

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

TESE

**Otimização Estrutural de 7-((piperidin-1-il)alcoxi)-cumarinas:
Homologação e Construção de Heterociclos Miméticos Visando o
Desenvolvimento de Novos Inibidores Mistos de Colinesterases**

Nathalia Fonseca Nadur

2025



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO

INSTITUTO DE QUÍMICA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

OTIMIZAÇÃO ESTRUTURAL DE 7-((PIPERIDIN-1-IL)ALCOXI)-CUMARINAS: HOMOLOGAÇÃO E CONSTRUÇÃO DE HETEROCICLOS MIMÉTICOS VISANDO O DESENVOLVIMENTO DE NOVOS INIBIDORES MISTOS DE COLINESTERASES

NATHALIA FONSECA NADUR

Sob orientação do professor
Dr. Arthur Eugen Kümmerle

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

Seropédica, RJ
Julho de 2025

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

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

N126o Nadur, Nathalia Fonseca, 1995-
Otimização Estrutural de 7-((piperidin-1-il)alcoxi)
cumarinas: Homologação e Construção de Heterociclos
Miméticos Visando o Desenvolvimento de Novos
Inibidores Mistos de Colinesterases / Nathalia
Fonseca Nadur. - Seropédica, 2025.
288 f.

Orientador: Arthur Eugen Kümmerle.
Tese(Doutorado). -- Universidade Federal Rural do Rio
de Janeiro, Programa de Pós-graduação em Química, 2025.

1. Alzheimer. 2. Inibidores colinesterásicos. 3.
Multialvo. I. Kümmerle, Arthur Eugen , 1979-, orient.
II Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro.
Programa de Pós-graduação em Química III. Título.

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

NATHALIA FONSECA NADUR

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

TESE APROVADA EM 10/07/2025

Arthur Eugen Kummerle Dr. UFRRJ
(Orientador)

Aurea Echevarria Aznar Neves Lima Dra. UFRRJ

Guilherme da Silva Caleffi Dr. UFRJ

Carlos Mauricio Rabello de Sant'Anna Dr. UFRRJ

Pedro de Sena Murteiro Pinheiro Dr. UFRJ



TERMO Nº 590/2025 - PPGQ (12.28.01.00.00.00.60)

(Nº do Protocolo: NÃO PROTOCOLADO)

(Assinado digitalmente em 14/07/2025 19:01)

ARTHUR EUGEN KUMMERLE
PROFESSOR DO MAGISTERIO SUPERIOR
DQO (11.39.00.23)
Matrícula: ###004#0

(Assinado digitalmente em 11/07/2025 14:42)

AUREA ECHEVARRIA AZNAR NEVES LIMA
PROFESSOR DO MAGISTERIO SUPERIOR
DQO (11.39.00.23)
Matrícula: ###71#9

(Assinado digitalmente em 11/07/2025 14:50)

CARLOS MAURICIO RABELLO DE SANT ANNA
PROFESSOR DO MAGISTERIO SUPERIOR
DQF (11.39.00.25)
Matrícula: ###204#4

(Assinado digitalmente em 11/07/2025 11:25)

GUILHERME DA SILVA CALEFFI
ASSINANTE EXTERNO
CPF: ###.###.670-##

(Assinado digitalmente em 11/07/2025 11:25)

PEDRO DE SENA MURTEIRA PINHEIRO
ASSINANTE EXTERNO
CPF: ###.###.637-##

Visualize o documento original em <https://sipac.ufrrj.br/documentos/> informando seu número: **590**, ano: **2025**, tipo: **TERMO**, data de emissão: **11/07/2025** e o código de verificação: **a45cbbeffe**

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar, gostaria de agradecer a Deus pela oportunidade de ter concluído esta etapa importante da minha trajetória acadêmica.

Aos meus pais, Ana e Carlos Nadur, meu profundo e eterno agradecimento. Obrigado pelo apoio incondicional, pelo incentivo constante aos meus estudos e pela confiança depositada em minhas escolhas. Vocês foram meu alicerce fundamental durante toda a minha trajetória. Seu amor e dedicação foram essenciais.

Aos meus queridos irmãos, Rodrigo e Letícia, meu muito obrigado. Vocês foram presença constante, com incentivo e apoio emocional sincero. Obrigada por estarem sempre ao meu lado, pela parceria e por todo o carinho.

Ao meu namorado, Dennison, agradeço o companheirismo. Obrigada por estar ao meu lado nos momentos mais difíceis, pelo carinho constante e por trazer tanta leveza quando mais precisei. Sua presença fez toda a diferença e tornou este caminho muito mais suportável e feliz.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Arthur Eugen Kümmerle, minha sincera gratidão. Agradeço profundamente por todo o conhecimento compartilhado, pela dedicação e pela orientação ao longo da minha vida acadêmica. Sua paciência, compreensão e palavras de incentivo nos momentos mais difíceis foram fundamentais para que eu superasse os desafios.

Aos meus amigos do LaDMol-QM, que acompanharam de perto o desenvolvimento desta pesquisa e sempre me auxiliaram quando necessário. Em especial, à Larissa, Marina, Lucas, Luanny, Thiago, Manuelle, Atila, Daniela, Thaís, Clara, Vitor I e Vitor II: obrigado por todos os momentos compartilhados – de alegria, ansiedade e, acima de tudo, de muito companheirismo. Esta jornada foi mais leve e significativa com vocês.

Agradeço aos professores do programa de pós-graduação, pela dedicação em ensinar.

Aos professores membros da banca examinadora, meu agradecimento por aceitarem o convite e dedicarem parte do seu valioso tempo à leitura e avaliação deste 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

NADUR, Nathalia Fonseca. **Otimização Estrutural de 7-((piperidin-1-il)alcoxi)-cumarinas: Homologação e Construção de Heterociclos Miméticos Visando o Desenvolvimento de Novos Inibidores Mistos de Colinesterases: Seropédica, RJ. 2025. 288p Tese (Doutorado em Química). Instituto de Química, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2025.**

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 envolvendo ligantes multialvo (MTDLs), como inibidores mistos da enzima acetilcolinesterase (AChE) que atuam inibindo indiretamente a agregação do β -amiloide ($A\beta$) ou que combinem a inibição das colinesterases (ChEs) com outros mecanismos de ação vem sendo apontado como de grande valia para o tratamento da DA devido à possibilidade de se modular simultaneamente alvos que contribuem para a instalação e manutenção da doença. Recentemente, nosso grupo de trabalho (LaDMol-QM) descreveu duas classes de cumarinas (**24** e **25a-b**) que possuíam atividade inibitória mista, atuando no sítio catalítico (CAS) e periférico (PAS) ao mesmo tempo, com valores de CI_{50} de até 20 nM sobre a AChE e seletividades de até 354 vezes sobre a butirilcolinesterase (BChE). Tendo como base o mapa farmacofórico dessas séries, este trabalho tem como objetivo geral o planejamento, síntese e a avaliação farmacológica de uma série de benzil-triazol-cumarinas e de heterociclos miméticos de cumarinas como possíveis agentes inibidores da enzima AChE de forma mista. Foram propostas três séries, sendo a primeira uma otimização da série triazol-cumarina, com a síntese de novos derivados benzílicos (série A), e as séries com os heterociclos miméticos quinolinona (série B) e aminoquinazolina (série C). A síntese da série A, homóloga superior da série **25**, foi concluída após dez etapas sintéticas, levando a obtenção de dez novos derivados da série triazol-cumarina (**26a-j**), em que todos os compostos foram capazes de inibir a AChE com valores de CI_{50} variando de 4,2 a 103,8 nM e seletividades de até 685 vezes frente a BChE. O estudo de ancoramento molecular mostrou consistência com os resultados do estudo de cinética enzimática de compostos triazol-cumarínicos, que os classifica como inibição do tipo mista. O potencial multialvo da série A foi evidenciado pelos resultados obtidos frente a hH_3R , MAO-A e MAO-B. A síntese da série B, bioisótero clássico da série **24**, foi concluída após seis etapas sintéticas, levando a obtenção de sete novos derivados da quinolinona (**58a-g**), que demonstraram um perfil de inibição dual das colinesterases (ChEs). Os estudos de ancoramento molecular permitiram elucidar os distintos mecanismos de inibição observados para os derivados da série B. A síntese da série C, bioisótero não-clássico da série **24**, foi realizada de forma convergente após a obtenção dos dois principais blocos de construção reacional, do fenol-2-aminoquinazolina e do cloridrato de cloroalquil piperidina, levando a obtenção de dois novos derivados da série aminoquinazolina (**67a-b**), que demonstraram ser capazes de inibir a BChE de forma seletiva. O estudo de ancoramento molecular mostrou consistência com os resultados do estudo de cinética enzimática, que os classifica como inibição do tipo mista.

Palavras-chave: Alzheimer. Inibidores colinesterásicos. Multialvo.

ABSTRACT

NADUR, Nathalia Fonseca. **Structural Optimization of 7-((piperidin-1-yl)alkoxy)-coumarins: Homologation and Construction of Mimetic Heterocycles Aiming at the Development of New Mixed Cholinesterase Inhibitors: Seropédica, RJ.** 2025. 288p Thesis (PhD in Chemistry). Institute of Chemistry, Federal Rural University of Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2025.

Alzheimer's disease (AD) is characterized by being a progressive and irreversible neurodegenerative disorder of memory and other cognitive functions, affecting occupational and social functioning. The use of compounds involving multitarget-directed ligands (MTDLs), such as mixed inhibitors of the enzyme acetylcholinesterase (AChE) that indirectly suppress aggregation of β -amyloid ($A\beta$) or combine cholinesterase (ChEs) inhibition with other mechanisms, has been observed as a high-value objective for AD treatment due to the possibility to inhibit simultaneously different targets that contribute to the onset and maintenance of the disease. Recently, our research group (LaDMol-QM) described two classes of coumarins (**24** and **25a-b**) that exhibited mixed inhibitory activity, acting on at the catalytic site (CAS) and at the peripheral site (PAS) simultaneously, with IC_{50} values of up to 20 nM on AChE and selectivities of up to 354-fold over butyrylcholinesterase (BChE). Based on the pharmacophoric map of these series, this work has as its general objective the design, synthesis, and pharmacological evaluation of a series of benzyl-triazole-coumarins and coumarin mimetic heterocycles as possible mixed inhibitors of the AChE enzyme. Three series were proposed: the first, an optimization of the triazole-coumarin series involving the synthesis of new benzyl derivatives (series A); the second, a series with mimetic heterocycles, including quinolinone (series B) and aminoquinazoline (series C). The synthesis of series A, a superior homolog of series **25**, was completed after ten synthetic steps, leading to the production of ten new derivatives of the triazole-coumarin series (**26a-j**), in which all compounds were able to inhibit AChE with IC_{50} values ranging from 4.2 to 103.8 nM and selectivities of up to 685-fold against BChE. The molecular docking study showed consistency with the results of the enzymatic kinetics study of triazole-coumarin compounds, which classified them as mixed-type inhibition. The multitarget potential of series A was demonstrated by the results obtained against hH_3R , MAO-A, and MAO-B. The synthesis of series B, a classical bioisostere of series **24**, was completed after six synthetic steps, leading to the production of seven new quinolinone derivatives (**58a-g**), which demonstrated a dual inhibition profile of cholinesterases (ChEs). Molecular docking studies elucidated the distinct inhibition mechanisms observed for the B series derivatives. The synthesis of the C series, a non-classical bioisostere of the **24** series, was performed in a convergent manner after obtaining the two main reaction building blocks, phenol-2-amino quinazoline and chloroalkyl piperidine hydrochloride, leading to the production of two new derivatives of the amino quinazoline series (**67a-b**), which were shown to be capable of inhibiting BChE selectively. The molecular docking study showed consistency with the results of the enzyme kinetics study, which classified them as mixed-type inhibition.

Keywords: Alzheimer, cholinesterase inhibitors. multitarget.

INDICE DE ESQUEMAS

Esquema 1. Análise retrossintética para obtenção dos compostos planejados da série A.	30
Esquema 2. Obtenção da 3-bromo-cumarinas substituídas (34a-b).....	31
Esquema 3. Esquema de intermediários proposto para a formação dos compostos 3-bromo-7-(bromoalcoxi)cumarínicos (34a-b).....	32
Esquema 4. Obtenção dos intermediários chave (29a-b).....	33
Esquema 5. Esquema de intermediário proposto para reação acoplamento de Sonogashira para obtenção de 7-(bromoalcoxi)-3-((trimetilsilil)etenil)-cumarinas (42a-b) (Adaptado de (Sonogashira, 2002)).	35
Esquema 6. Síntese dos álcoois benzílicos (32a-h).....	36
Esquema 7. Esquema de intermediários proposto para a formação dos derivados de álcool benzílico (32a-h) (Adaptado de (Clayden; Greeves; Warren, 2012)).	37
Esquema 8. Síntese dos brometos de benzila (31a-h).....	37
Esquema 9. Esquema de intermediários proposto para a formação dos derivados de brometo de benzila (31a-h) (Adaptado de (Clayden; Greeves; Warren, 2012)).	38
Esquema 10. Síntese das benzil azidas (30a-i).....	39
Esquema 11. Esquema de intermediários proposto para a formação dos derivados de benzil azida (30a-i) (Adaptado de (Smith, 2020)).	39
Esquema 12. Síntese das 3-(1-R-benzil-1H-1,2,3-triazol-4-il)-7-(bromoalcoxi)-cumarinas (27a-j).....	40
Esquema 13. Mecanismo da CuAAC envolvendo ambos os complexos mono e bis acetileto de Cu(I) X e XI respectivamente, proposto para a obtenção dos compostos 3-(1-R-benzil-1H-1,2,3-triazol-4-il)-7-(bromoalcoxi)-cumarinas (27a-j) (Adaptado de (JIN et al., 2015)).	42
Esquema 14. Síntese da 3-(1-R-benzil-1H-1,2,3-triazol-4-il)-7-(3-(piperidin-1-il)alcoxi)-cumarina (26a-j).....	46
Esquema 15. Esquema de intermediários proposto para formação dos derivados 3-(1-R-benzil-1H-1,2,3-triazol-4-il)-7-(3-(piperidin-1-il)alcoxi)-cumarina (26a-j)	46
Esquema 16. Reação observada no ensaio de Ellman.....	48
Esquema 17. Semelhanças entre os mapas farmacofóricos propostos de antagonistas H ₃ R (literatura) e iChE (LaDMol-QM).....	53
Esquema 18. Reação observada no ensaio de atividade inibitória dos compostos sobre as isoformas MAO A e MAO B.	55
Esquema 19. Análise retrossintética para obtenção dos compostos planejados da série B.....	75
Esquema 20. Obtenção da 7-hidroxi-3,4-diidroquinolin-2(1H)-ona (63)	76
Esquema 21. Esquema de intermediários proposto para a formação do composto 3-cloro-N-(3-metoxifenil)propanamida (62).	77
Esquema 22. Esquema de intermediários proposto para o fechamento do anel do composto 7-hidroxi-3,4-diidroquinolin-2(1H)-ona (63)	78
Esquema 23. Esquema de intermediários proposto para a O-desmetilação para formação do composto 7-hidroxi-3,4-diidroquinolin-2(1H)-ona (63).	78
Esquema 24. Síntese da 7-(bromoalcoxi)-3,4-diidroquinolin-2(1H)-ona (62a-b)	80
Esquema 25. Síntese da 7-(bromoalcoxi)-quinolin-2(1H)-one (60a-b)	82

Esquema 26. Esquema de intermediários proposto para a aromatização oxidativa para obtenção da 7-(bromoalcoxi)-quinolin-2(1 <i>H</i>)-one (60a-b) (Adaptado de (Chen et al., 2019)	83
Esquema 27. Síntese da 7-(bromoalcoxi)-3-(<i>R</i> -fenil)quinolin-2(1 <i>H</i>)-one (59a-g).....	84
Esquema 28. Esquema de intermediários proposto para a arilação radicalar mediada por KMnO ₄ /AcOH para obtenção da 7-(bromoalcoxi)-3-(<i>R</i> -fenil)quinolin-2(1 <i>H</i>)-ona (59a-g) (Adaptado de YUAN et al., 2016).....	86
Esquema 29. Síntese da 3-(<i>R</i> -fenil)-7-[(piperidin-1-il)alcoxi]quinolin-2(1 <i>H</i>)-ona (58a-g) ...	87
Esquema 30. Tautomeria amida-iminol em derivados de quinolinona.	96
Esquema 31. Análise retrossintética para obtenção dos compostos planejados da série C...	104
Esquema 32. Síntese da N-(3-metoxifenil)quinazolin-2-amina (71)	105
Esquema 33. Esquema de intermediários proposto para a formação do composto N-(3-metoxifenil)quinazolin-2-amina (71) (Adaptado de CAREY; SUNDBERG, 2002; CLAYDEN; GREEVES; WARREN, 2012).	105
Esquema 34. Síntese da 3-(quinazolin-2-ilamino)fenol (68)	108
Esquema 35. Esquema de intermediários proposto para a O-desmetilação para formação do composto 3-(quinazolin-2-ilamino)fenol (68).	109
Esquema 36. Síntese do cloridrato de 1-(cloroalquil)piperidina (69a-b).....	110
Esquema 37. Esquema de intermediários proposto para a obtenção do cloridrato de 1-(cloroalquil)piperidina (69a-b) (Adaptado de (Solomons; Fryhle; Snyder, 2022; Scotland; Vreugdenhil; Shetranjiwalla, 2025))	111
Esquema 38. Síntese da N-(3-((piperidin-1-il)alcoxi)fenil)quinazolin-2-amina (67a-b). ..	113
Esquema 39. Esquema de intermediários proposto para a O-alkilação do composto N-(3-((piperidin-1-il)alcoxi)fenil)quinazolin-2-amina (67a-b) (Adaptado de (Clayden; Greeves; Warren, 2012)).....	114
Esquema 40. Comparação entres as séries propostas.	121

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1. Características físicas, pontos de fusão e rendimentos dos álcoois benzílicos (32a-h).....	36
Tabela 2. Características físicas e rendimentos das benzil azidas (30a-i).....	39
Tabela 3. Características físicas, pontos de fusão e rendimentos das 3-(1-R-benzil-1H-1,2,3-triazol-4-il)-7-(bromoalcoxi)-cumarinas (27a-j)	40
Tabela 4. Características físicas, pontos de fusão e rendimentos das 3-(1-R-benzil-1H-1,2,3-triazol-4-il)-7-(3-(piperidin-1-il)alcoxi)-cumarina (26a-j).....	45
Tabela 5. Resultados obtidos nos ensaios inibição enzimática frente à EeAChE e EqBChE.	49
Tabela 6. Parâmetros cinéticos de 26a e 26c em AChE e BChE.	51
Tabela 7. Resultados de afinidade dos compostos frente ao Receptor de Histamina tipo 3 (H ₃ R) e comparação com resultados frente à AChE.	54
Tabela 8. Resultados de atividade inibitória dos compostos frente as isoformas MAO A e MAO B.	55
Tabela 9. Resultados de score e os respectivos valores de CI ₅₀ dos compostos avaliados.	57
Tabela 10. Resultados de score e os respectivos valores de CI ₅₀ dos compostos avaliados....	64
Tabela 11. Resultados de score e os respectivos valores de Ki dos compostos avaliados.	67
Tabela 12. Resultados de score e os respectivos valores de CI ₅₀ dos compostos avaliados....	69
Tabela 13. Parâmetros-chave ADME.	74
Tabela 14. Características físicas, pontos de fusão e rendimentos da 7-(bromoalcoxi)-3,4-diidroquinolin-2(1H)-ona (62a-b).	80
Tabela 15. Características físicas, pontos de fusão e rendimentos da 7-(bromoalcoxi)-quinolin-2(1H)-one (60a-b).....	82
Tabela 16. Características físicas e rendimentos da 7-(bromoalcoxi)-3-(R-fenil)quinolin-2(1H)-ona (59a-g).....	85
Tabela 17. Características físicas e rendimentos das 3-(R-fenil)-7-((piperidin-1-il)alcoxi)quinolin-2(1H)-ona (58a-g)	87
Tabela 18. Resultados obtidos nos ensaios inibição enzimática frente à EeAChE e EqBChE.	90
Tabela 19. Parâmetros cinéticos de 58a , 58b , 58e e 58f em AChE e BChE.....	91
Tabela 20. Resultados de score e os respectivos valores de CI ₅₀ dos compostos avaliados....	94
Tabela 21. Cálculos de estabilidade relativa dos tautômeros amida e iminol em meio aquoso para os compostos 58a e 58e	97
Tabela 22. Resultados de score e os respectivos valores de CI ₅₀ dos compostos avaliados....	99
Tabela 23. Resultados de score e os respectivos valores de CI ₅₀ dos compostos avaliados..	102
Tabela 24. Dados de RMN de ¹ H (500MHz) e de ¹³ C (125MHz) do produto 71 em DMSO, incluindo os resultados obtidos dos espectros de correlação heteronuclear de HSQC (J ¹) e HMBC (J ² , J ³ e J ⁴). Deslocamentos em δ (ppm) e multiplicidade entre parênteses.....	106
Tabela 25. Características físicas e rendimento da 1-(cloroalquil)piperidina (69a-b)	110
Tabela 26. Características físicas e rendimento da N-(3-((piperidin-1-il)alcoxi)fenil)quinazolin-2-amina (67a-b)	113

Tabela 27. Resultados obtidos nos ensaios inibição enzimática frente à EeAChE e EqBChE.	116
Tabela 28. Parâmetros cinéticos de 67a na enzima BChE	116
Tabela 29. Resultados de score e os respectivos valores de CI_{50} dos compostos avaliados..	117
Tabela 30. Resultados de score e os respectivos valores de CI_{50} dos compostos avaliados..	119
Tabela 31. Concentrações de inibidores para o estudo cinético da AChE e BChE.....	148

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 (Knopman et al., 2021)).	4
Figura 2. Hiperfosforilação da proteína Tau que causa dissociação dos microtúbulos, levando à formação de filamentos helicoidais pareados que evoluem para a formar emaranhados neurofibrilares.	5
Figura 3. Representação do ciclo da acetilcolina nos neurônios.	6
Figura 4. A) Representação da superfície do canal profundo da acetilcolinesterase humana (hAChE) (PDB: 4EY4) e B) da butirilcolinesterase humana (hBChE) (PDB: 1P0I) (cinza). Os resíduos estão representados: no PAS (em verde); na tríade catalítica (em magenta); na cavidade oxiânion (em laranja); no sítio de ligação a acila (em ciano); no sítio de ligação de colina (em amarelo) (Adaptado de (Do N. Goulart et al., 2021)).	7
Figura 5. Papel dos astrócitos e micróglia na neurodegeneração da DA.	10
Figura 6. A) Receptores H ₃ funcionando como auto e heterorreceptores. B) Vias de sinalização associadas ao H ₃ R (Adaptado de (Thomas et al., 2024)).	12
Figura 7. A) Estimulação do sistema dopaminérgico pela ação dos inibidores da MAO-B (Adaptado de (ParkinsonsDisease, 2025)); B) Desaminação oxidativa catalisada pela MAO-B, levando a formação de radicais livres (Adaptado de (Oyovwi et al., 2025)).	14
Figura 8. Fármacos inibidores colinesterásicos (1-4) e inibidor do receptor NMDA (5) aprovados pela FDA para o tratamento dos sintomas cognitivos da DA.	15
Figura 9. Fármaco Brexpiprazol (6) usado para o tratamento da agitação na DA.	16
Figura 10. Número de candidatos a fármacos em cada fase do processo de desenvolvimentos de medicamentos para a doença de Alzheimer (Adaptado de (AlzPipeline, 2025)).	18
Figura 11. Número de candidatos a fármacos classificados por finalidade terapêutica em cada fase do processo de desenvolvimento de medicamentos para a doença de Alzheimer (Adaptado de (AlzPipeline, 2025)).	18
Figura 12. Fármacos neuroprotetores e potenciadores cognitivos em ensaio clínico para o tratamento da DA.	20
Figura 13. Fármacos que foram investigados em ensaio clínico para o tratamento da DA.	20
Figura 14. Estratégia de design para ligantes direcionados a múltiplos alvos (Adaptado de (Yoo et al., 2025)).	21
Figura 15. Ligantes direcionados a múltiplos alvos da DA	22
Figura 16. Planejamento das 1,4-di-idropiridina-piperidina (19).	23
Figura 17. Tiossemicarbazona-acridina (22) como MTDL para DA.	24
Figura 18. Planejamento dos compostos cumarínicos (24 e 25a) do LadMol-QM.	25
Figura 19. A) Interações da cumarina (25a) com a AChE (Nadur, 2020). B) Mapa farmacofórico das interações entre cumarinas e AChE.	27
Figura 20. Derivatizações propostas para a série triazol-cumarinas (A). *(Nadur, 2020)	27
Figura 21. Planejamento dos novos heterociclos miméticos (B-C) das cumarinas. Os principais pontos de interação de 24 com a AChE estão marcados em azul, assim como nas estruturas propostas.	28

Figura 22. Estrutura numerada do núcleo cumarínico e multiplicidade dos sinais de H ₆ (duplo duplete) e H ₈ (duplete).	43
Figura 23. Atribuição comparativa dos principais sinais dos compostos 3-(1-R-benzil-1H-1,2,3-triazol-4-il)-7-(bromoalcoxi)-cumarinas (27a-j) e 3-(1-R-benzil-1H-1,2,3-triazol-4-il)-7-(3-(piperidin-1-il)alcoxi)-cumarinas (26a-j) nos espectros de RMN ¹ H e ¹³ C.....	47
Figura 24. Gráficos de Lineweaver-Burk da cinética de inibição em EeAChE (à esquerda) e EqBChE (à direita) do composto 26a	52
Figura 25. Gráficos de Lineweaver-Burk da cinética de inibição em EeAChE (à esquerda) e EqBChE (à direita) do composto 26c	52
Figura 26. A) Análise da sobreposição dos compostos 26a-j e a cavidade enzimática da AChE. B) Análise da cavidade de acesso ao sítio catalítico da AChE com os compostos 26a-j ancorado. Figura gerada com PyMol 3.1.3.1 (Copyright © Schrödinger LLC).....	58
Figura 27. A) Análise das principais interações moleculares entre o composto 26a , destaque em azul, e a cavidade enzimática da AChE, com sobreposição ao composto 25a , destaque em rosa. B) Análise da superfície de Van der Waals com o composto 25a (rosa) ancorado. C) Análise da superfície de Van der Waals com o composto 26a (azul) ancorado. Figura gerada com PyMol 3.1.3.1 (Copyright © Schrödinger LLC).	59
Figura 28. Análise das principais interações moleculares entre o composto 26c , destaque em rosa, e a cavidade enzimática da AChE. Figura gerada com PyMol 3.1.3.1 (Copyright © Schrödinger LLC).....	60
Figura 29. Análise das principais interações moleculares entre o composto 26d , destaque em ciano, e a cavidade enzimática da AChE, com sobreposição ao composto 26c , destaque em rosa. Figura gerada com PyMol 3.1.3.1 (Copyright © Schrödinger LLC).....	61
Figura 30. A) Análise da sobreposição dos compostos 26b, e-j na cavidade enzimática da AChE. B) Análise da sobreposição dos compostos 26e-f, h , destacando as interações de halogênio entre o composto 26h (roxo) e 26f (azul claro) com o resíduo Gln291. Figura gerada com PyMol 3.1.3.1 (Copyright © Schrödinger LLC).....	62
Figura 31. Análise da sobreposição do composto 26j (vinho) e o composto 26a (azul), na cavidade enzimática da AChE. Figura gerada com PyMol 3.1.3.1 (Copyright © Schrödinger LLC).	63
Figura 32. A) Análise da sobreposição dos compostos 26a-j e a cavidade enzimática da BChE. B) Análise da cavidade de acesso ao sítio catalítico da BChE com os compostos 26a-j ancorado, visto de frente e C) de lado. Figura gerada com PyMol 3.1.3.1 (Copyright © Schrödinger LLC).....	65
Figura 33. A) Análise da sobreposição dos compostos 25a (rosa) e 26a (azul) e a cavidade enzimática da eqBChE. B) Análise da cavidade de acesso ao sítio catalítico da eqBChE com os compostos 25a e 26a ancorado. Figura gerada com PyMol 3.1.3.1 (Copyright © Schrödinger LLC).....	66
Figura 34. Análise das principais interações moleculares entre o composto 26j e a cavidade da hH ₃ R. Figura gerada com PyMol 3.1.3.1 (Copyright © Schrödinger LLC).....	67
Figura 35. A) Análise da sobreposição dos compostos 26a (azul), 26j (vinho) e 25b (verde), e B) Análise das principais interações moleculares entre o composto 2a e a cavidade da hH ₃ R. Figura gerada com PyMol 3.1.3.1 (Copyright © Schrödinger LLC).	68

Figura 36. Análise das principais interações moleculares entre o composto 26j e a cavidade enzimática da MAO-B. Figura gerada com PyMol 3.1.3.1 (Copyright © Schrödinger LLC).	70
Figura 37. A) Composto 26a e B) Composto 25b na cavidade enzimática da MAO-B. Figura gerada com PyMol 3.1.3.1 (Copyright © Schrödinger LLC).	70
Figura 38. A) Análise da sobreposição dos compostos 26a (azul), 26j (vinho) e 25b (verde) e a cavidade enzimática da MAO-A. Aminoácidos Tyr69, Gln215, Phe352, Tyr407, Tyr444 destacados em rosa. B) Análise da cavidade de acesso ao sítio catalítico da MAO-A com os compostos 26a , 26j e 25b ancorado. Figura gerada com PyMol 3.1.3.1 (Copyright © Schrödinger LLC).	71
Figura 39. A) A viabilidade celular (%) foi avaliada a partir de células SH-SY5Y pré-incubadas com 12,5, 25,0 e 50,0 μM dos compostos 26a , 26c , 26d e 26j . Os resultados representam a média de 9 réplicas (n=9). B) Efeitos neuroprotetores dos compostos 26a , 26c , 26d e 26j (12,5 μM) em células SH-SY5Y danificadas por H_2O_2 . As células foram pré-incubadas com 12,5 μM dos compostos ou 10 μM do fármaco padrão donepezil por 2 horas e então expostas a H_2O_2 (400 μM) por 24 horas. Para ambos os ensaios, a viabilidade celular foi avaliada usando o ensaio MTT. Os dados são expressos como média \pm desvio padrão (DP); (n=9). (*p < 0,05; **p < 0,01; ***p < 0,001). Comparações estatísticas foram realizadas entre cada composto e o experimento de controle com H_2O_2 .	73
Figura 40. Modelo ADMET <i>BOILED-Egg</i> para compostos cumarínicos 26a-j . (HIA) absorção gastrointestinal; (BBB) penetração cerebral; (PGP+) substrato para glicoproteína P; (PGP-) Não é um substrato para glicoproteína P.	74
Figura 41. Atribuição comparativa dos principais sinais dos compostos 7-hidroxi-3,4-diidroquinolin-2(1H)-ona (63) e 7-(bromoalcoxi)-3,4-diidroquinolin-2(1H)-ona (62a-b) nos espectros de RMN ^1H e ^{13}C .	81
Figura 42. Espectros bidimensionais de HMBC do composto 62a em DMSO: Visualização das correlações J^3 e J^2 , entre carbono e hidrogênio.	81
Figura 43. Atribuição comparativa dos principais sinais dos compostos 7-(bromoalcoxi)-3,4-diidroquinolin-2(1H)-ona (62a-b) e 7-(bromoalcoxi)-quinolin-2(1H)-one (60a-b) nos espectros de RMN ^1H e ^{13}C .	83
Figura 44. Efeito de ressonância entre a ligação dupla conjugada à carboxila do anel.	84
Figura 45. Híbrido de ressonância de uma benzonitrila.	88
Figura 46. Atribuição comparativa dos principais sinais dos compostos 7-(bromoalcoxi)-quinolin-2(1H)-one (59a) e 3-(R-fenil)-7-[(piperidin-1-il)alcoxi]quinolin-2(1H)-ona (58e) nos espectros de RMN ^1H e ^{13}C .	89
Figura 47. Gráficos de Lineweaver-Burk da cinética de inibição em EeAChE (à esquerda) e EqBChE (à direita) do composto 58a .	93
Figura 48. Gráficos de Lineweaver-Burk da cinética de inibição em EeAChE (à esquerda) e EqBChE (à direita) do composto 58b .	93
Figura 49. Gráficos de Lineweaver-Burk da cinética de inibição em EeAChE (à esquerda) e EqBChE (à direita) do composto 58e .	94
Figura 50. Gráficos de Lineweaver-Burk da cinética de inibição em EeAChE (à esquerda) e EqBChE (à direita) do composto 58e .	94

Figura 51. Análise da sobreposição dos compostos 58a-g e a cavidade enzimática da AChE. Figura gerada com PyMol 3.1.3.1 (Copyright © Schrödinger LLC).	95
Figura 52. A) Análise parcial das principais interações moleculares a cavidade enzimática da AChE e os compostos 58e e B) 58f . Figura gerada com PyMol 3.1.3.1 (Copyright © Schrödinger LLC).	96
Figura 53. Análise da sobreposição dos compostos 58a-f na conformação enol e a cavidade enzimática da AChE. Figura gerada com PyMol 3.1.3.1 (Copyright © Schrödinger LLC). ...	97
Figura 54. A) Substrato acetiltiocolina (ACTI) (ciano) na cavidade enzimática da AChE, destacando-se a tríade catalítica Ser203, His447, Glu335 (rosa). B) Mapa farmacofórico com as principais interações do ACTI na AChE. Legenda: cargas atrativas (azul), cátion- π (laranja), van der Waals (verde). Figura gerada com PyMol 3.1.3.1 (Copyright © Schrödinger LLC).	98
Figura 55. A) Análise da sobreposição dos complexos ternários formados pelos compostos 58a-f na cavidade enzimática da tiocolina/AChE. B) Análise da cavidade de acesso ao sítio da tiocolina/AChE com os compostos 58a-f ancorados. C) Representação da superfície de van der Waals do sítio da tiocolina/AChE, com os compostos 58a-f ancorados, e a tiocolina sob um ângulo de visão longitudinal. Figura gerada com PyMol 3.1.3.1 (Copyright © Schrödinger LLC).	99
Figura 56. Análise das principais interações moleculares a cavidade enzimática da tiocolina/AChE e o composto 58a . Figura gerada com PyMol 3.1.3.1 (Copyright © Schrödinger LLC).	100
Figura 57. Análise das principais interações moleculares a cavidade enzimática da tiocolina/AChE e o composto 58g . Figura gerada com PyMol 3.1.3.1 (Copyright © Schrödinger LLC).	101
Figura 58. A) Análise da sobreposição dos compostos 58a-g e a cavidade enzimática da BChE. B) Análise da cavidade de acesso ao sítio catalítico da BChE com os compostos 58a-g ancorado, visto de frente. Figura gerada com PyMol 3.1.3.1 (Copyright © Schrödinger LLC).	103
Figura 59. Espectros bidimensionais de HSQC do composto 71 em DMSO- d_6 : Visualização das correlações J^1 entre carbono e hidrogênio.	107
Figura 60. Espectros bidimensionais de HMBC do composto 71 em DMSO- d_6 : Visualização das correlações J^2 , J^3 e J^4 , entre carbono e hidrogênio.	108
Figura 61. Espectros bidimensionais de HMBC do composto 67a em DMSO: Visualização das correlações J^3 , entre carbono e hidrogênio.	115
Figura 62. Gráficos de Lineweaver-Burk da cinética de inibição em EqBChE do composto 65a	117
Figura 63. A) Sobreposição do composto 58e (roxo) e os compostos 67a (azul) e 67b (vinho), na cavidade enzimática da AChE. B) Análise das principais interações moleculares entre o composto 67a (azul) e C) 67b (vinho) na cavidade enzimática da AChE. Figura gerada com PyMol 3.1.3.1 (Copyright © Schrödinger LLC).	118
Figura 64. A) Sobreposição do composto 58a e os compostos 67a (azul) e 67b (vinho), na cavidade enzimática da BChE. B) Análise das principais interações moleculares entre o	

composto 67a (azul) e C) 67b (vinho) na cavidade enzimática da BChE. Figura gerada com PyMol 3.1.3.1 (Copyright © Schrödinger LLC).	120
---	-----

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

[S] – Concentração de substrato

ACh – Acetilcolina

AChE – Acetilcolinesterase

ACTI – Iodeto de acetiltiocolina

AKT – Proteína cinase B

AMPA – Ácido α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolpropiónico

APP – Proteína precursora do amiloide (*amyloid precursor protein*)

ARIA – Anormalidades de imagem relacionadas ao amiloide (*Amyloid-Related Imaging Abnormalities*)

ATP – trifosfato de adenosina

A β – beta-amiloide

BACE-1 – Beta-secretase 1

BBB – Barreira hematoencefálica (*blood-brain barrier*)

BChE – Butirilcolinesterase

BCTI – Iodeto de butiriltiocolina

BPSD – Sintomas comportamentais e psicológicos da demência

BSA – Albumina Sérica Bovina

cAMP – Adenosina monofosfato cíclico (*cyclic adenosine monophosphate*)

CAS – Sítio catalítico aniônico (*catalytic anionic site*)

CCDA – Cromatografia em camada delgada analítica

CDCl₃ – Clorofórmio deuterado

cGMP – Guanosina 3',5'-monofosfato cíclico (*cyclic guanosine monophosphate*)

ChAT – enzima colina acetiltransferase

ChE – Colinesterases

CREB – Proteína de ligação ao elemento responsivo ao AMPc

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

ENFs – Emaranhados neurofibrilares

*Eq*BChE – Butirilcolinesterase de soro equino

ERN – espécies reativas de nitrogênio

ERO – espécies reativas de oxigênio

FDA – Food and Drug Administration

FHP – Filamentos helicoidais pareados

GBD – Carga global de doença (*Global Burden of Disease*)

GLU – Glutamato

GPCRs – Receptores acoplados à proteína G (*G protein-coupled receptors*)

GSK-3 β – Glicogênio sintase cinase-3 beta (*glycogen synthase kinase 3 beta*)

hAChE – 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

Ki – Constante de afinidade para inibição do tipo competitiva

Ki' – Constante de afinidade para inibição do tipo não-competitiva

Km – Constante de Michaelis-Menten

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

MAO – Monoamina oxidase

MAP – Proteína associada a microtúbulos (*microtubule-associated protein*)

MAPKs – Proteínas cinases ativadas por mitógenos (*mitogen-activated protein kinases*)

mGluRs – Receptores metabotrópicos de glutamato

MTDLs – Ligantes direcionados a múltiplos alvos (*Multi-Target Directed Ligands*)

N3pE – N-terminal piroglutamado da A β

NBM – Núcleo basal de Meynert

NIH – Institutos Nacionais de Saúde (*National Institutes of Health*)

NMDA – N-metil D-Aspartato

NTM – Núcleo tuberomamilar

PAS – Sítio aniônico periférico (*peripheral anionic site*)

PDB – Protein Data Bank

Ph – Fenila

pH – Potencial Hidrogeniônico

PI3K – Fosfoinosítideo 3-cinase (*phosphoinositide 3-kinase*)
PKA – Proteína cinase A (*protein kinase A*)
ppm – partes por milhão
Ptau – proteína Tau
RMN – Ressonância Magnética Nuclear
RMN ^{13}C – Ressonância Magnética Nuclear de Carbono
RMN ^1H – Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio
S_EAr – Substituição Eletrofílica Aromática
S_N2 – Substituição Nucleofílica Bimolecular
SNC – Sistema nervoso central
TMDs – Terapias modificadoras da doença
v – Velocidade
V_{max} – Velocidade máxima
 α CTF – Fragmento C-terminal alfa (*alpha C-terminal fragment*)
 β CTF – Fragmento C-terminal beta (*beta C-terminal fragment*)
 δ – deslocamento químico
 λ – comprimento de onda

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
1.1. Doença de Alzheimer	1
1.2. Mecanismos Neuropatológicos e Alvos Terapêuticos na Doença de Alzheimer ..	2
1.2.1. Hipótese amiloide.....	3
1.2.2. Hipótese da Proteína tau	4
1.2.3. Hipótese Colinérgica	5
1.2.4. Hipótese Glutamatérgica	8
1.2.5. Hipótese da Neuroinflamação	9
1.2.6. Hipótese do Estresse Oxidativo	10
1.2.7. Homeostase de metais.....	11
1.2.8. Histamina H ₃ R.....	11
1.2.9. Monoamino Oxidase B (MAO-B).....	13
1.3. Terapias para a Doença de Alzheimer.....	14
1.3.1. Terapias sintomáticas da doença	14
1.3.2. Terapias modificadoras da doença	16
1.3.3. Candidatos a Fármacos em Fases clínicas.....	17
1.4. Compostos Multialvos	20
1.4.1. Estratégias Multialvo com Cumarinas: Contribuições do Acervo LadMol-QM	24
2. OBJETIVOS	26
2.1. Objetivos gerais	26
2.2. Objetivos específicos.....	26
2.3. Planejamento Estrutural.....	26
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	29
3.1. SERIE A	29
3.1.1. Planejamento sintético dos compostos.....	29
3.1.2. Obtenção das 3-bromo-cumarinas substituídas (34a-b)	31
3.1.3. Obtenção dos intermediários chave (29a-b).....	32
3.1.4. Síntese dos álcoois benzílicos (32a-h)	36
3.1.5. Síntese dos brometos de benzila (31a-h).....	37
3.1.6. Síntese das benzil azidas (30a-i)	38

3.1.7.	Síntese de 3-(1-R-benzil-1 <i>H</i> -1,2,3-triazol-4-il)-7-(bromoalcoxi)-cumarinas (27a-j)	40
3.1.8.	Síntese da 3-(1-R-benzil-1 <i>H</i> -1,2,3-triazol-4-il)-7-(3-(piperidin-1-il)alcoxi)-cumarina (26a-j)	45
3.1.9.	Atividade inibitória dos compostos obtidos frente à AChE e BChE	47
3.1.10.	Ensaio do mecanismo de inibição enzimática frente à AChE e BChE	49
3.1.11.	Atividade inibitória dos compostos obtidos frente à Histamina (H ₃ R)	53
3.1.12.	Atividade inibitória dos compostos obtidos frente à Monoamino Oxidase (MAO-A e MAO-B)	54
3.1.13.	Avaliação <i>in silico</i> da interação dos compostos com a <i>Ee</i> AChE	56
3.1.14.	Avaliação <i>in silico</i> da interação dos compostos com a <i>Eq</i> BChE	63
3.1.15.	Avaliação <i>in silico</i> da interação dos compostos no receptor de Histamina H ₃ (H ₃ R)	66
3.1.16.	Avaliação <i>in silico</i> da interação dos compostos Monoamino Oxidase (MAO-A e MAO-B)	68
3.1.17.	Ensaio de citotoxicidade e neuroproteção <i>in vitro</i> contra a linhagem celular de neuroblastoma SH-SY5Y	72
3.1.18.	Análise do perfil físico-químico ADMET <i>in silico</i>	73
3.2.	SERIE B	75
3.2.1.	Planejamento sintético dos compostos	75
3.2.2.	Obtenção da 7-hidroxi-3,4-diidroquinolin-2(1 <i>H</i>)-ona (63)	76
3.2.3.	Síntese da 7-(bromoalcoxi)-3,4-diidroquinolin-2(1 <i>H</i>)-ona (62a-b)	79
3.2.4.	Síntese da 7-(bromoalcoxi)-quinolin-2(1 <i>H</i>)-one (60a-b)	82
3.2.5.	Síntese da 7-(bromoalcoxi)-3-(R-fenil)quinolin-2(1 <i>H</i>)-one (59a-g)	84
3.2.6.	Síntese da 3-(R-fenil)-7-((piperidin-1-il)alcoxi)quinolin-2(1 <i>H</i>)-ona (58a-g)	87
3.2.7.	Resultados de atividade inibitória dos compostos obtidos frente à AChE e BChE	90
3.2.8.	Ensaio do mecanismo de inibição enzimática frente à AChE e BChE	91
3.2.9.	Avaliação <i>in silico</i> da interação dos compostos com a <i>Ee</i> AChE	94
3.2.10.	Avaliação <i>in silico</i> da interação dos compostos com a <i>Eq</i> BChE	101
3.3.	SERIE C	104
3.3.1.	Planejamento sintético dos compostos	104
3.3.2.	Síntese da <i>N</i> -(3-metoxifenil)quinazolin-2-amina (71)	105
3.3.3.	Síntese da 3-(quinazolin-2-ilamino)fenol (68)	108

3.3.4.	Síntese do cloridrato de 1-(cloroalquil)piperidina (69a-b)	110
3.3.5.	Síntese da N-(3-((piperidin-1-il)alcoxi)fenil)quinazolin-2-amina (67a-b)	112
3.3.6.	Resultados de atividade inibitória dos compostos obtidos frente à AChE e BChE	115
3.3.7.	Ensaio do mecanismo de inibição enzimática frente à BChE	116
3.3.8.	Estudo de interação enzimática <i>in silico</i> na enzima EeAChE	117
3.3.9.	Estudo de interação enzimática <i>in silico</i> na enzima EqBChE	119
4.	CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS	121
5.	METODOLOGIA	123
5.1.	SERIE A	123
5.1.1.	Síntese da álcoois benzílicos (32a-h).....	123
5.1.2.	Síntese dos brometos de benzila (31a-h).....	124
5.1.3.	Síntese das benzil azidas (30a-i)	124
5.1.4.	Síntese de 3-(1-R-benzil-1 <i>H</i> -1,2,3-triazol-4-il)-7-(bromoalcoxi)-cumarinas (27a-j)	125
5.1.5.	Síntese da 3-(1-R-benzil-1 <i>H</i> -1,2,3-triazol-4-il)-7-(3-(piperidin-1-il)alcoxi)-cumarina (26a-j)	130
5.2.	SERIE B	136
5.2.1.	Síntese da 3-cloro- <i>N</i> -(3-metoxifenil)propanamida (64).....	136
5.2.2.	Síntese da 7-hidroxi-3,4-diidroquinolin-2(1 <i>H</i>)-ona (63).....	136
5.2.3.	Síntese da 7-(bromoalcoxi)-3,4-diidroquinolin-2(1 <i>H</i>)-ona (62a-b)	137
5.2.4.	Síntese da 7-(bromoalcoxi)-quinolin-2(1 <i>H</i>)-one (60a-b)	138
5.2.5.	Síntese da 7-(bromoalcoxi)-3-(<i>R</i> -fenil)quinolin-2(1 <i>H</i>)-one (59a-g).....	139
5.2.6.	Síntese da 3-(<i>R</i> -fenil)-7-((piperidin-1-il)alcoxi)quinolin-2(1 <i>H</i>)-ona (58a-g)	140
5.3.	SERIE C	143
5.3.1.	Síntese da <i>N</i> -(3-metoxifenil)quinazolin-2-amina (71).....	143
5.3.2.	Síntese da 3-(quinazolin-2-ilamino)fenol (68)	144
5.3.3.	Síntese do cloridrato de 1-(cloroalquil)piperidina (69a-b)	144
5.3.4.	Síntese da <i>N</i> -(3-((piperidin-1-il)alcoxi)fenil)quinazolin-2-amina (67a-b)	145
5.4.	Teste <i>in vitro</i> da atividade anticolinesterásica dos derivados da série A, B e C	147
5.5.	Estudo do mecanismo de inibição enzimática série A, B e C.....	147
5.6.	Ensaio de ligação ao receptor H ₃ humano (<i>h</i> H ₃ R) dos derivados da série A	148

5.7.	Teste <i>in vitro</i> da atividade frente a MAO dos derivados da série A.....	149
5.8.	Modelagem Molecular.....	150
5.8.1.	Enzima Acetilcolinesterase de Enguia Elétrica (<i>EeAChE</i>).....	150
5.8.2.	Enzima Butirilcolinesterase Equina (<i>EqBChE</i>).....	150
5.8.3.	Receptor de histamina humana H ₃ R	151
5.8.4.	Enzima Monoamina Oxidase A humana.....	151
5.8.5.	Enzima Monoamina Oxidase B humana	152
5.9.	Citotoxicidade em células de neuroblastoma SH-SY5Y	152
5.9.1.	Preparo das amostras para o ensaio de citotoxicidade em MTT	152
5.9.2.	Cultivo das células derivados de neuroblastoma humano (SH-SY5Y)....	152
5.9.3.	Ensaio de citotoxicidade pelo método em MTT	153
6.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	154
7.	ANEXOS	165
7.1.	ANEXO 1 – MODELAGEM MOLECULAR.....	165
7.2.	ANEXO 2 – ESPECTROS DE RMN DE ¹ H e ¹³ C.....	170
7.3.	ANEXO 3 – PROPRIEDADES ADMET	248
7.4.	ANEXO 4 – TRABALHOS PUBLICADOS DURANTE O DOUTORADO ..	258

1. INTRODUÇÃO

1.1. Doença de Alzheimer

A doença de Alzheimer (DA) recebeu sua denominação em 1910, quando Emil Kraepelin propôs homenagear o colega Alois Alzheimer (Kraepelin, 1915). O termo reflete as observações pioneiras de Alzheimer, que a partir de 1901, acompanhou e documentou detalhadamente o caso de Auguste Deter, uma paciente de 51 anos com sintomas progressivos de degeneração cognitiva. Após o óbito da paciente, o exame *post-mortem* revelou atrofia difusa generalizada e alterações histológicas marcantes como o acúmulo de placas amiloides e emaranhados neurofibrilares, que hoje são reconhecidas como os principais marcadores biológicos da DA (MÖLLER, 1998). Em 1907, Alzheimer publicou o primeiro relato científico dessa forma de demência pré-senil, descrevendo pela primeira vez as anomalias nos emaranhados neurofibrilares (ALZHEIMER, 1907; Hippus; Neundörfer, 2003).

A doença de Alzheimer (DA), é uma das demências neurodegenerativas mais frequentes associadas ao envelhecimento e corresponde a 60-70% dos casos. Sua prevalência aumenta exponencialmente com a idade: abaixo de 1% entre indivíduos de 60 a 64 anos, duplica a cada 5 anos após os 65 anos e atinge 30-50% das pessoas acima de 85 anos (Nichols et al., 2022). No Brasil, o *Global Burden of Disease* (GBD) estimou 1,85 milhão de casos de DA e outras demências em 2019, com projeções de triplicar até 2050 (6,7 milhões), um aumento superior a 200% (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2024; NICHOLS et al., 2022). Globalmente, mais de 55 milhões de pessoas vivem com demência atualmente, número que deve saltar para 78 milhões em 2030 e 139 milhões em 2050, concentrando-se principalmente em países de baixa e média renda – onde já residem 60% dos casos, percentual que alcançará 71% até 2050. O crescimento mais acelerado ocorre em regiões como Ásia Meridional e Pacífico Ocidental, impulsionado pelo envelhecimento populacional em países como China e Índia (Nichols et al., 2022; WHO, 2025).

A DA é uma doença neurodegenerativa progressiva e irreversível, em que há deterioração das funções cognitivas de modo superior ao que seria esperado pelo envelhecimento normal. Ela é caracterizada pela perda progressiva de memória e outras funções cognitivas, além do desenvolvimento de distúrbios comportamentais (Burns; Iliffe, 2009; Knopman et al., 2021).

A progressão clínica da DA divide-se em três fases principais. Na fase inicial, observa-se esquecimento e comprometimento cognitivo leve, alterações comportamentais sutis (como

irritabilidade ou ansiedade) e tendência ao isolamento social. No estágio moderado, há uma perda significativa de memória, confusão mental, comprometimento das habilidades de planejamento e raciocínio lógico, além de manifestações como agressividade, agitação e distúrbios do sono. No estágio grave, ocorre perda total da memória, desorientação espaço-temporal, incapacidade de comunicação verbal e dependência completa de cuidadores para atividades básicas. Com a evolução, surgem complicações motoras e disfagia, reforçando a necessidade de cuidados paliativos especializados (Hussain et al., 2025).

Infelizmente, a detecção precoce da doença de Alzheimer na prática clínica enfrenta desafios significativos, principalmente devido à dificuldade em diagnosticar a patologia com precisão e à tendência de pacientes e profissionais de saúde atribuírem os sintomas iniciais ao envelhecimento natural. Embora a doença seja conhecida há muito tempo, apenas nas últimas décadas ganhou maior atenção científica, impulsionando avanços no entendimento de sua evolução e no desenvolvimento de métodos terapêuticos. Apesar disso, a sequência exata das alterações cerebrais que desencadeiam a doença permanece desconhecida (Porsteinsson et al., 2021).

1.2. Mecanismos Neuropatológicos e Alvos Terapêuticos na Doença de Alzheimer

A DA consiste em uma disfunção sináptica de origem multifatorial, resultante da interação entre múltiplos mecanismos patogênicos. Contudo, a origem desses mecanismos e seu papel no comprometimento da funcionalidade e sobrevivência neuronal ainda não foram completamente esclarecidos (Knopman et al., 2021).

Observações ao 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 agregação de placas β -amiloide ($A\beta$) nas células nervosas ao longo de todo o córtex cerebral (Hardy, 2002; Knopman et al., 2021), a presença dos emaranhados neurofibrilares intracelulares associados à hiperfosforilação da proteína Tau (PTau), que ocorrem inicialmente no lobo temporal medial e subsequentemente se estendem para as regiões isocorticais dos lobos temporal, parietal e frontal (Knopman et al., 2021), neuroinflamação das células gliais (Knezevic; Mizrahi, 2018), a disfunção mitocondrial (Wu; Chen; Jiang, 2019) e colinérgica, além do envolvimento do estresse oxidativo como agravante da perda sináptica e morte neuronal (Zhao; Zhao, 2013;

Huang; Mucke, 2012). 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

A hipótese da cascata amiloide é a teoria mais aceita e postula que a agregação dos peptídeo β -amiloide como placas senis no cérebro desencadeia a neurodegeneração observada na DA, sendo um gatilho para várias outras vias patológicas intimamente associadas a doença (Rajasekhar; Govindaraju, 2018; Singh et al., 2022). As placas $A\beta$ acumulam-se predominantemente no córtex cerebral, hipocampo, córtex entorrinal e no estriado ventral, que são cruciais para a memória e a cognição, e é gerado a partir da clivagem enzimática sequencial da proteína precursora de amiloide (PPA) (Cheignon et al., 2018; Rajasekhar; Govindaraju, 2018).

Em condições fisiológicas normais, a proteína precursora de amiloide (APP) é processada pela α -secretase, que realiza uma clivagem não amiloidogênica. Essa ação gera dois fragmentos solúveis: APPs α (com função neuroprotetora) e α CTF (fragmento C-terminal). Posteriormente, o α CTF é clivado pela γ -secretase, produzindo o peptídeo p3 (não patogênico) e o domínio intracelular da proteína precursora do amiloide (AICD). Esse mecanismo previne a formação do peptídeo β -amiloide ($A\beta$). Em condições patológicas, entretanto, o processamento da APP é desviado para a via amiloidogênica. Nesse caso, a β -secretase cliva a APP primeiro, gerando APPs β e β CTF. Em seguida, a γ -secretase atua sobre o β CTF, produzindo peptídeos $A\beta$ de diferentes tamanhos (27 a 43 aminoácidos). Após a síntese, o $A\beta$ é secretado no espaço extracelular na forma de monômeros. Devido à sua sequência hidrofóbica – especialmente no caso do $A\beta_{42}$ –, esses monômeros têm alta propensão a agregar-se de forma concentração-dependente. Esse processo inicia-se com a formação de oligômeros (estruturas pequenas e altamente tóxicas) e progride para fibrilas amiloides (estruturas alongadas e insolúveis), que compõem as placas senis (Figura 1) (Roy et al., 2025).

Embora o $A\beta_{40}$ seja o fragmento mais abundante, o $A\beta_{42}$ destaca-se por sua maior hidrofobicidade e potencial amiloidogênico, sendo considerado o principal responsável pela formação das placas. Ambos os peptídeos, contudo, podem agregar-se e contribuir para a gênese das estruturas fibrilares características da doença (Knopman et al., 2021; Rajasekhar; Govindaraju, 2018; Roy et al., 2025; Singh et al., 2022).

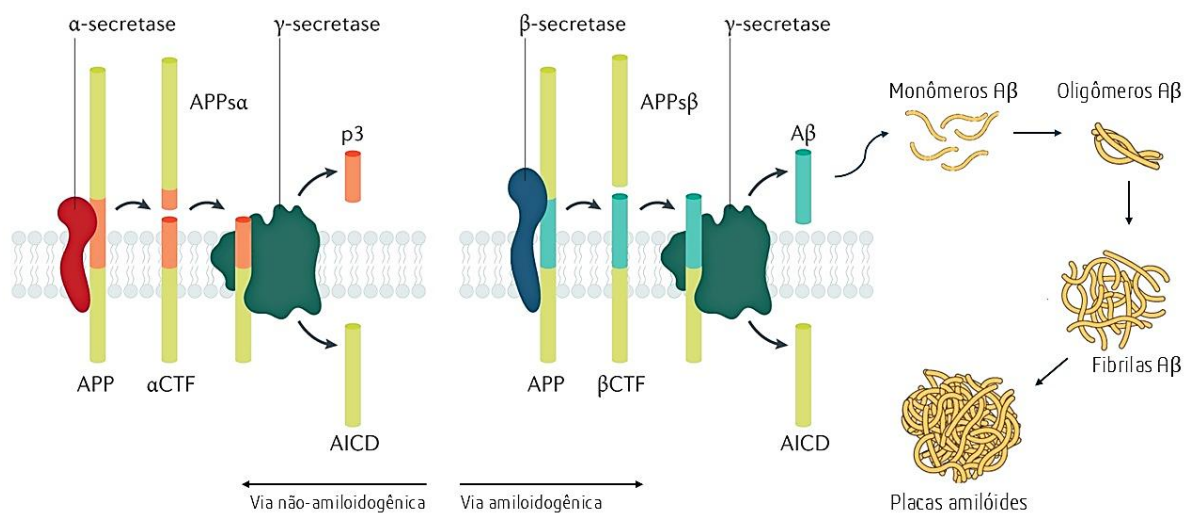


Figura 1. Formação dos peptídeos Aβ seguida do seu acúmulo para formar placas insolúveis de Aβ em cérebros portadores da DA (Adaptado de (Knopman et al., 2021)).

1.2.2. Hipótese da Proteína tau

A hipótese da proteína Tau tem como base patológica a hiperfosforilação da proteína Tau (PTau), que desencadeia a desintegração dos microtúbulos e a subsequente agregação intracelular da Tau hiperfosforilada, formando os emaranhados neurofibrilares (ENFs).

Em condições fisiológicas, a proteína Tau está associada aos microtúbulos (sendo classificada como uma *proteína associada a microtúbulos* – MAP) e desempenha um papel essencial na modulação da estabilidade dessas estruturas, principalmente nos microtúbulos axonais. As cinases que fosforilam a proteína Tau (PTau) atuam como reguladoras centrais de sua função biológica, dado que a Tau é predominantemente localizada nos axônios neuronais, onde sua fosforilação controlada é crucial para manter a integridade estrutural e funcional dos neurônios.

Em portadores de DA, no entanto, observa-se uma hiperfosforilação da Tau. Esse processo leva à desestabilização dos microtúbulos, resultando na formação de filamentos patológicos que se agregam no interior das células. Inicialmente, formam-se filamentos helicoidais pareados (FHP), que evoluem para a formação dos ENFs no interior dos corpos celulares neuronais. Esses agregados atuam como barreiras físicas ao transporte axonal, comprometendo a comunicação sináptica e contribuindo para a degeneração neuronal (Figura 2) (Ali et al., 2025; Soni et al., 2025).

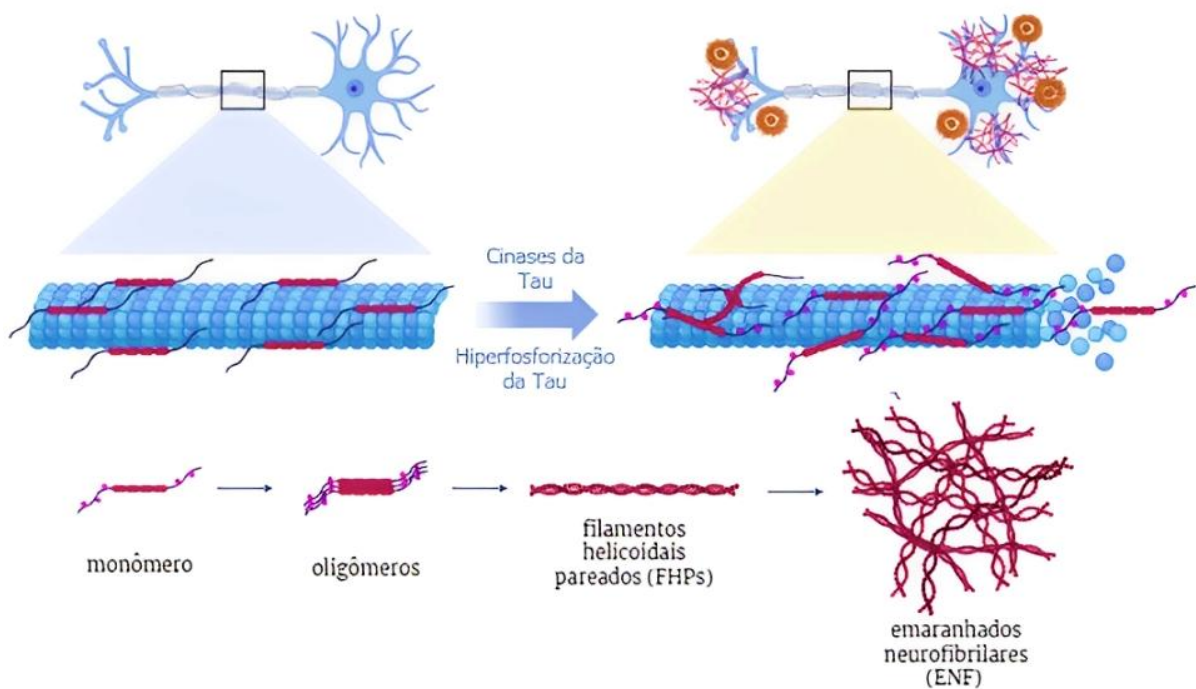


Figura 2. Hiperfosforilação da proteína Tau que causa dissociação dos microtúbulos, levando à formação de filamentos helicoidais pareados que evoluem para a formar emaranhados neurofibrilares.

1.2.3. Hipótese Colinérgica

A hipótese colinérgica postula que os déficits cognitivos surgem principalmente da degeneração extensiva dos neurônios colinérgicos no prosencéfalo basal, com destaque para o núcleo basal de Meynert (NBM). Essa neurodegeneração resulta em um declínio acentuado da atividade da colina acetiltransferase (ChAT) em regiões vitais para a cognição, incluindo o hipocampo, o córtex cerebral e as estruturas límbicas, comprometendo funções como memória, aprendizagem e processamento cognitivo. Além disso, a disfunção colinérgica desencadeia desregulação da neurotransmissão glutamatérgica e GABAérgica, comprometimento da modulação cardíaca mediada pelo nervo vago e alterações na regeneração sináptica. A redução da densidade de receptores nicotínicos e muscarínicos agrava a desregulação neuronal e acelera a progressão da doença de Alzheimer (DA)(Chen et al., 2022; Picciotto; Higley; Mineur, 2012; Soni et al., 2025).

A enzima colina-acetiltransferase (ChAT) catalisa a biossíntese da acetilcolina (ACh), combinando colina e acetil-CoA. Após sua síntese, a ACh é armazenada em vesículas sinápticas até sua liberação na fenda sináptica durante a transmissão neuronal. Após a exocitose, a ACh

pode se ligar a receptores colinérgicos no neurônio pós-sináptico, desencadeando respostas fisiológicas, ou ser degradada pela acetilcolinesterase (AChE) presente na fenda, resultando em acetato e colina. A colina liberada é recapturada pelo neurônio pré-sináptico por meio de um transportador dependente de Na^+ nos terminais axonais, sendo reutilizada para síntese de novas moléculas de ACh, fechando assim seu ciclo de reciclagem (Figura 3)(Chen et al., 2022).

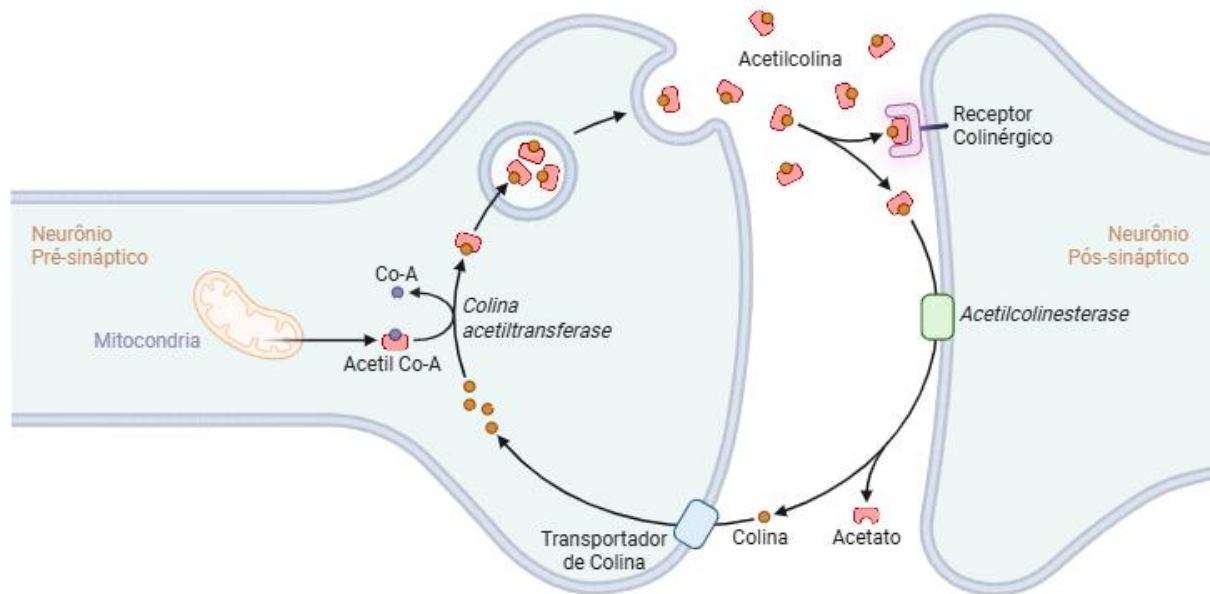


Figura 3. Representação do ciclo da acetilcolina nos neurônios.

Dessa forma, o desenvolvimento de uma abordagem terapêutica baseada em inibidores da acetilcolinesterase (*iAChE*), que atuam bloqueando a enzima acetilcolinesterase (AChE) – responsável pela hidrólise da acetilcolina (ACh) na fenda sináptica. Ao inibir a AChE, esses fármacos aumentam a disponibilidade de ACh, restabelecendo assim a função colinérgica (Chen et al., 2022).

Apesar da hidrólise da acetilcolina (ACh) ser mediada principalmente pela acetilcolinesterase (AChE), a butirilcolinesterase (BChE) também é capaz de degradar esse neurotransmissor, embora em menor proporção. Produzida pelo fígado e presente principalmente no plasma sanguíneo, a BChE desempenha um papel secundário no cérebro de adultos saudáveis, onde a AChE responde por cerca de 80% da atividade das colinesterases (ChE). No entanto, durante a progressão da doença de Alzheimer (DA), observa-se que em algumas regiões cerebrais, até 90% da atividade da AChE é perdida, enquanto os níveis de atividade da BChE aumentam em até 105-165% do normal, tornando-se a principal enzima

metabólica da ACh (Li et al., 2018). Essa inversão sugere que a modulação da BChE pode representar uma abordagem terapêutica promissora para restaurar a função colinérgica, em estágios mais avançados da doença, com potencial de oferecer benefícios sinérgicos e reduzir efeitos colaterais periféricos (Do N. Goulart et al., 2021; Perry et al., 1978; Tok, 2025)

A AChE e BChE apresentam homologia estrutural de aproximadamente 65%, compartilhando a presença de uma região periférica, denominada PAS, e outra composta pela tríade catalítica (Ser, His, Glu), conhecida com sitio catalítico (CAS), separados por um canal com aproximadamente 20 Å (De Boer et al., 2021; Peitzika; Pontiki, 2023). As diferenças entre ambas residem na organização de subdomínios dentro da cavidade catalítica, como o sítio de ligação de acila, o sítio de ligação de colina e cavidade oxiânion. A distinção mais relevante ocorre na cavidade de ligação a acila, na qual os resíduos aromáticos Phe295 e Phe297 presentes na AChE são substituídos pelos resíduos alifáticos Leu286 e Val288 na BChE, tornando sua cavidade mais ampla e capaz de acomodar substratos volumosos (Figura 4) (Brus et al., 2014; Do N. Goulart et al., 2021; Li et al., 2018)

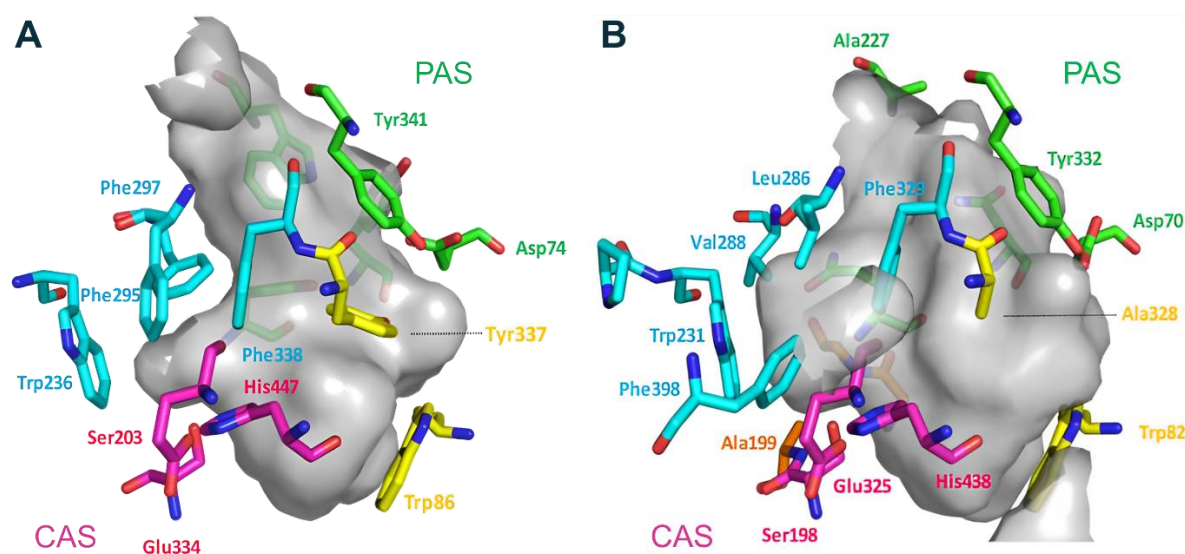


Figura 4. A) Representação da superfície do canal profundo da acetilcolinesterase humana (*hAChE*) (PDB: 4EY4) e B) da butirilcolinesterase humana (*hBChE*) (PDB: 1P0I) (cinza). Os resíduos estão representados: no PAS (em verde); na tríade catalítica (em magenta); na cavidade oxiânion (em laranja); no sítio de ligação a acila (em ciano); no sítio de ligação de colina (em amarelo) (Adaptado de (Do N. Goulart et al., 2021)).

A AChE não está envolvida apenas no controle dos níveis de acetilcolina (ACh), mas também atua como cofator crítico na agregação do peptídeo β -amiloide ($A\beta$). A literatura relata

que a AChE induz alterações conformacionais e bioquímicas no A β , acelerando a oligomerização dos peptídeos A β e a agregação de placas senis e formando complexos AChE-A β que exibem neurotoxicidade significativamente maior comparada aos peptídeos A β isolados (Han; He, 2018; Li et al., 2018). Esse mecanismo está intimamente ligado à região do PAS da AChE, que possui alta similaridade estrutural com o fragmento A β ₁₆₋₄₀ (Mauri et al., 2014). Diante disso, compostos iAChE com atividade mista, i.e. que atuem tanto no sítio catalítico (CAS) quanto no PAS da AChE, emergem como candidatos promissores para o desenvolvimento de ligantes multi-alvo direcionados (MTDLs) (Li et al., 2018).

1.2.4. Hipótese Glutamatérgica

A hipótese glutamatérgica propõe que o desequilíbrio na sinalização do glutamato, contribui para a excitotoxicidade e neurodegeneração na DA. O glutamato (GLU) é o neurotransmissor excitatório que exerce funções importantes para a cognição e plasticidade sináptica, e é mediado por diferentes classes de receptores de glutamato, como os ionotrópicos, incluindo os receptores de N-metil-D-aspartato (NMDA) e ácido α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazol-propiónico (AMPA) e os metabotrópicos (mGluRs) (Bukke et al., 2020; Puranik; Song, 2024).

De acordo com a hipótese, a desregulação inicia-se pela liberação excessiva de glutamato por neurônios danificados e a pela falha na recaptação por astrócitos, levando a um acúmulo de GLU na fenda sináptica que superativa os receptores NMDA. Em condições normais, os receptores NMDA permitem a entrada controlada de cálcio (Ca²⁺) após despolarização neuronal. Na DA, é observado a abertura crônica desses receptores, permitindo um influxo excessivo de Ca²⁺, que excede a capacidade de tamponamento celular. Esse excesso ativa enzimas pró-apoptóticas e gera radicais livre (ROS), desencadeando excitotoxicidade, dano oxidativo a componentes celulares e disfunção mitocondrial. Esses eventos culminam em perda sináptica, morte neuronal e agravamento da patologia de A β e tau, estabelecendo um ciclo vicioso de neurodegeneração e declínio cognitivo característico da doença (Abdallah, 2024; Puranik; Song, 2024).

Uma estratégia terapêutica promissora envolve o uso de antagonistas do receptor NMDA, que bloqueiam a ativação excessiva pelo glutamato sem interferir na sinalização

fisiológica. Ao inibir o receptor NMDA, se previne a superativação do sistema glutamatérgico e, conseqüentemente, a excitotoxicidade observada na DA (Abdallah, 2024).

1.2.5. Hipótese da Neuroinflamação

A neuroinflamação é desencadeada pela resposta de células gliais dominantes no sistema nervoso central (SNC), como a micróglia e os astrócitos (Chen et al., 2025a). A micróglia, em estado fisiológico normal, desempenha um papel vital na ativação de mecanismos reparadores para englobar patógenos, bem como células necróticas e detritos celulares. Estudos demonstram que, na fase inicial da doença de Alzheimer (DA), a micróglia exerce um papel protetor, fagocitando agregados de β -amiloide ($A\beta$) e reduzindo a formação de placas, o que confere efeito neuroprotetor (Dominguez-Gortaire et al., 2025). Entretanto, com a progressão da DA, a micróglia entra em um estado de hiperativação crônica, liberando quantidades excessivas de citocinas pró-inflamatórias (como IL-1 β , IL-6, IL-8 e TNF- α), quimiocinas e moléculas neurotóxicas, incluindo óxido nítrico (NO) e espécies reativas de oxigênio (ERO). Esses mediadores inflamatórios aumentam a lesão neuronal, promovem a disfunção sináptica e amplificam as cascatas neurodegenerativas (Abbas et al., 2025; Chen et al., 2025a; Dominguez-Gortaire et al., 2025).

Os astrócitos, que constituem a maioria das células gliais, desempenham uma variedade de funções essenciais, como sustentação dos neurônios, regulação da barreira hematoencefálica, controle das respostas imunes, equilíbrio dos íons extracelulares e promoção da plasticidade sináptica. No sistema nervoso central (SNC), atuam como reguladores dos processos inflamatórios, produzindo uma série de citocinas pró-inflamatórias e sendo importantes para a fagocitose e remoção de placas $A\beta$ (Martin-Jiménez et al., 2017). Entretanto, sob condições de estresse oxidativo, os astrócitos transitam para um estado reativo conhecido como astrogliose, em que é observado um acúmulo de astrócitos em sítios de placas $A\beta$, o que intensifica a liberação de reguladores pró-inflamatórios, levando ao aumento das funções tóxicas e causando um prolongamento da neuroinflamação (Chen et al., 2025a).

Dessa forma, a neuroinflamação na DA, impulsionada pela interação entre micróglia e astrócitos, correlaciona-se diretamente com a agregação $A\beta$, a hiperfosforilação da tau e disfunção sináptica (Chen et al., 2025a).

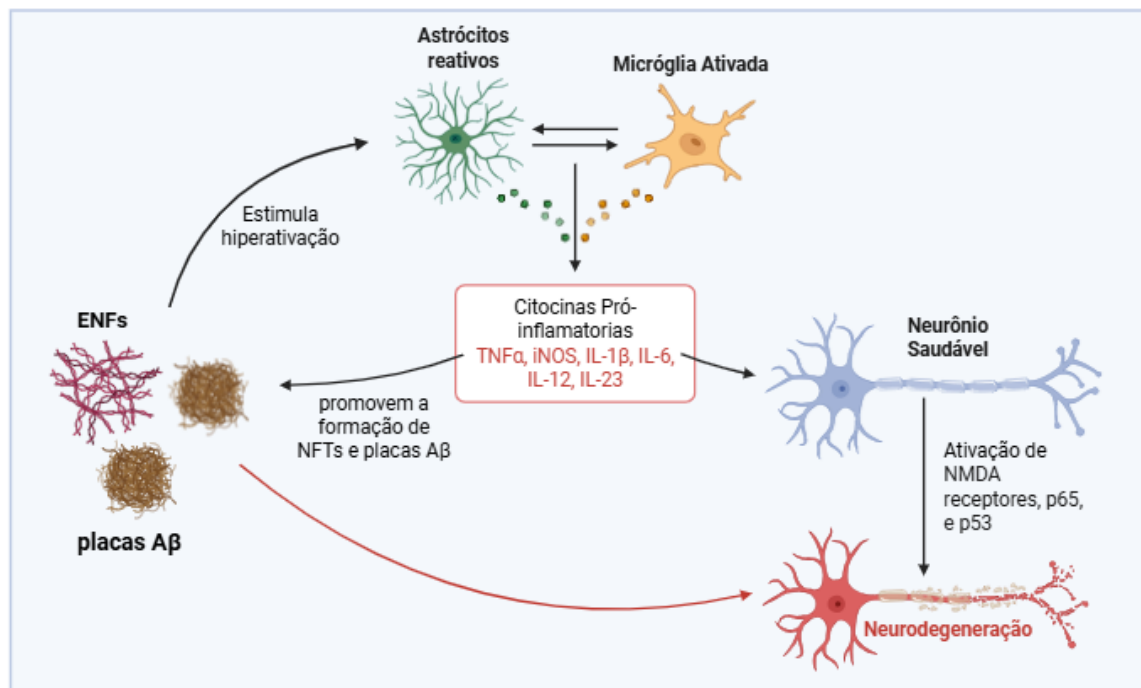


Figura 5. Papel dos astrócitos e micróglia na neurodegeneração da DA.

1.2.6. Hipótese do Estresse Oxidativo

O estresse oxidativo é considerado um mecanismo-chave na patogênese da DA, uma vez que pode ativar múltiplas vias de sinalização celular que contribuem para a progressão inicial da neurodegeneração. Estudos indicam que o desequilíbrio entre a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) e de nitrogênio (ERN) e a defesa antioxidante está associado a danos celulares precoces, como disfunção mitocondrial, falhas no reparo do DNA, agregação de beta-amiloide (A β) e hiperfosforilação da proteína tau (Dominguez-Gortaire et al., 2025; Li et al., 2018).

As EROs, moléculas altamente reativas derivadas do metabolismo do oxigênio, são essenciais em processos fisiológicos, como sinalização celular e defesa contra patógenos, quando mantidas em homeostase (Sies, 2015). No entanto, seu acúmulo descontrolado gera estresse oxidativo, afetando principalmente os neurônios, uma vez que o cérebro possui um maior consumo de oxigênio em relação aos demais órgãos do corpo. Como consequência, observa-se danos em lipídios, proteínas e DNA, comprometendo a função neuronal e desencadeando morte celular (Dominguez-Gortaire et al., 2025). Desta forma, estratégias antioxidantes são investigadas visando reduzir danos, proteger neurônios e obter efeitos neuroprotetores sendo consideradas abordagens viáveis para o tratamento da DA (Li et al., 2018).

1.2.7. Homeostase de 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. Esse desequilíbrio nos íons metálicos, seja por excesso ou insuficiência, contribui prejudicialmente nos mecanismos patológicos de doenças neurodegenerativas (Rajasekhar; Govindaraju, 2018).

Altas concentrações de biometais, como ferro (Fe), cobre (Cu) e zinco (Zn), no cérebro promovem interações com a proteína beta-amiloide ($A\beta$), levando à formação de agregados tóxicos. Íons de Cu^{2+} e Zn^{2+} aceleram a agregação de peptídeos $A\beta$, contribuindo para a formação de placas senis. Metais redox-ativos, como Fe e Cu, ligam-se à $A\beta$, formando complexos ($Cu-A\beta$ e $Fe-A\beta$) que estabilizam oligômeros neurotóxicos e participam diretamente da geração de espécies reativas de oxigênio (EROs), resultando em estresse oxidativo e morte neuronal. Além disso, a deposição de ferro está correlacionada com agregados insolúveis da proteína tau no giro temporal inferior, sugerindo seu papel na formação de emaranhados neurofibrilares (NFTs) (Abbas et al., 2025; Chen et al., 2025b).

Esses íons metálicos (Fe^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+}) estimulam a produção de radicais livres, oxidando lipídios, proteínas e DNA, e estão associados tanto à agregação de $A\beta$ quanto à formação de NFTs. Paralelamente, promovem neuroinflamação e ativam vias tóxicas que culminam em disfunção e morte celular. Embora os mecanismos precisos ainda sejam investigados, o desenvolvimento de quelantes metálicos para reduzir a toxicidade neuronal emerge como uma estratégia terapêutica promissora na DA (Chen et al., 2025b; Li et al., 2018).

1.2.8. Histamina H_3R

Localizados no hipotálamo, no núcleo tuberomamilar (NTM), os neurônios histaminérgicos servem como a principal fonte de síntese de histamina no cérebro (Szukiewicz, 2024). A histamina é um neurotransmissor e regulador imunológico essencial no sistema nervoso central, atuando por meio de quatro subtipos (H_1R , H_2R , H_3R e H_4R) de receptores acoplados à proteína G (GPCRs). Enquanto os receptores H_1R , H_2R e H_4R estão associados a respostas alérgicas, secreção gástrica e imunológicas/ inflamatórias respectivamente, o receptor H_3 (H_3R) possui funções críticas na modulação cognitiva e neuroinflamatória (Nieto-Alamilla et al., 2016; Thomas et al., 2024).

O H₃R está localizado principalmente em neurônios pré-sinápticos, onde atua como autorreceptor, inibindo a síntese e liberação de histamina, e como heterorreceptor regulando a liberação de neurotransmissores como dopamina, acetilcolina, GABA, serotonina e norepinefrina (Figura 6A). Sua ativação inibe a adenilato ciclase, reduzindo os níveis de adenosina monofosfato cíclico (cAMP) e suprimindo vias de sinalização dependentes, como a ativação da proteína cinase A (PKA) e a transcrição de genes mediada pela proteína de ligação ao elemento responsivo ao cAMP (CREB). Além disso, o H₃R regula efetores como MAPKs e PI3K/AKT/GSK-3 β , vias críticas para a sobrevivência neuronal e modulação inflamatória. Adicionalmente, o H₃R inibe o trocador Na⁺/H⁺ (NHE), regulando pH intracelular e Ca²⁺, modulando homeostase iônica e excitabilidade neuronal (Figura 6B) (Szukiewicz, 2024; Thomas et al., 2024).

Em contraste, antagonistas ou agonistas inversos do H₃R elevam a liberação de histamina, amplificando a neurotransmissão e a plasticidade sináptica. Além disso, reduzem a neuroinflamação ao inibir a ativação da micróglia no estado pró-inflamatório, suprimindo a liberação de citocinas e estimulando a polarização para o fenótipo anti-inflamatório. Essas propriedades destacam o H₃R como um alvo farmacológico promissor para doenças com déficits cognitivos e neuroinflamatórios, como a DA (Szukiewicz, 2024; Thomas et al., 2024; Zhao et al., 2024).

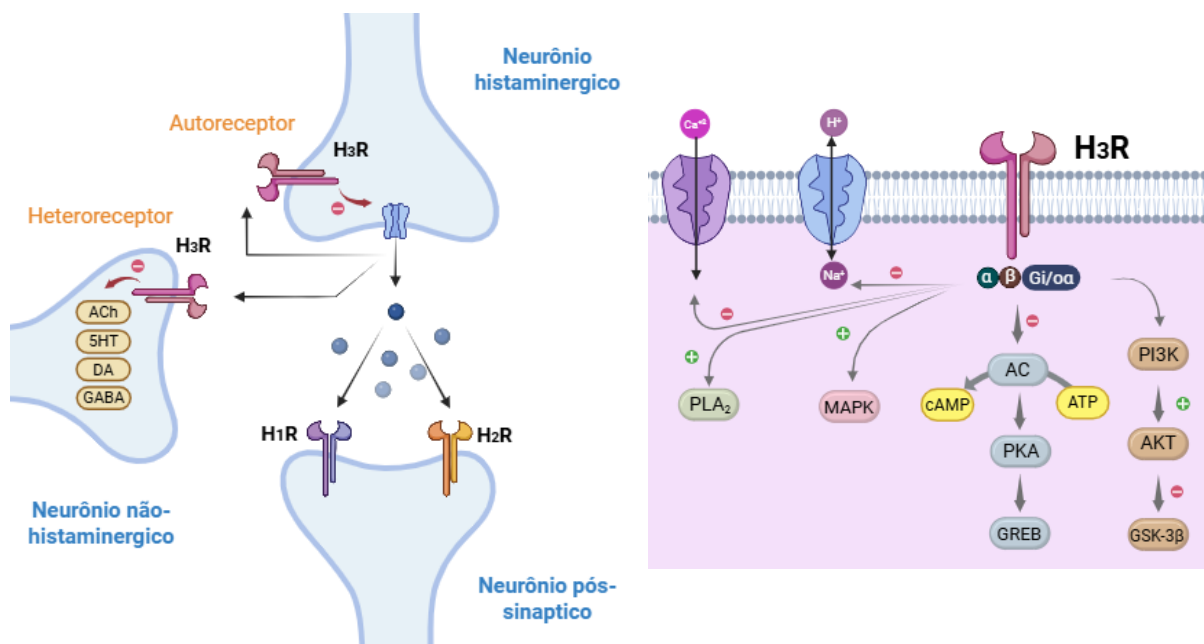


Figura 6. A) Receptores H₃ funcionando como auto e heterorreceptores. B) Vias de sinalização associadas ao H₃R (Adaptado de (Thomas et al., 2024)).

1.2.9. Monoamino Oxidase B (MAO-B)

As monoamina oxidase (MAO) são enzimas mitocondriais que contêm dinucleotídeos de flavina adenina (FAD) responsáveis por catalisar a desaminação oxidativa de monoaminas e outras proteínas, desempenhando um papel crítico no metabolismo dos neurotransmissores (Li et al., 2018; Soni et al., 2025). A MAO é classificada em duas isoformas, MAO-A e MAO-B, de acordo com a especificidade do substrato e a sensibilidade ao inibidor. A MAO-A se caracteriza por ter maior especificidade por serotonina (5-HT), norepinefrina e epinefrina. No cérebro a MAO-A está predominantemente localizada em neurônios catecolaminérgicos e em tecidos periféricos humanos e é predominantemente expressa na placenta e fibroblastos. Além disso, está envolvida na patogênese e no progresso de doenças neuropsiquiátricas (Naoi et al., 2025).

Já a MAO-B está presente em neurônios serotoninérgicos e histaminérgicos e células gliais, e em tecido como plaquetas e linfócitos (Naoi et al., 2025). Além disso a MAO-B, é a enzima responsável pela degradação da dopamina, regulando a neurotransmissão dopaminérgica, essencial para funções motoras, cognitivas e de recompensa (Figura 7A). Na Doença de Alzheimer (DA), sua atividade elevada em células gliais e neurônios reduz a disponibilidade de dopamina, prejudicando a sinalização sináptica e exacerbando déficits motores e cognitivos, paralelos aos observados na Doença de Parkinson. Além disso, a MAO-B gera peróxido de hidrogênio (H_2O_2) durante o metabolismo da dopamina, produzindo espécies reativas de oxigênio (ROS) que induzem estresse oxidativo, danificam componentes celulares (lipídios, proteínas e DNA), desestabilizando a homeostase celular e ativando células gliais (como astrócitos e micróglia), que liberam citocinas pró-inflamatórias. Essas citocinas regulam positivamente a expressão da MAO-B, amplificando sua atividade enzimática (Figura 7B) (Oyovwi et al., 2025).

Dessa forma, estratégias terapêuticas focadas na inibição seletiva da MAO-B, visam restaurar o equilíbrio dopaminérgico, reduzir ROS e interromper a cascata inflamatória, oferecendo potencial neuroprotetor contra os mecanismos centrais da DA (Oyovwi et al., 2025).

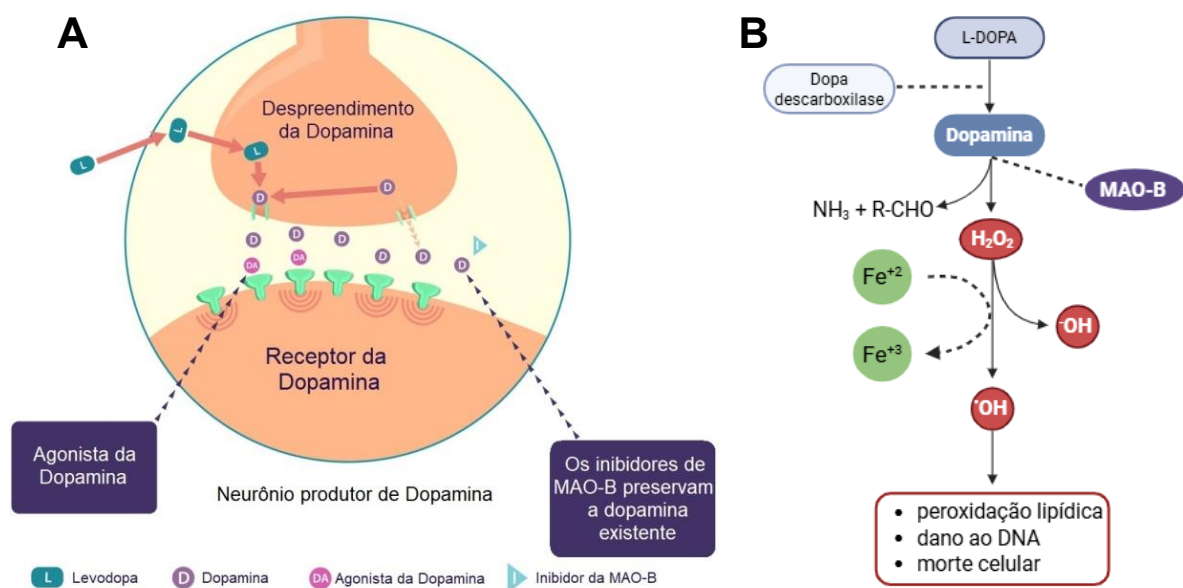


Figura 7. A) Estimulação do sistema dopaminérgico pela ação dos inibidores da MAO-B (Adaptado de (ParkinsonsDisease, 2025)); **B)** Desaminação oxidativa catalisada pela MAO-B, levando a formação de radicais livres (Adaptado de (Oyovwi et al., 2025)).

1.3. Terapias para a Doença de Alzheimer

Nas últimas décadas, observou-se um aumento significativo nos estudos sobre a patologia da doença de Alzheimer, tanto na identificação de alvos terapêuticos quanto no desenvolvimento de fármacos. A complexidade desta doença torna o desenvolvimento de terapias um grande desafio. Além da incerteza sobre seus mecanismos patológicos, sua progressão lenta torna os ensaios clínicos demorados, exigindo abordagens específicas para cada estágio e segurança em tratamentos de longo prazo. Além disso, somam-se os desafios de integrar múltiplos alvos moleculares e validar biomarcadores precisos (Abdallah, 2024).

Por muitas décadas as terapias disponíveis para o tratamento da doença de Alzheimer eram apenas terapias sintomáticas, ou seja, terapias capazes de aliviar os sintomas de uma doença, sem necessariamente tratar ou erradicar a causa. Entretanto houve progresso recente no desenvolvimento e aprovação de terapias modificadoras da doença (TMDs).

1.3.1. Terapias sintomáticas da doença

Ao longo de décadas, poucos fármacos receberam a aprovação pelo *Food and Drug Administration* (FDA) para tratar os sintomas cognitivos da DA. A Tacrina (**1**), foi o primeiro inibidor da colinesterase aprovado pela FDA em 1993 para o tratamento da DA, entretanto, foi

retirado do mercado em 2013 por apresentar a alta hepatotoxicidade, sendo substituída pelos fármacos rivastigmina (2), donepezila (3) e galantamina (4). A rivastigmina (2) é um inibidor não-competitivo pseudoirreversível e não seletivo, de modo que inibe com afinidades muito semelhantes tanto a AChE quanto a BChE, já a donepezila (3) e galantamina (4) são inibidores reversíveis e seletivos de AChE, mas ainda possuem efeitos adversos associados (Figura 8).

Esta classe é reconhecida por atuar apenas de forma paliativa, melhorando a neurotransmissão colinérgica pelo aumento da disponibilidade de ACh pela inibição da AChE, mas sem impedir a progressão da doença (Abdallah, 2024; Ferri et al., 2005).

O outro fármaco utilizado é a memantina (5), um derivado da adamantina, que foi aprovado para uso clínico em 2003 como um antagonista de N-metil D-aspartato (NMDA) e é prescrito principalmente para estágios mais avançados da doença, podendo ser usada sozinha ou em combinação com a donepezila (3) (Figura 8).

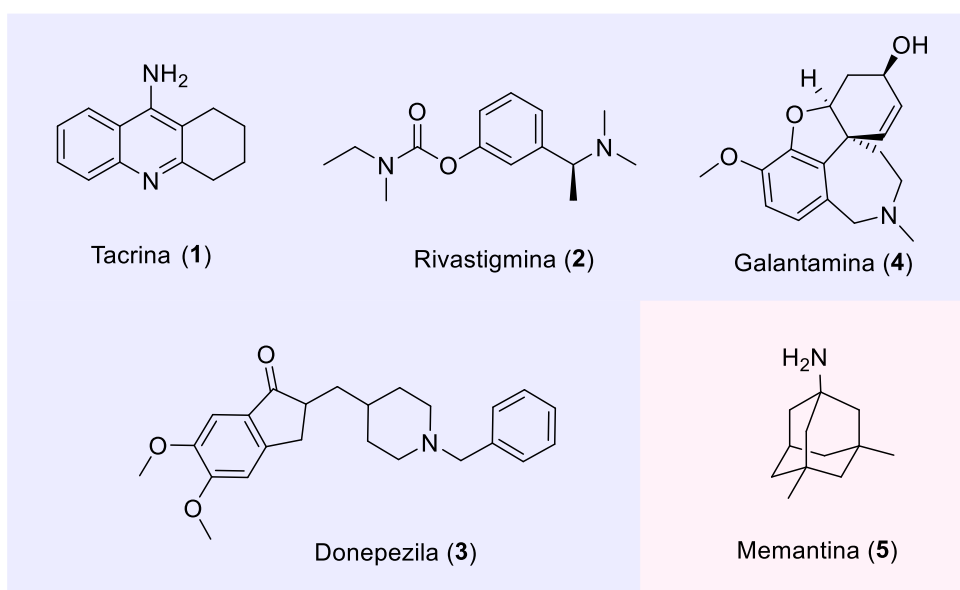


Figura 8. Fármacos inibidores colinesterásicos (1-4) e inibidor do receptor NMDA (5) aprovados pela FDA para o tratamento dos sintomas cognitivos da DA.

A abordagem terapêutica da memantina (5) segue a hipótese glutamatérgica e age inibindo os receptores NMDA reduzindo o influxo de íons de cálcio nos neurônios, de modo que impede a ativação de eventos intracelulares tóxicos. Ela melhora a capacidade cognitiva e distúrbios comportamentais, mas sem modificar a doença (Abdallah, 2024).

Além do tratamento dos sintomas cognitivos, os sintomas comportamentais e psicológicos da demência (BPSD) — como agitação, agressividade, alucinações, depressão ou

ansiedade — também são frequentemente abordados, embora com extrema cautela, devido aos riscos associados em pacientes idosos (Lee et al., 2025; Murphy; Golden; Tampi, 2025). Recentemente, o brexpiprazol (6) tornou-se o primeiro fármaco aprovado pela FDA para o tratamento da agitação associada à doença de Alzheimer (Figura 9) (Commissioner, 2024). Outras opções terapêuticas utilizadas para BPSD, ainda que não aprovadas oficialmente pela FDA incluem outros antipsicóticos, antidepressivos, particularmente inibidores seletivos da recaptação da serotonina (ISRS), e baixas doses de trazodona, inibidores da colinesterase (1-4) e memantina (5). No entanto, esses tratamentos apresentam eficácia apenas modesta no controle dos sintomas comportamentais e psicológicos, reforçando a necessidade de monitoramento rigoroso e abordagens multidisciplinares (Murphy; Golden; Tampi, 2025).

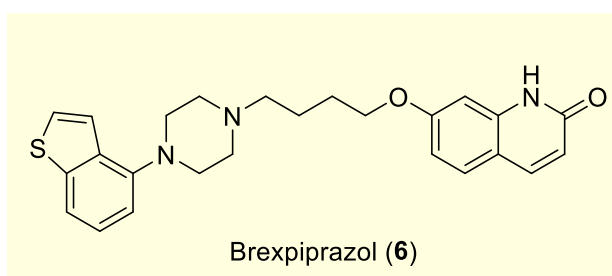


Figura 9. Fármaco Brexpiprazol (6) usado para o tratamento da agitação na DA.

1.3.2. Terapias modificadoras da doença

Por décadas, não houve terapias modificadoras da doença (TMDs) aprovadas pelo FDA para a doença de Alzheimer. Esse cenário mudou em 2021, com a aprovação do aducanumabe (Aduhelm®), o primeiro anticorpo monoclonal anti-amiloide. Essa nova classe de medicamentos tem como alvo a remoção de placas de beta-amiloide ($A\beta$), marcando o início das TMDs para a DA. O aducanumabe recebeu aprovação acelerada pelo FDA, baseado em resultados satisfatórios na fase II dos ensaios clínicos, e em dados reanalisados de dois estudos de fase III inconclusivos. A decisão, que ignorou a recomendação contrária do comitê consultivo da FDA, foi bastante criticada e gerou debates entre os cientistas (Abdallah, 2024; Liu et al., 2024).

O Aducanumabe, um anticorpo monoclonal recombinante, é descrito como capaz de interagir com os agregados de $A\beta$ e os marcar para remoção microglial, retardando o declínio cognitivo em pacientes com DA leve. Entretanto, além da falta de evidências sólidas de sua

eficácia clínica, demonstra efeito colateral significativo, como risco de edema cerebral (ARIA-E) em 35% dos casos (Abdallah, 2024; Ameen et al., 2025; Yang; Abd-Elrahman, 2025).

Em janeiro de 2023, o fármaco lecanemabe (Leqembi®) também recebeu aprovação acelerada pela FDA, e após investigação mais aprofundada, recebeu a aprovação tradicional da FDA em julho de 2023 para o tratamento da DA em estágio inicial. O lecanemabe, um anticorpo monoclonal anti-A β , apresenta uma estratégia direcionada ao interagir preferencialmente com oligômeros solúveis de A β e agregados fibrilares, reduzindo a carga neurotóxica nas formas de A β (Abdallah, 2024; Ameen et al., 2025). Como efeitos colaterais foram observado risco de edema cerebral (ARIA-E) em 12,6 % dos casos e risco de micro-hemorragias (ARIA-H) em 17,3% dos casos. Esses efeitos são mais comuns em portadores do gene APOE ϵ 4. A maioria dos casos é leve, mas exige monitoramento por ressonância magnética (Ameen et al., 2025).

Recentemente, em julho de 2024, houve a aprovação do donanemabe (Kisunla™), um anticorpo monoclonal, que se liga especificamente a região N-terminal do piroglutamato da A β (N3pE), presente principalmente em placas amiloides. Ele promove a remoção das placas amiloides e redução das formas tóxicas de A β , incluindo agregados solúveis e insolúveis. Como efeito colateral foram observado risco de edema cerebral (ARIA-E) em 26 % dos casos (Ameen et al., 2025; Kim et al., 2025).

1.3.3. Candidatos a Fármacos em Fases clínicas

Muitos candidatos a fármacos se encontram em fases clínicas do processo de desenvolvimento de medicamentos para a DA. Os dados de registro desses ensaios clínicos podem ser encontrados no *clinicaltrials.gov*, mantido pela Biblioteca Nacional de Medicina dos Institutos Nacionais de Saúde (NIH) dos EUA. Esses dados são diariamente transferidos para o Observatório de Ensaios Clínicos para análise e interpretação e disponibilizados em *Alzpipeline.com*, cujo banco de dados abrange todos os ensaios clínicos intervencionistas sobre a Doença de Alzheimer e demências relacionadas, garantindo análise sistemática e atualizada do panorama de pesquisa global (AlzPipeline, 2025; ClinicalTrials, 2025; Cummings et al., 2024).

Dados obtidos em maio de 2025, contabilizam 175 ensaios clínicos para DA avaliando 138 candidatos a fármacos. Isso incluiu 52 ensaios testando 36 candidatos a fármacos na Fase III; 89 ensaios avaliando 82 candidatos a fármacos na Fase II; e 34 ensaios testando 33 candidatos a fármacos na Fase I (Figura 10) (AlzPipeline, 2025).

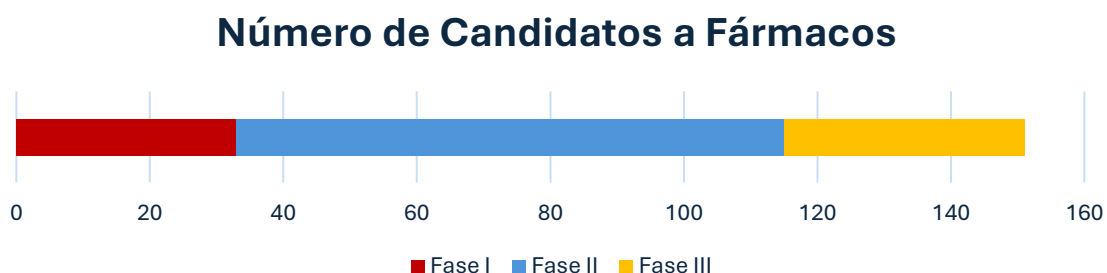


Figura 10. Número de candidatos a fármacos em cada fase do processo de desenvolvimentos de medicamentos para a doença de Alzheimer (Adaptado de (AlzPipeline, 2025)).

A maioria dos candidatos a fármacos em desenvolvimento para DA são TMDs. No total, há 133 TMDs, representando 76% dos compostos em ensaios clínicos, dos quais 71 são pequenas moléculas e 62 biológicas. Além disso, 22 candidatos a fármacos (12,6%) têm como objetivo o aprimoramento cognitivo, e 19 fármacos (11%) são tratamentos propostos para sintomas neuropsiquiátricos (Figura 11).

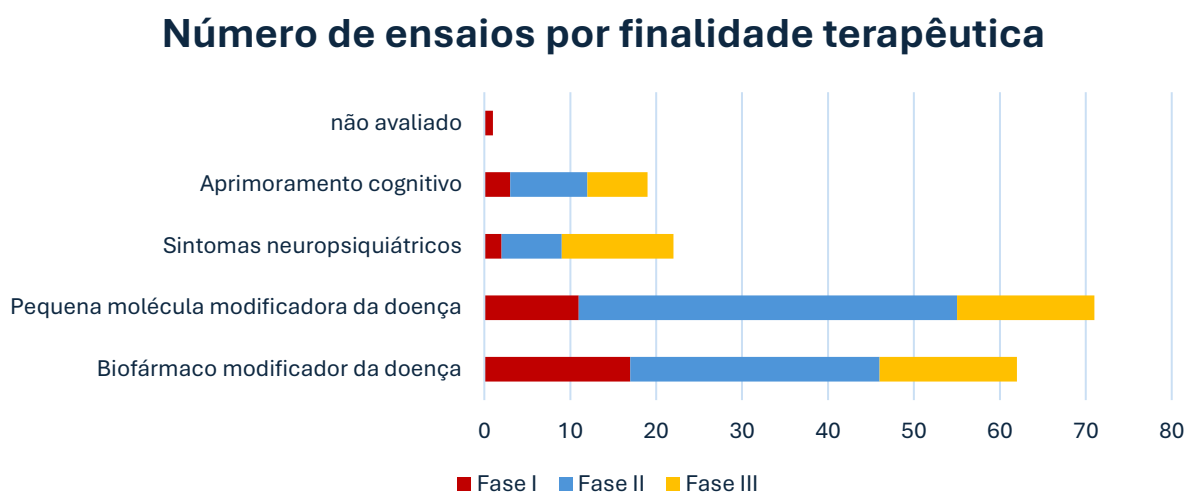


Figura 11. Número de candidatos a fármacos classificados por finalidade terapêutica em cada fase do processo de desenvolvimento de medicamentos para a doença de Alzheimer (Adaptado de (AlzPipeline, 2025)).

De modo geral, observa-se que vários ensaios clínicos com anticorpos monoclonais anti-amiloide estão em andamento. Recentemente, foi concluído o ensaio de fase III do solanezumabe (NCT04623242), que falhou ao não demonstrar eficácia em retardar o declínio cognitivo. Paralelamente, a fase III do gantenerumabe (NCT06424236) foi interrompida pela Roche, após vários estudos, apesar de ter mostrado maior eficácia na redução de placas amiloides. Isso porque o candidato a fármaco enfrentou desafios significativos, como

a alta incidência de ARIA e baixa penetração na barreira hematoencefálica (BBB). Como alternativa, a empresa está desenvolvendo uma nova versão, o trontinemabe, que visa melhorar a permeabilidade cerebral. Quanto ao remternetuge (NCT06653153), o recrutamento para a fase III está em curso, com previsão de conclusão para 2030 (Cummings et al., 2024; Kim et al., 2025; Tipton, 2024).

Ainda sobre modificadores da doença de origem biológica, temos o bepranemab (NCT04867616), um anticorpo monoclonal IgG4 que tem como alvo a região central da proteína tau. Os ensaios de fase II estão em andamento, com previsão de conclusão para 2028 (Cummings et al., 2024).

Voltado para neuroprotetores e potenciadores cognitivos, temos o buntanetap (7) (NCT06709014) atualmente em fase de recrutamento para ensaios de fase III para avaliação de eficácia e segurança em pacientes com doença de Alzheimer leve a moderada. Trata-se de um inibidor da tradução de proteínas neurotóxicas, incluindo APP, tau e α -sinucleína (Figura 12) (Fang et al., 2023; Huang et al., 2023).

Outro exemplo é o inibidor seletivo da fosfodiesterase 5 (PDE5), o AR-1001 (8) (NCT05531526), da farmacêutica Polaris, que está com os ensaios clínicos de fase III em andamento, com previsão de conclusão em 2027. AR-1001 atua impedindo a hidrólise da guanosina 3',5'-monofosfato cíclico (cGMP), que leva a ativação da proteína cinase G e no aumento da fosforilação da proteína de ligação responsiva ao AMPc (CREB) em Ser133 (Huang et al., 2023).

Também em destaque o inibidor de tirosina cinase (TKI) nilotinibe (9) (NCT05143528) está em estudos de fase III para investigar a segurança e a eficácia em indivíduos com DA precoce. O Nilotinibe (9) atua por meio da inibição das tirosina quinases ABL e receptores de discoidina (DDR1/2), modulando respostas celulares e removendo proteínas tóxicas como a β -amiloide e a tau fosforilada (Figura 12) (Huang et al., 2023; Tocci et al., 2025).

Além disso, a metformina (10) (NCT04098666), um medicamento antidiabético comumente prescrito, está em fase III de ensaios clínicos para o tratamento da DA, com conclusão prevista para 2026. A metformina (10) vem demonstrando melhorar a cognição ou o humor em muitos distúrbios neurológicos e resultados preliminares apontam recordação total do teste de lembrança seletiva livre e com indicação aos 24 meses (Huang et al., 2023; Li; Zhou; Fei, 2022).

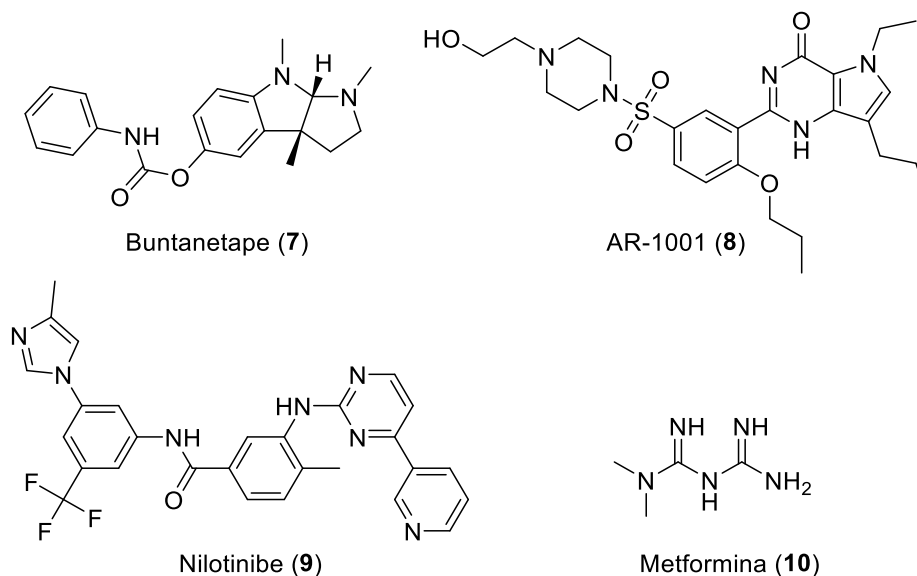


Figura 12. Fármacos neuroprotetores e potenciadores cognitivos em ensaio clínico para o tratamento da DA.

Atualmente, nenhum novo inibidor colinesterásico se encontra em ensaios clínicos. Um dos últimos exemplo foi o ladostigil (**11**) (NCT01429623), um inibidor multialvo que atuava inibindo as enzimas MAO-B e AChE simultaneamente, além de demonstrar efeito antioxidante. Ladostigil (**11**) foi avaliado em ensaio clínicos de fase II/III, mas falhou por falta de eficácia clínica, sendo descontinuado (Zarini-Gakiye et al., 2020). Ladostigil (**11**) é um derivado da rasagilina (**12**), fármaco inibidor da MAO-B usado no Parkinson, com um grupo carbamato similar ao da rivastigmina (**2**), fármaco inibidor da colinesterase usado no Alzheimer (Youdim, 2013). A rasagilina (**12**) também já foi avaliado em ensaios clínicos para a doença de Alzheimer, com conclusão de estudos de fase II em 2019, mostrando efeito favorável. Entretanto, nenhum estudo de fase III foi iniciado ainda (Figura 13) (Matthews et al., 2020).

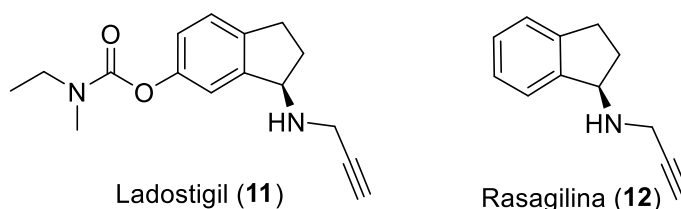


Figura 13. Fármacos que foram investigados em ensaio clínico para o tratamento da DA.

1.4. Compostos Multialvos

Estratégias de design racional de ligantes direcionados a múltiplos alvos (MTDLs – do inglês *Multi-Target Directed Ligands*) baseiam-se na combinação de duas ou mais estruturas moleculares com propriedades já estabelecidas, em uma única entidade molecular. Essa

abordagem traz muitos benefícios no tratamento de doenças complexas, como DA, nas quais múltiplas vias e mecanismos contribuem para a progressão da doença, além de reduzir efeitos colaterais associados a terapias combinadas e sinergia terapêutica ((Jeremic; Jiménez-Díaz; Navarro-López, 2021; Yoo et al., 2025)).

A combinação entre as unidades farmacofóricas pode ser realizada através de três abordagens principais: ligação, fusão ou conjugação. Na abordagem da ligação as estruturas originais são conectadas por meio de um espaçador, na abordagem por fusão temos a união direta entre os núcleos e na abordagem por conjugação temos a mesclagem dos componentes funcionais, preservando características estruturais essenciais para a atividade (Ogos; Stary; Bajda, 2024; Yoo et al., 2025)).

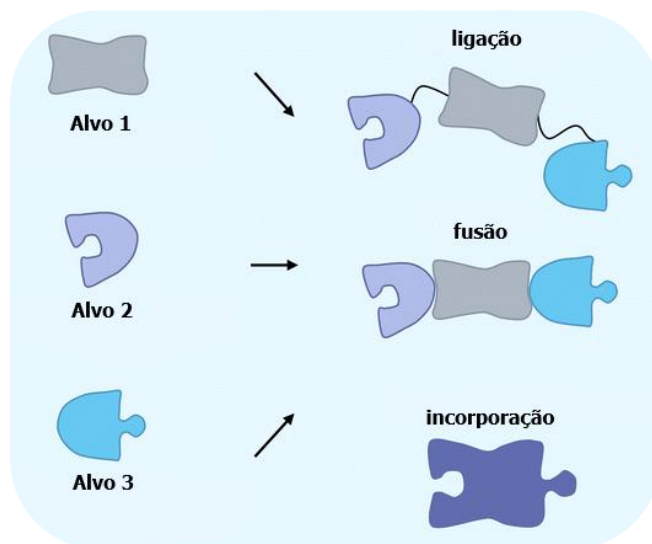


Figura 14. Estratégia de design para ligantes direcionados a múltiplos alvos (Adaptado de (Yoo et al., 2025)).

Atualmente, diversas estratégias envolvendo ligantes multialvo (MTDLs) combinam a inibição das colinesterases (ChEs) com outros mecanismos de ação. Na literatura, são descritos compostos inibidores da AChE que atuam de forma dual ou multialvo, integrando propriedades como quelação de metais, inibição da agregação de β -amiloide ($A\beta$), bloqueio da BACE-1 (β -secretase), modulação da MAO-B, inibição de PDE, moduladores de H_3R , além de atividades antioxidantes e anti-inflamatórias, entre outras. (Azam; Naseer; Rochais, 2025).

Na busca por MTDLs, Kumar e colaboradores otimizaram uma cromona – estrutura de importância medicinal e considerada um farmacóforo para MAO-B, com a inserção da pirrolidina, farmacóforo da AChE. O resultado foi o derivado de cromona (**13**), que exibe ação dual por meio da inibição simultânea de AChE e MAO-B (Figura 15) (Kumar et al., 2024).

Do mesmo modo, Yang et al reportou a obtenção da 4-hidrocurarina substituída com dimetilaminopropil (**14**) (Figura 15) com atividade inibitória significativa frente AChE, agregação autoinduzida e induzida por Cu^{2+} de $\text{A}\beta_{1-42}$ e capacidade quelante de metais, quelando seletivamente íons Cu^{2+} , Al^{3+} , Fe^{3+} , Fe^{2+} , e Zn^{2+} (Yang et al., 2022).

Outro exemplo é o híbrido de quinolina-piridina (**15**) (Figura 15) com potente atividade de AChE, inibindo também a BChE e agregação de $\text{A}\beta_{1-42}$, além de demonstrar efeitos anti-inflamatórios significativos (Czarnecka et al., 2018).

Assim como a quinolina e a cumarina, a quinazolina também ocupa um lugar único na química heterocíclica e medicinal, com diversas aplicações biológicas. Mohamed et al. sintetizaram os derivados de quinazolina **16** e **17** (Figura 15), sendo **16** um inibidor duplo de colinesterases (ChEs), além de prevenir a agregação de $\text{A}\beta_{40}$. Já **17** é inibidor seletivo da AChE, potente inibidor da agregação de $\text{A}\beta_{40}$ e também apresentou boa atividade antioxidante (Mohamed; Rao, 2017).

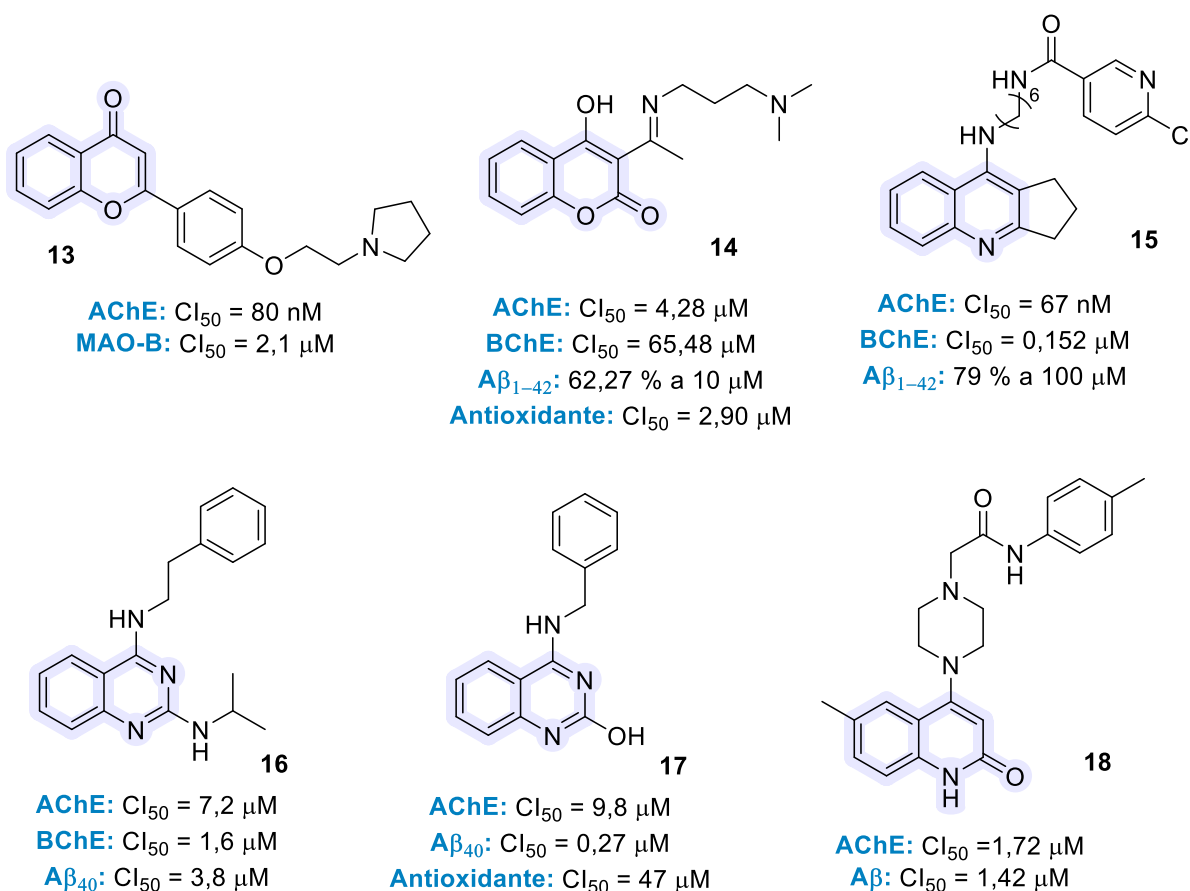


Figura 15. Ligantes direcionados a múltiplos alvos da DA

Outro estudo para o desenvolvimento de MTDLs realizado por Manzoor e colaboradores, identificaram um híbrido de quinolinona (**18**) (Figura 15) como inibidor dual da AChE e da agregação de A β , exibindo efeito neuroprotetor e eficaz capacidade antioxidante (Manzoor et al., 2024).

Vale destacar ainda o trabalho desenvolvido por Malek e colaboradores, que propuseram o MTDLs 1,4-di-hidropiridina-piperidina (**19**), derivada da 4-di-hidropiridina (1,4-DHP) (**20**) — um antagonista de canais de cálcio bem estabelecido —, conjugada ao pitolisante (**21**), antagonista H₃R, por meio de uma cadeia espaçadora (Figura 16). Esse composto demonstrou atividade notável como bloqueador de canais de Ca²⁺, além de alta afinidade pelo *h*H₃R. Adicionalmente, apresentou inibição seletiva da *h*BChE, propriedades antioxidantes e potencial para atenuar déficits cognitivos induzidos por lipopolissacarídeos em modelos experimentais (Malek et al., 2019).

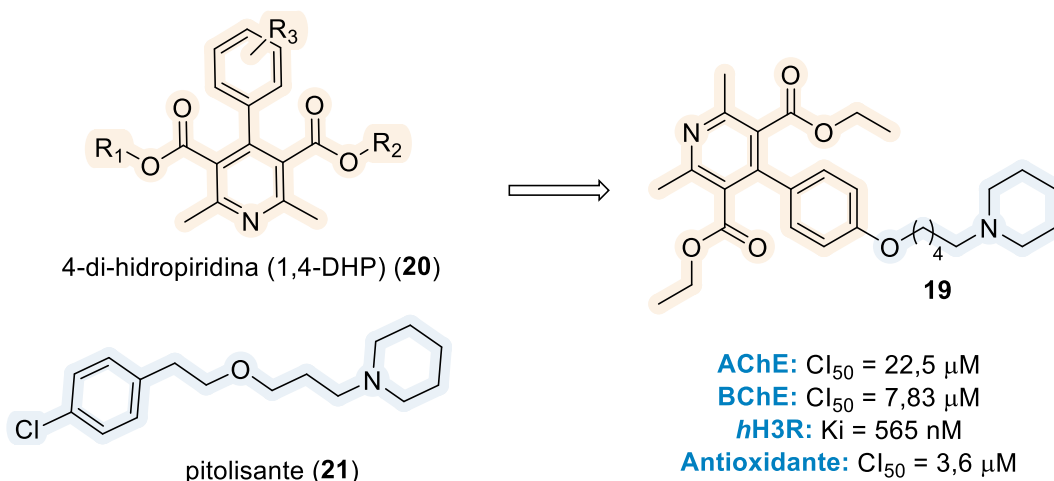
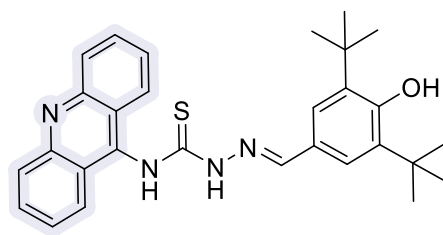


Figura 16. Planejamento das 1,4-di-idropiridina-piperidina (**19**).

Por fim, vale mencionar o trabalho desenvolvido por Sousa e colaboradores, que propuseram uma série de MTDL com tiossemicarbazona-acridina. O composto **22** demonstrou inibição das colinesterases, além de propriedade antioxidantes relevante e capacidade quelante de metais, especificamente para os íons Cu²⁺, Fe³⁺ e Zn²⁺. Adicionalmente, esse derivado exibiu propriedades neuroprotetivas *in vitro* e reverteu o comprometimento cognitivo induzido por escopolamina *in vivo*, sem afetar a atividade locomotora em camundongos (Silva Sousa et al., 2025).



22

AChE: $Cl_{50} = 10,53 \mu M$

BChE: $Cl_{50} = 1,15 \mu M$

Antioxidante: 69,05 % a $100 \mu M$

$CE_{50} = 47,01 \mu M$

Figura 17. Tiossemicarbazona-acridina (**22**) como MTDL para DA.

Os exemplos supracitados demonstram a versatilidade e o notável potencial da estratégia de MTDLs no desenho de novas terapias para a DA. A partir de diferentes núcleos heterocíclicos, é possível integrar múltiplos farmacóforos que atuam em alvos distintos e complementares da patologia. Evidencia-se, portanto, a importância de conjugar, em uma única molécula, um efeito sintomático com uma ou mais ações modificadoras da doença. Esta abordagem híbrida, que busca simultaneamente aliviar os sintomas e interferir na progressão da doença, representa uma das fronteiras mais promissoras no campo, servindo como o fundamento racional para o desenvolvimento contínuo de novos e mais eficazes agentes terapêuticos.

1.4.1. Estratégias Multialvo com Cumarinas: Contribuições do Acervo LadMol-QM

Isoladas em 1820 por Vogel a partir do *Coumarouna odorata*, as cumarinas são lactonas do ácido *orto*-hidroxi-cinâmico e são amplamente investigadas devido à grande gama de atividades farmacológicas relevantes demonstradas, tais como: anti-inflamatória, antioxidante, antimicrobiana, anticoagulante, anti-HIV, anti-Alzheimer, antitubercular, anti-influenza e antidiabética. Adicionalmente, seu sistema π conjugado confere intensa fluorescência, permitindo aplicações como sondas biomoleculares, corantes e biomarcadores. Essas propriedades impulsionaram o desenvolvimento de sínteses otimizadas (Perkin, Pechmann, Knoevenagel) com técnicas modernas (micro-ondas, ultrassom) para derivados bioativos (Pereira et al., 2018).

Considerando os alvos moleculares associados à DA, as cumarinas estabelecem-se como agentes multifuncionais com atividades farmacológicas documentadas: inibição de colinesterases (AChE/BChE), supressão da agregação de placas β -amiloide ($A\beta$), inibição da BACE-1, bloqueio da MAO-B, inibição da GSK-3 β e quelação de metais (De Souza et al., 2019b; Fayyaz et al., 2024; Liu et al., 2022; Rodrigues et al., 2020; Yang et al., 2022).

Baseando-se nesse potencial, nosso grupo desenvolveu derivados alquilamino-cumarínicos (**24**) planejados a partir do núcleo alquilamino-indanona (**23**) — que demonstrou inibição seletiva mista da AChE e da agregação de placas A β . A estratégia envolveu a troca do núcleo indanônico (**23**) pela cumarina via isosterismo não clássico (expansão do anel), mantendo o grupo alquilamino cíclico responsável pela interação com o sítio catalítico (CAS) da AChE. Os derivados alquilamino-cumarínicos (**24**) demonstraram inibição potente e seletiva, com valores de CI₅₀ de até 20 nM sobre a AChE e seletividades de até 354 vezes sobre a butirilcolinesterase (BChE), além de propriedades antioxidantes (Figura 18) (De Souza et al., 2019).

Essa classe de compostos serviu como protótipo para novos projetos, originando os derivados 3-(1,2,3-triazol)-cumarínicos (**25**). Nesta segunda geração, realizou-se a substituição bioisostérica do anel aromático pelo grupamento 1,2,3-triazol — estratégia clássica visando otimizar as interações com o sítio periférico (PAS) da AChE. Como resultado, os análogos triazólicos exibiram inibição de CI₅₀ de até 50 nM sobre a AChE e seletividades de até 173 vezes sobre a butirilcolinesterase (BChE), validando o potencial do núcleo cumarínico modificado para o direcionamento dual CAS/PAS (Figura 18) (Nadur, 2020).

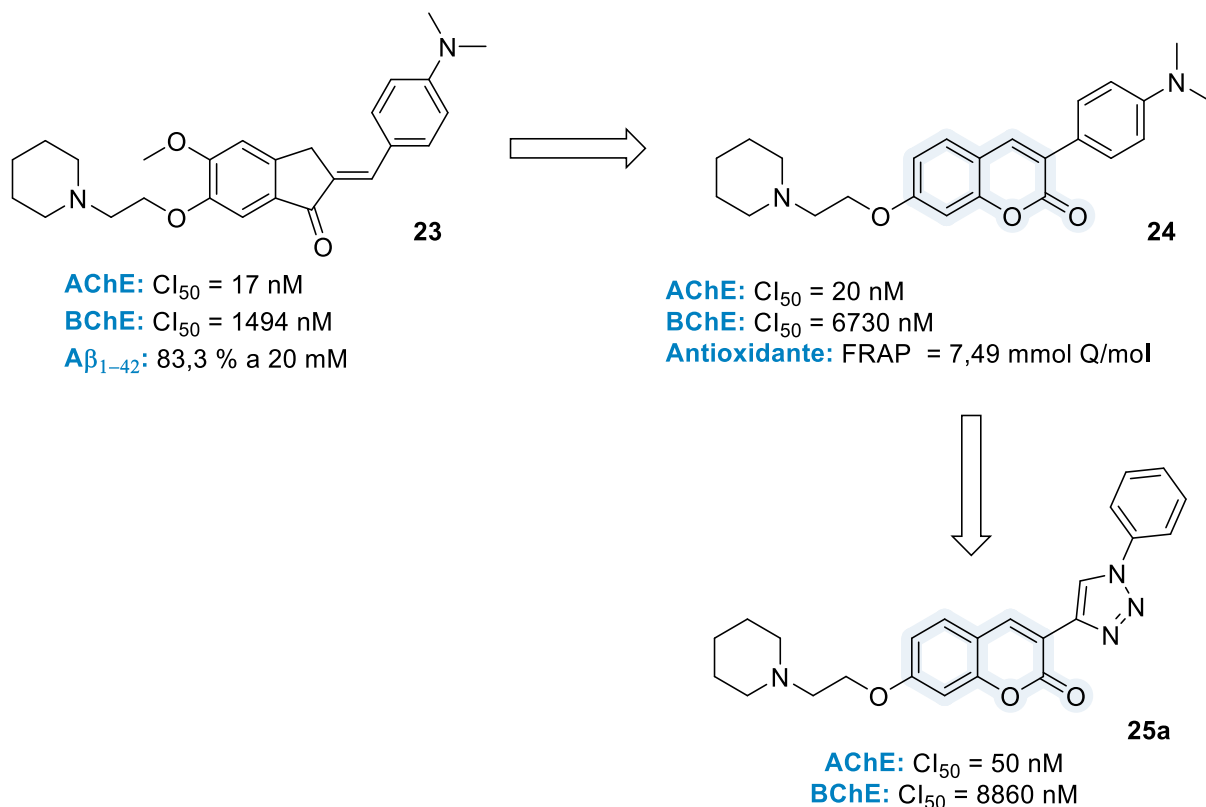


Figura 18. Planejamento dos compostos cumarínicos (**24** e **25a**) do LadMol-QM.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivos gerais

Esse trabalho tem como objetivos o planejamento, a síntese e avaliação farmacológica de uma série de benzil-1,2,3-triazolil-cumarinas e de heterociclos miméticos de cumarinas como possíveis agentes inibidores multialvos da enzima AChE e modulação de receptor de histamina H₃ e MAO-B, capazes de atuarem inibindo simultaneamente alvos que contribuem para a instalação e manutenção da DA.

2.2. Objetivos específicos

- Síntese dos compostos contendo os benzil-1,2,3-triazóis e os heterociclos miméticos de cumarinas propostos nas Figura 20 e Figura 21;
- Caracterização dos compostos sintetizados através dos métodos espectroscópicos de RMN ¹H e ¹³C.
- Investigação da inibição enzimática das colinesterases e modo de ação pelos compostos;
- Investigação da inibição enzimática dos compostos (A-C) frente a H₃R;
- Investigação da inibição enzimática dos compostos (A-C) frente a MAO-A e MAO-B;
- Investigação por métodos teóricos de modelagem molecular do perfil de interação dos compostos (A-C) com a AChE, BChE, H₃R, MAO-A e MAO-B, a fim de auxiliar no desenvolvimento de novas séries de ligantes mais potentes e seletivos;
- Avaliação de neurotoxicidade e de proteção neuronal.

2.3. Planejamento Estrutural

Recentemente, nosso grupo de trabalho (LaDMol-QM) descreveu duas classes de cumarinas (**24** e **25a-b**) que possuíam atividade inibitória mista, atuando no CAS e PAS ao mesmo tempo, com valores de CI₅₀ de até 20 nM sobre a AChE e seletividades de até 354 vezes sobre a butirilcolinesterase (BChE) (De Souza et al., 2019; Nadur, 2020). Estes estudos nos levaram a compreender os requisitos necessários para essa inibição: a) uma ligação cátion- π entre a piperidina da cadeia lateral das cumarinas e o Trp86 da AChE; b) uma ligação de H entre o oxigênio da cumarina e a Tyr337; c) espaçamento em torno de 2 metilenos entre o nitrogênio da piperidina e o oxigênio da cumarina; d) uma ligação de H entre o oxigênio da carboxila da cumarina e a cadeia peptídica da Phe295; e) a presença de substituintes aromáticos na posição 3 da cumarina para interações hidrofóbicas adicionais no PAS (Figura 19A). Estes

dados foram obtidos por comparações entre dados experimentais e teóricos obtidos por modelagem molecular e nos permitiram montar o mapa farmacofórico exposto na Figura 19B.

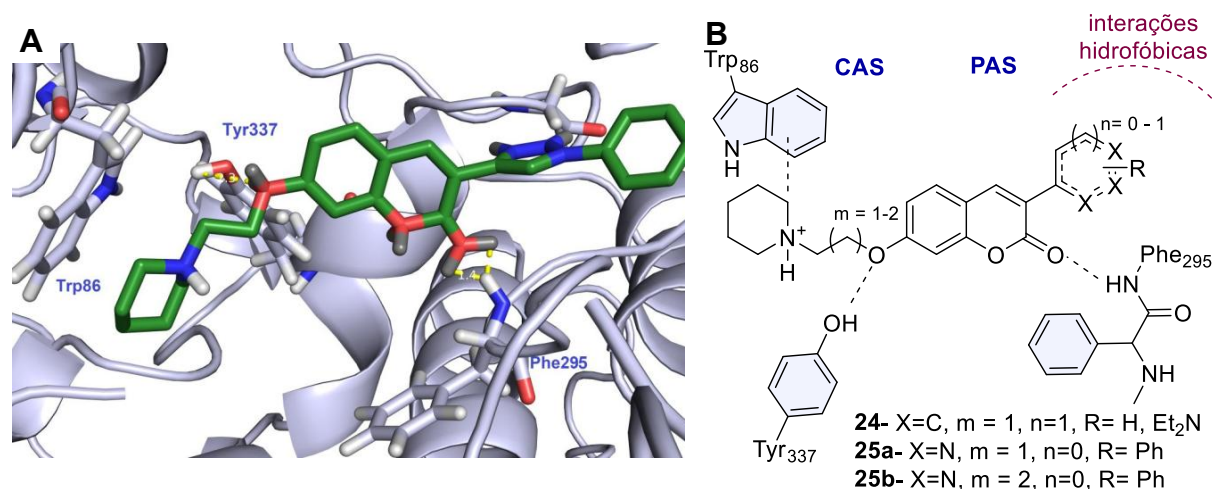


Figura 19. A) Interações da cumarina (**25a**) com a AChE (Nadur, 2020). B) Mapa farmacofórico das interações entre cumarinas e AChE.

Desta forma, foi inicialmente proposta a otimização da série de 1,2,3-triazolil-cumarinas (**25**) frente a AChE, lançando mão da estratégia de homologação, levando ao planejamento de novos derivados benzílicos (**A**), a fim de avaliar a influência do maior grau de liberdade da fenila e seus substituintes nas interações com o sítio periférico (PAS).

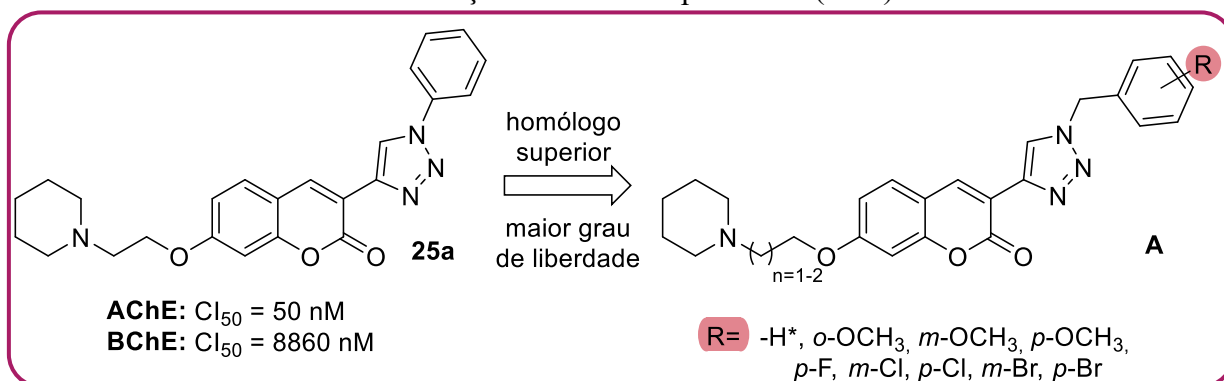


Figura 20. Derivatizações propostas para a série triazol-cumarinas (**A**). *(Nadur, 2020)

O sucesso demonstrado pelas cumarinas em nossas pesquisas valida este núcleo como um protótipo promissor. Apesar disso, nosso grupo busca continuamente otimizar potenciais candidatos terapêuticos. Neste contexto, exploramos a transposição do farmacóforo das cumarinas para núcleos que possam mimetizá-las do ponto de vista de interações com o biorreceptor, visando gerar *scaffolds* inéditos.

Com este objetivo, este projeto lança mão do mapa farmacofórico exposto na Figura 19B visando aplicação de estratégias de bioisosterismo clássico e de bioisosterismo não clássico, buscando a identificação de compostos estruturalmente diversos que são semelhantes

com relação a um protótipo em espaço químico e atividade biológica (Figura 21). Dessa forma, por meio de uma troca bioisostérica O→N no oxigênio lactônico, propôs-se o núcleo da fenil-quinolin-2(1*H*)-ona (**B**). Subsequentemente, mediante bioisosterismo não clássico, propuseram-se: a) abertura do anel da quinolin-2(1*H*)-ona, seguida por b) ciclização para proposta do núcleo da fenil-2-aminoquinazolina (**C**).

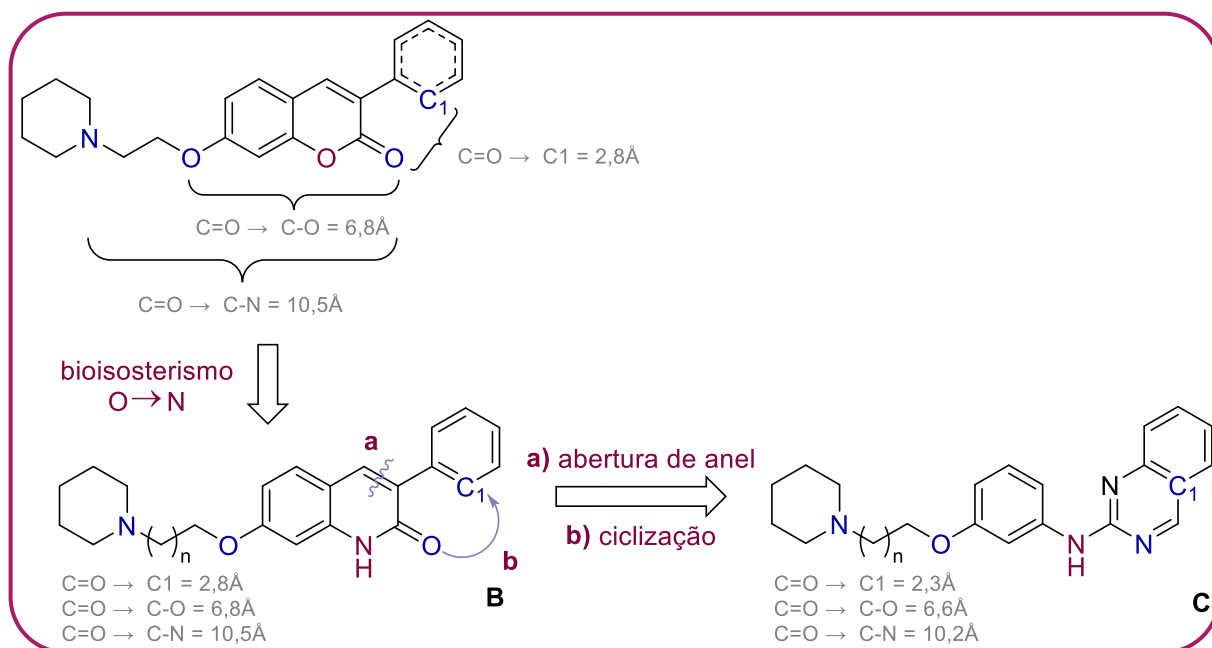


Figura 21. Planejamento dos novos heterociclos miméticos (**B-C**) das cumarinas. Os principais pontos de interação de **24** com a AChE estão marcados em azul, assim como nas estruturas propostas.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. SERIE A

3.1.1. Planejamento sintético dos compostos

A síntese da série de compostos (**26a-j**) foi planejada com base na análise retrossintética detalhada no Esquema 1.

Inicialmente, por meio de uma desconexão C-N (etapa a), foram identificados a piperidina (**28**) e as 3-(1-R-benzil-1*H*-1,2,3-triazol-4-il)-7-(bromoalcoxi)-cumarínicos (**27a-j**) como precursores, mediante uma reação de substituição nucleofílica bimolecular (S_N2).

Por meio de duas desconexões C-N (etapa b), foi verificado que os compostos triazólicos (**27a-j**) poderiam ser obtidos por meio da estratégia de síntese convergente, onde dois “blocos” moleculares são sintetizados de forma linear e, posteriormente, unidos em um meio reacional. (SMITH, 2016). Os precursores identificados foram as benzil azidas (**30a-i**) e os compostos 3-etenil-7-bromoalcoxi-cumarinas (**29a-b**), utilizando uma reação de cicloadição 1,3-dipolar de Huisgen, alcino-azida, catalisada por cobre(I) (CuAAC).

Deste modo, os benzaldeídos (**33a-h**) foram identificados como precursores das benzil azidas (**30a-i**) por meio de três etapas de interconversão de grupo funcional: redução dos benzaldeídos aos álcoois benzílicos (**32a-h**), seguida pela conversão destes álcoois em brometos de benzila (**31a-i**) via S_N2 (desconexão C-Br), e finalmente pela reação dos brometos com azida sódica (NaN₃) para formar as azidas via S_N2 (desconexão C-N).

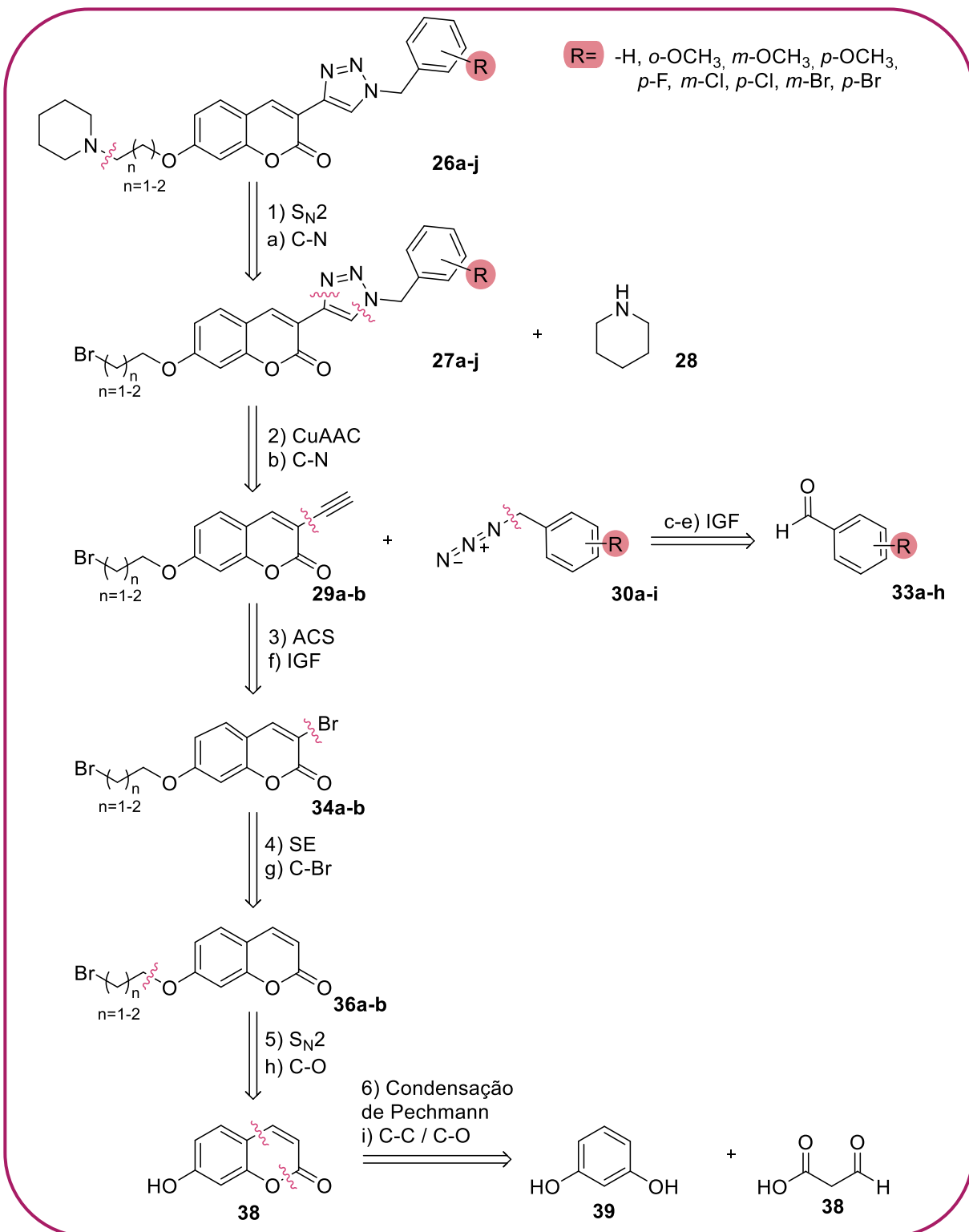
Para os compostos 3-etenil-7-bromoalcoxi-cumarinas (**29a-b**), foram identificados os compostos 3-bromo-7-bromoalcoxi-cumarinas (**34a-b**) como precursores após interconversões de grupos funcionais (etapa f), por meio da reação de acoplamento cruzado de Sonogashira (ACS). Contudo, devido à impossibilidade de realizar essa reação utilizando acetileno, um gás inflamável de alta periculosidade, o processo pode ser conduzido com acetileno protegido por trimetilsilano, seguido de uma etapa de desproteção do alcino.

Por uma desconexão C-Br (etapa g), foram identificados o bromo molecular (**35**) e os compostos (**36a-b**) como precursores, obtidas por uma reação de substituição eletrofílica em um sistema α,β -insaturado.

Através de uma desconexão C-O (etapa h), foi possível identificar o composto 7-hidroxycumarina (**38**) e os dibromoalcanos (**37a-b**) como precursores dos respectivos compostos alquilados (**36a-b**) via reação de substituição nucleofílica bimolecular (S_N2).

Por fim, uma desconexão C-C e C-O aplicada à 7-hidroxycumarina (etapa i) sugere o resorcinol (**39**) e o ácido formilacético (**40**) como reagentes de partida, explorando a

condensação de Pechmann. Devido à instabilidade do ácido formilacético, recomenda-se sua formação "*in situ*" a partir do ácido málico (**41**).



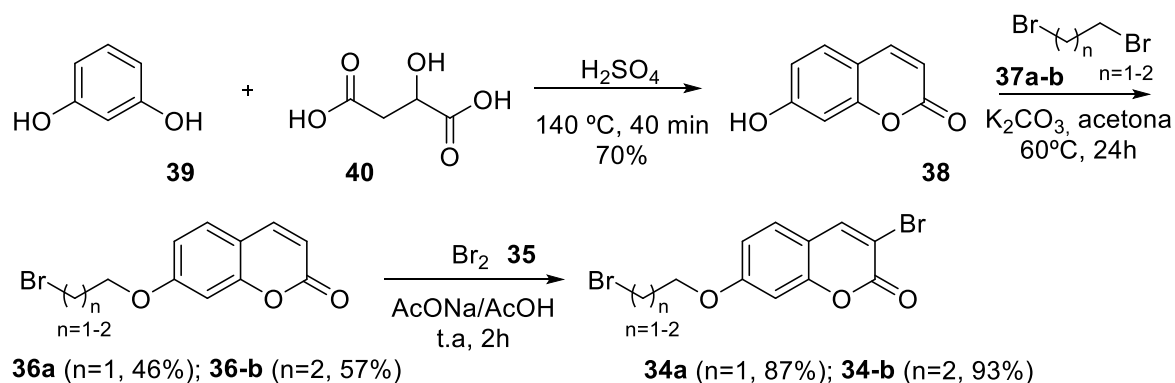
Esquema 1. Análise retrosintética para obtenção dos compostos planejados da série A.

3.1.2. Obtenção das 3-bromo-cumarinas substituídas (**34a-b**)

A síntese do composto 7-hidroxicumarina (**38**) foi realizada através da condensação de Pechmann (PECHMANN, 1884). Nesta condensação, foram utilizados resorcinol (**39**) e ácido málico (**41**) em meio de ácido sulfúrico, a 140°C (Esquema 2). 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) (Nadur, 2020).

Em seguida, a 7-hidroxicumarina (**38**) foi utilizada na síntese dos compostos 7-bromoalcoxi-cumarínicos (**36a-b**) através de reação de *O*-alquilação (Síntese de Williamson) em meio de carbonato de potássio (K₂CO₃) e dibromoalcanos (**37a-b**) em acetona, à 60 °C (Esquema 2). Os produtos obtidos se apresentaram sob a forma de sólidos com rendimentos de 46% (**36a**) e 57% (**36b**) (Nadur, 2020).

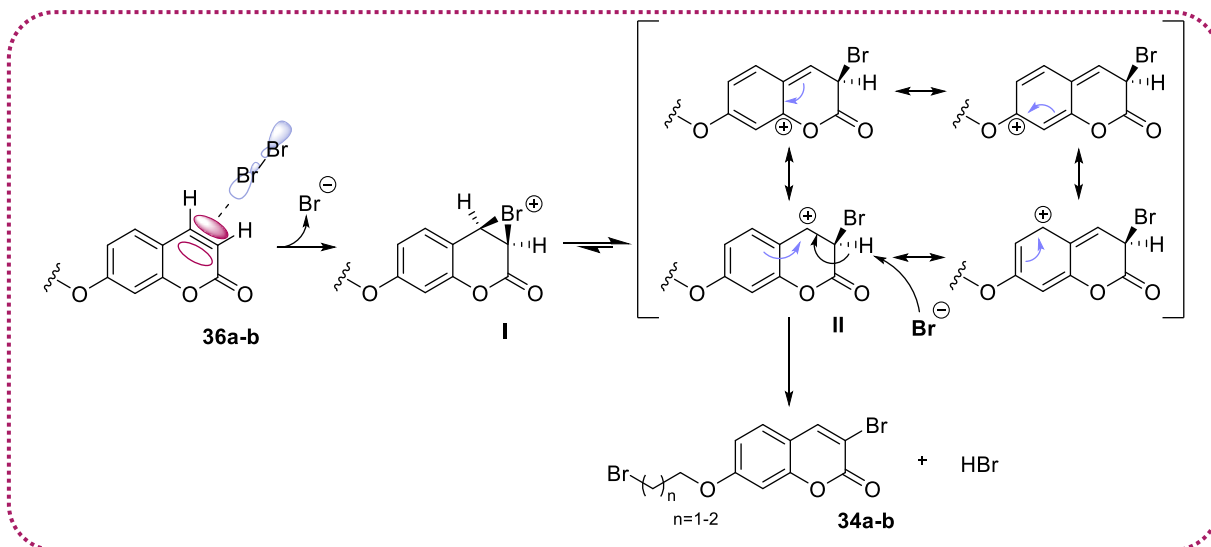
Por fim, os intermediários 3-bromo-7-(bromoalcoxi)cumarínicos (**34a-b**) foram obtidos como sólidos em rendimentos de 87 e 93%, respectivamente (Nadur, 2020), por meio de uma reação de bromação envolvendo as 7-(bromoalcoxi)cumarinas (**36a-b**) e bromo (**35**) à temperatura ambiente em meio tamponado com acetato de sódio/ácido acético (CH₃COONa/CH₃COOH) (Esquema 2).



Esquema 2. Obtenção da 3-bromo-cumarinas substituídas (**34a-b**).

O mecanismo proposto para a reação de bromação envolve uma substituição eletrofílica em um sistema α,β -insaturado. A reação inicia-se com a formação de um complexo pela aproximação do orbital σ^* vazio do bromo (LUMO) ao orbital π ocupado do alceno do sistema α,β -insaturado (HOMO). Em seguida, ocorre a formação de um intermediário iônico, podendo haver um equilíbrio entre o íon bromônio (**I**) e um β -bromocarbocátion (**II**), dependendo da estabilidade do carbocátion formado (Esquema 3) (CAREY; SUNDBERG, 2002). Neste caso, o β -bromocarbocátion (**II**) é favorecido, uma vez que é fortemente estabilizado pelo efeito de ressonância proporcionado pelo anel aromático adjacente. Além disso, a formação do

carbocátion também é favorecida pela solvatação eficiente promovida pelo ácido acético, um solvente prótico ácido.



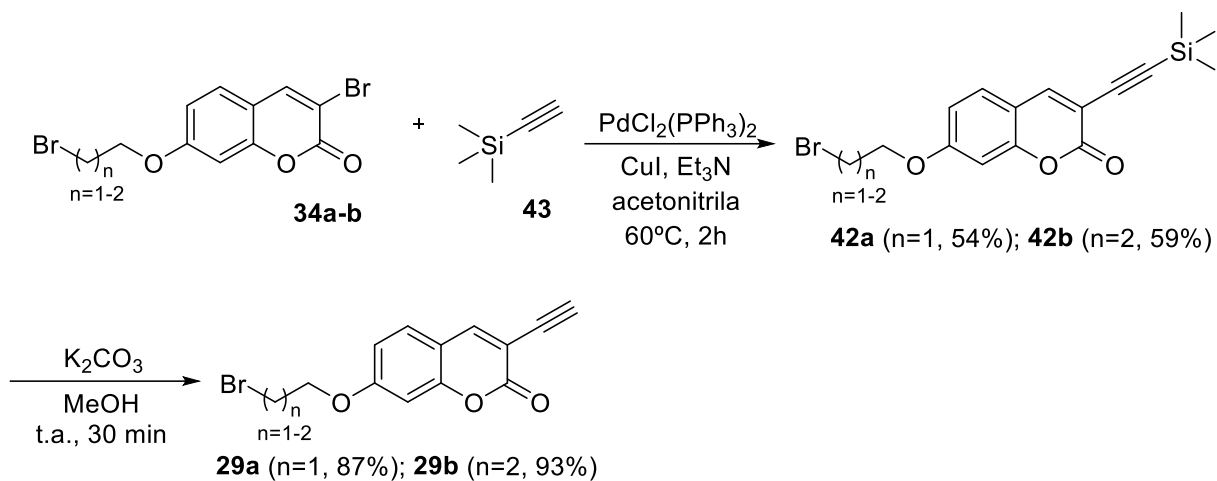
Esquema 3. Esquema de intermediários proposto para a formação dos compostos 3-bromo-7-(bromoalcoxi)cumarínicos (**34a-b**)

Devido às baixas concentrações de bromo, a substituição prevalece sobre a adição, já que a abstração do próton ocorre mais rapidamente do que o ataque pelo brometo (CAREY; SUNDBERG, 2002). Sendo assim, o brometo (Br^-) presente no meio abstrai o hidrogênio ácido deste intermediário (II), restituindo a ligação dupla e levando à formação dos respectivos produtos desejados (**34a-b**) e de ácido bromídrico (HBr). Vale destacar, adicionalmente, que o produto formado gera um sistema α,β -insaturado que estende a conjugação do anel aromático até a carbonila, o que também pode ser um dos fatores de favorecimento da reação substituição eletrofílica. Por ocorrer a formação de HBr como subproduto e este se tratar de um ácido forte, a reação é realizada em meio tamponado com $\text{CH}_3\text{COONa}/\text{CH}_3\text{COOH}$, a fim de se evitar uma possível abertura do anel lactônico do núcleo cumarínico (Esquema 3).

3.1.3. Obtenção dos intermediários chave (29a-b)

A síntese dos compostos 7-(bromoalcoxi)-3-((trimetilsilil)etnil)cumarinas (**42a-b**) foi realizada por meio da reação de acoplamento cruzado de Sonogashira. O processo utilizou como reagentes as 3-(bromo)-7-(bromoalcoxi)cumarinas (**34a-b**), cloreto de bis(trifenilfosfina)paládio(II), iodeto de cobre, trietilamina e trimetilsililacetileno (TMS-A, **43**), com acetonitrila como solvente, conduzido a $60\text{ }^\circ\text{C}$ (Yee; Balsanek; Sames, 2010) (Esquema 4). Os produtos foram obtidos na forma de um sólidos amorfos e com rendimentos de 54% para o composto **42a** e 59% para **42b** (Nadur, 2020).

Em seguida, os compostos 7-(bromoalcoxi)-3-(etenil)-cumarinas (**29a-b**) 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 4), onde se obteve os produtos sob a forma de um sólido amorfo com rendimentos de 87% para o derivado **29a** e 93% para **29b** (Nadur, 2020).



A execução dessas duas etapas reacionais é essencial para possibilitar a obtenção segura das 7-(bromoalcoxi)-3-(etenil)cumarinas (**29a-b**). A utilização de acetileno como bloco de construção de dois carbonos foi descartada devido à sua natureza explosiva e aos riscos associados à manipulação desse gás. Como alternativa prática e segura, optou-se pelo TMS-A (**43**), um líquido destilável de fácil manuseio. A desproteção subsequente de **42a-b** forneceu os intermediários-chave **29a-b**.

É relevante mencionar que na reação de acoplamento cruzado de Sonogashira, o solvente originalmente descrito na literatura, DMF, foi substituído pela acetonitrila, um solvente aprótico com menor ponto de ebulição (82 °C) em comparação ao DMF (153 °C). Essa modificação facilita a evaporação do solvente ao término da reação, otimizando o processo.

De acordo com Sonogashira e colaboradores, a reação de acoplamento cruzado de Sonogashira constitui uma ferramenta sintética eficiente para a formação de ligações Csp²-Csp, permitindo a síntese de compostos acetilênicos dissustituídos. Esse método consiste no acoplamento entre haletos de arila ou vinila e acetilenos terminais, empregando complexos de paládio(0) como catalisador, co-catalisado por sais de cobre(I), na presença de uma base orgânica (geralmente uma amina) (Sonogashira; Tohda; Hagihara, 1975).

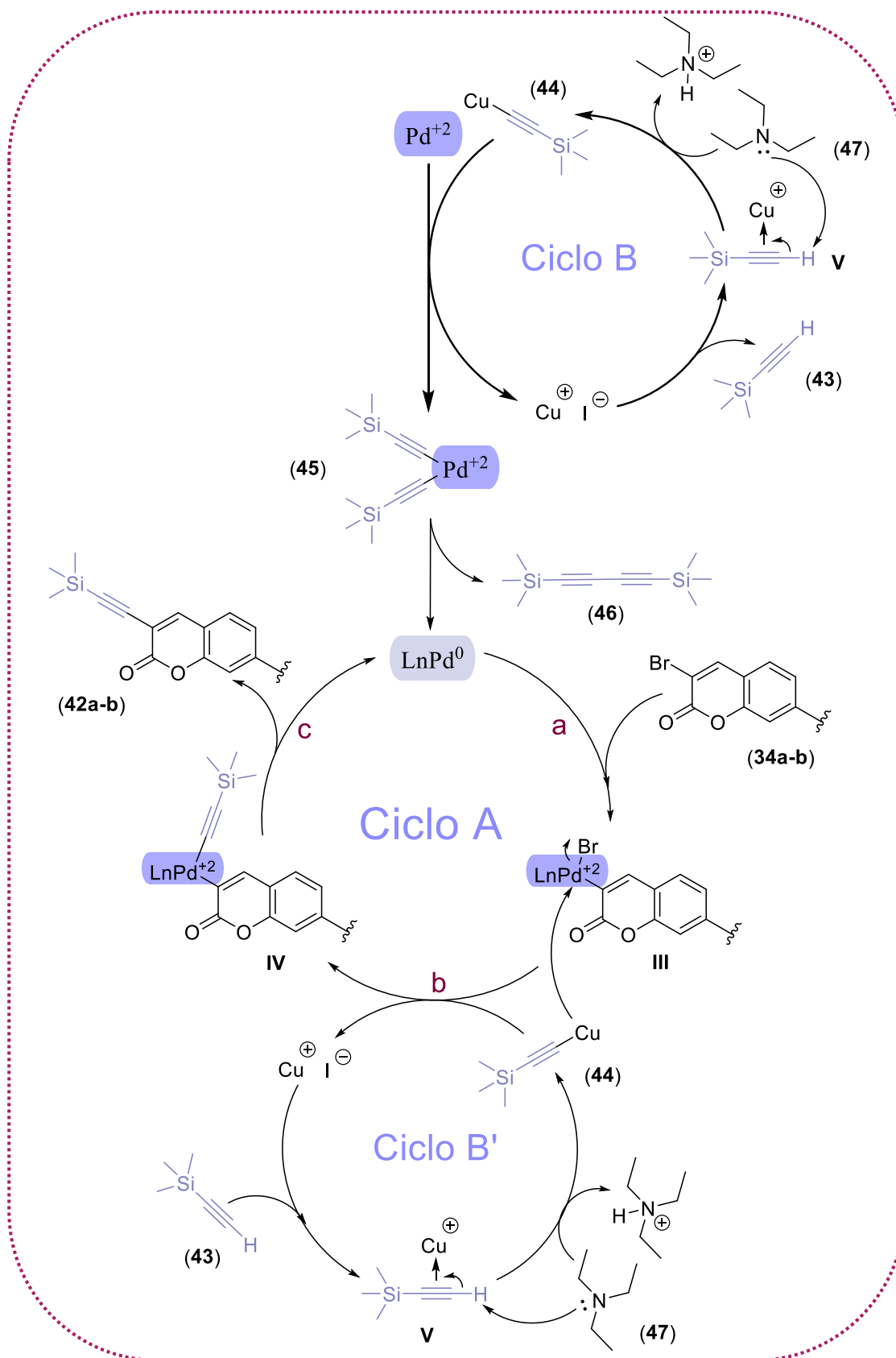
Para tal, o mecanismo mais aceito pela comunidade científica integra três ciclos catalíticos (A, B e B') que operam sinergicamente e envolvem as etapas de adição

oxidativa, transmetalção e eliminação redutiva (Esquema 5). (Sonogashira, 2002; Zhao; Liu, 2024).

Inicialmente temos a reação do complexo $\text{PdCl}_2(\text{PPh}_3)_2$ com dois equivalentes do acetileto de cobre (**44**), proveniente do ciclo B, que leva a formação do bis(trifenilfosfina)dialquinil de paládio (II) (**45**). Este, por sua vez, sofre eliminação redutiva resultando na formação do 1,3-butadiino (**46**) e da espécie catalítica ativa, bis-trifenilfosfina de paládio(0) ($\text{Pd}(\text{PPh}_3)_2$).

O ciclo catalítico do paládio (A) inicia-se com a adição oxidativa da ligação $\text{C}(sp^2)\text{-Br}$ da 3-(bromo)-7-(bromoalcoxi)-cumarina (**34a-b**) (etapa a), resultando na formação do intermediário de paládio (II) (**III**). Em seguida, este intermediário sofre transmetalção (etapa b) com o acetileto de cobre (**44**) proveniente do ciclo B', gerando o intermediário (**IV**). Evidências indicam que essa etapa de transmetalção, crucial para a transferência do grupo acetileto ao paládio, é a limitante da velocidade da reação, o que ressalta sua importância no controle cinético do processo. Por fim, a eliminação redutiva (etapa c) produz o composto 7-(bromoalcoxi)-3-((trimetilsilil)etenil)-cumarina (**42a-b**) e regenera o catalisador de paládio, $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_2$ (Sonogashira, 2002; He et al., 2013; Gazvoda et al., 2018).

A formação do acetileto de cobre (**44**) ocorre através da catálise de cobre na presença da base, Et_3N (**47**) (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 (**43**), promovendo a formação do complexo (**V**). 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 Et_3N (**47**), resultando na formação do acetileto de cobre (**44**) (KURT, 2005).

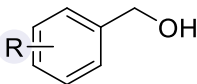


Esquema 5. Esquema de intermediário proposto para reação acoplamento de Sonogashira para obtenção de 7-(bromoalcoxi)-3-((trimetilsilil)etenil)-cumarinas (42a-b) (Adaptado de (Sonogashira, 2002)).

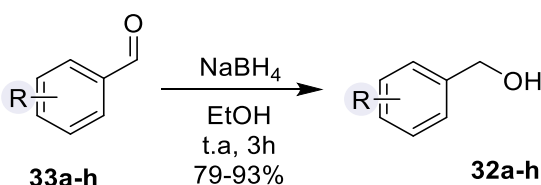
3.1.4. Síntese dos álcoois benzílicos (32a-h)

Os álcoois benzílicos (**32a-h**) foram sintetizados por meio da redução dos benzaldeídos (**33a-h**), e os produtos obtidos se apresentaram sob a forma de sólido ou óleo com coloração variada. Seus rendimentos variaram entre 79-96%, conforme seus substituintes, e o ponto de fusão de 71-76°C (Tabela 1).

Tabela 1. Características físicas, pontos de fusão e rendimentos dos álcoois benzílicos (**32a-h**)

				
Compostos	R	Características físicas	P.F °C	Rendimento (%)
32a	2-OCH ₃	Óleo amarelo claro	-	84
32b	3-OCH ₃	Óleo branco	-	87
32c	4-OCH ₃	Óleo branco	-	82
32d	4-F	Óleo amarelo claro	-	96
32e	3-Cl	Óleo branco	-	93
32f	4-Cl	Sólido Branco	71 – 72	82
32g	3-Br	Óleo amarelo	-	79
32h	4-Br	Sólido Branco	72 – 76	80

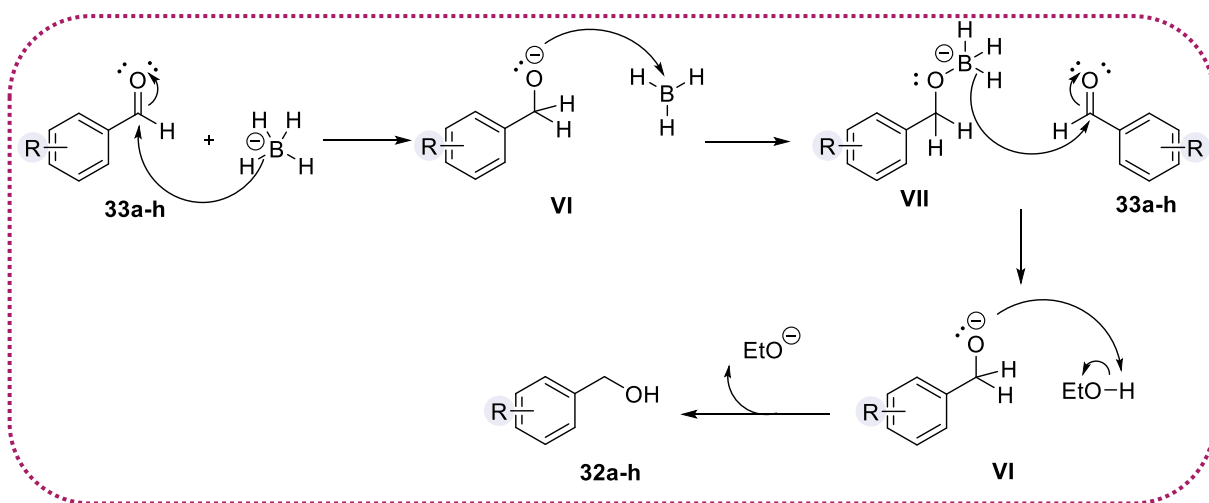
A reação de redução dos benzaldeídos (**33a-h**) foi realizada utilizando borohidreto de sódio (NaBH₄) como agente redutor, em etanol, à temperatura ambiente (Senaweera; Weaver, 2017) (Esquema 6).



Esquema 6. Síntese dos álcoois benzílicos (**32a-h**)

O mecanismo proposto para essa reação inicia-se com uma transferência de hidreto, onde os elétrons σ da ligação B-H atuam como nucleófilo atacando o orbital π^* do carbono carbonílico. O oxiânion gerado (**VI**) ajuda a estabilizar a molécula de BH₃ (deficiente em elétrons) ao se adicionar ao seu orbital p vazio, funcionalizando novamente o ânion de boro

tetravalente (**VII**). Para concluir a formação do álcool, o oxiânion abstrai um próton do meio reacional (Esquema 7).



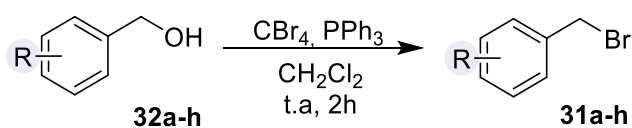
Esquema 7. Esquema de intermediários proposto para a formação dos derivados de álcool benzílico (**32a-h**) (Adaptado de (Clayden; Greeves; Warren, 2012)).

3.1.5. Síntese dos brometos de benzila (**31a-h**)

Os brometos de benzila (**31a-h**) foram obtidos a partir dos álcoois benzílicos (**32a-h**) via substituição nucleofílica bimolecular ($\text{S}_{\text{N}}2$) e os produtos obtidos se apresentaram sob a forma de um sólido amorfo ou óleo de diferentes colorações. Seus rendimentos não foram calculados devido à instabilidade apresentadas por esses brometos de benzila durante a etapa de purificação em coluna cromatográfica flash. Dessa forma, optou-se por não purificar esses intermediários e seguir imediatamente para a síntese das azidas.

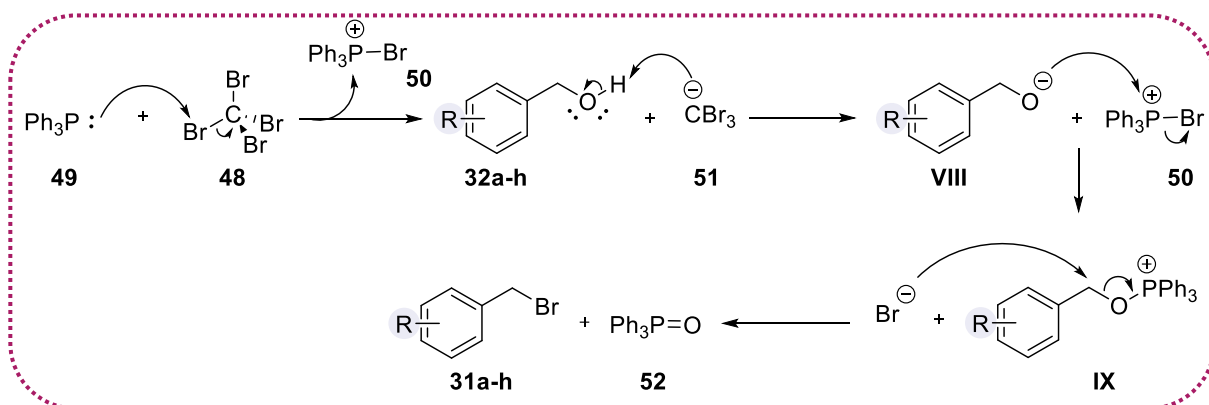
É descrito na literatura, que os brometos de benzila possuem instabilidade considerável, principalmente devido à sua reatividade com água e umidade, passando facilmente por hidrólise para formar álcool benzílico e gás brometo de hidrogênio. Além disso, são propensos à degradação térmica ou à fotodegradação.

A síntese dos brometos de benzila (**31a-h**) foi realizada utilizando tetrabrometo de carbono (**48**) e trifenilfosfina (**49**), em diclorometano, à temperatura ambiente (Esquema 8).



Esquema 8. Síntese dos brometos de benzila (**31a-h**)

O mecanismo proposto para essa reação inicia-se com o par de elétrons não ligantes do fósforo (**49**) atacando um dos átomos de bromo do tetrabrometo de carbono (**48**), levando à formação de um sal de brometo de trifenilfosfônio (**50**) e de bromofórmio (**51**). O ânion CBr_3^- (**51**), um excelente nucleófilo – devido à estabilização da carga por efeitos indutivos e alta polarizabilidade dos átomos de bromo –, remove o próton da hidroxila do álcool benzílico (**32a-h**), resultando na formação de seu alcóxido (**VIII**). Posteriormente, o ânion alcóxido ataca o átomo de fósforo positivamente carregado (**50**), formando o intermediário **IX**. Esse processo é energeticamente favorável devido à força da ligação P–O formada. Em seguida, ocorre uma substituição nucleofílica bimolecular ($\text{S}_{\text{N}}2$), na qual o brometo liberado atua como nucleófilo e ataca o carbono ligado ao oxigênio. De maneira concertada, a ligação entre o carbono e o nucleófilo se forma ao mesmo tempo que a ligação C–O se rompe, resultando na formação do brometo de benzila (**31a-h**) e do óxido de trifenilfosfina (**52**) (Esquema 9).

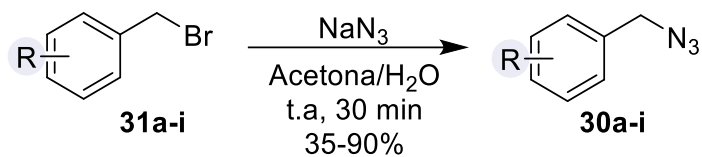


Esquema 9. Esquema de intermediários proposto para a formação dos derivados de brometo de benzila (**31a-h**) (Adaptado de (Clayden; Greeves; Warren, 2012).

A caracterização dos brometos de benzila sintetizados não foi realizada, visto que a instabilidade descrita para essas substâncias impossibilitaria que as análises fossem realizadas antes de sua degradação.

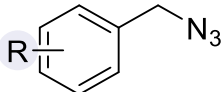
3.1.6. Síntese das benzil azidas (**30a-i**)

As benzil azidas (**30a-i**) foram obtidas a partir da azida de sódio e os brometos de benzilas (**31a-i**) via reação de substituição nucleofílica ($\text{S}_{\text{N}}2$) em uma mistura de água/acetona (Esquema 10) (Zhao et al., 2016). As benzil azidas (**30a-i**) obtidas se apresentaram sob a forma óleo com coloração variada. Seus rendimentos variaram entre 35-90%, conforme seus substituintes (Tabela 2).

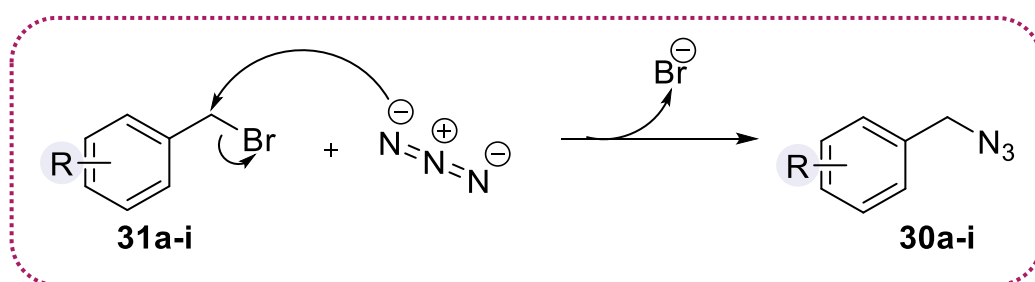


Esquema 10. Síntese das benzil azidas (**30a-i**)

Tabela 2. Características físicas e rendimentos das benzil azidas (**30a-i**)

			
Compostos	R	Características físicas	Rendimento (%)
30a	2-OCH ₃	Óleo amarelo	52
30b	3-OCH ₃	Óleo incolor	58
30c	4-OCH ₃	Óleo amarelo	45
30d	4-F	Óleo amarelo	79
30e	3-Cl	Óleo branco	47
30f	4-Cl	Óleo incolor	39
30g	3-Br	Óleo amarelo	35
30h	4-Br	Óleo incolor	51
30i	H	Óleo amarelo	90

O mecanismo proposto para a síntese das benzil azidas (**30a-i**) ocorre por meio de uma reação de substituição nucleofílica bimolecular (S_N2) (Esquema 11) (Smith, 2020). Inicialmente, a azida atua como nucleófilo, atacando o carbono ligado ao brometo de benzila (**31a-i**). De forma concertada, a ligação N-carbono se forma, enquanto a ligação C-Br se rompe, até que o brometo, um bom grupo de saída, seja eliminado, resultando na formação das benzil azidas (**30a-i**).

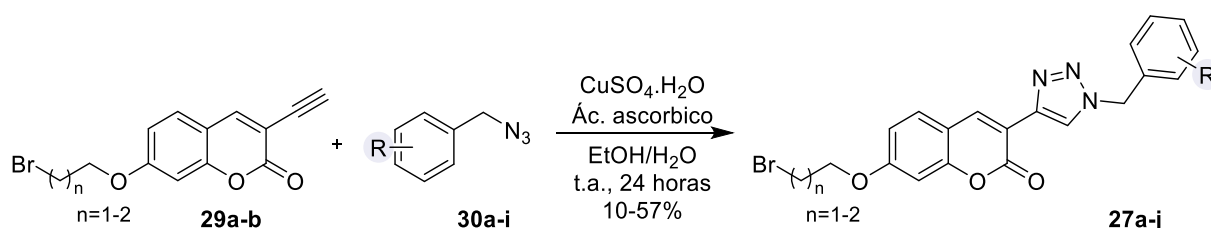


Esquema 11. Esquema de intermediários proposto para a formação dos derivados de benzil azida (**30a-i**) (Adaptado de (Smith, 2020)).

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.

3.1.7. Síntese de 3-(1-R-benzil-1*H*-1,2,3-triazol-4-il)-7-(bromoalcoxi)-cumarinas (27a-j)

A síntese dos compostos inéditos 3-(1-R-benzil-1*H*-1,2,3-triazol-4-il)-7-(bromoalcoxi)-cumarinas (**27a-j**) 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 (**29a-b**) e as azidas orgânicas (**30a-i**), levando a formação regioespecífica do 1,2,3-triazol-1,4-dissubstituído (Esquema 12). Os compostos obtidos possuem as atribuições descritas na Tabela 3.



Esquema 12. Síntese das 3-(1-R-benzil-1*H*-1,2,3-triazol-4-il)-7-(bromoalcoxi)-cumarinas (**27a-j**).

Tabela 3. Características físicas, pontos de fusão e rendimentos das 3-(1-R-benzil-1*H*-1,2,3-triazol-4-il)-7-(bromoalcoxi)-cumarinas (**27a-j**)

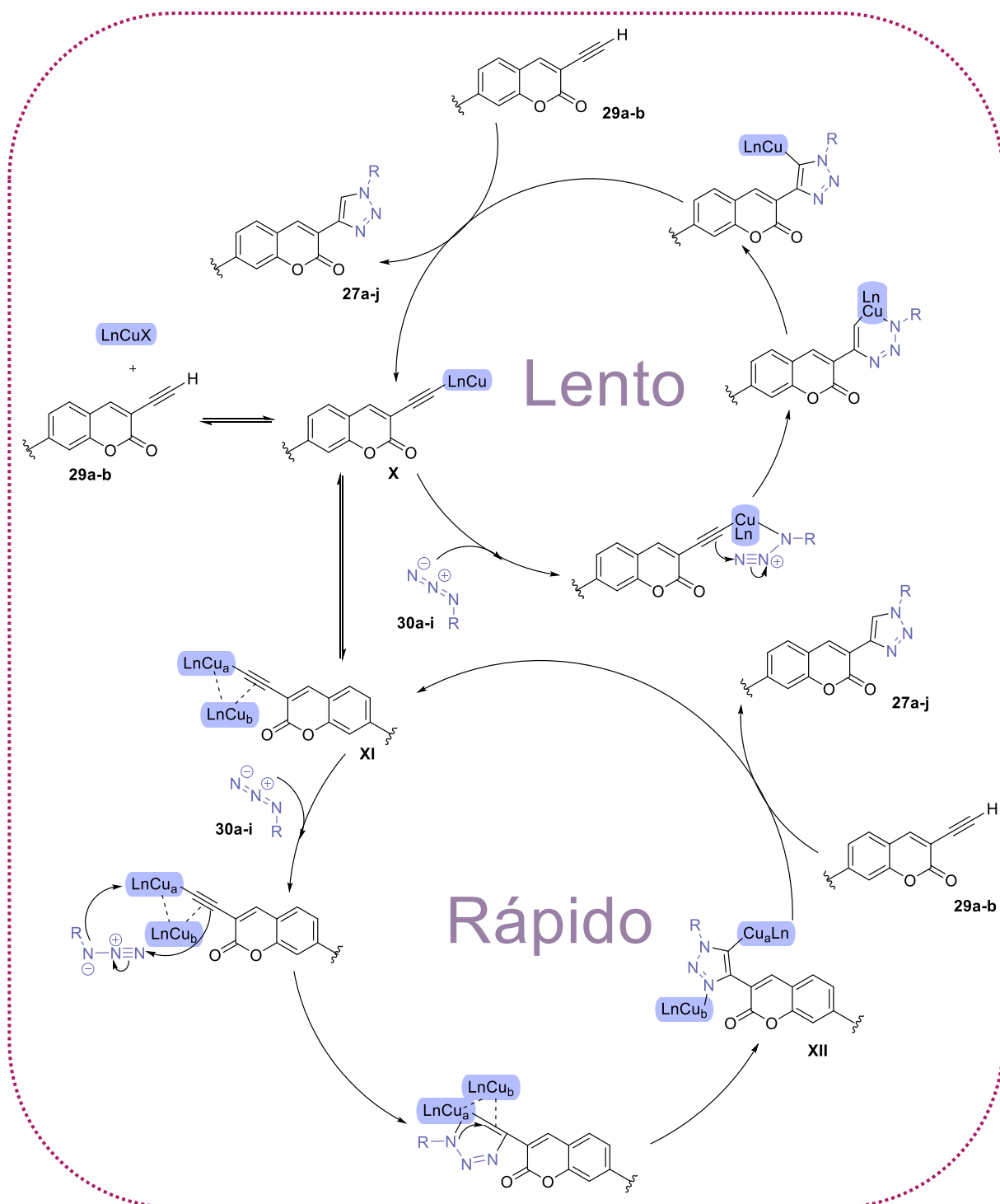
Compostos	n	R	Características físicas	P.F. °C	Rendimento (%)
27a	1	H	Óleo marrom	-	57
27b	1	2-OCH ₃	Sólido amarelo	180 – 182 ^d	46
27c	1	3-OCH ₃	Sólido branco	188 – 191 ^d	37
27d	1	4-OCH ₃	Sólido bege	197 – 200 ^d	21
27e	1	4-F	Sólido amarelo	193 – 196	10

27f	1	3-Cl	Sólido amarelo	177 – 179	12
27g	1	4-Cl	Sólido amarelo	200 – 203	44
27h	1	3-Br	Sólido bege	185 – 189	12
27i	1	4-Br	Sólido laranja	211 – 214	16
27j	2	H	Sólido amarelo	179 – 180 ^d	33

^d Ponto de degradação

Ao longo das últimas décadas, alguns mecanismos foram propostos para descrever a reação CuAAC, sinônimo perfeito do conceito “*Click Chemistry*”. Uma das primeiras postulações sugeriam 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 acetileto de Cu dinuclear corresponde a espécie catalítica ativa, levando a proposta de um novo mecanismo (Rostovtsev et al., 2002; Worrell; Malik; Fokin, 2013)

Estudos relataram o isolamento dos complexos de mono e bis acetileto de Cu(I) (**X** e **XI** respectivamente) e 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. Ademais, relatam o isolamento de um complexo de triazóila de Cu dinuclear nunca descrito (**XII**). A partir disso, os autores ainda propuseram que é o próton proveniente do alcino que inicia a desmetalização de **XII**, regenerando assim o acetileto de Cu(I) dinuclear **XI** e tornando o complexos de LnCuX desnecessário para recomençar o ciclo catalítico (Esquema 13) (Jin et al., 2015; Khandelwal et al., 2024).



Esquema 13. Mecanismo da CuAAC envolvendo ambos os complexos mono e bis acetileto de Cu(I) **X** e **XI** respectivamente, proposto para a obtenção dos compostos 3-(1-R-benzil-1*H*-1,2,3-triazol-4-il)-7-(bromoalcoxi)-cumarinas (**27a-j**) (Adaptado de (JIN et al., 2015)).

Para confirmar a formação dos compostos 3-(1-R-benzil-1*H*-1,2,3-triazol-4-il)-7-(bromoalcoxi)-cumarinas (**27a-j**) foram realizados experimentos de determinação estrutural como RMN ¹H e ¹³C, cujos espectros estão disponíveis nas Figura S1 à Figura S20 do Anexo 7.2.

Visando tornar a discussão mais clara, foram selecionados os espectros de RMN ^1H e ^{13}C do composto **27g** para a elucidação detalhada no texto. Inicialmente, foram observados sinais característicos do núcleo cumarínico: δ 7,55 (d, $J = 8,1$ Hz, 1H), 6,93 (dd, $J = 8,6$, 2,1 Hz, 1H) e 6,86 (d, $J = 1,9$ Hz, 1H), atribuídos respectivamente aos hidrogênios H_5 , H_6 e H_8 . As atribuições foram baseadas no efeito mesomérico do grupo alcóxila, que doa elétrons para o anel aromático via ressonância, aumentando a densidade eletrônica nas posições *orto* (H_6 e H_8). Essa blindagem resulta em deslocamentos químicos em menores frequências para esses hidrogênios. A diferenciação entre H_6 e H_8 foi estabelecida pela análise das multiplicidades: o duplo duplete (dd) de H_6 surge devido ao acoplamento com H_5 ($J = 8,6$ Hz, acoplamento vicinal) e com H_8 ($J = 2,1$ Hz, acoplamento de longo alcance (J_5)). Já o duplete (d) de H_8 ocorre pelo acoplamento apenas com H_6 ($J = 1,9$ Hz) (Figura 22).

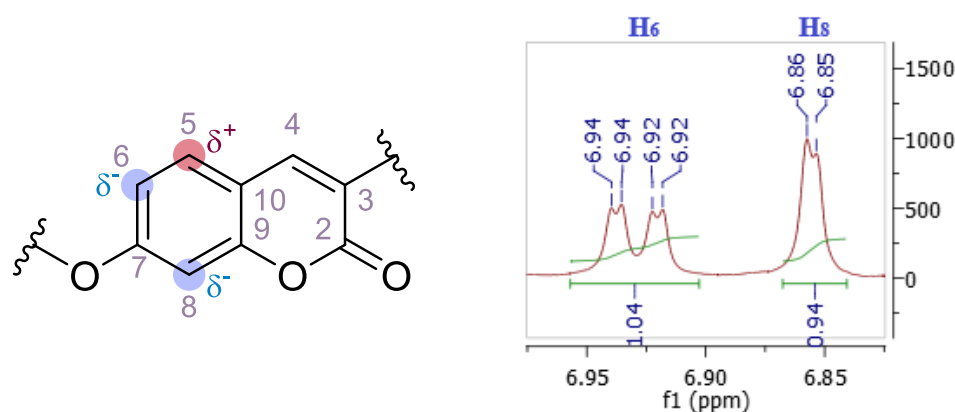
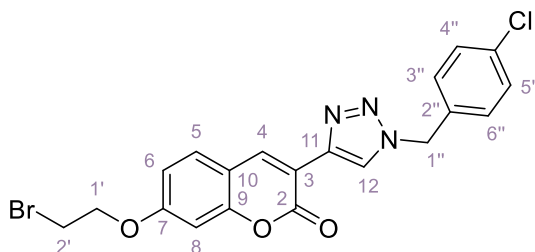


Figura 22. Estrutura numerada do núcleo cumarínico e multiplicidade dos sinais de H_6 (duplo duplete) e H_8 (duplete).

O sinal correspondente ao hidrogênio H_4 do anel lactônico (sistema carboxílico α,β -insaturado) foi observado em δ 8,69 (s, 1H). Esse deslocamento químico elevado é explicado pelo efeito de desblindagem anisotrópica gerado pelo sistema π conjugado da carbonila ($\text{C}=\text{O}$) e da dupla ligação α,β -insaturada. No espectro de RMN ^{13}C um dos fatores cruciais para a confirmação presença do núcleo cumarínico foi a presença do sinal em δ 161,38 característico de carbono carboxílico.

Os sinais característicos do grupamento bromo-alcóxila foram identificados na região de hidrogênios ligados a carbonos sp^3 . Destaca-se o triplete em δ 4,37 ($J = 6,1$ Hz, 2H), atribuído aos hidrogênios metilênicos diretamente ligados ao oxigênio. O deslocamento químico elevado reflete o efeito eletrôn-retirador do oxigênio, que desblinda os hidrogênios por indução, expondo-os ao campo magnético externo. Outro sinal significativo foi observado em δ 3,68 (t, $J = 6,1$ Hz, 2H), correspondente aos hidrogênios metilênicos ligados ao carbono

bromado. O deslocamento em frequências mais baixa ocorre porque o efeito indutivo do bromo (menos eletronegativo que o oxigênio) é parcialmente compensado pelo efeito de blindagem anisotrópica da ligação C-Br.



A formação do anel triazólico foi confirmada pelo sinal do hidrogênio H₁₂ em δ 8,29 (s, 1H), característico do próton não acoplado do núcleo 1,2,3-triazol, formado via reação de *Click Chemistry*. O deslocamento químico elevado reflete a desblindagem causada pela conjugação com os átomos de nitrogênio eletronegativos e pela anisotropia magnética do sistema aromático heterocíclico. No RMN ¹³C, o carbono *sp*² do triazol (C₁₂) apresentou deslocamento de 123,30 ppm, consistentes com a hibridização *sp*² e a desblindagem provocada pela eletronegatividade dos nitrogênios adjacentes. Já o carbono *sp* (C₁₁) exibiu um deslocamento de 130,7 ppm, valor compatível com a conjugação extensa do sistema triazólico e a influência de efeitos de ressonância.

Por fim, os sinais correspondentes ao anel aromático *para*-cloro-substituído foram claramente identificados no espectro de RMN ¹H. Observaram-se dois dupletos (d) em δ 7,55 (*J* = 8,3 Hz, 2H) e 7,35 (*J* = 8,1 Hz, 2H), atribuídos respectivamente aos hidrogênios *meta* (H_{4''} e H_{5''}) e *orto* (H_{3''} e H_{6''}). No espectro de RMN ¹³C, os sinais característicos do anel aromático *para*-cloro-substituído foram confirmados: os carbonos (C_{3''}, C_{4''}, C_{5''} e C_{6''}) apresentaram o mesmo deslocamento de 129,49 ppm.

Além disso, o grupo metileno benzílico posicionado entre o anel aromático e o nitrogênio do triazol, foi claramente identificado no RMN ¹H como o sinal em δ 5,55 (s, 2H). O deslocamento elevado, para hidrogênios presentes em carbono *sp*³, é resultado da desblindagem pronunciada causada pela conjugação com o anel aromático (efeito anisotrópico) e pela proximidade do nitrogênio eletronegativo do triazol. No RMN ¹³C, o carbono metilênico apareceu em δ 53,44 ppm. Esse deslocamento reflete a hibridização *sp*³ do carbono e a influência dos efeitos indutivos do nitrogênio e da blindagem anisotrópica do anel.

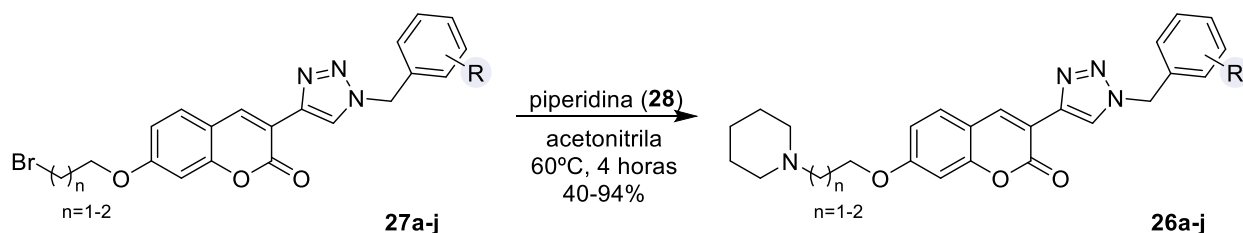
3.1.8. Síntese da 3-(1-R-benzil-1*H*-1,2,3-triazol-4-il)-7-(3-(piperidin-1-il)alcoxi)-cumarina (26a-j)

Os compostos inéditos 3-(1-R-benzil-1*H*-1,2,3-triazol-4-il)-7-(3-(piperidin-1-il)alcoxi)-cumarina (**26a-j**) foram sintetizados via reação de aminação e possuem as atribuições descritas na Tabela 4.

Tabela 4. Características físicas, pontos de fusão e rendimentos das 3-(1-R-benzil-1*H*-1,2,3-triazol-4-il)-7-(3-(piperidin-1-il)alcoxi)-cumarina (**26a-j**)

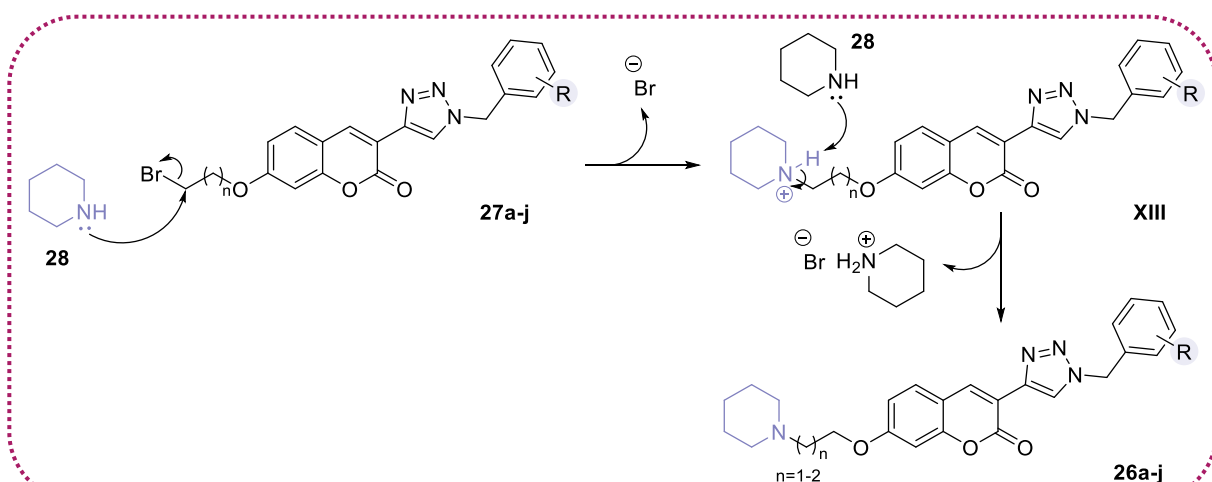
Compostos	n	R	Características físicas	P.F °C	Rendimento (%)
26a	1	H	Óleo marrom	-	40
26b	1	2-OCH ₃	Sólido bege	140 – 144	55
26c	1	3-OCH ₃	Sólido amarelo	141 – 143	44
26d	1	4-OCH ₃	Sólido amarelo	131 – 136	85
26e	1	4-F	Sólido amarelo	167 – 169	45
26f	1	3-Cl	Sólido amarelo	143 – 144	94
26g	1	4-Cl	Sólido amarelo	157 – 161	87
26h	1	3-Br	Sólido amarelo	143 – 144	74
26i	1	4-Br	Sólido amarelo	153 – 156	73
26j	2	H	Sólido marrom	158 – 163	64

Esta reação foi realizada a partir da piperidina (**28**) e dos respectivos derivados 3-(1-R-benzil-1*H*-1,2,3-triazol-4-il)-7-(3-(piperidin-1-il)alcoxi)-cumarina (**26a-j**) em acetonitrila, sob aquecimento a 60 °C (Esquema 14).



Esquema 14. Síntese da 3-(1-R-benzil-1*H*-1,2,3-triazol-4-il)-7-(3-(piperidin-1-il)alcoxi)-cumarina (**26a-j**).

O mecanismo proposto para a síntese dos compostos **26a-j** começa com uma reação de substituição nucleofílica bimolecular (S_N2), na qual a piperidina (**28**) atua como nucleófilo. O par de elétrons não ligantes do nitrogênio ataca o carbono metilênico ligado ao bromo. De maneira concertada, a ligação nucleófilo-carbono é formada enquanto a ligação C-Br se rompe, resultando na liberação do brometo e na formação do intermediário protonado **XIII**. Na etapa seguinte, a amina cíclica abstrai o próton ligado ao nitrogênio, gerando os respectivos compostos 3-(1-R-benzil-1*H*-1,2,3-triazol-4-il)-7-(3-(piperidin-1-il)alcoxi)-cumarina (**26a-j**) e, como subproduto, o sal brometo de amônio. Como a piperidina (**28**) também desempenha o papel de base na reação, ela foi adicionada em excesso ao meio reacional para assegurar a completa conversão dos reagentes (Esquema 15).



Esquema 15. Esquema de intermediários proposto para formação dos derivados 3-(1-R-benzil-1*H*-1,2,3-triazol-4-il)-7-(3-(piperidin-1-il)alcoxi)-cumarina (**26a-j**)

Para confirmar a formação dos compostos 3-(1-R-benzil-1*H*-1,2,3-triazol-4-il)-7-(3-(piperidin-1-il)alcoxi)-cumarina (**26a-j**) foram realizados experimentos de determinação estrutural como RMN ^1H e ^{13}C , cujos espectros estão disponíveis nas Figura S21 à Figura S40 do Anexo 7.2. A formação do composto foi confirmada por sinais característicos nos espectros de RMN. No RMN ^{13}C , o sinal do metileno (sp^3) adjacente ao nitrogênio apresentou

deslocamento químico entre δ 55,95-58,01 ppm, valor significativamente mais elevado em comparação aos compostos **27a-j** (Figura 23), nos quais o mesmo metileno (sp^3) estava ligado ao bromo. Essa diferença evidencia o efeito eletrônico distinto do nitrogênio, que induz uma desblindagem pronunciada no carbono vizinho.

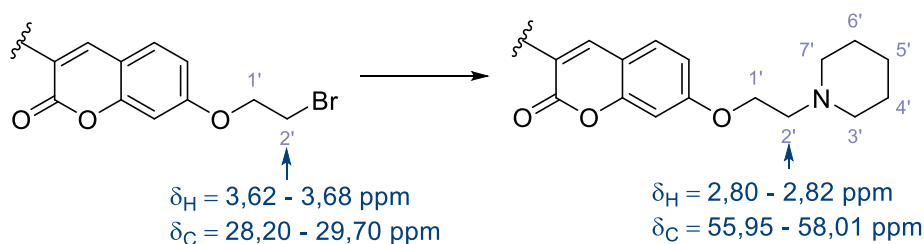


Figura 23. Atribuição comparativa dos principais sinais dos compostos 3-(1-R-benzil-1*H*-1,2,3-triazol-4-il)-7-(bromoalcoxi)-cumarinas (**27a-j**) e 3-(1-R-benzil-1*H*-1,2,3-triazol-4-il)-7-(3-(piperidin-1-il)alcoxi)-cumarinas (**26a-j**) nos espectros de RMN ^1H e ^{13}C .

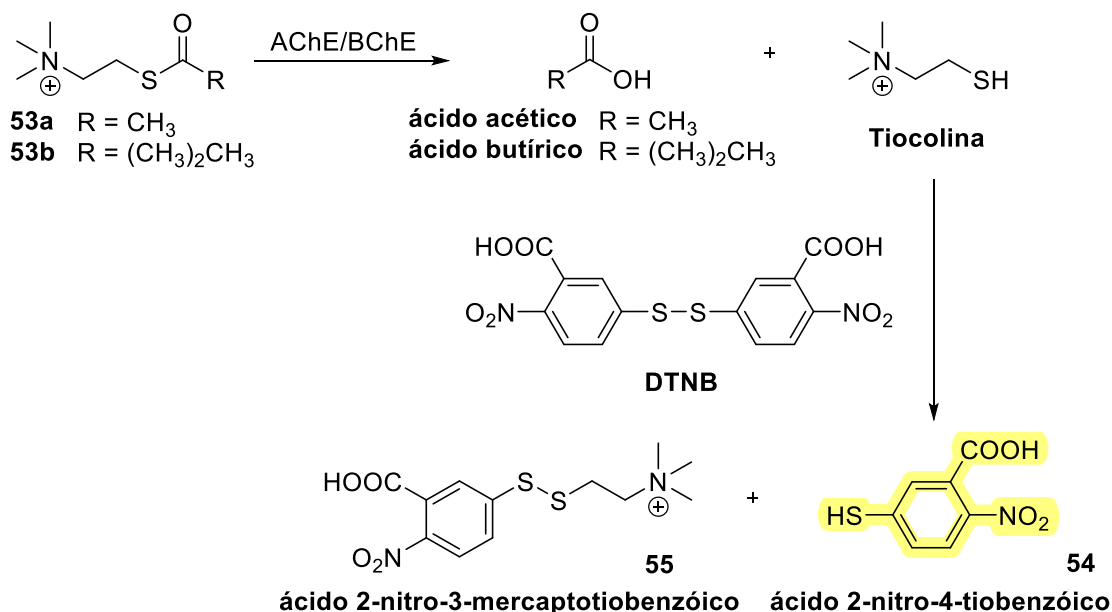
Os sinais da piperidina no RMN ^1H foram observados com deslocamentos variando entre δ 2,51 – 2,67 (sl, 4H) para os hidrogênios adjacentes ao N ($\text{H}_{3'}$ e $\text{H}_{7'}$), δ 1,61 – 1,77 (m, 4H) para os hidrogênios $\text{H}_{4'}$ e $\text{H}_{6'}$ e δ 1,45 – 1,46 (sl, 2H) para os hidrogênios $\text{H}_{5'}$. No RMN ^{13}C , a amina cíclica (**26a-j**) apresentou deslocamentos em δ 54,74 – 55,50 ppm ($\text{C}_{3'}$ e $\text{C}_{7'}$), δ 25,98 – 26,32 ppm ($\text{C}_{4'}$ e $\text{C}_{6'}$) e δ 24,23 – 24,54 ppm ($\text{C}_{5'}$).

Além disso, tanto no RMN ^1H quanto no ^{13}C , os sinais do núcleo cumarínico e de outros grupos funcionais mantiveram-se inalterados após a reação de aminação, indicando ausência de degradação do composto.

3.1.9. 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 **26a-j**, foram realizados de acordo com um método adaptado de Ellman (De Souza et al., 2019; Ellman et al., 1961) e tendo como composto de referência a donepezila. O ensaio consiste na clivagem enzimática da acetiltiocolina ou butiriltiocolina (**53a-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 (**54**) e do ácido 2-nitro-3-mercaptopitiobenzóico (**55**). O produto **54** apresenta coloração amarela, a qual pode ser quantificada por medida da absorbância em um leitor de placas equipado com filtro de luz a $\lambda = 415 \text{ nm}$. 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 16).



Esquema 16. Reação observada no ensaio de Ellman.

Todos os compostos testados demonstraram capacidade de inibir a AChE, com alguns apresentando alta potência e seletividade frente a BChE. O derivado benzílico **26a** exibiu um ganho significativo de potência inibitória, com $\text{CI}_{50} = 6 \text{ nM}$ para a AChE e um índice de seletividade de 632 entre as colinesterases ($\text{BChE } \text{CI}_{50} = 3790 \text{ nM}$), em comparação ao seu protótipo **25a** ($\text{AChE} - \text{CI}_{50} = 50 \text{ nM}$; $\text{BChE} - \text{CI}_{50} = 8660 \text{ nM}$). Os demais derivados benzílicos (**26b-j**) também apresentaram potenciais inibitórios promissores para as colinesterases. Entre os derivados metoxilados, **26c** ($4,2 \pm 0,1 \text{ nM}$; substituição *meta*) e **26d** ($4,6 \pm 0,6 \text{ nM}$; substituição *para*) destacaram-se pelo melhor perfil de inibição da AChE. Adicionalmente, o composto **26c** apresentou $\text{CI}_{50} = 2880 \text{ nM}$ para a BChE, resultando em um índice de seletividade de 685,7 entre as colinesterases, o maior da série e duas vezes maior do que o fármaco referência donepezila ($\text{IS} = 341$). Todos os resultados estão consolidados na Tabela 5.

Tabela 5. Resultados obtidos nos ensaios inibição enzimática frente à *Ee*AChE e *Eq*BChE.

Compostos	n	R	CI ₅₀ (nM) ± DP ^a		IS ^d
			AChE ^b	BChE ^c	
26a	1	H	6 ± 0,6	3790 ± 365	632
26b	1	2-OCH ₃	15,3 ± 0,3	2810 ± 243	183,7
26c	1	3-OCH ₃	4,2 ± 0,1	2880 ± 122	685,7
26d	1	4-OCH ₃	4,6 ± 0,6	2080 ± 99	442,5
26e	1	4-F	23,4 ± 1,8	4120 ± 110	176
26f	1	3-Cl	13,1 ± 0,8	1950 ± 115	148,8
26g	1	4-Cl	103,8 ± 5,4	2240 ± 60	16,2
26h	1	3-Br	7,9 ± 0,5	2090 ± 54	264,5
26i	1	4-Br	12,9 ± 1,0	1140 ± 70	88,4
26j	2	H	1950 ± 86	3557 ± 185	1,8
Donepezila	-	-	7 ± 0,2	2390 ± 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.

Também foi observado que o derivado benzílico **26j**, que possui cadeia alquílica com 3 carbonos, teve uma perda significativa na potência de inibição da AChE (CI₅₀ = 1950 nM) em relação ao seu homólogo inferior com 2 carbonos (**26a**). Esse resultado reproduz a tendência já identificada e descrita em trabalhos anteriores do grupo, onde temos a diminuição da atividade conforme a cadeia alquílica aumenta de tamanho (De Souza et al., 2019; Nadur, 2020).

3.1.10. Ensaios do mecanismo de inibição enzimática frente à AChE e BChE

Os inibidores enzimáticos correspondem a moléculas capazes de reduzir ou interromper a catálise de reações mediadas por enzimas. Esses compostos são classificados em duas categorias principais: reversíveis e irreversíveis. Os inibidores reversíveis, por sua vez, subdividem-se conforme seu mecanismo de ação em competitivos, não

competitivos e incompetitivos, cujos efeitos são identificados por alterações nas constantes cinéticas K_m (constante de Michaelis-Menten) e V_{max} (velocidade máxima da reação).

Na inibição competitiva, o inibidor compete diretamente com o substrato pelo sítio ativo da enzima, em virtude da similaridade do perfil de interações no sítio. A formação do complexo enzima-inibidor (EI) impede a ligação do substrato, bloqueando a geração do complexo enzima-substrato (ES). Nesse caso, observa-se um aumento significativo de K_m , enquanto V_{max} permanece inalterada, desde que a concentração de substrato seja elevada o suficiente para superar a competição.

Já os inibidores não competitivos ligam-se a um sítio alostérico da enzima, distinto do sítio ativo. Embora o substrato ainda possa se associar à enzima, formando um complexo ternário enzima-substrato-inibidor (ESI), a etapa catalítica é inviabilizada. Esse mecanismo resulta na redução de V_{max} , sem alterações significativas em K_m .

Por fim, na inibição incompetitiva, o inibidor somente interage com o complexo ES (enzima-substrato), vinculando-se a um sítio conformacionalmente induzido após a ligação do substrato. A formação do complexo ESI inibe a reação, reduzindo simultaneamente K_m e V_{max} , pois a afinidade aparente da enzima pelo substrato aumenta, mas a eficiência catalítica global diminui ((Copeland, 2013; L; M, 2022)).

Para determinar o mecanismo de inibição dessa série de compostos, foram realizados ensaios de cinética enzimática com os compostos **26a** e **26c** em ambas as enzimas. Esses compostos foram selecionados com base em seu bom perfil inibitório frente à AChE.

Com base nos parâmetros cinéticos (K_m e V_{max}) (Tabela 6), e no perfil do gráfico de Lineweaver-Burk observou-se que o tipo de inibição promovida pelo composto testado é mista para ambas as enzimas. Assim, os inibidores são capazes de ligar-se tanto ao sítio catalítico das enzimas (inibição competitiva) quanto ao sítio alostérico (inibição não competitiva), atuando de duas formas distintas. Desse modo, calculam-se duas constantes de afinidade para o composto em cada enzima: K_i (inibição competitiva) e K_i' (inibição não competitiva), conforme apresentado na Tabela 6.

Inicialmente, ao comparar as constantes de afinidade competitiva e não competitiva do composto **26a** para ambas as enzimas, observou-se que os valores foram aproximadamente 550 vezes maiores na BChE ($K_i = 980$ nM; $K_i' = 2670$ nM) do que na AChE ($K_i = 1,682$ nM; $K_i' = 4,780$ nM). Isso indica que a maior atividade inibitória do composto na AChE está correlacionada com sua interação tanto no sítio catalítico quanto no sítio alostérico da enzima. Para o composto **26c**, a comparação das constantes de afinidade competitiva (K_i) revelou que

o valor é ~1200 vezes maior na BChE ($K_i = 615$ nM) do que na AChE ($K_i = 0,508$ nM). Já a constante não competitiva (K_i') foi ~950 vezes maior na BChE ($K_i' = 1619$ nM) do que na AChE ($K_i' = 1,696$ nM). Esses resultados indicam que, embora a seletividade do composto pela AChE esteja relacionada à interação em ambos os sítios, a afinidade pelo sítio catalítico foi a mais efetiva para a seletividade.

Além disso, a comparação da razão K_i'/K_i entre as constantes de afinidade permitiu compreender a preferência dos compostos pelos sítios de ligação. Para a AChE, o composto **26a** apresenta uma razão $K_i'/K_i = 2,86$ ($K_i = 1,682$ nM; $K_i' = 4,780$ nM), enquanto o protótipo **25a** ($K_i = 3,15$ nM; $K_i' = 14,27$ nM) apresenta uma razão $K_i'/K_i = 4,53$. Isso indica que o ganho de potência do **26a** está correlacionado a uma melhor interação com o sítio catalítico, mas, principalmente, a uma interação mais eficaz com o sítio alostérico em comparação ao protótipo **25**. Ao realizar a mesma comparação para o composto **26c**, observa-se uma razão $K_i'/K_i = 3,92$. Isso demonstra que a inserção da metoxila na posição *meta* não apenas aumentou a eficácia da interação no sítio alostérico em comparação ao protótipo **25a**, mas também promoveu maior afinidade pelo sítio catalítico em relação ao composto **26a**.

Por fim, a variabilidade dos valores de K_i e K_i' entre a AChE e a BChE está em concordância com os dados obtidos na atividade inibitória, o que demonstra que o índice de seletividade entre as colinesterases é elevado e favorável à AChE.

Tabela 6. Parâmetros cinéticos de **26a** e **26c** em AChE e BChE.

Concentração (μM)	$V_{\text{máx}} \pm \text{DP}$ (1 x 10 ³ nM/min)	$K_{\text{m}} \pm \text{DP}$ (1 x 10 ³ nM)	$K_{\text{i}} \text{ (nM)} \pm \text{DP}^{\text{a}}$	$K_{\text{i}}' \text{ (nM)} \pm \text{DP}^{\text{b}}$
26a em AChE				
0	8,50 ± 0,1743	72,19 ± 6,8207	1,682 ± 0,038	4,780 ± 0,0106
0,005	4,45 ± 0,02231	88,07 ± 6,7812		
0,007	3,19 ± 0,0981	93,73 ± 7,0155		
26a em BChE				
0	4,51 ± 0,1648	88,72 ± 7,6123	980 ± 24	2670 ± 67
2,8	3,62 ± 0,1358	234,43 ± 16,1506		
4,8	3,40 ± 0,0349	354,67 ± 19,2448		
26c em AChE				
0	9,53 ± 0,0584	64,30 ± 0,6389	0,508 ± 0,0001	

0,003	$5,21 \pm 0,0656$	$156,63 \pm 4,4377$		$1,696 \pm$
0,005	$3,90 \pm 0,1517$	$208,97 \pm 10,6829$		$0,0038$
26c em BChE				
0	$9,35 \pm 0,1171$	$96,81 \pm 1,6613$		
1,9	$5,97 \pm 0,1562$	$181,63 \pm 6,1890$	$615 \pm 0,58$	1619 ± 14
3,9	$4,12 \pm 0,2257$	$233,03 \pm 16,4394$		

^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.

O gráfico de Lineweaver-Burk é uma ferramenta amplamente utilizada para identificar mecanismos de inibição enzimática, por meio da análise do comportamento das retas geradas. Nas figuras a seguir (Figura 24 e Figura 25), que representam os gráficos de Lineweaver-Burk dos compostos **26a** e **26c** para as enzimas AChE (à esquerda) e BChE (à direita), observa-se que as linhas de intersecção convergem à esquerda do eixo y ($1/V$) e acima do eixo x ($1/[S]$), ou seja, no segundo quadrante do sistema cartesiano, indicando um mecanismo de inibição mista.

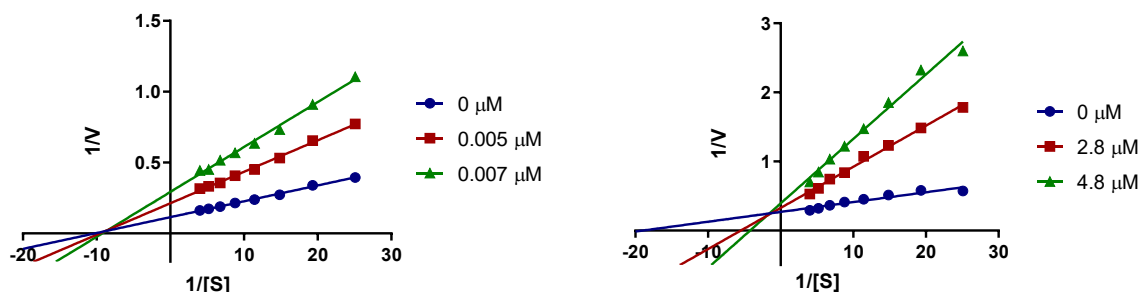


Figura 24. Gráficos de Lineweaver-Burk da cinética de inibição em *EeAChE* (à esquerda) e *EeBChE* (à direita) do composto **26a**.

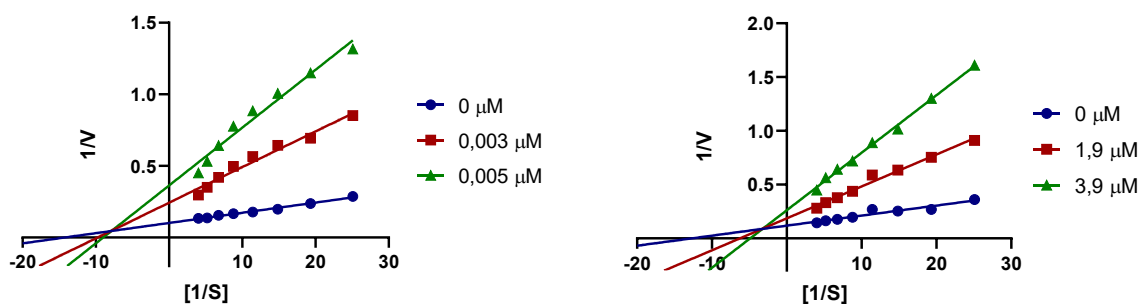


Figura 25. Gráficos de Lineweaver-Burk da cinética de inibição em *EeAChE* (à esquerda) e *EeBChE* (à direita) do composto **26c**.

3.1.11. Atividade inibitória dos compostos obtidos frente à Histamina (H₃R)

A avaliação do perfil de inibição frente à histamina fundamentou-se na semelhança estrutural entre as subunidades farmacofóricas dos inibidores cumarínicos de ChE desenvolvidos pelo nosso grupo e os antagonistas H₃R descritos na literatura. Essas subunidades farmacofóricas apresentam i) uma região básica, essencial para interagir com ambos os alvos, ii) um espaçador de dois a três carbonos e iii) um átomo de oxigênio que estabelece a conexão com a região arbitrária. Em nossos compostos, o núcleo cumarínico representa essa região arbitrária (Esquema 17) (Khanfar et al., 2018; Wingen; Stark, 2013).



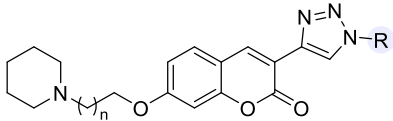
Esquema 17. Semelhanças entre os mapas farmacofóricos propostos de antagonistas H₃R (literatura) e *i*ChE (LaDMol-QM).

Os ensaios realizados para determinar a afinidade de ligação dos compostos frente ao receptor H₃R foram realizados de acordo com um método de detecção de radioatividade (Bautista-Aguilera et al., 2017). O método baseia-se na competição entre os compostos teste e o radioligante [³H]-N- α -metilhistamina pelo sítio de ligação do H₃R. A radioatividade do radioligante retido nas membranas foi quantificada por contagem de cintilação líquida, que mede a emissão luminosa proporcional à concentração ligada. A ligação específica (interação farmacológica relevante) foi calculada subtraindo-se a ligação inespecífica (avaliada com 10 μ M de pitolisant) da ligação total.

A análise dos dados, por regressão não linear, permite obter a constante de afinidade (K_i), que reflete a concentração necessária para o ligante teste ocupar 50% dos sítios receptores (Tabela 7).

Para o ensaio, foram selecionados os compostos **26a**, **26j** e **25b** (sintetizado em estudos anteriores). A escolha dos compostos baseou-se nos requisitos estruturais conhecidos para interação com o sítio ativo do receptor H₃R, em especial a distância de 4,5 Å entre o grupo básico e o heteroátomo da molécula (Khanfar et al., 2018). Nesse contexto, compostos com cadeias espaçadoras de três metilenos foram considerados ideais para a inibição. Adicionalmente, o composto **26a** foi incluído no estudo para ampliar a análise comparativa e enriquecer a discussão dos resultados.

Tabela 7. Resultados de afinidade dos compostos frente ao Receptor de Histamina tipo 3 (H₃R) e comparação com resultados frente à AChE.

				
Composto	n	R	K _i hH ₃ R [nM] ^a	AChE ^c CI ₅₀ (nM) ± DP
26a	1	-Bn	558 [337; 925]	6 ± 0,6
26j	2	-Bn	151 [70,5; 325]	1950 ± 86
25b^b	2	-Ph	31,9 [25,1; 40,5]	1,33 ± 0,045
Pitolisant	-	-	6,09	-

^a O intervalo de confiança (95%) é dado entre colchetes; ^b composto obtido em trabalhos anteriores (Nadur, 2020); ^c AChE de enguia elétrica.

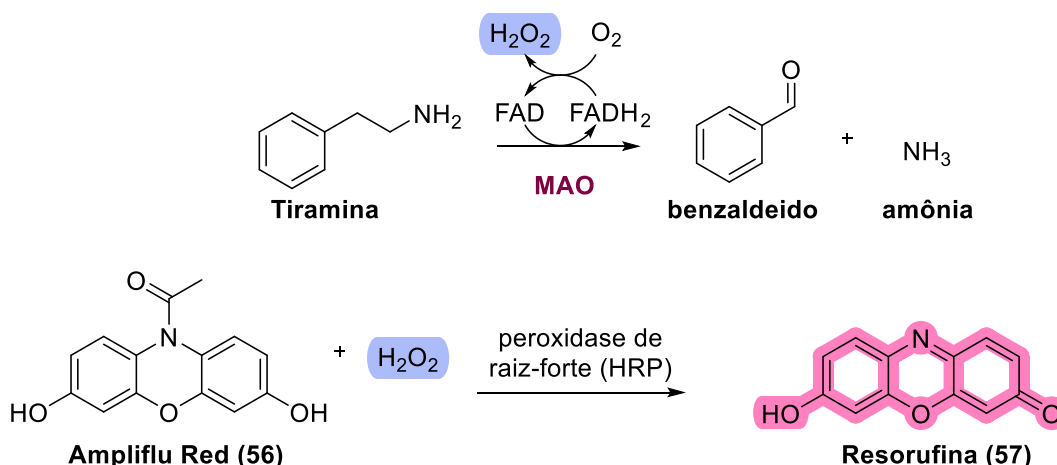
Os valores de K_i obtidos para os compostos **26a** (558 nM), **26j** (151 nM) e **25b** (31,9 nM) estão em concordância com a literatura, que identificou cadeias de três metilenos espaçadores como as mais adequadas para a interação com o H₃R. O **25b** destaca-se como o candidato mais promissor, exibindo potência próxima a antagonistas de referência do H₃R, como o pitolisant (K_i = 6,09 nM). Já o composto **26j** (K_i = 151 nM), embora estruturalmente análogo ao **25b** (homólogo superior no triazol), apresenta afinidade reduzida, possivelmente devido ao aumento da flexibilidade conformacional causado pela introdução do grupo metileno entre o núcleo 1,2,3-triazol e a fenila, que pode comprometer o alinhamento ideal com o sítio ativo, ou resultar em maior perda entrópica na interação. Ambos os compostos (**25b** e **26j**) foram considerados com potencial para otimização estrutural em estudos futuros, não apenas pelo seu potencial frente ao receptor H₃R, mas também devido ao seu perfil multialvo.

3.1.12. Atividade inibitória dos compostos obtidos frente à Monoamino Oxidase (MAO-A e MAO-B)

A avaliação do perfil de inibição das monoaminoxidases A e B (MAO-A/B) fundamentou-se no fato de que as cumarinas atuam como *scaffolds* para inibição de MAO e por apresentarem grupos aromáticos na posição 3 – região reconhecidamente crítica para a inibição da MAO-B (Rullo et al., 2025).

Os ensaios para determinação da atividade inibitória dos compostos sobre as isoformas MAO-A e MAO-B foram conduzidos utilizando um método fluorimétrico que

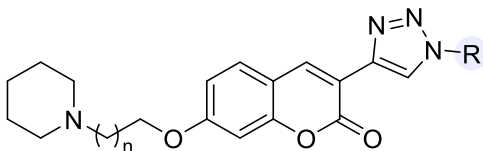
quantificou a produção de peróxido de hidrogênio (H_2O_2), subproduto da reação catalisada por MAO. Nesse sistema, o H_2O_2 reage com o corante Ampliflu Red (**56**) na presença da enzima peroxidase de raiz-forte (HRP), gerando resorufina (**57**), um composto fluorescente de cor rosa com emissão em 587 nm (Esquema 18). A intensidade da fluorescência da resorufina (**55**) é diretamente proporcional à atividade enzimática das MAOs, permitindo a avaliação quantitativa da inibição.



Esquema 18. Reação observada no ensaio de atividade inibitória dos compostos sobre as isoformas MAO A e MAO B.

Os ensaios foram realizados para os compostos **26a**, **26j** e **25b**. A inibição percentual das isoformas MAO A e MAO B foi determinada inicialmente na concentração-teste de 1 μM . Para o composto **26j**, que exibiu inibição $>50\%$ na triagem inicial, os valores de CI_{50} foram determinados, permitindo a avaliação quantitativa da potência inibitória (Tabela 8).

Tabela 8. Resultados de atividade inibitória dos compostos frente as isoformas MAO A e MAO B.

				
Composto	n	R	<i>h</i> MAO A CI_{50} [nM] ^a	<i>h</i> MAO B CI_{50} [nM] ^a
26a	1	-Bn	$5,21 \pm 1,89^c$	$11,31 \pm 1,90^c$
26j	2	-Bn	31055 [11758; 82018]	1688 [1164; 2449]
25b^b	2	-Ph	$6,43 \pm 0,48^c$	$11,40 \pm 1,89^c$
Rasagilina	-	-	-	25 ± 7^d

^a O intervalo de confiança (95%) é dado entre colchetes. ^b composto obtido em trabalhos anteriores (Nadur, 2020). ^c porcentagem de inibição de MAO A/B em uma concentração de teste de 1 $\mu\text{M} \pm \text{SEM}$. ^d $\text{CI}_{50} \pm \text{SEM}$ [nM].

Com base nos resultados obtidos para a inibição das isoformas MAO A e MAO B pelos compostos **26a**, **26j** e **25b**, observa-se que apenas o **26j** exibiu inibição potente e seletiva para MAO B, com valor de $\text{CI}_{50} = 1688 \text{ nM}$ e razão de seletividade MAO B/A superior a 18 vezes. Esse perfil é farmacologicamente relevante, uma vez que inibidores seletivos de MAO B são prioritários no tratamento de doenças neurodegenerativas, como a doença de Alzheimer, minimizando riscos de efeitos colaterais ligados à inibição de MAO A (ex.: síndrome serotoninérgica).

Com base nos resultados de inibição de colinesterases e MAO, e afinidade pelo H_3R , apesar de poucos exemplos ($n = 3$), aparentemente é possível inferir que dependendo do perfil de substituição dos compostos, podemos ter modulações diferenciadas das atividades. Para **26a** ($n = 1$ e $\text{R} = \text{Bn}$), a principal atividade é a inibição de AChE ($\text{CI}_{50} = 6 \text{ nM}$), tendo como atividade complementar a modulação de H_3R ($\text{K}_i = 558 \text{ nM}$). No caso de **26j** ($n = 2$ e $\text{R} = \text{Bn}$), homólogo superior de **26a** na cadeia amino-alcoxila, foi possível obter um composto com perfil inverso, onde a modulação de H_3R ($\text{K}_i = 151 \text{ nM}$) é prioritária, enquanto também apresenta atividades complementares como inibidor de colinesterases e MAO B (AChE $\text{CI}_{50} = 1950 \text{ nM}$; BChE $\text{CI}_{50} = 3557 \text{ nM}$ e MAO B $\text{CI}_{50} = 1688 \text{ nM}$). Por fim, **25b** ($n = 2$ e $\text{R} = \text{Ph}$), homólogo inferior de **26j** entre o núcleo 1,2,3-triazol e a fenila, se mostrou como promissor hit por apresentar excelente modulação de H_3R ($\text{K}_i = 31,9 \text{ nM}$) e interessante potência de inibição da AChE ($\text{CI}_{50} = 1330 \text{ nM}$). Esse conjunto de resultados mostra que essa série de compostos pode servir de modelo para a criação de compostos multialvos para o tratamento da DA.

3.1.13. Avaliação *in silico* da interação dos compostos com a EeAChE

Para a realização do estudo de ancoramento molecular (*docking*) entre os compostos e a enzima EeAChE foi utilizado a proteína disponível no *Protein Data Bank* (PDB) de código 1C2B e resolução de 4,5 Å (Bourne et al., 1999). Como a enzima 1C2B não possui substrato co-cristalizado, a escolha da melhor função pelo programa GOLD 2024.3.0 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 apresentou simultaneamente para uma mesma posição de ligação o menor valor de RMSD e a maior

pontuação de ancoramento, sendo, por esse motivo, esta função escolhida para os procedimentos subsequentes de atracamento molecular (De Souza et al., 2019; Neves Santos et al., 2019). Os resultados de *score* de ligação e valores de CI_{50} obtidos para os compostos **26a-j** estão apresentados na Tabela 9, permitindo a visualização da correlação entre os dados. O detalhamento qualitativo das interações moleculares entre os ligantes e a enzima *EeAChE* está descrito na Tabela S1 do Anexo 7.1.

Tabela 9. Resultados de *score* e os respectivos valores de CI_{50} dos compostos avaliados.

Compostos	<i>EeAChE</i>	
	GoldScore	CI_{50} (nM) \pm DP
26a	82,01	$6 \pm 0,6$
26b	83,3	$15,3 \pm 0,3$
26c	73,41	$4,2 \pm 0,1$
26d	78,24	$4,6 \pm 0,6$
26e	79,61	$23,4 \pm 1,8$
26f	82,87	$13,1 \pm 0,8$
26g	83,49	$103,8 \pm 5,4$
26h	83,98	$7,9 \pm 0,5$
26i	80,18	$12,9 \pm 1,0$
26j	77,19	1950 ± 86

Embora escores elevados de docking sugiram maior afinidade na interação ligante-proteína, verificou-se que essas pontuações não corresponderam à conformação bioativa experimentalmente relevante – especialmente para o composto **26j**, cujo melhor *score* computacional não refletiu sua orientação funcional no sítio ativo. Essa desconexão ficou evidente após análise minuciosa de todas as soluções geradas pelo GOLD 2024.3.0, onde o maior *score* nem sempre correspondia à conformação esperada. A avaliação manual das poses tornou-se necessária porque esse experimento lança mão da mecânica molecular, que prioriza otimização energética ainda que em detrimento aos ângulos diedros e as coordenadas que definem a orientação da molécula no sítio. Para contornar essa limitação seria necessário utilizar experimentos baseados em cálculos semiempíricos.

Com base na análise das poses de ligação obtidas pelo estudo de *docking*, observou-se que os inibidores ocuparam simultaneamente o sítio ativo (CAS) e o sítio periférico (PAS), confirmando os dados do estudo de cinética enzimática. No sítio ativo, o grupamento amino-

cíclico protonado dos inibidores estabeleceu interações do tipo cátion- π com o resíduo Trp86. Além disso, o núcleo cumarínico posicionou-se no canal do sítio ativo, formando ligações de hidrogênio com o resíduo Tyr337 e o grupo peptídico do resíduo Phe295. Essas três interações, já descritas como requisitos essenciais para a atividade inibitória de compostos do tipo alcoxi-amino-cumarinas, foram consistentemente observadas em todos os derivados sintetizados (Figura 26A).

Adicionalmente, o triazol substituído na posição 3 da cumarina orienta-se para a região de interseção entre o sítio ativo (CAS) e o sítio periférico (PAS), estabelecendo ligações de hidrogênio e/ou interações hidrofóbicas, dependendo dos substituintes presentes no grupo benzila. Por sua vez, o grupo benzila posiciona-se na entrada da cavidade do PAS, atuando predominantemente por meio de interações hidrofóbicas (Figura 26B).

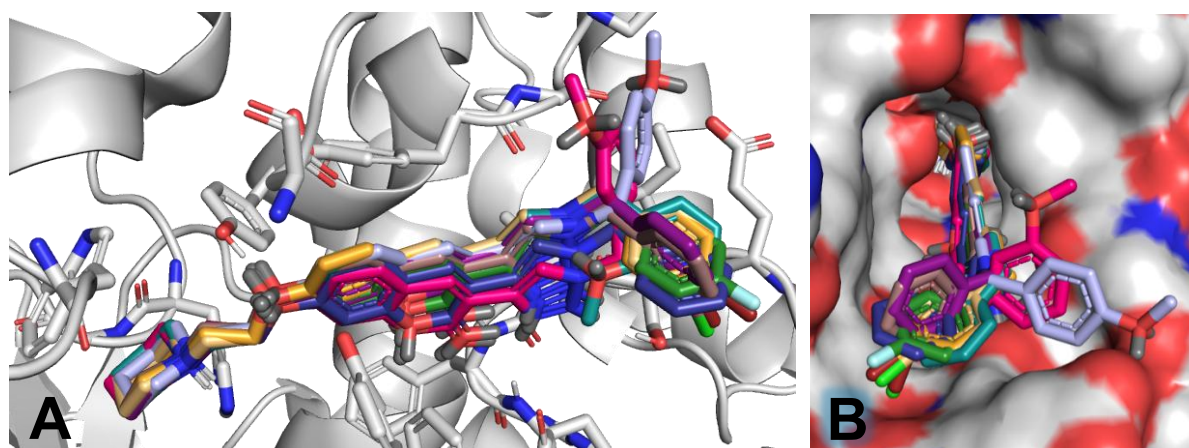


Figura 26. A) Análise da sobreposição dos compostos **26a-j** e a cavidade enzimática da AChE. B) Análise da cavidade de acesso ao sítio catalítico da AChE com os compostos **26a-j** ancorado. Figura gerada com PyMol 3.1.3.1 (Copyright © Schrödinger LLC).

Ao analisar a sobreposição entre o composto **26a** e o protótipo **25a** (Figura 27A), observa-se que as interações no sítio catalítico são mantidas, enquanto as interações no sítio alostérico sofrem modificações. Sob a perspectiva da superfície de Van der Waals, nota-se que no protótipo **25a**, o triazol está posicionado no limite da cavidade (Figura 27B-i), com liberdade conformacional restrita devido ao impedimento estérico causado pelo grupo fenila no sítio alostérico (Figura 27B-ii). Em contraste, no composto **26a**, o carbono sp^3 da benzila confere ao triazol maior flexibilidade conformacional, permitindo interações de hidrogênio com os resíduos Phe295 (3,2Å), Arg296 (3,4Å) e Ser293 (3,2Å) e posicionamento direcionado do anel aromático no sítio alostérico (Figura 27C).

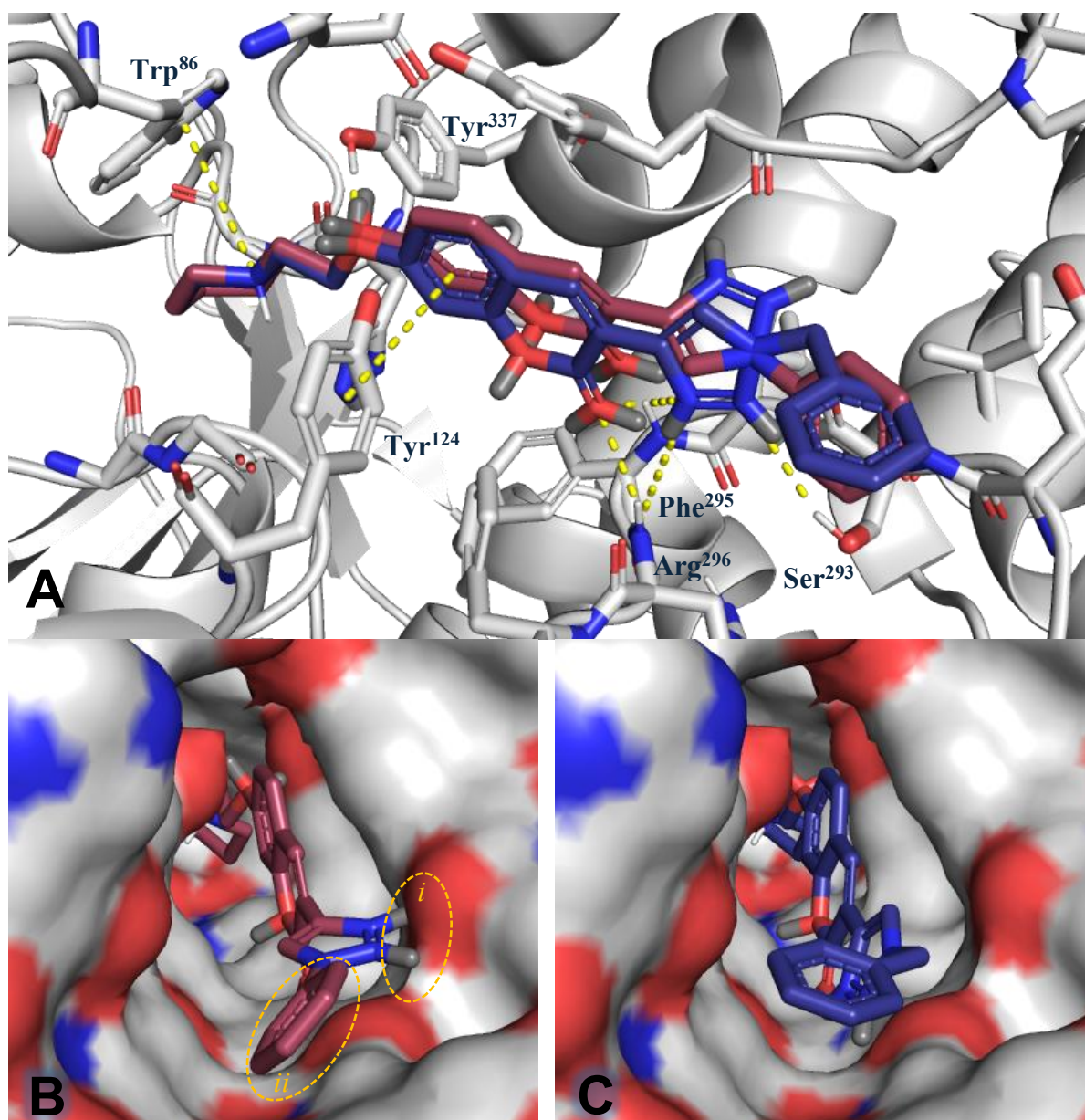


Figura 27. A) Análise das principais interações moleculares entre o composto **26a**, destaque em azul, e a cavidade enzimática da AChE, com sobreposição ao composto **25a**, destaque em rosa. B) Análise da superfície de Van der Waals com o composto **25a** (rosa) ancorado. C) Análise da superfície de Van der Waals com o composto **26a** (azul) ancorado. Figura gerada com PyMol 3.1.3.1 (Copyright © Schrödinger LLC).

A análise das poses de ligação obtidas no estudo de *docking* para o inibidor **26c** o mais potente da série, revelou a interação do tipo cátion- π com o resíduo Trp86 do sítio ativo (CAS), além de ligações de hidrogênio com os resíduos Tyr337 (1,9 Å), Phe295 (1,6 e 2,8 Å), Arg296 (2,4 e 2,8 Å) e Ser203 (2,8 Å). O grupo benzila *meta*-substituído com uma metoxila interagiu exclusivamente por interações hidrofóbicas no sítio periférico (PAS). Adicionalmente,

observaram-se interações hidrofóbicas ao longo da cavidade da enzima, contribuindo para a estabilização do complexo.

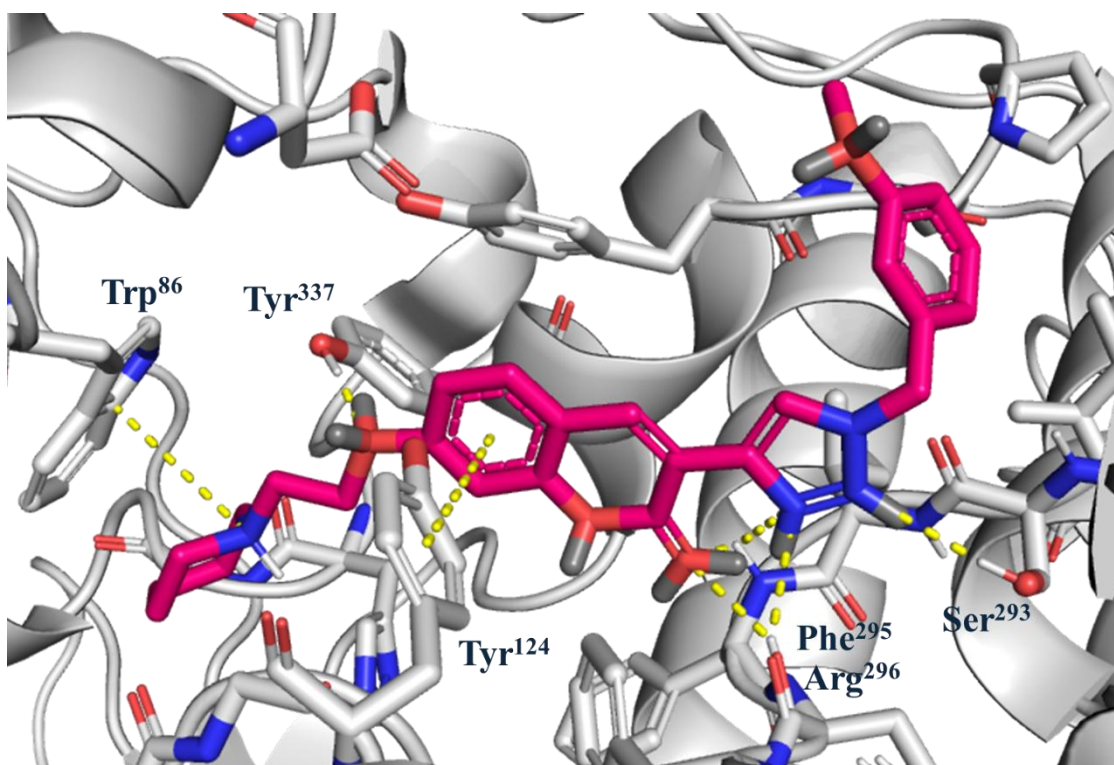


Figura 28. Análise das principais interações moleculares entre o composto **26c**, destaque em rosa, e a cavidade enzimática da AChE. Figura gerada com PyMol 3.1.3.1 (Copyright © Schrödinger LLC).

Quando analisamos o composto **26d**, cuja potência é equivalente à do **26c**, observamos de forma análoga a interação cátion- π com o resíduo Trp86 e ligações de hidrogênio com os resíduos Tyr337 (1,9 Å), Phe295 (1,8 Å e 3,1 Å), Arg296 (2,5 Å e 3,4 Å) e Ser203 (3,1 Å). No sítio periférico (PAS), o grupo benzila *para*-substituído com grupo metoxila também interagiu exclusivamente por interações hidrofóbicas. Entretanto, ao analisarmos as distâncias das interações e os ângulos conformacionais, conclui-se que a diferença mínima na atividade entre os dois compostos é provocada pelo deslocamento estrutural induzido pela posição do substituinte no grupo benzila, alterando o arranjo espacial do ligante na cavidade enzimática.

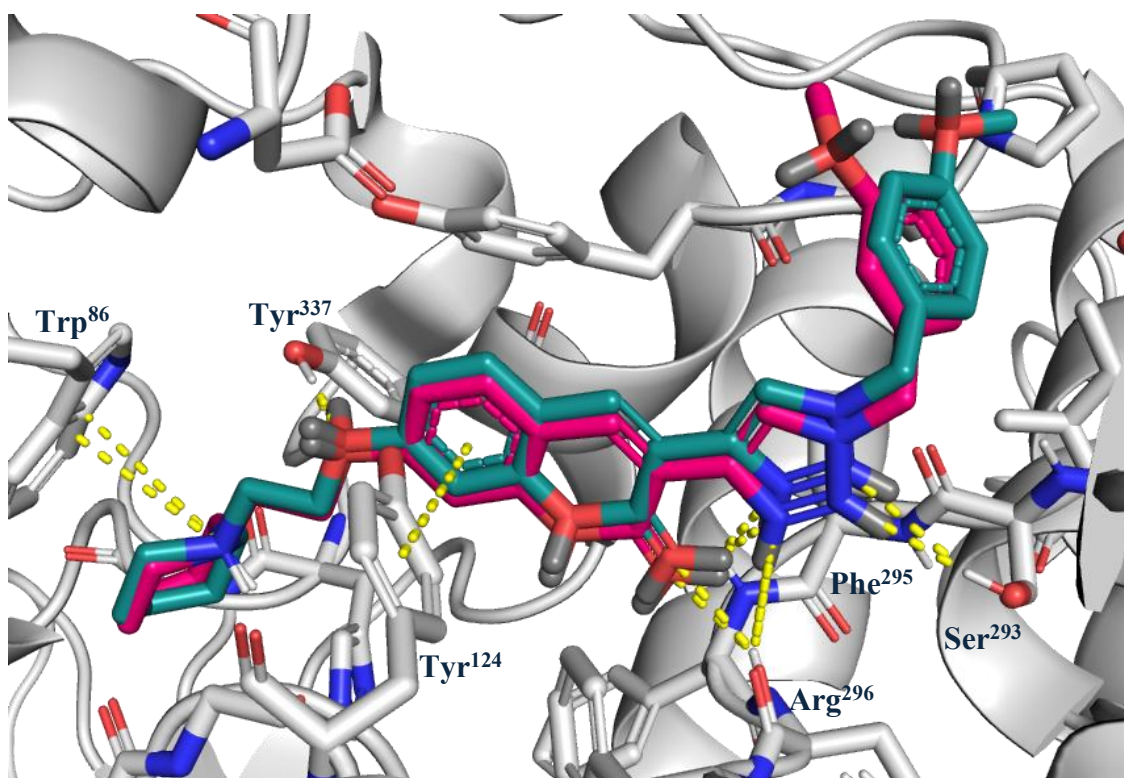


Figura 29. Análise das principais interações moleculares entre o composto **26d**, destaque em ciano, e a cavidade enzimática da AChE, com sobreposição ao composto **26c**, destaque em rosa. Figura gerada com PyMol 3.1.3.1 (Copyright © Schrödinger LLC).

Já os demais derivados benzílicos com dois carbonos na cadeia alquílica (**26b**, **e-j**) demonstraram interagir predominantemente no sítio ativo (CAS), estabelecendo interações cátion- π com o resíduo Trp86 e ligações de hidrogênio com os resíduos Tyr337 e Phe295. Entretanto, as interações no sítio periférico (PAS), induzidas pelos substituintes do grupo benzila, deslocaram a estrutura do ligante, impedindo a formação de ligações de hidrogênio com os resíduos Arg296 e Ser293 (Figura 30A).

Na análise das poses dos compostos **26f** (*m*-Cl) e **26h** (*m*-Br), demonstrou-se a presença de interações de halogênio com o resíduo de Gln291 (**26f** e **26h**) (Figura 30B). Uma vez que a interação de halogênio é uma interação não covalente que ocorre devido à polarização da ligação carbono-halogênio, a força dessa interação depende diretamente da polarizabilidade e tamanho do átomo de halogênio. Desta forma, pode-se dizer que a ordem de força das interações de halogênio é Br > Cl > F. Essa tendência correlacionou-se diretamente com os potenciais de inibição dos compostos, que seguiram a mesma hierarquia: **26h** > **26f** > **26e**.

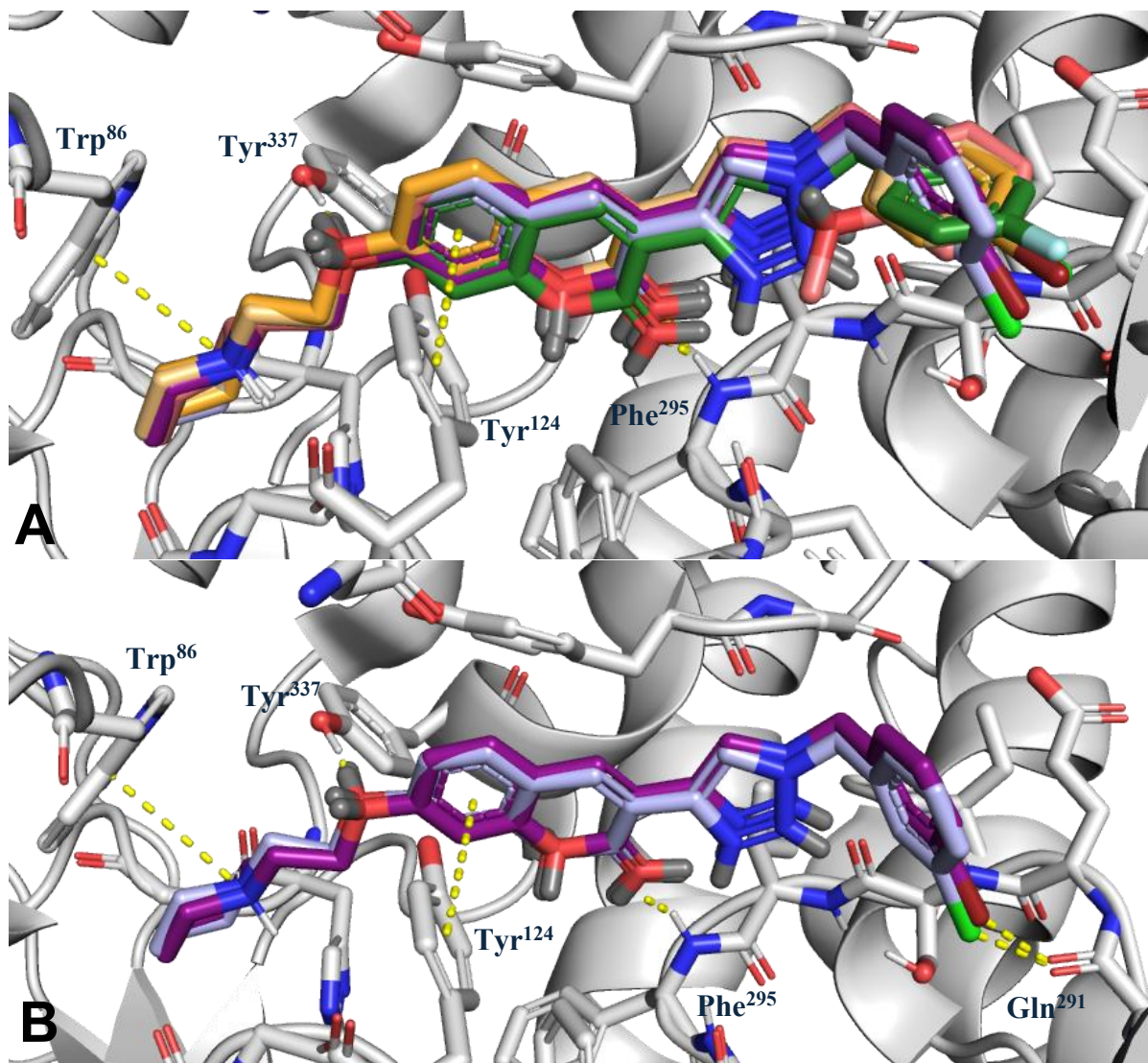


Figura 30. A) Análise da sobreposição dos compostos **26b**, **e-j** na cavidade enzimática da AChE. B) Análise da sobreposição dos compostos **26e-f**, **h**, destacando as interações de halogênio entre o composto **26h** (roxo) e **26f** (azul claro) com o resíduo Gln291. Figura gerada com PyMol 3.1.3.1 (Copyright © Schrödinger LLC).

Ao avaliar a variação do tamanho da cadeia alifática, observou-se que o composto **26j** (3 metilenos), manteve a interação do tipo cátion- π com o resíduo Trp86 no sítio catalítico (CAS), embora esta apresentasse leve descentralização. Além disso, foram observadas interações de hidrogênio com os resíduos Tyr337 (1,9 Å) e Phe295 (2,2 Å). Entretanto, a variação do tamanho da cadeia alquílica induziu o deslocamento do ligante na cavidade, impedindo a formação de ligações de hidrogênio com os resíduos Arg296 e Ser293 no sítio periférico (PAS). Essa alteração correlaciona-se com a diminuição da potência de inibição desse composto, conforme observado nos ensaios *in vitro*.

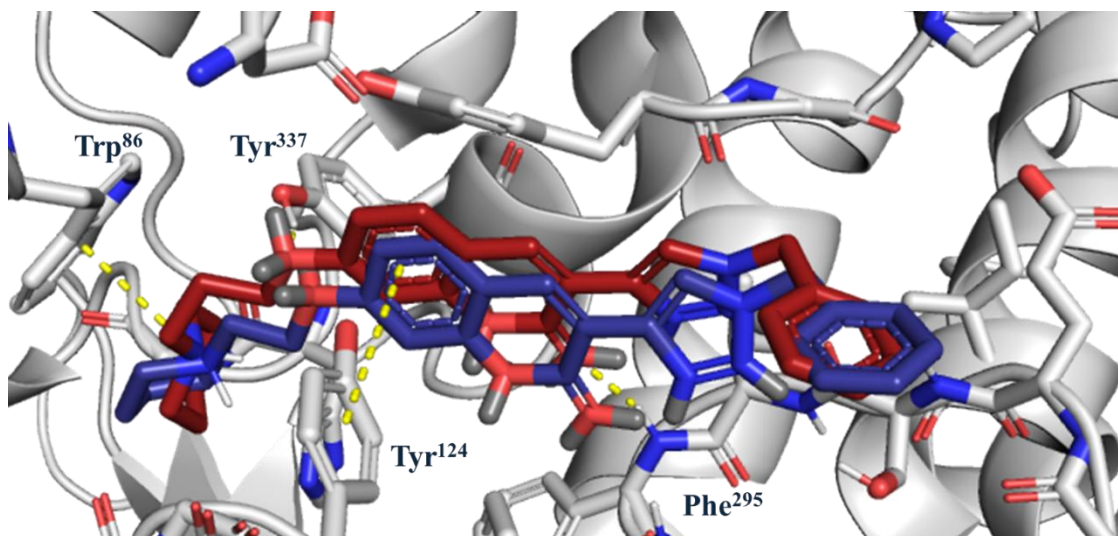


Figura 31. Análise da sobreposição do composto **26j** (vinho) e o composto **26a** (azul), na cavidade enzimática da AChE. Figura gerada com PyMol 3.1.3.1 (Copyright © Schrödinger LLC).

3.1.14. Avaliação *in silico* da interação dos compostos com a *EqBChE*

Para a realização do estudo de ancoramento molecular (*docking*) entre os compostos e a enzima *EqBChE*, foi necessária a construção de um modelo tridimensional (3D) a partir de uma sequência disponível no banco de dados UniProtKB/Swiss-Prot (acesso Q9N1N9). O modelo foi gerado no servidor Swiss-Model, utilizando como *template* a estrutura cristalográfica da BChE humana (PDB 4BDS) (Nachon et al., 2013). O modelo final apresentou identidade sequencial de 89,89% em relação à enzima humana, com uma cobertura de 0,87. Para validação da função de *scoring* no programa GOLD 2024.3.0, realizou-se um experimento de *redocking* com a tacrina (ligante co-cristalizado no PDB 4BDS). A função ASP demonstrou maior precisão na reprodução das interações moleculares da tacrina, com valores de RMSD inferiores a 1,00 Å. Os resultados de *score* de ligação e valores de CI_{50} obtidos para os compostos **26a-j** estão apresentados na Tabela 10, permitindo a visualização da correlação entre os dados. O detalhamento qualitativo das interações moleculares entre os ligantes e a enzima *EqBChE* está descrito na Tabela S2 do Anexo 7.1.

Tabela 10. Resultados de score e os respectivos valores de CI_{50} dos compostos avaliados.

Compostos	<i>Eq</i> BChE	
	ASP	CI_{50} (nM) \pm DP
26a	48,55	3790 \pm 365
26b	50,06	2810 \pm 233
26c	50,67	2880 \pm 122
26d	50,40	2080 \pm 99
26e	48,29	4120 \pm 110
26f	48,38	1950 \pm 115
26g	48,13	2240 \pm 60
26h	48,64	2090 \pm 54
26i	48,34	1140 \pm 70
26j	50,44	3557 \pm 185

A análise das poses de ligação obtidas pelo estudo de *docking* revelou que os inibidores ocupam simultaneamente o sítio catalítico (CAS) e o sítio periférico (PAS) da enzima, o que está em concordância com os dados cinéticos observados experimentalmente. No CAS, o grupamento amino-cíclico protonado dos inibidores estabelece interações do tipo cátion- π com o resíduo Trp110, enquanto o núcleo cumarínico posiciona-se no sítio catalítico, formando uma interação de empilhamento π - π com o resíduo Tyr360. No sítio periférico (PAS), predominaram interações hidrofóbicas, cujos resíduos envolvidos mantiveram-se consistentes independentemente dos substituintes presentes no grupo benzila. Entretanto, a natureza desses substituintes influenciou diretamente os parâmetros geométricos das interações, como distâncias intermoleculares e ângulos conformacionais, sem alterar significativamente a identidade dos resíduos participantes.

Os resultados de *docking* apoiam a influência do volume da cavidade da BChE na atividade dos compostos. A maior dimensão do sítio ativo da BChE, embora permita a entrada de ligantes mais volumosos, compromete a formação de interações direcionais e estáveis. Essa menor eficiência nas interações moleculares explica diretamente os menores valores de potência inibitória observados *in vitro* em comparação à AChE

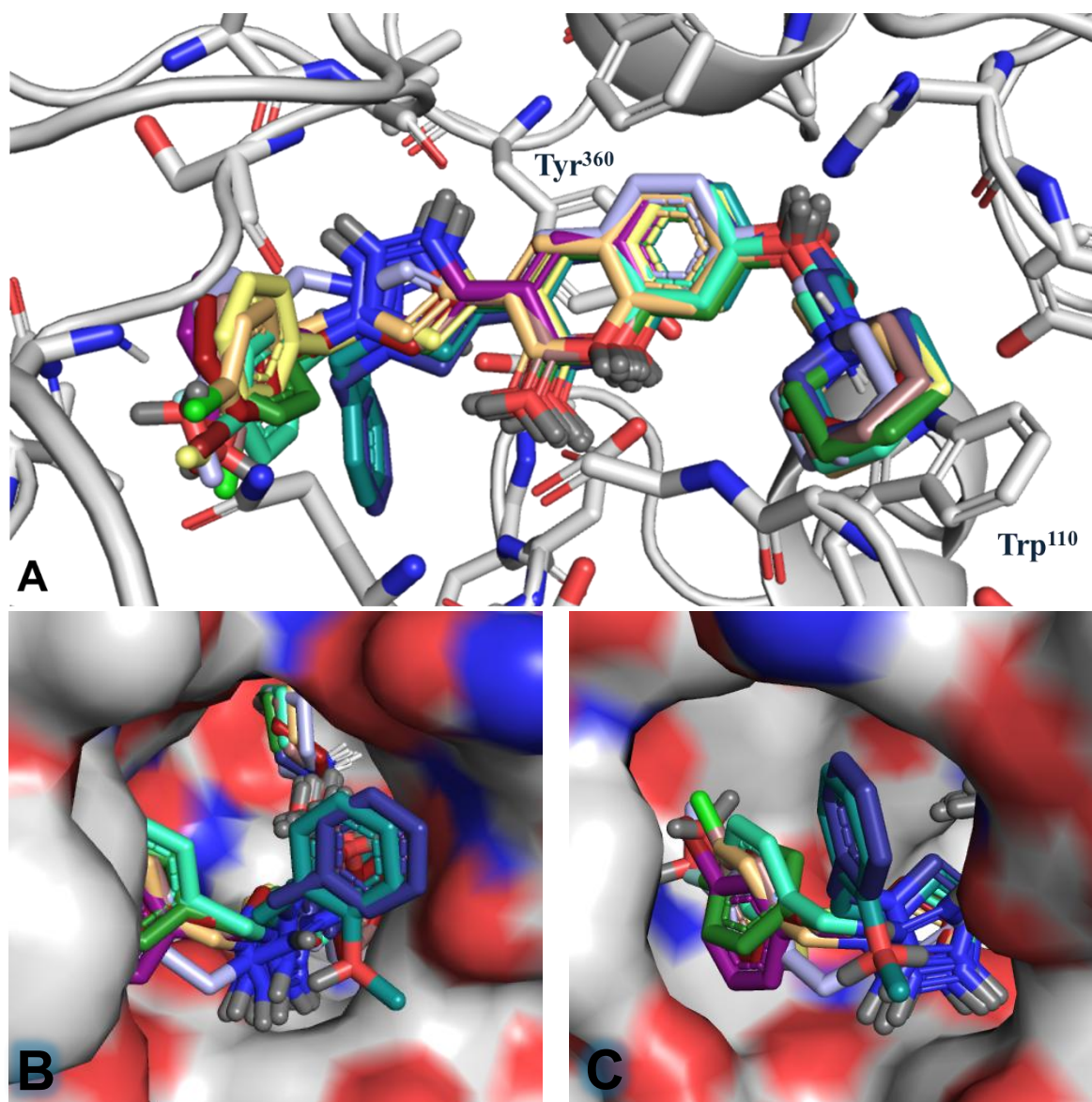


Figura 32. A) Análise da sobreposição dos compostos **26a-j** e a cavidade enzimática da BChE. B) Análise da cavidade de acesso ao sítio catalítico da BChE com os compostos **26a-j** ancorado, visto de frente e C) de lado. Figura gerada com PyMol 3.1.3.1 (Copyright © Schrödinger LLC).

Ao analisar a sobreposição entre o composto **26a** e o protótipo **25a** (Figura 33A), observa-se que as interações no sítio catalítico são mantidas, enquanto as interações no sítio alostérico sofrem modificações. Sob a perspectiva da superfície de Van der Waals (Figura 33B), nota-se que no protótipo **25a**, o triazol direciona o anel fenílico para a entrada da cavidade, em uma região como poucos aminoácidos. Em contraste, no composto **26a**, o carbono sp^3 da benzila confere uma maior flexibilidade conformacional, permitindo diversas interações hidrofóbicas no PAS. Ainda que energeticamente modestas, essas interações hidrofóbicas estabilizam o complexo no PAS, elevando a afinidade pelo sítio ativo mesmo quando o CAS permanece inalterado.

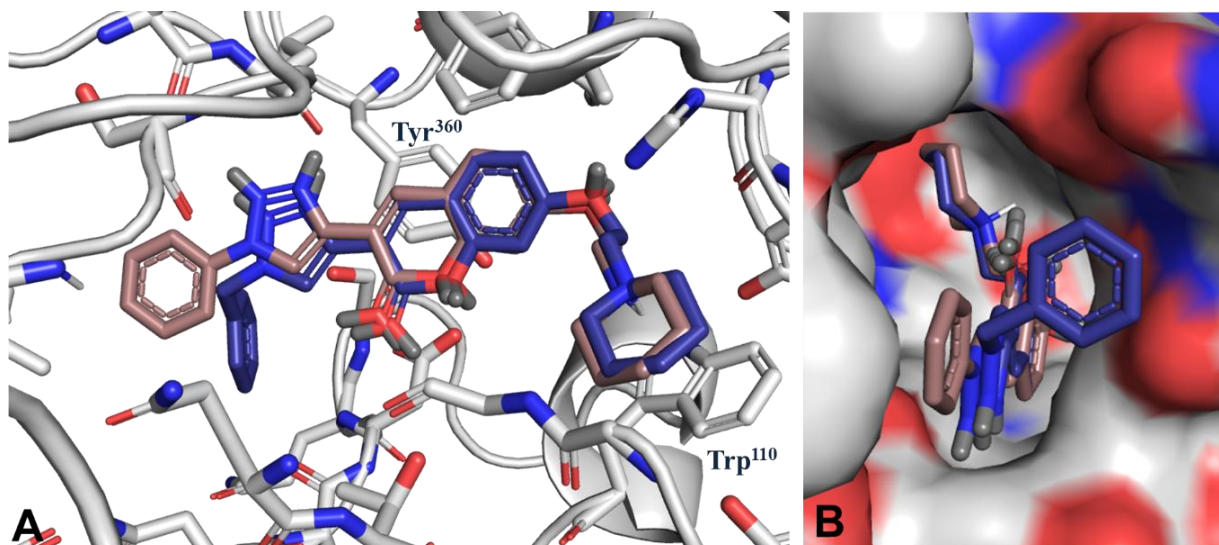


Figura 33. A) Análise da sobreposição dos compostos **25a** (rosa) e **26a** (azul) e a cavidade enzimática da *eqBChE*. B) Análise da cavidade de acesso ao sítio catalítico da *eqBChE* com os compostos **25a** e **26a** ancorado. Figura gerada com PyMol 3.1.3.1 (Copyright © Schrödinger LLC).

3.1.15. Avaliação *in silico* da interação dos compostos no receptor de Histamina H₃ (H₃R)

Para a realização do estudo de ancoramento molecular (*docking*) entre os compostos e a enzima *hH₃R* foi utilizado a proteína disponível no *Protein Data Bank* (PDB) de código 7F61 e resolução de 2,6 Å (Peng et al., 2022). Para determinar a melhor função pelo programa GOLD 2024.3.0 foi realizada *redocking* com o ligante co-cristalizado da enzima (PF03654746). A função ChemPLP demonstrou maior precisão na reprodução das interações moleculares do ligante, com valores de RMSD inferiores a 1,00 Å. Além disso, a molécula do pitolisant (**20**) foi utilizada como referência experimental para validar o modelo de docking. Os resultados de *score* de ligação e valores de K_i obtidos para os compostos **26a**, **26j** e **25b** estão apresentados na Tabela 11, permitindo a visualização da correlação entre os dados. O detalhamento qualitativo das interações moleculares entre os ligantes e a enzima *hH₃R* está descrito na Tabela S3 do Anexo 7.1.

Os resultados indicaram que todos os compostos formaram interações eletrostáticas (pontes salinas) entre a amina catiônica e o resíduo Asp114, reconhecido na literatura como aminoácido-chave do sítio de ligação do H₃R (Wingen; Stark, 2013). Essa interação é característica de ligantes que adotam uma conformação estendida, condição essencial para

posicionar o grupo catiônico na região mais profunda do sítio de ligação, onde o Asp114 está estrategicamente localizado (Añazco et al., 2025).

Tabela 11. Resultados de *score* e os respectivos valores de *K_i* dos compostos avaliados.

Compostos	<i>h</i> H ₃ R	
	ChemPLP	<i>K_i</i> [nM] ^a
26a	101,31	558 [337; 925]
26j	106,73	151 [70,5; 325]
25b^b	86,50	31,9 [25,1; 40,5]

^a O intervalo de confiança (95%) é dado entre colchetes.

^b composto obtido em trabalhos anteriores (Nadur, 2020)

Nos compostos **25b** e **26j**, que possuem cadeias espaçadoras com três metilenos, a interação com o resíduo de Asp114 (**25b**: 2,7 Å e **26j**: 2,6 Å) foi mediada por um empilhamento π - π do tipo T entre o núcleo cumarínico e os resíduos Phe193 (**25b**: 5,9 Å e **26j**: 5,5 Å) e Phe398 (**25b**: 5,0 Å e **26j**: 5,1 Å), além de um empilhamento π - π paralelo envolvendo o anel triazólico e o resíduo Tyr94 (**25b** e **26j**: 4,4 Å). Adicionalmente, foram identificadas duas interações de ligação de hidrogênio com os resíduos Tyr189 (**25b**: 2,9 e 3,3 Å e **26j**: 2,5 e 3,5 Å) e Tyr394 (**25b**: 2,1 Å e **26j**: 2,4 Å) (Figura 34).

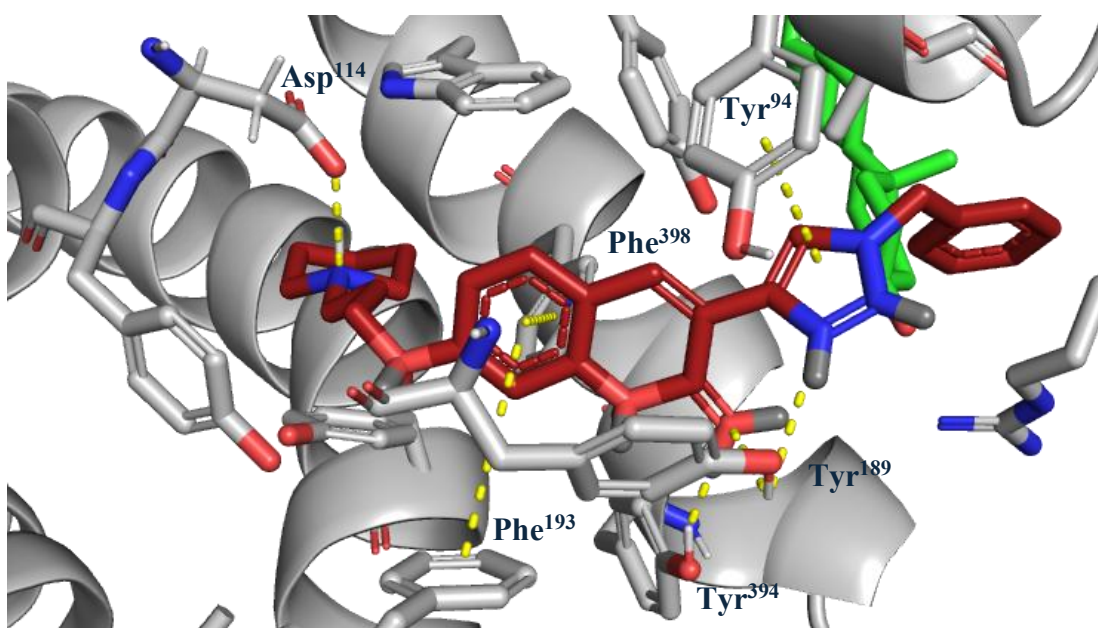


Figura 34. Análise das principais interações moleculares entre o composto **26j** e a cavidade da *h*H₃R. Figura gerada com PyMol 3.1.3.1 (Copyright © Schrödinger LLC).

Em contraste, o composto **26a** — com cadeia espaçadora de dois grupos metilenos — interagiu com o resíduo Asp114 (2,8 Å), porém exigiu um deslocamento estrutural na cavidade que prejudicou outras interações essenciais à estabilização do complexo (Figura 35A). Adicionalmente, foram detectadas interações hidrofóbicas como um empilhamento π - π do tipo T com Phe398 (4,5 Å) e um empilhamento π - π paralelo com Tyr94 (4,0 Å) (Figura 35B).

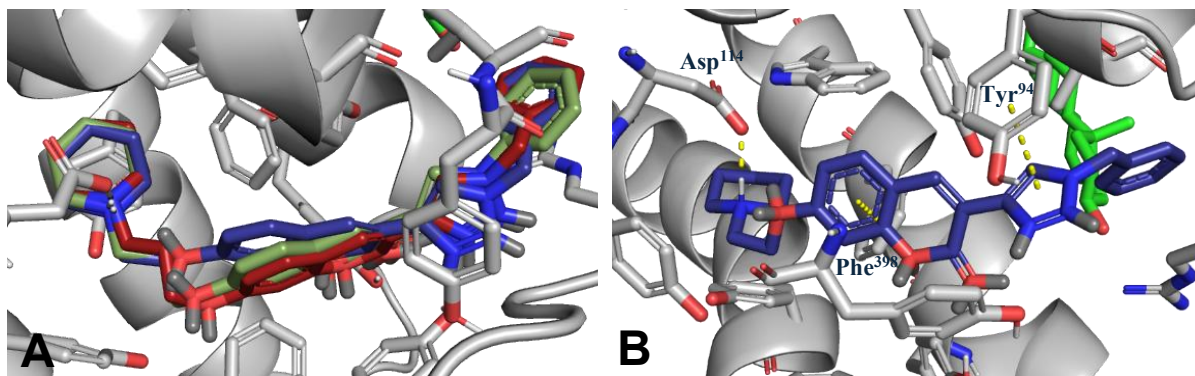


Figura 35. A) Análise da sobreposição dos compostos **26a** (azul), **26j** (vinho) e **25b** (verde), e B) Análise das principais interações moleculares entre o composto **2a** e a cavidade da *hH3R*. Figura gerada com PyMol 3.1.3.1 (Copyright © Schrödinger LLC).

3.1.16. Avaliação *in silico* da interação dos compostos Monoamino Oxidase (MAO-A e MAO-B)

Para o estudo de ancoramento molecular (*docking*) entre os compostos e a isoforma *hMAO-A* foi utilizado a proteína disponível no *Protein Data Bank* (PDB) de código 2Z5X e resolução de 2,2 Å (Son et al., 2008). Para determinar a melhor função pelo programa GOLD 2024.3.0 foi realizada *redocking* com o ligante co-cristalizado da enzima (Harmina). A função ChemPLP apresentou maior precisão na reprodução das interações moleculares do ligante nativo, com valores de desvio quadrático médio (RMSD) inferiores a 1,00 Å, validando sua seleção para análises subsequentes.

Para a isoforma *hMAO-B*, adotou-se o PDB de código 2V60 e resolução de 2,0 Å (Binda et al., 2007). O procedimento de *redocking* foi executado com o ligante co-cristalizado 7-(3-clorobenziloxi)-4-carboxaldeído-cumarina. A função Chemscore demonstrou maior eficiência na predição das interações moleculares, exibindo valores de RMSD consistentemente abaixo de 1,00 Å, o que justificou sua aplicação nos experimentos.

Os resultados de *score* de ligação e valores de CI_{50} obtidos para os compostos **26a**, **26j** e **25b** estão apresentados na Tabela 12, permitindo a visualização da correlação entre os dados.

O detalhamento qualitativo das interações moleculares entre os ligantes e a enzima hMAO está descrito na Tabela S4 e Tabela S5 do Anexo 7.1.

Tabela 12. Resultados de score e os respectivos valores de CI_{50} dos compostos avaliados.

Compostos	MAO-A		MAO-B	
	ChemPLP	CI_{50} [nM] ^a	Chemscore	CI_{50} [nM] ^a
26a	63,62	5,21 ± 1,89 ^c	36,53	11,31 ± 1,90 ^c
26j	79,50	31055 [11758; 82018]	37,82	1688 [1164; 2449]
25b^b	72,61	6,43 ± 0,48 ^c	37,66	11,40 ± 1,89 ^c

^a O intervalo de confiança (95%) é dado entre colchetes. ^b composto obtido em trabalhos anteriores (Nadur, 2020). ^c porcentagem de inibição de MAO A/B em uma concentração de teste de 1 μ M ± SEM.

Os domínios de ligação de substrato das MAO-A e MAO-B são majoritariamente hidrofóbicos, com cavidades de $\sim 550 \text{ \AA}^3$ e $\sim 490 \text{ \AA}^3$, respectivamente. Resíduos como Phe208 e Ile335 na MAO-A, e Ile199 e Tyr326 na MAO-B, são considerados de grande importância para as interações com substratos e inibidores, definindo as diferenças funcionais entre as isoformas (Shi et al., 2019).

Os resultados para a isoforma MAO-B indicaram que os compostos interagem com o sítio ativo da enzima, composto por duas regiões distintas: a cavidade do substrato e a cavidade de entrada. A cavidade do substrato, localizada adjacente ao cofator FAD, é delimitada pelos resíduos Tyr60, Trp119, Leu164, Leu167, Cys172, Gln206, Tyr398 e Tyr435. Já a cavidade de entrada, posicionada abaixo da superfície da proteína, é uma região lipofílica revestida pelos resíduos Phe168, Leu171, Ile198, Ile199 e Tyr326 (Żołek et al., 2024).

O composto **26j**, o único que apresentou potência significativa para essa enzima, demonstrou interações de ligação de hidrogênio com Pro102 (1,7 \AA) e Gln206 (3,1 \AA). Adicionalmente, apresentaram empilhamento π - π com os resíduos de Tyr398 (3,9 \AA) e Tyr435 (3,7 \AA), empilhamento π - π do tipo T com o resíduo de Tyr326 (5,3 \AA) (Figura 36).

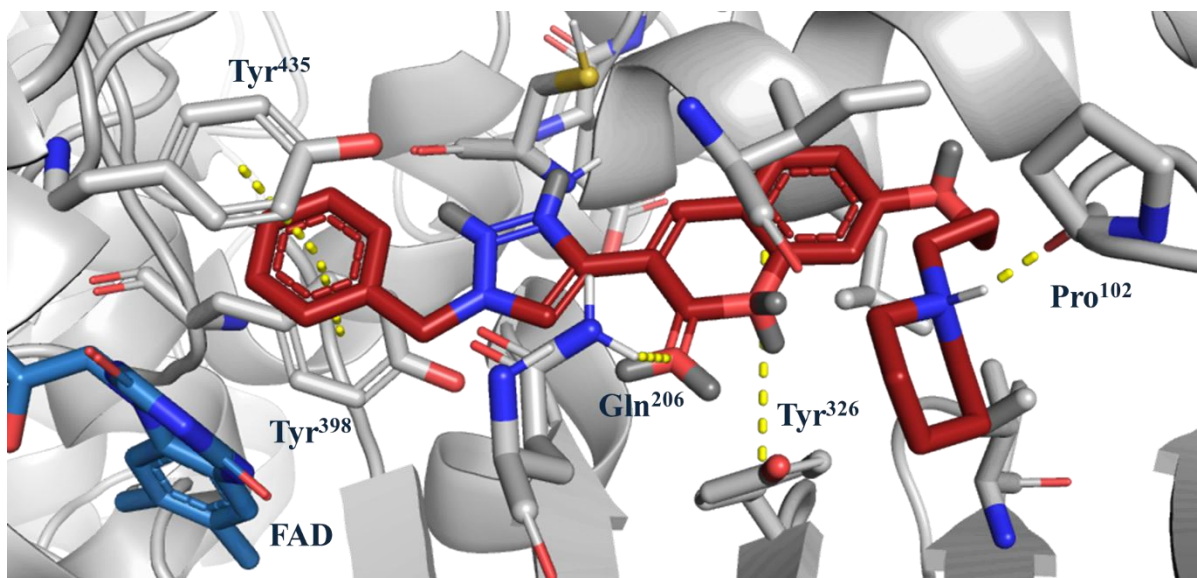


Figura 36. Análise das principais interações moleculares entre o composto **26j** e a cavidade enzimática da MAO-B. Figura gerada com PyMol 3.1.3.1 (Copyright © Schrödinger LLC).

Por sua vez, os compostos **26a** e **25b**, embora tenham demonstrado baixa potência de inibição no estudo experimental, apresentaram interações com as cavidades da enzima no estudo de ancoramento molecular. As interações de empilhamento π - π com os resíduos Tyr398 e Tyr435 mantiveram-se presentes, assim como o empilhamento π - π do tipo T com o resíduo Tyr326. Entretanto, interações-chave como ligações de hidrogênio com os resíduos Pro102 e Gln206 não foram observadas, uma vez que a orientação dos compostos na cavidade é distinta (Figura 37).

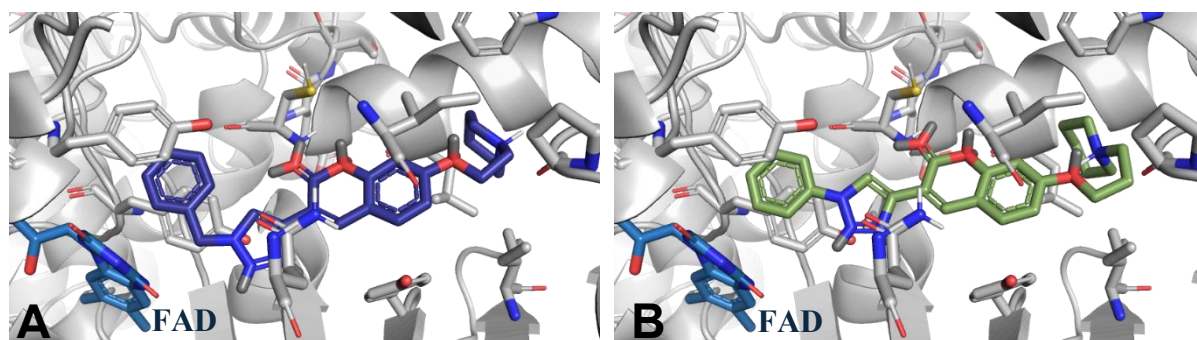


Figura 37. A) Composto **26a** e B) Composto **25b** na cavidade enzimática da MAO-B. Figura gerada com PyMol 3.1.3.1 (Copyright © Schrödinger LLC).

Já na isoforma MAO-A, foi observado que nenhum dos compostos avaliados estabelece interações com os resíduos polares críticos (ex.: Tyr69, Gln215, Tyr407, Tyr444) localizados na região profunda do sítio ativo, adjacente ao cofator FAD. Em vez disso, as interações restringiram-se a resíduos da cavidade de entrada. Essa tendência está associada ao maior volume da cavidade da MAO-A ($\sim 550 \text{ \AA}^3$), que permite a entrada de inibidores menos

volumosos, porém não direciona esses compostos eficientemente para a região catalítica próxima ao FAD. Como resultado, essas moléculas tendem a se estabilizar na porção inicial da cavidade, interagindo com resíduos como Phe208 e Thr211 (Figura 38).

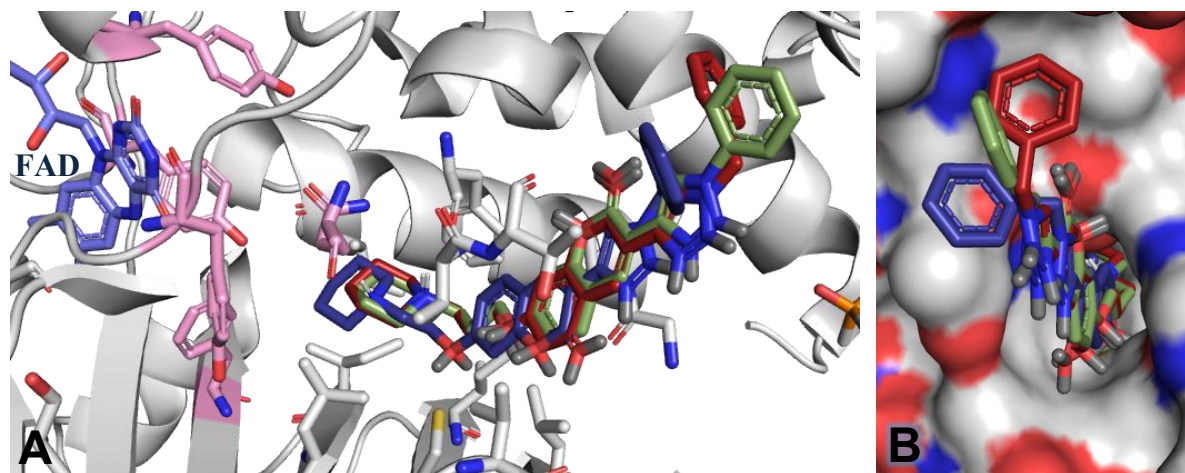


Figura 38. **A)** Análise da sobreposição dos compostos **26a** (azul), **26j** (vinho) e **25b** (verde) e a cavidade enzimática da MAO-A. Aminoácidos Tyr69, Gln215, Phe352, Tyr407, Tyr444 destacados em rosa. **B)** Análise da cavidade de acesso ao sítio catalítico da MAO-A com os compostos **26a**, **26j** e **25b** ancorado. Figura gerada com PyMol 3.1.3.1 (Copyright © Schrödinger LLC).

3.1.17. Ensaio de citotoxicidade e neuroproteção *in vitro* contra a linhagem celular de neuroblastoma SH-SY5Y

A avaliação de segurança é essencial no desenvolvimento de novos compostos bioativos. Grande parte do fracasso no processo de descoberta de novos medicamentos (ensaios clínicos) seria atribuída a perfis de segurança insuficientes (De Conto et al., 2021). Assim, foram avaliadas a neurotoxicidade dos derivados mais potentes na inibição da AChE (**26a**, **26c**, **26d** e **26j**) frente a linhagem imortalizada SH-SY5Y nas concentrações de 12,5, 25 e 50 μM (Figura 39A). Os compostos apresentaram perfis considerados não neurotóxicos até 25 μM , pois a viabilidade celular permaneceu acima ou igual a 70%. Apenas **26c** reduziu a viabilidade celular abaixo desse limite (63%), e apenas a 50 μM . Além disso, os compostos **26a**, **26d** e **26j** apresentaram viabilidade celular a 50 μM comparável aos padrões farmacológicos, como donepezila (80%) e tacrina (97%), testados nas mesmas condições (Das; Tizabi, 2009; Przybyłowska et al., 2022; Queda et al., 2021).

Para avaliação do potencial neuroprotetor de compostos, empregaram-se modelos *in vitro* que simulam danos neuronais. Nesses protocolos consolidados, culturas neuronais são expostas ao peróxido de hidrogênio (H_2O_2) agente neurotóxico que induz desregulação do balanço redox via superprodução de espécies reativas de oxigênio (ROS).

Neste estudo, investigou-se a capacidade dos mesmos compostos testados quanto à neurotoxicidade (**26a**, **26c**, **26d** e **26j**) em prevenir a morte celular neuronal induzida por H_2O_2 na linhagem imortalizada SH-SY5Y. Neste ensaio, a adição de H_2O_2 (400 μM) ao meio de cultura induziu morte celular significativa, demonstrada por uma redução de 65% na viabilidade celular em comparação com o meio controle (DMEM:F12) (Figura 39B).

O fármaco de referência e o controle positivo donepezil (Leonel Silva Sousa et al., 2024), a 10 μM , aumentaram a viabilidade celular em 11% (para 76%). Notavelmente, 1h e 1k demonstraram interessante capacidade neuroprotetora, aumentando a viabilidade celular em 23% (viabilidade celular de 88%) e 27% (viabilidade celular de 92%), respectivamente (Figura 6B).

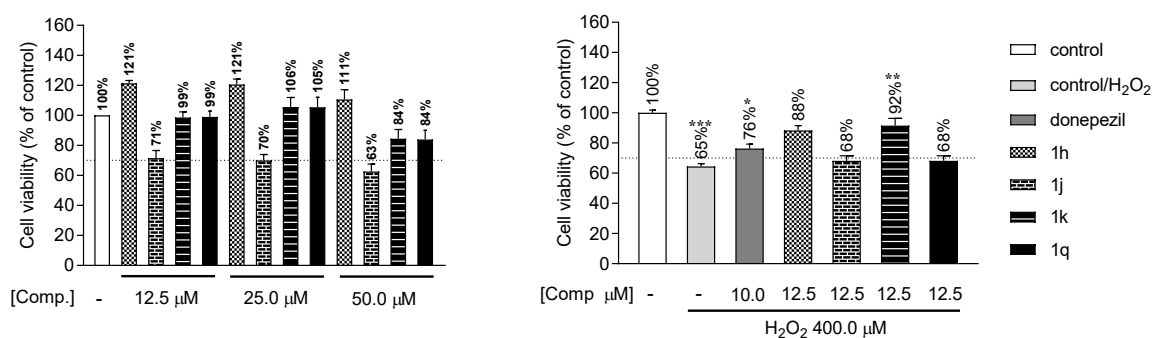


Figura 39. A) A viabilidade celular (%) foi avaliada a partir de células SH-SY5Y pré-incubadas com 12,5, 25,0 e 50,0 μM dos compostos **26a**, **26c**, **26d** e **26j**. Os resultados representam a média de 9 réplicas ($n=9$). **B)** Efeitos neuroprotetores dos compostos **26a**, **26c**, **26d** e **26j** (12,5 μM) em células SH-SY5Y danificadas por H_2O_2 . As células foram pré-incubadas com 12,5 μM dos compostos ou 10 μM do fármaco padrão donepezil por 2 horas e então expostas a H_2O_2 (400 μM) por 24 horas. Para ambos os ensaios, a viabilidade celular foi avaliada usando o ensaio MTT. Os dados são expressos como média \pm desvio padrão (DP); ($n=9$). (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$). Comparações estatísticas foram realizadas entre cada composto e o experimento de controle com H_2O_2 .

3.1.18. Análise do perfil físico-químico ADMET *in silico*

O perfil farmacocinético dos novos derivados de 1,2,3-triazol-cumarina (**26a–j**) foi avaliado por meio de estudos *in silico*, revelando propriedades ADMET favoráveis para a maioria dos compostos. Os principais parâmetros incluíram área de superfície polar topológica (TPSA: 73,39–85,42 \AA^2), Log P de consenso (3,63–4,60), absorção intestinal humana (HIA), permeabilidade da barreira hematoencefálica (BHE), status do substrato da glicoproteína-P (P-gP) e similaridade com fármacos (Tabela 13; Tabela S11 - Tabela S20). Polaridade moderada (TPSA $< 79 \text{\AA}^2$) e lipofilicidade balanceada colocaram a maioria dos derivados na região amarela do modelo BOILED-Egg (Daina; Zoete, 2016) (Figura 40), sugerindo alta acessibilidade ao sistema nervoso central (SNC) — crítica para terapêuticas de ação central. Todos os compostos foram identificados como substratos de P-gP, enquanto 1a–b, 1e–h e 1n aderiram às regras de similaridade a fármacos de Lipinski's (Lipinski et al., 2012), Ghose (Ghose; Viswanadhan; Wendoloski, 1999), Veber (Veber et al., 2002), Egan (Egan; Merz; Baldwin, 2000) e Muegge (Muegge; Heald; Brittelli, 2001) sem violações, reforçando sua promessa como candidatos a fármacos.

Esta análise demonstrou que, embora os compostos **26c** e **26d** apresentem forte potência inibitória contra a AChE, seu alto TPSA (82,62 \AA^2) compromete a permeabilidade da BHE.

Portanto, o composto **26a** surge como um *lead candidate*, combinando potência relevante contra a AChE com um perfil farmacocinético favorável.

Tabela 13. Parâmetros-chave ADME.

Compostos	TPSA (Å²)	Log P	Log S	Absorção GI	Permeabilidade BBB
26a	73,39	3,63	-4,93	Alto	Sim
26b	82,62	3,64	-5,00	Alto	Não
26c	82,62	3,63	-5,00	Alto	Não
26d	82,62	3,63	-5,00	Alto	Não
26e	73,39	4,04	-5,09	Alto	Sim
26f	73,39	4,22	-5,52	Alto	Sim
26g	73,39	4,19	-5,52	Alto	Sim
26h	73,39	4,30	-5,84	Alto	Sim
26i	73,39	4,27	-5,84	Alto	Sim
26j	73,39	3,99	-5,15	Alto	Sim

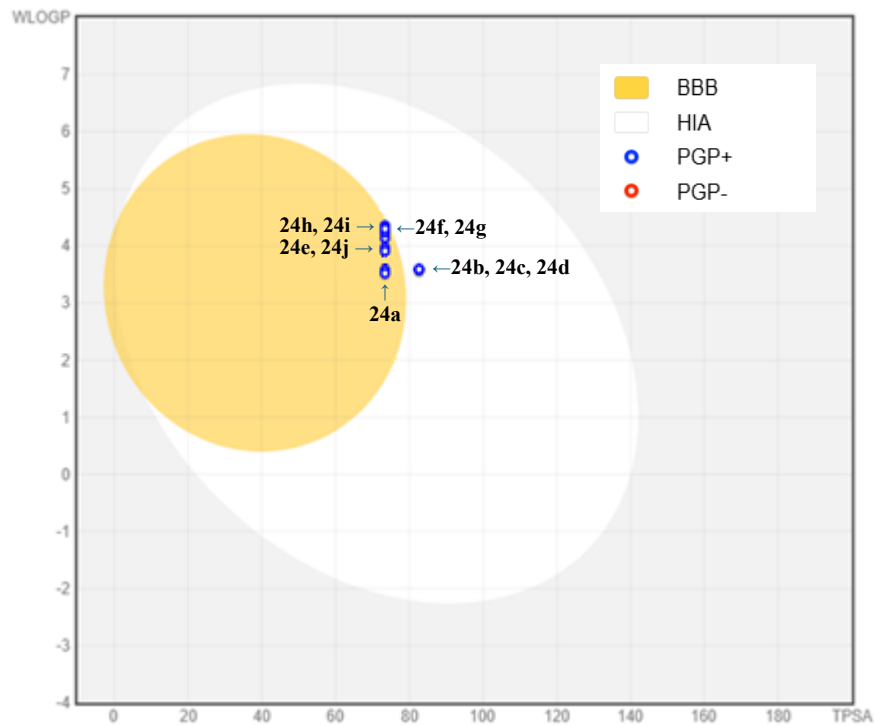


Figura 40. Modelo ADMET *BOILED-Egg* para compostos cumarínicos **26a–j**. (HIA) absorção gastrointestinal; (BBB) penetração cerebral; (PGP+) substrato para glicoproteína P; (PGP-) Não é um substrato para glicoproteína P.

3.2. SERIE B

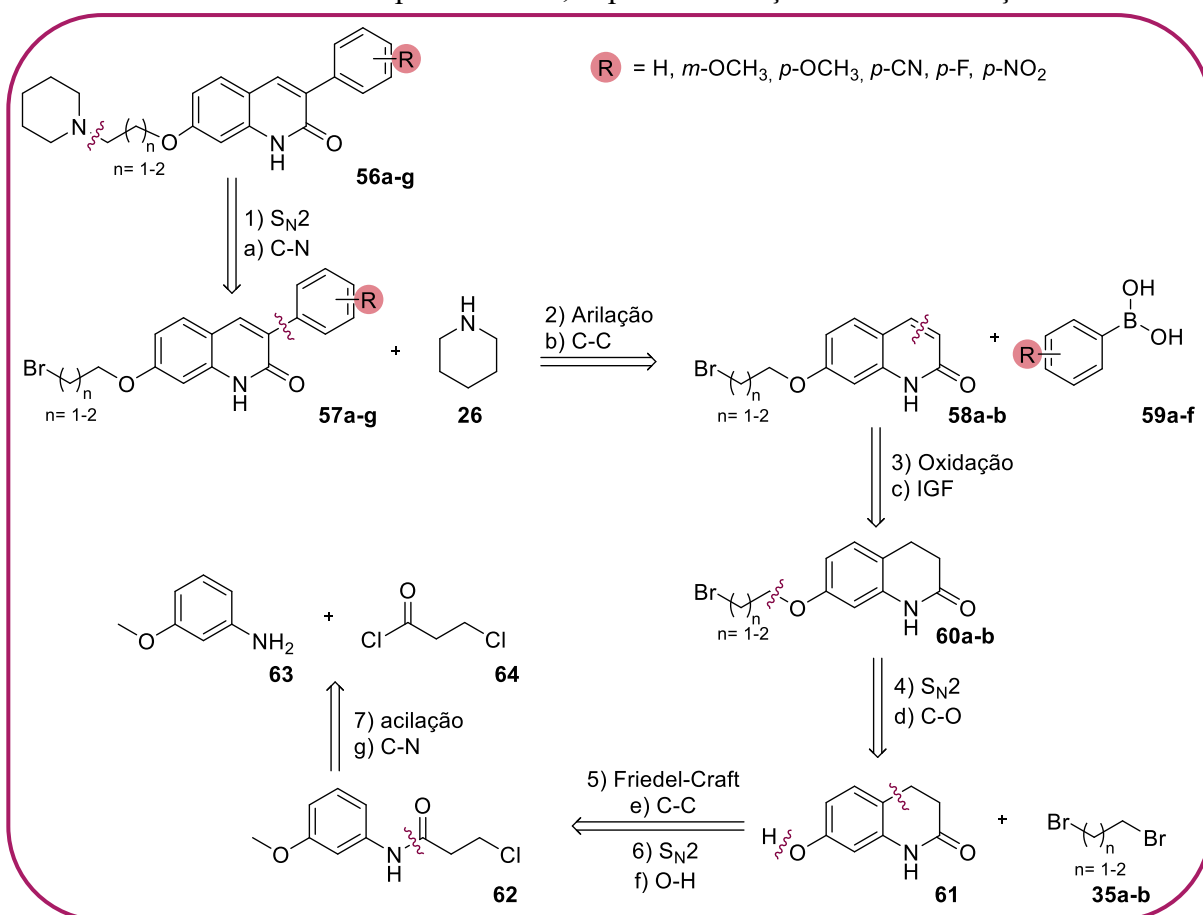
3.2.1. Planejamento sintético dos compostos

A síntese da série de compostos (**58a-g**) foi planejada com base na análise retrossintética detalhada no Esquema 19.

Inicialmente, a partir de uma desconexão C-N (etapa a) de **58a-g**, foi identificado a piperidina (**28**) e as 7-bromoalcoxi-3-R-fenilquinolin-2(1*H*)-ona (**57a-g**) como precursores, sendo essa etapa proporcionada pela reação de substituição nucleofílica bimolecular (S_N2).

Através de uma desconexão C-C (etapa b) se identificou como precursores o intermediário-chave (**60a-b**) e os ácidos borônicos (**59a-f**) obtidos via reação de arilação radicalar direta mediada por KMnO₄/AcOH.

Em seguida, através de uma IGF (etapa c), o precursor do intermediário-chave (**60a-b**) foi caracterizado como os compostos **62a-b**, explorando reações de aromatização oxidativa.



Esquema 19. Análise retrossintética para obtenção dos compostos planejados da série B.

Através de uma desconexão C-O (etapa d), foi possível identificar o composto 7-hidroxi-3,4-diidroquinolin-2(1*H*)-ona (**63**) e os dibromoalcanos (**37a-b**) como precursores dos

respectivos compostos alquilados **62a-b** mediante uma reação de substituição nucleofílica bimolecular (S_N2).

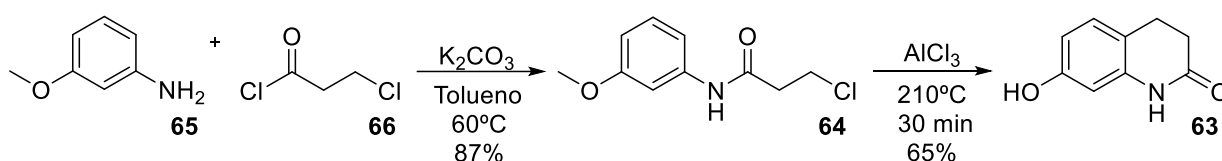
Em seguida, caracterizou-se o 3-cloro-*N*-(3-metoxifenil)propanamida (**64**) como precursor do composto 7-hidroxi-3,4-diidroquinolin-2(1*H*)-ona (**63**), através de uma desconexão C-C (etapa e), utilizando reações de alquilação de Friedel-Crafts com cloreto de alumínio seguida de fechamento de anel. Paralelamente, ocorre uma desconexão O-H (etapa f), por meio de uma reação de substituição nucleofílica bimolecular (S_N2) com cloreto de alumínio.

Por fim, uma desconexão C-N (etapa g) sugere como reagentes de partida a *m*-anisidina (**65**) e o cloreto de 3-cloropropanoíla (**66**), através de uma reação de acilação de aminas.

3.2.2. Obtenção da 7-hidroxi-3,4-diidroquinolin-2(1*H*)-ona (**63**)

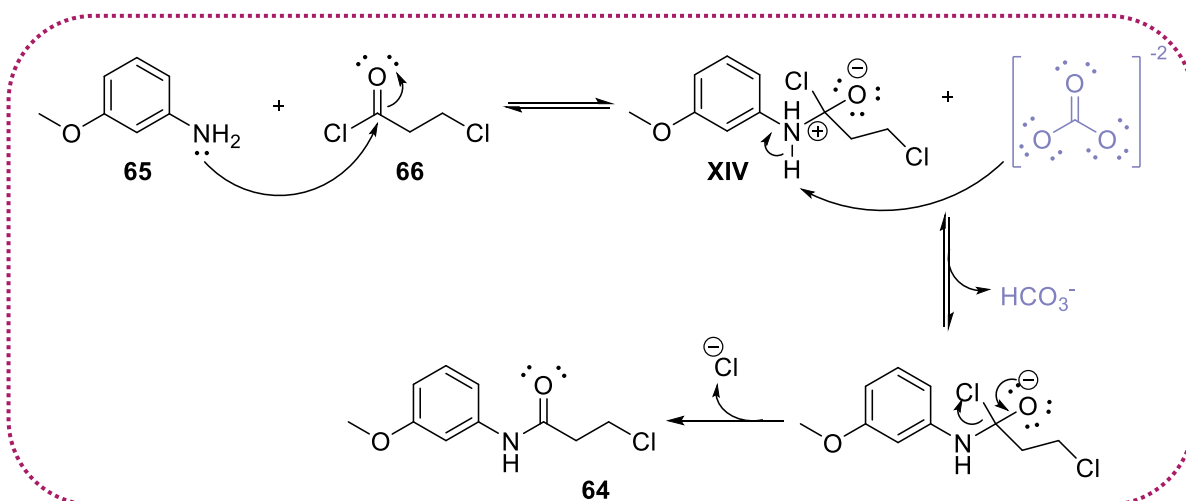
O composto 3-cloro-*N*-(3-metoxifenil)propanamida (**64**) foi obtido por reação de acilação de aminas, utilizando a *m*-anisidina (**65**) com o cloreto de 3-cloropropanoíla (**66**), carbonato de potássio (K_2CO_3) em tolueno, com aquecimento a 60°C (Esquema 20). O produto foi obtido como um sólido branco com rendimento de 87% e com ponto de fusão na faixa de 92-95°C (literatura: P.F. = 93-95 °C).

Em seguida, o composto 7-hidroxi-3,4-diidroquinolin-2(1*H*)-ona (**63**) foi obtido por reação de Friedel-Craft, utilizando a 3-cloro-*N*-(3-metoxifenil)propanamida (**64**) com o cloreto de alumínio ($AlCl_3$), com aquecimento a 210°C (Esquema 20). O produto foi obtido como um sólido amarelo com rendimento de 65%, com ponto de fusão na faixa de 234-238°C (literatura: P.F. = 233-237 °C).



Esquema 20. Obtenção da 7-hidroxi-3,4-diidroquinolin-2(1*H*)-ona (**63**)

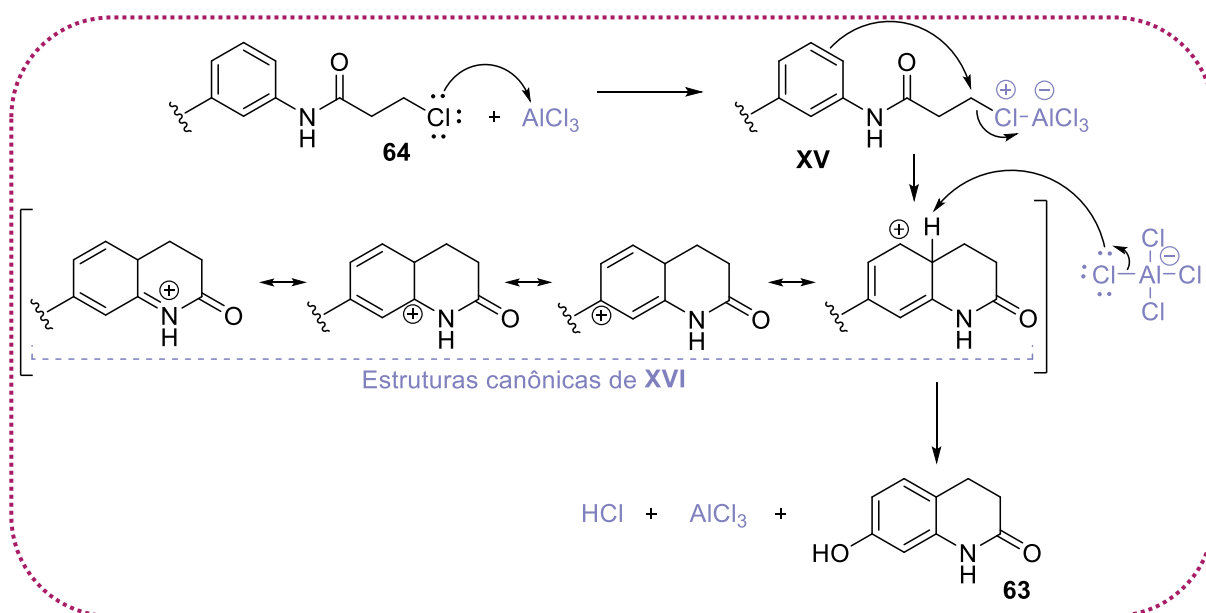
O mecanismo proposto para obtenção do composto **64** é adição-eliminação (Substituição Nucleofílica Acílica), onde inicia-se com o ataque nucleofílico do par de elétrons não ligantes da amina ao carbono eletrofílico do cloreto de acila. Este carbono é eletrofílico devido à retirada de densidade eletrônica pelo oxigênio carbonílico e pelo átomo de cloro, ambos grupos retiradores de elétrons. O intermediário tetraédrico formado (**XIV**) perde um próton para o meio, e em seguida temos a eliminação do haleto e a formação do composto 3-cloro-*N*-(3-metoxifenil)propanamida (**64**) (Esquema 21).



Esquema 21. Esquema de intermediários proposto para a formação do composto 3-cloro-*N*-(3-metoxifenil)propanamida (**62**).

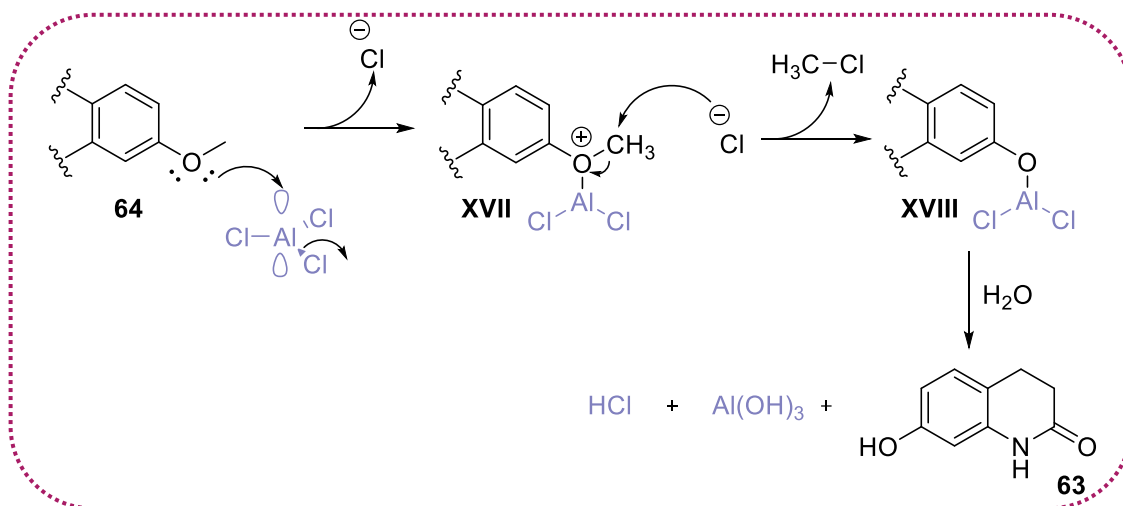
Para a obtenção da 7-hidroxi-3,4-diidroquinolin-2(1*H*)-ona (**63**), empregou-se uma reação clássica de alquilação de Friedel-Craft, na qual temos a formação de um intermediário carbocátion após a coordenação com o ácido de Lewis, de modo que a estabilidade desse cátion é determinante para o sucesso da reação. Entretanto, quando se trata de haletos de primários, que não formam carbocátions estáveis, é observado que sob condições de Friedel-Craft, esses haletos reagem via S_N2 , promovendo a transferência do grupo alquila para o anel aromático de forma concertada (Clayden; Greeves; Warren, 2012).

Nesse contexto, o mecanismo proposto para a formação do composto alvo envolve uma alquilação de Friedel-Crafts seguida de fechamento de anel quinolínico. Esse processo se inicia pela ativação eletrofílica do $AlCl_3$ que se coordena ao átomo de cloro da cadeia lateral, tornando o carbono do cloreto mais eletrofílico e suscetível ao ataque nucleofílico. O anel aromático então realiza um ataque nucleofílico intramolecular a esse carbono eletrofílico, formando o intermediário cíclico (**XVI**) que é estabilizado pelo efeito de ressonância. Em seguida, ocorre a perda de um próton para restabelecer a aromaticidade do sistema (Esquema 22) (Clayden; Greeves; Warren, 2012).



Esquema 22. Esquema de intermediários proposto para o fechamento do anel do composto 7-hidroxi-3,4-diidroquinolin-2(1H)-ona (**63**)

Paralelamente, temos uma *O*-desmetilação onde o AlCl_3 , atuando como um ácido de Lewis, aceita um par solitário de elétrons no seu orbital *p* vazio, proveniente do oxigênio da metoxila. O íon oxônio (**XVII**) resultante pode ser atacado por Cl^- em uma reação $\text{S}_{\text{N}}2$, onde temos a clivagem da ligação C-O e a formação do intermediário de reação **XVIII**, que se hidrolisa para a formação do grupo hidroxila no composto 7-hidroxi-3,4-diidroquinolin-2(1H)-ona (**63**) (Esquema 23) (Clayden; Greeves; Warren, 2012).

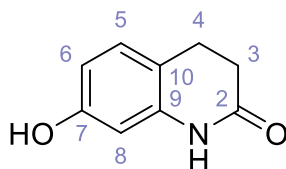


Esquema 23. Esquema de intermediários proposto para a *O*-desmetilação para formação do composto 7-hidroxi-3,4-diidroquinolin-2(1H)-ona (**63**).

Para confirmar a formação dos compostos 3-cloro-N-(3-metoxifenil)propanamida (**64**) e 7-hidroxi-3,4-diidroquinolin-2(1H)-ona (**63**), foram realizados experimentos de determinação estrutural por RMN ^1H e ^{13}C . Os espectros do composto **64** encontram-se nas Figura S41 à

Figura S42 (Anexo 7.2), enquanto os do composto **63**, cujos sinais serão discutidos adiante, estão nas Figura S43 à Figura S44 (Anexo 7.2).

Sinais característicos no espectro de RMN ^1H foram determinantes para comprovar a formação do composto **63**. Na região de campo baixo do espectro, foi possível identificar o hidrogênio de amida (H_{NH}) com sinal simpleto δ 9,91 (*s*, 1H). O outro simpleto em 9,23 (*s*, 1H) presente nessa região corresponde ao hidrogênio fenólico (H_{OH}), confirmando a *O*-desmetilação. Além disso, os hidrogênios aromáticos apresentam absorção na região característica, com deslocamentos químicos: δ 6,88 (*d*, $J = 8,0$ Hz, 1H); 6,29 (*d*, $J = 2,2$ Hz, 1H); 6,27 (*dd*, $J = 8,0, 2,3$ Hz, 1H). Esses sinais foram atribuídos respectivamente aos hidrogênios H_5 , H_8 e H_6 , confirmando o padrão esperado para o composto.



Na região de campo alto do espectro, é possível observar os sinais atribuídos aos hidrogênios H_3 e H_4 . O sinal em δ 2,69 (*t*, $J = 7,5$ Hz, 2H) corresponde aos hidrogênios benzílicos, desprotegidos pelo campo anisotrópico do anel, mas com um efeito menor devido à distância do anel. Já o sinal em δ 2,35 (*t*, $J = 7,5$ Hz, 2H) é referente aos hidrogênios do grupo metilênico α de amidas (H_3), desblindados pela influência do grupo carbonila.

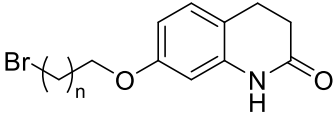
No espectro de RMN ^{13}C a confirmação da formação da 7-hidroxi-3,4-diidroquinolin-2(1H)-ona (**63**) foi evidenciada pelos quatro sinais referentes aos carbonos quaternários: δ 170,36 (C_2), 156,48 (C_7), 139,05 (C_9) e 113,74 (C_{10}). Adicionalmente, foram observados três sinais atribuídos aos carbonos aromáticos com hidrogênios diretamente ligados: 128,32, 108,82 e 102,33, referentes respectivamente a C_5 , C_6 e C_8 . A ausência do sinal referente ao carbono da metoxila, previamente observado para o composto **63** confirma a *O*-desmetilação. Por fim, foram observados os sinais referentes aos carbonos sp^3 pelos sinais em δ 30,94 e 24,05, correspondentes aos carbonos C_3 e C_4 , respectivamente.

3.2.3. Síntese da 7-(bromoalcoxi)-3,4-diidroquinolin-2(1H)-ona (**62a-b**)

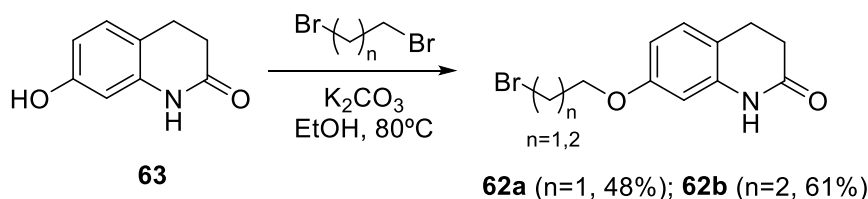
Os compostos 7-(bromoalcoxi)-3,4-diidroquinolin-2(1H)-ona (**62a-b**) foram obtidos via reação de *O*-alquilação, apresentando distintas características físicas. Seus rendimentos variaram entre 48-61%, de acordo com o número de carbonos espaçadores, e ponto de fusão do

composto **62a** foi determinado (não havendo relatos de P.F. na literatura para o sólido obtido) (Tabela 14).

Tabela 14. Características físicas, pontos de fusão e rendimentos da 7-(bromoalcoxi)-3,4-diidroquinolin-2(1*H*)-ona (**62a-b**).

				
Compostos	n	Características físicas	P.F °C	Rendimento (%)
62a	1	Sólido amarelo	146 – 150	48
62b	2	Óleo amarelo	-	61

A reação de *O*-alquilação (Síntese de Williamson) foi realizada a partir da 7-hidroxi-3,4-diidroquinolin-2(1*H*)-ona (**63**), carbonato de potássio (K₂CO₃) e dibromoalcanos (**37a-b**) em etanol, sob aquecimento de 80 °C (Esquema 24).



Esquema 24. Síntese da 7-(bromoalcoxi)-3,4-diidroquinolin-2(1*H*)-ona (**62a-b**)

Para confirmar a formação do composto 7-(bromoalcoxi)-3,4-diidroquinolin-2(1*H*)-ona (**62a-b**), foram realizados experimentos de determinação estrutural como RMN ¹H e ¹³C, cujos espectros estão disponíveis nas Figura S45 à Figura S48 do Anexo 7.2. Os principais indicadores da formação desses compostos no espectro de RMN ¹H foram os sinais característicos de hidrogênios ligados a carbonos *sp*³. Destacou-se, em particular, a presença de um tripleto na região de δ 3,99 - 4,23, com integração correspondente a dois, atribuído aos hidrogênios metilênicos conectados ao carbono oxigenado. De forma similar, os sinais correspondentes ao carbono oxigenado podem ser observados no espectro de RMN ¹³C, na região de δ 65,28 - 67,77.

Além disso, a ausência do sinal referente a hidroxila fenólica (H_{OH} = δ 9,23), anteriormente observada para o intermediário **63**, confirma a *O*-alquilação.

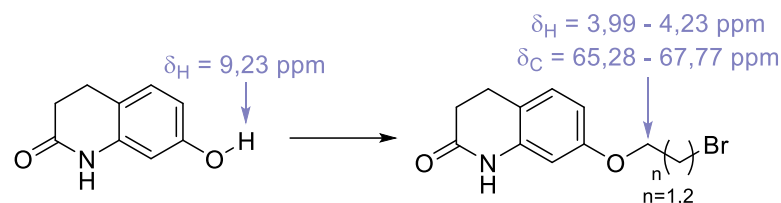


Figura 41. Atribuição comparativa dos principais sinais dos compostos 7-hidroxi-3,4-diidroquinolin-2(1*H*)-ona (**63**) e 7-(bromoalcoxi)-3,4-diidroquinolin-2(1*H*)-ona (**62a-b**) nos espectros de RMN ^1H e ^{13}C

Para comprovar que a substituição ocorre no grupo hidroxila (OH) e não na amina (NH), realizou-se a espectroscopia de RMN bidimensional (2D). Por meio do experimento HMBC, observou-se que o próton $\text{H}_{\text{N-H}}$ (δ 10,02 ppm) do composto **62a** apresenta correlações de J^3 com os carbonos C_3 (30,94), C_8 (102,44) e C_{10} (116,22), e J^2 com os carbonos C_2 (170,26) e C_9 (139,29), indicando a posição da substituição no grupo hidroxila (Figura 43).

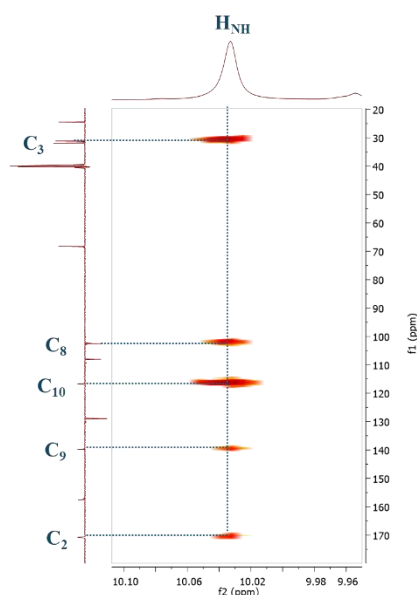


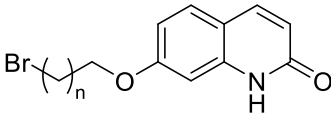
Figura 42. Espectros bidimensionais de HMBC do composto **62a** em DMSO: Visualização das correlações J^3 e J^2 , entre carbono e hidrogênio.

Todos os demais sinais referentes ao núcleo 3,4-diidroquinolin-2(1*H*)-ona, assim como, da cadeia alquílica, foram devidamente identificados nos espectros de RMN ^1H e ^{13}C .

3.2.4. Síntese da 7-(bromoalcoxi)-quinolin-2(1*H*)-one (60a-b)

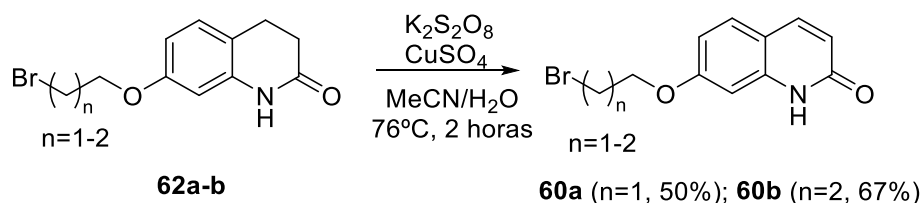
Os compostos 7-(bromoalcoxi)-quinolin-2(1*H*)-one (**60a-b**) foram obtidos via aromatização oxidativa, apresentando distintas características físicas. Seus rendimentos variaram entre 50-67%, e o ponto de fusão de 112-170°C (não havendo relatos de P. F. na literatura para nenhum dos sólidos obtidos) (Tabela 15).

Tabela 15. Características físicas, pontos de fusão e rendimentos da 7-(bromoalcoxi)-quinolin-2(1*H*)-one (**60a-b**).

				
Compostos	n	Características físicas	P.F °C	Rendimento (%)
60a	1	Sólido bege	170 – 172 ^d	50
60b	2	Sólido bege	112 - 117	67

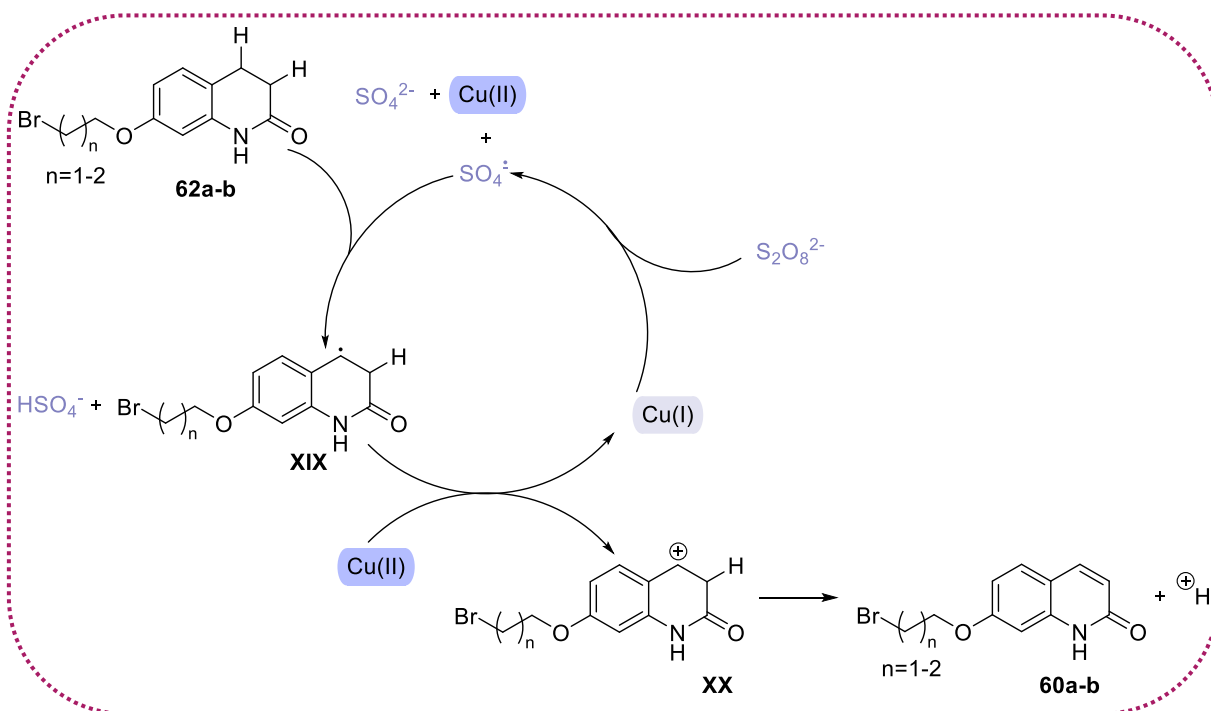
^d Ponto de degradação

A reação de aromatização oxidativa da 7-(bromoalcoxi)-3,4-dihidroquinolin-2(1*H*)-ona (**62a-b**) foi realizada usando persulfato de potássio (K₂S₂O₈) ativado por sulfato de cobre (CuSO₄) em mistura acetonitrila/ água (1:1), sob refluxo de ~76 °C (Esquema 25).



Esquema 25. Síntese da 7-(bromoalcoxi)-quinolin-2(1*H*)-one (**60a-b**)

O mecanismo proposto inicia-se com a oxidação do persulfato ativado por um metal de transição (Cu (I)), resultando na formação do radical sulfato (SO₄^{•-}) através de um processo de transferência de elétron único (SET) (Cao et al., 2008). Esse radical promove a conversão de 7-(bromoalcoxi)-3,4-dihidroquinolin-2(1*H*)-onas (**62a-b**) na espécie radical intermediária (**XIX**), que posteriormente passa por uma oxidação radicalar para formar o cátion benzílico (**XX**) (Kochi; Rust, 1962). Esse cátion facilita a aromatização oxidativa, resultando nos derivados correspondentes de 7-(bromoalcoxi)-quinolin-2(1*H*)-one (**60a-b**).



Esquema 26. Esquema de intermediários proposto para a aromatização oxidativa para obtenção da 7-(bromoalcoxi)-quinolin-2(1*H*)-one (**60a-b**) (Adaptado de (Chen et al., 2019))

Para confirmar a formação do composto 7-(bromoalcoxi)-quinolin-2(1*H*)-one (**60a-b**), foram realizados experimentos de determinação estrutural como RMN ^1H e ^{13}C , cujos espectros estão disponíveis nas Figura S49 à Figura S52 do Anexo 7.2. Os principais indicadores da formação desses compostos no espectro de RMN ^1H foram os sinais referentes aos hidrogênios do anel lactâmico (sistema carboxílico α , β -insaturado), que foram observados com deslocamento químicos em δ 7,82- 7,81 (*d*, 1H) e δ 6,30 – 6,32 (*d*, 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 (Figura 43).

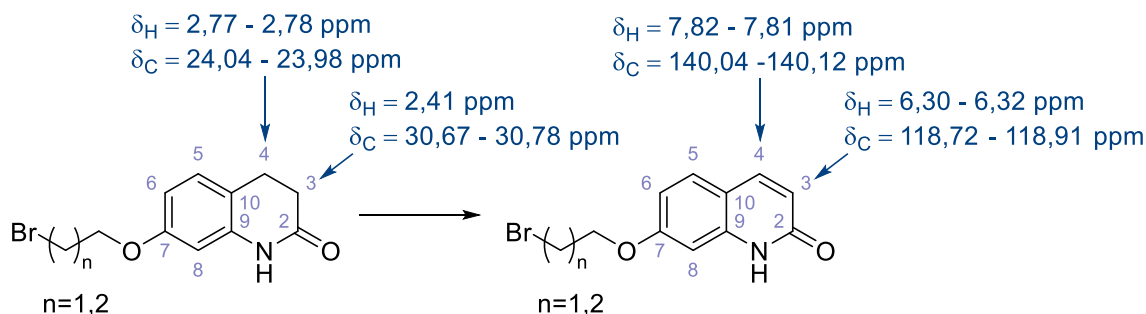


Figura 43. Atribuição comparativa dos principais sinais dos compostos 7-(bromoalcoxi)-3,4-diidroquinolin-2(1*H*)-ona (**62a-b**) e 7-(bromoalcoxi)-quinolin-2(1*H*)-one (**60a-b**) nos espectros de RMN ^1H e ^{13}C .

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 44)

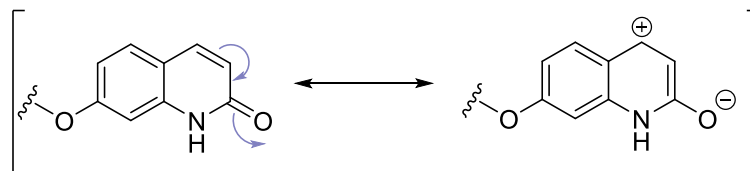


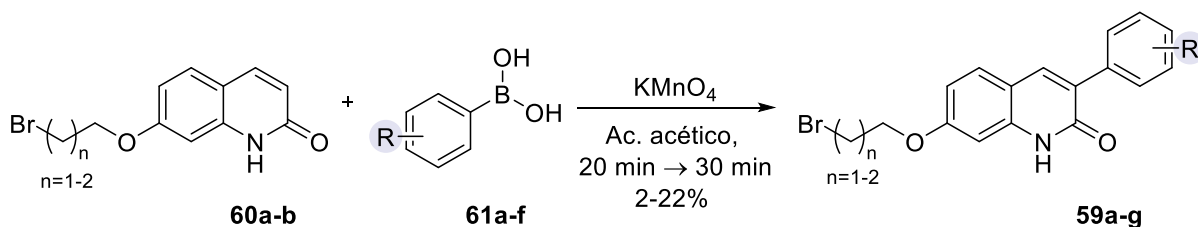
Figura 44. Efeito de ressonância entre a ligação dupla conjugada à carboxila do anel.

No RMN ^{13}C também foi possível observar os sinais referentes a esses carbonos do anel lactâmico, como carbonos metínicos na região de carbonos sp^2 de sistema aromático, apresentando deslocamento químicos em δ 140,04 – 140,12 (C_4) e δ 118,72 – 118,91 (C_3). Vale ressaltar que esses carbonos estão desprotegidos pelos mesmos efeitos que influenciam seus hidrogênios equivalentes, como o campo anisotrópico dos elétrons π e o efeito β -carboxílico.

Todos os demais sinais referentes ao núcleo quinolin-2(1H)-one, assim como, da cadeia alquílica, foram devidamente identificados nos espectros de RMN ^1H e ^{13}C .

3.2.5. Síntese da 7-(bromoalcoxi)-3-(R-fenil)quinolin-2(1H)-one (**59a-g**)

Os compostos 7-(bromoalcoxi)-3-(R-fenil)quinolin-2(1H)-ona (**59a-g**) foram sintetizados por meio de uma arilação radicalar direta, regioseletiva e desidrogenativa das quinolinonas (**60a-b**) com ácidos arilborônicos (**61a-f**), utilizando $\text{KMnO}_4/\text{AcOH}$ como mediador (Esquema 27). Os produtos obtidos exibiram características físicas distintas, com rendimentos variando entre 2% e 22% (Tabela 16).

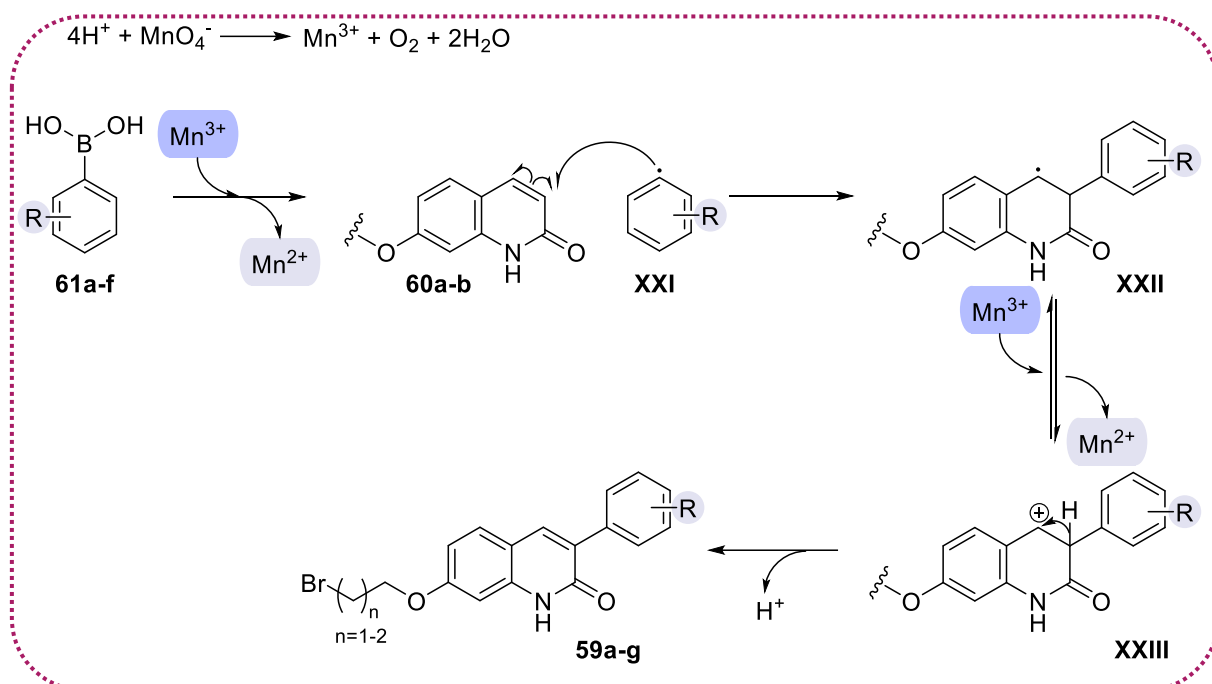


Esquema 27. Síntese da 7-(bromoalcoxi)-3-(R-fenil)quinolin-2(1H)-one (**59a-g**)

Tabela 16. Características físicas e rendimentos da 7-(bromoalcoxi)-3-(R-fenil)quinolin-2(1*H*)-ona (**59a-g**).

Compostos	n	R	Características físicas	Rendimento (%)
59a	1	H	Sólido bege	9
59b	1	3-OCH ₃	Sólido amarelo	7
59c	1	4-OCH ₃	Sólido bege	4
59d	1	4-F	Sólido amarelo	2
59e	1	4-CN	Sólido amarelo	22
59f	1	4-NO ₂	Sólido amarelo	9
59g	2	H	Sólido branco	6

Ao longo das últimas décadas, as reações radiculares promovidas por metais têm ganhado destaque na síntese orgânica, com as reações mediadas por Mn(OAc)₃ sendo amplamente estudadas. O Mn(OAc)₃ atua como um oxidante de transferência de um único elétron e tem sido aplicado em diversas formações regio-, quimio- e estereosseletivas de ligações carbono-carbono e carbono-heteroátomo, tanto em reações intra quanto intermoleculares (Demir; Findik, 2008; Yuan et al., 2016). Contudo, o acetato de manganês (III) apresenta baixa estabilidade, desproporcionando facilmente em Mn (II) e Mn (IV). Nesse contexto, o sistema KMnO₄/ácido acético surge como uma alternativa eficaz para a obtenção do acetato de manganês (III) (Demir et al., 2010).



Esquema 28. Esquema de intermediários proposto para a arilação radicalar mediada por $\text{KMnO}_4/\text{AcOH}$ para obtenção da 7-(bromoalcoxi)-3-(R-fenil)quinolin-2(1*H*)-ona (**59a-g**) (Adaptado de YUAN et al., 2016)

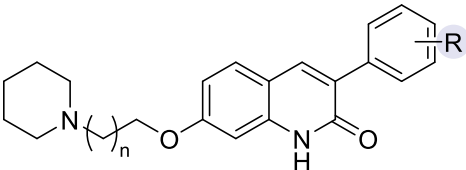
Deste modo, o mecanismo proposto para a síntese da 7-(bromoalcoxi)-3-(R-fenil)quinolin-2(1*H*)-ona (**59a-g**) inicia-se com a formação *in situ* da espécie reativa $\text{Mn}(\text{III})$, gerada pela reação entre KMnO_4 e AcOH . Posteriormente, o ácido arilborônico (**60a-f**) reage com o sal de $\text{Mn}(\text{III})$, originando o radical aril (**XXI**), que ataca seletivamente a posição C3 da quinolinona, formando um radical carbônico (**XXII**) estabilizado por conjugação com o grupo fenila. Na sequência, ocorre uma transferência de elétron único (SET) do radical carbônico (**XXIII**) para $\text{Mn}(\text{III})$, resultando na formação do intermediário (**XXIV**), enquanto $\text{Mn}(\text{III})$ é reduzido a $\text{Mn}(\text{II})$. Por fim, o intermediário (**XXIV**) perde um próton, culminando na formação da quinolinona funcionalizada na posição C3 (**59a-g**).

A fim de confirmar a formação dos derivados 7-(bromoalcoxi)-3-(R-fenil)quinolin-2(1*H*)-ona (**59a-g**), foram realizados experimentos de determinação estrutural como RMN ^1H e ^{13}C . Entretanto esses derivados não foram completamente solúveis em nenhum dos solvente deuterados testados (clorofórmio, DMSO, DMSO + MeOH, acetona). Desta forma, optou-se por prosseguir para etapa reacional seguinte e realizar a determinação estrutural apenas dos compostos finais.

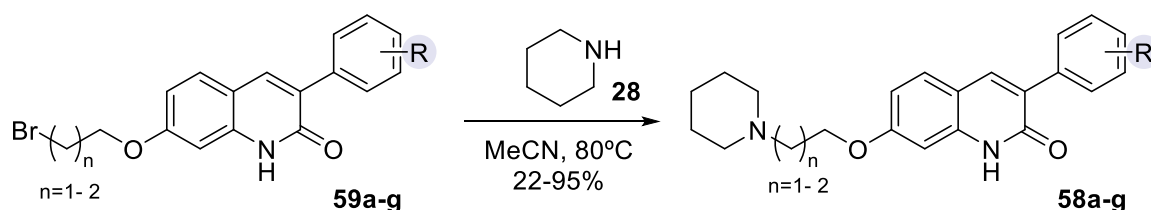
3.2.6. Síntese da 3-(R-fenil)-7-((piperidin-1-il)alcoxi)quinolin-2(1H)-ona (58a-g)

Os novos compostos 3-(R-fenil)-7-[(piperidin-1-il)alcoxi]quinolin-2(1H)-ona (**58a-g**) foram sintetizados por meio de uma reação de aminação. Os produtos foram obtidos como sólidos amorfos ou óleos com diferentes colorações, apresentando rendimentos variáveis entre 22% e 95% (Tabela 17).

Tabela 17. Características físicas e rendimentos das 3-(R-fenil)-7-((piperidin-1-il)alcoxi)quinolin-2(1H)-ona (**58a-g**)

				
Compostos	n	R	Características físicas	Rendimento (%)
58a	1	H	Sólido branco	66
58b	1	3-OCH ₃	Óleo amarelo	22
58c	1	4-OCH ₃	Sólido bege	59
58d	1	4-F	Sólido amarelo	37
58e	1	4-CN	Sólido amarelo	48
58f	1	4-NO ₂	Sólido amarelo	71
58g	2	H	Sólido amarelo	95

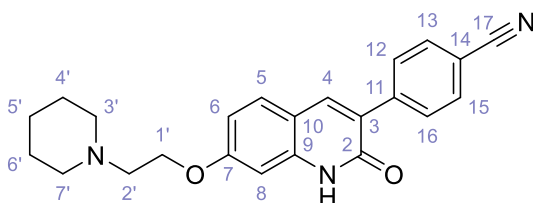
Esta reação foi realizada a partir da piperidina (**28**) e dos respectivos derivados 7-bromoalcoxi-3-(R-fenil)quinolin-2(1H)-ona (**59a-g**) em acetonitrila, sob aquecimento a 80 °C (Esquema 29).



Esquema 29. Síntese da 3-(R-fenil)-7-[(piperidin-1-il)alcoxi]quinolin-2(1H)-ona (**58a-g**)

O mecanismo proposto para a síntese dos compostos 3-(R-fenil)-7-[(piperidin-1-il)alcoxi]quinolin-2(1H)-ona (**58a-g**) é o mesmo já discutido anteriormente e está representado no Esquema 15.

Para confirmar a formação dos compostos 3-(R-fenil)-7-[(piperidin-1-il)alcoxi]quinolin-2(1*H*)-ona (**58a-g**) foram realizados experimentos de determinação estrutural como RMN ^1H e ^{13}C , cujos espectros estão disponíveis nas Figura S53 à Figura S66 do Anexo 7.2.



Visando tornar a discussão mais clara, foram selecionados os espectros de RMN ^1H e ^{13}C do composto **58e** para a elucidação detalhada no texto. Inicialmente, foram analisados os sinais relativos à arilação da etapa anterior, cuja caracterização estrutural completa não havia sido realizada. No espectro de RMN ^1H , identificaram-se claramente os padrões característicos do anel aromático *para*-ciano substituído. Foram observados dois dupletos (*d*) em δ 7,98 ($J = 8,2$ Hz, 2H) e 7,87 ($J = 8,2$ Hz, 2H), atribuídos respectivamente aos hidrogênios *meta* (H_{13} e H_{15}) e *orto* (H_{12} e H_{16}), seguindo o deslocamento químico esperado para grupos retiradores de elétrons em sistemas aromáticos (Figura 45). A constante de acoplamento ($J = 8,2$ Hz) é consistente com o acoplamento vicinal entre hidrogênios adjacentes em um anel aromático substituído *para*. No espectro de RMN ^{13}C , os sinais característicos do anel aromático *para*-ciano-substituído foram confirmados. Os carbonos C_{13} e C_{15} apresentaram um deslocamento químico de δ 131,90, enquanto os carbonos C_{12} e C_{16} foram observados em 129,06 ppm.

Os carbonos quaternários do anel aromático *para*-ciano-substituído foram atribuídos conforme suas posições: C_{11} (δ 140,62 ppm), desblindado pela conjugação com o grupo -CN, e C_{14} (δ 109,74 ppm), blindado parcialmente devido à proximidade direta ao grupo retirador (Figura 45). O carbono do ciano (C_{17}) apresentou deslocamento característico de δ 113,67 ppm, típico de nitrilas conjugadas (faixa δ 110–120 ppm).

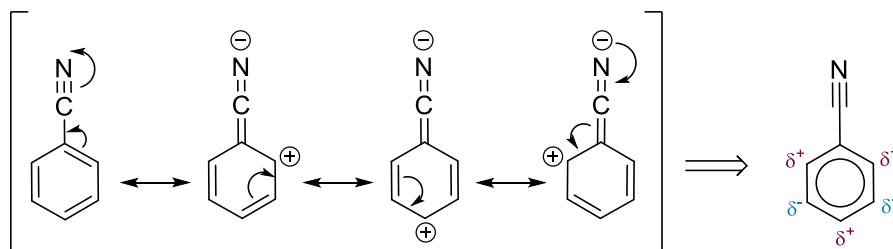


Figura 45. Híbrido de ressonância de uma benzonitrila.

A confirmação da inserção da amina cíclica ao nosso composto foi possível após a análises dos espectros. No RMN ^1H , foram observados os sinais dos hidrogênios adjacentes ao

N (H_{3'} e H_{7'}) como um simpleto largo em δ 2,43 (4H), assim como os sinais dos hidrogênios H_{4'} e H_{6'} em δ 1,49 (*m*, 4H) e δ 1,37 (*sl*, 2H) para os hidrogênios H_{5'}. No RMN ¹³C, os deslocamentos químicos em δ 54,49 ppm (C_{3'} e C_{7'}), δ 25,63 (C_{4'} e C_{6'}) e δ 23,98 ppm (C_{5'}) foram atribuídos aos hidrogênios do grupamento piperidina.

Além disso, no RMN ¹³C o sinal do metileno (*sp*³) adjacente ao nitrogênio apresentou deslocamento químico de δ 57,71 ppm, valor significativamente mais elevado em comparação aos compostos **59a** (Figura 46), nos quais o mesmo metileno (*sp*³) estava ligado ao bromo. Essa diferença evidencia o efeito eletrônico distinto do nitrogênio, que induz uma desblindagem pronunciada no carbono vizinho.

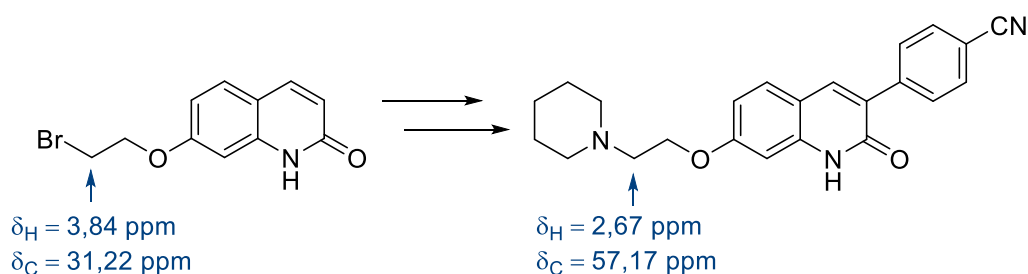


Figura 46. Atribuição comparativa dos principais sinais dos compostos 7-(bromoalcoxi)-quinolin-2(1H)-one (**59a**) e 3-(R-fenil)-7-[(piperidin-1-il)alcoxi]quinolin-2(1H)-ona (**58e**) nos espectros de RMN ¹H e ¹³C.

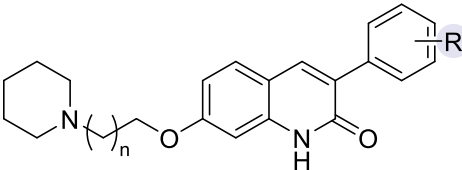
Além disso, tanto no RMN ¹H quanto no ¹³C, os sinais do núcleo quinolinona mantiveram-se inalterados após a reação de aminação, indicando ausência de degradação do composto.

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

A atividade anticolinesterásica dos compostos **58a-g** foi determinada de acordo com o método adaptado de Ellman (De Souza et al., 2019; Ellman et al., 1961), utilizando a donepezila como composto de referência. As reações envolvidas nesse ensaio são as mesmas já discutidas anteriormente e estão representadas no Esquema 16.

Todos os compostos testados se mostraram capazes de inibir a AChE, tendo alguns deles apresentado grande potência. Dos compostos ensaiados, o que se mostrou menos ativo foi o **58a**, o qual apresentou valor de $CI_{50} = 3,54 \mu M$ e os mais ativos foram os compostos **58e** e **58f**, os quais apresentaram valor de $CI_{50} = 0,25 \mu M$ e $CI_{50} = 0,41 \mu M$, respectivamente. Os compostos também se mostraram capazes de inibir a BChE, em sua maioria, de forma equipotente a AChE. Os respectivos resultados de CI_{50} obtidos nos ensaios de inibição frente às colinesterases encontram-se na Tabela 18

Tabela 18. Resultados obtidos nos ensaios inibição enzimática frente à *Ee*AChE e *Eq*BChE.

					
Compostos	n	R	$CI_{50} (\mu M) \pm DP^a$		SI ^d
			AChE ^b	BChE ^c	
58a	1	H	$3,544 \pm 0,191$	$1,607 \pm 0,035$	0,5
58b	1	3-OCH ₃	$2,756 \pm 0,228$	$2,653 \pm 0,077$	1,0
58c	1	4-OCH ₃	$1,254 \pm 0,033$	$4,469 \pm 0,412$	3,6
58d	1	4-F	$1,986 \pm 0,032$	$1,164 \pm 0,071$	0,6
58e	1	4-CN	$0,251 \pm 0,025$	$2,695 \pm 0,229$	10,7
58f	1	4-NO ₂	$0,408 \pm 0,019$	$3,285 \pm 0,103$	8,1
58g	2	H	$1,26 \pm 0,043$	$1,533 \pm 0,052$	1,2
Donepezila	-	-	$0,007 \pm 0,0002$	$2,39 \pm 0,105$	341

^aConcentração necessária para inibir 50% da atividade colinesterásica, dados obtidos \pm desvio padrão (DP) de triplicatas de ensaios independentes; ^bAChE de enguia elétrica; ^cBChE de soro equino; ^dÍndice de seletividade (IS) é dado como $BChE CI_{50}/AChE CI_{50}$.

3.2.8. Ensaios do mecanismo de inibição enzimática frente à AChE e BChE

Para determinar o mecanismo de inibição dessa série de compostos, foram realizados ensaios de cinética enzimática com os compostos **58a**, **58b**, **58e** e **58f** em ambas as enzimas. Esses compostos foram selecionados com base no seu perfil inibitório e nas diferentes propriedades eletrônicas.

Com base nos parâmetros cinéticos (K_m e V_{max}) (Tabela 19), e no perfil do gráfico de Lineweaver-Burk observou-se que o tipo de inibição promovida pelos compostos **58a**, **58b** frente a enzima AChE é do tipo não-competitiva, enquanto para a enzima BChE é do tipo mista. Já os compostos **58e** e **58f** demonstraram mecanismo de inibição do tipo mista para ambas as enzimas. As constantes de afinidade correspondentes aos tipos de inibição observados foram calculadas e estão apresentadas na Tabela 19.

Tabela 19. Parâmetros cinéticos de **58a**, **58b**, **58e** e **58f** em AChE e BChE.

Concentração (μM)	$V_{\text{máx}} \pm \text{DP}$ (1 x 10 ³ nM/min)	$K_{\text{m}} \pm \text{DP}$ (1 x 10 ³ nM)	K_{i} (nM) ± DP ^a	K_{i}^{r} (nM) ± DP ^b
58a em AChE				
0	9,51 ± 0,212	74,48 ± 2,778	-	1730 ± 20,40
2,5	4,05 ± 0,108	74,04 ± 4,003		
4,5	2,34 ± 0,050	72,30 ± 3,690		
58a em BChE				
0	6,42 ± 0,122	91,08 ± 5,450	230± 2,43	630 ± 7,18
1	3,30 ± 0,135	156,70 ± 15,304		
2	2,16 ± 0,144	215,80 ± 17,159		
58b em AChE				
0	21,52 ± 0,142	71,92 ± 0,431	-	1680 ± 17,80
1,9	7,94 ± 0,166	69,84 ± 5,498		
3,5	4,94 ± 0,070	70,75 ± 2,629		
58b em BChE				
0	6,19 ± 0,155	76,66 ± 6,364	250,87 ± 4,51	748,20 ± 13,47
1,7	3,68 ± 0,139	241,70 ± 17,027		
3,7	1,72 ± 0,033	358,80 ± 16,499		

58e em AChE				
0	11,51 ± 0,178	66,29 ± 2,411		
0,15	5,29 ± 0,052	76,91 ± 3,868	35,52 ± 0,46	120,38 ± 1,69
0,35	3,48 ± 0,055	93,03 ± 3,833		
58e em BChE				
0	9,57 ± 0,564	87,81 ± 5,294		
1,7	6,94 ± 0,180	218,87 ± 6,565	436,23 ± 3,57	1224 ± 9,60
3,7	3,71 ± 0,079	288,37 ± 5,281		
58f em AChE				
0	20,19 ± 0,461	90,47 ± 2,356		
0,2	10,70 ± 0,282	105,17 ± 4,200	69,30 ± 0,90	194,03 ± 2,56
0,6	5,76 ± 0,036	133,77 ± 2,458		
58f em BChE				
0	14,86 ± 0,222	122,10 ± 1,90		
2,6	8,61 ± 0,200	202,83 ± 7,25	838,63 ± 7,62	1957,67 ±
4	6,55 ± 0,135	233,10 ± 3,83		17,70

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

Para o composto **58e**, a comparação das constantes de afinidade competitiva (K_i) revelou que o valor é ~12 vezes maior na BChE ($K_i = 436,23 \mu\text{M}$) do que na AChE ($K_i = 35,52 \mu\text{M}$). Já a constante não competitiva (K_i') foi ~10 vezes maior na BChE ($K_i' = 1,224 \mu\text{M}$) do que na AChE ($K_i' = 120,38 \mu\text{M}$). Para o composto **58f**, observou-se a repetição desses resultados de comparação, onde K_i é ~12 vezes maior na BChE ($K_i = 838,63 \mu\text{M}$) do que na AChE ($K_i = 69,30 \mu\text{M}$) e K_i' é ~10 vezes maior na BChE ($K_i' = 1957,67 \mu\text{M}$) do que na AChE ($K_i' = 194,03 \mu\text{M}$). Essa diferença modesta nas constantes (K_i e K_i') reforça a baixa seletividade dos compostos, indicando interações relevantes em ambos os sítios das enzimas.

A análise da razão K_i'/K_i entre as constantes de afinidade revelou a preferência dos compostos pelos sítios catalítico e alostérico da BChE. Para essa enzima, todos os compostos apresentaram uma razão $K_i'/K_i \approx 3$, indicando que a afinidade relativa pelo sítio catalítico é três vezes maior que pelo sítio alostérico, independentemente dos substituintes na fenila. Essa

consistência sugere que as modificações estruturais nos substituintes não alteraram significativamente o equilíbrio de interação entre os sítios.

Nos gráficos de Lineweaver-Burk foi possível confirmar os mecanismos de inibição indicados pela análise dos parâmetros cinéticos. Para os compostos **58a** (Figura 47) e **58b** (Figura 48) na enzima AChE (à esquerda), observou-se que as retas de intersecção convergem à esquerda do eixo y ($1/V$) e sobre o eixo x ($1/[S]$), indicando um mecanismo de inibição não-competitiva. Já para o composto **58e** (Figura 49) e **58f** (Figura 50) em ambas as enzimas, assim como para a BChE (à direita) dos compostos **58a** e **58b**, as retas de intersecção convergem à esquerda do eixo y ($1/V$) e acima do eixo x ($1/[S]$), indicando um mecanismo de inibição mista. As concentrações dos compostos [I] utilizadas nas curvas estão representadas nos gráficos.

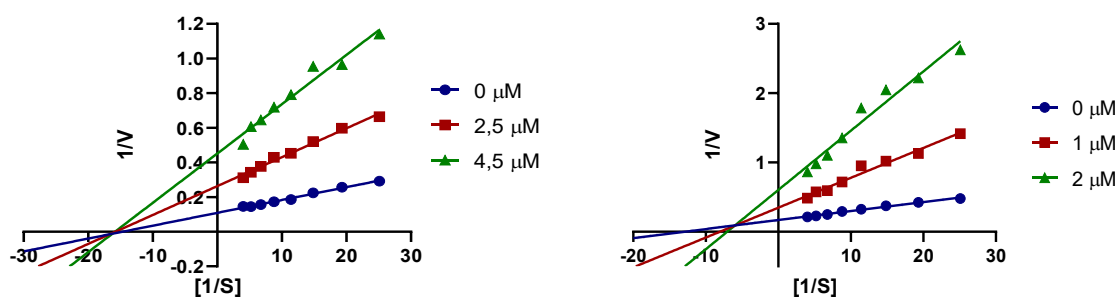


Figura 47. Gráficos de Lineweaver-Burk da cinética de inibição em *EeAChE* (à esquerda) e *EqBChE* (à direita) do composto **58a**.

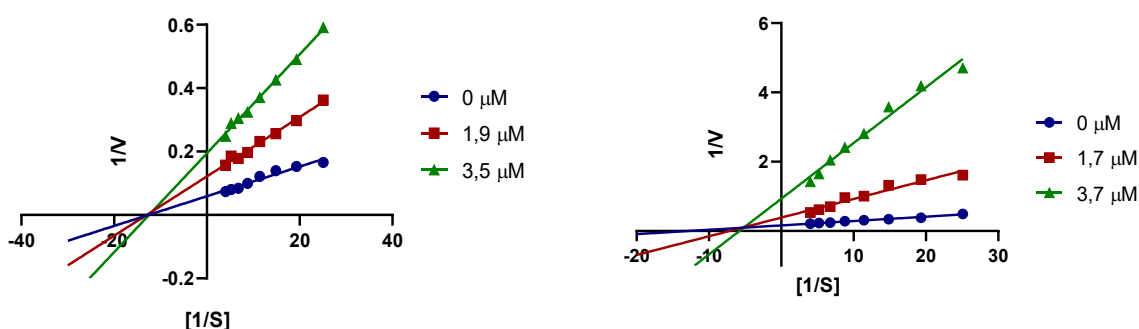


Figura 48. Gráficos de Lineweaver-Burk da cinética de inibição em *EeAChE* (à esquerda) e *EqBChE* (à direita) do composto **58b**.

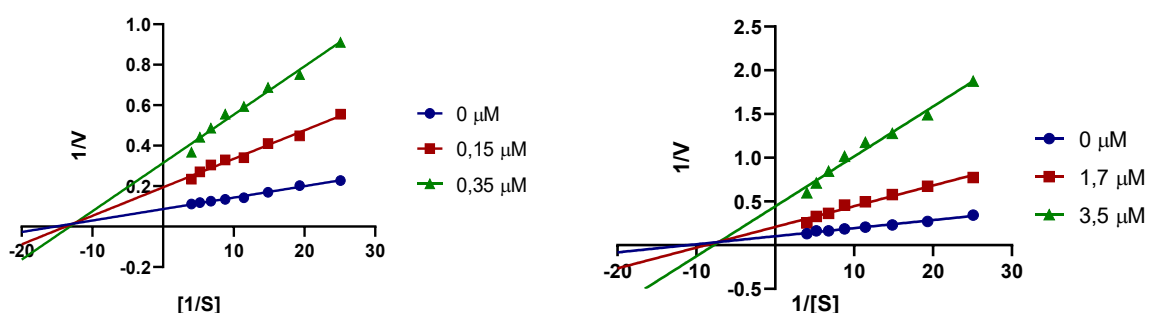


Figura 49. Gráficos de Lineweaver-Burk da cinética de inibição em *EeAChE* (à esquerda) e *EqBChE* (à direita) do composto **58e**.

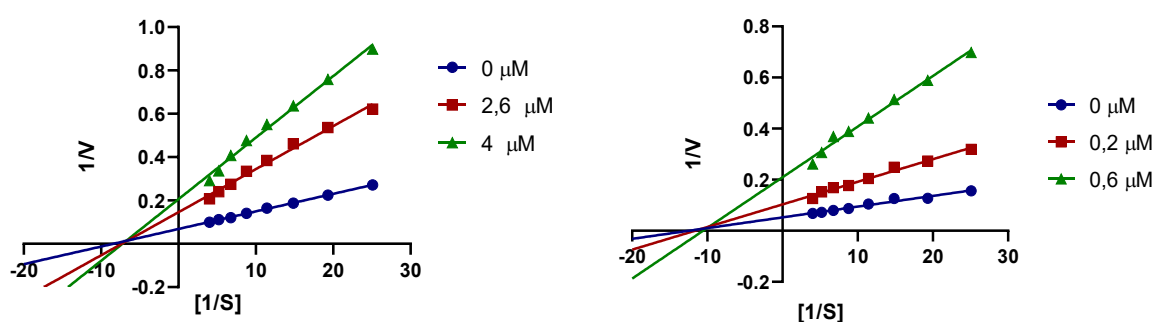


Figura 50. Gráficos de Lineweaver-Burk da cinética de inibição em *EeAChE* (à esquerda) e *EqBChE* (à direita) do composto **58e**.

3.2.9. Avaliação *in silico* da interação dos compostos com a *EeAChE*

Para a realização do estudo de ancoramento molecular (*docking*) entre os compostos e a enzima *EeAChE* foi utilizada as mesmas condições já expostas anteriormente e que estão descritas no item 3.1.13.

Os resultados de *score* de ligação e valores de CI_{50} obtidos para os compostos **58a-g** estão apresentados na Tabela 20, permitindo a visualização da correlação entre os dados. O detalhamento qualitativo das interações moleculares entre os ligantes e a enzima *EeAChE* está descrito na Tabela S6 do Anexo 7.1.

Tabela 20. Resultados de *score* e os respectivos valores de CI_{50} dos compostos avaliados.

Compostos	<i>EeAChE</i>	
	GoldScore	CI_{50} (μM) \pm DP
58a	76,59	$3,544 \pm 0,191$
58b	77,51	$2,758 \pm 0,228$
58c	80,82	$1,254 \pm 0,033$
58d	76,84	$1,986 \pm 0,032$

58e	78,86	$0,251 \pm 0,025$
58f	82,6	$0,408 \pm 0,019$
58g	78,21	$1,26 \pm 0,043$

Com base na análise das poses de ligação obtidas pelo estudo de *docking*, observou-se que todos os inibidores ocupariam simultaneamente o sítio ativo (CAS) e o sítio periférico (PAS). No sítio ativo, o grupamento amino-cíclico protonado dos inibidores estabeleceu interações do tipo cátion- π com o resíduo Trp86 e um empilhamento π - π do tipo T entre o núcleo cumarínico e o resíduo de Tyr124. Além disso, o núcleo cumarínico posicionou-se no canal do sítio ativo, formando ligações de hidrogênio com o resíduo Tyr337 e o resíduo Phe295 e Arg296 (Figura 51).

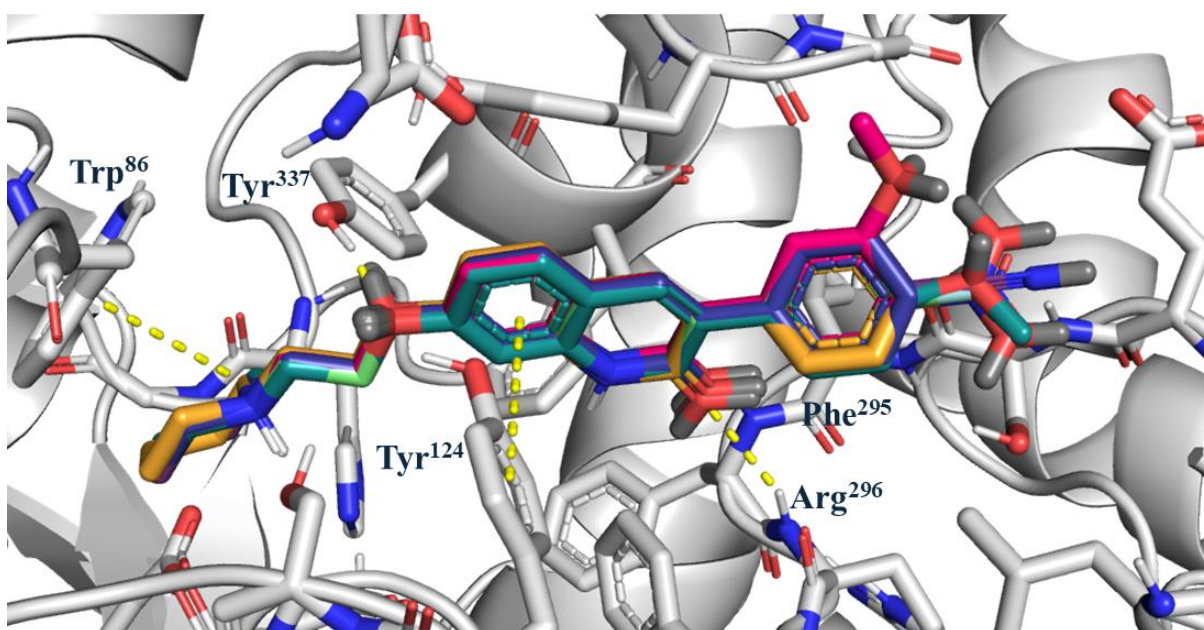


Figura 51. Análise da sobreposição dos compostos **58a-g** e a cavidade enzimática da AChE. Figura gerada com PyMol 3.1.3.1 (Copyright © Schrödinger LLC).

Esses resultados reproduzem de forma adequada o perfil de inibição mista dos compostos **58e** (*p*-CN) e **58f** (*p*-NO₂), porém não preveem a divergência observada experimentalmente para os compostos **58a** (H) e **58b** (*m*-OCH₃), que demonstraram perfil de inibição do tipo não-competitivo. Considerando que os demais compostos da série apresentam atividade enzimática equipotentes à dos compostos **58a** e **58b**, aliada à presença de substituintes neutros ou doadores de elétrons, é válido propor que todos os demais análogos sigam o mesmo mecanismo não-competitivo. A exceção observada para **58e** e **58f** pode ser atribuída à presença dos substituintes *p*-CN e *p*-NO₂, grupos fortemente

retiradores de elétrons. Essa característica eletrônica parece favorecer interações simultâneas com os sítios CAS e PAS da AChE, justificando a maior atividade desses compostos.

Adicionalmente, além das interações descritas, os compostos **58e** e **58f** exibiram interação de hidrogênio adicionais com o resíduo de Ser293, com distancias de 2,2 Å (grupo ciano, **58e**) (Figura 52A) e 2,9 Å (grupo nitró, **58f**) (Figura 52B).

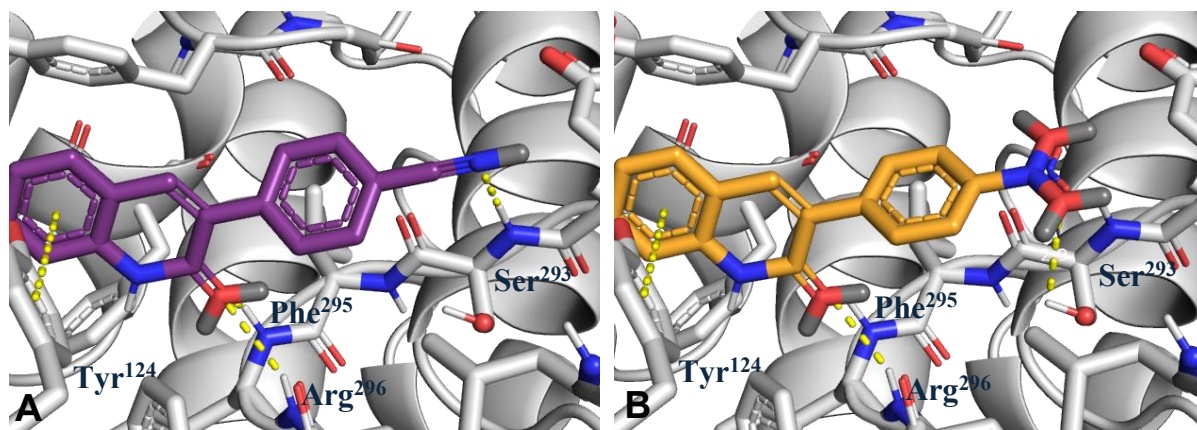
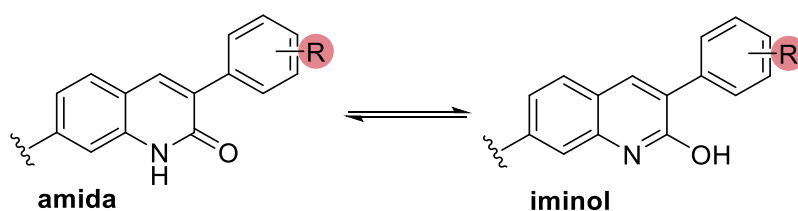


Figura 52. A) Análise parcial das principais interações moleculares a cavidade enzimática da AChE e os compostos **58e** e B) **58f**. Figura gerada com PyMol 3.1.3.1 (Copyright © Schrödinger LLC).

Por causa da divergência observada entre os dados *in silico* e *in vitro*, levantou-se a hipótese que essas quinolinonas poderiam se encontrar predominantemente na forma tautomérica iminol em meio aquoso, em contraste com a forma amida considerada nos cálculos iniciais de modelagem molecular (Esquema 30).



Esquema 30. Tautomeria amida-iminol em derivados de quinolinona.

Para avaliar essa possibilidade, realizou-se um estudo comparativo de estabilidade termodinâmica entre os tautômeros amida e iminol em meio aquoso, utilizando cálculos de Teoria do Funcional da Densidade (DFT). Os compostos **58a** e **58e** foram selecionados como representantes da série, considerando suas diferenças estruturais e perfis cinéticos distintos (Tabela 21).

Tabela 21. Cálculos de estabilidade relativa dos tautômeros amida e iminol em meio aquoso para os compostos **58a** e **58e**.

Composto	Energia (amida) (au)	Energia (iminol) (au)	ΔE (au) ¹	ΔE (kJ/mol)
58a	-1333,26602	-1113,25031	- 0,01571	- 41,24
58b	-1205,51433	-1205,49689	-0,01741	-45,70

$$^1\Delta E(\text{au})=E_{\text{ceto}}-E_{\text{enol}}$$

Os resultados revelaram que a forma amida apresenta maior estabilidade termodinâmica em meio aquoso, com uma diferença de energia de -41,24 kJ/mol em relação ao tautômero iminol para **58a** e de -45,70 kJ/mol para o composto **58e**. No entanto, mesmo com essa preferência tautomérica, a possível coexistência de ambas as formas em equilíbrio dinâmico poderia permitir interações pontuais com resíduos-chave da AChE.

Por isso realizou-se um estudo de ancoramento molecular (*docking*) entre os compostos na forma tautomérica iminol e a enzima *EeAChE*, visando avaliar se essa conformação explicaria o mecanismo de inibição não-competitivo observado experimentalmente. Contudo, a análise das poses de ligação obtidas revelou que todos os compostos ocuparam simultaneamente o sítio CAS e PAS, sem alterações significativas no modo de interação em relação ao observado para os tautômeros amida (Figura 53).

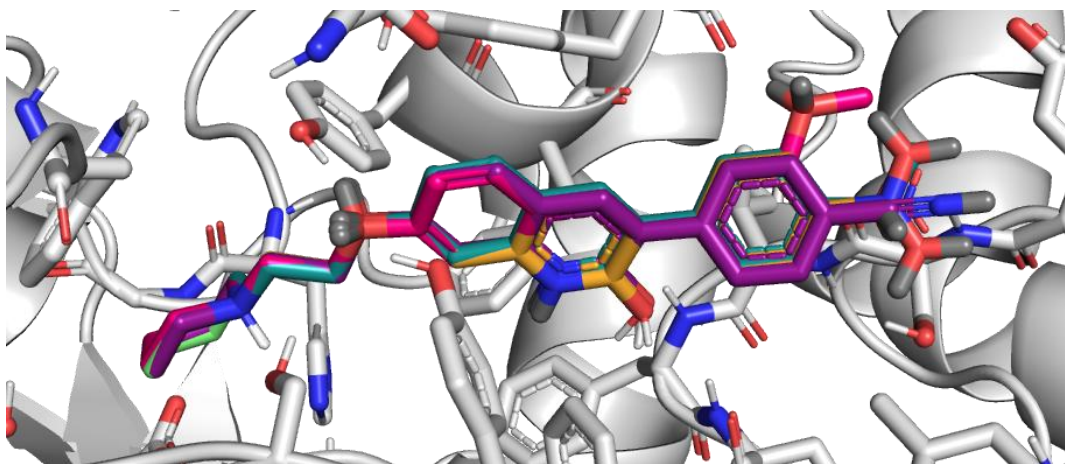


Figura 53. Análise da sobreposição dos compostos **58a-f** na conformação enol e a cavidade enzimática da AChE. Figura gerada com PyMol 3.1.3.1 (Copyright © Schrödinger LLC).

Diante disso, foi proposta a hipótese da formação de complexos ternários, que contêm a enzima, o substrato e o inibidor. Primeiramente, realizaram-se cálculos de docking molecular utilizando a acetilticolina (ACTI), análoga do substrato natural acetilcolina, que foi empregada no estudo cinético. Nos complexos tiocolina/AChE melhor classificados, previu-se

que a molécula de tiocolina se posicionaria no sítio ativo, com o grupo trimetilamônio orientado em direção à cadeia lateral Trp84, enquanto o átomo de carbono da carbonila do substrato se localizaria próximo ao átomo O_γ da Ser 203 catalítica.

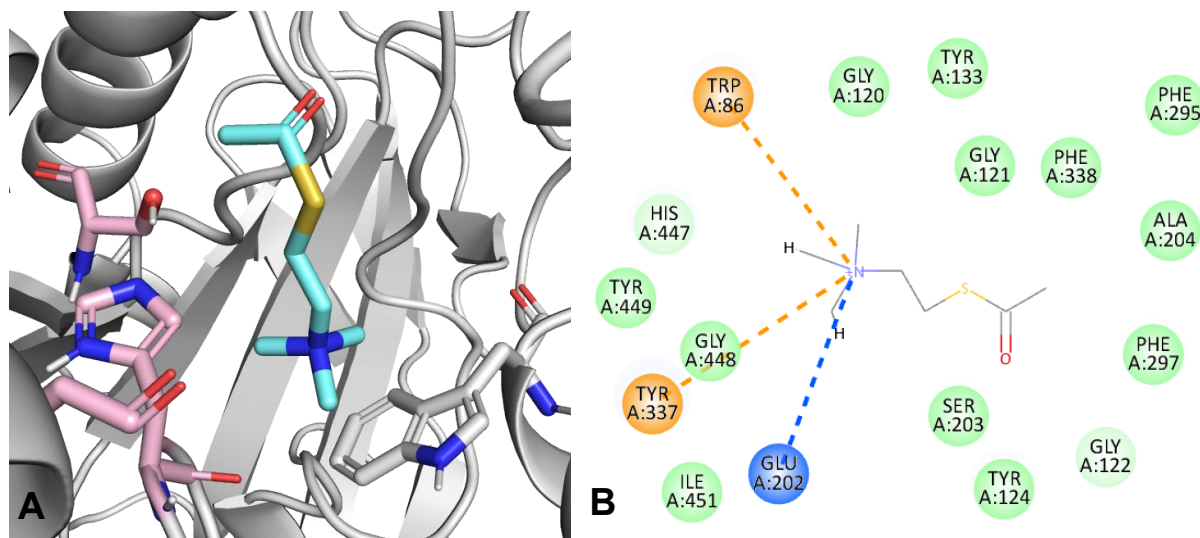


Figura 54. A) Substrato acetiltiocolina (ACTI) (ciano) na cavidade enzimática da AChE, destacando-se a tríade catalítica Ser203, His447, Glu335 (rosa). B) Mapa farmacofórico com as principais interações do ACTI na AChE. Legenda: cargas atrativas (azul), cátion- π (laranja), van der Waals (verde). Figura gerada com PyMol 3.1.3.1 (Copyright © Schrödinger LLC).

Em seguida, o melhor complexo tiocolina/AChE foi selecionado para a realização do estudo de ancoramento molecular (*docking*) com os derivados da quinolinona **58a-g**. Os resultados de *score* de ligação e valores de CI₅₀ obtidos para os compostos estão apresentados na Tabela 22, permitindo a visualização da correlação entre os dados. O detalhamento qualitativo das interações moleculares entre os ligantes e a enzima *EeAChE* está descrito na Tabela S7 do Anexo 7.1.

A análise estrutural mostrou que os compostos **58a-f** estabelecem interações semelhantes entre si, exibindo um deslocamento mais pronunciado em direção ao sítio PAS nos complexos ternários em comparação aos complexos binários. Apesar dessa tendência, observou-se que os compostos ainda interagem parcialmente com resíduos do sítio CAS, como Asp74 e Tyr124 (Figura 55). Entretanto, esse padrão é compatível com a cinética não-competitiva observada experimentalmente, uma vez que a ausência de competição pelo sítio catalítico (já ocupado pelo substrato) não impede interações secundárias com resíduos adjacentes.

Tabela 22. Resultados de *score* e os respectivos valores de CI_{50} dos compostos avaliados.

Compostos	<i>EeAChE</i> +ACTI	
	GoldScore	CI_{50} (μM) \pm DP
58a	70,84	$3,544 \pm 0,191$
58b	73,65	$2,756 \pm 0,228$
58c	72,39	$1,254 \pm 0,033$
58d	70,55	$1,986 \pm 0,032$
58e	71,83	$0,251 \pm 0,025$
58f	71,28	$0,408 \pm 0,019$
58g	62,00	$1,26 \pm 0,043$

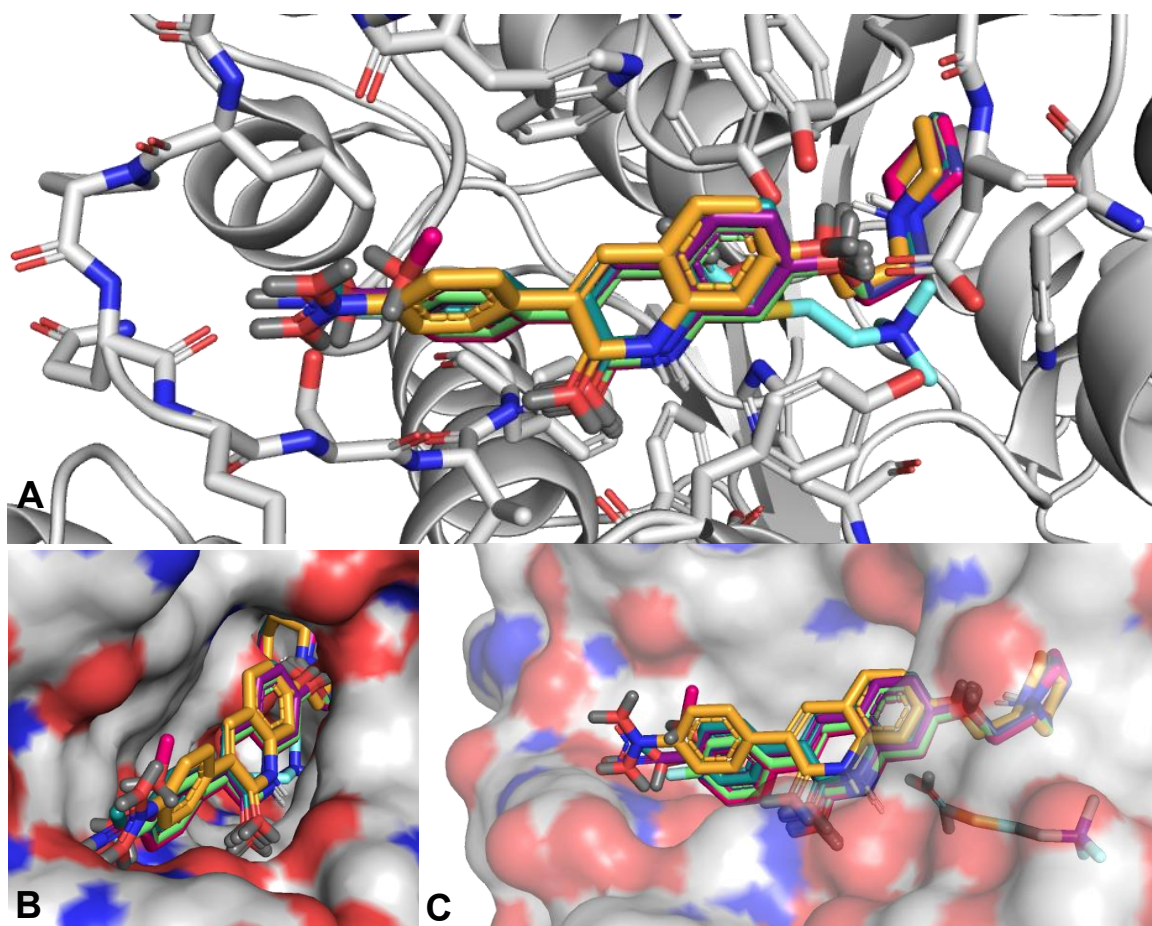


Figura 55. A) Análise da sobreposição dos complexos ternários formados pelos compostos **58a-f** na cavidade enzimática da tiocolina/AChE. B) Análise da cavidade de acesso ao sítio da tiocolina/AChE com os compostos **58a-f** ancorados. C) Representação da superfície de van der Waals do sítio da tiocolina/AChE, com os compostos **58a-f** ancorados, e a tiocolina sob um ângulo de visão longitudinal. Figura gerada com PyMol 3.1.3.1 (Copyright © Schrödinger LLC).

Sendo assim, as principais interações observadas para o composto **58a** envolveram a atração eletrostática – mesmo que distante – entre a piperidina protonada e o resíduo Asp74 (4,6 Å), além de ligações de hidrogênio estabelecidas pelo H_{N-H} da piperidina com o resíduo Tyr124 (2,6 Å) e pela carbonila da quinolinona com o resíduo Phe295 (2,5 Å). Adicionalmente, verificou-se empilhamento π - π entre o núcleo quinolinona e o resíduo Tyr341 (4,4 e 5,0 Å), bem como entre o anel fenílico e o resíduo Trp286 (5,3 Å). O mesmo anel fenílico também demonstrou interações de empilhamento π -amida com Ser293 (4,8 Å), reforçando a estabilização do complexo (Figura 56).

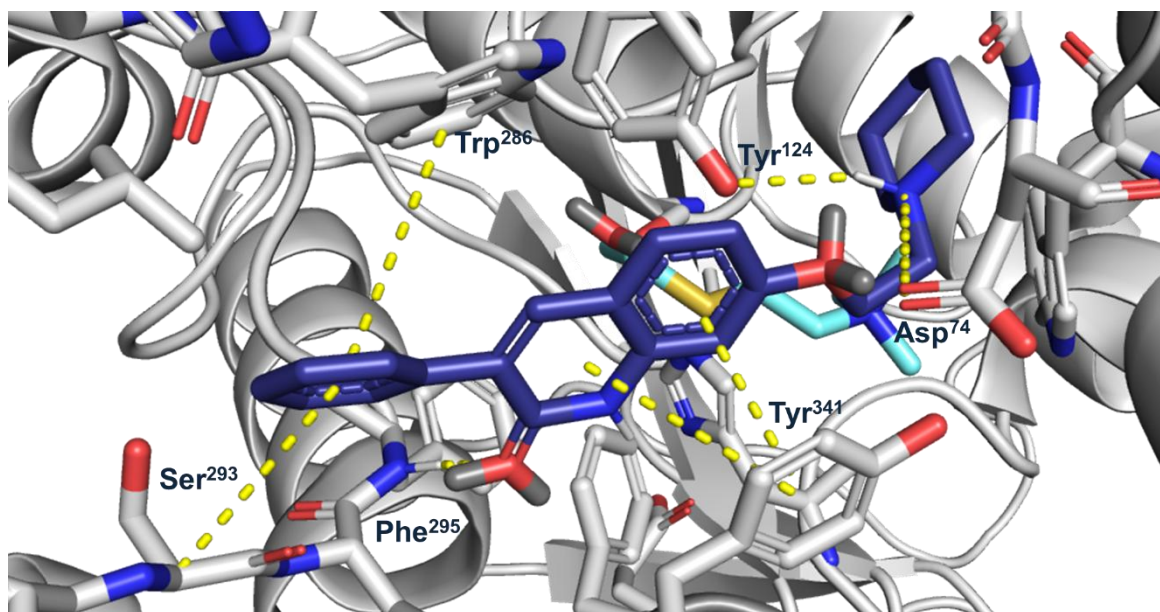


Figura 56. Análise das principais interações moleculares a cavidade enzimática da tiocolina/AChE e o composto **58a**. Figura gerada com PyMol 3.1.3.1 (Copyright © Schrödinger LLC).

Os demais derivados contendo dois metilenos como cadeia espaçadora apresentaram interações semelhantes às destacadas para o composto **58a**, variando principalmente em função do substituinte do grupo fenil. Entretanto, no composto **58g**, que possui três metilenos espaçadores, observou-se uma variação mais significativa. Embora a atração eletrostática entre a piperidina protonada e o resíduo Asp74 (4,3 Å) tenha sido mantida, foram identificadas ligações de hidrogênio entre o H_{N-H} da piperidina e o resíduo Ser125 (2,2 Å) e o H_{N-H} da quinolinona e o resíduo Tyr124 (2,6 Å). Adicionalmente, verificou-se empilhamento π - π entre o núcleo quinolinona e o resíduo Tyr341 (3,2 e 4,8 Å), bem como entre o anel fenílico e o resíduo Trp286 (4,8 Å) (Figura 57).

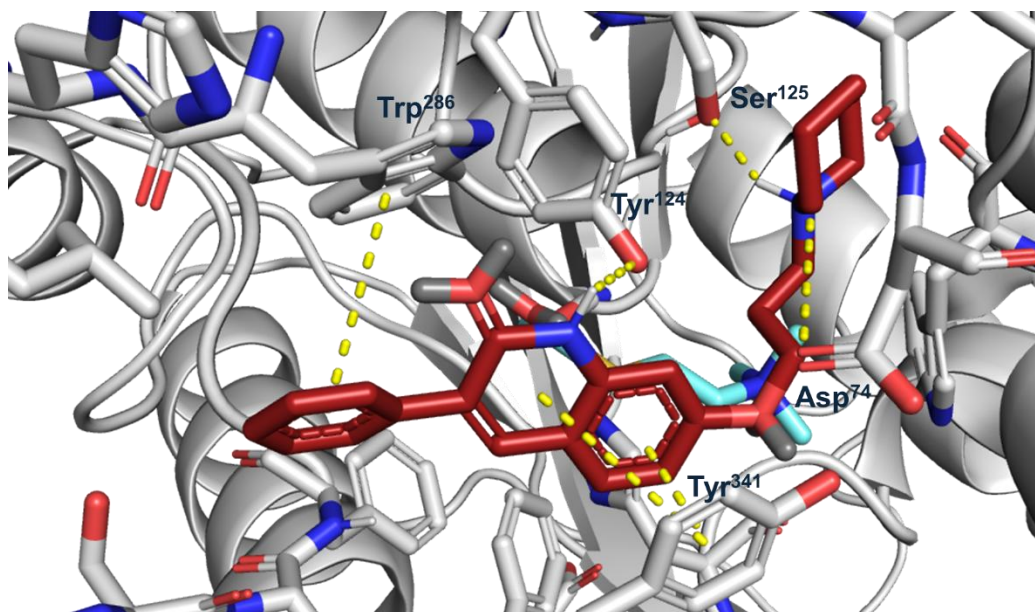


Figura 57. Análise das principais interações moleculares a cavidade enzimática da tiocolina/AChE e o composto **58g**. Figura gerada com PyMol 3.1.3.1 (Copyright © Schrödinger LLC).

Diante do que foi exposto, conclui-se que a formação do complexo ternário poderia explicar de forma mais consistente o perfil de inibição não-competitiva demonstrado experimentalmente para parte dos compostos desta série. Além disso, é plausível inferir que os compostos com perfil de inibição mista (**58e** e **58f**) interajam com a enzima em ambas as formas – tanto através do complexo binário quanto do ternário –, sugerindo um mecanismo de ação dual e explicando uma maior afinidade pelo PAS, como verificado em seus valores de K_i' (Tabela 18). Visando confirmar os resultados de forma robusta, o ideal seria a realização de estudos de cristalografia de raios X e/ou simulações de dinâmica molecular.

3.2.10. Avaliação *in silico* da interação dos compostos com a EqBChE

Para a realização do estudo de ancoramento molecular (docking) entre os compostos e a enzima EqBChE foi utilizada as mesmas condições já expostas anteriormente e que estão descritas no item 3.1.14.

Os resultados de *score* de ligação e valores de CI_{50} obtidos para os compostos **58a-g** estão apresentados na Tabela 23, permitindo a visualização da correlação entre os dados. O detalhamento qualitativo das interações moleculares entre os ligantes e a enzima EqBChE está descrito na Tabela S8 do Anexo 7.1.

Tabela 23. Resultados de score e os respectivos valores de CI_{50} dos compostos avaliados.

Compostos	<i>EqBChE</i>	
	ChemScore	CI_{50} (μM) \pm DP
58a	44,64	$1,607 \pm 0,035$
58b	46,28	$2,653 \pm 0,077$
58c	45,31	$4,469 \pm 0,412$
58d	45,31	$1,164 \pm 0,071$
58e	46,24	$2,695 \pm 0,229$
58f	46,58	$3,285 \pm 0,103$
58g	47,10	$1,533 \pm 0,052$

A análise das poses de ligação obtidas pelo estudo de *docking* revelou que os inibidores ocupam simultaneamente o sítio catalítico (CAS) e o sítio periférico (PAS) da enzima, o que está de acordo com os dados cinéticos observados experimentalmente. No CAS, o grupamento amino-cíclico protonado dos inibidores estabelece interações do tipo cátion- π com o resíduo Trp110, enquanto o núcleo quinolinona posiciona-se no sítio catalítico, formando uma interação de empilhamento π - π com o resíduo Tyr360. No sítio periférico (PAS), predominaram interações hidrofóbicas, cujos resíduos envolvidos mantiveram-se consistentes independentemente dos substituintes presentes no grupo benzila. Entretanto, a natureza desses substituintes influenciou diretamente os parâmetros geométricos das interações, como distâncias intermoleculares e ângulos conformacionais, sem alterar significativamente a identidade dos resíduos participantes (Figura 58).

A baixa seletividade, ou até mesmo a inversão da seletividade dos compostos entre as enzimas AChE e BChE, demonstra ter correlação direta com a cinética de inibição. Enquanto boa parte dos derivados demonstraram perfil de inibição não-competitivo para a AChE, todos demonstram perfil de inibição misto frente a BChE, permitindo que os compostos realizassem interações importantes no sítio CAS, como a interação do tipo cátion- π com o resíduo Trp110.

Adicionalmente, a planaridade do sistema, ao restringir a liberdade conformacional dos compostos, parece direcionar os derivados para a cavidade enzimática de forma menos suscetível ao maior volume da cavidade da BChE.

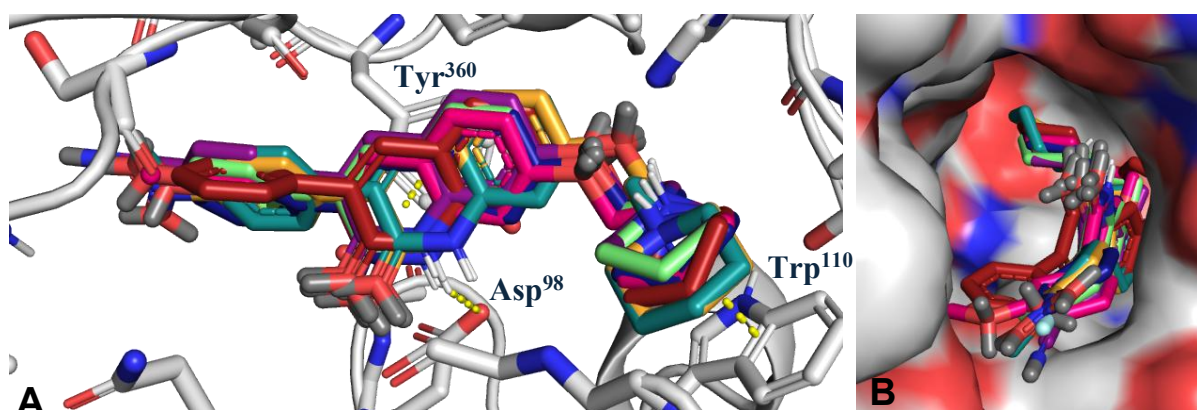


Figura 58. A) Análise da sobreposição dos compostos **58a-g** e a cavidade enzimática da BChE. **B)** Análise da cavidade de acesso ao sítio catalítico da BChE com os compostos **58a-g** ancorado, visto de frente. Figura gerada com PyMol 3.1.3.1 (Copyright © Schrödinger LLC).

3.3. SÉRIE C

3.3.1. Planejamento sintético dos compostos

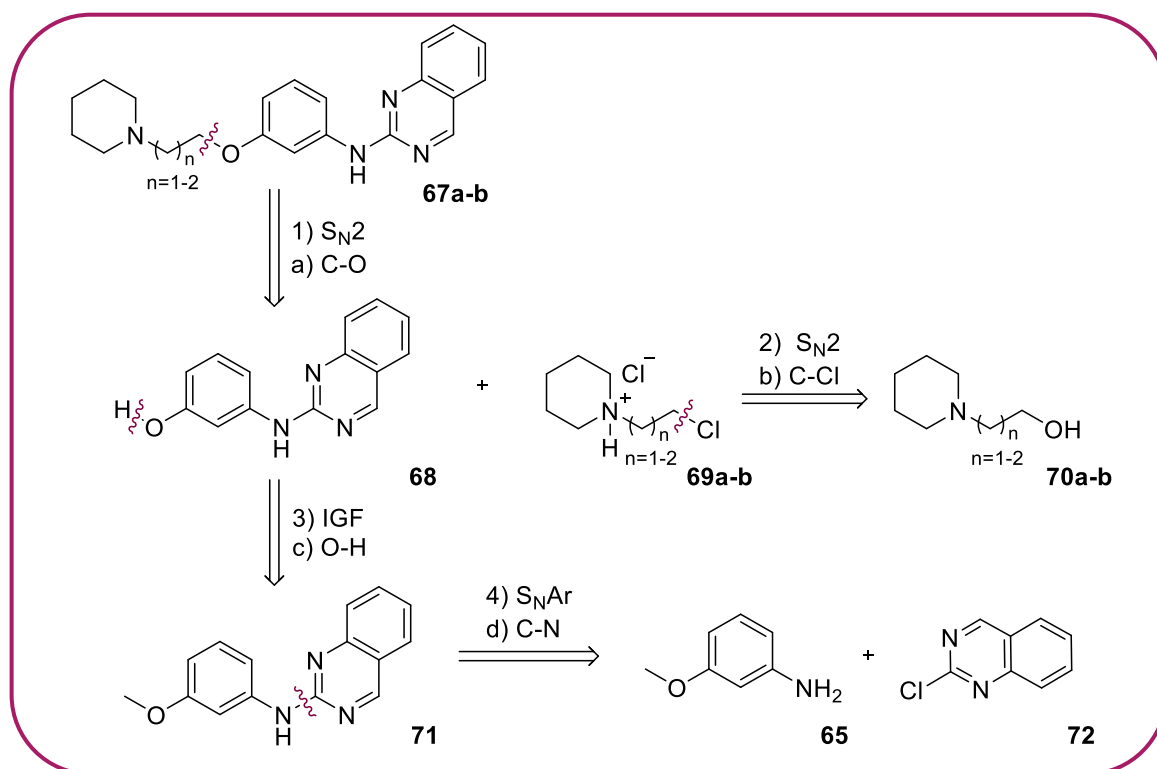
A síntese da série de compostos (**67a-b**) foi planejada com base na análise retrossintética detalhada no Esquema 31.

Inicialmente, a partir de uma desconexão C-O (etapa a), foi identificado a 3-(quinazolin-2-ilamino)fenol (**68**) e os cloridrato de 1-(cloroalquil)piperidina (**69a-b**) como precursores das *N*-(3-((piperidin-1-il)alcoxi)fenil)quinazolin-2-amina (**67a-b**), por meio de uma reação de substituição nucleofílica bimolecular (S_N2).

Através de uma desconexão C-Cl (etapa b), identificou-se o piperidinil-etanol ou propanol (**70a-b**) como reagentes de partida dos cloridratos de 1-(cloroalquil)piperidina (**69a-b**), por meio de uma reação de substituição nucleofílica bimolecular (S_N2) com cloreto de tionila ($SOCl_2$).

Paralelamente, identificou-se o composto metoxilado (**71**) como precursor do composto a 3-(quinazolin-2-ilamino)fenol (**68**), através uma desconexão O-H (etapa c) que ocorre por meio de uma reação de substituição nucleofílica bimolecular (S_N2) com tribrometo de boro.

Por fim, uma desconexão C-N aplicada ao composto *N*-(3-metoxifenil)quinazolin-2-amina (**71**) sugere a *m*-anisidina (**65**) e a 2-cloroquinazolina (**72**), como reagentes de partida, explorando uma reação de substituição nucleofílica aromática (S_NAr).

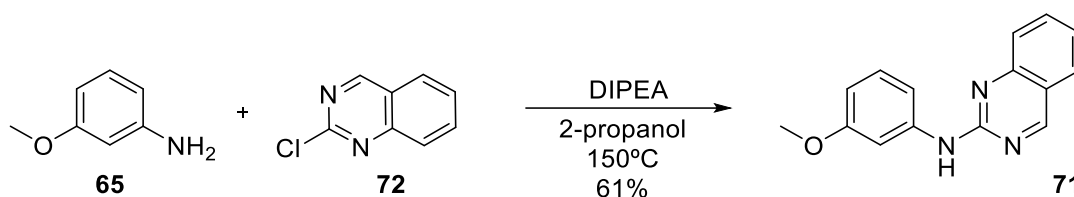


Esquema 31. Análise retrossintética para obtenção dos compostos planejados da série C.

3.3.2. Síntese da *N*-(3-metoxifenil)quinazolin-2-amina (71)

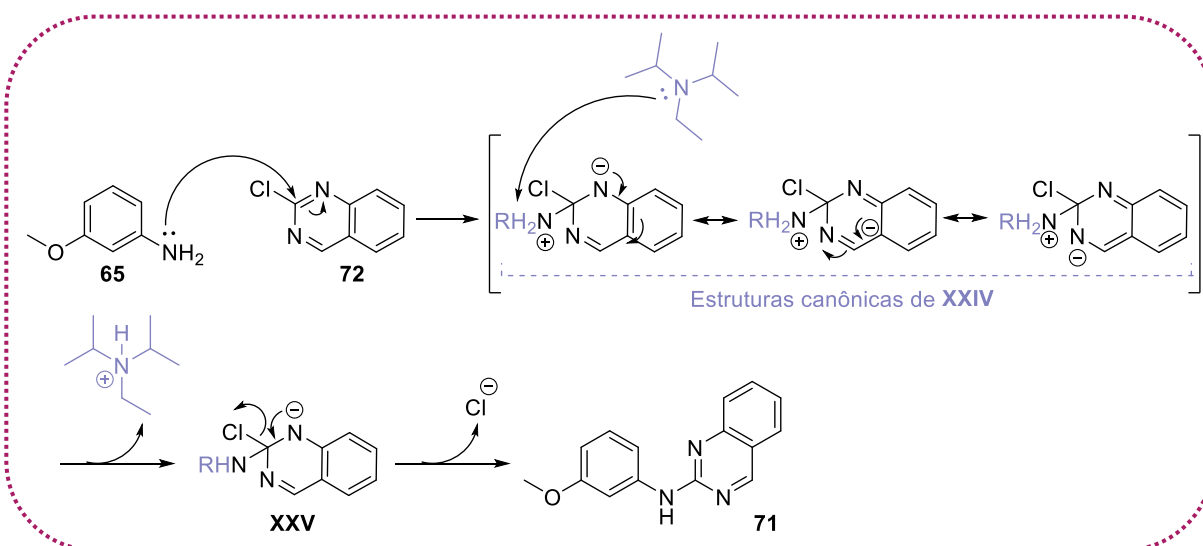
A síntese do composto *N*-(3-metoxifenil)quinazolin-2-amina (71) foi realizada via substituição nucleofílica aromática (S_NAr), levando a obtenção de um sólido amarelo. O rendimento alcançado foi de 61%, com ponto de fusão na faixa de 139-141°C.

A reação foi realizada utilizando a *m*-anisidina (65) com a 2-cloroquinazolina (72), na presença de *N,N*-diisopropiletilamina (DIPEA) em 2-propanol, com aquecimento a 150°C (Esquema 32).



Esquema 32. Síntese da *N*-(3-metoxifenil)quinazolin-2-amina (71)

O mecanismo proposto para a obtenção da *N*-(3-metoxifenil)quinazolin-2-amina (71) é uma substituição nucleofílica aromática (S_NAr), também conhecido como mecanismo de adição-eliminação. O mecanismo se inicia pelo ataque nucleofílico do par de elétrons não ligantes da amina secundária (65) ao carbono eletrofílico da 2-cloroquinazolina (72), formando o intermediário de adição (XXIV) (intermediário de Meisenheimer), que é estabilizado pelo efeito de ressonância. Em seguida, ocorre a abstração de um próton pela base (XXV), seguida pela eliminação do grupo de saída (Cl^-).



Esquema 33. Esquema de intermediários proposto para a formação do composto *N*-(3-metoxifenil)quinazolin-2-amina (71) (Adaptado de CAREY; SUNDBERG, 2002; CLAYDEN; GREEVES; WARREN, 2012).

A caracterização estrutural do composto *N*-(3-metoxifenil)quinazolin-2-amina (**71**) foi realizada por meio da análise dos espectros de RMN ^1H e ^{13}C , cujos espectros estão disponíveis nas Figura S67 à Figura S68 do Anexo 7.2.

A presença do grupo metoxila foi confirmada pelo sinal simples (integrável para 3H) observado no espectro de ^1H em δ 3,78 ppm, atribuído aos hidrogênios da metoxila ($\text{H}_{7'}$). No espectro de ^{13}C , o carbono metoxílico ($\text{C}_{7'}$) foi identificado como um simples em δ 54,91 ppm, corroborando a ausência de acoplamentos ou substituintes adjacentes. Adicionalmente, o hidrogênio aminico (H_{NH}) foi observado como um simples em δ 9,89 ppm, com integração correspondente a 1H. Um sinal característico observado no espectro de ^1H foi o do H_4 , que exibiu um deslocamento altamente desblindado em δ 9,31 ppm (*s*, 1H). Essa desblindagem acentuada é atribuída aos efeitos eletrônicos combinados do anel aromático: o efeito de ressonância e o efeito indutivo dos átomos de nitrogênio adjacentes (N_1 e N_3), que intensificam a desproteção do H_4 .

Na região aromática (sp^2), foram identificados 7 hidrogênios (δ 6,8–8,5 ppm), distribuídos em múltiplos padrões de desdobramento, compatíveis com os sistemas aromáticos da quinazolina e do anel 3-metoxifenila.

Para validação inequívoca da estrutura, além da análise de multiplicidades e deslocamentos químicos, realizou-se espectroscopia de RMN bidimensional (2D), incluindo experimentos de HSQC e HMBC, que permitiram correlacionar os sinais de ^1H e ^{13}C (Tabela 24).

Tabela 24. Dados de RMN de ^1H (500MHz) e de ^{13}C (125MHz) do produto **71** em DMSO, incluindo os resultados obtidos dos espectros de correlação heteronuclear de HSQC (J^1) e HMBC (J^2 , J^3 e J^4). Deslocamentos em δ (ppm) e multiplicidade entre parênteses.

HSQC (J^1)			HMBC		
	δ_{C}	δ_{H} (multiplicidade)	J^2_{CH}	J^3_{CH}	J^4_{CH}
C					
C_2	150,65	-	$\text{H}_{\text{N-H}}$	H_4	$\text{H}_8; \text{H}_{2'}$
C_9	156,87	-	-	H_4	-
C_{10}	120,36	-	$\text{H}_4; \text{H}_5$	$\text{H}_6; \text{H}_8$	-

C ₁ '	141,71	-	H _{N-H} ; H ₂ '; H ₆ '	H ₅ '	-
C ₃ '	159,57	-	H ₂ '; H ₄ '	H ₅ '; H ₇ '	-
CH					
C ₄	162,31	H ₄ : 9,31 (<i>s</i>)	-	-	H ₈
C ₅	125,57	H ₅ : 7,67 (<i>d</i> , <i>J</i> = 8,4Hz)	H ₆	-	-
C ₆	123,60	H ₆ : 7,39 (<i>t</i> , <i>J</i> = 7,4Hz)	H ₅	-	-
C ₇	134,55	H ₇ : 7,82 (<i>m</i>)	H ₈	H ₅	-
C ₈	127,95	H ₈ : 7,92 (<i>d</i> , <i>J</i> = 7,8Hz)	H ₇	-	H ₄
C ₂ '	104,59	H ₂ ': 7,82 (<i>sl</i>)	-	H _{N-H} ; H ₆ '; H ₄ '	H ₅ '
C ₄ '	106,85	H ₄ ': 6,56 (<i>dd</i> , <i>J</i> = 8,1, 2,1Hz)	-	H ₂ '; H ₆ '	-
C ₅ '	129,23	H ₅ ': 7,22 (<i>t</i> , <i>J</i> = 8,1Hz)	-	-	-
C ₆ '	111,22	H ₆ ': 7,49 (<i>d</i> , <i>J</i> = 8,1Hz)	H ₅ '	H _{N-H} ; H ₂ '; H ₄ '	-
CH₃					
C ₇ '	54,91	H ₇ ': 3,81 (<i>s</i>)	-	-	-
-	-	H _{N-H} : 9,89 (<i>s</i>)	-	-	-

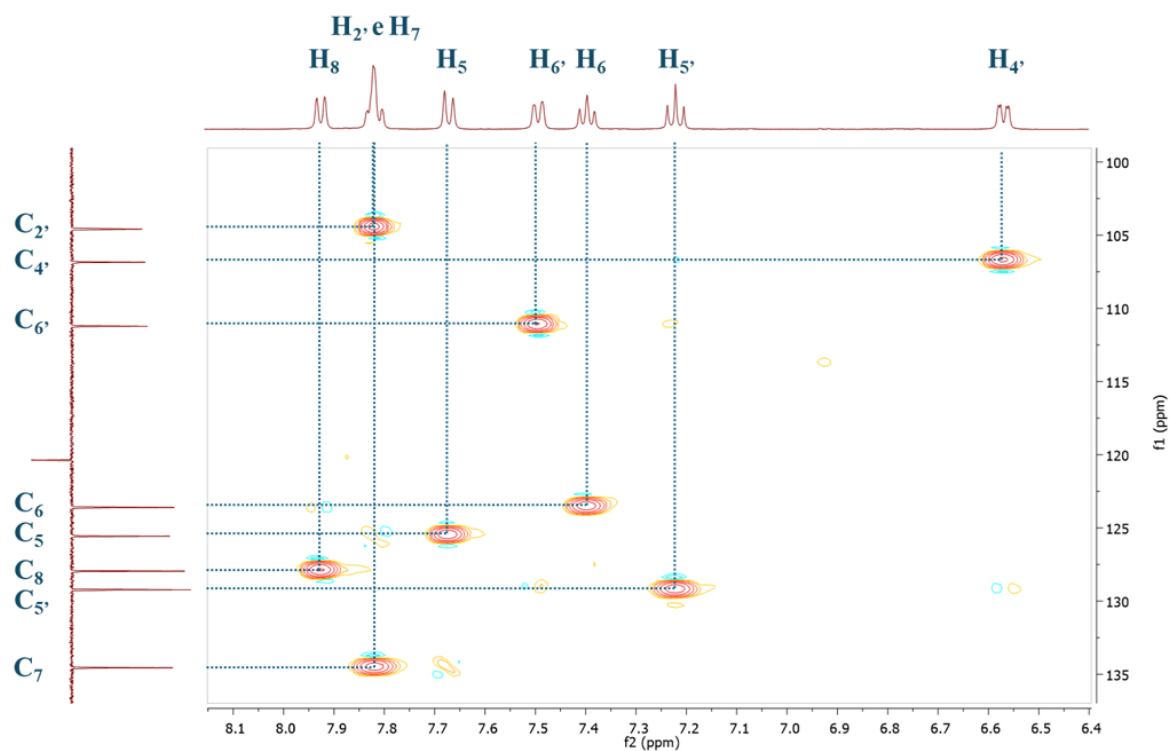


Figura 59. Espectros bidimensionais de HSQC do composto **71** em DMSO-*d*₆: Visualização das correlações J^1 entre carbono e hidrogênio.

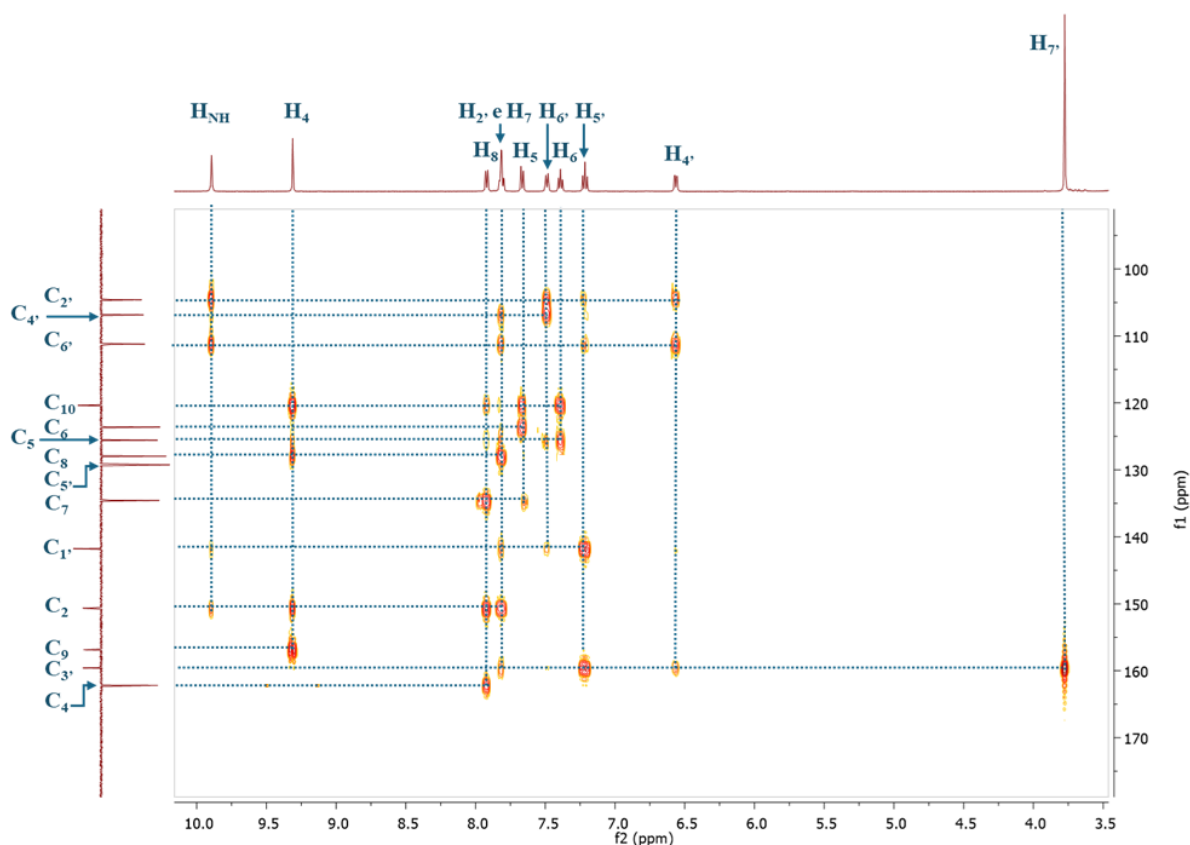
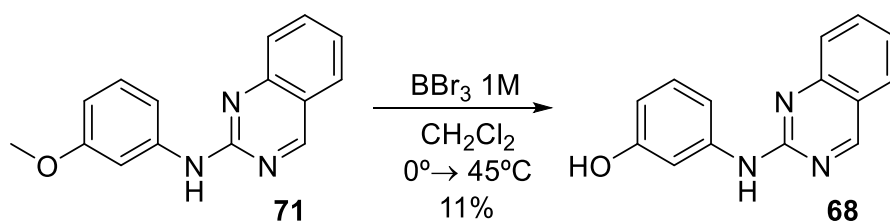


Figura 60. Espectros bidimensionais de HMBC do composto **71** em DMSO- d_6 : Visualização das correlações J^2 , J^3 e J^4 , entre carbono e hidrogênio.

3.3.3. Síntese da 3-(quinazolin-2-ilamino)fenol (**68**)

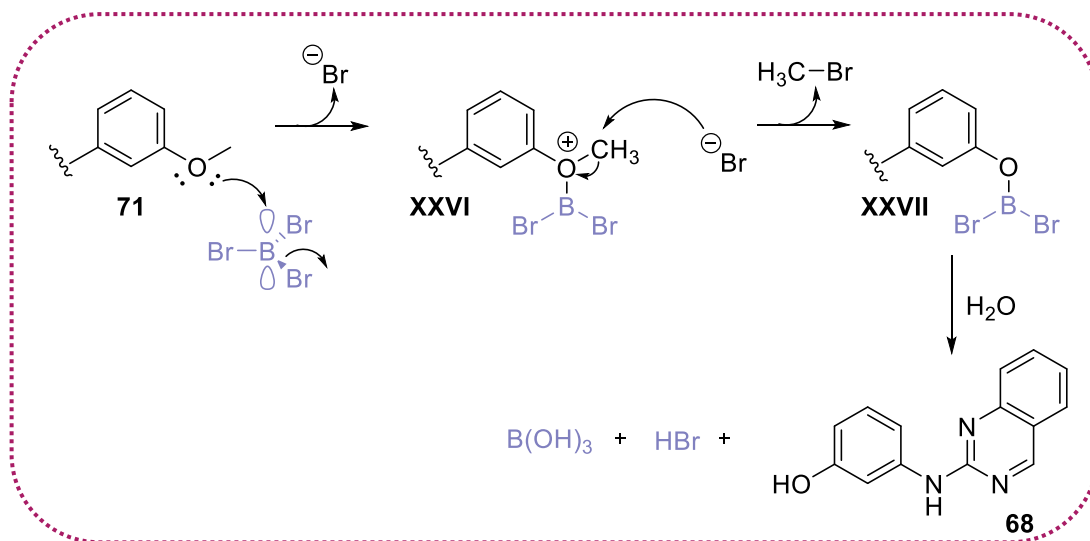
O composto 3-(quinazolin-2-ilamino)fenol (**68**) foi obtido por reação de *O*-desmetilação, apresentando-se como um sólido amarelo. O rendimento alcançado foi de 11%, com ponto de fusão na faixa de 140-144°C.

A reação de *O*-desmetilação foi realizada utilizando a *N*-(3-metoxifenil)quinazolin-2-amina (**71**) com o tribrometo de boro (BBr_3) em diclorometano anidro, com aquecimento a 45°C (Esquema 34).



Esquema 34. Síntese da 3-(quinazolin-2-ilamino)fenol (**68**)

O mecanismo proposto para a obtenção da 3-(quinazolin-2-ilamino)fenol (**68**) envolve uma reação de *O*-desmetilação, na qual o BBr₃ atua como um ácido de Lewis, aceitando um par de elétrons do oxigênio da metoxila em seu orbital *p* vazio. O íon oxônio (**XXVI**) resultante pode então ser atacado por Cl⁻ em uma reação do tipo S_N2, promovendo a quebra da ligação C–O e levando à formação do intermediário de reação **XXVII**, que, ao ser hidrolisado, gera o grupo hidroxila no composto 3-(quinazolin-2-ilamino)fenol (**68**) (Esquema 35) (Clayden; Greeves; Warren, 2012).



Esquema 35. Esquema de intermediários proposto para a *O*-desmetilação para formação do composto 3-(quinazolin-2-ilamino)fenol (**68**).

Para confirmar a formação do composto 3-(quinazolin-2-ilamino)fenol (**68**) foram realizados experimentos de determinação estrutural como RMN ¹H e ¹³C, cujos espectros estão disponíveis nas Figura S69 à Figura S70 do Anexo 7.2.

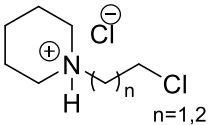
Os principais indicadores da formação desse composto foi a ausência do sinal referente a metoxila presente no reagente **68**, tanto no espectro de RMN ¹H quanto no de ¹³C. Pela análise ter sido realizada em clorofórmio (CDCl₃) não foi possível visualizar hidrogênio da hidroxila (H_{OH}) ou mesmo o hidrogênio da amina (H_{NH}).

Além disso, tanto no RMN ¹H quanto no ¹³C, os sinais do núcleo *N*-fenilquinazolin-2-amina mantiveram-se inalterados após a reação de *O*-desmetilação, indicando ausência de degradação do composto.

3.3.4. Síntese do cloridrato de 1-(cloroalquil)piperidina (69a-b)

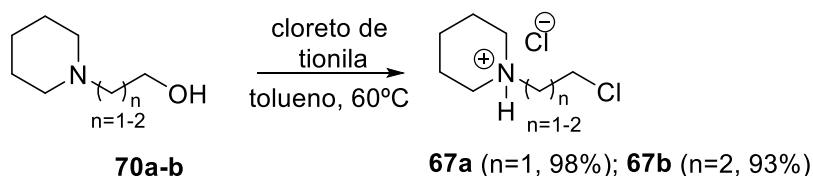
A síntese do composto cloridrato de 1-(cloroalquil)piperidina (**69a-b**) foi realizada via reação substituição nucleofílica bimolecular (S_N2), apresentando como sólidos. Seus rendimentos variaram entre 93-98%, de acordo com o número de carbonos espaçadores (Tabela 25).

Tabela 25. Características físicas e rendimento da 1-(cloroalquil)piperidina (**69a-b**)

				
Compostos	n	Características físicas	P.F. °C	Rendimento (%)
69a	1	Sólido bege	209-211 ^d	98
69b	2	Sólido bege	215-219 ^d	93

^d Ponto de degradação

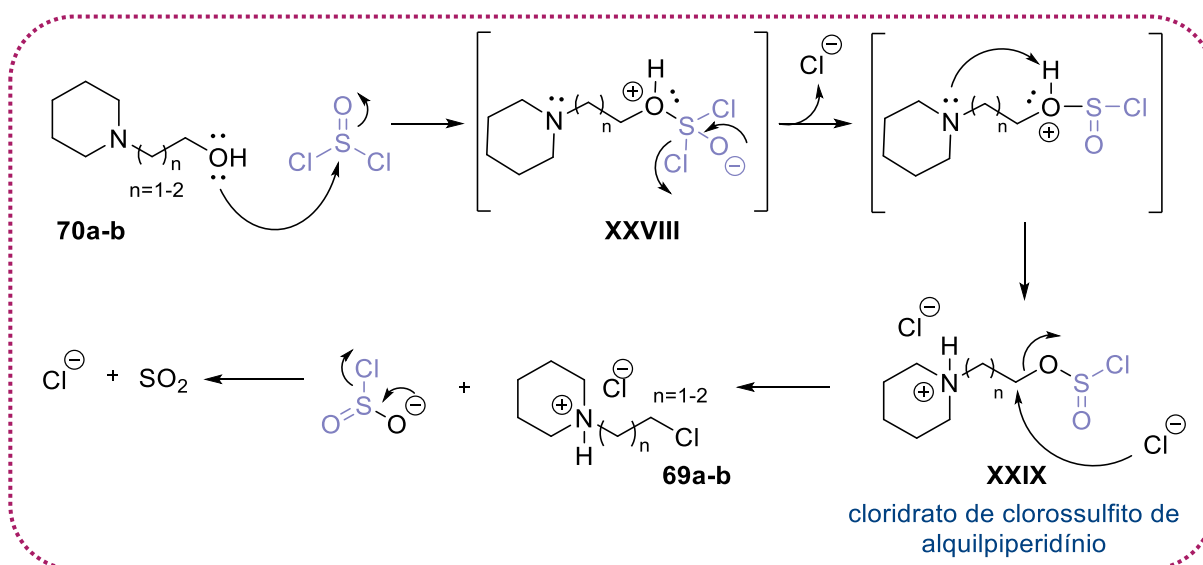
A reação para obtenção dos haletos de alquila foi realizada a partir piperidinil-alcanol (**69a-b**) e cloreto de tionila (SOCl_2) em tolueno, sob aquecimento de 60 °C (Esquema 36).



Esquema 36. Síntese do cloridrato de 1-(cloroalquil)piperidina (**69a-b**)

O mecanismo inicia-se com o ataque nucleofílico do oxigênio do grupo hidroxila do piperidinil-alcanol (**70a-b**) ao enxofre eletrofílico do cloreto de tionila (SOCl_2), formando um intermediário tetraédrico (**XXVIII**), que libera um íon cloreto (Cl^-). Em seguida, ocorre uma transferência intramolecular de prótons entre o nitrogênio e o oxigênio, gerando o cloridrato de clorossulfito de alquylpiperidínio (**XXIX**) (Esquema 37).

Posteriormente, em uma substituição nucleofílica bimolecular (S_N2), um íon cloreto (Cl^-) atua como nucleófilo, atacando o carbono α ao oxigênio e deslocando o grupo ClSO_2^- . Este grupo é um excelente grupo de saída e decompõe-se facilmente em SO_2 gasoso e Cl^- , tornando a reação irreversível (Esquema 37) (Solomons; Fryhle; Snyder, 2022; Scotland; Vreugdenhil; Shetranjiwalla, 2025).

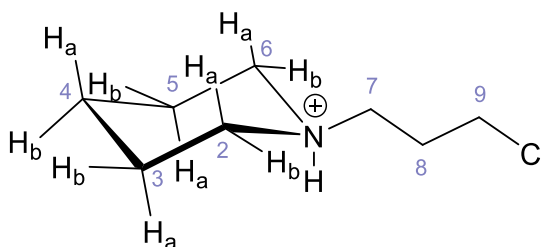


Esquema 37. Esquema de intermediários proposto para a obtenção do cloridrato de 1-(cloroalquil)piperidina (**69a-b**) (Adaptado de (Solomons; Fryhle; Snyder, 2022; Scotland; Vreugdenhil; Shetranjiwalla, 2025))

Para confirmar a formação do composto cloridrato de 1-(cloroalquil)piperidina (**69a-b**) foram realizados experimentos de determinação estrutural como RMN ^1H e ^{13}C , cujos espectros estão disponíveis nas Figura S71 à Figura S74 do Anexo 7.2.

Vale mencionar que as análises desses compostos foram realizadas em DMSO- d_6 para a melhor visualização de hidrogênios ligados a heteroátomos. Visando tornar a discussão mais clara, foram selecionados os espectros de RMN ^1H e ^{13}C do composto **69b** para a elucidação detalhada no texto. Inicialmente, podemos observar os sinais referentes a cadeia alquílica, como o deslocamento de δ 3,73 ppm (t, J = 6,3 Hz, 2H) atribuído aos hidrogênios metilênicos adjacentes ao átomo de cloro (H_9), que apresentam desblindagem acentuada devido ao efeito indutivo eletronegativo do cloro. Contudo, esse sinal isoladamente não seria suficiente para confirmar a formação do composto **69b**, visto que ele não demonstra mudança significativa no deslocamento químico em relação ao álcool precursor. Sendo assim, a única evidência concreta fornecida pelo espectro de RMN ^1H é a ausência do sinal referente ao H_{OH} , que seria esperado como um singlete em ~ 4 ppm. O sinal em δ 3,37 ppm (s, 2H) corresponde aos hidrogênios metilênicos próximos ao nitrogênio (H_7), cujo deslocamento elevado sugere a influência do ambiente polarizado gerado pelo grupo amino protonado. Por fim, o sinal em δ 2,19–2,23 ppm (m, 2H) é atribuído aos hidrogênios centrais da cadeia (H_8), que sofrem acoplamentos múltiplos com os metilenos vizinhos (H_7 e H_9), resultando em um padrão complexo.

Os hidrogênios H₂₋₆ e H₄ da piperidina protonada exibiram deslocamentos químicos distintos no RMN ¹H para os hidrogênios axiais e equatoriais, refletindo a influência da anisotropia magnética do nitrogênio protonado (H_{NH} = 10,72 ppm (s, 1H)) e da conformação em cadeira. Para os hidrogênios axiais H₂₋₆, o sinal em 3,07 (dt, *J* = 10,1, 5,2 Hz, 2H) reflete a desblindagem causada pelo nitrogênio protonado, com o acoplamento *J* = 10,1 Hz correspondendo à interação axial-axial. Já os hidrogênios equatoriais em 2,84 (td, 2H) apresentam menor deslocamento devido à menor exposição ao campo desblindante do nitrogênio protonado. Para o hidrogênio axial em H₄ foi atribuído o sinal de 1,68 (d, *J* = 13,2 Hz, 1H) e sinal em 1,36 (q, 1H) para o H₄ equatorial. Para o H₃₋₅ temos o sinal em 1,85 – 1,67 como um multipeto integrado para 4H.

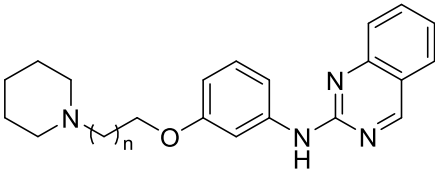


No espectro de RMN ¹³C, observaram-se os seguintes deslocamentos químicos para a cadeia alquila: δ 53,37 ppm para o carbono C₇, δ 42,59 ppm para o carbono C₉ e δ 26,23 ppm para o carbono C₈. O deslocamento do C₉ é característico de um carbono adjacente a halogênios (Cl) e constitui evidência da formação do composto **69b**, uma vez que esse valor é significativamente diferente do observado para o álcool precursor, que ocorreria em aproximadamente 60 ppm. Para a amina cíclica, observou-se deslocamentos característicos: δ 52,06 ppm para os carbonos C₂ e C₆ (adjacentes ao nitrogênio protonado), δ 26,23 ppm para os carbonos C₃ e C₅ e δ 21,41 ppm para o carbono C₄.

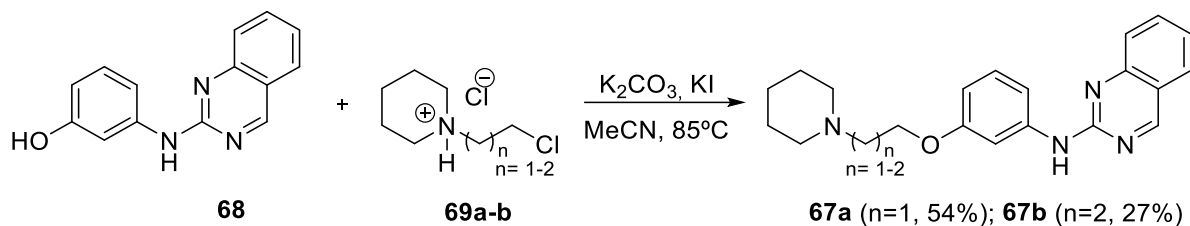
3.3.5. Síntese da N-(3-((piperidin-1-il)alcoxi)fenil)quinazolin-2-amina (67a-b)

O composto *N*-(3-((piperidin-1-il)alcoxi)fenil)quinazolin-2-amina (**67a-b**) foi obtido via reação de *O*-alquilação, apresentando como sólido. Seus rendimentos variaram entre 27-54%, de acordo com o número de carbonos espaçadores (Tabela 26).

Tabela 26. Características físicas e rendimento da *N*-(3-((piperidin-1-il)alcoxi)fenil)quinazolin-2-amina (**67a-b**)

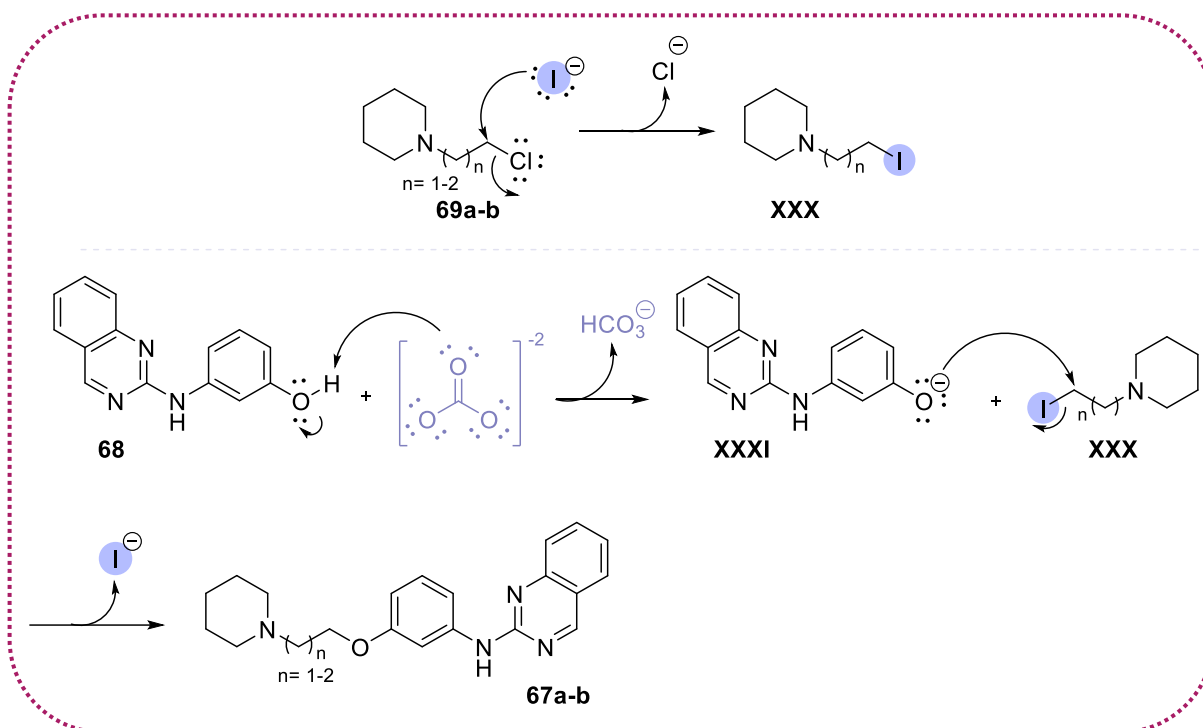
			
Compostos	n	Características físicas	Rendimento (%)
67a	1	Sólido amarelo	54
67b	2	Óleo amarelo	27

A reação de *O*-alquilação (Síntese de Williamson) foi realizada a partir da 3-(quinazolin-2-ilamino)fenol (**68**), cloridrato de 1-(cloroalquil)piperidina (**69a-b**), carbonato de potássio (K_2CO_3) e iodeto de potássio (KI) em acetonitrila, sob aquecimento de 85 °C (Esquema 38).



Esquema 38. Síntese da *N*-(3-((piperidin-1-il)alcoxi)fenil)quinazolin-2-amina (**67a-b**).

O mecanismo proposto para essa reação inicia-se pela reação de substituição nucleofílica (S_N2) entre o KI, que está sendo utilizado como catalisador da reação, e o cloridrato de 1-(cloroalquil)piperidina (**69a-b**). O ataque nucleofílico é realizado pelo iodeto, que é um bom nucleófilo, no carbono α ao cloreto, levando a formação do intermediário (**XXX**). Paralelamente, temos a abstração do próton da hidroxila fenólica pelo íon carbonato (CO_3^{2-}), resultando na formação da 3-(quinazolin-2-ilamino)fenolato (**XXXI**) e do íon bicarbonato (HCO_3^-). Em seguida, ocorre uma substituição nucleofílica bimolecular (S_N2), em que a 3-(quinazolin-2-ilamino)fenolato (**XXXI**) recém-formada atua como nucleófilo, atacando o carbono ligado ao iodo (**XXX**). De forma concertada, a ligação entre o nucleófilo e o carbono se forma enquanto a ligação C-I é rompida, liberando o iodeto e originando a *N*-(3-((piperidin-1-il)alcoxi)fenil)quinazolin-2-amina (**67a-b**) (Esquema 39) (Clayden; Greeves; Warren, 2012).

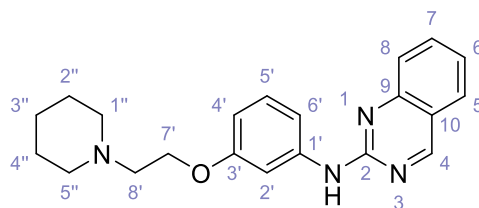


Esquema 39. Esquema de intermediários proposto para a *O*-alquilação do composto *N*-(3-((piperidin-1-il)alcoxi)fenil)quinazolin-2-amina (**67a-b**) (Adaptado de (Clayden; Greeves; Warren, 2012))

Para confirmar a formação do composto *N*-(3-((piperidin-1-il)alcoxi)fenil)quinazolin-2-amina (**67a-b**) foram realizados experimentos de determinação estrutural como RMN ^1H e ^{13}C , cujos espectros estão disponíveis nas Figura S75 à Figura S78 do Anexo 7.2.

Inicialmente, observou-se nos espectros que os sinais do núcleo *N*-fenilquinazolin-2-amina se mantiveram inalterados após a introdução do grupo piperidinil-alcoxila, confirmando que a funcionalização não afetou a estrutura central. Além disso, observou-se um tripleto variando entre δ 4,00 - 4,08 ($J = 5,8$ Hz, 2H) referente ao metileno adjacente ao oxigênio e um tripleto em δ 2,40–2,68 ppm ($J = 5,4$ Hz, 2H) que foi associado aos hidrogênios metilênicos próximos ao nitrogênio da piperidina. Para o composto **67b**, com cadeia alquila de 3 carbonos, ainda foi possível observar o sinal em δ 1,89 ppm (m , 2H).

Para confirmar que a substituição ocorre no grupo hidroxila (OH) e não na amina (NH), realizou-se a espectroscopia de RMN bidimensional (2D). Por meio do experimento HMBC, observou-se que o próton $\text{H}_{\text{N-H}}$ do composto **67a** apresenta correlações de longo alcance (J^3) com os carbonos $\text{C}_{2'}$ e $\text{C}_{4'}$, indicando a posição da substituição no grupo hidroxila (Figura 61).



Os sinais da piperidina no RMN ^1H foram observados com deslocamentos variando entre δ 2,34 – 2,45 (*sl*, 4H) para os hidrogênios adjacentes ao N ($\text{H}_{1''}$ e $\text{H}_{5''}$), δ 1,49 – 1,50 (m, 4H) para os hidrogênios $\text{H}_{2''}$ e $\text{H}_{4''}$ e δ 1,36 – 1,38 (*sl*, 2H) para os hidrogênios $\text{H}_{3''}$. No RMN ^{13}C , a amina cíclica apresentou deslocamentos em δ 54,24 – 54,48 ppm ($\text{C}_{1''}$ e $\text{C}_{5''}$), δ 25,59 – 25,67 ppm ($\text{C}_{2''}$ e $\text{C}_{4''}$) e δ 24,24 – 23,964 ppm ($\text{C}_{3''}$).

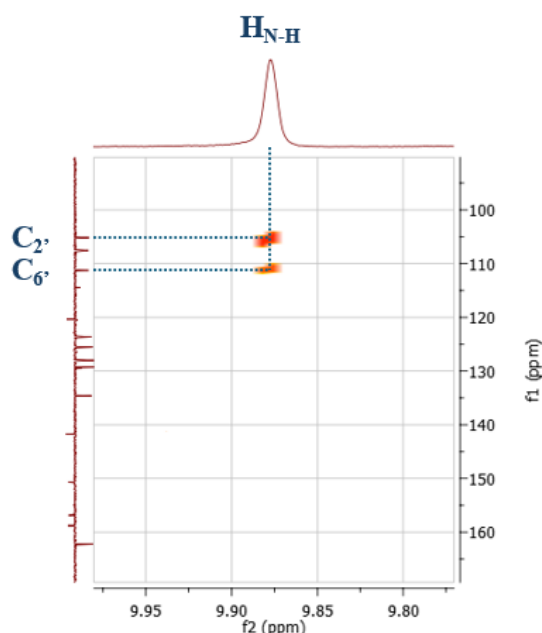


Figura 61. Espectros bidimensionais de HMBC do composto **67a** em DMSO: Visualização das correlações J^3 , entre carbono e hidrogênio.

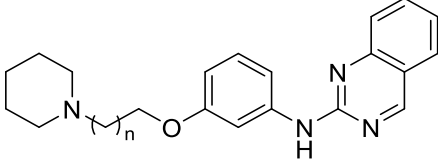
3.3.6. Resultados de atividade inibitória dos compostos obtidos frente à AChE e BChE

A atividade anticolinesterásica dos compostos **67a-b** foi determinada de acordo com o método adaptado de Ellman (De Souza et al., 2019; Ellman et al., 1961), utilizando a donepezila como composto de referência. As reações envolvidas nesse ensaio são as mesmas já discutidas anteriormente e estão representadas no Esquema 16.

Nenhum dos compostos demonstrou inibição superior a 50% para a AChE na concentração fixa de 10 μM . Já para a BChE, os compostos apresentaram uma potência

considerável, sendo o mais ativo o composto **67a**, o qual apresentou valor de $CI_{50} = 0,782 \mu M$ (Tabela 27).

Tabela 27. Resultados obtidos nos ensaios inibição enzimática frente à *EeAChE* e *EqBChE*.

				
Compostos	n	$CI_{50} (\mu M) \pm DP^a$		SI ^d
		AChE ^b	BChE ^c	
67a	2	41,8 ^e	$0,782 \pm 0,041$	< 0,08
67b	3	36,1 ^e	$1,37 \pm 0,129$	< 0,14
Donepezila	-	$0,007 \pm 0,0002$	$2,39 \pm 0,105$	341

^a Concentração necessária para inibir 50% da atividade colinesterásica, dados obtidos \pm 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 $BChE CI_{50}/AChE CI_{50}$. ^e Porcentagem de inibição de AChE em uma concentração de teste de $10 \mu M \pm DP$.

3.3.7. Ensaios do mecanismo de inibição enzimática frente à BChE

Para determinar o mecanismo de inibição dessa série de compostos, foram realizados ensaios de cinética enzimática com os compostos **67a** na BChE. Com base nos parâmetros cinéticos (K_m e V_{max}) (Tabela 19), e no perfil do gráfico de Lineweaver-Burk observou-se que o tipo de inibição promovida pelos compostos **67a** frente a enzima BChE é do tipo mista. As constantes de afinidade correspondentes aos tipos de inibição observados foram calculadas e estão apresentadas na Tabela 28.

Tabela 28. Parâmetros cinéticos de **67a** na enzima BChE

Concentração (μM)	$V_{max} \pm DP$	$K_m \pm DP$	$K_i (nM) \pm DP^a$	$K_i' (nM) \pm DP^b$
	(1×10^3 nM/min)	(1×10^3 nM)		
0	$12,13 \pm 0,095$	$109,53 \pm 4,456$		
0,6	$8,26 \pm 0,196$	$210,23 \pm 1,222$	$207,77 \pm 3,77$	$509,75 \pm 9,10$
1	$6,00 \pm 0,154$	$262,37 \pm 9,721$		

No gráfico de Lineweaver-Burk foi possível confirmar o mecanismo de inibição indicado pela análise dos parâmetros cinéticos. Na Figura 62 observa-se que as linhas de intersecção convergem à esquerda do eixo y ($1/V$) e acima do eixo x ($1/[S]$), indicando um mecanismo de inibição mista. As concentrações dos compostos utilizadas para a obtenção das curvas estão representadas nos gráficos pelo símbolo [I].

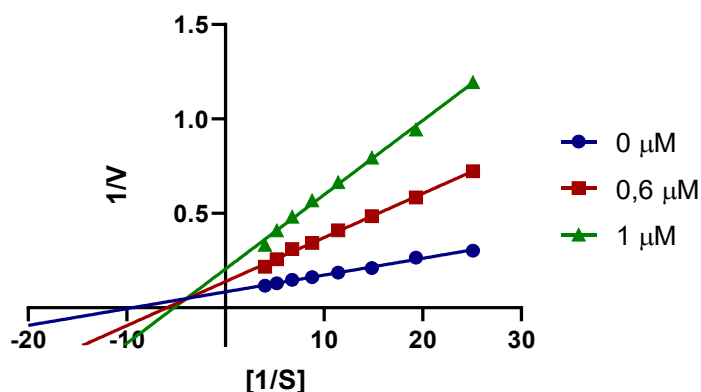


Figura 62. Gráficos de Lineweaver-Burk da cinética de inibição em *EqBChE* do composto **65a**.

3.3.8. Estudo de interação enzimática *in silico* na enzima *EeAChE*

Para a realização do estudo de ancoramento molecular (docking) entre os compostos e a enzima *EeAChE* foi utilizada as mesmas condições já expostas anteriormente e que estão descritas no item 3.1.13.

Os resultados de *score* de ligação e valores de CI_{50} obtidos para os compostos **67a-b** estão apresentados na Tabela 20, permitindo a visualização da correlação entre os dados. O detalhamento qualitativo das interações moleculares entre os ligantes e a enzima *EeAChE* está descrito na Tabela S9 do Anexo 7.1.

Tabela 29. Resultados de *score* e os respectivos valores de CI_{50} dos compostos avaliados.

Compostos	<i>EeAChE</i>	
	GoldScore	% de inibição ^e
67a	85,41	41,8
67b	81,82	36,1

^e Porcentagem de inibição de AChE em uma concentração de teste de $10 \mu M \pm DP$.

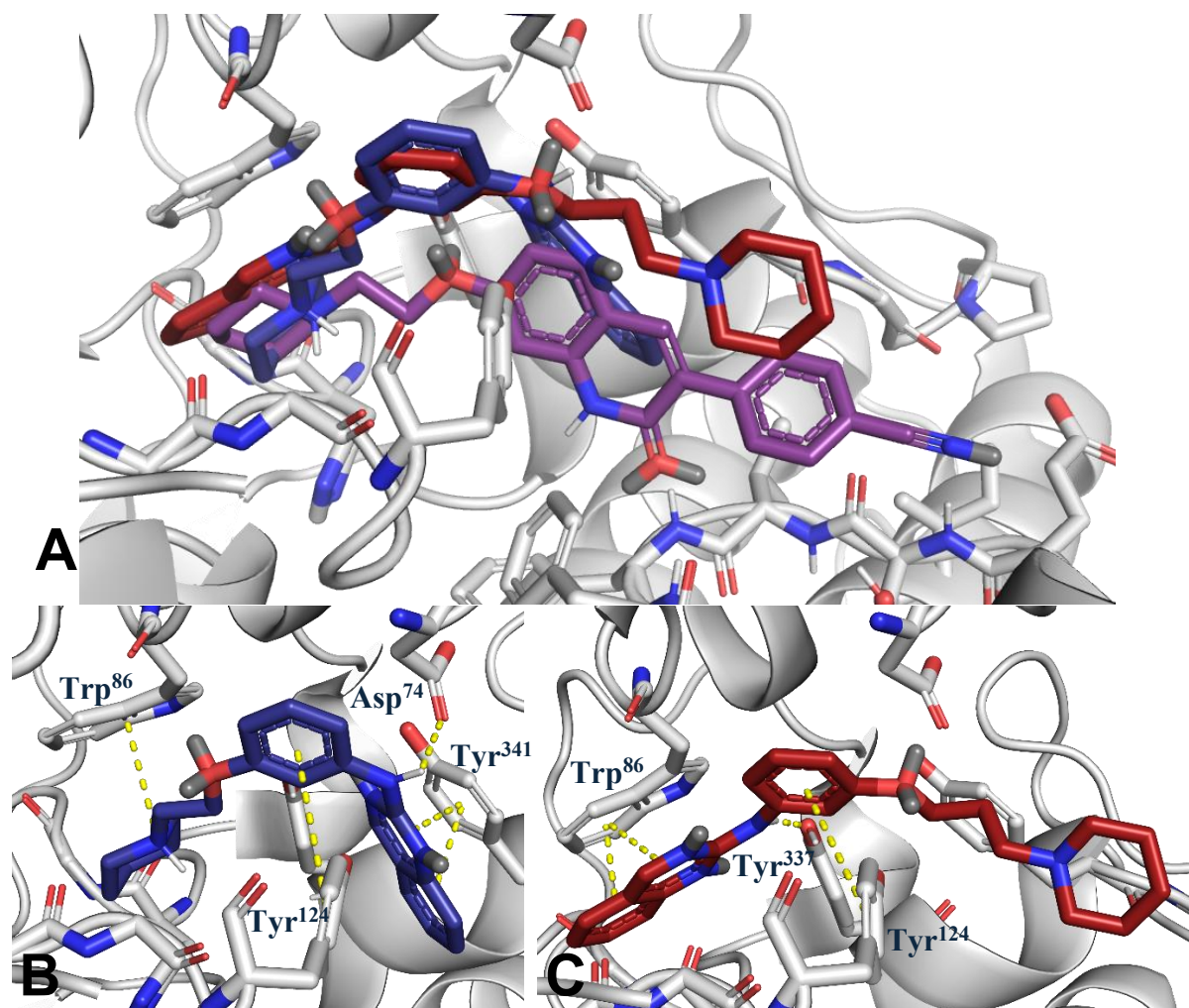


Figura 63. A) Sobreposição do composto **58e** (roxo) e os compostos **67a** (azul) e **67b** (vinho), na cavidade enzimática da AChE. B) Análise das principais interações moleculares entre o composto **67a** (azul) e C) **67b** (vinho) na cavidade enzimática da AChE. Figura gerada com PyMol 3.1.3.1 (Copyright © Schrödinger LLC).

Com base na análise das poses de ligação obtidas pelo estudo de *docking*, observou-se que os inibidores ocuparam o sítio ativo (CAS), porém de formas distintas. O grupamento amino-cíclico protonado do composto **67a** realiza interação do tipo cátion- π com o resíduo Trp⁸⁶, conforme o composto **58e** (Figura 63A). Entretanto, o restante da estrutura apresenta uma orientação completamente distinta dentro da cavidade enzimática. Essa diferença decorre da menor rigidez do núcleo fenil-2-aminoquinazolina em comparação à quinolin-2(1*H*)-ona original. A abertura do anel confere maior liberdade conformacional, resultando em uma amina secundária com geometria trigonal plana (sp^2). Essa flexibilidade permitiu ao composto explorar a cavidade enzimática e estabelecer interações diferenciadas. Contudo, tais interações mostraram-se menos eficientes em relação ao composto **58e**, o que explica a baixa atividade biológica observada contra a AChE (Figura 63B).

Para o composto **67b**, a maior liberdade conformacional resultou em uma inversão completa da orientação dentro da cavidade enzimática em comparação ao composto **58e**. Desse modo, uma interação de empilhamento π - π com o resíduo Trp86 no fundo do sítio CAS, associada à ligação de hidrogênio com o resíduo Tyr337 e ao empilhamento π - π em forma de T com o resíduo Tyr124, demonstrou definir a orientação do composto na cavidade da AChE (Figura 63C).

3.3.9. Estudo de interação enzimática *in silico* na enzima *EqBChE*

Para a realização do estudo de ancoramento molecular (docking) entre os compostos e a enzima *EqBChE* foi utilizada as mesmas condições já expostas anteriormente e que estão descritas no item 3.1.14.

Os resultados de *score* de ligação e valores de CI_{50} obtidos para os compostos **67a-b** estão apresentados na Tabela 30, permitindo a visualização da correlação entre os dados. O detalhamento qualitativo das interações moleculares entre os ligantes e a enzima *EqBChE* está descrito na Tabela S10 do Anexo 7.1.

Tabela 30. Resultados de *score* e os respectivos valores de CI_{50} dos compostos avaliados.

Compostos	<i>EqBChE</i>	
	ASP	CI_{50} (μ M) \pm DP
67a	51,31	$0,782 \pm 0,041$
67b	56,02	$1,37 \pm 0,129$

Com base na análise das poses de ligação obtidas pelo estudo de *docking*, observou-se que os inibidores ocuparam tanto o sítio ativo (CAS) quanto o sítio periférico (PAS) da enzima, exibindo orientação espacial distinta em comparação ao composto **58a** (Figura 63A). Ao contrário do observado para a AChE, a maior liberdade conformacional da amina secundária (sp^2), resultante da abertura do anel quinolin-2(1*H*)-ona, otimizou as interações dos compostos com a BChE, resultando em aumento de potência.

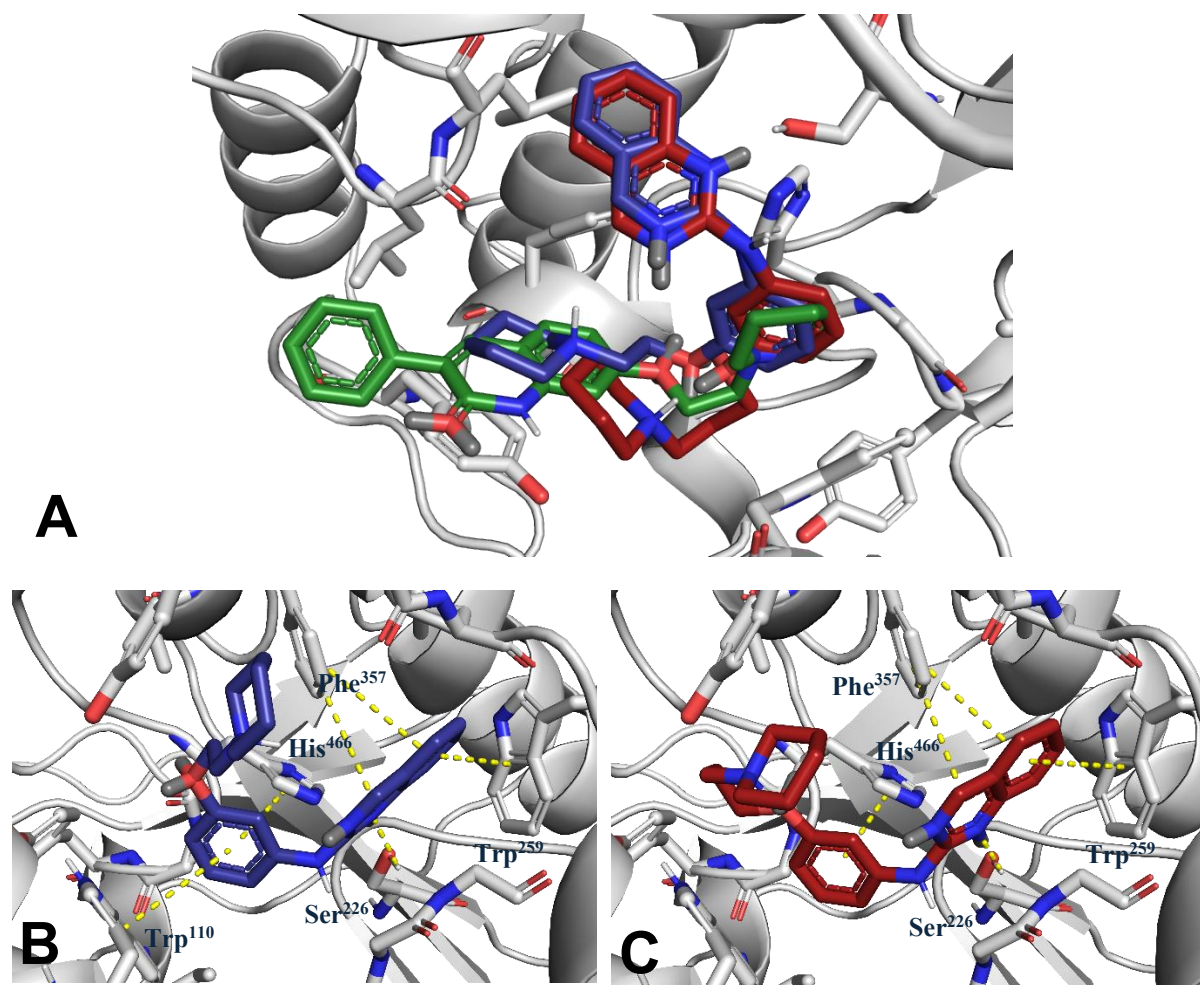
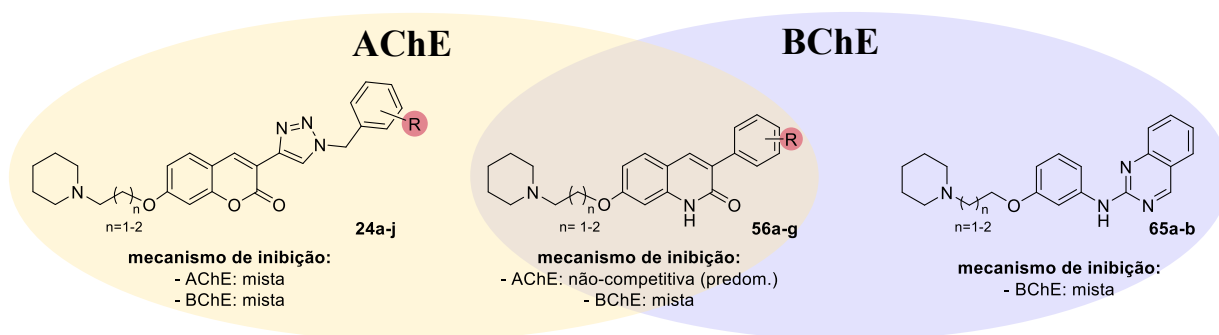


Figura 64. A) Sobreposição do composto **58a** e os compostos **67a** (azul) e **67b** (vinho), na cavidade enzimática da BChE. B) Análise das principais interações moleculares entre o composto **67a** (azul) e C) **67b** (vinho) na cavidade enzimática da BChE. Figura gerada com PyMol 3.1.3.1 (Copyright © Schrödinger LLC).

No composto **67a**, identificaram-se ligações de hidrogênio com Ser226 (2,3 Å) e empilhamentos π - π em forma de T com Trp110 (4,6 Å), Trp259 (4,4 Å), Phe357 (5,2 Å; 5,5 Å) e His466 (4,5 Å) (Figura 63B). Já o **67b**, com cadeia espaçadora estendida, perdeu a interação π - π com Trp110, mantendo apenas a ligação de hidrogênio com Ser226 (2,2 Å) e empilhamentos π - π com Trp259 (4,9 Å), Phe357 (5,2 Å; 5,5 Å) e His466 (4,5 Å) (Figura 63C). Essa redução no número de interações explica sua menor potência inibitória frente ao **67a**.

4. CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS

Neste trabalho, foram obtidos 19 compostos finais inéditos mediante uma estratégia de modificação molecular seriada, partindo de um núcleo cumarínico. Essa abordagem permitiu modular racionalmente a seletividade dos inibidores, resultando em compostos altamente seletivos para AChE (Série A), compostos de ação dual (Série B) e compostos seletivos para BChE (Série C). Esses resultados demonstram o papel crucial do esqueleto heterocíclico na determinação do perfil farmacológico (Esquema 40). Adicionalmente, a comparação entre as Série A e Série B revelou que a modificação bioisostérica do núcleo cumarínico para fenil-quinolin-2(1H)-ona (**58a-g**) alterou o mecanismo de inibição da AChE, enfatizando a sensibilidade farmacodinâmica às alterações no arcabouço molecular.



Esquema 40. Comparação entres as séries propostas.

Partindo da análise individualizada, a série A foi concluída com grande êxito resultando na obtenção de 10 novos derivados benzílicos de 3-(1,2,3-triazol)-cumarinas (**26a-j**), tendo as metodologias sintéticas e métodos de purificação propostos estabelecidos de forma satisfatória, apresentando rendimentos de razoáveis a bons. Os ensaios de inibição enzimática evidenciaram que a homologação proposta contribuiu significativamente para o aumento da potência e seletividade desses compostos frente à AChE. Além disso, demonstraram que a natureza dos substituintes ligados ao grupo benzila não afeta de modo significativo a atividade desses compostos – o que possibilita, em estudos futuros, explorar essa região na otimização de *leads* para melhorar propriedades físico-químicas. Relevante destacar que nos compostos submetidos à avaliação de citotoxicidade, observaram-se efeitos neuroprotetores e perfil não neurotóxico, com viabilidade celular $\geq 70\%$. Nesse contexto, o composto **26a** destaca-se como candidato a *lead* por combinar potência frente a AChE, perfil farmacocinético favorável e baixa toxicidade neuronal. O potencial multialvo da série A foi evidenciado pelos resultados obtidos frente a *h*H₃R e MAO-B, que destacou o composto **26j** pelo seu perfil farmacológico singular caracterizado por sua ação multialvo promissora.

A síntese da série B foi concluída com sucesso, resultando na obtenção de 7 derivados inéditos de fenil-quinolin-2(1*H*)-ona (**58a-g**). Até a etapa de formação dos intermediários-chave **60a-b**, as metodologias sintéticas e de purificação empregadas demonstraram eficiência satisfatória, com rendimentos variando de razoáveis a bons. Entretanto, a etapa crítica de síntese dos compostos **59** apresentou desafios significativos, incluindo rendimentos drasticamente reduzidos e complexidades operacionais, o que limitou a eficiência global do processo e, conseqüentemente, a obtenção de um maior número de derivados. Os ensaios de inibição enzimática das colinesterases pelos compostos **58a-g** demonstraram um perfil de inibição dual das colinesterases (ChEs), com potências de inibição promissoras. E contrariando as projeções iniciais, a maioria dos derivados demonstraram perfil de inibição não-competitivo frente a AChE, indicando interagir como um complexo ternários.

As perspectivas para a série B incluem, otimização da rota sintética para viabilizar a obtenção de mais derivados, assim como, a realização de estudos de dinâmica molecular e cristalografia para elucidar completamente o mecanismo de inibição desses compostos. Além disso, explorar o potencial multialvo da série através dos ensaios de inibição *in vitro* da agregação de placas β -amilóide, *h*H₃R, MAO-A e MAO-B, e avaliação de citotoxicidade e de proteção neuronal.

A síntese da série C foi concluída com a obtenção de 2 derivados inéditos de fenil-2-aminoquinazolina (**67a-b**), apresentando metodologias sintéticas e de purificação com eficiência satisfatória e com rendimentos razoáveis. Os ensaios de inibição enzimática das colinesterases pelos compostos **67a-b** demonstraram que os compostos são capazes de inibir a BChE de forma eficiente, e com mecanismo de inibição misto.

As perspectivas para a série C – que representa uma potencial otimização em relação à série B – incluem sua ampliação via exploração de substituintes no anel quinazolinico, visando aprimorar a atividade frente a BChE. Além disso, explorar o potencial multialvo da série através dos ensaios de inibição *in vitro* da agregação de placas β -amilóide, *h*H₃R, MAO-A e MAO-B, e avaliação de citotoxicidade e de proteção neuronal.

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 ultravioleta (254 e 365 nm).

A purificação dos compostos foi realizada a partir da técnica de cromatografias líquida de adsorção em coluna flash, Isolera Biotage, modelo ISO-4SV (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.

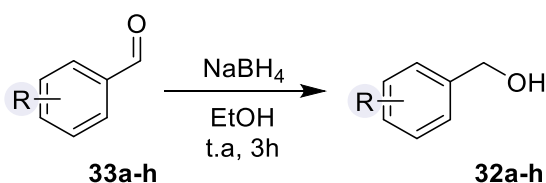
Os espectros de RMN¹H foram obtidos em aparelhos Bruker Avance-500 e Bruker Avance-400 (IQ-UFRRJ), operando a 500MHz e 400MHz, respectivamente. As amostras foram dissolvidas em CDCl₃ e DMSO-d₆, contendo tetrametilsilano (TMS) como referência interna e colocadas em tubos de 5 mm de diâmetro. Os espectros 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-dubeto / t-tripeto / q-quarteto / m-multipeto / dd-duplo dubeto.

Os pontos de fusão foram determinados em aparelho GEHAKA modelo PF 1500 FARMA e os valores não foram corrigidos.

5.1. SERIE A

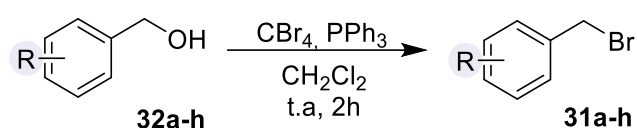
5.1.1. Síntese da álcoois benzílicos (32a-h)



Em tubo borossilicato reforçado, seco em chama, foi preparada uma solução com 3 mmol do benzaldeído (**33a-h**) em 2,97 mL de EtOH, sob atmosfera de N₂ e então resfriada a 0°C. A essa solução foram adicionados 4,5 mmol de NaBH₄ em uma única fração e a mistura reacional

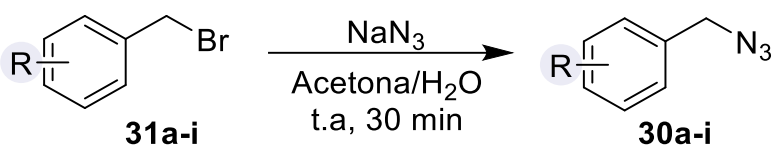
foi submetida a agitação em temperatura ambiente por 3 horas. Após a confirmação do consumo completo do reagente observado por CCD (Hexano:AcOEt 10%), a reação foi interrompida uma solução de NaOH 10% e agitada por aproximadamente 10 minutos. A mistura bruta foi concentrada em em rotaevaporador para remover o EtOH e em seguida foi extraída com DCM (3 vezes), e as camadas orgânicas combinadas foram secas com Na₂SO₄ e concentrada à vácuo, para obter o produto álcool correspondente, que foi utilizado na etapa seguinte sem purificação adicional (Senaweera; Weaver, 2017).

5.1.2. Síntese dos brometos de benzila (31a-h)



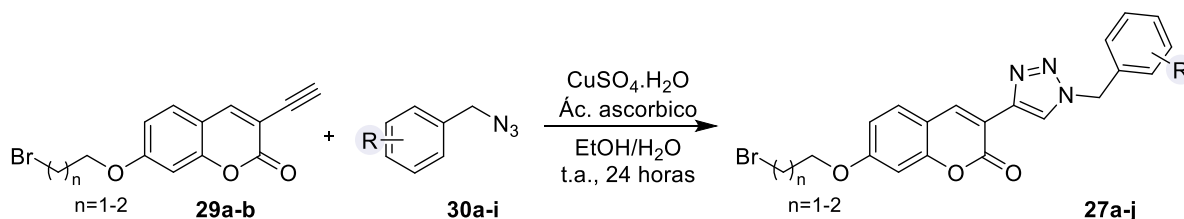
Em um tubo de borosilicato reforçado, preparou-se uma solução de 1,75 mmol de álcool benzílico (**31a-h**) em diclorometano (8,6 mL), ao qual foram adicionados 1,75 mmol de tetrabrometo de carbono e 1,75 mmol de trifenilfosfina. A mistura reacional foi agitada à temperatura ambiente por 2 horas e monitorada por CCD (Hexano:AcOEt 10%). Após o consumo completo do álcool benzílico, o solvente foi removido por evaporação sob pressão reduzida, e o brometo de benzila formado foi utilizado na etapa seguinte sem purificação adicional.

5.1.3. Síntese das benzil azidas (30a-i)



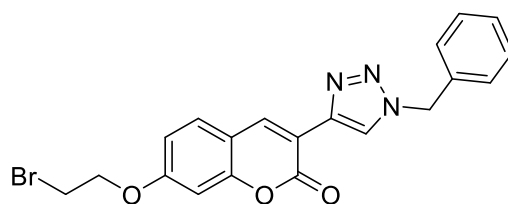
Em um tubo de borosilicato reforçado, solubilizou-se 1,75 mmol de brometo de benzila (**31a-i**) em água/acetona (1:3), seguida da adição de 3,50 mmol de NaN₃. A reação foi mantida em agitação durante 30 minutos à temperatura ambiente. Ao fim da reação, a mistura reacional foi extraída com diclorometano e lavada com água. A fase orgânica foi seca com Na₂SO₄ anidro e concentrada sob vácuo. Os produtos obtidos (**30a-i**) foram purificados em coluna cromatográfica flash no equipamento Isolera, com fase estacionária de sílica em gel e utilizando como fase móvel mistura de hexano:acetato de etila em gradiente de concentração de 10-30% do solvente mais polar.

5.1.4. Síntese de 3-(1-R-benzil-1*H*-1,2,3-triazol-4-il)-7-(bromoalcoxi)-cumarinas (27a-j)



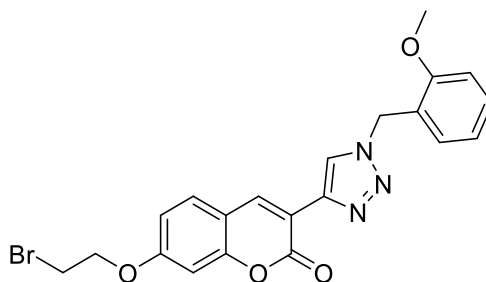
Em um tubo de borosilicato reforçado foram solubilizados 1 mmol de 3-(etenil)-7-(bromoalcoxi)-cumarina (**29a-b**) e 1,3 mmol de benzil azida (**30a-i**) em água e etanol (v/v= 1:1, mL). Em seguida foi adicionado uma solução previamente preparada de 0,2 mmol de ascorbato de sódio dissolvido em 2 mL de água. Seguido pela adição de outra solução previamente preparada de 0,05 mmol de CuSO_4 .pentahidratado 7.5 % 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 à vácuo e lavado com água gelada. Os produtos obtidos (**27a-i**) foram purificados em coluna cromatográfica flash no equipamento Isolera, com fase estacionária 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

7-(2-bromoetoxi)-3-(1-benzil-1*H*-1,2,3-triazol-4-il)-2*H*-cromen-2-ona (**27a**)



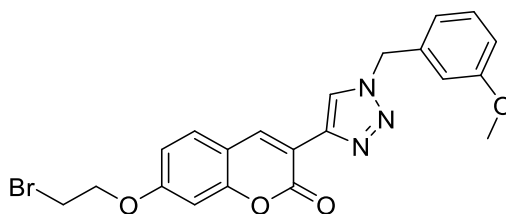
O composto **27a** foi obtido como um óleo marrom em 57% de rendimento. ^1H RMN (500 MHz, CDCl_3): δ = 8,61 (s, 1H); 8,25 (s, 1H); 7,53 (d, J = 8,7 Hz, 1H); 7,32 (t, J = 7,8 Hz, 4H); 7,27 (s, 1H); 6,89 (dd, J = 8,6, 2,1 Hz, 1H); 6,81 (sl, 1H); 5,53 (s, 2H); 4,32 (t, J = 6,0 Hz, 2H); 3,63 (t, J = 6,0 Hz, 2H). ^{13}C RMN (126 MHz, CDCl_3): δ = 161,64; 160,22; 155,07; 141,56; 138,15; 134,73; 130,00; 129,44; 129,12; 128,35; 123,89; 115,15; 113,81; 113,73; 101,62; 77,16; 68,57; 54,63; 28,72.

7-(2-bromoetoxi)-3-(1-(2-metoxibenzil)-1*H*-1,2,3-triazol-4-il)-2*H*-cromen-2-ona (27b)



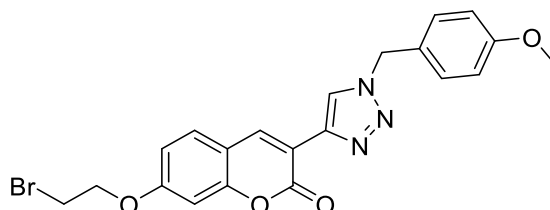
O composto **27b** foi obtido como um sólido amarelo em 46% de rendimento. Ponto de degradação na faixa de 180-182°C. **¹H RMN (500 MHz, CDCl₃):** δ = 8,67 (s, 1H); 8,32 (s, 1H); 7,53 (d, J = 8,6 Hz, 1H); 7,34 (t, J = 7,3 Hz, 1H); 7,25 (t, J = 7,3 Hz, 1H); 6,99 – 6,88 (m, 1H); 6,85 (d, J = 2,1 Hz, 1H); 5,60 (s, 2H); 4,36 (t, J = 6,2 Hz, 2H); 3,89 (s, 3H); 3,68 (t, J = 6,1 Hz, 2H). **¹³C RMN (126 MHz, CDCl₃):** δ = 161,44; 160,12; 157,63; 155,16; 137,61; 130,77; 130,66; 129,89; 124,25; 123,29; 121,32; 115,90; 113,99; 113,70; 111,21; 101,76; 77,16; 68,63; 55,89; 49,70; 28,75.

7-(2-bromoetoxi)-3-(1-(3-metoxibenzil)-1*H*-1,2,3-triazol-4-il)-2*H*-cromen-2-ona (27c)



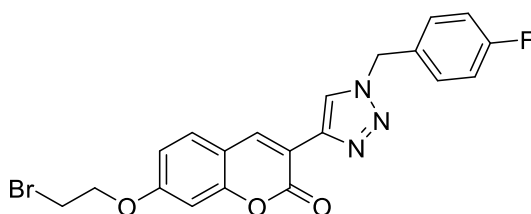
O composto **27c** foi obtido como um sólido branco em 37% de rendimento. Ponto de degradação na faixa de 188-191°C. **¹H RMN (500 MHz, CDCl₃):** δ = 8,70 (s, 1H); 8,29 (s, 1H); 7,55 (d, J = 8,5 Hz, 1H); 7,29 (t, J = 7,9 Hz, 1H); 6,96 – 6,78 (m, 5H); 5,55 (s, 2H); 4,37 (t, J = 6,0 Hz, 2H); 3,79 (s, 3H); 3,68 (t, J = 6,0 Hz, 2H). **¹³C RMN (126 MHz, CDCl₃):** δ = 161,79; 160,58; 159,86; 154,93; 141,57; 137,66; 136,07; 130,38; 129,71; 120,40; 115,31; 114,41; 113,76; 113,69; 113,52; 101,44; 77,16; 68,34; 55,45; 54,39; 28,53.

7-(2-bromoetoxi)-3-(1-(4-metoxibenzil)-1*H*-1,2,3-triazol-4-il)-2*H*-cromen-2-ona (27d)



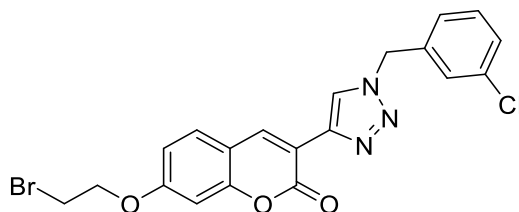
O composto **27d** foi obtido como um sólido bege em 21% de rendimento. Ponto de degradação na faixa de 197-200°C. **¹H RMN (500 MHz, CDCl₃):** δ = 8,68 (s, 1H); 8,25 (s, 1H); 7,54 (d, J = 8,7 Hz, 1H); 7,28 – 7,22 (m, 2H); 6,93 – 6,89 (m, 3H); 6,85 (d, J = 2,0 Hz, 1H); 5,55 (s, 2H); 4,36 (t, J = 6,1 Hz, 2H); 3,81 (s, 3H); 3,68 (t, J = 6,1 Hz, 2H). **¹³C RMN (126 MHz, CDCl₃):** δ = 161,30; 160,14; 159,83; 154,97; 141,40; 137,54; 129,82; 129,69; 126,70; 123,39; 115,47; 114,70; 113,70; 113,51; 101,55; 68,41; 55,50; 54,03; 28,46.

7-(2-bromoetoxi)-3-(1-(4-fluorbenzil)-1*H*-1,2,3-triazol-4-il)-2*H*-cromen-2-ona (27e)



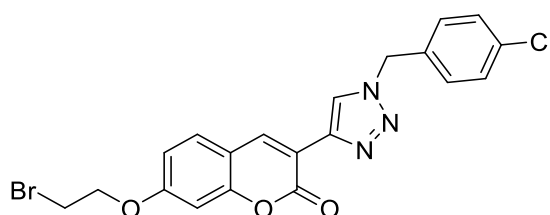
O composto **27e** foi obtido como um sólido amarelo em 10% de rendimento. Ponto de fusão na faixa de 193-196°C. **¹H RMN (500 MHz, CDCl₃):** δ = 8,69 (s, 1H); 8,29 (s, 1H); 7,55 (d, J = 8,6 Hz, 1H); 7,31 (dd, J = 8,3, 5,3 Hz, 1H); 7,07 (t, J = 8,5 Hz, 1H); 6,93 (dd, J = 8,6, 2,2 Hz, 1H); 6,86 (d, J = 2,0 Hz, 1H); 5,55 (s, 2H); 4,37 (t, J = 6,1 Hz, 1H); 3,68 (t, J = 6,1 Hz, 1H). **¹³C RMN (126 MHz, CDCl₃):** δ = 161,35; 159,86; 154,96; 141,56; 137,73; 130,15; 130,08; 129,73; 123,46; 116,40; 116,23; 115,23; 113,60; 113,56; 101,49; 77,16; 68,37; 53,69; 28,50.

7-(2-bromoetoxi)-3-(1-(3-clorobenzil)-1*H*-1,2,3-triazol-4-il)-2*H*-cromen-2-ona (27f)



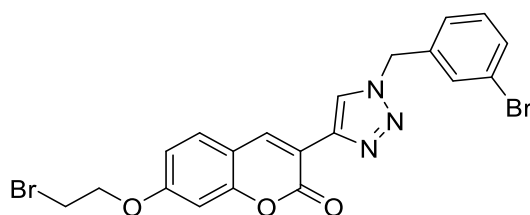
O composto **27f** foi obtido como um sólido amarelo em 12% de rendimento. Ponto de fusão na faixa de 177-179°C. **¹H RMN (500 MHz, CDCl₃):** δ = 8,70 (s, 1H); 8,31 (s, 1H); 7,55 (d, J = 8,6 Hz, 1H); 7,35 (m, 3H); 7,19 (d, J = 6,7 Hz, 1H); 6,93 (dd, J = 8,6, 2,2 Hz, 1H); 6,86 (d, J = 1,8 Hz, 1H); 5,56 (s, 2H); 4,37 (t, J = 6,0 Hz, 1H); 3,68 (t, J = 6,1 Hz, 1H). **¹³C RMN (126 MHz, CDCl₃):** δ = 161,38; 159,86; 154,98; 141,66; 137,81; 136,61; 135,21; 130,58; 129,75; 129,30; 129,19; 128,25; 126,22; 123,63; 115,19; 113,59; 113,57; 101,50; 68,38; 53,71; 28,36.

7-(2-bromoetoxi)-3-(1-(4-clorobenzil)-1*H*-1,2,3-triazol-4-il)-2*H*-cromen-2-ona (27g)



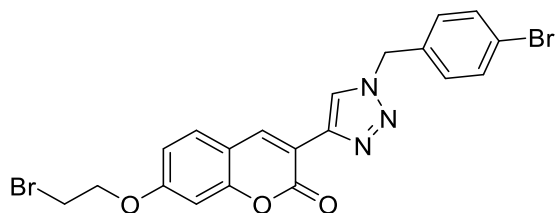
O composto **27g** foi obtido como um sólido amarelo em 44% de rendimento. Ponto de fusão na faixa de 177-179°C. **¹H RMN (500 MHz, CDCl₃):** δ = 8,69 (s, 1H); 8,29 (s, 1H); 7,55 (d, J = 8,6 Hz, 1H); 7,35 (d, J = 8,3 Hz, 2H); 7,25 (J = 8,1 Hz, 2H); 6,93 (dd, J = 8,6, 2,1 Hz, 2H); 6,86 (d, J = 1,9 Hz, 1H); 5,55 (s, 2H); 4,37 (t, J = 6,1 Hz, 3H); 3,68 (t, J = 6,1 Hz, 4H). **¹³C RMN (126 MHz, CDCl₃):** δ = 161,14; 159,58; 154,74; 141,37; 137,51; 134,78; 132,94; 129,49; 129,27; 123,30; 114,97; 113,37; 113,31; 101,29; 77,16; 68,16; 53,44; 28,20.

7-(2-bromoetoxi)-3-(1-(3-bromobenzil)-1*H*-1,2,3-triazol-4-il)-2*H*-cromen-2-ona (27h)



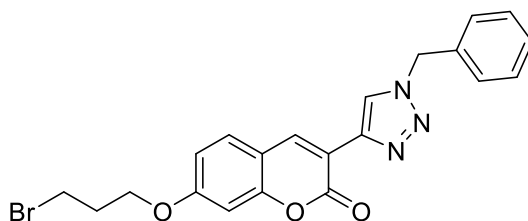
O composto **27h** foi obtido como um sólido amarelo em 12% de rendimento. Ponto de fusão na faixa de 185-189°C. **¹H RMN (500 MHz, CDCl₃):** δ = 8,70 (s, 1H); 8,31 (s, 1H); 7,55 (d, J = 8,6 Hz, 1H); 7,49 (d, J = 7,0 Hz, 1H); 7,46 (s, 1H); 7,24 (m, 2H); 6,93 (dd, J = 8,6, 2,3 Hz, 1H); 6,86 (d, J = 2,1 Hz, 1H); 5,55 (s, 2H); 4,37 (t, J = 6,1 Hz, 2H); 3,68 (t, J = 6,1 Hz, 2H). **¹³C RMN (126 MHz, CDCl₃):** δ = 161,12; 159,60; 154,72; 141,41; 137,56; 136,60; 131,87; 130,89; 130,58; 129,49; 126,44; 123,36; 123,03; 114,92; 113,33; 113,31; 101,24; 77,16; 68,12; 53,38; 28,24.

7-(2-bromoetoxi)-3-(1-(3-bromobenzil)-1*H*-1,2,3-triazol-4-il)-2*H*-cromen-2-ona (27i)



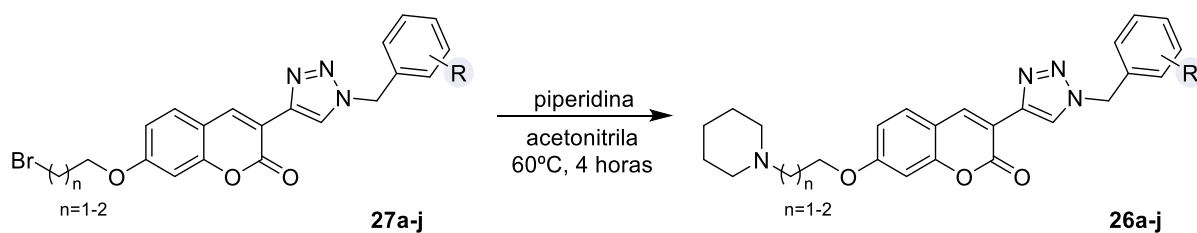
O composto **27i** foi obtido como um sólido laranja em 16% de rendimento. Ponto de fusão na faixa de 211-214°C. **¹H RMN (500 MHz, CDCl₃):** δ = 8,70 (s, 1H); 8,30 (s, 1H); 7,74 – 7,39 (m, 3H); 7,20 (s, 2H); 6,93 (d, J = 7,8 Hz, 1H); 6,86 (s, 1H); 5,54 (s, 2H); 4,37 (s, 2H); 3,68 (s, 2H). **¹³C RMN (126 MHz, CDCl₃):** δ = 161,64; 160,09; 155,23; 141,88; 138,07; 133,92; 132,73; 130,08; 130,01; 127,95; 123,81; 123,40; 115,38; 113,83; 101,74; 77,16; 68,63; 54,01; 28,75.

3-(1-benzil-1*H*-1,2,3-triazol-4-il)-7-(3-bromopropoxi)-2*H*-cromen-2-ona (27j)



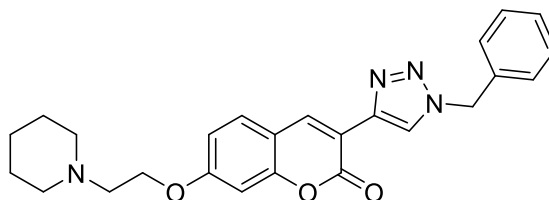
O composto **27j** foi obtido como um sólido amarelo em 33% de rendimento. Ponto de degradação na faixa de 179-180°C. **¹H RMN (500 MHz, CDCl₃):** δ = 8,70 (s, 1H); 8,29 (s, 1H); 7,53 (d, J = 8,6 Hz, 1H); 7,42 – 7,28 (m, 2H); 6,90 (d, J = 8,5 Hz, 1H); 6,87 (s, 1H); 5,58 (s, 1H); 4,19 (t, J = 5,6 Hz, 1H); 3,62 (t, J = 6,2 Hz, 1H); 2,39 – 2,34 (m, 1H). **¹³C RMN (126 MHz, CDCl₃):** δ = 162,00; 159,96; 155,04; 137,78; 134,69; 129,58; 129,29; 128,94; 128,21; 123,54; 115,03; 113,50; 113,28; 101,30; 77,16; 66,05; 54,45; 32,09; 29,70.

5.1.5. Síntese da 3-(1-R-benzil-1*H*-1,2,3-triazol-4-il)-7-(3-(piperidin-1-il)alcoxi)-cumarina (26a-j)



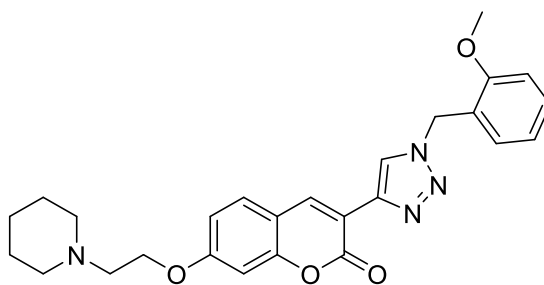
Em um tubo de borosilicato reforçado, foram adicionados 1 mmol dos respectivos derivados 3-(1-R-benzil-1*H*-1,2,3-triazol-4-il)-7-(bromoalcoxi)-cumarina (**27a-j**), que foram solubilizados em 15 mL de acetonitrila. Em seguida, foram adicionados 3 mmol de piperidina (**28**). O tubo foi então selado, e a mistura submetida à agitação magnética e aquecimento a 60°C por 4 horas. Após a confirmação do consumo completo do reagente, observada por CCD (DCM:MeOH 10%), a acetonitrila foi evaporada em rot evaporador. Os respectivos produtos foram purificados utilizando o equipamento Isolera, com fase estacionária de sílica e fase móvel composta por uma mistura de diclorometano e metanol em gradiente de concentração de 0-20% do solvente mais polar.

3-(1-benzil-1*H*-1,2,3-triazol-4-il)-7-[2-(piperidin-1-il)etoxi]-2*H*-cromen-2-ona (**26a**)



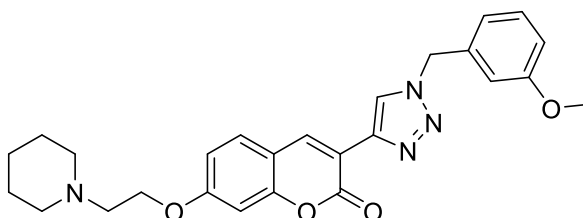
O composto **26a** foi obtido como um óleo marrom em 40% de rendimento. ¹H RMN (500 MHz, CDCl₃): δ = 8,59 (s, 1H); 8,24 (s, 1H); 7,50 (d, *J* = 8,5, 1H); 7,35 -7,28 (m, 3H); 7,25 (m, 2H); 6,86 (dd, *J* = 8,7, 2 Hz, 1H); 6,81 (d, *J* = 1,6, 1H); 5,52 (s, 1H); 4,15 (t, *J* = 5,5 Hz, 2H); 2,82 (t, *J* = 5,4 Hz, 2H), 2,54 (sl, 4H); 1,51 (m, 4H); 1,41 (m, 2H). ¹³C RMN (126 MHz, CDCl₃): δ = 161,96; 160,06; 154,87; 141,37; 138,04; 134,47; 129,61; 129,16; 128,83; 128,06; 123,56; 114,54; 113,57; 113,10; 101,21; 68,91; 57,28; 54,82; 54,34; 25,24; 23,71.

3-[1-(2-metoxibenzil)-1*H*-1,2,3-triazol-4-il]-7-[2-(piperidin-1-il)etoxi]-2*H*-cromen-2-ona (**26b**)



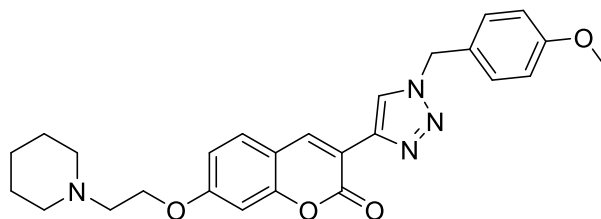
O composto **26b** foi obtido como um sólido marrom claro em 55% de rendimento. Ponto de fusão na faixa de 140-144°C. **¹H RMN (500 MHz, CDCl₃):** δ = 8,66 (s, 1H); 8,31 (s, 1H); 7,50 (d, J = 8,6 Hz, 1H); 7,33 (t, J = 7,9 Hz, 1H); 7,25 (t, J = 7,9 Hz, 1H); 6,94 (m, J = 14,5, 2H); 6,90 (dd, J = 8,7, 2,3 Hz, 1H); 6,85 (d, J = 1,9 Hz, 1H); 5,60 (s, 2H); 4,18 (t, J = 5,9 Hz, 2H); 3,89 (s, 3H); 2,82 (t, J = 5,7 Hz, 2H); 2,53 (s, 4H); 1,77 – 1,54 (m, 4H); 1,46 (s, 1H). **¹³C RMN (126 MHz, CDCl₃):** δ = 162,13; 160,05; 157,39; 155,05; 141,08; 137,59; 130,49; 130,40; 129,42; 123,90; 123,11; 121,07; 115,21; 113,66; 113,24; 110,97; 101,37; 77,16; 66,83; 57,74; 55,65; 55,23; 49,42; 26,01; 24,25.

3-[1-(3-metoxibenzil)-1H-1,2,3-triazol-4-il]-7-[2-(piperidin-1-il)etoxi]-2H-cromen-2-ona (26c)



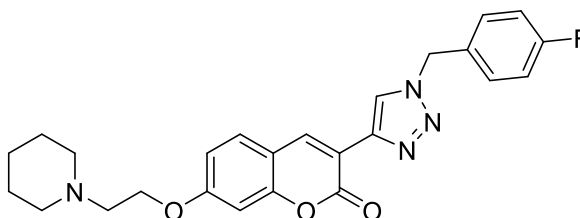
O composto **26c** foi obtido como um sólido amarelo em 44% de rendimento. Ponto de fusão na faixa de 141-143°C. **¹H RMN (500 MHz, CDCl₃):** δ = 8,68 (s, 1H); 8,28 (s, 1H); 7,51 (d, J = 8,7 Hz, 1H); 7,29 (t, J = 7,9 Hz, 1H); 6,89 (td, J = 8,3, 2,0 Hz, 3H); 6,84 (d, J = 14,0 Hz, 2H); 5,54 (s, 2H); 4,17 (t, J = 5,9 Hz, 2H); 3,78 (s, 3H); 2,81 (t, J = 5,9 Hz, 2H); 2,51 (s, 4H); 1,61 (dt, J = 11,0, 5,5 Hz, 4H); 1,45 (s, 2H). **¹³C RMN (126 MHz, CDCl₃):** δ = 162,23; 160,23; 160,02; 155,05; 141,57; 137,85; 136,12; 130,35; 129,47; 123,52; 120,39; 114,85; 114,41; 113,73; 113,10; 101,31; 77,16; 66,79; 57,71; 55,44; 55,20; 54,36; 25,99; 24,23.

3-[1-(4-metoxibenzil)-1*H*-1,2,3-triazol-4-il]-7-[2-(piperidin-1-il)etoxi]-2H-cromen-2-ona (26d)



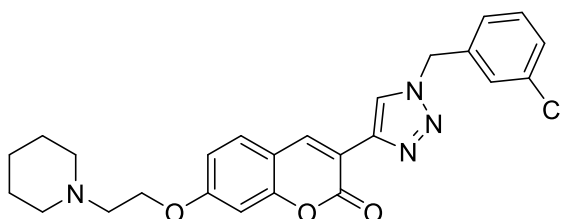
O composto **26d** foi obtido como um sólido amarelo em 85% de rendimento. Ponto de fusão na faixa de 131-136°C. **¹H RMN (500 MHz, CDCl₃):** δ = 8,67 (s, 1H); 8,24 (s, 1H); 7,50 (d, J = 8,7 Hz, 1H); 7,27 (d, J = 9,1 Hz, 3H); 6,89 (d, J = 8,5 Hz, 3H); 6,85 (d, J = 1,8 Hz, 1H); 5,50 (s, 2H); 4,17 (t, J = 5,9 Hz, 2H); 3,80 (s, 3H); 2,81 (t, J = 5,9 Hz, 2H); 2,52 (s, 4H); 1,68 – 1,56 (m, J = 11,0, 5,5 Hz, 4H), 1,45 (sl, 2H). **¹³C RMN (126 MHz, CDCl₃):** δ = 162,19; 160,05; 160,02; 155,03; 141,48; 137,78; 129,80; 129,45; 126,69; 123,26; 114,89; 114,63; 113,71; 113,11; 101,29; 77,16; 66,77; 57,70; 55,48; 55,19; 53,99; 25,98; 24,23.

3-[1-(4-fluorbenzil)-1*H*-1,2,3-triazol-4-il]-7-[2-(piperidin-1-il)etoxi]-2H-cromen-2-ona (26e)



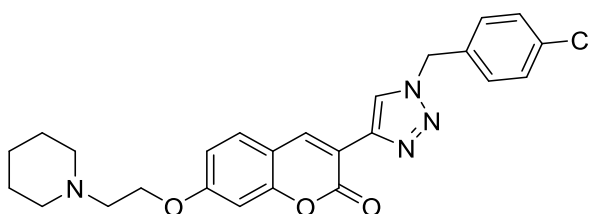
O composto **26e** foi obtido como um sólido amarelo em 45% de rendimento. Ponto de fusão na faixa de 167-169°C. **¹H RMN (500 MHz, CDCl₃):** δ = 8,69 (s, 1H); 8,28 (s, 1H); 7,58 – 7,45 (m, 2H); 7,36 – 7,28 (m, 2H); 7,07 (t, J = 8,3 Hz, 2H); 6,91 (d, J = 8,3 Hz, 2H); 6,86 (s, 1H); 5,55 (s, 2H); 4,18 (s, 2H); 2,82 (s, 2H); 2,52 (sl, 4H); 1,62 (sl, 4H); 1,45 (sl, 2H). **¹³C RMN (126 MHz, CDCl₃):** δ = 162,29; 160,04; 155,07; 141,69; 137,96; 135,40; 133,35; 130,13; 130,07; 129,50; 123,36; 116,38; 116,21; 114,73; 113,78; 113,07; 101,31; 77,16; 66,82; 57,71; 55,21; 53,66; 26,00; 24,24.

3-[1-(3-clorobenzil)-1*H*-1,2,3-triazol-4-il]-7-[2-(piperidin-1-il)etoxi]-2*H*-cromen-2-ona
(26f)



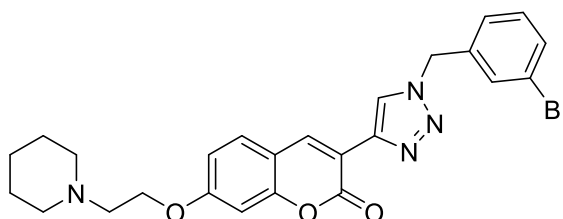
O composto **26f** foi obtido como um sólido amarelo em 94% de rendimento. Ponto de fusão na faixa de 143-144°C. **¹H RMN (500 MHz, CDCl₃):** δ = 8,69 (s, 1H); 8,31 (s, 1H); 7,51 (d, J = 8,4 Hz, 1H); 7,35 – 7,28 (m, 3H); 7,18 (d, J = 5,9 Hz, 1H); 6,91 (d, J = 8,0 Hz, 1H); 6,86 (sl, 1H); 5,55 (s, 2H); 4,17 (s, 2H); 2,81 (s, 2H); 2,52 (s, 4H); 1,61 (m, 4H); 1,45 (sl, 2H). **¹³C RMN (126 MHz, CDCl₃):** δ = 162,29; 160,03; 155,08; 141,77; 138,03; 136,64; 130,56; 129,52; 129,15; 128,23; 126,20; 123,53; 114,68; 113,77; 113,07; 101,32; 77,16; 66,76; 57,67; 55,17; 53,68; 25,94; 24,21.

3-[1-(4-clorobenzil)-1*H*-1,2,3-triazol-4-il]-7-[2-(piperidin-1-il)etoxi]-2*H*-cromen-2-ona
(26g)



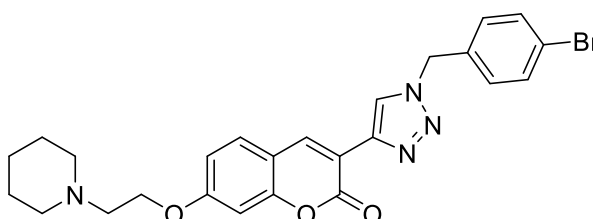
O composto **26g** foi obtido como um sólido amarelo em 87% de rendimento. Ponto de fusão na faixa de 157-161°C. **¹H RMN (500 MHz, CDCl₃):** δ = 8,68 (s, 1H); 8,29 (s, 1H); 7,51 (d, J = 8,6 Hz, 1H); 7,35 (d, J = 8,3 Hz, 2H); 7,25 (d, J = 8,4 Hz, 2H); 6,91 (dd, J = 8,6, 1,9 Hz, 1H); 6,86 (s, 1H); 5,55 (s, 2H); 4,17 (t, J = 5,9 Hz, 2H); 2,81 (t, J = 5,8 Hz, 2H); 2,51 (s, 4H); 1,64 – 1,57 (m, 4H); 1,45 (s, 2H). **¹³C RMN (126 MHz, CDCl₃):** δ = 162,62; 160,27; 155,39; 142,02; 138,23; 135,27; 133,51; 129,79; 129,76; 123,69; 115,01; 114,05; 113,36; 101,65; 77,16; 67,20; 58,01; 55,50; 53,93; 26,32; 24,54.

3-[1-(3-bromobenzil)-1*H*-1,2,3-triazol-4-il]-7-[2-(piperidin-1-il)etoxi]-2H-cromen-2-ona (26h)



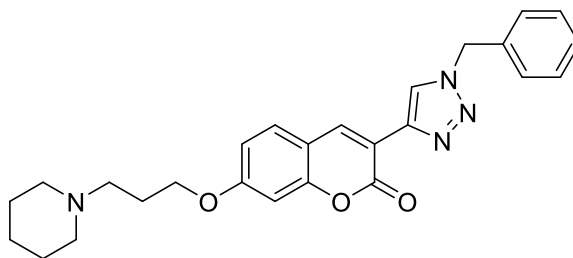
O composto **26h** foi obtido como um sólido amarelo em 74% de rendimento. Ponto de fusão na faixa de 143-144°C. **¹H RMN (500 MHz, CDCl₃):** δ = 8,69 (s, 1H); 8,31 (s, 1H); 7,62 – 7,41 (m, 3H); 7,25 (d, J = 7,2 Hz, 1H); 6,91 (d, J = 8,4 Hz, 1H); 6,86 (sl, 1H); 5,54 (s, 2H); 4,17 (t, J = 5,6 Hz, 2H); 2,81 (t, J = 5,6 Hz, 3H); 2,51 (sl, 4H); 1,74 – 1,52 (m, 4H); 1,45 (sl, 2H). **¹³C RMN (126 MHz, CDCl₃):** δ = 162,31; 160,03; 155,08; 141,78; 138,03; 136,88; 132,09; 131,12; 130,82; 129,51; 126,68; 123,52; 123,25; 114,66; 113,78; 113,05; 101,30; 77,16; 66,81; 57,71; 55,21; 53,60; 26,00; 24,24.

3-[1-(4-bromobenzil)-1*H*-1,2,3-triazol-4-il]-7-[2-(piperidin-1-il)etoxi]-2H-cromen-2-ona (26i)



O composto **26i** foi obtido como um sólido amarelo em 73% de rendimento. Ponto de fusão na faixa de 153-156°C. **¹H RMN (500 MHz, CDCl₃):** δ = 8,68 (s, 1H); 8,29 (s, 1H); 7,51 (dd, J = 8,5, 2,4 Hz, 3H); 7,19 (d, J = 8,2 Hz, 2H); 6,91 (dd, J = 8,6, 1,7 Hz, 1H); 6,86 (sl, 1H); 5,53 (s, 2H); 4,17 (t, J = 5,9 Hz, 2H); 2,80 (t, J = 5,8 Hz, 2H); 2,51 (sl, 4H); 1,63 – 1,59 (m, 4H); 1,45 (sl, 2H). **¹³C RMN (126 MHz, CDCl₃):** δ = 162,33; 160,03; 155,09; 141,74; 138,00; 133,73; 132,45; 129,81; 129,51; 123,43; 123,10; 114,66; 113,80; 113,05; 101,31; 77,16; 66,86; 57,74; 55,23; 53,71; 26,04; 24,26.

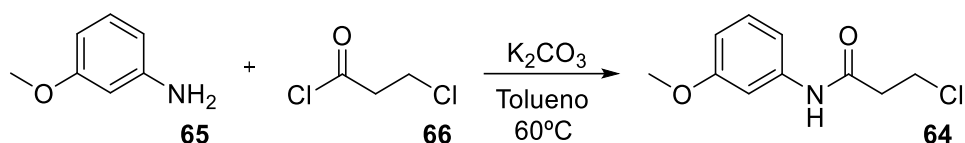
3-(1-benzil-1*H*-1,2,3-triazol-4-il)-7-[2-(piperidin-1-il)propoxi]-2H-cromen-2-ona (26j)



O composto **26j** foi obtido como um sólido amarelo em 64% de rendimento. Ponto de fusão na faixa de 158 – 163°C. ¹H RMN (500 MHz, CDCl₃): δ = 8,68 (s, 1H); 8,28 (s, 1H); 7,51 (d, *J* = 8,7 Hz, 1H); 7,39 – 7,35 (m, 3H); 7,32 – 7,30 (m, 2H); 6,88 (dd, *J* = 8,6, 2,2 Hz, 1H); 6,84 (d, *J* = 2,0 Hz, 1H); 5,58 (s, 2H); 4,10 (t, *J* = 6,1 Hz, 2H); 2,67 – 2,61 (m, 6H); 2,15 (sl, 2H); 1,73 (sl, 4H); 1,51 (sl, 2H). ¹³C RMN (126 MHz, CDCl₃): δ = 162,47; 160,25; 155,30; 141,82; 138,08; 134,95; 129,78; 129,53; 129,18; 128,46; 123,75; 115,14; 113,73; 113,38; 101,52; 77,16; 67,16; 55,95; 54,74; 54,68; 26,16; 25,42; 24,17.

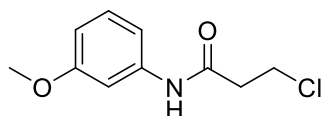
5.2. SERIE B

5.2.1. Síntese da 3-cloro-*N*-(3-metoxifenil)propanamida (**64**)



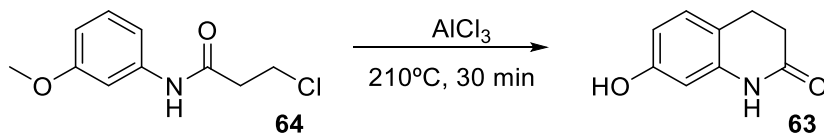
Em um tubo de borosilicato reforçado, foram adicionados 5 mmol de *m*-anisidina (**65**) e 7,5 mmol de carbonato de potássio (K_2CO_3) em 630 μL de tolueno. Em seguida, uma solução contendo 5 mmol de cloreto de 3-cloropropionila (**66**) em 1,25 mL de tolueno foi adicionada lentamente, gota a gota, ao longo de 1 hora, mantendo a temperatura abaixo de $40^\circ C$. Após a adição completa, a mistura reacional foi aquecida a $60-65^\circ C$ por 1 hora.

O sistema foi então resfriado à temperatura ambiente, e 3 mL de uma solução aquosa de HCl a 10% foram adicionados lentamente sob agitação contínua por 30 minutos. O sólido formado foi filtrado, lavado com água e tolueno.



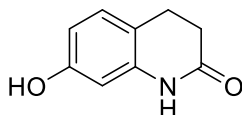
O composto **64** foi obtido como um sólido branco em 87% de rendimento. Ponto de fusão na faixa de $92-95^\circ C$ (literatura: P.F. = $93-95^\circ C$). 1H RMN (500 MHz, DMSO-*d*6): δ = 7,37 (s, 1H); 7,30 (s, 1H); 7,21 (t, J = 7,9 Hz; 1H); 6,97 (d, J = 7,6 Hz, 1H); 6,68 (d, J = 7,8 Hz, 1H); 3,88 (s, 2H); 3,80 (s, 1H); 2,81 (s, 1H). ^{13}C RMN (126 MHz, DMSO-*d*6): δ = 167,83; 160,31; 138,76; 129,87; 112,16; 110,70; 105,83; 77,41; 77,16; 77,16; 76,91; 55,47; 40,73; 39,95.

5.2.2. Síntese da 7-hidroxi-3,4-diidroquinolin-2(1*H*)-ona (**63**)



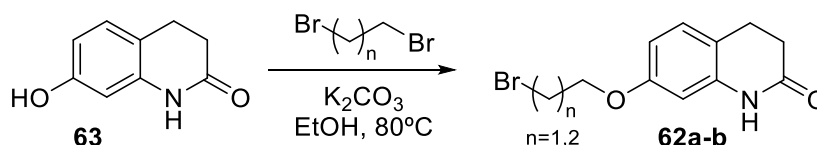
Em um tubo de borosilicato reforçado, foi adicionado 1,4 mmol da 3-cloro-*N*-(3-metoxifenil)propanamida (**64**) e 4,2 mmol de cloreto de alumínio ($AlCl_3$). O tubo foi selado e uma agulha foi colocada para permitir a saída do gás. A mistura foi então aquecida a $210^\circ C$ com agitação por 30 minutos até que a evolução do gás cessasse. A mistura foi então resfriada à temperatura ambiente e extinta com água. A fase aquosa foi extraída com acetato de etila (3x40 mL) e a fase orgânica combinada foi seca com Na_2SO_4 e concentrada à vácuo, resultando

em um sólido de coloração rosa. Esse produto bruto foi então purificado em coluna cromatográfica flash no equipamento Isolera, com fase estacionária de sílica em gel e utilizando como fase móvel mistura de hexano:acetato de etila em gradiente de concentração de 20-50% do solvente mais polar.



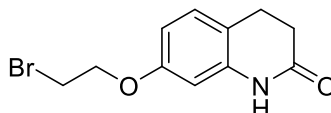
O composto **63** foi obtido como um sólido amarelo em 65% de rendimento. Ponto de fusão na faixa de 234-238°C (literatura: P.F. = 233-237 °C). ¹H RMN (500 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 9,91 (s, 1H); 9,23 (s, 1H); 6,88 (d, *J* = 8,0 Hz, 1H); 6,29 (d, *J* = 2,2 Hz, 1H); 6,27 (dd, *J* = 8,0, 2,3 Hz, 1H); 2,69 (t, *J* = 7,5 Hz, 2H); 2,35 (t, *J* = 7,5 Hz, 2H). ¹³C RMN (126 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 170,36; 156,48; 139,05; 128,32; 113,74; 108,82; 102,33; 39,52; 30,94; 24,05.

5.2.3. Síntese da 7-(bromoalcoxi)-3,4-diidroquinolin-2(1H)-ona (62a-b)



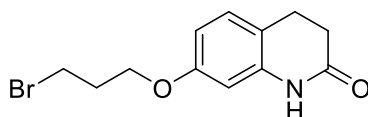
Em um tubo de borosilicato reforçado, foram solubilizados 3 mmol do composto 7-hidroxi-3,4-diidroquinolin-2(1H)-ona (**63**) e 9 mmol de carbonato de potássio (K₂CO₃) em 18,4 mL de etanol. Em seguida foi adicionado 12 mmol do dibromoalcano (**37a-b**) e a solução foi mantida em refluxo durante a 24 horas. Após a confirmação do consumo completo do reagente observado por CCD (Hexano:AcOEt 30%), a mistura reacional foi então diluída com água e extraída com EtOAc. As camadas orgânicas combinadas foram lavadas com solução aquosa saturada de NaHCO₃, seguidas por solução saturada de NaCl e secas sobre Na₂SO₄ anidro, concentradas sob pressão reduzida e purificadas por cromatografia em coluna de sílica flash no equipamento Isolera, com fase estacionária de sílica em gel e utilizando como fase móvel mistura de hexano:acetato de etila em gradiente de concentração de 30-40% do solvente mais polar.

7-(2-bromoetoxi) -3,4-diidroquinolin-2(1H)-ona (62a)



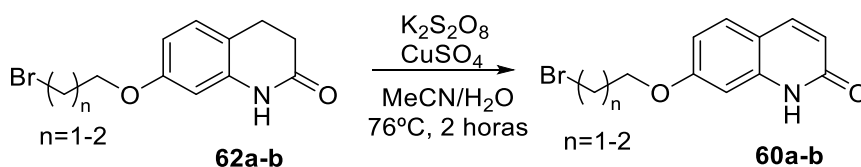
O composto **62a** foi obtido como um sólido amarelo em 48% de rendimento. Ponto de fusão na faixa de 146 - 150°C. **¹H RMN (500 MHz, DMSO-*d*6):** δ = 10,02 (s, 1H); 7,06 (d, J = 8,2 Hz, 1H); 6,51 (dd, J = 8,2, 2,3 Hz, 1H); 6,45 (d, J = 2,2 Hz, 1H); 4,23 (t, J = 5,3 Hz, 2H); 3,78 (t, J = 5,3, 2H); 2,78 (t, J = 7,5 Hz, 2H); 2,41 (t, J = 7,5 Hz, 2H). **¹³C RMN (126 MHz, DMSO-*d*6):** δ = 170,26; 157,12; 139,29; 128,49; 116,22; 107,55; 102,04; 67,77; 39,52; 31,42; 30,67; 23,98.

7-(3-bromopropoxi) -3,4-diidroquinolin-2(1*H*)-ona (62b)



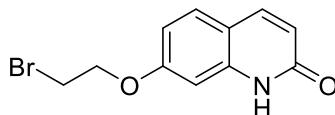
O composto **62b** foi obtido como um óleo amarelo em 61% de rendimento. **¹H RMN (500 MHz, DMSO-*d*6):** δ = 10,02 (s, 1H); 7,05 (d, J = 8,3 Hz, 1H); 6,50 (dd, J = 8,2, 2,4 Hz, 1H); 6,44 (d, J = 2,4 Hz, 1H); 3,99 (t, J = 6,0 Hz, 2H); 3,65 (t, J = 6,5 Hz, 2H); 2,77 (t, J = 7,4 Hz, 2H); 2,41 (t, J = 7,4 Hz, 2H); 2,24 – 2,18 (m, 2H). **¹³C RMN (126 MHz, DMSO-*d*6):** δ = 170,43; 157,63; 139,30; 128,56; 117,50; 115,91; 107,63; 101,73; 68,21; 65,28; 39,52; 31,80; 31,44; 30,78; 24,04.

5.2.4. Síntese da 7-(bromoalcoxi)-quinolin-2(1*H*)-one (60a-b)



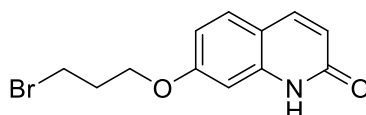
Em um tubo de borosilicato reforçado, foram adicionados 1 mmol de 7-(bromoalcoxi)-3,4-diidroquinolin-2(1*H*)-ona (**62a-b**), 2 mmol de persulfato de potássio ($K_2S_2O_8$) e 0,1 mmol de sulfato de cobre ($CuSO_4$) e solubilizados em 2,7 mL de acetonitrila (10V) e 2,7 mL de água (10V). A suspensão resultante foi aquecida a 76 °C durante 2 horas. Após a confirmação do consumo completo do reagente observado por CCD (DCM: MeOH 5%), a mistura de reacional foi extraída com diclorometano e a fase orgânica combinada foi lavada com água e solução saturada de NaCl e secas sobre Na_2SO_4 anidro. Após ser concentrada sob pressão reduzida, o produto bruto foi purificado por cromatografia em coluna de sílica flash no equipamento Isolera, com fase estacionária de sílica em gel e utilizando como fase móvel mistura de DCM:MeOH em gradiente de concentração de 5–10% do solvente mais polar para obter o produto oxidativo.

7-(2-bromoetoxi)-quinolin-2(1H)-one (60a)



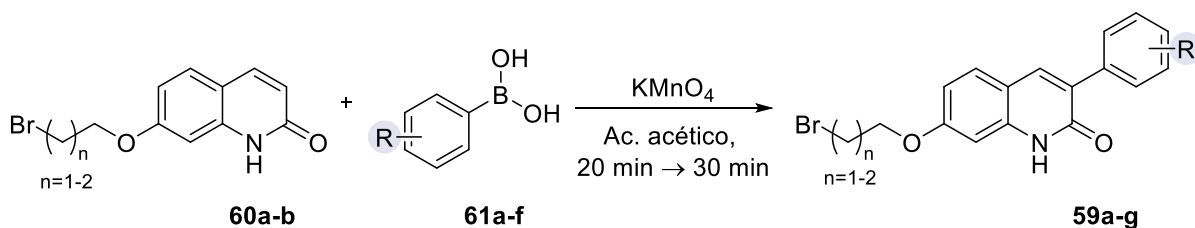
O composto **60a** foi obtido como um sólido bege em 50% de rendimento. Ponto de degradação na faixa de 170 – 172°C. ¹H RMN (500 MHz, DMSO-*d*6): δ = 11,63 (s, 1H); 7,82 (sl, 1H); 7,58 (sl, 1H); 6,80 (sl, 2H); 6,32 (sl, 1H); 4,35 (sl, 2H); 3,84 (sl, 2H). ¹³C RMN (126 MHz, DMSO-*d*6): δ = 162,25; 159,66; 140,59; 140,04; 129,47; 118,91; 113,74; 110,59; 99,06; 67,93; 39,52; 31,22.

7-(3-bromopropoxi)-quinolin-2(1H)-one (60b)



O composto **60b** foi obtido como um sólido bege em 67% de rendimento. Ponto de fusão na faixa de 112 - 117°C. ¹H RMN (500 MHz, DMSO-*d*6): δ = 11,62 (s, 1H); 7,81 (d, *J* = 9,5 Hz, 1H); 7,56 (d, *J* = 9,3 Hz, 1H); 6,81 – 6,80 (m, 2H); 6,30 (d, *J* = 9,5 Hz, 1H); 4,11 (t, *J* = 6,0 Hz, 1H); 3,68 (t, *J* = 6,5 Hz, 1H); 2,28 (m, *J* = 6,2 Hz, 1H). ¹³C RMN (126 MHz, DMSO-*d*6): δ = 162,33; 160,18; 140,67; 140,12; 129,42; 118,72; 113,53; 110,88; 98,64; 65,63; 39,52; 31,70; 31,28.

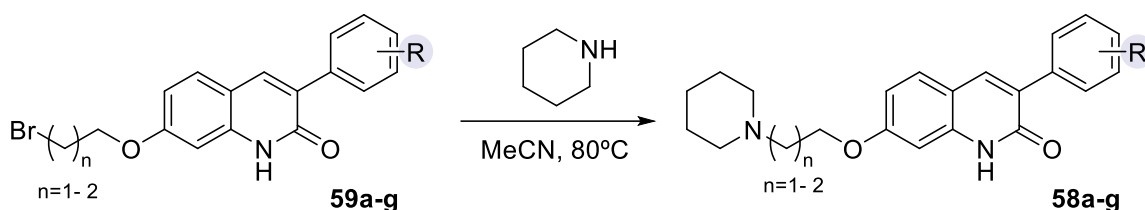
5.2.5. Síntese da 7-(bromoalcoxi)-3-(R-fenil)quinolin-2(1H)-one (59a-g)



Em um tubo de borossilicato e sob condição anidra, foi preparada uma solução de 1,25 mmol de KMnO₄ em 20 mL de ácido acético e agitado sob refluxo até que a cor roxa do KMnO₄ se tornasse marrom (20 minutos). Após o resfriamento da reação à temperatura ambiente, ela foi adicionada a outro tubo de borossilicato anidro contendo 0,5 mmol da 7-(bromoalcoxi)-quinolin-2(1H)-one (**60a-b**) e 1 mmol do ácido arilborônicos (**61a-f**). A reação foi submetida a aquecimento a 80°C por 30 min ou até seu completo descoramento. Após o resfriamento da

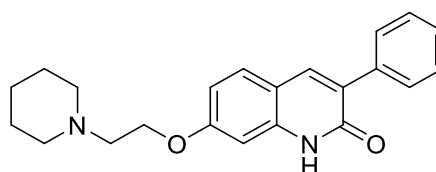
reação à temperatura ambiente, o ácido acético foi removido à vácuo e óleo resultante foi precipitado em gelo. O sólido foi filtrado a vácuo e lavado com água gelada. Os produtos obtidos (**59a-g**) foram purificados em coluna cromatográfica flash no equipamento Isolera, com fase estacionária de sílica em gel e utilizando como fase móvel mistura de DCM:MeOH em gradiente de concentração de 2–10% do solvente mais polar.

5.2.6. Síntese da 3-(R-fenil)-7-((piperidin-1-il)alcoxi)quinolin-2(1H)-ona (**58a-g**)



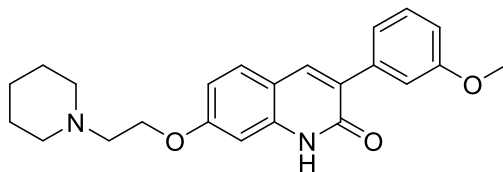
Em um tubo de borossilicato, foram solubizados 0,1 mmol de 7-(bromoalcoxi)-3-(R-fenil)quinolin-2(1H)-one (**59a-g**) em 1,5 mL acetonitrila. Em seguida, foi adicionado 0,3 mmol de piperidina e a mistura reacional foi submetida a agitação a 80°C por 4 horas. Após a confirmação do consumo completo do reagente observado por CCD (DCM: MeOH 5%), o solvente e a piperidina foram removidos à vácuo. Os produtos obtidos (**58a-g**) foram purificados em coluna cromatográfica flash no equipamento Isolera, com fase estacionária de sílica aminada e utilizando como fase móvel mistura de DCM:MeOH em gradiente de concentração de 2–10% do solvente mais polar.

3-fenil-7-(2-(piperidin-1-il)etoxi)quinolin-2(1H)-ona (**58a**)



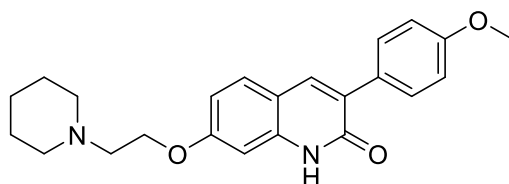
O composto **58a** foi obtido como um sólido bege com 66% de rendimento. ¹H RMN (500 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 11,84 (s, 1H); 8,04 (s, 1H); 7,73 (d, *J* = 7,2 Hz, 2H); 7,65 (d, *J* = 8,7 Hz, 1H); 7,41 (t, *J* = 7,5 Hz, 2H); 7,34 (t, *J* = 7,3 Hz, 1H); 6,84 (dd, *J* = 11,9, 3,2 Hz, 2H); 4,12 (t, *J* = 5,7 Hz, 2H); 2,69 (t, *J* = 5,7 Hz, 2H); 2,44 (sl, 4H); 1,52 – 1,48 (m, 4H); 1,38 (sl, 2H). ¹³C RMN (126 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 161,69; 160,81; 140,49; 139,37; 137,96; 137,96; 136,92; 129,99; 128,90; 128,28; 127,81; 114,13; 111,63; 98,32; 66,63; 55,43; 54,46; 39,52; 25,92; 24,48.

3-(3-metoxifenil)-7-(2-(piperidin-1-il)etoxi)quinolin-2(1H)-ona (58b)



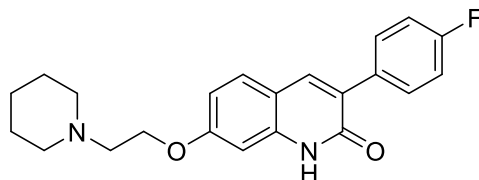
O composto **58b** foi obtido como um óleo amarelo com 22% de rendimento. **¹H RMN (500 MHz, DMSO-*d*₆):** δ = 11,80 (s, 1H); 8,06 (s, 1H); 7,63 (d, J = 8,5 Hz, 1H); 7,37 – 7,26 (m, 3H); 6,92 (dt, J = 6,5, 2,6 Hz, 1H); 6,84 (d, J = 2,3 Hz, 1H); 6,82 (s, 1H); 4,11 (t, J = 5,9 Hz, 2H); 3,79 (s, 3H); 2,69 (t, J = 5,8 Hz, 2H); 2,44 (sl, 4H); 1,50 (m, 4H); 1,38 (sl, 2H). **¹³C RMN (126 MHz, DMSO-*d*₆):** δ = 161,27; 160,33; 158,89; 140,11; 137,87; 137,73; 129,70; 128,94; 127,93; 120,91; 114,28; 113,79; 112,92; 111,19; 98,14; 65,81; 57,17; 55,12; 54,47; 39,52; 25,60; 23,95.

3-(4-metoxifenil)-7-(2-(piperidin-1-il)etoxi)quinolin-2(1H)-ona (58c)



O composto **58c** foi obtido como um sólido bege com 59% de rendimento. **¹H RMN (500 MHz, DMSO-*d*₆):** δ = 11,77 (s, 1H); 7,98 (s, 1H); 7,70 (d, J = 8,8 Hz, 1H); 7,61 (d, J = 8,4 Hz, 1H); 6,97 (d, J = 8,8 Hz, 2H); 6,85 – 6,75 (m, 2H); 4,10 (t, J = 5,8 Hz, 2H); 3,79 (t, 3H); 2,69 (t, J = 5,3 Hz, 1H); 2,45 (sl, 4H); 1,50 (m, 4H); 1,38 (sl, 2H). **¹³C RMN (126 MHz, DMSO-*d*₆):** δ = 161,53; 160,02; 158,79; 139,80; 136,40; 129,76; 129,44; 128,84; 127,85; 114,01; 113,39; 111,10; 98,19; 65,76; 57,17; 55,19; 54,46; 25,57; 23,92.

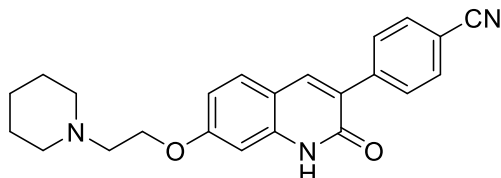
3-(4-fluorfenil)-7-(2-(piperidin-1-il)etoxi)quinolin-2(1H)-ona (58d)



O composto **58d** foi obtido como um sólido amarelo com 37% de rendimento. **¹H RMN (500 MHz, DMSO-*d*₆):** δ = 11,85 (s, 1H); 8,05 (s, 1H); 7,79 (dd, J = 8,7, 5,7 Hz, 2H); 7,63 (d, J = 8,6 Hz, 1H); 7,24 (t, J = 8,9 Hz, 2H); 6,84 (dd, J = 8,6, 2,3 Hz, 1H); 6,81 (d, J = 2,1 Hz,

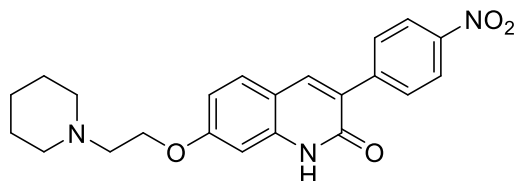
1H); 4,11 (t, $J = 5,8$ Hz, 2H); 2,69 (sl, 2H); 2,45 (sl, 4H); 1,51 – 1,48 (m, 4H); 1,38 (sl, 2H). ^{13}C RMN (126 MHz, DMSO- d_6): $\delta = 162,67; 161,33; 158,48; 140,11; 137,58; 137,36; 130,62; 130,55; 129,70; 127,10; 114,86; 114,69; 113,83; 111,27; 98,21; 66,96; 57,13; 54,46; 39,52; 25,58; 23,92$.

3-(4-cianofenil)-7-(2-(piperidin-1-il)etoxi)quinolin-2(1H)-ona (58e)



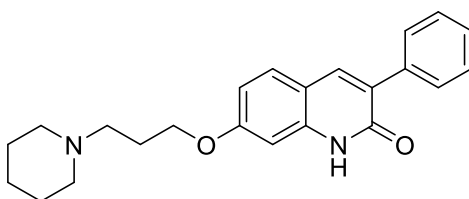
O composto **58e** foi obtido como um sólido amarelo com 48% de rendimento. ^1H RMN (500 MHz, DMSO- d_6): $\delta = 11,95$ (s, 1H); 8,20 (s, 1H); 7,98 (d, $J = 8,2$ Hz, 2H); 7,87 (d, $J = 8,2$ Hz, 2H); 7,65 (d, $J = 8,7$ Hz, 1H); 6,85 (d, $J = 8,7$ Hz, 1H); 6,82 (s, 1H); 4,11 (t, $J = 5,7$ Hz, 2H); 2,67 (t, $J = 5,7$ Hz, 2H); 2,43 (sl, 4H); 1,54 – 1,42 (m, 4H); 1,37 (sl, 2H). ^{13}C RMN (126 MHz, DMSO- d_6): $\delta = 160,97; 160,94; 141,39; 140,62; 139,21; 131,90; 130,19; 129,26; 126,08; 119,11; 113,67; 111,62; 109,74; 98,20; 65,92; 57,17; 54,49; 39,52; 25,63; 23,98$.

3-(4-nitrofenil)-7-(2-(piperidin-1-il)etoxi)quinolin-2(1H)-ona (58f)



O composto **58f** foi obtido como um sólido amarelo com 71% de rendimento. ^1H RMN (500 MHz, DMSO- d_6): $\delta = 12,00$ (s, 1H); 8,27 (d, $J = 9,2$ Hz, 3H); 8,08 (d, $J = 8,9$ Hz, 2H); 7,69 (d, $J = 8,8$ Hz, 1H); 6,87 (dd, $J = 8,7, 2,3$ Hz, 1H); 6,83 (d, $J = 2,1$ Hz, 1H); 4,12 (t, $J = 5,9$ Hz, 2H); 2,69 (t, $J = 5,7$ Hz, 2H); 2,44 (sl, 4H); 1,52 – 1,48 (m, 4H); 1,38 (sl, 2H). ^{13}C RMN (126 MHz, DMSO- d_6): $\delta = 161,07; 160,91; 146,31; 143,45; 140,76; 139,63; 130,31; 129,49; 125,60; 123,16; 113,64; 111,71; 98,20; 65,89; 57,13; 54,47; 39,52; 25,60; 23,95$.

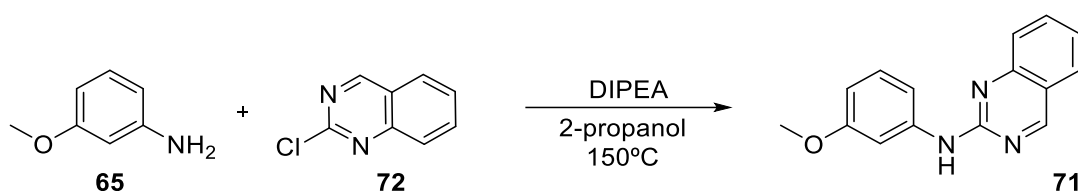
3-fenil-7-(3-(piperidin-1-il)propoxi)quinolin-2(1H)-ona (58g)



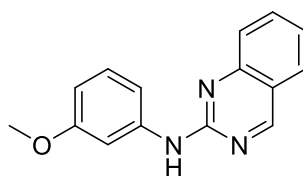
O composto **58g** foi obtido como um sólido amarelo com 95% de rendimento. **¹H RMN (500 MHz, DMSO-*d*6):** δ = 11,81 (s, 1H); 8,03 (s, 1H); 7,73 (d, J = 7,2 Hz, 2H); 7,63 (d, J = 9,4 Hz, 1H); 7,41 (t, J = 7,5 Hz, 2H); 7,34 (t, J = 7,3 Hz, 1H); 6,85 – 6,78 (m, 2H); 4,04 (t, J = 6,4 Hz, 2H); 2,41 (t, J = 6,9 Hz, 2H); 2,35 (s, 3H); 1,93 – 1,86 (m, 2H); 1,50 (dt, J = 10,6, 5,3 Hz, 4H); 1,38 (s, 2H). **¹³C RMN (126 MHz, DMSO-*d*6):** δ = 161,36; 160,48; 140,15; 139,03; 137,63; 137,63; 136,58; 129,65; 129,65; 128,57; 128,57; 127,95; 127,95; 127,48; 127,48; 113,80; 111,30; 111,30; 97,98; 97,98; 66,30; 55,09; 55,09; 54,13; 54,13; 39,52; 26,12; 25,59; 25,59; 24,14.

5.3. SERIE C

5.3.1. Síntese da *N*-(3-metoxifenil)quinazolin-2-amina (**71**)

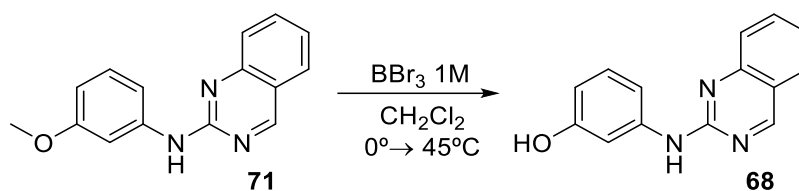


Em um tubo de borossilicato, foram solubilizados 1 mmol de 2-cloroquinazolina (**72**), 3 mmol de *m*-anisidina (**65**) e 3 eq de *N,N*-diisopropiletilamina em 1,76 mL de 2-propanol (0,25 molar) e então aquecida por 18 h a 150 °C. Após a confirmação do consumo completo do reagente observado por CCD (Hexano:AcOEt 20%), a mistura reacional foi resfriada e concentrada á vácuo. O produto bruto foi purificado em coluna cromatográfica flash no equipamento Isolera, com f com fase estacionaria de sílica em gel e utilizando como fase móvel mistura de hexano:acetato de etila em gradiente de concentração de 10-20% do solvente mais polar.

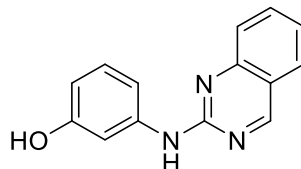


O composto **71** foi obtido como um sólido marrom em 61% de rendimento. Ponto de fusão na faixa de 139 - 141°C. **¹H RMN (500 MHz, DMSO-*d*6):** δ = 9,89 (s, 1H); 9,31 (s, 1H); 7,92 (d, J = 7,8 Hz, 1H); 7,84 – 7,79 (m, 2H); 7,67 (d, J = 8,4 Hz, 1H); 7,49 (d, J = 8,1 Hz, 1H); 7,39 (t, J = 7,4 Hz, 1H); 7,22 (t, J = 8,1 Hz, 1H); 6,56 (dd, J = 8,1, 2,1 Hz, 1H); 3,78 (s, 3H). **¹³C RMN (126 MHz, DMSO-*d*6):** δ = 162,18; 159,57; 156,87; 150,65; 141,77; 134,55; 129,23; 127,95; 125,57; 123,60; 120,36; 111,22; 106,85; 104,59; 54,91.

5.3.2. Síntese da 3-(quinazolin-2-ilamino)fenol (68)

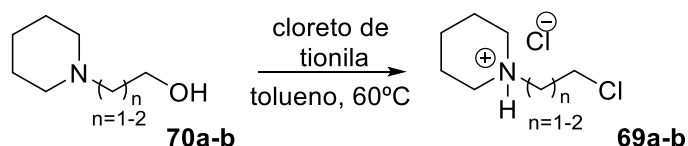


Em um tubo de borossilicato, foram solubilizados 1 mmol do *N*-(3-metoxifenil)quinazolin-2-amina (**71**) em 3,3 mL de diclorometano. Em seguida, o tubo foi selado e submetido à agitação sob resfriamento até alcançar 0°C. Posteriormente, 3 mmol de triborborano (BBr₃) 1M foram adicionados à mistura, gota a gota. Ao término da adição, a reação foi mantida sob agitação em refluxo por 12 horas. Após a confirmação do consumo completo do reagente observado por CCD (Hexano:AcOEt 30%), a mistura reacional foi resfriada e extraída com diclorometano e a fase orgânica combinada foi lavada com água e e secas sobre Na₂SO₄ anidro. Após ser concentrada sob pressão reduzida, o produto bruto foi purificado por cromatografia 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 15-30% do solvente mais polar.



O composto **68** foi obtido como um sólido amarelo em 11% de rendimento. Ponto de fusão na faixa de 140-144°C. ¹H RMN (500 MHz, CDCl₃): δ = 9,12 (s, 1H); 7,77 (d, 3H); 7,63 (s, 1H); 7,38 (s, 1H); 7,21 (t, *J* = 8,0 Hz, 1H); 7,16 (d, *J* = 7,9 Hz, 1H); 6,58 (d, *J* = 8,1 Hz, 1H). ¹³C RMN (126 MHz, CDCl₃): 162,21; 160,67; 157,12; 151,86; 141,27; 134,78; 130,00; 127,83; 126,82; 124,28; 121,28; 111,79; 108,35; 105,33; 77,16.

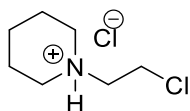
5.3.3. Síntese do cloridrato de 1-(cloroalquil)piperidina (69a-b)



Em um tubo de borossilicato, foi suspenso 1 mmol de piperidinil-alcanol (**70a-b**) em 500µL de tolueno. Em seguida, um excesso de cloreto de tionila (2 mmol) foi adicionado gota a gota a uma temperatura de 0°C sob atmosfera inerte. Após o início da reação exotérmica, a

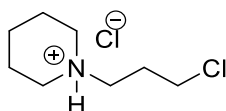
mistura foi agitada a 60°C por 3 horas. Por fim, o cloreto de tionila e o tolueno foram removidos à vácuo e o produto cristalizado filtrado.

Cloridrato de 1-(2-cloroetil)piperidin-1-io (69a)



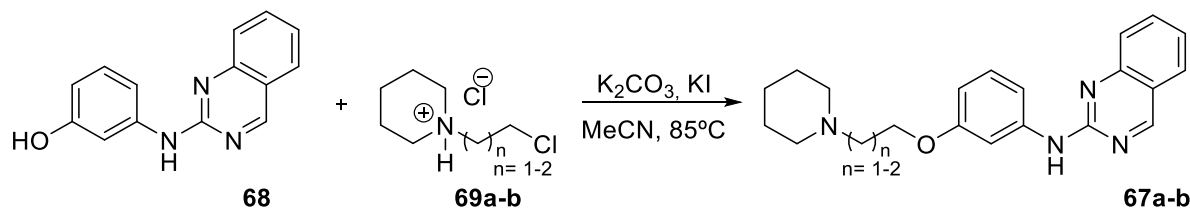
O composto **69a** foi obtido como um sólido bege com 98% de rendimento. Ponto de degradação na faixa de 209 - 211°C. ¹H RMN (500 MHz, DMSO-*d*6): δ = 209 - 211°C. ¹H RMN (500 MHz, DMSO-*d*6): δ = 10,85 (s, 1H); 4,05 (t, *J* = 6,9 Hz, 2H); 3,44 - 3,40 (m, 4H – mascarado pela água), 2,92 (s, 2H); 1,78 - 1,75 (m, 4H), 1,69-1,66 (m, 1H); 1,36 (s, 1H). ¹³C RMN (126 MHz, DMSO-*d*6): δ = 56,14; 52,19; 37,17; 22,19; 21,23.

Cloridrato de 1-(3-cloropropil)piperidin-1-io (69b)



O composto **69b** foi obtido como um sólido bege com 93% de rendimento. Ponto de degradação na faixa de 215 - 219°C. ¹H RMN (500 MHz, DMSO-*d*6): δ = 10,72 3,73 (t, *J* = 6,3 Hz, 2H); 3,37 (s, 2H); 3,07 (dt, *J* = 10,1, 5,2 Hz, 2H); 2,84 (td, *J* = 12,1, 3,0 Hz, 2H); 2,23 - 2,19 (m, 2H); 1,85 - 1,67 (m, 4H); 1,68 (d, *J* = 13,2 Hz, 1H); 1,36 (q, *J* = 12,6 Hz, 1H). ¹³C RMN (126 MHz, DMSO-*d*6): δ = 53,67; 52,06; 42,59; 26,23; 22,33; 21,41.

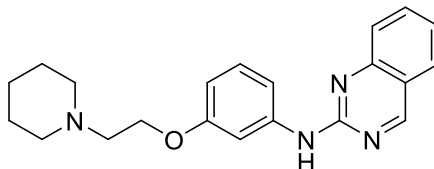
5.3.4. Síntese da *N*-(3-((piperidin-1-il)alcoxi)fenil)quinazolin-2-amina (67a-b)



Em um tubo de borossilicato, foram adicionados 1 mmol de 3-(quinazolin-2-ilamino)fenol (**68**), 0,92 mmol do cloridrato de 1-(cloroalquil)piperidina (**69a-b**), 3 mmol de carbonato de potássio (K₂CO₃) e 1 mmol de iodeto de potássio (KI). Em seguida, o tubo foi selado, e 5,8 mL de acetonitrila seca foram adicionados. A reação foi então conduzida sob refluxo por 48 horas em atmosfera inerte. Após a confirmação do consumo completo do reagente observado por CCD (DCM: MeOH 5%), a reação foi resfriada até temperatura ambiente e concentrada á vácuo. Os produtos obtidos (**67a-b**) foram purificados em coluna

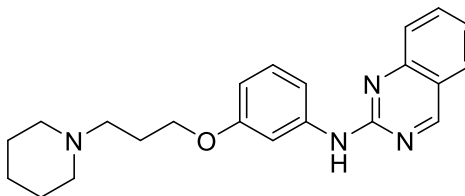
cromatográfica flash no equipamento Isolera, com fase estacionária de sílica aminada e utilizando como fase móvel mistura de DCM:MeOH em gradiente de concentração de 3–5% do solvente mais polar.

***N*-(3-(2-(piperidin-1-il)etoxi)fenil)quinazolin-2-amina (67a)**



O composto **67a** foi obtido como um sólido amarelo com 54% de rendimento. **¹H RMN (500 MHz, DMSO-*d*6):** δ = 9,87 (s, 1H); 9,31 (s, 1H); 7,92 (d, J = 7,9 Hz, 1H); 7,82 (t, J = 7,7 Hz, 1H); 7,73 (s, 1H); 7,65 (d, J = 8,5 Hz, 1H); 7,51 (d, J = 8,0 Hz, 1H); 7,39 (t, J = 7,4 Hz, 1H); 7,20 (t, J = 8,1 Hz, 1H); 6,56 (d, J = 8,1 Hz, 1H); 4,08 (t, J = 5,8 Hz, 2H); 2,68 (t, J = 5,4 Hz, 2H); 2,45 (s, 3H); 1,53 – 1,48 (m, 4H); 1,38 (s, 2H). **¹³C RMN (126 MHz, DMSO-*d*6):** δ = 162,21; 158,79; 156,89; 150,68; 141,74; 134,59; 129,29; 128,00; 125,54; 123,63; 120,39; 111,26; 107,54; 105,17; 65,41; 57,39; 54,48; 39,52; 25,59; 23,96.

***N*-(3-(3-(piperidin-1-il)propoxi)fenil)quinazolin-2-amina (67b)**



O composto **67b** foi obtido como um óleo amarelo com 27% de rendimento. **¹H RMN (500 MHz, DMSO-*d*6):** δ = 9,86 (s, 1H); 9,30 (s, 1H); 7,92 (d, J = 7,9 Hz, 1H); 7,81 (t, J = 7,6 Hz, 1H); 7,77 (s, 1H); 7,65 (d, J = 8,4 Hz, 1H); 7,47 (d, J = 8,1 Hz, 1H); 7,39 (t, J = 7,4 Hz, 1H); 7,19 (t, J = 8,1 Hz, 1H); 6,54 (dd, J = 7,7, 1,4 Hz, 1H); 4,00 (t, J = 6,4 Hz, 2H); 2,40 (t, J = 7,2 Hz, 2H); 2,34 (s, 4H); 1,92 – 1,86 (m, J = 7,0, 6,5 Hz, 2H); 1,53 – 1,44 (m, J = 10,6, 5,2 Hz, 4H); 1,36 (s, 2H). **¹³C RMN (126 MHz, DMSO-*d*6):** δ = 162,34; 159,04; 156,97; 150,74; 141,84; 134,70; 129,39; 128,12; 125,65; 123,76; 120,47; 111,22; 107,71; 105,05; 65,92; 55,40; 54,24; 39,52; 26,39; 25,67; 24,24.

5.4. Teste *in vitro* da atividade anticolinesterásica dos derivados da série A, B e C

A determinação da atividade anticolinesterásica foi realizada de acordo com o método adaptado de Ellman (Ellman et al., 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 de acordo com cada série: Série A - mistura DMSO:EtOH (7:3) (35 mM), Série B- DMSO (30mM), Série C - DMSO (30mM). Em uma placa de 96 poços de fundo plano foram adicionados 150 µL de solução do composto inibidor (**26a-j**; **58a-g**; **67a-b**; donepezila) em oito diferentes concentrações diluídas em série, as quais variaram de entre 60 - 0,001 µM para AChE (fator de diluição = 2) e de 60 - 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 $\lambda = 415$ 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-butiriltiocolina (BCTI) a 2,75 mM foram adicionados e a absorbância foi registrada após 1 minutos de incubação a 25°C a $\lambda = 415$ nm por 10 vezes em intervalos de 30 segundos a cada leitura. 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 IC₅₀ foram calculados com auxílio do programa Graphpad Prism 8.0.1 utilizando a proteína de regressão não linear para a inibição dose-resposta.

5.5. Estudo do mecanismo de inibição enzimática série A, B e C

Para se realizar o estudo cinético foi utilizado o método adaptado de Ellman (Ellman et al., 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 de acordo com cada série: Série A - mistura DMSO:EtOH (7:3) (35 mM), Série B- DMSO (30mM), Série C - DMSO (30mM). Inicialmente, foram adicionados 150 µL de solução do composto inibidor (**26a**, **26c**, **58a**, **58b**, **58e**, **58f** e **67a**)

em uma placa de 96 poços de fundo plano em duas concentrações diferentes (Tabela 31), em oito conjuntos de triplicatas cada. Como controle negativo foram utilizados oito conjuntos de triplicatas tratados com DMSO. 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-butiltiocolina (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 $1 / \text{velocidade}$ versus $1 / [\text{substrato}]$ para o controle negativo e duas concentrações diferentes de inibidor. A regressão linear de cada conjunto de dados mostra um comportamento convergente, de forma que a região na qual as curvas convergem determina o tipo de inibição observada. Os valores de K_i , K_i' (constantes de inibição competitiva e não-competitiva respectivamente), K_m (constante de Michaelis-Menten) e $V_{\text{máx}}$ (velocidade máxima) foram calculados com auxílio do programa Graphpad Prism 8.0.1 usando modelos de regressão não linear para cinética enzimática - inibição e cinética enzimática - substrato versus velocidade.

Tabela 31. Concentrações de inibidores para o estudo cinético da AChE e BChE

	Concentração do Inibidor (μ M)						
	26a	26c	58a	58b	58e	58f	67a
AChE	0,005 e	0,003 e	2,5 e	1,9 e	0,15 e	0,2 e	-
	0,007	0,005	4,5	3,9	0,35	0,6	
BChE	2,8 e 4,8	1,9 e 3,9	1 e 2	1,7 e	1,7 e 3,7	2,6 e 4	0,6 e
				3,7			1

5.6. Ensaio de ligação ao receptor H_3 humano (hH_3R) dos derivados da série A

Células HEK-293 (células renais embrionárias humanas) que expressam o hH_3R de forma estável foram lavadas e colhidas em tampão PBS (solução salina tamponada com fosfato). Em seguida, foram centrifugadas ($3.000 \times g$, 10 min, 4°C) e homogeneizadas com um homogeneizador Ultra-Turrax® em tampão de ligação H_3R resfriado no gelo (12,5 mM de

MgCl₂, 100 mM de NaCl e 75 mM de Tris/HCl, pH 7,4). O homogenato de membrana celular foi centrifugado (20.000 × g, 20 min, 4°C), e o sedimento (pellet) obtido foi ressuspensão no tampão de ligação e armazenado a -80°C até o uso (Kottke et al., 2011).

Antes dos experimentos, as membranas celulares foram descongeladas, homogeneizadas por sonicação a 4°C e mantidas em tampão de ligação resfriado no gelo. Extratos brutos de membrana (20 µg/poço em volume final de 0,2 mL de tampão de ligação) foram incubados com [³H]-N-α-metilhistamina (2 nM; 78,3 Ci/mmol) e diferentes concentrações dos compostos teste. Os ensaios foram realizados em duplicata, com concentrações variando entre 0,01 nM e 100 µM do composto teste. As incubações ocorreram por 90 min à temperatura ambiente (aproximadamente 25°C), sob agitação contínua. A ligação inespecífica foi determinada na presença de 10 µM de pitolisant.

A separação do radioligante ligado do livre foi realizada por filtração em filtros GF/B pré-tratados com polietilenimina 0,3% (m/v), utilizando um coletor de células (*cell harvester*). A radioatividade foi quantificada por contagem de cintilação líquida. Os dados foram analisados pelo software GraphPad Prism 8 (San Diego, EUA), utilizando ajuste de regressão não linear (Bautista-Aguilera et al., 2017).

5.7. Teste *in vitro* da atividade frente a MAO dos derivados da série A

A atividade das isoformas recombinantes humanas da monoamina oxidase ligada à membrana A/B (MAO A/B) (Sigma-Aldrich, Reino Unido) em tampão fosfato de potássio 50 mM (pH 7,5) foi determinada a partir da produção de peróxido de hidrogênio, acoplada ao corante Ampliflu Red (Sigma-Aldrich, Reino Unido) em concentração final de 50 µM, por meio da peroxidase de raiz-forte (HRP) (2,5 U/mL), resultando na produção de resorufina fluorescente, medida em um leitor de placas de fluorescência (Molecular Devices FilterMax F5) a 30°C. Nas condições utilizadas, o K_m para tiramina com MAO A foi de 0,4 mM e, para MAO B, de 0,16 mM. Os compostos não interferiram na fluorescência do produto (resorufina) nem inibiram a enzima de acoplamento (peroxidase de raiz-forte). Os valores de IC₅₀ para MAO A e B foram determinados para os compostos (>10 concentrações em duplicata), sem e com pré-incubação por 30 minutos a 30°C. Os valores de IC₅₀ foram calculados a partir das taxas de reação com variação da concentração do inibidor, na presença de concentração de substrato 2xK_m, adicionando-se a enzima por último (tempo zero) ou após pré-incubação do inibidor com a enzima por 30 minutos, seguida da adição do substrato e do corante. Os dados foram

analisados usando a equação de três parâmetros implementada no GraphPad Prism 4 (San Diego, EUA). Pelo menos duas determinações independentes foram realizadas para cada valor reportado.

5.8. Modelagem Molecular

5.8.1. Enzima Acetilcolinesterase de Enguia Elétrica (*EeAChE*)

Inicialmente, foi realizada minimização energética dos compostos **26a-j**, **58a-g** e **67a-b** utilizando o método semi-empírico Parametric 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 a proteína 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-tetrahydroacridin-9-il-pentano-1,5-diamina). Uma vez que a proteína 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.

5.8.2. Enzima Butirilcolinesterase Equina (*EqBChE*)

Para iniciar o estudo teórico foi realizada minimização energética dos compostos **26a-j**, **58a-g** e **67a-b** utilizando o método semi-empírico Parametric Method 6 (PM6) no programa Spartan Pro, versão 14.0.

Para a realização do estudo de ancoramento molecular (*docking*) entre os compostos e a enzima *EqBChE*, foi necessária a construção de um modelo tridimensional (3D) a partir de uma sequência disponível no banco de dados UniProtKB/Swiss-Prot (acesso Q9N1N9). O modelo foi gerado no servidor Swiss-Model, utilizando como *template* a estrutura cristalográfica da BChE humana (PDB 4BDS)(Nachon et al., 2013). O modelo final apresentou identidade sequencial de 89,89% em relação à enzima humana, com uma cobertura de 0,87. Para validação da função de *scoring* no programa GOLD 2024.3.0, realizou-se um experimento de *redocking* com a tacrina (ligante co-cristalizado no PDB 4BDS). 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. 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 Tyr110, já estabelecidas pela literatura como sítio ativo.

5.8.3. Receptor de histamina humana H₃R

Para iniciar o estudo teórico foi realizada minimização energética dos compostos **26a**, **26j** e **25b** utilizando o método semi-empírico Parametric Method 6 (PM6) no programa Spartan Pro, versão 14.0.

Para a realização do estudo de ancoramento molecular (*docking*) entre os compostos e a enzima *hH₃R*, foi utilizado a proteína disponível no *Protein Data Bank* (PDB) de código 7F61 e resolução de 2,6 Å (Peng et al., 2022). Para determinar a melhor função pelo programa GOLD 2024.3.0 foi realizada *redocking* com o ligante co-cristalizado da enzima (PF03654746). 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. 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 10Å a partir do centro da cavidade do co-cristal.

5.8.4. Enzima Monoamina Oxidase A humana

Para iniciar o estudo teórico foi realizada minimização energética dos compostos **26a**, **26j** e **25b** utilizando o método semi-empírico Parametric Method 6 (PM6) no programa Spartan Pro, versão 14.0.

Para a realização do estudo de ancoramento molecular (*docking*) entre os compostos e a enzima *hMAO-A*, utilizado a proteína disponível no *Protein Data Bank* (PDB) de código 2Z5X e resolução de 2,2 Å (Son et al., 2008). Para determinar a melhor função pelo programa

GOLD 2024.3.0 foi realizada *redocking* com o ligante co-cristalizado da enzima (Harmina). 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. 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 10Å a partir do centro da cavidade do co-cristal.

5.8.5. Enzima Monoamina Oxidase B humana

Para iniciar o estudo teórico foi realizada minimização energética dos compostos **26a**, **26j** e **25b** utilizando o método semi-empírico Parametric Method 6 (PM6) no programa Spartan Pro, versão 14.0.

Para a realização do estudo de ancoramento molecular (*docking*) entre os compostos e a enzima hMAO-B, utilizado a proteína disponível no *Protein Data Bank* (PDB) de código 2V60 e resolução de 2,0 Å (Binda et al., 2007). Para determinar a melhor função pelo programa GOLD 2024.3.0 foi realizada *redocking* com o ligante co-cristalizado da enzima (7-(3-clorobenziloxi)-4-carboxaldeído-cumarina). 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. 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 10Å a partir do centro da cavidade do co-cristal.

5.9. Citotoxicidade em células de neuroblastoma SH-SY5Y

5.9.1. Preparo das amostras para o ensaio de citotoxicidade em MTT

Para cada amostra em estudo, uma solução mãe em dimetilsulfóxido (DMSO) foi preparada e diluída utilizando meio de cultivo para concentrações nos valores de 12,5, 25 e 50 µM. A amostra representando o branco/veículo foi preparada utilizando 20 µL de DMSO puro e 1980 µL de meio de cultivo, representando 1% de DMSO.

5.9.2. Cultivo das células derivados de neuroblastoma humano (SH-SY5Y)

Foram utilizadas células da linhagem imortalizada de neuroblastoma humano (SH-SY5Y – ATCC: CRL-2226; BCRJ: 0223) para avaliação de citotoxicidade. As linhagens foram cultivadas utilizando meio de cultura Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) e F12 na proporção 1:1, suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) e 1% de

estreptomicina/penicilina. A cultura foi mantida em estufa a 37°C contendo 5% de CO₂ e 95% de ar atmosférico. O cultivo foi realizado variando entre garrafas de 25 e 75 cm² em meio DMEM:F12 10%, substituído a cada 48 horas, até que as células atingissem a semi-confluência ($\geq 70\%$). A passagem celular foi realizada com auxílio da solução de tripsina-EDTA/0,25% (NOVA BIOTECNOLOGIA) e dividida entre volumes de 5 ou 8 mL de cultivo conforme as respectivas garrafas utilizadas.

5.9.3. Ensaio de citotoxicidade pelo método em MTT

O ensaio de citotoxicidade avaliou a viabilidade celular pelo ensaio de redução de brometo de [3(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil tetrazolium] (MTT). Nesse método, a viabilidade celular é determinada pela capacidade da enzima succinato desidrogenase mitocondrial reduzir o MTT, formando cristais insolúveis de formazan em mitocôndrias de células viáveis (Mosmann, 1983).

Em placas de 96 poços as células foram distribuídas na densidade de $3,0 \times 10^4$ células/poço em um volume de 100 μ L. As placas foram mantidas em estufa a 37°C contendo 5% de CO₂ e 95% de ar atmosférico por 24 h. Na etapa seguinte, com um volume de 100 μ L adicionados em cada poço, as células foram tratadas com diferentes concentrações das amostras em teste. Após o tratamento por 24 e 48 h de incubação, foram adicionados 20 μ L de MTT em PBS pH= 7,4 a uma concentração final de 0,5 mg/mL por poço. As placas foram cobertas com papel alumínio e mantida em estufa a 37°C contendo 5% de CO₂ e 95% de ar atmosférico por 3 h. Em seguida, as placas foram centrifugadas a 1500 rpm durante 12 minutos, o sobrenadante foi descartado e os cristais de formazan formados foram dissolvidos em 100 μ L de DMSO, gerando uma coloração violeta medida em um leitor de microplacas (Microplate Absorbance Reader iMARK em 562 nm), após agitação vigorosa durante 60 segundos.

Para o cálculo da viabilidade celular foi utilizada a equação:

$$\% \text{ células vivas} = \frac{\text{absorbância das células tratadas}}{\text{média absorbância das células sem tratamento}} \times 100$$

Todas as concentrações testadas foram avaliadas em sextuplicatas (n=6). A variação dos resultados foi observada através de análise estatística aplicando ANOVA seguido do Teste de Tukey para comparações múltiplas através GraphPad Prism 5TM com nível de significância de $p < 0,05$.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBAS, Kashif *et al.* Multi-target approach to Alzheimer's disease prevention and treatment: antioxidant, anti-inflammatory, and amyloid- modulating mechanisms. **Neurogenetics**, v. 26, n. 1, p. 39, 1 abr. 2025.

ABDALLAH, Abdallah E. Review on anti-alzheimer drug development: approaches, challenges and perspectives. **RSC Advances**, v. 14, n. 16, p. 11057–11088, 2024.

ALI, Nisha *et al.* Molecular mechanisms and biomarkers in neurodegenerative disorders: a comprehensive review. **Molecular Biology Reports**, v. 52, n. 1, p. 337, dez. 2025.

ALZHEIMER, A. Über eigenartige Erkrankung der Hirnrinde. **All Z Psychiatr**, v. 64, p. 146–148, 1907.

ALZPIPELINE. **AlzPipeline**. Disponível em: <<https://alzpipeline.com/>>. Acesso em: 15 maio. 2025.

AMEEN, Taha Basit *et al.* Amyloid solutions: lecanemab, gantenerumab, and donanemab in the treatment of Alzheimer's disease. **The Egyptian Journal of Neurology, Psychiatry and Neurosurgery**, v. 61, n. 1, p. 37, 8 maio 2025.

AÑAZCO, Tito *et al.* First in class pyrrolo[2,3-d]pyrimidine derivatives fused to fluorobenzylpiperidines as dual ligands of acetylcholinesterase and histamine H3 receptor. **Archiv der Pharmazie**, v. 358, n. 3, p. e2400387, 2025.

AZAM, Uzma; NASEER, Muhammad Moazzam; ROCHAIS, Christophe. Analysis of skeletal diversity of multi-target directed ligands (MTDLs) targeting Alzheimer's disease. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 286, p. 117277, mar. 2025.

BAUTISTA-AGUILERA, Óscar M. *et al.* Multitarget-Directed Ligands Combining Cholinesterase and Monoamine Oxidase Inhibition with Histamine H₃ R Antagonism for Neurodegenerative Diseases. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 56, n. 41, p. 12765–12769, 2 out. 2017.

BINDA, Claudia *et al.* Structures of Human Monoamine Oxidase B Complexes with Selective Noncovalent Inhibitors: Safinamide and Coumarin Analogs. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 50, n. 23, p. 5848–5852, 1 nov. 2007.

BOURNE, Yves *et al.* Conformational Flexibility of the Acetylcholinesterase Tetramer Suggested by X-ray Crystallography *. **Journal of Biological Chemistry**, v. 274, n. 43, p. 30370–30376, 22 out. 1999.

BRUS, Boris *et al.* Discovery, Biological Evaluation, and Crystal Structure of a Novel Nanomolar Selective Butyrylcholinesterase Inhibitor. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 57, n. 19, p. 8167–8179, 9 out. 2014.

BUKKE, Vidyasagar Naik *et al.* The Dual Role of Glutamatergic Neurotransmission in Alzheimer's Disease: From Pathophysiology to Pharmacotherapy. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 21, n. 20, p. 7452, 9 out. 2020.

BURNS, A.; ILIFFE, S. Alzheimer's disease. **BMJ**, v. 338, n. feb05 1, p. b158–b158, 5 fev. 2009.

CAO, Jiasheng *et al.* Oxidation of Lindane with Fe(II)-Activated Sodium Persulfate. **Environmental Engineering Science**, v. 25, n. 2, p. 221–228, mar. 2008.

CAREY, FRANCIS A.; SUNDBERG, RICHARD J. Advanced Organic Chemistry Part A: Structure and Mechanisms Part B: Reactions and Synthesis. **Chemistry International**, v. 24, n. 5, p. 28–29, set. 2002.

CHEIGNON, C. *et al.* Oxidative stress and the amyloid beta peptide in Alzheimer's disease. **Redox Biology**, v. 14, p. 450–464, abr. 2018.

CHEN, Jiangmin *et al.* Refining the interactions between microglia and astrocytes in Alzheimer's disease pathology. **Neuroscience**, v. 573, p. 183–197, maio 2025a.

CHEN, Leilei *et al.* Homeostasis and metabolism of iron and other metal ions in neurodegenerative diseases. **Signal Transduction and Targeted Therapy**, v. 10, n. 1, p. 31, 3 fev. 2025b.

CHEN, Weiming *et al.* Oxidative Aromatization of 3,4-Dihydroquinolin-2(1 *H*)-ones to Quinolin-2(1 *H*)-ones Using Transition-Metal-Activated Persulfate Salts. **The Journal of Organic Chemistry**, v. 84, n. 13, p. 8702–8709, 5 jul. 2019.

CHEN, Zhi-Ru *et al.* Role of Cholinergic Signaling in Alzheimer's Disease. **Molecules**, v. 27, n. 6, p. 1816, 10 mar. 2022.

CLAYDEN, Jonathan; GREEVES, Nick; WARREN, Stuart. **Organic Chemistry**. [S.l.]: OUP Oxford, 2012.

CLINICALTRIALS. **ClinicalTrials.gov**. Disponível em: <<https://clinicaltrials.gov/>>. Acesso em: 15 maio. 2025.

COMMISSIONER, Office of the. **FDA Approves First Drug to Treat Agitation Symptoms Associated with Dementia due to Alzheimer's Disease**. Disponível em: <<https://www.fda.gov/news-events/press-announcements/fda-approves-first-drug-treat-agitation-symptoms-associated-dementia-due-alzheimers-disease>>. Acesso em: 15 maio. 2025.

COPELAND, Robert A. **Evaluation of Enzyme Inhibitors in Drug Discovery: A Guide for Medicinal Chemists and Pharmacologists**. 1. ed. [S.l.]: Wiley, 2013.

CUMMINGS, Jeffrey *et al.* Alzheimer's disease drug development pipeline: 2024. **Alzheimer's & Dementia: Translational Research & Clinical Interventions**, v. 10, n. 2, p. e12465, abr. 2024.

CZARNECKA, Kamila *et al.* New cyclopentaquinoline hybrids with multifunctional capacities for the treatment of Alzheimer's disease. **Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry**, v. 33, n. 1, p. 158–170, 1 jan. 2018.

- DAINA, Antoine; ZOETE, Vincent. A BOILED-Egg To Predict Gastrointestinal Absorption and Brain Penetration of Small Molecules. **ChemMedChem**, v. 11, n. 11, p. 1117–1121, 2016.
- DAS, Jharna R.; TIZABI, Yousef. Additive Protective Effects of Donepezil and Nicotine Against Salsolinol-Induced Cytotoxicity in SH-SY5Y Cells. **Neurotoxicity Research**, v. 16, n. 3, p. 194–204, 1 out. 2009.
- DE BOER, Danna *et al.* A Comprehensive Review of Cholinesterase Modeling and Simulation. **Biomolecules**, v. 11, n. 4, p. 580, 15 abr. 2021.
- DE CONTO, Véronique *et al.* *In vitro* differentiation modifies the neurotoxic response of SH-SY5Y cells. **Toxicology in Vitro**, v. 77, p. 105235, 1 dez. 2021.
- DE SOUZA, Gabriela Alves *et al.* Discovery of novel dual-active 3-(4-(dimethylamino)phenyl)-7-aminoalkoxy-coumarin as potent and selective acetylcholinesterase inhibitor and antioxidant. **Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry**, v. 34, n. 1, p. 631–637, 1 jan. 2019.
- DEMIR, Ayhan S. *et al.* Manganese(III) acetate-mediated synthesis of biaryls under microwave irradiation. **Tetrahedron**, v. 66, n. 6, p. 1308–1312, fev. 2010.
- DEMIR, Ayhan S.; FINDIK, Hamide. Potassium permanganate/carboxylic acid/organic solvent: a powerful reagent for enone oxidation and aryl coupling reactions. **Tetrahedron**, v. 64, n. 27, p. 6196–6201, jun. 2008.
- DO N. GOULART, Paula *et al.* Butyrylcholinesterase - BuChE: A Potential Target for Development of Drugs for Alzheimer's Disease Treatment. **Revista Virtual de Química**, v. 13, n. 1, p. 90–126, 2021.
- DOMINGUEZ-GORTAIRE, Jose *et al.* Alzheimer's Disease: Exploring Pathophysiological Hypotheses and the Role of Machine Learning in Drug Discovery. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 26, n. 3, p. 1004, 24 jan. 2025.
- EGAN, William J.; MERZ, Kenneth M.; BALDWIN, John J. Prediction of Drug Absorption Using Multivariate Statistics. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 43, n. 21, p. 3867–3877, 1 out. 2000.
- ELLMAN, George L. *et al.* A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. **Biochemical Pharmacology**, v. 7, n. 2, p. 88–95, 1 jul. 1961.
- FANG, Cheng *et al.* Buntanetap, a Novel Translational Inhibitor of Multiple Neurotoxic Proteins, Proves to Be Safe and Promising in Both Alzheimer's and Parkinson's Patients. **The Journal of Prevention of Alzheimer's Disease**, v. 10, n. 1, p. 25–33, 1 jan. 2023.
- FAYYAZ, Ammara *et al.* Investigation of 3-Phenylcoumarin Derivatives as Potential Multi-target Inhibitors for Human Cholinesterases and Monoamine oxidases: A Computational Approach. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 196, n. 11, p. 8389–8409, nov. 2024.

FERRI, Cleusa P. *et al.* Global prevalence of dementia: a Delphi consensus study. **The Lancet**, v. 366, n. 9503, p. 2112–2117, 17 dez. 2005.

GAO, Mingshan *et al.* 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, n. 8, p. 3281–3295, 25 abr. 2013.

GAZVODA, Martin *et al.* Mechanism of copper-free Sonogashira reaction operates through palladium-palladium transmetalation. **Nature Communications**, v. 9, n. 1, p. 4814, 16 nov. 2018.

GHOSE, Arup K.; VISWANADHAN, Vellarkad N.; WENDOLOSKI, John J. A Knowledge-Based Approach in Designing Combinatorial or Medicinal Chemistry Libraries for Drug Discovery. 1. A Qualitative and Quantitative Characterization of Known Drug Databases. **Journal of Combinatorial Chemistry**, v. 1, n. 1, p. 55–68, 12 jan. 1999.

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, 21 fev. 2018.

HARDY, John. Testing times for the “amyloid cascade hypothesis”. **Neurobiology of aging**, v. 23, n. 6, p. 1073–1074, 1 nov. 2002.

HE, Chuan *et al.* Synergistic Catalysis in the Sonogashira Coupling Reaction: Quantitative Kinetic Investigation of Transmetalation. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 52, n. 5, p. 1527–1530, 28 jan. 2013.

HIPPIUS, Hanns; NEUNDÖRFER, Gabriele. The discovery of Alzheimer's disease. **Dialogues in Clinical Neuroscience**, v. 5, n. 1, p. 101–108, 31 mar. 2003.

HUANG, Li-Kai *et al.* Clinical trials of new drugs for Alzheimer disease: a 2020–2023 update. **Journal of Biomedical Science**, v. 30, n. 1, p. 83, 2 out. 2023.

HUANG, Yadong; MUCKE, Lennart. Alzheimer Mechanisms and Therapeutic Strategies. **Cell**, v. 148, n. 6, p. 1204–1222, 16 mar. 2012.

HUSSAIN, Mohd Kamil *et al.* Phytomolecules as Alzheimer's therapeutics: A comprehensive review. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 288, p. 117401, abr. 2025.

JEREMIC, Danko; JIMÉNEZ-DÍAZ, Lydia; NAVARRO-LÓPEZ, Juan D. Past, present and future of therapeutic strategies against amyloid- β peptides in Alzheimer's disease: a systematic review. **Ageing Research Reviews**, v. 72, p. 101496, 1 dez. 2021.

JIN, Liquan *et al.* Isolation of bis(copper) key intermediates in Cu-catalyzed azide-alkyne “click reaction”. **Science Advances**, v. 1, n. 5, p. e1500304, 5 jun. 2015.

KHANDELWAL, Riya *et al.* Recent advances in triazole synthesis via click chemistry and their pharmacological applications: A review. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 112, p. 129927, nov. 2024.

KHANFAR, Mohammad A. *et al.* Design, synthesis, and biological evaluation of novel oxadiazole- and thiazole-based histamine H₃R ligands. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 26, n. 14, p. 4034–4046, ago. 2018.

KIM, Byeong-Hyeon *et al.* Second-generation anti-amyloid monoclonal antibodies for Alzheimer's disease: current landscape and future perspectives. **Translational Neurodegeneration**, v. 14, n. 1, p. 6, 27 jan. 2025.

KNEZEVIC, Dunja; MIZRAHI, Romina. Molecular imaging of neuroinflammation in Alzheimer's disease and mild cognitive impairment. **Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry**, Neuroimaging in psychiatry: Steps toward the clinical application of brain imaging in psychiatric disorders. v. 80, p. 123–131, 3 jan. 2018.

KNOPMAN, David S. *et al.* Alzheimer disease. **Nature Reviews Disease Primers**, v. 7, n. 1, p. 33, 13 maio 2021.

KOCHI, Jay K.; RUST, Frederick F. **Oxidation of Free Radicals from Unsaturated Compounds by Cupric Salts**. **Journal of the American Chemical Society**, v. 84, n. 20, p. 3946–3953, out. 1962.

KOTTKE, Tim *et al.* Receptor-specific functional efficacies of alkyl imidazoles as dual histamine H₃/H₄ receptor ligands. **European Journal of Pharmacology**, v. 654, n. 3, p. 200–208, 11 mar. 2011.

KRAEPELIN, Emil. **Psychiatrie : ein Lehrbuch für Studierende und Ärzte**. [S.l.]: Leipzig : Barth, 1915.

KUMAR, Naveen *et al.* In Vitro and In Vivo Investigations of Chromone Derivatives as Potential Multitarget-Directed Ligands: Cognitive Amelioration Utilizing a Scopolamine-Induced Zebrafish Model. **ACS Chemical Neuroscience**, v. 15, n. 14, p. 2565–2585, 17 jul. 2024.

L, Nelson, David; M, Cox, Michael. **Princípios de Bioquímica de Lehninger**. [S.l.]: Artmed Editora, 2022.

LEE, Hyewon H. *et al.* Behavioral and Psychological Symptoms (BPSD) in Alzheimer's Disease (AD): Development and Treatment. In: KIDD, Emma J.; NEWHOUSE, Paul A. (Orgs.). **Neurobiology of Alzheimer's Disease**. Cham: Springer Nature Switzerland, 2025. p. 245–273.

LEONEL SILVA SOUSA, Gleyton *et al.* Design, synthesis and antiproliferative evaluation of new acridine-thiosemicarbazone derivatives as topoisomerase II α inhibitors. **Results in Chemistry**, v. 7, p. 101371, 1 jan. 2024.

LI, Nuojin; ZHOU, Tian; FEI, Erkang. Actions of Metformin in the Brain: A New Perspective of Metformin Treatments in Related Neurological Disorders. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 23, n. 15, p. 8281, jan. 2022.

LI, Qi *et al.* Donepezil-based multi-functional cholinesterase inhibitors for treatment of Alzheimer's disease. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 158, p. 463–477, out. 2018.

LIPINSKI, Christopher A. *et al.* Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. **Advanced Drug Delivery Reviews**, MOST CITED PAPERS IN THE HISTORY OF ADVANCED DRUG DELIVERY REVIEWS: A TRIBUTE TO THE 25TH ANNIVERSARY OF THE JOURNAL. v. 64, p. 4–17, 1 dez. 2012.

LIU, Wenjie *et al.* Design, synthesis and biological evaluation of novel coumarin derivatives as multifunctional ligands for the treatment of Alzheimer's disease. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 242, p. 114689, 15 nov. 2022.

LIU, Yuqing *et al.* The interaction between ageing and Alzheimer's disease: insights from the hallmarks of ageing. **Translational Neurodegeneration**, v. 13, n. 1, p. 7, 23 jan. 2024.

MALEK, Rim *et al.* New Dual Small Molecules for Alzheimer's Disease Therapy Combining Histamine H3 Receptor (H3R) Antagonism and Calcium Channels Blockade with Additional Cholinesterase Inhibition. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 62, n. 24, p. 11416–11422, 26 dez. 2019.

MANZOOR, Shoaib *et al.* Discovery of Quinolinone Hybrids as Dual Inhibitors of Acetylcholinesterase and A β Aggregation for Alzheimer's Disease Therapy. **ACS Chemical Neuroscience**, v. 15, n. 3, p. 539–559, 7 fev. 2024.

MARTIN-JIMÉNEZ, Cynthia Alexandra *et al.* Relationship Between Obesity, Alzheimer's Disease, and Parkinson's Disease: an Astrocentric View. **Molecular Neurobiology**, v. 54, n. 9, p. 7096–7115, 1 nov. 2017.

MATTHEWS, Dawn C. *et al.* **Rasagiline effects on glucose metabolism, cognition, and tau in Alzheimer's dementia.** Disponível em: <<https://alz.journals.onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.1002/trc2.12106>>. Acesso em: 17 maio. 2025.

MAURI, M. C. *et al.* Clinical pharmacology of atypical antipsychotics: an update. **EXCLI Journal**, v. 13, p. 1163–1191, 13 out. 2014.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Relatório Nacional sobre a Demência no Brasil.** Disponível em: <<https://www.gov.br/saude/pt-br/assuntos/noticias/2024/setembro/relatorio-nacional-sobre-a-demencia-estima-que-cerca-de-8-5-da-populacao-idosa-convive-com-a-doenca>>. Acesso em: 26 abr. 2025.

MOHAMED, Tarek; RAO, Praveen P. N. 2,4-Disubstituted quinazolines as amyloid- β aggregation inhibitors with dual cholinesterase inhibition and antioxidant properties: Development and structure-activity relationship (SAR) studies. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 126, p. 823–843, 27 jan. 2017.

MOSMANN, Tim. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**, v. 65, n. 1, p. 55–63, 16 dez. 1983.

MUEGGE, Ingo; HEALD, Sarah L.; BRITTELLI, David. Simple Selection Criteria for Drug-like Chemical Matter. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 44, n. 12, p. 1841–1846, 1 jun. 2001.

MURPHY, Kayla S.; GOLDEN, Julia C.; TAMPI, Rajesh R. Dexmedetomidine for agitation in dementia: Current data and future direction. **Journal of the American Geriatrics Society**, v. 73, n. 2, p. 552–557, fev. 2025.

NACHON, Florian *et al.* Crystal structures of human cholinesterases in complex with huprine W and tacrine: elements of specificity for anti-Alzheimer's drugs targeting acetyl- and butyryl-cholinesterase. **Biochemical Journal**, v. 453, n. 3, p. 393–399, 12 jul. 2013.

NADUR, Nathalia Fonseca. **Síntese e avaliação farmacológica de novas 3-(1,2,3-triazol)-cumarinas planejadas para o tratamento da Doença de Alzheimer**. Seropédica, RJ: UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO, 2020.

NAOI, Makoto *et al.* Type A monoamine oxidase; its unique role in mood, behavior and neurodegeneration. **Journal of Neural Transmission**, v. 132, n. 3, p. 387–406, mar. 2025.

NEVES SANTOS, Sabrina *et al.* 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.

NICHOLS, Emma *et al.* Estimation of the global prevalence of dementia in 2019 and forecasted prevalence in 2050: an analysis for the Global Burden of Disease Study 2019. **The Lancet Public Health**, v. 7, n. 2, p. e105–e125, fev. 2022.

NIETO-ALAMILLA, Gustavo *et al.* The Histamine H3 Receptor: Structure, Pharmacology, and Function. **Molecular Pharmacology**, v. 90, n. 5, p. 649–673, nov. 2016.

OGOS, Martyna; STARY, Dorota; BAJDA, Marek. Recent Advances in the Search for Effective Anti-Alzheimer's Drugs. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 26, n. 1, p. 157, 27 dez. 2024.

OYOVWI, Mega Obukohwo *et al.* Molecular pathways: the quest for effective MAO-B inhibitors in neurodegenerative therapy. **Molecular Biology Reports**, v. 52, n. 1, p. 240, dez. 2025.

PARKINSONSDISEASE, Editorial Team 3. min. **Medications for Parkinson's Disease**. Disponível em: <<https://parkinsonsdisease.net/medications>>. Acesso em: 18 maio. 2025.

PEITZIKA, Stergiani-Chrysovalanti; PONTIKI, Eleni. A Review on Recent Approaches on Molecular Docking Studies of Novel Compounds Targeting Acetylcholinesterase in Alzheimer Disease. **Molecules**, v. 28, n. 3, p. 1084, 21 jan. 2023.

PENG, Xueqian *et al.* Structural basis for recognition of antihistamine drug by human histamine receptor. **Nature Communications**, v. 13, n. 1, p. 6105, 15 out. 2022.

PEREIRA, Thiago Moreira *et al.* Coumarin Compounds in Medicinal Chemistry: Some Important Examples from the Last Years. **Current Topics in Medicinal Chemistry**, v. 18, n. 2, p. 124–148, 24 abr. 2018.

PERRY, Elaine K. *et al.* CHANGES IN BRAIN CHOLINESTERASES IN SENILE DEMENTIA OF ALZHEIMER TYPE. **Neuropathology and Applied Neurobiology**, v. 4, n. 4, p. 273–277, jul. 1978.

PICCIOTTO, Marina R.; HIGLEY, Michael J.; MINEUR, Yann S. Acetylcholine as a Neuromodulator: Cholinergic Signaling Shapes Nervous System Function and Behavior. **Neuron**, v. 76, n. 1, p. 116–129, 4 out. 2012.

PORSTEINSSON, A. P. *et al.* Diagnosis of Early Alzheimer's Disease: Clinical Practice in 2021. **The Journal of Prevention of Alzheimer's Disease**, v. 8, n. 3, p. 371–386, jul. 2021.

PRZYBYŁOWSKA, Maja *et al.* Design, synthesis and biological evaluation of novel N-phosphorylated and O-phosphorylated tacrine derivatives as potential drugs against Alzheimer's disease. **Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry**, v. 37, n. 1, p. 1012–1022, 31 dez. 2022.

PURANIK, Nidhi; SONG, Minseok. Glutamate: Molecular Mechanisms and Signaling Pathway in Alzheimer's Disease, a Potential Therapeutic Target. **Molecules**, v. 29, n. 23, p. 5744, 5 dez. 2024.

QUEDA, Fausto *et al.* Novel Donepezil–Arylsulfonamide Hybrids as Multitarget-Directed Ligands for Potential Treatment of Alzheimer's Disease. **Molecules**, v. 26, n. 6, p. 1658, jan. 2021.

RAJASEKHAR, K.; GOVINDARAJU, Thimmaiah. 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.

RODRIGUES, Daniel A. *et al.* Structure–property relationship studies of 3-acyl-substituted furans: the serendipitous identification and characterization of a new non-classical hydrogen bond donor moiety. **New Journal of Chemistry**, v. 44, n. 26, p. 10994–11005, 2020.

ROSTOVTSEV, Vsevolod V. *et al.* A Stepwise Huisgen Cycloaddition Process: Copper(I)-Catalyzed Regioselective “Ligation” of Azides and Terminal Alkynes. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 41, n. 14, p. 2596–2599, 15 jul. 2002.

ROY, Sreekanya *et al.* An approach to predict and inhibit Amyloid Beta dimerization pattern in Alzheimer's disease. **Toxicology Reports**, v. 14, p. 101879, jun. 2025.

RULLO, Mariagrazia *et al.* In Vitro Evaluation of Novel Furo[3,2-c]coumarins as Cholinesterases and Monoamine Oxidases Inhibitors. **Molecules**, v. 30, n. 8, p. 1830, jan. 2025.

RYDBERG, Edwin H. *et al.* Complexes of Alkylene-Linked Tacrine Dimers with Torpedo californica Acetylcholinesterase: Binding of Bis(5)-tacrine Produces a Dramatic Rearrangement in the Active-Site Gorge. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 49, n. 18, p. 5491–5500, 1 set. 2006.

SCOTLAND, Kevin M.; VREUGDENHIL, Andrew J.; SHETRANJIWALLA, Shegufa. The reaction of thionyl chloride with β amino alcohols: a computational investigation to delineate the mechanisms of the well-established synthesis that forms the 1-chloro-(2-

alkylamino)ethanes and the 1,2,3 alkyloxathiazolidine-2-oxide compounds. **Canadian Journal of Chemistry**, v. 103, n. 4, p. 114–128, abr. 2025.

SENAWEERA, Sameera; WEAVER, Jimmie D. S_NAr catalysis enhanced by an aromatic donor–acceptor interaction; facile access to chlorinated polyfluoroarenes. **Chemical Communications**, v. 53, n. 54, p. 7545–7548, 2017.

SHI, Riri *et al.* Structure-Based Specific Detection and Inhibition of Monoamine Oxidases and Their Applications in Central Nervous System Diseases. **ChemBioChem**, v. 20, n. 12, p. 1487–1497, 14 jun. 2019.

SIES, Helmut. Oxidative stress: a concept in redox biology and medicine. **Redox Biology**, v. 4, p. 180–183, 1 abr. 2015.

SILVA SOUSA, Gleyton Leonel *et al.* Discovery of novel thiosemicarbazone-acridine targeting butyrylcholinesterase with antioxidant, metal complexing and neuroprotector abilities as potential treatment of Alzheimer's disease: In vitro, in vivo, and in silico studies. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 281, p. 117030, jan. 2025.

SINGH, Som *et al.* Amylin and Secretases in the Pathology and Treatment of Alzheimer's Disease. **Biomolecules**, v. 12, n. 7, p. 996, 17 jul. 2022.

SMITH, Michael B. **March's Advanced Organic Chemistry: Reactions, Mechanisms, and Structure**. [S.l.]: John Wiley & Sons, 2020.

SOLOMONS, T. W. Graham; FRYHLE, Craig B.; SNYDER, Scott A. **Organic Chemistry**. [S.l.]: John Wiley & Sons, 2022.

SON, Se-Young *et al.* Structure of human monoamine oxidase A at 2.2-Å resolution: The control of opening the entry for substrates/inhibitors. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 105, n. 15, p. 5739–5744, 15 abr. 2008.

SONI, Urvashi *et al.* Exploring Alzheimer's disease treatment: Established therapies and novel strategies for future care. **European Journal of Pharmacology**, v. 998, p. 177520, jul. 2025.

SONOGASHIRA, Kenkichi. Development of Pd–Cu catalyzed cross-coupling of terminal acetylenes with sp^2 -carbon halides. **Journal of Organometallic Chemistry**, v. 653, n. 1, p. 46–49, 1 jul. 2002.

SONOGASHIRA, Kenkichi; TOHDA, Yasuo; HAGIHARA, Nobue. A convenient synthesis of acetylenes: catalytic substitutions of acetylenic hydrogen with bromoalkenes, iodoarenes and bromopyridines. **Tetrahedron Letters**, v. 16, n. 50, p. 4467–4470, 1 jan. 1975.

SZUKIEWICZ, Dariusz. Histaminergic System Activity in the Central Nervous System: The Role in Neurodevelopmental and Neurodegenerative Disorders. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 25, n. 18, p. 9859, 12 set. 2024.

THOMAS, Shilu Deepa *et al.* Targeting Microglia in Neuroinflammation: H3 Receptor Antagonists as a Novel Therapeutic Approach for Alzheimer's Disease, Parkinson's Disease, and Autism Spectrum Disorder. **Pharmaceuticals**, v. 17, n. 7, p. 831, 25 jun. 2024.

TIPTON, Philip W. Updates on pharmacological treatment for Alzheimer's disease. **Neurologia i Neurochirurgia Polska**, v. 58, n. 2, p. 150–160, 30 abr. 2024.

TOCCI, Darcy *et al.* Beyond expectations: investigating nilotinib's potential in attenuating neurodegeneration in Alzheimer's disease. **Alzheimer's Research & Therapy**, v. 17, n. 1, p. 60, 15 mar. 2025.

TOK, Fatih. Recent Studies on Heterocyclic Cholinesterase Inhibitors Against Alzheimer's Disease. **Chemistry & Biodiversity**, v. 22, n. 4, p. e202402837, abr. 2025.

VEBER, Daniel F. *et al.* Molecular Properties That Influence the Oral Bioavailability of Drug Candidates. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 45, n. 12, p. 2615–2623, 1 jun. 2002.

WHO. **Dementia**. Disponível em: <<https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/dementia>>. Acesso em: 26 abr. 2025.

WINGEN, Kerstin; STARK, Holger. Scaffold variations in amine warhead of histamine H3 receptor antagonists. **Drug Discovery Today: Technologies**, v. 10, n. 4, p. e483–e489, dez. 2013.

WORRELL, B. T.; MALIK, J. A.; FOKIN, V. V. Direct Evidence of a Dinuclear Copper Intermediate in Cu(I)-Catalyzed Azide-Alkyne Cycloadditions. **Science**, v. 340, n. 6131, p. 457–460, 26 abr. 2013.

WU, Yuanbo; CHEN, Meiqiao; JIANG, Jielong. Mitochondrial dysfunction in neurodegenerative diseases and drug targets via apoptotic signaling. **Mitochondrion**, v. 49, p. 35–45, 1 nov. 2019.

YANG, Aihong *et al.* Novel coumarin derivatives as multifunctional anti-AD agents: Design, synthesis, X-ray crystal structure and biological evaluation. **Journal of Molecular Structure**, v. 1268, p. 133747, 15 nov. 2022.

YANG, Eleen; ABD-ELRAHMAN, Khaled S. Alzheimer's disease treatment landscape: current therapies and emerging mechanism-targeted approaches. **Neural Regeneration Research**, v. 20, n. 12, p. 3531–3532, dez. 2025.

YEE, Dominic J.; BALSANEK, Vojtech; SAMES, Dalibor. **Ligands for Aldoketoreductases**. , 25 fev. 2010. Disponível em: <<https://patents.google.com/patent/US20100048604A1/en>>. Acesso em: 14 dez. 2024

YOO, Jeasang *et al.* Multi-target-directed therapeutic strategies for Alzheimer's disease: controlling amyloid- β aggregation, metal ion homeostasis, and enzyme inhibition. **Chemical Science**, v. 16, n. 5, p. 2105–2135, 2025.

YOUDIM, Moussa B. H. Multi Target Neuroprotective and Neurorestorative Anti-Parkinson and Anti-Alzheimer Drugs Ladostigil and M30 Derived from Rasagiline. **Experimental Neurobiology**, v. 22, n. 1, p. 1–10, 30 mar. 2013.

YUAN, Jin-Wei *et al.* KMnO₄/AcOH-mediated C3-selective direct arylation of coumarins with arylboronic acids. **RSC Advances**, v. 6, n. 42, p. 35936–35944, 2016.

ZARINI-GAKIYE, Elahe *et al.* Recent Updates in the Alzheimer's Disease Etiopathology and Possible Treatment Approaches: A Narrative Review of Current Clinical Trials. **Current Molecular Pharmacology**, v. 13, n. 4, p. 273–294, 2 nov. 2020.

ZHAO, Jin *et al.* Pd/C Catalyzed Carbonylation of Azides in the Presence of Amines. **Organic Letters**, v. 18, n. 8, p. 1736–1739, 15 abr. 2016.

ZHAO, Xian; LIU, Wei. Recent Advances in Transition-Metal-Catalyzed Sonogashira Cross-Coupling Reactions of Alkyl Electrophiles. **Synthesis**, v. 56, n. 08, p. 1244–1258, abr. 2024.

ZHAO, Xingyi *et al.* Dual-target inhibitors based on acetylcholinesterase: Novel agents for Alzheimer's disease. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 279, p. 116810, dez. 2024.

ZHAO, Yan; ZHAO, Baolu. Oxidative Stress and the Pathogenesis of Alzheimer's Disease. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2013, p. 1–10, 2013.

ŽOŁEK, Teresa *et al.* Coumarin Derivative Hybrids: Novel Dual Inhibitors Targeting Acetylcholinesterase and Monoamine Oxidases for Alzheimer's Therapy. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 25, n. 23, p. 12803, 28 nov. 2024.

7. ANEXOS

7.1. ANEXO 1 – MODELAGEM MOLECULAR

Tabela S1. O detalhamento qualitativo das interações moleculares entre os ligantes da Série A e a enzima *EeAChE*

Composto	Score	Cátion- π	Ligação de hidrogênio	Empilhamento π - π tipo T	Hal.	π -alquil
26a	82,01	Trp ⁸⁶	Tyr ³³⁷ Phe ²⁹⁵ Ser ²⁹³ Arg ²⁹⁶	Tyr ¹²⁴	-	Trp ⁸⁶ Ile ²⁹⁴ His ⁴⁴⁷
26b	83,3	Trp ⁸⁶	Tyr ³³⁷ Phe ²⁹⁵	Tyr ¹²⁴	-	Trp ⁸⁶ Trp ²⁸⁶ His ⁴⁴⁷
26c	73,41	Trp ⁸⁶	Tyr ³³⁷ Phe ²⁹⁵ Ser ²⁹³ Arg ²⁹⁶	Tyr ¹²⁴	-	Trp ⁸⁶ Ile ²⁹⁴ His ⁴⁴⁷
26d	78,24	Trp ⁸⁶	Tyr ³³⁷ Phe ²⁹⁵ Ser ²⁹³ Arg ²⁹⁶	Tyr ¹²⁴	-	Trp ⁸⁶ Ile ²⁹⁴ His ⁴⁴⁷
26e	79,61	Trp ⁸⁶	Tyr ³³⁷ Phe ²⁹⁵	Tyr ¹²⁴	Trp ²⁸⁶	Trp ⁸⁶ Ile ²⁹⁴
26f	82,87	Trp ⁸⁶	Tyr ³³⁷ Phe ²⁹⁵	Tyr ¹²⁴	Gln ²⁹¹	Trp ⁸⁶
26g	83,49	Trp ⁸⁶	Tyr ³³⁷ Phe ²⁹⁵	Tyr ¹²⁴	-	Trp ⁸⁶ Ile ²⁹⁴ His ⁴⁴⁷
26h	83,98	Trp ⁸⁶	Tyr ³³⁷ Phe ²⁹⁵	Tyr ¹²⁴	Gln ²⁹¹	Trp ⁸⁶ Ile ²⁹⁴ His ⁴⁴⁷
26i	80,18	Trp ⁸⁶	Tyr ³³⁷ Phe ²⁹⁵	Tyr ¹²⁴	-	Trp ⁸⁶ Ile ²⁹⁴ His ⁴⁴⁷
26j	77,19	Trp ⁸⁶	Tyr ³³⁷ Phe ²⁹⁵	Tyr ¹²⁴	-	Trp ⁸⁶ Ile ²⁹⁴ Leu ²⁸⁹ His ⁴⁴⁷
25a	80,42	Trp ⁸⁶	Tyr ³³⁷ Phe ²⁹⁵	Tyr ¹²⁴	-	Trp ⁸⁶ His ⁴⁴⁷

Tabela S2. O detalhamento qualitativo das interações moleculares entre os ligantes da Série A e a enzima *EqBChE*

Composto	Score	Cátion- π	Ligação de hidrogênio	Empilhamento π - π	π -alquil
26a	48,55	Trp ¹¹⁰	-	Tyr ³⁶⁰ Phe ³⁵⁷	Trp ¹¹⁰ Ala ³⁵⁶
26b	50,06	Trp ¹¹⁰	-	Tyr ³⁶⁰	Trp ¹¹⁰ Ala ³⁵⁶ Leu ³¹³
26c	50,67	Trp ¹¹⁰	-	Tyr ³⁶⁰	Trp ¹¹⁰ Ala ³⁵⁶ Leu ³¹³ Val ³⁰⁵
26d	50,40	Trp ¹¹⁰	Asn ³¹⁷	Tyr ³⁶⁰	Trp ¹¹⁰ Ala ³⁵⁶ Leu ³¹³ Val ³⁰⁵
26e	48,29	Trp ¹¹⁰	Asn ³¹⁷	Tyr ³⁶⁰ Phe ³⁵⁷	Trp ¹¹⁰ Ala ³⁵⁶ Leu ³¹³ Val ³⁰⁵
26f	48,38	Trp ¹¹⁰	-	Tyr ³⁶⁰ Phe ³⁵⁷	Trp ¹¹⁰ Ala ³⁵⁶ Leu ³¹³ Val ³⁰⁵
26g	48,13	Trp ¹¹⁰	-	Tyr ³⁶⁰	Trp ¹¹⁰ Ala ³⁵⁶ Leu ³¹³ Val ³⁰⁵
26h	48,64	Trp ¹¹⁰	-	Tyr ³⁶⁰	Trp ¹¹⁰ Ala ³⁵⁶ Leu ³¹³ Val ³⁰⁵
26i	48,34	Trp ¹¹⁰	-	Tyr ³⁶⁰ Phe ³⁵⁷	Trp ¹¹⁰ Ala ³⁵⁶ Leu ³¹³ Val ³⁰⁵
26j	50,44	Trp ¹¹⁰	-	Tyr ³⁶⁰	Trp ¹¹⁰ Ala ³⁵⁶ Leu ³¹³ Val ³⁰⁵

Tabela S3. O detalhamento qualitativo das interações moleculares entre os ligantes da Série A e a enzima *hH₃R*.

Composto	Score	Ponte salina	Ligação de hidrogênio	Empilhamento π - π tipo T	Empilhamento π - π	π -alquil
26a	101,31	Asp ¹¹⁴	Tyr ¹⁸⁹ Tyr ⁹⁴	Phe ³⁹⁸	Tyr ⁹⁴	Arg ²⁷ Phe ³⁹⁸ Tyr ³⁷⁴ Trp ⁴⁰²
26b	106,73	Asp ¹¹⁴	Tyr ¹⁸⁹ Tyr ³⁹⁴	Phe ¹⁹³ Phe ³⁹⁸	Tyr ⁹⁴	Arg ²⁷ Val ⁹⁵ Tyr ³⁷⁴ Trp ⁴⁰²
25b	86,50	Asp ¹¹⁴	Tyr ¹⁸⁹ Tyr ³⁹⁴	Phe ¹⁹³ Phe ³⁹⁸	Tyr ⁹⁴	Arg ²⁷ Val ⁹⁵ Tyr ³⁷⁴ Trp ⁴⁰²

Tabela S4. O detalhamento qualitativo das interações moleculares entre os ligantes da Série A e a isoforma MAO-B.

Composto	Score	Ligação de hidrogênio	π -alquil	π -sigma	Empilhamento π - π do tipo T	Empilhamento π - π
26a	36,53	Cys ¹⁷²	Ile ¹⁹⁹	Leu ¹⁷¹	Tyr ³²⁶	Tyr ³⁹⁸ Tyr ⁴³⁵
26b	37,82	Cys ¹⁷² Pro ¹⁰² Gln ²⁰⁶	Leu ¹⁷¹ Ile ¹⁹⁹	Leu ¹⁷¹ Ile ¹⁹⁹	Tyr ³²⁶	Tyr ³⁹⁸ Tyr ⁴³⁵
25b	37,66	Cys ¹⁷²	Leu ¹⁷¹ Ile ¹⁹⁹	Leu ¹⁷¹ Ile ¹⁹⁹	Tyr ³²⁶	Tyr ³⁹⁸ Tyr ⁴³⁵

Tabela S5. O detalhamento qualitativo das interações moleculares entre os ligantes da Série A e a isoforma MAO-A.

Composto	Score	Ligação de hidrogênio	π -alquil	π -sigma
26a	63,62	Cys ³²³	Val ⁹³ Ala ¹¹¹	Leu ⁹⁷ Val ²¹⁰ Thr ²¹¹
26b	79,50	Phe ²⁰⁸	Val ⁹³ Leu ⁹⁷ Ala ¹¹¹ Val ²¹⁰	Thr ²¹¹
25b	72,61	Phe ²⁰⁸	Val ⁹³ Leu ⁹⁷ Ala ¹¹¹ Val ²¹⁰	Thr ²¹¹

Tabela S6. O detalhamento qualitativo das interações moleculares entre os ligantes da Série B e a enzima *EeAChE*.

Composto	Score	Cátion- π	Ligação de hidrogênio	Empilhamento π - π tipo T	π -alquil	π -sigma
58a	76,59	Trp ⁸⁶	Tyr ³³⁷ Phe ²⁹⁵ Arg ²⁹⁶	Tyr ¹²⁴	Trp ⁸⁶ His ⁴⁴⁷	-
58b	77,51	Trp ⁸⁶	Tyr ³³⁷ Phe ²⁹⁵ Arg ²⁹⁶	Tyr ¹²⁴	Trp ⁸⁶ His ⁴⁴⁷	-
58c	80,82	Trp ⁸⁶	Tyr ³³⁷ Phe ²⁹⁵ Arg ²⁹⁶ Ser ²⁹³	Tyr ¹²⁴	Trp ⁸⁶ His ⁴⁴⁷ Leu ²⁸⁹	-
58d	76,84	Trp ⁸⁶	Tyr ³³⁷ Phe ²⁹⁵ Arg ²⁹⁶ Ser ²⁹³	Tyr ¹²⁴	Trp ⁸⁶ His ⁴⁴⁷	-
58e	78,86	Trp ⁸⁶	Tyr ³³⁷ Phe ²⁹⁵ Arg ²⁹⁶ Ser ²⁹³	Tyr ¹²⁴	Trp ⁸⁶ His ⁴⁴⁷	-
58f	82,6	Trp ⁸⁶	Tyr ³³⁷ Phe ²⁹⁵ Arg ²⁹⁶ Ser ²⁹³	Tyr ¹²⁴	Trp ⁸⁶ His ⁴⁴⁷	-
58g	78,21	Trp ⁸⁶	Phe ²⁹⁵	Tyr ¹²⁴	Trp ⁸⁶ His ⁴⁴⁷	Ile ²⁹⁴

Tabela S7. O detalhamento qualitativo das interações moleculares entre os ligantes da Série B e a enzima *EeAChE* com o substrato ACTI.

Composto	Score	Carga atrativa	Lig de H	Emp. π - π	Emp. amida- π	Hal.	π -alquil	π -sigma	n \rightarrow π^*
58a	70,84	Asp ⁷⁴	Tyr ¹²⁴ Phe ²⁹⁵	Tyr ³⁴¹ Trp ²⁸⁶	Ser ²⁹³	-	Leu ²⁸⁹	-	Tyr ¹²⁴
58b	73,65	Asp ⁷⁴	Tyr ¹²⁴ Phe ²⁹⁵	Tyr ³⁴¹ Trp ²⁸⁶	Ser ²⁹³	-	Leu ²⁸⁹	-	Tyr ¹²⁴
58c	72,39	Asp ⁷⁴	Tyr ¹²⁴	Tyr ³⁴¹ Trp ²⁸⁶	-	-	Leu ²⁸⁹	-	Trp ²⁸⁶
58d	70,55	Asp ⁷⁴	Tyr ¹²⁴ Phe ²⁹⁵	Tyr ³⁴¹ Trp ²⁸⁶	Ser ²⁹³	Ser ²⁹³ Gln ²⁹¹	Leu ²⁸⁹	-	Tyr ¹²⁴
58e	71,83	Asp ⁷⁴	Tyr ¹²⁴ Phe ²⁹⁵	Tyr ³⁴¹ Trp ²⁸⁶	-	-	Leu ²⁸⁹	-	-
58f	71,28	Asp ⁷⁴	Tyr ¹²⁴ Ser ²⁹³	Trp ²⁸⁶	-	-	Leu ²⁸⁹	Tyr ³⁴¹	-
58g	62,00	Asp ⁷⁴	Tyr ¹²⁴ Ser ¹²⁵	Tyr ³⁴¹ Trp ²⁸⁶	-	-	-	-	Trp ²⁸⁶

Tabela S8. O detalhamento qualitativo das interações moleculares entre os ligantes da Série B e a enzima *EqBChE*

Composto	Score	Cátion- π	Ligação de hidrogênio	Empilhamento π - π	π -alquil	π -sigma
58a	44,64	Trp ¹¹⁰	Asp ⁹⁸	Tyr ³⁶⁰	Trp ¹¹⁰ Ala ³⁵⁶ Leu ³¹³	-
58b	46,28	Trp ¹¹⁰	Asp ⁹⁸	Tyr ³⁶⁰	Trp ¹¹⁰ Ala ³⁵⁶ His ⁴⁶⁶ Leu ³¹³	-
58c	45,31	Trp ¹¹⁰	-	Tyr ³⁶⁰	Trp ¹¹⁰ Ala ³⁵⁶	Leu ³¹³
58d	45,31	Trp ¹¹⁰	Asp ⁹⁸	Tyr ³⁶⁰	Trp ¹¹⁰ Ala ³⁵⁶ His ⁴⁶⁶ Leu ³¹³	-
58e	46,24	Trp ¹¹⁰	Asp ⁹⁸	Tyr ³⁶⁰	Trp ¹¹⁰ Ala ³⁵⁶ His ⁴⁶⁶	Leu ³¹³
58f	46,58	Trp ¹¹⁰	Asp ⁹⁸	Tyr ³⁶⁰	Trp ¹¹⁰ Ala ³⁵⁶ His ⁴⁶⁶ Leu ³¹³	-
58g	47,10	Trp ¹¹⁰	Asp ⁹⁸	Tyr ³⁶⁰	Trp ¹¹⁰ Ala ³⁵⁶ His ⁴⁶⁶ Leu ³¹³	-

Tabela S9. O detalhamento qualitativo das interações moleculares entre os ligantes da Série C e a enzima *EeAChE*.

Composto	Score	Cátion- π	Ligação de hidrogênio	π -alquil	Empilhamento π - π	Empilhamento π - π tipo T
67a	85,41	Trp ⁸⁶	Asp ⁷⁴	Trp ⁸⁶ Tyr ³³⁷ His ⁴⁴⁷	Tyr ³⁴¹	Tyr ¹²⁴
67b	81,82	-	Tyr ³³⁷	Trp ²⁸⁶	Trp ⁸⁶	Tyr ¹²⁴

Tabela S10. O detalhamento qualitativo das interações moleculares entre os ligantes da Série C e a enzima *EqBChE*.

Composto	Score	Ligação de hidrogênio	π -alquil	π -sigma	Empilhamento π - π tipo T
67a	51,31	Ser ²²⁶	Leu ³¹⁴ Tyr ³⁶⁰	-	Trp ¹¹⁰ Trp ²⁵⁹ Phe ³⁵⁷ His ⁴⁶⁶
67b	56,02	Ser ²²⁶	Leu ³¹⁴	Trp ¹¹⁰	Trp ²⁵⁹ Phe ³⁵⁷ His ⁴⁶⁶

7.2. ANEXO 2 – ESPECTROS DE RMN DE ^1H e ^{13}C

Figura S1. Espectro de RMN ^1H do composto (**27a**) em CDCl_3 a 500 MHz.

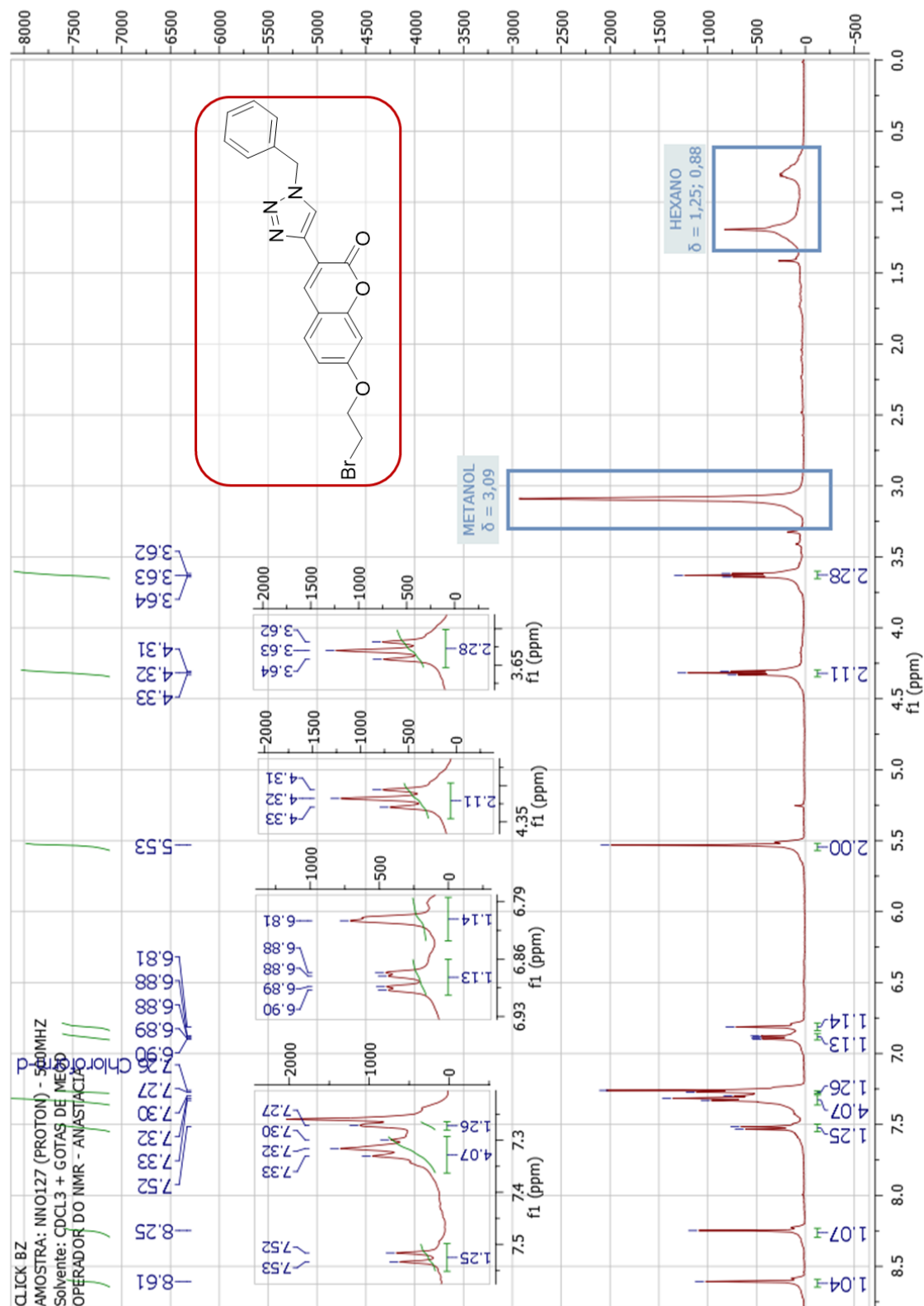


Figura S2. Espectro de RMN ^{13}C do composto (**27a**) em CDCl_3 a 125 MHz.

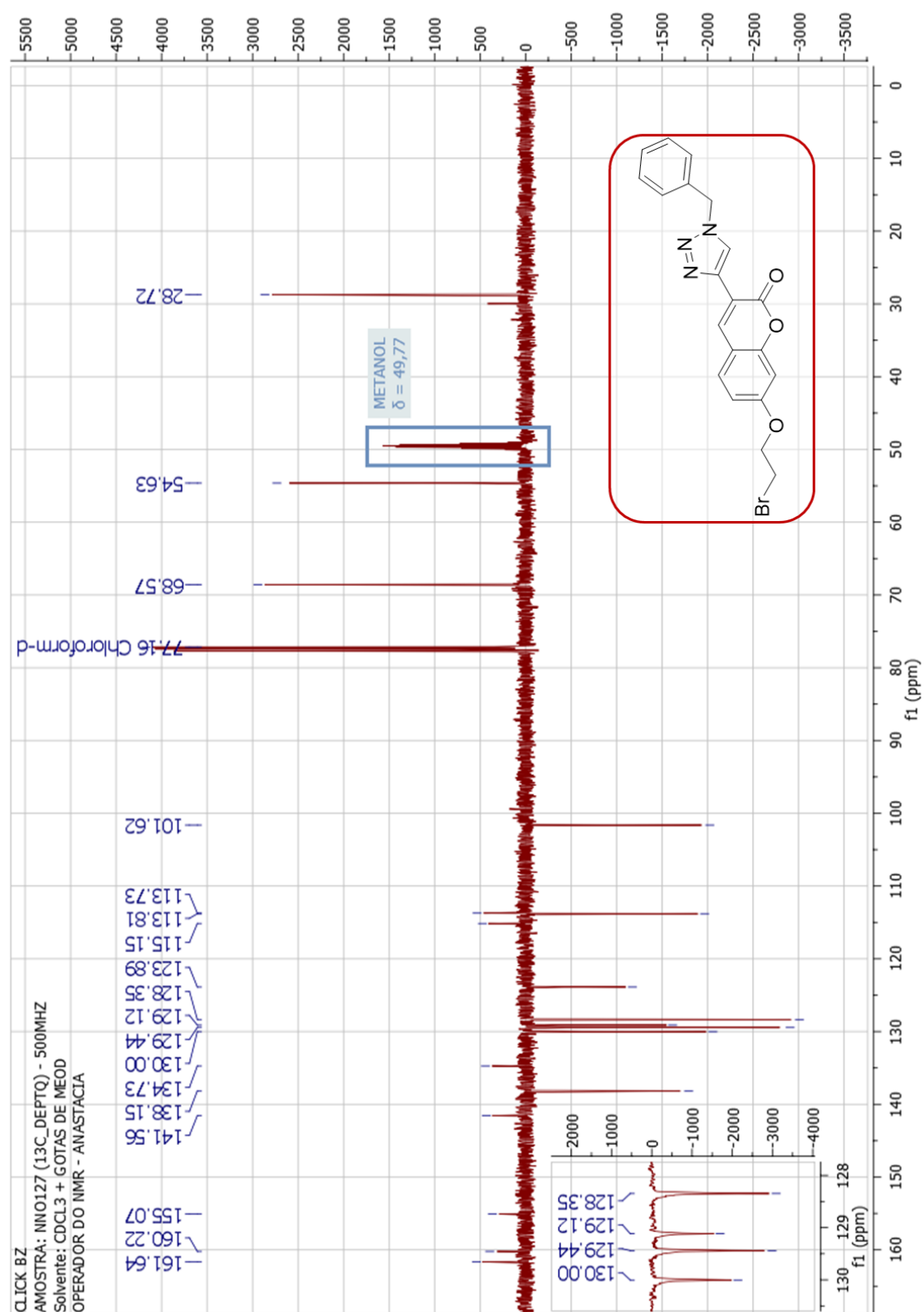


Figura S3. Espectro de RMN ^1H do composto (**27b**) em CDCl_3 a 500 MHz.

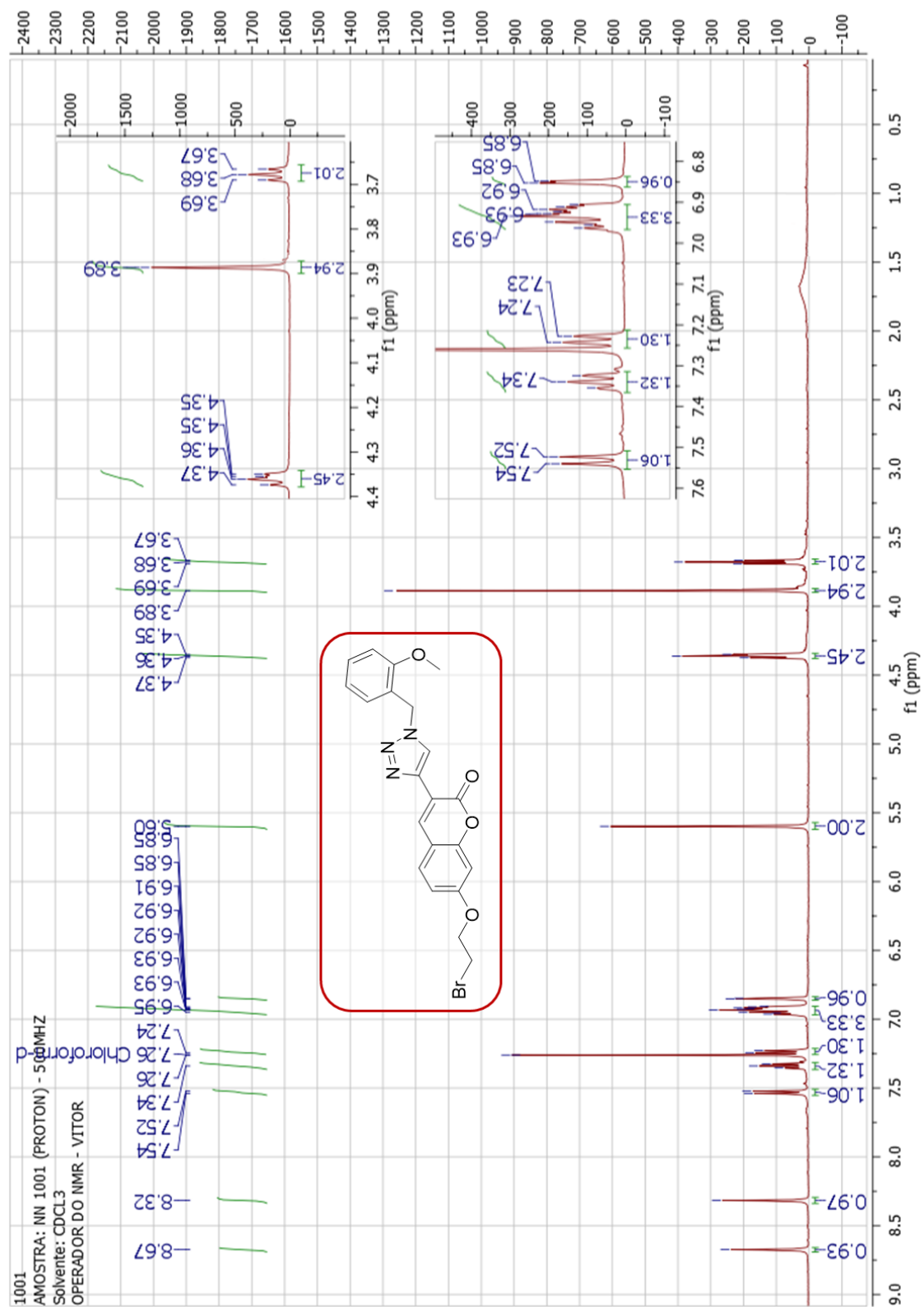


Figura S4. Espectro de RMN ^{13}C do composto (**27b**) em CDCl_3 a 125 MHz.

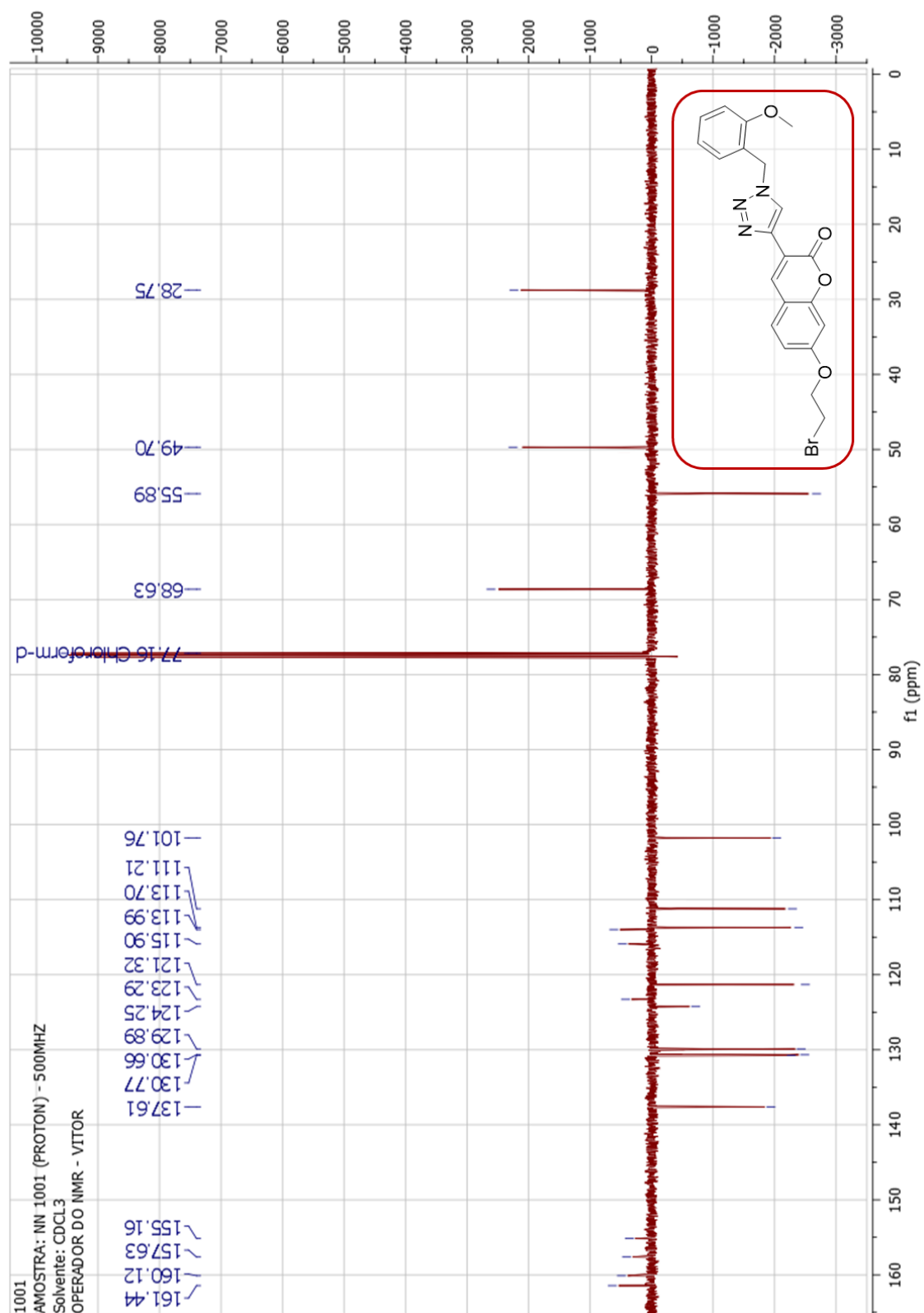


Figura S5. Espectro de RMN ^1H do composto (**27c**) em CDCl_3 a 500 MHz.

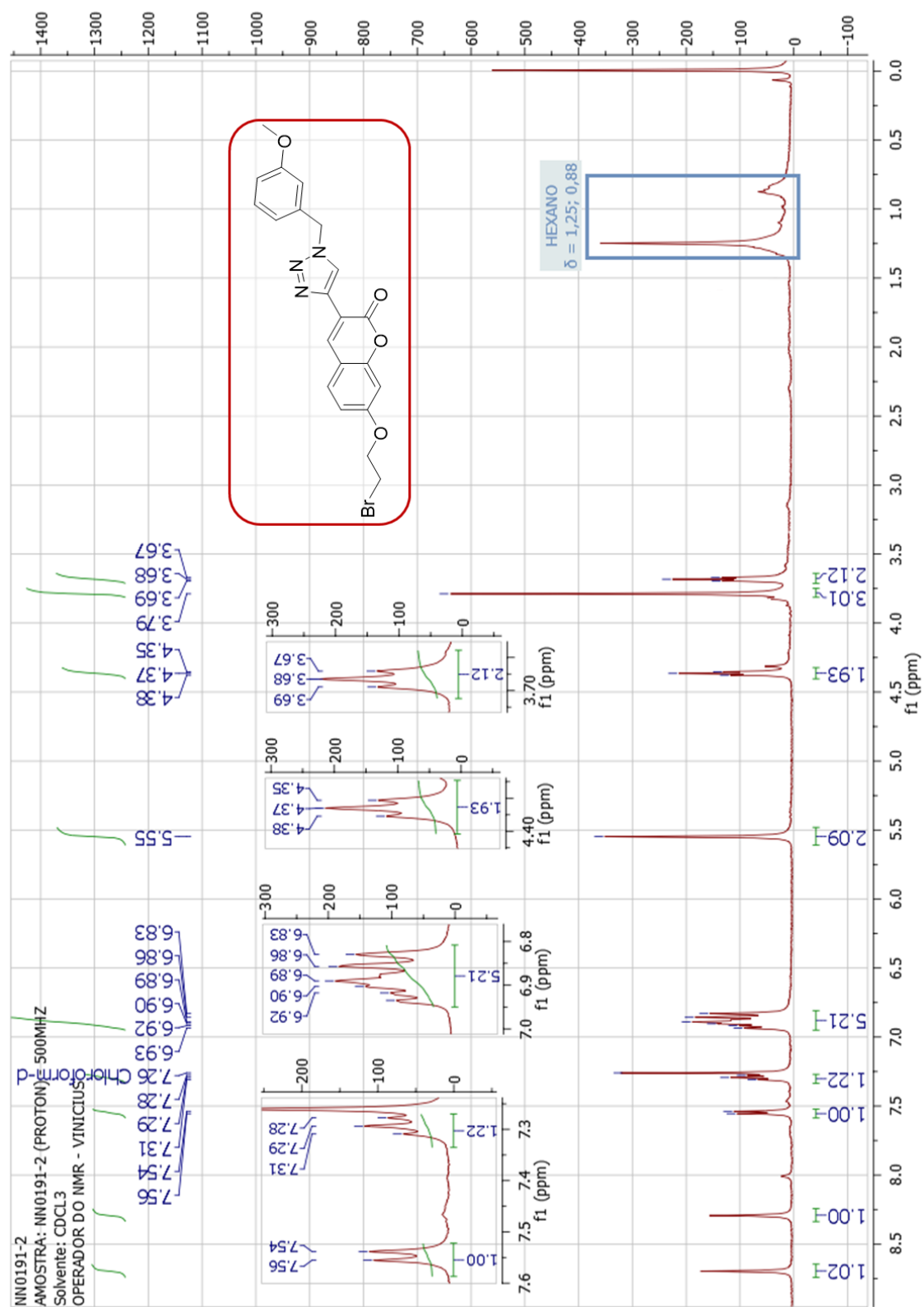


Figura S6. Espectro de RMN ^{13}C do composto (**27c**) em CDCl_3 a 125 MHz.

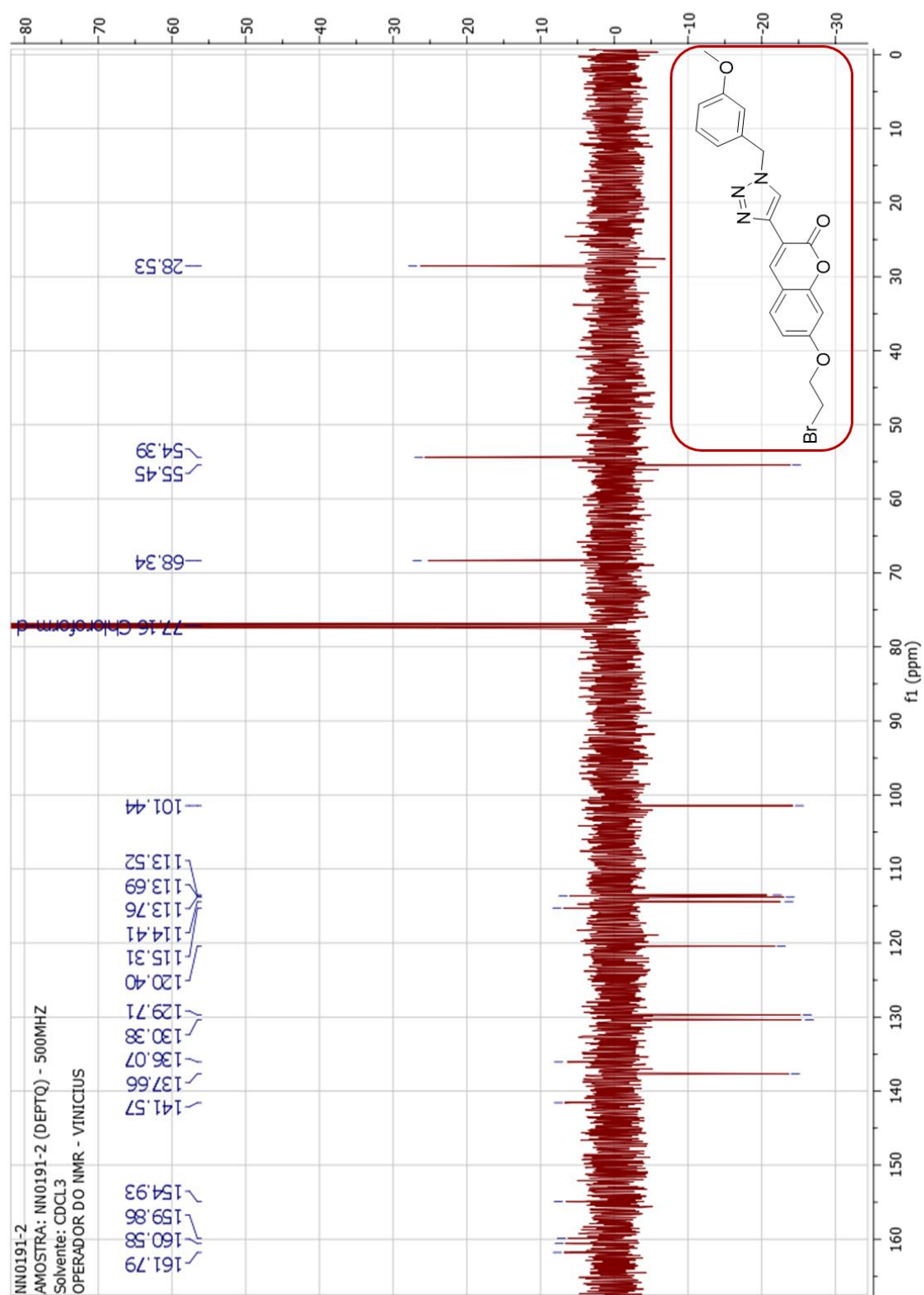


Figura S7. Espectro de RMN ^1H do composto (**27d**) em CDCl_3 a 500 MHz.

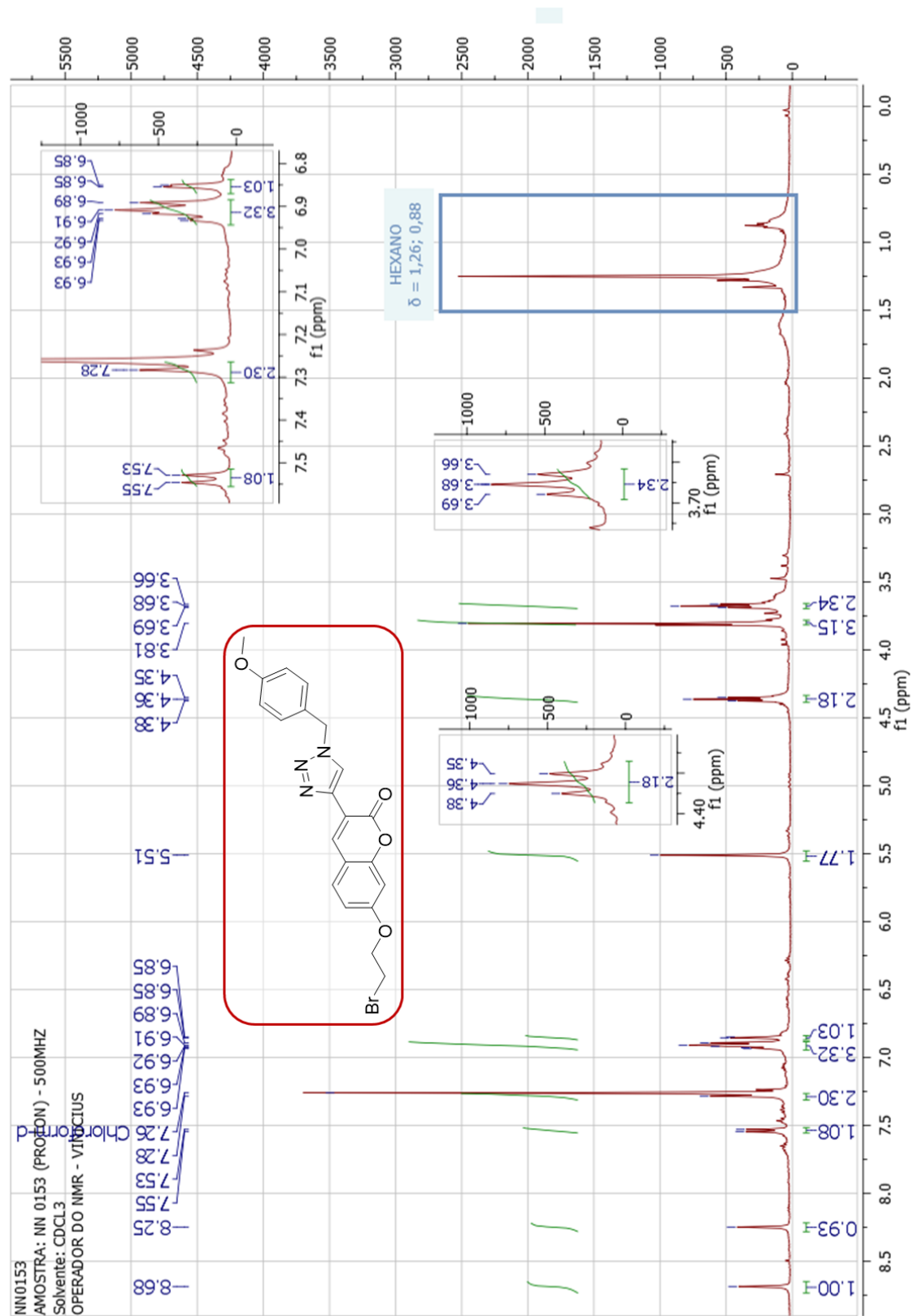
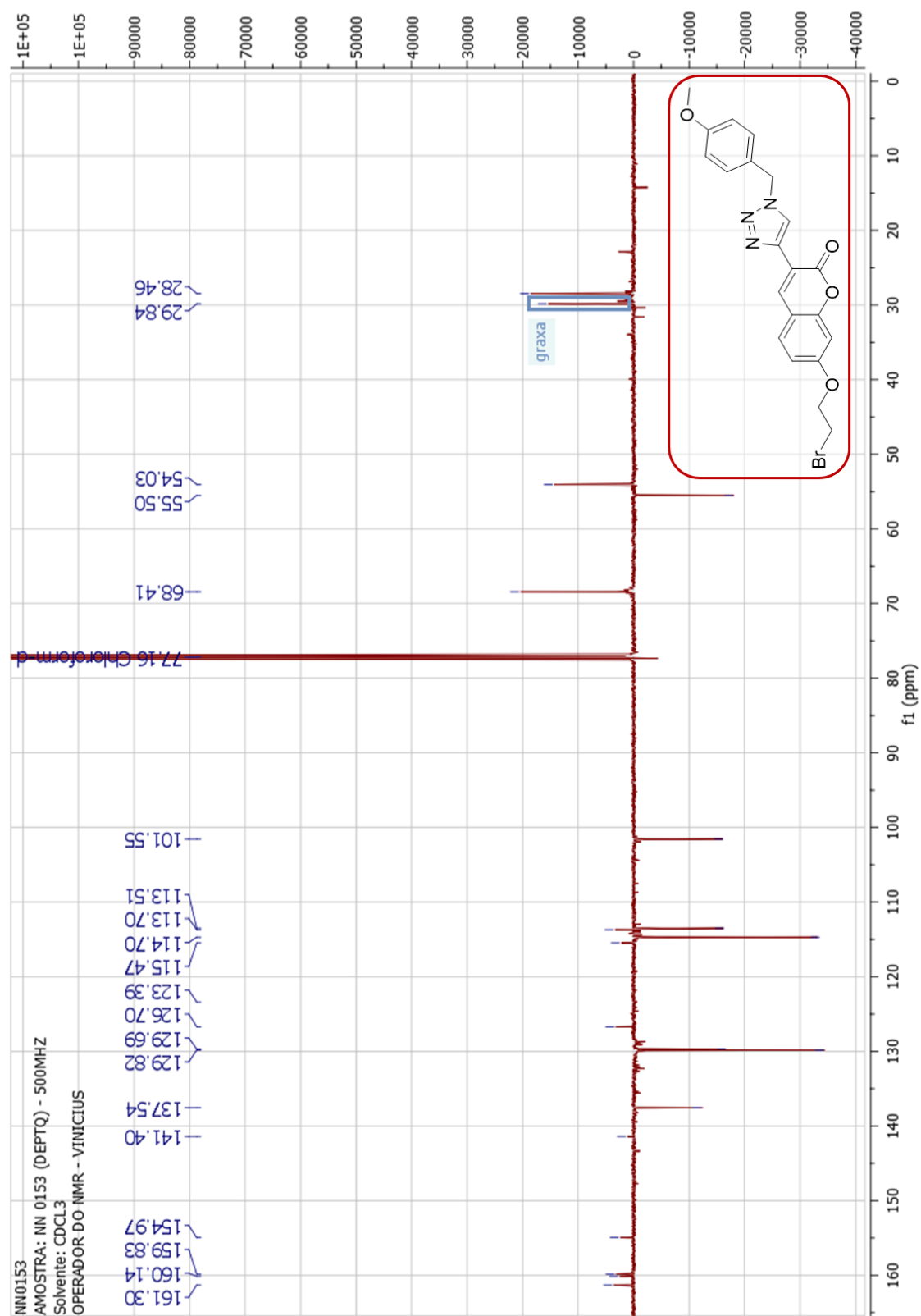


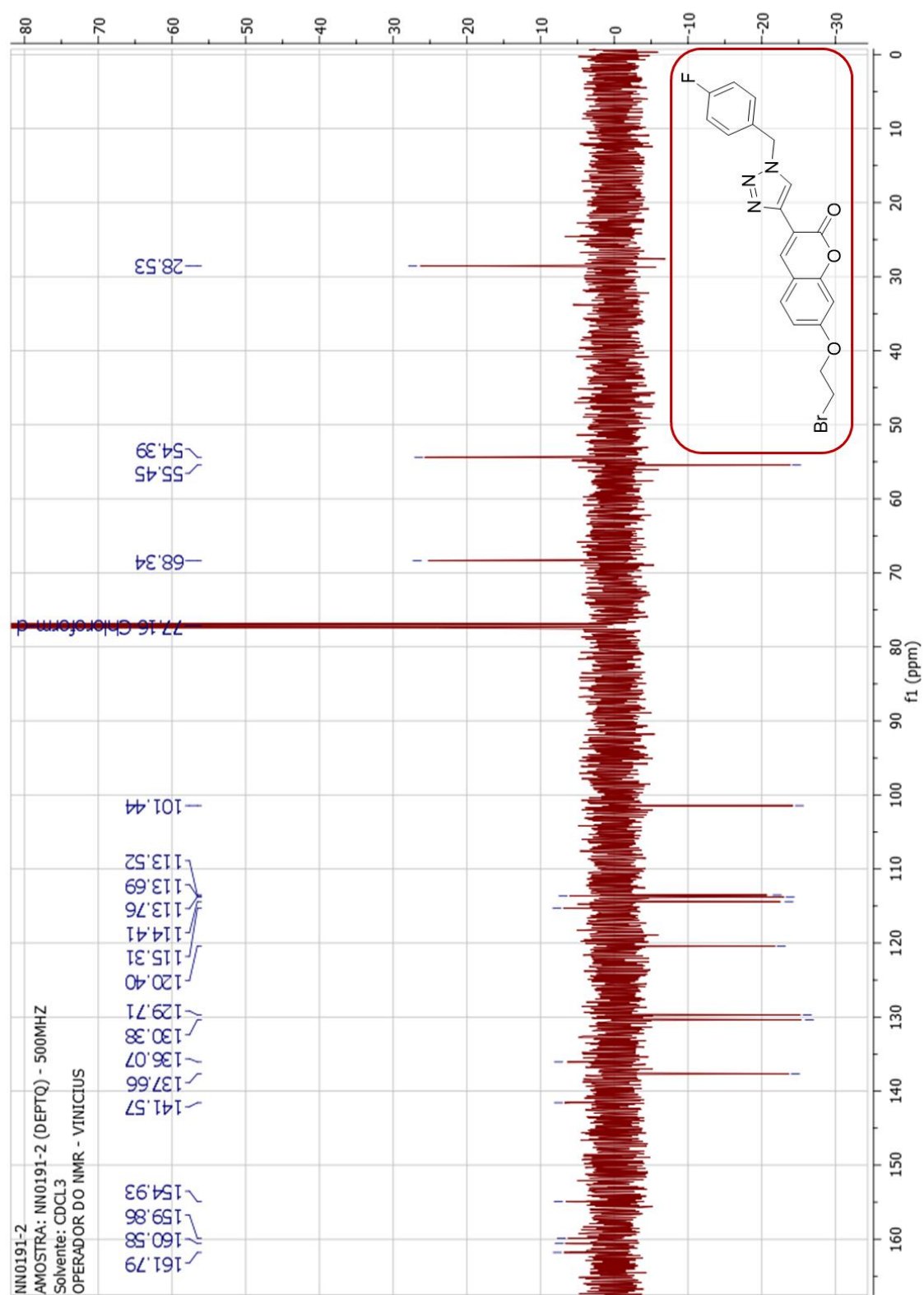
Figura S8. Espectro de RMN ^{13}C do composto (**27d**) em CDCl_3 a 125 MHz.



Oc1ccc(cc1OC2CCBr)C3=CN=NC=C3c4ccc(cc4)F
 10

1H NMR (500 MHz, CDCl₃) spectrum of compound 10. The spectrum shows peaks from 0.92 to 8.69 ppm. Key features include a triplet at 0.92 ppm (3H, t, J=7.0 Hz), a doublet at 0.91 ppm (3H, d, J=7.0 Hz), a multiplet between 1.07-1.89 ppm (4H, m), a singlet at 1.94 ppm (3H, s), a multiplet between 3.67-4.38 ppm (4H, m), a doublet at 7.30 ppm (2H, d, J=8.5 Hz), and a multiplet between 7.26-7.55 ppm (4H, m). The chemical structure of 10 is shown in a red box: 1-(2-bromoethoxy)-4-(2-(4-fluorophenyl)-1H-1,2,4-triazol-5-yl)phenol.

Figura S10. Espectro de RMN ^{13}C do composto (**27e**) em CDCl_3 a 125 MHz.



11
 AMOSTRA: 11 0189 (PROTON) - 500MHZ
 Solvente: CDCl3
 OPERADOR DO NMR - VINICIUS

Chemical structure of **11** (1-(4-bromophenyl)-2-(4-chlorobenzyl)-1H-benzotriazole-3-carboxylic acid) is shown in a red box.

1H NMR Spectrum (CDCl₃):

- Chemical Shifts (ppm):** 8.70, 8.31, 8.31, 7.56, 7.54, 7.33, 7.31, 7.30, 7.26, 7.20, 7.18, 6.94, 6.94, 6.93, 6.92, 6.86, 6.86, 5.56, 4.38, 4.37, 4.36, 3.69, 3.68, 3.67, 2.00, 1.97, 1.10, 1.10, 0.94, 0.94.
- Integration values:** 0.94, 0.93, 1.00, 2.77, 0.84, 0.97, 0.94, 1.97, 4.38, 2.10, 2.00, 3.69, 3.68, 3.67, 2.00, 2.10, 1.00, 0.84, 0.97, 0.94.

Figura S12. Espectro de RMN ^{13}C do composto (**27f**) em CDCl_3 a 125 MHz.

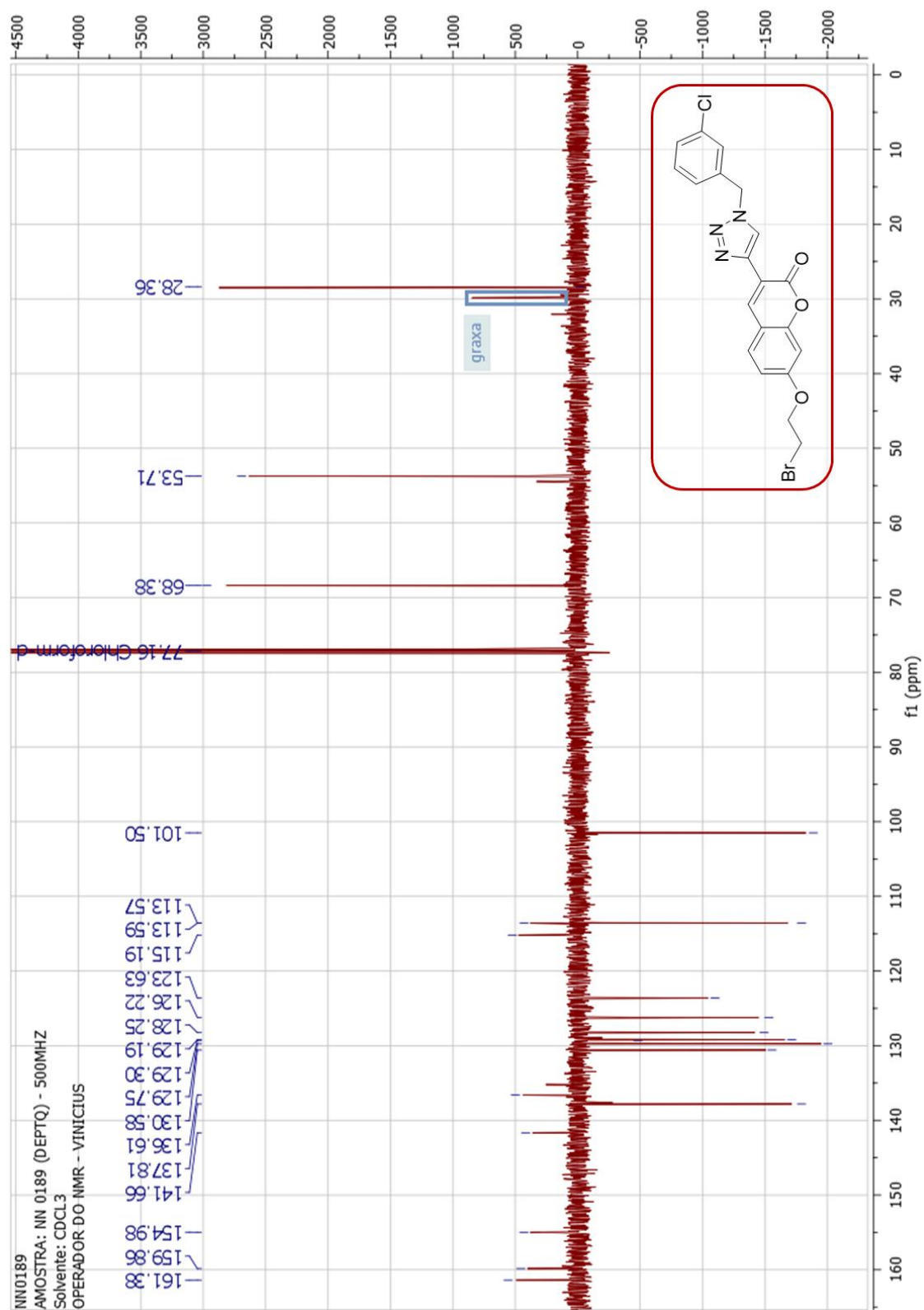


Figura S13. Espectro de RMN ^1H do composto (**27g**) em CDCl_3 a 500 MHz.

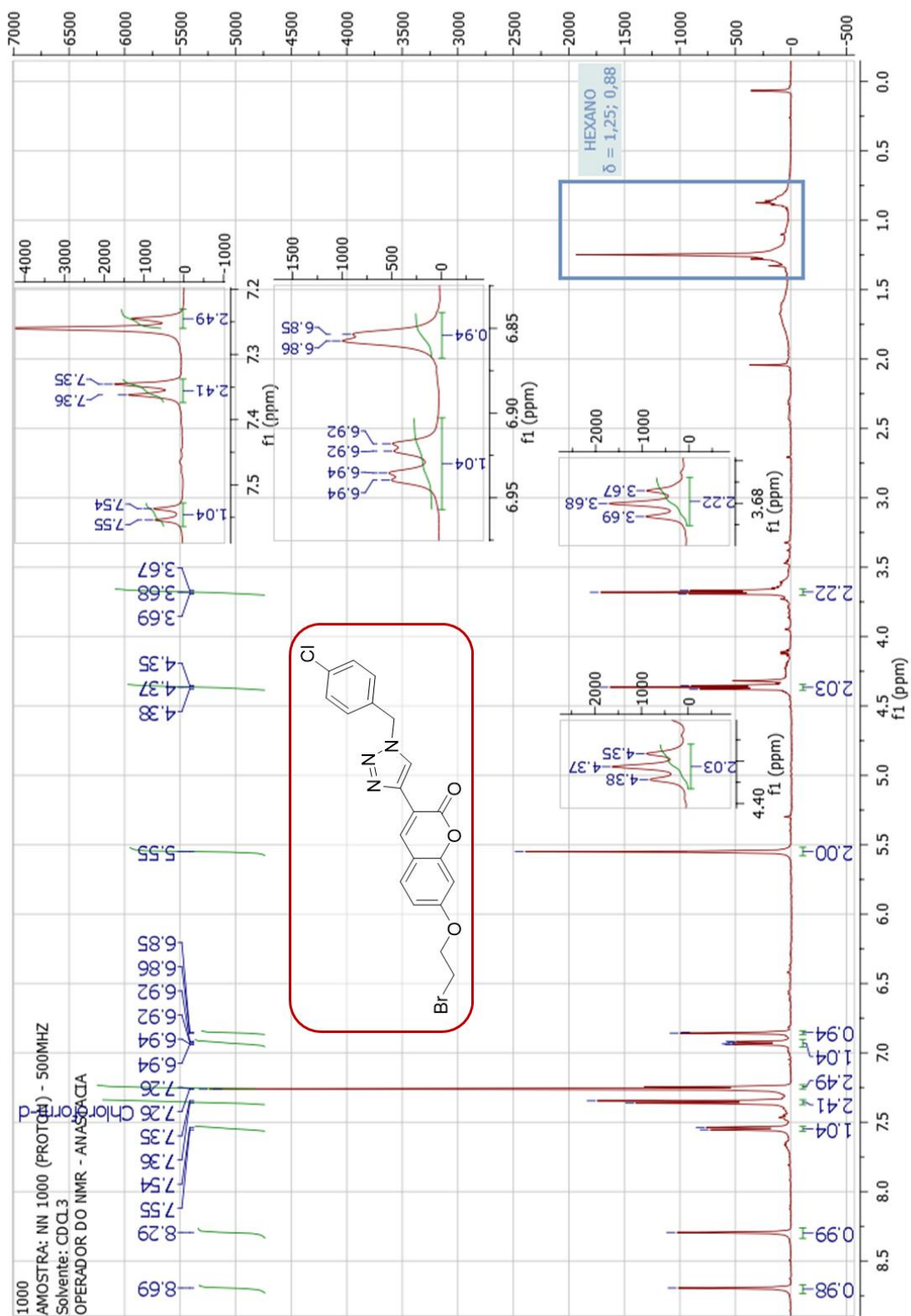


Figura S14. Espectro de RMN ^{13}C do composto (**27g**) em CDCl_3 a 125 MHz.

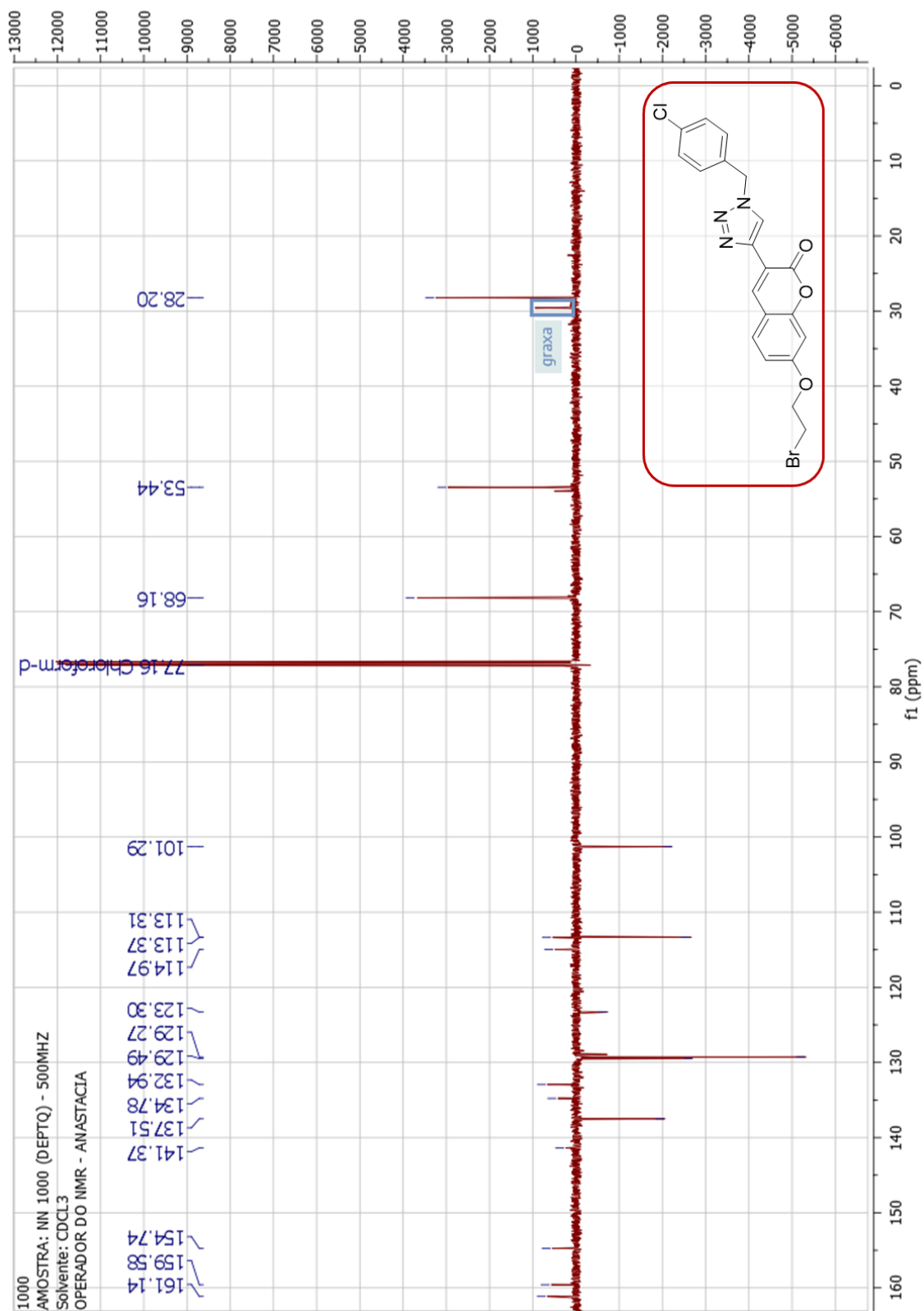


Figura S15. Espectro de RMN ^1H do composto (**27h**) em CDCl_3 a 500 MHz.

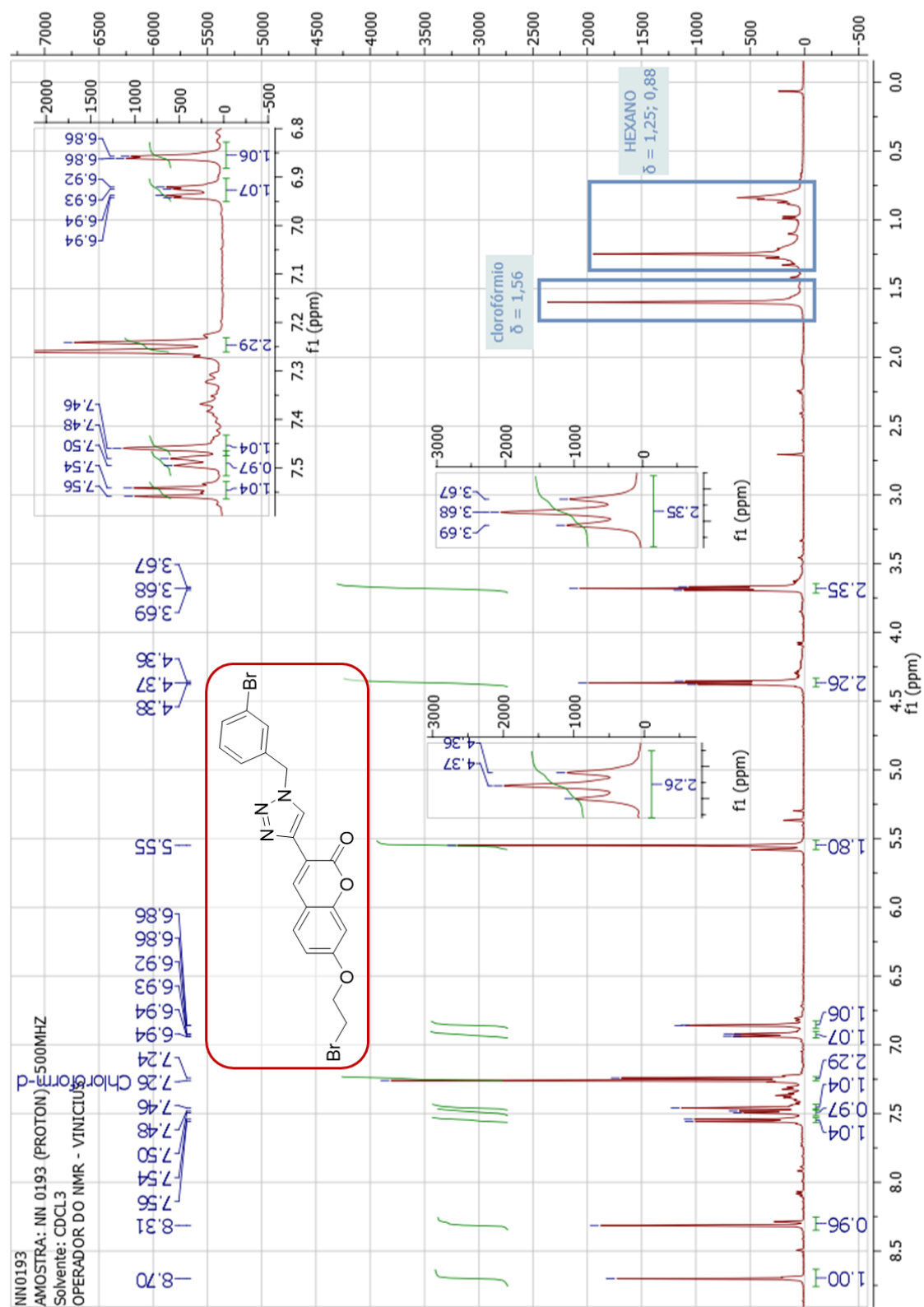


Figura S16. Espectro de RMN ^{13}C do composto (**27h**) em CDCl_3 a 125 MHz.

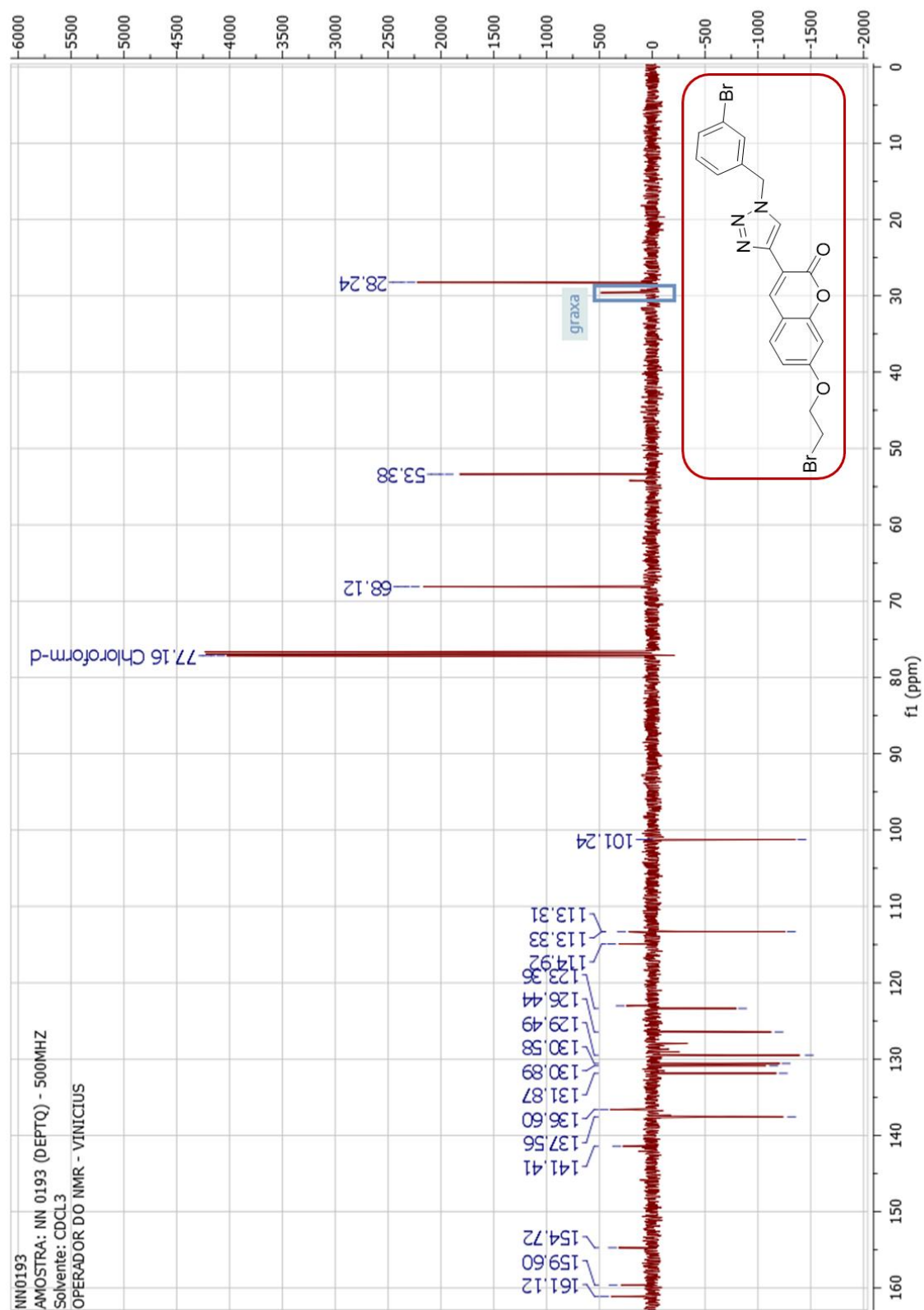


Figura S17. Espectro de RMN ^1H do composto (**27i**) em CDCl_3 a 500 MHz.

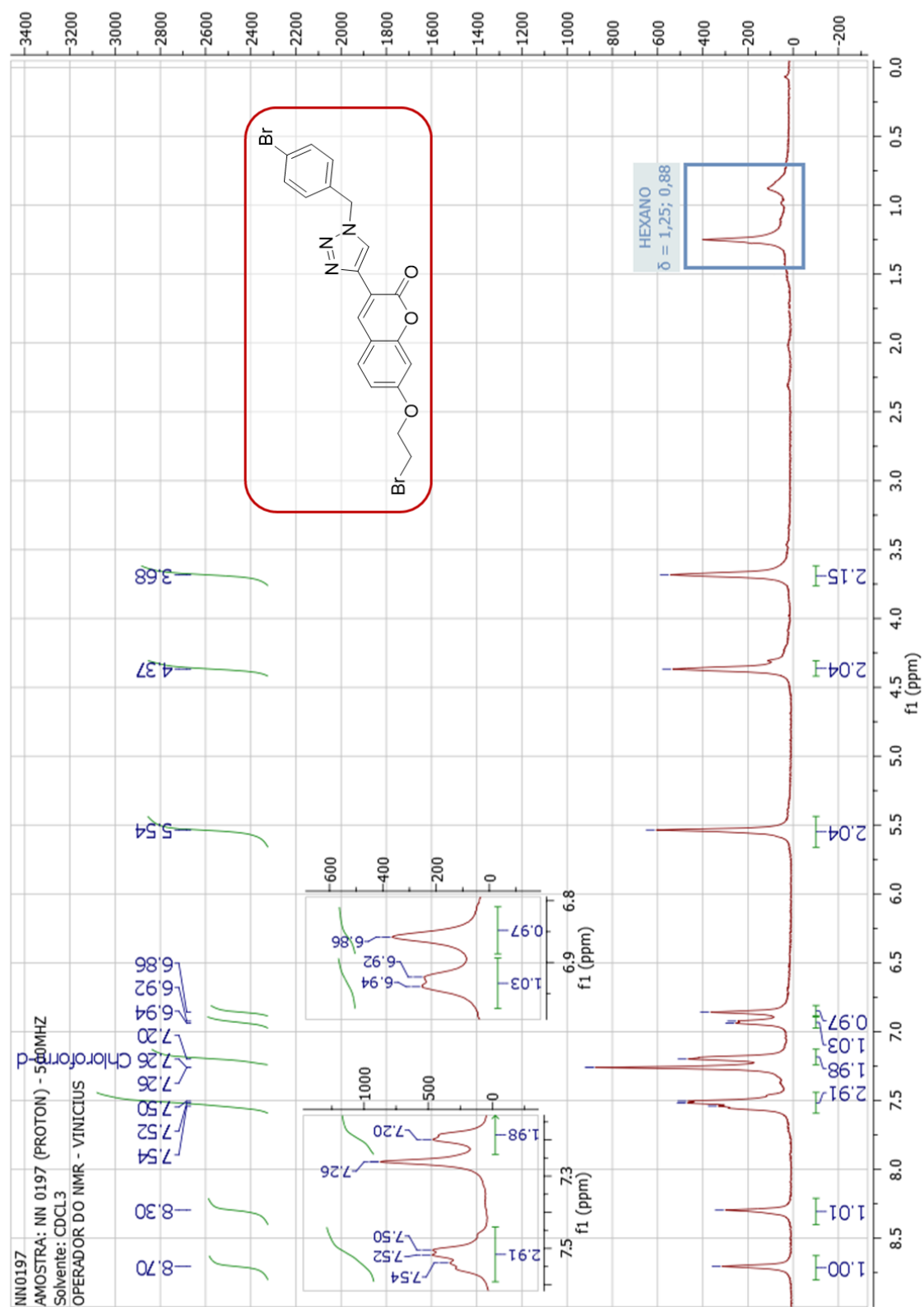


Figura S18. Espectro de RMN ^{13}C do composto (**27i**) em CDCl_3 a 125 MHz.

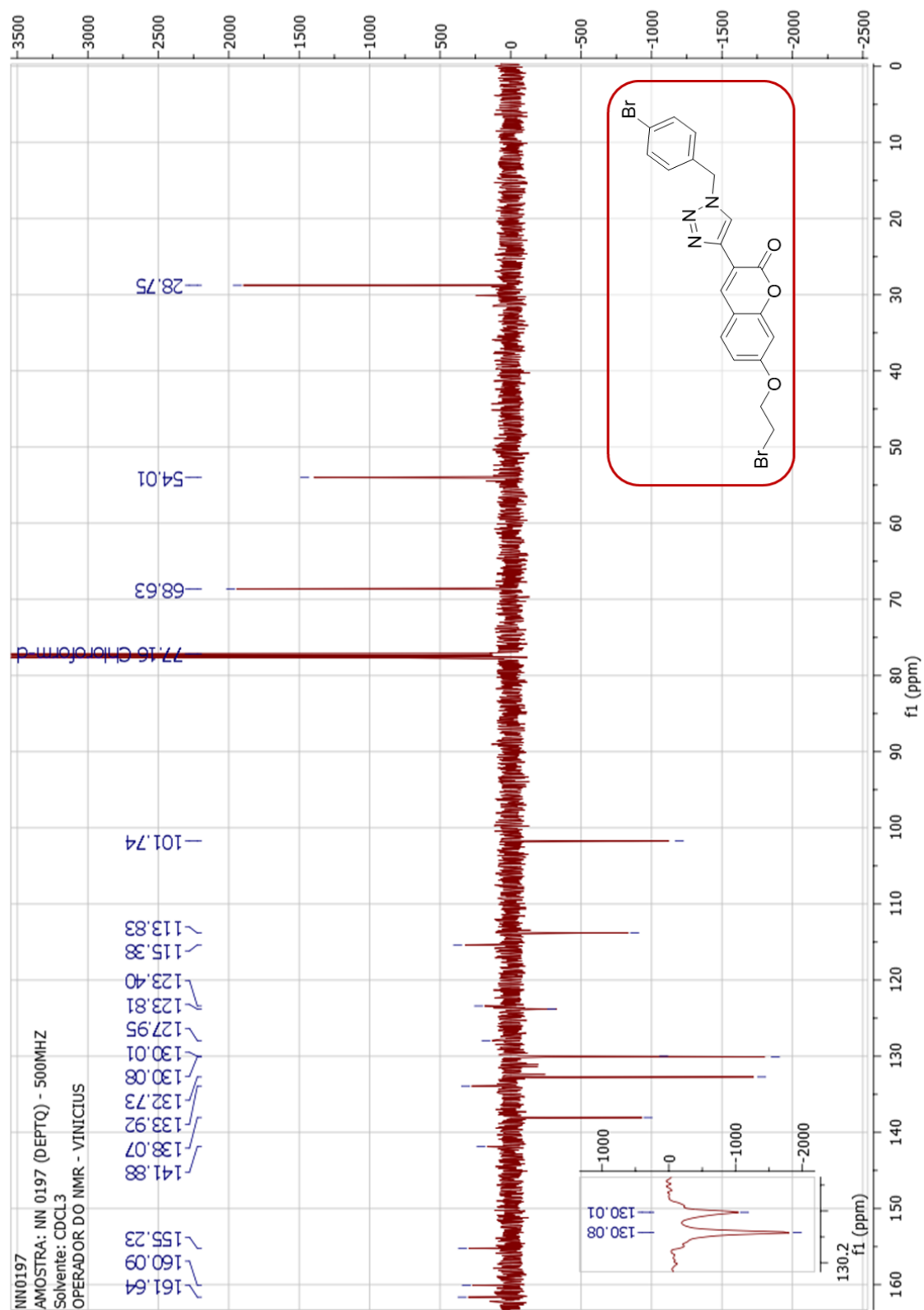


Figura S19. Espectro de RMN ^1H do composto (**27j**) em CDCl_3 a 500 MHz.

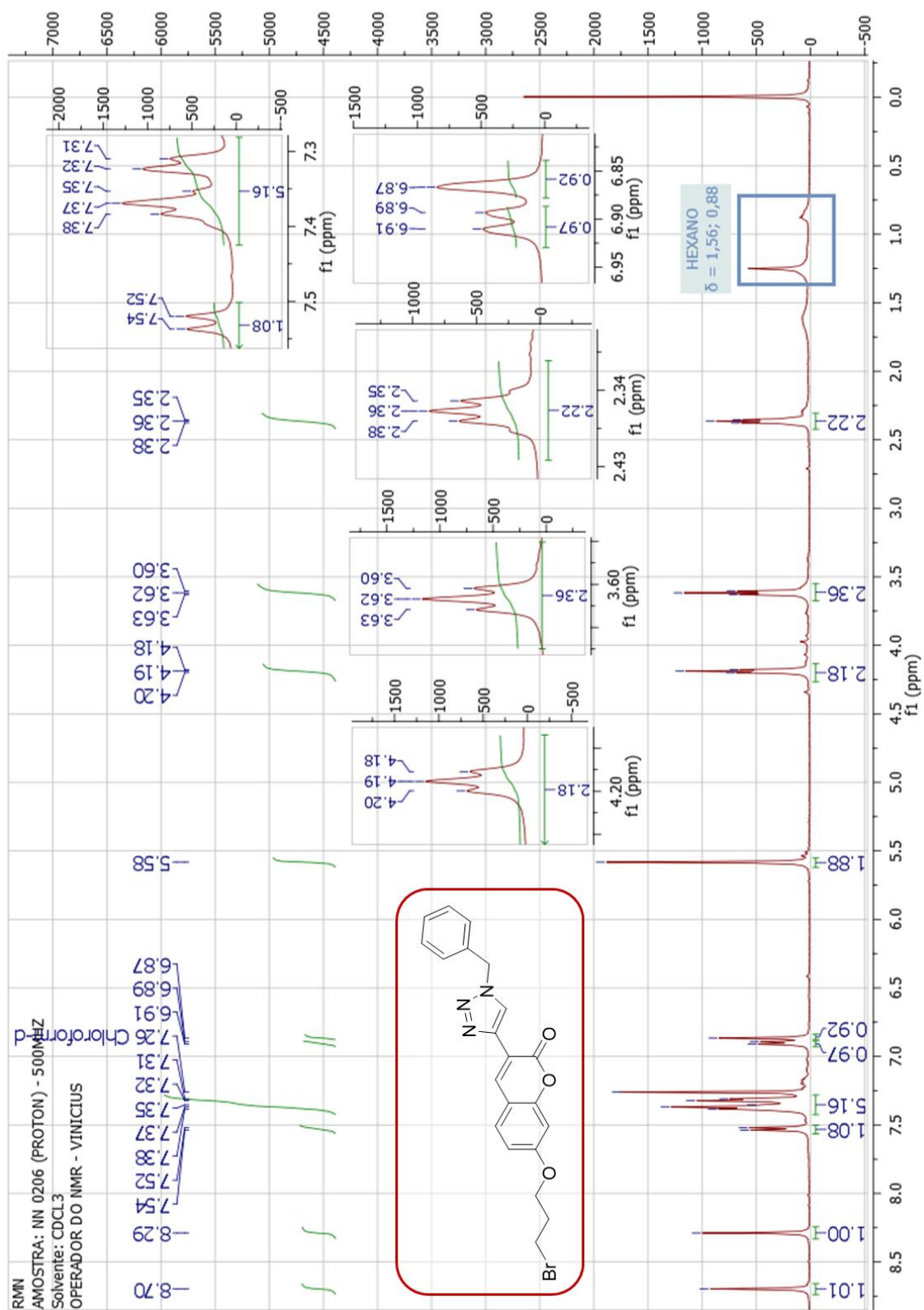


Figura S20. Espectro de RMN ^{13}C do composto (**27j**) em CDCl_3 a 125 MHz.

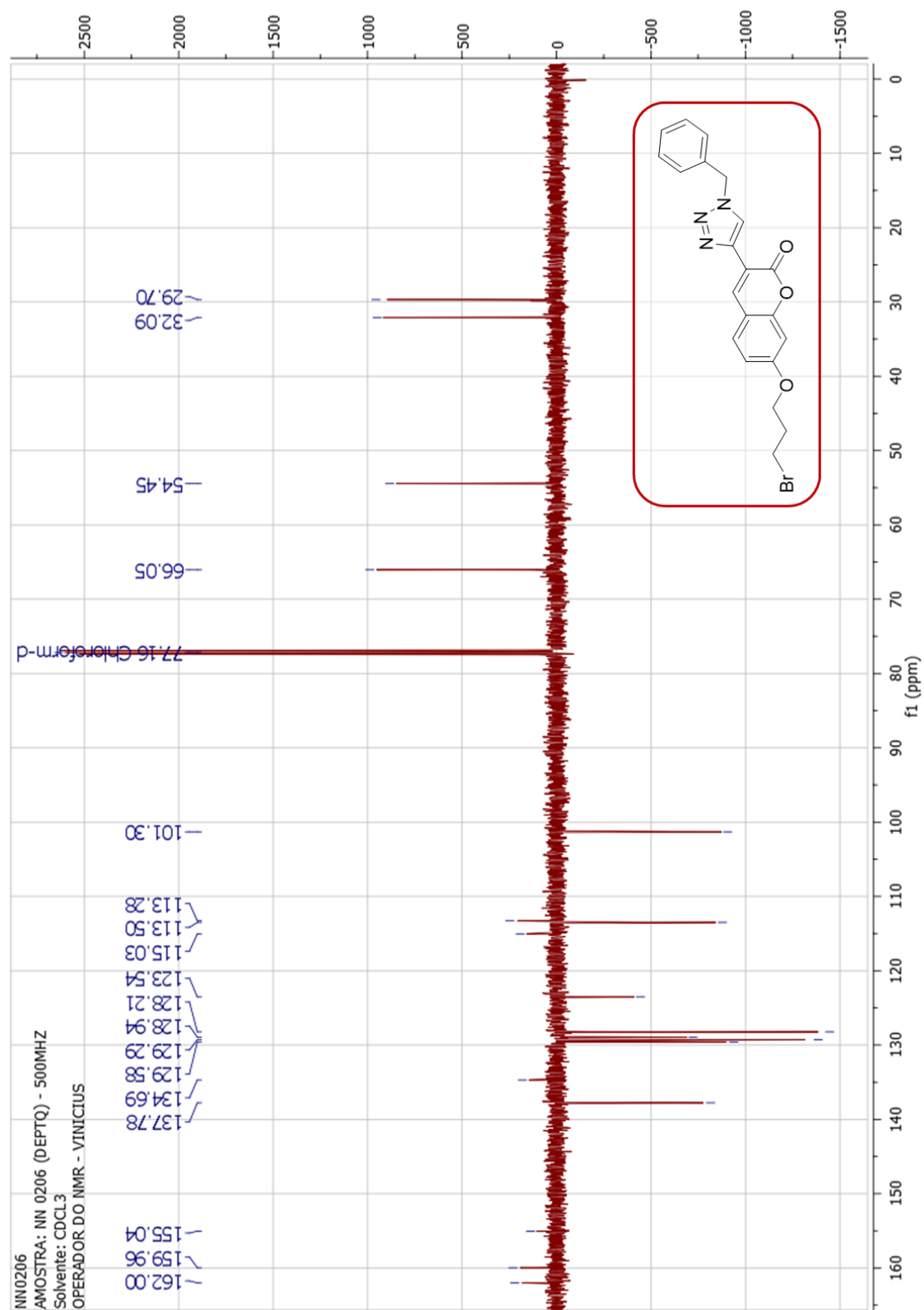


Figura S21. Espectro de RMN ^1H do composto (**26a**) em CDCl_3 a 500 MHz.

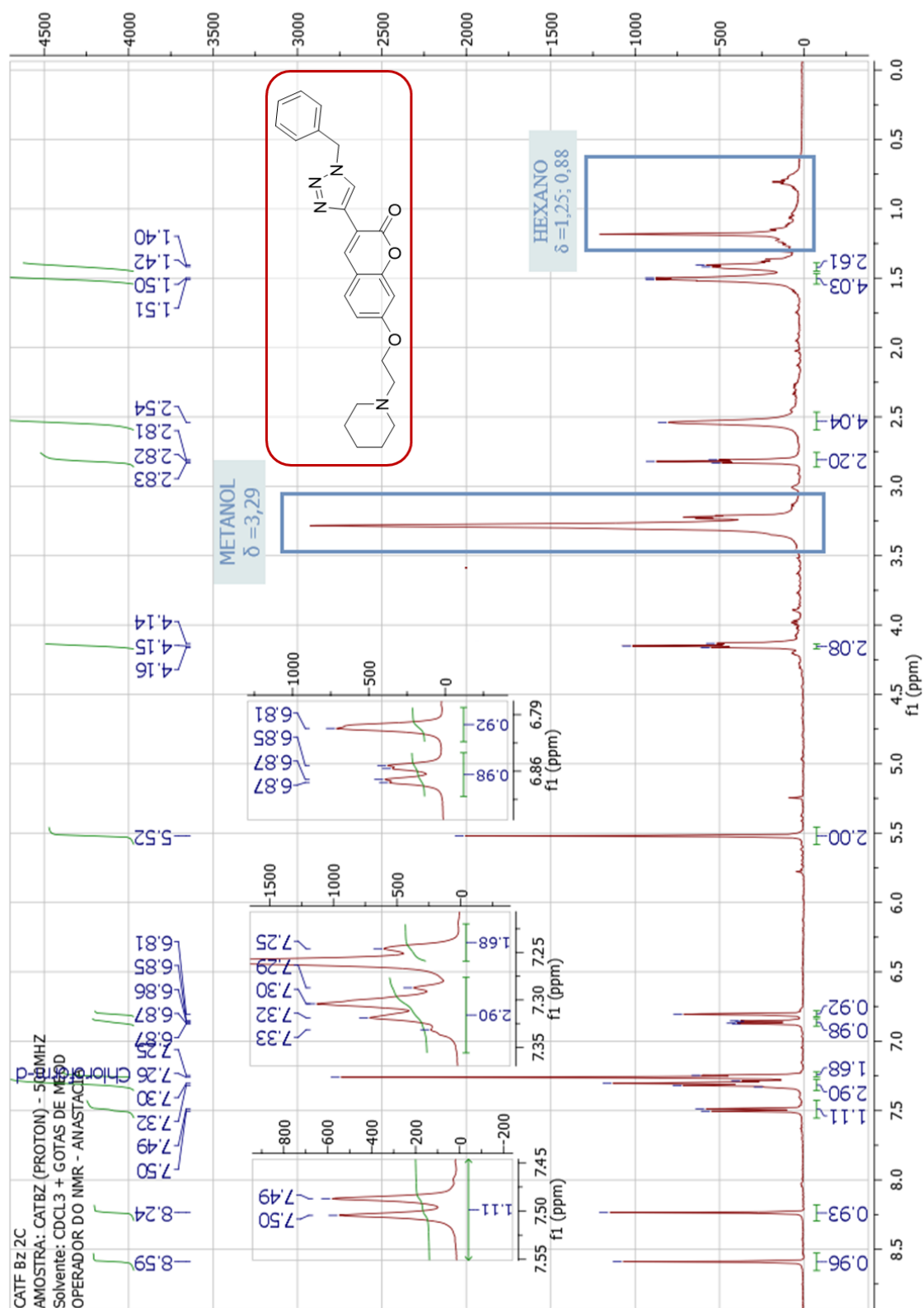


Figura S22. Espectro de RMN ^{13}C do composto (**26a**) em CDCl_3 a 125 MHz.

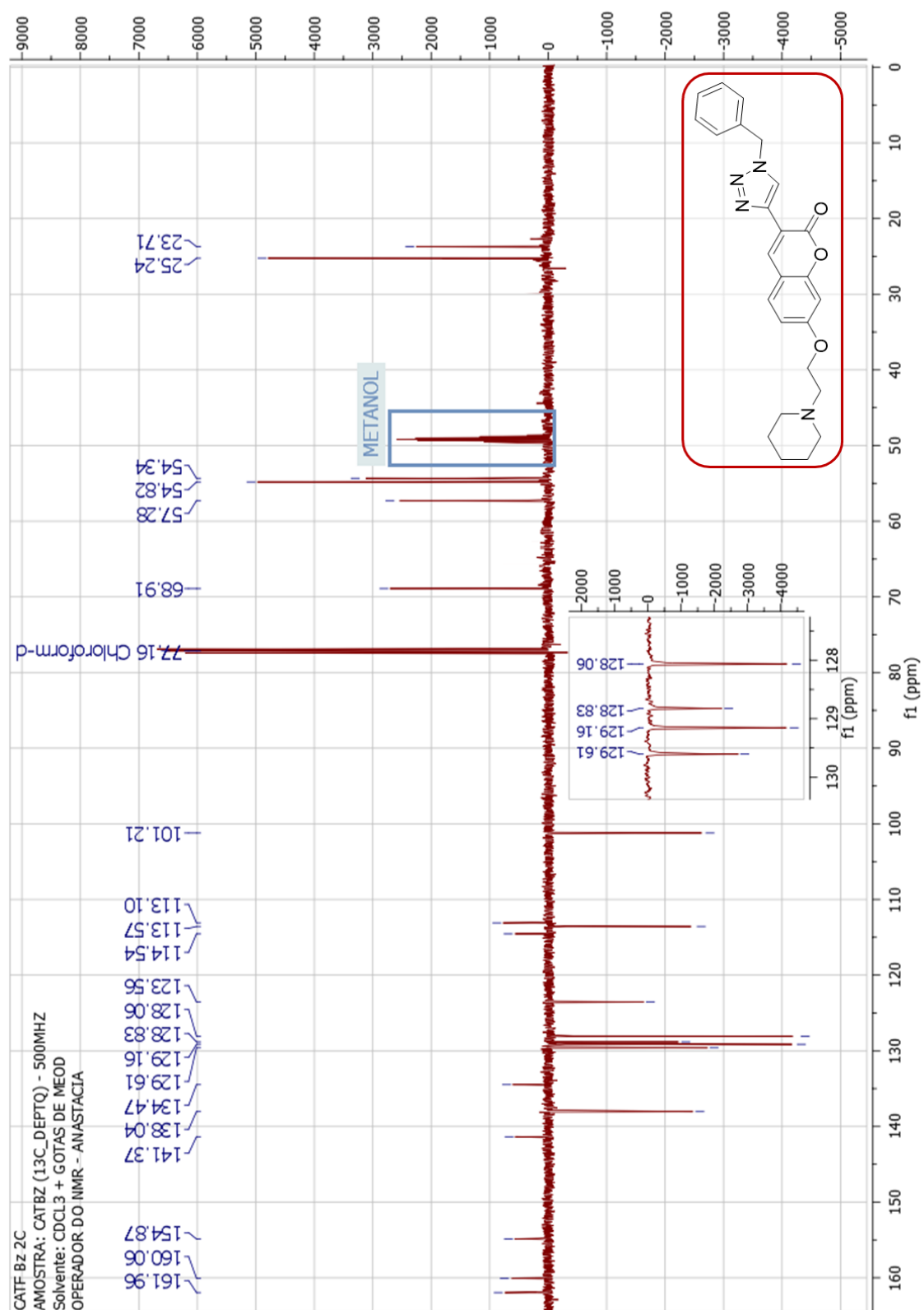


Figura S23. Espectro de RMN ^1H do composto (**26b**) em CDCl_3 a 500 MHz.

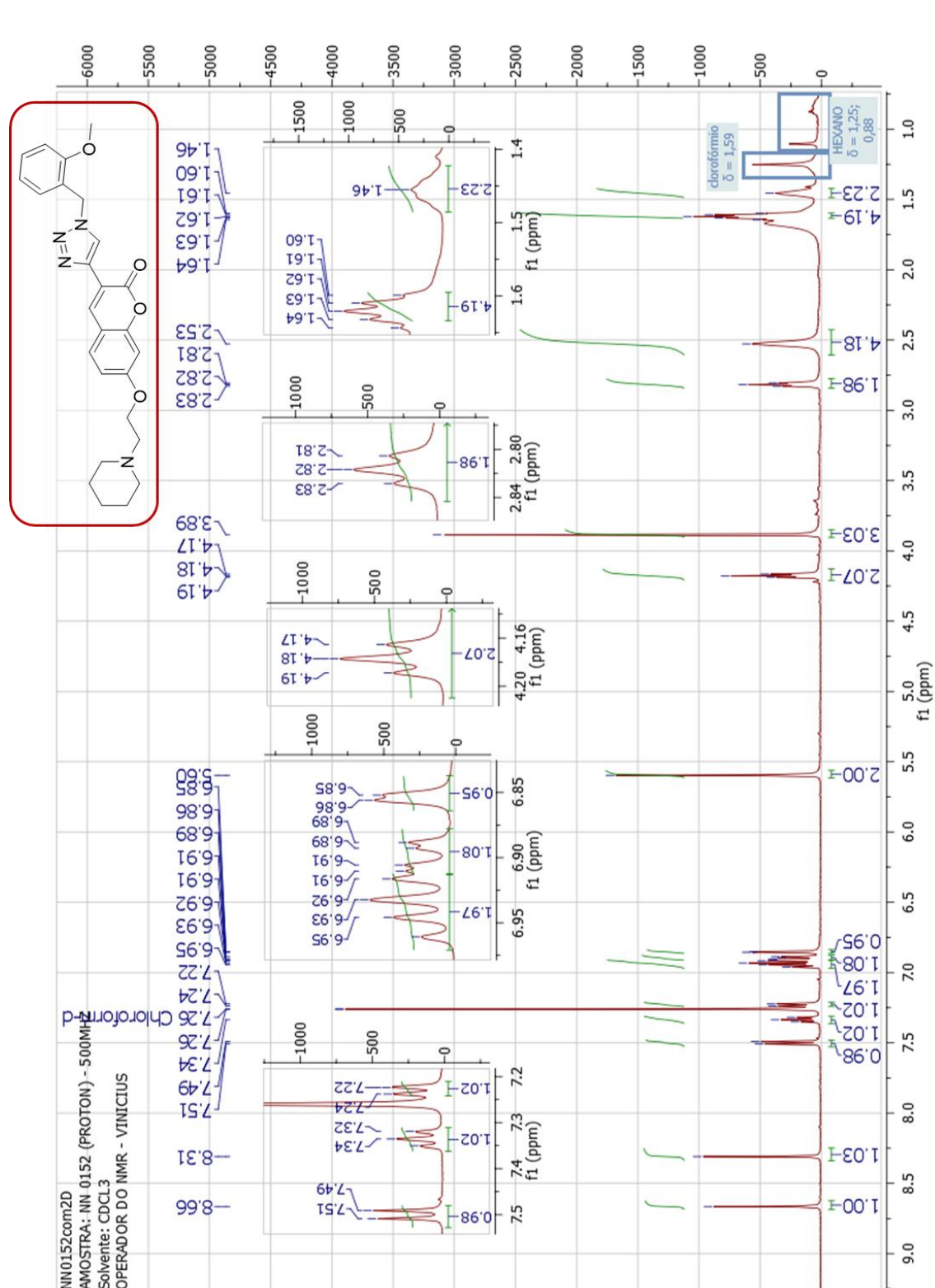


Figura S24. Espectro de RMN ^{13}C do composto (**26b**) em CDCl_3 a 125 MHz.

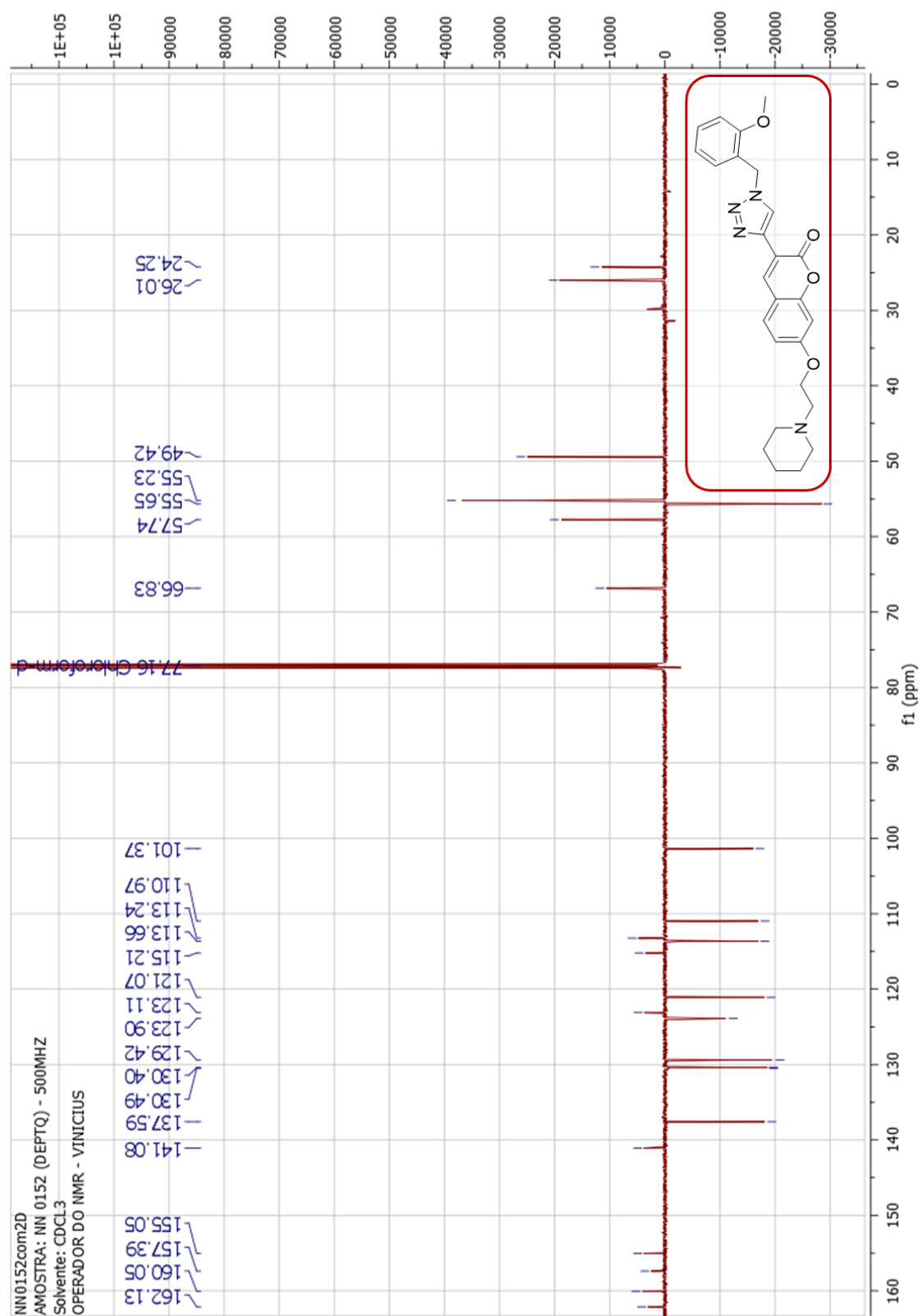


Figura S25. Espectro de RMN ^1H do composto (**26c**) em CDCl_3 a 500 MHz.

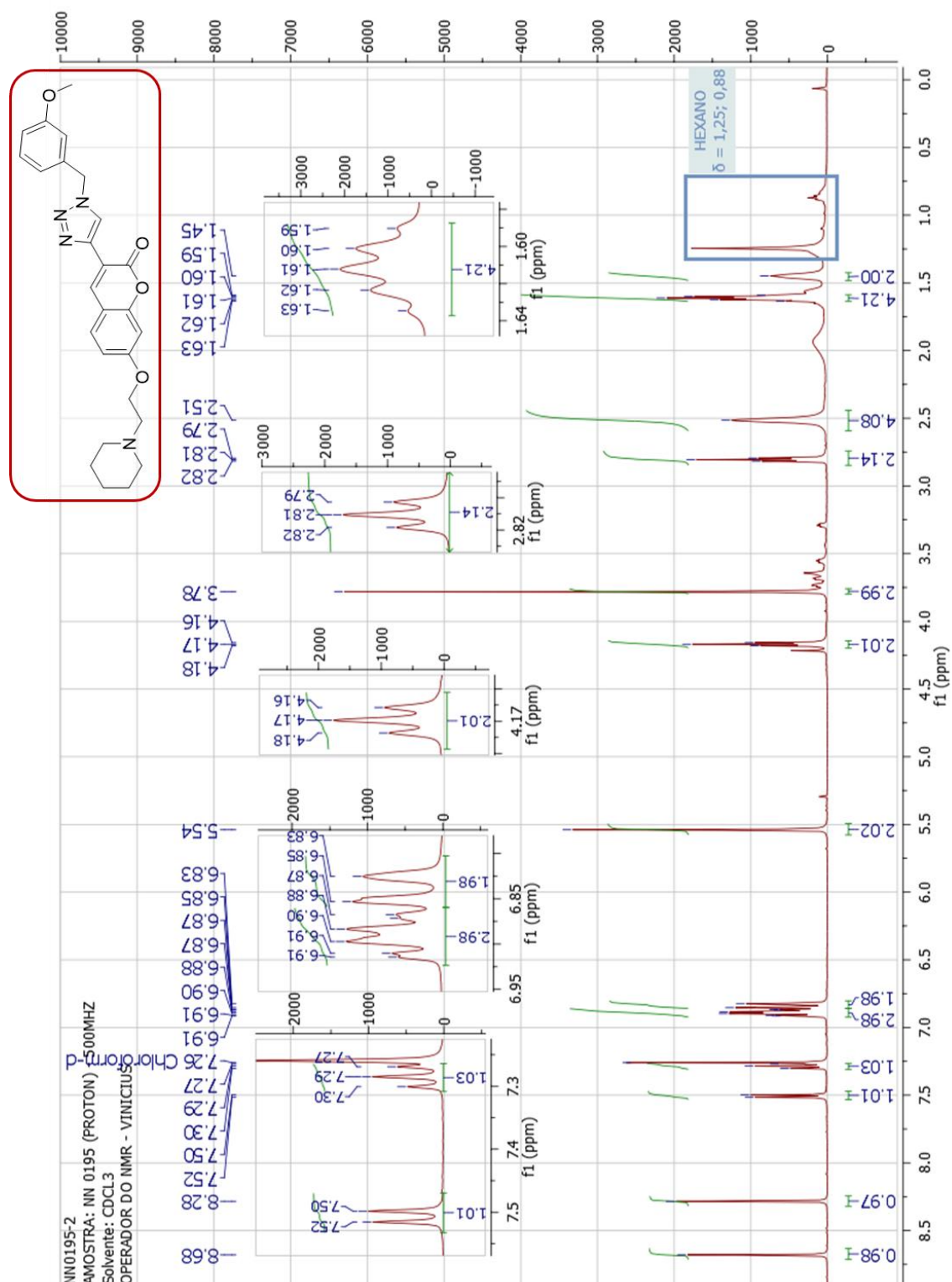


Figura S26. Espectro de RMN ^{13}C do composto (**26c**) em CDCl_3 a 125 MHz.

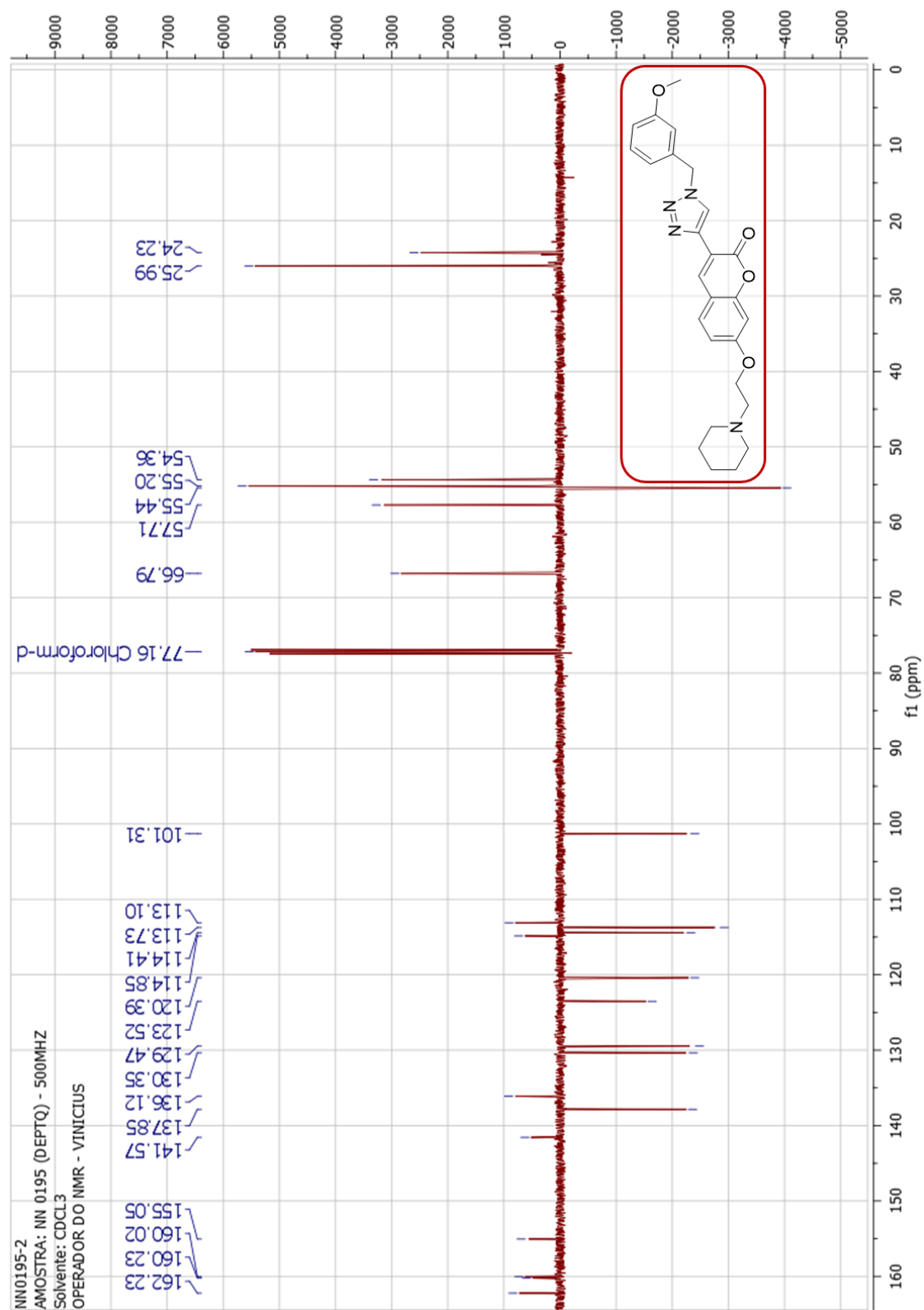


Figura S27. Espectro de RMN ^1H do composto (**26d**) em CDCl_3 a 500 MHz.

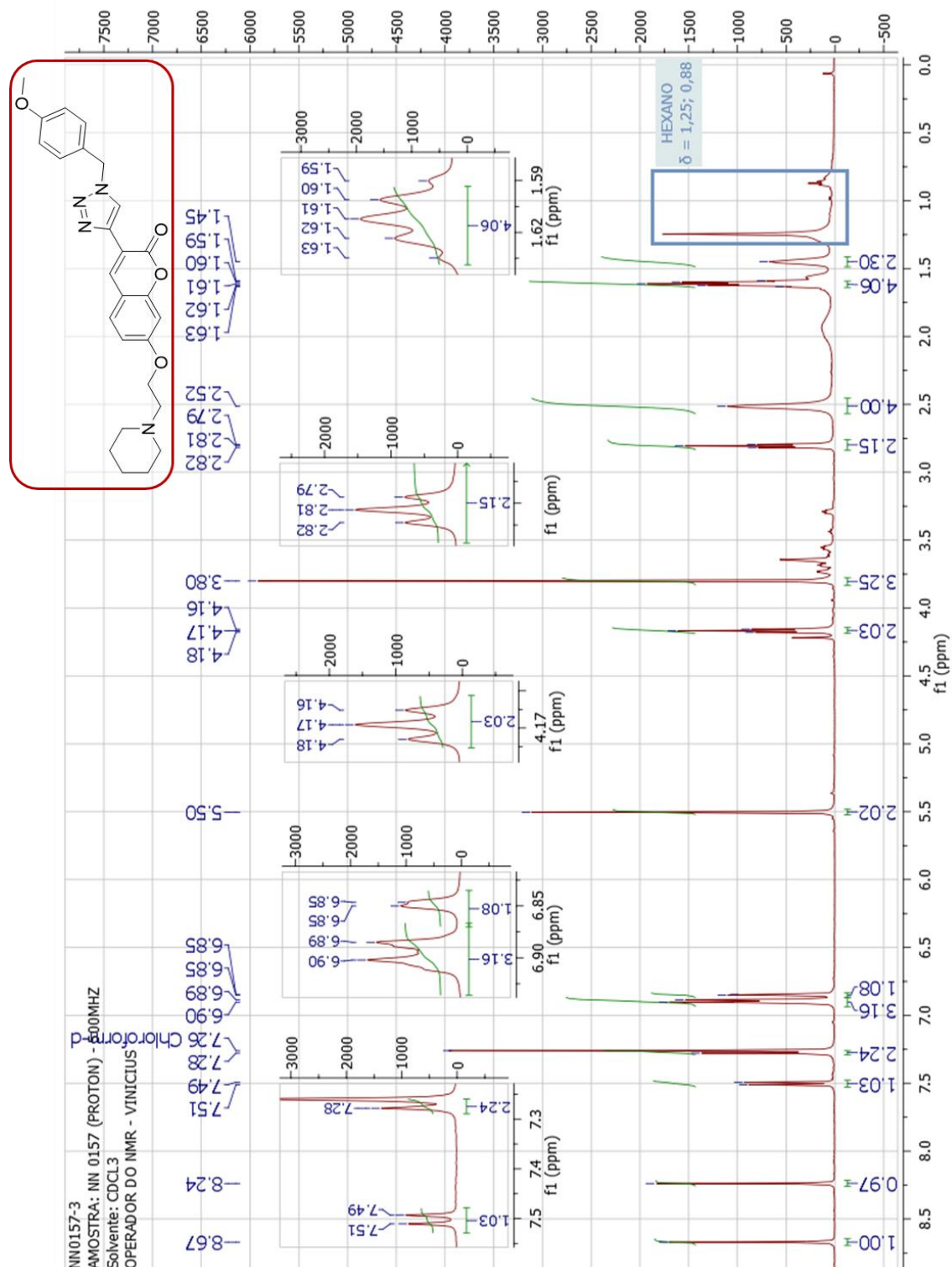


Figura S28. Espectro de RMN ^{13}C do composto (**26d**) em CDCl_3 a 125 MHz.

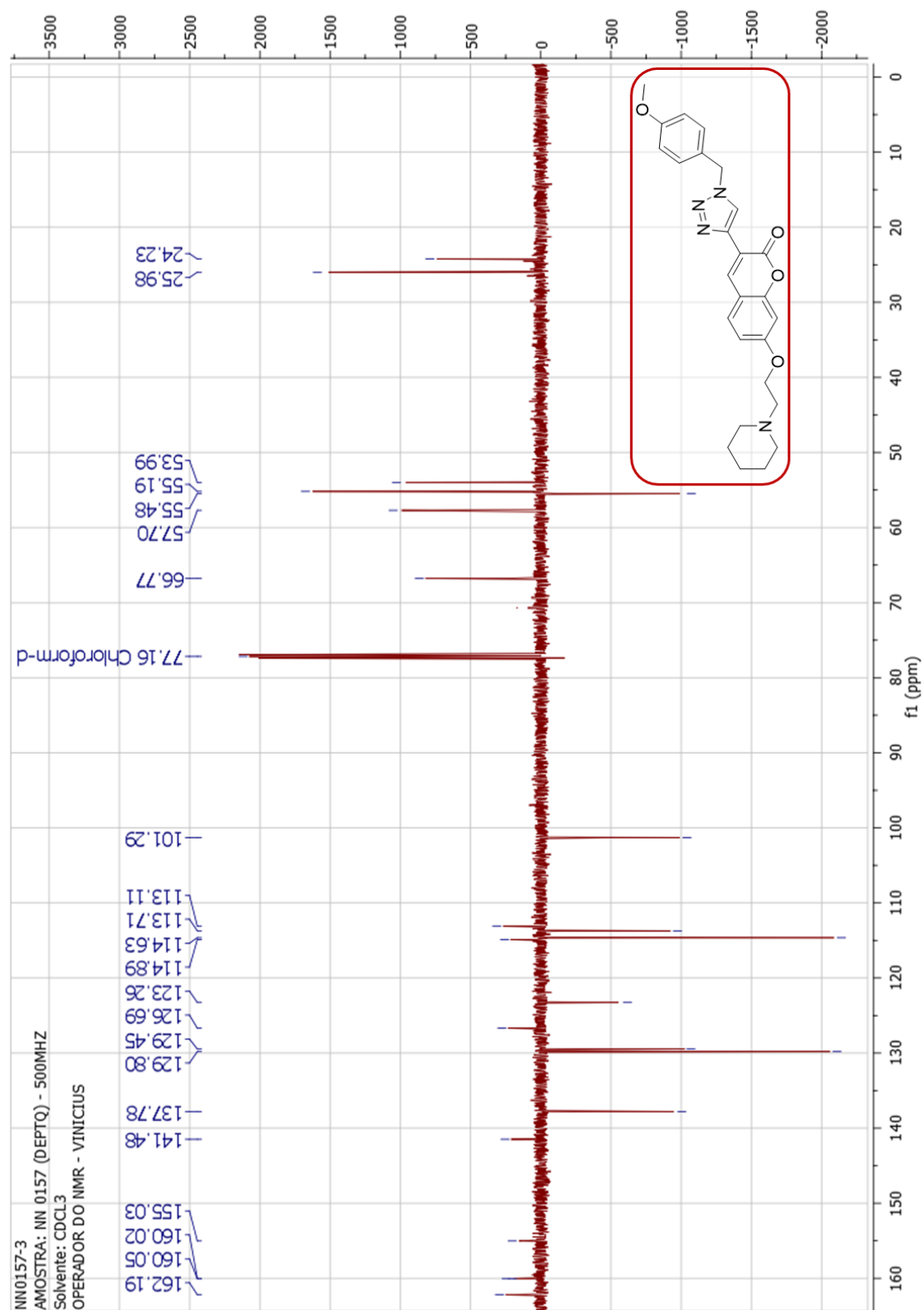


Figura S29. Espectro de RMN ^1H do composto (**26e**) em CDCl_3 a 500 MHz.

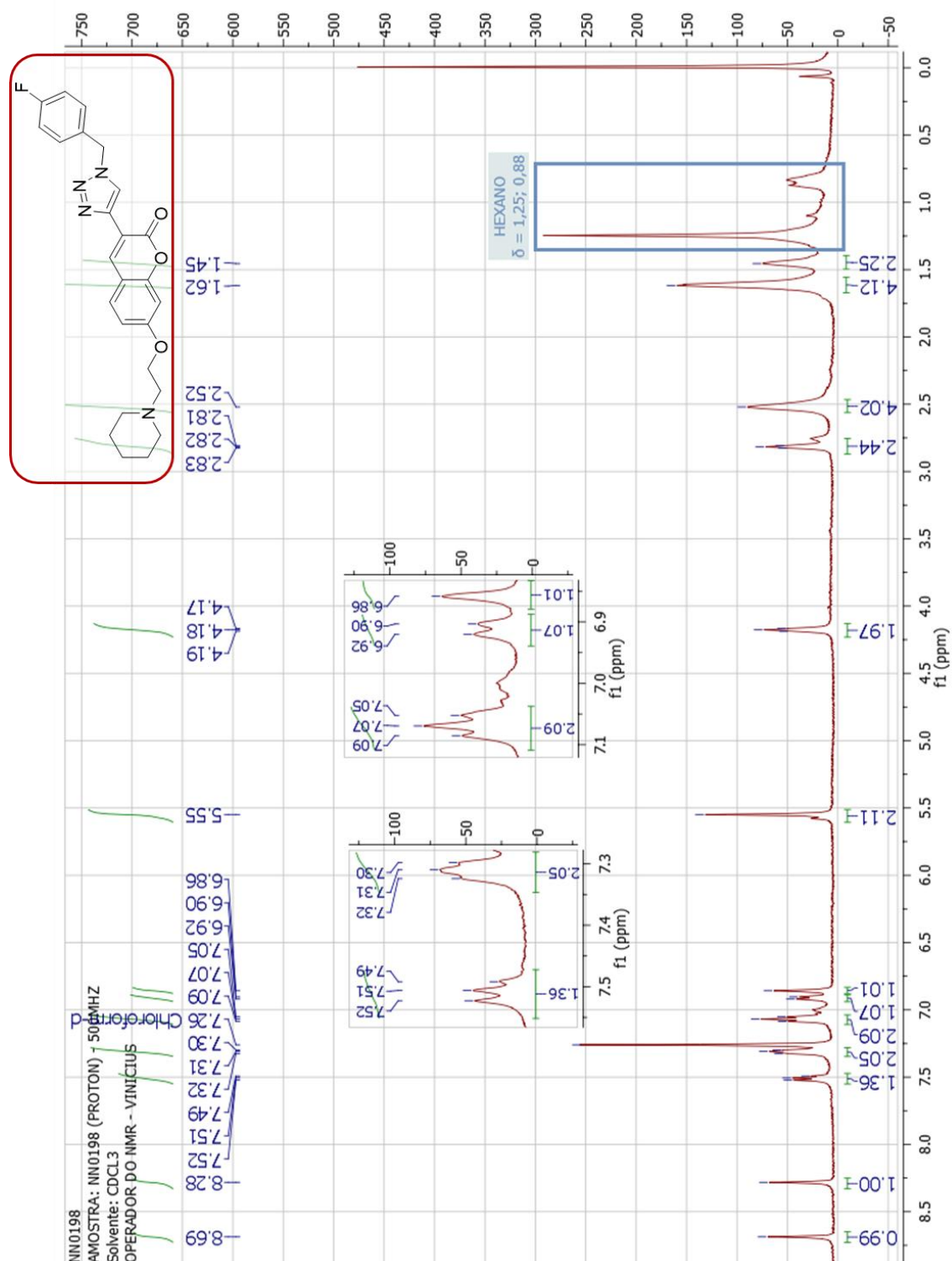


Figura S30. Espectro de RMN ^{13}C do composto (**26e**) em CDCl_3 a 125 MHz.

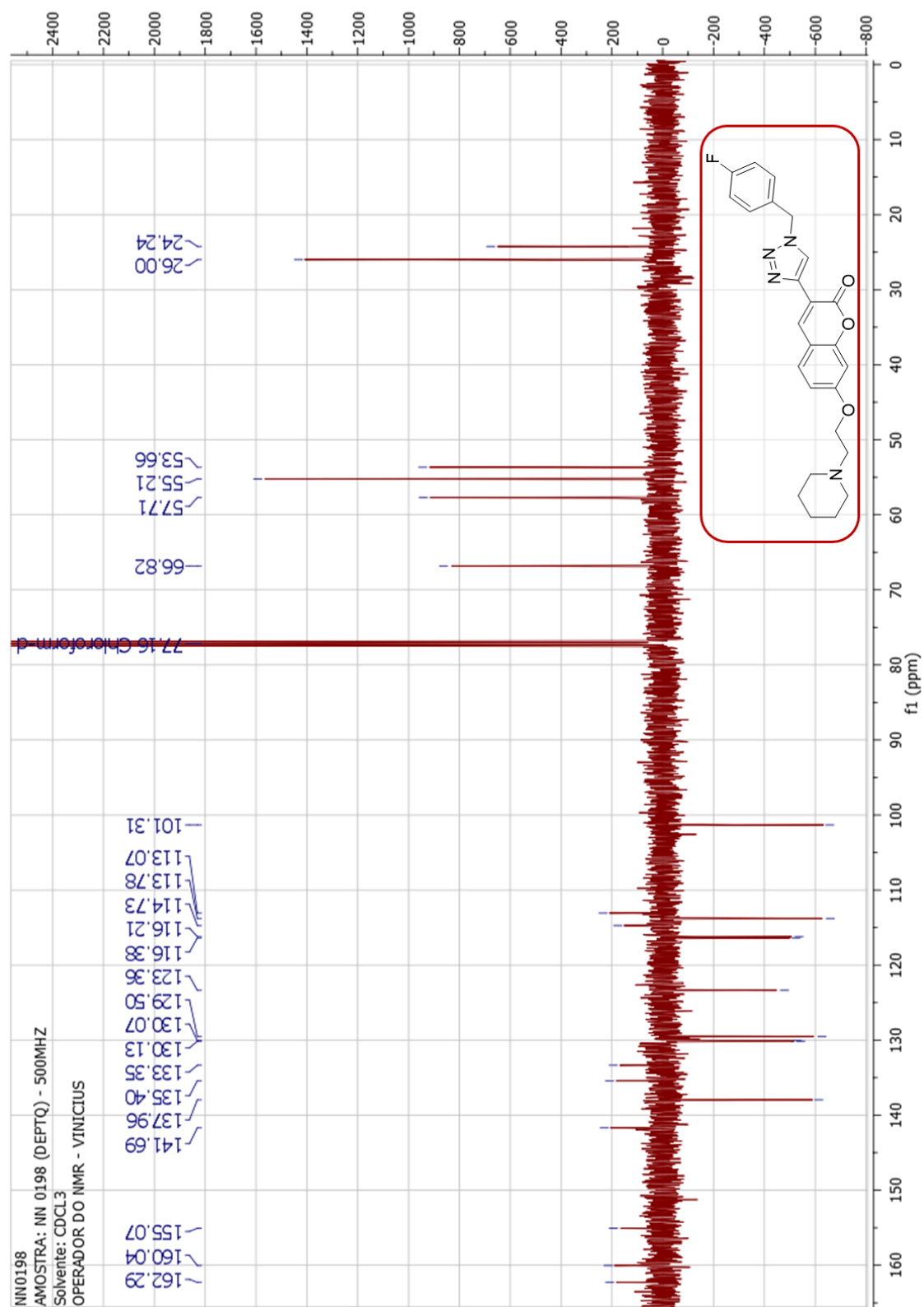


Figura S31. Espectro de RMN ^1H do composto (**26f**) em CDCl_3 a 500 MHz.

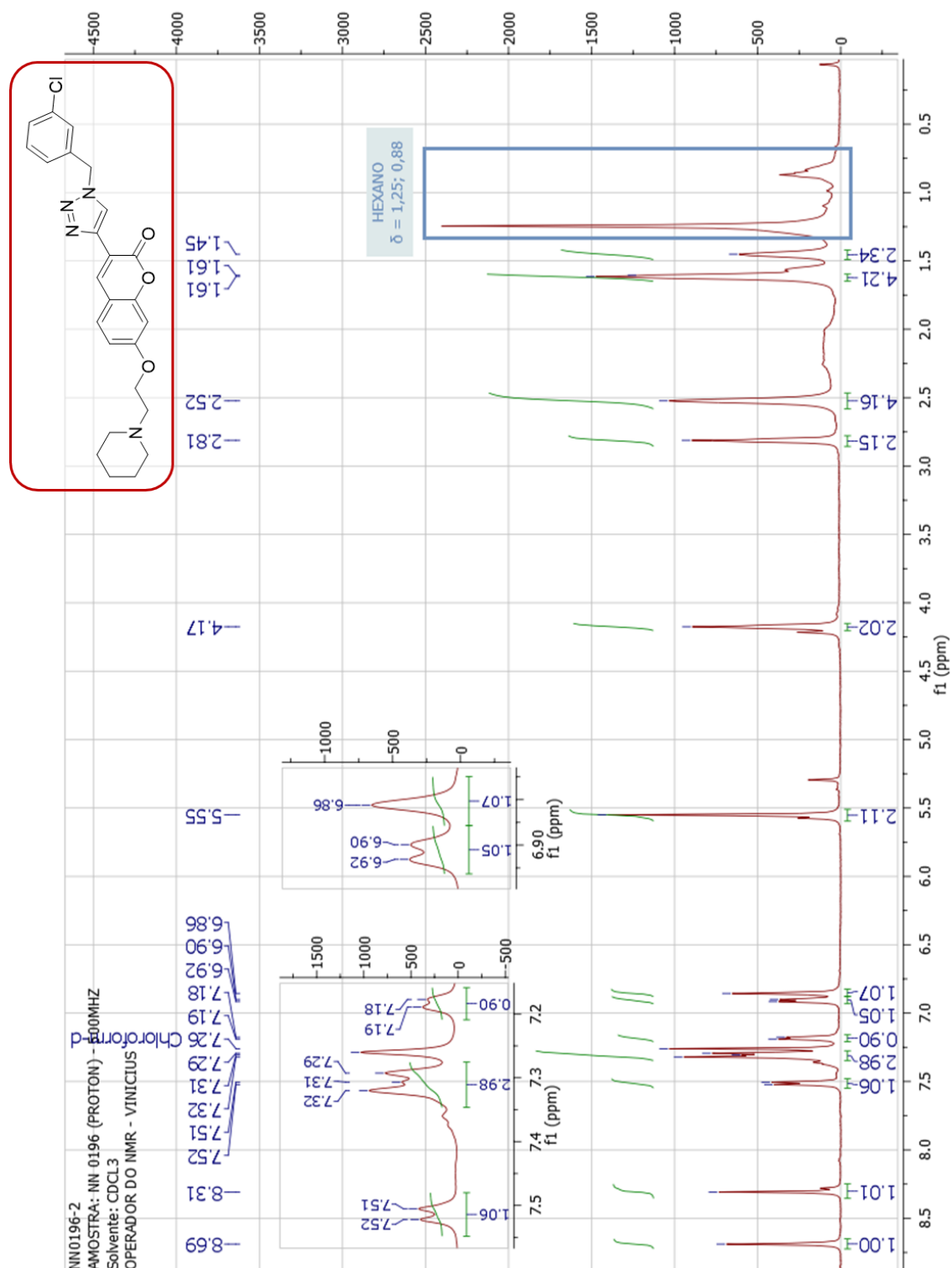


Figura S32. Espectro de RMN ^{13}C do composto (**26f**) em CDCl_3 a 125 MHz.

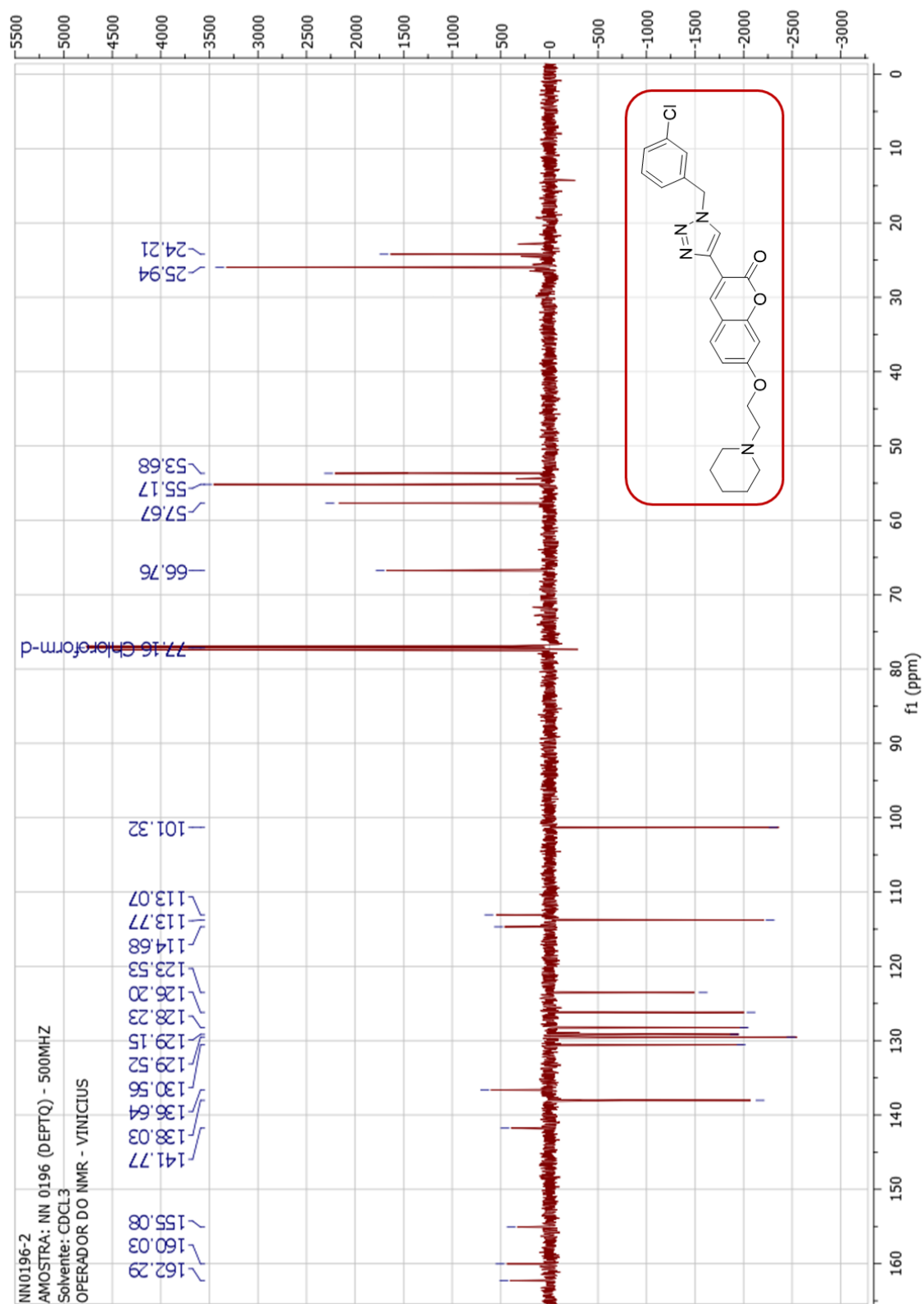


Figura S33. Espectro de RMN ^1H do composto (**26g**) em CDCl_3 a 500 MHz.

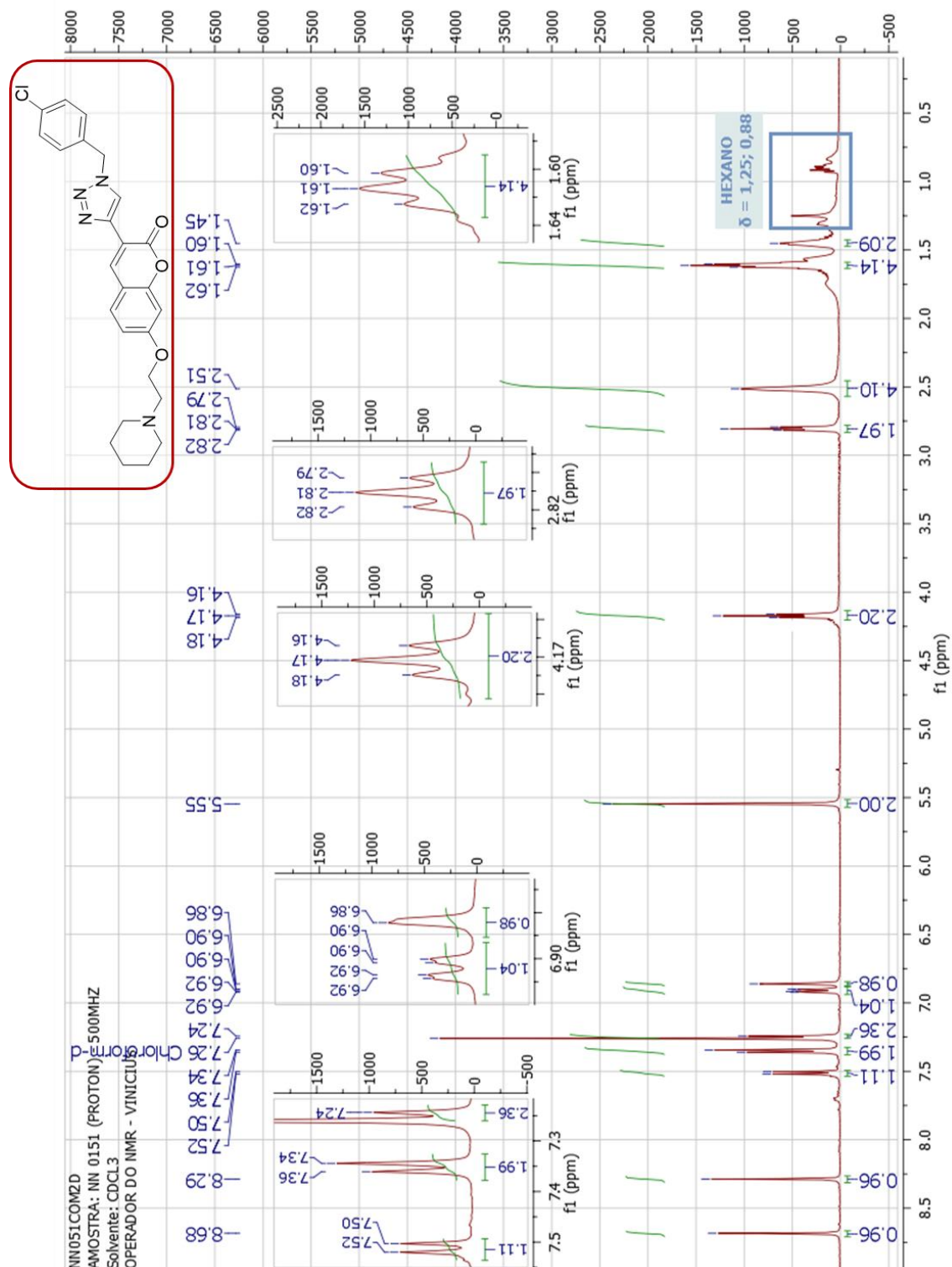


Figura S34. Espectro de RMN ^{13}C do composto (**26g**) em CDCl_3 a 125 MHz.

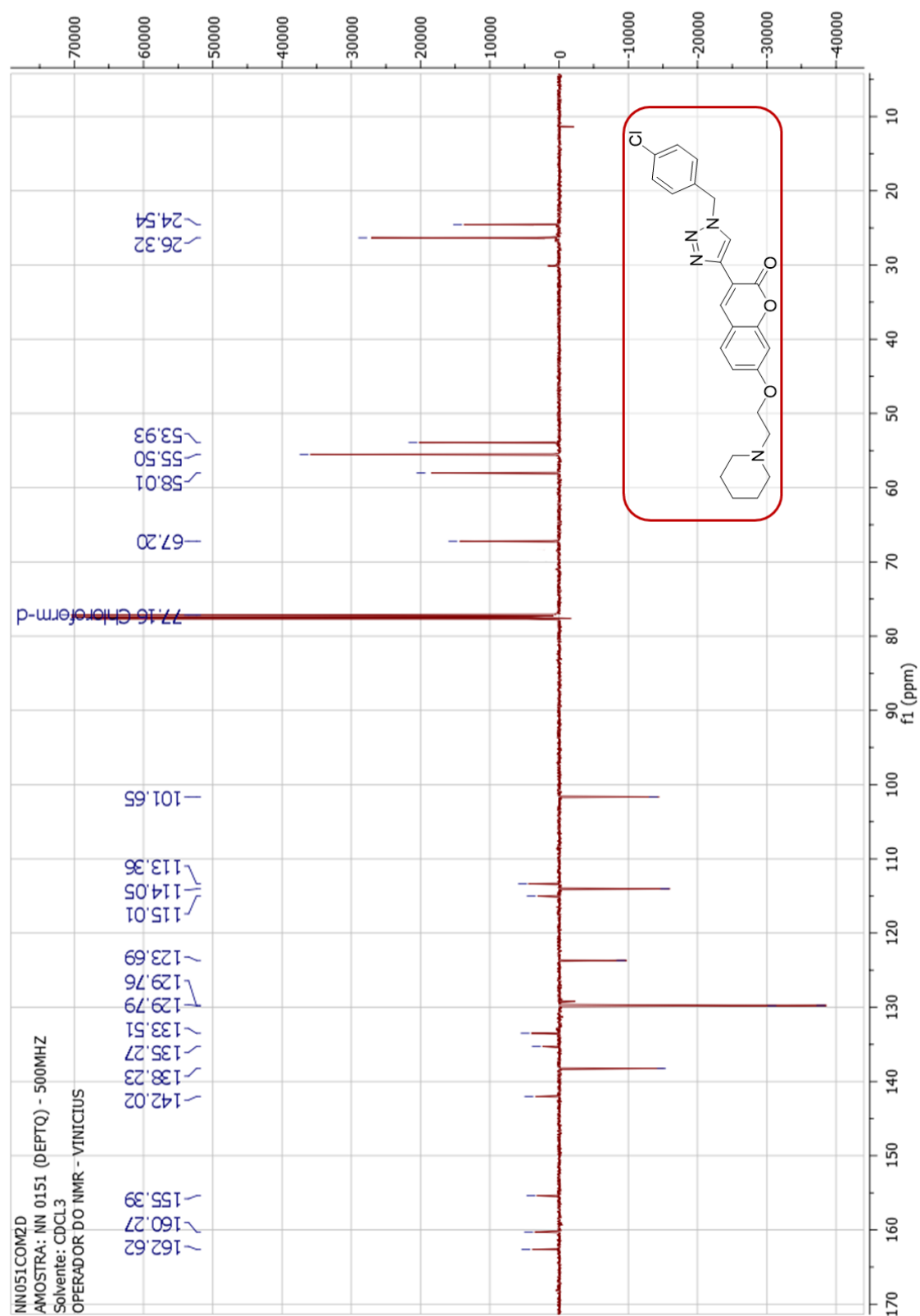


Figura S35. Espectro de RMN ^1H do composto (**26h**) em CDCl_3 a 500 MHz.

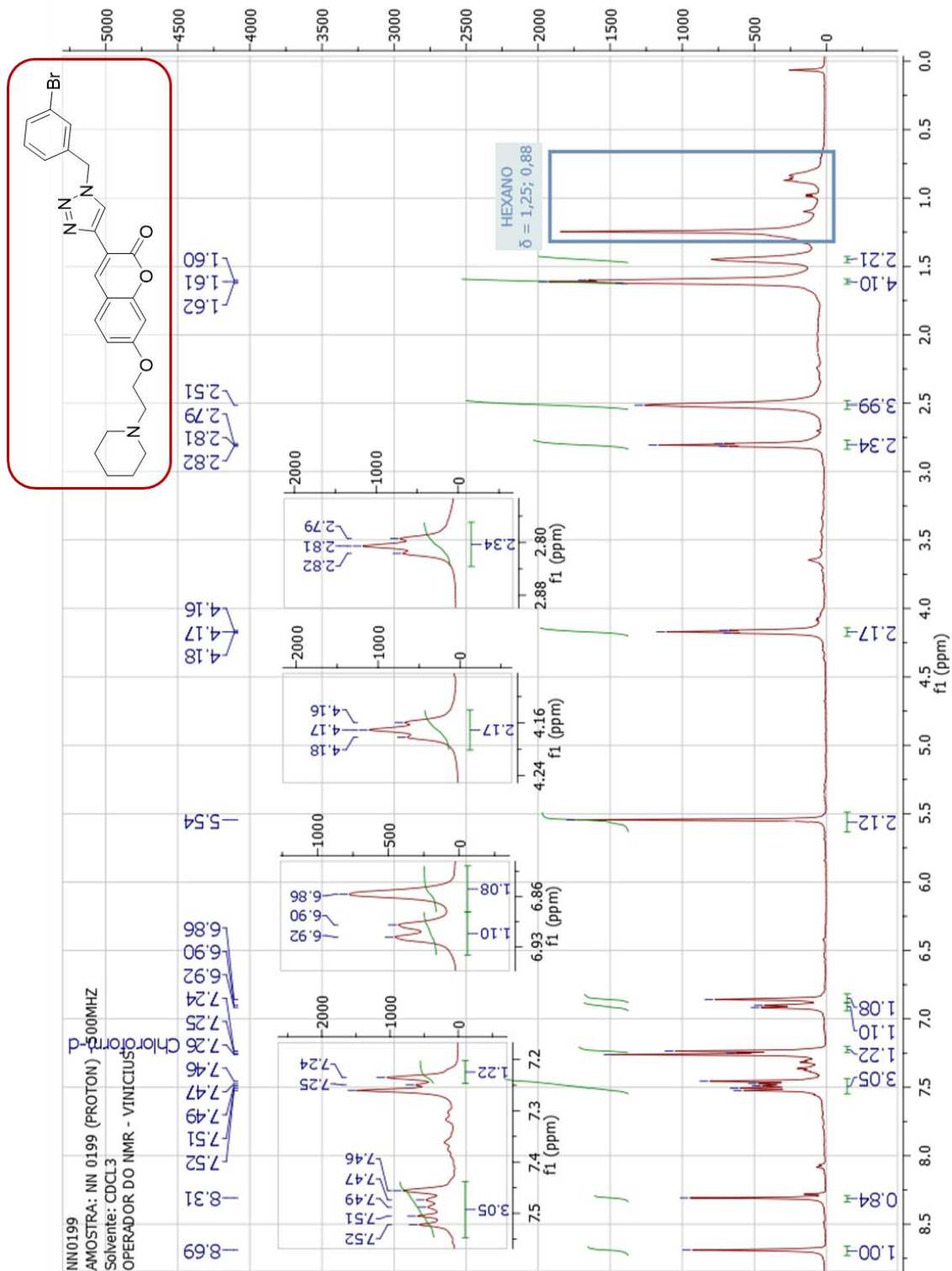


Figura S36. Espectro de RMN ^{13}C do composto (**26h**) em CDCl_3 a 125 MHz.

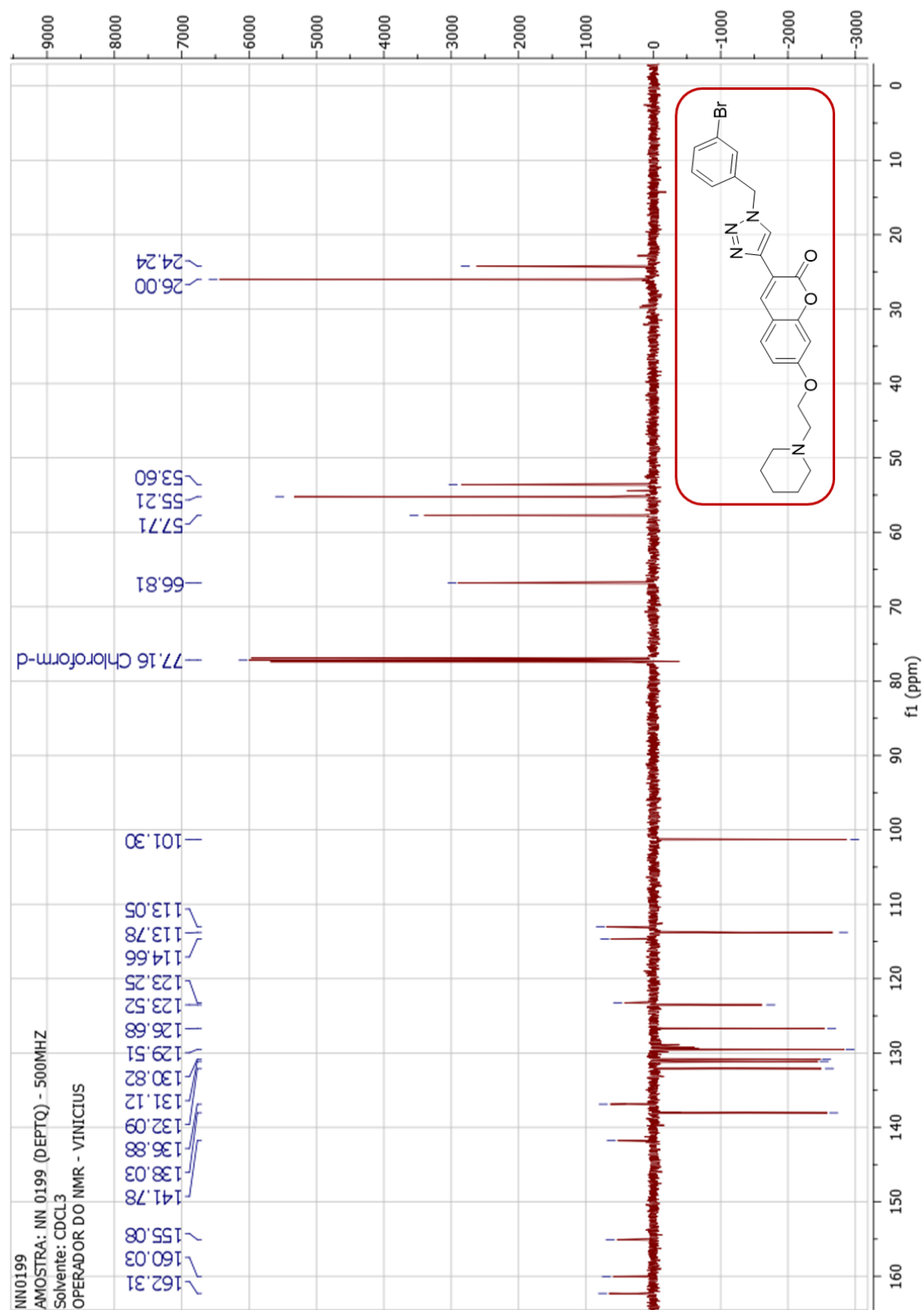


Figura S37. Espectro de RMN ^1H do composto (**26i**) em CDCl_3 a 500 MHz.

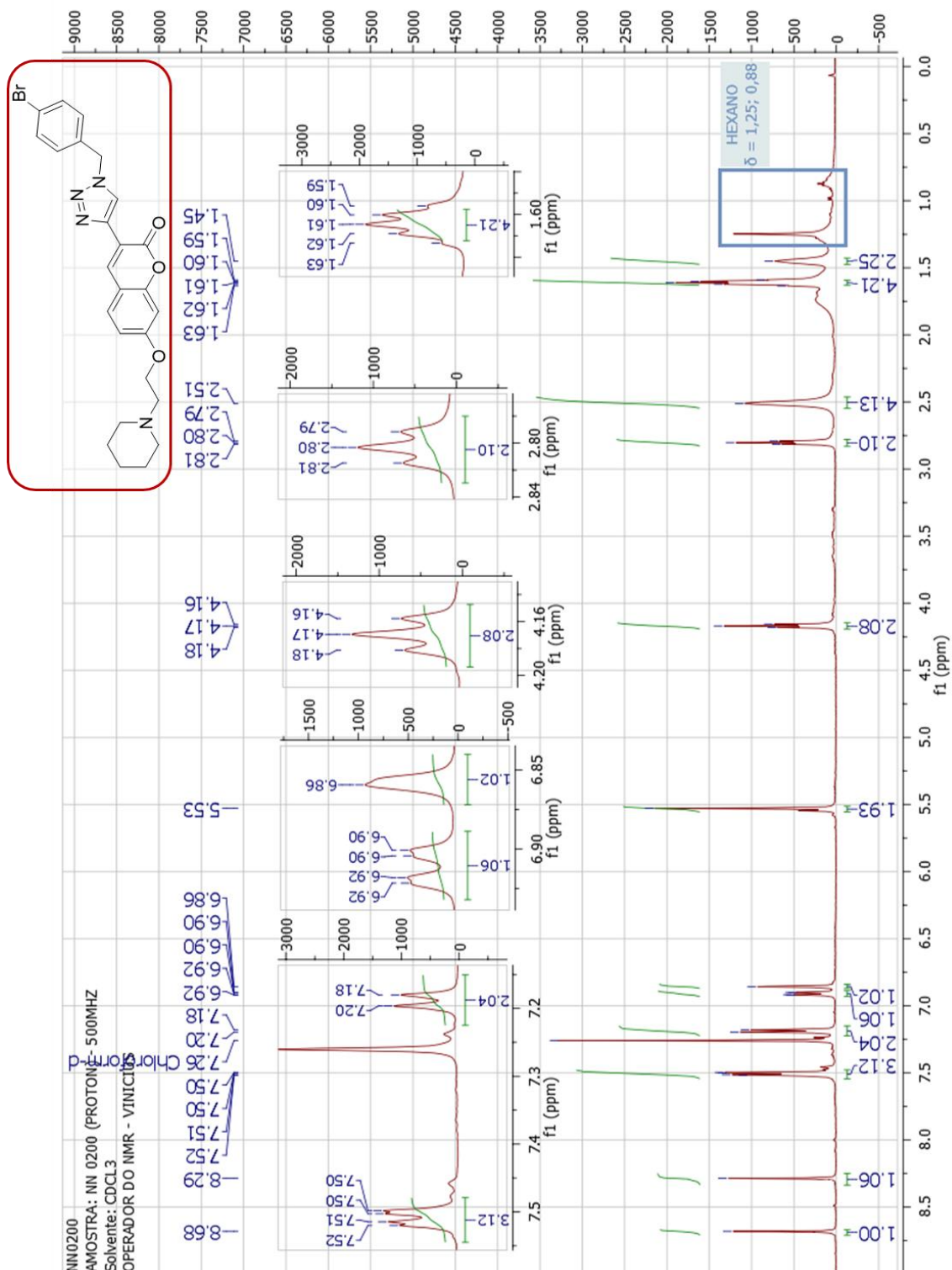


Figura S38. Espectro de RMN ^{13}C do composto (**26i**) em CDCl_3 a 125 MHz.

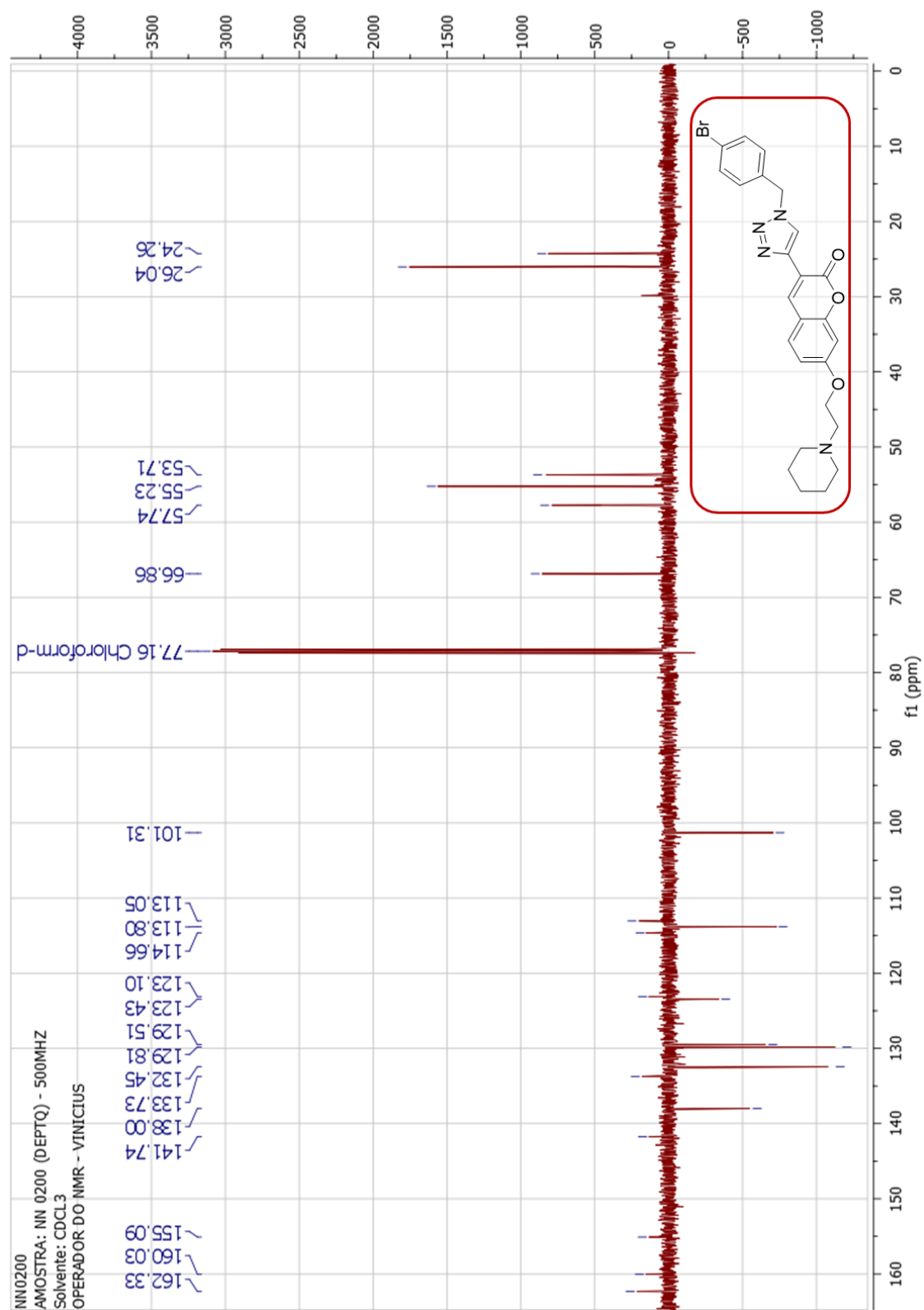


Figura S39. Espectro de RMN ^1H do composto (**26j**) em CDCl_3 a 500 MHz.

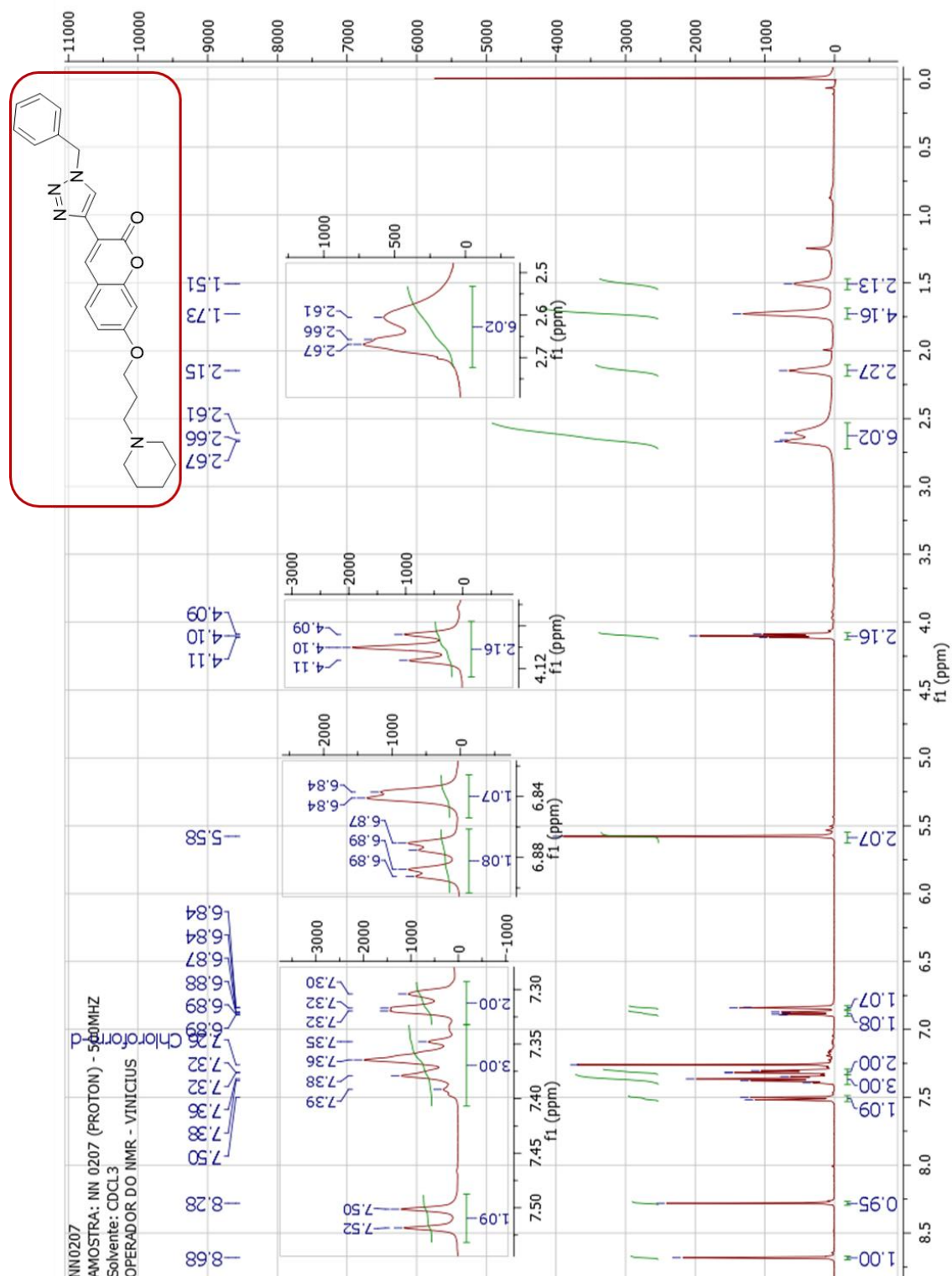


Figura S40. Espectro de RMN ^{13}C do composto (**26j**) em CDCl_3 a 125 MHz.

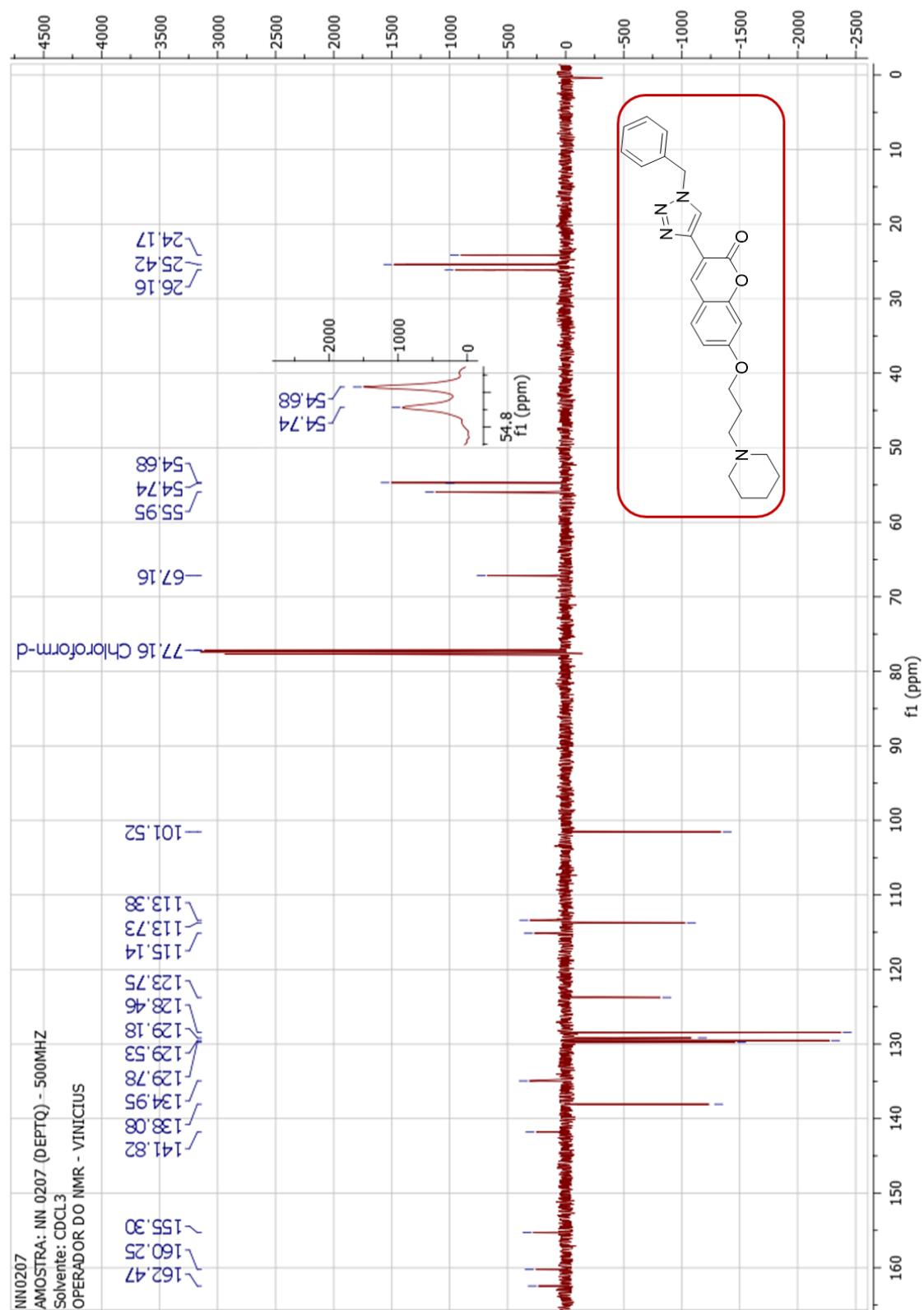


Figura S41. Espectro de RMN ^1H do composto (**64**) em $\text{DMSO-}d_6$ a 500 MHz.

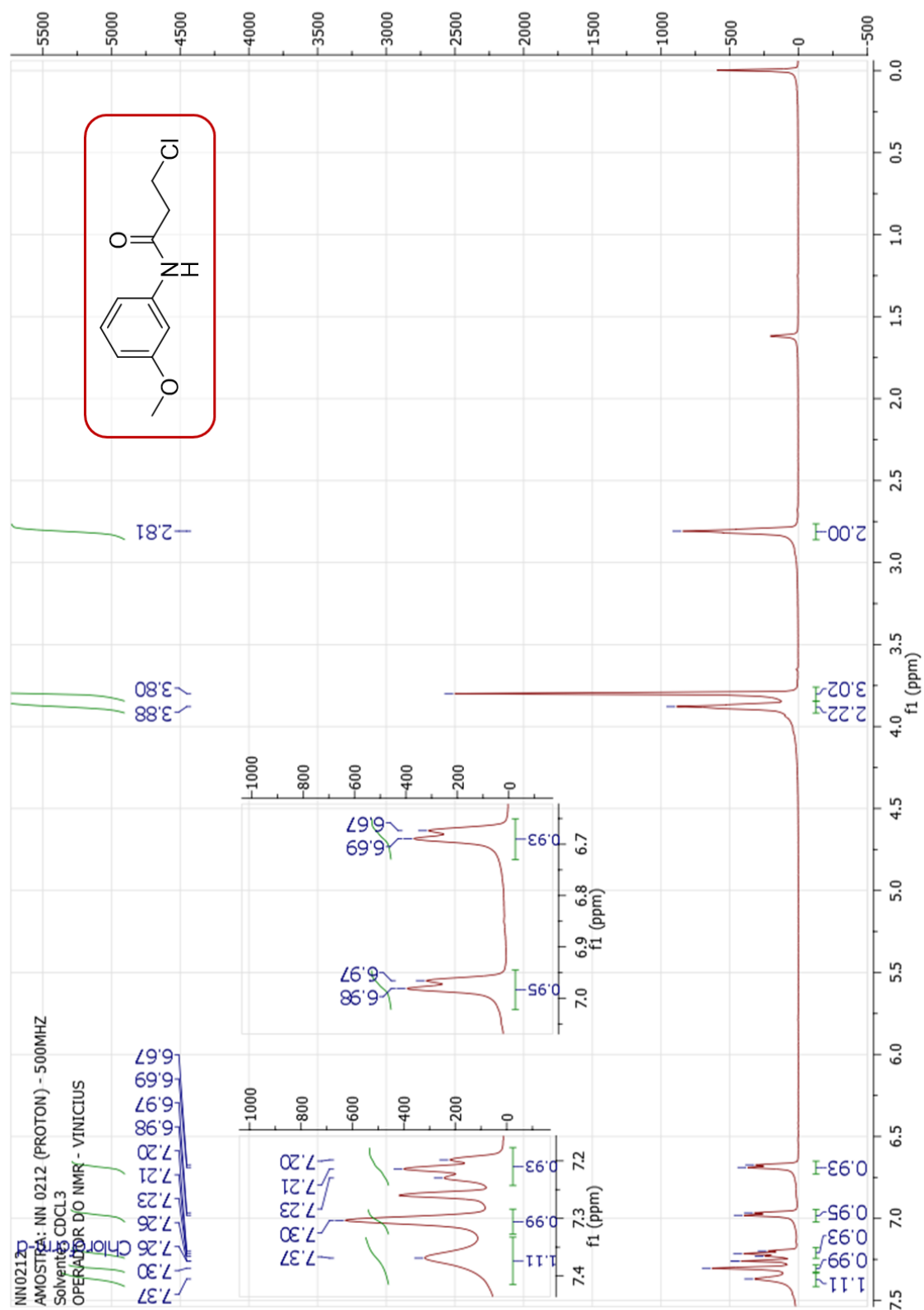


Figura S42. Espectro de RMN ^{13}C do composto (64) em $\text{DMSO-}d_6$ a 125 MHz.

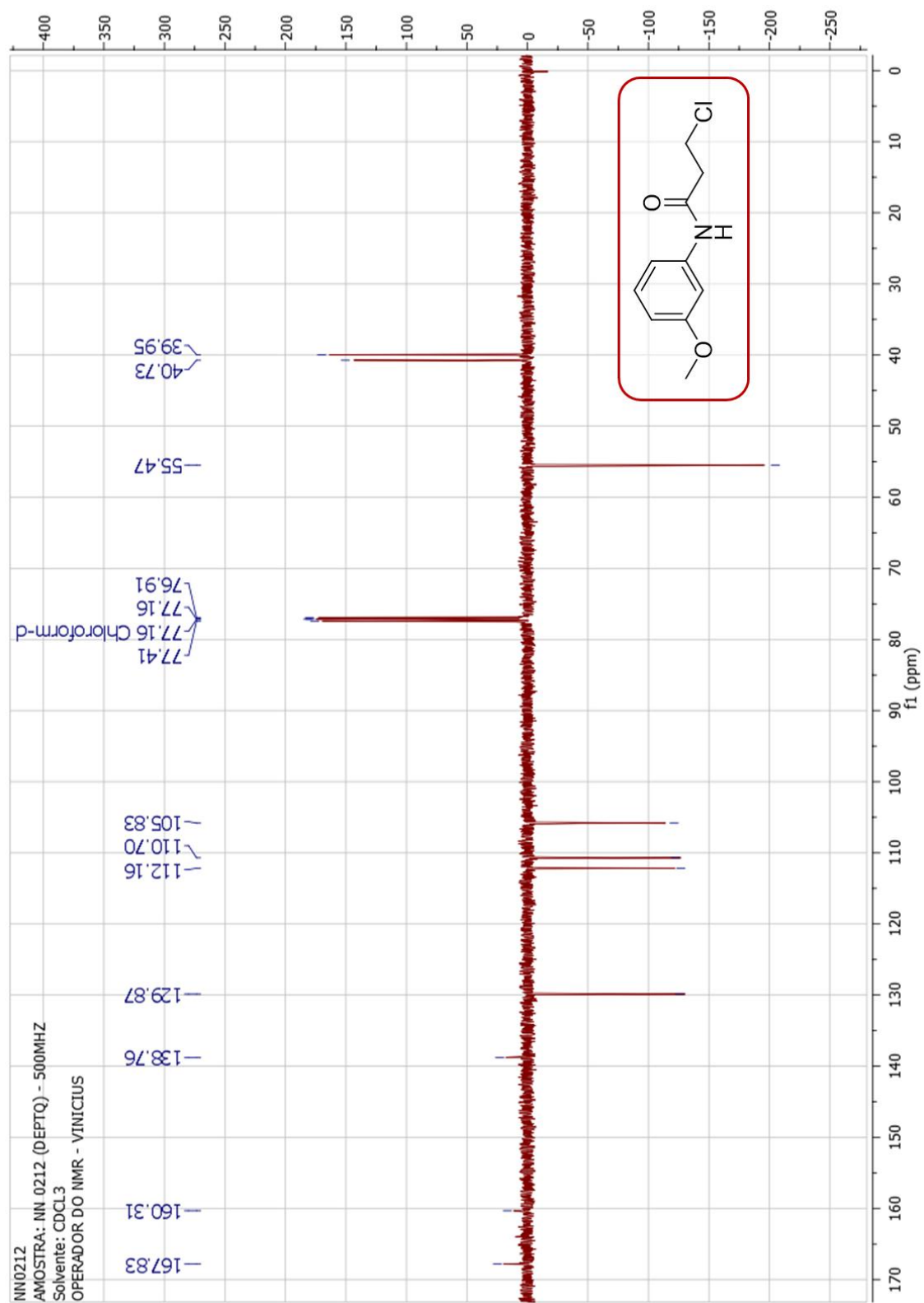


Figura S43. Espectro de RMN ^1H do composto (**63**) em DMSO-*d*₆ a 500 MHz.

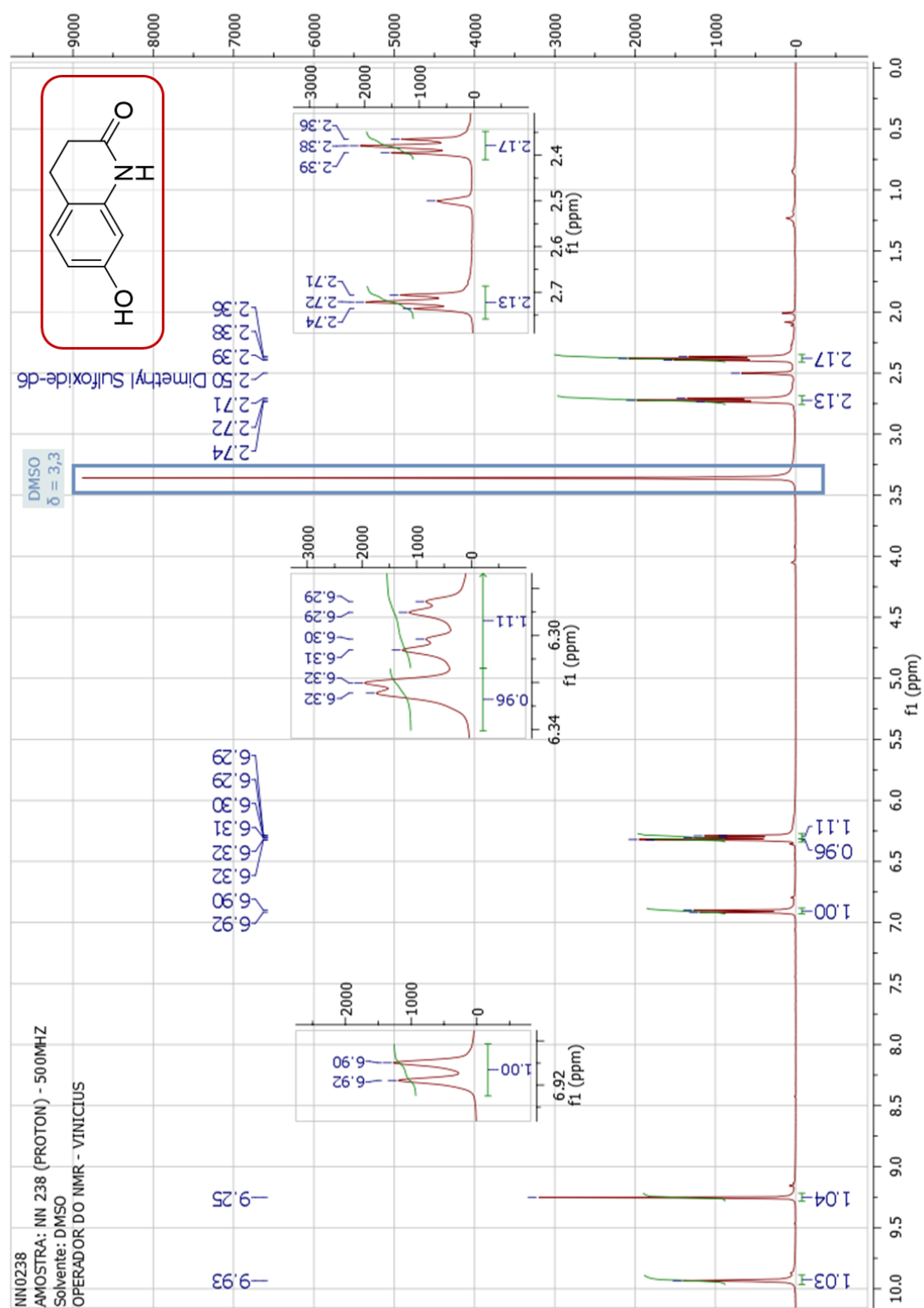


Figura S44. Espectro de RMN ^{13}C do composto (**63**) em $\text{DMSO-}d_6$ a 125 MHz.

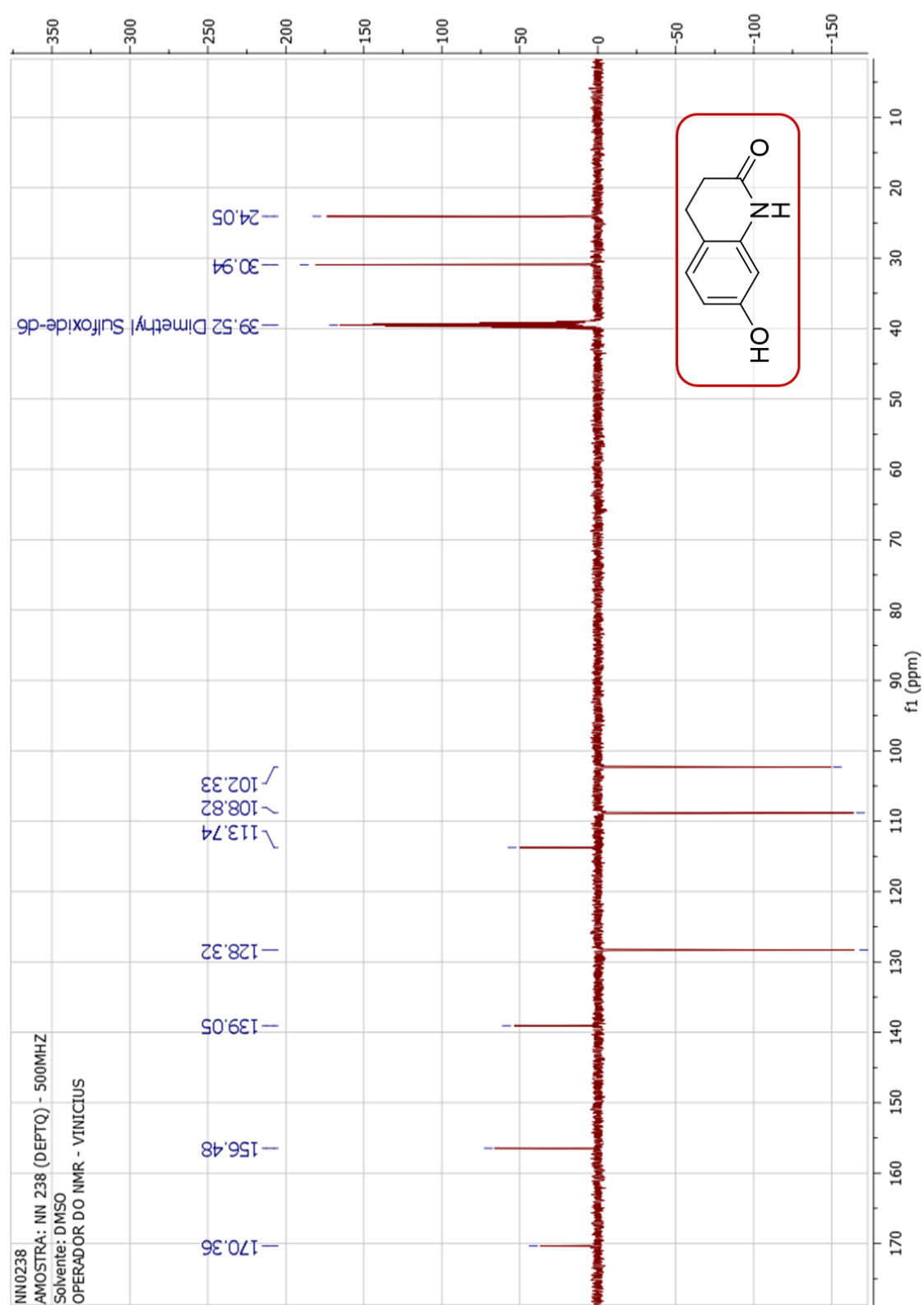


Figura S45. Espectro de RMN ^1H do composto (**62a**) em DMSO- d_6 a 500 MHz.

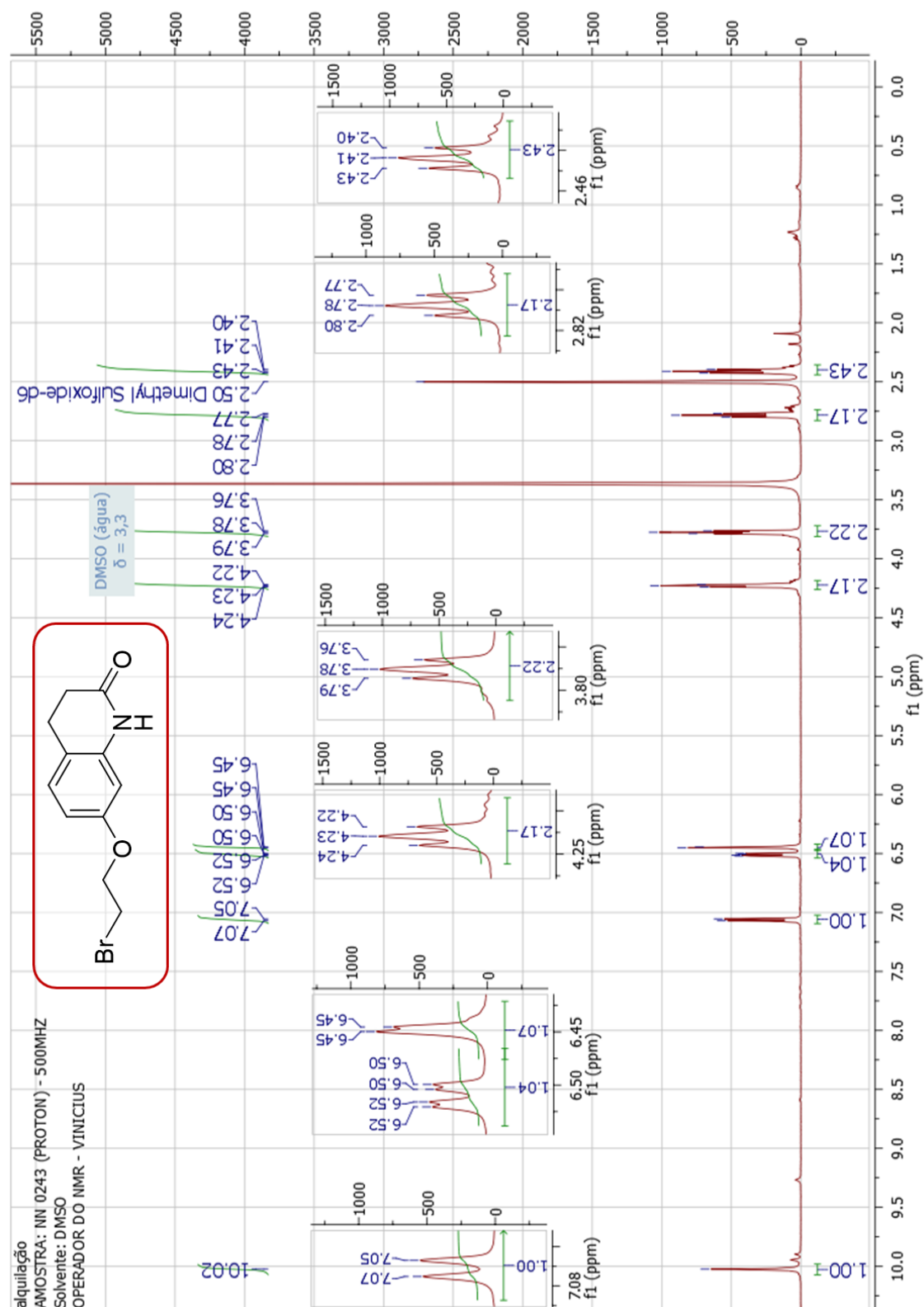
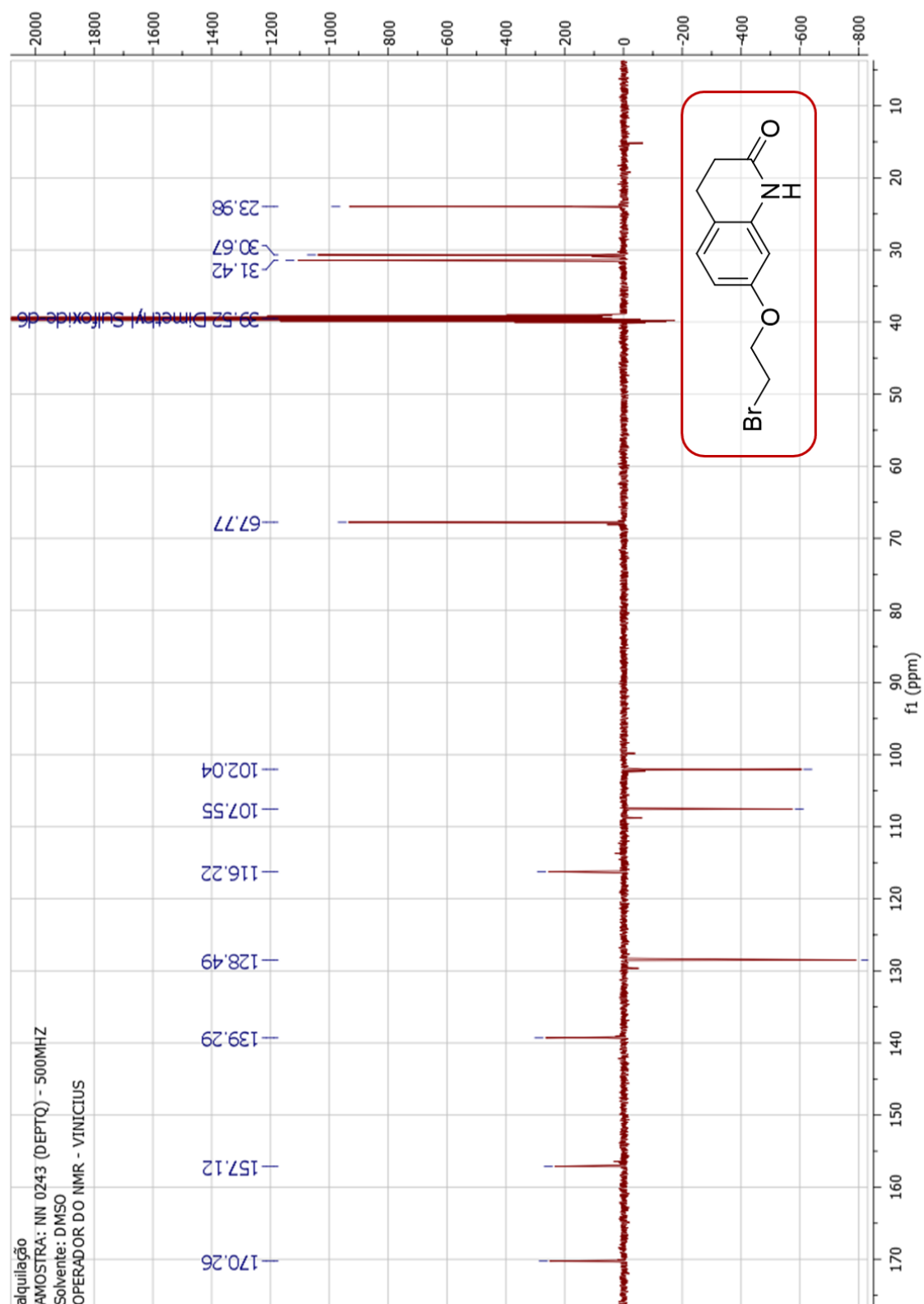


Figura S46. Espectro de RMN ^{13}C do composto (**62a**) em DMSO-*d*₆ a 125 MHz.



[illegible]

Figura S48. Espectro de RMN ^{13}C do composto (**62b**) em $\text{DMSO-}d_6$ a 125 MHz.

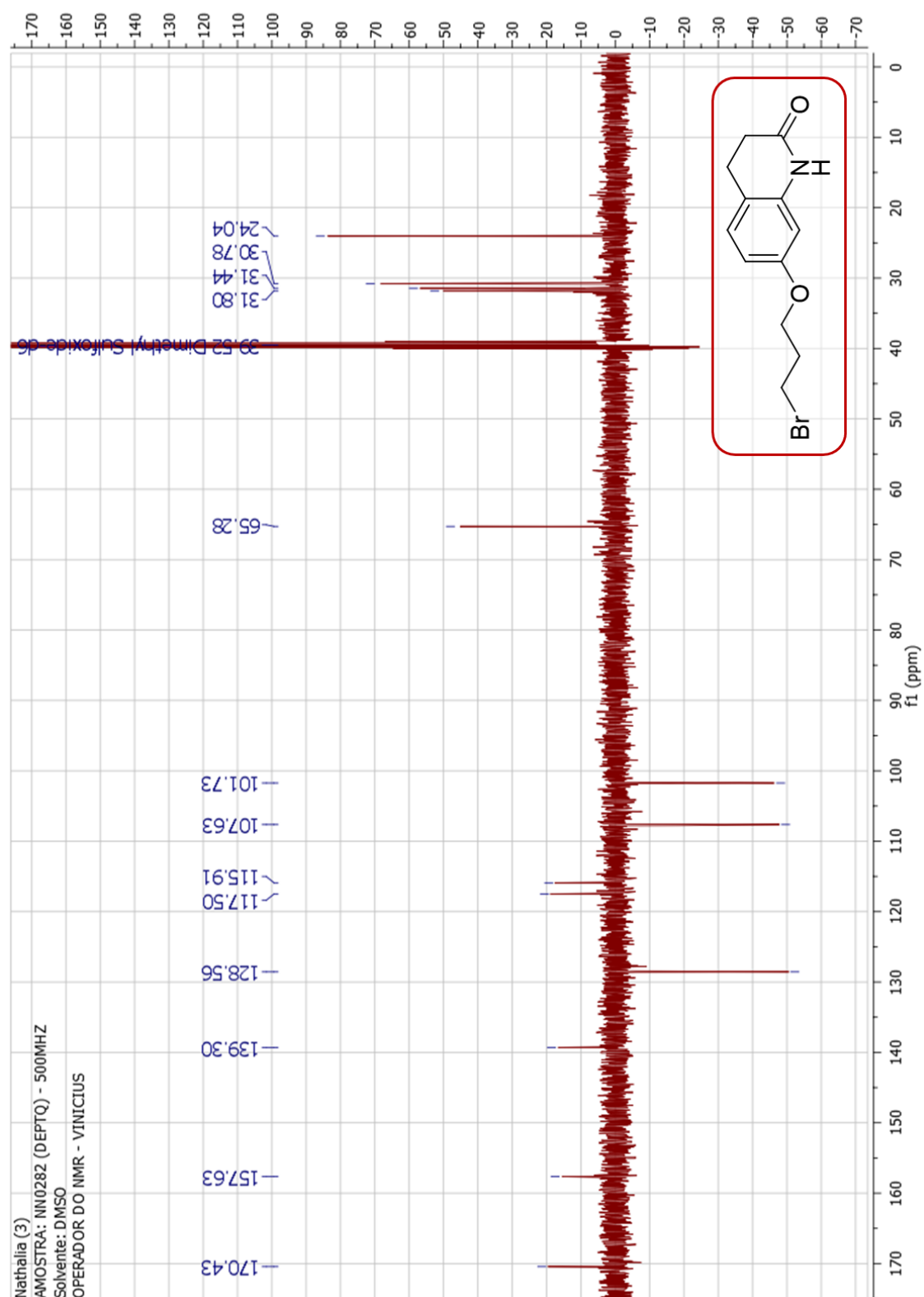


Figura S49. Espectro de RMN ^1H do composto (**60a**) em DMSO-*d*₆ a 500 MHz.

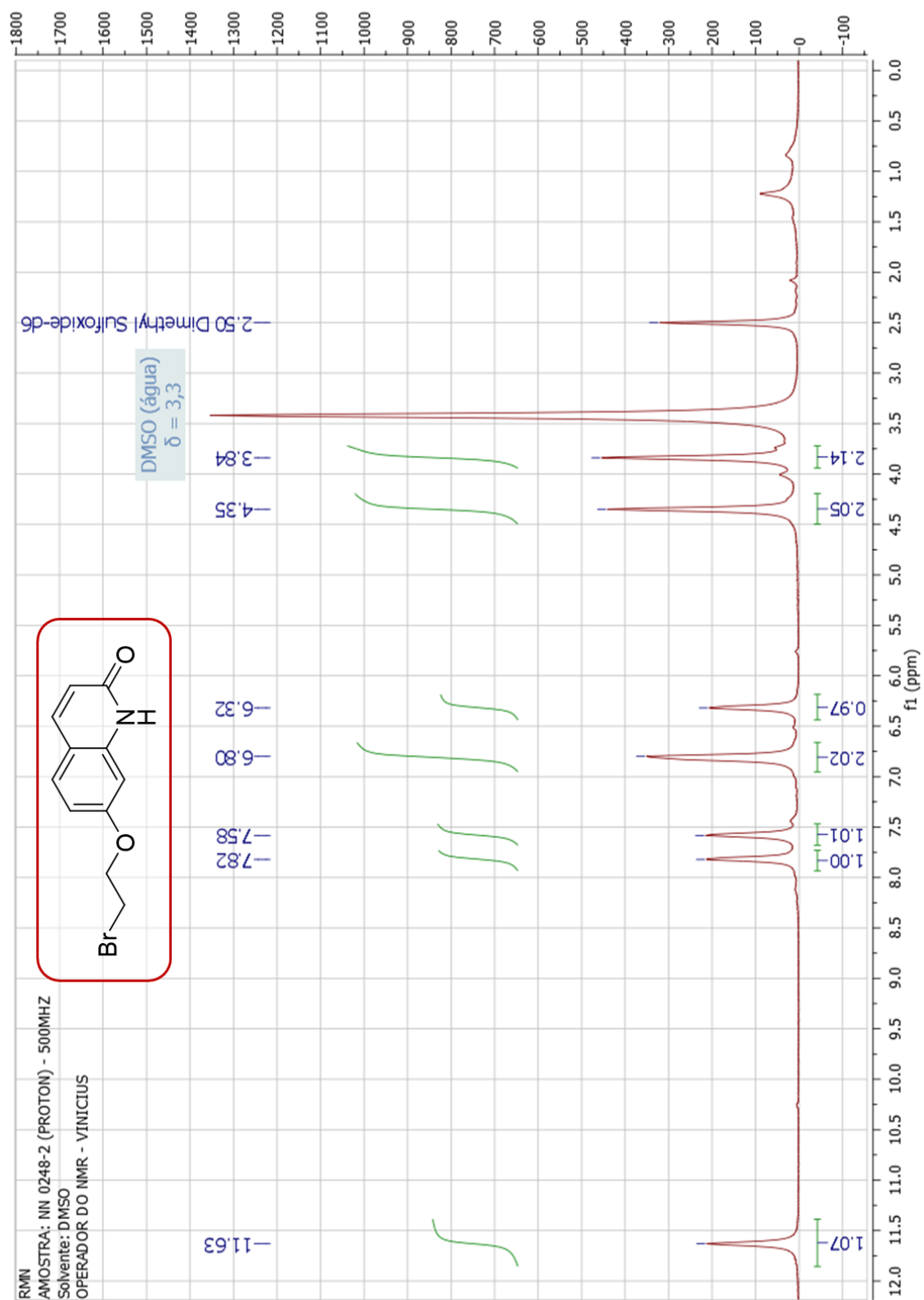
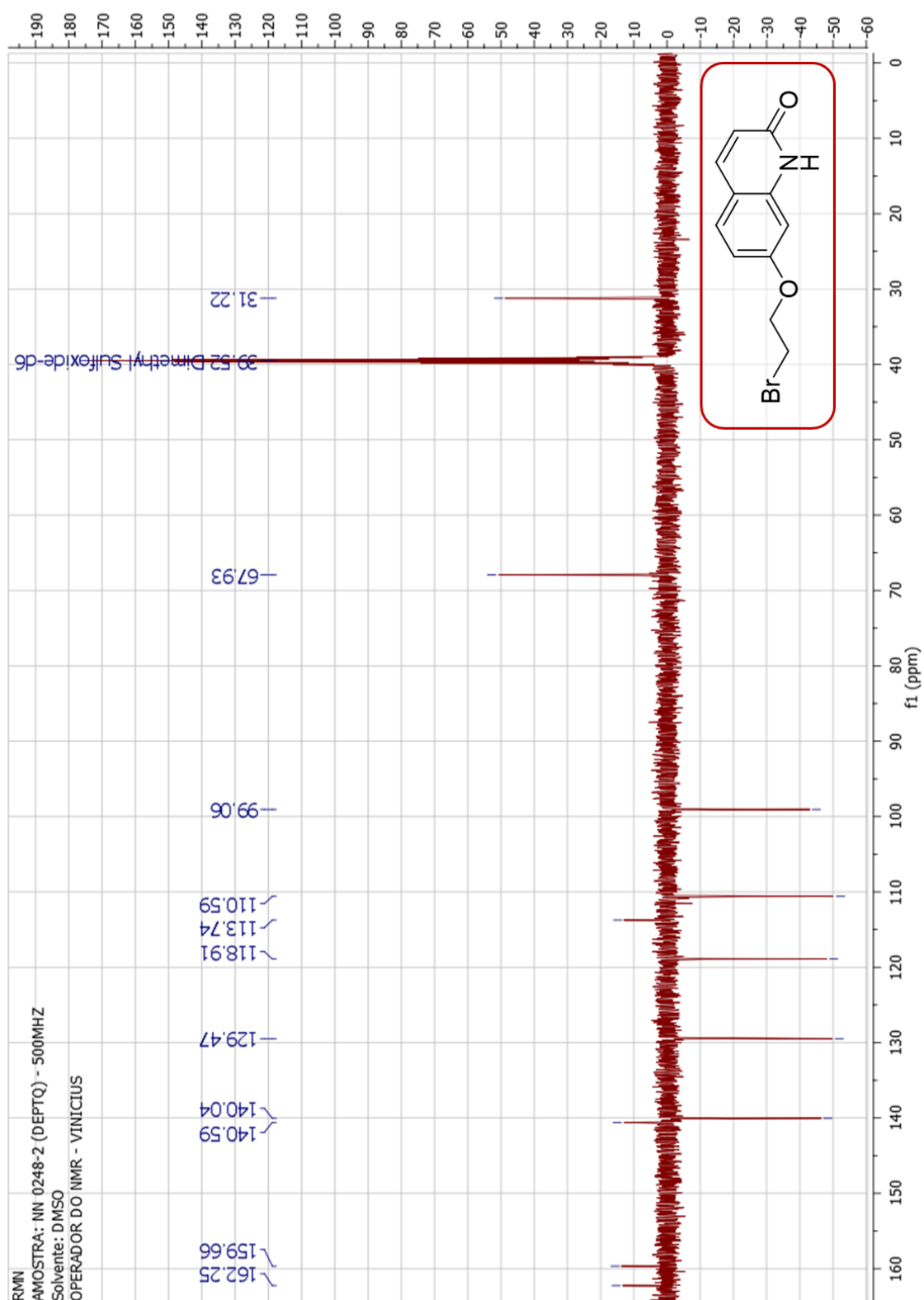


Figura S50. Espectro de RMN ^{13}C do composto (**60a**) em DMSO-*d*₆ a 125 MHz.



Nathalia (2)
AMOSTRA: NN0283 (PROTON) - 500MHZ
Solvente: DMSO
OPERADOR DO NMR - VINICIUS

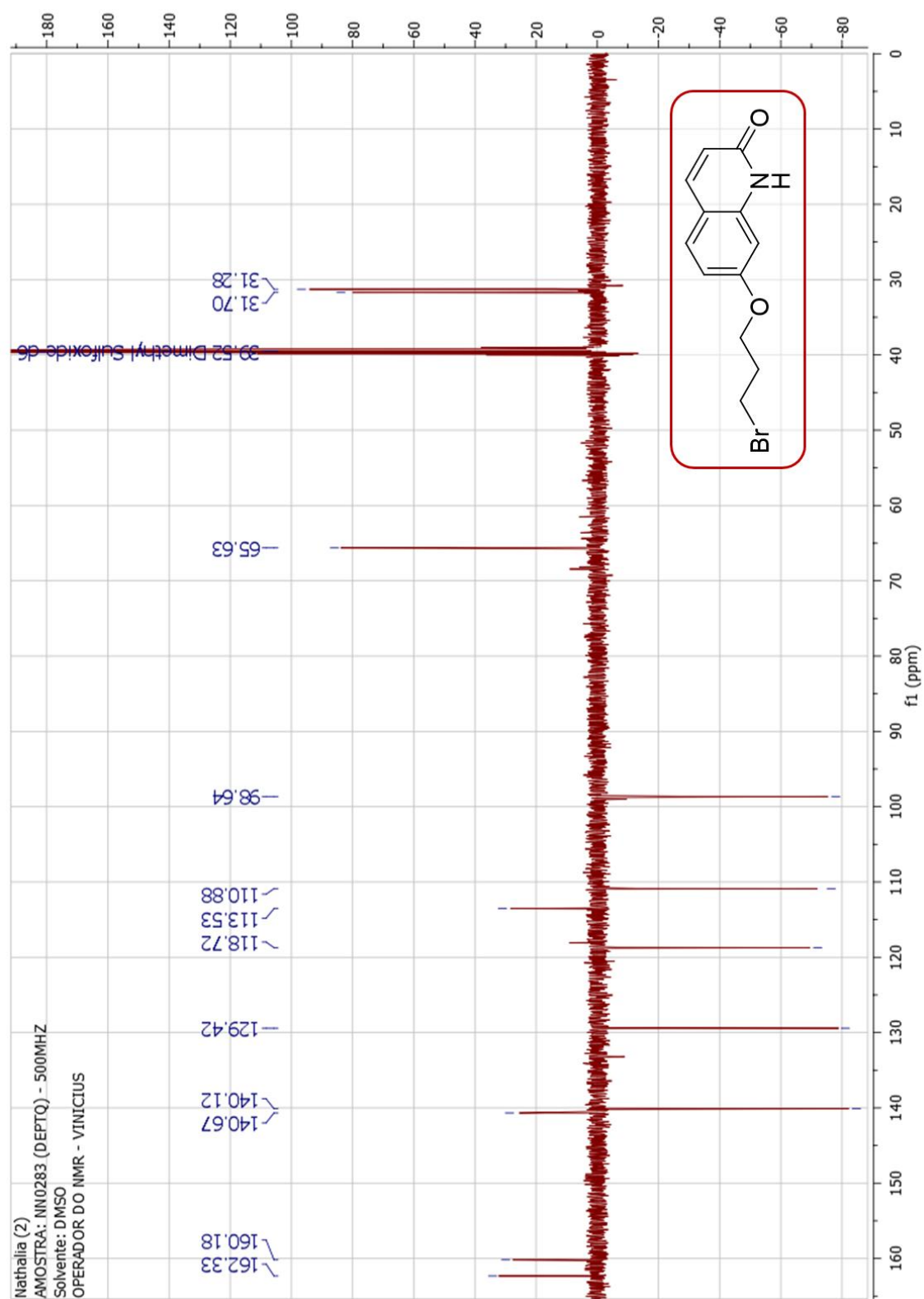
BrCCCCOc1ccc2c(c1)c(=O)[nH]c2

DMSO (água)
 $\delta = 3,3$

2.50 Dimethyl Sulfoxide-d6

11.62
7.80 7.74
7.82 7.80
1.06
7.62 7.56 7.50
1.04
7.57
7.82 7.80 7.57 7.55
6.81 6.81 6.81
2.10
6.80 6.81 6.81
1.04
6.31 6.29
1.04
f1 (ppm)
5.84
f1 (ppm)
3.72
f1 (ppm)
1.86
3.69 3.68 3.67
4.12 4.11 4.10
3.67
2.25 2.26 2.28 2.29 2.30
1.89
2.28 2.24
f1 (ppm)

Figura S52. Espectro de RMN ^{13}C do composto (**60b**) em $\text{DMSO-}d_6$ a 125 MHz.



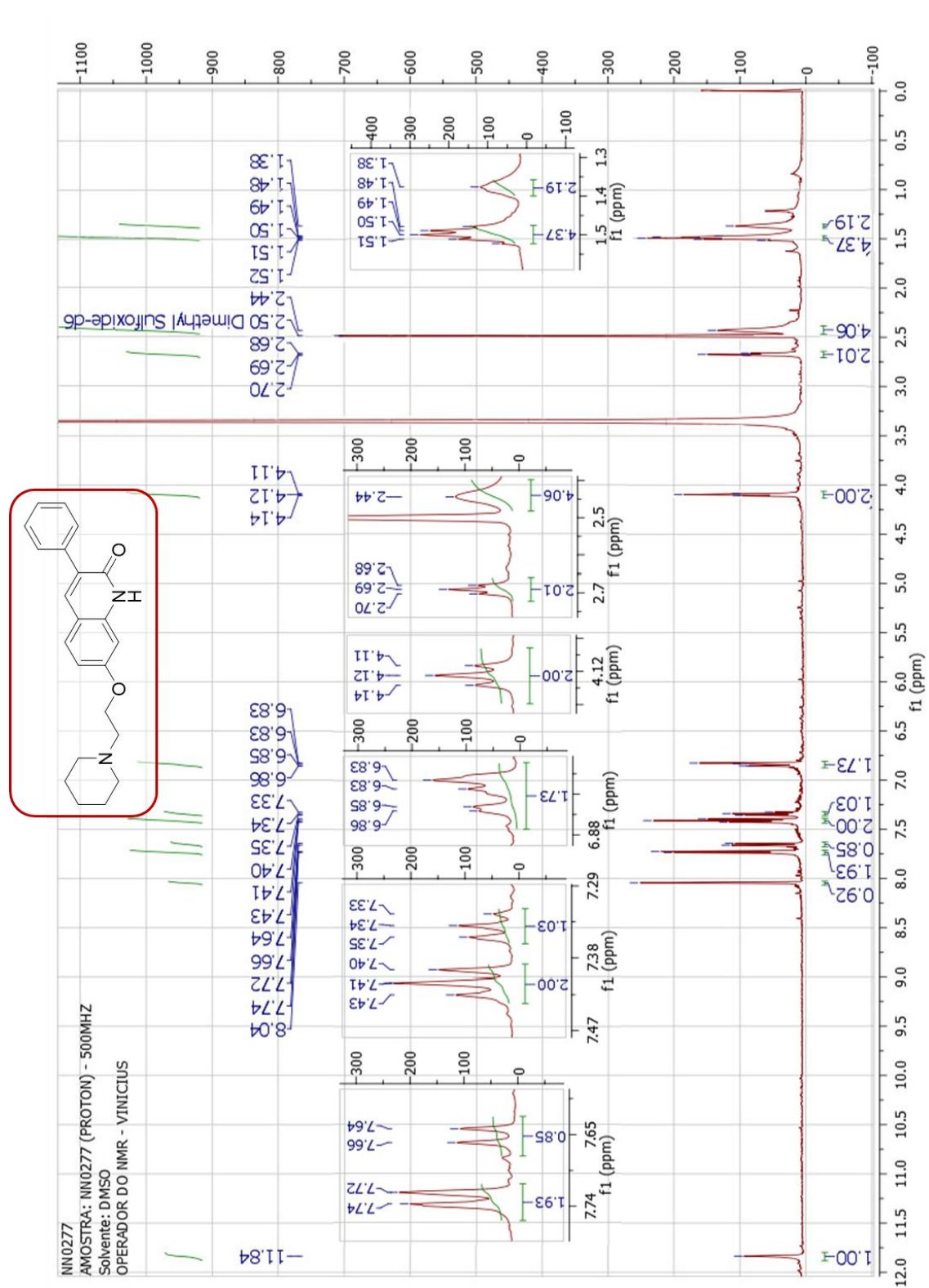
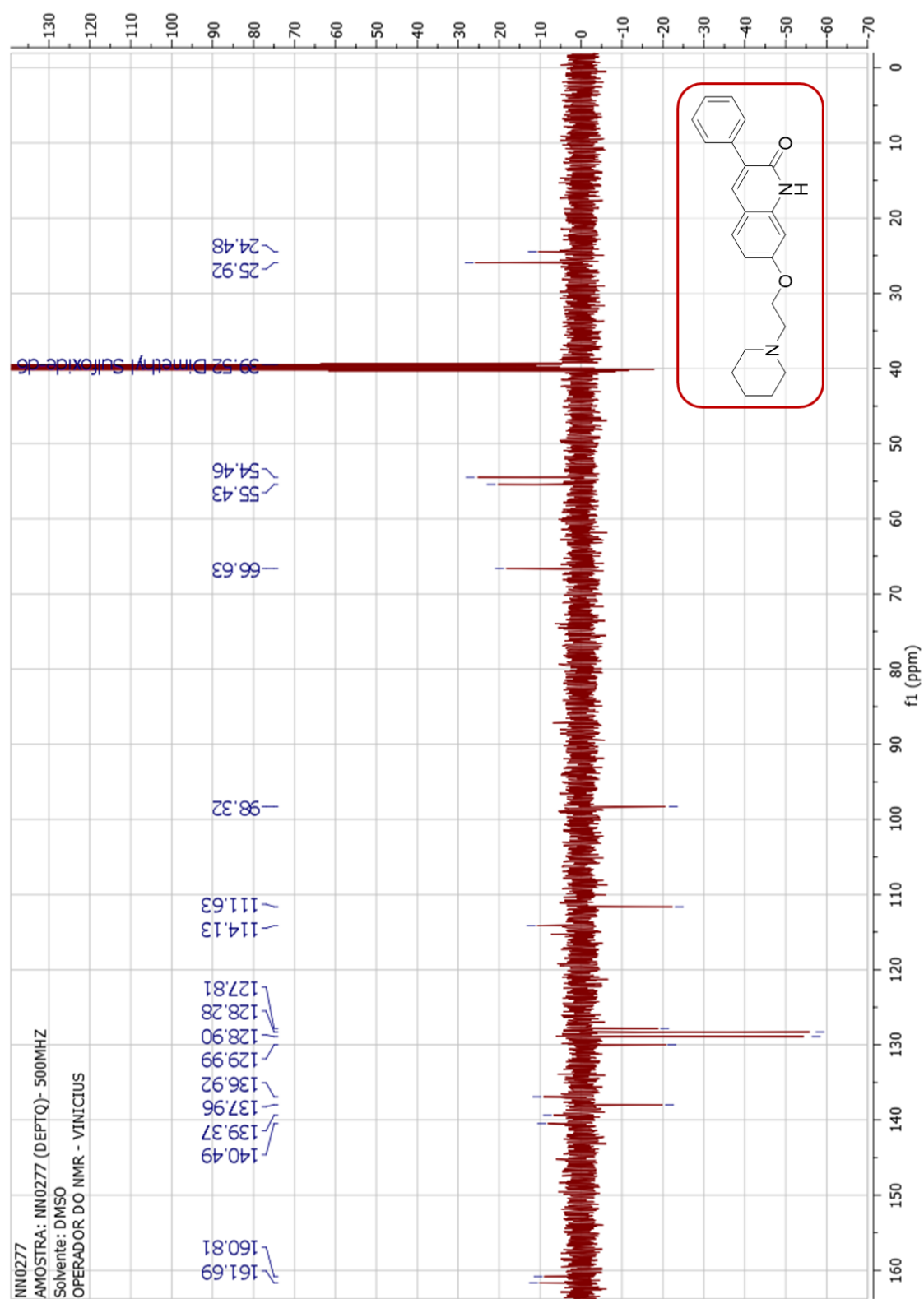
O=C1C(=O)c2cc(OCCCN3CCCCC3)ccc2C1c4ccccc4

Figura S54. Espectro de RMN ^{13}C do composto (**58a**) em DMSO-*d*₆ a 125 MHz.



[illegible]

Figura S56. Espectro de RMN ^{13}C do composto (**58b**) em $\text{DMSO-}d_6$ a 125 MHz.

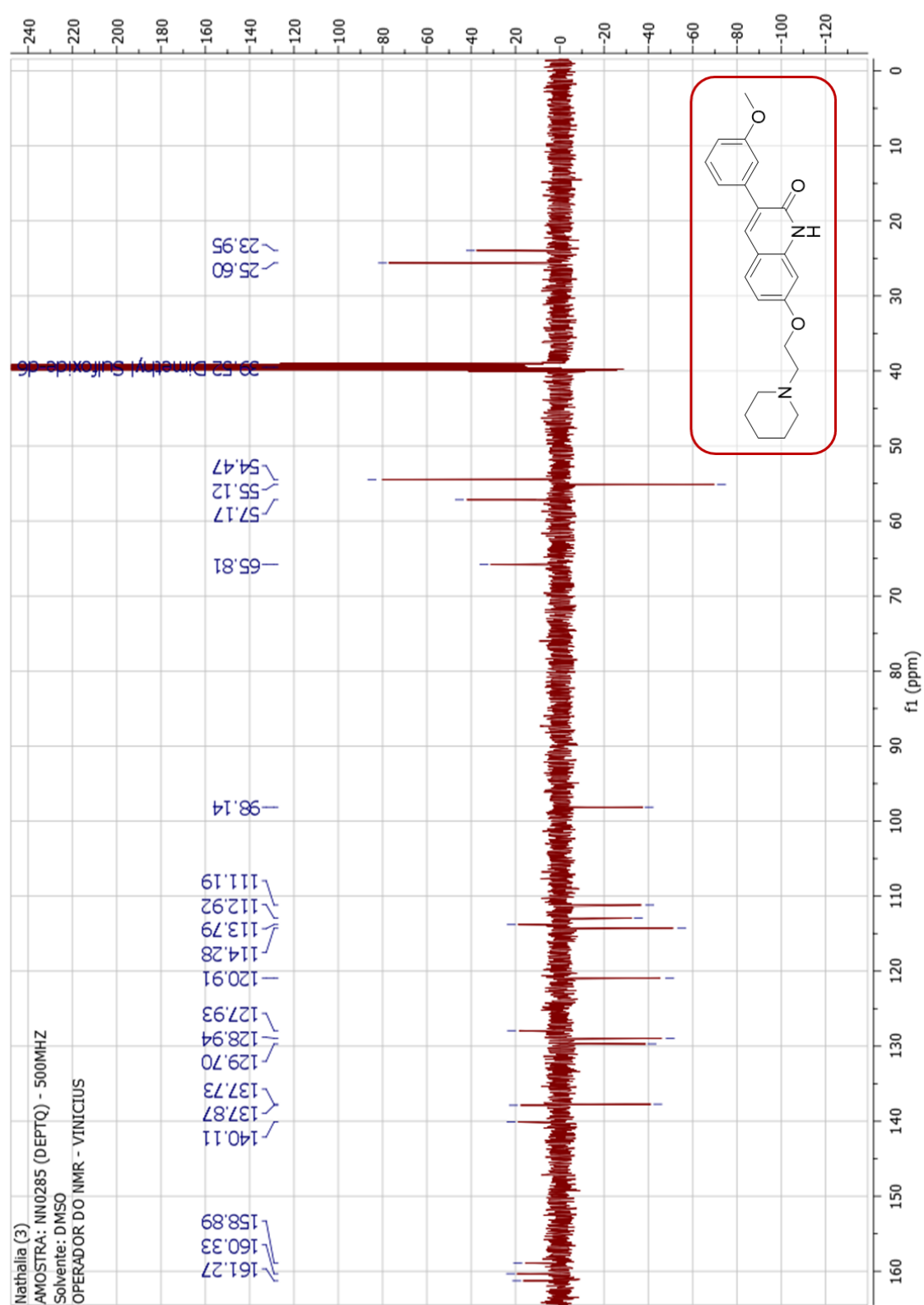


Figura S57. Espectro de RMN ^1H do composto (**58c**) em DMSO- d_6 a 500 MHz.

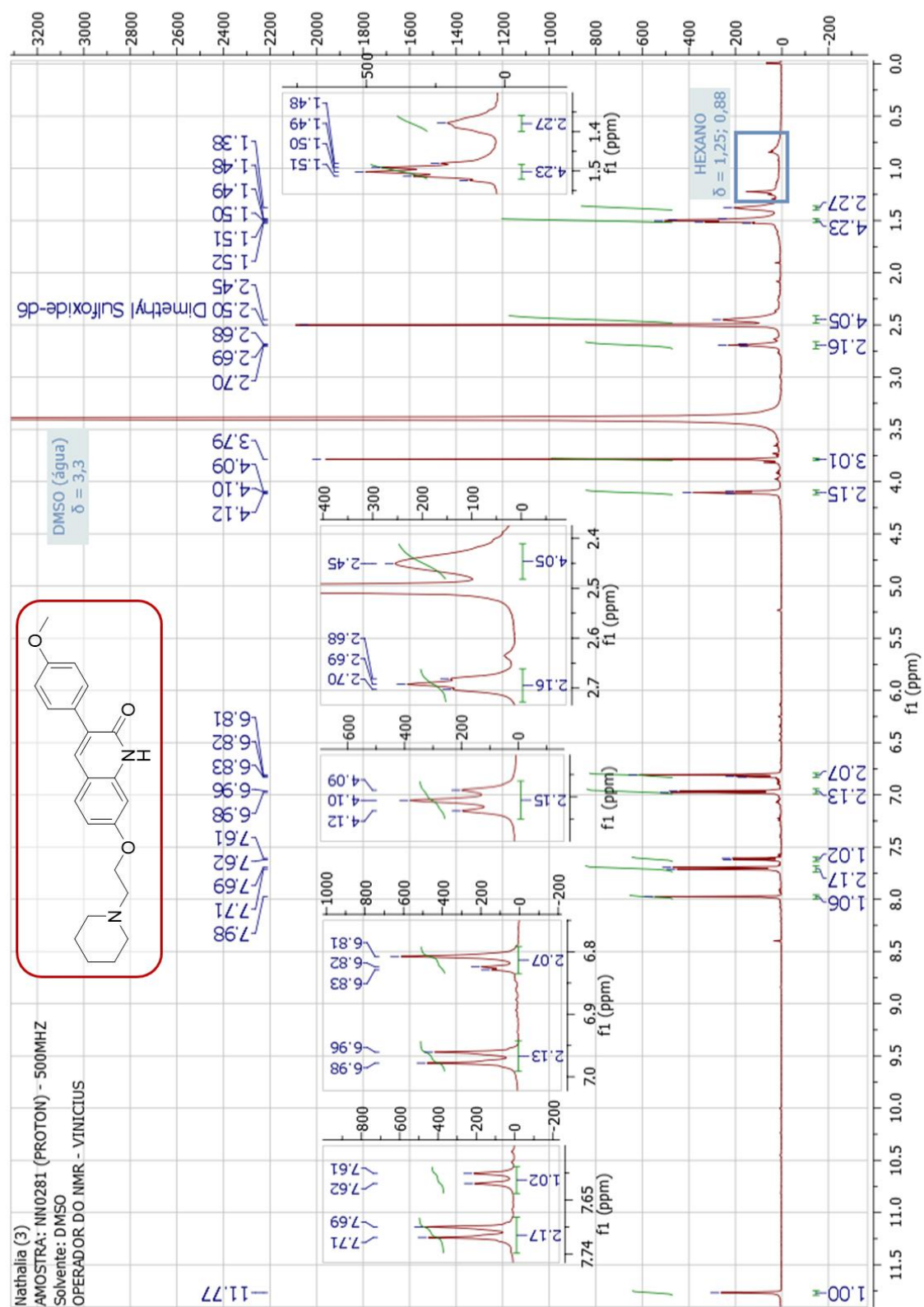
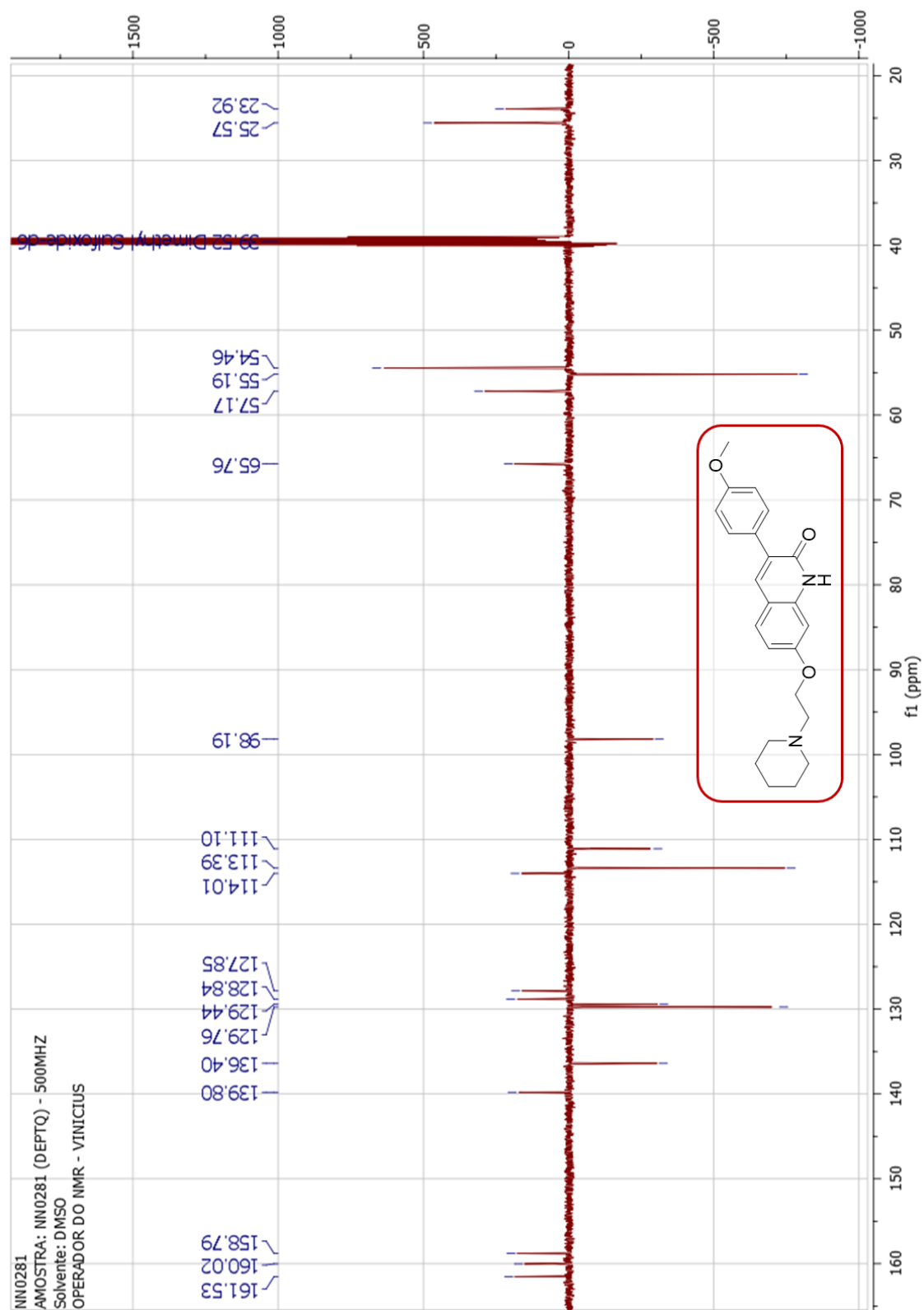


Figura S58. Espectro de RMN ^{13}C do composto (**58c**) em DMSO-*d*₆ a 125 MHz.



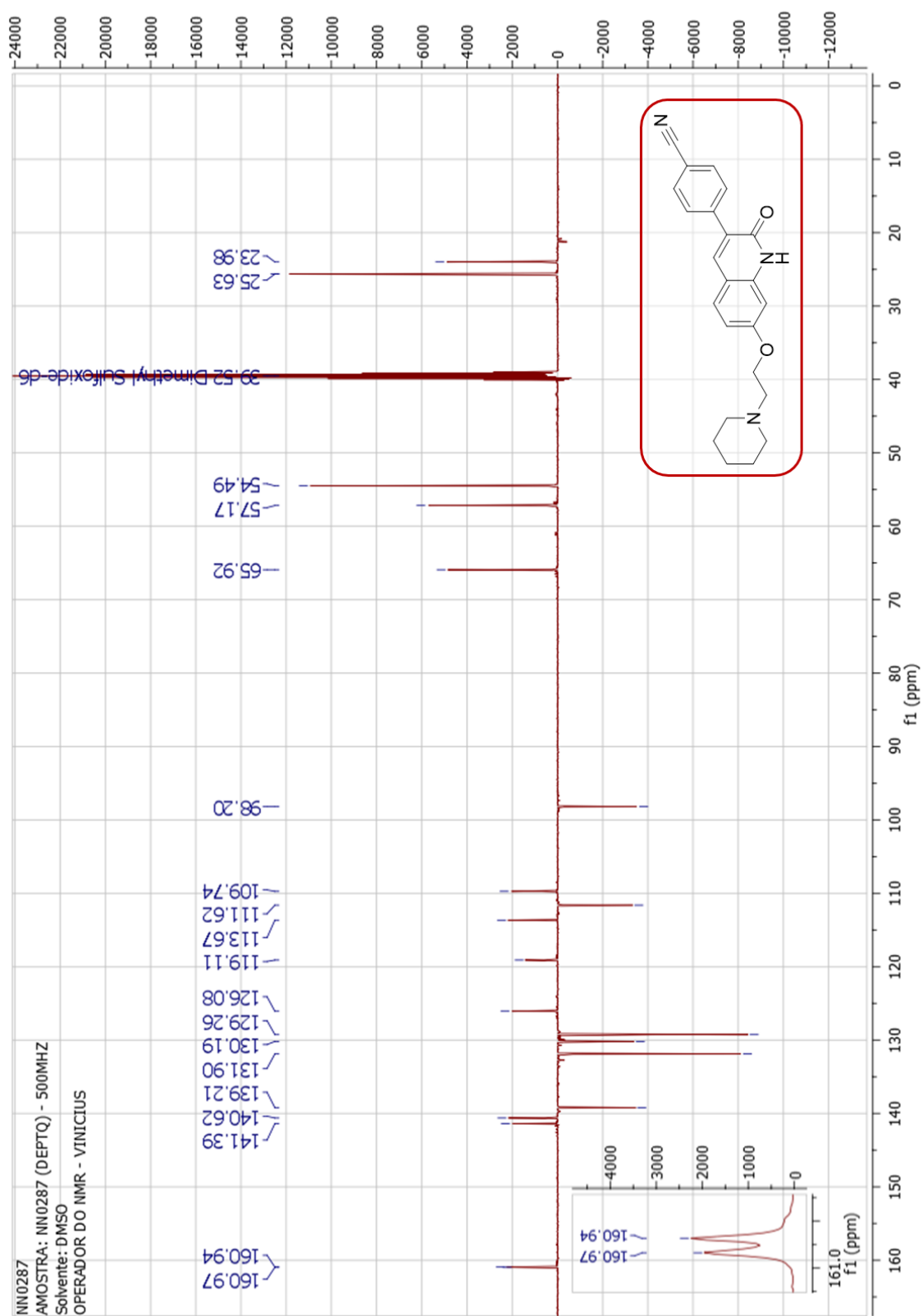
NMR Spectrum Data:

Chemical Shift (ppm)	Assignment
1.08	CH ₂ -N (triplet)
1.96	CH ₂ -O (singlet)
2.04, 2.12, 2.15	Aromatic protons (multiplet)
2.07	CH ₂ -N (singlet)
2.32	CH ₂ -O (singlet)
2.40	CH ₂ -N (singlet)
2.42	CH ₂ -O (singlet)
2.44	CH ₂ -N (singlet)
2.46	CH ₂ -O (singlet)
2.48	CH ₂ -N (singlet)
2.50	CH ₂ -O (singlet)
2.52	CH ₂ -N (singlet)
2.54	CH ₂ -O (singlet)
2.56	CH ₂ -N (singlet)
2.58	CH ₂ -O (singlet)
2.60	CH ₂ -N (singlet)
2.62	CH ₂ -O (singlet)
2.64	CH ₂ -N (singlet)
2.66	CH ₂ -O (singlet)
2.68	CH ₂ -N (singlet)
2.70	CH ₂ -O (singlet)
2.72	CH ₂ -N (singlet)
2.74	CH ₂ -O (singlet)
2.76	CH ₂ -N (singlet)
2.78	CH ₂ -O (singlet)
2.80	CH ₂ -N (singlet)
2.82	CH ₂ -O (singlet)
2.84	CH ₂ -N (singlet)
2.86	CH ₂ -O (singlet)
2.88	CH ₂ -N (singlet)
2.90	CH ₂ -O (singlet)
2.92	CH ₂ -N (singlet)
2.94	CH ₂ -O (singlet)
2.96	CH ₂ -N (singlet)
2.98	CH ₂ -O (singlet)
3.00	CH ₂ -N (singlet)
3.02	CH ₂ -O (singlet)
3.04	CH ₂ -N (singlet)
3.06	CH ₂ -O (singlet)
3.08	CH ₂ -N (singlet)
3.10	CH ₂ -O (singlet)
3.12	CH ₂ -N (singlet)
3.14	CH ₂ -O (singlet)
3.16	CH ₂ -N (singlet)
3.18	CH ₂ -O (singlet)
3.20	CH ₂ -N (singlet)
3.22	CH ₂ -O (singlet)
3.24	CH ₂ -N (singlet)
3.26	CH ₂ -O (singlet)
3.28	CH ₂ -N (singlet)
3.30	CH ₂ -O (singlet)
3.32	CH ₂ -N (singlet)
3.34	CH ₂ -O (singlet)
3.36	CH ₂ -N (singlet)
3.38	CH ₂ -O (singlet)
3.40	CH ₂ -N (singlet)
3.42	CH ₂ -O (singlet)
3.44	CH ₂ -N (singlet)
3.46	CH ₂ -O (singlet)
3.48	CH ₂ -N (singlet)
3.50	CH ₂ -O (singlet)
3.52	CH ₂ -N (singlet)
3.54	CH ₂ -O (singlet)
3.56	CH ₂ -N (singlet)
3.58	CH ₂ -O (singlet)
3.60	CH ₂ -N (singlet)
3.62	CH ₂ -O (singlet)
3.64	CH ₂ -N (singlet)
3.66	CH ₂ -O (singlet)
3.68	CH ₂ -N (singlet)
3.70	CH ₂ -O (singlet)
3.72	CH ₂ -N (singlet)
3.74	CH ₂ -O (singlet)
3.76	CH ₂ -N (singlet)
3.78	CH ₂ -O (singlet)
3.80	CH ₂ -N (singlet)
3.82	CH ₂ -O (singlet)
3.84	CH ₂ -N (singlet)
3.86	CH ₂ -O (singlet)
3.88	CH ₂ -N (singlet)
3.90	CH ₂ -O (singlet)
3.92	CH ₂ -N (singlet)
3.94	CH ₂ -O (singlet)
3.96	CH ₂ -N (singlet)
3.98	CH ₂ -O (singlet)
4.00	CH ₂ -N (singlet)
4.02	CH ₂ -O (singlet)
4.04	CH ₂ -N (singlet)
4.06	CH ₂ -O (singlet)
4.08	CH ₂ -N (singlet)
4.10	CH ₂ -O (singlet)
4.12	CH ₂ -N (singlet)
4.14	CH ₂ -O (singlet)
4.16	CH ₂ -N (singlet)
4.18	CH ₂ -O (singlet)
4.20	CH ₂ -N (singlet)
4.22	CH ₂ -O (singlet)
4.24	CH ₂ -N (singlet)
4.26	CH ₂ -O (singlet)
4.28	CH ₂ -N (singlet)
4.30	CH ₂ -O (singlet)
4.32	CH ₂ -N (singlet)
4.34	CH ₂ -O (singlet)
4.36	CH ₂ -N (singlet)
4.38	CH ₂ -O (singlet)
4.40	CH ₂ -N (singlet)
4.42	CH ₂ -O (singlet)
4.44	CH ₂ -N (singlet)
4.46	CH ₂ -O (singlet)
4.48	CH ₂ -N (singlet)
4.50	CH ₂ -O (singlet)
4.52	CH ₂ -N (

[illegible]

[illegible]

Figura S62. Espectro de RMN ^{13}C do composto (**58e**) em DMSO-*d*₆ a 125 MHz.



Nathalia (3)
 AMOSTRA: NN0291 (PROTON) - 500MHZ
 Solvente: DMSO
 OPERADOR DO NMR - VINICIUS

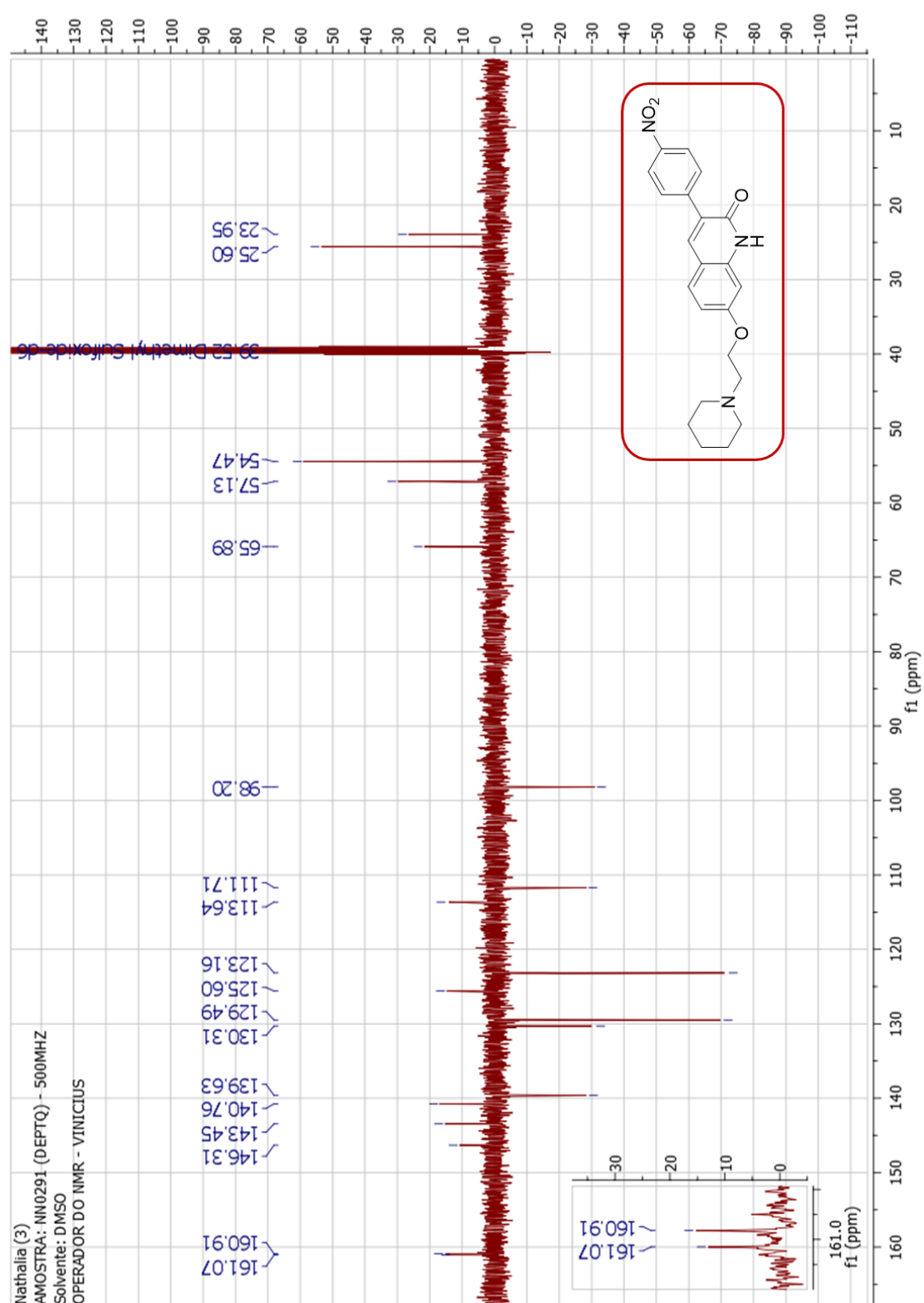
Chemical structure of NN0291 (highlighted in red):

O=C(c1ccc(cc1)C2=CC=CC=C2)C3=CC=CC=C3C4=CC=CC=C4OCCN5CCCCC5

¹H NMR spectrum (500 MHz, DMSO-d₆) data:

Chemical Shift (ppm)	Integration
12.00	1.00
8.28, 8.26, 8.09, 8.08	3.06
7.76	1.00
6.85	1.15
6.88, 6.86, 6.83, 6.87, 6.88, 6.83	2.07
3.06	3.06
2.70, 2.69, 2.68, 2.44	4.15
2.23	2.23
2.07	2.07
1.52, 1.51, 1.50, 1.49, 1.48	4.49
1.38	2.33

Figura S64. Espectro de RMN ^{13}C do composto (**58f**) em DMSO-*d*₆ a 125 MHz.



[illegible]

Figura S66. Espectro de RMN ^{13}C do composto (**58g**) em DMSO- d_6 a 125 MHz.

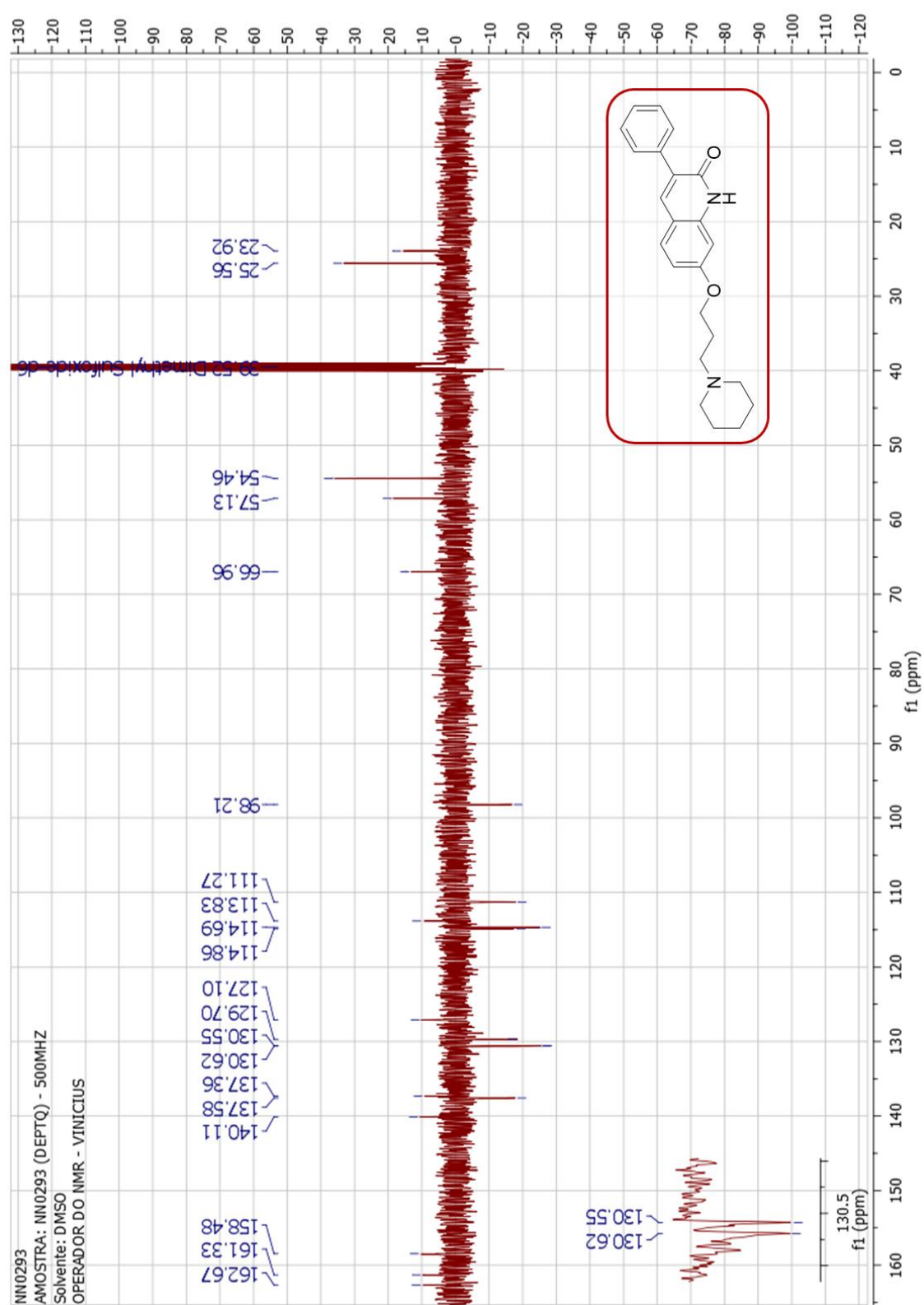


Figura S67. Espectro de RMN ^1H do composto (**71**) em DMSO-*d*₆ a 500 MHz.

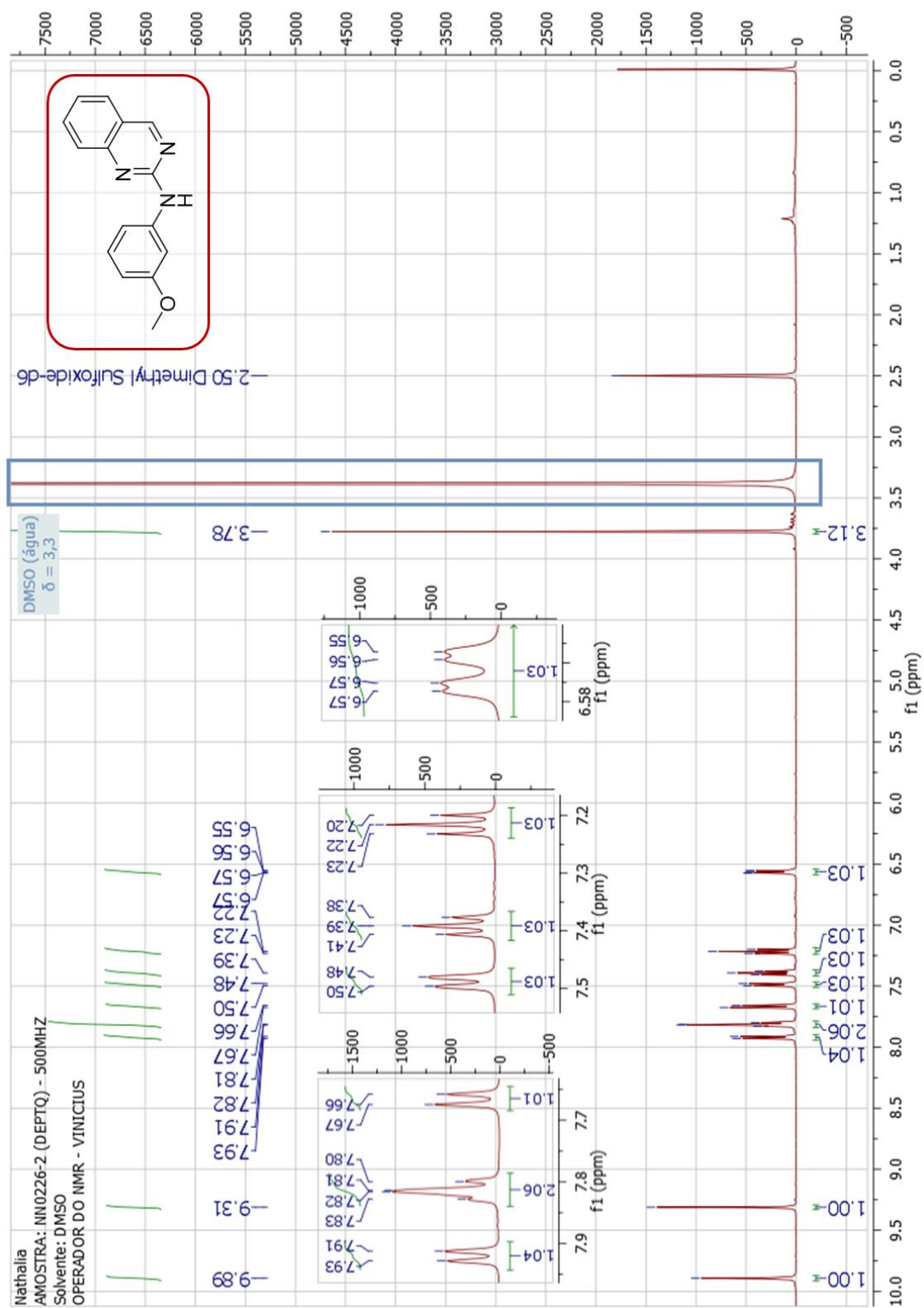


Figura S68. Espectro de RMN ^{13}C do composto (**71**) em DMSO-*d*₆ a 125 MHz.

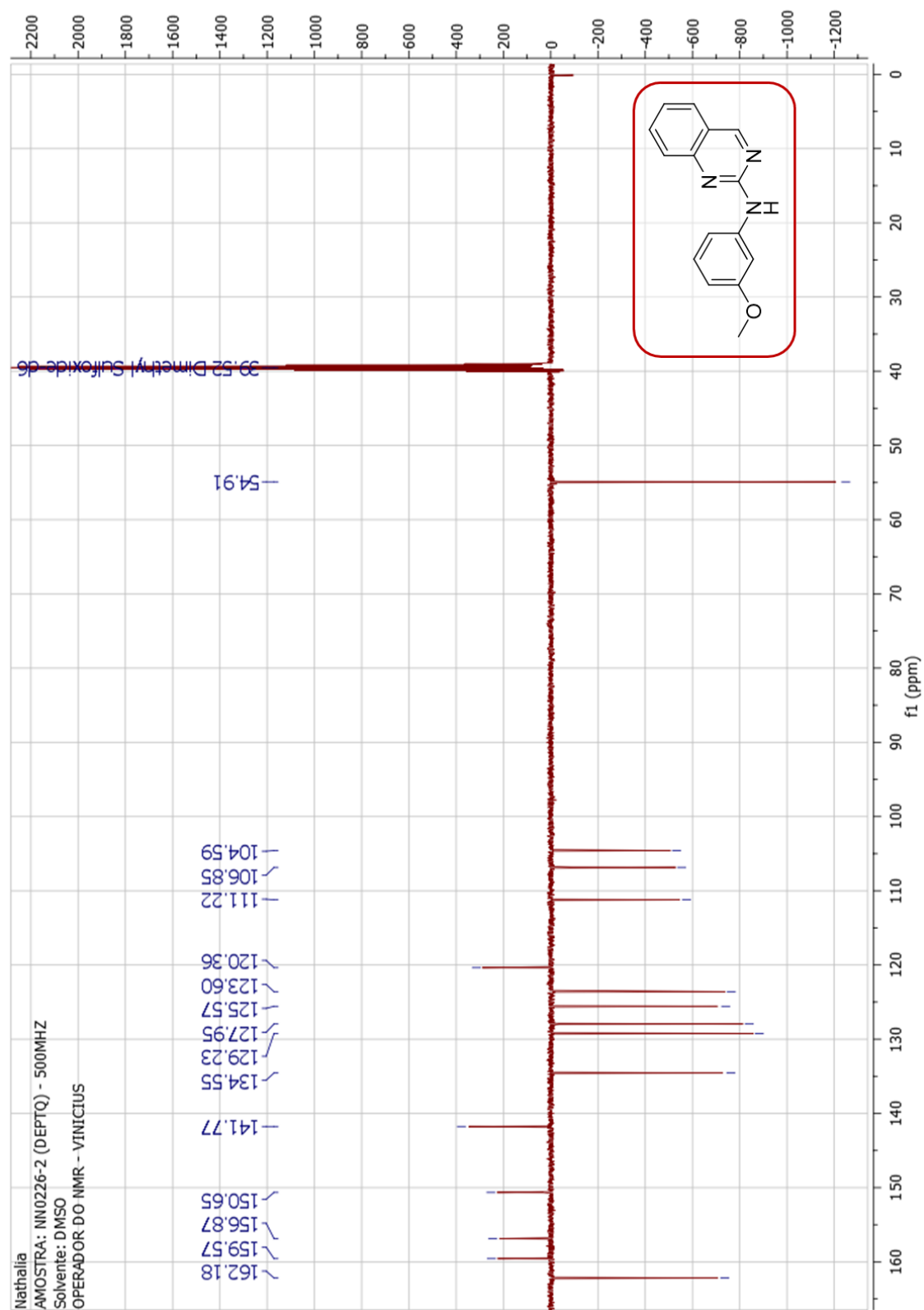


Figura S69. Espectro de RMN ^1H do composto (**68**) em CDCl_3 a 500 MHz.

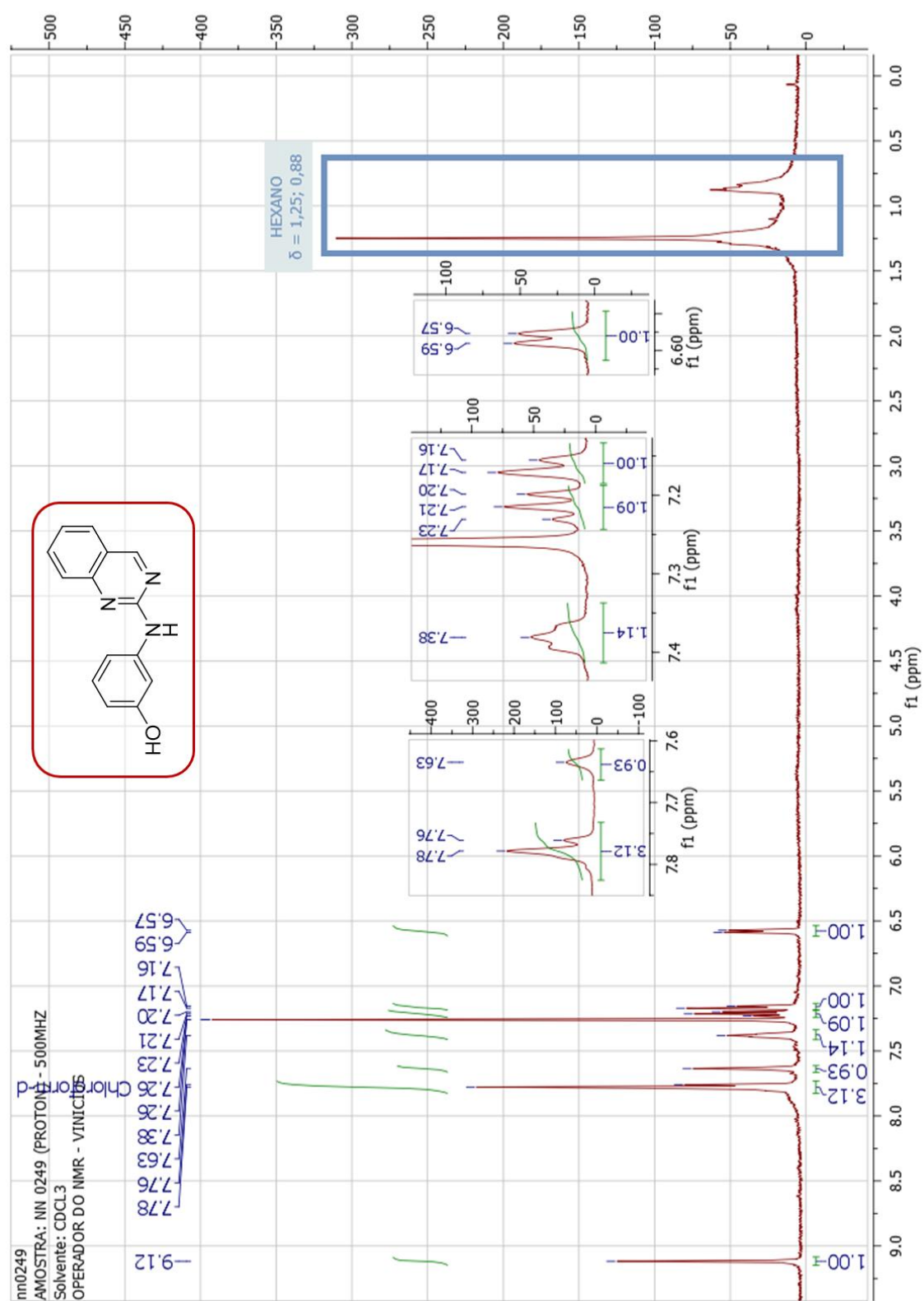


Figura S70. Espectro de RMN ^{13}C do composto (**68**) em CDCl_3 a 125 MHz.

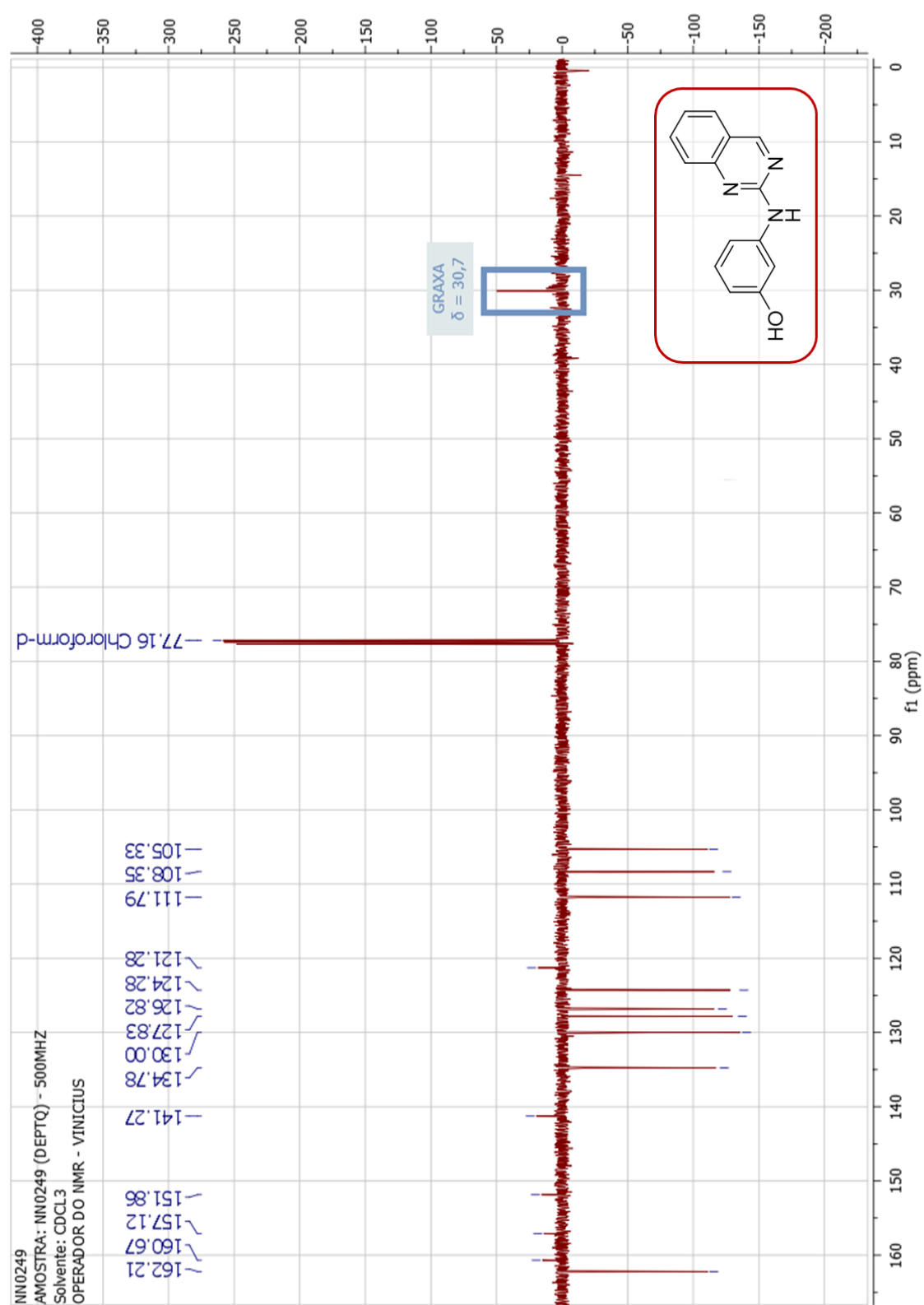


Figura S71. Espectro de RMN ^1H do composto (**69a**) em DMSO- d_6 a 500 MHz.

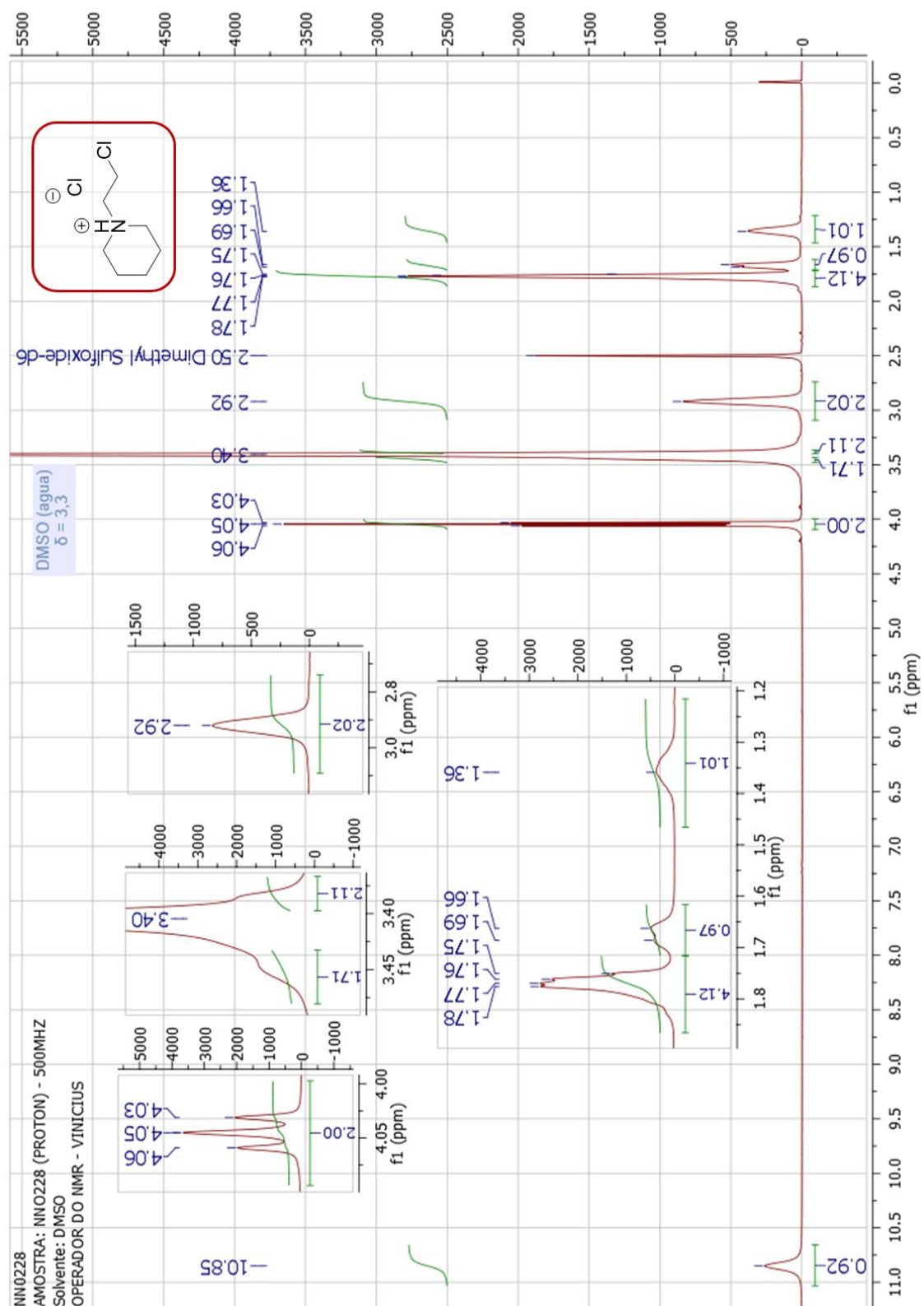
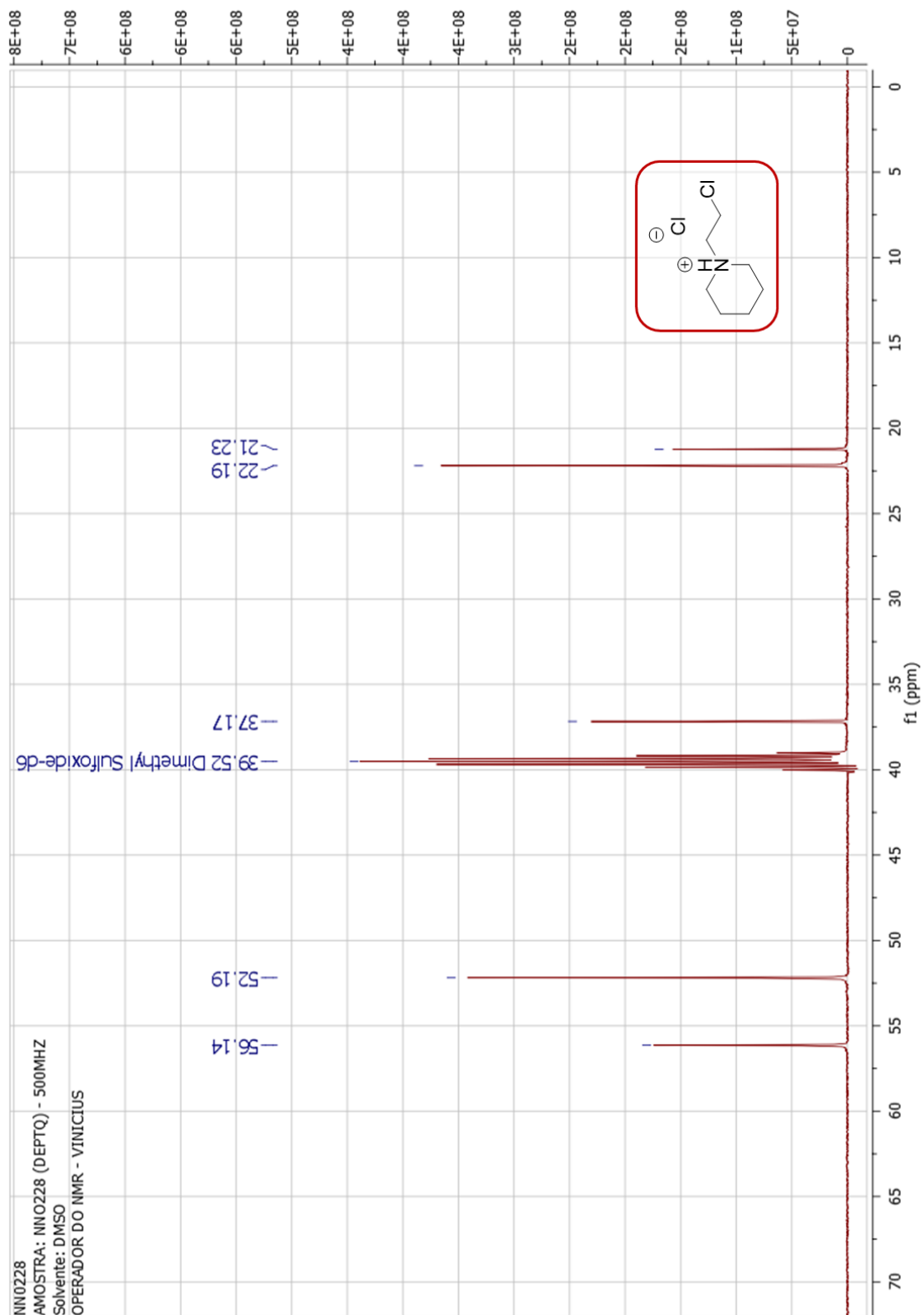


Figura S72. Espectro de RMN ^{13}C do composto (**69a**) em DMSO-*d*6 a 125 MHz.



NN0272
 AMOSTRA: NN 0272 (PROTON) - 500MHZ
 Solvente: DMSO
 OPERADOR DO NMR - VINICIUS

CC[N+]1CCCC1.[Cl-]

1.02
 2.00
 2.06
 2.05
 2.07
 4.16
 1.09
 1.04

1.32
 1.34
 1.37
 1.39
 1.67
 1.69
 1.73
 1.76
 1.79
 1.82
 1.85
 1.88
 1.91
 1.94
 1.97
 2.00
 2.03
 2.06
 2.09
 2.12
 2.15
 2.18
 2.21
 2.24
 2.27
 2.30
 2.33
 2.36
 2.39
 2.42
 2.45
 2.48
 2.51
 2.54
 2.57
 2.60
 2.63
 2.66
 2.69
 2.72
 2.75
 2.78
 2.81
 2.84
 2.87
 2.90
 2.93
 2.96
 2.99
 3.02
 3.05
 3.08
 3.11
 3.14
 3.17
 3.20
 3.23
 3.26
 3.29
 3.32
 3.35
 3.38
 3.41
 3.44
 3.47
 3.50
 3.53
 3.56
 3.59
 3.62
 3.65
 3.68
 3.71
 3.74
 3.77
 3.80
 3.83
 3.86
 3.89
 3.92
 3.95
 3.98
 4.01
 4.04
 4.07
 4.10
 4.13
 4.16
 4.19
 4.22
 4.25
 4.28
 4.31
 4.34
 4.37
 4.40
 4.43
 4.46
 4.49
 4.52
 4.55
 4.58
 4.61
 4.64
 4.67
 4.70
 4.73
 4.76
 4.79
 4.82
 4.85
 4.88
 4.91
 4.94
 4.97
 5.00
 5.03
 5.06
 5.09
 5.12
 5.15
 5.18
 5.21
 5.24
 5.27
 5.30
 5.33
 5.36
 5.39
 5.42
 5.45
 5.48
 5.51
 5.54
 5.57
 5.60
 5.63
 5.66
 5.69
 5.72
 5.75
 5.78
 5.81
 5.84
 5.87
 5.90
 5.93
 5.96
 5.99
 6.02
 6.05
 6.08
 6.11
 6.14
 6.17
 6.20
 6.23
 6.26
 6.29
 6.32
 6.35
 6.38
 6.41
 6.44
 6.47
 6.50
 6.53
 6.56
 6.59
 6.62
 6.65
 6.68
 6.71
 6.74
 6.77
 6.80
 6.83
 6.86
 6.89
 6.92
 6.95
 6.98
 7.01
 7.04
 7.07
 7.10
 7.13
 7.16
 7.19
 7.22
 7.25
 7.28
 7.31
 7.34
 7.37
 7.40
 7.43
 7.46
 7.49
 7.52
 7.55
 7.58
 7.61
 7.64
 7.67
 7.70
 7.73
 7.76
 7.79
 7.82
 7.85
 7.88
 7.91
 7.94
 7.97
 8.00
 8.03
 8.06
 8.09
 8.12
 8.15
 8.18
 8.21
 8.24
 8.27
 8.30
 8.33
 8.36
 8.39
 8.42
 8.45
 8.48
 8.51
 8.54
 8.57
 8.60
 8.63
 8.66
 8.69
 8.72
 8.75
 8.78
 8.81
 8.84
 8.87
 8.90
 8.93
 8.96
 8.99
 9.02
 9.05
 9.08
 9.11
 9.14
 9.17
 9.20
 9.23
 9.26
 9.29
 9.32
 9.35
 9.38
 9.41
 9.44
 9.47
 9.50
 9.53
 9.56
 9.59
 9.62
 9.65
 9.68
 9.71
 9.74
 9.77
 9.80
 9.83
 9.86
 9.89
 9.92
 9.95
 9.98
 10.01
 10.04
 10.07
 10.10
 10.13
 10.16
 10.19
 10.22
 10.25
 10.28
 10.31
 10.34
 10.37
 10.40
 10.43
 10.46
 10.49
 10.52
 10.55
 10.58
 10.61
 10.64
 10.67
 10.70
 10.73
 10.76
 10.79
 10.82
 10.85
 10.88
 10.91
 10.94
 10.97
 11.00

Figura S74. Espectro de RMN ^{13}C do composto (**69b**) em DMSO- d_6 a 125 MHz.

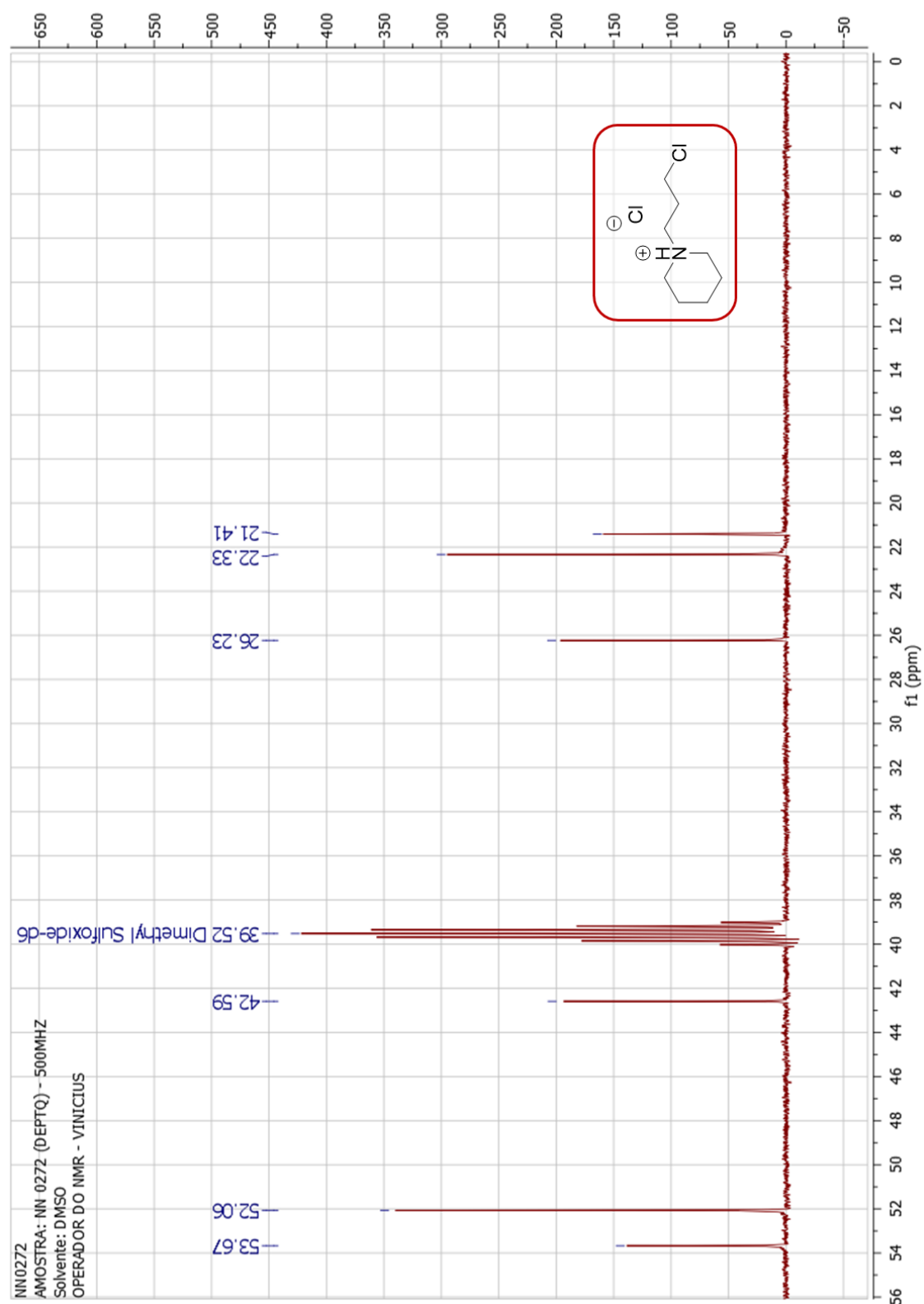


Figura S75. Espectro de RMN ^1H do composto (**67a**) em DMSO- d_6 a 500 MHz.

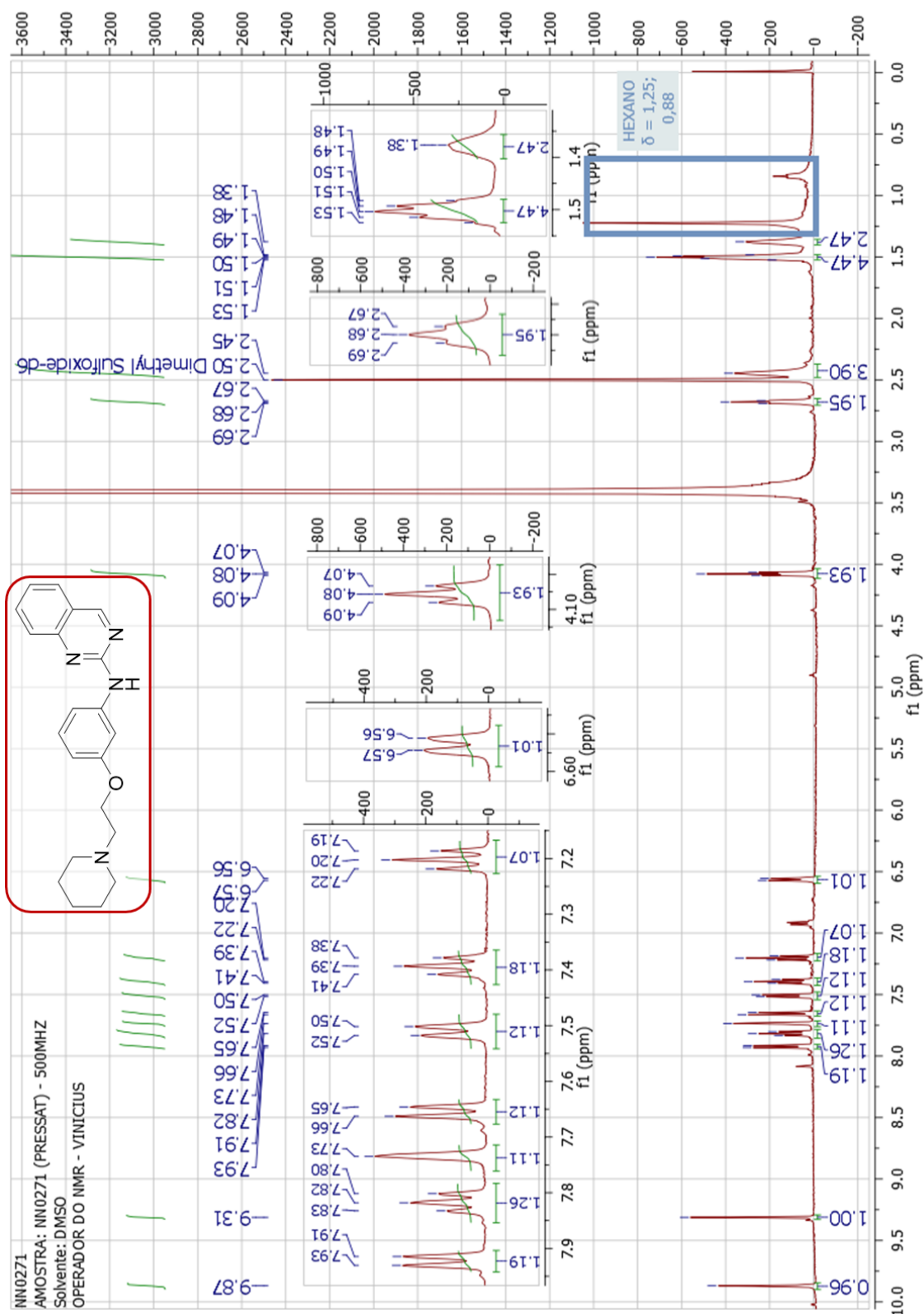


Figura S76. Espectro de RMN ^{13}C do composto (**67a**) em DMSO-*d*₆ a 125 MHz.

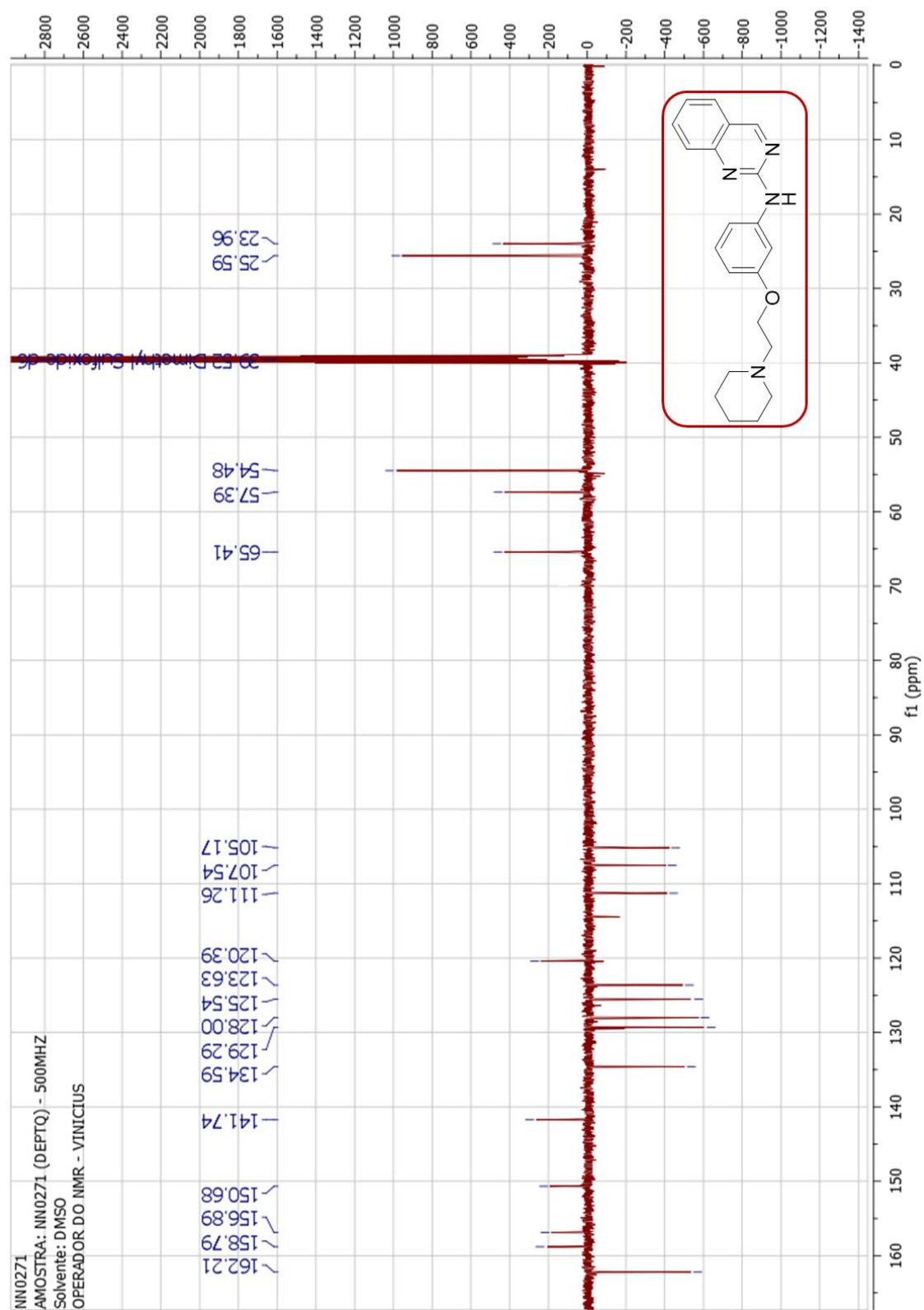


Figura S77. Espectro de RMN ^1H do composto (**67b**) em DMSO- d_6 a 500 MHz.

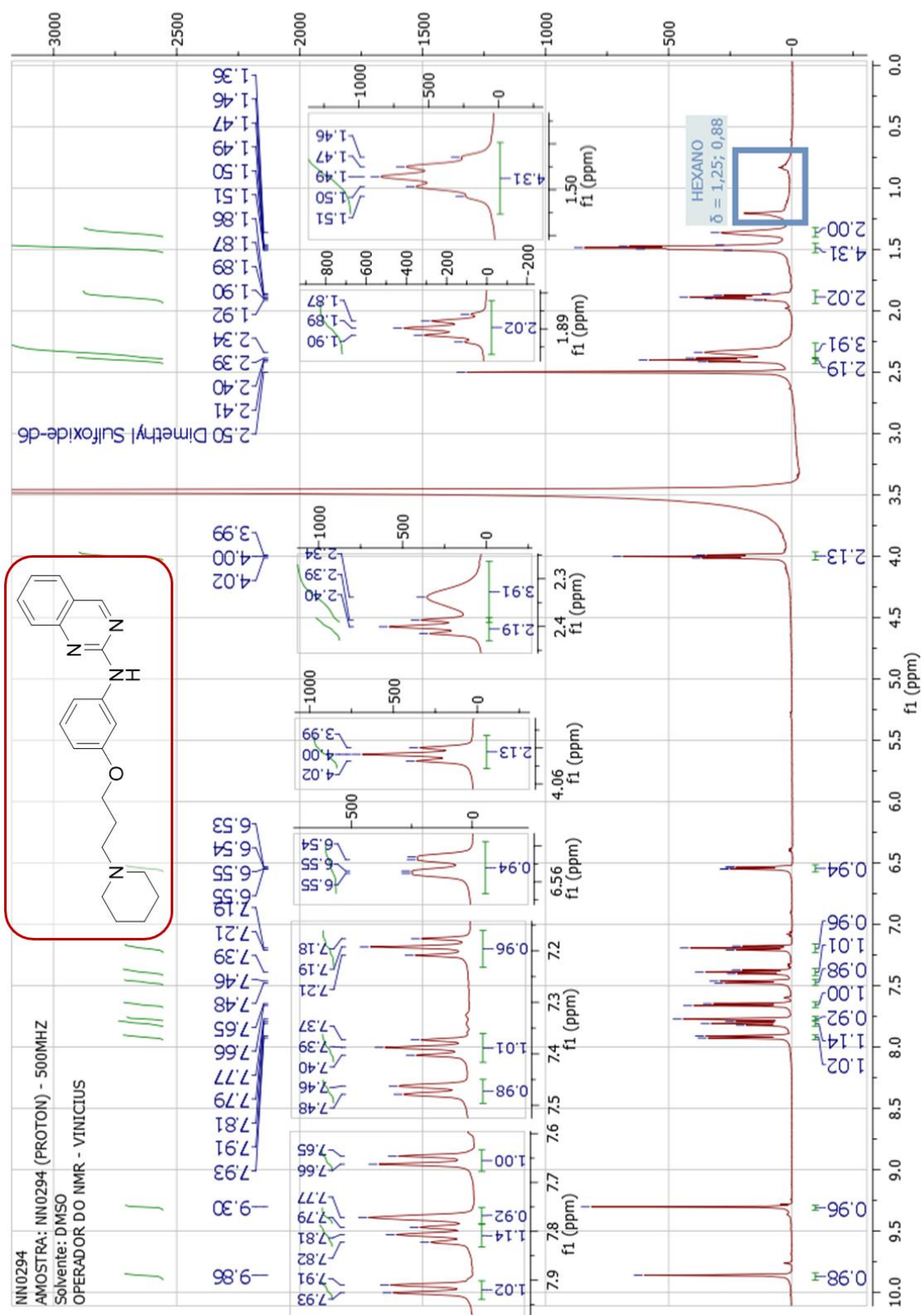
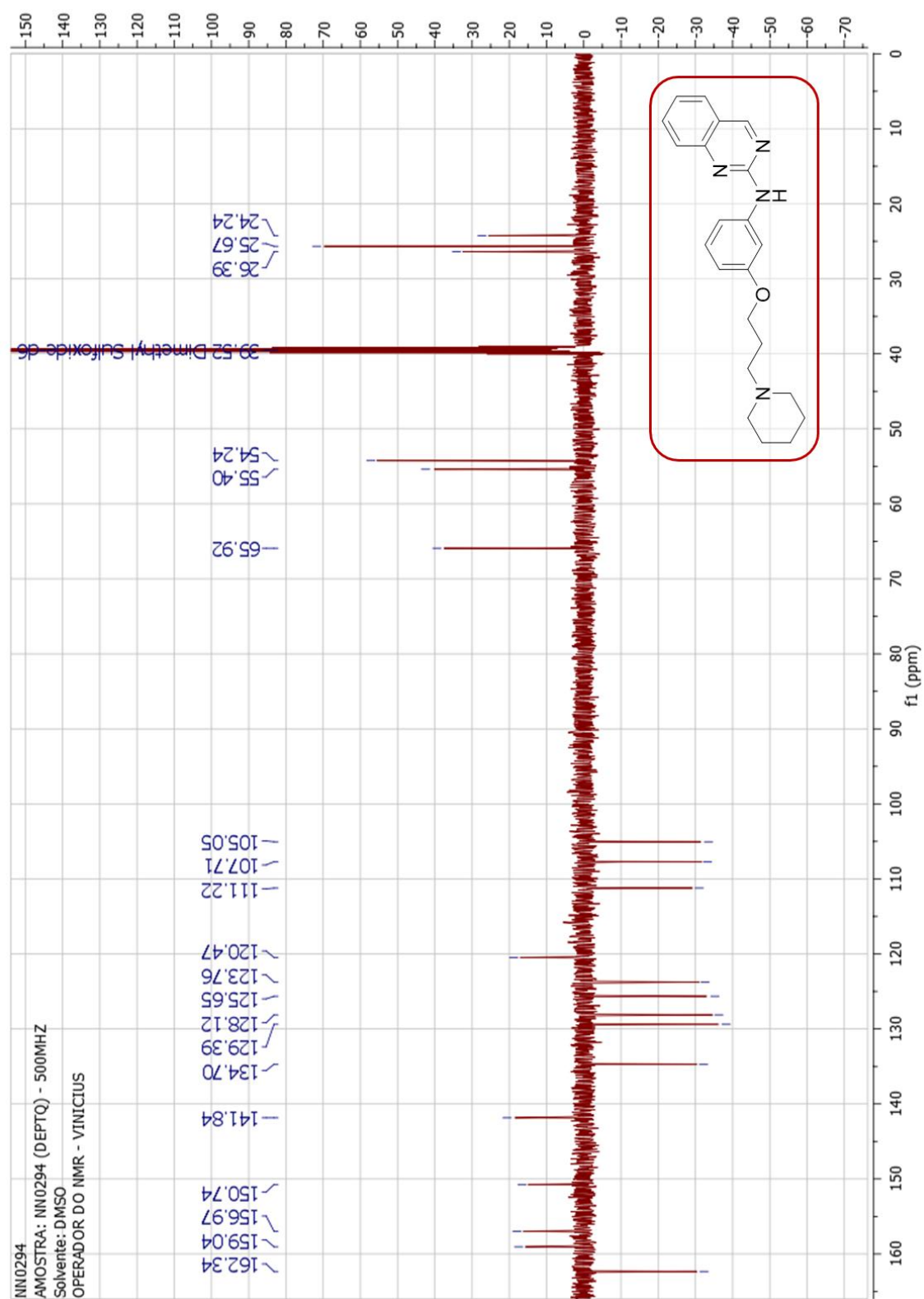


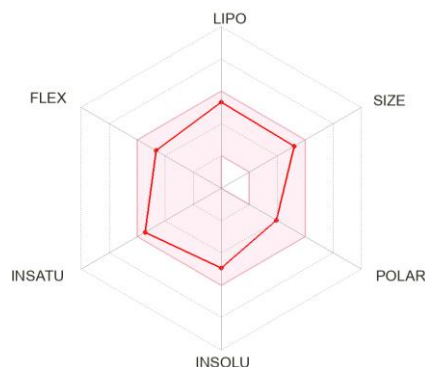
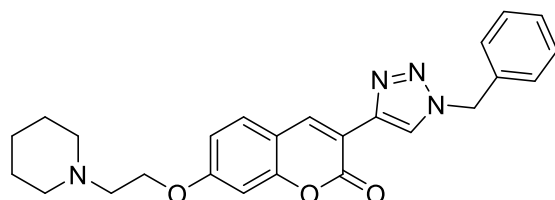
Figura S78. Espectro de RMN ^{13}C do composto (**67b**) em DMSO- d_6 a 125 MHz.



7.3. ANEXO 3 – PROPRIEDADES ADMET

Tabela S11. Propriedades ADMET do composto **26a**

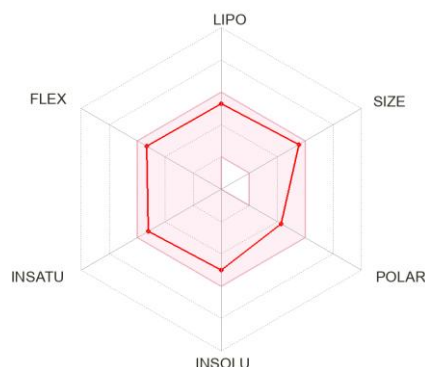
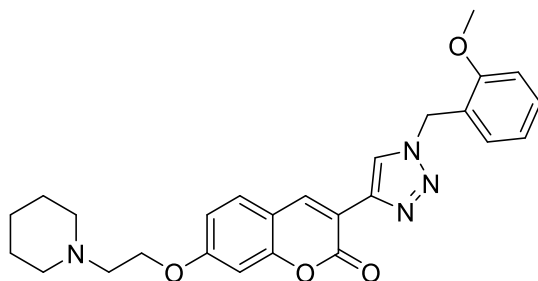
Composto 26a



Propriedades físico-químicas	
Fórmula	C ₂₅ H ₂₆ N ₄ O ₃
Peso molecular	430,50 g/mol
Fração Csp ³	0,32
Num. ligações rotativas	7
Num. aceptadores de ligação H	6
Num. de doadores de ligação H	0
Refratividade molar	127,28
TPSA	73,39 Å ²
Lipofilicidade	
Log <i>P</i> _{o/w} (iLOGP)	3,80
Log <i>P</i> _{o/w} (XLOGP3)	3,80
Log <i>P</i> _{o/w} (WLOGP)	3,58
Log <i>P</i> _{o/w} (MLOGP)	2,89
Log <i>P</i> _{o/w} (SILICOS-IT)	4,07
Consensus Log <i>P</i> _{o/w}	3,63
Solubilidade em água	
Log <i>S</i> (ESOL)	-4,93
Solubilidade	5,10e-03 mg/ml; 1,18e-05 mol/l
Classe	Moderadamente solúvel
Farmacocinética	
Absorção GI	Alto
Permeabilidade BBB	Sim
Substrato P-gp	Sim
Inibidor do CYP1A2	Sim
Inibidor do CYP2C19	Sim
Inibidor do CYP2C9	Sim
Inibidor do CYP2D6	Sim
Inibidor do CYP3A4	Sim
Log <i>K</i> _p (permeação da pele)	-6,23 cm/s
Druglikeness	
Lipinski	Sim; 0 violação
Ghose	Sim
Veber	Sim
Egan	Sim
Muegge	Sim
Pontuação de biodisponibilidade	0,55

Tabela S12. Propriedades ADMET do composto **26b**

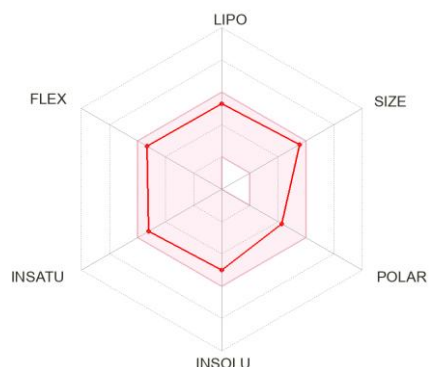
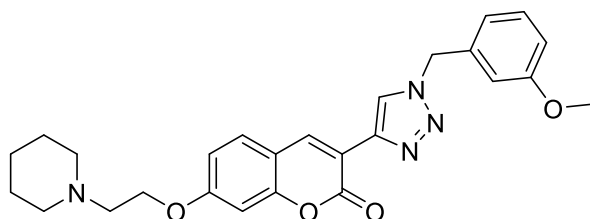
Composto 26b



Propriedades físico-químicas	
Fórmula	C ₂₆ H ₂₈ N ₄ O ₄
Peso molecular	460,52 g/mol
Fração Csp ³	0,35
Num. ligações rotativas	8
Num. aceptadores de ligação H	7
Num. de doadores de ligação H	0
Refratividade molar	133,77
TPSA	82,62 Å ²
Lipofilicidade	
Log <i>P</i> _{o/w} (iLOGP)	4,12
Log <i>P</i> _{o/w} (XLOGP3)	3,77
Log <i>P</i> _{o/w} (WLOGP)	3,59
Log <i>P</i> _{o/w} (MLOGP)	2,58
Log <i>P</i> _{o/w} (SILICOS-IT)	4,13
Consensus Log <i>P</i> _{o/w}	3,64
Solubilidade em água	
Log <i>S</i> (ESOL)	-5,00
Solubilidade	4,61e-03 mg/ml; 1,00e-05 mol/l
Classe	Moderadamente solúvel
Farmacocinética	
Absorção GI	Alto
Permeabilidade BBB	Não
Substrato P-gp	Sim
Inibidor do CYP1A2	Não
Inibidor do CYP2C19	Sim
Inibidor do CYP2C9	Sim
Inibidor do CYP2D6	Sim
Inibidor do CYP3A4	Sim
Log <i>K</i> _p (permeação da pele)	-6,43 cm/s
Druglikeness	
Lipinski	Sim; 0 violação
Ghose	Não; 1 violação: MR>130
Veber	Sim
Egan	Sim
Muegge	Sim
Pontuação de biodisponibilidade	0,55

Tabela S13. Propriedades ADMET do composto **26c**

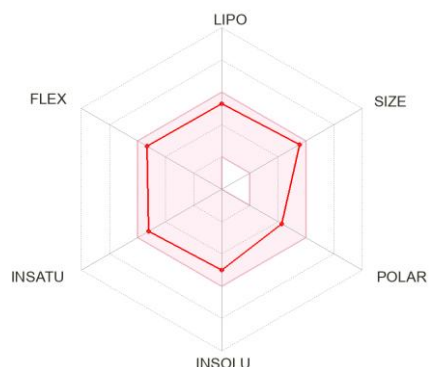
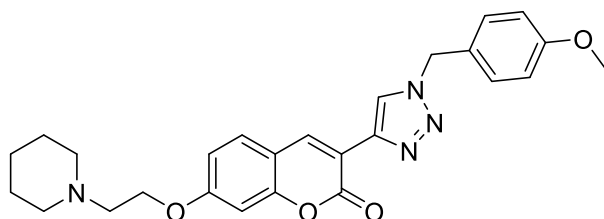
Composto 26c



Propriedades físico-químicas	
Fórmula	C ₂₆ H ₂₈ N ₄ O ₄
Peso molecular	460,52 g/mol
Fração Csp ³	0,35
Num. ligações rotativas	8
Num. aceptadores de ligação H	7
Num. de doadores de ligação H	0
Refratividade molar	133,77
TPSA	82,62 Å ²
Lipofilicidade	
Log <i>P</i> _{o/w} (iLOGP)	4,07
Log <i>P</i> _{o/w} (XLOGP3)	3,77
Log <i>P</i> _{o/w} (WLOGP)	3,59
Log <i>P</i> _{o/w} (MLOGP)	2,58
Log <i>P</i> _{o/w} (SILICOS-IT)	4,13
Consensus Log <i>P</i> _{o/w}	3,63
Solubilidade em água	
Log <i>S</i> (ESOL)	-5,00
Solubilidade	4,61e-03 mg/ml; 1,00e-05 mol/l
Classe	Moderadamente solúvel
Farmacocinética	
Absorção GI	Alto
Permeabilidade BBB	Não
Substrato P-gp	Sim
Inibidor do CYP1A2	Não
Inibidor do CYP2C19	Sim
Inibidor do CYP2C9	Sim
Inibidor do CYP2D6	Sim
Inibidor do CYP3A4	Sim
Log <i>K</i> _p (permeação da pele)	-6,43 cm/s
Druglikeness	
Lipinski	Sim; 0 violação
Ghose	Não; 1 violação: MR>130
Veber	Sim
Egan	Sim
Muegge	Sim
Pontuação de biodisponibilidade	0,55

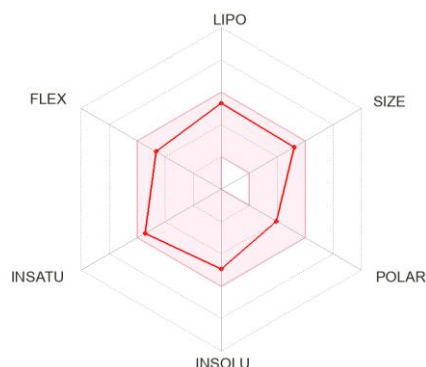
Tabela S14. Propriedades ADMET do composto **26d**

Composto 26d



Propriedades físico-químicas	
Fórmula	C ₂₆ H ₂₈ N ₄ O ₄
Peso molecular	460,52 g/mol
Fração Csp ³	0,35
Num. ligações rotativas	8
Num. aceptadores de ligação H	7
Num. de doadores de ligação H	0
Refratividade molar	133,77
TPSA	82,62 Å ²
Lipofilicidade	
Log <i>P</i> _{o/w} (iLOGP)	4,07
Log <i>P</i> _{o/w} (XLOGP3)	3,77
Log <i>P</i> _{o/w} (WLOGP)	3,59
Log <i>P</i> _{o/w} (MLOGP)	2,58
Log <i>P</i> _{o/w} (SILICOS-IT)	4,13
Consensus Log <i>P</i> _{o/w}	3,63
Solubilidade em água	
Log <i>S</i> (ESOL)	-5,00
Solubilidade	4,61e-03 mg/ml; 1,00e-05 mol/l
Classe	Moderadamente solúvel
Farmacocinética	
Absorção GI	Alto
Permeabilidade BBB	Não
Substrato P-gp	Sim
Inibidor do CYP1A2	Não
Inibidor do CYP2C19	Sim
Inibidor do CYP2C9	Sim
Inibidor do CYP2D6	Sim
Inibidor do CYP3A4	Sim
Log <i>K</i> _p (permeação da pele)	-6,43 cm/s
Druglikeness	
Lipinski	Sim; 0 violação
Ghose	Não; 1 violação: MR>130
Veber	Sim
Egan	Sim
Muegge	Sim
Pontuação de biodisponibilidade	0,55

Composto 26e

252

Composto 26f

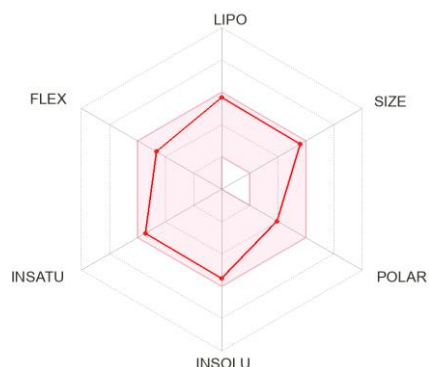
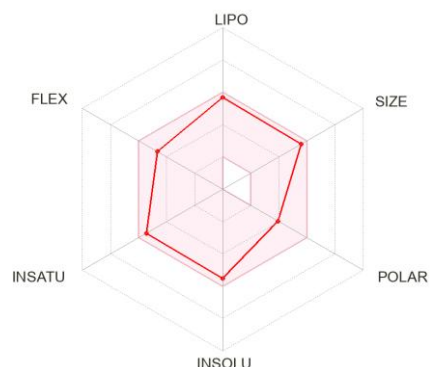
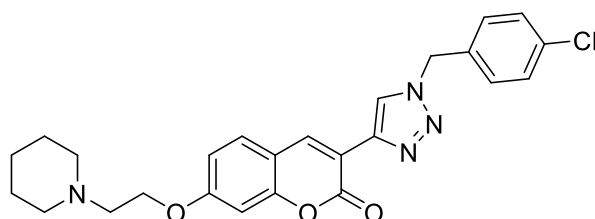
253

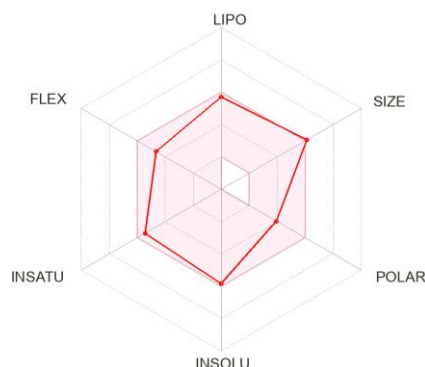
Tabela S17. Propriedades ADMET do composto **26g**

Composto 26g

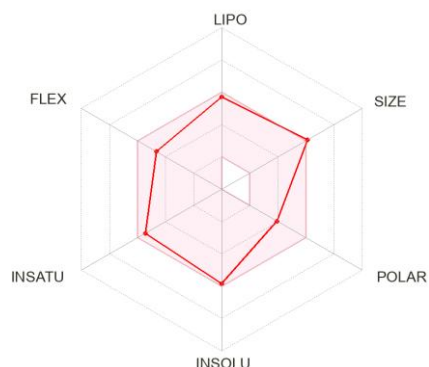


Propriedades físico-químicas	
Fórmula	C ₂₅ H ₂₅ ClN ₄ O ₃
Peso molecular	464,94 g/mol
Fração Csp ³	0,32
Num. ligações rotativas	7
Num. aceptadores de ligação H	6
Num. de doadores de ligação H	0
Refratividade molar	132,29
TPSA	73,39 Å ²
Lipofilicidade	
Log <i>P</i> _{o/w} (iLOGP)	4,24
Log <i>P</i> _{o/w} (XLOGP3)	4,42
Log <i>P</i> _{o/w} (WLOGP)	4,24
Log <i>P</i> _{o/w} (MLOGP)	3,36
Log <i>P</i> _{o/w} (SILICOS-IT)	4,71
Consensus Log <i>P</i> _{o/w}	4,19
Solubilidade em água	
Log <i>S</i> (ESOL)	-5,52
Solubilidade	1,42e-03 mg/ml; 3,05e-06 mol/l
Classe	Moderadamente solúvel
Farmacocinética	
Absorção GI	Alto
Permeabilidade BBB	Sim
Substrato P-gp	Sim
Inibidor do CYP1A2	Sim
Inibidor do CYP2C19	Sim
Inibidor do CYP2C9	Sim
Inibidor do CYP2D6	Sim
Inibidor do CYP3A4	Sim
Log <i>K</i> _p (permeação da pele)	-6,00 cm/s
Druglikeness	
Lipinski	Sim; 0 violação
Ghose	Não; 1 violação: MR>130
Veber	Sim
Egan	Sim
Muegge	Sim
Pontuação de biodisponibilidade	0,55

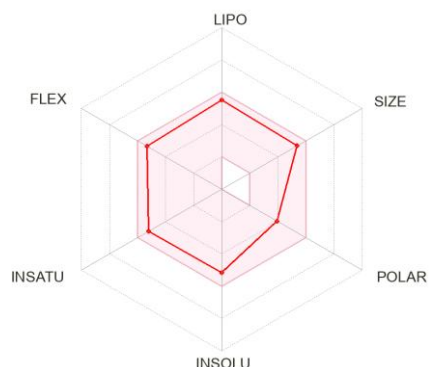
Composto 26h

255

Composto 26i

256

Composto 26j

257

7.4. ANEXO 4 – TRABALHOS PUBLICADOS DURANTE O DOUTORADO

European Journal of Medicinal Chemistry 212 (2021) 113123



Contents lists available at ScienceDirect

European Journal of Medicinal Chemistry

journal homepage: <http://www.elsevier.com/locate/ejmech>



The long and winding road of designing phosphodiesterase inhibitors for the treatment of heart failure



Nathalia Fonseca Nadur^{a, b}, Luciana Luiz de Azevedo^{a, b}, Lucas Caruso^{a, b},
Cedric Stephan Graebin^{a, b}, Renata Barbosa Lacerda^b, Arthur Eugen Kümmerle^{a, b, *}

^a Laboratório de Diversidade Molecular e Química Medicinal (LaDMol-QM, Molecular Diversity and Medicinal Chemistry Laboratory), Chemistry Institute, Rural Federal University of Rio de Janeiro, Seropédica, Rio de Janeiro, 23897-000, Brazil

^b Programa de Pós-Graduação em Química (PPGQ), Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, Rio de Janeiro, 23897-000, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 14 October 2020

Received in revised form

18 December 2020

Accepted 19 December 2020

Available online 24 December 2020

Keywords:

Phosphodiesterase

Phosphodiesterase inhibitors

Heart failure

cAMP

cGMP

Cardiovascular

ABSTRACT

Cyclic nucleotide phosphodiesterases (PDEs) are a superfamily of enzymes known to play a critical role in the indirect regulation of several intracellular metabolism pathways through the selective hydrolysis of the phosphodiester bonds of specific second messenger substrates such as cAMP (3',5'-cyclic adenosine monophosphate) and cGMP (3',5'-cyclic guanosine monophosphate), influencing the hypertrophy, contractility, apoptosis and fibrosis in the cardiovascular system. The expression and/or activity of multiple PDEs is altered during heart failure (HF), which leads to changes in levels of cyclic nucleotides and function of cardiac muscle. Within the cardiovascular system, PDEs 1–5, 8 and 9 are expressed and are interesting targets for the HF treatment. In this comprehensive review we will present a briefly description of the biochemical importance of each cardiovascular related PDE to the HF, and cover almost all the “long and winding road” of designing and discovering ligands, hits, lead compounds, clinical candidates and drugs as PDE inhibitors in the last decade.

© 2020 Elsevier Masson SAS. All rights reserved.

Contents

1. Introduction	2
1.1. The roles of PDEs in cardiovascular function	2
1.2. PDEs and heart failure	4
1.3. PDE1	4
1.3.1. PDE1 inhibitors	4
1.4. PDE2	8
1.4.1. PDE2 inhibitors	9
1.5. PDE3	14
1.5.1. PDE3 inhibitors	16
1.6. PDE4	17
1.6.1. PDE4 inhibitors	19
1.7. PDE5	25
1.7.1. PDE5 inhibitors	26
1.8. PDE8	32
1.8.1. PDE8 inhibitors	33
1.9. PDE9	33
1.9.1. PDE9 inhibitors	34

* Corresponding author. Department of Organic Chemistry, Rural Federal University of Rio de Janeiro, Seropédica, 23897-000, Brazil.

E-mail addresses: akummerle@ufrj.br, akummerle@hotmail.com (A.E. Kümmerle).

<https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2020.113123>

0223-5234/© 2020 Elsevier Masson SAS. All rights reserved.



Contents lists available at ScienceDirect

European Journal of Medicinal Chemistry

journal homepage: www.elsevier.com/locate/ejmech

Research paper



Discovery of novel thiosemicarbazone-acridine targeting butyrylcholinesterase with antioxidant, metal complexing and neuroprotector abilities as potential treatment of Alzheimer's disease: In vitro, in vivo, and in silico studies

Gleyton Leonel Silva Sousa^a, Nathalia Fonseca Nadur^a, Larissa de Almeida Peixoto Ferreira^a,
Thiago da Silva Honório^b, Alice Simon^b, Lucio Mendes Cabral^b, Maria Luiza Móra Santos^c,
Bruna Andrade^c, Emanuelle V. de Lima^c, Julia R. Clarke^c, Rosane Nora Castro^a,
Ricardo Olímpio de Moura^d, Arthur Eugen Kümmerle^{a,*}

^a Institute of Chemistry, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, 23897-000, Brazil

^b Cell Culture Laboratory (LabCel), Department of Drugs and Pharmaceutics, Faculty of Pharmacy, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 21941-902, Brazil

^c Institute of Biomedical Sciences, Universidade Federal do Rio de Janeiro, 21941-902, Brazil

^d Department of Chemistry, Universidade Estadual da Paraíba, Campina Grande, 58429-500, Brazil

ARTICLE INFO

Keywords:
Thiosemicarbazone-acridine
Cholinesterase inhibitors
Multiple targets

ABSTRACT

Inhibition of cholinesterases, combined with antioxidant activity, metal-chelating capacity, and neuroprotection, is recognized as an effective multitarget therapy for the treatment of Alzheimer's disease (AD). Based on our in-house thiosemicarbazone-acridine compounds, this study recognized these derivatives as possible multi-target-directed ligand (MTDL). Initial screening against cholinesterases identified CL-01, which exhibited a promising IC₅₀ value of 0.71 μM against butyrylcholinesterase (BChE). Twelve new derivatives were designed based on CL-01 aiming to retain the BChE inhibitory activity while incorporating a MTDL profile, including antioxidant properties and metal-complexing abilities. Among the new derivatives, CL-13 maintained a good BChE inhibition (IC₅₀ = 1.15 μM) with improved selective index against acetylcholinesterase (SI = 9.2). The acridine nucleus was important for the activity, as its saturated tetrahydroacridine analogue (TA-01) showed a decrease in cholinesterases inhibition potencies and altered the mode of inhibition, revealing for the first time distinct functional roles for the two nuclei. Moreover, CL-13 emerged as a promising lead compound, demonstrating interesting antioxidant activity (DPPH IC₅₀ = 47.01 μM), chelating capacity of biomaterials involved in Aβ aggregation and/or oxidative stress, and a lack of neurotoxicity at 50 μM in SH-SY5Y cells. It also exhibited neuroprotective effects in an *in vitro* oxidative stress model induced by H₂O₂. Finally, *in vivo* experiments confirmed that CL-13 effectively reversed scopolamine-induced cognitive impairment, without affecting locomotor activity in the mice.

1. Introduction

Alzheimer's disease (AD) is an irreversible and progressive neurodegenerative disorder, responsible for impairment of the cognitive functions of the human brain [1]. According to estimates by Alzheimer's Disease International, 50 million people worldwide currently live with some form of dementia; projections indicate that these numbers could triple by 2050, with AD being the main disease associated to dementia

[2,3]. Directly linked to population aging, with an etiology that is not fully understood but considered multifactorial, AD demonstrates synaptic alteration involving several neurotransmission systems, filamentous aggregates of amyloid-β protein (Aβ) and intracellular neurofibrillary tangles formed mainly by hyperphosphorylated tau protein [4]. While these events may be noticeable in the brain of healthy elderly individuals, they are not frequently observed together or with the same intensity that people affected by the disease [5].

* Corresponding author. BR465, Federal Rural University of Rio de Janeiro, Institute of Chemistry, PQ-52 Seropédica, 23897-000 – RJ, Brazil.
E-mail address: akummerle@ufrrj.br (A.E. Kümmerle).


<https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2024.117030>

Received 5 July 2024; Received in revised form 2 November 2024; Accepted 3 November 2024

Available online 7 November 2024

0223-5234/© 2024 Elsevier Masson SAS. All rights are reserved, including those for text and data mining, AI training, and similar technologies.

Structure-based design of new *N*-benzyl-piperidine derivatives as multitarget-directed AChE/BuChE inhibitors for Alzheimer's disease

Raissa Alves da Conceição^{1,2}  | Natalia von Ranke¹ | Luciana Azevedo³ | Daiana Franco³ | Nathalia Fonseca Nadur³ | Arthur Eugen Kummerle³ | Maria Leticia de C. Barbosa² | Alessandra M. T. Souza¹

¹Laboratory of Molecular Modeling & QSAR (ModMolQSAR), Faculty of Pharmacy, Federal University of Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil

²Laboratory of Organic Synthesis and Medicinal Chemistry (LaSOQuiM), Faculty of Pharmacy, Federal University of Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil

³Laboratory of Molecular Diversity and Medicinal Chemistry (LaDMol-QM), Institute of Chemistry, Federal Rural University of Rio de Janeiro, Seropédica, Brazil

Correspondence

Alessandra M. T. Souza

Email: amtsouza@pharma.ufrj.br

Maria Leticia de C. Barbosa

Email: marialeticia@pharma.ufrj.br

Funding information

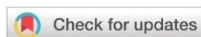
Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Grant/Award Numbers: 312878/2022-2, 314723/2021-1; Fundação Carlos Chagas Filho de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ), Grant/Award Number: E-26/202.742/2019; Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Grant/Award Number: 001

Abstract

The pathogenic complexity of Alzheimer's disease (AD) demands the development of multitarget-directed agents aiming at improving actual pharmacotherapy. Based on the cholinergic hypothesis and considering the well-established role of butyrylcholinesterase (BuChE) in advanced stages of AD, the chemical structure of the acetylcholinesterase (AChE) inhibitor drug donepezil (**1**) was rationally modified for the design of new *N*-benzyl-piperidine derivatives (**4a–d**) as potential multitarget-direct AChE and BuChE inhibitors. The designed analogues were further studied through the integration of *in silico* and *in vitro* methods. ADMET predictions showed that **4a–d** are anticipated to be orally bioavailable, able to cross the blood-brain barrier and be retained in the brain, and to have low toxicity. Computational docking and molecular dynamics indicated the formation of favorable complexes between **4a–d** and both cholinesterases. Derivative **4a** presented the lowest binding free energy estimation due to interaction with key residues from both target enzymes (-36.69 ± 4.47 and -32.23 ± 3.99 kcal/mol with AChE and BuChE, respectively). The *in vitro* enzymatic assay demonstrated that **4a** was the most potent inhibitor of AChE (IC_{50} 2.08 ± 0.16 μ M) and BuChE (IC_{50} 7.41 ± 0.44 μ M), corroborating the *in silico* results and highlighting **4a** as a novel multitarget-directed AChE/BuChE inhibitor.

Abbreviations: 3D, three-dimensional; ACh, acetylcholine; AChE, acetylcholinesterase; AChEi, AChE inhibitor; AD, Alzheimer's disease; ALP, alkaline phosphatase; BACE1, β -site amyloid precursor protein cleaving enzyme 1; BFE, binding free energy; BuChE, butyrylcholinesterase; CAS, catalytic aromatic site; CNS, central nervous system; eeAChE, electric eel acetylcholinesterase; eqBuChE, equine serum butyrylcholinesterase; GGT, gamma-glutamyl transferase; GSK-3 β , glycogen synthase kinase 3 β ; H, human; HBA, hydrogen bond acceptor; HBD, hydrogen bond donor; LDH, lactate dehydrogenase; logBB, logarithm of brain-blood partition coefficient; logP, logarithm of octanol-water partition coefficient; LRV, number of Lipinski's rules violations; MAO-A, monoamine oxidase A; MDS, molecular dynamics simulations; MM/GBSA, molecular mechanics-generalized born surface area; MTDL, multitarget-directed ligand; MW, molecular weight; PAS, peripheral aromatic site; Pgp, P-glycoprotein; SGOT, serum glutamic oxaloacetic transaminase; SGPT, serum glutamic pyruvic transaminase; TPSA, topological polar surface area.

RESEARCH ARTICLE



Cite this: *RSC Med. Chem.*, 2022, 13, 568

Design, synthesis, and biological evaluation of new thalidomide–donepezil hybrids as neuroprotective agents targeting cholinesterases and neuroinflammation†

Cindy Juliet Cristancho Ortiz,^a Matheus de Freitas Silva,^a Letizia Pruccoli,^b Nathália Fonseca Nadur,^c Luciana Luíza de Azevedo,^c Arthur Eugen Kümmerle,^c Isabella Alvim Guedes,^d Laurent Emmanuel Dardenne,^d Luiz Felipe Leomil Coelho,^e Marcos J. Guimarães,^f Fernanda M. R. da Silva,^f Newton Castro,^f Vanessa Silva Gontijo,^g Viviana C. T. Rojas,^g Merelym Ketterym de Oliveira,^g Fabiana Cardoso Vilela,^g Alexandre Giusti-Paiva,^h Gisele Barbosa,^h Lídia Moreira Lima,^h Gabriela Beserra Pinheiro,ⁱ Leticia Germino Veras,ⁱ Márcia Renata Mortari,ⁱ Andrea Tarozzi^{ab} and Claudio Viegas Jr.^{ab*}

A new series of eight multifunctional thalidomide–donepezil hybrids were synthesized based on the multi-target-directed ligand strategy and evaluated as potential neuroprotective, cholinesterase inhibitors and anti-neuroinflammatory agents against neurodegenerative diseases. A molecular hybridization approach was used for structural design by combining the *N*-benzylpiperidine pharmacophore of donepezil and the isoindoline-1,3-dione fragment from the thalidomide structure. The most promising compound, PQM-189 (**3g**), showed good AChE inhibitory activity with an IC₅₀ value of 3.15 μM, which was predicted by docking studies as interacting with the enzyme in the same orientation observed in the AChE–donepezil complex and a similar profile of interaction. Additionally, compound **3g** significantly decreased iNOS and IL-1β levels by 43% and 39%, respectively, after 24 h of incubation with lipopolysaccharide. *In vivo* data confirmed the ability of **3g** to prevent locomotor impairment and changes in feeding behavior elicited by lipopolysaccharide. Moreover, the PAMPA assay evidenced adequate blood–brain barrier and gastrointestinal tract permeabilities with an Fa value of 69.8%. Altogether, these biological data suggest that compound **3g** can treat the inflammatory process and oxidative stress resulting from the overexpression of iNOS and therefore the increase in reactive nitrogen species, and regulate the release of pro-inflammatory cytokines such as IL-1β. In this regard, compound PQM-189 (**3g**) was revealed to be a promising neuroprotective and anti-neuroinflammatory agent with an innovative thalidomide–donepezil-based hybrid molecular architecture.

Received 22nd November 2021,
Accepted 15th March 2022

DOI: 10.1039/d1md00374g

rsc.li/medchem

Introduction

Neuroinflammation has been implicated as a pathological hallmark in several neurodegenerative diseases (NDs), including Alzheimer's disease (AD),¹ Parkinson's disease

(PD),² Huntington's disease (HD)³ and multiple sclerosis.⁴ NDs are characterized by protein misfolding and accumulation of some specific protein aggregates inside the cell (tau or α-synuclein) or outside the cell (β-amyloid peptide (βA)), affecting different types of neurons and causing a set of

^aPeQuiM-Laboratory of Research in Medicinal Chemistry, Federal University of Alfenas, 2600 Jovino Fernandes Sales Ave., Alfenas, MG 37130-840, Brazil. E-mail: cvjviegas@gmail.com

^bDepartment for Life Quality Studies, University of Bologna 'Alma Mater Studiorum', 237 Corso d'Augusto St., 47921 Rimini, Italy. E-mail: andrea.tarozzi@unibo.it

^cLaboratory of Molecular Pharmacology, Institute of Biomedical Sciences, Federal University of Rio de Janeiro, 21941-902, Seropédica, RJ, Brazil

^dNational Laboratory for Scientific Computing, 25651-075, Petrópolis, RJ, Brazil

^eInstitute of Biomedical Sciences, Federal University of Alfenas, 700 Gabriel Monteiro da Silva St, Alfenas, MG 37130-840, Brazil

^fLaboratory of Molecular Pharmacology, Institute of Biomedical Sciences, Federal University of Rio de Janeiro, 21941-902, Rio de Janeiro/RJ, Brazil

^gLaboratory of Physiology, Federal University of Alfenas, 2600 Jovino Fernandes Sales Avenue, Alfenas, MG 37130-840, Brazil

^hLASSBio - Laboratório de Avaliação e Síntese de Substâncias Bioativas, Health Sciences Center, Federal University of Rio de Janeiro, 21941-902, Rio de Janeiro/RJ, Brazil

ⁱLaboratory of Neuropharmacology, Institute of Biological Sciences, University of Brasília, Brasília, DF 70910-900, Brazil

† Electronic supplementary information (ESI) available. See DOI: 10.1039/d1md00374g

REVIEW ARTICLE



The Design of Multi-target Drugs to Treat Cardiovascular Diseases: Two (or more) Birds on One Stone



Lucas Caruso^{1,2}, Nathalia Fonseca Nadur^{1,2}, Marina Brandão da Fonseca^{1,2}, Larissa de Almeida Peixoto Ferreira^{1,2}, Renata Barbosa Lacerda^{1,2}, Cedric Stephan Graebin^{1,2} and Arthur Eugen Kümmerle^{1,2,*}

¹Laboratório de Diversidade Molecular e Química Medicinal (LaDMol-QM, Molecular Diversity and Medicinal Chemistry Laboratory), Chemistry Institute, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, Rio de Janeiro, 23897-000, Brazil; ²Programa de Pós-Graduação em Química (PPGQ), Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, Rio de Janeiro, 23897-000, Brazil

ARTICLE HISTORY

Received: July 24, 2021
Revised: November 25, 2021
Accepted: December 27, 2021

DOI:
10.2174/1568026622666220201151248



CrossMark

Abstract: Cardiovascular diseases (CVDs) comprise a group of diseases and disorders of the heart and blood vessels, which together are the number one cause of death worldwide, being associated with multiple genetic and modifiable risk factors, and that may directly arise from different etiologies. For a long time, the search for cardiovascular drugs was based on the old paradigm “one compound - one target”, aiming to obtain a highly potent and selective molecule with only one desired molecular target. Although historically successful in the last decades, this approach ignores the multiple causes and the multifactorial nature of CVDs. Thus, over time, treatment strategies for cardiovascular diseases have changed, and, currently, pharmacological therapies for CVD are mainly based on the association of two or more drugs to control symptoms and reduce cardiovascular death. In this context, the development of multitarget drugs, *i.e.*, compounds having the ability to act simultaneously at multiple sites, is an attractive and relevant strategy that can be even more advantageous to achieve predictable pharmacokinetic and pharmacodynamics correlations as well as better patient compliance. In this review, we aim to highlight the efforts and rational pharmacological bases for the design of some promising multitargeted compounds to treat important cardiovascular diseases like heart failure, atherosclerosis, acute myocardial infarction, pulmonary arterial hypertension, and arrhythmia.

Keywords: Cardiovascular diseases, Multi-target Drugs, Molecular hybridization, Heart failure, Atherosclerosis, Acute myocardial infarction, Pulmonary arterial hypertension, Arrhythmia.

1. INTRODUCTION

Cardiovascular disease (CVDs) is a collective term for a group of diseases and disorders of the heart and blood vessels, such as coronary heart disease, cerebrovascular disease, peripheral arterial disease, rheumatic heart disease, congenital heart disease, deep vein thrombosis, and pulmonary embolism [1].

The World Health Organization (WHO) reports that CVDs are the major cause of death globally, both in developed and developing countries. In 2016, an estimated number of 17.9 million people (31% of all global deaths) died from CVDs, being 85% of these deaths due to heart attacks and strokes. The annual mortality of CVDs is expected

to reach approximately 23.6 million deaths by 2030 [1-4]. At least 75% of CVD-related deaths occur in low and middle-income countries, mostly due to the lack of preventive care and lack of access to effective and equitable health care services [5, 6]. The economic burden of CVDs in low and middle-income countries is also significant [7]. In the past few years, the number of CVD deaths in high-income countries has been declining, but there is evidence pointing that this long-term decline is either staggering or reversing [8].

For many years, most of the research concerning the development of new drugs has been focused on the “one compound - one target” paradigm, in which the goal is to obtain a highly potent and selective molecule that binds (hopefully) to only one desired molecular target, to avoid potentially harmful side effects [9, 10]. This approach, although historically successful in the last decades, ignores the fact that some diseases arise from multiple factors and biological pathways, and agents that treat only one of these factors or pathways tend to be ineffective when dealing with complex

*Address correspondence to this author at the Laboratório de Diversidade Molecular e Química Medicinal (LaDMol-QM, Molecular Diversity and Medicinal Chemistry Laboratory), Chemistry Institute, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, Rio de Janeiro, 23897-000, Brazil; E-mail: akummerle@hotmail.com

REVIEW ARTICLE



Recent Advances in Microwave-Assisted Synthesis and Functionalization of 1,2,3- and 1,2,4-triazoles



Daiana Portella Franco^{1,2}, Lucas Caruso^{1,2}, Nathalia Fonseca Nadur^{1,2}, Thiago Moreira Pereira^{1,2}, Renata Barbosa Lacerda² and Arthur Eugen Kümmerle^{1,2,*}

¹Laboratório de Diversidade Molecular e Química Medicinal (LaDMol-QM, Molecular Diversity and Medicinal Chemistry Laboratory), Chemistry Institute, Rural Federal University of Rio de Janeiro, Seropédica, 23897-000, Rio de Janeiro, Brazil; ²Programa de Pós-Graduação em Química (PPGQ), Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, 23897-000, Rio de Janeiro, Brazil

ARTICLE HISTORY

Received: June 25, 2021
Revised: August 25, 2021
Accepted: August 26, 2021

DOI:
10.2174/138527282566621101111408



CrossMark

Abstract: Triazoles are five-membered aromatic heterocycles, which exhibit two isomeric forms (1,2,3-triazoles and 1,2,4-triazoles), as well as multiple applications in medicinal, agricultural, supramolecular, and materials sciences. Famous examples of triazoles include drugs, such as fluconazole, ribavirin, cefatrizine, and tazobactam, as well as herbicides, such as cafenstrole and metosulam. This review aims to present the recent major examples of the application of microwave-assisted organic synthesis (MAOS) to the syntheses and end-functionalizations of 1,4- and 1,5-disubstituted 1,2,3-triazoles, 1,2,4-triazoles, 3-amino-1,2,4-triazoles, 1,2,4-triazol-3-one, and 1,2,4-triazol-3-thiol derivatives. Notably, the previous reviews on triazole syntheses have not exclusively elucidated the relevance of MAOS techniques in the obtention and derivatization of these compounds.



Arthur Eugen Kümmerle

Keywords: 1,2,3-triazoles, 1,2,4-triazoles, microwave-assisted synthesis, heterocycles, classical heating methods, microwave irradiation.

1. INTRODUCTION

Triazoles are aromatic heterocyclic compounds (molecular formula = $C_2H_3N_3$), which are characterized by a five-membered ring comprising three nitrogen and two carbon atoms [1]. Thus far, triazoles are exclusively obtained *via* synthesis because there are no indications of their natural occurrences [2].

These compounds exhibit two isomeric forms (1,2,3-triazoles and 1,2,4-triazoles) based on the position of the three nitrogen atoms [3]. Each isomeric form exhibits three tautomers that differ according to the position of the hydrogen atom; however, the structures of the proton of carbon-two (**3** and **6**) are non-aromatic and are rarely mentioned in the literature (Fig. 1) [4, 5].

1,2,4-triazole derivatives exhibit a wide range of applications in medicinal, agricultural, supramolecular, and materials sciences. In medicinal chemistry, these derivatives exhibit extensive biological activities [6], such as anti-inflammatory [7-9], antibacterial [10-13], antifungal [14, 15], antiviral [16], anticancer [17], antioxidant [18-20], antitubercular [21], anticonvulsants [22], anti-nociceptive [9], as well as CNS-stimulating, antidepressants [23, 24], and anti-anxiety properties [25, 26]. To date, many drugs, including alprazolam (**7**), fluconazole (**8**), voriconazole (**9**), ribavirin (**10**), rizatriptan (**11**), estazolam (**12**), vorozole (**13**), anastrozole (**14**), and letrozole (**15**), containing the 1,2,4-triazole moiety have been extensively employed in clinics. In agriculture, 1,2,4-triazoles exhibit insecticidal and plant growth-regulating activities, as evidenced in cafenstrole (**16**), metosulam (**17**), azafenidin (**18**), carfentrazone-ethyl (**19**), and sulfentrazone (**20**) (Fig. 2).

Similarly, 1,2,3-triazole-based compounds have been extensively employed as agrochemicals [27, 28], dyes [29, 30], corrosion inhibitors [31-33], photostabilizers [34], dendrimers [34-37], liquid crystals [38-40], and metal chelators [41, 42]. Additionally, 1,2,3-triazoles exist generally as the core structures of many compounds exhibiting broad biological activities [6], such as anti-HIV [43-45], anticancer [46, 47], antiprotozoal [48, 49], antimicrobial [50, 51], antifungal [52, 53], and neuroactive agents [54, 55]. However, only a few molecules contain 1,2,3-triazole moieties in the market or the last phase of clinical trials. Cefatrizine (**21**) and tazobactam (**22**) account for some of the already commercialized drugs exhibiting such a ring system (Fig. 2).

A literature search performed in Scopus® on June 20, 2021, revealed that the 1,2,4-triazole system with 14,002 publications (containing the keywords "1,2,4-triazole") is the most studied compared with the 8,333 publications related to the other system (containing the keywords "1,2,3-triazole"). However, there has been significantly increased research on 1,2,3-triazoles since the past 20 years [56] probably owing to the advent of "click chemistry."

Among the organic synthesis techniques for preparing triazoles, Microwave-Assisted Organic Synthesis (MAOS) has attracted recent attention [57]. The utilization of microwave ovens for organic synthesis has been preferred to the classical heating method because it reduces the reaction time, ensures improved efficiency and product purity, as well as the possibility of eliminating the solvents [58]. Similar to MAOS, ultrasonic irradiation exhibits numerous advantages over other conventional methods (reduced cost, excellent yields, and improved purity). However, there is no well-established direct comparison between microwaves and ultrasound [59-61]. This review summarizes the most recent (since 2014) relevant microwave-assisted methods for synthesizing and deriving triazoles.

*Address correspondence to this author at the Department of Organic Chemistry, Rural Federal University of Rio de Janeiro, Seropédica, Brazil, 23897-000; Tel: ++55-21998576298; E-mails: akummerle@ufrj.br; akummerle@hotmail.com

Artigo

Butirilcolinesterase - BuChE: um Potencial Alvo para o Desenvolvimento de Fármacos para o Tratamento da Doença de Alzheimer

Goulart, P. N.; Caruso, L.; Nadur, N. F.; Franco, D. P.; Kümmerle, A. E.;* Lacerda, R. B.

Rev. Virtual Quim., 2021, 13 (1), no prelo. Data de publicação na Web: 11 de Novembro de 2020

<http://rvq.sbq.org.br>**Butyrylcholinesterase - BuChE: A Potential Target for Development of Drugs for Alzheimer's Disease Treatment**

Abstract: Alzheimer's disease (AD) is a major cause of senile dementia, being responsible for most of the deaths of elderly people in developed countries. An important feature of AD is the loss of acetylcholine (ACh) in cholinergic and non-cholinergic neurons. However, acetylcholinesterase (AChE) activity is increased in amyloid plaques, which has been important in therapeutic strategy using AChE inhibitors, such as donepezil and galantamine. Butyrylcholinesterase (BuChE) has less affinity for ACh compared to AChE, however its activity seems to be crucial for AD process with decline in AChE levels in the advanced stages of this disease. Thus, research with selective BuChE inhibitors has been increasing considerably as a new perspective for AD treatment. In this review we highlight synthetic and natural selective BuChE inhibitors, described as drug prototypes candidates for AD.

Keywords: Butyrylcholinesterase (BuChE); Selective inhibitors; Alzheimer Disease (AD).

Resumo

A Doença de Alzheimer (DA) é uma das principais causas de demência senil, sendo responsável por grande parte das mortes de idosos em países desenvolvidos. Uma importante marca da DA é a perda de acetilcolina (ACh) nos neurônios colinérgicos e não-colinérgicos. No entanto, a atividade acetilcolinesterase (AChE) está aumentada nas placas amiloides, o que tem sido importante na estratégia terapêutica usando inibidores de AChE, como por exemplo a donepezila e a galantamina. A butirilcolinesterase (BuChE) tem menor afinidade pela ACh se comparada a AChE, no entanto sua atividade parece ser crucial para o processo da DA com o declínio nos níveis de AChE nos estágios avançados desta doença. Dessa forma, a pesquisa com inibidores seletivos de BuChE vem aumentando consideravelmente como uma nova perspectiva para o tratamento da DA. Nesta revisão destacamos inibidores seletivos de BuChE sintéticos e naturais, descritos como candidatos a protótipos de fármacos para a DA.

Palavras-chave: Butirilcolinesterase (BuChE); inibidores seletivos; Doença de Alzheimer (DA).

* Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Instituto de Química, Departamento de Química Orgânica, CEP 23989-000, Seropédica-RJ, Brasil

 akummerle@hotmail.com
DOI: [10.21577/1984-6835.20200133](https://doi.org/10.21577/1984-6835.20200133)

Article

Design, Synthesis and Biological Evaluation of Novel Triazole *N*-acylhydrazone Hybrids for Alzheimer's Disease

Matheus de Freitas Silva ^{1,*}, Ellen Tardelli Lima ¹, Letizia Pruccoli ², Newton G. Castro ³, Marcos Jorge R. Guimarães ³, Fernanda M. R. da Silva ³, Nathalia Fonseca Nadur ⁴, Luciana Luiz de Azevedo ⁴, Arthur Eugen Kümmerle ⁴, Isabella Alvim Guedes ⁵, Laurent Emmanuel Dardenne ⁵, Vanessa Silva Gontijo ¹, Andrea Tarozzi ^{2,*} and Claudio Viegas Jr. ^{1,*}

¹ Laboratory of Research in Medicinal Chemistry (PeQuiM), Federal University of Alfenas, Jovino Fernandes Sales Avenue, 2600, Alfenas 37130000, MG, Brazil; ellentlima17@gmail.com (E.T.L.); vanessagontijo@yahoo.com.br (V.S.G.)

² Department for Life Quality Studies, Alma Mater Studiorum-University of Bologna, Corso d'Augusto 237, 47921 Rimini, Italy; letizia.pruccoli2@unibo.it

³ Laboratory of Molecular Pharmacology, Federal University of Rio de Janeiro, Avenida Carlos Chagas Filho, 373, Rio de Janeiro 21941590, RJ, Brazil; ngcastro@icb.ufrj.br (N.G.C.); mj.jorge93@gmail.com (M.J.R.G.); dasilvafmr@gmail.com (F.M.R.d.S.)

⁴ Laboratory of Molecular Diversity and Medicinal Chemistry (LaDMol-QM), Federal Rural University of Rio de Janeiro—UFRRJ, BR-465, Km 7 Seropédica-Rio de Janeiro 23890000, RJ, Brazil; nathaliafn18@gmail.com (N.F.N.); lucianaluizazevedo@gmail.com (L.L.d.A.); akummerle@yahoo.com.br (A.E.K.)

⁵ Grupo de Modelagem Molecular em Sistemas Biológicos (GMMSB), National Laboratory for Scientific Computing—LNCC, Avenida Getúlio Vargas, 333, Petrópolis 25651-076, RJ, Brazil; isabella.alvim@gmail.com (I.A.G.); dardenne@lncc.br (L.E.D.)

* Correspondence: defreitassilva.matheus@gmail.com (M.d.F.S.); andrea.tarozzi@unibo.it (A.T.); cvjviegas@gmail.com (C.V.J.)

Academic Editor: Federica Belluti

Received: 5 June 2020; Accepted: 9 July 2020; Published: 10 July 2020



Abstract: Alzheimer's disease (AD) is a multifactorial neurodegenerative disorder that involves different pathogenic mechanisms. In this regard, the goal of this study was the design and synthesis of new compounds with multifunctional pharmacological activity by molecular hybridization of structural fragments of curcumin and resveratrol connected by an *N*-acyl-hydrazone function linked to a 1,4-disubstituted triazole system. Among these hybrid compounds, derivative **3e** showed the ability to inhibit acetylcholinesterase activity, the intracellular formation of reactive oxygen species as well as the neurotoxicity elicited by Aβ₄₂ oligomers in neuronal SH-SY5Y cells. In parallel, compound **3e** showed a good profile of safety and ADME parameters. Taken together, these results suggest that **3e** could be considered a lead compound for the further development of AD therapeutics.

Keywords: molecular hybridization; Alzheimer's disease; curcumin; resveratrol

1. Introduction

Alzheimer's disease (AD) is an age-related neurological disorder with complex pathophysiology and clinical symptoms that causes memory loss, decline in thinking ability, motor and executive functions. The hallmark brain changes related to AD are due to loss of inter-neuronal connectivity and neuronal death, especially in areas such as the frontal cortex and hippocampus [1]. The pathology begins with a series of events at the molecular level, which results in the production of a functional

A IMPORTÂNCIA DAS CUMARINAS PARA A QUÍMICA MEDICINAL E O DESENVOLVIMENTO DE COMPOSTOS BIOATIVOS NOS ÚLTIMOS ANOS

Daiana P. Franco^a, Thiago M. Pereira^a, Felipe Vitorio^a, Nathalia F. Nadur^a, Renata B. Lacerda^b e Arthur E. Kümmerle^{a*}^aDepartamento de Química Orgânica, Instituto de Química, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, 239897-000 Seropédica – RJ, Brasil^bDepartamento de Ciências Farmacêuticas, Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, 239897-000 Seropédica – RJ, Brasil

Recebido em 10/06/2020; aceito em 02/09/2020; publicado na web em 15/10/2020

Revisão

THE IMPORTANCE OF CUMARINS FOR MEDICINAL CHEMISTRY AND THE DEVELOPMENT OF BIOACTIVE COMPOUNDS IN THE LAST YEARS. Coumarins are natural products characterized as 2H-chromen-2-one, according to IUPAC nomenclature, largely distributed in plants, as well as, in species of fungi and bacteria. Nowadays, many synthetic procedures allow the discovery of coumarins with expanded chemical space. The ability to exert non-covalent interactions with many enzymes and receptors in living organisms lead the coumarins to exhibit a wide range of biological activities and applications. Then, this manuscript provides an overview of the use of coumarin compounds in medicinal chemistry in treating many diseases. Important examples of the last years have been selected concerning the activities of coumarins as anticoagulant, anticancer, antioxidant, antiviral, anti-diabetic, anti-inflammatory, antibacterial, antifungal, and anti-neurodegenerative agents. Thus, this work aims at contributing to the development of new rational research projects searching for new treatments and bioactive compounds for many pathologies using coumarin derivatives.

Keywords: coumarin; biological activity; structure-activity relationship; enzymes.

INTRODUÇÃO

As cumarinas são heterociclos orgânicos amplamente estudados e caracterizados como 1,2 benzopirona (1, Figura 1). Estruturalmente, consistem em um anel pirano fundido a benzeno com a carbonila da pirona na posição 2 (Figura 1) e são também denominadas como 2H-cromen-2-onas. As mesmas, compreendem um grupo de produtos naturais encontrados na natureza e em uma grande variedade de plantas.¹ A cumarina foi primeiramente isolada por Vogel em 1820 a partir da espécie *dipteryx odorata*, popularmente conhecida como cumaru. Após este primeiro relato, muitos trabalhos foram publicados demonstrando o isolamento e síntese de cumarinas e análogos a partir de outras espécies de plantas.²

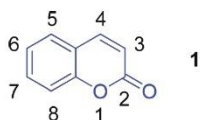


Figura 1. Estrutura química da cumarina

As cumarinas compreendem uma importante classe de metabólitos secundários amplamente distribuídos no reino vegetal, sendo encontradas em diversas partes de plantas, tanto em raízes como em flores e frutos. Diferentes espécies vegetais com hábitos bastante diversificados são capazes de biossintetizar cumarinas, como árvores, arbustos e ervas.³ Um número superior a 1300 cumarinas foram identificadas de fontes naturais, especialmente de plantas verdes.⁴ Porém, a biossíntese de cumarinas, cuja principal rota é a do ácido chiquímico,⁵ não está restrita apenas a plantas, pois algumas espécies de fungos (*Armillariella tabescens*, *Fomitopsis officinalis*)

e bactérias (*Streptomyces niveus*, *Escherichia coli*) são capazes de biossintetizar cumarinas.^{6a-c}

As cumarinas possuem um importante efeito na fisiologia das plantas, atuando como antioxidante e inibidor enzimático. Essa classe de substâncias está envolvida no controle do crescimento das plantas, na respiração, fotossíntese e na defesa contra infecções.¹ A variedade de propriedades biológicas reportada para as cumarinas contribuiu para o aumento do seu interesse no desenvolvimento da síntese orgânica,⁷ possibilitando a obtenção dos compostos conhecidos em maior escala e obtenção de novos derivados com aplicações biológicas e industriais.

A história da síntese de cumarinas começou em meados do século XIX com a descoberta da síntese de Perkin,⁸ seguida de outras metodologias clássicas para obtenção destes compostos como as reações de Pechmann e Knoevenagel.^{9a-b}

As cumarinas podem apresentar grande contribuição na pesquisa para prevenção e tratamento de doenças devido à capacidade de exercer interações não covalentes com estruturas proteicas, possuindo um amplo espectro de atividades biológicas.¹⁰ De fato as cumarinas têm sido amplamente investigadas como compostos bioativos ao longo dos anos. Como exemplo podemos destacar a varfarina (2), fármaco utilizado desde a década de 50 e, registrado pela ANVISA e FDA como agente anticoagulante para o tratamento e prevenção de doenças tromboembólicas.^{11a-b}

Além das bioatividades relacionadas às cumarinas, outra característica importante destes compostos explorada pela indústria são as propriedades luminescentes que estas apresentam, resultado das propriedades de transferência interna de carga do sistema conjugado π - π^* rico em elétrons. Estes compostos possuem uma ampla gama de aplicações como: sondas de fluorescência, agentes de monitoramento de inibição enzimática ou fornecimento de informações farmacológicas em tempo real,¹² corantes,^{9a,13} sensores de pH¹⁴ e potenciais agentes de biorredução.^{15a-b}

A grande variedade de aplicações para cumarinas reforça a importância da pesquisa e desenvolvimento de compostos análogos.

*e-mail: akummerle@hotmail.com



Cinnamoyl-*N*-Acylhydrazone-Donepezil Hybrids: Synthesis and Evaluation of Novel Multifunctional Ligands Against Neurodegenerative Diseases

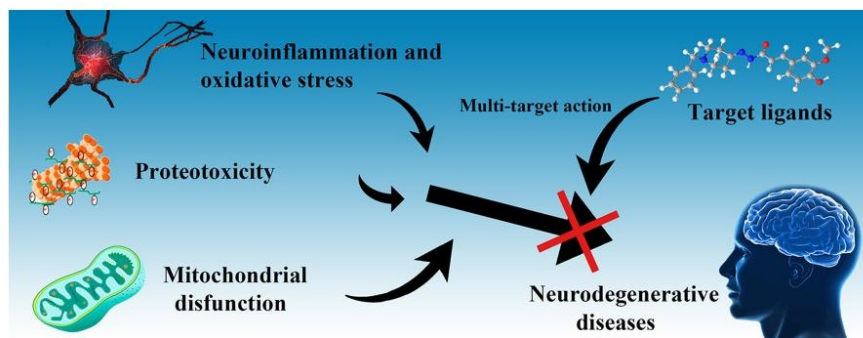
Cindy Juliet Cristancho Ortiz¹ · Caio Miranda Damasio¹ · Letizia Pruccoli² · Nathália Fonseca Nadur³ · Luciana Luiza de Azevedo³ · Isabella Alvim Guedes⁴ · Laurent Emmanuel Dardenne⁴ · Arthur Eugen Kümmerle³ · Andrea Tarozzi² · Claudio Viegas Jr.¹

Received: 23 July 2020 / Revised: 25 September 2020 / Accepted: 7 October 2020
© Springer Science+Business Media, LLC, part of Springer Nature 2020

Abstract

A new series of ten multifunctional Cinnamoyl-*N*-acylhydrazone-donepezil hybrids was synthesized and evaluated as multifunctional ligands against neurodegenerative diseases. The molecular hybridization approach was based on the combination of 1-benzyl-4-piperidine fragment from the anti-Alzheimer AChE inhibitor donepezil (**1**) and the cinnamoyl subunit from curcumin (**2**), a natural product with remarkable antioxidant, neuroprotective and anti-inflammatory properties, using a *N*-acylhydrazone fragment as a spacer subunit. Compounds **4a** and **4d** showed moderate inhibitory activity towards AChE with IC₅₀ values of 13.04 and 9.1 μM, respectively. In addition, compound **4a** and **4d** showed a similar predicted binding mode to that observed for donepezil in the molecular docking studies. On the other hand, compounds **4a** and **4c** exhibited significant radical scavenging activity, showing the best effects on the DPPH test and also exhibited a significant protective neuronal cell viability exposed to t-BuOOH and against 6-OHDA insult to prevent the oxidative stress in Parkinson's disease. Similarly, compound **4c** was capable to prevent the ROS formation, with indirect antioxidant activity increasing intracellular GSH levels and the ability to counteract the neurotoxicity induced by both OAβ1-42 and 3-NP. In addition, ADMET in silico prediction indicated that both compounds **4a** and **4c** did not show relevant toxic effects. Due to their above-mentioned biological properties, compounds **4a** and **4c** could be explored as lead compounds in search of more effective and low toxic small molecules with multiple neuroprotective effects for neurodegenerative diseases.

Graphic Abstract



Electronic supplementary material The online version of this article (<https://doi.org/10.1007/s11064-020-03148-2>) contains supplementary material, which is available to authorized users.

Extended author information available on the last page of the article

Published online: 20 October 2020

Springer