55 – 7,58 (m, 4H); H₅ = 7,84 (d, *J* = 7,9 Hz, 1H); H₄ = 8,78 (s, 1H); H₁₂ = 8,81 (s, 1H). **RMN¹³C (125 MHz) CDCl₃/ TMS (δ-ppm)**: C_{2'} = 27,62; C_{3'} = 29,27; C_{4'} = 33,18; C_{1'} = 67,57; C₈ = 101,01; C₁₀ = 112,95; C₆ = 113,50; C₃ = 114,42; C_{2''/C_{6''}} = 120,45; C₁₂ = 121,21; C₅ = 128,78; C_{4''} = 129,48; C_{3''/C_{5''}} = 129,77; C₁₁ = 136,94; C₄ = 138,07; C_{1''} = 141,63; C₉ = 155,01; C₇ = 159,86; C₂ = 169,21.}

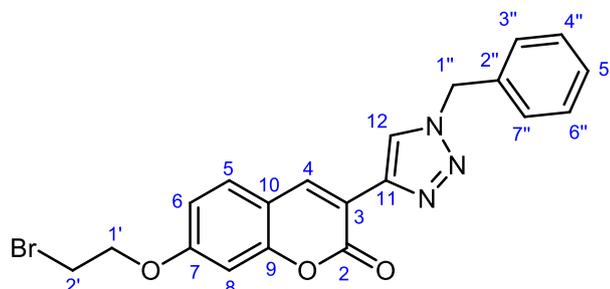
3-(1*H*-1,2,3-triazol-4-fenil)-7-(2-bromobutoxi)-cumarina (31d)



O composto **31d** foi obtido como um sólido marrom claro em 61% de rendimento. Ponto de fusão igual a 175°C (informação indisponível na literatura). **RMN¹H (500 MHz) CDCl₃ / TMS (δ-ppm)**: H_{3'} = 1,26 (sl, 2H); H_{4'} = 1,88 (m, 2H); H_{2'} = 1,97 (m, 2H); H_{5'} = 3,47 (t, 2H); H_{1'} = 4,07 (t, 2H); H₈ = 6,88 (s, 1H); H₆ = 6,93 (d, *J* = 7,6 Hz, 1H); H_{4''} = 7,47 (m, 1H); H_{2''/H_{3''/H_{5''/H_{6''}}} = 7,56 (m, 4H); H₅ = 7,85 (d, *J* = 6,9 Hz, 1H); H₁₂ = 8,78 (s, 1H); H₄ = 8,81 (s, 1H). **RMN¹³C (125 MHz) CDCl₃ / TMS (δ-ppm)**: C_{3'} = 24,99; C_{2'} = 28,42; C_{4'} = 32,61; C_{5'} = 33,70; C_{1'} = 68,54; C₈ = 101,25; C₁₀ = 113,13; C₆ = 113,83; C₃ = 114,61; C_{2''/C_{6''}}}

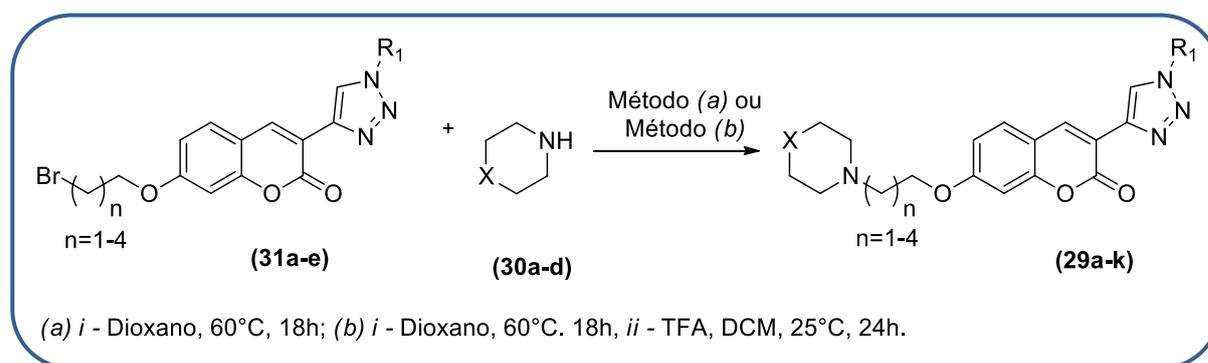
= 120,71; C₁₂ = 121,47; C₅ = 129,03; C_{4''} = 129,72; C_{3''/C_{5''}} = 130,02; C₁₁ = 137,21; C₄ = 138,38; C₉ = 155,30; C₇ = 160,17; C₂ = 162,62.

3-(1*H*-1,2,3-triazol-4-benzil)-7-(2-bromoetoxi)-cumarina (31e)



O composto **31e** foi obtido como um óleo marrom escuro em 57% de rendimento. **RMN¹H (500 MHz) CDCl₃ / TMS (δ-ppm):** H_{2'} = 3,64 (t, 2H); H_{1'} = 4,33 (t, 2H); H_{1''} = 5,52 (s, 2H); H₈ = 6,82 (s, *J* = 1,9 Hz, 1H); H₆ = 6,90 (d, *J*₁ = 8,5, *J*₂ = 2,2 Hz, 1H); H_{5''} = 7,25 (m, 1H); H_{3''/H_{4''/H_{6''/H_{7''}}} = 7,31 - 7,35 (m, 4H); H₅ = 7,54 (d, *J* = 8,8 Hz, 1H); H₄ = 8,26 (s, 1H); H₁₂ = 8,62 (s, 1H). **RMN¹³C (125MHz) CDCl₃ / TMS (δ-ppm):** C_{2'} = 28,06; C_{1''} = 53,96; C_{1'} = 67,91; C₈ = 100,96; C₁₀ = 113,06; C₆ = 113,14; C₃ = 114,40; C₁₂ = 123,22; C_{3''/C_{7''}} = 127,68; C_{5''} = 128,45; C_{4''/C_{6''}} = 128,77; C₅ = 129,33; C₁₁ = 134,06; C₄ = 137,49; C_{2''} = 140,90; C₉ = 154,40; C₇ = 159,55; C₂ = 160,97.}

5.8. Síntese da 3-(1*H*-1,2,3-triazol-4-R₁)-7-(aminoalcoxi)-cumarinas (29a-k)

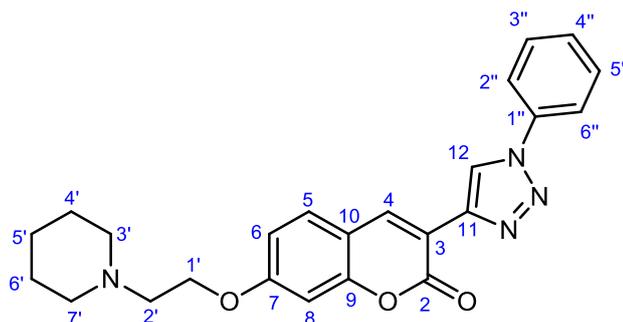


Em um tubo de reação de 25 mL, foram adicionados 1 mmol dos respectivos derivados 3-(1*H*-1,2,3-triazol-4-R₁)-7-alcoxi-cumarínicos (**31a-e**) e solubilizados em 15 mL de 1,4-dioxano. Em seguida foram adicionados 3 mmol da amina cíclica (**30a-d**). O tubo foi então selado e a mistura foi submetida a agitação magnética e aquecimento a 60°C por 18h. Ao término da reação, o 1,4 - dioxano foi evaporado em rotaevaporador. Por fim, os respectivos produtos foram purificados no equipamento Isolera com fase estacionária sílica e

fase móvel mistura de diclorometano:metanol em gradiente de concentração de 0-25% do solvente mais polar.

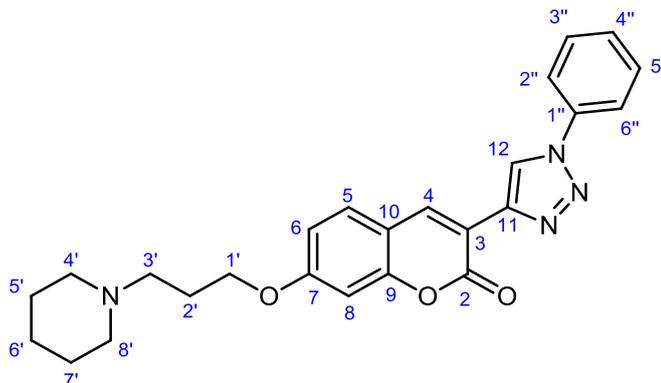
O produto proveniente da amina cíclica protegida (**29j'**) foi submetido à condição (b), onde, na primeira etapa foi realizada a reação de aminação (i) como descrito anteriormente, seguido da etapa de desproteção (ii). Em tubo de reação de 25 mL foram solubilizados 0,1 mmol de **29j'** em 10ml de diclorometano sob banho de gelo, seguida da adição de 2 mmol de ácido trifluoroacético. O banho de gelo foi retirado e a reação prosseguiu sob agitação em temperatura ambiente por 24h. Ao fim da reação, a mistura reacional foi neutralizada com uma solução saturada de bicarbonato de sódio, seguida da sua extração com diclorometano (3x30mL). Por fim, fase orgânica combinada foi seca com Na₂SO₄ e concentrada à vácuo, para fornecer o composto **29j**.

3-(1*H*-1,2,3-triazol-4-fenil)-7-(2-(piperidin-1-il)etoxi)-cumarina (**29a**)



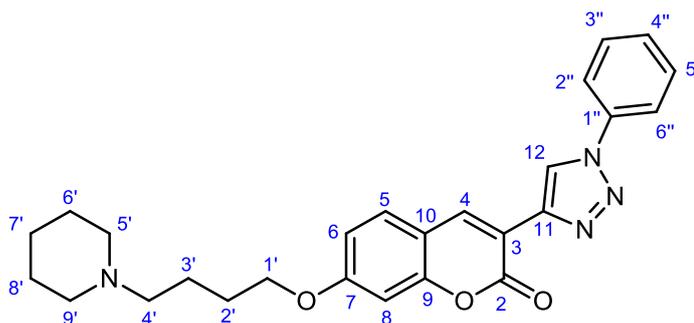
O composto **29a** foi obtido como um sólido amarelo em 53% de rendimento. Ponto de fusão igual a 176°C (informação indisponível na literatura). **RMN¹H (500 MHz) CDCl₃ / TMS (δ-ppm):** H_{3'/H7'} = 2,98 (sl, 6H); H_{2'} = 3,23 (t, 2H); H_{1'} = 4,49 (sl, 2H); H₈ = 6,90 (s, 1H); H₆ = 6,95 (d, 1H); H_{4''} = 7,48 (t, 1H); H_{2''/H3''/H5''/H6''} = 7,56 (m, 4H); H₅ = 7,83 (d, 1H); H₄ = 8,75 (s, 1H); H₁₂ = 8,80 (s, 1H). **RMN¹³C (125MHz) CDCl₃ / TMS (δ-ppm):** C_{5'} = 22,63; C_{4'/C6'} = 29,64; C_{3'/C7'} = 54,48; C_{2'} = 56,60; C_{1'} = 70,47; C₈ = 101,65; C₆ = 113,04; C₁₀ = 113,51; C₃ = 114,87; C_{2''/C6''} = 120,45; C₁₂ = 121,34; C₅ = 128,82; C_{4''} = 129,70; C_{3''/C5''} = 129,77; C₁₁ = 136,87; C₄ = 137,88; C_{1''} = 141,48; C₉ = 154,79; C₇ = 159,70; C₂ = 160,99.

3-(1*H*-1,2,3-triazol-4-fenil)-7-(3-(piperidin-1-il)propoxi)-cumarina (29b)



O composto **29b** foi obtido como um sólido âmbar em 63% de rendimento. Ponto de degradação igual a 250°C (informação indisponível na literatura). **RMN¹H (500 MHz) CDCl₃ / TMS (δ-ppm):** H_{2'} = 2,29 (m, 2H); H₈ = 2,52 (sl, 2H); H_{4'} = 2,73 (sl, 2H); H_{3'} = 3,24 (sl, 2H); H_{1'} = 4,19 (sl, 2H); H₈ = 6,85 (sl, 1H); H₆ = 6,9 (d, *J* = 7,9 Hz, 1H); H_{4''} = 7,46 (t, *J* = 7,3 Hz 1H); H_{2''/H_{3''}/H_{5''/H_{6''}} = 7,53 – 7,58 (q, 4H); H₅ = 7,82 (d, *J* = 7,6 Hz, 1H); H₄ = 8,74 (s, 1H); H₁₂ = 8,79 (s, 1H). **RMN¹³C (125 MHz) CDCl₃/ TMS (δ-ppm):** C_{5'/C_{7'}} = 22,53; C_{6'} = 23,68; C_{2'} = 29,63; C_{4'/C_{8'}} = 53,64; C_{3'} = 65,66; C_{1'} = 70,43; C₈ = 101,37; C₆ = 112,93; C₁₀ = 113,36; C₂ = 114,73; C_{2''/C_{6''}} = 120,43; C₁₂ = 121,33; C₅ = 128,84; C_{4''} = 129,70; C_{3''/C_{5''}} = 129,76; C₁₁ = 136,83; C₄ = 137,96; C_{1''} = 141,46; C₉ = 154,79; C₇ = 159,74; C₂ = 161,43.}

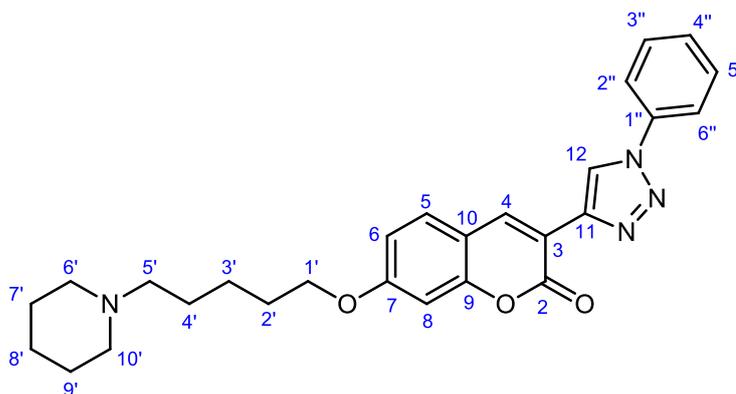
3-(1*H*-1,2,3-triazol-4-fenil)-7-(2-(piperidin-1-il)butoxi)-cumarina (29c)



O composto **29c** foi obtido como um sólido amarelo mostarda em 69% de rendimento. Ponto de fusão igual a 190°C (informação indisponível na literatura). **RMN¹H (500 MHz) CDCl₃ / TMS (δ-ppm):** H_{6'/H_{7'/H_{8'}} = 1,87 (sl, 6H); H_{2'/H_{3'}} = 2,05 – 2,13 (m, 4H); H_{9'} = 2,67 – 2,71 (t, 2H); H_{5'} = 3,05 (sl, 2H); H_{4'} = 3,54 (sl, 2H); H_{1'} = 4,06 (sl, 2H); H₈ = 6,83 (sl, 1H); H₆ = 6,89 (d, 1H); H_{4''} = 7,42 (sl, 1H); H_{2''/H_{3''/H_{5''/H_{6''}} = 7,50 – 7,56 (m, 4H); H₅ = 7,78 (d, 1H); H₄ = 8,69 (s, 1H); H₁₂ = 8,76 (s, 1H). **RMN¹³C (125MHz) CDCl₃ / TMS (δ-ppm):** C_{7'} =}}}

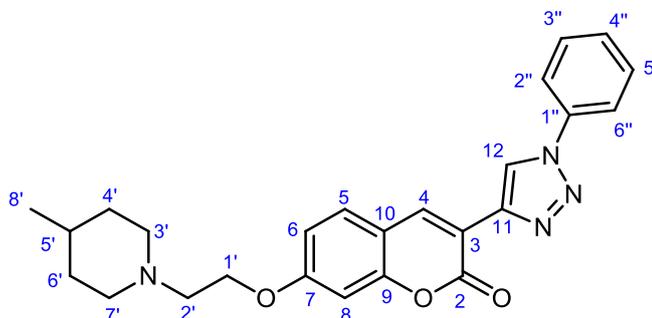
21,78; C₆'/C₈' = 22,47; C₃' = 26,14; C₂' = 29,52; C₅'/C₉' = 53,13; C₄' = 56,80; C₁' = 67,48; C₈' = 101,04; C₁₀' = 112,96; C₆' = 113,32; C₃' = 114,15; C₂'/C₆' = 120,38; C₁₂' = 121,31; C₅' = 128,84; C₄' = 129,61; C₃'/C₅' = 129,70; C₁₁' = 136,70; C₄' = 138,25; C₉' = 154,80; C₇' = 159,95; C₂' = 161,98.

3-(1*H*-1,2,3-triazol-4-fenil)-7-(2-(piperidin-1-il)pentoxi)-cumarina (29d)



O composto **29d** foi obtido como um sólido bege em 76% de rendimento. Ponto de fusão igual a 277°C (informação indisponível na literatura). **RMN¹H (500 MHz) CDCl₃ / TMS (δ-ppm):** H₅' = 3,29 (sl, 2H); H₁' = 4,01 (sl, 2H); H₈' = 6,81 (sl, 1H); H₆' = 6,86 (d, 1H); H₄' = 7,41 (t, 1H); H₂'/ H₃'/ H₅'/ H₆' = 7,48 – 7,54 (m, 4H); H₅' = 7,75 (sl, 1H); H₄' = 8,67 (s, 1H); H₁₂' = 8,74 (s, 1H). **RMN¹³C (125MHz) CDCl₃ / TMS (δ-ppm):** C₃' = 21,97; C₇'/C₉' = 22,67; C₈' = 23,45; C₄' = 28,44; C₂' = 29,74; C₆'/C₁₀' = 53,34; C₅' = 57,22; C₁' = 68,13; C₈' = 101,18; C₆' = 113,32; C₁₀' = 114,17; C₃' = 114,77; C₂'/C₆' = 120,61; C₁₂' = 121,51; C₅' = 129,08; C₄' = 129,80; C₃'/C₅' = 129,92; C₁₁' = 136,92; C₄' = 138,61; C₉' = 156,64; C₇' = 160,70; C₂' = 162,56.

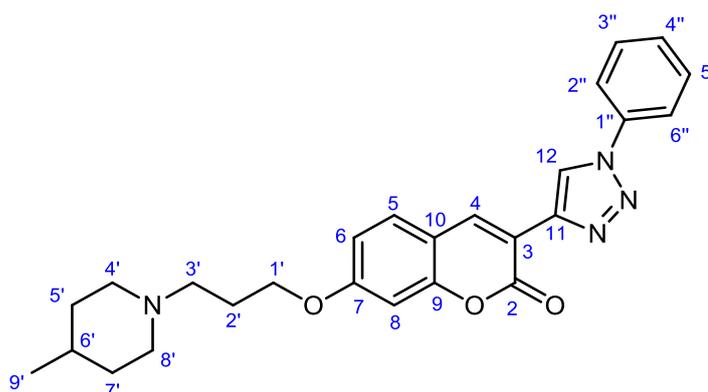
3-(1*H*-1,2,3-triazol-4-fenil)-7-(2-(4-metilpiperidin-1-il)etoxi)-cumarina (29e)



O composto **29e** foi obtido como um sólido alaranjado em 52% de rendimento. Ponto de fusão igual a 149°C (informação indisponível na literatura). **RMN¹H (500 MHz) CDCl₃ / TMS (δ-ppm):** H₈' = 0,97 (d, 3H); H₅' = 1,27 (s, 1H); H₄'/H₆' = 1,31; 1,71 (t, 2H; d, 2H); H₃'/H₇' = 2,23; 3,05 (t, 2H; d, 2H); H₂' = 3,66 (sl, 2H); H₁' = 4,26 (sl, 2H); H₈' = 6,94 (s, 1H);

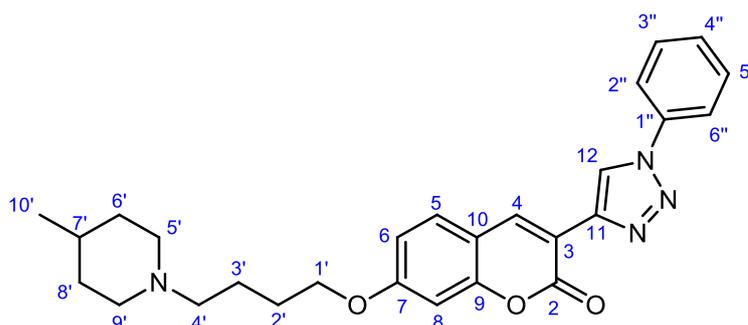
$H_6 = 6,99$ (d, $J = 8,5$, 1H); $H_{4''} = 7,51$ (t, 1H); $H_{2''}/H_{3''}/H_{5''}/H_{6''} = 7,58 - 7,65$ (m, 4H); $H_5 = 7,85$ (d, $J = 8,1$, 1H); $H_4 = 8,74$ (s, 1H); $H_{12} = 8,84$ (s, 1H). **RMN¹³C (125MHz) CDCl₃ / TMS (δ -ppm):** $C_{8'} = 21,77$; $C_{5'} = 30,52$; $C_{4'}/C_{6'} = 33,81$; $C_{3'}/C_{7'} = 54,54$; $C_{2'} = 57,23$; $C_{1'} = 70,70$; $C_8 = 101,47$; $C_{10} = 113,36$; $C_6 = 114,01$; $C_3 = 114,40$; $C_{2''}/C_{6''} = 120,82$; $C_{12} = 121,90$; $C_5 = 129,36$; $C_{4''} = 130,07$; $C_{3''}/C_{5''} = 130,14$; $C_{11} = 137,09$; $C_4 = 138,94$; $C_{1''} = 141,90$; $C_9 = 155,23$; $C_7 = 160,52$; $C_2 = 162,53$.

3-(1H-1,2,3-triazol-4-fenil)-7-(2-(4-metilpiperidin-1-il)propoxi)-cumarina (29f)



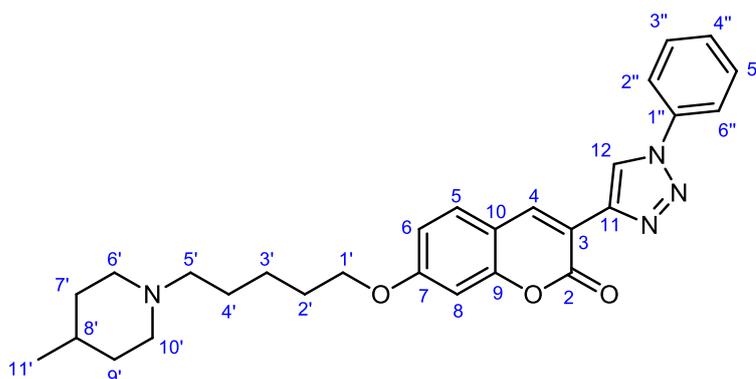
O composto **29f** foi obtido como um sólido amarelo em 73% de rendimento. Ponto de degradação igual a 162°C (informação indisponível na literatura). **RMN¹H (500 MHz) CDCl₃ / TMS (δ -ppm):** $H_{8'} = 0,97$ (d, 3H); $H_{6'} = 1,27$ (s, 1H); $H_{5'}/H_{7'} = 1,32$; 1,70 (t, 2H; d, 2H); $H_{2'} = 2,22$ (t, 2H); $H_{4'}/H_{8'} = 2,91$; 3,05 (t, 2H; d, 2H); $H_{3'} = 3,66$ (t, 2H); $H_{1'} = 4,25$ (t, 2H); $H_8 = 6,94$ (sl, 1H); $H_6 = 6,99$ (d, $J = 8,5$, 1H); $H_{4''} = 7,50$ (t, 1H); $H_{2''}/H_{3''}/H_{5''}/H_{6''} = 7,58 - 7,65$ (m, 4H); $H_5 = 7,85$ (d, $J = 8,2$, 1H); $H_4 = 8,75$ (s, 1H); $H_{12} = 8,84$ (s, 1H). **RMN¹³C (125MHz) CDCl₃ / TMS (δ -ppm):** $C_{9'} = 21,76$; $C_{2'} = 29,88$; $C_{6'} = 30,47$; $C_{5'}/C_{7'} = 33,78$; $C_{4'}/C_{8'} = 54,51$; $C_{3'} = 57,19$; $C_{1'} = 70,66$; $C_8 = 101,44$; $C_{10} = 113,30$; $C_6 = 113,94$; $C_3 = 114,37$; $C_{2''}/C_{6''} = 120,77$; $C_{12} = 121,84$; $C_5 = 129,29$; $C_{4''} = 129,99$; $C_{3''}/C_{5''} = 130,09$; $C_{11} = 137,06$; $C_4 = 138,71$; $C_{1''} = 141,85$; $C_9 = 155,21$; $C_7 = 160,44$; $C_2 = 162,45$.

3-(1H-1,2,3-triazol-4-fenil)-7-(2-(4-metilpiperidin-1-il)butoxi)-cumarina (29g)



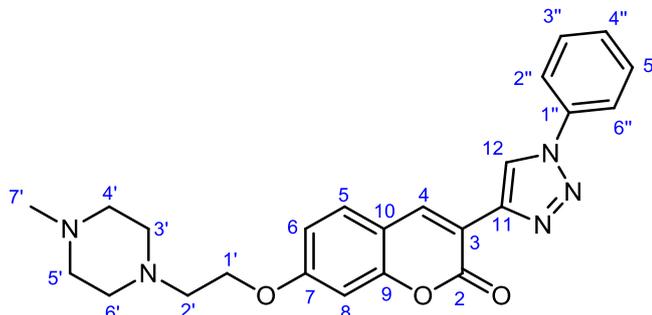
O composto **29g** foi obtido como um sólido bege em 86% de rendimento. Ponto de fusão igual a 224°C (informação indisponível na literatura). **RMN¹H (500 MHz) CDCl₃ / TMS (δ-ppm)**: H_{10'} = 0,96 (d, 3H); H_{7'} = 1,26 (s, 1H); H_{6'/H8'} = 1,34; 1,70 (m, 2H; d, 2H); H_{2'/H3'} = 2,11 (d, 4H); H_{5'/H9'} = 2,64; 3,05 (sl, 2H; d, 2H); H_{4'} = 3,65 (sl, 2H); H_{1'} = 4,11 (t, 2H); H₈ = 6,90 (s, 1H); H₆ = 6,94 (d, *J* = 8,2, 1H); H_{4''} = 7,49 (t, 1H); H_{2''/ H3''/ H5''/ H6''} = 7,56 – 7,61 (m, 4H); H₅ = 7,84 (d, *J* = 8,2, 1H); H₄ = 8,75 (s, 1H); H₁₂ = 8,82 (s, 1H). **RMN¹³C (125MHz) CDCl₃ / TMS (δ-ppm)**: C_{10'} = 21,65; C_{6'/C8'} = 26,08; C_{3'} = 29,76; C_{7'} = 30,49; C_{2'} = 33,51; C_{5'/C9'} = 53,92; C_{4'} = 55,48; C_{1'} = 70,52; C₈ = 101,18; C₁₀ = 113,02; C₆ = 113,73; C₃ = 114,20; C_{2''/C6''} = 120,62; C₁₂ = 121,51; C₅ = 129,08; C_{4''} = 129,75; C_{3''/C5''} = 129,93; C₄ = 136,95; C₁₁ = 138,59; C_{1''} = 141,74; C₉ = 155,09; C₇ = 160,27; C₂ = 162,59.

3-(1*H*-1,2,3-triazol-4-fenil)-7-(2-(4-metilpiperidin-1-il)pentoxi)-cumarina (29h)



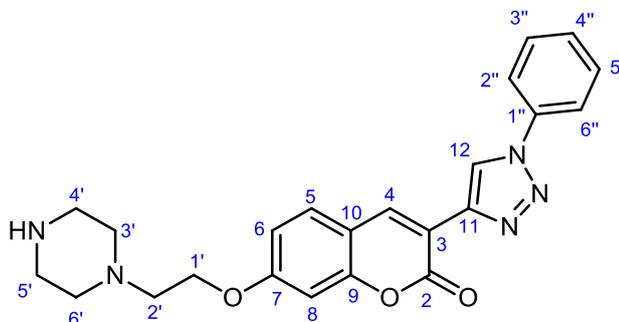
O composto **29h** foi obtido como um sólido amarelo claro em 64% de rendimento. Ponto de fusão igual a 164°C (informação indisponível na literatura). **RMN¹H (500 MHz) CDCl₃ / TMS (δ-ppm)**: H_{11'} = 1,04 (d, 3H); H_{8'} = 1,27 (sl, 1H); H_{1'} = 4,14 (sl, 2H); H₈ = 6,91 (sl, 1H); H₆ = 6,97 (d, *J* = 8,5, 1H); H_{4''} = 7,49 – 7,52 (m, 1H); H_{2''/ H3''/ H5''/ H6''} = 7,58 – 7,65 (m, 4H); H₅ = 7,85 (d, *J* = 8,5, 1H); H₄ = 8,74 (s, 1H); H₁₂ = 8,83 (s, 1H). **RMN¹³C (125MHz) CDCl₃ / TMS (δ-ppm)**: C_{11'} = 21,04; C_{3'} = 21,20; C_{7'/C9'} = 26,47; C_{8'} = 29,09; C_{4'} = 31,26; C_{2'} = 46,74; C_{6'/C10'} = 53,33; C_{5'} = 57,26; C_{1'} = 67,88; C₈ = 101,38; C₁₀ = 113,32; C₆ = 113,81; C₃ = 114,40; C_{2''/C6''} = 120,79; C₁₂ = 121,71; C₅ = 129,34; C_{4''} = 130,06; C_{3''/C5''} = 130,12; C₁₁ = 137,06; C₄ = 138,74; C_{1''} = 141,86; C₉ = 155,23; C₇ = 160,47; C₂ = 162,56.

3-(1*H*-1,2,3-triazol-4-fenil)-7-(2-(4-metilpirerazin-1-il)etoxi)-cumarina (29i)



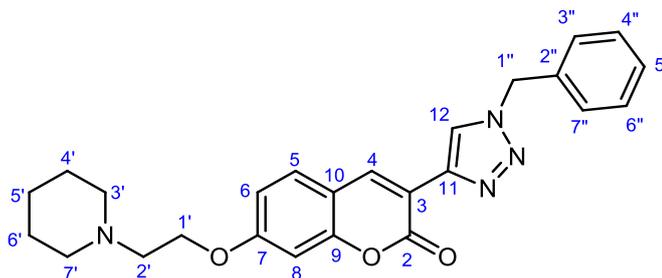
O composto **29i** foi obtido como um óleo marrom claro em 64% de rendimento. **RMN¹H (500 MHz) CDCl₃ / TMS (δ-ppm):** H_{7'} = 2,21 (s, 3H); H_{4'/H_{5'}} = 2,29 (t, 4H); H_{3'/H_{6'}} = 2,34 (t, 4H); H_{1'} = 4,14 (sl, 2H); H₈ = 6,79 (sl, 1H); H₆ = 6,83 (d, *J* = 8,2, 1H); H_{4''} = 7,37 (t, 1H); H_{2''/ H_{3''/ H_{5''/ H_{6''}} = 7,43 – 7,50 (m, 4H); H₅ = 7,79 (d, *J* = 8,2, 1H); H₄ = 8,69 (s, 1H); H₁₂ = 8,71 (s, 1H). **RMN¹³C (125MHz) CDCl₃ / TMS (δ-ppm):** C_{7'} = 45,45; C_{4'/C_{5'}} = 53,65; C_{3'/C_{6'}} = 54,77; C_{2'} = 60,83; C_{1'} = 68,78; C₈ = 100,89; C₁₀ = 112,82; C₆ = 113,35; C₃ = 113,99; C_{2''/C_{6''}} = 120,20; C₁₂ = 125,49; C₅ = 128,69; C_{3''/C_{5''}} = 129,54; C_{4''} = 129,64; C₄ = 138,09; C_{1''} = 141,26; C₉ = 159,74; C₇ = 161,74; C₂ = 168,20.}}

3-(1*H*-1,2,3-triazol-4-fenil)-7-(2-(pirerazin-1-il)etoxi)-cumarina (29j)



O composto **29j** foi obtido como um óleo marrom escuro em 60% de rendimento. **RMN¹H (500 MHz) CDCl₃ / TMS (δ-ppm):** H_{1'} = 4,23 (sl, 2H); H₈ = 6,87 (s, 1H); H₆ = 6,91 (d, *J* = 7,9, 1H); H_{4''} = 7,43 (t, 1H); H_{2''/ H_{3''/ H_{5''/ H_{6''}} = 7,51 – 7,59 (m, 4H); H₅ = 7,79 (d, *J* = 7,5, 1H); H₄ = 8,71 (s, 1H); H₁₂ = 8,77 (s, 1H). **RMN¹³C (125MHz) CDCl₃ / TMS (δ-ppm):** C_{4'/C_{5'}} = 45,81; C_{2'} = 55,52; C_{3'/C_{6'}} = 56,42; C_{1'} = 65,45; C₈ = 101,37; C₁₀ = 113,57; C₆ = 113,65; C₃ = 114,30; C_{2''/C_{6''}} = 120,67; C₁₁ = 121,01; C₁₂ = 126,28; C₅ = 129,28; C_{3''/C_{5''}} = 129,99; C_{4''} = 130,37; C₄ = 138,40; C_{1''} = 141,66; C₉ = 155,01; C₇ = 161,59; C₂ = 162,53.}}

3-(1*H*-1,2,3-triazol-4-fenil)-7-(2-(piperidin-1-il)etoxi)-cumarina (29k)



O composto **29k** foi obtido como um óleo marrom em 40% de rendimento. Ponto de **RMN¹H (500 MHz) CDCl₃ / TMS (δ-ppm)**: H_{5'} = 1,42 (m, 2H); H_{4'/H_{6'}} = 1,51 (m, 4H); H_{3'/H_{7'}} = 2,55 (sl, 4H); H_{2'} = 2,83 (t, 2H); H_{1'} = 4,16 (t, 2H); H₈ = 6,82 (s, *J* = 1,6, 1H); H₆ = 6,87 (d, *J*₁ = 8,7, *J*₂ = 2 Hz, 1H); H_{5''} = 7,26 (m, 1H); H_{2''/ H_{3''/ H_{5''/ H_{6''}} = 7,30 -7,35 (m, 4H); H₅ = 7,51 (d, *J* = 8,5, 1H); H₄ = 8,25 (s, 1H); H₁₂ = 8,60 (s, 1H). **RMN¹³C (125MHz) CDCl₃ / TMS (δ-ppm)**: C_{5'} = 23,83; C_{4'/C_{6'}} = 24,83; C_{1''} = 53,92; C_{3'/C_{7'}} = 54,41; C_{2'} = 56,87; C_{1'} = 68,50; C₈ = 100,76; C₁₀ = 112,68; C₆ = 113,16; C₃ = 114,12; C₁₂ = 123,14; C_{3''/C_{7''}} = 127,65; C₅ = 128,41; C_{4''/C_{6''}} = 128,74; C_{4''} = 129,19; C₁₁ = 134,06; C₄ = 137,62; C_{2''} = 140,95; C₉ = 154,46; C₇ = 159,64; C₂ = 161,54.}}

5.9. Teste in vitro da atividade anticolinesterásica dos derivados cumarínicos

A determinação da atividade anticolinesterásica foi realizada de acordo com o método adaptado de Ellman (ELLMAN, 1961). Todas as soluções utilizadas nos ensaios foram preparadas em tampão tris-HCl 0,02 M (pH = 7,5, ajustado com solução 1 M de HCl ou NaOH) e as soluções estoque dos compostos foram preparadas em mistura DMSO:EtOH (7:3) (35 mM). Em uma placa de 96 poços de fundo plano foram adicionados 150 µL de solução do composto inibidor (**29a-k**; donepezila) em oito diferentes concentrações diluídas em série, as quais variaram de entre 50 - 0,001 µM para AChE (fator de diluição = 2) e de 50 - 0,1 µM para BChE (fator de diluição = 2). O controle veículo (DMSO - concentração final 0,02% v / v para AChE e 0,02% v / v para BChE), foi utilizado como referência (controle negativo). Em seguida, foram adicionados 60 µL de ácido 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzóico (DTNB, reagente de Ellman) a 1,1 mM e 30 µL de acetilcolinesterase isolada de cérebro de enguia elétrica (EeAChE) ou butirilcolinesterase isolada de soro equino (EqBChE) a 0,20 U/mL na presença de 1 mg/mL de albumina sérica bovina (BSA). A absorbância foi então registrada utilizando um leitor de placas iMark (BioRad) equipado com um filtro de luz de = 415 nm e esta medida foi usada como uma referência em branco. Após uma incubação de 10 minutos a 25°C, 24 µL de solução do substrato iodeto de acetiltiocolina (ACTI) ou iodeto de S-butiltiocolina

(BCTI) a 2,75 mM foram adicionados e a absorbância foi registrada após 5 minutos de incubação a 25°C a $\lambda = 415$ nm por 3 vezes dentro de 60 segundos. A atividade enzimática foi calculada como porcentagem referente à média dos valores de absorbância medidos para o controle tratado com DMSO, descontada dos valores de referência em branco. Os ensaios foram realizados em triplicatas (para o cálculo do desvio-padrão) e os valores de CI_{50} foram calculados com auxílio do programa Graphpad Prism 7.0 utilizando o modelo de regressão não linear para a inibição dose-resposta.

5.10. Estudo do mecanismo de inibição enzimática

Para se realizar o estudo cinético foi utilizado o método adaptado de Ellman (ELLMAN, 1961). O tampão tris-HCl 0,02 M (pH = 7,5, ajustado com solução 1 M de HCl ou NaOH) foi usado para realizar o preparo de todas as soluções utilizadas nos ensaios e as soluções estoque dos compostos foram preparadas em DMSO (50 mM). Inicialmente, foram adicionados 150 μ L de solução do composto inibidor (**29a** e **29k**) em uma placa de 96 poços de fundo plano em duas concentrações diferentes (Tabela 12), em oito conjuntos de triplicatas cada. Como controle negativo foram utilizados oito conjuntos de triplicatas tratados com DMSO (concentração final 0,0004% v / v para AChE e 0,012% v / v para BChE). Em seguida, foram adicionados 60 μ L de ácido 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzóico (DTNB, reagente de Ellman) a 1,1 mM e 30 μ L de acetilcolinesterase isolada de cérebro de enguia elétrica (EeAChE) ou butirilcolinesterase isolada de soro equino (EqBChE) a 0,20 U / mL na presença de 1 mg / mL de albumina sérica bovina (BSA). Um leitor de placas iMark (Bio-Rad) equipado com um filtro de luz de $\lambda = 415$ nm foi utilizado para registrar a absorbância e esta medida foi então usada como uma referência em branco. Após 10 minutos de incubação a 25°C, 24 μ L de solução do substrato iodeto de acetiltiocolina (ACTI) ou iodeto de S-butiriltiocolina (BCTI) em oito concentrações diluídas em série (fator = 1,3) de 2,75 - 0,44 mM (concentração final: 0,25 - 0,04 mM) foram adicionados aos respectivos poços e a absorbância registrada após incubação durante 10 minutos a 25°C a $\lambda = 415$ nm. Os respectivos gráficos de Lineweaver-Burk foram obtidos por plotagem de um gráfico de 1 / velocidade versus 1 / [substrato] para o controle negativo e duas concentrações diferentes de inibidor. A regressão linear de cada conjunto de dados mostra um comportamento convergente, de forma que a região na qual as curvas convergem determina o tipo de inibição observada. Os valores de K_i , K_i' (constantes de inibição competitiva e não-competitiva respectivamente), K_m (constante de Michaelis-Menten) e $V_{m\acute{a}x}$ (velocidade máxima) foram

calculados com auxílio do programa Graphpad Prism 7.0 usando modelos de regressão não linear para cinética enzimática - inibição e cinética enzimática - substrato versus velocidade.

Tabela 12. Concentrações dos inibidores utilizados nos ensaios de estudo do mecanismo de inibição enzimática.

Composto	Concentração do inibidor (μM)	
	29a	29k
AChE	0,02 e 0,06	0,005 e 0,007
BChE	4,0 e 8,0	2,8 e 4,8

5.11. Ensaios de interação enzimática *in silico*

Inicialmente, foi realizada minimização energética dos compostos **29a-k** utilizando o método semi-empírico Parameterization Method 6 (PM6) no programa Spartan Pro, versão 14.0 para o estudo teórico.

Para a realização do estudo de ancoramento molecular (*docking*) entre os compostos e a enzima EeAChE foi utilizado o modelo disponível no *Protein Data Bank* (PDB) de código ICB2 e resolução de 4,5 Å (BOURNE et al., 1999). O programa utilizado para realizar o estudo de *docking* foi o GOLD, versão 5.6 (CCDC). O conjunto de resíduos de aminoácidos que foi selecionado como local de ligação para a realização dos estudos de *docking* corresponde a uma distância de 15Å a partir do resíduo de Ser203, já estabelecidas pela literatura como sítio ativo.

A fim de validar o estudo, foi realizado o experimento de *redocking* para diferentes funções de pontuação, sendo estas: ChemPLP, Goldscore, ASP e Chemscore. Para isso, foi realizado um teste preliminar da habilidade de docagem do programa utilizando-se o ligante dimérico bis-tacrina (N,N'-di-1,2,3,4-tetrahidroacridin-9-il-pentano-1,5-diamina). Uma vez que o modelo de EeAChE utilizado no ensaio não possui ligante co-cristalizado, os valores obtidos foram comparados com a enzima co-cristalizada com ligante bis-tacrina (PDB 2CMF) (RYDBERG et al., 2006). A partir dos valores obtidos de RMSD de cada função, foi escolhida a função que melhor se aplica ao estudo, ou seja, com o menor valor.

No programa GOLD as pontuações obtidas são apresentadas como valores adimensionais, os quais mensuram a aptidão do ligante em interagir com o centro da proteína, de modo que, maiores valores de pontuação representam as melhores conformações e orientações do ligante no biorreceptor.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADI - ALZHEIMER'S DISEASE INTERNATIONAL. Disponível em:

< <http://www.alz.co.uk/about-dementia> >. Acesso em: 15 jun. 2019.

AGALAVE, Sandip G.; MAUJAN, Suleman R.; PORE, Vandana S. Click chemistry: 1, 2, 3-triazoles as pharmacophores. **Chemistry–An Asian Journal**, v. 6, n. 10, p. 2696-2718, 2011.

ALVAREZ, A.; ALARCÓN, R.; OPAZO, C.; CAMPOS, E. O.; MUNOZ, F. J.; CALDERON, F. H.; DAJAS, F.; GENTRY, M. K.; DOCTOR, B. P.; DE MELLO, F.G.; INESTROSA, N. C. Stable complexes involving acetylcholinesterase and amyloid- β peptide change the biochemical properties of the enzyme and increase the neurotoxicity of Alzheimer's fibrils. **Journal of Neuroscience**, v. 18, n. 9, p. 3213-3223, 1998.

ALVAREZ-BUILLA, J.; VAQUERO, J. J.; BARLUENGA, J. **Modern Heterocyclic Chemistry**. v. 1, Wiley-Blackwell, 2011.

ALZHEIMER'S ASSOCIATION. Dentro Do Cérebro: Uma Viagem Interativa. Disponível em: <https://www.alz.org/brain_portuguese/>. Acesso em: 05 jun. 2019.

ALZHEIMER'S ASSOCIATION. Disponível em:

< https://www.alz.org/brain_portuguese/09.asp >. Acesso em: 28 dez. 2019.

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

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

BANU, K. Masna; DINAKAR, A.; ANANTHANARAYANAN, C. Synthesis, characterization, antimicrobial studies and pharmacological screening of some substituted 1, 2, 3-triazoles. **Indian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 61, n. 4, p. 202, 1999.

BARNARD, Eric A. Ionotropic glutamate receptors: new types and new concepts. **Trends in pharmacological sciences**, v. 18, n. 5, p. 141-148, 1997.

BERTRAND, G.; JIN, I.; TOLENTINO, D. R.; MELAIMI, M.; Isolation of bis(copper) key intermediates in Cu-catalyzed azide-alkyne “click reaction. **Science Advances**, v.1 , 2015.

BOCK, V. D.; HIEMSTRA, H.; MAARSEVEEN, J H. V. CuI Catalyzed alkyne-azide “click” cycloadditions from a mechanistic and synthetic perspective. **European Journal of Organic Chemistry**, v. 2006, p. 51–68, 2006.

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

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

BOURNE, Y., GRASSI, J., BOUGIS, P. E., MARCHOT, P. Conformational flexibility of the acetylcholinesterase tetramer suggested by X-ray crystallography. **Journal of Biological Chemistry**, v. 274, n. 43, p. 30370-30376, 1999.

BOZOROV, K.; ZHAO, J.; AISA, H. A. 1, 2, 3-Triazole-containing hybrids as leads in medicinal chemistry: A recent overview. **Bioorganic & medicinal chemistry**, 2019.

BROWN, G. C.; BAL-PRICE, A. Inflammatory neurodegeneration mediated by nitric oxide, glutamate, and mitochondria. **Molecular Neurobiology**, v. 27, n. 3, p. 325-355, 2003.

BUTLER, R. N.; FOX, A.; COLLIER, S.; BURKE, L. A. Pentazole chemistry: the mechanism of the reaction of aryldiazonium chlorides with azide ion at 280 8C: concerted

versus stepwise formation of arylpentazoles, detection of a pentazene intermediate, a combined ¹H and ¹⁵N NMR experimental and ab initio theoretical study. *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 2*, p. 2243–2247, 1998.

CAIXETA, Leonardo et al. **Doença de Alzheimer**. 1. ed. Porto Alegre: Artmed, 2012. 504 p.

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

CAREY, F. A. SUNDBERG, R. J. *Advanced Organic Chemistry, Part A: Structure and Mechanisms*, 5^a Ed., New York: **Springer**, 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 Biology**, 2017.

CHEN, M.; LU, S.; YUAN, G.; YANG, S.; DU, X. Synthesis and antibacterial activity of some heterocyclic β -enamino ester derivatives with 1, 2, 3-triazole. **Heterocyclic Communications**, v. 6, n. 5, p. 421-426, 2000.

CHENG, H.; WAN, J.; LIN, M.; LIU, Y.; LU, X.; LIU, J.; XU, Y.; CHEN, J.; TU, Z.; CHENG, Y. E.; DING, K. Design, Synthesis, and in Vitro Biological Evaluation of 1H-1,2,3- 85 Triazole-4-carboxamide Derivatives as New Anti-influenza A Agents Targeting Virus Nucleoprotein. *Journal of Medicinal Chemistry*, v. 55, p. 2144-2153, 2012.

CHENG, Y.; BAI, F. The association of tau with mitochondrial dysfunction in alzheimer's disease. **Frontiers in neuroscience**, v. 12, p. 163, 2018.

CHRIS MIN, K.; DOCKENDORF, M. F.; PALCZA, J.; TSENG, J.; MA, L.; STONE, J. A.; KLEIJN, H.J.; HODSMAN, P.; MASUO, K.; TANEN, M.; TROYER, M. D.; VUGT. M.; FORMAN, M. S.; TROYER, M. D. Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of the BACE 1 Inhibitor Verubecestat (MK-8931) in Healthy Japanese Adults: A Randomized, Placebo-Controlled Study. **Clinical Pharmacology & Therapeutics**, v. 105, n. 5, p. 1234-1243, 2019.

CITRON, Martin. Alzheimer's disease: strategies for disease modification. **Nature reviews Drug discovery**, v. 9, n. 5, p. 387, 2010.

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

CONGDON, E. E.; WU, J. W.; MYEKU, N.; FIGUEROA, Y. H.; HERMAN, M.; MARINEC, P. S.; GESTWICKI, J. E.; DICKEY, C. A.; YU, W. H.; DUFF, K. E. Methylthionium chloride (methylene blue) induces autophagy and attenuates tauopathy in vitro and in vivo. **Autophagy**, v. 8, n. 4, p. 609-622, 2012.

DE OLIVEIRA FREITAS, L. B.; RUELA, F. A.; PEREIRA, G. R.; ALVES, R. B.; DE FREITAS, R. P.; DOS SANTOS, L. J. A reação “click” na síntese de 1, 2, 3-triazóis: aspectos químicos e aplicações. **Química Nova**, v. 34, n. 10, p. 1791-1804, 2011.

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

HLER, D.; MICHAEL, P.; BINDER, W. H. CuAAC-Based Click Chemistry in Self-Healing Polymers. **Accounts of Chemical Research**, v. 50, n. 10, p. 2610-2620, 2017.

DURAN, A.; DOGAN, H. N.; ROLLAS, S. Synthesis and preliminary anticancer activity of new 1, 4-dihydro-3-(3-hydroxy-2-naphthyl)-4-substituted-5H-1, 2, 4-triazoline-5-thiones. **II Farmaco**, v. 57, n. 7, p. 559-564, 2002.

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

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

FALLER, P.; HUREAU, C.; LA PENNA, G. Metal ions and intrinsically disordered proteins and peptides: from Cu/Zn amyloid- β to general principles. **Accounts of chemical research**, v. 47, n. 8, p. 2252-2259, 2014.

FERREIRA, V. F.; DA ROCHA, D. R.; DA SILVA, F. C.; FERREIRA, P. G.; BOECHAT, N. A.; MAGALHÃES, J. L. Novel 1 H-1, 2, 3-, 2 H-1, 2, 3-, 1 H-1, 2, 4-and 4 H-1, 2, 4-triazole derivatives: a patent review (2008–2011). **Expert opinion on therapeutic patents**, v. 23, n. 3, p. 319-331, 2013.

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. **The Lancet**, v. 366, n. 9503, p. 2112-2117, 2006

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

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

FOKIN, V. V. (Ed.). **Organic chemistry: breakthroughs and perspectives**. Weinheim: Wiley-VCH, 2012.

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

GAO, M.; DUAN, L.; LUO, J.; ZHANG, L.; LU, X.; ZHANG, Y.; ZHANG, Z.; TU, Z.; XU, Y.; REN, X.; DING, K. Discovery and Optimization of 3-(2 (Pyrazolo[1,5-a]pyrimidin-6-yl)-ethynyl)benzamides as Novel Selective and Orally Bioavailable Discoidin Domain Receptor 1(DDR1) Inhibitors. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 56, p. 3281-3295, 2013.

GAO, Y., PIMPLIKAR, S. W. The γ -secretase-cleaved C-terminal fragment of amyloid precursor protein mediates signaling to the nucleus. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 98, n. 26, p. 14979-14984, 2001.

GODOY, J. A.; RIOS, J. A.; ZOLEZZI, J. M.; BRAIDY, N.; INESTROSA, N. C. Signaling pathway cross talk in Alzheimer's disease. **Cell Communication and Signaling**, v. 12, n. 1, p. 23, 2014.

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

GREENAMYRE, J. Timothy; YOUNG, Anne B. Excitatory amino acids and Alzheimer's disease. **Neurobiology of aging**, v. 10, n. 5, p. 593-602, 1989.

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

GUAN, L. P.; JIN, Q. H.; TIAN, G. R.; CHAI, K. Y.; QUAN, Z. S. Synthesis of some quinoline-2 (1H)-one and 1, 2, 4-triazolo [4, 3-a] quinoline derivatives as potent anticonvulsants. **J. Pharm. Pharmaceut. Sci**, v. 10, n. 3, p. 254-262, 2007.

GUJJAR, R.; MARWAHA, A.; EL MAZOUNI, F.; WHITE, J.; WHITE, K. L.; CREASON, S.; SHACKFORD, D. M.; BALDWIN, J.; CHARMAN, W. N.; BUCKNER, F. S.; RATHOD, P. K.; PHILLIPS, M. A.; CHARMAN, S. Identification of a metabolically stable triazolopyrimidine-based dihydroorotate dehydrogenase inhibitor with antimalarial activity in mice. **Journal of medicinal chemistry**, v. 52, n. 7, p. 1864-1872, 2009.

HAFEZ, H.; ABBAS, H.; EL-GAZZAR, A. Synthesis and evaluation of analgesic, anti-inflammatory and ulcerogenic activities of some triazolo-and 2-pyrazolyl-pyrido [2, 3-d]-pyrimidines. **Acta Pharmaceutica**, v. 58, n. 4, p. 359-378, 2008.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. **Free radicals in biology and medicine**. Oxford University Press, USA, 2015.

HAN, Xu; HE, Gefei. Toward a rational design to regulate β -amyloid fibrillation for alzheimer's disease treatment. **ACS chemical neuroscience**, v. 9, n. 2, p. 198-210, 2018.

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

HEIN, J. E.; FOKIN, V. V. Copper-catalyzed azide-alkyne cycloaddition (CuAAC) and beyond: new reactivity of copper(I) acetylides. **Chemical Society Reviews**, v. 39, p.1302-1315, 2010.

HONG, L.; LIN, W.; ZHANG, F.; LIU, R.; ZHOU, X. Ln[N(SiMe₃)₂]₃-catalyzed 1,3-dipolar cycloaddition of terminal alkynes to azides leading to 1,5-disubstituted 1,2,3-triazole derivatives: new mechanistic features. **Chemical Communications**, v. 49, p. 5589-5591, 2013.

HORI, Y.; TAKEDA, S.; CHO, H.; WEGMANN, S.; SHOUP, T. M.; TAKAHASHI, K.; IRIMIA, D.; ELMALEH, D. R.; HYMAN, B. T.; HUDRY, E. A Food and Drug Administration-approved asthma therapeutic agent impacts amyloid β in the brain in a transgenic model of Alzheimer disease. **Journal of Biological Chemistry**, v. 290, n. 4, p. 1966-1978, 2015.

HOWELL, S. J.; SPENCER, N.; PHILP, D. Recognition-Mediated Regiocontrol of a Dipolar Cycloaddition Reaction. **Tetrahedron**, v. 57, p. 4945-4954, 2001.

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

HUISGEN, R.; SZEIMIES, G.; MOEBIUS, L.; 1.3-Dipolare Cycloadditionen, XXXII. Kinetik der Additionen organischer Azide an CC-Mehrfachbindungen. *Chemische Berichte*, v. 100, p. 2494, 1967.

JING, L.; WU, G.; KANG, D.; ZHOU, Z.; SONG, Y.; LIU, X.; ZHAN, P. Contemporary medicinal-chemistry strategies for the discovery of selective butyrylcholinesterase inhibitors. *Drug discovery today*, 2018.

JOHNS, B. A., WEATHERHEAD, J. G., ALLEN, S. H., THOMPSON, J. B., GARVEY, E. P., FOSTER, S. A., JEFFREY, J. L.; MILLER, W. H. The use of oxadiazole and triazole substituted naphthyridines as HIV-1 integrase inhibitors. Part 1: Establishing the pharmacophore. *Bioorganic & medicinal chemistry letters*, v. 19, n. 6, p. 1802-1806, 2009.

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

JOULE, J. A.; MILLS, K. *Heterocyclic Chemistry*. 5th Ed., New Jersey: **Wiley-Blackwell**, 2010.

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

KHARB, R.; SHARMA, P. C.; YAR, M. S. Pharmacological significance of triazole scaffold. *Journal of enzyme inhibition and medicinal chemistry*, v. 26, n. 1, p. 1-21, 2011.

KHOMENKO, T.M.; ZARUBAEV, V.V.; ORSHANSKAYA, I.R.; KADYROVA, R.A.; SANNIKOVA, V.A.; KORCHAGINA, D.V.; VOLCHO, K.P.; SALAKHUTDINOV, N.F. Anti-influenza activity of monoterpene-containing substituted coumarins. **Bioorganic & medicinal chemistry letters**, 27(13), p. 2920-2925, 2017.

KNEZEVIC, D.; MIZRAHI, R. Molecular imaging of neuroinflammation in Alzheimer's disease and mild cognitive impairment. **Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry**, v. 80, p. 123-131, 2018.

KOLB, H. C.; FINN, M. G.; SHARPLESS, K. B. Click chemistry: diverse chemical function from a few good reactions. **Angewandte Chemie International Edition in English**, v. 40, p. 2004–2021, 2001.

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

KRAEPELIN, E. Psychiatrie: Ein Lehrbuch für Studierende und Ärzte, Klinische Psychiatrie [Psychiatry: a study book for students and doctors, clinical psychiatry]. **Liepzig, Barth**, v. 1915, 1910.

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

KUMAR, D.; REDDY, V. B.; VARMA, R. S. A facile and regioselective synthesis of 1, 4-disubstituted 1, 2, 3-triazoles using click chemistry. **Tetrahedron Letters**, v. 50, n. 18, p. 2065-2068, 2009.

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

LEE, S. J. C.; NAM, E.; LEE, H. J.; SAVELIEFF, M. G.; LIM, M. H. Towards an understanding of amyloid- β oligomers: characterization, toxicity mechanisms, and inhibitors. **Chemical Society Reviews**, v. 46, n. 2, p. 310-323, 2017.

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

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

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

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

MANFREDINI, S.; VICENTINI, C. B.; MANFRINI, M.; BIANCHI, N.; RUTIGLIANO, C.; MISCHIATI, C.; GAMBARI, R. Pyrazolo-triazoles as light activable dna cleaving agents. **Bioorganic & medicinal chemistry**, v. 8, n. 9, p. 2343-2346, 2000.

MARTIN-JIMÉNEZ, C. A.; GAITÁN-VACA, D. M.; ECHEVERRIA, V.; GONZÁLEZ, J.; BARRETO, G. E. Relationship Between Obesity, Alzheimer's Disease, and Parkinson's Disease: an Astrocentric View. **Molecular Neurobiology**, p. 1-20, 2016

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

MELDAL, M.; TORNØE, C. W. Cu-catalyzed azide-alkyne cycloaddition. **Chemical Reviews**, v. 108, p. 2952-3015, 2008.

MESULAM, M. M.; GUILLOZET, A.; SHAW, P.; LEVEY, A.; DUYSSEN, E. G.; LOCKRIDGE, O. Acetylcholinesterase knockouts establish central cholinergic pathways and can use butyrylcholinesterase to hydrolyze acetylcholine. **Neuroscience**, 110(4), p. 627-639, 2002.

MI, J.; ZHOU, C.; BAI, X. Advances in triazole antimicrobial agents. 2007.

MICHAEL, A. Ueber die einwirkung von diazobenzolimid auf acetylcendicarbonsäuremethylester. *Journal für Praktische Chemie*, v. 46, p. 94, 1893.

MÖBIUS, H. J.; STÖFFLER, A. New approaches to clinical trials in vascular dementia: memantine in small vessel disease. **Cerebrovascular Diseases**, v. 13, n. Suppl. 2, p. 61-66, 2002.

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

MOREIRA, P. I.; CARVALHO, C.; ZHU, X.; SMITH, M. A.; PERRY, G. Mitochondrial dysfunction is a trigger of Alzheimer's disease pathophysiology. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease**, v. 1802, n. 1, p. 2-10, 2010.

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

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

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

NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de Bioquímica de Lehninger-7**. Artmed Editora, 2018.

NEUMANN, U.; UFER, M.; JACOBSON, L. H.; ROUZADE-DOMINGUEZ, M. L.; HULEDAL, G.; KOLLY, C.; LÜÖND, R. M.; MACHAUER, R.; VEENSTRA, S. J.; HURTH, K.; RUEEGER, H.; TINTELNOT-BLOMLEY, M.; STAUFENBIEL, M.; SHIMSHEK, D. R.; PERROT, L.; FRIEAUFF, W.; DUBOST, V.; SCHILLER, H.; VOGG, B.; BELZT, K.; AVRANEAS, A.; KRETZ, S.; PEZOUS, N.; RONDEAU, J. M. BECKMANN, N.; HARTMANN, A.; VORMFELDE, S.; DAVID, O. J.; GALLI, B.; RAMOS, R.; GRAF, A.; LOPEZ, C. L. The BACE-1 inhibitor CNP520 for prevention trials in Alzheimer's disease. **EMBO molecular medicine**, v. 10, n. 11, 2018.

NORRIS, P.; HORTON, D.; LEVINE, B. R. Cycloaddition of acetylenes with 5-azido-5-deoxy-D-aldopentose derivatives: synthesis of triazole reversed nucleoside analogs. **Heterocycles**, v. 12, n. 43, p. 2643-2655, 1996.

PARIHAR, M. S.; HEMNANI, T. Alzheimer's disease pathogenesis and therapeutic interventions. **Journal of Clinical Neuroscience**, v. 11, n. 5, p. 456-467, 2004.

PASSANNANTI, A.; DIANA, P.; BARRAJA, P.; MINGOIA, F.; LAURIA, A.; CIRRINCIONE, G. Pyrrolo [2, 3-d][1, 2, 3] triazoles as potential antineoplastic agents. **Heterocycles**, v. 6, n. 48, p. 1229-1235, 1998.

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

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

PECHMANN, H. Neue bildungsweise der cumarine. Synthese des daphnetins. I. **Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft**, v. 17, n. 1, p. 929-936, 1884.

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

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

QUINN, Daniel M. Acetylcholinesterase: enzyme structure, reaction dynamics, and virtual transition states. *Chemical Reviews*, v. 87, n. 5, p. 955-979, 1987.

RAJASEKHAR, K.; GOVINDARAJU, T. Current progress, challenges and future prospects of diagnostic and therapeutic interventions in Alzheimer's disease. *RSC advances*, v. 8, n. 42, p. 23780-23804, 2018.

RAJENDRAN, L.; SCHNEIDER, A.; SCHLECHTINGEN, G.; WEIDLICH, S.; RIES, J.; BRAXMEIER, T.; SCHWILLE, P.; SCHULZ, J. B.; SCHROEDER, C.; SIMONS, M.; JENNINGS, G.; KNÖLKER, H. J.; SIMONS, K. Efficient inhibition of the Alzheimer's disease β -secretase by membrane targeting. *Science*, v. 320, n. 5875, p. 520-523, 2008.

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

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.

RIHA, P. D.; ROJAS, J. C.; GONZALEZ-LIMA, F. Beneficial network effects of methylene blue in an amnesic model. *Neuroimage*, v. 54, n. 4, p. 2623-2634, 2011.

RODIONOV, V. O.; FOKIN, V. V.; FINN, M. G. Mechanism of the ligand-free CuI-catalyzed azide-alkyne cycloaddition reaction. **Angewandte Chemie International Edition in English**, v. 44, p. 2210-2215, 2005.

ROGERS, J.; LUE, L. Microglial chemotaxis, activation, and phagocytosis of amyloid β -peptide as linked phenomena in Alzheimer's disease. **Neurochemistry International**, v. 39, n. 5, p. 333-340, 2001.

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

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

SANTOS, S. N., DE SOUZA, G. A., PEREIRA, T. M., FRANCO, D. P., DEL CISTIA, C. D. N., SANT'ANNA, C. M. R., LACERDA, R. B., KÜMMERLE, A. E. Regioselective microwave synthesis and derivatization of 1, 5-diaryl-3-amino-1, 2, 4-triazoles and a study of their cholinesterase inhibition properties. **RSC advances**, v. 9, n. 35, p. 20356-20369, 2019.

SHALINI, K.; KUMAR, N.; DRABU, S.; SHARMA, P. K. Advances in synthetic approach to and antifungal activity of triazoles. **Beilstein journal of organic chemistry**, v. 7, n. 1, p. 668-677, 2011.

SANABRIA-CASTRO, A.; ALVARADO-ECHEVERRÍA, I.; MONGE-BONILLA, C. Molecular pathogenesis of Alzheimer's disease: an update. **Annals of neurosciences**, v. 24, n. 1, p. 46-54, 2017.

SAVELIEFF, M. G.; LEE, S.; LIU, Y.; LIM, M. H. Untangling amyloid- β , tau, and metals in Alzheimer's disease. **ACS chemical biology**, v. 8, n. 5, p. 856-865, 2013.

SELKOE, D. J. Alzheimer's Disease: Genes, Proteins, and Therapy. **Physiological Reviews**, v. 81, n. 2, p. 741-766, 2001.

SHARPLESS, K. B.; ROSTOVTSSEV, V. V.; GREEN, L. G.; FOKIN, V. V. A stepwise Huisgen cycloaddition process: copper(I)-catalyzed regioselective “ligation” of azides and terminal alkynes. **Angewandte Chemie International Edition in English**, v. 41, p. 2596–2599, 2002.

SIES, H. Oxidative stress: a concept in redox biology and medicine. **Redox biology**, v. 4, p. 180-183, 2015.

SMITH, M. B.; MARCH, J. **March’s advanced organic chemistry reactions, mechanism, and structure**, 6^o Ed., Wiley, New York, 2007.

SONOGASHIRA, K. Development of Pd–Cu catalyzed cross coupling of terminal acetylenes with sp²-carbon halides. **Journal of Organometallic Chemistry**, v. 653, p. 46–49, 2002.

SONOGASHIRA, K.; TOHDA, Y.; HAGIHARA, N. A.; A Convenient Synthesis of Acetylenes: catalytic substitutions of acetylenic hydrogen with bromoalkenes, iodoarenes, and bromopyridines. *Tetrahedron Lett*, v. 50, p. 4467-4471, 1975.

SUGIMOTO, H., IIMURA, Y., YAMANISHI, Y., & YAMATSU, K. Synthesis and structure-activity relationships of acetylcholinesterase inhibitors: 1-benzyl-4-[(5, 6-dimethoxy-1-oxoindan-2-yl) methyl] piperidine hydrochloride and related compounds. **Journal of medicinal chemistry**, v. 38, n. 24, p. 4821-4829, 1995.

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

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

TAKASU, K.; AZUMA, T.; TAKEMOTO, Y. Synthesis of trifunctional thioureas bearing 1, 5-disubstituted triazole tether by Ru-catalyzed Huisgen cycloaddition. **Tetrahedron Letters**, v. 51, n. 20, p. 2737-2740, 2010

TALEKAR, R. R.; WIGHTMAN, R. H. Synthesis of some pyrrolo [2, 3-d] pyrimidine and 1, 2, 3-triazole isonucleosides. **Tetrahedron**, v. 53, n. 10, p. 3831-3842, 1997.

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

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

UTTARA, B.; SINGH, A. V.; ZAMBONI, P.; MAHAJAN, R. T. Oxidative stress and neurodegenerative diseases: a review of upstream and downstream antioxidant therapeutic options. **Current neuropharmacology**, v. 7, n. 1, p. 65-74, 2009.

VAN ES, J. H., VAN GIJN, M. E., RICCIO, O., VAN DEN BORN, M., VOOIJS, M., BEGTHEL, H., COZIJNSEN, M., ROBINE, S., WINTON, D. J. RADTKE, F., CLEVERS, H. Notch/ γ -secretase inhibition turns proliferative cells in intestinal crypts and adenomas into goblet cells. **Nature**, v. 435, n. 7044, p. 959, 2005.

VASSAR, R.; BENNETT, B. D.; BABU-KHAN, S.; KAHN, S.; MENDIAZ, E. A.; DENIS, P.; TELOW, D. B.; ROSS, S.; AMARANTE, P.; LOELOFF, R.; LUO, Y.; FISHER, S.; FULLER, J.; EDENSON, S.; LILE, J.; JAROSINSKI, M. A.; BIERE, A. L.; CURRAN, E.; BURGESS, T.; LOIUS, J. C.; COLLINS, F.; TREANOR, J.; ROGERS, G.; CITRON, M. β -Secretase cleavage of Alzheimer's amyloid precursor protein by the transmembrane aspartic protease BACE. **Science**, v. 286, n. 5440, p. 735-741, 1999.

VENUGOPAL, C.; DEMOS, C. M.; JAGANNATHA RAO, K. S.; PAPPOLLA, M. A.; SAMBAMURTI, K. Beta-secretase: structure, function, and evolution. **CNS & Neurological Disorders-Drug Targets (Formerly Current Drug Targets-CNS & Neurological Disorders)**, v. 7, n. 3, p. 278-294, 2008.

WHO. Disponível em: < <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs362/en/> >. Acesso em: 15 jun. 2019.

WILCOCK, G. K.; GAUTHIER, S.; FRISONI, G. B.; JIA, J.; HARDLUND, J. H.; MOEBIUS, H. J.; PETER, B.; KOOK, K. Q.; SCHELTER, B. O.; WISCHIK, D. J.; DAVIS, C. S.; STAFF, R. T.; VUKSANOVIC, V.; AHEARN, T.; BRACOUD, L.; SHAMSI, K.; MAREK, K. SEIBYL, J.; RIEDEL, G.; STOREY, J. M. D.; HARRINGTON, C. R.; WISCHIK. C.M. Potential of low dose leuco-methylthionium bis (hydromethanesulphonate)(LMTM) monotherapy for treatment of mild Alzheimer's disease: Cohort analysis as modified primary outcome in a phase III clinical trial. **Journal of Alzheimer's Disease**, v. 61, n. 1, p. 435-457, 2018.

WORRELL, B. T.; MALIK, J. A.; FOKIN, Valery Valerievich. Direct evidence of a dinuclear copper intermediate in Cu (I)-catalyzed azide-alkyne cycloadditions. **Science**, v. 340, n. 6131, p. 457-460, 2013.

WU, Y.; CHEN, M.; JIANG, J. Mitochondrial dysfunction in neurodegenerative diseases and drug targets via apoptotic signaling. **Mitochondrion**, 2019.

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

YANG, L. B., LINDHOLM, K., YAN, R., CITRON, M., XIA, W., YANG, X. L., BEACH. T., SUE. L., WONG. P., LI, R., SHEN. Y. Elevated β -secretase expression and enzymatic activity detected in sporadic Alzheimer disease. **Nature medicine**, v. 9, n. 1, p. 3, 2003.

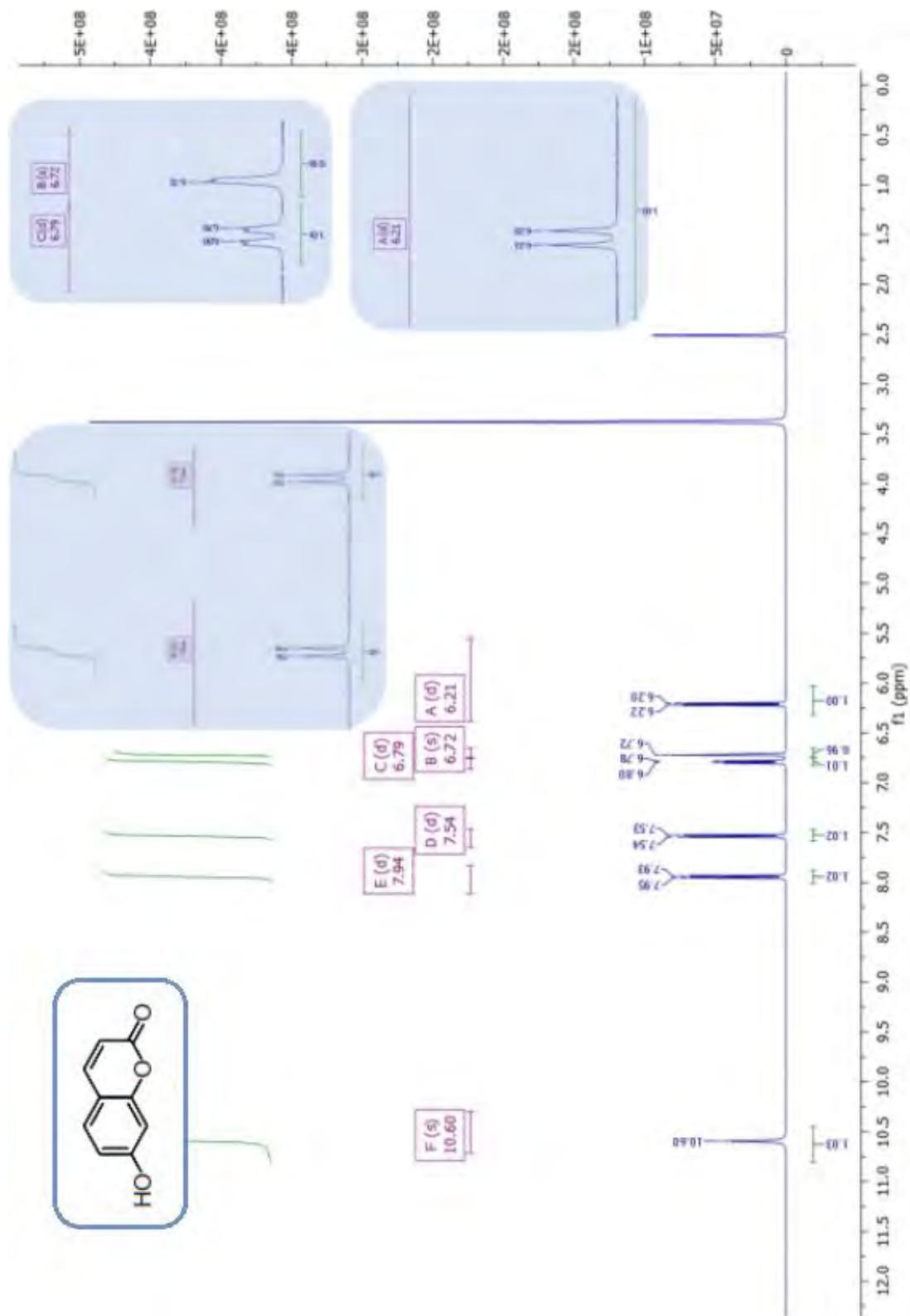
YEE, D. J.; BALSANEK, V.; SAMES, D. Ligands for aldoketoreductases. **WO2006023821 A2**, 2006.

ZHOU, C. H.; ZHANG, F. F.; GAN, L. L.; ZHANG, Y. Y.; GENG, R. X. Research in supermolecular chemical drugs. *Sci China Ser B*, v. 39, p. 208-252, 2009.

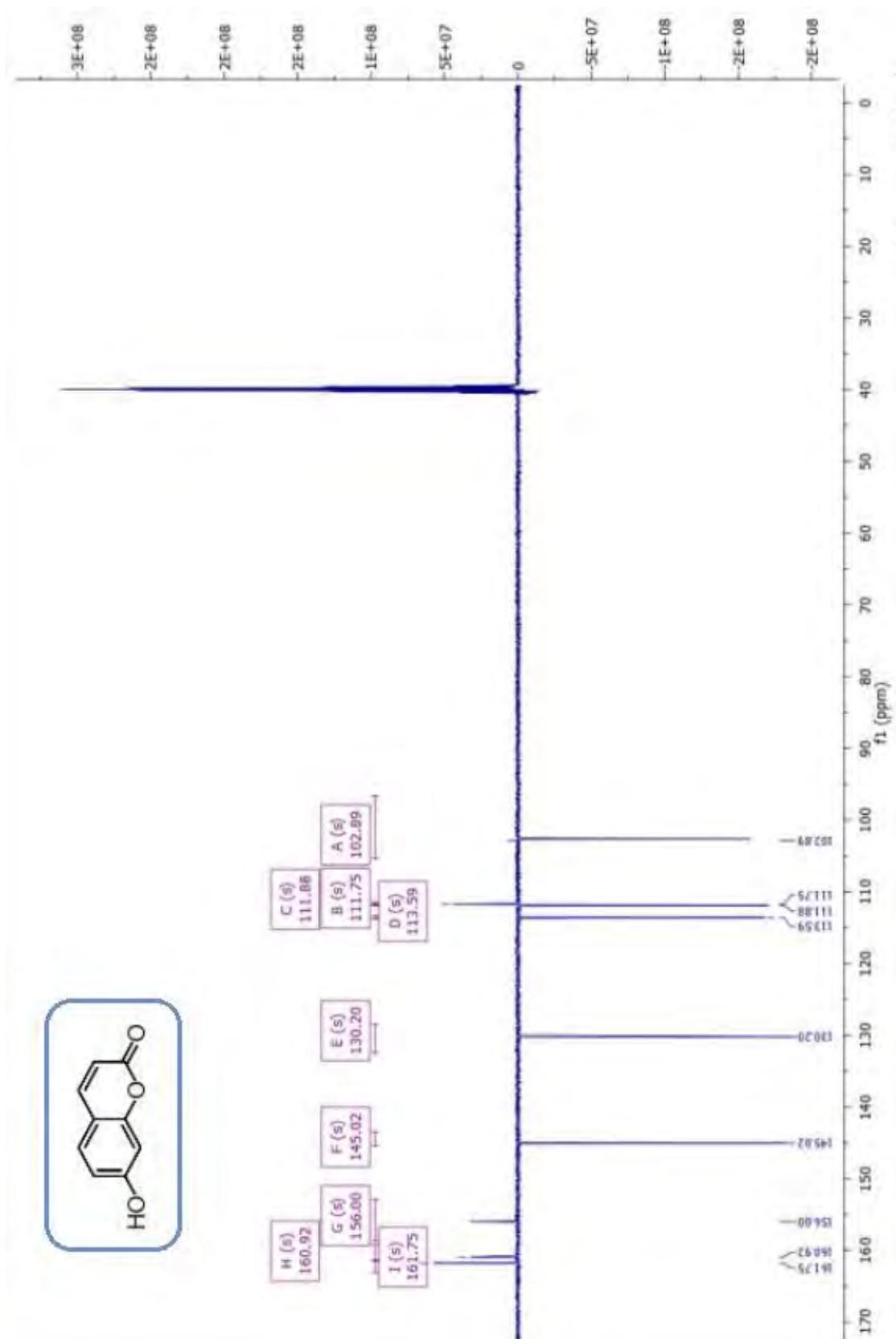
ZHOU, C. H.; ZHANG, Y. Y.; YAN, C. Y.; WAN, K.; GAN, L. L.; SHI, Y. Recent researches in metal supramolecular complexes as anticancer agents. **Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry (Formerly Current Medicinal Chemistry-Anti-Cancer Agents)**, v. 10, n. 5, p. 371-395, 2010.

7. ANEXOS

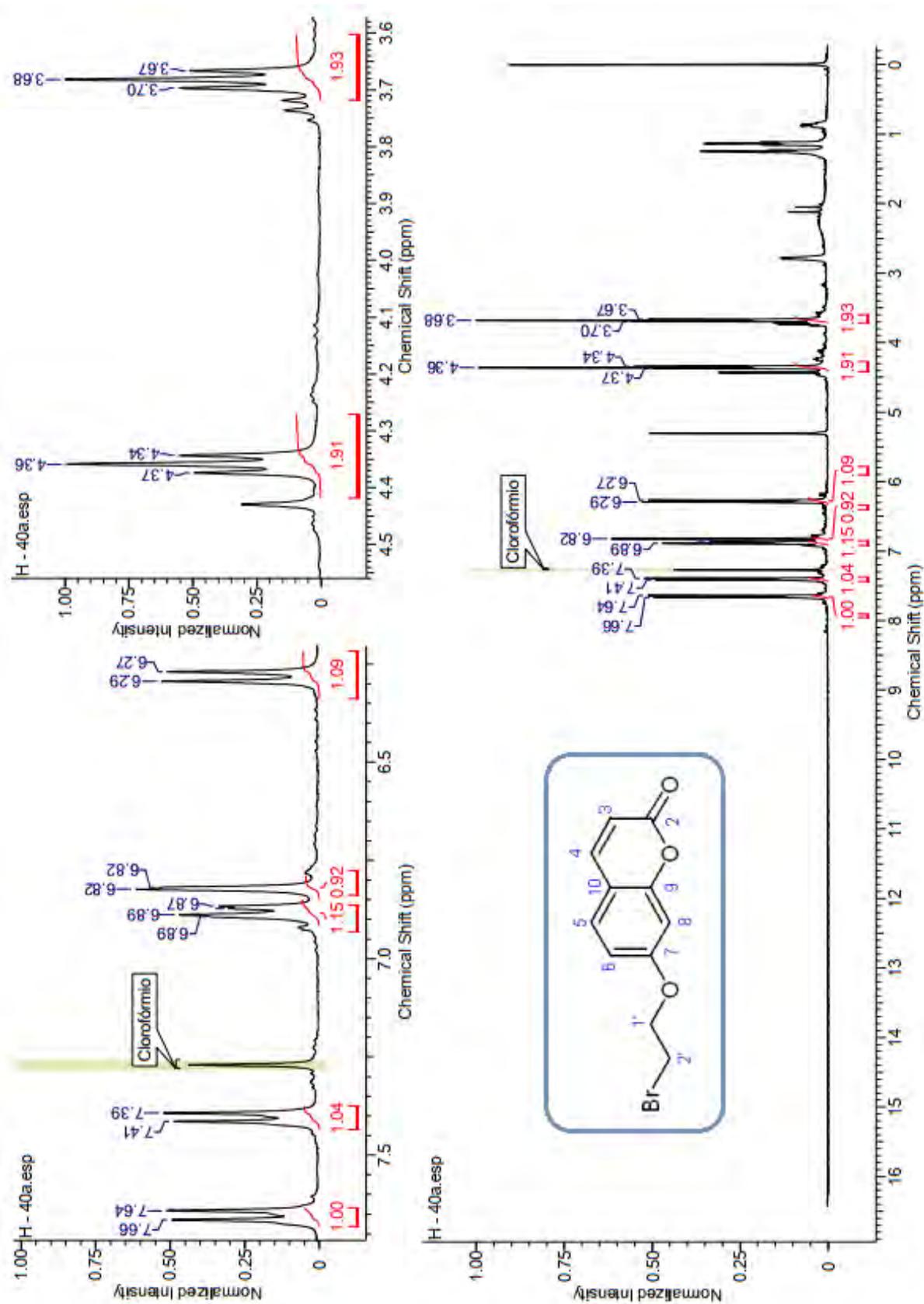
Anexo 1: Espectro de RMN ^1H do composto (39) em DMSO-d₆ a 500 MHz.



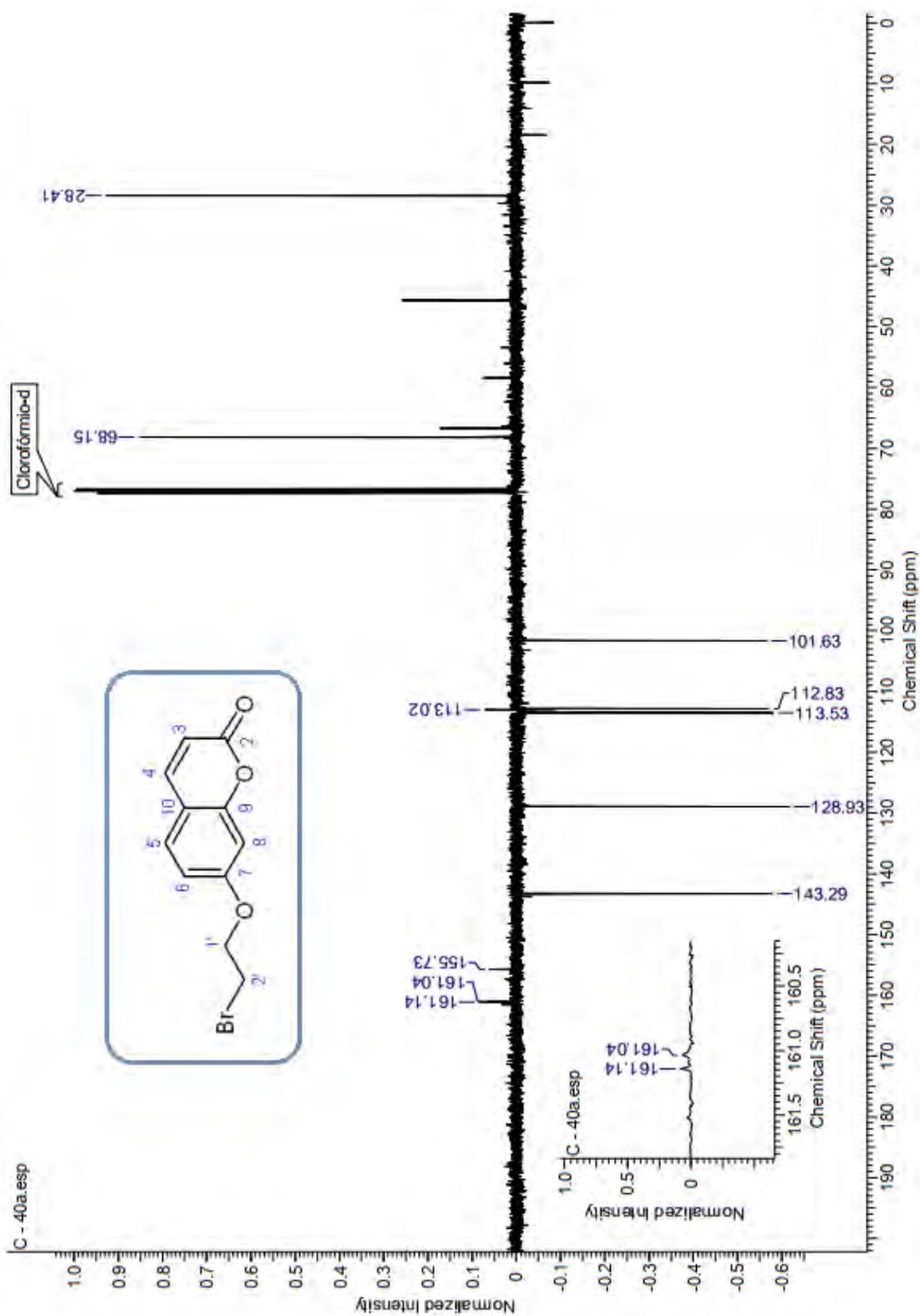
Anexo 2: Espectro de RMN ^{13}C do composto (39) em DMSO-d₆ a 125 MHz



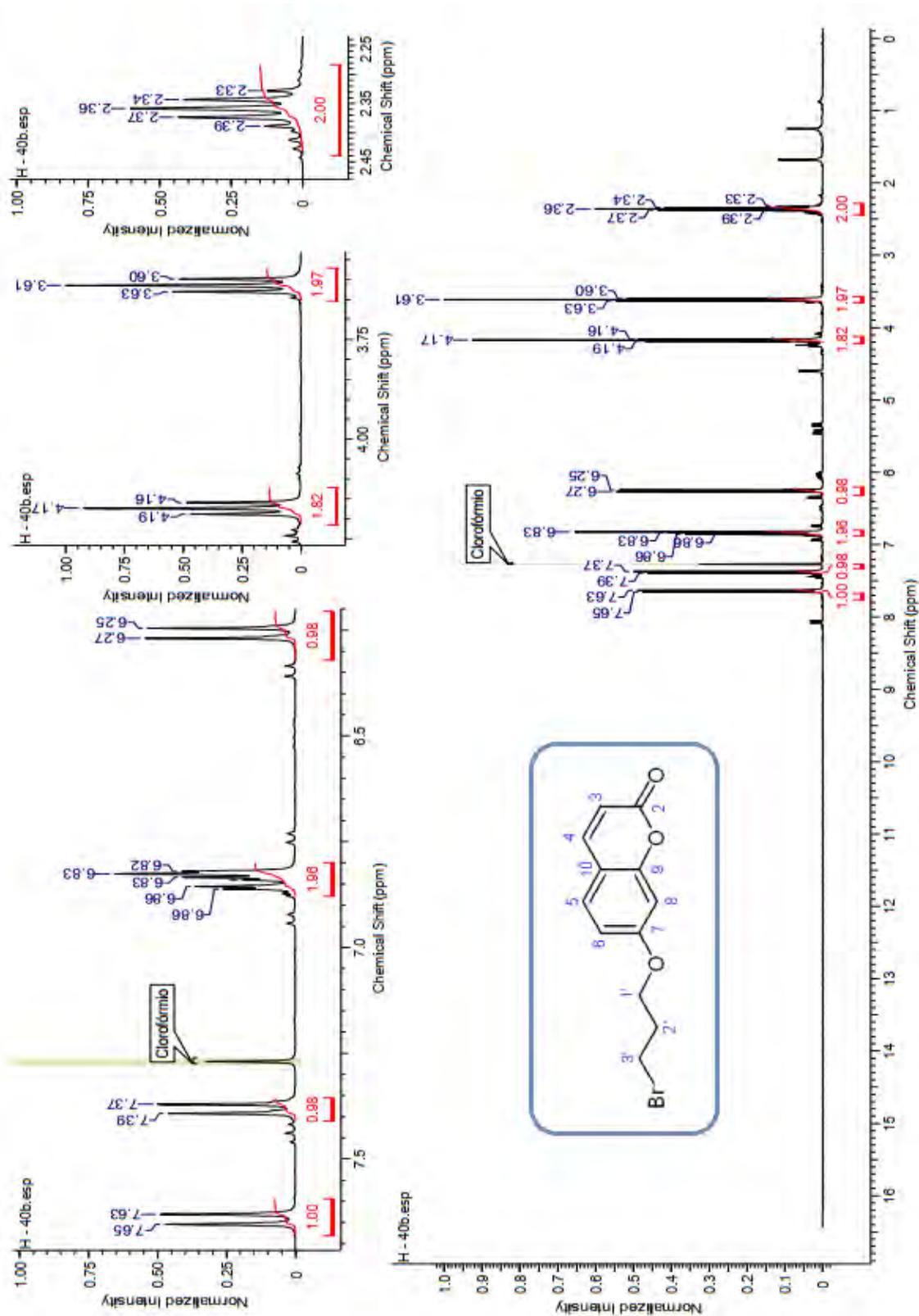
Anexo 3: Espectro de RMN ^1H do composto (38a) em CDCl_3 a 400 MHz



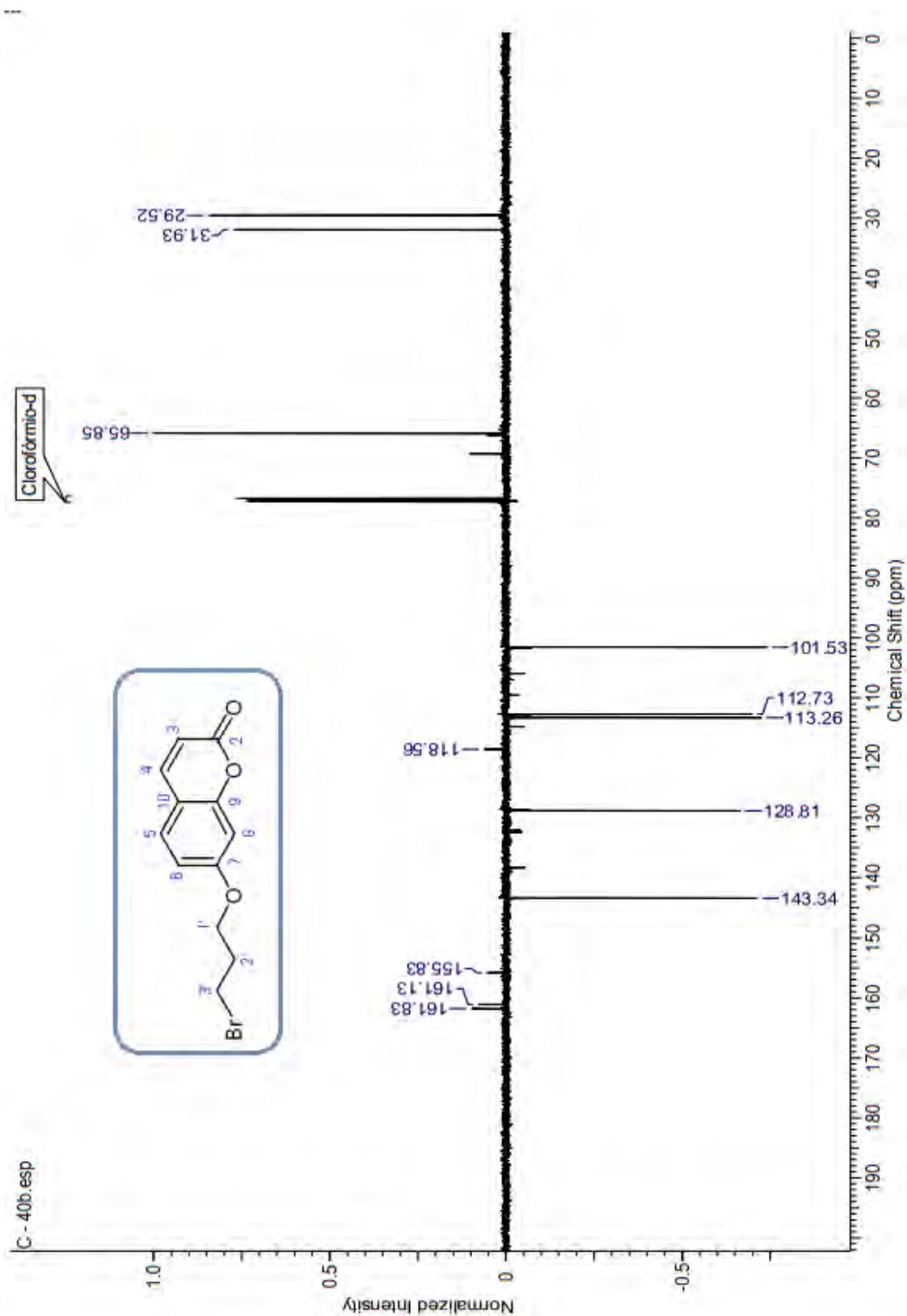
Anexo 4: Espectro de RMN ¹³C do composto (38a) em CDCl₃ a 100 MHz



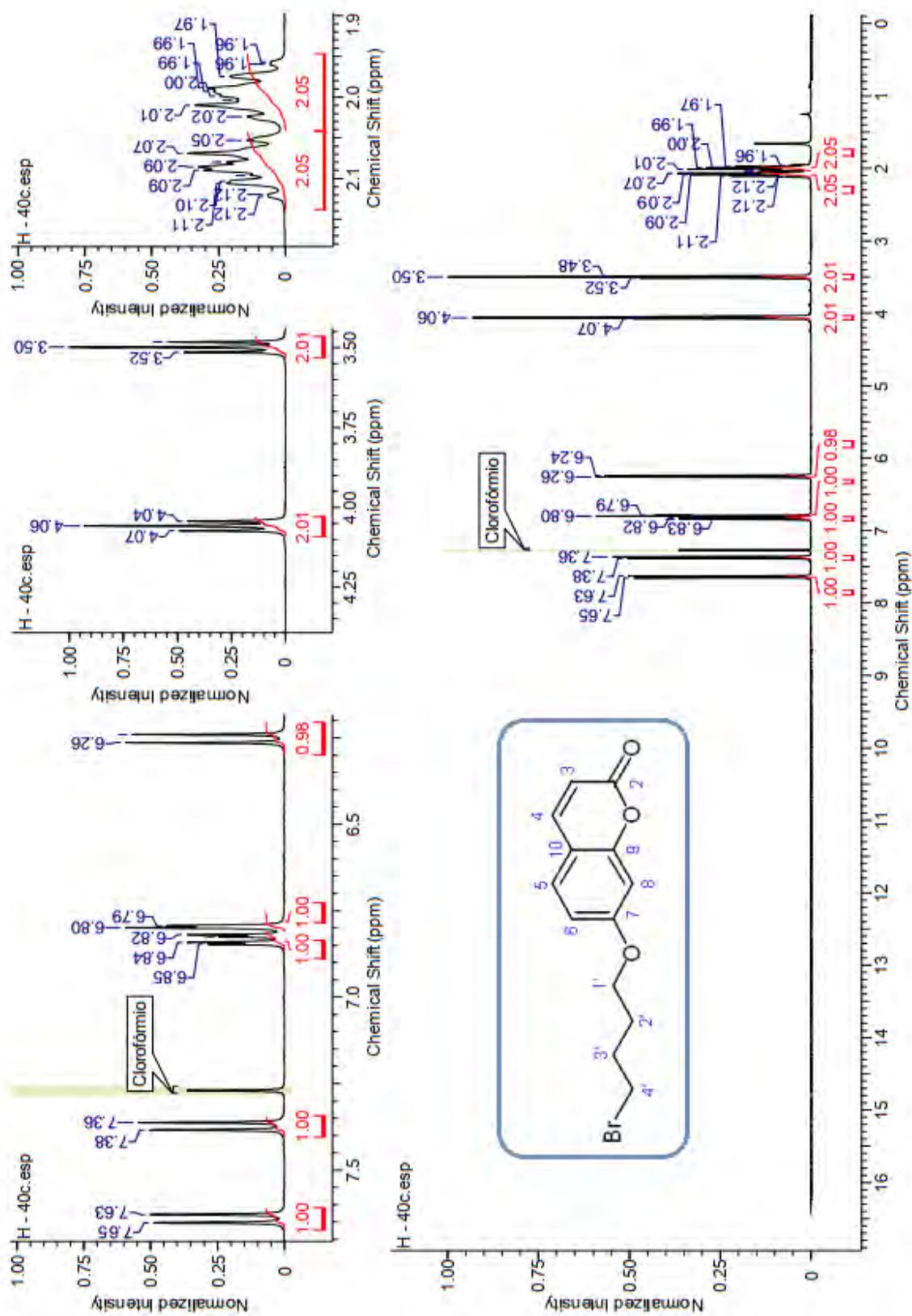
Anexo 5: Espectro de RMN ^1H do composto (38b) em CDCl_3 a 400 MHz



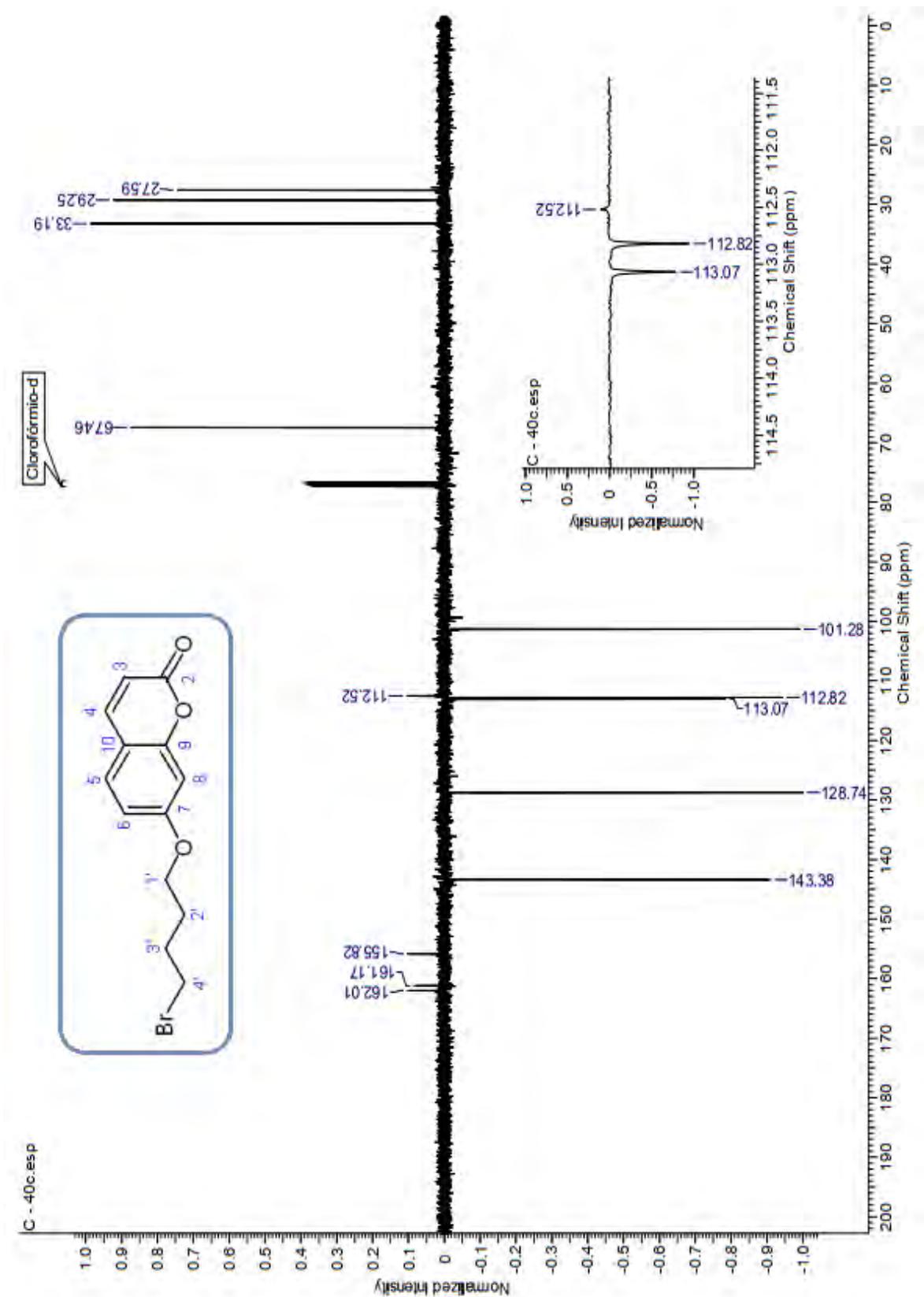
Anexo 6: Espectro de RMN ^{13}C do composto (38b) em CDCl_3 a 100 MHz



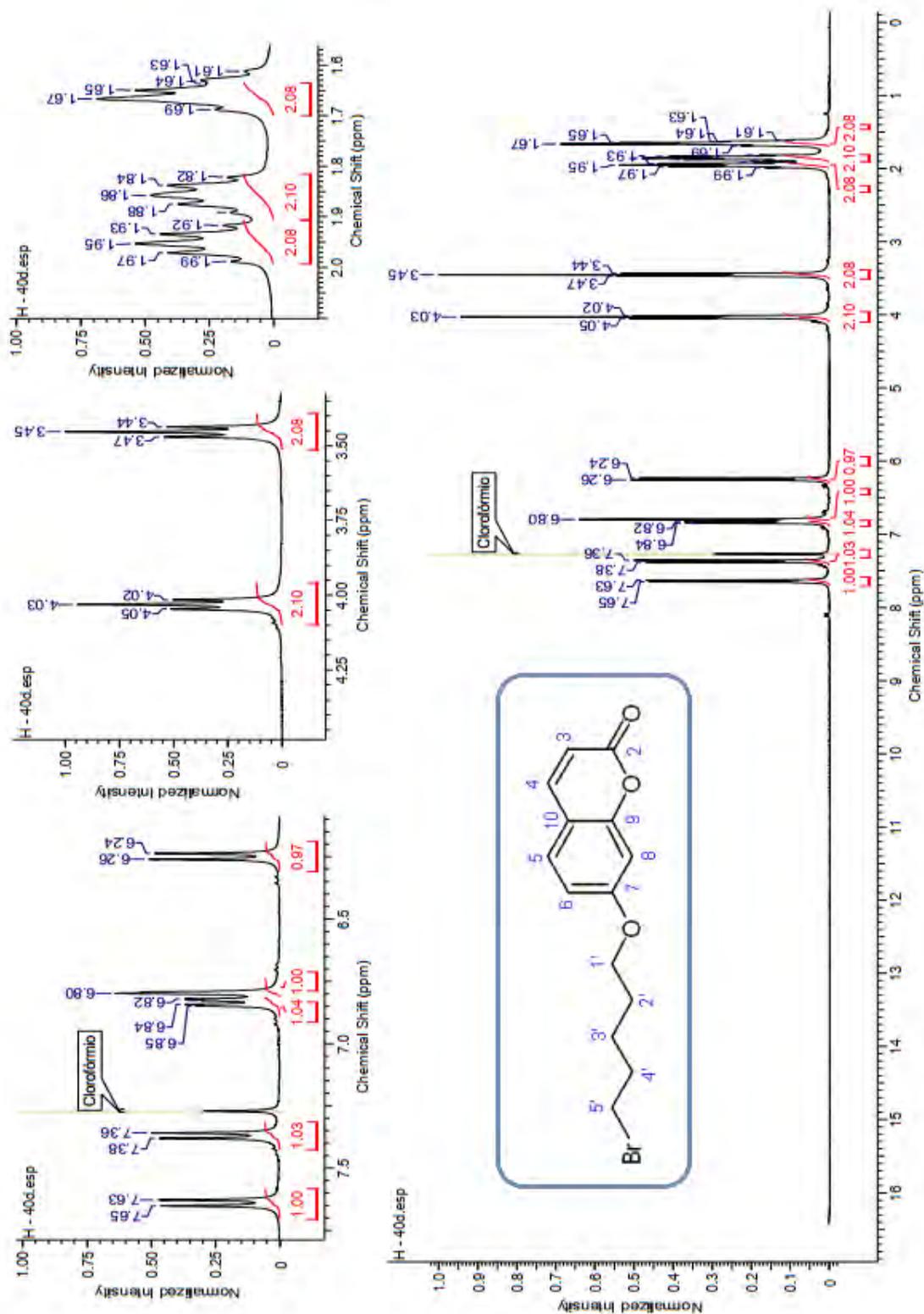
Anexo 7: Espectro de RMN ^1H do composto (38c) em CDCl_3 a 400 MHz



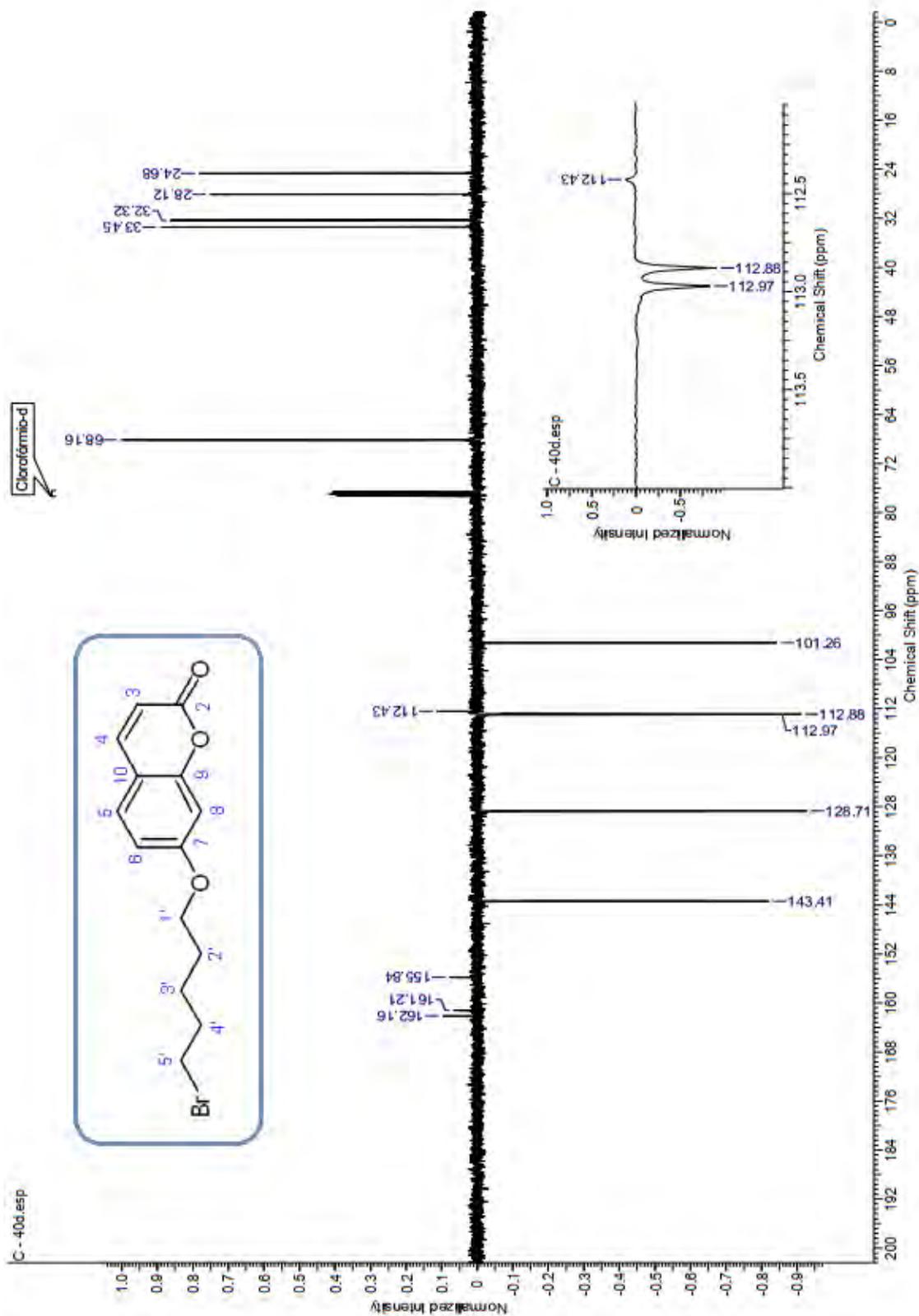
Anexo 8: Espectro de RMN ^{13}C do composto (38c) em CDCl_3 a 100 MHz



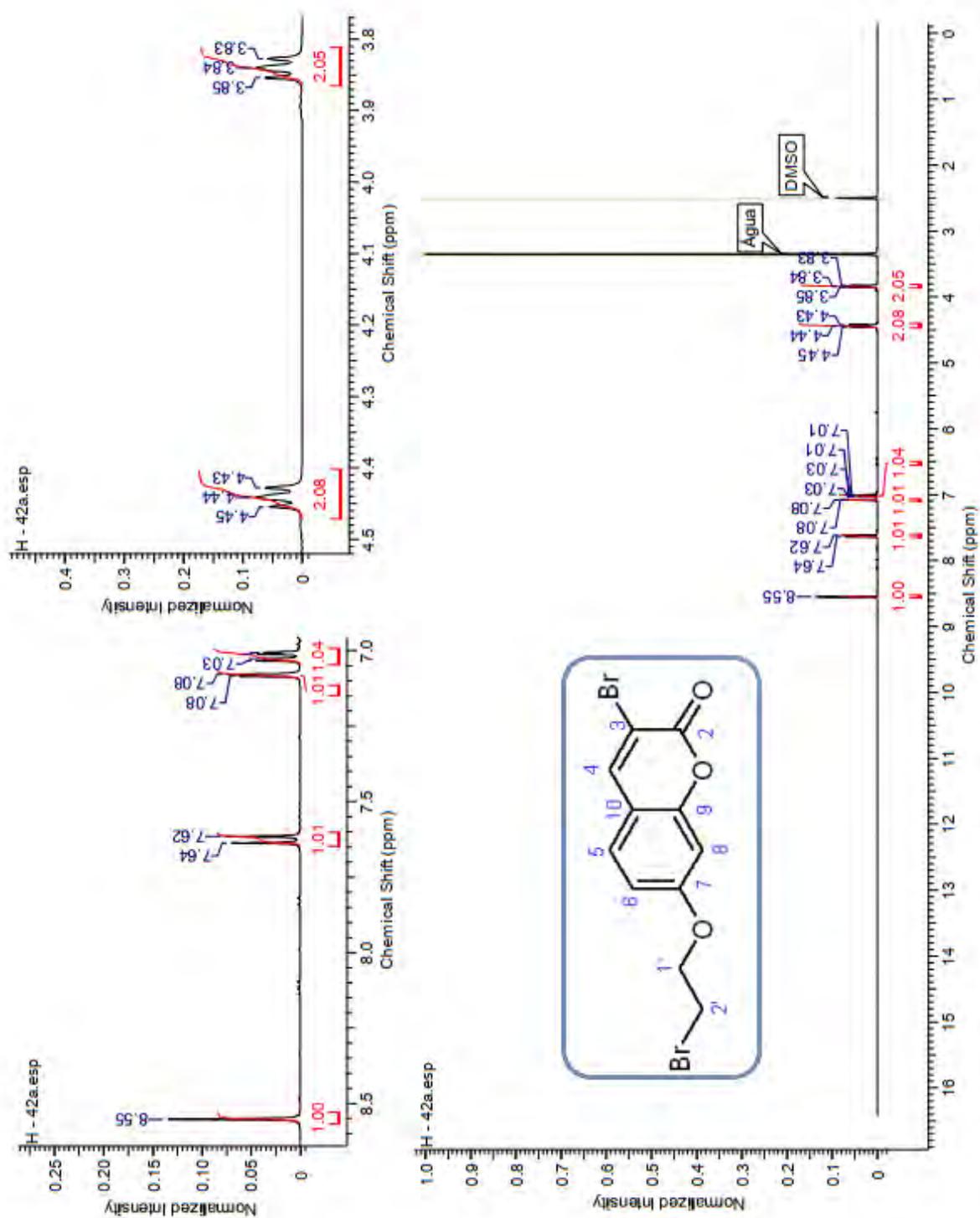
Anexo 9: Espectro de RMN ¹H do composto (38d) em CDCl₃ a 400 MHz



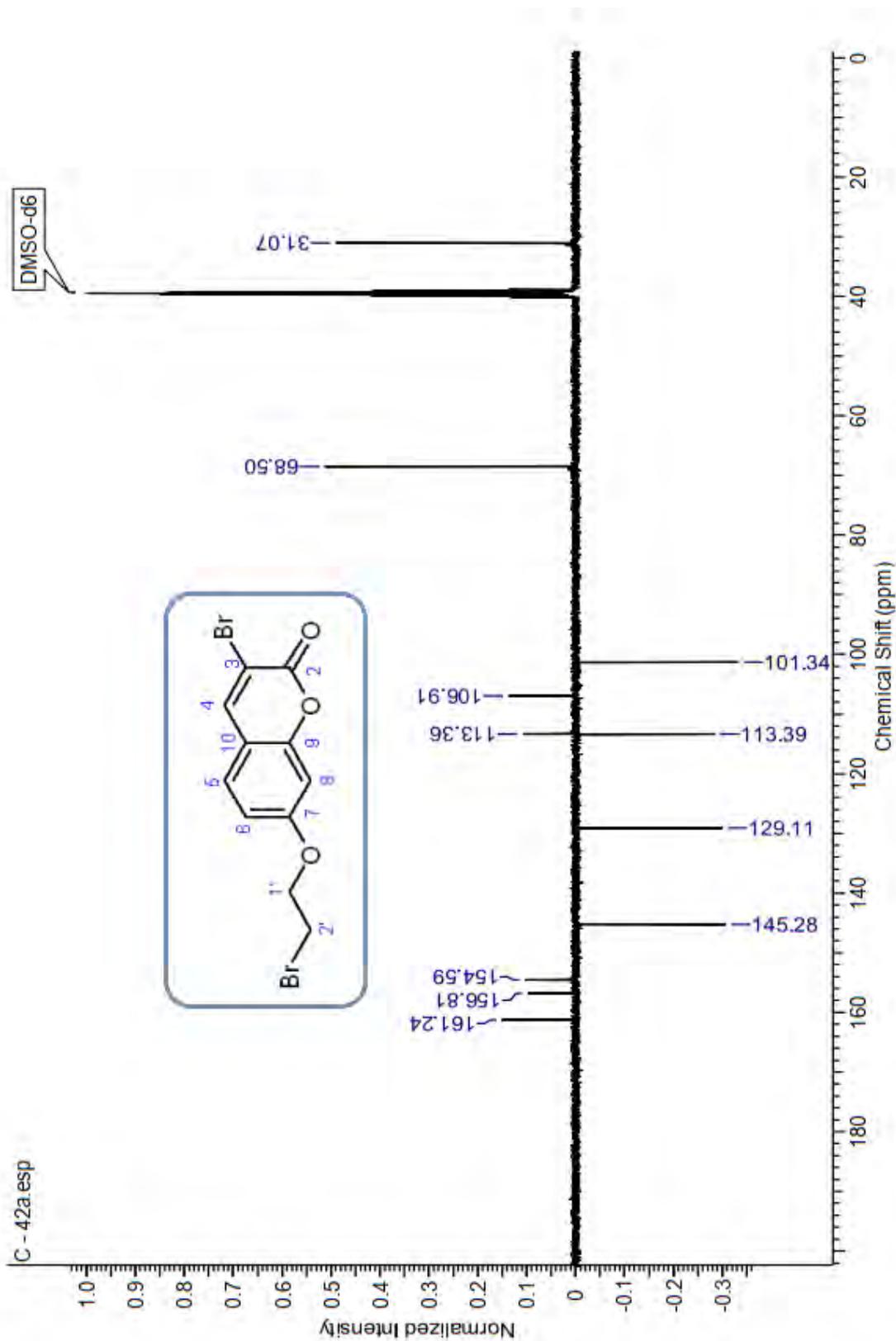
Anexo 10: Espectro de RMN ^{13}C do composto (38d) em CDCl_3 a 100 MHz



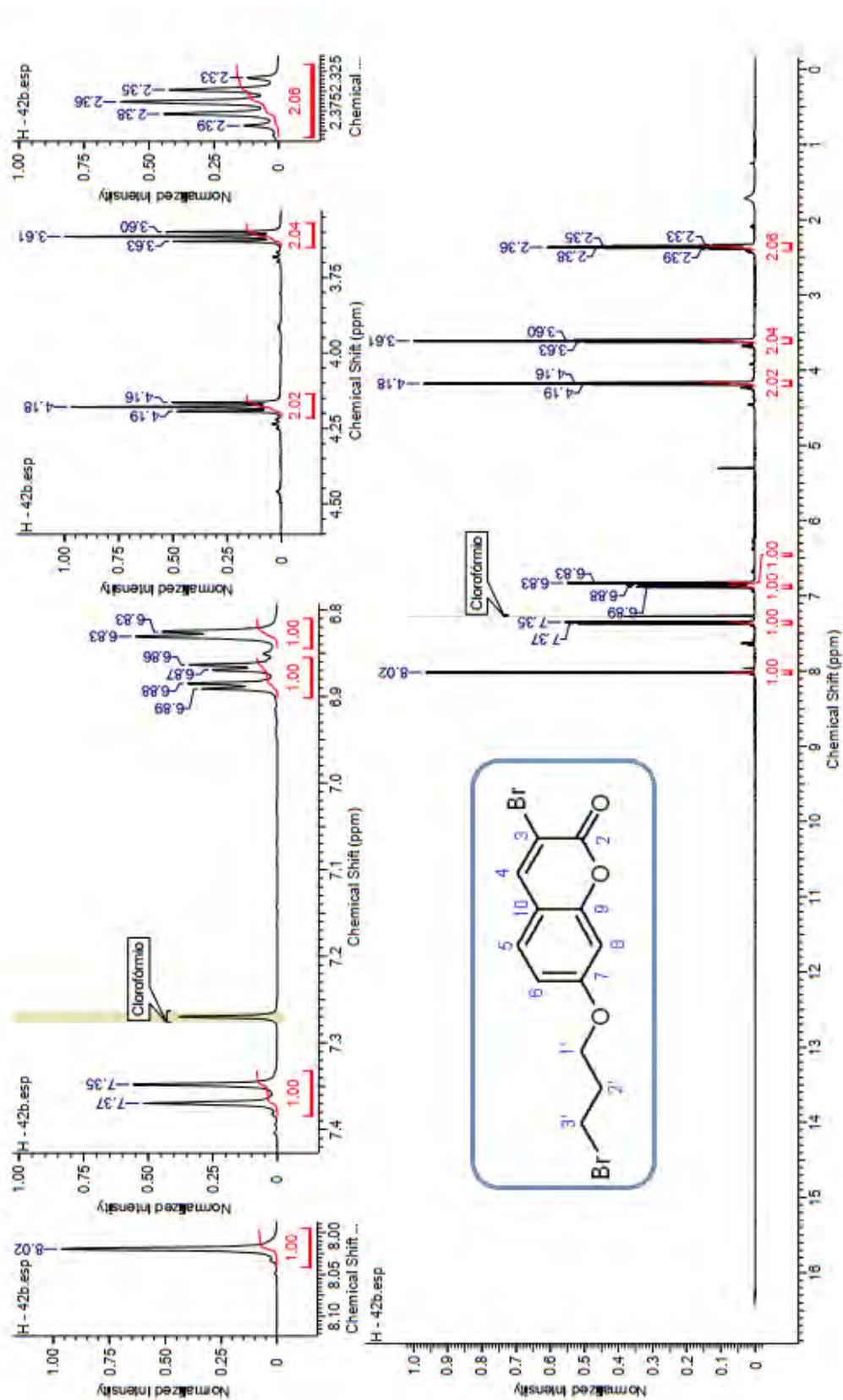
Anexo 11: Espectro de RMN ^1H do composto (36a) em DMSO- d_6 a 400 MHz



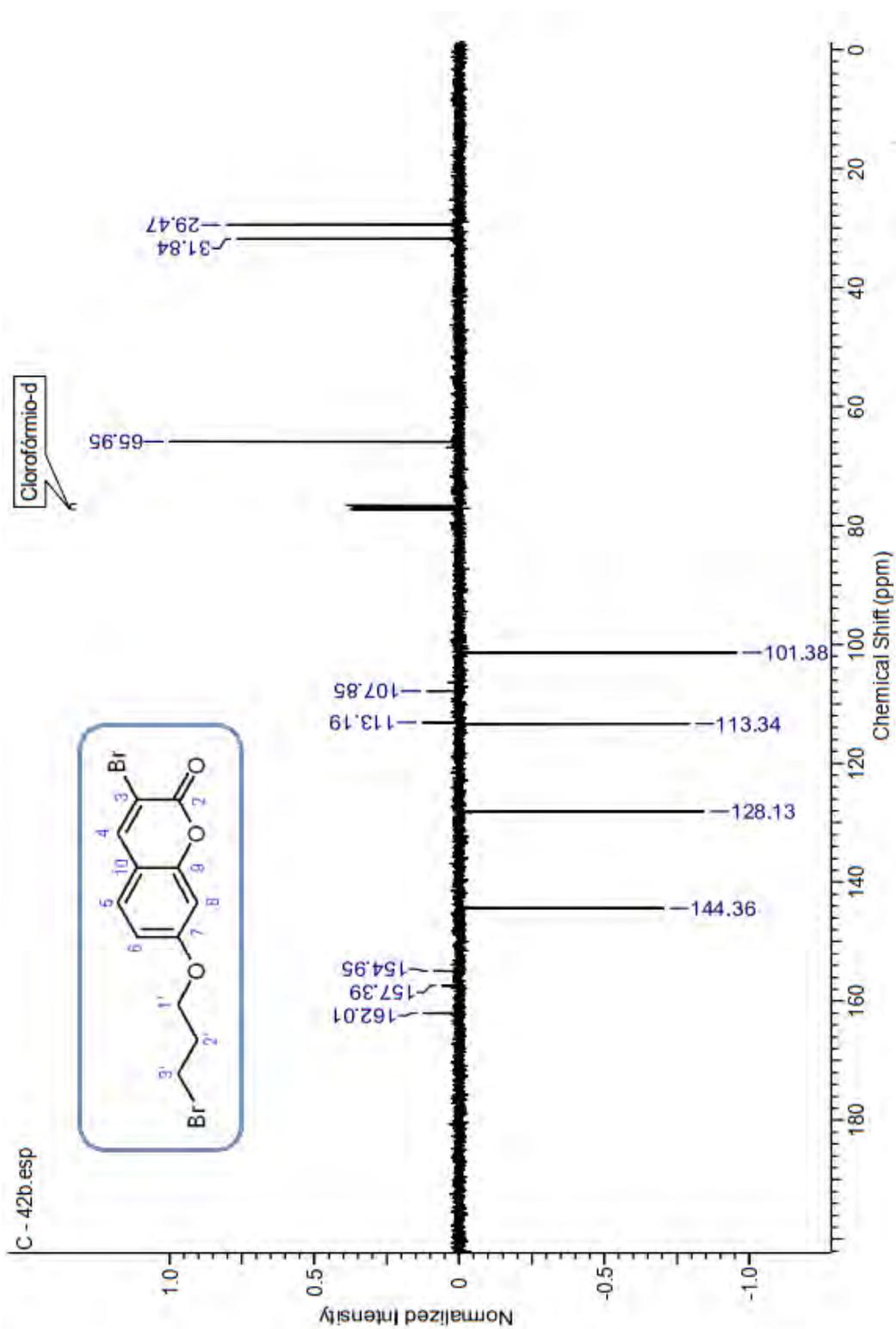
Anexo 12: Espectro de RMN ^{13}C do composto (36a) em DMSO- d_6 a 100 MHz



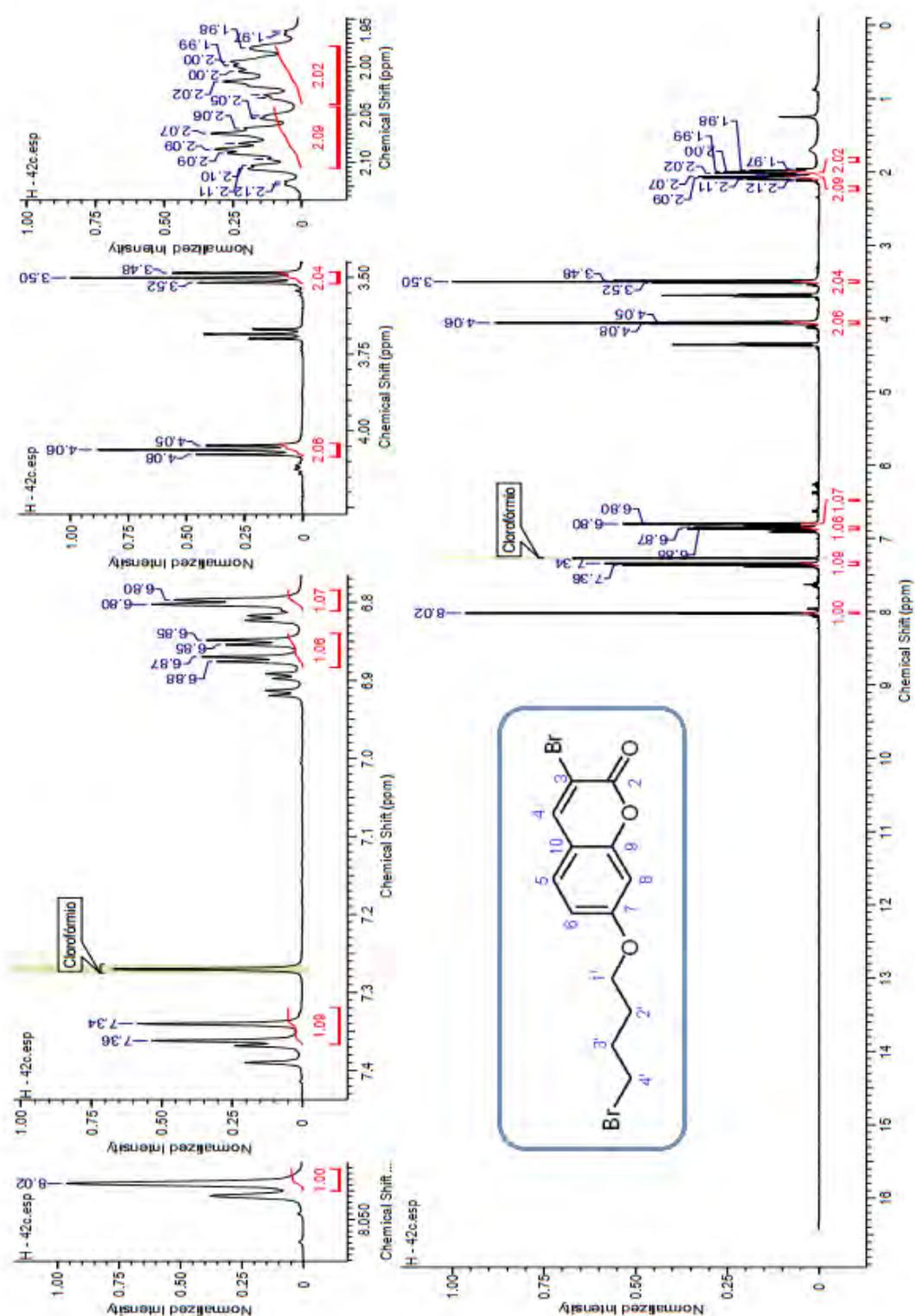
Anexo 13: Espectro de RMN ^1H do composto (36b) em CDCl_3 a 400 MHz



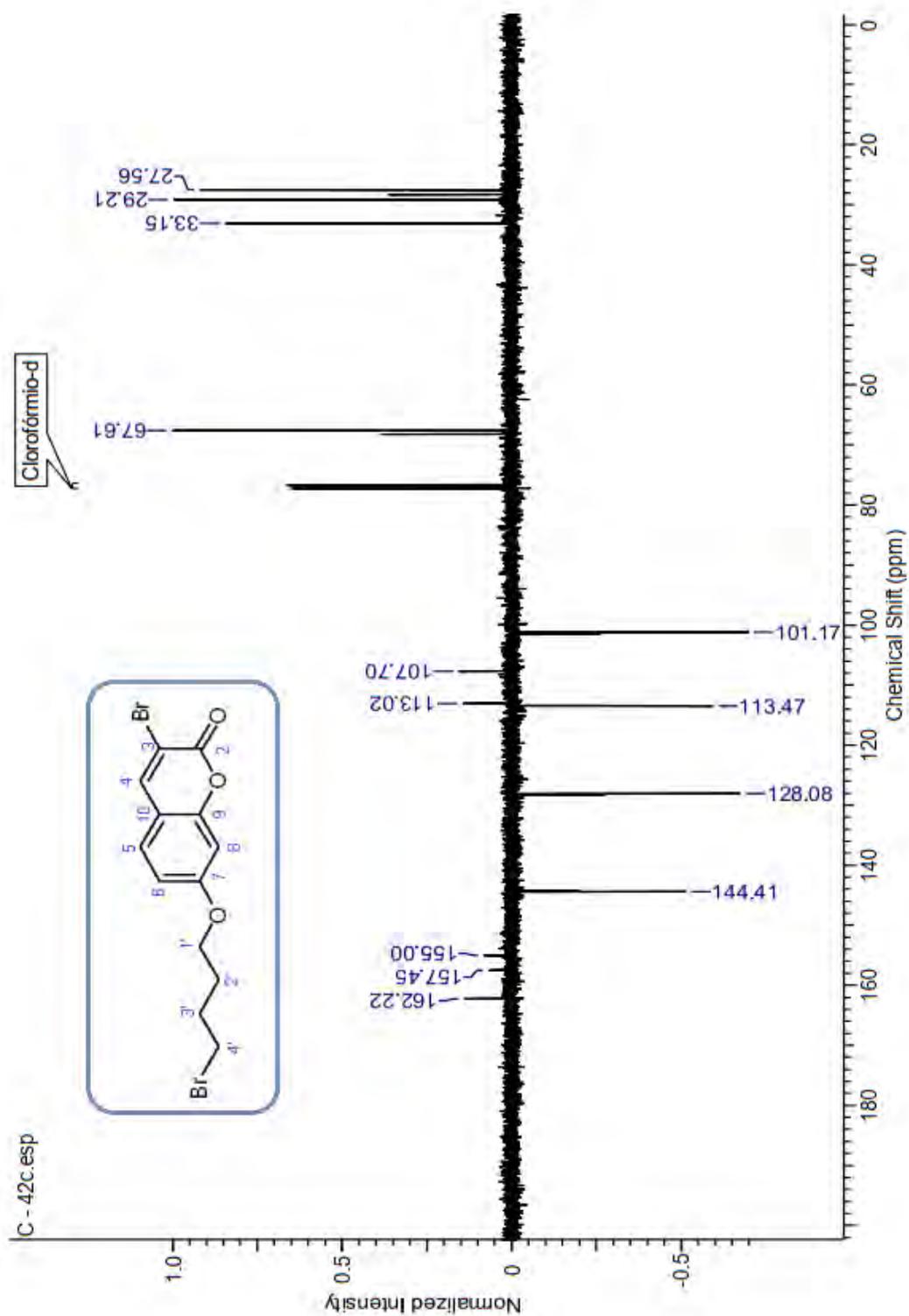
Anexo 14: Espectro de RMN ^{13}C do composto (36b) em CDCl_3 a 100 MHz



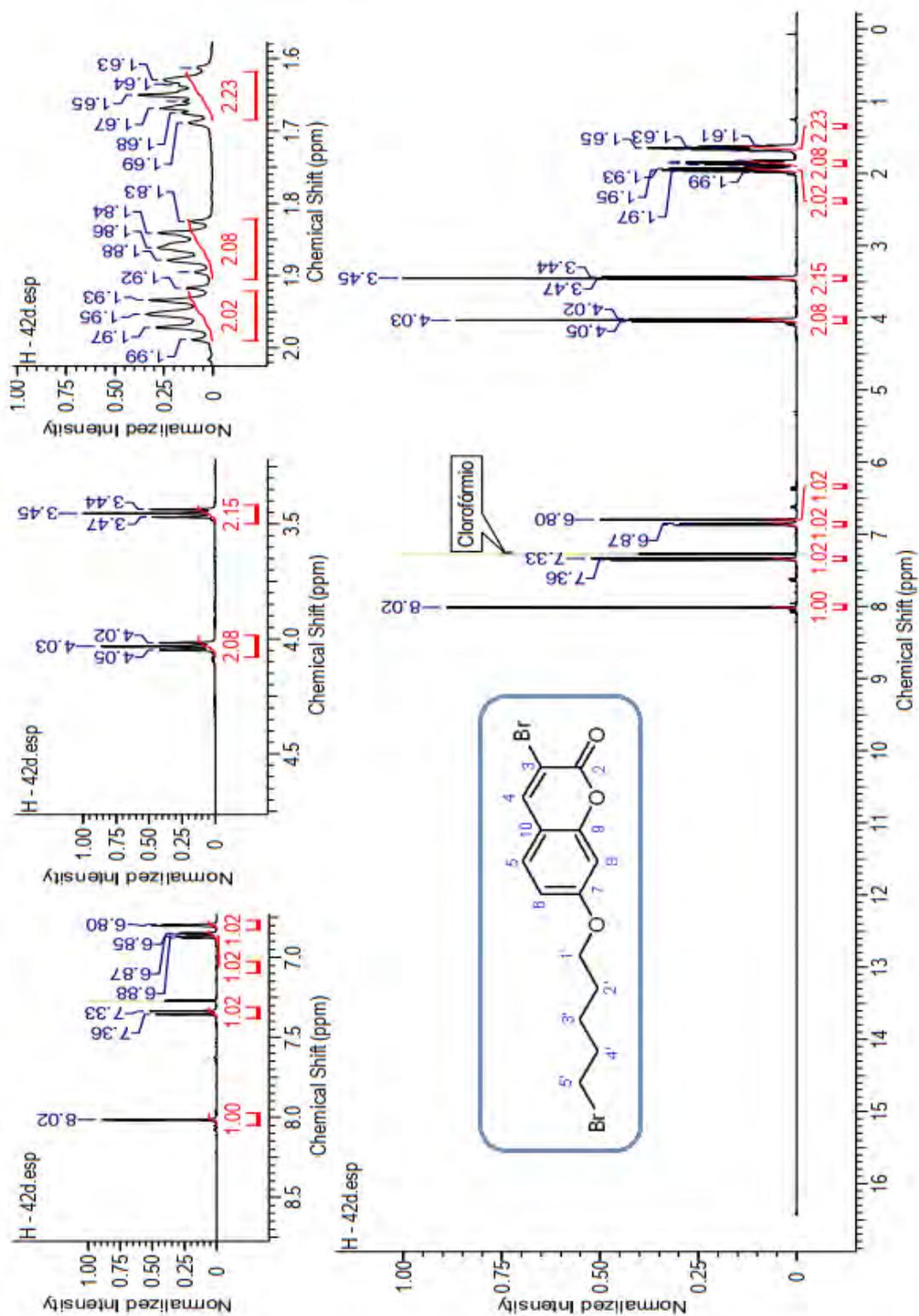
Anexo 15: Espectro de RMN ^1H do composto (36c) em CDCl_3 a 400 MHz



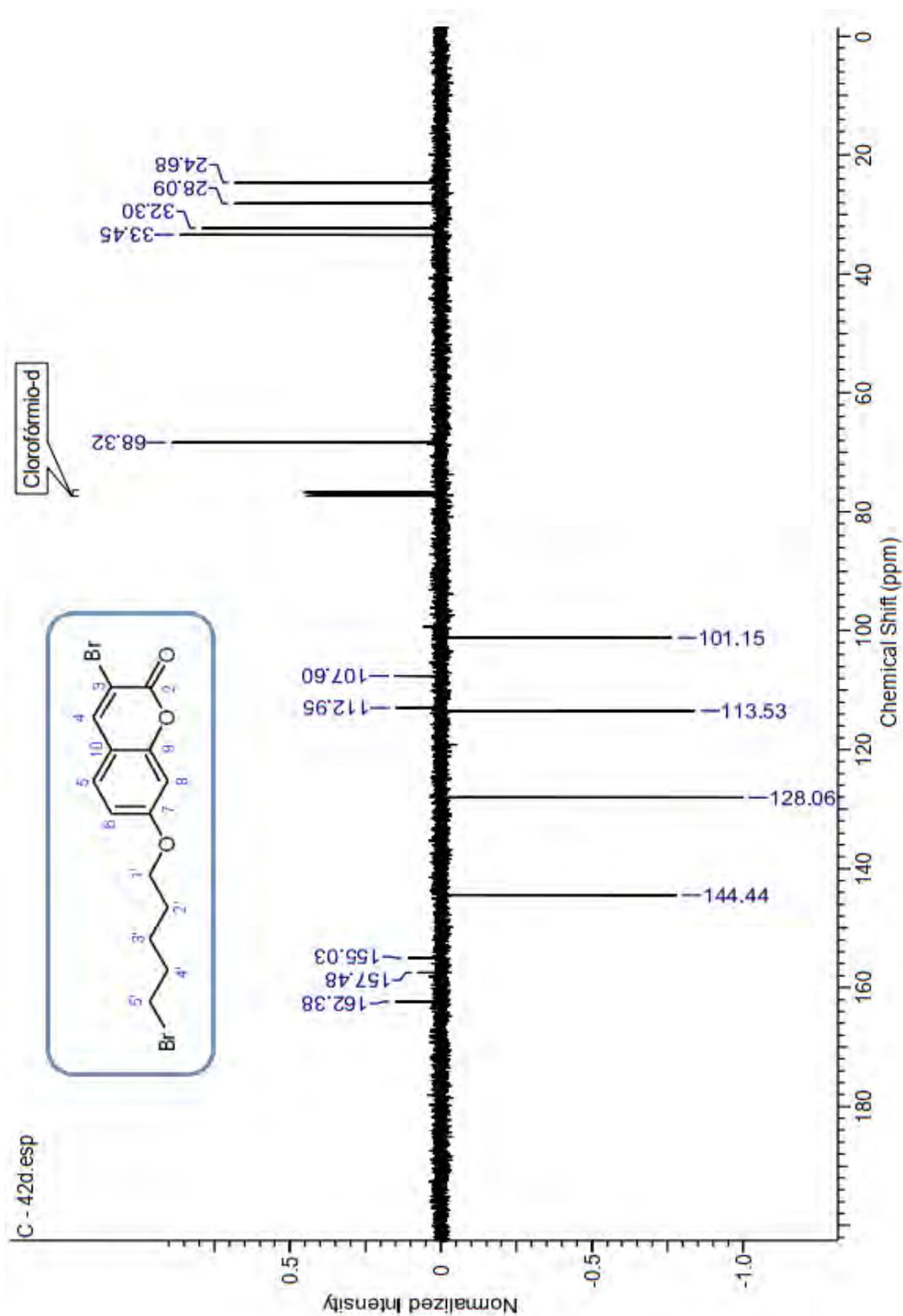
Anexo 16: Espectro de RMN ^{13}C do composto (36c) em CDCl_3 a 100 MHz



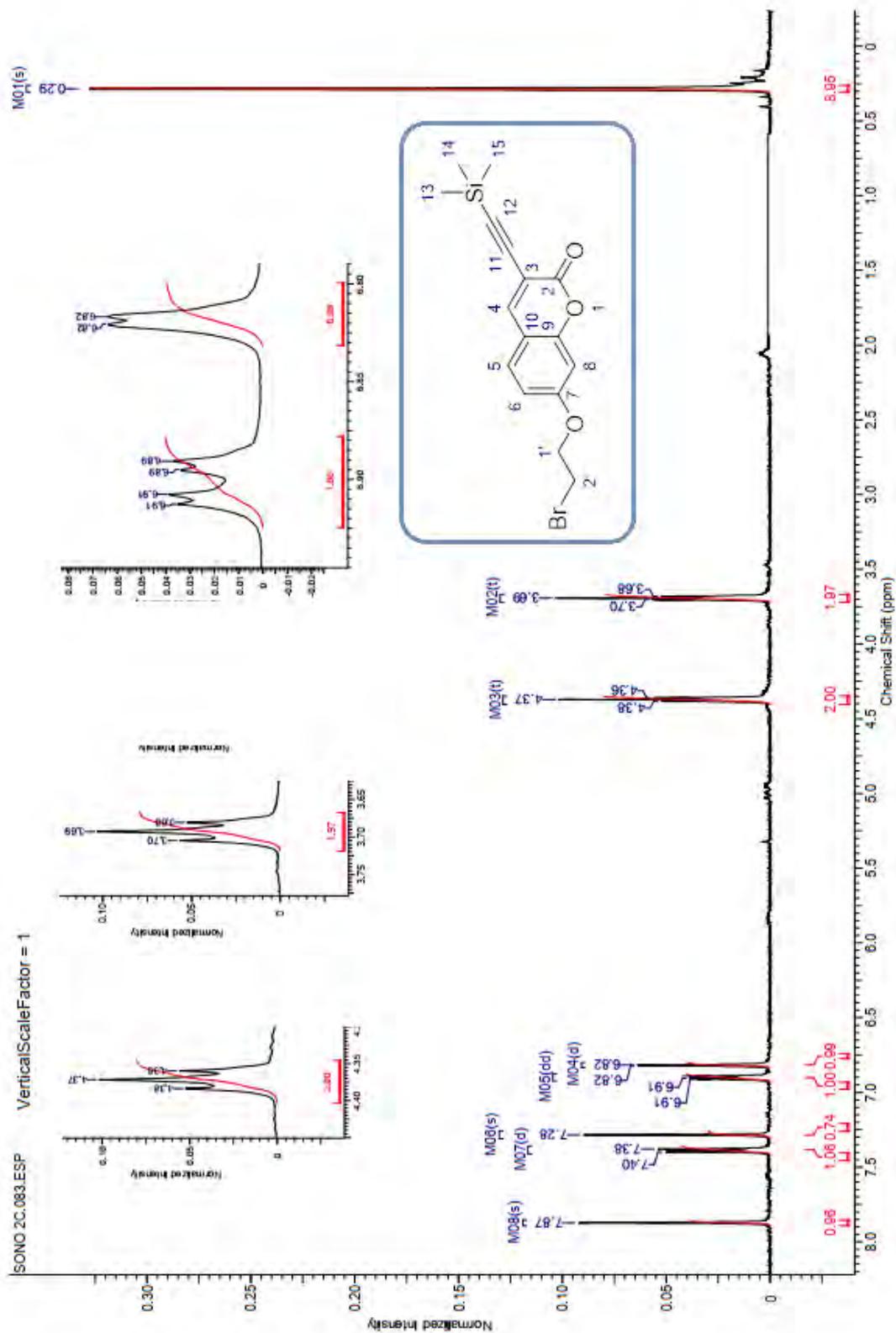
Anexo 17: Espectro de RMN ^1H do composto (36d) em CDCl_3 a 400 MHz



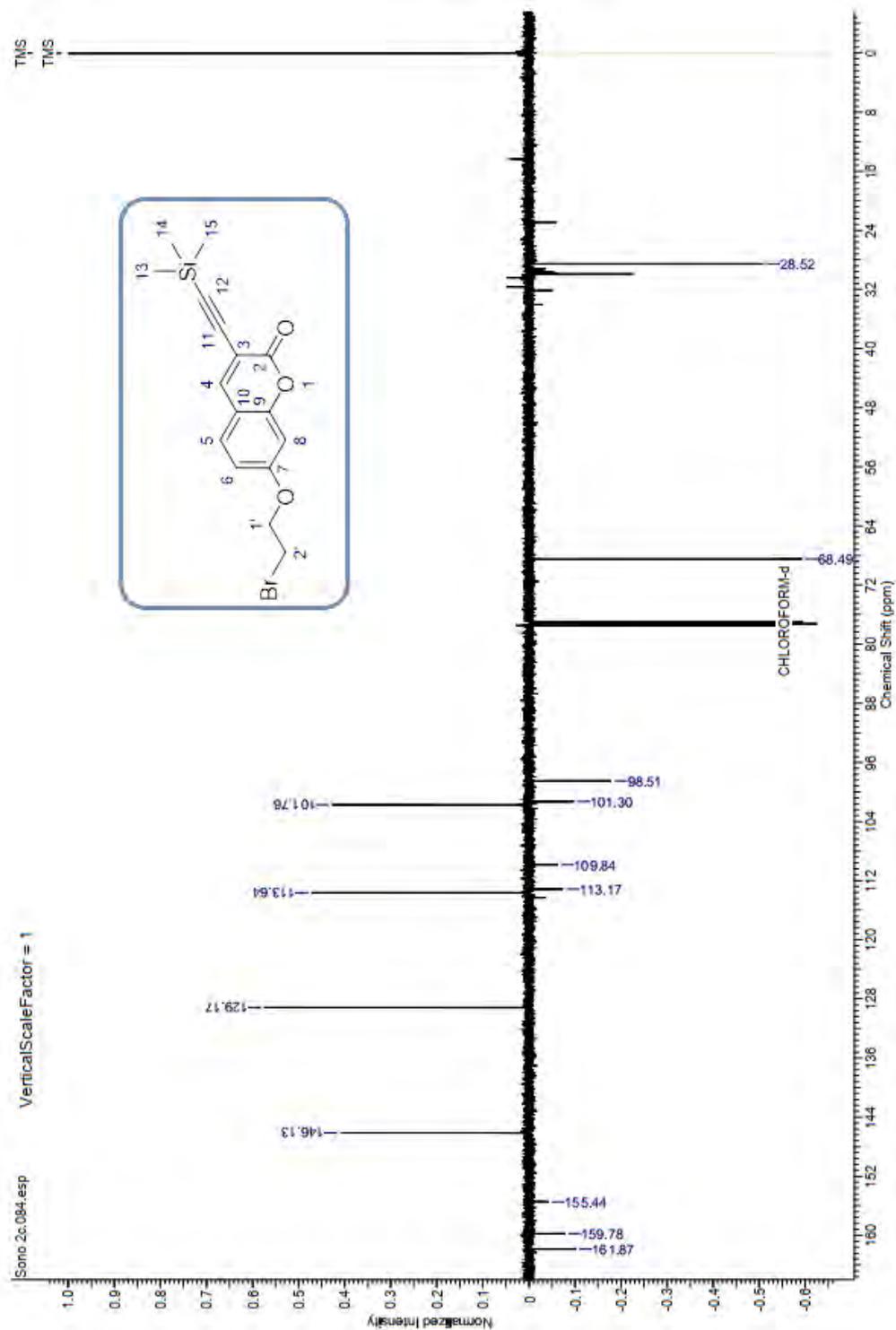
Anexo 18: Espectro de RMN ^{13}C do composto (36d) em CDCl_3 a 100 MHz



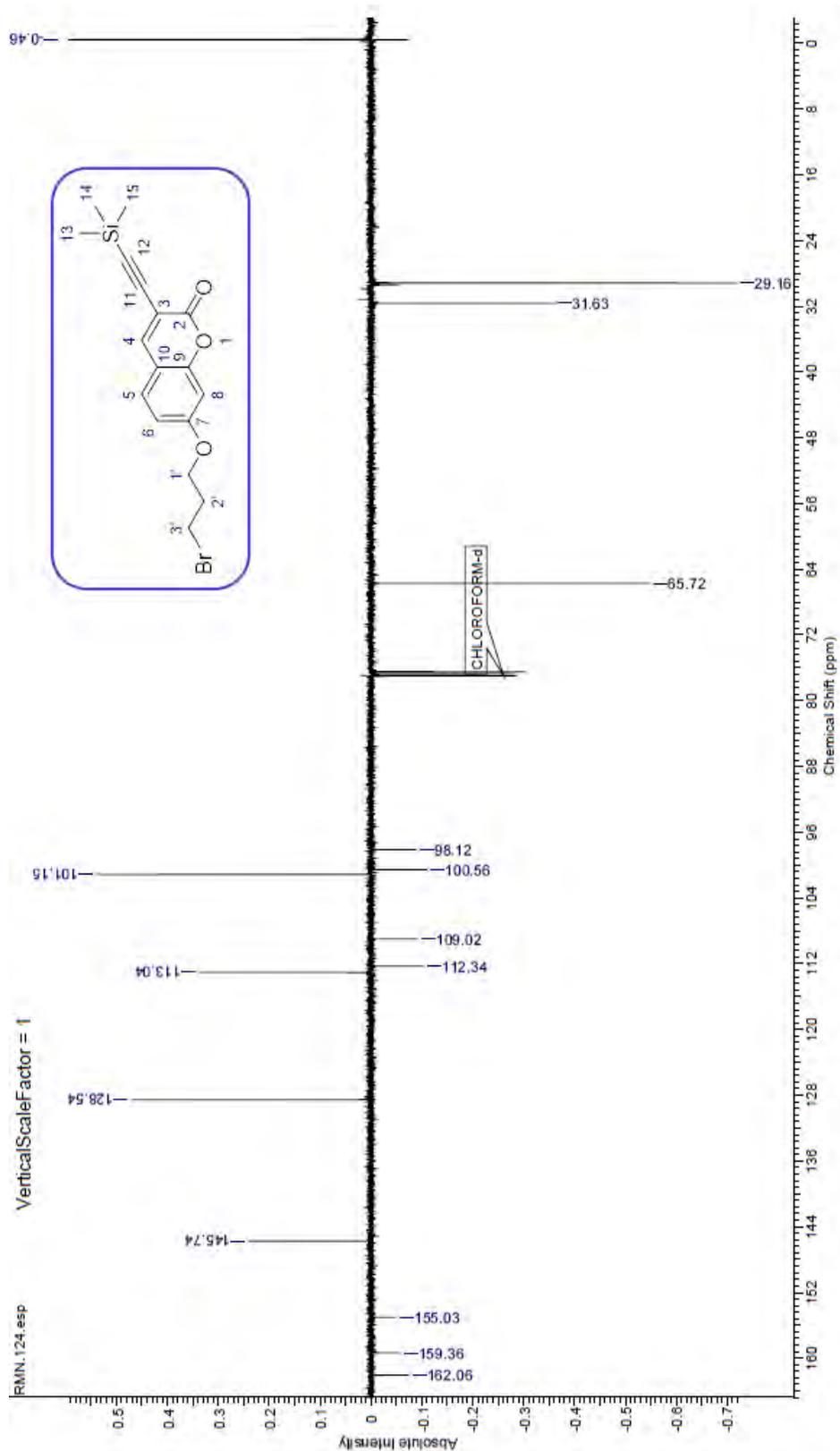
Anexo 19: Espectro de RMN ¹H do composto (45a) em CDCl₃ a 500 MHz



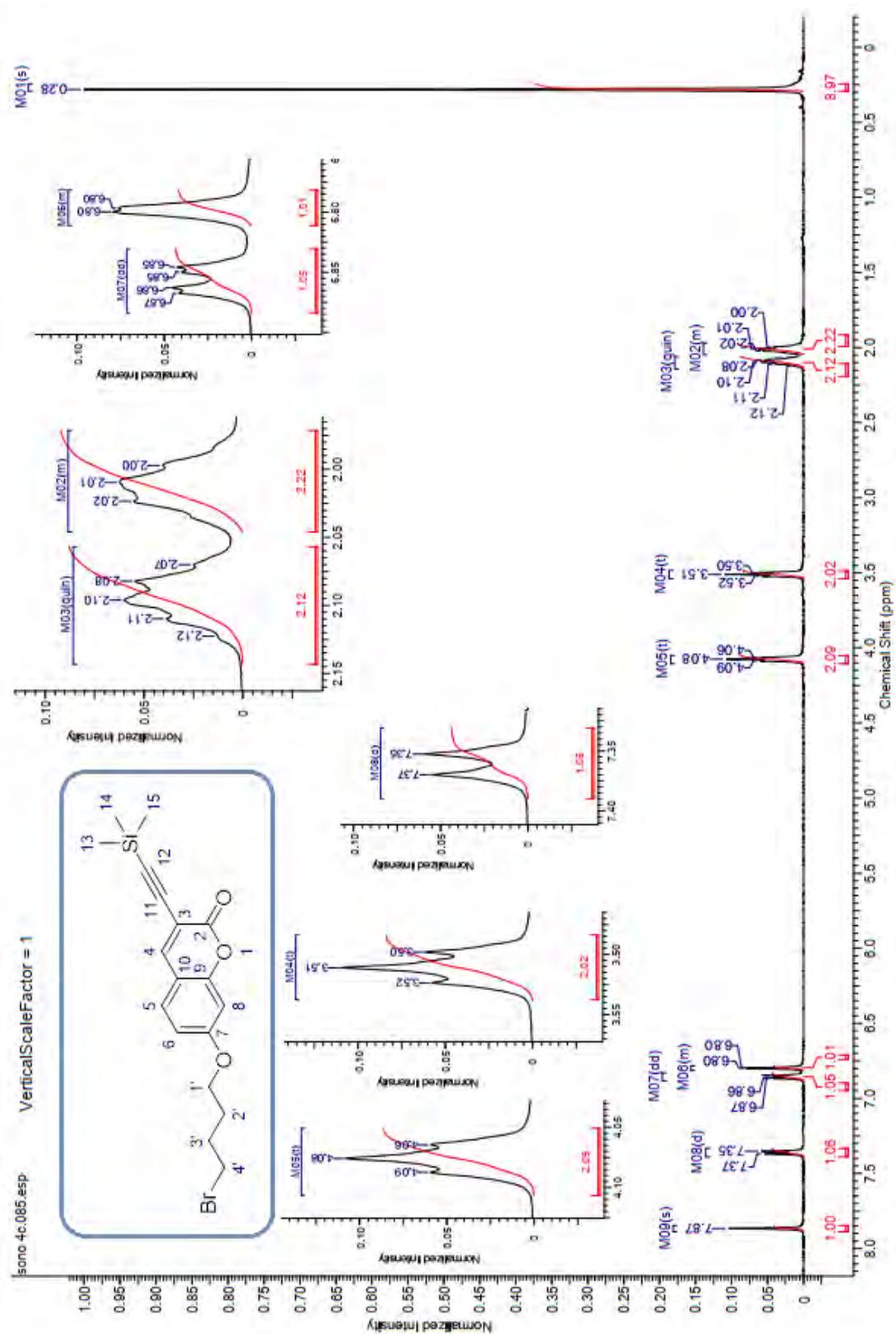
Anexo 20: Espectro de RMN ¹³C do composto (45a) em CDCl₃ a 125 MHz



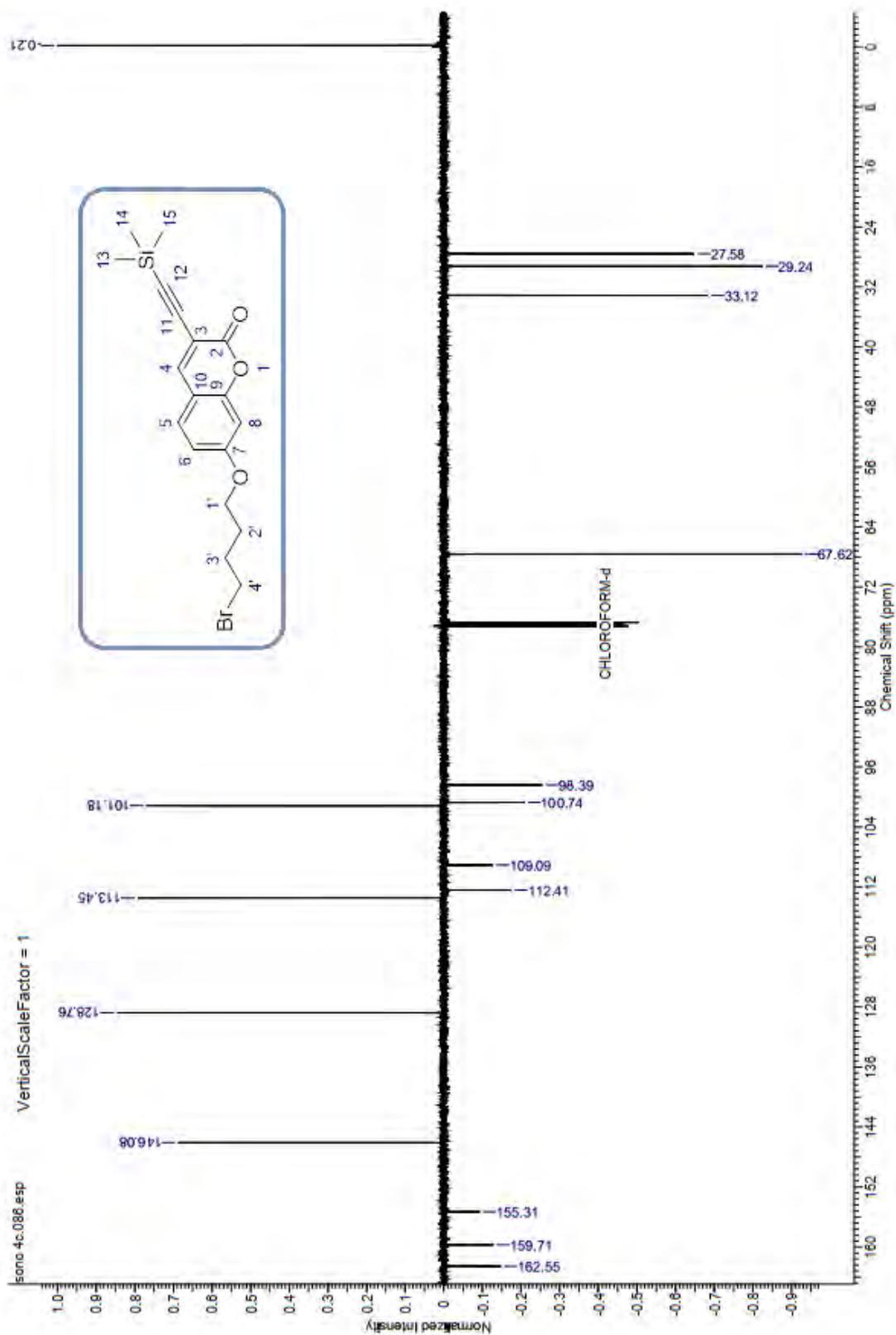
Anexo 22: Espectro de RMN ^{13}C do composto (45b) em CDCl_3 a 125MHz



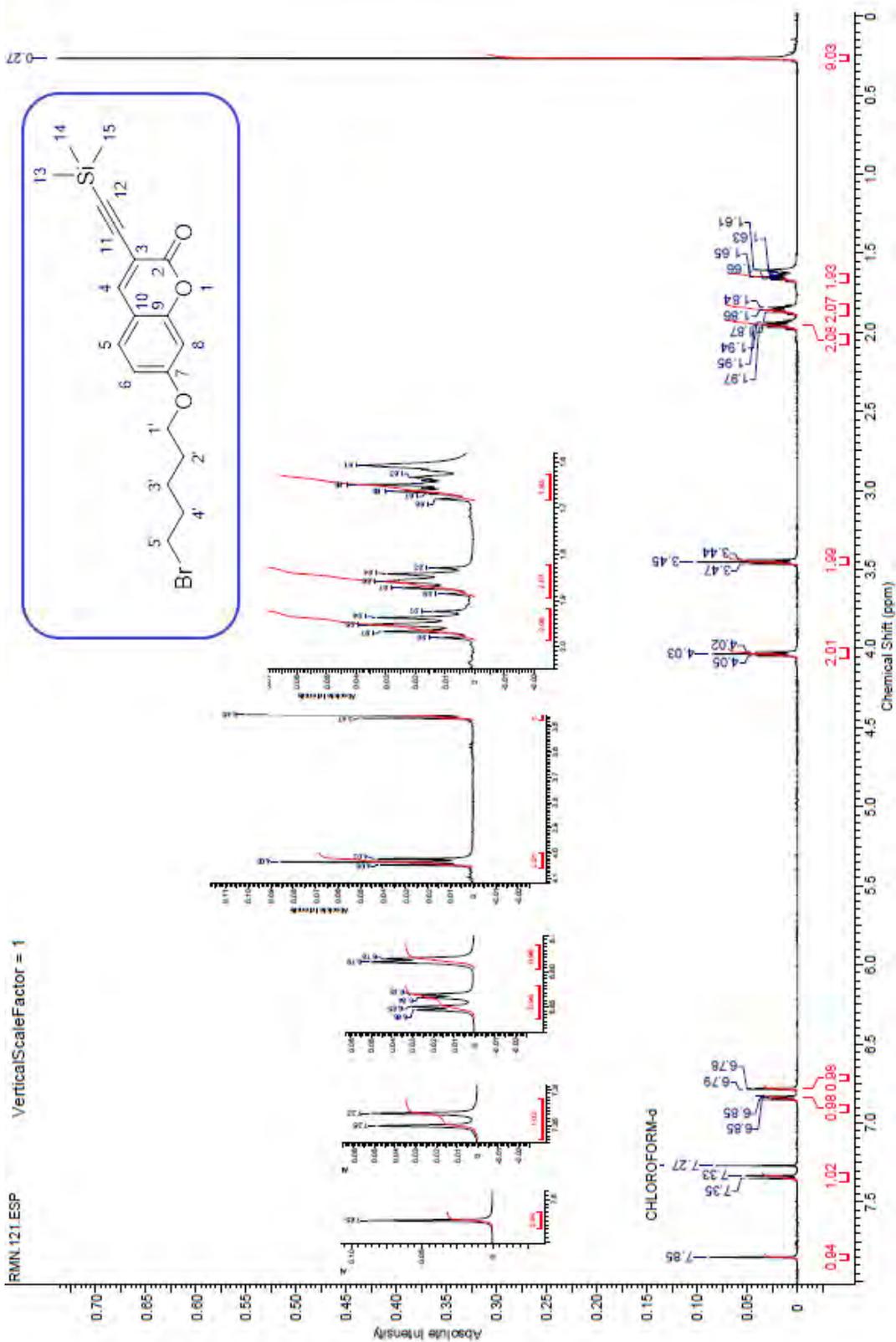
Anexo 23: Espectro de RMN ^1H do composto (45c) em CDCl_3 a 500 MHz



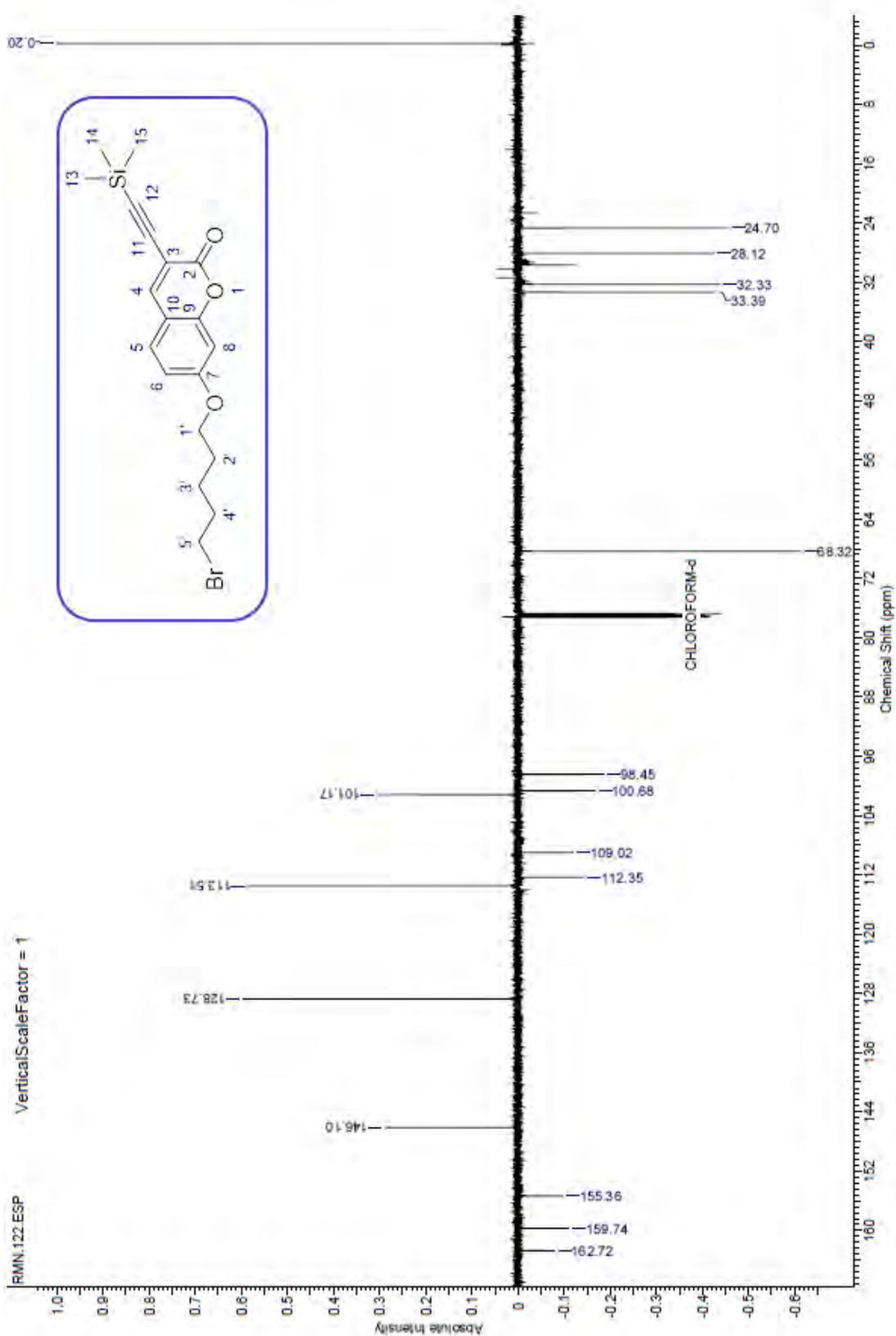
Anexo 24: Espectro de RMN ^{13}C do composto (45c) em CDCl_3 a 125 MHz



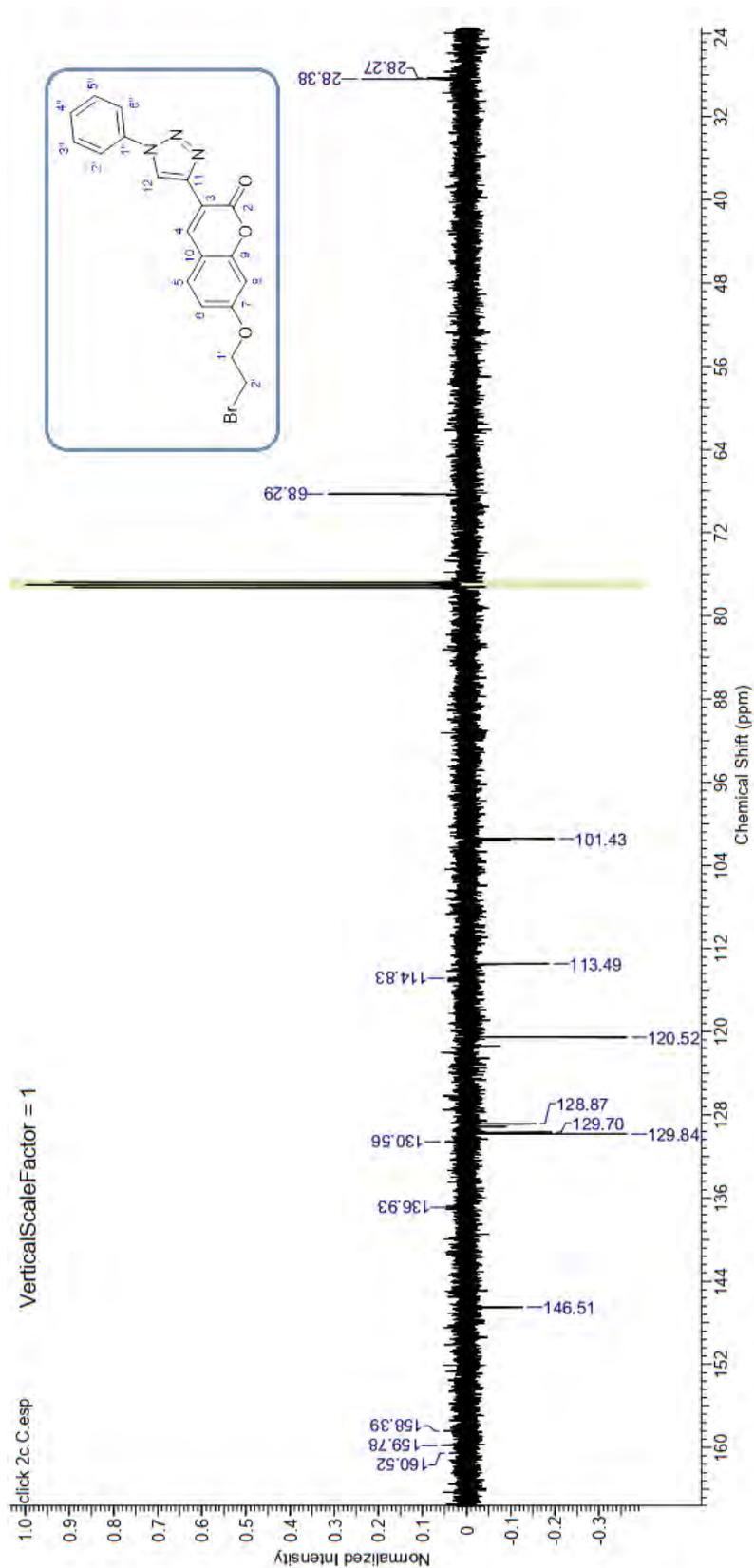
Anexo 25: Espectro de RMN ¹H do composto (45d) em CDCl₃ a 500 MHz



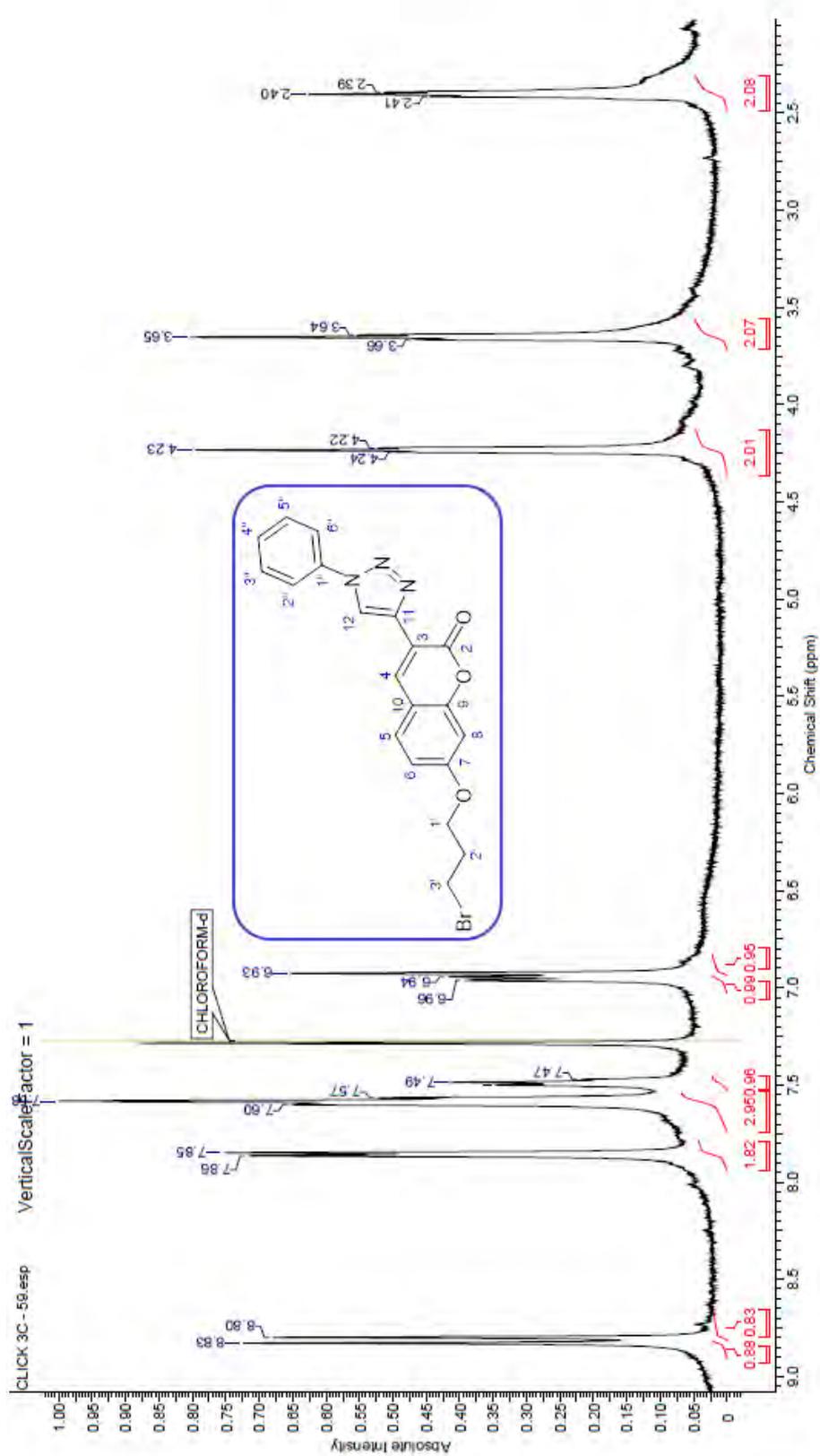
Anexo 26: Espectro de RMN ¹³C do composto (45d) em CDCl₃ a 125 MHz



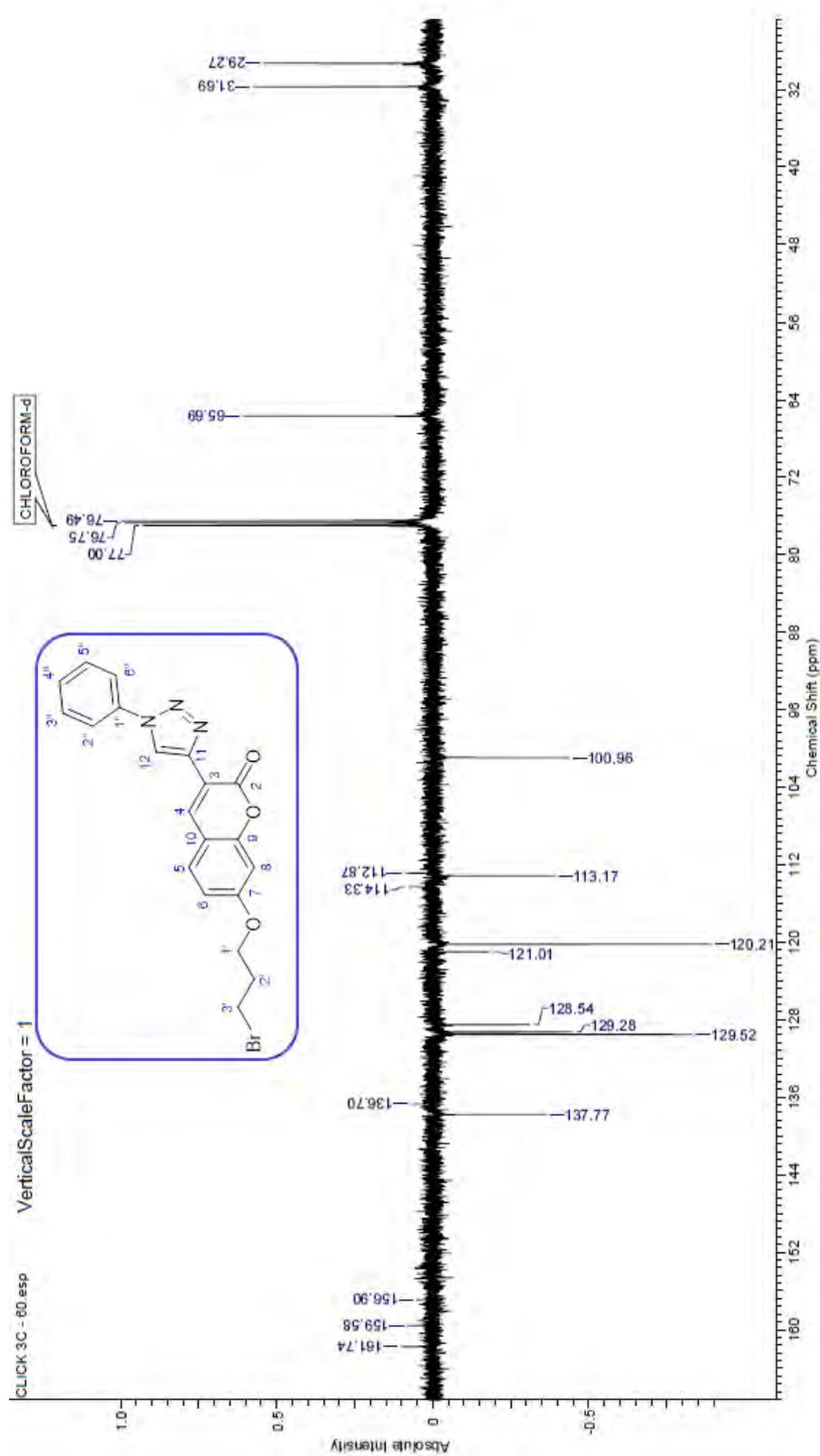
Anexo 28: Espectro de RMN ¹³C do composto (31a) em CDCl₃ a 125 MHz



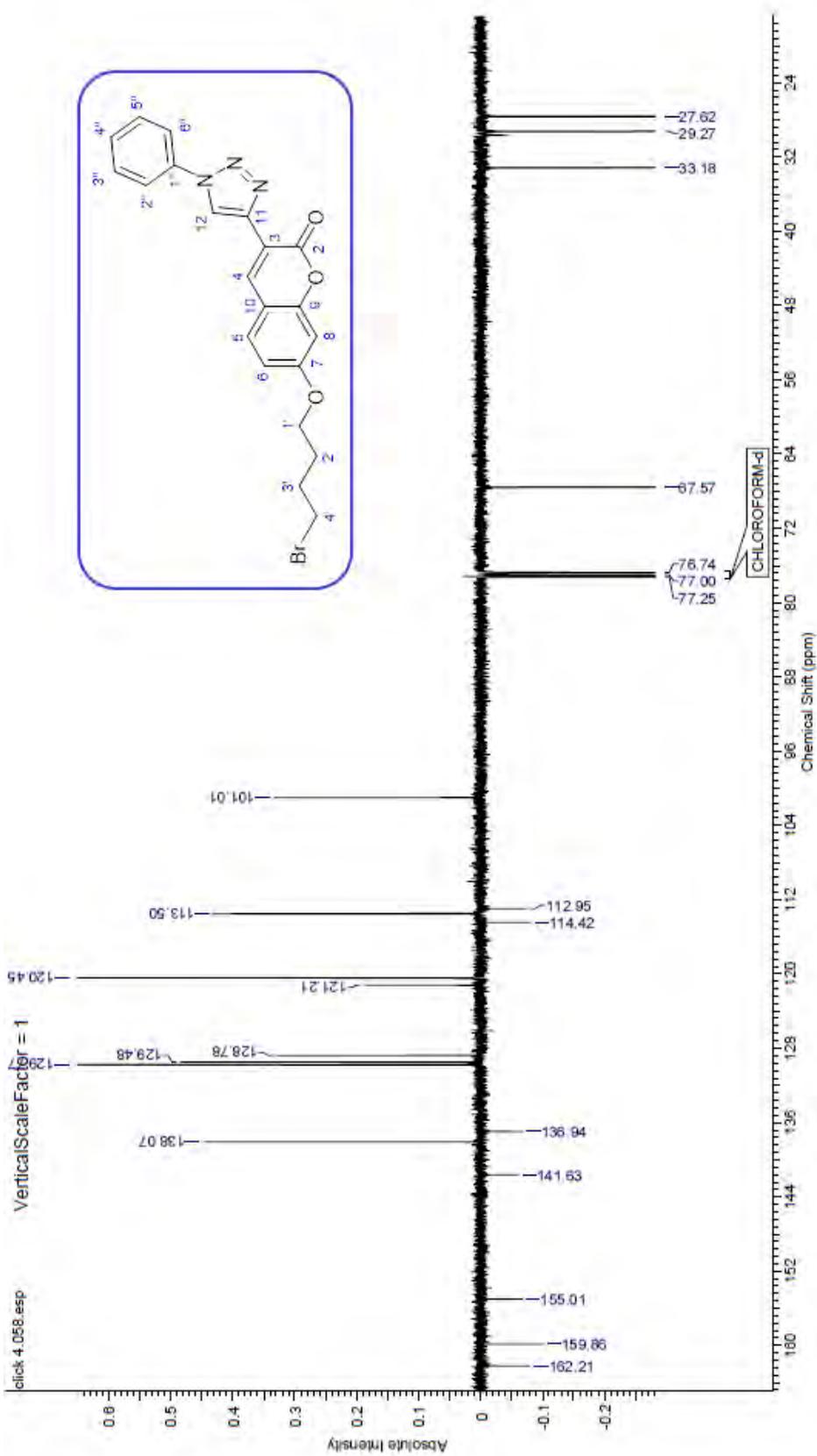
Anexo 29: Espectro de RMN ^1H do composto (31b) em CDCl_3 a 500 MHz



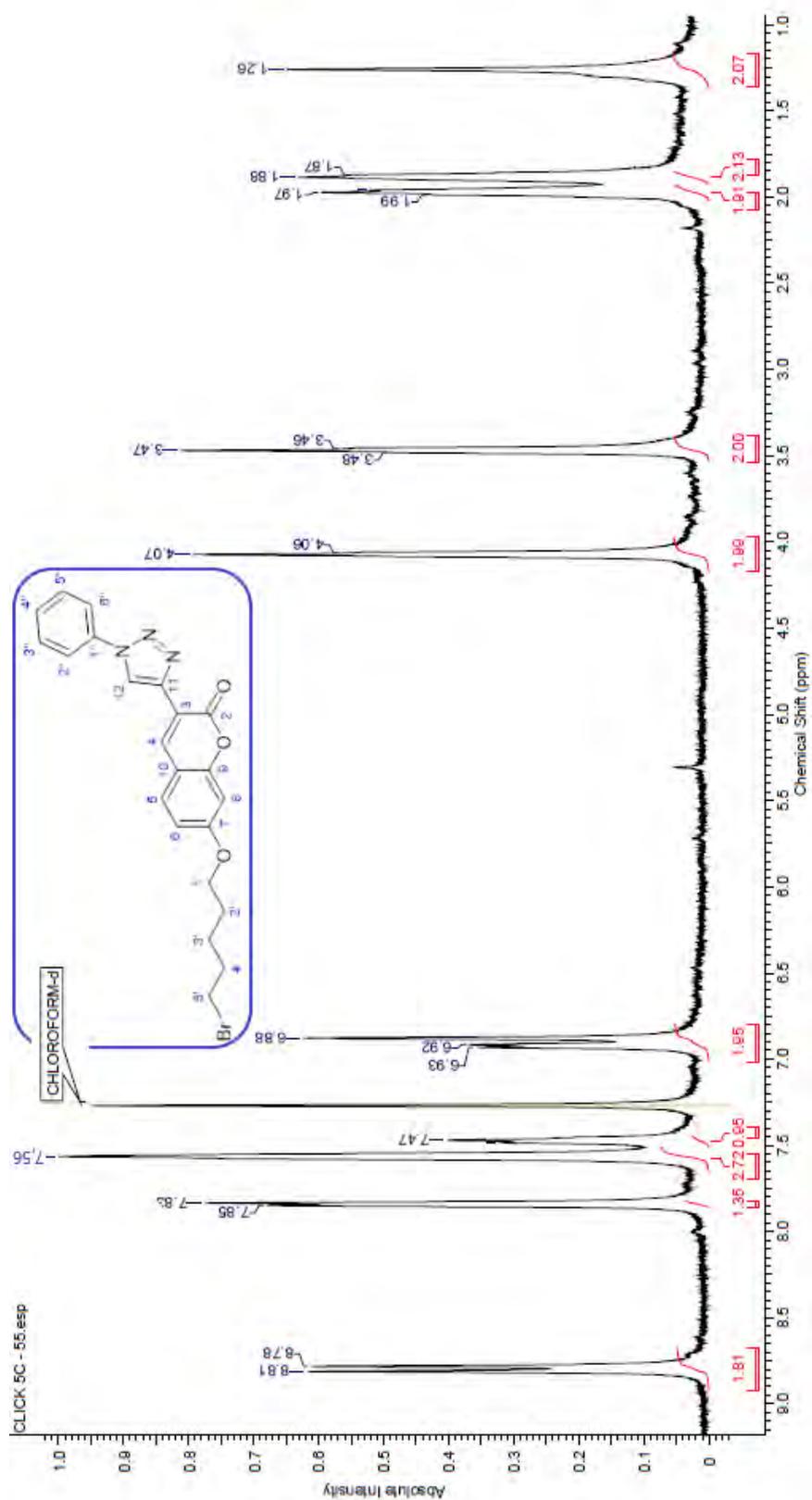
Anexo 30: Espectro de RMN ^{13}C do composto (31b) em CDCl_3 a 125 MHz



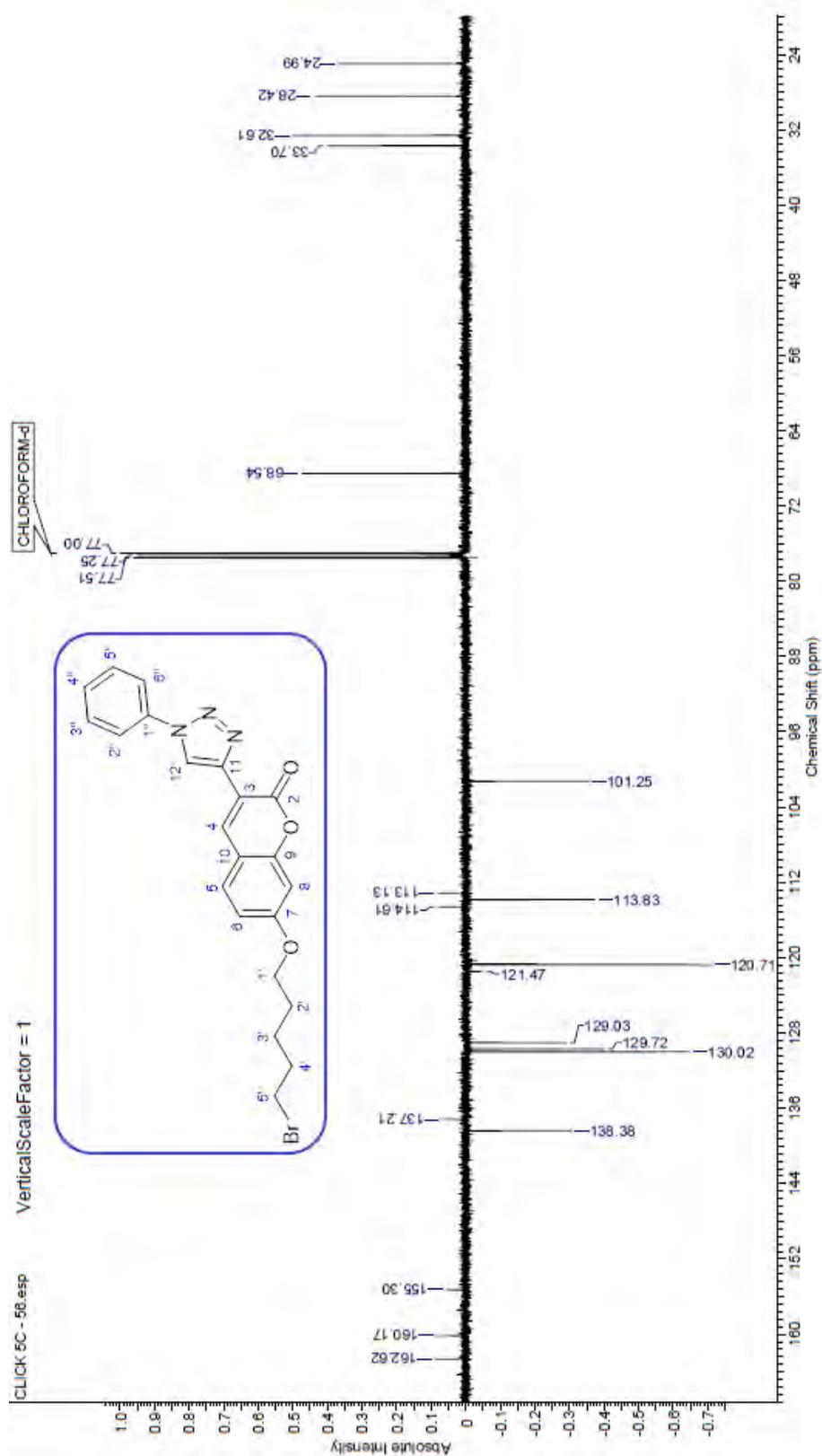
Anexo 32: Espectro de RMN ¹³C do composto (31c) em CDCl₃ a 125 MHz



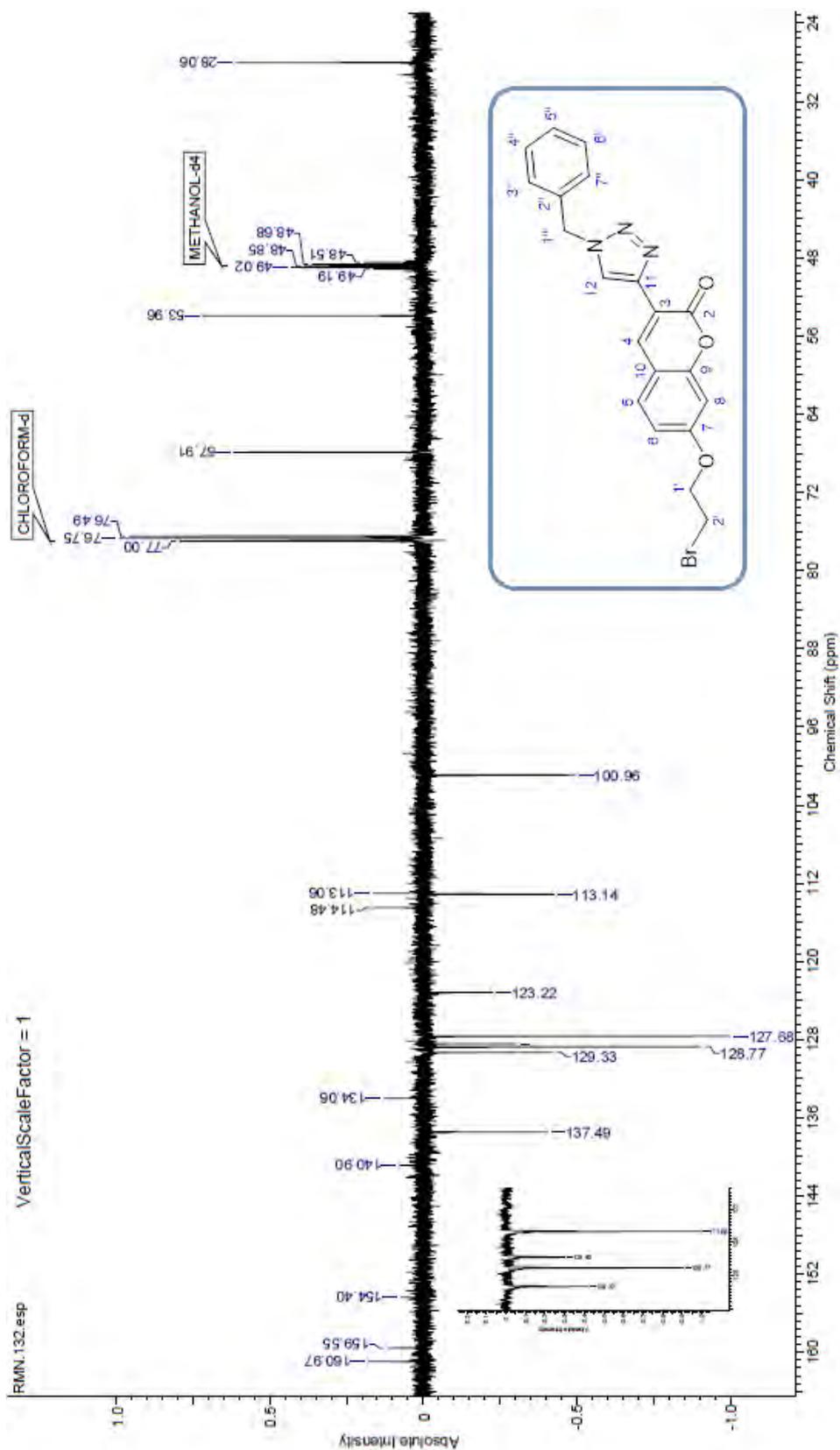
Anexo 33: Espectro de RMN ¹H do composto (31d) em CDCl₃ a 500 MHz



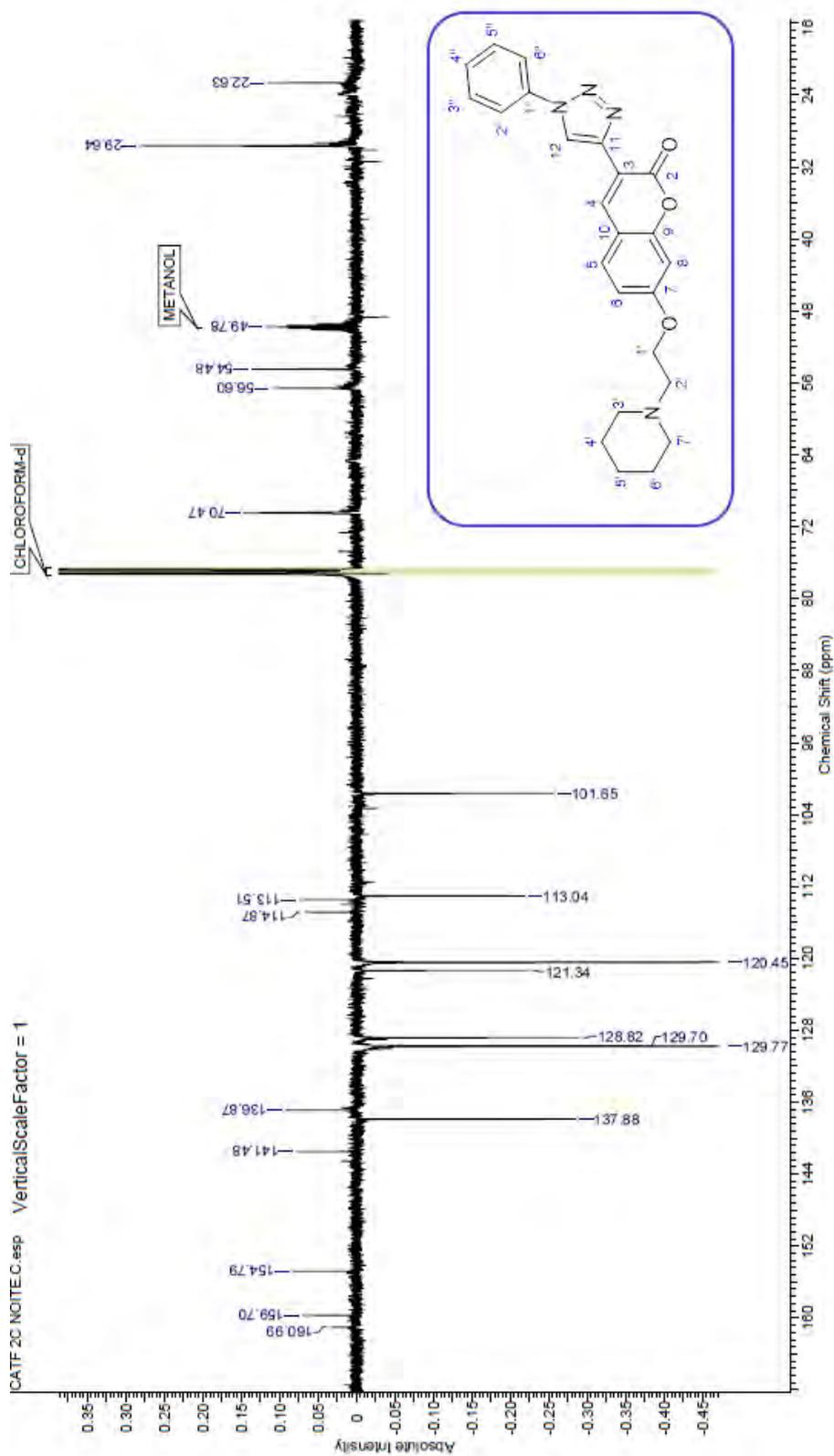
Anexo 34: Espectro de RMN ¹³C do composto (31d) em CDCl₃ a 125 MHz



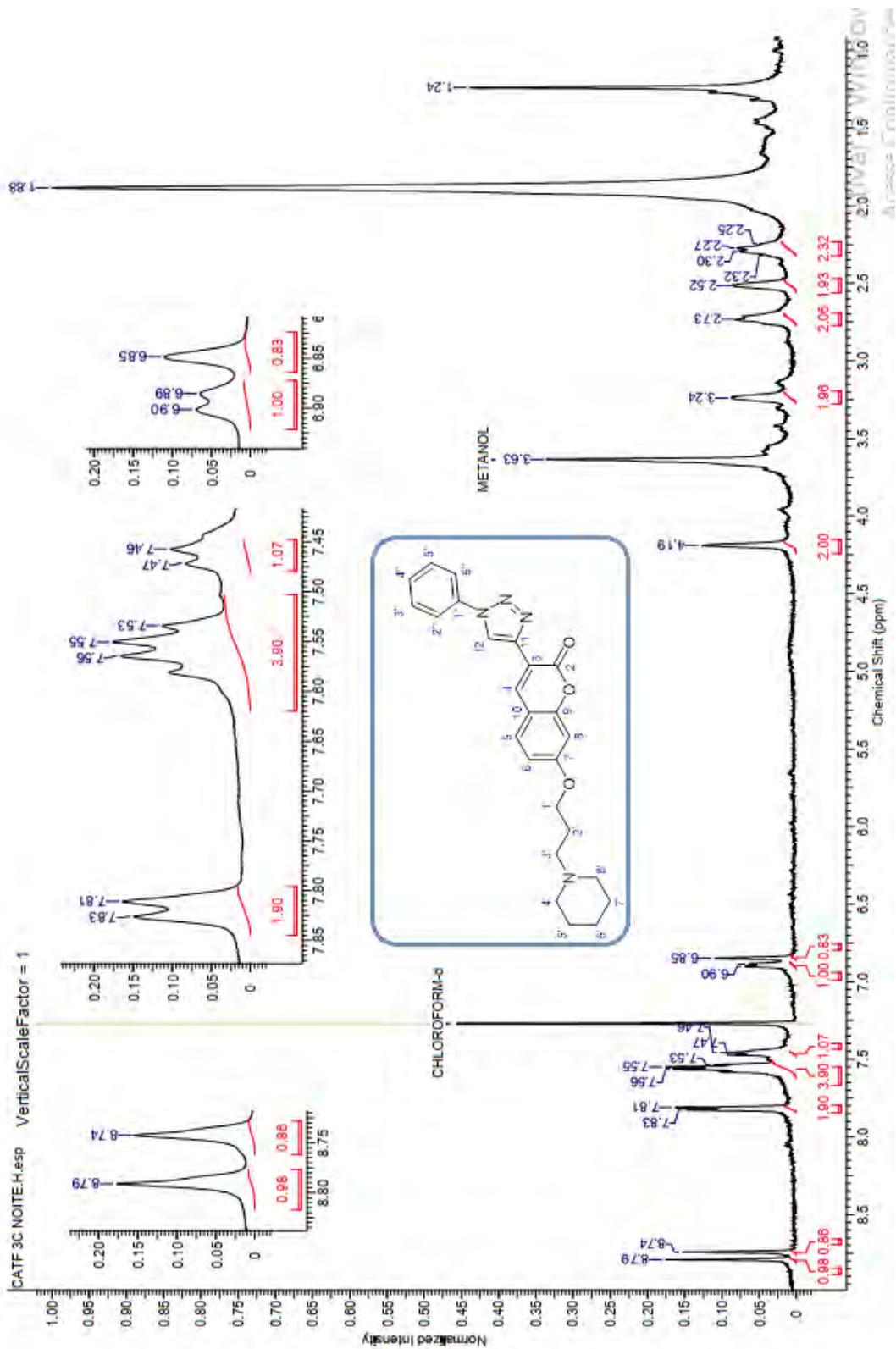
Anexo 36: Espectro de RMN ¹³C do composto (31e) em CDCl₃ a 125 MHz



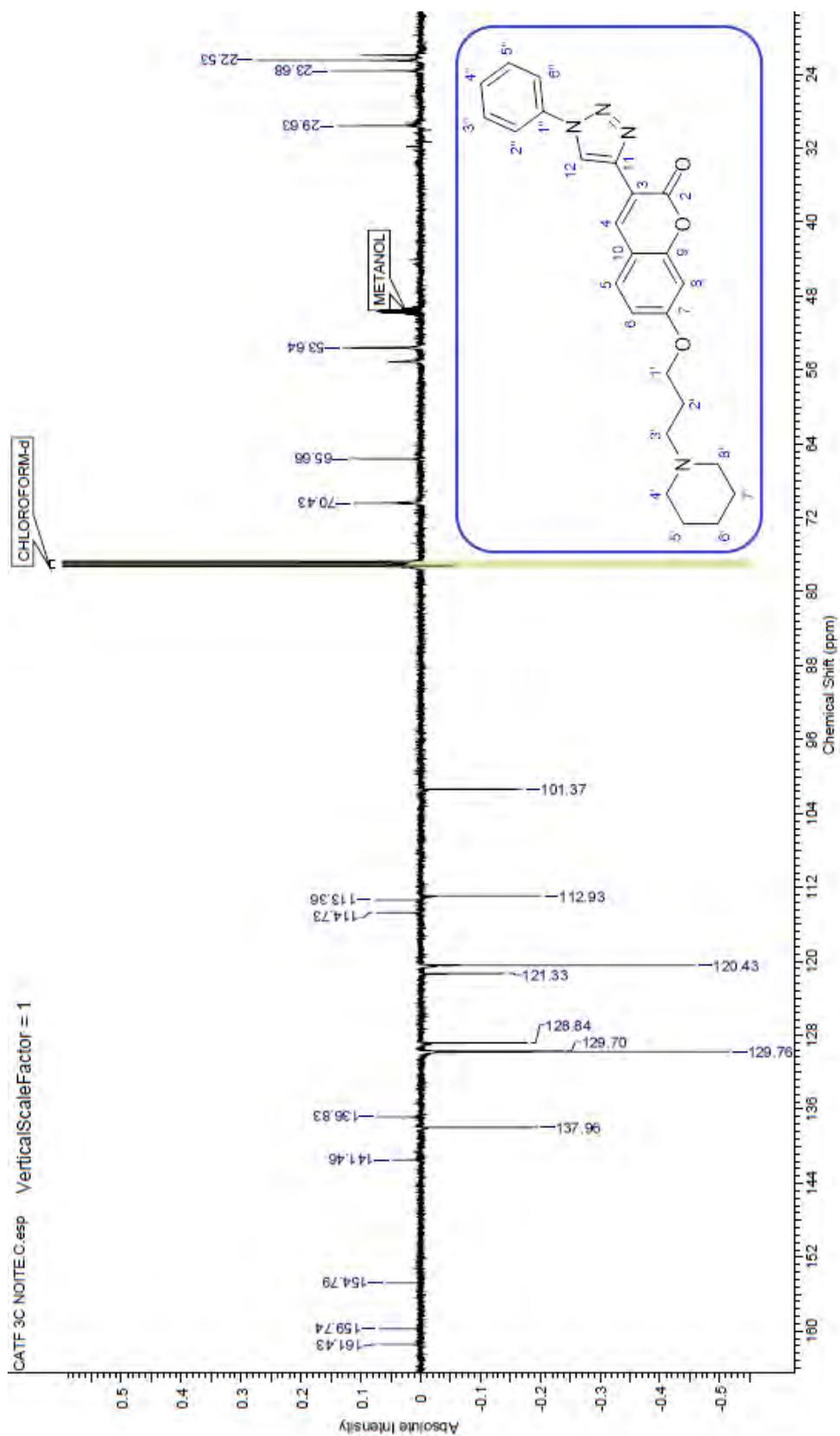
Anexo 38: Espectro de RMN ¹³C do composto (29a) em CDCl₃ a 125 MHz



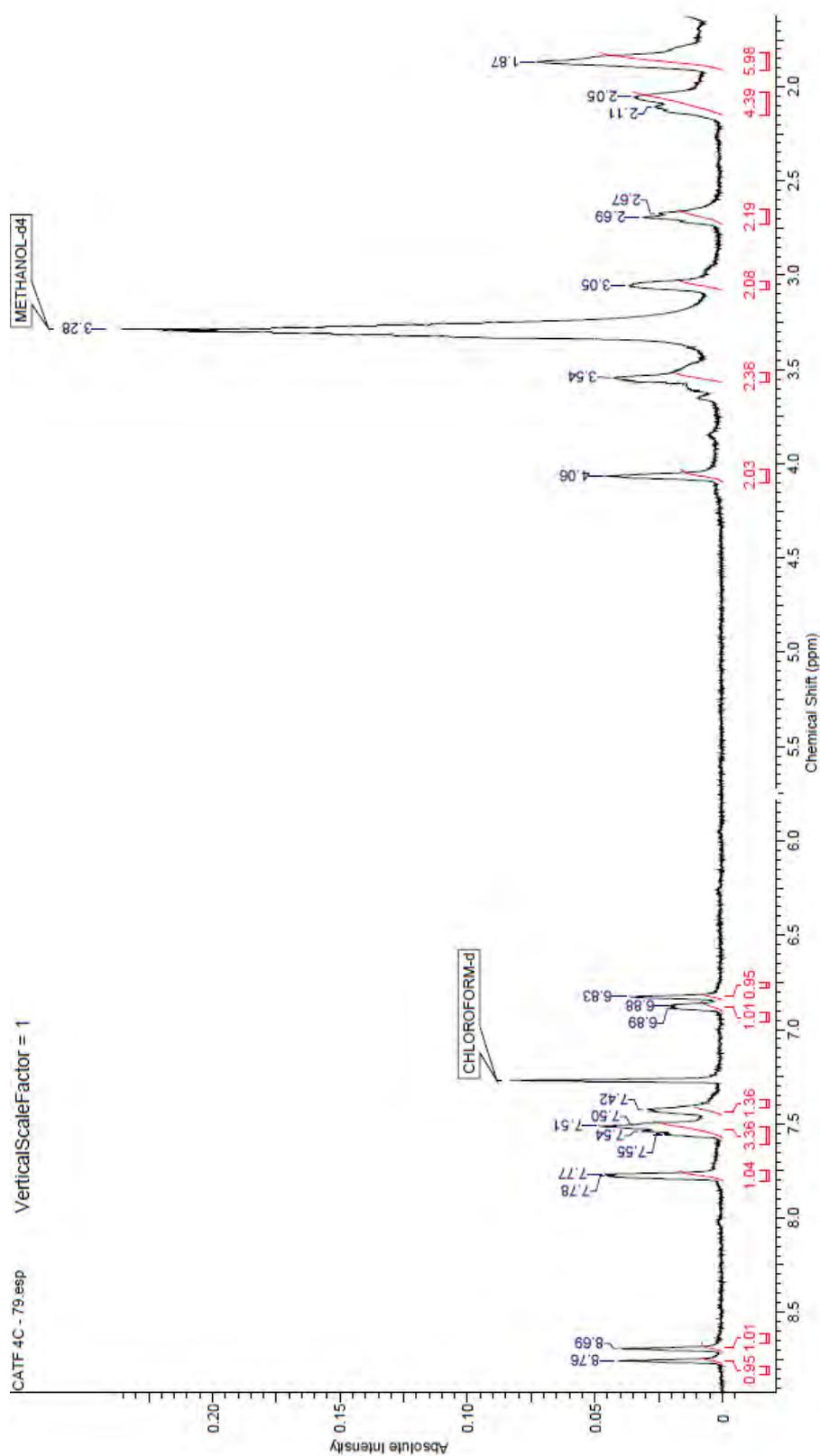
Anexo 39: Espectro de RMN ¹H do composto (29b) em CDCl₃ a 500 MHz



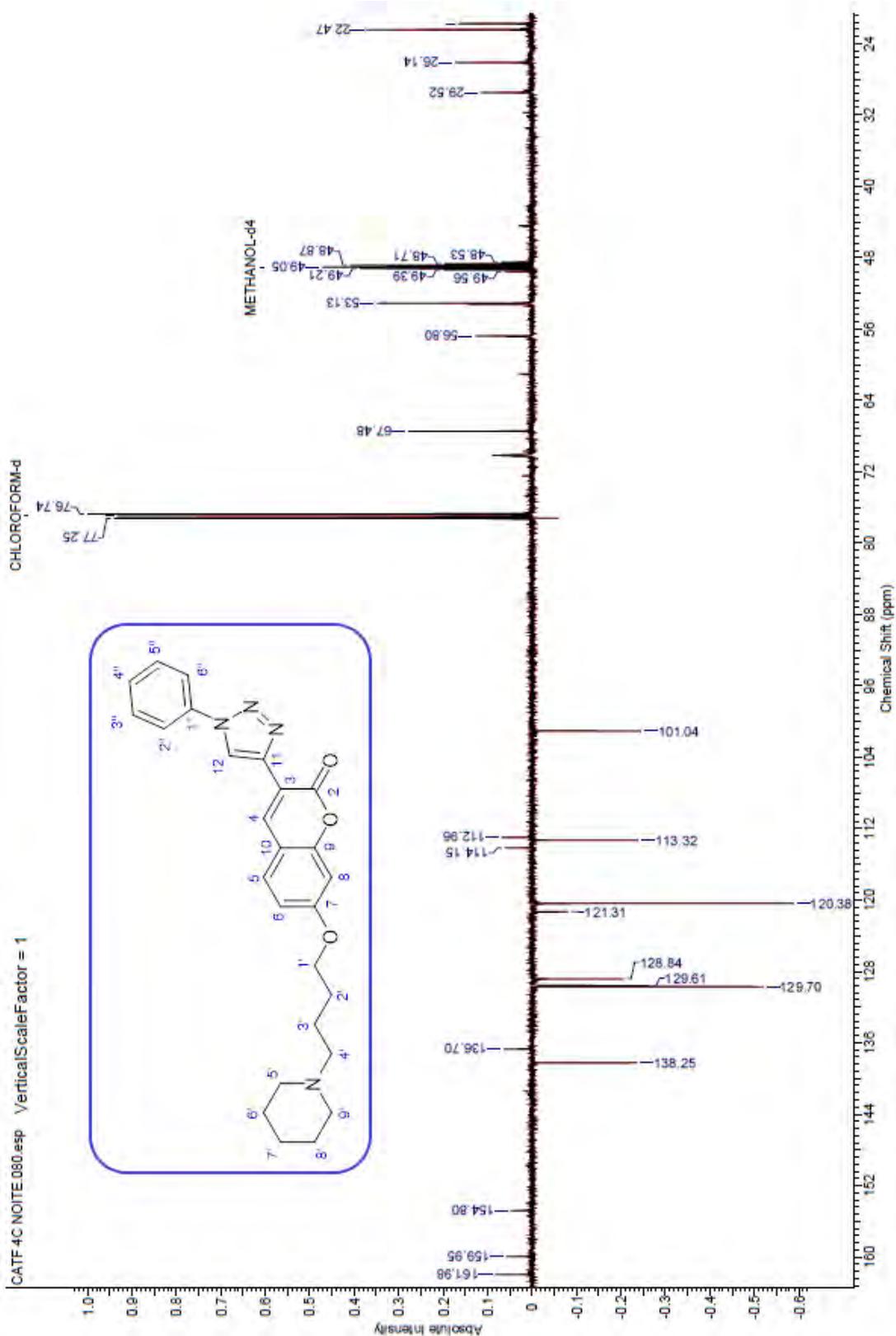
Anexo 40: Espectro de RMN ^{13}C do composto (29b) em CDCl_3 a 125 MHz



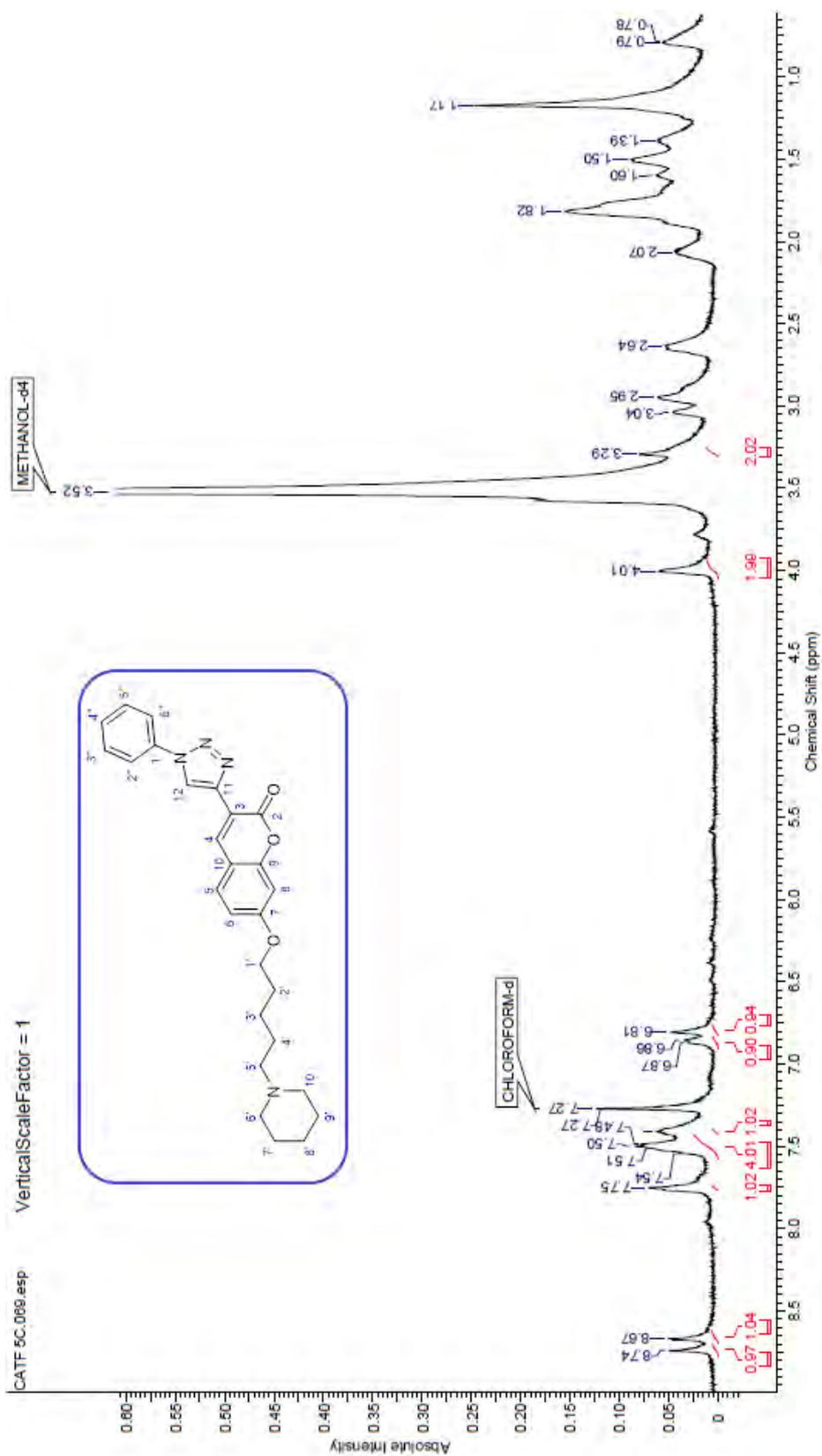
Anexo 41: Espectro de RMN ^1H do composto (29c) em CDCl_3 a 500 MHz



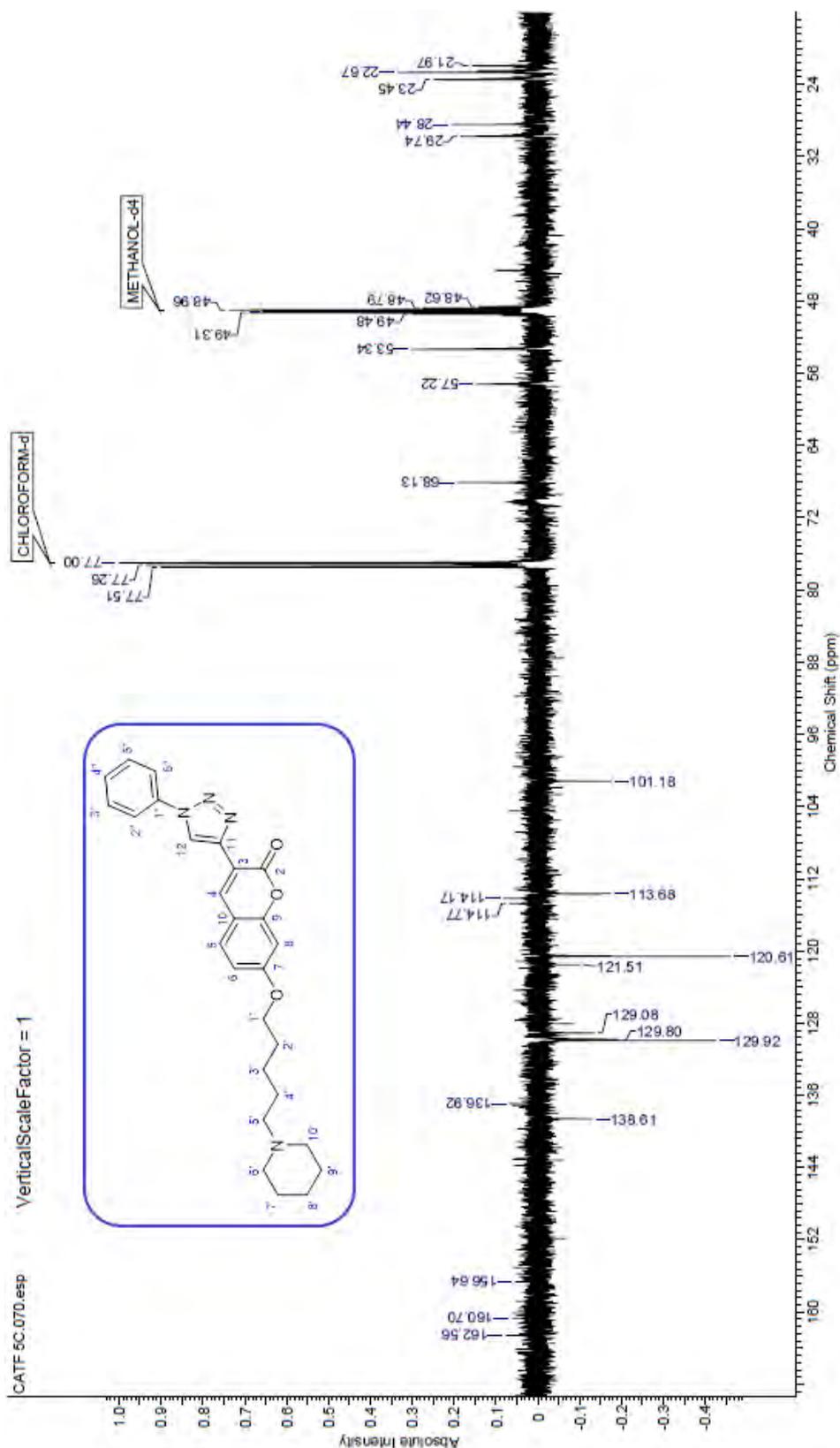
Anexo 42: Espectro de RMN ¹³C do composto (29c) em CDCl₃ a 125 MHz



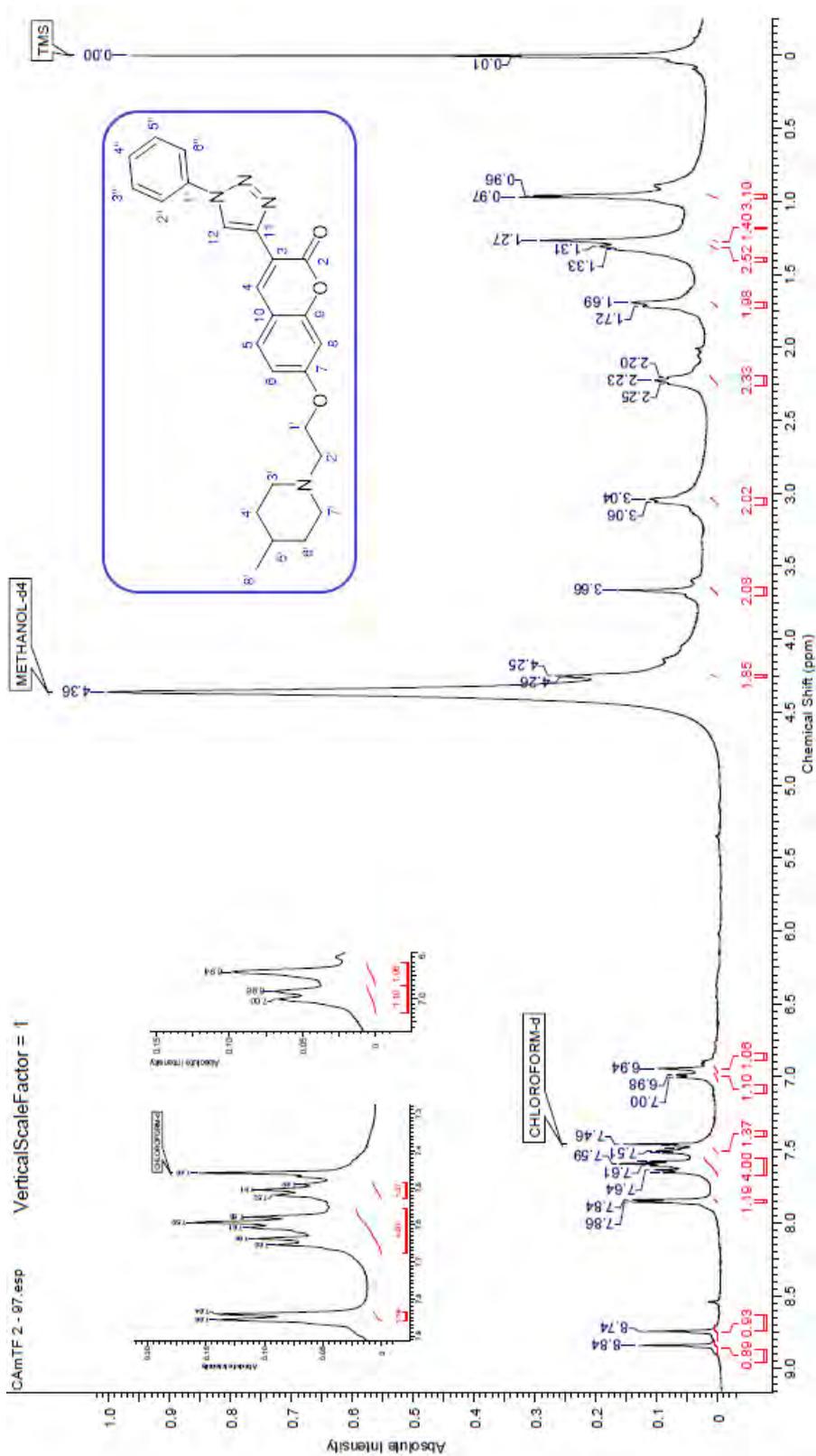
Anexo 43: Espectro de RMN ^1H do composto (29d) em CDCl_3 a 500 MHz



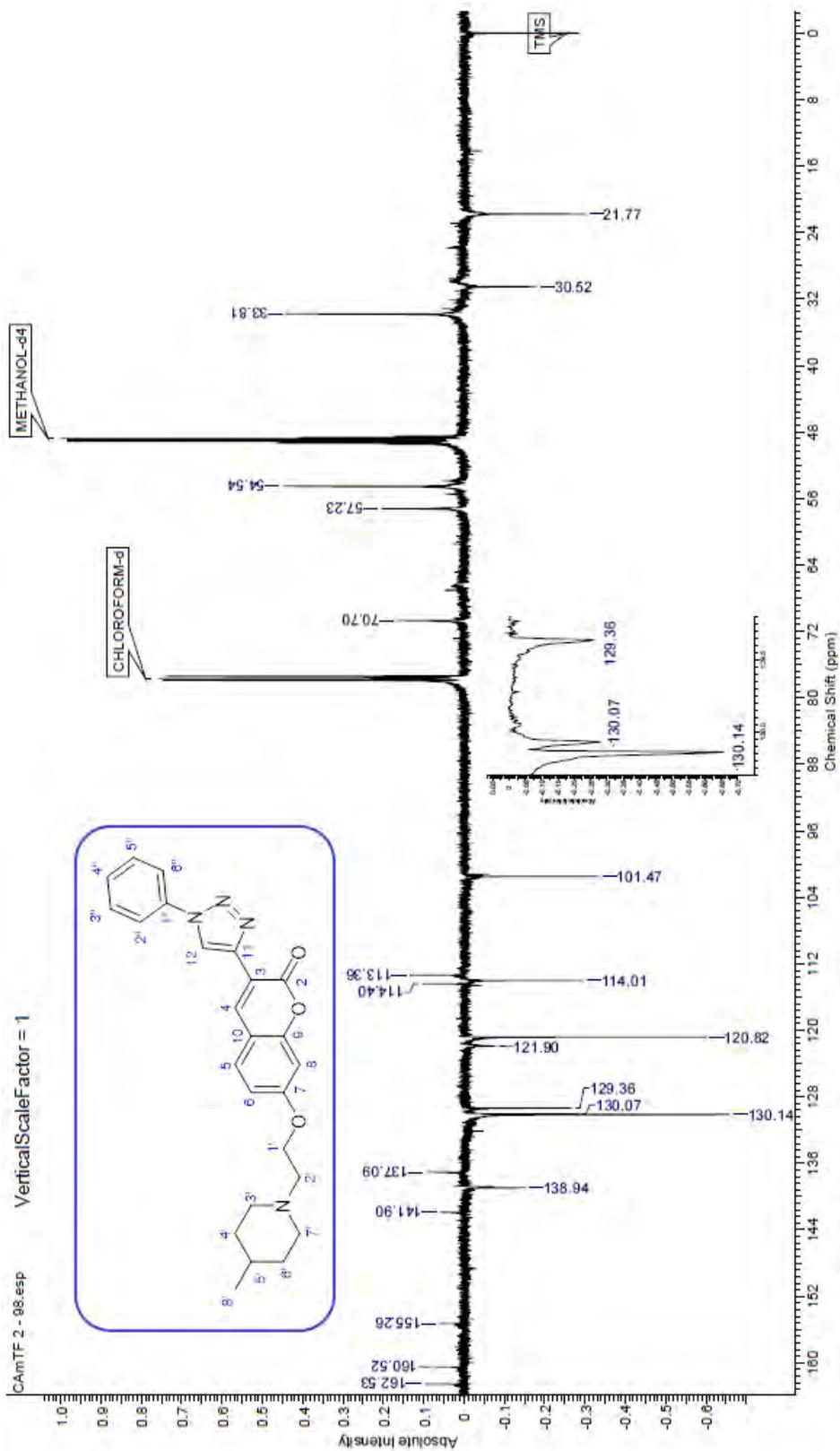
Anexo 44: Espectro de RMN ¹³C do composto (29d) em CDCl₃ a 125 MHz



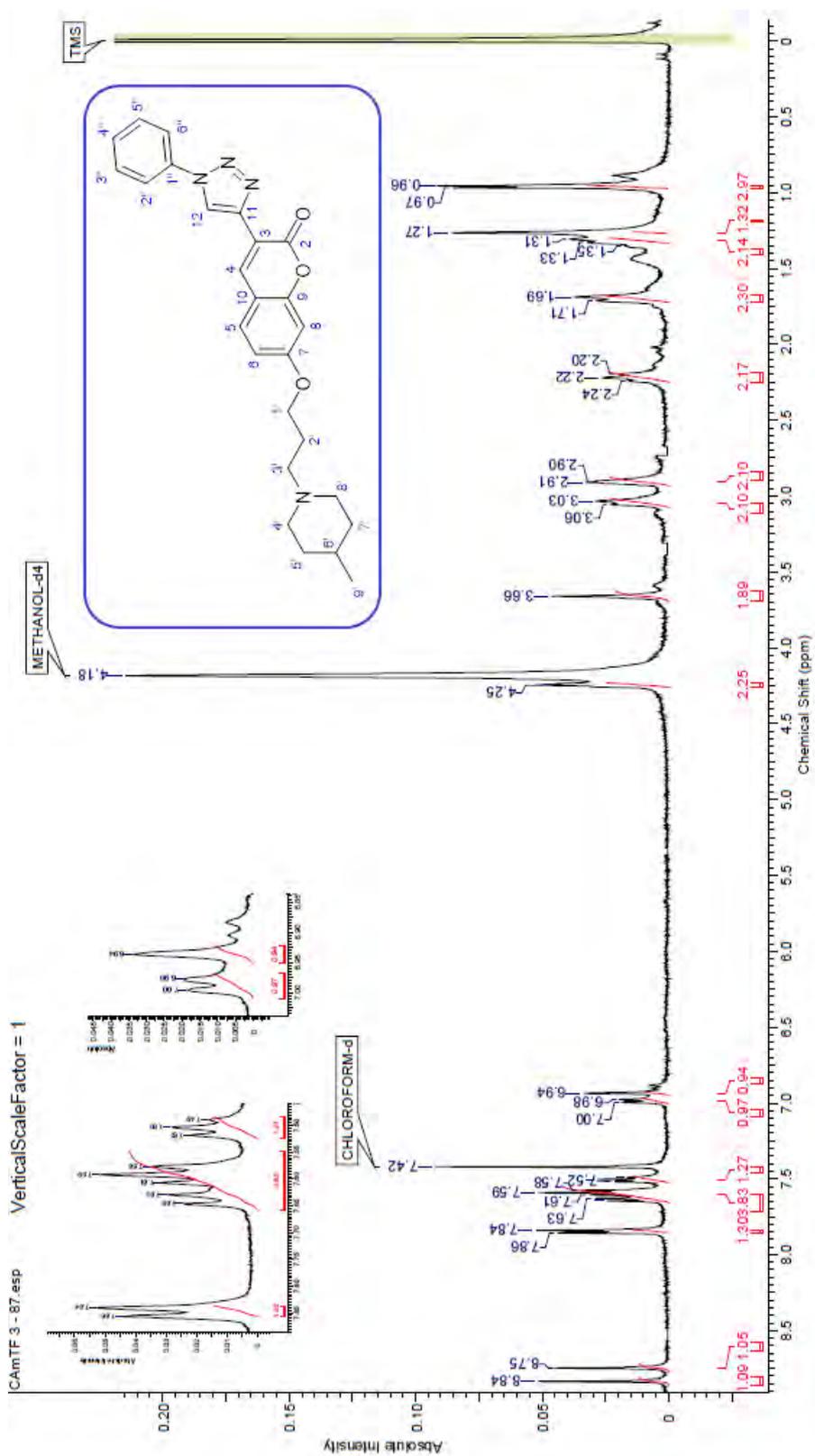
Anexo 45: Espectro de RMN ¹H do composto (29e) em CDCl₃ a 500 MHz



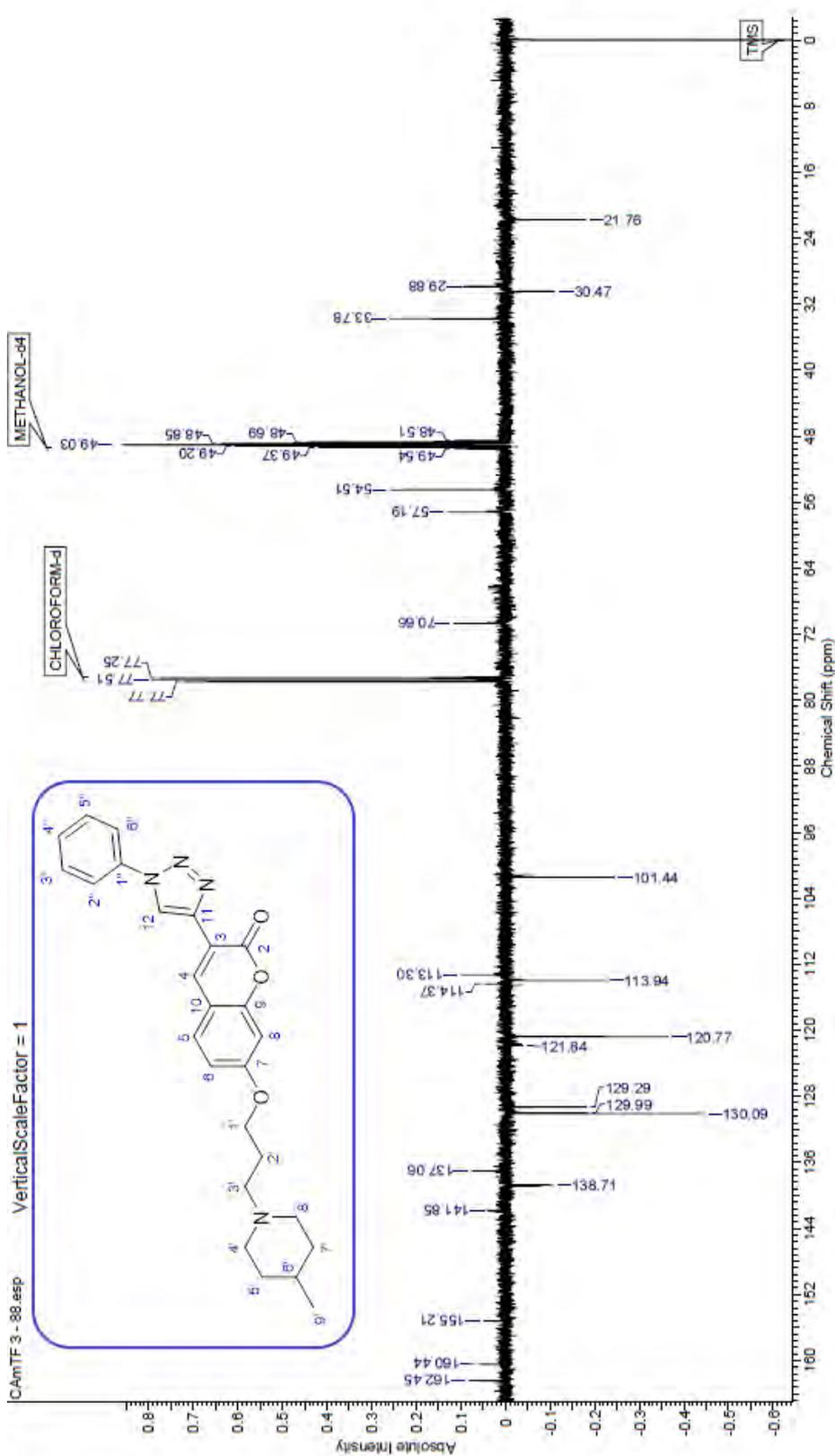
Anexo 46: Espectro de RMN ¹³C do composto (29e) em CDCl₃ a 125 MHz



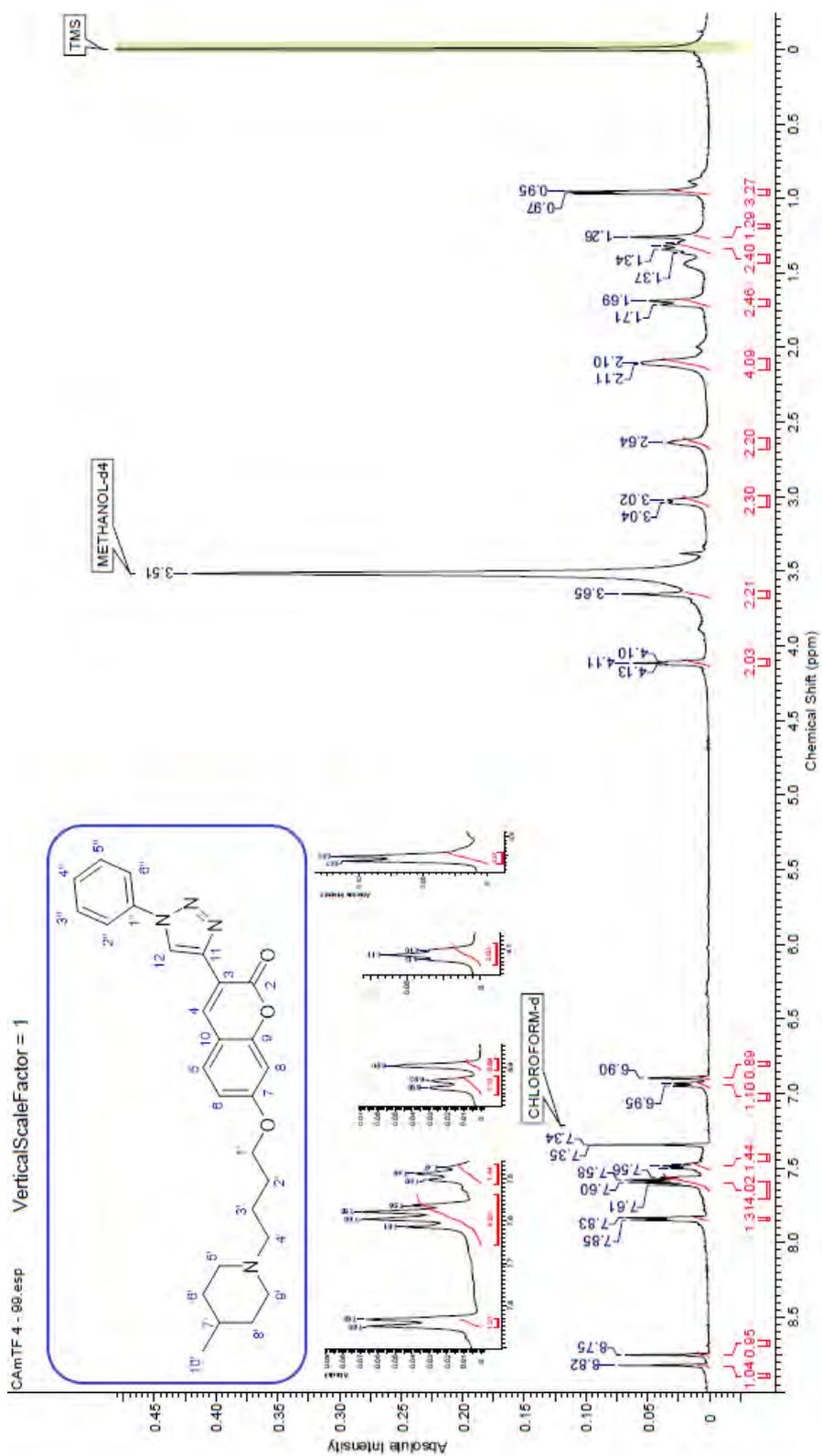
Anexo 47: Espectro de RMN ^1H do composto (29f) em CDCl_3 a 500 MHz



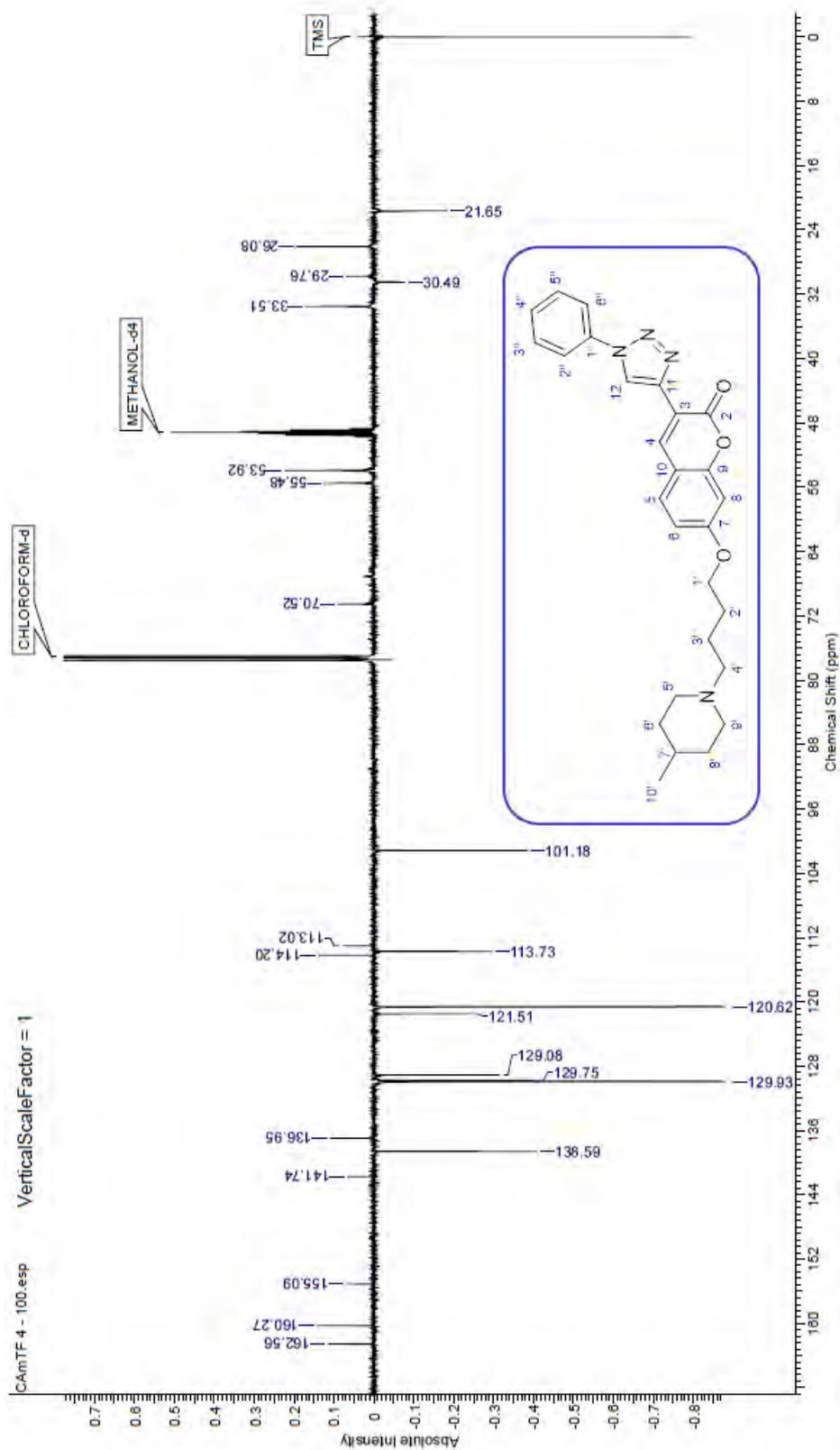
Anexo 48: Espectro de RMN ¹³C do composto (29f) em CDCl₃ a 125 MHz



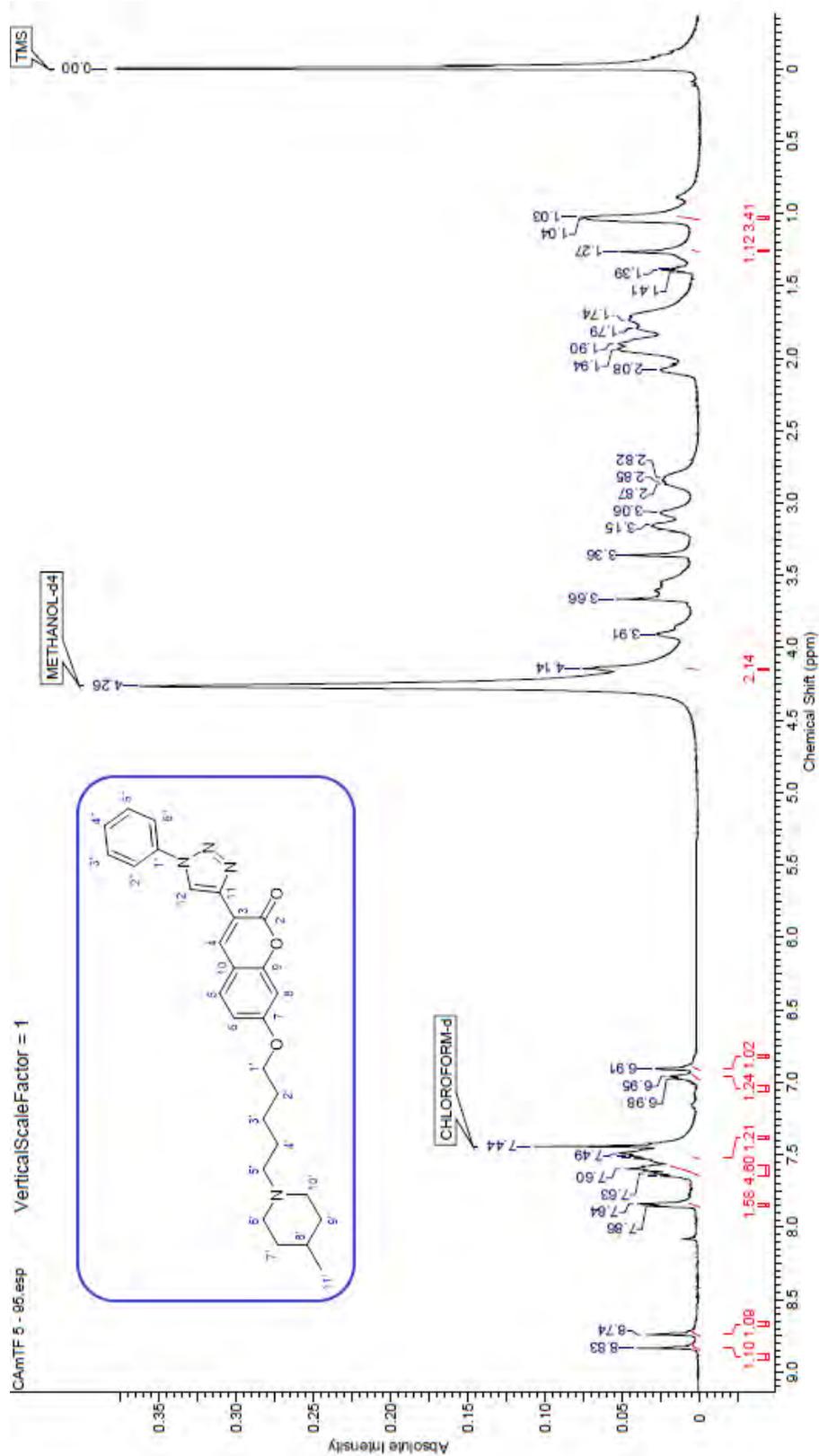
Anexo 49: Espectro de RMN ^1H do composto (29g) em CDCl_3 a 500 MHz



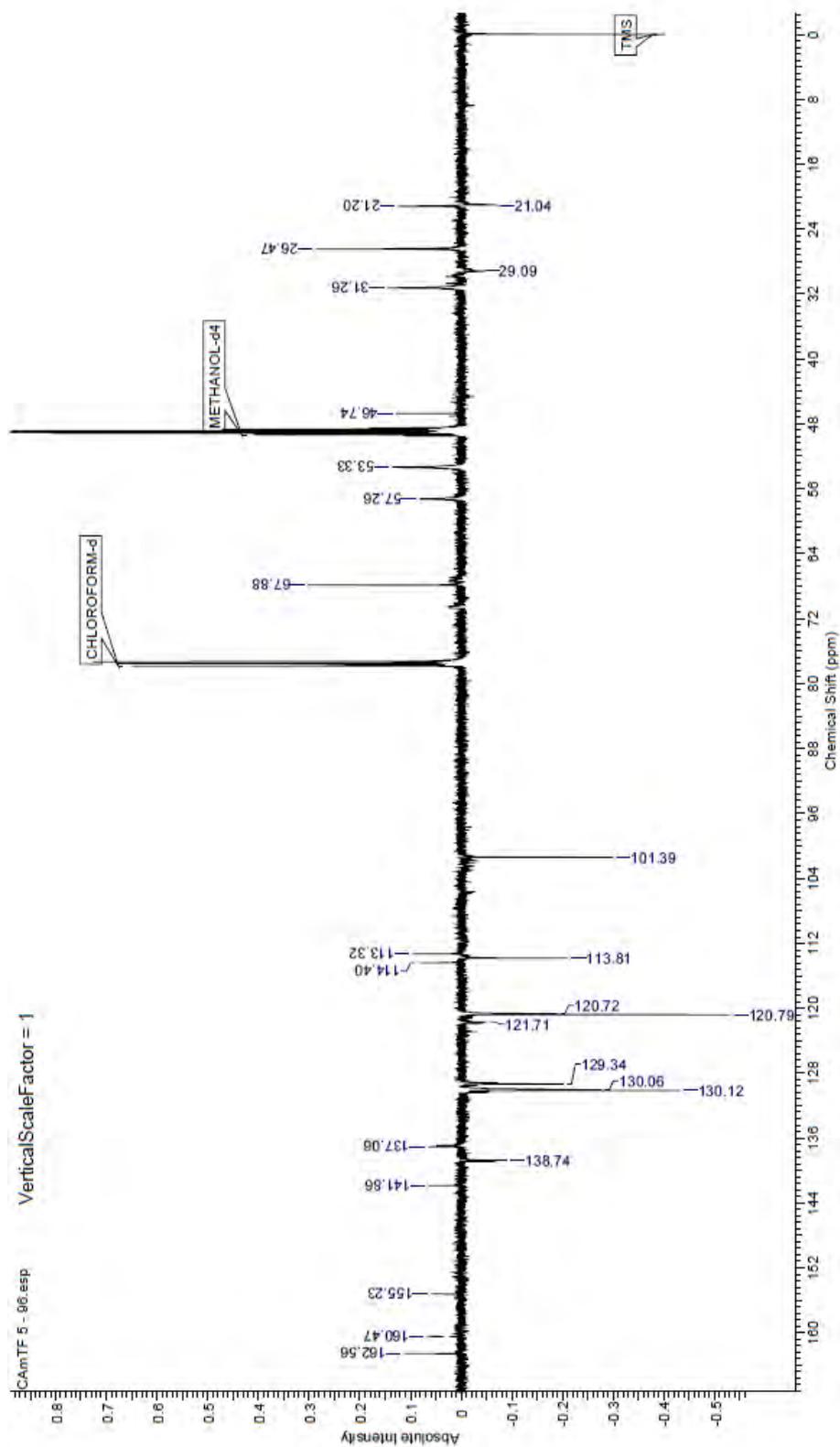
Anexo 50: Espectro de RMN ¹³C do composto (29g) em CDCl₃ a 125 MHz



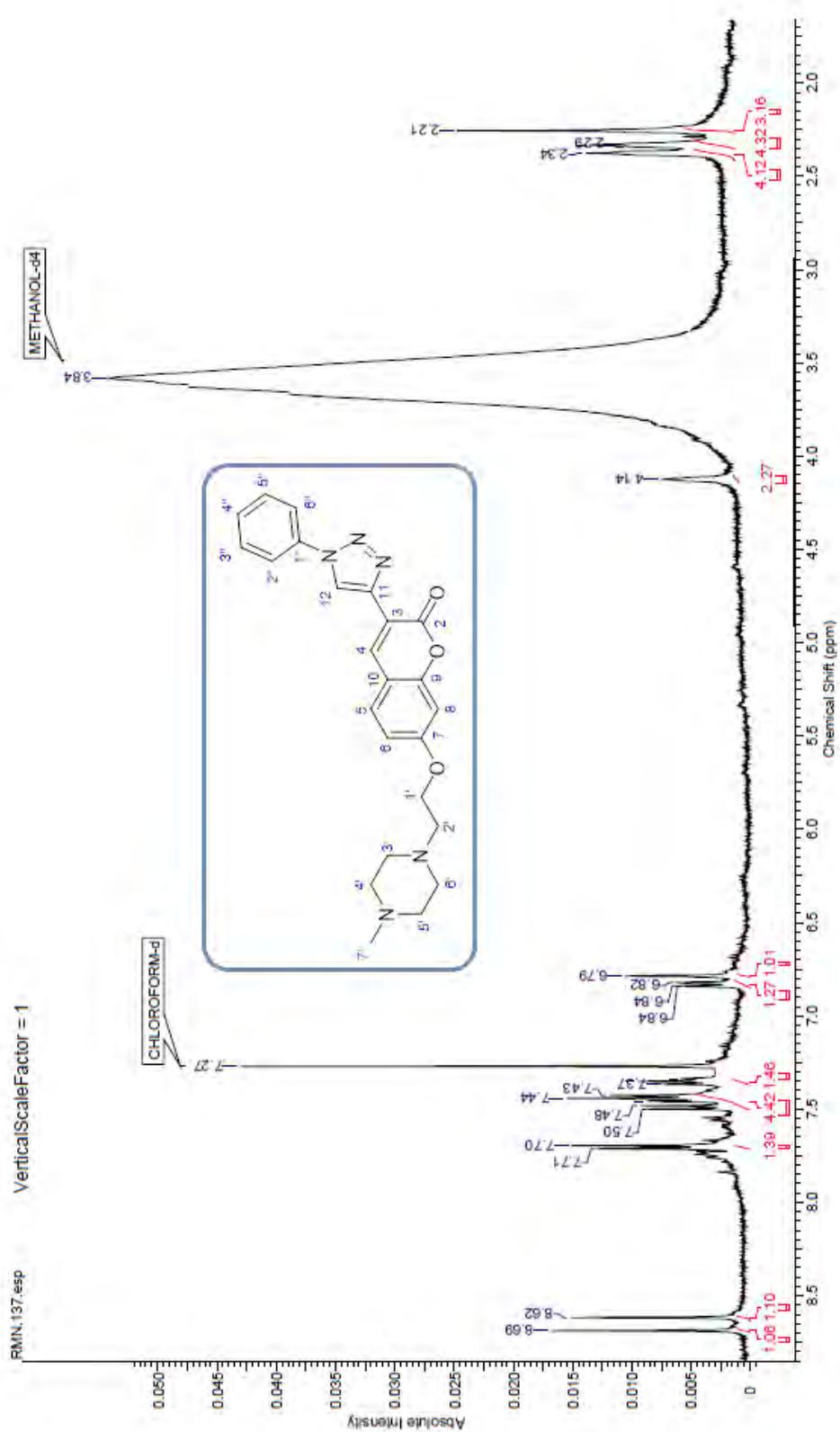
Anexo 51: Espectro de RMN ¹H do composto (29h) em CDCl₃ a 500 MHz



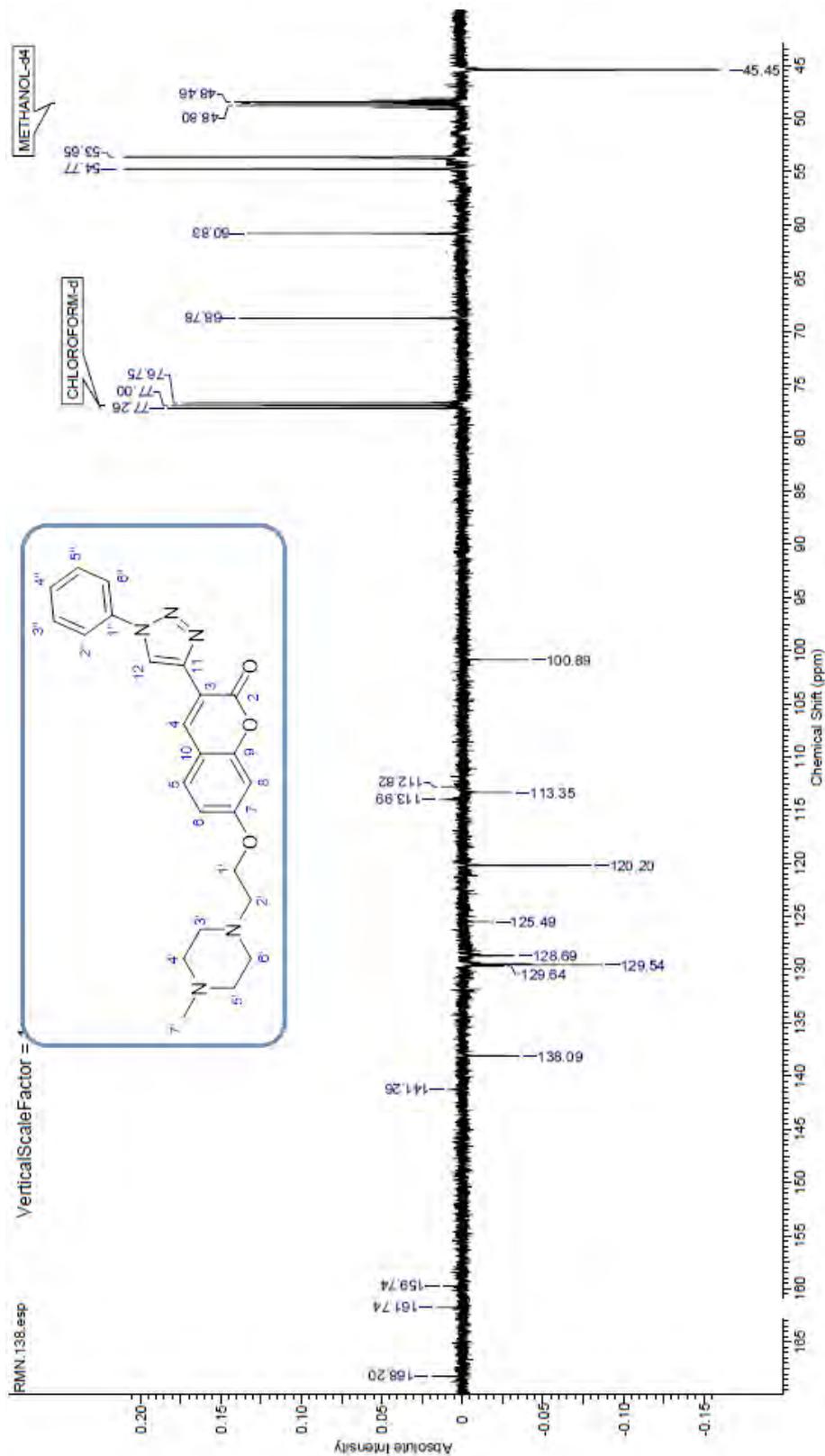
Anexo 52: Espectro de RMN ^{13}C do composto (29h) em CDCl_3 a 125 MHz



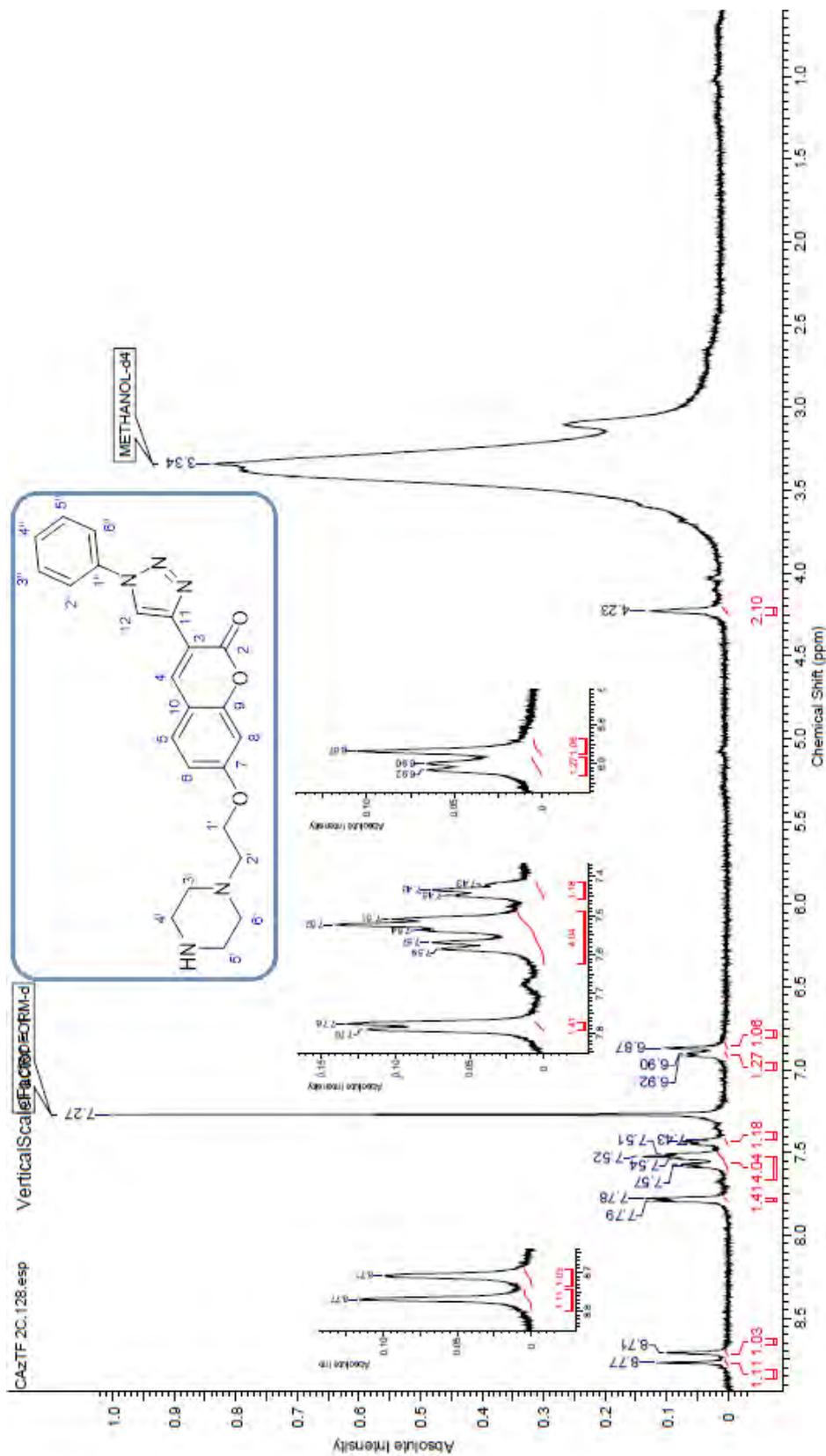
Anexo 53: Espectro de RMN ¹H do composto (29i) em CDCl₃ a 500 MHz



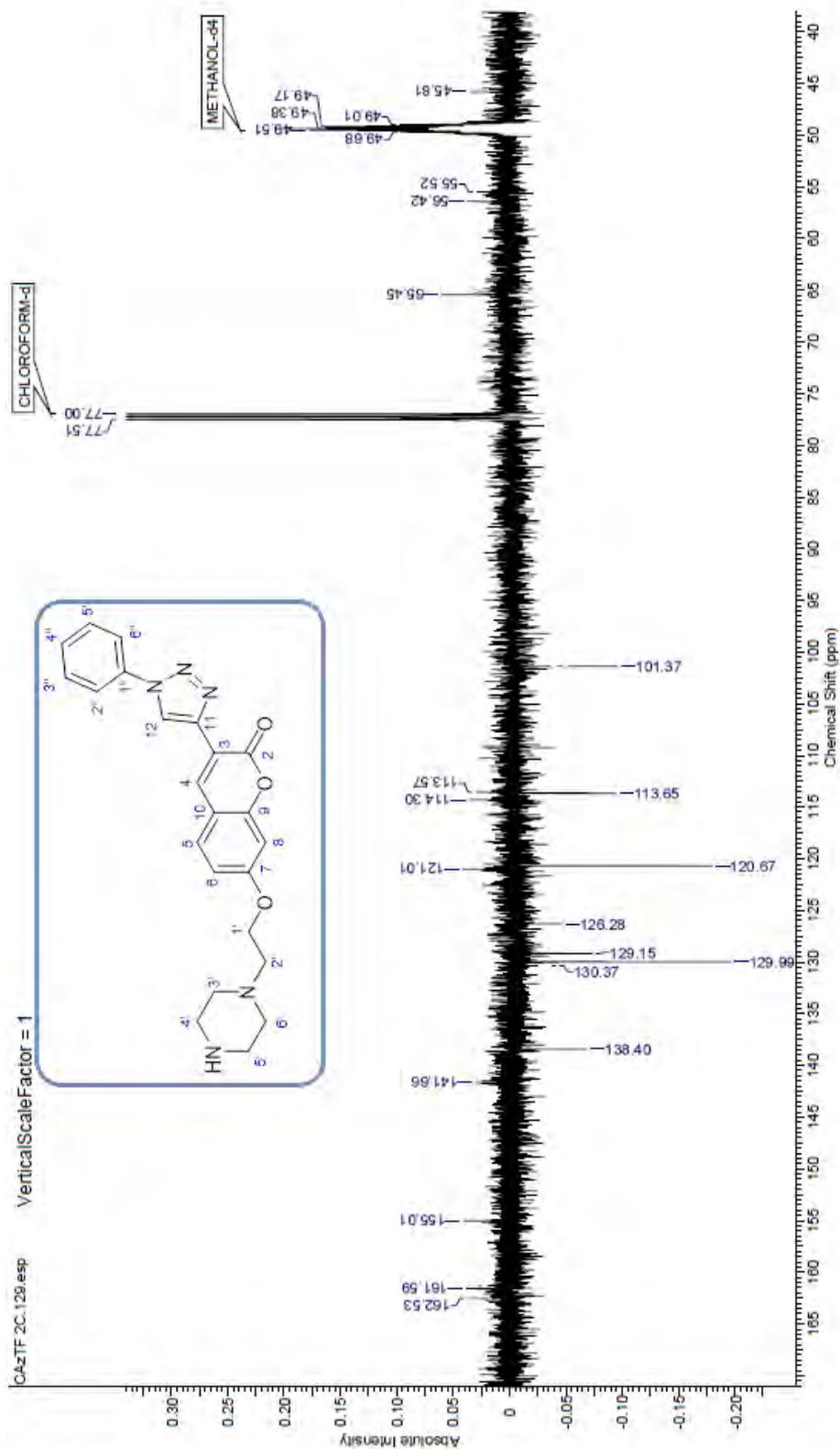
Anexo 54: Espectro de RMN ¹³C do composto (29i) em CDCl₃ a 125 MHz



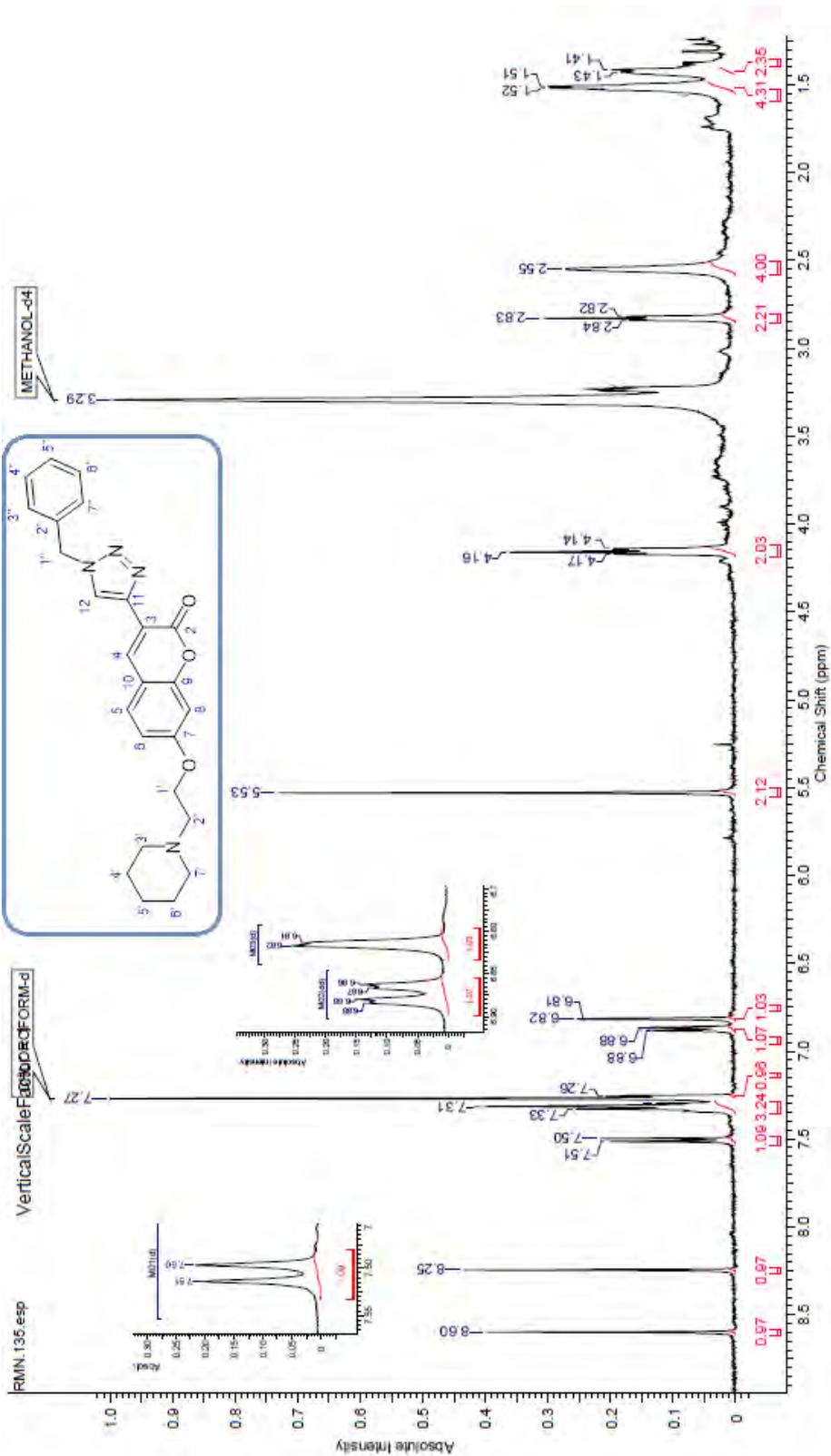
Anexo 55: Espectro de RMN ¹H do composto (29j) em CDCl₃ a 500 MHz



Anexo 56: Espectro de RMN ¹³C do composto (29j) em CDCl₃ a 125 MHz



Anexo 57: Espectro de RMN ¹H do composto (29i) em CDCl₃ a 500 MHz



Anexo 58: Espectro de RMN ¹³C do composto (29h) em CDCl₃ a 125 MHz

